

과제번호
918009-4

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
미생물유전체전략연구사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004049-01

**유전체
분석
기반
사과병해
방제 및
가지과
작물
생육촉진
미생물제
제 개발**

유전체 분석 기반 사과병해 방제 및 가지과 작물 생육촉진 미생물제제 개발

2022. 4. 3

2021

주관연구기관 / 국립안동대학교
협동연구기관 / 고려바이오(주)

**농림축산식품부
농림식품기술기획평가원**

**농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원**

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “유전체 분석 기반 사과병해 방제 및 가지과 작물 생육촉진 미생물제제 개발” (개발기간 : 2018. 4. 25 ~ 2021. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 4. 3

주관연구기관명 : 국립안동대학교 산학협력단 전 익 조



협동연구기관명 : 고려바이오(주) 김 영 권



주관연구책임자 : 전 용 호

협동연구책임자 : 윤 여 준

국기연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

〈 요약 문 〉

사업명	미생물유전체전략연구사업	총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)					
내역사업명 (해당 시 작성)		연구개발과제번호		918009-4			
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB0302	50%	LB0304	30%	LB0301	20%
	농림식품 과학기술분류	RA0305	80%	RA0303	10%	RA0301	10%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단						
연구개발과제명	유전체 분석 기반 사과병해 방제 및 가지과 작물 생육촉진 미생물제제 개발						
전체 연구개발기간	2018. 04. 25 - 2021. 12. 31(3 년 8 개월)						
총 연구개발비	총 1,266,900 천원 (정부지원연구개발비:950,000천원, 기관부담연구개발비 :316,900 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)						
연구개발단계	기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]			기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준() 종료시점 목표()	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)	조기성과창출과제						
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표		<ul style="list-style-type: none"> ○ 유전체 기술을 활용하여 사과 주요 병해 방제용 미생물 제제 개발 및 작물의 생육촉진 친환경 미생물제제개발 - 유용미생물의 유전체 해독을 통한 미생물의 기능성 유전자 및 항균물질 구명 - 유용미생물의 기능성과 효능 검증 - 고부가가치 기능성 미생물제제 개발 				
	전체 내용		<ul style="list-style-type: none"> ○ 유용미생물을 이용한 사과 주요 병 방제 효과 및 작물 생육촉진 효과 연구 ○ 선정미생물 유전체 해독 2건 이상/유용 미생물 유전자원 확보 1건 이상 ○ 유용미생물을 이용한 과수, 과채류 병해 방제 및 생육증진용 미생물제제 제품화 				
	주관기관 (안동대학교)	목표	○ 유용미생물을 이용한 사과 주요 병 방제 효과 및 작물 생육촉진 효과 연구				
		내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유용미생물의 특성 규명 ○ 사과탄저병 및 가지과 작물 생육촉진효과 검증 ○ Paenibacillus sp.의 변이 요인 연구 ○ 유용미생물의 유전체 해독 ○ 포장실증시험 				
협동기관 (고려바이오)	목표	○ 유용미생물을 이용한 과수, 과채류 병해 방제 및 생육증진용 미생물제제 제품					
	내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유용미생물의 배양성 및 제제화 최적조건 결정 ○ 대량생산 최적화 확립 ○ 시제품 제작 및 시제품의 효과검증 ○ 시제품의 농가실증시험 ○ 공인기관 안전성 확인, 공시를 통한 제품화 및 사업화 					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> 1. 유용미생물을 이용한 사과 주요 병 방제 효과 및 작물 생육촉진 효과 연구 ○ 유용미생물 이용 병방제 효과 및 생육촉진 연구 결과 <ul style="list-style-type: none"> - 미생물 분야 저명 저널에 3편 게재 Scientific Reports 2편, Frontiers in Microbiology 1편 - 학술발표 13편 발표 (우수포스터상 1회 수상) 						

	<ul style="list-style-type: none"> - 국내외 특허출원 3건 (국내 2건 / 미국 1건) - 연구사업단 및 과제 연구결과 홍보 (일간지 및 TV방송 7건) - 연구결과를 통한 우수산학협력상 등 4건 수상 ○ 연구인력 양성(박사/석사/학사) <ul style="list-style-type: none"> - 참여연구원의 박사, 석사학위 취득 2명 - 참여연구원의 학사졸업 4명 ○ 고용창출 <ul style="list-style-type: none"> - 참여연구원 2명, 관련 기업체 연구소로 취업 ○ 교육 및 컨설팅 <ul style="list-style-type: none"> - 연구결과를 지역 농업기관 및 농민 대상으로 병해 및 미생물제제 사용법 교육, 컨설팅 6건 수행함(478명) ○ 선정미생물 유전체 해독 4건 /생명자원(미생물자원) 26균주 기탁 <ul style="list-style-type: none"> - <i>Bacillus velezensis</i> AK-0 - <i>Paenibacillus polymyxa</i> E681-F - <i>Paenibacillus polymyxa</i> E681-B - <i>Serratia plymuthica</i> GYUN-8 - 생명자원(생명정보) 27균주 KACC 등 등록기탁 2. 선정미생물 유전체 해독 /유용 미생물 유전자원 확보 <ul style="list-style-type: none"> ○ 선정 미생물 유전체 해독 4건 <ul style="list-style-type: none"> <i>Bacillus velezensis</i> AK-0 <i>Paenibacillus polymyxa</i> E681-F <i>Paenibacillus polymyxa</i> E681-B <i>Serratia plymuthica</i> GYUN-8 ○ 생명자원(생명정보) 27균주 KACC 등 등록기탁 <ul style="list-style-type: none"> <i>Pseudomonas fluorescens</i> GYUN-520 (KACC 22538)등 KACC 기탁 3. 유용미생물 이용 과수, 과채류 병해 방제 및 생육증진용 미생물제제 제품화 <ul style="list-style-type: none"> ○ 기술이전 4건(유상실시) ○ 제품화 4건 <ul style="list-style-type: none"> 상표명: 병해관리용 유기농업자재 ‘탄저킬’ (공시번호: 공시-2-4-167호) 상표명: 병해관리용 유기농업자재 ‘세라탄’ (공시번호: 공시-2-4-175호) 상표명: 병해관리용 유기농업자재 ‘올팡’ (공시번호: 공시-2-4-194호) 상표명: 작물생육용 유기농업자재 ‘올업’ (공시번호: 공시-2-2-283호) ○ 매출발생 1건 현재 탄저킬 매출 33,000 (천원) 																												
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제품으로 생산된 4개의 미생물제제는 고려바이오(주)를 통해 과수 및 과채류 생산현장에 활용될 계획임 ○ 홍보용 리플렛을 제작하거나 농업전문지에 광고를 게재하여 홍보할 계획임. 당초 고려바이오(주) 출고가를 기준으로 960백만원의 성과를 목표로 설정하였으며, 소비자가격 기준으로는 약 2배에 상응하는 경제적 성과 도출이 가능함. 또한, 본 과제 결과물이 기존 제품들과 비교하여 성능이 월등하며 대상 병해(탄저병) 및 작물생육용 미생물제제의 시장성을 고려할 때 투입연구비보다 월등한 수준의 경제적 성과가 기대됨 																												
연구개발성과의 비공개여부 및 사유																													
연구개발성과의 등록·기탁 건수	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th rowspan="2">논문</th> <th rowspan="2">특허</th> <th rowspan="2">보고서 원문</th> <th rowspan="2">연구시설·장비</th> <th rowspan="2">기술요약 정보</th> <th rowspan="2">소프트웨어</th> <th rowspan="2">표준</th> <th colspan="2">생명자원</th> <th rowspan="2">회합물</th> <th colspan="2">신품종</th> </tr> <tr> <th>생명정보</th> <th>생물자원</th> <th>정보</th> <th>실물</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	논문	특허	보고서 원문	연구시설·장비	기술요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		회합물	신품종		생명정보	생물자원	정보	실물												
논문	특허								보고서 원문	연구시설·장비		기술요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		회합물	신품종											
		생명정보	생물자원	정보	실물																								

	3	3					27			
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호	
국문핵심어 (5개 이내)	유용미생물		생육촉진근권세균	사과탄저병		미생물제제		바실러스		
영문핵심어 (5개 이내)	Useful microorganisms		Plant growth promoting rhizobacterium	Apple bitter rot		Biopesticide		Bacillus		

최종보고서

최종보고서							보안등급	
							일반[], 보안[]	
중앙행정기관명			사업명		사업명			
전문기관명			명		내역사업명			
공고번호			총괄연구개발 식별번호		연구개발과제번호			
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0302	50%	LB0304	30%	LB0301	20%	
	농림식품과학기술분류	RA0305	80%	RA0303	10%	RA0301	10%	
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문		영문				
연구개발과제명		국문		영문				
주관연구개발기관		기관명		안동대학교 산학협력단		사업자등록번호		509-82-06009
		주소		(36729)안동시 경동로 1375		법인등록번호		
연구책임자		성명		전 용 호		직위		교수
		연락처		직장전화		휴대전화		
				전자우편		국가연구자번호		10177115
연구개발기간		전체		2018. 04. 25 - 2021. 12. 31(3년 8개월)				
		단계 (해당 시 작성)		1단계		YYYY. MM. DD - YYYY. MM. DD(년 개월)		
		n단계		YYYY. MM. DD - YYYY. MM. DD(년 개월)				
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		합계		연구개발비 외 지원금
		현금		현금		현금		합계
총계		950,000		31,900		285,000		981,900
1단계		1년차		200,000		6,700		60,000
		2년차		250,000		8,400		75,000
n단계		3년차		250,000		8,400		75,000
		4년차		250,000		8,400		75,000
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위		휴대전화 전자우편
공동연구개발기관		고려바이오(주)		윤여준		연구소장		비고 역할 기관유형
연구개발담당자 실무담당자		성명		윤미선		직위		사무원
		연락처		직장전화		휴대전화		
				전자우편		국가연구자번호		

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

2022년 2월 10일

연구책임자: 전 용 호

주관연구개발기관의 장: 안동대학교 산학협력단장 전 의 조

공동연구개발기관의 장: 고려바이오(주) 대표 김 영 권



농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

〈 요약 문 〉

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명	미생물유전체전략연구사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)				연구개발과제번호		918009-4	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB0302	50%	LB0304	30%	LB0301	20%
	농림식품 과학기술분류	RA0305	80%	RA0303	10%	RA0301	10%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단						
연구개발과제명	유전체 분석 기반 사과병해 방제 및 가지과 작물 생육촉진 미생물제제 개발						
전체 연구개발기간	2018. 04. 25 - 2021. 12. 31(3 년 8 개월)						
총 연구개발비	총 1,266,900 천원 (정부지원연구개발비:950,000천원, 기관부담연구개발비 :316,900 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)						
연구개발단계	기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]			기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준() 종료시점 목표()	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)	조기성과창출과제						
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표		<ul style="list-style-type: none"> ○ 유전체 기술을 활용하여 사과 주요 병해 방제용 미생물 제제 개발 및 작물의 생육촉진 친환경 미생물제제개발 - 유용미생물의 유전체 해독을 통한 미생물의 기능성 유전자 및 항균물질 구명 - 유용미생물의 기능성과 효능 검증 - 고부가가치 기능성 미생물제제 개발 				
	전체 내용		<ul style="list-style-type: none"> ○ 유용미생물을 이용한 사과 주요 병 방제 효과 및 작물 생육촉진 효과 연구 ○ 선정미생물 유전체 해독 2건 이상/유용 미생물 유전자원 확보 1건 이상 ○ 유용미생물을 이용한 과수, 과채류 병해 방제 및 생육증진용 미생물제제 제품화 				
	주관기관 (안동대학교)	목표	○ 유용미생물을 이용한 사과 주요 병 방제 효과 및 작물 생육촉진 효과 연구				
		내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유용미생물의 특성 규명 ○ 사과탄저병 및 가지과 작물 생육촉진효과 검증 ○ Paenibacillus sp.의 변이 요인 연구 ○ 유용미생물의 유전체 해독 ○ 포장실증시험 				
협동기관 (고려바이오)	목표	○ 유용미생물을 이용한 과수, 과채류 병해 방제 및 생육증진용 미생물제제 제품					
	내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유용미생물의 배양성 및 제제화 최적조건 결정 ○ 대량생산 최적화 확립 ○ 시제품 제작 및 시제품의 효과검증 ○ 시제품의 농가실증시험 ○ 공인기관 안전성 확인, 공시를 통한 제품화 및 사업화 					

연구개발성과

1. 유용미생물을 이용한 사과 주요 병 방제 효과 및 작물 생장촉진 효과 연구
 - 유용미생물 이용 병방제 효과 및 생육촉진 연구 결과
 - 미생물 분야 저명 저널에 3편 게재
Scientific Reports 2편, Frontiers in Microniology 1편
 - 학술발표 13편 발표 (우수포스터상 1회 수상)
 - 국내외 특허출원 3건 (국내 2건 / 미국 1건)
 - 연구사업단 및 과제 연구결과 홍보 (일간지 및 TV방송 7건)
 - 연구결과를 통한 우수산학협력상 등 4건 수상
 - 연구인력 양성(박사/석사/학사)
 - 참여연구원의 박사, 석사학위 취득 2명
 - 참여연구원의 학사졸업 4명
 - 고용창출
 - 참여연구원 2명, 관련 기업체 연구소로 취업
 - 교육 및 컨설팅
 - 연구결과를 지역 농업기관 및 농민 대상으로 병해 및 미생물제제 사용법 교육, 컨설팅 6건 수행함(478명)
 - 선정미생물 유전체 해독 4건 /생명자원(미생물자원) 26균주 기탁
 - *Bacillus velezensis* AK-0
 - *Paenibacillus polymyxa* E681-F
 - *Paenibacillus polymyxa* E681-B
 - *Serratia plymuthica* GYUN-8
 - 생명자원(생명정보) 27균주 KACC 등 등록기탁
2. 선정미생물 유전체 해독 /유용 미생물 유전자원 확보
 - 선정 미생물 유전체 해독 4건
 - Bacillus velezensis* AK-0
 - Paenibacillus polymyxa* E681-F
 - Paenibacillus polymyxa* E681-B
 - Serratia plymuthica* GYUN-8
 - 생명자원(생명정보) 27균주 KACC 등 등록기탁
 - Pseudomonas fluorescens* GYUN-520 (KACC 22538)등 KACC 기탁
3. 유용미생물 이용 과수, 과채류 병해 방제 및 생육증진용 미생물제제 제품화
 - 기술이전 4건(유상실시)
 - 제품화 4건
 - 상표명: 병해관리용 유기농업자재 ‘탄저킬’
(공시번호: 공시-2-4-167호)
 - 상표명: 병해관리용 유기농업자재 ‘세라탄’
(공시번호: 공시-2-4-175호)
 - 상표명: 병해관리용 유기농업자재 ‘올팡’
(공시번호: 공시-2-4-194호)
 - 상표명: 작물생육용 유기농업자재 ‘올업’
(공시번호: 공시-2-2-283호)
 - 매출발생 1건
 - 현재 탄저킬 매출 33,000 (천원)

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제품으로 생산된 4개의 미생물제제는 고려바이오(주)를 통해 과수 및 과채류 생산현장에 활용될 계획임 ○ 홍보용 리플렛을 제작하거나 농업전문지에 광고를 게재하여 홍보할 계획임. 당초 고려바이오(주) 출고가를 기준으로 960백만원의 성과를 목표로 설정하였으며, 소비자가격 기준으로는 약 2배에 상응하는 경제적 성과 도출이 가능함. 또한, 본 과제 결과물이 기존 제품들과 비교하여 성능이 월등하며 대상 병해(탄저병) 및 작물생육용 미생물제의 시장성을 고려할 때 투입연구비보다 월등한 수준의 경제적 성과가 기대됨 											
연구개발성과의 비공개여부 및 사유												
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
	3	3						생명정보	생물자원		정보	실물
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	유용미생물		생육촉진근권세균		사과탄저병		미생물제제		바실러스			
영문핵심어 (5개 이내)	Useful microorganisms		Plant growth promoting rhizobacterium		Apple bitter rot		Biopesticide		Bacillus			

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	17
1. 연구개발의 필요성	17
2. 연구개발 대상의 국내외 현황	21
3. 연구개발의 중요성	25
4. 연구개발의 목표 및 내용	27
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용	28
I. 후보 균주, 동정	28
1. APEC123 (GYUN-8)	28
2. Paenibacillus polymyxa APEC128 (ANUB038)	30
II. 균주별 기본 특성	31
1. 유용미생물 최적 배지조건 및 배양시간	31
2. 길항기작 효소능 조사	31
3. 탄소원 이용능 및 생리·생화학적 특성	33
III. 실내실험	36
1. 사과 주요병 방제	36
2. 고추 병 방제 및 생육촉진 효과	49
IV. 유전체 분석	56
1. AK-0의 전장유전체 분석	56
2. 유용미생물 AK-0의 비교유전체 연구	61
3. 유용미생물 Serratia plymuthica GYUN-8의 전장 유전체 연구	66
V. 세균의 변이(Phenotypic variation) 연구	71
1. P. polymyxa E681에서의 변이 발생 및 특성	71
2. E681에서의 역변이 연구	73
3. P. polymyxa 비교유전체 연구	77
VI. Field Trial	81
1. 시제품 이용 포장 약효검정 (탄저병, 겹무늬썩음병)	81
2. 시제품 이용 앞에 발생하는 병해에 대한 포장 효과검정	83
3. 유용미생물 시제품 처리 시 사과 잎의 엽록소 함량 비교	84
4. 사과 주요 병의 발생과 날씨와의 상관관계	84
5. 포장에서의 고추탄저병 방제효과 검정	86
6. 시설재배지에서의 오이흰가루병 방제효과 시험	88
VII. 제제화	91
1. 유용미생물의 배양성 확인 및 미생물제 제제화 고려요인 분석	91
2. 제제화 및 제형화(액상 또는 분말) 최적화 조건 설정	95
3. 선발 균주의 제제화 및 대량생산 최적화 확립	96
4. 시제품 제조	100

VIII. 실증시험	103
1. 시제품의 효과검증	103
2. 시제품의 농가 실증시험	104
IX. 제품화	108
1. 탄저킬 제품화	108
2. 세라탄 제품화	113
3. 올업 제품화	119
4. 올팡 제품화	122
5. 사업화 연구	126
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	129
1. 연구수행 결과	129
2. 목표 달성 수준	148
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)	149
3. 연구개발 과정의 성실성	149
5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도	150
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	151
자체평가의견서	153
연구성과 활용계획서	157

〈표 차례〉

표 1. 유용미생물의 탄소원 이용	33
표 2. 유용미생물의 생리·생화학적 특성	34
표 3. 화학농약 살충제에 대한 유용미생물 저항성 검정.	36
표 4. 살균제에 대한 유용미생물 저항성 검정	38
표 5. 유용미생물의 사과 탄저병원균 포자발아 억제 효과(48시간 배양)	40
표 6. Comparison of genomic features of the <i>Bacillus velezensis</i> AK-0 with genomes of other <i>Bacillus</i> spp.	57
표 7. Comparative genomic analysis of <i>Bacillus velezensis</i> AK-0 with <i>Bacillus</i> genomes	62
표 8. Comparative genome anlysis of <i>Serratia plymuthica</i> GYUN-8 with <i>Serratia</i> strains	69
표 9. Multicalling result	79
표 10. Summary of base substitutions and insertions detected in F	79
표 11. SNP 확인을 위해 고안된 primer sets	80
표 12. SNP 확인을 위해 고안된 primer sets	80
표 13. 유용미생물 5종의 배지별 배양성	91
표 14. 천연유래 항균물질의 탄저병원균에 대한 항균력 확인	92
표 15. 유용미생물의 효과를 증진시키기 위한 첨가제 선발 및 유효농도 검정	92
표 16. 생분해성 접착제를 이용한 부착성 증진제 선발 및 유효농도 검정	93
표 17. 확산제 선발 및 유효농도 검정	93
표 18. 주성분과 첨가제의 혼합에 따른 물성조정제(안정제) 선발 및 유효농도 검정	94
표 19. 산업용배지(KAM) 조성	96
표 20. 시제품 최종 배합	98
표 21. 시제품의 처리방법, 처리주기, 처리횟수에 따른 고추 탄저병 방제효과	104
표 22. 시제품의 고추 탄저병에 대한 최적 처리방법 결정	105
표 23. 시제품의 처리방법, 처리주기, 처리횟수에 따른 딸기 탄저병 방제효과	106
표 24. 시제품의 처리방법, 처리주기, 처리횟수에 따른 오이 흰가루병 방제효과	107

〈그림 차례〉

그림 1. 사과 탄저병 병징	19
그림 2. 사과 탄저병을 일으키는 <i>Colletotrichum</i> sp.의 세계적 분포	19
그림 3. <i>Colletotrichum</i> 군의 병환 특이성	20
그림 4. <i>Serratia plymuthica</i> GYUN-8의 16S rDNA서열	29
그림 5. Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences	29
그림 6. Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences	30
그림 7. 유용미생물 5종의 배양시간에 따른 균 생장곡선.	31
그림 8. 유용미생물 5종의 길항기작 조사를 위한 효소 생성능 검정.	33
그림 9. 유용미생물 5종에 대한 사과탄저병, 겹무늬썩음병 균사생장 억제효과 검정	39
그림 10. 유용미생물 5종 처리 시 <i>C. gloeosporioides</i> 포자 발아 억제 효과 확인.	41
그림 11. 유용미생물의 휘발성 물질(VOCs) 생성 여부와 병원균 균사생장 억제효과 검정. ...	42
그림 12. 유용미생물을 이용한 사과탄저병 발병 억제 실내 검정	43
그림 13. 살균제 Pyaclostrobin, Tebuconazole에 대한 탄저병균의 감수성 검정	44
그림 14. 약제 저항성 탄저병균에 대한 유용미생물 항균활성 포자발아억제 검정.	45
그림 15. 유용미생물을 이용한 사과탄저병 발병 억제 실내 검정	46
그림 16. 선발 유용미생물 시제품을 이용한 사과탄저병 방제효과 실내 검정	47
그림 17. 시제품 희석배수 별 사과탄저병 방제 결과	47
그림 18. CM을 이용한 병원균 예방 효과 검정.	48
그림 19. 시제품 AK-0을 과실에 처리 시 사과탄저병원균 억제 효과 관찰	49
그림 20. 고추육묘용 포트에서의 생육촉진효과	50
그림 21. 고추육묘용 포트에서의 생육촉진 차이	50
그림 22. 종자에 길항세균 펠렛팅하여 뿌리길이 생육촉진효과 검정	51
그림 23. 고추 과실에서의 예방효과에 대한 방제가	51
그림 24. 고추 과실에서의 치료효과에 대한 방제가	52
그림 25. <i>Serratia plymuthica</i> GYUN-8의 배양액(culture) 및 배양여액(filtrate)을 이용하여 고추 탄저병균 <i>Colletotrichum acutatum</i> KACC40423의 포자발아를 억제한 효과	53
그림 26. GYUN-8 배양액 처리에 따른 고추탄저병 억제효과	53
그림 27. GYUN-8 현탁액 처리 유무에 따른 고추종자 초기발아 촉진효과	54
그림 28. GYUN-8 현탁액 처리 유무에 따른 고추 육묘의 생육촉진 효과	55
그림 29. The whole genome map of <i>Bacillus velezensis</i> AK-0	56
그림 30. The COG function annotation of <i>B. velezensis</i> AK-0	57
그림 31. <i>B. velezensis</i> AK-0 균주의 antifungal에 관여하는 유전자 발현 확인	58
그림 32. <i>B. velezensis</i> AK-0 균주의 Metabolism 관련 유전자 분석	59
그림 33. Secondary metabolite gene clusters with antifungal metabolites in AK-0	60
그림 34. Secondary metabolite gene clusters with antibacterial in <i>B. velezensis</i> AK-0	60
그림 35. <i>B. velezensis</i> AK-0 균주의 antifungal에 관여하는 유전자 발현 확인	61
그림 36. Phylogenetic tree by ANI-derived UPGMA dendrogram(Newickformat).	62

그림 37. The venndiagram of <i>B. velezensis</i> strain AK-0, FZB42, G341 and DSM7.	63
그림 38. Pan-genome accumulation curve of 21 <i>Bacillus</i> genomes.	63
그림 39. Clustering of the gene content and the conserved pan-genome orthologosgroups (POGs) of 21 <i>Bacillus</i> genomes subsets	64
그림 40. Biosynthetic gene clusters of secondary metabolites from <i>B. velezensis</i> AK-0	64
그림 41. Comparison of secondary metabolite gene clusters.	65
그림 42. Whole genome map of <i>Serratia plymuthica</i> GYUN-8.	67
그림 43. EggNog/COG 분석	68
그림 44. Phylogenetic tree by ANI-derived UPGMA dendrogram(Newickformat)	69
그림 45. The venn diagram of <i>Serratia plymuthica</i> strain GYUN-8	70
그림 46. Biosynthetic gene clusters of secondary metabolites from <i>S. plymuthica</i> GYUN-8 ..	70
그림 47. <i>P. polymyxa</i> E681의 기존형(B-type)과 변이형(F-type)간의 표현형 비교.	71
그림 48. RNA-seq에서 확인된 DEG(differentially expressed genes)의 GO 분석.	72
그림 49. E681에서의 Sporulation단계별 유전자 발현양상.	72
그림 50. E681에서의 단백질체 분석.	73
그림 51. 장기 배양시 F-type에서 내생포자 형성능의 회복.	74
그림 52. Endospore formation depending on pH at 3d in TSB.	76
그림 53. Endospore formation depending on pH at 6 d in TSB.	76
그림 54. Endospore formation depending on pH at 9 d in TSB	77
그림 55. ANIb-value	77
그림 56. pangenome frequency(좌) and pangenome matrix(우)	78
그림 57. pangenome pie	78
그림 58. 타입 B와 F 콜로니 12개의 genomic DNA를 이용하여, SNP이 있는 부위를 증폭 ...	80
그림 59. 시제품 약효 포장 검정 실험 과원 전경사진	81
그림 60. 4종 시제품을 이용한 사과탄저병 발생 억제 효과 검정.	82
그림 61. 예천 시험포에서 AK-0 시제품의 사과탄저병 방제 효과	83
그림 62. 4종 시제품을 이용한 갈색무늬병 발생 억제 효과 검정(예천).	84
그림 63. 유용미생물 시제품 처리 시 사과 잎의 엽록소 함량 비교(예천)	84
그림 64. 사과탄저병 발생과 날씨 요인과의 상관관계 분석	85
그림 65. 사과탄저병 발생과 날씨 요인과의 상관관계 분석	85
그림 66. 예천(좌)과 문경(우) 과수원 주변환경 모습	86
그림 67. GYUN-8, AK-0를 이용하여 고추탄저병 방제 실외실험	87
그림 68. 2020년 6월17일~8월 31일 일일 최고기온, 강우량, 상대습도	88
그림 69. 길항세균 단독 처리를 통한 고추탄저병 발병률, 방제가	88
그림 70. GYUN-8, AK-0 시제품을 이용하여 오이흰가루병 예방효과 검정	89
그림 71. 오이흰가루병 예방 약제효과 방제가	90
그림 72. 보습제를 이용한 미생물 발아촉진제 유효농도 검정	94
그림 73. 자외선 차단제를 이용한 미생물의 피해 최소화 물질 검정	94
그림 74. 분말 및 입상 제형화 과정 중 유용미생물의 안정성 검정.	95
그림 75. 보조성분들과 유용미생물 임시 혼합배합의 온도별 미생물 안정성 검정.	96

그림 76. 유용미생물 대량생산 공정에 사용되는 Multi-room incubator	97
그림 77. 배양온도(상), 교반속도(중), 배양시간(하)에 따른 유용미생물의 배양성 확인	97
그림 78. 유용미생물 대량생산 공정	99
그림 79. 시제품 생산 공정도	100
그림 80. 액상혼합기 및 시제품 검사	100
그림 81. 시제품 출하를 위한 포장	100
그림 82. 보관온도별 시제품의 유용미생물 밀도 경시적 변화	101
그림 83. 생산된 시제품(포장전).	102
그림 84. AK-0 시제품	102
그림 85. 시제품의 작물생장촉진 효과 확인	103
그림 86. 고추 탄저병 농가실증시험 포장 및 시제품 최적처리방법 결정	105
그림 87. 딸기 탄저병 농가실증시험 포장 및 시제품 최적처리방법 결정	106
그림 88. 오이 흰가루병 농가실증시험 포장 및 시제품 최적처리방법 결정	107
그림 89. 탄저킬 주성분검사 성적서	108
그림 90. 탄저킬 독성시험 성적 요약서	109
그림 91. 급성경구독성/병원성시험(렛드) 보고서	109
그림 92. 급성경피독성시험(렛드) 보고서	109
그림 93. 안점막자극성시험(토끼) 보고서	110
그림 94. 피부자극성시험(토끼) 보고서	110
그림 95. 담수어류 영향시험 보고서	110
그림 96. 꿀벌 영향시험 보고서	111
그림 97. 탄저킬 농약피해시험 성적서(사과)	111
그림 98. 탄저킬 농약피해시험 성적서(고추, 딸기)	112
그림 99. 탄저킬 농약피해시험 성적서(가지)	112
그림 100. 탄저킬 농약피해시험 성적서(벼)	112
그림 101. 탄저킬 잔류농약검사 성적서	113
그림 102. 탄저킬 유기농업자재 공시서	113
그림 103. 세라탄 주성분검사 성적서(미생물 동정, 생균수 측정, 병원성미생물 검사)	114
그림 104. 급성경구독성/병원성시험(렛드) 보고서	115
그림 105. 급성경피독성시험 보고서	115
그림 106. 안점막자극성시험(토끼) 보고서	115
그림 107. 피부자극성시험(토끼) 보고서	116
그림 108. 담수어류 영향시험 보고서	116
그림 109. 꿀벌 영향시험 보고서	116
그림 110. 세라탄의 농약피해시험 성적서(가지, 고추, 오이)	117
그림 111. 세라탄의 농약피해시험 성적서(딸기)	117
그림 112. 세라탄의 농약피해시험 성적서(벼)	118
그림 113. 세라탄 잔류농약검사 성적서	118
그림 114. 세라탄 유기농업자재 공시서 및 제품사진.	119
그림 115. 올업 주성분검사 성적서	120

그림 116. 올업의 비료피해 시험 성적서(고추, 배추, 오이)	120
그림 117. 올업의 비료피해 시험 성적서(상추)	121
그림 118. 올업 잔류농약검사 성적서	121
그림 119. 올업 유기농업자재 공시서 및 제품사진	122
그림 120. 올팜 주성분검사 성적서	122
그림 121. 급성경구독성/병원성시험(렛드) 보고서	123
그림 122. 급성경피독성시험(렛드) 보고서	123
그림 123. 안점막자극성시험(토끼) 보고서	124
그림 124. 피부자극성시험(토끼) 보고서	124
그림 125. 담수어류 영향시험 보고서	124
그림 126. 올팜 농약피해시험 성적서(고추, 배추, 상추, 오이, 콩)	125
그림 127. 올팜 농약피해시험 성적서(벼)	125
그림 128. 올팜 잔류농약검사 성적서	126
그림 129. 올팜 유기농업자재 공시서 및 제품사진	126
그림 130. 온라인 홍보 및 리플렛 제작	127
그림 131. 시제품(탄저킬, 세라탄, 올팜)의 고추 탄저병에 대한 경쟁제품군과의 비교평가 ...	127
그림 132. 고려바이오(주) 전국 판매망 및 대형 쇼핑몰(쿠팡) 제품판매	128

1. 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 필요성

○ 농업생산성의 향상과 에너지 절약형 재배기술의 개발이 시급히 요구됨에 따라 작물보호의 측면에서 농약의 사용이 날로 증가해 왔다. 현재 국내에서 유통되고 있는 농약의 대부분은 외국으로부터 원자재 수입에 의해 생산되는 유기합성 농약이다. 유기합성농약은 약효가 우수하고, 값이 저렴하며 오랫동안 보관 저장이 가능하나 무차별적인 남용과 오용으로 인해 지하수, 토양오염, 생태계에 영향을 끼치는 환경 파괴가 심각할 뿐 아니라 약효에 대한 저항성 병원균의 출현 등으로 인해 농약으로서의 가치가 감소하는 반면 새로운 무독성 및 저독성의 농약 개발 필요성이 증가하고 있는 추세이다. 농업환경오염과 인축에 대한 독성과 약제 저항성 병균 문제, 친환경 농산물에 대한 수요자의 니즈가 크게 부각되면서 화학 농약의 대안으로 생물학적 방제제로서의 미생물사용에 대한 관심이 높아지고 있다.

○ 원예작물 병의 친환경적이고 효과적인 방제를 도모하기 위하여 흔히 생물제제를 사용하여 방제한다 (Upadhyay and Rai, 1988; Weller, 1988). 이를 생물학적 방제라 한다. 생물학적 방제는 환경 친화적이고 인축에 무해하지만 일반적으로 단점으로는 방제효율이 낮고 기후나 재배환경에 따라 방제에 일관성이 없다는 점이다(Jung 등, 1980; Park, 1994). 이러한 단점의 주요 원인은 미생물제의 작용점에 도달하여 정착하는 비율이 낮으며 병원미생물 등 이미 식물에 안정적 관계를 이루고 있는 자연적인 환경 하에서 추가되는 미생물제는 상대적으로 경쟁력이 낮다는 것과 항균 물질이 자연환경에서 안정하지 않다는 복합적인 원인에 기인한다.

○ 생물학적 방제는 환경 친화적이고 인축에 무해하지만 일반적인 단점으로는 방제 효율이 낮고 토양의 물리화학적 성질과 생물적 환경에 따라 방제에 일관성이 없다는 점이다. 이는 생물제제의 근권 정착 능력과 이미 선점하고 있는 다른 생물과의 경쟁에 있어서 경쟁력이 낮음에 그 원인이 있다. 이를 극복하기 위해 여러 길항미생물이 혼합된 복합길항미생물제를 사용하거나 농약과 미생물제를 혼용하여 병방제의 효율을 제고하고 있다.

○ 미생물로부터 유용한 활성물질의 탐색은 Waksman(1940)에 의해 토양 미생물 상호간의 길항관계를 발견한 이후 활발하게 수행되어 왔다. 미생물 중에는 방선균에 의한 활성물질에 관한 연구가 대부분을 차지해 지금까지 발견된 물질 중 약 45%가 방선균 생산물질로 보고되었으며, 이중 대부분은 *Streptomyces* 속 방선균에서 분리되었다(Welington, 1983). 최근에는 방선균 이외에 *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Serratia* 속 등 많은 종류의 미생물에서 다양한 항균물질들이 동정되고 분리되고 있다. 근래에는 살충 또는 제초활성 등의 농업용 항생물질은 물론 항종양 물질, 면역조절 물질, 효소 저해제, 고혈압 및 저혈압 치료제, 항염증 물질, 기타 당뇨, 비만, 치매 등의 치료물질들이 미생물로부터 탐색되고 있고(Deman, 1889), 식물병 방제에 있어 최근에는 항균 물질의 개발에 관심이 더해지고 있다.

○ 병원균에 대해 직접 antibiosis를 나타내지 않으나, 식물 뿌리에 근착되어 식물의 방어 시스템을 활성화 시켜 병원균에 대한 저항성 (Induced systemic Resistance)을 유도시키는 미생물이 알려져 있고 많은 연구가 되고 있다. 근권미생물에 의해 식물체에 일단 방어시스템을 활성화되면 곰팡이, 세균, 바이러스 등 다양한 병원균에 대해 저항성을 갖게 되며 또한 ISR을 유발시킨 미생물이 감소하여도 상당히 오랫동안

안 저항성이 지속된다고 알려져 있으므로 차세대 생물학적 방제제는 식물생장을 촉진시키면서 병원균에 대해 억제 능력을 가질뿐만 아니라, 식물체내 systemic한 방어체계, ISR을 유발시킴으로 다양한 병원균에 대해 방제효과를 갖는 Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)을 이용함이 바람직하다.

○ 현재까지 개발된 길항미생물제는 제조의 편의성으로 인해 단일 미생물제가 대부분이다. 일부 생물제제의 경우 세균, 곰팡이를 한가지씩을 혼합하거나 또는 여러 가지 미생물을 혼합 배양하여 처리하여 방제 효율을 증가시킨 보고가 있다.

○ 복합길항미생물제에 의한 생물학적 방제 기술이 현재의 단일 생물제제의 대안이 될 것이며 이를 위해 본 연구는 선행연구를 통해 항균활성이 뛰어난 *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus amyloliquefaciens* 균주를 생물학적 방제제로 개발하고자 한다.

○ 또한 생물제제의 근권 정착 능력과 이미 선점하고 있는 다른 생물과의 경쟁에 있어서 경쟁력이 낮음에 생물학적 방제의 효율이 낮아지는 이유이다. 이러한 단점을 보완하기 위해 여러 가지 미생물제제를 동시에 처리함에 의해 방제 효율을 제고하고자 한다. 이는 여러 길항미생물을 사용하였을 때 길항작용의 상승효과와 방제효율의 변이 감소를 지향하기 위함이다.

○ 전국 사과 재배면적의 65%를 차지하는 경북에서 주로 발생하는 병해는 탄저병, 겹무늬썩음병, 점무늬낙엽병, 갈색무늬병과 최근 세균성 가지마름병을 들 수 있다. 또한 최근 경기 충청 지역에서 발생한 사과/배나무 화상병이 발생하고 있어 예방제로 항생제를 살포하는 실정이다. 유용미생물이 항생제를 대체할 수 있다. 4개의 곰팡이 병원균과 2개의 세균에 대한 항균활성을 검정하고자 한다. 배지 상에서 대치배양에 의한 항균활성 검정 및 휘발성 물질(VOCs)에 의한 억제효과를 검정한다. 휘발성 물질 분비 여부는 사과의 저장병 방제를 위한 친환경 소독제로서의 가능성을 생각할 수 있다. 선발균주의 교호살포 혹은 Mixture에 의한 상승/상충 효과를 분석하고자 한다. 세 균주를 두 개 혹은 세 개 균주를 섞어서 병 방제 효과가 어떻게 되는지를 검정하고자 한다. 휘발성 물질 분비 여부는 사과의 저장병 방제를 위한 친환경 소독제로서의 가능성을 생각할 수 있다. 선발균주의 교호살포 혹은 Mixture에 의한 상승/상충 효과를 분석하고자 한다. 세 균주를 두 개 혹은 세 개 균주를 섞어서 병 방제 효과가 어떻게 되는지를 검정하고자 한다.

○ 선발균주에 대한 유전체 및 오믹스 연구를 통해 비교 유전체학 및 전사체학 연구를 위한 기반이 되며, 이를 통해 균주 고유의 기능성유전자, 항균 기작 및 항균물질을 구명하고자 한다. 아울러 세균을 이용한 미생물제제 개발시 문제가 될 수 있는 변이체 생성의 요인, 기작 등에 대한 구명은 해당 연구분야의 연구 기술 수준을 여러 단계 이상으로 향상 시킨 것으로 이 분야의 세계 최고 수준을 이룰 수가 있다. 궁극적으로 본 연구결과인 미생물제제의 제품화 성공률을 높이는데 기여할 수 있으리라 본다.

○ 이를 위해 본 연구진은 균주의 특성, 유전체 구조, 오믹스 분석, 기능성 유전자/물질 분석 및 미생물 상호간의 관계에 대한 연구를 안동대학교, 그리고 미생물농약, 미생물비료 개발을 고려바이오 연구팀으로 구성한다.

○ 최종적으로 본 연구진은 “미생물유전체전략연구사업”을 통해 고효율 고부가가치 미생물제제를 개발하여 작물의 생육 촉진, 병해충 예방 및 방제, 재해 내성 확보 등을 통한 친환경 재배 작물의 생산성 증대에 그 목적이 있다.

○ 사과 탄저병

▶ 사과탄저병 (Bitter rot of apple)은 사과 재배지에서 가장 발생이 많으며 방제가 어려운 병이다. *Colletotricum gloeosporioides* 및 *C. acutatum* 에 의해 발생하는 사과 탄저병은 전 세계적으로 발생하며, 특히 온난다습한 날씨에서는 재배기간 동안 병 발생을 함으로써 엄청난 손실을 일으킨다 (Munir et al. 2016).

▶ 식물병은 병원체, 기주, 환경의 병 발생 3요소에 의해 병이 발생한다. 이러한 요소 중 하나라도 성립되지 않으면 병이 발생할 수 없다. 그러나 다른 병과 달리 사과탄저병은 하나의 병원균에 의해 발생한다고 보기 어렵다(그림). 탄저병은 같은 종이지만 그 특성이 다르게 나타나 complex로 분류되어 왔다. 최근에 이러한 complex 내의 종들에 대해 multigene sequencing를 통해 ployphasic character를 특성화 함으로써 계통학적 분류를 세분화 하게 된다. 그 결과 한 기주에 하나의 병원균 혹은 두 개의 병원균으로 생각되었던 *C. gloeosporioides* Complex 및 *C. acutatum* Complex로 생각해 왔던 병원균은 실제로 더욱 세분화되어 있다는 것을 알게 된다(Hassan, 2018). 전 세계에서 사과 탄저병을 일으키는 *Colletotrichum*의 종(species) 수는 20여 종이 관여하고 있다고 보고되고 있다(표. Dowling, 2020).

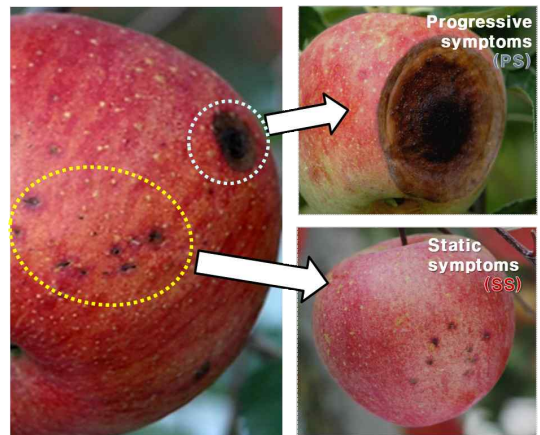


그림 1. 사과 탄저병 병징

▶ 결국, 사과 탄저병은 다양한 종(multiple species)의 병원균에 의해 하나의 병, 탄저병이 발생하게 되고(Multiple species pathogens can cause a single disease), 하나의 병원균을 목표로 했던 방제방법은 달라져야 한다는 것을 알게 된다. 일반적인 병의 경우 하나의 disease cycle을 구성하는 요소 중 일부를 제거함으로써 방제가 가능하다. 그러나 탄저병의 병환을 보면 하나의 병삼각형에서 1개 이상의 요소를 제거한다고 하더라도 다른 병삼각형의 구성요소는 그대로 존재함으로 병은 계속 발생하게 된다(Dowling, 2020). 각각의 병삼각형에서 구성요소 중 하나 혹은 그 이상의 요소를 제거해야 병 발생을 억제할 수 있게 된다. 요약하자면 일반적인 병은 병원균을 제거하게 되면 병삼각형이 이루어지지 않아 병이 발생하지 않게 된다. 그러나 탄저병의 경우 하나의 병원균을 제거하더라도 탄저병을 일으키는 다른 종의 탄저병 병원균에 의해 병이 발생함으로 인해 탄저병 방제가 어렵다(그림).

Table 1. List of *Colletotrichum* spp. on major fruit crops compiled from literature reports. See Supplementary Table S1 for literature sources.

Host	Complex/species	Current name ^a	Location(s)
Apple	<i>C. acutatum</i>	<i>C. fioriniae</i> **b	USA*, Belgium, Croatia*, Japan, Korea, France, Slovenia
		<i>C. godetiae</i> * (syn. <i>C. clavatum</i>)	Belgium*, UK, Netherlands, Slovenia, Japan, Croatia, Australia
		<i>C. nymphaeae</i> *	USA, Belgium, Brazil*, Japan, Korea
		<i>C. cuscatae</i>	Netherlands, New Zealand, USA
		<i>C. salicis</i>	Belgium, Germany, New Zealand
		<i>C. acerbum</i>	New Zealand
		<i>C. acutatum</i> s. str.	Belgium, Australia
		<i>C. melonis</i>	Brazil, Uruguay
		<i>C. rhombiforme</i>	Belgium, China
		<i>C. limeticicola</i>	Brazil
		<i>C. paranaense</i>	Brazil
		<i>C. simmondsii</i>	Japan
		<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. fructicola</i> ****
	<i>C. siamense</i> *		USA, Korea*, Japan, Pakistan, Argentina
	<i>C. tropicale</i> *		USA*
	<i>C. alienum</i>		USA, New Zealand
	<i>C. theobromicola</i> (syn. <i>C. fragariae</i>)		USA, Uruguay
	<i>C. boninense</i>	<i>C. aenigma</i>	Japan, China
		<i>C. kahawae</i>	USA, Belgium
		<i>C. gloeosporioides</i> s. str.	USA
<i>C. karsti</i>		Brazil	

그림 3. 사과 탄저병을 일으키는 *Colletotrichum* sp.의 세계적 분포 (20 species 관여)

▶ 탄저병과 같이 식물의 병이 발생했을 때는 그게 어떤 병인지, 해당 병의 특성이 무엇인지를 먼저 알아야만 효과적으로 제어할 수 있다. 유전정보를 이용한 탄저병균 분류 및 동정 연구는 그래서 중요하다. 병에 대해 잘못된 진단을 하거나, 대상 병원균의 특성을 정확히 모르면 방제효과는 당연히 떨어지게 된다. 어떤 병원균이 주로 피해를 주는지, 여러 농작물에 탄저병을 일으키는 탄저병균의 종은 무엇인지를 정확하게 파악하는 것은 방제는 물론 저항성 품종 육종 등에 있어 매우 중요한 요인이 된다.

▶ 사과 탄저병을 일으키는 병원균 종(species)으로 우리나라에서는 2종으로 알고 있다가 최근에는 4종으로 재분류하였다. DNA(유전자) 정보를 기반으로 한 최신 분류법으로 사과 탄저병균을 분류, 동정이 세밀하게 추진되어야 하며 국가별로 식물검역에 이용하거나 지역별 병원균 분포도 작성, 저항성 품종 육종에 활용하는 등 병해관리 및 대응을 위한 기반기술로 꼭 연구되어야 한다.

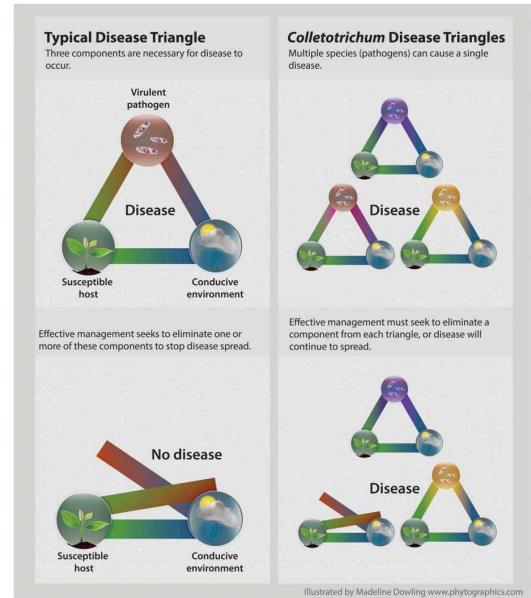


그림. 3. *Colletotrichum*균의 병환 특이성

2. 연구개발 대상의 국내외 현황

□ 국내 기술 수준 및 시장 현황

○ 최근 환경문제가 인류의 생존, 특히 식량문제와 직접적으로 관련되어 전 세계적으로 관심이 집중되어 있는 가운데 국내에서도 농산물에 대한 농약 잔류 문제가 꾸준히 대두되어 문제시 되고 있는 실정이다. 국내 농약 사용량은 1990년대 중반 1,205kg/km²로 OECD 회원국 중 일본에 이어 2위이며, OECD 평균 사용량 263kg의 4.6배, 농약 최소 사용국인 뉴질랜드(25kg)의 48배에 해당하며 농약 과다 사용으로 인해 자연 환경 생태계 파괴, 지하수 오염, 농작물의 잔류 독성 및 해충의 저항성 출현 등 심각한 문제를 야기하고 있는 실정이다.

○ 이러한 문제 해결을 위해 '92 Rio 환경회의에서는 유기합성 농약의 사용량을 2004년까지 50% 감소 하자는 국가 간의 협약을 체결하기에 이르렀고 1997년 미국에서는 기존 유기합성 살충제 사용의 46%, 특히 채소 및 과수 재배에서 68%가 대체 농약(alternative pesticides)으로 전환하였으며, 이중 과수 재배지의 14%와 채소 재배지의 6%를 곤충병원성곰팡이와 천적곤충 등을 이용하여 해충 방제('98, USDA-NASS)를 실시하고 있다. 이러한 생물학적 방제는 환경 친화적인 방제 수단으로 농업생태계에 지속적으로 병해충밀도 억제효과를 발휘할 수 있으므로 외국에서는 범국가적인 차원에서 많은 연구가 수행 중이며, 일부 단일 유효성분에 의해 병해충에 대한 생물학적 개발을 완성하여 시판 중이다. 이처럼 대체 농약이 차지하는 비중은 점차 증가할 것으로 예상되고 있다.

○ 세계적으로는 지난 20여 년간 생물적 방제기술의 발달로 인하여 환경에 대한 위해성을 감소시킬 수 있게 되었다. 그럼에도 우리나라에서는 아직까지 화학농약의 오남용으로 인한 농작물 피해가 심각한 실정으로 이와 관련된 농촌진흥청 민원은 연간 2만4천 여 건이 접수되고 있으며 공식 접수되지 않은 민원을 포함하면 연간 4만 건 수준에 이르고 있는 실정이다(농업과학기술원, 2006). 이를 개선하기 위해서는 개별 농가에서 농약의 안전 사용기준을 준수하는 것이 중요하지만 이와 더불어 친환경 작물보호제와 같은 제품과 이를 이용한 기술을 개발·보급하는 것도 시급히 해결해야 할 과제임에는 틀림없다.

○ 한·칠레, 한·미, 한·EU FTA 등 각국 간의 자유무역협정(FTA)이 체결됨에 따라 값싼 수입농산물이 물밀 듯이 수입되고 있는 상황에서 이러한 값싼 수입농산물에 효과적으로 대처하기 위해서는 생산이 필요한 것은 분명한 사실이다. 이러한 친환경 농산물을 꾸준히 생산하기 위해서는 친환경 농산물 재배농가의 소득을 향상시키고 안정적인 수익성을 확보해야 하며, 이를 위해서는 친환경 농산물을 생산할 수 있는 기술이 개발되어 널리 보급되어야 한다.

○ 경제·산업적 측면에서 친환경 미생물농약의 개발비는 화학농약에 비해 투자가 상대적으로 경제적일 수 있다(표 3). 이는 화학농약 개발비의 대부분을 차지하는 독성, 잔류 관련 시험 등이 비교적 완화적이고, 개발에 필요한 시간과 노력이 적은 이유에서이다. 대부분 수입에 의존하는 기존 화학농약을 대체할 경우 수입 대체 효과와 더불어 식량주권의 회복에도 크게 일조하리라 여겨진다.

< 생물농약과 화학농약과의 개발 비교 >

구분	생물농약	화학농약
적용	유기농산물, 수출용 농산물 정원, 가로수, 공원, 도시농업	일반 농산물
등록기간	1.5-2.5년	3-5년
개발기간	3년	7-10년
개발비용	약 5억원	약 200억원
개발가능성	1/2,000	1/150,000-1/200,000

○ 그러나 생물농약이 무조건 장점만 있는 것이 아니라 단점도 있기 때문에 미생물농약 개발 시에 해결해야 할 난제도 많이 있다.

< 미생물농약의 장단점 >

장점	단점
독성이 거의 없음	유통기한 짧음
환경에 무해	지속기간이 짧음
특정 대상에 효과	적용 범위가 좁음
특정 메카니즘	특정한 대상만 작용
완전 박멸은 어려움	늦게 효과가 나타나며 낮은 약효

○ 환경 친화적인 작물보호제 및 효과적인 생산공정의 개발은 차세대 생물 산업의 핵심 분야이다. 21세기형 작물보호제 개발은 국제경쟁력을 확보하고 과학기술선진국으로 도약해야 할 우리나라의 현시점에 있어서 매우 중요한 과제이다. 국내 미생물 전문기관에서 확보된 미생물들을 이용하여 친환경 방제제를 개발하면 화학 농약 잔류문제로부터 해방되고 수출 시장에도 접목을 할 수 있을 것으로 기대된다.

○ 국내의 경우 최근 화두가 되고 있는 모든 농산물에 대한 PLS(Positive List System)의 2019년 전면 시행을 앞두고 친환경농가 뿐만 아니라 일반 관행농가에서도 친환경 작물보호제에 대한 관심이 급증하고 있으며 현장에서도 이와 관련된 제품의 시장이 확대되고 있다.

○ 국내 미생물농약에 대한 연구는 1990년대 후반부터 본격적으로 진행되었으며, 한국화학연구원, 한국생명공학연구원 중심의 출연연구소, 경상대학교, 서울대학교, 안동대학교, 충남대학교, 충북대학교 등의 대학교, 농촌진흥청 산하 농업과학원, 경기도농업기술원, 전남농업기술원, 충남농업기술원 등의 정부기관, 고려바이오(주), 그린바이오텍(주), (주)한국바이오케미칼과 같은 중소기업에서 꾸준히 연구되고 있다.

○ 특히, 2001년에 생물농약에 대한 등록규정이 마련되고 2003년에 처음으로 미생물농약이 등록된 이후 (주)그린바이오텍, (주)한국바이오케미칼, 고려바이오(주) (주)팜한농 등에서 미생물농약을 꾸준히 등록하였으며, 2016년 12월말 현재 국내에 등록된 생물농약은 15업체(제조 9업체, 수입 6업체), 29품목으로, 그 중 살균제 19품목, 살충제 9품목, 제초제 품목이고, 분야별로는 미생물농약 27품목, 생화학농약 2품목이다.

○ 국내의 미생물농약, 미생물비료, 친환경농자재, 천적 등을 포함한 생물농약시장은 약 1,000억 정도

로 추정되며, 2020년에는 전체 농약 시장의 10% 규모인 2,000억 원 정도에 이를 것으로 예상되고 있다.

○ 우리나라에서 사과병해에 대한 미생물제 연구는 거의 전무한 실정이다. 사과 병해 방제력에 따른 농약의존성이 극히 높다. 유기농 경작인들은 농약을 대용할 마땅한 친환경자제가 없어 민간에서 자가제조를 하는 실정이다. 저장 중 사과 부패를 막기 위해 Methyl bromide를 사용하였으나 이제 수출금지 약제로 등록 되면서 다른 대안을 찾아야 한다. 이에 원자력연구원을 중심으로 이온화에너지(전자선, 감마선)을 이용하거나 친환경 훈증제를 일부 연구 한 바 있다.

□ 국외 기술 수준 및 시장 현황

※ 기술현황, 시장현황, 경쟁기관현황, 지식재산권현황, 표준화현황, 기타

○ 사과 병해에 대한 생물학적 방제는 미국, 중국, 이탈리아 등지에서 2000년대 들어서 많은 연구가 이루어지고 있지만 특허출원된 기술은 거의 없는 것으로 확인되었다. 우리나라에서도 큰 문제가 되지 않지만 *Venturia inaequalis*에 의한 검은별 무늬병(apple scab) 방제를 위해 *Bacillus* sp., yeast 등을 이용하여 시도되고 있다. 외국에서는 사과를 껍질채 먹기 때문에 친환경 방제에 대한 연구는 더 늘어날 것으로 사료된다. 특히 수확후 저장, 유통 시 문제가 되는 병해에 대해 생물학적 방제를 시도하고 있다. 이는 Methyl bromide의 사용 금지에 따른 대안이라고 할 수 있다.

○ 세계시장의 경우 최근 지속적으로 화두가 되고 있는 것이 생물농약임. 앞으로의 전통 농약 시장은 저성장 시기로 진입할 것으로 전망되지만, 반대로 전 세계적으로 불고 있는 지속 가능 농업에 대한 요구와 개발이 동시에 맞물리며 녹색·환경보호를 필두로 한 새로운 분야가 고성장기로 접어들 예정임. 동시에 전 세계 국가들이 결정한 정책과 규정, 반복되는 환경 문제 등으로 기업과 품목에 따라 기회와 도전이 계속될 것으로 보인다.

○ 전 세계적으로 규제 당국들이 환경 보호에 대한 비중을 높이고 있고, 동시에 소비자들도 건강에 대한 인식을 중요 시 함에 따라 안전한 농산물에 대한 요구는 증가하고 있음. 이에 따라 전통적인 글로벌 농약 기업들도 생물농약 등의 신흥 시장에 적극적인 투자와 기술력을 확보하고 있는 생물농약 기업들을 M&A 등을 통해 시장점유율을 높이기 위한 사업을 추진하고 있어 시장규모는 지속적인 증가세를 보일 것으로 추정된다.

○ 전 세계적으로 미생물을 이용한 과수, 과채류 병해방제제 개발 연구는 오래전부터 진행되어 왔고, 제품화는 많이 되어 있으며 일부 제품은 연간 1억 달러 이상의 매출을 올리고 있다.

Upcoming Biopesticide Active Ingredients Approved(' 12-' 13)

Global Biopesticides Market Trends & Forecasts (2012-2017) (Markets and Markets)

AI	Type	Uses
Cydia pomonella granulovirus V22	Insecticide	Food crops
B. subtilis strain 713 variant soil	Fungicide	Food crops
Organic acids derived from Leonardite	PGR	Food crops and nonfood crops
B. pumilus strain BU F-33	ISR	Seed treatment in food crops, turf, flowers
Sclerotinia minor IMF 344141	Herbicide	Turf
Pasteuria sp.	Nematicide	Food and nonfood crops
Burkholderia sp. strain A396	Insecticide	Food crops, turf and ornamentals
Bt galleriae strain SDS-502	Insecticide	Turf
Sclerotinia minor IMI 34441	Herbicide	Turf

< 세계 주요 생물농약 제조 회사 >

	회사	국적	웹사이트
1	Ag Biotech Australia,. Ltd	Australia	agbiotech.com, au
2	AgraQuest, Inc.	USA	agraquest.com
3	Ajay Bio-Tech(India) Ltd.	India	ajaybio.in
4	Amit Biotech	India	amitbiotech.com
5	Bayer CropScience AG	Germany	bayercropscience.com
6	Becker Underwood	USA	beckerunderwood.com

○ Markets and Markets에서 발표된 자료에 의하면, 세계 농약 시장은 2016년 548억 8000만 달러로 전년 대비 5.15% 성장이 예상되고 있으며, 2021년까지 705억 7000만 달러에 달할 것으로 전망하고 있다.

○ 생물농약은 향후 5년간 17% 이상의 성장률을 보일 전망이다. 현재 33억 7000만 달러 규모에서 2021년 75억 1000만 달러 수준으로, 규모 자체는 화학농약 시장에 비해 아직은 작지만 향후 잠재력을 내포한 생물농약 시장을 선점하는 기업에게는 성장 기회가 될 것으로 판단된다.

○ 해외에서의 미생물을 이용한 병해방제용 제품 등의 생산 및 판매가 활발히 이루어지고 있으나, 국내에서는 실용화뿐만 아니라 제품화에 필요한 기술개발도 미미하며, 성장률도 더딘 상황임. 또한 국내외적으로 기후 온난화와 맞물려 각종 식물병해의 발생이 지속적으로 증가하는 추세여서 향후에도 시장규모는 계속 증가할 것으로 보인다.

○ 또한, 미국에서 산업화에 성공한 대표적인 미생물농약은 다음과 같다.

Company Product	Active Ingredient	Crop(s)	Relative Market Share
BioWorks, Inc. RootShield® PlantShield®	<i>Trichoderma harzianum</i> strain T-22	Ornamentals	10% (horticulture soil fungicides)
Valent Bio. DiPel®/Xentari®	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Veg Vines/Fruit	5-80% of avail. Acres
Foray®	-	Forestry	50% U.S./80% Can.
DiTera®	<i>Myrothecium verrucaria</i>	Grapes/ Veg.	2% U.S./30% Mexico
AgraQuest Serenade® Sonata®	<i>Bacillus subtilis</i> 713 <i>Bacillus pumilus</i> 2808	Wine grapes Lettuce Tomatoes	15% CA Premium 17% CA/AZ 20% FL Fresh Mkt

○ 2007년도 일본 미생물 농약시장은 다음과 같다. 아래 표에서 보듯이 일본의 미생물농약 시장 중 가장 많은 부분을 차지하는 것은 바실러스이며, 트리코도마와 어위니아가 그 다음을 차지하는 미생물 종류이다.

Strain name	Amount (kg,l)	Sales (million JPY)
<i>Trichoderma lignorum</i>	-	-
<i>Talaromyces flavus</i>	2,073.0	36.6
<i>Trichoderma atroviride</i>	28,125.0	188.7
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	-
<i>Conyothyrium minitans</i>	-	-
<i>Agrobacterium radiobactor</i>	530.0	4.5
<i>Erwinia carotovora</i>	15,266.3	151.9
<i>Bacillus subtilis</i> (5)	19,878.5	238.9
<i>Pseudomonas fluorescence</i> (2)	4,903.0	22.8
<i>Pseudomonas sp.</i>	2,331.8	17.1
<i>Bacillus simplex</i>	379.0	2.7
<i>Variovorax paradoxus</i>	-	-
ZYMV	-	-

3. 연구개발의 중요성

○ 사과의 생물학적 방제 시도는 2000년대 전에는 미미하였으나 최근 미국을 비롯한 외국에서 많은 연구가 이루어지고 있다. 과수의 병 발생은 다른 곡류나 채소에 비해 농약 의존도가 높다. 최근 유기농 사과를 비롯한 무농약 사과의 수요가 많아짐에 따라 생물학적 방제의 필요성이 대두되고 있다. 또한 연용 및 남용으로 인한 약제 저항성균의 출현은 농약 사용에 의존하는 관행의 사과 병 방제에 어려움이 나타나고 있다. 그러므로 미생물제제를 혼용하거나 교차살포 하는 방법으로 기존 병 방제 체계를 개선할 필요가 있다. 우리나라에도 그동안 발생하지 않았던 화상병이 발생하여 일부 과수원이 폐기/폐원하고 있으며 사과 주산지인 경북지역을 위협하고 있는 실정이다. 개화기를 전후하여 농용 항생제를 살포하는 농가가 늘어나고 있다. 농업 현장에서 항생제의 사용은 이미 알려져 있듯이 국제적인 규제 및 항생제 내성균의 출현 등의 제약이 있다. 이런 이유에서 미생물제가 그 대안이라고 할 수 있다. 고추와 토마토에 미생물을 처리함으로써 생장촉진, 병 저항성의 증대를 불러올 수 있다. PGPR균과 항균활성미생물을 혼합하여 처리함으로써 근권 및 엽권에서의 경쟁력 우점, 병원균의 생장 억제, 생육촉진, 저항성 등이 유도되어 작물의 생육을 돕게 된다. 한편, 현재까지의 생물학적 방제균의 특성연구는 대부분 실험실과 같

은 좋은 조건에서 이루어진 경우가 대다수인 반면, 실제 자연환경은 매우 다이나믹하다. 식물생장촉진근권세균이 적용될 자연환경은 다양한 병원균이 혼재해 있는 상황, 때로는 가뭄이나 저온, 고온과 같은 환경스트레스 상황 등이 될 수 있다. 따라서 이러한 상황에서의 특성연구가 필요하며, 이러한 다양한 환경조건이 식물-미생물의 상호관계에 어떠한 영향을 미치는지 확인할 필요가 있다. 궁극적으로 미생물의 변이에 관한 연구, 유용미생물-식물체-병해충 간의 상호작용의 이해 및 이와 더불어 다양한 환경변화 즉, 여러 스트레스 조건하에서의 상호작용을 연구하는 것이 매우 중요하다.

