과제번호
120043-02

부숙 버섯 수확 후 배지 추출물 이용 식물역병 방제 및 식물생장 촉진 친환경 복합제재 개발

2021

농림식품기술기획평가원

농림축산식품부

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

유용농생명자원산업화기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호
11-1543000-003876-01

부숙 버섯 수확 후 배지 추출물 이용 식물역병 방제 및 식물생장촉진 친환경 복합제재 개발

2022년 4월 20일

주관연구기관 / 한경대학교산학협력단
협동연구기관 / 전북대학교 산학협력단
협동연구기관 / (주) 케이글로벌

농 림 축 산 식 품 부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

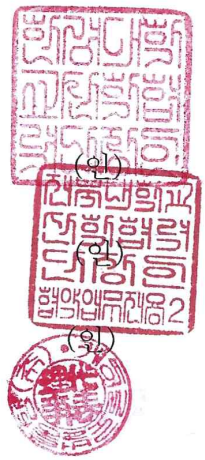
본 보고서를 “부숙 버섯 수확 후 배지 추출물 이용 식물역병 방제 및 식물생장촉진 친환경 복합제재 개발” (개발기간 : 2020. 04. 29. ~ 2021. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022년 4월 20일

주관연구기관명 : 한경대학교산학협력단 문준관 (인)

협동연구기관명 : 전북대학교 산학협력단 조기환 (인)

협동연구기관명 : ㈜케이글로벌 강대선 (인)



주관연구책임자 : 강희완
협동연구책임자 : 윤봉식
협동연구책임자 : 강대선

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

< 요 약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

<table>
<tr><td colspan="2">사업명</td><td colspan="3">유용농생명자원산업화기술개발사업</td><td>총괄연구개발 식별번호
(해당 시 작성)</td><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td colspan="2">내역사업명
(해당 시 작성)</td><td colspan="3"></td><td>연구개발과제번호</td><td colspan="2">120043-2</td></tr>
<tr><td rowspan="2">기술분류</td><td>국가과학기술 표준분류</td><td>LA0906</td><td>40%</td><td>LB0201</td><td>20%</td><td>LA0506</td><td>15%</td></tr>
<tr><td>농림식품 과학기술분류</td><td>PA0201</td><td>%</td><td>AA0303</td><td>30%</td><td>PA0103</td><td>20%</td></tr>
<tr><td colspan="2">총괄연구개발명
(해당 시 작성)</td><td colspan="6"></td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제명</td><td colspan="6">부숙 버섯 수확 후 배지 추출물 이용 식물역병 방제 및 식물생장촉진 친환경 복합제재 개발</td></tr>
<tr><td colspan="2">전체 연구개발기간</td><td colspan="6">2020. 04. 29 - 2021. 12. 31(1 년 9개월)</td></tr>
<tr><td colspan="2">총 연구개발비</td><td colspan="6">총 천원
(정부지원연구개발비: 302,000 천원, 기관부담연구개발비 : 100,670 천원,
지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발단계</td><td colspan="3">기초[ ] 응용[ ] 개발[√] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]</td><td>기술성숙도
(해당 시 기재)</td><td colspan="2">착수시점 기준( )
종료시점 목표( )</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제 유형
(해당 시 작성)</td><td colspan="6"></td></tr>
<tr><td rowspan="2">연구개발
목표 및 내용</td><td>최종 목표</td><td colspan="6">부숙 버섯 수확 후 배지 추출물의 병 저항성 유도물질, 항균물질, 식물생육촉진 유효기능과 물질을 구명하여 지표물질을 설정하고 이를 원료로 한 식물 역병균의 방제와 식물생육에 유효성능이 최적화된 친환경 복합제재 개발</td></tr>
<tr><td>전체 내용</td><td colspan="6">❍ 버섯 수확 후 배지 부숙 추출물과 배양추출물의 식물역병방제및 생육효과 구명(한경대학)
◦ 버섯 수확 후 배지의 부숙(CSMS) 최적조건을 확립과 이를 이용한식물 역병균에 대한 항균활성효과와 식물생장촉진효과 및 고추역병 방제효과를 규명
◦ CSMS추출물이용 미생물 배양 및 고추역병 방제 이용
◦ 투입량에 따른 식물역병, 근권미생물분포, 식물생육 및 병 저항성 유도등을 조사
◦ CSMS로 부터 동정된 항균활성화합물의 식물병원성곰팡이에대한 항균유효효과, 식물생장, 병 저항성기구 구명
◦ 시제품의 식물역병, 근권 미생물분포, 식물생육 및 병 저항성 유도등을 조사
❍ 식물역병 방어 및 생육효과 유인 물질의 화학적 동정 (전북대학교)
◦ CSMS추출물 및 MC추출물로부터 역병 항균활성물질, 식물생육촉진 성분 및 병 저항성 유도물질의 구명을 위하여 활성성분정제
◦ Diaion HP-20, Amberlite XAD-2, activated carbon 등으로 활성성분을 분리 하고 Gel filtration: Sephadex LH-20 resin, Sephadex G series 등을 이용한 gel filtration column chromatography를 수행하여 활성성분을 정제.
◦ 활성물질의 화학구조 분석: Mass spectrum의 측정 및 해석: EI-mass, LC-ESI-mass 혹은 FAB-mass 등을 측정하여 화합물의 분자량을 밝히고 high-resolution EI-mass, high-resolution ESI-mass 혹은 high-resolution FAB-mass 등을 측정하여 화합물의 분자식을 밝힘.</td></tr>
</table>

연구개발 목표 및 내용	전체 내용		○ 시제품생산 및 안정성 평가(케이글로벌) ◦ CSMS추출물 및 MC추출물의 최적 배합율 규명에 따른 시제품 제형 제조: 혼합액을 이용한 친환경 복합 기능성 시제품 개발을 위하여 CSMS추출물을 원재로 토양 중에 잘 용해되는 액형과 입제형을 제조하기 위하여 증량제, 전착제 등의 유용첨가물 선발 및 원재분석(구조, 제조공정, 기타물질, 시료분석, 분석방법, 이화학적 특성) ◦ 시제품의 중금속, 유해미생물, 잔류농약, 독성 검사 ◦ 시제품 이용 고추 역병 방제 및 식물생육 효과를 주관과제와 함께 포장시험
	1단계	목표	○ SMS의 식물역병방제와 식물생육 최적 부숙화 조건 확립과 유효 활성 미생물 구명 ○ CSMS추출물의 식물역병 방제의 최적 성능 및 병 방제기구 구명 ○ 식물역병 길항물질과 저항성 유도체 및 식물생육관련 유효 물질의 화학적 동정 ○ CSMS의 고추역병 방제용 친 환경 복합기능성 제형개발 ○ 시제품생산 및 안정성 평가 및 포장실증 시험
		내용	○ 버섯 수확 후 배지 추출물 및 부숙 추출물의 역병 길항활성 검정 및 스크리닝 ○ 미생물 균주 배양액, 버섯 수확 후 배지 추출물 및 부숙 추출물의 활성성분 규명 ○ 버섯 수확 후 배지 부숙물로부터 식물 생장촉진물질의 분리 및 정제 ○ 버섯 수확 후 배지 부숙물 지표성분의 선정 ○ 버섯 수확 후 배지 부숙물 지표성분의 분리 및 화학구조 규명 ○ 지표성분의 분석법 확립 및 시제품을 이용한 분석법 ○ CSMS와 MS추출 원료의 특성분석(원료의 특성, 제조조성비, 물질의 유래 등) ○ Pilot scale 제조공정 및 품질관리 정립(SMS 부숙온도 및 뒤집기자료, 품질관리항목 및 방법 등) ○ CSMS 및 MS추출물원료의 성분 검사 ○ SMS부숙 추출물을 이용한 복합 기능성 액상 제형(병해관리용)시제품 개발 ○ 시제품의 안정성 평가 및 유기 농자재 구비요건확립

연구개발성과	○ 버섯 수확 후 배지(SMS) 퇴비화 시험을 위하여 버섯농가에서 수거한 표고SMS, 노루궁뎅이 SMS, 느타리 SMS를 사용 부숙 최적 조건 확립 함 ○ 버섯수확후배지 퇴비 (CSMS)의 물리 화학적 특성 및 미생물밀도 구명 ○ 표고, 느타리, 노루궁뎅이 버섯수확후배지 퇴비(CSMS)처리에 따른 고추, 상추, 배추생육촉진 효과 구명 ○ 표고, 노루궁뎅이버섯수확후배지 퇴비(LeCSMS)처리에 따른 고추역병 방제효과 구명 ○ 표고버섯수확후배지의 Pilot-scale 부숙화 특성구명으로 대량생산체제 구축하여 대량생산체제 구축 ○ 16S ribosomal RNA 염기서열을 이용한 LeCSMS에 분포하는 세균동정으로 7 *Citrobacter koseri*, 1 *Bacillus altitudinis*, 2 *Burkholderia multivorans*, 3 *Klebsiella pneumoniae*, 2 *Bacillus velezensis* , 3 *Pseudomonas* spp.을 동정하고 *Bacillus velezensis* HKB-1 분리 및 특허균주 기탁 ○ *Bacillus velezensis* HKB-1 의 LeCSMS 물추출물 배양법 개발 및 및 고추역병 방제효과 구명 ○ LeCSMS 유래 4-hydroxybenzoic acid와 vanillic acid의 항균활성의 유효성을 구명하여 고추역병 방제의 지표물질로 활용 ○ qRT-PCR로 노루궁뎅이버섯수확후배지 유래 항균활성물질 *N*-De-phenylethylisohericerin의 고추 병 저항성유전자 CaPR10의 발현유도 기능 구명 ○ 버섯 균주 배양액 13종과 버섯 수확 후 배지 추출물 및 부숙 추출물 5종의 고추역병균에 대한 항균활성 검정을 수행하고, *Oudemansiella* sp., *Panus rudis*, 표고버섯 수확 후 배지 부숙물이 활성을 나타냄을 밝힘. ○ 고추역병균에 대한 길항물질 및 성분규명 연구를 수행한 결과, *Oudemansiella* sp.는 strobilurin A, *Panus rudis*는 신규 화합물인 panepoxydiol과 9종의 기지화합물을 규명함. ○ 산업화소재로 최종 선정한 표고버섯 수확 후 배지 부숙물로부터 다양한 column chromatography 및 MPLC를 이용하여 고추 역병균에 길항 활성을 나타내는 화합물 compound 1을 분리 정제하고, mass 및 NMR 분석을 수행하여 compound 1의 화학구조를 *N*-De-phenylethylisohericerin으로 규명함. ○ 표고버섯 수확 후 배지 부숙물로부터 식물 생장촉진물질의 분리, 정제를 수행하였으며, 그 결과 식물 생장촉진 활성은 단일성분에 의한 것이 아니고 화합물이 복합적으로 존재할 때 활성을 나타내는 것을 밝힘. ○ 표고버섯 수확 후 배지와 표고버섯 수확 후 배지 부숙물의 HPLC 분석을 수행하여 부숙 후에 함량이 크게 증가한 compound 2와 3을 지표성분으로 선정함. ○ 지표성분으로 선정한 compound 2와 3의 화학구조를 규명하기 위하여 silica gel column chromatography, MPLC, HPLC를 이용하여 화합물 2와 3을 분리, 정제한 후 mass 및 NMR 분석을 수행하여 compound 2의 화학구조를 4-hydroxybenzoic acid로, compound 3의 화학구조를 vanillic acid로 화학구조를 결정함. ○ 지표성분으로 선정한 4-hydroxybenzoic acid와 vanillic acid의 특이성, 직선성 등을 조사하여 분석법을 확립하고, (주)케이글로벌에서 제조한 서로 다른 3개 배치 시제품(lot number: 20210722, 20210917, 20211213)을 사용하여 분석법을 검증함. ○ 버섯 수확 후 배지 활용 대량퇴비생산체계를 구축 함 ○ 버섯 수확 후 배지 부숙(CSMS)추출물유래 길항성미생물 배양 “케이바이탈 엑스트라” 액상형 시제품은 토양 전염성 고추 역병 방제에 활용 ○ 표고버섯 수확 후 배지 퇴비유래 필렛형 제품(케이바이탈 펠렛)은 토양개량 및 작물생육용 유기농업자재로 활용 될 수 있으며 기존의 축산분뇨사용 유기질비료의 악취 및 농약성분검출을 배제하고 친환경농업과 도시농업에 활용이 기대되는 제품 ○ 시제품의 안정성 검정: 독성시험 (급성섭취에 의한 독성, 급성 피부를 통한 독성, 급성폐독성),환경독 성시험(어독성, 꿀벌독성, 토양미생물 등) ○ 시제품의 포장 실증시험에서 기존의 유기질비료 성능과 비교하면 우수한 결과로 나타남

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	❍ 버섯 수확 후 배지 부숙(CSMS)추출물과 미생물배양 을 원재로 하여 식물역병 방제와 식물생육에 효과적인 복합기능성 친 환경 제재로 국내외 최초로 개발된 것으로 식물역병 뿐만 아니라 광범위한 작물 및 병해를 대상으로 활용 ❍ 표고버섯 수확 후 배지 퇴비유래 필렛형 제품(케이바이탈 펠렛)은 토양개량 및 작물생육용 유기농업자재로 활용 될 수 있으며 기존의 축산분뇨사용 유기질비료의 악취 및 농약성분 검출을 배제하고 친환경농업에 널리 이용 될 수 있음 ❍ 버섯수확후배지 부숙(CSMS)추출물유래 길항성미생물 배양 “케이바이탈 엑스트라” 액상형 시제품은 토양 전염성 식물병 방제와 식물생육촉진 효과를 볼 수 있음 ❍ CSMS추출물과 MC추출물은 친 환경 유기농자재의 허용물질에 포함 되며 토양개량과 작물생육 뿐 만아니라 병해충 관리를 위하여 사용이 가능한 물질로 활용 가능 ❍ LeCSMS 유래 4-hydroxybenzoic acid와 vanillic acid는 난균류에 속하는 고추역병균과 Phytium 균에 강한 항균력이 있어 시제품의 지표물질로 활용 가능 함 ❍ LeCSMS WE에 당밀 1%배지는 기존의 미생물 배지보다 저 비용으로 길항성 미생물의 고밀도 배양이 가능하여 대량 배양체제구축으로 미생물농약 제형 제조 원가절감에 매우 유용하게 활용될 수 있음 ❍ 친 환경 유기질비료 및 병 방제에 이용되는 제품이 유럽 등에서 수입 가공하여 대농가에 고가로 판매되고 있으나 버섯수확후배지 퇴비 활용한 친환경 유기농자재식물역병균의 항균활성, 식물생육촉진, 식물병 저항성 유도를 포함하는 복합 기능성의 우수한 성능으로 국외 제품과 경쟁력이 있어 수입대체효과로 경제적 파급효과가 클 것으로 기대됨 ❍ 농산부산물인 버섯 수확 후 배지활용은 원가절감효과로 기존 제품보다 저렴하게 농가에 공급 할 수 있어 친환경농산물 생산 증대에 이바지할 수 있으며, 특히 버섯 농가에서 문제시되는 버섯 폐 배지 처리를 해결하고 환경오염을 감소시킬 수 있음
연구개발성과의 비공개여부 및 사유	

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구시설·장비	기술요약정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명정보	생물자원		정보	실물
	3	2								10		

연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입기관	연구시설·장비명	규격(모델명)	수량	구입연월일	구입가격(천원)	구입처(전화)	비고(설치장소)	ZEUS 등록번호

국문핵심어 (5개 이내)	버섯 수확 후 배지	부숙	식물역병	친환경	병 방제
영문핵심어 (5개 이내)	Spent mushroom substrate	Decomposing	Plant Phytophthora blight disease	Eco-friendly	Disease control

〈 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

❍ 역병은 Phytophthora 속 균에 의해 발생되는 모든 식물병해를 말하며 미국 32종, 일본 26종, 중국 23종 등 세계적으로 다양한 작물 재배지에서 해마다 발병하며 심각한 피해를 초래함 *미국은 코코아역병으로 매년 20억 달러 손실

❍ 식물역병균은 국내에서는 21종이 보고 *Phytophthora cactorum*, *P. capsici*, *P. drechsleri*, *P. infestans*, *P. nicotiana* 등이 중요 역병균으로, 토마토, 고추, 인삼, 감자, 담배, 과수류, 엽채류, 화훼류 등 다양한 원예작물에 큰 피해 초래

* 고추역병 피해가 2-25%로 볼 때 매년 평균 700억원 손실 (한국의 식물 역병, RDA).

❍ 식물역병 화학농약으로 Metalaxyl를 포함한 phenylamide농약이 농가에서 주로 사용하지만 저항성 균계 출현, 생태계파괴와 환경오염 위험이 있어 효과적인 친 환경 방제가 절실히 필요

❍ 친환경· 웰빙 등 안전·안심 먹을거리에 대한 국민 수요 증대에 힘입어 친환경농산물 국내외적으로 유기농 등 친환경 농산물의 요구도가 빠르게 증대되고 있음

❍ 따라서 친환경농업 실천이 가능하도록 안전하면서도 저비용의 고품질 친환경자재 보급 시스템 구축 필요성이 증대; 생물농약 장규모(국내/세계) : ('05) 500억원/67천만불 → ('08) 800/90 → ('15)2,000/500

❍ 병해충관리 유기농자재로 허가된 품목은 식물추출물과 미생물농약이 대부분이나 원료생산단가가 높고 외국수입 원자재 의존도가 높아 유기농자재는 값이 비싸 농가사용에 부담으로 작용 친 환경농업의 실현에 걸림돌이 되고 있음.

❍ 식용 및 약용으로 활용되고 있는 버섯은 항생물질을 비롯한 생체방어물질, 생체기능조절물질 등 다양한 기능성 물질을 함유하는 유용한 농생명자원이며 느타리버섯, 큰느타리버섯, 팽이버섯, 표고버섯, 양송이버섯이 국내 식용버섯 생산량의 90%이상을 차지 함

❍ 버섯 수확 후 배지(spent mushroom substrate, SMS)는 버섯재배 부산물로 국내에서 년간 약 200만톤 이상이 생산되며 자연에 방출될 경우 환경오염과 생태계 교란 등 많은 문제점이 유발될 수 있음. 따라서 SMS의 가공 후 재활용 방안이 체계적으로 연구되어 산업적 활용에 적극적으로 적용할 시점에 있음

❍ SMS는 순수 균사체와 자실체 잔재가 고밀도로 존재하면서 목질 분해효소, 2차대사물질을 생산하며 아미노산, 식물 유기질 비료성분, 미량원소, 항균물질, 병 저항성 유도물질 (elicitor) 등 다양한 유용물질의 보고로 미생물농약처럼 별도의 배양공정 없이 간단한 추출과정만으로 저 비용 원료로 고 부가가치의 유용자원으로 전환 시킬 수 있는 매우 유효한 농생명자원 임

❍ SMS는 자체가 미생물배양체로 미생물배양시설과 별도의 복잡한 공정과정 없어 저가 원재료 확보로 저비용 고효율로 유효 물질의 제형 화 가능

❍ 유기농자재 허용물질종류로 버섯추출액, 미생물추출액 및 SMS 퇴비추출액을 유효재료로 규정하고 있어(제3조 1항) 버섯배양체와 수확후배지 부숙에 의한 유기 농자재 활용 가능

❍ 본 연구는 버섯수확후배지 퇴비 제형 개발과 퇴비 추출 배양체와 치마버섯 등 버섯배양추출물의 병 저항성 유도물질, 항균물질, 식물생육촉진 유효기능과 물질을 구명하여 지표물질을 설정하고 이를 원료로 한 식물 역병균의 방제와 식물생육에 유효성능이 최적화된 친 환경 복합제재를 개발하여 실용화 산물을 창출하는 것이 목표로 함

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

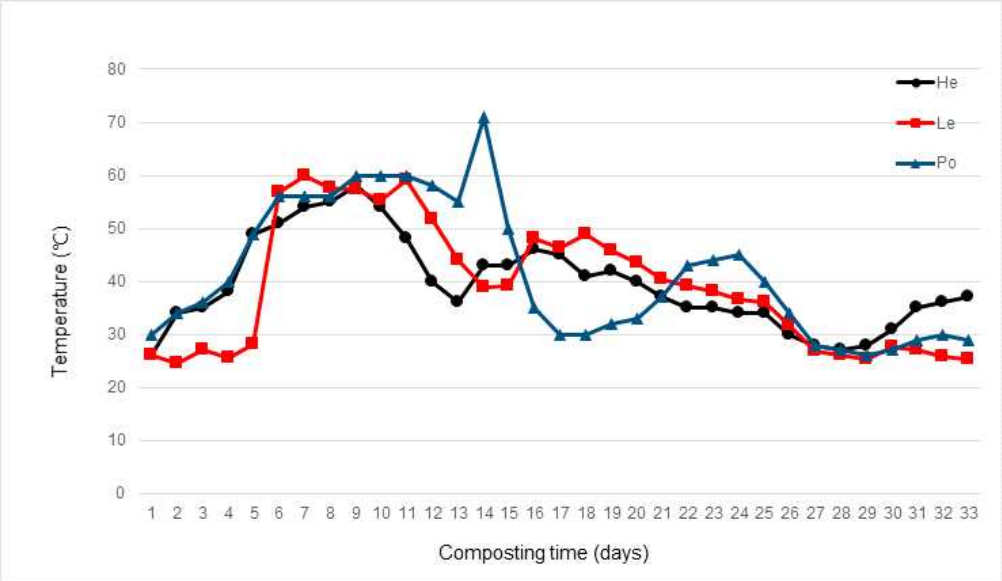
<제1주관연구과제: 부숙 버섯 수확 후배지 추출물의 식물역병방제 및 식물생육촉진 효과 구명 >

1) 버섯 수확 후 배지(SMS)의 부숙 최적 조건 확립

버섯 수확 후 배지(SMS) 퇴비화 시험을 위하여 버섯농가에서 수거한 표고SMS, 노루궁뎅이 SMS, 느타리 SMS를 사용하였다. SMS는 약 1톤을 판넬로 제작한 트레이(넓이 2m x 길이 2m x 높이 1m)에 투입하고 자동 온도 센서(Yokogawa, Japan)를 3곳에 설치하여 SMS부숙 과정에서 나타나는 온도변화를 시간별로 자동 기록하였다. 공기주입은 트레이 하단에 공기 투입 관을 설치하여 컴프레서로 2시간 간격으로 15분씩 공기를 투입하였으며 1주일에 1회 간격으로 공기순환을 위하여 퇴비 뒤집기를 수행하였다.

<그림> 버섯수확후배지의 부숙시설 및 부숙

표고, 느타리, 노루궁뎅이 SMS부숙화 과정에서 나타난 온도변화를 보여 주고 있다. 표고는 부숙 6일째부터 온도가 55℃ 이상으로 급격히 상승하기 시작하여 7일간 50℃이상 고온으로 유지 되다가 8일째 되는 날부터 50℃이하로 하강 하기 시작하여 40℃에서 35℃내외로 유지 되어 퇴비화를 종료하였다. 느타리 SMS퇴비화 온도변화는 3일 후부터 온도가 상승하기 시작하여 10일간 50℃에서 70℃의 고온이 유지되었으며 퇴비화 27일 후부터는 35℃내외로 퇴비화가 안정화 되어 30일 이후까지 온도의 변화가 없어 퇴비화 과정을 종료하였다.



He: 노루궁뎅이, Le: 표고, Po: 느타리

<그림> 버섯수확후배지 종류별 부숙화과정의 온도변화

2) 버섯수확후배지의 부숙도 검정

퇴비 부숙도 평가는비료의 품질검사방법 및 시료 채취기준에 명시되어 있는 부숙도 측정법(콤백법)과 종자발아시험을 적용하였다. CSMS시료 10g에 증류수 50ml을 가하여 80℃에서 2시간 열수 추출된 용액을 3M paper에 여과하여 불순물을 제거한 추출용액 10 ml를 2매의 여과지가 깔린 90mm petri dish에 첨가하고 무종자(*Raphanus sativus* L.) 30립을 넣어 25℃에서 5일간 배양하여 발아율과 뿌리길이를 조사하였다. 대조구는 증류수를 이용하였다. 종자발아지수(Germination Index, GI)는 발아율(Germination rate, GR)과 뿌리길이(Root extension, RE)을 이용하여 지수화 한 것으로 다음의 식을 이용하였다(Lee et al. 2015). GI = (GR × RE)GR = (발아율 / 대조구 발아율) × 100, RE = (뿌리길이 / 대조구 뿌리길이) × 100.

<표> 버섯수확후배지의 부숙도

Treatments	Germination Index (%)	Root length average	CoMMe-100 Maturity Index
LeCSMS	131.04	3.37	Completed
HeCSMS	80.31	3.30	Completed
PoCSMS	69.25	3.29	Completed
Water	100	4.26	-

표고, 노루궁뎅이, 느타리 SMS의 퇴비화를 고온 발열과정 후 온도 하강이 지속적으로 유지 되어 부숙과정이 끝난 시점을 30일로 하여 부숙도를 조사 하였다. 부숙도는 CoMMe-100방법으로 하였으며 모든 SMS에서 부숙도 80% 이상으로 비료공정규격을 충족 하였다. 부숙도 검정을 위하여 무 종자 발아지수를 조사한 결과 표 1과 같다. LeCSMS는 131%, HeCSMS는 80.3%의 발아지수를 보여, 비료 공정규격의 부숙도 발아지수 70% 이상을 충족하였다. 반면에 PoCSMS는 69%의 낮은 발아지수로 종자발아에 장해가 되어 퇴비화에 따른 물리 화학적 변화가 종자 발아에 영향을 끼친 것으로 사료 된다.

3) 퇴비 버섯수확후배지의 물리 화학적 분석

퇴비화된 버섯수확후배지 시료 (CSMS)는 국립농산물품질관리원 유기농업자재 시험기관으로 지정된 에이티 분석센터에 의뢰하여 분석하였다. 총질소 함량(Kjeldahl method; Bremner, 1965), 치환성 양이온 K+, Ca2+, Mg2+ (1 N NH4-acetate pH 7.0, AAS, atomic absorption spectroscopy), 유효인산의 함량은 Lancaster 법(을 이용하여 분석하였다. 중금속 농도는 nitric-hydrochloric acid 처리 후 ICP(Inductively coupled plasma spectrometer)로 측정하였다. pH와 전기전도도(EC)는 시료와 증류수를 각각 1 : 10(w/v)으로 혼합하여 1시간 교반 후 측정하였다. 유기물 측정은 회화법(Ben-Dor and Banin, 1989)을 이용하였으며 600℃에서 약 2시간 가열한 후 수분의 양을 제한 양으로 계산하였다.

표고, 노루궁뎅이, 느타리 SMS와 부숙화 퇴비 LeCSMS, HeCSMS, PoCSMS 간의 물리 화학적 변화를 조사하였다(Table 2). 주요 조사항목은 pH, EC, 중금속, NPK와 Mg 및 Ca 함량으로 하였다. LeSMS, HeSMS, PoSMS의 pH는 4.1, 4.8, 5.8로 산성화 되어 있었으나 퇴비화 LeCSMS, HeCSMS, PoCSMS는 pH 6.9, 6.8, 7.9로 높게 변화되었다. EC은 CSMS내의 염분농도를 반영하며 높은 염분농도는 토양과 식물체에 악 영양을 미칠 수 있다. 본 연구에서 표고, 노루궁뎅이, 느타리 CSMS는 1.48, 1.89, 1.32 ds/m로 비교적 낮은 EC 값을 나타내었다. 퇴비의 EC 값이 6 ds/m이하가 퇴비로 이용 가능한 것으로 보고 되어(Brady, 1990) 본 연구의 CSMS는 기준치 값을 충족하였다. 유기질 함량에서 LeCSMS는 36.9%, HeCSMS는 53.6%, PoCSMS는 53.5로 나타나 퇴비의 유기질 함량 기준치를 충족하였다. 이러한 CSMS의 유기질 함량 감소는 부숙 과정에서 미생물 활성에 의한 유기물분해가 발생한 결과로 사료 된다. LeCSMS의 총 질소함량은 1.39%로 노루궁뎅이 HeCSMS의 1.94%보다 낮았으나 느타리 PoCSMS의 0.96%보다 높았다. 인 함량은 LeCSMS에서 2.03%로 가장 높게 나타났으며 칼륨함량은 노루궁뎅이 HeCSMS에서 1.33으로 가장 높게 나타났다. 그 밖에 Ca과 Mg함량은 SMS시료 보다 LeCSMS, HeCSMS, PoCSMS시료에서 60% 이상 증가 되었다 퇴비 제조 시에 닭 계분을 포함한 축산분뇨가 일정한 비율로 첨가함에 따라 심한 악취가 발생하며 축사분뇨에 살충제 처리로 인하여 퇴비 내에 농약이 검출됨에 따라 유기 농자재 활용에 문제점으로 부각 되고 있다. CSMS 퇴비는 친환경 농자재로 활용 가능하며 악취 없는 퇴비로 도시 배란다 농업에 유용하게 활용 가능할 것으로 전망된다.

<표>. 버섯수화후배지의 부숙화에 따른 물리 화학적변화

Materials	Le SMS	Le CSMS	He SMS	He CSMS	Po SMS	Po CSMS
pH	4.1	6.9	4.8	6.8	5.8	7.9
EC(dS/m)	2.02	1.48	1.89	1.34	1.32	1.06
Organic matter (%)	53.7	36.9	73.0	53.6	57.5	53.5
As(mg/kg)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cd(mg/kg)	ND	ND	ND	0.13	ND	ND
Hg(g/kg)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pb (mg/kg)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cr (mg/kg)	ND	6.17	ND	ND	ND	ND
Cu (mg/kg)	4.01	15.1	ND	17.3	ND	3.08
Ni (mg/kg)	0.19	2.52	ND	3.40	ND	ND
Zn (mg/kg)	25.3	69.9	11.9	52.1	81.0	10.0
Nitrogen ratio in Organic	45.1	26.5	58.4	27.65	39.7	55.7
Moisture(%)	39.7	55.3	24.1	41.2	39.7	42.7
Maturity	-	completed	-	completed	-	completed
Total Carbon(%)	31.1	21.4	42.3	31.0	33.3	31.0
Total Nitrogen(%)	1.19	1.39	1.25	1.94	0.71	0.96
C/N ratio	26.1	15.3	33.8	15.9	46.9	32.2
Total Phosphorus(%)	1.54	2.03	0.74	1.50	0.2	0.23
Total Potassium(%)	0.84	0.77	0.68	1.33	0.3	0.46
Ca (%)	1.19	2.01	0.36	0.63	0.68	0.79
Mg (%)	0.29	0.46	0.23	0.45	0.09	0.12

ND: Not detected. He: 노루궁뎅이, Le: 표고, Po: 느타리, SMS:버섯수확후배지, CSMS:부숙버섯수확후배지

4) 부숙버섯수확후배지(CSMS)처리에 따른 식물생육 효과

(1) 고추의 생육효과

CSMS의 식물성장효과를 조사하기 위하여 고추종자를 plug tray에 상토(피트모스 65:펄라이트 35, v/v)를 투입하고 고추종자를 파종 후 3주 동안 유묘로 성장시켰다. CSMS 조성물은 CSMS 20: 상토 80 v/v비율로 혼합하여 Pot(직경10cm)투입 하였으며 고추 유묘를 이식하여 4주간 생육 후 초장, 엽장, 엽폭, 엽수를 측정하여 고추유묘 생육효과를 조사하였다. 대조 구로서는 상토(Control), 시판 원예상토 (Commercial Soil Bed, CSB)를 사용하였으며 시판되는 퇴비(Commecial compost, N 사)는 CSMS의 혼합 비율과 동등하게 상토와 혼합하여 사용하였다

표 3은 CSMS처리에 따른 고추 유묘의 성장효과를 조사한 것으로 표고 LeCSMS 노루궁뎅이 HeCSMS와 느타리 PoCSMS를 비롯한 다른 처리구에 비하여 초장, 옆장, 엽폭, 잎 수에서 모두 우수한 생육효과를 보였다. 표고 LeCSMS처리 구는 초장이 41cm로 노루궁뎅이 HeCSMS처리 구 24cm와 PoCSMS처리 구 8.2 cm보다 월등히 높은 식물성장률을 보였으며 특히 시판용 퇴비 처리구(CC, N사)와 시판용 상토 처리 구보다 고추 유묘 생육에 우수 효과를 보였다. 반면에 PoCSMS처리 구는 고추 유묘생육 지표를 나타내는 초장, 옆폭, 옆장, 옆수에서 다른 처리구에 비하여 현저하게 생육억제 효과를 보여 부숙 방법에 보완이 필요할 것으로 사료 되었다. 그림 3은 부숙버섯수확후배지에서 생육된 고추유묘로서 LeCSMS에서 가장 우수한 생육효과를 확인 할 수 있다.

<표> 부숙화 버섯수확후배지처리에 의한 고추생육효과

Treatments	Plant height (cm)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Leaf number
PoCSMS	8.2±0.50d	3.81±0.19d	3.6±1.71b	3.7±0.21c
HeCSMS	24.4±2.01bc	11.4±0.67b	6.0±0.28ab	8.2±0.57b
LeCSMS	41.0±2.50a	13.8±0.66a	6.1±0.30a	12.8±1.17a
Control	20.3±0.47c	9.7±0.45c	4.9±0.23ab	9.8±0.36b
CSB	26.3±0.73b	11.7±0.47b	5.9±0.23ab	8.5±0.27b
CC	25.5±2.09b	12.2±0.92ab	6.2±0.51	10.0±0.93b

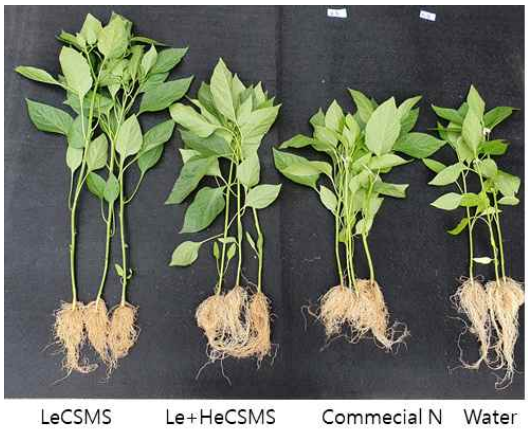
The different letters are significantly(p<0.05)different according to Duncan's multiple. Control (Peatmoss 65:pearlite 35, v/v), CSB(Commercial soil bed) and CC(Commercial compost, N company). He: 노루궁뎅이, Le: 표고, Po: 느타리, SMS:버섯수확후배지, CSMS:부숙버섯수확후배지

Le-CSMS: 부숙표고수확후배지,CC(Commercial compost, N company), control: Peatmoss 65:pearlite 35, v/v>

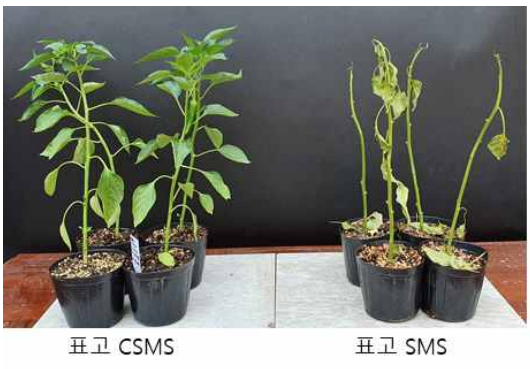
<그림> 표고버섯수확후배지 퇴비처리에 의한 고추생육효과

표고CSMS와 SMS를 상토(Peatmoss 65:pearlite 35, v/v)와 2:8로 혼합한 후 고추 유묘를 파종 후 60일간 성장시킨 결과 CSMS 처리구는 고추의 생육이 좋았으나 SMS처리구는 잎이 황화되고 잎이 떨어지는 생리장애가 발생하였다. 따라서 식물생육을 위하여 SMS를 직접사용하기 보다 부숙화된 CSMS의 처리가 퇴비로서 유효한 방법인 것으로 확인 되었다. 일반적으로 LeSMS는 버섯생장기에 oxalic acid 등의 유기산이 많이 생성되어 pH 4이하로 조성되어 식물에 대한 장해요인으로 작용 했을 것으로 사료 되었다.

A



B



LeCSMS: 표고수확후배지퇴비, HeCSMS: 노루궁뎅이버섯수확후배지퇴비, CC(Commercial compost, N company), control: Peatmoss 65:pearlite 35, v/v

<그림> 표고수확후배지 (SMS)와 부숙표고수확후배지(CSMS)처리에 따른 고추생육효과>

(2) 상추 및 배추 생육효과

CSMS의 상추 및 배추 생육효과를 조사하기 위하여 각각의 종자를 plug tray에 상토(피트모스 65:펄라이트 35, v/v)를 투입하고 파종 후 15일 동안 유묘로 성장 시켰다. CSMS 조성물은 CSMS 20: 상토 80 v/v비율로 혼합하여 Pot(직경10cm)투입 하였으며 상추와 배추유묘를 이식하여 상추는 30일, 배추는 60일간 성장시켜 초장, 엽장, 엽폭, 엽수를 측정하여 고추유묘 생육효과를 조사하였다. 대조 구로서는 상토(Control), 시판 원예상토 (Commercial Soil Bed, CSB)를 사용하였으며 시판되는 퇴비 (Commecial compost, N 사)는 CSMS의 혼합 비율과 동등하게 상토와 혼합하여 사용하였다. CSMS에대한 배추의 생육효과는 고추처리효과와 유사한 경향치를 보였다. HeCSMS, LeCSMS, CC는 초장이 21-20cm로 대조구 13cm보다 월등히 길었으며 엽장, 엽폭, 생체량에 있어서 유사한 경향치를 보였다. PoCSMS의 경우 생육장해가 일어나 배추성장이 억제되었다.

<표>부숙화 버섯수확후배지 처리에 의한 배추생육효과

Treatments	Height (cm)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Fresh weight (g)
HeCSMS	21.60±0.89a	17.30±3.38a	11.97±1.61a	77.45±12.30a
LeCSMS	20.80±1.48a	17.30±3.01a	11.00±1.49b	77.10±8.95a
CC	20.00±1.22a	16.53±3.10a	11.43±1.98ab	76.70±15.90a
Control	13.94±3.22b	10.98±3.01b	7.38±1.47c	24.99±5.05b

LeCSMS Commercial compost CC

<그림> 부숙표고수확후배지(CSMS)처리에 따른 배추 생육효과

한편 상추 처리구 에서는 초장, 엽장, 엽폭, 생체량에 있어서 HeCSMS>LeCSMS>PoCSMS순으로 높게 나타났으며 LeCSMS+HeCSMS+PoCSMS혼합처리 하였을 경우 생육효과가 다소 감소하였는데 PoCSMS의 영향으로 생육이 억제 되는 것으로 사료 되었다.

<표 > 부숙화 버섯수확후배지 처리에 의한 상추생육효과

Treatments	Height (cm)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Fresh weight (g)
PoCSMS	3.66±0.32c	3.22±0.68c	3.35±0.65e	1.53±1.48e
HeCSMS	10.22±0.82a	9.43±1.02b	11.13±2.01a	24.22±2.71a
LeCSMS	10.5±1.12a	9.90±1.48ab	10.49±1.09ab	20.13±2.35b
CC	10.3±0.67a	9.75±0.99ab	11.17±1.10a	21.30±4.39ab
Le+He+Po	9.94±0.61a	9.41±0.76b	9.95±0.95bc	20.29±3.31b
Le+He	10.12±0.62a	9.72±0.87ab	10.64±0.70ab	20.31±2.13b
Control	6.1±0.42b	5.78±0.68c	6.04±0.85d	5.39±1.48d

Control CC LeCSMS

<그림> LeCSMS 처리에 따른 상추 생육효과

5) Chlorophyll 함량

CSMS처리구에서 성장한 고추잎 0.5 g취하여 막자사발에서 마쇄하여 99% acetone을 첨가하고 2ml ethanol을 추가 첨가하여 10ml 튜브에 옮겨 충분히 혼합하고 냉동고에서 30분동안 암조건으로 보관 후 2000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 취하여 spectrometer에서 OD 663과 645에서 측정 하였다. Chlorophyll 함량은 Chlorophyll a (mg/g) = (12.7 * A663) – (2.59 * A645), Chlorophyll b (mg/g) = (22.9 * A645) – (4.7 * A663), Chlorophyll total (mg/g) = (8.2 * A663) + (20.2 * A645)로 하여 결정 하였다.

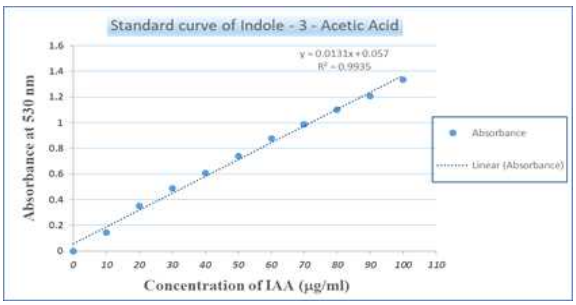
LeCSMS는 전체 Chlorophyll 함량이 77.7mg/g으로 HeCSMS(69.05mg/g), PoCSMS (21.07mg/g), Control (11.96mg/g)보다 높게 나타났으며, 양성대조구로 사용된 CC와 유사한 결과를 얻었다. 그 결과는 LeCSMS처리에 따른 광합성 효율의 증대를 반증 하고 있다.

<표> CSMS처리에 따른 고추잎의 Chlorophyll 함량

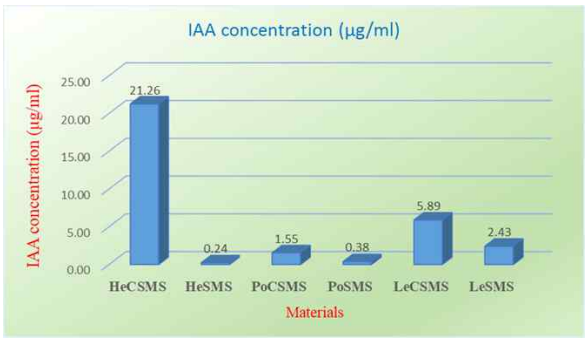
Treatments	Chlorophyll A (mg/g)	Chlorophyll B (mg/g)	Total Cholorophyll (mg/g)
LeCSMS	31.3	46.1	77.72
HeCSMS	31.6	37.1	69.05
PoCSMS	14.1	6.8	21.07
CC	31.9	44.0	76.25
Control	8.0	3.9	11.96

6) Indole-3-acetic acid (IAA)함량

HeCSMS과 LeCSMS내의 IAA 함량을 조사하기 위하여 CSMS: 물(1:10, v/v)로 하여 2시간동안 실온에서 추출한 후에 원심분리하고 상등액을 0.45 ㎛ syringe filter에서 여과하였다. 여과액 1ml를 200㎕ orthophosphoric acid와 2ml Salkowski reagent(0.5 M ferric chloride (FeCl3) and 35% perchloric acid)와 혼합하고 30분 동안 암 상태에서 반응하였다. 반응액을 OD530 spectrophotometer에서 측정하였으며 정량을 위하여 IAA(sigma)를 사용하여 정량곡선을 작성하였다.



<그림> IAA의 정량곡선 (R^2 = 0.99)



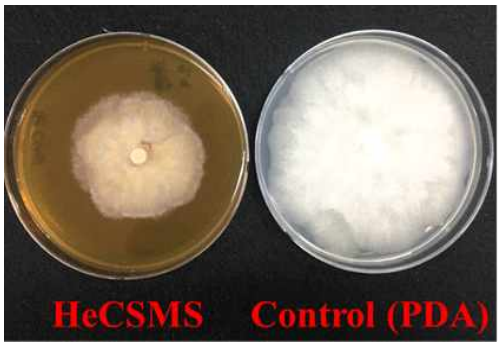
<그림> SMS와 CSMS 추출물애에 Indole-3-acetic acid (IAA) 함량

HeCSMS추출물의 IAA함량은 21.26µg/ml로 대조구로 사용된 HeSMS추출물 0.24 µg/ml보다 월등히 높게 검출되었다. 따라서 HeCSMS의 높은 IAA함량은 HeSMS가 부숙화 과정에 발생한 미생물로부터 유래 된 것으로 사료 되었다. 그러나 다른 PoCSMS, LeCSMS는 IAA함량이 1.55µg/ml와 5.89µg/ml 로 검출되어 낮은 함량을 보였다.

7) CSMS의 고추역병에대한 항균효과 및 방제효과

(1) 항균효과

CSMS고추역병 항균효과를 조사하기 위하여CSMS: 물(1:10, v/v)로 하여 2시간동안 실온에서 추출한 후에 원심분리하고 상등액을 PD agar와 혼합하고 고압살균하여 배지를 조제하였다. 고추역병균의 균사절편 (5x5 cm)을 조제한 CSMS추출물: PDA배지 중앙에 접종하여 6일 후에 PDA+물 배지와 성장률을 비교 하였다. LeCSMS 배지 추출물은 균사 성장을 억제하지 않았으나 HeCSMS 배지에서 49%의 균사성장 억제율을 보였다.



