

발간등록번호

11-1541000-000526-01

국내 토착미생물 *Serratia* Gsm01 유래 신규
고분자 천연물질을 이용한 친환경적 *cucumber*
mosaic virus(CMV) 방제기술의 산업화

Industrialization of environmental-friendly
control method of CMV using a novel high
molecules originated from domestic
microorganism *Serratia* Gsm01

(주)파이오니아

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “국내 토착미생물 *Serratia* Gsm01 유래 신규 고분자 천연물질을 이용한 친환경적 *cucumber mosaic virus*(CMV) 방제기술의 산업화” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010년 05월 29일

주관연구기관명 : (주) 바이오니아

주관연구책임자 : 임 춘 근

연 구 원 : 조 준 모

연 구 원 : 민 용 원

연 구 원 : 구 준 학

연 구 원 : 한 준 희

협동연구기관명 : 강원대학교

협동연구책임자 : 허 장 현

협동연구책임자 : 이 상 용

요 약 문

I. 제 목

국내 토착미생물 *Serratia* Gsm01 유래 신규 고분자 천연물질을 이용한 친환경적 *cucumber mosaic virus*(CMV) 방제기술의 산업화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

Cucumber mosaic virus (CMV : 오이모자이크바이러스)는 직경 28nm~30nm인 구형 입자 내에 외가닥 RNA를 함유한 식물바이러스다. CMV는 접목 및 즙액 전염을 하며 진딧물과 같은 흡즙해충에 의하여 주로 전염된다. CMV는 오이, 토마토, 가지, 고추, 참외, 수박, 메론, 상추, 배추, 무 등 39과 117종의 식물에 감염을 일으키는 대표적 식물바이러스로서, CMV에 의하여 감염된 식물은 잎의 경우 처음 신엽에 황색으로 반문을 형성하고 또한 엽면에 작은 주름을 형성하면서 굴곡을 형성한다. 잎이 커짐에 따라서 황색모자이크 증상이 뚜렷해지며 주 전체가 위축된다. 특히 CMV는 원예 작물을 재배하는 농가 경영체에게는 치명적인 경제적 손실을 일으키고 있다. CMV에 의한 고추의 피해액은 최소 300억 원 이상으로 추정된다. 그러나 CMV 방제제 개발을 요구하는 농민의 수가 급증하고 있으나, CMV를 효과적으로 방제할 수 있는 제품이 없는 실정이다. 또한, 친환경 농산물에 대한 국민의 수요가 급증하고 있는 실정에서 화학물질이 아닌 천연물질을 이용한 CMV 방제제 개발이 절실하게 요구되고 있다. 본 연구의 최종 목적은 국내 토착 미생물 기원 고분자 천연물질을 이용하여 *cucumber mosaic virus* (CMV)에 대한 친환경적 방제기술을 산업화하는 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 과제에의 연구 범위는 크게 3 파트로 나누어 수행하였다. 주관기관인 바이오니아에서는 고분자 천연물질의 대량생산 시스템 구축, 친환경 제형화 기술 확립 및 혼합제 개발 연구를 수행하였다. 세부 내용에는 우선 고분자 천연물질의 산업화 대량 생산 system 구축하고 제형에 필요한 약효 상승제를 선별하였다. 선별된 결과를 바탕으로 저독성 제형을 개발하였고 더 나아가 혼합제의 가능성을 검토하였다. 또한 최종 선별된 *Serratia* Gsm01 균주 유래 고분자 천연 물질 제형에 대해서는 독성학적 안전성을 분석하였다.

협동 기관인 강원대학교 협동 1 연구팀은 우선 고분자 천연물질의 CMV에 대한 농가

실증시험 및 작물별 재배력 확립, 이화학적 특성 분석 연구를 수행하였다. 연구내용에는 원예 작물 재배 농가 실증 시험을 통하여 작물에 대한 생육단계별 최적 처리 체계와 사용법을 확립하였다. 또한 고분자 천연물질 이용한 원재/제품에 대한 이화학적 특성 분석과 시제품의 품질 관리 시스템 확립하였다. 최종 제형에 대하여 현장에서 발생할 수 있는 여러 환경요인에 대한 안정성 및 타농자재와 혼용 시 발생할 수 있는 약효 감소와 관련된 혼용 안정성 검정하였다.

마지막으로 강원대 협동 2 연구팀에서는 고분자 천연물질의 CMV에 대한 작용기작 구명, 생물 활성적 특성 분석 연구를 수행하였다. 세부내용으로는 우선 고분자천연물질의 CMV에 대한 작용 기작 구명 연구를 실시하였으며 생물 활성적 특성 분석 및 원예 작물에 대한 약해 특성을 검정하였다.

IV. 연구개발결과

주관연구기관(파이오니아) : 고분자 천연물질의 대량생산 시스템 구축, 친환경 제형화 기술 확립 및 혼합제 개발

고분자 천연물질의 대량생산 시스템 구축, 친환경 제형화 기술 확립 및 혼합제 개발 연구 파트에서는 고분자 천연물질의 산업화 대량 생산 system을 구축하였다. 대량 생산 시스템에는 항바이러스성 미생물인 *Serratia* Gsm01 균주가 항바이러스성 고분자물질을 최대한 생산할 수 있는 전용 산업화 배지 1종 개발하였다. 개발된 산업화 배지는 활성의 최적화 및 제품화를 고려하였고, 경제성을 감안하여 선발하였다. 탄소원은 Glucose가 최적이었으며, 질소원은 soybean meal과 peptone이 최적이었다. 이들 성분의 배지 내 함유량 최적 조합 결과 탄소원과 질소원이 1:4 또는 1:1로 배양하는 것이 가장 좋은 것으로 확인되었다.

미생물의 최적 배양을 위하여 최대 약효를 발생할 수 있는 미생물 농도 및 미생물 배양조건을 확립하였으며 배양 조건으로 최적 산도는 pH 6.5~7.0, 최적 발효 온도는 30℃, 통기량은 0.5~1.0vvm(air volume per volume of culture medium per minute), 배양시간은 18시간~20시간, 교반속도는 200rpm~300rpm, 접종원의 최적 농도는 10%이었다. 본 배양의 미생물 발효 scale은 산업용으로 적합한 5톤 수준까지 확보하였으며 최종 산물의 CMV 감염 억제 효율은 최고 82% 수준이었다.

미생물 발효공정 이후 고분자 천연물질의 최대 회수율을 보장할 수 있는 제품화 후공정을 확립하였다. 후공정에는 여액확보에는 Pall. sep 기기가 최적이었으며 정제 및 농축 공정에는 한외여과기(Ultra filtration), 건조공정 및 제형화 공정에는 동결건조기가 최적임을 확인하였다. 이상의 후공정을 통하여 *Serratia* Gsm01 균주 생성 고분자 천연물질의 활성은 90.3% 이상 유지하였다.

제형개발을 위하여 고분자 천연물질과 사용 가능한 약효 상승제를 선발한 결과 시험물질 4종 중 Yeast extract가 가장 우수한 약효를 보였으며 제형 중 약 10% 함량을 첨가할 때

그 효과가 *in-vitro* 시험 결과 93.1% 가장 우수하였고 5%를 첨가할 경우 효과대비 경제성이 우수하였다. 약효 상승제가 포함된 기초 제형은 경시변화 고온 학대 시험 결과 54℃ 4주 95% 이상 안정하였으며, 실제 농가의 농업용수 4종에 대한 활성 안정성을 95% 유지하였다.

친환경 부성분 선발을 통한 저독성 제형 개발 하였다. 제형에는 앞선 시험을 통하여 선발한 약효상승제가 포함되었으며 시험을 통하여 약효를 유지하며 현장에서 실제 사용에 불편하지 않는 부성분을 선발하였다. 그 결과 시험한 3종의 증량제 중 수화성과 분말도, 현수성, 수용성중 최적을 나타내는 식물유래 다당류 1종을 선발하였다. 선발된 다당류는 food grade 부성분으로서 인축과 환경에 안전한 물질이다. 또한 100% 수용해도를 나타내기에 최종 제형은 분말형 수용제 타입을 유지하였다. 기초 제형을 250배~1000배 희석하여 CMV에 대한 감염억제 약효를 확인한 결과 86%~93%를 유지하였기에 기준 희석배수를 1,000배로 확정하였다.

고분자 천연물질을 주성분으로 하는 최종 제형을 이용하여 물리성 검토를 실시하였고, 수분 함량 및 pH 조사에서도 안정한 것으로 나타났다. 최종 제형의 경시변화 고온 학대 시험 결과 CMV 감염 억제 활성을 유지하는 것으로 나타났다. 이렇게 최종 제형은 Pi0805-30%로 code 하고 2008년~2010년 포장시험용 시료로 제공하였다.

고분자 천연물질을 이용한 혼합제 개발에 대한 선행연구로 살충제, 살균제, 친환경농자재와의 혼용 안정성 점검을 실시하였다. 살충제와 혼용 시 Pi0805-30%는 CMV 감염억제 활성이 80% 이상으로 나타났고, 살충제 역시 진딧물에 대한 약효 평가 시 90%의 방제효과를 나타내어 혼용에 따른 문제점은 발견 할 수 없었다. 살균제와 친환경농자재 시험 결과도 안정하였다. 특히, 고분자 천연 물질과 최적화 혼합 가능한 친환경농자재 3종(해조추출물, 폴빅산, 수용성키토산)을 선발하여 수용액상에서 24시간동안 안정함을 나타내었고, 경시안정성에서도 54℃에서 8주 동안 안정한 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 추후 다양한 기능을 갖는 혼합제의 개발 가능성 사사하여 준다.

고분자 천연물질을 이용한 CMV 감염억제제에 대한 독성학적 안전성을 분석한 결과 급성 경구 독성시험에 대해서 반수치사약량(LD₅₀)치는 2,500 mg/kg B.W. 이상이었으며, 급성 경피 독성시험에서 반수치사약량(LD₅₀)치는 2,000 mg/kg B.W.이상이었다. 환경 어독성 시험 결과 잉어에 대하여 48시간 및 96시간 LC₅₀은 10.0 mg/L 이상이였다. 이상의 결과들은 고분자 천연물질을 이용한 CMV 감염억제제가 저독성 이하의 독성학적 특성을 나타내는 것으로 확인되었다.

제1협동기관(강원대학교) : 고분자 천연 물질의 CMV에 대한 농가실증시험 및 작물별 재배력 확립 및 이화학적 특성 분석

강원대학교 협동 1연구팀에서는 고분자 천연물질의 CMV에 대한 농가실증시험 및 작물별 재배력 확립 및 이화학적 특성 분석 연구하였다.

원예 작물 재배 농가 실증 시험을 수행한 결과, 고분자 천연물질은 시설고추(마니파)에

서 바이러스에 대한 억제 시험 결과 약 63.8% 감염억제효과를 나타내었다. 시험이 실시된 시설고추의 경우 고분자 천연 물질이 처리된 처리구가 무처리 대비 개수는 21%, 무게는 28%, 주당개수는 32% 증가하였다. 이러한 결과는 CMV의 감염이 억제된 처리구가 정상적인 생육을 나타낸 반면 무처리구는 CMV에 의하여 정상적인 생육이 이루어지지 않아 수확량이 감소된 것으로 사료된다.

또한 고분자 천연물질은 노지고추(수퍼마니파)에 대한 바이러스 감염 억제 시험 결과 약 66.0% 감염억제효과를 나타내었으며 무처리 대비 고분자물질 처리구의 엽록소 함량이 14% 증가하였다. 처리 방법을 달리한 춘천에서의 고추 시험에서는 80.6%의 감염억제효과를 나타내었다. 이는 처리시기를 육묘상 1회 처리를 추가함으로써 생육초기에 바이러스 감염을 억제하는 작용이 더 컸다고 할 수 있다.

피망에 대한 시험 결과 예방제 형태로 처리한 경우 약 70.2% 감염억제 효과를 나타내었다. 특히 CMV가 이미 발병된 피망 포장에 처리한 결과 CMV의 감염 억제 및 병 확산 속도가 현저히 감소했음을 알 수 있었다.

애호박에 대한 실증시험 결과 고분자 천연물질의 처리구는 무처리 대비 약 64.1% 감염억제효과 및 수확량 35.9% 증가량을 나타내었다.

담배에 대한 바이러스 감염 억제 실증 시험을 수행하였다. 오이모자이크바이러스(CMV)와 담배모자이크바이러스(TMV)의 의하여 복합적으로 발생한 담배 포장에 대하여 고분자 천연물질은 약 74.4% 감염억제효과를 나타내었다.

감자에 대한 PVY 감염억제 시험 결과 무처리 대비 85.7%의 방제 효과를 나타내었다. 이상의 결과를 정리하면 *Serratia* Gsm01 균주 유래 고분자 천연물질은 대부분의 작물에 대하여 무처리 대비 60%의 CMV 감염억제 효과를 나타내었고, 특히 바이러스병 피해 억제를 통하여 수확량 증가 및 식물 활력이 강화된 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과들은 고분자 천연물질의 초기 처리를 통하여 CMV 피해를 예방하며, 감염 후 처리를 통하여 CMV의 감염억제 및 비감염주로의 전염 속도를 억제하는 기능이 있음을 시사하고, 특히 고분자 천연물질은 식물 바이러스병과 관련하여 CMV를 포함한 광범위한 스펙트럼을 갖고 있음을 시사한다.

작물에 대한 생육 단계별 최적 처리 체계 확립을 위하여 CMV 발생 전 처리와 발생 후 처리로 나누어 시험을 하였다. 시험 결과 CMV 발생 전에는 1,000배 희석배수로 살포하여도 감염억제 효과(69.8%)가 인정되었다. 작물의 생육 단계별 시험을 실제 고추 포장에서 실시한 결과 육묘기 때와 정식 후 60일 이내 살포하는 것이 감염 억제 효과가 50~60%로 가장 효과적이었다. 그러나 생육 후반기나 수확기에 살포한 경우 방제효과가 거의 나타나지 않았다. 이는 생육 중 후반부에는 이미 바이러스가 감염되어 있어서 고분자천연물질의 감염 억제 효과가 나타나지 않은 것으로 사료된다. 약효의 지속기간을 실내에서 검정한 결과 처리 14일 까지 80%이상의 약효를 유지하는 하는 것으로 확인되었다.

한편 본 사업을 통하여 실증 사업 참여한 15개 농가를 대상으로 시제품 사용 후 반응을 분석한 결과 제품의 효과와 제형성에 대한 만족도는 매우 높았으며, 사업화시 가장 중요한

포인트는 정확한 사용법의 전달 및 CMV의 감염 특성에 대한 설명이었다. 이는 발병 초기에 살포하는 기존의 살균제와는 달리 예방효과를 극대화하기 위한 방법이 기존 관행 처리법과 상이하기 때문인 것으로 사료된다. 또한, 본 개발 자제를 단순한 미생물제로 생각하는 농가가 대다수였으며 생화학제에 대한 홍보나 교육이 매우 절실한 것으로 나타났다. 본 제품의 분류는 일반 영양제로 판단하는 경향이 높았는데 이는 농가들이 바이러스에 피해를 영양 결핍에 의한 생육억제와 수확량 감소와 연계하고 있기에 발생한 것을 판단된다. 가장 우려하는 점으로는 제품의 특수성에 따른 고가의 소비자 가격이었으며, 사용하기에 적합한 포장 규격은 250g 이었다. 향후 구매 성향은 “무조건 구매한다.”는 의견과 “가격이 결정된 후 구매한다.”라는 의견이 주를 이루었다.

이상의 다양한 시험을 통하여 최적 사용법을 선정하였다. 우선 CMV의 감염 억제를 위해서는 육묘 상에서 1회 처리한 후 작물 정식 15일 후 14일 간격으로 3~4회에 걸쳐 1,000배 희석하여 엽면 시비하는 것이 가장 효과적이다.

고분자 천연물질 이용한 CMV 감염억제 제품의 입도를 분석한 결과 95%가 500 μ m 이하였다. 제품의 수화성은 500ml 증류수에 5g의 분말이 모두 1분 안에 가라앉아 수화성도 우수하였으며 수용성도 분량의 증류수에 시료를 100배 희석 수준으로 넣고 10초가 저어주면 모두 용해되는 것으로 확인되었다. 완전히 용해된 후 pH는 7.00으로 중성을 나타내었다.

고분자 천연물질 원제/제품 품질 관리법을 확립하기 위하여 총 4가지 방법을 비교 검토한 결과 명아주를 이용한 Bio-assay가 가장 신속한 시간에 정확히 항바이러스 특성을 표현해주는 것으로 나타났다. 따라서 고분자 천연물질 품질관리법으로 명아주를 이용한 간이검정법을 확정하였다.

고분자천연물질 제품의 54 $^{\circ}$ C 고온학대조건 경시변화 시험 결과 6주까지 외관, 수화성 분말도, 항바이러스활성이 보존되는 것으로 확인되었다. 따라서 제품의 약효 보증기간은 3년인 것으로 판단된다. 또한 pH 3~pH 9 범위 내에서 안정하였으며, 수용액 상태에서도 24시간까지 잘 보존되는 것으로 나타났다.

고분자 천연물질과 살균제 7종과 살충제 6종 그리고 영양제 6종을 혼용한 결과 수용액 상태로 유지된 모든 시료에서 48시간까지 CMV 감염억제효과를 유지하는 것으로 나타나 혼용에 따른 활성 억제 현상은 없었다.

제2협동기관(강원대학교) : 고분자 천연 물질의 CMV에 대한 작용기작 규명 및 생물활성적 특성분석

강원대학교 제 2협동 연구팀은 고분자 천연물질의 CMV에 대한 작용기작 규명 및 생물활성적 특성 분석 연구를 수행하였다.

고분자 천연물질은 CMV 바이러스의 국부감염기주인 *C. amaranticolor*에서 항바이러스 억제 실험 결과 93.4%의 감염억제율을 나타내었다. 전신감염기주인 *N. tabacum cv. Xanthi-*

nc에서 73.7%의 감염억제율을 나타내었다.

바이러스 방제제의 가장 중요한 요소인 식물체내에서 항바이러스 효과를 나타내는 고분자 천연물질의 전신이행성 검토를 위하여 농축한 고분자 천연물질(crude extract) 시료를 바탕으로 담배에서 수행한 결과 *Serratia* Gsm01의 바이러스 억제 시 전신이행성을 관찰 할 수 있었다.

분자 생물학적인 방법을 기초로 하여 고분자 천연물질의 CMV에 대한 작용기작 구명을 하였다. DAS-ELISA에 의한 검정에 의하여 바이러스 접종 후 5일 및 10일째 되는 시점에서는 건전식물체에 비하여 바이러스 농도의 수치가 다소 높았으나, 15~20일째 되는 시점에서는 건전 식물체의 바이러스 농도의 수치보다 낮거나 유사한 경향을 나타냄으로서 바이러스가 억제되는 현상을 나타내었다.

정제한 바이러스를 이용하여 항바이러스를 검정을 한 결과 50pmol의 CMV-Y 접종원에 대해서는 100%의 병징 발현 억제 효율을 나타내었으며 120pmol에서 60%의 병징 발현 억제를 나타내었다.

RT-PCR에 의한 효과 검정 결과 접종 후 20일 경과할 때까지도 RT-PCR에 의한 CMV RNA3 CP gene의 특이적인 증폭 산물이 발견되지 않아 고분자 천연물질이 바이러스의 감염 및 증식을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다.

DOT-Blotting 검정과 Western-Blotting으로 본 단백질 분석 결과 고분자 천연물질을 도말 처리하지 않고 CMV-Y의 조즙액 만을 접종한 식물체는 probe와 반응을 하였다. 반면에, 고분자 천연물질을 도말 처리한 *N. tabacum* cv. Xanthi-nc 의 경우는 접종 후 5일 간격으로 20일까지 증식한 식물체 모두가 probe와 반응하지 않아 바이러스의 감염 및 증식을 억제하는 효과가 있음을 나타내 주었다.

식물체내 바이러스 저항성 유발 물질의 생성을 확인하기 위하여 Phenylalanine Ammonia 분석, Peroxydase 분석, Phenol 함량 분석을 수행하였다. 고분자 천연물질 처리에 의하여 세 항목의 효소 활성이 증가 되었고 이는 고분자 천연물질에 항바이러스의 효과를 가지는 어떠한 물질이 함유되어 있는 고분자 구조로 판단할 수 있다. PR-1b gene 발현 분석에서도 고분자 천연물질 처리구에서 PR gene이 발현하여 식물 자체에서 전신저항성을 획득하는 것으로 나타났다.

고분자 천연물질 원제의 주요 원에 작물에 대한 생물 활성적 특성 분석을 위하여 오이, 피망, 토마토에 대하여 항바이러스 효과검정을 하였다. 그 결과 무처리에 대비하여 처리구는 감염억제 활성을 나타내어 다양한 기주에서도 활용이 가능할 것으로 본다.

단독감염에 따른 고분자 천연물질의 감염억제효과 검정에서는 CMV가 85.3%, TMV가 70.5%, PVY가 72.6%의 효과를 나타내었다. 또한 3종의 바이러스를 CMV+PepMoV, CMV+PMMoV, PepMoV+PMMoV와 같이 조합한 뒤 복합감염 시켰을 경우 고분자 천연물질을 처리한 고추에서 접종 후 7일까지의 감염 지연억제 효과를 볼 수 있었다. ELISA 검정을 통한 검정에서 복합감염의 형태는 바이러스 농도가 무처리에 대비하여 줄어들었지만 단독감염

의 형태보다는 다소 높은 바이러스 농도를 나타내었다.

피망 포장에서 채취한 감염 엽을 PCR 진단법에 의하여 진단한 결과 CMV와 TMV로 예상되는 바이러스가 복합적으로 발생되었음을 확인하였다. 이 지역에서의 고분자 천연물질 처리에 의한 바이러스 억제율 조사를 3차에 걸쳐 수행한 결과 70% 이상의 높은 방제 효과를 나타내어 복합감염 형태에서도 고분자 천연물질의 바이러스 예방효과는 뛰어나다고 판단되었다.

고분자 천연물질의 주요 원예 작물에 대한 약해 검정은 실내와 실외 포장에서 고추, 배추, 감자 등에 수행하였다. 시험결과 외관상 나타나는 약해는 관찰할 수 없으므로 시험 약제는 안전하다고 판단된다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 국내·외 최초로 고분자 천연물질을 이용하여 친환경적 *cucumber mosaic virus* (CMV) 방제 기술의 상품화
- 농민의 작물 생산 현장애로사항 해결과 소득증대 극대화
- 해외 수출을 통한 시장 개척과 외화 획득
- 해외로부터 수입되고 있는 항바이러스제 유사 제품에 대체 기술로 국내 산업보호
- 적용 확대에 의한 기타 주요 식물바이러스병 방제제 개발을 위한 자료 활용
- 대량 생산을 통하여 토양미생물제제로 등록
- 시장 규모를 분석하여 친환경유기농자재로 제품력을 향상
- 본 연구개발의 산업화 성과물은 직접 제조한 후 기존의 대리점, 농협, 국가보조사업, 컨설팅 사업을 통하여 직접 보급
- 국내 사업 확대를 위하여 Gsm01 군주의 CMV 방제용 고분자물질을 원료의 형태로 전문 마케팅 기업에 판매 공급
- 국내 시장의 정착과 더불어 KOTRA, 중소기업진흥회를 통하여 해외수출을 타진
- Gsm01 군주의 CMV 방제용 고분자물질의 생물농약 등록을 위한 물질 동정 및 안전성 분석

시험을 위한 국가 과제 추가 도출

SUMMARY

I. Title

Industrialization of environmental-friendly control method of CMV using a novel high molecules originated from domestic microorganism *Serratia* Gsm01

II. Purpose and necessity of research and development

Cucumber mosaic virus (CMV) is a plant pathogenic virus in the family Bromoviridae. It is the type member of the plant virus genus, Cucumovirus. It is 28nm~30nm in diameter with a single strand. This virus has a worldwide distribution and a very wide host range, like cucumber, tomato, eggplant, pepper, melon, watermelon, melon, lettuce, cabbage, radish and 39, and other 117 species of plants is infected with this virus. Symptoms seen with this virus include leaf mosaic or mottling, yellowing, ring spots, stunting, and leaf, flower and fruit distortion. Farmers growing large variety of crops are the main group suffering from the catastrophic economic loss due to CMV. Damage caused by CMV in peppers is estimated to be at least 300 billion won or more. Thus, requiring the development of CMV control agents. CMV can be effectively controlled and the product is not well known. Additionally, development of the environmental-friendly agricultural products and chemicals to control CMV is of utmost necessity. The ultimate goal of this study, is to develop origin of the indigenous microbial polymers using natural materials *cucumber mosaic virus*(CMV) control technology for the environmental-friendly ways and its industrialization

III. Content and scope of research and development

The scope of this project research was conducted into three parts. Pioneer institute organized the mass production of natural substances in the polymer system, the development of eco-friendly formulations technology development and infusion was performed. Details of the first polymer of natural materials to build industrial mass production system increased dosage required for effectiveness, was selected. Selected on the basis of the results and further development of less toxic formulations investigated the

possibility of mixture. The final selected strains of *Serratia* Gsm01 resulted polymer formulations of natural substances for toxicological safety analysis.

A cooperative organization, Kangwon National University researchers and carried out experiments on first polymeric natural substances against CMV. Physicochemical characterization were also carried out. Demonstration of a horticultural crop growers on crop growth stages throughout the processing system and the optimal usage has been established. Moreover, HMNS product analysis and physicochemical properties of the prototype was carried out to establish the quality management system.

For the final formulation in the field of environmental factors that can cause stability and mixed with other seeds that may occur during re-reduction and drug stability was also tested. Mechanism of action, biological activities were also carried out for the newly developed environmental-friendly agent against CMV.

IV. Results

Subjective research team : Development of mass production system construction of the high-molecular natural material, the environmental trapezoid technical establishment which hits and mixture system development

Mass production system constructed by the high-molecular natural substances, (HMNS) industrialization mass production system of the high-molecular natural material constructed from the environmental technical establishment and mixture system which is part of research development.

For mass production system *Serratia* Gsm01 strain which are an antiviral microbe the ultimate medium for its growth is developed.

The industrialization medium developed is considered as economical efficient for the optimization and the production of antiviral substance because of its high content of carbon (glucose), soybean meal and peptone(nitrogen). The medium of these ingredient put out the oil content optimum union carbon source and nitrogen were confirmed to be in the ratio of 1:4 or 1:1.

For the optimum and consistent growth of the microbe, microbe cultivation condition is established. The growth of microbes was found to be optimum at 30°C temperature, 6.5~7.0 pH, 0.5~1.0 vvm(air volume per volume of culture medium per minute), for 18~20 hours, at speed 200rpm~300rpm, the consistency of inoculation circle was 10%. The scale up production obtained was about 5 tons. CMV infection suppression

efficiency of the final product was observed to be about 81% .

After the fermentation of microbial product obtained was macromolecular substance (polymer). Then the natural product obtained was further subjected to purification by using various secondary process like Pall. sep, Ultra filtration and freeze dryer. The natural product obtained from *Serratia* Gsm01 using these technique also maintained high molecular natural material for about 90.3% or more.

Among the 4 different ingredients in HMNS yeast extract was found to be efficient. 10% yeast extract was found to be better to get the powder formulation of about adding effect of 93.1%. 5% east extract was also found to be similar as 10% and it was found to be stable at 54°C for 4 weeks and maintained its activity for about 95 % in various water sources.

The low toxic powder formulation was prepared from 3 natural macromolecule substance. Among 3 one of the best formulation was selected for the mass production after performing their physicochemical characterization. The polysaccharide which is selected as food grade accessory ingredients rises is the material was found to be safe. It also showed, 100% solubility to water. Moreover, 250~1000 times diluted HMNS showed about 86%~93% control efficacy against CMV virus.

The HMNS product has stable physical conditions like pH and water content. The product was sample distributed to farmers giving code Pi0805-30% from the year 2008~2010 for field test.

Furthermore, the HMNS and mixture formulations were developed and its effectiveness was tested. The mixture formulation of both HMNS and insecticide mixture showed 80% CMV suppression while its showed about 90% effectiveness as an ahpid control. Also mixture of fungicide and environment-friendly agricultural materials was stable. Additionally mixture of HMNS with one of each seaweeds extract, fulvic acid and chitosan were stable at 24h in soluble condition and at 54°C for 8 weeks.

Acute oral poisonous test safety analysis half homicide. quantity (LD50) was found to be 2,500 mg/kg B.W. and acute sclerite poisonous test and quantity (LD50) was found to be above of 2,000 mg/kg. Poisonous test result carp for about 48 hours and 96 hours LC50 was found to be above of 10.0 mg/L. The results of above were confirmed that anti-CMV infection HMNS has less toxicity.

First research team : Quality analysis of high-molecular natural substance against CMV under green house, guideline of crop management, and its physiological characterization

Kangwon National University performed the chemical and physiological test of HMNS showing antiviral effect against CMV. HMNS showed about 63.8% more control effect against CMV in pepper than the control under greenhouse condition. HMNS treatment on pepper increased control effect about 21% fruit yield and 28% weight more than the control plants.

Additional experiments carried out in another pepper field also showed antiviral effect about 66.0% more than control plant and chlorophyll content was increased by 14%.

The experiment performed in chuncheon differed from the greenhouse. Treatment of HMNS showed about 80.6% control effect against CMV in pepper. Infection was more suppressed in seedlings and early stage treatment. Furthermore, HMNS treatment on pepper suppressed the CMV by 70.2%

While its treatment in pumpkin showed the control effect of 64.1% and its green fruit production was increased by 35.9%.

Antiviral assay on tobacco was performed. This antiviral assay against CMV and TMV by HMNS showed about 74.4% control effect.

The test was also performed against PVY. The control effect observed was found to be 85.7% more than control potato plant.

1000th time diluted HMNS was also able to suppress the viral infection by 69.8%. Liquid formulation of antiviral substance was stable for 60 days and was able to suppress virus about 50~60%. The treatment of HMNS in infected plant at 14th day could reduced the disease symptoms by 80%. The control efficacy of HMNS was found to be significantly effective when treated in seedling at interval of 15 days for first 4 times and then at 14th day interval for the last time.

5g of HMNS in 500ml of water was used as standard treatment concentration and this was the best concentration which suppressed CMV infection by 95%. The 100th time diluted formulation was completely soluble in water with pH of 7 resulting it to be reliable biopesticides.

The HMNS production was stable at 54°C for 6 weeks and the powder formulation was stable for 3 years. The aqueous solution was stable for 24hr within pH of 3~9. The mixture formulations of 7 fungicides, 6 pesticides and 6 herbal tonic along with HMNS was able to suppress the CMV infection.

Second research team : Mode of action of HMNS against CMV

Mechanism of action of HMNS was investigated in Kangwon National University by 2nd research team.

The antiviral infection ratio of HMNS on local host *C. amaranticolor* and systemic host *N. tabacum* CV *Xanthi-nc* was found to be 93.4% and 73.7% respectively when bioassay was performed.

The antiviral effect of crude extract of strain Gsm01 on symptoms development by yellow strain of CMV-Y was tested in tobacco. The local lesions on the treated leaves were very low compared to lesions on untreated leaves.

Quantification of the virus in the plant, the amount of CMV-Y accumulation in the leaves was analyzed at 5, 10, 15, and 20 dai by DAS-ELISA. The CMV-Y accumulation was slightly lower in crude filtrate treated leaves than in those with healthy plants until 20 dai, whereas only CMV-Y treated plants showed high values, however, after 15 and 20 dai accumulation of CMV-Y decreased.

The accumulation of CP gene or coat protein by CMV-Y in the plant leaves was determined using RT-PCR, dot blotting and western blotting analysis. The CP genes were not detected on treated leaves throughout the experiment days(5-20 day) by RT-PCR and dot blotting and also coat proteins were not detected by western blotting.

Phenylalanine ammonia assay, peroxidase assay, phenol content was found to be increased in the leaves of plants treated with HMNS.

The expression of PR-1b genes was studied at 6 DPI. The expression of the gene was observed in the case of HMNS treated and HMNS treated plus CMV-Y inoculated leaves, however, based on the band intensity of the expressed gene products, it was observed that the expression of the PR-1b gene was more in HMNS treated, CMV-Y inoculated plants compared with HMNS treatment alone. The expression was not observed in the case of healthy non inoculated and CMV-Y inoculated leaves of tobacco plants.

The above results showed that the HMNS have wide host range of antiviral effect in different plants like bell pepper. The HMNS showed about 82.5%, 79.1% and 78.0% suppressive effect against CMV and TMV respectively when occurred individually. PCR was performed using the leaves collected from the field infected with CMV and TMV virus.

The expression of disease suppressive gene was found to be higher in the HMNS treated plants leave than the control ones. Thus, this result shows that the expression of disease suppressive gene was increased by 70% in HMNS treated plants than untreated

ones.

Phytotoxicity test of HMNS was performed on different horticultural crops like pepper, chinese cabbage and potato. There was no phytotoxic effect on the plant tested. Thus HMNS is safe and has no phytotoxicity.

V. Application of research result

- Commercial use of the environmental friendly formulation of high-molecular natural substance at the domestic and international level against cucumber mosaic virus (CMV).
- Crops production management and income augmentation of farmer.
- Market opening up and foreign currency acquisition through an overseas export.
- Domestic industrial protection by using substitutional technique of antiviral system similar product which is imported from foreign countries.
- The data application for the development of antiviral product to protect plant virus disease by extension of application.
- Registration of soil natural microbial biopesticide through mass production.
- Analysis of a market size of environmental organic materials for the improvement of product.
- Direct supply through the commercial agent, agricultural association, national cadence enterprise and consulting enterprise after the manufacturing of the industrialization result of research development.
- Supply high polymer of Gsm01 strain for anti-CMV in form of the materials to the professional marketing enterprise for extension of a domestic enterprising.
- Location of domestic market and promotion of overseas export by KOTRA and small and medium business corporation.

- Identification of antiviral substance for its registration as biopesticide of high polymer of Gsm01 strain for anti-CMV.

CONTENTS

Summary	2
Chapter 1. Introduction	29
Section 1. Significant of research	29
Section 2. Purpose of research	31
Section 3. Requisite of research	31
Chapter 2. Current situation in domestic foreign technology	33
Section 1. Current situation in domestic technology	33
Section 2. Current situation in foreign technology	34
Section 3. Situation of this research	34
Chapter 3. Research contents and results	36
Section 1. Development of mass production systems of HMNS and development of environmental friendly refining technique	36
1. Development of mass production systems of HMNS	36
A. Development of development of industrial microbial fermentation medium and condition	36
(1) Selection of microbial basic medium of HMNS	36
(a) <i>In-vitro</i> microbial cultivation medium	36
(b) Selection of industrial fermentation medium	37
(c) Development of industrial fermentation medium development and condition	40
(2) Analysis of physical and chemical characteristics in selected industrial medium of (<i>Serratia</i> Gsm01)	41
B. Development of optimal production medium and industrial fermentation condition in jar 5L ~ 5,000L levels	42
(1) Inspection of industrial medium of optimal culture period using 5L jar fermenter	42
(2) Inspection of industrial medium of optimal culture period by Scale-up	44
(3) Selection of industrial medium for mass culture	

and microbial fermentation condition (50L pilot plant)	45
(a) Selection of industrial medium and condition	
in 50L pilot plant	45
(b) Development optimal culture condition	
by variation medium at Scale-up process	47
(4) Selection of industrial medium for mass culture	
and microbial fermentation condition (500L pilot plant)	49
(a) Selection of industrial medium and condition	
in 500L pilot plant	49
(b) Inoculum condition in 500L pilot plant	52
(c) Inspection of pure microbial culture in 50L pilot plant or	
500L pilot plant	55
(5) Development of industrial fermentation medium development	
and condition in 5,000L levels	56
(a) 5,000L pilot plant mass culture using selected	
industrial medium	56
(b) Effect of density and culture period of inoculum	58
(c) Inspection of representation of 5,000L cultivation process	59
C. Development of post production system by product	59
(1) Development of active material substance for post production	59
(2) Development of HMNS mass product for post production	61
(a) Selection and filtration method of cell	61
(b) Analysis of microbial existence in supernatant	63
(c) Analysis of microbial death cell in supernatant	64
(d) Filtration and enrichment process of tablet	65
(e) Dry process	66
2. Development of HMNS along with other formulations	68
A. Analysis of inspection for mixture formulation development	68
B. Inspection of activity stability of mixture formulations	69
C. Stability analysis of HMNS and mixture formulations	70
(1) Stability analysis using original HMNS and mixtures	70
(2) Stability analysis in liquid condition	71
(3) Analysis of contempt stability mixture	71
(4) Analysis of agriculture water in different sites	73
(5) Inspection of mixture ratio of mixtures formulations	73

(6) Inspection of organism activity about selected powder	74
3. Development of low toxic powder for environment friendly substance	75
A. Analysis of activity material characteristics	75
B. Development of low toxic powder for environment friendly substance	75
(1) Environment friendly substance search of carrier	76
(a) Selection of environment friendly carrier	76
(b) Stability inspection of environment friendly carrier	77
(c) Investigation of physical characteristics by prescription	78
(d) Inspection of microbial activity by prescription	79
C. Basic formulation research and production of HMNS	80
(1) Basic formulation research of HMNS	80
(a) Manufacture of formulation	80
(b) Inspection of physical characteristic of formulation	81
(c) Stability analysis of formulation	82
(2) Test sample production	83
(a) Sample production	83
(b) Treatment of plant with diluent (Pi0805-30%)	84
(c) Packaging of final product formulation	84
4. Development of HMNS along with other mixture	85
A. Stability test of mixture formulations on treatment	85
(1) Stability test of HMNS along with pesticides	85
(2) Stability test of HMNS along with fungicides	86
B. Development of mixture formulations	88
(1) Stability function of liquid condition	88
(2) Stability of contempt test	89
5. Toxin stability analysis of HMNS	90
A. Seed germination test of HMNS	90
B. Acute oral virulence test of HMNS	91
C. Acute dermal virulence test of HMNS	97
D. Fish toxicity analysis on HMNS	103
Section 2. Catabolic characterization and PGPR effect of HMNS in field	107
1. Field test of farm house of principle crops	107

A. Production of crops area	107
(1) Reference of virus of principle crops	107
(2) Analysis of red crop production area	108
(3) Trend inspection of principle virus in pepper	111
B. Field test of farm house of principle crops	112
(1) Field test of pepper and bell pepper	112
(a) Green house pepper	112
(b) Field pepper I	114
(c) Field pepper II	116
(d) Bell pepper	118
(2) Field test of young pumpkin	119
(3) Field test of tobacco	120
(4) Field test of potato	122
2. Development of optimal treatment system of crop planting	123
A. Inspection of CMV suppression by HMNS dilution	123
B. Inspection of consistence effect of HMNS	124
C. Treatment of time period test with Pi0805-30%	125
3. Publication of crop management technical manual	125
4. Monitoring and marketing of field test of crops	133
5. Quality maintenance of HMNS	135
A. References of plant virus disease and host	135
B. Confirmation method of HMNS activity	136
(1) Inspection of CMV inoculum	137
(2) Analysis of suppressive factor on CMV infection	138
6. Quality analysis and catabolic characterization of HMNS	140
A. Size analysis with Pi0805-30% treatment	140
B. Wetability analysis with Pi0805-30% treatment	141
C. Water solubility analysis with Pi0805-30%	141
D. Catabolic characterization of Pi0805-30%	142
7. Stability analysis of environmental factor of HMNS	142
A. Stability of cultivation temperature of <i>Serratia</i> Gsm01	142
B. Stability of pH of <i>Serratia</i> Gsm01	143
C. Stability of Temperature of U/F filtration tablets	143
D. Stability of pH of U/F filtration tablets	144
E. Contempt analysis of HMNS product	145

F. Inspection of stability in liquid condition of HMNS product	146
G. Inspection of stability on pH HMNS product	147
8. Stability analysis of HMNS along with mixture	
of other formulations	147
A. Stability analysis of HMNS with fungicides	147
B. Stability analysis of HMNS with pesticides	148
C. Stability analysis of HMNS with herbal tonic	150
Section 3 Mode of action of HNMS against CMV	152
1. Analysis of HMNS on different plants infected by CMV	152
A. Antiviral assay on local host	152
B. Antiviral assay on systemic host	153
C. Crude extract	154
(1) Antiviral bioassay on tobacco leaf using “Crude extract”	155
(2) Antiviral bioassay on tobacco plant using “Crude extract”	156
(3) Analysis of symptoms expression period after treatment	
with “Crude extract”	157
2. Mechanism of HMNS of active substance against CMV	158
A. DAS-ELISA test	158
B. Antiviral effect of refined HMNS	159
C. RT-PCR	162
D. DOT-Blotting test	164
E. Western-Blotting	165
F. RNase effect of HMNS	166
G. Triggering ISR in Plant	167
(1) Phenylalanine Ammonia assay	167
(2) Peroxydase assay	168
(3) Phenol content assay	169
H. PR-1b gene expression assay	170
3. Quality analysis on different principle crops by using HMNS	171
4. Quality analysis of characterization of principle crops	
by using HMNS	173
A. Effective analysis of <i>in vitro</i> independent infection	173
B. Effective analysis of <i>in vitro</i> combination infection	173
(1) Effective analysis by symptom of combination infection form	173
(2) Effective analysis by ELISA of combination infection form	174

C. Effective analysis of field by infection form	175
(1) Investigation on suppression effect of powder product at bell pepper	175
(2) Investigation on physiological characteristic of powder product in bell pepper	176
(3) Investigation of virus expression type in bell pepper	177
5. HMNS phytotoxicity analysis on principle economic crops	179
(1) Phytotoxic analysis of HMNS original <i>in vitro</i>	179
(2) Phytotoxic analysis of HMNS product <i>in vitro</i>	180
(3) Field test phytotoxic analysis of HMNS product	182
(a) Pepper	182
(b) Potato	182
Chapter 4 Attainability of research goal and contribution to related field	184
Section 1 Attainment of research aim	184
Section 2 Contribution to related field	185
Chapter 5 Attainment of research aim and future plan	187
Section 1 Industrialization plan	187
Section 2 Awareness of new and high technology to public	187
Section 3 Intellectual properties like patent and paper	188
Section 4 Additional research plan and application of research results	188
Chapter 6 References	189

목 차

요 약 문	2
제 1 장 연구개발과제의 개요	29
제 1 절 연구의 필요성	29
제 2 절 연구개발의 목적	31
제 3 절 연구의 범위	31
제 2 장 국내외 기술개발 현황	33
제 1 절 국외 수준 및 현황	33
제 2 절 국내 수준 및 현황	34
제 3 절 본 과제 연구결과의 위치	34
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	36
제 1 절 고분자 천연물질의 대량생산 시스템 구축, 친환경 제형화 기술 확립 및 혼합제 개발	36
1. 고분자 천연물질의 대량생산 시스템 구축	36
가. 산업용 미생물 발효 배지 개발 및 조건 확립	36
(1) 고분자 천연물질 생산 미생물의 기본배지 선발	36
(가) <i>in-vitro</i> 미생물 배양배지를 선발	36
(나) 산업용 미생물 발효 배지 선발	37
(다) 산업용 미생물 발효 배지 개발 및 조건 확립	40
(2) 선발된 산업용 배지에서 미생물 원제(<i>Serratia</i> Gsm01)의 물리·화학적 특성 분석	41
나. jar 5L ~ 5,000L 수준에서의 최적 생산 배지 및 미생물 발효 조건 확립	42
(1) 5L jar fermenter를 이용한 산업용 배지의 최적배양시간 점검	42
(2) Scale-up에 따른 최적배양시간 점검	44
(3) 대량배양을 위한 산업용 배지 선택과 미생물 발효조건 분석(50L pilot plant)	45
(가) 50L 발효조에서 산업용 배지의 선택과 배양조건	45
(나) Scale up 과정에서 변형 배지를 통한 최적 배양 조건 확립	47
(4) 대량배양을 위한 산업용 배지 선택과	

미생물 발효조건 분석(500L pilot plant)	49
(가) 500L 발효조에서 산업용 배지의 선택과 배양조건	49
(나) 500L 발효조에서 접종원에 따른 배양조건	52
(다) 50L pilot plant와 500L pilot plant 수준에서의 배양에 따른 재현성 검정	55
(5) 5,000L 수준에서의 산업화 생산 배지 및 미생물 발효조건 확립	56
(가) 선발된 산업용 배지를 이용한 5,000L pilot plant 대량 배양	56
(나) 접종원의 농도와 배양시간에 따른 영향	58
(다) 5,000L 배양 공정에서의 재현성 검정	59
다. 제품 생산을 위한 후공정 시스템 개발	59
(1) 후공정 개발을 위한 활성 물질 분획	59
(2) 고분자 천연물질의 대량생산 후공정 개발	61
(가) 세포의 분리 및 여과 방법의 선택	61
(나) 배양 상층액의 미생물 잔존 분석	63
(다) 배양 상층액의 미생물 사멸 공정	64
(라) 여과 정제 및 농축공정	65
(마) 건조공정	66
2. 고분자 천연물질과 혼합/혼용 가능한 약효 상승제의 개발	68
가. 혼합제 개발을 위한 약효 상승제에 대한 조사 분석	68
나. 배양 원액과 약효 상승제의 혼합/혼용시 활성적 안정성 조사	69
다. 고분자 천연물질 원제와 약효상승제의 혼합/혼용 시 안정성 분석	70
(1) 원제와 약효상승제의 혼합/혼용 시 안정성 분석	70
(2) 수용액상에서의 안정성 점검	71
(3) 약효상승제의 경시안정성 분석	71
(4) 지역별 농업용수에 대한 안정성 분석	73
(5) 약효상승제의 최적 혼합비율 점검	73
(6) 선발된 제형에 대한 생물 활성 검정	74
3. 친환경 부성분 선발을 통한 저독성 제형 개발	75
가. 활성 물질의 특성 분석	75
나. 친환경 부성분 선발을 통한 저독성 제형 개발	75
(1) 증량제(carrier)의 친환경적 부성분 탐색	76
(가) 친환경적 증량제 선발	76
(나) 친환경적 증량제의 안정성 점검	77
(다) 처방에 따른 물리성 검토	78
(라) 처방에 따른 생물 활성 검정	79

다. 고분자 천연물질을 이용한 기초 제형화 연구 및 시제품 생산	80
(1) 고분자 천연물질을 이용한 기초 제형화 연구	80
(가) 제형 제조 레시피	80
(나) 제형 제조의 물리성 검토	81
(다) 제형 제조의 안정성 분석	82
(2) 시험용 시제품 생산	83
(가) 시제품 생산	83
(나) 포장시험용 시제품(Pi0805-30%)의 최적 희석배수 점검	84
(다) 최종 제형 포장 및 단위 설정	84
4. 고분자 천연물질과 타농자재의 혼합제 개발	85
가. 타농자재와의 동시살포를 통한 고분자 천연 물질의 안정성 점검	85
(1) 살충제용 농자재와의 동시 살포를 통한 안정성 점검	85
(2) 살균제용 농자재와의 동시 살포를 통한 안정성 점검	86
나. 다기능성 혼합제의 개발	88
(1) 수용액상에서의 안정성 점검	88
(2) 경시 안정성 점검	89
5. 고분자 천연물질 제품의 독성학적 안정성 분석	90
가. 고분자 천연물질 제품의 식물 발아 시험	90
나. 고분자 천연물질 제품의 급성경구독성	91
다. 고분자 천연물질 제품의 급성경피독성	97
라. 고분자 천연물질 제품의 환경 어독성	103
제 2 절 고분자 천연 물질의 CMV에 대한 농가실증시험	
및 작물별 재배력 확립 및 이화학적 특성 분석	107
1. 주요 원예 작물의 농가 실증 사업	107
가. 주요 원예작물의 생산지 분석	107
(1) 주요 원예 작물의 바이러스 발병에 관한 문헌조사	107
(2) 고추에 대한 재배면적과 생산지 분석	108
(3) 고추에 발생하는 주요 바이러스병 경향조사	111
나. 주요 원예 작물 농가 실증 사업	112
(1) 고추와 피망에서의 농가 실증 사업	112
(가) 시설 고추	112
(나) 노지 고추 I	114
(다) 노지 고추 II	116
(다) 피망	118
(2) 애호박에서의 농가 실증 사업	119

(3) 담배에서의 농가 실증 사업	120
(4) 감자에서의 농가 실증 사업	122
2. 주요 원예 작물에 대한 생육 단계별 최적처리 체계 확립	123
가. 고분자 천연 물질 원제의 희석에 따른 CMV 감염억제효과 검정	123
나. 고분자 천연물질의 약효 지속효과 검정	124
다. Pi0805-30% 시제품에 대한 처리 시기 시험	125
3. 주요 원예 작물에 대한 재배력 확립 및 사용 매뉴얼 작성	125
4. 주요 원예 작물 실증 사업 농가의 제품력 모니터링 및 마케팅 포인트 설정	133
5. 고분자 천연물질 제품의 품질관리 시스템 확립	135
가. 바이러스와 기주작물에 대한 문헌조사	135
나. 고분자 천연물질의 활성화에 대한 간이 확인법 개발	136
(1) CMV 최적 바이러스 접종원 농도 검정	137
(2) CMV 감염억제효과 검정방법	138
6. 고분자 천연물질에 대한 이화학적 특성 분석	140
가. Pi0805-30% 시료에 대한 입도 분석	140
나. Pi0805-30% 시료에 대한 수화성 분석	141
다. Pi0805-30% 시료에 대한 수용성 분석	141
라. Pi0805-30% 시료의 이화학적특성	142
7. 고분자 천연물질의 환경 요소에 대한 안정성 분석	142
가. <i>Serratia</i> Gsm01의 배양여액의 온도에 대한 안정성	142
나. <i>Serratia</i> Gsm01의 배양여액의 pH에 대한 안정성	143
다. 고분자 천연물질 U/F filtration 정제물의 온도에 대한 안정성	143
라. 고분자 천연물질 U/F filtration 정제물의 pH에 대한 안정성	144
마. 고분자 천연물질 제품 경시안정성 분석	145
바. 고분자 천연물질 제품 수용액상에서 안정성 점검	146
사. 고분자 천연물질 제품 pH에 대한 안정성 점검	147
8. 고분자 천연물질과 시판되는 타농자재의 혼용 안정성 분석	147
가. 살균제와의 혼용안정성 분석	147
나. 살충제와의 혼용안정성 분석	148
다. 영양제, 친환경농자재와의 혼용안정성 분석	150
제 3 절 고분자 천연 물질의 CMV에 대한 작용기작 규명 및 생물 활성적 특성분석	152
1. 고분자 천연물질에 의한 CMV 바이러스의 식물별 영향분석	152
가. 국부감염 기주에 대한 항바이러스 효과	152

나. 전신감염 기주에 대한 항바이러스 효과	153
다. 고분자 천연 물질의 전신이행성 검정(Crude extract)	154
(1) “Crude extract”의 담배 엽에서의 전신이행성 검정	155
(2) “Crude extract”의 담배 식물체에서의 전신이행성 검정	156
(3) 병징 발현 시기에 따른 “Crude extract”의 효과 분석	157
2. 고분자천연물질의 CMV에 대한 작용 기작 구명	158
가. DAS-ELISA에 의한 검정	158
나. 정제된 바이러스에 대한 항바이러스 효과 검정	159
다. RT-PCR에 의한 효과 검정 결과	162
라. DOT-Blotting 검정 결과	164
마. Western-Blotting으로 본 단백질 분석 결과	165
바. 고분자 천연물질의 RNase 효과 검정	166
사. 식물체내 바이러스 저항성 유발 물질의 생성 확인 시험	167
(1) Phenylalanine Ammonia 분석	167
(2) Peroxydase 분석	168
(3) Phenol 함량 분석	169
아. PR-1b gene 발현 분석	170
3. 고분자 천연물질의 주요 원예 작물에 대한 생물 활성적 특성분석	171
4. 고분자 천연물질의 주요 원예에 대한 감염 특징에 따른 생물 활성적 특성 분석	173
가. <i>in vitro</i> 상에서의 단독 감염 형태에 따른 효과 분석	173
나. <i>in vitro</i> 상에서의 복합 감염 형태에 따른 효과 분석	173
(1) 표징에 의한 복합 감염 형태에 따른 효과 분석	173
(2) ELISA에 의한 복합 감염 형태에 따른 효과 분석	174
다. 포장에서의 감염 형태에 따른 효과 분석	175
(1) 피망 포장에서의 제형 제품에 대한 바이러스 억제효과 검정	175
(2) 피망 포장에서의 제형 제품에 대한 작물의 생리적 특성 구명	176
(3) 피망 포장에서의 바이러스 발생 유형 구명	177
5. 고분자 천연물질의 주요 경제 원예 작물에 대한 약해 검정	179
(1) 고분자 천연물질 원제에 대한 실내 약해 검정	179
(2) 고분자 천연물질 제품에 대한 실내 약해 검정	180
(3) 고분자 천연물질 제품에 대한 소포장 약해 검정	182
(가) 고추에 대한 약해 검정	182
(나) 감자에 대한 약해 검정	182

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	184
제 1 절 연구개발목표의 달성도	184
제 2 절 관련분야의 기술 발전에의 기여도	185
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	187
제 1 절 실용화·산업화 계획	187
제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술 확산 계획	187
제 3 절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등	188
제 4 절 추가연구, 타연구에 활용 계획 등	188
제 6 장 참고문헌	189

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구의 필요성

식물바이러스는 농작물을 가해하는 병원체로서 그 크기가 20-1200nm이며 전자현미경으로만 관찰할 수 있는 미세한 생물체다. 또한 합성 배양기나 바이러스 자체적인 증식 활동 및 생리 대사 활동을 할 수 없으므로 살아있는 세포와 생물체에서만 증식하는 활물 기생체이다. 바이러스는 바이러스의 유전 정보를 지닌 핵산은 DNA 또는 RNA를 중심으로 핵산을 보호하는 외피단백질(coat protein)을 형성하고 있으나 바이러스의 종류에 따라 간혹 외막을 가진 것도 있다. 식물바이러스는 1576년 프랑스 식물학자 Clusius(de l'Ecluse)에 의해 최초로 발견한 툴립 모자이크병이 알려져 있으며, 병원체로서 식물바이러스가 연구대상이 된 것은 담배 모자이크병이 시초가 되었다(McKinney, 1929).