○ *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* 및 *Paenibacillus polymyxa*는 유용성이 검증되어 세계적으로도 유전체 연구가 상당히 진행되어 있다. 따라서 본 연구진은 연구중인 미생물 3종에 대한 비교유전체, 오믹스 연구의 접근으로, 기존 연구자료를 바탕으로 연구 미생물의 특정 기능성 유전자를 발굴하고, 항균 물질을 동정하며 미생물 고유의 특성을 나타내는 데 중요한 역할을 하는 유전자들을 서로 다른 세균에서 검증함으로써, 특이적 또는 공통적인 특성의 연구를 수행할 수가 있다.

○ 농약사용 저감 및 환경친화적인 재배에 대한 소비자의 니즈가 최근 급증함에 따라 생물학적 방제균은 환경친화형 소재로서 산업적 응용을 위한 많은 연구가 되고 있는 실정이다. 그러나 생물학적 방제균을 농업에 응용하고자 할 때, 생물학적 방제균-식물-병해충 사이에는 예상했던 것보다 훨씬 복잡한 기작에 의해서 상호 조절이 진행되고 있음을 발견하게 된다.

*P. polymyxa*의 경우, 특정 환경이 되면 변이가 발생하며, 이 변이체는 기존의 균주와 다소 다른 생물학적 특성을 보유하고 있음이 확인되었다. 따라서 생물학적 방제제 개발에 앞서, 기존 균주와 새로 발생한 변이체가 식물체 및 병해충에 어떠한 영향을 미치는 지에 대한 비교 분석 및 변이체 발생 조건에 대한 연구가 반드시 선행되어야 한다.

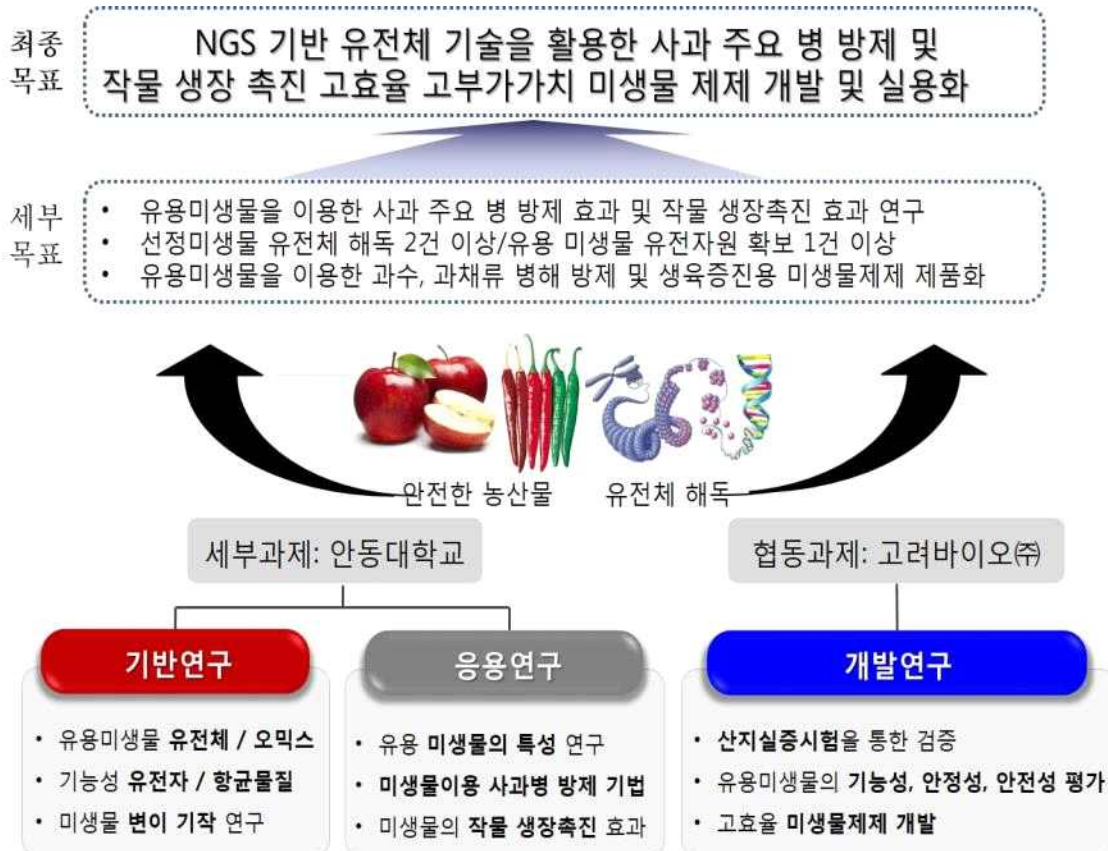
○ 환경 친화적인 작물보호제 및 효과적인 생산 공정의 개발은 차세대 생물 산업의 핵심 분야이다. 21세기형 작물보호제 개발은 국제경쟁력을 확보하고 과학기술선진국으로 도약해야 할 우리나라의 현 시점에 있어서 매우 중요한 과제이다. 국내 미생물 전문기관에서 확보된 미생물들을 이용하여 친환경 방제제를 개발하면 화학 농약 잔류문제로부터 해방되고 수출 시장에도 접목을 할 수 있을 것으로 기대된다.

○ 그동안의 미생물 비료를 연구하고 미생물을 확보한 경험과 자원을 토대로 본 연구에서는 유용미생물들을 활용하여 사과의 병해충 미생물제제와 과채류의 생육을 촉진하는 미생물비료를 개발하여 제품화할 계획이다. 따라서 본 연구의 수행으로 유용미생물의 대량배양기술, 제제화기술 개발을 통해 제품 생산방법을 표준화하고 제품화하여 농가에서의 실증시험을 통해 현장적용매뉴얼을 확립한다면 당 연구의 대상작물에 대한 병해방제 및 생육증진 이외에도 다양한 작물에 적용 확대될 것으로 확신한다.

4. 연구개발의 목표 및 내용

□ 연구개발의 최종목표

구분	내용	코드번호	B-05-01
최종목표	NGS 기반 유전체 기술을 활용하여 사과 주요 병해 방제용 미생물 제제 개발 및 작물(고추, 토마토)의 생육촉진 친환경 미생물제제개발이 연구 목표이다. 유용미생물의 유전체 해독을 통해 미생물의 기능성 유전자 및 항균물질을 구명하고, 유용미생물의 기능성과 효능을 검증하여 고부가가치 기능성 미생물제제를 개발한다.		
세부목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유용미생물을 이용한 사과 주요 병 방제 효과 및 작물 생장촉진 효과 연구 ○ 선정미생물 유전체 해독 2건 이상/유용 미생물 유전자원 확보 1건 이상 ○ 유용미생물을 이용한 과수, 과채류 병해 방제 및 생육증진용 미생물제제 제품화 		



<연구 최종 목표 및 세부/협동과제 별 수행연구 내용 모식도>

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

I. 후보 균주, 동정

Biological Control Agents (BCA) 개발을 위해, 선행 연구에서 선발된 아래의 유용미생물 5종을 이용하여 이후 실험을 진행하였다.

	Species	Strain	다른 이름 ¹⁾	제품화 ²⁾
1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	AK-0		탄저킬, 올업
2	<i>Serratia plymuthica</i>	APEC123	GYUN-8	세라탄
3	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	APEC128	ANUB038, GYUN-2273	올팡
4	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	APEC267		
5	<i>Bacillus subtilis</i>	APEC170		

총 5개 균주 중 미동정이었던 *Serratia plymuthica* APEC123과 *Paenibacillus polymyxa* APEC128에 대하여 16S rDNA서열을 이용한 Blast 검색 및 phylogenetic tree 분석을 수행하였다.

1. APEC123 (GYUN-8)

□ *Serratia plymuthica* GYUN-8 동정, 특성 분석

식물병원균에 대한 방제효과를 가지면서 동시에 식물의 생육촉진활성을 갖는 새로운 균주를 동정하기 위해, 인삼 근권의 토양을 채취하여 멸균수에 현탁하여 희석 후 Brain heart infusion (BHI)에 도말하고 단일 콜로니로 형성되는 미생물들을 분리하였다.

이후 분리된 토양 근권세균의 핵산을 토대로 염기서열 분석을 수행하였고, 분석된 염기서열은 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 BLAST를 이용하여 Genbank에 등록되어 있는 균주들과 비교분석 하였다. 이때 상기 염기서열 분석을 위해, 프라이머로써 27F 프라이머(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 및 1492R 프라이머(5'-GGYTACCTTGTTACG ACTT-3')를 사용하여 분리된 토양 근권세균의 16S rDNA 유전자 부분을 PCR로 증폭하였고, PCR 반응 조건은 predenaturation (60°C, 2분), denaturation (98°C, 1분), annealing (60°C, 1분), extension (72°C, 1분), total cycle (30 cycle), final extension (72°C, 4분)으로 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel, 0.5 X TBE buffer (0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA)에서 100 V, 25 mA로 30분 전기영동 후 UV 하에서 확인하였다. 이후 PCR 산물은 DNA 염기서열 분석 전문업체(Solgent, daejeon, Korea)에 의뢰하였으며, Seqman (DNASTAR, USA) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 그 결과, 분리한 토양 근권세균은 *Serratia plymuthica*와 99%의 서열 상동성을 가지는 균주로서 종래 존재하지 않은 신균주임을 확인하였고, 이를 “*Serratia plymuthica* GYUN-8”로 명명하였으며, 2020년 10월 15일자로 농업생명공학연구원에 수탁하여 수탁번호 KACC 81140BP를 부여받았다. 또한, *Serratia plymuthica* GYUN-8의 16S rDNA의 서열을 아래에 기재하였다.

1) 본 연구실의 균주리스트 재정비로 인해, 균주의 strain명이 바뀌어 재명명되었음.

2) 해당 유용미생물에 대한 이해를 돕기 위하여, 본 과제의 결과물인 제품명을 본 표에 기재하였음.

caggcctaac acatgcaagt cgagcggtag cacaggagag cttgctctct gggtgacgag	60
cggcggacgg gtgagtaatg tctgggaaac tgcctgatgg agggggataa ctactggaaa	120
cggtagctaa taccgcataa cgtctacgga ccaaagtggg ggaccttcgg gcctcacgcc	180
atcagatgtg cccagatggg attagctagt aggtggggta atggctcacc taggcgacga	240
tccctagctg gtctgagagg atgaccagcc aactgggaac tgagacacgg tccagactcc	300
tacgggaggc agcagtgggg aatattgcac aatgggcgca agcctgatgc agccatgccg	360
cgtgtgtgaa gaaggccta gggttgtaaa gcactttcag cgaggaggaa gggttcagtg	420
ttaatagcac tgtacattga cgttactcgc agaagaagca cgggctaact ccgtgccagc	480
agcccggtg atacggaggg tgcaagcgtt aatcggatt actgggcgta aagcgcacgc	540
aggcggttt ttaagtcaag tgtgaaatcc ccgcgcttaa cgtgggaact gcatttga	600
ctggcaagct agagtctgt agaggggggt agaattccag gtgtagcggg gaaatgcgta	660
gagatctgga ggaataccgg tggcgaagc ggccccctgg acaaagactg acgctcaggt	720
gcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga taccttggtg gtccacgctg taaacgatgt	780
cgatttgag gttgtgccct tgagggctgg cttccggagc taacgcgta aatcgaccgc	840
ctggggagta cggccgcaag gttaaaactc aatgaattg acgggggcc gcacaagcgg	900
tggagcatgt ggtttaattc gatgcaacgc gaagaacctt acctactctt gacatccaga	960
gaactttcca gagatggatt ggtgccttcg ggaactctga gacaggtgct gcatggctgt	1020
cgctcagctc gttgtgtaaa tgttgggtta ag	1052

그림 5. *Serratia plymuthica* GYUN-8의 16S rDNA서열

상기 16S rDNA서열을 이용하여 계통분류를 진행하였다. GYUN-8은 *Serratia plymuthica*와 동일한 clade로 분류되었다. 가장 가까운 strains은 *Serratia plymuthica* 4Rx13이었다.

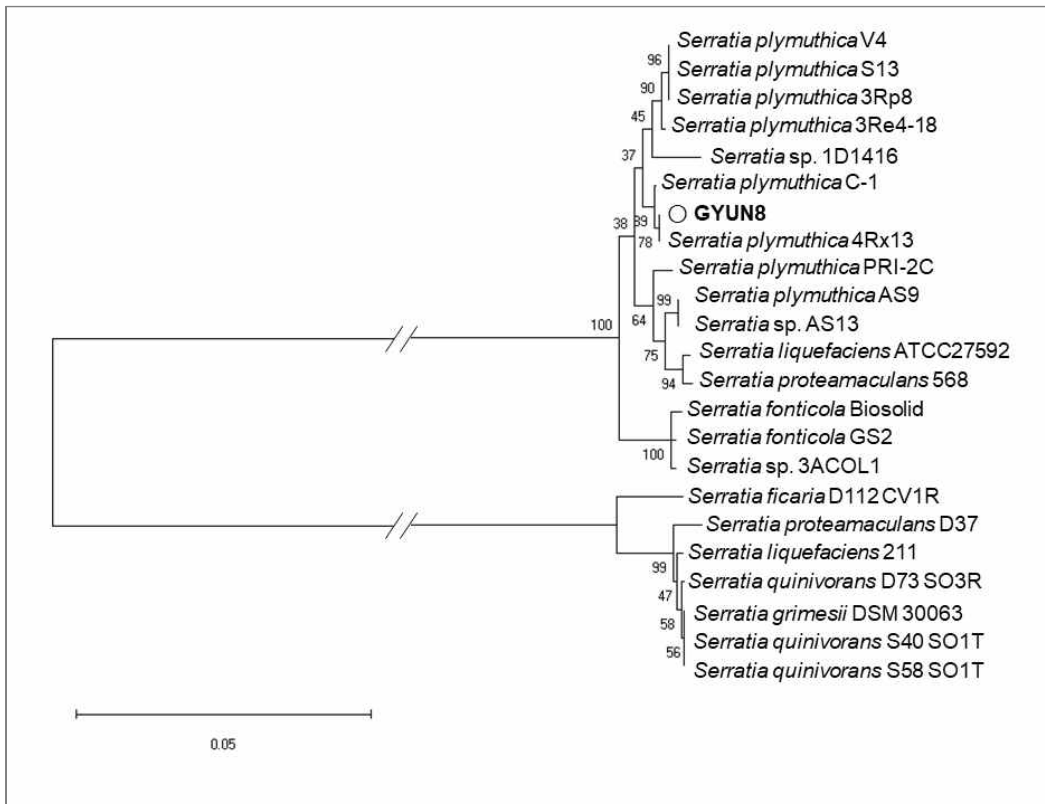


그림 6. Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of strain YGB36 and the closely related species.

Bootstrap values (expressed as percentages of 1000 replications) greater than 50% are shown at branch points and the species names followed by the GeneBank accession numbers. Bar, 1.0 substitutions per 100 nucleotide position.

2. *Paenibacillus polymyxa* APEC128 (ANUB038)

16S rDNA서열을 이용한 NCBI Blast 결과, ANUB038은 *Paenibacillus polymyxa* (Accession no. CP017968.3, CP011420.1)에 99.79% 유사한 것으로 동정되었으며, MEGA-X를 이용한 Phylogenetic tree 분석에서도 *P. polymyxa*와 동일한 그룹으로 분류되었다.

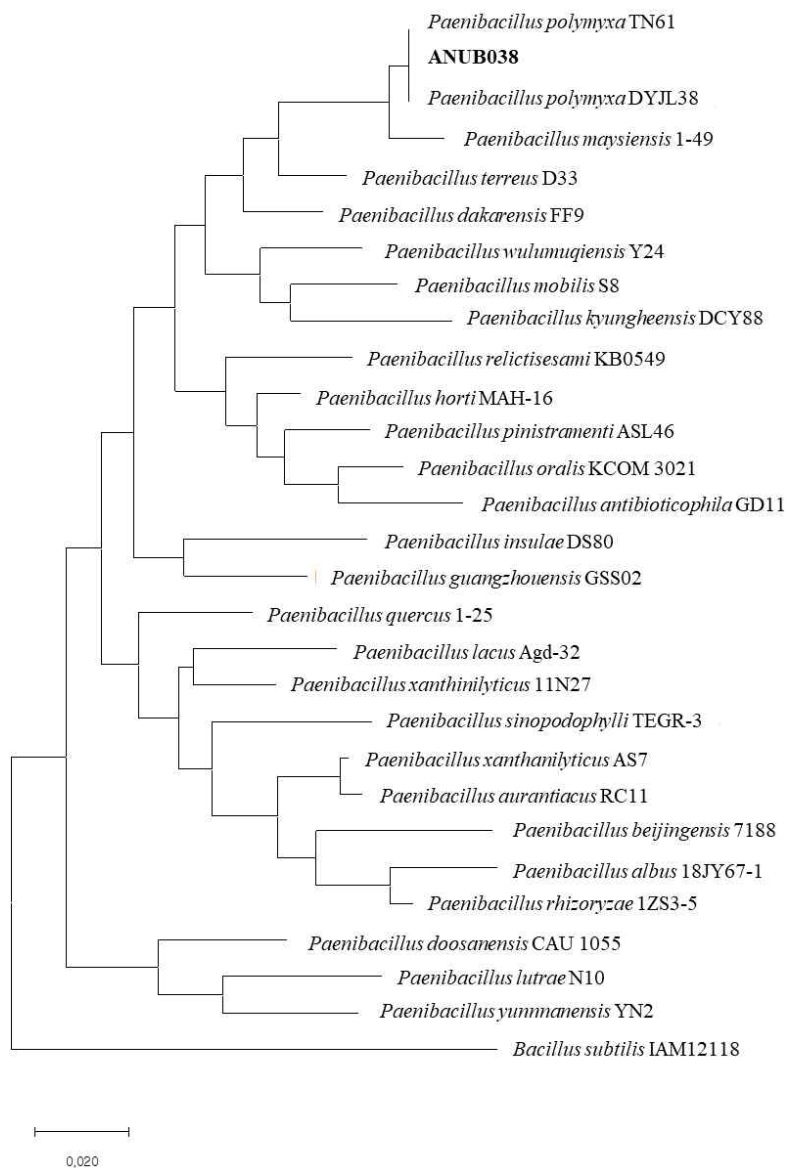


그림 7. Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of strain ANUB038 and the closely related species.

II. 균주별 기본 특성

선행 연구에서 선발된 유용미생물 5종 (*Bacillus amyloliquefaciens* AK-0, *Paenibacillus polymyxa* APEC128, *Serratia plymuthica* APEC123, *Bacillus subtilis* APEC170, *P. polymyxa* APEC267)에 대한 기본 특성을 분석하였다. 배양적 특성, 길항력관련 효소능 및 생리/생화학적 특성에 대한 분석이 수행되었다.

1. 유용미생물 최적 배지조건 및 배양시간

선발된 유용미생물 5종이 생성하는 항생물질의 항균활성과 항생물질 생산을 위한 최적 배지조건을 결정하기 위해 nutrient broth (NB), minimal media (M9), trypticase soy broth (TSB), brain heart infusion broth (BHI) 배지를 이용하였다. 각각 broth 100 ml에 전 배양 유용미생물(2일, 28° C, 180rpm) 100 µl를 접종한 뒤 28° C, 180rpm shaking incubator에서 배양을 하였다. 매일 1 ml 씩 sampling 하여 spectrophotometer 600 nm 파장에서 현탁도를 측정하여 최적 배지를 선발하였다.

그 결과, *S. plymuthica* APEC123 균주를 제외한 나머지 4종의 균주는 TSB, BHI 배지에서 배양 24 h에 108 cfu/ml 농도로 성장하는 것을 확인하였으며, 최고 109-1010 cfu/ml 까지 배양이 가능한 것을 확인하였다. *S. plymuthica* APEC123 균주는 다른 4종의 균주와는 다르게 그람음성균으로 6시간 배양했을 시 108 cfu/ml 농도로 배양할 수 있는 것을 확인하였다. 또한 4개의 배지 모두 배양이 우수한 것을 확인하였으므로 앞으로의 연구는 BHI 배지를 기본배지로 결정하여 연구를 진행하였다.

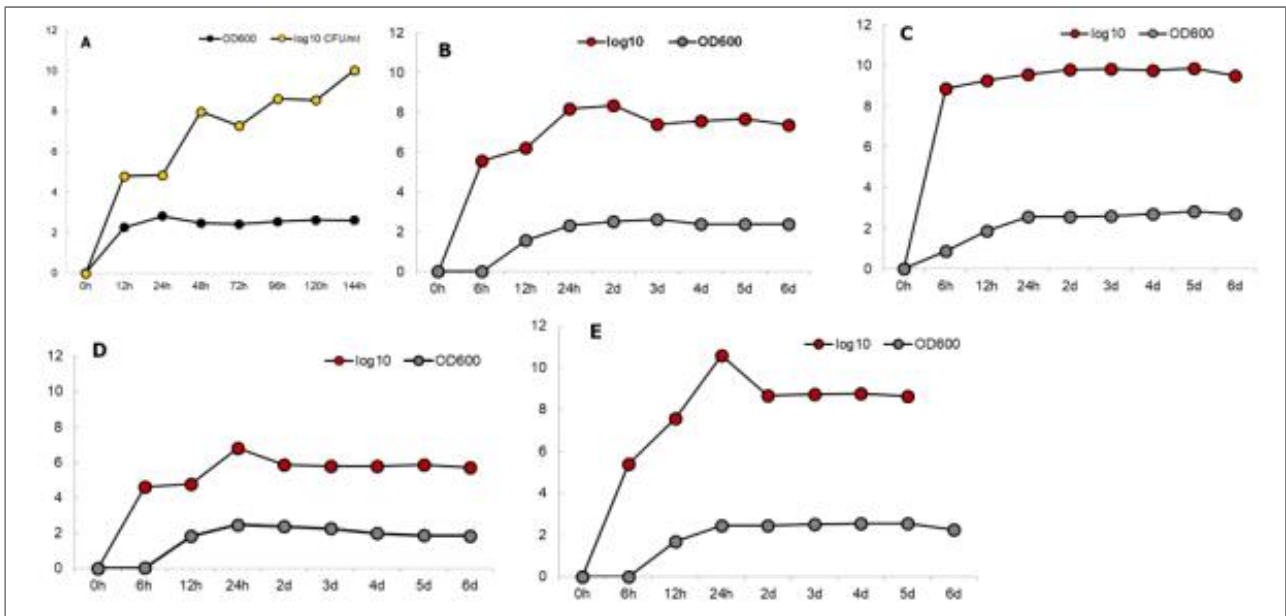


그림 8. 유용미생물 5종의 배양시간에 따른 균 성장곡선.

Serratia plymuthica APEC123 배양 6시간만에 108 cfu/ml 이상의 성장을 보였다.

2. 길항기작 효소능 조사

5종의 유용미생물들이 병원균을 억제하는데 사용되는 효소능을 알아보기 위해 다음의 연구를 진행하

였다. Cellulase, protease, amylase 및 siderophore 생성 여부를 각각의 배지에 유용미생물들을 배양하여 나타나는 clear zone을 측정하여 효소 생성여부를 판단하였다.

Cellulase는 CMC agar 배지, Amylase 활성 배지(starch hydrolytic medium), siderophore 생산성을 조사하기 위하여 CAS(chrome azurol S) blue agar 배지를 사용하였다. 각각의 배지에 균을 접종 한 후 28° C 5일간 배양하여 halo zone 형성 유무를 관찰하여 효소 생성능을 판단하였다.

유용미생물은 곰팡이 외막을 분해할 수 있는 가수분해효소를 이용하여 식물병원균의 세포벽을 분해시키는 용균작용을 통해 항균활성을 보인다. 위 연구를 실시한 결과 siderophore, amylase 효소는 APEC123 균주를 제외한 나머지 균에서 모두 생성하는 것을 확인하였다.

균류의 세포벽은 세포의 형태를 결정하고, 환경과 균류 자신과의 경계면을 이루어 삼투분해(osmotic lysis)로부터 세포를 보호해 주며, 세포벽 간격을 통한 고분자의 통과를 조절하는 역할을 하고, 색소를 포함할 경우에는 세포벽은 자외선 또는 다른 미생물의 효소적 분해로부터 세포를 보호하며, 다른 생물과의 상호작용을 가능하게 하는 항원적인 성질을 가지기도 한다. 세포벽의 화학적 분석에 의하면 다당류를 주요물질로 가지며 약간의 당단백질과 적은양의 지질이 있음이 밝혀졌다. 다당류의 종류는 균주의 분류군에 따라 다르다. 특히 불완전균류는 전형적인 물질인 chitin, glucan 및 cellulose를 포함하고 있다. 곰팡이 세포의 세포벽을 이루는 물질인 chitin, β -glucan 및 cellulose등의 다당류는 이들의 합성이 저해될 경우 진균의 성장을 선택적으로 방해할 수 있어 항생물질을 생성하는 미생물 탐색의 좋은 대상으로 인식되고 있다.

Siderophore는 철 이온(Fe^{3+})과 친화성이 높은 가용성이며 저분자인 2차 대사산물로 많은 미생물들이 이 물질을 생산한 후 철수송계(high-affinity iron-transport system)를 이용해 토양환경 내 철 이온을 흡수하여 생육에 이용한다. 그리하여 많은 미생물들이 철 이온(Fe^{3+})의 경쟁에서 우위를 선점하기 위해 경쟁적으로 siderophore를 생산한다. 이는 식물의 근권에서 철 이온을 선택적으로 흡수하여 병원성 진균의 철 이온(Fe^{3+}) 흡수를 방해함으로써 식물병원성 진균을 고사시키는 작용을 한다.

사과탄저병균 *C. gloeosporioides*, 겹무늬썩음병균 *B. dothidea*에 대한 군사생장억제 효과를 보인 유용미생물 5종은 cellulose와 siderophore 형성함으로써 군사생장억제에 효과를 보이는 것으로 판단된다.

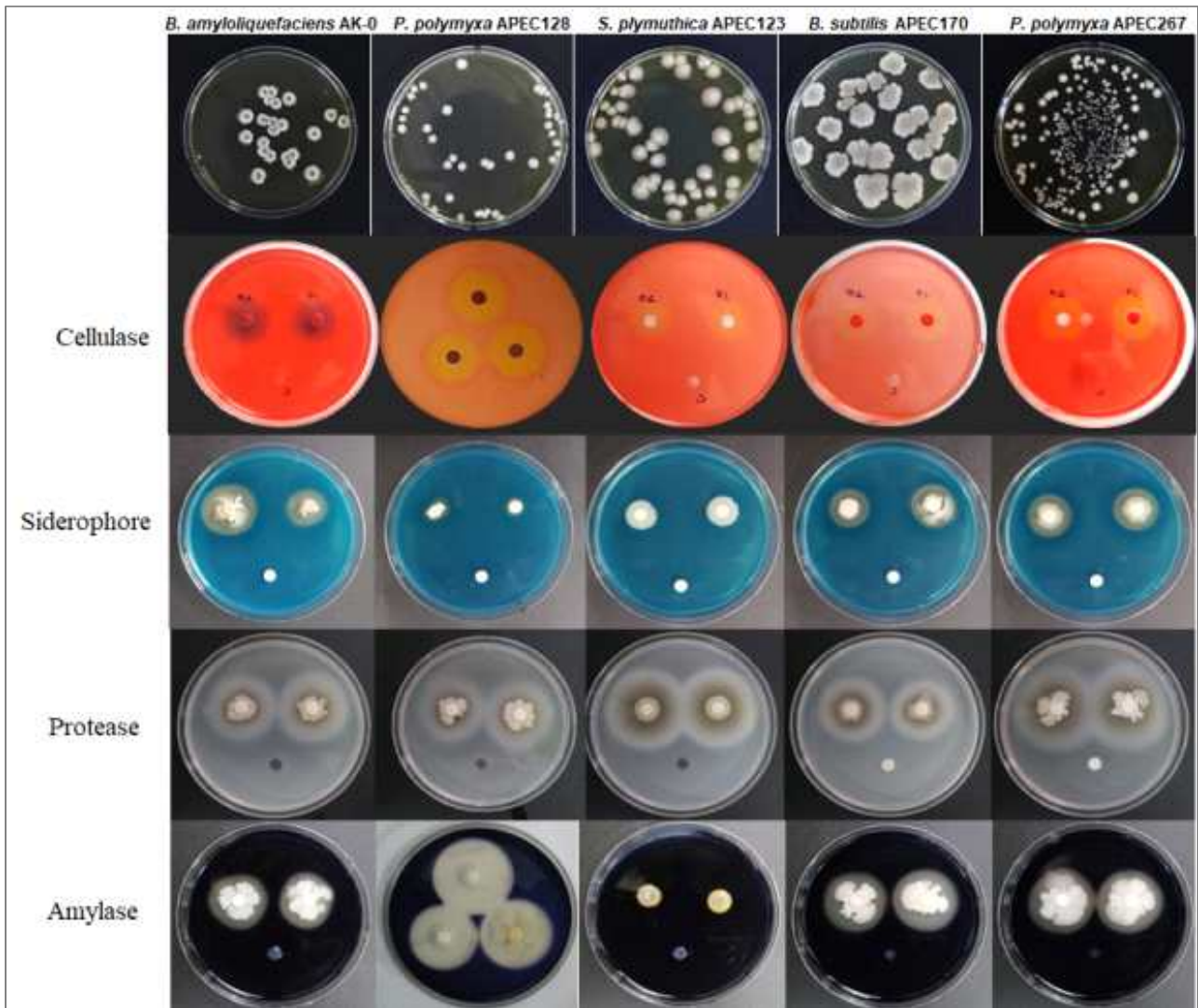


그림 9. 유용미생물 5종의 길항기작 조사를 위한 효소 생성능 검정.
Cellulase, siderophore, protease, amylase 효소 생성 여부를 확인하였다.

3. 탄소원 이용능 및 생리·생화학적 특성

유용미생물의 배양조건을 위해 탄소이용능을 확인하였다. Biolog GEN III microplate를 사용하였으며, 미생물의 현탁액을 각 well에 접종하여 28° C, 24시간 배양 후 spectrophotometer를 이용하여 현탁도를 측정하였다. 탄소이용 여부는 아래의 표와 같은 결과 값을 도출하였다.

표 1. 유용미생물의 탄소원 이용

Substrates	AK-0	APEC128	APEC267	APEC170	APEC123
Dextrin	+	+	+	+	+
D-Maltose	+	+	+	+	
D-Trehalose	+	+	+	+	+
D-Cellobiose	+	+	+	+	+
Gentiobiose	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+

D-Turanose	+	+	+	+	+
Stachyose	+	+	+	+	
D-Raffinose	+	+	+	+	+
α -D-Lactose	+	+	+	+	
D-Melibiose	+	+	+	+	+
β -Methyl-D-Glucoside	+	+	+	+	+
D-Salicin	+	+	+	+	
N-Acetyl-D-Glucosamine	+	+	+	+	+
N-Acetyl- β -D-Mannosamine					
N-Acetyl-D-Galactosamine	-	-	-	-	
N-Acetyl-Neuraminic Acid	-	-	-	-	
α -D-Glucose	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	
D-Fructose	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	+	
3-Methyl Glucose	-	-	-	-	+
D-Fucose	-	-	-	-	+
L-Fucose	-	-	-	-	+
L-Rhmnose	-	-		-	
Inosine	-	-		-	+
D-Sorbitol	+	+		+	
D-Mannitol	+	-	+	+	
D-Arabitol	+	-	-	+	
myo-Inositol	+	+	-	+	+
Glycerol		-	+		+
D-Glucose-6-PO4			-		+
D-Fructose-6-PO4		-			+

표 2. 유용미생물의 생리·생화학적 특성

Characteristics*	AK-0	APEC128	APEC267	APEC170	APEC123
Gram stain	+	+	+	+	-
Growth in pH 6	+	+	+	+	+
pH 5	+	+	+	+	+
1% NaCl	+	+	+	+	+
4% NaCl	+	+	+	+	±
8% NaCl	-	-	-	-	-
1% Sodium Lactate	+	+	+	+	+
Fusidic Acid	-	-	-	-	±
D-Serine	-	-	-	-	+
Troleandomycin	-	-	-	-	+
Rifamycin SV	+	+	+	+	+
Minocycline	-	-	-	-	-
Lincomycin	-	-	-	-	+
Guanidine HCl	+	+	+	+	±
Niaproof 4	-	-	-	-	+
Vancomycin	-	-	-	-	+
Tetrazolium Violet	±	±	±	±	+
Tetrazolium Blue	±	-	±	±	+
Nalidixic Acid	-	-	-	-	-

연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

2. 균주별 기본 특성

Lithium Chloride	+	+	+	+	±
Potassium Tellurite	+	+	+	+	-
Aztreonam	-	-	-	-	±
Sodium Butyrate	+	+	+	+	-
Sodium Bromate	-	-	-	-	-

*BioLog system 및 Vitek 분석

III. 실내실험

1. 사과 주요병 방제

□ 식물체 처리후 밀도변화, 엽권/근권 정착력, 약제내성 평가

○ 사과 과실 처리 후 밀도변화

유용미생물의 실용화 가능성을 알아보기 위한 방법의 하나로서 길항미생물의 근권 및 엽권에서의 정착율을 조사하였다. 대상 작물의 병이 사과탄저병 및 겹무늬썩음병 임으로 사과 과실에서의 정착율을 관찰하였다. 사과는 후지품종을 사용하였으며, 표면소독은 1% NaCl에서 1회 세척 후 멸균수로 2회 세척하여 사용하였다. 유용미생물 현탁액은 BHI agar 배지에서 2일간 배양한 균체를 멸균수에 현탁하여 108 cfu/ml의 농도로 만들어 한 과실 당 10 ml의 양을 분무하였다. 분무 후 과실을 자연상태와 동일한 조건으로 두고 24시간 간격으로 sampling 하여 유용미생물의 밀도를 serial dilution 방법으로 확인하였다.

유용미생물 처리 과실에서의 정착률을 조사한 결과, 식물체 표면에 처리하였을 때 대부분의 세균들이 과실 표면에 부착은 잘하는 것으로 밝혀졌으나, 일정 기간 뒤의 재분리율은 그리 높지 않았다. 처리 후 2일 뒤 유용미생물은 102~103 cfu/ml의 낮은 농도로 재분리되었다. 그러므로 유용미생물과 계면활성제를 함께 처리하여 균의 과실 표면 부착력을 높일 수 있도록 제제화 과정에서 보조제를 첨가하여야 한다.

○ 유용미생물 약제내성 평가

일반적으로 생물학적 방제제만으로 충분한 방제가 어려우므로 유용미생물 제제는 살균제 대체제 뿐만 아니라 정규방제 사이에 처리되는 것을 목표로 하고 있기에 사과 과원에 살포되는 살균제 및 살충제의 화학농약 상충작용을 확인하는 실험이 필요하다.

통상적으로 사용하는(최근 3년간 경북 사과원에서 방제력으로 사용되고 있는 약제) 22종의 살균제와 14종의 살충제를 이용하여 진행하였다. BHI broth에 유용미생물을 2일간 28° C, 180 rpm에서 진탕배양 후 접종원으로 사용하였다. BHI agar 배지에 배양한 유용미생물 100 µl를 도달 한 뒤 1/2X, 1X, 2X (반량, 정량, 배량)으로 희석한 화학농약을 각각 10 µl씩 떨어뜨려 28° C에서 배양 후 inhibition zone을 확인하였다.

그 결과 사용한 살균제 22종 중 10종에서 유용미생물 생장억제를 보였으며, 살충제 14종과의 저항성 검정에서는 유용미생물이 억제되지 않았다. 이러한 결과를 종합해 볼 때, 유용미생물과 살균제를 혼용할 경우, 항생제와 동계 계통의 약제와의 혼용은 가급적 피하는 것이 좋을 것으로 판단된다. 또한 살충제에 의한 길항세균의 항균효과는 나타나지 않았으므로 상시에 명시된 살충제에 한하여 유용미생물과 혼용이 가능할 것으로 판단된다.

표 3. 화학농약 살충제에 대한 유용미생물 저항성 검정.

Active ingredient	AK-O			APEC123			APEC128			APEC267		
	1/2X	1X	2X	1/2X	1X	2X	1/2X	1X	2X	1/2X	1X	2X
acetamiprid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
acetamiprid/etofenprox	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bifenthrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

chlorantraniliprole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chlorfenapyr/clothianidin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
clothianidin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
emamectin benzoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
flonicamid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
fulbendiamide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
imidacloprid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
methoxyfenozide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
spinetoram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cypermethrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
etofenprox	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

표 4. 살균제에 대한 유용미생물 저항성 검정

유효성분	AK-0			APEC123			APEC128			APEC170			APEC257			
	1X	2X	0.5X	1X	2X	0.5X	1X	2X	0.5X	1X	2X	0.5X	1X	2X	0.5X	
acibenzolar-S-methyl, mancozeb	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+++	++++	+	+	+	+	
Propineb	+	+	+	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
pyraclostrobin	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
fluazinam	+	++	+	+	+	+	++	++	++	++	+++	+++	++	++	++	++
tebuconazole, trifloxystrobin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
flquinconazole, prochloraz manganese complex	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	+	+	++	+	+
chlorothalonil, difenoconazole	+	+	+	++	++	+	+	++	+	++	++++	+	+	++	+	+
copper oxychloride, kasugamycin	++	+++	+	+++	+++	+++	++	++++	++	-	++	-	++	++	++	++
iminocadine tris(albesilate)	+	++	+	-	-	-	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+
boscalid, pyraclostrobin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
validamycin-A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
metconazole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
trifloxystrobin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
difenoconazole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
trifloxystrobin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tebuconazole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chlorothalonil, difenoconazole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
acibenzolar-S-methyl, mancozeb, chlorothalonil	+	+	+	++	+++	++	++	++	++	+	+	+	++	++	++	++
fluquinconazole, trifloxystrobin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bitertanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
streptomycin, validamycin-A	+	++	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
pynibencarb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
difenoconazole, fluazinam	+	+	+	-	-	-	++	++	++	++++	+++	++++	++++	+++	++++	++++

0, +: 1~5 mm, ++: 6~11 mm, +++: 12 mm~

□ 사과병원균 억제효과 검증

○ 사과 병원균 균사 성장 억제 검증

2017년도 안동에서 분리한 사과탄저병원균 *Colletotrichum gloeosporioides*와 사과 겹무늬썩음병원균 *Botryosphaeria dothidea* 두 균주에 대한 균사성장 억제 검정을 실시하였다. 병원균 선정은 사과 과원에서 특히 과실에 가장 문제되는 병을 선발하여 실험을 진행하였다.

BHI agar 배지에서 28° C, 2일간 유용미생물 (AK-0, APEC123, APEC128, APEC170, APEC267) 균주를 배양하였으며, 2종의 병원균은 PDA 배지에서 5일간 배양한 균을 사용하였다. PDA 배지 중앙에 병원균 균사 절편(6 mm)을 올려놓은 뒤 배양된 유용미생물을 병원균과 3 cm 떨어진 가장자리에 획선 배양하였다. 접종한 배지는 25° C 배양기에서 배양하였으며, 5일 뒤 균사성장 억제영역을 측정하여 결과를 도출하였다. 5종의 유용미생물 모두 사과 탄저병과 겹무늬썩음병원균의 균사 성장을 억제시키는 것으로 확인되었다. *C. gloeosporioides* 균사 성장 억제에 APEC123 균주가 가장 높은 값을 보였고, *B. dothidea* 균은 APEC267 16.3 mm로 가장 효과가 좋았다.

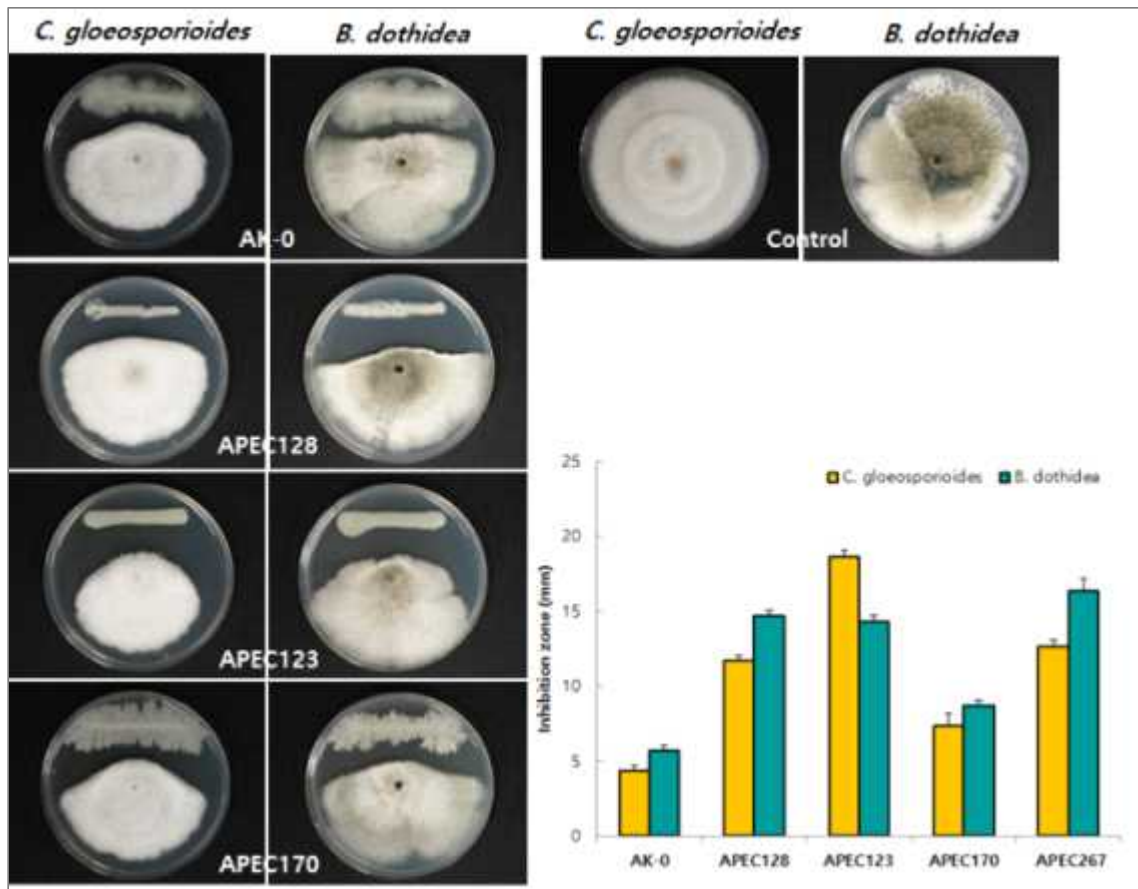


그림 10. 유용미생물 5종에 대한 사과탄저병, 겹무늬썩음병 균사성장 억제효과 검증

○ 사과 병원균 포자 발아 억제 검증

선발 유용미생물의 병원균 항균활성 작용기작 중 포자 발아억제능을 확인하기 위하여(예방 살균제 능력) 사과탄저병원균 *C. gloeosporioides* 포자를 이용하여 연구를 진행하였다. 포자현탁액(104 spores/ml) 20 ul를 슬라이드글라스에 떨어뜨린 후 유용미생물 현탁액(106 cfu/ml) 10ul를 접종하여 페트리디쉬에 넣

은 후 마르지 않게 습실 처리하였다. 처리한 현탁액은 25° C 배양기에 배양하면서 시간 별로 포자발아 수를 관찰하였다.

유용미생물 대신 멸균수를 처리한 대조구에서는 *C. gloeosporioides* 포자가 8 시간동안 배양했을 시 발아를 시작하였지만 5종의 유용미생물을 처리한 처리구에서는 포자가 발아하지 않았다. APEC170 균주는 32시간 배양시 3% 포자 발아가 관찰되었나 48시간 동안 배양 중 최종적으로 발아한 포자는 7.1%임으로, 92.5% 포자발아를 보인 대조구와 비교했을 시 현저히 발아율이 떨어지는 것을 알 수 있었다. 대조구에서는 *C. gloeosporioides* 포자 발아는 8시간부터 관찰되었으며, 24시간 이후에는 90% 이상 발아가 되었다. 배양 32시간 후부터 부착기형성을 관찰하였으며, APEC128, APEC170, APEC267 처리구의 포자에서 발아를 시작했지만 48시간까지 관찰한 결과 부착기형성은 관찰할 수 없었다. 이는 포자발아율도 현저히 낮았지만 발아 후 부착기 형성을 하지 않았음으로 병발생 유효 포자가 될 수 없다고 판단되며, 사과탄저병이 발생하지 않을 것으로 판단된다. 5종의 유용미생물은 사과탄저병원균 *C. gloeosporioides* 포자 발아를 억제 길항능력을 가지고 있다고 생각된다.

표 5. 유용미생물의 사과 탄저병원균 포자발아 억제 효과(48시간 배양)

유용미생물	총 포자수 (개)	발아포자 수 (개)	발아율 (%)	발아억제율 (%)
AK-0	150	0	0	100
APEC123	168	0	0	100
APEC128	156	5	3.2	96.8
APEC170	156	11	7.1	92.9
APEC267	142	5	3.5	96.5
대조구	122	113	92.6	-

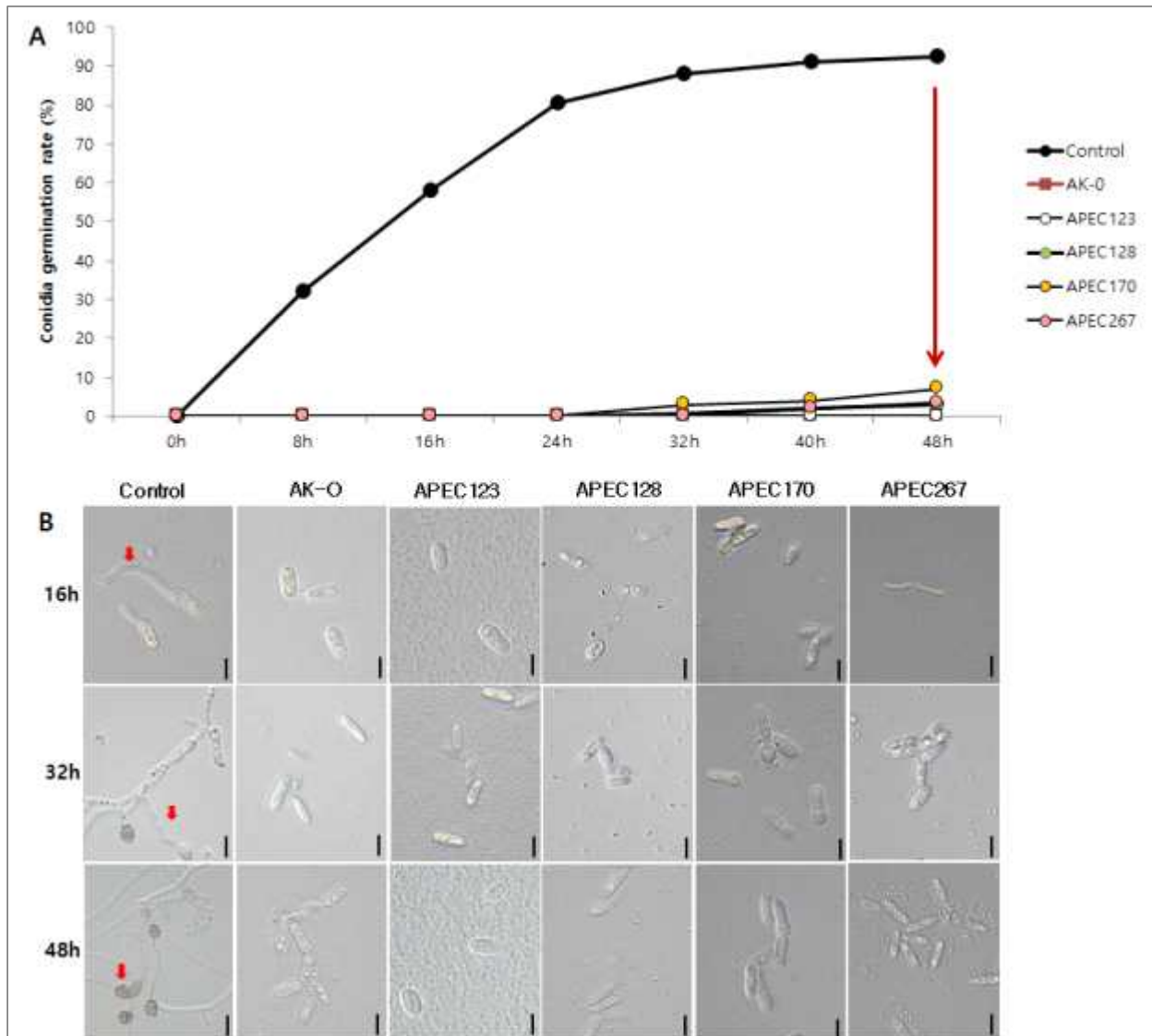


그림 11. 유용미생물 5종 처리 시 *C. gloeosporioides* 포자 발아 억제 효과 확인. (bar = 10 μ m)

□ I-Petri-Dish system을 이용한 휘발성 물질(VOCs)에 의한 병원균 억제효과 검증

유용미생물의 사과 병방제의 작용기작 중 휘발성 물질을냄으로써 병원균의 균사생장 억제 여부를 관찰하기 위하여 I-Petri-Dish system을 적용한 연구를 시행하였다. I-Petri-Dish는 중앙에 플라스틱 칸막이로 나뉘어져 있어 유용미생물의 향균물질이 직접적으로 이동이 불가능하고 공기 중으로 휘발되는 물질만이 이동이 가능하도록 만들어져 있다. 두 칸으로 나뉜 플레이트에 한쪽은 PDA 배지를 10 ml 정량으로 분주하고, 다른 한쪽은 BHI 배지를 동량으로 분주하였다. PDA 배지에는 병원균 절편(6 mm)을 가운데 올려두었고, BHI 배지에는 유용미생물 현탁액(108 cfu/ml) 10 μ l 떨어뜨린 후 25 $^{\circ}$ C 배양기에서 배양, 7일 뒤 균사생장 억제도를 관찰하였다.

유용미생물을 처리하지 않은 대조구의 병원균 균사의 길이를 측정하여 비교했을 때, 휘발성 물질에 의한 균사생장 억제는 그리 크지 않았다. 그러나 APEC170, AK-0 균주에서 사과탄저병원균 *C. gloeosporioides* 균의 균사생장억제를 APEC170은 1.5 cm (26.6 % 억제율), AK-0 0.5 cm (9.8% 억제율)정도 차이를 보였다.

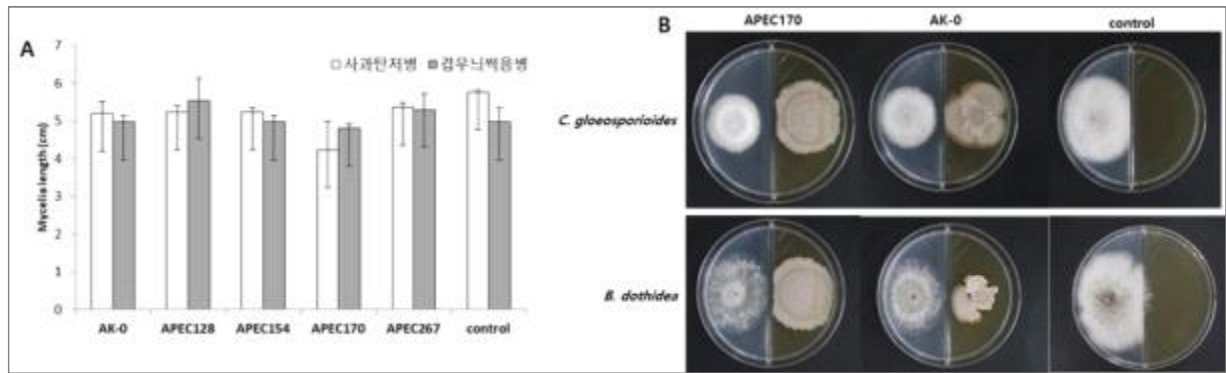


그림 12. 유용미생물의 휘발성 물질(VOCs) 생성 여부와 병원균 균사생장 억제효과 검증. APEC170, AK-0에서 생성되는 휘발성 물질에 의해 *C. gloeosporioides* 균의 균사생장이 억제되는 것을 확인되었다.

□ 유용미생물을 이용한 사과 병해 실내 시험

사과 과실병인 탄저병과 검무늬썩음병에 대한 방제효과를 기내 시험을 통해 실시하였다. 사과과실의 품종은 후지를 사용하였으며 사과 중소과를 과수원에서 구입하여 실험에 사용하였다.

사과를 흐르는 물에 먼저 1차 세척을 한 후 1% NaOCl에서 2차 세척 후 2회 멸균수로 씻어 주어 표면 소독을 하였다. 표면소독한 사과는 자연상태에서 건조시켰으며, 집중원인 사과탄저병 포자현탁액은 5일 PDA배지에서 배양한 균사에서 포자만을 채취하여 포자현탁액(10^6 spores/ml)를 제조하였고, 유용미생물의 농도는 10^8 cfu/ml 현탁액을 처리 하였다. 처리방법은 예방과 치료로 나누어 실시하였으며, 예방은 유용미생물 현탁액을 분무 후 건조시킨 뒤 30° C 배양기에서 하루 보관 후 포자현탁액을 분무 처리하였다. 치료는 포자현탁액을 분무 후 30° C 배양기에서 하루 배양 한 후 유용미생물 현탁액을 처리하였으며, 모두 습실 처리 후 30° C 배양기에서 보관 후 결과를 관찰하였다.

사과과실에서의 탄저병 발생은 병반 크기를 측정하고 무처리구의 결과 값과 비교하여 방제가를 도출하였다. 무처리구에서 발생한 탄저병의 병반 평균크기는 7 cm정도이나 유용미생물을 처리하였을 시 병반의 크기는 AK-0은 1.34 cm, APEC123 0.72 cm, APEC128 0.71 cm, APEC170 0.7 cm, APEC267 0.46 cm로 현저히 병반의 크기가 적게 나타나는 것을 확인하였다. 병반의 크기로 방제가를 구한 결과, 5종 유용미생물 모두 80 %이상의 높은 방제가를 실내검정에서 확인하였다. 이에 5종의 유용미생물 모두 사과탄저병 발생 억제로 친환경 생물제제 균으로써의 가능성을 확인하였다.

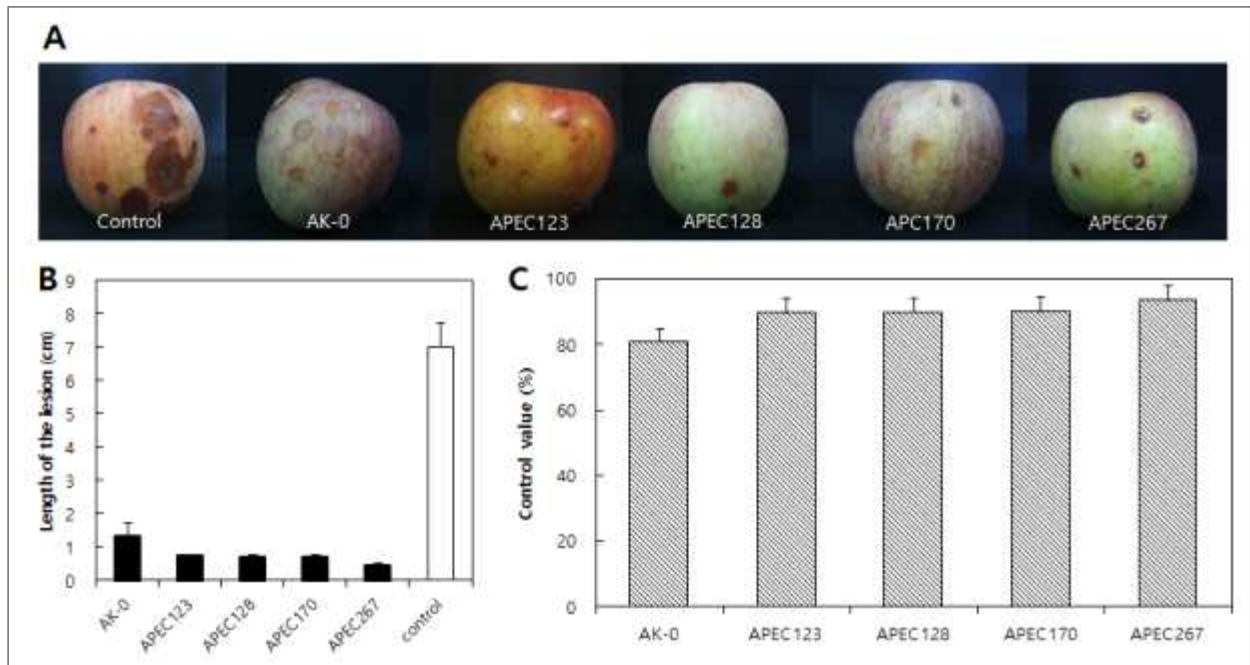


그림 13. 유용미생물을 이용한 사과탄저병 발병 억제 실내 검정

□ 살균제 Pyraclostrobin, Tebuconazole에 대한 탄저병균의 감수성 검정

사과탄저병균 *C. gloeosporioides*에 대한 살균제 감수성을 조사하기 위하여 strobilurin계 살균제에 속하는 pyraclostrobin과 triazole계의 tebuconazol 두 가지의 약제를 선택하여 위 실험을 진행하였다. 약제선택의 이유는 지난 5년간 경북 사과병해 방제력을 조사한 결과 탄저병 방제를 위해 가장 많이 쓰이는 약제이기 때문에 두 가지의 약제를 선택하여 실험하였다.

Pyraclostrobin과 tebuconazole에 대한 *C. gloeosporioides*의 감수성 조사를 하기 위해 한천희석법을 통한 균사생장 억제율을 조사하였다. 살균제는 멸균증류수에 녹여 사용하였고, 살균제의 농도는 고시된 사용량의 반량, 정량(1,000배), 배량으로 조정하였다. PDA 배지 상에서 5일간 배양한 병원균의 균사 선단에서 직경 6 mm의 조각을 떼어 각 살균제가 농도별로 첨가된 PDA 배지에 접종하였다. 병원균을 접종한 배지는 25°C 암조건 배양기에서 5~7일간 배양한 후, 살균제를 첨가하지 않은 배지에서 균총의 직경이 80~85 mm가 되었을 때 조사하였다. 실험한 살균제의 균사생장 억제율(%)은 아래 식에 의해서 계산하였다.

$$\text{균사생장 억제율(\%)} = \frac{\text{살균제 무첨가 배지의 균총의 직경} - \text{살균제 첨가 배지의 균총의 직경}}{\text{살균제 무첨가 배지의 균총의 직경}} \times 100$$

Pyraclostrobin과 tebuconazole에 대한 *C. gloeosporioides*의 반응 조사 결과, pyraclostrobin에 대한 EC₅₀값이 정량인 중도저항성 균주가 YCHH4, YCHH5, YCSH1, YCSH3, YCSH5, YCSH8, YCSH9로 영천에서 분리한 사과탄저병균주에서 나타났다. 올해 강수량이 적어 탄저병의 발생이 적었는데 영천의 과원은 올해 탄저병의 발생이 있었던 과원이다. 이는 이 두 약제가 그 과원의 탄저병 방제에 적합하지 않다고 판단된다. 다양한 농가의 탄저병균에 대한 약제 저항성 실험이 동반되어야 할 것으로 생각된다.

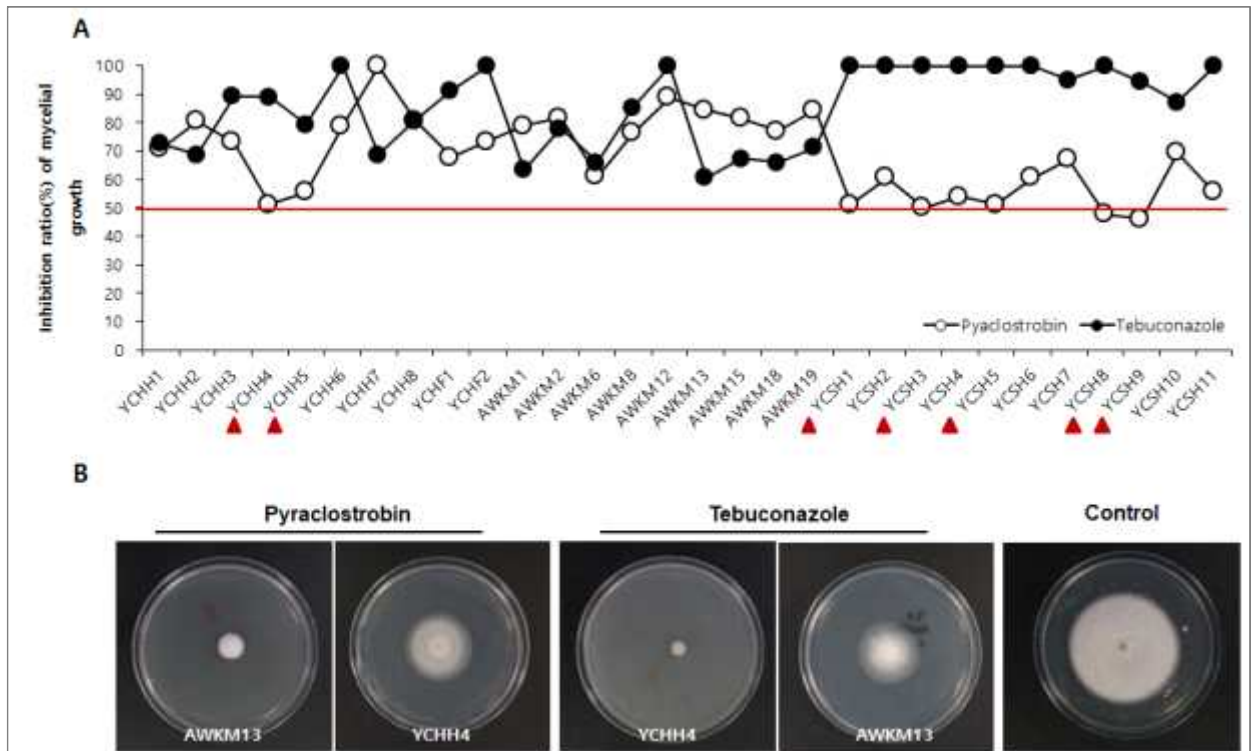


그림 14. 살균제 Pyraclostrobin, Tebuconazole에 대한 탄저병균의 감수성 검정

약제 저항성 탄저병균(YCHH4)에 대한 유용미생물의 포자발아 억제효과를 관찰하였다. 위 실험은 화학 약제에 저항성균이 한 포장내에서 계속적으로 발생되고 있는 과정에 병원균 포자발아 억제에 효과를 보인 유용미생물을 처리함으로써 약제로 방제할 수 없는 균주의 발생억제를 위해 실험을 진행하였다. 유용미생물의 세균 농도를 10^8 cfu/ml, 10^7 cfu/ml, 10^6 cfu/ml로 조정된 현탁액에 저항성탄저병균 현탁액을 1:1로 섞어 25°C에 배양하며 포자 발아 및 부착기 형성능 등을 관찰하였다. 또한 유용미생물의 배양 여액의 포자억제능도 함께 조사하였다.