<그림> 노루궁뎅이수확후배지 퇴비(HeCSMS)의 고추역병에대한 항균효과 >

(2) 방제효과

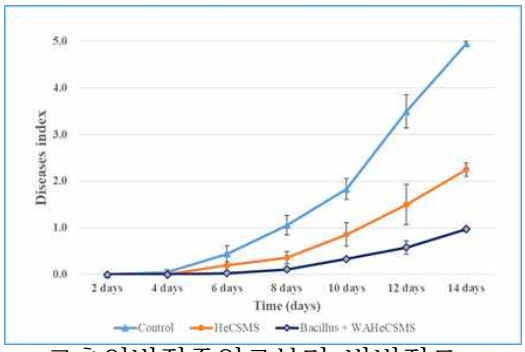
본 실험은 CSMS를 퇴비로 고추유묘에 처리하고 고추역병을 인공접종 하여 방제효과를 조사하였다. LeCSMS : Peatmoss 65:pearlite 35, v/v(10:90)을 포트 90(직경10cm)내에서 두 달간 성장시킨 고추유묘에 고추역병 유주자 농도를 $1X10^4$/ml로 조절하여 1ml씩 접종 후 14일간 병발생정도를 관찰하였다. 접종 후 4일 후부터 물 처리 구에서는 고추 역병의 병징이 발병 정도 3정도로 높게 나타났으며 LeCSMS 처리구에서는 병징이 나타나지 않았다. 접종 14일 후 control과 CC는 발병 정도 5로 고추가 완전히 시들었지만 LeCSMS 처리 구는 발병 정도 1-2로 고추 역병에 대한 70%의 방제 효과를 보였다. 위 결과로 LeCSMS에서 성장한 고추유묘는 고추 역병 방제 효과가 있는 것으로 LeCSMS내에 병 저항성 유도 elicitor에 의한 고추의 병 저항성 유도 여부와 부숙 화 과정에서 발생한 항균성 미생물에 의한 병 방제 효과 여부 조사가 필요할 것으로 사료되었다. 위에서 HeCSMS추출의 고추역병균의 균사성장 억제 효과가 있어 HeCSMS 물 추출물의 고추역병에 대한 방제 효과를 조사하였다. HeCSMS 물 추출물 20ml를 고추유묘 포토에 관주 처리하고 1일 후 고추역병 유주자를 접종하였으며 추가적으로 3일 간격으로 고추유묘 포트에 2회 관주 처리하였다. 고추역병균 접종 후 6일부터 고추역병 병징이 나타나기 시작하였으며 14일 후 control 고추에서는 발병정도 5로 완전히 고추가 완전히 시들었으나 HeCSMS 물 추출물에서 성장시킨 길항성 미생물(Bacillus)과 혼합처리 하였을 경우 발병 정도 1로 가장 높은 방제 효과를 보였다. 한편 HeCSMS 물 추출물 처리구는 발병정도 2로 60% 정도의 방제 효과를 보였다.

LeCSMS Control CC

LeCSMS Control

<그림> LeCSMS퇴비 처리구 고추유묘의 고추역병 방제효과

물처리 HeCSMS추출물



고추역병접종일로부터 발병정도

<그림> HeCSMS 물추출물 처리에의한 고추유묘의 고추역병 방제효과

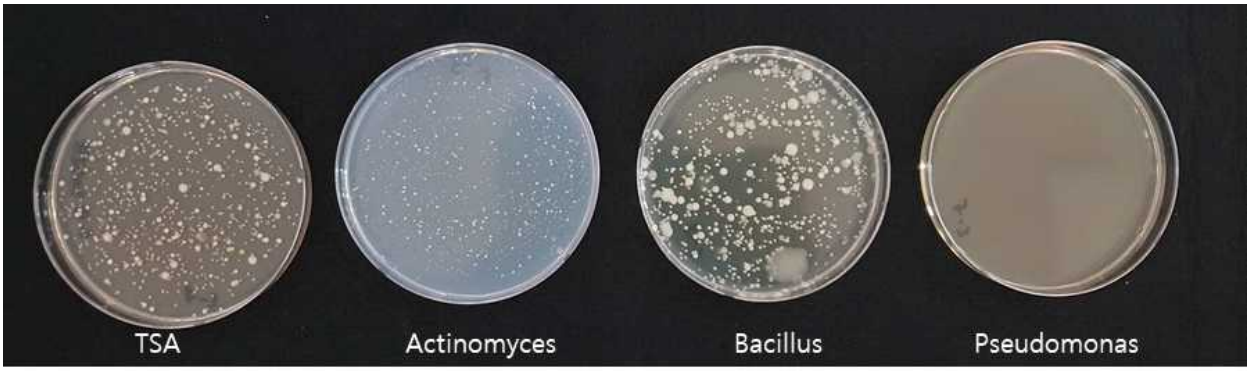
8) CSMS의 부숙과정에서 발생한 미생물 밀도

(1) 선택배지별 세균밀도분석

퇴비화 과정은 다양한 미생물 군집에 의한 부숙과정이 필수적으로 진행되며 특히 고온성 미생물로 인한 고온과정과 기질의 분해과정이 동반된다. 따라서 부숙과정에 발생한 미생물밀도를 조사하였다. 다양한 세균류를 검출할 수 있는 Tryptic Soy Agar(TSA), *Bacillus* spp.선택배지(Plet medium), 방선균류 선택배지 (Actinomyces medium), *Pseudomonas* spp. 선택배지 (Pseudomonas medium)를 사용하고 HeCSMS, LeCSMS, PoCSMS 1:10(v/v)로 처리하고 희석배양법으로 하여 위의 배지에 도말하였다. 표 7과 같이 Bacillus spp. 가 CSMS별로 9.6×10^6에서 1.2×10^8 CFU/ml로 가장 많이 분포하였으며 *Pseudomonas* spp.은 2×10^3에서 9.8×10^6으로 가장 낮은 미생물 밀도를 보였다(그림 13). CSMS중에서는 HeCSMS가 선택배지 별로 가장 많은 미생물 밀도를 나타내었다.

<표> SMS의 부숙화 과정에 발생된 세균밀도

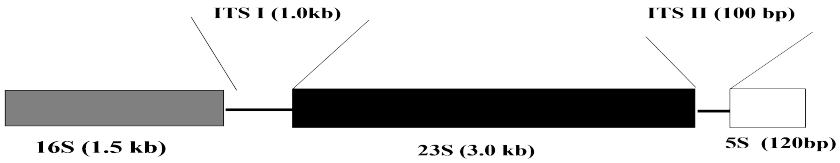
CSMSs	TSA (CFU/mℓ)	Bacillus spp. (CFU/mℓ)	Actiomycete spp. (CFU/mℓ)	Pseudomonas spp.(CFU/mℓ)
Po CSMS	1.4×10^7	9.0×10^6	3.2×10^6	2.0×10^4
He CSMS	1.28×10^8	1.2×10^8	6.24×10^7	9.8×10^6
Le CSMS	3.9×10^7	2.6×10^7	5.0×10^5	3.0×10^3



<그림 13> HeCSMS추출물의 배지에 형성된 세균

(2) 부숙 표고버섯수확후배지(LeCSMS)로부터 미생물 동정

1년차 연구결과에서 LeCSMS를 물로 추출하여 Bacillus, Actiomycete, Pseudomonas 선택배지에서 고 밀도의 미생물이 검출된바 있다. TSA는 비 선택배지로 다양한 미생물이 혼재 할 것으로 예상 되었으며 무작위로 TSA배지에 형성된 세균류를 선발하여 TSB액체배지에서 28℃에서 2일 배양하여 Chang et al (Bactechnology Letter(2006)28:55-59) 방법으로 DNA를 추출하였다. 이 방법은 Gram-negative or Gram-positive bacteria를 신속하게 분리 할 수 있는 방법이다. 배양 세균류를 8000g에서 2 min원심 분리하여 pellet 세균을 400 ㎕ STE Buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris/ HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)로 2번 세척 하고 200㎕ TE buffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 현탁하였다. 100㎕ Tris-saturated phenol (pH 8.0)를 첨가 하고 vortex에서 60초간 혼합하고 13,000g에서 5분 원심분리하여 분획된 물층을 160㎕를 새 튜브에 옮겨 40 ㎕ TE buffer를 첨가, RNase (10 mg/ml)처리하였다. 100㎕ chloroform을 첨가하고 원심분리하여 물층 분획물을 회수하여 실험에 이용하였다. 다양한 세균류의 16S ribosomal RNA를 PCR 증폭할 수 있는 16S 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')과 16S 1492R(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3) primer를 이용하여 94℃-4분(1 cycle), 94℃ 30초-55℃ 1분-72℃ 2분(35 cycle)로 하여 PCR 증폭하였다. 각각의 세균류로부터 증폭된 16S rDNA 영역을 염기서열 분석하여 NCBI blastn에서 상동성 검색을 수행하였다.



<그림> 세균의 ribosomal RNA 영역>

TSA배지로부터 LeCSMS물추출물로부터 유래된 50 세균 colony를 무작위로 선발하여 DNA추출과 6S rDNA 영역을 증폭 한 결과 18 세균샘플에서 16S rDNA PCR밴드를 얻어 염기서열을 결정 하였다. NCBI blastn 상동성검색 결과 7 *Citrobacter koseri*, 1 *Bacillus altitudinis*, 2 *Burkholderia multivorans*, 3 *Klebsiella pneumoniae*, 2 *Bacillus velezensis* , 3 *Pseudomonas* spp. 등 다양하게 분포하고 있었다. 퇴비화에 관여하는 미생물은 세균, 방선균, 사상균이며 퇴비화 단계마다 달라질 수 있다.

<표> 부숙 표고버섯수확후배지로부터 분리한 세균의 16S ribosomal RNA 동정

Bacterial strains	Bacterial species	16S ribosomal RNA homology (%)
B-1	*Bacillus altitudinis* strain WS1-9	98
B-2	*Burkholderia multivorans* strain FDAARGOS	99
B-6	*Burkholderia multivorans* strain FDAARGOS	99
B-7	*Citrobacter koseri* strain E710D3	98
B-8	*Pseudomonas citronellolis* strain A13	99
B-9	*Citrobacter koseri* strain E710D3	98
B-10	*Bacillus velezensis* strain WK1	98
B-11	*Klebsiella pneumoniae* strain 1557	98
B-11	*Citrobacter koseri* strain E710D3	98
B-12	*Citrobacter koseri* strain E710D3	98
B-16	*Klebsiella pneumoniae* strain 587	99
B-17	*Citrobacter koseri* strain E710D3	98
B-18	*Citrobacter koseri* strain E710D3	100
B-20	*Pseudomonas brenneri* strain XJC-6	100
B-21	*Pseudomonas aeruginosa* strain MLTBM2	100
B-22	*Bacillus velezensis* strain HSB1	100
B-23	*Klebsiella pneumoniae* strain	99
B-24	*Citrobacter koseri* strain E710D3	97

(2) LeCSMS에서 고온성 미생물 배양

표고수확후배지 부숙화 과정에서 부숙온도 60도℃에서 채취한 샘플을 희석 배양법으로 희석하여 2.5%의 Agar를 포함하는 TSA배지에 도말하고 50도에서 3일 배양 후 성장한 미생물을 관찰 하였다. 고온조건의 TSA 배지에서 사상균과 세균 집락으로 보이는 미생물이 다수 형성하였다.

<그림> LeCSMS유래 고온성 미생물 집락>

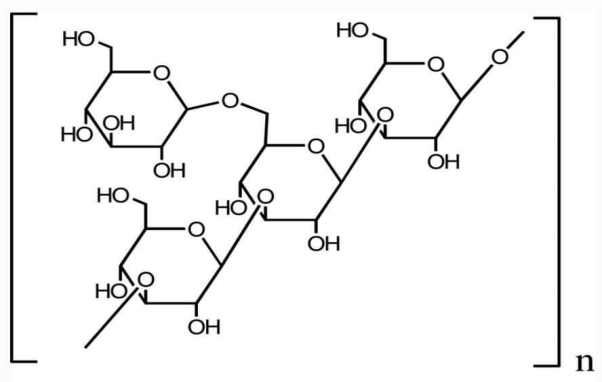
퇴비 부숙과정 중 고온단계에서는 퇴비의 세균활성과 다양성이 크게 억제되고 Bacillus *stearothermophillus* 등의 고초균, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, 방선균류 와 같은 호열성 미생물이 우점하게 된다.

9) 치마버섯 버섯배양(MC)추출물의 병 저항성 유도

(1) 치마버섯 exopolysaccharide(SC-EP) 에의해 유도된 고추의 저항성반응

치마버섯(*Schizophyllum commune* Fr.)은 치마버섯과(Schizophyllaceae) 치마버섯속

(Schizophyllum Fr.)으로 표면은 미세한 털로 덮여있고 갓은 부채형이다(Fig. 4). 봄부터 가을에 침엽수 및 활엽수의 고목, 그루터기, 나무토막, 등에 속생하는 백색 목재 부후균이다. 치마버섯은 식용으로의 이용은 어려우나 균사체를 액체배양 시에 다량의 exopolysaccharide를 배양액에 분비하며 β-(1,6)이 분지된 β-(1,3)-glucan 구조를 가지며 (그림), glucose 3개에 1개씩 분지된 구조를 갖는 점액성 물질로 (Franz *et al.,* 1989) schizophyllan으로 알려져 있으며 치마버섯의 exopolysaccharide의 주요성분인 β-glucan은 의약품, 건강기능식품, 화장품으로서의 연구 개발이 주를 이루고 있다(Sutivisedsak *et al.*, 2013). β-glucan은 담자균을 포함한 곰팡이류는 대부분 세포벽 성분이며 SC-EP와 유사하다. 콩 역병균(*Phytophthora sojae*)의 세포벽성분 β-glucan은 콩과 식물의 병 저항성 유도체 (elicitor)로 작용하여 식물병 저항성 유전자 발현을 유도 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 곰팡이세포벽으로부터 β-glucan생산은 강산, 효소처리 등 물리 화학적 처리 과정이 복잡하여 실용적 접근이 어려운 실정이다. 그러나 SC-EP는 배양 여액에 다량 생산이 가능하여 배양 여액을 희석 또는 기타 유용 병 억제물질로 혼합처리 하게 되면 실용성이 있다. 효모세포벽 β-glucan, 갈조류 유래 laminarin은 다양한 식물체의 병 저항성을 유도 하는 것으로 알려졌다. 본 연구에서는 치마버섯 배양여액의 β-glucan을 이용하여 식물체의 병 저항성 유도와 고추 역병의 방제 효과를 조사하였다.



<그림> 치마버섯의 exopolysaccharide의 화학적구조 (Sutivisedsak *et al.*, 2013)

○ 액체배양에의한 치마버섯 exopolysaccharide(SC-EP)의 대량생산

치마버섯균사체를 Potato Dextrose Agar(PDA, MBcell)에서 7일간 25℃에서 배양한 후 1 L Potato Dextrose Broth (PDB, MBcell) 액체배지에 계대하여 2주간 배양한 후 균사체를 미라크로즈(Calbiochem, La Jolla, CA)를 이용하여 여과 하여 걸러낸 치마버섯 배양여액을 SC-EP분리에 이용하였다. 치마버섯 배양 여액을 회전식 감압농축기(Eyela, Japan)를 이용하여 10배로 농축하고 4 volume의 100% 에탄올(Merke)을 첨가하여 SC-EP를 침전시켜 물에 다시 녹여 원심분리하여 불순물을 제거하고 동결건조(Ilshin, Co. Ltd.)하여 SC-EP로 하여 본 실험에 이용하였다. β-glucan 함량 측정에 이용하였다. 치마버섯 배양여액의 β-glucan 함량은 1,3:1,6-BETAGLUCAN (Yeast/Mushroom) assay kit(Megazyme, Ireland)를 이용하여 측정하였다. SC-EP의 β-glucan 함량은 23.07±1.02g/100g였으며 액체배지에서 1.12g(건조물)/L로 대량 생산되었다. 이는 치마버섯은 다량의 exopolysaccharide를 액체배지에 분비하며 이를 이용한 배지성분 그대로 활용할 수 있을 것으로 사료 되었다.

○ 치마버섯유래 SC-EP처리에 따른 병 저항성 유전자 발현

기 연구에서 치마버섯 exopolysaccharide는 70%이상의 병 방제 효과가 있는 것으로 확인된 바 있으며 치마버섯 exopolysaccharide의 직접적인 항균 활성은 매우 미약한 것으로 나타났다.

따라서 치마버섯 exopolysaccharide는 콩 역병균(*Phytophthora sojae*)의 세포벽성분 β-glucan의 식물의 병 저항성 유도체 (elicitor)로서의 기능에 중요한 역할을 하는 것으로 예측되었으며 RT-PCR과 qRT-PCR분석에서 500mg/L에서 CaPR1의 발현유도를 하는 것으로 나타났다.

본 연구는 치마버섯 exopolysaccharide의 고추에서의 병 저항성 유전자 발현유도를 CaPR1, CaBGLU, CaPR4, CaPR10 병 저항성 유전자를 대상으로 qRT-PCR로 수행 하였다. 포트(직경 10cm)에서 60일 성장시킨 고추에 배양여액의 조당체를 500mg/L로 조정하여 토양에 30ml씩 관주하고 식물체의 잎이 충분히 젖을 정도로 분무 하였다. 72시간 후 고추 잎을 액체질소로 마쇄하였다. 마쇄한 고추 잎으로 부터 TRIzol Reagent (Gibco-BRL, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. Total RNA로 부터 SuperscriptIII(invitrogen, USA)를 이용하여 cDNA로 합성하고, 고추의 저항성 유전자를 증폭하는 PCR primer를 이용하여 qRT-PCR (Roche, UK)을 수행하였다. PCR 반응조건은 95℃ 10min (Pre-incubation),95℃ 15sec, 58℃ 30sec, 72℃ 30sec, 총 40 cycle로 하였다. 상대적인 유전자의 발현양은 고추의 Actin유전자로 발현 양으로 보정 하고 타겟 유전자의 발현양을 조사하였다.

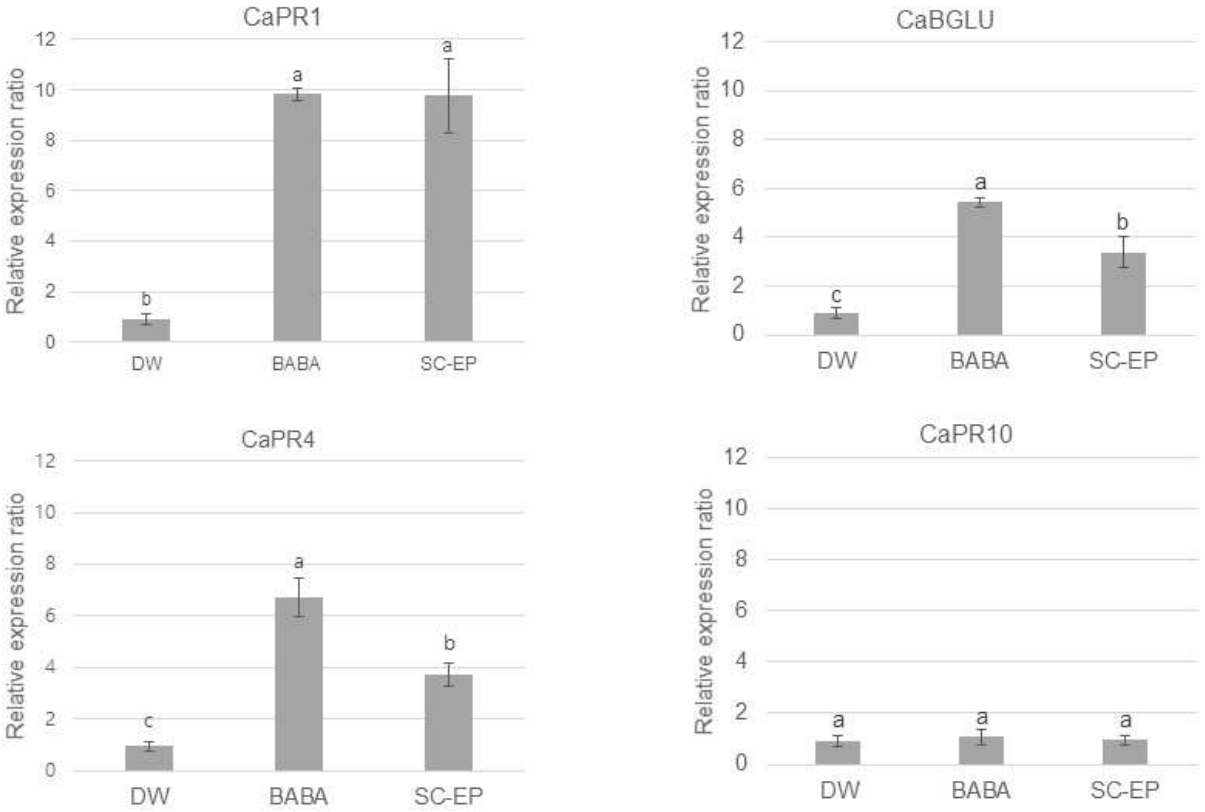
<표> 본 연구에 사용된 고추 병 저항성 유전자 검출 primer

Target genes	Primer sequences
CaPR1	F: 5′-ACTTGCAATTATGATCCACC-3′ R: 5′-ACTCCAGTTACTGCACCATT-3′
CaBGLU	F: 5′-TAAAAGGGGAAGTCCAAGAAGG-3′ R: 5′-TCAGCAAAAATGTCCAAAAATC-3′
CaPR4	F: 5′-AACTGGGATTTGAGAACTGCCAGC-3′ R: 5′-ATCCAAGGTACATATAGAGCTTCC-3′
CaPR10	F: 5′-ATGTTGAAGGTGATGGTGGTGCTG-3′ R: 5′-TCCCTTAGAAGAACTGATACAACC-3′
CaActin	F: 5′-TTGGACTCTGGTGATGGTGTG-3′ R: 5′-AACATGGTTGAGCCACCACTG-3′

F: forward, R: reverse

qRT-PCR분석에서 SC-EP를 처리한 고추식물체는 DW처리구에 비하여 *CaPR1* 유전자는 10배 가까이 많이 발현하였고 positive control인 BABA와 유사한 CaPR1유전자 발현양을 보였으며 CaBGLU, CaPR4 유전자는 3배이상의 발현량을 보였다. 식물체의 면역반응은 식물체에 존재하는 glucanase의 활성에 의하여 병원균의 세포벽성분이 분해되고 유리된 β-glucan이 식물병 저항성유도 elicitor로 작용하는 것으로 알려져 있다. β-glucan의 식물병 저항성 유도 elicitor연구는 콩역병균에서 가장 많이 연구되었으며 치마버섯 배양 여액 유래 β-glucan은 콩역병균 또는 갈조류 세포벽 성분인 β-glucan의 기능과 유사한 elicitor 로 기능적인 역할을 하는 것으로 사료 되었다. 병저항성을 유도하는 elicitor가 식물체의 수용체에 인식되면 Salicylic acid(SA)나 Jasmonic acid(JA) 같은 병저항성 신호물질이 저항성 유전자의 발현을 유도한다. *CaPR1*와 *CaBGLU*유전는 전신획득저항성(Systemic acquired Resistance, SAR)에 관련된 유전자로 SA에 의존적이다 (Minami *et al,* 2011). 반면에 *CaPR4 CaPR10*은 ET(Ethylene), JA(Jasmonate) 의존적으로 Indused systemic resistance(ISR)기구에 포함하는 것으로 알려져 있다 (Park et al. 2001, Yang

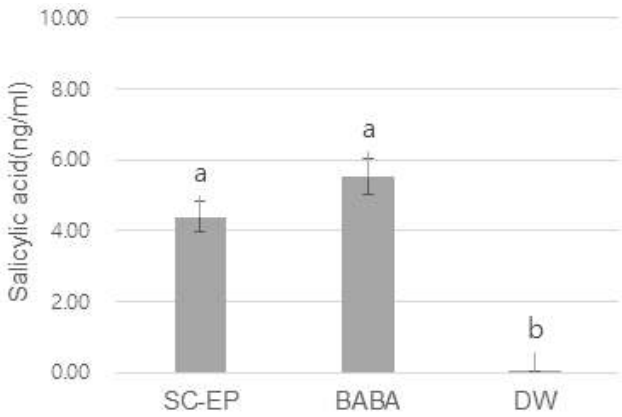
et al., 2005). 따라서 SC-EP는 고추 식물체에서 SAR과 ISR저항성 기구에 관여하는 것으로 사료되었다.



<그림> SC-EP처리에의한 고추 병 저항성 유전자의 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

○ 치마버섯유래 SC-EP처리에 따른Salicylic acid 함량증가

90% 메탄올로 추출한 고추식물체 추출물 1ml에 5% Trichloroacetic acid 100ul를 넣고 DW로 2ml로 맞춰준 후 Liquid chromatograph Mass Spectrometer(LCMS8050, Shimadzu, Japan)를 이용하여 Salicylic acid을 분석하였다. 이온화 장치로는 ESI(electrospray ionization) 장치를 사용하였으며, SA분석을 위한 컬럼으로는 Kinetex 1.7um, C18(100 x 2.1 mm)으로 이동상의 유속은 0.25ml/min으로 하였고 컬럼 오븐 온도는 40℃로 일정하게 유지하였다. 이동상의 용매로는 Acetonitrile(0.1% formic acid) 와 Water (0.1% formic acid)를 사용하였고 5uL씩 주입하여 분석하였다. *CaPR1*유전자와 *CaBGLU*유전자는 Salicylic acid에 의존적인 Systemic Acquired Resistence (SAR)에 관여하는 유전자로 알려져 있다(Hwang, 2000; Kang *et al.*, 2017). 따라서 SC-V처리 96시간 후 고추 식물체내의 SA함량을 측정하였다. 그림은 SC-EP, BABA, DW 처리 72시간 후 고추식물체내 SA를 LC-MS를 이용하여 분석한 결과이다. SC-EP를 처리한 고추식물체의 SA는 3.446ng/ml, Positive control인 BABA를 처리한 고추식물체의 SA는 5.936ng/ml로 DW처리구에 비하여 4-5배 높게 나타났다. 이러한 결과는 SC-EP는 고추식물체에서 SA를 유도하여 SAR저항성기구에 관여하는 것을 반증하고 있다.



<그림> SC-EP처리에 따른 고추잎에서의 Salicylic acid 함량변화

○ SC-EP처리에 따른 Phenylalanine ammonia lyase (PAL)활성증가

5주간 생육한 고추유묘에 SC-EP(0.5%)를 처리하고 72시간 후 고추잎(0.5g)을 액체질소에 마쇄하고 PAL분석에 사용하였다. 식물 재료를 1mM EDTA, 15mM mercaptoethanol 및 50mM ascobic acid를 함유하는 50mM Tris-HCl 완충액(pH 8.8) 3mL로 추출하였다. 추출물을 12,000rpm에서 10분간 원심분리하여 불순물을 제거하였다. 추출물의 분취량(0.1mL)을 1mL의 100mM Tris-HCl 완충액(pH 8.8), 10mM L-phenylalanine 및 0.4mL 증류수와 혼합 하였다. 혼합물을 37℃에서 1시간 동안 반응하고 0.5mL의 6M HCl을 첨가하여 반응을 종결시켰다. 샘플 흡광도는 290 nm에서 측정되었으며, PAL은 cinamic acid에 대해 얻은 보정 곡선을 기반으로 정량 하였다.

PAL은 phenylalanine에서 trans-cinamate 로의 비산화적 탈아미노화를 촉매하여 cinamic acid을 생성한다. cinamic acid에서 파생된 phenylpropanoids가 다양한 페놀 화합물의 전구체 역할을 하고 PAL 활성과 페놀 화합물 간의 상관관계가 보고된 바 있다. SC-EP 및 BABA 처리된 고추 식물의 잎에서 PAL 활성이 유의하게 증가된 반면, 물 처리된 음성 대조군 식물의 잎에서는 비교할 만한 증가가 감지되지 않는 것으로 나타났다(그림). PAL은 식물의 SAR 반응에서 필수적인 신호인 SA의 생합성에서 중요한 역할을 한다고 보고되었다. SC-EP가 고추 식물의 병원체에 대한 방어 반응의 효과적인 유도제임을 입증 하였다. 이러한 유도된 내성은 PAL과 같은 방어 관련 효소의 활성화, Phytoalexin 등 페놀류의 축적과 연관되어 최종적으로 고추의 항 진균 활성의 증진으로 이어진 것으로 추정된다.

○ LeCSMS추출배지를 이용한 치마버섯 배양 및 SC-EP생산

치마버섯의 병 저항성 유도를 확인 하였으며 본 연구는 버섯수확후배지 퇴비를 이용성을 고려한 연구로 치마버섯균사체를 LeCSMS는 다량의 NPK와 미네랄성분이 함유되어 있어 LeCSMS를 이용한 치마버섯의 배양을 시도하였다. LeCSMS 50g에 물 1L를 첨가하고 4시간 동안 실온에서 100rpm에서 진탕 하면서 추출물을 생산하였으며 당밀을 최종 1%로하여 탄소원으로 이용하였다. 1L LeCSMS 추출물 (당밀 1%)를 고압살균하고 치마버섯 균사체 절편(직경 5mm x 5mm)를 접종하여 12일동안 100rpm에서 진탕배양 하였다. LeCSMS 추출액체배지에서 균사체는 PDA와 유사한 성장을 보였으며 미라크로스로 균사체를 제거하고 SC-EP의 함량을 측정하였다. LeCSMS 추출액체배지에서 Total glucan이 25.31g/100g으로 측정 되었으며 α-glucan, 4.5g/100g, β-glucan, 21g /100g으로, PDB에서 배양한 샘플의 β-glucan, 23g /100g보다는 다소 함량이 떨어지며 이는 LeCSMS추출물에 Total glucan의 증가는 LeCSMS추출물의 당성분에 기인 되는 것으로 사료 되었다. 결론적으로 LeCSMS추출물을 이용하여 치마버섯 배양이 가능하며 이를 이용한 고추 역병 방제 효과를 중대 시킬 수 있을 것으로 사료 되나 균사체 제거 공정에 따른 부수적인 단계가 필요하여 제품개발을 위한 방법이 고안되어야 할 것으로 사료 되었다.

<표> 배양배지별 치마버섯 균사체 배양여액내 glucan 함량

Cultural media	Total glucan/100g	α-glucan/100g	β-glucan/100g
LeCSMS extract	25.31±1.21	4.54±0.24	21.18±1.12
PDB	24.15±0.73	2.51±0.18	23.12±0.81

3) 표고버섯수확후배지 퇴비 유래 *Bacillus velezensis* HKB-1를 이용한 고추 역병의 생물학적 방제

임산 버섯의 대표적인 표고버섯(*Lentinula edodes*)의 생산량은 37,000톤/년 내외가 되며 원목재배 에서 톱밥 봉지 재배로 급속히 전환되고 있다. 표고버섯 봉지재배는 표고버섯균사체배양--> 갈변화--> 버섯유기의 단계로 재배 하고 있으며 2-3회 수확을 기본으로 하고 있다. 표고 버섯수확후배지(spent mushroom substrate, SMS)는 oxalic acid등 유기산이 높은 함량으로 존재하여 낮은 pH의 원인이 되며 작물생육 장해요인으로 작용할 수 있다. 표고버섯 SMS의 퇴비화 (composting) 과정에서 발생하는 물리 화학적 변화는 pH 6.0이상의 식물생육에 대한 안정성과 NPK비료성분과 미네랄성분의 증가로 식물생육을 위한 유기질비료 성분이 증가 한다 . 퇴비의 일반적인 효과는 토양 질을 개선하고 유기질비료를 식물체에 공급하는 것 외에도 토양 유용 미생물을 증가시켜 식물의 환경적응력을 높인다.

일반적으로 퇴비는 계분 등 축산분뇨와 톱밥, 왕겨, 짚, 등을 혼합, 발효시켜 만드는 축 분뇨 퇴비와 식물성 기름을 짜내고 남은 찌꺼기(아주까리, 유채, 콩, 쌀겨 등으로 제조한 유박비료가 대가 대부분을 차지하고 있다. 계분과 가축분뇨 이용으로 인한 악취와 살충제 등 농약이 검출되어 유기농 퇴비로서의 적정성에 문제점으로 지적되고 있다. 버섯 수확 후 배지(SMS)는 농약, 중금속 등 유해물질이 없을 뿐만 아니라 표고버섯이 생산한 다양한 2차대사물과 병 저항성 유도 물질이 포함되어 있어 기능성 유기농 퇴비로 유용하게 활용 가능하다.(Kang et al., 2019; Song et al., 2000). 퇴비화 과정은 중온단계, 고온단계, 숙성단계를 거치는데 50℃에서 70℃ 고온단계가 지속함으로써 미생물에 의한 물리 화학적 변화가 발생한다 (González-Marcos et al., 2014; Song et al., 2000; Zhang and Sun, 2014).

고추는 조미채소로서 국내 전체 채소 중 가장 많은 재배면적과 생산량을 차지하며 안정적으로 생산하기 위해서는 고추 생산에 피해를 주는 병해충을 효과적으로 방제하는 것이 매우 중요하다. 식물병원성곰팡이 *Phythopthora capsici*에의하여 고추역병은 토양전염성으로 고추에 큰 피해를 주는 고질적인 병으로 매년 국내 고추재배생산량을 감소시키는 주요인이 된다 (Hwang and Kim, 1995). 메탈락실(metalaxyl), 캅타폴(captafol)과 같은 화학 살균제가 고추역병 방제제로 널리 사용되고 있지만(Parran and Ristaino, 2001), 환경오염과 장기간 사용으로 병원균 내성을 유발할 수 있다. 특히 고추 역병 방제를 위하여 농약의 토양처리는 토양생태계 파괴의 원인이 될 수 있다. 따라서 길항미생물 *Bacillus subtilis* strains를 이용한 미생물농약이 고추역병의 생물학적 방제가 적용되었다(Nguyen et al., 2013; Lee et al., 2011; Woo et al., 2008). 그러나 길항성 미생물배양을 위하여 고가의 상용화된 미생물 배지를 이용하고 있어 미생물농약 제조의 생산단가 상승의 요인이 되고 있다.

버섯수확후배지의 퇴비화 과정에서 페놀화합물 등 미생물의 대사산물과 식물성 이차 대사산물은 병원균 방제 효과를 가질 수 있다 (Kang, 2019; Suess and Curtis, 2006). 국내 버섯수확후배지를 이용한 퇴비는 농약 유해성분이 없고 악취가 나지 않으며 유기질 식물 영양성분이 풍부하여 미생물배양을 위한 배지 성분으로 활용할 수 있을 뿐만 아니라 토양에 영양원을 공급하여 식물생

육촉진과 토양생태계에 유익한 기능을 할 수 있다(Song et al., 2020).

본 연구는 표고버섯수확후배지 퇴비로부터 고추 역병 균을 포함하는 식물 병원성 곰팡이에 대한 항균 활성을 가지는 *Bacillus velezensis* HKB-1을 신규분리 동정하였으며 표고버섯수확후배지 퇴비(LeCSMS) 물 추출물을 이용한 세균배양 및 그 배양체를 이용한 고추 식물체 생육촉진 효과 및 고추 역병의 생물학적 방제 적용을 목적으로 수행하였다.

(1) 길항성 미생물 *B. velezensis* HKB-1의 분리 및 동정

Bacillus velezensis 는 그람 양성 세균으로 siderophores, 항균물질, 휘발성 유기화합물, lipopeptide 등이 식물의 병 저항성 유도성분과 Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)의 특성을 가지는 식물생육촉진 호르몬 Indole-3-acetic acid (IAA)를 생산하는 것으로 알려져 있다, 표고버섯수확후배지퇴비로부터 B-22를 분리하였으며 16S ribosomal RNA 염기서열을 비교 분석한 결과 *Bacillus velezensis* 와 99%의 염기서열이 일치하여 균주명 *Bacillus velezensis* HKB-1로 하였다.

(2) *Bacillus velezensis* HKB-1 의 식물병원항균성 곰팡이에 대한 항균활성검정

Potato Dextrose Agar (PDA)에 배지에 식물병원성곰팡이 고추역병균 (*Phythopthora capsici*), 인삼잘록병균(*Rhizoctonia solani*,), 고추탄저병균 (*Collectotrichum coccodes*,) 시드름병균(*Fusarium oxysporium)* 균사절편 (직경 5mm)를 PDA 중앙에 접종하고 2.5 cm 떨어진 지점에 1 x 10^6의 *B. velezensis* HKB-1를 5㎕접종 하여 7일에서 14일 후 식물 병원성 곰팡이의 균사체 생장 억제율을 조사하였다. 곰팡이균이 잘 성장할 수 있는 Potato Dextrose Agar(PDA) 배지를 조제하고 배지중앙에 고추역병균 (*Phythopthora capsici*) 인삼잘록병균 (*Rhizoctonia solani*), 고추탄저병균 (*Collectotrichum coccodes*,) 시드름병균(*Fusarium oxysporium)* 균사절편 (직경 5mm)를 접종하였다. 병원균 접종부위로 부터 2.5 cm 떨어진 지점에 1 x 10^6의 *B. velezensis* HKB-1를 5㎕접종 하여 7내지 14일 후에 각각의 병원균의 균사 억제효과를 관찰하였다. Fig. 2는 그 결과로서 *B. velezensis* HKB-1는 4종류의 곰팡이 병원균에 대하여 70% 이상의 균사체 성장억제 효과를 보였다.

B. velezensis 균주는 식물에 병해를 입히는 병원성 곰팡이에 높은 항균활성을 갖는 물질인 Fengycin, liturin, Surfactin 등이 보고되어 있으며 (Park et al., 2018)인삼모잘록병(Lee et al, 2016), 세균성 토마토풋마름병 (Chen et al., 2020)과 다양한 식물병원성 곰팡이의 생물학적 방제에 이용되었다 (Fan et al., 2020). 본 연구의 신규 *B. velezensis* HKB-1은 다양한 고추역병을 포함한 식물병원성곰팡이에 대하여 항균효과가 확인 됨으로서 생물학적 방제에 활용 가능할 것으로 사료 되었다.

Phythopthora capsici *Rhizoctonia solani* *Collectotrichum coccodes* *Fusarium oxysporium*

<그림> *Bacillus velezensis* HKB-1의 식물 병원성 곰팡이에 대한 항균 활성

(3) 표고버섯 수확후배지퇴비 물 추출물이용 *Bacillus velezensis* HKB-1 배양

B. velezensis HKB-1는 표고버섯 수확후배지퇴비(LeCSMS)에서 분리된 바 있다. 따라서 LeCSMS에서의 배양효과를 실험하였다. LeCSMS건조물 50g에 물 1L를 첨가하여 실온에서 80rpm으로 2시간 추출하여 1차적으로 미라크로스에서 여과하고 6000 rpm에서 원심분리하여 LeCSMS 건조물 찌꺼기를 제거하여 LeCSMS의 water extract(WE)로 하였다. LeCSMS WE에 당 성분으로 당밀을 최종농도 1%로 되게 하여 첨가하고 15기압 121℃ 조건에서 15분간 가압멸균하여 배양배지를 제조하였다. 대조 구로는 일반적인 세균류 배지로 가장 많이 사용되는 상용 화 배지 Triptic soy broth(TSB, Duchefa), Lurina-Bertani broth(LB, Duchefa) 배지, Mueller Hinton broth(MHB, Duchefa)를 사용 하였다. 위의 액체배지 1L에 *B. velezensis* HKB-1(1 x 10^7/ml) 500㎕를 접종하고 28℃ 2일간 100rpm에서 진탕배양 하였다. LeCSMS WE에 당밀 1%를 첨가한 배지에 *B. velezensis* HKB-1를 접종하여 24시간 동안 28℃에서 100 rpm에서 진탕 배양하였다. 대조구로는 세균류의 배양 배지로 사용되는 상용화 배지 TSB, LBB, THB를 같은 조건에서 배양하였다. 각각의 배지에서 액체배양한 배양액 50㎕를 희석배양법으로 TS고체 배지에 도말 하고 2일 후에 배지에 형성된 세균 colony로 CFU/ml로 하였다.

LeCSMS WE + 당밀 1% 배지는 6.2 x 10^9 CFU/ml로 TB의 4.0 x 10^7, LBB의 1.2 x 10^7에 비하여 100배, MHB의 7.5 x 10^8 보다 8배 이상의 세균세포 증가율을 보였다. 이러한 결과는 LeCSMS WE추출물과 탄소원으로 당밀 1% 첨가로 상용화 배지에 비하여 고밀도 *B. velezensis* HKB-1의 세균배양의 가능성을 나타내 준다. 일반적으로 생물학적방제를 위하여 *Bacillus* spp.가 LBB등 상용화배지 또는 탄소원 변경 등에 의하여 500 L fermenter를 이용한 대량 배양을 실시하였다 (Park et al., 2018). 그러나 세균배양용 상용배지는 고가로 판매되고 있으며 미생물농약 제형제조 생산단가 상승의 주요요인이 된다. 따라서 미생물 대량배양을 위한 저비용 고효율배지 개발을 위하여 다양한 배양법과 배지조성을 개발하고 있으나 고가의 Trypton, yeast extract, Triptic soy 등의 질소원과 glucose, starch, glycerol 등 탄소원, Na_2CO_3, $MgSO_4$ 등의 무기염류를 이용한 배지조성으로 *Bacillus* spp를 배양하여 여전히 저 비용 배양은 해결 되지 못하고 있는 실정이다. 본 연구의 LeCSMS WE에 당밀 1%배지는 기존의 미생물배지보다 저 비용으로 대량 배양할 수 있는 고 효율 배지로 사용할 수 있어 미생물 제형 제조 원가절감에 매우 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

<표> 다양한 배지에 형성된 *Bacillus velezensis* HKB-1의 세균밀도

배양배지	세균밀도 (CFU/ml)
LeCSMS WE + molasses 1%	6.2 x 10^9
Triptic soy broth	4.0 x 10^7
Lurina-Bertani broth	1.2 x 10^7
Mueller Hinton broth	7.5 x 10^8

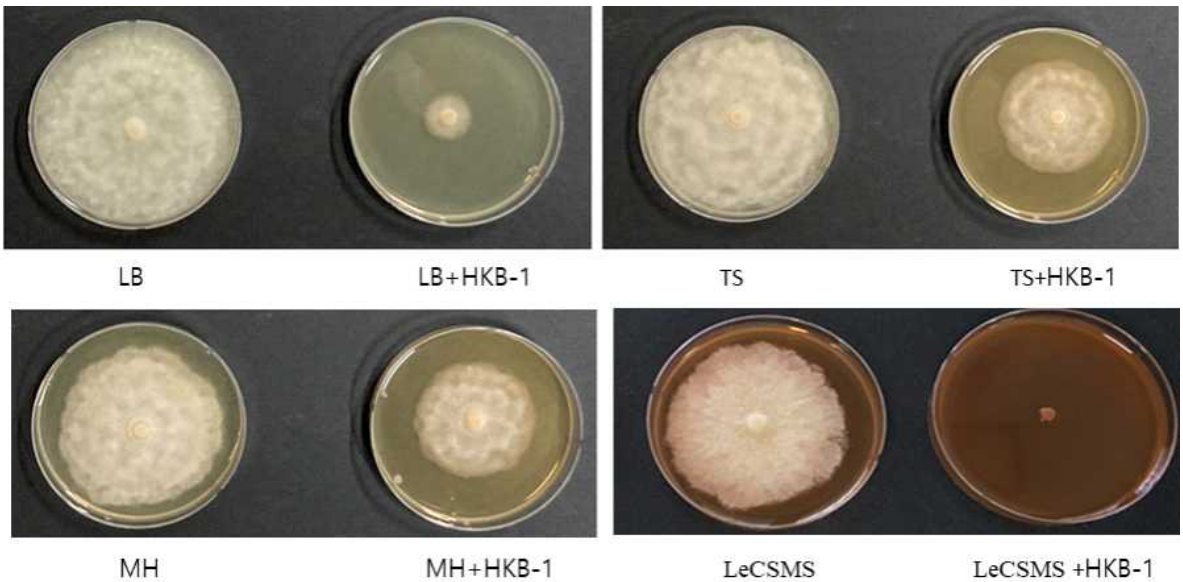
(4) *B. velezensis* HKB-1의 LeCSMS배양여액의 고추역병에 대한 항균효과 검정

B. velezensis HKB-1를 LeCSMS WE+당밀 1% 에서 2일동안 28℃에서 진탕 배양하였다. Triptic soy broth, Lurina-Bertani broth 및 Mueller Hinton broth는 대조구 배지로 동등한 방법으

로 세균배양 하였다. 배지별 *B. velezensis* HKB-1 배양체를 7000rpm으로 원심 분리하여 HKB-1세균을 제거하였다. 각각의 세균배양여액에 1/2 PDA배지를 첨가하여 고압살균 후 페트리디쉬에 배지에 분주하였다. 배지 중앙에 고추역병균 균사 절편 (직경 5mm)를 접종하여 배양체 종류별 균사체 억제 효과를 조사하였다. LeCSMS WE 배지에서 고추역병균사체 성장이 대조 구보다 균사체 성장율이 94% 이상 억제되었으며 LB+HKB-1(78%), MHB+HKB-1 (40%), TSB+HKB-1 (27%)보다 강한 항균활성을 나타내었다. 일반적으로 사용되는 세균배양용 MH, TS, LB 미생물 배지는 매우 고가로 상용화되고 있으며 미생물을 대량 배양할 때 원가 상승의 주요요인이 된다. 반면에 LeCSMS 배지는 물 추출만으로 미생물에 유용한 영양원을 제공할 수 있으며 고밀도 세균배양이 가능하므로 친환경 미생물농약 제조에 매우 유용한 배지 재료로 활용할 수 있을 것으로 사료 된다.