현재까지 알려진 바이러스는 전 세계적으로 약 2,000여종에 달하고 있으며, 크게 rhabdoviridae, bunyaviridae, reoviridae의 세 종류의 바이러스계, bromovirus, tobamovirus, potexvirus, potyvirus, nepovirus, tymovirus, closterovirus, rhabdovirus 및 cucumovirus군 등 다수의 RNA 바이러스와 geminivirus, baciliform virus 및 caulimovirus군의 DNA 바이러스로 분류되고 있다.

식물바이러스는 벼와 같은 식량작물을 비롯하여 채소류, 과수류, 화훼류 등 모든 재배 작물에 기주하며 피해를 입히는 것으로 알려져 있다. 식물바이러스병의 주요 병징에는 변색(discoloration), 모자이크(mosaic, mottle, color breaking 등), 괴사반점(necrotic spot), 둥근겹무늬(ring spot), 괴사줄무늬(streak), 위축(dwarf, stunt), 잎말림(leafroll, leaf curl), 증대(enation), 변형·기형(malformation) 등의 형태를 나타낸다.

식물바이러스의 전염 방식은 즙액전염, 종자전염, 접촉전염, 토양전염, 충매전염, 접목전염 등이 있으며 이 중 벌구, 매미충, 진딧물 등의 곤충에 의해 매개되는 충매전염이 가장 심각한 것으로 알려져 있다. 한번 감염된 식물바이러스는 우선 그 세포내에서 증식하고 다른 세포, 조직 및 기관에 이동하면서 증식하여 식물체에 병을 일으킨다.

국내에 알려진 바이러스는 오이모자이크바이러스(cucumber mosaic virus, CMV), 담배모자이크바이러스(tobacco mosaic virus, TMV), potato virus Y(감자바이러스Y, PVY) 등 약 150여종이 있으며, 특히 최근에는 농산물의 국제 교역량의 증가함으로 말미암아 국내에 존재하지 않는 병원성 식물 바이러스의 유입 가능성이 커지고 있는 실정이다.

오이모자이크바이러스(Cucumber mosaic virus, CMV)는 직경 28nm~30nm인 구형입자내에 외가닥 RNA를 함유한 식물바이러스다(그림 1). CMV는 접목 및 즙액 전염을 하며 진딧물과 같은 흡즙 해충에 의하여 주로 전염된다.

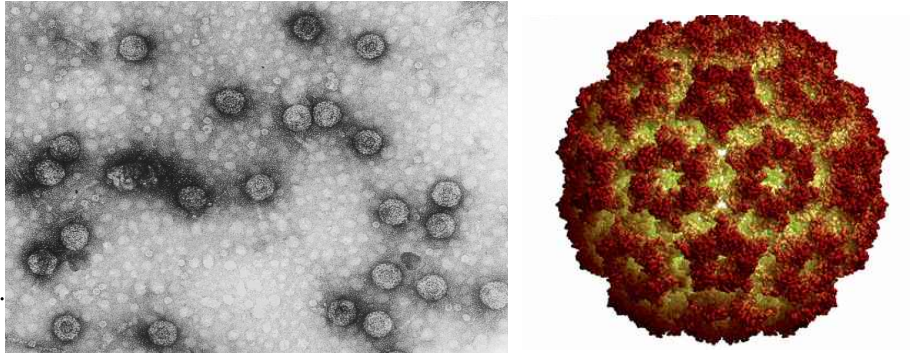


그림 1. CMV 전자현미경 사진

CMV는 오이, 토마토, 가지, 고추, 참외, 수박, 메론, 상추, 배추, 무 등 39과 117종의 식물에 감염을 일으키는 대표적 식물바이러스로서, CMV에 의하여 감염된 식물은 잎의 경우 처음 신엽에 황색으로 반문을 형성하고 또한 엽면에 작은 주름을 형성하면서 굴곡을 형성한다. 잎이 커짐에 따라서 황색모자이크 증상이 뚜렷해지며 주 전체가 위축한다(그림 2).



고추



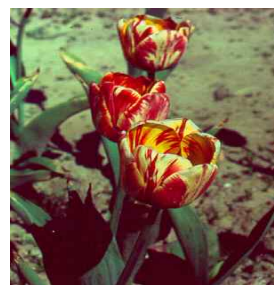
피망



오이



호박



튤립

그림 2. CMV에 감염된 경제 작물 사진

특히 CMV는 원예 작물을 재배하는 농가경영체에게는 치명적인 경제적 손실을 일으키고 있다. CMV에 의한 고추의 피해액은 최소 300억 원 이상으로 추정된다. 이에 CMV 방제제 개발을 요구하는 농민의 수가 급증하고 있으나, CMV를 효과적으로 방제할 수 있는 제품이 없는 실정이다. 이는 CMV의 독특한 특성으로 인해 CMV를 직접 제거하는 약제 방제법이 개발되지

못하고 있기 때문이다. 즉 CMV 증식을 저해할 수 있는 물질의 산업화가 어려우며, 다양한 경로를 통하여 감염되는 바이러스를 전신이행적으로 차단할 수 있는 물질 개발이 어렵기 때문인 것으로 알려져 있다. 따라서 농가 현장에서는 CMV에 의한 피해를 최소화하는 수준으로 바이러스를 관리하고 있다. 이러한 방제법으로는 조기진단법을 이용하여 바이러스 감염식물을 초기에 제거하여 확산을 막는 방법과 바이러스에 감염된 종묘를 선별 제거하는 방법 등이 있다. 또한 바이러스 저항성 식물을 교잡 육종하여 발병을 억제하는 방법도 많이 사용되고 있다. 그러나 이러한 방법은 모두 경종적 방법으로서 작기 중 CMV가 포장 내에 발생하였을 경우 부적합한 방법이다. 이에 많은 CMV 피해농가에서는 기존의 작기 중에 항상 사용 가능한 CMV 관리용 농자재의 개발을 요구하고 있다. 특히, 또한, 친환경 농산물에 대한 국민의 수요가 급증하고 있는 실정에서 화학물질이 아닌 천연물질을 이용한 CMV 방제제 개발이 절실하게 요구되고 있다.

제 2 절 연구개발의 목적

본 연구의 최종 목적은 국내 토착 미생물 기원 고분자 천연물질을 이용하여 cucumber mosaic virus (CMV)에 대한 친환경적 방제기술을 산업화하는 것이다.

제 3 절 연구의 범위

본 연구 사업의 범위 크게 대량생산 산업화 연구 분야, 생물활성 평가 및 사용법 연구 분야, 고분자천연물질의 작용 기작 구명 분야로 나누었으며 그 세부 내용은 아래와 같다.

1. 대량생산 산업화 연구 분야

- 고분자 천연물질의 산업화 대량 생산 system 구축
- 고분자 천연물질을 이용한 원제/ 제품 생산 후공정 확립
- 친환경 부성분 선발을 통한 저독성 제형 개발
- 고분자 천연물질을 이용한 원제와 제품의 경시 변화 특성 분석
- 고분자 천연물질과 혼합/혼용 가능한 약효 상승제의 개발
- 고분자 천연물질(원제/제품)과 타농자재의 혼합제 개발

2. 생물활성 평가 및 사용법 연구 분야

- 오이모자이크 바이러스(CMV) 억제제의 독성학적 안전성 분석
- CMV 억제제의 작물에 대한 재배 농가실증 시험
- 주요 원예 작물 재배 농가에 대한 생육단계별 최적 처리 체계 확립
- 고분자천연물질 원제와 제품에 대한 이화학적 특성 분석

- 고분자천연물질 원제와 제품의 품질 관리 시스템 확립
- 고분자천연물질 원제와 제품의 환경요소에 대한 안정성 분석
- 고분자천연물질과 시판되는 타농자재의 혼용 안정성 분석

3. 고분자천연물질의 작용 기작 구명 분야

- 고분자천연물질의 CMV에 대한 작용 기작 구명
- 고분자 천연물질의 주요 원예 작물 재배 농가에 대한 약해 검정
- 고분자 천연물질의 다양한 농약과 혼용, 교호살포 방법에 따른 생물활성 평가

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외 수준 및 현황

개념 정립 단계	✓	기업화 단계		기술 안정화 단계	
----------	---	--------	--	-----------	--

식물바이러스병의 방제는 바이러스 저항성 품종의 이용하고 윤작, 토양의 배수 및 통기를 원활히 하고 석회시용으로 pH를 높여 바이러스를 불활성화하는 방법과 밭 주변의 잡초 제거, 무독(virus-free)종묘의 육성, 열 치료(heat therapy)에 의한 방제(Kobus, 1889; Kunkel, 1936), 생장점 배양법(meristem culture), 식물 재배시기의 조절, 무병식물재배 등의 경종적 방법(Quiot 등, 1982), 바이러스를 매개하는 해충을 방제하는 방법(Harpaz, 1982), 바이러스 내성 식물체 개발(Lawson, 1990) 등의 방법이 연구되어왔다. 그러나 이러한 방제 법은 직접적으로 바이러스를 저해하거나 억제하는 것이 아니라 바이러스로부터 식물을 안전하게 보호하는 간접적인 관리방법이다. 따라서 포장에서 작물에 바이러스 병이 발생하였을 경우 방제가 매우 어려운 상황에 직면하게 된다. 이에 국외에서도 식물체에 직접 처리하여 바이러스의 감염을 억제할 수 있는 항바이러스제의 개발이 중요한 연구 관심사가 되어 왔다.

식물 바이러스 감염 억제 물질이 알려진 것은 1925년 Duggar 등이 식물(자리공)의 대사물질이 담배모자이크바이러스의 감염에 저해를 일으킨다고 보고한 후부터다. 현재 바이러스 저해제로는 고등식물이 생산하는 물질(Cheo, 1969; Grasso 등, 1978; Ragetli 등, 1962; Pottier 등, 1979; Taniguchi 등, 1979; Van kammen 등, 1961; Wyatt 등, 1969), 미생물이 생산하는 물질(Hirai 등, 1965; Hodgson 등, 1966; John 등, 1938; Mann 등, 1968; Mayhew 등, 1971) 등이 보고되어 있다. 식물바이러스의 저해물질을 생산하는 고등식물로는 명아주과의 명아주(Taniguchi 등, 1979; Yoshii 등, 1967; Yoshizaki 등, 1967), 상륙과의 자리공(Grasso 등, 1978; Wyatt 등, 1969), 쥐손이풀과의 제라니움(Cheo, 1969), 석죽과의 카네이션(Ragetli 등, 1962, Pottier 등, 1979) 등이 보고되어 있다. 그러나 이상의 식물로부터 유래된 천연물질의 경우 산업화를 위한 대량 생산이 불가능하여 산업화된 사례는 없었다.

또한 일본에서 1976년 tartaric acid, oxalic acid, fumaric acid, citric acid 및 alkali metal salts 등 유기산(organic acids)들의 혼합체와 ferric citrate, ferriclactate, glycerine 및 aluminum chloride 등의 지방산(fatty acids)과 당들이 ester 결합에 의해 이루어진 혼합체를 식물바이러스 방제제로 개발하였으나 실제 포장 적용 단계에서 식물 바이러스에 대한 항바이러스 효과는 매우 낮아 산업화가 되지 못했다.. 1981년 진균류인 *Basidiomycetes*를 100~250°C 범위의 암모니아수에서 배양할 때 생산하는 질소함유 다당류와 n-alkylamine과 sugar 및 salt의 결합체가 다양한 종류의 바이러스에 대한 감염 억제효과를 나타내는 것으로 연구되어졌으

나 이 또한 실제 포장 적용에 어려움과 약효가 낮은 문제점을 드러냈다(Enoki, 1981). 미국에서 1989년 5',5'- or 2',5'- or 3',5'-phyrophosphorylated dinucleotides를 식물 뿌리 및 잎에 처리하였을 때 식물 바이러스인 TMV의 복제(replication)능력을 저해하는 것으로 연구가 이루어졌으나 효과가 낮은 것으로 보고되었다(Montalbini, 1989). 1996년에는 비번역(untranslation) sense RNA를 이용하여 식물바이러스 유전자가 식물체내에서 발현되지 않도록 유도하였으나, GMO의 특성으로 인하여 상품화에 실패하였다.

제 2 절 국내 수준 및 현황

개념 정립 단계	✓	기업화 단계		기술 안정화 단계	
----------	---	--------	--	-----------	--

국내의 경우 진지분유 처리로 코팅효과에 의한 TMV의 감염 저지 효과(박 등, 1980), 계면활성제 엽면 살포에 의한 TMV 감염 저지 효과(박 등, 1980), 진딧물 비래 차단 망에 의한 PVY 감염 억제효과(박 등, 1993)등의 경종적 방제 법에 관한 연구가 주를 이루고 있다. 물질개발 분야에서는 *Pseudomonas* sp. KTB61 균주가 생산하는 glycoprotein은 TMV의 감염억제 효과가 매우 우수하나 실제 포장단계에서 약효가 매우 낮아 산업화가 어려운 것으로 알려져 있다.

제 3 절 본 과제 연구결과의 위치

개념 정립 단계		기업화 단계	✓	기술 안정화 단계	
----------	--	--------	---	-----------	--

본 연구팀은 지난 2003년 이후 4년간 1,000여개의 미생물로부터 CMV 억제에 가장 효과적인 국내 토착미생물 *Serratia* Gsm01 분리·동정하였다. 이 후 국내 토착미생물부터 생산되는 고분자 천연물질을 분리하여 CMV 방제 효과를 입증하였으며 2006년에 특허등록 및 논문발표로 원천기술을 확보하였다(아래사항 참조).

※ 특허 : 식물바이러스병 방제효과를 갖는 세라티아 속 Gsm01(제10-0646669호)

※ 논문 : Isolation and evaluation of an antiviral producing *Serratia* spp. strain Gsm01 against *Cucumber mosaic virus* in Korea : The Korean Journal of Pesticide Science 2006. 10(4) : 344-350

본 연구팀이 확보한 항바이러스성 미생물은 기내실험 결과 97.8%의 바이러스 감염 억제 효과를 나타내었으며, 특히 미생물균주 자체보다 미생물이 생산한 여액에서 더 높은 CMV 억제 효과를 나타내었다. 실내에서 Gsm01 균주의 여액을 처리할 경우 CMV 방제지속기간은 14일 이상 강한 억제활성효과를 나타내었으며 CMV 뿐만 아니라 다른 식물바이러스에 대해서는 감염 억제효과가 우수하였기에 체계적인 연구개발을 통하여 바이러스 억제제의 산업화하고자 한다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 고분자 천연물질의 대량생산 시스템 구축, 친환경 제형화 기술 확립 및 혼합제 개발

1. 고분자 천연물질의 대량생산 시스템 구축

가. 산업용 미생물 발효 배지 개발 및 조건 확립

(1) 고분자 천연물질 생산 미생물의 기본배지 선별

(가) *in-vitro* 미생물 배양배지를 선별

고분자 천연물질 생산 미생물의 배양배지를 선별하기 위하여, 일반적인 세균 배양용 4종류의 배지를 이용하여 *Cucumber mosaic virus*(CMV)에 대한 감염억제효과를 조사하였다. 각각 MH(Muller Hinton Broth : Beef extract 3 g L⁻¹, Casein Hydrolysate 17.5 g L⁻¹, Starch 1.5 g L⁻¹)배지, NB(Nutrient Broth : Beef extract 3 g L⁻¹, Bacto peptone 5 g L⁻¹)배지, LB(Luria Burtani broth : Bacto tryptone 10 g L⁻¹, Yeast extract 5 g L⁻¹, Sodium chloride 5 g L⁻¹)배지, MGY(Manitol Glutamate Yeast Broth : Manitol 10 g L⁻¹, L-Glutamic 2 g L⁻¹, Potassium phosphate 0.5 g L⁻¹, Magnesium sulfate heptahydrate 0.2 g L⁻¹, Sodium chloride 0.2 g L⁻¹, Yeast extract 0.25 g L⁻¹)배지에 미생물을 접종하여 진탕 배양하였다. 그 후 배양액을 원심 분리하여 상층액을 회수하고 0.45 μ m syringe filter로 균체를 제거 한 후 CMV 감염억제효과를 조사하였다. 이때 배지 성분 자체의 효과를 검정하기 위하여 배지 자체의 CMV 감염억제효과를 함께 검정하였다. 바이러스 접종은 CMV에 대한 국부병반 기주인 명아주 (*Chenopodium amaranticolar*)에 바이러스를 즙액접종 하였으며 마주보는 잎의 한쪽에는 고분자 천연물질을 처리하고 다른 엽에는 무처리로 하는 대엽법의 검정법을 사용하였다. 바이러스 즙액접종 후 온실 유지하고, 7일 후 나타나는 국부병반수를 무처리에 대비하여 감염억제효과로 평가하였다.

그 결과, 고분자 천연물질을 생산하는 *Serratia* Gsm01은 MH배지에 배양한 배양여액에서 80.5%의 감염억제효과를 나타내었고, LB배지에 배양한 배양여액에서 70.2%의 감염억제효과를 나타내었다. 또한 배지 자체의 감염억제효과 검정에서는 MH배지와 LB배지 모두 CMV에 대한 감염억제효과를 볼 수 없었기 때문에 앞의 두 가지 배지에서 배양한 고분자 천연물질은 CMV에 대한 감염억제효과가 있는 것으로 판단되었다. 그러나 NB배지와 MGY배지에서는 상대적으로 매우 낮은 감염억제효과를 나타내어 고분자 천연 물질 생산에 적합하지 않다고 판단되었다 (표 1, 그림 1). 따라서 MH배지를 기본배지로 선정하고 MH배지를 산업용 배지로 개발하기 위

하여 다음 실험을 진행하였다.

표 1 . 고분자 천연물질을 생산하는 *Serratia* Gsm01의 기본배지 선발

배지 종류	CMV 감염억제효과(%)
MH(Muller Hinton Broth)	38.4
MH + 배양 상층액	80.5
NB(Nutrient Broth)	16.4
NB + 배양 상층액	22.1
LB(Luria Burtani broth)	28.9
LB + 배양 상층액	70.2
MGY(Mannitol Glutamate Yeast Broth)	10.3
MGY + 배양 상층액	15.6

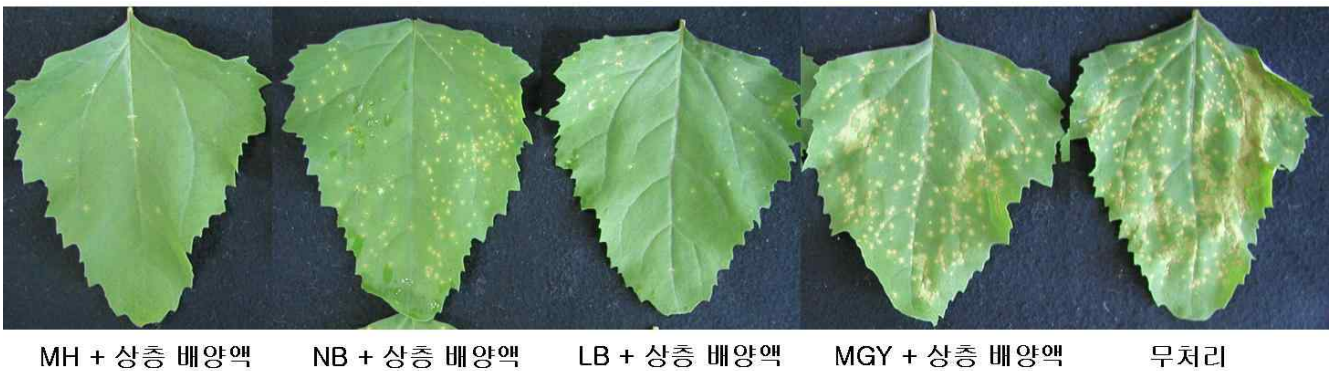


그림 1. 배지에 따른 CMV 감염억제효과 검정

(나) 산업용 미생물 발효 배지 선발

위에 실험에서 선발된 기본배지인 MH배지는 산업용으로 사용하기에는 가격이 매우 비싼 단점을 가지고 있다. 따라서 고분자 천연물질을 생산하는 *Serratia* Gsm01을 산업적으로 대량 생산하기 위하여 실험용 MH(Muller Hinton Broth : Beef extract 3g/L, Casein Hydrolysate 17.5g/L, Starch 1.5 g/L)배지를 대체 할 수 있는 경제적인 배지를 선발하여야 한다. 이를 위하여 산업용으로 이용할 수 있는 적절한 탄소원과 질소원의 선발이 필수적이다. 선발 시 고려 할 점은 배양하고자 하는 원균주의 cell 농도를 조사하여 균주 성장의 최적 원료를 선발해야 할 것이고, 그에 따른 배양액의 고분자 천연물질의 활성을 조사하여 적절한 영양원을 선발하여야 할 것이다. 마지막으로 산업용 원료의 적절한 농도를 선발함으로써 산업용 배지로의 이용가능성에 대하여 연구한다.

① 고분자 천연물질 생산을 위한 탄소원 선발

고분자 천연물질의 생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 arabinose, fructose, glucose, glycerol, lactose, maltose, mannitol, sorbitol 그리고 sucrose를 선발하였다. 각각의 원료는 원료단가에 비례하여 표 2와 같이 고가, 증가, 저가로 구분하여 산업용으로서의 이용 가능성을 점검하였다. 수행 방법은 기본배지인 MH배지에 0.5%씩 첨가하여 진탕 배양 한 뒤 배양액의 cell mass를 확인하기 위하여 UV spectrophotometer로 흡광도를 측정해 Optical density(OD)를 구하였다. 각각의 배양액은 원심분리와 filtering을 통하여 균체를 제거하고 상층액의 CMV 감염억제효과를 검정하여 여러 가지 탄소원에 따른 최적의 영양원을 선발하였다.

그 결과, 세균의 성장은 기본배지와 비교하여 비교적 중·저가의 arabinose와 glucose 그리고 mannitol 영양원에서 우수한 성장을 나타내었고, CMV 감염억제효과에서는 glucose와 lactose 영양원에서 감염억제효과가 우수하였다(표 2). 따라서 고분자 천연물질 생산을 위한 최적의 영양원은 원료의 단가와 Cell의 농도 그리고 CMV 감염억제효과를 종합적으로 보았을 때 glucose를 선발하는 것이 최적이라고 판단된다.

표 2. 여러 가지 탄소원에 의한 cell mass 및 CMV 감염억제효과 점검

탄소원	Cell mass (OD600nm)	CMV 감염억제효과 (%)	원료단가
기본배지	1.54	78.4	고가
arabinose	1.53	76.3	증가
fructose	1.26	69.0	저가
glucose	1.50	77.5	저가
glycerol	1.41	74.5	고가
lactose	1.44	75.6	증가
maltose	1.30	70.8	저가
mannitol	1.47	73.9	증가
sorbitol	1.35	75.1	증가
sucrose	1.39	69.5	저가

② 고분자 천연물질 생산을 위한 질소원 선발

고분자 천연물질의 생산을 위한 질소원의 영향을 조사하기 위하여 bactopectone, tryptone, urea, corn meal, soybean meal, corn gluten meal, ammonium sulfate, malt extract 그리고 yeast extract를 선발하였다. 각각의 원료는 원료단가에 비례하여 표 3과 같이 고가, 증가, 저가로 구분하여 산업용으로서의 이용 가능성을 점검하였다. 수행 방법은 위에 탄소원 영향 조사와

같은 방법으로 수행 하였고 여러 가지 질소원에 따른 최적의 영양원을 선발하였다.

그 결과, 비교적 저가의 원료인 urea, corn meal, corn gluten meal, ammonium sulfate의 원료에서는 세균의 성장과 CMV 감염억제효과에서 기본배지와 비교하여 낮은 효과를 나타내었다. 그러나 고가의 원료인 bactopectone, tryptone, malt extract, yeast extract에서는 기본 배지와 유사한 cell mass와 감염억제효과를 나타내었다(표 3). 그러나 고가의 원료들은 배지의 들어가는 함량과 단가가 산업용으로 사용하기에는 적당하지 않다. 따라서 원료의 단가와 Cell의 농도 그리고 CMV 감염억제효과를 종합적으로 보았을 때 고분자 천연물질 생산을 위한 질소원으로는 soybean meal을 선발하는 것이 최적이라고 판단된다.

표 3. 여러 가지 질소원에 의한 cell mass 및 CMV 감염억제효과 점검

질소원	Cell mass (OD600nm)	CMV 감염억제효과 (%)	원료단가
기본배지	1.53	78.4	고가
bactopectone	1.48	75.2	고가
tryptone	1.49	74.9	고가
urea	1.32	69.1	저가
corn meal	1.24	72.4	저가
soybean meal	1.54	80.6	중가
corn gluten meal	1.29	65.7	저가
ammonium sulfate	1.30	67.4	저가
malt extract	1.45	75.6	고가
yeast extract	1.56	76.7	고가

③ 선발된 탄소원 · 질소원의 최적 비율 선발

위에서 선발한 두 개의 영양원은 현재 발효공업에서 산업적으로 주로 사용하고 있는 탄소원과 질소원이다. 위 시험에서는 glucose를 탄소원 영양원으로 선발하였고, soybean meal을 질소원 영양원으로 선발한 산업용 배지를 1차적으로 검토하였다. 따라서 본 시험에서는 소량의 영양원을 기본으로 함유한 배지에서 glucose 농도와 soybean meal의 농도를 1~4%로 각각 조절하여 진탕 배양을 하고 각각의 배양액을 원심분리와 filtering을 통하여 균체를 제거하였다. 이렇게 만들어진 상층액의 CMV 감염억제효과를 검정하여 탄소원과 질소원의 최적의 농도를 선발하였다.

그 결과, glucose 2%와 soybean meal 4%의 비율에서 85.2%의 감염억제율과 glucose 3%와

soybean meal 4%의 비율에서 87.5%의 감염억제율로 가장 높게 나타났고, glucose 1%와 soybean meal 4%의 비율에서도 83% 이상의 유사한 수준을 나타내었다(표 4).

위의 결과에서 알 수 있듯이 고분자 천연물질을 생산하는 *Serratia* Gsm01을 산업적으로 대량생산하기 위해서는 glucose 3%와 soybean meal 4%의 비율이 가장 우수하게 나타났고, 이는 당의 양과 질소원의 양이 비교적 많이 들어가는 것을 알 수 있었다. 그러나 이러한 조합의 비율에서 *Serratia* Gsm01을 생산하는 것도 좋지만 가장 경제적이면서 가장 효율적인 glucose 1%와 soybean meal 4%를 선택하여 scale-up의 산업용 배지로 사용하기로 하였다.

표 4. 최적배지 선발을 위한 탄소원과 질소원 비율에 따른 CMV 감염억제효과 검정

탄소원 함량 glucose (%)	질소원함량 soybean meal (%)	CMV 감염억제효과 (%)
1	1	55.8
1	2	60.4
1	3	68.5
1	4	83.9
2	1	62.1
2	2	67.2
2	3	75.4
2	4	85.2
3	1	69.4
3	2	70.3
3	3	83.5
3	4	87.5

(다) 산업용 미생물 발효 배지 개발 및 조건 확립

위에서 선발한 탄소원으로 이용되는 glucose 1%와 질소원으로 이용되는 soybean meal 4%를 포함한 배지를 사용하기 위하여 여러 가지 다른 영양원의 함량을 조절하여 2차적으로 배지를 선발하였다. 미량으로 들어가는 기본배지를 바탕으로 여러 가지 조합으로 10종의 배지를 만들어 Media1~Media10으로 명명하고, 각각의 배지에서 배양된 배양액을 이용하여 CMV 감염억제효과를 검정하였다.

그 결과 고분자 천연물질을 생산하는 *Serratia* Gsm01을 Media5와 Media6에서 배양 할 경우 각각 87.4%와 88.9%의 높은 감염억제효과를 나타내었고, 그 외의 배지에서는 실험용 배지

인 MH배지 보다 낮은 80% 이하의 감염억제효과를 나타내었다(그림 2). 따라서 고분자 천연물질을 생산하는 산업용 배지로 CMV 감염억제효과가 뛰어난 Media5와 Media6을 선정하였고 scale-up를 통하여 산업용 배지의 가능성을 점검하였다.

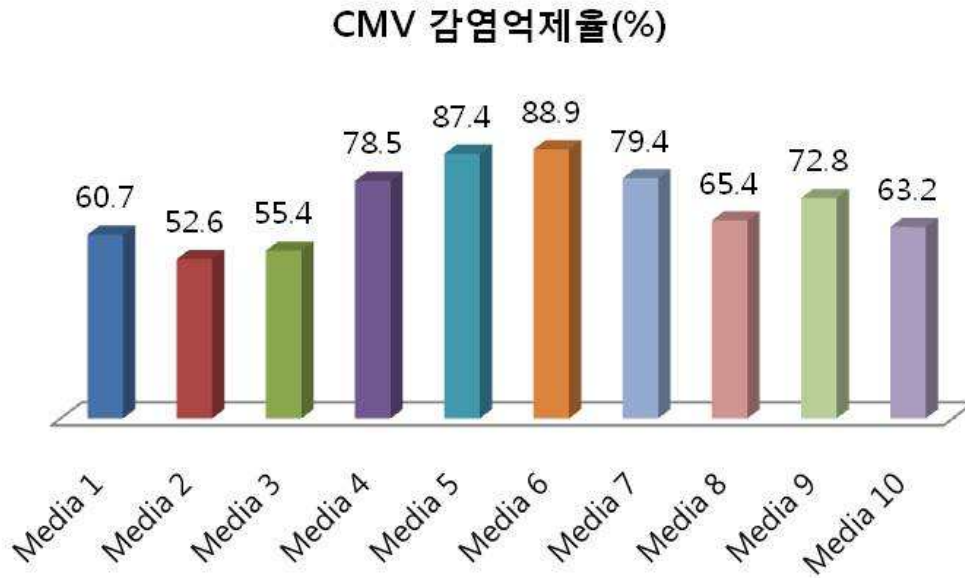


그림 2. 자체 배지를 이용한 산업용 최적 배지 선발

(2) 선발된 산업용 배지에서 미생물 원제(*Serratia* Gsm01)의 물리·화학적 특성 분석

미생물을 또는 미생물 추출물을 이용한 산업화 연구에는 고분자 천연물질을 생산하는 미생물 원제의 안정성이 필수적이다. 균주 보관의 형태나 특성에 의하여 물질을 생산하는 양이 달라지거나 균주의 형태가 변할 수 있기 때문이다. 따라서 본 연구에서는 선발된 산업용 배지를 이용하여 미생물 원제(*Serratia* Gsm01)의 물리·화학적 특성 분석을 통하여 원균주의 안정성을 점검하였다.

Serratia Gsm01 균주의 온도에 대한 안정성을 조사하기 위하여 MH(Muller Hinton) 고체 배지에서 24시간 배양한 colony를 각각 -10°C, 0°C, 4°C, 20°C, 30°C의 온도로 일정기간 보관 후 1차 번도에서 선발한 산업용 배지 Media6으로 옮겨 액체 배양한 후 CMV 바이러스에 대한 감염억제 효과를 검정하였다. 그 결과 그림 3에서 보는 바와 같이 미생물 원제는 보존 온도 및 보존 기간에 관계없이 CMV 바이러스에 대한 감염억제 효과를 유지하였다.

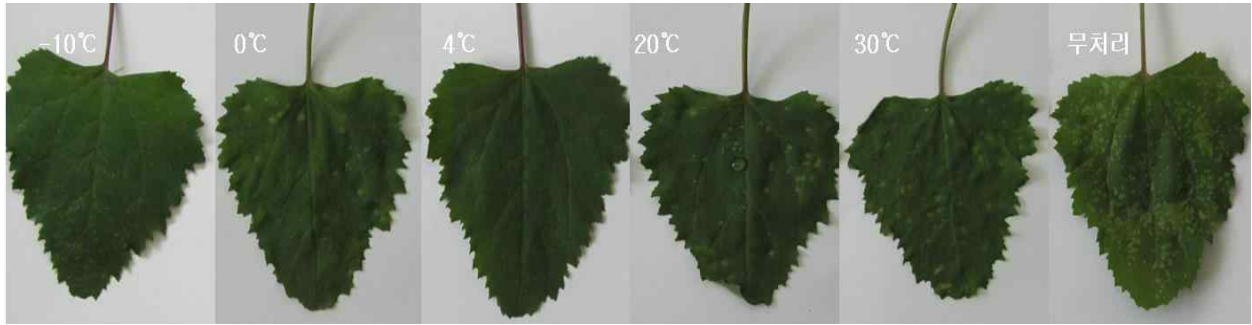


그림 3. *Serratia* Gsm01 균주의 보관 온도에 따른 CMV 감염억제효과.

Serratia Gsm01 균주의 계대의 대한 안정성을 조사하기 위하여 MH 고체배지에 배양한 colony를 10일 간격으로 계대를 하고 single colony를 Media6의 옮겨 액체 배양한 후 CMV 바이러스에 대한 감염억제 효과를 검정하였다. 그 결과 바이러스에 대한 감염억제 효과는 10회에 걸쳐 계대를 하여도 일정하게 유지되어 계대의 의한 균주의 안정성을 확인할 수 있었다(결과 미제시).

마지막으로 자외선에 대한 안정성을 조사하기 위하여 MH 배지에서 배양한 colony를 자외선이 조사되는 clean bench에 12~24시간 둔 후 single colony를 Media6으로 옮겨 액체 배양한 후 CMV 바이러스에 대한 감염억제 효과를 검정하였다. 그 결과 Gram-negative의 세균인 미생물 원제 *Serratia* Gsm01 균주는 자외선 처리 시 cell 자체가 잘 안자라는 현상을 보였고, 그에 따른 바이러스의 감염억제 효과도 볼 수 없었다(결과 미제시). 이는 colony를 자외선 처리 시 균주가 사멸되는 일반적인 현상에 의한 것으로 판단된다.

나. jar 5L ~ 5,000L 수준에서의 최적 생산 배지 및 미생물 발효 조건 확립

(1) 5L jar fermenter를 이용한 산업용 배지의 최적배양시간 점검

위에서 선발된 두 가지 배지를 이용하여 Lab 수준의 scale-up인 5L jar fermenter에서 배양을 실시하여 최적 배양 시간을 점검하였다. 5L 발효조를 121°C / 20분 멸균하여 냉각시킨 후 *Serratia* Gsm01을 접종하였다. 24시간 배양하여 배양 후 0h, 6h, 12h, 18h, 24h sampling 하였고, 각각 sample에 대한 세균의 성장속도와 CMV 감염억제효과를 조사하였다.

그 결과 두 배지 모두 세균의 성장속도나 cell mass양이 유사하였다. 배양 후 3h~8h 사이의 대수증가기를 거친 후 12h 이후 안정기에 접어들어 일반적인 세균의 Growth curve와 유사하게 나타나서 배양공정에 두 가지 배지가 모두 적합하다고 판단되었다(그림 4). 이는 산업용 배지를 이용했을 경우 배양 후 12h 이상 지나면 세균의 성장이 최대치가 되고 세균이 용출하는 유기물의 양 또한 많아질 것이라 예상된다.

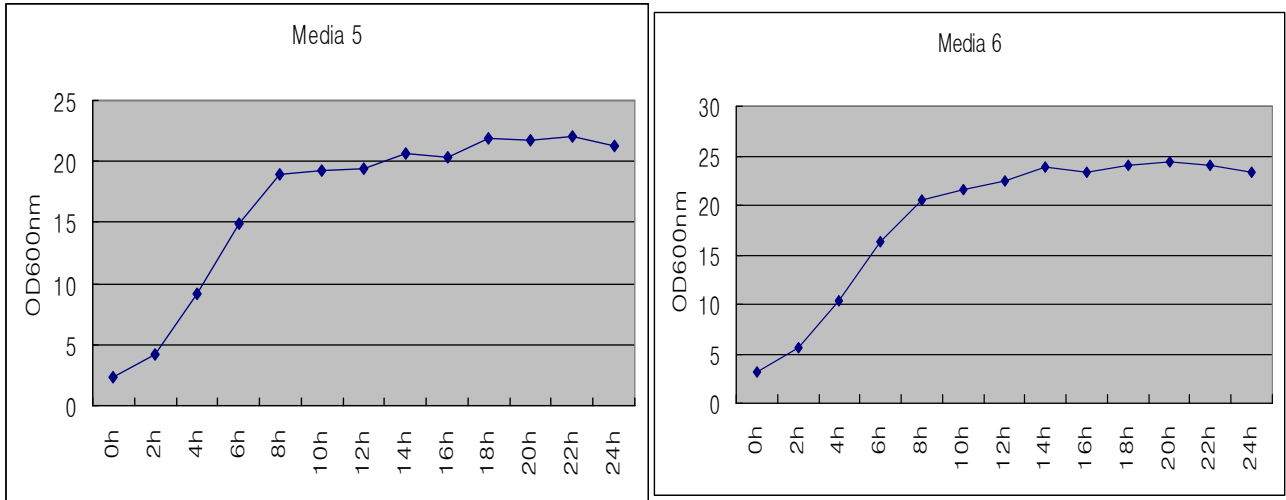


그림 4. 5L jar fermenter를 이용한 *Serratia* Gsm01의 분리 균의 Growth curve

또한, 각 sampling 시간 별 CMV 감염억제효과를 조사한 결과 배양 후 18h의 배양액에서 각각 85.4와 88.7%로 가장 높게 나타났다(표 5). 이는 저가의 산업용 배지를 이용하여 미생물과 고분자 천연물질을 생산하는데 충분한 영양분이 있었고 산업화를 고려한 배지의 경쟁력이 있음을 시사한다.

표 5. 5L jar fermenter를 이용한 최적배양시간 점검

Media 5 배양시간 (Hours)	Cell OD (600nm)	CMV 감염억제효과 (%)
0	3.2	13.4
6	16.4	62.8
12	22.5	82.6
18	24.0	85.4
24	23.4	83.2

Media 6 배양시간 (Hours)	Cell OD (600nm)	CMV 감염억제효과 (%)
0	2.4	20.4
6	14.9	64.8
12	19.4	86.7
18	21.9	88.7
24	21.3	87.2

(2) Scale-up에 따른 최적배양시간 점검

대량 배양을 위한 기초 연구로 50L fermenter와 500L fermenter에서 배양에 따른 CMV 감염억제 효과를 검토하였다.

선발된 산업용 배지 Media6에 *Serratia* Gsm01을 20~22시간 배양하였다. 배양을 하는 동안 각각 0h, 6h, 12h, 18h에서 sampling을 하였고, Cell OD가 떨어지는 시점에서 배양 종료를 하였다. 배양 후 얻어진 상층액을 이용하여 CMV 감염억제효과를 점검하여 산업용 배지를 이용한 scale-up의 배양조건 확립의 기초자료로 쓰고자 하였다.

그 결과 배양 scale이 증가함에 따라서 cell mass가 증가하는 경향을 보였고, CMV 감염억제효과 또한 5L에서 생산한 고분자 천연물질과 비교하여 감염억제효과가 떨어지지 않았다(표 6, 표 7). 따라서 고분자 천연 물질을 생산하는 *Serratia* Gsm01의 산업화는 충분히 가능 할 것이라 판단된다.

표 6. 산업용 배지를 이용한 50L 대량 배양에 따른 CMV 감염억제효과 점검

배양시간(Hours)	Cell OD (600nm)	CMV 감염억제효과 (%)
0	3.9	15.3
6	16.8	52.9
12	20.3	72.1
18	23.8	82.5
20	22.0	80.4

표 7. 산업용 배지를 이용한 500L 대량 배양에 따른 CMV 감염억제효과 점검

배양시간 (Hours)	Cell OD (600nm)	CMV 감염억제효과 (%)
0	4.1	10.0
6	15.1	48.0
12	22.6	70.4
18	26.5	83.0
22	25.5	83.1

위의 연구 결과에 의하면 선발하였던 Media5와 Media6의 두 배지 간 차이는 cell mass의

양이나 CMV 감염억제효과가 Media5 보다는 Media6이 다소 높은 결과를 나타내었다. 따라서 산업용 대량 배양을 위한 최적화 배지로 Media6배지를 선정하였으며, 배양시간은 18~20시간 동안 배양하는 조건이 최적임을 확인하였다.

(3) 대량배양을 위한 산업용 배지 선택과 미생물 발효조건 분석(50L pilot plant)

(가) 50L 발효조에서 산업용 배지의 선택과 배양조건

Serratia Gsm01 균주에서의 고분자 천연물질을 대량 생산하기 위한 산업용 배지의 조성 및 배양조건을 분석하였다. 1차 년도에서 선발된 경제성 있는 탄소원과 질소원에 다양한 미량요소를 조합한 Media5와 Media6을 적용하였다(표 8). 공시 배지량은 50L 발효기에서 30L을 배양하였다. 발효기 배양을 위한 Seed 배양액은 MH 액체배지에서 24시간 배양한 배양액 500ml을 사용하였다.

표 8. 배지 종류 및 50L 발효조 operating conditions

배지종류	탄소원	질소원	미량요소	배양온도	RPM	pH
Media5	Glucose 1%	Soybean meal 4%	Mg · SO ₄ 등	25℃ ~35℃	100 ~300 rpm	pH 5.0 ~pH 8.0
Media6			(NH ₄) ₂ SO ₂ 등			

① 배양적온 및 교반속도

25℃, 30℃, 35℃의 배양조건을 달리하여 균주의 성장을 비교하였을 때 30℃ > 35℃ > 25℃의 순으로 나타났다. 30℃와 35℃의 생육이 유사하였지만 30℃에서 균주의 성장이 약간 우수하였다(그림 5).

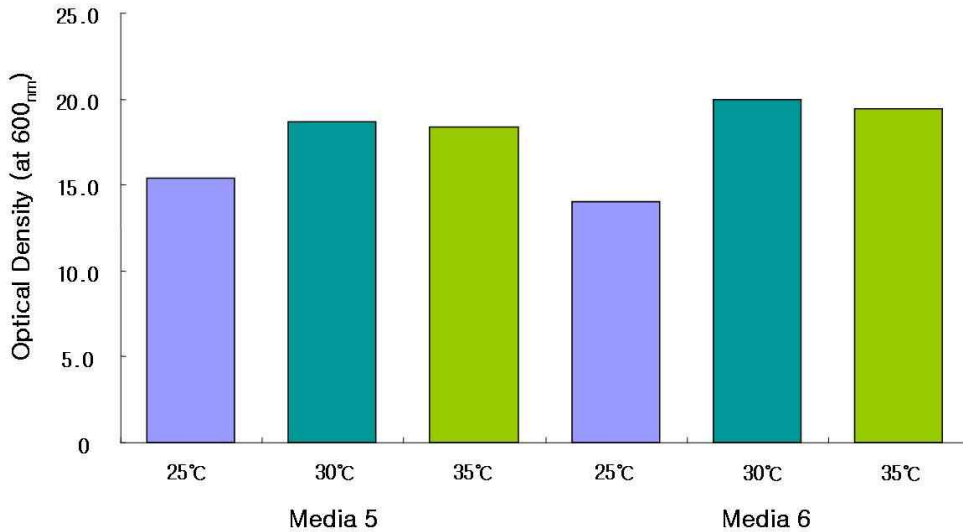


그림 5. 배양 조건에 따른 *Serratia* Gsm01 균주의 성장 비교

100~300 rpm의 교반속도에 의한 *Serratia* Gsm01 균주의 밀도 변화는 크게 나타나지 않았다(표 9).

표 9. 교반속도에 따른 의한 *Serratia* Gsm01 균주의 밀도 변화

배양시간 (hrs)	교반속도 (rpm)		
	100	200	300
12	19.3 ^a	20.4	20.3
24	20.6	21.2	19.8

a Optical Density (at 600nm)

② pH에 의한 영향 분석

Media5와 Media6의 배지내의 pH를 다양하게 보정하여 *Serratia* Gsm01 균주의 밀도 변화를 조사하였다. Media5에서는 초기 pH를 7.0으로 보정하고 배양한 세균 밀도가 가장 우수하게 나타났다. Media6에서도 비슷한 결과를 나타내었다(표 10). 하지만 Media5보다는 Media6에서 배양한 세균의 밀도가 더 증가하는 경향을 나타내었다.

또한 두 가지 배지 모두 초기 pH를 5.0에서 8.0까지 1.0 간격으로 증가시켜 보정하였을 때 최종 배양한 24시간 후에 pH는 6.6에서 7.6으로 증가되는 경향을 보였다.

표 10. pH에 의한 세균 밀도 변화

pH 보정	Optical Density(at600nm)					
	Media 5			Media 6		
	배양시간		Final pH	배양시간		Final pH
	12시간	24시간		12시간	24시간	
5.0	17.4	19.7	6.64	18.2	19.3	6.89
6.0	19.5	20.1	7.31	18.2	22.4	7.26
7.0	19.5	21.3	7.29	19.6	21.7	7.29
8.0	15.7	18.6	7.58	17.1	19.3	7.66

(나) Scale up 과정에서 변형 배지를 통한 최적 배양 조건 확립

기본 배양 조건을 기초로 하여 CMV 감염억제 물질생산 최적화를 위한 scale up 과정으로 배지조건의 최적화 및 50L pilot plant에서의 최적화를 수행하였다. 1차년도 연구와 위의 연구에서 선발된 산업용 미생물 배지인 Media6의 경우 다른 여러 가지 산업용 배지에 비하여 활성 성분(고분자 천연물질) 생산량이 많은 장점은 있으나 미생물체제를 만들 때 여러 가지 공정상에 문제를 일으키는 불용성 soybean meal이 4%(40gram/liter)가 들어가 배양액의 물성이 짙어지는 형태를 띠게 된다. 특히 배양공정에 scale이 5,000L와 같은 대량 배양일 경우 배양 완료 후 원심분리 과정에서 시간이 지연이 될 수 있는 단점을 노출 할 수 있다. 이를 해결하기 위하여 다양한 media6의 조성을 조정하면서 활성물질 생성량을 유지 할 수 수용성 질소원을 찾아 배양 후공정상의 안정적인 물성을 확보하고 활성물질 key factor를 찾아내어 최종적으로 배양의 scale up에서 사용될 산업용 배지를 사용하여 경제성을 확보하는 대량생산 체제의 생산원료를 탐색 확립해야 할 것이다.

① 고분자 천연물질 생산을 위한 우수한 수용성 배지 성분 탐색

1차년도 연구에서 사용한 일반적인 세균 배양에 사용되는 10가지(Media1~Media10) 중 활성이 좋은 산업용 배지 중 soybean meal을 대체할 수 있는 수용성 배지 성분을 대체하여 *in vitro* test를 통하여 Media6와 유사한 활성을 나타내는 한 가지 배지 성분을 선발하여 Media6-1(glucose 1%, peptone 1%, Ammonium sulfate 0.2%, KH₂PO₄ 0.1% 등)로 명명하였다. Media6-1은 기존의 Media6과 활성물질 생성량이 거의 같으면서도 배양액의 물성은 후공정에 매우 적합한 특성을 가지고 있다. C/N ration을 비교하면 1:1이고 미량으로 들어가는 원료가 2차 대사산물을 만드는데 유리한 조성이며 대량의 배지 멸균 시에도 효과적으로 사용하는 조성이라 하겠다. 실제 50L pilot scale에서 배양 시 균체보다는 배양상태와 활성물질의 생성이 양호 하였고, 배양상태도 양호한 것으로 나타나 Media6-1을 scale up을 위한 기본배지로

설정하였다.

② Media6-1 배지의 CMV 감염억제효과 검정

Media6 배지와 Media6-1 배지를 50L 발효기에서 배양한 후 CMV 감염억제 효과를 검정하였다. 두 가지 산업용 배지에 따른 배양 profile은 약간은 달랐지만 CMV 감염억제효과는 유사하여 배양액의 물성을 비교하여 Media6-1 배지를 선발하였다(표 11).

표 11. Media6-1 배지의 CMV 감염억제효과 검정

배지 종류	배양시간 (hrs)	Cell OD (600nm)	CMV 감염억제효과 (%)
Media6	15.5	20.8	83.6
Media6-1	16.0	18.2	82.4

③ 50L 발효조에서 변형배지 및 발효조건에 따른 CMV 감염억제효과 검정

위의 연구 결과에 따른 배양온도와 교반속도 그리고 초기 pH를 7.0으로 보정하여 Media6-1을 50L 발효조에 배양하였다. 30℃와 200rpm, 0.5vvm으로 24시간 배양 후 배양 상등액을 이용하여 CMV 감염억제 효과를 검정하여 바이러스 억제 효과가 있는 고분자 천연물질의 생산여부를 검토하였다. 선발된 조건을 통기량과 압을 보정하여 각 3번의 배양을 하였고 배양여액을 채취하여 감염억제효과를 검정하였다.

그 결과 통기량과 압에 상관없이 선발된 조건에 의하여 배양된 배양여액은 CMV 감염억제 효과를 나타냄으로서 50L 발효조에서의 최적 배양의 조건을 확립하였다(표 12, 그림 6).

표 12. 50L 발효조건에 따른 CMV 감염억제효과 검정

반복수	Cell OD (600nm)	CMV 감염억제효과 (%)	비고
1반복	23.4	80.2	통기량 0.5vvm
2반복	22.5	83.9	통기량 0.7vvm
3반복	20.1	78.1	통기량 1.0vvm



그림 6. 50L 발효조건에 따른 CMV 감염억제효과 검증

(4) 대량배양을 위한 산업용 배지 선택과 미생물 발효조건 분석(500L pilot plant)

(가) 500L 발효조에서 산업용 배지의 선택과 배양조건

Serratia Gsm01 균주에서의 고분자 천연물질을 대량 생산하기 위한 산업용 배지의 조성 및 배양조건을 500L 발효조에서 분석하였다. 50L 발효조에서 선발된 조건을 바탕으로 산업용 배지 Media6-1을 적용하였다. 공시 배지양은 500L 발효기에서 300L을 배양하였다. 발효기 배양을 위한 Seed 배양액은 1차 플라스크 배양액을 MH 액체배지에서 24시간 배양한 배양액 500ml를 사용하였고, 2차 seed 배양액은 산업용 배지 Media6에서 12시간 배양한 30L 배양액을 사용하였다.

① 배양적온

Media6-1 배지에서 30℃와 35℃로 배양하였을 때 pH와 DO의 변화를 24시간 관찰하였다. 두 가지 배양온도에서 pH와 DO의 배양 패턴을 비슷한 양상을 나타내었다. 그러나 DO가 0까지 도달하는 시간이 30℃에서는 20시간이 반면에 35℃ 배양에서는 24시간까지 0으로 도달하지 않았다.

또한, 세균의 밀도는 비슷하게 진행되었고, 배양 후 16시간에서 20시간 사이에 최대 밀도를 나타내었다. 30℃에서의 최대 균수는 24시간이었고, 35℃ 배양에서는 16시간으로 관찰 되었다. 이는 온도가 높음에 따라 세균이 더 빨리 증식되었음을 알 수 있었다(그림 7).

마지막으로 CMV 감염억제효과를 관찰하였다. 이는 고분자 천연물질이 어떠한 배양온도에서 가장 많이 추출되는 지를 판가름하므로 적정 배양온도를 확인할 수 있는 지표라 사료된다. 그 결과 30℃에서 배양한 배양여액이 35℃에서 배양한 여액보다 우수한 방제효과를 나타내었다(그림 8). 배양시간에 따른 감염억제효과는 16시간 이상 배양하였을 때 CMV에 우수한 방제효과를 나타내었다. 따라서 500L 발효조에서의 적정 배양은 30℃의 온도로 산업용 배지 Media6-1을 이용하여 16시간에서 20시간 배양하는 것이 최적이라고 판단된다.