그 결과 대조구 포자발아율은 24시간 배양했을 시 80%의 발아율을 보였는 반면 유용미생물 10^8 cfu/ml 농도의 현탁액을 처리한 처리구에서는 AK-0 0%, APEC123 0.5%, APEC128 8.4%, APEC179 4.6%의 포자발아율을 확인하였다. 유용미생물 처리구에서 포자가 발아를 했지만 대부분 10% 미만으로 적은 발아율을 보였으며, 발아억제율은 90% 이상으로 높은 억제율을 보였다. 24시간 관찰시 모든 처리구에서 탄저병 부착기를 확인하지 못하였다. 약제에 대한 저항성 균의 출현에 대한 방제 병행 수단으로 미생물 제제의 활용이 가능할 것으로 판단된다.

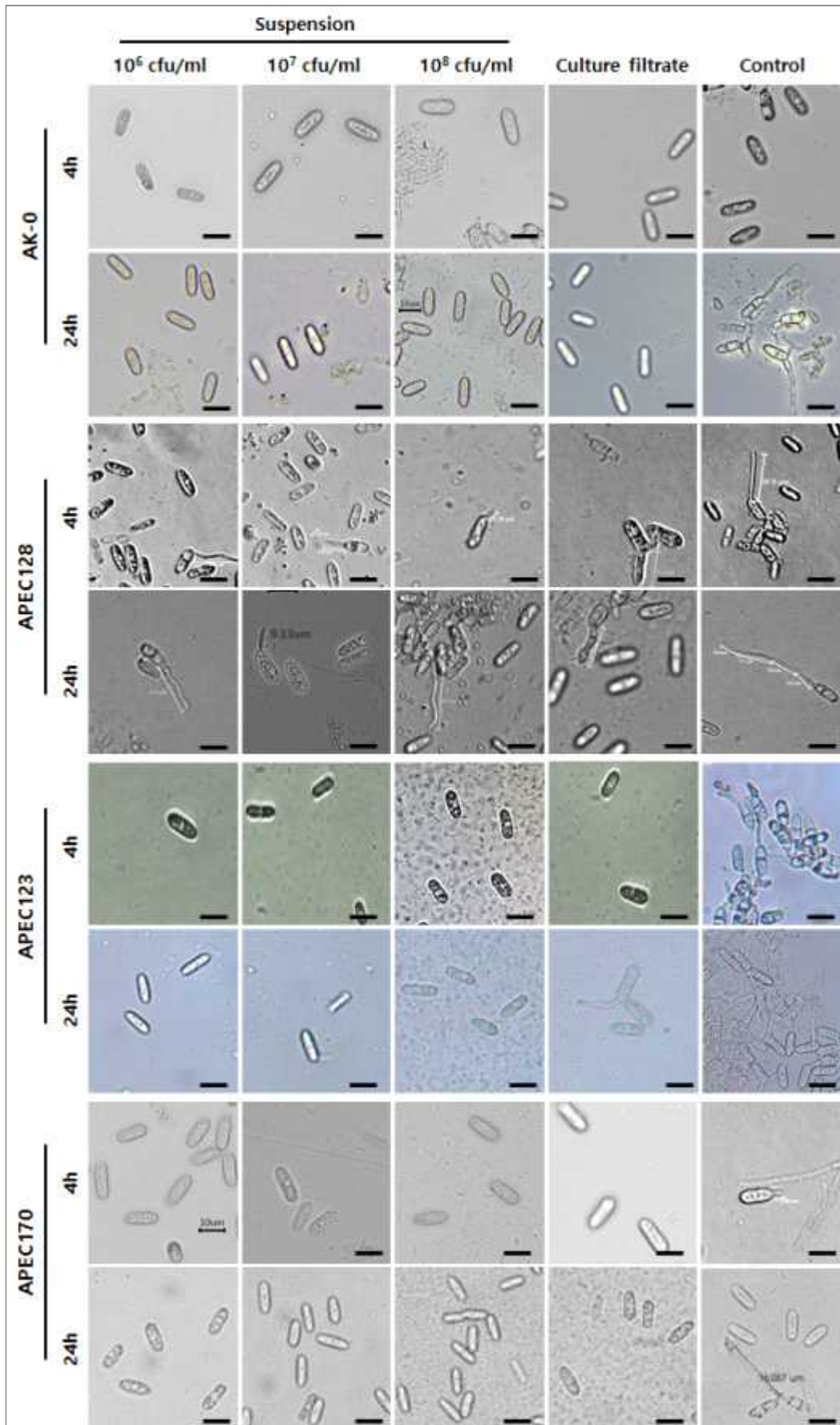


그림 15. 약제 저항성 탄저병균에 대한 유용미생물 항균활성 포자발아억제 검정. (bar = 10 μ m)

□ 유용미생물을 이용한 사과 병해 실내 시험

사과 과실병인 탄저병과 겹무늬썩음병에 대한 방제효과를 기내 시험을 통해 실시하였다. 사과과실의 품종은 후지를 사용하였으며 사과 중소과를 과수원에서 구입하여 실험에 사용하였다.

사과를 흐르는 물에 먼저 1차 세척을 한 후 1% NaOCl에서 2차 세척 후 2회 멸균수로 씻어 주어 표면 소독을 하였다. 표면소독한 사과는 자연상태에서 건조시켰으며, 접종원인 사과탄저병 포자현탁액은 5일 PDA배지에서 배양한 균사에서 포자만을 채취하여 포자현탁액(10^6 spores/ml)를 제조하였고, 유용미생물의 농도는 10^8 cfu/ml 현탁액을 처리 하였다. 처리방법은 예방과 치료로 나누어 실시하였으며, 예방은 유용미생물 현탁액을 분무 후 건조시킨 뒤 30°C 배양기에서 하루 보관 후 포자현탁액을 분무 처리하였다. 치료는 포자현탁액을 분무 후 30°C 배양기에서 하루 배양 한 후 유용미생물 현탁액을 처리하였으며, 모두 습실 처리 후 30°C 배양기에서 보관 후 결과를 관찰하였다.

사과과실에서의 탄저병 발생은 병반 크기를 측정하고 무처리구의 결과 값과 비교하여 방제가를 도출하였다. 무처리구에서 발생한 탄저병의 병반 평균크기는 7 cm정도이나 유용미생물을 처리하였을 시 병반의 크기는 AK-0은 1.34 cm, APEC123 0.72 cm, APEC128 0.71 cm, APEC170 0.7 cm, APEC267 0.46 cm로 현저히 병반의 크기가 적게 나타나는 것을 확인하였다. 병반의 크기로 방제가를 구한 결과, 5종 유용미생물 모두 80 %이상의 높은 방제가를 실내검정에서 확인하였다. 이에 5종의 유용미생물 모두 사과탄저병 발생 억제로 친환경 생물제제 균으로써의 가능성을 확인하였다.

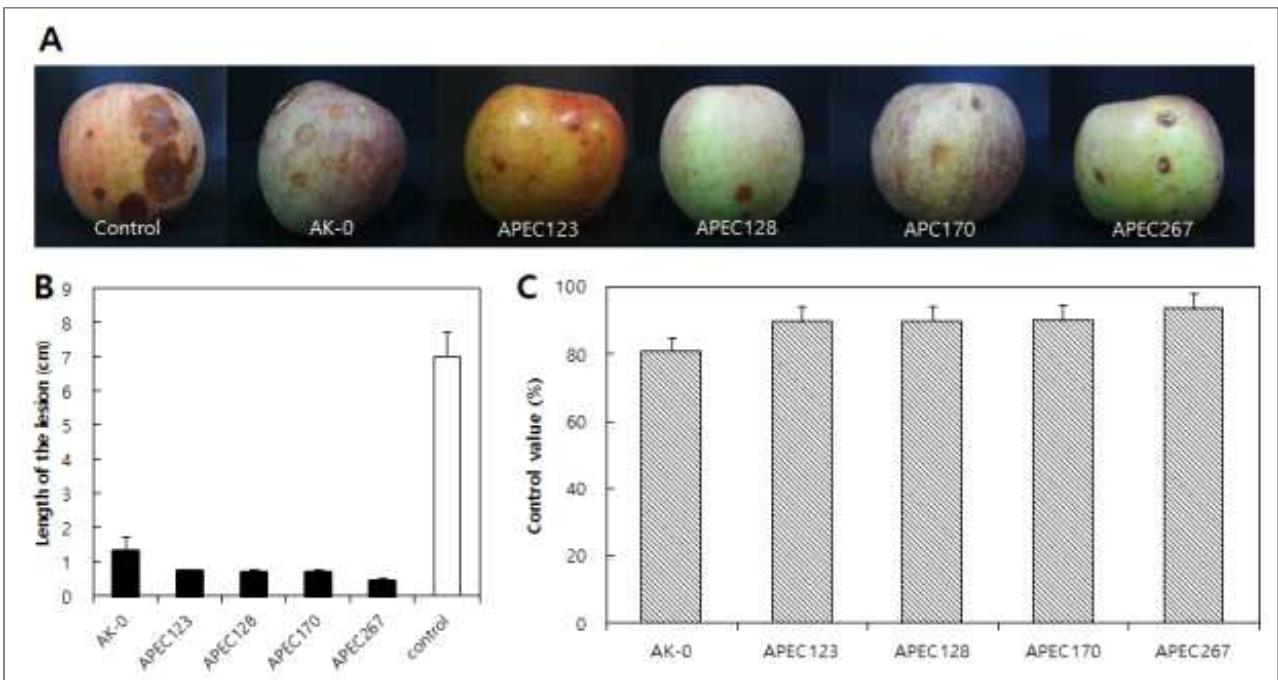


그림 16. 유용미생물을 이용한 사과탄저병 발병 억제 실내 검정

□ 선발균주 및 시제품을 이용한 탄저병 방제효과 검정

1차년도에서 선발 유용미생물에 적합한 제형과 보조제 선발을 통해 시제품을 고려바이오에서 제작하였다. 제작한 시제품을 이용하여 1차 실험으로 기내에서 사과 탄저병 발생 억제 검정을 사과 과실에서 실시하였다. 유용미생물의 예방효과와 치료효과 검정을 위해 부사 품종의 사과를 구입하여 표면 소독 후 100배 희석한 시제품과 사과탄저병원균(*C. gloeosporioides*) 포자현탁액(10^5 spores/ml)를 접종하여 습실처리 후 30°C 배양기에서 6일 배양 후 3일 동안 실온에 두어 병 발생을 관찰하였다. 그 결과 선발 유

용미생물 4종 모두 치료효과 보다는 예방효과에 탄저병 방제효과를 60% 이상 보였으며, 그 중 *B. velezensis* AK-0은 80%, *S. plymuthica* APEC123은 96%의 기내 실험에서 사과탄저병 발생 방제에 높은 효과를 나타내었다. 이에 유용미생물 4종 모두 예방효과를 보임으로써 실제 포장 방제 시험에서도 병 방제 예방을 목적으로 실험을 진행하였다.

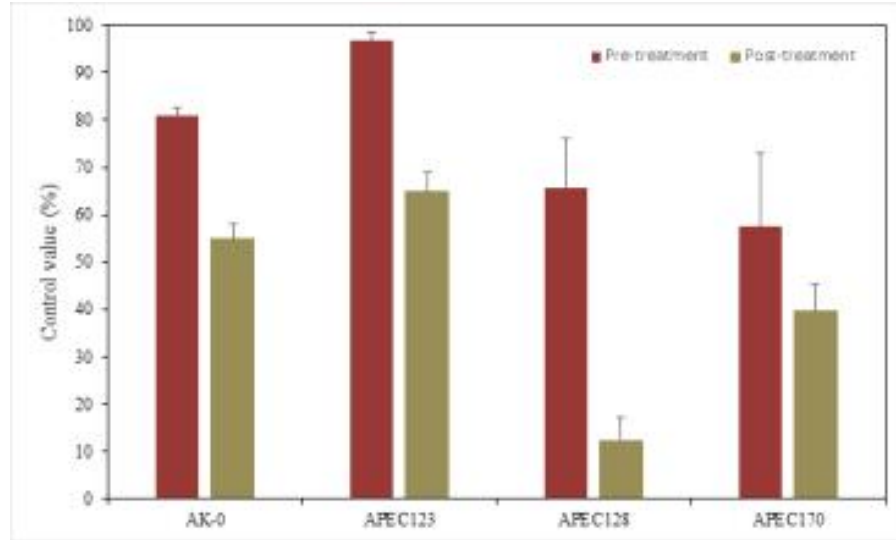


그림 17. 선발 유용미생물 시제품을 이용한 사과탄저병 방제효과 실내 검정

시제품 희석배수를 결정하기 위해 실내 기내 검정을 실시하였다. 각 시제품의 100배, 250배, 500배 로 희석하여 위와 동일한 예방제 검정 방법으로 검정하였으며, 그 결과 모든 선발균주 시제품에서 100배 희석액에서 80% 이상의 방제효과를 나타냈으며, 그 중 APEC123 균주는 250배 희석에서 92%의 우수한 방제효과를 보였다. 위 결과를 바탕으로 실제 과원에서의 방제 실험 시 예방제로써, 100배 희석액으로 처리하였다.

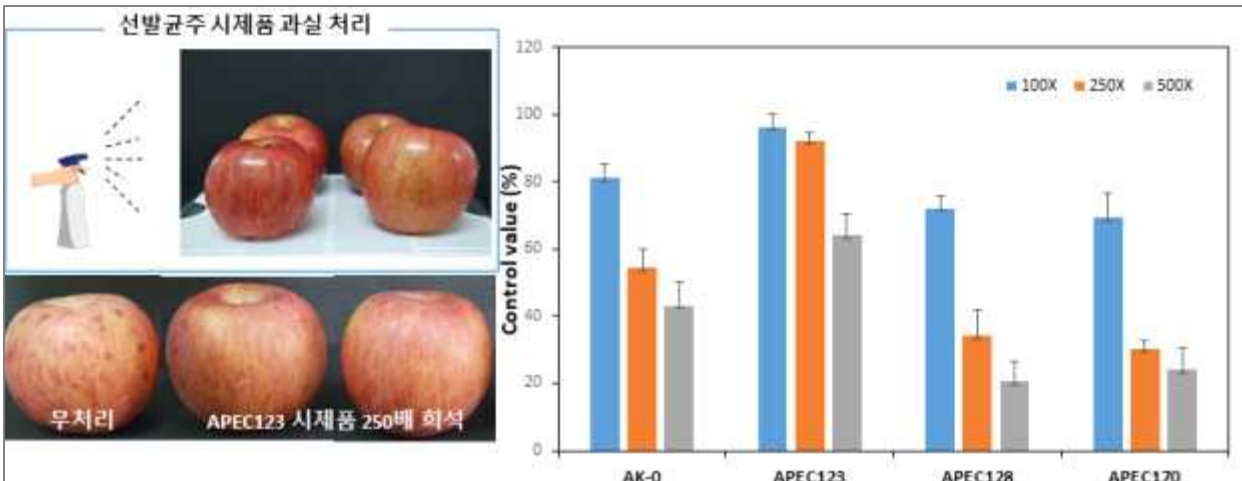


그림 18. 시제품 희석배수 별 사과탄저병 방제 결과

□ CM (Cellophane membrane)이용 병원균 예방/치료효과 검정

선발균주 *B. velezensis* AK-0 균주를 이용하여 사과탄저병 병원균 억제 작용기작을 보고자 셀로판지를 이용하여 검정하였다. 선발균주 배양액과 사과탄저병 병원균 포자현탁액을 PDA 배지 위에 올려놓은 셀로판지 위에 떨어뜨려 포자 발아 및 2차균사 생장 여부를 조사하였다. 선발균주를 처리하지 않은 대조

구에서는 포자발아가 8시간 이후 시작하였으며 72시간에는 94% 이상 포자가 발아하였다. AK-0 균주를 처리한 처리구에서는 최초 발아는 24시간 이후 시작하였으며, 발아율은 14%으로 현저히 낮은 발아율을 보였고, 포자가 발아를 하였더라도 균사생장만 할 뿐 부착기를 형성하지 않았다.

아래그림의 (좌)는 무처리구이며 부착기 형성 후 셀로판지를 침입하여 침입균사를 형성한 것을 확인 하였으며 이는 사과 과실을 침입하여 세포에 영향을 주는 것이 침입균사며, AK-0 처리구에서는 사과 과실 표면에서부터 침입을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

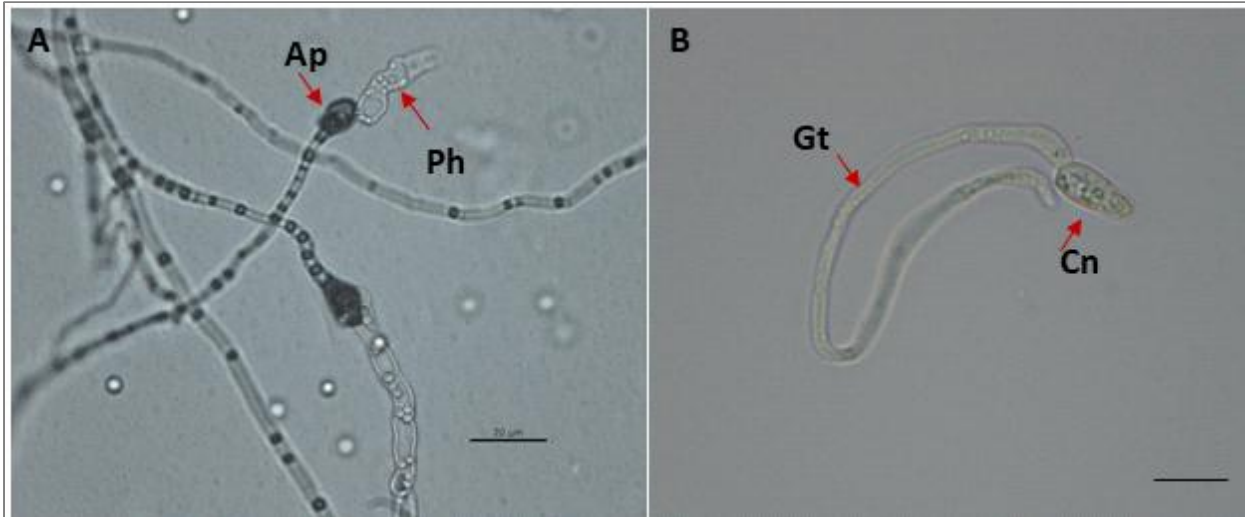


그림 19. CM을 이용한 병원균 예방 효과 검정.

(Cn: conidia, Gt: germ tube, Ap: appressorium, Ph: penetration hyphae(infection hyphae))

□ 사과 표면 미세구조 관찰

선발 유용미생물 시제품을 사과 과실표면에 살포 한 후, 과실 표면에서 유용미생물의 항균활성 기작을 규명하고자 과실표면을 주사전자현미경(SEM)을 이용하여 관찰하였다. 1차 항균활성 효과에서 예방효과가 우수하였으므로 사과 표면에 시제품 100배 희석액을 분무 접종하고 12시간 뒤 사과탄저병원균(*C. gloeosporioides*) 포자현탁액을 분무 접종하였다. 습식처리 후 30℃ 배양기에서 방제 효과를 관찰하였으며 24, 48 시간에 과실 표면을 sampling 하여 실온에서 자연 건조 후 광학현미경과 SEM을 이용하여 관찰하였다.

표면 관찰 결과 무처리구에서는 접종 후 24시간 sample에서 포자 발아가 진행된 것을 관찰하였고 48 시간에는 과실 표면에 포자 부착기 형성 후 병 발생이 시작되는 것을 관찰하였다. 시제품 AK-0을 처리한 과실에서는 48시간일 때, 포자 발아가 진행되지만 부착기 형성이 되지 않았고 과실 표면에서도 병징이 관찰 되지 않은 것을 확인하였다. 이에 선발 균주 AK-0을 비롯한 균주들의 병원균 억제 작용기작은 포자 발아를 억제함은 물론이고 부착기 형성에도 영향을 주는 것을 과실 표면에서 확인하였다.

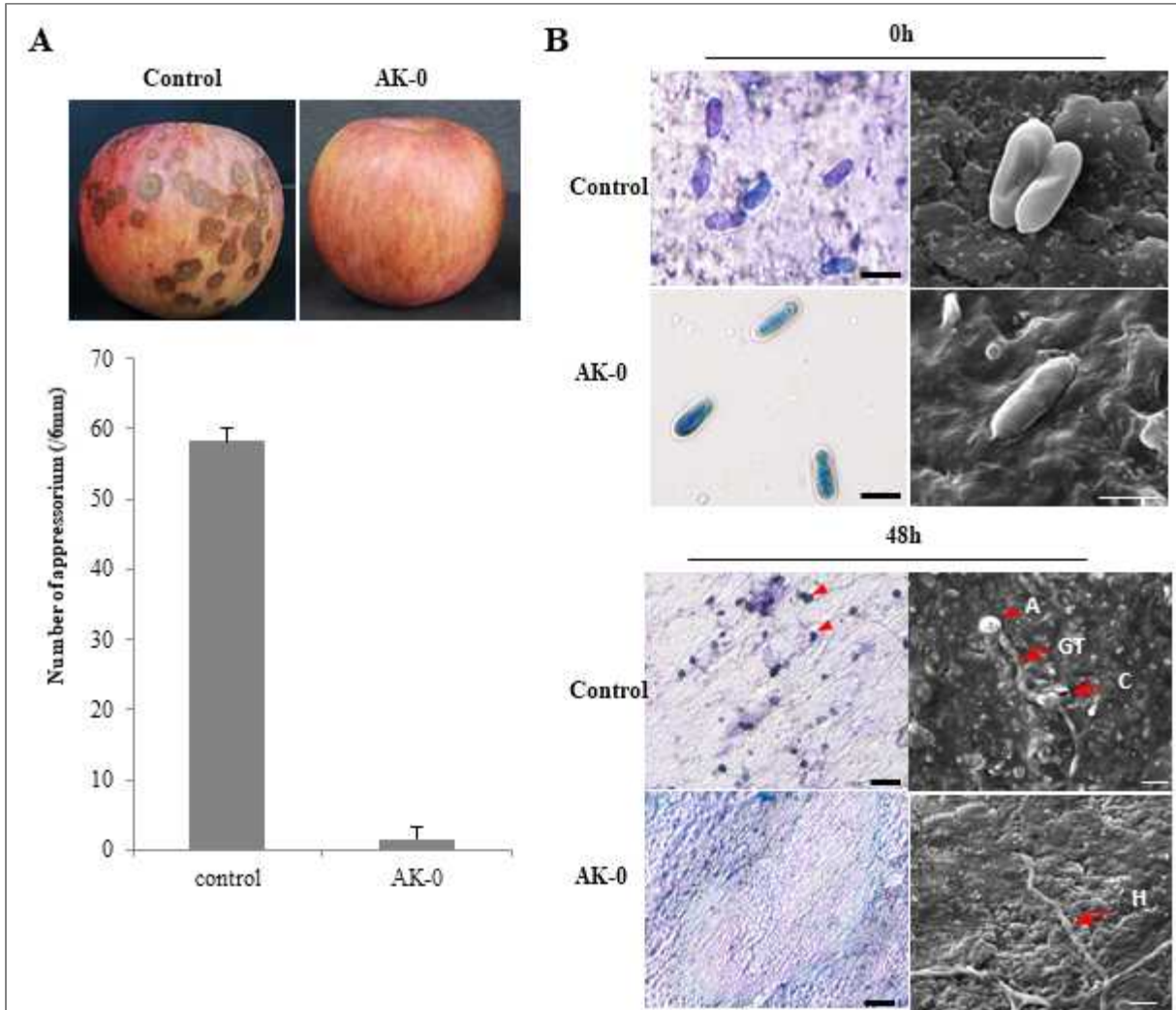


그림 20. 시제품 AK-0을 과실에 처리 시 사과탄저병원균 억제 효과 관찰

2. 고추 병 방제 및 생육촉진 효과

□ 고추육묘용 포트를 이용한 초기생육 효과검증

GYUN-8, AK-0 2개의 길항세균을 이용하여 고추생육촉진 효과를 알아보기 위해 고추 육묘용 포트를 이용하여 실험을 실시하였다. 실험은 안동대학교 임상식물병리실 항온실에서 진행하였다. 실험기간은 2020년 9월 15일 부터 10월 26일(총 42일) 진행하였다. 포트상에서의 초장을 측정하였다. 고추 생육 초장길이 측정은 직파 후 42일까지 관찰하였다. 모든 처리구는 고추육묘용 포트에 2반복으로 실시하였다. 고추육묘용포트(27.5 cm × 27.5 cm × 3.5 cm)에 상토를 채운 뒤 고추종자(녹광, 홍농종묘)를 1립씩 파종하였다. 길항세균의 처리는 파종일로 부터 7일 간격으로 GYUN-8, AK-0를 TSA 평면배지에 28℃ 항온기에 3일간 배양하여 10⁵ 부터 10⁷ 까지 현탁하여 분주하였다. 1개 포트당 500ml 씩 관주 처리하였고, Control은 수돗물로 처리하였다. 생육촉진의 측정은 고추 육묘의 지상부에서 최상단까지 측정하였다.



그림 21. 고추육묘용 포트에서의 생육촉진효과

GYUN-8, AK-0을 이용하여 고추육묘에 생육촉진효과를 관찰하였다. GYUN-8, AK-0 두 길항세균에서 PGPR 기능을 보였다. GYUN-8 처리구에서 초장길이는 16.2cm로 가장 높았으며, AK-0 처리구의 길이는 13.8cm 였다. 무처리구에서는 13.3cm 길이로 성장하였다. 이러한 결과를 토대로 GYUN-8, AK-0 길항세균은 고추 생육촉진 효과가 있다.

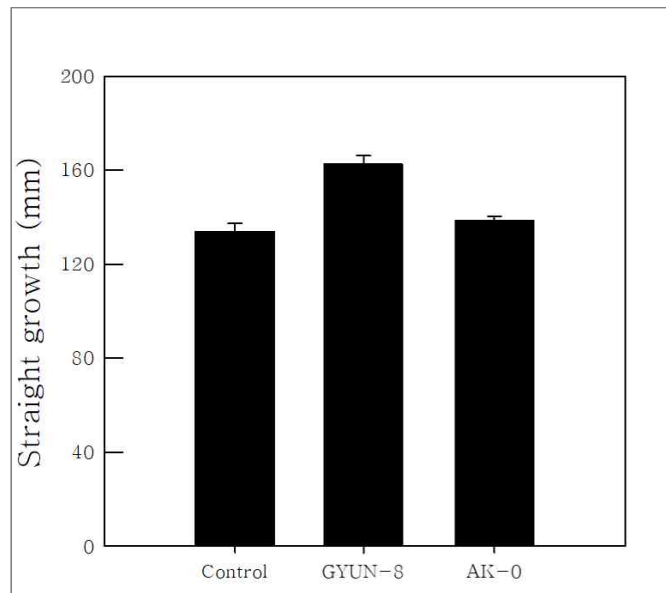


그림 22. 고추육묘용 포트에서의 생육촉진 차이

□ Double Later Paper를 이용한 초기생육 뿌리 길이 성장 효과

GYUN-8, AK-0 를 이용하여 고추의 초기 뿌리 길이 생육촉진 효과를 관찰하였다. 실험에 사용하는 고추 종자(녹광, 흥농종묘)의 코팅을 제거하였다. 50ml Falcon tube에 1% 차아염소산나트륨을 고추 종자와 같이 넣어 2~3회 흔들어 코팅을 완전히 제거하였다. 멸균수를 이용하여 1% 차아염소산나트륨을 완전히 세척 후 상온에 건조 시켜주었다. TSA 평면배지에 28°C 항온기에 3일간 배양 후 10^6 cfu/ml 농도로 GYUN-8, AK-0 현탁액을 제조하였다. 제조된 현탁액에 고추 종자를 30분간 충분히 침지시킨 고추 종자는 20 mm 간격으로 배치 하여 25°C 항온기에 6일간 배양하였다. 길이 측정은 뿌리의 시작지점에서 끝지점까지의 길이를 측정하였다. 결과 GYUN-8, AK-0균주를 펠렛팅한 고추 종자의 발아 및 생육효과가 있었다.

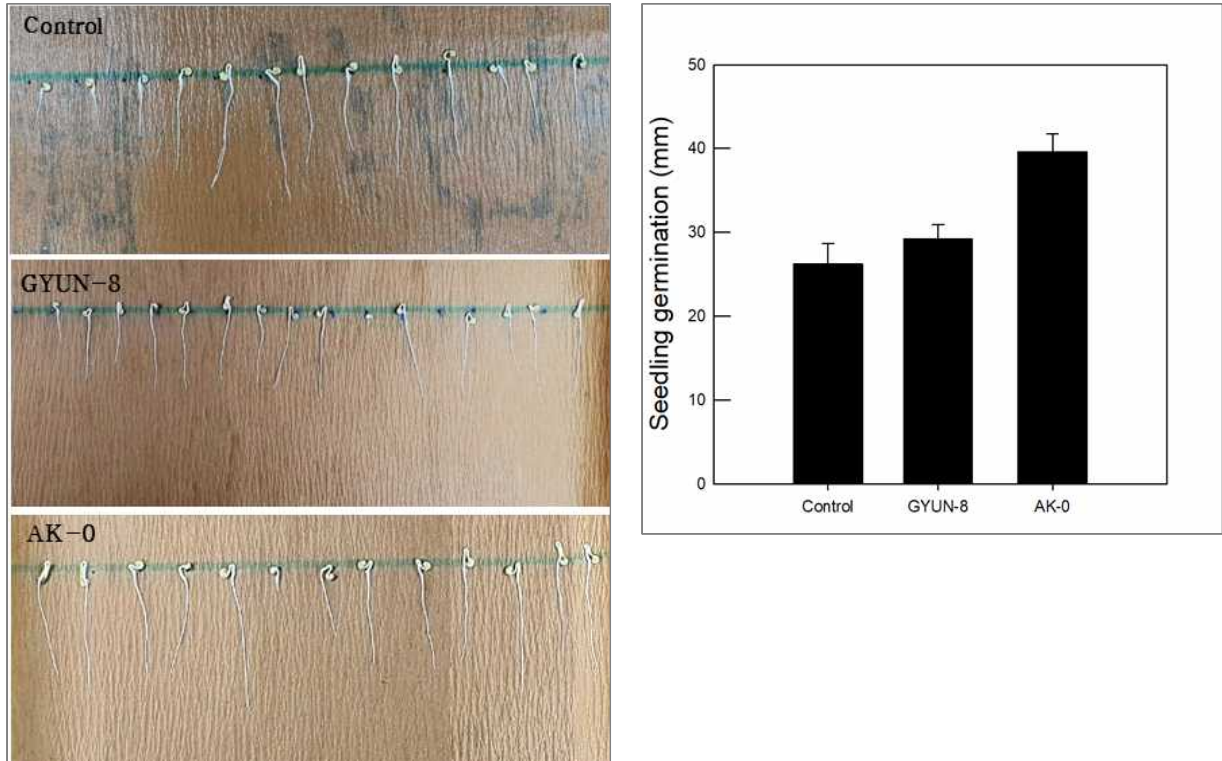


그림 23. 종자에 길항세균 펠렛팅하여 뿌리길이 생육촉진효과 검정

□ 고추탄저병 방제효과 검정

○ 길항세균(AK-0, GYUN-8)을 이용한 고추과실의 탄저병 예방 및 치료 방제효과

고추 과실에 대한 길항세균의 고추탄저병 예방 및 치료효과를 검정하기 위하여 실내검정을 실시하였다. 시중에 시판 되고 있는 풋고추 과실을 70% Ethanol, 1%차아염소산나트륨을 이용하여 3분간 표면 살균을 하였다. 살균수를 이용하여 2회 세척 후 상온에서 건조 후 실험에 사용하였다. 각 처리구 별로 5 개의 고추를 사용하였다. 멸균된 200µl pipet tip을 이용하여 고추 과실 표면 6 곳에 상처를 내었다. 예방효과 검증은 길항세균을 TSA 평면배지에 28℃ 항온기에 3일간 배양 후 10⁷ cfu/ml 농도로 희석하여 분무한 후 상온에서 충분히 건조시킨 후 *Colletotrichum acutatum* 포자현탁액 10⁵ conidia/ml을 10µl를 접종 한 후 상온에서 건조 후 플라스틱 용기를 이용하여 습실처리 후 7일간 25℃ 항온기에 배양 하면서 병 발생을 비교하였다. 치료효과 검증은 *C. acutatum* 포자현탁액 10⁵ conidia/ml를 10µl 접종 한 후 상온에서 건조 후 플라스틱 용기로 습실 처리하여 25℃ 배양기에 24시간 동안 배양 후 길항세균 현탁액을 분무하여 건조 후 7일간 25℃로 배양하였다.

고추 과실에 상처를 내어 길항세균 10⁷ cfu./ml 농도의 현탁액을 분무하여 건조 후 고추 탄저병균을 접종을 한 예방약제 처리구의 GYUN-8 방제가는 42.24%이고, AK-0 처리구 방제가는 81.67%로 예방 효과가 있는 것을 확인할

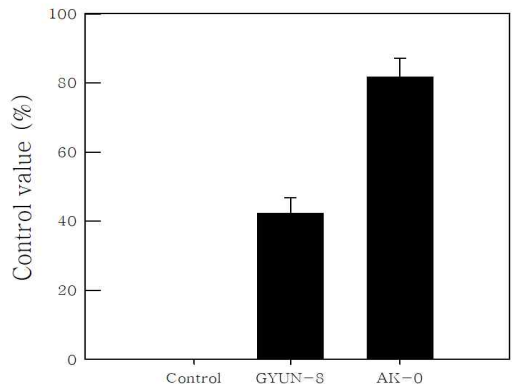


그림 24. 고추 과실에서의 예방효과에 대한 방제가

수 있다.

고추 탄저병균을 접종 후 25°C 항온기에 24시간 배양 후 길항세균을 분무를 한 치료효과 처리구의 GYUN-8 방제가는 54.17%이며 AK-0 처리구 방제가는 43.91%로 예방 및 치료약제로 가능성이 있었다. 방제가와 발병률은 다음과 같은 식을 사용하였다.

$$\text{열매에 발생하는 병 발병률 (\%)} = \frac{(0 \times 1) + (1 \times 2) + (2 \times 3) + (3 \times 4) + (4 \times 5)}{\text{조사주수} \times 4} \times 100$$

병지수: 0 : 0mm, 1: 0~5mm, 2: 6~10mm, 3: 11~15, 4: 16~20mm

$$\text{전수조사 방제가(\%)} = \left(1 - \frac{\text{처리구 발병과율(\%)}}{\text{무처리구 발병과율(\%)}} \right) \times 100$$

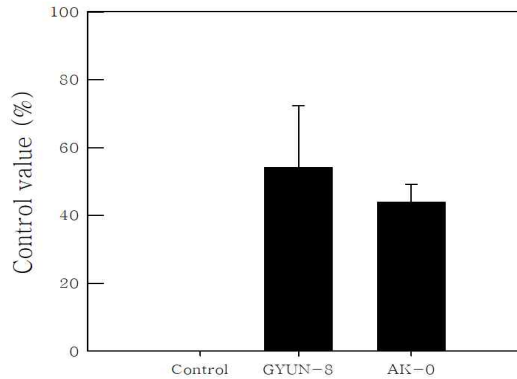


그림 25. 고추 과실에서의 치료효과에 대한 방제가

Serratia plymuthica GYUN-8 신균주에 대한 식물 병원균의 포자발아 억제활성 분석을 위해, GYUN-8 을 배양한 배양액 및 배양여액을 이용하여 고추 탄저병원균(*Colletotrichum acutatum* KACC40423)의 포자 발아 억제 활성을 분석하였다. 이를 위해, 고추 탄저병원균(*C. acutatum* KACC40423)을 PDA배지에서 5일간 배양하여 포자 현탁액을 10^5 conidia/ml 농도로 조정하고, *Serratia plymuthica* GYUN-8 균주는 BHI 액체 배지에서 3일간 배양한 배양액 및 상기 배양액을 MF-Millipore 막여과지(pore size, $0.22 \mu\text{m}$)로 여과하여 수득한 배양여액을 준비하였다. 이후, 슬라이드 글라스 위에 포자현탁액 $10 \mu\text{l}$ 을 분주하고, 여기에 *Serratia plymuthica* GYUN-8 배양액 및 배양여액을 각각 $10 \mu\text{l}$ 씩 처리하였다. 습도를 유지하면서 25°C에서 배양하면서 8시간 간격으로 48시간 동안 발아(germination) 유무와 부착기(appressorium) 형성을 조사하였다. 이때 포자의 발아는 발아관(germ tube)의 길이가 포자 크기의 1/2 이상 되었을 때로 정의하였고, 대조군으로는 멸균수를 처리한 균을 사용하였다.

분석 결과, 멸균수를 처리한 대조군에서는 *C. acutatum*이 48시간까지 97%가 발아한 것으로 나타난 반면, *Serratia plymuthica* GYUN-8 배양여액을 처리한 균에서는 49.2%가 발아한 것으로 나타났으며, 배양액을 처리한 균에서는 전혀 발아가 진행되지 않은 것으로 나타났다.

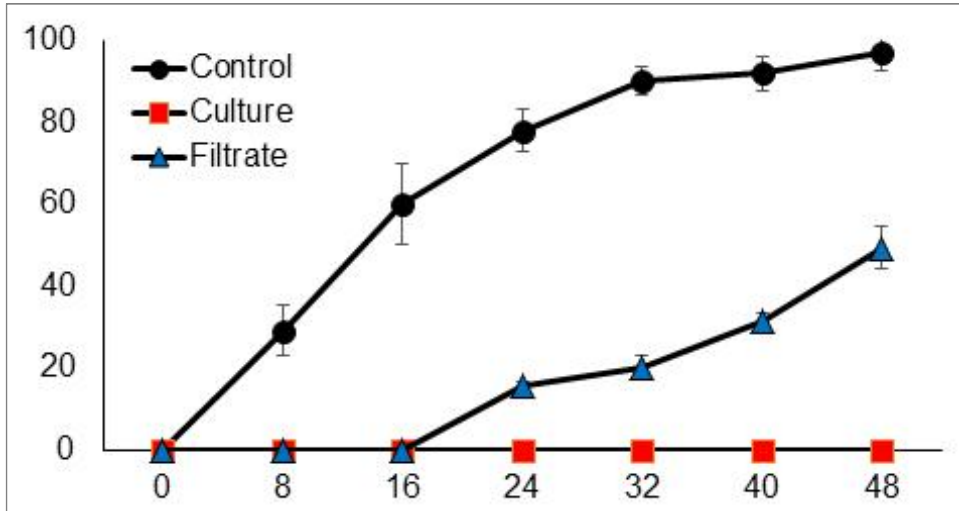


그림 26. *Serratia plymuthica* GYUN-8의 배양액(culture) 및 배양여액(filtrate)을 이용하여 고추탄저병균 *Colletotrichum acutatum* KACC40423의 포자발아를 억제한 효과

따라서 이러한 결과를 통해 *Serratia plymuthica* GYUN-8가 식물병원균에 대한 포자발아 억제 활성이 있음을 알 수 있었다.

Serratia plymuthica GYUN-8 신균주에 대한 고추과실의 탄저병 방제 효과 분석을 위하여, 고추 과실에 상처를 내어 탄저병균을 접종한 뒤, GYUN-8 균주의 배양액을 분무한 다음, 탄저병의 발생억제 정도를 조사하였다.

그 결과, *Serratia plymuthica* GYUN-8 균주의 배양액을 처리한 군은 대조군(멸균수 처리)에 비해 탄저병의 발생이 현저하게 억제되어 일부에서만 병반을 확인할 수 있었으며, 대조군 대비 GYUN-8 배양액을 처리한 군은 80.02%의 탄저병 방제 활성이 있음을 확인할 수 있었다.



그림 27. GYUN-8 배양액 처리에 따른 고추탄저병 억제효과

Serratia plymuthica GYUN-8 균주가 식물의 발아 및 생육을 촉진시키는 활성이 있는지 확인하기 위해, 고추의 초기 뿌리 길이 생육촉진 효과를 분석하였다. 이를 위해, 고추(cv. 녹광, 흥농종묘) 종자의 코팅을 1% NaOCl를 이용하여 모두 제거하였고, 코팅을 제거한 종자를 TSA 평면배지에서 28°C 온도로 3일간 배양 후, 상기 종자를 10^7 cfu/ml의 *Serratia plymuthica* GYUN-8 균주의 현탁액에 30분간 침지시켰

다. 이때 대조군으로는 현탁액 대신 멸균수에 상기 종자를 침지시킨 균을 사용하였다. 이때 상기 현탁액은 균주를 고체배지에 배양한 후 콜로니를 긁어서 멸균수에 현탁한 액을 사용하였다. 이후, 고추종자를 DLP(Double layered papers)를 이용하여 2 cm 간격으로 배치하고 지퍼 팩을 이용하여 습실처리 한 후, 25°C 배양기에 암 조건으로 6일간 배양하였다. 모든 실험은 3반복으로 진행하였다. 길이 측정은 씨앗 부분에서 뿌리 끝까지의 길이를 측정하였다.

그 결과, 대조군에 비해 *Serratia plymuthica* GYUN-8 균주의 현탁액을 처리한 군이 11.43% 뿌리의 길이가 더 성장한 것으로 나타났다(그림 15).

이러한 결과를 통해 *Serratia plymuthica* GYUN-8 신균주는 식물병원균의 방제효과 뿐만 아니라 식물의 발아 및 생육촉진 활성도 있다는 것을 알 수 있었다.

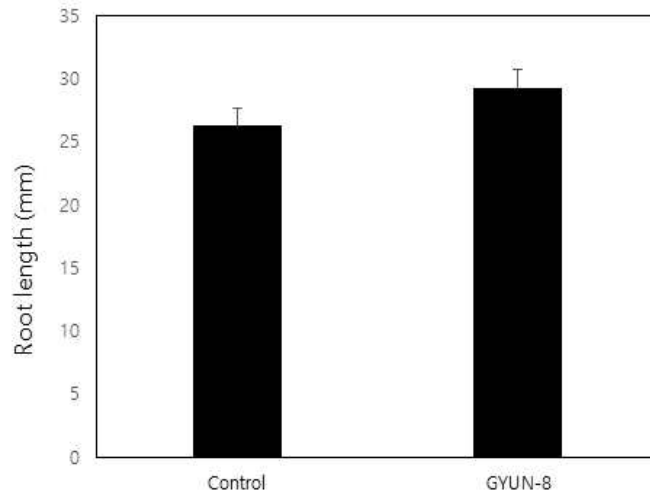


그림 28. GYUN-8 현탁액 처리 유무에 따른 고추종자 초기발아 촉진효과

Serratia plymuthica GYUN-8 균주가 고추작물에 대해서는 생육 촉진활성이 있는지 확인하기 위해, 고추 육묘용 포트를 이용하여 실험을 실시하였다. 실험은 안동대학교 임상식물병리실 항온실에서 진행하였으며, 2020년 9월 20일부터 10월 13일까지 진행하였다. 고추의 생육촉진 분석은 포트 상에서의 초장 측정으로 수행하였고, 모든 처리구는 36구 포트에서 3반복으로 실시하였다. 고추 육묘용 36구 포트 (27.5cm * 27.5cm * 3.5cm)에 상토를 채운 뒤 고추 종자(녹광)를 1립씩 파종하였다. 본 균주 처리는 파종 일로부터 7일 간격으로 TSA 평면배지에 3일간 배양하여 10×10^7 cfu/ml 농도로 1개의 포트당 500 ml 씩 관주 처리하였다. 이때 대조군으로는 본 균주 대신 수돗물을 처리한 균을 사용하였다. 생육 촉진의 길이는 고추 육묘의 지상부에서 최상단까지 측정하였다.

그 결과, GYUN-8 균주를 처리한 군은 대조군에 비해 초장의 생육길이가 31.01% 더 성장한 것으로 나타났다.

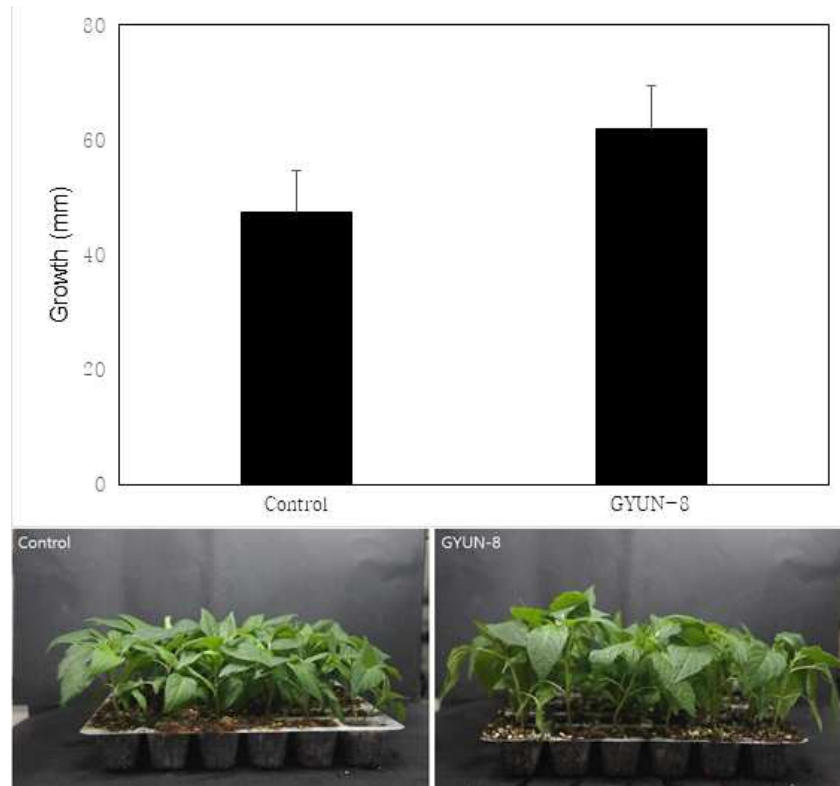


그림 29. GYUN-8 현탁액 처리 유무에 따른 고추 유묘의 생육촉진 효과

상기와 같은 실험결과들을 통해, *Serratia plymuthica* GYUN-8 균주는, 식물병원균에 대한 우수한 방제 활성 뿐만아니라 식물의 생육촉진 활성을 동시에 가지고 있어, 식물 또는 작물의 식물병 방제제 및 식물생장 촉진제로서 유용하게 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

IV. 유전체 분석

1. AK-0의 전장유전체 분석

□ Pac-bio 분석을 통한 AK-0의 유전자 분석

B. velezensis AK-0 균주를 pac-bio 분석한 결과 전체 3,969,447bp chromosome을 얻었고, 3,795 predicated protein-coding sequences (CDSs), 86 tRNA, 27 rRNA와 46.6%의 G+C content가 확인되었다. *B. velezensis* FZB42, *B. amyloliquefaciens* DSM7, *B. subtilis* 168, *B. siamensis* KCRC 13613 균주와 본 실험에 사용한 AK-0 균주의 비교 분석 시 *B. velezensis*와 비슷한 양상의 결과를 확인하여 더 정확한 균주 동정과 동시에 유전자원을 확보할 수 있었다.

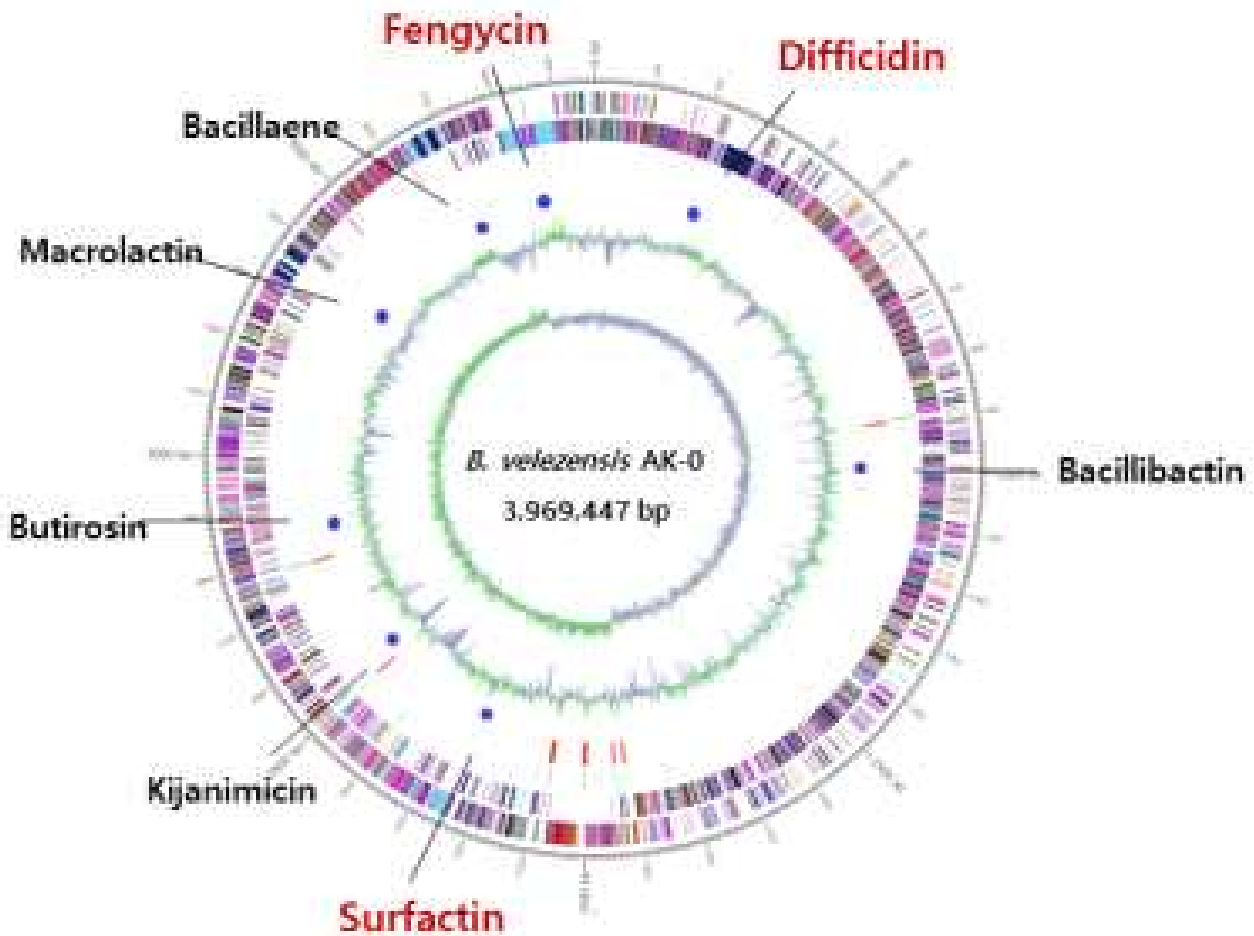


그림 30. The whole genome map of *Bacillus velezensis* AK-0

표 6. Comparison of genomic features of the *Bacillus velezensis* AK-0 with genomes of other *Bacillus* spp.

Features	<i>Bacillus</i> AK-0	<i>B. velezensis</i> FZB42T	<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM7T	<i>B. subtilis</i> 168T	<i>B. siamensis</i> KCRC 13613T
Genome size (bp)	3,969,447	3,918,591	3,908,199	4,214,630	3,784,323
G+C content (%)	46	46.49	46.10	43.51	46.30
Protein-coding sequences	3795	3693	3893	4106	3892
Percent of coding region		88.0	87	87.2	n.a
rRNA operons	27	10	10	10	n.a
tRNA genes	86	89	94	86	n.a

*n.a : not applicable.

B. velezensis AK-0 모든 단백질 서열은 COG 데이터베이스의 것들과 비교하여 상동성이 높은 아미노산 서열을 검색하였다. 단백질 COG 기능의 분류 기준에 따라 기능적 군집분석을 실시하였고, 그 결과 general function prediction (360 genes)로 가장 많았으며, amino acid transport and metabolism (339 genes)으로 분석되었다. secondary metabolite biosynthesis에 관여하는 유전자는 모두 117개의 단백질로 다량의 이차대사산물이며 다량의 antibiotic 물질 합성에 관여하는 것으로 분석되었다. 위 4가지 균주 (FZB42, DSM7, 168, KCRC 13613) 사이에서 COG 범주를 비교한 결과가 아래와 같다.

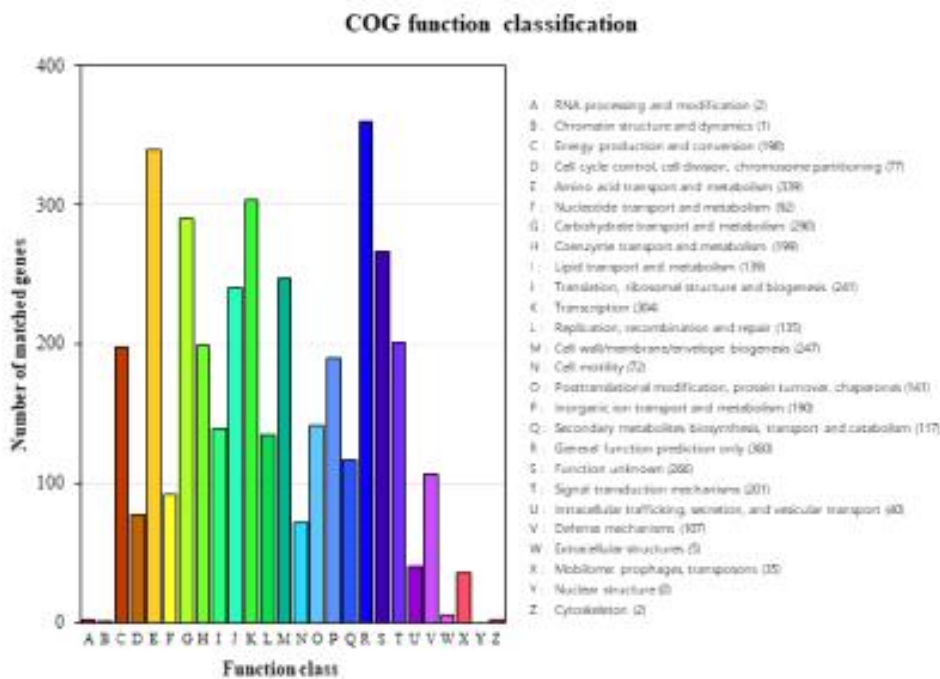


그림 31. The COG function annotation of *B. velezensis* AK-0

*B. velezensis*와 유사한 *B. amyloliquefaciens* DSM7을 type strain 균주로 설정하여 단백질 비교 결과 두 종에 모두 포함된 단백질은 3,430개로 365개의 단백질의 차이를 보였다. 유사종과의 정확한 비교 동정으로 AK-0 균주는 *B. velezensis*로 동정하였으며, *B. velezensis* 균주 중 type strain 균주인 FZB42 균주와 비교유전체 분석을 수행하였다. 총 3,519개의 단백질이 공통적으로 보유하고 있었으며, 같은 종임에도 불구하고 276개의 단백질에서 차이를 보였다. 그 중 AK-0의 mobilome: prophage, transposons에 관여하는 단백질은 전체에서 0.82%를 차지하지만 FZB42와 비교했을 시 unique한 유전자는 31개로 29.25% 정도 차지하는 단백질에서 가장 큰 차이를 보였다.

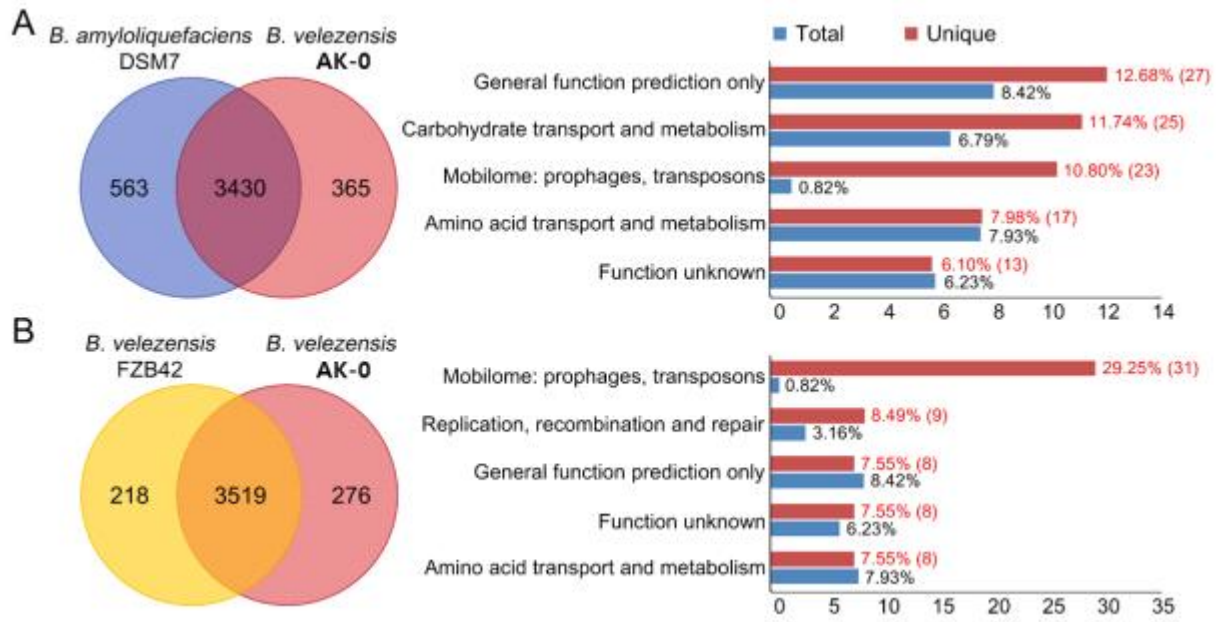


그림 32. *B. velezensis* AK-0 균주의 antifungal에 관여하는 유전자 발현 확인

□ *B. velezensis* AK-0 secondary metabolism 분석

B. velezensis AK-0의 전체 유전자 중 metabolism에 관여하는 것은 34%이며, 그 중 antibiotic의 secondary metabolites 유전자의 비중을 표로 표시하였다. AK-0 균주의 metabolites pathway를 초록색으로 표시하여 나타내었다.

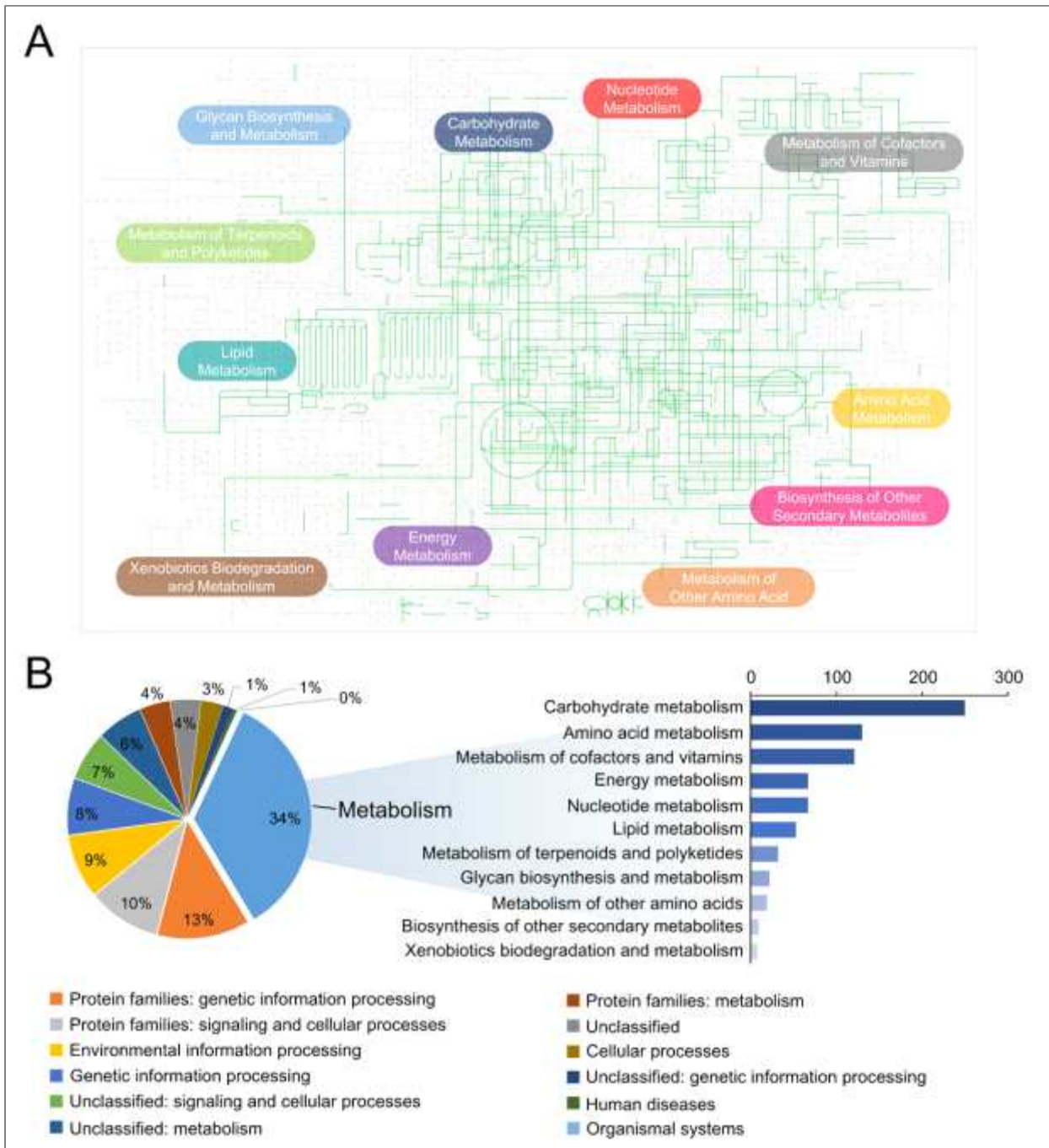


그림 33. *B. velezensis* AK-0 균주의 Metabolism 관련 유전자 분석

선발 균주 중 *B. velezensis* AK-0 전체 유전자를 antiSMASH4.0을 이용하여 분석한 결과, surfactin(srf), fengycin(fen), bacillomycin(bmy)의 antifungal activity한 유전자를 가지고 있었고, diffucidin(dif), bacillaene(bae), macrolactin의 antibacterial activity의 유전자를 확인하였다. 그 외에도 bacillibactin(dhb), butirosin, bacilysin, kijanimicin 등의 유전자도 확인되었다. 사과의 주요 병원균은 모두 진균에 의한 병으로 antifungal 기능에 포함되어진 surfactin, fengycin, bacillomycin의 유전자에 의해 발생하는 이차대사산물의 영향으로 병원균이 억제되는 것일 가능성을 유추할 수 있었다.