<표> *Bacillus velezensis* HKB-1배양배지 별 배양여액의 균사성장억제 효과 항균활성 효과

배양여액	균사체성장율(cm)
LeCSMS WE + molasses 1%	0.5 ± 0.2
Triptic soy broth	4.7 ± 0.1
Lurina-Bertani broth	2.0 ± 0.3
Mueller Hinton broth	5.2 ± 0.2



<그림> *Bacillus velezensis* HKB-1배양액을 포함한 PDA상에서 고추 역병 균사체 억제 효과

(5) 표고버섯수확후배지 퇴비 (LeCSMS) 물 추출물의 이화학적 분석

LeCSMS 건물량 50g에 물 1 L를 첨가하여 추출한 물추출물 LeCSMS WE와 LeCSMS WE에 당밀 1%를 첨가하여 *B. velezensis* HKB-1를 배양한 배양체 LeCSMS WE+HKB-1의 물리화학적 특성을 비교 분석하였다. LeCSMS WE+HKB-1는 LeCSMS WE의 pH7.25보다 낮은 pH 6.25으로 나타났으나 EC, 질소, 인, 카리, 마그네슘, 칼슘 함량은 높아지는 효과가 있었다.

<표> 표고버섯수확후배지 퇴비 (LeCSMS) 물 추출 *Bacillus velezensis* HKB-1 배양여액의 이화학적 분석

처리구	pH	EC dS/m	T-N g/100ml	T-P g/100ml	T-K g/100ml	Mg g/100ml	Ca g/100ml
LeCSMS WE	7.25	4.76	0.051	0.036	0.102	0.028	0.029
LeCSMS WE+HKB-1	6.25	5.63	0.058	0.038	0.11	0.031	0.031

한편 LeCSMS WE+HKB-1배양체내의 유해물질인 중금속 이온을 조사 한 결과 모두 불검출 또는 기준치 이하로 나타나 인체 유해물질의 위험성이 없는 것으로 확인되었다.

<표> 표고버섯수확후배지 퇴비 (LeCSMS) 물 추출물 *Bacillus velezensis* HKB-1 배양여액내 금속이온

분석항목	한계치	검출량
As(mg/L)	45 or less	Not Detected
Cd(mg/L)	5 or less	Not Detected
Hg(g/L)	2 or less	Not Detected
Pb (mg/L)	130 or less	Not Detected
Cr (mg/L)	200 or less	Not Detected
Cu (mg/L)	360 or less	Not Detected
Ni (mg/L)	45 or less	0.48
Zn (mg/L)	900 or less	Not Detected

(6) LeCSMS WE의 *Bacillus velezensis* HKB-1 배양체 처리에 따른 고추생육조사

LeCSMS HKB-1 배양체를 고추 묘종에 50 ml 3회 첨가하여 식물생육 효과를 조사하였다. 음성 대조 구는 물, 양성 대조 구는 상용화된 퇴비추출물 (CC)를 사용하였다. 고추 종자를 상토(피트모스 65:펄라이트 35, v/v) 파종하고 고추잎이 3-4엽이 형성된 고추 유묘를 포트(직경 12 cm)에 이식하여 같은 상토를 첨가한 후 LeCSMS HKB-1 배양체 100mL를 투입하고 4주 후 생육 후 초장, 엽장, 엽폭, 엽수를 측정하여 고추유묘 생육 효과를 조사하였다.

LeCSMS WE + HKB-1배양체 처리 구는 물 처리 구에 비하여 초장, 엽장, 엽폭, 엽수가 35%, 23%, 22%, 23%증가 하였으며 상용화된 유기비료 추출물에 비하여 유사 또는 우수한 효과를 나타내었다. 따라서 LeCSMS WE + HKB-1배양체를 직접 투여하여도 식물 생장 저해 효과가 없으며 오히려 생장 촉진 효과를 나타낸 것으로 확인되었다. 기본적으로 LeCSMS WE는 NPK등 식물 영양물질이 풍부하고 다양한 유기 물질이 다량 분포함으로 비료 효과로 인한 결과로 생각되었다. *B. velezensis*는 indole-3-acetic acid (IAA)와 siderophore를 생산하여 식물 생장을 촉진하는 것으로 알려져 있어 (Myo et al., 2019), 향 후 *B. velezensis* HKB-1가 배양중에 식물 생장촉진 관련 IAA 등 식물 호로몬 생산 여부를 분석할 필요가 있을 것으로 사료된다.

<표> LeCSMS WE의 *Bacillus velezensis* HKB-1 배양체 처리에 따른 고추생육

처리구	초장 (cm)	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	엽수
LeCSMS WE +HKB-1	38.5±2.20a	12.6±0.56a	5.8±0.35a	11.5±1.17a
Water	25.5±0.42c	9.8±0.42c	4.5±0.26ab	8.8±0.32b
Commercial compost extract	35.3±0.43b	11.4±0.37b	5.2±0.32ab	10.5±0.37b

*The different letters are significantly ($P < 0.05$) different according to Duncan's multiple test.

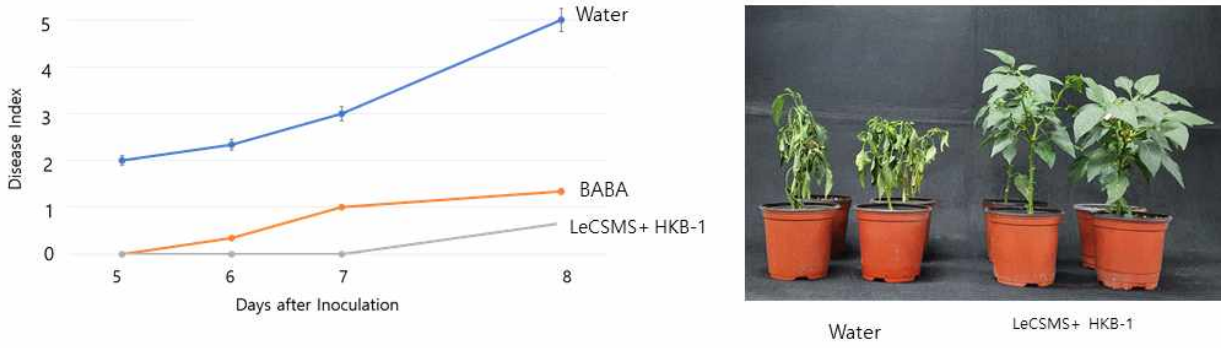
(7) LeCSMS WE의 *Bacillus velezensis* HKB-1 배양체의 고추역병 방제효과

유주자낭 형성유도를 위하여 10% V8 배지 상에 고추 역병균 균사체절편을 접종하고 24℃ 암 조건에서 5일동안 배양하였다. V8 배지 상에 형성된 고추역병균 균사체를 절편(약 직경 10 mm)에 살균수 20 ml를 첨가하여 형광 빛을 조사하면서 24℃에서 다시 2일간 배양하였다. 유주자낭 형성 여부를 고배율(x 400) 광학현미경(Zeiss Axioimager)으로 확인한 후 4℃냉장고에 60분간 유주자의 유출을 유도하였다. 유주자 밀도는 헤머사이토미터를 사용하여 1 x 10^5/ml 로 조정하여 접종원으로 사용하였다.

고추종자를 고압 멸균한 상토에 파종하고 60일 성장시킨 고추 유묘에 고추역병포자를 접종 2일 후에 LeCSMS+HKB-1 배양체 30ml씩 3일 간격으로 2회 처리하였다. 음성 대조 구는 물을 사용하였으며 양성 대조 구는 병 저항성 유도에 의한 고추 역병 억제 효과로 알려진 DL-β-aminobutyric acid (BABA, 0.5mg/ml)를 처리하였다. 발병도는 0: 병징없음, 1: 10-20% 시드름, 2: 30-40% 시드름, 3: 41-60%, 4: 61-70%, 5: 71-100% 시듦을 기준으로 판별하였다.

물 처리 구는 접종 5일 이후부터 발병도 2 이상의 역병이 발생하였으며 접종 7일에서 8일 후에는 발병도 3이상이 지속되어 잎 전체가 시들고 마르는 전형적인 고추 역병 병징이 나타났다. 그러나 LeCSMS+HKB-1배양체 처리 구에서는 접종 8일경과 후에도 1 이하의 낮은 역병 발병도를 보였으며 양성 대조 구 BABA 처리 구보다 효과적인 결과를 얻었다. 물 처리구는 그림과 같이 고추묘 전체가 시들어 버리는 고추 역병의 전형적인 병징이 나타났으나 LeCSMS+HKB-1 처리 구에서는 건전한 고추 묘로 유지 되어 LeCSMS+HKB-1배양체는 고추 역병균의 생물학적 방제에 효과적으로 사용 할 수 있을 것으로 사료 된다.

(8) 표고버섯수확후배지 퇴비 유래 *Bacillus velezensis* HKB-1를 이용한 고추 역병의 생물학적 방제

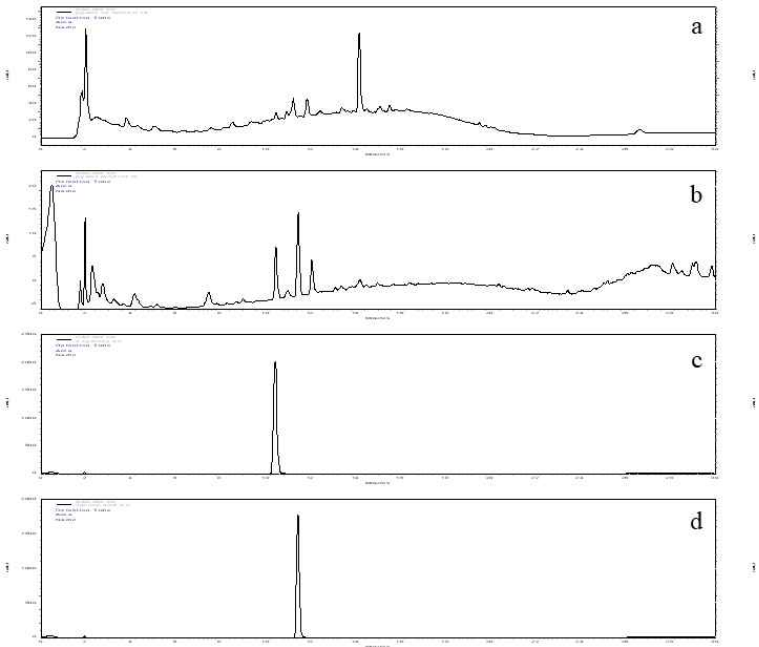


<그림> *Bacillus velezensis* HKB-1 표고버섯수확후배지 물 추출물 배양체의 고추역병 방제효과

표고버섯수확후배지 물 추출물은 항균활성이 있으며 oxalic acid가 항균활성에 중요한 역할을 하며 병 저항성 유전자 발현에 의한 salycylic acid 함량증가로 병 저항성이 유도되는 것으로 보고된 바 있다 (Kang et al., 2017). 본 연구는 표고버섯수확후배지퇴비 LeCSMS 물 추출물과 당밀 1%첨가로 *B. velezensis* HKB-1를 배양하여 고추역병방제 적용을 수행 하였다. LeCSMS는 퇴비로서의 이용뿐만 아니라 길항성 미생물 *B. velezensis* HKB-1의 대량배양에 활용 될 수 있으며 항균 활성이 강화된 배양 배지를 생산할 수 있다. 특히 *B. velezensis* 는 항균 활성, 식물 생장촉진, 병 저항성 유도 등 다양한 기능이 있는 세균으로 알려져 LeCSMS배지의 저 비용배지로 활용하여 복합 기능성 미생물농약 생산에 유효할 것으로 생각한다. 앞으로 LeCSMS에 존재하는 항균활성 성분과 병 저항성 유도 및 식물 생장촉진 물질 구명이 필요할 것으로 사료 된다.

7) LeCSMS추출물에서 4-hydroxybenzoic acid와 vanillic acid검출 및 항균활성검정

LeCSMS 추출물의 고추 역병균에 대한 방제효과와 항균활성이 있는 것으로 확인 되었다. 또한 부숙 과정에서 다양한 미생물들이 분포하며 *B. velezensis* HKB-1와 같은 길항성 미생물을 분리 동정한바 있어 항균활성에 연관된 화합물이 존재 할 것으로 예상 되었다. 그림은 부숙전 표고버섯수확후배지(LeSMS)와 부숙 후 표고버섯수확후배지(LeCSMS)추출물의 HPLC결과로 LeSMS에는 없고 LeCSMS에서함량이 크게 증가한 화합물을 정제하여 화학구조 분석을 수행하였던 결과 4-hydroxybenzoic acid와 vanillic acid로 동정하였다(제 1협동과제 제공).



<그림> 표고버섯수확후배지 부숙전 SMS(a)와 표고버섯수확후배지 부숙후 LeCSMS(b)의 HPLC분석. c: standard 4-hydroxybenzoic acid (HA), d: standard Vanillic acid (VA)

본 실험은 LeCSMS 주요 화합물인 vanillic acid와 4-hydroxybenzoic acid의 식물병원성 곰팡이에 대한 항균활성을 조사 하였다. PDA에 가가각의 화합물을 250에서 2000 mg/L로 조정하여 *P. capsici, Phythium ul timum, Rhizoctonia solani, Collectotrichum coccodes, Fusarium oxysporium, Botrytis cenerea*의 각각의 균사체절편(직경 5mm)을 접종하고 대조구와 비교하여 균사체 억제효과를 조사하였다. vanillic acid와 4-hydroxybenzoic acid는 난균류에 속하는 *Phytophthora capsici*와 *Phythium ultimum*은 500 mg/L이하에서 90%이상의 균사체생장억제율을 보이면서 강력한 항균력을 나타내었다. 그러나 다른 곰팡이 종은 Hydroxybenzoic acid와 vanillic acid의 1000 mg/L에서 비교적 약한 25%에서 12%의 균사성장억제율을 보였으며 *Rhizoctonia solani*에서는 항균활성이 없었다.

왕겨는 저장 기간동안 곰팡이나 해충으로부터 물리적 화학적 방어 기구가 알려져 있으며 4-hydroxybenzoic acid가 항균물질로 보고 된 바 있다. 4-hydroxybenzoic acid는 식품병원세균, 식물병원세균, 효모, 식물병원성곰팡이를 대상으로 항균활성 실험을 실시 한 결과 그람양성세균과 그람음성세균에 강한 항균 활성이 있는 것으로 판명 되었으나 곰팡이 균에서는 억제효과가 없는 것으로 보고되었다. 표고버섯, 느타리버섯, 상황버섯 등에서 vanillic acid와 4-hydroxybenzoic acid가 분리 보고 된 바 있으며 *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* 등 식품병원성세균에 항균효과가 있는 것으로 보고 된 바 있다. 길항성곰팡이 Penicillium sp. AF5로부터 분리된 hydroxybenzoic acid를 이용하여 식물병원성곰팡이에 대한 항균력을 조사한 바 있으며 *Phytophthora capsici, Phythium ultimum*에 강한 활성이 있는 것으로 보고 된 바 있어 본 연구결과와 일치 하였다. 그러나 vanillic acid의 항곰팡이효과는 보고 된 바 없다. 따라서 vanillic acid와 4-hydroxybenzoic acid는 난균류에 항균활성이 강하게 나타나 표고버섯수확후배지 퇴비의 역병 방제 지표 화합물로 활용 가능 할 것으로 생각 되었다.

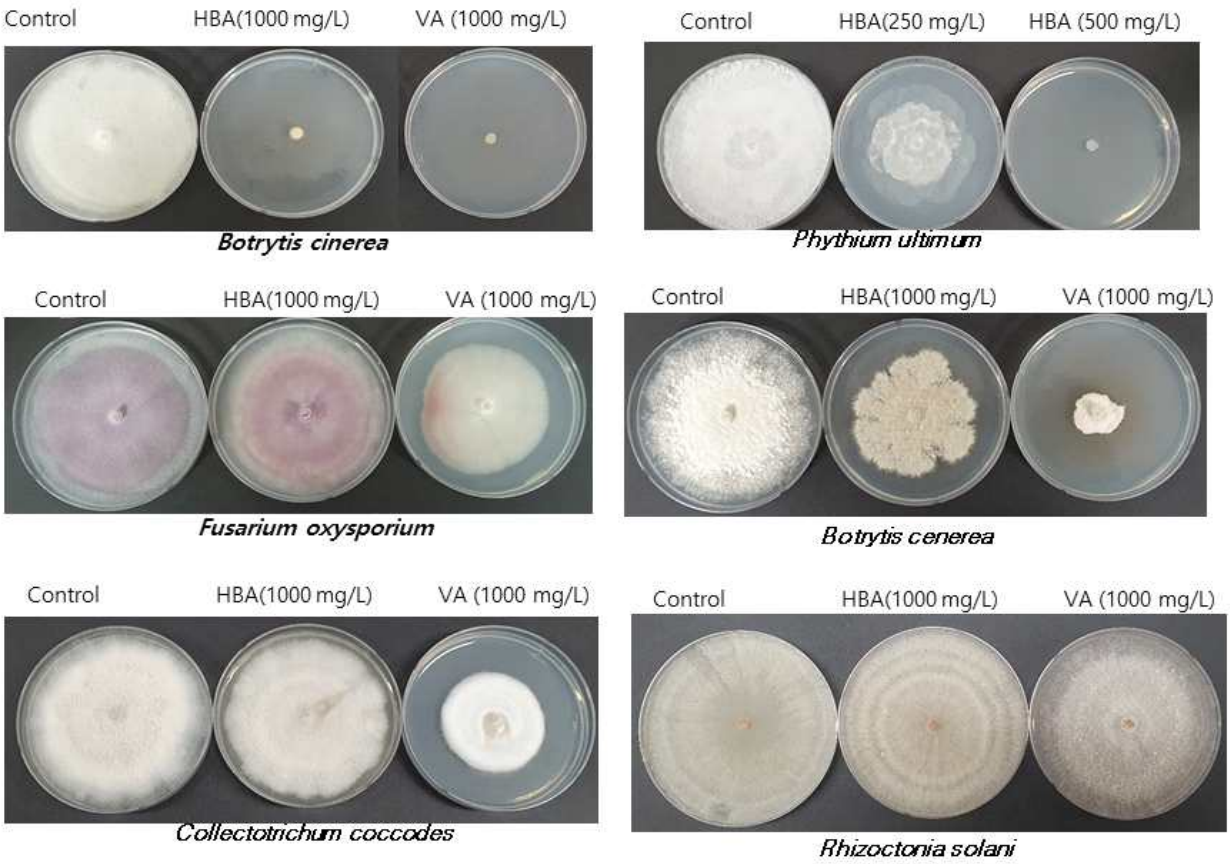
<표> Hydroxybenzoic acid의 식물병원성곰팡이에대한 균사성장억제효과

Fungal species	PDA media with Hydroxybenzoic acid(mg/L)						
	0	250	500	750	1000	1500	2000
Phytophthora capsici	8.5±0	6.8±0.24	3.2±0.17	2.0±0.16	NG	N.G	N.G
Phythium ultimum	8.5±0	6.13±0.26	NG	NG	NG	NG	NG
Rhizoctonia solani	8.5±0	ND	ND	ND	8.5±0	ND	ND
Collectotrichum coccodes	8.5±0	ND	ND	ND	6.4±0.16	ND	ND
Fusarium oxysporium	8.5±0	ND	ND	ND	7.47±0.12	ND	
Botrytis cenerea	8.5±0	ND	ND	ND	7.23±0.2	ND	

ND: Not Determined, NG: No Growth

<표> Vanillic acid의 식물병원성곰팡이에대한 균사성장억제효과

Fungal species	PDA media with Vanillic acid(mg/L)						
	0	250	500	750	1000	1500	2000
Phytophthora capsici	8.5±0	3.33±0.18	1.73±0.25	NG	NG	N.G	N.G
Rhizoctonia solani	8.5±0	ND	ND	ND	8.5±0	ND	ND
Collectotrichum coccodes	8.5±0	ND	ND	ND	8.5±0	ND	ND
Fusarium oxysporium	8.5±0	ND	ND	ND	5.2±0.65	ND	ND
Botrytis cenerea	8.5±0	ND	ND	ND	3.53±0.12	ND	ND

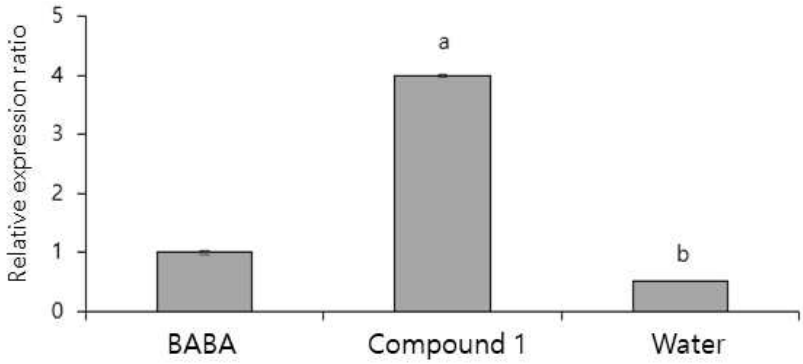


< 그림> Hydroxybenzoic acid(HBA)와 Vanillic acid(VA)가 첨가된 PDA 배지에서의 균사체 성장억제효과

8) 부숙버섯수확후배지 유래 항균물질의 병 저항성 유전자발현 유도

노루궁뎅이버섯수확후배지 유래 항균 활성물질 compound 1의 화학구조를 *N*-De-phenylethylisohericerin로 동정한 바 있다(제 1 협동과제). 본 실험은 제 1 협동과제로부터 분양받은 compound 1을 300mg/L로 조정하여 병 저항성 유전자 발현 유도여부를 조사 하였다.. 포트(직경 10cm)에서 60일 성장시킨 고추(품종: 아크다플러스)에 compound 1 300mg/L 30mL를 관주 및 잎에 분사하였으며 0.5% BABA를 양성대조구로, 물처리구는 음성대조구로 사용 하였다. 72시간 후 각 처리구로부터 고추식물체의 잎을 취하여 액체질소로 마쇄하고 마쇄분말로 부터 RNA를 TRIzol Reagent (Gibco-BRL, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 분리한 Total RNA 1 mg를 Superscript III (invitrogen, USA)를 이용하여 cDNA로 합성하고, 고추 병 저항성 유전자 CaPR1의 PCR primer set F: 5′-ACTTGCAATTATGATCCACC-3′R: 5′-ACTCCAGTTACTGCACCATT-3′와 CaPR10 F: 5′-ATGTTGAAGGTGATGGTGGTGCTG-3′ R: 5′-TCCCTTAGAAGAACTGATACAACC-3′로 qRT-PCR (Roche, UK)을 수행하였다. PCR 반응 조건은 95℃ 10min(Pre-incubation),95℃ 15sec, 58℃ 30sec, 72℃ 30sec, 총 35cycle으로 증폭하였다. 상대적인 유전자의 발현양은 고추의 *CaActin* F: 5′-TTGGACTCTGGTGATGGTGTG-3′ R: 5′-AACATGGTTGAGCCACCACTG-3′primer를 사용하여 Actin유전자로 발현양으로 보정하고 타겟 유전자의 발현양을 조사하였다. 그 결과 항균물질 compound 1처리구에서 CaPR1유전자 발현 유의차가 없었으나 CaPR10은 에서 BABA처리구에 비하여 4배물처리보다는 8배 이상의 유전자 발현의 유의차를 보였다. 저항성을 유도하는 elicitor가 식물체의 수용체에 인식되면 Salicylic acid(SA)나 Jasmonic acid(JA) 같은 병저항성 신호물질이 저항성 유전자의 발현을 유도하는데 *CaPR1* 유전자는 전신획득저항성(systemic acquired resistance, SAR)에 관련된 유전자로 SA에 의존적이다(Minami *et al,* 2011; Kwak et al, 2015).

반면에 CaPR10은 induced systemic resistance(ISR)에 관여하는 것으로 알려져 있다. ISR은 plant growth promoting rhizobacteria(PGPR)의 기능을 가진 미생물이 식물체 뿌리에 정착한 결과로 JA와 ethylen-sensitive pathway에의해서 중계된다.



<그림> 항균물질 compound 1처리에 따른 고추 방어유전자 CaPR1의 qRT-PCR) 분석
막대그래프상에 표시된 처리별 영어소문자는 유의차를 나타낸다 (Duncan' multiple testdp 따른 $P<0.05$)

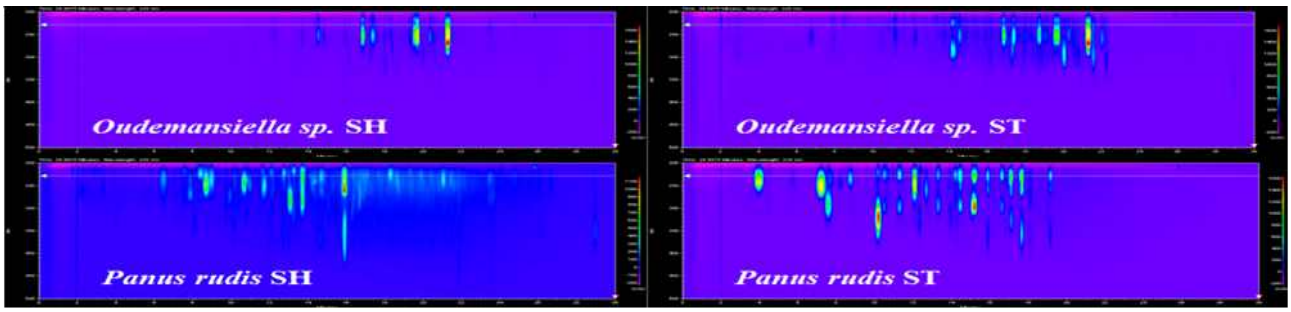
<제1협동연구과제: 식물역병 방어 및 생육효과 유인 물질의 화학적 동정>

1) 버섯 균주 배양액과 버섯 수확 후 배지 부숙 추출물의 고추역병균(*Phytophthora capsici*)에 대한 항균활성 검정

본 연구실에서 확보하고 있는 버섯 균주 배양추출물 13종과 제1세부과제를 담당하는 한경대학교 연구팀에서 제공한 버섯 수확 후 배지 부숙 추출물 5종을 대상으로 고추역병균(*Phytophthora capsici*)에 대한 항균활성을 검정하였다. 그 결과 버섯 추출물 중에서 *Oudemansiella* sp.가 강한 항균활성을 나타내었으며, *Panus rudis*는 약한 활성을 나타내었다. 그러나 *Oudemansiella* sp.는 strobilurin A를 생산하는 것으로 본 연구팀에서 보고한 바가 있어 본 연구에서는 연구가 많이 수행되지 않은 *Panus rudis*의 성분규명 연구를 수행하였다. 그 결과 *Panus rudis*의 아세톤 추출물로부터 신규 화합물인 panepoxydiol과 9종의 기지화합물을 분리, 정제하고, mass 및 NMR spectrum의 측정 및 해석을 통하여 hydroxy-3-methylbut-1-en-1-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ene-2,5-diol, isopanepoxydone, neopanepoxydone, panepoxydone, panepophenanthrin, 4-hydroxy-2,2-dimethyl-6-methoxychromane, 6-hydroxy-2,2-dimethyl-3-chromen, 2,2-dimethyl-6-methoxychroman-4-one, 3,4-dihydroxy-2,2-dimethyl-6-methoxychromane으로 화학구조를 규명하였다. 그러나 분리한 화합물의 각각에 대한 항균활성 검정결과 활성이 약하여 추가적인 연구를 진행하지 않았다. 또한 아래에 기술한 버섯 수확 후 배지보다 항균활성이 강한 균주를 확보하지 못하여 버섯 균주를 활용한 추가적인 연구는 수행하지 않았으며 버섯 수확 후 배지의 항균물질에 관한 연구를 중점적으로 수행하였다.

<표> 버섯 균주 배양추출물 13종 목록 및 추출물 양>

No.	Scientific name	Extract yield (mg/400 ml)	No.	Scientific name	Extract yield (mg/400 ml)
01 SH	*Lenzites betulina*	12.9	08 SH	*Agrocybe praecox*	33.0
01 ST		17.8	08 ST		32.1
02 SH	*Coprinus radians*	58.6	09 SH	*Microporus affinis*	23.3
02 ST		32.2	09 ST		22.1
03 SH	*Calvatia craniiformis*	19.0	10 SH	*Gymnopilus aeruginosus*	95.1
03 ST		12.0	10 ST		131.3
04 SH	*Dacrymyces palmata*	201.3	11 SH	*Oudemansiella* sp.	54.1
04 ST		23.5	11 ST		58.0
05 SH	*Fomitella fraxinea*	45.7	12 SH	*Panus rudis*	14.7
05 ST		29.5	12 ST		289.8
06 SH	*Marasmius siccus*	26.7	13 SH	*Panellus serotinus*	51.5
06 ST		15.7	13 ST		62.7
07 SH	*Lycoperdon perlatum*	14.7			
07 ST		14.9			

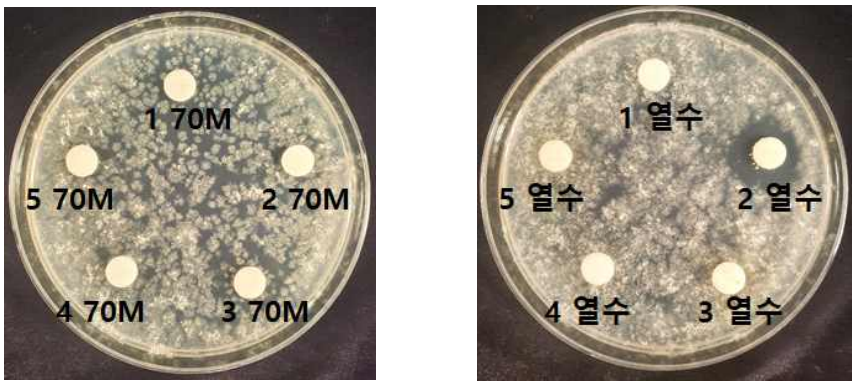


<그림> 항균활성을 나타낸 버섯 균주 배양추출물의 HPLC chromatogram>

한경대학교 연구팀에서 제공한 버섯 수확 후 배지 부숙 추출물 5종의 시료는 각각 70% methanol과 열수(45℃, 10시간)로 추출하여 70% methanol 추출물과 열수추출물을 제조하였다. 이들 추출물을 10 ㎎/㎖의 농도로 만든 후 40 ㎕ 씩 paper disc에 올려 고추역병균(*Phytophthora capsici*)에 대한 항균활성을 검정하였으며, 그 결과 아래의 그림에 나타낸 바와 같이 70% methanol 추출물에서는 항균활성이 나타나지 않았으나, 2번 시료의 열수추출물 즉 표고버섯 수확 후 부숙한 배지의 열수 추출물에서 고추역병균에 대한 강한 길항 활성을 나타내었다. 2번 시료의 경우 70% methanol 추출물의 경우 낮은 농도에서는 활성을 나타내지 않았으나 농도를 높이면 열수추출물과 같이 강한 길항활성을 나타내었다. 따라서 표고버섯 수확 후 부숙 배지로부터 항균활성물질을 분리, 정제하여 화학구조를 규명하였다.

<표> 한경대학교 연구팀에서 제공한 버섯 수확 후 배지 추출물

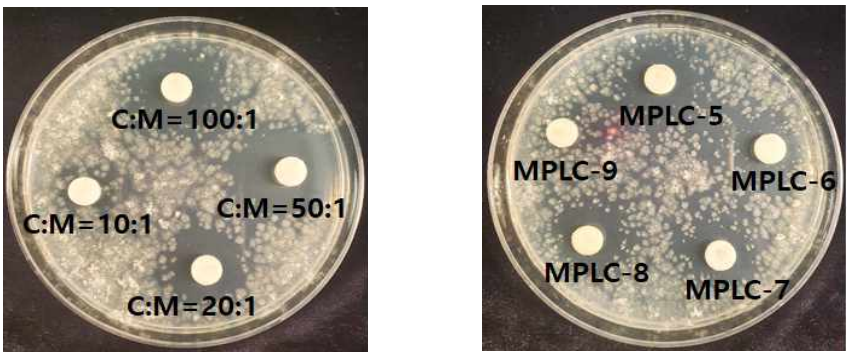
시료 번호	시료명
1	느타리버섯 수확 후 배지(SMS) + 미강 + 고오랑
2	표고버섯 수확 후 배지(SMS) 처리2 (부숙)
3	표고버섯 수확 후 배지(SMS) + 깻묵(10%) + 고오랑 + 처리1
4	표고버섯 수확 후 배지(SMS)
5	노루궁뎅이버섯 수확 후 배지(SMS)



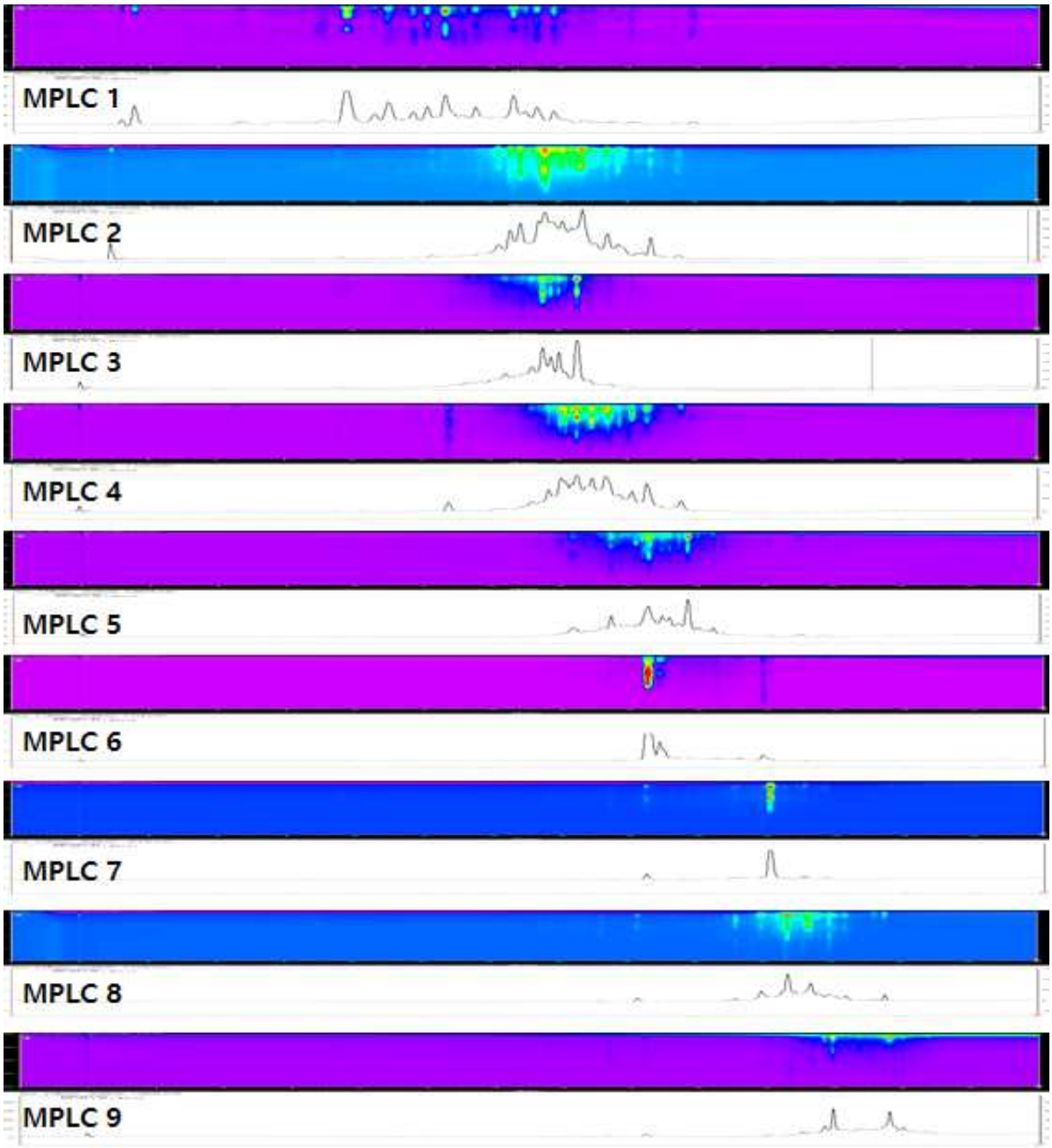
<그림> 70% methanol 추출물(좌)과 열수추출물(우)의 고추역병균에 대한 항균활성

2) 표고버섯 수확 후 배지 부숙물로부터 고추역병균에 대한 길항활성물질의 분리 및 정제

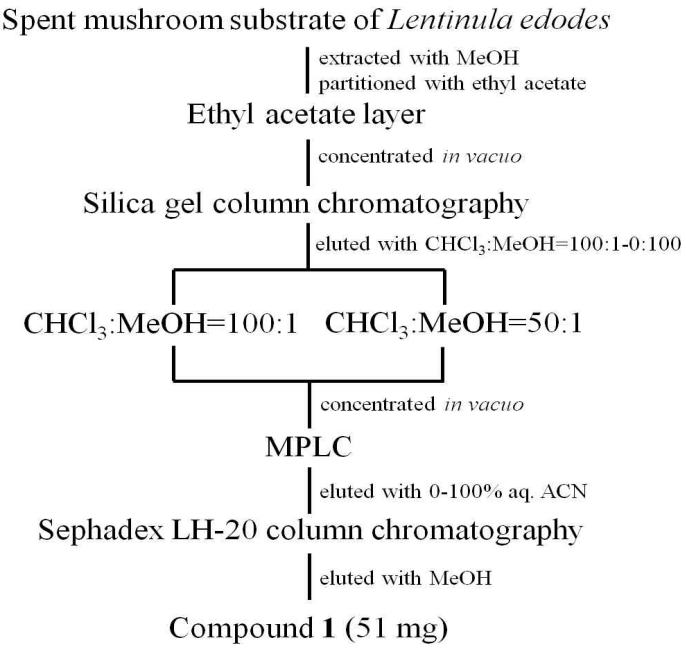
표고버섯을 수확한 후 남은 배지를 부숙시킨 표고버섯 수확 후 배지 부숙물 3.2 kg에 methanol을 가하여 추출하였다. 추출물을 여과한 후 여과액을 감압 농축하여 methanol을 제거한 뒤 물과 ethyl acetate를 넣어 분배 추출하였다. 고추역병균에 대한 항균활성을 검정한 결과 ethyl acetate 층에서 활성을 나타내었으며, 따라서 ethyl acetate 층을 감압 농축(약 20.0 g)한 후 chloroform : methanol (100:1→0:100, v/v)을 용출용매로 하여 silica gel column chromatography를 수행하였다. 각 분획물 중 고추역병균에 강한 항균활성을 나타내는 chloroform : methanol (100:1) 분획(1.95 g)과 chloroform : methanol (50:1) 분획(605.9 mg)을 합하여 농축한 후 0→100% aqueous acetonitrile gradient를 용출용매로 사용하여 MPLC를 수행하였다. MPLC를 수행한 후 활성을 나타낸 분획을 모아 농축한 후 100% methanol을 용출용매로 사용하여 Sephadex LH-20 column chromatograpy를 수행하였으며, 그 결과 항균활성물질 compound **1** (51.2 mg)을 정제하였다.



<그림> Silica gel column chromatography 분획물(좌)과 MPLC 분획물(우)의 고추역병균에 대한 항균활성 검정



<그림> MPLC 분획물의 MPLC profile

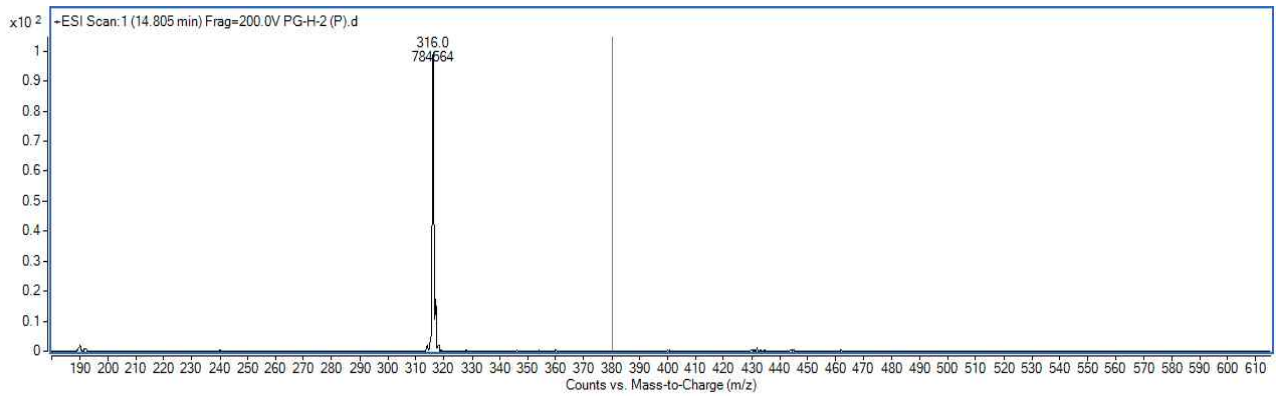


<그림> 표고버섯 수확 후 배지 부숙물로부터 고추역병균 길항활성물질의 분리 및 정제 과정

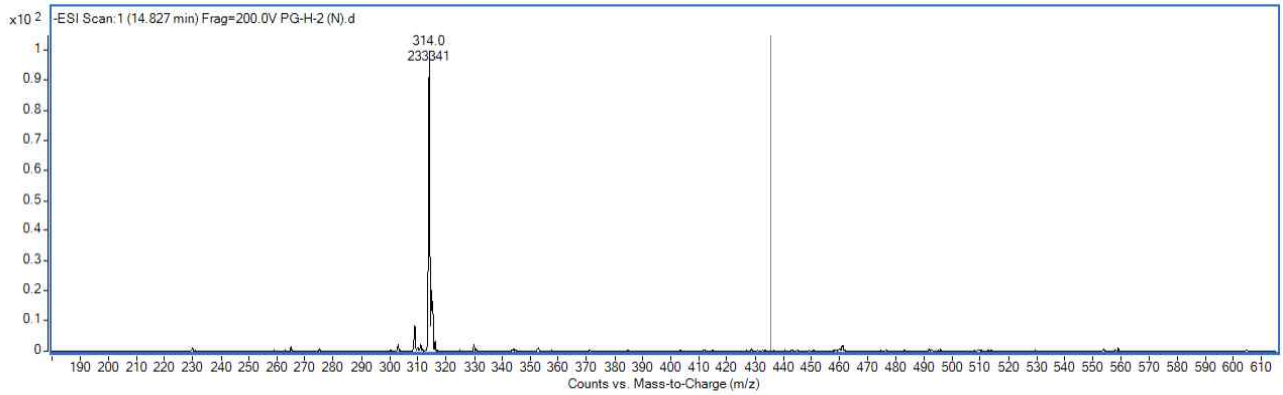
3) 표고버섯 수확 후 배지 부숙물로부터 분리한 항균활성물질의 화학구조 규명

표고버섯 수확 후 배지 부숙물로부터 분리한 항균활성물질 Compound **1**의 화학구조를 규명하기 위하여 mass 분석과 NMR 분석을 수행하였다. 분자량을 확인하기 위하여 ESI-mass 분석을 수행하였고, 화학구조를 결정하기 위하여 CD_3OD에 녹인 후 ^1H NMR, ^{13}C NMR 등의 1차원 NMR과 ^1H-^1H COSY, HMQC, HMBC 등의 2차원 NMR을 측정하여 해석하였다.

ESI-mass spectrum의 측정 및 해석: Compound **1**의 분자량을 알아보기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하여 해석하였다. Positive mode에서 ESI-mass spectrum을 측정한 결과, *m/z* 316.0에서 $[M+H]^+$ 이온 피크가 관찰되었고, negative mode에서 측정한 결과 *m/z* 314.0에서 $[M-H]^-$ 이온피크가 관찰되어 분자량을 315로 확인하였다.