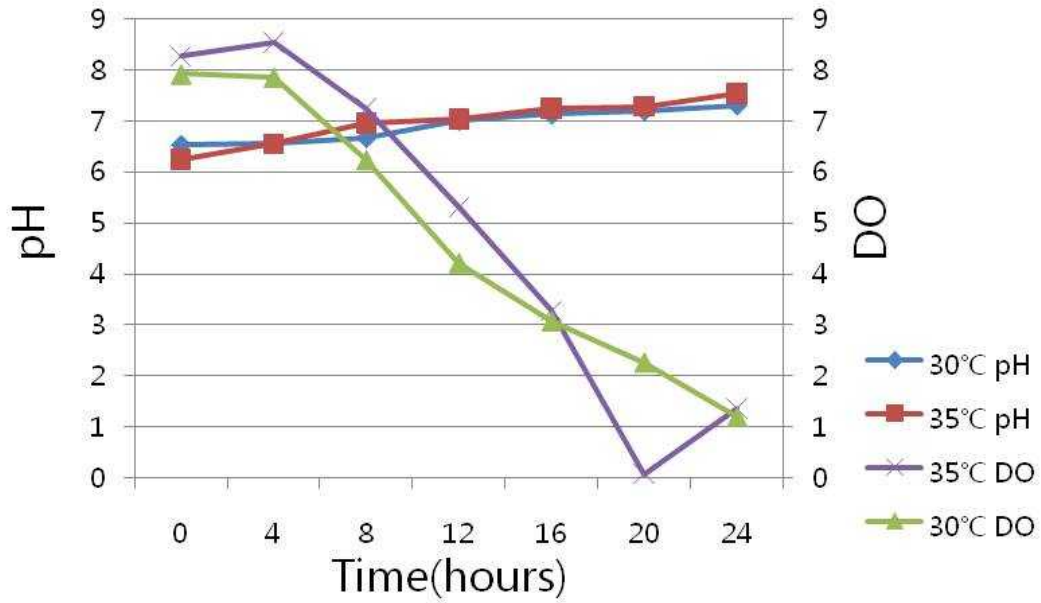


그림 7. 배양온도에 따른 pH와 DO의 변화

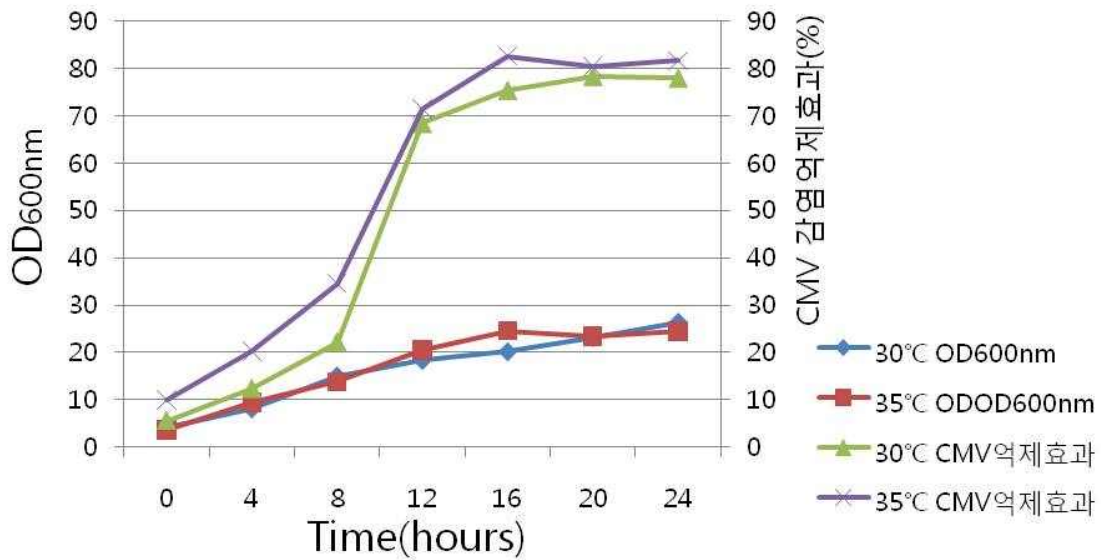


그림 8. 배양온도에 따른 세균 밀도와 CMV 감염억제효과 검정

② 교반속도

교반속도를 200rpm과 300rpm으로 배양하였을 때 pH, DO와 세균밀도의 변화는 거의 비슷한 경향을 나타내어 교반속도의 의한 미생물상의 변화는 없었다. 그러나 교반속도가 빨라짐에 따라 세균의 증식 속도는 빨라졌고, 사멸속도 또한 빨라졌음을 관찰 할 수 있었다(그림 9, 그림 10).

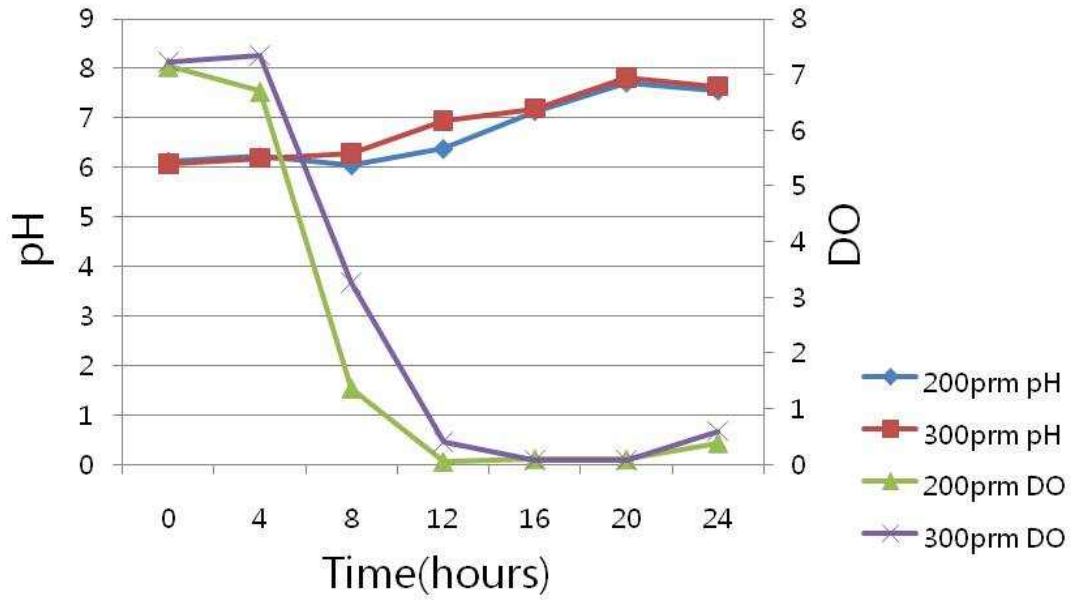


그림 9. 교반속도에 따른 pH와 DO의 변화

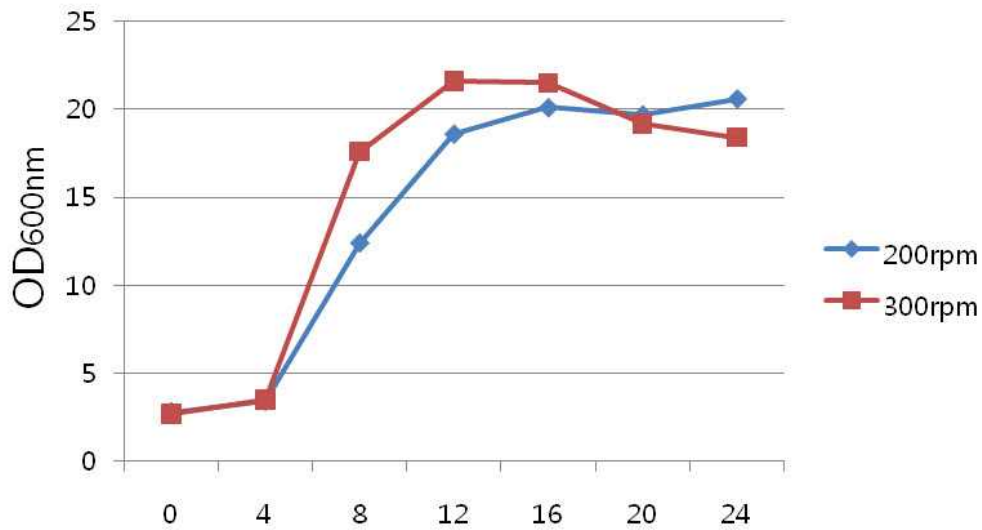


그림 10. 교반속도에 따른 세균 밀도 변화 검정

③ pH의 영향

배양 초기 pH를 5와 7로 보정한 후 pH에 의한 배양액의 영향과 DO 변화를 관찰하였다. 세균이 자랄 수 있는 적정 pH인 pH 5와 7에서의 배양 패턴은 비슷한 경향을 보였다. 배양초기는 초기 pH에 대비하여 산성화 되다 배양 8시간 이후 알칼리화되어 배양 24시간에는 각각 7.26과 7.88이었다(그림 11). 이는 고분자 천연물질의 대량생산을 위한 pilot plant 배양 시 pH에 의한 배양 종료 시점을 가늠할 수 있는 선행 연구로 충분하다고 판단된다.

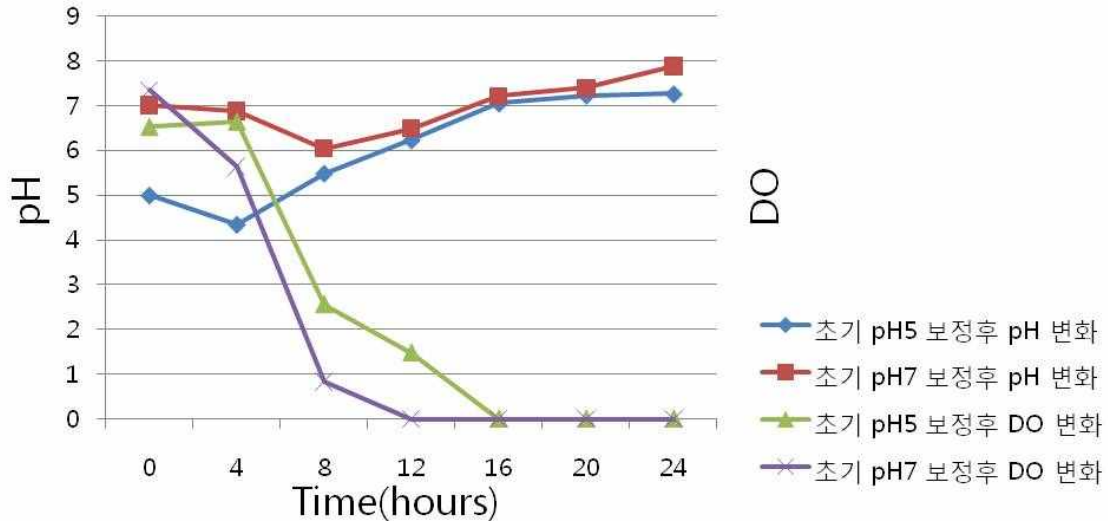


그림 11. pH 영향에 의한 DO와 pH의 변화

또한 발효공정 내내 pH를 7.0으로 일정하게 유지시킨 경우에는 DO가 0이 되는 시점이 20시간 정도로 pH를 보정하지 않았을 때보다 늦는 경향을 나타내었다. 세균의 최대 밀도에서는 초기 pH 7로 보정 후 배양한 처리구에서 27.4(600nm)로 가장 우수하였고, CMV 감염억제효과에도 82.1%로 가장 우수하게 나타났다(표 13).

표 13. pH 보정에 따른 CMV 감염억제효과 검정

pH 보정	배양시간	Cell OD (600nm)	CMV 감염억제효과 (%)
초기 pH 5로 보정 후 배양		26.5	79.4
초기 pH 7로 보정 후 배양	24hr	27.4	82.1
pH 7로 유지 배양		25.1	75.9

(나) 500L 발효조에서 접종원에 따른 배양조건

① 접종원의 농도에 따른 영향

500L 발효기를 이용하여 배양을 할 경우 접종원의 농도를 5~10%를 사용하므로 seed의 양이 상당히 많이 필요하다. 따라서 1차 seed는 flask로 배양 후 2차 seed 배양조로 접종하여 배양 후 접종원으로 사용된다.

본 연구에서는 500L 배양조로 *Serratia Gsm01* 균주를 배양 할 때 접종원의 농도에 따른 최적 배양 시스템을 확립하고자 하였다. 2차 seed 배양조는 50L 발효조에 배양된 배양액을 접종원 농도에 따라서 500L 발효조에 접종하고 배양 후 원심분리를 통하여 얻은 고분자 천연물

질의 CMV 감염억제효과를 검정하여 최적의 접종원의 농도로 활용하였다.

그 결과 접종원의 농도가 5%이면 500L 본 배양에서 배양시간이 길어질 뿐만 아니라 세균의 밀도가 높지 않았다. CMV 감염억제 활성 또한 60.4%로 다른 배양액보다 낮은 활성을 나타내었다. 하지만 접종원을 10%와 15%를 사용하였을 경우 정상생육이 가능하였으며 CMV 감염억제 효과 역시 80% 수준으로 매우 양호한 결과를 나타내었다(표 14).

표 14. 접종원 농도에 따른 CMV 감염억제효과 검정

접종원 농도 (%)	Cell OD (600nm)	CMV 감염억제효과 (%)
5	18.6	60.4
10	25.7	83.5
15	26.1	80.3

② 접종원 배양시간에 따른 영향

접종원의 농도를 10%로 고정하고 배양시간에 의한 500L 배양조의 배양 패턴 및 CMV 감염억제 효과를 검정하였다.

그 결과 접종원을 6시간 배양한 배양액을 제외하고는 모두 정상 패턴을 나타내었다. 6시간 배양액은 pH 상승하는 속도와 DO가 0이 되는 시점이 상당히 늦어짐을 관찰 할 수 있었다(그림 12). 이는 접종원의 배양 시간이 단축되면 본 배양의 배양이 늦어짐을 알 수 있었고, 세균이 충분히 자란 접종원을 사용하여야 새로운 배지에 적응하는 속도가 빠름을 시사하여 준다.

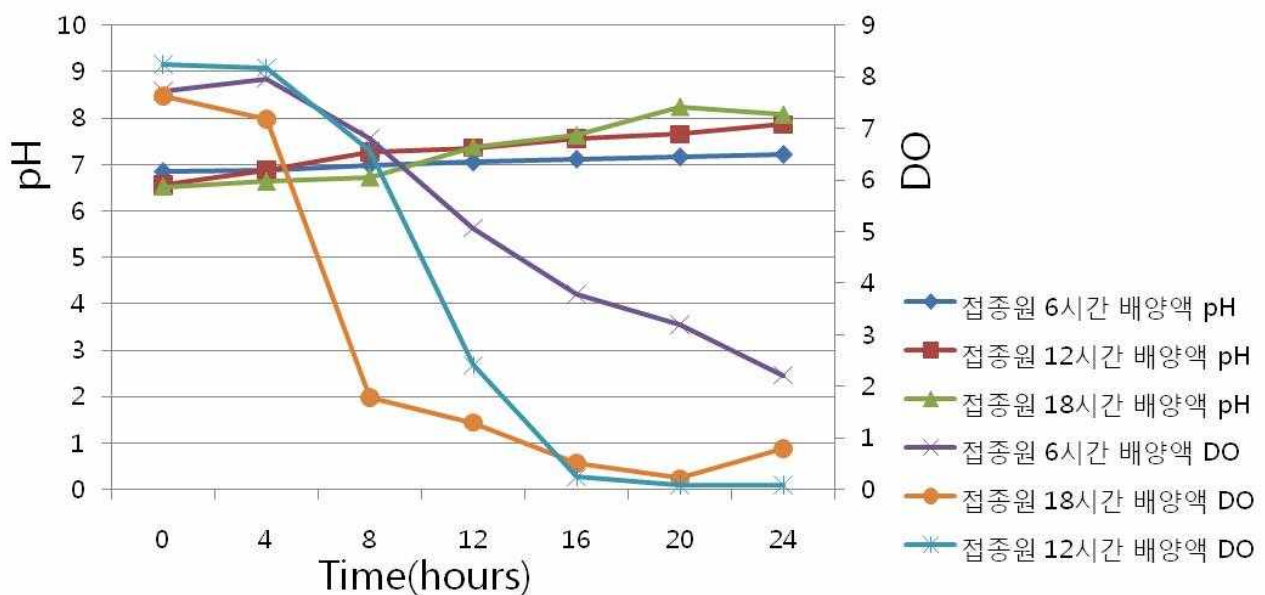


그림 12. 접종원의 배양시간에 따른 본 배양조의 배양 profile의 변화

③ 500L 발효조에서 선발된 발효조건에 따른 CMV 감염억제효과 검정

위의 연구 결과에 따른 배양온도와 교반속도 그리고 초기 pH를 7.0으로 보정하여 Media6-1을 500L 발효조에 배양하였다. 30℃와 300rpm, 0.5vvm으로 24시간 배양 후 배양 상등액을 이용하여 CMV 감염억제 효과를 검정하여 바이러스 억제 효과가 있는 고분자 천연물질의 생산여부를 검토하였다. 선발된 조건을 통기량과 압을 보정하여 각 3번의 배양을 하였고 배양여액을 채취하여 감염억제효과를 검정하였다. 그 결과 통기량과 압에 상관없이 선발된 조건에 의하여 배양된 배양여액은 CMV 감염억제 효과를 나타냄으로서 500L 발효조에서의 최적 배양의 조건을 확립하였다(표 15, 그림 13).

표 15. 500L 발효조건에 따른 CMV 감염억제효과 검정

반복수	Cell OD (600nm)	CMV 감염억제효과 (%)	비고
1반복	26.7	83.6	통기량 0.5vvm
2반복	25.1	85.4	통기량 0.7vvm
3반복	27.4	86.2	통기량 1.0vvm



그림 13. 500L 발효조건에 따른 CMV 감염억제효과 검정

(다) 50L pilot plant와 500L pilot plant 수준에서의 배양에 따른 재현성 검정

본 연구에서는 50L pilot plant와 500L pilot plant에서 산업용 배지 Media6-1을 이용하여 산업화 배지의 개발과 발효 공정의 최적화를 통하여 각각의 균체량과 CMV 바이러스 감염억제효과를 점검하였다. 50L pilot plant에서 Media6-1을 이용하여 배양한 결과 평균 19시간을 배양하여 약 79.1%의 CMV 바이러스 감염억제 효과를 확인하였다(표 16). 500L pilot plant에서도 50L와 비슷한 결과를 나타내었다(표 17).

위와 같은 결과는 배양 scale이 증가함에 따라서 cell mass가 증가하는 경향을 보였고,

CMV 감염억제효과 또한 5L와 50L에서 생산한 고분자 천연물질과 비교하여 감염억제효과가 떨어지지 않았다. 따라서 고분자 천연 물질을 생산하는 *Serratia* Gsm01의 산업화는 충분히 가능 할 것이라 판단된다.

표 16. 50L pilot plant에서의 재현성 점검

반복수	배양시간 (Hours)	Cell OD (600nm)	CMV 감염억제효과 (%)
1	20.5	22.4	73.8
2	18.0	20.5	80.4
3	18.5	19.4	83.2
평균	19.0	20.8	79.1

표 17. 500L pilot plant에서의 재현성 점검

반복수	배양시간 (Hours)	Cell OD (600nm)	CMV 감염억제효과 (%)
1	17.5	25.8	79.4
2	18.0	26.9	70.6
3	17.5	23.0	82.7
평균	17.7	25.2	77.6

(5) 5,000L 수준에서의 산업화 생산 배지 및 미생물 발효조건 확립

CMV 바이러스에 대하여 감염억제 효과를 가지고 있는 *Serratia* Gsm01 균주의 산업화는 5,000L 이상의 대량 배양을 통한 활성 물질의 안정적 생산이 필수적이다. 따라서 본 연구에서는 *Serratia* Gsm01 균주의 활성 물질을 대량으로 배양 할 수 있는 방법을 확립하기 위하여 대용량 5,000L pilot plant를 사용하여 안정적인 대량 배양 시스템을 확립하고자 하였다(그림 14).

배지의 종류와 온도 및 pH는 앞선 연구에서 선발한 내용을 그대로 적용하였으며 본 연구에서는 5,000L pilot plant 공정 시스템에서의 배양 조건의 확립과 안정적인 생산을 위한 재현성 검정을 실시하였다.



그림 14. 5,000L pilot plant 대량 배양 시스템

(가) 선발된 산업용 배지를 이용한 5,000L pilot plant 대량 배양

고분자 천연물질 생산을 위한 대량배양 기술개발을 위하여 5,000L pilot plant 공정을 scale-up하여 위에서 선발된 Media6-1 배지에 *Serratia* Gsm01을 24시간동안 배양하였다. 배양을 하는 동안 각각 0h, 6h, 12h, 18h, 24h에서 sampling을 하였고, Cell OD가 떨어지는 시점에서 배양 종료를 하였다. 배양 후 얻어진 상층액을 이용하여 CMV 감염억제효과를 점검하여 산업용 배지를 5,000L pilot plant 수준에서 scale-up의 배양조건 확립의 기초자료로 쓰고자 하였다.

배양 프로파일에서는 초기 pH를 6.5로 보정 한 뒤 배양하여 앞선 연구 결과와 유사하게 알칼리화 되는 시간이 유사하였다. 하지만 DO의 패턴 변화는 배양 후 12시간 만에 DO가 0의 시점으로 도달한 뒤 상승하는 패턴을 보였다. 이는 반복실험을 통하여 통기량과 rpm의 조절 등의 배양 operation 조정을 통하여 충분히 보정 될 수 있다고 사료 된다(그림 15).

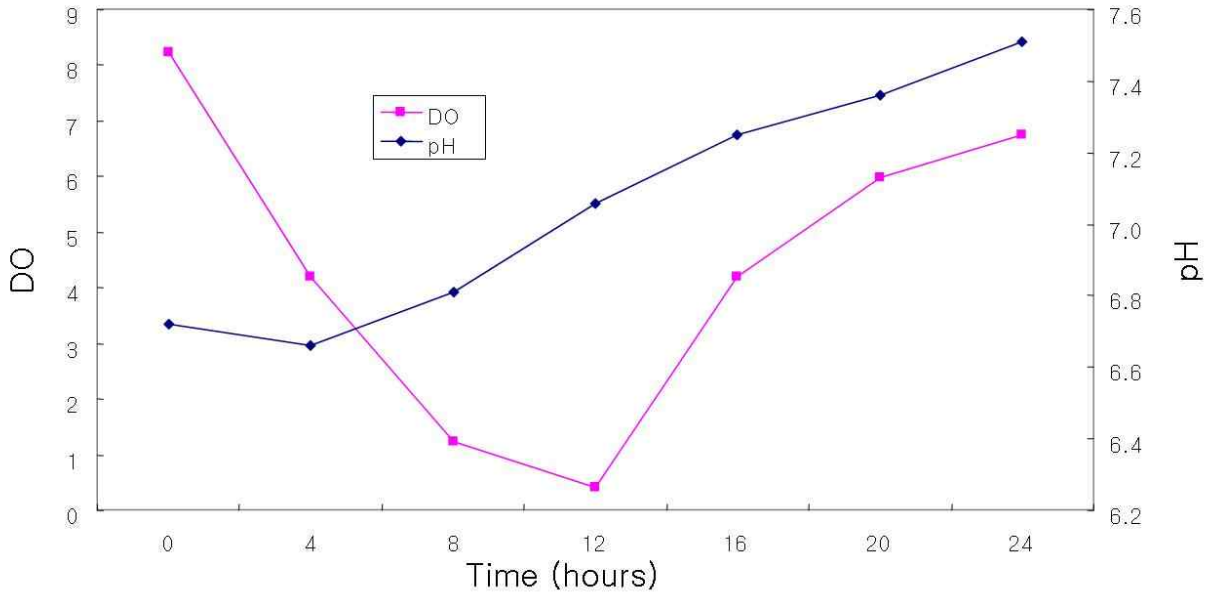


그림 15. 5,000L 발효조건에 따른 배양 profile

또한, 배양 scale이 증가함에 따라서 cell mass가 증가하는 경향을 보였고, CMV 감염억제 효과 또한 5L, 50L와 500L에서 생산한 고분자 천연물질과 비교하여 감염억제효과가 떨어지지 않았다(그림 16). 따라서 고분자 천연 물질을 생산하는 *Serratia* Gsm01의 산업화는 충분히 가능 할 것이라 판단된다.

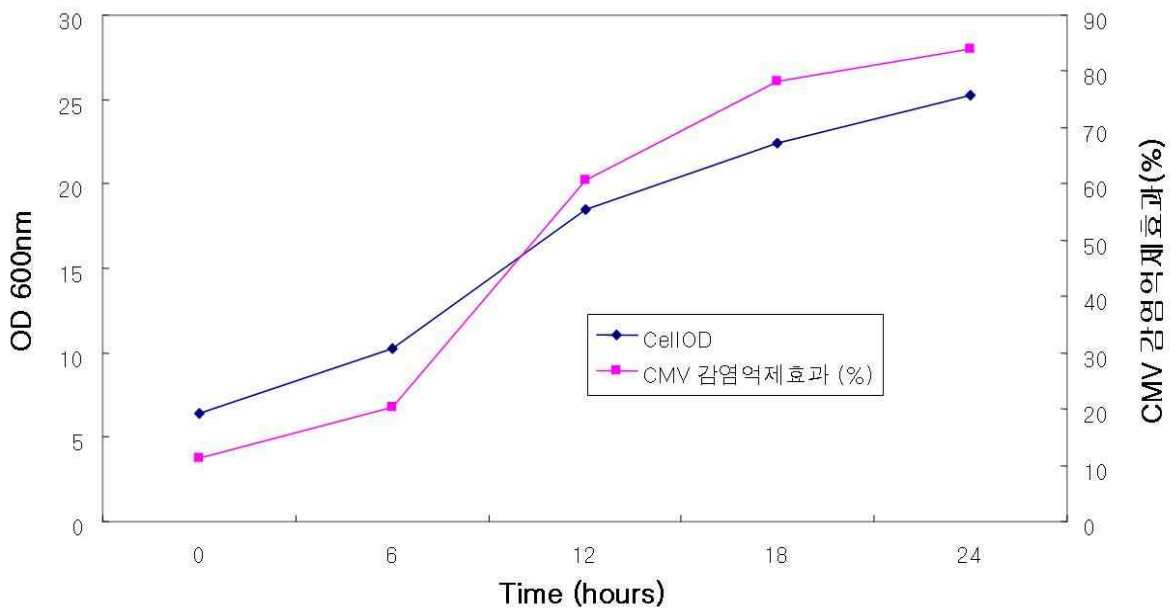


그림 16. 5,000L 발효조건에 따른 CMV 감염억제효과 검정

(나) 접종원의 농도와 배양시간에 따른 영향

5,000L 발효기를 이용하여 배양을 할 경우 접종원의 농도를 5~10%를 사용하므로 seed의 양이 많이 필요하다. 따라서 1차 seed는 flask로 배양 후 2차와 3차 seed 배양조로 접종하여 배양 후 접종원으로 사용한다.

본 연구에서는 5,000L 배양조로 *Serratia* Gsm01 균주를 배양 할 때 접종원의 농도에 따른 최적 배양 시스템을 확립하고자 하였다. 2차와 3차 seed 배양조는 50L와 500L 발효조에 배양된 배양액을 접종원 농도에 따라서 5,000L 발효조에 접종하고 배양 후 원심분리를 통하여 얻은 고분자 천연물질의 CMV 감염억제효과를 검정하여 최적의 접종원의 농도로 활용하였다. 접종원의 배양시간은 위의 연구 결과를 바탕으로 각각 12시간으로 확정을 하였다.

그 결과 접종원의 농도가 10%와 15%를 사용하였을 경우 정상생육이 가능하였으며 CMV 감염억제 효과 역시 약 80% 수준으로 매우 양호한 결과를 나타내었다(표 18).

표 18. 접종원 농도에 따른 CMV 감염억제효과 검정

접종원 농도 (%)		Cell OD (600nm)	CMV 감염억제효과 (%)
2차 접종원	3차 접종원		
10	10	28.1	81.2
15	15	28.8	79.0

(다) 5,000L 배양 공정에서의 재현성 검정

고분자 천연물질의 산업화를 위한 대량 배양 공정의 재현성 검정은 생산 단가와 CMV 감염억제 활성이 좋은 산업용 배지(Media6-1)를 이용하여 현장에 적용하였다. 배양조건으로 통기량 0.5~1.0vvm, 내압 0.25kg/cm² 그리고 교반속도는 50~100rpm으로 실시하였고 배양 종료는 선행 연구 결과에 의하여 18~24시간 사이의 배양 패턴을 보고 종료하였다. 배양 종료 시료는 배양액을 12,000rpm에서 10분간 원심분리하고 상등액을 바이러스 활성 검정 방법으로 통하여 그 효과를 평가하였다.

그 결과 50L와 500L 수준과 마찬가지로 세포 농도에 있어서도 OD(optical density)는 lab scale에서 보다 세포 증식이 좋아졌으며 배양 종료 시점까지 세포의 농도가 꾸준히 증가함을 확인하였다. 또한 CMV 바이러스 억제 효과에서도 5,000L pilot plant scale의 시료에서도 모두 활성이 유지되었음을 확인하였다(표 19).

따라서, 최종적으로 고분자 천연물질 생산을 위한 산업용 배지 Media6-1을 대량 배양 배지로 선발 할 수 있었고 배양 조건이나 배양 패턴을 확인하여 고분자 천연 물질의 대량 배양 시스템을 확립하였다.

표 19. 5,000L pilot plant에서의 재현성 점검

반복수	배양시간 (Hours)	Cell OD	CMV 감염억제효과 (%)
1	19.5	43.1	75.4
2	18.0	40.8	80.6
3	22.0	46.2	73.1
4	19.0	43.9	78.2
5	18.5	41.1	82.4
평균	19.40	43.02	77.94

다. 제품 생산을 위한 후공정 시스템 개발

(1) 후공정 개발을 위한 활성 물질 분획

우선 Lab scale에서의 고분자 천연물질을 분획하기 위하여 그림 17의 방법으로 수행하였다. 먼저 5L jar fermenter 수준으로 배양을 한 후 원심분리 하여 얻은 상층액을 이용하여 고분자 천연물질을 추출하였다. 추출 방법으로 분자량이 큰 물질을 추출하는데 많이 이용되는 한외여과법을 선택하였으며, Ultra filtration(M.W.C.O. 100,000)을 통과시켜 분자량 100,000 이상의 고분자 물질의 시료를 채취하여 분말과 액상 제형에 이용하였다. 또한 추출과정에서 생기는 단계별 시료를 채취하여 각각에 대한 CMV 감염억제효과를 검정하였다.

그 결과 위에서 선별한 산업용 배지를 5L jar fermenter에 배양하여 얻은 배양액에서 85.2%의 CMV 감염억제효과를 나타내었다. 또한 원심분리 후 얻어낸 상층액과 pellet층에서 각각 84.1%와 76.6%의 우수한 감염억제효과를 나타내었다(표 20). 이는 고분자 천연물질이 상층액 뿐만 아니라 pellet층에서도 다량 함유되어 차후 제품 개발 시 중요한 factor가 될 것이라고 판단된다. 다시 말해서 고분자 천연물질의 추출효과를 극대화하기 위하여 pellet 자체의 열처리를 통하여 세포외벽과 세포 주변의 고분자물질까지 추출할 수 있음을 의미한다. 또한 한외여과법으로 추출 하는 과정에서 채취한 sample 중 Ultra filtration(M.W.C.O. 100,000)을 통과시켜 얻어낸 분자량 100,000 이하의 시료에서는 CMV 감염억제효과를 볼 수 없었고, 분자량 100,000 이상의 시료와 이를 동결건조 시킨 후 얻은 분말시료에서 80% 이상의 우수한 CMV 감염억제효과를 볼 수 있었다(표 20). 따라서 *Serratia* Gsm01이 생산하는 고분자 천연물질은 분자량 100,000이상의 고분자 물질임을 확인 할 수 있었다.

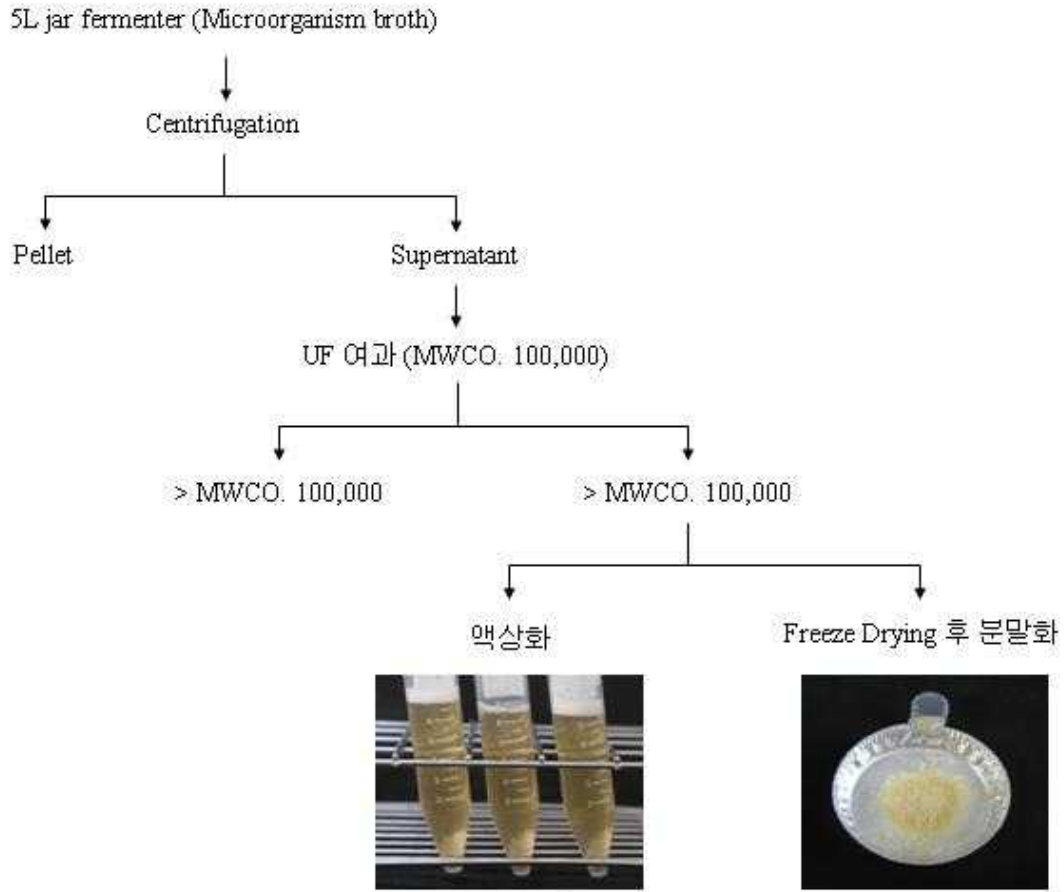


그림 17. 후공정 개발을 위한 활성 물질 분획 모식도

표 20. 분획 단계별 CMV 감염억제효과 검정

처리구	CMV 감염억제효과 (%)
배양액	85.2
원심분리 후 pellet	76.6
원심분리 후 supernatant	84.1
UF 여과 후 > MWCO. 100,000	82.7
UF 여과 후 < MWCO. 100,000	10.0
< MWCO. 100,000 후 동결건조 분말	86.3

(2) 고분자 천연물질의 대량생산 후공정 개발

Lab scale에서 확인한 고분자 천연물질을 대량으로 생산하기 위해서 scale-up을 통한 효율적인 생산 공정이 필요하다. 따라서 생산 공정의 scale-up시 활용할 수 있는 여러 가지 생산 장비에 대한 점검이 필요하다. 그림 18은 고분자 천연물질의 효과적인 생산 공정을 모식도로 나타내었다. 우선 *Serratia* Gsm01을 배양 한 후 세포와 고분자물질을 분리하여 추출 및 정제, 건조하는 단계로 구성되어 있다. 본 연구에서는 이러한 공정의 효율을 극대화하고 청정성을 개선하기 위하여 기기의 선발과 그에 따른 조건을 최적화 할 것이다.

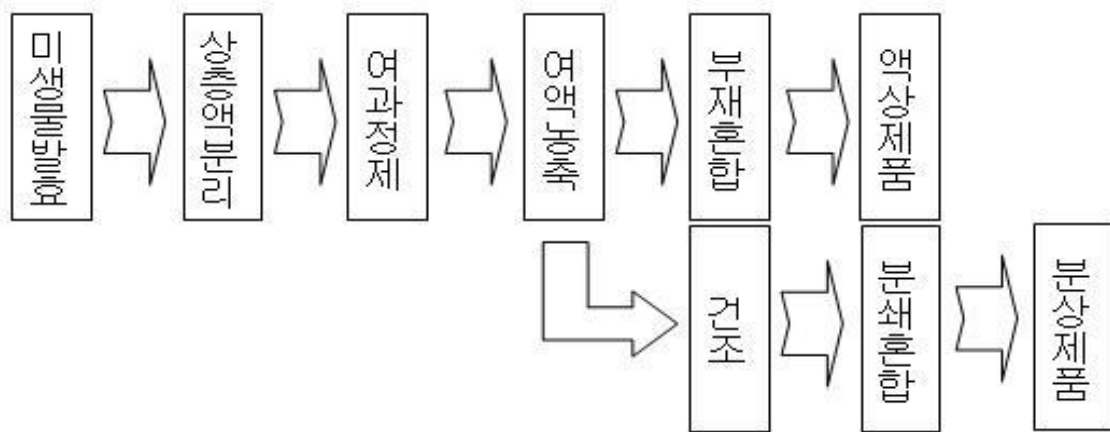


그림 18. 고분자 천연물질의 생산 공정 모식도

(가) 세포의 분리 및 여과 방법의 선택

고분자 천연물질을 효과적으로 생산하기 위해서는 발효공정 후 세포를 제거하는 여과공정이 필수적이다. 일반적으로 pilot plant 공정 중에서 여과공정을 하기 위해서는 연속식 원심분리거나 막 여과장치를 사용하고 있고, 여러 가지 여과공정 기기 중 최적의 여과기기를 선별하여야 한다. 본 시험에서는 배양 scale에 따른 고분자 천연물질을 분리하기 위한 최적의 장비를 선별하고자 수행하였다. 시험에 사용한 기기는 연속원심분리 형태의 Tomoe와 Alfal laval을 사용하였고, 막 여과 방식인 Pall. sep. 기기를 사용하였다(그림 19).

그 결과 여러 기기들의 판매원과 생산기술 연구원들의 매뉴얼과 조언을 바탕으로 각 기기의 장단점을 표 9와 같이 분석하였다. 각각의 기기들마다 가격이나 효율 면에서 서로의 장단점을 가지고 있었다. 50L 이하의 small scale 배양액에서는 정제 효율성과 가격 면에서 Tomoe가 가장 우수한 효율성을 가지고 있었고, 500L 이상의 large scale 배양액에서는 Pall. sep.이 정제 효율성에서 우수하게 나타났다. 하지만 Alfal laval에서는 정제 시간이 짧은 장점이 있는 것에 비해 정제효율이 다른 장비와 비교 하였을 때 효율성이 낮아 고분자 천연물질을 생산하기 위한 여과공정에는 적당하지 않다고 판단된다(표 21).



Tomoe



Pall. Sep.



Alfal laval

그림 19. 여과 정제 장치

또한, 기기를 선발하기 위하여 반복적으로 50L와 500L pilot plant 미생물 발효를 실시하였고 각각의 배양액을 여과 시킨 뒤 여과액에 대한 CMV 감염억제효과를 점검해 비교하였다. 그 결과 3가지 기기로 여과한 배양액의 여액에서 모두 80% 이상의 CMV 감염억제효과를 나타내어 상층액에 대한 여과 시 기기에 대한 영향은 없는 것으로 판단된다(표 21).

표 21. 3종의 기기로 여과한 여과액의 CMV 감염억제효과 검정

	CMV 감염억제효과(%)	
	50L 배양 여과액	500L 배양 여과액
Tomoe	84.1	85.4
Pall. sep	83.6	84.0
Alfal laval	80.2	82.4

3종의 기기를 분석한 결과 Pall. sep.을 고분자 천연물질을 생산하기 위한 여과 장치로 선택할 수 있었다. Pall. sep.은 정제 효율이 높을 뿐만 아니라 공정상 발생될 수 있는 오염 문제를 사전에 방지할 수 있으며 살균·세척의 용이함으로 생산 공정에 적합하리라 판단된다(표 22).

표 22. 3종의 여과 정제 기기의 장·단점 비교

항목	Tomoe	Pall. sep	Alfal laval
장점	<ul style="list-style-type: none"> - 작업시간이 짧다 - 장비 가격이 저렴하다 	<ul style="list-style-type: none"> - 작업시간이 짧다 - 정제효율이 높다 - 살균·세척의 용이 	<ul style="list-style-type: none"> - 유지보수비가 적다 - 범용 적으로 사용 가능
단점	<ul style="list-style-type: none"> - 외부 오염 노출 - 수동 작업이 필요 	<ul style="list-style-type: none"> - 고가의 소모성 부품 - 별도의 sub tank 설치 	<ul style="list-style-type: none"> - 작업시간이 길다 - 전력소모가 크다 - 정제효율이 낮다
정제효율	90%	98%	85%
평가	- Small scale에 적당	- Large scale에 적당	- 상층액 분리시 정제 효율이 매우 낮다

(나) 배양 상층액의 미생물 잔존 분석

산업용 기기는 대량생산을 기본으로 하기 때문에 일반 실험실에서 소량을 원심 분리하는 것과 같이 완벽하게 미생물을 분리 할 수 없는 단점을 가지고 있다. 본 연구에서는 원심분리 공정에서 사용한 3가지 장비에서 분리한 상층액의 미생물 잔존여부를 확인하기 위하여 희석평판법에 의하여 분석하였다. 사용된 장비에서 Tomoe에서는 약 5.5×10^2 cfu/ml, Pall. sep.에서는 2.5×10^2 cfu/ml, Alfal laval 에서는 3.6×10^3 cfu/ml의 미생물이 검출 되었다(그림 20). 따라서 원심 분리 후의 미생물의 완전 사멸을 위한 새로운 공정이 추가 되어야 한다고 사료된다.



그림 20. 배양 상층액의 미생물 잔존 분석(MGY agar 배지 10^{-1} 희석액)

(다) 배양 상층액의 미생물 사멸 공정.

배양 상층액에서 검출된 원균주를 완전히 사멸하기 위하여 boiling 공정과 자외선 조사 그리고 0.45um filtering을 통하여 잔존 균을 사멸시킨 후 CMV 감염억제효과를 검정하였다(그림 21). 그 결과 자외선 조사법과 filtering 방법을 처리한 배양 상층액은 활성을 유지하는 반면 boiling 처리 시 활성이 약간 감소되는 현상을 나타내었다(표 23). 따라서 대량 생산 후공정 개발 시 boiling 공정은 배제되어야 한다고 사료된다.



그림 21. 배양 상층액의 미생물 사멸 공정 처리 후

표 23. 배양 상층액의 미생물 사멸 공정 처리 후 CMV 감염억제효과 분석

공정	CMV 감염억제효과 (%)	비고
배양여액(+control)	82.1	
Boiled	60.8	95℃ 10min 처리
filtering	85.4	0.45um filter
자외선 조사	83.2	자외선 12시간 조사

(라) 여과 정제 및 농축공정

고분자 천연물질 추출물을 건조하기 위해서는 반드시 부피를 줄여야 한다. 따라서 원심 분리한 배양 상층액을 여과 정제 및 농축하기 위하여 농축기 2종을 대상으로 그 효율을 측정하였다(그림 22). 시험에 사용한 생산용 농축기기는 한외여과시스템(ultra filtration system)과 감압농축시스템이다. 한외여과기의 카세트의 MWCO(molecular weight cut off)은 일반적으로 사용되는 10,000을 사용하여 분자량 5,000 이하의 물질, cell 찌꺼기들은 waste로 빠져나가 정제 효과를 동반할 수 있으며, 고분자 천연물질과 같은 고분자 물질은 계속 농축된다. 감압농축시

시스템은 배양액을 추출기에서 흡입한 후 60℃ 전후의 온도로 열을 가하면서 압력과 진공을 걸어 주면 물의 끓는점이 낮아져 물이 증발되고 전체적인 액량을 줄이는 농축법이다.

두 종의 여과 정제 및 농축공정 기기를 분석한 결과 고분자 천연물질을 추출 및 정제하는 기기로 한외여과시스템을 사용하기로 하였다. 두 장비 모두 고분자 천연 물질을 농축하기에는 문제가 없었으나 정제효과나 대량 배양에 사용이 용이한 장점을 살려 한외여과시스템을 이용한 고분자 천연물질을 분리 정제 공정에 사용하기로 하였다(표 24). 또한 한외여과시스템은 고분자 천연물질의 안정성 확보 및 오염가능성을 최소화시켜주는 장비로 평가되었다.



그림 22. 여과 정제 및 농축공정 기기

표 24. 여과 정제 및 농축공정 기기에 따른 CMV 감염억제효과 분석

공정	CMV 감염억제효과 (%)	장점
배양여액(+control)	80.4	
한외여과기	79.5	작업 속도가 빠름
감압농축기	72.1	가격이 저렴함

(마) 건조공정

① 건조 공정 기기의 선별

미생물을 이용한 제제는 액상과 분상으로 나뉘지만 본 과제 of 미생물 추출물은 고함량으로 오랫동안 유지하기 위하여 고분자 천연물질을 건조하는 공정이 필수적이다. 고분자 천연물질을 건조하기 위하여 일반적으로 산업 현장에서 많이 사용하고 있는 동결건조법과 Spray dryer에 대한 최적의 건조방법을 연구하였다(그림 23). 원심분리와 농축의 공정과정을 거친 고분자 천연물질의 농축액에 대하여 건조시간 및 최종 product의 CMV 감염억제 효과를 분석하여 각각의 장·단점을 확인하였다.



그림 23. 고분자 천연물질 건조용 산업용 후공정 기기

시험 결과 최종 고분자 천연물질 생산 여액을 동결건조 할 경우 건조 시간은 3~4일이 소요 되었고 최종 농축된 product(분상)를 이용한 CMV 감염억제 효과는 90.3%로 매우 높았다. 또한, Spray dryer할 경우 건조 시간은 1~2일로 비교적 단축되는 장점을 나타내었다. 그러나 최종 건조물의 CMV 감염억제 효과는 80.4%로 감소되는 것으로 나타났다. 이는 최종 product가 농축된 결과물임을 감안 할 때 동결 건조기에서의 효율이 더 높았음을 확인 할 수 있었다.

② 건조 공정에서의 안정한 carrier 선발

최종 고분자 천연물질의 건조 공정 중 배양 여액 농축액과 그 액의 carrier의 역할을 하는 여러 가지 부제를 혼합한 후 활성 물질의 안정성을 점검하였다.

그 결과 3가지 부제 모두 활성 물질을 저해를 하는 요인을 볼 수 없었다(표 25). 그러나 부제를 혼합함에 있어 수분이 배양여액 농축액에 대비하여 줄어들어 따라 건조 시간을 단축 할 수 있는 장점을 나타내어 생산비 절감의 효과를 가질 수 있다고 판단된다. CMV 감염억제효과 및 동결건조 시간을 보았을 때 건조 공정에서 Carrier-3을 선발하였다.

표 25. 건조공정 중 carrier에 따른 CMV 감염억제효과 분석

Carrier	CMV 감염억제효과 (%)	동결건조 시간(hrs)
배양여액 농축액	82.0	72
배양여액 농축액 + Carrier-1	81.1	50
배양여액 농축액 + Carrier-2	78.2	56
배양여액 농축액 + Carrier-3	80.5	42

이상의 결과로 고분자 천연물질의 산업화 대량 생산 시스템 및 후공정 시스템을 확립하였

다. 그림 24는 고분자 천연물질 생산을 위한 모식도로써 5,000L 수준의 대량 배양 조건의 확립과 후공정의 안정성을 확보하여 고분자 천연물질의 산업화의 가능성이 있었으며 바이러스에 대하여 감염억제 효과가 있는 고농도의 고분자 천연물질을 확보 할 수 있었다.



5,000L 발효시스템 대량 배양 공정



Pall sep.을 이용한 분리공정



한외여과기의 농축공정



동결건조기의 건조공정



자외선 조사를 통한
미생물 제거한 원재 확보

그림 24. 고분자 천연물질 대량 생산을 위한 모식도.

2. 고분자 천연물질과 혼합/혼용 가능한 약효 상승제의 개발

가. 혼합제 개발을 위한 약효 상승제에 대한 조사 분석

식물 바이러스병의 방제는 바이러스에 직접적인 약제가 없는 것이 현실이기 때문에 경종적 방제 방법인 이병체 제거, 바이러스 매개체인 진딧물과 메뚜기 등의 곤충 그리고 선충 구제, 저항성 품종 이용, 포장 위생, 윤작, 간작 및 경작시기의 조절 등의 방법이 사용되고 있는 실정이다. 그러나 이들 방법은 직접적으로 식물 바이러스를 방제하는 방법이 아닌 매우 소극적이며 비효율적인 방법으로 식물 바이러스병 방제가 불가능하다고 알려져 있다. 그렇기 때문에 현재 선진국을 위주로 항바이러스 효과를 나타내는 물질 개발 및 저항성 품종 개발에 관한 연구가 집중적으로 진행되었으며, 실용화를 위한 진입단계까지 성공을 하고 있다. 또한, 화학물질을 이

용해 바이러스 병을 치료하고자 하는 연구는 50년 이상의 오랜 역사를 가지고 있으며 그동안 표 26과 같이 다양한 종류의 바이러스 감염, 증식 저해 물질로 알려져 왔다. 그러나 대부분 실용화되지 못했으며 실제로는 유기산들의 혼합체나 당들의 ester 결합에 의한 혼합체들이 개발되어 있으나 효과가 미비하거나 처리농도, 처리시간, 실제 포장에서 나타나는 바이러스의 농도나 복합 감염 여부에 따라 반응하는 양상이 다르게 나타나고 있다.

따라서 본 연구팀이 개발한 고분자 천연물질의 산업화를 위해서는 CMV 감염억제효과를 상승시키기 위하여 약효상승제의 첨가가 필수적이라 판단된다.

표 26. 식물바이러스의 감염과 증식을 저해하는 물질

약효 상승 물질	내용
식물유래 물질	자리공과, 시금치, 카네이션, 비름과, 명아주과 등의 식물 추출액
미생물 유래 물질	Trichothecium roseum의 배양여액, 담자균류 자실체 추출물, 효모 균체 추출물
항생물질	Blasticidin S, Aabomycin A, Horomycin B, Miharamycin
그 외기타 물질	우유, 탈지분유, 유청, 식물유

<http://bric.postech.ac.kr/webzine>) Vol. 6, No. 3

나. 배양 원액과 약효 상승제의 혼합/혼용시 활성적 안정성 조사

식물 바이러스병의 방제로 열치료, 약품처리, 자외선 등을 이용한 바이러스의 불활성화, 항생물질 등의 처리가 이용되고 있다. 하지만 친환경이 대두되고 있는 시점에서 연구자들은 생물적 방제에 관심을 보이게 되었고, 이중에서도 약독바이러스의 이용과 단백질, 다당류 및 알칼로이드 등의 물질이 항바이러스 효과가 있는 것으로 알려지게 되어 식물 바이러스 방제제 개발을 위한 기초자료가 되고 있다.

고분자 천연 물질 혼합제 개발을 위한 기초 연구로 배양 원액에 대하여 혼합/혼용 시 안정성 점검을 실시하였다. 약효상승제로 탈지분유(skim milk powder)와 유청 분말 파우더를 선발하여 농도를 각각 0.1%, 0.5%, 1.0% 농도별로 혼합/혼용하여 혼합제의 CMV 감염억제효과에 대하여 점검하였다.

그 결과 탈지분유와 유청분말 두 시료 모두 고분자 천연물질의 활성에 영향을 미치는 요인은 없었고, 배양 원액의 CMV 감염억제효과와 비교하여 다소 높은 감염억제효과를 볼 수 있었다(표 27). 따라서 차후 고분자 천연물질의 제형화에서 약효 상승을 위한 부성분으로 활용 가능 할 것이라고 판단된다.

표 27. 배양 원액과 약효상승제의 혼합/혼용 시 안정성 분석

약효상승제	함량 (%)	CMV 감염억제효과 (%)
탈지분유 파우더	무첨가	82.3
	0.1	82.6
	0.5	83.9
	1.0	85.5
	무첨가	82.3
유청분말 파우더	0.1	82.1
	0.5	84.2
	1.0	84.9
	무첨가	82.3

다. 고분자 천연물질 원제와 약효상승제의 혼합/혼용 시 안정성 분석

(1) 원제와 약효상승제의 혼합/혼용 시 안정성 분석

고분자 천연물질의 바이러스에 대한 효과를 상승시키기 위한 약효상승제를 선발하여 건조된 최종 product 분말과 혼합/혼용하여 CMV 감염억제 효과를 점검하였다. 1차 년도에서 선발한 탈지분유 파우더와 유청분말 파우더 외에 Yeast extract, 미생물 유래 물질 등을 혼합하여 제형을 한 뒤 활성에 대한 안정성 조사를 실시하였다. 제형된 4가지에 제품에 대하여 100배 희석한 물질을 분무처리 하고 공시작물인 명아주에 스프레이 처리하였다. CMV의 감염억제 효과는 4가지 제형 모두에서 안정하게 나타나 고분자 천연물질 단독 처리에 의한 CMV 감염억제 효과와 비교하여 다소 높은 감염억제효과를 볼 수 있었다(표 28). 따라서 차후 고분자 천연물질의 제형화에서 약효 상승을 위한 부성분으로 활용 가능 할 것이라고 판단된다.