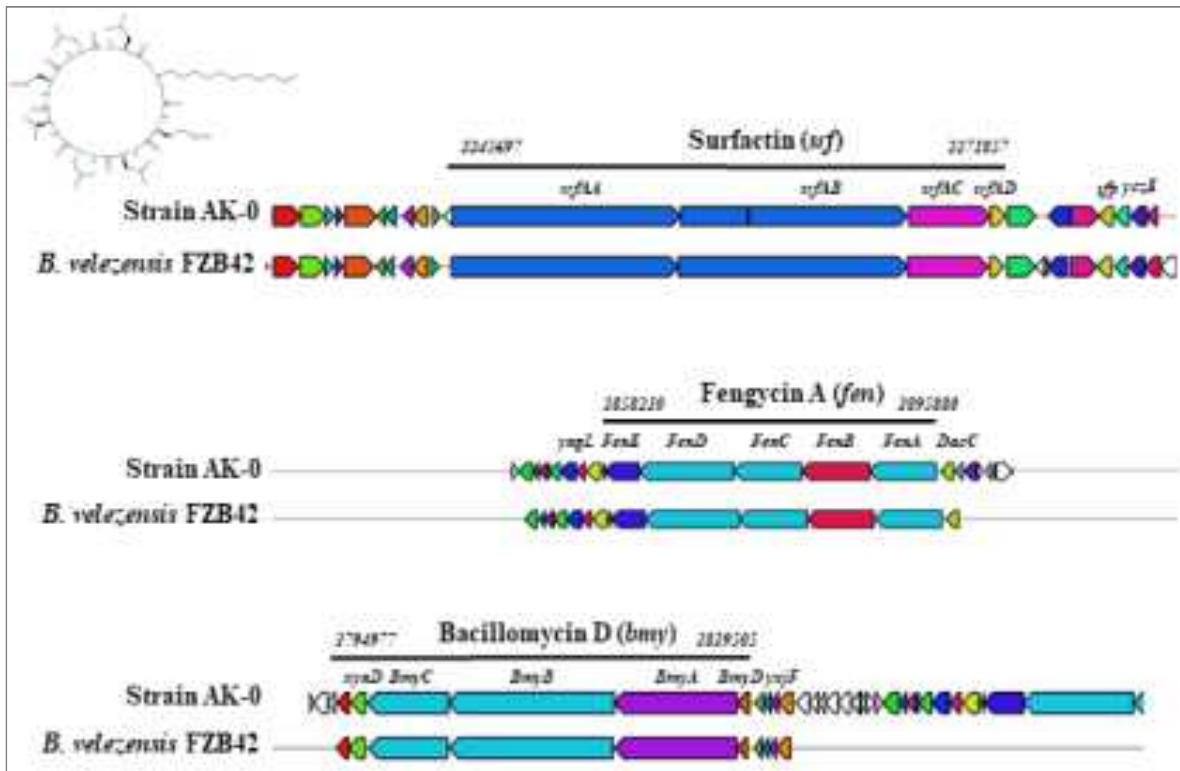


그림 34. Secondary metabolite gene clusters with antifungal metabolites in *B. velezensis* AK-0

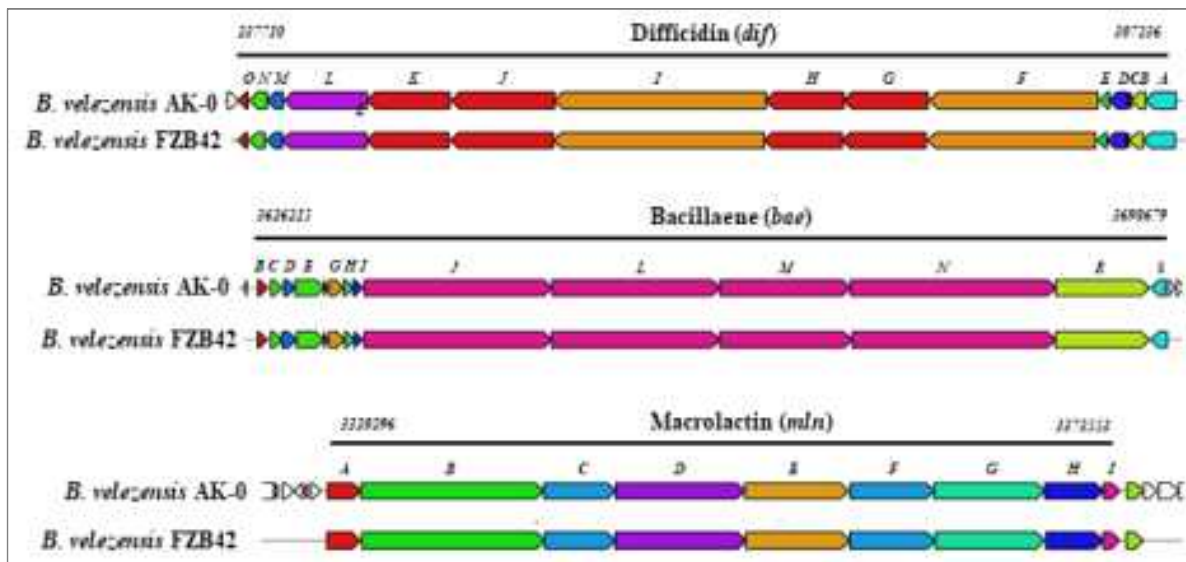


그림 35. Secondary metabolite gene clusters with antibacterial in *B. velezensis* AK-0

□ AK-0의 특성 유전자 분석

B. velezensis AK-0의 균주가 가지고 있는 이차대사산물에 의해 병원균의 생육 억제가 가능하다고 생각되어 대사산물에 관여하는 유전자의 primer을 디자인하였다. 총 7개의 유전자를 검정하기 위하여 housekeeping gene 16S를 포함한 총 9개의 primer을 디자인하여 real-time PCR를 실시하였다. *B. velezensis* AK-0의 2일과 5일 동안 배양한 균주에서 RNA를 추출하여 real-time PCR를 실시하였으며, 5

일 동안 배양한 균주에서는 7개의 유전자에서 높은 발현을 나타냈으며, 이는 배양환경이 지속적으로 계속됨에 따른 환경 변화에 유전자 발현이 높게 나타난 것으로 생각되며, 2일 배양한 균주에서 bacD, ituD, ituA의 유전자 발현이 높게 나타난 것을 확인하였다. bacillobmycin D, Iturin 유전자는 곰팡이 생육 억제에 효과적인 이차대사산물 유전자로 보고 되어져 있으며, 이에 따라, *B. velezensis* AK-0 균주의 사과 탄저병 발생 억제에 가장 큰 영향을 주는 물질로 bacillomycin D, iturin라고 판단하였다.

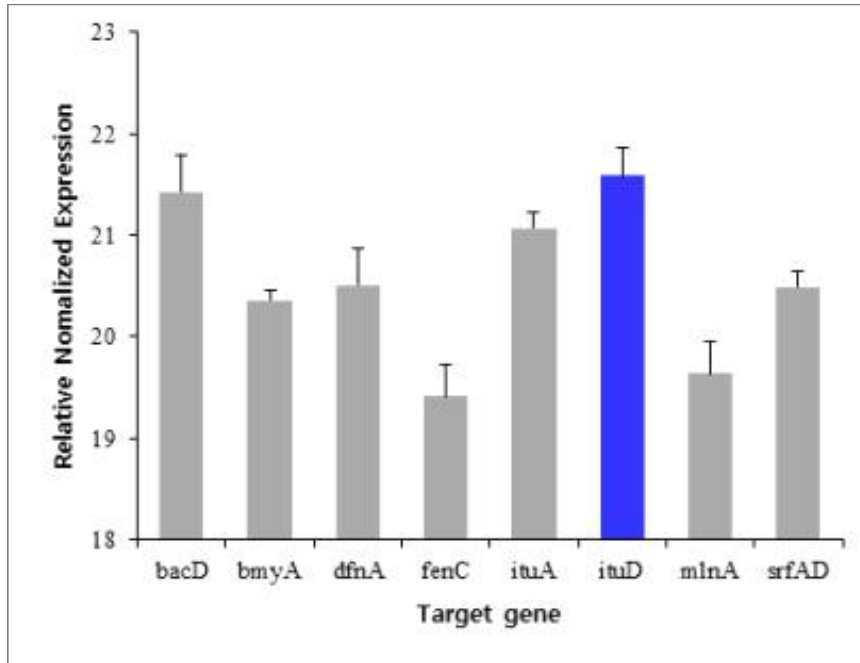


그림 36. *B. velezensis* AK-0 균주의 antifungal에 관여하는 유전자 발현 확인

2. 유용미생물 AK-0의 비교유전체 연구

총 20개의 *Bacillus* 유전체를 추가하여 비교유전체분석을 수행하였다. 해당 분석에는 AK-0, 다른 *Bacillus velezensis* 16개, *Bacillus amyloliquefaciens* 2개 및 out group으로 *Bacillus subtilis* 2개가 포함되었다.

표 7. Comparative genomic analysis of *Bacillus velezensis* AK-0 with *Bacillus* genomes

Project accession	Taxon name	Strain name	Source of isolation	Geographical Origin	Country	Year of isolation	No. of contigs	Genome size (bp)	DNA G+C content (%)	No. of CDSs	No. of rRNA genes	No. of tRNA genes	
1	42042.AK-0.1	<i>Bacillus velezensis</i>	AK0				1	3969429	46.503943	3808	27	86	
2	GCA_003073255.1	<i>Bacillus velezensis</i>	QST713	Commercial product Serenade (Bayer)	France	01-Oct-15	1	4233757	45.904217	4135	25	79	
3	GCA_001709055.1	<i>Bacillus velezensis</i>	CFSAN034339	Agricultural soil	Canada		53	4209526	45.863477	4149	12	79	
4	GCA_001593765.1	<i>Bacillus velezensis</i>	UMAF6639				1	4034636	46.341752	3840	27	83	
5	GCA_000341875.1	<i>Bacillus velezensis</i>	UCMB5036	Cotton plant	Ukraine		1	3910324	46.599438	3724	31	89	
6	GCA_000319475.1	<i>Bacillus velezensis</i>	AS43.3				1	3961368	46.58729	3808	31	89	
7	GCA_000455585.1	<i>Bacillus velezensis</i>	UCMB5113				1	3889532	46.709167	3698	31	89	
8	GCA_000583065.1	<i>Bacillus velezensis</i>	TrigoCor1448	Wheat plant	Brazil	1995	1	3957904	46.534479	3779	24	77	
9	GCA_000015785.1	<i>Bacillus velezensis</i>	FZB42	Plant-pathogen infested soil and its organic material	Berlin	Germany	1	3918589	46.475657	3736	31	89	
10	GCA_001023595.1	<i>Bacillus velezensis</i>	G341	4-year-old roots of Korean ginseng	Cheongju	South Korea	2012	1	4009746	46.493693	3861	30	95
11	GCA_000455565.1	<i>Bacillus velezensis</i>	UCMB5033	Unknown			1	4071167	46.188329	3934	30	86	
12	GCA_001687745.1	<i>Bacillus velezensis</i>	LS69	isolated from the rice field	Lichuan,field	China	2015	1	3917761	46.48257	3749	21	72
13	GCA_000685725.1	<i>Bacillus velezensis</i>	SQR9				1	4117023	46.098552	3959	21	72	
14	GCA_000284395.1	<i>Bacillus velezensis</i>	YAU B9601-Y2				1	4242774	45.85467	4142	30	91	
15	GCA_000769555.1	<i>Bacillus velezensis</i>	JS25R	Wheat	Yancheng, Jiangsu Province	China	2012	2	4014440	46.390904	3818	21	83
16	GCA_000493375.1	<i>Bacillus velezensis</i>	NAU-B3	Unknown			2	4204608	45.979411	4099	30	92	
17	GCA_000242855.2	<i>Bacillus velezensis</i>	IT-45	Unknown			2	3936866	46.607682	3796	30	95	
18	GCA_000196735.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	DSM 7 ^T	Soil	United Kingdom	United Kingdom	1987	1	3980199	46.082344	4039	30	94
19	GCA_000195515.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	TA208				1	3937511	45.825269	4000	19	70	
20	GCA_002055965.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	NCIB 3610 ^T	source unknown	unknown	unknown	1835	2	4299822	43.349934	4329	30	88
21	GCA_000009045.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	168	Unknown			1	4215606	43.514408	4220	30	86	

Comparative genomics 분석을 위해, 상기 균주들간의 계통학적 관계를 살펴봄으로써 어떤 균주들이 서로 더 가깝게 연관되어 있는 지를 확인하였다. OrthoANI는 2개의 유전체 염기서열 간의 분류학적 의미를 가지는 유사도를 측정하는 값으로, 여러 개의 유전체/균주들 간의 계통학적 유연관계를 추론하기 위한 가장 좋은 방법이다. 총 21개 유전체의 OrthoANI값을 이용하여 계층적 클러스터링(UPGMA)을 MEGA-X program을 이용하여 phylogenetic tree를 나타내었다. 그 결과, 총 21개의 *Bacillus* strains의 phylogenomic interrelation을 tree로 나타낸 결과, *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens* 및 *B. subtilis*가 뚜렷이 구분되었다. 그 중 AK-0는 *B. velezensis* clade에 속하였으며, AS43.3, TrigoCor1448 및 FZB42와 가장 가까운 근연관계를 보였다.

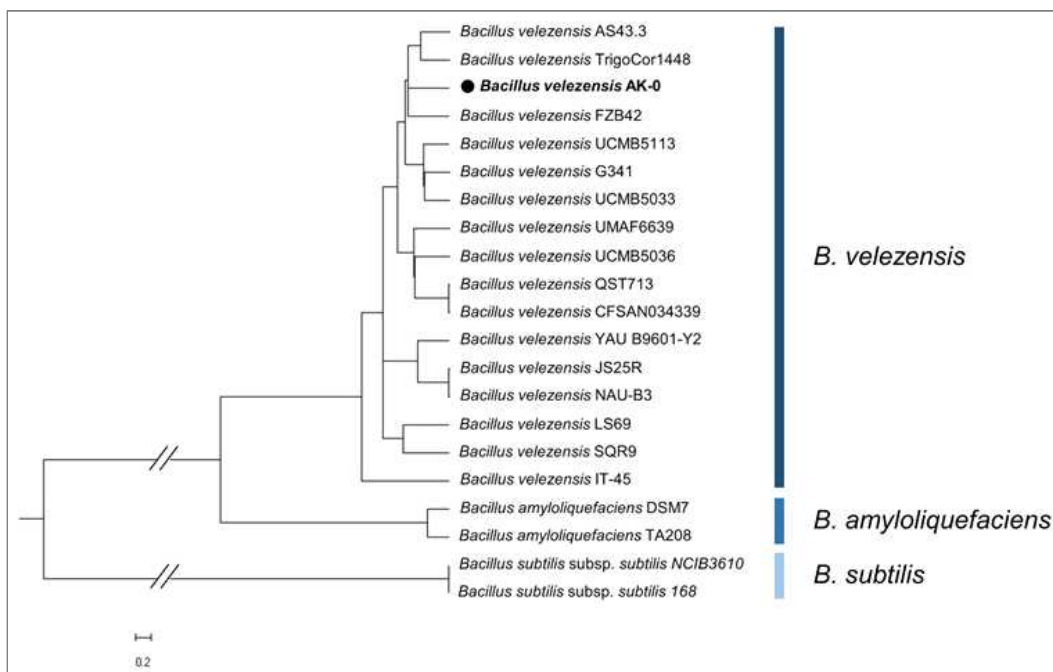


그림 37. Phylogenetic tree by ANI-derived UPGMA dendrogram(Newickformat). *B. velezensis* AK-0 is more related to the strains including FZB42, TrigoCor1448 and AS43.3

같은 종이라 할지라도 완벽하게 유전자를 공유하지는 않으므로, AK-0와 동일한 소그룹에 속하며 가장 근연관계가 가까운 FZB42균주, AK-0와 분리환경이 유사한 G341균주(한국 인삼재배지 토양에서 분리) 및 out group으로 *B. amyloliquefaciens* DSM7을 사용하여 한쪽의 균주에만 존재하는 유전자, 양 쪽 모두에 존재하는 유전자의 양상을 분석하였다.

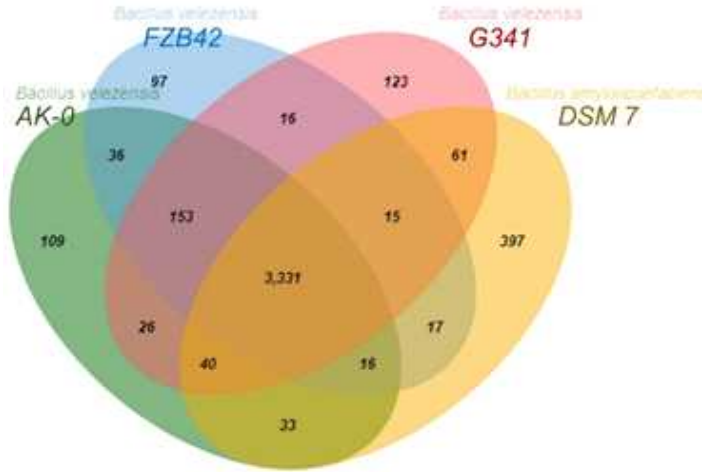


그림 38. The venndiagram of *B. velezensis* strain AK-0, FZB42, G341 and DSM7.

The values overlapping are the gene coding proteins (GCPs) common within the genomes and values outside the overlaps signify the GCPs in each genome without orthologs in the other genomes.

4개 균주가 3,331개의 유전자(CDS)를 공유하고 있으며 이는 필수 유전자로 판단된다. 또한 extra 유전자로 여겨지는 약 100개의 유전자가 단일 유전체에만 존재하였다. AK-0와 가장 가까운 strain으로 분석된 FZB42와 비교할 때, 3,536개의 동일한 유전자를 가지고 있으며, AK-0는 208개의 유전자를 추가로 가지고 있었다.

Pan-genome을 이용한 분석 및 유전자의 존재 유무를 통한 계통분석, POG frequency 분석등을 수행하였다.

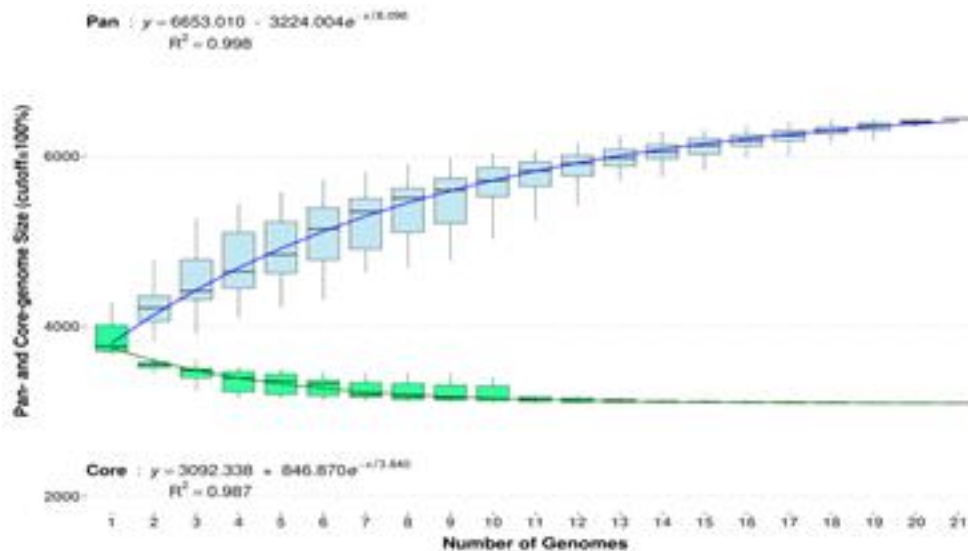


그림 39. Pan-genome accumulation curve of 21 *Bacillus* genomes.

It showed that the size of the *B. velezensis* pan-genome may grow with the number of strains, and this pan-genome was considered in an open state. The blue boxes denote the number of unique genes discovered with the sequential addition of new genomes. The orange boxes denote the number of core genes discovered with the sequential addition of new genomes.

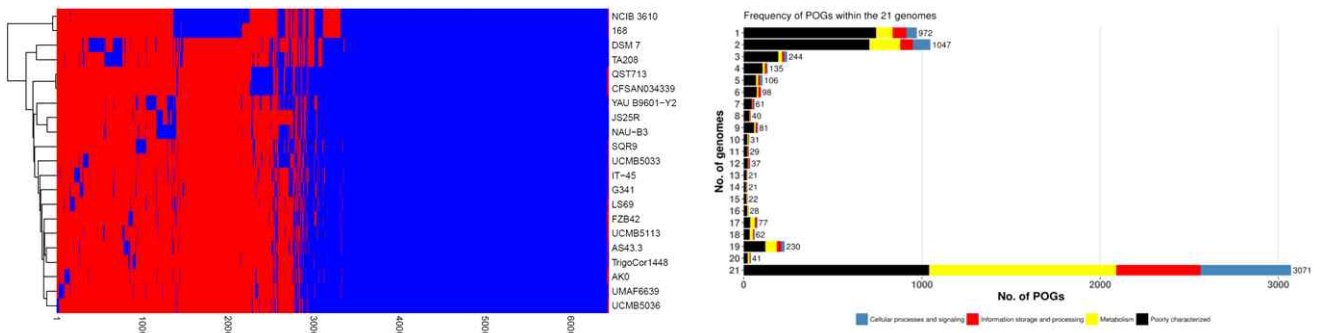


그림 40. Clustering of the gene content and the conserved pan-genome orthologous groups (POGs) of 21 *Bacillus* genomes subsets (a, b).

Both the core genes and dispensable genes are important in determining bacterial species diversity. The core genes serve to basic functions in organism's biology, including replication, translation, and maintenance of cellular homeostasis. These core genes represent the genetic diversity among the strains compared. The dispensable genes are associated with survivability, antimicrobial resistance, virulence traits, and development of novel gene functions. Some of these genes, when present within the strains, confer an adaptive superiority over others that are lacking (Carlos Guimaraes et al. 2015).

AK-0와 유사한 다른 균주들의 이차대사산물의 유전정보를 비교분석하고자 web 기반의 antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org/>)를 이용하였다. AK-0의 경우 12개의 cluster가 검출되었고, 그 중 7개는 알려진 항균물질과 높은 유사성을 보였다. Difficidin, bacillibactin, bacilysin, macrolactin, bacillaene, fengycin은 기존에 보고된 cluster와 100% 일치하였고, surfactin은 91%의 상동성을 나타내었다.

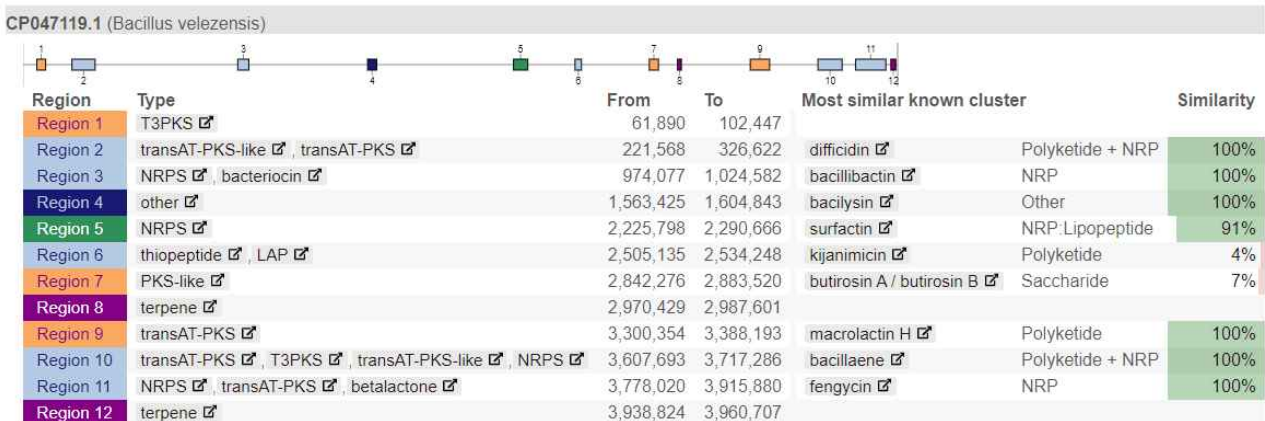


그림 41. Biosynthetic gene clusters of secondary metabolites from *B. velezensis* AK-0

이 cluster들을 자세히 살펴보면 다음과 같다.

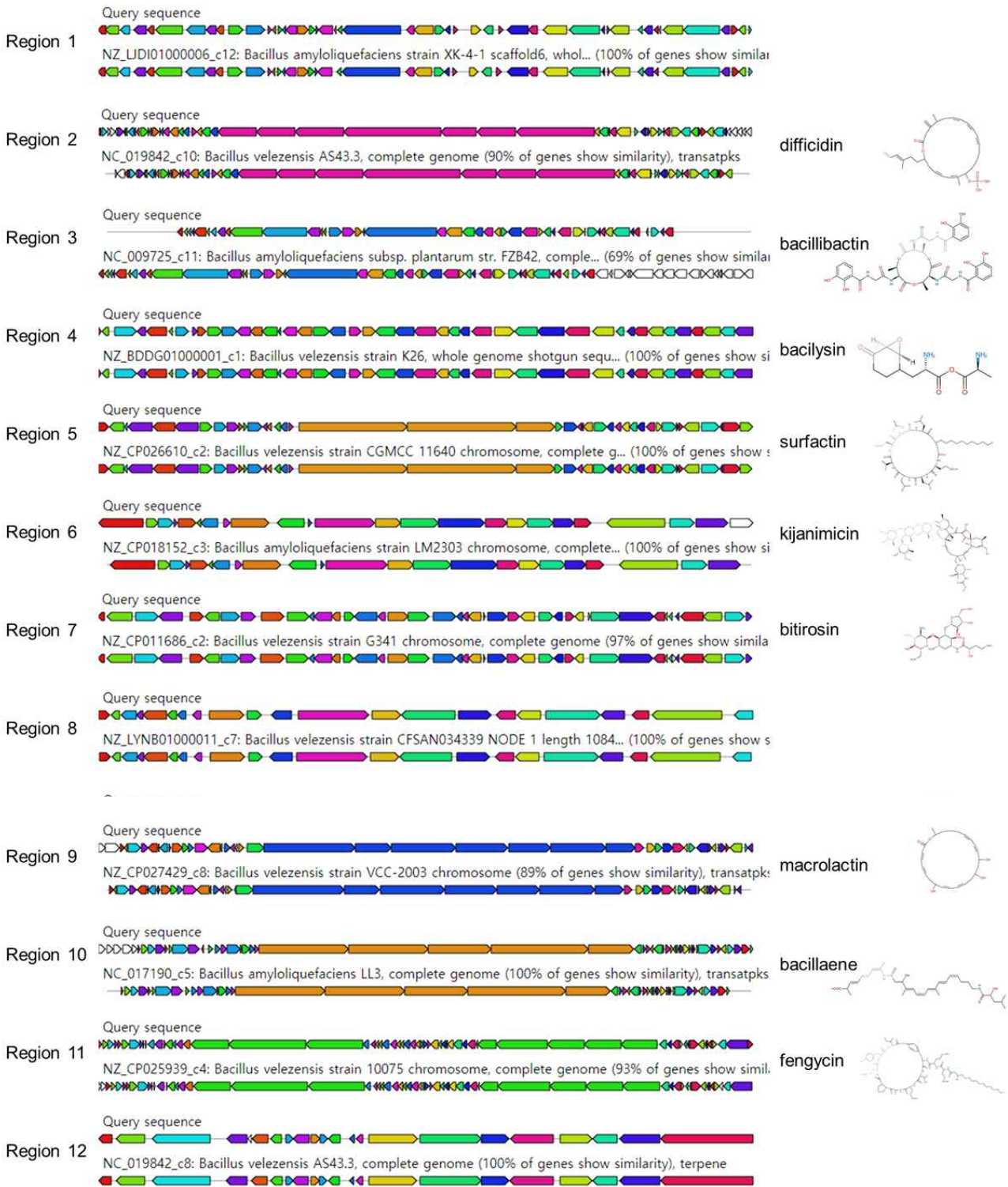


그림 42. Comparison of secondary metabolite gene clusters.

Different genes are filled with different color, and genes with the same color are homologous to each other. The secondary metabolite clusters in the sequenced genome of *B. velezensis* AK-0 were predicted using antiSMASH (<http://antismash.secondarymetabolites.org/>) (Medema et al., 2011)

요약하자면, 유용미생물 *Bacillus velezensis* AK-0의 유전체 정보를 이용하여 다른 20종의 *Bacillus* strain과의 비교유전체 분석을 수행하였다. Pan-genome은 open상태로 새로운 게놈서열이 추가될때마다 증가하는 곡선을 나타내었다. 한편, AK-0는 다양한 이차대사산물에 대한 유전자를 보유하고 있어 매우

넓은 스펙트럼의 항균활성이 예상되었다.

3. 유용미생물 *Serratia plymuthica* GYUN-8의 전장 유전체 연구

유용미생물 GYUN-8의 complete sequencing data를 얻기 위하여 PacBio사의 RSII NGS 장비를 이용하였고 Sequencing depth는 200.59x이다. 생성된 raw data는 HGAP2 프로토콜로 assembly를 진행하여 하나의 contig로 이루어진 fasta형식의 파일을 얻을 수 있었고 이를 iGEM 생명정보에 igem-0001612로 등록하였다.

iGEM 생명정보 등록확인서

사업명	유전체 분석 기반 사과병해 방제 및 가지과 작물 생육촉진 미생물 제제 개발			NTIS고유번호	1545017460	
바이오프로젝트	과제명	유전체 분석 기반 사과병해 방제 및 가지과 작물 생육촉진 미생물 제제 개발				
	책임자명	전용호	부과제번호	918009-04-1-SB010		
	소속기관	국립안동대학교	부서명	생명자원과학부 식물의학전공	직위	조교수
	총 연구기간	2018-04-01 - 2021-12-31		과제유형	단위/기체부	
실험	실험명	Serratia plymuthica GYUN-8 전장유전체				
	실험설명	유용미생물 Serratia plymuthica GYUN-8의 유전체서열임				
	성과지표	진박미생물학회	등록번호	igem-0001612		
	Platform	PacBio RS II	컨소시엄	농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단		
	생물정보 (형태>대분류>소분류)			Genome> Genome> WGS		
	공개일	2019-12-31	NABIC 번호			
샘플	 샘플리스트는 QR코드로 확인이 가능합니다.					
<p>「생명연구자원의 확보 관리 및 활용에 관한 법률」 제10조2항(2010.3.)에 의거하여, 위와 같이 해당 생명정보가 농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단에 등록되었음을 확인 합니다.</p> <p>등록확인 : 2020년 10월 21일</p> <p style="text-align: center;">농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단장</p> 						

유전체 분석에서 GYUN-8은 *Serratia plymuthica*로 동정되었고, 이 세균의 core genome coverage는 98.9%였다.

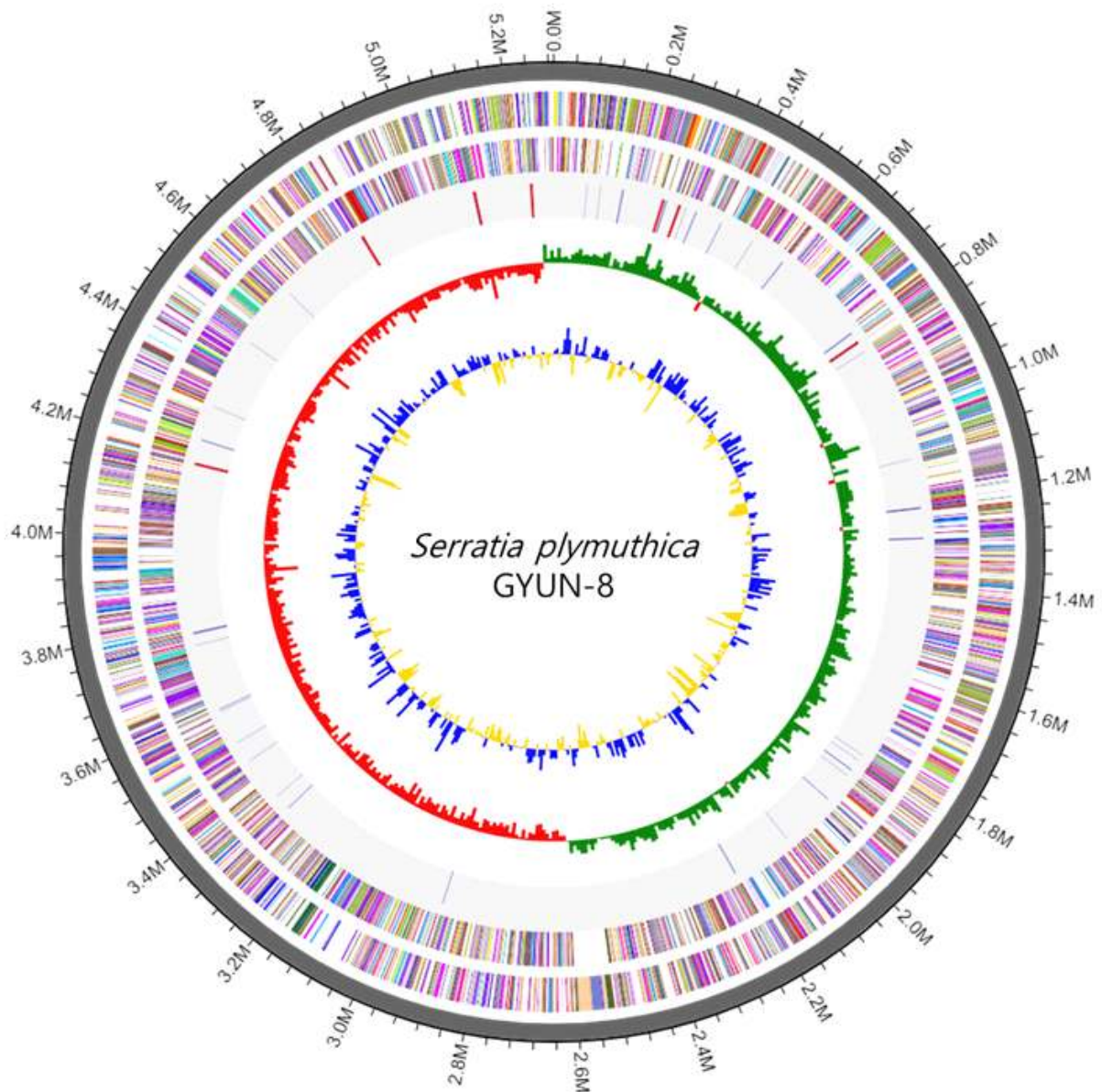


그림 43. Whole genome map of *Serratia plymuthica* GYUN-8.

Marked characteristics are shown from the outside to the center; coding sequence (CDS) on forward strand, CDS on reverse strand, tRNA, rRNA, guanine-cytosine (GC)-content, and GC skew.

1개의 contig로 구성된 것으로 보아 genomic DNA 외에 플라스미드 형태를 추가로 갖고 있지는 않은 것으로 판단되었다. 그림은, 바깥쪽 첫 번째 원인 회색원은 1개의 contig를 나타내며, 안쪽으로 가면서 두 번째 원은 Forward, 세 번째 원은 Reverse strand 위에 있는 유전자 (CDSs)를 나타낸다. 네 번째 원은 tRNA와 rRNA 위치를 나타낸다. 다섯 번째 원은 GC skew metric을 나타내며 이는 leading/lagging strands와 replication loci에 대한 indicator로서 사용된다. 평균 genomic GC-scew를 중심으로 이보다 높으면 녹색, 낮으면 붉은 색으로 나타내었다. 여섯 번째 원은 GC ratio metric으로 평균 GC ratio를 기준으로 이보다 높으면 파란색, 낮으면 노란색으로 나타내었다. GC skew와 GC ratio는 모두 10kb간격으로 표현하였다.

GYUN-8 genome의 CDS를 EggNog/COG 분석을 통해 카테고리별로 분석하였다.

EggNog/COG

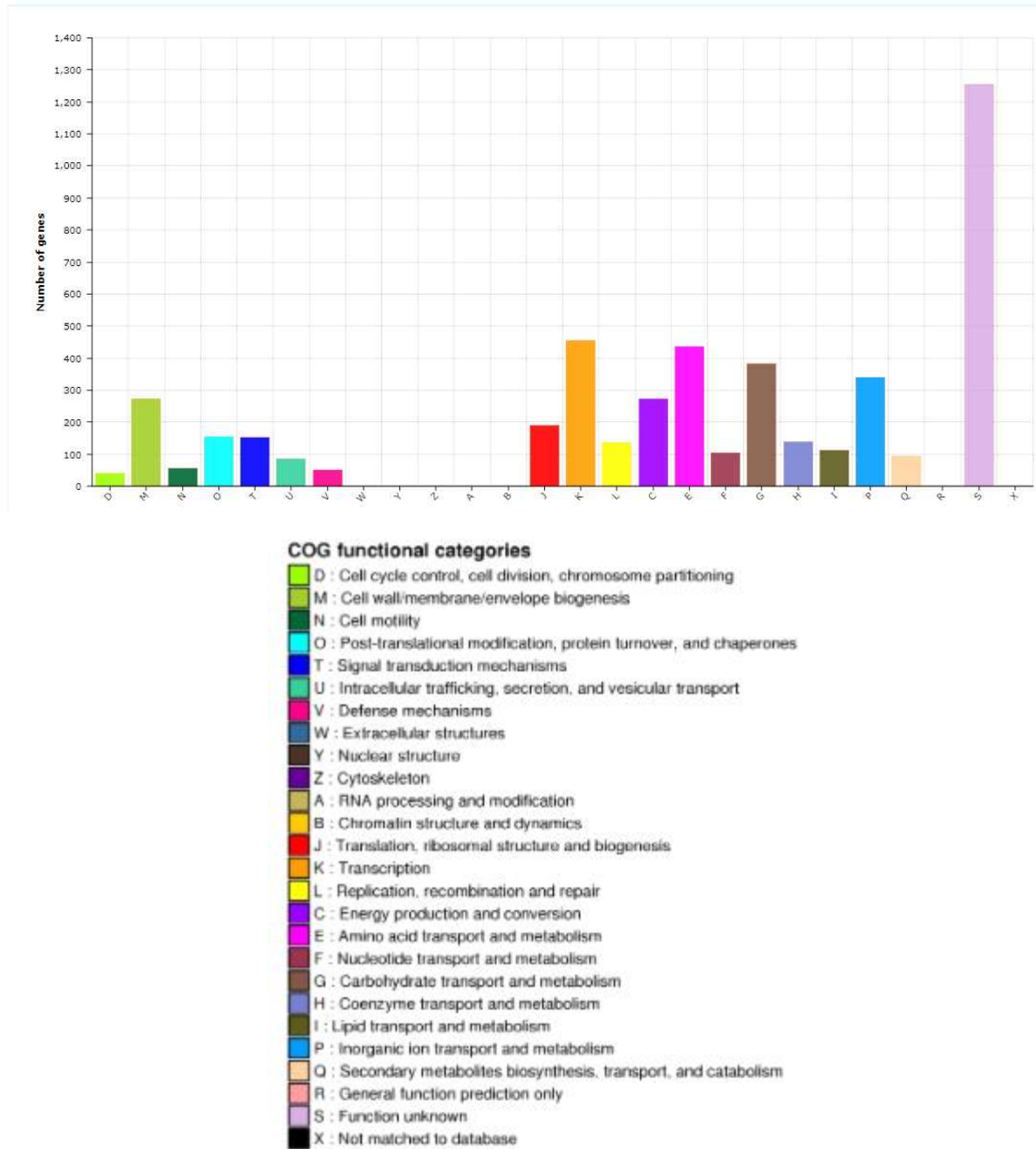


그림 44. EggNog/COG 분석

GYUN-8의 일반적인 유전체 특성을 분석하기 위해. 비교균주로서, *Serratia plymuthica* NTCT 12961T, *Serratia inhibens* PRI-2c, *Serratia liquefaciens* ATCC 27592T, 및 *Serratia quinivorans* NCTC 11544의 genome data를 분석하였다. 이 중에서 PRI-2c는 원래 *Serratia plymuthica*로 동정되었다가 이후 *Serratia inhibens*로 재분류된 바 있다.

GYUN-8의 유전체 크기는 5.29 Mb로 동일 종인 *Serratia plymuthica* NTCT 12961T보다 58 kb 정도 길었다. G+C ratio는 56.3%로 비교적 높았고, CDS의 개수는 상대적으로 적었으며, rRNA 갯수는 NTCT 12961과 동일하였지만 tRNA 개수는 많았다.

표 8. Comparative genome analysis of *Serratia plymuthica* GYUN-8 with *Serratia* strains

	Project accession	Taxon name	Strain name	Source of isolation	Geographical Origin	Country	Year of isolation	No. of contigs	Genome size (bp)	DNA G+C content (%)	No. of CDSs	No. of rRNA genes	No. of tRNA genes
1	42042.GYUN8.1	<i>serratia plymuthica</i>	GYUN8	-				1	5289819	56.320887	4790	22	86
2	GCA_900478125.1	<i>Serratia plymuthica</i>	NCTC 12961 <Type>	-			2007	1	5348135	55.921606	5851	22	84
3	GCA_000261045.2	<i>Serratia inhibens</i>	PRI-2c	maize rhizosphere soil			2004	1	5474685	55.653869	5010	22	87
4	GCA_000422085.1	<i>Serratia liquefaciens</i>	ATCC 27592 <Type>	Milk	Cork	Ireland	1931	2	5282719	55.3295	4898	24	86
5	GCA_900457075.1	<i>Serratia quinivorans</i>	NCTC 11544 <Type>	-			1983	3	5875301	54.742268	5739	22	86

상기 5개 유전체의 OrthoANI를 기반으로 하는 계통도 분석을 실시하였다. OrthoANI는 유전체 서열을 약 1 kb길이를 단편화하여 mapping한 후 계통도를 분석하는 방법으로 전체 서열을 상호 비교하기 때문에, 매우 신뢰도가 높다. 본 분석에서도 OrthoANI값을 이용하여 phylogenetic tree를 나타내었다.

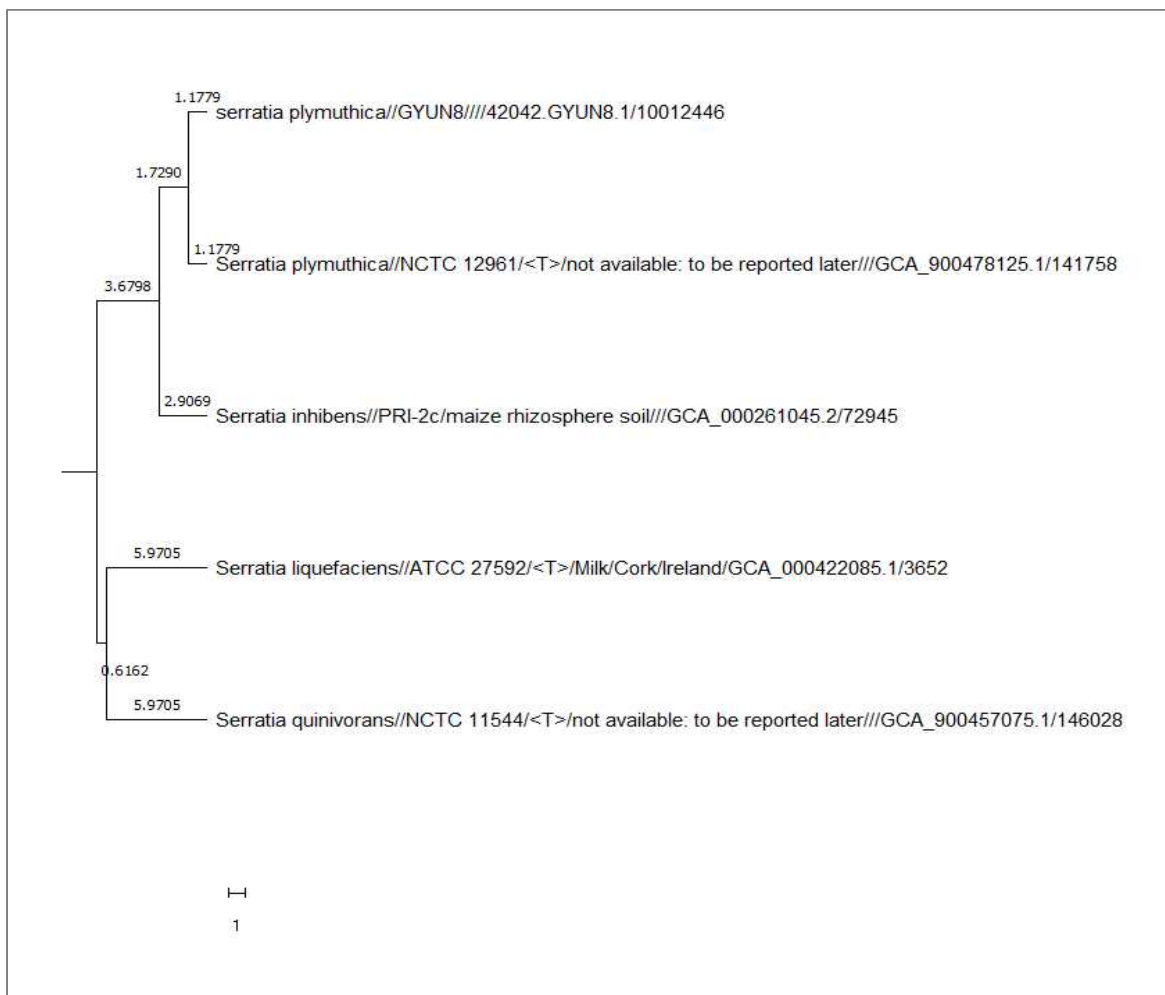


그림 45. Phylogenetic tree by ANI-derived UPGMA dendrogram(Newickformat

GYUN-8은 Type strain인 *Serrtia plymuthica* NTCT 12961T와 가장 근연관계인 것으로 확인되었다. GYUN-8과 NCTC 12961과의 유전자(CDS)비교에서, 이들 두 strain은 4,243개의 CDS (coding sequence)를 공유하고 있으며, GYUN-8만 보유하고 있는 유전자는 527개인 것으로 나타났다. *Serratia inhibens* PRI-2c를 추가하여 CDS를 venn diagram으로 나타내었다. 세 strains 모두가 공통적으로 보유하고 있는 CDS는 4,033개였으며, NCTC 12961만 가지고 있는 유전자 개수가 987개로 특별히 많았다.

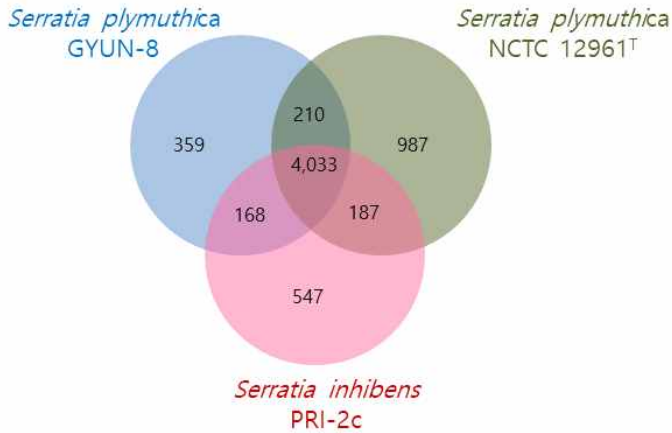


그림 46. The venn diagram of *Serratia plymuthica* strain GYUN-8, NCTC 12961 and RPI-2c. The values overlapping are the gene coding proteins (GCPs) common within the genomes and values outside the overlaps signify the GCPs in each genome without orthologs in the other genomes.

GYUN-8의 이차대사산물 정보는 antiSMASH를 이용하여 분석하였다. GYUN-8에는 총 10개의 cluster가 다음과 같이 검출되었다. Cluster 3은 APE-Ec와 78%의 유사성을 보이며, cluster 7은 oocydin A와 91%, cluster 10은 pyrrolnitrin과 100%의 유사성을 나타내었다.

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 1	hserlactone	19,343	40,014		
Region 2	betalactone	658,088	683,761		
Region 3	arylpoliene, siderophore	807,464	856,968	APE Ec, Other	78%
Region 4	NRPS	881,819	932,391	vulnibactin	12%
Region 5	T1PKS, NRPS	1,141,298	1,189,136	rishiriide B / rishiriide A	7%
Region 6	thiopeptide	1,719,850	1,746,347	O-antigen	14%
Region 7	T3PKS, PKS-like, transAT-PKS-like, transAT-PKS	2,508,706	2,623,491	oocydin A	91%
Region 8	phosphonate	3,385,217	3,426,086		
Region 9	NRPS	3,763,179	3,815,512	amonabactin P 750	57%
Region 10	other	4,461,457	4,502,542	pyrrolnitrin	100%

그림 47. Biosynthetic gene clusters of secondary metabolites from *S. plymuthica* GYUN-8

후속연구를 통해 *Bacillus velezensis*와 *Serratia plymuthica*의 2차 대사산물의 기능성을 정밀 분석하고 최대한 발현되어 항균, 생육촉진이 증가할 수 있는 방법을 개선하여 신규제품 개발을 확보해 나갈 필요성이 있음

V. 세균의 변이(Phenotypic variation) 연구

*P. polymyxa*는 세계적으로 널리 알려진 PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) 균임에도 불구하고 배양과정에서 변이가 일어나는 현상에 대한 연구는 거의 없었다. 그러나 선행연구 결과에서 해당 종에서의 변이 발생은 매우 일반적인 현상임을 밝혔다. 본 과제를 위해 선발된 5종의 유용미생물 중 2종이 *Paenibacillus polymyxa* species (*Paenibacillus polymyxa* APEC128, *Paenibacillus polymyxa* E681)이며, 그 중에서도 E681에서의 변이 발생에 대한 연구는 본 연구팀에서 상당한 기간동안 수행해오고 있다.

1. *P. polymyxa* E681에서의 변이 발생 및 특성

P. polymyxa E681은 그람양성균으로 스트레스 환경에서 내생포자를 형성하여 불리한 환경을 극복한다고 보고되어 있다. 그런데 놀랍게도 E681은 군집의 대부분이 죽어갈 만큼 열악한 환경에서, 내생포자를 형성하는 것이 아니라 오히려 내생포자 형성능력을 버리는 것으로 확인되었다. 기존형(B-type)과 비교하여 내생포자 형성능력이 없는 변이체를 F-type으로 명명하였고, 이는 고체배지에서 뚜렷이 구별되는 콜로니 모양 및 현미경상의 내생포자 여부를 통해 구별이 가능하다. 이처럼 내생포자 형성능력을 소실한 변이체는 실험실 내 뿐만 아니라 자연상태에서도 발생하는 것으로 확인되었고, 해당 세균의 여러 strain에서도 발생하였으므로 이러한 Phenotypic variation은 *P. polymyxa* 종 전체에 걸쳐 발생하는 현상으로 여겨진다. 내생포자를 형성하지 못하는 F-type의 다양한 생물학적 특성을 확인한 결과, Biofilm 형성, 식물생장촉진, 뿌리정착 및 항생물질 생산능력 등이 감소한 반면, 편모발달로 인한 이동성은 우수한 것으로 나타났다.

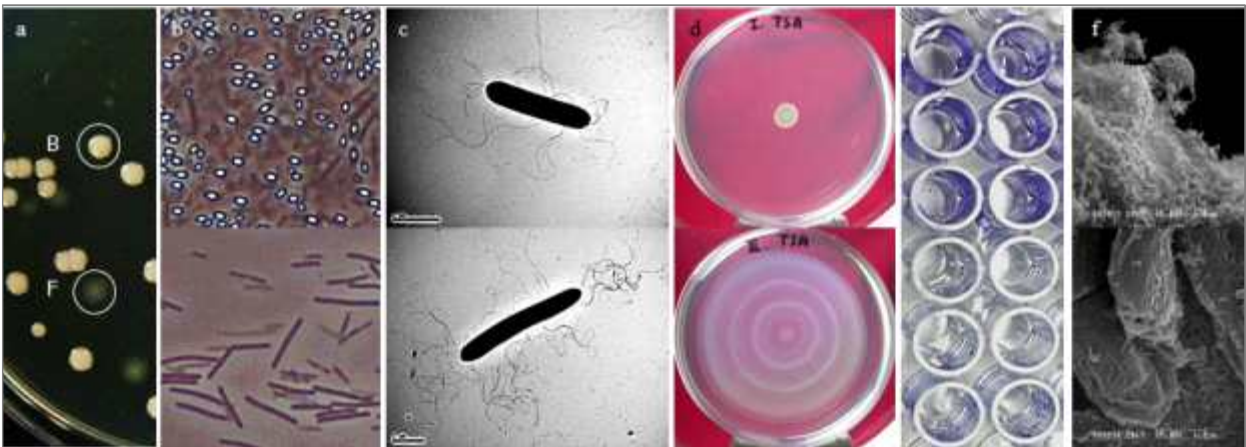


그림 48. *P. polymyxa* E681의 기존형(B-type)과 변이형(F-type)간의 표현형 비교.

(a) Different colony morphologies. Type 'B' colonies are bald and milky-white and 'F' colonies are flat and translucent. (b) Endospore forming. Most 'B' cells had endospores, but no endospores were detected in 'F' during 9th day culture onto TSA at 30oC. (c) TEM imaging. Increase of flagella in 'F' in comparison to 'B'. Scale bar = 2 um (d) Swarming motilities. 'B' had no motility, but 'F' showed a strong swarming response during 48h of incubation at 30oC on TSA medium containing 1.0% agar. (e) Biofilm formation assay by crystal violet staining. Significant decrease in biofilm formation was observed in the bottom six wells cultured with 'F' compared to the top six wells cultured with 'B'. (f) SEM imaging. 'B'-treated cucumber root tip is covered with biofilm, while biofilm is hardly observed in 'F' treatment.

그러나 이같은 큰 변화에도 불구하고 게놈서열 (genome sequencing) 비교 결과, B-type과 F-type간의 유전적 차이는 없었다. 두 타입간의 전사체분석 (Transcriptome) 결과를 보면, 편모 및 수송 (transport)와 관련된 유전자가 B-type에 비해 F-type에서 많이 발현된 반면, 내생포자 형성과정 (sporulation) 및 항생 물질 생산과 관련된 유전자의 발현은 감소되어 있었다. ‘수송’ 카테고리 내에서는 ATP-binding cassette (ABC) transporter가 대부분으로 구성되어 있었고, 이들은 F-type에서 발현이 증가하였다.

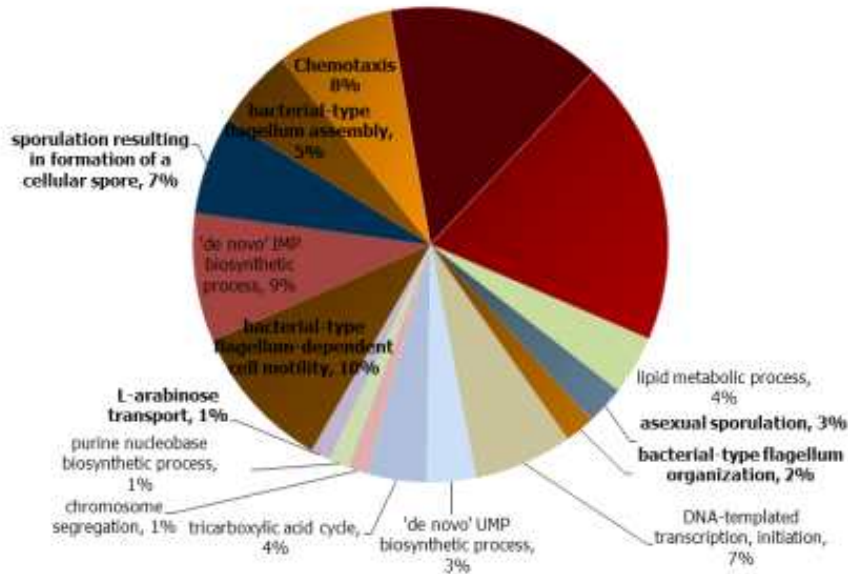


그림 49. RNA-seq에서 확인된 DEG(differentially expressed genes)의 GO 분석.

Functional annotation결과, 크게 3가지 카테고리에 속하는 유전자의 과발현이 확인되었으며, 이는 수송 (transport), sporulation 및 편모(flagella) 관련 유전자들이다.

Sporulation은 일반적으로 stage 0에서 7까지 단계적으로 진행된다고 보고되어 있는데, E681에서는 stage 0에서 유전자 발현이 조절되며 이후 단계에 속하는 모든 유전자가 F에서 거의 발현되지 않음으로써 포자생성을 못하게 되는 것을 확인하였다. stage 0에서의 주요 유전자는 spo0A와 sigH이며, F-type에서 이들의 발현이 감소되었고, 이 과정의 조절인자로 알려진 abrB의 발현은 증가되어 있었다. 따라서, sigH-spo0A-abrB 상호간의 조절을 통해 내생포자를 생성하지 못하는 변이형이 나타나는 것으로 확인되었다.

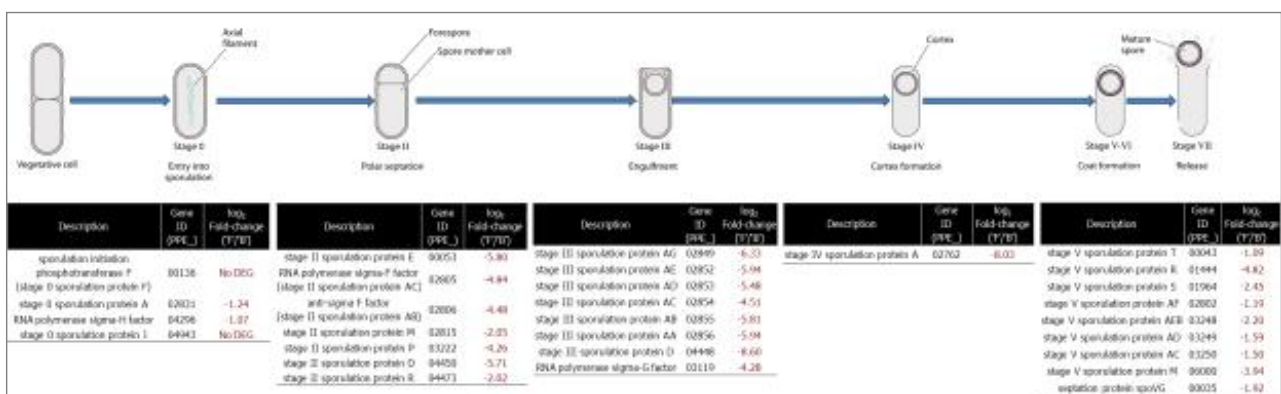
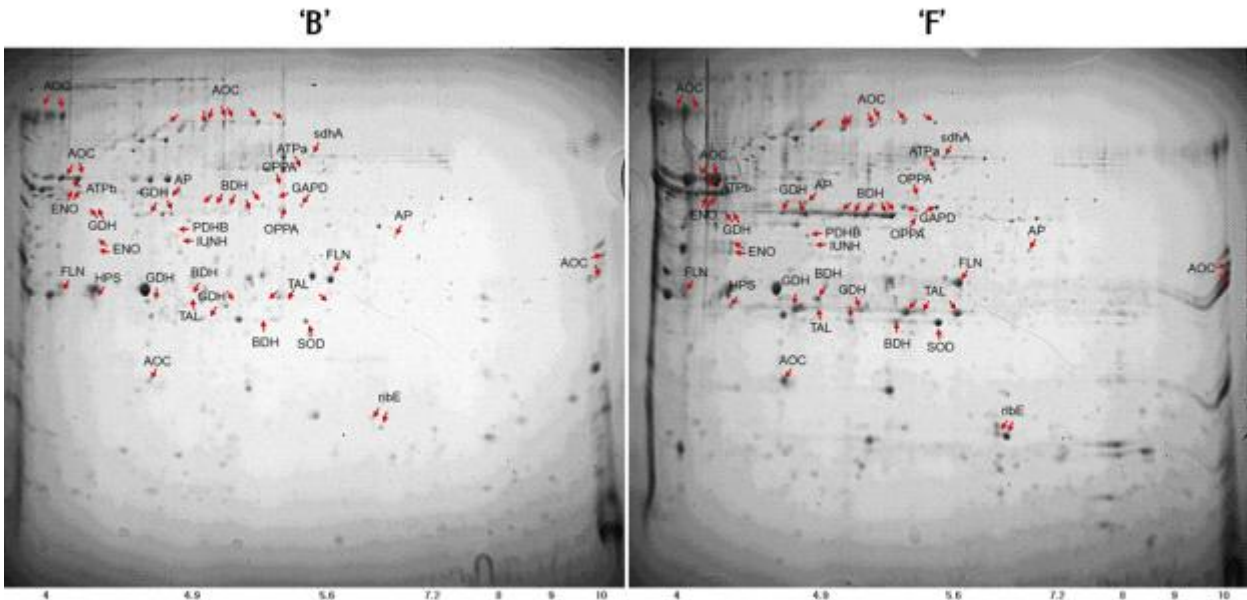


그림 50. E681에서의 Sporulation단계별 유전자 발현양상.

Stage 0에서의 regulation에 의해 Stage 2이후의 log2 fold change값은 모두 (-)로 나타남을 확인할 수 있다.

단백질체 분석 (proteomics) 결과, F-type에서 편모관련 단백질의 과발현과 함께, 해당작용 및 탄수화물 대사에 관련된 단백질의 과발현이 확인되었다. 즉, F에서 에너지대사가 매우 활발함을 알 수 있었다. 대사를 통해 생산한 에너지는, ABC transporter와 같은 ATP를 사용하는 능동수송, B-type에 비해 빠른 세포분열 rate 및 편모의 운동성 등에 사용되는 것으로 추측이 가능하다.



High level of energy metabolism

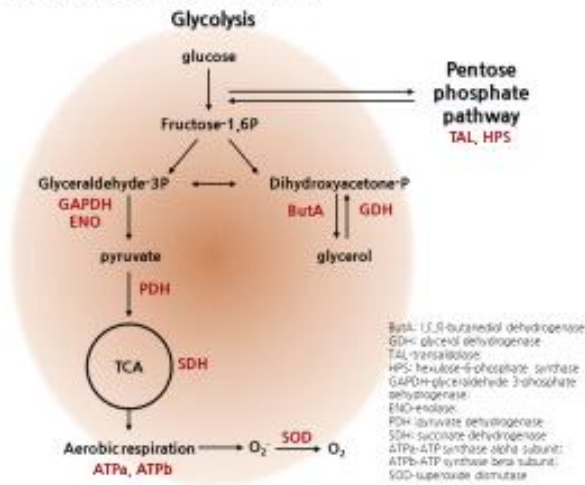


그림 51. E681에서의 단백질체 분석. 2-dimensional electrophoresis를 통하여, B와 F간의 발현에 큰 차이를 보이는 단백질 spots 53개를 분리하고, Maldi-tof를 통해 아미노산 서열을 결정하였다. 53개 단백질은 모두 F-type에서 과발현되고 있었으며, 이들 대부분은 해당작용 및 TCA 회로와 관련된 것으로 나타났다.

종합해 보면, E681균주는 스트레스 환경에서 내생포자를 생성하는 일반적인 내생포자 형성균과 다른 선택을 할 수 있는 것으로 추측되며, 그 선택은 F-type과 같은 변이형이 되어 스트레스 환경으로부터 이동하겠다는 것이다. 예컨대, F-type은 이를 위해, 편모를 많이 만들어 이동성을 높이며, 적극적인 수송을 통해 영양분 흡수 및 외부환경에 민감하게 반응하는 것이다. 이동과 수송에 필요한 에너지를 위해 내생포자 형성능력은 과감이 버린다. 그것도 sporulation stage 0단계에서 조절함으로써 불필요한 에너지 낭비를 막았고, 이제 이동할 것이므로 더 이상 바이오필름이나 항생물질도 만들 필요가 없어졌다. 이와 같이 F-type은 이동에 필요한 에너지를 충분히 비축했으니 더 이상 내생포자는 필요없으며 보다 나은 환경을 향해 이동하게 되는 것으로 추측해볼 수 있다.

