

120049  
-02

방 선  
제 발  
용 균  
유 주  
기 를  
농 활  
업 용  
자 한  
재 재  
제 뿌  
품 리  
화 흑  
선  
총

2021

농  
림 축 산  
식품 부  
농  
림 식품  
기술  
기획  
평가  
원

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

발간등록번호

11-1543000-004018-01

## 선발균주를 활용한 뿌리흑선충 방제용 유기농업자재 제품화

2022.04.12

주관연구개발기관 / (주)마이크로자임  
공동연구개발기관 / 세계김치연구소  
공동연구개발기관 / 전남대학교 산학협력단

농 립 축 산 식 품 부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “선발균주를 활용한 뿌리혹선충 방제용 유기농업자재 제품화”(개발기간 : 2020. 04. 29~ 2021. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022.04.12

주관연구개발기관명 : ㈜마이크로자임

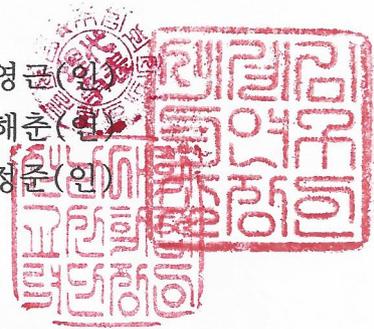
(대표자) 심영근(인)

공동연구개발기관명 : 세계김치연구소

(대표자) 장해준(인)

공동연구개발기관명 : 전남대학교 산학협력단

(대표자) 민정준(인)



주관연구책임자 : 심영근

협동연구책임자 : 장지윤

협동연구책임자 : 이준호

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## < 요약 문 >

사업명				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)				연구개발과제번호		120049-2	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	Y06LB	70 %	Y06LA	30 %		
	농림식품 과학기술분류	RA0303	80 %	RA0305	20 %		
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		선발균주를 활용한 뿌리혹선충 방제용 유기농업자재 제품화					
연구개발과제명		선발균주를 활용한 뿌리혹선충 방제용 유기농업자재 제품화					
전체 연구개발기간		2020.04.29 - 2021.12.31(1년 9개월)					
총 연구개발비		총 709,500천원 (정부지원연구개발비 528,000천원, 기관부담연구개발비 : 181,500천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)					
연구개발단계		기초[ ] 응용[ ] 개발[√] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준(3) 종료시점 목표(9)	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	국내 주요 농업 해충인 뿌리혹선충을 선형연구를 통하여 선발한 미생물을 활용하여 선택적으로 방제 가능한 유기농업자재 개발과 사업화를 목적으로 한다.					
	전체 내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 뿌리혹선충 방제용 유기농업자재 제품화 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 선발 균주의 살선 충 활성물질 함량 최적화</li> <li>- Pilot 이상의 대량생산 공정확립</li> <li>- 제형형태, 제형조건, 제형 안전성 등 최적 제형 개발</li> <li>- 시제품 개발 및 생산</li> <li>- 유기농업자재 등재(효능효과 검정 포함)</li> </ul> </li> <li>○ 김치유래 미생물을 이용한 뿌리혹선충 방제용 미생물 탐색 및 이용 연구 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 선발 균주의 살 선충 물질 활성 연구</li> <li>- 선발 균주의 기호성(대사물질)에 대한 연구</li> <li>- 균주의 살 선충 및 대사물질 간의 방제 상승효과 검토</li> <li>- 복합 균주의 적용 시 살 선충 시너지 평가</li> <li>- 선발 균주의 토양 잔류성 평가</li> </ul> </li> <li>○ 뿌리혹선충의 선택적 신경 제어로 미생물 살선충 작용 기전 구명 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 선충 신경제어 소재 확보</li> <li>- 살 선충 활성 미생물 선발 연구</li> <li>- 선발 미생물을 적용한 뿌리혹선충 억제 메커니즘 분석</li> <li>- 시제품의 신경제어 활성 평가</li> <li>- Lab scale 생물검정 실험</li> <li>- 시제품의 세포 독성 평가</li> </ul> </li> </ul>					

연구개발성과	항목	목표	실적	달성도(%)								
	유기농업자재 등록	1	유기농업자재 1건(1건 추가 도출 예상)	200								
	기술이전	1	기술이전 1건	100								
	매출액	50백만원	90백만원	180								
	특허출원	1	특허출원 1건 특허등록 1건	100								
	SCI논문 학술발표	2 2	SCI 논문 2건 학술발표 8건	100 400								
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 실 방제가가 높은 뿌리혹선충 방제용 유기농업자재 상품화</li> <li>○ 친환경, 고품질 작물 생산에 따른 농가의 소득 향상</li> <li>○ 선택적 선충 신경 제어를 통한 방제제 기술 개발</li> <li>○ 대량생산 발효공정 기술 및 제형 기술 축적</li> </ul>											
연구개발성과의 비공개여부 및 사유	해당없음.											
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 ·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
	2	1						생명 정보	생물 자원		정보	실물
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설 ·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	뿌리혹선충		내부기생선충		신경제어		미생물제어		유기농업자재			
영문핵심어 (5개 이내)	Root knot nematodes		Endo parasitic nematode		Neural control		Microbial control		Agricultural materials			

# 최종보고서

보안등급  
일반[ ], 보안[ ]

중앙행정기관명		농림축산식품부		사업명				
전문기관명 (해당 시 작성)				사업명		내역사업명 (해당 시 작성)		
공고번호				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)				
				연구개발과제번호				
기술분류	국가과학기술 표준분류	Y06LB	70 %	Y06KA	30 %			
	농림식품과학기술분류	RA0303	80 %	RA0305	20 %			
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문						
		영문						
연구개발과제명		국문		선발균주를 활용한 뿌리혹선충 방제용 유기농업자재 제품화				
		영문		Commercialization of organic agricultural materials for root-knot nematode control using selected strains				
주관연구개발기관		기관명		(주)마이크로자임		사업자등록번호		
		주소		(우)57309 전남 담양군 담양읍 태봉로 97, 2F		법인등록번호		
						409-86-19995		
						200111-0316252		
연구책임자		성명		심영근		직위		
		연락처		직장전화		휴대전화		
				061-363-0607		010-9130-8701		
		전자우편		info@microzyme.co.kr		국가연구자번호		
						1109 4910		
연구개발기간	전체		2020. 04. 29 - 2021. 12. 31 ( 1년 9개월)					
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원	기관부담		그 외 기관 등의 지원금				연구개발비 외 지원금
	연구개발비	연구개발비	연구개발비	지방자치단체	기타( )			
	현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계
총계	528,000		181,500					528,000 181,500 709,500
1년차	226,000		80,000					226,000 80,000 306,000
2년차	302,000		101,500					302,000 101,500 403,500
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자		직위	휴대전화	전자우편	비고	
		역할	기관유형					
공동연구개발기관	세계김치 연구소	장지윤		선임급 (단장)	010-860 6-1576	jychang@ wikim.re.kr	공동	정부 출연연
공동연구개발기관	전남대학교 산학협력단	이준호		책임 (교수)	010-513 3-5014	leejunho@ch onnam.ac.kr	공동	대학
연구개발담당자 실무담당자	성명	오재준		직위		선임연구원		
	연락처	직장전화		휴대전화		010-9130-8701		
		061-363-0607		국가연구자번호		11094910		
	전자우편	info@microzyme.co.kr						

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

2022년 4월 12일

연구책임자:

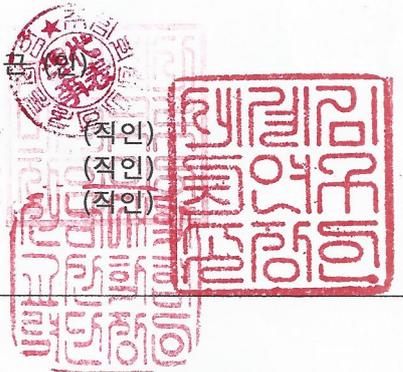
심영근

주관연구개발기관 의 장: 심영근 (직인)

세계김치연구소 의 장: 장해춘 (직인)

전남대학교 산학협력단의 장: 민정준 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하



## 〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 .....	1
2. 연구개발과제의 수행과정 및 수행내용 .....	19
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 .....	20
1절. 연구수행 결과 .....	20
1장. 뿌리혹선충 방제용 유기농업자재 제품화 .....	20
2장. 김치유래 미생물을 이용한 뿌리혹선충 방제용 미생물 탐색 및 이용 연구 ..	136
3장. 뿌리혹선충의 선택적 신경제어로 미생물 살선충 작용기전 구명 ...	174
2절. 세부 정량적 연구 개발 성과 .....	217
4. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도 .....	226
5. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 .....	227
별첨. 참고 문헌 .....	229

# 1. 연구개발과제의 개요

## 제 1절 연구개발 과제의 필요성

### 가. 뿌리혹선충에 대한 기술개발의 필요성

- 선충은 토양 내 널리 분포하는 생물이나, 이 중 식물 기생선충이 농업시장에 피해가 되고 있음.
- 높은 밀도에서 기주식물이 치명적인 손상을 받거나, 고사를 유발, 생산 품질 및 생산능력에 영향을 미치고, 감염된 식물체는 병원균에 대한 저항능력이 상실 되, 질병에 쉽게 노출되기도 하며, 새로운 기주를 가해하는 과정에서 바이러스를 매개하기도 함.
- 선충 중 국내 시설 재배지에서 연작하고 있는 시설 과채류에서 특히 뿌리혹선충의 피해가 높으며, 일부지역에서는 90%이상이 검출될 만큼 피해가 막심함.
- 방제 기술에 있어, 살충농약을 비롯한 다양한 방제기술이 제공되고 있으나, 낮은 현장 방제가, 살충약제등의 저항성 개체 출현, 생태계 교란, 잔류농약에 대한 거부감 등 피해 사례가 누적되어, 친환경 소재를 기반으로 한 방제 기술의 도입이 필요함.

### 나. 피해 작물 재배 규모

- 국내 농업시장에서 연작하고 있는 참외, 오이, 멜론 등 시설 재배에서 피해가 큰 것으로 보고되고 있으며, 특정 지역에서는 뿌리혹선충 발생이 80%에 육박하고 있음.
- 피해 추이를 위해 국내 시설 과채류(과실과 열매를 먹는 채소를 일컫는 것 ; 고추, 토마토, 가지등의 가지과 채소와 오이, 호박, 참외 등 박과 채소, 완두, 강낭콩 등 콩과 채소) 재배 규모를 살펴봄.
- 국내 과채류 중 상위 6대 과채류의 재배 면적은 '18년 기준으로 1,880,890 ha로 전년대비 0.5% 감소, 재배면적 증감율 : 수박(6.7% ↓), 참외(0.9% ↑), 딸기(2.6% ↑), 오이(8.3% ↑), 호박(1.2% ↑), 토마토(4.8% ↑).
- 과채류의 생산량의 경우 전년 대비 0.5% 감소, 가격은 전반적으로 높아질 전망 : 생산량 토마토, 17년 대비 9.4% ↑, 오이 '17년 대비 14.6% ↑.
- 시설 재배 과채류의 경우 오이가 전년대비 8.3%의 재배 면적이 증가하여 생산량이 14.6%, 토마토는 9.4% 증가 전망, 외 상위 과채류는 전년 대비 유사하거나, 소폭 감소할 것으로 집계됨.
- 수박의 경우, 전년대비 재배 면적 및 생산량이 6.7, 5.9% 감소하였으나, 농가의 주요 소득 원으로 과채류의 상위 5위권을 유지하고 있음.
- 외 뿌리 등 작물에 직접적으로 피해를 입히는 선충은 기생 특성 상 작물의 기생 범위가 매우 넓으며, '09년 집계에 의하면, 세계적으로 식량작물 11%, 경제작물 14%가 피해를 입히는 것으로 보고됨.
- 이 중 국내 기후 특성 상 사계의 특성이 있어, 연 중 온도 등이 유지되는 시설 재배지의 피해 발생이 집중, 뿌리혹선충의 증식 및 노출에 유리한 조건이며, 시설 재배지 내 과채류의 생산이 집약됨에, 과채류에 대한 피해가 집중 보고되고 있음.

표 1. 주요 과채류 생산량

(단위: 톤,%)

구분	수박	참외	딸기	오이	호박	토마토	총계
2018	476,634	130,528	183,639	391,214	310,218	388,657	1,880,890
2017	506,471	166,281	208,699	341,364	212,690	355,107	1,890,612
평년 (시설 재배률%)	591,181 (84.8%)	157,889 (98.2%)	200,769 (99.0%)	311,843 (88.0%)	325,727 (45.2%)	413,272 (100.0%)	2,000,707 (84.5)
전년대비 증감	-5.9%	-21.5%	-12.0%	14.6%	-0.8%	9.4%	-0.5%
평년대비	-19.4%	-17.3%	-8.5%	25.5%	-4.8%	-6.0%	-6.0%

\* 출처 : 2013-2018, 시설작물 중 과채류 재배 면적, KOSIS

## 다. 피해 추정 집계

- 토양은 선충의 가장 적합한 서식지로서, 토양 입자 주변의 얇은 수막에 존재하기도 하지만, 대부분 식물체의 뿌리 부분에 가장 많이 서식하는 것으로 알려져 있음(Ingham and Detling, 1984).
- 이와 같은 토양선충 중 이 중 국내에서 90% 이상의 피해를 입히는 개체가 바로 뿌리에 기생하며, 피해를 누적시키고 있는 뿌리혹 선충임(Choi, 1978; Choi and Choi, 1982; Choo et al., 1987).
- 이들은 1850년대 영국의 온실에서 재배 중인 오이 뿌리혹에서 처음 발견, 세계적으로는 78종이 동정되었고(Jepson, 1987), 국내에서는 6종의 뿌리혹선충이 서식(Cho and Han, 1986 ; Cho et al., 2000), 시설원예작물인 수박, 참외, 멜론, 고추, 토마토, 상추, 셀러리, 당근, 딸기 등일 비롯해 넓은 기주식물에 대한 수확량 감소 등의 피해를 야기함(Kwon et al., 1998 ; 박동금, 2000 ; Park et al., 1995).
- 전국 시설 재배 면적의 1/2을 차지하고 있는 중부지방의 뿌리혹선충의 '13-'15년 3년간의 조사 결과 시설 재배지 132개소 중 65개 포장(49%)이 대상해충에 감염되어 있음이 집계됨(Ko et al., 2017).
- 게다가 작물 별로 토마토(83%), 오이(61%), 딸기(41%), 고추(30%), 수박(26%) 순으로 높은 감염율을 보이는 등 전국적으로 뿌리혹선충에 대한 시설 재배지의 피해는 막대함(Ko et al., 2017).
- 국내 추산된 피해액은 2,500억원에 달하며, 세계적 식량작물 및 경제작물의 선충 피해에 의한 농작물 생산량의 저하는 최소 3.3% 많게는 20.6%로 주요 작물 22종만으로 103조에 육박할 것으로 추정된 바 있음(유기적 선충 방제 매뉴얼, 경상북도 농업기술원 유기농업연구소, 2015).

표 2. 작물별 선충에 의한 전 세계 농작물 피해 현황

식량작물	경제작물	선충 피해	
		식량작물 생산 감소량( %/년 )	경제작물 생 산 감소량( %/년 )
감자	가지	12.2	16.9
고구마	고추	10.2	12.2
귀리	관상용 작물	4.2	11.1
땅콩	구아바	12.0	10.8
밀	굴	7.0	4.2
바나나	담배	19.7	14.7
벼	동부	10.0	15.1
병아리콩	멜론	13.7	13.8
보리	목화	6.3	10.7
콩	사료용 작물	10.6	8.2
사탕무	마	10.9	17.7
사탕수수	오크라	15.3	20.4
수수	차(Tea)	6.9	8.2
옥수수	카카오	10.2	10.5
잠두	커피	10.9	15.0
조	토마토	11.8	20.6
카사바	파인애플	8.4	14.9
코코넛	포도	17.1	12.5
호밀	기타	3.3	17.3
선충 피해 평균 집계		10.7	14.0

○ 작물의 피해 종류별 선충에 의한 피해 기여도는 5.69%로 가장 높은 수준, 농업에 있어 토양선충은 박멸 대상 최우선 순위라고 하겠음(Mulooney, R.P Plant Disease).

표 3. 작물 별 선충에 의한 생산량 감소 및 피해액

작물	전세계생산량 (천톤)	가격 (천원/톤)	선충 피해	
			생산 감소량( %/년 )	손실금액 (억원)
감자	321,736	290	12.2	11,387
고구마	126,299	448	10.2	57,664
귀리	25,991	129	4.20	1,401
굴	105,000	728	14.2	116,613
담배	6,326	7,260	14.7	67,512
땅콩	30,670	1,617	12.0	59,512
목화	112	1,144	10.7	137
밀	676,300	261	7.0	123,616
바나나	81,263	1,021	19.7	163,406
벼	432	686	10.0	297
보리	136,209	262	6.3	22,495
사탕무우	247,878	52	10.9	13,841
사탕수수	1,557,664	40	15.3	93,091
수수	64,589	65	6.9	2,892
옥수수	637,444	201	10.2	130,855
잠두	6,371	1,320	10.9	9,167
차	3,871	310	8.2	986
카사바	228,138	193	8.4	96,890
커피	7,742	2,107	15.0	24,458
코코아	4,012	2,962	10.5	12,481
콩	56,389	373	10.6	22,275
손실 평균 및 합계			10.9	1,030,976

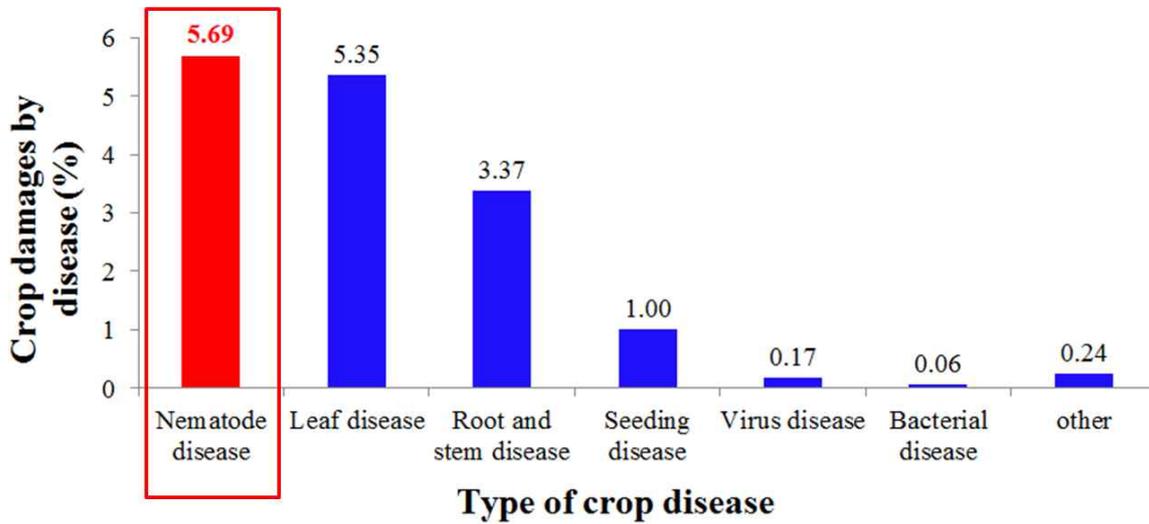


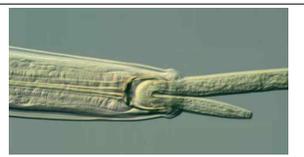
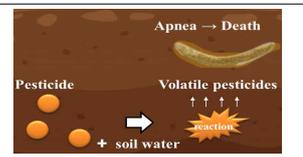
그림 1. 작물 질병 유발에 대한 선충의 피해도

## 라. 현행 방제 방법 및 문제점

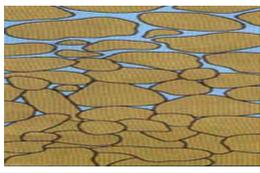
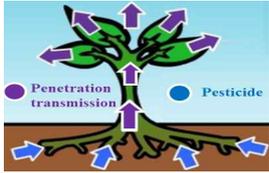
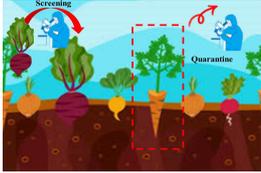
- 현행 토양 선충의 방제 방법으로는 작물윤작, 객토, 저항성 식물, 피복, 수복 등 일반적인 방제방법을 현장 특성에 맞게 검함.
- 본 방제법은 친환경적 방제 수단으로써 다양한 선충의 생태를 교란할 수 있는 연구결과를 기반으로 방법론이 공급되고 있으나, 이는 작물 정식 전 또는 현장 여건을 고려하여야 하는 적용 한계에 봉착함.
- 또한 초기 투자 시설비, 전반적인 재배 환경의 변화 등이 요구됨에 따라, 일시적으로 또는 보조적인 수단으로 방제하는 전략으로써 주된 방제 방법으로 채택하는 농가는 매우 적음.
- 농약 Chemical을 이용한 화학적 훈증, 토양 침투성 약제 및 식물 내부 침투성 약제등의 방법과 포식성 혹은 기생성 곰팡이를 비롯한 생물학적 방법 등이 대부분으로 구성됨.
- 현행 농가는 생물자원 및 살충농약을 단독 혹은 일반적 방제기법과 혼용 활용하고 있으나, 현행 선충에 대한 탁월한 현장 방제가를 보이는 제품군류의 출시가 미흡하여, 대체 기술의 수요성이 요구됨.
- 살충농약의 경우, 기 구명된 약제의 지속적인 활용에 의해, 내성 개체의 출현과, 19년도 최초 시행된 농약 허용물질 목록 관리제도(Positive List System, PLS)로 인해 활용의 시기 및 강도의 제약이 발생, 농가 현장의 부정적인 목소리가 커지고 있는 실정임.
- 미생물 및 생물자원을 기반으로 한 약제에 대해서도 친환경 방제라는 면죄부를 고려해도, 현장에서 괄목할만한 방제가를 도출해내고 있지 못함.
- 토양 및 식물 체내 기생하는 반·내부 기생선충의 생태적 특성은 약제의 노출에 대한 높은 안전성을 갖고 있음에 실 방제가가 저하되는 주요 요인임.
- 토양 내 선충은 현장 농가의 육안으로 검출이 불가, 조기방제가 힘들어 피해가 심화되기 쉽고, 일정 밀도수 이상의 발생 이후 방제작업이 진행됨에 유효한 방제가를 도출하기 쉽지 않음.
- 뿌리 내 형성된 난낭은 물관부의 물과 영양분을 이송하는데 문제를 야기하며, 생육과정에 따라 비대해져, 뿌리혹발생이 심화됨.

- 뿌리 내 형성된 난낭은 약제등과 같은 후속 방제작업으로도 치료가 불가해, 토양의 암이라고 불리울 만큼, 예방차원을 포함한 방제기술의 도입이 필요함.
- 현재 도입 약제는 기존 혹은 외국에서 생산되어 지는 농약을 희석 또는 대체 적용하는 등 적용 한계적이며, 팔목할 만한 선충 특이적 방제제의 개발 사례가 미흡함.
- 친환경 방제제의 경우, 자연유래 및 좁은 소재 스펙트럼과 섭식, 살충유효 물질의 함량 최적화 및 정제측면에서 현장 단가 경쟁력을 도달치 못해, 실효성 측면에서 만족한 결과를 보이지 못하고 있음.
- 이에 재반 되어야 할 기술은 잔류성이 없는 친환경적 소재 기반, 우수한 토양 및 식물 침투성의 제공과 저비용 고효율 생산기술의 접목과 더불어 선충의 생태를 고려한 맞춤형 방제기술의 도출이 요구됨.
- 현행 선충 피해 농가는 다양한 방제방법을 복합적으로 적용하여, 선충에 대한 피해를 해소하고 있으나, 팔목할 만한 실효성을 거두고 있는 농가는 극소수에 불가함에 따라 선충 방제제 시장에 대한 기술적 난이도는 높으나, 시장 진입장벽은 상대적으로 낮은 상황임.

표 4. 현행 대표적인 선충 방제 방법

일반적 방법			
Crop ration	Flooding	Desiccation	Antagonistic
			
윤작작물의 선충 저항성	물을 10cm 깊이로 침수, 수개월 방제	건기 시 2-4주 간격 토양 경운	재배품목이 한정
Planting healthy seed	Covering plant	Solar disinfection	Wheat bran disinfection
			
높은 초기 비용	피복제+녹비혼용 높은 초기 비용	비닐도포 6-8주간 광량이 우수한 하절기 한정	밀기울 도포, 혐기환경 조성
생물학적 방법			
Endozoic fungi	Predatory nematodes	Predatory insect	Soil fumigation agent
			
Trapping : 선충 이동성 저하 Endozoic : 선충 섭식, 구조파괴	<i>Monochus, Mononchoides, Butlerius, Anatonchus, Diplogaster, Tripyla, Seinura, Dorylaimus, Discolaimus</i>  직접 섭식, 내부 기생선충에 대한 방제 불가  낮은 이동성 : 방제속도 저하	Tardigrades, Collembola, mites, tubellarian, etc.  직접 섭식, 내부 기생선충에 대한 방제 불가, 산업화 대량생산 공정 적용 불리	농약성분이 토양 내 휘발 선충 큐티클을 통해 침투 호흡 장애 선충 외 토양 생태계 독성 작용 농약의 잔류물질의 문제 야기

< 표 계속 >

생물학적 방법		기타 방제 방법	
Non soil fumigation agent	Penetrating agent	Quarantine	Electricity
			
<p>농약성분이 토양 내 침투            낮은 토양 침투성 → 토양 선충에 대한 목적 부위 노출 불가 → 낮은 방제가            농약의 잔류성 문제 야기</p>	<p>낮은 토양 침투성 → 식물체 뿌리에 대한 침투력 저하 → 낮은 침투 흡수율            농약의 잔류성 문제 야기</p>	<p>유입을 방제하는 인프라 필요            검사 및 조직체계 구축 필요            농업 현장에는 적용 불가</p>	<p>소기 투자 시설비 요구            표층 15cm 이하 효과 없음.</p>

\* 출처 : 식물기생선충 생태 및 방제, 전남농업기술원 내부 자료

## 제 2절 선행 연구개발 현황

### 가. 제품 등록 현황

- 국내에 고시된 뿌리혹선충 방제용 약제는 총 76종으로, 과중 전 2-4주 내에 토양의 소독 혹은 관주약제로 구성됨.
- Dazomet이 14종, Abamecin 및 혼합제가 12종, Fosthiazate 10종, Fthoprophos 8종, Carbofuran, Terbufos 6종, Metam sodium 5종, Dimethyl disulfide, Monacrosporium thaumasium, Benfuracarb, Fosthiazate, Difenthrin, Cadusafos, Flusulfamide, Terbufos, Flusulfamide, Fluensulfone, Fluopyram 등 90종 중 76종인 84.4%에 달함.
- 다수 약제가 출시되었으나, 저항성 개체의 출현, 낮은 실 방제가, 잔류 농약 규제 강화에 따른 상시 적용 불가 등, 선충을 효과적으로 방제하기 위해 효과적인 후속제품의 개발이 필요함.

표 5. 뿌리혹선충 방제용 살충농약 고시 현황

성분명	종류	제품 수
Dazomet	입제	8
Dimethyl disulfide	유제, 살포 액제	2
Metam-sodium	액제	5
Monacrosporium thaumasium KBC3017	고상제	1
Benfuracarb+Fosthiazate	입제	1
Bifenthrin+cadusafos	입제	1
Abamectin	미탁제, 분산성액제, 입제	9
Abamectin혼합제(Dinotefuran,Acetamiprid,Fosthiazate)	액제, 미탁제	3
Etofenprox혼합제(terbufos)	입제	1
Ethoprophos	입제	8
Imicyafos	액제, 입제	2
Cadusafos	입제, 캡슐 현탁제	4
Cadusafos혼합제(imidacloprid,carbosulfan,clothianidin)	입제	3
Carbofuran	입제	6
Terbufos	입제	6
Fosthiazate	액제	10
Flusulfamide	세립제	1
Fluensulfone	유제	3
Fluopyram	입제	2
기생 곰팡이	액상 수화제, 입제	(2)
식물추출물	고상제, 액상 수화제	(3)
미생물 발효액	액제	(3)
총 계		76(8)

\* 출처 : 농촌진흥청 국립농업과학원, 농약정보, 국립농산물 품질관리원 유기농업자재 정보시스템, 비고 ; (유기농업자재)

- 유기농업자재에서 주로 활용되는 미생물은 대사물질 기반인, 바실러스 계열 23종, 기타 1종, 기생 곰팡이 7종, 키틴분해 미생물인 리소박테류가 1종으로 바실러스 계열이 71.9%로 활용되고 있음.
- 적용 미생물의 소재 범위가 협소, 유사한 대사물질의 활용은 저항성의 문제점과 직결될 수 있음을 시사함.

표 6. 병해충 및 병충 자재 내 미생물 활용 제품 현황

방제 기작	균체명	제품 수
대사물질	<i>B. thuringiensis</i>	17
	<i>B. subtilis</i>	4
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	1
	<i>P. temperate</i>	1
소 계		23
기생, 체내 균사 형성	<i>B. bassiana</i>	5
	<i>B. brongniartii</i>	1
	<i>E. vermicola</i>	1
소 계		7
키틴 분해	<i>L. capsici</i>	1
총 계		31

\* 출처 : 국립농산물 품질관리원, 유기농업자재정보시스템

## 나. 대상 시장 현황

- '14년 국내 작물 보호제 시장 : 1조 4,200억원, 5년간 연평균 2.7%의 성장, 살충 및 살균제는 1조 이상으로 전체 시장의 72.2%를 차지함.
- 국내 농업용 미생물제제(미생물농약, 유기농자재, 미생물비료) 시장 규모는 '08년 약 320억원에서, '20년 718억원으로 추산됨.
- '16년부터 친환경 농산물 저농약 인증제 폐지로 유기농 시대가 본격 도래, '17년까지 무농약 재배면적 비율이 10% 까지 확대가 목적인.
  - ('09) 4.9% → ('12) 7.3% → ('15) 9.0% → ('17) 10.0%.
- 친환경농산물 시장은 09년도부터 15년까지 감소 추세, ('15) 1조 2,728억 → 저농약 인증제 폐지로 → (현재) 1조 6,546억 → ('25) 2조 338억원, 23% 증가할 것으로 예상됨.
- 친환경 농산물 재배에 사용되는 병해충 방제용 자재는 생물농약보다 유기농업자재의 비중이 높는데 1) 유기농업자재의 등록 비용 및 절차 간소화, 2) 정부 및 지방자치단체의 보조금 지원 정책의 사유로 사료됨.
- 이에 유기농업자재의 시장은 지속적으로 증가 추세임.
  - ('07) 301종 → ('10) 1,058종) → 1,207('13) → 1,209('14) → ('20)1,725
- '20년 기준 유기농업자재 내 병해 관리 고시 제품은 총 564종, 32.7%를 차지하며, '17년도 병해충 관리용 규모는 1,200억으로 추어됨(한국 친환경 농자재협회 2018 전망, 2018.02, 농기자재신문).

○ 해충 관리용 자재는 66.0%로 792억원으로 산출되며, 이 중 미생물을 활용한 자재는 50종으로, 13.4%에 해당함.

표 7. 유기농업자재 고시 현황

	용도	제품수	제조업체 수
병해충관리 분야	병해관리	189	98
	충해관리	274	98
	병충해관리	98	61
	기타	3	3
	소계	564	260
토양개량 및 작물생육 분야	작물생육	260	178
	토양개량	37	29
	토양개량 및 작물생육	858	474
	기타	7	7
	소계	1,162	688
계		1,726	948

\* 출처 : 국립농산물 품질관리원, 유기농업자재정보시스템

## 다. 지적 재산권 및 원천기술 개발 현황

### (1) 지적 재산권

○ 20년 2월 현재 선충소재와 관련한 검색한 결과 총 524종 중, 관련 특허는 145종으로, 이 중 해충 방제 분야는 115종으로 79.3%로 가장 높았으며, 외 기초연구, 의약분야, 기타 분야 순으로 조사됨.

표 8. 국내 선충 관련 특허 현황

구분	해충방제	기초연구	의약분야	기타
특허 수	115	13	11	6
(%)	(79.3)	(9.0)	(7.6)	(4.1)

\* 출처 : National digital science library '20년 2월 20일 검색 keyword ; 선충

○ 선충을 활용한 기생 및 병원성 선충이 27건으로 가장 높았으며, 외 미생물제제 관련 24건, 농약 관련 22건, 식물 추출물 20건, 천연물 9건, 저항성 품종 계량 5건, 기타 6건으로 조사되어, 미생물 선충방제 소재 관련은 13건으로 집계됨.

표 9. 국내 선충 관련 해충방제 특허 현황

구분	병원성 선충	미생물 방제	살충 농약	식물 추출물	천연물	저항성 품종	기타
특허 수	27	24	22	20	9	5	6
(%)	(23.9)	(21.2)	(19.5)	(17.7)	(8.0)	(4.4)	(5.3)

\* 출처 : National digital science library '20년 2월 20일 검색 key ; 선충

- 살충농약은 Anthraquinone 화합물, N,N-Dimethyl Decylamide, Methylisothiocyanat 등으로 구성되어 있으며, 외국이 총 15종, 68.2% 이상의 원천기술을 보유하고 있음.
- 저항성 식물의 경우 80%로 외국 출자로 구성되어 있어, 외국 의존도가 높음.
- 반면에 국내 출자는 미생물, 식물 추출물, 천연물 등 친환경 소재의 개발 진척도가 높았고, 관련 특허 총 48건으로 90% 이상을 차지함.
- 식물추출물은 동충하초를 비롯한 고삼, 님등의 한약제등 유기농업자재 허용 범위에 국한되는 생물자원으로 구성됨.
- 천연물은 kojic acid, *Xylaria grammica* 균주에서 분리된 Grammicin 화합물, 정향나무에서 분리한 Eugenol, 불가사리, 초산, 젖산, 키토산 등 생물자원 기원으로 접촉 활성을 갖는 물질들로 구성됨.
- 본 과제 도출물과 유사한 미생물 소재를 활용한 방제의 경우, 뿌리혹선충에 9건, 식물 기생선 선충에 16건으로, 외 국내에 피해를 주는 뿌리썩이선충, 환선충, 씨스트선충 등 기타 선충 용 특허는 관찰 할 수 없었음.
- 주로 *Wolfiporia extensa*, *Monaricro sporium* 등 곰팡이를 활용한 방제 또는 *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Saccharomyces cerevisiae* 등 항균활성을 지니는 균주로 구성됨이 확인 되었고, 추가적으로 산란알의 키틴질을 분해하여 부화율을 절감 할 수 있는 키틴 분해 미생물인 *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* 등의 도입이 있었음.

## (2) 원천기술 개발 현황

- National digital science library 등 국내 저널에 선충으로 '20년 2월 20일 검색한 결과 총 811종이 검색되었고, 이 중 국내 주요 피해 선충으로 스크리닝 한 결과 213건이 확인됨.
- 밀접 관련으로, 기초분야 72건, 미생물제 29건, 저항성 품종 연구 20건, 살충약제 9건, 식물 추출물 11건, 물리적 방제 2건, 천연물 방제 1건, 기타 7건의 순으로 연구개발이 된 것으로 조사됨.
- 저항성 품종의 경우, 미생물 소재 다음으로 많은 연구가 진행되었고, 선충의 특성 상 재배기간 중 방제가 용의하지 않은 점이 저항성 품종에 대한 연구의 결과로 이어짐.
- 살충약제의 경우 기 개발된 약제에 대한 활용 방안에 대해 중점적으로 연구가 주로 진행되었고, 식물추출물은 '98년 만수국, 잔디등의 도입을 시작으로, 멸구술, 계피, 국내 자생 식물 등 유기농업자재 고시 법률에 준한 성분범위 내로 다양한 소재 발굴 개발이 진행되고 있음.

- 미생물제의 경우 '90년 선충 기생세균의 *Pratylenchus penetrans*의 최적 부착 온도 연구를 시작으로 '04년 *Chromobacterium* sp. 등 키틴 분해 미생물 적용을 통한 산란알의 부화율 저감 연구, *Pseudomonas putida*, '14년 *Bacillus* sp. 등 젤라틴 분해 세균의 적용 등 형태를 파괴하고 방제효과를 얻는 연구가 진행되었음.
- 94년 *Lysobacter capsici*를 도입, 유사 발굴 균주로 '00년, '03년, '13년 적용 된 바 있으며, '02년 *Streptomyces sampsonii*, '05년 *Bacillus thuringiensis*, '10년 *Streptomyces cacaoi*, '13 - 14년 *Paenibacillus* sp.로 연구개발 된 바 있음.
- 선충 기생성 곰팡이는 '07년 *Monacrosporium thaumasium*를 시작으로 '10년 *Pratylenchus penetrans*, '11년 *Monacrosporium thaumasium*, '12년 *Purpureocillium lilacinum*, *Purpureocillium lilacinus*, '13년 *P. temperat*, *Arthrobotrys thaumasia* Nema-1등 다양한 개체가 신규로 발굴되어 적용된 바 있음.
- 선충의 특성 상, 토양 혹은 뿌리에 분포하여, 살포성 약제에 대한 노출에 매우 안정하므로, 다양한 물질을 혼용하여, 접촉시간 대비 높은 방제효율을 얻기 위한 노력이 진행되고 있음.
- '13년 *Arthrobotrys thaumasia* Nema-1와 계피추출물, *Bacillus subtilis*등 항균활성 균주 혼합 적용, '16년도 기생 곰팡이와 계피, 님 등 천연추출물과 혼합 적용을 그 근거로 들 수 있음.
- 이에 짧은 접촉으로 지속적인 방제효과를 거둘 수 있는 기생성 곰팡이를 기반 된 연구가 진행됨.
- 상위 연구 개발 중 28건(96.6%)이 뿌리혹 선충에 집중 되며, 외 국내 신규 선충에 대한 피해 보고가 진행됨에 따라, 대상해충의 연구 범위가 점차 확대되는 중임.

### (3) 경쟁 제품 현황

#### (가) 제품 출시 현황

- '20년 2월 현재 국립농산물 품질관리원, 유기농업자재정보시스템에 따르면 선충 방제용 유기농업자재는 현재 14종이 시판중임.
- 천적 곰팡이의 경우 *Arthrobotrys robusta*, *Ditylenchus myceliophagus* 를 활용한 'Royla 300', *Arthrobotrys irregularis*를 이용한 Royal 350, *Steinernema carpocapsae*를 활용한 NB-Sc, *Heterorhabditis bacteriophora* 를 활용한 NB-Hb, *Aspergillus*를 활용한 네마프리등이 출시되고 있으며, 현재 (주)팜한농 및 (주)경농 제조사의 제품이 대표적임.
- 식물 추출물을 비롯한 천연 방제는 7종으로 식물성 유박, 야생나무, 님 추출물 등 활용되어 지는 것으로 확인됨.

#### (나) 표준화사례(제품 규격 인증)

- 현재 시판 중인 14종 중 작물 시험 등 표준화 규격을 진행한 제품은 2제품으로 14.3%에 그쳤고, 무처리구 대비 50-60%의 방제효율을 보이고 있음이 특징임.
- 유기농업자재 관련 법령 자체가 표준화 사례에 강제성이 없고 권고사항이며, 진행한 업체도 비교적 규모가 중견 기업 이상으로 확인됨.

표 10. 국내 선충 방제용 유기농업자재 제품 출시 현황

구분	제조사	상품명	주요성분	표준화 규격	효능/효과
미생물	(주)한국바이오키미칼	선충에	-	-	-
	(주)에코윈	참선충	<i>Photorhabdus temperata</i>	-	-
	(주)이에스에프	참선충 입제	-	--	--
	농업회사법인 성주 참회혁신 원단(주)	선충제로	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-
기생성 곰팡이	(주)남보	내마캐치 액제	<i>Photorhabdus temperata</i>	작물시험	무처리 대비 60%
	(주)팜한농	네마프리	아스퍼질러스 류	작물시험	무처리 대비 50%
	(주)경농	네마크린	<i>Steinernema carpocapsae</i>	-	-
식물유래	(주)남보	네마캐치 입제	식물성유박	-	-
	(주)오더스	네마큐	켈라야 사포나리아	-	-
	비엔에스큐퍼 레이션(주)	네마킹	Cinnamaldehyde, Oleic acid	-	-
	(주)넬바이오텍	네마트를	올레인산	-	-
	(주)대유	대유선충뚝	야생나무 추출물	-	-
	(주)대유	선충뚝입제	넝추출물 외	-	-
	(주)에코윈	선충썩	-	-	-

\* 출처 : 국립농산물 품질관리원, 유기농업자재정보시스템

## 라. 국외 연구 현황

### (1) 국외 대상 시장 현황

- 현재 세계 생물농약시장은 약 8,000억원 정도이며, 미생물 농약은 약 2,000억원 규모임.
- 미생물 농약은 ('13) 500억 달러 → ('18) 645억 달러, 29%의 성장 전망, 이중 살충제 시장은 34%인 170억 달러임.
- 생물농약은 현재 전 세계적으로 188여종이 등록 : 살충제 71.8% > 살균제 15.4% > 제초제 5.3% > 식물생장조절제 및 기타 3.7%의 순임.
- 이 중 친환경농약 시장은 ('12) 22억 달러 → ('16) 33억 달러 → ('20) 62억 달러, 연평균 10.9% 성장이 전망됨.
- 세계 선충 방제제 시장은 '14년 100억 1,100만 달러 → '19년에는 약 153억 2,950만 달러 지속 성장이 예측된바 있음(BCC Research, The Global Market, Feb. 2010, AgriSeivice, 2006~2012, Transparency market research 2018).

### (2) 원천기술 개발 현황

#### (가) 생물농약 출시 현황

- 세균, 곰팡이, 천적 바이러스 등을 활용한 농림 해충 방제는 선진 외국의 경우 오래 전부터 유효 미생물을 이용하여 여러 관련분야에서 광범위하게 실용화 되고 있음.
- '05년도 기준, 천적이 가장 많은 개발 사례가 있으며, 이어서 미생물 농약, 천연물질 및 페로몬등 순으로 조사됨.

표 11. 해외 생물 기반 농약 개발 현황

기술 구분	개발 종수(종)			활용 분야
	'98	'02	'05	
미생물 농약	60	96	112	바이러스, 세균, 곰팡이, 선충
천연물질	30	51	58	생물자원의 항생물질
천적류	40	54	127	기생성 및 포식성 천적
페로몬	45	53	56	성 교란물질을 활용한 유살 및 예찰
유전자 변화	13	19	20	병, 병해충, 선충 저항성 유전자 개발
총 계	158	273	373	

\* 출처 : 영국 BCPC

(나) 곤충 바이러스 개발 사례

○ 주요 사례를 살펴보면, 해충 방제용 농약으로 등록된 곤충 바이러스는 주로 NPV이며, *Heliothis zea*, *Spodoptera exigua*, *Trichoplusia ni*, *Autographa californica*, *Lymantria dispar* 등이 대표적 해충임.

표 12. 세계해충 방제용 대표적 천적 바이러스 개발 사례

병원체	해충제	제품명	대상해충명	실용 국
NPV	<i>Heliothis zea</i> (bollworm, cornearworm, tomato fruit moth)	Biotrol VHZ Elcar, Viron H	거세미나방 일종	미국
NPV	<i>Heliothis virescens</i> (tomato budworm)	Biotrol VHZ Elcar, Viron H	거세미나방 일종	미국
NPV	<i>Spodoptera exigua</i> (beet armyworm) <i>Trichoplusia ni</i> (cabbagelooper)	Biotrol VSE Biotrol VTN, Viron T	파밤나방	미국
NPV	<i>Autographa californica</i> (alfalfa looper)	SAN 405	거세미나방 일종	미국
NPV	<i>Orgyia pseudotsugata</i> (douglass-fir, tussock moth)	TM-Bio control -1, virtuss	독나방 일종	미국
NPV	<i>Lymantraia dispar</i> (gypsy moth)	cypcheck virin-Ensh	짚시나방	미국, 케나다
NPV	<i>Necodipiron sefiter</i> (Pine sawfly)	Neocheck-S Vrin-Diprion	솔잎혹파리	미국, 러시아
NPV	<i>Necodipiron lecontei</i> (red beaded pine sawfly)	Lecontivirus	솔파리의 일종	미국, 러시아
GPV	<i>Deontrolimus spectabilis</i> (pine caterpillar)		솔나방	일본
GV	<i>Pieris rapae</i> (imported cabbage worm)	Virgin-Gkb	배추흰나방	러시아

### (다) 기생성 곰팡이

- 곤충 병원성 곰팡이는 불완전균류가 주로 이용되었고, 선충, 가루이, 진딧물, 나방류, 응애 등이 주된 방제대상으로 조사됨.

표 13. 기생성 곰팡이를 활용한 제품화 사례

살충성 병원 곰팡이	표적해충	제품명	사용국
<i>Arthrobotrys robusta antipolis</i>	양송이식균성 선충	Royal 300	프랑스
<i>Arthrobotrys irregularis</i> 1141	뿌리혹 선충	Royal 350	프랑스
<i>Aschersonia placenta</i>	감귤가루이		러시아
<i>Beauveria bassiana</i>	감귤가루이 콜로라도 잎벌레 코드랑나방 European corn borer	Aseronijia Boverin	러시아 러시아 러시아 중국
<i>Beauveria tenella</i>	풍뎅이 일종 구리풍뎅이		프랑스 일본
<i>Hisutella thompsonii</i>	감귤녹응애	Mycar	미국
<i>Netarhizium anisopliae</i>	검뽕벌레과 바구미류	Metaguino	브라질
<i>Nomuraea rilyi</i>	옥수수명나방류		미국
<i>Verticillium locanni</i>	온살의 진딧물 온실가루이 무화과까치벌레	Vertaalec Mycotal	영국 영국 체코

### (라) 병원성 세균

- 곤충 병원성 세균은 *B. thuringiensis*이 대표적으로, 일본 미국, 프랑스 등 다양한 국가에서 개발되어 상용화된 사례가 조사됨.

표 14. 병원성 세균을 이용한 제품화 사례

병원성 세균	표적해충	제품명	사용국
<i>Bacillus oppilliae</i>	Japanes beetle	Doomn Japidemic	일본
		Milky spore disease	미국
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	Lepidopteran	Dipel	미국
		Thuricide	미국
		Bactur	미국
		Bastospeine	프랑스
		Plantibac	프랑스
		Sporeine	프랑스
		Biosper	독일
		Raktukal	러시아
		Insektin	러시아
		Entobacterin	러시아
Dendrobacillin	러시아		
<i>B. t. var. israelensis</i>	Dipteran	Teknar	미국 외
<i>B. t. Sandiego</i>	Coleoteran	M-one M-Trak	미국
<i>B. t. tenbrionis</i>	Coleoteran	Trident Novodor	스위스

### (마) 길항 미생물을 이용한 제품화 사례

- *Bacillus subtilis*, *Pseudomas* sp. 등 길항작용이 있는 것으로 보고되는 미생물을 대상으로, 병원성 미생물 및 질병 방제용 개발 사례가 주류를 이룸.

표 15. 길항미생물을 이용한 제품화 사례

미생물	적용 대상	생산물질	제품명	사용국
<i>Agrobacterium</i>	Agrobacterium	Agrocin	Dygal, Nogall	호주
<i>Radiobacter</i>	Tumefaciens 각종 종자 부패	항진균	Galltrol, Norbac Quantum 4,000	미국 미국
<i>Bacillus subtilis</i>	곰팡이병 방제	항생물질		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	목화입고병 질병방제	Pyrrrolotrin Pyuternin	Dagger G	미국
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Pythium spp. verticillium			미국
<i>Pseudomonas putida</i>	오이만부병			
<i>Streptomyces griseo viridis</i>	Pythium 등 토양 질병 방제			미국

### (바) 선충 방제용 미생물제제 개발 사례

- 신젠타에서 연 간 15억 달러의 손해를 입히는 콩 씨스트 선충을 방제하는 제품으로 대사물질로써 기능 교란 및 독성을 유발하는 *Pasteuria* 균체를 활용한 친환경 종자 처리제가 개발되어, 전세계적으로 제품 등록 및 판매가 개시됨.
- 또한 미국 농업 연구청 Edward masler에 의해 콩 씨스트 선충에 대한 생화학적 제어방법이 연구 진행중임.
- 또한 Cyst 선충은 형태 안전성으로 인해, 살충약제에 대한 저항성이 높아 Imicyafos 등 Cyst에 효과가 있는 성분 연구가 진행중, 저항성이 높은 종자의 개발 및 유인작물 식재를 포함한 윤작 등이 활용됨.
- 본 연구 대상인 고구마 뿌리혹선충을 비롯한 뿌리혹선충 대상의 미생물 기원의 교미 및 활동 저감제의 추가적인 개발이 진행중임.
- 작기 중 농약의 고독성 및 잔류성을 대체하기 위한 생물 소재 기반 제품화연구가 진행중, 미생물의 경우 항생물질 균주인 *Pseudomonas*, *Trichoderma*, *Bacillus*, 살충활성 단백질 *Beauveria bassiana*, *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces*등이 활용되고 있음.

표 16. 선충 방제용 미생물 종류

방제분류	방제 기작	적용 범위	대표 종	References
알 방제	독소, 효소, 기생	토양	<i>Telluria</i>	Spiegl et al., 1991;
			<i>Bacillus firmus</i>	Wilson and Jackson, 2013
활력저하, 기생, 유인 체내 친입	독소, 뿌리 퇴화 및 저항 유도, 기생	토양 근원	<i>Pasteuria penetrans</i>	Kretchel et al., 2002;
			<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Siddingqui and Shaukat(2004);
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Siddingqui and Shaukat(2006)
			<i>Rhizobium etli</i>	
적용방법 개발	기생 및 저항독소	내부균근	<i>Pratylenchus penetrans</i> <i>Rhizobium etli</i>	Davies et al.,1991; Reitz et al.,2002

### (사) 경쟁사 현황

- 세계 10대 농약회사들 중 Bayer, Syngenta, Monsanto 및 Dupont은 ‘12년도 이래로 이들 상호간에 인수합병을 통해 다국적 기업으로서 전 세계 작물보호제 시장을 점유율을 상승시키고 있음.
- 전 세계적으로 110여 개의 회사들이 생물농약의 주요사업을 펼치고 있는 것으로 알려지며, 주요 업체로 Valent Bio Sciences사, Certis USA사, Koppert사 등이 500억원 이상 매출규모의 생물농약 및 천적방제를 펼치고 있음.

## 제 3절 개선 방안 및 연구의 최종 목표

### 가. 선충 선택적 신경 제어 소재 적용

- 자연계의 동·식물은 대다수 GABA 수용체를 보유, GABA 수용체 중 chloride 이온이 유입되는 통로(Voltage dependent Cl<sup>-</sup> channel)는 공통적으로 형성되나, Sodium 이온이 유입되는 통로(Voltage dependent Na<sup>+</sup> channel)는 곤충에게 독립적으로 존재함(그림 2) (Kim, 2007).
- GABA 수용체 활성화 시, 인간 및 고등동물은 중추신경의 활성화 억제로 기억력 증대, 뇌혈류 개선, 혈압 강하작용, 우울증 완화 등 조절에 관여하나, 곤충의 경우 시냅스와 근육 세포 중간에서 근육활동을 조절하는 상이한 특성을 보임 (Kang and Oh, 2007).

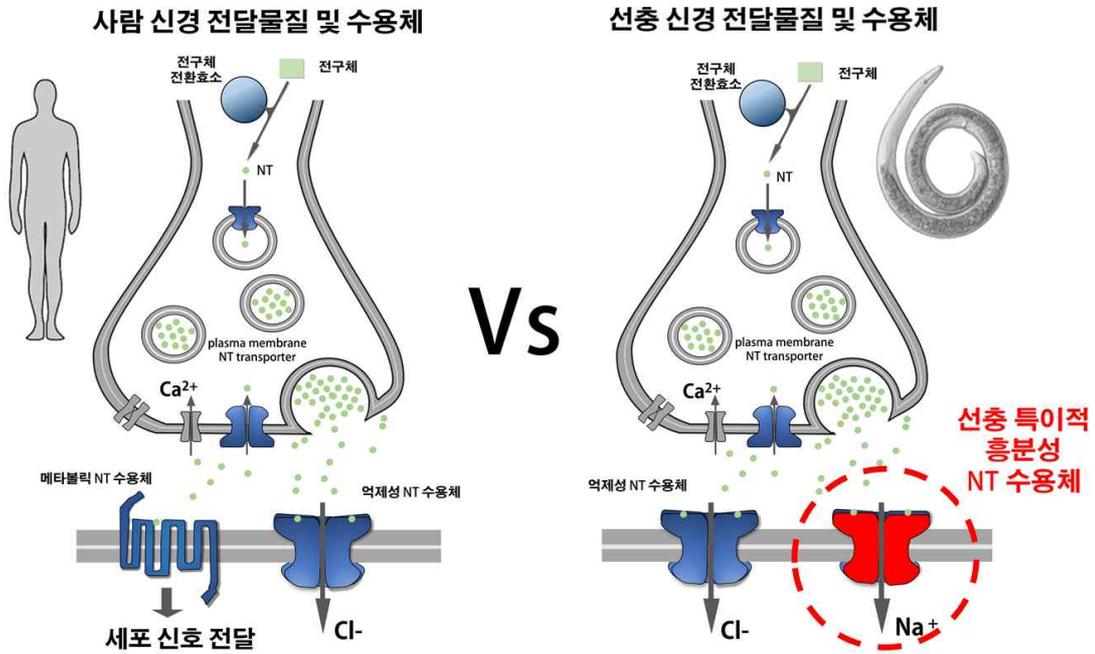


그림 2. 선충의 선택적 신경 반응

- 곤충의 GABA 수용체의 활성 메커니즘은 현행 농업 해충을 방제 수단으로 활용되어져 왔음.
- Endosulfan류 유기염소계 살충제 및 fipronil 살충제 : GABA gated Chloride channel에 결합 → GABA의 역할을 차단 → Chloride 이온의 Neuron 내 유입 억제 → 신경자극 억제 방해 → 과자 신경 자극을 통한 경련과 마비를 통한 사멸
- Avermectin류 살충제 : Glutamate gated chloride channel에 결합 → Glutamate의 작용을 강화 → Chloride 이온이 Neuron 내로 다량 유입 → 신경자극 전달 과다 유발 → 최종 운동성 상실 및 고사

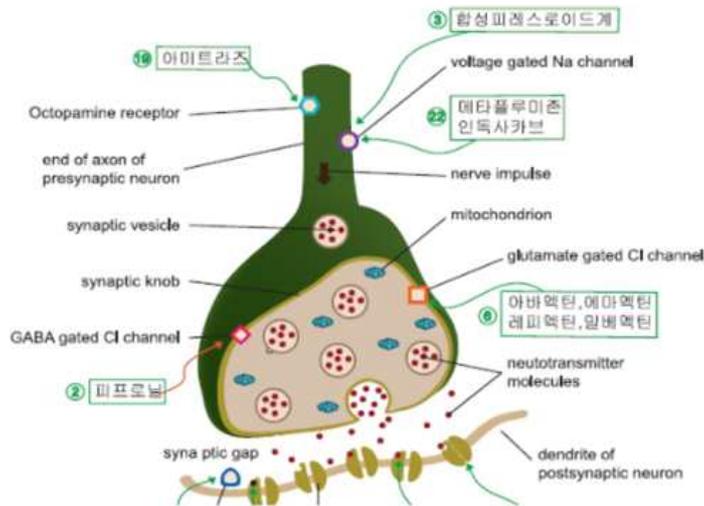


그림 3. 살충농약의 GABA chloride channel을 활용한 작용 기전

- 살충약제의 활용 범위가 GABA receptor chlorine channel에 집중되어 있음은 상위 연구인 단계인 의약수준의 도출된 연구 결과에 노출된 영향임.

- 반면 상위 물질들은 인류 및 고등동물 대상의 GABA receptor에 교란물질로 공통 작용됨에 따라, 억제사용이 금지되거나, 제약되는 등 활용 범위 측면에서 규제가 강화되고 있음.
- 반면 선충의 경우, 신경 근육 junction에서 흥분상태인 신경세포는 Acetylcholine을 방출하고,  $\gamma$ -aminobutyric acid를 방출하여, 흥분을 억제하여 정상 상태를 유지함.
- 선충은 체내 전반에 구성된 근육의 수축 및 이완과 좌우의 spin 파도 패턴으로 이동하는 보행이동(굴곡이동)과 앞부분을 늘리고 뒷부분을 끌어 당겨 이동하는 신축이동(신장운동)을 통해 섭식활동을 위해 기주를 찾아 이동함.
- 이동에 관여하는 근육 신경계가 체내 전반에 형성되어 있고, 선충의 이동 수단인 이완 및 수축의 명령 신호를 GABA receptor가 관여하고 있음(그림 4).

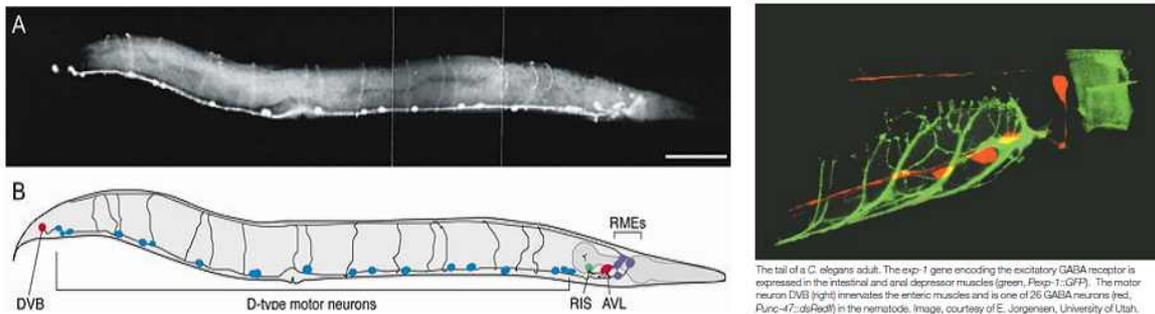


그림 4. 선충의 근육 활성 신경에 관여하는 GABA receptor 분포

- 선충은 GABA receptor sodium channel이 별도로 존재하며, 시험 선충인 *Caenorhabditis elegans* 에서 본 채널을 EXP-1이라 명명, GABA 처리에 의한 활성화에 의해 근육의 수축 이완에 영향을 줌을 확인 할 수 있음(Fetty et al., 2003).
- 선충의 genome은 매우 짧고, 현재 시험 선충인 *Caenorhabditis elegans*와 주요 해충인 뿌리혹선충의 genome이 밝혀진바 있으며, 발달 생식, 이동, 대사과정에 관여하는 많은 유전자들이 유사함이 구명되어짐.
- 이는 인류와 동물들에게 영향이 없는 GABA sodium channel인 Exp-1 채널을 타겟으로 친환경성을 확보한 다양한 선충에 대한 선택적 방제제의 도입 가능성을 시사함.
- 선충의 체내 GABA receptor의 넓고 밀집적 형성도는 본 방제제의 저농도 처리에서 민감한 반응이 예상되며, 토양 선충의 억제에 대한 노출이 불리한 생태환경 내 효과적인 방제소재로 활용될 수 있음.
- 선충의 흥분성 신경 채널은 이동에 관여하는 근육조직 및 항문에 전방위 분포있어, 아래와 같은 방제기작의 제공이 예상됨(그림 5).
  - 근육 이완 명령 연속 수행 → 활동정지 및 항문(산란관) 이완 → 활동 정지 및 최종 고사 → 선충의 밀도 저감 및 부화율 감소

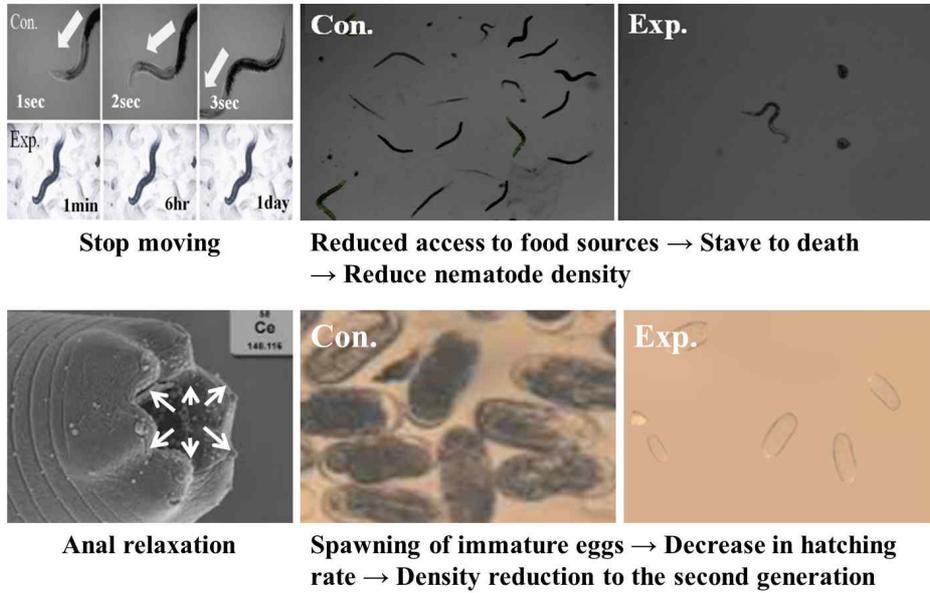


그림 5. 뿌리혹선충 신경 제어를 통한 방제 메커니즘

## 나. 본 연구의 최종 목표

- 본 연구팀은 김치 또는 국내 전통 발효 식품 근원의 토착 미생물을 활용하여, 선충류에만 독립적으로 보유된 GABA Sodium Channel의 신경제어물질을 활용한 농약과 작용 기전은 유사하나 친환경성을 보유한 유기농업자재의 도출을 목표로함.
- 이를 위해, 상위 Channel의 신경제어물질을 다량으로 생성하는 미생물을 활용해, 선충 특이적 친환경 방제제의 실용화를 시도하였음.
- 최종 토양관주, 정식적 시비 혼합제, 식물체 침투성 약제 등 다양한 활용방법을 제시하고자 하였고, 뿌리혹선충에 대한 친환경적 방제기술의 제공 및 사업화를 통해 본 사업의 의의를 달성하고자 하였음.

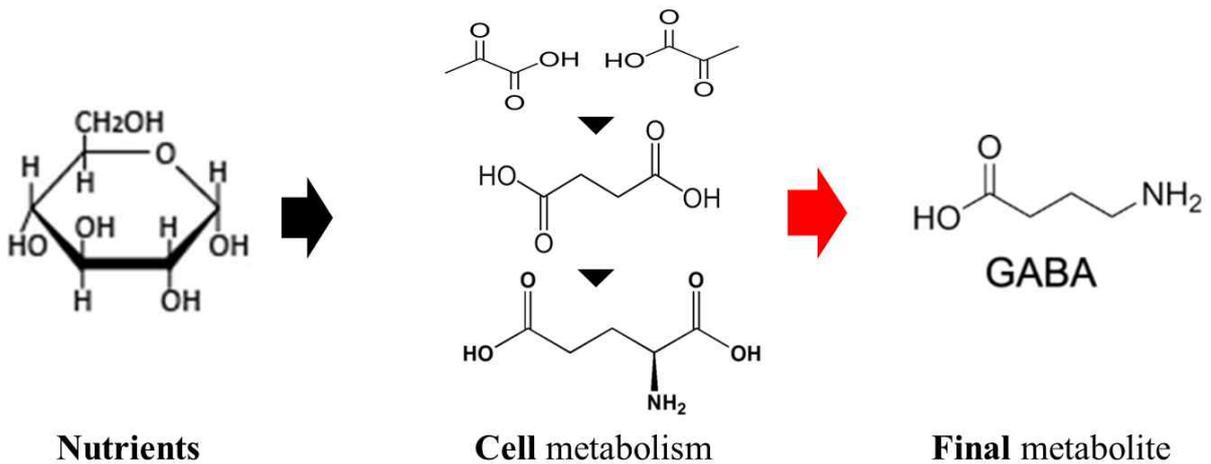


그림 6. 미생물을 활용한 신경제어 물질 생성 메커니즘

## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### 제 1절 뿌리혹선충 방제용 유기농업자재 제품화

#### 가. 연구목표

- 뿌리혹선충 선택적 신경제어 물질을 생성하는 균주 최적 생육 조건, 대량생산 및 시제품 개발 및 최종 유기농업자재 등록 및 사업화를 진행함 - 유기농업자재 등록 1건

#### 나. 연구내용

- 선발 균주의 살선충 활성물질 함량 최적화
- Pilot 이상의 대량생산 공정확립
- 제형형태, 제형조건, 제형 안전성 등 최적 제형 개발
- 시제품 개발 및 생산
- 유기농업자재 등재(효능효과 검정 포함)

### 제 2절 김치유래 미생물을 이용한 뿌리혹선충 방제용 미생물 탐색 및 이용연구

#### 가. 연구목표

- 뿌리혹선충 선택적 신경제어물질 생성 균주 발굴, 대사체 분석을 통한 유용물질의 구명, 선발균주 토양 내 잔류성 검토를 통하여 방제제로써의 활용 가능성을 검정 - 기술이전 1건 이상(2협동 포함), 특허출원 1건 이상(2협동 포함)

#### 나. 연구내용

- 선발 균주의 살 선충 물질 활성 연구
- 선발 균주의 기호성(대사물질)에 대한 연구
- 균주의 살 선충 및 대사물질 간의 방제 상승효과 검토
- 복합 균주의 적용 시 살 선충 시너지 평가
- 선발 균주의 토양 잔류성 평가

### 제 3절 뿌리혹선충의 선택적 신경 제어로 미생물 살선충 작용기전 구명

#### 가. 연구목표

- 뿌리혹선충의 선택적 신경제어로 미생물 살선충 작용기전을 구명함. - 기술이전 1건 이상(1협동 포함), 특허출원 1건 이상(1협동 포함), SCI 논문 2건 이상

#### 나. 연구내용

- 선충 신경제어 소재 확보
- 살 선충 활성 미생물 선발 연구
- 선발 미생물을 적용한 뿌리혹선충 억제 메커니즘 분석
- 시제품의 신경제어 활성 평가
- Lab scale 생물검정 실험
- 시제품의 세포 독성 평가

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 제 1절 연구수행 결과

#### ■ 뿌리혹선충 방제용 유기농업자재 제품화 - (주)마이크로자임

##### 가. 뿌리혹선충 방제용 미생물의 최적 생산 조건 연구

##### (1) 활성물질 최적 생산 조건 연구

##### (가) Wikim0118 생육 및 활성 물질 생산 배지 연구

###### ① 연구목적

- wikim0118균주의 생육 및 살선충 물질 생산 최적화 배지 원료 선발

###### ② 재료 및 방법

###### ㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : *L. sakei* wikim0118(세계김치연구소)
- 기본 배지 : MRS broth
- 질소원 : Peptone, Soytone, Beef extract, Yeast extract, Tryptone,  $\text{Na}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{3+}$ , Casein,  $\text{NH}_4\text{-N}$ , Malt extract, HSP
- 탄소원 : Sucrose, Fructose, Lactose, Phenyl-alanine, Galactose, Maltose
- 무기염원 : NaCl,  $\text{MnSO}_4$
- 살충물질 정성분석 : TLC plate silicagel 60 F254(Merck)
- 살충물질 정량분석 : Gabase from *pseudomonas fluorescens*(Merck)

###### ③ 시험방법

###### ㉠ 균주의 생육 및 배지 조건

- 초기 배지 조성은 MRS 배지를 기본으로, 각 실험 별 탄소원, 질소원, 무기염원의 생육 정도 및 살충물질 생산 능력을 평가해 최종 배지 조성을 확립함.
- 배양 조건 및 배지 함량에 따른 생육 밀도 및 뿌리 혹선충 방제용 지표 물질로 설정한 살충물질 생산량 최적화에 관련된 연구를 진행함.

###### ㉡ 살충물질 생산 정성 분석

- 균주 배양액을 원심 분리하여 상등액을 취한 후, 박층크로마토그래피(Thin layer chromatography; TLC)법으로 수행함.
- 전개용매는 n-butyl alcohol; acetic acid; disitilled water(4:1:1 v/v/v)를 사용하였고, 1시간 전개 후 TLC Plate를 80°C에서 10분간 건조하였고, 이 과정을 1회 더 반복함.

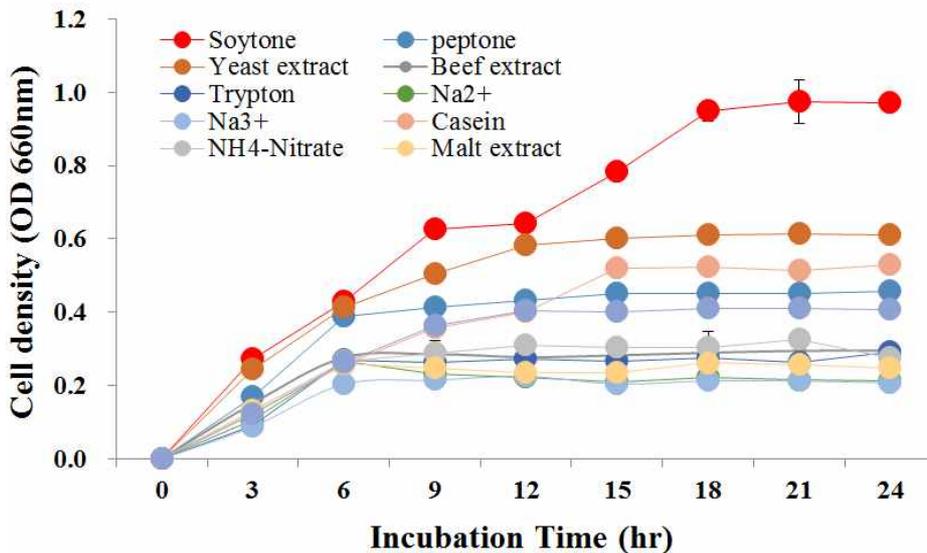
㉔ 살충물질 생산량 분석

- 균주 배양액을 원심 분리하여 상등액을 취한 후, 1mL에 70mM LaCl<sub>3</sub> 1 mL를 가하여 15분 동안 잘 섞어준 후 4,000 rpm 에서 5분간 원심분리 함.
- 상등액 400 μL를 취하여 0.1 M KOH 160 μL를 미리 넣어둔 centrifuge tube에 넣어 5분간 교반함.
- 4,000 rpm에서 5분간 원심 분리한 상등액 50 μL에 0.5 M K<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 완충용액(pH 8.6) 50 μL, 4 mM NADP 150 μL를 첨가한 후, 2.0 unit/mL GABase 50 μL를 혼합하여 340 nm에서 흡광도를 측정함(initial A).
- 20 mM α-ketoglutarate를 50 μL 넣고 37℃에서 3시간 동안 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도를 측정(final A)함.
- 농도별 GABA(Sigma-Aldrich Co.)를 동일한 조건에서 분석한 표준검량곡선에 측정된 흡광도(final A-initial A)를 대입하여 생성된 살충물질 함량을 산출하였고 대표적 HPLC 결과 및 최적화 단계별 TLC 결과 와 대조하여, 데이터를 신뢰도를 검증함.

④ 결과

㉕ 생육 및 살충물질 생성 최적 질소원 선발

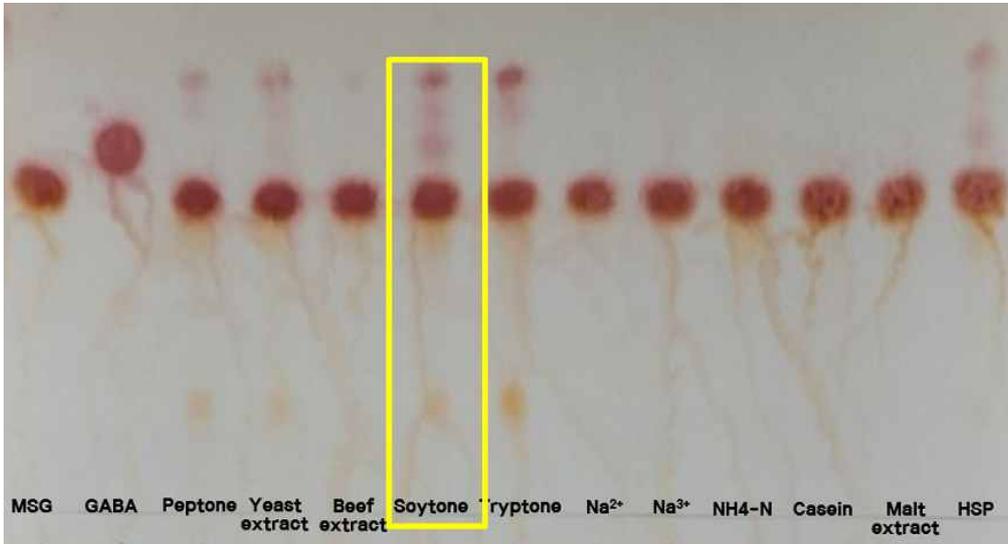
- 질소원을 제외한 MRS 배지를 기본배지로 사용해, 각 질소원을 2% 첨가하여 제조하였고 살충물질 생성능을 확인하기 위해, MSG 5%를 혼합함.
- 25℃에서 24시간 동안 배양하여, 균체 증식 및 살충물질 생성능력을 평가함(그림 7-9).



\* Baffled Flask 25℃ 정지배양

그림 7. 질소원에 따른 균체의 생육속도

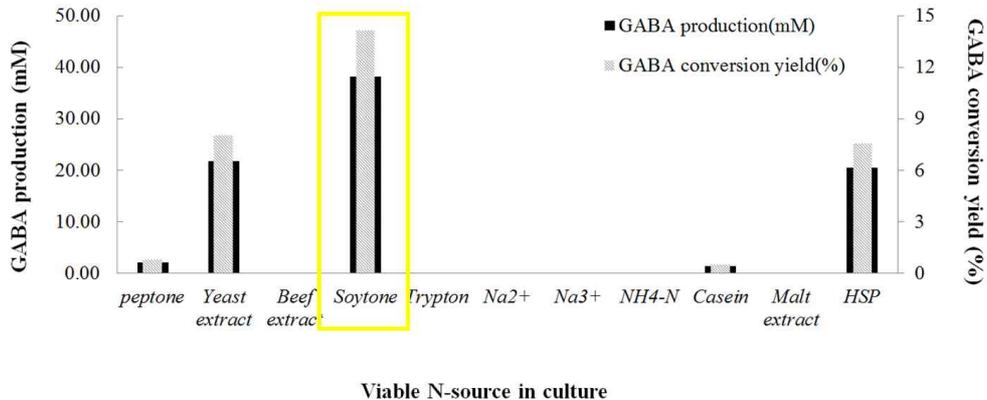
- 생육 속도를 평가한 결과 Soytone을 첨가한 군이 18시간 내, 대수 증식기에 도달하였고, 가장 우수한 생육 밀도를 나타냄(그림 7).
- 24시간 경과 후 Soytone을 첨가 군의 살충물질 생성량이 37.9mM, MSG 전환율 14.04%로 가장 높은 수준을 보임(그림 9).



\* 24시간 균체의 상등액 10배 희석액을 4 $\mu$ L 로딩하였고, MSG 및 살충물질 표준품은 5% 농도의 10배 희석액 임.

그림 8. 살충물질 정성 분석

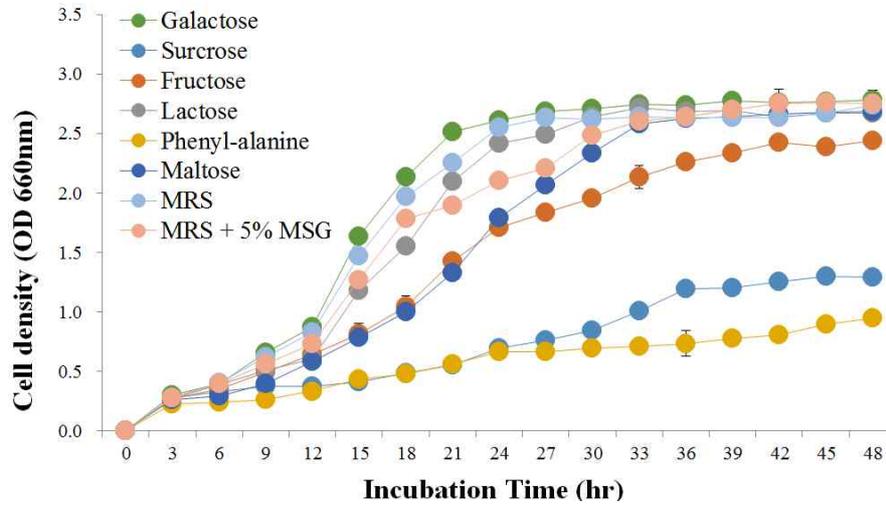
- GABA 생성에 관여하는 효소인 GAD는 Cell mass의 증가에 따라 유의성 있게 증가하므로, 가장 높은 수준을 보인 Soytone을 질소원으로 선발함(그림 7-9).



\* 24시간 균체 상등액을 대상으로 함.

그림 9. Gabase를 활용한 질소원별 배양물의 GABA 정량 분석

- ㉞ 생육 및 살충물질 생성 최적 탄소원 선발
  - 질소원을 2% Soytone으로 고정한 채 MRS 배지 조성 중 복합 탄소원을 배제하고, 각 탄소원을 2% 첨가하여 제조, 살충물질 생성능력을 확인하기 위해, MSG 5%를 혼합한 생육을 실시함.
  - 25°C에서 24시간 동안 배양하여, 균체 증식 및 살충물질 생성능력을 평가함(그림 10-13).
  - 균체 증식을 검토한 결과 Galactose를 첨가한 균이 21시간부터 정체기에 도달하였고, 2.61-2.74 OD 범위로 가장 높은 균체 밀도를 나타냄(그림 10-11).
  - Galactose의 빠른 성장속도 및 높은 생육밀도는 24시간 내 평균 164.07mM의 살충물질 생산과 MSG 전환율 62.1%, 48시간에는 221.67mM, 82.10%의 전환율로, 모든 탄소원 시험군들 중 가장 높은 살충물질 생산능력을 보임(그림 12-13).



\* Baffled Flask 25℃ 48시간 정기 배양

그림 10. 탄소원에 따른 Wikim0118균주의 생육곡선

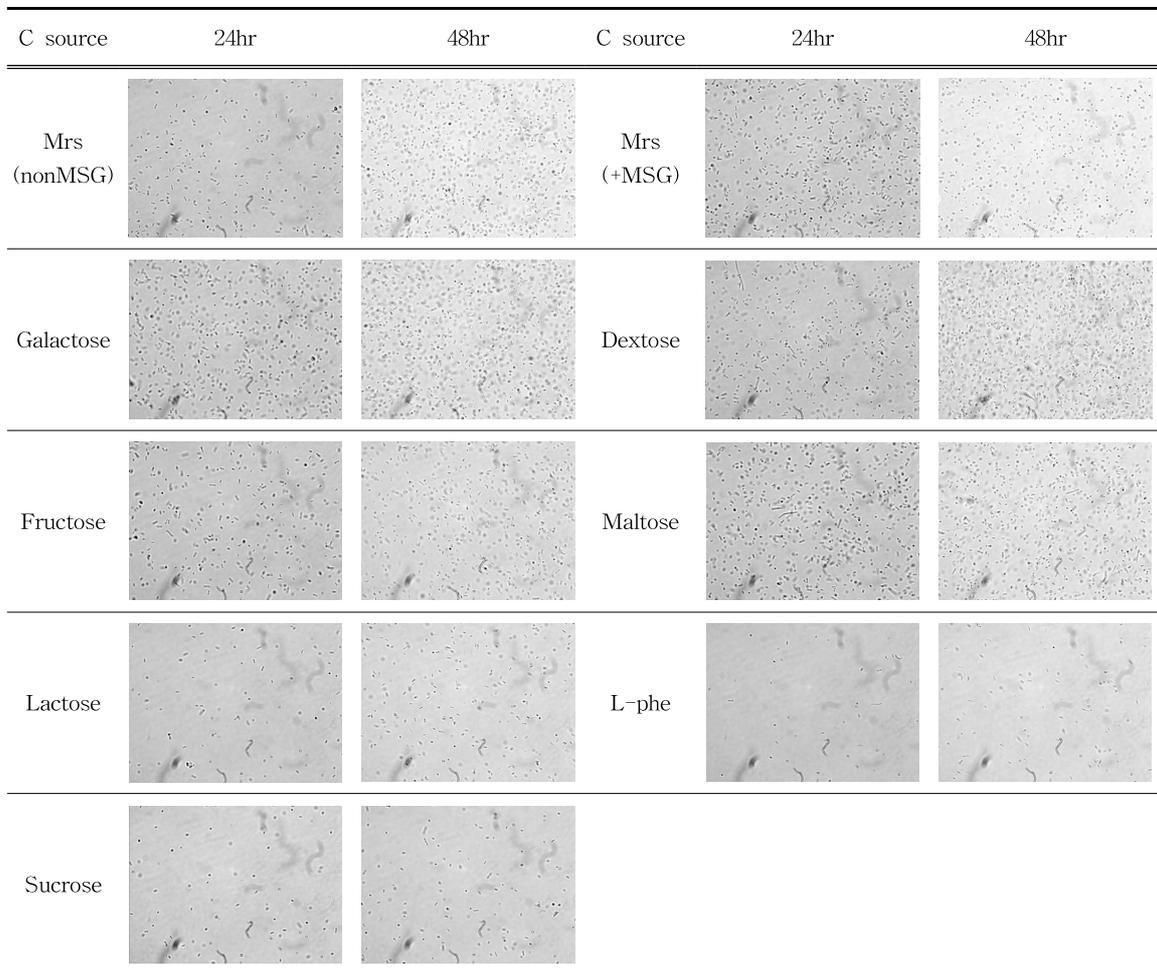
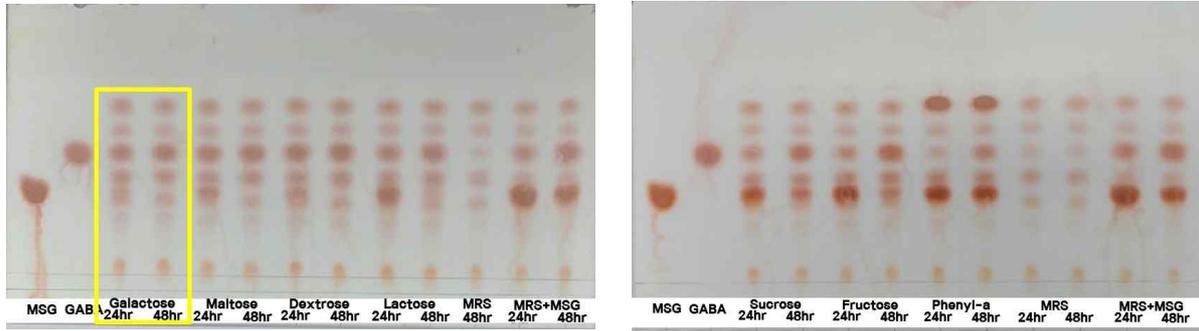
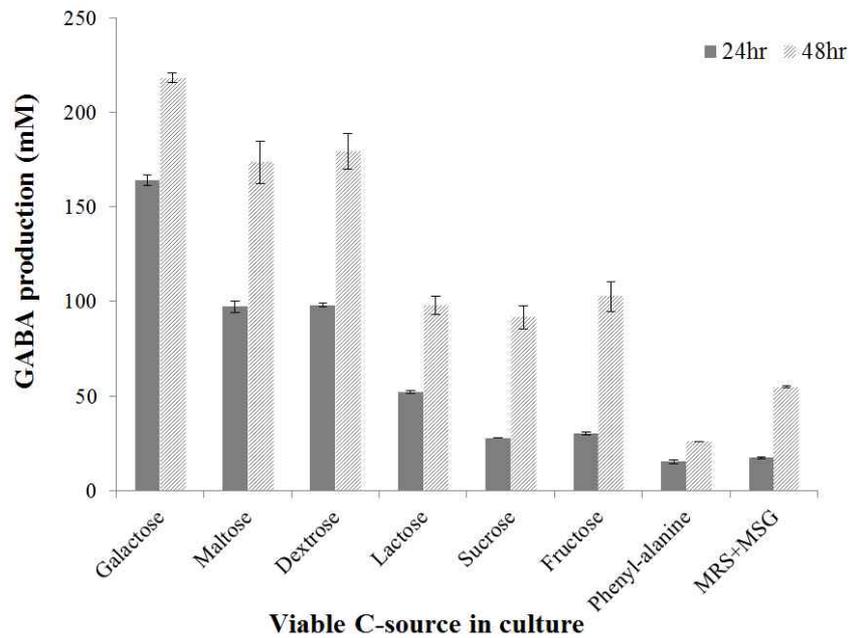


그림 11. 탄소원 적용에 따른 wikim0118균주의 생육 밀도



\* 24시간 균체의 상등액 10배 희석액을 4μL 로딩하였고, MSG 및 살충물질 표준품은 5% 농도의 10배 희석액 임.

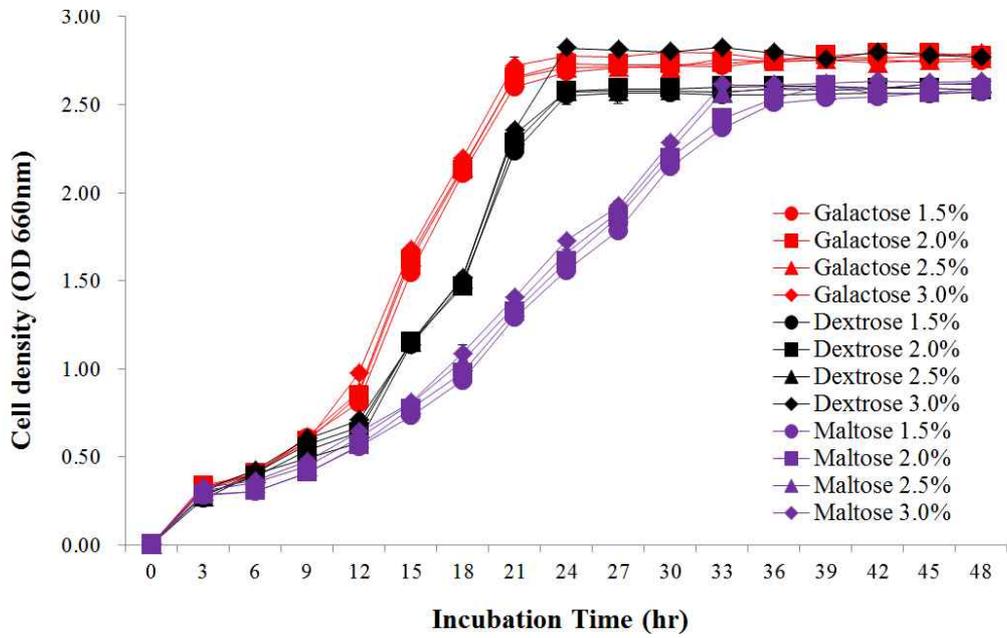
그림 12. TLC를 활용한 탄소원 별 배양물의 GABA 정성분석



비고) 균체의 상등액을 대상으로 함.

그림 13. Gabase를 활용한 탄소원별 배양물의 GABA 정량 분석

- 상위 Galactose를 비롯한 생육 및 살충물질 전환이 우수한 Dextrose, Maltose를 1.5, 2.0, 2.5, 3.0%로 적용하여, 실험에 따른 생육 속도 및 살충물질 전환능력을 추가로 평가 함.(그림 14-17).
- Galactose균이 21시간 전후로 가장 이른 안정기가 도달됨(그림 14).
- Galactose균은 최대 2.8의 생육을 보여, 가장 우수한 생육 탄소원 결과를 보이나, 농도 별 유사성은 살펴 볼 수 없음(그림 14-15).
- 고농도인 2.5-3.0% 구간에서 24시간에 20.93-29.15mM, 48시간 79.52-82.78mM인 반면, 저농도인 1.5-2.0%에서는 48시간에 233.55-244.08mM의 생산량과 86.5-90.4%의 MSG 전환 효율을 보임(그림 16-17).
- 따라서 선발 균주의 최적 생육 및 살충물질 전환 탄소원으로 Galactose를 선발하였고, 원활한 살충물질 생성을 보이는 2%로 함량을 결정하였음.

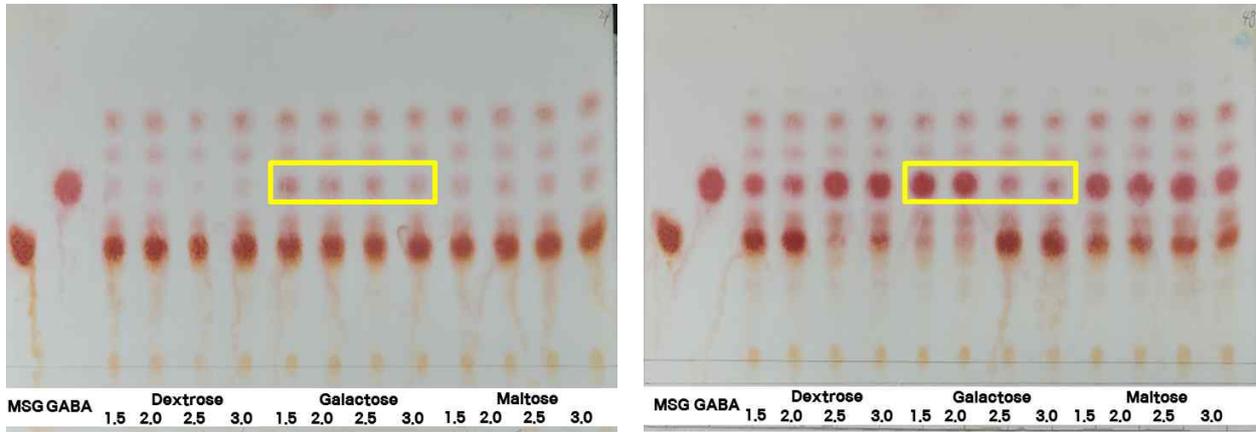


\* Baffled Flask 25°C 48시간 정지 배양

그림 14. 탄소원(Dextrose, Maltose, Galactose)에 따른 Wikim0118균주의 생육곡선

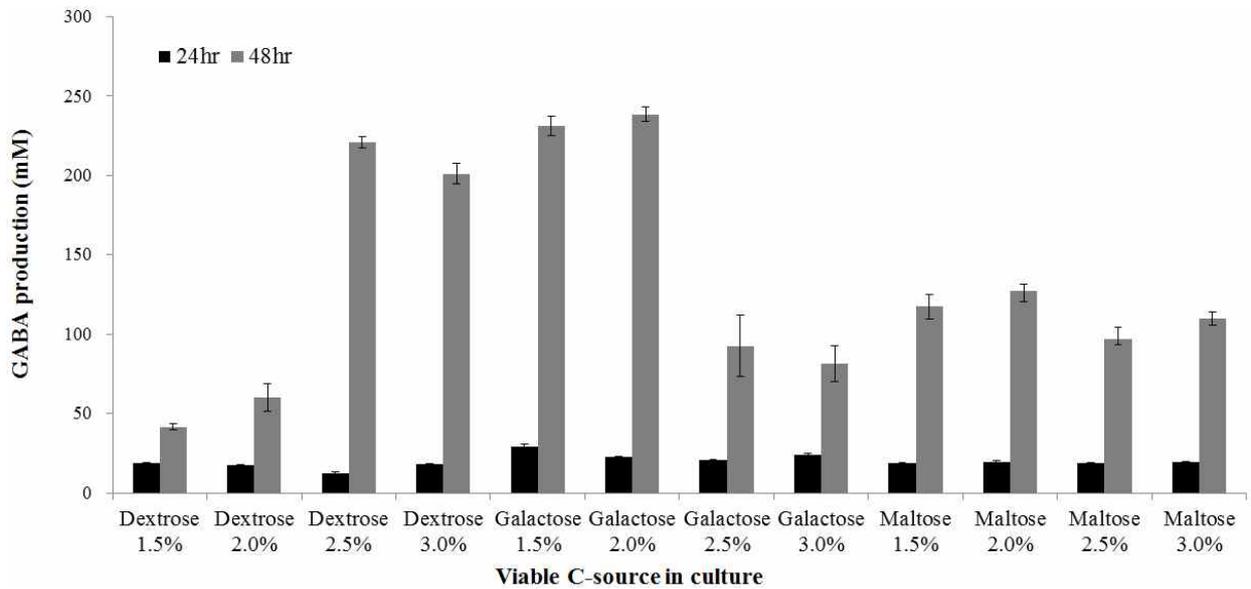
C source	24hr	48hr	C source	24hr	48hr
Dextrose 1.5%			Dextrose 2.0%		
Dextrose 2.5%			Dextrose 3.0%		
Galactose 1.5%			Galactose 2.0%		
Galactose 2.5%			Galactose 3.0%		
Maltose 1.5%			Maltose 2.0%		
Maltose 2.5%			Maltose 3.0%		

그림 15. 탄소원 적용(Dextrose, Maltose, Galactose)에 따른 wikim1108균주의 생육밀도



\* 시간 별 균체의 상등액 10배 희석액을 4 $\mu$ L 로딩하였고, MSG 및 살충물질 표준품은 5% 농도의 10배 희석액 임.