표 28. 고분자 천연물질 원제와 약효상승제의 혼합/혼용 시 안정성 분석

제형	함유량			CMV 감염억제효과 (%)
제형 1	고분자 천연물질	탈지분유 파우더	etc	91.6
	30%	10%	60%	
제형 2	고분자 천연물질	유청분말 파우더	etc	86.7
	30%	10%	60%	
제형 3	고분자 천연물질	Yeast extract	etc	93.1
	30%	10%	60%	
제형 4	고분자 천연물질	미생물 추출물	etc	85.1
	30%	10%	60%	

(2) 수용액상에서의 안정성 점검

미생물 천연물질을 이용한 작물보호제에서의 약효 상승제의 선발은 유효성분의 안정성 및 효과증진에 미치는 영향이 크므로 처방 검토에 필수적이라 하겠다. 다양한 문헌과 시험자료를 바탕으로 다양한 부자재가 약효증진 효과를 보일 수 있음을 확인하였고 실제적으로 효과가 확인되거나 제제검토에 이용된 경우도 있다.

본 연구에서는 4가지 제형의 시료를 이용하여 멸균수에 100배 희석액 수준으로 현탁하여 시간별 고분자 천연물질의 활성 안정성을 점검하였다.

그 결과 24시간 현탁액까지 활성을 저해하는 요인은 없어 모두 안정함을 나타내었다(그림 25).

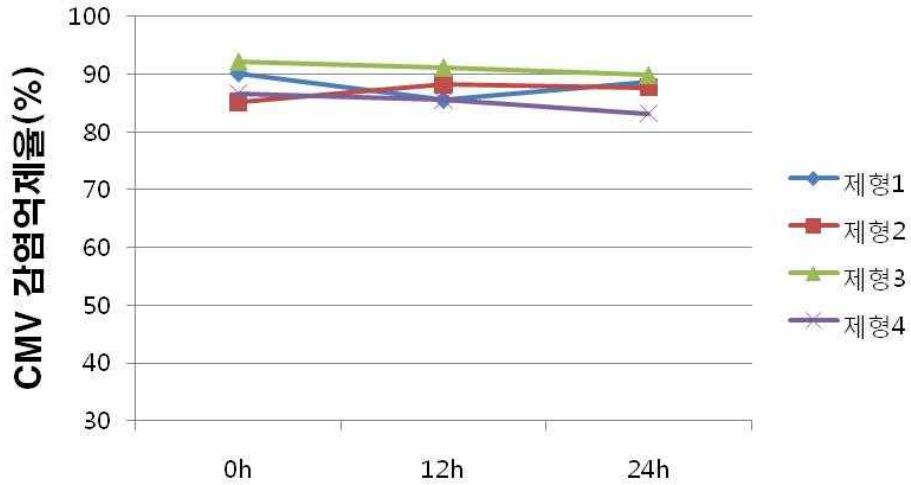


그림 25. 약효상승제의 수용액상에서의 안정성 점검

(3) 약효상승제의 경시안정성 분석

제형 4가지의 온도에 대한 경시변화 분석을 통하여 혼합 안정성을 점검하였다. 각각의 제형을 잘 밀봉한 후 54°C의 incubator에 보관한 뒤 각각 0주차부터 8주차까지 2주 간격으로 샘플 분석을 실시하였다. 그 결과 제형 4가지 모두 고온에서 안정되었음을 확인하였다(그림 26).

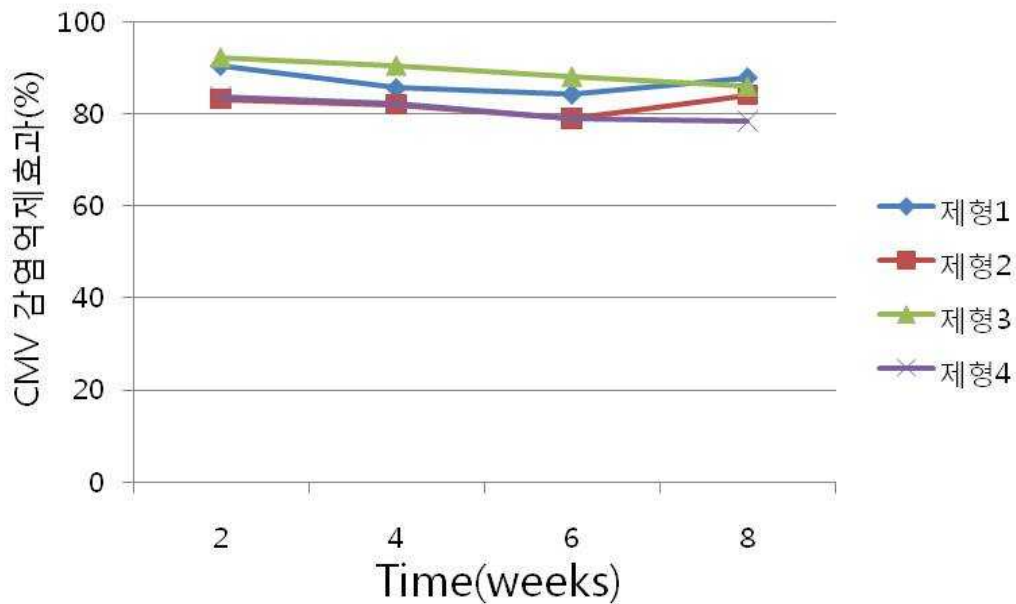


그림 26. 약효상승제의 경시안정성 분석

(4) 지역별 농업용수에 대한 안정성 분석

고분자 천연 물질에 약효상승제를 혼합한 제형별로 일반적으로 농업인이 사용하는 농업용수를 지역별로 채집하여 활성 여부를 검토하였다. 농업용수는 강원도 춘천과 철원 지역, 충북 음성, 경기도 화성지역의 농업용수를 이용하였다. 각 지역의 농업용수에 대한 유효 활성에 저해 요인은 없었던 것으로 확인 되었다(그림 27).

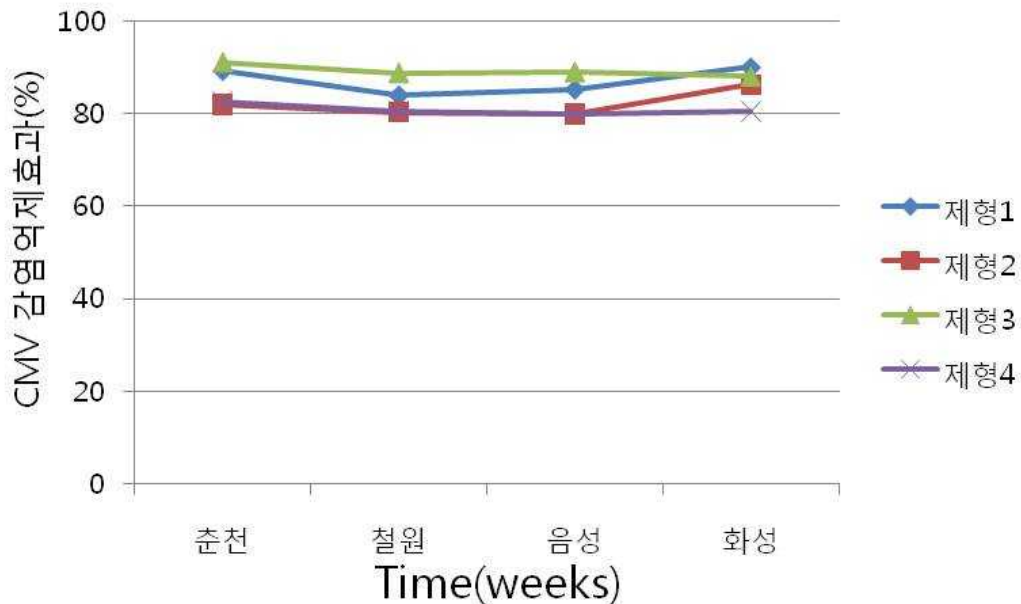


그림 27. 지역별 농업용수에 대한 안정성 분석

(5) 약효상승제의 최적 혼합비율 점검

위의 연구 내용에서 4가지의 약효상승제 중 Yeast extract 분말이 온도나 농업용수에 대하여 상당히 안정적인 것으로 확인 되었다. 그러나 Yeast extract는 Kg당 17,000원 고가의 원료로 10%의 함량으로 제조가 된다면 가격 경쟁력이 없음을 알 수 있다.

따라서 본 연구에서는 약효상승제로 선발된 Yeast extract의 최적 혼합비율을 설정하여 가격경쟁력과 약효상승의 효과를 보고자 수행하였다. 고분자 천연물질 30%와 Yeast extract를 각각 1%, 5%, 10%의 함량으로 보정 한 뒤 증량제로 제조하였다.

그 결과 기존 제형보다 50%의 원료가 절감된 새로운 제형3-1을 확인할 수 있었다(고분자 천연물질 30%+Yeast extract 5%+etc 65%)(표 29).

표 29. 약효상승제의 최적 혼합비율 점검

약효상승제	함량 (%)	CMV 감염억제효과 (%)
Yeast extract	무첨가	83.8
	1	83.1
	5	88.4
	10	92.9

(6) 선발된 제형에 대한 생물 활성 검증

약효상승제를 첨가한 제형 3-1을 이용하여 명아주와 피망에 대한 생물 활성 검정을 실시하였다. 명아주에 스프레이 처리를 하고 고분자 천연 물질을 자연 건조 시켜 caborandum 법으로 바이러스를 유발하여 CMV에 대한 감염억제효과를 검증하였다. 그 결과 그림 28과 같이 무처리 대비하여 상당히 억제되었음을 확인하였다(90% 이상).



그림 28. 제형3-1 처리에 의한 CMV 감염억제효과 검증

또한 피망에 대한 CMV 감염억제효과에서는 무처리구는 바이러스의 전형적인 위축증상과 황화증상을 보인 반면 제형3-1 처리구는 건전하게 자라 바이러스를 예방하는 효과를 나타내었다(그림 29).



그림 29. 제형3-1 처리에 의한 CMV 감염억제효과 검정(피망 유묘검정)

3. 친환경 부성분 선발을 통한 저독성 제형 개발

가. 활성 물질의 특성 분석

친환경적 부성분 선발을 하기 위해서는 CMV 바이러스에 대한 억제 효과를 나타내는 물질의 특성을 알아야 할 것이다. 지난 연구에서 고분자 천연물질은 분자량이 100,000이상인 고분자량의 활성물질이므로 활성물질의 특성을 분석하기 위하여 배양 여액의 활성물질을 분리 및 추출하였다.

물질의 특성을 규명하고 제형검토에 필요한 항목으로 활성물질을 포함하여 원제의 약효활성, 처리방법, 물리화학적 등이 있다. 본 제형연구에서는 *Serratia* Gsm01의 배양여액의 경우 CMV 바이러스에 우수한 활성을 보이는 물질로 사용방법은 희석하여 사용하는 것이므로 결국 원제의 물리화학적 특성에 대한 특성조사가 제형연구에 있어서는 원제의 성상과 용해도 그리고 안정성 등이 가장 중요한 특성들이다. 먼저 용해도는 작물보호제 제형을 결정하는 1차적 요소이므로 우선적으로 조사를 실시하였다.

그 결과, 활성성분은 수용성의 성질을 가지고 있는 것으로 확인되었다(제1협동과제). 또한 제형화 연구를 위한 시료의 성상은 액상의 경우 연한 갈색의 전형적인 배지배양액이었고 동결 건조물의 형태는 갈색의 분말형태로, 물에 희석 시 비교적 잘 수화되는 현상을 나타낸다. 활성 성분인 고분자 천연물질은 열에 안전하며 pH 3~9 조건에서도 활성의 변화가 유지됨에 따라 기본적인 일반적인 부재의 사용에 큰 무리가 없을 것으로 판단되었다.

나. 친환경 부성분 선발을 통한 저독성 제형 개발

우선 제형화 할 시료가 액상의 경우 액상수화제로서의 제형 검토가 이루어졌다. 하지만 액상수화제의 경우에는 수화성이나 CMV 감염활성에는 문제가 없었으나 원제 제조과정 중에 포함된 이물질 등으로 장기간 보존 시에 층분리 문제와 함께 제품이 변질되는 문제점이 발견되

었다.

따라서 동결 건조된 분상 원분을 대상으로 처방검토를 실시하였다. 고상제형의 경우, 1차적인 검토제형으로는 수화제의 처방검토를 실시하였다. 이러한 수화제에 대한 검토결과는 향후 제형화 다양성에 대한 검토 시에 활용할 수 있는 자료로 충분하다. 수화제는 관리법상 분상으로 물에 희석하였을 때 수화되는 것으로 유효성분, 수화성 그리고 분말도를 이화학적 검사항목으로 하고 있다.

(1) 증량제(carrier)의 친환경적 부성분 탐색

(가) 친환경적 증량제 선발

고분자 천연물질을 이용한 작물보호제의 원분에서 유효 함량은 20~30% 수준으로 맞추어 제형을 한다. 또한, 실제 농민이 사용하는 유효 함량은 이보다 더 낮기 때문에 제형 개발 시 희석배수를 고려한 증량제의 첨가가 필수적이다. 먼저 제형화를 위한 유효성분의 함량은 약효 증진제 연구와 동일하게 30%로 정하여 처방검토를 실시하였고, 증량제는 시중에 식품 첨가용으로 사용되는 천연물질 3종을 대상으로 원가 및 안정성 분석을 실시하였다.

그 결과 수화성이나 분말도에서는 모든 제품에서 우수하게 나타났지만 다당류2>다당류1>고분자 천연물질>다당류3의 순으로 조사되었다(그림 30).

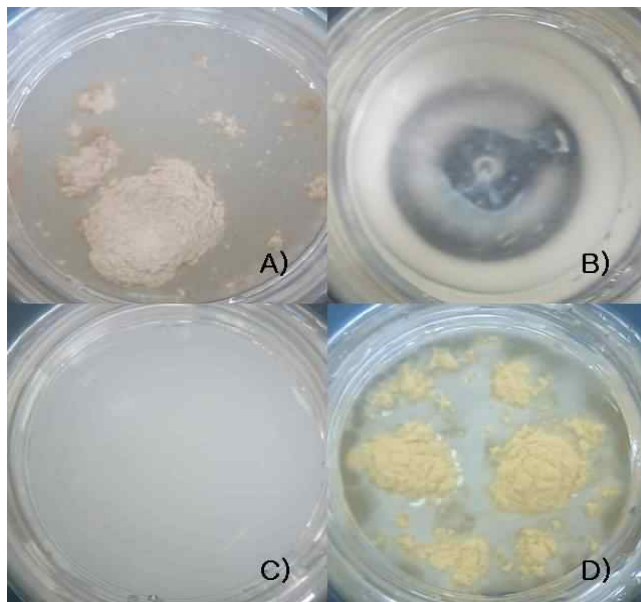


그림 30. 각 처방에 따른 증량제의 수화성 검토 A) 고분자 천연물질 원제, B) 원제 + 식품용 다당류 1, C) 원제 + 식품용 다당류 2, D) 원제 + 식품용 다당류 3

CMV 감염억제 효과 역시 모든 처방에서 80%이상의 높은 활성을 나타내었다(표 30).

표 30. 증량제의 친환경적 부성분 탐색

Sample	CMV 감염억제효과(%)	수화성	분말도
고분자 천연물질 원제	89.2	양호	양호
원제 + 식품용 다당류 1(처방 1)	87.1	양호	양호
원제 + 식품용 다당류 2(처방 2)	85.6	양호	양호
원제 + 식품용 다당류 3(처방 3)	88.5	보통	양호

(나) 친환경적 증량제의 안정성 점검

① 수용액상에서의 안정성 점검

본 연구에서는 3가지 증량제 선발을 위한 제형 시료를 이용하여 멸균수에 100배 희석액 수준으로 현탁하여 시간별 고분자 천연물질의 활성 안정성을 점검하였다.

그 결과 24시간 현탁액까지 활성을 저해하는 요인은 없어 모두 안정함을 나타내었다(그림 31).

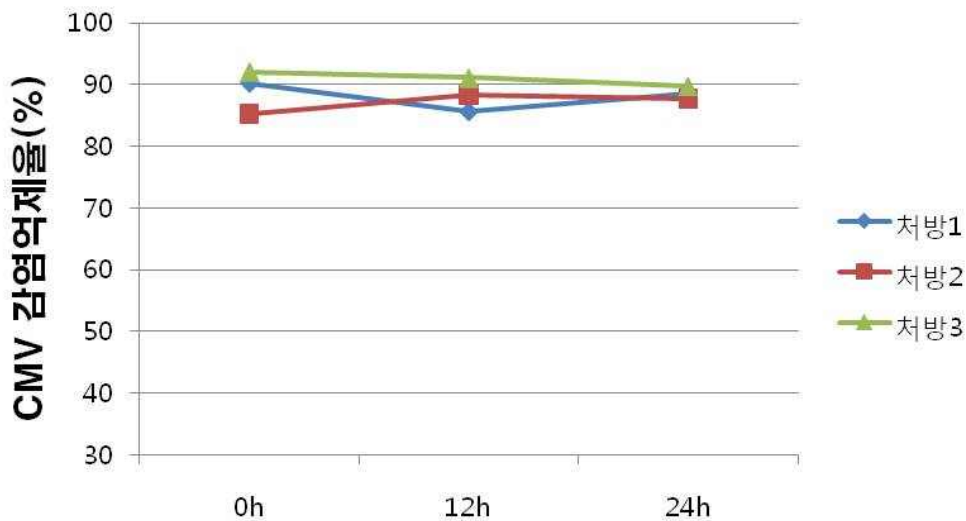


그림 31. 증량제의 수용액상에서의 안정성 점검

② 경시안정성 분석

처방 3가지의 온도에 대한 경시변화 분석을 통하여 혼합 안정성을 점검하였다. 각각의 제형을 잘 밀봉한 후 54°C의 incubator에 보관한 뒤 각각 0주차부터 8주차까지 2주 간격으로 샘플 분석을 실시하였다. 그 결과 처방 3가지 모두 고온에서 안정되었음을 확인하였다(그림 32).

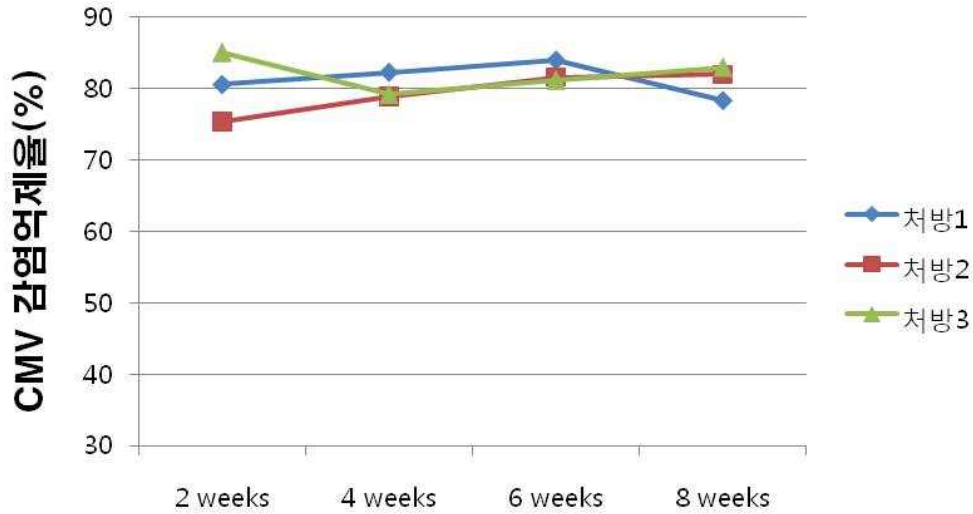


그림 32. 증량제의 경시안정성 분석

③ 지역별 농업용수에 대한 안정성 분석

고분자 천연 물질에 증량제를 혼합한 처방별로 일반적으로 농업인이 사용하는 농업용수를 지역별로 채집하여 활성 여부를 검토하였다. 약효증진제 선발과 동일한 조건으로 강원도 춘천과 철원 지역, 충북 음성, 경기도 화성지역의 농업용수를 이용하였다. 각 지역의 농업용수에 대한 유효 활성에 저해 요인은 없었던 것으로 확인 되었다(그림 33).

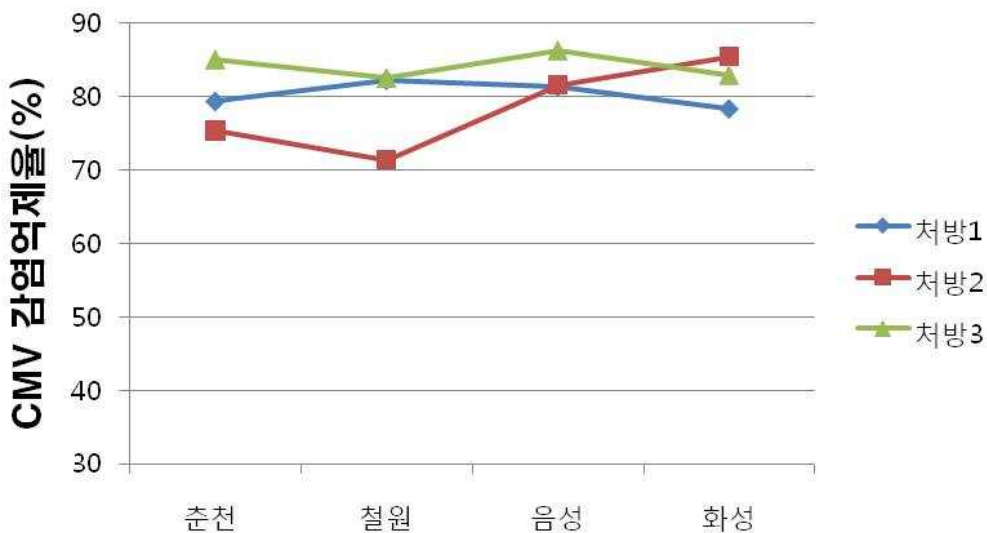


그림 33. 증량제의 지역별 농업용수에 대한 안정성 분석

(다) 처방에 따른 물리성 검토

고분자 천연물질 원제와 증량제의 제형을 통하여 각각의 증량제에 따른 물리성을 검토하였

다. 표 31과 같이 3가지 증량제 모두 수화성, 분말도, 저장안정성에서 양호한 결과를 도출 할 수 있었다. 이는 친환경적 증량제 선발에 따른 다양한 제형이 가능할 것으로 판단이 된다.

표 31. 증량제 혼합에 따른 물리성 검토

검토	처방 1	처방 2	처방 3	검토항목
제제형태	수화제	수화제	수화제	
외관(색)	연한갈색	연한갈색	갈색	
수화성	양호	양호	보통	2분 이내
분말도	양호	양호	양호	325mesh, 98% 통과
저장안정성	양호	양호	양호	54℃, 8주간

(라) 처방에 따른 생물 활성 검정

고분자 천연물질 원제와 증량제의 제형을 통하여 각각의 증량제에 따른 생물 활성 검정시 안정성을 검토하였다(표 32).

시험 결과 식품용 다당류 3의 처방 3에서 CMV 감염억제 효과가 88.2%로 가장 높게 나타났다. 그러나 수화성 검토에서 다른 다당류에 비하여 떨어지는 결과를 나타내어 앞선 연구 결과에서 비슷한 효과를 나타내는 다당류 1을 제형에 적용하기로 하였다(그림 34).

표 32. 증량제 혼합에 따른 생물 활성 검정

Sample	국부 병반수(개)				CMV 감염억제효과 (%)
	1반복	2반복	3반복	평균	
원제 + 식품용 다당류 1(처방 1)	10	12	16	12.7	86.8
원제 + 식품용 다당류 2(처방 2)	64	10	3	25.7	73.2
원제 + 식품용 다당류 3(처방 3)	12	8	14	11.3	88.2
무처리	83	105	99	95.7	-

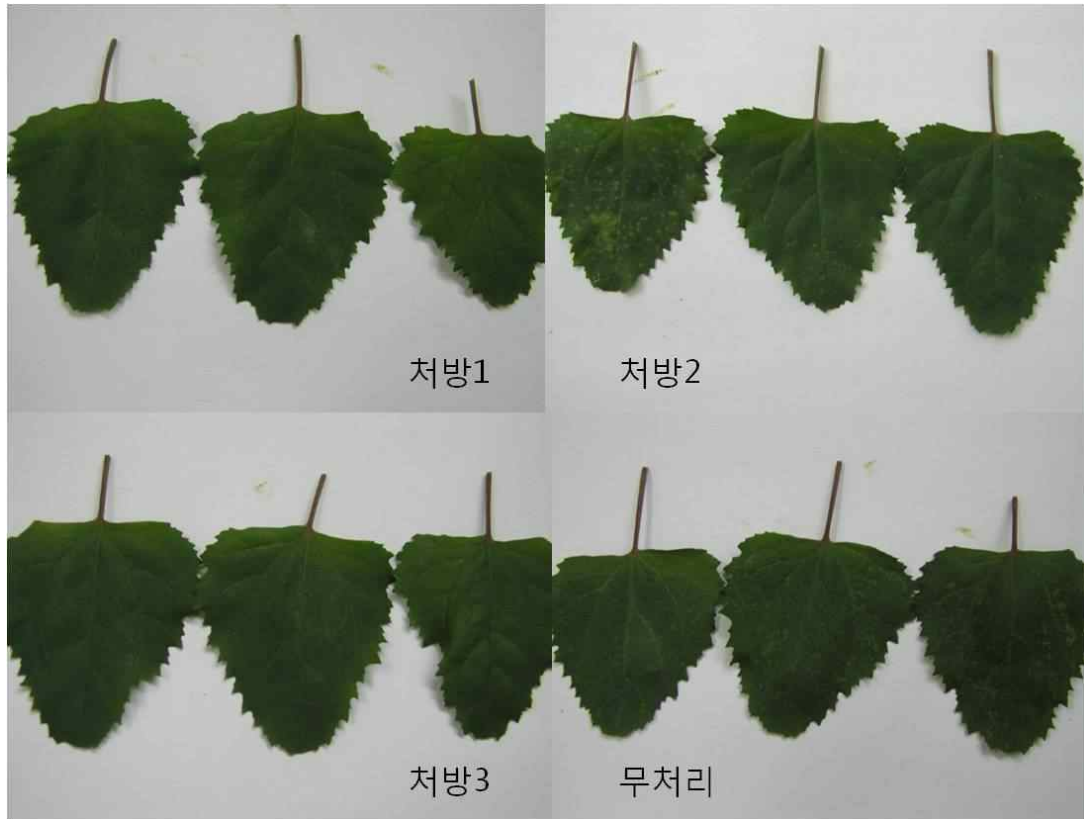


그림 34. 증량제 혼합에 따른 생물 활성 검정

다. 고분자 천연물질을 이용한 기초 제형화 연구 및 시제품 생산

(1) 고분자 천연물질을 이용한 기초 제형화 연구

(가) 제형 제조 레시피

고분자 천연물질을 주성분으로 하여 선행 연구에서 선발된 약효증진제와 증량제를 포함하는 제조 레시피는 표 33과 같다. 주성분 함량은 30%로 하였고 약효증진제와 증량제의 비율을 다르게 첨가하여 제조하였다.

표 33. 처방에 따른 제형 제조 레시피

재료명	Pi0801-30%	Pi0803-30%	Pi0805-30%	Pi0807-30%	비고
원제	30	30	30	30	
약효증진제 1 (제조사 A)	5	10			
약효증진제 2 (제조사 B)			5	10	
증량제	60	65	60	65	
total	100	100	100	100	
수화성	양호	양호	양호	양호	2분 내외
색상	연갈색	연갈색	연갈색	연갈색	

(나) 제형 제조의 물리성 검토

① 기초제형의 입도분포

입도분포는 제형화 된 고분자 천연물질 4종에 대하여 100g를 정량 취한 후 325mesh(44 μ m) 체에 올려놓은 후 서서히 흔들여 준 다음 체에 걸러진 양을 백분율로 조사하였다. 그 결과 325mesh 체를 98% 이상 통과하였다(표 34).

표 34. 고분자 천연물질 기초제형의 입도분포

	Particle size (%)		비고
	1mm 이상	44 μ m이하	
Pi0801-30%	2.0	98.0	98% up
Pi0803-30%	1.8	98.2	98% up
Pi0805-30%	1.0	99.0	98% up
Pi0807-30%	1.5	98.5	98% up

② 기초제형의 수분함량 및 pH

수분함량은 약 3g를 정확히 취하여 소형칭량병에 넣은 후 110 $^{\circ}$ C로 조절된 건조기내에서 12

시간 이상 건조한 다음 무게 감소에 대한 백분율로 조사하였다. 그 결과 4가지 기초제형은 수분함량이 1% 미만인 것으로 나타났다. 제형제제의 pH 조사는 5%의 용액을 만들어 측정하였고, 원제는 pH 6.0~6.5 사이인 것으로 나타나 pH에 의한 원제의 영향은 없을 것으로 판단된다(표 35).

표 35. 고분자 천연물질 기초제형의 수분함량 및 pH

	수분함량 (%)	pH
Pi0801-30%	0.95	5.99
Pi0803-30%	0.80	6.05
Pi0805-30%	0.60	5.86
Pi0807-30%	0.90	6.23

(다) 제형 제조의 안정성 분석

① 수용액상에서의 안정성 분석

제조 레시피에 의한 제형별 수용액상에서의 활성 안정성을 점검하였다. 멸균수에 100배 희석액 수준으로 현탁하여 시간별 고분자 천연물질의 활성 안정성을 점검하였다.

그 결과 24시간 현탁액까지 80% 가량의 감염억제 활성을 나타내어 활성을 저해하는 요인은 없어 4가지 기초 제형의 실제 포장에서의 사용 가능성을 확인하였다(그림 35).

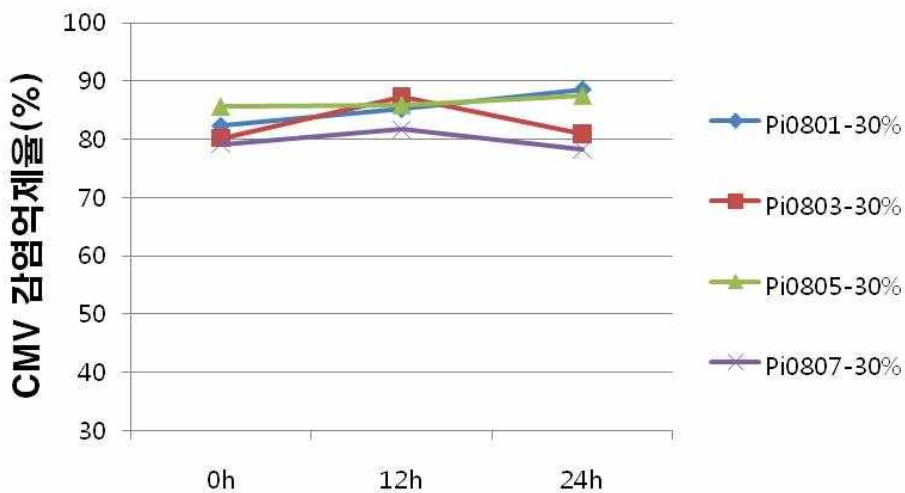


그림 35. 고분자 천연물질 기초제형의 수용액상에서의 안정성 분석

② 경시 안정성 점검

각각의 제조된 처방에 의한 Pi0801-30%~Pi0807-30%의 고온학대에 의한 CMV 감염억제 활성 안정성을 점검하였다. 각각의 처방된 시료를 제조하여 알루미늄 팩에 밀봉한 뒤 54°C로 고정되어 있는 배양기에 보관 한 뒤 2주, 4주, 6주, 8주에서의 CMV 감염 억제 활성을 검토하였다.

실험 결과 기초 제형 4가지 중 Pi0805-30%가 8주 동안 비교적 안정된 활성을 나타내었다 (그림 36).

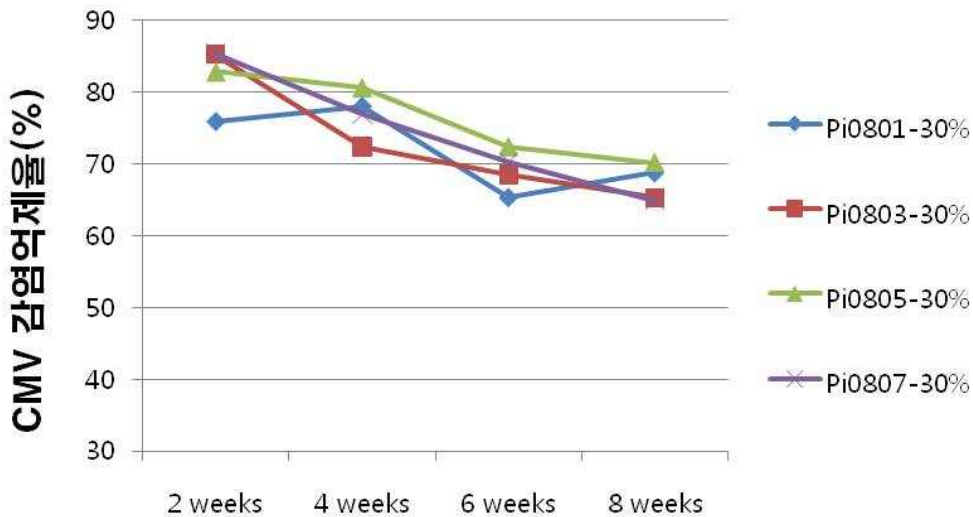


그림 36. 고분자 천연물질 기초제형의 경시변화 분석

(2) 시험용 시제품 생산

(가) 시제품 생산

선행 기초 제형화 시험을 통하여 선발된 시험용 시료를 제조하였다(code name : Pi0805-30%). 수화제의 제조과정은 동결건조 된 고분자 천연물질을 건식분쇄기를 이용하여 분쇄하였고, 선발된 약효증진제와 증량제를 함량에 맞춰 혼합 제조하였다(그림 37).



그림 37. 시제품 시료(code name : Pi0805-30%)

품질 검사 결과 수화성은 2분 이내였으며, 분말도는 325mesh에서 98% 통과하였다. 이렇게 제조된 Pi0805-30%는 2008년~2010년 포장시험용 시료로 제공하였다.

(나) 포장시험용 시제품(Pi0805-30%)의 최적 희석배수 점검.

고분자 천연물질이 고농축된 시제품 Pi0805-30%의 최적 희석배수 점검을 위하여 실내 유묘검정법으로 확인하였다. 시제품을 10배, 250배, 500배, 1,000배 희석하여 엽면 살포하고 CMV의 감염억제효과를 검정하였다. 그 결과 1,000배 희석까지도 제품의 안정성을 나타내었다(그림 38).

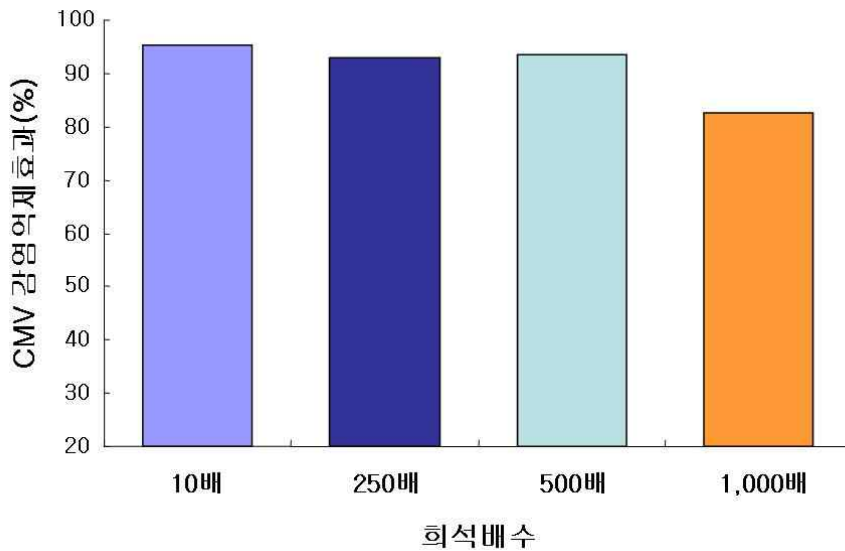


그림 38. 시제품(Pi0805-30%)의 최적 희석배수 점검

(다) 최종 제형 포장 및 단위 설정

최종 제형의 포장 단위는 농가 실증 참여 농가를 대상으로 설문조사를 한 결과, 유묘기, 생

육 초기에 엽면살포하는 특성에 따라 250L 기준에 적합한 250g의 포장 단위를 확정하였다.

4. 고분자 천연물질과 타농자재의 혼합제 개발

가. 타농자재와의 동시살포를 통한 고분자 천연 물질의 안정성 점검

현재까지 세계 각지에서 발견된 식물 바이러스는 약 800여 종에 이르는데 이것은 식물에 전염성 질병을 일으키는 병원체 중에서 진균 다음으로 많은 숫자이다. 이들 바이러스는 벼, 밀 등 세계의 주요 식량작물을 비롯해 수많은 원예 경제 작물에 침해하여 수량과 품질을 떨어뜨려 커다란 경제적 손실을 주고 있다.

특히 국내에서 분리·동정된 식물바이러스는 보고된 종만 50여 종 이상으로 다양하게 기주하고 있다. 국내에서 발생되고 있는 주요 바이러스 병은 진딧물에 의해 전염되는 바이러스로 CMV, TuMV, WMV, PVY등이 알려져 있다. 대부분의 바이러스가 진딧물이나 다른 매개충에 의해 전염되는 것이 대부분이므로 매개충 방제도 동시에 이루어져야 된다고 판단된다.

본 연구에서는 타농자재와의 혼합제 개발에 앞서 제형화 한 시료를 바탕으로 시중에서 사용되고 있는 타농자재와의 동시 살포를 통하여 고분자 천연물질의 안정성을 점검하고자 하였다.

(1) 살충제용 농자재와의 동시 살포를 통한 안정성 점검

Pi0805-30%를 다른 살충제용 농자재와 동시 살포하였을 때의 CMV 감염억제 효과를 검정하여 혼용에 대한 안정성 점검을 실시하였다. 그 결과 혼용에 따른 Pi0805-30%의 활성은 유지되어 해충방제용 자재와 혼용도 가능한 것으로 사료되었다(표 36).

표 36. Pi0805-30%의 해충방제용 농자재와 혼용 안정성 점검

처리구	희석배수	CMV 감염억제효과(%)	비고
Pi0805-30%	1,000	88.2	
Pi0805-30% + 마트린제제	1,000+1,000	80.6	
Pi0805-30% + 코니도	1,000+1,000	83.4	
무처리	-	-	

또한 소포장에서의 혼용에 따른 진딧물 억제효과를 검정하였다. 그 결과 혼용에 따른 해충

방제용 농자재의 활성을 저해하지 않고 약효상승에 도움이 되었다고 판단된다. Pi0805-30% 혼용에 따른 약해 여부도 관찰 할 수 없었다(표 37, 그림 39).

표 37. 오이 진딧물에 대한 약제 효과 검정
(약제처리 3일 후)

시험약제	약제처리전 밀도	생충율(%)				방제가 (%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평 균	
Pi0805-30% + 마트린제제	117.0	10.8	9.4	12.7	11.0	87.5
Pi0805-30% + 코니도	102.6	5.2	6.9	8.8	7.0	92.0
무처리	100.7	80.2	92.6	89.9	87.6	-

(약제처리 7일 후)

시험약제	약제처리전 밀도	생충율(%)				방제가 (%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평 균	
Pi0805-30% + 마트린제제	117.0	15.4	5.2	10.5	10.4	88.0
Pi0805-30% + 코니도	102.6	5.4	6.6	8.4	6.8	92.1
무처리	100.7	75.6	86.8	95.1	86.1	-



그림 39. 오이 포장에서의 혼용안정성 검사 및 약효 약해 테스트

(2) 살균제용 농자재와의 동시 살포를 통한 안정성 점검

Pi0805-30%를 다른 살균제용 농자재와 동시 살포하였을 때의 CMV 감염억제 효과를 검정하여 혼용에 대한 안정성 점검을 실시하였다.

시험 결과 일반적인 미생물제제와의 혼용 시 83.3%의 CMV 감염억제 활성을 나타내어 단체 처리와 유사하였다. 화학약제와의 혼용 처리 시 다소 낮은 CMV 감염억제 활성을 나타내었지만 활성은 유지하는 것으로 판단된다. 따라서 혼용에 따른 Pi0805-30%의 활성은 유지 되어 살균제용 자재와 혼용도 가능한 것으로 사료되었다(표 38).

표 38. Pi0805-30%의 살균제용 농자재와 혼용 안정성 점검

처리구	희석배수	CMV 감염억제효과(%)	비고
Pi0805-30%	1,000	85.2	
Pi0805-30% + 위조금지	1,000+300	83.3	
Pi0805-30% + 디크론	1,000+600	76.2	
무처리	-	-	

또한 오이 유묘를 이용하여 혼용 시 오이 잿빛곰팡이병에 대한 억제 효과를 검정하였다. 오이 유묘 2~3엽기에 처리구에 따라 전처리 후 잿빛곰팡이 병원균 포자현탁액(1×10^6 cfu/ml)를 오이 유묘에 접종하여 20°C, 60% 이상의 습도를 유지한 chamber에 넣어 병을 유도하였다. 3~4일 후 오이 엽면에 발생한 병반 면적 율을 조사하여 억제 효과를 검정하였다.

시험 결과 살균제용 농자재의 활성을 저해하지 않고 기존의 방제효과를 유지하였다(표 39, 그림 40). 또한, Pi0805-30% 혼용에 따른 약해 여부도 관찰 할 수 없었다.

표 39. 오이 유묘에서의 잿빛곰팡이병 활성 검정

시험약제	희석배수	병반면적율(%)					평균	방제가 (%)
		I	II	III	IV			
Pi0805-30% + 위조금지	1,000+300	5	10	10	15	11.7	61.1	
Pi0805-30% + 디크론	1,000+600	0	0	5	0	1.7	94.4	
무처리	-	25	30	35	25	30.0	-	



그림 40. 오이 유묘에서의 잿빛곰팡이병 활성 검정

나. 다기능성 혼합제의 개발

고분자 천연 물질은 생육 초기에 처리함으로써 식물 바이러스에 대하여 예방의 효과로 적용이 가능하다(제1협동과제). 바이러스 병과 같은 난방제 식물병은 대부분 작물이 주위환경으로부터 불리한 조건일 때 쉽게 감염 된다.

따라서, 본 연구에서는 작물 생육의 유익한 천연물질과의 혼합제 개발을 통하여 작물 생육 촉진 및 면역력 강화 등의 다기능성 혼합제 개발을 위한 선행 연구로 시행하였다. 친환경적인 혼합제 형태를 위하여 친환경 농업에서 사용 가능한 3가지 물질을 선발하여 고분자 천연물질 혼합제 안정성을 점검하였다.

(1) 수용액상에서의 안정성 점검

시험에 선발한 천연물질은 수화제로서의 제형화와 친환경유기농자재 목록 등제가 가능한 해조추출물, 수용성 풀빅산, 수용성 저분자키토산분말을 선발하였다. 공시시료는 시제품 Pi0805-30%에 천연물질 5% 함량으로 제조하였다. 시료 제조 후 멸균수에 100배 희석액 수준으로 현탁하여 시간별 고분자 천연물질의 활성 안정성을 점검하였다.

그 결과 24시간 현탁액까지 활성을 저해하는 요인은 없어 3가지 천연물질들은 수용액상에서 고분자 천연물질의 활성 성분을 저해하지 않음으로서 기능성을 보완한 친환경농자재로서의 개발이 가능함을 알 수 있었다(그림 41).

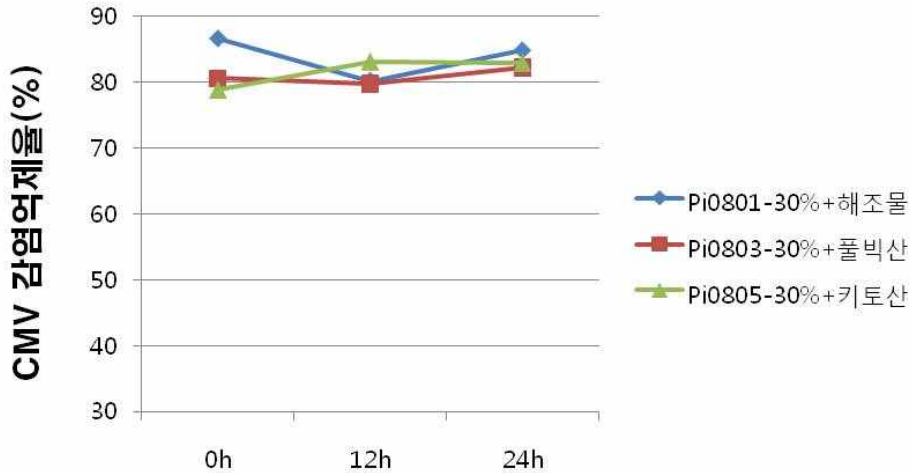


그림 41. 다기능성 혼합제의 수용액상에서의 안정성 점검

(2) 경시 안정성 점검

다기능성 혼합제의 고온학대에 의한 CMV 감염억제 활성 안정성을 점검하였다. 각각의 처방된 시료를 제조하여 알루미늄 팩에 밀봉한 뒤 54°C로 고정되어 있는 배양기에 보관 한 뒤 2주, 4주, 6주, 8주에서의 CMV 감염 억제 활성을 검토하였다.

실험 결과 기초 제형 4가지 중 Pi0805-30%가 8주 동안 비교적 안정된 활성을 나타내었다 (그림 42).

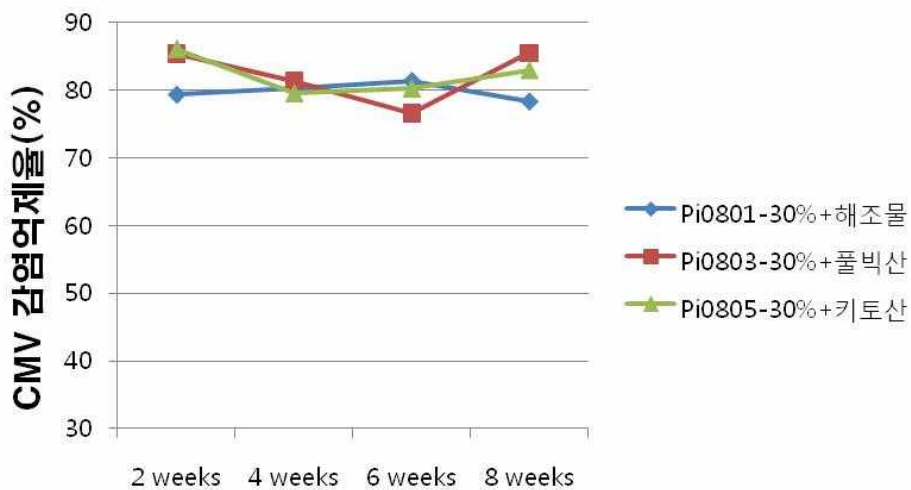


그림 42. 다기능성 혼합제의 경시 안정성 점검

이상의 결과로 작물의 생육촉진 등의 기능성을 추가 할 수 있는 고품질의 작물 보호제가 개발이 가능하여 다기능성 혼합제는 실용성이 있는 것으로 판단된다.

차후 연구에서는 기능성 성분을 함유한 제형에서 포장시험을 통한 따른 생물활성을 수행하여 농자재로서의 개발이 가능함을 연구해야 할 것이다.

5. 고분자 천연물질 제품의 독성학적 안정성 분석

가. 고분자 천연물질 제품의 식물 발아 시험

선발된 제형 Pi0805-30%의 식물 종자발아와 생육에 미치는 영향과 안정성을 구명하고자 파종 실험을 실시하였다. 실험은 식물생장실과 온실을 이용하여 발아율과 생육을 동시에 측정하였다. 고추 종자의 발아율을 조사하기 위하여 50공 plug tray pot에 상토를 넣고 Pi0805-30% 100배액에 12시간 침종하였던 고추 종자를 파종하였다. 무처리구는 증류수를 침지 처리하였다.

Pi0805-30%에 대해 고추 종자를 파종한 후 약해 존재 유무는 육안으로 관찰하였고 약해에 의한 작물의 해는 없는 것으로 판단되었다(그림 43).



그림 43. Pi0805-30% 처리에 의한 고추 종자 발아율 검정

또한 고추 종자 발아율은 Pi0805-30% 처리구에서 82%, 무처리구에서는 74.0%의 발아율을 보여주어 처리된 고분자 천연물질에 의한 종자 발아의 억제는 확인 할 수 없었다(표 40). 그러나 작물의 초기 생육 차이는 볼 수 없었다. 따라서 선발된 시제품은 식물체에 처리시 발아에 전혀 영향을 주지 않으며 안전할 것으로 판단되어 추후 동물 독성 시험에 안정성이 확보될 경우 제품화가 가능하리라 판단된다.

표 40. Pi0805-30% 침중 처리에 의한 발아율 검정

처리구	발아수/전체조사수	발아율 (%)
Pi0805-30%	41/50	82.0
무처리	37/50	74.0

나. 고분자 천연물질 제품의 급성경구독성

요 약

Pi0805-30%에 대한 급성경구독성을 마우스(ICR계통)를 공시하여 1회 경구투여한 후 14일 동안 치사수, 일반중독증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰·조사한 결과는 다음과 같다.

- 치사동물은 기초시험의 투여약량 2500 mg/kg에서 치사가 없었다.
- 일반중독증상은 관찰되지 않았다.
- 체중변화는 약제투여 후 경과일수에 따라 암수모두에서 1일째까지 감소를 보였으나 3일째부터는 회복되어 증가추세를 보였다.
- 부검소견은 투여약량 2500 mg/kg에서 특이한 증상은 없었다.

이상의 시험결과, 본 시험에서 각 장기에 미치는 영향은 없는 것으로 사료되며 수컷과 암컷 모두에 대한 LD50값은 2500 mg/kg 이상으로 농약관리법에 의거독성을 구분하면 IV급(저독성)으로 분류되었다.

1. 시험물질

- 명 칭 : Pi0805-30%
- 시료번호 : 2009-1-43번
- 입 수 일 : 2009년 03월 17일
- 시 료 량 : 500 gr
- 시험물질의 특성 : 고상, 미색
- 시험의뢰자 : 주식회사 파이오니아

2. 재료 및 방법

가. 실험동물

(1) 동물종(계통) : SPF mouse (ICR계)

(2) 공급원

- 명 칭 : (주) 한림실험동물연구소

- 주 소 : 경기도 화성시 봉담읍 유리 254-1

전화번호 : 031-227-5955

- 대 표 : 김 길 수

(3) 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제 2009-1호의 농약의 독성시험기준과 방법에 마우스를 사용하도록 되어 있으며, ICR계통은 농약의 독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과해석 및 평가가 용이하기 때문이다.

(4) 주령 및 체중범위

구 분	수 컷	암 컷
구입시 주령	7	7
구입시 체중(gr)	20 ~ 22	18 ~ 20
투여시 주령	8	8
투여시 체중(gr)	24 ~ 27	21 ~ 25

(5) 순화 및 검역

동물을 구입한 후 6일 동안 동물실험실의 환경조건하에서 순화시키면서 외관상 건강한 동물을 선별, 무작위로 추출하여 시험에 공시하였다.

나. 사육환경

(1) 사육실

본 시험의 사육환경은 온도 23±2℃, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간 (오전 7시~오후7시) 및 조도 200~300 Lux의 실험실조건에서 멸균된 사료와 음용수를 급여하며 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

(2) 사육상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육 상자(26×20×12 cm)에 5마리씩 넣어 펄프드라이를 깔아 사육하였다.

(3) 사료 및 물의 급여방법

사료는 실험동물용 고품사료[E.P 슈퍼피드(주)]를 자외선 멸균시켜 자유 급식시켰으며 물은 지하수를 자외선 유수살균기로 소독시킨 후 자유 섭취시켰다.

다. 투여약량수준설정 및 약제조제

(1) 투여약량설정

기초시험으로 수컷과 암컷 모든 동물의 투여약량은 2500 mg/kg으로 설정하였다.

(2) 투여약량수준의 실험동물수

투여약량의 공시동물수는 암수 각각 5마리씩 10마리를 1군으로 하였으며, 개체별 식별은 피모에 색소로 일련번호를 표시하였다.

(3) 대조군의 설정

시험물질이 고상으로 투여약제 조제시 0.5% CMC에 잘 현탁되므로 용매대조군은 설정하지 않았다.

(4) 용매의 선택과 시험물질 조제

공시약제 조제시 용매의 선택은 시험물질이 고상으로 0.5% CMC에 잘 현탁되므로 0.5% CMC를 용매로 선정하였고 소정 약량의 조제는 50 ml의 메스플라스크에 넣고 0.5% CMC를 가하여 현탁시켜 조제하였다.