2. E681에서의 역변이 연구

연구과정에서, E681은 항상 B-type에서 F-type로의 변이가 발생하였으며, 역반응인 F-에서 B-type으

로의 변이는 아직까지 확인되지 않았다. 그러나 해당 균주를 개발하고자 할 때, 매우 중요한 부분으로 반드시 확인해야만 하는 부분이다. 다양한 배지 조성으로 실험한 결과, 역변이 (F-type --> B-type) 현상은 나타나지 않았으나, 장기 배양 및 pH연구에서 reversible variation에 대한 가능성을 확인할 수 있었다.

□ 장기배양시 역변이 연구 (고체배지)

변이형인 F-type에서는 나타나지 않아 기능을 소실한 것으로 보였던 내생포자 생성능이 장기 배양과정을 통해 조금씩 회복되는 것을 확인하였다. Tryptic soy agar배지 (TSA) 에 변이형 균주인 F-type을 스프레딩한 후 온도별로 20° C, 30° C, 37° C에서 한 달간 배양하였다. 그 결과 장기 배양시 (1 month), F-type에서의 endospore형성능력은 낮은 온도(20° C, 30° C)에서 회복되는 것이 확인되었다. *P. polymyxa* 에서의 내생포자 형성은 온도, 특히 낮은 온도에 의해 촉진되는 것으로 보인다. 본 연구를 통해, F-type에서 나타나는 가장 큰 특징 중의 하나인 sporulation deficiency는 F-type이 내생포자 생성능을 완전히 상실하여 나타난 것이 아니라 필요에 의해 기능을 발휘하지 않는 것으로 판단할 수 있었다. 따라서, F-type에서 내생포자 생성능이 회복된다면, 이는 F-type에서 B-type으로의 reversible variation 가능성도 열려 있는 것으로 판단되었다.

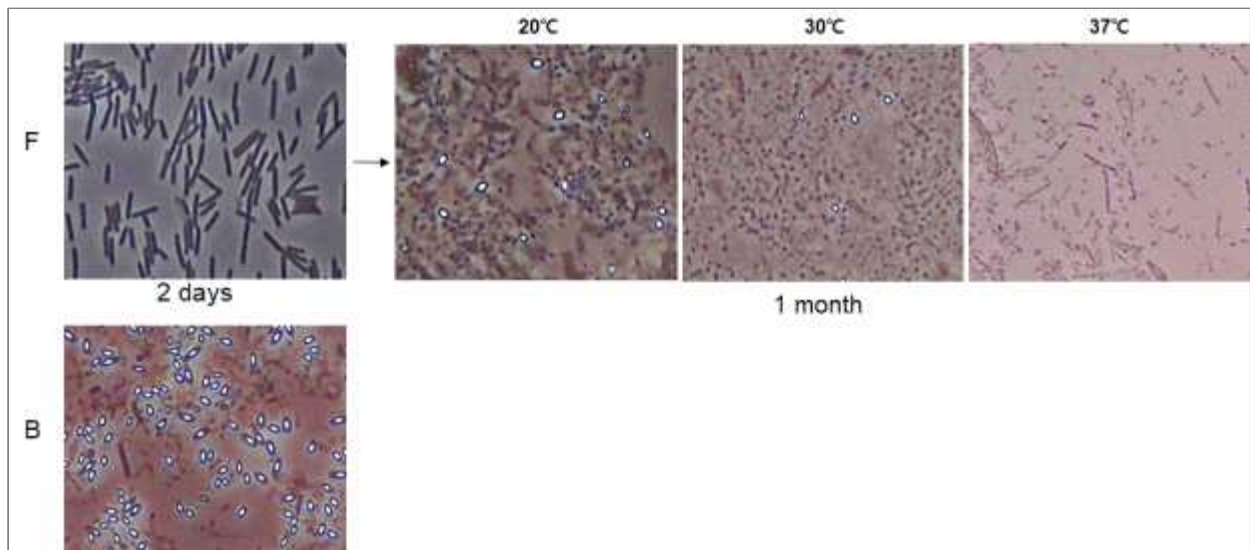


그림 52. 장기 배양시 F-type에서 내생포자 형성능의 회복.

B-type은 2일간 배양시에도 내생포자를 활발히 생성하는 반면 'F'는 전혀 생성하지 못하였지만, 장기간 배양함에 의해, 20°C에서 내생포자 형성능이 최대로 회복된 것으로 나타났으며, 37°C에서는 내생포자를 전혀 형성하지 못하고 degradation된 것이 확인되었다.

	20°C	30°C	37°C
	<p>한달간 배양한 콜로니는 진한 milky-white 색의 중심부와, 다소 translucent한 가장자리로 구별되는 콜로니를 확인할 수 있었다. Phase contrast microscope 관찰에서, 콜로니 중앙부에서 endospore가 다수 관찰되었고 나머지 cell은 모두 degradation된 반면, 콜로니 가장자리에서는 endospore는 없고, 살아있는 vegetative cell이 드물게 관찰되었다.</p> 	<p>cell은 모두 degradation되었고, 콜로니 중앙부에서 endospore가 관찰되었으며, 20°C 배양보다 그 수가 적었다.</p>	<p>cell은 모두 degradation되었고, 콜로니의 어느 부분에서도 endospore는 전혀 관찰되지 않았다.</p>

--	--

□ F-type으로부터 기존형 B-type (역변이체)의 순수분리 연구

한 달간 배양한 F-type plates에서 내생포자의 생성을 확인하였으므로, Endospore를 생산하는 cell 혹은 endospore가 발아하여 생성된 콜로니는 B-type일 것으로 예상하여 이를 순수분리하고자 하였다. 실험은 두 가지 방법으로 진행되었다.

위상차현미경을 통해 Endospore가 존재하는 것을 확인한 콜로니를 회수하여 ① 그대로 또는, ② 열처리하여 내생포자만을 남긴 후 고체배지에 spreading하여 콜로니 모양관찰을 통해 'B' 타입을 확인하는 방법이다. 20° C, 30° C, 37° C에서 한 달간 각각 배양한 F-type plates로부터 콜로니 1-2개를 증류수 1 ml에 현탁한 후 현미경으로 endospore 존재여부를 확인하고 TSA plates에 10-fold serial dilution plating을 수행하였다. 그 결과, 2일간 배양 후 새로 생성된 콜로니에는 B-type이 전혀 없었고, 모두 F-type이었다. 상기 증류수 현탁액을 80° C에서 30분간 열처리를 한 후 TSA plates에 10-fold serial dilution plating을 수행하였다. 그 결과, 새로 생성된 콜로니에는 역시 B-type이 전혀 없었으며, 모두 F-type이었다. Endospore를 형성하였던 cell은 콜로니 모양으로 확인한 결과, F-type의 반투명한 콜로니 특성을 그대로 가지고 있었다. 결론적으로, B-type의 가장 중요한 특성 중 하나였던 내생포자 생성능이 F-type에서 확인되기는 하였으나, 콜로니 모양은 여전히 F-type 고유의 특징을 가지고 있었으므로, F-type → B-type로의 reversible variation은 관찰되지 않았다.

□ pH에 따른 변이 연구 (액체배지)

P. polymyxa 기존형 (B-type) 및 변이형 (F-type) 균주를 TSB 배지에서 2일간 배양 후 배양액의 pH를 측정하면, B-type은 pH 6.3인 반면, F-type은 pH 5.7이었다. F-type 배양 시 상대적으로 배지가 산성으로 변하는 것이 확인되었고, RNA sequencing연구에서 ATP를 능동수송하는 ABC transporter의 발현 및 해당작용/TCA cycle 관련 효소 유전자의 발현이 F-type에서 매우 높았던 결과 등으로 유추해 볼 때, 산성인 환경에서 F-type은 B-type에 비해 생존이 유리할 것으로 판단되었다. 산성환경에서 F-type은 수소 펌프를 통해 수소이온을 내부로 실어나르고 이를 이용해 ATP를 더욱 생성하는 메커니즘을 운영할 것으로 예상되므로, F-type을 혐기성에서 배양하면 해당작용/TCA 회로를 활성화하지 않고, B-type의 고유특징인 내생포자 생성능을 회복할 가능성이 있을 것으로 기대하고 본 연구를 진행하게 되었다. 배양배지는 혐기성 위주로 개선하여 제조하였고, HCl 또는 NaOH로 적정하여 pH 5 ~ pH 12로 단계별로 제조하였다. 해당 실험은 3반복으로 진행되었다.

9일간 배양결과, F-type 배양액에서 pH 8을 제외하고는 pH 5 ~11까지에서 내생포자가 전혀 생성되지 않았으며, pH 8일 때, F-type배양액에서 내생포자의 생성이 확인되었다.

그러나 내생포자 형성 cell이 B타입인지 F타입인지는 콜로니로 다시 확인하여야 하는 과정이 아직 남아 있다. 따라서 향후 실험은 pH 8에서의 vegetative cells이 모두 죽을 때까지 배양기간을 늘린 후 내생포자만을 배지에 도말하여 확인하는 것이 바람직하다. 이때 만약 F-type 콜로니의 전형적인 모양으로 형성된다면 지속적인 계대배양을 통해 B-type 콜로니 모양으로 자라는 cell을 분리해내는 방법을 사용할 계획이다.

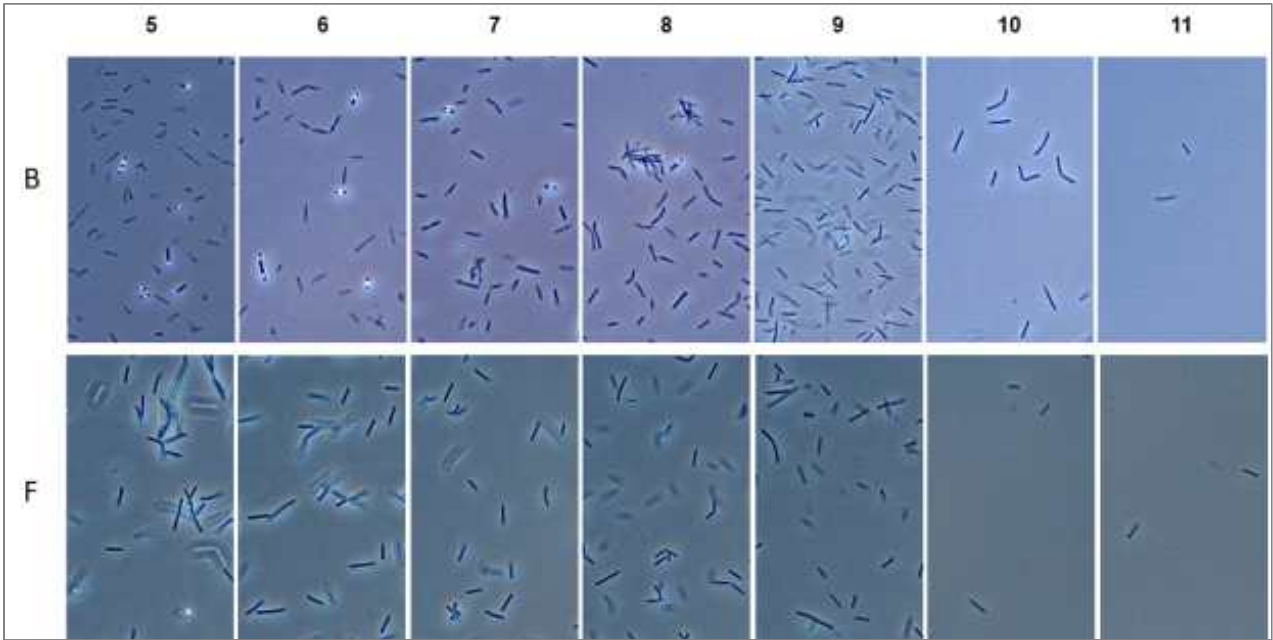


그림 53. Endospore formation depending on pH at 3d in TSB.

B-type은 pH 5~10에서 잘 생존하였으나, pH 11에서는 살아있는 cell이 거의 없었다. pH가 높아질수록 endospore형성을 잘 못하는 것으로 나타났으며, pH10에서는 endospore를 전혀 볼 수 없었다. F-type은 pH 5~9에서 잘 생존하였으나, pH 10 및 11에서 살아있는 cell이 거의 없었다. 또한 모든 pH 구간에서 endospore를 형성하지 않았다.

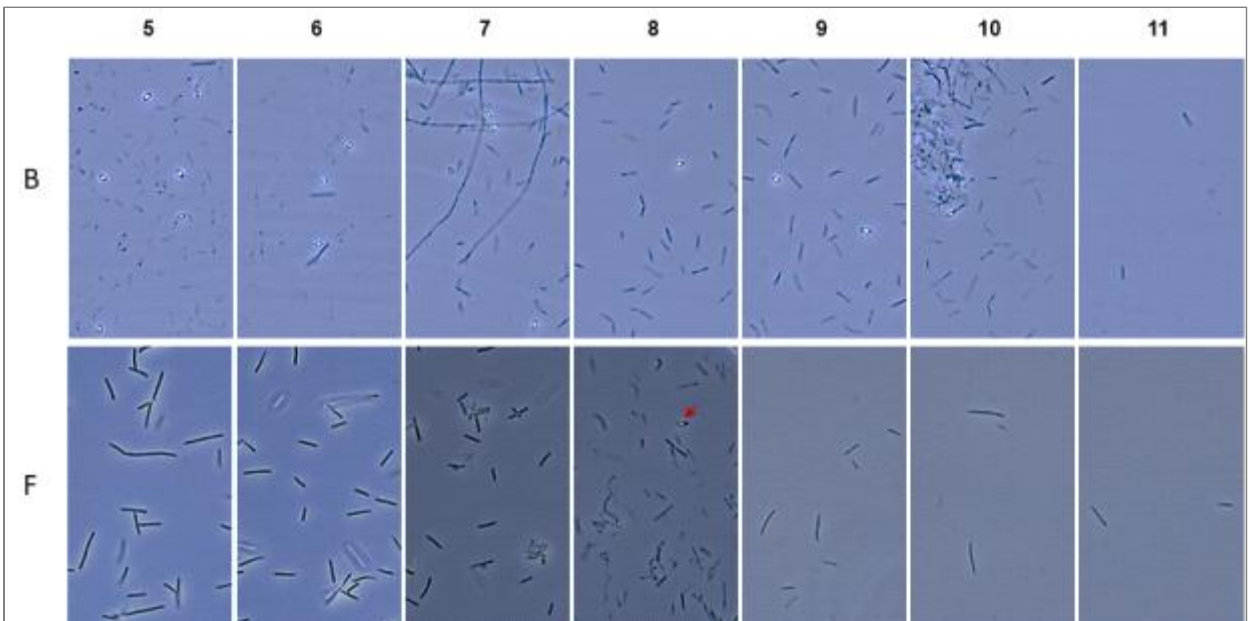


그림 54. Endospore formation depending on pH at 6 d in TSB.

B-type은 3일차와 마찬가지로 pH 5~10에서 잘 생존하였으나, pH 11에서는 살아있는 cell이 거의 없었다. pH가 높아질수록 endospore형성을 잘 못하는 것은 3일차와 유사한 패턴이었으나, pH10에서도 endospore가 매우 조금 생성된 것을 확인할 수 있었다. F-type은 pH 5~8에서 잘 생존하였고, 특이한 점은 pH8에서 매우 적은 수지만 endospore가 관찰되었다.

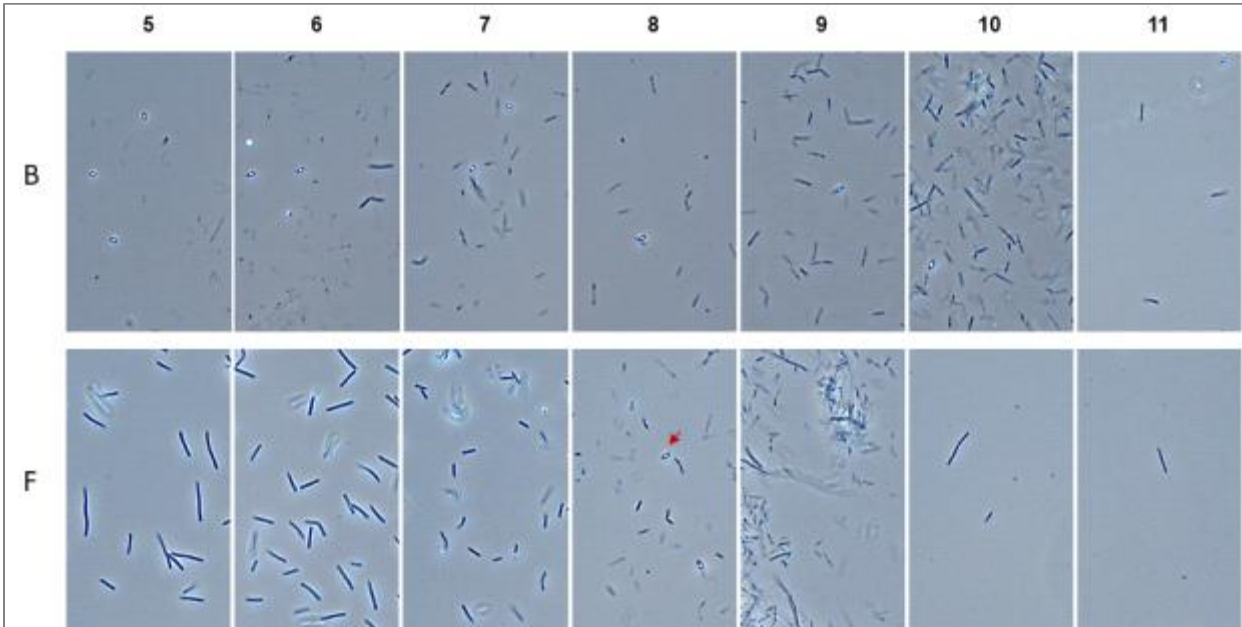


그림 55. Endospore formation depending on pH at 9 d in TSB

B-type은 pH5에서 vegetative cell이 매우 적었으며, endospore를 빈번히 확인할 수 있었고, pH가 높아질 수록 endospore수는 현저히 줄어들었다. pH가 높아질수록 endospore형성을 잘 못하는 패턴은 유사한 것으로 보인다.

F-type은 pH5 및 6에서 vegetative cell의 형태로 잘 생존하고 있었고, pH8에서의 endospore형성이 확인되었다.

○ reversible variation 연구 결과 및 고찰

역변이 (reversible variation) 발생을 통한 변이체 혹은 기존형 생성유무의 판단은, 내생포자 형성을 현미경으로 확인함과 동시에 TSA배지에서 콜로니 모양으로 확인한 후 가능하다. 그러나 지금까지의 연구 결과로는, 장기배양하거나 pH 8에서 배양시 F-type 균주에서 내생포자 형성이 확인은 되었으나, TSA 배지에서의 콜로니 모양은 여전히 F-type의 특징을 하고 있는 것으로 나타났다. 따라서, 이는 F-type에서 B-type로 변하는 중간단계일 것으로 예상되며, 상당한 기간을 두고 계대배양을 함으로써 완전한 B-type을 분리해 낼 수 있을 것으로 기대한다.

3. *P. polymyxa* 비교유전체 연구

B-와 F-type간의 변이 특성이 상당하므로, 상호간의 유전체 비교시 특이점이 있는 지 알아보기 위하여 분석하였다. NCBI에 등재된 reference 서열에 대하여 B와 F의 full genome 서열과 비교하였다. Web based tool인 JSpeciesWS를 통해 ANIb-value 값을 계산한 결과, B와 F간에 매우 높은 상동성을 나타내었다(<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>).

Legend	Reference (100%)	Reference (99.93%)	Reference (99.94%)
	Ref Ppolymyxa E681.fasta	B-gDNA.fasta	F-gDNA.fasta
Ref Ppolymyxa E681.fasta	-	100.00 (99.93)	100.00 (99.93)
B-gDNA.fasta	100.00 (99.93)	-	100.00 (99.93)
F-gDNA.fasta	100.00 (99.94)	100.00 (99.94)	-

그림 56. ANIb-value

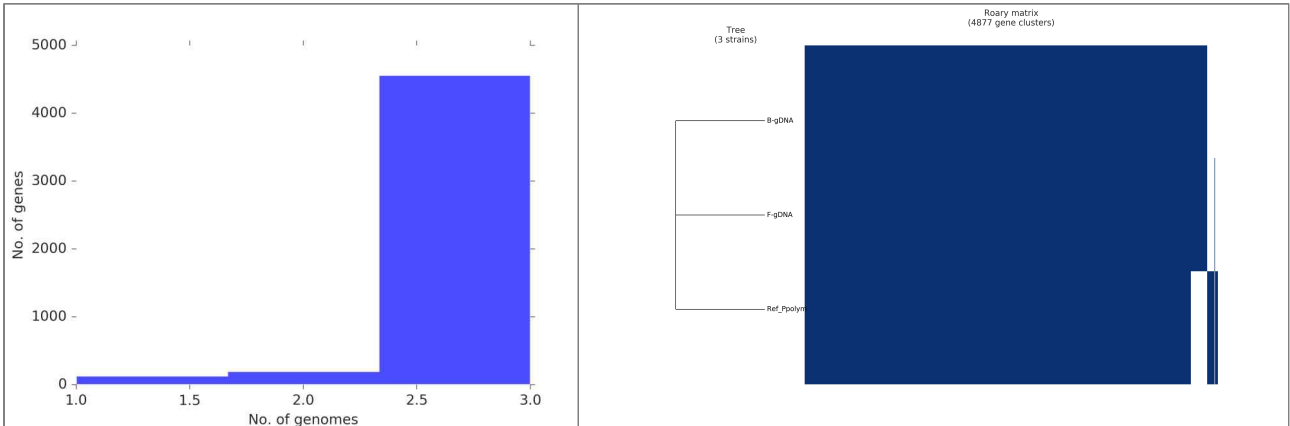


그림 57. pangenome frequency(좌) and pangenome matrix(우)

ANIb-value는 BLAST+결과를 기반으로 하는 방식으로, Reference *Paenibacillus polymyxa* E681.fasta와 본 실험의 두 타입인 B-gDNA.fasta, F_gDNA.fasta의 세 서열을 비교하였으며, 그 결과 모두 100%를 나타내었고, aligned nucleotide의 전체 대비 %값은 99.93 내지 99.94를 나타내므로, 세 서열 모두 거의 같은 값의 ANIb-value를 보이고 있었다. 이를 기반으로 pangenome frequency, matrix 및 pie chart를 아래에 나타내었다.

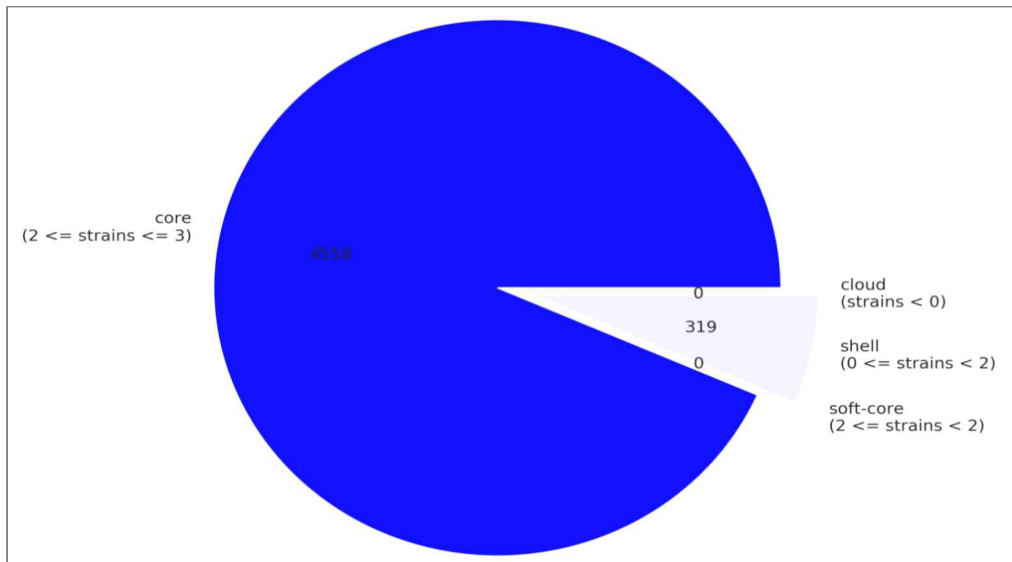


그림 58. pangenome pie

Reference chromosome NC_014483.2에 대하여 E681의 두 가지 타입 B와 F의 전장 유전체 비교를 실시하였다. multicalling을 수행한 결과, 총 7개의 유전자에서 차이가 확인되었다. 그 중 116,115 및 2,999,845 position의 경우는 reference는 T이지만 B와 F타입 모두에서 C로 확인되었으므로, B와 F간의 차이를 나타내는 SNP로 볼 수 없다. 170,511 position의 SNP은 F에서만 발견되었으며 Read depth 216이고, Alt depth 216으로 유의한 차이로 보인다. 이와 유사하게 2,017,123 position의 경우도 Read depth 171, Alt depth 171로 유의한 차이로 보인다. 한편, 1,466,225 position의 경우, hetero variant로 C : 141 depth / T : 52 depth이며, B-gDNA draft-genome에서는 “C”로 조립된 것으로 확인되었다. mapping 결과에서는 hetero pattern이 확인되었으나, 해당 position에 C를 가진 base의 비율이 많아 assemble과정에서 C로 조립된 것으로 추정되었다. 3,106,045 position은 spoIIIAF유전자에 속하는 것으로 F타입에서 T 하나가 addition된 것으로 확인되었고, (-T) 120 depth / T : 117 depth로 이도 유의한 차이로 보인다.

4,669,458 position에서도 F타입에서만 hetero variant로 확인되었고 G : 190depth / T : 190 depth으로 확인되어 유의한 차이로 보인다.

표 9. Multicalling result

Pos	B-gDNA		F-gDNA		Annotation				
	Ref	Alt	Ref	Alt	Gene Name	Gene ID	Start	End	Strand
116,115	T	C	T	C	PPE_RS00430	gene85	115441	118370	+
170,511			C	T	PPE_RS00675	gene135	170198	170566	+
1,466,225	C	T			PPE_RS06590	gene1345	146510	146664	+
2,017,123			G	T	PPE_RS09240	gene1883	201695	201748	+
2,995,845	T	C	T	C	PPE_RS13270	gene2719	299555	299709	+
3,106,045			CTTTTTTTTT	CTTTTTTTTT	spolIIAF	gene2835	310576	310653	-
4,669,458			G	T

Paenibacillus polymyxa E681의 배양과정에서 발생하는 변이에 대하여, 특성분석, 발생기작, 변이에 영향을 미치는 요인 및 해당 종 전체에서의 변이발생 등에 대한 연구결과는 Scientific Report 2020년 10월호에 게재되었고, 아래는 further study로 연구중인 내용에 대한 결과를 정리하였다.

□ SNP와 phenotypic variation의 관련성 연구

Paenibacillus polymyxa E681의 작년 연구 중, whole genome sequencing결과 확인된 5개의 SNP이 타입 B와 타입 F의 고유한 특성을 나타내는 원인인지 여부를 확인하는 실험을 수행하였다[표 3]. 타입 B와 타입 F의 전형적인 형태적 특성을 띠고 있는 콜로니를 각 12개씩 랜덤으로 선발하여 아래 SNP이 존재하는 지 여부를 확인하였다.

표 10. Summary of base substitutions and insertions detected in F compared to B from whole genome sequencing data.

Gene ID	Gene	Gene product	Mutation type	Allele F (no. reads)	Allele B. (no. reads)	Effect of Mutation
PPE_00086		23S ribosomal RNA	Substitution	C (44) T (18)	C ()	
PPE_00136	spo0F	sporulation initiation phosphotransferase F (stage 0 sporulation protein F)	Substitution	T (222) C (152)	C ()	pro --> Leu
PPE_01898	fliP	flagellar biosynthetic protein fliP	Substitution	T (356)	G ()	
PPE_02850	SpolIIAF	stage III sporulation protein AF	Insertion	T (197) ' (6)	- ()	
intron(4669458)	-	-	Substitution	T (500)	G ()	

'-' means no insertion was present.

랜덤으로 선발된 콜로니 각 24개(B타입 12개, F타입 12개)로부터 genomic DNA를 추출한 뒤 상기 5 loci의 해당 SNP를 포함하는 부분을 PCR로 증폭하였다. 이 PCR용으로 design된 primer는 다음과 같다.

표 11. SNP 확인을 위해 고안된 primer sets

		Forward	Reverse	Amplicon Length	Tm
PPE_00086	23S ribosomal R NA	GGACCATCTGCCAAGGCTAAATAC (Sense)	CGGAGTTTGACTGAGCTTGGTAAC (AntiSense)	508	65
PPE_00136	Spo0F	AGGTATGGACGGACTCGAAATTCT (Sense)	CTCAACCATAGCGACTCACCTAGT (AntiSense)	215	65
PPE_01898	flip	GACGCATTGAGTACATCCAGCAATA (Sense)	ACACACTGCTACCACTTCAACAA (AntiSense)	208	65
PPE_2850	SpoIIIAF	CGAGCCGATCTATGGAAAGGTATGT (Sense)	ACCGACTGAATTGCTAACCCAGTAT (AntiSense)	301	66
-	Intron	GTGGAGCTTTGTGGGTAGTCATTC (Sense)	GCGAACCTCTGTTTGACCTTAT (AntiSense)	452	65

상기 primer sets을 이용하여 PCR한 결과, single band로 해당 size에 맞게 잘 증폭된 것을 확인할 수 있었다.

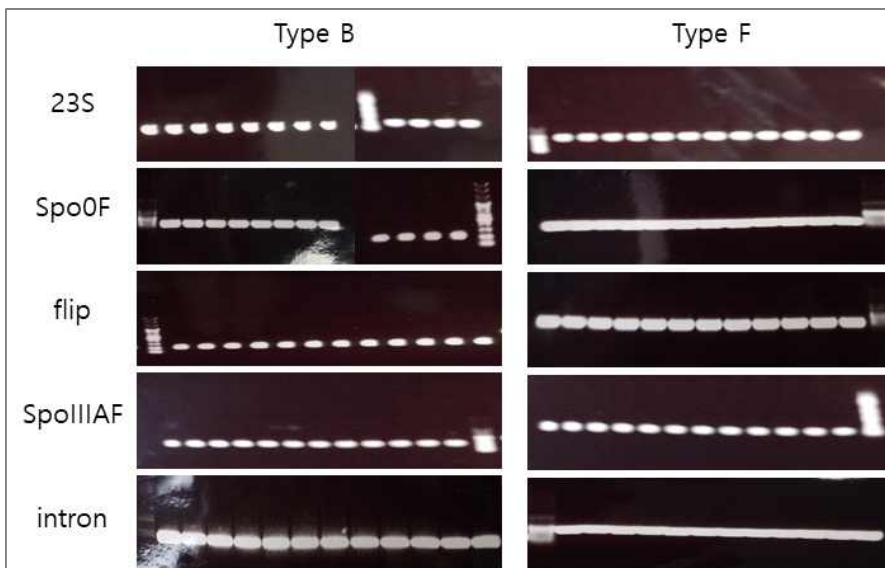


그림 59. 타입 B와 F 콜로니 12개의 genomic DNA를 이용하여, SNP이 있는 부위를 증폭한 사진

증폭된 PCR band 총 120개를 gel elution하여 sequencing한 결과, F타입 및 B타입에서 동일한 SNP은 없었다. 따라서, 이러한 SNP은 PacBio sequencing에 사용된 콜로니에서 일시적으로 발생한 것으로, B와 F타입을 결정짓는 중요한 mutation이 아닌 것으로 판단되었다.

한편, B와 F타입의 중요한 차이가 sporulation 여부에 있으므로, 가장 결정적인 유전자로 주목되는 spo0A 및 spoIIIAF 유전자의 full sequence에서의 변이여부를 상기와 동일한 방법으로 확인하였으나, 모든 DNA 서열이 동일한 것으로 나타났다. 이때 design하여 사용한 primer sets는 아래와 같다.

표 12. SNP 확인을 위해 고안된 primer sets

		Forward	Reverse	Amplicon Length	Tm
Spo0A		TGGAATATCACTCAATGAGGAGGAAGTA (Sense)	CAACTCTCTCCCTTGGTAGAACGA (AntiSense)	1016	65
SpoIIIAF		GAACCAATGCACGTAACCAACAAG (Sense)	GACCAAGAATAAGCAGCCAACGA (AntiSense)	925	65

결론적으로, *Paenibacillus polymyxa* E681의 whole genome sequencing에서 발견된 5개의 SNP은 B와 F타입간의 차이를 설명해주지 못하였다.

VI. Field Trial

1. 시제품 이용 포장 약효검정 (탄저병, 꺾무늬썩음병)

시제품 4종을 포장에서 사과 주요 병해 방제 효과검정을 실시하였다. 문경과 예천에 사과 과원을 임대 후 약효시험을 하였다. 후지 품종을 대상으로 수행하였다. 7월 초부터 10월 말까지 10~15일 간격으로 8~9회 약제 방제를 실시하였다. 무처리, 방제력에 의한 관행약제 처리구, 대조약제처리구 (Tebuconazol WP 25%), 유용미생물 AK-0, APEC123, APEC128, APEC170 시제품 단체 처리구와 AK-0 + APEC123 혼용 처리구로 수행하였다. 또한 AK-0과 APEC123과 대조약제 Tebuconazol WP 25%의 교호살포에 의한 병 방제효과 시험도 수행하였다. 처리구당 3반복으로 실시하였으며, 나무당 20L 정도로 충분히 약제가 묻도록 동력분무기를 사용하여 시행하였다. 병해조사는 15일 간격으로 병징이 보인 과실을 채집하여 이병과 갯수와 병징 크기를 조사하여 병 발생률을 조사하였다.



그림 60. 시제품 약효 포장 검정 실험 과원 전경사진

탄저병 발생은 무처리구에서는 7월하순부터 병징이 나타나기 시작하였으며, 약제와 선발균주 시제품 처리구에서는 8월 초부터 탄저병 과실이 발생되기 시작하였다.

예천포장의 무처리구에서 탄저병 발병이 60.4% 발생하였으며 4종의 시제품 단독 처리구에서는 AK-0 처리구는 24.1%, APEC123은 27.3%, APEC128 41.4%, APEC170 32.1%의 탄저병이 발생하였다. 방제가는 APEC128 (방제가 29%)와 APEC170(방제가 57%)의 방제가가 상대적으로 낮았으며 AK-0 처리구와 APEC123은 70% 이상의 우수한 방제효과를 보였다. 시제품 혼합 처리와 대조약제 교호 살포에서는 시제품 단체 처리 보다 다소 낮은 방제효과를 보여 가설과 다른 결과를 얻었다. 예천 포장에서는 시제품을 처리 시 20% 이상의 탄저병 발생이 있었지만 화학약제 대조구에서도 비슷한 발병률을 보였다. 이는 평

년보다 잦은 비와 고온, 예천 포장의 특성상 산으로 둘러싸인 분지 형태의 포장으로 인해 탄저병이 발병이 높게 나타났다고 판단된다(Fig 6B). AK-0 시제품의 사과탄저병 방제효과는 아주 우수하였다.

문경포장에서는 탄저병 첫 발생이 8월 초순이었으며, 전체 발병률은 무처리구에서 23% 발병하였다. 대조약제와 4종 시제품 단계 처리 시 탄저병 발병율이 12~17%의 발병률로 나타났으며, 혼합처리와 교호살포시에도 비슷한 탄저병이 발생하였다. 문경과 예천 포장에서의 탄저병 병발생율 조사결과, 예천은 무처리구와 비교했을 시 모든 처리구에서 높은 유의성을 나타냈지만 약제 처리구와 AK-0 처리구에서는 통계학적으로 유의성이 없어 약제 처리구와 비슷한 방제효과가 인정되었다. 문경은 전체 병발생율이 20% 내외로 전반적으로 비슷한 병발생이 나타나 통계적 유의성이 없었다.

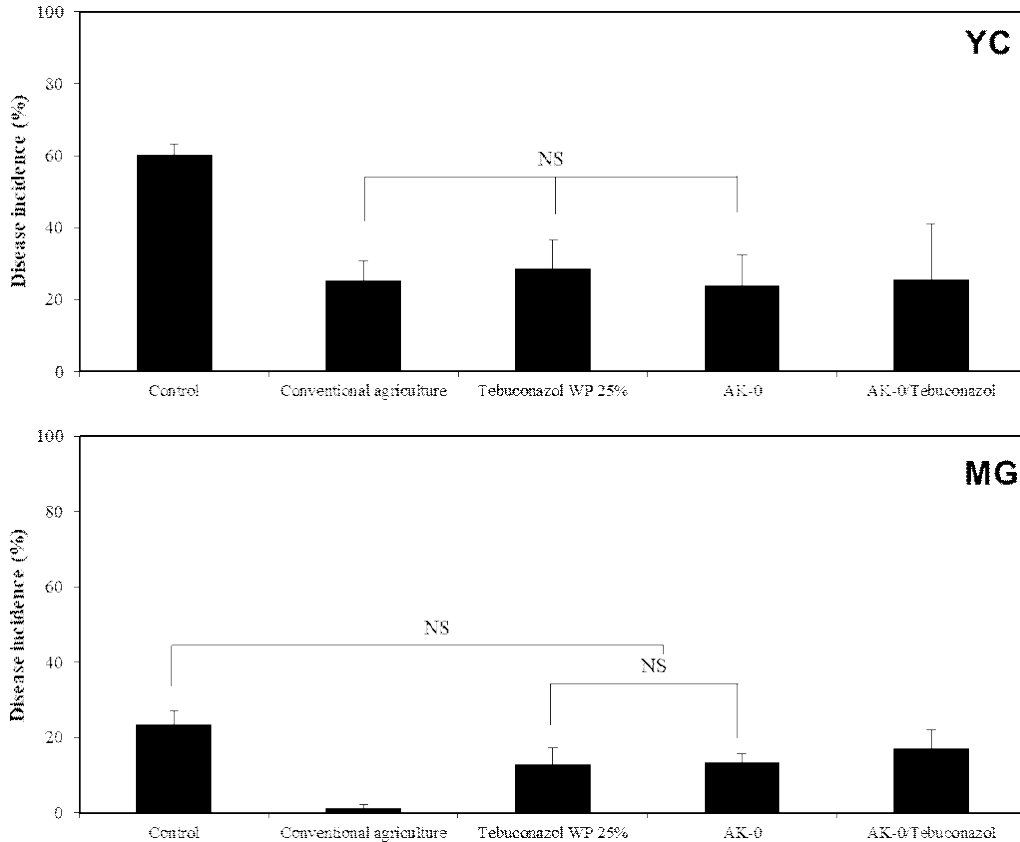


그림 61. 4종 시제품을 이용한 사과탄저병 발생 억제 효과 검정.
(A): 문경 시험포 (B): 예천 시험포

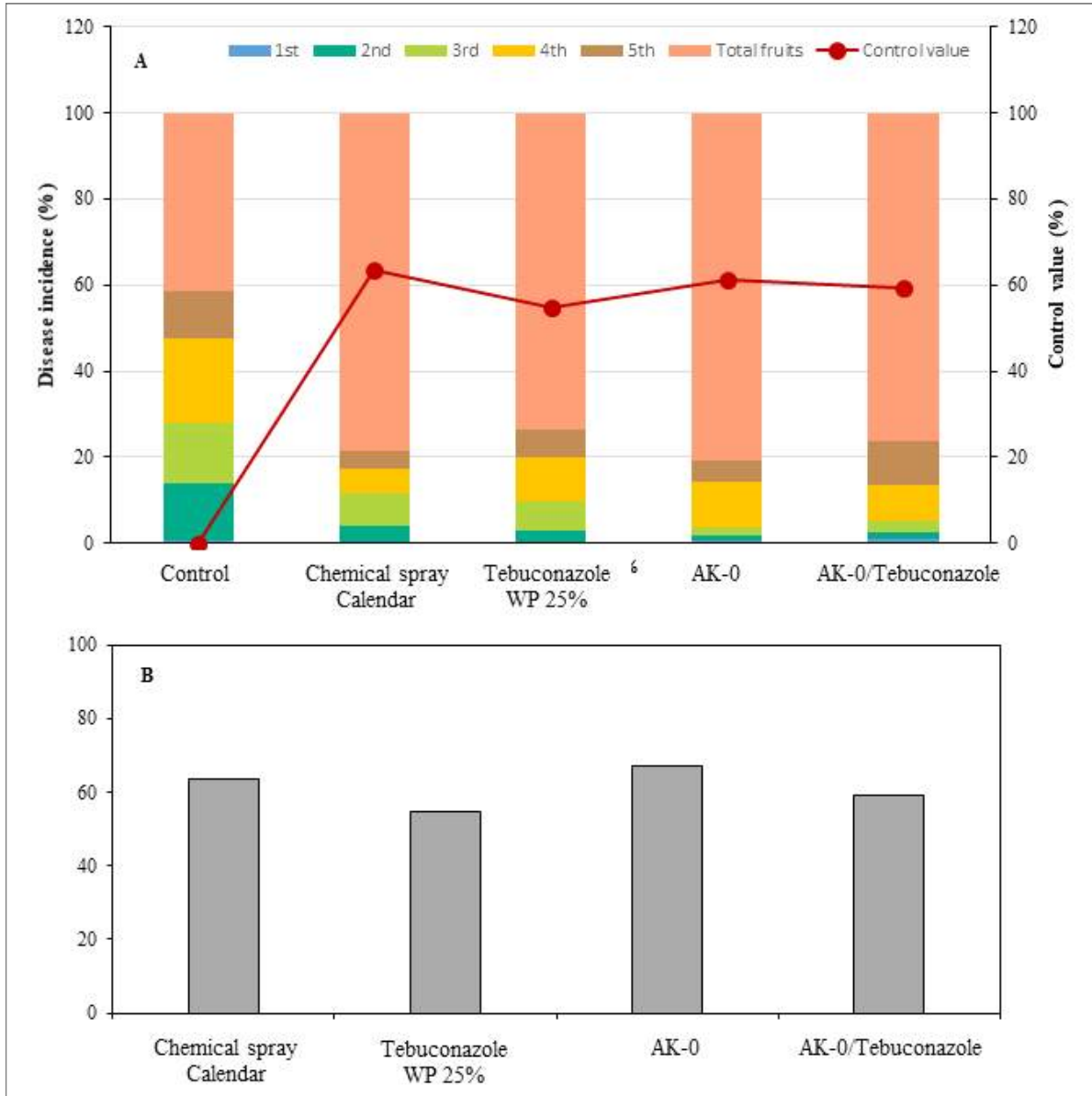


그림 62. 예천 시험포에서 AK-0 시제품의 사과탄저병 방제 효과
(A): 시기별 병 발생도 (B): 방제효과

2. 시제품 이용 앞에 발생하는 병해에 대한 포장 효과검정

문경, 예천 사과 과수원 시험포에 탄저병 방제효과 검정과 같은 방법으로 실험을 실시하였으며, 병 발생률 조사는 농진청 예찰방법을 인용하여 갈색무늬병 발생 상황을 조사하였다. 4종 시제품 단독처리시 높은 방제효과를 보였으며, 그 중 AK-0 시제품(76%)에서 가장 효과가 좋았다(APEC123 63%, APEC128 63%, APEC170 54%). 혼합과 대조구약제 교호 살포 시 시제품 단제 처리보다 다소 낮은 방제효과를 보였으나 무처리와 비교 했을 시 방제효과는 40~50%의 방제효과를 나타내었다.

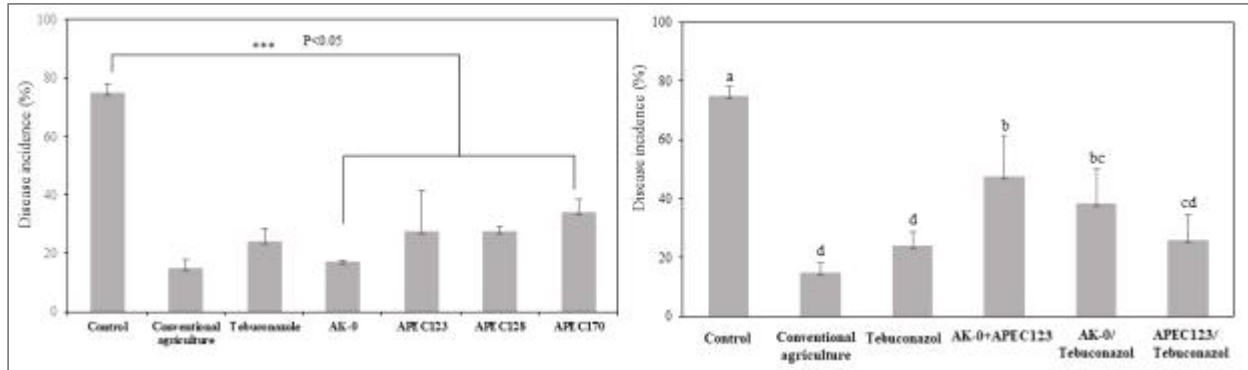


그림 63. 4종 시제품을 이용한 갈색무늬병 발생 억제 효과 검정(예천).

3. 유용미생물 시제품 처리 시 사과 잎의 엽록소 함량 비교

선발 유용미생물 시제품 처리 시 잎의 엽록소 함량을 비교하고자 SPAD를 이용하여 측정하였다. 시제품 처리는 위 탄저병 방제 처리와 동일한 방법으로 처리 된 과원에서 15일 간격으로 총 4번 8월 중순부터 9월 초 까지 1년생 가지의 3~4번째 잎을 조사하였다. 그 결과 엽록소 함량이 무처리구 및 처리구와 비교했을 시 대부분의 처리구에서는 차이가 없었으나, AK-0 시제품 처리구에서는 다소의 차이를 보였다.

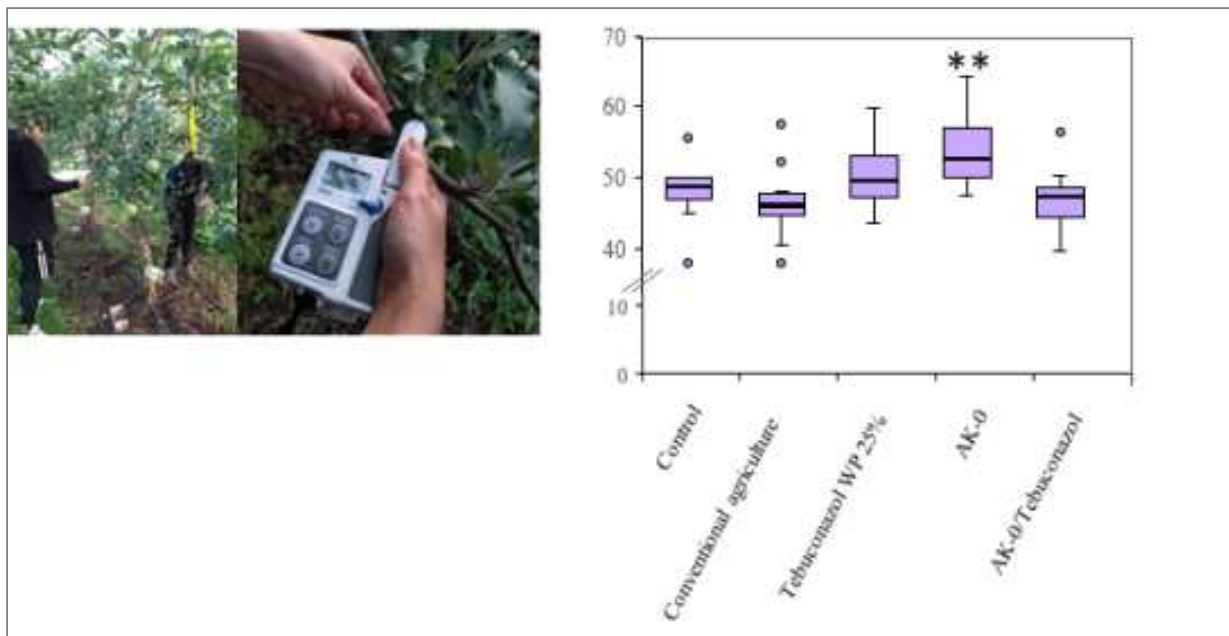


그림 64. 유용미생물 시제품 처리 시 사과 잎의 엽록소 함량 비교(예천)

4. 사과 주요 병의 발생과 날씨와의 상관관계

예천과 문경 지역에서 발생한 사과 탄저병 발병률이 상이하게 차이가 나는 것을 확인하였다. 또한 탄저병 발생이 날씨와의 상관관계를 확인하고 생물학적 방제 시 병 발생 조건을 낮춤으로써, 미생물 제제의 효과를 높이기 위해 병 발생 조건을 분석하였다. 8월~9월까지 발생한 탄저병 발병률과 날씨 요인은

평균 기온, 강수량, 누적강수량, 평균풍속을 이용하여 비교분석하였다.

평균 기온과 강수량, 평균 풍속은 병 발생과 유의성이 없었으며, 누적강수량과 병 발생은 P=0.9로 높은 정도의 상관관계를 보였다. 이에 8~9월 탄저병 발생은 누적강수량과의 관계가 있다고 판단되며 누적 강수량은 습도와도 연관이 있어 과수원의 습도 유지가 탄저병 발생에 중요한 요인으로 작용한다고 판단된다.

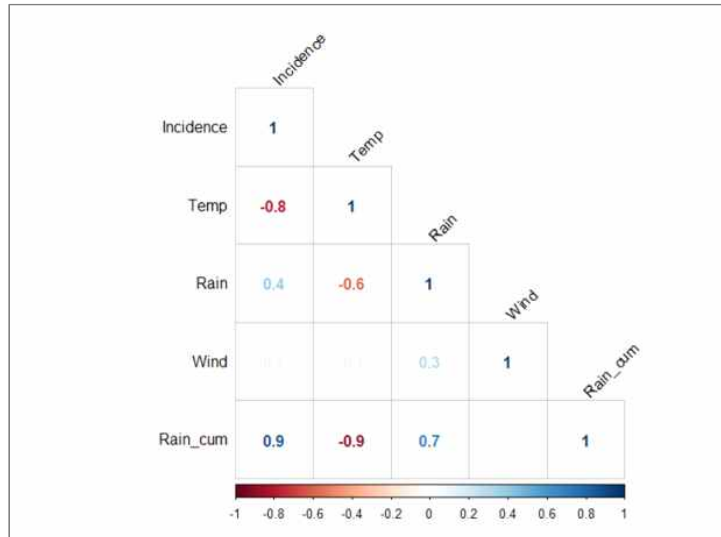


그림 65. 사과탄저병 발생과 날씨 요인과의 상관관계 분석

탄저병 발생은 누적강수량과의 영향이 있다고 판단되나, 예천과 문경의 날씨요인을 분석한 결과 두 곳의 누적강수량에서는 큰 차이가 나타나지 않았다. 예천과 문경의 탄저병 발생률은 40% 정도 차이가 있어 다른 요인이 있을 것으로 판단되어 두 포장에서의 병발생 요인을 분석하였다. 그 결과, 예천과 문경 두 포장에서는 평균 온도와, 강수량, 누적강수량은 차이가 나타나지 않았으나 풍속에서 큰 차이를 보였으며, 이는 탄저병 발생요인으로 누적강수량 즉 습도도 있지만 또 다른 요인으로 풍속도 하나의 요인으로 작용할 수 있다고 판단되었다.

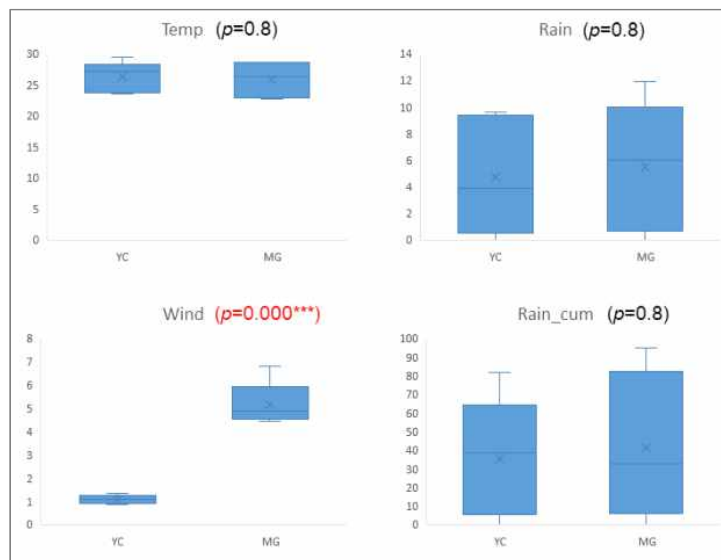


그림 66. 사과탄저병 발생과 날씨 요인과의 상관관계 분석

예천과 문경의 밭 조경도를 비교해보면 문경의 과원은 주변 환경이 도로와, 논으로 구성되어있고 주변 산과의 거리가 멀어 과원의 기류의 흐름이 원활하게 이뤄지고 있으나 예천은 주변 3면이 산으로 둘러 싸여 있고 주변보다 다소 낮은 위치에 과원이 위치하고 있었다. 이에 예천의 포장에서는 풍속도 낮았으며 과원 안에서의 기류가 원활하게 이뤄지지 않아 정체기류 현상으로 사과탄저병의 발병이 문경보다 높게 나타난 것으로 판단되었다. 유용미생물을 이용하여 과수에 병 방제 시 병방제 효과는 과원의 환경에서도 많은 차이가 나는 것으로 연구결과가 나왔으며, 이에 따라 생물학적 방제를 진행함에 있어 과원 환경조성 또한 중요한 요인으로 생각되었다.



그림 67. 예천(좌)과 문경(우) 과수원 주변환경 모습

5. 포장에서의 고추탄저병 방제효과 검증

2020년 고추탄저병 생물학적방제를 위한 포장 실증실험을 진행하였다. 실증실험 포장은 안동대학교 온실의 고추포장에서 실시하였다. 실험에 사용된 고추(거창한, 사타카코리아)는 5월 17일 정식하였다. 재식방법은 고랑 간격 1m, 재식간격은 40cm로 하였고, 잡초방제를 위하여 이랑에 부직포를 덮었다. 시험구의 배치는 난괴법 4 반복으로 수행하였다. 포장에서 탄저병의 발생은 인공적으로 접종하지 않았다. Positive control은 화학약제 Pyraclostrobin을 사용하였으며, Negative control은 수돗물을 사용하였다. 길항세균은 시제품으로 나와 있는 GYUN-8, AK-0약제를 사용하였다. 약제처리는 관주, 살포+관주, 살포로 나누어 진행하였다. 관주처리는 고추 1주당 500ml를 관주 처리하였으며, 살포 처리구 경우 한 처리구당 5L 씩 살포처리 하였다.



그림 68. GYUN-8, AK-0를 이용하여 고추탄저병 방제 실외실험

□ 고추 탄저병 발병조사

안동대학교 시험포장에서 고추탄저병 발병조사를 실시하였다. 2020년 8월 31일을 9회차 방제를 마지막으로 10일 후 모든 고추를 수확하여 조사를 실시하였다. 조사 방법은 농촌진흥청의 작물 병해충 조사 방법과 기준에 준하여 실시하였으며, 각 처리구에서 발병도를 환산(%)하였다. 각 처리구의 방제효과는 무처리구의 발병도를 기준으로 아래 식에 의하여 방제가(%)를 계산하여 각 처리구를 비교하였다.

$$\text{열매에 발생하는 병 발병률 (\%)} = \frac{\text{발병과실} - \text{건전과실}}{\text{전체수확량}}$$

$$\text{전수조사 방제가(\%)} = \left(1 - \frac{\text{처리구 발병과율(\%)}}{\text{무처리구 발병과율(\%)}} \right) \times 100$$

길항세균의 단독 처리를 통하여 고추 탄저병에 대한 발병률을 확인하였다. 2020년 경우 이상 기후로 인하여 돌발 강우의 횡수 증가와 짧으면 2~3일 길게는 22일 연속 강우가 있었다. 이러한 이유로 화학약

제의 살포횟수가 증가함에 따라 약제 저항성 고추 탄저병균의 발생 가능성이 높아졌다. 또한, 잦은 강우와 연속강우 일수가 길어 약제 살포시기를 맞추기 힘든 실정이다. 이러한 기후 조건으로 비싼 화학약제를 자주 사용하여 농민들이 경제적으로 피해를 입고 있는 실정이다.

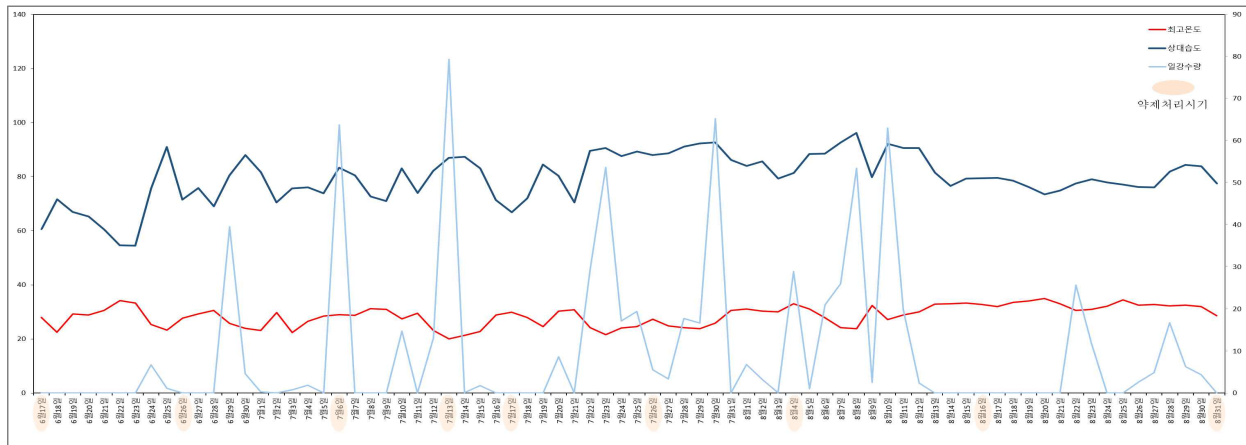


그림 69. 2020년 6월17일~8월 31일 일일 최고기온, 강우량, 상대습도

당해 포장시험은 연속된 강우로 인해 적기에 약제 살포를 하기 힘들었으며, 약제 살포 후 몇 시간 되지 않아 폭우가 쏟아지는 등 포장시험에 어려움이 있었다. 그로인해 전반적으로 방제효과가 없었다. 그럼에도 포장 시험 결과를 분석하면 다음과 같다.

2020년 8월 31일 9회차 방제를 하고 10일 후 탄저병 발병률을 조사하였다. Chemical 처리구에서 81.08%로 발병률이며, AK-0 처리구 83.73%, GYUN- 86.02%의 발병률을 나타냈다.

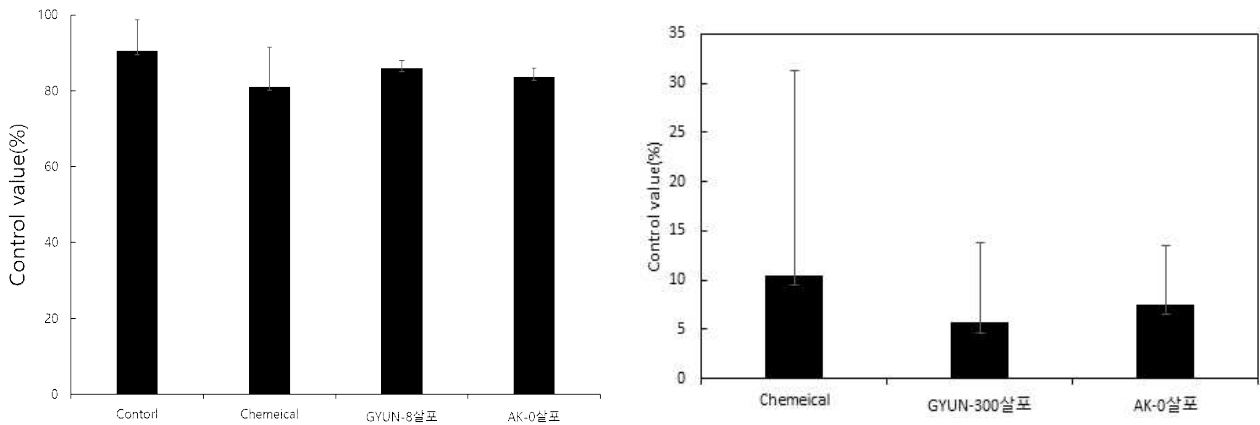


그림 70. 좌. 길항세균 단독 처리를 통한 고추탄저병 발병률, 우.길항세균 단독 처리를 통한 고추탄저병 방제가

6. 시설재배지에서의 오이흰가루병 방제효과 시험

오이흰가루병의 포장 실증 실험은 경상북도 안동시 남선면의 시설재배지에서 실시하였다. 약제 살포 기간은 7월 19일을 1회차 방제로 10일 간격으로 8월 28일 까지 방제를 하였다. 200ml/20L(x100), 40ml/20L(x250), 20ml/20L(x500) 세 가지 농도로 살포 처리를 하였다.



그림 71. GYUN-8, AK-0 시제품을 이용하여 오이흰가루병 예방효과 검정

수동 농약 살포기를 이용하여 한 처리구당 10 L 경엽살포하였다. 조사 방법은 농약등록시험 약효·약해분야 세부지침의 기준에 준하여 실시하였으며, 각 처리구에서 발병도를 환산(%)하였다. 각 처리구의 방제효과는 무처리구의 발병도를 기준으로 아래 식에 의해서 방제가(%)를 계산하여 각 처리구를 비교하였다.

$$\text{발병도}(\%) = \frac{\sum(\text{발병수} \times \text{계수})}{4N} \times 100$$

구당 108엽(구당 12주, 주당 9엽) 이상에 대한 병반면적률을 아래와 같이 조사한 후 발병도로 환산하였음

- 0 : 발병무
- 1 : 병반면적률 1~5%
- 2 : 병반면적률 5.1~20%
- 3 : 병반면적률 20.1~40%
- 4 : 병반면적률 40.1% 이상
- N : 조사엽수

$$\text{전수조사 방제가}(\%) = \left(\frac{\text{처리구 발병엽율}(\%)}{\text{무처리구 발병엽율}(\%)} \right) \times 100$$

오이흰가루병의 GYUN-8 x100희석 처리구에서 방제가는 26.03%이며 AK-0 x100희석 처리구는 44.77%이다. Chemical의 방제가가 42.79%임을 감안하여 AK-0 시제품의 경우 흰가루병 친환경방제제로 사용할수 있을 것으로 판단이 되었다.