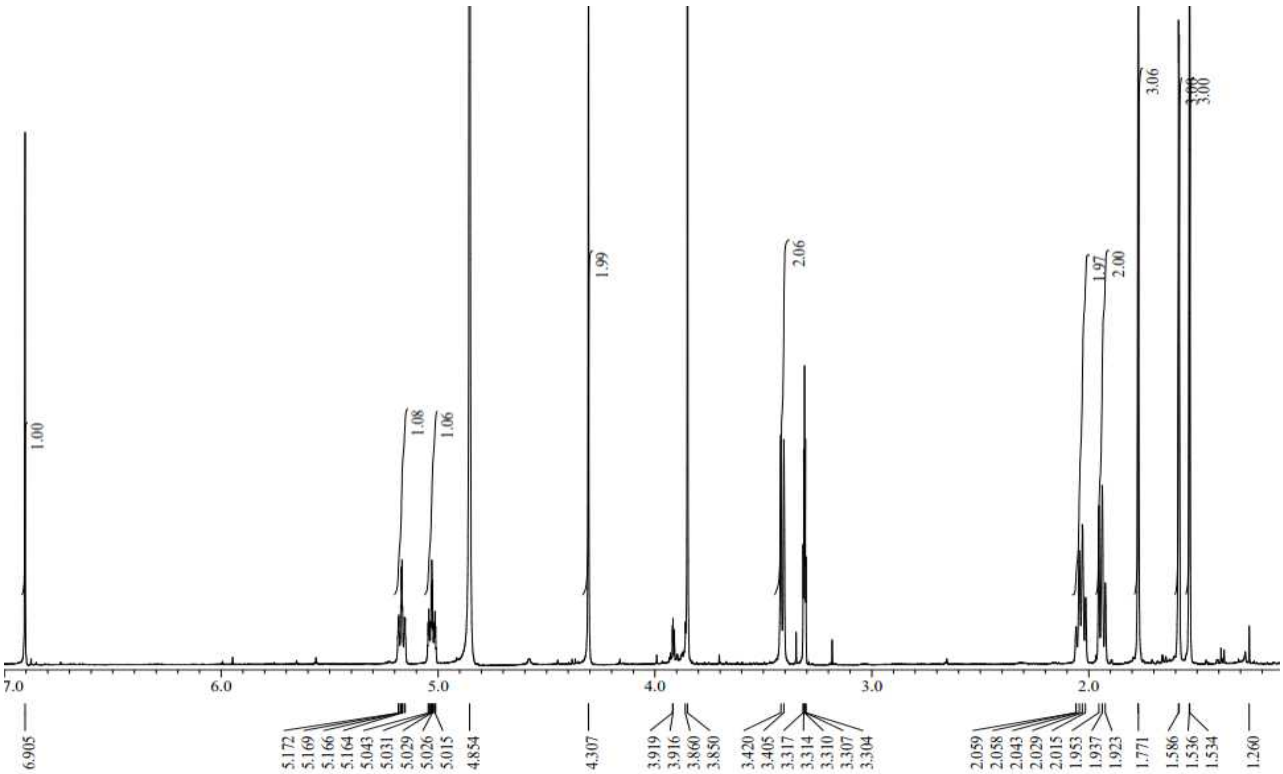


<그림> Compound **1**의 ESI-mass spectrum (positive mode)>



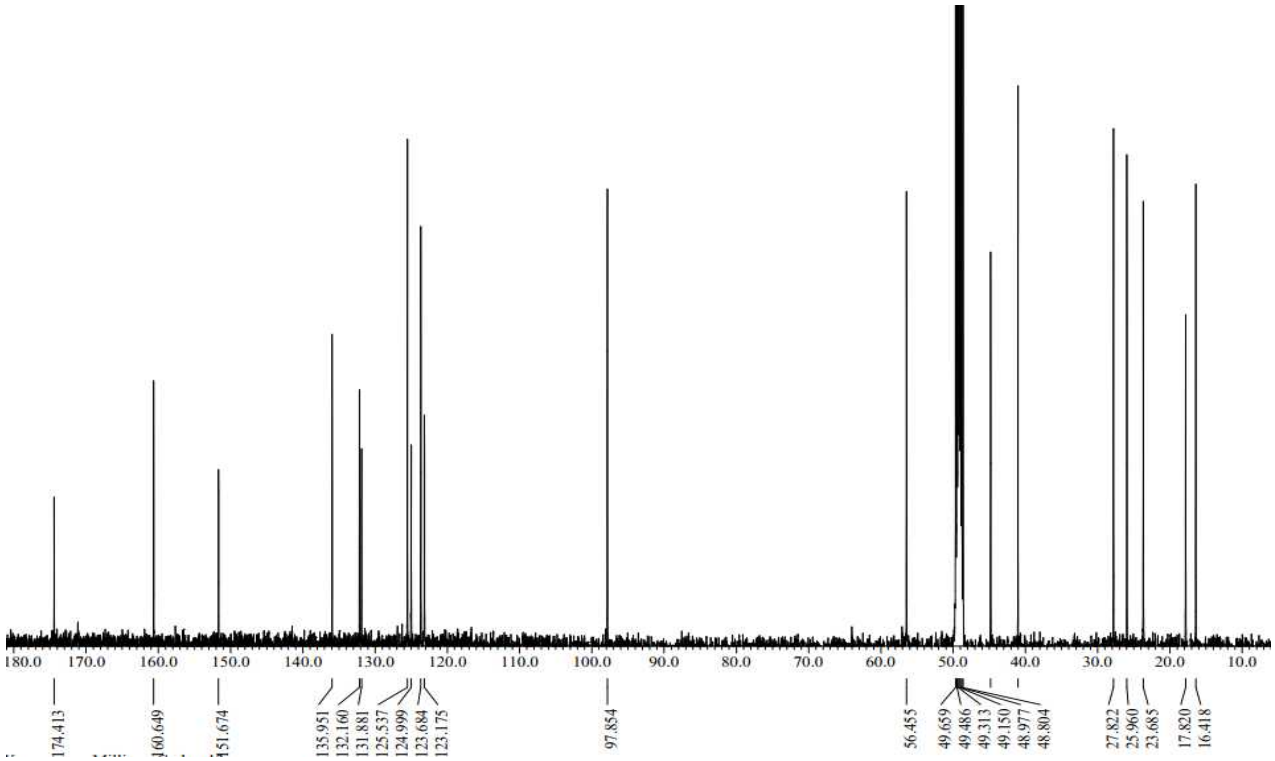
<그림> Compound **1**의 ESI-mass spectrum (negative mode)>

^{1}H NMR spectrum의 측정 및 해석: ^{1}H NMR spectrum을 측정한 결과, 6.91 ppm에서 한 개의 aromatic methine proton, 5.17, 5.03 ppm에서 두 개의 olefinic methine proton, 4.31, 3.41, 2.04, 1.94 ppm에서 네 개의 methylene proton, 3.85 ppm에서 한 개의 methoxy proton, 1.77, 1.59, 1.54 ppm에서 세 개의 methyl proton이 관찰되었다.



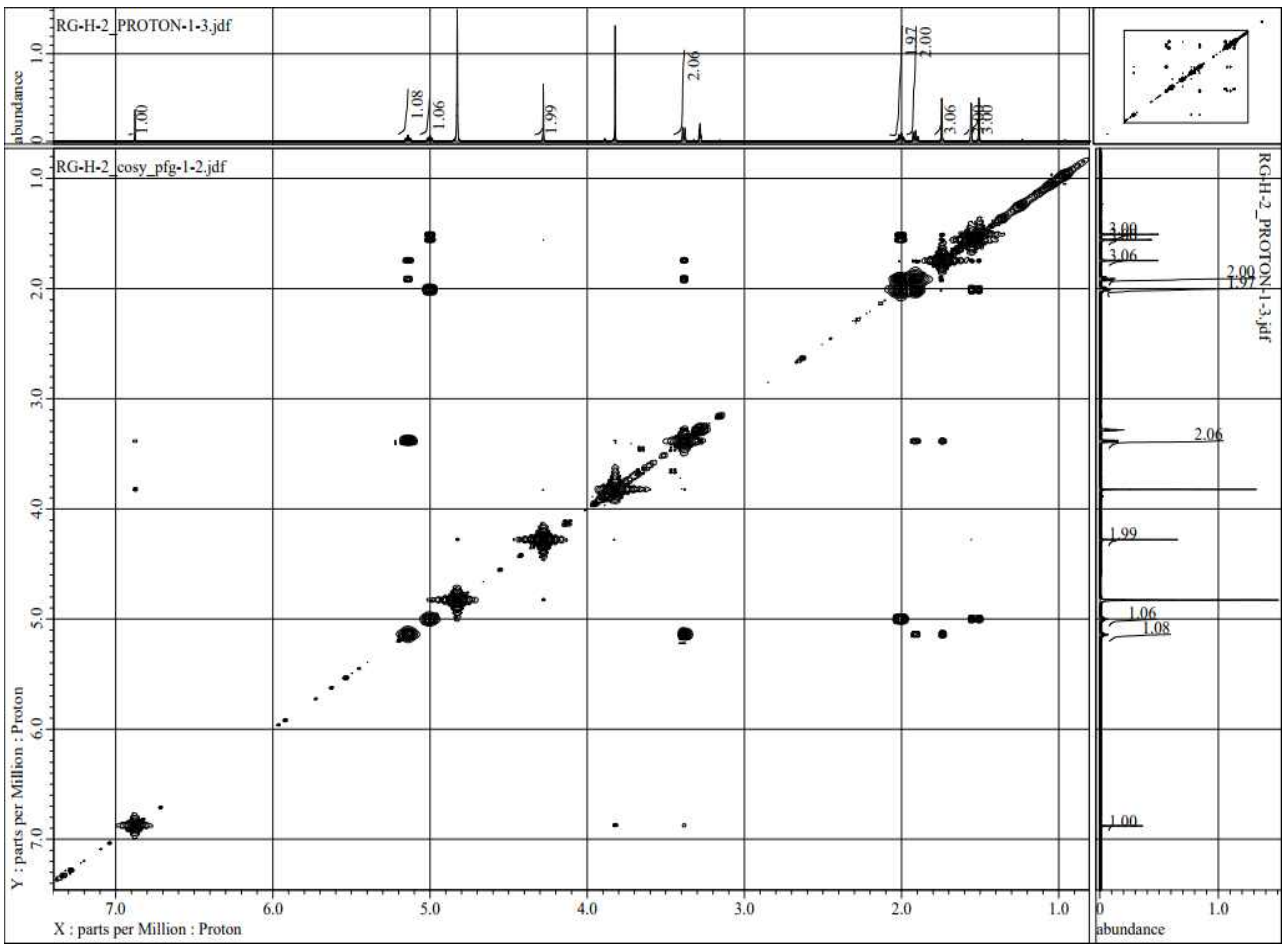
<그림> Compound **1**의 ^{1}H NMR spectrum

^{13}C NMR spectrum의 측정 및 해석: ^{13}C NMR spectrum을 측정한 결과, 174.4 ppm에서 한 개의 carbonyl carbon, 160.6, 151.7 ppm에서 두 개의 oxygenated sp^2 quaternary carbon, 136.0, 132.2, 131.9, 125.0, 123.2 ppm에서 다섯 개의 sp^2 quaternary carbon, 123.7, 125.5, 97.9 ppm에서 세 개의 sp^2 methine carbon, 56.5 ppm에서 한 개의 methoxy carbon, 44.8 ppm에서 한 개의 nitrogenated methylene carbon, 41.1, 27.8, 23.7 ppm에서 세 개의 methylene carbon, 26.0, 17.8, 16.4 ppm에서 세 개의 methyl carbon이 관찰되었다.



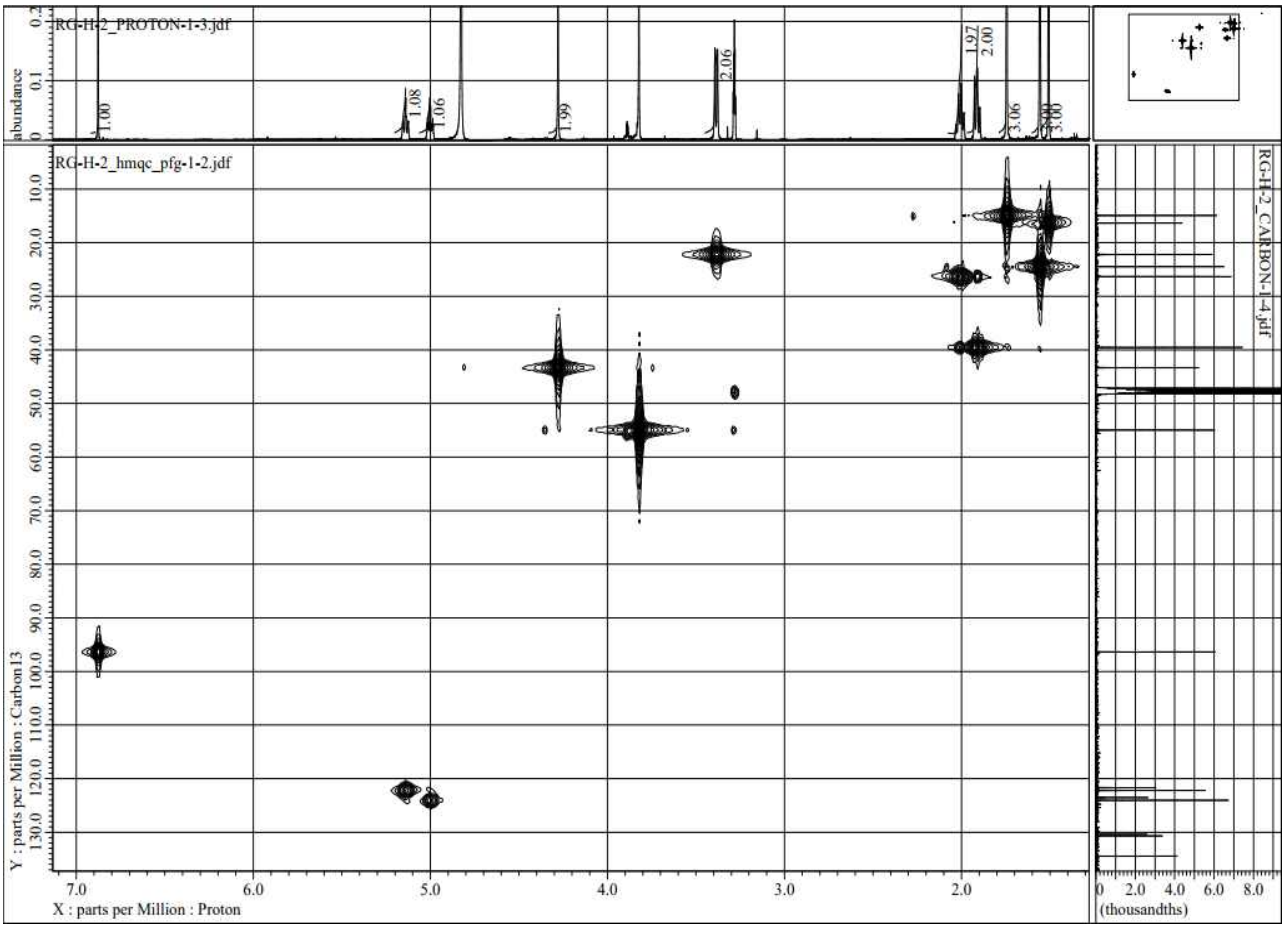
<그림> Compound **1**의 ^{13}C NMR spectrum

<u>^{1}H-^{1}H COSY spectrum의 측정 및 해석</u>: 화합물 Compound **1**의 ^{1}H-^{1}H COSY spectrum을 측정한 결과, 두 개의 부분구조 =CH-CH_2-CH_2-과 =CH-CH_2-의 존재를 밝혔다.

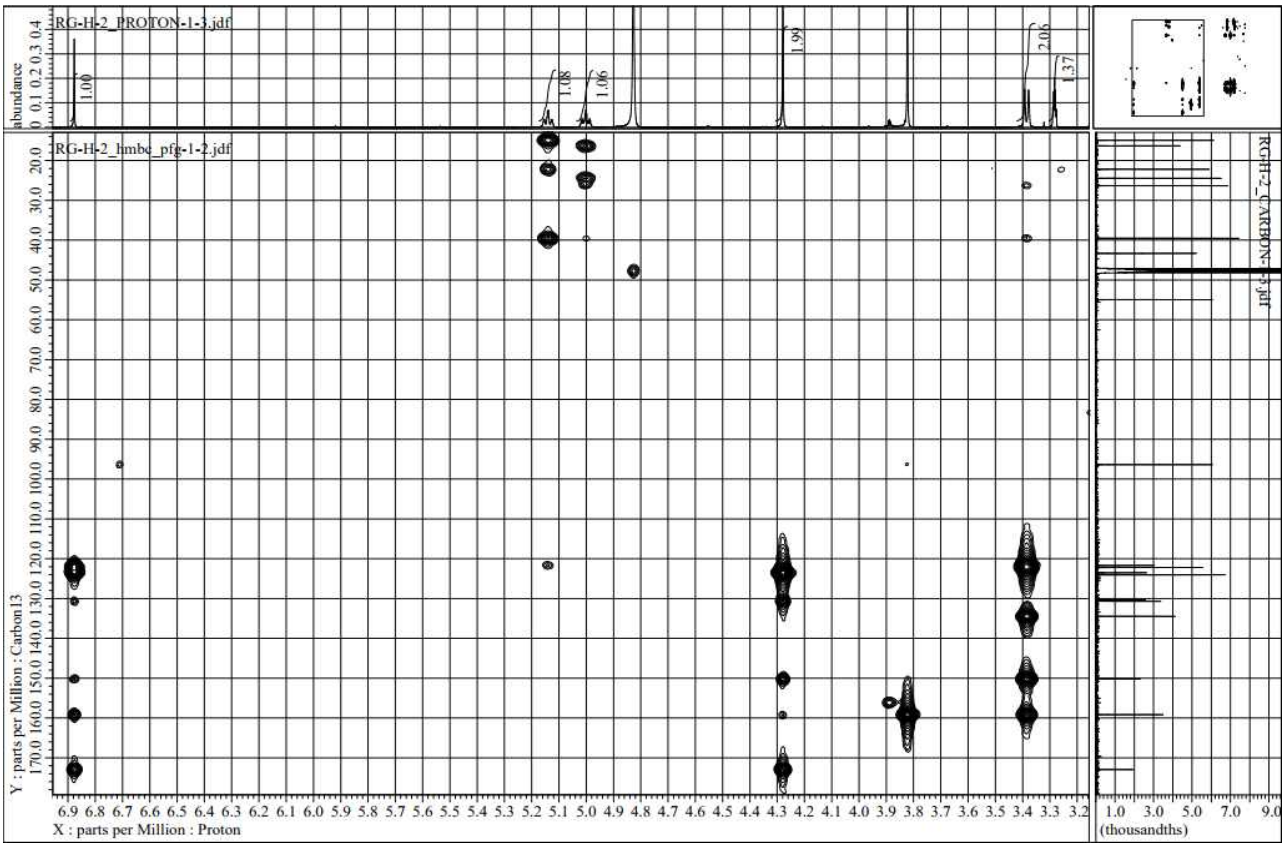


<그림> Compound **1**의 ^{1}H-^{1}H COSY spectrum

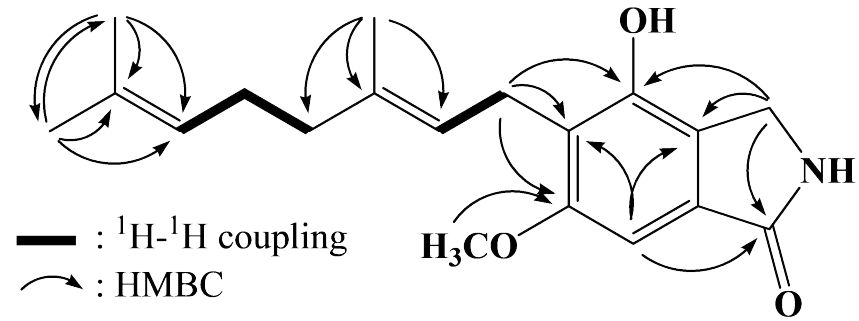
HMQC spectrum 및 HMBC spectrum의 측정 및 해석: HMQC spectrum을 측정, 해석하여 관찰된 모든 proton-bearing carbon ($^1J_{C-H}$)을 규명하였다. 또한, HMBC spectrum을 측정하여 해석한 결과 아래의 그림에 도시한 바와 같이 각각의 proton으로부터 carbon에 관찰된 long-range correlation으로부터 compound **1**의 화학구조를 규명하였다. 즉 1.59, 1.54 ppm의 proton으로부터 132.2, 125.5 ppm의 carbon에, 1.77 ppm의 proton으로부터 136.0, 123.7, 41.1 ppm의 carbon에 long-range correlation이 관찰되어 두 개의 isoprene unit가 연결되었고, 3.41 ppm의 methylene proton으로부터 160.6, 151.7, 123.2 ppm의 carbon에 long-range correlation이 관찰되어 isoprene unit의 결합위치가 결정되었다. 또한 6.91 ppm의 aromatic methine proton으로부터 174.4, 125.0, 123.2 ppm의 carbon에, 4.31 ppm의 methylene proton으로부터 174.4, 151.7, 125.0 ppm의 carbon에, 3.85 ppm의 methyl proton으로부터 160.6 ppm의 carbon에 long-range correlation이 관찰되어 아래의 그림과 같이 화학구조가 결정되었다. 화학구조를 바탕으로 SciFinder database를 검색한 결과, 항균활성물질 compound **1**의 화학구조를 *N*-De-phenylethylisohericerin으로 결정하였다.



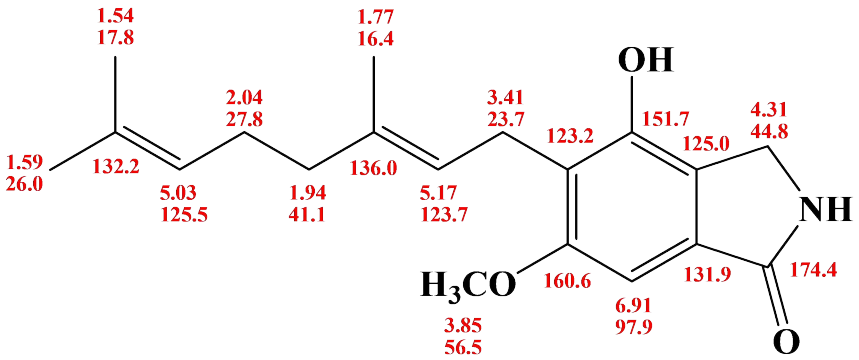
<그림> Compound **1**의 HMQC spectrum



<그림> Compound 1의 HMBC spectrum



<Compound 1의 2차원 NMR correlation>



<그림> Compound 1의 ^{1}H 및 ^{13}C peak assignment

4) 표고버섯 수확 후 배지 부숙물로부터 식물생장촉진물질의 분리 및 정제

주관연구기관인 한경대학교와 협력하여 표고버섯 수확 후 배지 부숙물로부터 식물생장촉진물질의 분리를 수행하였다. 즉 표고버섯 수확 후 배지 부숙물(3.2 kg)에 methanol을 가하여 추출한 후 추출물을 여과하여 감압 농축하였다. 농축물에 물과 ethyl acetate를 넣어 분배 추출한 후 ethyl acetate 층을 감압 농축하였다. Ethyl acetate 층(약 20 g)을 chloroform : methanol (100:1 →0:100, v/v)을 용출용매로 하여 silica gel column chromatography를 수행한 후 각 분획물에 대하여 식물생장촉진 활성을 평가하였다. 그 결과 분획물 중 식물생장을 촉진시키는 chloroform : methanol (10:1) 분획과 chloroform : methanol (2:1) 분획에 관하여 한 단계 물질의 분리를 추가적으로 수행하였다. 먼저 chloroform : methanol (10:1) 분획(약 5 g)을 감압농축한 후 용출용매 0→100% aqueous methanol gradient를 이용하여 MPLC를 수행하였다. 또한, chloroform : Methanol (2:1) 분획(1.92 g)을 감압농축한 후 용출용매 20→100% aqueous methanol을 사용하여 MPLC를 수행한 후 methanol을 용출용매로 사용하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하였다. 각각의 분획을 대상으로 활성을 검정한 결과, 식물생장촉진활성을 나타내지 않았다. 이상의 결과를 바탕으로 활성의 소실원인을 분석한 결과, 식물생장촉진활성은 단일성분에 의한 효과는 아닌 것으로 추정되며, 활성분획에 포함되어 있는 화합물이 복합적으로 존재할 때 활성을 나타내는 것으로 추정되었다.

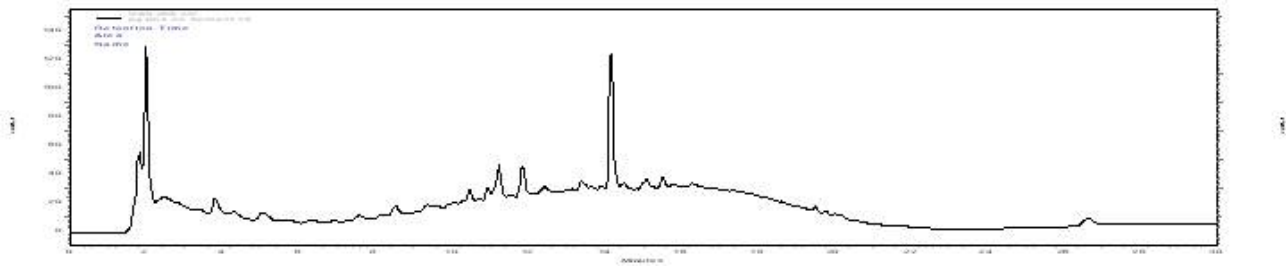
<표> 각 분획물의 식물생장촉진활성>

Treatments	shoot height (cm)	root height (cm)	shoot weight (g)	root weight (g)
water	7.54	7.54	0.7042	0.0687
수확 후 배지 부숙물	11.08	4.08	1.3506	0.1174
Ethyl acetate 층	8.34	7.18	0.8482	0.1181
Silica column 10:1 분획물	8.32	6.20	0.6321	0.0548
Silica column 2:1 분획물	9.3	8.14	0.8558	0.5220

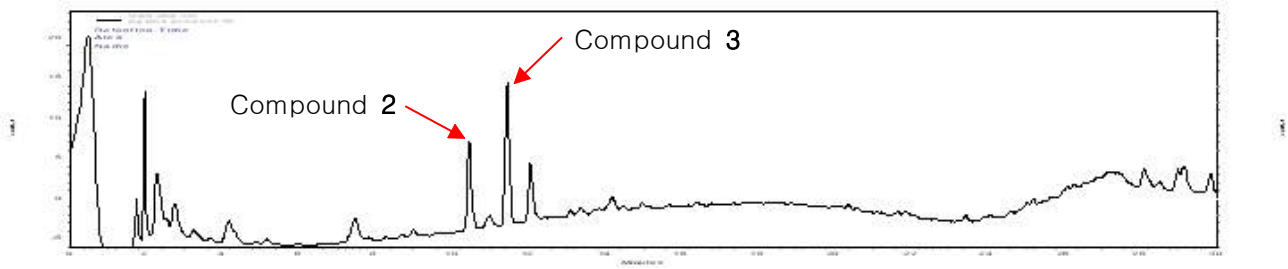
<그림> 식물생장촉진활성: 왼쪽(water), 중간(수확 후 배지 부숙물), 오른쪽(ethyl acetate 층)>

5) 표고버섯 수확 후 배지와 표고버섯 수확 후 배지 부숙물의 methanol 추출물의 비교

앞서 기술한 바와 같이 표고버섯 수확 후 배지 부숙물이 부숙 전의 배지에 비하여 항균활성이 우수하고, 식물생장촉진 활성이 우수하였다. 이를 토대로 본 과제 참여연구팀의 연구회의를 통하여 최종 제품화 소재를 표고버섯 수확 후 배지 부숙물로 결정하였다. 따라서 표고버섯 수확 후 부숙 전 배지와 표고버섯 수확 후 배지 부숙물을 methanol로 추출한 후 부숙과정에 의하여 생성된 주요 화합물의 분석을 수행하였다. 이는 제품의 지표성분 확보를 위하여도 필요한 연구이다. HPLC 분석 결과, retention time 10-15분사이의 peak들이 뚜렷한 차이가 보였다. 특히 표고버섯 수확 후 배지에서는 매우 미량이었으나, 부숙 후에 함량이 크게 증가한 화합물 compound 2와 compound 3을 확인하였으며, 따라서 본 연구에서는 compound 2와 compound 3을 분리, 정제하고 화학구조를 규명하였다



<그림> 표고버섯 수확 후 부숙 전 배지의 methanol 추출물 HPLC profile>

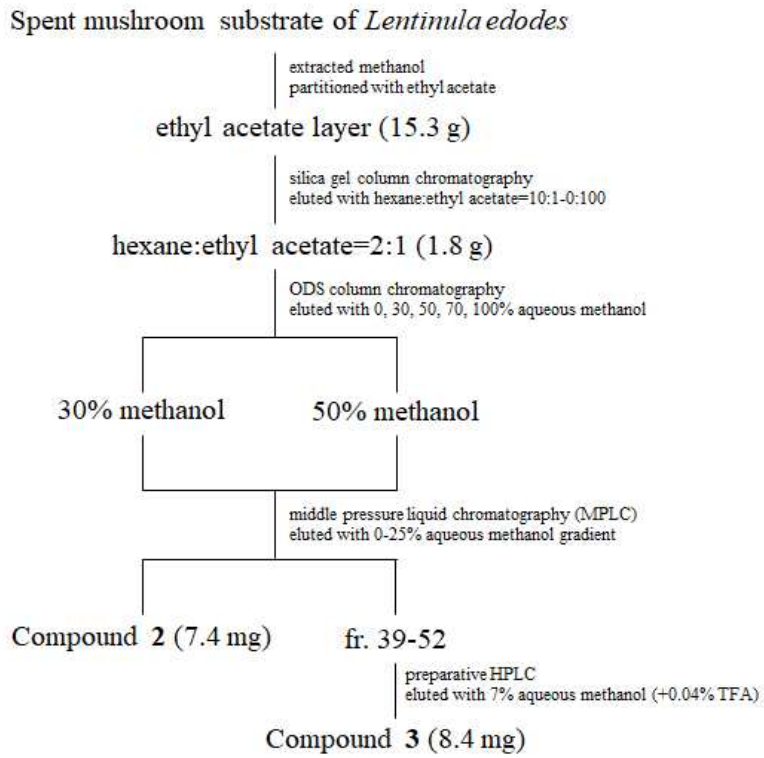


<그림> 표고버섯 수확 후 부숙 후 배지의 methanol 추출물 HPLC profile>

6) 표고버섯 수확 후 배지 부숙물로부터 분리한 compound 2와 3의 정제 및 화학구조 규명

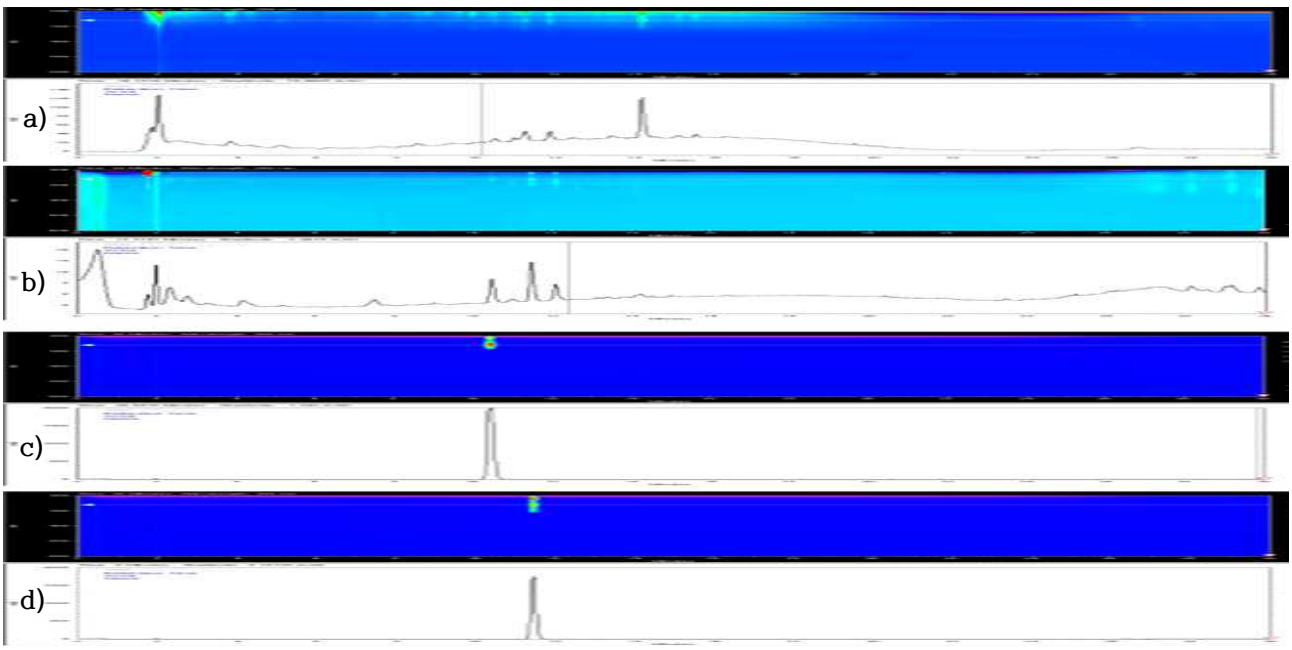
(1) 표고버섯 수확 후 배지 부숙물로부터 compound 2와 3의 분리 및 정제

표고버섯 수확 후 배지 부숙물 약 2.5 kg에 methanol을 가하여 추출하였다. 추출물을 filter paper를 사용하여 여과한 후 여과액을 감압 농축하여 methanol을 제거한 뒤 물과 ethyl acetate를 넣어 분배 추출하였다. Ethyl acetate 층(약 15.1 g)을 감압 농축한 후 hexane : ethyl acetate (10:1→0:100, v/v)를 용출용매로 이용하여 silica gel column chromatography를 수행하였다. 분획물의 HPLC 분석 결과 hexane : ethyl acetate (2:1, v/v) 분획(1.8 g)에서 부숙 전 배지와 차이를 나타내는 peak 즉 compound 2와 3이 관찰되었다. 따라서 이를 감압 농축한 후 0, 30, 50, 70, 100% aqueous methanol을 용출용매로 사용하여 ODS column chromatography를 수행하였다. 각 분획물의 HPLC 분석결과 부숙 전 배지와 차이를 나타내는 compound 2와 compound 3이 30% methanol 분획과 50% methanol 분획에서 관찰되어 두 분획을 합하여 농축한 후 0→100% aqueous methanol gradient를 용출용매로 사용하여 MPLC를 수행하였다. MPLC를 수행한 결과, compound 2 (7.4 mg)를 정제하였고 fr. 39-52를 합쳐 감압농축한 뒤 얻은 분획을 7% aqueous methanol을 용출용매로 사용하여 preparative HPLC를 수행하여 compound 3 (8.4 mg)을 정제하였다. 분리, 정제과정을 아래의 그림에 도시하였다.



<그림> 표고버섯 수확 후 배지 부숙물로부터 compound 2와 3의 분리 및 정제 과정>

표고버섯 수확 후 배지 부숙물과 분리, 정제한 화합물 compound 2와 3을 HPLC 분석을 통하여 비교하였으며, 그 결과 아래의 그림에 나타낸 바와 같이 HPLC retention time이 잘 일치하였다. 이로써 당초 목표한 부숙 후 함량이 크게 증가한 화합물이 정제한 compound 2와 compound 3임을 확인하였으며, 이들 화합물의 화학구조 분석을 수행하였다.

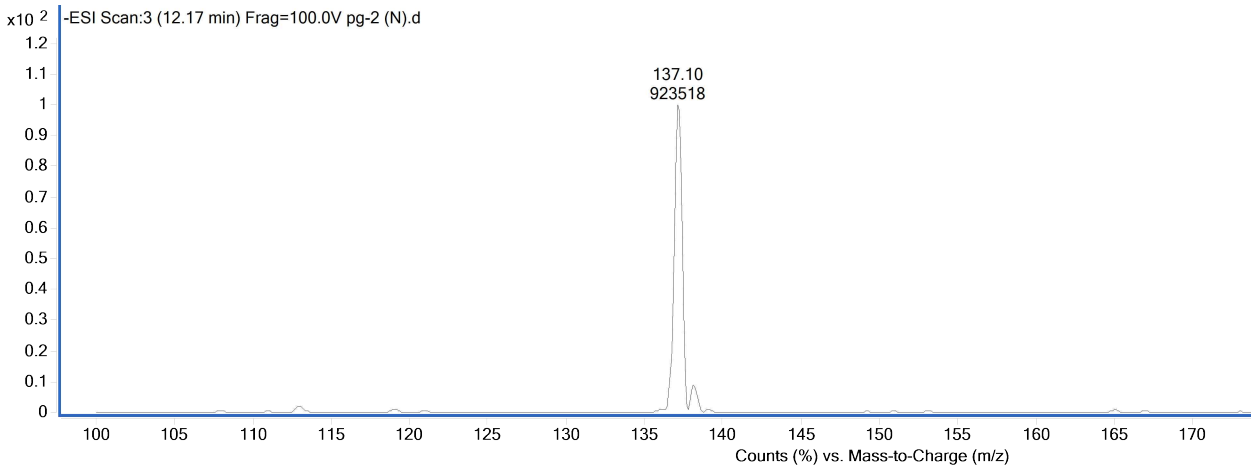


<그림> a: 표고버섯 수확 후 배지의 methanol 추출물, b: 표고버섯 수확 후 배지 부숙물의 methanol 추출물, c: compound 2, d: compound 3의 HPLC profile>

(2) 표고버섯 수확 후 배지 부숙물로부터 분리한 compound **2**의 화학구조 규명

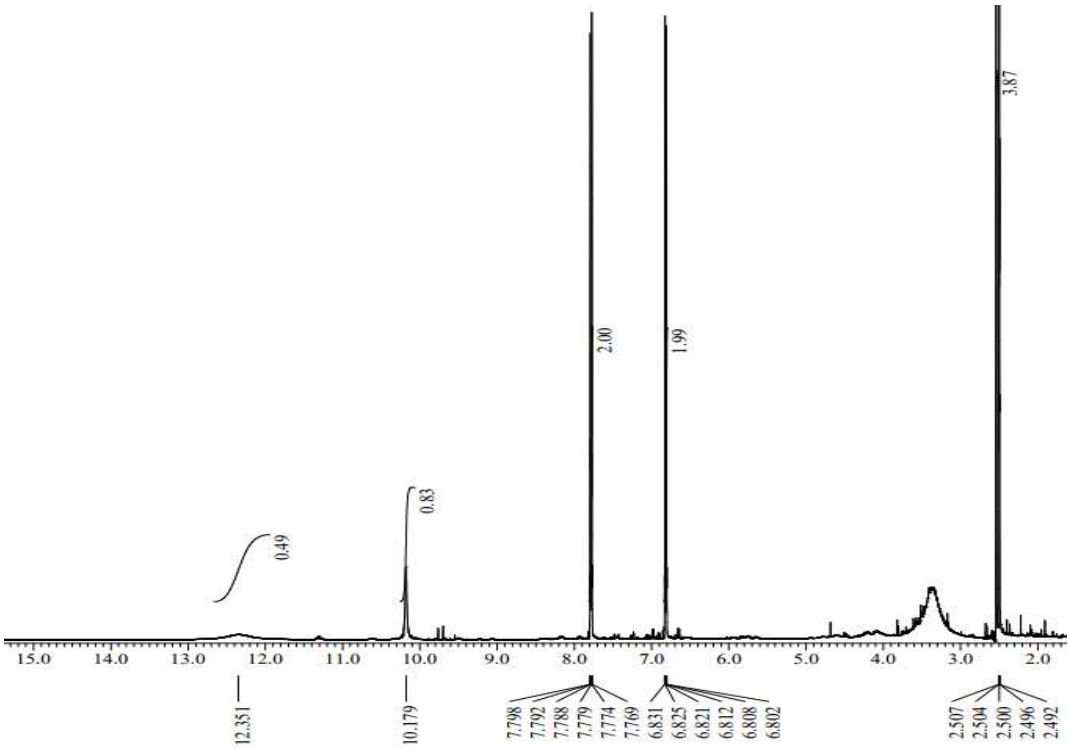
표고버섯 수확 후 배지 부숙물로부터 분리한 Compound **2**의 화학구조를 규명하기 위하여 mass 측정과 NMR 분석을 수행하였다. 분자량을 확인하기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하였고, 화학구조를 결정하기 위하여 DMSO-d_6에 녹인 후 ^{1}H NMR 및 ^{13}C NMR spectrum을 측정하여 해석하였다.

Compound **2**의 ESI-mass spectrum의 측정 및 해석: Compound **2**의 분자량을 알아보기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하여 해석하였다. Negative mode에서 ESI-mass spectrum을 측정한 결과 137.1에서 $[M-H]^-$ 이온피크가 관찰되어 분자량을 138로 확인하였다.



<그림> Compound **2**의 ESI-mass spectrum (negative mode)>

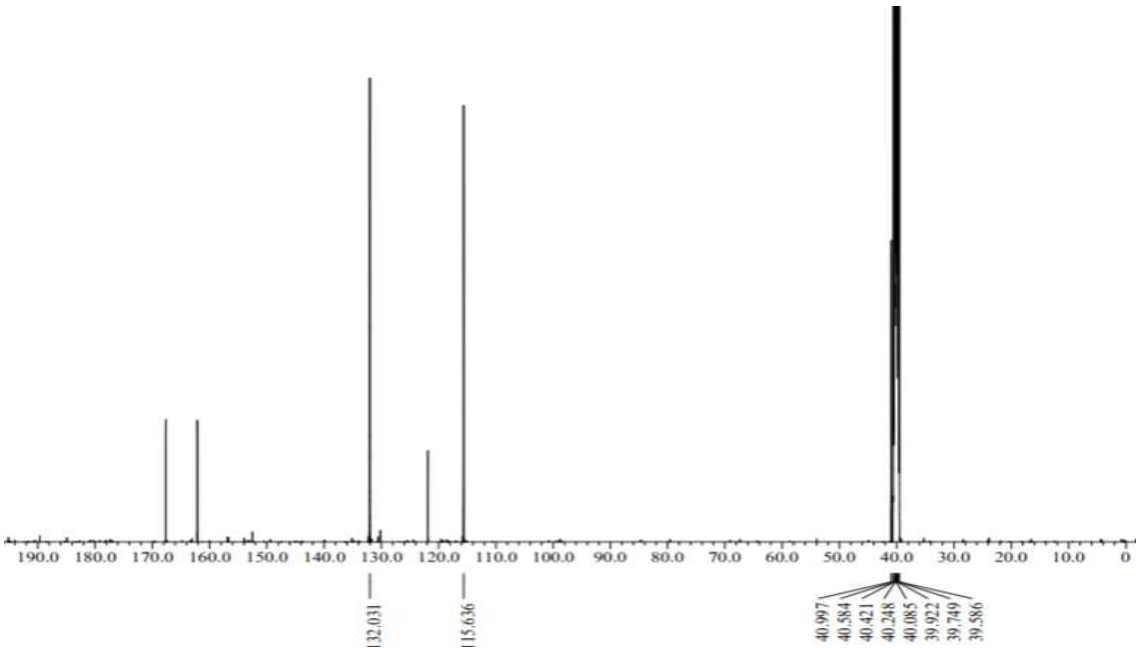
Compound **2**의 ^{1}H NMR spectrum의 측정 및 해석: DMSO-d_6에 녹여 ^{1}H NMR spectrum을 측정한 결과, 12.35 ppm에서 carboxylic acid, 10.18 ppm에서 한 개의 방향족 hydroxyl proton, 7.78, 6.82 ppm에서 네 개의 aromatic methine proton이 관찰되었다. 7.78, 6.82 ppm peak들



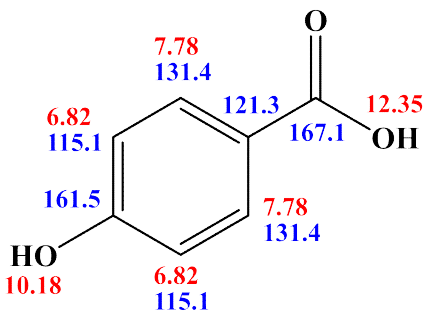
<그림> Compound **2**의 ^{1}H NMR spectrum>

의 적분과 coupling constant로부터 1,4-disubstituted benzene의 존재가 확인되었다. 따라서 본 화합물은 benzene에 한 개의 carboxylic acid, 한 개의 hydroxyl 기가 치환된 구조로 유추되었다.

Compound 2의 ^{13}C NMR spectrum의 측정 및 해석: ^{13}C NMR spectrum을 측정한 결과, 167.1 ppm에서 1개의 carbonyl carbon, 161.5 ppm에서 한 개의 oxygenated sp^2 carbon, 131.4, 115.1 ppm에서 네 개의 sp^2 methine carbon, 121.3 ppm에서 한 개의 sp^2 quaternary carbon이 관찰되었다. 이는 앞에서 언급한 바와 같이 1,4-disubstituted benzene에 한 개의 carboxylic acid와 한 개의 hydroxyl 기가 치환된 구조로 유추되었다. 화학구조를 바탕으로 SciFinder database를 검색한 결과, compound 2의 화학구조를 4-Hydroxybenzoic acid로 결정하였으며 이는 ESI-mass 분석과도 잘 일치하였다.