그림 16. TLC를 활용한 탄소원(Dextrose, Maltose, Galactose) 별 배양물의 GABA 정성분석

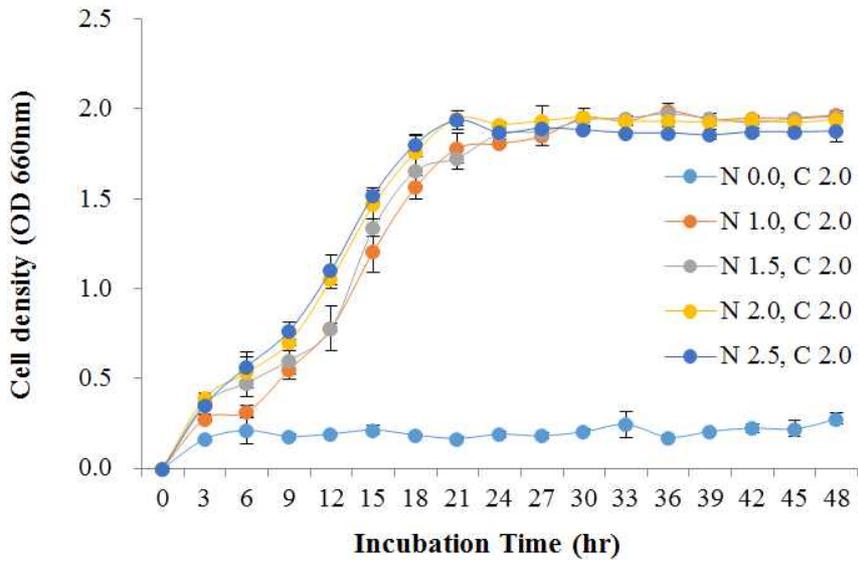


\* Baffled Flask 25 $^{\circ}$ C 48시간 정지 배양

그림 17. Gabase를 활용한 탄소원 별 (Dextorse, Maltose, Galactose) 배양물의 GABA 정량 분석

㉔ 생육 및 살충물질 생산 최적 탄질비 결정

- Galactose 2.0%를 고정한 체 균체증식과 살충물질 생산이 가장 좋았던 Soytone의 농도별 생육 및 살충물질 생산력을 분석을 평가함(그림 18-21).
- 질소원 2.0-2.5%에서 정체기인 21시간에 1.90-1.937의 가장 높은 생육 밀도를 보이며, 최종 48시간에 1.877-1.941의 생육 지속성을 보임(그림 18-19).
- 전반적으로 Soytone의 농도 상승에 따라, 24시간에 살충물질은 0.13-70.47mM로 생산량이 증가함을 확인할 수 있음(그림 20-21).
- 48시간에는 0.14-247.86mM로 상위와 동일하게 농도 상승에 따라, 살충물질 생산성이 상승됨을 확인할 수 있으나, 2.0% 이상에서 상승폭은 매우 미비하였음(그림 21).



\* Baffled Flask 25°C 48시간 정지 배양

그림 18. C/N ratio에 따른 Wikim0118균주의 생육곡선

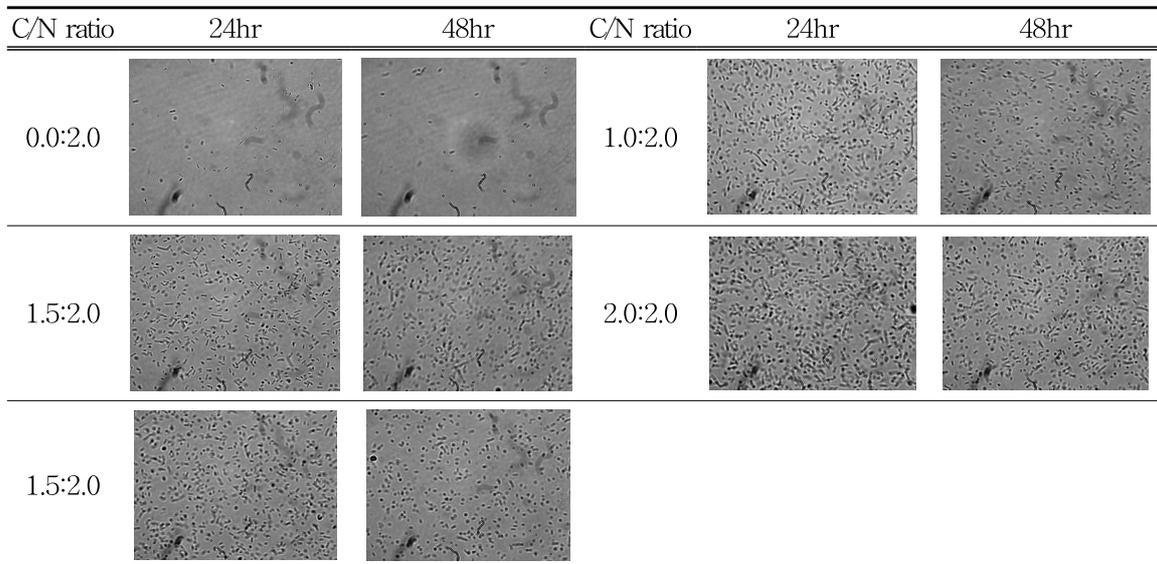
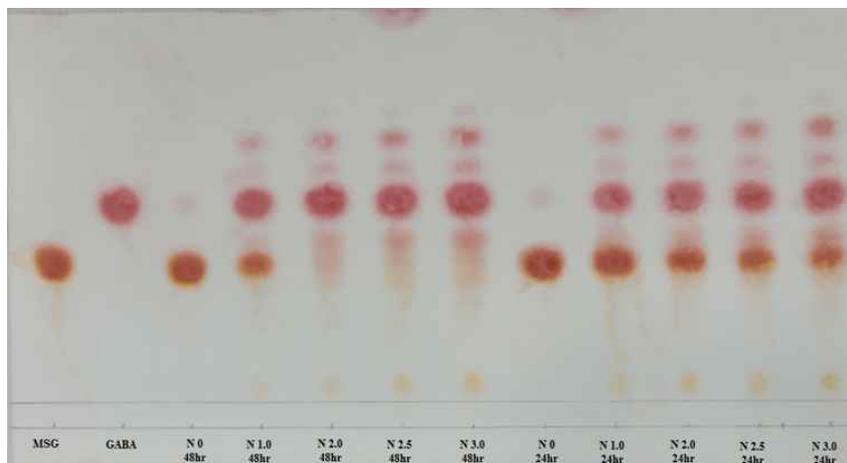


그림 19. 탄질비에 따른 Wikim0118균주의 생육밀도



\* 24시간 균체의 상등액 10배 희석액을 2μL 로딩하였고, MSG 및 살충물질 표준품은 5% 농도의 10배 희석액 임.

그림 20. 탄질비 적용에 의한 살충물질 정성 평가

- Galactose 2.0%의 탄소원 아래, Soytone의 생육 및 살충물질 생산 임계점은 2.0%로, 상업적 측면을 고려해, 2.0%로 고정함.

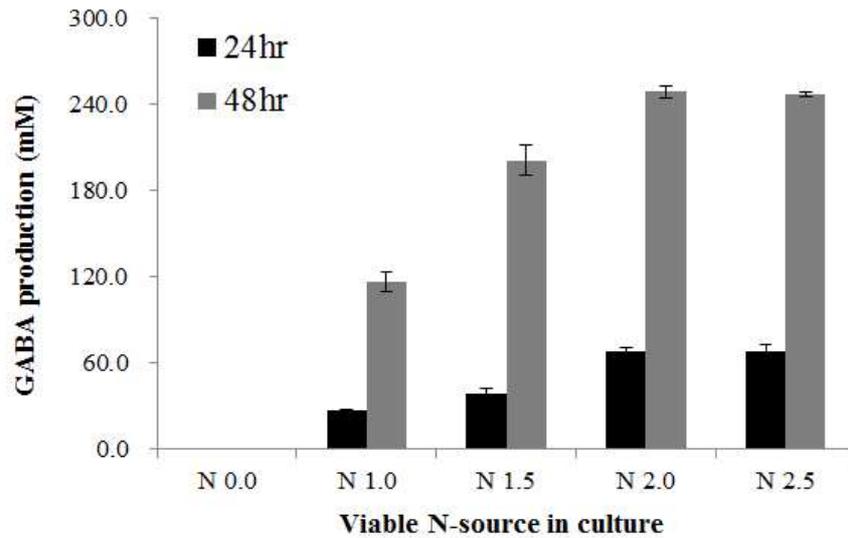
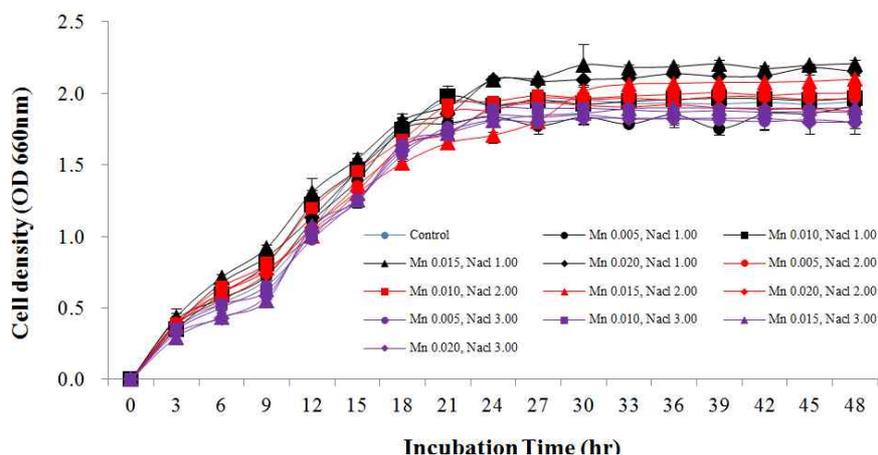


그림 21. 탄질비 별 배양물의 살충물질 생성함량 평가

㉔ 생육 및 살충물질 생산 최적 무기염원 결정

- 상기 균주는 내염성 균주이며, Chloride 이온이 살충물질 전환에 상승효과를 준다는 결과고 보고됨.
- 실 예로, 본 Wikim0118 균체의 배양 시 제1협동의 연구결과 내 1%의 Sodium chloride을 첨가하였을 때 배양 및 살충물질 생산이 우수하였음을 제시하였음.
- 선행 문헌에서 Manganese 이온의 첨가에 따라 유산균주의 생육속도가 향상되고, 이에 따라 최종 살충물질 생산량이 증가함이 보고된바 있음(Du 등 2014).
- 따라서 Manganese 및 Chloride 이온의 첨가에 따른 최적화 배지의 균체 증식 및 살충물질 생산성을 평가하고자 하였음(그림 22-29).



\* Baffled Flask 25°C 48시간 정지 배양

그림 22. 무기염원 첨가에 의한 균체의 생육 속도

- 전반적으로 제1협동에서 제시한 Sodium chloride 첨가 농도 1%을 초과 할 시 균체 성장이 불량해짐을 확인할 수 있음(그림 22-23).
- 균체의 성장이 지연되거나, 생육 밀도가 저하 될 경우, GAD의 생산량의 저하와 최종 살충물질 생산량에 영향을 미칠 수 있음.

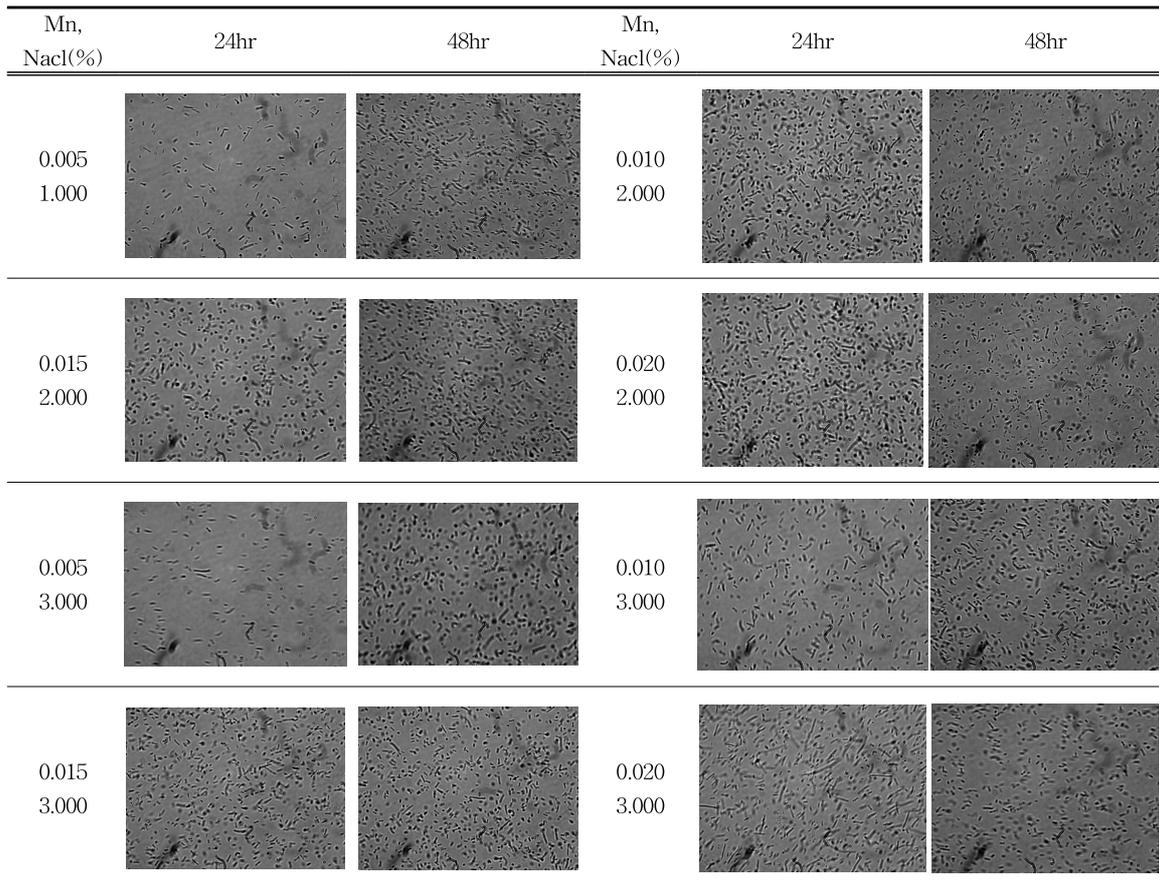
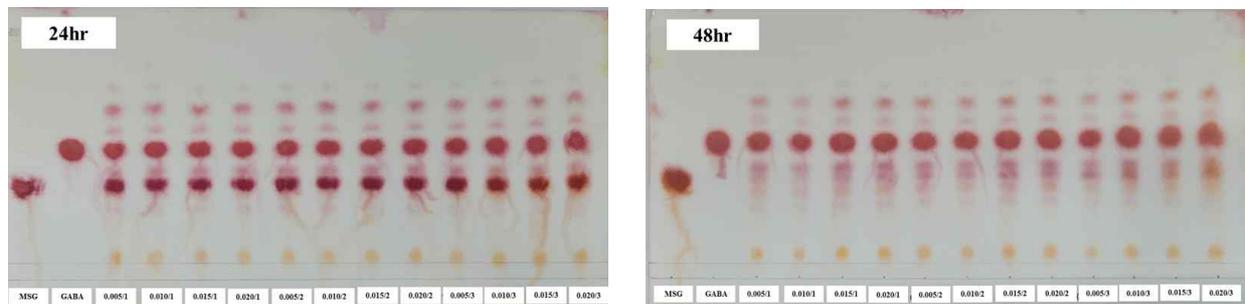


그림 23. 무기염원 첨가에 의한 균체의 생육 밀도



\* 균체의 상등액 10배 희석액을 0.1mL 로딩하였고, MSG 및 살충물질 표준품은 7% 농도의 10배 희석액 임.

그림 24. 미량원소 첨가에 의한 배양물의 살충물질 정성 평가

- Sodium chloride가 첨가된 구의 살충물질 생산량을 보면 2%에서는 24시간에 70.47-95.85, 3%는 71.28-90.99mM를 생산한 반면, 1% 첨가구는 84.78-111.24mM의 살충물질을 생산함(그림 24-25).
- 48시간에서는 전반적으로 MSG 5%를 전량 소진하여, 결과 비교가 불가함(그림 24-25).
- 따라서 24시간 내 결과를 볼 때 NaCl의 1%를 초과한 추가 첨가는 생육을 불량하게

만들어, 단기간의 살충물질 생성에 악영향을 미칠 것으로 판단됨.

- 1% 첨가군의 경우 Manganese 이온 첨가 농도별 1.915-2.096의 생육 밀도 상승을 보였고, 이에 따라 24시간 내 살충물질 생산량이 83.18-108.81mM로 증가되는 경향을 보임(그림22-25).
- 따라서 Sodium chloride의 경우 1%의 첨가가 생육 및 GABA 생산에 유리한 조건으로 판단됨.

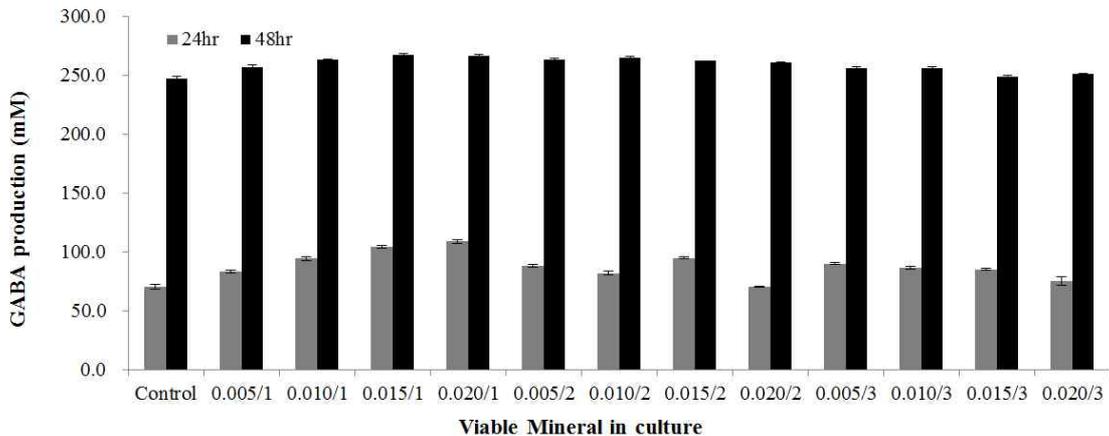
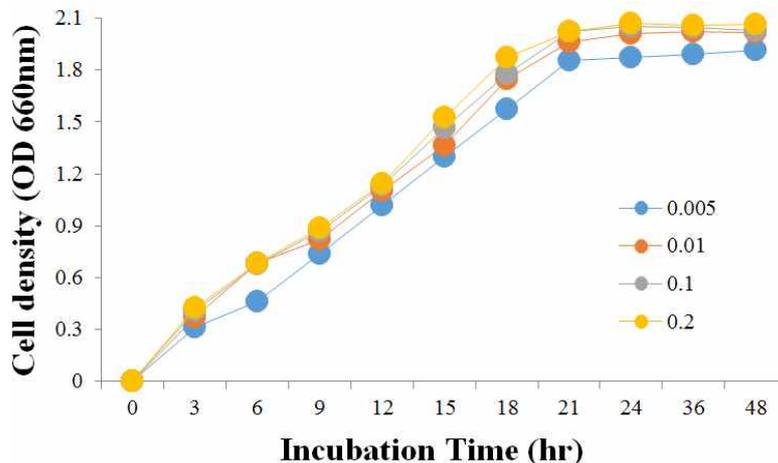


그림 25. 미량원소 첨가에 의한 배양물의 살충물질 생산능력 평가

- 1% 첨가군의 경우 Manganese 첨가 농도별 1.915-2.096의 생육 밀도 상승을 보였고, 이에 따라 24시간 내 살충물질 생산량이 83.18-108.81mM로 증가되는 경향을 보임(그림22-25).
- Sodium chloride의 경우 1%의 첨가가 생육 및 GABA 생산에 유리한 조건으로 판단됨.
- 또한 Manganese 의 농도별 균체 생육 및 GABA 생산에 미치는 영향을 검토한 결과, Manganese 농도의 증가에 따라 배양 종료 시 의 증가되는 생육 밀도 경향을 보이며, 0.2 이상부터 유의성을 살펴볼 수 없음(그림 26-27).



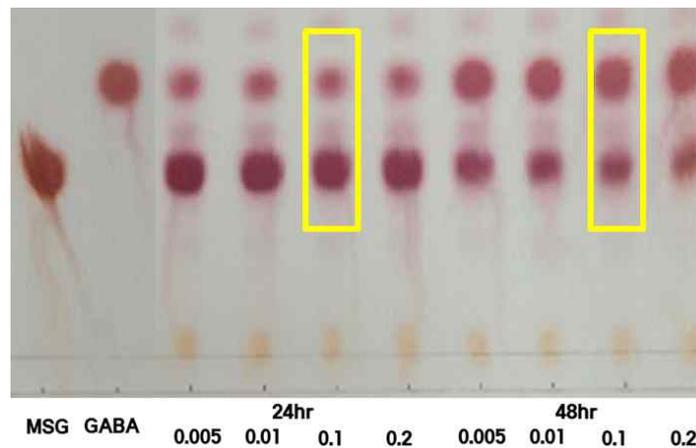
\* Baffled Flask 25°C 48시간 정지 배양

그림 26. 미량원소(Mn) 첨가에 의한 균체의 생육 속도

- 살충물질 생산량에 있어, 0.1% 이상부터 24시간 내 67.23-68.76mM로 경향으로 높은 생산 분포를 확인하였고, 반면 48시간에는 Manganese 이온 농도가 매우 높은 0.2%에서 230.40mM로 0.1%의 224.10mM의 생산량 대비 소폭 상승의 결과를 보임(그림 28-29).
- 따라서 살충물질 생산 대비 배지의 경제성으로 평가할 때 0.1% 이상의 Manganese 이온 첨가는 무의미할 것으로 판단됨.

Mn(%)	24hr	48hr	Mn(%)	24hr	48hr
0.005			0.01		
0.1			0.2		

그림 27. 미량원소(Manganese) 첨가에 의한 균체의 생육 밀도



\* 균체의 상등액 10배 희석액을 2 $\mu$ L 로딩하였고, MSG 및 살충물질 표준품은 7% 농도의 10배 희석액 임.

그림 28. 미량요소(Manganese) 첨가에 의한 배양물의 살충물질 정성 평가

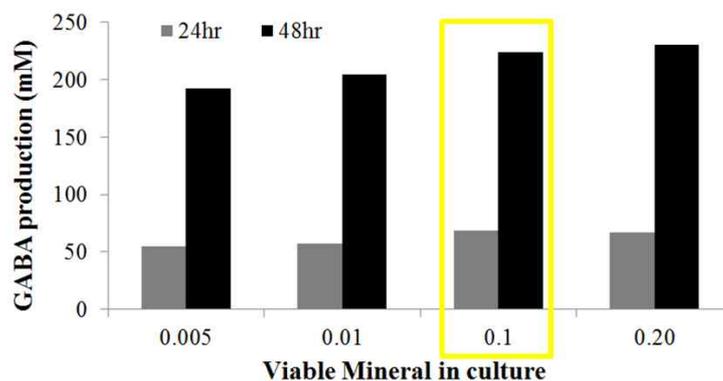


그림 29. 미량요소(Manganese) 첨가에 의한 배양물의 살충물질 생산능력 평가

⑤ 결론

- 살선충 물질 생산 최적화를 균주의 생육 및 살충물질 생산을 기준으로, 질소, 탄소, 탄질비, 무기염원등에 대한 최적 배지 조성을 확립함(표 17).

표 17. 살충물질 생성 최적화용 배지 조성표

Component	Content(%)
Galactose	2.0
Soytone	2.0
tween 80	0.1
Potassium phosphate (dibasic)	0.5
Sodium acetate	1.0
Ammonium citrate	0.2
Magnesium sulfate	0.1
Manganase sulfate	0.1
Sodium chloride	1.0

(나) 균주의 살충물질 최적 생산 조건 탐색

① 연구목적

- 실험실 규모의 발효조(5L) 환경에서의 배양 profile 결정

② 재료 및 방법

㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : *L. sakei* wikim0118(세계김치연구소)
- 적용 배지 : 표 17 조성의 최적화 배지
- 배양 규모 : 5L 실험실 규모의 발효조
- 살충물질 정성분석 : TLC plate silicagel 60 F254(Merck)
- 살충물질 정량분석 : Gabase from pseudomonas fluorescens(Merck)

㉡ 시험방법

1) 균주의 배양 Profile 변화

- 균주의 최적 생육 및 살충물질의 생산능력을 평가하기 위해 실험실 규모 발효조(5L)에서 통기량, 배지 사용량, 온도, 교반속도, pH 등 배양 조건을 달리하여, 생육속도 및 살충물질의 생산력을 평가하여 최종 최적 생산 조건을 탐색함.

## 2) 살충물질 생산 정성 분석

- 균주 배양액을 원심 분리하여 상등액을 취한 후, 박층크로마토그래피(Thin layer chromatography; TLC)법으로 수행함.
- 전개용매는 n-butyl alcohol; acetic acid; disitilled water(4:1:1 v/v/v)를 사용하였고, 1시간 전개 후 TLC Plate를 80°C에서 10분간 건조하였고, 이 과정을 1회 더 반복함.

## 3) 살충물질 생산량 분석

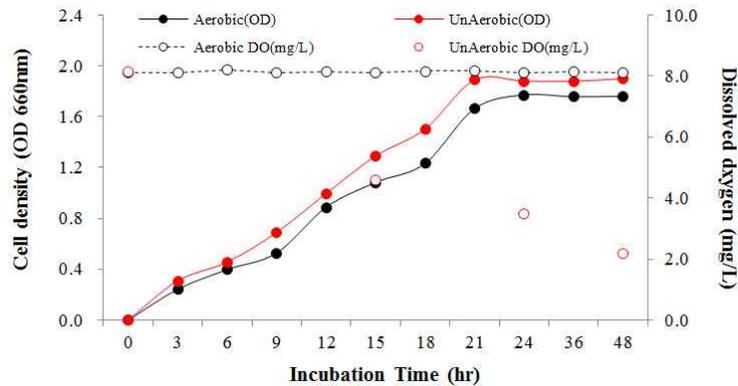
- 균주 배양액을 원심 분리하여 상등액을 취한 후, 1mL에 70mM LaCl<sub>3</sub> 1 mL를 가하여 15분 동안 잘 섞어준 후 4,000 rpm 에서 5분간 원심분리 함.
- 상등액 400 μL를 취하여 0.1 M KOH 160 μL를 미리 넣어둔 centrifuge tube에 넣어 5분간 교반함.
- 4,000 rpm에서 5분간 원심 분리한 상등액 50 μL에 0.5 M K<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 완충용액(pH 8.6) 50 μL, 4 mM NADP 150 μL를 첨가한 후, 2.0 unit/mL GABase 50 μL를 혼합하여 340 nm에서 흡광도를 측정함(initial A).
- 20 mM α-ketoglutarate를 50 μL 넣고 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도를 측정(final A)함.
- 농도별 GABA(Sigma-Aldrich Co.)를 동일한 조건에서 분석한 표준검량곡선에 측정된 흡광도(final A-initial A)를 대입하여 생성된 살충물질 함량을 산출하였고 대표적 HPLC 결과 및 최적화 단계별 TLC 결과 와 대조하여, 데이터를 신뢰도를 검증함.

## ③ 결과

### ㉠ 통기량

- 실험실 규모 발효조 (5L)에서 산소 공급량에 따른 생육속도 및 7% 전구물질에 대한 살충물질 생산량을 평가하였음(그림 30-33).
- 호기조건으로는 통기량 0.3vvm으로 결정하여 반영하였고, 반 혐기조건으로는 통기량의 최소치인 0.03vvm으로 결정하였음.
- 용존산소 농도를 보면, 0.3vvm을 공급한 호기조건에서는 산소량의 변동이 없음을 확인할 수 있으나, 0.03vvm의 반혐기 조건에서는 48시간에 용존산소가 2.0mg/L까지 저감됨이 확인됨(그림 30).
- 통상 유산균주는 산소에 크게 영향을 받지 않는 균주로 나타나나, 본 균주의 경우, 시간의 경과에 따라 산소를 소모하는 결과를 보임.
- 이는 배양의 경과에 따른 염의 생산에 따른 영향이 용존산소 저감에 일정 영향을 미쳤을 수도 있으나, 완전 혐기 조건에서는 생육속도 및 대사물질의 함량이 70%이상 감소된다는 선행 보고가 있음.
- 따라서, 완전 혐기조건보다는 미량 산소를 공급하는 반 혐기조건에서 배양하는 것이 바람직할 것으로 판단할 수 있음.
- 생육속도에서 알 수 있듯 반 혐기조건이 전반적으로 높은 생육속도 및 밀도를 보이며,

최종 1.898으로 호기조건 1.761대비 7.2%의 높은 생육밀도를 보여 반혐기 조건이 생육속도 향상에 유리한 조건으로 판단됨(그림 30-31).



\* 호기조건 : 0.3vvm, 반혐기 조건 : 0.03vvm 통기량

그림 30. 통기량 조절에 의한 균체의 생육 속도

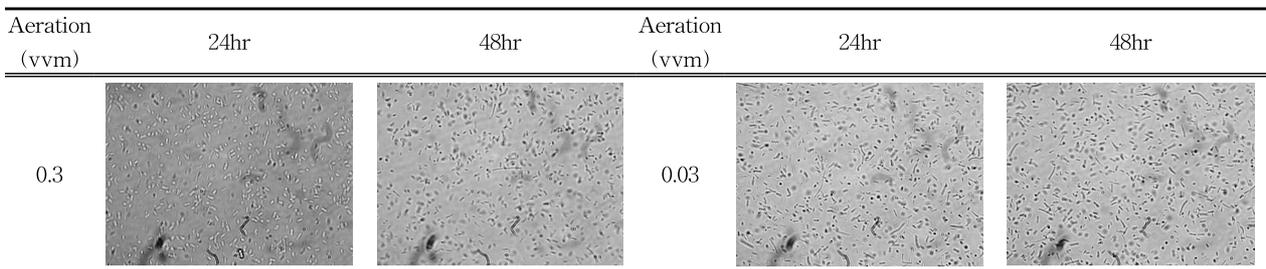
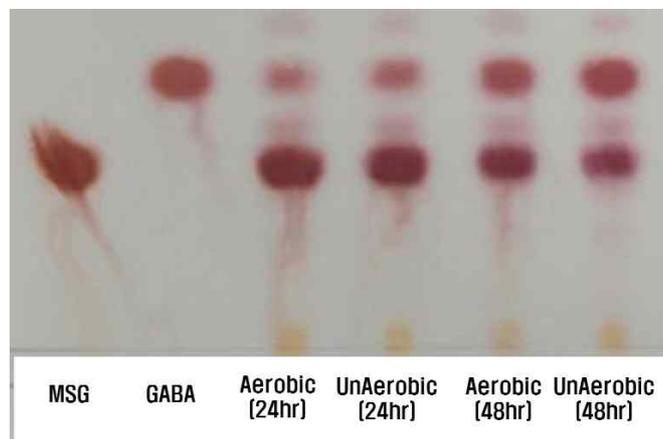


그림 31. 통기량 조절에 의한 균체의 생육 밀도

- 살충물질 생산력이 있어서, 24시간 내 호기조건은 17.96mM을 생산한 반면, 반 혐기조건은 32.13mM을 생산하였고, 반 혐기조건 48시간의 생산력은 170.91mM로 호기 조건 대비 40.1% 높은 생산력을 보임(그림 32-33).
- 반면 혐기조건 48시간 내 7% MSG에 대한 살충물질의 전환은 63.3%로 7% 미만의 전환능력을 나타냄(그림 33).



\* 균체의 상등액 10배 희석액을 0.1mL 로딩하였고, MSG 및 살충물질 표준품은 7% 농도의 10배 희석액 임.

그림 32. 통기량 조절에 의한 배양물의 살충물질 정성 평가

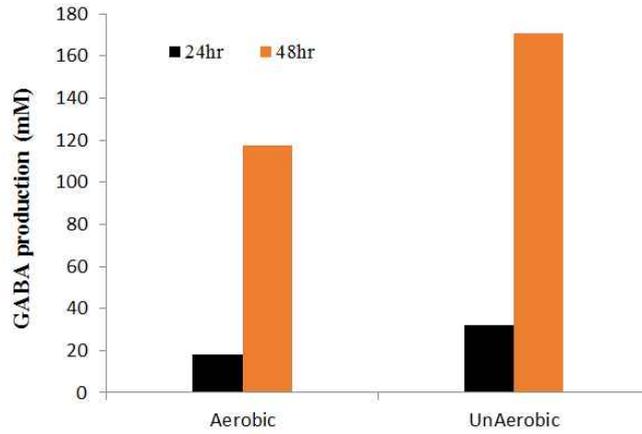
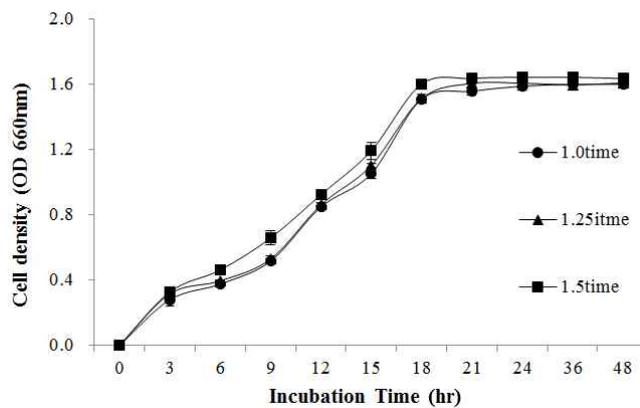


그림 33. 통기량 변화에 의한 배양물의 살충물질 생산능력 평가

㉔ 배지 사용량

- 최적화된 배지의 사용량에 따른 균주의 성장과 살충물질 생산성에 미치는 영향을 조사하였음.
- 배지 투여량에 따른 균체의 성장 분석 결과 18시간 내 1.507-1.600로 정체기에 도달하였고, 최종 1.598-1.634의 균체 밀도를 보임(그림 34-35).
- 배지 투여량의 상승에 따라 대수증식기의 속도 차가 일정부분 관찰이 되었으나, 배양 종료 후 균체 밀도는 일정한 수준을 보여, 균체의 생육밀도의 임계점에 도달한 것으로 보임.
- 따라서 추가적인 배지 첨가는 일정 배양 시간의 단축 외, 큰 영향은 없었음.



\* 호기조건 : 0.3vvm, 반헤파기 조건 : 0.03vvm 통기량

그림 34. 배지 사용량 변화에 의한 균체의 생육 속도

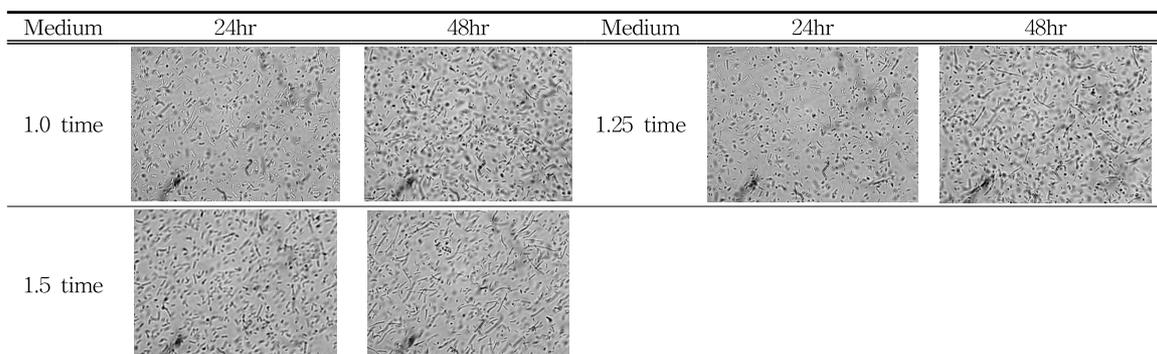
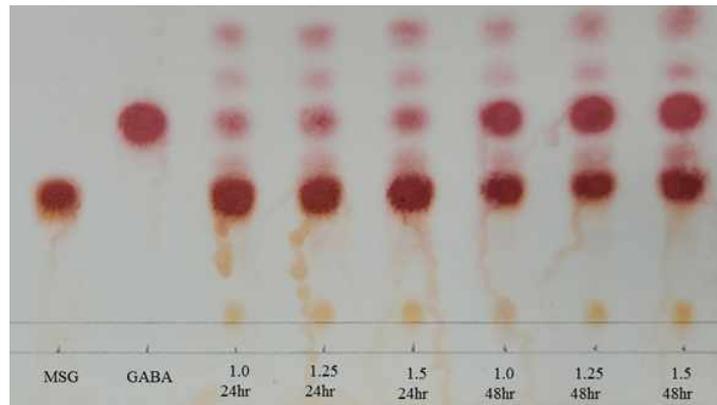


그림 35. 배지 사용량 변화에 의한 균체의 생육 밀도

- 배지 활용량에 따른 살충물질 생산성을 검토한 결과 24시간 내 24.93-25.70, 최종 110.44-115.89mM의 살충물질 생산 분포를 보이며, 배지 활용량에 따른 상승 유의성은 살펴볼 수 없음(그림 36-37).
- 배지 추가 활용은 대수증식속도의 활성화에 일정부분 기여할 수 있으나, 본 생산 공정은 최소 48시간 이상의 공정으로 설계할 것으로, 최종 공정 산물의 농도로 볼 때, 추가 배지 적용의 영향은 미흡할 것으로 보임(그림 36-37).



\* 균체의 상등액 10배 희석액을 2 $\mu$ L 로딩하였고, MSG 및 살충물질 표준품은 7% 농도의 10배 희석액 임.

그림 36. 배지 활용량에 따른 최종 배양물의 살충물질 정성 평가

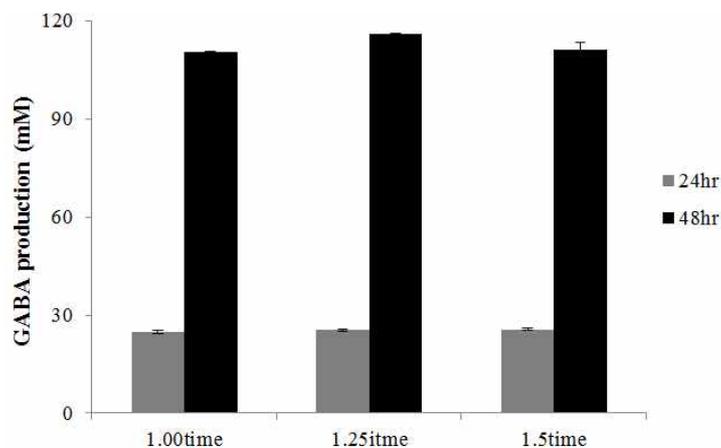
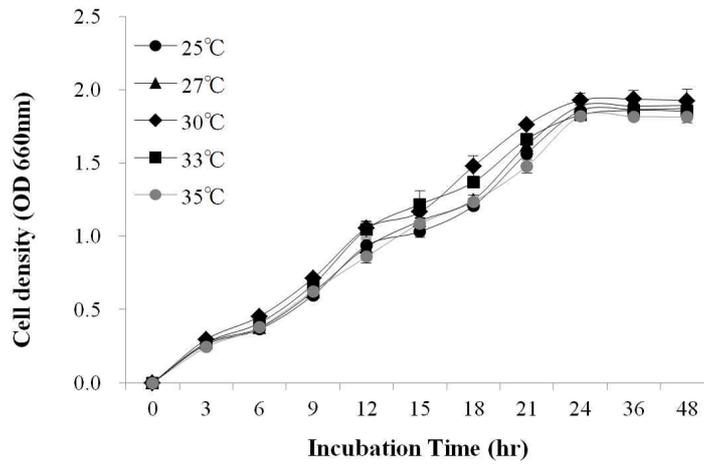


그림 37. 배지 활용량에 따른 최종 배양물의 살충물질 생산능력 평가

㉔ 배양 온도

- 배양온도가 균체 생육 및 살충물질의 주요 성분인 살충물질 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해, MSG 7%가 포함된 배지를 바탕으로 25-35 $^{\circ}$ C 범위로 48시간 까지 배양하였음(그림 38-41).
- 제 1협동이 제시한 균체 생육 및 살충물질 전환 최적 온도는 30 $^{\circ}$ C를 제시한 바 있으나, 배지의 조성 및 통기량 변화 등 다양한 배양 인자가 변화함에 따라, 균체 활성화의 범위가 변화할 수 있음에, 재평가를 진행함.
- 전 실험군들 모두 24시간 내 안정기에 도달하였고, 제 1협동에서 제시한 결과와 동일한 30 $^{\circ}$ C에서 안정적인 성장 및 실험 종료 후 가장 높은 밀도인 1.924를 보임(그림 38-39).



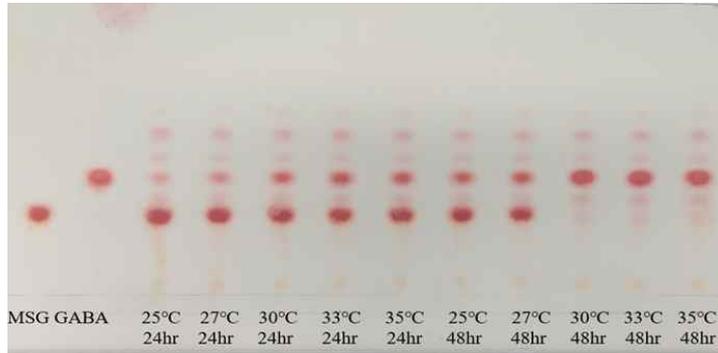
\* 5L jarpermentor 내 0.3vvm 통기량, 48시간 정치배양

그림 38. 배양온도에 의한 균체의 생육 속도

Temp(°C)	24hr	48hr	Medium	24hr	48hr
25			27		
30			33		
35					

그림 39. 배양온도에 의한 균체의 생육 밀도

- 반면 25-27°C 실험군은 48시간에 1.872-1.893, 33-35°C 실험군은 1.815-1.854로 다소 낮은 균체 밀도를 보였고, 특히 35°C 실험군은 가장 낮은 균체밀도를 보임(그림 38-39).
- 선행 문헌 결과 본 살충물질을 생산하는 균체는 25, 30, 35°C 등 다양한 생육온을 보이는 것으로 보이나, 제1협동의 생육 및 살충물질 전환 최적온도가 30°C이며, 본 실험 결과도 이에 동일한 결과임.
- GAD 효소는 넓은 온도에 대한 내성이 있어, 배양온도에 크게 영향을 받지 않음에, 최종 시간 별 균체의 생육밀도 및 속도가 가장 우수한 30°C가 바람직할 것으로 판단하였음.
- 이와 같은 30°C에서 살충물질 생산능력은 24시간 내 104.93mM, 48시간에 359.90mM로 95.5%의 생산량 및 MSG 전환률이 전 시험구 중 가장 높았고, TLC 상에서 MSG는 검출되지 아니하였음(그림 40-41).
- 따라서 균체의 최적 생육 및 살충물질 생성 생육온도를 30°C로 결정하였음.



\* 균체의 상등액 10배 희석액을 0.1mL 로딩하였고, MSG 및 살충물질 표준품은 7% 농도의 10배 희석액 임.

그림 40. 배양온도에 따른 최종 배양물의 살충물질 정성 평가

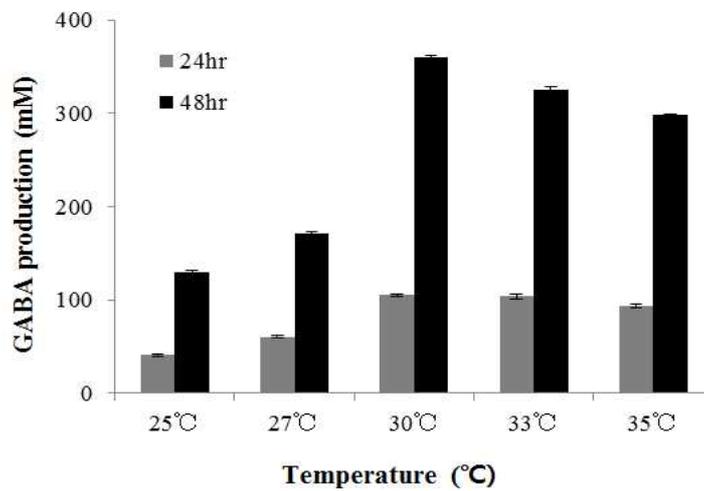
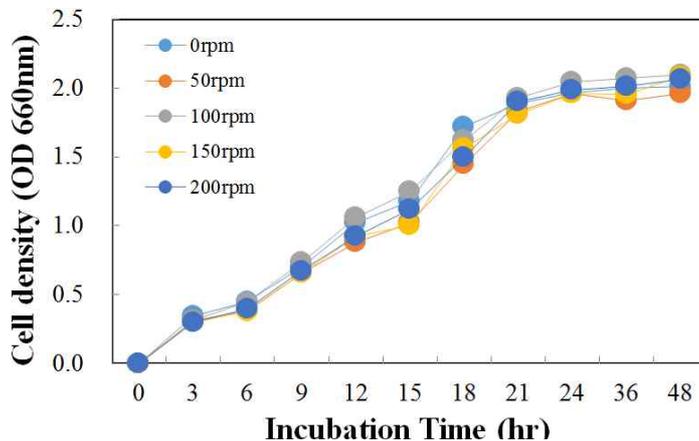


그림 41. 배양온도에 따른 최종 배양물의 살충물질 생산능력 평가

㉠ 교반 속도

- 교반속도에 따른 균체 생육 및 살충물질 생산 능력을 살펴보았음(그림 42-45).
- 24시간 내 1.967-2.045, 48시간에서 2.009-2.096로 50rpm조건에서 다소 높은 경향을 보였으나, 교반속도에 따른 생육밀도에 대한 큰 차이를 관찰 할 수 없었음(그림 42-43).



\* 5L jarfermentor 내 0.3vvm 통기량, 30°C, 48시간 정치배양

그림 42. 교반속도에 의한 균체의 생육 속도

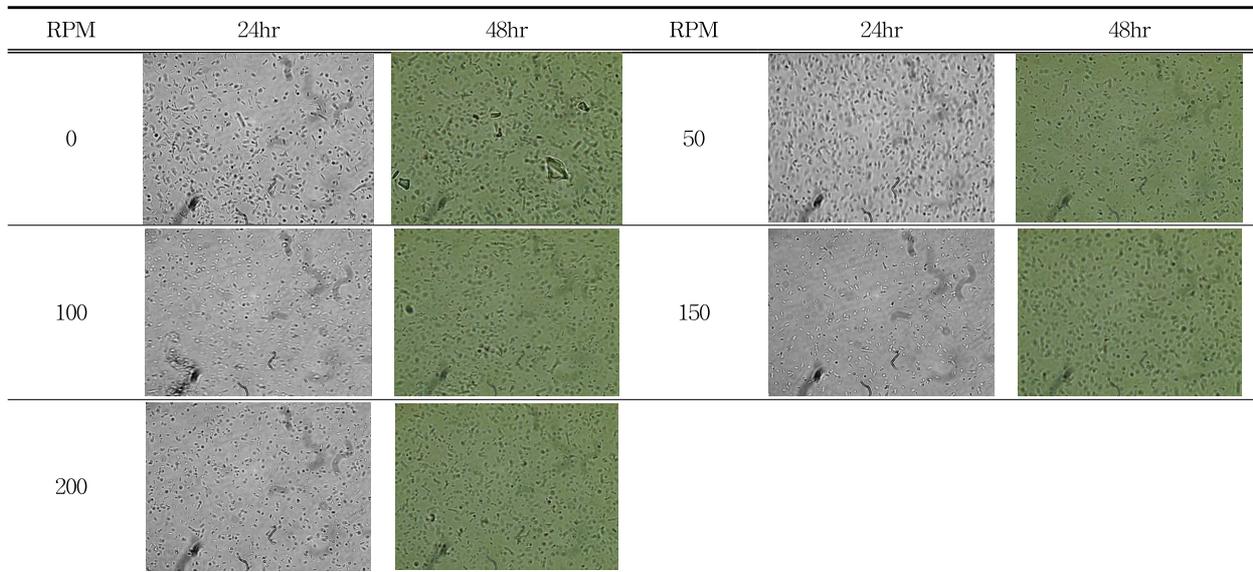
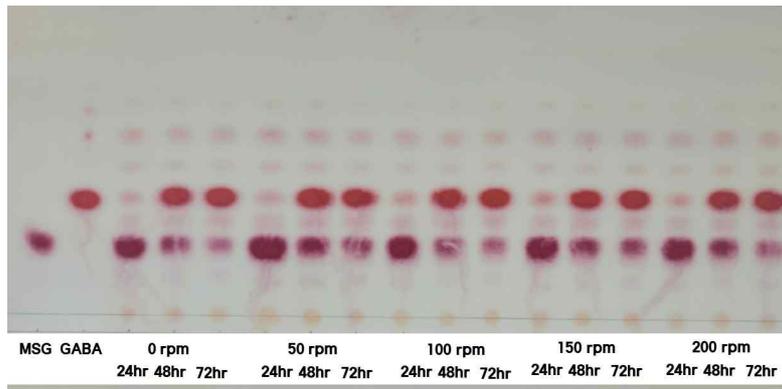


그림 43. 교반속도에 의한 균체의 생육 밀도

○ 반면 150rpm 조건에서 24시간에 63.46mM, 48시간에 266.46mM, 최종 388.02mM의 살충물질 생산량을 보였고, 최종 10% MSG에 대한 72.05%의 전환율로 전 시험구간 가장 높은 생산량을 보임(그림 44-45).



\* 균체의 상등액 10배 희석액을 2 $\mu$ L 로딩하였고, MSG 및 살충물질 표준품은 10% 농도의 10배 희석액 임.

그림 44. 교반속도에 따른 최종 배양물의 살충물질 정성 평가

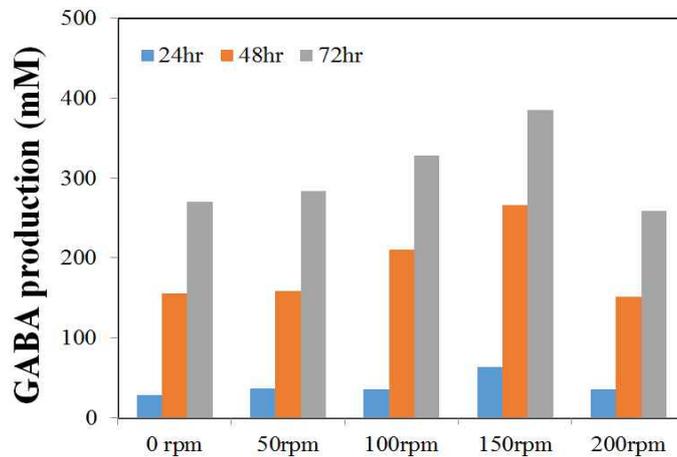
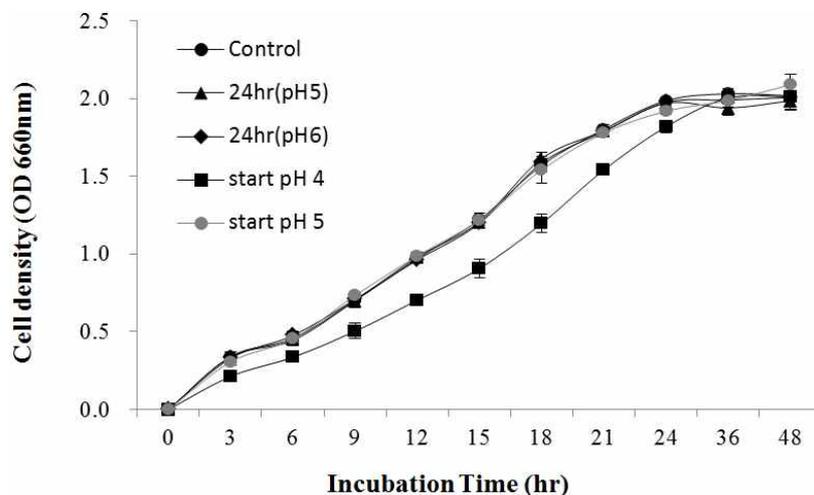


그림 45. 교반속도에 따른 최종 배양물의 살충물질 생산능력 평가

- 교반속도는 1차 적으로 산소전달 및 균체에 대한 기질의 전달력에 대한 주요 변수이나, 과할 경우 효소의 파괴 등의 안전성을 저하하여, 생산량의 저하를 불러올 수 있음.
- 실험결과에서 150RPM 까지의 상승은 살충물질의 생산능력의 지속적인 상승 결과로 이어지나, 초과할 경우, 생산능력이 저하 되는 결과를 보여, 최적 교반속도는 150RPM으로 결정하였음(그림 45).

#### ㉞ pH

- 제 1협동에서 제시한 wikim0118균주는 pH 5-6범위에서 생육 및 살충물질 생성이 가장 우수한 것으로 나타남.
- 반면 살충물질 생성에 있어, pH가 지속적으로 상승하여, GAD 효소의 반응 최적 범위를 벗어나 최종 살충물질 전환에 장애요인으로 작용할 수 있음.
- 따라서, 다양한 pH 조절을 통해 생육 밀도 및 살충물질 생산 능력을 평가하여, 추가적인 살충물질 전환 가능성을 평가하고자 함.
- 이를 위해, control(시발 pH 6), Start pH 4(시발 pH 4), start pH 5(시발 pH 5), 24hr pH 5(24시간 간격 pH 5 조정), 24hr pH 6(24시간 간격 pH 6 조정)의 조건으로 pH를 변경하여 실험을 실시함(그림. 46-49).
- 전 시험구들은 24시간 전후로 안정기에 도달하였고, start pH 4 시험 조건의 경우 타 시험군 대비 낮은 생육속도 및 최종 1.897의 생육밀도로 실험이 종료됨(그림 46-47).
- 반면 start pH 5 샘플의 경우, 시발 pH를 조절하지 않은 타 실험군 대비 성장속도는 더 컸으나, 최종 2.002로 큰 차이를 보이지 아니하였음(그림 46-47).
- 따라서 생육에 있어 pH 6 구간에서 초기 생육이 원활함을 확인할 수 있으며, 이는 제1협동의 pH에 따른 생육 범위인 5-6범위에 상응함.
- 선행 문헌 시 살충물질의 최적 생산 활성은 pH 5구간이나, 제1협동의 살충물질 및 생육의 최적 범위는 5-6으로 제시된 바 있고, pH가 4이하로 저하될 경우 생육이 불량해지는 생육특성이 보고됨(GABA 생산능 우수 유산균주 개발 및 균주를 이용한 GABA생산, 경상대학교, 2016).



\* 5L jarpermentor 내 0.3vvm 통기량, 30°C, 150rpm, 48시간 정치배양

그림 46. pH 조절에 의한 균체의 생육 속도

○ 시발 pH 4의 경우, pH를 보정하지 않은 대조구는 24시간 내 95.86mM, 시작 pH를 5로 보정한 실험조건은 162.29mM을 보인 반면, pH를 4로 보정한 조건이 전 실험 조건 중 가장 낮은 53.14mM의 살충물질 생산성을 보임(그림48-49).

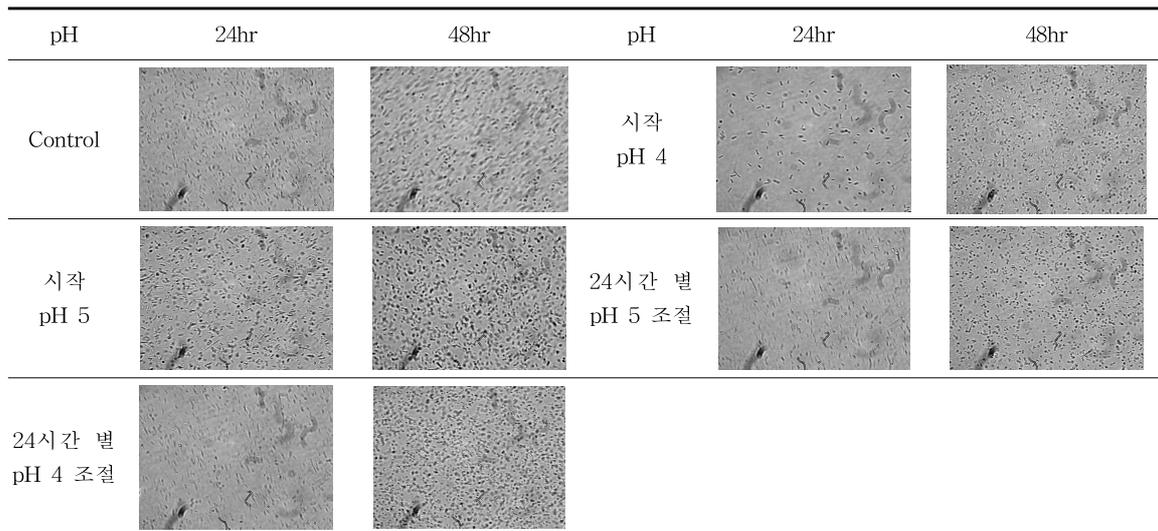
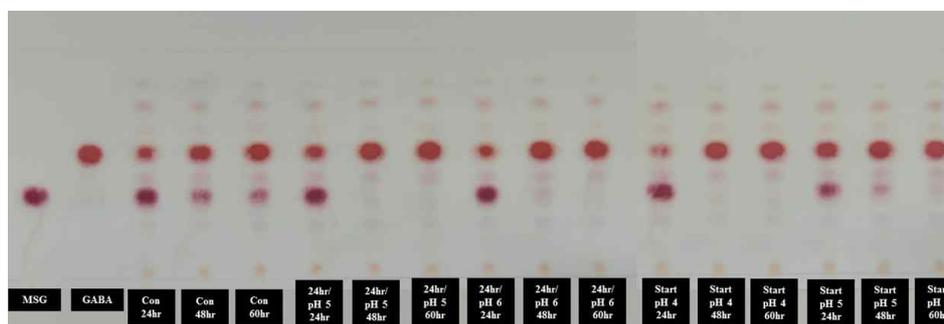


그림 47. pH 조절에 의한 균체의 생육 밀도

- pH를 4로 초기 보정한 균체의 생육 결과는 지연되었고, 이에 GAD 효소 생성 함량의 저하로, 살충물질의 함량의 저하 결과로 이어짐(그림 46-50).
- 시작 pH를 5로 조정할 조건은 24시간 내 162.29mM의 살충물질 생산 및 30.13%의 높은 MSG 전환률을 보이며, 균체의 성장에 큰 장애가 없고, GAD 최적 생산 pH 범위에 수렴한 생육 및 전환조건에 따른 결과로써 판단됨(그림 46-50).
- 24시간 간격 pH 5, 6로 조절할 조건에서, pH 5의 경우, 24-48시간 간격 393.87mM을, pH 6는 349.53mM의 생산량을 보여, 제 1협동에서 제시한 최적 범위 인 pH 5-6 구간으로 보정한 시험구에서 살충물질의 원활한 생산이 관찰되었음(그림 48-50).
- pH를 조절하지 않은 시험구는 최종 379.87mM의 살충물질을 생산한데 반해, 초기 pH 4 조절 조건은 최종 535.24mM로 전 시험구들 중 가장 높은 살충성분 생산량을 나타냄.
- 초기 pH 5 조절 조건은 pH 4 조절구 대비 초기 살충물질의 생산량이 높았으나, 60시간 경과 후 458.5mM로 4조절구 대비 낮은 살충물질 생산량을 보임(그림 48-50).



\* 균체의 상등액 10배 희석액을 2 $\mu$ L 로딩하였고, MSG 및 살충물질 표준품은 10% 농도의 10배 희석액 임.

그림 48. pH 조절에 따른 최종 배양물의 살충물질 정성 평가

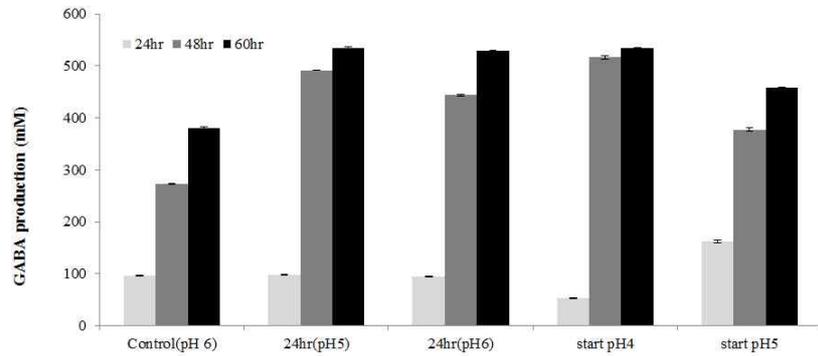
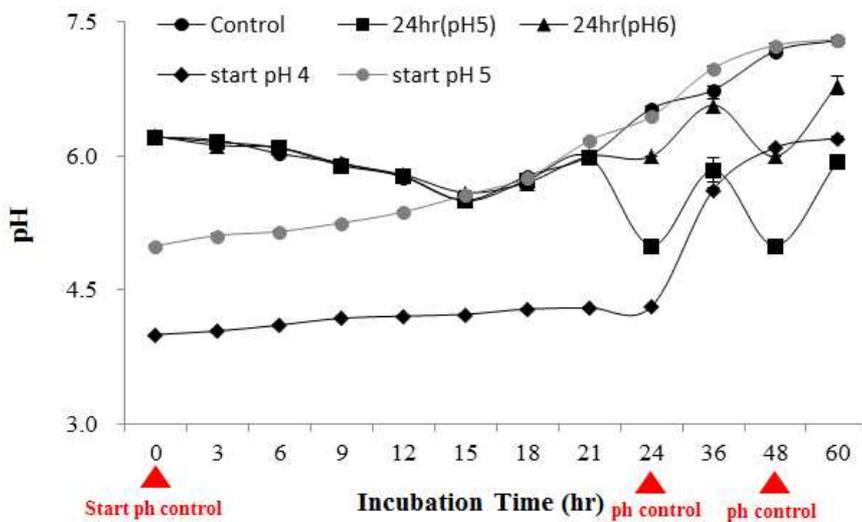


그림 49. 살충물질 조절에 따른 최종 배양물의 살충물질 생산능력 평가

- 살충물질 생성과정 내 pH 변화 추이를 살펴보면, 초기 pH 4 조절구는 최종 6.18로 pH가 종료되는데 반해, 초기 pH 5 조절구는 7.33으로 종료됨을 알 수 있음(그림 50).
- GABA를 고농도로 생산하는 장기 공정의 설계 시 지속적으로 상승하는 pH의 조절이 필수임을 알 수 있는 결과임.
- 최종 균체의 생육 및 GAD의 활성범위에 공통범위로 활용될 수 있는 pH 구간은 5 전후로 판단되고, 이후 생육 밀도가 최고점인 24시간 전후로 pH 4로 조절하는 것이 시간 대비 높은 살충물질의 수율 습득에 유리할 것으로 판단됨(그림 46-50).

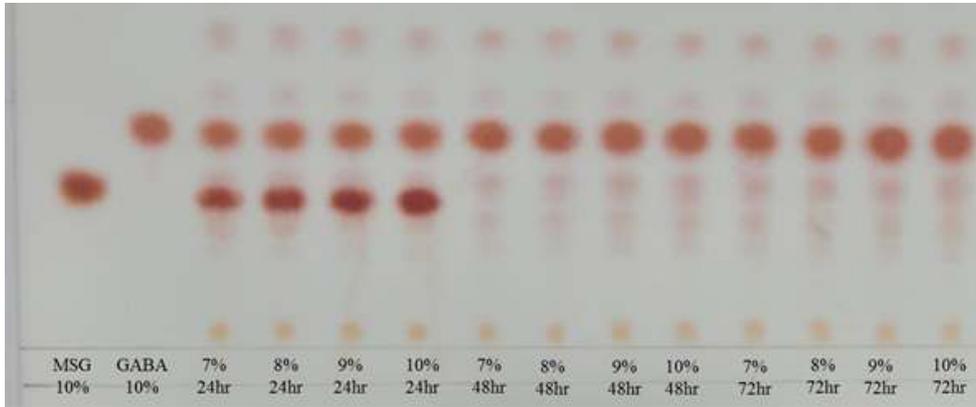


\* control(시발 pH 6), 24hr(pH 5) ; 24시간 간격 pH 5조절, 24hr(pH 6) ; 24시간 간격 pH 6 조절, start pH 4(시발 pH 4 조절), start pH 5(시발 pH 5 조절)

그림 50. 균체의 pH 환경 보정 및 살충물질 생성에 따른 pH 변화

#### ④ 결론

- 본 배지 및 배양 조건을 적용하여, 전구물질 인 MSG 농도별 살충물질 생산 및 MSG 잔류 농도를 평가하여 최종 살충물질의 생산 재현성을 재검증하였음(그림 51).
- 시험구는 살충물질의 전구물질인 MSG를 7-10%가 함유된 개선 배지 아래 24, 48, 72hr 간 샘플을 취하여, 정성 평가하였음(그림 51).
- 실험결과 48시간 내 MSG 10%까지 전량 살충물질로 전환됨을 확인, 10% 이상 GABA 생산 조건을 확립하였고, 살충물질의 함량은 540mmol 근사값을 보임(그림 51, 표 6).



\* 균체의 상등액 10배 희석액을 2 $\mu$ L 로딩하였고, MSG 및 살충물질 표준품은 10% 농도의 10배 희석액 임.

그림 51. 최적 생산 공정에 따른 살충물질 생산 재현성 평가

표 18. 살충물질 최적 생산 조건

Culture profile	
scale	5L
working volume	3L
Incubation time	48hr
Seed	1%
Medium	2%
Temperature	30 $^{\circ}$ C
RPM	150RPM
pH(start)	5
pH(each of 24hr)	5
Airation	0.03vvm

## (2) 균체의 상업용 규모의 생산 조건 확립

### (가) 최적 생산 조건의 Pilot 규모에서의 생산 재현성 평가

#### ① 연구목적

- 실험실 규모에서 최적화된 생산 조건의 상업용 규모에서 적용 가능 여부 검토

#### ② 재료 및 방법

##### ㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : *L. sakei* wikim0118(세계김치연구소)
- 적용 배지 : 표 17 조성의 최적화 배지
- 배양 규모 : 50L-5ton 규모의 상업용 발효조
- 살충물질 정성분석 : TLC plate silicagel 60 F254(Merck)
- 살충물질 정량분석 : Gabase from *pseudomonas fluorescens*(Merck)

㉔ 시험방법

1) 배양 조건

- 기존 배양 조건은 아래와 같으며, 상업화 규모 및 생산 연구 단계별 배양 조건을 추가적으로 보완하여 반영하였음(표 19).

표 19. Pilot scale 배양조건

Culture profile	
scale	60.0%
working volume	100.0%
Incubation time	48hr
Seed	1%
Medium	2%
Temperature	30℃
RPM	150RPM
pH(start)	5
pH5 control time	15hr
Air	0.03vvm
Pressure	0.2
pH control reagent	Sulphuric acid 1N
Sterilization conditions	80℃, 20min
Cooling conditions	10min
Foam reagent	CS-205

2) 균주의 상업적 규모의 배양

- 상위 최적 생산 공정이 상업용 scale에서 재현되는지 확인하고자, 전남 생물산업진흥원, 친환경 농생명 연구센터 시험생산동 내 발효조에 적용하였음(그림 52).
- 지속적으로 증가되는 pH 조절 및 원활한 살충물질 생산성을 유지하기 위해, pH가 증가되는 구간을 기점으로 pH를 조절 하였고, 후속 공정인 멸균 및 냉각 공정을 실시하여, 최종 공정을 종료함.

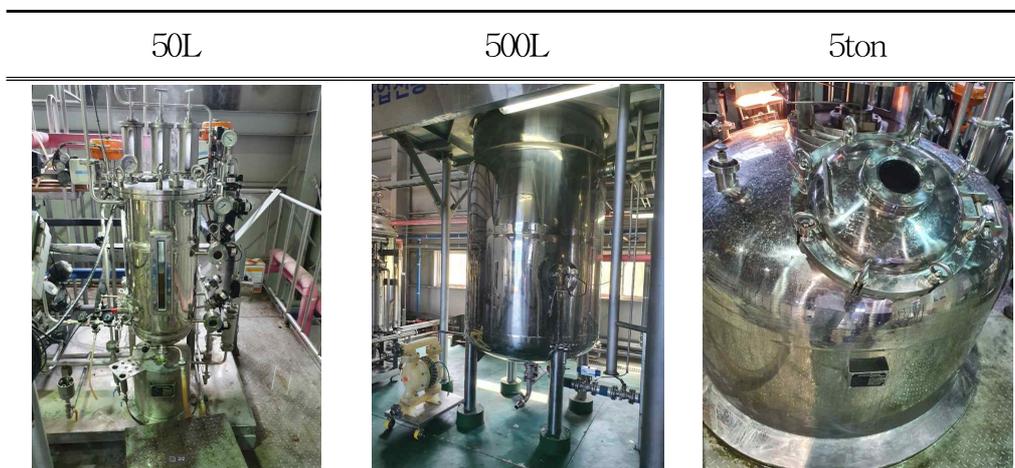


그림 52. 적용 산업화 발효조의 생산 설비 현황

3) 살충물질 생산 정성 분석

- 균주 배양액을 원심 분리하여 상등액을 취한 후, 박층크로마토그래피(Thin layer chromatography; TLC)법으로 수행함.
- 전개용매는 n-butyl alcohol; acetic acid; disitilled water(4:1:1 v/v/v)를 사용하였고, 1시간 전개 후 TLC Plate를 80°C에서 10분간 건조하였고, 이 과정을 1회 더 반복함.

4) 살충물질 생산량 분석

- 균주 배양액을 원심 분리하여 상등액을 취한 후, 1mL에 70mM LaCl<sub>3</sub> 1 mL를 가하여 15분 동안 잘 섞어준 후 4,000 rpm 에서 5분간 원심분리 함.
- 상등액 400 μL를 취하여 0.1 M KOH 160 μL를 미리 넣어둔 centrifuge tube에 넣어 5분간 교반함.
- 4,000 rpm에서 5분간 원심 분리한 상등액 50 μL에 0.5 M K<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 완충용액(pH 8.6) 50 μL, 4 mM NADP 150 μL를 첨가한 후, 2.0 unit/mL GABase 50 μL를 혼합하여 340 nm에서 흡광도를 측정함(initial A).
- 20 mM α-ketoglutarate를 50 μL 넣고 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도를 측정(final A)함.
- 농도별 GABA(Sigma-Aldrich Co.)를 동일한 조건에서 분석한 표준검량곡선에 측정된 흡광도(final A-initial A)를 대입하여 생성된 살충물질 함량을 산출하였고 대표적 HPLC 결과 및 최적화 단계별 TLC 결과 와 대조하여, 데이터를 신뢰도를 검증함.

③ 결과

㉠ 50L 배양 1차

1) 배양 profile

- 본 배양을 통한 배양 profile 기본 조건은 아래와 같고, 용존산소의 경우, 포화도 미만 이 관찰되지 않아, 산소 공급이 과한 조건임을 알 수 있음(표 20, 그림 53).
- 현장 기기의 여건 상 산소의 공급의 경우 최적 조건 대비 과한 조건인 0.3vvm으로 배양을 실시하였고, 최대한 산소의 공급을 억제하기 위해, 내부 압력을 0.2로 조절하여 실험을 착수한 사유로써 판단됨(표 20-21).

표 20. Pilot scale(50L) 배양조건 - 1차

Culture profile	
scale	50L
working volume	30L
Incubation time	48hr
Seed	1%
Medium	16.04%(MSG 10%)
Temperature	30°C
RPM	150RPM
pH control time	19hr
Air	0.3vvm
Pressure	0.2
pH control reagent	Sulphuric acid 1N
Sterilization conditions	80°C, 20min
Cooling conditions	10min
Foam reagent	CS-205

○ 배양 18시 경과 전후로 pH의 상승이 발생하였고, 균체의 밀도 및 GAD 효소의 함량 증가에 의해 살충물질의 전환과정이 본격적으로 시작되었음을 확인할 수 있으며, 실험실 규모와 비교 시 보다 빠른 시점에 pH 상승이 발생되어, 살충물질의 생성시기가 이 큰 시점부터 발생되었음을 확인할 수 있음(표 21, 그림 53).

표 21. 1차 pilot scale(50L)의 배양 profile

Time(hr)	pH	DO(%)	Temp.	Air	Pressure	RPM	OD
1	7.27	100	30	0.3	0.2	150	0.00
2	7.29	100	30	0.3	0.2	150	
3	7.29	100	30	0.3	0.2	150	0.31
4	7.28	100	30	0.3	0.2	150	
5	7.28	100	30	0.3	0.2	150	
6	7.28	100	30	0.3	0.2	150	0.47
7	7.28	100	30	0.3	0.2	150	
8	7.29	89	30	0.3	0.2	150	
9	7.29	82	30	0.3	0.2	150	0.84
10	7.29	81	30	0.3	0.2	150	
11	7.28	85	30	0.3	0.2	150	
12	7.28	82	30	0.3	0.2	150	1.11
13	7.28	82	30	0.3	0.2	150	
14	6.93	83	30	0.3	0.2	150	
15	5.62	82	30	0.3	0.2	150	1.42
16	5.17	82	30	0.3	0.2	150	
17	4.82	82	30	0.3	0.2	150	
18	6.60	81	30	0.3	0.2	150	1.67
19	4.84	82	30	0.3	0.2	150	
20	4.92	85	30	0.3	0.2	150	
21	4.96	82	30	0.3	0.2	150	1.95
22	5.00	82	30	0.3	0.2	150	
23	5.00	82	30	0.3	0.2	150	
24	5.00	100	30	0.3	0.2	150	2.24
25	5.00	100	30	0.3	0.2	150	
26	5.00	100	30	0.3	0.2	150	
27	5.00	100	30	0.3	0.2	150	
28	5.00	100	30	0.3	0.2	150	2.65
29	5.00	100	30	0.3	0.2	150	
30	5.00	100	30	0.3	0.2	150	
31	5.00	100	30	0.3	0.2	150	
32	5.00	100	30	0.3	0.2	150	2.58
33	5.00	100	30	0.3	0.2	150	
34	5.00	100	30	0.3	0.2	150	
35	5.00	100	30	0.3	0.2	150	2.6
36	5.00	100	30	0.3	0.2	150	
37	5.00	100	30	0.3	0.2	150	
38	5.00	100	30	0.3	0.2	150	
39	5.00	100	30	0.3	0.2	150	
40	5.00	100	30	0.3	0.2	150	2.57
41	5.00	100	30	0.3	0.2	150	
42	5.00	100	30	0.3	0.2	150	
43	5.00	100	30	0.3	0.2	150	
44	5.00	100	30	0.3	0.2	150	2.61
45	5.00	100	30	0.3	0.2	150	
46	5.00	100	30	0.3	0.2	150	
47	5.00	100	30	0.3	0.2	150	
48	5.00	100	30	0.3	0.2	150	2.58

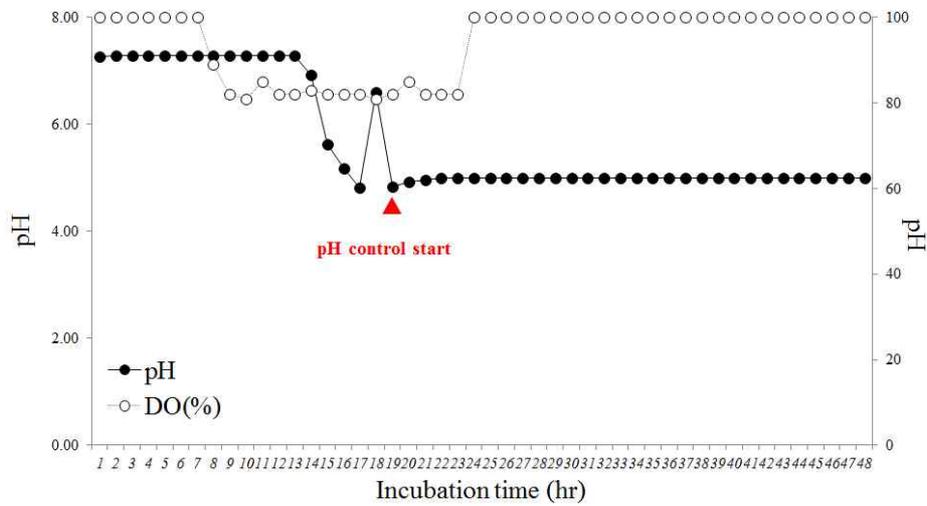


그림 53. 1차 pilot 생산에 대한 주요 profile

2) 생균 밀도(효소공장)

- Lab scale 최적 조건과 대비하여, 균체의 생육밀도의 최고점은 28시간으로 균체의 생육속도가 지연되었음을 확인할 수 있음(그림 54-55).
- 대상 균주의 생육 특성상 7-10시간 전후로 생육 속도가 가파르게 상승하는 특성을 보이는데 반해, 본 생산 조건에서 생육 속도는 지연되어, 대수 증식기가 완만하게 상승하는 결과를 보여, 생육의 지연이 되었을 것으로 판단할 수 있음(그림 54-55).

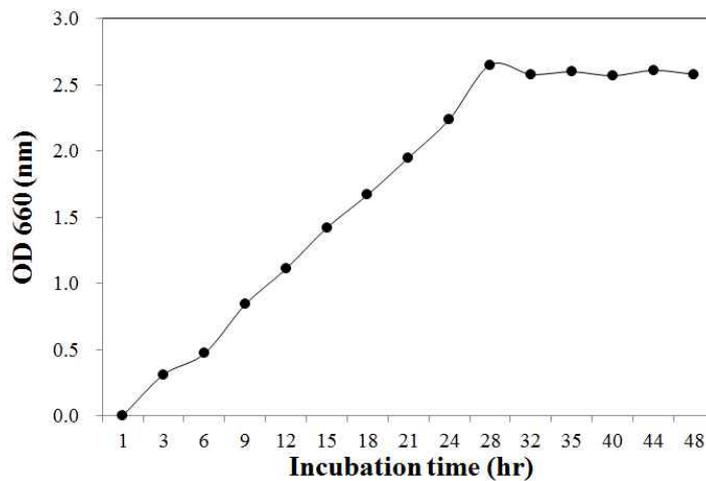
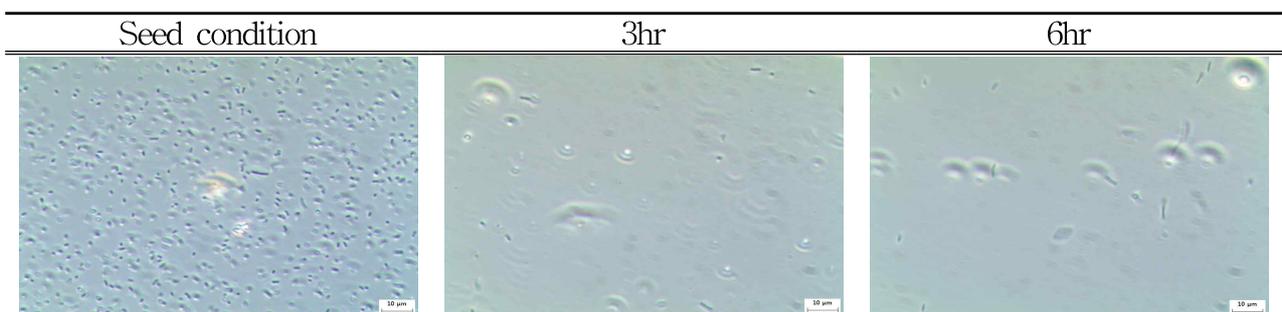


그림 54. 1차 pilot 생산에 대한 생육속도



<그림 계속>

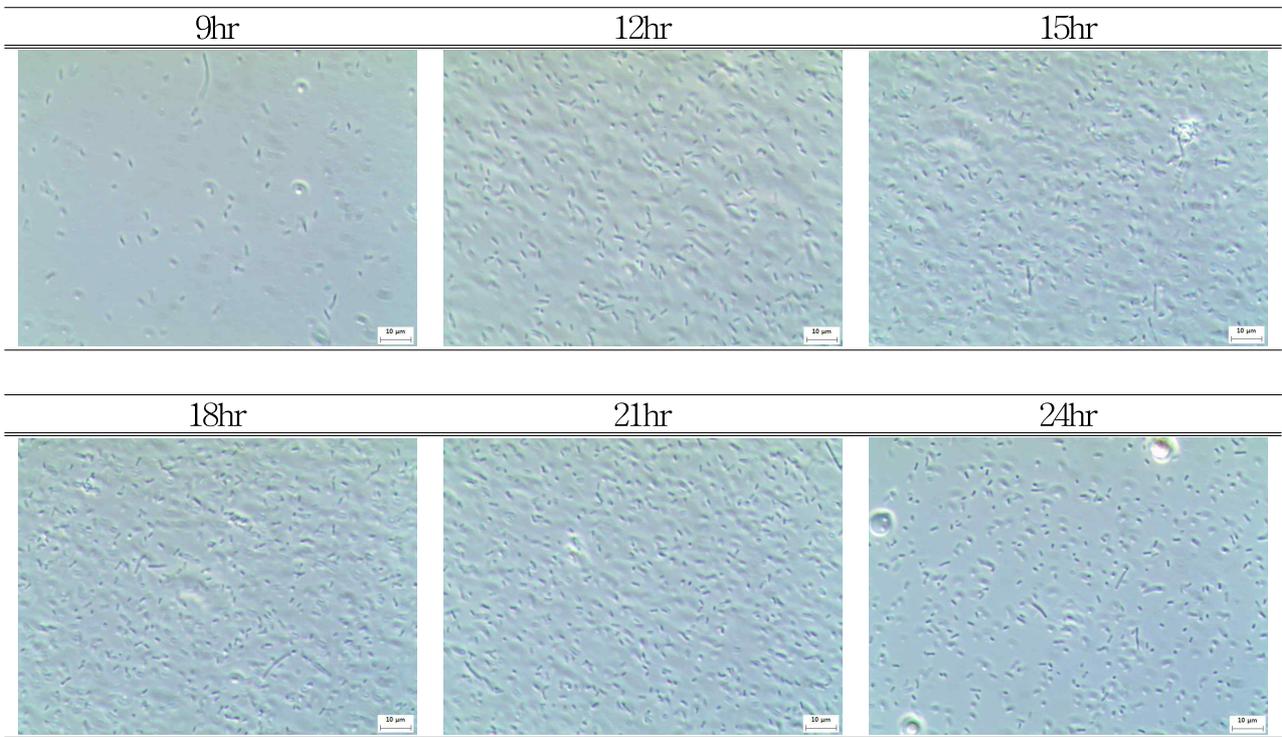
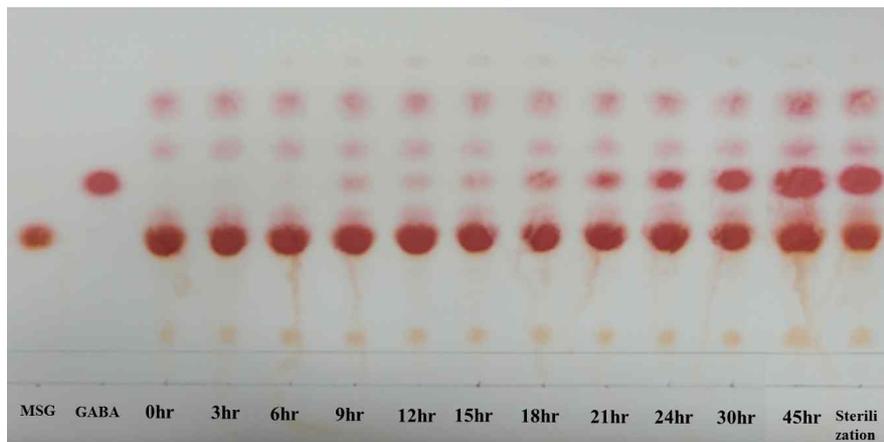


그림 55. 1차 pilot 생산에 대한 생육밀도

3) 단위 시간 별 살충물질 생산성

○ 살충물질의 생산은 배양 후 9시간부터 검출되어, 48시간 이내의 최종 전환율은 64.1%로 345.2mM의 생산에 그쳤으며, lab scale을 기준으로 최적 살충물질 습득률 대비 60% 정도의 생산 재현성을 보임(그림 56-57).



\* 균체의 상등액 10배 희석액을 2μL 로딩하였고, MSG 및 살충물질 표준품은 10% 농도의 10배 희석액 임.

그림 56. 1차 pilot 생산에 대한 시간별 살충물질 정성평가

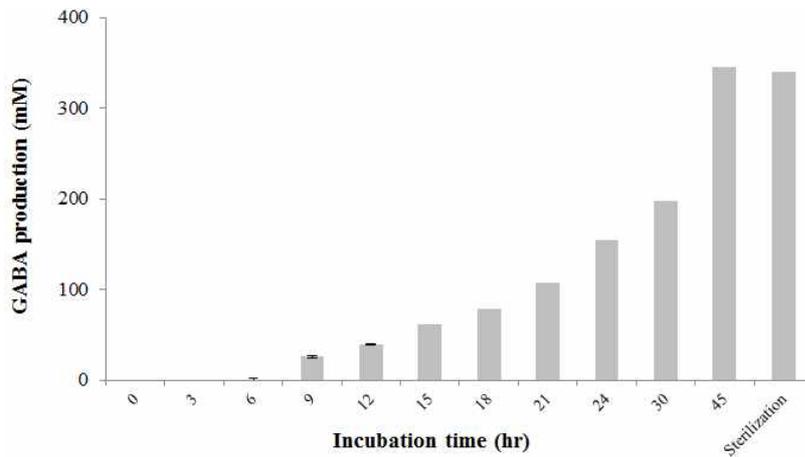


그림 57. 1차 pilot 생산에 대한 시간별 살충물질 정량평가

4) 결론

- 현장 여건 상 산소의 과다 공급조건이 동일 시간 대비 균체의 생육 속도 및 GAD 효소의 생산에 장애요인으로 작용하였을 것으로 판단되며, 이에 따라 산소를 추가 가감하여 공급할 수 있는 공정을 추가로 도입하여 생산 재현성 평가가 추가로 필요함.

㉞ 50L 배양 2차

1) 배양 profile

- 1차 생산에서 폭기량의 과다 산정에 의한 생육속도의 불량에 따라 48hr 이내의 생산력이 저하되었을 것으로 판단됨.
- 현장에서 산소를 추가적으로 저감할 수 있는 ball valve 및 내부 압력 고정을 통해 폭기량을 90% 저감하여 0.03vvm으로 조절하여 2차 실험을 착수함(표 22).

표 22. Pilot scale(50L) 배양조건 - 2차

Culture profile	
scale	50L
working volume	30L
Incubation time	48hr
Seed	1%
Medium	16.04%(MSG 10%)
Temperature	30℃
RPM	150RPM
pH control time	15hr
Air	0.03vvm
Pressure	0.2
pH control reagent	Sulphuric acid 1N
Sterilization conditions	80℃, 20min
Cooling conditions	10min
Foam reagent	CS-205

- 1차 생산 시와 달리 pH 저감 속도가 빨라져 생육활동에서 동반되는 유기산의 생산이 앞 당겨졌음을 확인할 수 있으며, 이에 따라 1차 배양 시 pH가 상승되는 시점은 배양 18시 전후로 예상되었음(표 23, 그림 58).
- 본 배양시에는 pH 상승 시점이 배양 15시 전후로 1차 시험 대비 단축되었고, 단위시간별 살충물질의 생산성이 향상되었음을 판단됨(표 23, 그림 58).

표 23. 2차 pilot scale(50L)의 배양 profile

Time(hr)	pH	Temp.	Air	Pressure	RPM	OD
1	7.45	30	0.3	0.2	150	0.00
2	7.37	30	0.3	0.2	150	
3	7.25	30	0.3	0.2	150	0.42
4	7.32	30	0.3	0.2	150	
5	7.25	30	0.3	0.2	150	
6	7.29	30	0.3	0.2	150	0.64
7	7.26	30	0.3	0.2	150	
8	7.25	30	0.3	0.2	150	
9	7.25	30	0.3	0.2	150	0.78
10	6.95	30	0.3	0.2	150	
11	6.00	30	0.3	0.2	150	
12	5.21	30	0.3	0.2	150	1.32
13	4.88	30	0.3	0.2	150	
14	4.64	30	0.3	0.2	150	
15	5.21	30	0.3	0.2	150	1.97
16	5.00	30	0.3	0.2	150	
17	5.00	30	0.3	0.2	150	
18	5.00	30	0.3	0.2	150	2.05
19	5.00	30	0.3	0.2	150	
20	5.00	30	0.3	0.2	150	
21	5.00	30	0.3	0.2	150	2.06
22	5.00	30	0.3	0.2	150	
23	5.00	30	0.3	0.2	150	
24	5.00	30	0.3	0.2	150	2.11
25	5.00	30	0.3	0.2	150	
26	5.00	30	0.3	0.2	150	
27	5.00	30	0.3	0.2	150	
28	5.00	30	0.3	0.2	150	2.04
29	5.00	30	0.3	0.2	150	
30	5.00	30	0.3	0.2	150	
31	5.00	30	0.3	0.2	150	
32	5.00	30	0.3	0.2	150	2.09
33	5.00	30	0.3	0.2	150	
34	5.00	30	0.3	0.2	150	
35	5.00	30	0.3	0.2	150	2.04
36	5.00	30	0.3	0.2	150	
37	5.00	30	0.3	0.2	150	
38	5.00	30	0.3	0.2	150	
39	5.00	30	0.3	0.2	150	
40	5.00	30	0.3	0.2	150	2.04
41	5.00	30	0.3	0.2	150	
42	5.00	30	0.3	0.2	150	
43	5.00	30	0.3	0.2	150	
44	5.00	30	0.3	0.2	150	2.04
45	5.00	30	0.3	0.2	150	
46	5.00	30	0.3	0.2	150	
47	5.00	30	0.3	0.2	150	
48	5.00	30	0.3	0.2	150	2.04

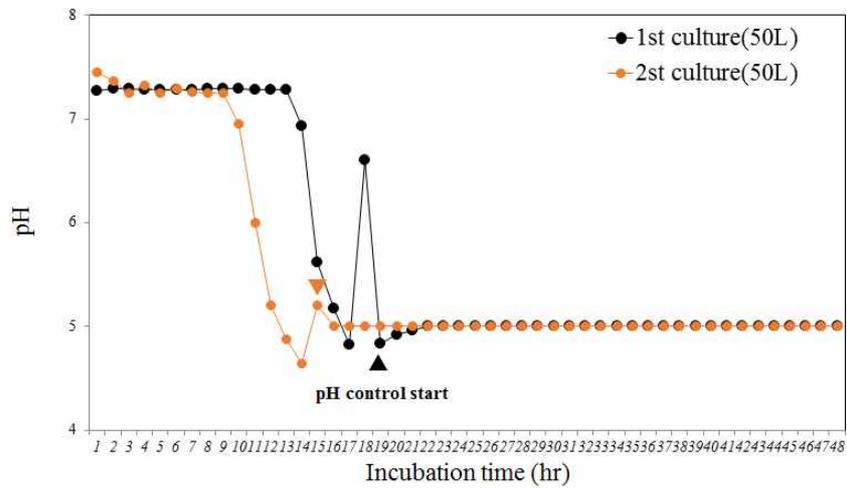


그림 58. 2차 pilot 생산에 대한 pH 변화 추이

2) 생균 밀도(효소공장)

- 선발균주의 증식은 9-15시간 사이에 급격하게 성장하여, 15시 이후로 안정기에 도달하였고, 1차 조건에서 28시간에서 안정기에 도달한 결과와 대조 시 본 배양의 생육이 정상적으로 진행되었음을 확인할 수 있음(그림 59-60).