(5) 투여 액량(volume)설정

투여액량은 투여약량수준별 공히 10 ml/kg(체중)으로 설정하였다.

라. 시험물질의 투여

(1) 사료의 절식

시험물질 투여개시 3~4시간 전부터, 시험물질 투여 후 3시간 동안은 먹이를 주지 않았다.

(2) 투여경로 및 투여방법

마우스용 경구투여주사바늘을 이용하여 체중 측정치를 기준으로 소정의 시험물질 조제액량을 산출한 후 경구투여 경로로 위내에 1회에 한하여 강제 투여하였다.

마. 관찰 및 검사항목

(1) 일반중독증상 및 치사동물

투여 당일은 투여 후 10분, 30분, 1시간에서 4시간째까지 매시간 그리고 익일부터는 매일 1회씩 일반중독증상 및 치사된 동물수를 14일간 관찰·조사하였다.

(2) 체중측정

공시된 모든 동물에 대하여 투여당일과 투여 후 체중을 측정하였고 생존한 동물에 대하여는 1, 3, 7일 및 14일째 개체별 체중을 측정하였다.

(3) 부검

관찰기간 종료 후 CO₂ gas로 마취시켜 내부장기의 육안적 이상 유무를 관찰하였다.

바. LD50 산출

기초시험에서 시험이 종료되어 통계처리는 수행하지 않았다.

3. 결과 및 고찰

가. 치사동물 및 LD50 값

기초시험결과 투여약량 2500 mg/kg에서 치사가 없었으며, 급성경구독성의 LD50 값은 수컷과 암컷 모두 2500mg/kg이상으로 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV 급(저독성)으로 분류되었다.

나. 일반중독증상

본 시험에서 경구투여 후 일반중독증상은 관찰되지 않았다.

다. 체중변화

체중변화는 약제투여 후 경과일수에 따라 암수 모두에서 1일째까지 감소를 보였으나 3일째부터는 회복되어 증가추세를 보였다.

라. 부검소견

공시한 동물에 대하여는 투여 14일 후에 부검하여 내부장기의 육안적 이상 유무를 관찰하였으나 모든 장기에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

4. 참고문헌

가. 농촌진흥청(2009) : 농약의 독성시험기준과 방법 (농촌진흥청고시 제 2009-1호)

나. 식품의약품안전청(2005) : 의약품등의 독성시험기준

(식품의약품안전청고시 제 2005-60호)

다. 일본농림성(2003) : 농약의 독성시험적정실시에 관한 기준

5. 첨부자료

- 표1. 일별치사동물수조사결과
- 표2. 임상관찰결과
- 표3. 체중변화측정결과
- 표4. 부검소견결과

5. 첨부자료

표1. 일별치사동물수조사결과

성 별	투여약량 (mg/kg)	투여 후 치 사 동 물 수														합계	
		분		시 간				일 수									
		10	30	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	~ 14		
수컷	2500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	~	0	0/5
암컷	2500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	~	0	0/5

표2. 임상관찰결과

성 별	투여약량 (mg/kg)	투여 후 증 득 증 상															
		분		시 간				일 수									
		10	30	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	~ 14		
수컷	2500	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	~	-
암컷	2500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	~	-

◆ - : 정상

표3. 체중변화측정결과

(단위 : gr)

성 별	투여약량 (mg/kg)	투여 후 경 과 일 수				
		0	1	3	7	14
수컷	2500	23.8±0.9(5*)	23.4±0.9(5)	24.2±0.9(5)	26.3±0.8(5)	29.6±0.6(5)
암컷	2500	23.1±0.4(5)	22.7±0.3(5)	23.3±0.4(5)	25.0±0.3(5)	27.7±0.8(5)

* () : 마리

표4. 부검소견결과

성 별	투여약량 (mg/kg)	주 요 장 기 명	육안적 소견
수 컷	2500	신 장	정 상
		비 장	정 상
		간 장	정 상
		심 장	정 상
		소화기계	정 상
		폐 장	정 상
		이외의 장 기	정 상
암 컷	2500	신 장	정 상
		비 장	정 상
		간 장	정 상
		심 장	정 상
		소화기계	정 상
		폐 장	정 상
		이외의 장 기	정 상

다. 고분자 천연물질 제품의 급성경피독성

요 약

Pi0805-30%에 대한 급성경피독성을 랫드(S.D.계통)를 공시하여 1회 약제처리 후 14일 동안 치사수, 일반중독증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰·조사한 결과는 다음과 같다.

- 기초시험의 처리약량수준인 2000 mg/kg에서 치사동물은 없었다.
- 일반중독증상은 관찰되지 않았다.
- 체중변화는 약제처리 후 경과일수에 따라 암수 모두에서 1일째까지 감소를 보였으나 3일째부터는 회복되어 증가추세를 보였다.
- 부검소견은 처리약량 2000 mg/kg에서 특이한 증상은 없었다.

이상의 시험결과, 본시험에서 각 장기에 미치는 영향은 없는 것으로 사료되며 수컷과 암컷 모두에 대한 LD50값은 2000 mg/kg 이상으로 IV급(저독성)으로 구분되었다.

1. 시험물질

- 명 칭 : Pi0805-30%
- 시료번호 : 2009-1-44번
- 입 수 일 : 2009년 03월 17일
- 시 료 량 : 500 gr
- 시험물질의 특성 : 고상, 미색
- 시험의뢰자 : 주식회사 파이오니아

2. 재료 및 방법

가. 실험동물

(1) 동물종(계통) : SPF Rat (S.D.계)

(2) 공급원

-명 칭 : (주) 한림실험동물연구소

-주 소 : 경기도 화성시 봉담읍 유리 254-1

전화번호 : 031-227-5955

-대 표 : 김 길 수

(3) 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제2009-1호의 농약의 독성시험기준과 방법에 랫드를 사용하도록 되어 있으며 S.D.계통은 농약의 독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가

충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가가 용이하기 때문이다.

구 분	수 컷	암 컷
구입시 주령	7	7
구입시 체중(gr)	200 ~ 220	180 ~ 200
구입시 주령	8	8
구입시 체중(gr)	240 ~ 270	210 ~ 250

(4) 주령 및 체중범위

(5) 순화 및 검역

동물을 구입한 후 6일 동안 동물실험실의 환경조건하에서 순화시키면서 외관상 건강한 동물을 선별, 무작위로 추출하여 시험에 공시하였다.

나. 사육환경

(1) 사육환경

본 시험의 사육환경은 온도 23±2℃, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간(오전 7시 ~ 오후7시) 및 조도 200 300 Lux의 실험실 조건에서 멸균된 사료와 음용수를 급여하여 시험기간 동안 격리·사육하였다.

(2) 사육상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육상자(40×25×18 cm)에 5마리씩 넣어 펄프드라이를 깔아 사육하였다.

(3) 사료 및 물의 급여방법

사료는 실험동물용 고품사료[E.P 슈퍼피드(주)]를 자외선 멸균시켜 자유 급식시켰으며 물은 지하수를 자외선 유수살균기로 소독시킨 후 자유 섭취시켰다.

다. 처리약량수준설정 및 약제조제

(1) 처리약량설정

기초시험으로 수컷과 암컷 모든 동물의 약제처리 약량은 2000 mg/kg으로 설정하였다.

(2) 약제처리 약량수준의 실험동물수

약제처리 약량의 공시동물 수는 암수 각각 5마리씩 10마리를 1군으로 하였으며, 개체별 식별은 피모에 색소로 일련번호를 표시하였다.

(3) 대조군의 설정

시험물질이 액상으로서 처리약제 조제시 증류수에 잘 현탁되므로 용매대조군은 설정하지 않았다.

(4) 용매의 선택과 시험물질 조제

공시약제 조제시 용매의 선택은 시험물질이 액상으로 증류수에 잘 현탁되므로 증류수를 용매로 선정하였고, 소정 약량의 조제는 50ml의 메스플라스크에 넣고 증류수를 가하여 현탁시켜 조제하였다.

(5) 약제처리 액량(volume)설정

처리액량은 투여약량수준별 공히 5.0 ml/kg(체중)으로 설정하였다.

라. 시험물질의 처리

(1) 약제처리경로 및 처리방법

공시동물은 시험물질처리 전에 흉복배부에 제모기를 이용하여 5×6 cm 이상 크기의 넓이로 제모하고, 4×5 cm 크기 면적의 거즈에 조제된 시험물질을 체중 측정치를 기준으로 소정 액량을 산출한 후 균일하게 묻힌 다음 제모된 부위에 도포한 후 의료용 반창고로 고정·유지시켰다.

(2) 시험물질의 제거

흉복배부에 도포시킨 시험물질은 24시간 후 제거하고 피부에 묻은 잔여물질은 생리식염수로 잘 닦고 휴지로 물기를 흡수시킨 다음 케이지에 넣어두었다.

마. 관찰 및 검사항목

(1) 일반중독증상 및 치사동물수

처리 당일은 처리 후 10분, 30분, 1시간에서 4시간까지 매시간 그리고 익일부터는 매일 1회씩 일반중독증상 및 치사된 동물 수를 14일간 관찰·조사하였다.

(2) 체중측정

공시한 동물에 대하여 투여 당일과 약제 투여 후 체중을 측정하였고 생존한 동물에 대하여는 1, 3, 7일 및 14일째 개체별 체중을 측정하였다.

(3) 부검

관찰기간 종료 후 CO₂ gas로 마취 시켜 주요장기에 대한 육안적 이상 유무를 관찰하였다.

바. LD₅₀ 산출

기초시험에서 시험이 종료되어 통계처리는 수행하지 않았다.

3. 결과 및 고찰

가. 치사동물 및 LD₅₀ 값

기초시험결과 수컷과 암컷 모두 처리약량 2000 mg/kg수준에서 치사동물은 없었으며, 수컷과 암컷 모두에 대한 급성경피독성 LD₅₀값은 2000 mg/kg 이상으로 IV급(저독성)으로 구분되었다.

나. 일반중독증상

본 시험에서 약제처리 후 중독증상은 관찰되지 않았다.

다. 체중변화

체중변화는 약제처리 후 경과일수에 따라 암수 모두에서 1일째까지 감소를 보였으나 3일째부터는 회복되어 증가추세를 보였다.

라. 부검소견

공시한 동물에 대하여 약제처리 14일 후에 부검하여 내부 장기의 육안적 이상 유무를 관찰하였으나 모든 장기에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

4. 참고문헌

가. 농촌진흥청(2009) : 농약의 독성시험기준과 방법 (농촌진흥청고시 제2009-1호)

나. 식품의약품안전청(2005) : 의약품등의 독성시험기준
(식품의약품안전청고시 제 2005-60호)

다. 일본농림성(2003) : 농약의 독성시험적정실시에 관한 기준

5. 첨부자료

- 표1. 일별치사동물수조사결과
- 표2. 임상관찰결과
- 표3. 체중변화측정결과
- 표4. 부검소견결과

5. 첨부자료

표1. 일별치사동물수조사결과

성 별	처리약량 (mg/kg)	약제처리 후 치 사 동 물 수														합계		
		분		시 간				일										
		10	30	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	~		14	
수 컷	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	~	0	0/5
암 컷	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	~	0	0/5

표2. 임상관찰결과

성 별	처리약량 (mg/kg)	약제처리 후 증 득 증 상																
		분		시 간				일										
		10	30	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	~	14		
수 컷	2000	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	~	-	-
암 컷	2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	~	-	-

• - : 정상

표3. 체중변화측정결과

(단위 : gr)

성 별	처리약량 (mg/kg)	약제처리 후 경 과 일 수				
		0	1	3	7	14
수 컷	2000	251.1±8.3(5*)	249.0±6.6(5)	253.6±8.7(5)	271.6±9.9(5)	300.4±7.8(5)
암 컷	2000	229.5±4.1(5)	226.5±3.7(5)	231.7±4.7(5)	246.3±4.5(5)	267.4±10.5(5)

• () : 마리

표4. 부검소견기록

성 별	처리약량 (mg/kg)	주 요 장 기 명	육안적 소견
수 컷	2000	신 장	정 상
		비 장	정 상
		간 장	정 상
		심 장	정 상
		소화기계	정 상
		폐 장	정 상
		이외의 장 기	정 상
암 컷	2000	신 장	정 상
		비 장	정 상
		간 장	정 상
		심 장	정 상
		소화기계	정 상
		폐 장	정 상
		이외의 장 기	정 상

라. 고분자 천연물질 제품의 환경 어독성

요 약

Pi0805-30%에 대한 급성어독성시험을 잉어 (Cyprinus Carpio)를 공시하여 96 시간 동안 생사수와 일반중독증상을 관찰하고 체중 및 전장을 조사한 결과는 다음과 같다.

농도 (mg/L)	잉 어 (마리)	누적치사수(마리)			
		24h	48h	72h	96h
10.0	10	0	1	1	1

- 일반중독증상은 관찰되지 않았다.
- 체중은 평균 1.66 ± 0.06 g, 전장은 평균 4.74 ± 0.07 cm 이었다.
- PH는 평균 6.84 (최저 6.65- 최고 7.11), DO는 평균 6.8 mg/ℓ (최저 5.9 - 최고 8.3)이었다.
- 시험기간의 평균 수온은 23.8℃ 이었다.

이상의 시험결과, 본 시험 물질의 잉어에 대한 LC50은 48시간 및 96 시간에서 모두 10mg/ℓ 이상 이었으며, 농약관리법에 의거 독성정도별로 어독성을 구분하면 어독성 III 급에 해당되었다.

1. 시험물질

- 명 칭 : Pi0805-30%
- 입 수 일 : 2009년 03월 17일
- 시험물질의 특성 : 고상, 미색
- 시험의뢰자 : 주식회사 파이오니아

2. 재료 및 방법

가. 시험생물 .

- 시험어종(학명) : 잉어(Cyprinus Carpio)

- 공급원

명 칭 : 농촌진흥청 국립농업과학원

주 소 : 경기도 수원시 권선구 수인로 150번지

전화번호 : (031) 290-0584

- 순화 및 사육조건

시험어류를 구입한 후 22주 동안 실험실내의 환경하에서 사육순화 시켰으며

사육온도는 22~24℃, 조도 200~300Lux 유지시켰으며 사료는 잉어용 부산관상 어사료(주)를 1일 2회 급여하였다.

나. 시험용기

원통형의 유리제품 10ℓ (높이25.5cm×Ø25.5cm)용기를 사용하였다.

다. 시험용수 및 수온

시험용수는 지하수를 사용하였으며 대형 항온수조 내에 시험용 유리수조를 담아 수온을 23.8℃로 시험기간 동안 유지시켰다.

라. 처리방법

○ 시험약제의 조제

시험농도 수준에 해당하는 약량을 평량하여 비이커를 이용, 공시용수를 첨가한 후 자석교반기로 현탁시켰다.

○ 시험농도

기초시험으로 시험농도 수준은 10 mg/ℓ 으로 하였다.

○ 시험어 절식

시험물질 처리 24시간 전부터 시험 종료시까지 사료급여를 중단시켰다.

○ 시험어류수

시험어류수는 10ℓ 용 수조 2개에 각각 5마리씩 넣어 함께 10마리를 1군으로 하였다.

○ 시험 대조군의 설정

시험용수 무 처리를 음성 대조군으로 하고 PCP-Na염(90%)을 양성 대조군으로 하였다.

마. LC50 산출

기초시험 농도에서 종료되어 통계처리는 하지 않았다.

바. 관찰 및 조사항목

○ 중독증상 및 치사율

○ 수질측정(DO, pH, 수온) 조사 시기 및 방법

수질측정은 시험개시전과 24시간 간격으로 시험 종료시까지 DO, pH, 수온을 측정하였으며 용존산소량은 DO-24P모델로 산소량을 측정하고, pH는 Orion 203A+으로 조사하며 수온은 항온수조에 시험용기를 넣고 온도계를 설치하여 온도를 조사하였다.

3. 시험결과

가. 농약처리 후 경과시간별 치사수

농도 (mg/L)	잉 어 (마리)	누적치사수(마리)				치사율(%)	
		24h	48h	72h	96h	48h	96h
10.0	10	0	1	1	1	10	10

나. 시험약제의 LC50 및 중독증상

약제	LC50(mg/ℓ)		중독증상	체중(g)	전장(cm)
	48h	96h			
Pi0805-30%	>10	>10	N	1.66±0.06	4.73±0.07
PCP-Na염	0.11 (0.10~0.13)	0.11 (0.10~0.13)	LOE	1.16±0.03	4.11±0.05
음성대조군	-	-	N	1.63±0.08	4.69±0.09

* N (정상), LOE(평형상실)

다) 요약

Pi0805-30%대한 96시간 급성 어독성시험결과 48시간째에 1마리의 치사가 있었으며, 48시간 및 96시간 반수치사농도(LC50)는 10 mg/ℓ 이상이었다.

이상증상을 조사한 결과 시험농도인 10 mg/ℓ의 시험농도에서도 중독증상이 관찰되지 않았으며, 음성대조군에서도 특이한 증상은 관찰되지 않았다.

4. 참고문헌

가. 농촌진흥청(2009) : 농약의 등록시험기준과 방법<별표7>

환경생물독성시험의 기준과 방법

1. 담수어류에 대한 급성독성시험

나. 농촌진흥청(2009) : 농약관리법 시행령 별표, [별표 1] 독성 및 잔류성 정도별 농약의구분, 농약관리법령 고시 훈령집(전부개정판, 2009)

5. 첨부자료

○ 경시적 수질검사 성적서

구 분		시험개시당일	농약처리 48시간후	농약처리 96시간후
DO	공시농약	8.0	7.0	6.1
	PCP-Na염	8.9	6.2	5.7
	음성대조군	9.0	8.1	6.9
pH	공시농약	7.23	6.70	6.53
	PCP-Na염	7.52	7.12	7.22
	음성대조군	7.18	7.14	7.11
수 문		23.8	23.8	23.8

제 2 절 고분자 천연 물질의 CMV에 대한 농가실증시험 및 작물별 재배력 확립 및 이화학적 특성 분석

1. 주요 원예 작물의 농가 실증 사업

가. 주요 원예작물의 생산지 분석

(1) 주요 원예 작물의 바이러스 발병에 관한 문헌조사

현재까지 세계 각지에서 발견된 식물 바이러스는 약 800여 종에 이르는데 이것은 식물에 전염성 질병을 일으키는 병원체 중에서 진균 다음으로 많은 숫자이다. 이들 바이러스는 벼, 밀 등 세계의 주요 식량작물을 비롯해 수많은 원예 경제 작물에 침해하여 수량과 품질을 떨어뜨려 커다란 경제적 손실을 주고 있다. 특히 국내에서 분리·동정된 식물바이러스는 보고된 종만 50여 종 이상으로 다양하게 기주하고 있다. 표 1은 국내에서 발생되고 있는 주요 원예작물의 바이러스 병을 전염방법에 의하여 정리하였다. 이들은 CMV, TuMV, WMV, PVY등의 경우와 같이 주로 진딧물에 의해 전염되는 바이러스와 TMV, CGMMV와 같이 즙액전염이 쉽게 되는 2개의 대표적인 그룹으로 분류되는데 이러한 전염경로를 이해하는 것이 바이러스 억제제 개발에 있어 매우 중요한 요인이라 할 수 있겠다.

표 1. 주요 원예작물에 병을 일으키는 바이러스의 종류와 전염방법

작물	바이러스	전염방법			
		즙액	충매	종자	토양
토마토	TMV	+	-	+	+(물리적감염)
	CMV	+	+(진딧물매개)	-	-
	PVY	+	+(진딧물매개)	-	-
고추	TMV	+	-	+	+(물리적감염)
	PMMoV	+	-	+	+(물리적감염)
	CMV	+	+(진딧물매개)	-	-
	PVY	+	+(진딧물매개)	-	-
오이	CMV	+	+(진딧물매개)	-	-
	WMV	+	+(진딧물매개)	-	-
	CGMMV	+	-	+	+(물리적감염)
수박	WMV	+	+(진딧물매개)	-	-

	CGMMV	+	-	+	+(물리적감염)
무우	TuMV	+	+(진딧물매개)	-	-
배추	TuMV	+	+(진딧물매개)	-	-
	RMV	+	-	+	+(물리적감염)

(<http://bric.postech.ac.kr/webzine>) Vol. 6, No. 3

TMV : *Tobacco mosaic virus*, CMV : *Cucumber mosaic virus*, PVY : *Potato virus Y*, PMMoV : *Pepper mild mottle virus*, WMV : *Watermelon mosaic virus*, CGMMV : *Cucumber green mottle mosaic virus*, TuMV : *Turnip mosaic virus*, RMV : *Ribgrass mosaic virus*

(2) 고추에 대한 재배면적과 생산지 분석

고추(*Capsicum annuum L.*)는 우리나라에 들어온 지 300여 년이 지나는 동안 한국인의 식생활에 뿌리깊이 토착화되어 전통적 식생활에 빼놓을 수 없는 중요한 채소가 되고 있다. 생산적인 면에서도 전체 작물재배면적 3위, 채소재배면적 1위의 양념채소작물로서 농가소득에 기여도가 높다. 2007년 농림부 통계에 따르면 고추재배 면적은 전국적으로 약 54,900ha로 채소 재배 면적의 25%를 차지하고 있고, 생산량은 160,400톤에 이르고 있다(표 2). 전년도 대비 재배면적은 3.4%가 증가하였고, 생산량 또한 37.2% 증가하는 경향을 보였다. 이는 전년도 생산량 감소로 인한 재배면적의 증가와 기상요건과 병충해에 의한 피해가 줄었음을 시사한다.

또한 고추 1인당 연간 소비량은 2005년 기준 2.2kg으로 매년 꾸준히 증가하고 있는 추세이다. 이렇듯 농민들에게 고추만큼 수익성이 좋은 대체작물이 없기 때문에 고추재배가 확대되고 있는 실정이다. 지역적으로 고추의 재배면적이나 생산량은 표 3에 작성하였다. 자세히 살펴보면 경상도와 전라도에 전체 재배 면적의 50%를 차지하고 있고, 생산량 또한 전체 생산량의 40%를 차지 할 만큼 집중되어 있었다. 고추의 재배면적과 생산량은 외부적 요인에 의하여 매년 증가하거나 감소하는 추세를 보이고 있다. 이는 기후 조건에 따른 병발생과 깊은 연관이 있다고 판단된다.

표 2. 2007년 고추 생산량 조사 결과

	평년	2005	2006	2007	전년도대비 증가율 (%)
재배면적 (천 ha)	54.9	61.3	53.1	54.9	3.4
10a당 수량 (kg)	248	263	220	292	32.7
생산량 (천 톤)	136.1	161.4	116.4	160.4	37.2

2008년 농림부 통계자료

표 3. 2007년 시도별 고추 생산량 조사 결과(2008년 농림부 통계자료)

	재 배 면 적			10a당 수량			생 산 량		
	'06	'07	증감률	'06	'07	증감률	'06	'07	증감률
	ha	ha	%	kg	kg	%	톤	톤	%
전 국	53,097	54,876	3.4	220	292	32.7	116,914	160,398	37.2
서 울	21	25	19.0	178	238	33.7	37	60	62.2
부 산	53	52	-1.9	164	285	73.8	87	148	70.1
대 구	219	160	-26.9	102	204	100	223	327	46.6
인 천	679	677	-0.3	194	274	41.2	1,318	1,855	40.7
광 주	146	152	4.1	180	268	48.9	262	407	55.3
대 전	99	114	15.2	217	216	-0.5	215	246	14.4
울 산	219	205	-6.4	169	209	23.7	371	429	15.6
경 기	4,104	3,881	-5.4	184	245	33.2	7,563	9,510	25.7
강 원	3,346	3,522	5.3	232	261	12.5	7,773	9,200	18.4
충 북	7,130	7,142	0.2	224	274	22.3	15,991	19,567	22.4
충 남	5,380	5,754	7.0	227	274	20.7	12,205	15,779	29.3
전 북	6,722	6,839	1.7	207	280	35.3	13,904	19,170	37.9
전 남	8,833	9,284	5.1	217	327	50.7	19,203	30,376	58.2
경 북	13,749	14,761	7.4	246	317	28.9	33,830	46,779	38.3
경 남	2,355	2,275	-3.4	164	286	74.4	3,872	6,499	67.8
제 주	42	33	-21.4	146	136	-6.8	61	45	-26.2

(3) 고추에 발생하는 주요 바이러스 병 경향조사

바이러스 병을 비롯한 역병, 꽃마름병, 세균성 점무늬병 등으로 인해 고추에 발생하는 병이 고추 재배의 제한 요인이 되고 있다. 고추의 바이러스에 의한 피해는 종자, 육묘, 성체 등 고추의 전 생육기간 동안 발생하고 주로 잎에 황화 모자이크, 얼룩무늬, 위축, 기형, 열매 괴저 등의 병징을 나타내며, 해마다 반복적 악순환으로, 바이러스에 감염된 식물은 생육이 지연되고 과실품질이 떨어져 그 경제적 피해 규모가 매우 큰 것으로 추정되며, 이에 대한 완벽한 방제법은 아직 확립되어 있지 않다. 전 세계적으로 고추에 발생하는 바이러스는 약 60여종이 보고되고 있으며, 국내에서는 지금까지 10종의 바이러스가 보고되어 있다. 이들 바이러스는 주로 진딧물, 토양, 종자에 의해 전염이 되거나 작업 도중 농기구 또는 사람을 통해 옮겨지는 경우가 많다.

최근에는 고추 재배가 자가 육묘할 경우에도 플러그 육묘를 하며, 육묘장에서 구입할 경우에도 모두 플러그 육묘를 하여 묘 생산을 하므로 접촉전염으로 인한 tobamovirus의 발생이 매우 적을 것이라고 판단된다. 그러나 진딧물전염성인 CMV등의 발생률은 증가하고 있다. 이와 같이 고추에 발생하는 바이러스 종류가 재배양식의 변천 등에 의해 변화하고 있어 지속적인 모니터링이 필요하다. 본 연구에서는 강원도 일부 지역의 고추에 발생하는 바이러스의 진단을 위하여 감염 주를 확보하여 바이러스를 분리하고 발생 예찰의 기본 자료로 쓰고자 수행하였다 (그림 1).



그림 1. 2007년 춘천시 거두리 포장에서 발생한 CMV에 의해 감염된 고추 작물

나. 주요 원예 작물 농가 실증 사업

(1) 고추와 피망에서의 농가 실증 사업

(가) 시설고추

(주)과이오니아에서 공시 받은 Pi0805-30%의 시제품을 이용하여 농가실증 시험을 수행하기로 하였다. 포장생물활성검정은 강원도 춘천시 천전리 강원대학교 부속농장에서 고추를 대상으로 수행하였다. 재배 방법은 일반 관행 재배 방법에 준하였고, 반농민 재배방식과 동일하게 실시하였다. 재배방식으로는 2008년 5월6일에 고추 (품종 : 마니따)를 정식하였으며, 난괴법으로 3반복 실시하였다. 처리구는 Pi0805-30% 1,000배 희석액과 대조A(J사 영양제 제품) 그리고 무처리를 설정하여 실험하였다. 처리방법은 각각 처리구의 희석 액을 전착제와 혼합하여 활착기부터 14일 간격으로 7월 중하순까지 5회 경엽처리 하였다. 식물바이러스 감염억제효과는 조사는 최종 처리 14일 후에 각각 생육지연과 위축현상을 발병도로 나타내었다. 그 결과, 항바이러스효과는 이병주율 및 발병도 모두에서 효과적으로 나타나 실용성이 매우 큰 것으로 나타났다 (표 4, 그림 2.).

표 4. 고추 포장에서의 식물바이러스 억제 효과 검정

시험약제	발병도(%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균	
Pi0805-30% 시료	11.1	16.2	15.6	14.3	63.8
대조 A (J사 영양제 제품)	30.2	38.3	15.6	28.0	29.1
무처리	42.9	29.6	46.0	39.5	-

발병도 : $(4 \times \text{조사주수}) + (3 \times \text{조사주수}) + (2 \times \text{조사주수}) + (1 \times \text{조사주수}) + (0 \times \text{조사주수}) / 4 \times \text{총 조사주수}$
 [0 : 무증상, 1 : 모틀 또는 약한 모자이크, 2 : 모자이크 증상, 3 : 모자이크+굴곡 증상, 4 : 줄기고사 또는 총생 이상]



그림 2. 처리구에 따른 바이러스 감염 특성

또한 Pi0805-30% 시료의 식물생장촉진효과(PGP)를 검정하기 위하여 수확량을 조사하였다. 수확량 조사에 있어서도 총 개수, 총 수확량 무게 및 주당개수에 있어서 모두 무처리에 비해 상당히 증가되었음을 확인 할 수 있었다. 즉 고분자 천연물질을 이용하여 만든 시생산 시료는 식물바이러스에 대한 예방 및 억제를 작용과 더불어 작물의 생육에 좋은 물질을 함유하고 있어 수확량이 증가되었음을 확인 할 수 있었다(표 5 , 그림 3).

표 5 . Pi0805-30% 시료 처리에 따른 수확량 증가

시료	수확량		
	개수 (개)	무게 (kg)	주당개수 (개)
Pi0805-30% 시료	834	12.39	52.69
대조 A (J사 영양제 제품)	760	12.01	42.92
무처리	652	8.84	35.42



그림 3. Pi0805-30% 시료 처리에 따른 수확량 증가

(나) 노지 고추 I

(주)파이오니아에서 공시 받은 Pi0805-30%의 시제품을 이용하여 농가실증 시험을 수행하기로 하였다. 포장생물활성검정은 강원도 인제군 일반 농가를 대상으로 하여 실행하였다. 재배 방법은 일반 관행 재배 방법에 준하였고, 농민 재배방식과 동일하게 실시하였다. 재배방식으로는 2008년 5월 18일에 고추(품종 : 수퍼마니파)를 정식하였으며, 처리구 설정은 그림 4와 같다. 처리구는 Pi0805-30% 1,000배 희석액과 무처리를 설정하여 실험하였다. 처리방법은 각각 처리구의 희석액을 전착제와 혼합하여 정식 후 20일 간격으로 3회 경엽처리 하였다(5월 19일, 5월 29일, 6월 9일). 식물바이러스 감염억제효과 조사는 최종 처리 14일 후에 각각 전체주수에 대한 이병주수를 조사하여 발병도 및 바이러스 감염억제율을 조사하였다.

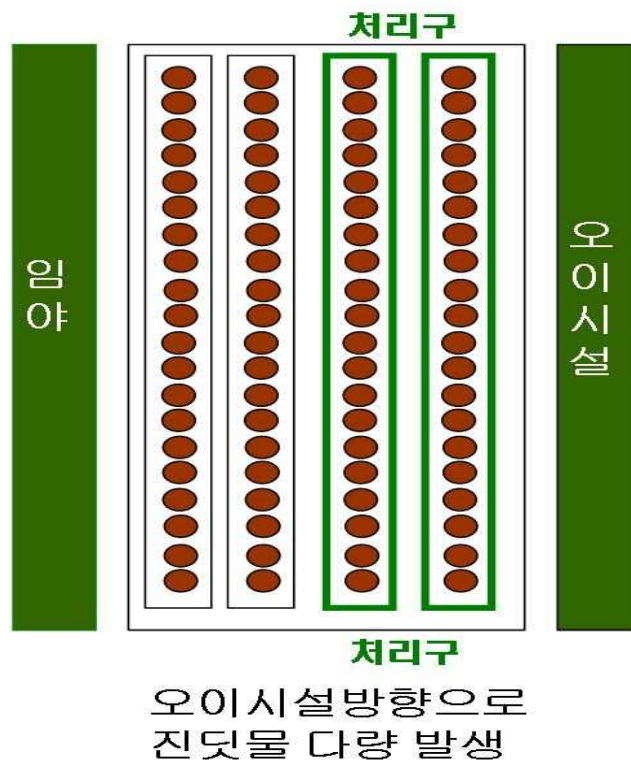


그림 4. 노지고추 포장 생물활성 시험 처리구 설정

그 결과 시험포장에서는 CMV와 TMV로 예상되는 바이러스가 복합적으로 감염되어 있는 형태를 띠었으며 Pi0805-30%의 처리구에서는 바이러스 감염이 66% 억제율을 보였다. 시각적으로 특이했던 점은 진딧물이 옆의 오이하우스 재배지에서는 다량 발생된 반면에 고추재배지에서는 발생을 하지 않았다는 점이다(표 6).

표 6. 노지 고추에서의 바이러스 감염 억제율(CMV, TMV 복합감염)

	이병주수/전체주수	발병률	감염억제효과(%)
관행처리구	6/40	15.0	-
Pi0805-30%	2/40	5.0	66.0

시험포장에서의 생육조사에서는 그림 5에서 보는바와 같이 생육이 Pi0805-30% 처리구의 생육이 관행처리구에 대비하여 우수하였고, 엽록소 함량 측정 결과 관행처리구에 대비하여 16.7%의 상승효과를 나타내었다(그림 6).



그림 5. 노지고추포장에서의 Pi0805-30% 처리에 의한 생육상태 점검

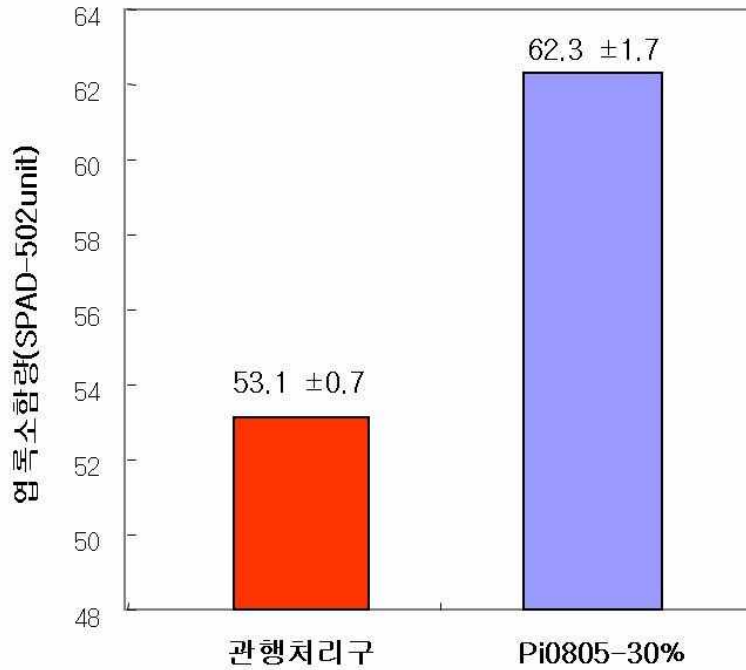


그림 6. 노지고추 포장에서의 Pi0805-30% 처리에 의한 엽록소 함량 변화 측정

(다) 노지 고추 II

노지 고추에 대한 고분자 천연물질의 농가 실증 사업을 실시하였다(강원도 인제군). 품종은 “청양”으로 정식 시기는 2009년 6월 2일이며 시험 약제는 육묘기 1회, 정식 15후 14일 간격으로 3회 엽면처리 하였다. 식물바이러스 감염억제효과 검정은 최종 처리 14일 후에 각각 전체주수에 대한 이병주수를 조사하여 발병도 및 바이러스 감염억제율을 조사하였다.

시험 결과 무처리구 포장에서는 전형적인 모자이크 증상이 다수 발생하였고 황화되어 생육이 불량한 모습을 볼 수 있었다. 반면 시제품 Pi0805-30% 처리 구는 바이러스에 대한 감염 증상을 관찰 할 수 없었고 정상적인 생육 상태를 나타내었다(그림 7).



그림 7. 노지고추포장에서 Pi0805-30% 처리에 의한 바이러스 감염 억제 효과 검증(무처리구 원 : 전형적인 모자이크증상, Pi0805-30% 처리구 원 : 정상생육)

전체 주에 대비한 바이러스 감염주수를 조사한 결과 Pi0805-30% 처리 구는 80.6%의 높은 감염억제 효과를 나타내었다. 이는 전년도 노지고추 포장시험과는 다르게 올해 연구에서는 정식 전 유평기에 Pi0805-30% 처리를 육묘 상에서 1회 처리를 한 뒤 정식하였다. 따라서 작년도 노지고추 시험 결과 대비 감염억제효과는 약 15% 상승하는 결과를 나타내었다. 이는 유평기 처리시 생육초기에 바이러스 감염을 억제하는 작용이나 종자 또는 토양에 감염되어 있는 바이러스를 사전에 예방하는 효과를 나타내었다고 판단된다(표 7).

따라서 차후 작물에 대한 친환경 재배력이나 사용 매뉴얼 작성 시 육묘상 처리에 대한 사용 효과를 명시해야 한다고 판단된다.

표 7. 노지 고추에서의 바이러스 감염 억제율

	이병주수/전체주수	발병률	감염억제효과(%)
관행처리구	31/120	25.8	-
Pi0805-30%	6/120	5.0	80.6

(라) 피망

피망은 다른 작물에 비해 바이러스에 매우 민감하여 종자 자체나 전작에서 발생한 바이러스가 토양, 작업 도구 등에 남아서 후작에 피해를 줄 수 있으므로 육묘 환경 관리나 플러그육묘에서의 예방이 매우 중요하다. 따라서 본 연구에서는 Pi0805-30%의 육묘상 처리에 의한 바이러스 발병 억제 효과를 검증하였다.

시험 방법은 육묘 상에서 1회 처리한 후 정식 15일 후 14일 간격으로 3회 엽면처리하였다. 바이러스 감염억제 효과를 검증은 전체주수에 대한 이병주수를 조사하여 발병도 및 바이러스 감염억제율을 조사하였다.

시험 결과 Pi0805-30%의 육묘상 처리에 의하여 바이러스 발생이 거의 없었음을 관찰 할 수 있었고 약 70.2%의 감염억제효과를 나타내었다(그림 8).



그림 8. 피망 포장에서의 Pi0805-30% 처리에 의한 바이러스 감염 억제 효과 검증

(2) 애호박에서의 농가 실증 사업

호박에 발생한 바이러스 병에 대한 감염억제 활성을 검증하기 위하여 강원도 춘천시에서 농가 실증 사업을 수행하였다. 그림 10은 춘천 일대에서 발생한 호박 바이러스 병으로 곰보 과가 형성되면 상품성이 떨어지고, 숙아주기를 하여 제거하므로 수확량이 줄어드는 피해를 입는다.

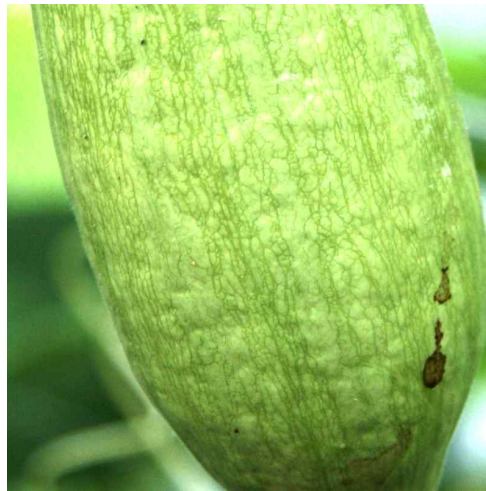


그림 10. 춘천 지역에서 발생한 호박바이러스 피해과(곰보형성)

포장시험은 전년도 피해 농가를 대상으로 Pi0805-30% 1,000배 희석액을 정식 전 유묘 1회 처리를 권장하였고 생육 초기 활착 후 10일 간격으로 3~4회 엽면처리하였다. 재배 방법은 일반 관행 재배 방법에 준하여 실시하였다. 바이러스 감염억제에 대한 조사항목은 이병과율을 조사하였으며 수확량 조사를 함으로서 바이러스에 의한 피해 경감을 예측하였다.

애호박 포장에서 바이러스 이병과율을 조사한 결과 무처리구의 이병과율은 48.7%, Pi0805-30% 처리구의 이병과율은 17.5%로 조사되어 약 64%의 감염억제 효과를 나타내었다 (표 9).

표 9. 애호박에서의 바이러스 감염 억제율

	이병과율(%)	발병률
관행처리구	48.7	-
Pi0805-30%	17.5	64.1

애호박의 수확량을 조사한 결과 Pi0805-30% 처리구에서는 382개, 관행처리구에서는 281개

의 수확량을 나타내어 처리에 의한 수확량이 35.9% 증가되었음을 확인하였다(그림 11). 이는 바이러스 피해가 감소함에 따른 상품성과 수확량 증가를 반영하는 결과이다.

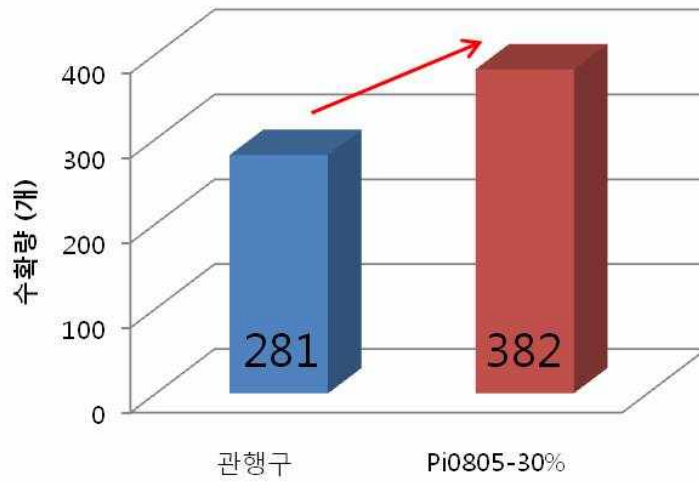


그림 11. 애호박에서의 수확량 조사

(3) 담배에서의 농가 실증 사업

포장에서의 생물활성 검정을 위하여 (주)파이오니아에서 공시 받은 Pi0805-30%의 시제품을 이용하여 담배재배 농가실증 시험을 수행하기로 하였다. 재배 방법은 일반 관행 재배 방법에 준하였고, 반농민 재배방식과 동일하게 실시하였다. 재배방식으로는 2008년 4월 6일에 정식하였으며, 처리구 설정은 그림 12, 13과 같다. 처리구는 Pi0805-30% 1,000배 희석액과 무처리를 설정하여 실험하였다. 처리방법은 각각 처리구의 희석액을 전착제와 혼합하여 활착이 된 이후 14일 간격으로 3회 경엽처리 하였다(5월 10일, 5월 23일, 6월 3일). 식물바이러스 감염억제효과는 조사는 최종 처리 14일 후에 각각 전체주수에 대한 이병주수를 조사하여 발병도 및 바이러스 감염억제율을 조사하였다.

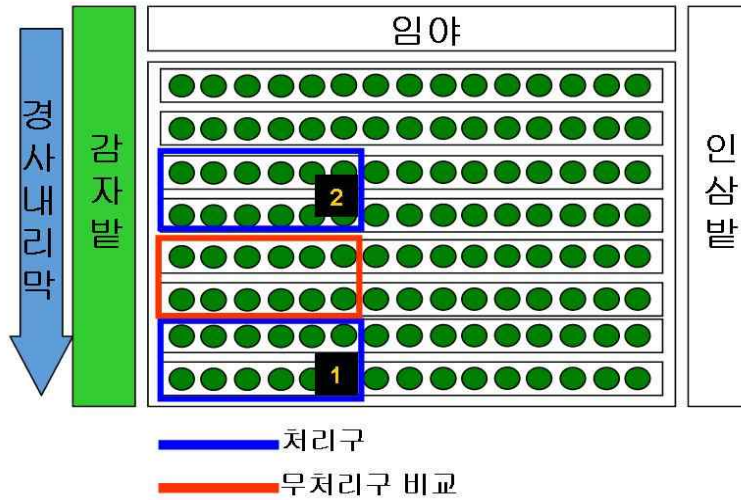


그림 12. 담배재배 포장 생물활성 시험 처리구 설정

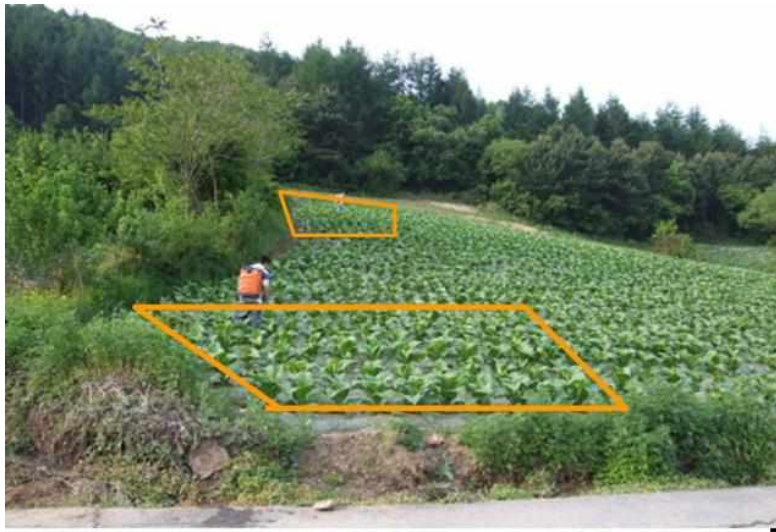


그림 13. 담배 재배 시험구(Line : 처리구)

시험 결과 시험포장에서는 CMV, TMV, PVY로 예상되는 바이러스가 복합적으로 감염되어 있는 형태를 띠었으며 무처리구는 바이러스에 전신이행 발병 정도가 심하였고 Pi0805-30%의 처리 구에서는 바이러스 감염이 74.4% 억제율을 보였다(그림 14, 표 10).

표 10. 담배 재배에서의 바이러스 감염 억제율(CMV, TMV, PVY 복합감염 전신기주 기준)

	이병주수/전체주수	발병률	감염억제효과(%)
관행처리구	15/153	9.8	-
Pi0805-30%	4/158	2.5	74.4

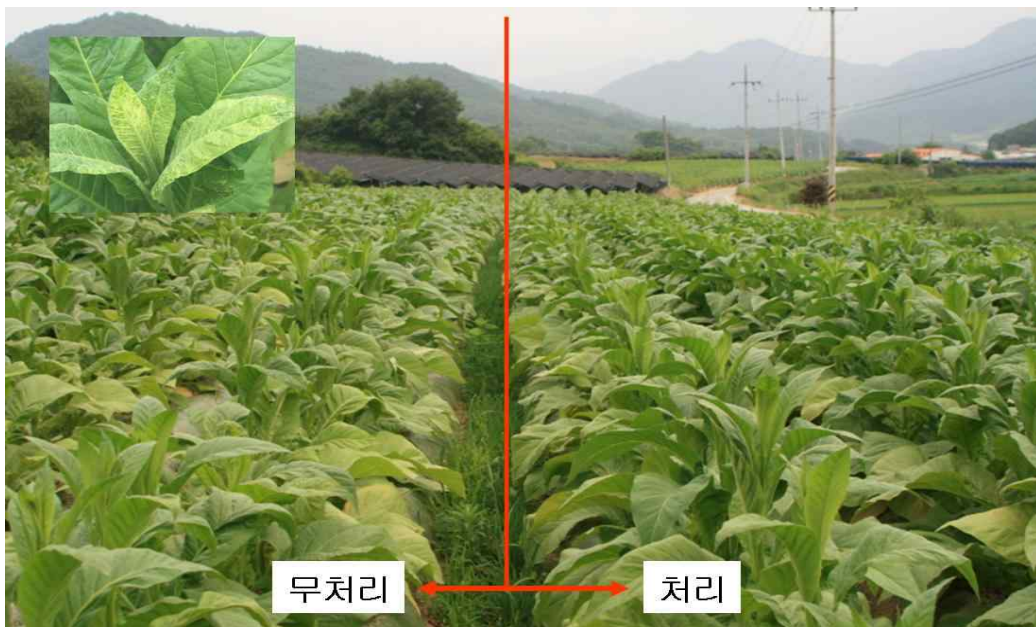


그림 14. 담배 재배지에서의 처리에 따른 효과 검정

(4) 감자에서의 농가 실증 사업

감자에서 발생하는 감자바이러스Y(PVY)의 감염 억제 활성을 검정하기 위하여 강원도 춘천시 서면의 포장에서 실증 사업을 수행하였다. 정식은 2009년 4월 3일 실시하였으며 품종은 수미로 적용하였다. 진딧물 발생 전 7일 간격 3회 처리 하였으며 바이러스 감염 억제 검정은 조사주수에 대비하여 감염 형태에 따른 감염주수를 조사하였다.

시험 결과 무처리구에서는 그림 15와 같이 감자바이러스의 전형적인 잎말림 현상을 나타내는 감염 주를 관찰 할 수 있었고 모자이크 증상도 관찰 할 수 있었다(그림 15). 또한 무처리 대비하여 Pi0805-30% 처리구의 바이러스 감염 억제효과는 74.4%로 매우 우수하게 나타났다(표 11).



그림 15. 감자 재배지에서의 처리에 따른 효과 검정

표 11. 감자 재배에서의 바이러스 감염 억제율

	바이러스 감염 형태			조사주수	발병률 (%)	감염억제효과(%)
	Leaf roll	mosaic	계			
관행처리구	5	2	7	40	17.5	-
Pi0805-30%	1	0	1	40	2.5	74.4

2. 주요 원예 작물에 대한 생육 단계별 최적처리 체계 확립

가. 고분자 천연 물질 원제의 희석에 따른 CMV 감염억제효과 검정

최적 희석배수를 선정하기 위하여 (주) 파이오니아로부터 제공 받은 *Serratia* Gsm01에서 생산된 고분자 천연물질의 희석배수에 따른 CMV 감염억제효과의 변화를 알아보기 위하여 각각 500, 750, 1,000, 1,500배까지 조정하여 감염억제효과를 조사하였다. 그 결과 1,000배까지 희석할 경우 원제 감염억제효과를 확인할 수 있었다(표 12).

표 12. 항바이러스 물질의 희석에 따른 감염억제효과 검정결과

희석배수	CMV 감염억제효과 (%)
배양여액	81.6
500배 희석	78.4
750배 희석	73.5
1,000배 희석	69.8
1,500배 희석	29.4

나. 고분자 천연물질의 약효 지속효과 검정

약제 간 반복 살포시 처리간격을 결정하기 위하여 고분자 천연물질의 약효지속 효과를 검정하였다. (주)파이오니아로부터 제공 받은 *Serratia* Gsm01에서 생산된 고분자 천연물질의 실내 온실조건에서 배양여액의 약효 지속 효과를 알아보기 위해 바이러스원의 처리 시간 (0, 3, 5, 7, 10, 14, 20일 후)을 달리하여 CMV 감염억제효과를 실내 검정하였다. 그 결과 고분자 천연물질을 처리 한 후 14일까지 CMV를 접종하여도 70% 이상의 높은 감염억제효과를 유지하였다(표 13).

표 13. 바이러스 접종 시간에 따른 고분자 천연 물질의 약효 지속효과 검정 결과

바이러스 접종 시간 (days)	감염억제효과 (%)
처리 후 바로 접종	72.8
3	80.5
5	74.2
7	70.6
10	82.0
14	81.1
20	78.0

다. Pi0805-30% 시제품에 대한 처리 시기 시험

Pi0805-30% 시제품에 대한 병 발생 초기 처리와 병 발생 후기 처리에 따른 CMV 감염억제 효과를 검정하였다. 병 발생 초기 처리는 기존의 처리구와 동일한 시기에 처리하였고, 발생 후기 처리 구는 CMV 바이러스를 인공 즙액 접종하여 발생 시킨 후 14일 간격으로 3회 경엽 처리 하였다.

그 결과 기존 처리구와 동일한 시기의 처리한 발생 전 처리구에서는 바이러스의 발병이 지연된 반면에 발생 후 처리구에서는 CMV 발병에 대한 억제 효과는 없는 것으로 확인되었다(그림 16). 따라서 고분자 천연물질을 함유한 시제품에서는 CMV가 초기에 감염되기 이전에 미리 처리하는 것이 효과적임을 증명하였고, 차후 작물에 대한 재배력 작성 시 유용한 데이터로 활용될 것으로 사료된다.



그림 16. Pi0805-30% 시제품에 대한 처리 시기 시험(Line : 바이러스 발병 확인)

이상의 결과들을 바탕으로 Pi0805-30% 시제품 최적 처리농도는 1,000배 희석이며 처리간격은 2주(14일)가 최적이었다. 처리 시기는 CMV의 감염이 가장 쉽게 발생하는 유묘기와 정식 후 60일 이내임을 감안한다면 유묘기 1회 처리 정식 15일 후 3~4회적이라 가장 효과적이라 판단된다.

3. 주요 원예 작물에 대한 재배력 확립 및 사용 매뉴얼 작성

고분자 천연물질의 원제와 시제품을 이용하여 주요 원예작물(고추, 담배, 호박, 감자 등)에 대하여 포장시험 및 농가 실증사업을 수행한 결과 대부분의 원예작물에 발생할 수 있는 바이러스 병에 대하여 감염억제 효과를 나타내었다. 더 다양한 작물에 대하여 연구가 이뤄져야 하지만 앞선 연구 결과는 다양한 바이러스 병에 대하여 광범위한 스펙트럼을 가지는 것으로 예측 할 수 있다. 또한, 생육 초기 처리를 통하여 바이러스 병을 예방하며 감염 후기 처리를 통

하여 감염 억제 및 포장 내 바이러스 전염 속도를 저하시키는 역할을 한다. 특히 유묘기 처리 시 생육초기에 바이러스 감염을 예방 할 수 있고 생육 후기 예방으로 사용할 수 있다. 또한, 항 바이러스 효과 외에 식물생육증진 효과와 품질 향상 그리고 수확량 증가의 효과도 볼 수 있었다. 이와 같은 바이러스 억제제는 친환경농업 시장뿐만 아니라 일반 농업 시장에서도 모두 적용이 가능하므로 실용적이라 판단된다(표 14).