<그림> Compound 2의 ^{13}C NMR spectrum>

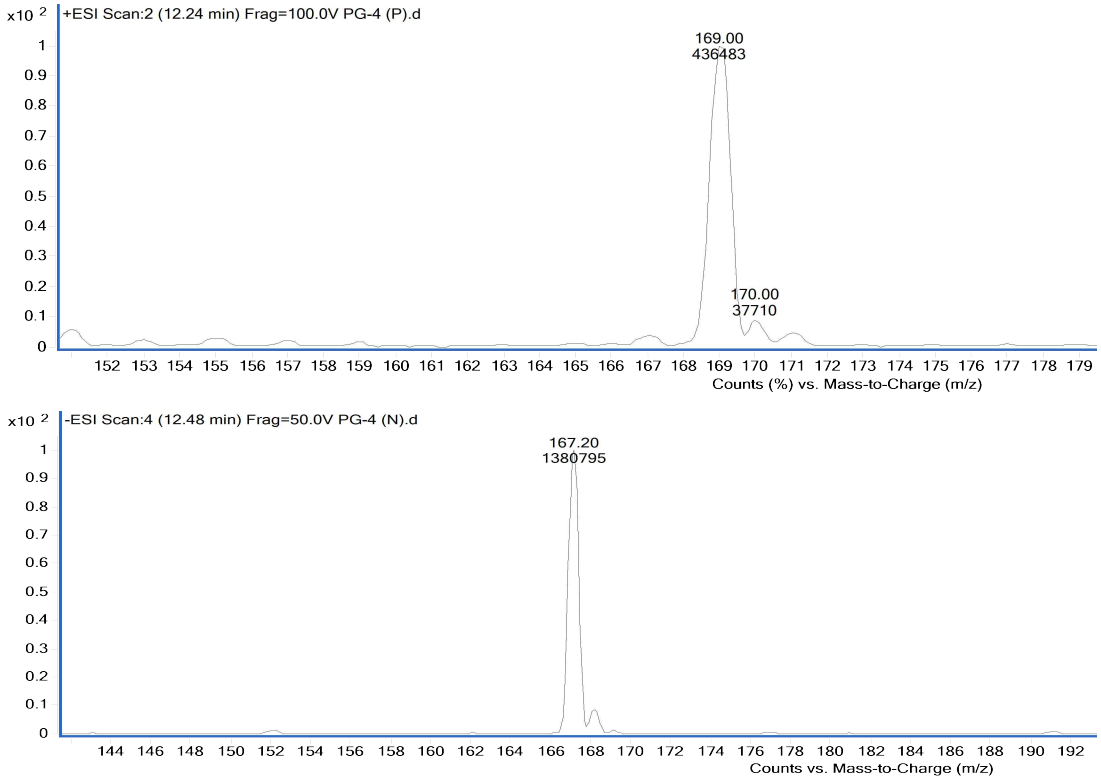


<그림> Compound 2의
^{1}H 및 ^{13}C peak assignment

(3) 표고버섯 수확 후 배지 부숙물로부터 분리한 compound 3의 화학구조 규명

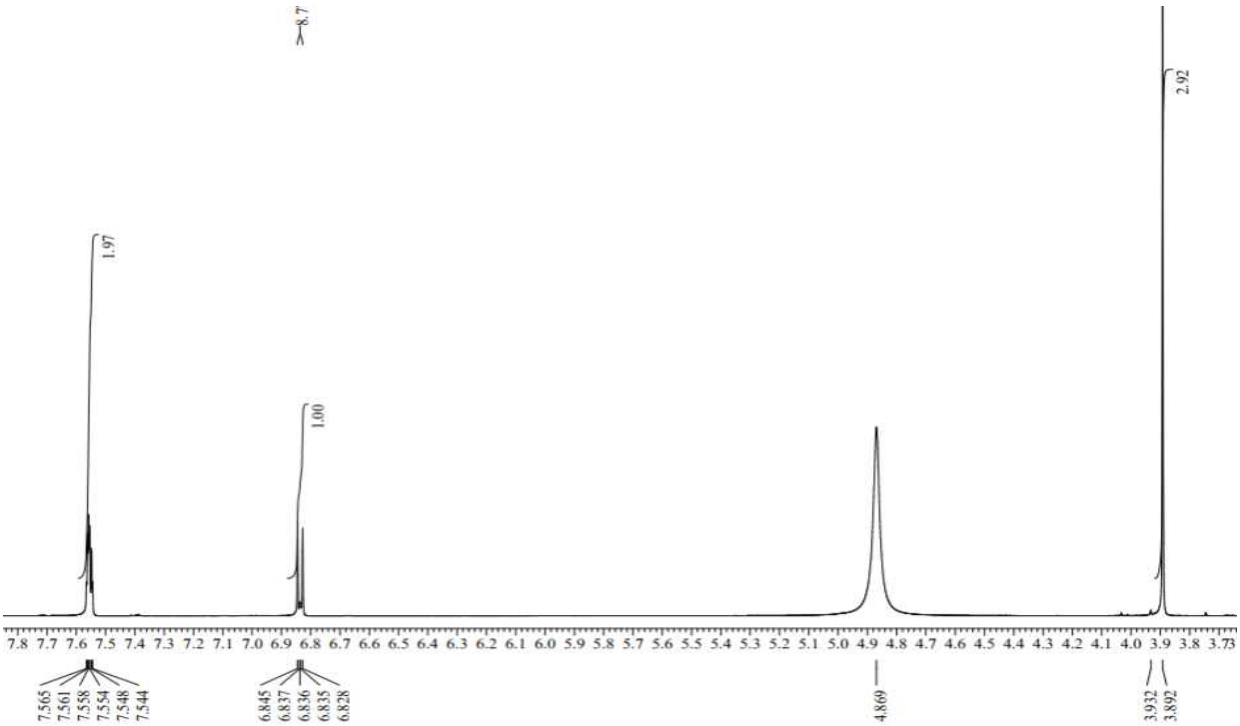
표고버섯 수확 후 배지 부숙물로부터 분리한 Compound 3의 화학구조를 규명하기 위하여 mass 측정과 NMR 분석을 수행하였다. 분자량을 확인하기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하였고, 화학구조를 결정하기 위하여 DMSO-d_6에 녹인 후 ^{1}H NMR, ^{13}C NMR 등의 1차원 NMR과 HMBC 등 2차원 NMR을 측정하여 해석하였다.

Compound **3**의 ESI-mass spectrum의 측정 및 해석: Compound **3**의 분자량을 알아보기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하였다. Positive mode에서 ESI-mass spectrum을 측정한 결과, *m/z* 169에서 $[M+H]^+$ 이온 피크가 관찰되었고, negative mode에서 측정한 결과 *m/z* 167.2에서 $[M-H]^-$ 이온피크가 관찰되어 분자량이 168임을 알았다.



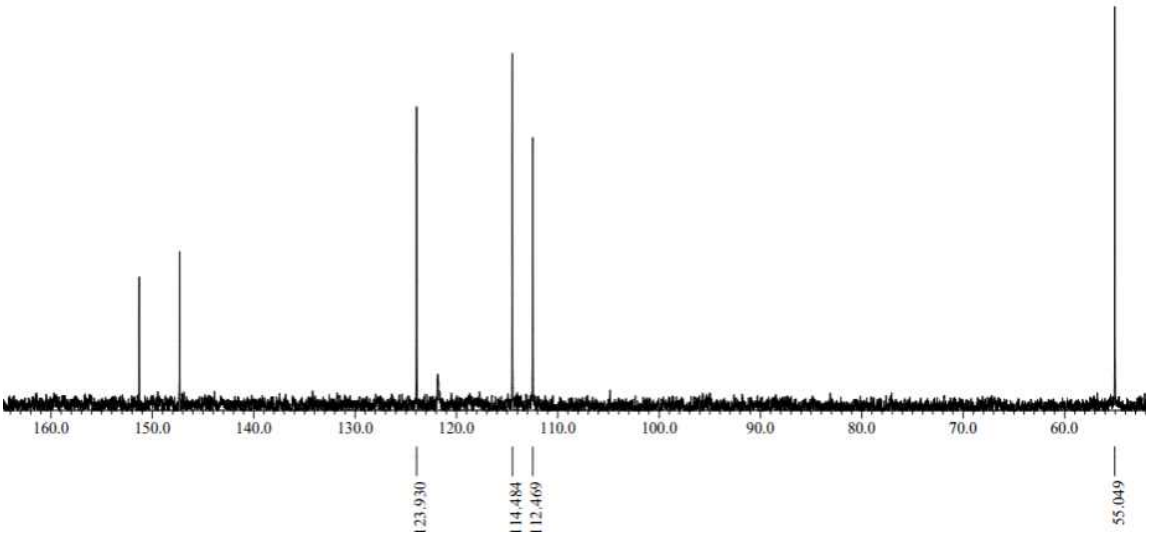
<그림> Compound **3**의 ESI-mass spectra (위: positive mode, 아래: negative mode)

Compound **3**의 ^{1}H NMR spectrum의 측정 및 해석: DMSO-d_6에 녹여 ^{1}H NMR spectrum을 측정한 결과 7.56, 7.55, 6.84 ppm에서 세 개의 aromatic methine proton, 3.89 ppm에서 한 개의 methoxy proton이 관찰되었다.



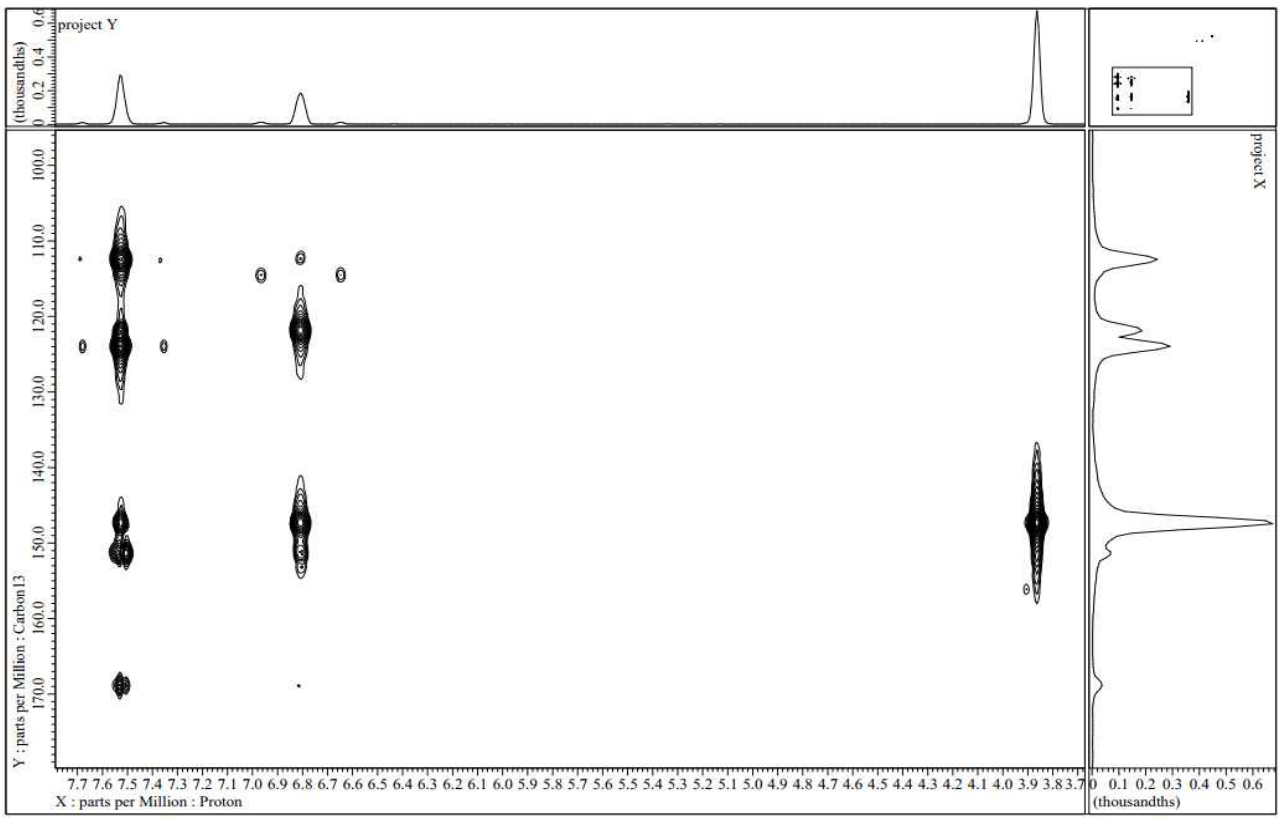
<그림> Compound **3**의 ^{1}H NMR spectrum>

Compound 3의 ^{13}C NMR spectrum의 측정 및 해석: ^{13}C NMR spectrum을 측정한 결과, 170.2 ppm에서 1개의 carbonyl carbon, 152.8, 148.8 ppm에서 두 개의 oxygenated sp^2 carbon, 125.4, 116.0, 114.0 ppm에서 세 개의 sp^2 methine carbon, 56.5 ppm에서 한 개의 methoxy carbon이 관찰되었다.



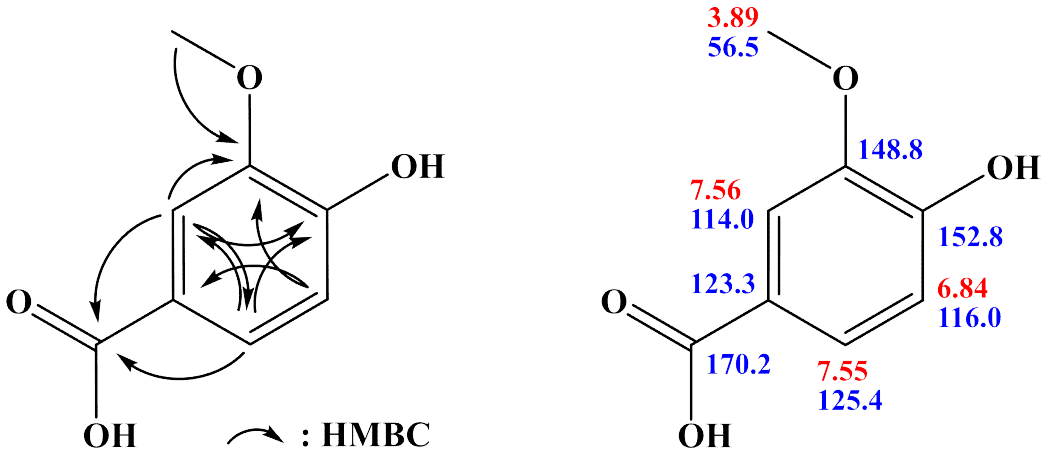
<그림> Compound 3의 ^{13}C NMR spectrum>

Compound 3의 HMBC spectrum의 측정 및 해석: HMBC spectrum을 측정하여 해석한 결과 아래의 그림에 도시한 바와 같이 각각의 proton으로부터 carbon에 관찰된 long-range correlation으로부터 compound 3의 화학구조를 규명하였다. 즉, 7.56 ppm의 methine proton으로부터 170.2, 152.8, 148.8, 125.4, 123.3 ppm의 carbon에, 7.55 ppm의 methine proton으로부터 170.2, 152.8, 123.3, 116.0, 114.0 ppm의 carbon에, 6.84 ppm의 methine proton으로부터 152.8, 148.8, 123.3 ppm의 carbon에 long range correlation이 관찰되었다. 또한, 3.89 ppm의



<그림> Compound 3의 HMBC spectrum

methyl proton으로부터 148.8 ppm의 carbon에 long range correlation이 관찰되어 아래의 그림과 같이 화학구조가 결정되었다. 화학구조를 바탕으로 SciFinder database를 검색한 결과, compound 3의 화학구조를 vanillic acid로 결정하였다.



<그림> Compound 3의 HMBC correlation (좌) 및 ^{1}H, ^{13}C peak assignment (우)>

7) 표고버섯 수확 후 부숙물의 지표성분 분석법 확립 및 시제품을 이용한 시험법 검증

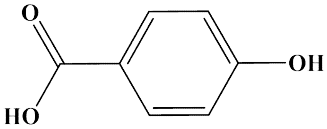
표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물을 활용하여 제조한 제품에 대한 분석법을 확립하기 위하여 compound 2 (4-hydroxybenzoic acid)와 compound 3 (vanillic acid)을 지표성분으로 활용하여 분석법 개발을 수행하였다. 또한 개발된 분석법을 검증하기 위하여 참여기업인 (주)케이글로벌에서 제조한 서로 다른 3개의 표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물 시제품(lot number: 20210722, 20210917, 20211213)을 사용하여 시험법을 검증하였다. 다양한 HPLC 조건을 설정하여 분석을 실시한 결과 4-hydroxybenzoic acid와 vanillic acid를 지표성분으로 한 분석 방법을 확립할 수 있었다.

가) 4-Hydroxybenzoic acid (Compound 2)를 지표성분으로 한 분석법 확립

4-Hydroxybenzoic acid를 지표성분으로 활용하여 분석법을 확립하였으며, 확립한 분석방법을 이용하여 3종의 표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물 시제품의 분석을 수행하여 분석법을 검증하였다.

(1) 4-Hydroxybenzoic acid의 분석법 확립

- 개요

성분명	4-Hydroxybenzoic acid 
Chemical name	4-Carboxyphenol, NSC 4961, *p*-Carboxyphenol *p*-Hydroxybenzoic acid, *p*-Hydroxyl benzoic acid, *p*-Salicylic acid, Parabenzoic acid
Molecular formula	$C_7H_6O_3$
Molecular weight	138.12

항 목	평가 방법	결 과
특이성 (Specificity)	HPLC 분석 시 4-hydroxybenzoic acid와 표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물의 검출시간(Retention time), UV spectrum 검토	o 검출시간 : 약 13.9~14.0 분 o UV spectrum : $\lambda_{max.}$ 약 255 nm 표준용액과 시험용액 일치
직선성 (Linearity)	표준물질에 대한 5개 농도에서 직선성 확인	o 0.425~8.5 mg/L에서 확인 o R^2 : 0.9997

- 분석방법

(장비)

HPLC system HITACHI Chromaster, HITACHI , Japan
Pump 5110, Autosampler 5210

(시약)

4-Hydroxybenzoic acid: Sigma-Aldrich Co., H20059, 99%
Methanol: J.T.Baker, 4L, 9093-68
Trifluoroacetic acid (TFA): ACROS, 139721000

(표준용액의 조제)

표준물질 4-hydrxoybenzoic acid 1.7 mg에 10% 메탄올 수용액 10 ml을 넣어 170 ppm의 농도를 만든 후, 메탄올로 희석(0.425, 0.85, 1.7, 4.25, 8.5 μg/ml)하여 사용함.

(분석조건)

항목	조건
컬럼	입자 5 μm, 직경 4.6 mm × 250 mm, TSKgel ODS-100V, TOSOH, Japan
주입량	5 μl
컬럼 온도	25℃
이동상/유속	A: methanol, B: 3rd distilled water (0.04% TFA) 30% A for 18 mins, 1 ml/min
검출기 파장	255 nm

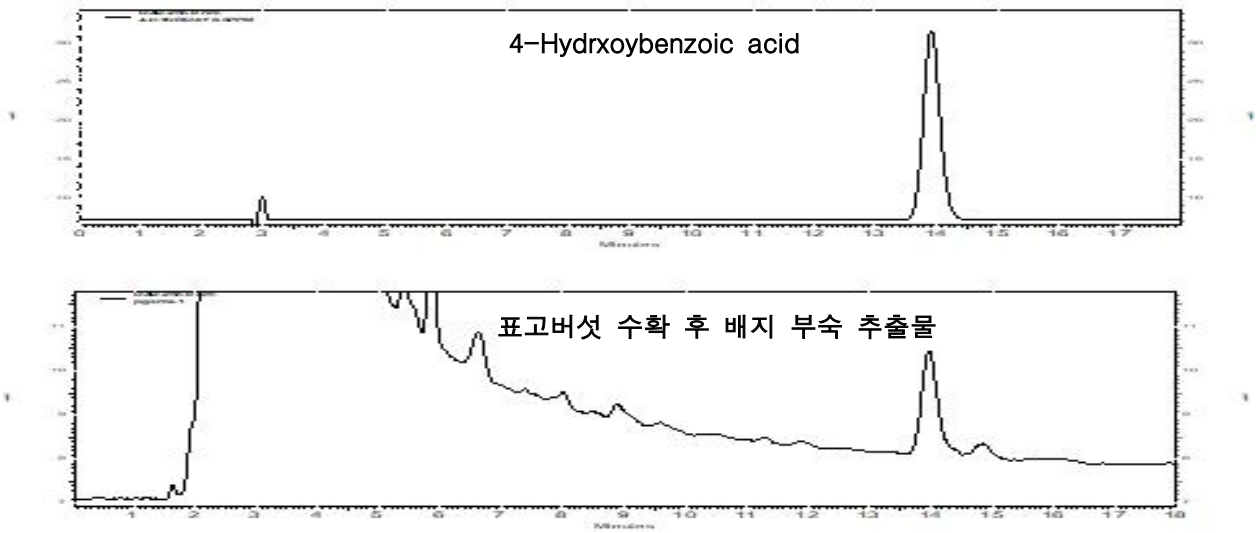
(계산식)

$$\text{함량 (\%)} = \text{검량선결과 (ug/mL)} \times \frac{\text{시험용액 (mL)}}{\text{시료 (mg)}} \times \text{표준품순도 (\%)} \times \frac{1}{1000}$$

(2) 4-Hydrxoybenzoic acid의 분석법 확립 결과

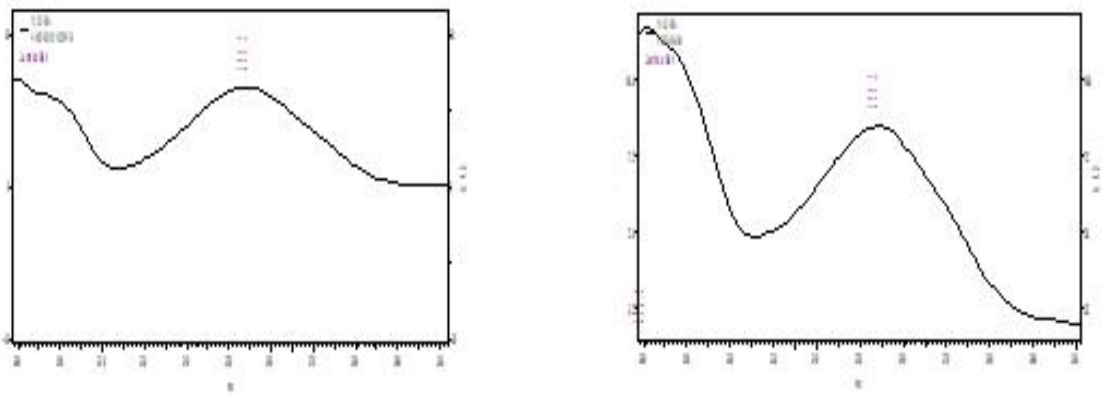
- 특이성(Specificity)

표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물 중 4-hydroxybenzoic acid의 retention time과 peak 분리도 확인: 표준용액 4-hydroxybenzoic acid와 표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물을 분석하여 검출된 peak를 확인하였다. 즉, 4-hydroxybenzoic aicd와 표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물에서 약 13.9분대에 peak가 검출되어 동일한 물질임을 확인하였다. 표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물에서 주변 peak와의 분리가 완전히 이루어짐을 확인할 수 있었다.



<그림> 표준용액과 표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물 중의 4-hydroxybenzoic acid의 HPLC chromatogram>

표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물 중 4-hydroxybenzoic acid의 UV spectrum 확인: 표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물 중 검출된 chromatogram이 4-hydroxybenzoic acid 표준용액과 동일한지 확인하기 위하여 UV spectrum을 확인하였다. 약 13.9 분대 검출된 peak의 UV spectrum을 확인한 결과 255 nm에서 최대 흡광도를 보였으며, 표준용액과 표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물에서 동일한 패턴의 UV spectrum을 나타냄을 확인 하였다.

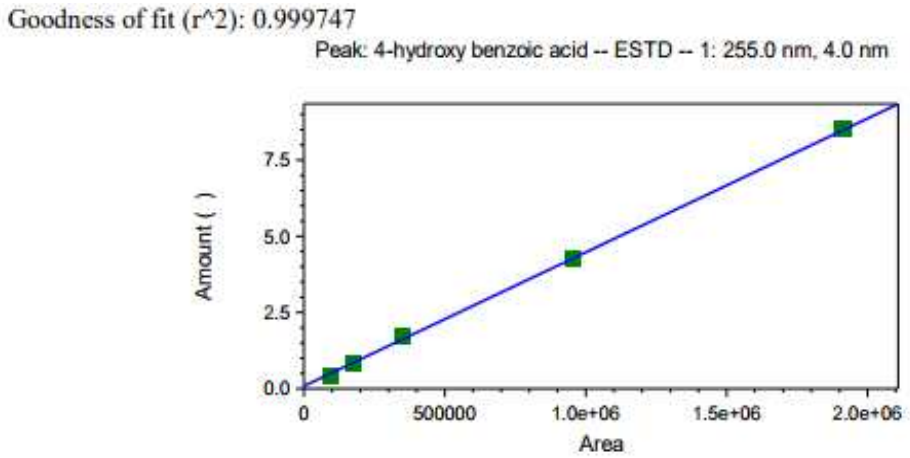


[4-Hydroxybenzoic acid] [표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물]

<4-Hydroxybenzoic acid와 표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물에서 검출된 HPLC 피크의 UV spectrum>

- 직선성 (Linearity)

4-Hydroxybenzoic acid의 검출농도 0.425~8.5 ug/mL 범위에서 3회 반복하여 직선성을 평가하였다. 분석결과 R^2는0.9997, 즉 99.97%의 직선성을 확인할 수 있었다.



<4-Hydroxybenzoic acid의 직선성을 나타낸 calibration curve>

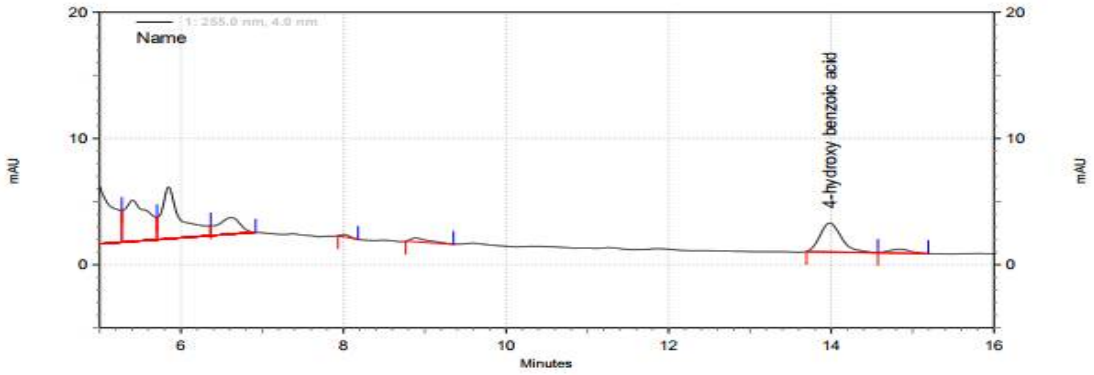
○ 4-Hydroxybenzoic acid (Compound 2)를 지표성분으로 한 분석법 검증

4-Hydroxybenzoic acid를 지표성분으로 활용하여 분석법을 확립하였으며, 확립한 분석방법을 이용하여 (주)케이글로벌에서 제조한 서로 다른 3개의 표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물 시제품(lot number: 20210722, 20210917, 20211213)을 사용하여 분석법을 검증하였다. 그 결과 시제품 lot number 20210722는 평균함량이 0.019%, lot number 20210917은 0.091%, lot number 20211213은 0.173%의 평균함량을 나타내었으며, 반복수에 따라 안정하게 검출됨을 확인하였다. 그러나 제조 lot에 따라 함량의 차이가 매우 달랐으며, 따라서 제조 lot 별 안정한 함량이 되도록 공정의 개선이 필요한 것으로 나타났다.

<3종 시제품의 4-hydroxybenzoic acid의 정량분석 결과>

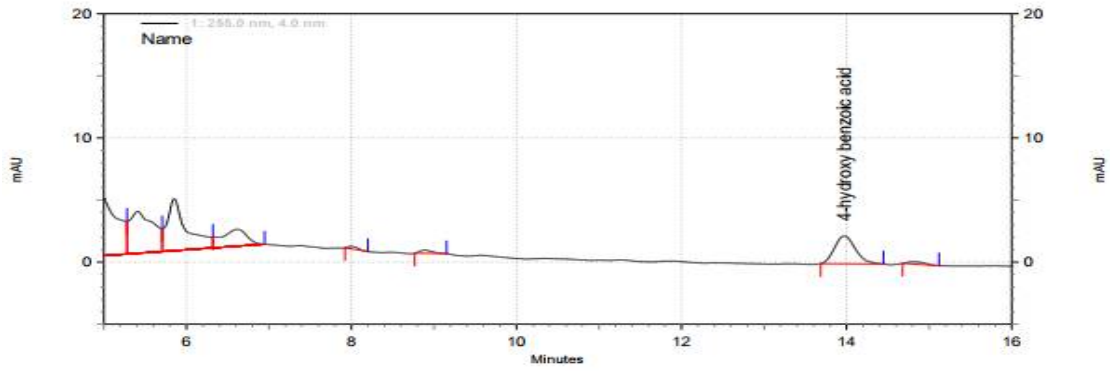
종류	검량선결과 (ug/ml)	최종량 (ml)	시료무게 (mg)	함량 (%)	평균 함량 (%)
Lot No. 20210722-1	0.820	10	9.9621	0.080	0.079±0.003
Lot No. 20210722-2	0.775	10	9.9461	0.076	
Lot No. 20210722-3	0.839	10	9.9968	0.081	
Lot No. 20210917-1	1.219	10	9.9027	0.119	0.119±0.001
Lot No. 20210917-2	1.220	10	9.9122	0.119	
Lot No. 20210917-3	1.217	10	10.0289	0.118	
Lot No. 20211213-1	0.311	10	9.9823	0.030	0.03±0.001
Lot No. 20211213-2	0.300	10	9.9982	0.029	
Lot No. 20211213-3	0.305	10	10.1234	0.029	

<Lot number 20210722>



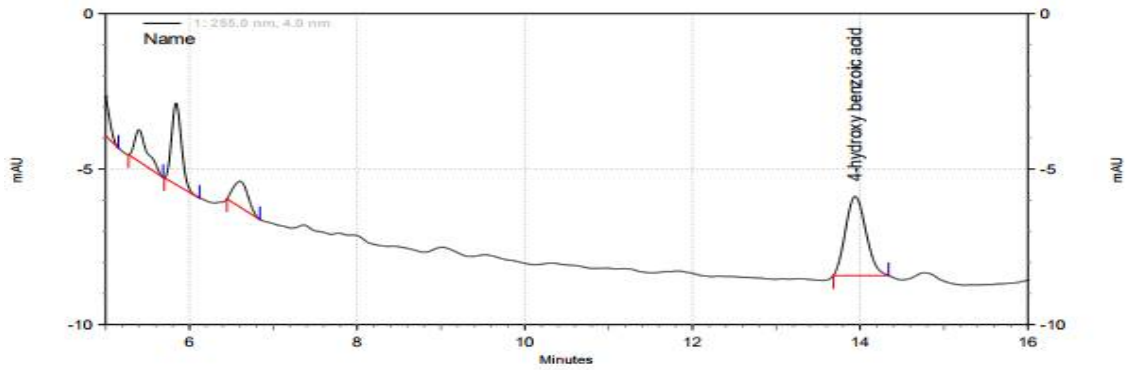
1: 255.0 nm, 4.0 nm Results

Name	Retention Time	Area	Area %	ppm
4-hydroxy benzoic acid	13.980	167743	0.51	**0.820**



1: 255.0 nm, 4.0 nm Results

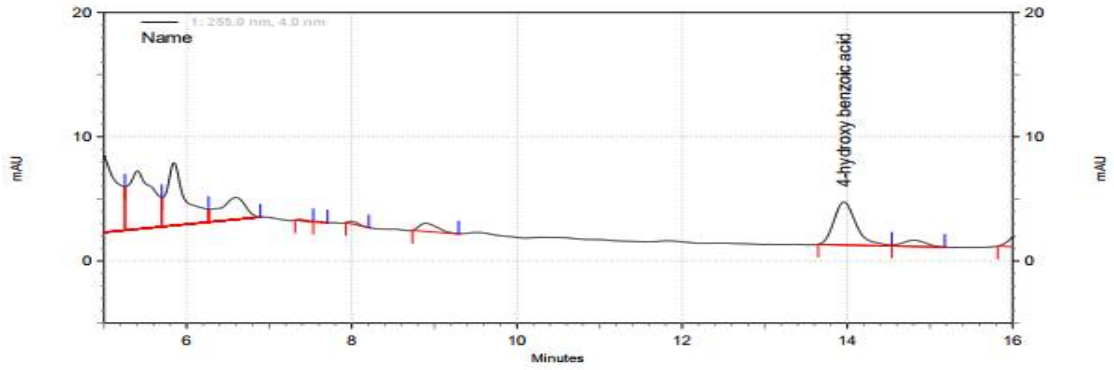
Name	Retention Time	Area	Area %	ppm
4-hydroxy benzoic acid	13.973	157365	0.79	**0.775**



1: 255.0 nm, 4.0 nm Results

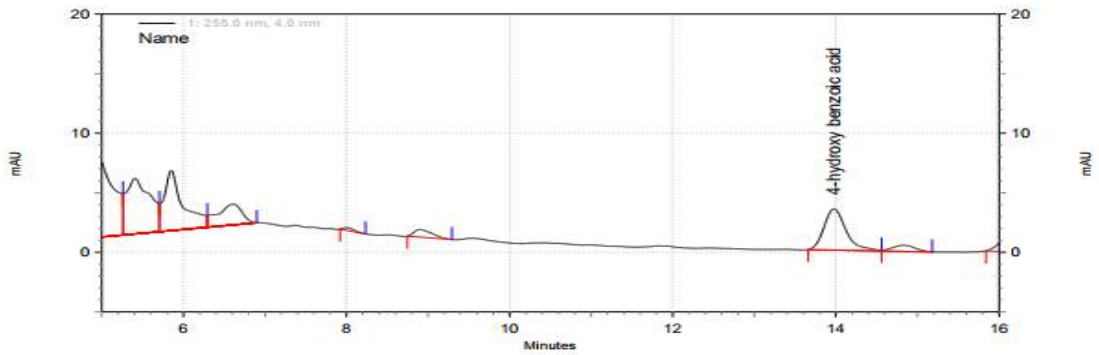
Name	Retention Time	Area	Area %	ppm
4-hydroxy benzoic acid	13.940	172088	0.95	**0.839**

<Lot number 20210917>



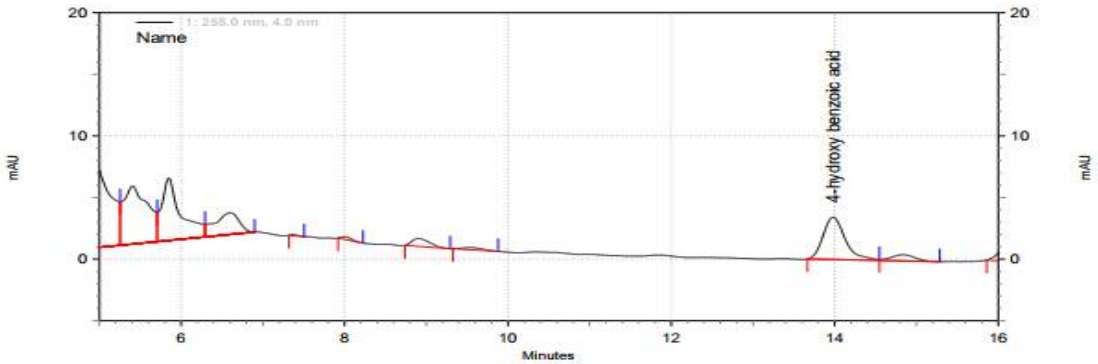
1: 255.0 nm, 4.0 nm Results

Name	Retention Time	Area	Area %	ppm
4-hydroxy benzoic acid	13.960	258437	1.06	**1.219**



1: 255.0 nm, 4.0 nm Results

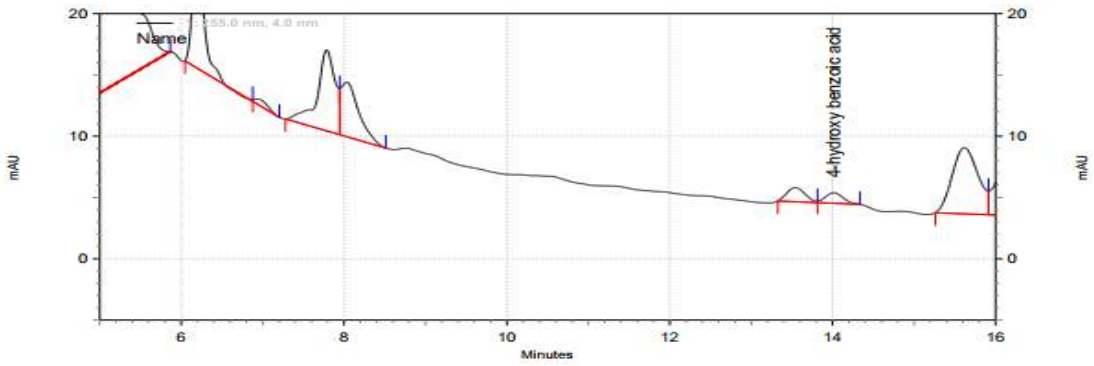
Name	Retention Time	Area	Area %	ppm
4-hydroxy benzoic acid	13.973	258644	1.04	**1.220**



1: 255.0 nm, 4.0 nm Results

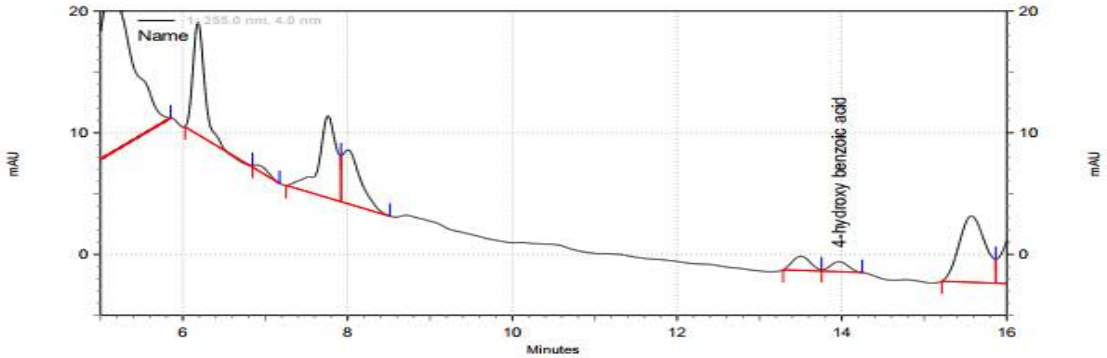
Name	Retention Time	Area	Area %	ppm
4-hydroxy benzoic acid	13.980	258153	1.06	**1.217**

<Lot number 20211213>



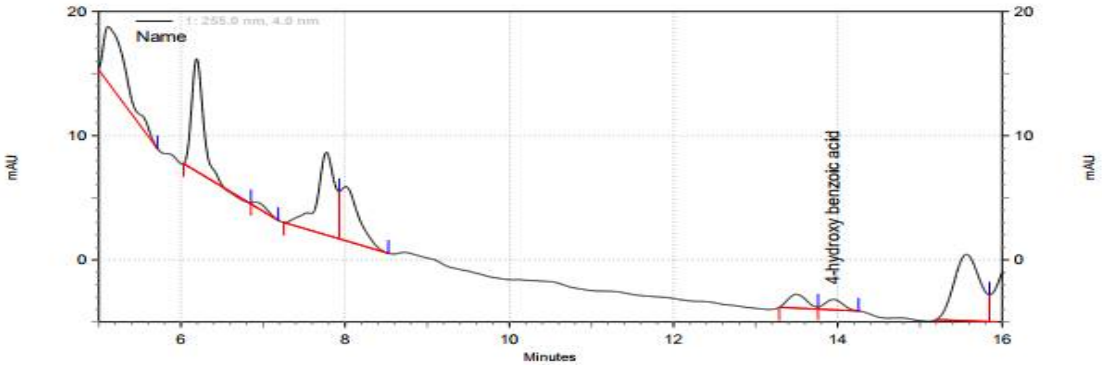
1: 255.0 nm, 4.0 nm Results

Name	Retention Time	Area	Area %	ppm
4-hydroxy benzoic acid	14.013	51689	0.02	**0.311**



1: 255.0 nm, 4.0 nm Results

Name	Retention Time	Area	Area %	ppm
4-hydroxy benzoic acid	13.967	49203	0.01	**0.300**



1: 255.0 nm, 4.0 nm Results

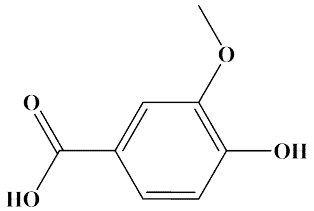
Name	Retention Time	Area	Area %	ppm
4-hydroxy benzoic acid	13.940	50485	0.02	**0.305**

○ Vanillic acid (Compound 3)를 지표성분으로 한 분석법 확립

Vanillic acid를 지표성분으로 활용하여 분석법을 확립하였으며, 확립한 분석방법을 이용하여 3종의 표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물 시제품의 분석을 수행하여 분석법을 검증하였다.

(1) Vanillic acid의 분석법 확립

- 개요

성분명	Vanillic acid 
Chemical name	2-Methoxy-4-carboxyphenol, 3-Methoxy-4-hydroxybenzoic acid, 4-Carboxyl-2-methoxyphenol, Methylprotocatechuic acid, *m*-Methoxy-*p*-hydroxybenzoic acid, NSC 3987, NSC 674322
Molecular formula	$C_8H_8O_4$
Molecular weight	168.15

항 목	평가 방법	결 과
특이성 (Specificity)	HPLC 분석 시 vanillic acid와 표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물의 검출시간(Retention time), UV spectrum 검토	o 검출시간 : 약 28.5~28.7 분 o UV spectrum : $\lambda_{max.}$ 약 262 nm 표준용액과 시험용액 일치
직선성 (Linearity)	표준물질에 대한 5개 농도에서 직선성 확인	o 0.625~12.5 mg/L에서 확인 o R^2 : 0.9998

- 분석방법

(장비)

HPLC system HITACHI Chromaster, HITACHI , Japan
Pump 5110, Autosampler 5210,
Column Oven 5310, Diode Array Detector

(시약)

Vanillic acid: Sigma-Aldrich Co., H36001, 97%
Methanol: J.T.Baker, 4L, 9093-68
Trifluoroacetic acid (TFA): ACROS, 139721000

(표준용액의 조제)

표준물질 vanillic acid 2.5 mg에 10% 메탄올 수용액 10 ml을 넣어 250 ppm의 농도를 만든 후, 메탄올로 희석(0.625, 1.25, 2.5, 6.25, 12.5 μg/ml)하여 사용함.

(분석조건)

항목	조건
컬럼	입자 5 μm, 직경 4.6 mm × 250 mm, TSKgel ODS-100V, TOSOH, Japan
주입량	5 μl
컬럼 온도	25℃
이동상/유속	A: acetonitrile, B: 3rd distilled water (0.04% TFA) 10% A for 30 mins, 1 ml/min
검출기 파장	262 nm

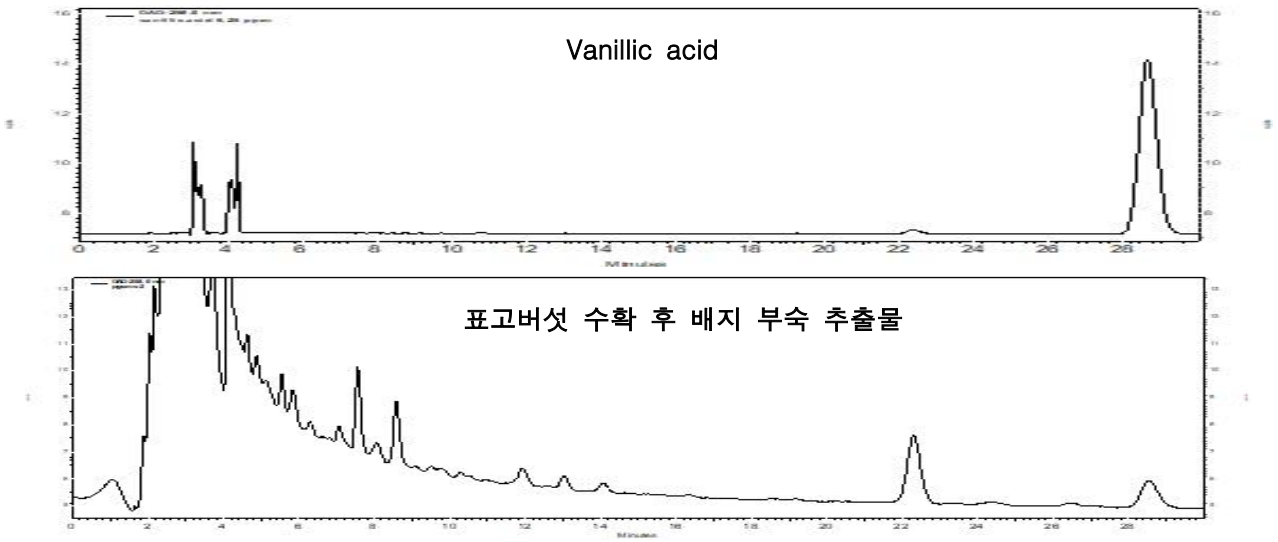
(계산식)

$$\text{함량 (\%)} = \text{검량선결과 (ug/mL)} \times \frac{\text{시험용액 (mL)}}{\text{시료 (mg)}} \times \text{표준품순도 (\%)} \times \frac{1}{1000}$$

(3) Vanillic acid의 분석법 확립 결과

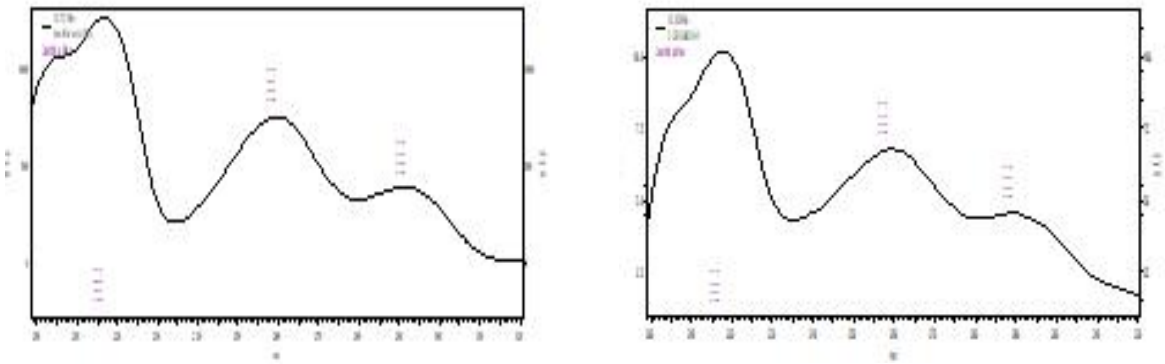
- 특이성(Specificity)

표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물 중 vanillic acid의 retention time과 peak 분리도 확인: 표준용액 vanillic acid와 표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물을 분석하여 검출된 peak를 확인하였다. 즉, vanillic acid와 표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물에서 약 28.6분대에 peak가 검출되어 동일한 물질임을 확인하였다. 또한, 표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물에서 주변 peak와의 분리가 완전히 이루어짐을 확인할 수 있었다.