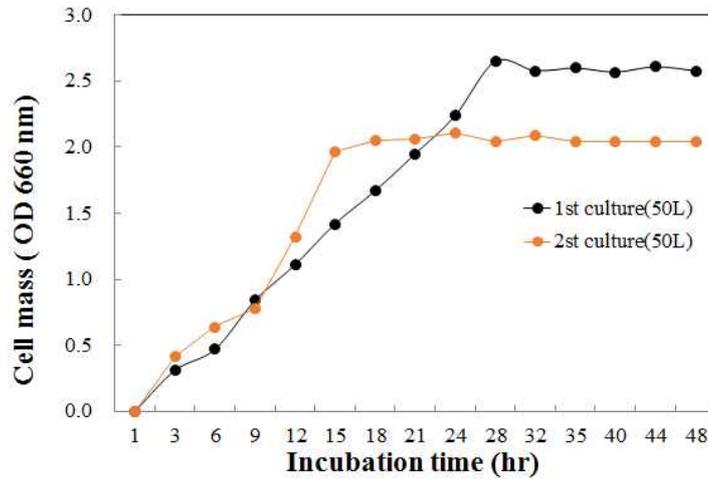
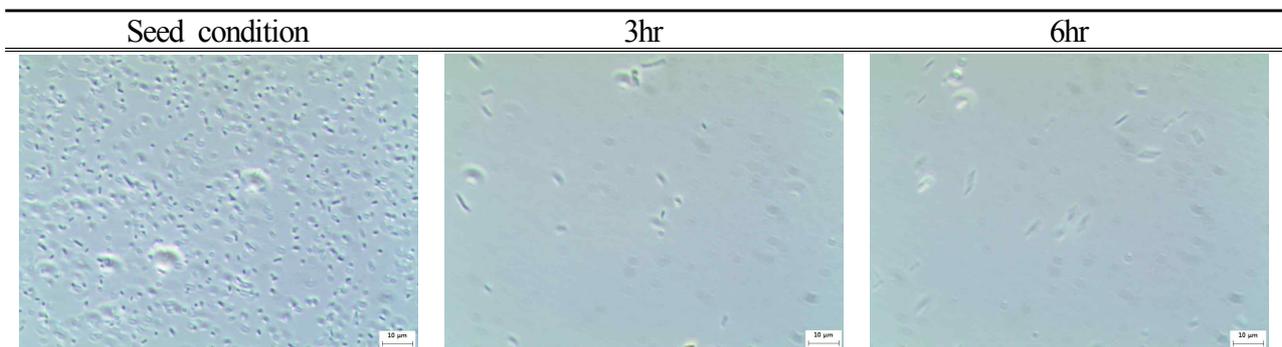


그림 59. 2차 pilot 생산에 대한 생육속도



<그림 계속>

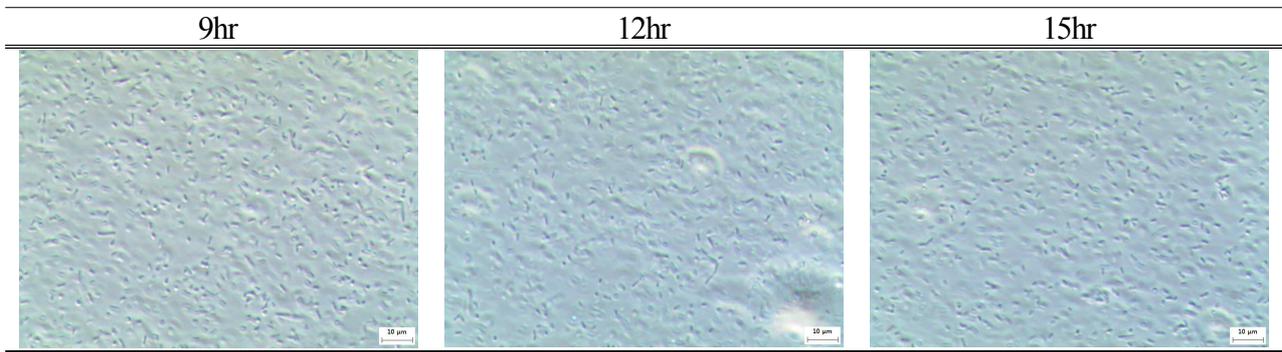
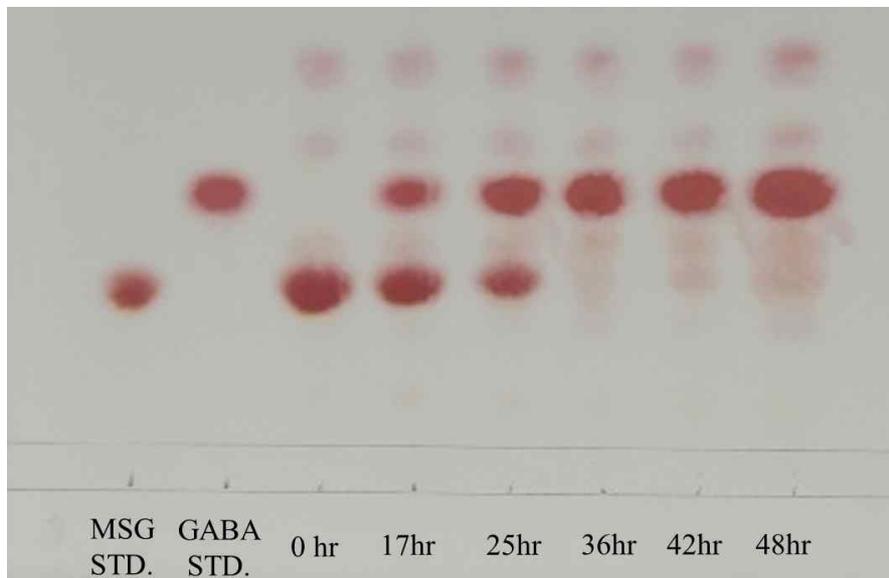


그림 60. 2차 pilot 생산에 대한 생균 밀도

3) 단위 시간 별 살충물질 생산성

○ 본 배양 시 48시간 이내 전구물질을 100% 소진한 것으로 나타났으며, 최종 생산농도는 589mM로 Lab 규모 생산 최적 조건에 대한 재현성 있는 최적 생산 결과를 도출하였음(그림 61-62).



\* 균체의 상등액 10배 희석액을 2μL 로딩하였고, MSG 및 살충물질 표준품은 10% 농도의 10배 희석액 임.

그림 61. 2차 pilot 생산에 대한 시간별 살충물질 정성평가

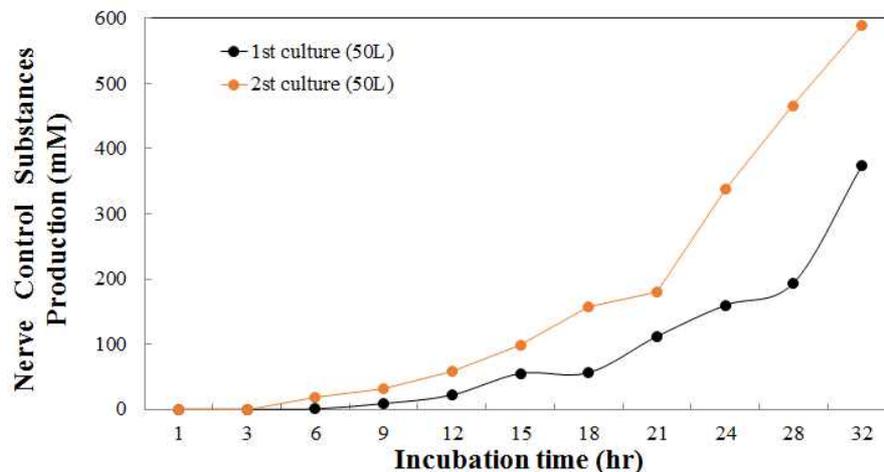


그림 62. 1차 pilot 생산에 대한 시간별 살충물질 정량평가

4) 결론

- 본 배양 시 완화된 통기량의 적용으로 균체의 생육속도가 lab 규모 생산과 유사한 수준으로 회복되었고, 단위시간 당 GAD의 함량 증가로 인해, 48시간 내의 생산시간 내 투입한 전구물질 10%을 전량 소진한 결과를 보임.
- 50L에서 생산 재현성을 확인함에 따라 상업용 생산 규모를 50L에서 500L로 scale up 하여 최적 생산 조건의 생산 재현성을 추가 평가하였음.

㉔ 500L 배양 1차

1) 배양 profile

- 50L 배양 2차 조건을 적용하여 500L 상업 생산 규모에서 생산 재현성을 평가함(표 24).

**표 24. Pilot scale(500L) 배양조건 - 3차**

Culture profile	
scale	500L
working volume	300L
Incubation time	48hr
Seed	1%
Medium	16.04%(MSG 10%)
Temperature	30℃
RPM	150RPM
pH control time	16hr
Air	0.03vvm
Pressure	0.2
pH control reagent	Sulphuric acid 1N
Sterilization conditions	80℃, 20min
Cooling conditions	10min
Foam reagent	CS-205

- 2차 생산 결과와 비교 시 1시간 지연된 16시간부터 pH가 증가하기 시작하였고, 이때 부터 GAD효소의 원활한 활성을 위해 pH를 5로 지속 유지하였음(표 25, 그림 63).

**표 25. 3차 pilot scale(500L)의 배양 profile**

Time(hr)	pH	Temp.	Air	Pressure	RPM	OD
1	7.38	30	0.3	0.2	150	0
2	7.24	30	0.3	0.2	150	
3	7.26	30	0.3	0.2	150	0.38
4	7.19	30	0.3	0.2	150	
5	7.18	30	0.3	0.2	150	
6	7.17	30	0.3	0.2	150	0.54
7	6.99	30	0.3	0.2	150	
8	6.94	30	0.3	0.2	150	

<표 계속>

Time(hr)	pH	Temp.	Air	Pressure	RPM	OD
9	6.52	30	0.3	0.2	150	0.65
10	6.21	30	0.3	0.2	150	
11	6.05	30	0.3	0.2	150	
12	5.45	30	0.3	0.2	150	1.11
13	5.01	30	0.3	0.2	150	
14	4.84	30	0.3	0.2	150	
15	4.76	30	0.3	0.2	150	1.84
16	5.51	30	0.3	0.2	150	
17	5.00	30	0.3	0.2	150	
18	5.00	30	0.3	0.2	150	2.21
19	5.00	30	0.3	0.2	150	
20	5.00	30	0.3	0.2	150	
21	5.00	30	0.3	0.2	150	2.19
22	5.00	30	0.3	0.2	150	
23	5.00	30	0.3	0.2	150	
24	5.00	30	0.3	0.2	150	2.24
25	5.00	30	0.3	0.2	150	
26	5.00	30	0.3	0.2	150	
27	5.00	30	0.3	0.2	150	
28	5.00	30	0.3	0.2 </tr		

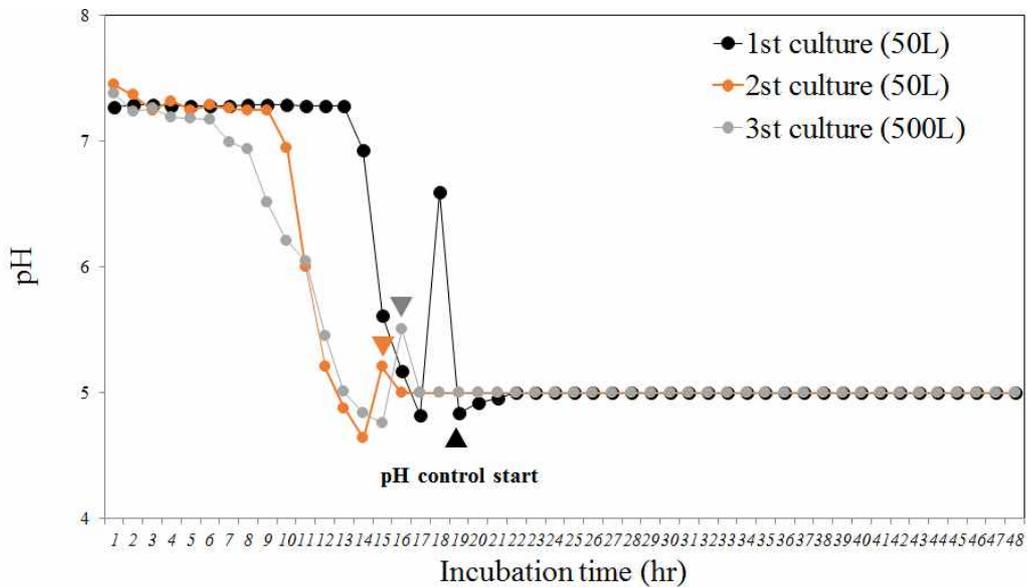


그림 63. 3차 pilot 생산에 대한 pH 변화 추이

2) 생균 밀도(효소 공장)

○ 2차 생산과 유사한 수준으로 선발균주의 밀도는 12-18시간 사이에 급격하게 증가, 18시간 이후로 안정기에 도달, 단위시간 별 GAD 효소의 생산력이 뒷받침 되어 원활한 살충물질 생산이 48시간 내 이루어질 것으로 판단됨(그림 64-65).

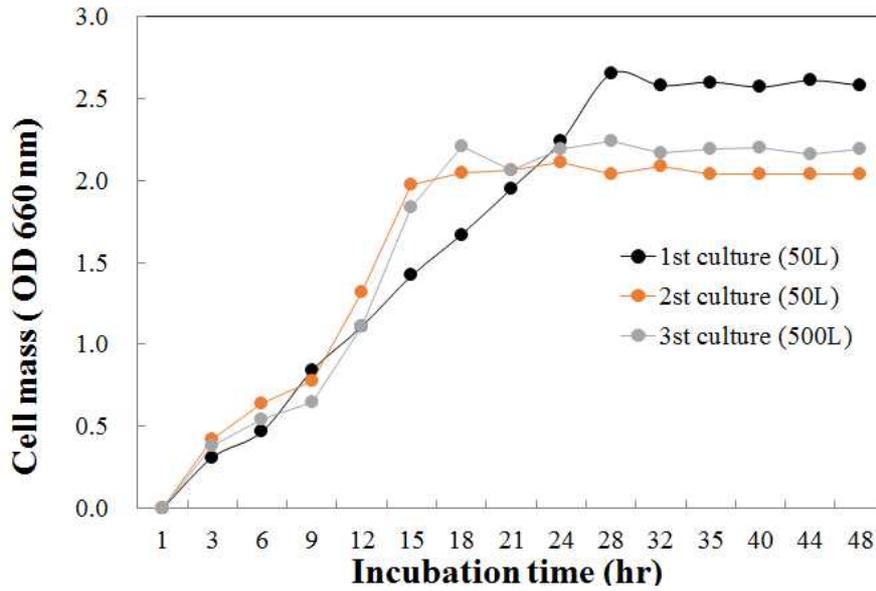


그림 64. 3차 pilot 생산에 대한 생육속도

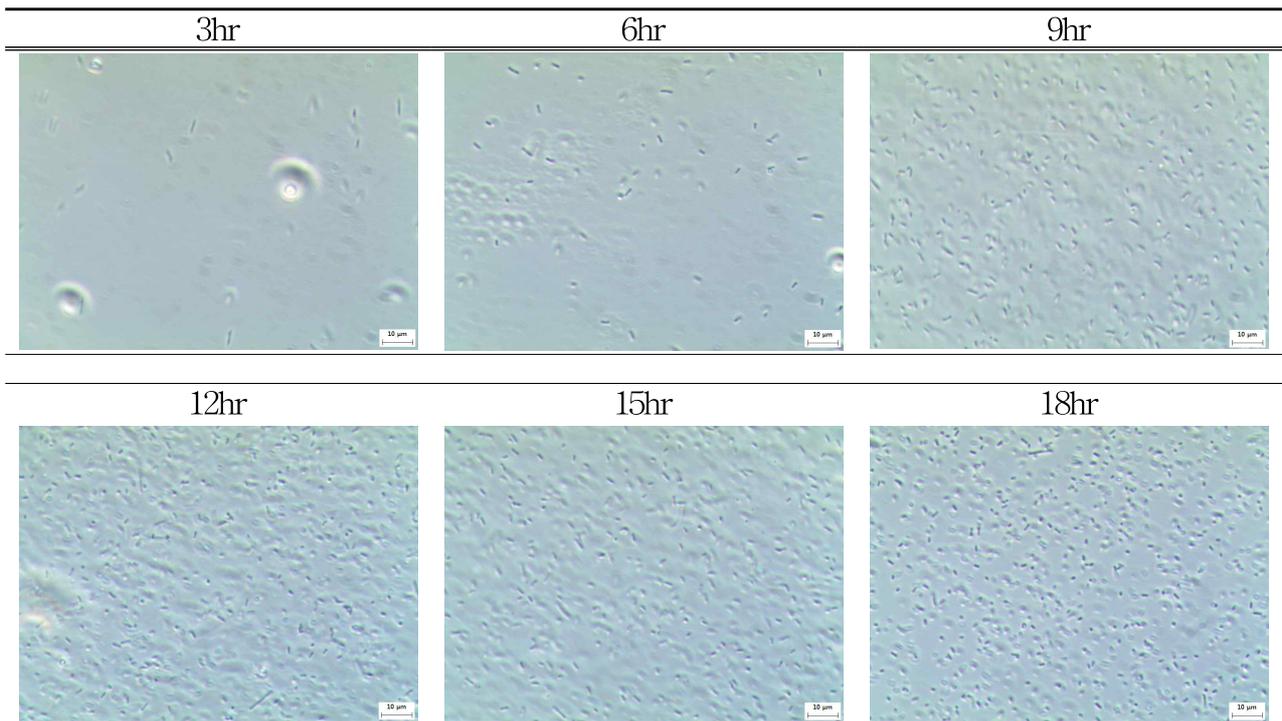
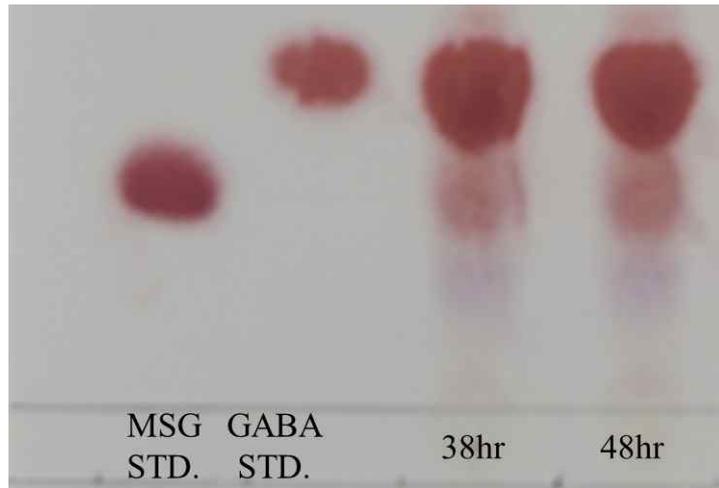


그림 65. 3차 pilot 생산에 대한 생균 밀도

3) 단위 시간 별 살충물질 생산성

- 정성 평가 시 전구물질의 함량이 실험 종료 시간 까지 미약하게 검출되어 첨가한 전구물질 10%에 대한 전환능력이 100%에 미치지 못함을 확인할 수 있음(그림 66-67).



\* 균체의 상등액 10배 희석액을 2 $\mu$ L 로딩하였고, MSG 및 살충물질 표준품은 10% 농도의 10배 희석액 임.

그림 66. 3차 pilot 생산에 대한 시간별 살충물질 정성평가

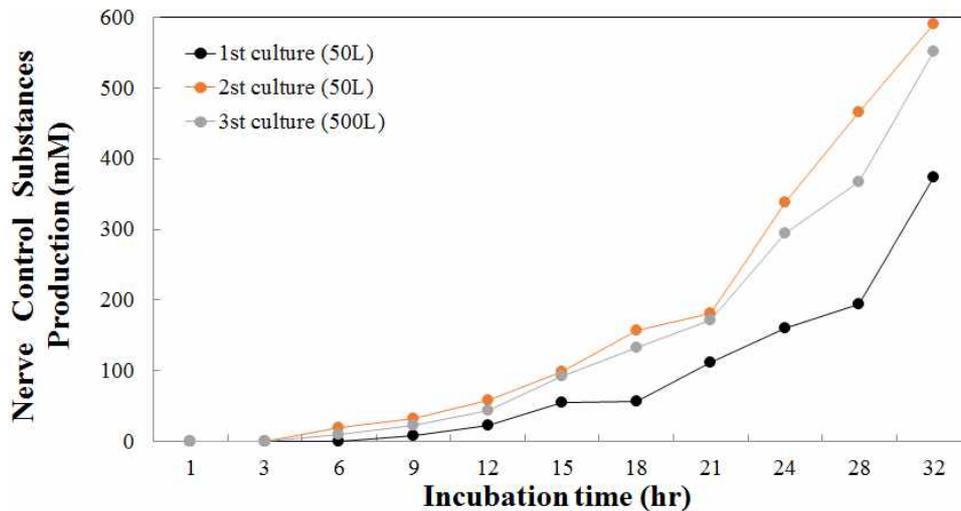


그림 67. 3차 pilot 생산에 대한 시간별 살충물질 정량평가

- 최적 2차 배양과 비교하여 최종 살충물질 습득량은 551.5mM로 6.5% 저감된 결과를 보였음(그림 67).

4) 결론

- 생산 종료 기준 살충물질 전구물질이 100% 전환되지 않았음을 확인할 수 있으나, 살충물질의 함량이 2차 배양조건 대비 93.5%의 생산성을 보였고, 단위시간 별 습득량에서도 큰 차이를 보이지 않아, 비교적 우수한 재현성을 나타내었다고 판단, 이를 기준으로 5ton 배양 조건으로 scale-up 하여 생산 재현성을 확인하고자 하였음(그림 67).

㉔ 5ton 배양 1차

1) 배양 profile

○ 500L 배양 3차 조건을 적용하여 5ton 상업 생산 규모에서 생산 재현성을 평가함(표 26).

표 26. Pilot scale(5ton) 배양조건 - 4차

Culture profile	
scale	5ton
working volume	3ton
Incubation time	48hr
Seed	1%
Medium	16.04%(MSG 10%)
Temperature	30°C
RPM	150RPM
pH control time	33hr
Air	0.03vvm
Pressure	0.2
pH control reagent	Sulphuric acid 1N
Sterilization conditions	80°C, 20min
Cooling conditions	10min
Foam reagent	CS-205

○ 5ton 생산 시 pH의 변화를 살펴보면 31시간 이후 pH의 증가가 확인되었고, 증가 수준도 가장 미흡하여 생육 및 살충물질의 전환 능력이 미비하였을 것으로 판단할 수 있음.(표 27, 그림 68).

표 27. 4차 pilot scale(5ton)의 배양 profile

Time(hr)	pH	Temp.	Air	Pressure	RPM	OD
1	7.52	30	0.3	0.2	150	0.00
2	7.51	30	0.3	0.2	150	
3	7.48	30	0.3	0.2	150	0.17
4	7.35	30	0.3	0.2	150	
5	7.30	30	0.3	0.2	150	
6	7.27	30	0.3	0.2	150	0.34
7	7.15	30	0.3	0.2	150	
8	7.11	30	0.3	0.2	150	
9	7.05	30	0.3	0.2	150	0.55
10	6.99	30	0.3	0.2	150	
11	6.87	30	0.3	0.2	150	
12	6.54	30	0.3	0.2	150	0.64
13	6.32	30	0.3	0.2	150	
14	6.11	30	0.3	0.2	150	
15	5.89	30	0.3	0.2	150	0.78
16	5.77	30	0.3	0.2	150	
17	5.65	30	0.3	0.2	150	
18	5.59	30	0.3	0.2	150	0.81
19	5.54	30	0.3	0.2	150	
20	5.49	30	0.3	0.2	150	

<표 계속>

Time(hr)	pH	Temp.	Air	Pressure	RPM	OD
21	5.32	30	0.3	0.2	150	0.85
22	5.25	30	0.3	0.2	150	
23	5.11	30	0.3	0.2	150	
24	5.05	30	0.3	0.2	150	0.94
25	4.95	30	0.3	0.2	150	
26	4.94	30	0.3	0.2	150	
27	4.88	30	0.3	0.2	150	
28	4.81	30	0.3	0.2	150	1.11
29	4.77	30	0.3	0.2	150	
30	4.65	30	0.3	0.2	150	
31	4.86	30	0.3	0.2	150	
32	4.99	30	0.3	0.2	150	1.23
33	5.23	30	0.3	0.2	150	
34	5.00	30	0.3	0.2	150	
35	5.00	30	0.3	0.2	150	1.34
36	5.00	30	0.3	0.2	150	
37	5.00	30	0.3	0.2	150	
38	5.00	30	0.3	0.2	150	
39	5.00	30	0.3	0.2	150	
40	5.00	30	0.3	0.2	150	1.45
41	5.00	30	0.3	0.2	150	
42	5.00	30	0.3	0.2	150	
43	5.00	30	0.3	0.2	150	
44	5.00	30	0.3	0.2	150	1.67
45	5.00	30	0.3	0.2	150	
46	5.00	30	0.3	0.2	150	
47	5.00	30	0.3	0.2	150	
48	5.00	30	0.3	0.2	150	1.72

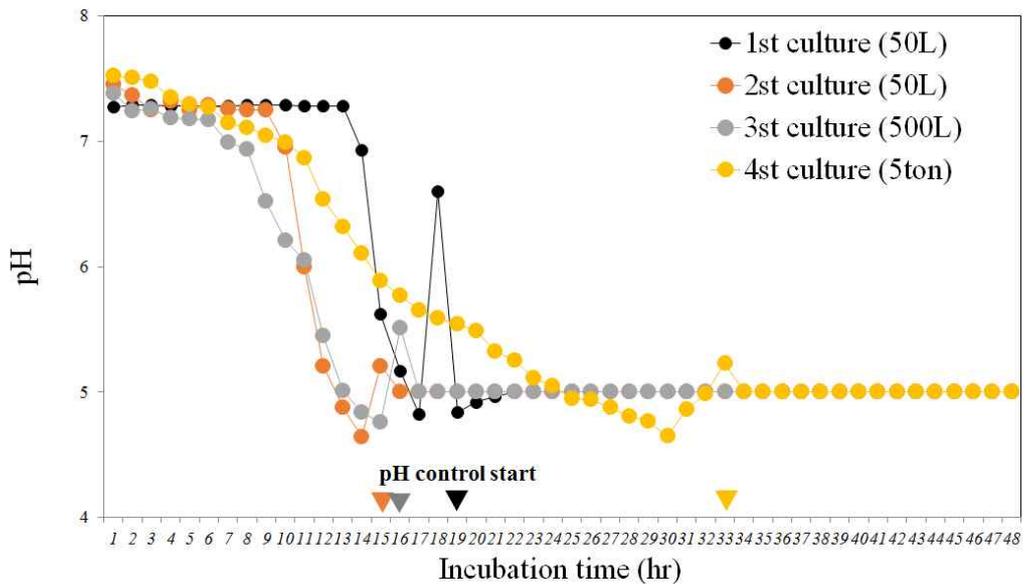


그림 68. 4차 pilot 생산에 대한 pH 변화 추이

2) 생균 밀도(효소공장)

- 48시간 이내 균체의 생육은 지속적으로 증가하는 추세를 보이거나, 안정기의 도달은 확인되지 않았고, 선행 생산 시험 대비 성장속도가 지연되는 경향을 보임(그림 69-70).
- 이에 본 5톤 공정에서, 균체의 생육에 스트레스가 있었음을 확인할 수 있음(그림 69-70).

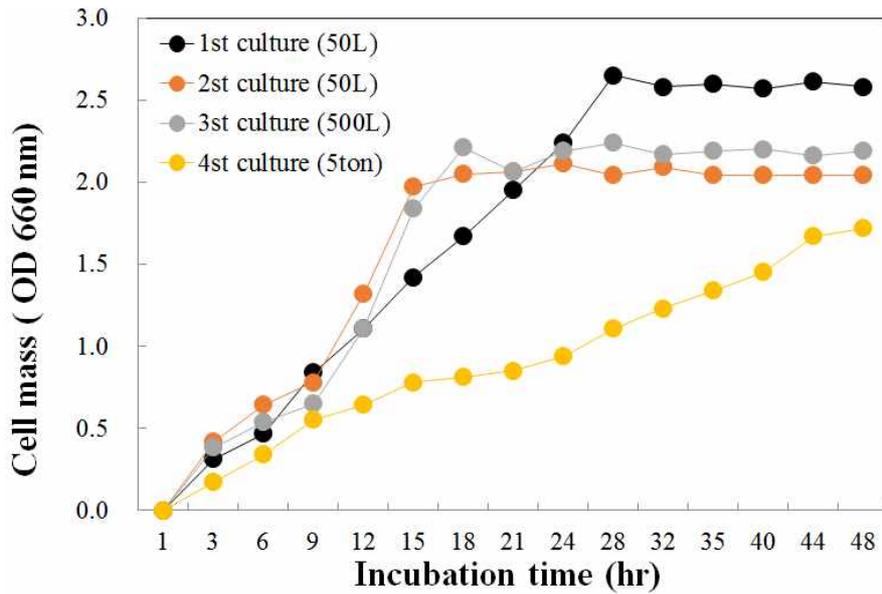


그림 69. 4차 pilot 생산에 대한 생육속도

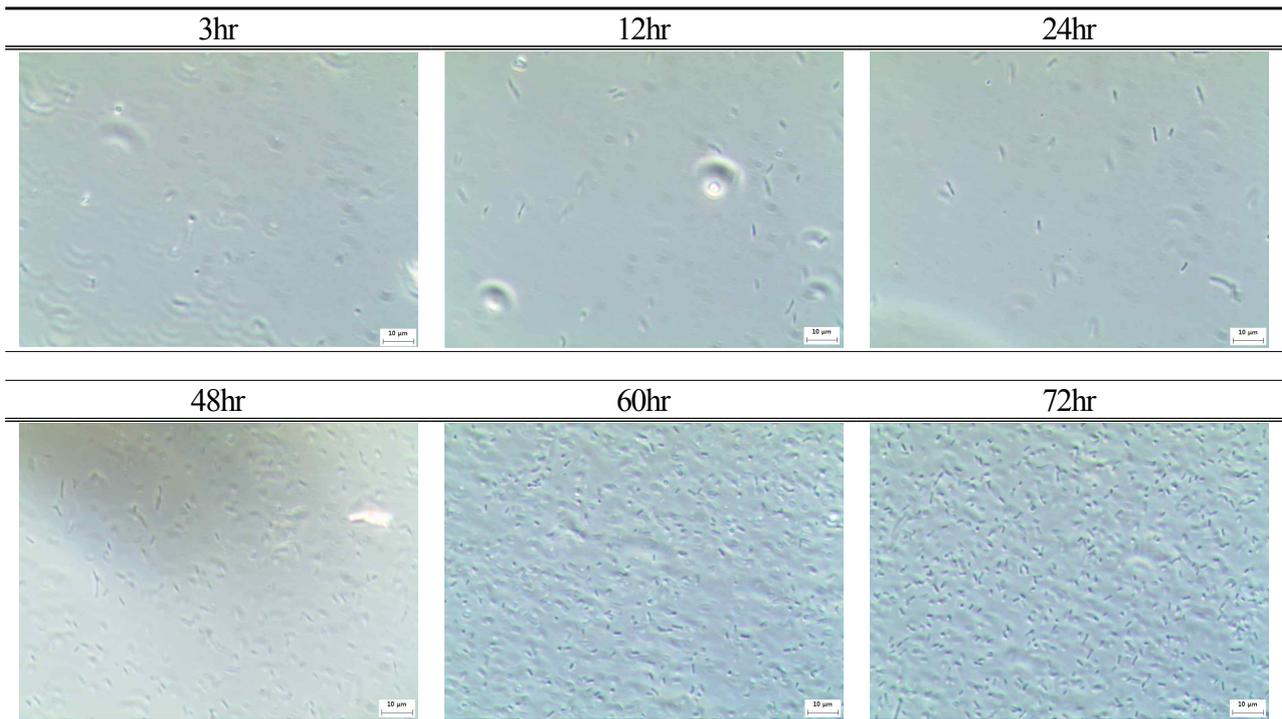
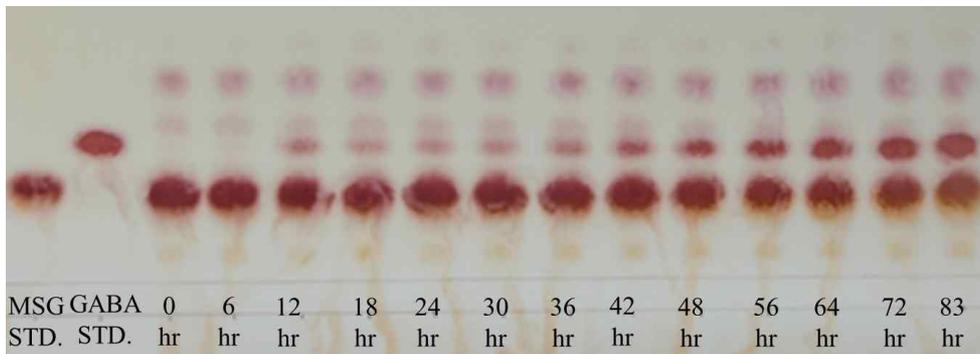


그림 70. 4차 pilot 생산에 대한 생균 밀도

- 따라서 48시간 이후의 생산 공정을 연장하여 실시, 현미경 관찰 결과 60시간 이후부터 균체의 밀도가 비교적 높은 수준을 보여, 본 실험 조건에서는 생육 스트레스가 발생하였음을 재차 확인할 수 있음.(그림 70).

### 3) 살충물질 생산성

- 전구물질의 함량이 실험 종료 시간 까지 지속적으로 검출, 전구물질에 대한 전환능력이 15%에 미치지 못함을 확인할 수 있음(그림 71-72).
- 또한 추가적으로 83시간까지 생산 시간을 연장한 결과, 전구물질이 지속적으로 검출되어, 투입 원료 대비 살충물질의 전환율이 미흡하였음을 확인할 수 있음(그림 71-72).



\* 균체의 상등액 10배 희석액을 2μL 로딩하였고, MSG 및 살충물질 표준품은 10% 농도의 10배 희석액 임.

그림 71. 4차 pilot 생산에 대한 시간별 살충물질 정성평가

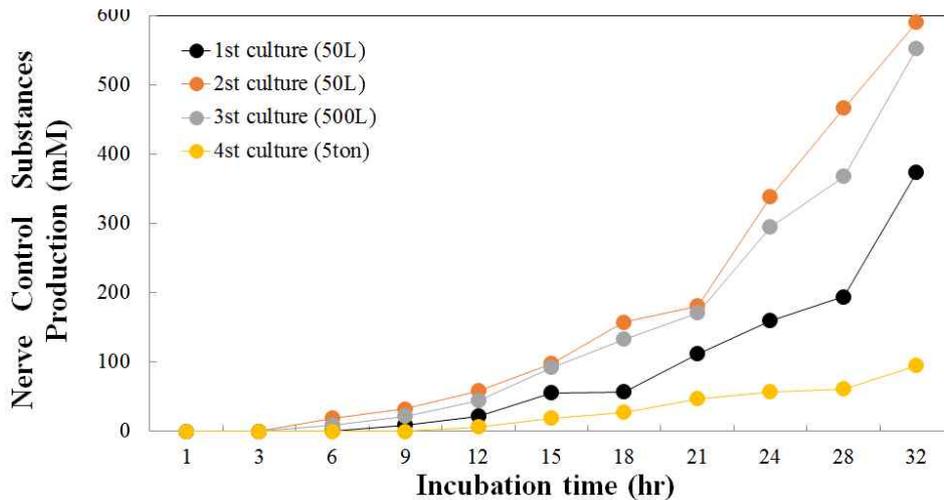


그림 72. 4차 pilot 생산에 대한 시간별 살충물질 정량평가

### 4) 결론

- 5ton 규모에서 함유되어지는 탄소원은 전구물질인 monosodium glutamate 300kg, Galactose등 16.04%에 육박하며, 초기 과한 탄소원의 적용은 균체의 생육에 스트레스를 제공하여 최종 GAD 효소 생산에 악영향을 미칠 수 있음(표 26).
- 500L까지는 본 탄소원의 함량에 따라 생육 지연이 발견되지 않았으나, 5톤 규모의 scale-up에 의해 기질의 전달력이 상대적으로 균일하지 못해, 고농도의 탄소원의 노출

에 의한 균체의 스트레스가 발생하였을 것으로 가정하였음(그림 69-70).

- 이에 균체의 정상 성장을 유도하기 위해, 생균의 밀도 증가 및 살충물질 생산 관여 효소의 습득율을 개선한 후, 후속적으로 전구물질을 공급, 유가식 배양(fed batch)의 도입이 필요할 것으로 판단되었음.
- 반면 본 연구팀이 도출한 탄소원 배지는 생육 및 효소의 반응에서 공통적으로 활용되어지는 에너지원으로써, 상위의 유가식 배양을 적용하기 위해서는 각 공정별 독립적으로 탄소원을 재적용 해야 할 필요성이 있음.
- 반면 배지 및 배양 최적화가 연구가 재 구명될 필요가 있어, 연구 시기 및 비용적 측면에서 이와 같은 부분은 무리가 있음.
- 이에 생육의 지연을 감안하고, 단위 시간 당 탄소원 및 배지를 신속하게 소진하여, 과탄소에 의한 생육 stress에서 완화할 수 있는 추가적인 배양방법을 강구하기로 함.

㉞ 5ton 배양 2차

1) 배양 profile

- 5ton 배양 1차 시 균체의 생육 지연으로 인해 단위시간 별 효소의 생산 속도 및 최종 살충물질의 전환능력이 현저히 저감되었음을 확인하였음.
- 생육지연의 문제를 해소하고자 본 연구팀은 5ton 발효이전에 접종 목적의 균체를 500L에 생산하여 이송관로를 통해 접종하는 유사 유가식 배양을 적용함.
- 초기 종균 접종량을 증가, 초기 탄소기질의 초기 소비 속도의 증가로 생육 환경의 개선 및 생육 stress로 인한 균체의 성장 측면에서 증식개체의 추가 투입으로 단위시간 당 생균 및 GAD 효소의 습득량을 개선하기로 방향을 선회함(표 28).

표 28. Pilot scale(5ton) 배양조건 - 5차

Culture profile	
scale	5ton
working volume	3.5ton
Incubation time	48hr
Seed	10%
Medium	16.04%(MSG 10%)
Temperature	30℃
RPM	150RPM
pH control time	33hr
Air	0.03vvm
Pressure	0.2
pH control reagent	Sulphuric acid 1N
Sterilization conditions	80℃, 20min
Cooling conditions	10min
Foam reagent	CS-205

○ 14시간 전후로 pH가 증가 추세를 보여, 생육 및 GAD 활성이 정상적으로 진행되었을 것으로 판단됨(표 29, 그림 73).

표 29. 5차 pilot scale(5ton)의 배양 profile

Time(hr)	pH	Temp.	Air	Pressure	RPM	OD
1	7.44	30	0.3	0.2	150	0
2	7.38	30	0.3	0.2	150	
3	7.37	30	0.3	0.2	150	0.38
4	7.22	30	0.3	0.2	150	
5	7.15	30	0.3	0.2	150	
6	7.12	30	0.3	0.2	150	0.54
7	6.85	30	0.3	0.2	150	
8	6.76	30	0.3	0.2	150	
9	6.22	30	0.3	0.2	150	0.65
10	5.48	30	0.3	0.2	150	
11	5.11	30	0.3	0.2	150	
12	4.77	30	0.3	0.2	150	1.11
13	4.52	30	0.3	0.2	150	
14	5.64	30	0.3	0.2	150	
15	5.00	30	0.3	0.2	150	2.02
16	5.00	30	0.3	0.2	150	
17	5.00	30	0.3	0.2	150	
18	5.00	30	0.3	0.2	150	2.11
19	5.00	30	0.3	0.2	150	
20	5.00	30	0.3	0.2	150	
21	5.00	30	0.3	0.2	150	2.05
22	5.00	30	0.3	0.2	150	
23	5.00	30	0.3	0.2	150	
24	5.00	30	0.3	0.2	150	2.07
25	5.00	30	0.3	0.2	150	
26	5.00	30	0.3	0.2	150	
27	5.00	30	0.3	0.2	150	
28	5.00	30	0.3	0.2	150	2.04
29	5.00	30	0.3	0.2	150	
30	5.00	30	0.3	0.2	150	
31	5.00	30	0.3	0.2	150	
32	5.00	30	0.3	0.2	150	2.05
33	5.00	30	0.3	0.2	150	
34	5.00	30	0.3	0.2	150	
35	5.00	30	0.3	0.2	150	2.04
36	5.00	30	0.3	0.2	150	
37	5.00	30	0.3	0.2	150	
38	5.00	30	0.3	0.2	150	
39	5.00	30	0.3	0.2	150	
40	5.00	30	0.3	0.2	150	2.08
41	5.00	30	0.3	0.2	150	
42	5.00	30	0.3	0.2	150	
43	5.00	30	0.3	0.2	150	
44	5.00	30	0.3	0.2	150	2.07
45	5.00	30	0.3	0.2	150	
46	5.00	30	0.3	0.2	150	
47	5.00	30	0.3	0.2	150	
48	5.00	30	0.3	0.2	150	2.05

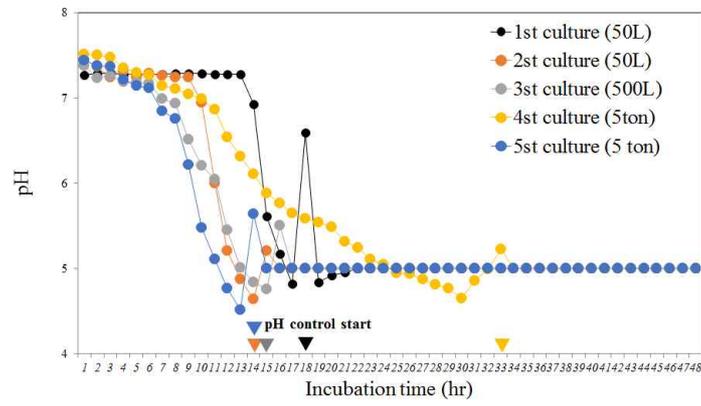


그림 73. 5차 pilot 생산에 대한 pH 변화 추이

2) 생균 밀도(효소 공장)

○ 15시간 이내 균체의 증식이 급격히 이루어져 안정기에 도달, 4차 생육속도 개선된 결과를 보이며, Lab 규모 최적 조건 및 2차 배양과 유사한 수준의 결과를 보임(그림 74-75).

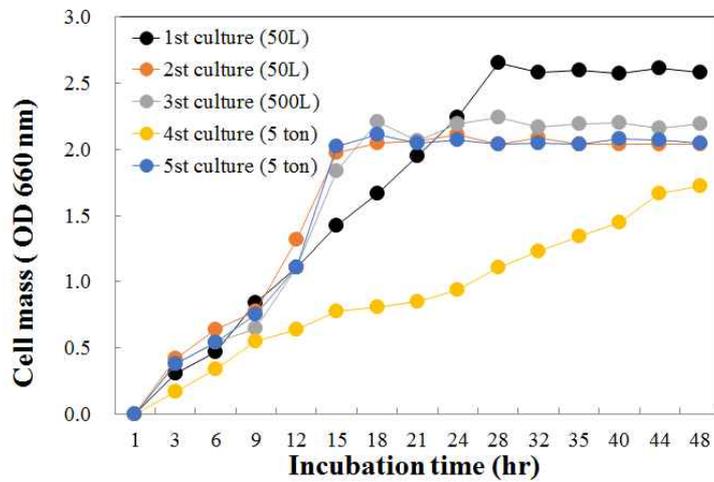


그림 74. 5차 pilot 생산에 대한 생육속도

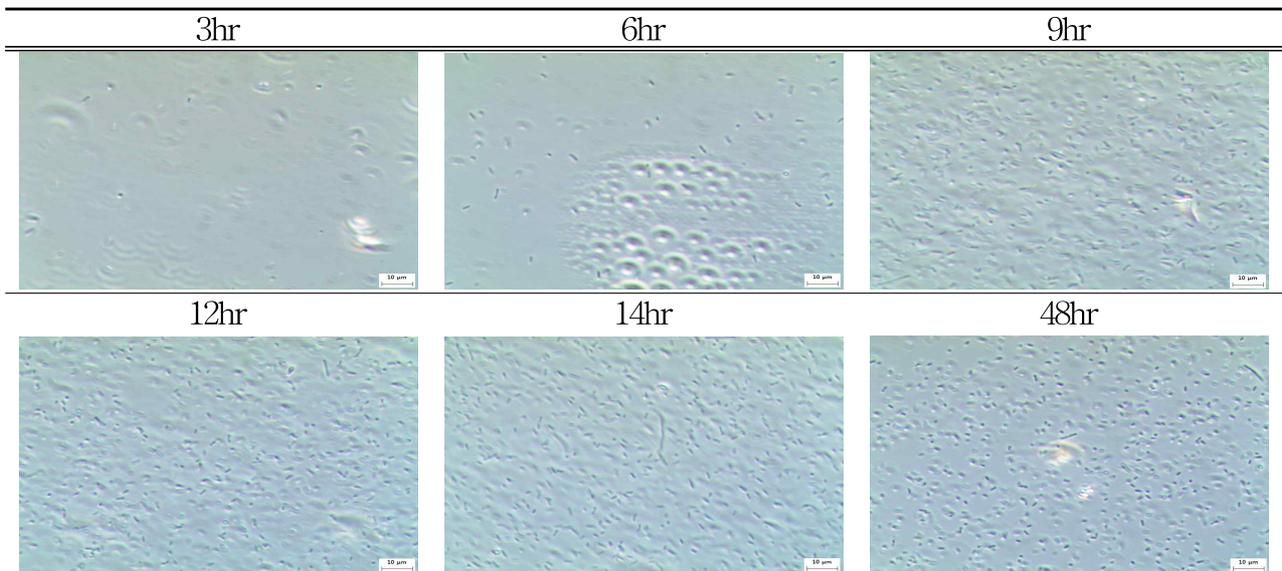


그림 75. 5차 pilot 생산에 대한 생균 밀도

### 3) 살충물질 생산성

- 24시간 경과시까지 모든 실험군중 단위시간 당 가장 우수한 살충물질 전환효율을 나타내었고, 48시간에서 전구물질의 불검출 및, 살충물질의 습득량은 591.02mM로 가장 높은 결과를 보임.(그림 76-77).

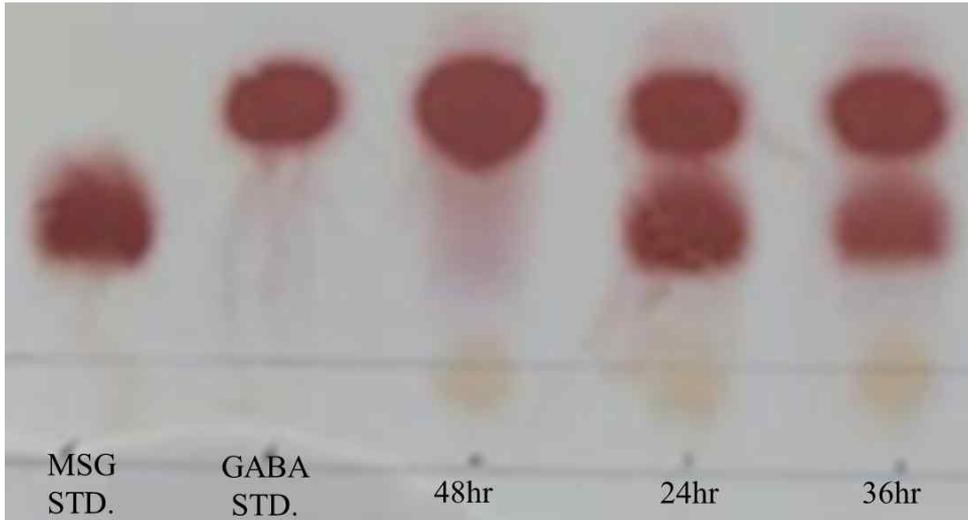


그림 76. 5차 pilot 생산에 대한 시간별 살충물질 정성평가

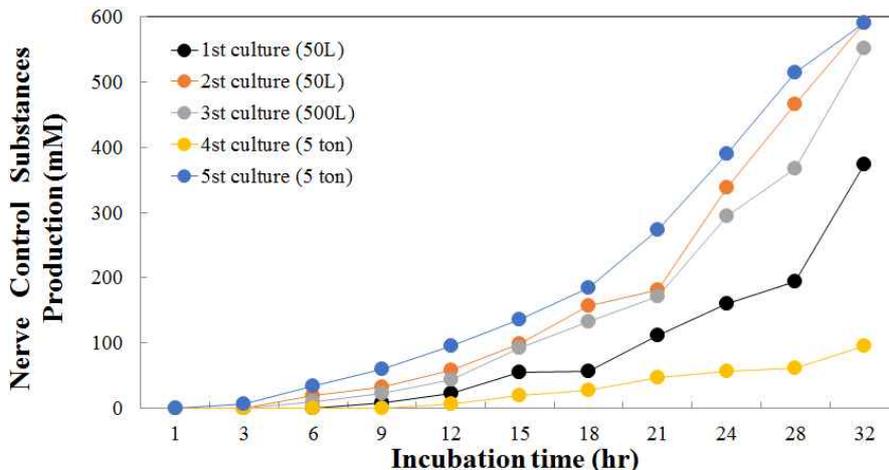


그림 77. 5차 pilot 생산에 대한 시간별 살충물질 정량평가

### 4) 결론

- 5ton 규모에서 애로사항으로 발생하였던 균체의 생육 지연과 이에 따른 단위시간당 효소 생성량 및 최종 살충물질의 전환 지연의 결과를 유사 유가식 배양을 적용하였음.
- 균체의 접종량을 증가시키었고, 균체의 높은 초기 밀도로 인해, 탄소기질의 신속한 저감으로 탄소원에 대한 생육 스트레스가 개선된 것으로 판단됨.
- 초기 높은 균체 밀도는 대수 증식기 이전의 낮은 균체 밀도에도 불구하고, 살충물질의 생성성량이 증가, 모든 시험 시간동안 가장 우수한 살충물질 전환 결과를 거두었음.

㉞ 후속 pH buffer의 발굴

1) 연구목적

- 상업용 생산 기기에서 고농도의 pH buffer 적용에 의해 이송관로 및 pH 충전 tank에 pH 산화에 의한 누수 및 배양기 외벽의 산화의 의한 스케일 침착이 발생함(그림 78).
- 이에 저 산도의 다양한 pH buffer를 적용하여, 생산기기의 피해를 저감하고, 산업용 살충물질 생산 공정에 적용 가능한 후속 pH buffer를 선별하고자 함(그림 78).

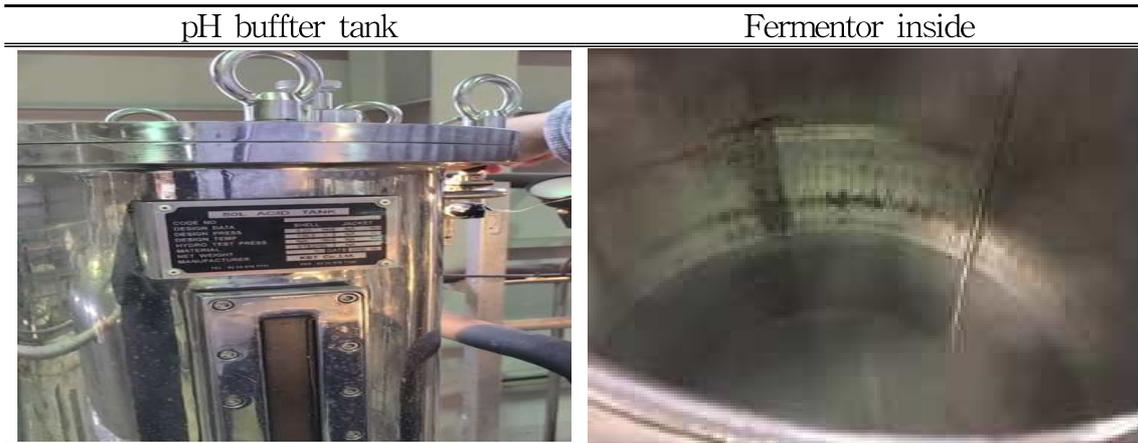


그림 78. 고농도 pH buffer 적용에 의한 생산시설의 피해 현황

2) 재료 및 방법

- 공시 미생물 : *L. sakei* wikim0118(세계김치연구소)
- 적용 배지 : 표 17 조성의 최적화 배지
- 적용 pH buffer : Hydrochloric acid 40% (Duksan), Sulfuric Acid 40% (Duksan), Citric acid 50% (Duksan), CH<sub>3</sub>COOH 50% (Duksan)

3) 실험방법

- 상위 최적화 조성 및 배양 조건으로 생산된 살충물질이 함유된 발효물에 대한 pH buffer의 단위 용량 별 pH 저감능력을 평가하여, 5ton scale에 적용 시 예상되는 buffer 소비량을 산출하도록 함.
- 측정 장비 : STARTER 3100 (OHAUS)

4) 실험결과

- Hydrochloric acid 40%는 1mL 당 6.55→5.14로 pH 1.41, Sulfuric Acid 40%는 1.26로 우수한 buffer 능력을 보이는 반면, Citric acid 50%는 7mL 처리 시 저감은 1.26으로 기존에 채택한 Sulfuric Acid와 동일한 pH 저감을 보이기 위하여 7배의 추가 소요가 필요함(그림 79).
- CH<sub>3</sub>COOH 50%는 Citric acid 50%에서 처리한 동량의 7mL 처리 시 1.09로 전시험구 중 가장 낮은 pH 저감능을 보이며, 특유의 휘발성 향기가 강하여, 활용 buffer에서 배재하였음(그림 79).

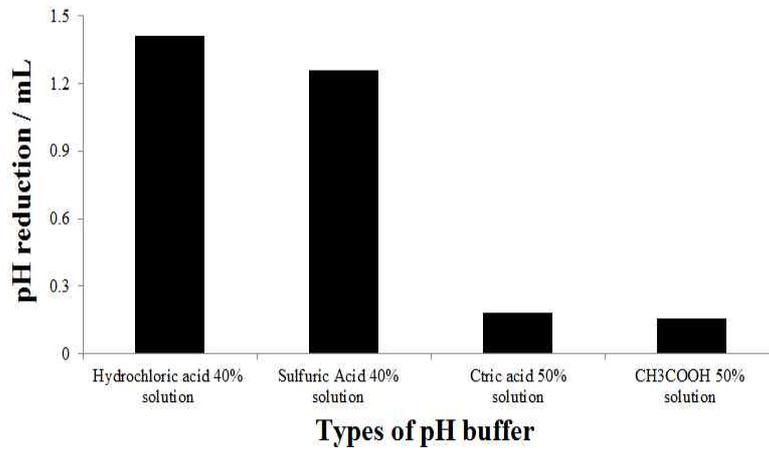


그림 79. 다양한 pH buffer의 pH 저감 능력 대조

5) 결론

- 최종 pH 저감능력은 다소 떨어지나, 식품 및 유기농업자재에서 활용 가능한 안정성이 높은 citric acid를 50% solution으로 제조하여, pH buffer로 활용하기로 하며, 기존 Sulfuric Acid 대비 동량의 pH 저감능력을 보이는 부피비를 적용하여, 향후 생산 공정에 적용함(그림 79).

㉞ 5ton 배양 3차

1) 배양 profile

- 생산 설비의 내구성 측면 및 유기농업자재로 활용이 가능한 EPA list 3-4 grade에 포함되는 구연산을 PH buffer로 활용하여, 5ton scale에 살충물질 생산 재현성을 확인함.
- Citric acid 50%의 용량 당 pH 저감 능력이 낮아 pH 조절제의 첨가량의 증가에 의해 살충물질의 함량 저하가 발생할 수 있음에, 배지 및 전구물질의 첨가량을 실험 배양 부피에 맞춰 반영함(표 30).

표 30. Pilot scale(5ton) 배양조건 - 6차

Culture profile	
scale	5ton
working volume	3.7ton
Incubation time	48hr
Seed	10%
Medium	16.04%(MSG 10%)
Temperature	30°C
RPM	150RPM
pH control time	23
Air	0.03vvm
Pressure	0.2
pH control reagent	Citric acid 50% solution
Sterilization conditions	80°C, 20min
Cooling conditions	10min
Form reagent	CS-205

- pH 거동 결과, 18시간 전후로 pH의 증가가 확인되었으나, 선행 결과 대비 증가폭은 매우 미비하였고, pH buffer 의 소비량도 정체수준의 결과를 보임(표 31, 그림 80).
- 이에 48시간 내 살충물질의 전환이 억제되었음을 알 수 있음(표 31, 그림 80).

표 31. 6차 pilot scale(5ton)의 배양 profile

Time(hr)	pH	Temp.	Air	Pressure	RPM	OD
1	6.87	30	0.3	0.2	150	0.00
2	6.53	30	0.3	0.2	150	
3	6.45	30	0.3	0.2	150	0.29
4	6.54	30	0.3	0.2	150	
5	6.30	30	0.3	0.2	150	
6	6.05	30	0.3	0.2	150	0.48
7	6.19	30	0.3	0.2	150	
8	6.25	30	0.3	0.2	150	
9	6.28	30	0.3	0.2	150	0.57
10	6.32	30	0.3	0.2	150	
11	6.37	30	0.3	0.2	150	
12	6.16	30	0.3	0.2	150	1.08
13	5.92	30	0.3	0.2	150	
14	5.69	30	0.3	0.2	150	
15	5.49	30	0.3	0.2	150	1.67
16	5.34	30	0.3	0.2	150	
17	5.34	30	0.3	0.2	150	
18	5.36	30	0.3	0.2	150	2.04
19	5.39	30	0.3	0.2	150	
20	5.42	30	0.3	0.2	150	
21	5.45	30	0.3	0.2	150	2.11
22	5.46	30	0.3	0.2	150	
23	5.40	30	0.3	0.2	150	
24	5.40	30	0.3	0.2	150	2.08
25	5.40	30	0.3	0.2	150	
26	5.40	30	0.3	0.2	150	
27	5.40	30	0.3	0.2	150	
28	5.40	30	0.3	0.2	150	2.07
29	5.40	30	0.3	0.2	150	
30	5.40	30	0.3	0.2	150	
31	5.40	30	0.3	0.2	150	
32	5.40	30	0.3	0.2	150	2.09
33	5.40	30	0.3	0.2	150	
34	5.40	30	0.3	0.2	150	
35	5.40	30	0.3	0.2	150	2.10
36	5.40	30	0.3	0.2	150	
37	5.40	30	0.3	0.2	150	
38	5.40	30	0.3	0.2	150	
39	5.40	30	0.3	0.2	150	
40	5.40	30	0.3	0.2	150	2.07
41	5.40	30	0.3	0.2	150	
42	5.40	30	0.3	0.2	150	
43	5.40	30	0.3	0.2	150	
44	5.40	30	0.3	0.2	150	2.10
45	5.40	30	0.3	0.2	150	
46	5.40	30	0.3	0.2	150	
47	5.40	30	0.3	0.2	150	
48	5.40	30	0.3	0.2	150	2.07

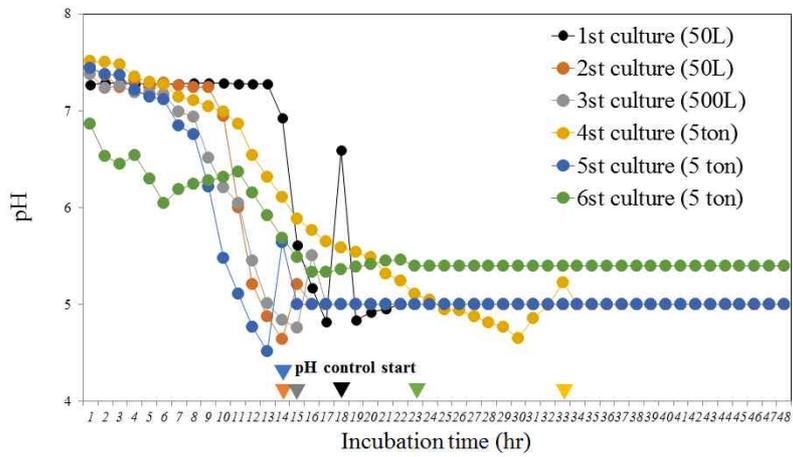


그림 80. 6차 pilot 생산에 대한 pH 변화 추이

2) 생균 밀도(효소공장)

- 균체의 성장속도를 살펴보면, 18시간 전후로 안정기에 도달하였고, 균체의 정상적 생육이 진행되었음을 확인할 수 있어, 단위시간 당 GAD 효소의 생성은 원활하였음이 확인됨(그림 81-82).

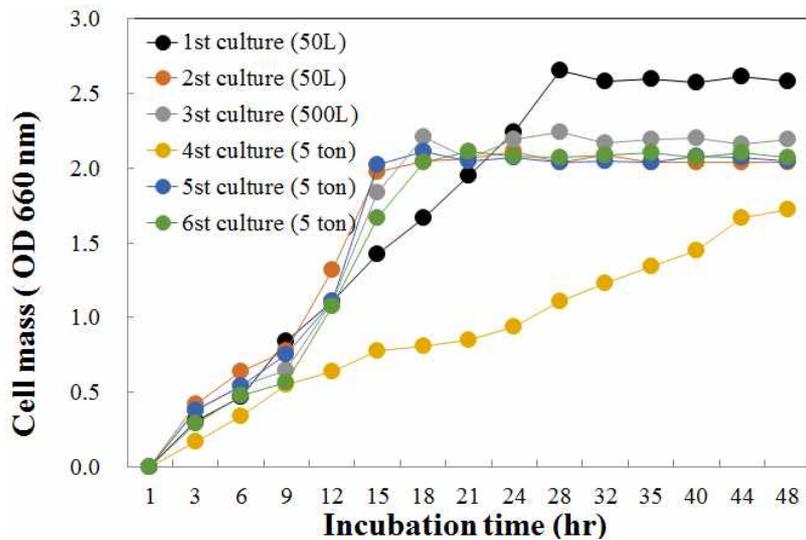
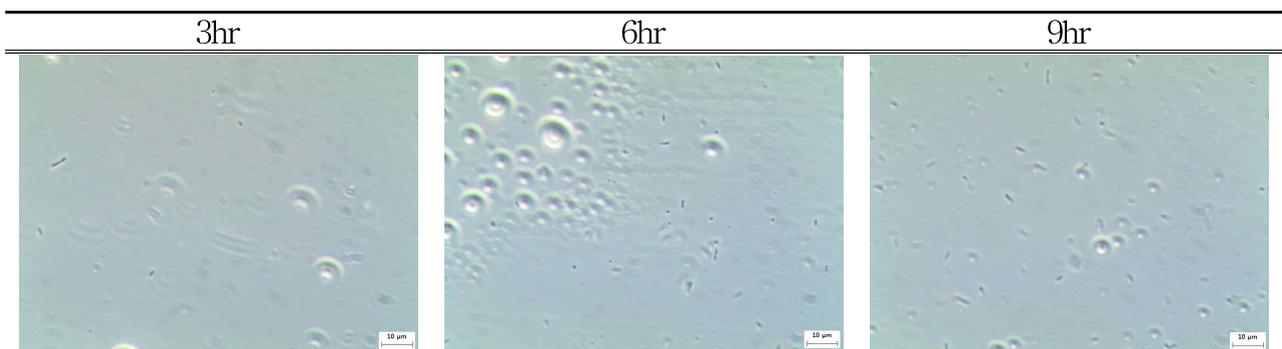


그림 81. 6차 pilot 생산에 대한 생육속도



<그림 계속>

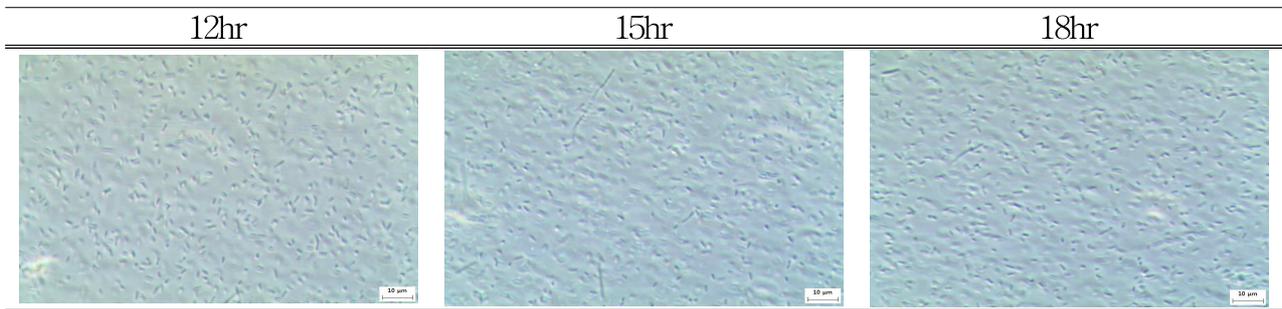


그림 82. 6차 pilot 생산에 대한 생균 밀도

3) 살충물질 생산성

- 12시간 전후로의 살충물질의 전환은 정상적으로 판단되나, 이후 단위시간 당 살충물질의 생성량이 감소되었고, 이에 따라 24시간 이후 살충물질의 생산능력은 정체 수준을 보이고 있음(그림 83-84).

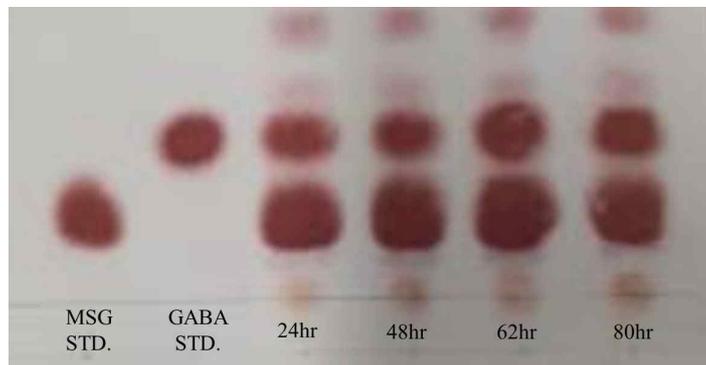


그림 83. 6차 pilot 생산에 대한 시간별 살충물질 정성평가

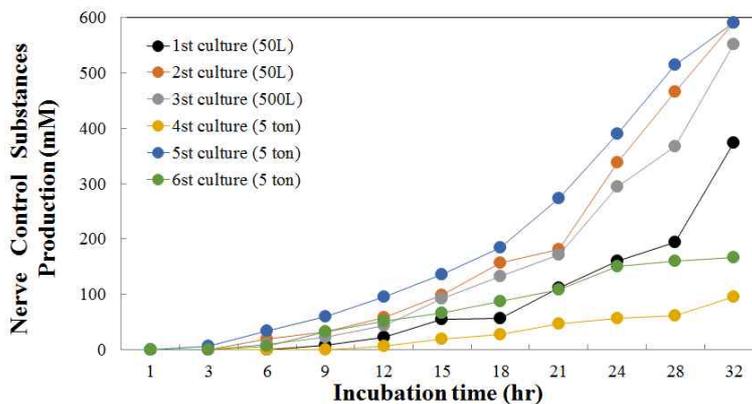


그림 84. 6차 pilot 생산에 대한 시간별 살충물질 정량평가

4) 결론

- 당초 GAD 효소와 균체의 생육에 필요한 탄소 기질은 다당류인 Galactose로 본 기질은 균체의 생육 과정에서 단당류로 분해되어, GAD의 효소 반응 에너지원으로 활용됨.
- 반면 pH buffer로 활용 된 citric acid는 균체의 생육 및 호흡 과정 내 TCA cycle에 전환되는 중간 기질로써 본 연구팀이 최종 선별한 다당류인 Galactose에 비해 전환이 매우 쉬운 특성이 있음.

- 대수 증식기 과정 이내 균체는 다당류인 Galactose를 분해과정을 통해, 단당류로 전환하고, 최종 GAD 효소 반응에 적합한 탄소 기질을 제공함에 따라 원활한 반응이 발생하였음을 확인할 수 있음.
- 반면 대수 증식기 내 citric acid의 공급으로 인해, 균체의 생육 및 증식은 TCA cycle의 전환에 유리한 탄소기질로써 citric acid를 활용 및 적응한 것으로 가설을 세움.
- 가설에 따르면 당초 생육을 통해 단당류로 분해되어야할 Galactose 탄소기질의 선택적 소비가 억제되어, 최종 GAD 효소 반응에 필요한 단당류의 탄소기질의 공급이 제한됨.
- 최종 생육 및 GAD 효소 전환에 필요한 탄소 밸런스가 붕괴된 현상으로 살충물질의 생산이 억제된 것으로 사료됨.
- 또한 생산배지의 다당류의 탄소기질을 단당류로 전환의 원활성의 확보를 위해, 균체의 성장 적응을 다당류인 Galactose에 최적화할 필요가 있고, 단당류의 전환과정으로 GAD 효소에 적합한 탄소기질의 확보가 필요함.
- 이에 생육 과정이 완전히 종료 된 시점부터 citric acid를 공급해, pH buffer인 Citric acid의 생육 과정의 TCA 전환을 억제함.
- 생육과정에서 적용 탄소원의 우선 소비를 통해 단당류 전환을 유도 GAD의 탄소기질의 공급을 정상화 하였고, 추가적으로 생육 종료 시점에서 배양온도를 50℃로 조작해, Cell-lysis를 유도, TCA 전환을 추가로 억제하고 GAD의 활성 환경을 개선하였음.

㉔ 5ton 배양 4차

1) 배양 profile

- 안정기가 도달한 후 pH의 지속증가가 관찰되는 시점인 22시간부터 pH 조절을 실시하였고, 외 배양 조건은 상위 ㉔항과 동일함(표 32).

**표 32. Pilot scale(5ton) 배양조건 - 7차**

Culture profile	
scale	5ton
working volume	3.7ton
Incubation time	48hr
Seed	10%
Medium	16.04%(MSG 10%)
Temperature	30℃
RPM	150RPM
pH control time	22
Air	0.03vvm
Pressure	0.2
pH control reagent	Citric acid 50% solution
Sterilization conditions	80℃, 20min
Cooling conditions	10min
Foam reagent	CS-205

○ pH의 거동은, 13시간 전으로 지속 감소추세 후, 21시간까지 pH가 최대 8.24까지 지속적으로 상승되어, GAD의 효소 활성이 이루어짐으로 판단, 21시간 PH 조절을 실시함 (표 33, 그림 85).

표 33. 7차 pilot scale(5ton)의 배양 profile

Time(hr)	pH	Temp.	Air	Pressure	RPM	OD
1	7.48	30	0.3	0.2	150	0.00
2	7.39	30	0.3	0.2	150	
3	7.57	30	0.3	0.2	150	0.35
4	7.34	30	0.3	0.2	150	
5	7.25	30	0.3	0.2	150	
6	7.11	30	0.3	0.2	150	0.57
7	6.99	30	0.3	0.2	150	
8	6.84	30	0.3	0.2	150	
9	6.35	30	0.3	0.2	150	0.84
10	5.67	30	0.3	0.2	150	
11	5.23	30	0.3	0.2	150	
12	4.99	30	0.3	0.2	150	1.23
13	4.67	30	0.3	0.2	150	
14	4.87	30	0.3	0.2	150	
15	5.34	30	0.3	0.2	150	1.64
16	5.69	30	0.3	0.2	150	
17	6.24	30	0.3	0.2	150	
18	6.57	30	0.3	0.2	150	1.98
19	7.23	30	0.3	0.2	150	
20	7.89	30	0.3	0.2	150	
21	8.24	30	0.3	0.2	150	2.14
22	5.00	30	0.3	0.2	150	
23	5.00	30	0.3	0.2	150	
24	5.00	30	0.3	0.2	150	2.08
25	5.00	30	0.3	0.2	150	
26	5.00	30	0.3	0.2	150	
27	5.00	30	0.3	0.2	150	
28	5.00	30	0.3	0.2	150	2.11
29	5.00	30	0.3	0.2	150	
30	5.00	30	0.3	0.2	150	
31	5.00	30	0.3	0.2	150	
32	5.00	30	0.3	0.2	150	2.12
33	5.00	30	0.3	0.2	150	
34	5.00	30	0.3	0.2	150	
35	5.00	30	0.3	0.2	150	2.09
36	5.00	30	0.3	0.2	150	
37	5.00	30	0.3	0.2	150	
38	5.00	30	0.3	0.2	150	
39	5.00	30	0.3	0.2	150	
40	5.00	30	0.3	0.2	150	2.09
41	5.00	30	0.3	0.2	150	
42	5.00	30	0.3	0.2	150	
43	5.00	30	0.3	0.2	150	
44	5.00	30	0.3	0.2	150	2.11
45	5.00	30	0.3	0.2	150	
46	5.00	30	0.3	0.2	150	
47	5.00	30	0.3	0.2	150	
48	5.00	30	0.3	0.2	150	2.09

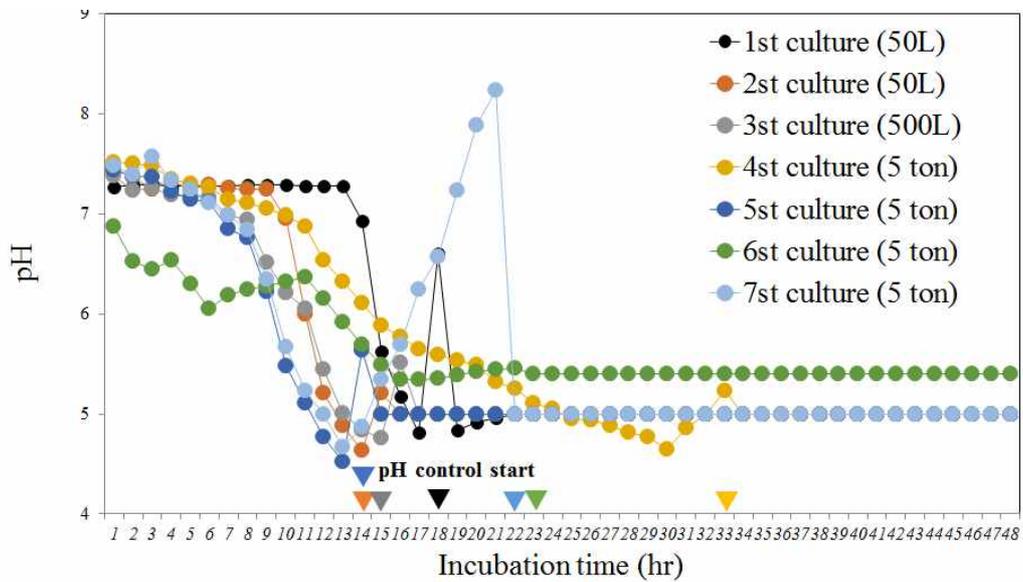


그림 85. 7차 pilot 생산에 대한 pH 변화 추이

2) 생균밀도(효소공장)

- 균체의 성장속도를 살펴보면, 21시간 전후로 안정기에 정상 도달 하였고, 이에 따라 단위 시간 당 GAD 효소의 생성은 원활하였음이 확인됨(그림 86-87).

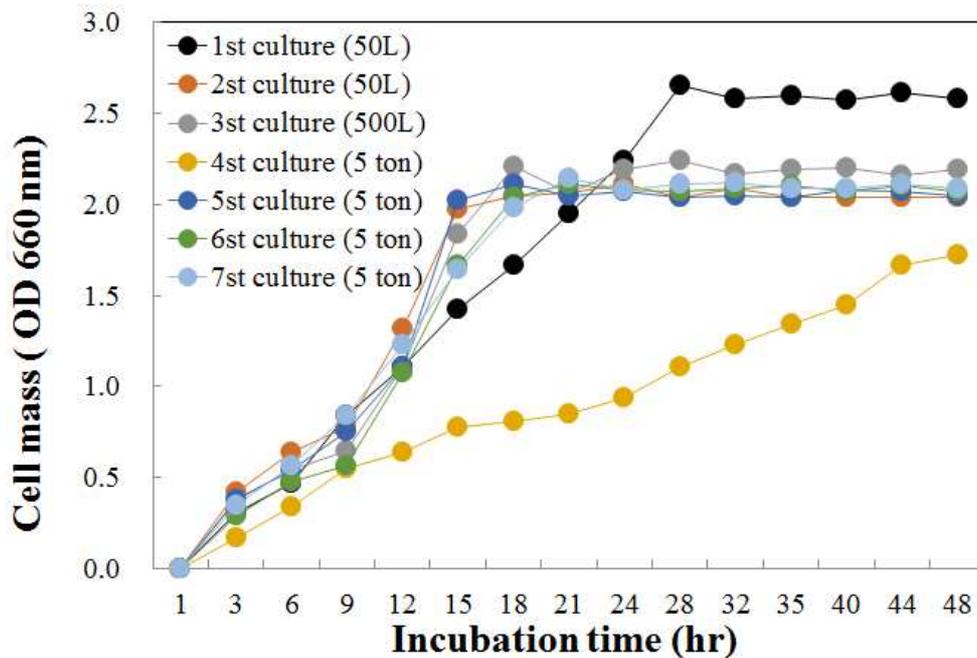


그림 86. 7차 pilot 생산에 대한 생육속도

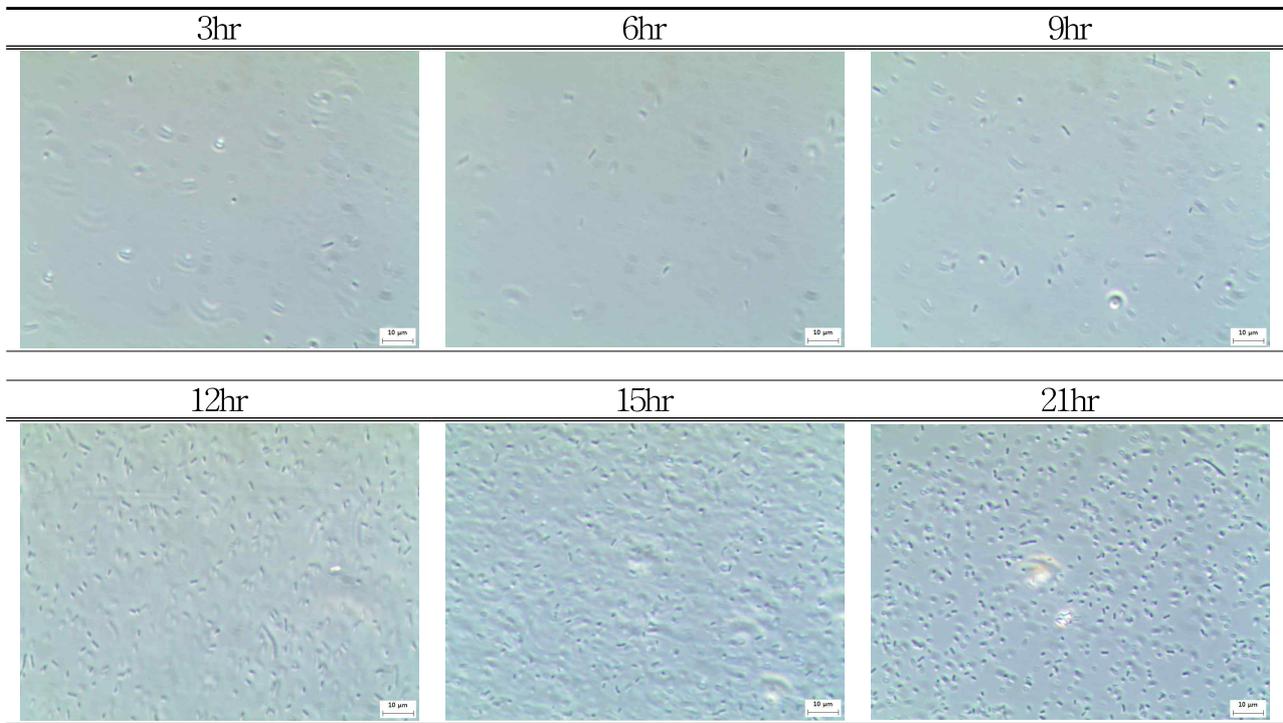


그림 87. 7차 pilot 생산에 대한 생균 밀도

3) 살충물질 생산성

- 시간별 전구물질의 소진 및 살충물질의 생산은 원활히 진행되었으며, 전 시험구중 가장 높은 살충물질 전환 속도를 나타냄(그림 88-89).
- 선행 문헌에 따르면, 효소 반응을 촉진하기 위해, cell-lysis 과정을 통해 효소를 용출시킬 경우, 단위시간 당 효소의 반응성이 향상된다는 보고가 있으며, 본 차수 배양 시 열처리 의해 cell-lysis가 정상적으로 작동되었음을 판단할 수 있음.

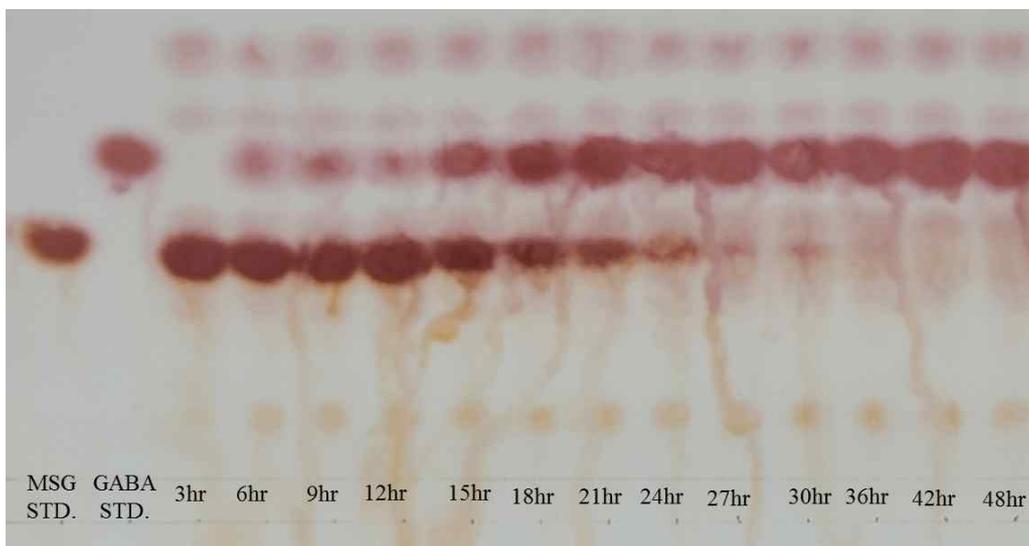


그림 88. 7차 pilot 생산에 대한 시간별 살충물질 정성평가

- 48시간 경과 후 최종 살충물질의 습득률은 전구물질 전환 98.4%에 해당하는 량인 589.2mM로 분석됨.

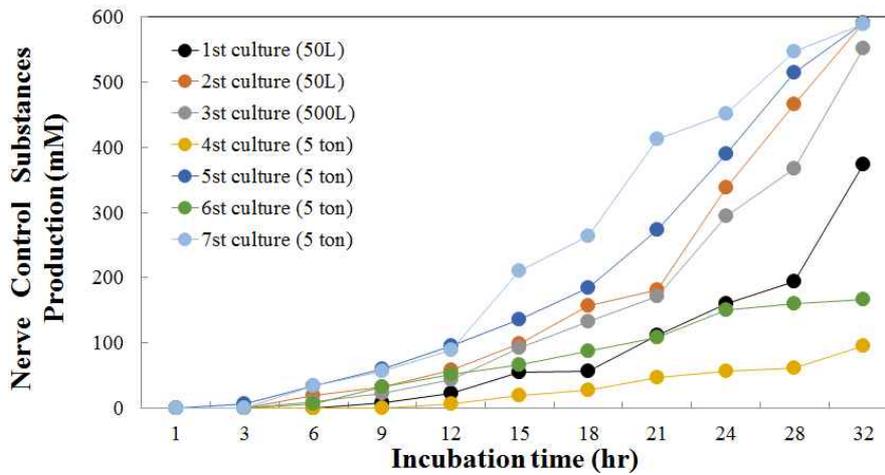


그림 89. 7차 pilot 생산에 대한 시간별 살충물질 정량평가

#### 4) 결론

- 다당류인 Galactose의 원활한 균체의 선택적 소비를 촉진하기 위해, 생육 종료 후 pH buffer인 citric acid를 활용함.
- 균체의 cell-lysis 공정을 추가로 도입, 증식 정체기에 TCA 회로의 작동을 억제하고, 효소를 용출하여, GAD 효소의 반응을 촉진하기로 하였음.
- 최종 48시간 이내 전구물질의 전환이 100%에 육박하였고, 589.2mM의 습득률을 보여, 최종 산업화 공정의 설계를 완료함.

#### ㉠ 최종 결론

- 초기 고함량의 탄소원에 기이한 생육 stress를 해결하기 위해, 유사 유가식 배양을 도입하여, 초기 기질 소비 및 생육 스트레스를 개선하고자 하였음.
- 500L에 균체를 배양, 내부 이송관로를 통해 집중하여, 최종 종균 집중량을 10%로 증가시켰음(그림 90).
- 당초 sulfuric acid 50%를 활용하여, pH buffer로 활용하였으나, pH Loading tank와 이송관로, 배양기 내벽에 부식에 의한 누수, 스케일 침착 등 애로사항이 발생함.(그림 78).
- 이에 식품 및 유기농업자재로 활용이 용의하며, 부식도가 상대적으로 완화된 citric acid를 대체 적용하였음(그림 79).
- 균체의 증식 가운데 citric acid의 적용은 생육 및 GAD 효소가 요구하는 배양 원료의 탄소 밸런스를 붕괴시키는 것으로 판단하였음.
- citric acid는 TCA 사이클의 중간 산물로, 본 최적 배지 복합 탄소원 대비 생육환경 내 선택적 소비가 쉬워 본연의 pH buffer 개념이 아닌, 생육용으로 활용되어짐.
- 이에 최적 생산 원료인 탄소원의 단당류 전환을 억제하여 GAD 활성화 시 필요한 단당류의 탄소원 기질의 전환에 장애를 유발함(그림 80-84).

- 이를 해결하고자 생육 증식 및 살충물질 생성구간을 독립적으로 진행하기로 하였음.
- 균체의 증식 구간 내 citric acid의 활용을 배제하였고, 균체를 성장 안정기 및 pH의 지속적 상승 구간 이후 citric acid를 후속적으로 첨가하여, 생육환경 내 citric acid의 활용에 의한 탄소 밸런스 붕괴 현상을 보완하였고, GAD효소의 최적 pH 범위를 수렴하였음(표 32, 그림 85)
- 반면 상대적으로 지연된 pH 조절에 따라 목표 공정 설계 시간인 48시간 이내 살충물질의 전환이 미흡할 수 있으므로, 가온처리를 통한 cell-lysis 공정을 추가로 도입하였음(그림 90).
- 최종 Plant 환경에서 전구물질의 전환이 100%에 육박하며, 살충물질의 습득률이 589.2mM 수준을 보이는 산업화 공정의 설계를 완료하였음.(그림 88-89).

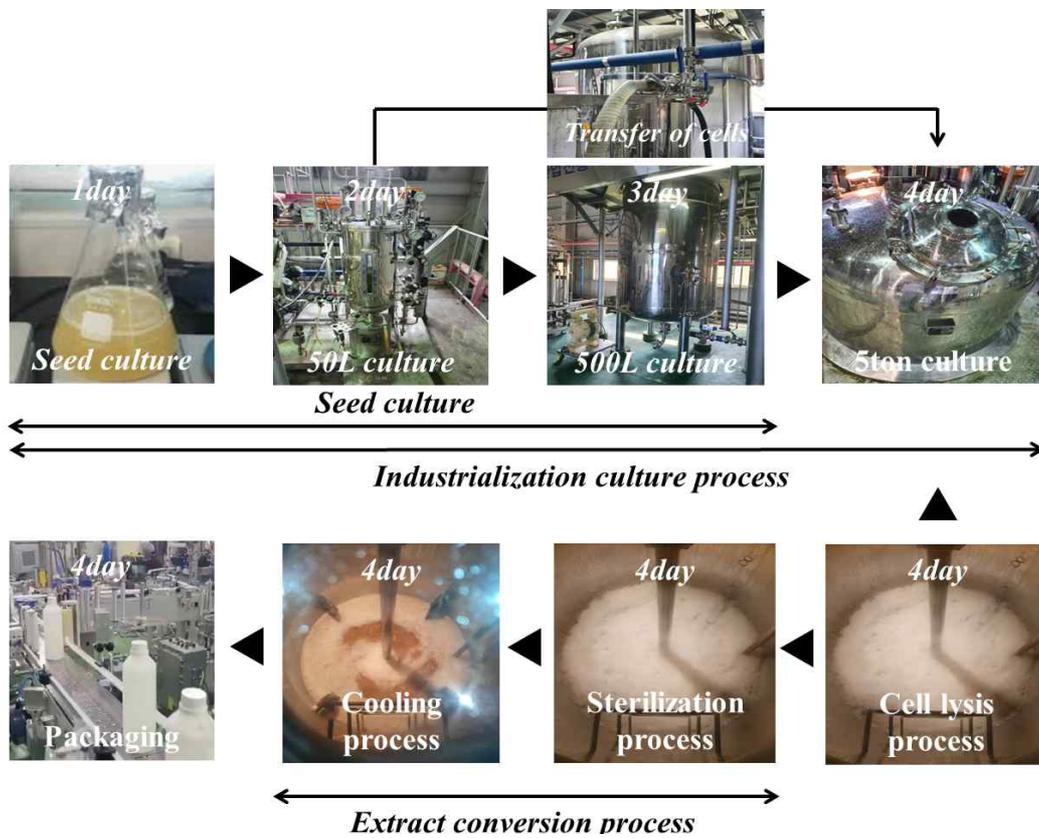


그림 90. 살충원료의 최적 생산 공정도

## 나. 제품의 제형 소재 개발

### (1) 제품 제형화 전략 수립

#### (가) 규격 확립 전략 수립

##### ① 연구목적

- 살충 소재의 현장 여건을 고려한 다양한 제형화 도출 계획 수립

##### ② 재료 및 방법

- 선행 논문 및 유기농업자재 정보시스템, 현장 답사를 통해 필요한 제형 정보 도출

##### ③ 결과

- 제2협동에서 제시하는 선충 실험 결과 2,000배 희석 액에서 시중의 유사제품과 방제효율이 비슷한 수준으로 나옴을 확인하였음.
- 반면 제제 처리 후 짧게는 7일 내 뿌리혹선충의 재활성이 관찰되었고, 이는 본 제제의 처리가 일정 농도 이하가 될 경우, 근육 신경이 정상상태로 활성화되는 결과로 예상됨
- 따라서 일정 분기 별로 살충물질의 지속적인 투여가 있어야만 안정적인 방제가 될 수 있음.
- 기존 액상 약제는 살충물질의 함량이 고농도이며, 관주 등 재배 기간에 자유롭게 활용될 수 있음이 장점이나, 토양 공극 내 투과 후 유실되는 등 잔류성이 미흡함이 단점임.
- 또한 제1협동기관에서 제공한 토양 정착력 분석 결과 액상제형의 경우 균체의 토양 정착력은 미흡하고, 이를 통한 살충물질의 추가적인 생산을 기대하기는 어려움
- 이에 본 살충물질을 함유하여 지속적인 방출 형태가 제공되는 서방출형 입제를 추가적인 제품 제형으로 적용하기로 하고, 초기 토양을 만드는 과정 또는 작물 정식 초기에 담체 내 하여 반영토록 전략화 함.
- 반면에 담체 내 함유된 살충물질 제형의 경우, 살충물질의 서방출성이 방제의 지속성 측면에서 유리하나, 고농도 처리에는 부적합함.
- 따라서 상위 제형들의 상호 보완의 목적으로 재배 초기 및 중간의 처리 약제의 활용 방법 차이를 통해 방제 효율 및 지속성 유지 전략을 수립하였고 방제 전략은 아래와 같음 (그림 91 표 34).