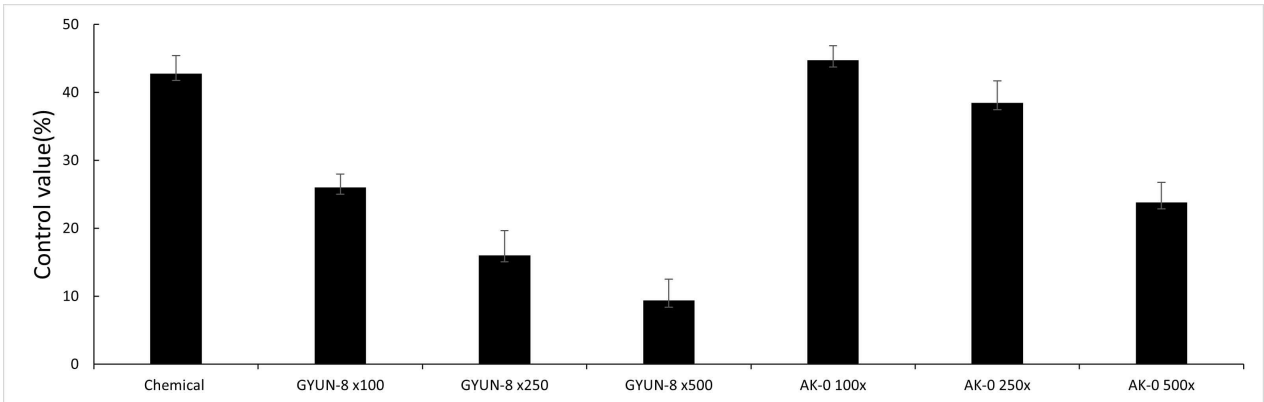


그림 72. 오이흰가루병 예방 약제효과 방제가

VII. 제제화

1. 유용미생물의 배양성 확인 및 미생물제 제제화 고려요인 분석

□ 유용미생물의 배양성 확인

5종의 유용미생물(*Bacillus amyloliquefaciens* AK-0, *Paenibacillus polymyxa* APEC128, *Paenibacillus polymyxa* E681, *Serratia plymuthica* APEC123, *Bacillus subtilis* APE170)의 대량배양을 위한 배지를 선발하였다. 배지는 당사 고려바이오 (주)에서 사용하고 있는 일반적인 산업용 배지(M-204, KCS, KAM) 3종과 실험용 배지(TSB, NA, LB) 3종을 이용하였다. 그 결과, 실험용 배지인 TSB, 산업용 배지인 KAM에서 우수한 배양성을 보였으며, 산업용 배지인 KAM은 완전 수용성으로 고형물이 남지 않아 제제화 및 제형화 과정에서도 유리할 것으로 판단된다.

표 13. 유용미생물 5종의 배지별 배양성

	TSB	NA	LB	M-204	KCS	KAM
<i>B. amyloliquefaciens</i> AK-0	8.7	1.7	0.9	3.6	0.5	11.2
<i>P. polymyxa</i> APEC128	6.4	1.1	1.1	2.5	0.4	6.8
<i>P. polymyxa</i> E681	8.5	0.8	0.7	3.1	0.3	8.4
<i>S. plymuthica</i> APEC123	6.8	1.0	0.9	2.6	0.2	6.6
<i>B. subtilis</i> APE170	9.3	1.8	1.6	6.3	0.9	10.7

(10⁸ cfu/ml)

□ 미생물제 제제화 고려요인 분석

미생물제의 제제화를 위해서 고려할 요인으로는 첫번째는 유용미생물의 배양성, 배양액의 물성 및 안정성, 두번째는 제형화 과정에서의 유용미생물의 안정성, 세번째는 식물체에 살포 후 시설이나 자연환경의 영향 및 사용상의 편의성이다. 첫번째 고려요인은 상기의 시험을 통해 확인하였으며, 두번째는 분말 또는 입상, 액상 제형 중에서 유용미생물이 안정적으로 생존할 수 있는 제형을 선택해야 한다. 분말 또는 입상 제형화를 위해서는 필수적으로 중간제형인 수화제 형태로의 제형화 과정이 필요하며, 이를 위해 동결건조 또는 분무건조 과정을 거치게 된다. 동결건조의 경우 열에 민감한 원료를 분말화 할 수 있는 장점이 있는 반면 대량으로 처리 시 오랜 시간이 소요됨에 따라 고비용이 발생하는 단점이 있다. 분무건조의 경우 빠른 시간 내에 액상의 형태를 건조된 미분말 형태로 변화시킬 수 있는 장점이 있는 반면 180° C 내외의 열처리를 거치게 되어 미생물의 안정성에 영향을 주는 단점이 있다. 또한 분말화 된 미생물의 경우 다른 보조제와의 혼합 시 제제화 과정에서 수화제 형태를 안정화하기 위해 여러가지 문제점이 예상된다. 세번째는 식물체에 살포 후 시설이나 자연환경에서의 영향 및 사용상의 편의성을 위해 선행연구를 통해 확인된 자외선차단제, 보습제 등의 보조제를 이용하여 유용미생물의 생존에 악영향을 미치는 조건들을 배제하고 농가 사용상의 편의성을 위해 물에 희석하여 경엽처리와 관주처리가 용이한 액상 제형이 적합할 것으로 판단된다.

□ 안정제, 부형제, 동결보호제 등 제제화용 보조제 선발

○ 천연유래 항균물질을 이용한 효력증진제 선발

효력을 증진시키기 위한 첨가제 선발을 위해 당사가 보유 중인 천연유래 항균물질 10종(Azadirachtin, Campor oil, Cinnamaldehyde, Cinnamon oil, Lemon grass oil, Oregano oil, Rosin, Tee tree oil 2종, Thyme oil, Trupentine oil)의 탄저병균(*Collectotrichum gloeosporioides*)에 대한 실내 항균효과 시험을 진행하였다. 이 중 우수한 항균 효과를 보인 성분들을 선발하여 각각의 유효농도를 확인하였다. 배지혼입 법으로 진행한 1차 선발시험 결과 Azadirachtin, Cinnamaldehyde, Cinnamon oil, Oregano oil, Thyme oil 에서 우수한 항균력을 확인하였으며, 상기의 항균물질들을 억제대법(halo test)을 통해 유효농도를 확인 하였다.

표 14. 천연유래 항균물질의 탄저병균에 대한 항균력 확인

No.	천연유래 항균물질	항균효과
1	Azadirachtin	◎
2	Campor oil	△
3	Cinnamaldehyde	◎
4	Cinnamon oil	◎
5	Lemon grass oil	○
6	Oregano oil	◎
7	Rosin	△
8	Tee tree oil A	△
9	Tee tree oil B	△
10	Thyme oil	◎
11	Trupentine oil	△
12	Control	-

* 항균효과 : ◎ 우수, ○ 양호, △ 보통, × 불량

표 15. 유용미생물의 효과를 증진시키기 위한 첨가제 선발 및 유효농도 검정

	항균효과(halo size)*				
	5%	10%	15%	20%	25%
Azadirachtin	×	△	△	○	◎
Cinnamaldehyde	△	○	○	◎	◎
Olegano oil	○	○	○	◎	◎
Thyme oil	△	○	△	○	◎

* 항균효과(mm) : ◎ 10이상, ○ 5~10, △ 2~5, × 2 이하

○ 유화제, 분산제, 물성조정제 등 보조제 선발

유용미생물과 선발하고자 하는 보조제(안정제, 부형제, 증점제 등)와의 상호 조건 등을 고려하여 유기 농업자재로 활용 가능한 EPA inerts ingredient list 4에 해당하는 다양한 계면활성제들과의 물성, 안정성 등의 비교시험을 진행하였으며, 각 성분별 유효농도를 확인하였다. 보습제와 UV차단제는 선행연구를 통해 기 선발된 성분과 투입농도에 따른 성능을 재검증하였다. 최종 시제품 제조 시에는 이화학적 안정성 및 희석배수 등을 고려하여 투입농도를 결정할 예정이다.

- 생분해성 접착제를 이용한 부착성 증진제 시험

후보물질로 Rosin, 라놀린오일, 파라핀오일을 선정하여 유효성분을 탄저병 균사체 및 식물체에 오래 유지시켜 유효성분의 효과를 증진시키고자 하였다. 각각의 후보물질을 미생물배양액과 혼합한 혼합액을 1,000배로 희석하여 식물체 잎에 경엽살포하여 식물체 잎에 묻는 양상을 유관관찰하고 식물체 잎 1g 내에 존재하는 미생물의 양상을 현미경으로 관찰한 결과 Rosin 1.0% 이상에서 우수한 부착성을 보였다.

표 16. 생분해성 접착제를 이용한 부착성 증진제 선발 및 유효농도 검정

	처리농도				
	0.1%	0.2%	0.5%	1.0%	1.5%
Rosin	×	△	○	◎	◎
라놀린 오일	×	×	△	△	○
파라핀 오일	×	×	△	○	◎

* 부착정도 : ◎ 우수, ○ 양호, △ 보통, × 불량

- 계면활성제를 이용한 확산제 시험

대부분의 곰팡이들의 균사와 식물체의 표면은 인지질층과 큐티클층으로 이루어져 있어 약제가 잘 묻지 않는다. 이를 보완하여 유효성분이 탄저병 균사체와 식물체 표면에 잘 묻게하기 위해 부착성과 확산성이 우수한 보조제(EPA inerts ingredient list 3, 4)를 선발한 결과, 확산정도와 분산정도가 polyalkyleneoxide modified heptamethyltrisiloxane 4% 이상에서 우수한 효과를 확인하였다.

표 17. 확산제 선발 및 유효농도 검정

	EPA List	확산정도					분산정도				
		1%	2%	4%	6%	8%	1%	2%	4%	6%	8%
polyalkyleneoxide modified heptamethyltrisiloxane	4B	○	○	◎	◎	◎	△	○	◎	◎	◎
polyxyethylene tridecylether	3	×	×	△	○	◎	×	△	○	○	○
oleic acid	4A	×	×	△	△	○	×	△	△	○	○

* 확산정도/분산정도 : ◎ 우수, ○ 양호, △ 보통, × 불량

- 보습제를 이용한 미생물 발아촉진제 시험

유용미생물의 발아를 위해 목적 부위에서의 적정습도가 요구되어 제품 살포 후 미생물 주위의 미세 환경 내 습도를 유지할 수 있는 보습제를 선발하고자 하였다. 선행연구를 통해 선발된 Na-PCA의 유효농도를 재확인 한 결과, Na-PCA 0.5% 이상에서 높은 발아 수를 보였다.

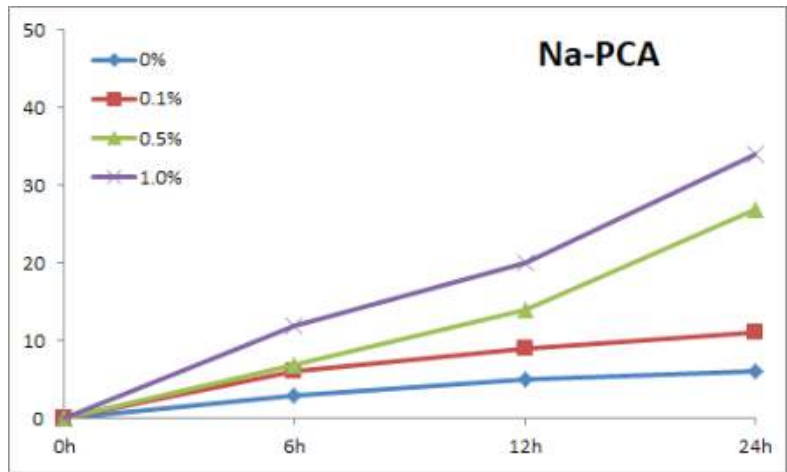


그림 73. 보습제를 이용한 미생물 발아촉진제 유효농도 검정

- 자외선 차단제를 이용한 미생물 피해 최소화 시험

목적 부위에 부착된 미생물은 노지 또는 시설 내로 투과되는 자외선에 의해 그 활성이 급격히 소실되므로 유용미생물의 안정적인 활성 유지를 위해 자외선을 차단 또는 흡수할 수 있는 성분을 선별하여 제제화에 적용하고자 하였다. 선행연구를 통해 선별된 Lowilite 62의 유효농도를 재확인한 결과, 제품 내 1% 이상의 투입이 필요할 것으로 확인되었다.

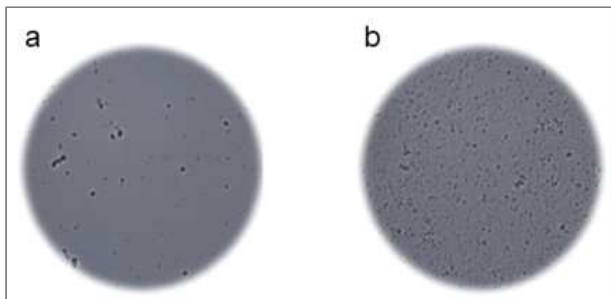


그림 74. 자외선 차단제를 이용한 미생물의 피해 최소화 물질 검정. (a) 무처리, (b) 1% of Lowilite 62

- 주성분 및 첨가제의 혼합에 따른 물성조정제, 안정제 시험

유용미생물과 상기의 시험들로 선별된 효력증진제, 보조제 등의 유화 및 물성안정을 위해 EPA inerts ingredient list 4에 속하는 계면활성제를 농도별로 혼합하여 유화정도를 육안으로 관찰하였으며, methyloleate가 4% 이상에서 우수한 유화성을 보였다.

표 18. 주성분과 첨가제의 혼합에 따른 물성조정제(안정제) 선별 및 유효농도 검정

	EPA List	유화 정도				
		1%	2%	4%	6%	8%
polyoxyethylene dodecyl mono ether	4B	×	○	○	◎	◎
polyoxyethylene methyloleate	4B	×	×	×	△	△
methyloleate	4B	×	○	◎	◎	◎
Polyoxyethylene Sorbitan monooleate	4B	×	×	△	○	○

* 유화정도 : ◎ 우수, ○ 양호, △ 보통, × 불량

2. 제제화 및 제형화(액상 또는 분말) 최적화 조건 설정

□ 유용미생물에 적합한 제형 결정

유용미생물의 분말 및 입상 제형화를 위한 방법 중 동결건조는 유용미생물이 농축되어 미생물의 밀도는 상승하였으나 대량처리 시 처리시간에 비례하여 발생하는 고비용의 문제가 있었으며, 분무건조는 고열처리로 인한 유용미생물의 안정성이 문제가 되었다(그림 20.). 상기의 제제화 고려요인 분석과 유용미생물의 동결건조 및 분무건조 시험을 통해, 제형화 과정이나 환경의 영향 및 사용상의 편의성을 고려하여 최종 제형은 액상으로 결정하였다.

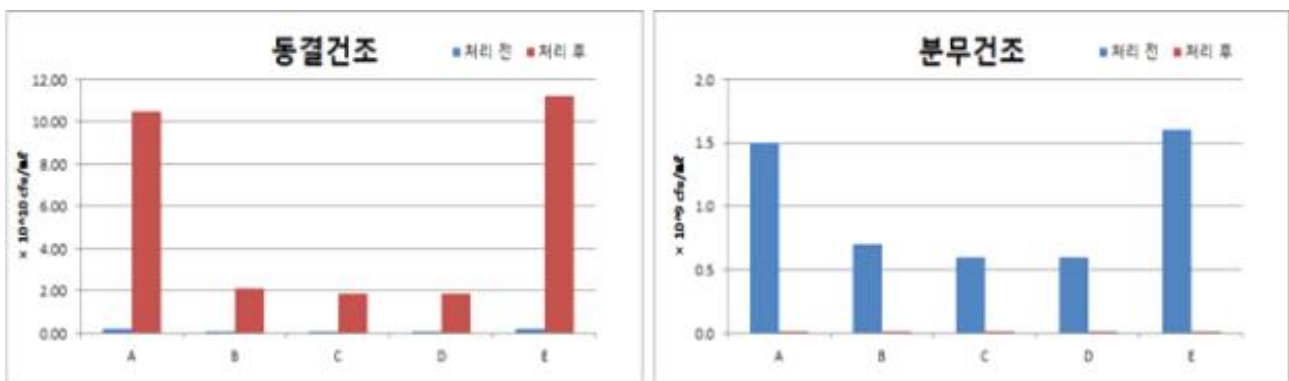


그림 75. 분말 및 입상 제형화 과정 중 유용미생물의 안정성 검정.

A: *B. amyloliquefaciens* AK-0, B: *P. polymyxa* APEC128, C: *P. polymyxa* E681, D: *S. plymuthica* APEC123, E: *B. subtilis* APE170

□ 각각의 보조성분들과 미생물과의 다양한 조건에서 안정성 확인

선발된 보조성분들과 5종의 유용미생물 혼합물의 물리적, 이화학적 안정성 및 미생물 안정성 확인을 위하여 임시 혼합배합을 결정하여 온도별(-4, 25° C(상온), 50° C)로 보관하였다. 보관 10주차까지 각 온도에서 혼합배합의 물성이나 이화학적 성분의 변화는 없었으며, 3가지(*P. polymyxa* APEC128, *P. polymyxa* E681, *S. plymuthica* APEC123) 미생물의 혼합배합에서 50° C 보관 시 미생물 안정성이 유지되지 못하는 것으로 확인되었다.

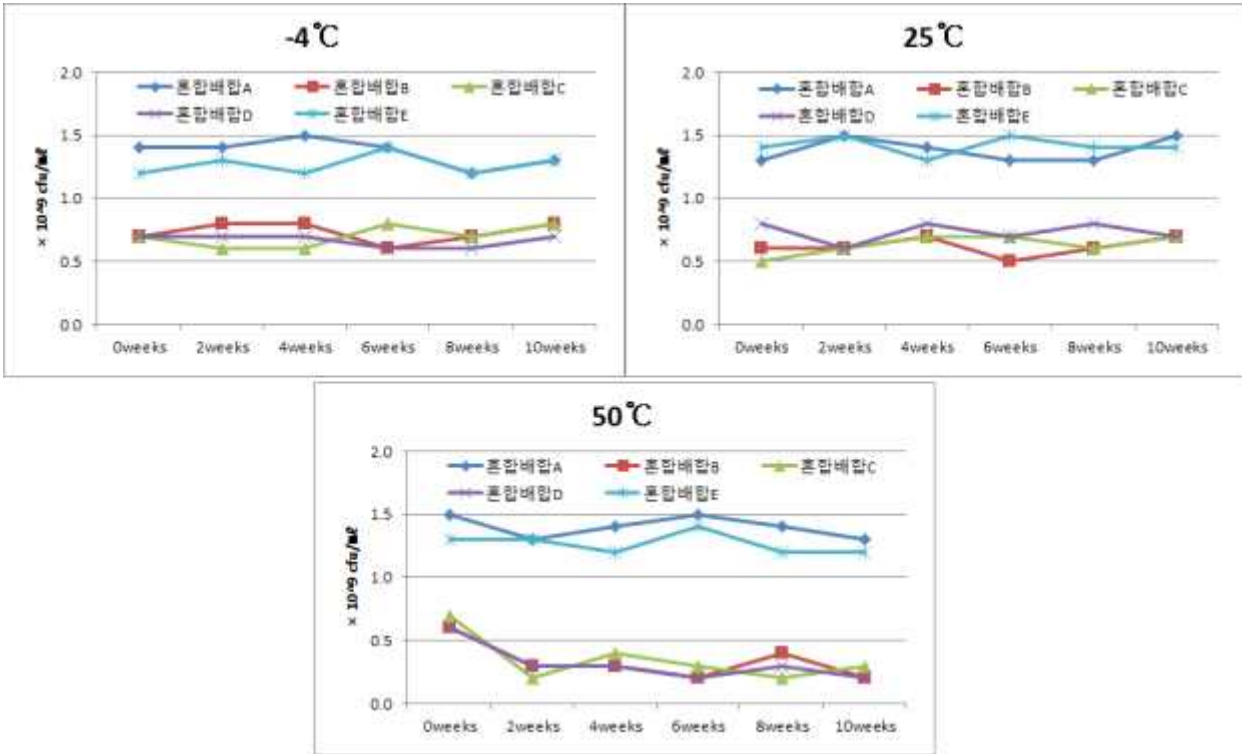


그림 76. 보조성분들과 유용미생물 임시 혼합배합의 온도별 미생물 안정성 검정.

혼합배합A: *B. amyloliquefaciens* AK-0, 혼합배합B: *P. polymyxa* APEC128, 혼합배합C: *P. polymyxa* E681, 혼합배합D: *S. plymuthica* APEC123, 혼합배합E: *B. subtilis* APE170

3. 선발 균주의 제제화 및 대량생산 최적화 확립

□ 온도, 배양시간, 산업용 배지 등 생산최적화 조건 확립

4종의 유용미생물을 대량생산하기 위하여 1차년도 연구결과에 의해 선발된 산업용배지(표 3)를 이용하여 다양한 배양조건에서의 배양성을 확인하였다. *Bacillus amyloliquefaciens* AK-0 균주는 32±0.5 °C, 150 rpm의 배양조건으로 48 시간 배양 시 최대 배양성을 보였으며, *Paenibacillus polymyxa* APEC128 균주는 30±0.5 °C, 125 rpm의 배양조건으로 48 시간 배양 시 최대 배양성을 보였다. *Serratia plymuthica* APEC123 균주는 30±0.5 °C, 150 rpm의 배양조건으로 36 시간 배양 시 최대 배양성을 나타내었으며, *Bacillus subtilis* APEC170 균주는 30±0.5 °C, 150 rpm의 배양조건으로 48 시간 배양 시 최대 배양성을 나타내었다.

표 19. 산업용배지(KAM) 조성

원료명	투입양(g)	원료명	투입양(g)
Glucose	5.45	FeSO ₄	0.005
MSG	3.25	MgSO ₄	0.08
Yeast Extract	0.67	MnSO ₄	0.005
KH ₂ PO ₄	0.27	CuSO ₄	0.003
CaCl ₂	0.27	ZnSO ₄	0.003
		Water	1ℓ



그림 77. 유용미생물 대량생산 공정에 사용되는 Multi-room incubator

□ 유용미생물 대량생산 공정 최적화 확립

각각의 유용미생물의 배양에 적합한 배양조건을 활용하여 대용량 퍼멘터를 사용하여 대량생산을 위한 공정을 최적화하였다. 대용량 퍼멘터를 이용한 배양 시 소용량 배양에 비해 최종 배양 밀도가 근소하게 증가하였으나 큰 유의차는 보이지 않았다.

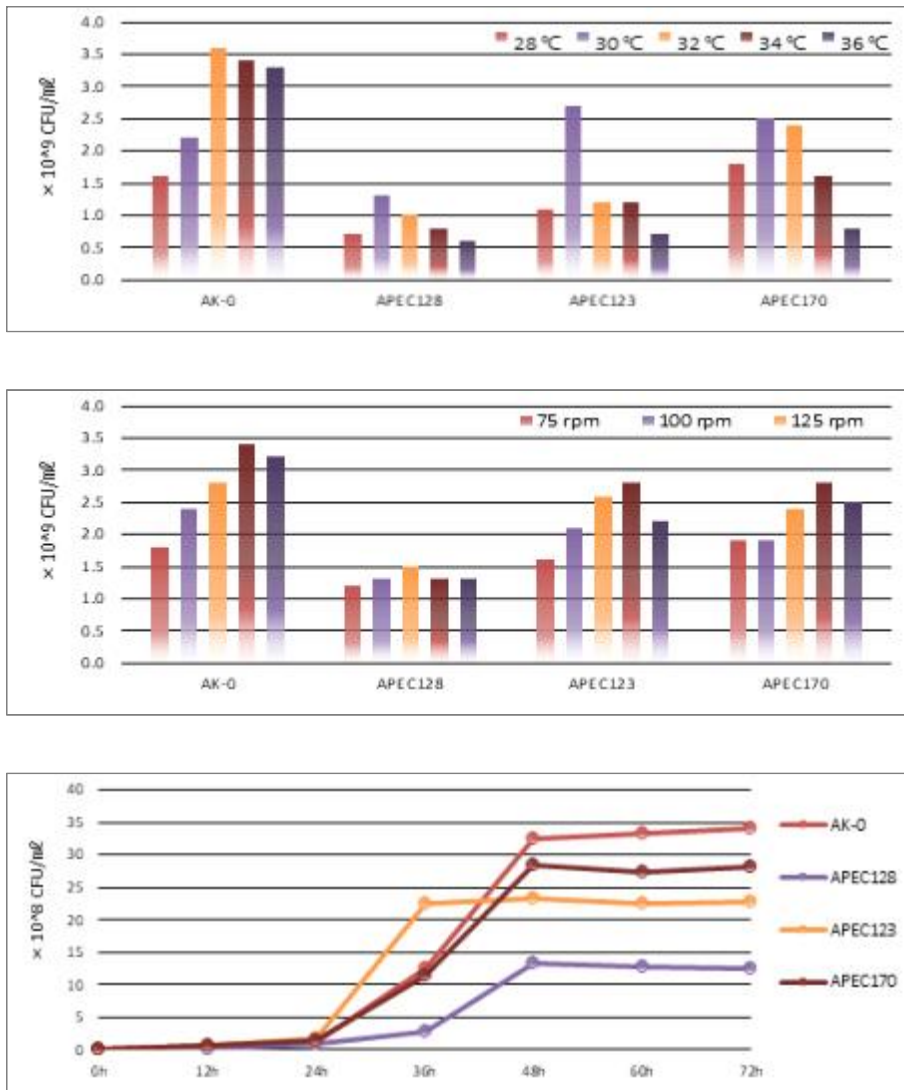


그림 78. 배양온도(상), 교반속도(중), 배양시간(하)에 따른 유용미생물의 배양성 확인

□ 제제화 및 제형화 공정 최적화

4종의 유용미생물(AK-0, APEC128, APEC123, APEC170)과 1차년도 연구결과를 토대로 선발된 효력증진용 첨가제(80% Oregano oil), 부착성 증진제(36% Rosin), 계면활성제(polyalkyleneoxide modified heptamethyltrisiloxane), 보습제(Na-PCA), 자외선 차단제(Lowilte -62), 안정제(methylolate)를 이용한 생산 공정을 확립하고 시제품의 최종배합을 결정하였다.

표 20. 시제품 최종 배합

구분	원료명	투입비율(%)
유효성분	미생물배양액	85.0
효력증진용 첨가제	80% Oregano oil	5.0
부착성 증진제	36% Rosin	1.0
제제화용 첨가제	계면활성제 polyalkyleneoxide modified heptamethyltrisiloxane	4.0
	보습제 Na-PCA	0.5
	자외선차단제 Lowilte-62	1.0
	안정제 methylolate	4.0

시제품의 생산 공정은 각 원료의 특성에 맞추어 투입순서를 결정하였다. 미생물배양액에 보습제와 자외선차단제를 순차적으로 투입하여 혼합하고(tank 1), 미생물배양액과 혼합하기 위해서 유화가 필요한 효력증진용 첨가제와 부착성 증진제는 안정제와 따로 혼합하여 10분 동안 교반하고 계면활성제를 투입하였다(tank 2). 각각의 tank를 30분 동안 충분히 교반한 뒤, 최종적으로 tank 1과 tank 2를 혼합하여 10~20분 동안 교반하여 시제품을 생산하였다. 생산된 시제품은 제품 내 유용미생물의 밀도와 오염미생물 여부를 검사하고, 이화학적 물성을 확인하여 이상이 없을 경우 포장하여 출하하였다.



그림 79. 유용미생물 대량생산 공정

4. 시제품 제조

시제품의 생산공정은 아래와 같다.

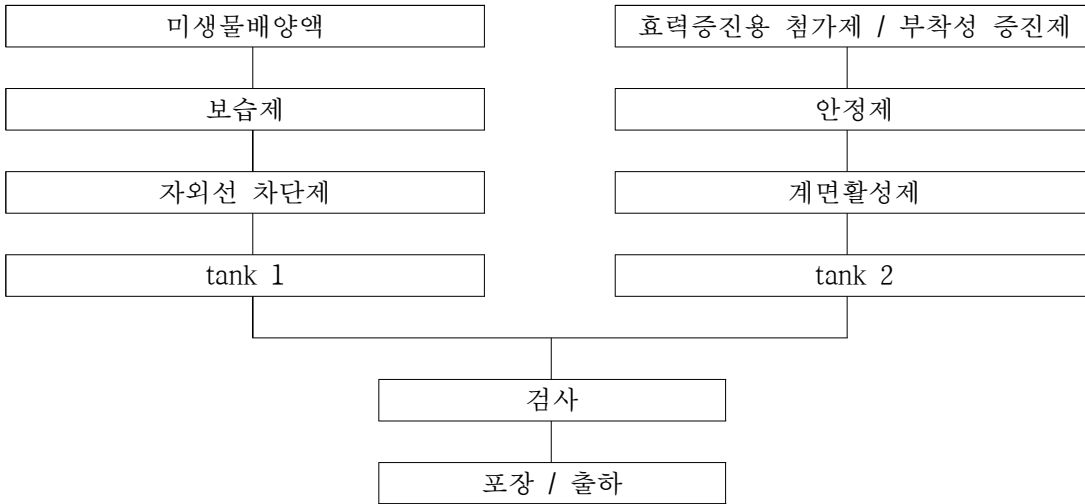


그림 80. 시제품 생산 공정도

시제품 제조시 사용되는 액상 혼합기 및 생산제품의 검사, 포장은 아래 사진에서 나타내었다.



그림 81. 액상혼합기 및 시제품 검사



그림 82. 시제품 출하를 위한 포장

□ 시제품의 유통기한 확립을 위한 조건별 경시적 안정성 조사

시제품의 유통기한을 결정하기 위해 생산된 시제품을 각각 4 °C, 25 °C, 40 °C incubator에 보관하면서 1개월 단위로 소량 채취하여 시제품 내 유용미생물 밀도 및 물성의 변화를 경시적으로 관찰하였다. 유용미생물의 밀도변화는 TSA배지를 이용하여 평판도말법으로 확인하였고, 물성변화는 물에 유화되는 정도 및 물리적 변화를 육안으로 확인하였다. 4종의 시제품은 11개월 동안 각각의 온도에서 미생물의 밀도가 안정적으로 유지되었으며, 물리화학적 변화도 관찰되지 않았다.

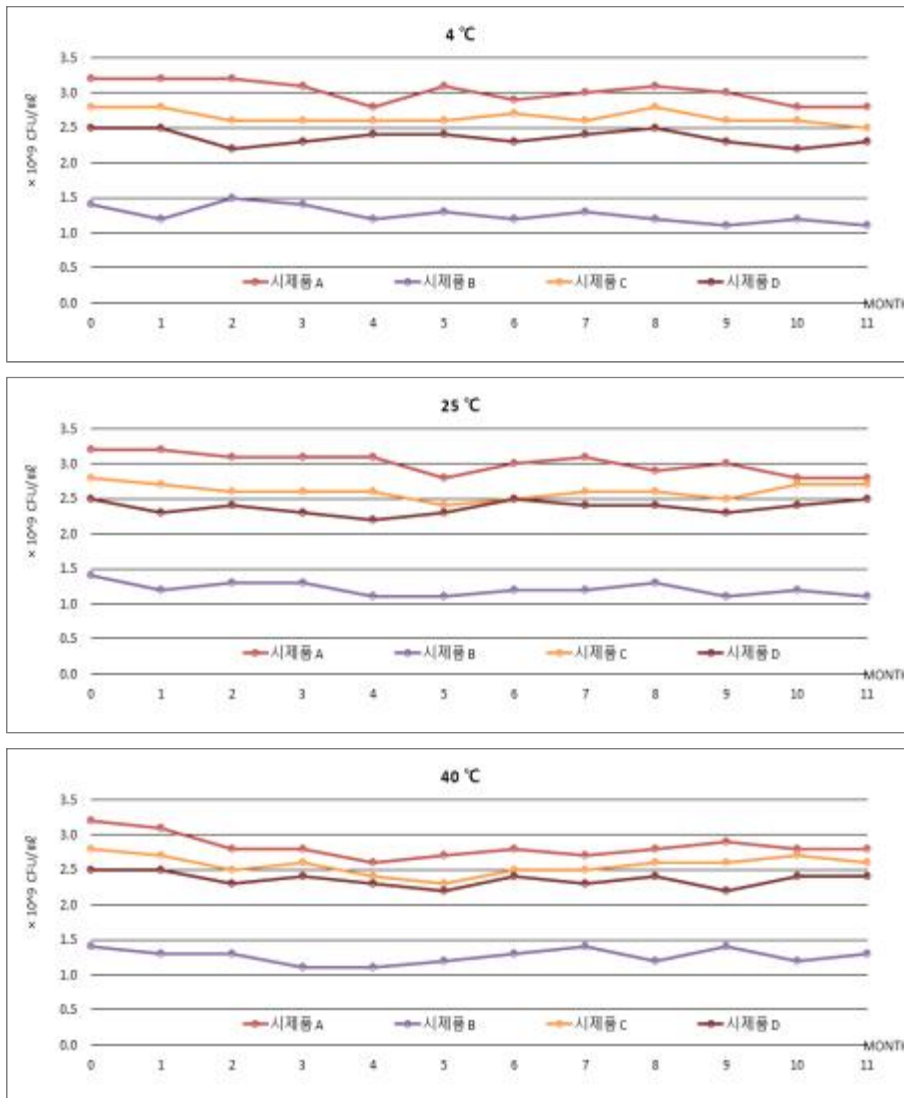


그림 83. 보관온도별 시제품의 유용미생물 밀도 경시적 변화



그림 84. 생산된 시제품(포장전). 시제품A : AK-0, 시제품B : APEC128, 시제품C : APEC123, 시제품D : APEC170



그림 85. AK-0 시제품

VIII. 실증시험

1. 시제품의 효과검증

□ 시제품을 이용한 작물별 성장촉진 효과 검증

시제품 4종(탄저킬, 세라탄, 시제품C, 시제품D)의 작물성장촉진 효과를 확인하기 위하여 고려바이오(주) 온실에서 과채류인 토마토, 고추 유묘에 pot시험을 수행하였다. 시제품 내 유용미생물의 밀도를 고려하여 500배 희석액을 1주일 간격으로 3회 관주처리 하였다. 시험결과, 시제품C는 무처리구 대비 초장이 고추 76.2%, 토마토 84.7% 신장되었고 지상부생체중은 고추 65.4%, 토마토 59.1%로 가장 큰 생육촉진 효과를 보였다. 탄저킬과 세라탄도 이미 확인된 탄저병에 대한 예방 및 방제효과 뿐만 아니라 작물생육 촉진 효과도 있음을 확인하였다.

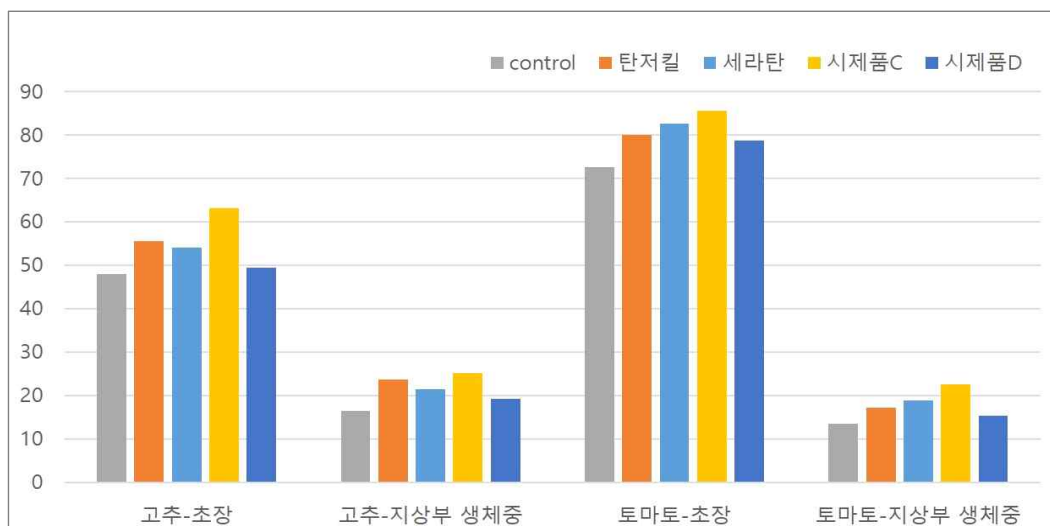


그림 86. 시제품의 작물성장촉진 효과 확인

2. 시제품의 농가 실증시험

□ 고추 탄저병에 대한 시제품의 농가적용방법 최적화

시제품 2종(탄저킬, 세라탄)의 고추 탄저병에 대한 처리방법, 처리농도, 처리주기 및 횟수 등 적절한 예방 및 방제방법을 확립하기 위해 충북 음성군 소재 농가에서 농가실증시험을 실시하였으며, 구당 30주로 하여 완전임의배치법에 의해 3반복으로 시험을 진행하였다. 최종 약제처리 21일 후 시험구내 이병과율을 조사하였다.

시제품의 희석배수는 제품 내 유효미생물의 밀도를 고려하여 500배 희석으로 결정하였으며, 시제품의 처리방법과 처리주기 및 횟수에 따라 고추 탄저병의 방제효과를 비교하였다. 시험결과, 처리 주기가 짧을수록 높은 방제가를 나타내었으며, 생육초기 관주처리보다는 병 발생초기 경엽처리 처리구에서 더 높은 방제가를 보였다. 세라탄이 탄저킬에 비해 모든 처리구에서 높은 방제가를 보였다.

표 21. 시제품의 처리방법, 처리주기, 처리횟수에 따른 고추 탄저병 방제효과

시료명	처리방법	처리주기 및 횟수	이병과율				방제가 (%)
			I 반복	II 반복	III 반복	평균	
탄저킬	관주처리	7일 간격 2회	20.6	22.8	20.3	21.2	34.6
		5일 간격 2회	20.4	18.6	21.5	20.2	37.9
	경엽처리	7일 간격 2회	16.5	17.6	15.4	16.5	49.2
		5일 간격 2회	15.4	16.4	15.5	15.8	51.4
세라탄	관주처리	7일 간격 2회	18.5	21.4	20.3	20.1	38.2
		5일 간격 2회	18.2	18.5	19.3	18.7	42.5
	경엽처리	7일 간격 2회	15.2	14.8	15.6	15.2	53.2
		5일 간격 2회	12.5	15.2	13.7	13.8	57.5
무처리	-	-	32.4	30.7	34.3	32.5	-

상기의 시험결과 1가지 처리방법으로는 절대적인 방제효과가 부족하다고 판단하여 2가지 처리방법을 병행하여 방제효과를 상승시키고자 추가시험을 진행하였다. 시험결과, “생육초기 5일 간격 2회 관주처리+병 발생초기 5일 간격 2회 경엽처리” 시 탄저킬 64.1%, 세라탄 67.9%의 방제가를 보여 가장 효과가 좋았으나 “생육초기 7일 간격 2회 관주처리+병 발생초기 5일 간격 2회 경엽처리” 시 탄저킬 62.8%, 세라탄 65.3%의 방제가를 보여 방제효과가 충분하다고 판단되고 농가 경제성을 고려하여 “생육초기 7일 간격 2회 관주처리+병 발생초기 5일 간격 2회 경엽처리” 최적처리방법으로 결정하였다.

표 22. 시제품의 고추 탄저병에 대한 최적 처리방법 결정

시료명	처리방법	처리주기 및 횟수	이병과율				방제가 (%)
			I 반복	II 반복	III 반복	평균	
탄저킬	관주처리 7일 간격 2회 + 경엽처리 7일 간격 2회		19.2	18.7	17.6	18.5	52.3
세라탄			15.8	18.4	17.3	17.2	55.7
탄저킬	관주처리 7일 간격 2회 + 경엽처리 5일 간격 2회		14.8	15.1	13.4	14.4	62.8
세라탄			12.2	14.4	13.7	13.4	65.3
탄저킬	관주처리 5일 간격 2회 + 경엽처리 7일 간격 2회		16.8	20.1	18.2	18.4	52.6
세라탄			15.4	17.8	17.6	16.9	56.3
탄저킬	관주처리 5일 간격 2회 + 경엽처리 5일 간격 2회		12.6	14.5	14.7	13.9	64.1
세라탄			11.2	12.7	13.4	12.4	67.9
무처리	-	-	40.2	38.6	37.5	38.8	-

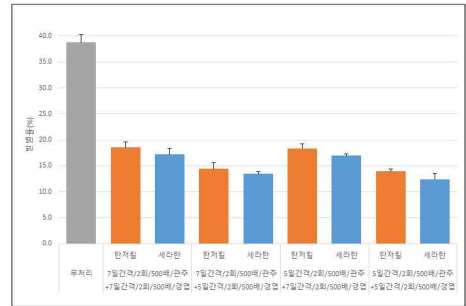
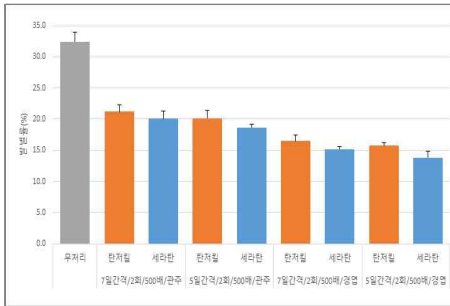


그림 87. 고추 탄저병 농가실증시험 포장 및 시제품 최적처리방법 결정

□ 딸기 탄저병에 대한 시제품의 농가적용방법 최적화

시제품 2종(탄저킬, 세라탄)의 딸기 탄저병에 대한 처리방법, 처리농도, 처리주기 및 횟수 등 적절한 예방 및 방제방법을 확립하기 위해 경기 화성시 소재 농가에서 농가실증시험을 실시하였으며, 구당 20 주로 하여 완전임의배치법에 의해 3반복으로 시험을 진행하였다. 최종 약제처리 21일 후 시험구내 이병과율을 조사하였다. 시제품의 희석배수는 제품 내 유효미생물의 밀도를 고려하여 500배 희석으로 결정하였으며, 시제품의 처리방법과 처리주기 및 횟수에 따라 딸기 탄저병의 방제효과를 비교하였다.

표 23. 시제품의 처리방법, 처리주기, 처리횟수에 따른 딸기 탄저병 방제효과

시료명	처리방법	처리주기 및 횟수	이병과율				방제가 (%)
			I 반복	II 반복	III 반복	평균	
탄저킬	관주처리 7일 간격 2회 + 경엽처리 7일 간격 2회		12.5	13.2	11.7	12.5	51.6
세라탄			13.6	14.7	13.4	13.9	46.0
탄저킬	관주처리 7일 간격 2회 + 경엽처리 5일 간격 2회		9.2	10.5	9.4	9.7	62.3
세라탄			11.8	12.3	12.4	12.2	52.7
탄저킬	관주처리 5일 간격 2회 + 경엽처리 7일 간격 2회		13.3	12.8	11.2	12.4	51.7
세라탄			14.3	13.8	14.6	14.2	44.7
탄저킬	관주처리 5일 간격 2회 + 경엽처리 5일 간격 2회		9.3	8.6	8.8	8.9	65.4
세라탄			11.6	9.8	10.1	10.5	59.2
무처리	-	-	25.6	24.2	27.4	25.7	-

시험결과, 처리주기가 짧을수록 높은 방제가를 나타내었으며, 생육초기 관주처리보다는 병 발생 초기 경엽처리 처리구에서 더 높은 방제가를 보였다. 탄저킬이 세라탄에 비해 모든 처리구에서 높은 방제가를 보였다.

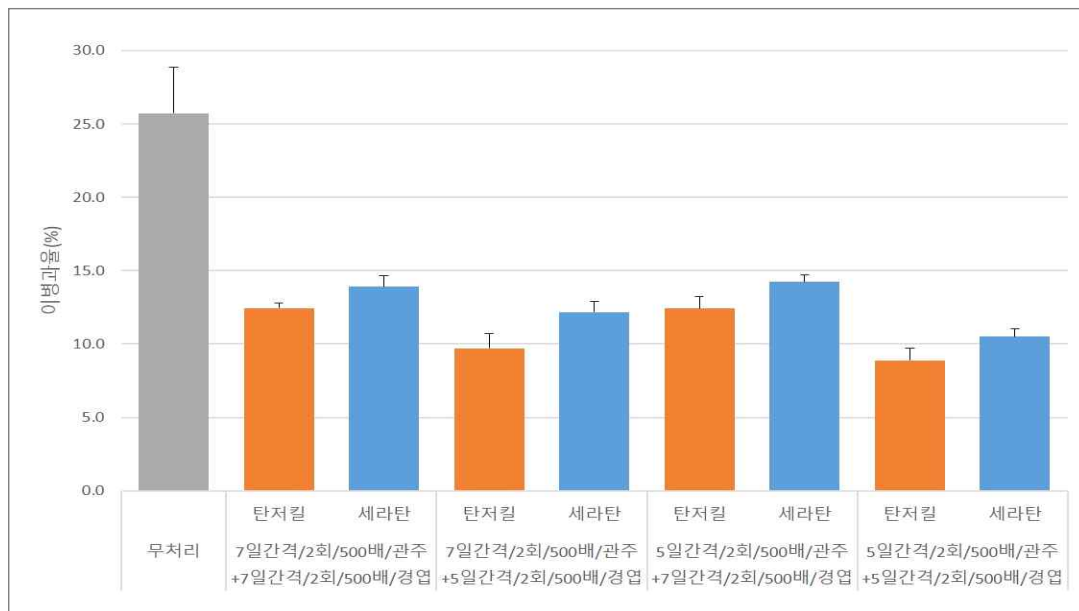


그림 88. 딸기 탄저병 농가실증시험 포장 및 시제품 최적처리방법 결정

□ 오이 흰가루병에 대한 시제품의 농가적용방법 최적화

시제품 3종(탄저킬, 세라탄, 올팡)의 오이 흰가루병에 대한 처리방법, 처리농도, 처리주기 및 횟수 등 적절한 예방 및 방제방법을 확립하기 위해 경기 천안시 소재 농가에서 농가실증시험을 실시하였으며, 최종 약제처리 21일 후 시험구내 발병율을 조사하였다.
시제품의 희석배수와 처리방법은 제품 내 유효미생물의 밀도를 고려하여 500배 희석하여 경엽처리로 결정하였으며, 처리주기 및 횟수에 따른 오이 흰가루병의 방제효과를 비교한 결과 처리주기가 짧을수록 높은 방제가를 나타내었으나 7일 간격 처리구에서도 충분한 방제가를 보였다. 오이 흰가루병에 대해서는 올팡이 가장 높은 방제효과를 보였다.

표 24. 시제품의 처리방법, 처리주기, 처리횟수에 따른 오이 흰가루병 방제효과

시료명	처리주기 및 횟수	이병과율				방제가 (%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균	
탄저킬	7일 간격 2회	10.8	11.7	11.6	11.4	80.6
세라탄		11.4	11.7	11.6	11.4	82.3
올팡		8.3	8.8	6.4	7.8	86.7
탄저킬	5일 간격 2회	8.6	9.4	7.5	8.5	85.5
세라탄		9.3	8.4	8.1	8.6	85.4
올팡		5.6	6.3	7.6	6.5	85.4
무처리	-	62.3	54.7	59.2	58.7	-

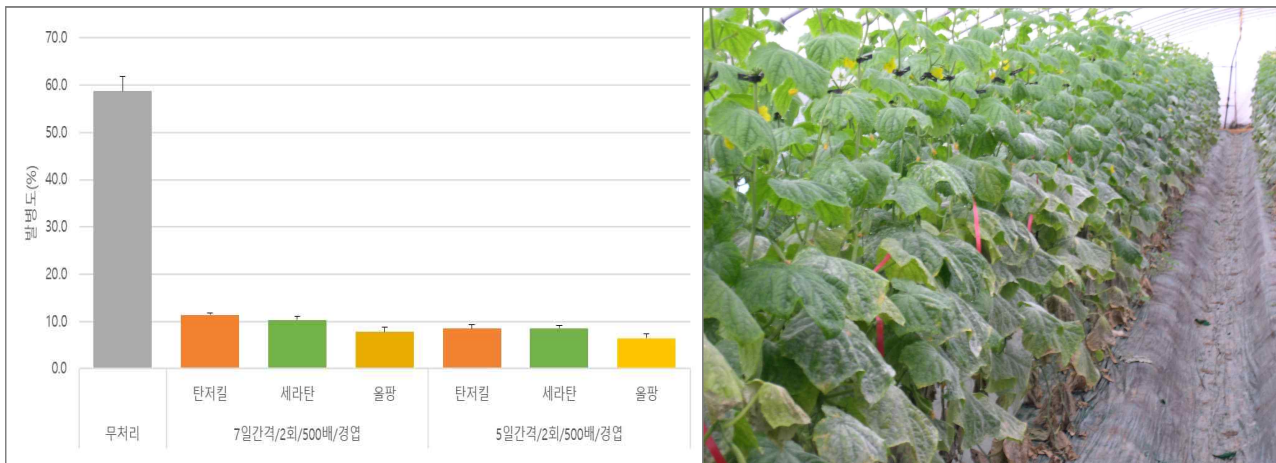


그림 89. 오이 흰가루병 농가실증시험 포장 및 시제품 최적처리방법 결정

IX. 제품화

1. 탄저균 제품화

□ 제품화를 위한 공인기관시험

○ 시제품의 주성분 분석

시제품의 제품화를 위한 유기농업자재 등록의 일환으로 시제품(상표명 : 탄저균)에 대한 주성분 분석 및 병원성미생물 검사를 완료하였다. 유기농업자재 공인시험기관인 (주)친환경농산물안전성센터에 시험을 의뢰하였으며, 유전자 염기서열 상동성 검색을 통해 제품에 투입한 미생물이 *Bacillus amyloliquefaciens* 와 상동성 99%로 확인되었다. 희석평판법을 통한 생균수 측정을 통해 제품 내 해당 미생물이 6.8×10^8 cfu/ml 포함된 것으로 확인되었다. 5종의 병원성미생물(병원성 대장균, 병원성 살모넬라, 황색포도상구균, 리스테리아 모노사이토제네스, 바실러스 세레우스) 선택배지를 이용한 검정을 통해 제품 내 병원성미생물이 검출되지 않았다.

제 EFAP-19-0906-1-M-1호 미생물계분 분석 성적서		제 EFAP-19-0908-M-1호 병원성미생물 검사성적서		제 EFAP-19-0873-M-1호 미생물계분 분석성적서	
위탁자	① 성명 (법인명) : 고려바이오 ② 주 소 : 경기도 화성시 청남면 청남동로 346	위탁자	① 성명 (법인명) : 고려바이오 ② 주 소 : 경기도 화성시 청남면 청남동로 346	위탁자	① 성명 (법인명) : 고려바이오 ② 주 소 : 경기도 화성시 청남면 청남동로 346
공시품	④ 대상 : 배양 ⑤ 상표명 (유교미생물) : 탄저균 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>) ⑥ 제조회사 : 고려바이오	공시품	④ 대상 : 약산 ⑤ 상표명 : 탄저균 ⑥ 제조회사 : 고려바이오 ⑦ 검사방법 : 병원성미생물 선택배지를 이용한 검정 ⑧ 용 도 : 동육/인공용(신규)	공시품	④ 대상 : 약산 ⑤ 상표명 (유교미생물) : 탄저균 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>) ⑥ 제조회사 : 고려바이오
⑦ 검사방법	이정물균수측정 : 희석 평판법 (Standard plate count)	⑦ 검사방법	병원성 미생물	⑦ 검사방법	1. 유전자 염기서열 상동성 검색을 통한 균주 확인
⑧ 용 도	동육/인공용(신규)	⑧ 용 도	동육/인공용(신규)	⑧ 용 도	동육/인공용(신규)
⑨ 분석 항목	분석회수 분석치 [cfu/mL/g] 1 6.7 × 10 ⁸ 2 6.7 × 10 ⁸ 3 7.0 × 10 ⁸ 평균 6.8 × 10 ⁸ 표준편차 1.7 × 10 ⁷	⑨ 분석 항목	병원성 미생물 검사결과 병원성 대장균(<i>Escherichia coli</i> O157:H7) 불검출 병원성 살모넬라(<i>Salmonella</i> spp.) 불검출 황색포도상구균(<i>Staphylococcus aureus</i>) 불검출 리스테리아 모노사이토제네스(<i>Listeria monocytogenes</i>) 불검출 바실러스 세레우스(<i>Bacillus cereus</i>) 불검출	⑨ 분석항목	유교미생물 상동성(%) <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 99%
참고사항	1) 본 성적서는 시료를 3회 반복 분석한 후의 결과입니다. 2) 본 성적서는 고객에 제공한 시료를 이용한 결과로서 판매용에 대한 품질을 보장하지는 않습니다. 3) 본 성적서의 유효기간은 검사일 기준, 1년으로 정하며, 유효기간 만료 시 재검사를 권장합니다.	참고사항	1) 본 성적서는 시료를 3회 반복 분석한 후의 결과입니다. 2) 본 성적서는 고객에 제공한 시료를 이용한 결과로서 판매용에 대한 품질을 보장하지는 않습니다. 3) 본 성적서의 유효기간은 검사일 기준, 1년으로 정하며, 유효기간 만료 시 재검사를 권장합니다.	참고사항	1) 본 성적서는 시료를 3회 반복 분석한 후의 결과입니다. 2) 본 성적서는 고객에 제공한 시료를 이용한 결과로서 판매용에 대한 품질을 보장하지는 않습니다. 3) 본 성적서의 유효기간은 검사일 기준, 1년으로 정하며, 유효기간 만료 시 재검사를 권장합니다.
시험일자	2019년 10월 29일	시험일자	2019년 11월 14일	시험일자	2019년 10월 29일
(주)친환경농산물안전성센터 EFAPSC		(주)친환경농산물안전성센터 EFAPSC		(주)친환경농산물안전성센터 EFAPSC	

그림 90. 탄저균 주성분검사 성적서

○ 시제품의 독성평가

시제품의 제품화를 위한 유기농업자재 등록의 일환으로 시제품(상표명 : 탄저균)에 대한 독성시험을 완료하였다. 유기농업자재 공인시험기관인 (주)한국생물안전성연구소에 의뢰하였으며, 독성시험은 포유동물에 대한 독성시험(랫드에 대한 급성경구독성/병원성시험, 랫드에 대한 급성경피독성시험, 토끼에 대한 피부자극성시험, 토끼에 대한 안점막자극성시험)과 생태계 생물에 대한 영향시험(담수어류에 대한 영향시험, 꿀벌에 대한 영향시험)을 통해 제품에 대한 안전성이 확인되었다.

탄저질의 독성시험 요약보고서

제출일: 2020.07.03.

1. 시험의뢰자
명칭: 고려대학교
소재지: 경기도 화성시 정남면 향남동로 346

2. 시험기관
명칭: ㈜한국생물안전성연구소
소재지: 충청북도 음성군 관곡면 성항로 362-20
연락처: Tel: 043-882-0297; Fax: 043-882-0298

3. 탄저질 특성시험결과 요약자료

시험번호	시험목적	시험결과	비고
ETD-19006	광성경구독성/병원성시험	반수치사량 (LD ₅₀) > 1.0x10 ¹⁰ cfu/개체	살균용량: 5D 정도
ETP-19058	광성경피독성	반수치사량 (LD ₅₀) > 1.0x10 ¹⁰ cfu/개체	살균용량: 5D 정도
ETD-19008	인원피독성	광양탄자극자극 (ACGIH 기준 (극중중))	살균용량: 6개 (New Zealand White)
ETD-19059	피부사구독성	3차 피부사구독성 (PI ₃) 기준 (극중중)	살균용량: 6개 (New Zealand White)
ETP-19069	담수어독성	어류독성시험 (LC50) > 1.0x10 ¹⁰ cfu/ml 피내투여독성 (LD ₅₀) > 1.0x10 ¹⁰ cfu/ml	시용동물: 잉어 (Common carp)
ETP-20004	포유동물독성	포유동물독성시험 (LD50) > 1.0x10 ¹⁰ cfu/개체 (내: 피내투여)	시용동물: 흰쥐 (Sprague-Dawley)

(주)한국생물안전성연구소 

주소: 충청북도 음성군 관곡면 성항로 362-20 / www.kbsi.or.kr
전화: 043-882-0297 / fax: 043-882-0298 / kbsi@kbsi.or.kr

그림 91. 탄저질 독성시험 성적 요약서



<p><i>Study No. / ETD-19006</i> <i>Final Report</i></p> <p>최종보고서</p> <p>탄저질의 렛드에 대한 급성경구독성/병원성시험</p> <p>ETD-19006</p> <p> (주)한국생물안전성연구소</p> <p style="text-align: center;">KBSI</p> <p style="text-align: right;">1 page of 28</p>	<p><i>Study No. / ETD-19006</i> <i>Final Report</i></p> <p>1. 요약 (Summary)</p> <p>탄저질에 대한 급성경구/병원성 시험을 위하여 시험용 동물 당 1.0x10¹⁰ cfu를 1회 경구 투여한 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 복강에 액체를 채취하여 다음 체내 잔존 미생물 수와 1일, 3일, 7일 및 14일째의 체외 배양 수를 검사하였다. 또한 본 시험기간 동안 일반증상을 관찰하였으며 투여 전, 투여 후 3일, 주 1회씩 체중을 측정하였다.</p> <ul style="list-style-type: none"> 투여한 미생물농도 1.0x10¹⁰ cfu/개체에서 치사동물은 없었다. 일반증독증상은 관찰되지 않았다. 체중변화는 정상적인 증가추세를 보였다. 체내 잔존 미생물 수를 검사한 결과 약에서는 미생물이 검출되지 않았다. 체외 배양 미생물 수를 검사한 결과 대변에서는 미생물이 검출되지 않았다. 부검결과 시험용량 투여와 관련된 특이한 이상 소견은 관찰되지 않았다. <p>이상의 시험결과, 렛드에 탄저질은 인체 경구 투여 시 장기 (췌) 및 대변에서 미생물이 검출되지 않았으며 부검 시 이상증상이 관찰되지 않았다. 따라서 탄저질의 1.0x10¹⁰ cfu 당위에 해당하는 미생물을 렛드에 인체 경구 투여 시 주요 장기 (췌)에 잔존하지 않았으며 시험 종료 시까지 증독증상 및 치사가 없는 것으로 보아 급성독성으로 인한 영향은 없는 것으로 판단된다.</p> <p> KBSI</p> <p style="text-align: right;">8 page of 28</p>
--	---

그림 92. 급성경구독성/병원성시험(렛드) 보고서



<p><i>Study No. / ETP-19058</i> <i>Final Report</i></p> <p>최종보고서</p> <p>렛드에 대한 탄저질의 급성경피독성시험</p> <p>ETP-19058</p> <p> (주)한국생물안전성연구소</p> <p style="text-align: center;">KBSI</p> <p style="text-align: right;">1 page of 17</p>	<p><i>Study No. / ETP-19058</i> <i>Final Report</i></p> <p>1. 요약 (Summary)</p> <p>탄저질에 대한 급성경피독성 시험을 위하여 1.0x10¹⁰ cfu의 약량을 단회 경피 투여한 후 14일 동안 치사수, 일반증독증상, 체중변화를 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.</p> <ul style="list-style-type: none"> 1.0x10¹⁰ cfu에서 치사개체가 관찰되지 않았다. 일반증독증상은 관찰되지 않았다. 체중변화는 약제투여 후 경과일수에 따라 증가추세를 보였다. <p>따라서, 렛드에 탄저질을 개체당 1.0x10¹⁰ cfu씩 단회 경피 투여 시 영향이 없는 것으로 판단된다.</p> <p> KBSI</p> <p style="text-align: right;">8 page of 17</p>
--	--

그림 93. 급성경피독성시험(렛드) 보고서

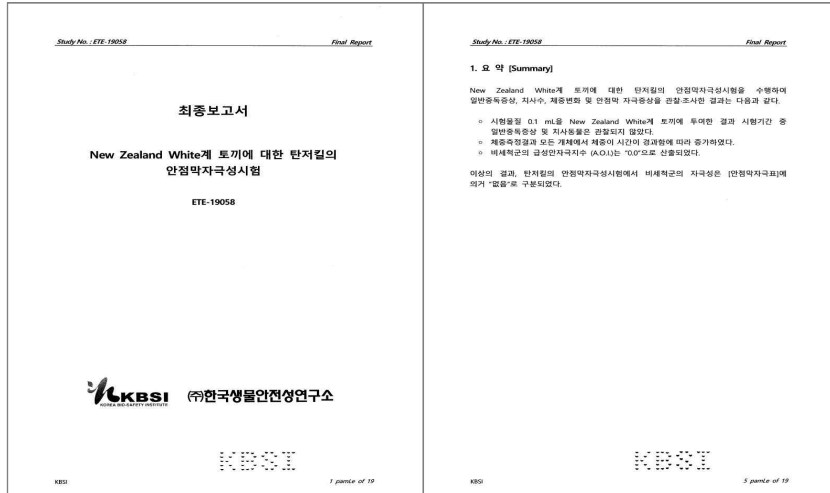


그림 94. 안점막자극성시험(토끼) 보고서

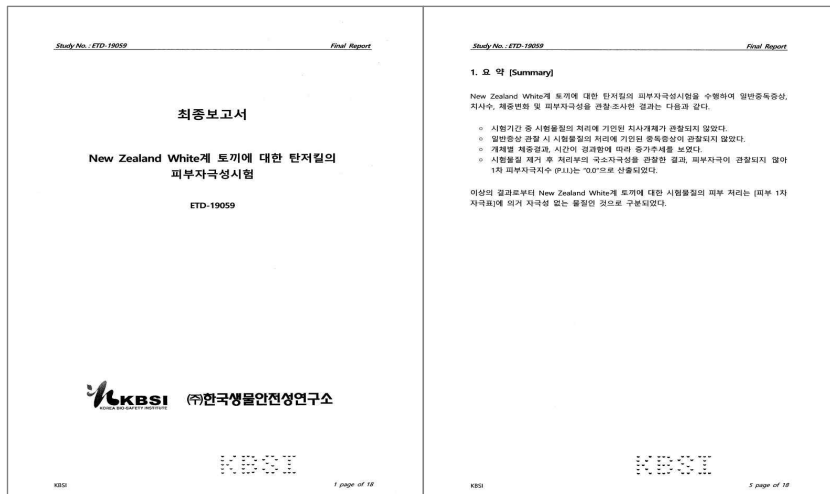


그림 95. 피부자극성시험(토끼) 보고서

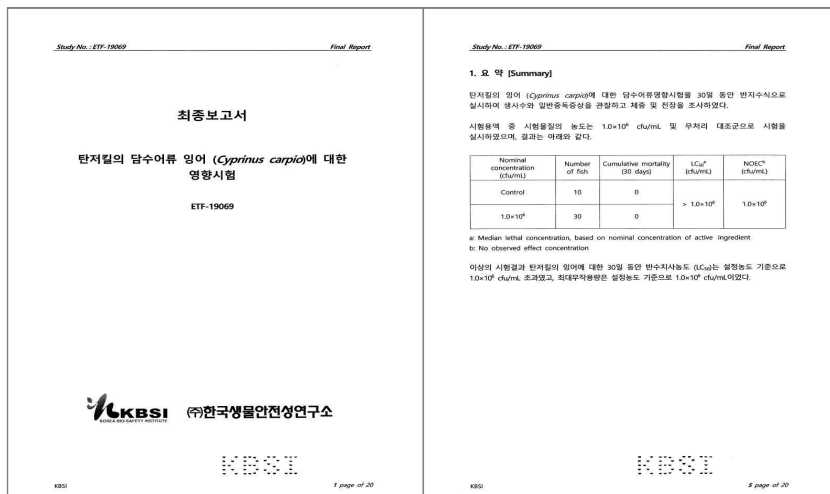


그림 96. 담수어류 영향시험 보고서

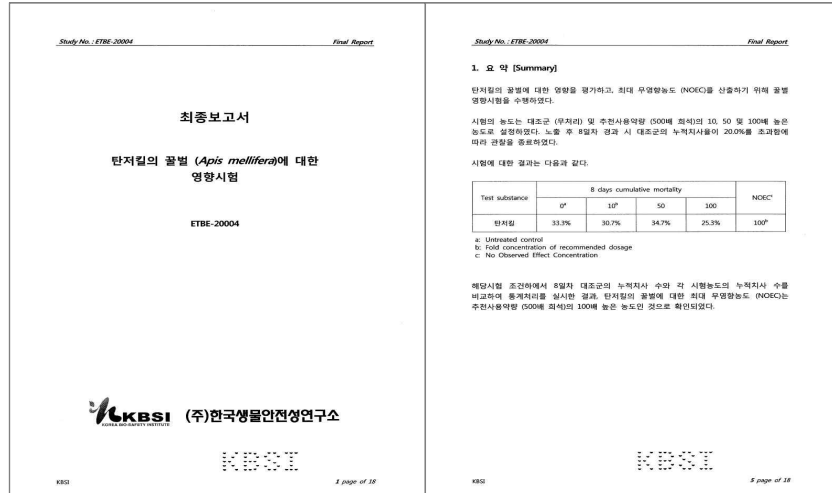


그림 97. 꿀벌 영향시험 보고서

○ 시제품의 약해평가

시제품의 제품화를 위한 유기농업자재 등록의 일환으로 시제품(상표명 : 탄저킬)에 대한 약해시험을 완료하였다. 유기농업자재 공인시험기관인 (주)친환경농산물안전성센터에 시험을 의뢰하였으며, 약해시험은 사과, 딸기, 고추, 가지, 벼 총 5종의 유식물에 기준량과 배량으로 경엽처리하여 약해의 유무를 관찰한 결과 제품 기준량과 배량에서 약해가 없는 것으로 확인되었다.