<그림> 표준용액과 표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물중의 vanillic acid의 HPLC chromatogram

표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물 중 vanillic acid의 UV spectrum 확인: 표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물 중 검출된 chromatogram이 vanillic acid 표준용액과 동일한지 확인하기 위하여 UV spectrum을 확인하였다. 약 28.6 분대에서 검출된 peak의 UV spectrum을 확인한 결과 262 nm에서 최대 흡광도를 보였으며, 표준용액과 표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물에서 동일한 패턴의 UV spectrum을 나타냄을 확인하였다.

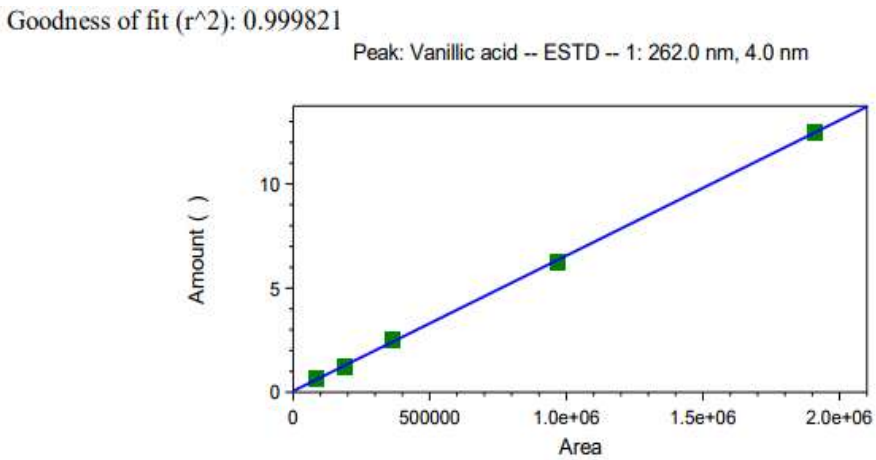


[Vanillic acid] [표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물]

<그림> Vanillic acid와 표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물에서 검출된 HPLC 피크의 UV spectrum

- 직선성 (Linearity)

Vanillic acid의 검출농도 0.625~12.5 ug/mL 범위에서 3회 반복하여 직선성을 평가하였다. 분석결과 R^2는0.9998, 즉 99.98%의 직선성을 확인할 수 있었다.



<그림> Vanillic acid의 직선성을 나타낸 calibration curve

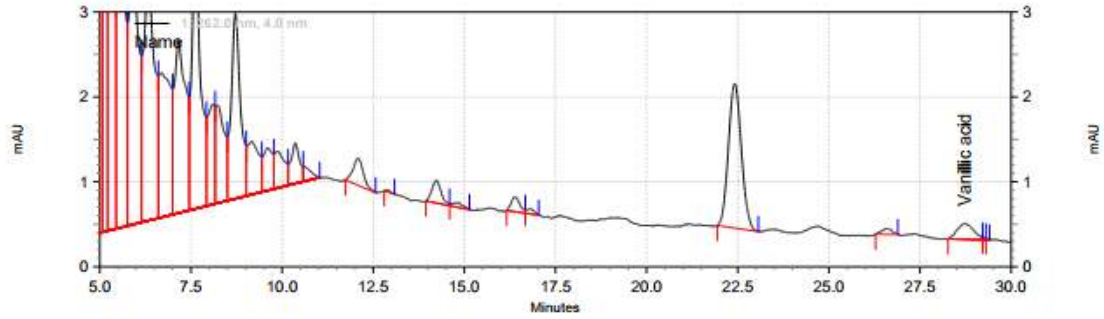
나) Vanillic acid (Compound **3**)를 지표성분으로 한 분석법 검증

Vanillic acid를 지표성분으로 활용하여 분석법을 확립하였으며, 확립한 분석방법을 이용하여 (주)케이글로벌에서 제조한 서로 다른 3개의 표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물 시제품(lot number: 20210722, 20210917, 20211213)을 사용하여 분석법을 검증하였다. 그 결과 시제품 lot number 20210722는 평균함량이 0.019%, lot number 20210917은 0.091%, lot number 20211213은 0.173%의 평균함량을 나타내었으며, 반복수에 따라 안정하게 검출됨을 확인하였다. 그러나 vanillic acid 또한 제조 lot에 따라 함량의 차이가 매우 달랐으며, 따라서 제조 lot 별 안정한 함량이 되도록 공정의 개선이 필요한 것으로 나타났다.

<3종 시제품의 vanillic acid 정량분석 결과>

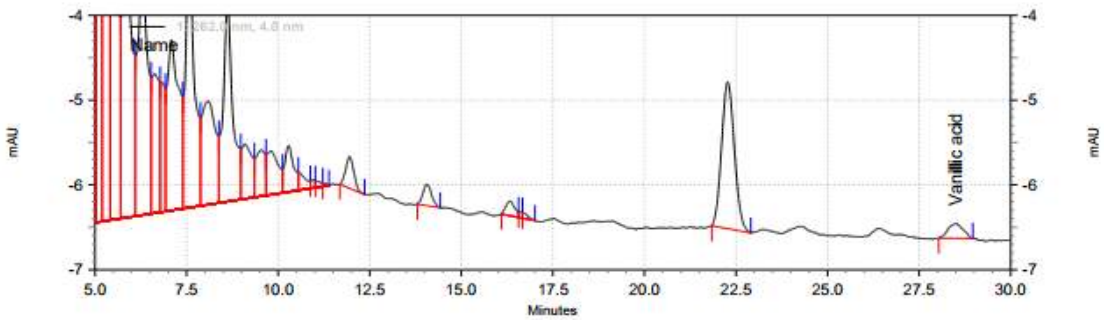
종류	검량선결과 (ug/ml)	최종량 (ml)	시료무게 (mg)	함량 (%)	평균 함량 (%)
Lot No. 20210722-1	0.200	10	9.9621	0.020	0.019±0.001
Lot No. 20210722-2	0.176	10	9.9461	0.018	
Lot No. 20210722-3	0.190	10	9.9968	0.019	
Lot No. 20210917-1	0.921	10	9.9027	0.092	0.091±0.001
Lot No. 20210917-2	0.895	10	9.9122	0.090	
Lot No. 20210917-3	0.911	10	10.0289	0.090	
Lot No. 20211213-1	1.764	10	9.9823	0.176	0.173±0.003
Lot No. 20211213-2	1.743	10	9.9982	0.173	
Lot No. 20211213-3	1.732	10	10.1234	0.170	

<Lot number 20210722>



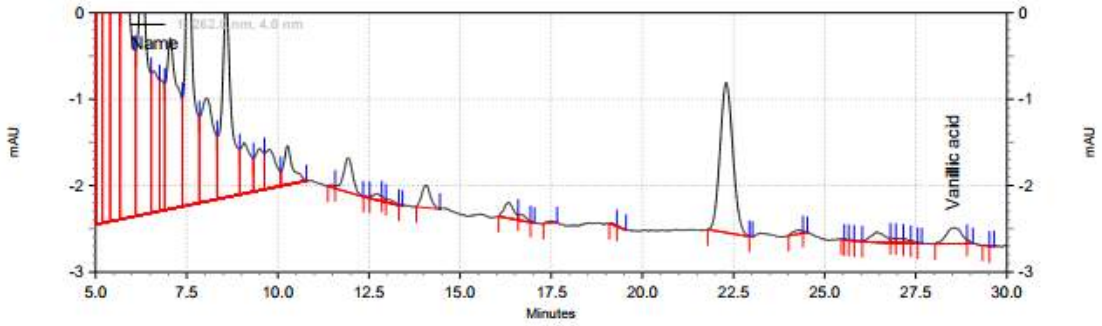
1: 262.0 nm, 4.0 nm Results

Name	Retention Time	Area	Area %	ppm
Vanillic acid	28.727	23339	0.03	**0.200**



1: 262.0 nm, 4.0 nm Results

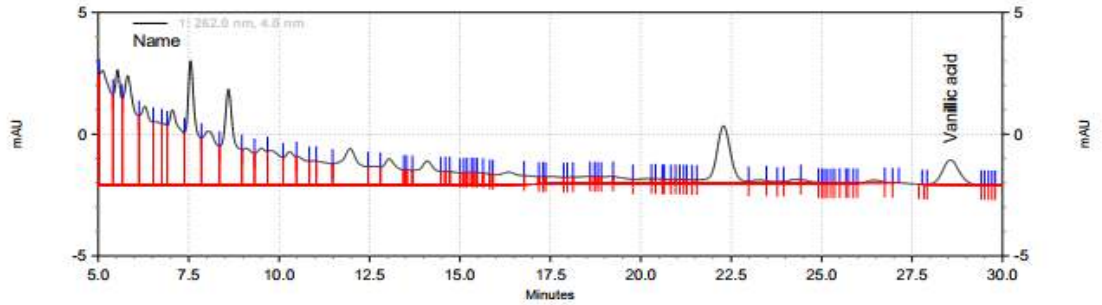
Name	Retention Time	Area	Area %	ppm
Vanillic acid	28.507	19651	0.09	**0.176**



1: 262.0 nm, 4.0 nm Results

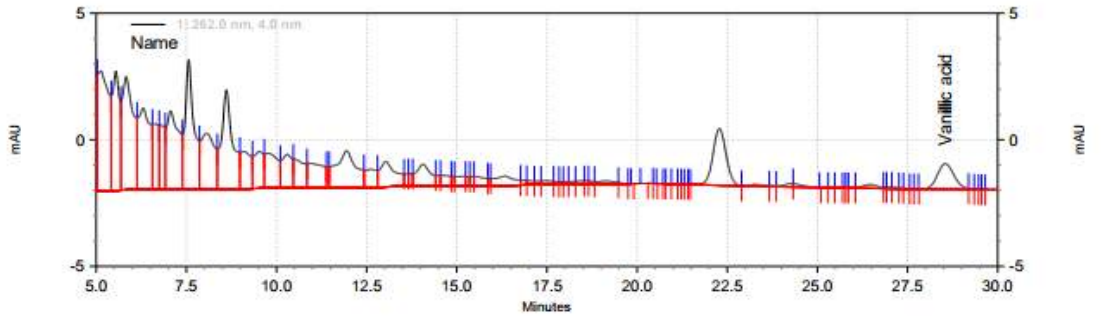
Name	Retention Time	Area	Area %	ppm
Vanillic acid	28.513	21726	0.10	**0.190**

<Lot number 20210917>



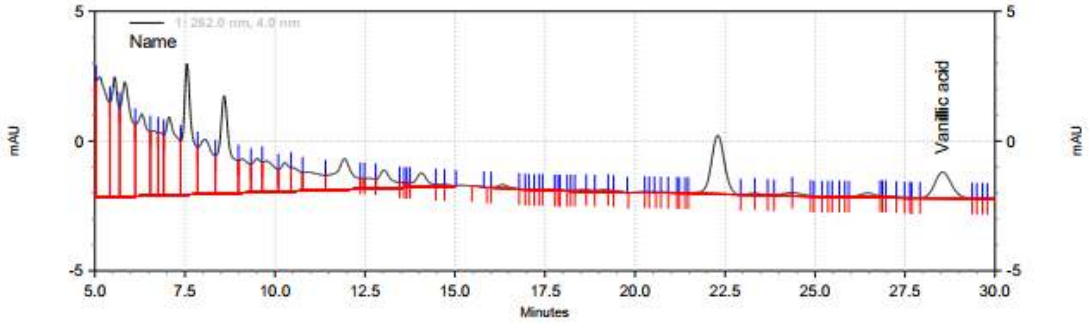
1: 262.0 nm, 4.0 nm Results

Name	Retention Time	Area	Area %	ppm
Vanillic acid	28.560	134083	0.43	**0.921**



1: 262.0 nm, 4.0 nm Results

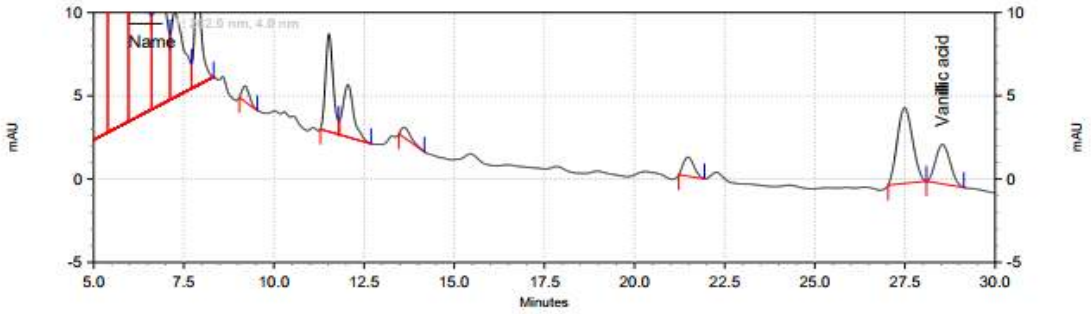
Name	Retention Time	Area	Area %	ppm
Vanillic acid	28.547	130171	0.44	**0.895**



1: 262.0 nm, 4.0 nm Results

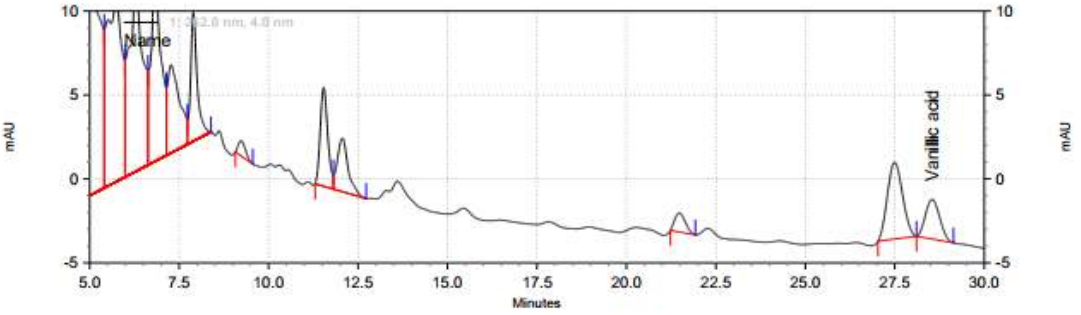
Name	Retention Time	Area	Area %	ppm
Vanillic acid	28.540	132546	0.47	**0.911**

<Lot number 20211213>



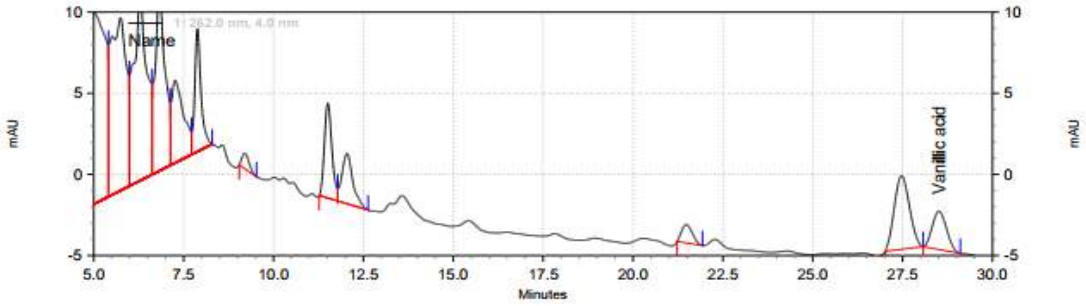
1: 262.0 nm, 4.0 nm Results

Name	Retention Time	Area	Area %	ppm
Vanillic acid	28.540	263855	0.05	**1.764**



1: 262.0 nm, 4.0 nm Results

Name	Retention Time	Area	Area %	ppm
Vanillic acid	28.547	260511	0.05	**1.743**



1: 262.0 nm, 4.0 nm Results

Name	Retention Time	Area	Area %	ppm
Vanillic acid	28.513	258863	0.05	**1.732**

<제2협동과제: 시제품생산 및 안정성 평가(케이글로벌) >

본 과제의 연구목표는 주관과제와 제 1 협동기관의 유효 산물을 바탕으로 산업화 제형을 만들고 시제품의 안정성을 보장하기 위하여 유기농자재 기준에 합당한 독성, 중금속, 농약잔유성, 유해미생물에 대한 검정을 인증기관과 협조하여 수행 하며 최종적으로 얻어진 시제품을 활용하여 얻어진 유효효과를 포장실증 시험과 주관과제의 협조를 얻어 최종 성능시험을 수행 하여 본 연구의 최종 목표인 친 환경 복합 제재 개발을 완성 하는데 있다.

<그림> 시제품 제조공정

1) 부숙재료 성분검사

버섯재배농가로부터 표고버섯, 노루궁뎅이버섯, 송화버섯, 느타리버섯, 새송이버섯을 각각 유상 또는 무상으로 분양받아 특성을 살표보기위하여 부숙전에 비료성분을 분석한 결과(표1) 비분(NPK)의 합이 표고버섯SMS에서 3.36으로 제일 높았고 그다음이 송화버섯SMS에서 2.15, 노루궁뎅이버섯SMS 2.03, 새송이SMS 1.74, 느타리SMS 0.76순이었다.

<표>. 부숙전 SMS의 비료성분 분석 (5/18)>

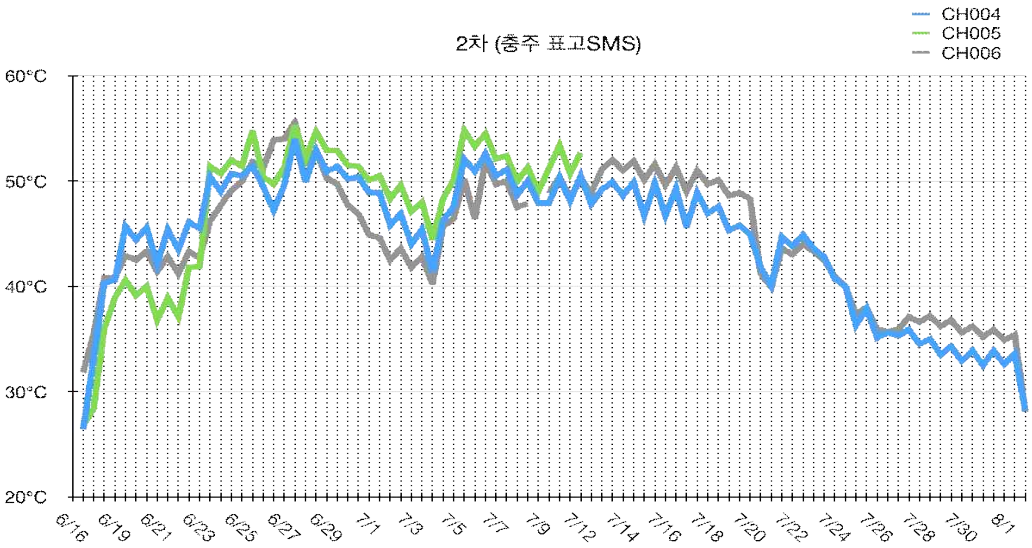
분석항목	SMS재료명				
	표고	노루궁뎅이	송화	느타리	새송이
질소전량	1.01	0.74	0.77	0.45	0.99
인산전량	1.50	0.78	0.76	0.10	0.36
칼리전량	0.85	0.51	0.62	0.21	0.39
합계	3.36	2.03	2.15	0.76	1.74

2) 버섯수확후배지 부숙시험

각각의 SMS를 부숙전 분석결과에따라 비료성분이 높게나온 표고버섯SMS와 표고버섯SMS+노루궁뎅이버섯SMS를 부숙하였다. 표고버섯SMS는 충주신니버섯농가로부터 분양받았으며 약 수확후 3개월정도 야적상태로 보관된 것으로 어느정도 자연상태에서 부숙이 진행되었다. SMS를 파쇄기로 잘게 부순다음 6월16일에 부숙실에 투입하였다. 부숙실은 50ml 두께의 샌드위치 판넬을 이용하여 가로2m 세로2m의 덮개와 출입문이 있는 챔버를 만들고 호기성발효를 위하여 3마력 콤프레샤를 이용하여 1일 6회공기를 주입할 수 있는 타이머 설치가 된 6개의 관을 챔버 바닥에 시설을 하여 제작하였다(그림1).이렇게 제작된 부숙실에 준비된 표고SMS를 챔버에 채운 높이는 48cm로 1.92루베였다. 시료는 약 3개월 된 건조한 상태의 것으로 투입시 약 50리터의 물을 공급하였으며 이후 6/24일 60리터, 7/9일 30리터, 7/12일 20리터, 7/20일 17리터의 물을 수시로 공급하였다. 뒤집기는 6/26, 7/4, 7/12, 7/20, 7/26일 까지 약 일주일간격으로 5회 하였다. 8/2일 최종 부숙종료하였다. 부숙기간은 약 47일이었으며 부숙기간중에 최고온도는 부숙시작후 13일째되는 6/29일 54.7℃를 보였으며 이후 조금씩 떨어지기 시작해서 8/2일 상온 28도씨가 떨어져 부숙완료를 하였다. 전체적인 온도변화는 그림2와 같다. 부숙 완료 후 후숙실로 옮긴 후에 관찰한 결과 후숙 중에 온도가 50℃이상 다시 오르는 것으로 보아 충분한 부숙이 완료되지 않은 것으로 판단하였다. 따라서 부숙이 완료되었다고 판단하여도 후숙 과정을 거쳐 온도의 변화로서 미부숙상태를 해소해야 할 것으로 보인다.버섯의 종류별로 부숙온도가 다소 상이 하게 나타나는데 표고버섯SMS는 60℃를 넘지 않았으나 노루궁뎅이버섯SMS 부숙시에는 부숙3일째부터 60℃를 넘기 시작하고 적게는 3일 동안 많게는 2주일 정도 지속되었다 .

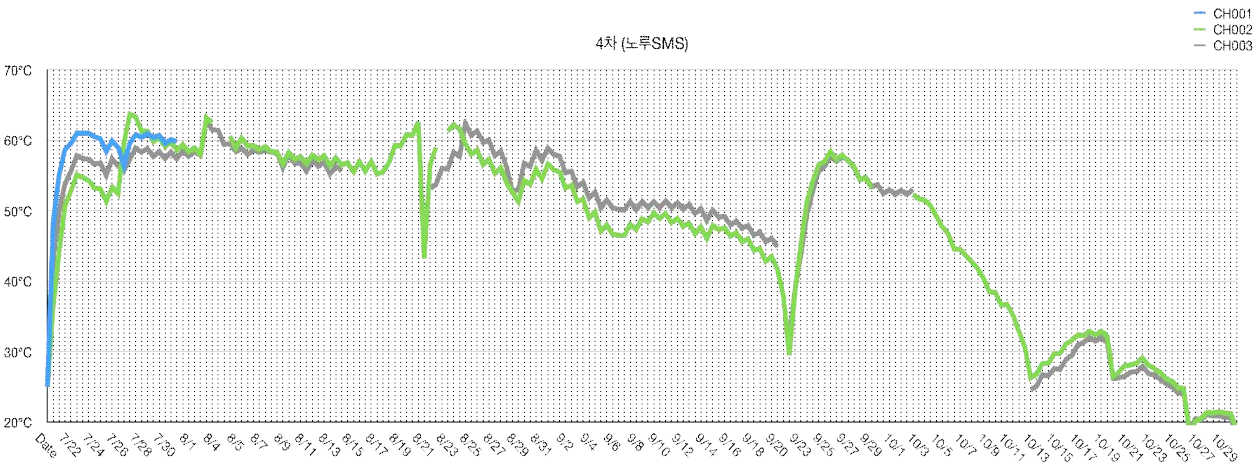
<그림> 본 연구에 사용된 부숙시설

반면에 느타리버섯SMS는 부숙3일부터 50℃를 넘긴이후 30여일동안 50℃ 후반을 유지하며 60도씨를 넘기지는 않았다. 새송이버섯SMS는 온도 상승율이 가장 느린데 부숙 10일 되어서야 50도씨를 넘어섰고 20일간을 50℃ 초반에 머물러 있었으며 3개월 이상의 부숙기간이 필요하였으며 부숙후 지렁이의 다량발생 되어 문제점으로 지적 되었다. 새송이 버섯SMS는 부숙 일주일 후부터 고온 상승하여 58-60℃사이의 고온 부숙 기간이 70일동안 지속 되다가 부숙온도가 떨어지고 최종적으로 100일 이상 부숙 과정이 필요 하였다. 느타리버섯과 새송이 버섯의 장기적인 부숙기간은 SMS내에 분해되지 않은 배지가 다량 잔존 하고 있는 것으로 예측 되었다. 국내 느타리버섯과 새송이버섯은 대규모 자동화시스템으로 병 재배를 하고 있으며 1회 수확후 배지를 버리고 있어 70%이상이 분해되지 않은 배지로 잔존 하고 있다. 따라서 목질섬유소의 자연적 부숙 기간이 장기간 소요 되는 것으로 사료 된다. 한편 표고버섯 톱밥재배는 균사배양-갈변화-3회이상 버섯수확 후 배지가 대부분이며 가축사료 등 다른 용도사용이 불가능하고 직접 퇴비로 사용 할 경우 낮은 pH와 높은 유기산 함량으로 식물체에 장해요인이 될 수 있다. 표고버섯 SMS는 다회 수확으로 배지성분이 대부분 분해되어 부숙화를 촉진시키며 퇴비의 용도로 최적화 할 수 있는 장점이 있다.



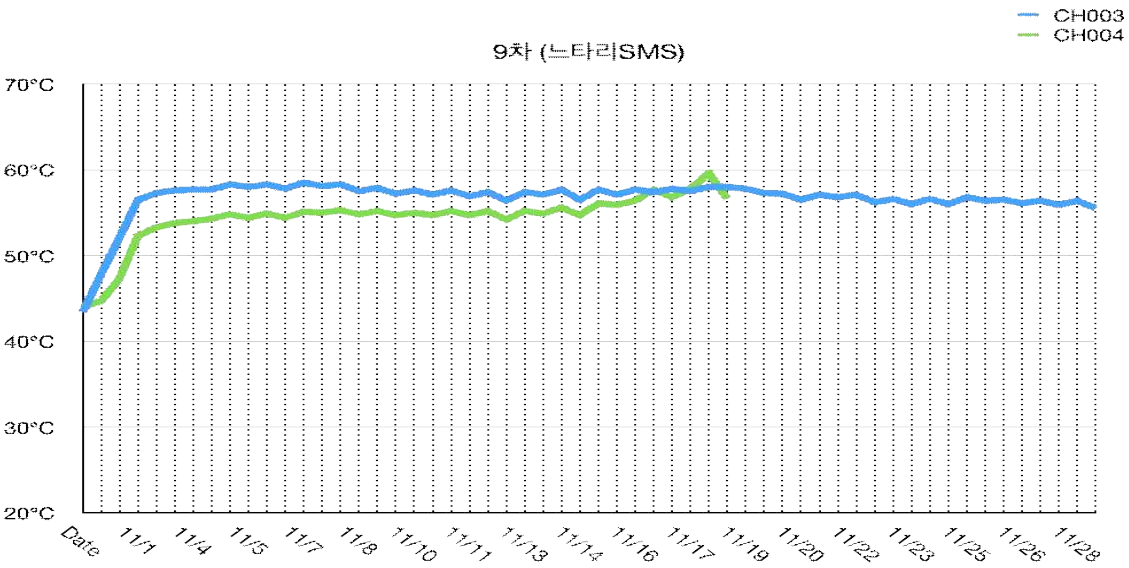
- 차수및 부숙실: 2차 (B1)
- 재료: 충주 표고SMS
- 수량: 2*2*0.48 (1.92루베)
- 투입: 6/16
- 종료: 8/2
- 부숙기간: 47일

<그림> 표고버섯SMS 일별 부숙온도의 변화>



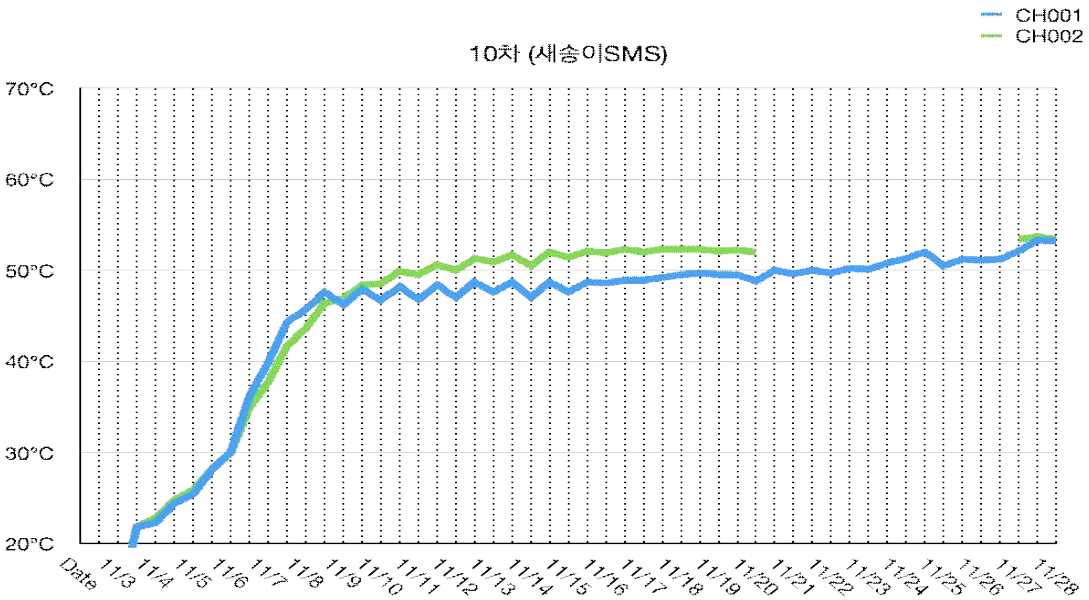
- 차수및 부숙실: 4차 (A3)
- 재료: 노루SMS+황산철6kg+아미노산7kg
- 수량: 2*2*0.5 (2루베)
- 공기: 3마력 4회 (0.6,12.24h)
- 투입일: 7/20
- 종료일: 10/27
- 부숙기간:99일
- 뒤집기: 7/26, 9/23, 10/13
- 물공급: 7/26(80), 8/16(40), 8/22(80), 8/29(80), 9/21(80)

<그림> 노루궁뎅이버섯SMS 부숙일자별 온도의 변화>



- 차수및 부숙실: 8차 (A4)
- 재료: 느타리버섯 SMS
- 수량: 2*2*0.5 (2루베)
- 공기: 3마력 4회 (0, 6, 12, 24h)
- 투입일: 10/31
- 종료일:
- 부숙기간:
- 뒤집기:
- 물공급: 11/29(80)

<그림> 느타리 버섯SMS 부숙일자별 온도의 변화>



- 차수및 부숙실: 9차 (B3)
- 재료: 새송이 SMS
- 수량: 2*2*0.5 (2루베)
- 공기: 5마력 2회 (7, 19h)
- 투입일: 11/3
- 종료일:
- 부숙기간:
- 뒤집기
- 물공급:

<그림> 새송이 버섯SMS 부숙일자별 온도의 변화>

이상의 결과를 보면 부숙기간을 3개월정도 예상해야 하며 부숙이후 후숙기간을 1개월정도 거치는 것이 제품화에 해가 없을 것으로 보인다. 이와같은 방법으로 부숙한후 표고CSMS 와 표고+노루CSMS를 분석한결과 표 1과 같았다. 분석결과는 유해성분은 검출 되지 않았으며 유기물, 부숙도, 유기물대질소(C/N)의비 같은 주요지표가 부숙유기질(퇴비)비료의 공정규격에 적합함으로써 최종산물인 입상제형후 병원성미생물 (대장균, 살모넬라), 염분, 수분, 염산불용해물을 충족하면 부숙유기질비료 및 유기농자재로서 가능할 것으로 사료된다. (최종 산물인 입상제형으로서 12월중 성분 분석예정). 표고와노루버섯SMS를 1:1로 혼합하여 부숙한 재료의 비료성분이 NPK비분의 합이 7로 표고버섯SMS의 4보다 높게 나온것은 수분의 함량에 기인하는 것으롤 보인다. 두재료의 수분의 함량이 크게 다른이유는 표고+노루의 시료는 시중에 판매되는 채소 건조기를 이용하여 건조하였기 때문이다. 이후의 연구에서는 수분은 입상제형기 제조회사에서 권장하는 10-20% 일정하게 맞춘다음 분석을 하는 것이 중요할 것으로 보인다.

<표1> 표고버섯CSMS 및 노루궁뎅이버섯CSMS 성분 분석>

분석항목	퇴비 비료공정규격	표고CSMS (7/13)	표고+노루CSMS (7/30)
유기물(%)	30이상	36.95	83.57
비소	45이하	불검출	불검출
카드뮴	5이하	불검출	불검출
수은	2이하	불검출	불검출
납	130이하	불검출	불검출
크롬	200이하	3.17	불검출
구리	360이하	15.09	11.94
니켈	45이하	2.52	1.01
아연	900이하	69.97	75.32
CN비	45이하	26.58	35.11
수분%	55이하	55.31	4.32
부숙도(콤백법)	부숙완료이상	부숙완료	부숙완료
질소전량%	해당없음	1.39	2.38
P2O5 %	해당없음	2.03	2.83
K2O%	해당없음	0.77	1.79
(1차요소의소계)		4.19	7.00
CaO %	해당없음	2.01	2.41
MgO %	해당없음	0.46	0.80
(2차요소의소계)		2.47	3.21
(1차+2차요소의합계)		6.66	10.21

o CSMS와 MS의 추출물

CSMS와 MS의 추출물에 대한 연구는 SMS의 부숙시간이 적게는 47일에서 많게는 90일까지 소요되고 정확한 부숙 조건을 확립하는데 시간이 많이 소요 되었다. 다만 CSMS추출물의 부숙이전의 SMS추출액의 성분을 살펴보면 표과 같다. SMS의 상온추출시 잡균이 너무많이 발생되는 문제로 80도씨이상의 고온에서 추출하였다. 표에서 보는 바와 같이 NPK 성분의 합이 노루궁뎅이버섯 SMS 추출액 (WESMS-He)에서 보다 표고버섯SMS 추출액 (WESMS-Le)에서의 결과가 2.8배 높게 나온 것으로 볼때 표고버섯 SMS 비분이 노루궁뎅이버섯SMS에서 보다 높은 것에 기인한다고 볼 수 있다. 위 추출액 성분량은 일정 조건을 표준화하면 그 자체로 비료로서 등록이 가능한 것으로 향후 특허등록이 가능할 것으로 보인다.

<표2> SMS의 추출액 성분 분석

분석항목	WESMS-He	WESMS-Le
N	0.05	0.22
P2O5	0.026	0.031
K2O	0.019	0.021
(NPK 합계)	0.095	0.27
CaO(%)	0.007	0.026
MgO(%)	0.009	0.015
구리	불검출	불검출
아연	불검출	불검출
망간	불검출	0.0003
철	불검출	불검출
붕소	불검출	불검출
pH	5.51	4.49

3) 중금속검사, 잔류농약검사, 미생물검사

우선적으로 표고버섯CSMS에대한 중금속및 농약잔류검사에서 중금속및 농약검출이 되지 않았으나 나머지 재료에 대한 농약잔류검사는 부숙중에 있는 관계로 최종 부숙이 완료 되고 입상제형이 완료후에 전반적인 농약잔류검사, 미생물검사 및 비료재배 시험이 수행될 예정이다. 한편 유식물비료 피해 시험은 2차년도 과제로써 2차연도에 수행예정이다.

4) 고추생육 포장시험

부숙이완료된 표고버섯CSMS를 처리한 후에 고추를 정식하였다. 처리구 면적은 50m2로 부숙시재료 90kg을 사용하였는데 이 사용량은 일반적인 건계분 사용량인 1.5kg/m2에서 수분을 감안항여 1.8kg/m2를 환산하여 실제면적에 90kg을 사용였다. 대조구는 시중에 널리 사용되고있는 유박(조은유박)을 권장최대량인 400g/m2를 준용하여 실제면적에 20kg을 살포하였다. 무처리구로써 50m2를 조성하였다. 공통적인 경종개요로써 고추는 6/1일 파종하였으며 7/9일 시재료및 대조유박을 살포 및 경운하고 7/10일 비닐 멀칭한 다음 당일 정식 하였다.

<참고: 시중 제품별 권장사용량>

- 농후퇴비 건계분 (채소.원예작물) 1,400-1,800kg/10a

- 유박 (채소작물) 200-400kg/10a

토양처리제로서 입상제형으로 만들기위하여 우선적으로 사용가능 물질에 대하여 법규정을 검토한결과 비료관리법에서 부산물비료로 사용가능한 원료가 명시되어있고 유기농업자재 공시기준은 비료관리법을 준용하는 것으로 설명 되어있는 바 주성분이 주로 미강과 톱밥으로 구성되어 있는 버섯폐배지는 별도의 첨가물을 넣지 않고 사용가능한 원료임이 명시되어 있다. 이와 관련하여 실제로 버섯수확후배지 입상제형 시제품을 제작해본 결과 다른 여타의 첨가물을 넣지 않고 입상제형으로 만드는데 문제가 없음을 확인하였다. 따라서 당초 연구계획에서 명시된 다양한 첨가물질인 결합제, 붕괴제, 증량제등은 불필요하고 법 규정에 불요하다.

궁극적인 제형의 목표인 입상제형을 만들기위한 조건은 계획서에 검토하기로한 첨가물이 아니라 재료에 포함된 수분의 함량이 중요한데 시험에서 CSMS의 수분함량은 60~70%정도로 높은 편이며며 이를 제형화 하기위해서는 10-20%수준으로 건조하여야한다. 수분을 건조하기 위하여 본 연구에서는 시중에서 판매되는 채소건조기의 반복시험을 통하여 건조한후 할로겐 수분분석기로 수분을 분석한후 9/11일 시제품 제작회사에 의뢰하여 제형 화하였다. 입상제형후 수분분석결과 13.36%를 보였다

생육조사는 8월21일에 시행하였다. 표고버섯수확후배지 퇴비를 이용하여 입상형으로 제조 하였으며 금싸락 (CSP)로 명명하였다.

금싸락 입상퇴비 (9/11)

<그림> 표고버섯수확후배지 입상형 퇴비

금싸락처리 고추의 생육을 조사한 결과 초장이 대조구대비 15%, 엽폭은 대조구대비 14.5%, 무처리구대비 22.5% 높았다. 엽수에서는 처리구가 대조구보다 배이상 높았고 엽장은 금싸락 처리구가 22% 높게 나타났다.

<그림> 포장에서 표고버섯수확후배지 입상형 퇴비의 고추생육효과

<시제품 처리구> <대조구> <무처리구>

<그림 7> 시제품 포장실험 (케이글로벌 부속농장, 경기용인)

.

6) 부숙 버섯재배퇴비의 제형개발: 퇴비등록, 토양개량 및 작물생육용 및 병해 관리용 유기농업자재 등록

국내 버섯 생산량 중 농산버섯은 팽이, 큰느타리, 느타리버섯이 88%이상을 차지 하며 자동화 규모화에 힘입어 대량생산체계가 정립되어 약 16만톤/년이 생산되고 있다. 임산 버섯의 대표적인 표고버섯(*Lentinula edodes*)의 생산량은 31,000톤/년 내외가 되며 원목재배 에서 톱밥 봉지재배로 급속히 전환되고 있는 것이 특징이라 볼 수 있다. 버섯 생산량이 증가함에 따라 부산물로 버섯수확후배지(spent mushroom substrate, SMS)도 동시에 증가 되고 있으며 대략 100 만톤 이상이 방출되고 있다. 느타리, 송이, 팽이, 양송이, 표고 등의 SMS는 퇴비로 직접 살포하거나 가축의 사료첨가제, 토양개량제 및 bioremidation으로 활용되고 있으며 SMS 추출물을 이용하여 식물병원균 방제에 유용하게 활용 된 바 있다 (Kang, 2019).

종래의 퇴비는 건초, 나뭇잎, 짚, 잡목 등을 쌓아 환적 하여 만드는 일반 퇴비와 계분 등 축산분뇨와 톱밥, 왕겨, 짚을 혼합, 발효시켜 만드는 축 분뇨 퇴비가 대부분을 차지하고 있다. 유기질비료 시장은 연간 8,500억원(2018년)에 달한다. 이 가운데 퇴비가 평균 70%, 유박비료가 30%를 점유하고 있는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 퇴비는 분말 상태이기 때문에 시비 작업이 불편하고, 완효성을 오래 유지하지 못하는 단점이 있다. 또한, 퇴비의 주 원료인 계분 등 축산분뇨에 기준치 이상의 농약 성분이 검출되고 있어 친환경 유기농 재배 사용에 걸림돌이 되고 있으며 유박비료는 각종 씨앗의 식물성 기름을 짜내고 남은 찌꺼기(아주까리, 유채, 콩, 쌀겨 등)를 부숙과정 없이 제조하며 냄새가 없고 사용하기 편리하지만 토양처리 시 후발효에 의한 작물의 가스피해 우려가 있으며 최근에는 청산가리의 6천 배에 달하는 독성물질 '리신'이 검출되어 유해성 논란이 되고 있다.

SMS는 버섯이 생산하는 강력한 목질 분해 효소 활성으로 배지가 당화되고 균사체가 다양한 다당체를 생산하며 단백질, 회분, 질소, 인성분이 증가하고 지방, 섬유소, 리그닌, 셀롤로스가 감소함으로써 식물 생장촉진에 유용한 유기질 비료와 미량요소를 공급하여 식물성장에 도움을 줄 뿐 아니라 토양공극, 보수력 등의 토양물리성을 개선 시킬 수 있다. 그러나 SMS에 포함된 영양원은 즉시 이용하는 것은 바람직하지 못하며 부숙 과정을 걸친 CSMC (composted spent mushroom substrate)를 적용하는 것이 더욱 효과적이다.

(1) 표고 버섯수확후배지 퇴비등록

1차년도 연구결과 표고버섯수확후배지 퇴비생산 공정을 거처 시제품 케이바이탈펠릿펠릿형 퇴비를 완성 하였다.

<표> 표고버섯수확후배지유래 시제품 케이바이탈펠릿펠릿 퇴비

제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
케이바이탈 펠렛		토양개량 및 작물생육 용 유기농업자재 처리방법: 정식10일전 토양혼화처리 사용량: 300평당 500kg	2022 년3월	100

공정규격은 유기물 30%이상, 건물중 함유 유해성분의 최대량은 비소 45mg/kg, 카드뮴5mg/kg, 수은2mg/kg. 납130mg/kg, 크롬 200mg/kg, 구리 360mg/kg, 니켈 45mg/kg, 아연 90mg/kg이다. 병원성미생물 대장균 (*Escherichia coli*) O157:H7, 살모넬라 (*Salmonella spp.*)은 불검출이다. 그밖에 유기물대 질소의비 45이하, 건물중에 대하여 염분(Nacl) 2%이하, 수분(H2O) 55%이하이다. 부숙도 판정기준은 콤백인경우는 부숙완료, 솔비타법에 의한 기준은 부숙후기 또는 부숙완료이고 종자발아지수는 70% 이상이다. 염산 불용해물은 25%이다.

<표> 시제품케이바이탈펠릿의 공정규격 분석

분석항목		공정규격	분석결과	비고
주성분(규격)	유기물%	30 이상	69.38	pass
유해성분	비소 mg/kg (건물중)	45 이하	불검출	pass
	카드뮴 mg/kg (건물중)	5 이하	0.04	pass
	수은 mg/kg (건물중)	2 이하	불검출	pass
	납 mg/kg (건물중)	130 이하	불검출	pass
	크롬 mg/kg (건물중)	200 이하	0.71	pass
	구리 mg/kg (건물중)	360 이하	23.86	pass
	니켈 mg/kg (건물중)	45 이하	4.4	pass
	아연 mg/kg (건물중)	900 이하	67.28	pass
	대장균 O157:H7	불검출	불검출	pass
	살모넬라	불검출	불검출	pass
그밖의 규격	유기물대 질소의비	45	37.50	pass
	염분% (건물중)	2	0.20	pass
	수분%	55	11.55	pass
	부숙도(솔비타법)	부숙후기(4)이상	7	pass
	염산불용해물%	25 이하	4.76	pass

<표> 시제품 케이바이탈펠릿의 NPK 분석결과

분석항목		분석결과	비고
공정규격외	질소전량	1.85	
	인산전량	3.87	
	칼리전량	1.70	
	pH (1:10)	6.39	

연구개발 시제품은 상기 퇴비등록 조건을 충족하고 퇴비등록 완료하였다. 퇴비등록증 첨부 (번호: 제 전북 익산070-가-20102 호). 또한 등록조건이외의 규격으로서 NPK의 함량의 합이 7 이상으로 시중 유기질 비료의 성분과 유사한 결과를 갖는 것은 매우 활용도가 높을 것으로 전망한다. 퇴비등록이 완료 됨으로써 토양 개량 및 작물생육용 유기농업자재의 등록이 유력하고 유기농업자재로서의 특성을 연구하였다.