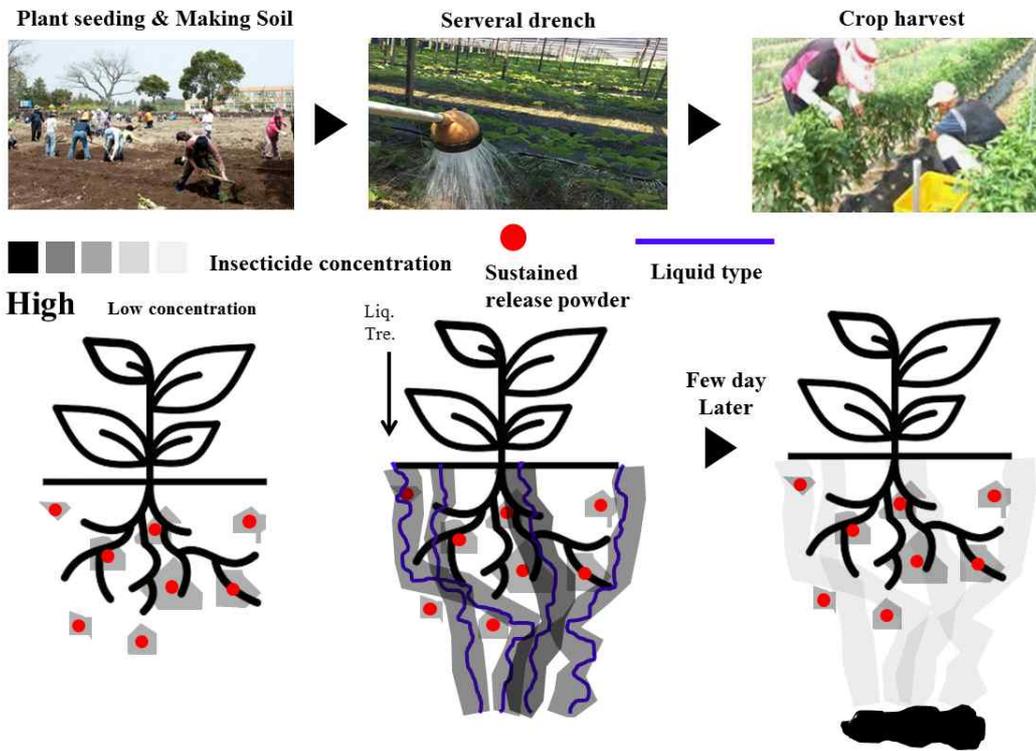


그림 91. 현장 적용 시 살충물질의 지속 노출을 위한 액제 및 입제 혼용 활용 전략

표 34. 액상 및 입제의 장·단점 비교 및 적용 전략

Formulation	Powder	Liquid
When to use	작물정식 전	제한 없음
Strength	살충물질 지속성	고농도 처리
Dis-advantage	낮은 살충농도 적용 시기 제한적	공극에 따른 유실 (낮은 지속성)
Prototype		

- 2020년 12월 기준 국립농산물품질관리원 유기농업자재 DB에 따르면 총 13종의 뿌리혹 선충 제품이 등재 되어있음.
- 효능효과에 대한 평가 제품은 2건이었고, 유기농업자재 관리 법령 아래, 대상 해충에 대한 언급을 하기 위해서는 효능효과 평가가 필수임에 따라, 각 제품들은 간접적으로 대상 해충을 명시하기 위해서 네마 또는 선충 단어를 활용한 상품명으로 구성됨(표 35).
- 미생물 및 추출물은 총 6종, 외 식물성 오일, 추출물, 복합물질이 7종으로 조사됨(표 35).
- 이 중 액상제는 9종이었고, 분말 입제는 8종으로 조사됨(표 35).

표 35. 유기농업자재 고시된 선충 방제용 제품 정보

Product	Fomulation	Source meterial	Image
참선충	Liquid	Microorganism <i>P. temperata</i>	
선충애	Liquid	Microorganism -	
선충제로	Liquid	Microorganism <i>B. subtilis</i>	-
선충쌈	Liquid	Microorganism & Plant oil extract	-
네마큐	Liquid	Plant oil extract Quillaja Saponin	
네마캐치 액제	Liquid	Microorganism extract	-
네마 프리	Liquid	Microorganism extract <i>A. oryzae</i> extract 20%	
대유 선충뚝	Liquid	Plant extract Crude Saponin	
참선충 입제	Granule	Plant oil Eugenol	
선충뚝 입제	Granule	Plant extract <i>A. Polysaccharide</i>	
네마캐치입제	Granule	Plant oil Nutrient	
네마크린	Granule	Microorganism & Diatomite <i>Steinermema carpocapsae</i>	

- 본 연구팀의 선충 방제용 균주 및 대사물질로써 등록된 성분의 유사성은 없는 것으로 조사됨(표 35).
- 포장 단위에 있어, 액상제는 최소 500mL-2L까지 구성, 내구성이 강한 밀폐형 플라스틱 용기로 구성되고, 30,000원/L의 전후의 가격대를 형성하고 있음.
- 입제의 경우 5-10kg대의 제품 구성을 이루며, kg당 6,500원의 전후의 가격대를 형성함.
- 액상제에 비해 입제의 제품 포장단위가 높은 이유와 저렴한 판매단가는 담채로써 활용되어지는 제올라이트를 비롯한 천연 광물질의 가격이 저렴함에 있음.
- 입제의 포장 중량의 증가는 담채와의 혼입 시 희석되는 살충물질 농도로, 본 연구팀이 추가적인 제형으로 택한 입제의 시험적 제조 비율은 1:10(미생물 추출물 : 담채 W/W)로 희석됨.
- 입제 포장규격의 경우 탈부착이 강하며, 광 투과가 차단되는 필름을 활용한 용기로 구성되며, 내부에 비닐 포장을 덧대어 공기의 노출을 추가적으로 차단함.
- 따라서 제형별 30,000원/L, 6,500원/kg의 전후 가격 수준에서 가격 경쟁력이 좌우됨.
- 제품 정보 및 디자인에서 「친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률」에 따른 허용 가능한 포장재 표기사항은 아래와 같음(표 36).

**표 36. 유기농업자재 제품 정보 표시 법령**

분류	예시	분류	예시
공시 번호	공시 번호	유통기간	제조일로부터 1년
자재의 명칭 및 상표명	제품 명칭	사용방법	1,000배 희석 등
자재의 구분	병해충 자재	제조장 주소	제조장 주소
실중량 또는 실용량	제품 규격	사용상 보관상 주의사항	밀폐용기로 건냉암소 보관하시오
주성분의 종류 및 함량	성분 함량	효능효과평가	효능효과평가 결과
원료의 종류 및 함량	미생물 추출물 100%	시험작물	고추, 당근, 무, 상추, 청경채
제조연월일	포장지 하단 별도 표기	업체명, 사업장주소, 전화번호	내용 기재

- 제품 규격 상 효능효과평가를 미실시할 경우, 대상선충에 대한 직접적인 방제효과가 있다고 언급할 수 없음.
- 또한 제품의 방제가 및 특정 작물 및 특정 해충에 대한 효과가 있다고 언급하는 것을 지양함.
- 따라서 제품 내 선충과 관련된 단어를 조합하여 상품명을 명시, 혹은 제품 디자인 내 관련 이미지를 도식화하여 간접 노출로써, 법적 규제를 우회하고 있음.
- 처리용량 살펴보면 액상제의 경우, L 당 최소 200평 - 300평, 희석배수는 500-4,000배까지 상이함(표 37).
- 현장 조사 결과, 200평 당 5만원 전후의 방제비용이 적정 수준으로 조사, 특정 제품을 제외하고 전반적으로 가격 내 부합되는 것으로 조사됨.

- 제1협동에서 제시한 타사제품 대비 방제효과 측면에서 언급한 자료를 살펴보면 2,000배 희석액에서도 우수한 방제력을 유지함을 확인할 수 있어, 200평 처리 기준 5만원 이하의 판매가를 형성할 경우 가격 경쟁력 확보가 용이할 것으로 판단됨.

**표 37. 선충 방제용 유기농업자재의 현장 적용 방법**

Product	Fomulation	Treatment method
참선충	Liquid	1L 200평 관주
선충애	Liquid	-
선충제로	Liquid	-
선충쌈	Liquid	-
네마큐	Liquid	500mL, 2,000배 관주
네마캐치 액제	Liquid	1L 500-1,000배 관주
네마프리	Liquid	수확기전 10일 간격 1L, 1,000배 관주 4회
대유 선충뚝	Liquid	600평당 2L 희석 관주
참선충 입제	Granule	7.5kg 토양 혼화처리
선충뚝 입제	Granule	토양혼화처리
네마캐치입제	Granule	200-300평/10kg 혼화처리
네마크린	Granule	600평/200g 관주 처리

- 입제의 경우, 제형의 특성 상 토양과 혼화 처리방법이 지배적이며, 200-300평 당 10kg 처리수준으로 조사됨.
- 가격은 200평 처리 시 평균 65,000원의 전후로, 본 연구진들의 분말 입제의 경우, 10배의 희석배율을 고려하여 10kg 전후의 제품 포장단위로 구성될 것으로 예상하였음.
- 제1협동에서 제시한 타사제품 중 입제와 살충물질 10%를 전환한 WiKim0018 균체 배양액 간의 처리 후 6일 경과 시의 방제효율을 대비해 보면 90% 이상 방제가가 향상되었음을 확인할 수 있음.
- 따라서 추가적인 제품 제형인 입제의 경우, 10kg 내의 제품규격으로 65,000원 이하의 제품가격을 형성한다면 시중 토양 혼합배율을 준수하며, 추가적인 가격경쟁력을 확보할 수 있으리라 보임.

## (나) 제품 복제 방안 확립

### ① 연구목적

- 균체 자원에 대한 제품 복제 방어책 확립 및 유사 살충물질 생산 가능 균주의 시장 도입 시기 예측

### ② 재료 및 방법

- 제품 복제 방어 우수 사례집 등 선행 자료 참고
- 생물자원 가운데 본 살충물질을 생성할 수 있는 소재에 관련 연구 및 기술 실시사례 평가 및 유사제품 도출화 가능성 평가

### ③ 결과

#### ㉠ 균주 무단 도용을 통한 제품 카피 방어

- 활용 균주의 무분별한 도용 및 유사균주의 활용에 의한 카피 제품의 출현이 발생할 수 있음에 이를 방어하기 위한 전략을 수립함.
- 유전자원의 상업적 이용 분야에서 지재권의 획득이라는 과정을 거치게 되며, 결국 유전 자원 권리보호는 지재권의 문제와 밀접한 관계를 가지게 됨.
- 반면 유전자원 그 자체는 지식재산이 아니므로, 지식재산시스템에 의한 직접적인 보호는 곤란하나, 간접적으로 유전자원이 타인의 지식재산권으로 등록 될 수 없도록 방어수단으로 활용될 수 있음.
- 이에 제 1 방법으로써, 본 살충물질의 생산 소재 및 활용범위를 포함한 특허를 등록해, 지적 재산권을 확보함.
- 반면 대응제약과 메디톡스간의 동일 균체에 대한 소송사례를 보면, 후속 균체를 발굴한 , 지재권만으로 균주에 대한 권리 보호를 받기에는 여러 변수가 많은 것을 알 수 있음.
- 따라서 균주의 무분별한 도용을 직접적으로 방어하기 위해, 다음과 같은 추가적인 방법을 고려하였음.
- 의학 계열에서는 species 내 다른 strain은 임상실험의 근거 없이 그 효능을 공유할 수 없는 것이 원칙임.
- 이는 species에서 종 유사성을 보일 수 있으나, strain에 따라, 대사물질, 저장성, 효소의 활성도 및 생산력 등에 큰 차이를 보일 수 있기 때문임.
- 반면 국내 통상 국내 종동정은 16S RNA 수준으로 sequence 종동정을 실시하고 유사도를 평가함.
- 이에 균체의 권리보호와 유사 도용 균주의 무단 도용에 대한 동일 균주의 검출기법 강화를 위해, 균주의 기능을 대표하는 특정 스트레인을 마킹하는 방법을 고려할 수 있음.

- 반면 사업기간 및 사업비적 측면으로 특정 기능을 발현하는 스트레인을 검출기법의 도입은 무리가 있음.
- 다음으로 유전자 재조합 균주를 제작하여, 세대 구분에 따라, 균주의 증식을 억제하여 균주의 도용을 방지하는 방법이 있음.
- 이는 출시되는 완제품에 대한 생균을 복제하여 활용하는 부분에 있어 방제기술로써 효과적일 수 있음.
- 반면 출시 제품 규격인 유기농업자재 관련 법령인 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 제3조 1항을 살펴보면 ‘자연 상태의 미생물의 배양 과정이 끝난 후, 화학물질의 첨가나 화학적 제조공정을 거치지 않을 것’이라 명시되어 있음.
- 본 유전자 조작 균주의 활용 시 유기농업자재의 고시를 위해, 안정성을 입증해야 하는 추가 단계가 필요하며, 본 과제의 기간 및 사업적 규모로 볼 때 무리가 있음.
- 따라서 최종 고려되었던 것이, 미생물 추출물로써 제품이 출시되는 부분임.
- 제1협동 과제에서 수행한 본 균주의 토양 정착력이 2개월 내 급격히 사멸 하는 결과를 보여, 토양정착에 의한, 생균 제형의 현장 방제가의 상승은 크게 기대할 수 없을 것으로 사료됨.
- 제품 공시 기관인 친환경 농산물 안정성 센터의 컨설팅 결과 추출물의 대사물질로써 출시 될 경우, 제품 정보 내 균주의 노출 없이, 추출물의 성분으로 등록이 가능함.
- 반면 본 추출물의 경우, 상위 유기농업자재 관련 법령과 동일하게 배양 과정이 끝난 후, 화학물질의 첨가나 화학적 제조공정을 거치지 않으면 등록이 가능함.
- 공정 수립을 위해, 균체 배양 후 회수과정을 도입하여, 균체의 회수율을 평가하였고, 이는 전남친환경농생물연구센터 내 MF 여과기, 관형 원심분리기를 통해 균체를 회수 효율을 평가하였음(그림 92).

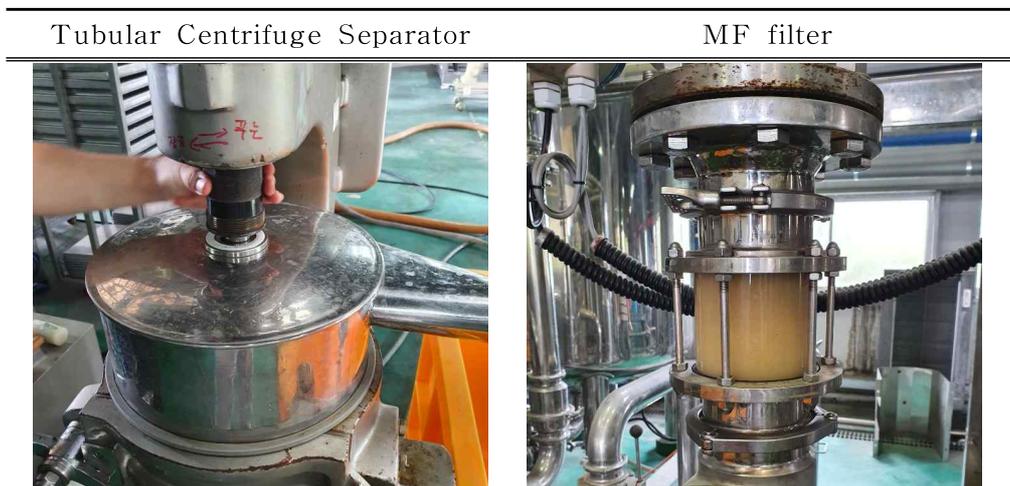


그림 92. 균체 복제 방지를 위한 균체 회수 공정 도입 현황

- 최대 99.0% 이상의 균체를 회수하는 결과를 보였으나 제품 내 균체의 정보를 완전 배제하기 위해 추가적인 균체 사멸 공정을 적용하기로 하였고, 이는 고온 처리를 통한 균체 사멸화를 택함.
- 협력 기관이 제시한 고온 처리 후 미생물 추출물에 있어서도, 균체가 포함된 현탁액 혹은 상등액등과 실험 선충에 대한 살선충 효율이 유사한 결과를 보여, 최종 균체를 사멸한 추출물으로써 제품 복제방안을 수립함.

㉔ 제품 유효성분 등록을 통한 유사제품 출시 방어

- 2021년 12월 2일 기준 농촌진흥청 농약안전정보시스템 내 556건의 생장 조정제 내 살충 물질인 GABA를 유효성분으로 등록한 자재는 확인되지 않음.
- 이에 후속 소재를 활용한 제품화 가능여부를 판단하기 위하여, 특허, 논문, 국책과제에 대한 정량분석을 실시함.

표 38. 살선충 물질 생성 생물자원에 관한 연구개발 분석 범위

검색 DB	국가과학기술정보센터(NDSL)
검색기간	~2022.02
검색범위	제목, 요약
Keyword	1차 : GABA, 가바, $\gamma$ -AminoButyric Acid
	2차 : 생산방법
검색 대상	등록, 공개
검색건수	논문 66,872건, 특허 3,648건, 보고서 482건

- 농업적으로 적용 가능한 GABA 생산과 관련한 유사도 높은 특허는 78건, 논문 82건, 국책 과제 31건으로 조사됨.
- 대표적인 GABA 생성 분야는 미생물 소재의 기여율이 90%이상을 차지하였고, 유산균 중에는 *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* 등 다양한 균들의 발굴이 이루어 지고 있고, 쌀 및 콩, 김치 발효 식품등에서 분리한 유산균이 고농도로 생산하는 것으로 보고됨.
- 개발 분야에 있어 대부분 건강기능식품 소재로 밀집되어 있고, GABA를 생산하는 단일균에 대한 발효식품의 Starter 개념으로 국한, Plant 규모의 순수 배양기술의 제시가 미흡하고, 단일균 순수 배양 기준으로 95% 이상이 TRL 7단계 미만의 기술 성숙도를 보임.
- 이에 본 연구팀의 살선충 물질인 GABA를 선충 제어 물질로써 채택하여 제품화 한 진보적 가치는 획득할 수 있겠으나, 이를 생산할 수 있는 소재는 대체 가능한 상황임에 따라 유사 제품의 출시가 예상될 수 있음.
- 본 연구팀은 살충소재의 등록 성분에 있어, 주요 물질인 GABA를 우회한 wikim0118 균체의 대사물질 중 해충을 방제하는 것으로 알려진 물질을 제품 등록 성분으로 하여 제품화를 진행해, GABA를 활용한 후속 및 유사제품의 출시를 방어하도록 전략화 하였음.

## (2) 액상 제형화 실험

### (가) 안정제 선발

#### ① 연구목적

- 미생물추출물의 가스 발생 등 변형 방지를 위한 안정제 선발

#### ② 재료 및 방법

##### ㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : *L. sakei* wikim0118(세계김치연구소) 배양 추출물
- 안정제 : Sodium benzoate, Potassium sorbate, sodium propionate, potassium sorbic acid, Ethyl p-Hydroxybenzoate

##### ㉡ 시험방법

- 100mL 삼각플라스크에 80 mL의 미생물 추출물을 넣고, 파라필름으로 밀봉함.
- 30°C로 셋팅된 미생물 배양기에 정치 한 후 7일간 보관함.
- 7일 후 안정제별 가스 발생 여부를 조사함.

##### ㉢ 조사내용

- 파라필름의 부분 정도에 따른 달관 조사

#### ③ 결과

- sodium benzoate 처리구에서 가장 우수한 억제력을 보였으며, 3% 이상 처리하였을 때 팽창이 확인되지 않아, 동일 농도 대비 가장 우수한 sodium benzoate를 안정제로 선발함(표 39).

표 39. 안정제 종류별 제형의 팽창에 의한 변형

함량 (%)	팽창률 <sup>1)</sup>					
	Sodium benzoate	Potassium sorbate	Potassium sorbic acid	Sodium propionate	Ethyl p-Hydroxy benzoate	Control
0.5	++	++	++	++	++	++
1.0	+	++	++	++	++	++
3.0	-	-	++	++	++	++
5.0	-	-	-	-	-	++

\* 1) 팽창률 : 강함(++), 약함(+), 없음(-)

#### ④ 결론

- 선충 방제용 미생물 추출물의 안정제로써 sodium benzoate를 선발함(표 39).

## (나) 동결방지제

### ① 연구목적

- 액제 제형의 저온노출에 의한 동결방지용 자재 선발

### ② 재료 및 방법

#### ㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : *L. sakei* wikim0118(세계김치연구소) 배양 추출물
- 동결방지제 : Ethylene glycol, propylene glycol

#### ㉡ 시험방법

- 미생물 배양액과 동결방지제를 1%, 3%, 4%, 5%, 8% 및 10% 씩 각각 혼합함.
- 동결방지제와 혼합한 미생물배양액을 -4℃와 -10℃에 처리함.
- 4시간정도 보관 한 후 동결방지제 효과를 조사함.

#### ㉢ 조사내용

- 미생물배양액의 동결여부를 달관 조사함.

### ③ 결과

- Ethylene glycol과 propylene glycol은 -4℃에서 동결방지효과를 나타내는 최소 함량은 각 1%와 4%로 조사되었음(표 40).
- 반면 -10℃에서는 Ethylene glycol은 3%일 때 동결방지효과가 도출되었으나, propylene glycol은 8%에 동결을 방지하는 것으로 나타남(표 40).
- 이들 결과를 종합할 때, 동결 방지효과가 가장 우수한 Ethylene glycol을 선발하였고, 적정 사용량은 3%로 결정하였음(표 40).

표 40. 안정제 종류별 제형의 팽창에 의한 변형

동결방지제	온도(℃)	동결방지제 함량(%) <sup>1)</sup>					
		1	3	4	5	8	10
Ethylene glycol	-4	×	×	×	×	×	×
	-10	○	×	×	×	×	×
Propylene glycol	-4	○	○	×	×	×	×
	-10	○	○	○	○	×	×

\* <sup>1)</sup> ○ : 동결, × : 비동결

④ 결론

- 선충 방제용 미생물 추출물의 동결방지제로써 Ethylene glycol을 선발하였고, 적정 사용량은 3%로 결정하였음.

(다) 계면활성제

① 연구목적

- 선충 방제용 미생물추출물의 물리 화학적 특성을 개선하기 위한 계면활성제의 선발

② 재료 및 방법

㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : *L. sakei* wikim0118(세계김치연구소) 배양 추출물
- 계면활성제 : 비이온계면활성제(Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80)

㉡ 시험방법

- 농촌진흥청에서 공고한 제2016년 153 농약의 검사방법 및 부정불량 농약 처리요령 중, 농약의 검사항목별 검사방법(물리성 검사방법)에 의하여 실시함.
- 수화성 : 50 mL의 코니칼튜브에 20℃의 배양 추출물 15 mL를 넣고 여기에 계면활성제를 농도별 표면상의 약 10 cm의 위치에서 얇게 퍼지도록 조용히 떨어뜨려 초자봉으로 교반하여 현탁의 균일성 여부를 관찰함.

③ 결과

- 계면활성제로서 Tween 80이 3% 함량에서 가장 우수한 수화 및 현탁성을 보임(표 41).

표 41. 계면활성제 종류별 수화성 평가

구분	계면활성제 농도(%)					구분	계면활성제 농도(%)				
	1	3	5	7	10		1	3	5	7	10
Tween 20						Tween 40					
Tween 60						Tween 80					

#### ④ 결론

- 선충 방제용 미생물 추출물의 계면활성제는 Tween 80으로 선발하였고, 적정 사용량은 3%로 판단됨(표 41).

### (3) 입제 제형화 실험

#### ① 연구목적

- 입제와 미생물 조성물 간의 최적 배합비 산출

#### ② 재료 및 방법

##### ㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : *L. sakei* wikim0118(세계김치연구소) 배양액
- 주요 원료 : 상위 배양액, 천연 제올라이트(한두교역), talc power

##### ㉡ 시험방법 및 조사내용

###### ▣ 제올라이트 분석 적합성 평가

- 원료들간의 혼합비를 달리하여, 혼합하였고, 이중 수분함량이 가장 적으며, 배양물의 혼입량이 가장 높은 시험구를 대상으로 한 제올라이트 분석 적합성 평가(CEC, 분말도, 수분)를 공인기관인 비토분석센터(주)를 통해 진행함.
- CEC( $\text{cmol}^+/\text{kg}$ ) : 공정 규격 80이상
- 분말도(%) : 공정규격 850 $\mu\text{m}$ 체에 90% 이상 통과
- 수분(%) : 포장물은 12% 이하

###### ▣ 중동정 및 균체 밀도

- 원료들간의 혼합비를 달리하여, 혼합하였고, 이중 수분함량이 가장 적으며, 배양물의 혼입량이 가장 높은 시험구를 대상으로 한 *L. sakei* wikim 0118 균주 중동정 및 밀도 분석을 공인분석 기관인 친환경농산물 안전성센터를 통해 진행함.
- 16s rRNA 염기서열 분석 결과를 바탕으로 한 중 동정
- 평판희석법을 통한 우점 균체의 개체 밀도

#### ③ 실험 결과

##### ▣ 제올라이트 분석 적합성 평가

- 최적 혼합이 완료된 제올라이트 제형은 CEC 공정규격 80 이상에 대해 91.74로, 14.7% 초과 달성하였음(그림 93).
- 또한 분말도 분포에 있어, 850 $\mu\text{m}$ 체에 95.51%가 통과하여, 공정규격 대비 6.12% 초과 달성

하였음(그림 93).

- 함유 수분에 있어, 7.2%로 공정규격의 함유 수분 12 이하 대비 40% 초과 달성하였음(그림 93).

제올라이트 분석 적합성 평가 결과 *L. sakei* 종동정 및 균체 밀도 평가 결과

(민생연방·농촌진흥청 미생시험연구원 제403호 & 국립농산물품질관리원 유기농업자재시험연구원 제47호)

**Vito** 비토분석센터(주) 시험 책임자 전유민, 김대환  
시험 담당자 전유민, 김대환

### 분석 성적서

의뢰인	상 호	(주)마이크로자임		사업자등록번호	409-86-19995
	주 소	전라남도 담양군 담양읍 태봉로 97, 25층 (본관)			
접수일자	2021. 6. 23	용 도	유기농업자재육육공시		
접수번호	2021-06-82016	시 료 명	제올라이트		

분석(시험)성적 결과 :

분석항목(단위)	공정규격	분석결과
그 밖의 규격	CBC(cmol/kg)	80이상 91.74
	분말도(%)	850μm이하 90%이상 통과 95.51
	수분(%)	포장물은 12이하 7.20

귀하가 당사에 의뢰한 시료에 대한 분석 성적입니다.  
2021년 6월 25일  
**비토분석센터 주식회사**

이 성적은 신청인이 제출한 시료를 분석한 것으로 관련사항 이외의 선전, 소송 등 증거자료로 사용하실 수 없습니다.  
주소: 경기도 안산시 단원구 지원로107, 시화저서산업센터205호 TEL:(031)364-8181, FAX:(031) 364-8185

제 EFAP-21-0779-M-1호

### 미생물제제 분석 성적서

위탁자	① 성 명 (법인명)	㈜마이크로자임	② 주민등록번호 (법인등록번호)	409-86-19995
공시품	③ 주 소	전라남도 담양군 담양읍 태봉로 97		
	④ 성 상	고상		
	⑤ 상표명 (유효미생물)	네이타더 플드 ( <i>Lactobacillus sakei</i> )		
	⑥ 제조회사	㈜마이크로자임		
	⑦ 검사방법	미생물균수측정 : 희석 평판법 (Standard plate count)		
	⑧ 용 도	등축/인중용		
분석 항목	유효균수	분석회수	분석치 [cfu/mL(g)]	
		1	7.5 × 10 <sup>7</sup>	
		2	7.1 × 10 <sup>7</sup>	
		3	7.4 × 10 <sup>7</sup>	
		평 균	7.3 × 10 <sup>7</sup>	
	표준편차	2.1 × 10 <sup>6</sup>		
	불 리 상	-		

1) 본 성적서는 농촌진흥청 「미생물규격설정 및 지정 별표 3」 및 국립농산물품질관리원 「유기농업자재 공시 기준 별표 5」의 규정에 의한 시험성적서임.  
2) 본 성적서는 시료를 3번씩 분석한 후의 결과 값임.  
3) 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로서 신뢰성 등에 대한 보증은 보증하지는 않음.  
4) 본 성적서의 결과는 평균, 최대, 최소 및 소용량 시험 수단으로 사용하실 수 없음.  
시 험 채 일 자 2021년 8월 2일 최 은 화

강원대학교 산학협력단  
친환경농산물안전성센터

그림 93. 입제 제형화 실험 별 공인시험 분석 결과

□ *L. sakei* 종동정 및 균체 밀도

- 최적 선발 입제의 우점균은 *Lactobacillus sakei*로 동정되었으며, 유효 균수는 평균 7.3×10<sup>7</sup> Cfu/mL로 분석되었음(그림 93).

④ 결론

- 최적 선발된 입제와 미생물 및 talc power와의 최적 배합비를 통해 제작된 시료에 대한 제올라이트 분석 적합성 평가 시 기준점을 상외한 결과를 도출하였고, 균체의 동정 결과 *Lactobacillus sakei*로 균체 밀도는 7.3×10<sup>7</sup> Cfu/mL의 최적 입제 제형화 결과를 도출함(그림 93).

#### (4) 제형의 안전성 평가

##### ① 연구목적

- 도출된 제형에 대한 포장 안전성 평가

##### ② 재료 및 방법

###### ㉠ 공시재료

- 액상 제형물 : 규격 용기를 달리한 미생물 추출물 포장 원료
- 분말 제형물

###### ㉡ 시험방법

- 가혹경시를 적용한 저장 안전성 평가

###### ㉢ 조사내용

- 온도, 충격에 의한 포장 원료의 최종 안정성 평가
- pH 및 미생물 오염 등 제형물의 최종 안정성 평가

##### ③ 실험 결과

###### ㉠ 성상 안전성 평가

- 도출한 시제품을 대상으로, 30일간의 시간의 경과에 따른 층분리, 현탁도 등의 육안을 통해 유화 안전성을 평가하였고, 물성의 변화를 평가 하기 위해, pH 변화를 모니터링함.
- 30일간 도출된 시제품의 층분리는 관찰되지 않았고, 수직적 균일한 현탁도를 보임(그림 94).
- 물성 변화에 있어, 전기전도도 및 pH 등 물성 변화에서도 큰 변화가 없어, 측정 대상 제형은 시간에 따라 높은 안정도를 보이고 있음을 확인할 수 있음(그림 94).

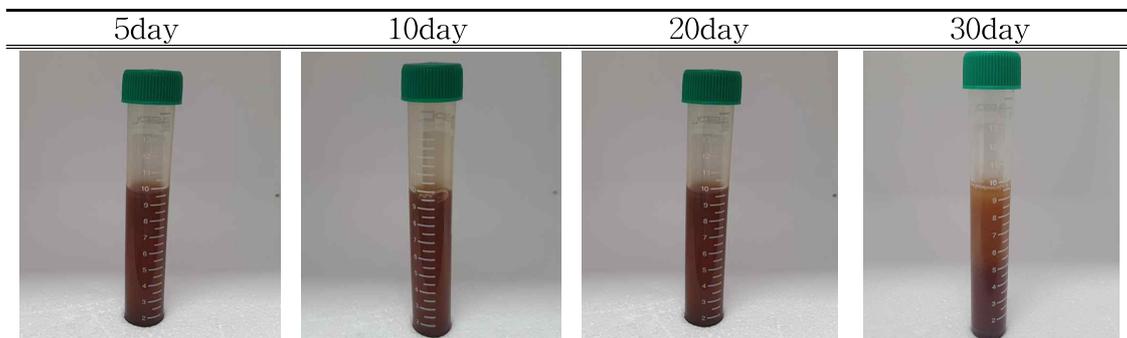


그림 94. 시간에 따른 제형의 성상 안전성 평가

㉞ 미생물 오염 분석

- 한달간 실온 보관 한 제형을 일정량 취하여, TSB agar(Difco), LB agar(Difco) 등 고체 배지에 도말하여, 미생물에 의한 오염 여부를 확인하였고, 검출되는 균집수를 계수하여, 균체 오염도를 수치화 함.
- 분석 결과 세균에 대하여 불검출로써, 세균에 대한 오염 안전성을 확보함(그림 95).



그림 95. 제형에 대한 미생물 오염 평가

㉞ 용기 적용에 의한 내용물의 보관 안전성 평가 1차

- 시제품의 적용을 위해, 포장의 증발 및 누수등의 손실을 억제하고, 보관의 안전성을 확보하고자 용기에 고주파 실링포장을 실시하였고, 호완되는 스크류캡을 결합하여, 1차 포장을 완료하였음.
- 이에 대한 장기간의 보관 결과, 액상 내부에서 가스가 지속적으로 발생하였고, 최종 고주파 실링 포장이 부품현상과 동반하여, 개봉 시 가스 방출로 인한 소음과 함께 터짐 현상이 동반하거나, 실링포장의 내수성을 초과할 경우, 누액이 지속 발견되었음(그림 96).



그림 96. 보관 안전성 평가 1차

- 원인으로 일부 균질화 되어 있지 않은 액상 원료 제형의 전구물질 잔여물이 존재하였고, 액상제형의 생산 과정에서 80℃ 균체 사멸 조건에도 불구하고, GAD 효소의 소멸이 완전히

이루어지지 않아, 효소의 연속반응에 따른 결과로 보여짐.(그림 97).

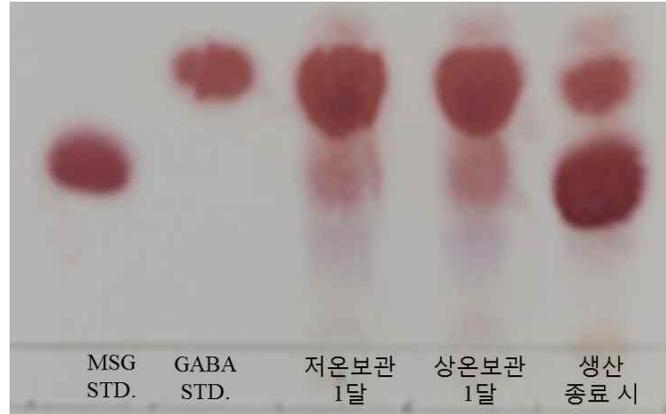
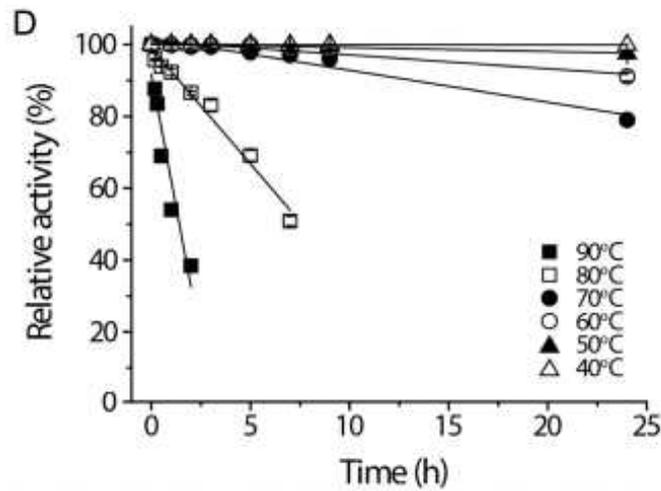


그림 97. 균체 사멸 이후 완성 원료의 효소 반응의 연속성

○ 선행 연구에서 보고되는 바와 같이 GAD 효소는 90°C의 고온 환경에서도 활성도가 40%에 육박 할 수준으로 열에 안전성이 높고 이에 따라 잔류성 전구물질과의 반응의 사유로써 최종 판단됨(Lee et al., 2015).



\*출처 : Lee et al., 2015

그림 98. GAD 효소의 열에 대한 활성 안정도

○ 최종 고주파 실링 및 스크류캡을 적용한 포장 상태에서 29.9%인 304.6mL의 손실량이 발생함에 따라, 포장 용기에서 활용을 제외하도록 함(표 41).

표 42. 1차 포장 용기에 대한 내구성 평가

반복	최초 무게(g)	최종 무게(g)	누액(g)	누액(%)
1	1010.2	783.4	226.8	22.5
2	1032.5	799.4	233.1	22.6
3	1018.2	564.3	453.9	44.6
평균	1020.3	715.7	304.6	29.9

- ㉔ 용기 적용에 의한 내용물의 보관 안전성 평가 2차
- 이와 같은 가스 발생에 의한 누액 부분을 해결하기 위해, 추가적으로 발생하는 반응 gas 만을 선택적으로 방출할 수 있는 gas 방출 캡을 포장으로 적용함(그림 98).
- 추가적으로 가스의 유출이 원활할 수 있도록 용기 내 고주파 실링 적용을 배제하였음.
- gas 방출 캡 적용 결과 용기의 개봉 시 발생하는 소음 및 누액부분은 크게 개선되었으나, 포장 용기 상단부의 가스 방출부에서 누액이 지속적으로 발생하였음(그림 98, 표 43).



그림 98. 보관 안전성 평가 2차

표 43. 2차 포장 용기에 대한 내구성 평가

반복	최초 무게(g)	최종 무게(g)	누액(g)	누액(%)
1	1021.3	978.5	42.8	4.2
2	1013.1	956.4	56.7	5.6
3	1005.2	997.2	8.0	0.8
평균	1020.3	715.7	35.8	3.5

- ㉕ 용기 적용에 의한 내용물의 보관 안전성 평가 3차
- 용기를 교차 적용하여, 누액부분을 방지하고자 하였으나, 이는 불가하여, 최종 액상 제형 의 내 가스 발생 유발물질인 전구물질 전량 소진 확인을 우선시함(그림 99).
- 또한 포장된 액상 원료의 효소반응을 억제하기 위해, 액상 원료의 공정 내 최종 pH를 8 로 조절하여, 효소반응을 추가로 억제시켰음.
- 온도에 의한 누액의 증발 등을 배제하기 위해, 평가 1차와 동일한 고주파 실링캡을 적용 한 스크류캡 용기로 포장을 변경하였음(그림 100).

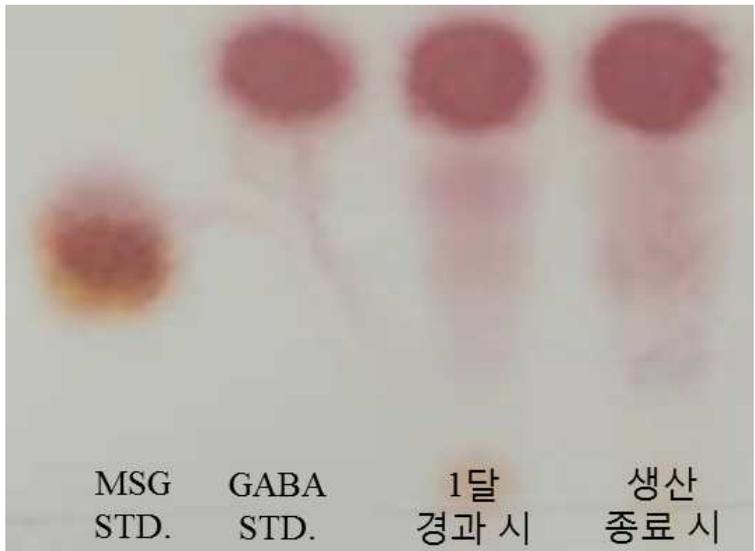


그림 99. 전구물질의 전량 소진 및 효소 억제 반응



그림 100. 보관 안전성 평가 3차 결과

○ 1달간의 최종 평가 결과, 1차 평가와 달리 액상제형에 대한 보관 시 가스발생 및 누액의 현상은 관찰되지 않았고, 최종 99.9% 이상 제품을 보존함을 확인하였음(그림 100, 표 44).

표 44. 3차 포장 용기에 대한 내구성 평가

반복	최초 무게(g)	최종 무게(g)	증발량(g)	증발량(%)
1	1050.4	1048.9	1.5	0.14
2	1027.2	1025.7	1.5	0.15
3	1033.3	1033.1	0.2	0.02
평균	1037.0	1035.9	1.1	0.10

㉞ 분말제형의 균체 방출 조절 능력 평가

- 최초 완성된 입제의 시료를 살균증류수에 현탁한 후 희석하여, *Lactobacillus sakei* 측정용 배지(MRS broth, difco)에 접종하고, 30°C로 항온기에서 3일간 배양 후 대표적 콜로니를 계수하며, 시간의 경과에 따른 균체의 밀도 변화를 측정하며, 균체 방출 조절 능력을 평가함.
- 양성 대조구로 액상 배양액을 기준으로 하였고, 모든 시료를 실온 환경 아래 저장하였음.
- 시간에 따른 평가 결과 최초, 대조구인 액상 제형은 평균  $2.2 \times 10^9$  Cfu/mL로 분말 제형 대비 높은 균체 수율을 보이나, 실험 종료인 35일 경과 후 평균  $3.2 \times 10^2$  Cfu/mL로 현격하게 균체수율이 감소 됨.
- 반면, 분말제형은 고체담체와의 혼합에 따라, 희석되어 균체수율은  $3.5 \times 10^8$  Cfu/g 로 다소 낮은 균체수율을 보이나, 시간의 경과에 따라 높은 보존성을 보이며, 최종 35일 경과 시  $2.5 \times 10^8$  Cfu/g으로 액상제제와 비교 시 785,340배 이상의 높은 균체 보존성을 보임(그림 101).

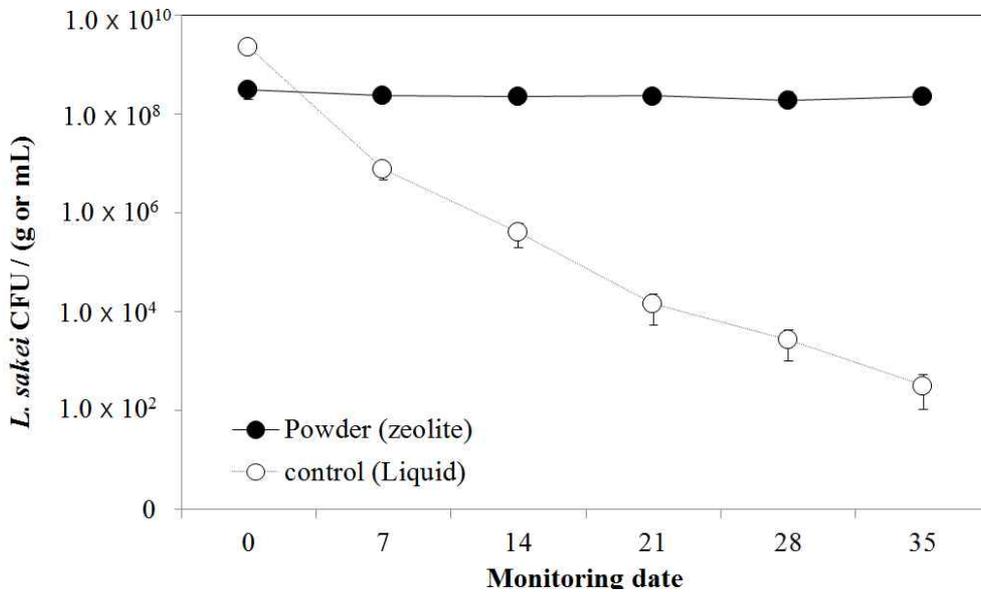


그림 101. 분말제형의 균체 서방출력 평가

④ 결론

- 액상제형의 경우, 1달간의 가혹시험결과, 제형의 정상 안전 및 안정성을 확보하였고, 포장용기에 대한 내구성 평가 결과 이를 만족하였음.
- 분말제형은 한달간의 균체 보존능력에 있어, 액상제제 대비 매우 우수한 결과를 보이며, 각 시기 별 현탁액을 제조한 균체 밀도 분석 결과 정상적인 균체의 용출성을 확인하여, 최종 우수한 균체 방출 조절 능력을 확보함.

## (5) 시제품 제작

### ① 연구목적

- 도출된 제형에 대한 최종 시제품 제작 및 경제성 분석

### ② 재료 및 방법

#### ㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : *L. sakei* wikim0118(세계김치연구소) 배양액 및 배양액 추출물
- 액상 제형 주요 원료 : Benzoate, Ethylene glycol, Tween 80
- 분말 제형 주요 원료 : 고체 담체(Zeolite), 수분흡착제(Talc powder)

표 45. 제형별 배합 비율

구 분		액상제(Liquid type)	서방출자제(Granule Type)
주요 물질	<i>L. sakei</i> wikim0118 extract or broth	91.0%	8.3%
안정제	Sodium benzoate	3.0%	0.3%
동결방지제	Ethylene glycol	3.0%	0.3%
계면활성제	Tween 80	3.0%	0.3%
고체담체	Zeolite		81.8%
증량제	Talc powder		9.1%
합 계		100.0%	100.0%

#### ㉡ 조사내용

- 토양 관주 및 객토용 목적별 시제품 제작
- 경제성 평가 : 배합비율별 원가 산정

#### ㉢ 시험방법

- 가혹경시를 적용한 저장 안전성 평가

#### ㉣ 조사내용

- 온도, 충격에 의한 포장 원료의 최종 안정성 평가
- pH 및 미생물 오염 등 제형물의 최종 안정성 평가

액상제(Liquid type)

서방출자제(Granule Type)

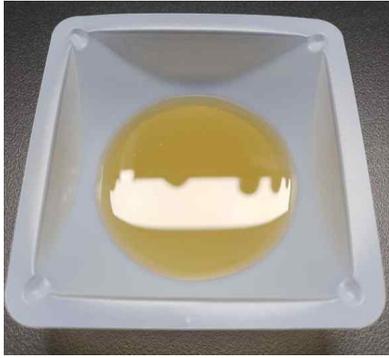


그림 102. 시제품의 제형별 도출 사진

③ 실험 결과

○ 액상제의 생산원가는 3,868원/kg, 서방출자제는 881.2원/kg으로 생산 원가가 조사됨(표 45).

표 46. 제형별 경제성 분석

구 분		단가1)	액상제(L)		서방출자제(kg)	
			투입비율	생산원가	투입비율	생산원가
주요 물질	<i>L. sakei</i> wikim0118 extract or broth	4,000	91.0%	3,640	8.3%	332
안정제	Sodium benzoate	5,000	3.0%	150	0.3%	15
동결방지제	Ethylene glycol	1,300	3.0%	39	0.3%	3.9
계면활성제	Tween 80	1,300	3.0%	39	0.3%	3.9
고체담체	Zeolite	470	-	-	81.8%	384.5
증량제	Talc powder	1,560	-	-	9.1%	142.0
합 계		-	100.0%	3,868	100.0%	881.2

④ 결론

○ 액상제의 생산원가는 3,868원/kg, 서방출자제는 881.2원/kg으로 5kg으로 구성 시 4,406원 /5kg의 생산 원가가 조사됨(표 46).

○ 유사제품의 포장 단위에 있어, 액상제는 최소 500mL부터 2L까지 구성되며, 30,000원/L의 가격대를 형성하고 있고, 입제의 경우 5-10kg 대의 제품구성으로 kg당 6,500원의 가격대를 형성하고 있음.

○ 본 생산 단가 조사 시 액제 및 입제 모두 상용제품과 비교하여 가격경쟁력이 충분함을 확인함(표 46).

## 다. 최종 제품 시험

### (1) 생물검정 실험

#### (가) 미생물 제형을 적용한 작물 Pot 재배 실험

##### ① 연구목적

- 도출 제형에 대한 뿌리혹선충에 대한 방제가 및 유사제품과의 방제능 비교

##### ② 재료 및 방법

###### ㉠ 공시재료

- 공시미생물 : *L. sakei* wikim0118 배양 추출물과 이를 적용한 분말담채
- 양성대조구 : 뿌리혹선충 방제용 타회사 농약 4종, 유기농업자재 1종
- 공시작물 : 토마토 유묘(*S. lycopersicum* var. *cerasiforme*), 당근 유묘(*D. carota* subsp. *sativus*)
- 공시토양 : 원예용 상토
- 공시비료 : 유기질비료(혼합유박비료, 질소-인산-칼리=4-2-1)
- 인위감염 : 50마리/ml 농도의 현탁액 100mL

###### ㉡ 시험방법

- 재배이력 1차: 시비(20. 8. 15), 정식(20. 8. 20), 감염(20. 08. 30), 종료(20. 11. 30)
- 재배이력 2차: 시비(21. 4. 17), 정식(21. 4. 22), 감염(21. 04. 30), 종료(21. 07. 30),
- 처리구 면적 및 배치: 4 inch 육묘용 포트, 완전임의배치법(3반복)
- 처리구 설정

표 47. 처리구 설정 방법

처리구	비료시비량(kg/10a)	약제 처리량	선충 감염량
무처리	250	-	5,000마리/100mL
타제품 A	250	4,000배 희석액 1,320L/10a	5,000마리/100mL
타제품 B	250	4,000배 희석액 1,320L/10a	5,000마리/100mL
타제품 C	250	6kg/10a	5,000마리/100mL
타제품 D	250	6kg/10a	5,000마리/100mL
타제품 E	250	500배 희석액 500L/10a	5,000마리/100mL
시험구 액제	250	500배 희석액 500L/10a×3회 처리	5,000마리/100mL
시험구 입제	250	15kg/10a	5,000마리/100mL

㉔ 뿌리혹선충 개수 방법

- 실험 최종 뿌리를 1cm 간격으로 잘게 잘라서, 200ml의 1% NaOCL 용액이 들어 있는 믹서기에 넣고 고속으로 1분간 회전시킴(Kim and Lee, 2008).
- 믹서기 내의 뿌리찌꺼기, 부유물은 공극별 mesh로 걸러서 부유물과 식물조직 및 뿌리혹선충을 분리하여, 현미경 상에서 개수하였음(표 48).
- 또한 실험 종료 후 최종 상토 중 100g을 계량칼대기법(kaya and stock, 1997)으로 선충의 밀도를 조사하였음(표 48).

**표 48. 뿌리혹선충 분리 방법**

구분	토양 내 선충	뿌리 내 선충
계량 칼대기법	토양 내 토양 선충 분리	-
10 - 20mesh	-	고형물 제거
30 - 40mesh	-	성충 스크리닝
325 mesh	-	유충 선충 스크리닝
500 mesh	알, 선충 스크리닝	알, 선충 스크리닝

㉕ 조사내용 및 통계분석

- 장물 생육 조사 내용 : 지상부 및 지하부 길이 및 무게
- 선충 피해 조사 내용 : 뿌리혹 수, 뿌리 및 토양 내 선충의 밀도
- 통계분석 : 처리구의 평균 비교는 SPSS ver 1.5을 이용하여 던컨다중검정을 통해 처리구 간 유의차를 검정함.

③ 실험 결과

㉖ 토마토 유묘 적용 결과

▣ 작물 생육 조사 내용

- 무처리구 대비, 양성 대조구와 본 제제 처리에 따라 지상부의 길이 및 지하부인 뿌리의 무게가 증가하였음(표 49).
- 대조구(타사제품) 지상부의 길이는 35.8-47.6cm 분포인 반면, 시험구의 액제는 48.9cm으로 최대 36.6% 최소 2.7%의 증가가 확인됨(표 49).
- 양성 대조구(타사제품) 지하부(뿌리)의 무게는 2.3-2.9g 분포였으나, 시험구 액제는 2.9로 최대 26.1%의 증가가 확인됨(표 49).
- 액제는 타사제품 대비 우수하거나 동등한 효율을 보이나, 액제 형태가 지상부 길이에서 4.7%, 지하부(뿌리)의 무게에서 3.6%의 개선된 결과를 보임(표 49).

○ 상기 결과를 종합할 때, 타사제품 및 본제제의 처리는 생육 장애현상을 나타내지 않음을 확인할 수 있고(그림 103), 미생물 처리구에서 타제품 대비 동등 이상의 생육 개선 효과가 있음을 확인할 수 있음.

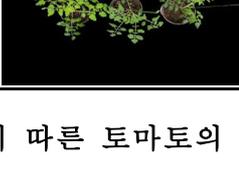
구분	정식 후		실험 종료 후	
	Front view	Top view	Front view	Top view
무처리구				
타제품 A				
타제품 B				
타제품 C				
타제품 D				
타제품 E				
시험구 액제				
시험구 입제				

그림 103. 시험약제 처리에 따른 토마토의 생육, (좌) 정식 후, (우) 수확 전

표 49. 실험 미생물 약제 및 타제품 처리에 따른 토마토의 생육 및 선충 피해

Characteristics Sample	Crop Growth		Nematode damage		
	Above ground Plant	Root weight	Root Knot	Nematodes in soil	Nematodes in Root
	(cm)	(g)	(ea/root)	(ea/soil[g])	(ea/root)
Control (A) <sup>1)</sup>	35.4 <sup>B, E-H</sup>	2.1 <sup>B, D-H</sup>	130.7	25.7 <sup>B-D, GH</sup>	678.0 <sup>GH</sup>
Other product 1 (B)	35.8 <sup>EG</sup>	2.4 <sup>D-H</sup>	97.0	13.5 <sup>ACDGH</sup>	462.7 <sup>GH</sup>
Other product 2 (C)	39.9 <sup>B, E-H</sup>	2.5 <sup>AB, D-H</sup>	99.3	10.7 <sup>ABDGH</sup>	440.7 <sup>GH</sup>
Other product 3 (D)	38.3 <sup>B, E-H</sup>	2.3 <sup>B, E-H</sup>	94.7	9.6 <sup>A-C, GH</sup>	422.3 <sup>GH</sup>
Other product 4 (E)	47.6 <sup>BGH</sup>	2.9 <sup>A-D, F-H</sup>	70.3	7.8 <sup>A-D, GH</sup>	355.3 <sup>GH</sup>
Other product 5 (F)	41.9 <sup>B, E-H</sup>	2.8 <sup>B, D-H</sup>	50.0	9.6 <sup>A-D, GH</sup>	507.3 <sup>GH</sup>
Liquid Type (G)	48.9 <sup>BEH</sup>	2.9 <sup>B, D-F, H</sup>	23.3	2.9 <sup>A-D, H</sup>	178.3 <sup>H</sup>
Granule Type (H)	46.7 <sup>BEH</sup>	2.8 <sup>A-G</sup>	29.3	5.3 <sup>A-D, G</sup>	247.3 <sup>G</sup>

<sup>1)</sup> Each group of results

\* Mean with different letter in a column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple test.

□ 선충 피해

○ 무처리구와 비교할 때, 대조구와 본 제제 처리에 따라 뿌리혹수, 토양선충 및 뿌리 내 선충 밀도가 저감됨을 확인할 수 있음(표 49).

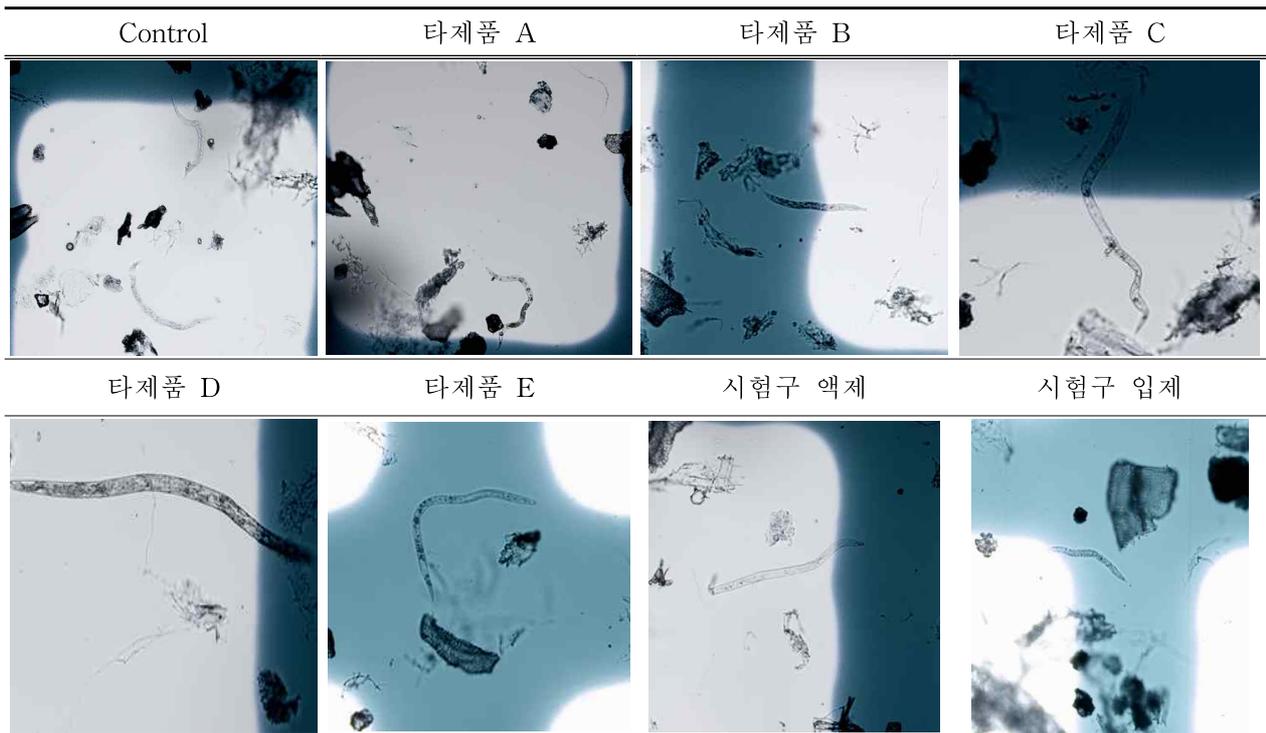


그림 104. 시험약제 처리에 따른 토마토 뿌리 내 선충 밀도 관찰 현황



그림 105. 시험약제 처리에 따른 토마토 뿌리 수거 현황

- 또한 본 시험구인 액제는 뿌리혹수가 평균 23.3개, 토양 선충밀도가 2.9마리/g, 뿌리 내 선충 밀도가 178.3마리로 선충에 대한 피해가 가장 완화된 결과를 보였음(표 49).
- 이어서 서방출형 입제의 선충에 대한 피해 수준이 완화된 결과로, 뿌리혹수 29.3개, 토양 선충밀도 5.3마리/g, 뿌리 내 선충 밀도 247.3마리의 분포를 보임(표 49).
- 액제 처리구는 대조구 대비 뿌리혹수 82.2%, 토양선충 밀도 88.7%, 뿌리 내 선충 밀도 73.7%의 개선효과를 보여, 최소 73.7% 이상의 방제가를 보임을 확인할 수 있음(표 49).
- 본 가장 우수한 결과를 도출한 액제와 타제품과의 방제효과를 비교함.
- 양성 대조구(타사제품) 뿌리혹 수는 50.0-97.0개 분포인 반면, 시험구는 23.3개로 최대 76.0%, 최소 53.4%의 대조구 결과 대비 개선된 효과를 도출함(표 49).
- 양성 대조구(타사제품)의 토양 내 선충 밀도는 9.6-13.5마리/g 밀도를 보이며, 시험구는 2.9마리/g 밀도로 최대 78.5%, 최소 69.8%의 대조구 결과 대비 개선된 효과를 도출함(표 49).
- 토양 내 선충 밀도는 대조구에서 355-507.3마리가 검출된 반면, 시험구는 178.3마리로 대조구 결과 대비 최대 64.9%, 최소 49.8%의 개선된 효과를 제시함(표 49).
- 상기 결과를 종합할 때, 타사제품 및 본제제의 처리는 타사제품 대비 개선된 방제효율을 나타내었고, 입제 단독 처리구에서는 액제에 비해 소폭 방제효과가 떨어지는 결과를 보이나, 상용제품 대비 우수한 방제 결과를 도출함.

#### ㉔ 당근 유묘 적용 결과

##### □ 작물 생육 조사 내용

- 무처리구와 비교할 때, 대조구와 본 제제 처리에 따라 지상부의 길이 및 지하부인 뿌리의 무게가 증가하였음(표 50).
- 양성 대조구(타사제품) 지상부의 길이는 28.1-30.4cm 분포인 반면, 시험구의 액제는 33.2cm로 최대 15.4%, 최소 8.4%의 증가가 확인됨(표 50).
- 양성 대조구(타사제품) 지하부(뿌리)의 무게는 5.5-6.1g 분포였으나, 시험구 액제는 6.4g으로 최대 14.1%, 최소 4.7%의 증가가 확인됨(표 50).

- 입제 또한 지상부 길이 31.0cm, 지하부(뿌리)의 무게 6.2g으로 양성 대조구(타사제품) 대비 우수한 결과를 보임(표 50).
- 상기 결과를 종합할 때, 타사제품 및 본 제제의 처리는 생육 장애 현상을 나타내지 않음을 확인할 수 있고 (그림 106), 미생물 처리구, 특히 액제에서 타제품 대비 우수한 생육 개선 효과가 있음을 확인할 수 있음.

표 50. 실험 미생물 약제 및 타제품 처리에 따른 당근의 생육 및 선충 피해

Characteristics	Crop Growth		Nematode damage		
	Above ground Plant	Root weight	Root Knot	Nematodes in soil	Nematodes in Root
	(cm)	(g)	(ea/root)	(ea/soil[g])	(ea/root)
Control (A) <sup>1)</sup>	23.3	4.7 <sup>C-E, GH</sup>	80.0	31.3 <sup>DEG</sup>	504.7 <sup>E</sup>
Other product 1 (B)	28.1	5.6	57.0	21.0 <sup>DEG</sup>	331.7 <sup>E</sup>
Other product 2 (C)	30.3	5.8 <sup>AB</sup>	33.7	6.3 <sup>DEG</sup>	65.7 <sup>E</sup>
Other product 3 (D)	29.7	5.5	49.3	10.7 <sup>EG</sup>	177.0 <sup>E</sup>
Other product 4 (E)	28.6 <sup>A-D</sup>	6.1	61.0	15.7 <sup>DG</sup>	178.7
Other product 5 (F)	30.4	5.5	56.7	17.3 <sup>DEG</sup>	285.3 <sup>E</sup>
Liquid Type (G)	33.2	6.4	24.3	3.7 <sup>DE</sup>	28.0 <sup>E</sup>
Granule Type (H)	31.0	6.2	41.3	5.0 <sup>DEG</sup>	79.7 <sup>E</sup>

<sup>1)</sup> Each group of results

\* Mean with different letter in a column are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple test.



그림 106. 시험약제 처리에 따른 당근 pot 운용 현황

□ 선충 피해

- 무처리구와 비교할 때, 양성 대조구와 본 제제 처리에 따라 뿌리혹 수, 토양 선충 및 뿌리 내 선충 밀도가 저감됨을 확인할 수 있음(표 50).
- 액제 시험구는 뿌리혹 수가 평균 24.3개, 토양 선충 밀도가 3.7마리/g, 뿌리 내 선충 밀도가 28.0마리로 선충에 대한 피해가 가장 완화된 결과를 보였음(표 50).
- 서방출형 입제의 선충에 대한 피해 수준 또한 무처리구에 대하여 크게 저감된 결과를 보이며, 뿌리혹 수 41.3개, 토양 선충 밀도 5마리/g, 뿌리 내 선충 밀도 79.7마리의 분포를 보임(표 50).
- 가장 우수한 선충 방제효율을 보인 액상제형은 대조구 대비 뿌리혹 수 69.6%, 토양 선충 밀도 88.2%, 뿌리 내 선충 밀도 94.5%의 개선 효과를 보여 최소 69.6% 이상의 방제가를 보임(표 50).
- 본 가장 우수한 결과를 도출한 액제 시험구와 타제품과의 방제효과를 비교함.
- 양성 대조구(타사제품) 뿌리혹 수는 33.7-61.0개 분포인 반면, 시험구는 24.3개로 최대 60.2%, 최소 27.9%의 대조구 결과 대비 개선된 효과를 도출함(표 50).
- 양성 대조구(타사제품)의 토양 내 선충 밀도는 6.3 - 21.0마리/g 이며, 시험구는 3.7마리/g 으로 최대 82.4%, 최소 41.3%의 대조구 결과 대비 개선된 효과를 도출함(표 50).
- 뿌리 내 선충 밀도는 대조구에서 65.7 - 331.7마리가 검출된 반면, 시험구는 28.0마리로 대조구 결과 대비 최대 91.6%, 최소 57.4%의 개선된 효과를 보임(표 50).
- 위의 결과를 종합할 때, 본 제제의 처리는 타사제품 대비 개선 된 방제 효율을 보이고 있으며, 입제 단독 처리구에서는 액제에 비해 방제 효과가 소폭 떨어지는 결과를 보이거나 타사제품 대비 적정 수준의 방제 결과를 도출함

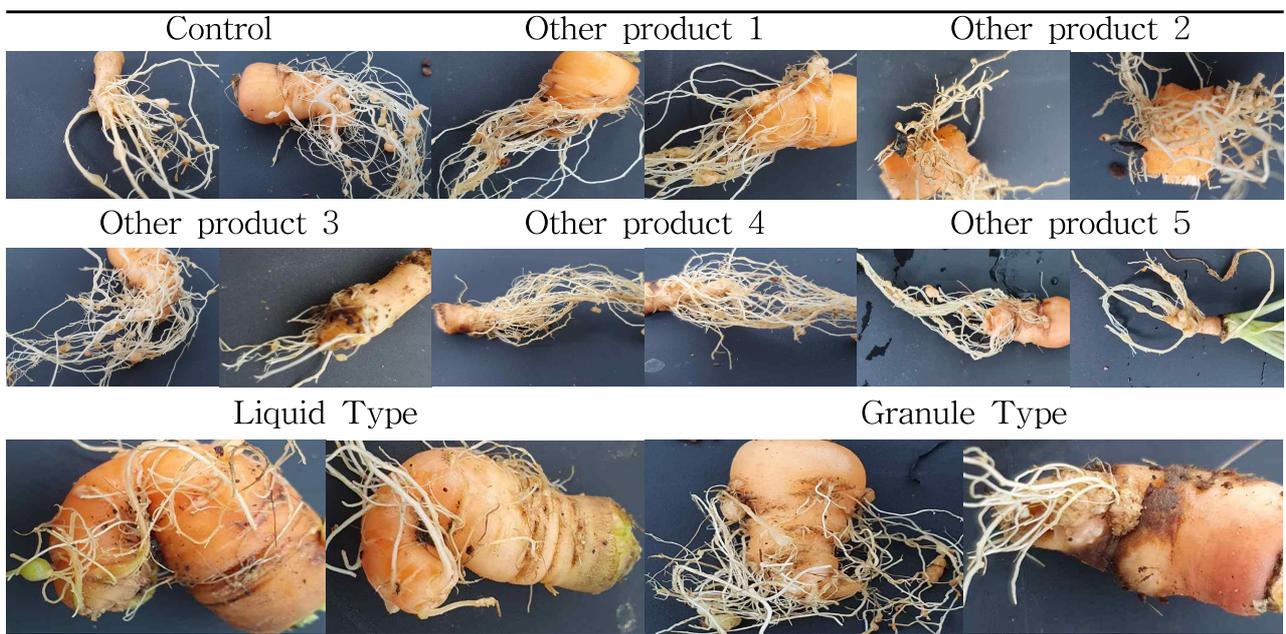


그림 107. 시험약제 처리에 따른 당근 뿌리 및 뿌리혹 발생 현황

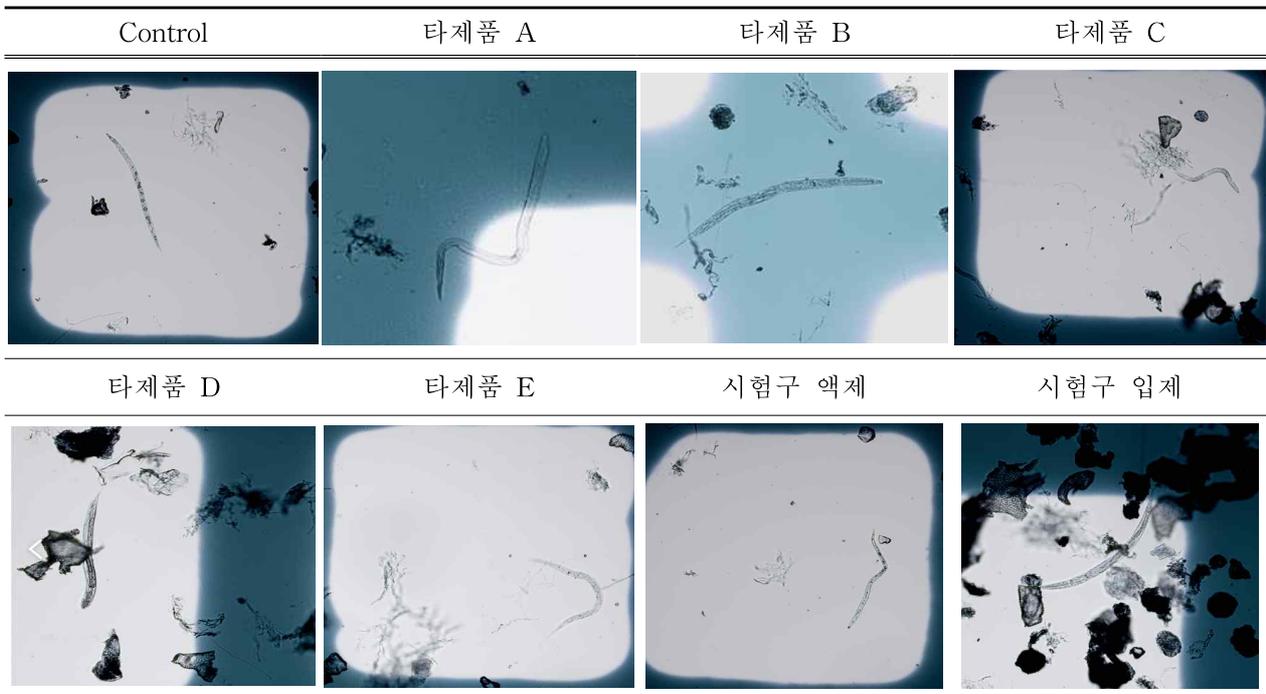


그림 108. 시험약제 처리에 따른 당근 뿌리 내 선충 밀도 관찰 현황

#### ④ 결론

- 작물 생육에 있어, 대조구 및 상용제품 대비 동등 또는 향상된 결과를 도출하였고, 이는 성충 방제의 결과에 따른 작물 생육 스트레스 개선과 더불어 미생물의 풍부한 영양원이 생육 개선에 영향을 미친 것으로 보임.
- 본 시료에 처리에 의한 선충 방제능은 입제에 비해 액제가 우월한 효과를 보이며, 대조구 대비 최대 94.5% - 최소 69.6%의 선충 피해 저감을 나타냄.
- 또한 본 제제의 처리는 타사제품 대비 개선된 방제효율을 보이고 있음.
- 농약 내 액상 수화제인 타제품 A-B의 약제처리량은 4,000배 희석액 1,320L를 1회 처리, 반면 시험구 액제의 경우 3회를 기준으로 500배 희석액 1,500L를 처리되며, 입제의 경우 타제품 C-D의 처리량 대비 2.5배의 증량된 처리량임을 알 수 있음.
- 시험구들의 상용제품 대비 향상된 처리량이 개선된 방제효율에 크게 영향을 미친 것으로 판단할 수 있으나, 본 사용농도는 일반적인 선충 관리용 유기농업자재의 사용메뉴얼에 범위 내 수렴하는 농도임.
- 최종 본 자제의 처리는 작물의 생육 장애현상을 나타내지 않음을 확인할 수 있고 사용제품 대비 우수한 방제 결과를 제시함을 확인할 수 있음.

## (나) 현장 적용 실험

### ① 연구목적

- 도출 제형에 대한 뿌리혹선충에 대한 방제가 및 유사제품과의 방제능 비교(자체 시험)

### ② 재료 및 방법

#### ㉠ 공시재료

- 공시식물 : 하우스 메론
- 공시약제 : 최종 제품 2종 (네마닥터 액제 : 살충물질 함량 540mM 이상, 네마닥터 입제 : *L. sakei* wikim 0118  $5.0 \times 10^7$ cfu/g 이상)
- 양성대조구 : 뿌리혹선충 방제용 타 회사 농약 4종(액제 2종, 입제 2종)

#### ㉡ 시험방법

- 시험기간 : 2021년 8월-10월
- 시험장소 : 전남 담양군 수북면 고성리 678, 하우스 1동(200평)
- 인위감염환경 : 본 포장에서 토양 선충의 밀도 30마리/g, 뿌리 내 선충밀도 350마리 이상의 자연 발생을 확인 한 후 별도의 토양 소독 없이, 야생상태의 출현 성충을 활용함.

#### ㉢ 처리구 설정 및 약제 처리

- 재배이력 : 시비(21.07.30), 정식(21.08.01), 종료(21.10.28)
- 처리구 면적 및 배치 : 200평, 20cm 간격, 구획별 완전임의 배치법(3반복)

표 51. 처리구별 약제 처리 방법

처리구	약제처리량	약제처리 시기	비고
무처리	-	-	-
타제품 A	4,000배 희석액 1,320L/10a	8월10일	타제품
타제품 B	4,000배 희석액 1,320L/10a	8월10일	타제품
타제품 C	6kg/10a	정식 전(토양 객토시)	타제품
타제품 D	6kg/10a	정식 전(토양 객토시)	타제품
액상제	500배 희석액,500L/10a 3회처리	8월10일, 20일, 30일	최종제품
서방출 입제	15kg/10a	정식 전(토양 객토시)	최종제품
액상제+서방출입제	액제 : 500배 희석액, 500L/10a 3회 처리 입제 : 15kg/10a	8월10일, 20일, 30일 정식전(토양 객토시)	최종제품
타사입제+액상제	입제 : 6kg/10a 액제 : 500배 희석액, 500L/10a 3회 처리	정식 전(토양 객토시) 8월10일, 20일, 30일	타제품+최종제품

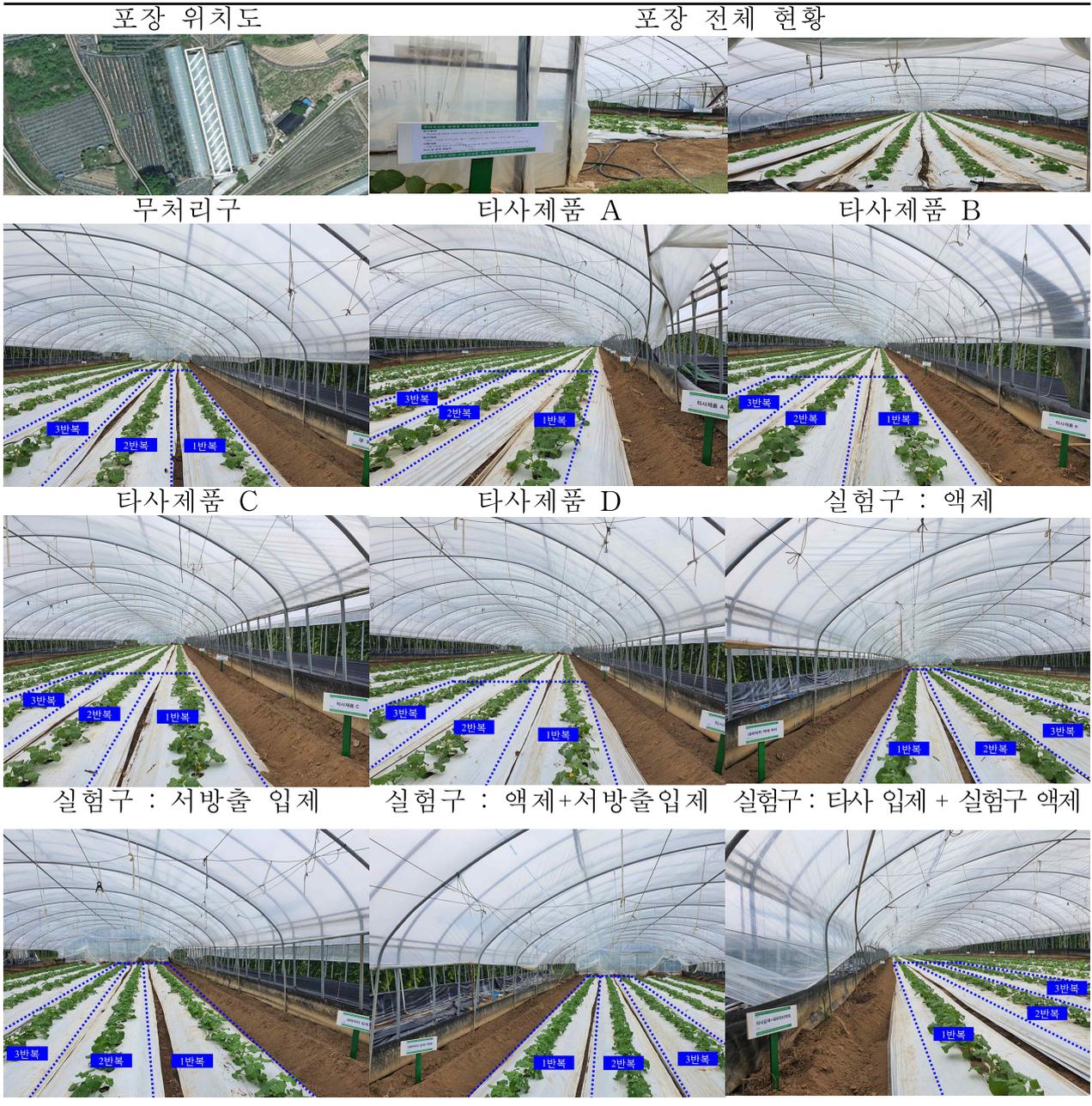


그림 109. 칠리구 설정

㉔ 조사방법 및 조사내용

- 구획별 현장 토양 내 선충의 밀도 및 완전임의 배치법을 통해 수거된 작물에 대한 뿌리 내 선충 발생량을 평가하며, 뿌리혹선충의 분석 방법은 상위 표 47과 동일함.

③ 실험 결과

㉕ 토양 내 선충 밀도

- 시제품의 제형 및 복합 적용과 상용제품의 처리에 따른 토양 내 뿌리혹선충의 억제효과를 조사하기 위해, 8월10일 최초 약제 처리를 시점으로 정식 후 10월 28까지 9회의 현장 토양시료를 채취하여 유충수를 조사하였음.
- 약제를 처리하지 않은 무처리구는 9월15일 경 153마리로 매우 높은 수준의 선충 밀도를

보여, 이벤트성 결과로 판단되며, 최소 9.9마리 평균 44.4마리/g의 선충 밀도를 보인 반면, 약제 처리구들은 초기 60마리/g의 토양 선충 밀도에서 최소 불검출, 최대 33.8마리/g으로 선충 밀도를 보여, 약제처리에 의해 토양선충의 밀도가 전반적으로 개선 되어짐(그림 110).

- 현장의 특성 상 모니터링 시기에 따른 토양 내 선충의 밀도가 통계적 유의성이 별도로 관찰되지 않으나, 총 채취 시기에 대한 도출 제형의 토양 선충의 평균 밀도는 14.8-16.6마리/g의 밀도, 이중 서방출형 제형이 평균 14.8마리/g으로 가장 우수한 저감 효과를 나타내었음(그림 110, 111).
- 대조구 대비 도출제형의 토양 선충의 방제가는, 62.6-66.6%의 범위로, 서방출형 제형이 66.6%로 가장 우수한 방제효과를 나타냄(그림 110).
- 유사 제품(양성대조구)인 입제 2종, 액제 2종의 토양 선충밀도는 최소 불검출에서 최대 38.5마리/g 밀도 분포를 보였고, 61.3-68.6%의 대조구 대비 방제가 결과를 나타내었고, 이 중 P사의 액제가 68.6%로 가장 우수한 방제 결과를 나타냄(그림 110, 111).
- 도출제형의 토양 선충의 방제 측면으로 살펴볼 때 액제의 경우 3회 반복 처리에 불구하고 방제가는 62.6%로 타사제품 일부에 비해 우수한 결과를 나타낸 반면 입제의 경우 1회 처리에도 불구하고 66.6%의 방제가로 타사제품 대비 동등 혹은 우월한 결과를 나타냄(그림 111).
- 따라서 토양 선충 방제의 측면에서는 액제에 비해 서방출형 제형의 우수한 결과를 나타내었음을 확인할 수 있으며, 액제와 유제, 혹은 타사 제품의 액제와의 혼용에서 유의미한 방제 개선 결과를 살펴볼 수 없었음(그림 111).

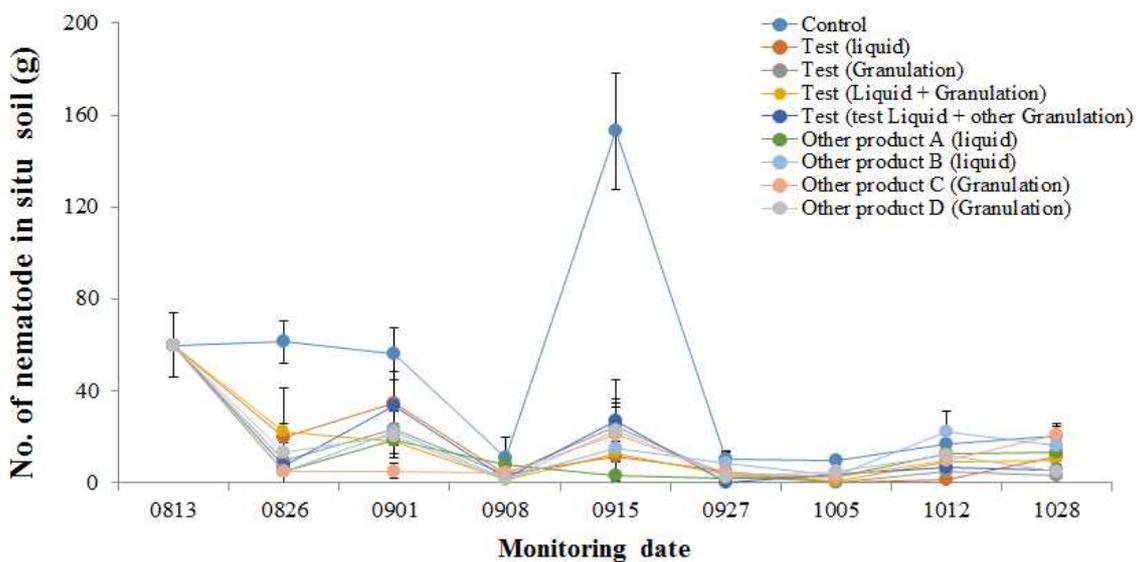


그림 110. 시료 처리에 따른 토양 선충 밀도 분석

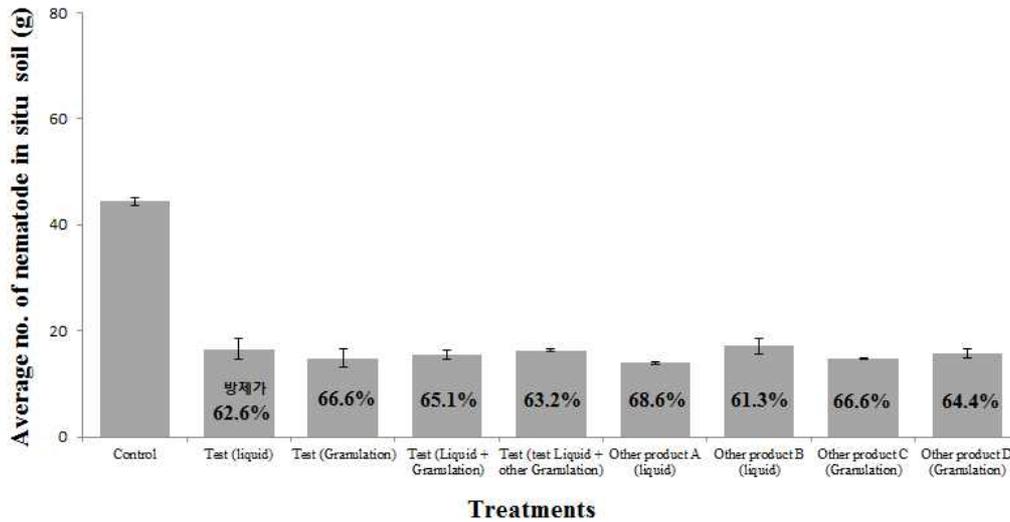


그림 111. 시료 처리에 따른 토양 선충의 평균 발생 밀도 및 방제가 분석

㉔ 뿌리 내 선충 밀도

- 8월10일 최초 약제를 처리한 시점으로부터 정식 후 9회 간격으로 최종 10월28일까지의 현장 작물 뿌리를 채취하여 뿌리 내 선충수를 확인하였음.
- 최초 뿌리 내 선충 밀도는 불검출 - 47.35마리/g에서 실험 종료인 10월28일 80.6-385.5마리/g으로 시간의 경과에 따라 선충이 뿌리 내 지속적으로 친입되거나, 증식된 결과로써 본 현장 실험은 정상 진행되어짐을 확인할 수 있음(그림 112).
- 약제를 처리하지 않은 대조구의 경우 최초 9.8마리/g에서 실험 종료 후 259마리/g으로 발생밀도가 심화된 반면, 도출 제형의 처리 조건에서는 최종 109-202.8마리/g으로 선충 발생밀도가 완화되었고, 모니터링 기간 별 평균 29.9-43.7마리/g의 분포 범위로 대조구의 76.6마리/g 대비 발생이 전반적으로 완화되었음을 확인할 수 있음(그림 112, 113).
- 타사제품 처리 조건의 경우 실험 종료 후 뿌리 내 선충 밀도가 80.6-385.5마리/g, 모니터링 기간 내 평균 48.7-70.1마리/g으로 대조구 대비 일정부 완화되었으나, 방제가는 8.3-36.4%의 범위로 토양 선충에 대한 방제가 범위인 61.3-68.6% 대비 약화된 억제력을 보임(그림 112, 113).
- 이는 타사제품의 유효물질의 식물 침투성 원활하지 못한 관계로 인해 방제력이 일정부 상실된 것으로 예측됨.
- 반면 도출 제형의 유효물질은 전술한 바와 같이, 뿌리에서 흡수가 개시되어, 식물 내 침투 및 운송성을 제공함에 따라, 뿌리 내 친입한 선충에 대한 유효 방제가를 제공한 결과일 것으로 사료됨.
- 최종 도출 제형 중 서방출형 제형이 최종 109.6마리, 평균 29.9마리로 60.9%의 현장 방제가를 나타내었고, 액제와 유제, 혹은 타사 제품의 액제와의 혼용에서 유의미한 방제 개선 결과를 살펴볼 수 없었음(그림 113).

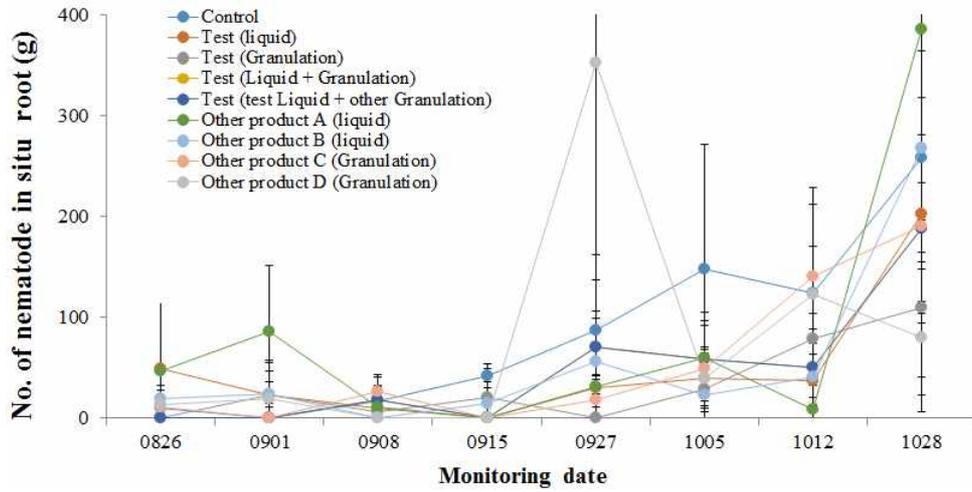


그림 112. 시료 처리에 따른 뿌리 내 선충의 밀도 분석

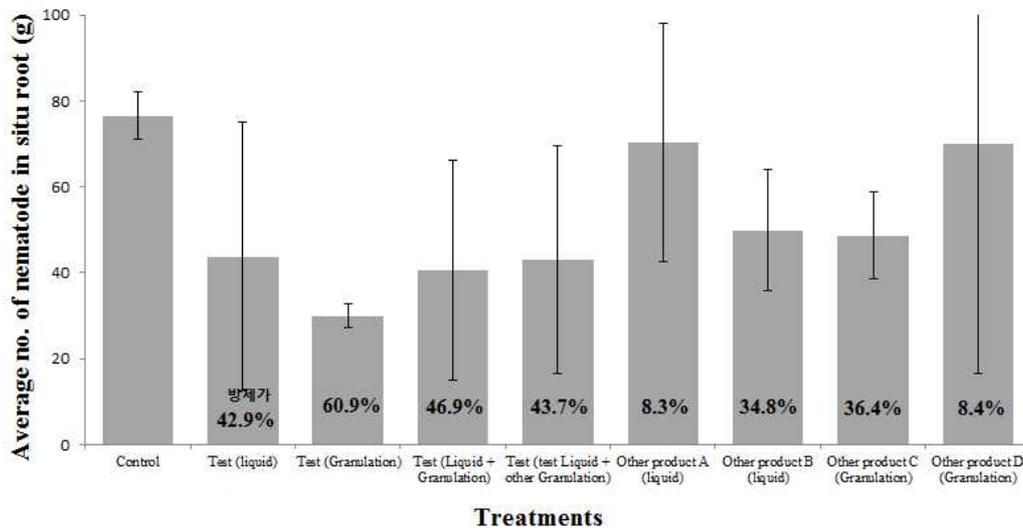


그림 113. 시료 처리에 따른 뿌리 내 선충의 평균 발생 밀도 및 방제가 분석

④ 결론

- 최종 도출 제형 중 서방출형 제형의 토양 선충에 대한 방제가는 66.6%로 유사제품 대비 동등 또는 우월한 결과를 보이며, 뿌리내 선충에 대하여는 60.9%로 모든 시험구들 중 가장 우수한 방제 결과를 도출함.

## (2) 최종 제품의 등록 실험

### (가) 액상형 제품의 약해 등록 실험

#### ① 연구목적

- 최종 제품(액상형 상품명을 “네마닥터”라 정함)의 처리에 따른 약해 시험 수행

#### ② 재료 및 방법

- 작물에 대한 약해 실험은 “친환경농산물안전성센터”에 의뢰하여 수행함.