표 14. 미생물 유래 고분자 천연 물질 현장 적용 시 기대효과

적용 작물	바이러스 감염 억제 효과	처리 시 기대효과
과채류 등	60~80%	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 바이러스 감염 예방 ✓ 작물의 면역력 증가 및 병저항성 증가 ✓ 수확량 향상 및 상품과 증가 ✓ 엽록소 함량 향상 ✓ 기감염기주에 대한 바이러스 전염 억제
담배, 감자 등	70%	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 바이러스 감염 예방 ✓ 작물의 면역력 증가 및 병저항성 증가 ✓ 전신이행바이러스에 효과적

표 15는 앞선 선행연구를 바탕으로 하여 사용자 매뉴얼을 작성하였다.

표 15. 미생물 유래 고분자 천연 물질 사용자 매뉴얼

적용 작물	적용대상	처리방법 및 주의사항
<p>과채류 (고추, 피망, 파프리카, 오이, 호박 등) 감자 담배 등</p>	<p>바이러스 병 (CMV 등)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 물에 1,000배 희석하여 엽면처리 2. 생육초기처리 (바이러스 감염 예방) <u>유묘기 1회 처리</u> <u>10~14일 간격 3회 처리</u> 3. 생육 중, 후기 (바이러스 피해 확대 억제) <u>바이러스 발생 초기 10 - 14일 간격 3회 처리</u> <u>10~14일 간격 3회 처리</u> 4. 바이러스 매개 충에 대한 별도의 방제 요구 5. 강산성, 강알칼리성, 단백질 성분의 농약을 제외한 모든 농약과 혼용 살포 가능 6. 사용 후 습기가 차지 않도록 밀봉 후 서늘한 곳에 보관

또한 앞선 선행 연구를 바탕으로 하여 각각의 작목 특성과 재배방식에 준하여 재배력을 작성하였다. 이는 바이러스 병을 예방 할 수 있는 고분자 천연물질의 정확한 사용 방법에 대한 가이드라인을 제공하고자 수행하였다(그림 17, 18, 19, 20, 21).

고추 친환경 재배력

시기	1월		2월		3월		4월		5월		6월		7월		8월		9월		10월		11월		12월		
	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	
생육 과정	← 발아기, 육묘기						← 정식기						← 개화기												
	← 온상설치		← 파종, 이식기				← 정식		← 지주설치, 유인				← 꽃고추수확		← 붉은고추 수확				← 생산량 및 수량 감소시 연장재배						
									← 웃거름		← 웃거름		← 웃거름												
발생병 해충	← 모잘록병				← 역병, 탄저병, 꽃마름병, 무름병, 진딧물(바이러스병), 담배나방																				
바이 러스 관리	사용법		육묘기 1회 엽면처리				정식 활착 후 10일 간격 3~4회 엽면처리						✓ 제품 1,000배 희석액을 충분히 엽면 살포 ✓ 바이러스 매개하는 매개충 구제로 효과를 극대화												
	기능		☞ 면역력 강화				☞ 면역력 강화 ☞ 병저항성 증대 ☞ 바이러스 초기 예방																		

그림 17. 고추 작물에 대한 바이러스 예방 기술 재배력

피망 신환경 재배력

시기	1월			2월			3월			4월			5월			6월			7월			8월			9월			10월			11월			12월					
	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하			
생육과정	←			수			←			←			←			←			←			←			←			←			←			←			←		
발생병해충										배꼽썩음과 총채벌레												진딧물 발생 바이러스매개						냉해, 모잘록병, 역병											
바이러스관리	<p>✓ 제품 1,000배 희석액을 충분히 엽면 살포</p> <p>✓ 바이러스 매개하는 매개충 구제로 효과를 극대화</p>																																						
사용법													정식포 준비												육묘														
기능													파종												정식														
													활착												착과														
	웃거름			웃거름			가온완료			웃거름			웃거름												웃거름			가온시작			웃거름								

그림 18. 피망 작물에 대한 바이러스 예방 기술 재배력

호박 신완경 재배력

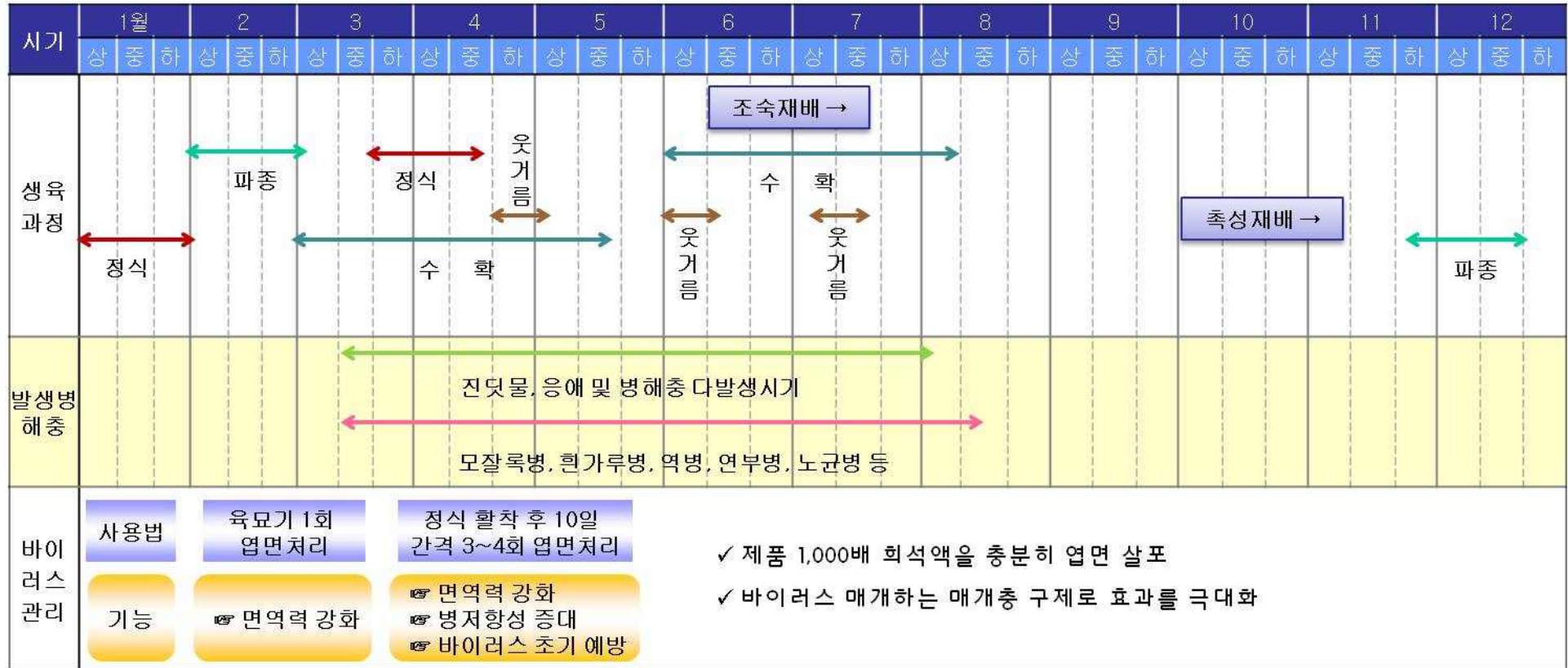


그림 19. 호박 작물에 대한 바이러스 예방 기술 재배력

담배 친환경 재배력

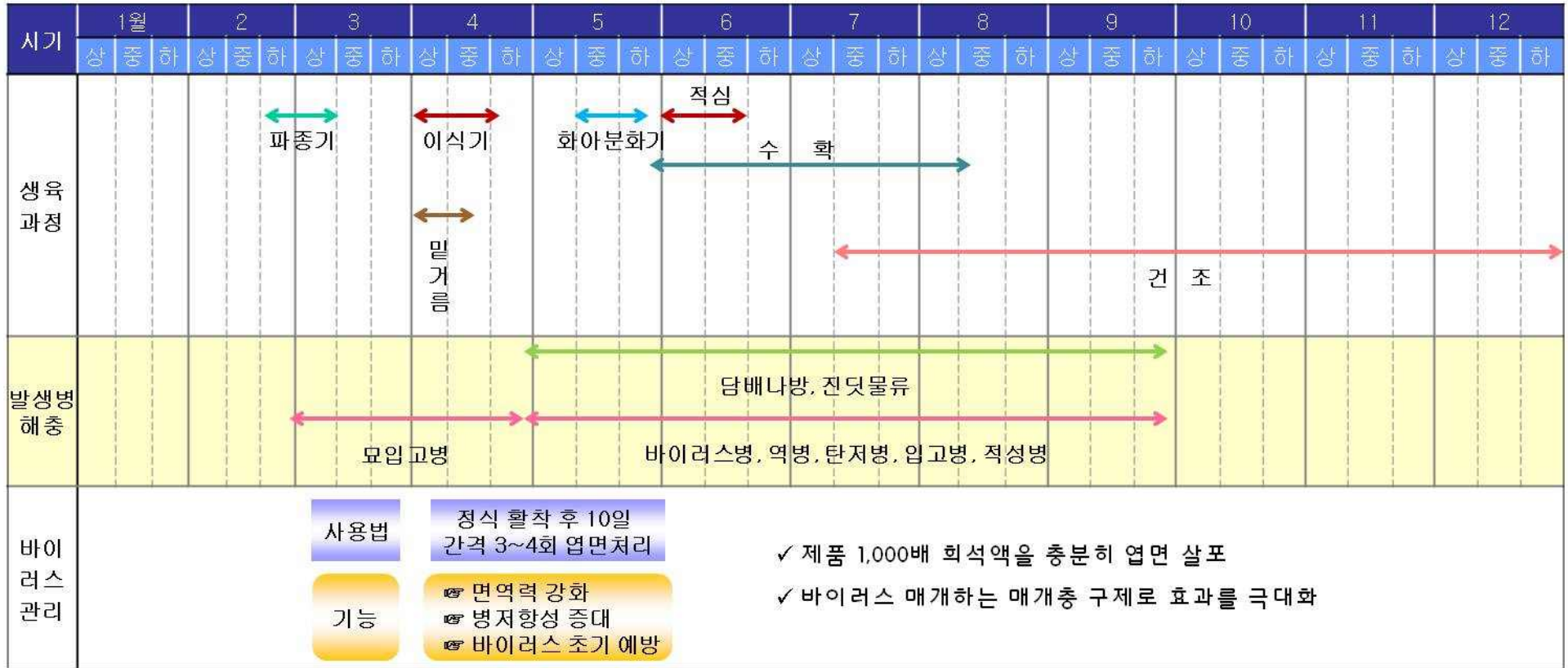


그림 20. 담배 작물에 대한 바이러스 예방 기술 재배력

감자 신환경 재배력

시기	1월		2월		3월		4월		5월		6월		7월		8월		9월		10월		11월		12월	
	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하
생육 과정	봄재배 →		← 유묘기		← 정식기		← 경엽신장기		← 감자비대기		가을재배 →		← 유묘기		← 정식기		← 경엽 신장기		← 감자비대기					
발생병 해충							← 역병		← 진딧물, 바이러스						← 역병		← 진딧물, 바이러스							
바이 러스 관리	사용법 종자처리 1회		기능 ☞ 면역력 강화		정식 활착 후 10일 간격 3~4회 엽면처리		☞ 면역력 강화 ☞ 병저항성 증대 ☞ 바이러스 초기 예방		사용법 종자처리 1회		기능 ☞ 면역력 강화		정식 활착 후 10일 간격 3~4회 엽면처리		☞ 면역력 강화 ☞ 병저항성 증대 ☞ 바이러스 초기 예방		✓ 제품 1,000배 희석액을 총 분히 엽면 살포		✓ 바이러스 매개하는 매개충 구제로 효과를 극대화					

그림 21. 감자 작물에 대한 바이러스 예방 기술 재배력

4. 주요 원예 작물 실증 사업 농가의 제품력 모니터링 및 마케팅 포인트 설정

Pi0805-30% 시제품에 대하여 다양한 포장시험을 수행하고 실증 사업에 참여한 15인의 농업인에게 제품력과 향후 마케팅에 대한 제안사항을 앙케이트 형식으로 조사하였다.

조사항목과 그 결과는 다음과 같다.

질문 1. 바이러스 병에 피해를 받은 경험이 있으십니까?

예	아니오
15	0

질문 2. 바이러스 억제제 시제품의 효과에 대한 만족도는 어떻습니까?

매우만족	만족	보통	불만족	매우불만족
7	6	1		

질문 3. 바이러스 억제제 시제품을 물에 희석하여 사용하시는데 만족하십니까?

매우만족	만족	보통	불만족	매우불만족
11	4			

질문 4. 만약 제품화된다면 어떤 정보를 가장 먼저 받고 싶으십니까?

제조과정	사용방법	구성 성분	바이러스 특성	혼용관계
0	8	0	4	3

질문 5. 시험하신 시제품이 미생물 추출물인데 정확한 분류는 무엇이라고 생각하십니까?

화학제	미생물제	생화학제	호르몬제	기타
0	13	0	2	0

질문 6. 시험하신 시제품은 어떤 종류의 농자재라고 생각하십니까?

농약	비료	영양제	친환경농자재	기타
0	1	11	3	0

질문 7. 시험하신 시제품은 바이러스 억제제로 상품화된다면 농업활동에 도움이 되십니까?

크게 도움	약간 도움	보통	도움 안됨
15	0	0	0

질문 8. 시제품에서 제품화가 될 때 가장 우려되는 부분은 무엇입니까?

효과	가격	구매경로	기타
2	13	0	0

질문 9. 제품의 포장단위는 어떤 것이 가장 좋다고 생각하십니까?

100g	200g	250g	500g	기타
1	1	11	2	0

질문 10. 제품화가 되면 구매하실 의향이 있으십니까?

즉시 구매	가격 고려후 구매	주위반응 확인 후	보조사업구매	기타
4	9	2	0	0

이상의 앙케이트 결과를 바탕으로 보았을 때 기존의 바이러스 억제제가 없었기 때문에 감염 억제 효과에 대하여 만족하는 것으로 판단된다.

또한 물에 쉽게 녹는 수용제로 개발된 시제품을 물에 녹여 사용하기에도 불편함은 없었던 것으로 판단된다. 향후 기대되는 정보에서 “정확한 사용법의 전달”이 필요하다는 것은 기존의 살균제 대부분 병 발생 초기에 살포되었던 점과 비교한다면 본 CMV 감염 억제제는 약 2~3개월 전 미리 예방처리를 해야 한다는 것이 관행 대비 익숙하지 않은 것으로 판단된다. 따라서 제품화시 사용법에 대한 정확한 정보를 바이러스의 특성과 함께 정확하게 전달해야 할 것으로 판단된다.

또한 본 자재가 미생물 추출물이라고 사전에 말씀드렸으나 농가에서는 여전히 미생물제 혹은 영양제로 판단하고 있었다. 따라서 교육시 미생물 추출물제에 대한 개념을 정확히 전달해야만 한다.

제품화 시 가장 고려해야할 사항은 최종 소비자 가격이였다. 따라서 생산가격과 유통비용에 대한 점검이 필요할 것으로 사료된다. 한편 시험에 참여한 일부 고추 재배 농가를 대상으로 고분자천연물질 사용 결과 발생하는 농가 소득 향상 분석한 결과, 노지 고추의 경우 수확량이 평균 20% 증가하였다. 이는 10a를 기준으로 보았을 때 총 수익이 약 18만원~20만원 증가한 것이다. 제품의 가격을 25,000원으로 가정했을 때 작기 중 총 5회에 걸쳐 250g 제품 4개를 사용한다. 따라서 농가 측에서는 8만원~10만원이 수익이 증가한 것으로 나타났다. 정확한 수치에 대하여 향후 구체적인 정보를 수집하여 투입 비용 대비 수입 증가에 대한 산출 내역을 정리하

여 마케팅에 활용해야 할 필요성이 있는 것으로 판단된다.

5. 고분자 천연물질 제품의 품질관리 시스템 확립

가. 바이러스와 기주작물에 대한 문헌조사

국내에서 분리 동정된 식물바이러스는 보고된 종만 50여종 이상으로 벼와 채소작물 그리고 과수류 등에 다양하게 기주하고 있다. 이 중에서 특히 채소에 주로 발생하는 바이러스 병인 CMV(*Cucumber Mosaic Virus*)와 TMV(*Tobacco Mosaic Virus*) 등은 바이러스 취급이 용이하며 직접적으로 식물체내에 인공접종이 가능하므로 항바이러스 검정이나 감염억제효과 실험에 적용할 수 있다. 특히 검정대상 바이러스와 기주식물간의 상호 작용에 의해 바이러스 병의 병징이 다르게 나타난다. 예를 들면, TMV를 담배(*Nicotiana glutinosa*)에 즙액접종을 하면 접종엽에 국부병반을 형성하지만 같은 담배인 *Nicotiana Tabacum* var. Xanti-nc에 CMV를 즙액접종을 하면 전신감염이 되어 서로의 병반이 틀리게 나타난다(그림 22). 이러한 작용으로 바이러스와 기주식물간의 이해가 더욱 중요하다고 할 수 있다. 또한, 바이러스 감염억제 효과 검정에서 국부병반 형성기주의 경우는 병징이 독립적으로 나타나 수치적으로 분석할 수 있는 장점이 있다. 표 16은 감염억제효과 시험에 사용되는 바이러스와 기주작물의 예이다.



그림 22. 바이러스와 기주작물의 조합 a) TMV를 담배(*Nicotiana glutinosa*)에 접종 후 생긴 국부병반 병징; b) CMV를 담배(*Nicotiana Tabacum* var. Xanti-nc)에 접종 후 생긴 전신 감염 병징.

표 16. 감염억제시험에 사용된 바이러스와 생물검정 대상 기주식물의 조합

바이러스	기주작물 (품종)
TMV-N (괴저계)	담배 (<i>Nicotiana glutinosa</i>) : 포트 유묘엽
CMV-Y (황반계)	명아주 (<i>Chenopodium amaranticolor</i>) : 포트 유묘엽
TuMV-일본계	명아주 (<i>Chenopodium amaranticolor</i>) : 포트 유묘엽
PVX	담배 (White Burley, Samsun) : 포트유묘엽
PVY	명아주 (<i>Chenopodium amaranticolor</i>) : 포트 유묘엽
TNV	동부 : 포트 유묘엽

나. 고분자 천연물질의 활성화에 대한 간이 확인법 개발

고분자 천연물질에 대한 CMV 감염억제효과를 나타내는 활성 물질을 조기에 검출하고자 간이 확인법을 개발하였다. 우선 위에 문헌조사에 따라 CMV 바이러스에 대하여 병징이 독립적으로 나타나는 국부기주(명아주 : *Chenopodium amaranticolor*)를 선택하였다. 바이러스 검정은 개체수준의 검정 방법으로 유묘를 이용한 포트실험을 하였고, 고분자 천연물질을 유묘 잎에 직접 도포한 후 일정 시간이 지난 후 바이러스를 인공 접종하였다. 마주보는 잎의 한 쪽에는 고분자 천연물질을 처리하고 다른 한 쪽은 무처리로 하는 대엽법(opposite leaf method)을 이용하였고, CMV 바이러스의 인공접종은 Carborandum 600 mesh로 기계적으로 옆면에 상처를 내어 식물체내에 침투시켰다. 바이러스의 인공접종 후 일정시간 바이러스를 증식 시켜 발병과 증식량을 조사하였다(그림 23). CMV 감염억제효과는((무처리 국부병반수-처리구 국부병반수)/무처리 국부병반수)×100으로 나타내었다.



그림 23. 국부기주를 이용한 CMV 감염억제효과 간이 확인법. a) 무처리구; b) 고분자천연물질 처리구

(1) CMV 최적 바이러스 접종원 농도 검정

고분자 천연물질의 CMV 감염억제효과를 보기 위하여 생체 내에서만 생명활동을 할 수 있는 활물기생체인 CMV 농도를 확인하는 것이 중요하다. 따라서 바이러스 접종원 농도에 따른 CMV 감염억제효과에 대하여 조사하였다. 바이러스 종류는 이후 모든 시험의 기준 바이러스로 사용할 CMV를 이용하였으며, CMV의 증식은 전신감염 기주인 *Nicotiana Tabacum* var. Xanti-nc를 이용하였고, CMV의 감염억제효과는 국부병반기주인 *Chenopodium amaranticolor*를 이용하였다. 먼저 바이러스 접종원으로서 CMV는 전신 기주에 즙액 접종하여 감염시킨 후 7일 뒤 이병조직을 각각 1배, 10배, 100배, 1,000배의 농도로 phosphate buffer에 마쇄하여 희석하였다. 그리고 국부기주에 각각 접종하여 나타나는 병반수로 최적의 바이러스 접종원 농도를 검정하였다.

그 결과, 고분자 천연물질 처리에 의한 CMV 감염억제효과를 확인하기 위한 최적의 바이러스 접종원 농도는 CMV 접종원을 10배 희석하여 사용하였을 때 국부병반 수가 150개~200개 사이로 확인되었고, 1,000배 와 100배의 희석 농도는 국부병반 수가 10개 내외로 바이러스 발병도가 낮았다(표 17, 그림 24). 또한 1배의 희석 농도는 발병도가 높게 나와 국부병반을 counting 하기에 어려움이 따를 것이라 예상된다. 따라서 최적의 바이러스 접종원 농도는 10배 희석하여 사용하는 것이 병반수 확인 및 감염억제효과 산출에 가장 적합한 것으로 판단된다.

표 17. CMV 최적 바이러스 접종원 농도 검정

CMV 바이러스 희석배수	CMV 바이러스 국부병반 수 (개)
1,000배	3
100배	12
10배	184
1배	846

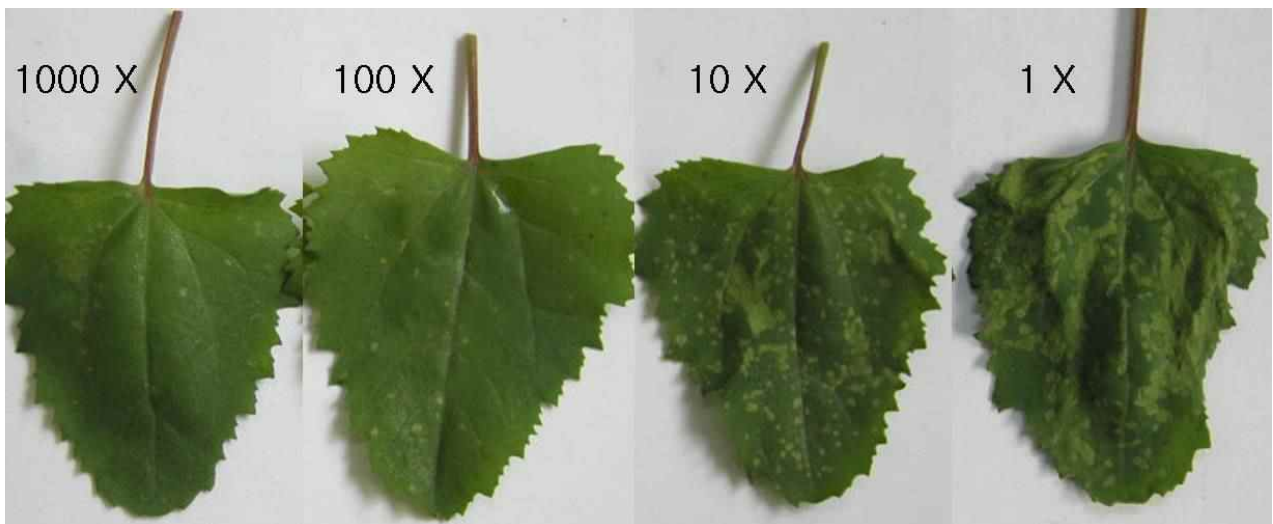


그림 24. CMV 최적 바이러스 접종원 농도 검정

(2) CMV 감염억제효과 검정방법

CMV 감염억제효과를 검정하기 위해서는 주로 국부병반 기주의 포트유묘엽을 이용한다고 알려져 있다. 검정법으로는 엽맥을 중심으로 절반에는 약제를 처리하고 절반은 무처리하는 반엽법(half leaf method)와 마주보는 잎의 한쪽에는 약제를 처리하고 다른 한 쪽은 무처리로 하는 대엽법(opposite leaf method)이 주로 쓰인다. 따라서 고분자 천연물질의 CMV 감염억제효과 검정을 위하여 그림 25와 같이 위에 두 가지 방법으로 최적의 검정방법을 확인하였다.



그림 25. CMV 감염억제효과 검정방법 (좌:반엽법, 우:대엽법)

또한, 약제 처리 시기와 방법에 따른 검정방법으로 고분자 천연물질이 바이러스에 직접 작용해 감염저해를 일으키는 것을 조사하기 위한 목적으로 사용되는 혼합처리 방법과 검정하고자 하는 약제를 잎의 표면에 붓으로 도포하여 말린 다음 일정시간 경과 후 동일한 표면에 바이러스를 접종하는 전처리 방법, 침투이행성 효과확인을 위한 엽이면 처리방법, 마지막으로 바이러스감염 후 약제를 처리하는 후처리 방법이 가능하다. 본 연구에서는 고분자 천연물질의 처리시기나 처리 방법에 따른 CMV 감염억제효과 검정을 위해서 위의 4가지 방법 중 최적의 검정 방법을 확인하였다.

그 결과 반엽법 실험에서는 고분자 천연물질의 처리구와 무처리구에서 CMV 바이러스의 국부병반이 잘 발병되지 않음을 관찰 할 수 있었다. 이는 고분자 천연물질 처리시 CMV에 감염억제효과를 나타내는 물질이 엽맥사이로 물질이동(translocation)하여 무처리 부분에도 CMV 바이러스 억제효과가 일어났다고 판단된다. 그러나 대엽법 실험에서는 무처리구의 국부반점 발병이 150~200개 사이로 발생하였고 고분자 처리구에는 CMV 감염억제효과를 볼 수 있었다. 따라서 Bioassy SOP시 대엽법이 CMV 감염억제효과 검정의 최적의 방법이라 판단된다.

또한 고분자 천연물질의 배양액은 혼합처리, 전처리 모두 80% 이상의 CMV 감염억제효과를 나타냈고, 이면처리 시에도 64.8%의 감염억제효과를 보임으로서 반엽법 실험과 마찬가지로 local systemic effect가 있는 것으로 판단된다(표 18). 특히 침투이행성이 있는 바이러스 억제제는 항바이러스제로의 개발가능성이 높으리라 판단된다. 한편, 후처리 시에는 효과가 없었는데 이는 고분자 천연물질이 CMV 바이러스 치료효과가 아닌 바이러스 감염 예방 작용이기 때문인 것으로 판단된다. 따라서 Bioassy SOP 제조시 고분자 천연물질의 처리는 CMV 감염억제효과가 가장 우수한 전처리방법을 이용하여 CMV 감염억제효과를 보았다.

표 18. 고분자 천연 물질의 처리방법에 따른 CMV 감염억제효과 검정

처리방법	국부병반 수		CMV 감염억제효과 (%)
	무처리 엽	처리엽	
혼합처리	158	27	82.9
전처리	182	24	86.8
엽이면처리	176	62	64.8
후처리	169	134	20.7

6. 고분자 천연물질에 대한 이화학적 특성 분석

가. Pi0805-30% 시료에 대한 입도 분석

(주)파이오니아로부터 공시 받은 시제품 Pi0805-30%에 대한 입도를 조사하였다. 실험방법은 그림 26과 같이 분말 원제 100g를 355mesh의 고은 채에 걸러준 뒤 원제량을 조사하였다. 그 결과 원제 100g중 96g이 고은 채를 통과하였고, 4g의 원제가 355mesh의 고은 채에 걸러지는 현상을 나타내었다. 하지만 걸러진 원제를 잘게 부수면 쉽게 부서져 원제의 수화성에는 문제가 없는 것으로 판단된다.

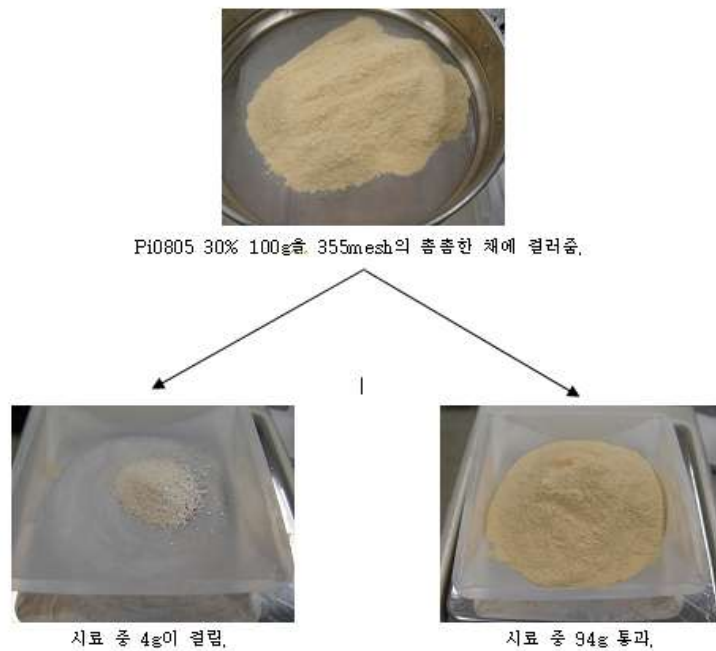


그림 26. Pi0805-30% 시료에 대한 입도 분석

나. Pi0805-30% 시료에 대한 수화성 분석

Pi0805-30% 시료 원제로서의 기초적인 수화성을 조사하였다. 실험방법은 그림 27과 같이 500ml dH₂O에 5g(100배 희석액)를 넣은 후 원제가 가라앉는 시간을 조사하였다. 그 결과 Pi0805-30% 시료는 수화가 완전히 이루어 질 때까지 1분의 시간이 소요 되었다.

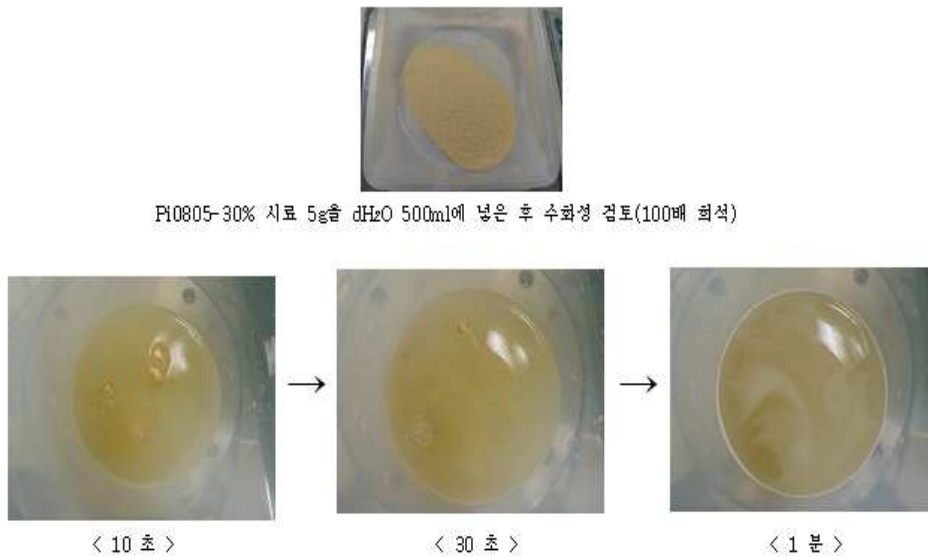


그림 27. Pi0805-30% 시료에 대한 수화성 분석

다. Pi0805-30% 시료에 대한 수용성 분석

Pi0805-30% 시료에 대한 기초적인 수용성을 조사하였다. 실험방법은 그림 28 과 같이 500 ml dH₂O에 5g(100배 희석액)를 넣은 후 원제의 수용성을 조사하였다. 그 결과 약간의 몽침 현상이 있었지만 원제 특성의 영향을 미칠만한 요인은 없었다고 판단된다(그림 29).



그림 28. Pi0805-30% 수용성 검토 10초경과 후



< 위 >



< 아래 >

그림 29. Pi0805-30% 수용성 검토 약수저로 혼합 후

라. Pi0805-30% 시료의 이화학적특성 결과는 다음의 표 19와 같다.

표 19. Pi0805-30% 시료의 이화학적 특성 분석

분석내용	기준	결과	평가
색	엷은 베이지	엷은 베이지	통과
pH (1g/ℓ)	7.00	6.98	통과
수화성 (5g/500ml)	1분 이내 전량 수화	합격	통과
수용해도	10g/ℓ	합격	통과

7. 고분자 천연물질의 환경 요소에 대한 안정성 분석

가. *Serratia* Gsm01의 배양여액의 온도에 대한 안정성

(주) 파이오니아로부터 제공 받은 *Serratia* Gsm01의 배양여액의 온도에 대한 열안정성을 점검하고자 분시험을 수행하였다. 배양여액을 대상으로 100℃에서 각각 0, 10, 20, 30, 40, 50분 간 중탕하여 열처리 한 후 각각의 sample에 대하여 CMV 감염억제효과를 점검하였다.

그 결과, 50분간 열처리의 고온학대 하여도 CMV 감염억제효과가 떨어지지 않고 활성을 유지하는 것으로 나타났다(표 20). 이는 고분자 천연물질을 생산하는 *Serratia* Gsm01의 배양여액이 열에 매우 안정함을 나타낸다고 판단된다.

표 20. *Serratia* Gsm01의 배양여액의 온도에 대한 안정성 점검

열처리 시간 (min)	CMV 감염억제효과 (%)
배양여액 (+control)	86.4
0	82.0
10	84.3
20	82.6
30	80.1
40	78.4
50	79.1

나. *Serratia* Gsm01의 배양여액의 pH에 대한 안정성

(주) 파이오니아로부터 공시 받은 *Serratia* Gsm01의 배양여액의 pH에 대한 안정성을 점검하고자 분시험을 수행하였다. 배양여액을 대상으로 0.5N NaOH와 0.5N HCl를 이용하여 각각 pH 3, 5, 7, 9로 보정 한 뒤 CMV 감염억제효과를 검정하였다.

그 결과 표 21과 같이 pH 3, 5, 7, 9 조건하에서 CMV 감염억제효과가 떨어지지 않았다. 이는 고분자 천연물질을 생산하는 *Serratia* Gsm01의 배양여액이 pH에도 매우 안정한 물질임을 확인하였다.

표 21. *Serratia* Gsm01의 배양여액의 pH에 대한 안정성 점검

pH	CMV 감염억제효과 (%)
배양여액 (+control)	87.2
pH 3	82.5
pH 5	86.9
pH 7	86.3
pH 9	78.1

다. 고분자 천연물질 U/F filtration 정제물의 온도에 대한 안정성

(주)파이오니아로부터 제공 받은 *Serratia* Gsm01의 배양여액을 Ultra filtration(MWCO. 100,000)으로 정제한 후 100,000이상의 시료를 이용하여 열 안정성 분석을 실시하였다. 위와 같은 방법으로 중탕 처리 하였고, 각각에 대한 CMV 감염억제효과에 대하여 점검하였다.

그 결과 정제물의 열 안정성은 표 28과 같이 100℃에서 50분간 처리하여도 80% 이상의 감염억제효과를 나타내었다. 이는 고분자 천연물질을 Ultra filtration(MWCO. 100,000)으로 정제하여도 열에 매우 안정한 성질을 가지고 있어 차후 물질 제형화에 많은 도움이 되리라 판단된다(표 22).

표 22. *Serratia* Gsm01의 배양여액의 온도에 대한 안정성 점검

열처리 시간 (min)	CMV 감염억제효과 (%)
배양여액 (+control)	81.4
0	82.8
10	83.9
20	82.2
30	79.6
40	78.4
50	80.5

라. 고분자 천연물질 U/F filtration 정제물의 pH에 대한 안정성

(주) 파이오니아로부터 제공 받은 *Serratia* Gsm01의 배양여액을 Ultra filtration(MWCO. 100,000)으로 정제한 후 100,000이상의 시료를 이용하여 pH에 대한 안정성을 점검하고자 본시험을 수행하였다. 위와 같은 방법으로 pH를 보정하였고, 각각에 대한 CMV 감염억제효과를 검정하였다.

그 결과 표 29와 같이 pH 3, 5, 7, 9 조건하에서 CMV 감염억제효과가 떨어지지 않았다. 이는 고분자 천연물질을 Ultra filtration(MWCO. 100,000)으로 정제하여도 pH에 매우 안정한 물질임을 확인하였다.

따라서 고분자 천연물질은 여러 가지 온도와 pH의 악조건에서도 바이러스에 대한 감염억제

효과를 나타내는 활성 물질이 유지됨에 따라 바이러스 감염억제제로서의 산업화에 매우 유리한 물질임을 확인 할 수 있었다(표 23).

표 23. *Serratia* Gsm01의 배양여액의 pH에 대한 안정성 점검

pH	CMV 감염억제효과 (%)
배양여액 (+control)	80.6
pH 3	83.1
pH 5	82.7
pH 7	84.0
pH 9	82.3

마. 고분자 천연물질 제품 경시안정성 분석

Pi0805-30%의 시제품의 경시 안정성 점검을 수행하였다. 온도의 조건은 $54^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 이었으며 0주, 1주, 2주, 4주, 6주 동안 보관 후 시험체제의 물리성을 검토하였다. 실험 결과 6주차까지 시제품의 대한 물리적인 변화는 관찰 할 수 없었다. 또한 경시안정성 검토에서 온도에 의한 물리적인 변화는 관찰 할 수 없었다(표 24).

표 24. Pi0805-30%의 시제품의 물리성 검토

검토사항	보관조건					검토기준
	0주	1주	2주	4주	6주	
외관	연한 갈색분말	연한 갈색분말	연한 갈색분말	연한 갈색분말	연한 갈색분말	
수화성	양호	양호	양호	양호	양호	2분 내외
분말도	양호	양호	양호	양호	양호	325mesh, 95% 통과

본 연구에서는 경시변화에 의한 CMV 바이러스 감염억제효과를 분석하여 활성 유지여부를

검토하였다. 그 결과 0주부터 6주까지 각 시료의 활성은 70% 이상으로 유지하여 시제품은 경시 적으로도 안정한 활성을 나타내었다(그림 30).

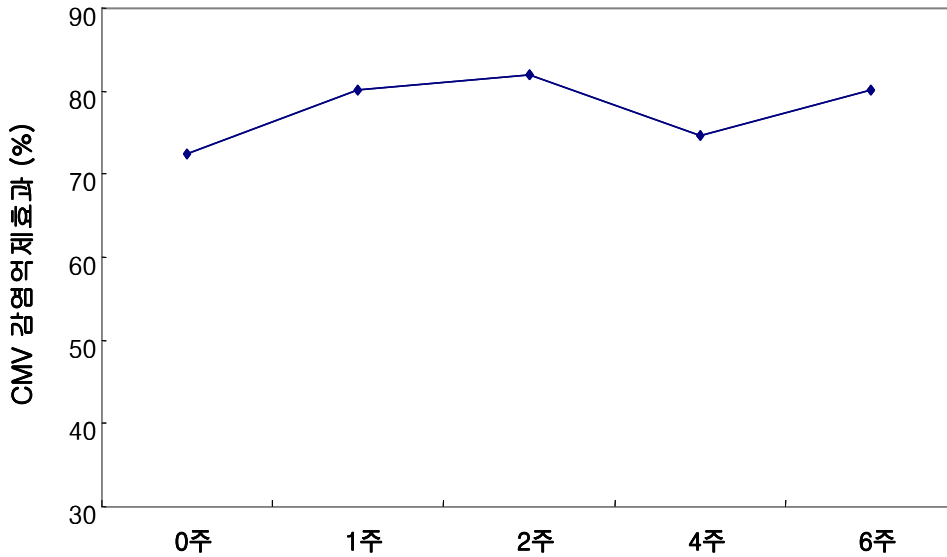


그림 30. Pi0805-30%의 시제품의 경시안정성 검토

바. 고분자 천연물질 제품 수용액상에서 안정성 점검

Pi0805-30%의 시제품을 멸균수에 용해한 후 0, 6, 12, 24시간 후 활성적 안정성을 관찰하였다. 시험 결과 6h, 12h, 24h에서 초기 시간에 대비하여 CMV 감염억제효과는 70% 이상 활성을 유지하여 안정성을 나타내었다(그림 31).

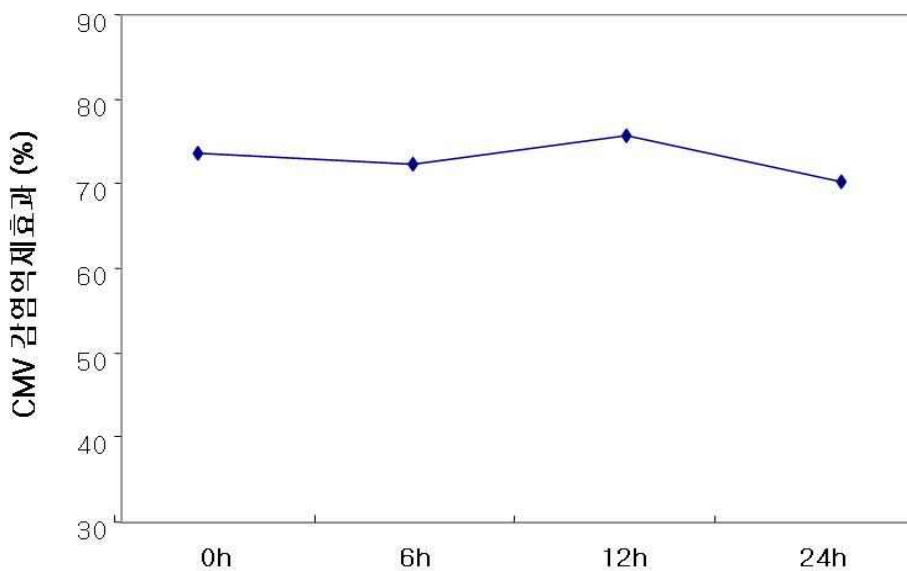


그림 31. Pi0805-30%의 수용액상에서의 안정성 검토

사. 고분자 천연물질 제품 pH에 대한 안정성 점검

Pi0805-30%의 시제품의 pH에 대한 안정성을 점검하고자 본 시험을 수행하였다. Pi0805-30%의 시제품을 대상으로 멸균수에 용해시킨 후 0.5N NaOH와 0.5N HCl를 이용하여 각각 pH 3, 5, 7, 9로 보정 한 뒤 CMV 감염억제효과를 검정하였다.

그 결과 그림 32와 같이 pH 3, 5, 7, 9 조건하에서도 CMV 감염억제효과가 70% 이상을 유지하였다. 이는 Pi0805-30%의 시제품이 다양한 pH 조건에서도 매우 안정한 물질임이 확인되었다.

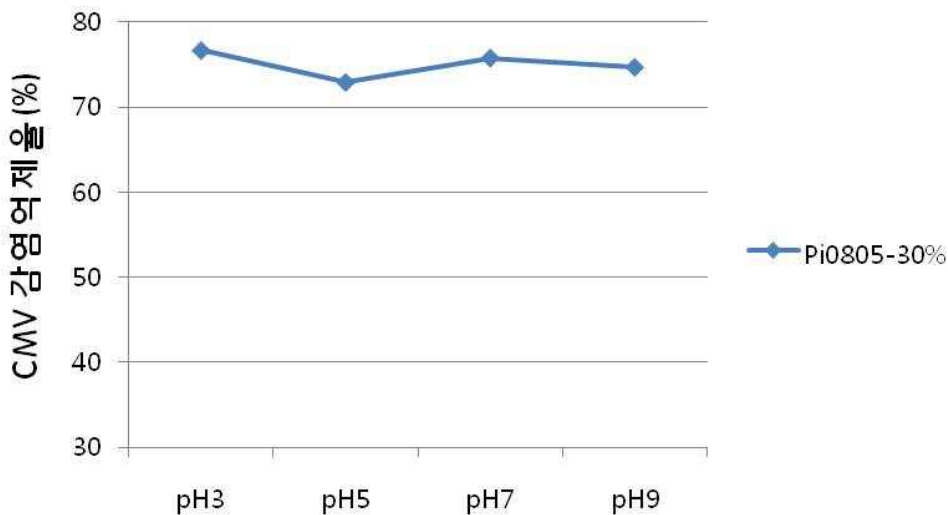


그림 32. Pi0805-30%의 pH에 대한 안정성 점검

8. 고분자 천연물질과 시판되는 타농자재의 혼용 안정성 분석

가. 살균제와의 혼용안정성 분석

시중에서 시판중인 살균제 7종에 대하여 고분자 천연물질의 혼용 안정성 시험을 위하여 본 연구를 수행하였다. 혼용 안정성 시험은 수중 안정성에 대하여 평가하였다. 수중 안정성 시험은 표 25의 살균제들을 고분자 천연물질과 혼합한 뒤 농약사용지침서에서 표기한 농도에 준하여 수용액에 희석하고 48시간까지 유지하였다. CMV 감염억제효과는 0, 24, 48시간에 sampling 하여 바이러스에 대한 안정성을 점검하였다.

표 25. 혼합 안정성 시험에 사용된 화학제명(살균제)

제품명	주성분	순도 (%)	처리농도
다코닐	chlorothalonil	75	600배 희석
푸르겐	difenoconazole	10	2,000배 희석
지오판	thiophanate-methyl	70	1,000배 희석
팡파르	mepanipyrim	50	2,000배 희석
스미랙스	procymidone	50	1,000배 희석
시스텐	myclobutanil	6	1,250배 희석
농용신	streptomycin	20	1,000배 희석

시험 결과 다코닐과 혼용 시 초기 81.6%의 감염억제효과가 48시간까지 79.6%로 활성이 유지됨에 따라 안정하다고 판단된다. 푸르겐과 혼용 시 초기 84.2%의 감염억제효과가 48시간에는 79.5%로 다소 떨어지는 경향이었으나 활성 보증에는 문제가 없다고 판단된다. 그 외 5종의 살균제도 마찬가지로 수용액 상태로 유지된 모든 시료에서 48시간까지 CMV 감염억제효과를 유지 할 수 있었다(그림 33). 이러한 결과는 추후 고분자 천연물질의 상용화시 기존의 살균제와 혼합, 혼용 처리하여도 고분자 천연물질의 활성이 안정하다는 것을 시사한다.

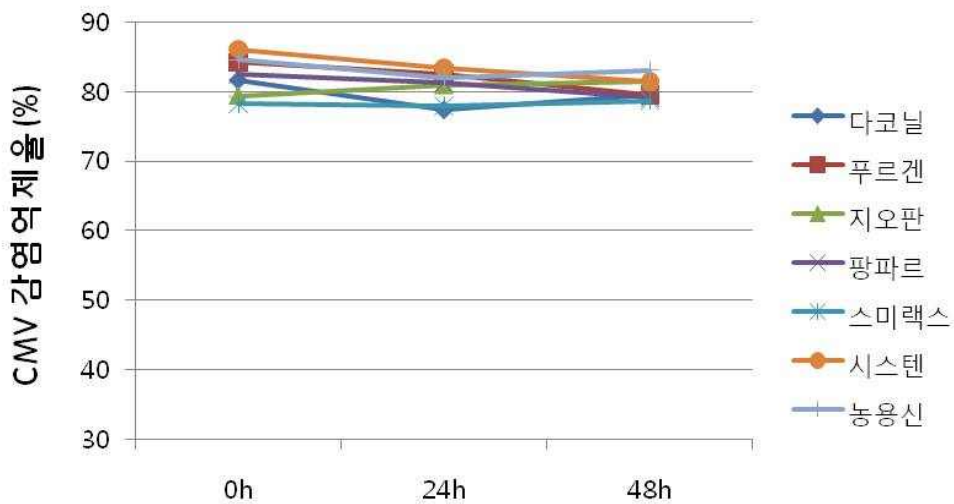


그림 33. 고분자 천연물질과 화학 살균제와의 혼합 수용액 안정성

나. 살충제와의 혼용안정성 분석

시중에서 시판중인 진딧물방제용 살충제 6종에 대하여 고분자 천연물질의 혼용 안정성 시험을 실시하였다. 표 26에 나타난 살충제들을 고분자 천연물질과 적정 농도로 혼합한 후

CMV 감염억제효과를 분석하였다. 시간은 0, 24, 48시간에 sampling하여 CMV에 대한 감염 억제율을 산출하였다.

표 26. 혼합 안정성 시험에 사용된 화학제명(살충제)

제품명	주성분	순도 (%)	처리농도
체스	pymetrine	25	2,300배 희석
세티스	flinicamid	10	2,000배 희석
칼립소	thiacloprid	10	2,000배 희석
아타라	thiamethoxam	10	2,000배 희석
빅카드	clothianidin	8	2,000배 희석
코니도	imidacloprid	10	1,000배 희석

살충제와의 혼용안정성 분석 결과 코니도와 혼용 시 0h, 24h, 48h에서 각각 79.3%, 75.8%, 77.4%의 CMV 감염억제효과를 나타내었고, 아타라와 혼용 시 85.8%, 77.3%, 80.2%의 억제율을 나타내어 안정한 것으로 판단되었다. 나머지 4종의 살충제 역시 70% 후반과 80% 초반의 CMV 감염억제효과를 나타내어 수용액 상태로 유지된 모든 시료에서 48시간까지 CMV 감염억제효과를 유지할 수 있었다(그림 34). 이러한 결과는 추후 고분자 천연물질의 상용화시 기존의 살충제와 혼합, 혼용 처리하여도 고분자 천연물질의 활성이 안정하다는 것을 시사한다.

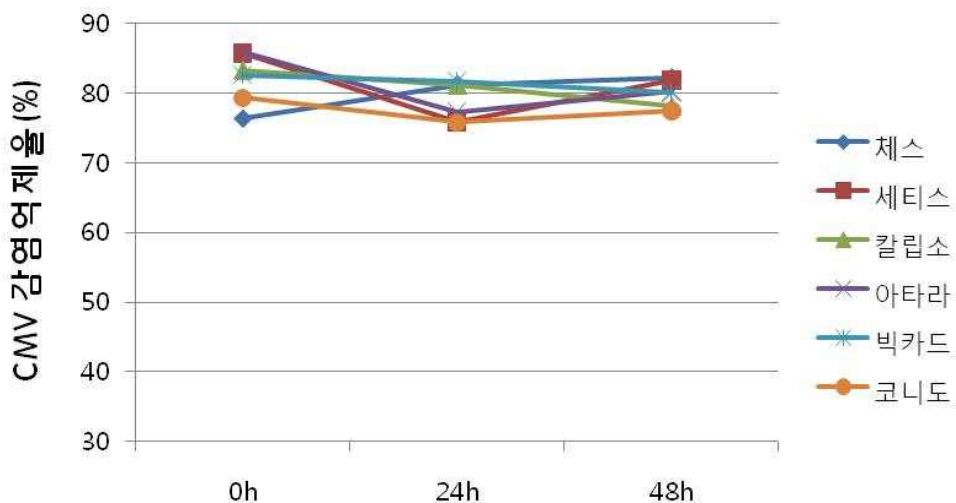


그림 34. 고분자 천연물질과 화학 살충제와의 혼합 수용액 안정성

다. 영양제, 친환경농자재와의 혼용안정성 분석

시중에서 시판중인 친환경유기농자재 4종, 칼슘제 1종, 미량요소복합비료제 1종 등에 대하여 고분자 천연물질의 혼용 안정성 시험을 실시하였다. 표 27에 나타낸 시료들을 고분자 천연물질과 분량의 농도대로 혼합한 후 CMV 감염억제효과를 0, 24, 48시간에 sampling하여 분석하였다.

표 27. 혼합 안정성 시험에 사용된 영양제 및 친환경유기농자재

제품명	원료	분류	처리농도
진박사	고삼추출물제	친환경유기농자재	1,000배 희석
응박사	고삼+넙오일제	친환경유기농자재	1,000배 희석
폴비그로우	폴빅산제제	친환경유기농자재	1,000배 희석
빅리거	해조추출물제	친환경유기농자재	1,000배 희석
스피드칼	칼슘제	석회비료	1,000배 희석
나르겐	화학제	미량요소복합비료	1,000배 희석

시험 결과 진박사와 응박사는 초기 수용액 상태에서의 약 82%의 감염억제율이 48시간까지 80% 이상의 감염억제율을 유지하여 매우 안정하였다. 그 외에 다른 농자재 4종 역시 앞선 살균제, 살충제와의 혼용 실험의 결과와 마찬가지로 수용액 상태로 유지된 모든 시료에서 48시간까지 CMV 감염억제효과를 유지 할 수 있었다(그림 35). 이러한 결과는 추후 고분자 천연물질의 상용화시 기존의 영양제 또는 비료제와의 혼용이 가능하여 사용이 편리하다는 장점을 부각시킬 수 있다고 판단된다.