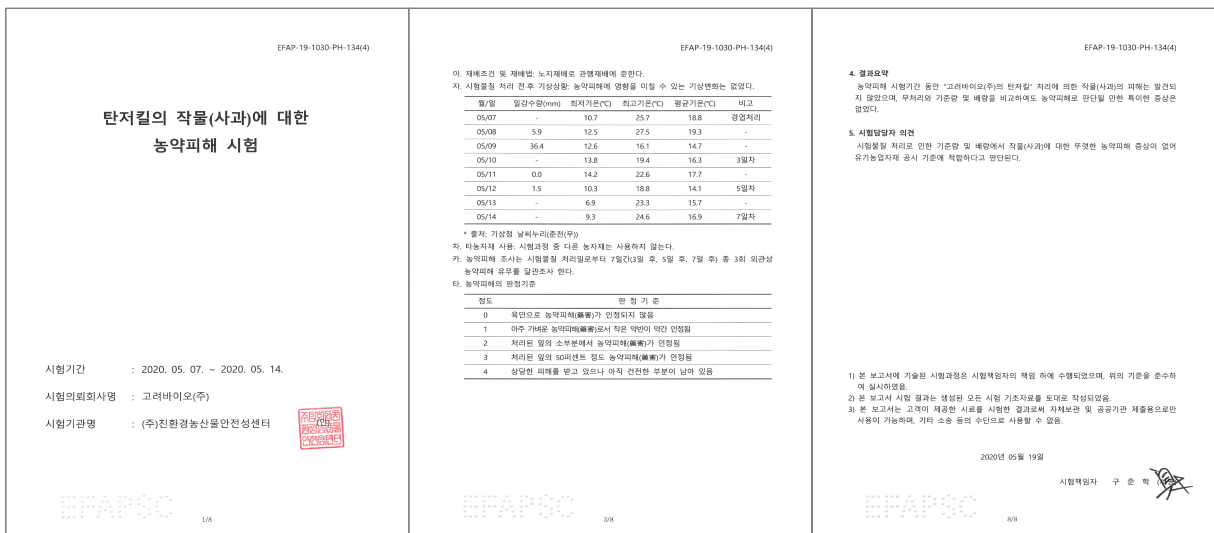


그림 98. 탄저킬 농약피해시험 성적서(사과)

EFAP-19-1030-PH-134(2)	EFAP-19-1030-PH-134(2)	EFAP-19-1030-PH-134(2)												
탄저킬의 2작물(고추, 딸기)에 대한 농약피해 시험	<p>이. 재배조건: 시설재배 자. 재배관리 ① 시설관리: 냉난방기 및 자동 개폐식 차광막이 설치된 유리온실에서 1월 2회 이상 온습도를 확인하여 작물을 재배한다. ② 물관리는 계절 및 온습도에 따라 1월 1회에서 2회 분수호스로 관수한다. 차. 타농자재 사용: 시험과정 중 다른 농자재는 사용하지 않는다. 카. 농약피해 조사: 시험을 끝 짓기 7일전(3월 후, 5월 후, 7월 후) 총 3회에 걸쳐 외관상 농약피해 유무를 점검조사 한다. 타. 농약피해의 판정기준</p> <table border="1"> <tr><th>정도</th><th>판 정 기 준</th></tr> <tr><td>0</td><td>육안으로 농약피해(農藥)가 인정되지 않음</td></tr> <tr><td>1</td><td>이후 가배론 농약피해(農藥)조사 직전 약이 약간 인정됨</td></tr> <tr><td>2</td><td>차리된 잎의 소부분에서 농약피해(農藥)가 인정됨</td></tr> <tr><td>3</td><td>차리된 잎의 50퍼센트 정도 농약피해(農藥)가 인정됨</td></tr> <tr><td>4</td><td>상당한 피해를 받고 있으나 아직 잔존한 부분이 남아 있음</td></tr> </table>	정도	판 정 기 준	0	육안으로 농약피해(農藥)가 인정되지 않음	1	이후 가배론 농약피해(農藥)조사 직전 약이 약간 인정됨	2	차리된 잎의 소부분에서 농약피해(農藥)가 인정됨	3	차리된 잎의 50퍼센트 정도 농약피해(農藥)가 인정됨	4	상당한 피해를 받고 있으나 아직 잔존한 부분이 남아 있음	<p>4. 결과요약 농약피해 시험기간 동안 '고려바이오(주)의 탄저킬' 처리에 의한 2작물(고추, 딸기)의 피해는 발견되지 않았으며, 무처리와 기준량 및 배양용 비교약제도 농약피해로 판단될 만한 특이한 증상은 없었다.</p> <p>5. 시험담당자 의견 시험물질 처리로 인한 기준량 및 배양에서 유식물에 대한 뚜렷한 농약피해 증상이 없어 유 기능없자재 공시 기준에 적합하다고 판단된다.</p> <p>1) 본 보고서에 기술된 시험과정은 시험책임자의 책임 하에 수행되었으며, 위의 기준을 준수하여 실시하였음. 2) 본 보고서 시험 결과는 생장된 모든 시험 기초자료를 토대로 작성되었음. 3) 본 보고서는 고적이 제공된 자료를 시험할 결과로서 자체보관 및 공공기관 제출용으로만 사용이 가능하며, 기타 소송 등의 수단으로 사용할 수 없음.</p> <p style="text-align: right;">2019년 12월 06일 시험책임자 구 준 학 </p>
정도	판 정 기 준													
0	육안으로 농약피해(農藥)가 인정되지 않음													
1	이후 가배론 농약피해(農藥)조사 직전 약이 약간 인정됨													
2	차리된 잎의 소부분에서 농약피해(農藥)가 인정됨													
3	차리된 잎의 50퍼센트 정도 농약피해(農藥)가 인정됨													
4	상당한 피해를 받고 있으나 아직 잔존한 부분이 남아 있음													
 1/8	 3/8	 6/8												

그림 99. 탄저킬 농약피해시험 성적서(고추, 딸기)

EFAP-19-1030-PH-134(3)	EFAP-19-1030-PH-134(3)	EFAP-19-1030-PH-134(3)												
<p>4. 결과요약 농약피해 시험기간 동안 '고려바이오(주)의 탄저킬' 처리에 의한 작물(가지)의 피해는 발견되지 않았으며, 무처리와 기준량 및 배양용 비교약제도 농약피해로 판단될 만한 특이한 증상은 없었다.</p> <p>5. 시험담당자 의견 시험물질 처리로 인한 기준량 및 배양에서 유식물에 대한 뚜렷한 농약피해 증상이 없어 유 기능없자재 공시 기준에 적합하다고 판단된다.</p> <p>1) 본 보고서에 기술된 시험과정은 시험책임자의 책임 하에 수행되었으며, 위의 기준을 준수하여 실시하였음. 2) 본 보고서 시험 결과는 생장된 모든 시험 기초자료를 토대로 작성되었음. 3) 본 보고서는 고적이 제공된 자료를 시험할 결과로서 자체보관 및 공공기관 제출용으로만 사용이 가능하며, 기타 소송 등의 수단으로 사용할 수 없음.</p> <p style="text-align: right;">2019년 12월 30일 시험책임자 구 준 학 </p>	탄저킬의 작물(가지)에 대한 농약피해 시험	<p>이. 재배조건: 시설재배 자. 재배관리 ① 시설관리: 냉난방기 및 자동 개폐식 차광막이 설치된 유리온실에서 1월 2회 이상 온습도를 확인하여 작물을 재배한다. ② 물관리는 계절 및 온습도에 따라 1월 1회에서 2회 분수호스로 관수한다. 차. 타농자재 사용: 시험과정 중 다른 농자재는 사용하지 않는다. 카. 농약피해 조사: 시험을 끝 짓기 7일전(3월 후, 5월 후, 7월 후) 총 3회에 걸쳐 외관상 농약피해 유무를 점검조사 한다. 타. 농약피해의 판정기준</p> <table border="1"> <tr><th>정도</th><th>판 정 기 준</th></tr> <tr><td>0</td><td>육안으로 농약피해(農藥)가 인정되지 않음</td></tr> <tr><td>1</td><td>이후 가배론 농약피해(農藥)조사 직전 약이 약간 인정됨</td></tr> <tr><td>2</td><td>차리된 잎의 소부분에서 농약피해(農藥)가 인정됨</td></tr> <tr><td>3</td><td>차리된 잎의 50퍼센트 정도 농약피해(農藥)가 인정됨</td></tr> <tr><td>4</td><td>상당한 피해를 받고 있으나 아직 잔존한 부분이 남아 있음</td></tr> </table>	정도	판 정 기 준	0	육안으로 농약피해(農藥)가 인정되지 않음	1	이후 가배론 농약피해(農藥)조사 직전 약이 약간 인정됨	2	차리된 잎의 소부분에서 농약피해(農藥)가 인정됨	3	차리된 잎의 50퍼센트 정도 농약피해(農藥)가 인정됨	4	상당한 피해를 받고 있으나 아직 잔존한 부분이 남아 있음
정도	판 정 기 준													
0	육안으로 농약피해(農藥)가 인정되지 않음													
1	이후 가배론 농약피해(農藥)조사 직전 약이 약간 인정됨													
2	차리된 잎의 소부분에서 농약피해(農藥)가 인정됨													
3	차리된 잎의 50퍼센트 정도 농약피해(農藥)가 인정됨													
4	상당한 피해를 받고 있으나 아직 잔존한 부분이 남아 있음													
 8/8	 1/8	 3/8												

그림 100. 탄저킬 농약피해시험 성적서(가지)

EFAP-19-1030-PH-134(1)	EFAP-19-1030-PH-134(1)	EFAP-19-1030-PH-134(1)												
<p>4. 결과요약 농약피해 시험기간 동안 '고려바이오(주)의 탄저킬' 처리에 의한 작물(벼)의 피해는 발견되지 않았으며, 무처리와 기준량 및 배양용 비교약제도 농약피해로 판단될 만한 특이한 증상은 없었다.</p> <p>5. 시험담당자 의견 시험물질 처리로 인한 기준량 및 배양에서 유식물에 대한 뚜렷한 농약피해 증상이 없어 유 기능없자재 공시 기준에 적합하다고 판단된다.</p> <p>1) 본 보고서에 기술된 시험과정은 시험책임자의 책임 하에 수행되었으며, 위의 기준을 준수하여 실시하였음. 2) 본 보고서 시험 결과는 생장된 모든 시험 기초자료를 토대로 작성되었음. 3) 본 보고서는 고적이 제공된 자료를 시험할 결과로서 자체보관 및 공공기관 제출용으로만 사용이 가능하며, 기타 소송 등의 수단으로 사용할 수 없음.</p> <p style="text-align: right;">2019년 12월 06일 시험책임자 구 준 학 </p>	탄저킬의 작물(벼)에 대한 농약피해 시험	<p>이. 재배조건: 시설재배 자. 재배관리 ① 시설관리: 냉난방기 및 자동 개폐식 차광막이 설치된 유리온실에서 1월 2회 이상 온습도를 확인하여 작물을 재배한다. ② 물관리는 계절 및 온습도에 따라 1월 2회 이상 확인하여 양수조식으로 관리하였다. 차. 타농자재 사용: 시험과정 중 다른 농자재는 사용하지 않는다. 카. 농약피해 조사: 시험을 끝 짓기 7일전(3월 후, 5월 후, 7월 후) 총 3회에 걸쳐 외관상 농약피해 유무를 점검조사 한다. 타. 농약피해의 판정기준</p> <table border="1"> <tr><th>정도</th><th>판 정 기 준</th></tr> <tr><td>0</td><td>육안으로 농약피해(農藥)가 인정되지 않음</td></tr> <tr><td>1</td><td>이후 가배론 농약피해(農藥)조사 직전 약이 약간 인정됨</td></tr> <tr><td>2</td><td>차리된 잎의 소부분에서 농약피해(農藥)가 인정됨</td></tr> <tr><td>3</td><td>차리된 잎의 50퍼센트 정도 농약피해(農藥)가 인정됨</td></tr> <tr><td>4</td><td>상당한 피해를 받고 있으나 아직 잔존한 부분이 남아 있음</td></tr> </table>	정도	판 정 기 준	0	육안으로 농약피해(農藥)가 인정되지 않음	1	이후 가배론 농약피해(農藥)조사 직전 약이 약간 인정됨	2	차리된 잎의 소부분에서 농약피해(農藥)가 인정됨	3	차리된 잎의 50퍼센트 정도 농약피해(農藥)가 인정됨	4	상당한 피해를 받고 있으나 아직 잔존한 부분이 남아 있음
정도	판 정 기 준													
0	육안으로 농약피해(農藥)가 인정되지 않음													
1	이후 가배론 농약피해(農藥)조사 직전 약이 약간 인정됨													
2	차리된 잎의 소부분에서 농약피해(農藥)가 인정됨													
3	차리된 잎의 50퍼센트 정도 농약피해(農藥)가 인정됨													
4	상당한 피해를 받고 있으나 아직 잔존한 부분이 남아 있음													
 8/8	 1/8	 3/8												

그림 101. 탄저킬 농약피해시험 성적서(벼)

○ 시제품의 잔류농약검사

시제품의 제품화를 위한 유기농업자재 등록의 일환으로 시제품 (상표명 : 탄저킬)에 대한 잔류농약검사를 완료하였다. 잔류농약검사는 제품 내 화학농약성분의 유무를 확인하기 위한 시험으로 Abamectin B1을 비롯해 총 322종의 화학농약성분을 LC/MSMS, GC/MSMS를 이용하여 분석하며, 유기농업자재 공인시험기관인 (주)피캠프코리아에 의뢰하였으며, 제품 내 322종의 화학농약성분이 불검출되었다.

시험 성적서 (Test Certificate)		검사번호	PCAM - 1910 - 1162
		발행처	(1) / (총 1)
W 34255 대안농자재 양성구 테스트 / 11월 12일 (월) 10:00 / 11월 12일 (월) 10:00		1 / 1	
1. 시험내용			
기관명	고려바이오㈜	시험일자	2019년 10월 29일
대상지/주소	경기도 화성시 정남면 정남동로 346	시험대상	고려바이오양액
시험종류	잔류농약	시험장소	본체실
시험기간	2019년 10월 29일 ~ 2019년 11월 4일	분석방법	LC-MS/MS, GC-MS/MS, GC-MS, GC
품명	고려배	시험환경온도	(22 ± 2) °C
		시험환경습도	70 ± 5% RH
2. 잔류농약검사결과			
검사 항목 322 명 분			
* 국립농산물품질관리원 비공개성분 320성분 추가성분 : Emamectin benzoate, Nitrofen			
** 국립농산물품질관리원 지정(의뢰) 농약항목을 미표기함.			
결과 (mg/kg)	상가형목 불검출		
확인	작성지 (시험자)	승인자 (기술책임자)	
	성명 : 김지현	성명 : 김현영	
* 본 시험결과를 받은 학교/소매점 등 비공개성분 사용불가능 (비밀유지). * 위도 내역은 신청일자 이후를 사용하며 결과/비밀유지, 시험의뢰명분은 비공개하여 처리할 수 있습니다. * 이 시험결과서는 원도 이외의 사용용 공합니다.			
2019년 11월 4일			
주식회사 피캠프코리아			

그림 102. 탄저킬 잔류농약검사 성적서

□ 병해관리용 유기농업자재 공시 신청

유기농업자재는 유기농산물을 제조, 가공 또는 취급하는 과정에서 사용할 수 있는 ‘농림축산식품부 소관 친환경농업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙, 별표1 허용물질의 종류’ 에서 정한 허용물질을 원료 또는 재료로 하여 만든 제품으로 유기농업자재 공시기관인 강원대학교 산학협력단에 병해관리용 유기농업자재로 신청하여 공시 완료됨(상표명 : 탄저킬 / 공시번호 : 공시-2-4-167).

유기농업자재 공시 사항

○ 토양계량 및 적용성적

연월일	적용대상 (작물명)	적용량	사용시기 (월/주)	사용량	처리방법	비료용량	비료용량	비고

○ 병해관리

연월일	적용대상 (작물명)	적용량	사용시기 (월/주)	사용량	처리방법	병해 발생률 (%)	비고
2020. 08. 19	배	고추	생육기	500배	경엽처리	아생물비염균 (Bacillus amyloqueliciensis) 80%	모조제 30%

* 적용량: 표는 표의 표시용량인 경우에만 해당합니다.

유기농업자재 공시서

공시번호: 제 공시-2-4-167 호

유기농업자재 공시서

- 업체명: 고려바이오㈜
- 대표자 성명: 김 영 권
- 주소(사업장): 경기도 화성시 정남면 정남동로 346
- 자재의 명칭: 미생물
- 자재의 구분: 병해관리용
- 상표명: 탄저킬
- 주성분(원료)의 종류 및 함량(%):
- 주성분의 종류 및 함량: *Bacillus amyloqueliciensis*
- 원료의 종류 및 함량: 아생물비염균(*Bacillus amyloqueliciensis*) 80%, 모조제 20%
- 유효기간: 2020. 08. 19. ~ 2023. 08. 19.
- 제조장 주소: 서울특별시 강남구 테헤란로 124 (국기, 제초사)
- 경기도 화성시 정남면 정남동로 346
- 최초 공시일: 2020. 08. 19.
- 최초 공시기간: 강원대학교 산학협력단

「친환경농업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률」 제38조 제2항 및 「농림축산식품부 소관 친환경농업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙」 제49조제2항에 따라 위와 같이 유기농업자재 공시임을 증명합니다.

2020년 08월 19일

강원대학교 산학협력단장

그림 103. 탄저킬 유기농업자재 공시서

2. 세라탄 제품화

□ 제품화를 위한 공인기관시험

○ 시제품의 주성분 분석

시제품의 제품화를 위한 유기농업자재 등록의 일환으로 시제품(상표명 : 세라탄)에 대한 주성분 분석 및 병원성미생물 검사를 완료하였다. 유기농업자재 공인시험기관인 (주)친환경농산물안전성센터에 시험을 의뢰하였으며, 유전자 염기서열 상동성 검색을 통해 제품에 투입한 미생물이 *Serratia plymuthica*와 상동성 99%로 확인되었다. 희석평판법을 통한 생균수 측정을 통해 제품 내 해당 미생물이 1.9×10^8 cfu/ml 포함된 것으로 확인되었다. 5종의 병원성미생물(병원성 대장균, 병원성 살모넬라, 황색포도상구균, 리스테리아 모노사이토제네스, 바실러스 세레우스) 선택배지를 이용한 검정을 통해 제품 내 병원성미생물이 검출되지 않았다.

<p>제 EFAP-20-0751-M-2호 미생물제제 분석성적서</p> <p>위탁자 ① 성명 (법인명) 고려바이오㈜ ② 주민등록번호 (법인등록번호) *****</p> <p>③ 주소 경기도 화성시 정남면 정남동로 346</p> <p>공시품 ④ 상품명 세라탄 (유기농업자재) ⑤ 상표명 <i>Serratia plymuthica</i> ⑥ 제조회사 고려바이오㈜</p> <p>⑦ 검사방법 1. 유전자 염기서열 상동성 검색을 통한 균주 확인</p> <p>⑧ 용도 등록/인용용(신규)</p> <p>⑨ 분석항목</p> <table border="1"> <tr> <th>유리미생물</th> <th>상동성(%)</th> </tr> <tr> <td><i>Serratia plymuthica</i></td> <td>99%</td> </tr> </table> <p>1) 본 성적서는 농촌진흥청 "비료공급규격서 및 지정 번호 3, 및 '국립농산물품질관리원' "유기농업자재 공인 시험 방법 5, 및 규정 제 14항 시험 성적서 양식"에 준하여 작성된 것으로 30일 이내 유효하며, 이의신청을 할 수 없습니다. 2) 본 성적서는 시료를 제공한 시료일 때만 유효하며, 재검사를 위한 시료는 별도로 제공하여야 합니다. 3) 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 바탕으로 작성된 것으로, 실제 제품에 대한 품질을 보증하지는 않으며, 유전자 염기서열 검색을 통한 상동성 99%로 확인된 것으로, 실제 제품에 대한 품질을 보증하지는 않습니다. 4) 본 성적서의 유효기간은 발급일로부터 30일이며, 유효기간 만료 시에는 재검사를 받아야 합니다. 시행 책임자 2020년 8월 25일 최은화</p> <p>(주)친환경농산물안전성센터</p>	유리미생물	상동성(%)	<i>Serratia plymuthica</i>	99%	<p>제 EFAP-20-0751-M-3호 병원성미생물 검사성적서</p> <p>위탁자 ① 성명 (법인명) 고려바이오㈜ ② 주민등록번호 (법인등록번호) *****</p> <p>③ 주소 경기도 화성시 정남면 정남동로 346</p> <p>공시품 ④ 상품명 세라탄 ⑤ 상표명 <i>Serratia plymuthica</i> ⑥ 제조회사 고려바이오㈜</p> <p>⑦ 검사방법 0 병원성미생물 선택배지를 이용한 검정</p> <p>⑧ 용도 등록/인용용(신규)</p> <p>병원성 미생물 검사 결과</p> <p>⑨ 분석항목</p> <table border="1"> <tr> <th>병원성 대장균(<i>Escherichia coli</i> O157:H7)</th> <th>결과</th> </tr> <tr> <td>병원성 살모넬라(<i>Salmonella</i> spp.)</td> <td>불검출</td> </tr> <tr> <td>황색포도상구균(<i>Staphylococcus aureus</i>)</td> <td>불검출</td> </tr> <tr> <td>리스트리아 모노사이토제네스(<i>Listeria monocytogenes</i>)</td> <td>불검출</td> </tr> <tr> <td>바실러스 세레우스(<i>Bacillus cereus</i>)</td> <td>불검출</td> </tr> </table> <p>1) 본 성적서는 농촌진흥청 "비료공급규격서 및 지정 번호 3, 및 '국립농산물품질관리원' "유기농업자재 공인 시험 방법 5, 및 규정 제 14항 시험 성적서 양식"에 준하여 작성된 것으로 30일 이내 유효하며, 이의신청을 할 수 없습니다. 2) 본 성적서는 시료를 제공한 시료일 때만 유효하며, 재검사를 위한 시료는 별도로 제공하여야 합니다. 3) 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 바탕으로 작성된 것으로, 실제 제품에 대한 품질을 보증하지는 않으며, 유전자 염기서열 검색을 통한 상동성 99%로 확인된 것으로, 실제 제품에 대한 품질을 보증하지는 않습니다. 4) 본 성적서의 유효기간은 발급일로부터 30일이며, 유효기간 만료 시에는 재검사를 받아야 합니다. 시행 책임자 2020년 8월 25일 최은화</p> <p>(주)친환경농산물안전성센터</p>	병원성 대장균(<i>Escherichia coli</i> O157:H7)	결과	병원성 살모넬라(<i>Salmonella</i> spp.)	불검출	황색포도상구균(<i>Staphylococcus aureus</i>)	불검출	리스트리아 모노사이토제네스(<i>Listeria monocytogenes</i>)	불검출	바실러스 세레우스(<i>Bacillus cereus</i>)	불검출	<p>제 EFAP-20-0751-M-1호 미생물제제 분석 성적서</p> <p>위탁자 ① 성명 (법인명) 고려바이오㈜ ② 주민등록번호 (법인등록번호) *****</p> <p>③ 주소 경기도 화성시 정남면 정남동로 346</p> <p>공시품 ④ 상품명 세라탄 (유기농업자재) ⑤ 상표명 <i>Serratia plymuthica</i> ⑥ 제조회사 고려바이오㈜</p> <p>⑦ 검사방법 미생물균수측정 : 희석 평판법 (Standard plate count)</p> <p>⑧ 용도 등록/인용용(신규)</p> <p>⑨ 분석항목</p> <table border="1"> <tr> <th>유리미생물</th> <th>분자량</th> <th>분자량 [cfu/ml/g]</th> </tr> <tr> <td>1</td> <td>1.9</td> <td>1.9×10^8</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>2.0</td> <td>2.0×10^8</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>2.0</td> <td>2.0×10^8</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>1.9</td> <td>1.9×10^8</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>7.2</td> <td>7.2×10^7</td> </tr> </table> <p>1) 본 성적서는 농촌진흥청 "비료공급규격서 및 지정 번호 3, 및 '국립농산물품질관리원' "유기농업자재 공인 시험 방법 5, 및 규정 제 14항 시험 성적서 양식"에 준하여 작성된 것으로 30일 이내 유효하며, 이의신청을 할 수 없습니다. 2) 본 성적서는 시료를 제공한 시료일 때만 유효하며, 재검사를 위한 시료는 별도로 제공하여야 합니다. 3) 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 바탕으로 작성된 것으로, 실제 제품에 대한 품질을 보증하지는 않으며, 유전자 염기서열 검색을 통한 상동성 99%로 확인된 것으로, 실제 제품에 대한 품질을 보증하지는 않습니다. 4) 본 성적서의 유효기간은 발급일로부터 30일이며, 유효기간 만료 시에는 재검사를 받아야 합니다. 시행 책임자 2020년 8월 25일 최은화</p> <p>(주)친환경농산물안전성센터</p>	유리미생물	분자량	분자량 [cfu/ml/g]	1	1.9	1.9×10^8	2	2.0	2.0×10^8	3	2.0	2.0×10^8	4	1.9	1.9×10^8	5	7.2	7.2×10^7
유리미생물	상동성(%)																																	
<i>Serratia plymuthica</i>	99%																																	
병원성 대장균(<i>Escherichia coli</i> O157:H7)	결과																																	
병원성 살모넬라(<i>Salmonella</i> spp.)	불검출																																	
황색포도상구균(<i>Staphylococcus aureus</i>)	불검출																																	
리스트리아 모노사이토제네스(<i>Listeria monocytogenes</i>)	불검출																																	
바실러스 세레우스(<i>Bacillus cereus</i>)	불검출																																	
유리미생물	분자량	분자량 [cfu/ml/g]																																
1	1.9	1.9×10^8																																
2	2.0	2.0×10^8																																
3	2.0	2.0×10^8																																
4	1.9	1.9×10^8																																
5	7.2	7.2×10^7																																

그림 104. 세라탄 주성분검사 성적서(미생물 동정, 생균수 측정, 병원성미생물 검사)

○ 시제품의 독성평가

시제품의 제품화를 위한 유기농업자재 등록의 일환으로 시제품(상표명 : 세라탄)에 대한 독성시험을 완료하였다. 유기농업자재 공인시험기관인 (주)한국생물안전성연구소에 의뢰하였으며, 독성시험은 포유동물에 대한 독성시험(랫드에 대한 급성경구독성/병원성시험, 랫드에 대한 급성경피독성시험, 토끼에 대한 피부자극성시험, 토끼에 대한 안점막자극성시험)과 생태계 생물에 대한 영향시험(담수어류에 대한 영향시험, 꿀벌에 대한 영향시험)을 통해 제품에 대한 안전성이 확인되었다.

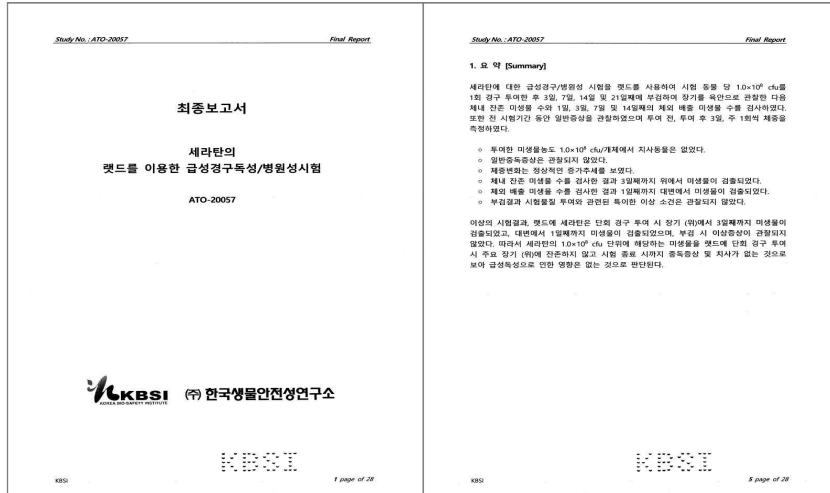


그림 105. 급성경구독성/병원성시험(램드) 보고서

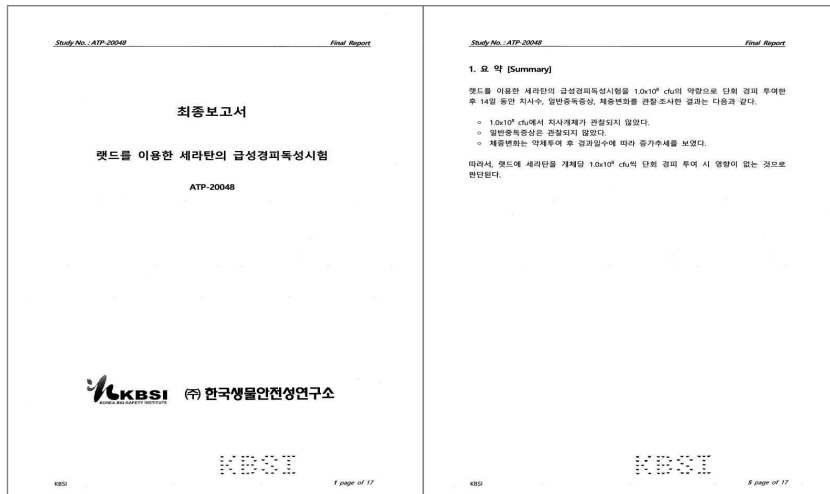


그림 106. 급성경피독성시험 보고서

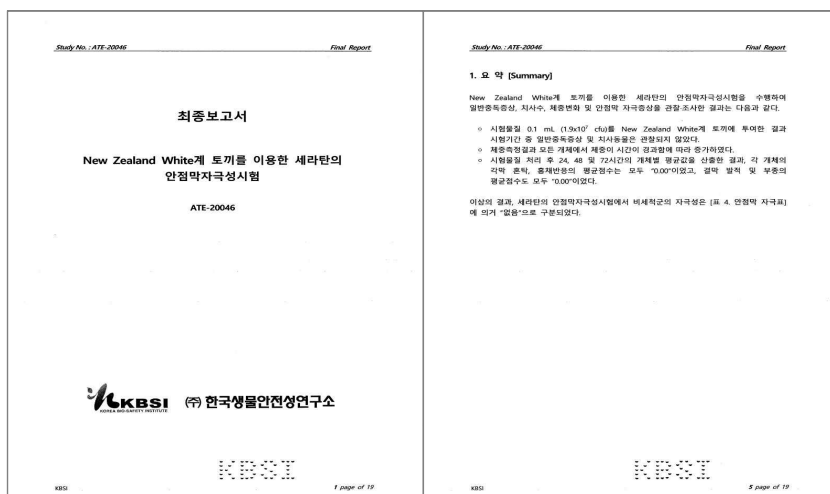


그림 107. 안점막자극성시험(토끼) 보고서

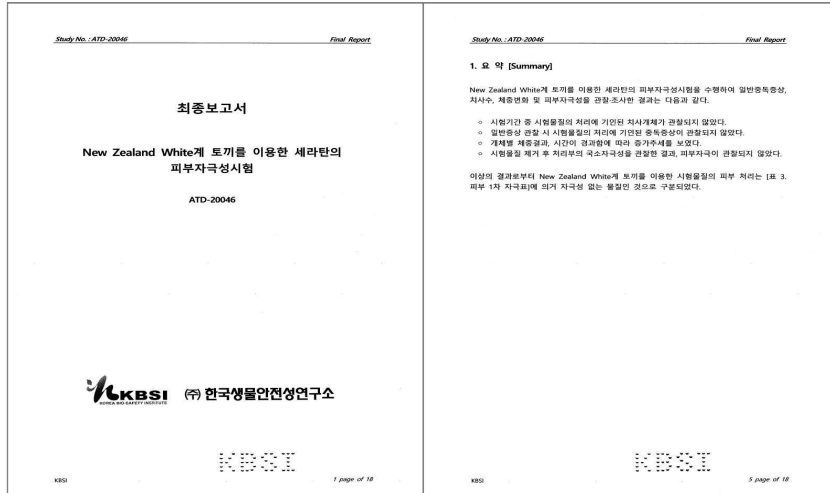


그림 108. 피부자극성시험(토끼) 보고서

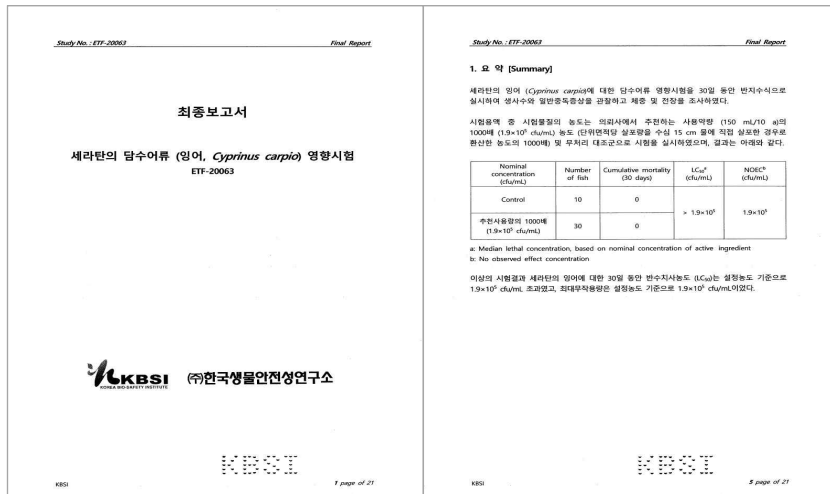


그림 109. 담수어류 영향시험 보고서

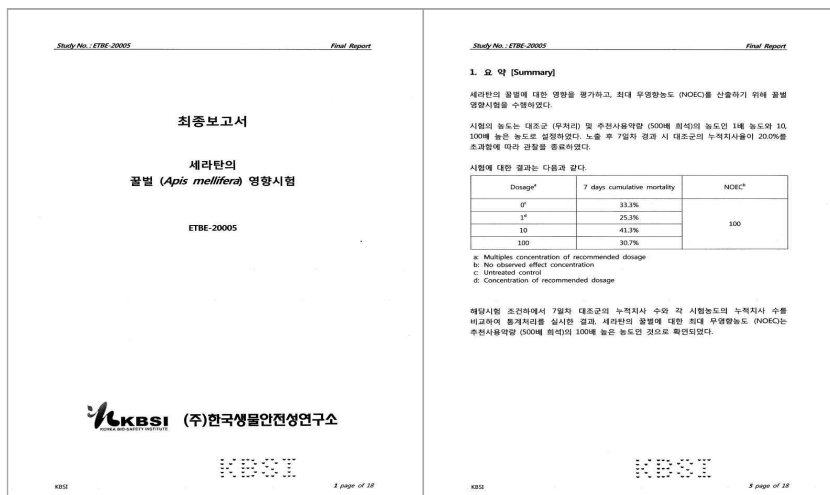


그림 110. 꿀벌 영향시험 보고서

○ 시제품의 약해평가

시제품의 제품화를 위한 유기농업자재 등록의 일환으로 시제품(상표명 : 세라탄)에 대한 약해시험을 진행 중이다. 약해시험은 5종(가지, 고추, 딸기, 오이, 벼)의 유식물에 기준량과 배량으로 경엽처리하여 약해의 유무를 관찰하며, 유기농업자재 공인시험기관인 (주)친환경농산물안전성센터에 의뢰하여 진행하였다. 약해시험은 가지, 고추, 오이, 딸기, 벼 총 5종의 유식물에 기준량과 배량으로 경엽처리하여 약해의 유무를 관찰한 결과 제품 기준량과 배량에서 약해가 없는 것으로 확인되었다.

EFAP-20-0751-PH-096(2)	EFAP-20-0751-PH-096(2)	EFAP-20-0751-PH-096(2)																																															
<p>세라탄의 3작물(가지, 고추, 오이)에 대한 농약피해 시험</p>	<p>4. 결과요약 농약피해 시험기간 동안 "고려바이오(주)의 세라탄" 처리에 의한 3작물(가지, 고추, 오이)의 피해는 발견되지 않았으며, 무처리와 기준량 및 배량을 비교하여도 농약피해로 판단될 만한 특이한 증상은 없었다.</p> <p>5. 시험담당자 의견 시험을 잘 처리로 인한 기준량 및 배량에서 유식물에 대한 뚜렷한 농약피해 증상이 없어 유기농업자재 공인 기준에 적합하다고 판단된다.</p> <p>1) 본 보고서에 기술된 시험과정은 시험책임자의 책임 하에 수행되었으며, 위의 기준을 준수하여 실시하였음. 2) 본 보고서 시험 결과는 생성된 모든 시험 기초자료를 토대로 작성되었음. 3) 본 보고서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로써 자체보관 및 공공기관 제출용으로만 사용이 가능하며, 기타 소송 등의 수단으로 사용할 수 없음.</p> <p style="text-align: right;">2020년 09월 17일 시험책임자 구준혁</p>	<p>아. 재배조건: 유리온실 자. 재배관리 ① 시설관리는 담당방기 및 자동 개폐식 차광막이 설치된 유리온실에서 1월 2회 이상 온습도를 확인하여 적절히 제어한다. ② 관수는 계절 및 온습도에 따라 1일 1회에서 2회 분수조로 관수한다. 차. 타농자재 사용: 시험과정 중 다른 농자재는 사용하지 않는다. 카. 농약피해 조사: 시험과정 처리일로부터 7월23일 후, 5월 후, 7월 후) 총 3회에 걸쳐 외관상 농약피해 유무를 일관조사 한다. 타. 농약피해의 판정기준</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>정도</th> <th>판 정 기 준</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>육안으로 농약피해(農藥)가 인정되지 않음</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>아주 가벼운 농약피해(農藥)로서 작은 약반이 약간 인정됨</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>처리된 잎의 소부분에서 농약피해(農藥)가 인정됨</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>처리된 잎의 50%이전 정도 농약피해(農藥)가 인정됨</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>상당한 피해를 받고 있으나 아직 건강한 부분이 남아 있음</td> </tr> </tbody> </table> <p>3. 시험결과 가. 처리 후 농약피해 조사 결과(3, 5, 7월차)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">작물명</th> <th rowspan="2">세라탄</th> <th colspan="2">농약피해(0-4)</th> <th rowspan="2">농약피해 양상</th> </tr> <tr> <th>3월(06/28)</th> <th>5월(08/09)</th> <th>7월(09/01)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">가 지</td> <td>무처리</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>기준량</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">고 추</td> <td>무처리</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>기준량</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">오 이</td> <td>무처리</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>기준량</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	정도	판 정 기 준	0	육안으로 농약피해(農藥)가 인정되지 않음	1	아주 가벼운 농약피해(農藥)로서 작은 약반이 약간 인정됨	2	처리된 잎의 소부분에서 농약피해(農藥)가 인정됨	3	처리된 잎의 50%이전 정도 농약피해(農藥)가 인정됨	4	상당한 피해를 받고 있으나 아직 건강한 부분이 남아 있음	작물명	세라탄	농약피해(0-4)		농약피해 양상	3월(06/28)	5월(08/09)	7월(09/01)	가 지	무처리	-	-	-	기준량	0	0	0	고 추	무처리	-	-	-	기준량	0	0	0	오 이	무처리	-	-	-	기준량	0	0	0
정도	판 정 기 준																																																
0	육안으로 농약피해(農藥)가 인정되지 않음																																																
1	아주 가벼운 농약피해(農藥)로서 작은 약반이 약간 인정됨																																																
2	처리된 잎의 소부분에서 농약피해(農藥)가 인정됨																																																
3	처리된 잎의 50%이전 정도 농약피해(農藥)가 인정됨																																																
4	상당한 피해를 받고 있으나 아직 건강한 부분이 남아 있음																																																
작물명	세라탄	농약피해(0-4)		농약피해 양상																																													
		3월(06/28)	5월(08/09)		7월(09/01)																																												
가 지	무처리	-	-	-																																													
	기준량	0	0	0																																													
고 추	무처리	-	-	-																																													
	기준량	0	0	0																																													
오 이	무처리	-	-	-																																													
	기준량	0	0	0																																													
EFAPSC 1/11	EFAPSC 11/11	EFAPSC 3/11																																															

그림 111. 세라탄의 농약피해시험 성적서(가지, 고추, 오이)

EFAP-20-0751-PH-096(3)	EFAP-20-0751-PH-096(3)	EFAP-20-0751-PH-096(3)																																						
<p>세라탄의 작물(딸기)에 대한 농약피해 시험</p>	<p>4. 결과요약 농약피해 시험기간 동안 "고려바이오(주)의 세라탄" 처리에 의한 작물(딸기)의 피해는 발견되지 않았으며, 무처리의 기준량 및 배량을 비교하여도 농약피해로 판단될 만한 특이한 증상은 없었다.</p> <p>5. 시험담당자 의견 시험을 잘 처리로 인한 기준량 및 배량에서 유식물에 대한 뚜렷한 농약피해 증상이 없어 유기농업자재 공인 기준에 적합하다고 판단된다.</p> <p>1) 본 보고서에 기술된 시험과정은 시험책임자의 책임 하에 수행되었으며, 위의 기준을 준수하여 실시하였음. 2) 본 보고서 시험 결과는 생성된 모든 시험 기초자료를 토대로 작성되었음. 3) 본 보고서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로써 자체보관 및 공공기관 제출용으로만 사용이 가능하며, 기타 소송 등의 수단으로 사용할 수 없음.</p> <p style="text-align: right;">2020년 09월 17일 시험책임자 구준혁</p>	<p>아. 재배조건: 유리온실 자. 재배관리 ① 시설관리는 담당방기 및 자동 개폐식 차광막이 설치된 유리온실에서 1월 2회 이상 온습도를 확인하여 적절히 제어한다. ② 관수는 계절 및 온습도에 따라 1일 1회에서 2회 분수조로 관수한다. 차. 타농자재 사용: 시험과정 중 다른 농자재는 사용하지 않는다. 카. 농약피해 조사: 시험과정 처리일로부터 7월23일 후, 5월 후, 7월 후) 총 3회에 걸쳐 외관상 농약피해 유무를 일관조사 한다. 타. 농약피해의 판정기준</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>정도</th> <th>판 정 기 준</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>육안으로 농약피해(農藥)가 인정되지 않음</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>아주 가벼운 농약피해(農藥)로서 작은 약반이 약간 인정됨</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>처리된 잎의 소부분에서 농약피해(農藥)가 인정됨</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>처리된 잎의 50%이전 정도 농약피해(農藥)가 인정됨</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>상당한 피해를 받고 있으나 아직 건강한 부분이 남아 있음</td> </tr> </tbody> </table> <p>3. 시험결과 가. 처리 후 농약피해 조사 결과(3, 5, 7월차)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">작물명</th> <th rowspan="2">세라탄</th> <th colspan="2">농약피해(0-4)</th> <th rowspan="2">농약피해 양상</th> </tr> <tr> <th>3월(09/10)</th> <th>5월(09/12)</th> <th>7월(09/14)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">딸 기</td> <td>무처리</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>기준량</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">배 량</td> <td>무처리</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>기준량</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	정도	판 정 기 준	0	육안으로 농약피해(農藥)가 인정되지 않음	1	아주 가벼운 농약피해(農藥)로서 작은 약반이 약간 인정됨	2	처리된 잎의 소부분에서 농약피해(農藥)가 인정됨	3	처리된 잎의 50%이전 정도 농약피해(農藥)가 인정됨	4	상당한 피해를 받고 있으나 아직 건강한 부분이 남아 있음	작물명	세라탄	농약피해(0-4)		농약피해 양상	3월(09/10)	5월(09/12)	7월(09/14)	딸 기	무처리	-	-	-	기준량	0	0	0	배 량	무처리	-	-	-	기준량	0	0	0
정도	판 정 기 준																																							
0	육안으로 농약피해(農藥)가 인정되지 않음																																							
1	아주 가벼운 농약피해(農藥)로서 작은 약반이 약간 인정됨																																							
2	처리된 잎의 소부분에서 농약피해(農藥)가 인정됨																																							
3	처리된 잎의 50%이전 정도 농약피해(農藥)가 인정됨																																							
4	상당한 피해를 받고 있으나 아직 건강한 부분이 남아 있음																																							
작물명	세라탄	농약피해(0-4)		농약피해 양상																																				
		3월(09/10)	5월(09/12)		7월(09/14)																																			
딸 기	무처리	-	-	-																																				
	기준량	0	0	0																																				
배 량	무처리	-	-	-																																				
	기준량	0	0	0																																				
EFAPSC 1/8	EFAPSC 3/8	EFAPSC 8/8																																						

그림 112. 세라탄의 농약피해시험 성적서(딸기)

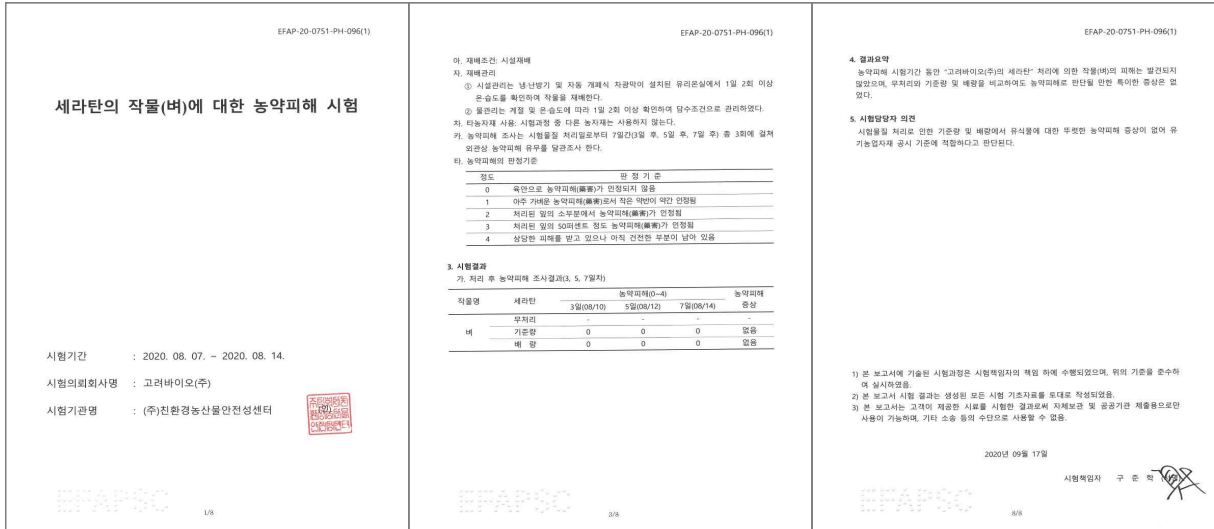


그림 113. 세라탄의 농약피해시험 성적서(벼)

○ 시제품의 잔류농약검사

시제품의 제품화를 위한 유기농업자재 등록의 일환으로 시제품(상표명 : 세라탄)에 대한 잔류농약검사를 진행 중이다. 잔류농약검사는 제품 내 화학농약성분의 유무를 확인하기 위한 시험으로 Abamectin BI을 비롯해 총 322종의 화학농약성분을 LC/MSMS, GC/MSMS를 이용하여 분석하며, 유기농업자재 공인시험기관인 (주)친환경농산물안전성센터에 의뢰하여 진행하였다. 제품 내에서 322종의 화학농약성분이 불검출되었다.



그림 114. 세라탄 잔류농약검사 성적서

□ 병해관리용 유기농업자재 공시 신청

유기농업자재는 유기농산물을 제조, 가공 또는 취급하는 과정에서 사용할 수 있는 ‘농림축산식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙, 별표1 허용물질의 종류’에서 정한 허용물질을 원료 또는 재료로 하여 만든 제품으로 상기의 공인기관시험 최종보고서를 취합하여 11월 중 유기농업자재 공시기관인 강원대학교 산학협력단에 병해관리용 유기농업자재로 신청하여 공시 완료되었다(상표명 : 세라탄 / 공시번호 : 공시-2-4-175).

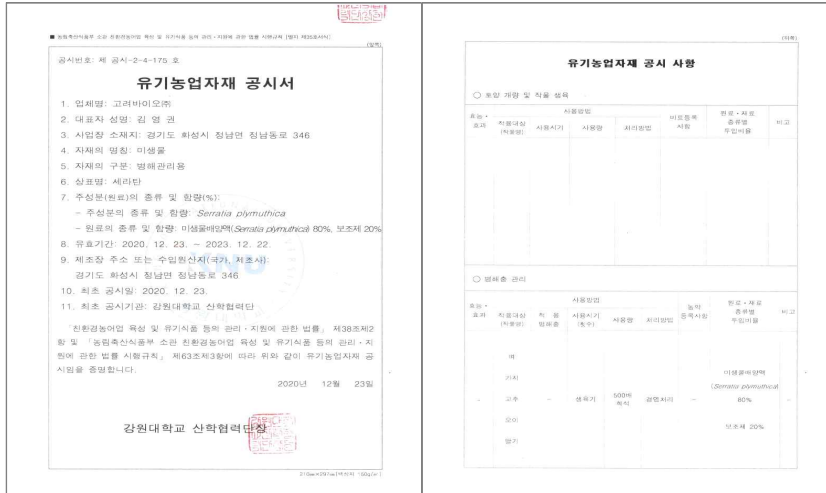


그림 115. 세라탄 유기농업자재 공시서 및 제품사진.

3. 율업 제품화

□ 제품화를 위한 공인기관시험

○ 시제품의 주성분 분석

시제품의 제품화를 위한 유기농업자재 등록의 일환으로 시제품(상표명 : 율업)에 대한 주성분 분석 및 병원성미생물 검사를 완료하였다. 유기농업자재 공인시험기관인 (주)친환경농산물안전성센터에 시험을 의뢰하였으며, 유전자 염기서열 상동성 검색을 통해 제품에 투입한 미생물이 *Bacillus velezensis*와 상동성 99%로 확인되었다. 희석평판법을 통한 생균수 측정을 통해 제품 내 해당 미생물이 6.0×10^8 cfu/ml 포함 된 것으로 확인되었다. 5종의 병원성미생물(병원성 대장균, 병원성 살모넬라, 황색포도상구균, 리스테리아 모노사이토제네스, 바실러스 세레우스) 선택배지를 이용한 검정을 통해 제품 내 병원성미생물이 검출되지 않았다.

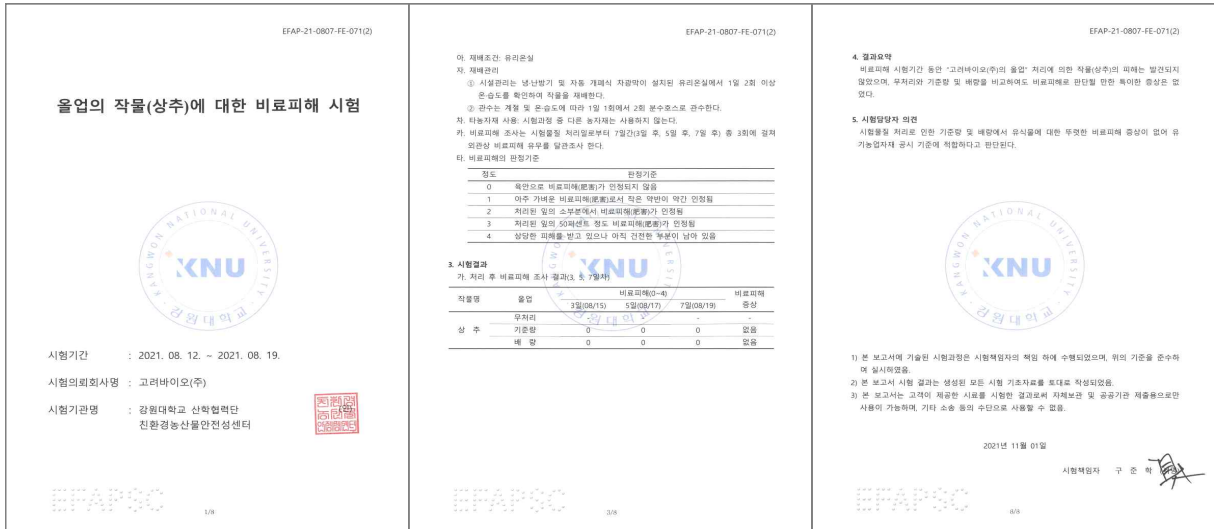


그림 118. 올업의 비료피해 시험 성적서(상추)

○ 시제품의 잔류농약검사

시제품의 제품화를 위한 유기농업자재 등록의 일환으로 시제품 (상표명 : 올업)에 대한 잔류농약검사를 완료하였다. 잔류농약검사는 제품 내 화학농약성분의 유무를 확인하기 위한 시험으로 Abamectin B1을 비롯해 총 322종의 화학농약성분을 LC/MSMS, GC/MSMS를 이용하여 분석하며, 유기농업자재 공인시험기관인 (주)친환경농산물안전성센터에 의뢰하였으며, 제품 내 322종의 화학농약성분이 불검출되었다.



그림 119. 올업 잔류농약검사 성적서

□ 병해관리용 유기농업자재 공시 신청

유기농업자재는 유기농산물을 제조, 가공 또는 취급하는 과정에서 사용할 수 있는 ‘농림축산식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙, 별표1 허용물질의 종류’에서 정한 허용물질을 원료 또는 재료로 하여 만든 제품으로 유기농업자재 공시기관인 강원대학교 산학협력단에 작물생육용 유기농업자재로 신청하여 공시 완료됨(상표명 : 올업 / 공시번호 : 공시-2-2-283).

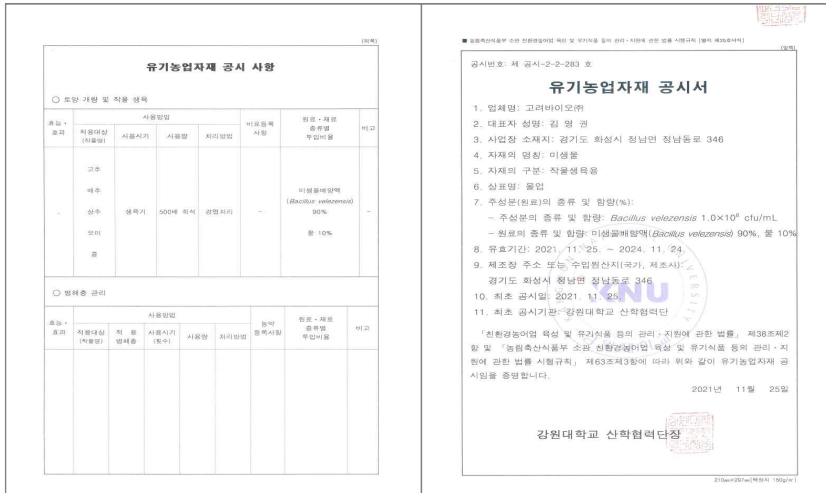


그림 120. 올업 유기농업자재 공시서 및 제품사진

4. 올팜 제품화

□ 제품화를 위한 공인기관시험

○ 시제품의 주성분 분석

시제품의 제품화를 위한 유기농업자재 등록의 일환으로 시제품(상표명 : 올팜)에 대한 주성분 분석 및 병원성미생물 검사를 완료하였다. 유기농업자재 공인시험기관인 (주)친환경농산물안전성센터에 시험을 의뢰하였으며, 유전자 염기서열 상동성 검사를 통해 제품에 투입한 미생물이 *Paenibacillus polymyxa*와 상동성 99%로 확인되었다. 희석평판법을 통한 생균수 측정을 통해 제품 내 해당 미생물이 1.1×10^7 cfu/ml 포함된 것으로 확인되었다. 5종의 병원성미생물(병원성 대장균, 병원성 살모넬라, 황색포도상구균, 리스테리아 모노사이토제네스, 바실러스 세레우스) 선택배지를 이용한 검정을 통해 제품 내 병원성 미생물이 검출되지 않았다.

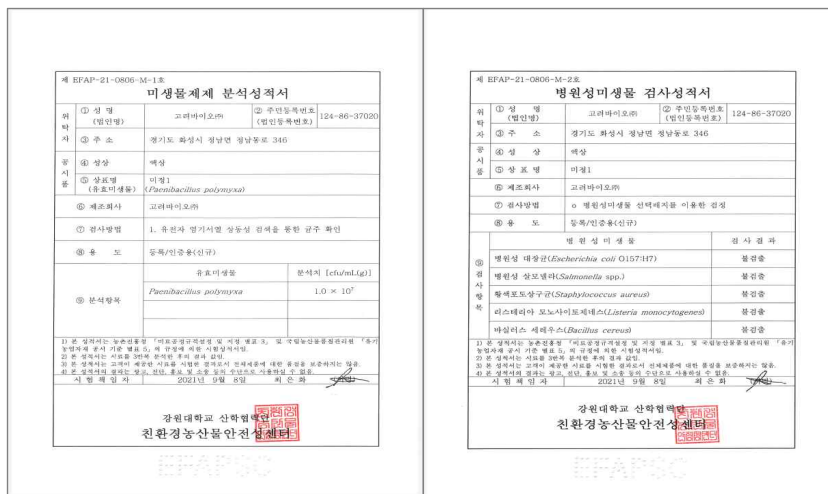


그림 121. 올팜 주성분검사 성적서

○ 시제품의 독성평가

시제품의 제품화를 위한 유기농업자재 등록의 일환으로 시제품(상표명 : 올팡)에 대한 독성시험을 완료하였다. 유기농업자재 공인시험기관인 (주)한국생물안전성연구소에 의뢰하였으며, 독성시험은 포유동물에 대한 독성시험(랫드에 대한 급성경구독성/병원성시험, 랫드에 대한 급성경피독성시험, 토끼에 대한 피부자극성시험, 토끼에 대한 안점막자극성시험)과 생태계 생물에 대한 영향시험(담수어류에 대한 영향시험)을 통해 제품에 대한 안전성이 확인되었다.

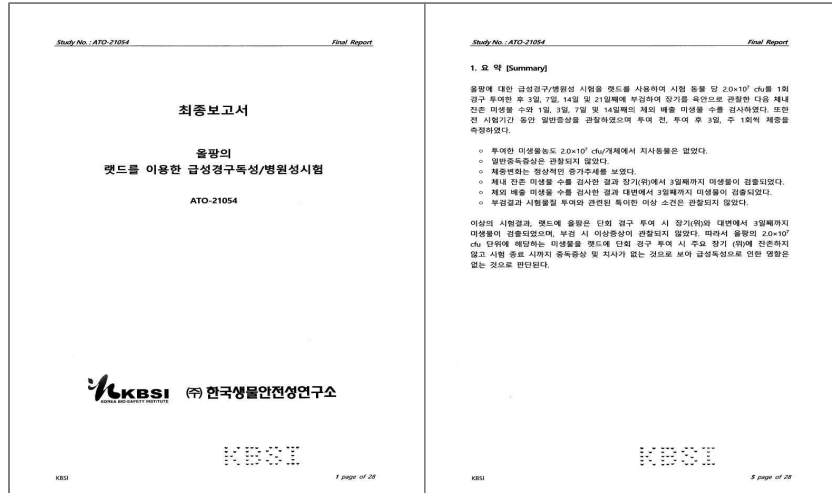


그림 122. 급성경구독성/병원성시험(랫드) 보고서

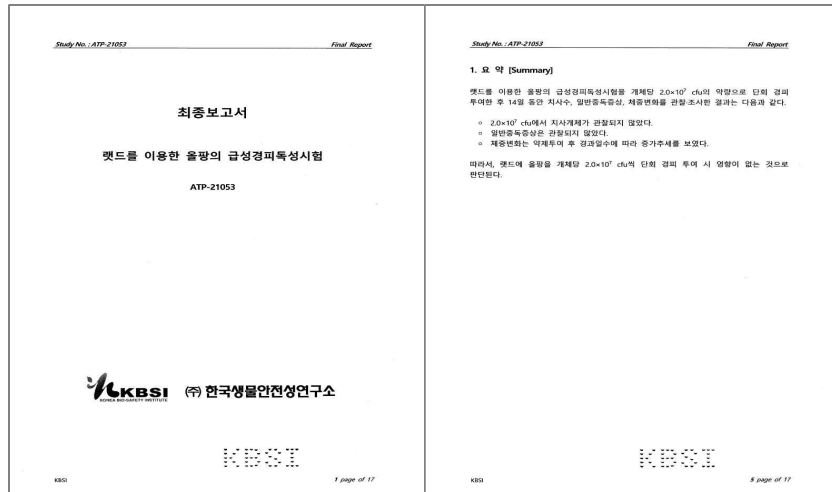


그림 123. 급성경피독성시험(랫드) 보고서

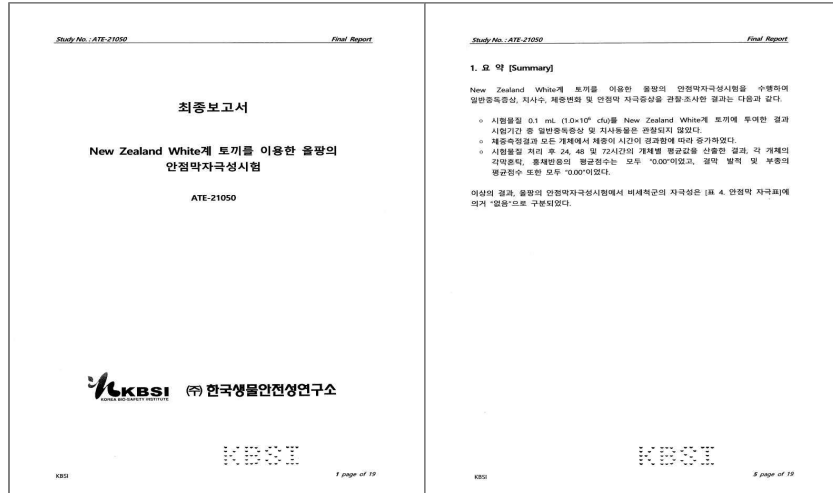


그림 124. 안점막자극성시험(토끼) 보고서

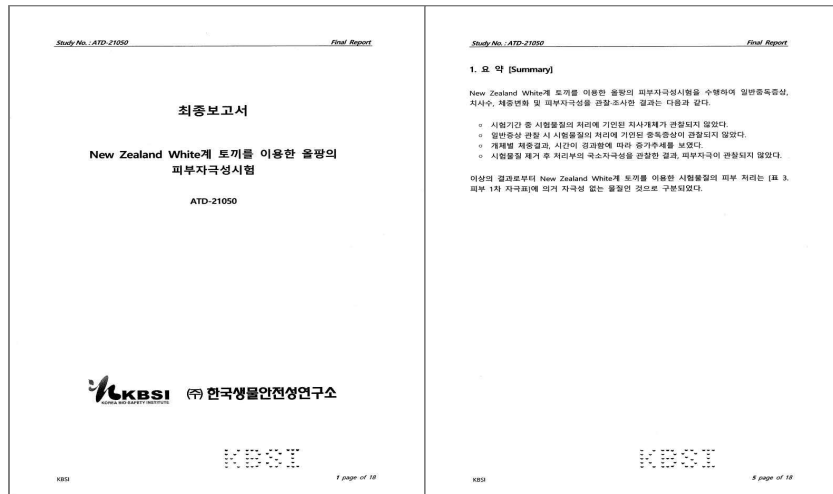


그림 125. 피부자극성시험(토끼) 보고서

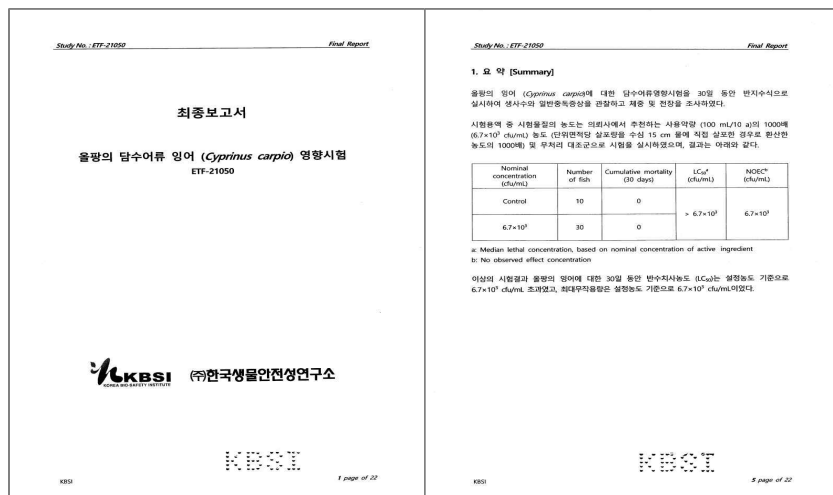


그림 126. 담수어류 영향시험 보고서

○ 시제품의 약해평가

시제품의 제품화를 위한 유기농업자재 등록의 일환으로 시제품(상표명 : 올팜)에 대한 약해시험을 완료하였다. 유기농업자재 공인시험기관인 (주)친환경농산물안전성센터에 시험을 의뢰하였으며, 약해시험은 고추, 배추, 상추, 오이, 콩, 벼 총 6종의 유식물에 기준량과 배량으로 경엽처리하여 약해의 유무를 관찰한 결과 제품 기준량과 배량에서 약해가 없는 것으로 확인된다.