#### ③ 결과

- 결과는 친환경농산물안전성센터의 약해시험 보고서로 제시함.

EFAP-20-1251-PH-162

**네마닥터의 5작물(고추, 무, 배추, 상추, 토마토)에 대한 농약피해 시험**

시험기간 : 2020. 12. 08. - 2020. 12. 22.

시험의뢰회사명 : (주)마이크로자임

시험기관명 : (주)친환경농산물안전성센터

EFAPSC 1/11

### 3. 시험결과

가. 처리 후 농약피해 조사 결과(7, 14, 21일차)

작물명	네마닥터	농약피해(0~4)			농약피해 증상
		3일(12/11)	7일(12/15)	14일(12/22)	
고 추	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배 량	0	0	0	없음
무	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배 량	0	0	0	없음
배 추	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배 량	0	0	0	없음
상 추	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배 량	0	0	0	없음
토마토	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배 량	0	0	0	없음

3/11

### 4. 결과요약

농약피해 시험기간 동안 “(주)마이크로자임의 네마닥터” 처리에 의한 5작물(고추, 무, 배추, 상추, 토마토)의 피해는 발견되지 않았으며, 무처리와 기준량 및 배량을 비교하여도 농약피해로 판단될 만한 특이한 증상은 없었다.

### 5. 시험담당자 의견

시험물질 처리로 인한 기준량 및 배량에서 유식물에 대한 뚜렷한 농약피해 증상이 없어 유기농업자재 공시 기준에 적합하다고 판단된다.

### 고추의 약해 시험

약해 결과					공시시료 처리 후 3일째			공시시료 처리 후 7일째			공시시료 처리 후 14일째			
작물명	네마닥터	농약피해 (0-4)			피해 증상	3일			7일			14일		
		3일	7일	14일		3일	7일	14일	3일	7일	14일			
고추	무처리	-	-	-	-									
	기준량	0	0	0	없음									
	배량	0	0	0	없음									

<그림 계속>

무의 약해 시험														
약해 결과				공시시료 처리 후 3일째			공시시료 처리 후 7일째			공시시료 처리 후 14일째				
작물명	네마 닥터	농약피해 (0-4)			피해 증상									
		3일	7일	14일										
무	무처리	-	-	-	-									
	기준량	0	0	0	없음									
	배량	0	0	0	없음									

배추의 약해 시험														
약해 결과				공시시료 처리 후 3일째			공시시료 처리 후 7일째			공시시료 처리 후 14일째				
작물명	네마 닥터	농약피해 (0-4)			피해 증상									
		3일	7일	14일										
배추	무처리	-	-	-	-									
	기준량	0	0	0	없음									
	배량	0	0	0	없음									

상추의 약해 시험														
약해 결과				공시시료 처리 후 3일째			공시시료 처리 후 7일째			공시시료 처리 후 14일째				
작물명	네마 닥터	농약피해 (0-4)			피해 증상									
		3일	7일	14일										
상추	무처리	-	-	-	-									
	기준량	0	0	0	없음									
	배량	0	0	0	없음									

토마토의 약해 시험														
약해 결과				공시시료 처리 후 3일째			공시시료 처리 후 7일째			공시시료 처리 후 14일째				
작물명	네마 닥터	농약피해 (0-4)			피해 증상									
		3일	7일	14일										
토마토	무처리	-	-	-	-									
	기준량	0	0	0	없음									
	배량	0	0	0	없음									

그림 114. 네마닥터의 5작물에 대한 약해시험결과서

## (나) 액상형 제품의 약효 등록 실험

### ① 연구목적

- 최종 제품(액상형 상품명을 “네마닥터”라 정함)의 처리에 따른 약효 시험 수행

### ② 재료 및 방법

- 작물에 대한 약효 실험은 “(주)현농”에 의뢰하여 2회 반복 수행함.

#### 1회차

##### 1. 시험 개요

- 1.1 시험기관 : ㈜현농
- 1.2 시험년도 : 2021년
- 1.3 시험책임자 : 한송희(연락처 : 062-530-5312, E-mail: hyunnong07@hanmail.net)
- 1.4 시험장소 : 전남 곡성군 입면 삼오리 433-4
- 1.5 시험입지조건(토성) : 양토

##### 2. 시험목적

㈜마이크로자임 의외 제품인 네마닥터의 토마토 뿌리혹선충에 대한 약효약해를 검토하여 유기농업자재 공시자료로 활용하기 위함.

##### 3. 시험방법

- 3.1 대상종에 : 뿌리혹선충 (*Meloidogyne incognita*)
- 3.2 시험작물(품종) : 토마토(TY노나리)
- 3.3 대상종에 발생상황 : 무처리구에서 생충수가 54.6마리로 약효를 조사하기에 충분하였음.
- 3.4 처리내용

시험 약제명	주원료투입비율(%)	약효 시험		약해 시험	
		희석배수 및 사용량	처리시기 및 방법	기준량	배량
네마닥터	<i>Lactobacillus sakei</i> 미생물추출물(100)	500배	토양관주처리 (8/13)	500배 (8/13)	250배 (8/13)
무 처리	-	-	-	-	-

##### 3.4.1 시험약제 처리 내용

##### 3.4.1.1 시험약제

- 네마닥터

##### 3.4.1.2 시험약제의 조제

- 약효시험 - 약제 10ml, 물 5L, 전제약량 15L
- 약해시험(정량) - 약제 2.5ml, 물 2.5L, 전제약량 7.5L
- 약해시험(배량) - 약제 5ml, 물 2.5L, 전제약량 7.5L

##### 3.4.1.3 시험구당 처리 약제의 양 : 처리구당 5L(약효), 2.5L(약해) 살포

##### 3.4.1.4 분무기(살포기) 제원 : SUN전동분무기/신일종합농기계, 1구 노출

##### 3.5 경종개요

##### 3.5.1 재배방법

시험포장	재배조건	재식간격	정식일자	기타
곡성	시설재배	30cm	2021.08.12	타약제 처리하지 않음

##### 3.6 시험구 배치 및 면적 : 난괴법 3반복

구분	처리수	반복수	총구수	구당면적	소요면적	총소요면적
약효	2	3	6	10m <sup>2</sup>	60m <sup>2</sup>	105m <sup>2</sup>
약해	3	3	9	5m <sup>2</sup>	45m <sup>2</sup>	

##### 3.7 약제처리(살포) 전후 기상상황 : 하우스 시설재배로 약제처리나 약효조사에 영향을 끼칠 큰 기상변화 없었음.

월/일	습도(%rh)	최고/최저 기온(°C)	평균기온(°C)
8/12	59.2	35.0/25.0	28.4
8/13	67.1	27.5/26.5	26.9
8/14	67.1	28.5/26.5	27.4

##### 4. 조사방법

구분	조사항목	조사횟수	조사일자	조사방법
약효 시험	생충률	2회	10/1, 10/28	약제처리 전 및 처리 후 49일, 76일 2회 구당 3주 토양 100cm <sup>3</sup> 내 선충수 조사
	뿌리혹지수	2회	10/1, 10/28	약제처리 전 및 처리 후 49일, 76일 2회 구당 3주 뿌리혹지수 조사
약해 시험	외관상 약해유무	3회	8/20, 8/27, 9/3	약제처리 21일 이내 3회(약제처리 후 7, 14, 21일) 외관상 약해유무 달관조사

#### 2회차

##### 1. 시험 개요

- 1.1 시험기관 : ㈜현농
- 1.2 시험년도 : 2021년
- 1.3 시험책임자 : 한송희(연락처 : 062-530-5312, E-mail: hyunnong07@hanmail.net)
- 1.4 시험장소 : 전남 장수군 장수읍 노곡리 1620
- 1.5 시험입지조건(토성) : 사양토

##### 2. 시험목적

㈜마이크로자임 의외 제품인 네마닥터의 토마토 뿌리혹선충에 대한 약효약해를 검토하여 유기농업자재 공시자료로 활용하기 위함.

##### 3. 시험방법

- 3.1 대상종에 : 뿌리혹선충 (*Meloidogyne incognita*)
- 3.2 시험작물(품종) : 토마토(TY노나리)
- 3.3 대상종에 발생상황 : 무처리구에서 생충수가 50.6마리로 약효를 조사하기에 충분하였음.
- 3.4 처리내용

시험 약제명	주원료투입비율(%)	약효 시험		약해 시험	
		희석배수 및 사용량	처리시기 및 방법	기준량	배량
네마닥터	<i>Lactobacillus sakei</i> 미생물추출물(100)	500배	토양관주처리 (8/13)	500배 (8/13)	250배 (8/13)
무 처리	-	-	-	-	-

##### 3.4.1 시험약제 처리 내용

##### 3.4.1.1 시험약제

- 네마닥터

##### 3.4.1.2 시험약제의 조제

- 약효시험 - 약제 10ml, 물 5L, 전제약량 15L
- 약해시험(정량) - 약제 2.5ml, 물 2.5L, 전제약량 7.5L
- 약해시험(배량) - 약제 5ml, 물 2.5L, 전제약량 7.5L

##### 3.4.1.3 시험구당 처리 약제의 양 : 처리구당 5L(약효), 2.5L(약해) 살포

##### 3.4.1.4 분무기(살포기) 제원 : SUN전동분무기/신일종합농기계, 1구 노출

##### 3.5 경종개요

##### 3.5.1 재배방법

시험포장	재배조건	재식간격	정식일자	기타
장수	시설재배	30cm	2021.08.09	타약제 처리하지 않음

##### 3.6 시험구 배치 및 면적 : 난괴법 3반복

구분	처리수	반복수	총구수	구당면적	소요면적	총소요면적
약효	2	3	6	10m <sup>2</sup>	60m <sup>2</sup>	105m <sup>2</sup>
약해	3	3	9	5m <sup>2</sup>	45m <sup>2</sup>	

##### 3.7 약제처리(살포) 전후 기상상황 : 하우스 시설재배로 약제처리나 약효조사에 영향을 끼칠 큰 기상변화 없었음.

월/일	습도(%rh)	최고/최저 기온(°C)	평균기온(°C)
8/12	65.5	29.0/27.0	28.0
8/13	58.9	28.8/25.0	26.8
8/14	56.9	28.5/24.5	26.4

##### 4. 조사방법

구분	조사항목	조사횟수	조사일자	조사방법
약효 시험	생충률	2회	10/1, 10/28	약제처리 전 및 처리 후 49일, 76일 2회 구당 3주 토양 100cm <sup>3</sup> 내 선충수 조사
	뿌리혹지수	2회	10/1, 10/28	약제처리 전 및 처리 후 49일, 76일 2회 구당 3주 뿌리혹지수 조사
약해 시험	외관상 약해유무	3회	8/20, 8/27, 9/3	약제처리 21일 이내 3회(약제처리 후 7, 14, 21일) 외관상 약해유무 달관조사

그림 115. 네마닥터의 효능효과 시험 방법

③ 결과

- 약제처리 후 네마닥터의 뿌리혹선충에 대한 방제가는 1회차 52.9-65.8%, 평균 59.4%, 2회차 56.1-66.5%, 평균 61.3%로 조사됨.
- 이에 대한 결과는 (주)현농의 약효시험 보고서로 제시함.

1회차

유기농업자재 효능효과시험(충해관리용)

시험번호 : HN21-O-01-54

시험제목 : 네마닥터의 토마토 뿌리혹선충에 대한 약제방제효과시험

시험기관  
명칭 : (주)현농  
소재지 : 전남 장성군 남면 나노산단3로 33-5  
시험책임자 : 한송희  
연락처 : 전화 062-530-5312, 팩스 062-530-5311,  
이메일 hyunnong07@hanmail.net

(주)현농



5. 시험성적

5.1 약효시험

5.1.1 토마토 뿌리혹선충에 대한 약제방제 효과(약제처리 후 49일차)-생중률(%)

시험약제	약제처리진밀도 (마리)	생중률(%)				유의차 (DMRT)	방제가(%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균		
네마닥터	54.6	62.3	61.1	65.9	63.1	b	52.9
무처리		154.5	147.1	139.8	147.1	a	-

CV(%)=3.2

5.1.2 토마토 뿌리혹선충에 대한 약제방제 효과(약제처리 후 49일차)-뿌리혹지수

시험약제	약제처리진밀도 (마리)	뿌리혹지수(0-10)				유의차 (DMRT)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균	
네마닥터	0	1.7	1.0	1.3	1.3	b
무처리		3.0	3.7	4.0	3.6	a

CV(%)=12.6

5.1.3 토마토 뿌리혹선충에 대한 약제방제 효과(약제처리 후 76일차)-생중률(%)

시험약제	약제처리진밀도 (마리)	생중률(%)				유의차 (DMRT)	방제가(%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균		
네마닥터	54.6	73.3	70.8	70.2	71.4	b	65.8
무처리		199.6	211.8	215.5	208.0	a	-

CV(%)=5.9

5.1.4 토마토 뿌리혹선충에 대한 약제방제 효과(약제처리 후 76일차)-뿌리혹지수

시험약제	약제처리진밀도 (마리)	뿌리혹지수(0-10)				유의차 (DMRT)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균	
네마닥터	0	2.0	2.3	2.7	2.3	b
무처리		8.0	7.3	8.3	7.9	a

CV(%)=6.8

2회차

유기농업자재 효능효과시험(충해관리용)

시험번호 : HN21-O-01-55

시험제목 : 네마닥터의 토마토 뿌리혹선충에 대한 약제방제효과시험

시험기관  
명칭 : (주)현농  
소재지 : 전남 장성군 남면 나노산단3로 33-5  
시험책임자 : 한송희  
연락처 : 전화 062-530-5312, 팩스 062-530-5311,  
이메일 hyunnong07@hanmail.net

(주)현농



5. 시험성적

5.1 약효시험

5.1.1 토마토 뿌리혹선충에 대한 약제방제 효과(약제처리 후 49일차)-생중률(%)

시험약제	약제처리진밀도 (마리)	생중률(%)				유의차 (DMRT)	방제가(%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균		
네마닥터	50.6	63.9	59.9	65.9	63.2	b	56.1
무처리		152.2	143.0	136.4	143.8	a	-

CV(%)=4.5

5.1.2 토마토 뿌리혹선충에 대한 약제방제 효과(약제처리 후 49일차)-뿌리혹지수

시험약제	약제처리진밀도 (마리)	뿌리혹지수(0-10)				유의차 (DMRT)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균	
네마닥터	0	1.0	1.0	1.3	1.1	b
무처리		2.3	3.3	3.7	3.1	a

CV(%)=11.0

5.1.3 토마토 뿌리혹선충에 대한 약제방제 효과(약제처리 후 76일차)-생중률(%)

시험약제	약제처리진밀도 (마리)	생중률(%)				유의차 (DMRT)	방제가(%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균		
네마닥터	50.6	72.5	68.5	88.3	76.4	b	66.5
무처리		224.0	249.7	210.8	228.2	a	-

CV(%)=3.8

5.1.4 토마토 뿌리혹선충에 대한 약제방제 효과(약제처리 후 76일차)-뿌리혹지수

시험약제	약제처리진밀도 (마리)	뿌리혹지수(0-10)				유의차 (DMRT)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균	
네마닥터	0	2.3	2.7	3.0	2.7	b
무처리		8.3	7.7	8.7	8.2	a

CV(%)=6.3

그림 116. 네마닥터의 효능효과 시험 결과 보고서

## (다) 서방출형 제품의 약해 등록 실험

### ① 연구목적

- 최종 제품(서방출형 상품명을 “네마닥터 골드”라 정함)의 처리에 따른 약해 시험 수행

### ② 재료 및 방법

- 작물에 대한 약해 실험은 “(주)현농”에 의뢰하여 수행함.

### ③ 결과

- 결과는 (주)현농의 약해시험 보고서로 제시함.

### 시험성적서

의뢰기관: (주)마이크로 자임  
시험항목: 작물재배시험(약해 시험)

시험성적서		
의뢰인	업체명	(주)마이크로 자임
	주소	전라남도 담양군 담양읍 태봉로 97, 2층(본관)
	연락처	
공시품	명칭	네마닥터 골드
검사항목	식물재배시험 (약해시험)	공시약제 처리에 의한 5작물의 약해시험
용도	제출용	
시험결과		
당근		약해없음
상추		약해없음
수박		약해없음
삼위		약해없음
토마토		약해없음

2021년 08월 11일  
(주)현농

시험담당자	박주연 (인)	작성일	2021년 08월 11일
시험책임자	한송희 (인)	확인일	2021년 08월 11일

**(주)현농**  
HYUNNONG CO.,LTD

농촌진흥청 지정 유기농업자재 시험연구기관 (지정번호:제36호)  
농촌진흥청 지정 비료시험연구기관 (지정번호:제47호)  
농촌진흥청 지정 농약시험연구기관 (지정번호:제127호)

광주광역시 북구 용봉동 300 전남대학교 농생대 친환경 농업연구소 510, 511호  
Tel: 062-530-5312 Fax: 062-530-5311

### 당근 약해시험

공시시료 처리 후 7일째

공시시료 처리 후 14일째

공시시료 처리 후 21일째

<그림 계속>



그림 117. 네마닥터 폴드의 5작물에 대한 약해시험결과서

## (라) 서방출형 제품의 약효 등록 실험

### ① 연구목적

- 최종 제품(서방출형 상품명을 “네마닥터 골드”라 정함)의 처리에 따른 약효 시험 수행

### ② 재료 및 방법

- 작물에 대한 약효 실험은 “(주)현농”에 의뢰하여 2회 반복 수행함.

#### 1회차

##### 1. 시험 개요

- 1.1 시험 기관 : ㈜현농
- 1.2 시험 년도 : 2021년
- 1.3 시험 책임자 : 한송희(연락처 : 062-530-5312, E-mail: hyunnong07@hanmail.net)
- 1.4 시험 장소 : 전남 곡성군 입암 삼오리 433-4
- 1.5 시험입지조건(토성) : 양토

##### 2. 시험목적

- ㈜마이크로자임 의뢰 제품인 네마닥터 골드의 토마토 뿌리혹선충에 대한 약효약해를 검토하여 유기농업자재 공시자료로 활용하기 위함.

##### 3. 시험방법

- 3.1 대상충해 : 뿌리혹선충 (*Meloidogyne incognita*)
- 3.2 시험작물(품종) : 토마토(TY노나리)
- 3.3 대상충해 발생상황 : 무처리구에서 생충수가 54.6마리로 약효를 조사하기에 충분하였음.
- 3.4 처리내용

시험 약제명	주원료투입비율(%)	약효 시험		약해 시험	
		희석배수 및 사용량	처리시기 및 방법	기준량	배 량
네마닥터 골드	<i>Lactobacillus sakei</i> (10) 제올라이트(90)	15kg/10a	정식 전 토양혼화처리 (8/9)	15kg/10a (8/9)	30kg/10a (8/9)
무 처리	-	-	-	-	-

##### 3.4.1 시험약제 처리 내용

##### 3.4.1.1 시험약제

- 네마닥터골드

##### 3.4.1.2 시험약제의 조제

- 약효시험 - 10m<sup>3</sup> 당 약제 150g, 전제약량 450g
- 약해시험(정량) - 5m<sup>3</sup> 당 약제 75g, 전제약량 225g
- 약해시험(배양) - 5m<sup>3</sup> 당 약제 150g, 전제약량 450g

##### 3.4.1.3 분무기(살포기) 제원 : 직접 손분무

##### 3.5 검증개요

##### 3.5.1 재배방법

시험포장	재배조건	재식간격	정식일자	기타
특성	시설재배	30cm	2021.08.12	타약제 처리하지 않음

##### 3.6 시험구배치 및 면적 : 난괴법 3반복

구 분	처리수	반복수	총구수	구당면적	소요면적	총소요면적
약 효	2	3	6	10m <sup>2</sup>	60m <sup>2</sup>	105m <sup>2</sup>
약 해	3	3	9	5m <sup>2</sup>	45m <sup>2</sup>	

##### 3.7 약제처리(살포) 전후 기상상황 : 하우스 시설재배로 약제처리나 약효조사에 영향을 끼칠 큰 기상변화 없었음.

월/일	습도(%rh)	최고/최저 기온(°C)	평균기온(°C)
8/08	58.2	33.5/29.7	29.7
8/09	65.0	37.5/25.0	29.1
8/10	71.2	40.5/23.0	29.0

##### 4. 조사방법

구분	조사항목	조사횟수	조사일자	조사방법
약효 시험	생충률	2회	10/1, 10/28	약제처리 전 및 정식 후 50일, 77일 2회 구당 3주 토양 100cm <sup>3</sup> 내 선충수 조사
	뿌리혹지수	2회	10/1, 10/28	약제처리 전 및 정식 후 50일, 77일 2회 구당 3주 뿌리혹지수 조사
약해 시험	외관상 약해유무	3회	8/19, 8/26, 9/2	정식 후 21일 이내 3회(약제처리 후 7, 14, 21일) 외관상 약해유무 달관조사

#### 2회차

##### 1. 시험 개요

- 1.1 시험 기관 : ㈜현농
- 1.2 시험 년도 : 2021년
- 1.3 시험 책임자 : 한송희(연락처 : 062-530-5312, E-mail: hyunnong07@hanmail.net)
- 1.4 시험 장소 : 전북 장수군 장수읍 노덕리 1620
- 1.5 시험입지조건(토성) : 사당토

##### 2. 시험목적

- ㈜마이크로자임 의뢰 제품인 네마닥터 골드의 토마토 뿌리혹선충에 대한 약효약해를 검토하여 유기농업자재 공시자료로 활용하기 위함.

##### 3. 시험방법

- 3.1 대상충해 : 뿌리혹선충 (*Meloidogyne incognita*)
- 3.2 시험작물(품종) : 토마토(TY노나리)
- 3.3 대상충해 발생상황 : 무처리구에서 생충수가 50.8마리로 약효를 조사하기에 충분하였음.
- 3.4 처리내용

시험 약제명	주원료투입비율(%)	약효 시험		약해 시험	
		희석배수 및 사용량	처리시기 및 방법	기준량	배 량
네마닥터 골드	<i>Lactobacillus sakei</i> (10) 제올라이트 (90)	15kg/10a	정식 전 토양혼화처리 (8/6)	15kg/10a (8/6)	30kg/10a (8/6)
무 처리	-	-	-	-	-

##### 3.4.1 시험약제 처리 내용

##### 3.4.1.1 시험약제

- 네마닥터골드

##### 3.4.1.2 시험약제의 조제

- 약효시험 - 10m<sup>3</sup> 당 약제 150g, 전제약량 450g
- 약해시험(정량) - 5m<sup>3</sup> 당 약제 75g, 전제약량 225g
- 약해시험(배양) - 5m<sup>3</sup> 당 약제 150g, 전제약량 450g

##### 3.4.1.3 분무기(살포기) 제원 : 직접 손분무

##### 3.5 검증개요

##### 3.5.1 재배방법

시험포장	재배조건	재식간격	정식일자	기타
장수	시설재배	30cm	2021.08.09	타약제 처리하지 않음

##### 3.6 시험구배치 및 면적 : 난괴법 3반복

구 분	처리수	반복수	총구수	구당면적	소요면적	총소요면적
약 효	2	3	6	10m <sup>2</sup>	60m <sup>2</sup>	105m <sup>2</sup>
약 해	3	3	9	5m <sup>2</sup>	45m <sup>2</sup>	

##### 3.7 약제처리(살포) 전후 기상상황 : 하우스 시설재배로 약제처리나 약효조사에 영향을 끼칠 큰 기상변화 없었음.

월/일	습도(%rh)	최고/최저 기온(°C)	평균기온(°C)
8/05	64.2	40.0/21.5	30.2
8/06	63.1	40.5/22.0	30.2
8/07	65.4	39.5/21.5	29.2

##### 4. 조사방법

구분	조사항목	조사횟수	조사일자	조사방법
약효 시험	생충률	2회	10/1, 10/28	약제처리 전 및 정식 후 53일, 80일 2회 구당 3주 토양 100cm <sup>3</sup> 내 선충수 조사
	뿌리혹지수	2회	10/1, 10/28	약제처리 전 및 정식 후 53일, 80일 2회 구당 3주 뿌리혹지수 조사
약해 시험	외관상 약해유무	3회	8/16, 8/23, 8/30	정식 후 21일 이내 3회(약제처리 후 7, 14, 21일) 외관상 약해유무 달관조사

그림 118. 네마닥터 골드의 효능효과 시험 방법

③ 결과

- 약제처리 후 네마닥터 골드의 뿌리혹선충에 대한 방제가는 1회차 59.0-65.5%, 평균 62.3%, 2회차 55.6-66.4%, 평균 61.0%로 조사됨.
- 이에 대한 결과는 (주)현농의 약효시험 보고서로 제시함.

1회차

유기농업자재 효능효과시험(충해관리용)

시험번호 : HN21-O-01-56

시험제목 : 네마닥터 골드의 토마토 뿌리혹선충에 대한 약제방제효과시험

시험기관  
 명 칭 : (주)현농  
 소재지 : 전남 장성군 남면 나노산단3로 33-5  
 시험책임자 : 한 송 희  
 연락처 : 전화 062-530-5312, 팩스 062-530-5311,  
 이메일 hyunnong07@hanmail.net

(주) 현 농



5. 시험성적

5.1 약효시험

5.1.1 토마토 뿌리혹선충에 대한 약제방제 효과(정식 후 50일차)-생중률(%)

시험약제	약제처리전 밀도 (마리)	생중률(%)				유역차 (DMRT)	방제기(%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균		
네마닥터 골드	54.6	59.8	58.0	61.1	59.6	b	59.0
무 처리		152.0	145.9	138.0	145.3	a	-

CV(%)=3.9

5.1.2 토마토 뿌리혹선충에 대한 약제방제 효과(정식 후 50일차)-뿌리혹지수

시험약제	약제처리전 뿌리혹지수	뿌리혹지수(0-10)				유역차 (DMRT)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균	
네마닥터 골드	0	1.7	1.3	1.7	1.6	b
무 처리		3.3	3.3	3.7	3.4	a

5.1.3 토마토 뿌리혹선충에 대한 약제방제 효과(정식 후 77일차)-생중률(%)

시험약제	약제처리전 밀도 (마리)	생중률(%)				유역차 (DMRT)	방제기(%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균		
네마닥터 골드	54.6	75.7	71.4	70.8	72.6	b	65.5
무 처리		209.4	197.2	225.3	210.6	a	-

CV(%)=4.8

5.1.4 토마토 뿌리혹선충에 대한 약제방제 효과(정식 후 77일차)-뿌리혹지수

시험약제	약제처리전 뿌리혹지수	뿌리혹지수(0-10)				유역차 (DMRT)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균	
네마닥터 골드	0	2.3	2.0	2.3	2.2	b
무 처리		8.3	8.0	8.0	8.1	a

CV(%)=8.2

2회차

유기농업자재 효능효과시험(충해관리용)

시험번호 : HN21-O-01-57

시험제목 : 네마닥터 골드의 토마토 뿌리혹선충에 대한 약제방제효과시험

시험기관  
 명 칭 : (주)현농  
 소재지 : 전남 장성군 남면 나노산단3로 33-5  
 시험책임자 : 한 송 희  
 연락처 : 전화 062-530-5312, 팩스 062-530-5311,  
 이메일 hyunnong07@hanmail.net

(주) 현 농



5. 시험성적

5.1 약효시험

5.1.1 토마토 뿌리혹선충에 대한 약제방제 효과(정식 후 53일차)-생중률(%)

시험약제	약제처리전 밀도 (마리)	생중률(%)				유역차 (DMRT)	방제기(%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균		
네마닥터 골드	50.8	64.3	61.0	70.2	65.2	b	55.6
무 처리		153.5	149.6	137.1	146.8	a	-

CV(%)=3.1

5.1.2 토마토 뿌리혹선충에 대한 약제방제 효과(정식 후 53일차)-뿌리혹지수

시험약제	약제처리전 뿌리혹지수	뿌리혹지수(0-10)				유역차 (DMRT)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균	
네마닥터 골드	0	1.0	1.3	2.0	1.4	b
무 처리		4.0	3.7	3.7	3.8	a

5.1.3 토마토 뿌리혹선충에 대한 약제방제 효과(정식 후 80일차)-생중률(%)

시험약제	약제처리전 밀도 (마리)	생중률(%)				유역차 (DMRT)	방제기(%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균		
네마닥터 골드	50.8	81.4	76.8	76.1	78.1	b	66.4
무 처리		233.6	235.6	227.7	232.3	a	-

CV(%)=12.9

5.1.4 토마토 뿌리혹선충에 대한 약제방제 효과(정식 후 80일차)-뿌리혹지수

시험약제	약제처리전 뿌리혹지수	뿌리혹지수(0-10)				유역차 (DMRT)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균	
네마닥터 골드	0	2.0	1.7	2.7	2.1	b
무 처리		8.7	8.3	9.0	8.7	a

CV(%)=8.5

그림 119. 네마닥터 골드의 효능효과 시험 결과 보고서

## 라. 최종 제품의 위해성 평가

### (1) 최종 제품의 인축 독성 평가

#### (가) 피부자극성자극시험(액상형)

##### ① 연구목적

- 최종 제품(상품명 : “네마닥터”)의 처리에 따른 피부자극성시험 수행

##### ② 재료 및 방법

- 유기농업자재 등록용 피부자극성시험은 “한국생물안전성연구소”에 의뢰하여 수행함.

##### ③ 결과

- 결과는 한국생물안전성연구소 피부자극성시험 보고서로 제시함.

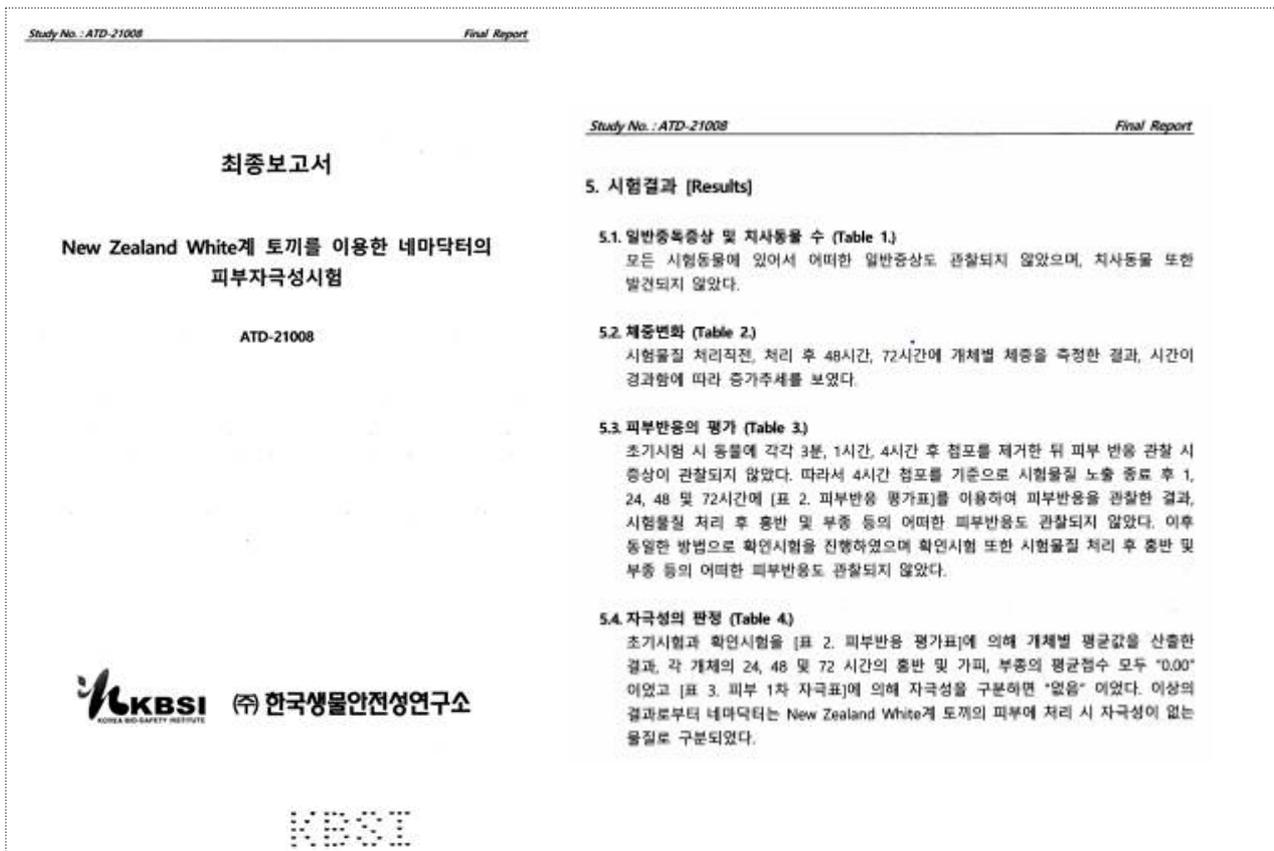


그림 120. 네마닥터의 피부자극성시험 결과보고서

## (나) 안점막 자극성 시험(액상형)

### ① 연구목적

- 최종 제품(상품명 : “네마닥터”)의 처리에 따른 안점막 자극성시험 수행

### ② 재료 및 방법

- 유기농업자재 등록용 안점막 자극성시험은 “한국생물안전성연구소”에 의뢰하여 수행함.

### ③ 결과

- 결과는 한국생물안전성연구소 안점막 자극성시험 보고서로 제시함.

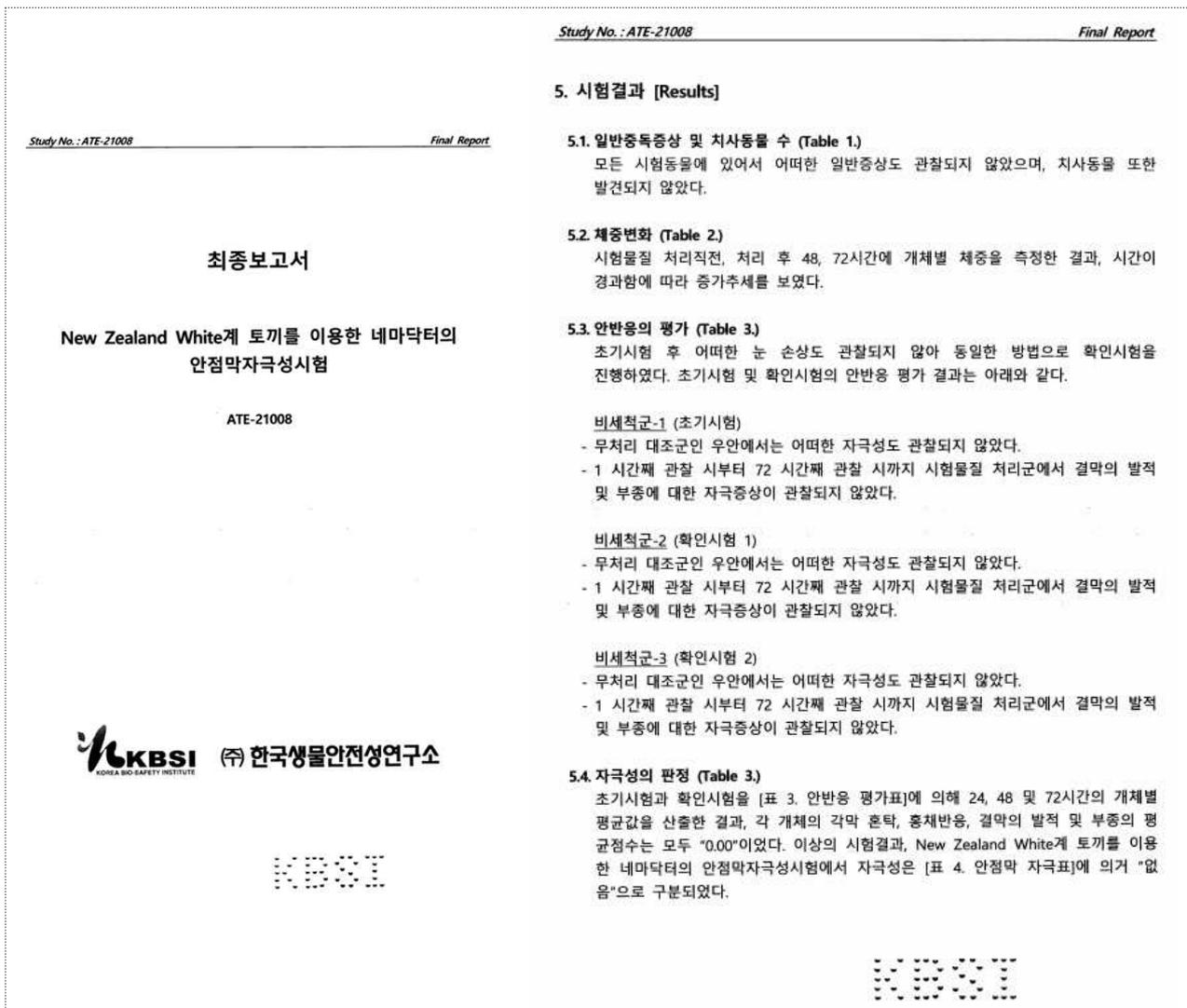


그림 121. 네마닥터의 안점막 자극성시험 결과보고서

## (다) 급성경구독성시험(액상형)

### ① 연구목적

- 최종 제품(상품명 : “네마닥터”)의 처리에 따른 급성경구독성시험 수행

### ② 재료 및 방법

- 유기농업자재 등록용 급성경구독성시험은 “한국생물안전성연구소”에 의뢰하여 수행함.

### ③ 결과

- 결과는 한국생물안전성연구소 급성경구독성시험 보고서로 제시함.

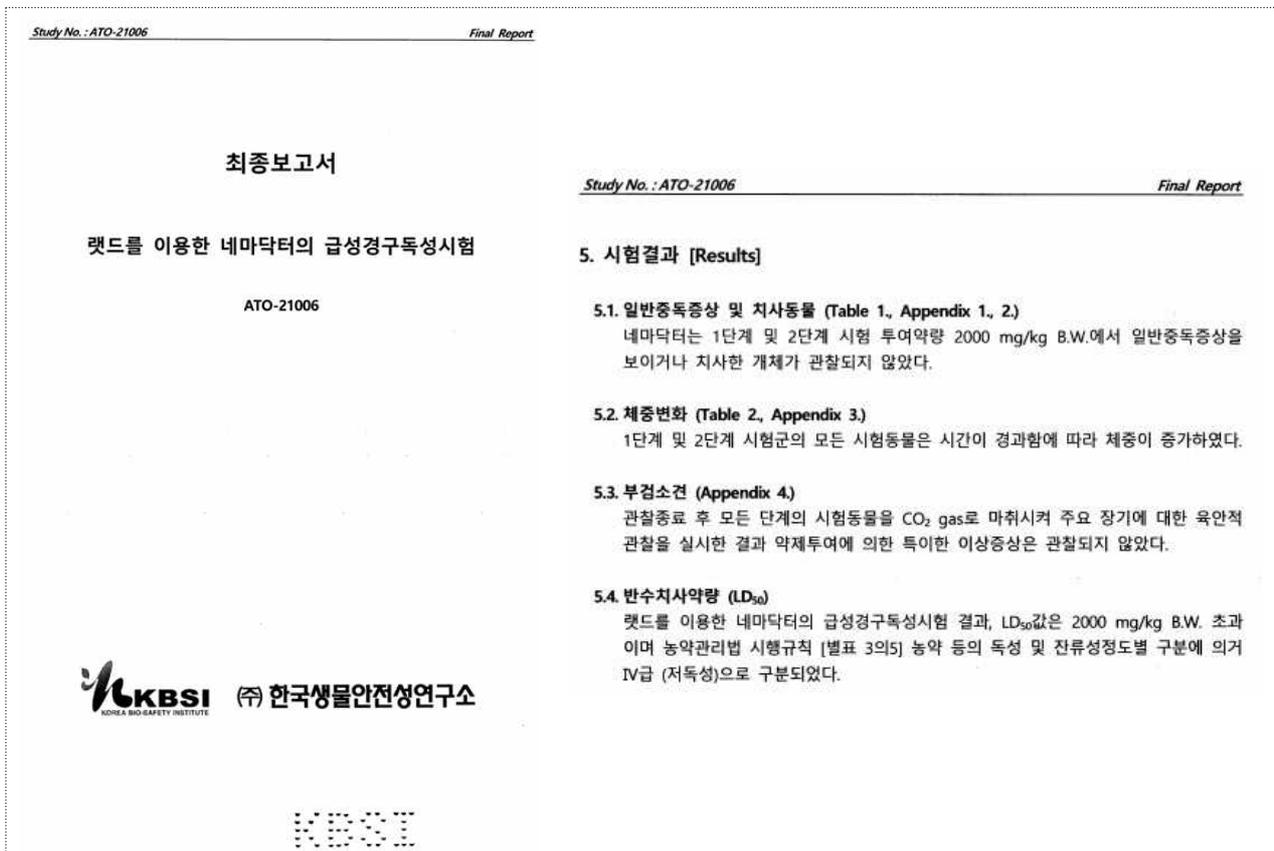


그림 122. 네마닥터의 급성경구독성시험 결과보고서

## (라) 급성경피독성시험(액상형)

### ① 연구목적

- 최종 제품(상품명 : “네마닥터”)의 처리에 따른 급성경피독성시험 수행

### ② 재료 및 방법

- 유기농업자재 등록용 급성경피독성시험은 “한국생물안전성연구소”에 의뢰하여 수행함.

### ③ 결과

- 결과는 한국생물안전성연구소 급성경피독성시험 보고서로 제시함.

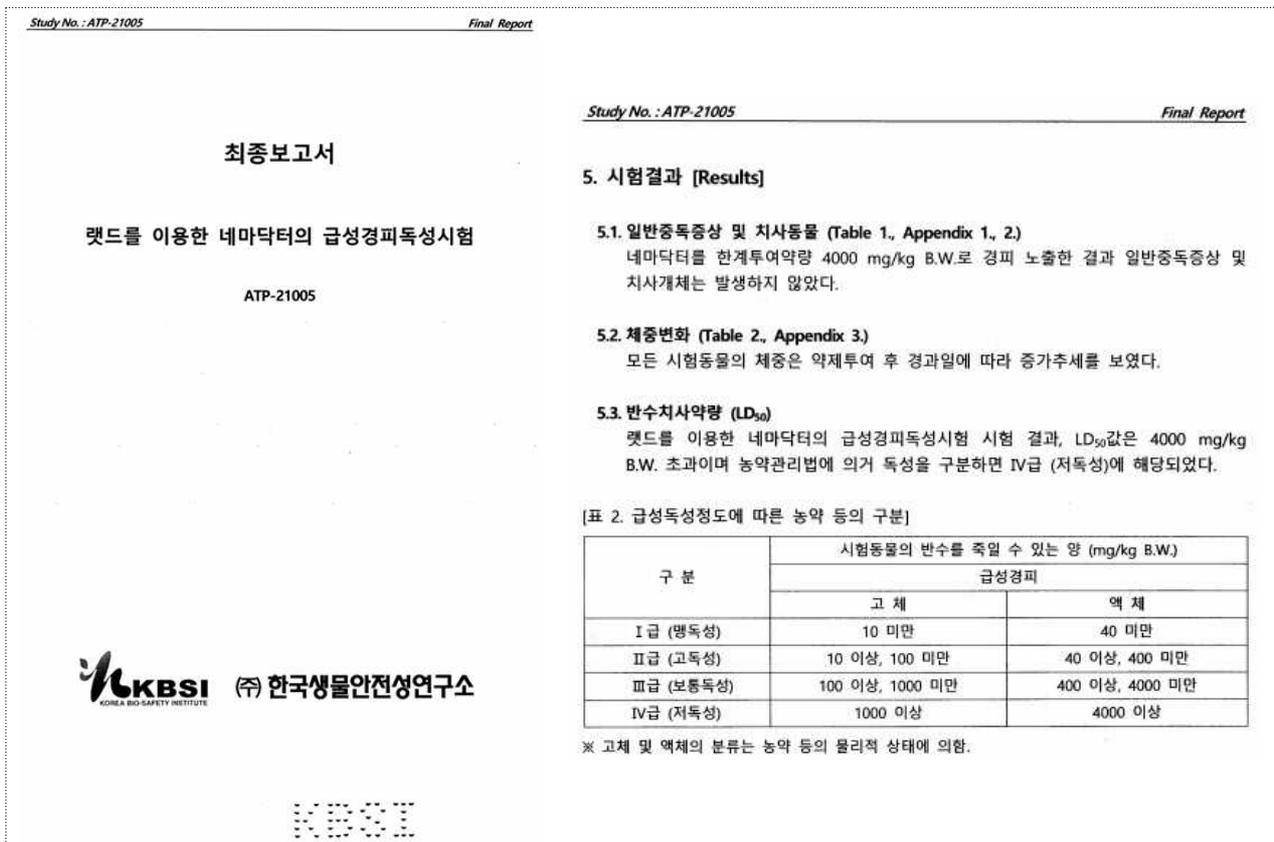


그림 123. 네마닥터의 급성경피독성시험 결과보고서

## (마) 피부자극성자극시험(서방출형)

### ① 연구목적

- 최종 제품(상품명 : “네마닥터 골드”)의 처리에 따른 피부자극성시험 수행

### ② 재료 및 방법

- 유기농업자재 등록용 피부자극성시험은 “한국생물안전성연구소”에 의뢰하여 수행함.

### ③ 결과

- 결과는 한국생물안전성연구소 피부자극성시험 보고서로 제시함.

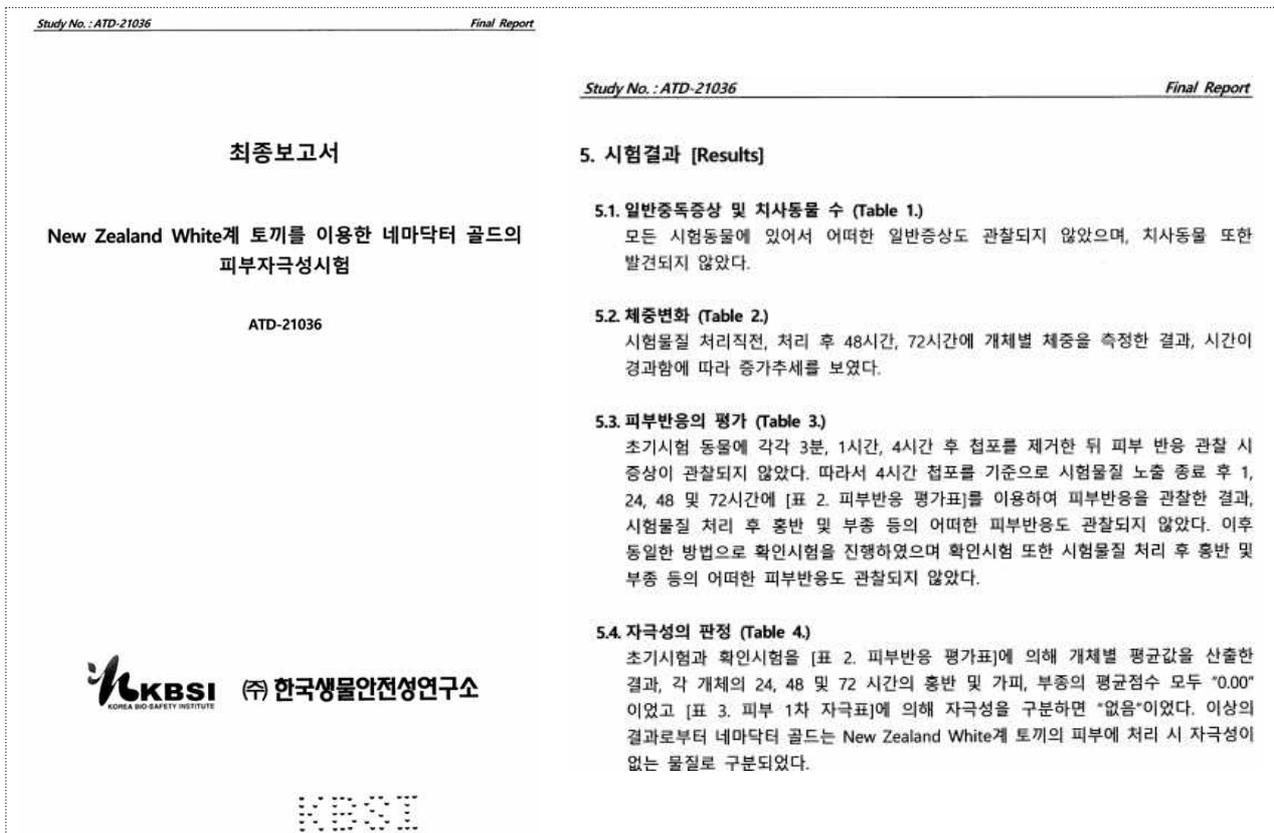


그림 124. 네마닥터골드의 피부자극성시험 결과보고서

## (바) 안점막 자극성 시험(서방출형)

### ① 연구목적

- 최종 제품(상품명 : “네마닥터골드”)의 처리에 따른 안점막 자극성시험 수행

### ② 재료 및 방법

- 유기농업자재 등록용 안점막 자극성시험은 “한국생물안전성연구소”에 의뢰하여 수행함.

### ③ 결과

- 결과는 한국생물안전성연구소 안점막 자극성시험 보고서로 제시함.

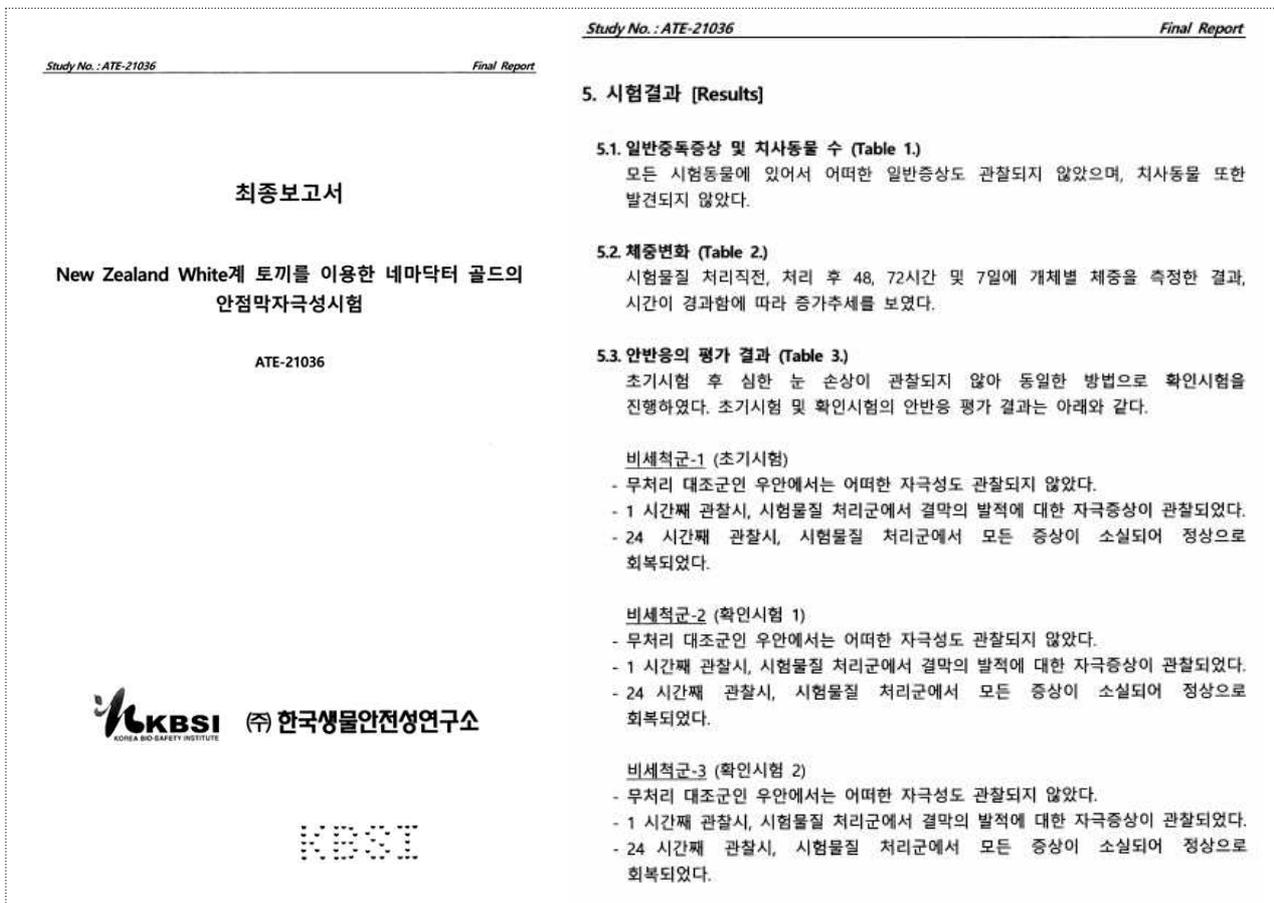


그림 125. 네마닥터골드의 안점막 자극성시험 결과보고서

## (사) 급성경구독성시험(서방출형)

### ① 연구목적

- 최종 제품(상품명 : “네마닥터골드”)의 처리에 따른 급성경구독성시험 수행

### ② 재료 및 방법

- 유기농업자재 등록용 급성경구독성시험은 “한국생물안전성연구소”에 의뢰하여 수행함.

### ③ 결과

- 결과는 한국생물안전성연구소 급성경구독성시험 보고서로 제시함.

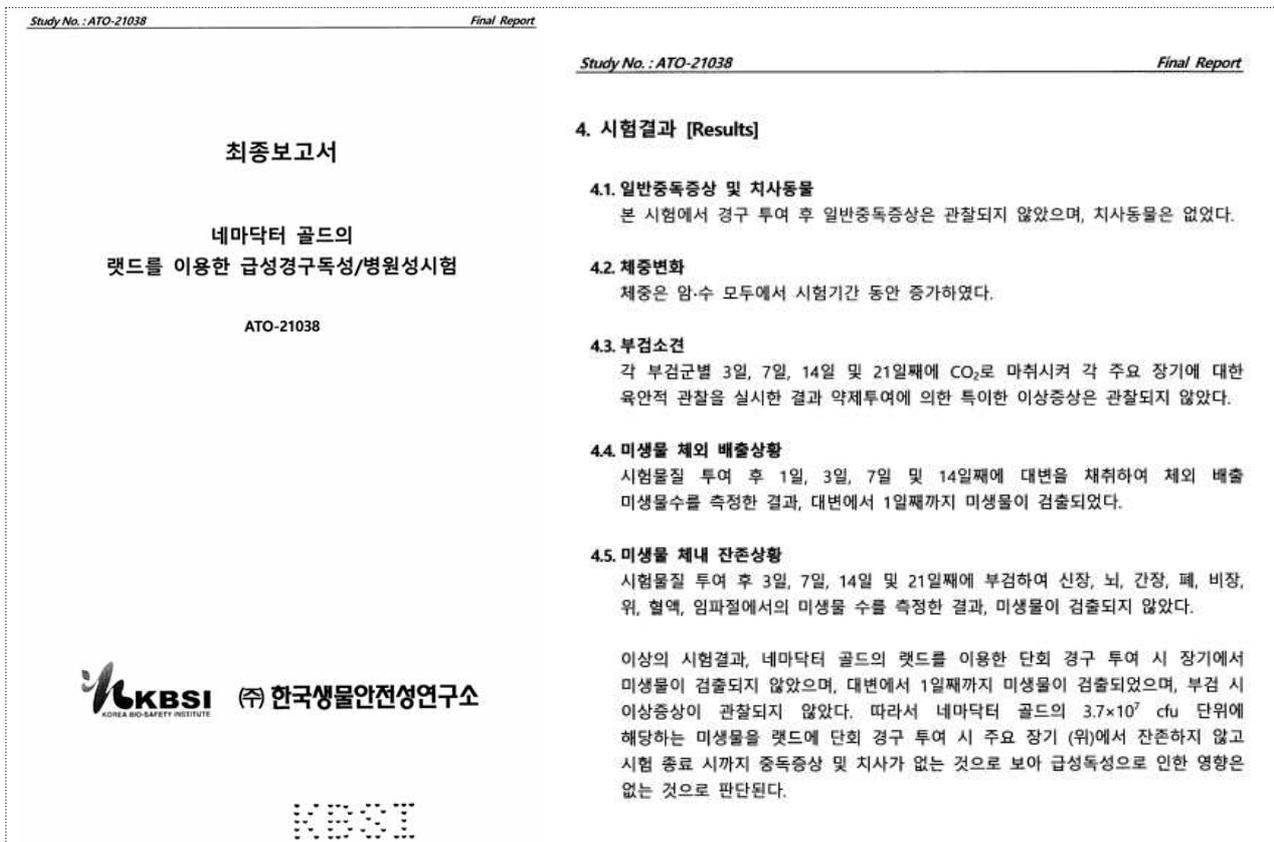


그림 126. 네마닥터골드의 급성경구독성시험 결과보고서

## (아) 급성경피독성시험(서방출형)

### ① 연구목적

- 최종 제품(상품명 : “네마닥터골드”)의 처리에 따른 급성경피독성시험 수행

### ② 재료 및 방법

- 유기농업자재 등록용 급성경피독성시험은 “한국생물안전성연구소”에 의뢰하여 수행함.

### ③ 결과

- 결과는 한국생물안전성연구소 급성경피독성시험 보고서로 제시함.

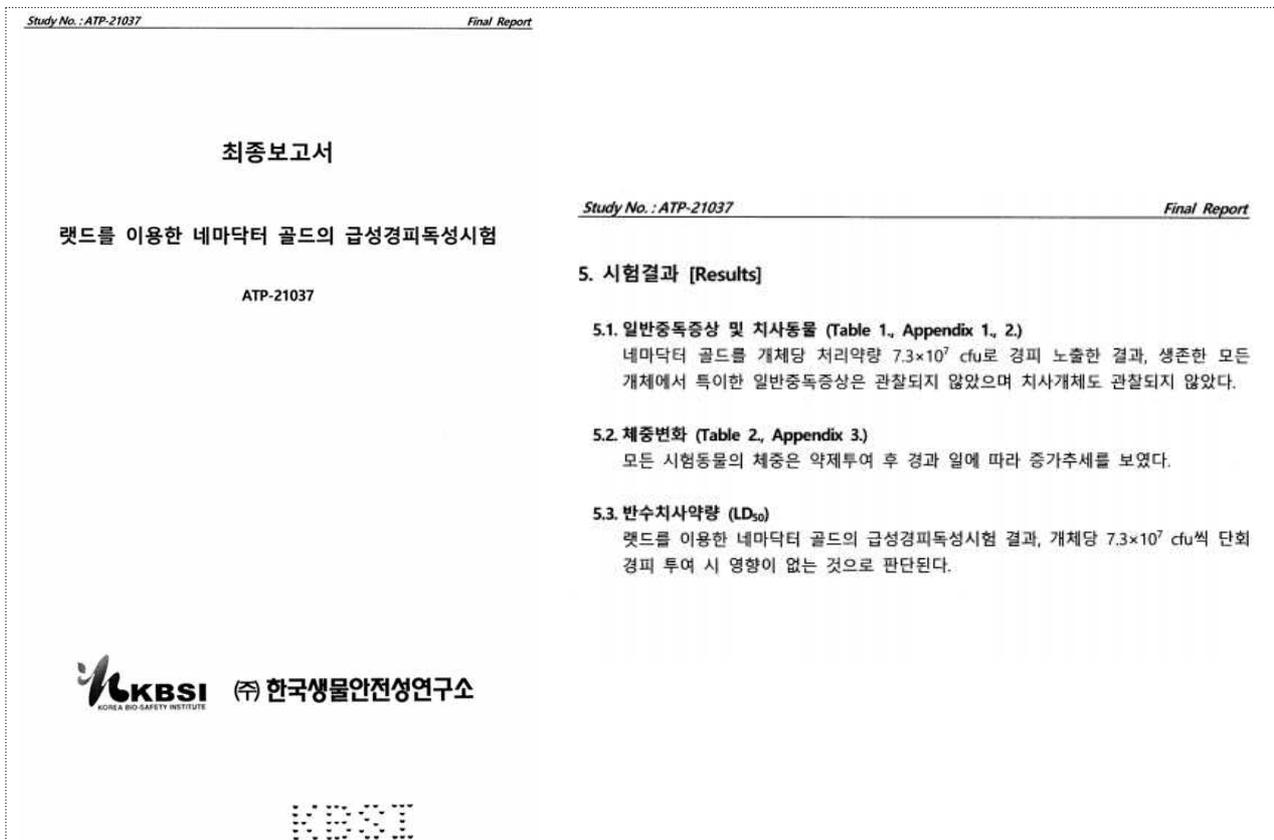


그림 127. 네마닥터골드의 급성경피독성시험 결과보고서

## (2) 최종 제품의 환경독성평가

### (가) 담수어류에 대한 급성독성시험(액상형)

#### ① 연구목적

- 최종 제품(상품명 : “네마닥터”)의 처리에 따른 담수어류에 대한 급성독성시험 수행

#### ② 재료 및 방법

- 유기농업자재 등록용 담수어류에 대한 급성독성시험은 “한국생물안전성연구소”에 의뢰하여 수행함.

#### ③ 결과

- 결과는 한국생물안전성연구소 담수어류에 대한 급성독성시험 보고서로 제시함.

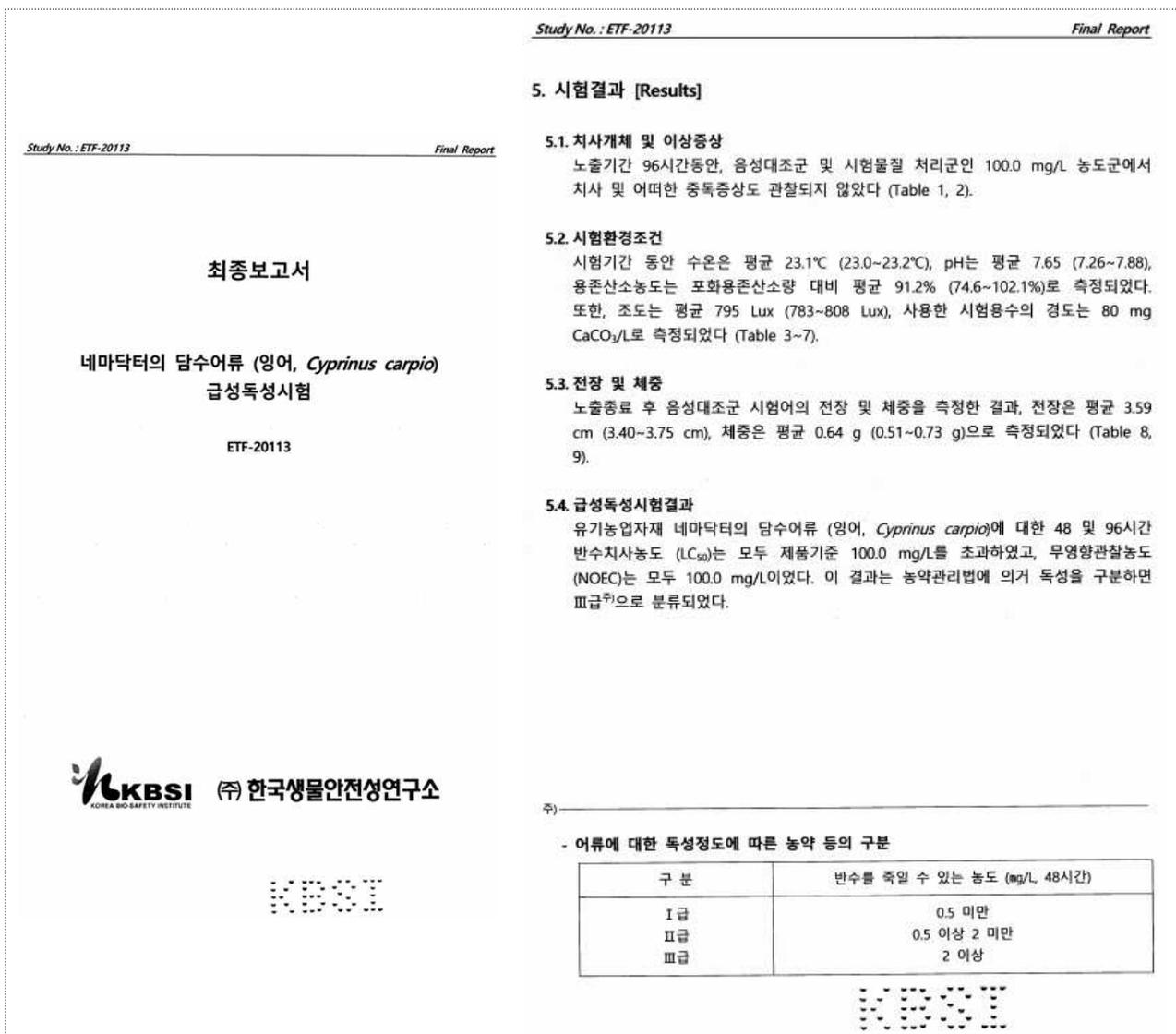


그림 128. 네마닥터의 담수어류에 대한 급성독성시험 결과보고서

## (나) 담수어류에 대한 급성독성시험(서방출형)

### ① 연구목적

- 최종 제품(상품명 : “네마닥터골드”)의 처리에 따른 담수어류에 대한 급성독성시험 수행

### ② 재료 및 방법

- 유기농업자재 등록용 담수어류에 대한 급성독성시험은 “한국생물안전성연구소”에 의뢰하여 수행함.

### ③ 결과

- 결과는 한국생물안전성연구소 담수어류에 대한 급성독성시험 보고서로 제시함.

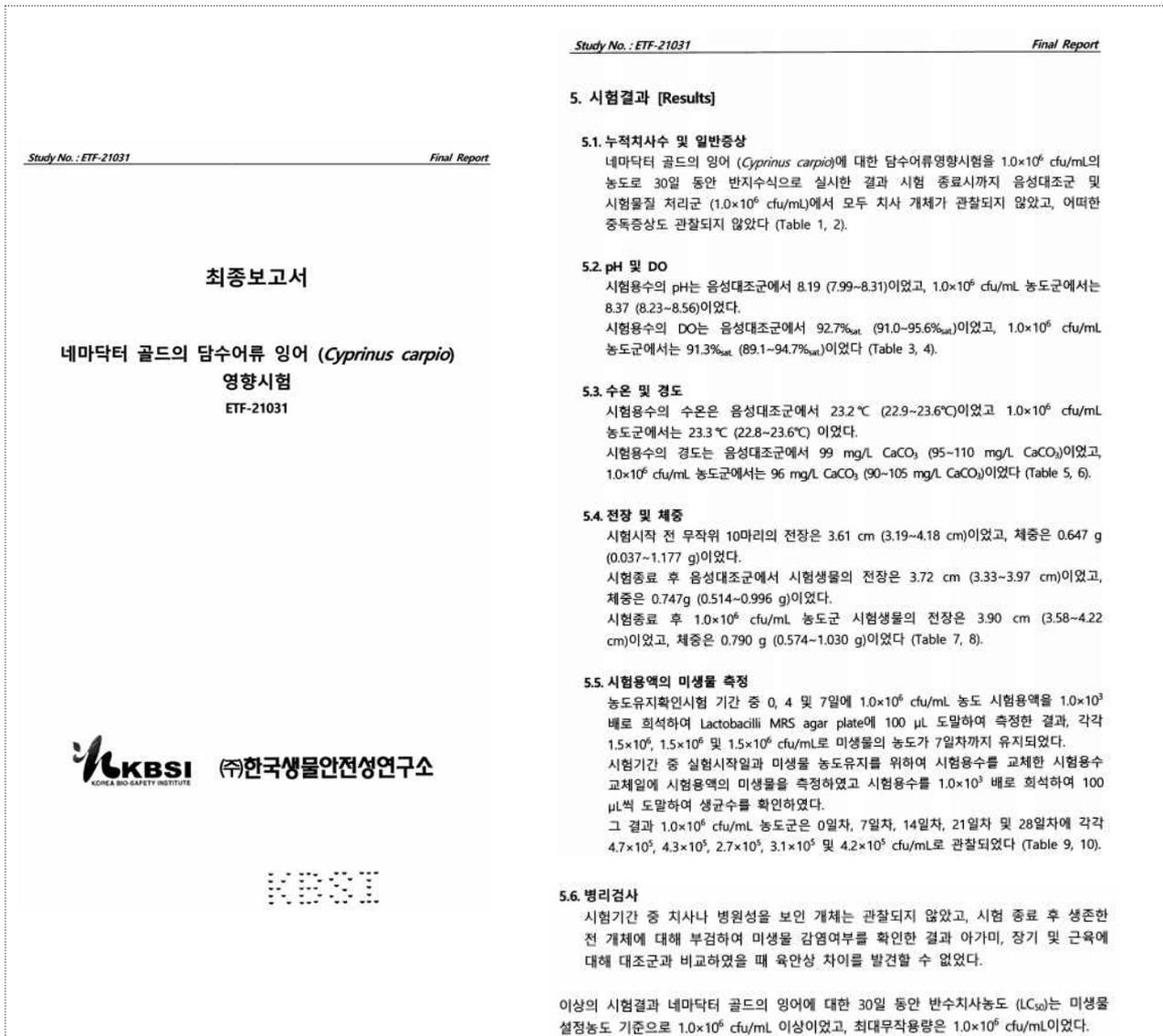


그림 129. 네마닥터골드의 담수어류에 대한 급성독성시험 결과보고서

### (3) 최종 제품의 병원성 평가

#### (가) 액상형 제품

##### ① 연구목적

- 최종 제품(상품명 : “네마닥터”)의 처리에 따른 병원성미생물(5종) 시험 수행

##### ② 재료 및 방법

- 유기농업자재 등록용 병원성미생물(5종)의 검사는 “친환경농산물안전성센터”에 의뢰하여 수행함.

##### ③ 결과

- 결과는 친환경농산물안전성센터의 병원성미생물 검사 보고서로 제시함.



그림 130. 네마닥터의 병원성 미생물5종 결과 보고서

## (나) 서방출형 제품

### ① 연구목적

- 최종 제품(상품명 : “네마닥터골드”)의 처리에 따른 병원성미생물(5종) 시험 수행

### ② 재료 및 방법

- 유기농업자재 등록용 병원성미생물(5종)의 검사는 “친환경농산물안전성센터”에 의뢰하여 수행함.

### ③ 결과

- 결과는 친환경농산물안전성센터의 병원성미생물 검사 보고서로 제시함.

제 EFAP-21-1206-M-2호 병원성미생물 검사성적서		
위탁자	① 성명 (법인명) ㈜마이크로자임      ② 주민등록번호 (법인등록번호) 409-86-19995	
주소	③ 주 소 전라남도 담양군 담양읍 태봉로 97, 2F	
공시품	④ 성 상 고상	
	⑤ 상표명 네마닥터 골드	
	⑥ 제조회사 ㈜마이크로자임	
	⑦ 검사방법 ○ 병원성미생물 선택배지를 이용한 검정	
	⑧ 용 도 등록/인증용(신규)	
③ 검 사 항 목	병원성 미생물	
	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
1) 본 성적서는 농촌진흥청 「비표공정규격설정 및 지정 별표 3」 및 국립농산물품질관리원 「유기농업자재 공시 기준 별표 5」의 규정에 의한 시험성적서임. 2) 본 성적서는 시료를 3만복 분석한 후의 결과 값임. 3) 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로서 전체제품에 대한 품질을 보증하지는 않음. 4) 본 성적서의 결과는 광고, 진단, 후보 및 소송 등의 수단으로 사용하실 수 없음.		
시험책임자	2021년 11월 4일 최은화	
강원대학교 산학협력단 친환경농산물안전성센터		



병원성 대장균(*Escherichia coli* O157:H7) 불검출



병원성 살모넬라(*Salmonella* spp.) 불검출



황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 불검출



리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*) 불검출



바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 불검출

그림 131. 네마닥터 골드의 병원성 미생물5종 결과 보고서





## 마. 최종 제품의 생산

### (1) 최종 제품의 등록 및 사용 방법

#### (가) 네마닥터(액상형 제품)

##### ① 유기농업자재 등록

- 최초 2021년 3월 25일에 개시하여, 2022년 1월27일에 효능효과를 포함한 유기농업자의 등록을 완료함.

■ 농림축산식품부 소관 친환경농업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙 [별지 제35호서식] (양쪽)

공시번호: 제 공시-2-6-063 호

### 유기농업자재 공시서

1. 업체명: ㈜마이크로자임
2. 대표자 성명: 심 영 근
3. 사업장 소재지: 전라남도 담양군 담양읍 태봉로 97, 2층(본관)
4. 자재의 명칭: 미생물추출물
5. 자재의 구분: 병해충관리용
6. 상표명: 네마닥터
7. 주성분(원료)의 종류 및 함량(%):
  - 주성분의 종류 및 함량: Inosine 22ppm
  - 원료의 종류 및 함량: 미생물추출물 100%
8. 유효기간: 2021. 03. 25. ~ 2024. 03. 24.
9. 제조장 주소 또는 수입원산지(국가, 제조사):  
전라북도 정읍시 첨단과학로 241, 시험생산동 및 벤처지원실 208호
10. 최초 공시일: 2021. 03. 25.
11. 최초 공시기관: 강원대학교 산학협력단

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

2022년 01월 27일

강원대학교 산학협력단

210mm×297mm(복합지 150g/㎡)

유기농업자재 공시 사항

○ 토양 개량 및 작물 생육

효능·효과	사용방법				비료등록사항	원료·재료 종류별 투입비율	비고
	적용대상 (작물명)	사용시기	사용량	처리방법			

○ 병해충 관리

효능·효과	사용방법				농약 등록사항	원료·재료 종류별 투입비율	비고
	적용대상 (작물명)	적 용 형태	사용시기 (횟수)	사용량			
(O) 고추 우 배추 상추		생육기	500배 희석	토양 관주처리	-	미생물추출물 100%	-
토마토	뿌리혹선충						

그림 134. 네마닥터의 유기농업자재 공시서

##### ② 사용방법

- 사용방법 : 500배 희석액을 제조하여 토양 관주 처리
- 적용대상 : 뿌리혹선충

## (나) 네마닥터골드(서방출형 제품)

### ① 유기농업자재 등록

- 네마닥터 골드의 효능효과 시험의 결과 도출 지연에 따라 과제 기간 내 유기농업자재의 도출은 미흡하였으나, 2022년 3월24일에 효능효과를 포함한 유기농업자의 등록을 완료함.

농림축산식품부 소관 친환경농업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙 [별지 제35호서식] (양식)

공시번호: 제 공시-2-5-283 호

### 유기농업자재 공시서

- 업체명: ㈜마이프로자임
- 대표자 성명: 심 영 근
- 사업장 소재지: 전라남도 담양군 담양읍 태봉로 97, 2층
- 자재의 명칭: 미생물
- 자재의 구분: 총해관리용
- 상표명: 네마닥터 골드
- 주성분(원료)의 종류 및 함량(%):
  - 주성분의 종류 및 함량: *Lactobacillus sakei* 1.0×10<sup>8</sup> cfu/g
  - 원료의 종류 및 함량: 미생물배양액(*Lactobacillus sakei*) 10%, 보조제 90%
- 유효기간: 2022. 03. 24. ~ 2025. 03. 23.
- 제조장 주소 또는 수입원산지(국가, 제조사):  
전라북도 정읍시 첨단과학로 241, 시험생산동 및 벤처지원실 208호
- 최초 공시일: 2022. 03. 24.
- 최초 공시기관: 강원대학교 산학협력단

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

2022년 03월 24일

강원대학교 산학협력단

210mm×297mm(박상지 150g/㎡)

유기농업자재 공시 사항

○ 트양 개량 및 작물 생육

효능·효과	사용방법				비료등록 시험	원료·재료 종류별 투입비율	비고
	적용대상 (작물명)	사용시기	사용량	처리방법			

○ 병해충 관리

효능·효과	사용방법				농약 등록사항	원료·재료 종류별 투입비율	비고
	적용대상 (작물명)	적 용 형태	사용시기 (횟수)	사용량			
(O) 당근 상추 수박 참외						미생물배양액 ( <i>Lactobacillus sakei</i> ) 10% 보조제 90%	
도마토	뿌리혹선충						

그림 135. 네마닥터골드의 유기농업자재 공시서

### ② 사용방법

- 사용방법 : 15kg 입제를 300평에 토양 혼입 처리
- 적용대상 : 뿌리혹선충

## (2) 최종 제품의 제품생산공정

### (가) 미생물의 기술이전

- 최종 제품인 네마닥터 및 네마닥터 골드의 선충 방제 유효성분을 생산하는 미생물인 *L. sakei* wikim0118의 균주 사용 및 노하우에 대해 전남대학교 및 세계김치연구소로부터 기술 이전 받음.

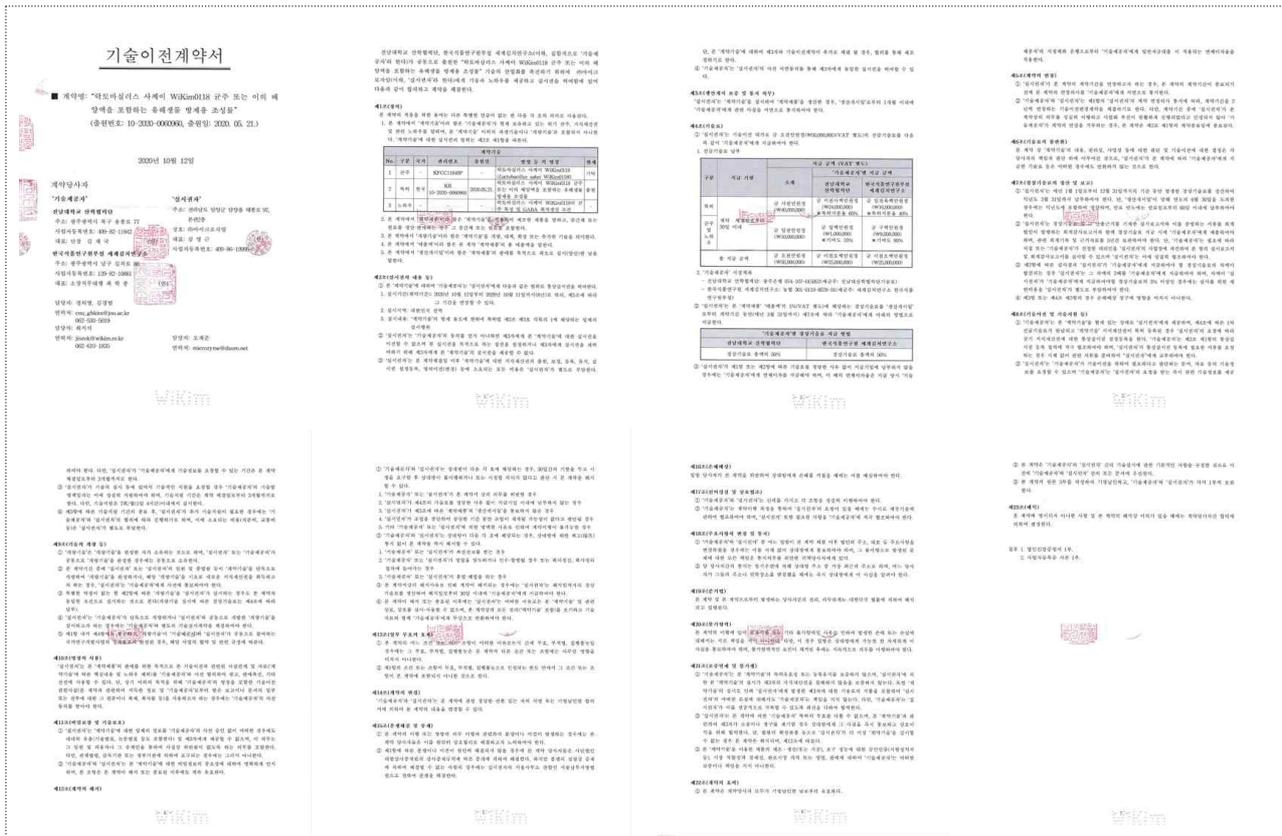


그림 136. 살선충 물질 생성 균주 및 관련 노하우 기술이전 계약서

### (나) 제품의 제조 공정

#### ○ 배지 조성

Component	content(%)
Galactose	2.0
Soytone	2.0
Tween80	0.1
Potassium posphate	0.5
Sodium acetate	1.0
Ammonium citrate	0.2
Magnesium sulfate	0.1
Manganese sulfate	0.1
Nacl	1.0
MSG	10.0

#### ○ 배양 profile

Scale	5ton
working volume	3.7ton(70%)
Incabation time	>48hr
Seed	10%
Medium	16.04%
Temperature	30℃
RPM	150
PH control time	22hr
Air(vvm)	0.03
Pressure	0.2
pH control agent	Citric acid 50%
Sterilization	80℃, 20min
Cooling conditions	10min
Form agent	CS-205

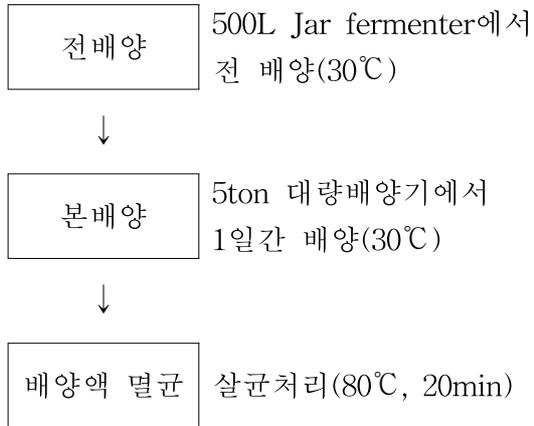
○ 네마닥터의 성분 구성도

Component	content(%)
<i>L. sakei</i> extract broth	91.0
Sodium benzoate	3.0
Ethylene glycol	3.0
Tween 80	3.0

○ 네마닥터 골드의 성분 구성도

Component	content(%)
<i>L. sakei</i> broth	8.3
Sodium benzoate	0.3
Ethylene glycol	0.3
Tween 80	0.3
Zeolite	81.8
Talc powder	9.1%

○ 네마닥터의 생산 공정도



○ 네마닥터 골드의 생산 공정도

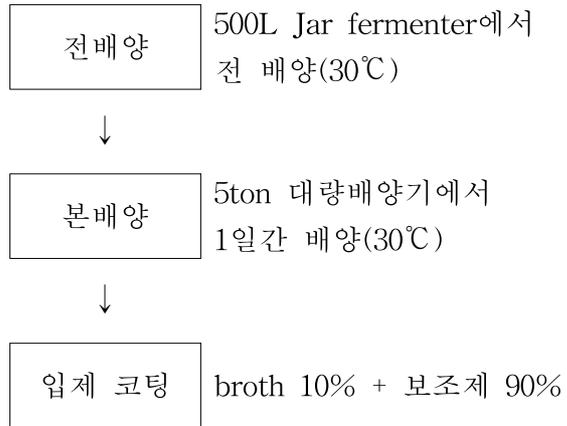


표 52. 도출 제품의 규격

구분	네마닥터	네마닥터 골드
제품의 성상		
완제품 형태		
제품의 규격 및 재원	○ 충해관리용(뿌리혹선충)자재 ○ 1L 액상제	○ 충해관리용(뿌리혹선충)자재 ○ 5kg 입제

## (다) 제품의 품질 관리

### ① 연구목적

- 최종 제품(상품명 : 네마닥터, 네마닥터 골드)의 등록성분의 함량 분석

### ② 재료 및 방법

- 네마닥터의 유기농업자재 등록용 이화학성분분석을 통한 유효성분 분석 및 미생물 중동정 및 균수 분석은 “친환경농산물안전성센터”에 의뢰하여 수행함.

### ③ 결과

- 네마닥터 및 네마닥터골드의 유효물질에 관한 수행성적서를 친환경농산물안전성센터에서 분석한 결과보고서로써 제시함.

발급번호 제 EFAP-20-1251-A-1 호				
이화학적 분석성적서				
분석년월일	2020. 12. 23.	제조(수입)년월일 (Batch No.)	2020. 11. 27.	
시험책임자	소속	위촉환경농산물안전성센터	성명	허경진
분석의뢰자	㈜마이프로자임			
품목명	네마닥터			
유효성분의 명칭 및 함유량	Inosine			
분 석 결 과				
분석항목	분석회수	분석치(mg/kg)		분석방법
1. 유효성분	1	28.350		HPLC/UVD를 이용한 정량 분석
	2	27.689		
	3	28.336		
	평균치	28.13		
	표준편차	0.38		
2. 물리성	항목	검사결과		
	수화성	- 해당사항 없음 -		
	분말도	- 해당사항 없음 -		
3. 외관	성상	-	색상	-
4. 시험항목 (의뢰자 기재)			냄새	-
첨부 자료 ○ 성적계산서 및 크로마토그램				
1) 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로서 전체제품에 대한 품질을 보증하지는 않음. 2) 본 성적서의 결과는 광고, 전단, 홍보 및 소송 등의 수단으로 사용하지할 수 없음.				
2020년 12월 24일				
(주)친환경농산물안전성센터 				

제 EFAP-21-1206-M-1호			
미생물제제 분석성적서			
위탁자	① 성명 (법인명)	㈜마이프로자임	② 주민등록번호 (법인등록번호)
	③ 주소	전라남도 담양군 담양읍 태봉로 97, 2F	
공시품	④ 성상	고상	
	⑤ 상표명 (유효미생물)	네마닥터 골드 ( <i>Lactobacillus sakei</i> )	
	⑥ 제조회사	㈜마이프로자임	
⑦ 검사방법	1. 유전자 염기서열 상동성 검색을 통한 균주 확인		
⑧ 용도	등록/인증용(신규)		
⑨ 분석항목	유효미생물		분석치 [cfu/mL(g)]
	<i>Lactobacillus sakei</i>		1.1 × 10 <sup>7</sup>
1) 본 성적서는 농촌진흥청 「비료공정규격설정 및 지정 별표 3」 및 국립농산물품질관리원 「유기농업자재 공시 기준 별표 5」의 규정에 의한 시험성적서임. 2) 본 성적서는 시료를 3번씩 분석한 후의 결과 값임. 3) 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로서 전체제품에 대한 품질을 보증하지는 않음. 4) 본 성적서의 결과는 광고, 전단, 홍보 및 소송 등의 수단으로 사용하지할 수 없음.			
시험책임자	2021년 11월 4일 최은화 		
강원대학교 산학협력단 친환경농산물안전성센터 			

그림 137. 네마닥터 및 네마닥터 골드의 유효성분 분석 결과

## ■ 김치유래 미생물을 이용한 뿌리혹선충 방제용 미생물 탐색 및 이용 연구

### 가. 김치 유래 미생물을 이용한 뿌리혹선충 방제용 미생물 탐색 및 활성 물질 구명

#### (1) 살선충 생성 균주의 분리 및 선정

##### ① 연구목적

- 선충 특이적 신경 조절 수용체의 활성물질을 생성하는 후보 균주의 선정

##### ② 재료 및 방법

###### ㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : 김치로부터 분리한 유산균 250종
- 기본 배지 : MRS broth
- 살충물질 분석 : TLC plate silicagel 60 F254(Merck)

###### ㉡ 시험방법

- MRS 액체 배지에 3% monosodium glutamic acid(MSG)를 첨가한 후 30℃에서 48시간 정치 배양하여 얻은 배양물을 대상으로 TLC 분석을 통해 살충물질 생성을 평가함.

##### ③ 결과

- 선충은 독립적으로 특이적 흥분성 신경 조절 채널이 존재하며, 이의 활성화를 위한 물질로 결정되어진 gamma-aminobutyric acid를 목표물질로 설정함.
- 유산균 250종 중 본 살충물질의 생성이 우수한 15종을 분리 및 확보하였음(그림 1).

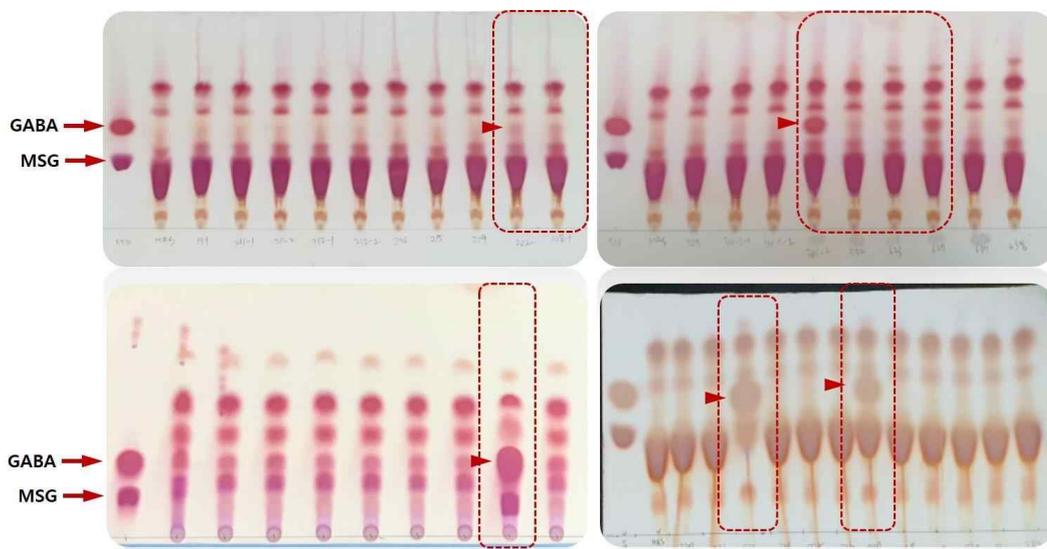


그림 1. TLC에 의한 살충물질 생성능 확인

- 유산균 15종의 살충물질 생성 균주 중 살선충 후보균을 선정(협동 2기관과의 공동실험) 하기 위해, 유산균 배양액 처리 후 선충의 운동성을 관찰한 결과 361-2 균주 배양액 처리 구에서 운동성이 현저히 저해됨을 확인함(그림 2).

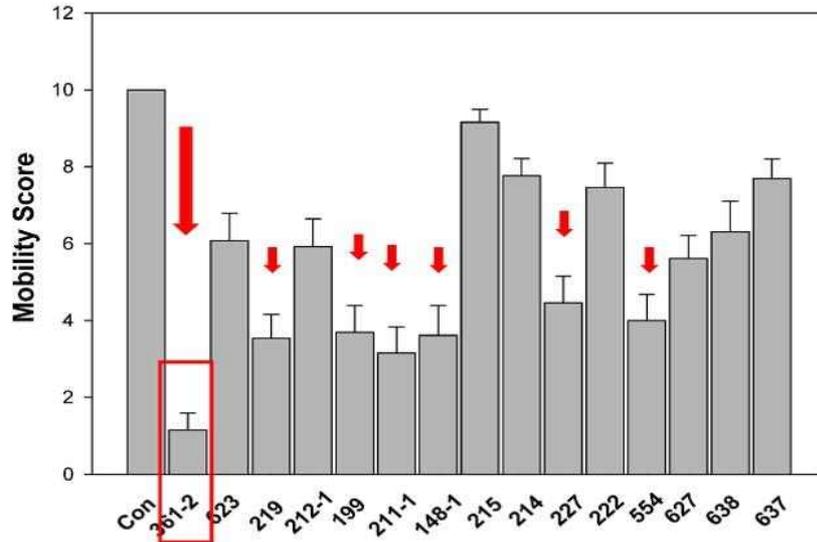


그림 2. 살충물질 생산 균 처리에 따른 선충 운동성 평가

- 선충 운동성 저해효과를 보이는 361-2 균주 처리 후 배양시간에 따른 선충 운동성 파악 결과, 처리 6시간 이후 선충이 사멸되는 것을 확인함(그림 3).