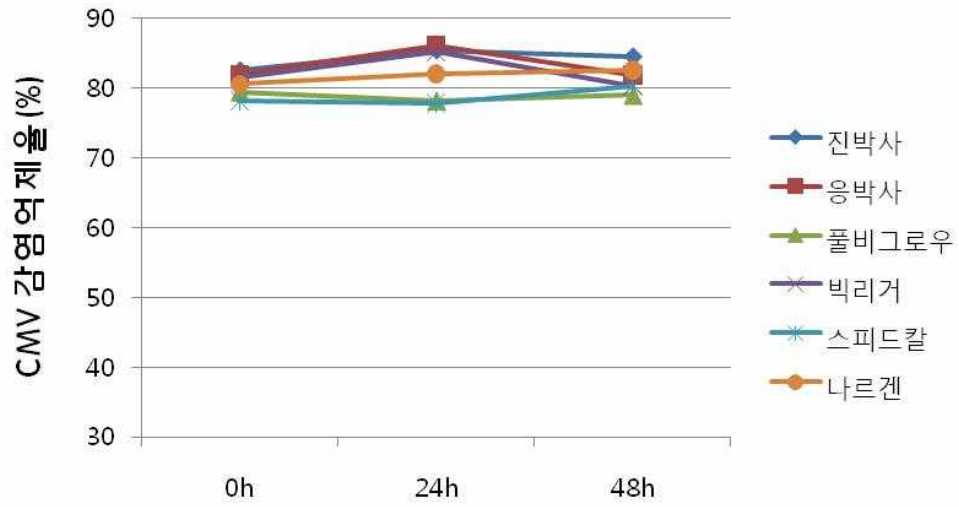


그림 35. 고분자 천연물질과 영양제, 친환경농자재와의 혼합 수용액 안정성

제 3 절 고분자 천연 물질의 CMV에 대한 작용기작 규명 및 생물 활성적 특성분석

1. 고분자 천연물질에 의한 CMV 바이러스의 식물별 영향분석

가. 국부감염 기주에 대한 항바이러스 효과

고분자 천연물질을 생산하는 *Serratia* Gsm01의 배양 여액을 증류수로 2배, 10배 및 100배로 희석하여 CMV의 국부병반 기주식물인 *C. amaranticolor*에 붓을 이용하여 엽 앞면에 도말한 직후, CMV-Y의 조즙액으로 접종한 다음 7일 후에 발생한 국부 병반을 확인한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 희석 배수가 증가할수록 국부병반의 발생량이 증가하여 세균 배양 여액이 항바이러스 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

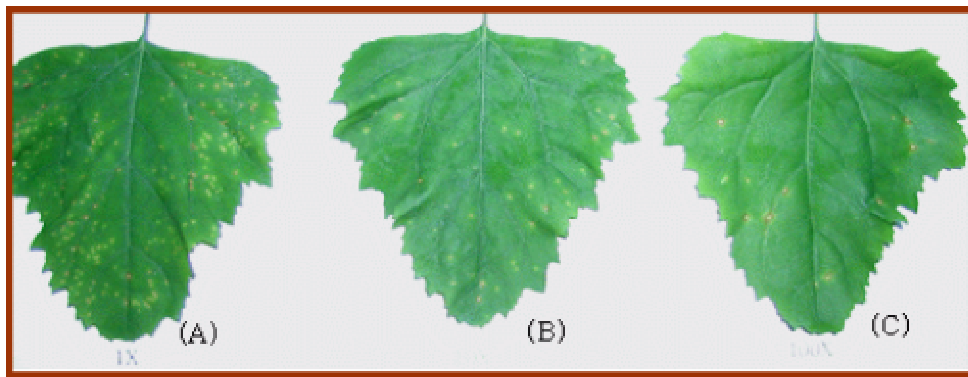


Fig. 1. Inhibitory effects of the concentration of bacterial culture filtrates on symptom development by CMV-Y. The bacterial culture filtrates diluted to 100 times (A), 10 times (B), and 2 times (C) were coated on the leaves of *C. amaranticolor* by brush, before inoculation of CMV-Y.

고분자 천연물질을 생산하는 *Serratia* Gsm01의 배양 여액을 *C. amaranticolor*의 3개 잎에 처리한 직후 CMV-Y의 조즙액을 접종한 다음 7일 후에 나타난 국부병반 수를 산정한 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 Gsm01은 93.4%의 높은 병징 발현 억제율을 나타냈다.

Table 1. Inhibitory effects of bacterial culture filtrates on symptom expression of *C. amaranticolor* by CMV-Y inoculation.

Bacteria Culture filtrate	Treated leaves				Untreated leaves				Inhibitory activity (%) ^b
	1	2	3	Average	1	2	3	Average	
Gsm01	3	3	3	3	84	40	38	45.3	93.4

a : No. of local lesions.

b : $\{1 - (\text{No. of symptoms on the plants treated with the culture filtrates} / \text{No. of symptoms on control plants})\} \times 100 = \%$

나. 전신감염 기주에 대한 항바이러스 효과

세균 배양 여액이 전신감염기주에서의 바이러스 감염 억제에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 잎의 전면에 붓으로 도말하는 방법으로 Gsm01의 배양 여액을 CMV의 전신 감염 기주인 *N. tabacum* cv. Xanthi-nc에 도말한 후, CMV-Y의 조즙액을 접종한 결과, 세균 배양여액을 도말하지 않은 식물과의 병징 발현 특성에 확연한 차이를 확인할 수 있었는데 (Fig. 2), 육안에 의한 병징 발현 유무의 관찰 결과 100%의 병징 발현 억제 효율을 나타내었다(자료 생략).

한편, 세균 배양여액을 직접 붓으로 도말하지 않고, 분무기를 이용하여 배양여액을 식물체 표면에 분무한 후 바이러스를 접종한 결과 무처리 식물에서는 모두 병징이 발현되었으나, 분무 처리한 식물의 경우 *N. tabacum* cv Xanthi-nc에서는 73.7%의 병징발현 억제 율을 나타내었으며, *N. benthamiana*의 경우는 44.5%의 병징발현 억제 율을 나타내었다(Table 2). 이 결과로서 분무 처리가 도말 처리에 비하여 항바이러스 효과가 감소된다는 사실을 알 수 있었다.

Table 2. Spray effects of bacterial culture filtrates on symptom expression by CMV-Y inoculation.

Bacterial culture filtrate ^a	<i>N. tabacum</i> cv Xanthi- nc				<i>N. benthamiana</i>			
	1	2	3	Inhibitory activity (%) ^a	1	2	3	Inhibitory activity (%) ^a
Gsm01	6	10	3	73.7	14	14	12	44.5
Control ^b	24	24	24	100	24	24	24	100

a : { 1 - (No. of symptoms on the plants treated with the culture filtrates / No. of symptoms on control plants) } X 100 = %

b : The plants were inoculated with CMV-Y without treatment of the culture filtrates.

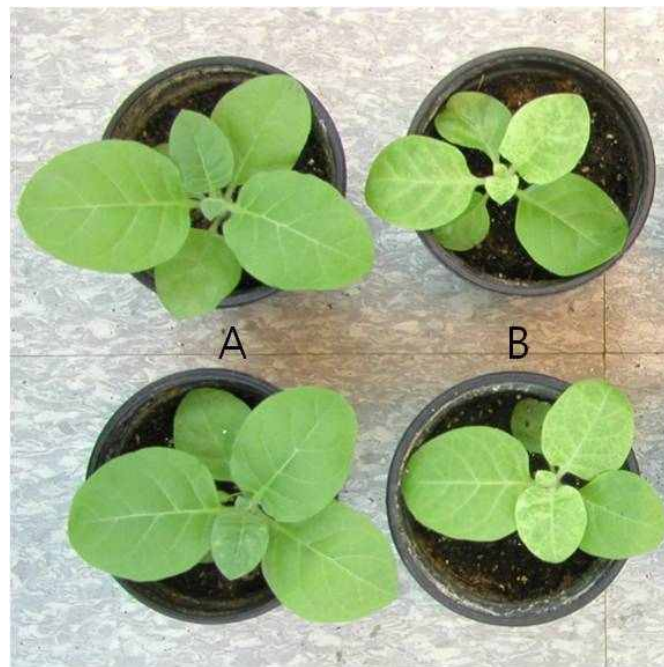


Fig. 2. Spray effects of Gsm01 culture filtrates on symptom expression of *N. tabacum* cv. Xanthi-nc by CMV-Y inoculation. The plants were sprayed with bacterial culture filtrates from Gsm01(A) before viral inoculation. B is control plant.

다. 고분자 천연 물질의 전신이행성 검정(Crude extract)

그동안 연구 개발 되었던 바이러스 억제제는 식물체 전체를 고르게 처리하여야 하는 문제로 실용화에 어려움이 많았으며 이를 해결하기 위해 전신이행효과를 갖는 바이러스 억제제의

탐색이 수행 되었으나 생산성과 물질의 안정성 등의 이유로 실용화에 매우 어려운 실정이었다. 이에 본 연구에서는 고분자 천연물질을 생산하는 *Serratia* Gsm01의 crude extract 물질을 이용하여 담배 엽과 담배 식물체에서의 전신이행성 검정을 실시하였다.

고분자 천연물질의 분리 및 정제를 위하여 *Serratia* Gsm01을 실험용 MH 배지에서 진탕 배양하고 배양된 상층액을 취하여 4배의 ethanol를 가한다음 4℃에서 24시간 침전한다. 침전물을 얻기 위하여 원심분리 방법을 사용하였고 펠렛은 모아서 상온 공기 중에 dry하여 crude한 고분자 천연물질을 회수하였다. 마지막으로 펠렛은 DNase(2U/ml), RNase(10 μ g), Protease로 처리하고 다시 10mM phosphate buffer로 투석하였다. 이렇게 얻어진 물질을 이하 “Crude extract”라고 표기한다.

CMV 바이러스의 증식 및 보관은 CMV 바이러스는 전신감염 기주인 담배(*Nicotiana Tabacum* var. Xanti-nc) 식물에서 보관 하였다. CMV 바이러스의 증식은 실험실에서 감염된 잎 절편을 phosphate buffer에 회석하였다. 모든 접종은 4℃의 냉기에서 이루어지며 접종 시에도 얼음에서 보관 하였다. 식물은 과종 후 4주 후 가장 오래된 잎을 문지르며 접종하였다.

(1) “Crude extract”의 담배 엽에서의 전신이행성 검정

담배 엽에서의 전신이행성 검정을 위해 두 가지 실험방법으로 수행하였다. 첫 번째로 crude 고분자 천연물질을 담배 엽 뒷면에 붓으로 도포한 뒤 CMV 바이러스를 즙액접종 하였고, 두 번째로 담배 엽을 엽맥을 기준으로 반으로 나눠 한쪽만 “Crude extract”를 처리한 뒤 CMV 바이러스를 즙액 접종하였다.

그 결과 그림 3과 4에서 보는 바와 같이 고분자 천연물질을 처리한 담배 엽에서는 CMV 감염억제효과를 볼 수가 있었다. 이는 고분자 천연 물질이 엽면에 부착 시 세포내로 빠르게 흡수되면서 처리한 엽뿐만 아니라 다른 세포조직으로 이동하면서 고분자 천연 물질을 처리하지 않았던 다른 곳에서도 CMV 감염억제효과가 나타난 것으로 판단된다.

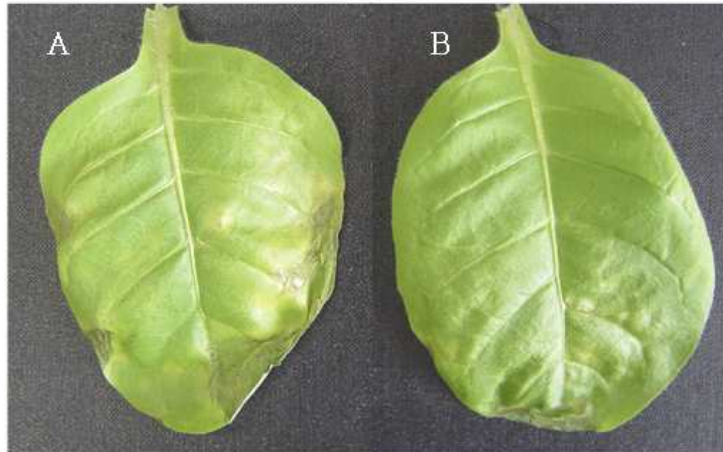


그림 3. 담배 엽 뒷면에 고분자 천연물질 처리하였을 때 전신이행성 검정 A, 증류수 처리구; B: Crude extract



그림 4. 담배 엽 반쪽 면에 고분자 천연물질을 처리하였을 때 전신이행성 검정 A, 증류수 처리구; B: Crude extract

(2) “Crude extract”의 담배 식물체에서의 전신이행성 검정

고분자 천연물질의 전신이행성을 확인하기 위하여 그림 5와 같이 crude 고분자 천연물질을 담배의 1엽에 스프레이 처리하였고, 무처리로 증류수를 처리하였다. 12시간 후 2엽에 CMV 바이러스를 즙액 접종하였다. 접종 후 온실 유지하면서 바이러스의 발병을 3엽에서 노란 모자이크 바이러스의 병징을 관찰하였다.

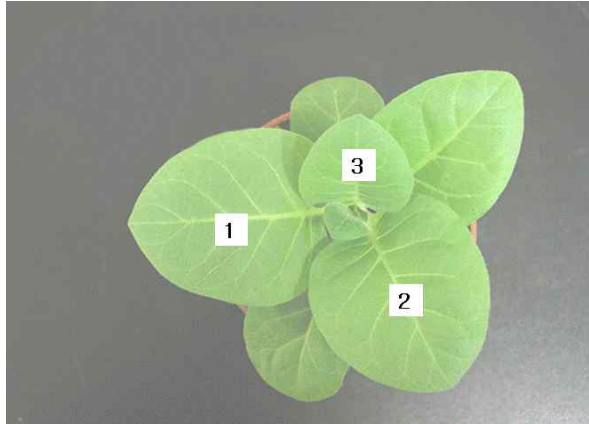


그림 5. 전신감염 기주에서의 전신이행성 검정을 위한 엽처리 방법

그 결과 고분자 천연물질을 처리한 시험 구에서는 상위 엽에 바이러스 병징이 관찰되지 않아 전신이행성 효과를 확인 할 수 있었다(그림 6). 위의 세 가지 결과를 토대로 고분자 천연물질을 생산하는 *Serratia* Gsm01의 바이러스 억제시 전신이행성을 관찰 할 수 있어 차후 제품의 상용화시에 매우 긍정적인 결과라 할 수 있겠다.



그림 6. 전신감염 기주에서의 전신이행성 검정 결과 A: Crude extract; B: 증류수 처리구

(3) 병징 발현 시기에 따른 “Crude extract”의 효과 분석

고분자 천연물질의 전신이행성을 시간에 따라 확인하기 위하여 본 연구를 수행하였다. “Crude extract” 200ppm의 양을 엽면살포한 뒤 72시간 뒤 카보랜덤법으로 CMV 바이러스를 즙액 접종하였다. 15일 후 CMV의 전형적인 모자이크 증상을 나타내는 식물체의 수를 새어 발병률로 표시하였다.

그 결과 “Crude extract”를 처리한 담배에서는 발병률이 33.33%인데 반하여 증류수를 처리

한 무처리구에서는 100%의 발병률을 나타내었다(표 3). 바이러스의 전형적인 모자이크 증상은 무처리구에 비하여 처리구가 3일 정도 지연되어 발병하는 효과를 나타내었다(no data).

표 3. 담배에 대한 CMV 바이러스 억제 효과

처리구 ^a	Trials			Mean ^c
	1	2	3	
Crude extract	30	40	30	33.33
증류수	100	100	100	100

^a 각 처리구당 10개 plant 반복

^b 시각적으로 관찰한 모자이크 병징을 15일 후 관찰하여 처리구별 백분율로 표기

^c 3반복의 의한 발병률

2. 고분자천연물질의 CMV에 대한 작용 기작 구명

가. DAS-ELISA (Direct double antibody sandwich - Enzyme linked immunosorbent assay)에 의한 검정

CMV의 전신 감염 기주인 *N. tabacum* cv. Xanthi-nc 에서의 세균 배양 여액의 항바이러스 효과는 육안에 의한 병징 발현 유무와 더불어, 식물 조직 내부에서의 바이러스의 정량적 분석을 위하여, ELISA에 의한 혈청학적 검정도 함께 실시하였다.

항혈청의 IgG를 분리하여 plate를 설계하고 전신 병징 바이러스에서 정량한 잎을 마쇄하여 실험에 사용하였다. *N. tabacum* cv. Xanthi-nc에 CMV 만 접종해 접종 후 5일부터 5일 간격으로 20일까지 증식시킨 대조구를 비롯해 Gsm01 배양 여액을 처리한 후 CMV를 접종한 식물을 접종 후 각각 5일, 10일, 15일, 20일 후 5g 씩 정량 채집하여 실험에 사용 하였다.

ELISA plate(Nunc-immunoTM plate, Nalge Nunc Internation)에 각 well당 coating buffer (sodium carboant<anhydrous> 1.59 g, sodium bicarbonate 2.93 g, sodium azide 0.2 g, per liter, pH 9.6) 1.6ml와 CMV antibody를 8 μ l(200:1)섞어 100 μ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 둔다. PBS-T(sodium chloride 8 g, sodium phosphate, dibasic<anhydrous> 1.15 g, potassium phosphate, monobasic <anhydrous> 0.2 g potassium chloride 0.2 g, tween-20 0.5ml per liter, pH 7.4)로 3분간 3번 세척하였다.

N. tabacum cv. Xanthi- nc 이병엽 5g에 general extract buffer (1 liter 당 sodium sulfite <anhydrous>20g, polyvinypyrrolidone <PVP> MW. 24,000-40,000 20 g, sodium azide 0.2 g, powder egg (ckicken) albumin grade II, tween-20 20ml , PH 7.4)를 100 μ l을 넣고 Tissue Striker (KS-TS 1000, Kisanbiotech, Korea)로 충분히 마쇄하였다. 마쇄한 시료를 ELISA

plate 에 500 μ l 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 30분 반응시켰다. 다시, PBS-T로 3번 세척을 거쳐 conjugator를 ECI buffer (PBS-T 1 liter 당 bovine serum albumin(BSA) 2.0 g, polyvinylpyrrolidone (PVP) MW. 24,000-40,000 20 g, sodium azide 0.2 g, PH 7.4) 1600 μ l와 항체16 μ l에 섞어 100 μ l씩 각 well에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 반응시켰다.

PBS-T로 3번 세척하고 PNP 2 g 에 substrate buffer (1 Liter 당 magnesium chloride 0.1g, sodium azide 0.2 g, diethanolamine 97ml , PH 9.8)를 20ml 넣어 녹인 후 각 well당 100 μ l 넣고 25 $^{\circ}$ C에서 ELISA reader (Power waveX, Bio-TEK Instruments Inc. USA)로 측정하였다 측정 시간은 30분경과 후와 45분경과 후로 나누어 측정하였다.

그 결과 Table 4에서 보는 바와 같이, Gsm01 배양 여액을 도말처리한 후 CMV-Y를 접종한 식물체의 경우는 접종 후 5일 및 10일째 되는 시점에서는 건전식물체에 비하여 A₄₂₀에서의 수치가 다소 높았으나, 15~20일째 되는 시점에서는 건전 식물체의 A₄₂₀에서의 수치보다 낮거나 유사한 경향을 나타냄으로서 바이러스가 억제되는 현상을 나타내었다. 따라서 공시 세균의 배양여액의 항바이러스 활성은 바이러스 감염 억제 효과뿐만 아니라 부분적으로는 바이러스의 증식을 억제하는 효과도 있음을 알 수 있었다.

Table 4. DAS-ELISA of CMV-Y in *N. tabacum* cv. Xanthi-nc treated with Gsm01 culture filtrates.

Time after treatment (days)	Absorbance at 420 nm		
	Gsm01	+ Control ^a	- Control ^b
5	0.583	1.317	0.128
10	0.763	1.651	0.109
15	0.104	1.568	0.099
20	0.105	1.302	0.124

a : The plants were inoculated with CMV-Y without treatment of the culture filtrates.

b : Healthy plants.

나. 정제된 바이러스에 대한 항바이러스 효과 검증

세균 배양 여액의 항바이러스 활성을 정량적으로 분석하기 위하여 정제된 바이러스의 국부 병반 기주에 대한 항바이러스 효과 실험을 수행하였다.

바이러스의 정제는 전 과정이 4 $^{\circ}$ C에서 이루어졌으며 Takanami (1981)의 방법을 토대로 부분 수정하여 사용하였다(Fig.7). 정제된 바이러스는 자외선 흡수 패턴으로 순화 정도를 측정하

고 정량하여 -70°C 에 보관하여 실험 시 사용하였다.

Infected leaves (*N. benthamiana*)

↓ wash 3,4 times. Mixer 5min.

Homogenize in chloroform and 0.5M sodium citrate buffer(pH 6.5)
containing 10 mM EDTA and 0.1% thioglycolic acid (1:2:1=W:V:V)

↓ Centrifuge at 9,000rpm for 10 min(Hanil, MEGA 17R)

supernatant

↓ Ultracentrifuge at 28,000rpm for 150min.(Kontron T-1170,TFT 5070)

pellet

↓ Suspend in 0.01M PO_4 buffer containing 2mM EDTA (pH 7.0)
and 1% Triton X100

↓ Stir on ice for 10hrs

supernatant

↓ Ultracentrifuge at 38,000rpm for 120min.(Kontron T-1170,TFT 7013)

pellet

↓ Resuspend in 0.01M PO_4 buffer containing 2mM EDTA (pH 7.0)

↓ Centrifuge at 6,000rpm for 10 min(Hanil, MEGA 17R)

supernatant

Purified virus

Fig. 7. Procedure for purification of CMV-Y

CMV-Y를 정제 후 (Fig. 8), OD_{260} 에서 정량하여 각각 50 pmol, 70 pmol, 90 pmol, 120 pmol, 150 pmol로 접종원을 제조하였다. 각 농도별 바이러스 접종원을 Gpf01과 Gsm01의 배양 여액을 도말 처리한 *C. amaranticolor*의 엽에 접종한 다음, 7일 후에 나타난 병징을 조사하였다.

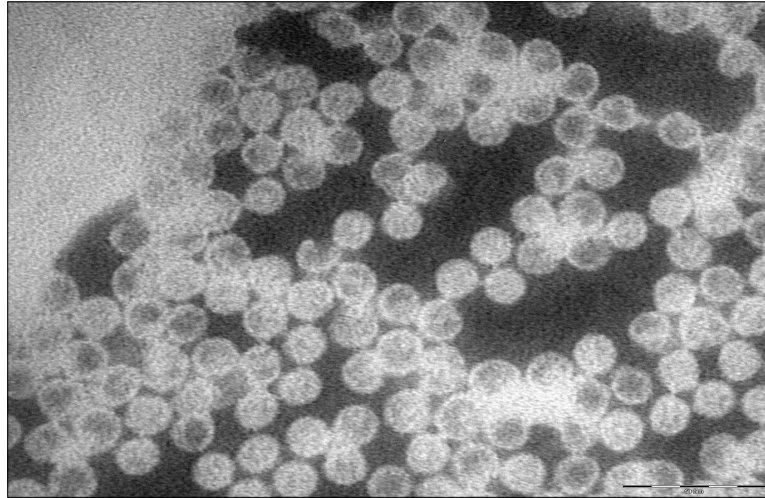


Fig. 8. Electron micrograph of purified CMV-Y. Viral preparations were stained with 2% phosphotungstic acid. Bar =100nm.

그 결과 50pmol의 CMV-Y 접종원에 대해서는 100%의 병징 발현 억제 효율을 나타내었으며 120pmol에서 60%의 병징 발현 억제를 나타내었다. 또한 바이러스 접종원의 농도가 증가함에 따라서 병징 발현 억제율도 감소하여 150pmol의 CMV-Y 접종원에 대해서는 32%의 병징 발현 억제율을 나타내어 바이러스 농도가 높아지면 감염 억제가 다소 불리할 것이라 판단된다 (Table 5, Fig. 9).

Table 5. Effect of Gsm01 culture filtrates on symptom expression by purified CMV-Y in *C. amaranticolor*.

Purified CMV (pmol)	Number of local lesions			Inhibitory activity* (%)
	Leaf 1	Leaf 2	Leaf 3	
50	0	0	0	100
70	0	2	6	97
90	28	35	18	73
120	34	56	26	60
150	48	67	82	32
Control	105	116	84	0

* : {1 - (No. of symptoms on the plants treated with the culture filtrates / No. of symptoms on control plants) } X 100 = %

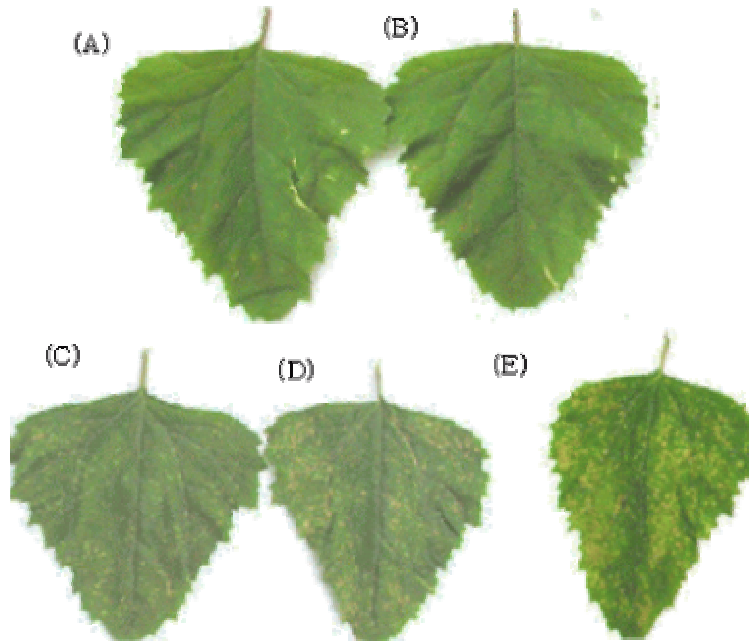


Fig. 9. Effect of Gsm01 culture filtrates on symptom expression by purified CMV-Y in *C. amaranticolor*. *C. amaranticolor* coated with the bacterial culture filtrates were inoculated by purified CMV-Y 50 pmol (A), 70 pmol (B), 90 pmol (C), 120 pmol (D), 150 pmol (E).

다. RT-PCR에 의한 효과 검정 결과

고분자 천연물질을 도말 처리한 전신 감염 식물체 조직 내에서의 바이러스 genome RNA의 존재를 확인하기 위하여, 공시한 식물체에서 추출한 RNA를 CP gene 특이적인 primer(5'-TAGTTTTGAGGTTCAATTCC-3'의 up stream primer(P1), 5'-GACTGACCATTTTAGCCG-3'의 downstream primer(P2))를 이용하여 RT-PCR한 결과 고분자 천연물질을 처리하지 않고 바이러스만 접종한 식물에서는 CMV RNA3의 CP gene를 확인할 수 있었다(Fig. 10).

한편, Gsm01의 배양여액 분자 천연물질을 식물체에 도말 처리한 후 CMV-Y를 접종한 *N. tabacum* cv. Xanthi-nc의 경우에는 접종 후 20일 경과할 때까지도 RT-PCR에 의한 CMV RNA3 CP gene의 특이적인 증폭 산물이 발견되지 않았다. 이러한 결과로서 고분자 천연물질이 바이러스의 감염 및 증식을 억제하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

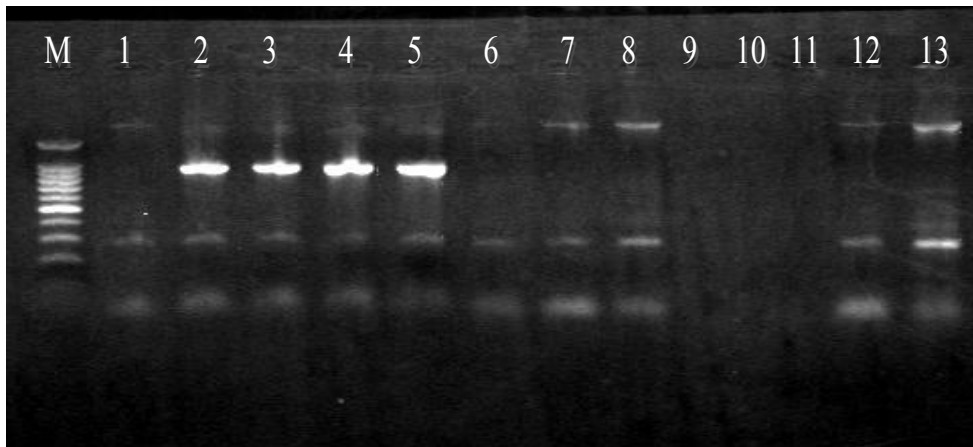


Fig. 10. RT-PCR detection of CMV CP gene in tobacco plants treated with *Serratia* Gsm01 (lane 6~13) culture filtrates. Tobacco plants were collected of 5 days (lane 2, 6, 10), 10 days (lane 3, 7, 11), 15 days (lane 4, 8, 12) and 20 days (lane 5, 9, 13) after inoculation of CMV. M : 100 bp ladder (Promega). Lane 1 : Healthy tobacco plant. Lane 2~5 : Non-treated tobacco plants.

한편, RT-PCR 증폭 산물이 CMV-Y의 외피단백질(coat protein, CP) 유전자 부분임을 재 확인하기 위하여, CMV-Y의 CP gene 부위의 특이적인 제한 효소 인식 부위의 유무를 검정하고자 하였다. RT-PCR에 의한 DNA 증폭산물을 증류수에 희석하여 제한 효소 (promega) *EcoR* I, *EcoRV*, *Hind*III 및 *Xho*I을 각각 $2\mu\text{l}$ 및 각 제한 효소용 완충액을 $8\mu\text{l}$ 넣은 후 증폭 산물 $20\mu\text{l}$ 을 첨가하여 총 $30\mu\text{l}$ 의 산물을 37°C 에서 2시간동안 반응시켰으며, 절단 결과는 1.2 % agrose gel(TAE buffer)로 전기영동(50V, 1시간)에 의하여 확인하였다(Fig. 11).

그 결과, *EcoR* I 및 *EcoRV*로는 절단되지 않았으나 *Hind*III으로 처리하였을 경우 490, 450bp의 단편으로 절단되었으며, *Xho* I으로 처리하였을 경우에는 730, 210bp의 단편으로 절단됨으로서 CMV-Y의 CP gene에 해당하는 증폭산물임을 알 수 있었다.

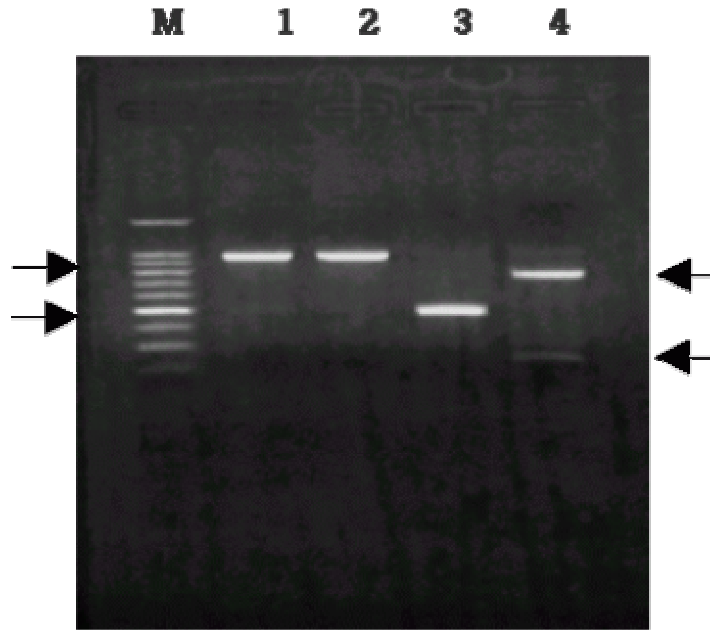


Fig. 11. Analysis of RT- PCR products from CMV-Y gene by restriction enzyme. RT-PCR products from CMV-Y CP genes were digested by *EcoR* I (lane 1), *EcoR*V (lane 2), *Hind*III (lane 3), *Xho* I (lane 4). M represents 100bp ladder (Promega).

라. DOT-Blotting 검정 결과

고분자 천연물질을 도말 처리한 CMV 전신 감염 기주에서의 CMV-Y genome RNA의 존재 유무를 dot-blotting법에 의하여 검정하였다. 즉, 고분자 천연물질을 도말 처리한 후 CMV-Y 조즙액을 접종한 *N. tabacum* cv. Xanthi-nc의 접종 부위 상엽을 5일 간격으로 20일까지 채집한 후, CMV-Y RNA3의 CP gene을 RT-PCR에 의하여 DIG로 표식한 probe를 사용하여 dot- blotting을 실시하였다(Fig. 12).

그 결과, 고분자 천연물질을 도말 처리하지 않고 CMV-Y의 조즙액 만을 접종한 식물체는 probe와 반응을 하였다. 반면에, 고분자 천연물질을 도말 처리한 *N. tabacum* cv. Xanthi-nc 의 경우는 접종 후 5일 간격으로 20일까지 증식한 식물체 모두가 probe와 반응하지 않았다. 따라서 이 결과 역시, RT-PCR에 의한 검정 결과 와 마찬가지로 고분자 천연물질이 바이러스의 감염 및 증식을 억제하는 효과가 있음을 나타내 주었다.

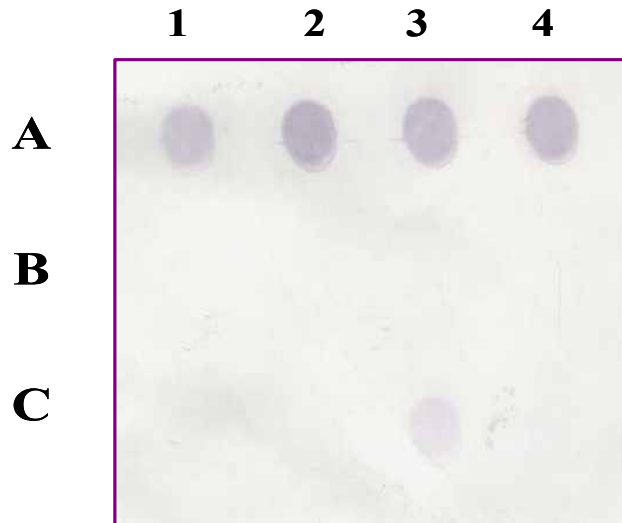


Fig. 12. Detection of CMV CP gene in *N. tabacum* cv. Xanthi-nc coated with bacterial filtrates by dot -blot hybridization. A: non-treated plants, B: plants treated with Gsm01-1 cultraye filtrates C: plants treated with Gsm01-2 cultrate filtrates. Lane 1-4 are samples of the plants (*N. tabacum* cv. Xanthi-nc) collected at 5, 10, 15 and 20 days after inoculation of CMV, respectively.

마. Western-Blotting으로 본 단백질 분석 결과

고분자 천연물질을 도말 처리한 CMV 전신감염 기주식물에서의 CMV-Y의 외피단백질의 존재를 Western-blotting에 의하여 검정하였다. 즉, 고분자 천연물질을 도말 처리한 후 CMV-Y 조즙액을 접종한 *N. tabacum* cv. Xanthi-nc의 접종 부위 상엽을 5일 간격으로 20일 까지 채집하고 total protein을 추출하여 Western-blotting을 실시하였다(Fig. 13).

그 결과, 고분자 천연물질을 도말 처리하지 않고 CMV-Y의 조즙액만을 접종한 *N. tabacum* cv. Xanthi-nc 식물체의 total RNA 중에서는 CMV-Y의 antibody와 결합하여 발색 반응을 나타내는 것이 있었으며, 그의 분자량은 정제한 CMV-Y의 외피 단백질과 일치하였다.

한편, 고분자 천연물질을 도말 처리한 후 CMV-Y를 접종한 *N. tabacum* cv. Xanthi-nc 잎에서 추출한 단백질 중에서는 CMV-Y의 antibody와 결합하여 발색 반응을 나타내는 것은 없었다.



Fig. 13. Western blot analysis of CMV coat protein in tobacco plant treated with *Serratia* Gsm01 (lane 7~14) culture filtrates. Tobacco plants were collected 5 (lane 3, 7, 11), 10 (lane 4, 8, 12), 15 (lane 5, 9, 13), 20 days (lane 6, 10, 14) after inoculation of CMV, respectively. Lane 2 : healthy tobacco plant. Lane 3~6 : non-treated tobacco plants. Lane 1: purified CMV.

바. 고분자 천연물질의 RNase 효과 검증

공시한 고분자 천연물질이 바이러스의 RNA를 분해하는 효과가 있는지를 분석하기 위하여, 정제한 바이러스로부터 추출한 CMV-Y의 genome RNA 5 μ l를 1.5ml Tube에 분주한 다음 여기에 고분자 천연물질을 각각 10 μ l씩 혼합한 후 10~50분간 처리한 다음 agarose gel 전기영동에 의하여 RNA의 분리 특성을 관찰하였다. (Fig.14).

그 결과, CMV-Y genome RNA 및 위성 RNA는 최소한 50분간의 고분자 천연물질과의 혼합반응에 의하여서는 전기영동 상에서 특정한 변화 현상을 발견할 수 없었다. 이 결과로서 고분자 천연물질의 항바이러스 작용은 CMV RNA의 분해 효과(RNase)로부터 기인하는 것은 아닌 것으로 확인되었다.

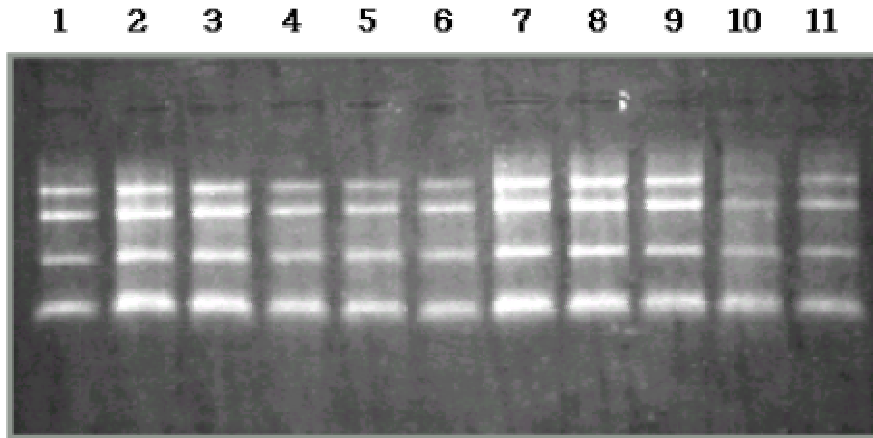


Fig. 14. RNase effects of Gsm01 culture filtrates on CMV genomic RNAs. CMV RNAs suspended in the culture filtrates were incubated at room temperature for 10 (lane 2, 7), 20 (lane 3, 8), 30 (lane 4, 9), 40 (lane 5, 10), 50 minutes (lane 6, 11), and analysed in agarose gel. Lane 1 is non-treated CMV RNAs.

사. 식물체내 바이러스 저항성 유발 물질의 생성 확인 시험

식물의 항바이러스 방어기작에 중요한 역할을 하는 효소는 phenylalanine ammonia lyase (PAL)와 peroxidase, 방향성물질인 phenolics level이 가장 잘 알려져 있다. 본 시험에서는 식물체내에서 바이러스 감염 전·후 고분자 천연물질 처리 시 발생하는 항바이러스 관련 효소의 활성을 측정하였다. 시험은 공시 식물인 담배에 대하여 CMV 접종 전·후, 고분자천연물질 처리 전·후 6일, 15일 경과한 식물을 처리구로 사용하였다.

(1) Phenylalanine Ammonia 분석

Phenylalanine ammonia lyase(PAL)의 활성 분석 Lavavia(2006)의 분석법에 준하여 실시하였다. 처리구와 무처리구 담배 잎을 액화질소를 혼화한 상태에서 균질 마쇄하였으며 이후 10mM sodium phosphate buffer(pH 6)을 넣고 4°C에서 20분간 10,000×g로 원심분리 하였다. 상층액은 효소활성을 측정하기 위하여 -80°C에 보관하여 표준 시료 액으로 사용하였다.

PAL의 활성은 100 μ l 표준시료 액에 6 μ M L-phenylalanine과 0.5M Tris-HCl 900 μ l를 넣고 37°C에서 70분간 반응하였다. PAL의 활성은 UV/VIS spectrophotometer 290nm서 확인하였다.

바이러스 저항성 유발 물질 효소 PAL 활성 분석 결과 고분자 천연물질과 CMV 바이러스 처리구에서 처리 후 6일과 15일 모두 가장 높은 활성을 나타내어 고분자 천연물질 처리시 저항성유발 물질이 많이 생성되었음을 확인하였다(그림 15).

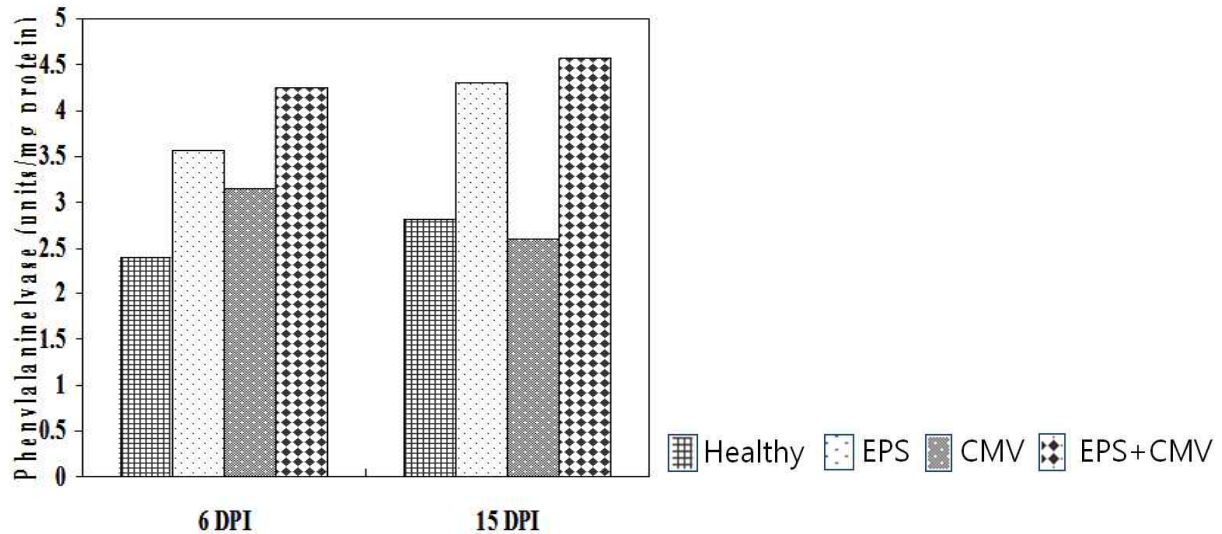


그림 15. Phenylalanine Ammonia 분석에 의한 바이러스 저항성 유발 물질의 생성 확인

(2) Peroxydase 분석

Peroxydase의 활성은 Shetty(2003)의 방법에 준하여 측정하였다. 냉동된 0.3g의 시료를 대상으로 Ice-cold extraction buffer(50mM Potassium acetate, pH 5.2, 100mM KCl, 1M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM ascorbic acid) 3ml를 첨가하여 균질마쇄한 후 4°C에서 12,000×g로 12분간 원심분리 하였다. 상층액을 -80°C에 보관하여서 표준 시료 액으로 사용하였다. Peroxydase의 활성 측정은 시료액 10μl에 100mM sodium acetate와 pH 5.5, 360μM의 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), 0.63mM H₂O₂가 포함된 기질용액 1ml를 20°C에서 반응하였다. 반응초기부터 반응 속도를 4분간 10초마다 405nm에서 확인하였다.

Peroxydase의 활성에 따른 바이러스 저항성 물질의 발현은 처리 후 6일과 15일 모두 가장 높은 활성을 나타내었다. 특히 6일 후에는 CMV 바이러스나 건전 식물에 대비하여 많은 효소를 분비함으로서 고분자 천연물질 처리 시 바이러스에 대한 저항성을 확인할 수 있었다(그림 16).

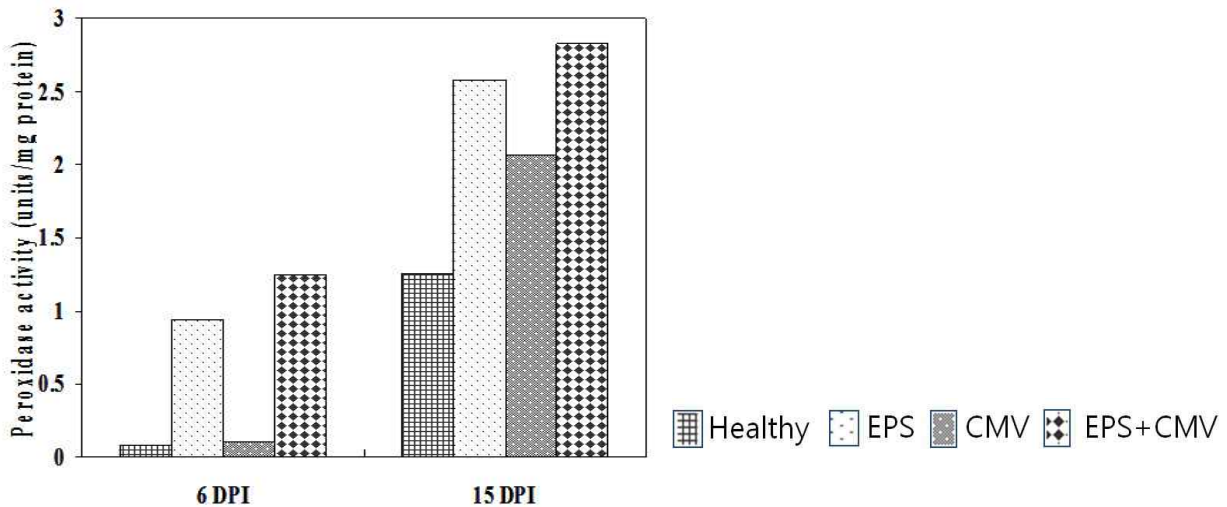


그림 16. Peroxydase 분석에 의한 바이러스 저항성 유발 물질의 생성 확인

(3) Phenol 함량 분석

Phenol 함량과 level은 Zieslin과 BenZaken(1993)의 시험법에 따라 Folin Ciocalteu의 phenol 시약을 사용하였다. 시료 담배 잎을 80% methanol액에서 균질마쇄한 후 70℃에서 15분간 방치하였다. 시료액 200 μ l와 증류수 7ml을 혼합한 후 Folin Ciocalteu의 phenol 시약 250 μ l를 첨가하여 이후 25℃에서 30분간 실시하였다. 이후 포화 Na₂CO₃액 1ml과 증류수 1ml을 첨가한 후 25℃에서 1시간동안 반응하였다. 반응액은 725nm에서 흡광도를 측정하였으며 표준품은 pyricatechol solution를 사용하여 시료 중 phenol 량을 산출하였다.

Phenol 함량 조사는 그림 17에서 확인 할 수 있듯이 처리 후 6일과 15일 모두 고분자 천연 물질과 CMV 바이러스 처리구에서 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 앞선 Phenylalanine Ammonia 분석과 Peroxydase 분석 결과와 거의 일치하는 것으로서 고분자 천연물질 처리시 식물체내 바이러스 저항성 유발 물질 활성이 좋았음을 확인하였다.

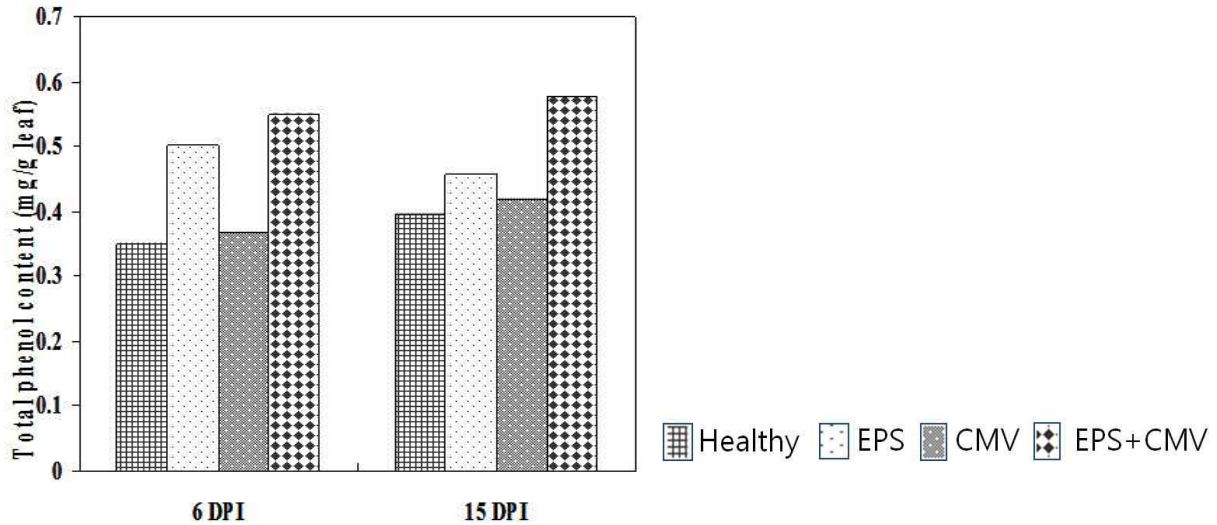


그림 17. Phenol 함량 분석에 의한 바이러스 저항성 유발 물질의 생성 확인

식물에 대한 방어기작과 연관이 있는 위의 세 가지 효소들이 고분자 천연물질을 처리함에 있어 증가된다는 사실은 항바이러스의 효과를 가지는 어떠한 물질이 함유되어 있는 고분자 구조로 판단할 수 있다.

아. PR-1b gene 발현 분석

식물체의 생체방어 과정에 의하여 발현되는 최종산물인 Pathogen-related(PR) 단백질의 발현은 다수의 병원균에 대하여 저항성이 강화된다. 본 연구에서는 고분자 천연 물질 처리 시 PR-1b gene의 발현 유무를 검토함으로써 식물 자체에 전신저항성 획득 유무를 관찰하였다.

시험 결과 그림 18과 같이 고분자 천연물질 처리구인 EPS와 EPS+CMV-Y 처리구에서는 224bp의 PR 유전자가 발현되었음을 확인하였다. 따라서 고분자 천연물질이 식물체내에 접촉하면 PR 유전자를 항상 발현시킴으로써 계속적으로 식물체 방어 신호기작을 활성화시키는 유도체로 작용을 한다고 사료된다.

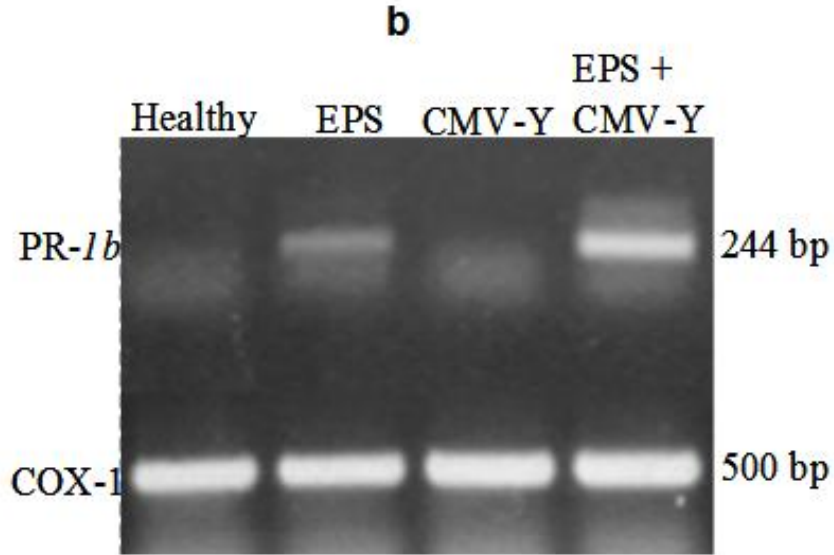


그림 18. PR-1b gene 발현 분석

3. 고분자 천연물질의 주요 원에 작물에 대한 생물활성적 특성분석

Crude한 고분자 물질을 처리하여 주요 작물별 CMV 감염억제효과를 검정 하였다. 수행방법은 고분자 천연물질을 처리하고 12시간 후 CMV 바이러스를 즙액집중 하였다. 시험에 사용된 기주들은 오이(*Cucumis sativus* L.), 피망(*Capsicum annuum* L.), 토마토(*Lycopersicon esculentum* Mill.)를 사용하였으며 병 관찰은 바이러스 증식 후 온실 유지하였으며 7일 후 작물의 위축현상과 모자이크 바이러스 현상을 조사하였다.