(2) 토양개량 및 작물 생육용 유기농업자재 등록

원료명은 버섯재배퇴비이며 물질의 기원 및 분포는 식용버섯을 재배하고 남은 폐배지의 성분은 주로 톱밥 및 미강 등으로 구성 되어 있다. 버섯재배 부산물인 폐배지는 국내에 다량 생산 되고 원료는 버섯재배 농가에서 지속적으로 계약수매할 수 있다. 유효 구성 물질의 종류는 버섯재배퇴비로써 함량은 100%이다. 농업분야 사용현황은 가공하지 않은 미부숙 버섯재배퇴비를 관행적으로 사용하고 있으며 미부숙 퇴비로 인한 식물체에 피해를 입기도 한다

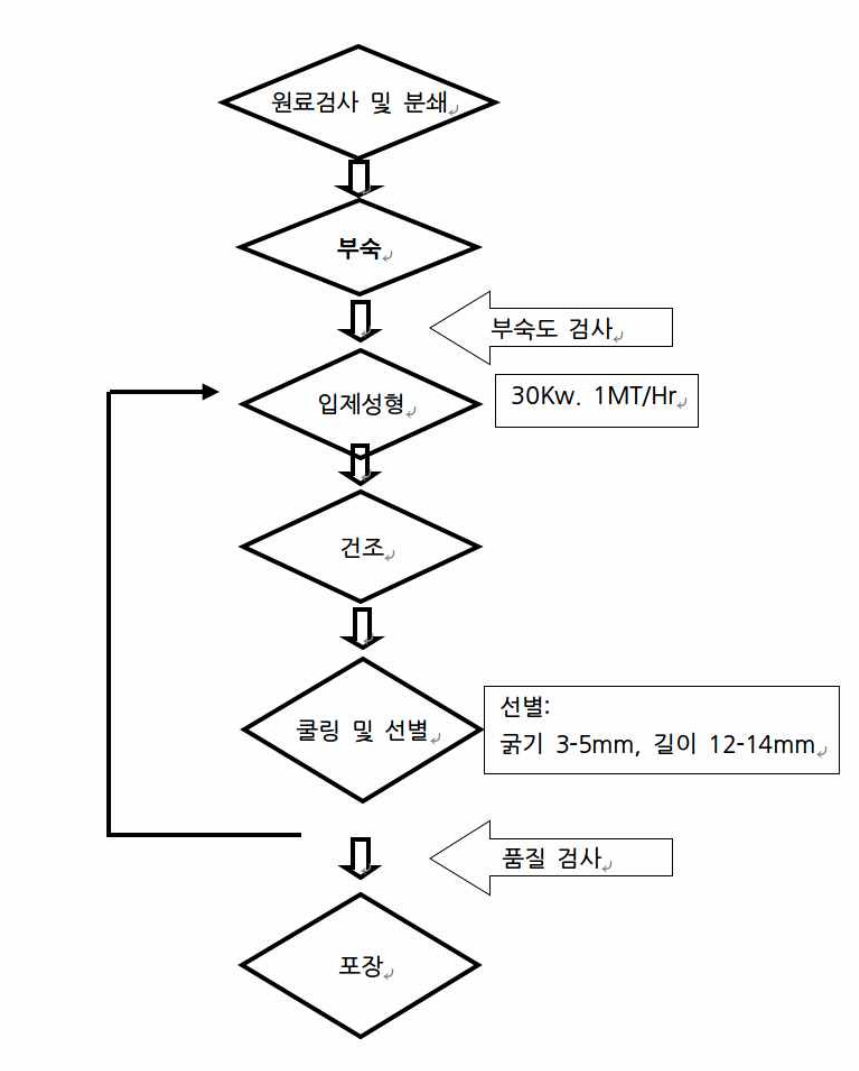
<표> 버섯재배퇴비 제조 조성비>

원료명	투입비율(%)
버섯재배퇴비	100%
계	100%

물질의 유래는 버섯폐배지를 원료로 하며 제조국은 국산으로써 버섯재배농가에서 수확후 폐기처분 되는 재료이다.

○ 제품공정

제품 제조공정은 원료검사를 하여 이물질을 제거하고 분쇄한 다음 부숙한다. 부숙시에 온도는 60도씨까 오르며 상온까지 떨어지면 뒤집기를 반복한다. 버섯수확후배지의 수분함량은 60-70%이며 부숙시 발효되면서 수분이 증발하므로 10%이내의 추가 수분과 공기를 공급하면서 호기성 발효 부숙을 실시한다. 부숙 후에는 부숙도 검사를 수행한 후 15일정도 후숙한다. 부숙도 검사는 콤팩 부숙완료, 솔비타의 부숙후기 또는 부숙완료, 종자발아지수 70%이상의 판정기준이상으로 한다. 재료의 수분이 30-40%이내의 수분이 될때까지 건조한후 입제성형을 한다. 입제성형후 제품의 수분이 13%이하까지 건조한후 펠릿 크기가 직경 14-5mm, 길이 13-18mm로 선별한다음 유기물분석등 품질관리 후 포장한다.

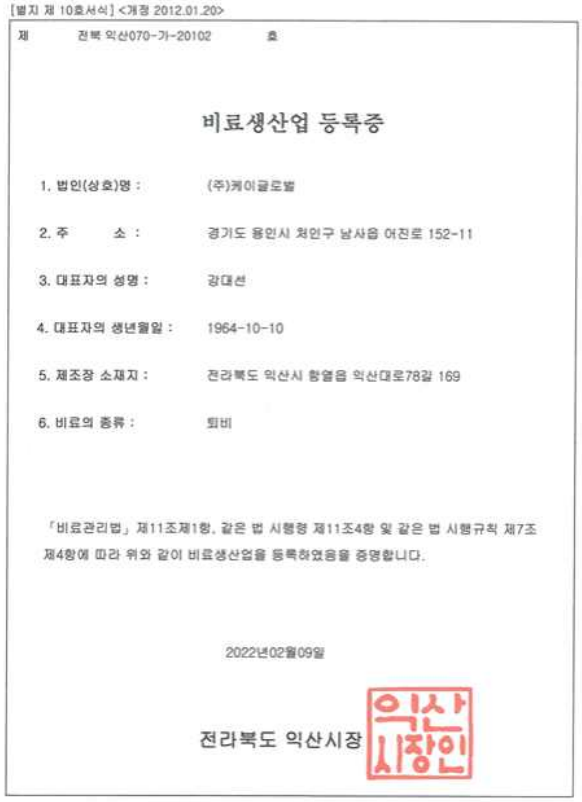


<그림> 버섯수확후배지 입제형퇴비 생산공정

<펠릿(입제)성형기 30kw (1-1.5Mt/H)>

<그림> 표고버섯수확후배지 퇴비의 케이바이탈펠릿제조 (30-40%수분함량)

○ 버섯수확후배지 퇴비등록 및 농약잔류검사



[별지 제 10호서식] <개정 2012.01.20>

제 전북 익산070-가-20102 호

비료생산업 등록증

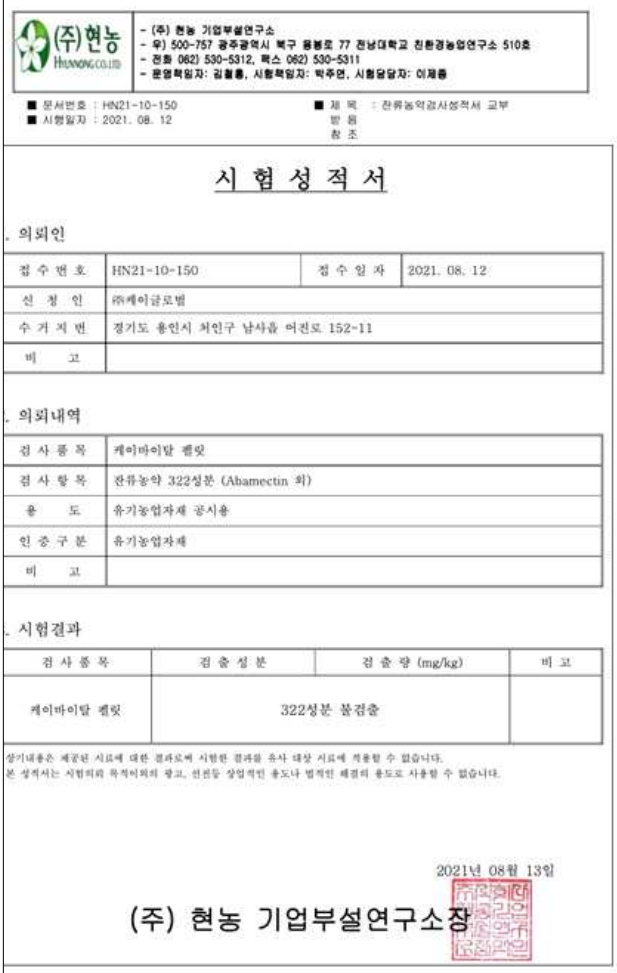
1. 법인(상호)명 : (주)케이글로벌
2. 주 소 : 경기도 용인시 처인구 남사읍 어진로 152-11
3. 대표자의 성명 : 강대선
4. 대표자의 생년월일 : 1964-10-10
5. 제조장 소재지 : 전라북도 익산시 함열읍 익산대로78길 169
6. 비료의 종류 : 퇴비

「비료관리법」 제11조제1항, 같은 법 시행령 제11조4항 및 같은 법 시행규칙 제7조 제4항에 따라 위와 같이 비료생산업을 등록하였음을 증명합니다.

2022년02월09일

전라북도 익산시장 익산시장인

<그림> 버섯수확후배지 퇴비등록



(주)현농 HYUNNONG CO.,LTD

- (주) 현농 기업부설연구소
- 우) 500-757 광주광역시 북구 용봉로 77 전남대학교 친환경농업연구소 510호
- 전화 062) 530-5312, 팩스 062) 530-5311
- 분야책임자: 김철홍, 시험책임자: 박주연, 시험담당자: 이재홍

■ 문서번호 : HN21-10-150
■ 시행일자 : 2021. 08. 12
■ 제 목 : 잔류농약검사성적서 교부
받 음
참 조

시 험 성 적 서

의뢰인

접 수 번 호	HN21-10-150	접 수 일 자	2021. 08. 12
신 청 인	㈜케이글로벌		
수 거 지 번	경기도 용인시 처인구 남사읍 어진로 152-11		
비 고			

의뢰내역

검 사 품 목	케이바이탈 펠릿
검 사 항 목	잔류농약 322성분 (Abamectin 외)
용 도	유기농업자재 공시용
인 증 구 분	유기농업자재
비 고	

시험결과

검 사 품 목	검 출 성 분	검 출 량 (mg/kg)	비 고
케이바이탈 펠릿	322성분 불검출		

상기내용은 제공된 시료에 대한 결과로써 시험한 결과를 유사 대상 시료에 적용할 수 없습니다.
본 성적서는 시험의뢰 목적이외의 광고, 선전등 상업적인 용도나 법적인 해결의 용도로 사용할 수 없습니다.

2021년 08월 13일

(주) 현농 기업부설연구소장

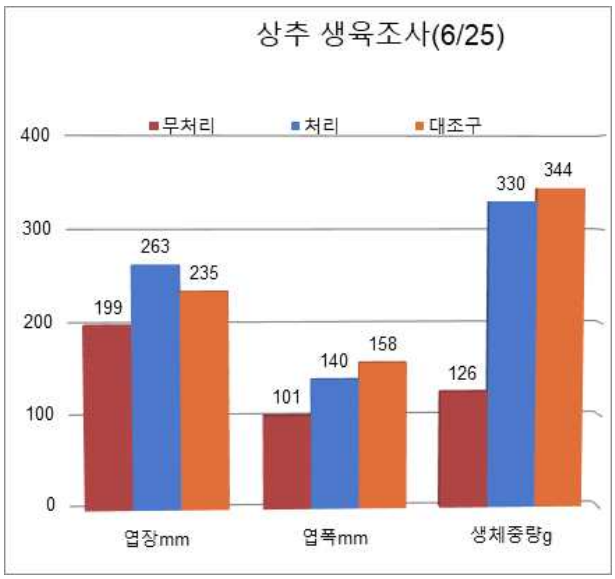
<그림> 농약잔류검사

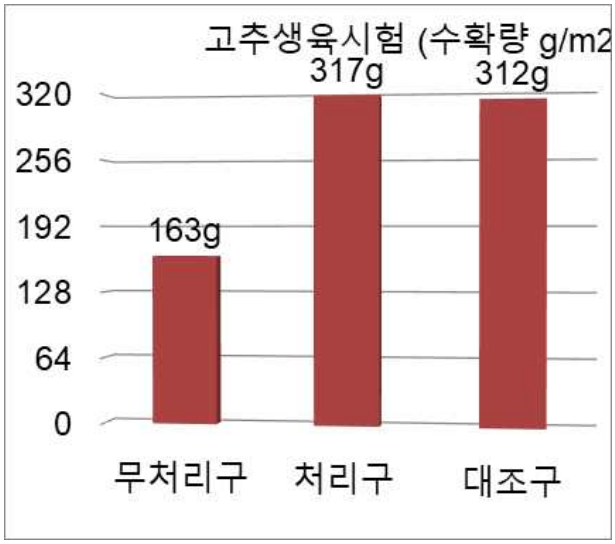
○케이바이탈필렛이용 식물재배 포장실험

- 처리방법
  - 파종: 2021. 5. 2
  - 조사일: 2021. 6. 25
  - 처리구: 케이바이탈펠릿 0.4kg/m2
  - 대조구: 좋은유박 0.4kg/m2

- 결과: 처리구 엽장 무처리대비 32%증가, 대조구대비 12% 증가. 처리구 엽폭 무처리대비 38%증가, 대조구대비 11% 감소. 처리구 생체중 무처리대비 160%증가, 대조구대비 4% 감소.

- 결론: 시중 제품과 동일량을 시비 하였을 경우 시제품 처리구의 수확량에서 큰 차이를 보이지 않았다



▪ 처리방법 – 정식: 2021. 5. 1 – 조사일: 2021. 7. 9~19 (10일) – 처리구:케이바이탈펠릿 0.3kg/m2, 대조구: 좋은유박 0.3kg/m2 ▪ 결과: 처리구는 무처리구 대비 94% 증가하였고 대조구 대비 약 1.6% 증가하였다. ▪ 결론: 시제품 처리구에서 시중 제품과 동일량을 시비하였을 경우 수확량에서 큰 차이는 보이지 않았다	

○ 품질관리

품질관리는 원료및 제품에 대하여 실시하며 유기농업자재 시험연구기관에 의뢰하여 실시한다. 원료에 대한 품질관리 분석항목은 잔류농약검사를 연 1회이상 실시하며 제품에 대한 품질관리의 분석항목은 이화학검사(주성분), 유해중금속검사, 병원성대장균및 살모넬라검사, 잔류농약검사를 연1회이상 실시한다.

○ 제품 포장지 표기사항

제품 포장지 표기사항은 공시번호가 부여되며 자재의 명칭은 버섯수확후배지퇴비 상표명은 케이바이탈 펠릿이다. 자재의 구분은 토양개량 및 작물생육용으로 등록하고 용량은 가정용으로 2kg 포장을 하고 농업용으로 20Kg포장을 한다. 보증 성분은 원료 버섯수확후배지퇴비 100%이고 유기물 함량 30%이상으로 법적요건을 충족 하였다. 사용방법은 10a당 400kg을 정식 7일전 토양 혼화 처리한다. 사용 및 보관상 주의사항은 사용량을 준수하고 타제품 혼용시 소량사전시험후 이상이 없을 경우에 사용하여야한다. 또한 처리시 식물체에 직접 닿지 않도록 정식 7일전 토양혼화처리하고 보관 시에는 수분과 직광을 피하고 그늘지 건조한 곳에 보관하여야한다. 공시품은 효과와 성분함량을 보증하지 아니하고 유기농산물 생산을 위해 사용가능 여부만 검토한 자재이다. 시험작물은 고추, 토마토, 오이, 참외, 상추, 무 등이다.

(3) 케이바이탈펠릿 퇴비의 식물장해시험

시험 목적은 케이바이탈펠릿 퇴비의 유기농업자재목록공시용으로 제출하기 위하여 시험을 수행하였으며 시험기간은 2021년 8월 11일～2021년 9월 29일까지 경기도 의왕시 포일동 170-1에서 수행하였다. 공시품은 케이바이탈 펠릿 (퇴비)을 사용하였고 시험 식물은 고추, 토마토, 오이, 참외, 상추, 무를 사용하였다. 공시토양으로 식물재배지 토양과 원예상토를 1:1 비율로 혼화하여 사용하였고 식물이식 및 배치는 공시토양이 담긴 포트(직경 12cm × 높이 11cm)에 공시식물 6종을 포트에 이식 후 5포트 3반복으로 배치하였다. 조사방법은 유식물 이식 후 7, 14, 21일 후 비해 유무 달관 조사를 수행하였다. 조사일자는 각각 9월 03일, 9월 10일, 9월 17일이다.

- 무처리구: 공시토양
- 기준구: 공시품을 400kg/1,000m2의 비율로 혼화
- 배량구: 공시품을 800kg/1,000m2의 비율로 혼화
- 달관조사: 0: 육안으로 비해무, 1: 작은 반점 보임, 2: 작은 부분에 비해 인정됨, 3: 잎의 50% 정도에서 비해 보임, 4: 상당한 피해보임, 5: 심한 비해로 고사 상태임.

<그림> 공시품의 혼화처리(2021년 8월 20일) >

<그림>공시식물의 유식물 이식(2021년 8월 27일) 고추, 토마토, 오이, 참외, 상추, 무

고추 처리구에서 조사일자별 달관 조사한 결과 계절적 영향으로 생육부진 현상이 보이나 다른 이상증상 없음

<표> 케이바이탈 펠릿 퇴비처리에 따른 고추식물체의 장해조사

처리구	공시품 처리 후 조사일수		
	7일차	14일차	21일차
무처리구	0*	0	0
기준구	0	0	0
배량구	0	0	0

<표> 케이바이탈 펠릿 퇴비처리에 따른 토마토의 장해조사

처리구	공시품 처리 후 조사일수		
	7일차	14일차	21일차
무처리구	0*	0	0
기준구	0	0	0
배량구	0	0	0

<표> 케이바이탈 펠릿 퇴비처리에 따른 오이의 장해조사

처리구	공시품 처리 후 조사일수		
	7일차	14일차	21일차
무처리구	0*	0	0
기준구	0	0	0
배량구	0	0	0

<표>케이바이탈 펠릿 퇴비처리에 따른 참외의 장해조사

처리구	공시품 처리 후 조사일수		
	7일차	14일차	21일차
무처리구	0*	0	0
기준구	0	0	0
배량구	0	0	0

<표> 케이바이탈 펠릿 퇴비처리에 따른 상추의 장해조사

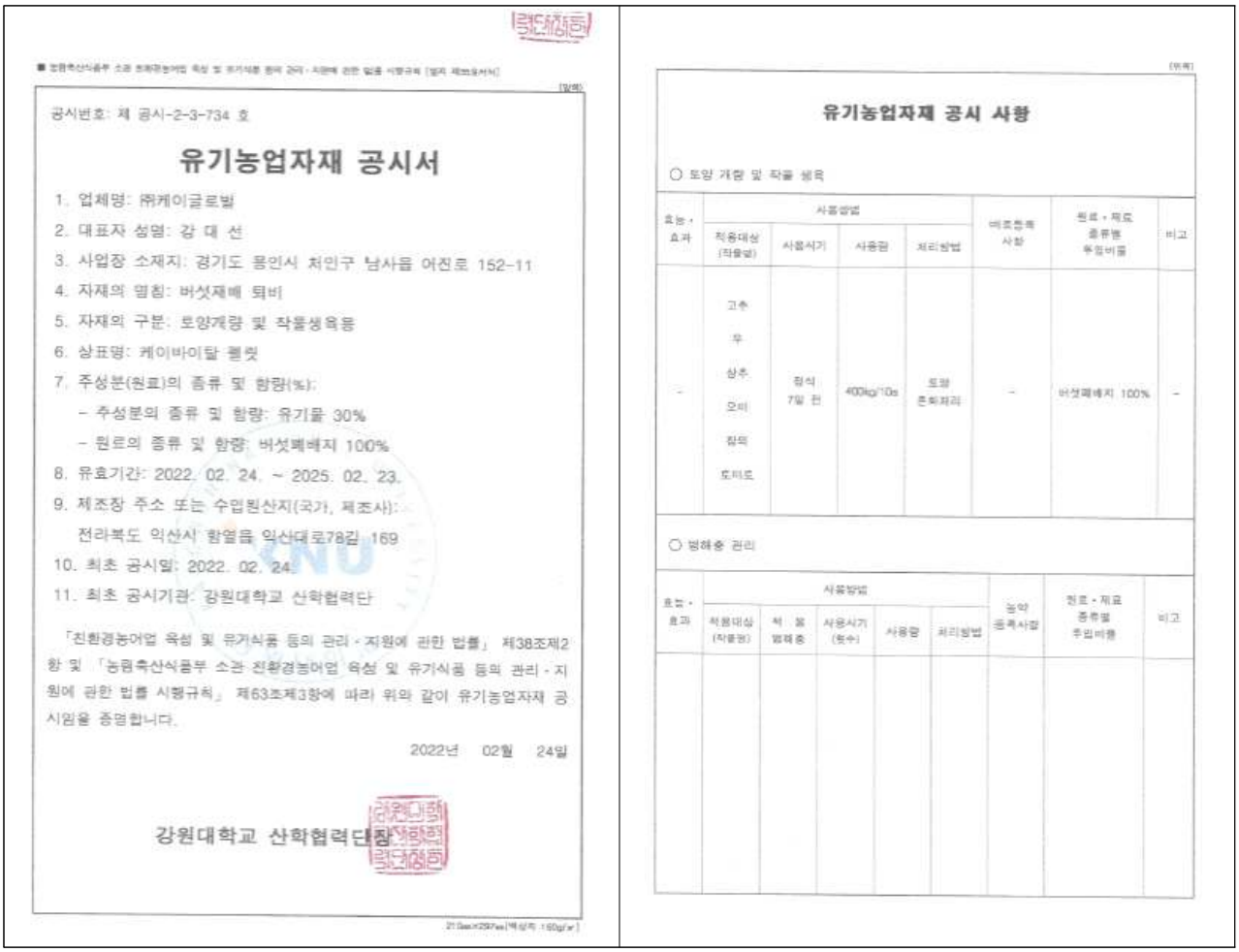
처리구	공시품 처리 후 조사일수		
	7일차	14일차	21일차
무처리구	0*	0	0
기준구	0	0	0
배량구	0	0	0

무 처리구에서 조사일자별 달관조사한 결과, 14일차 일부 생육부진 증상이 보이나 이후 정상 생육으로 다른 이상증상 없음

<표> 케이바이탈 펠릿 퇴비처리에 따른 무의 장해조사

처리구	공시품 처리 후 조사일수		
	7일차	14일차	21일차
무처리구	0*	1	0
기준구	0	0	0
배량구	0	1	0

결론적으로 공시품 “케이바이탈펠릿”를 공시토양에 혼화처리 정식 후 7, 14, 21일 후 달관 조사한 결과, 고추, 토마토, 오이, 참외, 상추, 무에 기준구(400kg/1,000m2), 배량 (800kg/1,000m2)를 일 부 작물의 생육이 저조한 현상을 보이나 이상증상(반점, 변색, 엽소 등)이 발견되지 않음. 따라서 장해가 없는 것으로 최종 평가 되었다. 이상의 실험결과로써 유기농업자재 공시를 완료하였다 (공시번호 제 공시-2-3-734 호)



공시번호: 제 공시-2-3-734 호

유기농업자재 공시서

1. 업체명: ㈜케이글로벌
2. 대표자 성명: 강 대 선
3. 사업장 소재지: 경기도 용인시 처인구 남사읍 어진로 152-11
4. 자재의 명칭: 버섯재배 퇴비
5. 자재의 구분: 토양개량 및 작물생육용
6. 상표명: 케이바이탈 펠릿
7. 주성분(원료)의 종류 및 함량(%):
   - 주성분의 종류 및 함량: 유기물 30%
   - 원료의 종류 및 함량: 버섯폐배지 100%
8. 유효기간: 2022. 02. 24. ~ 2025. 02. 23.
9. 제조장 주소 또는 수입원산지(국가, 제조사):
   전라북도 익산시 함열읍 익산대로78길 169
10. 최초 공시일: 2022. 02. 24.
11. 최초 공시기관: 강원대학교 산학협력단

「친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률」 제38조제2항 및 「농림축산식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙」 제63조제3항에 따라 위의 같이 유기농업자재 공시임을 증명합니다.

2022년 02월 24일

강원대학교 산학협력단장

유기농업자재 공시 사항

○ 토양 개량 및 작물 생육

효능·효과	사용방법				배조등록 사항	원료·재료 종류별 투입비율	비고
	적용대상 (작물명)	사용시기	사용량	처리방법			
-	고추 무 상추 오이 참외 토마토	정식 7일 전	400kg/10a	토양 혼화처리	-	버섯폐배지 100%	-

○ 병해충 관리

효능·효과	사용방법					농약 등록사항	원료·재료 종류별 투입비율	비고
	적용대상 (작물명)	적 용 병해충	사용시기 (토수)	사용량	처리방법			

(1) 버섯수확후배지 퇴비 유래 병해 관리용 시제품

○ 원료의 특성

원료의 특성은 퇴비에서 보는 바와 같으며 이를 부숙발효하여 물로서 유효성분을 추출하는 것으로써 그 제조 조성비는 표에서 에서 보는 바와 같다

<표> 시제품 케이바이탈엑스트라 추출액 제조 조성비

원료명	성분별 함유내역				투입비율
	물질명	함유량(%)	CAS NO.	EPA list	(%)
[주원료]	버섯재배퇴비추출액	100%	-	-	98%
[보조제]	솔빈산가리	100%	24634-61-5	4A	1%
[보조제]	당밀	100%	8052-35-5	4A	1%
계					100%

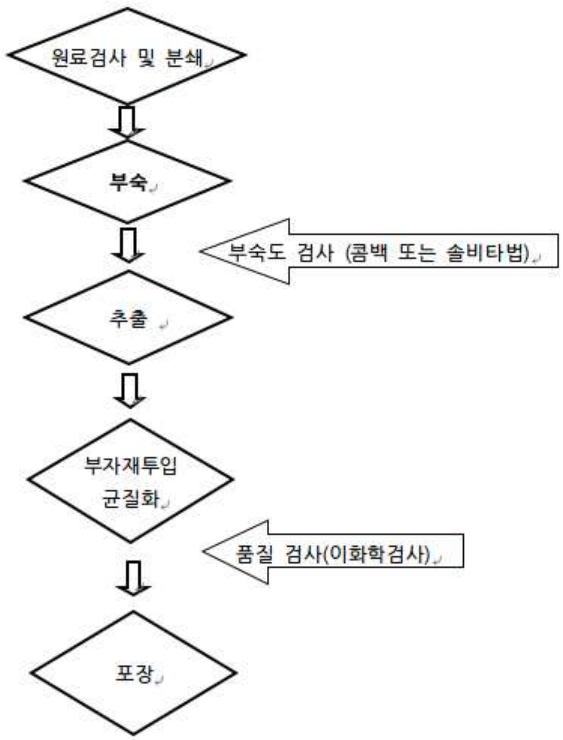
<표> 시제품 케이바이탈엑스트라 시제품

제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
케이바이탈 엑스트라		병해관리용 유기농업 자재 처리방법: 정식후 500 배 희석액 토양관주처 리 사용횟수: 10-15일간 격 2-3회처리	2022 년3월	100

○ 원료 및 제품에 대한 품질관리

품질관리는 원료및 제품에 대하여 실시하며 유기농업자재 시험연구기관에 의뢰하여 실시한다. 원료에 대한 품질관리 분석항목은 잔류농약검사를 연 1회이상 실시하며 제품에 대한 품질관리의 분석항목은 이화학검사(주성분), 잔류농약검사를 연1회이상 실시한다.

○ 제조공정도



<그림> 병해관리용 시제품 케이바이탈엑스트라 제조공정도>

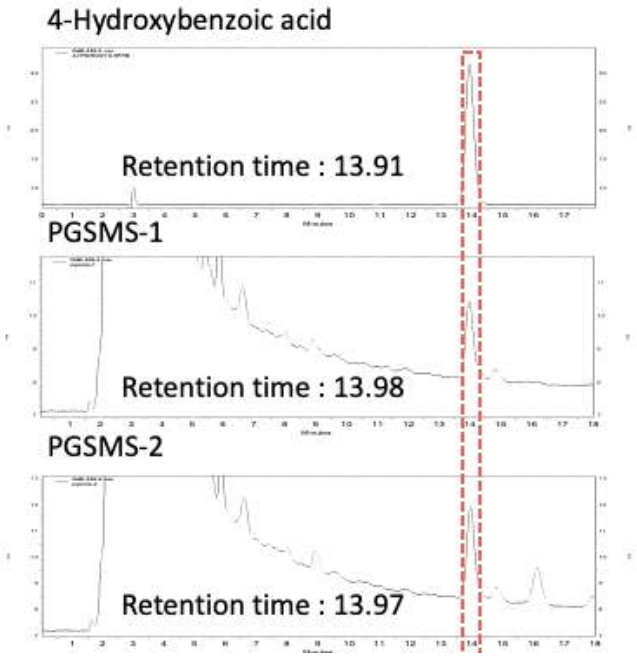
○ 제품 포장지 표기사항

자재의 명칭은 식물성 퇴비 발효 추출액으로 상표명은 케이바이탈엑스트라이다. 자재의 구분은 병해관리용으로 실용량 5L포 포장된다. 주성분의 종류는ㄴ 버섯재배퇴비추출액 전량 98%이며 보조제 2%가 포함된다. 사용방법은 200배 희석액을 토양관주처리 한다. 사용및 보관상 주의 사항은 아래와 같다.

- 사용량을 준수하시오.
- 타제품 혼용시 사전 소량시험후 이상이 없을 경우에 사용하시오.
- 보관시 상온 5도씨 이상 30도씨 이하에서 보관하고 직광을 피하고 건조하고 서늘한곳에 보관하시오.
- 어린이 손이 닿지 않는 곳에 보관하시오.
- 사용하고 남은 잔량은 마개를 잘 막아서 보관하되 가급적 1개월 이내에 사용하시오.

○ 병해충 저해 지표성분 조사

제 1협동과제에서 표고버섯수확후배지 퇴비 (LeCSMS)에서 HPLC분석과 화합물동정을 수행한 결과 주요화합물인 4-hydroxybenzoic acid가 검출 되었다. 4-hydroxybenzoic acid의 고추역병 균사체억제효과를 조사한 결과 난균류에 속하는 *Phytophthora capsici*와 *Phythium ultimum*은 500 mg/L이하에서 90%이상의 균사체생장 억제율을 보이면서 강력한 항균력을 나타내었다. 왕겨로부터 4-hydroxybenzoic acid가 항균물질로 보고 된 바 있다. 4-hydroxybenzoic acid는 식품병원세균, 식물병원세균, 효모, 식물병원성곰팡이를 대상으로 항균활성 실험을 실시 한 결과 그람양성세균과 그람음성세균에 강한 항균 활성이 있는 것으로 판명 되었으며 길항성 곰팡이 Penicillium sp. AF5로부터 분리된 hydroxybenzoic acid를 이용하여 식물병원성곰팡이에 대한 항균력을 조사한 바 있으며 고추역병(*Phytophthora capsici*), *Phythium ultimum*에 강한 활성이 있는 것으로 보고 된 바 있어 본 연구결과와 일치하였다. 4-hydroxybenzoic acid는 본 연구팀의 분석결과 “케이바이탈 엑스트라” 주원료에서 고추역병에 강한 항균활성이 나타나 4-Hydroxybenzoic acid는 역병방제 지표화합물로 활용 가능할 것으로 사료 되었다.



- HPLC condition

검출기 파장 : 255 nm

Moving phase : A-D.W. (+0.04% TFA)
B-MeOH

Method : 30% B for 18 mins

Column : TSKgel ODS-100V 5 ㎛
(4.6 I.D. × 250 mm)

Flow rate :1 ml/min

<그림> HPLC분석으로 시제품 케이바이탈 엑스트라내 병억제 유효성분 4-Hydroxybenzoic acid검출> PGSMS-1: 1 표고버섯농가 수확후배지시료, PGSMS-2: 2 표고버섯농가 수확후배지시료

○ 결론

병해관리용으로 개발한 표고수확후배지추출출액 케이바이탈엑스트라의 4-Hydroxybenzoic acid는 역병방제 지표화합물로 활용 가능하며 추후 농약안정성 시험과 식물장해 여부관련 시험을 통하여 유기농자재 등록 예정

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

- ○ 버섯 수확 후 배지(SMS) 퇴비화 시험을 위하여 버섯농가에서 수거한 표고SMS, 노루궁뎅이 SMS, 느타리 SMS를 사용 부숙 최적 조건 확립 함
- ○ 버섯수확후배지 퇴비 (CSMS)의 물리 화학적 특성 및 미생물밀도 구명
- ○ 표고, 느타리, 노루궁뎅이 버섯수확후배지 퇴비(CSMS)처리에 따른 고추, 상추, 배추생육촉진 효과 구명
- ○ 표고, 노루궁뎅이버섯수확후배지 퇴비(LeCSMS)처리에 따른 고추역병 방제효과 구명
- ○ 표고버섯수확후배지의 Pilot-scale 부숙화 특성구명으로 대량생산체제 구축하여 대량생산체제 구축
- ○ *Bacillus velezensis* HKB-1 의 LeCSMS 물추출물 배양법 개발 및 및 고추역병 방제효과 구명
- ○ LeCSMS 유래 4-hydroxybenzoic acid와 vanillic acid의 항균활성의 유효성을 구명하여 고추역병 방제의 지표물질로 활용
- ○ qRT-PCR로 노루궁뎅이버섯수확후배지 유래 항균활성물질 *N*-De-phenylethylisohericerin의 고추 병 저항성유전자 CaPR10의 발현유도 기능구명
- ○ 버섯 균주 배양액 13종과 버섯 수확 후 배지 추출물 및 부숙 추출물 5종의 고추역병균(*Phytophthora capsici*)에 대한 항균활성 검정을 수행하고, *Oudemansiella* sp., *Panus rudis*, 표고버섯 수확 후 배지 부숙물이 활성을 나타냄을 밝힘.
- ○ 표고버섯 수확 후 배지 부숙물로부터 식물생장촉진물질의 분리, 정제를 수행하였으며, 그 결과 식물생장촉진활성은 단일성분에 의한 것은 아니고 화합물이 복합적으로 존재할 때 활성을 나타내는 것으로 추정함.
- ○ 표고버섯 수확 후 배지 부숙물로부터 고추역병 길항활성물질 compound **1**을 정제하고, mass 및 NMR 분석을 수행하여 *N*-De-phenylethylisohericerin으로 화학구조를 결정함.
- ○ 표고버섯 수확 후 배지와 표고버섯 수확 후 배지 부숙물의 HPLC 분석을 수행하여 부숙 후에 함량이 크게 증가한 compound **2**와 **3**을 확인함.
- ○ 부숙 후에 함량이 크게 증가한 화합물 **2**와 **3**을 분리하고, mass 및 NMR 분석을 수행하여 화학구조를 각각 4-hydroxybenzoic acid ㅇ와 vanillic acid로 결정함.
- ○ 4-Hydroxybenzoic acid와 vanillic acid를 제품의 지표성분으로 이용하기 위하여 특이성, 직선성 등의 분석법을 확립하고, (주)케이글로벌에서 제조한 서로 다른 3개의 표고버섯 수확 후 배지 부숙 추출물 시제품(lot number: 20210722, 20210917, 20211213)을 사용하여 분석법을 검증함.
- ○ 버섯 수확 후 배지 활용 대량퇴비생산체계를 구축 함
- ○ 버섯 수확 후 배지 부숙(CSMS)추출물유래 길항성미생물 배양 “케이바이탈 엑스트라” 액상형 시제품은 토양전염성 고추역병 방제에 활용
- ○ 표고버섯 수확 후 배지 퇴비유래 필렛형 제품(케이바이탈 펠렛)은 토양개량 및 작물생육 용 유기농업자재로 활용 될 수 있으며 기존의 축산분뇨사용 유기질비료의 악취 및 농약성분검출을 배제하고 친환경농업과 도시농업에 활용이 기대되는 제품
- ○ 시제품의 안정성 검정: 독성시험 (급성경구독성, 급성경피독성, 급성폐독성),환경독 성시험(어독성, 꿀벌독성, 토양미생물 등)
- ○ 시제품의 포장실증시험에서 기존의 유기질비료성능에 비하여 우수한 결과로 나타남

(2) 정량적 연구개발성과

< 정량적 연구개발성과표(예시) >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명 \ 연도			1단계 (YYYY~YYYY)	n단계 (YYYY~YYYY)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표[1]		목표(단계별)				
		실적(누적)				
		목표(단계별)				
		실적(누적)				
연구개발과제 특성 반영 지표[2]		목표(단계별)				
		실적(누적)				
		목표(단계별)				
		실적(누적)				
계						

* 1」전담기관 등록·기탁 지표: 논문[에스시아이 Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신품종 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.
* 2」연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 설계 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다
  (연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

< 연구개발성과 성능지표(예시) >

평가 항목 (주요성능[1])		단위	전체 항목에서 차지하는 비중[2] (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치		목표설정 근거
				보유국/보유기관	성능수준	성능수준	1단계 (2020~2021)	n단계 (YYYY~YYYY)	
1	버섯수확후배지 퇴비		70%	중국	60	70	100		표고버섯수확후배지 퇴비
2	버섯수확후배지 퇴비 추출물 이용 길항성 미생물 배양		30	네덜란드	60	50	100		버섯수확후배지 퇴비 추출물 영양소 이용 고밀도 세균배양

* 1」 정밀도, 인장강도, 내충격성, 작동전압, 응답시간 등 기술적 성능판단기준이 되는 것을 의미합니다.
* 2」 비중은 각 구성성능 사양의 최종목표에 대한 상대적 중요도를 말하며 합계는 100%이어야 합니다.

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

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비 SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Chemical constituents of the culture broth of Panus rudis	Mycobiology	Ja-Gyeong Song	49	대한민국	Taylor & Francis Group	SCIE	2021.12.	1229-8093	100
2	버섯수확후배지의 퇴비화에 따른 물리화학적 변화 및 식물 생육 효과	Journal of Mushrooms	송지민	18	대한민국	한국버섯학회	비SCIE	2020.9	2288-8853	100
3	표고버섯 수확후배지 퇴비 추출물에서 *Bacillus velezensis* HKB-1의 배양적 특징 및 고추역병의 생물학적 방제	Journal of Mushrooms	김자윤	19	대한민국	한국버섯학회	비SCIE	2020.9	2288-8853	100
4	The defense response of pepper (*Capsicum annuum* L.) induced by exopolysaccharide from *Schizophyllum commune*	Physiological and Molecular Plant Pathology	Hae-lin Yu	118	영국	Elservier	SCIE	2022.3	ISSN: 0885-5765	100

MYCOBIOLOGY
2021, VOL. 49, NO. 6, 604–606
https://doi.org/10.1080/12298093.2021.2004663

RESEARCH NOTE

OPEN ACCESS

Chemical Constituents of the Culture Broth of *Panus rudis*

Ja-Gyeong Song, Lee Su Ha, Dae-Won Ki, Dae-Cheol Choi, In-Kyoung Lee and Bong-Sik Yun

Division of Biotechnology and Advanced Institute of Environment and Bioscience, College of Environmental and Bioresource Sciences, Jeonbuk National University, Iksan, Korea

ABSTRACT

In our ongoing search for new secondary metabolites from fungal strains, one novel compound (**1**) and nine known compounds (**2-10**) were isolated from the EtOAc-soluble layer of the culture broth of *Panus rudis*. The culture broth of *P. rudis* was extracted in acetone and fractionated by solvent partition; column chromatography using silica gel, Sephadex LH-20, and Sephadex G-10; MPLC; and HPLC. The structures of isolated compounds were elucidated by one- and two-dimensional NMR and LC-ESI-mass measurements. One new compound, panepoxydiol (**1**), and nine known compounds, (*E*)-3-(3-hydroxy-3-methylbut-1-en-1-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ene-2,5-diol (**2**), isopanepoxydone (**3**), neopanepoxydone (**4**), panepoxydone (**5**), panepophenanthrin (**6**), 4-hydroxy-2,2-dimethyl-6-methoxychromane (**7**), 6-hydroxy-2,2-dimethyl-3-chromen (**8**), 2,2-dimethyl-6-methoxychroman-4-one (**9**), 3,4-dihydroxy-2,2-dimethyl-6-methoxychromane (**10**), were isolated from the culture broth of *P. rudis*. This is the first report of isolation of a new compound panepoxydiol (**1**) and nine other chemical constituents (**2-5**, **7-10**) from the culture broth of *P. rudis*.

ARTICLE HISTORY
Received 1 October 2021
Revised 5 November 2021
Accepted 7 November 2021

KEYWORDS
Chemical constituents; culture broth; *Panus rudis*

Acknowledgements

The authors thank Ms. Ji-Young Oh, Center for University-wide Research Facilities (CURF) at Jeonbuk National University, for NMR measurements.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This study was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through Useful Agricultural Life Resources Industry Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) [grant number 120043-2], Republic of

the ubiquitin-activating enzyme inhibitor (+)-panepophenanthrin. Angew Chem. 2003;115(33):4043–4047.

[8] Cotelle N, Moreau S, Bernier JL, et al. Antioxidant properties of natural hydroquinones from the marine colonial tunicate *Aplidium californicum*. Free Radic Biol Med. 1991;11(1):63–68.

[9] Cota BB, Rosa LH, Fagundes EMS, et al. A potent trypanocidal component from the fungus *Lentinus strigosus* inhibits trypanothione reductase and modulates PBMC proliferation. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103(3):263–270.

[10] Lee IK, Jung JY, Kim YS, et al. *p*-Terphenyls from the fruiting bodies of *Paxillus curtisii* and their antioxidant properties. Bioorg Med Chem. 2009;17(13):4674–4680.

[11] Favre-Godal Q, Pinto S, Dorsaz S, et al. Identification of antifungal compounds from the root bark of *Cordia anisophylla* J.S. Mill. J Braz Chem Soc. 2019;30:472–478.

Journal of Mushrooms 한국버섯학회지 Research Article

버섯수확후배지의 퇴비화에 따른 물리 화학적 변화 및 식물 생육 효과

송지민[1] · Nguyen Hong Phong[1] · 김자윤[1] · 강대선[2] · 유정연[1] · 강희완[1,3,*]

[1]한경대학교 생명공학부 원예생명공학전공
[2]㈜에이글로벌
[3]한경대학교 유전공학연구소

Physicochemical changes and plant growth effect on composting of spent mushroom substrates

Ji-Min Song[1], Nguyen Hong Phong[1], Ja-Yoon Kim[1], Dae-Sun Kang[2], Jeong-Yeon Yu[1], and Hee-Wan Kang[1,3,*]

[1]Department of Horticultural Biotechnology, Division of Biotechnology, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea
[2]K-Global Ltd., Yongin 17015, Korea
[3]Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea

ABSTRACT: This study aimed to assess the feasibility of composting spent mushroom substrate (SMS) materials of *Lentinula edodes* (Le), *Hericium erinaceus* (He), and *Pleurotus ostreatus* (Po). The different SMSs were composted for 7 to 30 days at high temperatures over 50˚C; the composting procedure was completed in 30 days. A maturity test was conducted using the radish seed germination index and CoMMe-100. The composted SMS (CSMS) from Le and He showed germination indices of 130% and 81%, respectively, that satisfied the criteria of maturity standard (germination index over 70%) and the CoMMe-100 analysis. The physicochemical changes of CSMSs included an increase in the pH range from 4–5 to 6–7, slight reduction in the EC to 1–1.4 dS/m, and an organic content of 36.9% in LeCSMS. In LeCSMS, the contents of N, P, and K were 1.2%, 2.3%, and 0.77%, respectively, and heavy metals were detected below the standard value in all CSMSs; the Ca and Mg contents in the CSMSs were increased from 30% to 60% when compared to those in the SMSs. The C/N ratio (from 26–33) in LeSMS and HeSMS decreased to 15.3–15.9 in CSMSs. The growth effect of LeCSMS treatment on pepper seedlings was 60% higher than that in the control groups , one of which was treated with commercial organic compost; the former showed a superior growth effect on the leaf width, leaf length, and leaf number compared to other control groups. In conclusion, LeCSMS and HeCSMS could be utilized as compost resources capable of efficient soil amendment and plant growth promotion.

KEYWORDS: Composting, Physicochemical changes, Plant growth, Spent mushroom substrate

감사의 글

본 연구는 농림수산식품기술기획평가원 (IPET) 유용농생명자원산업화기술개발사업(과제번호: 120043-2)연구지원에 의해 수행된 결과입니다.

REFERENCES

Ben-Dor E, Banin A. 1989. Determination of organic matter content in arid-zone soils using a simple "loss-on-ignition" method. *Commun Soil Sci Plant Anal* 20: 75-1695.

Brady NC. 1990. The nature and properties of soils. Macmillan, New York, USA.

Bremner JM. 1965. Total nitrogen. In C. A. Black (ed.) Methods of Soil Analysis. American Society of Agronomy, Wisconsin, USA.

González-Marcos A, *et al.* 2014. Composting of spent mushroom substrate and winery Sludge. *Comp Sci Utiliz* 23: 58-65.

Jonathan SG, Lawal MM, Oyetunji OJ. 2011. Effect of spent Lee CJ, *et al.* 2009. Applicability of spent mushroom media as horticultural nursery media. *Kor J Soil Sci Fertil* 42: 117-122.

Lou Z, *et al.* 2017. Composition variability of spent mushroom substrates during continuous cultivation, composting process and their effects on mineral nitrogen transformation in soil. *Geoderma* 307: 30-37.