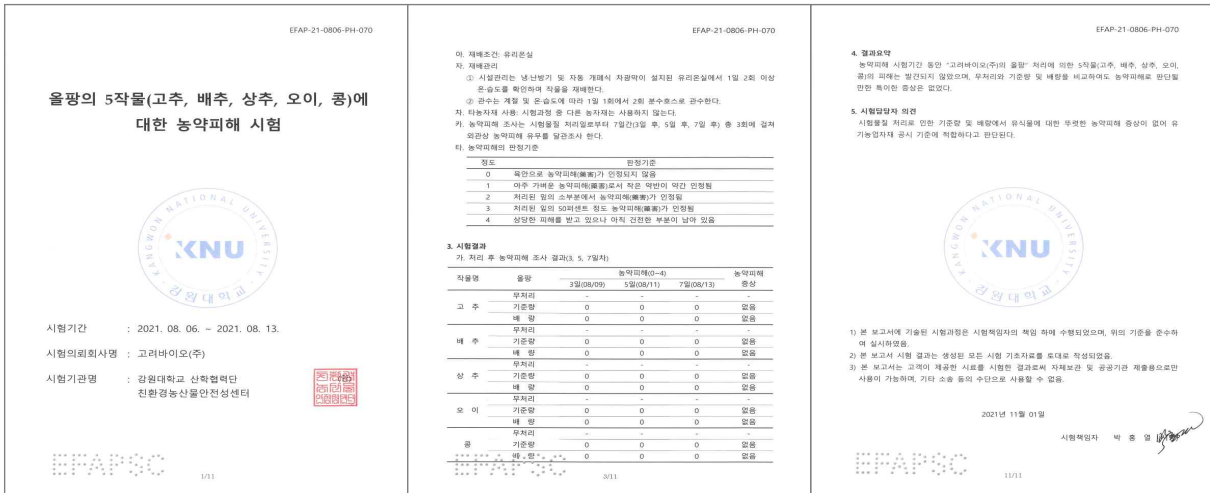


그림 127. 올팜 농약피해시험 성적서(고추, 배추, 상추, 오이, 콩)

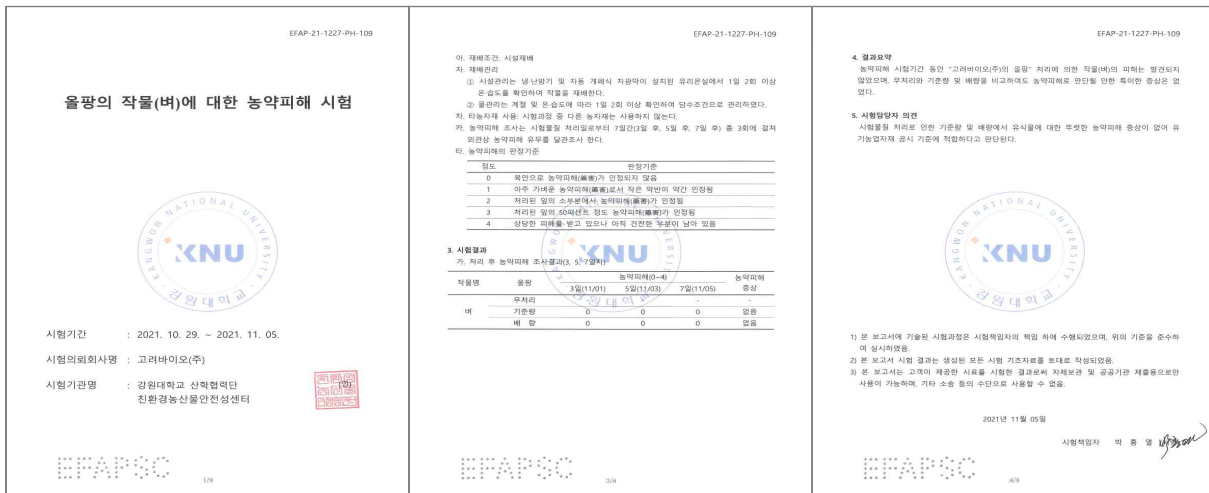


그림 128. 올팜 농약피해시험 성적서(벼)

○ 시제품의 잔류농약검사

시제품의 제품화를 위한 유기농업자재 등록의 일환으로 시제품(상표명 : 올업)에 대한 잔류농약검사를 완료하였다. 잔류농약검사는 제품 내 화학농약성분의 유무를 확인하기 위한 시험으로 Abamectin B1을 비롯해 총 322종의 화학농약성분을 LC/MSMS, GC/MSMS를 이용하여 분석하며, 유기농업자재 공인시험기관인 (주)친환경농산물안전성센터에 의뢰하였으며, 제품 내 322종의 화학농약성분이 불검출되었다.



그림 129. 올팡 잔류농약검사 성적서

□ 병해관리용 유기농업자재 공시 신청

유기농업자재는 유기농산물을 제조, 가공 또는 취급하는 과정에서 사용할 수 있는 ‘농림축산식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙, 별표1 허용물질의 종류’ 에서 정한 허용물질을 원료 또는 재료로 하여 만든 제품으로 유기농업자재 공시기관인 강원대학교 산학협력단에 작물생육용 유기농업자재로 신청하여 공시 완료되었다(상표명 : 올팡 / 공시번호 : 공시-2-4-194).

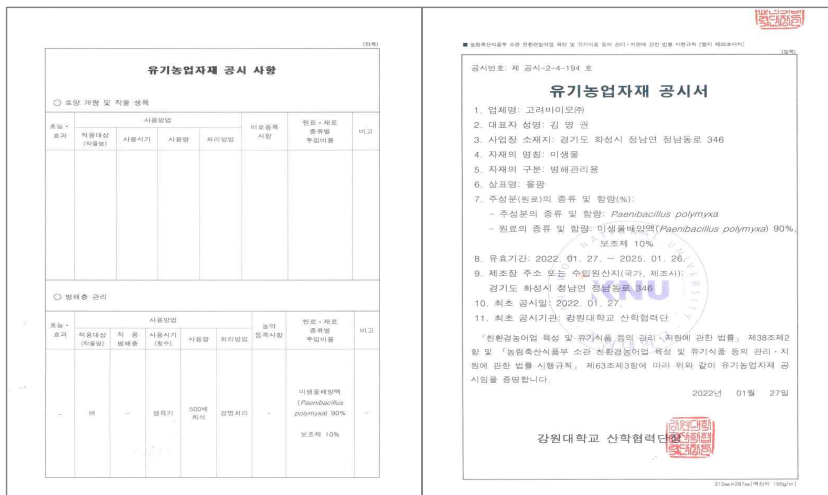


그림 130. 올팡 유기농업자재 공시서 및 제품사진



5. 사업화 연구

□ 국내외 전시회 홍보

COVID-19로 인해 대부분의 국내외 전시회가 취소되거나 내년으로 연기되어 국내외 농업관련 전시회를 통한 홍보를 진행할 수 없어 당사 홈페이지를 통해 온라인 홍보와 리플렛을 제작하여 농가, 판매점 및 관공서에 홍보하였다.



그림 131. 온라인 홍보 및 리플렛 제작

□ 시제품과 경쟁제품군과의 비교평가

경기 화성시 소재 농가 포장에서 고추 탄저병에 대한 시제품(탄저킬, 세라탄, 올팡)과 경쟁제품과의 비교평가를 실시하였으며, 경쟁제품은 미생물을 유효성분으로 하는 병해관리용 유기농업자재 3종(A,B,C)과 최근 다양한 살균효과로 각광받고 있는 황을 주성분으로 하는 병해관리용 유기농업자재 3종(D,E,F)을 선택하였으며, 대조농약으로는 디페노코나졸(10%) 입상수화제를 사용하였다. 각 제품별 권장 사용량(희석배수)으로 살포하고 병 발생초기 5일 간격 2회 경엽처리하여 이병과율을 조사하였다. 시험결과, 탄저킬과 세라탄은 미생물이나 황을 주성분으로하는 유기농업자재보다 높은 방제효과를 보였으며, 대조농약 대비 탄저킬은 92.3%, 세라탄은 87.6%의 방제효과를 보여 화학농약을 대체하기에 충분한 효과를 보였다.

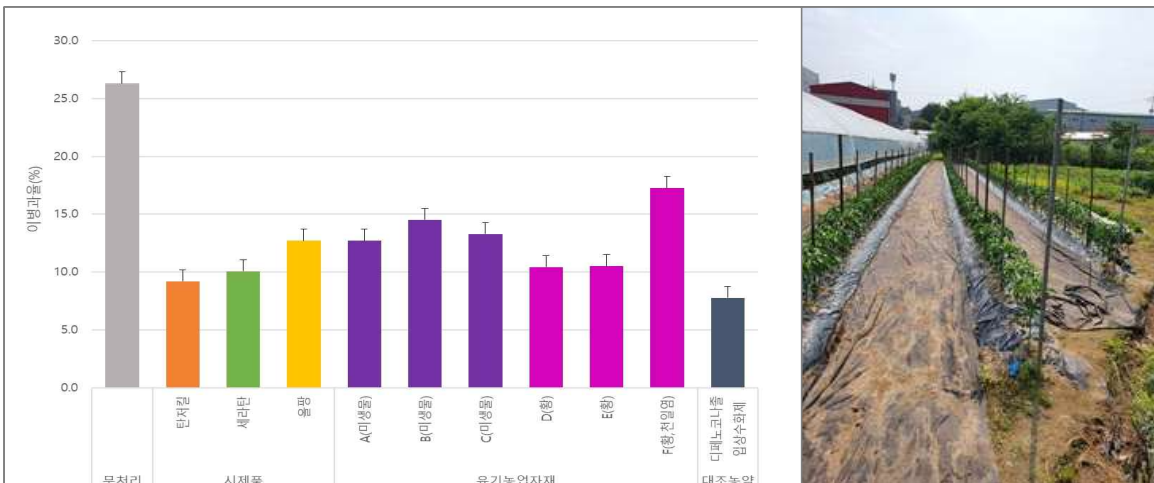


그림 132. 시제품(탄저킬, 세라탄, 올팡)의 고추 탄저병에 대한 경쟁제품군과의 비교평가

□ 사업화 전략

당사는 친환경농자재 업력 25년의 시장 선도기업으로 전국 12개 사업본부와 120여개 대리점과 거래 및 관리하고 있다. 본 연구를 통해 개발된 탄저킬을 즉시 사업화하여 유통망을 통해 판매 중이며 올해 부터 세라탄, 울업, 울광도 판매를 실시할 예정이다. 또한 전국 친환경농가 작목반, 농협 및 농업기술센터와의 연계와 적극적인 제품홍보를 통해 사업화할 예정이다. 종료 5차년도까지 누적 930백만원의 매출 달성을 목표로 하고 있으며, 이를 소비자가로 환산할 시 약 2배의 경제적 성과가 기대된다.

현재, COVID-19로 인해 직접적인 영업활동이 제한되고 고령층이 대부분인 농업인에게도 인터넷 매체의 보급이 확산됨에 따라 온라인마케팅 전담부서를 신설하여 홈페이지 운영을 활성화하고 대형 쇼핑몰을 통한 온라인 판매를 확대할 계획이다.

고려바이오 이외 많은 미생물제제 기업 및 관공서 미생물분양센터에 홍보하여 통상시절을 통한 기술 이전으로 활용성을 확대할 계획이며, 탄저병 이외의 병원균에 대한 연구를 후속연구에서 진행하고자 한다.

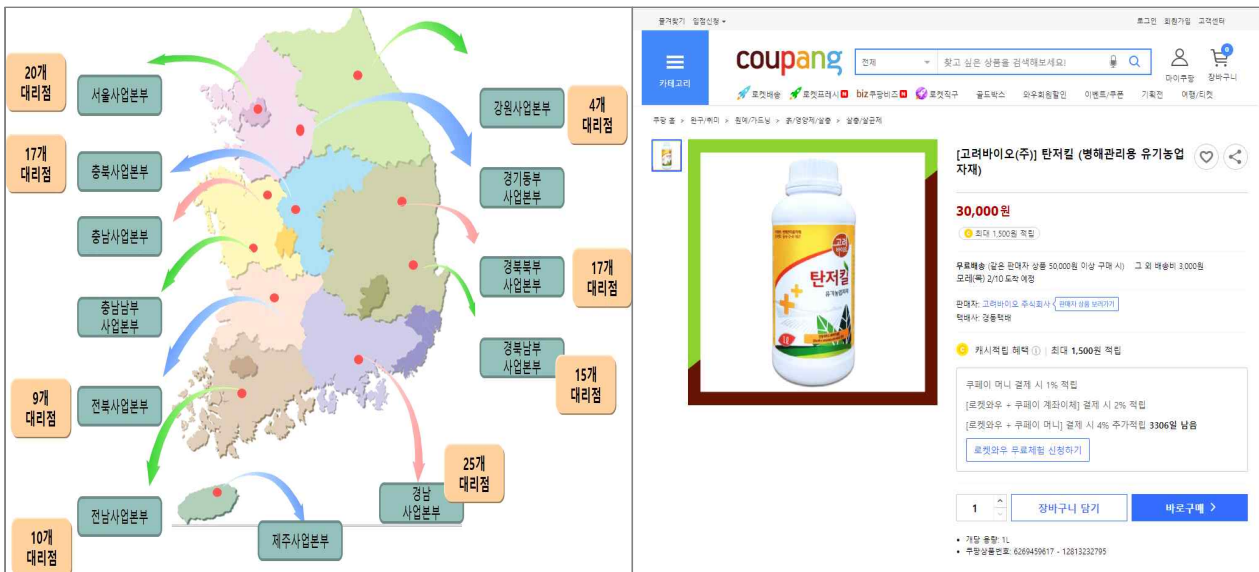


그림 133. 고려바이오(주) 전국 판매망 및 대형 쇼핑몰(쿠팡) 제품판매

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

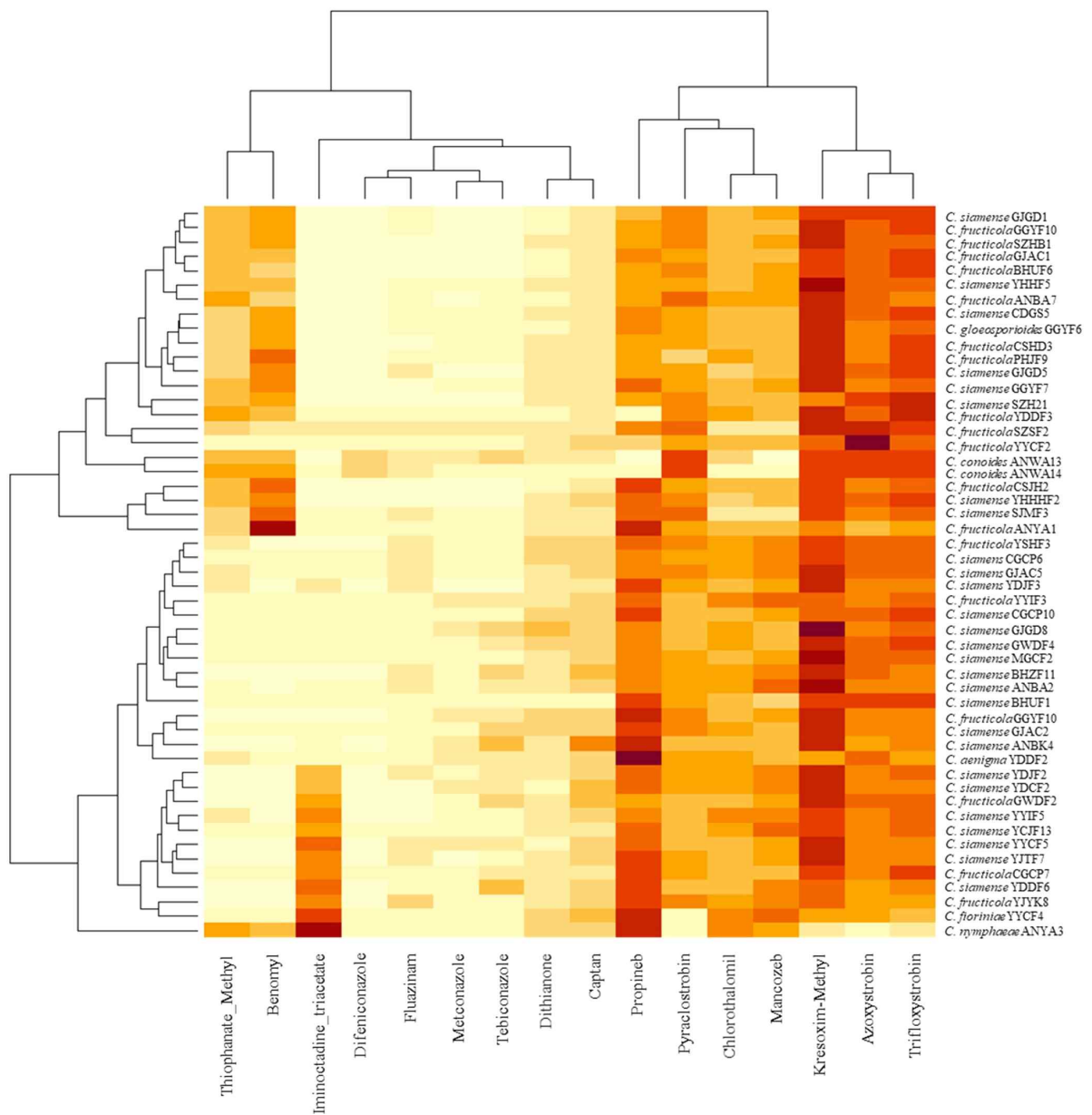
1. 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

- 유용미생물의 특성 구명 및 사과 주요 과실병 방제 조건 확립
 - 4종의 유용미생물의 사과 주요 병해 원인균에 대한 항균활성, 생리 생화학적 특성 및 식물 성장 촉진능 분석
 - 유용미생물 탄저병 발생 억제효과 실내 및 실외(포장) 검정.
 - 유용미생물 과실에서의 병 억제 기작 확인.
 - 유용미생물의 과실에서의 정착능력 연구 확인.
- 시제품으로 기존 화학농약과 대체할만한 효과 확인함.
 - 실제 과원 포장에서의 시제품으로 탄저병 방제효과 검정.
- 사과탄저병에 대한 특허 출원 국내 2건, 해외 3건
(출원번호: 10-2019-0127894, 10-2020-0137031,17/506,495)
- 유용자원확보 26건(균주기탁완료)
- 전략미생물 해독 4건 (iGEM등록)
AK-0: igem-0000770-1, E681_B: igem-0000762-1, E681_F: igem-0000769-1. GYUN-8: igem-0001612)
- 미생물 변이기작 규명
Reversible phenotypic variation 연구 중 내생포자 형성능의 회복 확인함.
- 미생물제 제제화 확립
 - 산업용 배지, 보조제(유화제, 분산제, 물성조정제 등), 효력증진용 첨가제 선발 및 유효농도 분석완료
 - 적합 제형 결정(액상)
 - 유용미생물과 보조제 혼합물의 경시적 안정성 확인 완료.
- 시제품 제작 및 제품화
 - 미생물제/ 시제품 대량생산 공정 확립
 - 기술이전 4건 완료(안동대산학협력단-고려바이오(주)).
 - 시제품의 유기농업자재 공시 완료 4건
 - 탄저킬, 세라탄, 올팡 (유기농업자재, 병해관리용), 올업(유기농업자재, 작물생육용) 생산 및 판매
 - 시제품 판로개척을 위한 해외시장 탐색(중국, 터키)

<정성적 연구개발성과 요약>

○ 생물학적 방제는 환경친화적이라는 일반적인 장점 외에도 기존 화학약제에 내성균이 발생하는 상황에 대처할 수 있는 매우 유용한 방법이다. 본 연구실에서 분석결과, 아래 그림과 같이 기존 화학약제에 내성을 나타내는 사과탄저병 균주가 다수 출현하고 있으며, 몇몇 약제에 대하여는 내성균주가 우점하고 있어 농가에 피해가 상당하였다. 이에, 본 연구실에서는 내성균주들을 MLST, 생물학적 특성 등으로 분리 동정하고, 이들에 대한 항균활성 및 식물생장촉진 연구를 수행하고 있다. 선발된 유용미생물들은 Whole genome sequencing, 활성물질 분석 등의 심화 연구를 거치게 되며, 제제화 연구, 시제품 제작, 농가실증시험 등의 일련의 제품화과정을 통하여 농민에게 직접 도움이 되는 제품으로 출시되게 되었다.



<탄저병균의 약제별 저항성 분석>

○ 약제 내성균에 대한 항균효과 및 실내검정

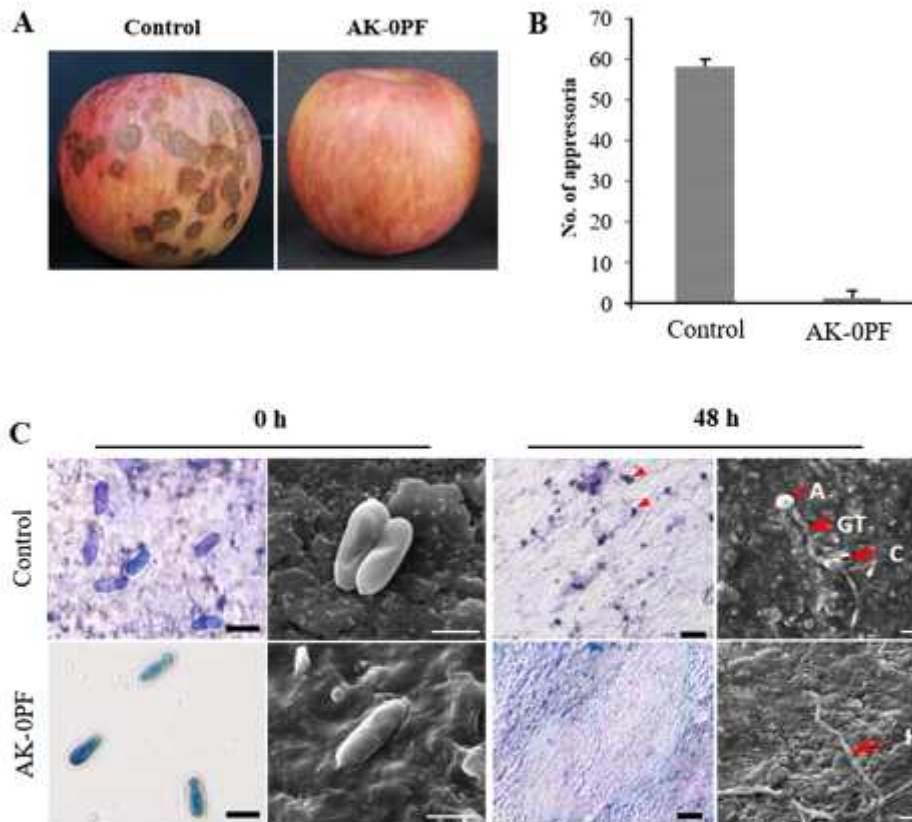


Figure 1. The ability of AK-0 product formulation (AK-0PF) to control anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and microscopic observation. (A) Disease suppression of anthracnose caused by *C. gloeosporioides* APEC18-004 on matured apples treated with AK-0PF. (B) Conidial germination was suppressed by AK-0PF. (C) Microscopic observations and scanning electron microscope (SEM) analysis of conidial germination and appressorium formation of *C. gloeosporioides* after AK-0 formulation treatment during 48 h of incubation at 25 °C compared to that in the non-treated control. A appressorium, GT germ tube, C conidium, H hyphae. Bar = 10 μm (microscopy), bar = 20 μm (SEM). The experiment was repeated at least once.

○ 유용미생물의 동정

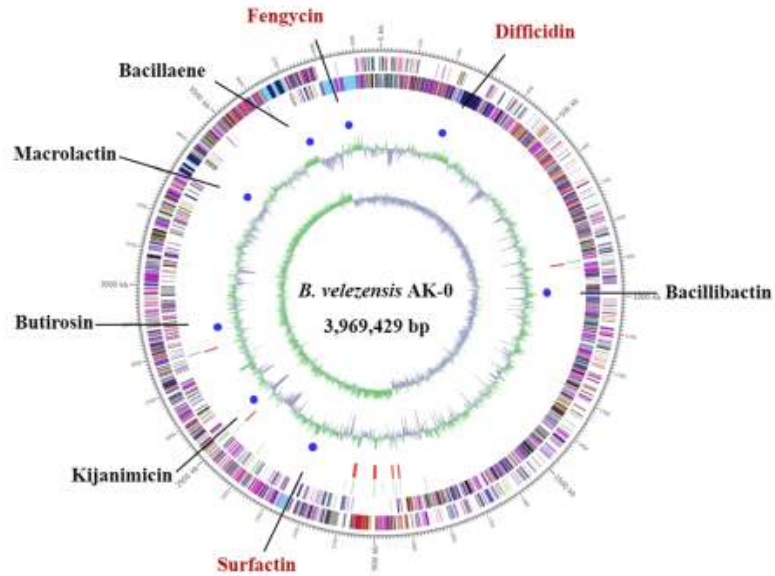


Figure 3. Whole-genome map of *Bacillus velezensis* AK-0. Marked characteristics are shown from the outside to the center; coding sequence (CDS) on the forward strand, CDS on the reverse strand, tRNA, rRNA, guanine-cytosine (GC)-content, and GC skew. Secondary metabolites with biocontrol activity were also displayed on this ring using blue arcs (surfactin, fengycin, bacillibactin, macrolactin, bacillaene, difficidin, kijanimicin and butirosin).

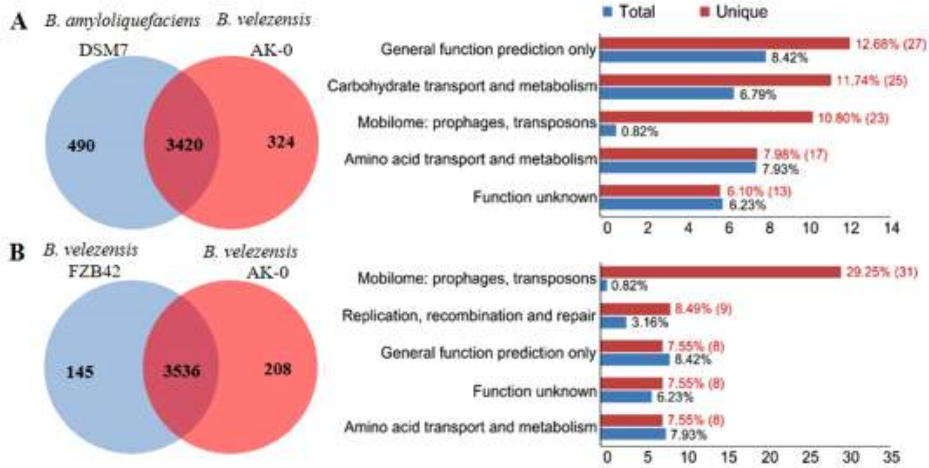


Figure 4. Venn diagram showing the comparison of common sharing unique protein-encoding genes between *Bacillus velezensis* AK-0 and *B. amyloliquefaciens* DSM7 (A), and *B. velezensis* FZB42 and *B. velezensis* AK-0 (B). A summary of unique SNPs from the total genes of the *B. velezensis* strain is shown here. The numbers 3420 and 3536 indicate the number of common high-expression gene families between the two strains DSM7 and AK-0 and between the other two strains FZB42 and AK-0, respectively.

○ 유용미생물의 제제화 및 대량생산 최적화, 시제품 제조, 효과 검증

경제성 검토를 위해 고추 탄저병에 대한 경쟁제품군과의 비교평가를 실시하였으며, 유사한 미생물을 유효성분으로 하는 경쟁제품군보다는 탄저킬이 상대적으로 우수한 효과를 보였으며, 최근 다양한 살균 효과로 각광받고 있는 황을 유효성분으로 하는 유기농업자재와 비교평가 결과, 동등한 효과를 보여 탄저킬은 미생물을 유효성분으로 하는 유기농업자재임에도 불구하고 충분한 경제성과 사업성이 있음을 확인하였다.



<미생물제제의 고추탄저병 방제효과>

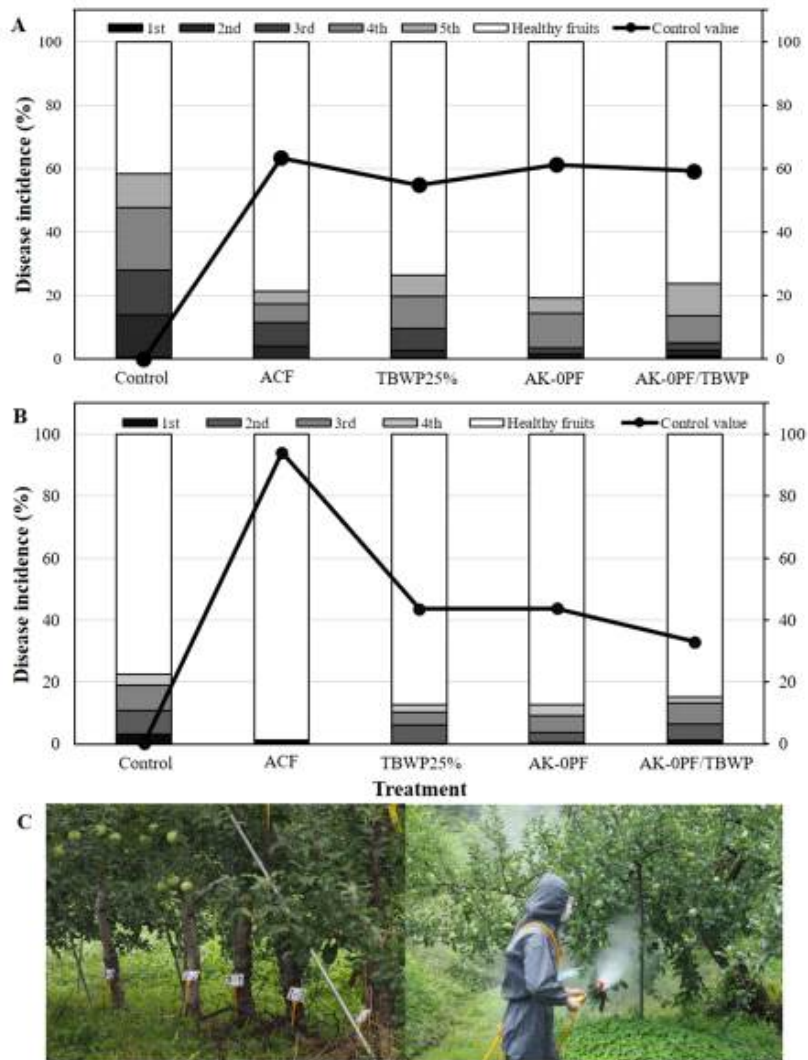


Figure 2. Effect of AK-0 product formulation and chemical fungicide application against bitter rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on apple orchards (under field conditions) in Yecheon (A) and Mungyeong (B) in Gyeongbuk Province, Korea. (C) Representative photographs of the apple orchard showing the application of AK-0PF (100-fold) during the period from July 2019 to October 2019 to control apple bitter rot. A total of nine times applications was performed by the foliar spray method using an electric power sprayer. Each treatment contained three replicates (plants) in the experiment. Results were compared using the least significant difference (LSD) test T_c with $P < 0.01$. The diseased fruits were harvested five and four times, in Yecheon and Mungyeong, respectively, to record the incidence (%). Control values (disease control %) are expressed along with the data. Control: plant treated with water, ACF: plants treated with agricultural chemical fungicides (Table S1), TBWP: plants treated with tebuconazole 25% WP (wetable powder), AK-0PF: AK-0 product formulation, AK-0PF/TBWP: plants treated with AK-0PF or TBWP as an alternative spray every week. The total number of diseased fruits harvested corresponding to 100% were 492, 649, 788, 1353, and 1087 for control, ACF, TBWP25%, AK-0PF, and AK-0PF/TBWP25, respectively in Yecheon, while the diseased fruits were 323, 450, 510, 385, and 383 for control, ACF, TBWP25%, AK-0PF, and AK-0PF/TBWP25, respectively in Mungyeong.

라. 제품화, 공인기관시험 및 사업화

시제품의 제품화를 위해 공인시험기관에서 주성분분석, 독성시험, 유식물 약해시험, 병원성미생물검사, 잔류농약검사를 진행하여 3개의 시제품을 병해관리용 유기농업자재로 공시하였다(탄저킬, 세라탄, 울업). 또한 1개의 제품(울팡)을 작물생육용 유기농업자재로 공시하였다.

가장 먼저 제품화가 완료된 탄저킬은 출시 첫해인 2020년 약 1천만원, 2021년 약 2천만원의 매출실적을 창출하였으며, 소비자가격 기준으로는 약 2배에 상응하는 경제적 성과를 달성하였다.



마. 홍보 및 매출성과

안전농산물 생산을 위한 전문관리제

탄저킬

유기농업자재

병해관리용 유기농업자재
공시-2-4-167

탄저킬에 함유된 '미생물' 소개합니다

어떤 특징을 가지고 있나요?

바실러스 아밀로리퀘페이스스 (*Bacillus amyloliquefaciens*)

바실러스속 그람양성균이며 포자를 형성합니다.
본 미생물은 안동대학교에서 개발한 특허기술을 이전 받은 것으로
식물병원성 진균에 대해 항진균 활성을 가집니다.

천연물이므로 분해속도가 빠르고 인축에 축적되지 않습니다.
안전한 유기농업자재로 작물 관리 시작하세요~!

제품 정보

- 제품명 탄저킬
- 용량 1L
- 공시번호 공시-2-4-167
- 자재종류 병해관리용
- 원료의 종류 및 함량 미생물배양액(*B. amyloliquefaciens*) 80%, 보조제 20%
- 유통기한 제조연월일로부터 3년

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

○ 가. 미생물 유전체사업의 성과목표

성과목표		전략 미생물 해독	유용 유전체 자원 확보	표준 유전체 해독	메타 유전체 분석	유전체 분석 기술 개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마커 개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표		3	2							
1차년도	목표									
	실적									
2차년도	목표	1	1							
	실적	2	4							
3차년도	목표	1								
	실적	1	1							
4차년도	목표	1	1							
	실적	1	21							
계	목표	3	2							
	실적	4	26							

○ 나. 기타 성과목표

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용홍보		기타 (타 연구 활용 등)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문 SC I	비 SC I	논문 평균 IF			학술 발표	정책 활용		홍보 전시
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	2	2		2	6	4	960				2			5	1					
1차년도	목표													1						
	실적													4						
2차년도	목표	1				1								1						
	실적	1			1	1.0	1							2	1					
3차년도	목표	1				1	10					1	1.255	2	1					
	실적	1			1	1.1	1	11				1	4.13	4	4	1		3		
4차년도	목표				2		2	20				1	1.2	1						

차 년 도	표 실 적	1		2	2.1	2	21				2	55.00	3	2		4
소 계	목 표	2		2		4	30				2	1.255	5		1	
	실 적	3		4	4.2	4	32				3	4.50	13	6	2	
종료 1차년도					6		30									
종료 2차년도							100									
종료 3차년도		2					250									
종료 4차년도							250									
종료 5차년도							300									
소 계		2			6		930									
합 계		2	2		2	6	960									

< 정량적 연구개발성과표(예시) >

(단위 : 건, 천원)

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

* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[에스시아 Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구 시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신품 종 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(기술 지도, 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 (YYYY~YYYY)	n단계 (YYYY~YYYY)	
1								
2								

* 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)

[미생물유전체사업 성과]

전략미생물 해독

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	Bacillus velezensis AK-0	전장 유전체	2019.10.31	igem-0000770-1	
2	Paenibacillus polymyxa E681-B	전장 유전체	2019.10.24	igem-0000762-1	
3	Paenibacillus polymyxa E681-F	전장 유전체	2019.10.28	igem-0000769-1	
4	Serratia plymuthica GYUN-8	전장 유전체	2020.10.15	igem-0001612	

유용 유전자원 확보

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	Paenibacillus polymyxa APE126	유용미생물 균주기탁	2019.11.06	FBCC-B405	
2	Paenibacillus polymyxa APE144	유용미생물 균주기탁	2019.11.06	FBCC-B404	
3	Brevibacterium sp. APEC152	유용미생물 균주기탁	2019.11.06	FBCC-B403	
4	Bacillus sp. APEC156	유용미생물 균주기탁	2019.11.06	FBCC-B402	
5	Serratia plymuthica GYUN-8	유용미생물 균주기탁	2020.10.15	KACC 81140BP	
6	Xanthomonas arboricola pv. juglandis GYUN-10	미생물 균주기탁	2021. 12. 6	KACC22531	
7	Xanthomonas arboricola pv. juglandis GYUN-11	미생물 균주기탁	2021. 12. 6	KACC22532	
8	Pseudomonas viridiflava GYUN-274	미생물 균주기탁	2021. 12. 6	KACC22533	
9	Arthrobacter bussei GYUN-310	미생물 균주기탁	2021. 12. 6	KACC22534	
10	Microbacterium shaanxiense GYUN-312	미생물 균주기탁	2021. 12. 6	KACC22535	
11	Frigoribacterium faeni GYUN-325	미생물 균주기탁	2021. 12. 6	KACC22536	
12	Pantoea agglomerans GYUN-335	미생물 균주기탁	2021. 12. 6	KACC22537	
13	Pseudomonas fluorescens GYUN-520	미생물 균주기탁	2021. 12. 6	KACC22538	
14	Ochrobactrum rhizosphaerae GYUN-522	미생물 균주기탁	2021. 12. 6	KACC22539	
15	Pantoea ananatis GYUN-551	미생물 균주기탁	2021. 12. 6	KACC22540	
16	Deinococcus actinosclerus GYUN-570	미생물 균주기탁	2021. 12. 6	KACC22541	
17	Variovorax paradoxus GYUN-583	미생물 균주기탁	2021. 12. 6	KACC22542	
18	Chryseobacterium taeanense GYUN-584	미생물 균주기탁	2021. 12. 6	KACC22543	
19	Staphylococcus epidermidis GYUN-603	미생물 균주기탁	2021. 12. 6	KACC22544	
20	Serratia plymuthica GYUN-2380	미생물 균주기탁	2021. 12. 6	KACC22545	
21	Pantoea ananatis GYUN-2384	미생물 균주기탁	2021. 12. 6	KACC22546	
22	Agrobacterium rubi GYUN-2392	미생물 균주기탁	2021. 12. 6	KACC22547	
23	Microbacterium hydrothermale GYUN-2393	미생물 균주기탁	2021. 12. 6	KACC22548	
24	Raoultella ornithinolytica GYUN-2401	미생물 균주기탁	2021. 12. 6	KACC22549	
25	Pseudomonas syringae GYUN-2402	미생물 균주기탁	2021. 12. 6	KACC22550	
26	Acinetobacter calcoaceticus GYUN-2403	미생물 균주기탁	2021. 12. 6	KACC22551	

표준유전체 해독

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)

메타유전체 분석

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)

유전체 분석기술 개발

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일시	등록번호	생산량 (GB)

NABIC 등록

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)

병원성미생물진단마커 개발

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)

병원성미생물 정보 완성

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)

미생물 병발생 기작 규명

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/ 비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Molecular changes associated with spontaneous phenotypic variation of <i>Paenibacillus polymyxa</i> , a commonly used biocontrol agent, and temperature-dependent control of variation	Scientific Reports	이연미, 전용호	10	UK	Springer Nature	SCI	2020. 10. 6	2045-2322	100
2	Characterization of <i>Bacillus velezensis</i> AK-0 as a biocontrol agent against apple bitter rot caused by <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Scientific Reports	김영수, 전용호	11	UK	Springer Nature	SCI	2021. 1.12	2045-2322	100
3	Distinct transcriptional programs underlie differences in virulence of isolates on host plants in a fungal pathogen, <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Frontiers in Microbiology	천원수, 전용호	12	스위스	Frontiers	SCI	2021. 11. 8	1664302X	100

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	국제식물생명공학회 2018 (IAPB; International Association for Plant Biotechnology)	Y. S. Kim, K. Balaraju, and Y. H. Jeon.	2018. 08. 17 ~08. 24	Convention Centre Dublin (CCD)	아일랜드
2	2018년 작물보호분야 공동 국제학술대회	이연미, 서영수, 류충민, 박승환, 전용호	2018. 10. 24 ~10. 26	김대중컨벤션센터, 광주	대한민국
3	2018년 작물보호분야 공동 국제학술대회	김영수, 전용호	2018. 10. 24 ~10. 26	김대중컨벤션센터, 광주	대한민국
4	2018년 작물보호분야 공동 국제학술대회	김영수, 전용호	2018. 10. 24 ~10. 26	김대중컨벤션센터, 광주	대한민국
5	한국미생물생명공학회	이연미, 서영수, 전용호	2019. 06. 23 ~06.25	제주 ICC	대한민국
6	FEMS (유럽미생물학회)	천원수, 김영수, 이연미, 전준현, 전용호	2019. 07. 07. ~07. 11	글래스고	스코틀랜드
7	2020 추계 한국식물병리학회	이연미, 김영수, 바라라주, 전용호	2020. 10. 14. ~10.16	한국과학기술회관 On-line	대한민국
8	2020 추계 한국식물병리학회	이연미, 김영수, 바라라주, 서영수, 박정욱, 류충민, 박승환, 김지현, 강석찬, 전용호	2020. 10. 14. ~10.16	한국과학기술회관 On-line	대한민국
9	2020 추계 한국식물병리학회	전용호	2020. 10. 14. ~10.16	한국과학기술회관 On-line	대한민국
10	2020 한국균학회 정기발표회	전용호	2020. 8. 20	소노벨 변산	대한민국
11	한국식물병리학회 추계학술대회	김중연, 전용호	2021. 11. 11	On-line	대한민국
12	mBiome International Conference	전용호	2021. 12. 10	연세대학교	대한민국
13	mBiome International Conference	이연미, 바라라주, 전용호	2021. 12. 10	연세대학교	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	Paenibacillus polymyxa APE126	FBCC-B405	생물자원관 FBCC	2019
2	Paenibacillus polymyxa APE144	FBCC-B404	생물자원관 FBCC	2019
3	Brevibacterium sp. APEC152	FBCC-B403	생물자원관 FBCC	2019
4	Bacillus sp. APEC156	FBCC-B402	생물자원관 FBCC	2019
5	Serratia plymuthica GYUN-8	KACC 81140BP	농업미생물유전자원센터 KACC	2020
6	Xanthomonas arboricola pv. juglandis GYUN-10	KACC22531	농업미생물유전자원센터 KACC	2021
7	Xanthomonas arboricola pv. juglandis GYUN-11	KACC22532	농업미생물유전자원센터 KACC	2021
8	Pseudomonas viridiflava GYUN-274	KACC22533	농업미생물유전자원센터 KACC	2021
9	Arthrobacter bussei GYUN-310	KACC22534	농업미생물유전자원센터 KACC	2021
10	Microbacterium shaanxiense GYUN-312	KACC22535	농업미생물유전자원센터 KACC	2021
11	Frigoribacterium faeni GYUN-325	KACC22536	농업미생물유전자원센터 KACC	2021
12	Pantoea agglomerans GYUN-335	KACC22537	농업미생물유전자원센터 KACC	2021
13	Pseudomonas fluorescens GYUN-520	KACC22538	농업미생물유전자원센터 KACC	2021
14	Ochrobactrum rhizosphaerae GYUN-522	KACC22539	농업미생물유전자원센터 KACC	2021
15	Pantoea ananatis GYUN-551	KACC22540	농업미생물유전자원센터 KACC	2021
16	Deinococcus actinosclerus GYUN-570	KACC22541	농업미생물유전자원센터 KACC	2021
17	Variovorax paradoxus GYUN-583	KACC22542	농업미생물유전자원센터 KACC	2021
18	Chryseobacterium taeanense GYUN-584	KACC22543	농업미생물유전자원센터 KACC	2021
19	Staphylococcus epidermidis GYUN-603	KACC22544	농업미생물유전자원센터 KACC	2021
20	Serratia plymuthica GYUN-2380	KACC22545	농업미생물유전자원센터 KACC	2021
21	Pantoea ananatis GYUN-2384	KACC22546	농업미생물유전자원센터 KACC	2021
22	Agrobacterium rubi GYUN-2392	KACC22547	농업미생물유전자원센터 KACC	2021
23	Microbacterium hydrothermale GYUN-2393	KACC22548	농업미생물유전자원센터 KACC	2021
24	Raoultella ornithinolytica GYUN-2401	KACC22549	농업미생물유전자원센터 KACC	2021
25	Pseudomonas syringae GYUN-2402	KACC22550	농업미생물유전자원센터 KACC	2021
26	Acinetobacter calcoaceticus GYUN-2403	KACC22551	농업미생물유전자원센터 KACC	2021

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 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	바실러스 벨레젠시스 AK-0 균주 및 이를 포함하는 과수병해 방제용 미생물 제제	대한 민국	안동대학 교산학협 력단	2019.1 0.15	10-201 9-0127 894					100%	✓
2	세라티아 플리무티카 (Serratia plymuthica) GYUN-8 신균주 및 이의 용도	대한 민국	안동대학 교산학협 력단	2020.1 0.21	10-202 0-0137 031					100%	✓
3	Novel strain Serratia plymuthica GYUN-8 and use thereof	미국	안동대학 교산학협 력단	2021. 10. 20	17/506, 495					100%	✓

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다

(최대 3개 중복선택 가능).

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

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

○ 국내표준

번호	인증구분 ¹⁾	인증여부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	제안/인증일자

- * 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.

○ 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	탄저킬	2020.08	고려바이오(주)	-	농업	2년	강원대학교 산학협력단	2020.08.19
2	세라탄	2020.12	고려바이오(주)	-	농업	2년	강원대학교 산학협력단	2020.12.23
3	올업	2021.10	고려바이오(주)	-	농업	2년	강원대학교 산학협력단	2021.11.25
4	올팡	2021.10	고려바이오(주)	-	농업	2년	강원대학교 산학협력단	2022.01.27

□ 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	기술이전 노하우	Bacillus amylokiquefaciens AK-0 균주를 이용한 사과 병해 방제 및 식물생장촉진 기술	고려바이오(주)	2019. 11. 21	1,000,000	1,000,000
2	기술이전 노하우	세라티아 플리므티카(Serratia plymuthica) GYUN-8 신규주 및 이의 용도	고려바이오(주)	2020. 10. 22	1,100,000	2,100,000
3	기술이전 노하우	패니바실러스 폴리믹사(Paenibacillus polymyxa) GYUN-2273 신규주 및 이의 용도	고려바이오(주)	2021. 11. 16	1,100,000	3,200,000
4	기술이전 노하우	바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis) GYUN-2433 신규주 및 이의 용도	고려바이오(주)	2021. 11. 16	1,100,000	4,300,000

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 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	신제품 개발	국내	병해관리용 유기농업자재 (상표명: 탄저킬)	바실러스 AK-0균주를 이용한 제제	고려바이오 (주)	31,800		2020-2021	10
2	기술이전	신제품 개발	국내	병해관리용 유기농업자재 (상표명: 세라탄)	세라티아 GYUN-8균주를 이용한 제제	고려바이오 (주)				
3	기술이전	신제품 개발	국내	유기농업자재 (상표명: 올업)	Bacillus velezensis를 이용한 작물생육용 유기농업자재	고려바이오 (주)				
4	기술이전	신제품 개발	국내	유기농업자재 (상표명: 올팡)	Paenibacillus를 이용한 병해관리용 유기농업자재	고려바이오 (주)				

* 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)		
병해관리용 유기농업자재 탄저킬	2020	10,200	-	10,200	출고가15,000원×680병
병해관리용 유기농업자재 탄저킬	2021	21,600	-	21,600	출고가15,000원×1,320병 +소비자가30,000원×60병
합계		31,800	-	31,800	

□ 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
			yyyy년	yyyy년	
합계					

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	
		생산인력	
	개발 후	연구인력	
		생산인력	

□ 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
1	경북농업마이스터 사과병해 교육 및 생물적 방제	2020. 3. 1 ~6. 30	경북농업마이스터 사과전공 농업인	안동대학교	30
2	경남농업마이스터 사과병해 교육 및 생물적 방제	2020. 9. 11 ~ 10. 16	경남농업마이스터 사과전공 농업인	경남농업기술원 사과이용연구소	50
3	문경 사과재배농업인 사과병해 및 생물적 방제	2020. 1. 31	문경 사과재배 농민	문경농업기술센터	200
4	청송 사과재배농업인 사과병해 및 생물적방제	2020. 7. 8	청송 사과재배 농민	청송농업기술센터	150
5	경북 사과마이스터 교육	2021. 4. 7	경북농업마이스터 사과전공 농업인	안동대학교	24
6	경북농업마이스터 사과병해 교육 및 미생물제제 사용법	2021. 8. 25	경북농업마이스터 사과전공 농업인	안동대학교	24

□ 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	구분 (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	식물병리학	2019	1					1			1		
2	식물병리학	2020		1			1				1		

#1: 김영수 과제 참여연구원: 박사학위 취득 후 (주)경농 연구소 생물농약팀으로 취업

#2: 권혁대 과제 참여연구원: 석사학위 취득 후 산림과학원 산림약용연구소 취업

□ 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
1	중앙일간지	연합뉴스 등	미생물농약 대량생산 때 생물학적 변이 규명	2020. 10. 12
2	지방일간지	매일신문 등	안동대 연구팀 미생물 변이기작 세계 첫 규명	2020. 10. 12
3	월간매거진	이슈메이커	미생물로 성공하는 농업의 모습 그린다	2020. 10. 27
4	중앙일간지	헤럴드경제 등	안동대 전용호 교수팀, 세계 첫 사과 탄저병 방제 미생물 유전체 규명	2021. 1. 13
5	지방TV방송	안동MBC, TBC	안동대, 사과 탄저병 억제 유용미생물 개발	2021. 1. 13
6	지방일간지	매일신문 등	탄저병 방제 유용미생물 개발	2021. 1. 13
7	중앙TV방송	NBS 농업방송	탄저병 방제 미생물제제 개발	2021. 1. 31

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
1	수상	우수포스터상	추계 한국식물병리학회에서 본 연구과제 결과를 발표하여 우수포스터발표상 수상 제목은 " Molecular changes associated with spontaneous phenotypic variation of Paenibacillus polymyxa, a commonly used biocontrol agent, and temperature-dependent control of variation	참여연구원 이연미	2020. 10. 16	한국식물병리학회
2	수상	감사장	추계 한국식물병리학회에서 본 연구과제 결과를 발표하여 감사장 수상 제목: Apple Bitter Rot Season is Upon Us: Clinical Pathology of Apple“	전용호	2020. 10. 16	한국식물병리학회
3	수상	공로장	미생물유전체전략연구사업단 과제를 수행한 공로를 인정받아 공로장 수상	연구책임자 전용호	2021. 12. 10	농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단
4	수상	우수산학협력상	본 과제연구를 통한 산학협력분야에 성과를 인정받아 안동대학교 산학협력 우수교수상 수상	전용호	2020. 12. 22	안동대학교

[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)

* 「과학기술기초법 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 단백질체정보, 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

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 유용미생물을 이용한 사과 주요 병방제 효과 및 작물 생장촉진 효과 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○유용미생물 이용 병방제 효과 및 생육촉진 연구 결과 <ul style="list-style-type: none"> - 미생물 분야 저명 저널에 3편 게재 <ul style="list-style-type: none"> Scientific Reports 2편, Frontiers in Microbiology 1편 학술발표 13편 발표 (우수포스터상 1회 수상) 국내외 특허출원 3건 (국내 2건 / 미국 1건) 연구사업단 및 과제 연구결과 홍보 (일간지 및 TV방송 7건) 연구결과를 통한 우수산학협력상 등 4건 수상 ○연구인력 양성(박사/석사/학사) <ul style="list-style-type: none"> 참여연구원의 박사, 석사학위 취득 2명 참여연구원의 학사졸업 4명 ○고용창출 <ul style="list-style-type: none"> 참여연구원 2명, 관련 기업체 연구소로 취업 ○교육 및 컨설팅 <ul style="list-style-type: none"> 연구결과를 지역 농업기관 및 농민 대상으로 병해 및 미생물제제 사용법 교육, 컨설팅 6건 수행함(478명) 	100
○ 선정미생물 유전체 해독 2건 이상/유용 미생물 유전자원 확보 1건 이상	<ul style="list-style-type: none"> ○ 선정 미생물 유전체 해독 4건 <ul style="list-style-type: none"> Bacillus velezensis AK-0 Paenibacillus polymyxa E681-F Paenibacillus polymyxa E681-B Serratia plymuthica GYUN-8 ○ 생명자원(생명정보) 27군주 KACC 등 등록기탁 <ul style="list-style-type: none"> Pseudomonas fluorescens GYUN-520 (KACC 22538)등 KACC 기탁 	100
○ 유용미생물을 이용한 과수, 과채류 병해 방제 및 생육증진용 미생물제제 제품화	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기술이전 4건(유상실시) ○ 제품화 4건 <ul style="list-style-type: none"> 상표명: 병해관리용 유기농업자재 ‘탄저킬’ (공시번호: 공시-2-4-167호) 상표명: 병해관리용 유기농업자재 ‘세라탄’ (공시번호: 공시-2-4-175호) 상표명: 병해관리용 유기농업자재 ‘올팡’ (공시번호: 공시-2-4-194호) 상표명: 작물생육용 유기농업자재 ‘올업’ (공시번호: 공시-2-2-283호) ○ 매출발생 1건 <ul style="list-style-type: none"> 현재 탄저킬 매출 33,000 (천원) 	100%

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

해당 없음

2) 자체 보완활동

해당 없음

3. 연구개발 과정의 성실성

세부기관과 협동기관이 협력하여 성실하게 수행하였음
목표성과 대비 초과달성함
제품화에 성공하여 매년 매출이 증대할 것으로 기대됨

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

사과 탄저병에 대한 미생물제제 개발은 처음이었으며 제품화에 성공하였기에 다양한 식물의 탄저병에 대한 시도와 도전이 있을 것으로 기대가 됨

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

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

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)]

[뒷면지]

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 미생물유전체전략연구개발사업 ○○연구개발과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(○○전문기관)에서 시행한 ○○연구개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	918009-4		
사업구분	농림수산식품 미생물유전체전략연구사업				
연구분야	조기성과창출분야		과제구분	단위	
사업명	미생물유전체전략연구사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	유전체 분석 기반 사과병해 방제 및 가지과 작물 생육촉진 미생물제제 개발		과제유형	(개발)	
연구개발기관	2018년 4월 ~ 2021년 12월(총 4년)		연구책임자	전 용 호	
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2018. 4~ 12. 31	200	66.7	266.7
	2차년도	2019.1.1.~12.31	250	83.4	333.4
	3차년도	2020.1.1.~12.31	225	83.4	308.4
	4차년도	2021.1.1.~12.31	225	83.4	308.4
	5차년도				
	계	2018.4~2021.12.31	900	316.9	1,216.9
참여기업	고려바이오(주)				
상대국			상대국연구개발기관		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2022. 2. 10.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
안동대학교	교수	전 용 호

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.

확약	
----	--

I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

사과 재배시 농약살포 횟수가 연간 10 ~ 15회에 이룸에도 불구하고 유용미생물을 이용한 방제 연구는 거의 없는 실정이다. 본 연구팀은 다년간의 유용미생물 연구 및 사과병 연구 경험을 토대로 유용미생물 4종을 이용하여 제품화에 성공하여 사과재배 및 과채류의 친환경재배에 활용가능할 것으로 사료된다.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

환경보전에 필수적인 생물학적 방제제로서 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 유기농법에 접목될 수 있기 때문에 시장성이 넓고, 고부가가치를 나타낼 수 있고 경제 산업적으로도 파급효과가 크다. 표현형 변이기작의 원인을 규명함으로써 안정적 생물학적 방제제 생산이 가능하다고 판단된다.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

본 연구개발의 성과물은 고려바이오(주)에서 직접 제조하여, 일차적으로 고려바이오의 기존거래처(농협, 각 시도사업본부)를 통하여 내수 판매할 계획이며, 국내시장의 안정적인 진입 이후에는 중국, 대만, 터키, 동남아, 중남미 등을 비롯하여 친환경농산물생산이 가능한 지역으로 수출할 계획이며, 다른 농자재수출업체와 연계 또는 KOTRA의 협조를 받아 해외수출시장을 넓혀나갈 계획이다.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

세부연구기관과 협동연구기관이 업무 분장을 통해 유용미생물의 유전체 및 생물학적 특성을 최대한 발휘되도록 연구하여 최적 제제화 조건 정립 및 제품화를 성실하게 수행하였다고 생각된다.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

조기성과창출과제 임에도 저명한 연구논문 게재 3건 및 특허출원, 기술이전 등을 성공적으로 수행하였다고 판단된다.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
○ 유용미생물을 이용한 사과 주요 병 방제 효과 및 작물 생장 촉진 효과 연구	30	100	○ 유용미생물을 이용한 생물적 방제 연구 및 발병기작 연구를 통해 우수한 연구결과를 도출함. 3편의 IF 4.0 이상의 논문 게재 등 목표초과 달성함
○ 선정미생물 유전체 해독 2건 이상/유용 미생물 유전자원 확보 1건 이상	20	100	○ 유전체 해독 4건을 비롯하여 유용미생물자원 26건을 기탁하였음. 목표 초과달성함
○ 유용미생물을 이용한 과수, 과채류 병해 방제 및 생육증진용 미생물제제 제품화	50	100	○ 특허출원, 기술이전 및 4건의 제품화 성공, 매출 발생하고 있으며 매년 매출증대할 것으로 예상됨.
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

○ 4년의 짧은 시간동안 4개의 제품을 성공적으로 사업화하였음. 기존 후보 미생물 자원을 중심으로 연구를 진행한 것이 성공요인으로 생각됨. 협동연구기관인 고려바이오와의 상호협력 및 소통으로 순조롭게 연구가 진행되었다고 생각됨.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

○ 유기농업자재로 등록된 제품을 친환경식물보호제(생물농약)로 연구개발 및 공시를 통해 외국의존적인 생물농약시장에서 탈피할 수 있도록 하고자 함

IV. 보안성 검토

○ 연구결과는 논문게재 및 기업의 제품개발 노하우로 인한 보안성이 필요함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

○ 연구결과는 논문게재 및 기업의 제품개발 노하우로 인한 보안성이 필요함

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

3. 연구목표 대비 성과

성과목표		전략 미생물 해독	유용 유전 자원 확보	표준 유전체 해독	메타 유전체 분석	유전체 분석 기술 개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마 커개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표		3	2							
1차 년도	목표									
	실적									
2차 년도	목표	1	1							
	실적	2	4							
3차 년도	목표	1								
	실적	1	1							
4차 년도	목표	1	1							
	실적	1	21							
계	목표	3	2							
	실적	4	26							

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구 활용비)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T 평 가 비 율	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논문				학 술 발 표	정 책 활 용	
											SCI		비 SCI	논 문 평 가 I F					
단위	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치																			
최종 목표	2	2			2	6	4	960				2		5	1				
당해 년도	목표				2		2	20				1	1.3	1					
	실적				2	2.1	2	21				2	5.0	3	2	2		7	
달성률 (%)	100	100			100	100	100	100				100		100	100	100		100	

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 종질지(80g/m²)]

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	사과 탄저병 및 작물생장촉진 유용미생물 유전체 분석 및 병방제연구 기술
②	유용미생물의 대량배양시 표현형 변이 억제 기술
③	친환경 미생물제제 제조 및 제품화 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		✓				✓	✓			
②의 기술	✓							✓		
③의 기술					✓		✓			
·										
·										

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	저명 학술지에 게재 및 다양한 작물에 적용 확대계획
②의 기술	표현형 변이에 의한 생물학적 기능 저하군에 대한 연구범위 확대 및 현장 애로사항 해결
③의 기술	사과탄저병 이외의 탄저병에 대한 적용범위 확대 및 타작물, 타 병해에 대한 연구범위 확대 및 적용

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	전략 미생물 해독	유용 유전 자원 확보	표준 유전체 해독	메타 유전체 분석	유전체 분석 기술 개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마커개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표	3	2							
연구기간내 달성실적	4	26							
연구종료후 성과창출 계획									

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 미생물유전체전략연구사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 미생물유전체전략연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.