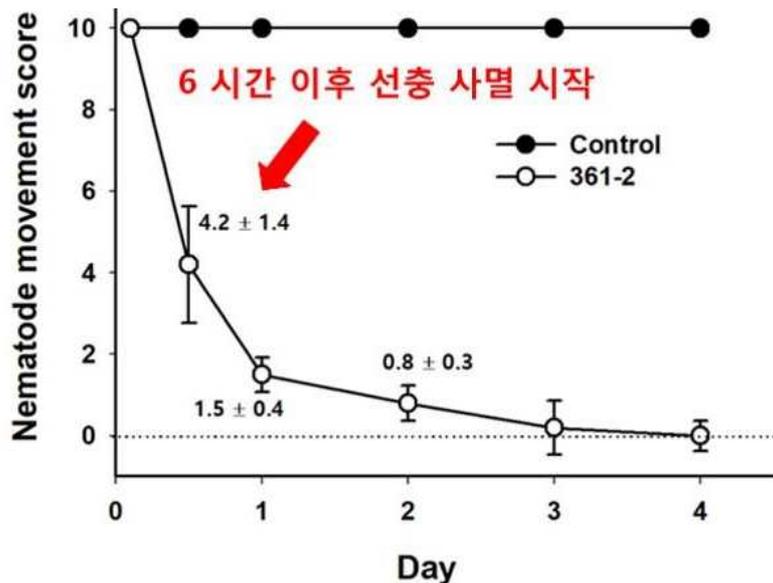


그림 3. 361-2 균주 처리 후 시간 경과에 따른 선충 운동성 평가

- 본 선발된 361-2 균주를 동정하기 위해, 16S rRNA 염기서열을 분석한 결과, *Lactobacillus sakei*로 동정되었으며, 이를 *Lb. sakei wikim0118*로 명명함(그림 4).

명칭	Wikim0118 16S rRNA
서열	CTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCACTCTCGTTTAGATTGAAGGAGCTTGCTCCTGATTGATAAACAT TTGAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTAAAGTGGGGGATAACATTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAA ACCTAACACCGCATGGTGTAGGGTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTTAGGATGGACCCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAAG GCTCACCAAGACCGTGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA GTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTGTGTGGAG AAGAATGTATCTGATAGTAACTGATCAGGTAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGT AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGA AGTGATCGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGGTAGATATATGGAAGAACACC AGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGTCGAAAGCATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCC GTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAA GGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT GACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCAGCTCGTGTCTGAGAT GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAACCGG AGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCG CGAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAACATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGTAGTAATCGCGGA TCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACCCCGCTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGCCGGTGAGGTAAC CCTTCGGGGAGCCAGCCGTCTAAGGTGGGACAGATGA

그림 4. 361-2 균주의 16S RNA 염기서열 분석 결과

④ 결론

- 후보균 가운데, 살충물질의 생산성 및 선충 방제능이 우수한 361-2균주를 최종 선발하였고, 이를 16S rRNA 분석 결과 *Lactobacillus sakei*로 동정되었으며, 이를 *Lb. sakei wikim0118*로 명명함.

(2) 살 선충 물질 생성 균주의 특성 분석

① 연구목적

- 선발 균주의 배양 환경에 따른 살선충 물질 생성 특성 평가

② 재료 및 방법

㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : *Lb sakei wikim0118*
- 기본 배지 : MRS broth
- 살충물질 정성적 분석 : TLC plate silicagel 60 F254(Merck)
- 살충물질 정량적 분석 : Gabase from pseudomonas fluorescens(Merck)

㉡ 시험방법

▣ 균의 생육도

- 시료를 살균 증류수에 현탁한 후 희석하여, *Lactobacillus sakei* 측정용 배지(MRS medium, difco)에 접종함.
- 30°C 항온기에서 48시간 배양 후 대표적 콜로니를 계수하여, Vible cell을 측정하였음.

□ 살충물질 정량 분석

- GABA transaminase는 GABA와  $\alpha$ -ketoglutarate를 glutamate와 succinic semialdehyde로 전환시키고, 생성된 succinic semialdehyde와 NADP+는 succinic semialdehyde dehydrogenase에 의해 succinate와 NADPH가 생성됨.
- 효소 GABA transaminase, succinic semialdehyde dehydrogenase를 첨가하고, 각각 필요한 기질  $\alpha$ -ketoglutarate, NADP+를 첨가시켜 효소반응 후 생성된 NADPH 양으로 GABA의 양을 측정함.

③ 결과

□ 배양온도에 따른 Wikim0118의 증식과 살충물질 생산성(그림 5)

- 배양온도 25°C~37°C범위에서 WiKim0118의 증식과 살충물질의 생산성을 측정한 결과, 30°C가 최적 증식 및 살충물질의 생산량을 나타냄.

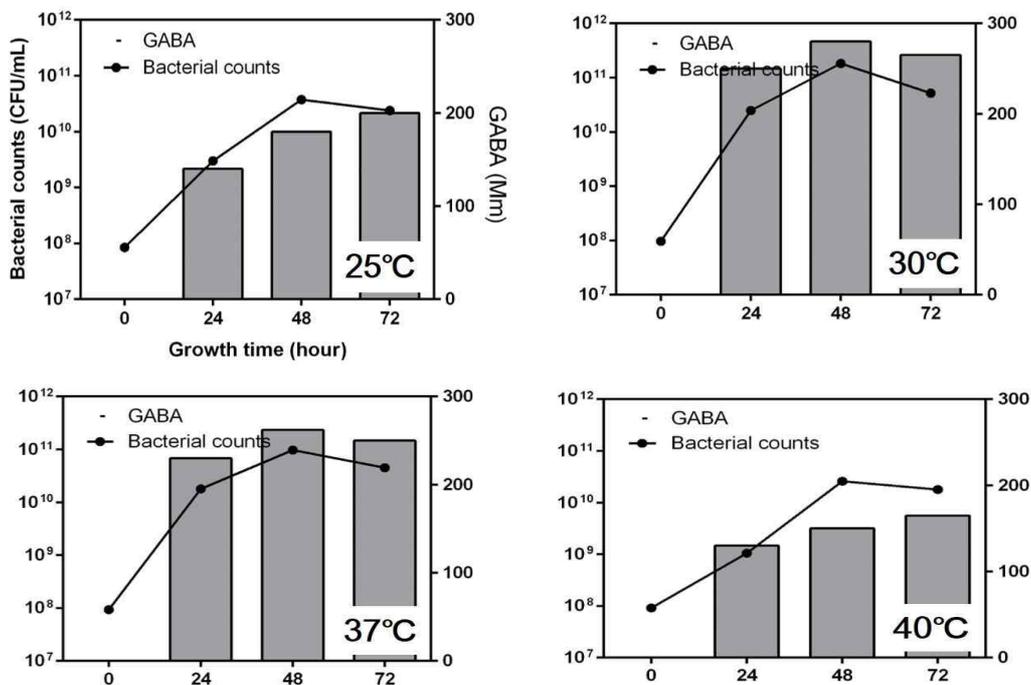


그림 5. 배양온도에 따른 Wikim0118 생육도 및 살충물질의 생산성

□ 배지의 MSG 농도에 따른 Wikim0118의 증식과 살충물질 생산성(그림 6)

- MSG 농도가 5%까지는 Wikim0118의 증식에 유의적인 영향을 미치지 않는으나, 7% 이후에는 균 생육이 저해됨.
- 균체 증식은 MSG 0-3% 첨가 시 가장 높았고, 살충물질의 생산은 3% 첨가 배양에서 가장 높았음.

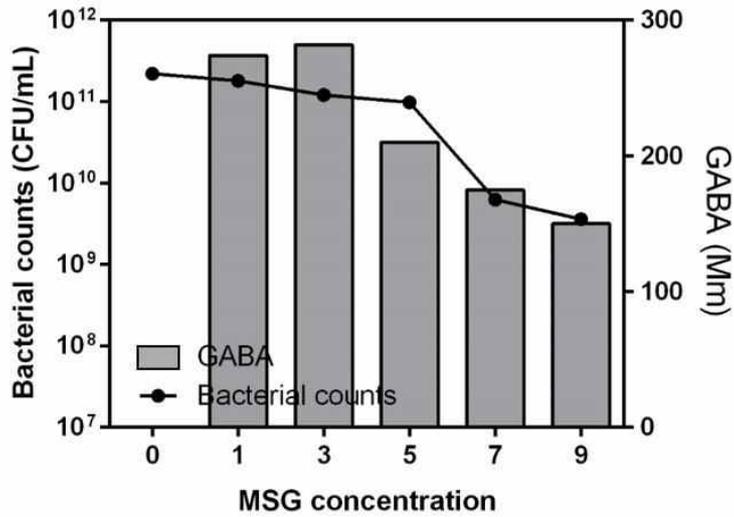


그림 6. 배지 내 MSG 농도에 따른 Wikim0118 생육도 및 GABA 생산성

□ Wikim0118 생육시기에 따른 GABA 생산(그림 7)

- MSG 3% 첨가된 MRS 액체배지에서 30℃, 4일간 정치배양하며, 생균수와 살충물질 생성량을 측정하였음.
- 생육초기 유도기(0-9시간)에서 살충물질 생성량은 거의 없었으나, 12시간부터 대수기가 시작되며 살충물질의 생성이 시작되었음.
- 36시간에 정지기에 이르고 60시간 이후 사멸기에 도달함.
- 살충물질은 GAD 효소에 의해 MSG가 전환되어 생성되므로 정지기 이후에도 지속적으로 증가하여 48시간-60시간에 최대 생성량을 나타냄.

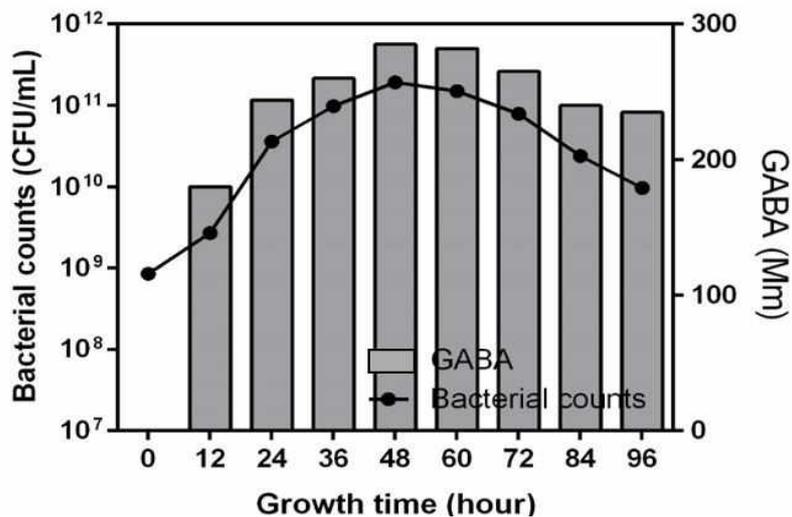


그림 7. Wikim0118 생육시기에 따른 생육곡선 및 살충물질 생산성

□ 배지의 초기 pH 영향(그림 8)

- 0.5 N NaOH 또는 0.5N HCl로 pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10으로 보정한 3% MSG가 첨가된 MRS 액체 배지에 30℃에서 48일간 정치 배양하여 Wikim0118 생육시기에 따른 살충물질 생산능을 검토함.
- 배지 초기 pH 5.0부터 pH 7.0까지는 원만한 생육 결과를 보이나, 그 중 생육 최적 pH 구간은 5-6이었으며, 살충물질의 최적 pH도 5-6 구간이었음.

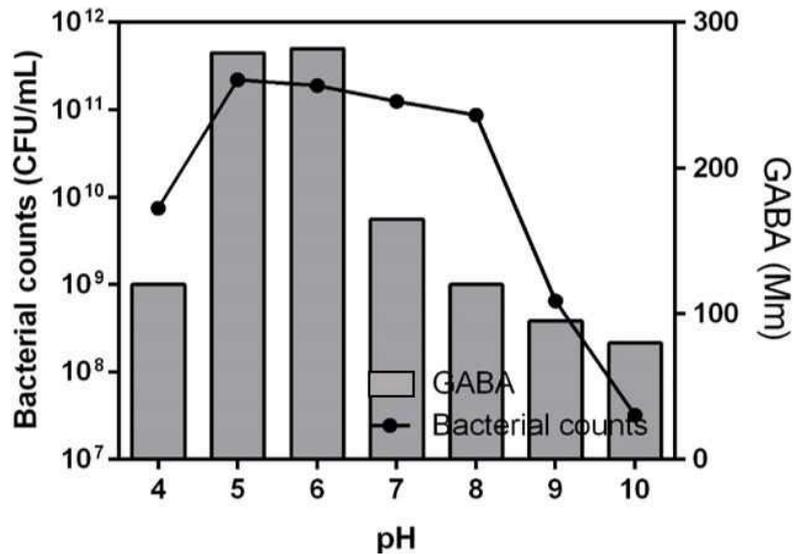


그림 8. 배지 초기 pH에 따른 Wikim0118 생육도 및 살충물질 생산성

□ NaCl 농도에 따른 영향(그림 9)

- NaCl이 살충물질 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 3% MSG가 첨가된 MRS 액체 배지에 NaCl을 0-7%가 되게 첨가 후 생육도와 살충물질의 생산성을 측정함.
- 측정 결과 NaCl 1% 첨가 시 생육도와 살충물질 생성량이 가장 높았음.

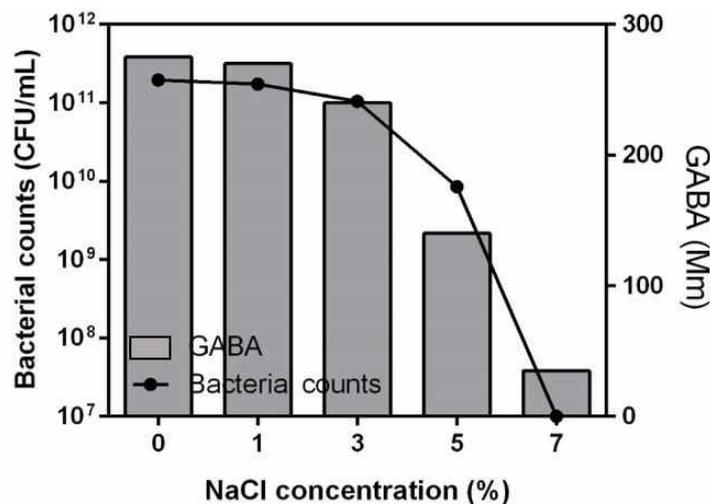


그림 9. 배지 내 NaCl 농도에 따른 Wikim0118 생육도 및 살충물질 생산성

□ 1세부의 최적 배지를 적용한 균체의 배양학적 특성

- 대조구를 MRS 배지로 설정하고, 시험구인 최적배지를 대상으로 Wikim0118의 생육도 및 살충물질 생산량을 비교하였음.
- 배지 내 MSG의 함량은 제 1세부에서 제시하는 7%를 기준으로 함유 유무에 따른 생육도를 평가하여, 생육 stress를 평가하였고, 30℃에서 최대 90시간까지 배양하였음.
- MSG를 첨가하지 않은 대조구 및 최적화 배지 모두 24시간 전후로 지속 성장하여, 안정기에 도달한 결과를 보임(그림 10).
- 반면 7%의 MSG를 혼합한 조건에서 대조구의 경우 생육도의 저하가 초래되었으나, 최적화 배지의 경우 MRS 첨가 유무과 관계없이 생육에 큰 변화가 없었음(그림 10).

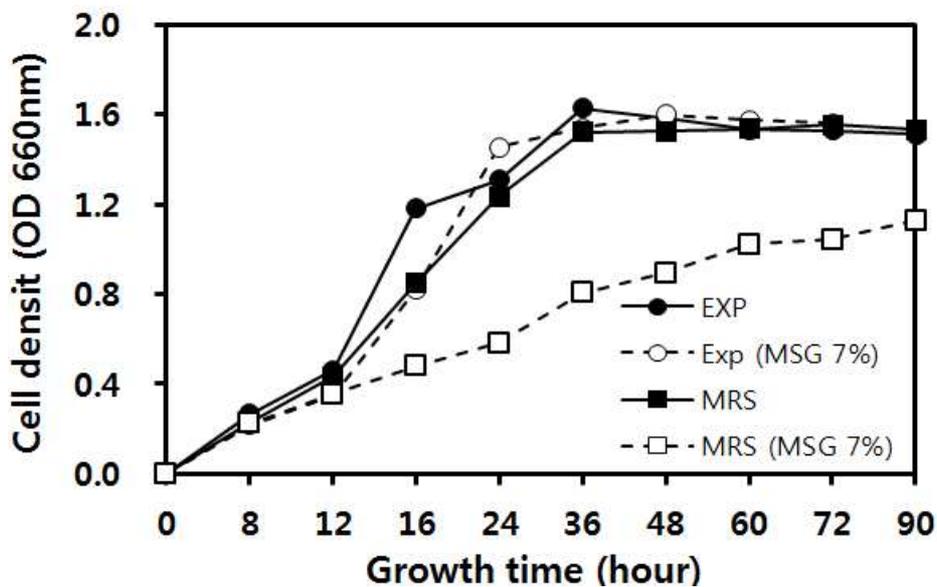


그림 10. 1세부의 최적배지를 반영한 균체의 생육도 평가

- 1세부에서 적용한 탄소원은 wikim0118의 생육 및 살충물질 생성 최적 탄소원으로 적용된 반면, 대조구인 MRS 배지는 범용 탄소원의 복합 배지임.
- 최적화 배지는 MSG 소비적 관점에서 최적화 되어 있는 탄소원의 적용으로, MSG 고농도 첨가량에 대한 소비가 쉬운 탄소원의 활용으로, 농도에 따른 스트레스가 완화된 결과로써 사료됨.
- 반면 MRS 배지에서 MRS 7%를 함유한 배지조성에서의 살충물질 생산량은 36시간부터 본격적으로 생산되기 시작하여, 72시간 가장 높은 수준을 보임(그림 11).
- 제 1세부의 최적화 배지는 24시간에 가장 높은 살충물질 생산능력을 보였고, 이후 소폭 감소하는 양상을 보이거나 대조구 대비 우수한 살충물질 생산성을 보임(그림 11-12).

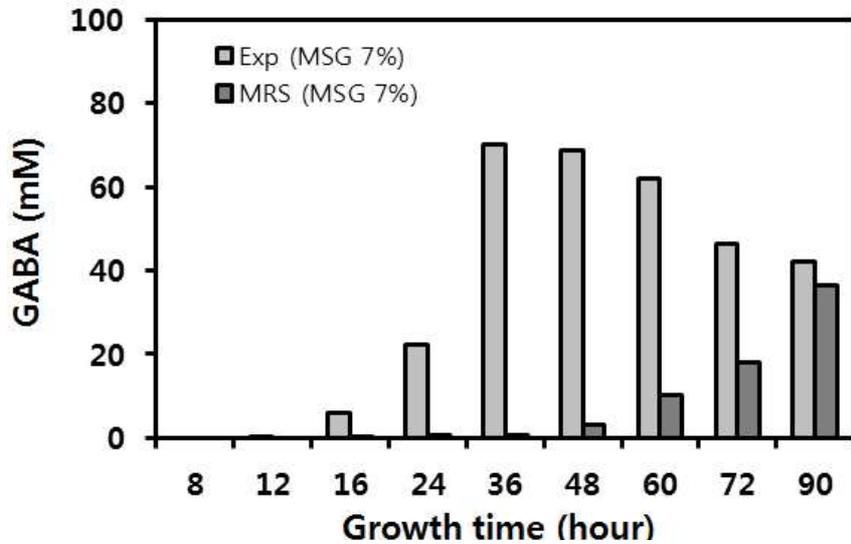


그림 11. 1세부의 최적배지를 반영한 균체의 살충물질 생성능력 평가

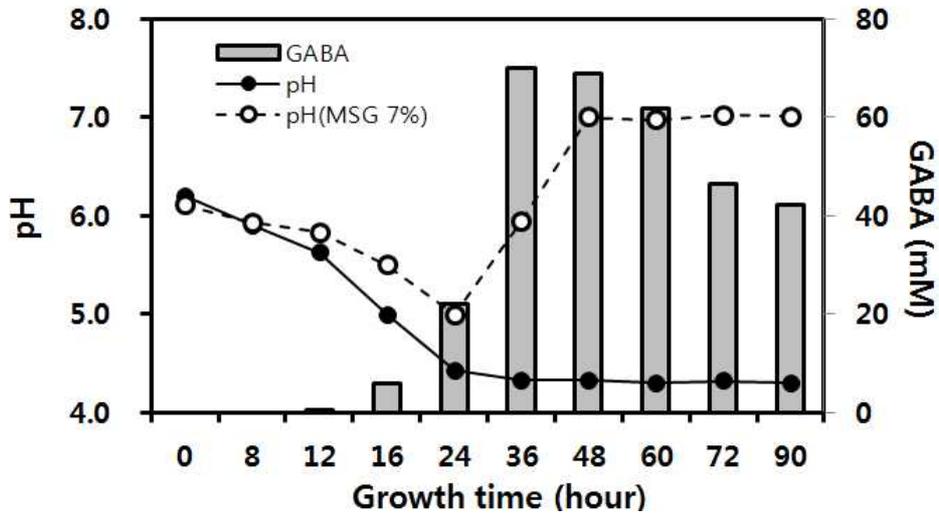


그림 12. 최적화배지의 pH에 따른 살충물질 생산의 영향

- 최적화 배지에 MSG 첨가 유무에 따른 pH 변화를 살펴보고, MSG 미 첨가 시 전형적인 유산균의 배양에 따른 pH 저감 형태로 최종 약산성의 물성을 띠는 결과를 보임(그림 12).
- 반면 최적화 배지에 MSG 7%를 첨가한 조건은 24시간 이후로 pH가 지속적으로 상승되어 pH 7을 초과하는 결과를 보여줌(그림 12).
- 이는 Wikim0118 균주의 지속적인 생육에 의해 24시간 전후로 GAD 효소의 생산량이 증가되어, 본 효소의 지속적인 활성화에 의한 결과임.
- 그러나 60시간 이후에 pH는 GAD 효소의 최적 범위를 벗어나 7 전후를 유지하며, 살충물질의 생산량이 저하됨을 확인할 수 있음(그림 12).
- 따라서 1세부에서 목표로 하는 고농도의 살충물질 생산을 위해 GAD의 적정 pH 범위를 유지하는 생산 공정이 포함되어야 할 것으로 판단됨.

#### ④ 결론

- Wikim 0118균주의 생육온도는 30℃에서 생육 및 살충물질의 생산성이 가장 우수하였음.
- 배지 내 MSG 함량은 3%를 초과 할 시 생육 지연 결과가 발생하였으나, 제 1세부의 최적화 배지는 7%의 함량에서도 증식이 우수하였음.
- Wikim 0118균주는 12시간부터 살충물질의 생성이 확인되었고, 48시간-60시간에 최대 생성량을 나타내었음.
- 반면 최적화 배지는 24시간에서 살충물질의 최대 생성능력을 보여주어, 시간 대비 우수한 살충물질 전환 속도를 보이고 있음.
- 배지 초기의 pH는 5-6 구간에서 생육 및 살충물질의 생산량이 가장 우수하였으며, 최적화 배지를 적용한 배양 조건에서 살충물질 전환에 의해 지속적으로 pH가 상승하는 결과를 보이므로, 고농도의 살충물질 생산을 위하여, GAD의 적정 pH 범위를 유지하는 생산공정이 포함되어야 함.
- 기타 배지 내 NaCl 1% 첨가 시 생육도 및 살충물질 생성량이 향상되는 특성을 보임.

### (3) 살 선충 효과 균주의 환경적 내구성 분석

#### ① 연구목적

- Wikim0118균주의 온도별 저장 기간에 따른 생존률을 살충물질 생산성 평가

#### ② 재료 및 방법

##### ㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : Lb *sakei* wikim0118
- 적용 배지 : MRS broth(MSG 3%), 제1세부 최적화배지(MSG 3%)
- 살충물질 정량적 분석 : Gabase from pseudomonas fluorescens(Merck)

##### ㉡ 시험방법

##### □ 균의 생육도

- 시료를 살균 증류수에 현탁한 후 희석하여, *Lactobacillus sakei* 측정용 배지(MRS medium, difco)에 접종함.
- 30℃ 항온기에서 48시간 배양 후 대표적 콜로니를 계수하여, Vible cell을 측정하였음.

#### ▣ 살충물질 정량 분석

- GABA transaminase는 GABA와  $\alpha$ -ketoglutarate를 glutamate와 succinic semialdehyde로 전환시키고, 생성된 succinic semialdehyde와 NADP<sup>+</sup>는 succinic semialdehyde dehydrogenase에 의해 succinate와 NADPH가 생성됨.
- 효소 GABA transaminase, succinic semialdehyde dehydrogenase를 첨가하고, 각각 필요한 기질  $\alpha$ -ketoglutarate, NADP<sup>+</sup>를 첨가시켜 효소반응 후 생성된 NADPH 양으로 GABA의 양을 측정함.

#### ▣ 실험 조건

- MRS 액체배지 및 최적화배지에 각 3% MSG를 첨가한 후 30℃에서 48시간 배양한 배양액을 토양의 온도를 고려하여, 4℃, 10℃, 25℃, 30℃, 37℃, 40℃ 범위에서 저장(0일-30일)하면서 Wikim0118의 생존율 및 살충물질의 생산량을 측정함(그림 13).

#### ③ 실험결과

- 배양 직후에는 MRS 액체배지보다는 최적화배지의 균수가 더 높았음.
- 저장온도 4℃와 10℃에서는 저장 60일까지 10<sup>11</sup> Cfu/mL를 유지하였고, 살충물질의 생성량은 저장기간이 경과할수록 약간 감소함.
- 저장온도 25℃-37℃에서는 저장기간이 경과할수록 Wikim0118의 생존율 및 살충물질 생성량도 감소하였고, 특히 저장 30일-60일에는 급격히 감소하는 경향을 보임.
- 실험구간 전체에서 MRS 액체 배지보다는 유산균용 액체배지(제1세부 최적화 배지)에서 생존율 및 살충물질의 생성량이 더 높게 유지되는 것으로 나타남.

#### ④ 결론

- 저장온도 10℃미만에서는 저장 60일까지 비교적 우수한 생존율을 보이거나, 저장온도의 상승에 따라 균체의 생존율이 급격히 감소하였음.
- 반면 제1세부의 최적화 배지는 MRS 액체 배지에 비해 생존율 및 살충물질의 생성량이 더 높게 유지되는 결과를 보임.

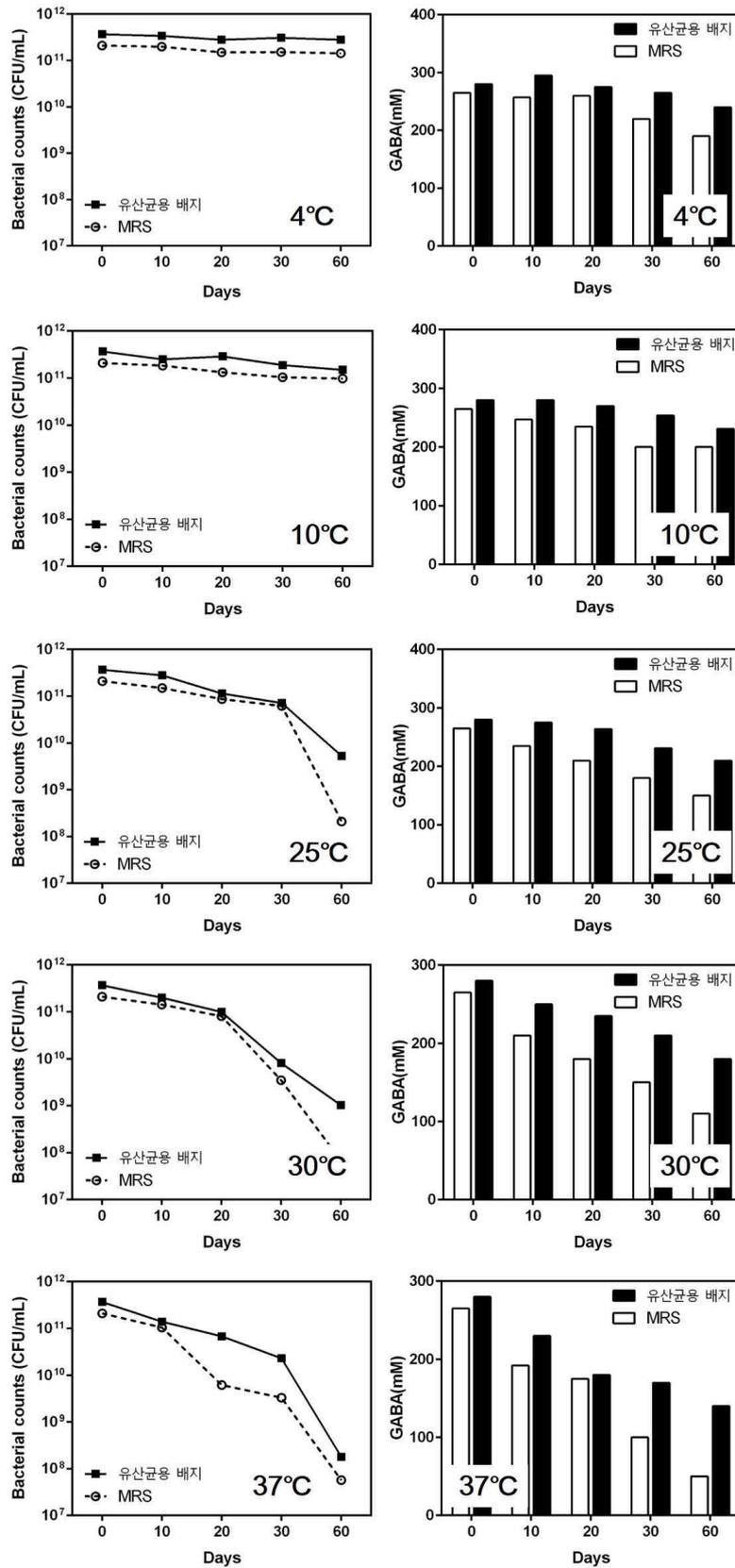


그림 13. Wikim0118 배양액의 저장기간에 따른 Wikim0118 생육도 및 살충물질 생산성

#### (4) 살 선충 물질 효과 지속성을 위한 제형화 연구(추가)

##### ① 연구목적

- 제 1세부 및 2협동 연구 결과 균체의 액상 제형의 경우 저농도의 처리 시 수일 경과 후 처리 선충이 재 활성화되어, 현장 방제가의 저하가 우려됨.
- 또한 상위 균주의 환경 내구성 분석 결과 고온의 환경에서 균주의 생존 및 살충물질의 생산력이 현저히 저하됨을 확인할 수 있음.
- 따라서 토양 현장의 악조건을 고려하여, 지속 방출 혹은 방제 시너지를 낼 수 있는 추가적인 제형의 적용 검토 및 방제 시너지 결과를 검토하고자 함.

##### ② 재료 및 방법

###### ㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : Lb *sakei* wikim0118
- 적용 배지 : 제 1세부 최적화 배지
- 살충물질 정량적 분석 : Gabase from *pseudomonas fluorescens*(Merck)
- 서방출용 고체담체 및 부원료 : 제올라이트 + 활석
- 증량제 : 규조토

###### ㉡ 시험방법

###### ▣ 제올라이트 파우더 적용에 따른 Wikim0118의 생존율 및 GABA 생산성 측정

- Wikim0118을 최적화 배지에 30℃에서 48시간 배양한 배양액에 제올라이트와 활석을 혼합(1: 10: 2 % W/W)하여 저장온도 및 저장기간에 따른 Wikim0118 생존율과 살충물질 생성능력을 평가함.

###### ▣ 규조토를 혼용한 물리학적 방제 시너지 효과 검토

- Wikim0118 배양액과 규조토를 혼용한 물리학적 방제 시너지 결과를 살펴봄.
- 규조토는 본 과제의 제품 등록 허용 성분으로, 해충 방제용등으로 활용되며, 형태학적 특성으로, 선충의 표면에 피해를 입혀, 선충의 운동성을 제어하거나 상처로 인한 물리적 방제를 기대할 수 있음.
- Wikim0118균주의 배양액 20배 희석액과 규조토를 혼합(1:10 % W/W)하여, 이를 실험 선충에 적용, 시간 경과에 따른 선충의 마리 수, 알 수, 운동성 평가등을 통해 방제 상승효과를 검토함.

□ 고압멸균을 통한 균체 사멸과 살충물질의 안전성

- 제 1세부에서 수립한 균체 회수 공정에서 고압멸균을 통한 배양 후 후처리 공정이 최종 선발되었음.
- 이에 따라, 균체의 생성 배양물의 열처리 과정 이후, 살충물질의 함량 변화를 확인하기 위해, TLC를 통한 정성평가를 실시하였음.

□ 살충물질 정량 분석

- GABA transaminase는 GABA와  $\alpha$ -ketoglutarate를 glutamate와 succinic semialdehyde로 전환시키고, 생성된 succinic semialdehyde와 NADP<sup>+</sup>는 succinic semialdehyde dehydrogenase에 의해 succinate와 NADPH가 생성됨.
- 효소 GABA transaminase, succinic semialdehyde dehydrogenase를 첨가하고, 각각 필요한 기질  $\alpha$ -ketoglutarate, NADP<sup>+</sup>를 첨가시켜 효소반응 후 생성된 NADPH 양으로 GABA의 양을 측정함.

③ 시험결과

㉔ 제올라이트 파우더 적용에 따른 Wikim0118의 생존율 및 GABA 생산성 측정

- 4°C - 30°C에서 저장 60일까지 저장 초기의 균수 및 살충물질의 생성량은 유지되는 것으로 나타났으나, 37°C에서는 저장 30일 이후 균수 및 살충물질 생성량이 감소한 경향을 보임(그림 14).
- 반면 액상제제에 비해서는 우수한 보존력을 보임을 확인할 수 있음(그림 14).

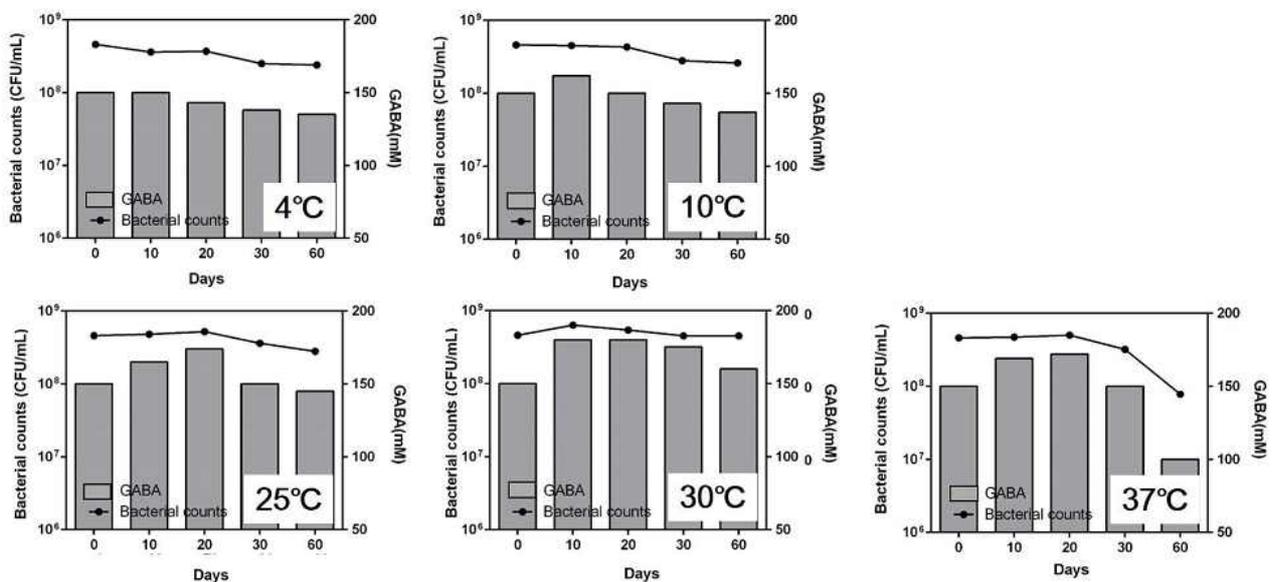


그림 14. Wikim0118 배양액의 제올라이트 파우더 적용에 따른 생존율 및 살충물질 생산성 측정

㉔ 구조토를 혼용한 물리학적 방제 시너지 효과 검증

- 표면적인 부분에서 혼입된 구조토가 선충의 움직임과 번식을 제한하는 효과를 관찰함.
- 반면, 대부분 작물에 기생하는 선충의 경우, 지표보다는 토양의 내부 또는 뿌리속에서 번식하므로, 구조토의 혼입의 효과를 거두기 위하여는 작물 정식 전 토양을 만드는 과정에서 한정적으로 활용될 수 있을 것으로 보임.

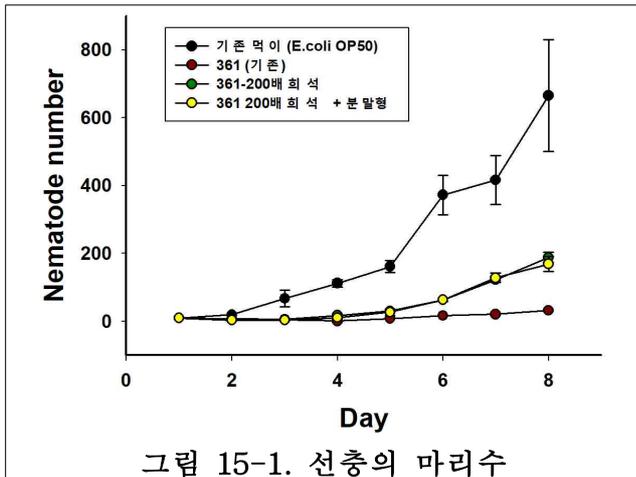


그림 15-1. 선충의 마리수

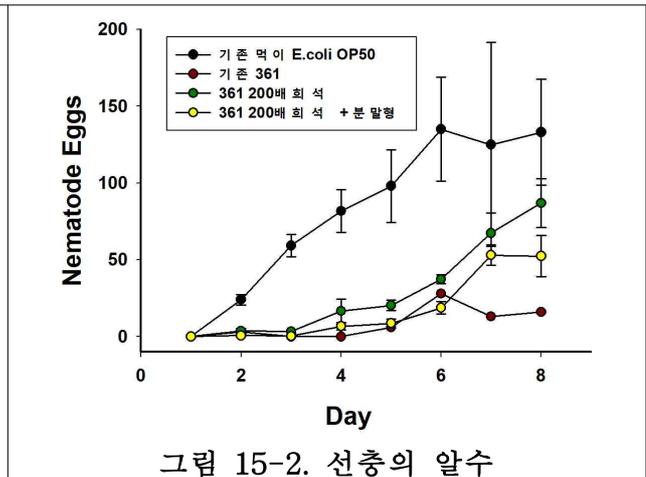


그림 15-2. 선충의 알수

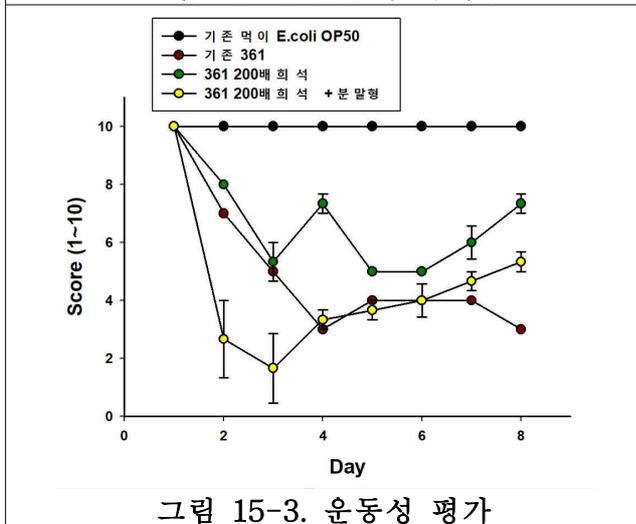


그림 15-3. 운동성 평가

- 공 란 -

그림 15. 구조토 혼입에 따른 살 선충 기능 평가

㉕ 고압멸균을 통한 균체 사멸과 살충물질의 안전성

- MSG에서 살충물질로 전환된 다양한 농도별 열처리 과정 이후 물질의 농도 차이는 없는 것으로 관찰되었음(그림 16).
- 살충물질인 GABA의 열 안전성을 살펴볼 때, 제 1세부가 진행하고자 하는 열처리를 통한 균체 사멸 공정은 적합하리라 판단됨.

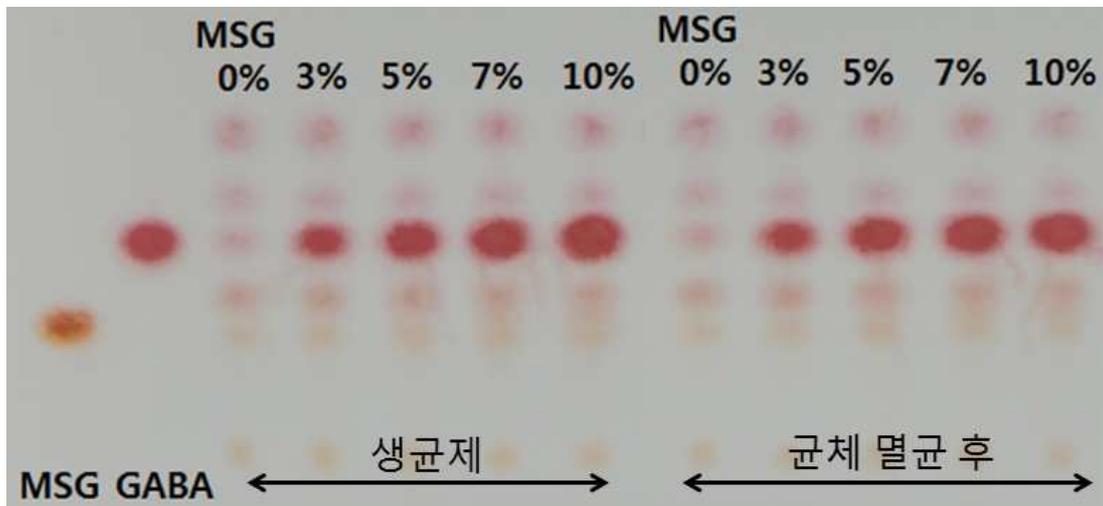


그림 16. 선발 균주의 생성된 살충물질의 열 안전성

㉔ 균 처리 방식에 의한 살 선충성 기능 효능 평가

- 선발 균체의 정착력 및 안전성을 고려할 때, 생균제를 통한 제품 등록은 유효물질 함량 보증 측면에서 다수의 애로사항을 동반할 것으로 예상됨.
- 따라서 Wikim0118균주의 다양한 처리방법을 통한 시험선충에 대한 방제효과를 평가하고자 하였음.
- 이를 통해 생균과 대사물질 혹은 대사물질 단독의 효과인지를 평가하고, 최종 제품 등록 규격을 결정하는데 목표가 있음.
- 시험방법은 제2협동의 선발 균주별 신경제어 활성 평가방법과 동일한 절차로 수행하였으며, 시험샘플을 처리 기준은 아래와 같음(표 1).

표 1. 균체의 처리 방법

Exp.	Treatment
Control	Untreated
361	Cell + Supernatant fluid
361-Auto	Autoclave culture broth
Super	Supernatant fluid
Super-Auto	Autoclave supernatant fluid
Cell	Cell extract
Cell-Auto	Au

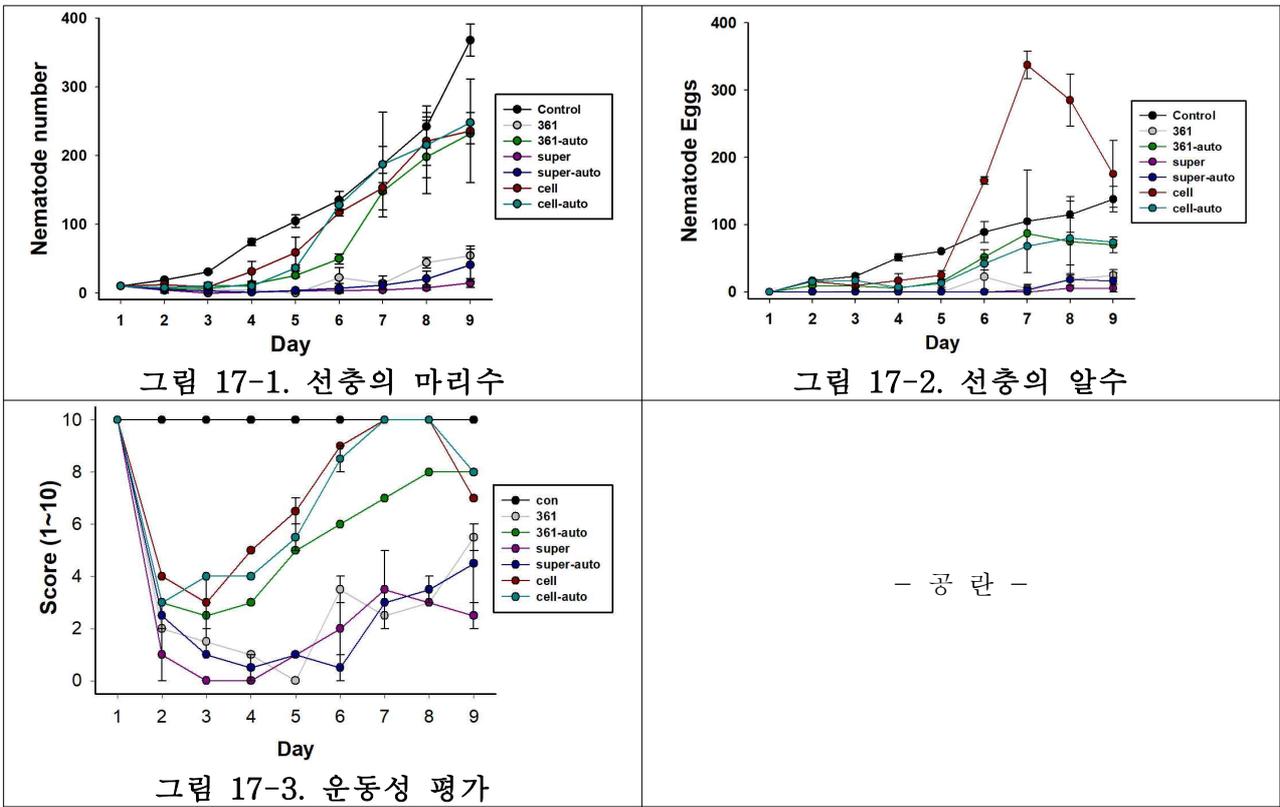


그림 17. 균 처리공정에 따른 살 선충 기능 평가

- 시험분석 결과 별도의 처리를 하지 않은 361 시험군(wikim0118)과 상등액만 처리한 시험조건에서 유사한 살충효율을 보였고, 멸균처리를 하여도 그 효과는 감소하지 않았음(그림 17).
- 셀 단위로 추출한 경우 효과가 매우 미미하였으며, 선발 균체가 물질대사로 생성해낸 대사물질 내 살 선충성 기능을 하는 물질이 들어있을 것으로 사료됨(그림 17).
- 따라서 생균제 외 멸균 과정 혹은 균체 회수과정을 거쳐, 미생물 추출물로써 제품 등록을 실시하여도, 선충 방제 측면에서는 무방할 것으로 판단되어짐.

④ 결론

- 제올라이트 파우더 적용은 액상제제에 비하여 우수한 보존력이 있음을 확인할 수 있음.
- 증량제인 규조토를 활용한 물리학적 방제 측면에서는 작물 정식 전 토양을 만드는 과정에 한정적으로 활용될 수 있을 것임.
- 고압멸균을 거칠 시 살충물질의 함량은 변화가 없었으며, 셀단위의 추출에서 선충의 방제능은 현저히 저감되었고, 상등액 및 균이 포함된 배양액 모두 유사한 선충 방제능이 도출되었음.
- 따라서 멸균과정 혹은 균체 회수과정을 거쳐, 미생물 추출물로써 제품 등록을 실시하여도, 선충 방제 측면에서는 무방할 것으로 보임.

## (5) 선발균주의 뿌리혹선충에 대한 추가적 방제 물질의 탐색

### ① 연구목적

- Wikim0118의 대사물질 내 살선충 물질 외 방제 효과를 낼 수 있는 후보 물질 선발

### ② 재료 및 방법

#### ㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : *Lb sakei wikim0118*
- 적용 배지 : MRS broth(add 3% MSG)

#### ㉡ 시험방법

- 선술한 그림에서와 같이 비슷한 양의 살충물질을 생성하는 유산균을 사이에서도 살 선충 효과는 다른 것으로 확인됨(그림 1-2).
- 이에 Wikim0118의 발효대사산물을 NMR로 분석함.
- 3% MSG가 첨가된 MRS 액체에 Wikim0118을 30°C에서 48시간 배양된 배양액을 사용함.
- 시간의 경과에 따른 선충의 마리 수, 알 수, 운동성을 평가하여, 종합적 수치화 하였고, 점수가 높을수록 살선충 기능이 높음을 나타냄.

### ③ 실험 결과

- 선발균주의 대사물질의 생성 library를 도출하였고, 이중 신경물질로 추정되는 후보물질을 제1세부에서 제공한 MSG 10% 전환된 살충물질을 배양물 1,000배 희석액 내 적정농도(최종농도 : 100µM)을 선충 배지에 혼합 처리함.

Sample	211-1	212-1	215	222	623	627	CTL	219	Wikim0118	Sample	211-1	212-1	215	222	623	627	CTL	219	Wikim0118	
Compound Name	Maximum (mM)	Maximum (mM)	Maximum (mM)	Maximum (mM)	Maximum (mM)	Maximum (mM)	Maximum (mM)	Maximum (mM)	Maximum (mM)	Maximum (mM)										
Lactulose	1.6702	2.8096	2.6545	1.6699	2.5986	81.0957	3.0459	2.2141	65.2597	Lactulose	4.8299	4.7831	3.7411	4.0025	4.2323	5.375	5.0057	4.1206	4.5623	
Isocitrate	1.81	1.2399	1.5179	1.5546	19.9108	79.4915	31.8005	1.2509	59.2825	Isocitrate	7.023	4.6073	2.9294	5.0287	3.4351	2.7825	1.567	6.7084	4.2094	
Acetate	8.9579	25.7247	30.147	7.8992	88.9108	46.9411	117.2748	10.9936	45.2851	Acetate	8.7983	4.8582	8.8461	3.4611	4.0012	2.6584	3.3557	4.6588	4.1985	
Lactate	10.0669	15.4071	14.4668	9.8206	26.1216	30.7904	2.0882	12.6164	29.0165	Valicose	0.3887	4.0578	3.2197	0.2677	5.583	3.0529	3.3352	0.8777	4.1267	
2-Phosphoglycerate	19.8021	21.7775	17.0412	19.2476	18.0556	14.4608	18.4206	18.5651	19.2888	Isoisocitrate	4.254	3.8855	4.184	4.0941	4.1596	3.8644	3.0552	3.9887	4.1007	
2-Aminoadipate	4.5264	5.4734	6.8483	4.5399	19.3043	21.2473	14.5342	5.7311	17.5388	Glutamine	103.3537	10.176	4.4281	98.8946	3.1965	1.8046	4.1685	4.0065	6.4159	4.5051
Homoisocitrate	13.6561	20.0852	14.9488	10.4265	15.3291	14.2967	28.3524	16.973	12.972	Galectin	4.0697	5.0555	4.3255	3.7936	4.1485	4.0065	3.8147	4.5081	3.8013	
Erythritol	12.8644	17.2715	14.2564	11.6997	18.8588	13.7714	11.87	13.9818	15.6931	Valine	3.865	5.4308	3.7738	3.7937	3.8147	3.5964	2.841	3.5391	3.8037	
Glycerate	8.7921	10.3956	8.1249	8.1867	11.4819	19.5791	6.8422	8.4879	12.1816	β-Aminoisobutyrate	1.8959	3.9907	2.7022	0.8371	3.0498	2.7242	0.9994	3.1506	3.8909	
2-Hydroxyisobutyrate	10.0422	8.8963	7.9518	19.3997	7.9295	8.4156	0.0499	7.8364	11.4714	Choleverine	2.1772	2.1889	2.8219	2.0445	1.8445	3.8956	1.6168	3.5582	3.5248	
Glycylglycine	13.4476	12.6532	9.2987	12.871	11.0039	8.9548	10.4189	10.8148	10.8148	Galactose	4.3284	4.2887	3.2597	4.0289	3.5231	2.3884	3.108	3.7796	3.5191	
Saccharosine	4.2482	4.7019	5.8795	3.4006	7.8779	6.9589	3.2454	7.7046	10.3066	myo-inositol	3.623	4.2499	3.9962	3.2493	3.5643	3.3132	3.5283	3.6441	3.5086	
α-Phosphoserine	8.8485	9.9785	7.807	8.0469	9.1388	10.0072	7.6162	8.9045	10.249	Proline	2.869	5.9546	3.9881	2.76	3.1279	2.5039	2.1335	3.5466	3.4796	
Pyruvate	2.4879	23.3481	25.8854	2.2947	20.3253	9.528	26.1524	20.2797	8.9295	Ornithine	1.5504	1.6999	2.0841	1.3501	2.281	1.9594	0.9772	2.3222	3.4544	
Ethanol	3.5066	30.3728	35.5147	0.9754	12.2244	23.0031	0.6464	19.9905	7.9548	Ribose	1.827	1.4699	0.9379	0.7198	2.2877	0.8899	4.1113	1.8256	3.2447	
Ulysine	3.8117	3.8639	5.5468	3.6331	7.8638	7.8401	2.9606	6.7166	7.4117	Cysteine	1.6608	2.5764	2.607	1.5512	2.8972	2.1374	1.4596	3.3309	3.2965	
2-Aminobutyrate	7.961	8.9398	7.8859	7.6288	7.6713	8.1254	7.7045	7.4142	7.2758	2-Hydroxybutyrate	1.412	9.7228	10.8203	0.8122	4.8493	8.8188	0.5668	7.8028	3.2488	
α-Threonine	8.064	10.1293	8.7517	7.4951	8.7432	8.9598	8.5061	8.9598	7.2905	Piccolate	2.6107	3.8617	2.505	3.056	2.9629	3.9163	3.9301	3.2339	3.2339	
Glycerate	6.3774	7.1283	5.6564	5.8847	8.2329	8.0949	5.0333	5.8939	7.2477	N-Acetylglucosamine	0.3196	5.4284	6.0336	6.2	2.9159	3.9529	3.5912	0.4242	3.1227	
Alloisovaleric	7.18	7.7468	7.424	7.4143	7.2527	7.6287	6.6368	6.627	8.8453	Urea	1.2182	0.8355	4.8888	0.8185	2.844	4.2932	1.9048	4.0098	3.0121	
Lactone	2.8489	7.795	7.2002	7.21	7.1585	6.6689	6.5259	7.1808	8.8344	Arabinose	3.0338	2.6002	2.0749	2.4742	2.5221	2.0445	1.881	2.8837	3.0234	
Pyritol	9.9033	14.2035	9.4545	7.9006	8.9424	6.9322	8.2994	11.3920	6.471	Glycine	2.8733	2.5154	2.7454	2.6973	2.7451	1.9584	3.9014	2.3892	2.9971	
2-Hydroxyisobutyrate	4.6814	7.243	6.9948	6.9552	6.8203	7.0204	6.2306	6.1959	6.4375	Glycerol	4.2557	5.8819	4.026	4.0285	4.4038	3.888	6.4197	3.8603	2.8755	
Pyrogallate	11.0114	8.0266	6.205	8.0944	11.4715	5.846	11.4715	6.4335	5.846	Homoisocitrate	3.9301	2.1384	1.2882	1.8272	3.1842	2.4704	4.1382	2.8385	2.8385	
Serine	6.0779	7.7056	6.5362	5.7582	6.764	6.8399	10.6396	6.939	6.3132	Cellulose	1.9951	5.1281	2.4135	1.9953	2.8642	2.272	3.1381	2.4608	2.7703	
Threonate	6.9639	6.12	6.9078	6.9972	6.5168	5.161	8.9414	6.7901	6.1961	Glucuronate	2.5614	4.4713	3.3348	2.6165	3.7425	3.2025	6.7207	3.2025	2.7895	
Glyoxalate	7.0291	7.8627	6.1441	6.7197	6.1889	4.7205	6.6529	6.6889	6.0807	α-Phosphoethanolamine	3.0906	5.4417	2.4652	2.7924	2.992	2.274	6.4602	2.904	2.725	
Mandelic	4.8453	9.4257	8.0862	4.4602	8.1307	5.832	11.9712	8.0441	6.0088	Putrescine	1.2417	1.8277	1.4339	0.9877	1.9273	1.8227	0.8976	1.9192	2.8877	
2-Hydroxyvalerate	3.9578	6.4588	6.2332	6.1994	6.0811	6.277	5.5467	5.5226	5.7463	Phenylalanine	2.0577	2.9966	2.6886	1.9735	2.8484	2.1235	1.9999	2.1546	2.6683	
2-Hydroxyglutarate	4.3748	5.849	4.7135	3.4737	5.5524	8.0045	6.8953	5.7621	5.6725	2-Hydroxy-β-methylvalerate	2.4764	2.9316	2.8005	2.2722	2.2555	2.6749	0.9561	1.8873	1.8013	
2-Hydroxyisopropionate	6.0288	6.4455	5.5056	6.069	5.9611	6.0342	5.0883	5.4818	5.5289	Melanine	1.6642	2.2845	1.9107	1.3505	2.2861	2.8033	2.2366	3.6022	2.5477	
Glucosuccinate	29.0644	24.209	18.8979	30.4827	12.6773	3.8886	18.4813	18.7486	5.4687	Asparagine	2.8754	3.3325	2.8338	2.6458	3.9632	3.9737	2.9969	3.6008	2.946	
Alanine	4.9913	5.1493	4.9909	4.9798	5.0796	3.8823	3.868	5.0517	5.9811	Creatine phosphate	1.0091	1.0382	1.5148	0.9832	1.8854	2.7995	0.8156	1.8117	2.5078	
Fructose	8.424	10.8302	7.0384	7.8739	6.1115	6.7337	11.3212	6.7512	5.287	Glucosyl-β-D-glucopyranoside	1.9981	3.8659	1.4074	0.9309	2.1708	2.4159	5.3851	2.1516	2.4798	
Lactose	6.2286	5.1773	5.1992	6.0074	5.0995	4.0387	8.8095	5.1004	5.177	Cystathionine	2.2748	3.9326	2.6389	1.928	2.2519	2.8667	2.2519	3.6192	2.4277	
Threonine	4.8732	6.0018	5.7011	5.1773	4.9754	4.8973	2.4528	5.1795	5.109	Glucosyl-ε-D-glucosylphosphate	2.7124	3.9719	1.9689	2.72	2.4526	2.943	6.6939	2.9435	2.3961	
Arabinitol	4.9503	9.9841	7.109	6.9558	5.045	6.8737	7.4772	6.6685	4.8204	Valerate	3.1729	2.8606	2.0499	2.3242	2.0486	2.8283	2.2093	1.6813	2.9834	
Lactulose	4.8209	4.7851	3.7411	4.0025	4.2313	3.378	3.9067	4.1706	4.9625	Guandinosuccinate	2.2263	2.3681	1.7892	1.5323	2.0819	1.8068	2.071	3.71	3.5293	
Isocitrate	7.013	4.6073	2.9294	5.0587	3.4151	2.7825	3.567	6.7484	4.2094											

그림 18. Wikim0118균주의 대사체 분석 결과

- 이중 추가 첨가한 물질 가운데, 선충의 몸체의 근육 마비효과 이외에 선충의 번식이나 삶을 제한시키는 물질에 대한 추가 탐색을 실시하였고, 추가 물질 탐색은 본 균체 내 다량으로 존재하는 대사체들로 스크리닝을 실시함.
- 기존에 비해 살 선충 효율이 높아진 것으로 보이는 (1) sodium gluconate, (2) L-pyroglutamic acid, (3) L-glutamic acid, (4) L-lysine, (5) Trans-4-Hydroxy-L-Proline 을 최종 선발함(그림 19).

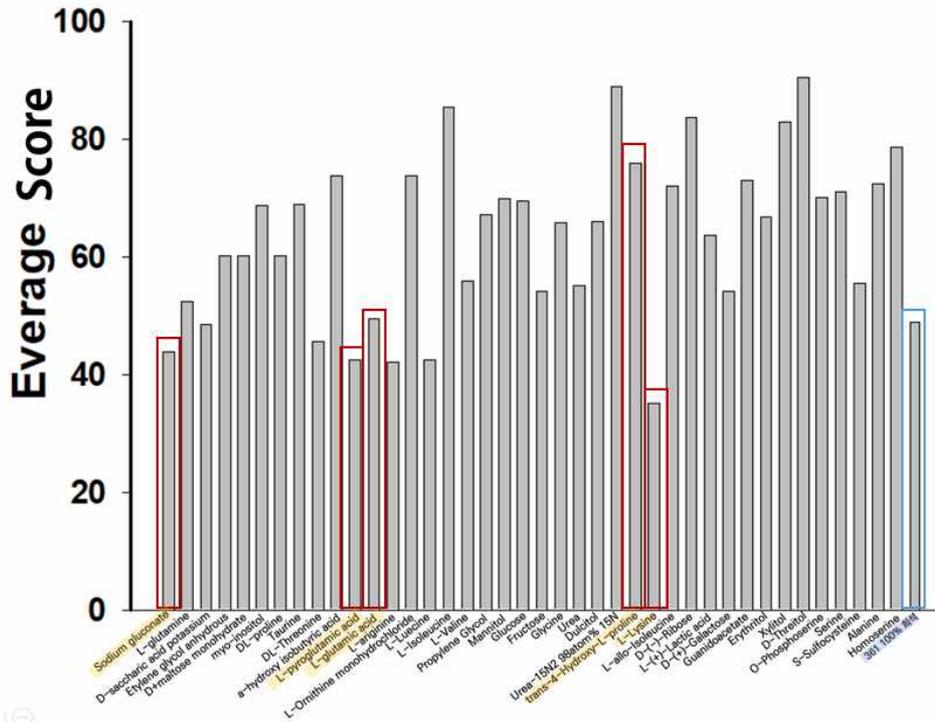


그림 19. 살충물질 생성 균주의 대사체 별 선충 방제 점수

④ 실험 결론

- Wikim0118의 다량으로 존재하는 대사체들의 선충의 마리수, 알수, 운동성을 종합 평가한 결과, (1) sodium gluconate, (2) L-pyroglutamic acid, (3) L-glutamic acid, (4) L-lysine, (5) Trans-4-Hydroxy-L-Proline 총 5종에 대한 후보 물질을 추가로 선발함.

## (6) 살 선충 효과 활성물질과 대사물질 교차적용에 의한 살선충 효과 효율 검증

### ① 연구목적

- Wikim0118의 살선충 물질과 대사물질간의 교차적용 방제 시너지 검증

### ② 재료 및 방법

#### ㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : *Lb sakei wikim0118*
- 적용 배지 : 제 1세부 최적화 배지
- 시험 해충 : *Caenorhabditis elegans*

#### ㉡ 시험방법

- 제 1세부에서 제공한 Wikim0118 균주를 활용한 MSG 10%이 전량 살충물질로 전환 된 배양물을 1,000배 희석액 내 선발된 후보물질을 적정 농도로 희석(최종농도 : 100 $\mu$ M, 300  $\mu$ M, 1mM)하여 선충을 분리한 Plate에 혼입 처리함.
- 대조군은 Wikim0118 균주를 활용한 살충물질 1,000배 희석 처리한 것이며, 실험구는 살충물질 1,000배 희석물 내 각 선발 된 기호성 물질의 혼입 처리한 군임.
- 최종 6일 간격, 선충의 마리 수, 산란알 수, 선충 운동성을 종합 평가하여, 기호성 물질간의 방제 시너지 효과를 검토하였음.

### ③ 실험 결과

- Wikim0118균주의 생산되는 주요 대사물질 중 살충효율이 있다고 판단되어 지는 후보물질을 검토한 바, L-lysine, L-pyroglutamic acid, L-glutamic acid의 경우, 대조군과 큰 차이를 보이지 않아, 방제 시너지 결과를 얻을 수 없었음(그림 20-22)..
- Sodium gluconate와 Trans-4-Hydroxy-L-Proline의 경우 대조군 보다 향상된 살선충 효과를 보이나, 선행실험 결과와 비교하였을 때 첨가 농도에 따른 살선충 효능의 유의성을 보이지 않았고, Trans-4-Hydroxy-L-proline의 경우 첨가 농도에 의 증가에 따라 살선충효과가 저하되는 상이한 결과를 보임(그림 23-24).
- 따라서 Wikim0118균주의 생산 대사물질의 추가적인 기호성 물질을 검토한 바, 추가 물질을 활용한 향상된 살 선충성 효과를 기대하기 힘든 바, 선충에 대한 주요 살 선충물질은 기 설정되었던 살충물질 인  $\gamma$ -aminobutyric acid 일 것으로 사료됨.

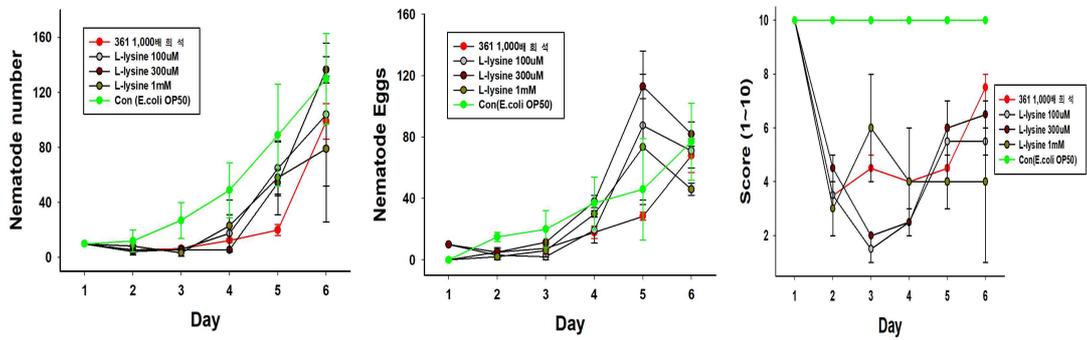


그림 20. L-lysine 처리에 의한 선충 방제효율 평가  
(좌부터 선충의 증식, 산란, 활동성 평가)

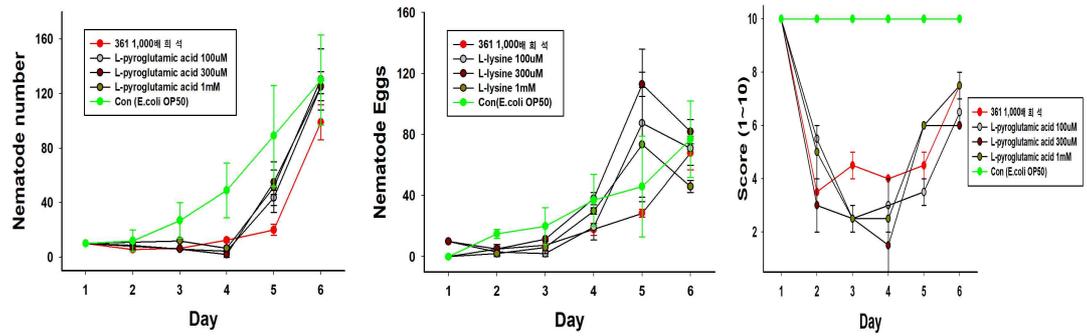


그림 21. L-pyroglutamic acid 처리에 의한 선충 방제효율 평가  
(좌부터 선충의 증식, 산란, 활동성 평가)

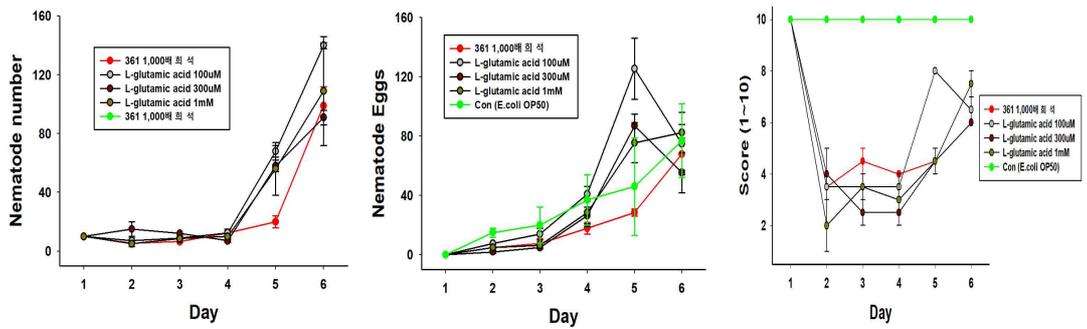


그림 22. L-glutamic acid 처리에 의한 선충 방제효율 평가  
(좌부터 선충의 증식, 산란, 활동성 평가)

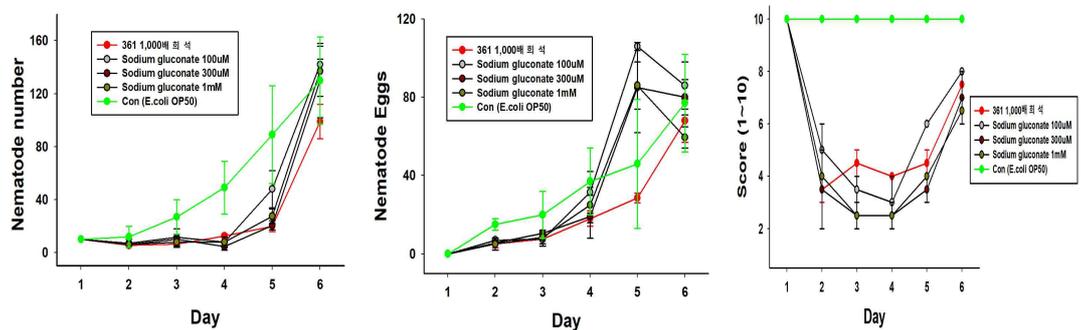


그림 23. Sodium gluconate 처리에 의한 선충 방제효율 평가  
(좌부터 선충의 증식, 산란, 활동성 평가)

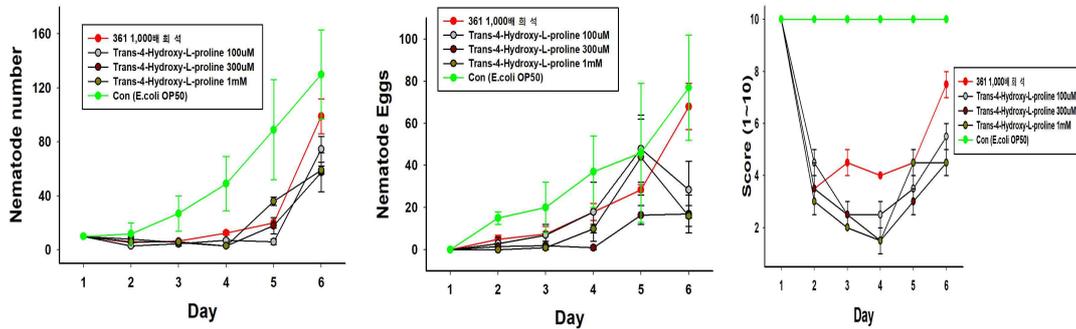


그림 24. Sodium gluconate 처리에 의한 선충 방제효율 평가 (좌부터 선충의 증식, 산란, 활동성 평가)

#### ④ 결론

- Wikim0118균주의 생산되는 주요 대사물질 중 살충효율이 있다고 판단되어 지는 후보물질을 검토한 바, L-lysine, L-pyroglutamic acid, L-glutamic acid의 경우, 대조군과 큰 차이를 보이지 않아, 방제 시너지 결과를 얻을 수 없었음.

### 나. 선발균주 및 복합균주 적용을 통한 방제 시너지 검토

#### ① 연구목적

- 살선충 효과 복합 균주 조합 적용에 따른 살선충 방제 시너지 검증

#### ② 재료 및 방법

##### ㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : Lb sakei WiKim0118 및 유산균 6종(219, 199, 211-1, 148-1, 227, 554, 그림 2의 살선충 효과 균주 대상)
- 적용 배지 : 제 1세부 최적화 배지
- 시험 해충 : *Caenorhabditis elegans*

##### ㉡ 시험방법

- WiKim0118 균주와 유산균 6종을 각각 최적화 배지에 1:1 비율로 접종한 후 생균수 및 *Caenorhabditis elegans*의 운동성 평가를 실시함.
- MSG 10%가 함유된 GABA 생산 최적화 배지에 WiKim0118를 단독 또는 각각의 다른 유산균 6종을 1%씩 접종한 후 30℃에서 48시간 배양하였음.
- 배양액 내 생균수는 MRS 고체배지에 serial dilution한 것을 도말하여 형성된 콜로니수를 측정하였음.
- 배양액의 선충 운동저해효과는 배양액을 1,000배 희석하여 선충을 분리한 Plate에 처리함.
- 대조군은 WiKim0118 균주를 활용한 살충물질 1,000배 희석 처리한 것이며, 실험구는

WiKim0118과 다른 유산균 6종을 각각 혼합 배양한 물질을 처리하였음.

### ③ 실험 결과

- 배양액내 각 유산균의 생균수를 측정된 결과, WiKim0118은 단독배양한 대조구보다 다른 유산균들과 혼합 배양한 경우 WiKim0118의 균수가 약간 낮은 것으로 확인됨.
- 선충의 운동성을 1일 간격으로 4일간 측정된 결과, WiKim0118을 단독으로 배양한 것을 사용한 구간이 효과가 좋은 것으로 확인됨(그림 25).

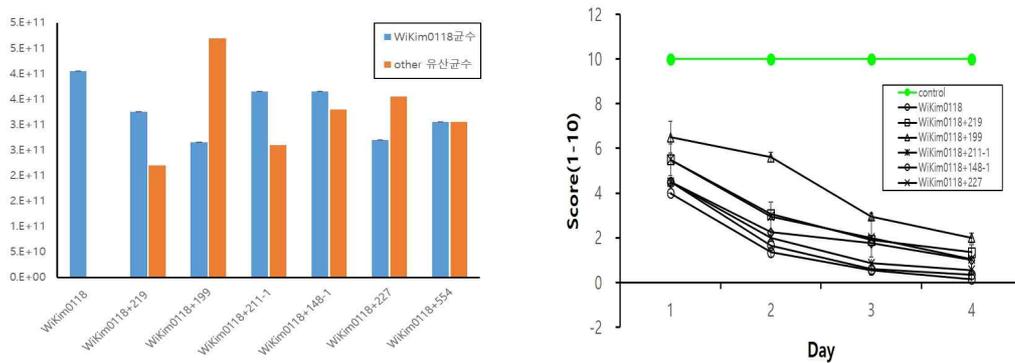


그림 25. WiKim0118균주의 단독 또는 복합배양에 따른 선충 방제효율 평가 (단독 또는 복합배양에 따른 생균수 측정 및 선충 활동성 평가)

### ④ 결론

- 최적화 배지 및 공정을 적용한 복합균주의 배양 결과 Wikim0118균주의 생산성이 저하됨이 확인되었고, 선충에 대한 운동성 등의 생물검정 실험 결과, Wikim0118균주의 단독 사용 대비 우수한 방제효과를 보이는 균주 조합을 탐색할 수 없었음.

## 다. 선발균주의 토양 정착력 평가

### (1) 시제품 처리 후 토양 내 살선충 물질 잔류성 평가

#### ① 연구목적

- 액상 시제품의 현장 모사 환경 내 처리 후 살충물질의 잔류성 평가를 통한 사용 주기 결정

#### ② 재료 및 방법

##### ㉠ 공시재료

- 공시재료 : *L. sakei* WiKim0118 배양 추출물 살충물질 함량 600mM 시제품
- 공시토양 : 원예용 상토
- 공시비료 : 유기질비료(혼합유박비료, 질소-인산-칼리=4-2-1)

㉔ 시험방법

- 재배이력: 시비(21. 4. 26), 정식(21. 4. 28), 처리(21. 4. 30), 종료(21. 5. 28)
- 처리구 면적 및 배치: 4 inch 육묘용 포트, 완전임의배치법(3반복)
- 처리구 설정

표 2. 처리구 설정 방법

처리구	비료시비량(kg/10a)	약제 처리량
무처리구	250	-
시험구	250	500배 희석액 500L/200평



그림 26. 시제품 처리에 따른 토마토 유묘의 포트 운용 현황

㉔ 시험방법

- 대조구(무처리)와 시험구(배양액 500배 희석액)을 토양에 처리한 후 토양 내 잔존하는 GABA를 확인하기 위해, 토양시료 100g을 채취후 1:1로 멸균수로 추출 후 다시 동결건조 하였음.
- 동결물은 멸균수로 20mL(5배 농축)로 녹인후 GABA 잔존여부를 TLC로 확인하였음.

㉔ 결과

▣ 미생물추출물의 당근뿌리 및 토양내 GABA 잔존여부

- 대조구(무처리)와 처리구(미생물추출액)를 2주 단위로 최종 6주간 토양에 처리한 후 당근뿌리와 토양 내 GABA 잔존여부를 확인하였음.
- 대조구 및 처리구의 당근뿌리에서는 GABA는 측정되지 않았음
- 대조구를 처리한 토양에서는 GABA는 검출되지 않았으나, 처리구에서는 처리 2주부터 GABA가 확인되었으며, 처리 기간이 길어질수록 토양 내 GABA량이 증가하는 것으로 나타남

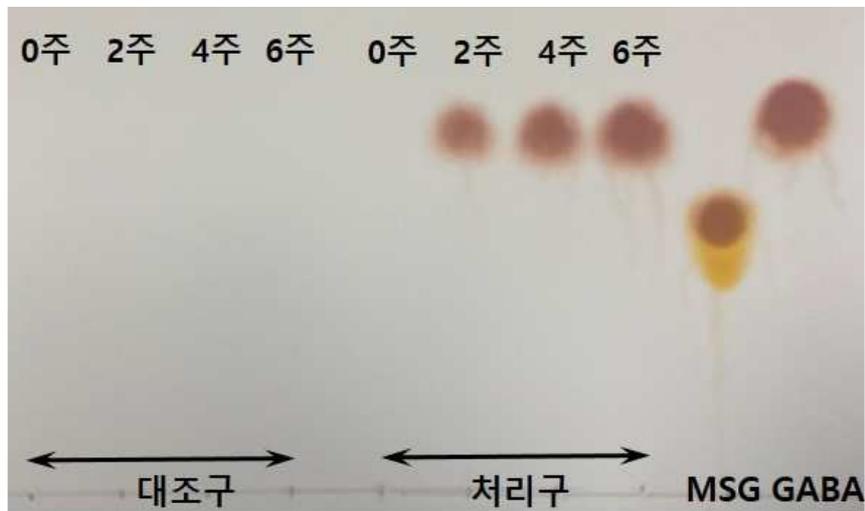


그림 27. 시제품 처리후 토양내 GABA 물질 잔류성 분석

㉠ 결론

- 시제품의 2주간격 토양 내 살충물질의 잔류성 결과를 살펴 볼 때 살충물질의 토양 잔류성 및 잔류량이 증가하는 것으로 나타남.
- 이에 시제품의 사용 주기는 최소 2주 이상으로 설정하는 것이 바람직할 것으로 사료됨.
- 반면 시제품의 처리 후 뿌리 내 살충물질의 검출은 확인되지 않아 목적부위인 뿌리에 노출이 용의한 처리방법 또는 제형의 도입이 필요할 것으로 판단됨.

(2) 토양 내 정착 강화를 위한 제형화 방안 수립

(가) 살선충 균체의 성장 원료를 함유한 정착 강화 개선 검토

① 연구목적

- 본 시제품의 처리에 있어 액상타입의 경우 연속 수확 작물에 대해 적용 시 방제비용의 증가를 초래할 수 있음에 살선충 균주의 생균 형태의 토양 혼입 시 잔류성 개선을 위한 방안 모색을 모색하였음.
- 이를 위해 Wikim0118의 생균의 토양 정착력의 강화 및 토양 내 살충물질의 생성을 목적으로 Wikim0118의 생육용배지 및 살충물질 원료를 함유한 생산 원료를 혼용 처리, 균주의 토양 정착력 개선 및 살충물질의 현장 생산성에 대한 가능 여부를 검토함.

② 재료 및 방법

㉠ 공시재료

- 공시재료 : *L. sakei* WiKim0118 생균 배양물( $1.0 \times 10^9$  Cfu/mL)
- 정착강화용 재료 : *L. sakei* WiKim0118 최적 생육용배지 수용액
- 공시토양 : 원예용 상토

㉞ 시험방법

- 처리이력: 시비(21. 6. 24), 처리(21. 6. 25), 종료(21. 7. 23)
- 처리구 면적 및 배치: 4 inch 육묘용 포트, 완전임의배치법(3반복)
- 처리구 설정

표 3. 처리구 설정 방법

처리구	미생물 처리량	정착강화용 배지 처리량
무처리구	-	-
양성 대조구	1.0×10 <sup>9</sup> Cfu/mL 배양물 100mL/포트	-
시험구	1.0×10 <sup>9</sup> Cfu/mL 배양물 100mL/포트	2% 배지 수용액 100mL/포트



그림 28. 생균 및 정착강화 원료를 적용한 모사환경 포트 운용 현황

▣ 토양 내 Wikim0118균주 확인

- 대조구(미생물 단독처리)와 실험구(미생물+배양액)을 토양에 처리한 후 토양내 잔존하는 Wikim0118의 생존율을 확인하기 위해, 토양시료 100g을 채취후 serial dilution 하여 2% CaCO<sub>3</sub>가 함유된 MRS 고체배지에 도말하여 30℃에서 48시간 배양함.
- 배양후 2% CaCO<sub>3</sub>가 함유된 MRS 고체배지에서 투명환을 형성하는 콜로니를 유산균으로 선정한 후 16S rRNA 서열분석 및 GABA 생성량을 측정하여 Wikim0118로 확정함.

▣ 토양 내 GABA 잔존여부 분석

- 대조구(미생물 단독처리)와 실험구(미생물+배양액)을 토양에 처리한 후 토양내 잔존하는 GABA를 확인하기 위해, 토양시료 100g을 채취후 1:1로 멸균수로 추출 후 다시 동결 건조하였고, 멸균수로 20mL(5배 농축)로 녹인후 GABA 잔존여부를 TLC로 확인하였음.

### ③ 시험 결과

- 대조구(미생물 단독처리)와 실험구(미생물+배양액)을 2주 단위로 최종 6주간 토양에 처리한 후 토양내 잔존하는 WiKim0118의 생존율을 분석한 결과, 최초 처리직후(0일)에는 대조구와 실험구 모두 토양내 WiKim0118 생균수는  $10^7$  CFU/g로 확인됨.
- 대조구와 실험구 모두 토양에 처리 6주 동안  $10^7$  CFU/g 수준을 나타내었으며, 처리 6주에는 대조구보다는 실험구에서 WiKim0118 생균수 더 높은 것으로 확인됨.
- 대조구(미생물 단독처리)와 실험구(미생물+배양액)을 2주 단위로 최종 6주간 토양에 처리한 후 토양내 잔존하는 GABA량을 분석한 결과, 무처리구의 토양에서는 GABA는 검출되지 않았음.
- 미생물만을 단독처리한 대조구에서는 처리 4주차 부터 GABA가 검출되었으며 6주에는 증가함.
- 대조구보다는 미생물과 배양액을 혼합 처리한 처리구에서 토양내 GABA가 더 검출되는 것으로 확인되었으며 처리 0주부터 검출되어 처리기간이 경과됨에 따라 더 증가하는 것으로 나타남.

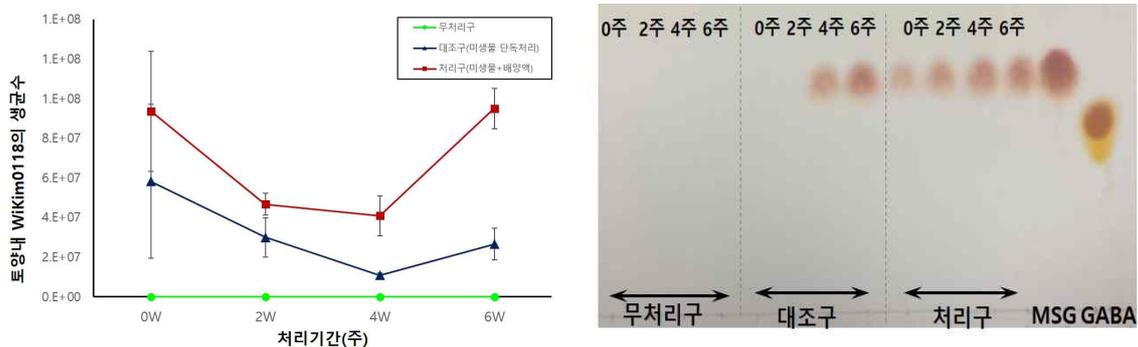


그림 29. 생균 및 정착강화 원료를 적용한 시제품의 토양내 WiKim0118 균수 및 GABA 잔존량 분석

### ④ 결론

- 생육용 배지 및 살충물질 생산원료를 혼용 처리한 시험구에서 살충물질 생성 균주의 토양 잔류성이 유지 및 개선되었고, 또한 살충물질의 검출량이 증가됨을 확인함.
- 이는 개선된 균체의 토양정착성과 더불어 혼용 처리한 살충물질의 생산원료와 균체의 효소 반응이 현장에서 생성됨에 기이한 결과로써 유추될 수 있음.
- 이에 제1세부에서 설계한 미생물추출물을 생균형태로 전환하고 생육용 배지 및 살충물질 생산원료를 추가로 구성하는 제품화 전략을 제공함으로써, 균주의 토양정착력 강화 및 지속적인 살충물질의 생산성을 제공할 수 있는 방안으로 현장 방제비용의 절감 목적의 처리방법을 추가로 제시함.

## (나) 토양 투과율을 고려한 제형의 현장 사용 방법 도출

### ① 연구목적

- 앞서 제 1세부의 액상제형의 지속처리에 의해 살충물질의 뿌리 흡수 및 식물체내 전달이 될 것으로 판단하였으나, 도달량이 미흡하였음.
- 이는 뿌리혹선충의 내부 기생성의 생태적 특성에 의거 침투 된 개체에 대한 효과적인 방제가 미흡할 수 있음.
- 따라서 액상 시제품의 토양 뿌리 등 목적부위에 대한 토양 침투성 향상 목적으로 추가적인 제형화 및 현장 적용 방안을 추가로 탐색함.

### ② 재료 및 방법

#### ㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : *L. sakei* WiKim0118 배양 추출물

#### ▣ 토양 침투성 원료

- 본 살충 조성물의 수용 물성과 용해가 쉬우며, 점도 감소제로 활용이 용의한 알코올류 점도 감소제를 적용함.
- 유기농업자재로써 활용이 가능한 EPA 3-4 grade 범위의 성분을 선발함.
- 최종 에탄올(발효주정), 부틸렌글라이콜, 프로필렌글라이콜, 헥실렌글라이콜을 선발하여 실험을 진행함.
- 이들을 농도별로 혼합하였을 시 정상적으로 투명한 용해도가 있음을 확인함.

표 4. 토양 침투성 원료의 종류 및 용해도 평가

Soil penetration improvement raw material			
Ethyl alcohol	Butylene Glycol	Propylene Glycol	Hexylene Glycol
			

### ㉡ 시험방법

#### ▣ 토양 침투성

- 젖은 토양과 건조 토양의 무게를 측정하는 방법으로, 현장환경의 목적 부위인 지하 30cm

이상의 뿌리 토양을 메스실린더 30cm 깊이로 채워 모사 토양을 적용하였고, 배양 조성물을 침투하여, 내부 원통의 수심 강하 등 침투율을 평가함.

- 5cm 지하부 별로 토양 내 수분함량을 측정하였고, 이는 배양물을 머금은 토양의 초기 무게 값에서 110°C 드라이오븐을 통해 건조과정을 거쳐 수분을 날린 후 토양의 무게값의 차이를 통해 침투 수분율을 측정하였음.
- 유사제품에서 제공하는 사용매뉴얼인 500배 토양 관주로써, 200평 당 해당 면적을 산출하여 침투 유량을 적용함.
- 수분 증발량을 억제하기 위해, 약제의 침투 개시 후 메스실린더 상단부에 실링포장을 하여, 증발을 억제하였고, 15°C 환경에서 1일간 침투를 이행하였음.

#### ▣ 토양 내 살충물질 침투력

- 일정 지면 깊이 별 살충물질의 함유농도를 산출하였고, 이는 깊이별 토양을 취하여, 희석액을 제조하였고, 이를 0.1 M KOH 160  $\mu$ L를 미리 넣어둔 centrifuge tube에 넣어 5분간 교반함.
- 4,000 rpm에서 5분간 원심 분리한 상등액 50  $\mu$ L에 0.5 M  $K_4P_2O_7$  완충용액(pH 8.6) 50  $\mu$ L, 4 mM NADP 150  $\mu$ L를 첨가한 후, 2.0 unit/mL GABase 50  $\mu$ L를 혼합하여 340 nm에서 흡광도를 측정함(initial A).
- 20 mM  $\alpha$ -ketoglutarate를 50  $\mu$ L 넣고 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도를 측정(final A)함.
- 농도별 GABA(Sigma-Aldrich Co.)를 동일한 조건에서 분석한 표준검량곡선에 측정된 흡광도(final A-initial A)를 대입하여 생성된 살충물질 함량을 산출함.

#### ▣ 통계분석

- 각 조건 별 통계 유의성을 평가하기 위해, IBM 사의 SPSS ver 1.5 프로그램 내 이변량 상관분석을 통해 시험조건 별 토양 투과율에 대한 통계적 유의성을 평가함.

### ③ 결과

#### ▣ 약제의 토양 침투성에 의한 살충물질의 토양 전달력(그림 30)

- 최종 목적부위인 뿌리부가 생육하는 침투 깊이인 30cm에 토양 수분 함량과 살충물질의 농도와의 연관성을 살펴봄.
- 대상 토양의 수분함량이 높을수록 살충물질의 검출량이 0.93의 결정계수를 보이며, 유의한 상관성을 나타내며, 즉 토양 침투력이 증가할수록 살충물질의 토양 전달력이 증가함을 알 수 있음.
- 따라서 본 약제의 토양 침투성의 향상은 뿌리 등의 목적 부위에 대한 살충물질의 노출이 증가될 수 있음이 확인됨.