Paula FS, *et al.* 2017. Stabilisation of spent mushroom substrate for application as a plant growth-promoting organic amendment. *J Environ Manage* 196: 476-486.

Said-Pullicino D, Erriquens FG, Gigliotti G. 2007. Changes in the chemical characteristics of water-extractable organic matter during composting and their influence on compost stability and maturity. *Bioresour Technol* 98: 1822-1831.

Suess A, Curtis J. 2006. Report: value-added strategies for spent mushroom substrate in BC. British Columbia Mushroom Industry, Columbia, UK. pp. 101.

Uzun I. 2004. Use of spent mushroom compost in sustainable fruit production. *J Fruit Ornam Plant Res* 12: 157-165.

Zhang L, Sun X. 2014. Changes in physical, chemical, and microbiological properties during the two-stage co-composting of green waste with spent mushroom compost and biochar. *Bioresour Technol* 171: 274-284.

Journal of Mushrooms 한국버섯학회지 Research Article

표고버섯 수확후배지 퇴비 추출물에서 *Bacillus velezensis* HKB-1의 배양적 특징 및 고추역병의 생물학적 방제

김자윤[1] · 서현지[1] · 강대선[2] · 강희완[1,3*]

[1]한경대학교 생명공학부 원예생명공학전공
[2]㈜에이글로벌
[3]한경대학교 유전공학연구소

Cultural characteristics of *Bacillus velezensis* HKB-1 in the water extract of the composted spent mushroom substrate of *Lentinula edodes* and biological control of Phytophthora blight disease of pepper

Ja-Yoon Kim[1], Hyun-Ji Seo[1], Dae-Sun Kang[2], and Hee-Wan Kang[1,3*]

[1]School of Biotechnology, Division of Horticultural Biotechnology, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea
[2]K-Global Ltd., Yongin 17015, Korea
[3]Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea

ABSTRACT: *Bacillus velezensis* HKB-1 was isolated from the composted spent mushroom substrate of *Lentinula edodes* (LeCSMS) and inhibited mycelial growth of phytopathogenic fungal species, *Phytophthora capsici*, *Collectotrichum coccodes* and *Fusarium oxysporium* by more than 70%. *B. velezensis*'s HKB-1 showed bacterial growth rate 10 to 100 times higher than that of other commercial bacterial media in water extract of LeCSMS supplemented with 1% molasses. The LeCSMS medium was effective in promoting the growth of pepper and controlling Phytophthora blight disease of pepper.

KEYWORDS: Bacteria, Composted spent mushroom substrate, Control, Culture, Lentinula edodes, Phytophthora blight disease of pepper, Water extract

적 요

Bacillus velezensis HKB-1가 표고버섯 수확후배지 퇴비로부터 분리되었으며 고추역병균(*Phytophthora capsici*), 인삼모잘록병균(*Rhizoctonia solani*), 고추탄저병균(*Collectotrichum coccodes*) 및 시들음병(*Fusarium oxysporium*)의 균사체 성장을 70% 이상 억제하는 항 진균 활성을 보였다. *B. velezensis* HKB-1은 표고버섯 수확후배지 퇴비 물 추출물과 당밀 1% 첨가배지에서 다른 상업용 세균배지보다 10~100배 더 높은 세균증식률을 보였으며 고추 역병균의 균사체 생장을 90% 억제하였으며 고추생육 촉진효과 및 고추역병에 대하여 70% 이상의 방제효과가 있었다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품기술기획평가원(IPET) 유용농생명자원산업화 기술개발사업(과제번호: 120043-2) 연구지원에 의해 수행된 결과입니다.

Hwang BK, Kim CH. 1995. *Phytophthora* blight of pepper and its control in Korea. *Plant Dis* 79: 221-227.

Kang DS, Min KJ, Kwak AM, Lee SY, Kang HW. 2017. Defense response and suppression of *Phytophthora* blight disease of pepper by water extract from spent mushroom substrate of *Lentinula edodes*. *Plant Pathol J* 33: 264-275.

Kang HW. 2019. Industrial utilization of spent mushroom substrate. *J Mushrooms* 17: 85-92.

Kim EY, Kook SW, Yuk HJ, Yoon MH, Kim SC. 2016. Compost production using vegetable waste and spent oak mushroom substrate (SMS). *J Mushrooms* 14: 237-243.

Kwak AM, Lee IK, Lee SY, Yun BS, Kang HW. 2016. Oxalic acid from *Lentinula edodes* culture filtrate: Antimicrobial activity on phytopathogenic bacteria and qualitative and quantitative analyses. *Mycobiology* 44: 338-342.

Lee GW, Kim MJ, Park JS, Chae JC, Soh BY, Ju JE, Lee KI. 2011. Biological control of *Phytophthora* blight and anthracnose disease in red-pepper using *Bacillus subtilis* S54. *Res Plant Dis* 17: 86-89.

Lee SY, Song JK, Park KH, Woo HY, Kim JI, Han JH. 2016. Biocontrol of ginseng damping-off by *Bacillus velezensis* CC112. *Kor J Mycol* 44: 176-183.

Myo EM, Liu B, Ma J, Shi L, Zhang K, Ge B. 2019. Evaluation of *Bacillus velezensis* NKG-2 for bio-control activities against

Physiological and Molecular Plant Pathology 118 (2022) 101810

Contents lists available at ScienceDirect

Physiological and Molecular Plant Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pmpp

The defense response of pepper (*Capsicum annuum* L.) induced by exopolysaccharide from *Schizophyllum commune*

Hae-lin Yu [a], Ja-Yoon Kim [b], Sun-Hwa Lim [c], Hee-Wan Kang [b,*]

[a] Department of Forest Bio-Resource, National Institute of Forest Science, Suwon 16632, South Korea
[b] School of Biotechnology, Division of Horticultural Biotechnology, Hankyong National University, Anseong 17579, South Korea
[c] Faculty of Health & Food /Medical Plant, Suwon Women's University, Suwon 16632, South Korea

ARTICLE INFO

Keywords:
Schizophyllum commune
Exopolysaccharide
Pepper
Phytophthora blight
Defense response

ABSTRACT

β-glucan, a major cell wall component of fungal species, functions as an elicitor inducing plant defense activities. The exopolysaccharide from *Schizophyllum commune* HNU-12 (SC-EP) showed a protective effect on pepper against Phytophthora blight disease. Quantitative real-time PCR revealed that the expression of defense genes, *CaWPR1*, *CaWGLU* and *CaPR-4* was significantly induced in SC-EP and α,β-aminobutyric acid-treated pepper leaves. Furthermore, phenolic compounds, phenylalanine ammonia lyase activity and salicylic acid contents increased in SC-EP-treated pepper leaves. Our findings indicate that SC-EP can be used as an elicitor to induce defense activities against Phytophthora blight of pepper.

increased total phenolic contents in the leaves of treated pepper plants to 0.16 and 0.17 mg CA/g, respectively, compared with the 0.1 mg CA/g measured in the leaves of water-treated negative control plants (Fig. 4A). The accumulation of phenolic compounds such as phytoalexins at the site of infection site has been shown to be correlated with defense mechanisms, such as the hypersensitive response, which is associated with their toxic activities [24,31]. In this context, consistent with the findings of the present study, it has been reported that BABA induces the accumulation of phenolic compounds and PR proteins in tomato roots [31] and enhances resistance to *Uromyces pisi* in pea plants by promoting an increase in total phenolic contents [32]. Accordingly, it is thus presumed that phenolics produced in SC-EP-treated pepper plants play potential roles in disease resistance.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This study was supported by research grant [Project No.120043–2] of the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET).

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	The 2020 KSPP Conference & Special Symposium (한국식물병리학회 2020년 학술대회)	Dae-Cheol Choi, Lee Su Ha, Won-Gi Seo, Chae-Won Kim, Minchan Kim, In-Kyoung Lee, Hee-Wan Kang and Bong-Sik Yun	2020. 10. 15	한국과학기술회관 (Online conference)	대한민국
2	2021년 (사)한국버섯학회 추계학술대회	Dae-Cheol Choi, Dae-Won Ki, Won-Gi Seo, Chae-Won Kim, In-Kyeong Lee, Hee-Wan Kang, Bong-Sik Yun	2021. 10. 15	국립한경대학교	대한민국
3	2020년 (사)한국버섯학회 추계학술대회	Ji-Min Song, Nguyen Hong Phong, Jeong-Yeon Yoo, Dae-Sun Kang, Hee-Wan Kang	2020.09.24	국립공주대학교	대한민국
4	2021년 (사)한국버섯학회 하계학술대회	Nguyen Hong, Hyun-Ji Seo, Chae-Young Mun, Hee-Wan Kang	2021. 06. 04	전라남도농업기술원	대한민국
5	2021년 (사)한국버섯학회 하계학술대회	Ja-Yoon Kim, Hyun-Ji Seo, Hee-Wan Kang	2021. 10. 15	국립한경대학교	대한민국
6	2021년 (사)한국버섯학회 하계학술대회	Dae-Sun Kang,,Hyun-Ji Seo, Chae-Young Mun, Hee-Wan Kang	2021. 06. 04	전라남도농업기술원	대한민국
7	2021(사)한국식물생명공학회 정기학술발표회 및 총회	Hyun-Ji Seo,Chae-Young Mun, Seon Hwa Lim, Hee-Wan Kang	2021. 08. 12-14	라마다 프라자 제주	대한민국

□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

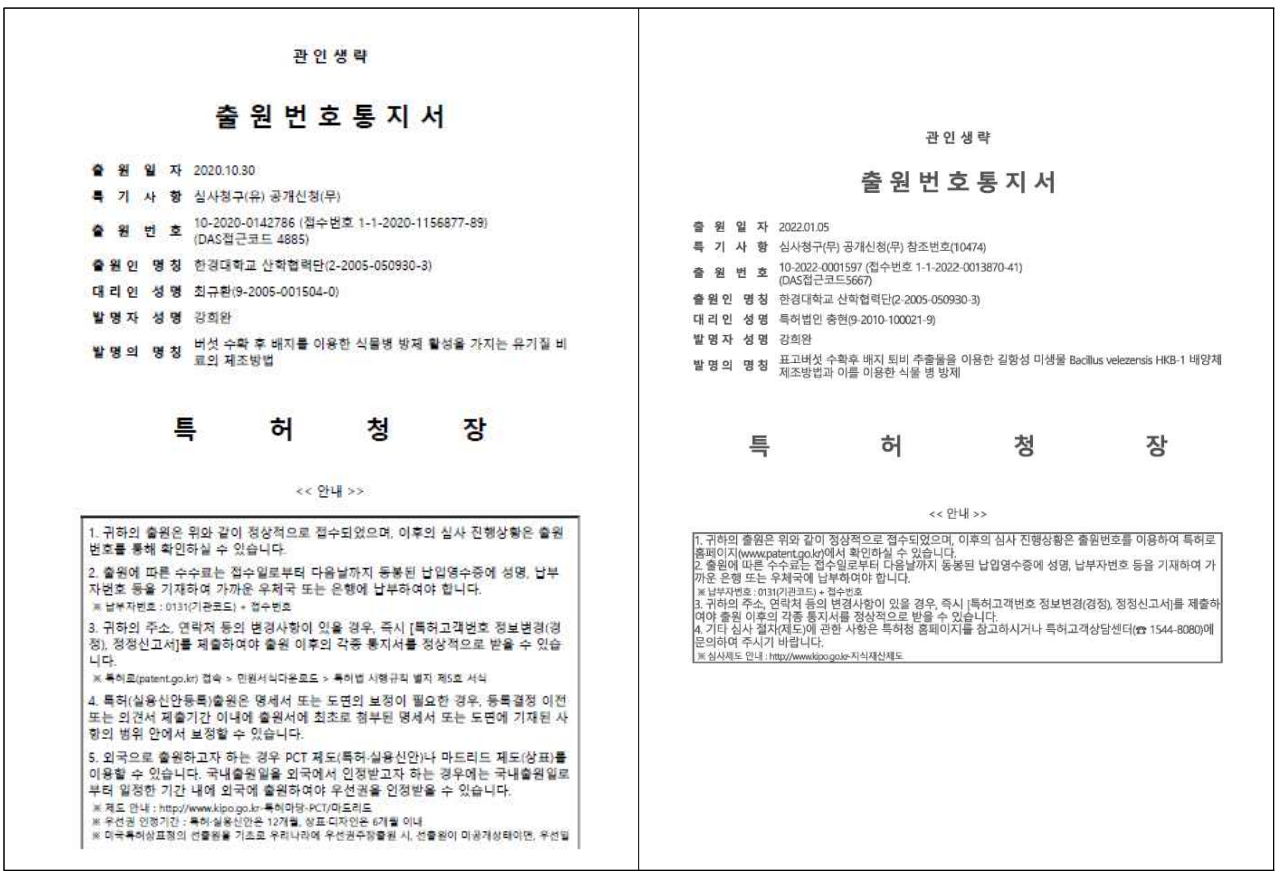
□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	특허미생물수탁 *Bacillus velenzenensis* HKB-1	KACC 92407P	KACC/국립농업과학원	2022.1

[기술적 성과]

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

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	버섯 수확 후 배지를 이용한 식물병 방제 활성을 가지는 유기질 비료의 제조방법	대한민국	한경대학교 산학협력단	2020.10.30	10-2020-0142786					100	√
2	표고버섯 수확후 배지 퇴비 추출물을 이용한 길항성 미생물 *Bacillus velezensis* HKB-1 배양체 제조방법과 이를 이용한 식물 병 방제	대한민국	한경대학교 산학협력단	2022.01.05	10-2022-0001597					100	√



관인생략

출원번호통지서

출 원 일 자 2020.10.30
특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무)
출 원 번 호 10-2020-0142786 (접수번호 1-1-2020-1156877-89)
(DAS접근코드 4885)
출원인 명칭 한경대학교 산학협력단(2-2005-050930-3)
대리인 성명 최규환(9-2005-001504-0)
발명자 성명 강희완
발명의 명칭 버섯 수확 후 배지를 이용한 식물병 방제 활성을 가지는 유기질 비료의 제조방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일

관인생략

출원번호통지서

출 원 일 자 2022.01.05
특 기 사 항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(10474)
출 원 번 호 10-2022-0001597 (접수번호 1-1-2022-0013870-41)
(DAS접근코드5667)
출원인 명칭 한경대학교 산학협력단(2-2005-050930-3)
대리인 성명 특허법인 충현(9-2010-100021-9)
발명자 성명 강희완
발명의 명칭 표고버섯 수확후 배지 퇴비 추출물을 이용한 길항성 미생물 Bacillus velezensis HKB-1 배양체 제조방법과 이를 이용한 식물 병 방제

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
※ 심사제도 안내 : http://www.kipo.go.kr-지식재산제도

ㅇ 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	√		√			√				

□ 저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

□ 신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

□ 기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

□ 표준화

ㅇ 국내표준

번호	인증구분[1」]	인증여부[2」]	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류[3」]	제안/인증일자
	토양개량 및 작물생육용	인증	유기농자재	제 공시-2-3-734호	케이글로벌		2022.2.24

* 1」 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
* 2」 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
* 3」 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

ㅇ 국제표준

번호	표준화단계구분[1」]	표준명	표준기구명[2」]	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식[3」]	제안자	표준화 번호	제안일자

* 1」 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.

* 2」 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.

* 3」 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

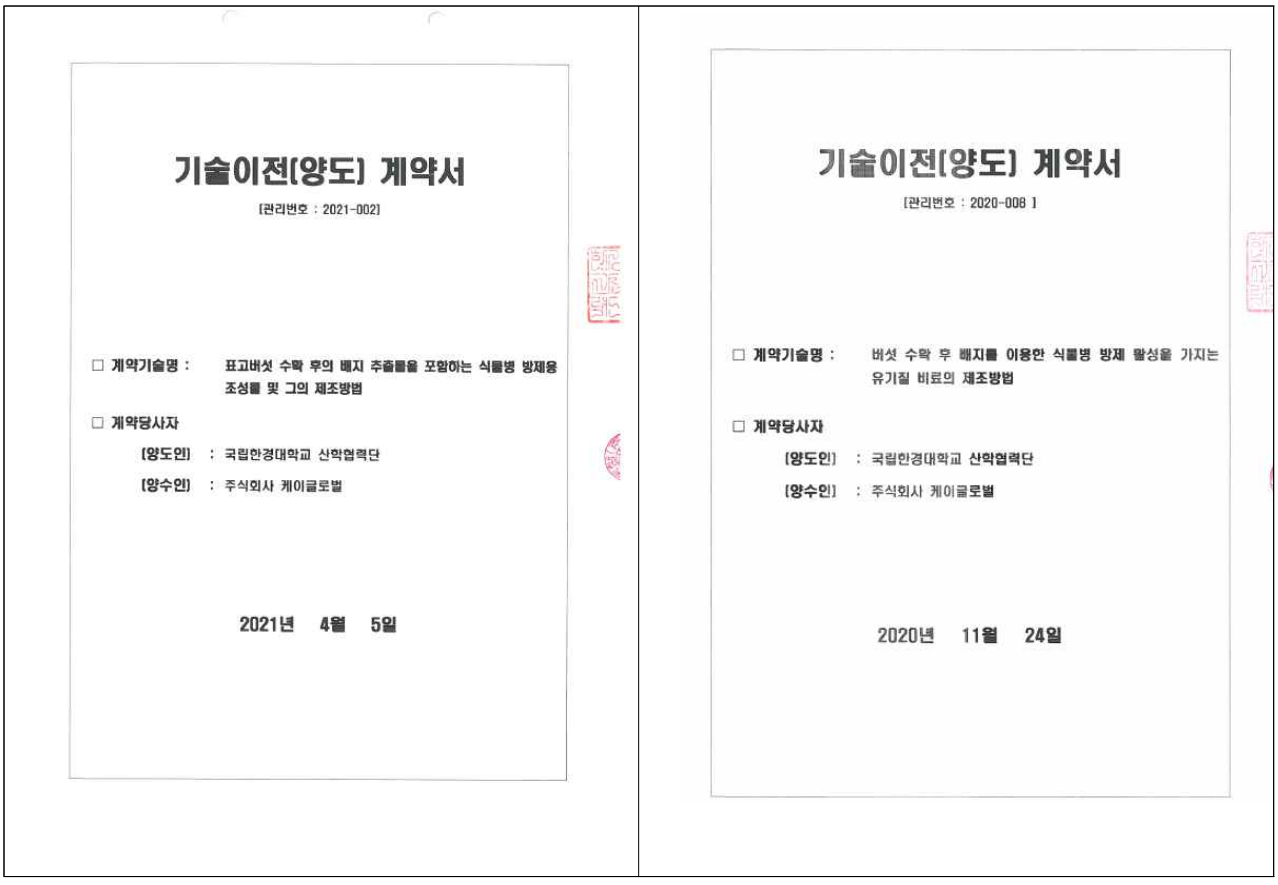
□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	케이바이탈 엑스트라	2022년 3월/2021.9	㈜케이글로벌	전북 익산공장	병해충관리용	1년	강원대산단	22. 4월예정
2	케이바이탈 펠렛	2022년 3월/2021.9	㈜케이글로벌	전북 익산공장	토양개량 및 작물생육 용	1년	강원대산단	22. 5월예정

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	양도	표고버섯 수확후의배지 추출물을 포함하는 식물병방제용 조성물 및 그의 제조방법	㈜케이글로벌	2021. 04.05	15,000,000원	
2	양도	버섯수확후배지를 이용한 식물병방제활성을 가지는 유기질비료의 제조방밥	㈜케이글로벌	2020.11.24	5,000,000원	

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등



기술이전(양도) 계약서

[관리번호 : 2021-002]

□ 계약기술명 : 표고버섯 수확 후의 배지 추출물을 포함하는 식물병 방제용 조성물 및 그의 제조방법

□ 계약당사자

(양도인) : 국립한경대학교 산학협력단

(양수인) : 주식회사 케이글로벌

2021년 4월 5일

기술이전(양도) 계약서

[관리번호 : 2020-008]

□ 계약기술명 : 버섯 수확 후 배지를 이용한 식물병 방제 활성을 가지는 유기질 비료의 제조방법

□ 계약당사자

(양도인) : 국립한경대학교 산학협력단

(양수인) : 주식회사 케이글로벌

2020년 11월 24일

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*
	국내	1억 (건조가 및 필렛제조기)	5억 (공자부지,신축)	6억	내부자금및 담보대출

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식[1]	사업화 형태[2]	지역[3]	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

* 1」기술이전 또는 자기실시
* 2」신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
* 3」국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)		현재까지	3년 후	5년 후
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내			
		국외			
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)		현재	3년 후	5년 후
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2020년	2021년	
1	시제품생산 및 안정성 평가	㈜케이글로벌	1	1	2
합계			1	1	2

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	0
		생산인력	3
	개발 후	연구인력	1
		생산인력	4

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구 분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1		2021		2	4		3	3	3			3	

□ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

□ 다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

□ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
1	버섯학회우수발표상	버섯학회우수발표상	학회발표우수	강대선, 서현지, 문채영, 강희완	202.06.04	한국버섯학회

[인프라 성과]

□ 연구시설・장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설・장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설・장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

* 「과학기술기본법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설・장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가)
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함)
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

<참고 2> 국가연구개발혁신법 시행령 제33조제4항 및 별표 4에 따른 연구개발성과의 등록·기탁 대상과 범위

구분	대상	등록 및 기탁 범위
등록	논문	국내외 학술단체에서 발간하는 학술(대회)지에 수록된 학술 논문(전자원문 포함)
	특허	국내외에 출원 또는 등록된 특허정보
	보고서원문	연구개발 연차보고서, 단계보고서 및 최종보고서의 원문
	연구시설·장비	국가연구개발사업을 통하여 취득한 3천만 원 이상 (부가가치세, 부대비용 포함) 연구시설·장비 또는 공동활용이 가능한 모든 연구시설·장비
	기술요약정보	연차보고, 단계보고 및 최종보고가 완료된 연구개발성과의 기술을 요약한 정보
	생명자원 중 생명정보	서열·발현정보 등 유전체정보, 서열·구조·상호작용 등 단백체정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
기탁	생명자원 중 생물자원	세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물자원, 인간 또는 동물의 세포·수정란 등 동물자원, 식물세포·종자 등 식물자원, DNA, RNA, 플라스미드 등 유전체자원 및 그 밖의 생물자원
	화합물	합성 또는 천연물에서 추출한 유기화합물 및 관련 정보
	신품종	생물자원 중 국내외에 출원 또는 등록된 농업용 신품종 및 관련 정보

2) 목표 달성 수준

추 진 목 표	달 성 내 용	달성도(%)
○ 버섯수확후배지 (SMS)의 부숙 조건 확립	- 버섯 수확 후 배지(SMS) 퇴비화 시험을 위하여 버섯농가에서 수거한 표고SMS, 노루궁뎅이 SMS, 느타리 SMS를 사용 부숙 최적 조건 확립 함 - 버섯수확후배지 퇴비 (CSMS)의 물리 화학적 특성 및 미생물밀도 구명 - 표고버섯수확후배지의 Pilot-scale 부숙화 대량생산체제 구축	100
○ 버섯 수확 후 배지 퇴비 (CSMS)의 고추역병방제 효과 및 식물생육 효과 구명	- 표고, 느타리, 노루궁뎅이 버섯수확후배지 퇴비(CSMS)처리에 따른 고추, 상추, 배추생육촉진 효과 구명 - 표고, 노루궁뎅이버섯수확후배지 퇴비(LeCSMS)처리에 따른 고추역병 방제효과 구명:	100
○ CSMS 추출 미생물 배양체를 이용 고추역병과 식물생육의 최적성능 개선	- 16S ribosomal RNA 염기서열을 이용한 LeCSMS에 분포하는 세균동정으로 7 *Citrobacter koseri*, 1 *Bacillus altitudinis*, 2 *Burkholderia multivorans*, 3 *Klebsiella pneumoniae*, 2 *Bacillus velezensis*, 3 *Pseudomonas* spp.을 동정하고 *Bacillus velezensis* HKB-1 분리 및 특허균주 기탁 - *B. velezensis* HKB-1의 LeCSMS 물 추출물 배양법을 개발하여 기존의 상업배지와 비교하여 우수한 세균증식효과와 고추역병 방제효과를 구명함	100
○ 표고CSMS유래 주요 화합물의 항균활성 검정	❍ LeCSMS의 주요성분인 4-hydroxybenzoic acid와 vanillic acid는 500 mg/L이하의 농도에서 난균류에 속하는 *Phytophthora capsici*와 *Phythium ultimum*에서 90%이상의 균사체 생장억제율을 보이면서 강력한 항균력을 나타내어 고추역병 방제의 지표물질로 활용 가능성 제시	100
○ CSMS 유래 항균활성 화합물의 식물역병 저항성 유전자 발현 유도 기구 구명	❍ qRT-PCR로 노루궁뎅이버섯수확후배지 퇴비 유래 항균활성물질 *N*-De-phenylethylisohericerin의 고추병 저항성유전자 CaPR10의 발현유도 기능구명	100
○ 버섯 균주 배양액, 버섯 수확 후 배지 추출물 및 부숙 추출물의 역병 길항활성 검정 및 스크리닝	○ 버섯 균주 배양액 13종과 버섯 수확 후 배지 추출물 및 부숙 추출물 5종의 고추역병균에 대한 항균활성 검정을 수행하고, *Oudemansiella* sp., *Panus rudis*, 표고버섯 수확 후 배지 부숙물이 활성을 나타냄을 밝힘	100
○ 버섯 균주 배양액, 버섯 수확 후 배지 추출물 및 부숙 추출물의 활성성분 규명	○ 고추역병균에 대한 길항물질 및 성분규명 연구를 수행한 결과, *Oudemansiella* sp.는 strobilurin A, *Panus rudis*는 신규 화합물인 panepoxydiol과 9종의 기지화합물을 규명함 ○ 산업화소재로 최종 선정한 표고버섯 수확 후 배지 부숙물로부터 다양한 column chromatography 및 MPLC를 이용하여 고추역병균에 길항활성을 나타내는 화합물 compound **1**을 분리, 정제함 ○ Mass 및 NMR 분석을 수행하여 compound **1**의 화학구조를 *N*-De-phenylethylisohericerin으로 규명함	100

○ 표고버섯 수확 후 배지 부숙물로부터 식물생장촉진물질의 분리 및 정제	○ 표고버섯 수확 후 배지 부숙물로부터 식물생장촉진물질의 분리, 정제를 수행하였으며, 그 결과 식물생장촉진활성은 단일성분에 의한 것이 아니고 화합물이 복합적으로 존재할 때 활성을 나타내는 것을 밝힘	100
○ 표고버섯 수확 후 배지 부숙물 지표성분의 선정	○ 표고버섯 수확 후 배지와 표고버섯 수확 후 배지 부숙물의 HPLC 분석을 수행하여 부숙 후에 함량이 크게 증가한 화합물 compound **2**와 **3**을 지표성분으로 선정함	100
○ 표고버섯 수확 후 배지 부숙물 지표성분의 분리 및 화학구조 규명	○ Column chromatography, MPLC, HPLC를 이용하여 부숙 후에 함량이 크게 증가한 화합물 compound **2**와 **3**을 분리, 정제함 ○ Mass 및 NMR 분석을 수행하여 compound **2**의 화학구조를 4-hydroxybenzoic acid로, compound **3**의 화학구조를 vanillic acid로 결정함	100
○ 지표성분의 분석법 확립 및 시제품을 이용한 분석법 검증	○ 지표성분으로 선정한 4-hydroxybenzoic acid와 vanillic acid의 특이성, 직선성 등을 조사하여 분석법을 확립함 ○ (주)케이글로벌에서 제조한 서로 다른 3개 배치 시제품(lot number: 20210722, 20210917, 20211213)을 사용하여 분석법을 검증함	100
○시제품생산	○ 표고버섯수확후배지 퇴비유래 “케이바이탈펠릿”생산 및 물리이확적성분 분석 ○ 표고버섯수확후배지 퇴비 추출물유래 케이바이탈엑스트라” 액상형 시제품은생산 및 이확적 성분분석	100
○시제품의 포장실증시험	○ 시제품 케이바이탈펠릿의 노지포장실험 결과 상용퇴비 대조구대비 15%이상 높았다.	100
○시제품의 대량생산체제확립	○ Pilot sale의 생산체계를 구축하였으며 전북익산에 2천평 공장부지를 확보 하였으며 대량생산체계를 확보함	100
❍ 시제품의 안정성평가 및 병해충관리 지표물질	○ 케이바이탈펠릿의 유기농자재 등록을 위하여 고추, 오이, 참외, 상추, 토마토에 대한 케이바이탈펠릿 처리에 따른 장해가 없었음 ○ 비소 45mg/kg, 카드뮴5mg/kg, 수은2mg/kg. 납 130mg/kg, 크롬 200mg/kg, 구리 360mg/kg, 니켈 45mg/kg, 아연 90mg/kg이다. 병원성미생물 대장균 (*Escherichia coli*) O157:H7, 살모넬라 (*Salmonella spp.*)은 불검출 확인 ○ 병해억제 성분으로써 4-Hydroxybenzoic acid의 검출이 확인되었으며 병해충관리 제품의 지표물질로 활용	90

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

○ 시제품의 대량생산체계를 완성하기 위하여 전북익산에 6억원을 투자하여 2000평 부지확보 및 공장설립을 수행 하였으나 인허가 지연으로 현재 공사 진척율 90%를 보이고 있으며 2022년 4월경 케이바이탈펠릿 대량생산 및 판매가 이루어 질것으로 예상 됨

○ 시제품 “케이바이탈 엑스트라” 는 병해충관리용으로 안정성검사에서 독성검사를 진행 하고 있으며 병해충억제 지표성분으로 4-Hydroxybenzoic acid를 설정 할 예정 임.

○ 2년과제로 연구 후 유기농자재 등록 등 인증을 위하여 시간이 촉박한 실정에 있으며 과제완결 후 추가실적으로 활용 할 예정임

2) 자체 보완활동

○ 버섯수확후배지 퇴비 추출물를 미생물배양체로 활용하여 치마버섯 균사체 배양을 배양하여 고추역병방제 성능을 강화시킬 목적으로 실험을실시 하였음.

○ 그러나 배양기간이 길고 공정과정이 복잡하여 산업화 적용이 어려워 길항성 세균을 활용하였음

○ 표고버섯수확후배지 퇴비(LeCSMS)로부터 길항성이 우수한 *Bacillus velezensis* HKB-1를 분리 동정하였으며 퇴비추출물을 이용한 세균배양이 상업 배지보다 우수하였으며 항균효과도 탁월 하였음

○ 따라서 LeCSMS 추출물 배양 *B. velezensis* HKB-1 복합액상체를 활용한 고추역병 방제 실험에 착수하였으며 고추 식물 생장과 고추 역병 방제 효과를 개선 시킬 수 있었음

3) 연구개발 과정의 성실성

○ 버섯수확후배지 중 표고버섯수확후배지는 재 활용이 극히 어려워 농가의 골칫거리로 여겨 지고 있으며 직접사용시 작물의 생리적 작용과 생태환경에 유해효과가 있음

○그러나 연구팀의 지속적 연구결과로 다른 느타리, 새송이, 팽이 등 다른 버섯수확후 배지보다 표고버섯수확후배지를 이용 성능이 우수한 최적의 유효성분이 증가된 퇴비를 만들었으며 유해성금속이온과 농약이 검출 되지 않은 친환경 퇴비로 활용할 수 있었으며 향후 도시농업의 퇴비로 활용 할 수 있을 것으로 전망 됨

○ 버섯수확후배지배지를 활용하여 퇴비제조 및 시제품생산을 위한 기반연구를 성실히 수행하였으며 최종적으로 “케이바이탈펠릿” 케이바이탈 엑스트라” 액상형 시제품을 개발 하였으며 ㈜ 케이글로벌에서는 전북 익산에 시제품 생산대량체제 구축을 하였음

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

○ 기존의 유기질 퇴비는 계분 등 가축분뇨를 혼합하여 제조 하고 있으며 유해성 중금속과 농약검출, 악취 등 유해성 논란이 문제점으로 지적되고 있으나 버섯수확후배지배지를 활용하면 위의 단점을 배제하고 친 환경농업에 활용 할 수 있는 유기농자재로 공시

○ 본 연구의 “케이바이탈펠릿”제품은 악취 없고 농약 성분이 없으며 유기농자제로 공시되어 다양한 농작물에 널리 적용할 수 있는 친환경 유기질 비료로 활용할 수 있음

○ 시제품 “케이바이탈 엑스트라” 는 버섯수확후배지추출물 배양 미생물과 혼합 제형으로 병해충관리용 유기 농자재로 활용

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

○ 품질관리는 원료및 제품에 대하여 실시하며 유기농업자재 시험연구기관에 의뢰하여 실시한다.

○ 원료에 대한 품질관리 분석항목은 잔류농약검사를 연 1회이상 실시하며 제품에 대한 품질관리의 분석항목은 이화학검사(주성분), 잔류농약검사를 연1회 이상 실시한다.

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)			연구개발 종료 후 5년 이내
국외논문	SCIE		1
	비SCIE		
	계		
국내논문	SCIE		
	비SCIE		1
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내		1
	국외		
	계		1
인력양성	학사		
	석사		
	박사		
	계		
사업화	상품출시		2
	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			

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
2.	1)
	2)

[별첨 1]

자체평가의견서

1. 과제현황

	과제번호			120043-2	
사업구분					
연구분야	LA0906, PA0201			과제구분	단위
사 업 명	유용농생명자원산업화기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과 제 명	부숙 버섯 수확 후 배지 추출물 이용 식물역병 방제 및 식물생장촉진 친환경 복합제재 개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구개발기관	한경대학교 산학협력단			연구책임자	강희완
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2020. 04. 29 - 2020. 12. 31 (9개월)	226,000	75,340	301,340
	2차년도	2021.01.10.-2021.12.31	302,000	100,670	402,670
	3차년도				
	4차년도				
	5차년도				
	계		528,000	176,010	704,010
참여기업					
상 대 국		상대국연구개발기관			

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 :2022년 2월 7일

3. 평가자(연구책임자) :강희완

소속	직위	성명
한경대학교	교수	강희완

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	

Ⅰ. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

버섯수확후배지를 이용한 퇴비화 공정을 개발하였으며 친 환경 고추역병 방제활용으로 유효효과가 인정되며 퇴비추출물을 이용한 고밀도 미생물배양 및 식물병 방제의 새로운 방향을 제시하여 저가 원료로 고부가가치 퇴비와 고추역병방제제 제품을 개발함

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

○친 환경 식물생육촉진 및 병 방제에 이용되는 제품이 유럽 등에서 고가로 수입 가공하여 대부분 병충해 방제용으로 농가에 보급되고 있으나 버섯유래 추출물을 활용한 친 환경 방제제는 고추역병균의 항균활성, 식물생육촉진, 식물병 저항성 유도를 포함하는 복합 기능성 친 환경 유기농자재로 활용 가능하여 저가원료로 우수한 성능의 제품개발로 경제적 파급효과가 클 것으로 전망 됨

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

○ 기존의 유기질 퇴비는 계분 등 가축분뇨를 혼합하여 제조 하고 있으며 유해성 중금속과 농약 검출, 악취 등 유해성 논란이 문제점으로 지적되고 있으나 버섯수확후배지배지를 활용하면 위의 단점을 배제하고 친 환경농업에 활용 할 수 있는 유기농자재로 공시함 ○ 본 연구의 “케이바이탈펠릿”제품은 악취 없고 농약 성분이 없으며 유기농자제로 공시되어 다양한 농작물에 널리 적용할 수 있는 친환경 유기질 비료로 활용할 수 있으며 악취 없는 원예화분용 유기질 비료로 활용 적합하며 수입대체효과 및 국외 수출도 가능할 것으로 기대 됨 ○ 시제품 “케이바이탈 엑스트라” 는 버섯수확후배지추출물 배양 미생물과 혼합 제형으로 병해충관리용 유기 농자재로 활용

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

○ 표고버섯수확후배지를 이용 고추역병 방제와 수한 최적의 유효성분이 증가된 퇴비개발 ○ 버섯수확후배지배지를 활용하여 퇴비제조 및 시제품생산을 위한 기반연구를 성실히 수행하였으며 최종적으로 “케이바이탈펠릿” 케이바이탈 엑스트라” 액상형 시제품을 개발 하였으며 ㈜ 케이글로벌에서는 전북 익산에 시제품 생산대량체제 구축을 하였음 ○ 본 제품은 악취가 없으며 유해성금속이온과 농약이 검출 되지 않은 친환경 퇴비와 병충해 방제용 유기농자재로 활용 가능

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

논문(SCIE 2편), 국내논문(2/3) 과 특허출원(2/2) 학회발표(6/4)를 목표달성 하였으며 기술이전에 큰 성과가 있었음

Ⅱ. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
버섯수확후배지의 식물역병방제와 식물생육 최적 부숙화 조건 확립과 유효활성 버섯균류 구명	20	100	우수
버섯수확후배지 퇴비(CSMS)와 미생물배양 (MC)추출물의 식물역병 방제의 최적 성능 혼합비율 및 병 방제기구 구명	10	100	우수
식물역병 길항물질과 저항성 유도체 및 식물생육관련 유효 물질의 화학적 동정	20	100	우수
CSMS와 MC추출물 혼합원료로 친환경 복합기능성 제형개발	10	100	우수
	40	100	우수
합계	100점	100	우수

Ⅲ. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

느타리, 새송이, 표고 등 다양한 국내 식용버섯 버섯수확후배지의 퇴비화 조건을 규명하였으여 표고버섯수확후배지 유래 “케이바이탈펠릿”은 유기 농자재로 고시되었으며 표고버섯수확후배지는 버섯농가의 폐자원처리의 애로사항을 해결하고 저가 원료로 친환경 고 성능 퇴비와 병충해 방제제 개발에 유용하게 활용 할 수 있을 것으로 기대 됨.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

○ 표고버섯수확후배지 유래 “케이바이탈펠릿” 케이바이탈 엑스트라” 액상형 시제품을 개발하였으며 ㈜ 케이글로벌에서는 전북 익산에 시제품 생산대량체제 구축을 하였음 ○ 케이바이탈펠릿은 악취가 없으며 유해성금속이온과 농약이 검출 되지 않은 친환경 유기농자재 인증으로 친환경 농산물생산에 활용하며 특히 도시 화훼농업에 적극적으로 진출하여 악취 없는 유기질 비료공급 ○ 표고버섯수확후배지 추출물 유래 “케이바이탈 엑스트라”제품은 본 연구에서 개발한 퇴비추출물을 이용한 길항성미생물 배양방법과 연계하여 성능을 고도화 시켜 병해충방제용으로 활용

Ⅳ. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구개발기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	■자유응모과제 □지정공모과제	분 야		
연 구 과 제 명	부숙 버섯 수확 후 배지 추출물 이용 식물역병 방제 및 식물생장촉진 친환경 복합제재 개발			
주관연구개발기관	한경대학교 산학협력단		주관연구책임자	강희완
연 구 개 발 비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	528,000	176,010		704,010
연구개발기간	2020. 04. 29 - 2021. 12. 31 (21개월)			
주요활용유형	■ 산업체이전 □교육 및 지도 □정책자료 □기타( ) □미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
①버섯수확후배지의 식물역병방제와 식물생육 최적 부숙화 조건 확립과 유효활성 버섯균류 구명	○ 치마버섯 액체배양여액 exopolysaccharide의 분리 및 고추역병방제효과 규명 ○ 표고버섯수확후배지 퇴비(LeCSMS)로부터 길항성이 우수한 *Bacillus velezensis* HKB-1를 분리 동정
②버섯수확후배지 퇴비(CSMS)와 미생물배양 (MC) 추출물의 식물역병 방제의 최적 성능 혼합비율 및 병 방제기구 구명	○ 치마버섯 exopolysaccharide (SC-EP)의 β-glucan의 병 저항성 유도기구 구명 ○ *B. velezensis* HKB-1의 LeCSMS 추출배지에 고밀도 배양법개발로 상업용 미생물배지 대체효과 ○ *B. velezensis* HKB-1 LeCSMS배양체의 고추식물생장과 고추역병 방제 효과를 개선
③식물역병 길항물질과 저항성 유도체 및 식물생육 관련 유효 물질의 화학적 동정	○병해관리용으로 개발한 표고수확후배지 퇴비 추출액으로 부터 4-Hydroxybenzoic acid와 vanillic acid를 분리 동정하였으며 난균류에 특이적으로 강한 균사체생장 억제력를 보여 역병방제 지표화합물로 활용 가능하며 추후 농약안정성 시험과 식물장해 여부관련 시험
④CSMS와 MC추출물 혼합원료로 친 환경 복합기능성 제형개발	○*B. velezensis* HKB-1 배양 LeCSMS 추출물의 고추역병 방제와 식물생육촉진 복합기능성 활용
⑤시제품생산 및 안정성 평가 및 포장실증 시험	○표고버섯수확후배지 유래 “케이바이탈펠릿”의 케 시제품의 포장실증실험으로 작물의 비료효과를 구명하였으며 이바이탈 엑스트라” 액상형은 *B. velezensis* HKB-1배양액이 포함 되어 안정성 평가를 위하여 의뢰 중에 있음

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표		사업화지표												연구기반지표									
		지식재산권				기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
														논문								
		특허출원	특허등록	품종등록	SMART	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI	논문평균IF	학술발표			정책활용	홍보전시	
단위		건	건	건	평균등급	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건	
가중치		5				5	5	45			15	0				10	5		5		5	
최종목표		2				2	6	2			2	0		2	3	3	4		4		2	
당해년도	목표	1				1	3	2			1	0		2	2	3	2		2		1	
	실적	1				1	15	2			1	600		2	2	4.5	4		2		0	
달성률(%)		100				100	500	100			100	600		100	67	150	200		100		0	

4. 핵심기술

구분	핵 심 기 술 명
①	버섯수확후배지 원료로 이용한 식물역병방제 효과를 가지는 입상형 유기질 퇴비제조 방법
②	표고버섯 수확후 배지 퇴비 추출물을 이용한 길항성 미생물 *Bacillus velezensis* HKB-1 배양체 제조방법과 이를 이용한 식물 병 방제
③	표고버섯 수확후 배지 퇴비 추출물로부터 식물생장촉진 유효성분 분리정제와 항균성 4-Hydroxybenzoic acid와 vanillic acid를 분리 동정 방법

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계최초	국내최초	외국기술복제	외국기술소화·흡수	외국기술개선·개량	특허출원	산업체이전(상품화)	현장애로해결	정책자료	기타
①의 기술		v			v	v	v	v		
②의 기술	v					v	v			
③의 기술					v		v			

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	○ 기존의 유기질 퇴비는 계분 등 가축분뇨를 혼합하여 제조 하고 있으며 유해성 중금속과 농약검출, 악취 등 유해성 논란이 문제점으로 지적되고 있으나 버섯수확후배지배지를 활용하면 위의 단점을 배제하고 친 환경농업에 활용 할 수 있는 유기농자재로 활용 가능 ○수입의존도가 높은 악취가 없는 원예화분용 친환경 유기질비료 활용 적합하며 수입대체효과 및 국외수출도 가능할 것으로 기대 됨
②의 기술	○표고버섯 수확후 배지 퇴비 추출물를 활용하여 미생물농약에 이용되는 길항성미생물 배양배지로 활용하여 식물병 방제기능 극대화 할 수 있는 복합기능성 제품개발 ○ *Bacillus velezensis* HKB-1는 표고버섯 수확후 배지 퇴비유래 특허기탁균주로 활용하며 항균성과 식물 병 저항성 유도 유도체, 식물생육촉진 기능 규명 ○ 표고버섯 수확후 배지 퇴비 추출물 이용 다양한 미생물의 배양기능을 탐색하고 대량배양 시스템을 확립하여 고가의 미생물배양 배지의 대체효과
③의 기술	○표고버섯 수확후 배지 퇴비 추출물로부터 식물생장촉진 유효성분 분리정제와 항균성 4-Hydroxybenzoic acid와 vanillic acid를 분리 동정 방법 - 병해충관리 친 환경 제품의 지표성분으로 활용

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표												연구기반지표								
	지식재산권				기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
													논문								
	특허출원	특허등록	품종등록	SMART	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI	논문평균IF	학술발표			정책활용	홍보전시	
단위	건	건	건	평균등급	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건	
가중치																					
최종목표		2						1150				2									
연구기간내 달성실적		0						0				0									
연구종료후 성과창출 계획		2						1150				2									

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명[1]	표고버섯 수확 후의 배지 추출물을 포함하는 식물병 방제용 조성물 및 그의 제조방법		
이전형태	□무상 ■유상	기술료 예정액	15,000천원
이전방식[2]	■소유권이전 □전용실시권 □통상실시권 □협의결정 □기타( )		
이전소요기간	14일	실용화예상시기[3]	2022년 4월
기술이전시 선행조건[4]	경상기술료 지급		

핵심기술명[1]	버섯 수확 후 배지를 이용한 식물병 방제활성을 가지는 유기질비료의 제조방법		
이전형태	□무상 ■유상	기술료 예정액	5,000천원
이전방식[2]	■소유권이전 □전용실시권 □통상실시권 □협의결정 □기타( )		
이전소요기간	14일	실용화예상시기[3]	2022년 4월
기술이전시 선행조건[4]	개량기술의 소유권		

주 의

1. 이 보고서는 농림식품기술기획평가원에서 시행한 유용 농생명 자원 산업화기술개발연구개발사업의 연구보고서입니다

2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림식품기술기획평가원에서 시행한 유용농생명자원산업화 연구개발사업의 결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.