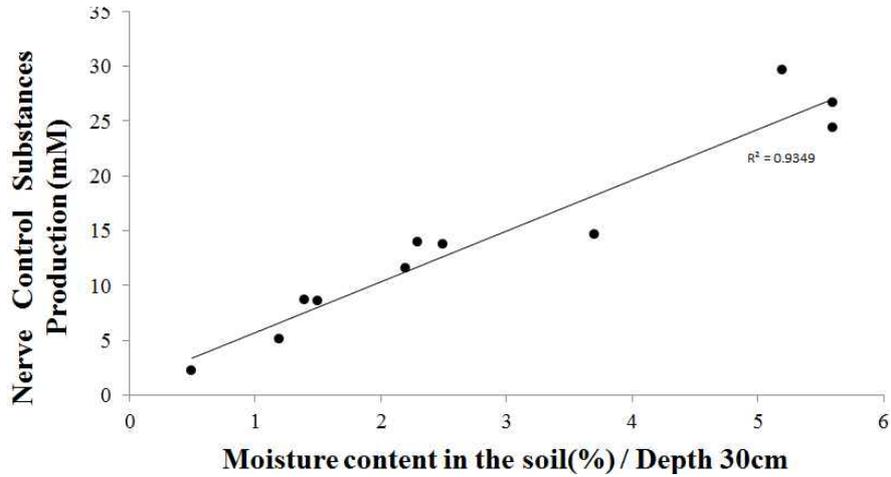
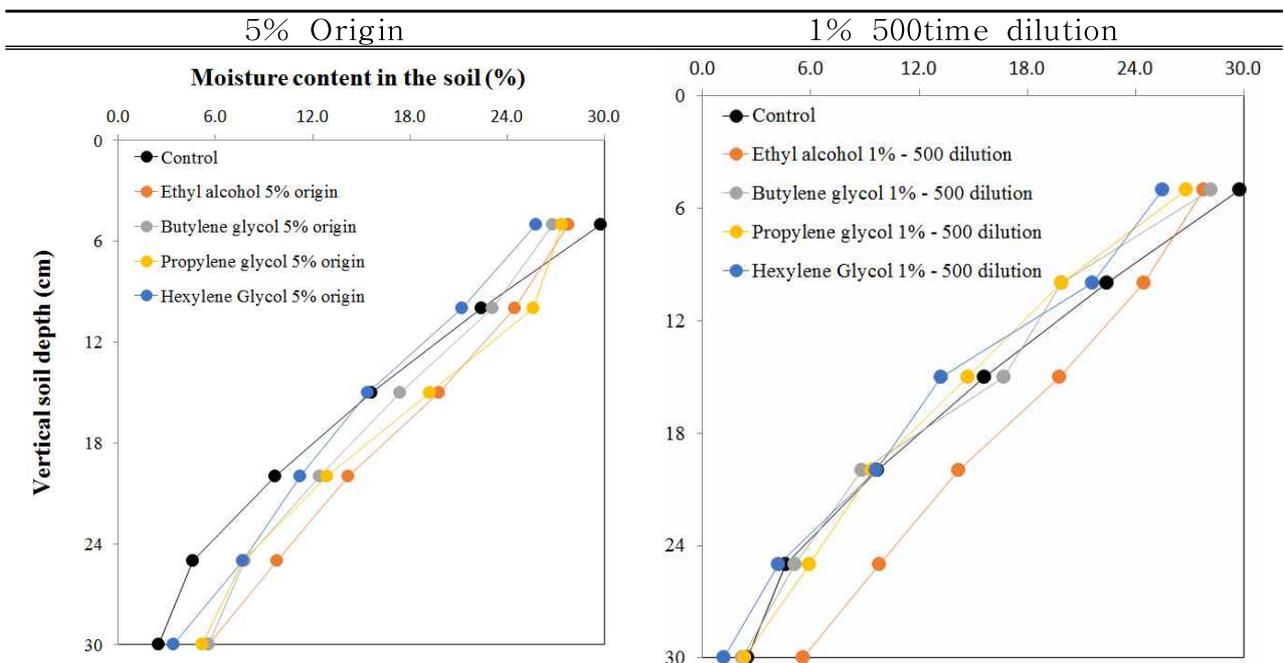


그림 30. 토양 내 약제의 침투력과 살충물질과의 상관성

□ 살충 조성물의 물성 개선을 통한 토양 침투성 향상 평가(그림 31)

- 침투성 원료 5%를 함유한 원액 기준에서 목적 부위에 대한 토양 침투력은 대조구인 무첨가 배양 조성물의 경우, 2.5%인 반면, Ethyl alcohol은 6.1%, Butylene glycol은 5.6%, Propylene glycol은 5.2% 순으로 개선된 토양 침투력을 보임(5% origin).
- 반면 1-3%를 혼합한 제형에서 현장 희석배율을 고려할 시 대조구에 비해 토양 침투력의 개선 요지를 살펴볼 수 없었고, 이는 희석과정에서 침투 이행제의 함량이 저감되어, 유효한 효과를 도출하지 못한 것으로 판단됨(1-5% 500time dilution).
- 그러나 전 시험구들 목적부위의 기준점인 지하부 30cm에 대해 최대 6.1 최소 0.0, 평균 2.6%의 토양 침투 도달력이 있음을 확인함.



<그림 계속>

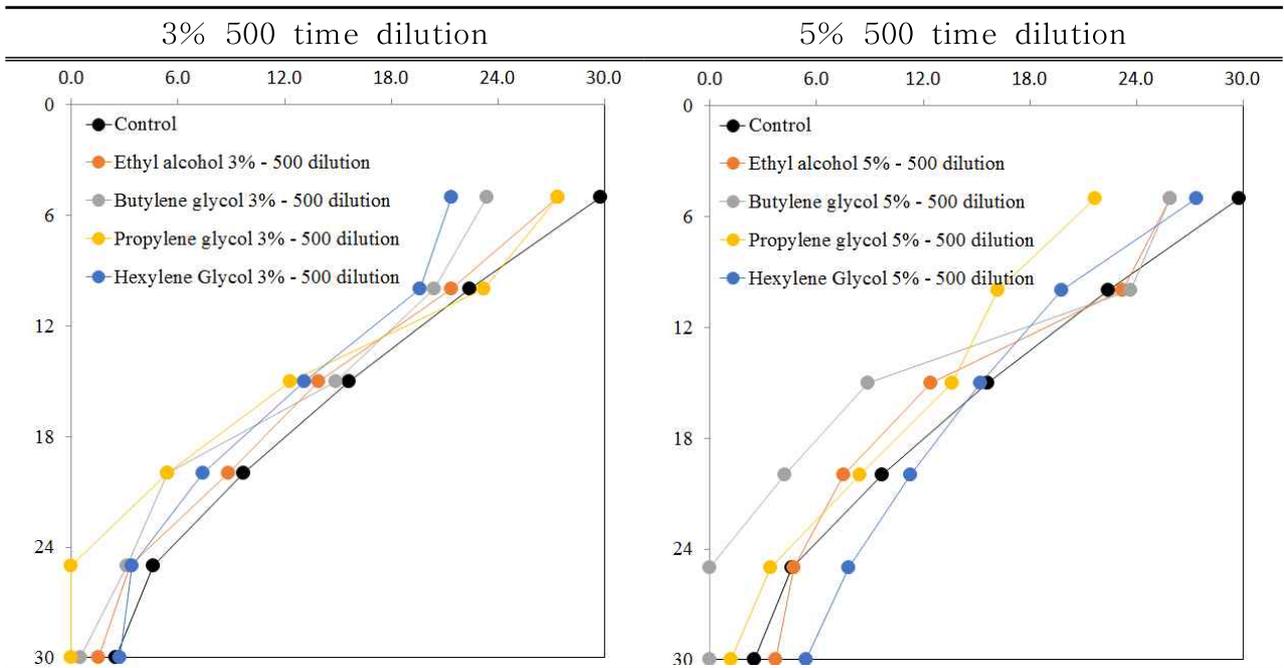


그림 31. 살충조성물의 토양 침투 원료 혼입에 따른 침투 개선 평가

- 토양 침투성이 개선된 결과를 도출하기 위하여 희석수 내 5% 전후의 토양 침투성 원료의 혼입이 필요할 것으로 판단되어, 이는 완제품의 함량 구성에 산술상으로 도출 불가능한 수치임(5% origin).
- 따라서 토양 침투성을 향상시키기 위한 추가적인 원료의 혼입을 배제하였음.

▣ 관주량 변화와 이에 대한 토양 침투 상관성(그림 32)

- 이에 약제의 토양 침투성을 향상시키기 위한 현장 사용방법의 개선 요지를 평가하도록 함.
- 500-1,500L/200평 규모로 관주량을 변화하며, 공급 유량을 증가시켜 목적부위에 대한 개선된 토양 침투력을 평가하였음
- 500L의 관주량의 경우 목적부위의 토양 수분률은 2.5%였던 반면, 관주량의 증가에 따라 목적부위의 토양 수분률은 11.1, 15.2%로 개선되었고, 1,500L의 경우 500L 대비 508.0%의 토양 침투 개선 능력을 보임.
- 따라서 본 살충약제의 액상 제형의 방제부에 대한 유효 토양 침투성은 최소 500배 이상의 관주용량에서 재현이 될 것으로 판단되며, 이 이상의 관주용량에서 토양 침투성의 증가가 기대될 수 있음.

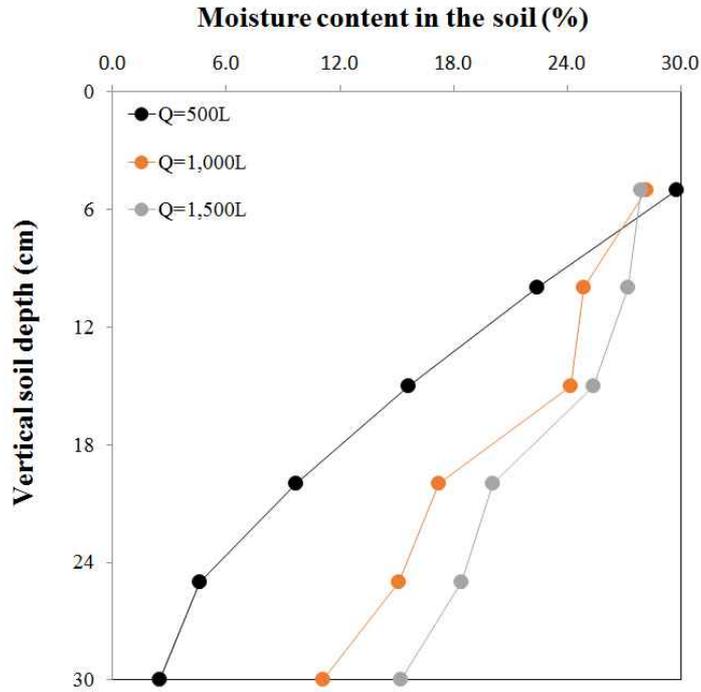


그림 32. 살충조성물의 관주용량에 의한 토양 침투 개선 평가

□ 통계분석(표 4)

- 각 측정 인자간의 통계적 유의성을 살펴보면, 토양 침투 개선제의 현장 희석에 의한 적용과 토양 침투력의 상승은 유의성이 없는 것으로 나타남.
- 토양 깊이 별 수분함량과 살충물질농도와 유의미한 양의 상관성을 보여, 약제의 토양 노출에 따라 살충물질의 전달력이 결정되어짐을 확인할 수 있음.
- 관주량의 증가에 따라 토양 깊이 별 투과율은 강한 양의 상관성을 보이며, 본 통계분석으로 참고하는 바, 관주량의 변화가 토양 침투성에 가장 주요한 변수임을 확인할 수 있음.

표 4. 토양 침투성 원료의 종류 및 용해도 평가

Vertical depth(cm)					
Q(Flow rate)	-				
토양침투개선제 농도(%)	-	-			
Moisture content(%)	-0.911 <sup>a</sup>	2.69 <sup>a</sup>	0.98		
Control matter content(mM)	-	-	-	0.95 <sup>a</sup>	
구분	Vertical depth(cm)	Q(Flow rate)	토양침투개선제 농도(%)	Moisture content(%)	Control matter content(mM)

\* a는 0.01의 유의성을 b는 0.05의 유의성이 있음을 나타내며, '-'는 유의성이 없음을 나타낸다.

④ 결론

- 제 1세부에서 제공한 액상 시제품의 토양 침투성 제형의 추가 도출은 무리가 있으나, 목적부위 인 뿌리에 대한 유효 토양 침투성은 최소 500배 이상의 관주용량에서 재현이 될 것으로 판단되며, 이 이상의 관주용량에서 토양 침투성의 증가가 기대될 수 있음.
- 이에 현장적용 방법 측면에서 시제품의 효과적인 방제전략을 수립함.

(다) 서방출형 입제 제형을 적용한 목적부위(뿌리)의 약효 지속성

① 연구목적

- 앞서 액상형태의 살충물질의 토양 침투성 및 잔존성 및 정착력 제고를 위한 다양한 제형화 및 현장사용방법을 도출하였으나, 연속 수확 작물의 경우 재배 기간 대비 현장방제비용의 상승의 리스크가 발생할 수 있음.
- 이에 1세부에서 목적부위인 뿌리에 대한 노출의 용의성과 연속수확작물의 현장 방제비용을 절감하기 위한 목적으로 Wikim0118의 생균 배양물이 혼입된 서방출형 입제 제형을 추가로 도출함.
- 이에 입제 제형의 모사 환경 적용에 의한 Wikim0118의 뿌리근처 토양에 대한 균주의 발생 지속성을 평가함.

② 재료 및 방법

㉠ 공시재료

- 공시재료 : *L. sakei* Wikim0118 생균 배양물( $1.0 \times 10^9$  Cfu/mL)
- 서방출형 원료 : 천연 제올라이트(CEC 80이상, 분말도 850 $\mu$ m 이하, 수분함량 12% 이하), talc power
- 공시토양 : 원예용 상토

㉡ 시험방법

- 처리이력: 시비(21. 9. 30), 처리(21. 10. 1), 종료(21. 10. 29)
- 처리구 면적 및 배치: 4 inch 육묘용 포트, 완전임의배치법(3반복)
- 처리구 설정

표 5. 처리구 설정 방법

처리구	서방출형 제형 처리량	비고
무처리구	-	
시험구	15kg/300평	현장 적용 시 토양 객토과정과 유사적용을 위해 토양과 혼합 처리함.



그림 33. 저방출형 제형을 적용한 모사환경의 포트 운용 현황

#### ▣ 서방출형 제형의 제조

- WiKim0118 생균 배양물 10% + 서방출형 담체인 천연 제올라이트와 90% 비율로 혼합 → talc power 최종 볼륨의 1% 후첨하여 수분 1차제거 → 완성된 제형을 Natural convection oven을 활용한 24시간동안 35℃ 환경으로 2차 수분 제거

#### ▣ 포트 운용 방법

- 서방출형 제형의 특성 상 수분과의 반응을 통해 균체가 외부로 용출되므로, 균주의 검출 시 희석효과를 최대한 배제하기 위하여 토양이 수분을 머금을 수 있도록 최소한의 관주를 실시하였고, 포트 상부에 밀봉 처리를 통해 증발등의 수분 손실을 추가로 방지함.

#### ▣ 미생물 검출 방법

- 대조구(무처리구)와 시험구(처리구)을 토양에 처리한 후 토양 내 잔존하는 WiKim0118의 생존율을 확인하기 위해, 토양시료 100g을 채취후 serial dilution 하여 2% CaCO<sub>3</sub>가 함유된 MRS 고체배지에 도말하여 30℃에서 48시간 배양함.
- 배양 후 2% CaCO<sub>3</sub>가 함유된 MRS 고체배지에서 투명환을 형성하는 콜로니를 유산균으로 선정한 후 16S rRNA 서열분석 및 GABA 생성량을 측정하여 WiKim0118로 확정함.

### ③ 실험 결과

- 처리기간 동안 뿌리 근처 토양 내 생존하는 WiKim0118의 균수를 측정한 결과, 처리 후 1일에 10<sup>4</sup> CFU/g가 검출되었으며, 처리 4주까지 10<sup>4</sup> CFU/g가 유지되는 것으로 확인됨

### ④ 결론

- 정식 시 토양과 본 시제품의 혼용 처리에 의해, 목적 부위인 뿌리 근처 토양에 Wikim0118균주의 노출력이 개선 되어졌고, 지속성 측면에서도 우수한 결과를 나타냄.
- 이에 본 제형의 뿌리 목적부에 대한 지속적인 방제력을 제공할 수 있음이 확인 되어짐.

## (라) 식물 침투성(추가)

### ① 연구목적

- 대상해충은 내부 기생선충으로써, 살충물질의 식물침투성 여부가 담보되어야만 식물 내 기생한 선충에게도 유효한 방제가를 제공할 수 있음.
- 이에 제1세부에서 도출한 액상 시제품을 현장 환경 내 처리함에 따라 식물체내 살충물질의 혼입 가능여부를 검토하였고, 최종 본 살충물질의 식물침투성 여부를 평가함.

### ② 재료 및 방법

#### ㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : *L. sakei* WiKim0118(세계김치연구소) 배양 추출물
- 대조구 : 배양 추출물을 처리하지 않은 자연 상태의 과실

#### ㉡ 시험방법

- 대조구 : 무처리 관주
- 시험구 : 최종 수확기 5일 전 Wikim0118 시제품 1L(살충물질 함량 : 600mM) 500배 희석액, 200평 관주 1회
- 출하 대상의 정상 과육을 완전임의배치법을 적용 3회 수거 후 분석 대상으로 설정

#### ▣ 시험포 현황

- 시험포 위치 : 고창군, 구례군
- 대상작물 : 시설하우스 메론, 시설하우스 수박
- 처리구 설정 방법

표 6. 처리구 설정 방법

처리구	처리량	처리 방법
무처리구	물 500L/200평	수확기 5일전 토양관주
시험구	시제품 1L(살충물질 함량 : 600mM) 500배 희석액/200평	수확기 5일전 토양관주



그림 33. 살충물질 식물 침투성 평가를 위한 고창 메론 포장 현장 처리 개황도



그림 34. 살충물질 식물 침투성 평가를 위한 화순 수박 포장 현장 처리 개황도

▣ 살충물질 분석 방법

- 시료 전처리 과정에서, 각 시료 별 일정량을 취하여 0.45 $\mu$ m 공극의 syringe filter로 부유물을 거르고 전처리 과정을 거쳤고, 표준 용액의 peak와 시료 peak의 머무름 시간(RT)을 분석하여 정성 분석을 실시하였음.
- 시료의 일정 농도의 살충물질 표준 용액을 첨가하여 peak의 면적이 증가하는 경향을 보고 정성 분석을 완료하였고, 크로마토그램의 농도 면적비에 대해, 1, 2, 4, 8, 100 $\mu$ g/mL의 농도에서 검량선을 작성하고 이를 통해 시료 중의 살충물질 함량을 산출하였음.
- 각 확립된 분석 조건에 따라 HPLC에 주입하여 각 시료가 함유하고 있는 살충물질의 양을 정량 분석하였고, 데이터의 객관성을 위해 공인분석 기관인 한국 고분자 연구소(KOPTRI)를 통해 수행하였음(표 7).

표 7. 시료 명 및 시료 사진

No.	의뢰자가 제공한 시료명	시험에 사용한 시료명	시료사진
1	멜론 T	Koptri-21-07-11315-1	
2	멜론 C	Koptri-21-07-11315-2	
3	수박 T	Koptri-21-07-11315-3	
4	수박 C	Koptri-21-07-11315-4	

Note a) 시료 형태 : 고상 : 덩어리( ), 분말( ), 액상 (pH 7) : 원액( ), 유기용액( ), 수용액( O )

③ 시험결과

- 시험 결과, 1회 관주 처리에 불구하고 메론 작물의 경우, 자연 상태의 살충물질 함량 대비 79mg/kg, 11.1%의 함량 증진 및 수박작물의 경우 46mg/kg으로 13.9%의 함량 증진 결과를 나타냄(표 8).

표 8. 시료 별 시험방법 및 시험결과

시료명	시험항목	단위	시험방법	검출한계	시험결과
Koptri-21-07-11315-1	$\gamma$ -aminobutyric acid,	mg/kg	LC-MSMS	0.001	788
Koptri-21-07-11315-2	$\gamma$ -aminobutyric acid,	mg/kg	LC-MSMS	0.001	709
Koptri-21-07-11315-3	$\gamma$ -aminobutyric acid,	mg/kg	LC-MSMS	0.001	378
Koptri-21-07-11315-4	$\gamma$ -aminobutyric acid,	mg/kg	LC-MSMS	0.001	332

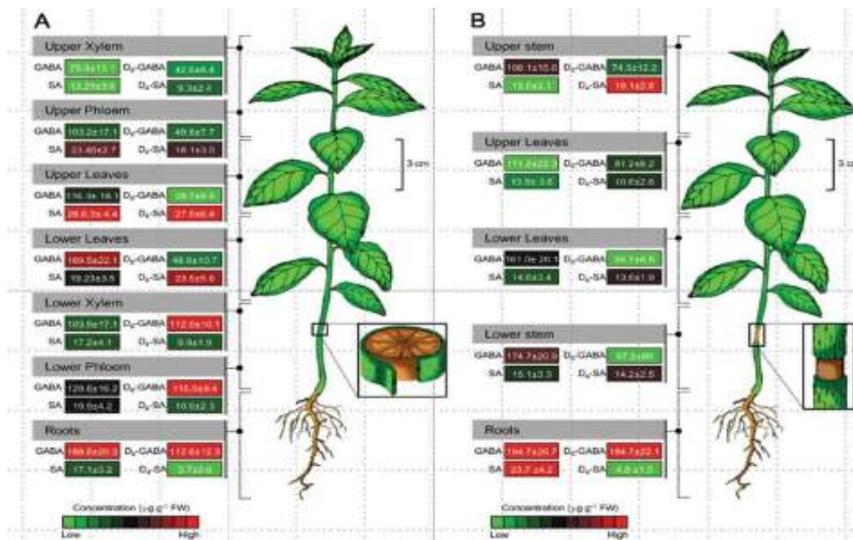
Note a) mg/kg = ppm

b) Koptri-NL-VI20-SW0.1-DL-MOH10

c) LC-MSMS ; Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry

④ 결론

- 본 배양 조성물 내 선충 방제용 유효물질인 GABA가 식물체의 뿌리로 흡수되어 식물체의 조직의 어디까지 도달하는지 연구한 사례가 있으며, 이를 위해 외부 공급 된 GABA에 별도의 마킹을 실시하여, 공급 경로를 연구한 사례가 있음(Roth et al., 2003).
- 외 생성 GABA(D 4, 6-GABA)는 식물체의 체관부, 목질부, 뿌리 앞에서 모두 검출 되었고, 뿌리부분이 가장 많고 식물체의 상부에 이동될수록 농도는 연해짐을 확인할 수 있음(Roth et al., 2003)(그림 35).



GABA - 표준품, D6 / D4-GABA - 마킹한 외생성 별도의 GABA

\*출처 : Roth et al., 2003

그림 35. 외생성 GABA의 식물체 침투성과 이송 결과

- 이는 식물체에 본 살충 조성물을 공급할 시 식물체가 이를 흡수하여, 그들의 체관 및 물관부를 통해 물질이송을 한다는 점에 있고, 이 부분에서 내부로 침입한 기생선충인 뿌리혹선충의 흡즙 활동에서 본 살충 물질의 섭식을 통해 방제가 가능하다는 점을 시사하는 바임(그림 36).
- 따라서 본 연구에서 이러한 선행 연구 및 과학적 가능성을 기반으로, 식물 침투 및 운송

성 유효물질의 전달 메커니즘은 토양 내 기주식물로 이동하는 뿌리혹선충에 대한 직접적인 방제 가능성을 제시함(그림 36).

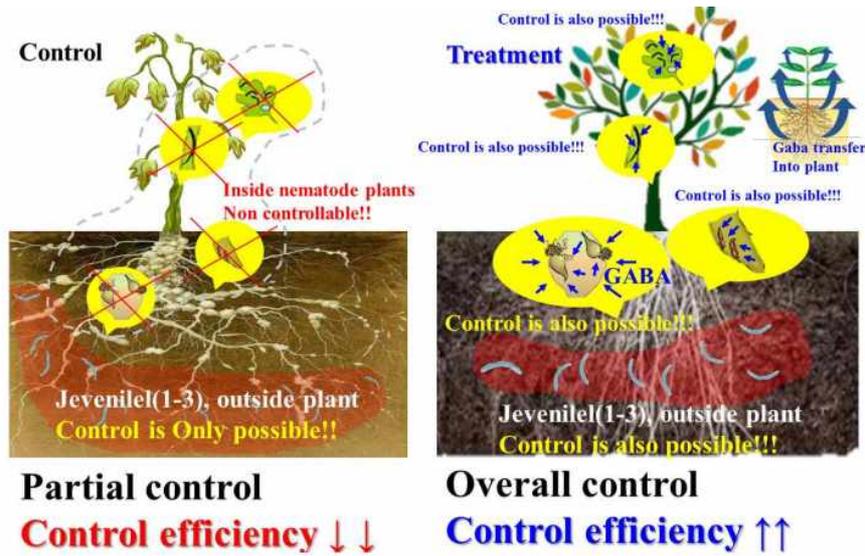


그림 36. 살충물질의 식물 체내 운송에 따른 내부 기생성 선충의 방제 전략

- 현장에서 과실의 수확 시 당도를 올리기 위하여, 관주를 단수하는 상황 아래, 수확기 이전에 살충물질의 처리가 불가하였으나, 5일 경과후의 결과에서만 판단할 때 메론 작물의 경우, 자연 상태의 살충물질 함량 대비 79mg/kg, 11.1%의 함량 증진 및 수박작물의 경우 46mg/kg으로 13.9%의 함량 증진 결과를 나타냄(표 8).
- 선행 연구에 따르면 외행성 살충물질의 공급은 뿌리에서 가장 높은 농도가 검출 되고 식물체의 상단부에 전달 될수록 전달농도가 연해짐을 확인할 수 있는바(Roth et al., 2003) 뿌리부위에 침투한 살충물질의 량은 이보다 높은 농도였음을 판단 할 수 있음.
- 따라서 본 미생물 조성물 내 살충물질은 식물체내에 유효한 침투성이 있음을 판단할 수 있으며, 이에 따라 뿌리혹선충의 내부 기생성에 대한 추가적인 방제가를 도출하는데 기여할 수 있을 것으로 보임.

## ■ 뿌리혹선충의 선택적 신경제어로 미생물 살선충 작용기전 구명

### 가. 신경 제어 미생물 선발 및 선충에 대한 활성 평가

#### (1) 신경제어 후보 물질 선발을 위한 목표 수용체 설정

- 척추동물에게서는 중앙신경계에서 신경 안정을 위한 신호전달자로써 억제성 GABA 수용체만 존재함.
- 반면 선충은 전혀 다른 기능을 하는 흥분성 GABA 수용체가 존재하며, 이는 선충의 몸체에서 발견되어 근육의 수축을 조절함.
- 이러한 근육 수축을 담당하는 흥분성 GABA 수용체는 선충의 운동성(움직임)을 조절하며, 배변 및 산란 등의 장내 근육의 조절을 담당함.
- 상기 근육의 이완 및 수축은 선충의 번식과 생존에 중요한 부분을 차지함.
- 이러한 특이점을 활용, 선충에만 존재하는 흥분성 GABA 수용체를 목표로 설정, 그에 따른 GABA 생성 미생물을 스크리닝을 계획하였음.

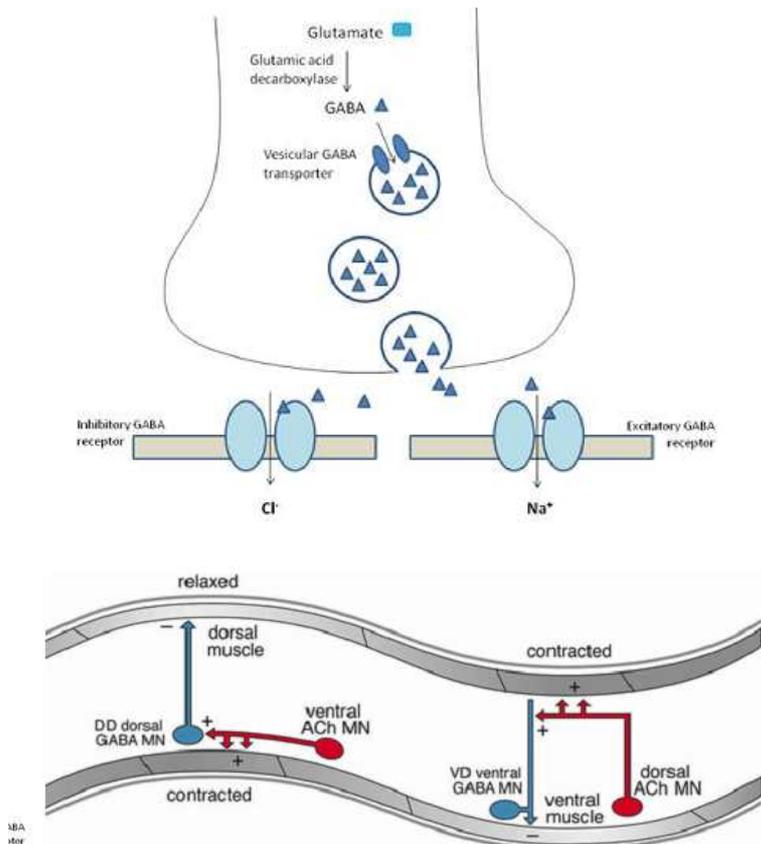


그림 1. 선충의 GABA system

## (2) 선발 균주 별 신경제어 활성 평가

### (가) 살충물질 생성 균체의 1차 스크리닝

#### ① 연구목적

- 선충에 대한 생물 검정 실험을 통한 살충물질 생성 균체 스크리닝

#### ② 재료 및 방법

##### ㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : 김치로부터 분리한 15개의 살충물질 생성 후보 균주
- 기본 및 대조구 : MRS broth, E.coil OP50
- 선충 배지 : NGM(nematode growth medium)
- 실험 선충 : *Caenorhabditis elegans*

##### ㉡ 시험방법

- 후보 균주별 살 선충성 기능을 확인 및 평가하기 위해, 실험 선충을 이용하여, 후보 균주에 대한 살충 기능을 평가함.
- 실험 방법으로 직경 60mm petri dish에 NGM(nematode growth medium)을 구성한 후, 3일간 상온에 두어 오염에 대한 확인을 마친 후 먹이를 도포함.
- 기존의 도포 먹이인 E.coli OP50과 김치 유산균 균종을 각 플레이트에 100 $\mu$ L 도포한 후, 배지가 잘 마르도록 37 $^{\circ}$ C에서 6시간 배양함.
- 성인 선충 10마리씩 각 플레이트에 성인 선충 10마리씩을 각 플레이트에 배치한 후 하루에 1-2회 주기적인 측정함.
- 각 시험구별 ① 플레이트에 존재하는 선충의 수 ② 플레이트에 존재하는 알의 수 ③ 선충의 운동성 (대조군 = 무처리군 = 기존먹이 : E.coli OP50 공급과 비교한 선충의 움직임에 대한 상대적인 평가)을 측정하여 기록함.
- 기록한 수치를 토대로 평균적인 점수를 환산하여 수치 및 도식화 함.

#### ③ 결과

- 실험 결과 기존의 먹이인 E.coli OP50과 유사하게 활발한 섭취를 하는 플레이트와 그렇지 않은 플레이트로 구분됨.
- 특히 활발한 섭취를 하는 플레이트(361)의 경우 선충의 생존이나 운동성같은 부분에서 대조군에 비해서 현저히 낮은 점수를 나타냄(그림 2).
- 각 플레이트를 점수로 수치화 하여 가장 낮은 점수를 받은 361, 623, 219, 212, 211, 148을 선별함(그림 2).

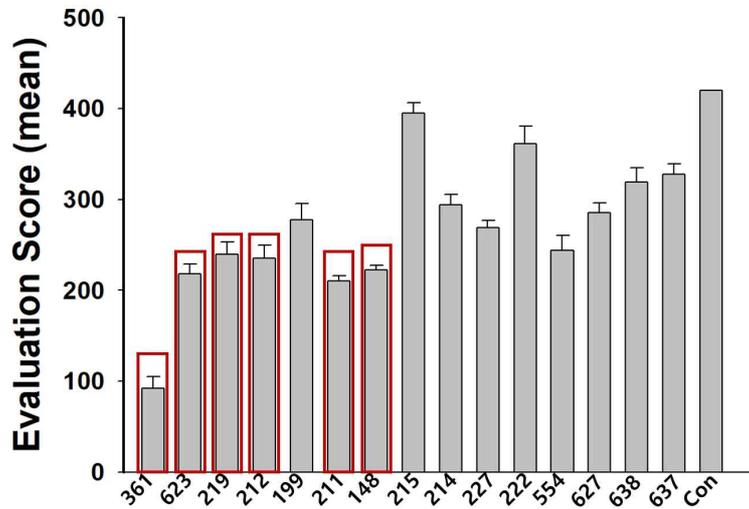


그림 2. 1차 선발 균주의 살 선충성 기능 점수화

④ 결론

- 각 플레이트를 점수로 수치화 하여 가장 낮은 점수를 받은 361, 623, 219, 212, 211, 148을 1차 후보균으로 선별함.

(나) 살선충 효능을 보이는 균체 2차 선발

① 연구목적

- 1차 선발된 15종의 후보균 가운데, 살선충 효능을 보이는 균체 선발

② 재료 및 방법

㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : 361, 623, 219, 212, 211, 148 총 6종의 1차 선발 후보균
- 기본 및 대조구 : 각 미생물의 MRS broth, E.coil OP50
- 선충 배지 : NGM(nematode growth medium)
- 실험 선충 : *Caenorhabditis elegans*

㉡ 시험방법

- 상대적으로 낮은 점수를 받은 균주(361, 211, 148, 623, 219)를 2차 선발하여 추가적인 실험을 진행함.
- 2차 선발 균주의 자세한 살충효율을 정량적으로 평가하기 위해, 기존의 먹이를 도포한 대조군과 함께 실험을 진행, 총 6일간의 선충 관찰을 통해 움직임의 점수를 대조군과 비교하여 상대화 함.
- 총 10마리의 성인 선충을 각 플레이트에 놓고 실험 진행, 각 플레이트 당 100μL를 도포함.

- 성인 선충 10마리씩 각 플레이트에 성인 선충 10마리씩을 각 플레이트에 배치한 후 하루에 1-2회 주기적인 측정함.
- 각 시험구별 ① 플레이트에 존재하는 선충의 수 ② 플레이트에 존재하는 알의 수 ③ 선충의 운동성 (대조군 = 무처리군 = 기존먹이 : E.coli OP50 공급과 비교한 선충의 움직임에 대한 상대적인 평가)을 측정하여 기록함.
- 기록한 수치를 토대로 평균적인 점수를 환산하여 수치 및 도식화 함.

### ③ 실험 결과

- 실험 결과 가장 낮은 점수를 받은 361의 경우, 기존의 먹이인 E. coli OP50과 유사하게 균체 배양물을 섭취함을 관찰 할 수 있었고, 처리 후 수 시간 동안 활동성이 정지함을 확인할 수 있었음(그림 3, 4).
- 이는 다른 실험군과도 비교되는 현상으로, 이를 통해 361균체의 경우 선충의 움직임을 제한하는 기능이 있음을 유추하였음.

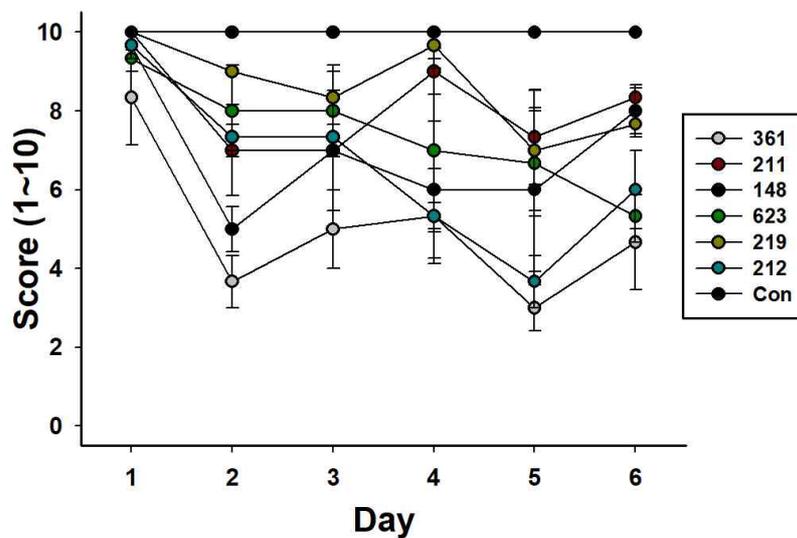


그림 3. 2차 선발 된 균주의 살 선충성 기능 평가



그림 4. 361 균주를 도포한 플레이트 내 비정상적 움직임을 보이는 선충 ; 위 선충은 수 시간동안 활동이 정지함.

#### ④ 결론

- 이러한 결과를 토대로 제1협동에서 제공한 김치 유래 살선충 물질 생성 균주 중 361균주를 살 선충성 기능 검증을 위한 최종 후보균으로 결정함.

### (다) 기존 제품과 비교한 Wikim0118균주의 살 선충 기능성 평가

#### ① 연구목적

- 시중에 시판되는 타사제품과 살선충 방제효율 비교 평가, 상업적 적용 가능 여부 검토

#### ② 재료 및 방법

##### ㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : LB *sakei* Wikim0118
- 대조구 : E. coli OP50
- 실험구 : LB *sakei* wikim0118 culture broth
- 양성 대조구 : 시중에 시판되는 살충 농약 2종(입제 1, 액제 1)
- 선충 배지 : NGM(nematode growth medium)
- 실험 선충 : *Caenorhabditis elegans*

##### ㉡ 시험방법

- 실험선충을 활용하여, 그들의 개체수, 산란 수, 활동성등을 종합평가하였고, 이는 상위와 동일한 방법으로 수행하였음.
- 타사의 제품은 입제 및 액상 농약 등 선충 방제용 자제로 대표적인 2종을 택하였고, 이를 선충 배지에 제품의 사용매뉴얼에 준하여 혼입하여 평가하였음.

#### ③ 결과

- 타사의 제품 A, B와 대조군(기준 먹이 : E. coli OP50), Wikim0118 균주 배양물과 비교한 결과, 타사 제품 A, B 보다 월등히 좋은 살 선충 결과를 보여줌(그림 5).
- 특히 선충의 마리수나, 산란 수가 5일 차부터 큰 차이점을 보이며, 이는 Wikim0118에 의한 초기 살 선충성 효과로 보여짐(그림 5).
- 초기에 선충의 움직임을 제한하고, 섭식 및 번식성 활동에 제한을 줌에 따라, 시간의 경과에도 본 효과는 유지되어 시중 제품군에 비해 낮은 번식력과 운동성을 보이는 것으로 관찰되었음(그림 5).

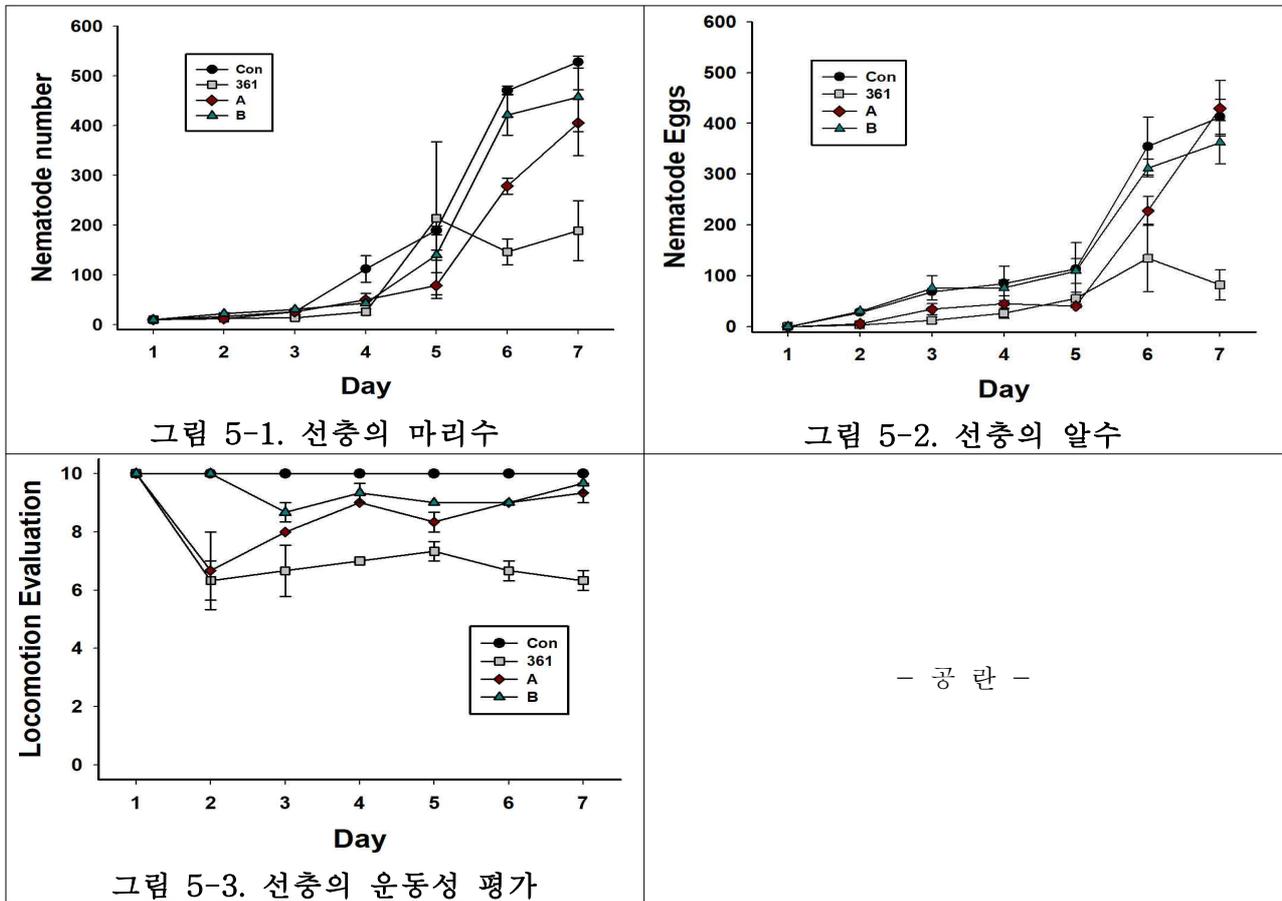


그림 5. 타사제품과 비교한 Wikim0118균주의 살선충 기능성 평가

④ 결론

- 타사의 제품 A, B와 대조군(기준 먹이 : *E. coli* OP50), Wikim0118 균주 배양물과 비교한 결과, 타사 제품 A, B 보다 월등히 좋은 살 선충 결과를 보여줌.

(3) 미생물 균주의 활성 제어 특성 연구

(가) 선발된 균주의 기준(*E. coli* OP50)과 비교한 살선충 기능성 확인

① 연구목적

- 선발된 균주의 살선충성 기능 평가를 위한 추가적인 실험을 진행

② 재료 및 방법

㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : LB *sakei* Wikim0118
- 대조구 : *E. coli* OP50
- 실험구 : LB *sakei* wikim0118 culture broth
- 선충 배지 : NGM(nematode growth medium)
- 실험 선충 : *Caenorhabditis elegans*

㉔ 시험방법

- 선발된 361 균주(이하 Wikim0118로 명명)에 대한 살 선충성 기능을 평가하기 위해, 추가적인 실험을 진행함.
- 기존의 먹이인 E.coli OP50을 도포한 플레이트와 함께 7일 동안 관측을 통해 ① 선충의 마리 수 ② 선충의 알 수 ③ 선충의 운동성을 평가함.
- 운동성 항목의 경우 대조군(E.coli OP50)과 비교한 상대적인 점수로써 움직임의 관찰을 통해 점수화 함 (1-10점).

③ 결과

- 선행 실험에서 선충의 먹이에 GABA 시약을 함께 처리한 경우, 선충의 움직임을 제한하는 효과는 존재하였으나, 미비한 지속성을 보였음(보고서 미수록).
- GABA 생성 유산균주의 경우 활성 균체의 연속적인 대사과정을 통해 GABA의 지속생산이 용의하고, 이에 따라 기존의 GABA 시약만 처리한 경우보다 저렴한 생산비용으로 고농도, 지속적 생산이 가능함.
- 이에 따라, 본 균체를 활용한 다량의 GABA에 지속적으로 선충이 노출될 경우, 몸체 마비에 대한 효과의 지속성 측면에서 GABA 시약 단독 처리보다 향상된 효율을 기대할 수 있으리라 판단됨.
- 본 실험 결과, 예상대로 장시간 동안 실험 선충의 활동 정지가 빈번이 관찰되었고, 그에 따른 생존성과 번식성의 부분에서 대조군에 비해 현저히 떨어지는 결과가 도출되었음.

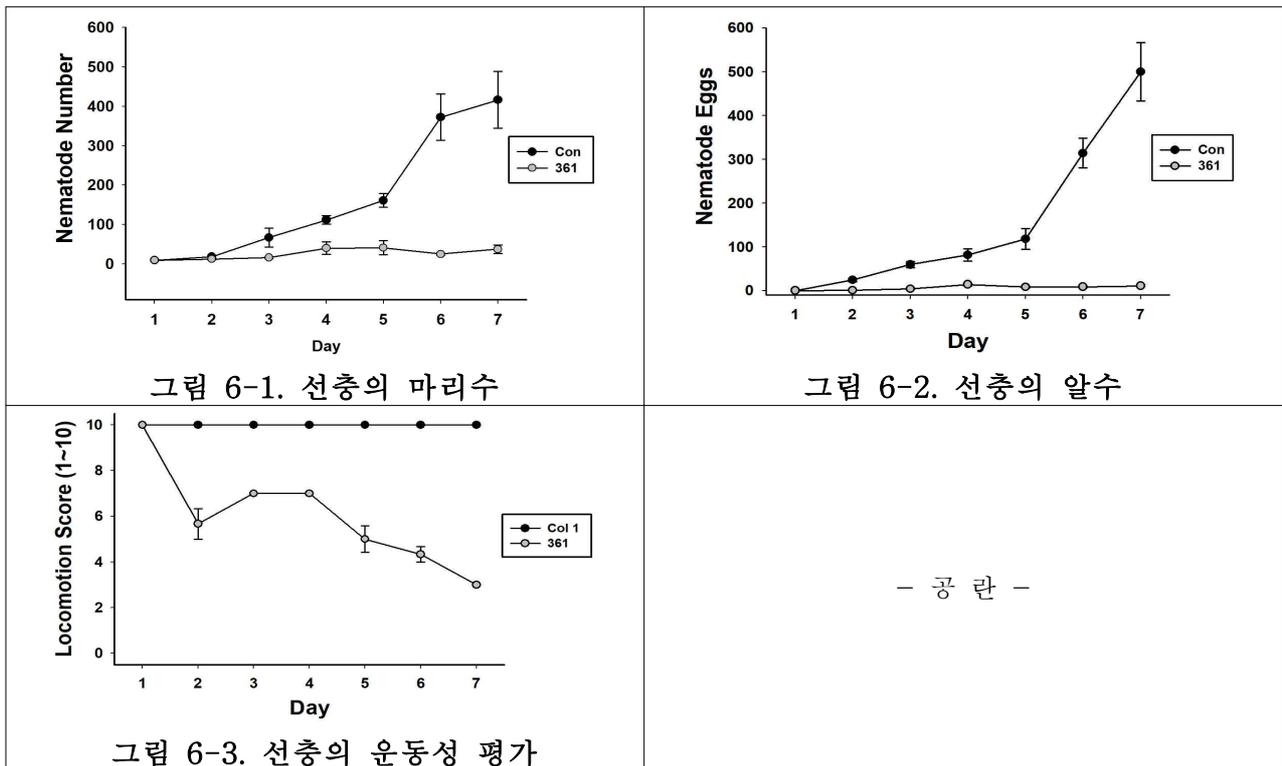


그림 6. 타사제품과 비교한 Wikim0118균주의 살선충 기능성 평가

#### ④ 결론

- 대조구 대비 선발 균체의 배양물에 노출된 실험 선충은 활동 정지가 빈번하게 관찰되어, 선충에 대한 방제효율이 있음을 재확인하였음.
- 살충물질의 시약 처리 구 대비 살충물질을 생성하는 균체가 함유된 배양물에서 향상된 선충 방제효과를 거둘 수 있었음.
- 생성 균체의 배양물에 선충이 노출 될 경우, 살충물질의 지속적인 생산에 따라, 향상된 방제효율을 기대할 수 있으며, 저렴한 생산비용으로 고농도, 지속적 생산이 기대됨.

### (나) Wikim0118균주의 농도별 처리에 따른 영향성

#### ① 연구목적

- 선발 균주의 배양물이 실험선충에 대한 활동성 억제 효율을 보임에 따라, 살선충성 기능이 농도 가역적 반응인지 확인하기 위해, 배양물의 농도를 달리하여 추가적인 실험을 진행함.

#### ② 재료 및 방법

##### ㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : LB *sakei* Wikim0118
- 대조구 : E. coli OP50
- 실험구 : LB *sakei* wikim0118 culture broth
- 선충 배지 : NGM(nematode growth medium)
- 실험 선충 : *Caenorhabditis elegans*

##### ㉡ 시험방법

- Wikim0118 균주의 농도 특이적 살 선충 효율을 검증하기 위해, 1,000배, 100배, 10배로 희석하여 대조구인 기존의 먹이 (E. coli OP50)과 비교함.
- 최종 플레이트 내 존재하는 선충의 밀도를 통해 농도별 살선충 효율을 비교 평가하였음.

#### ③ 결과

- 농도에 따른 살 선충성 분석 결과 1,000배 희석액의 경우 대조구와 큰 차이점을 보이지 않았으나, 100배 이하의 농도 조건에서는 원액과 비슷한 효과를 보임(그림 7).
- 위 실험 과정을 통해 Wikim0118 균주의 처리 농도에 따라 살 선충 효과를 달리 보였으며, 이는 살선충성 기능이 Wikim0118의 농도에 직접적인 연관성이 있음을 확인할 수 있었음.

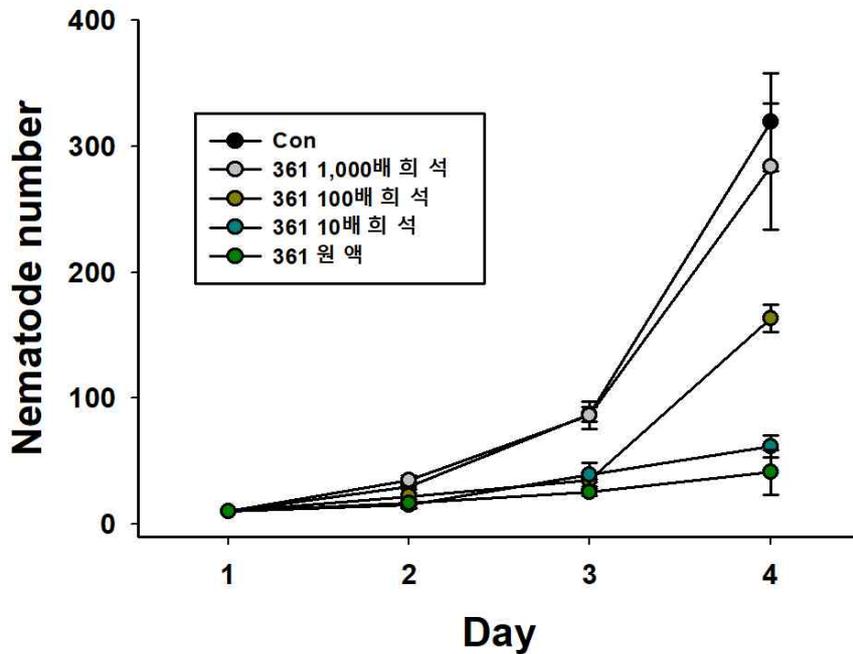


그림 7. Wikim0118균주의 농도 특이적 살 선충성 기능

④ 결론

- Wikim0118 균주의 처리 농도에 따라 살 선충 효과를 달리 보였으며, 이는 살선충성 기능이 Wikim0118의 농도에 직접적인 연관성이 있음을 확인함.

(다) 전기 생리학적 연구를 통한 신경제어 활성 확인

① 연구목적

- 앞선 과정을 통해 선충 특이적 수용체로 GABA 수용체를 선택하였음.
- 선충의 GABA 수용체는 흥분성과 억제성으로 양립되는데, 이 중 척추동물에는 없는 흥분성 가바 수용체를 직접적인 목표 수용체로 설정함
- 이에 대한 전기 생리학적인 연구를 통해 선발 균주인 Wikim0118이 목표 수용체에 영향을 미치는지 확인함.

② 재료 및 방법

㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : LB *sakei* Wikim0118
- 분석 기법 : 전기 생리학 실험(Two-electrode voltage clamp)

㉡ 시험방법

- 선충의 흥분성 GABA 수용체는 몸체의 근육 수축을 조절하여, 장내 근육의 수축을 유도

하기도 함(그림 8 A-B).

- 위와 같은 기능은 선충의 움직임에 큰 영향을 미치며 배변에 관해서도 억제성 GABA 수용체와 더불어 많은 영향을 미침(그림 8 C).

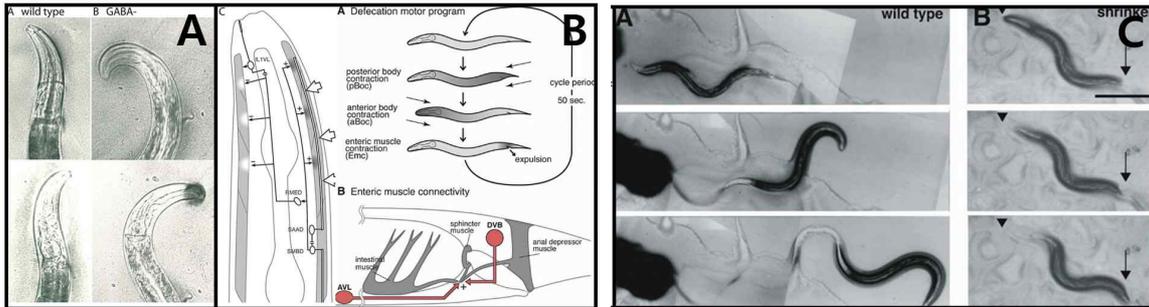


그림 8. 선충 흥분성 가바 수용체에 관한 작용 ; [1] Jorgensen, Erik M. "Gaba." WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology [Internet]. WormBook, 2005.

- 이 흥분성 GABA 수용체의 돌연변이는 몸체가 줄어들어있는 형태인 shrinker의 형태가 나타남.
- 선충의 흥분성 GABA 수용체인 LGC-35 (Ligand-gated Ion Channel 35)는 가바가 ligand로 작용하는 수용체이며 5개의 서브유닛과 가운데의 양이온 투과성 pore가 형성됨이 특징임.
- 또한 기존의 억제성 GABA수용체와 달리 양이온의 투과를 허용하며 이는 기존 척추동물 GABA 수용체가 하는 억제성의 역할이 아닌 흥분성의 역할을 매개함.

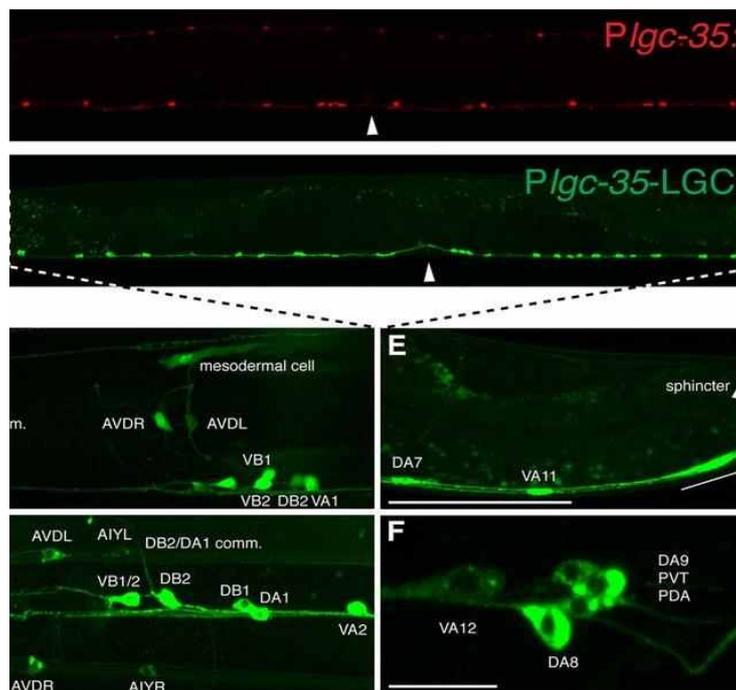


그림 9. Transcriptional reporter를 이용한 선충에서 LGC-35의 발현부 확인 ; Jobson, Meghan A., et al. "Spillover transmission is mediated by the excitatory GABA receptor LGC-35 in *C. elegans*." Journal of Neuroscience 35.6 (2015): 2803-2816.

- LGC-35는 선충 몸체의 배와 등쪽에서 끈 모양으로, 장내 근육에서는 괄약근에서 발현되며 근육의 수축을 매개함(그림 9).
- 선발된 Wikim0118 균주를 이용하여 위의 수용체 LGC-35에 효과적으로 작용하는지 확인하기 위해, 전기 생리학적인 실험(two-electrode voltage clamp)을 수행함(그림 10).
- 전기 생리학 실험(Two-electrode voltage clamp)은 아프리카 발톱개구리 (*xenopus laevis*)의 oocyte를 이용하여 원하는 특정 수용체의 cRNA를 주입하여 발현시킨 후, 그 수용체에 대한 활성을 확인할 수 있는 실험기법임(그림 10).

### Two-microelectrode voltage clamp

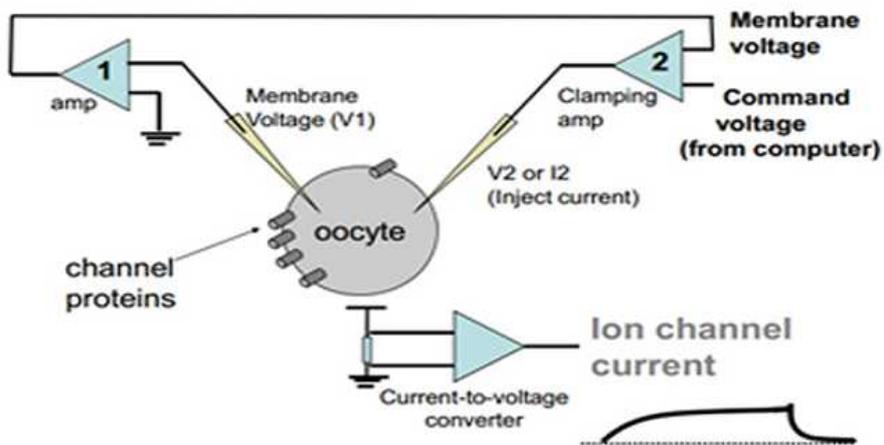


그림 10. Two-electrode voltage clamp 모식도

- 실험방법은 아래와 같음(그림 11)

#### ▣ *in vitro* RNA preparation

- RNA transcription 과정에는 plasmid DNA linearization, *in vitro* transcription 두 과정을 거침.

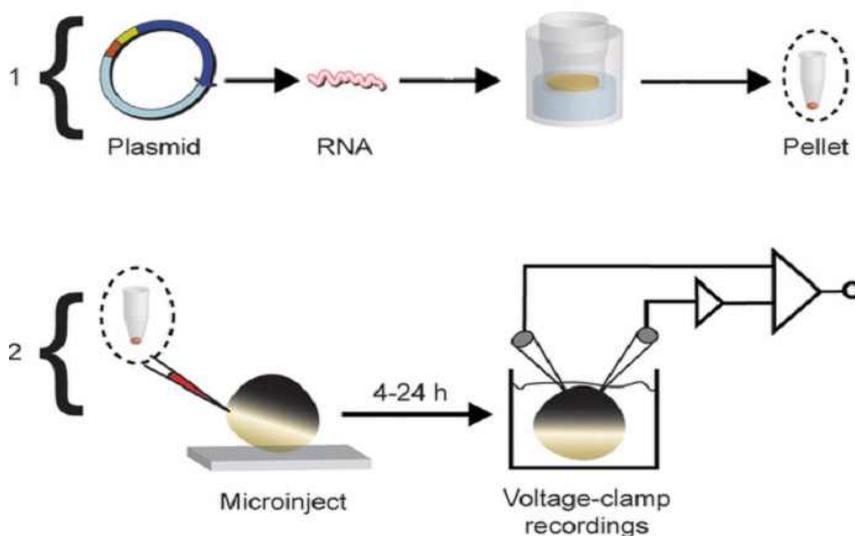


그림 11. Two-electrode voltage clamp 실험 순서

- **linearization** : 1.2-1.5 $\mu$ g DNA, 10X buffer 3 $\mu$ L, restriction enzyme 1 $\mu$ L에 total 30 $\mu$ L에 맞춰서 DW를 추가해서 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 incubation. 두 시간 후에 70 $\mu$ L 추가해 100  $\mu$ L로 맞추고 같은 양 (100 $\mu$ L)의 phenol (pH8)을 넣어 vortex 후에, 12,000rpm으로 5분 동안 centrifuge 돌려주는 phenol extraction을 진행함.
- 상등액을 새로운 ET tube에 옮기고 부피의 0.1배 NaOAC와 부피의2배 100% EtOH를 넣고 -20 $^{\circ}$ C에 30min 정도 store한 후에, 13,000 - 14,000 rpm과 4 $^{\circ}$ C에 20분 동안 centrifuge 로 돌리고 상등액 제거함.
- 400 $\mu$ L 70% EtOH를 넣고 다시 13,000rpm, 4 $^{\circ}$ C에 5분 동안 centrifuge 돌려 다시 상등액 제거, 이 때 1분동안 centrifuge 돌려 EtOH를 최대한 제거하고 10분 동안 dry하고 다 건조된 후에 6 $\mu$ L DEPC로 pellet을 녹임.
- **in vitro transcription** : pellet을 녹이고 2X NTP 10 $\mu$ L, 10X buffer 2  $\mu$ L, RNA polymerase 2  $\mu$ L를 추가해 총 20  $\mu$ L를 맞추고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 incubation 함.
- 2시간 Incubation 후에 DNase 1 $\mu$ L를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 incubation함.
- DEPC 115  $\mu$ L, NaOAC 15  $\mu$ L를 추가하고, 150 $\mu$ L phenol을 넣고 vortex 후 12,000rpm으로 5분 동안 centrifuge를 돌려 상등액을 새로운 ET tube에 옮김.
- 옮긴 tube에 2배 부피의 isopropanol을 넣고 -20 $^{\circ}$ C에 30min 정도 store한 후에, 13,000 ~ 14,000 rpm과 4 $^{\circ}$ C에 25분동안 centrifuge로 돌리고 상등액을 제거함.
- 1분 동안 centrifuge 돌려 EtOH를 최대한 제거하고 10분 동안 dry 하며, DEPC 11 $\mu$ L로 pellet을 녹이고 전기영동으로 확인한 후에, 몇 개로 분주해서 -80 $^{\circ}$ C deep freezer에 보관함.

#### ▣ Oocytes preparation

- 건강한 *Xenopus laevis*를 얼음에 40-50분간 처리하여, 동면을 유도하고, culture하여 *Xenopus oocytes*를 꺼내고 재 봉합함.
- Oocytes는 pH7.5로 맞춘 OR2 buffer (5 mM HEPES at pH 7.6 and 18 $^{\circ}$ C, 82.5 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>)에 두고 1 ml당 2 mg의 1 unit collagenase를 처리하고 shaker에 1시간 정도 shaking 처리함.
- 1시간 정도 후에 *Xenopus oocytes*를 먼저 OR2 buffer로, 후에 pH7.5로 맞춘 ND96 buffer (5 mM HEPES, 96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>)로 세척한 후 육안 및 현미경으로 선별함.

#### ▣ CRNA injection

- 유리관을 Narishige's PC-10 micropipette puller를 이용해 바늘 제조함.
- 구멍을 뚫은 바늘을 mineral oil로 채우고 oocyte pipette에 꽂음.
- Oocyte pipette은 oocytes에 RNA를 주입하고, 그 다음 *in vitro* transcription 한 RNA를 1 $\mu$ g/1 $\mu$ L로 준비하고 pipette을 이용해 흡입함.
- Pipette의 바늘을 oocytes에 꽂고 cRNA를 *Xenopus oocytes*에 40ng씩 주입하고,

Injection을 마친 후 ND96 buffer에 담아 18°C shaker에 보관하여 실험에 활용함.

### □ Electrophysiology test

- 단일 개체의 oocyte 를 plexiglass recording chamber에 놓고 1.8 mM Ca<sup>2+</sup> frog Ringer's solution ND96 (조성성분 mM: 115 NaCl, 2 KCl, 1.3 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 CaCl<sub>2</sub>; pH 7.4)을 분당 3-7 ml의 유속으로 관류함.
- 두 유리전극의 저항의 크기는 3 M KCl 용액을 채워 1-3 MΩ 이내로 하였음.
- Oocyte Clamp (OC 725C, Warner Instruments, Hamden, CT, USA)를 이용하여 -50 mV의 고정 막전압에서 실험을 하였으며 0.2 μA 이 상의 기저전류가 있는 oocyte는 실험에 사용하지 않음.
- GABA receptor를 통해 GABA에 의해 유도되는 최대 전류를 측정하기 위해, 100μM GABA를 사용하였고, ND96 용액을 2분간 미리 관류한 전류를 측정함.
- GABA 수용체는 cysteine-loop ligand-gated ion channel superfamily에 serotonin, acetylcholine, glycine과 함께 속함.
- 실험결과 선충의 흥분성 GABA 수용체 LGC-35의 발현 여부를 확인하기 위하여, 위 3가지 Sub family의 ligand들과의 GABA를 처리하였음.

### ③ 결과

- 물을 injection한 oocyte의 경우 어떠한 ligand에 의해서도 반응이 나타나지 않았지만 LGC-35를 injection한 알의 경우 다른 서브패밀리 ligand에 의해서는 반응하지 않았고 GABA에 의해서만 활성이 나타남.
- 이를 통해 GABA 수용체 LGC-35의 발현을 확인하였고 가바 특이적인 수용체임을 확인함(그림 12).

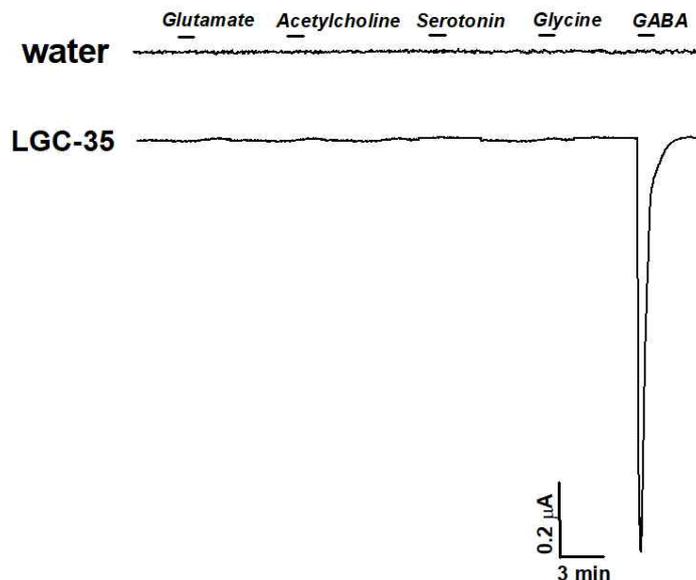


그림 12. 유전자(cRNA)를 주입한 실험군 oocyte와 oocyte의 유전자 발현 여부

- LGC-35 발현 oocyte에 ligand에 의한 활성을 확인하였고 농도 의존적으로 활성을 나타내는지 확인하기 위하여 살충물질의 농도를 달리 처리함.
- 살충물질의 농도가 높아질수록 활성이 크게 나타나는 것을 확인하였으며 또한 가역적인 작용으로 활성을 조절하는 것을 확인함(그림 13).

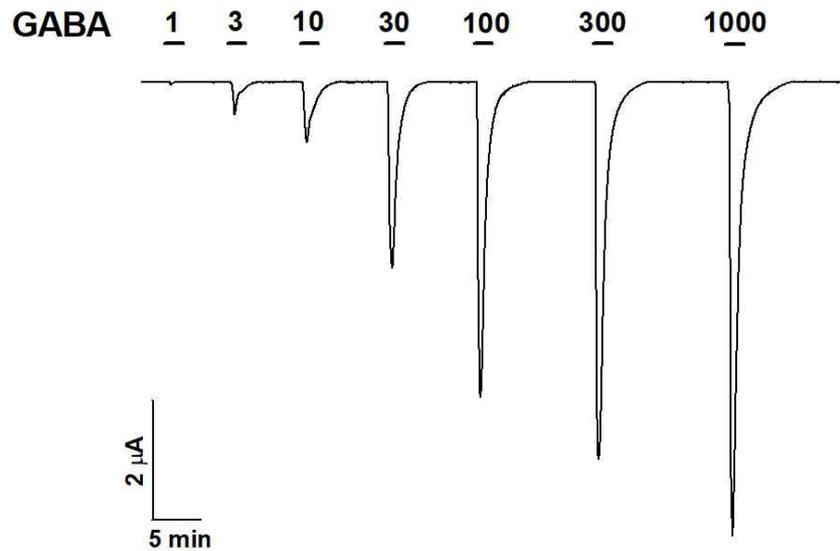


그림 13. LGC-35를 주입한 oocyte에 대한 농도구배실험 결과

- Wikim0118균주가 선충의 흥분성 GABA 수용체에 실질적으로 작용하는지 확인하기 위해, LGC-35를 주입한 알에 상등액을 3,000배 희석하여 단독적으로 처리함.
- 대조구인 물을 주입한 알에서는 활성이 나타나지 않았으나, LGC-35를 주입한 알에서는 큰 활성이 나타남.
- 이를 통해 선충의 흥분성 GABA 수용체 LGC-35에 Wikim0118균주의 배양물이 효과적으로 작용했음을 확인하였고, 배양물 내 다량의 살충물질이 존재함을 재확인함(그림 14).

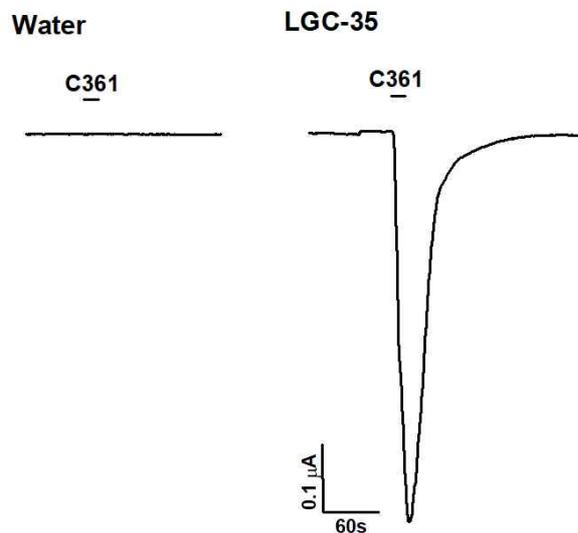


그림 14. LGC-35를 주입한 oocyte에 대한 농도구배실험결과

- LGC-35에 의한 wikim 0118균주 배양물의 활성이 기존 ligand인 GABA와 유사하게 농도 의존적으로 활성 되는지 평가하고자 균주 배양물 상등액을 적정 농도로 희석하여 처리함.
- 희석배수가 높아질수록 수용체에 대한 활성이 감소함을 확인하였고, 본 배양물의 상등액이 기존 ligand인 GABA와 유사한 작용을 했음을 확인함.

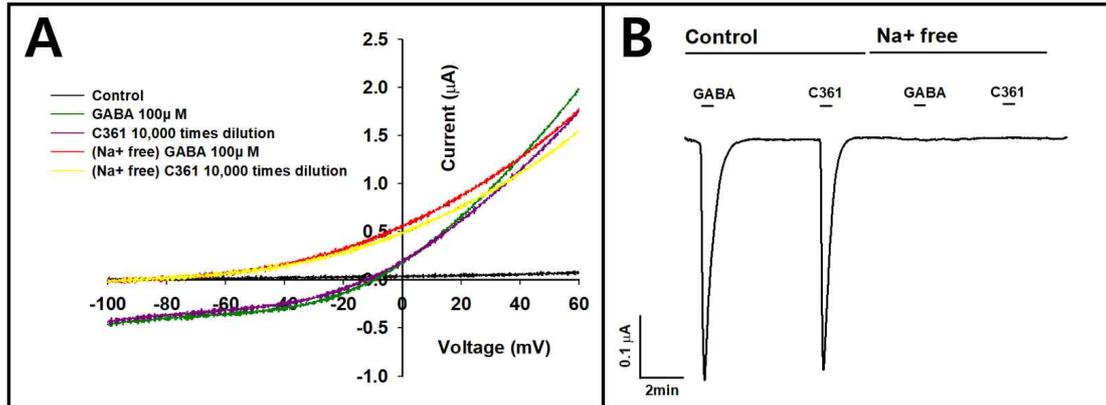


그림 15. LGC-35의 양이온 채널 확인

- 마지막으로 선충의 흥분성 GABA 수용체 LGC-35가 척추동물에게는 존재하지 않는 흥분성 수용체임을 확인하기 위해, 세포 외 용액의 NaCl을 다른 것으로 교치하여(NMDG : N-methyl-D-glucamine diatrizoate)하여 활성을 측정함.
- reversal potential이 기존 용액을 적용했을 경우인 -10mV 근접에서 NaCl을 교체한 경우 -80mV까지 이동 했음을 확인하였으며 활성의 정도를 측정한 결과 그 활성이 거의 사라졌음을 확인함(그림 15)
- 위의 결과를 토대로 LGC-35는 ligand 결합 시, 양이온의 투과를 통해 신호전달이 이루어지는 양이온 투과성 채널임을 확인함(그림 15).

#### ④ 결론

- 선충의 흥분성 GABA 수용체 LGC-35에 Wikim0118균주의 배양물이 효과적으로 작용했음을 확인하였음.
- 또한 살충물질의 농도가 높아질수록 활성이 크게 나타나는 것을 확인하였으며 또한 가역적인 작용으로 활성을 조절하는 것을 확인함.

### (라) 배지 최적화 단계별 살선충 방제 효율 평가

#### ① 연구목적

- 향상된 살선충 기능을 보유한 wikim0118균주 배양물을 생산하기 위해, 각 단계별 배지 최적화(제 1세부)를 실시하였음.
- 이에 제1세부에서 수행하는 배지의 구성에 배양산물의 살선충 효율이 있는지 평가하기 위해, 1세부에서 수행한 배지 최적화 중, 중간 단계의 생성물을 기준으로 평가를 진행함.

## ② 재료 및 방법

### ㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : LB *sakei* Wikim0118
- 대조구 : Mrs broth(Difco)적용 배양물
- 실험구 : 각 1세부가 수행한 Wikim0118 최적화 단계별 배양 도출물
- 선충 배지 : NGM(nematode growth medium)
- 실험 선충 : *Caenorhabditis elegans*

### ㉡ 시험방법

- Sample 1은 Wikim0118균주의 생육 질소원의 변경에 따르며, Sample 2는 선발된 질소원을 고정한채 탄소원을 최적화 한 단계이며, Sample3은 상위 영양원을 고정한 채 무기염 원 등의 미량원소가 반영된 것임.
- 평가의 기준으로 기존 상업용 배지(MRS)로 배양한 배양산물과의 살 선충 기능을 비교 평가하여 최적화가 살 선충 기능에 좀 더 효율적인지를 평가하고자 함.
- 이를 위해 실험선충을 대상으로, 시간 별 선충의 마리수, 알수, 운동성 등을 평가하였고, 세부적인 실험방법은 기존 실험방법과 동일함.

## ③ 결과

- 실험결과 sample 1, 2의 경우 기존 MRS로 배양한 Wikim0118 균과 비슷하거나 오히려 떨어지는 효과를 보여준 반면, Sample 3의 경우 개선된 살충 효율이 나타남(그림 16).
- 초기 wikim0118균체의 생육 시 MRS를 적용하였을 경우, 주요 살선충 물질의 생산이 3%의 한계를 보인 반면, 제 1세부에서 수행한 배지 최적화 3단계(sample-3)에서 5% 이상의 살충물질 전환 효율을 보이고 있고, 1-2단계는 3% 이하의 살충물질 전환 결과를 보임(그림 16).
- 따라서 1세부의 개선용 배지는 살충물질 생산 측면에서 향상된 결과를 보여, 이에 따른 살선충 효능이 반영된 것으로 보임(그림 16).
- 최종 이를 토대로 주관기관의 배지 최적화 지표를 제공하였음.

## ④ 결론

- 1세부의 개선용 배지는 살충물질 생산 측면에서 향상된 결과를 보여, 이에 따른 살선충 효능이 향상되었음.

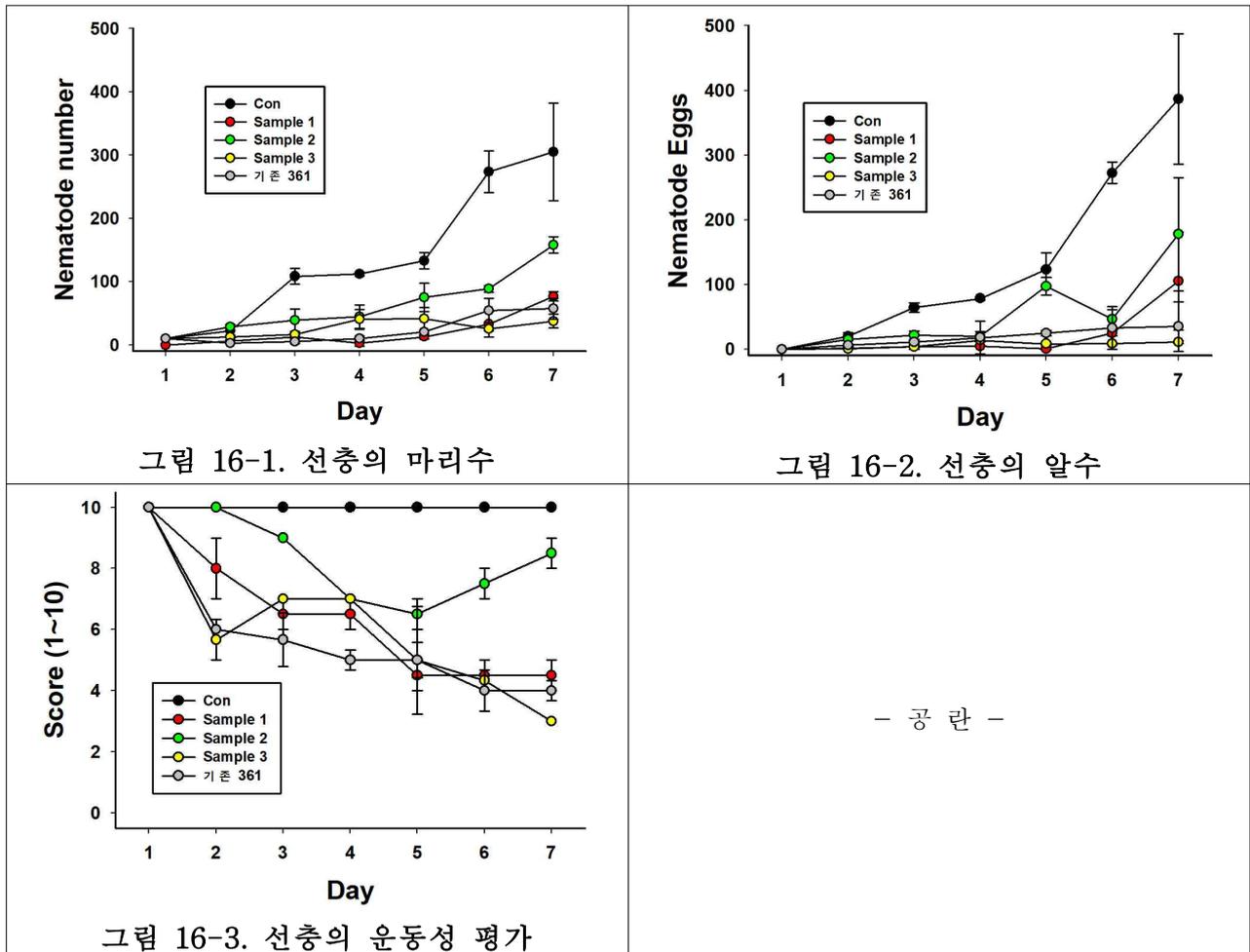


그림 16. 배지 개발 단계별 최적화에 따른 선충 방제 효과 검증

(마) 표준화 배지로 분리한 미생물의 선충 및 알 제어 기능 평가

① 연구목적

- 앞선 내용에 근거하여, 제 1세부는 살충물질 인 살선충 물질 생산에 최적화 단계를 진행하였고, 최종 살충물질 생산의 전구물질인 MSG가 10% 전량 전환된 살충물질 생산용 배지 및 생육 조건을 설립함.
- 반면 살충물질의 주요 성분인 살선충 물질의 습득률 향상에 따라 살선충 방제 효율이 유의한 결과를 보이는지 생물검정 실험을 실시함.

② 재료 및 방법

㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : LB *sakei* Wikim0118
- 양성 대조구 : Mrs broth(Difco)적용 배양물
- 실험구 : 실험구의 종류 및 처리방법은 아래와 같음.

표 2. 실험군의 종류 및 균체의 처리 방법

실험군 종류	최적화 기준점	살충물질 전환율 (in 48hr)	실험농도 (희석배율)
2%	질소원 변경	2%	100
3%	탄소원 변경	3%	100
5%	무기염원 미량원소 변경	5%	1,000
7%	배양 Profile 최적화	7%	1,000
10%	pH 보정	10%	1,000
361	-	3%	100
무처리	-	-	-
MRS	-	-	-

○ 선충 배지 : NGM(nematode growth medium)

○ 실험 선충 : *Caenorhabditis elegans*

㉠ 실험방법

○ 제1세부가 수행한 살선충 물질 생산 최적화 단계 및 시험용 샘플의 조건은 아래와 같으며, 살 선충성 기능 검증에 사용된 후보균은 초기 생산조건인 361과 살선충 물질 최적화 단계별 2-10% 생산단계별 실험구임(표 2).

○ 위 샘플들의 상등액을 추출하여 선충의 플레이트에 공급하여 살 선충성 기능을 평가하였고, 살선충성 평가 방법은 상위와 동일한 절차로 수행하였음.

③ 결과

○ 분석 결과를 살펴보면 2-3% 라인이나 기존 361 생산 조건의 경우 희석배율에 영향을 받아 기존의 효과보다 낮은 결과를 보임(그림 17).

○ 5-7% 라인의 경우 높아진 살충물질 함량에 따라 희석배율을 1,000배로 상승시킴에도 불구하고 2-3% 라인의 100배 희석액 보다 높은 살선충 효율을 보임(그림 17).

○ 위의 결과들을 토대로 살충물질의 생성 함량의 증가에 따라, 살 선충성 기능의 효율에 영향을 미침을 확인할 수 있었고, 배지 및 배양 최적화에 따른 살선충 방제효율의 향상을 검증하였음.

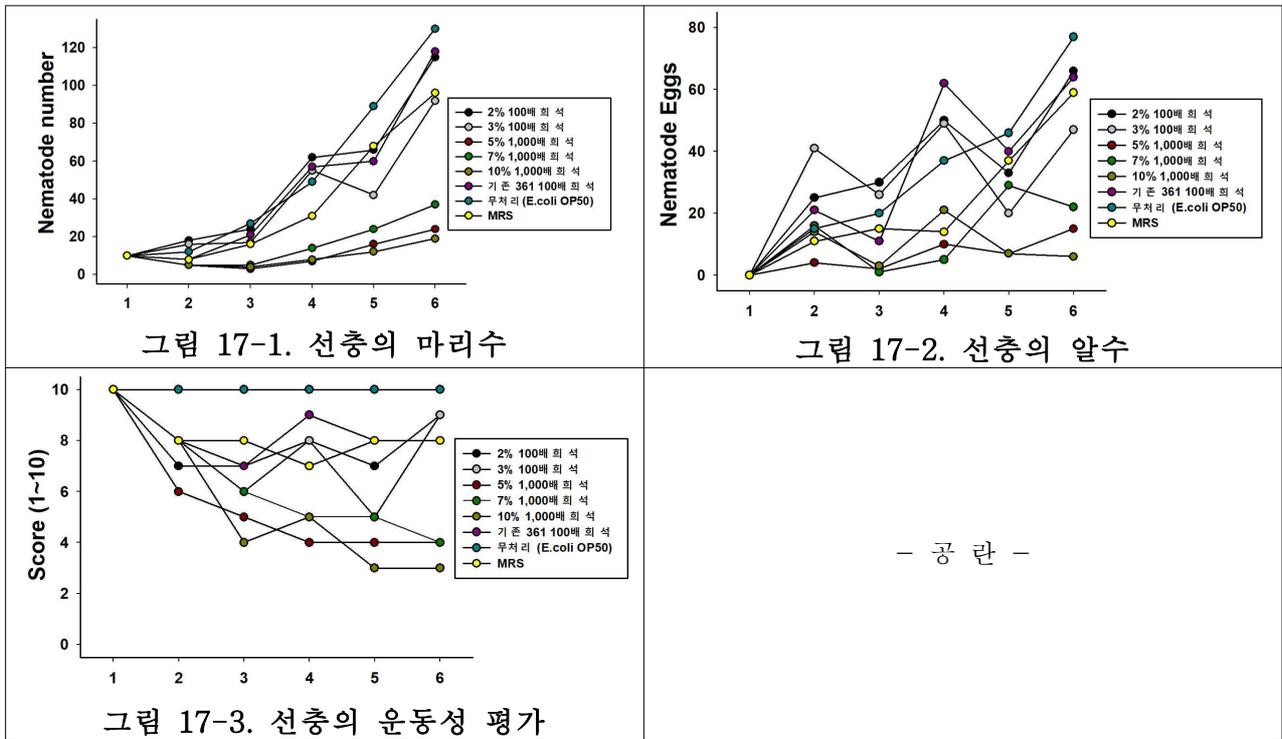


그림 17. 살충물질 전환율에 따른 함량별 살 선충 기능 평가

④ 결론

- 제 1세부가 수행한 살충물질의 생성 함량의 증가에 따라, 살 선충성 기능의 효율에 영향을 미침을 확인할 수 있었고, 배지 및 배양 최적화에 따른 살선충 방제효율의 향상을 검증하였음.

(바) Lab scale 미생물 처리 표준화

① 연구목적

- 사전 연구로 수행하였던 361의 조건의 경우 살선충물질 함량이 제1세부에서 수행된 생산 공정 대비 함량이 낮으므로, 급회 배지 및 생산 최적화를 통해 살선충 물질 함량을 개선한 배양물의 경우, 더 높은 희석배율에서도 효능이 있을 것으로 예상됨.
- 따라서 상위 최적화된 배지를 통해 생산된 균체를 상업용 생산 조건 최적화 및 현장 사용방법을 제시하는 목적으로 살 선충성 효과가 존재하는 최적 희석 배율을 산출하고자 하였음.

② 재료 및 방법

㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : LB *sakei* Wikim0118
- 실험구 : 실험구의 종류 및 처리방법은 아래와 같음(표 3).
- 선충 배지 : NGM(nematode growth medium)
- 실험 선충 : *Caenorhabditis elegans*

표 3. 실험군의 종류 및 균체의 처리 방법

실험군 종류	최적화 기준점	살충물질 전환율	실험농도 (희석배율)
		(in 48hr)	
5%	무기염원 미량원소 변경	5%	1,000-2,000
7%	배양 Profile 최적화	7%	1,000-2,000
10%	pH 보정	10%	1,000-2,000
361	-	3%	100
무처리	-	-	-

㉞ 시험방법

○ 위 샘플들의 상등액을 추출하여 선충의 플레이트에 공급하여 살 선충성 기능을 평가하였고, 살선충성 평가 방법은 상위와 동일한 절차로 수행하였음(표 3).

③ 결과

○ 실험 결과 사전 연구단계의 균체 100배 대비 10% 살충물질 전환 단계의 실험구 중 1,000 배 희석액이 가장 우수한 살 선충 효율을 보였고, 2,000배 희석액에서도 연구단계의 100배 희석액보다 우수한 살선충 효율을 나타냄(그림 18).

○ 최적화된 배지 및 생산 조건을 통해 높아진 살충물질 전환율이 선행 연구 생산 조건(기준 361)보다 선충의 제어에 높은 효율을 미치는 것으로 보임(그림 18).

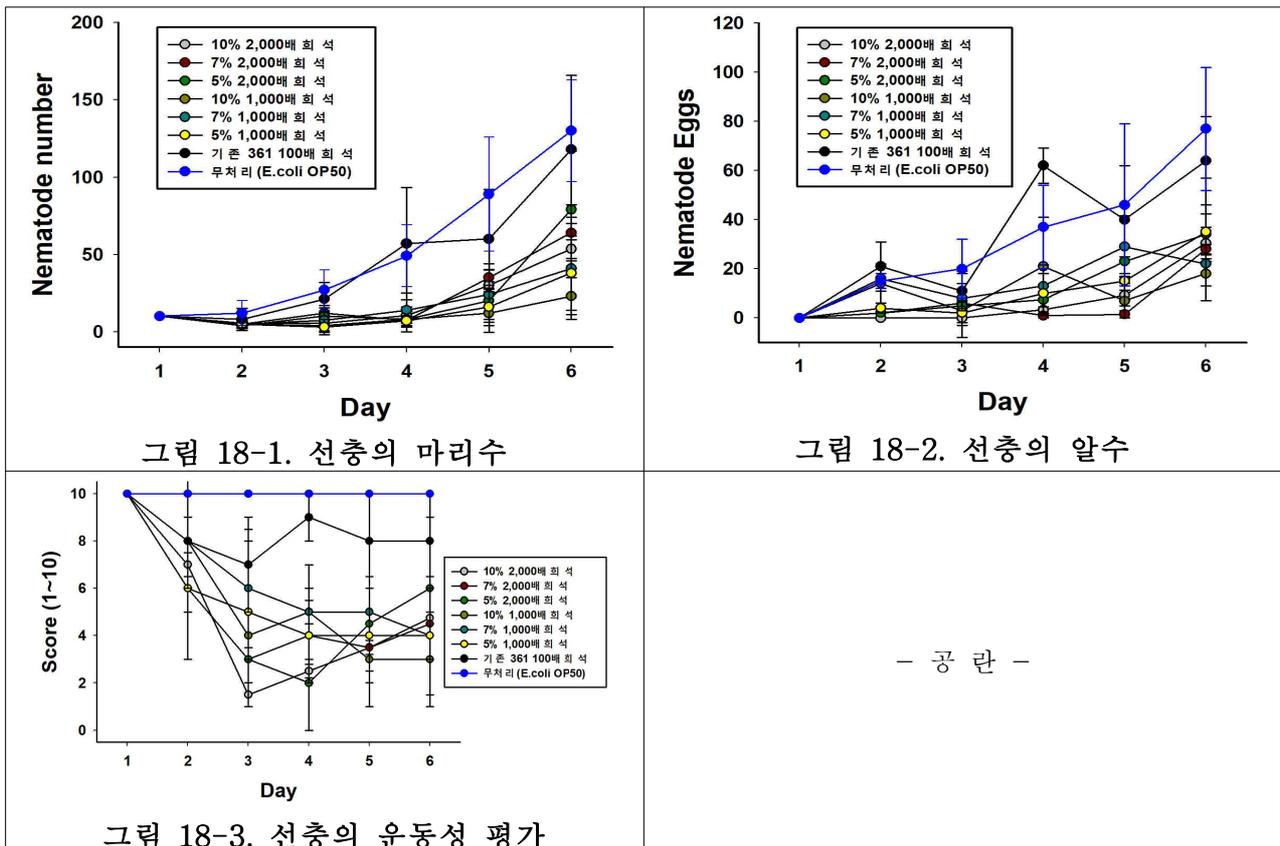


그림 18. 균체 희석 농도별 효과 검증

- 위의 결과를 토대로 선행 생산조건(361)과 살충물질 전환율 10%를 보이는 최적화된 배지 및 생산조건의 선충 방제 효율성 비교를 위해 평균적인 수치를 기록하여 도식화함(그림 19).
- 비교 수치의 정량화 결과 기존 생산조건(균주 361)과 비교하여 2,000배의 높은 희석배율에도 불구하고 마리수면에서 53.9%, 알의 수에서 21.7%, 운동성에서 58.5% 증감된 살 선충성 효과를 보임(그림 19).
- 위를 통해 배지 최적화의 효율을 검증하였으며 높아진 살선충 물질 함량은 선충의 제어에 좋은 효율을 보임.

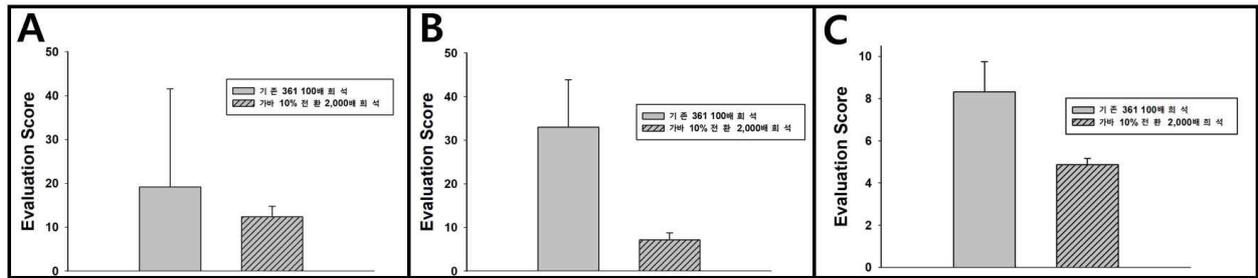


그림 19. 선행연구 대비 최적화된 살선충물질 생산 조건의 선충 제어력 검증 ; A : 마리수 점수 / B : 알의 점수 / C : 운동성 점수

#### ④ 결론

- 제 1세부가 수행한 배지 최적화의 효율을 검증하였으며 높아진 살선충 물질 함량은 선충의 제어에 좋은 효율을 보임.

### (사) 타사의 제품과 비슷한 효율을 내는 유효 농도 선발

#### ① 연구목적

- 앞선 테스트를 통해 최적화된 살충물질의 생산조건에 따른 개선된 살 선충성 기능을 확인함.
- 이에 타사제품과 비교하여 Wikim0118 살선충 배양물의 유효 방제농도의 수준을 평가해, 상업적으로 우수한 소재인지 확인하고자 함.

#### ② 재료 및 방법

##### ㉠ 공시재료

- 공시 미생물 : LB *sakei* Wikim0118
- 실험구 : Wikim 0118의 살충물질 10% 함량구
- 대조구 : E. coli op50 단독 처리구
- 양성 대조구 : 상용제품 5종(입제2, 액제 3종)
- 선충 배지 : NGM(nematode growth medium)
- 실험 선충 : *Caenorhabditis elegans*

##### ㉡ 시험방법

- 살선충물질 생산 효율이 가장 우수한 10% 샘플군을 대상으로, 희석배율을 100, 500, 1,000, 2,000배로 달리하여, 선충에게 공급, 선충의 마리수, 알 수, 활동성 평가 등 수치

적인 데이터를 산출하였음.

- 또한 타사제품의 경우 제품 사용 매뉴얼에 준하여 선충 배지에 혼입하여 처리를 실시하였고, 실험군을 포함한 처리방법은 아래와 같음(표 4).

표 4. 타사제품과 실험구의 처리방법

실험군 종류		사용매뉴얼	처리방법
실험구	살충물질 10% 함유시료	-	100-2,000배 구간희석
무처리	E. coli op 50 단독처리구	-	E. coli op50 단독처리
타제품	A	1,000m <sup>2</sup> 당 6kg	사용매뉴얼에 준함
	B	20L에 5ml 희석액제조	사용매뉴얼에 준함
	C	1,000m <sup>2</sup> 당 6kg	사용매뉴얼에 준함
	D	1정을 300평 관주	사용매뉴얼에 준함
	E	1L로 5ton 희석액	사용매뉴얼에 준함

③ 결과

- 실험결과 타사의 제품과 비슷한 효율을 내는 희석배율은 약 1,000배에서 2,000배 사이로 측정됨(그림 20).
- 본 실험 결과를 상업화 부분을 담당하는 제 1세부에게 제공하였고, 이를 기반으로 효과적인 현장 사용 매뉴얼을 제시할 수 있으리라 봄(그림 20).

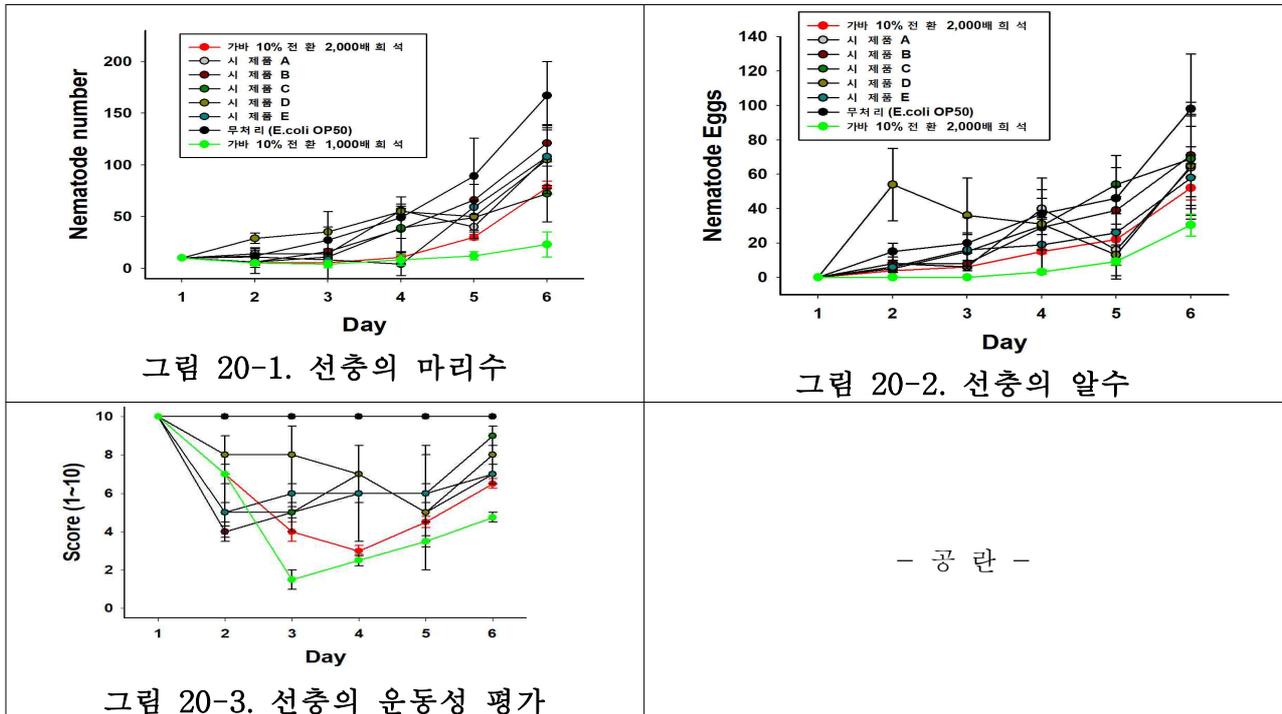


그림 20. 타사의 시제품과 비슷한 효율을 내는 Wikim0118의 처리 농도

#### ④ 결론

- 타사의 제품과 비슷한 효율을 내는 회석배율은 약 1,000배에서 2,000배 사이로 측정되었고, 상위 결과를 토대로 최종 제품의 상업화 및 현장 사용 매뉴얼의 기준점을 제시함.

### 나. 시제품의 신경 제어 기능성 및 선충에 대한 활성 평가

#### (1) 제품의 저장 안전성에 영향을 주는 인자 평가

##### ① 연구목적

- 가혹조건(온도)에서의 저장기간별 *L. sakei* wikim0118 배양 추출물의 GABA 함량 측정을 통해 높은 온도에서도 다량으로 생산되었던 GABA가 안정적으로 보존되는지 확인함.
- 전기 생리학적인 연구를 통해 살충효과의 표적인 선충의 흥분성 GABA 수용체에 가혹조건으로 저장된 *L. sakei* wikim0118 배양 추출물이 얼마나 영향을 미치는지 확인함.

##### ② 재료 및 방법

###### ㉠ 공시재료

- 전기생리(Two-electrode voltage clamp - TEVC) 실험을 위한 조건 : *Xenopus* oocytes, micro manipuler, nano injector, Two-electrode voltage clamp, 분석틀 (sigma plot, clampit, clampex)
- mRNA 합성 틀 : 선충 특이적 흥분성 GABA 수용체 'LGC-35' pDNA gene과 linearization, T7 mRNA in vitro transcription kit
- 가혹조건 (50°C)에서 저장된 *L. sakei* wikim0118 배양 추출물 (시제품 적용 농도) : 기간별로 저장 (10일~50일, 10일 단위로 저장)

###### ㉡ 시험방법

- 선충 특이적인 흥분성 GABA 수용체의 발현 및 *L. sakei* wikim0118 배양 추출물의 효능 평가를 위해 in vitro RNA transcription을 통해 선충의 흥분성 GABA 수용체를 합성함.

###### ▣ 선충 특이적인 흥분성 GABA 수용체인 LGC-35 발현

- LGC-35는 선충의 몸체의 배와 등쪽에서 끈 모양으로 발현되는 유전자로, 이는 척추동물에는 존재하지 않는 흥분성 신호작용을 매개하는 GABA 수용체임.

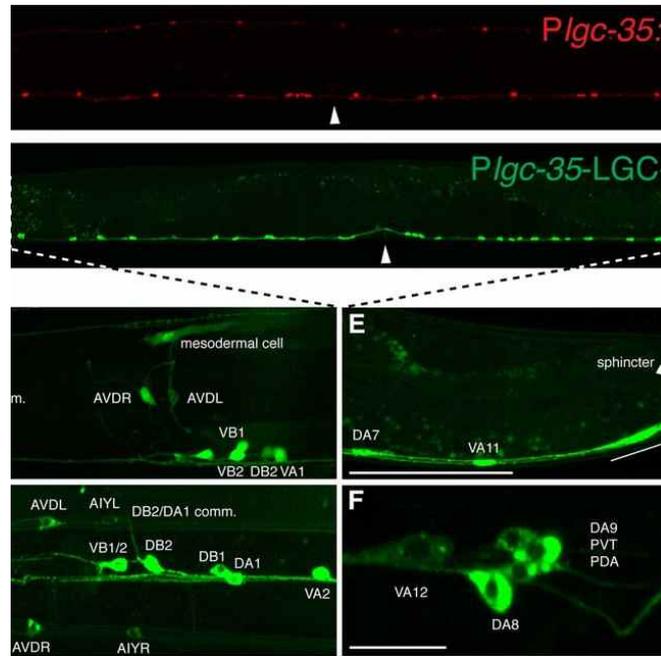


그림 21. Transcriptional reporter로 확인한 선충 내 LGC-35의 발현부 (Jobson, Meghan A., et al. "Spillover transmission is mediated by the excitatory GABA receptor LGC-35 in *C. elegans*." *Journal of Neuroscience* 35.6 (2015): 2803-2816.)

- 준비된 oocytes에 nano injector(arishige's PC-10 micropipette puller)를 통한 mRNA injection 수행 후 18°C에서 2일 이상 gently shaking 배양하여 목표 유전자가 oocyte에 발현되도록 함.
- 전기생리(TEVC) 실험을 통해 목표 유전자의 발현을 확인하고 L. sakei wikim0118 배양 추출물로 도출된 시제품이 가혹조건에서 저장된 후, 목표 유전자에 얼마나 영향을 미치는지, 저장기간별의 차이를 보이는지 확인함.

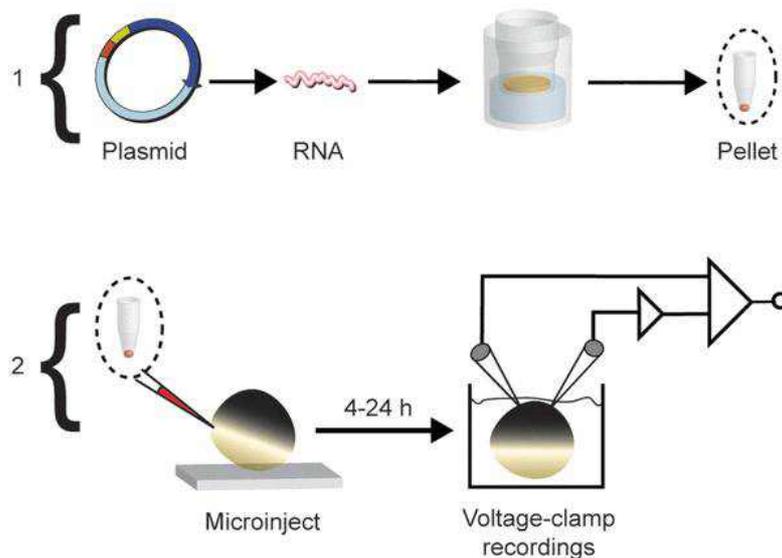


그림 22. *Xenopus*의 난모세포를 사용한 전기생리학 실험 모식도

## □ 전기생리학 실험을 위한 과정

- 선형화 및 시험관내 전사 : 목표 수용체의 mRNA 합성을 위해 선충의 LGC-35 receptor cDNA는 multi-cloning site의 restriction site Xho I 을 사용하여 선형화 후 mMESSAGING mMACHINE T7 Transcription Kit를 사용하여 시험관 내 전사하였으며 최종 RNA 생성물은 Rnase free water에서 최종농도 1 $\mu$ g/ $\mu$ L로 -80 $^{\circ}$ C deep freezer에서 사용전까지 보관 후 실험에 사용함.
- 실험을 위한 *Xenopus laevis* oocyte 준비 및 nano 단위의 mRNA 주입 : 선충 LGC-35 수용체 발현을 위한 세포는 *Xenopus laevis* oocyte(아프리카 발톱 개구리의 난모세포)를 사용하였으며 실험에 사용된 모든 암컷 개구리는 Korean *Xenopus* Resource Center for Research (KXRRCR000001)에서 얻었으며 위 실험에 사용된 개구리의 배양에는 Chonnam National University institution guidelines (CNU IACUC-YB-2016-07, July 2016)를 따름. Oocyte는 얼음 배양상태에서 분리되었으며 OR2 buffer를 이용하여 단일세포로 분리. 분리된 세포는 실험 수행 전까지 ND96 incubation buffer(oocyte incubation buffer)에서 18 $^{\circ}$ C에서 배양. 선충 LGC-35 수용체 mRNA는 미네랄을 채운 10 $\mu$ L microdispenser를 이용한 나노 인젝터로 oocyte에 주입함.
- 전기생리학 실험을 통한 수용체 발현 및 활성 확인 : 선충 LGC-35 수용체에 대한 *L. sakei* wikim0118 배양 추출물의 활성을 확인하기 위해 two-electrode voltage clamp with a Digidata 1550A를 사용해 실험. 실험을 위해 pClamp10 프로그램을 사용하여 프로토콜을 설정하고 시약 적용에 따른 induced-inward current는 digital data로 전환되어 recording. 모든 실험은 oocyte clamp equipped with Digidata를 사용하여 room temperature에서 수행. Membrane의 holding potential은 -80 mV로 설정하여 진행. 각 microelectrode는 3M KCl을 채웠으며 0.2M $\Omega$ 의 저항을 갖음. 실험에 적용된 *L. sakei* wikim0118 배양 추출물은 가혹조건인 높은 온도(50 $^{\circ}$ C)에서 저장되었으며 저장 날짜에 따라 분류(10일-50일)하여 처리함.

## □ 전기생리학 실험 수행 (TEVC : Two electrode voltage clamp)

- *Xenopus* oocyte에 mRNA를 주입, 배양 후 Two electrode voltage clamp를 사용하여 세포 막 단백질의 전류 흐름을 측정하여 pClamp8 데이터로 저장함.
- 실험에 적용된 라이간드들은 bathing solution인 ND96에 희석하여 사용되었으며 모든 실험은 상온에서 수행함.
- 타겟 유전자 발현에 대한 확인은 알려진 라이간드를 사용하였으며 선충 특이적인 수용체 LGC-35는 GABA-gated cation channel이므로 GABA( $\gamma$ -aminobutyric acid)를 사용하여 발현을 확인함.
- 목표 수용체의 발현을 확인 후 가혹조건에서 저장된 *L. sakei* wikim0118 배양 추출물을 적정 농도로 희석 후 단독 적용하여 기존 라이간드로 사용된 GABA와의 함량 비교 및 가혹 조건 저장 기간에 따른 current 활성화에 차이가 있는지 확인함.

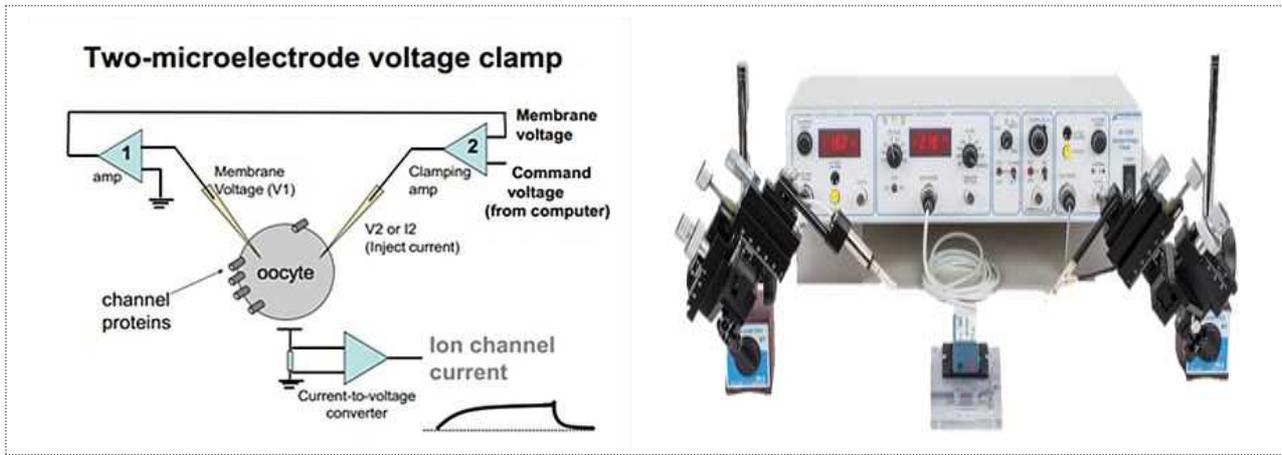


그림 23. Two electrode voltage clamp의 원리와 구성

③ 결과

- 선충 특이적인 흥분성 GABA 수용체 LGC-35의 mRNA 합성에 성공하여 전기생리학 실험에 활용 가능한 유전자원 확보함.
- 분자수준(유전자 발현 및 전기생리학 실험)에서의 정밀 측정 가능 확보함.

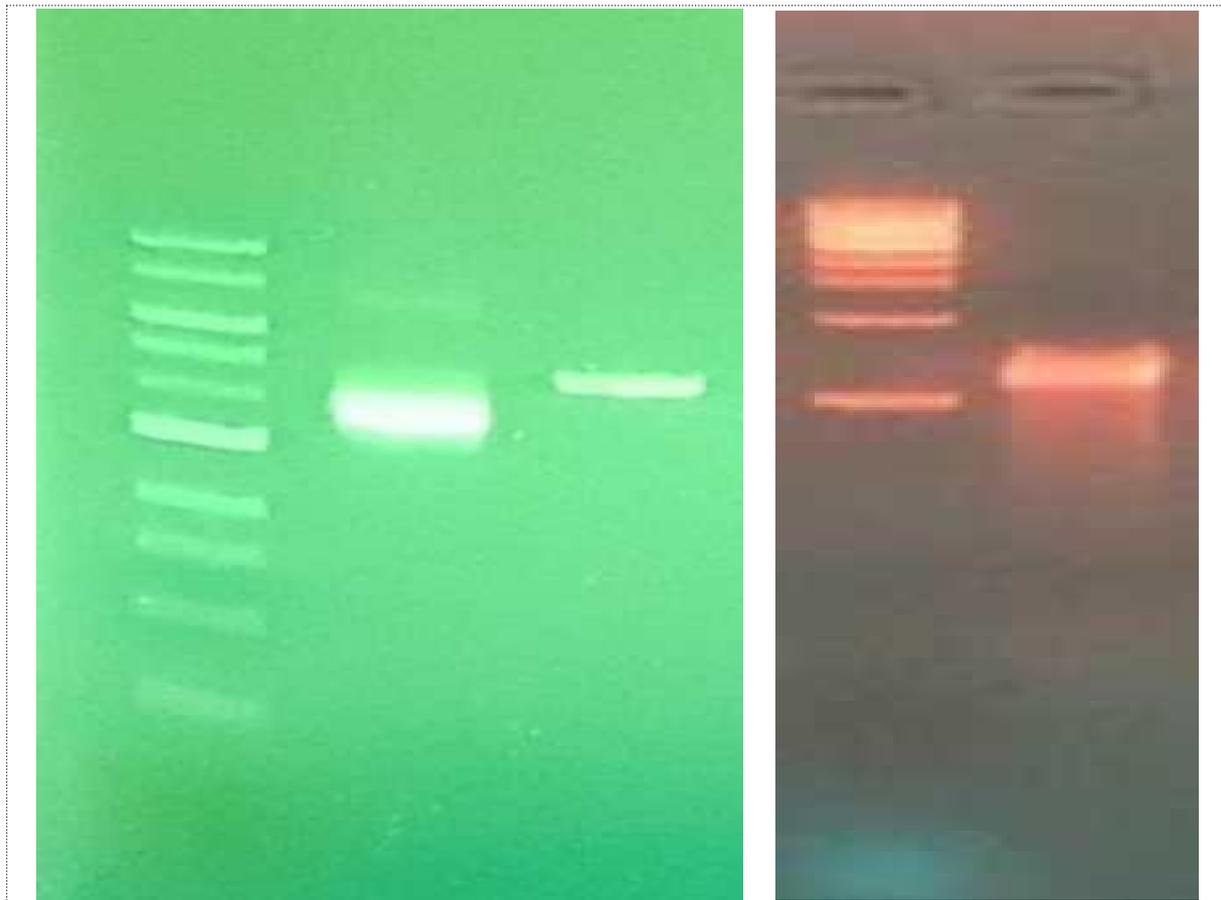


그림 24. (좌) LGC-35 DNA와 linearization cut, (우) LGC-35 RNA in vitro transcription

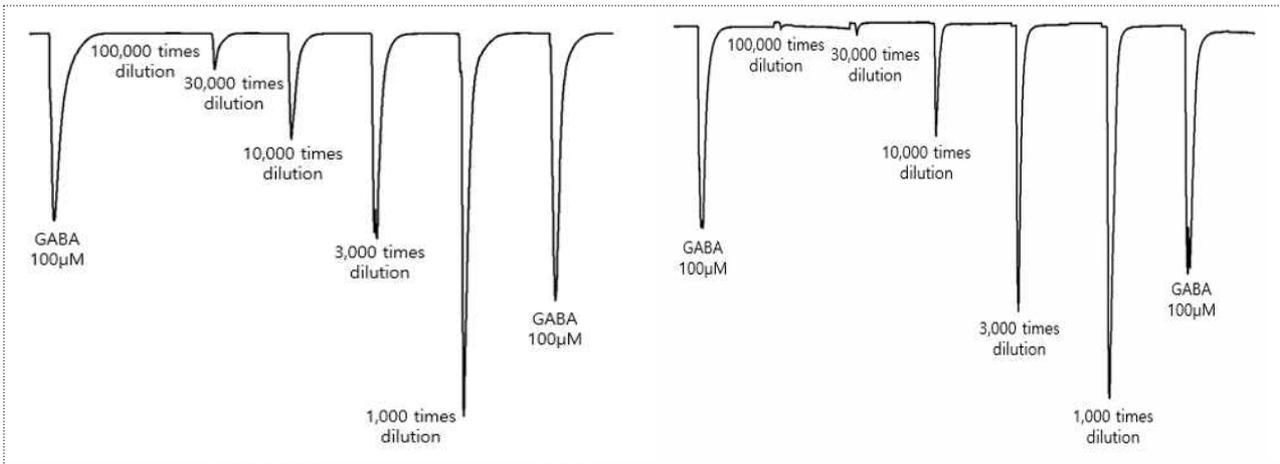


그림 25. *L. sakei* wikim0118 배양 추출물 희석정도가 수용체에 미치는 영향 비교 (TEVC)

- Control 라이간드인 GABA와 *L. sakei* wikim0118 배양 추출물의 희석 정도를 비교하여 다량의 GABA가 *L. sakei* wikim0118 배양 추출물에 함유되어있음을 분자적인 수준에서 확인함.
- *L. sakei* wikim0118 배양 추출물을 단독으로 처리함에도 선충 특이적인 흥분성 GABA 수용체 LGC-35의 inward current 형성에 큰 영향을 미침을 분자적인 수준에서 확인함.

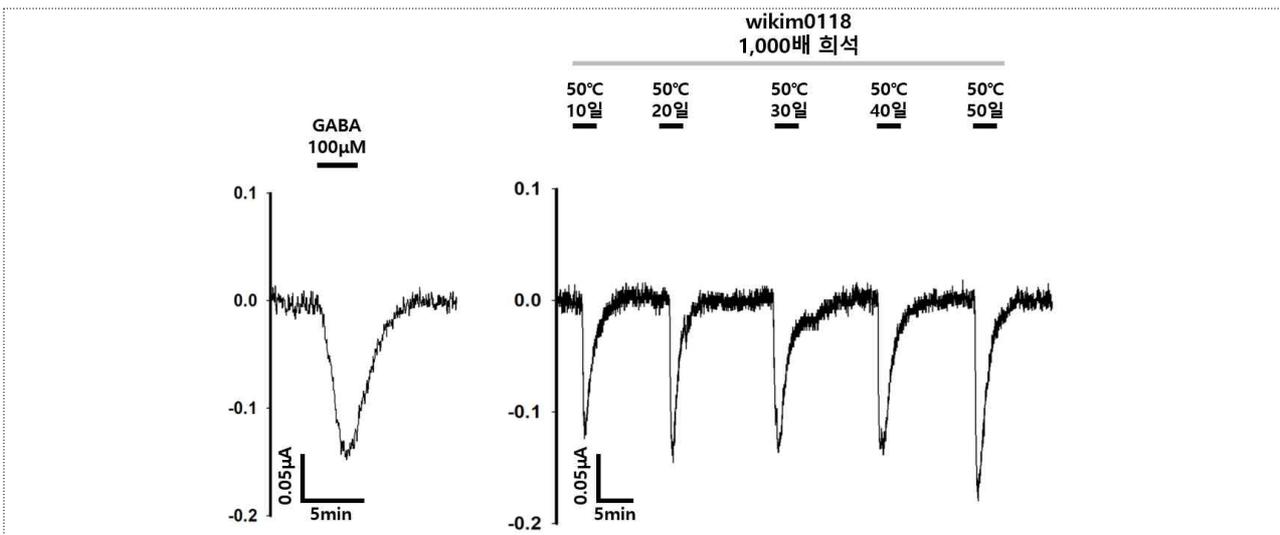


그림 26. 가혹조건과 저장기간별 GABA 수용체 활성 정도(TEVC)

- 가혹조건(50°C)에서 기간별(10일-50일) 저장된 *L. sakei* wikim0118 배양 추출물이 선충 특이적인 GABA 수용체인 LGC-35의 inward current를 형성함을 분자적인 수준에서 확인함.
- *L. sakei* wikim0118 배양 추출물은 control 라이간드인 GABA 100µM 적용과 비교하였을 때 1,000배 희석의 조건에서도 유사한 inward current 형성을 보이므로 아주 많은양의 GABA 생성물이 *L. sakei* wikim0118 배양 추출물에 함유되어 있으며 이 GABA는 가혹 저장 조건에서도 거의 손실되지 않았음을 확인함.

#### ④ 결론

- 선충 특이적인 흥분성 GABA 수용체인 LGC-35에서 핵심 제어 물질로 불리는 GABA의 함량이 *L. sakei* wikim0118 배양 추출물 1,000배의 희석이 GABA 100 $\mu$ M과 유사한 정도를 보임을 확인하여 이 배양 추출물에는 다량의 GABA가 함유되어있음을 확인함.
- 50°C라는 가혹 저장조건과 10일~50일의 긴 저장기간동안 배양된 *L. sakei* wikim0118 배양 추출물은 가혹적인 저장 조건에서도 수용체에 영향을 미치는 정도가 크게 변화하지 않았음이 확인됨.
- 따라서 *L. sakei* wikim0118 배양 추출물은 높은 온도에서의 긴 저장기간이라는 가혹 조건에서도 표적 수용체인 선충의 흥분성 GABA 수용체 'LGC-35'에 효과적으로 작용하였으며 이 결과를 토대로 다양한 조건에서도 우수한 살 선충 효율이 예상됨.

## (2) 포트에서의 시제품의 살선충 기능성 평가

### ① 연구목적

- 포트환경 내 *L. sakei* wikim0118 시제품 생산 단계의 뿌리혹선충에 대한 작물 생육 및 선충 억제 효과 분석

### ② 재료 및 방법

#### ㉠ 공시재료

- 공시미생물 : *L. sakei* wikim0118
- 처리 시료 : 생산 규모별 도출된 시제품
- 대조구 : 배양 추출물 무처리구
- 공시작물 : 당근 유묘(*D. carota* subsp. *sativus*)
- 공시토양 : 원예용 상토
- 인위감염 : 1,000마리/ml 농도의 현탁액 회당 15ml 총 3회 감염

#### ㉡ 시험방법

- 재배이력 : 정식(21. 05. 18), 감염(21. 05. 27), 종료(21. 08. 09)
- 처리구 면적 및 배치 : 직경 16cm 포트, 완전임의배치법(3반복)

#### ▣ 처리기준

- 액상제품: 200평당 완제품 1L(500배 희석)에 준하여 산출 (완제품 처리기준 : 500L/200평)

- 입제 : 200평당 완제품 1L(500배 희석)과 화분의 직경 16cm를 고려하여 산출 (완제품 처리기준 : 1kg/66m<sup>2</sup>)

표 5. 처리구 설정 및 처리 기준

처리구	선충 감염량	약제 처리량 (2주간 3회 처리)	처리 방법
무처리	1,000마리/mL (총 3회)	-	-
Lab scale	1,000마리/mL (총 3회)	500배 희석액 15ml씩 총 45ml	토양관주
		1,000배 희석액 15ml씩 총 45ml	
		2,000배 희석액 15ml씩 총 45ml	
50L scale	1,000마리/mL (총 3회)	500배 희석액 15ml씩 총 45ml	토양관주
		1,000배 희석액 15ml씩 총 45ml	
		2,000배 희석액 15ml씩 총 45ml	
500L scale	1,000마리/mL (총 3회)	500배 희석액 15ml씩 총 45ml	토양관주
		1,000배 희석액 15ml씩 총 45ml	
		2,000배 희석액 15ml씩 총 45ml	
5 ton scale	1,000마리/mL (총 3회)	500배 희석액 15ml씩 총 45ml	토양관주
		1,000배 희석액 15ml씩 총 45ml	
		2,000배 희석액 15ml씩 총 45ml	
입제	1,000마리/mL (총 3회)	0.3g/화분	토양혼입

□ 뿌리혹선충 개수 방법

- 실험 최종 뿌리를 잘게 다진 후 (약 1cm 간격), 200mL의 1% NaOCL 용액이 들어 있는 믹서기에 넣고 고속으로 1분간 회전(Kim and Lee, 2008)
- 선충과 알을 mesh로 거른 후 부유물과 작물조직 및 뿌리혹선충, 알을 분리하여 현미경상에서 개수

③ 결과

- 무처리구와 비교하여 *L. sakei* wikim0118 배양조건별 추출물의 처리에 따라 시험 종료 후 확인된 당근의 뿌리혹 수, 뿌리혹선충 및 알의 수가 저감됨을 확인함.
- 시제품의 scale-up 단계별 뿌리혹선충의 수를 500L 희석 기준으로 비교하였을 때 Lab scale의 경우 평균 7.3마리, 50L 조건에서 평균 22마리, 500L 조건에서 평균 20마리, 5 ton 조건에서 평균 11마리, 입제조건에서 평균 14.6마리로 무처리구의 평균 80.6마리와 비교하여 확연히 저감된 선충 밀도를 확인함.



그림 27. 당근 포트 운용 현황

- 5 ton 조건에서의 배양 추출물 중에서도 500배 희석의 경우 뿌리내 선충 밀도가 11마리/뿌리당, 알의 수가 4.6개/뿌리로 scale up 된 배양조건에도 우수한 방제효율을 보임.
- 5 ton 조건에서 500배 희석에서 검출된 선충의 마리수는 11마리, 2,000배 희석에서 검출된 선충의 마리수는 11.6마리로 크게 희석된 조건에서도 선충 방제능이 저하되지 않음이 확인함.
- 위의 결과를 종합하여 도출된 시제품의 처리는 검출된 선충 마리수에서 무처리구 대비 최소 72.7%(50L 500배 희석)에서 최대91.8%(50L 1,000배 희석)의 방제 효율, 검출된 알의 수를 비교하였을 때 무처리구 대비 최소 54.5%(Lab scale 500배 희석)에서 최대96.5%(50L 1,000배 희석)의 방제 효율을 보임함.

무처리구	배양혼탁액 처리구					
	Lab scale			50L scale		
	500배 희석	1,000배 희석	2,000배 희석	500배 희석	1,000배 희석	2,000배 희석
						

<그림 계속>

무처리구	배양혼탁액 처리구					
	Lab scale			50L scale		
	500배 희석	1,000배 희석	2,000배 희석	500배 희석	1,000배 희석	2,000배 희석
						
						

그림 28. 대조구, 50L scale 시제품의 농도별 처리 및 뿌리혹 발생 현황

배양혼탁액 처리구						입제
Lab scale			50L scale			
500배 희석	1,000배 희석	2,000배 희석	500배 희석	1,000배 희석	2,000배 희석	
						

<그림 계속>

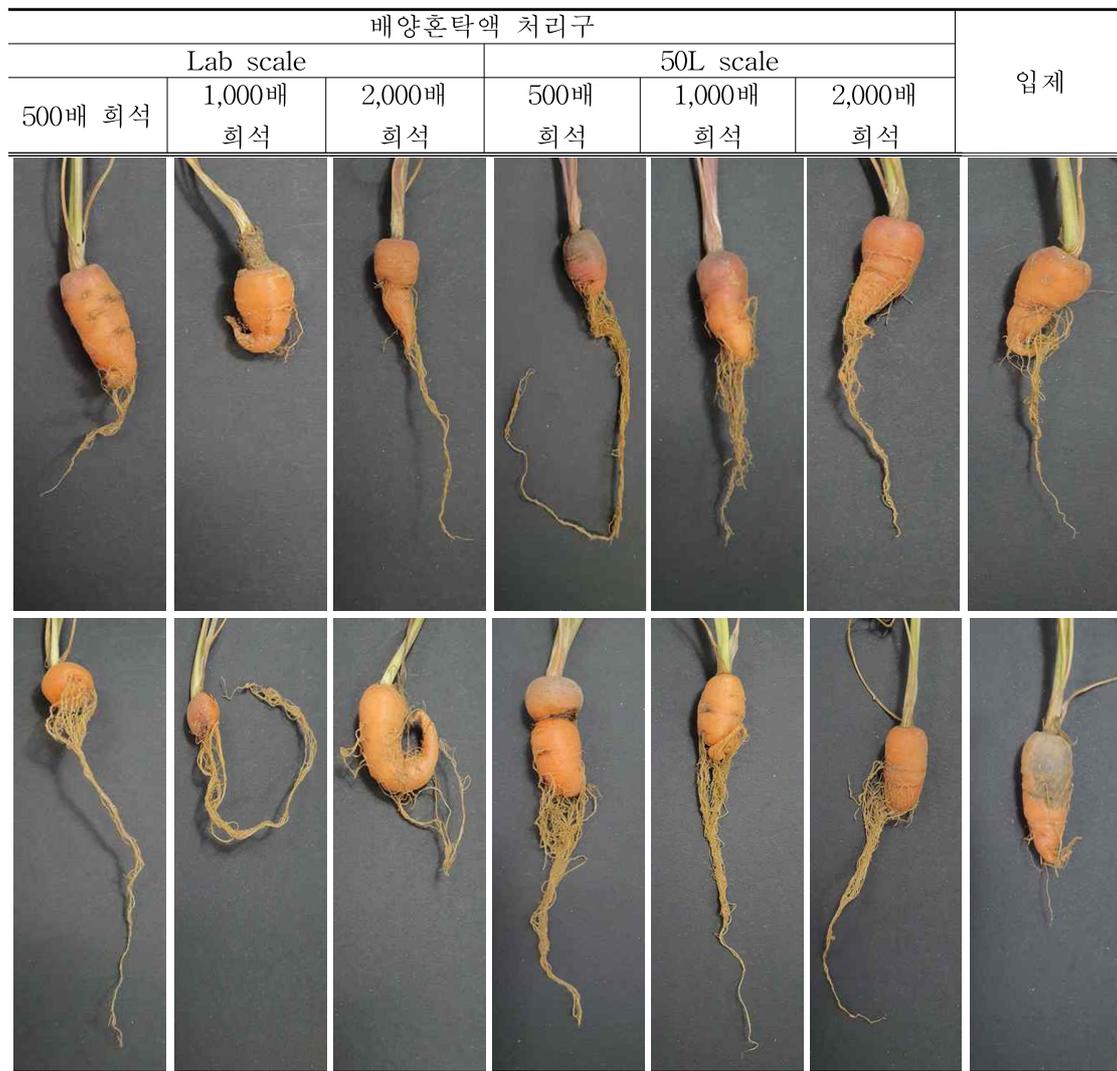


그림 29. 500L, 5ton 및 입제 시제품의 농도별 처리 및 뿌리혹 발생 현황

표 6. 시제품 생산 규모 및 종류에 따른 당근 선충 피해 결과

시제품 구분	희석배율	Root Knot	Nematodes in Root	Eggs in Root
무처리		11.3	80.6	51.3
Lab scale	500	3	7.3	13.3
	1,000	4.3	11	14.6
	2,000	2.6	14.6	8
50L scale	500	4	22	4
	1,000	4.6	6.6	2
	2,000	3.6	16.6	31
500L scale	500	5.6	20	11.3
	1,000	2.6	10.3	7.3
	2,000	3.3	8	7.3
5 ton scale	500	5	11	4.3
	1,000	4.3	15	6
	2,000	5.6	11.6	4.6
입제		7.3	14.6	10

#### ④ 결론

- 시험 작물의 생육에서 무처리구와 비교하였을 때 뛰어난 방제가 효과를 보였으며 작물의 생육 저해현상이 나타나지 않음을 확인함.
- 본 *L. sakei wikim0118* 배양조건별 추출물의 처리에 따라 선충의 방제능은 검출된 선충의 수에 따라 최소 72.7%에서 최대 91.8%의 효과를, 검출된 알의 수에서 최소 54.5%에서 최대 96.5%로 최소 54.5%의 방제 효과를 보임.
- 검출된 선충 마리수 부분에서 Lab scale 500배 희석의 경우 평균 7.3마리에서 5 ton scale 500배 희석의 경우 평균 2마리로, 배양 조건의 큰 변화에도 선충에 대한 방제능은 크게 영향을 받지 않고 유지됨이 확인함.
- 검출된 선충 알의 수 부분에서 Lab scale 500배 희석의 경우 평균 13.3개에서 5 ton scale 500배 희석의 경우 평균 2.6개로 오히려 감소되었으며 이는 배양 조건의 큰 변화에도 선충에 대한 방제능은 크게 줄어드는 점 없이 오히려 증가한 점이 확인함.
- 종 본 배양 추출물의 처리는 대량조건으로 배양 scale이 크게 달라짐(Lab scale → 5ton scale)에도 방제효과가 뚜렷하게 저하되는 점 없이 모든 조건에서 비슷하거나 우수한 방제효과를 보였으며, 입제의 조건에서도 기존 배양 추출물과 유사한 우수한 방제 효과를 확인함.

### (3) 시제품의 세포 독성 평가

#### ① 연구목적

- 시제품은 유기농업자재로써 환경 안전성이 확보되어야 함에 따라 세포단위의 미세 독성이 있는지를 판단함.
- 이에 MTT assay를 통해 Raw264.7 세포 및 SH-SY5Y 세포를 배양하여 도출된 *L. sakei wikim0118* 시제품(5ton scale, 입제)을 적용하여 독성평가를 실시함.

#### ② 재료 및 방법

##### ㉠ 공시재료

- 시험용 시료 준비 : *L. sakei wikim0118* 배양액 추출물을 사용, 시험용 시료로는 5 ton scale 사용. 5 ton scale의 경우 포트실험에 적용한 희석농도인 500배, 1,000배, 2,000배 희석 조건을 준비. 입제의 경우 포트실험에 적용된 용량(0.3g/화분)으로 준비하여 3차 증류수 45ml에 희석하여 준비. 본 실험실에서 실제 적용하는 세포의 처리 용량인 동물 적용실험과 세포적용실험의 농도 차이인 1,000배를 고려하여 5 ton scale의 경우 50만배, 100만배, 200만배를 세포에 적용. 입제의 경우 1,000배 희석하여 적용함.

##### ▣ 시험용 세포

- SH-SY5Y : human neuroblastoma cell

- Raw 264.7 : mouse macrophage cell
- 세포실험용 시료 : Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide

㉔ 시험방법

□ MTT cell proliferation assay

- Cell incubation : Freezing media에 보관되어있는 cell을 질소탱크에서 꺼내어 1분 이내 37°C water bath에서 신속히 thawing 후 잔여 freezing media를 제거하여 cell 배양용 flask에 옮겨 incubation 진행, cell의 양이 70-80% 되었을 때 subculture를 실시하여 지속적인 배양과 seeding을 수행함.
- Sample treatment : 적정수의 cell양이 확보되면 subculture과정을 통해 cell을 수확한 후, cell과 trypan blue를 1:1로 섞어 hemocytometer로 cell counting을 실시 (70 x 2 x 10<sup>4</sup> cells)함. 수확된 cell들은 96well plate에 100μL씩 분주하였으며 24시간후에 media를 제거하고 control(대조군)에는 RFP를 100μL씩 처리, negative control(음성대조군)에는 Scop(scopolamine) 400ng/ml (SH-SY5Y cell - cholinergic deficit을 유도하여 뇌신경세포 억제, 신호전달물질을 감소, 인지결핍을 유발)과 LPS(lipopolysaccharide) 6mM (Raw 264.7 cell - 대식세포에서의 inflammation을 유도)을 처리하였고 실험군(5 ton scale과 입제)에는 실험시료를 각 100μL씩 처리하였음.
- MTT assay : 96 well plate에 PBS로 희석된 5mg/mL MTT 시료(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) 20μL를 각 well에 분주한 후, 37°C incubator에서 3시간동안 빛에 노출되지 않도록 배양함. 3시간 후 DMSO 150μL를 넣은 후 570nm에서 흡광도를 측정함.

③ 결과

- MTT assay 결과 (흡광도 570nm로 측정한 세포생존률 비교)

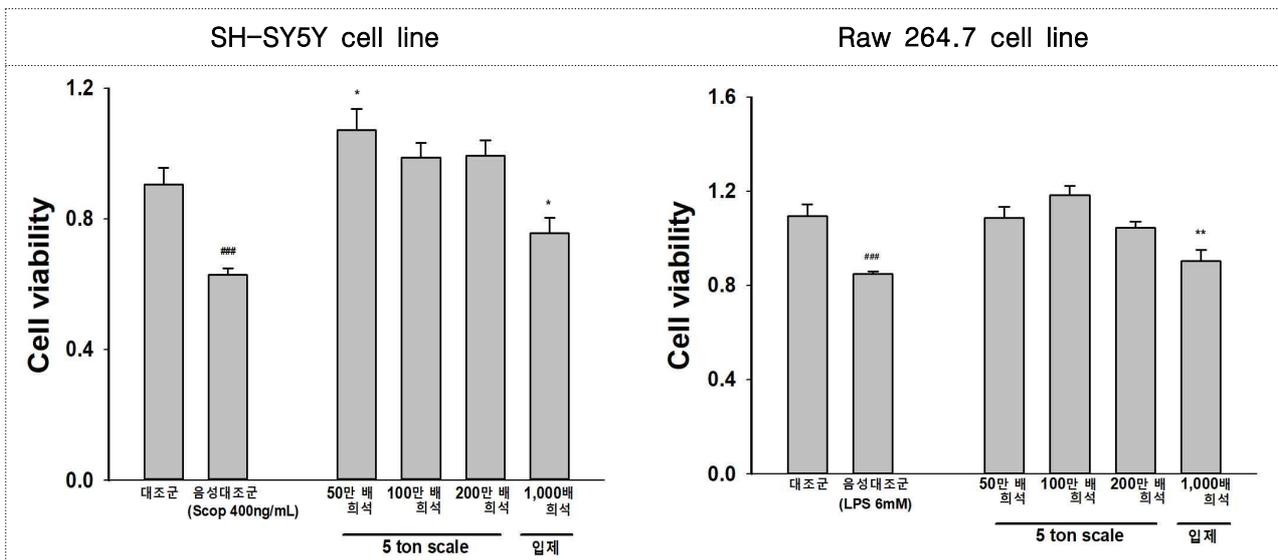


그림 30. 대조군과 음성대조군의 T-test 결과, #은 p value에 따른 유의성을 나타냄 = #(p<0.05), ##(p<0.01), ###(p<0.001) 음성대조군과 샘플그룹(5 ton scale, 입제)의 T-test 결과, \*은 p value에 따른 유의성을 나타냄 = \*(p<0.05), \*\*(p<0.01), \*\*\*(p<0.001)

- SH-SY5Y, Raw264.7 두 cell line에서 음성대조군은 대조군과 비교하였을 때 세포의 생존에 있어서 유의한 차이점을 보임(p value 0.001이하).
- 그러나 SH-SY5Y, Raw264.7 두 cell line에 *L. sakei* wikim0118 배양 추출물 5 ton scale과 입제를 처리한 세포의 생존은 샘플을 처리하지 않은 대조군과 비교한 경우, 유의한 차이점을 보이지 않았음
- MTT assay 결과(현미경 상 cell 확인)를 아래와 같이 제시함.

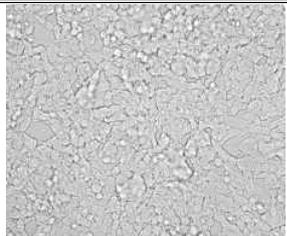
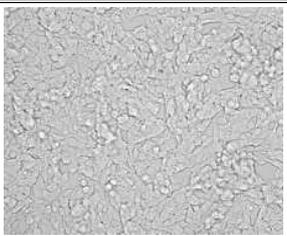
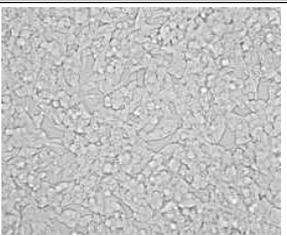
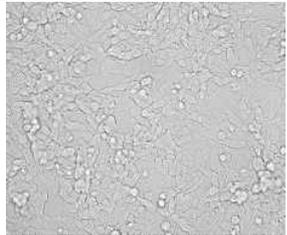
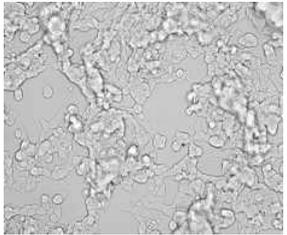
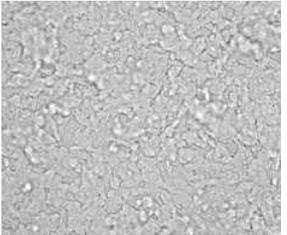
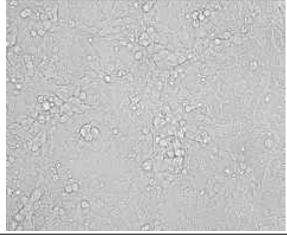
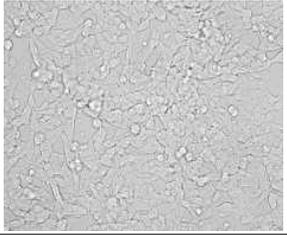
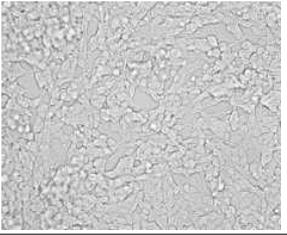
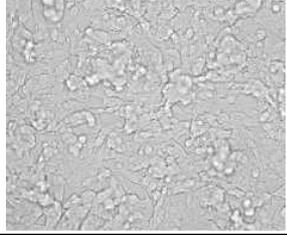
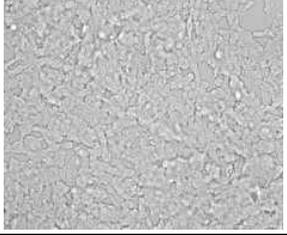
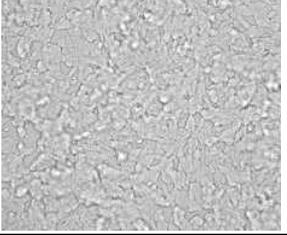
시료 구분	대조군	음성 대조군	5ton scale 50만배 희석
처리 전			
처리 후			
시료 구분	5ton scale 100만배 희석	5ton scale 200만배 희석	입제 100만배 희석
처리 전			
처리 후			

그림 31. SH-SY5Y cell line의 MTT assay 결과

- 대조군과 *L. sakei* wikim0118 배양 추출물 (5 ton scale, 입제)의 경우 SH-SY5Y 세포의 생존에 있어서 부정적인 영향을 끼치지 않음이 확인되었고 확연히 세포의 생존율이 감소한 음성대조군(Scopolamine 적용 그룹)과 비교하여 우수한 세포 생존률을 보임

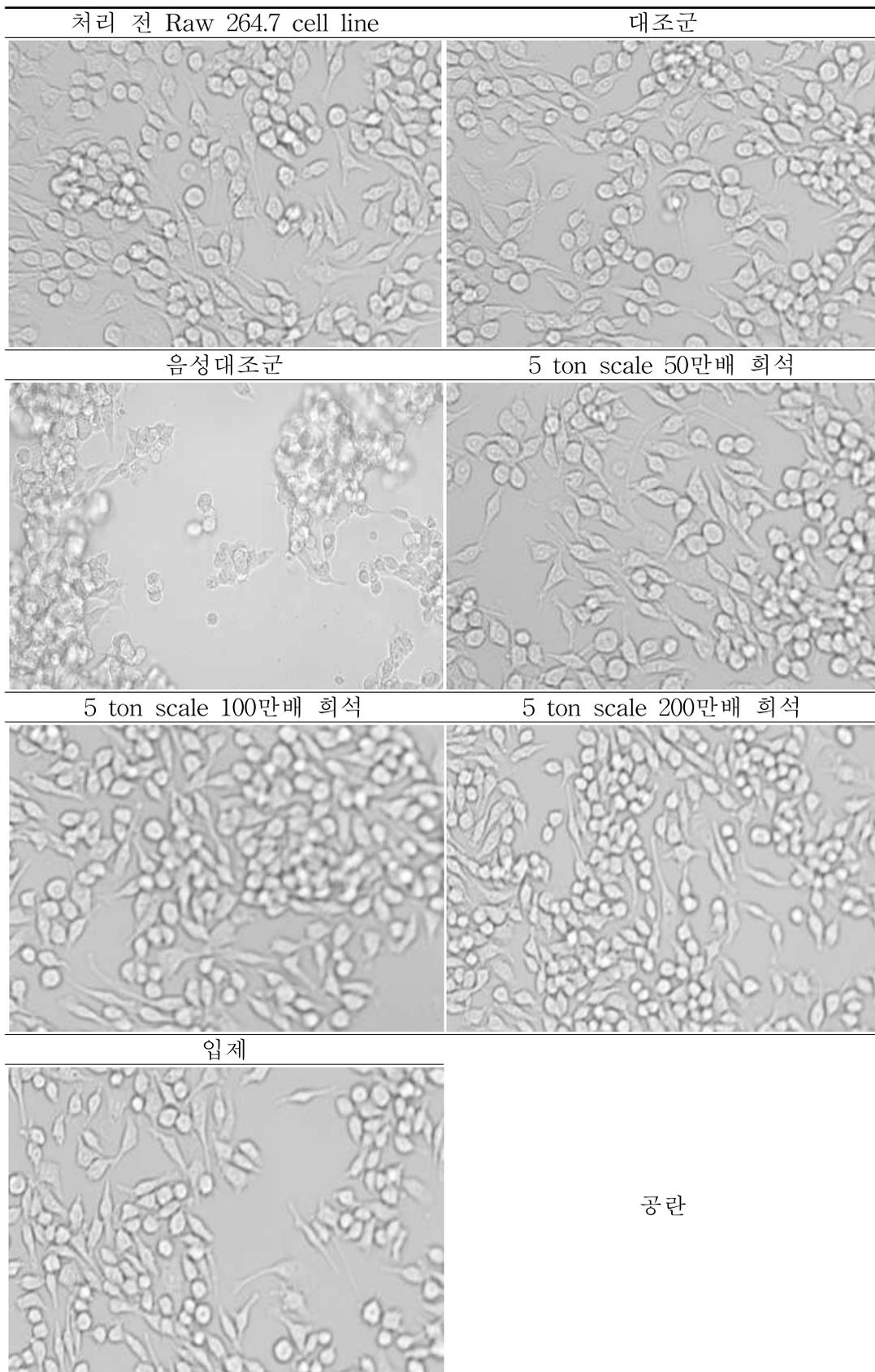


그림 32. Raw 264.7 cell line의 MTT assay 결과

- 대조군과 *L. sakei* wikim0118 배양 추출물 (5 ton scale, 입제)의 경우 Raw264.7 세포의 생존에 있어서 부정적인 영향을 끼치지 않음이 확인되었고 확연히 세포의 생존율이 감소한 음성대조군(lipopolysaccharide 적용 그룹)과 비교하여 우수한 세포 생존률을 보임.

#### ④ 결론

- 도출된 시제품에 대한 독성평가를 위해 SH-SY5Y cell과 Raw 264.7 cell에 시료 처리에 따라 유도되는 세포독성을 알아보기 위하여 세포생존률을 측정된 결과, SH-SY5Y cell line에서 5 ton scale (50만 배, 100만 배, 200만 배 희석) 모두 대조군보다 뛰어난 세포 생존성을 보였으며 입제의 경우 400ng/ml Scop(scopolamine)을 처리한 음성대조군보다 높은 생존률을 보임.
- Raw 264.7 cell line에서 5 ton scale 50만 배, 200만 배 희석의 경우 대조군과 유사한 세포 생존률, 1,00만 배 희석은 대조군보다 높은 세포 생존률을 보였으며 입제의 경우 6mM LPS(lipopolysaccharide)를 처리한 음성대조군보다 높은 세포 생존률을 보임.
- 5 ton scale을 희석한 시료는 SH-SY5Y cell과 Raw 264.7 cell line에서 대조군보다 높은 세포 생존률을 보였으며 입제 또한 세포 생존률이 음성대조군과 대조군 사이에 위치하는 이 결과로 인해 세포 생존에 있어 부정적인 영향을 끼치지 않음이 확인됨.
- *L. sakei* wikim 0118 배양 추출물 5 ton scale과 입제는 실험에 사용된 동물세포인 SH-SY5Y 그리고 Raw264.7 세포의 생존에 있어서 부정적인 영향을 끼치지 않음이 확인됨.

### (4) 현장 토양에서 미생물의 살선충 생물검정 실험(방제효율 평가)

#### ① 연구목적

- 도출된 *L. sakei* wikim0118 배양액 시제품에 대한 현장에서의 뿌리혹선충 방제가 검증

#### ② 재료 및 방법

##### ㉠ 공시재료

- 공시미생물 : *L. sakei* wikim0118
- 시험작물 : (1) 구례 수박 (2) 구례 애호박
- 대조군 : 기존 관주 방식으로 처리한 작물
- 실험군 : *L. sakei* wikim0118 배양액으로 도출된 시제품을 처리한 작물

##### ㉡ 시험방법

##### ▣ 재배 이력

- 구례 수박 : 정식(21. 04. 05), 처리(21. 05. 13), 샘플 채집(21. 07. 01)
- 구례 애호박 : 정식(21. 05. 15), 처리(21. 04. 30), 샘플 채집(21. 07. 05)

- 처리방법 및 처리농도 : 200평 당 시제품 1L 500배 희석 관주
- 처리구 배치 : 무처리구, 처리구, 구획별 완전임의 배치법(3반복)



그림 33. 시험구 배치 현황

- 인위감염환경 : 본 포장에서 뿌리혹선충의 자연 발생을 확인 한 후 별도의 토양 소독 없이, 야생상태의 출현 성충을 활용함.

#### ▣ 뿌리혹 선충 개수 방법

- 실험 최종 뿌리를 잘게 다진 후 (약 1cm 간격), 200mL의 1% NaOCL 용액이 들어 있는 믹서기에 넣고 고속으로 1분간 회전(Kim and Lee, 2008)
- 선충과 알을 mesh로 거른 후 부유물과 작물조직 및 뿌리혹선충, 알을 분리하여 현미경상에서 개수

### ③ 결과

- 무처리구인 대조구와 비교할 때, 본 시제품의 처리에 따라 토양선충 및 뿌리 내 선충의 밀도가 저감됨을 확인
- 선충의 마리수 저감효과는 대조구 대비 뿌리에서 발견된 선충의 수가 뿌리당 대조군 953.3마리에서 실험군 644.3마리(구례 수박), 대조군 430마리에서 실험군 371마리(구례 애호박)의 분포를 보이며 이는 구례 수박의 경우 21.8%의 저감 효과를, 구례 애호박의 경우 13.7%의 저감효과를 보임
- 토양에서의 선충의 마리수 저감효과는 대조구가 2039.6마리에서 실험군 1291.7마리(구례 수박), 대조군 728.3마리에서 실험군 650.5마리(구례 애호박)의 분포를 보이며 이는 구례 수박의 경우 10.7%의 저감 효과를, 구례 애호박의 경우 36.6%의 저감효과를 보임



그림 34. 시제품 처리 후 생육현황(구례 수박 포장)

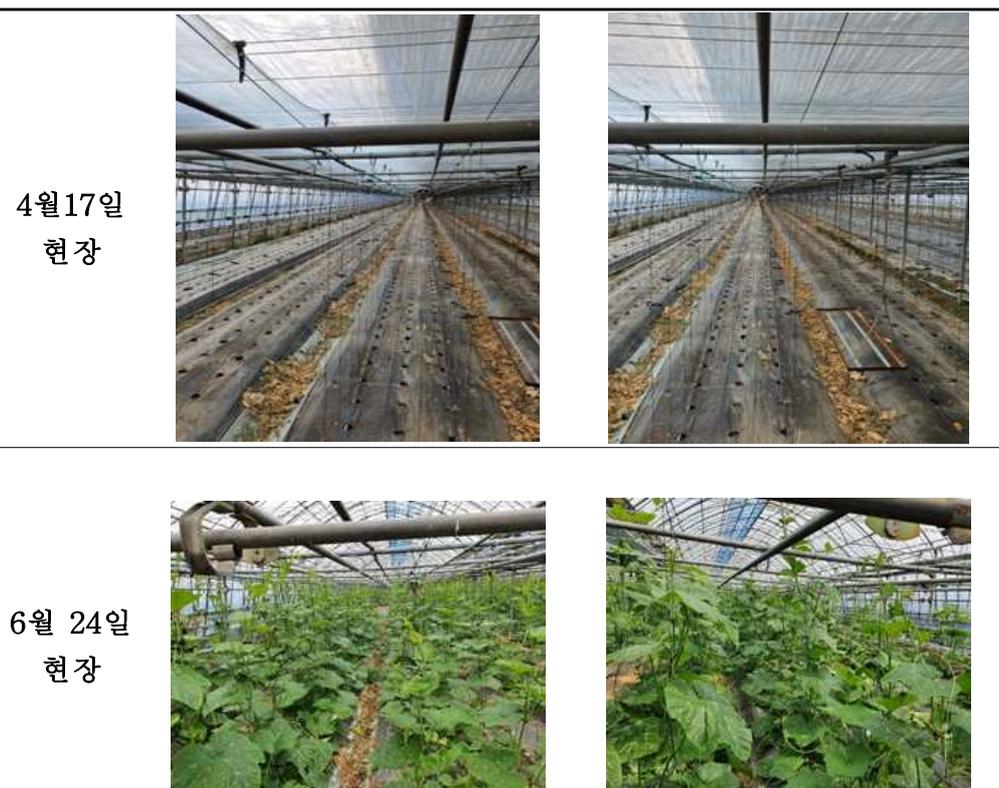


그림 35. 시제품 처리 후 생육현황(구례 애호박 포장)

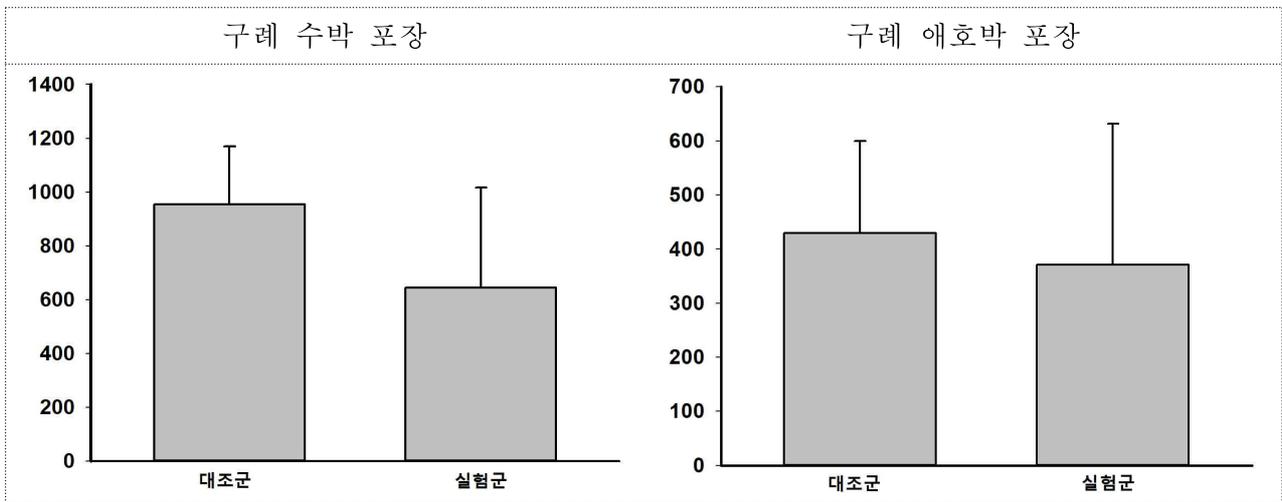


그림 36. 검출된 선충의 마리 수(뿌리 기준)

표 7. 검출된 선충의 마리수(뿌리 기준)

구 분	검출된 선충 수	
	대조군	실험군
구레 수박	953.3±215.7	644±372.2
구레 애호박	430±170	371±261

○ *L. sakei* wikim0118 배양 추출물 시제품을 현장에 적용한 구레 수박과 애호박의 경우 실험군은 대조군보다 저감된 선충 마리 수를 보였음

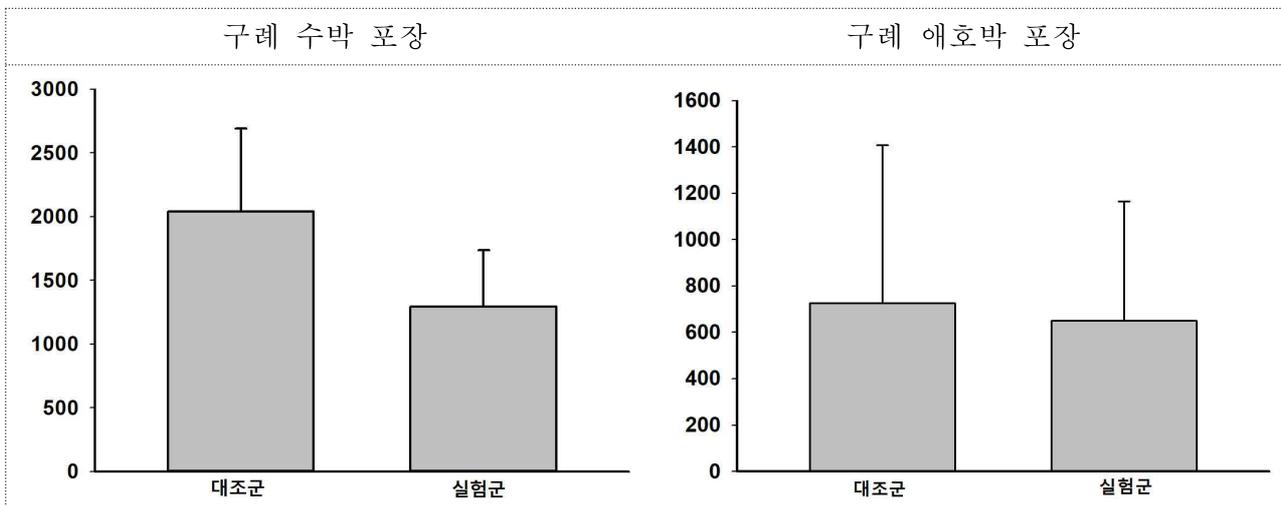


그림 37. 검출된 선충의 마리 수(토양 50g 기준)

표 8. 검출된 선충의 수(토양 50g 기준)

구 분	검출된 선충 수	
	대조군	실험군
구레 수박	2,039±651.4	1,291.7±447
구레 애호박	728.3±680	650±514.7

○ *L. sakei* wikim0118 배양 추출물 시제품을 현장에 적용한 구레 수박과 애호박의 토양을 채취하여 뿌리혹선충의 수를 확인한 결과, 실험군은 대조군보다 저감된 선충 마리 수를 보였음

#### ④ 결론

- 도출된 *L. sakei* wikim0118 배양액 시제품을 현장에 있는 작물에 적용한 후 뿌리와 토양을 채취하여 확인한 결과, 미생물 배양액을 처리하지 않은 대조구보다 감소된 선충의 수를 확인하였으며 이 결과를 토대로 배양액 시제품에 대한 방제 효과를 검증함
- 본 시제품의 처리에 의한 선충 방제능은 뿌리에서 검출된 선충의 수에서 13.7%(구레 애호박), 21.8%(구레 수박) 개선 효과를, 토양에서 검출된 선충의 수에서 10.7%(구레 애호박), 36.6%(구레 수박) 개선 효과를 보임
- 또한 본 시제품의 처리로 인해 구레 수박의 경우 A급 상품 수확량이 20% 이상 개선되었으며 당도 또한 2 brix 향상된 결과를 도출(보고서 미수록)
- 최종 본 시제품의 처리의 결과는 최소 10.7% - 최대 36.6%의 선충 피해 저감을 보였으며 작물의 생육에 있어서 크게 장해현상을 나타내지 않았음을 확인할 수 있었으며 사용 용량 대비 우수한 방제 효과를 확인

### (5) 토양 내 미생물 상 변화 조사

#### ① 연구목적

- Wikim0118균주 시제품의 토양 처리에 따른 토양 미생물 생태계의 교란 가능성을 평가하기 위해, 토양 내 Wikim0118균주 시제품을 처리한 현장 토양의 시간 별 미생물 군집 분석을 실시함.

#### ② 재료 및 방법

##### ㉠ 공시재료

○ 공시약제 : *L. sakei* wikim 0118  $2.0 \times 10^9$  cfu/g 5ton scale 배양물

㉔ 시험방법

○ 시험기간 : 2021년 8월-10월

○ 시험장소 : 전남 담양군 수북면 고성리 678, 하우스 1동(200평)

○ 약제의 처리 방법 : 1L의 500배 희석액 제조 후 300평 토양 관주(8월 10일)



그림 38. 실험구 배치 현황

㉕ 분석방법

○ 제 1세부에서 임대 수행하는 담양권역의 멜론포장에 토양관주를 실시한 토양을 0주차부터, 5주차까지 토양 내 미생물 균집 분석을 실시함.

○ 현장에서 채취한 토양을 일정 주기 별 제1세부에서 공급받아 NGS(Next Generation Sequencing) 분석을 통해 채취 시기별 토양의 균집분석을 실시하였고, 이는 유전체 분석 전문기관인 마크로젠에 의뢰하여 수행하였음.

③ 결과

○ 분석 결과 wikim0118균주의 토양내 우점도는 1주차 0.9%, 이 후 점차 감소하여, 5주차 불검출 결과를 나타내었음.

○ 또한 wikim0118 생균 처리 후 현장 토양의 검출된 미생물 종류는 초기 286종에서 최소 268종, 최대 290종으로 다양한 종 다양성을 유지하는 결과를 보임.

○ 최종 Wikim0118 생균 처리에 의한 토양 내 미생물의 종다양성이 유지되는 바, 토양 미생물 생태계 교란성은 미흡한 것으로 판단됨.

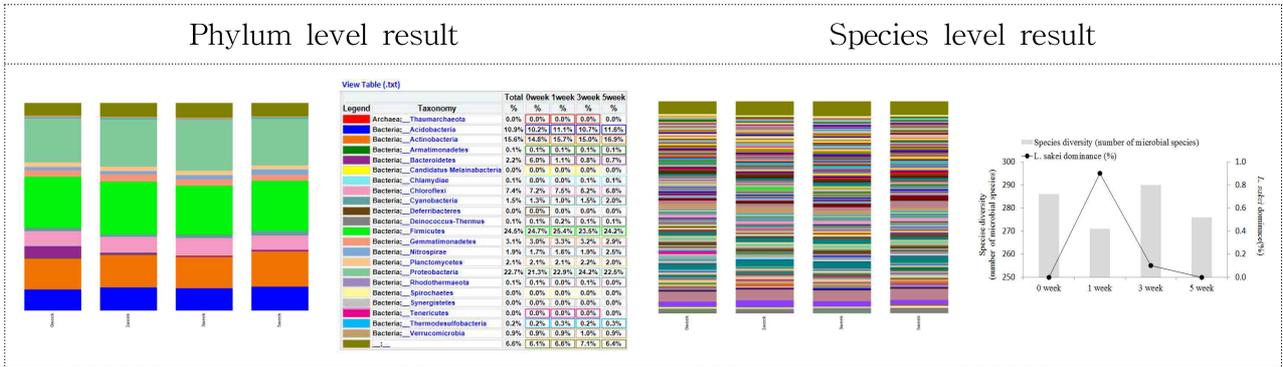


그림 39. wikim01180 생균 처리에 의한 현장 토양 내 미생물 군집 분석 결과

④ 결론

- Wikim0118 생균 처리에 의한 토양 내 미생물의 종다양성이 유지되는 바, 토양 미생물 생태계 교란성은 미흡한 것으로 판단됨.

## 제 2절 세부 정량적 연구개발 성과

### (3) 세부 정량적 연구개발성과

#### [과학적 성과]

#### 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Identification and molecular study on the interaction of Schisandrin C with human 5-HT <sub>3A</sub> receptor	European journal of pharmacology	Sanung Eom	906	국외	전남대학교	SCIE	2021.5.28	0014-2999	100.0
2	Molecular Regulation of Betulinic Acid on alpha3β4 Nicotinic Acetylcholine Receptors	Molecules a journal of synthetic chemistry and natural product chemistry	Shinhui Lee	26(9)	국외	전남대학교	SCIE	2021.05.01	26092659	100.0

#### 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	국제심포지엄 생물공학학회	이준호	2020.10.21	서울 라마다 호텔	대한민국
2	국제심포지엄 생물공학학회	이준호	2020.10.21	서울 라마다 호텔	대한민국
3	국제심포지엄 미생물학회	이준호	2020.10.07	E-conference	대한민국
4	국제심포지엄 생화학분자생명공학학회	이준호	2020.09.23	E-conference	대한민국
5	국제심포지엄 생명과학회	이준호	2020.08.06	경주 더케이 호텔	대한민국
6	국제심포지엄 생명과학회	이준호	2020.08.06	경주 더케이 호텔	대한민국
7	국제심포지엄 생물공학학회	이준호	2020.06.25	E-conference	대한민국
8	국제심포지엄 생물공학학회	이준호	2020.06.25	E-conference	대한민국

#### 기술 요약 정보

- 해당사항 없음.

#### 보고서 원문

- 해당사항 없음.

#### 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

- 해당사항 없음.

[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	락토바실러스 사케이 WiKim0118 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 유해생물 방제용 조성물	대한민국	전남대학 교산학협 력단/ 세계김치 연구소	20.05.21	10-2020- 0060960		전남대학 교산학협 력단/ 세계김치 연구소	21.04.28	10-22477 84	100.0	통상 실시

○ 지식재산권 활용 유형

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

저작권(소프트웨어, 서적 등)

○ 해당사항 없음.

신기술 지정

○ 해당사항 없음.

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		
1	농기계 및 농자재인증	강원대학교 산학협력단	유기농업자재	제 공시-2-6-063호	2022.01.27	대한민국

표준화

○ 해당사항 없음.

[경제적 성과]

시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	네마닥터	21.03.25	(주)마이크로자임	(주)마이크로자임 공장 동 내	농자재	1년		
2	네마닥터골드	21.11.17	(주)마이크로자임	(주)마이크로자임 공장 동 내	농자재	1년9개월		

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	통상실시	락토바실러스 사케이 wikim0118 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 유해생물 방제용 조성물	(주)마이크로 자임	20.10.12	50,000,000원	매출액의 1% 경상기술료를 2022년 3월31일까지 징수계획

□ 사업화 투자실적

○ 해당사항 없음.

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 <sup>1)</sup>	사업화 형태 <sup>2)</sup>	지역 <sup>3)</sup>	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	기술이전	신제품개발	국내	뿌리혹선충 방제용 친환경 유기농업자재 네마닥터	뿌리혹선충 방제용 유기농업자재 사업화	(주)마이크로자임	90,215		2021	3년

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
뿌리혹선충 방제용 친환경 유기농업자재 네마닥터	2021	90,215		90,215	본 과제 성과 매출기여율 100% / 거래건별 전자세금계산서 증빙
합계		90,215		90,215	본 과제 성과 매출기여율 100% / 거래건별 전자세금계산서 증빙

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과		뿌리혹선충 방제용 유기농업자재 신규 사업화			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	1년 9개월			
	소요예산(천원)	300,000			
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
		90,215	200,000	400,000	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
			국내	1	3
국외			-	-	-
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		본 살충성분을 생성하는 균주의 배양물의 서방출성을 제공하는 토양 시비용 약제인 네마닥터 골드의 출시로 선충에 대한 예방 및 연속 수확 작기의 작물 환경에서 현장 방제비용의 절감 목적의 후속 제품의 출시 계획			
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
		90,215	200,000	400,000	
	수출	-	25,000	100,000	

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2020년	2021년	
1	뿌리혹선충 방제용 유기농업자재 신규 사업화	(주)마이크로자임	1	1	2
합계			1	1	2

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	1
		생산인력	2
	개발 후	연구인력	2
		생산인력	3

**비용 절감(누적)**

○ 해당사항 없음.

**경제적 파급 효과**

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도	뿌리혹선충 방 제용 유기농업 자재 사업화	90,215	-	90,215	-	1인	-
기대 목표	뿌리혹선충 방 제용 유기농업 자재 사업화	300,000	50,000	350,000	-	2인	-

**산업 지원(기술지도)**

○ 해당사항 없음.

**기술 무역**

○ 해당사항 없음.

**[사회적 성과]**

**법령 반영**

○ 해당사항 없음.

**정책활용 내용**

○ 해당사항 없음.

**설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영**

○ 해당사항 없음.

**전문 연구 인력 양성**

번호	분류	기준 연도	현황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	석사학위 취득	2020		√				√				√		

**산업 기술 인력 양성**

○ 해당사항 없음.

**다른 국가연구개발사업에의 활용**

○ 해당사항 없음.

**국제화 협력성과**

○ 해당사항 없음.

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	인터넷/PC통신	유튜브 플랫폼	[한국농수산TV] 작년 선충피해 왔는데도 7~80% 수확!! 혈~ 그게 가능?? 충남 부여 원거과농예 6월호 잡지 내 전면광고 수록	21.03.10
2	월간잡지	원경과농예	인터넷 포털 내 제품 홍보 배너 위치	21.06.01
3	인터넷/PC통신	한국농기자재신문		21.06.16

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
1	수상	2020 농식품 R&D 우수성과 54선	2020 농식품 R&D 우수성과 54선 과학기술분야 선정	본과제 1세부 및 협동기관	21.10.01	농림축산식품부 /IPET

2

[인프라 성과]

- 해당사항 없음.

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항

- 해당사항 없음.

2) 목표 달성 수준

2-1) 정량적 성과 목표

① 특허출원 1건

- 수행 기간 내 성과 목표치인 특허 출원 1건을 완료하여, 추진 목표를 100% 달성함.

② 특허 등록 1건

- 종료 2차연도에 설정 목표치인 특허 등록 1건을 완료하여, 추진 목표를 조기 달성함.

③ 기술이전 실시 1건

- 수행 기간 내 성과 목표치인 기술이전 실시 목표치인 1건을 완료하여, 추진 목표를 100% 달성함.

④ 기술료 20백만원

- 수행 기간 내 성과 목표치인 기술이전 20백만원을 초과한 50백만원을 징수 완료하여, 추진 목표를 250% 달성함.

⑤ 제품화 1건

- 수행 기간 내 성과 목표치인 뿌리혹선충 전용 유기농업자재 인 네마닥터를 출시하였고, 2022년도 2월 내 후속제품인 네마닥터 골드의 출시가 가시화되어, 제품화 1건의 추진 목표를 상회한 200%를 달성함.

⑥ 매출액 50백만원

- 수행 기간 내 성과 목표치인 50백만원에 대한 90백만원의 매출 초과달성하여, 추진목표를 180% 달성함.

⑦ 고용창출 2건

○ 수행 기간 내 성과 목표치인 2인의 고용을 완료하여, 추진 목표를 100% 달성함.

⑧ 논문 SCI 2건

○ 수행 기간 내 성과 목표치인 2건의 SCI 논문게제를 완료하여, 추진 목표를 100% 달성함.

⑨ 논문 평균 IF

○ 수행 기간 내 논문 IF 목표치인 3.0을 상회한 4.3의 평균 IF을 달성, 추진 목표를 143% 달성함.

⑩ 학술발표

○ 수행 기간 내 성과 목표치인 2건을 상회한 8건의 학술발표를 게시하여, 추진 목표를 400% 달성함.

⑪ 홍보 및 전시

○ 수행 기간 내 성과 목표치인 1건을 상회한 3건의 홍보전시를 게시하여, 추진 목표를 300% 달성함.

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SCI	비 SCI							
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	5	0		10	5	30	30	5	5				5				5			
최종목표	1	0		1	20	1	50	0	2		2		3	2			1			
1 차 년 도	목 표								1											
	실 적	1			1	55			1					8						
2 차 년 도	목 표	1			1	20	1	50	1		2		3	2			1			
	실 적						2	90	1		2		4.3				3			
소 계	목 표	1			1	20	1	50	2		2		3	2			1			
	실 적	1	1		1	55	2	90	2		2		4.3	8			3			

## 2-2) 연구개발 목표

### ① 1세부/(주)마이크로자임

- 뿌리혹선충 방제용 유기농업자재 제품화
  - 선발 균주의 살선충 활성물질 함량 최적화
  - Pilot 이상의 대량생산 공정확립
  - 제형형태, 제형조건, 제형 안전성 등 최적 제형 개발
  - 시제품 개발 및 생산
  - 유기농업자재 등재(효능효과 포함)

### ② 1공동/세계김치연구소

- 김치유래 미생물을 이용한 뿌리혹선충 방제용 미생물 탐색 및 이용연구
  - 선발 균주의 살 선충 물질 활성 연구
  - 선발 균주의 기호성(대사물질)에 대한 연구
  - 균주의 살 선충 및 대사물질 간의 방제 상승효과 검토
  - 복합 균주의 적용 시 살 선충 시너지 평가
  - 선발 균주의 토양 잔류성 평가

### ③ 2공동/전남대학교

- 뿌리혹선충의 선택적 신경 제어로 미생물 살선충 작용기전 구명
  - 선충 신경제어 소재 확보
  - 선발 미생물을 적용한 뿌리혹선충 억제 메커니즘 분석
  - 시제품의 신경제어 활성 평가
  - Lab scale 생물 검정 실험
  - 시제품의 세포 독성 평가

## 2-3) 목표 달성 여부

### ① 1세부/(주)마이크로자임

#### ○ 선발균주인 Wikim0118균주의 최적 생육 및 살충물질 최적 대량생산 공정 확립

- 산업용 배지 최적화 : 탄소원, 질소원 및 C/N ratio, 무기염원의 설정 완료
- 살충물질 생산 조건 최적화 : 교반속도, 통기량, 배양온도, pH buffer 등의 최적 생산 조건의 확립
- 상업용 Pilot scale의 생산 재현성 확보 : lab scale < 50L < 500L < 5ton
- 최종 최적화 이전 살충물질의 함량 37.9mM 대비 5ton 규모의 상업화 규모에서 589.2mM의 습득량으로 1,454.6%의 개선된 생산 수율을 확보

#### ○ 뿌리혹선충 방제용 유기농업자재 제품화

- 계면활성제, 방부제, 동결방제제등을 통하여 기초 제형 시험을 진행하였고, 각 제형별 살충능을 테스트 하여 선발된 제제의 사용방법, 제제의 안전성시험 특성 및 효능평가로 최종 제품 2종을 도출함.
- 선발된 제품을 대상으로 하여 자체적으로 생물검정 및 현장 적용실험을 거쳐 타세 제품과의 경쟁력 분석과 현장에서의 방제가를 검증하였고, 약효 및 약해시험, 이화학성분석, 병원성 미생물 시험, 독성시험을 통한 유기농업자재 등록을 실시하였음.
- 이를 통해 본 과제의 개발 목표를 100% 달성하였음.

### ② 김치유래 미생물을 이용한 뿌리혹선충 방제용 미생물 탐색 및 이용연구

- 선발균주의 살 선충 물질 활성화에 관한 연구를 위해 다양한 접근법을 통하여 균주의 살충물질 활성화에 관한 특성을 연구함.
- 선발 균주의 대사물질에 관한 연구 및 살선충 물질간의 방제 상승효과를 검토 하였고, 대사물질 가운데, (1) sodium gluconate, (2) L-pyroglutamic acid, (3) L-glutamic acid, (4) L-lysine, (5) Trans-4-Hydroxy-L-Proline의 살선충 대사물질의 추가 선발을 생물검정 실험을 통해 실시하였으며, 이들과의 살충물질과의 혼용 방제 처리 시 별도의 시너지 효과가 없음을 과학적으로 구명하여, 기존 선발한 살충소재에 집중하여 제품화 할 수 있도록 기여하였음.
- 선발 균주 및 제 1세부가 제공하는 다양한 제형에 대한 균주의 토양 잔류성 평가와 살충물질의 토양 및 식물 침투성을 분석하여, 제품의 사용 주기 및 사용방법에 대한 가이드라인을 제시하였고, 이 과정에서 최적화된 제형화 및 사용방법을 도출함.
- 선발 균주와 복합균주의 적용 시 살 선충 효율의 시너지 평가를 진행하고자 다양한 김치유래 미생물을 적용하여 생물검정실험을 실시하였음.
- 이를 통해 본 과제의 개발 목표를 100% 달성하였음.

### ③ 뿌리혹선충의 선택적 신경 제어로 미생물 살선충 작용기전 구명

- 선행 연구를 통해 확보된 15개종의 후보 미생물 가운데, 시험선충을 활용한 생물검정 실험 및 전기생리학적 분석을 통해 최종 살선충 균주인 Wikim0118을 선발하였음.
- 전기생리학적 분석을 통해 Wikim0118이 생성하는 살충물질의 발현 수용체 및 작용기전을 구명하였고, 정제된 살충물질과의 비교 실험을 통해 선발균주의 상업적 가치 여부를 판단하였음.
- 본 균주의 제품화를 위한 유효 처리 농도, 배지 및 생산 단계별 살선충 방제 효율을 평가하였고, 이를 통해 상업화를 위한 설정 목표의 가이드라인을 제공하고, 년 중 상시적으로 방제효율 및 활동성 등의 생물검정 실험을 실시할 수 있는 분석 기법을 개발 및 도입함.
- 제 1세부에서 공급한 상업화 단계별 중간 산물을 대상으로 알, 선충, 활동성의 생물 검정 결과를 제공하였고, 이를 통해 효과적인 제품화를 실시하는데 기여함.
- 시제품 중단 단계 혹은 최종 단계에서 포트 실험 및 다양한 환경의 현장 적용 실험을 통해 뿌리혹선충에 대한 직접적인 방제가를 도출하였고, 시제품의 저장기간 별 방제가를 검토하였을 때 시간의 경과에 따라 살충효과의 안전성을 확인함.
- 세포독성 및 토양 균집분석을 통해 시제품의 유해성을 추가로 검증하여 제품의 안전성을 과학적으로 구명하였음.
- 상위와 같은 작균체의 작용기전 구명과 신속한 방제가를 측정할 수 있는 lab 규모에서 선충 생물검정 시스템을 도입하여 본 과제의 성과 도출의 가속화를 거두는데 일조하였고, 나아가 제품화 단계별 선충에 대한 방제효과를 신속히 제공하여 제1세부에서 원활한 제품 생산 공정을 설계하는데 일조하였음.
- 최종 시제품에 대한 생물검정 및 안전성 평가와 현장적용실험을 개시하여 완성도 높은 제품을 도출하는데 기여하였고, 도출 결과를 기반으로 뿌리혹선충 방제용 글로벌 제품 개발 가능성이 매우 높다고 판단되어 최종 성과목표를 훌륭히 달성하였다고 판단됨.
- 이를 통해 본 과제의 개발 목표를 100% 달성하였음.

## 4. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 뿌리혹선충 및 선충류가 독립적으로 보유한 GABA exp-1 및 LGC-35 channel에 결합하여 농약과 유사한 작용기전을 제공하나 친환경적인 물성을 보이는 소재에 대한 선충 방제 분야에 대한 적용은 기존 미생물의 접촉, 기생, 포식 등의 단순 메커니즘 이상의 신경 단위 규모의 방제기작을 제공하여 향후 개발될 다양한 선충 방제용 소재로써 활용 되어 질 것으로 사료됨.
- 현행 뿌리혹선충에 대한 살충농약을 제외한 효과적 방제수단이 미흡한 가운데 친환경 및 기능성 측면을 부각하기 위한 상업화 공정의 설계와 제형기술의 도출로 저비용 고효율 선충 방제제의 시장 보급이 기대됨.
- 현행 PLS 제도 및 살충농약의 활용 지향 환경 아래, 본 친환경성 소재를 접목한 신규 뿌리혹선충 방제용 유기농업자재의 보급은 장기적으로 대체 성장이 예상되는 유기농업자재 및 친환경 농업 시장에 편승하여 시장의 선택적 측면에서 다수의 기회를 제공받을 것으로 기여하며, 최종 국내 친환경 농업 시장과 동반성장하여 상호간의 긍정적인 영향을 거둘 수 있을 것으로 판단함.

## 5. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

### ① 1세부/(주)마이크로자임

- 기술이전 대상의 Wikim0118균주를 활용한 도출 제품인 네마닥터 및 네마닥터 골드 추가적인 양산 및 마케팅을 통해 전국 상업화를 추진할 수 있도록 할 계획임.
- 또한 현재, 메론, 수박, 애호박, 당근 외 뿌리혹선충에 피해가 보고되는 다양한 작물에 대한 적용 확대 시험을 거칠 예정이며, 이는 전국 농업기술원 및 농업기술센터와의 협력을 통해 객관적인 방제가를 분석한 후 그들의 구축한 농가와와의 유기적인 네트워크를 활용하여 전국 상업화의 성공 사례를 도출하는데 집중할 계획임.

### ② 1공동/세계김치연구소

- 본 연구진이 채택한 살충물질인 GABA는 식물체에 대한 방어 물질 및 작물환경의 스트레스 저감 혹은 직접적인 작물생육에 대한 영향원으로 작용되어짐이 보고되고 있음.
- 이에 김치유래 GABA 생성 미생물과 작물생육분야에 대한 후속 적용을 통해 GABA에 대한 작물생육분야의 적용성을 검토 할 계획임.

### ③ 2공동/전남대학교

- 본 선충 방제용 물질은 선충 외 다양한 해충에 대한 기피성 혹은 식물 방어 물질로써 다수의 보고가 개시되고 있음.
- 이에 국내 피해가 보고되고 있는 다양한 해충에 대한 적용 확대 실험을 개시하며, 작용기전 구명 및 상업용 가치 여부를 판단할 계획임.
- 또한 본 연구를 통해 개발된 시험선충을 활용한 방제가 분석 기법을 통해 다양한 신경자극물질의 처리를 통해 후속적인 신경 억제성 물질을 발굴할 계획임.

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
사업화	상품출시	2	
	기술이전	1	
	공정개발	1	
제품개발	시제품개발	2	
사업화(매출액/백만)	국내	종료 1년차	100
		종료 2년차	150
		종료 3년차	200
		종료 4년차	300
		종료 5년차	400
	국외	종료 1년차	-
		종료 2년차	-
		종료 3년차	25
		종료 4년차	50
		종료 5년차	100
성과홍보(농업기술원, 기술센터 협력)		5	

< 별첨 자료 >

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

## 붙임. 참고문헌

- BCC Research, The Global Market, Feb. 2010, AgriSevice, 2006~2012, Transparency market research 2018.
- Choi, Y. E. 1978. Studies on root-knot nematodes in korea. Kasetsart J(12) : PP. 31-35.
- Ingham, R. E. and Ddting, J. K. 1984. Plant-herbivore interations in a North American mixed grass prairie. III. soil nematode populations and root biomass on *cyomys Indovicianus* colonies and adjacent uncolonized areas. Oecologia 63 : PP. 307-313
- Choo, H. Y., Kim, H. K., Park, J. C., Lee, S. M., and Lee, J. I. 1987. Studies on the patterns of plastic film house, their growing conditions, and diseases and pests occurrence on horticultural crops in southern part of korea. Insects and nematodes associated with horticultural crops and effect of nursery soil conditions on the infection of root- knot nematode. Korea J. Plant prot 26 : PP. 195-201.
- Cho, H. I. and Han, S. C. 1986. Survey of plant parasitic nematodes on economic crops. Korean J. Plant prot. 25 : PP. 175-182.
- Cho, M. R., Lee, B. C., Kim, D. S., Jeon, H. Y., Yiem, M. S. and Lee, J. O. 2000. Distribution of plant-parasitic nematodes in fruit vegetable production areas in Korea and identification of root-knot nematodes by enzyme phenotypes. Korean J. Appl. Entomol. 39 : PP. 123-129.
- Jepson, S. B. 1987. Identification of root-knot nematodes(*meloïdogyne* species). CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Kim, J. H. 2007. Mode of action of insecticides. Safe food 2(4) : PP. 24-28.
- Kwon, T. Y., Jung, K. C., Park, S. D., Sim, Y. G. and Choi, B. S. 1998. Cultural and chemical control of root-knot nematodes *Meloïdobyne* sp. on oriental melon in plastic film house. RDA J. Crop prot. 40 : PP. 96-101.
- Ko, H. R., M, A. Lee., Kim, E. H., S. J. Kim and J. K. Lee. 2017. Incidence of plant-parasitic nematodes in strawberry nursery and nematode dispersal by daughter. Res. Plant Dis. 23(2) : PP. 186-192.
- Mulooney, R.P Plant Disease
- Park, S. D., Kwon., T. Y., Jun, H. S. and Choi, B. S. 1995. The occurrence and severity of damage by root-knot nematode *Meloïdogyne* incognita in controlled fruit vegetable field. RDA J. Agric Sci. 37 : PP. 318-323.
- 2013-2018, 시설작물 중 과채류 재배 면적, KOSIS
- 강 & 오, 강태진, 오석홍. GABA의 생성과 이용. Bio wave. 9(14)(2007).
- 박동금 : 참외 연작 장애와 그 대처 방안에 관한 연구(뿌리혹선충과 토양 염류 장애를 중심으로), 농학박사 학위논문, 안동대학교 대학원(2000).
- 유기적 선충 방제 매뉴얼, 경상북도 농업기술원 유기농업연구소(2015).
- 농촌진흥청 국립농업과학원, 농약정보, 국립농산물 품질관리원 유기농업자재 정보시스템
- 한국 친환경 농자재 협회 2018전망, 농기자재신문(2018).

## 뒷면지

### 주 의

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