그 결과 모든 기주작물에서 crude 고분자 천연물질 처리구에서 CMV 감염억제효과를 나타내었고, 바이러스로 인한 무처리 기주작물이 처리구에 비교하여 위축하여 성장하는 모습을 관찰할 수 있었다(그림 19, 그림 20, 그림 21). 이는 바이러스 병징의 하나의 현상으로 볼 수 있다. 따라서 고분자 천연물질은 다양한 기주에서도 CMV 감염억제효과를 나타내는 다양한 스펙트럼을 가지고 있다고 판단된다.

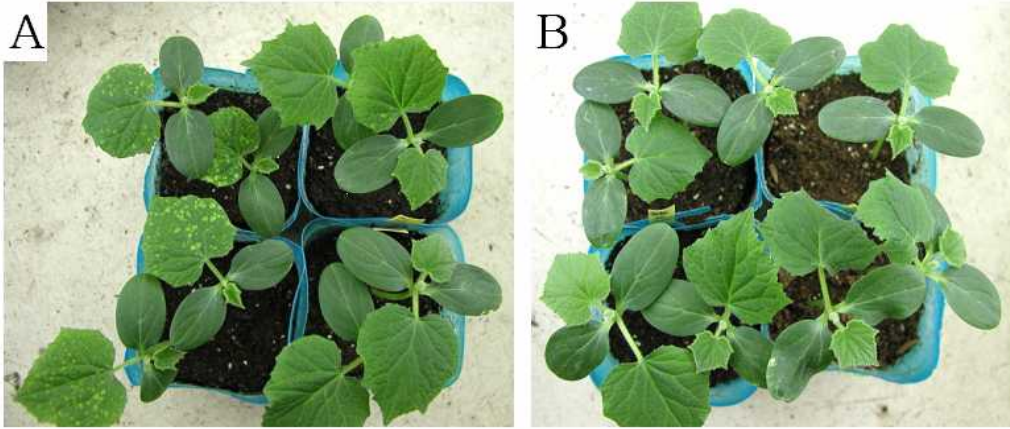


그림 19. 오이에서의 CMV 감염억제효과 검정. A, 증류수처리구; B, Crude extract



그림 20. 피망에서의 CMV 감염억제효과 검정. A, 증류수처리구; B, Crude extract

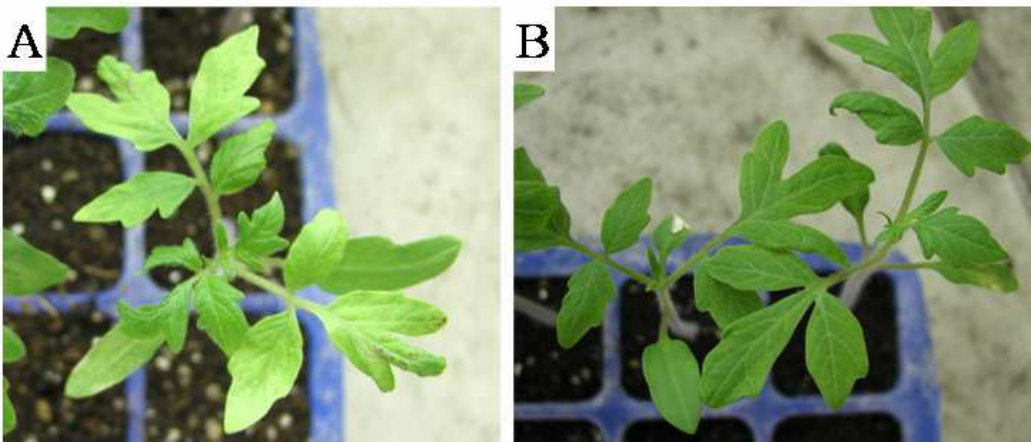


그림 21. 토마토에서의 CMV 감염억제효과 검정. A, 증류수처리구; B, Crude extract

4. 고분자 천연물질의 주요 원예에 대한 감염 특징에 따른 생물 활성적 특성 분석

가. *in vitro*상에서의 단독 감염 형태에 따른 효과 분석

실내에서 세 가지 바이러스에 대한 단독 감염 시 고분자 천연물질의 감염억제효과를 검정하였다. 실험에 사용된 바이러스는 *Cucumber mosaic virus*(CMV), *Tobacco mosaic virus*(TMV) 그리고 *Potato virus Y*(PVY)로 주요 원예작물에서 많이 발생하는 바이러스를 선발하여 각각의 바이러스에 대한 감염억제효과를 검정하였다.

또한 실험에 사용된 기주는 각각의 바이러스에 대하여 국부 병반을 나타내는 기주를 선발하여 무치리에 대한 병반 발병수로 감염억제효과를 산출하였다. CMV와 PVY는 명아주 (*Chenopodium amaranticolor*)를 사용 하였으며, TMV는 담배의 *Nicotiana glutinosa*를 사용하였다.

그 결과 CMV에서 감염억제효과는 85.3%로 가장 높았고, PVY와 TMV에서도 각각 72.6%와 70.5%의 감염억제효과를 나타내었다(표 6). 이는 고분자 천연물질이 바이러스의 감염억제효과를 나타내는 활성 물질이 CMV외에 주요 원예작물의 문제가 있는 TMV와 PVY에서도 우수한 감염억제효과를 나타내어 광범위한 스펙트럼을 가지고 있음을 시사한다.

표 6. 단독감염에 따른 고분자 천연물질의 감염억제효과 검정

바이러스 종류	국부기주	감염억제효과 (%)
CMV	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	85.3
TMV	<i>Nicotiana glutinosa</i>	70.5
PVY	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	72.6

나. *in vitro*상에서의 복합 감염 형태에 따른 효과 분석

(1) 표징에 의한 복합 감염 형태에 따른 효과 분석

실내에서 세 가지 바이러스에 대한 복합 감염 시 고분자 천연물질의 감염억제효과를 검정하였다. 실험에 사용된 바이러스는 *Cucumber mosaic virus*(CMV), *Pepper mottle virus*(PepMoV) 그리고 *Pepper mild mottle virus*(PMMoV)로 주요 원예작물 중 하나인 고추에 많이 발생하는 바이러스를 선발하였다. 이들 바이러스의 전신감염 기주인 고추에서의 감염억제효과는 각각의 바이러스를 단독 접종하였을 경우와 3종의 바이러스를 CMV+PepMoV, CMV+PMMoV, PepMoV+PMMoV와 같이 조합한 뒤 복합감염 시켰을 경우로 나누어 검정하

였다. 고추의 유묘에서 제1엽과 제 2엽에 고분자 천연물질을 스프레이 처리한 후 같은 엽에 바이러스를 흡액 접종하고 경시적으로 상위엽에 나타나는 병징의 발현을 관찰하였다.

그 결과 각각의 바이러스를 단독으로 접종하였을 경우 바이러스의 종류에 관계없이 고분자 천연물질을 처리한 고추에서 접종 후 7일까지의 감염 지연억제 효과를 볼 수 있었다. 3종의 바이러스 중 PMMoV와 CMV는 15일 이상 병징 발현이 억제 되는 효과가 있어 고분자 천연 물질의 감염억제 효과를 볼 수 있었다. 그러나 PepMoV에서는 바이러스 접종 10일 후부터 병징이 발현되어 시간이 지나면서 무처리구와 비교하여 유사한 병징을 나타내었다. 또한 복합 감염 시 고분자 천연물질의 효과를 검정한 결과 모든 바이러스의 조합에서 단독감염보다 빠르고 강한 병징이 발현됨으로서 감염억제효과가 미비하였다 판단된다(그림 22). 이는 1:1로 혼합한 바이러스 상호간에 우세하거나 복합감염으로 인해 바이러스 자체의 농도가 높아져 바이러스의 발병이 더 빠르게 진전되고 감염억제율이 감소하는 것으로 판단된다.

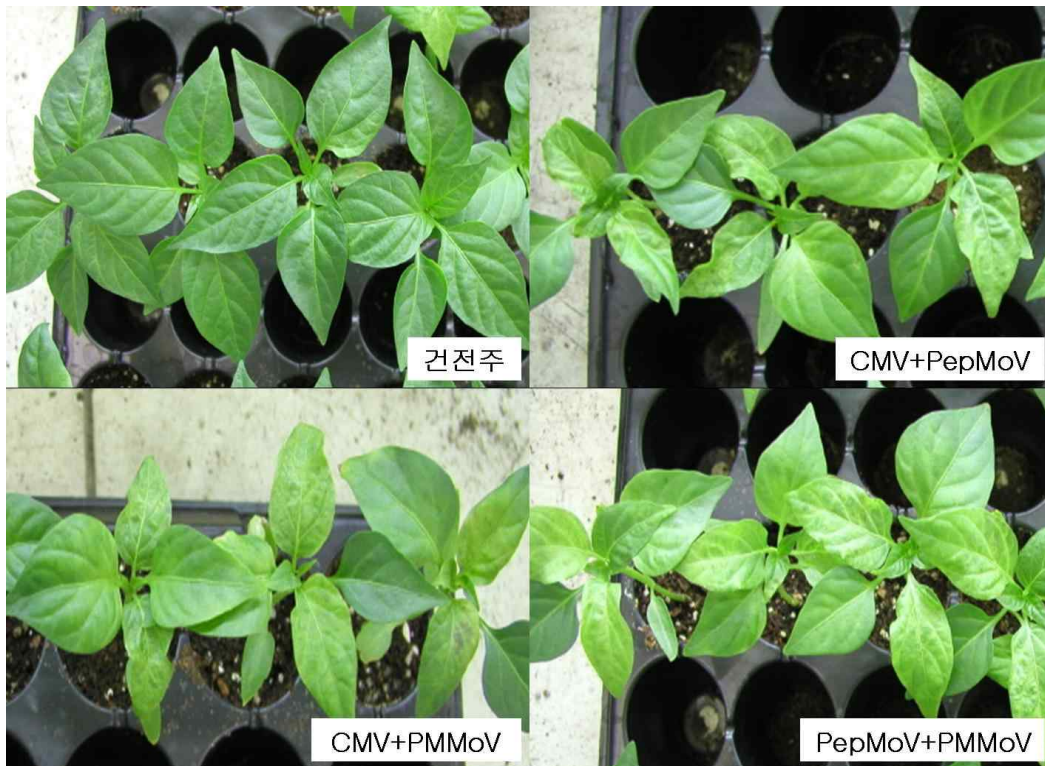


그림 22. 고추 주요 바이러스 복합감염에 의한 발병도

(2) ELISA에 의한 복합 감염 형태에 따른 효과 분석

복합 감염에 의하여 증식된 바이러스의 농도를 정밀하게 분석하기 위하여 바이러스 접종 후 5일, 10일, 15일, 20일 후에 ELISA 검정을 통하여 바이러스 농도를 무처리구와 비교하였다.

시험 결과 CMV만 단독 감염 시킨 처리구는 고분자 천연물질에 의하여 바이러스 농도가 크게 줄어들어 감염억제 효과가 확실히 인정되었다. 복합감염의 형태는 바이러스 농도가 무처

리에 대비하여 줄어들어 들었지만 단독감염의 형태보다는 다소 높은 바이러스 농도를 나타내었다(Table 7). 이러한 결과는 앞선 표징 관찰에 의한 결과와 유사함을 알 수 있다.

Table 7. Concentration of each virus in ELISA detection from pepper plants of single and multiple infections after treatment of the crude extract from Gsm01

Treatment	ELISA ^a			
	5DAI ^b	10DAI	15DAI	20DAI
CMV(Crude extract treatment)	0.531	0.723	0.211	0.132
CMV+PepMoV(Crude extract treatment)	0.638	0.692	0.724	0.704
CMV+PMMoV(Crude extract treatment)	0.503	0.438	0.612	0.826
CMV-untreatment	1.533	1.688	1.631	1.524
Healthy plant	0.138	0.092	0.114	0.102

a Days after inoculation

b ELISA results are presented as absorbance values (405 nm) of means of three leaves of each plant

다. 포장에서의 감염 형태에 따른 효과 분석

(1) 피망 포장에서의 제형 제품에 대한 바이러스 억제효과 검증

피망을 이용하여 Pi0805-30%의 시제품에 대한 생물활성 검정을 수행하였다. 기존 관행재배 방식에 Pi0805-30%의 시제품을 처리하고 처리하지 않은 지역의 바이러스 이병률을 조사하였다. 세 번의 걸친 조사 결과는 표 8과 같다. 일반 관행 농가를 대상으로 시험을 하였기 때문에 곰팡이병과 해충 방제에 신경을 썼기 때문에 무처리구에 이병률이 다소 낮게 나왔지만 방제가 70% 이상의 효과를 나타내었다(그림 23).

표 8. 피망에 대한 바이러스 감염억제효과 검증

바이러스 이병주율 (1차 조사, 9/9)

	이병주	이병율 (%)	방제가 (%)
Pi0805-30%	1/56	1.8	82.5
무처리	6/58	10.3	-

바이러스 이병주율 (2차 조사, 9/15)

	이병주	이병율 (%)	방제가 (%)
Pi0805-30%	2/56	3.6	79.1
무처리	10/58	17.2	-

바이러스 이병주율 (3차 조사, 10/1)

	이병주	이병율 (%)	방제가 (%)
Pi0805-30%	3/57	5.3	78.0
무처리	14/58	24.1	-

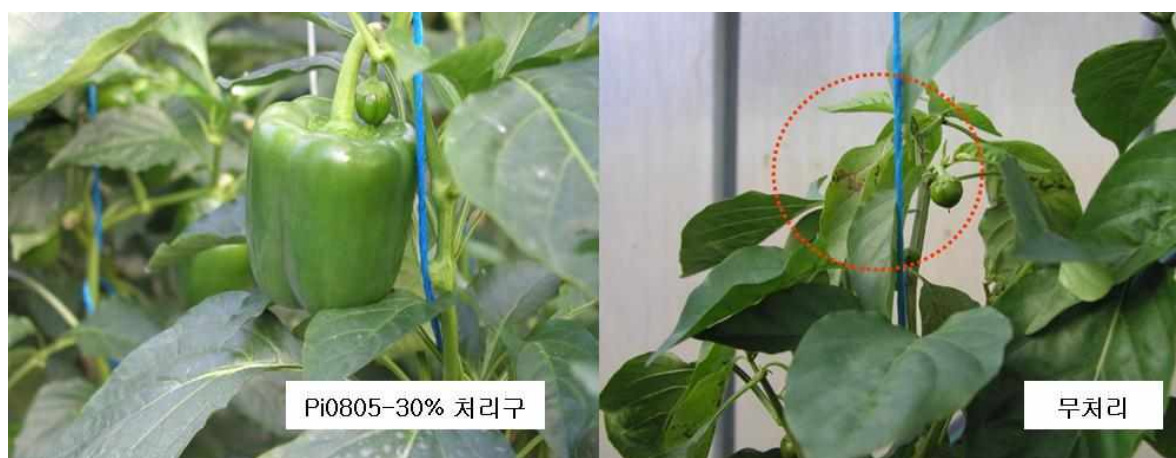


그림 23. 피망에서의 감염억제 효과 검증

(2) 피망 포장에서의 제형 제품에 대한 작물의 생리적 특성 구명

작물의 생리적 특성을 구명하기 위하여 수확기 중 총수량과 상품과 그리고 상품과율을 조사하였다. 상품과의 품질지표는 색깔이 선명하고 꼭지가 완전 상태를 유지해야 하고 병해충 피해 흔적이나 칼자국이 없는 과일이다. 그리고 130~180사이의 중량이면 상품과로 인정된다. B급은 모든 상태는 A급이지만 무게가 220g 이상 되는 대형과나 120~110g인 소형과인 것으로 조사하였다(그림 24).

그 결과 조사항목 모두 Pi0805-30% 처리구에서 증수효과를 나타내었다. 이는 고분자 천연 물질이 바이러스를 예방해 주는 효과와 동시에 작물 생육에 좋은 다양한 물질들이 작물의 생리적 특성을 유용하게 만드는 효과도 있음을 확인하였다(그림 25).

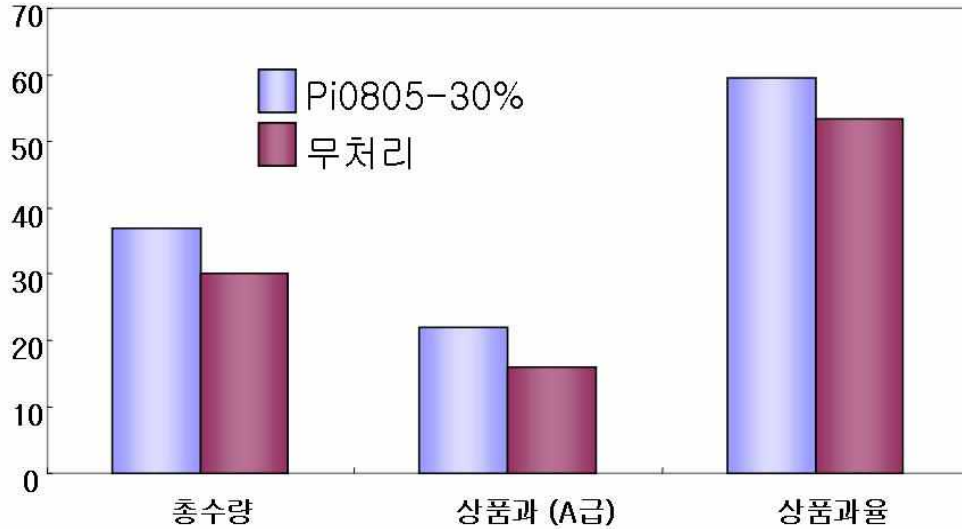


그림 24. 작물의 생리적 특성을 구명



그림 25. 수확과의 상품성 비교

(3) 피망 포장에서의 바이러스 발생 유형 구명

포장에서 발생한 바이러스 감염 주를 채취하여 실내에서 CMV와 TMV 그리고 PVY에 대한 specific primer를 이용하여 바이러스의 유형을 관찰하였다. 일반적으로 바이러스는 자연발생 상태에서는 여러 가지 바이러스가 복합적으로 발생하기 때문에 본 연구를 수행하였다. 먼저 포장에서 채취한 이병주(그림 26)의 RNA를 분리하여 공시재료로 이용하였다.



그림 26. 파프리카 포장에서 채취한 바이러스 이병주

CMV에 대한 specific primer 검정 결과 채취한 모든 주에서 CMV로 예상되는 바이러스가 감염되었음을 확인하였다(그림 27). TMV에 대한 specific primer 검정 결과도 마찬가지로 TMV로 예상되는 바이러스가 검출 되었다(그림 28). 마지막으로 PVY에 대한 specific primer 검정 결과 감염된 이병주에서는 PVY로 예상되는 바이러스는 검출되지 않았음을 확인하였다(그림 29).

이러한 결과는 강원도 횡성군 안흥 포장에서 감염된 이병주는 대부분 CMV와 TMV로 예상되는 바이러스가 복합적으로 발생되었음을 확인하였다.

이상의 결과로 시험 포장에서는 바이러스가 복합적으로 감염이 되어 있다는 사실이 확인되었다. 그러나 고분자 천연물질 Pi0805-30%의 시제품에 대한 감염 억제 활성은 75% 이상의 방제효과를 나타내었다. 따라서 실내에서 검정하였던 복합 감염에 따른 바이러스 진전 속도를 억제하는 기능을 한다고 할 수 있다.

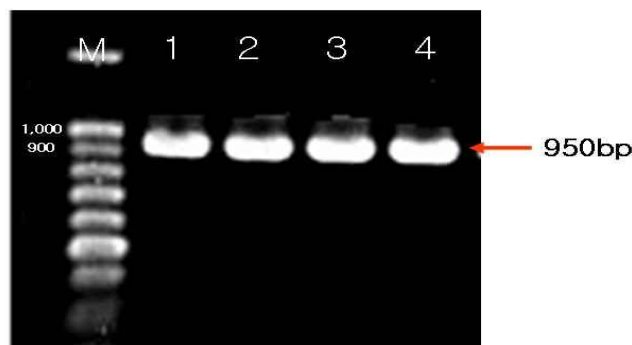


그림 27. CMV specific primer를 이용한 감염주의 RT-PCR 산물(M : size marker, 1 : +control, 2~4 : 감염주,)

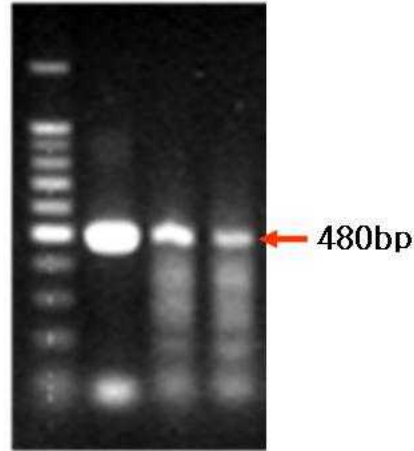


그림 28. TMV specific primer를 이용한 감염주의 RT-PCR 산물(M : size marker, 1 : +control, 2~3 : 감염주)

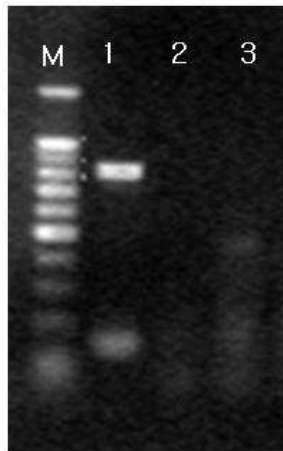


그림 29. PVY specific primer를 이용한 감염주의 RT-PCR 산물(M : size marker, 1 : +control, 2~3 : 감염주)

5. 고분자 천연물질의 주요 경제 원예 작물에 대한 약해 검정

(1) 고분자 천연물질 원제에 대한 실내 약해 검정

고분자 천연물질 원제의 작물에 대한 약해 검정을 위하여 담배, 명아주, 고추, 오이의 유묘를 이용하여 온실검정을 실시하였다. 고분자 천연물질 원제는 (주)과이오니아에서 500L 대량 배양 상층액을 공시 받았으며, 공시 받은 시료 원액을 이용하여 각 작물에 대하여 경엽 처리하였다. 약해의 유무 관찰은 처리 1, 3, 5일 후 달관 조사하였다.

시험 결과 모든 시험 작물에서 약해와 약흔은 관찰 할 수 없었다(그림 30). 이는 고분자 천연물질 원제가 대량배양을 통하여 얻은 고농도 일지라도 작물에 대한 약해 및 약흔이 없으므

로 미생물에서 유래한 천연물질임을 확인 할 수 있었다.



그림 30. 고분자 천연물질 원제의 작물에 대한 약해 실내 검정

(2) 고분자 천연물질 제품에 대한 실내 약해 검정

고분자 천연물질 제품의 작물에 대한 약해 검정을 위하여 고추와 배추의 잎을 이용하여 실내 검정을 실시하였다. 고추와 배추의 유묘엽을 채취하여 패트리디쉬에서 습실 유지하였다. (주)파이오니아에서 공시 받은 Pi0805-30%의 시제품을 1,000배(기준량), 500배(배량), 250배 희석 액을 각각의 유묘엽에 분무 처리 후 습실 유지하여 3, 5, 7일 후에 약해 및 약흔을 관찰하였다.

시험 결과 기준량 및 배량에서 고추와 배추 엽 모두 약해 및 약흔을 관찰 할 수 없었다(그림 31, 그림 32).

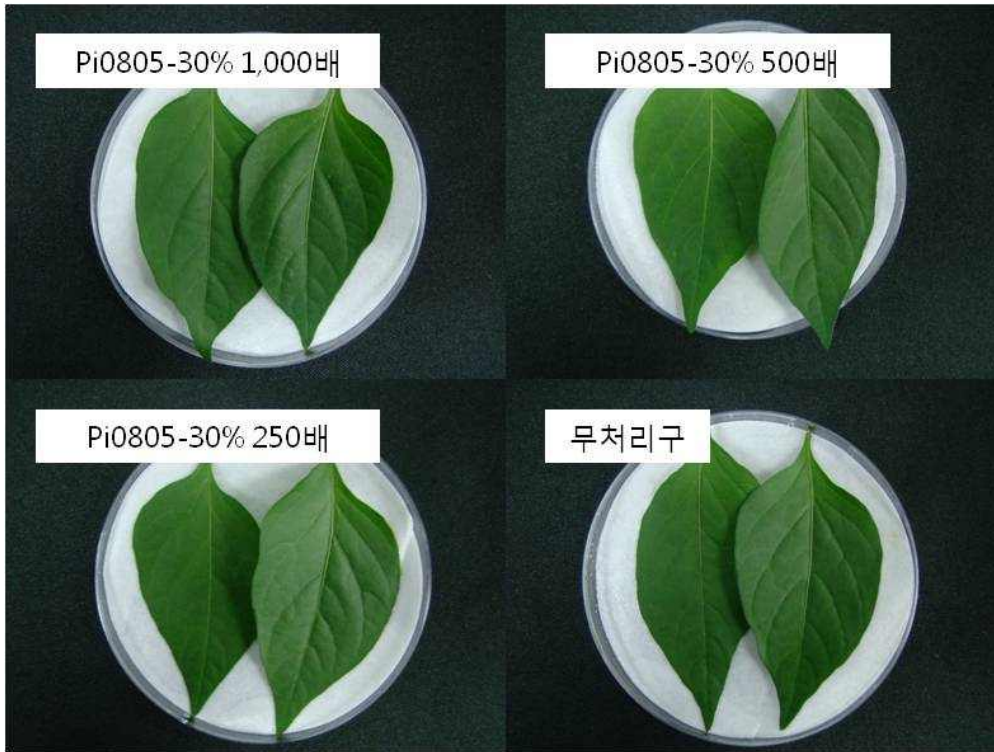


그림 31. 고분자 천연물질 제품의 고추에 대한 약해 실내 검정

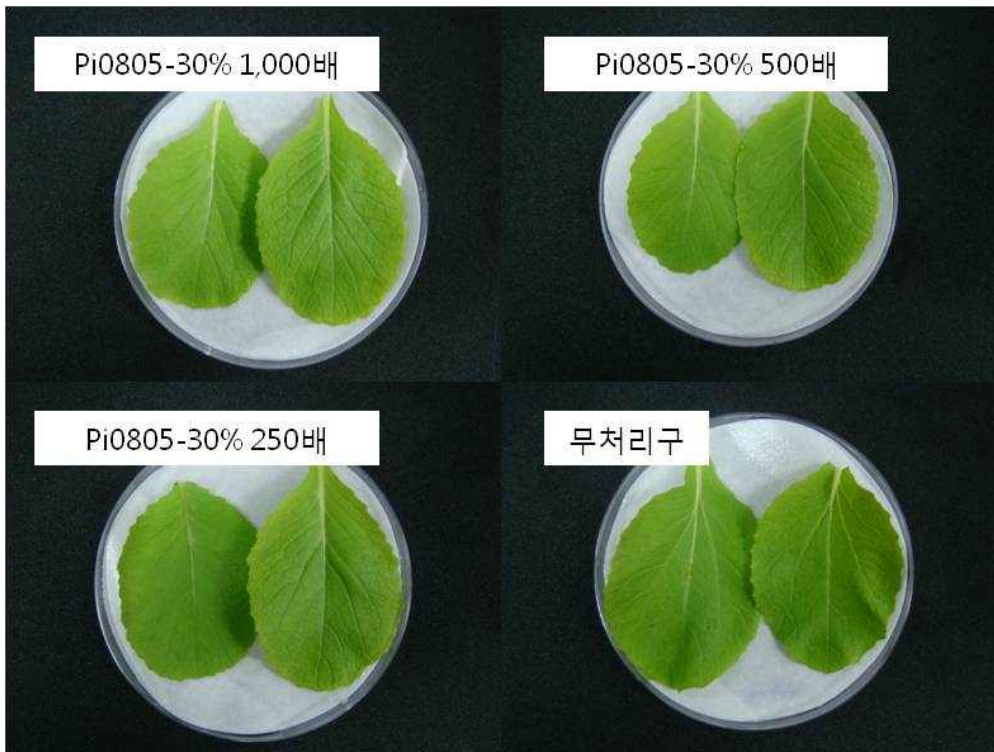


그림 32. 고분자 천연물질 제품의 배추에 대한 약해 실내 검정

(3) 고분자 천연물질 제품에 대한 소포장 약해 검정

(가) 고추에 대한 약해 검정

제형화한 시제품(Pi0805-30%)의 약해 검정을 고추 포장에도 적용하였다. 고추포장에서 시제품(Pi0805-30%)의 기준 처리량(1000X)과 배량(500X)을 1회 경엽 처리 하였고(2009년 6월 19일), 약해유무를 약제 처리 3, 5, 7일 후 육안으로 달관조사 하였다.

시험 결과 약제 처리에 따른 약해와 약흔은 관찰 할 수 없었다(표 9, 그림 33).

표 9. 고추 약해 포장시험 결과(약제처리 3, 5, 7일 후 조사)

시험약제	시험작물(품종)	약해정도(0 - 5)*		비고
		기준량	배량	
Pi0805-30% 시제품	고추(녹광)	0	0	약해 없음

* 약해 : 0-약해 없음, 5-고사



그림 33. 시제품(Pi0805-30%)의 고추 포장에 대한 약해검정

(나) 감자에 대한 약해 검정

제형화한 시제품(Pi0805-30%)의 약해 검정을 감자 포장에도 적용하였다. 시제품(Pi0805-30%)의 기준 처리량(1000X)과 배량(500X)을 1회 경엽 처리 하였고(2009년 6월 26일), 약해유무를 약제 처리 3, 5, 7일 후 육안으로 달관조사 하였다.

시험 결과 약제 처리에 따른 약해와 약흔은 관찰 할 수 없었다(표 10, 그림 34).

표 10. 감자 약해 포장시험 결과(약제처리 3, 5, 7일 후 조사)

시험약제	시험작물(품종)	약해정도(0 - 5)*		비고
		기준량	배량	
Pi0805-30% 시제품	감자(수미)	0	0	약해 없음

* 약해 : 0-약해 없음, 5-고사



그림 34. 시제품(Pi0805-30%)의 감자 포장에 대한 약해검정

고분자 천연물질 원제 및 시제품을 이용한 주요 원예 작물의 약해 검정은 바이러스 피해를 입을 수 있는 다양한 작물(고추, 오이, 감자, 담배, 배추 등)에 시험을 수행하였다. 시험 결과 어떠한 작물에서도 배량 또는 기준량에서 뚜렷한 약해 증상은 관찰 할 수 없으므로 시험 약제는 안전하다고 판단된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

연구목표	연구내용	평가의 착안점	달성도 (%)
제 1세부과제 고분자 천연 물질 대량 생 산 및 산업화	고분자 천연물질의 산업화 대량 생산 system 구축	<ul style="list-style-type: none"> · 산업용 미생물 발효 전용 배지 개발 · 5000L 수준의 미생물 배양 공정 확립 · 고분자 천연물질을 이용한 원제/제품 생산 후공정 확립 · 시제품 생산 	100
	고분자 천연물질과 혼합가 능한 약효 상승제의 개발	· 약효 상승제 선발 및 최적 혼합 비율 결정	100
	친환경 부성분 선발을 통 한 저독성 제형 개발	<ul style="list-style-type: none"> · 최적화된 부성분의 최적 혼합 비율 검 정 및 실용화 가능한 제형성 분석 · 최종 제형 포장 단위 설정 	100
	고분자 천연물질과 타농자 재(살충제, 살균제 등)의 혼합제 개발	· 고분자 천연 물질과 기존 활성을 유 지할 수 있는 가능성 점검	100
	고분자 천연물질의 독성학 적 안전성 분석	· 경구 독성, 경피 독성, 어독성 시험을 통한 고분자 천연물질의 안전성 확보	100
제 2세부과제 고분자 천연 물질의 CMV 에 대한 농가 실증시험 및 재배력 확립 과 이화학적 특성 분석	원예 작물 재배 농가 실 증 시험	· CMV 발생 농가 포장 시험	100
	고분자 천연물질 사용 농 가의 제품력 모니터링	· 실증 사업 참여 농가에 대한 반응 분석	100
	주요 원예 작물에 대한 재 배력 확립	· CMV 방제력이 포함된 재배력 작성	100
	최적 처리 체계 확립	· 처리 농도, 살포 횟수, 최적 처리 기 간 설정	100
	고분자 천연물질의 이화학 적 특성 분석	· 사용자 편이성 중심의 제형성 점검	100
	고분자 천연물질 원제/제 품 품질 관리 시스템 확립	· CMV 감염억제제 품질 관리법 확립	100
	고분자 천연물질 원제와 제품의 환경요소에 대한 안정성 분석	· 온도, 산도(pH) 등 환경에 대한 활성 안정성 분석	100
	고분자 천연물질과 타농자 재의 혼용 안정성 검증	· 농약, 영양제, 친환경농자재와의 혼용 활성 안정성 분석	100

연구목표	연구내용	평가의 착안점	달성도 (%)
제 3세부과제 고분자 천연물질의 CMV에 대한 작용 기작 구명, 생물활성적 특성 분석	○ 고분자 천연물질의 CMV에 대한 작용 기작 구명	· 바이러스 억제 작용점 구명 (농민 이해가능 수준)	100
	○ 고분자 천연물질 원제/제품의 주요 원예 작물에 대한 생물활성적 특성 분석	· 생물활성 스펙트럼 조사	100
	○ 고분자 천연물질의 주요 원예에 대한 감염 특징에 따른 생물활성적 특성 분석	· 단일감염, 복합감염시 활성 특성 분석	100
	○ 고분자 천연물질의 주요 경제 원예 작물에 대한 약해 검정	· 약해검정	100
최종평가	고분자 천연물질을 이용한 CMV 방제 제품 상품화	시제품 제작 및 제품화	100
	고분자 천연물질의 대량생산 공정 확립	전용 산업용 배지 및 5,000L 수준의 생산 공정 확립	100
	고분자 천연물질 사용법 확립	재배력 및 혼용가부표	100

제 2 절 관련 분야의 기술 발전에의 기여도

1. 현재 미생물 농약으로 등록된 제품이 60%이상이 해외에서 수입된 점을 감안하였을 때 국내 토종 미생물 자원을 활용하여 난방제 식물병 오이모자이크바이러스(CMV) 감염억제제를 개발한 것은 향후 국내 생물자원과 기술의 확보 및 활성화에 기여할 것으로 기대된다.

2. 기존의 생물 작물보호제들은 미생물 제제 혹은 생화학제인 식물추출물제다. 미생물제는 항상 생산이 가능하나 유통기한이 길지 못하고 해외에서 우수 미생물 수입이 용이하다. 생화학제인 식물추출물은 활성 식물을 생산하기 위하여 광범위하고 재배 과정이 필요하고 연중 생산이 어려운 단점이 있다. 본 과제를 통하여 개발된 고분자 천연물질은 미생물이 생산한 천연물이기에 연중 생산이 가능하고 분말화를 통하여 3년 이상의 유통을 확보할 수 있다. 따라서 향후 이러한 미생물 추출물의 산업화를 통하여 활성 및 유통적인 면에서 특징점을 지닌 생화학 제품들이 다수 출시될 것으로 기대한다.

3. 기존의 미생물의 대사산물을 이용한 산업은 의약과 제약, 식품 분야에 국한되어 왔다. 그

러나 본 과제를 통하여 미생물 추출 기술을 농약을 비롯하여 생물비료, 친환경농자재 등 다양한 농자재 개발 산업에 적용함으로써 다양한 미생물 추출물이 생산될 것으로 기대한다.

4. 제형화 공정에서 다양한 약효상승제와 증량제 등을 시험하였다. 시험과정에서 사용한 부 성분들은 모두 food grade ingredient로서 제품의 친환경성을 최대로 유지하였다. 따라서 이러한 연구 시험은 향후 친환경적 제형화와 관련된 연구 분야에 영향을 기칠 것으로 기대할 수 있다.

5. 오이모자이크바이러스 CMV는 가지과 작물(고추, 피망 등)과 박과작물(오이, 수박 등)에 특히 심하게 발생하여 연간 수백억 원의 피해를 주고 있다. 따라서 본 과제를 통하여 제품화된 CMV를 억제제를 사용하였을 경우 관련 농산물 생산 산업에 CMV 병해 발생 감소 및 소득 증대에 영향을 미칠 것이다.

6. 국내에서 생산된 바이러스 억제제의 사업화는 유사한 기능의 농자재 수입에 따른 외화 손실도 절감될 것으로 판단된다.

7. 본 사업을 통하여 개발된 바이러스 억제제는 국내 토착 미생물로부터 유래된 고분자 천연 물질을 food grade 부성분과 제형화한 친환경제품이다. 따라서 일반 관행부터 무농약 농산물 인증농가, 유기농 농산물 인증농가 모두 사용할 수 있는 농자재이며 이는 소비자 측면에서도 농산물의 친환경성에도 기여할 수 결과다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 실용화 · 산업화 계획

1. 본 과제로 개발된 *Serratia* Gsm01 균주의 고분자천연물질을 토양미생물제제로 등록하였다. 이는 대다수의 농가들이 바이러스 감염 억제 효과를 식물 생육 촉진 및 수확량 증가와 같은 비료 효과로 생각하였기에 우선 소비자들이 접근하기 쉬운 부분으로 실용화하였다.

2. 우선 국내에서는 *Serratia* Gsm01 균주의 고분자천연물질 CMV 감염억제제를 원료의 형태로 사업화할 것이다. 기존의 농약회사, 영양제회사, 친환경제제 판매회사와 같은 전문 유통회사를 통하여 마케팅을 실시할 것이다. 토양미생물 제제로 등록하였기에 비료와 농약, 친환경농자재에 모두 분야에 적용 · 사용 가능하리라 판단된다.

3. 본 과제의 연구내용 중 혼합제 관련한 연구에서는 향후 화학농약과 혼합이 가능한 것으로 나타났기에 화학농약을 취급하는 기업들과 공동 제형화 개발을 통하여 신제품 개발에 이용될 수 있다.

4. 국외 수출을 위하여 KOTRA 등 무역관련 기관과 협력을 통하여 해외 시장을 개척할 것이다. 특히, 식물 항바이러스제 개발과 세계적으로 산업화된 사례가 없는 분야이기에 해외에서도 충분한 경쟁력을 갖출 것으로 기대한다.

제 2 절 교육 · 지도 · 홍보 등 기술 확산 계획

1. 본 과제의 내용 중 농가를 대상으로 설문조사를 한 결과, 미생물 추출물제나 생화학제에 대한 정보가 실제 사용자에게 전무하였다. 따라서 농가를 대상으로 제품 홍보시 우선 제품의 개념을 우선 전달할 계획이다.

2. 또한 제품에 대한 홍보를 할 때 단순한 사용법이 아닌 바이러스에 대한 교육과 재배력에 대한 교육, 혼용가부표 보급 등을 같이 실시할 것이다.

3. 차후에도 다양한 실증 사업을 통하여 본 과제의 우수성과 개발내용을 소비자인 농민을 비롯하여 농업과 관련 각 시군 농업기술센터 담당자, 농협관련자에게 홍보, 교육할 것이다.

제 3 절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

1. 본 과제를 통하여 2종의 논문과 2종의 학위논문을 작성하였다.
2. *Serratia* Gsm01 균주의 고분자천연물질과 기존의 농약 주성분 및 천연물질과의 혼합제 제조 및 그 활성에 대한 특허 출원을 추진할 것이다.
3. 종자전염의 형태로 바이러스 감염이 확산되는 것을 억제하기 위하여 종자 전문회사와 종자 *Serratia* Gsm01 균주의 고분자천연물질 코팅기술을 적용한 종자를 연구할 계획이다.

제 4 절 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

1. 관련된 추가 과제 도출과 연구를 통하여 고분자물질의 동정 및 분석법을 개발할 필요성이 있다. 이는 생화학농약으로 등록하기 위하여 active ingredient의 구명이 반드시 필요하기 때문이다. 또한 생화학농약으로 등록하기 위한 제형의 개선 및 안전성에 대한 data 확보해야 할 것이다.
2. *Serratia* Gsm01 균주의 고분자천연물질은 분말형태이기에 다양한 제형 및 혼합제로 개발이 가능하다. 따라서 사용자 편의성을 upgrade한 제형과 다기능성을 지닌 혼합제 연구가 추가적으로 필요한 것으로 판단된다.

제 6 장 참고문헌

- Alarcón, B., Lacal, J.C., Fernández-Sousa, J.M. and Carrasco, L. (1984). Screening for new compounds with antiherpes activity. *Antiviral Res.* 4, pp. 231 - 244.
- Aydiushko, S.A., Ye, X.S. and Kuc, J. (1993). Detection of several enzymatic activities in leaf prints cucumber plant. *PhysiolMolPlantPathol.*42,pp.441 - 454.
- Baldwin, I.T. (2001). An ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco. *Plant Physiology.* 127, pp. 1449 - 1458.
- Bawden, F.C. and Freeman, G. G. (1952). The nature and behaviour of inhibitors of plant viruses produced by *Trichotheciumroseum* Link. *J.Gen.Microbiol.*7,pp.154 - 168.
- Bergstrom, G.C. and Kuć, J. (1981). Induction of systemic resistance in cucumber to bacterial wilt and gummy stem blight. *Phytopathology.(Abstract)*71,pp.203.
- Binutu, O.A. and Cordell, G.A. (2000). Gallic acid derivative from *Mezoneuron benthamianun* leaves. *Pharmacol.Biol.*38,pp.284 - 286.
- Broarbent, J.R.D., McMahon, D.J., Welker, D.L., Oberg, C.J. and Moineau, S. (2003). Biochemistry, genetics and applications of exopolysaccharide production *Streptococcus thermophilus*: a review. *J.DairySci.*86,pp.407-423.
- Bos, L. and Maat, D. Z. (1974) A strain of cucumber mosaic virus seed-transmitted in beans. *Neth. J. Plant Pathol.* 80: 113.
- Chen, L. and Francki, R.I.B. (1990) Cucumovirus transfer by the aphid *Myzus persicae* is determined solely by the viral coat protein. *J. General Virol.* 71: 939-944
- Choi. G. S., Kim, J. H., Kim, J. S. and Choi, J. K. (2004). Characterization of Cucumber mosaic virus Isolate from Water Chickweed (*Stellaria aquatica*). *Plant Pathol J.* 20(2): 131-134
- Choi, J. K., Kim, H. J., Hong, J. S., Kim, D. W. and Lee, S. Y. (1998) Identification and

- differentiation of cucumber mosaic virus isolated in Korea. Korean J. Plant Pathol. 14: 12.
- Choi, J. K., Kwan, S. B., Lee, S. Y. and Park W. M. (1990) Some properties of two isolates of cucumber mosaic virus isolated from *Aster yomena* and *Commelina communis*. Korean J. Plant Pathol. 6: 138-143.
- Chung, B. K., Park, H. C. and Lee S. H. (1975) Studies on the host range of cucumber mosaic virus in Korea. Kor. J. Pl. Prot. 14(4) : 185-192.
- Davies, C. and Symons, R. H. (1988) Future implications of the evolutionary relationships between tripartite plant viruses based on cucumber mosaic virus RNA. Virology. 165: 216-224.
- De Blas, C., Borja, M. J., Saiz, M, and Romero, J. (1994). Broad spectrum detection of cucumber mosaic virus (CMV) using the polymerase chain reaction. J. Phytopathol. 141: 323-329
- Devergne, J. C. and Cardin, L. (1973) Contribution a l'étude du virus de la mosaïque du concombre (CMV) IV. Essai de classification de plusieurs isolates sur la base de leur structure antigenique. Ann. Phytopathol. 5: 409-430.
- Ding, S., Li, W. and Symons, R. H. (1995) A novel naturally occurring gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. EMBO J. 14: 5762-5772
- Doolittle, S. P. (1916) A new infectious mosaic disease of cucumber. Phytopathology 6: 145-147
- Edwards M. C. and Gonsalves, D. (1983) Grouping of seven biologically defined isolates of cucumber mosaic virus by peptide mapping. Phytopathology 73: 1117-1120
- Francki, R. I. B. (1985) The plant viruses, Vol1, Polyhedral virions with tripartite genomes. Plenum, New York and London.
- Francki, R. I. B., Mossop, D. W. and Hatta, T. (1979) Cucumber mosaic virus No. 213 In: Description of plant viruses. Commonwealth Mycological Institute, Association of Applied

Mycologist, Kew, Surrey, England

- Grasso, S. and Shepherd, R.J., (1978). Isolation and partial characterization of virus inhibitors from plant species taxonomically related to *Phytolacca*. *Phytopathol.* 68: 199–205.
- Gonda, T. J. and Symons, R. H. (1978) The use of hybridization analysis with complementary DNA to determine the RNA sequence homology between strains of plant viruses: Its application to several strains of cucumoviruses. *Virology* 88: 361–370
- Gould, A. R., Palukaitis., Symons, R. H. and Mossop, D. W.(1978) Characterisation of satellite RNA associated with cucumber mosaic virus. *Virology* 84: 443–455.
- Habili, N., and Francki, R. I. B. (1974) Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses. I. Physical and chemical properties. *Virology* 57: 392–401
- Hanada, K. and Tochiwara, H. (1980) Genetic analysis of cucumber mosaic, peanut stunt and chrysanthemum mild mottle viruses. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* 46: 159–168.
- Hasse, A., Richter, J. and Rabenstein, F. (1989) Monoclonal antibodies for detection and sero-typing of cucumber mosaic virus. *J. Phytopathol.* 127: 129–136.
- Hayakawa, T., Mizukami, M. Nakajima and M. Suzuki (1989) Complete nucleotide sequence of RNA 3 from cucumber mosaic virus (CMV) strain Q: Comparative study of nucleotide sequence and amino acid sequences among CMV strain O, Q, D and Y. *J. Gen. Virol.* 70: 499–504.
- Horne, R. W. and Wildy, P. (1963) Virus structure revealed by negative staining. *Advan. Virus Res.* 10: 101–170.
- Jagger, I. C. (1916) Experiments with the cucumber mosaic disease. *Phytopathology.* 6: 148–151.
- Johnson, J., (1941). Chemical inactivation and the reactivation of plant virus. *Phytopath.*, 31:8, 679–701.

- Kaper, J. M., Tousignant, M. E. and Lot, H. (1976) A low molecular weight replicating RNA associated with a divided genome plant virus: defective or satellite RNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 72(4): 1237-1243.
- Kaper, J. M., Tousignant, M. E. and Steen, M. T. (1988) Cucumber mosaic virus-associated RNA 5. XI. Comparison of 14 CARNA 5 variants relates ability to induce tomato necrosis to a conserved nucleotide sequence. *Virology* 163, 284-292.
- Kaper, J. M., waterworth, H. E. (1981) Cucumoviruses. In plant virus infections and comparative diagnosis. Pp 251-332. Edited by E. Kurstak. New York: Elsevier/North Holland Biochem. J. 102: 251-257
- Kubo, S., Ikeda, T., Imaizumi, S., Takanami, Y. and Mikami, Y. (1990). A potent plant virus inhibitor found in *Mirabilis jalapa* L. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 56:481-487.
- Lee, S. H., Lee, K. W., and Chung, B. J. (1978) Purification and serology of cucumber mosaic virus. *Kor. J. Pl. Prot.*17 (1): 29-31
- Lee, S. H., Kim, J. S. and Choi, Y. M. (1983) Bean Yellow mosaic virus and cucumber mosaic virus causing mosaic disease on Gladioles in Korea. *Kor. J. Pl. Prot.* 22(3): 198-202.
- Lee, S. Y., Hong, E. J. and Choi, J. K. (1995) Transgenic tobacco plants introduced with cDNA of cucumber mosaic virus satellite RNA. *Korean J. Plant Pathol.* 12: 432-436.
- Maizel, J. V. (1971) Polyacrylamide gel electrophoresis of viral coat protein. *Methods in virology* V, pp 179-246
- Marrou, J., Quiot, J. B. and Marchoux, G. (1975) Characterisation de douze souches du VMC par leurs aptitudes pathogènes: tentative de classification. *Mededelingen van de Faculteit landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Genet* 40, 107-122.
- Michael, A. L., David, H. G. and John, J. S. (1995) RNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. In: *PCR Strategies*. Academic Press, Inc., New York, pp. 259-267.
- Morris, T. J., Dodds, J. A., Hillman, B., Jordan, R. L., Lommel, S. A. and Tamaki, S. J.

- (1983) Viral specific dsRNA: Diagnostic value for plant virus disease identification. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 27–30.
- Mossop, D. W. and Francki, R. I. B. (1977) Association of RNA 3 with aphid transmission of cucumber mosaic virus. *Virology* 81, 177–181.
- Mossop, D. W. and Francki, R. I. B. (1979) Comparative studies on two satellite RNAs of cucumber mosaic virus. *Virology* 95, 395–404.
- Nishiguchi, M., Mori, M., Suzuki, F., Nagata, R., Morishita, T., Sakai, J., Hanada, K. and Usugi, T. (1995) Specific detection of severe strain of sweet potato feathery mottle virus (SPFMV-S) by reverse transcription and polymerase chain reaction. (RT-PCR). *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 54: 516–522.
- Noordam, D. (1973) Identification of plant viruses. Methods and experiments. Centre for agricultural publishing and documentation (Pudoc) Wageningen.
- Normand, R. A. and Pirone, T. P. (1968) Differential transmission of strains of cucumber mosaic virus by aphids. *Virology* 36: 538
- Ouchterlony, O. (1962) Diffusion in gel methods for immunological analysis in: *Allergy* edited by Kallos P. and Waksman, B. H. Vol. VI pp. 30–154. Karger Basel.
- Owen, J. and Palukaitis, P. (1988) Characterisation of cucumber mosaic virus. I. Molecular heterogeneity mapping of RNA3 in eight CMV strains. *Virology*. 166: 495–502.
- Owen, J., Shintaku, M., Aeschleman, P., Tahar, S. B. and Palukaitis, P. (1990) Nucleotide sequence and evolution of cucumber mosaic virus (CMV) strain: CMV RNA3. *J. Gen. Viol.* 71: 2243–2249.
- Paden, K. W. C. and Symon, R. H. (1973) Cucumber mosaic virus contains a functionally divided genome. *Virology* 53: 187–192.
- Palukaitis, P., Roosinck, M. J., Dietzgen, R. G. and Francky, R.I.B. (1992) Cucumber mosaic virus *Adv. Vir. Res.* 41: 281–348.

- Park, W. M., Ryu, K. H. and Choi, J. K. (1990) Properties and purification of cucumber mosaic virus As strain. *Kor. J. Pl. Pathol.* 6: 393-401.
- Park, W. M., Ryu, K. H., Kim, S. J. and Choi, J. K. (1995) Rapid detection and identification of cucumber mosaic virus by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) and restriction analysis. *J. Plant Biol.* 38(3): 267-274
- Quemda, H., Kearney, C., Gonsalveses, D. and Slightom, J. L. (1989) Nucleotide sequences of the coat protein genes and flanking regions of cucumber mosaic virus strain C and WL RNA3. *J. Gen. Virol.* 70: 1065-1073.
- Rizos, H., Gunn, L. V., Pares, R. D. and Gillings, M. R. (1992) Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.* 73: 2099-2103
- Rizzo, T. M. and Palukaitis (1989) Nucleotide sequence and evolutionary relationships of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA 1 *J. Gen. Virol.* 70, 1-11.
- Roberson, N. L., French, R. and Gray, S.M. (1991) use of group specific primers and polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. *J. Gen. Virol.* 72: 1473-1477.
- Rodriguez-Alvarado, G., Kurath, G. and Dodds, J. A. (1995) Heterogeneity in pepper isolates of cucumber mosaic virus. *Plant Disease.* 79: 450-455.
- Roossinck, M. J., Zang, L. and hellwald, K. L., (1999). Rearrangement in the 5' nontranslated region and phylogenetic analysis of cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of tree subgroups. *Journal of Virology.* 73: 8, 6752-6758.
- Shah, J. (2003). The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, pp. 365 - 371.
- Shinkatu, M. (1991) Coat protein gene sequences of two cucumber mosaic virus strains reveal a single amino acid change correlating with chlorosis induction. *J. Gen. Virol.* 72; 2587-2589.

- Singh, Z., Jones, R. A., C. and Jones, M. G. K. (1995) Identification of cucumber mosaic virus subgroup I isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT-PCR. *Plant Disease*. 79: 713-716.
- Takanami, Y. (1981) Striking change in symptoms of cucumber mosaic virus infected plants induced by satellite RNA. *Virology*. 109: 120-126.
- Tiangco, E. S. and Varney, E. H. (1970) A vein chlorosis or yellow-net disease of Forsythia caused by tobacco ringspot virus (Abstr) *Phytopathology* 60: 579.
- Uknes, S., Mauch-Manl, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dlncher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E. and Ryals, J. (1992). Acquired resistance in Arabidopsis. *Plant Cell*. 4, pp. 645 - 656.
- Waterworth, H. E. and Pvish, W. R. (1972) Tobacco ring spot virus from naturally infected dogwood, autum crocus and forsythia. *Plant Dis. Rep.* 56: 336-337.
- Wayne, A. S., Howard, H. L. and Warrant, T. J. (1987) Disease of tree and shrubs. Cornell Univ. Press. 400-418.
- Zeislin, N. and Benzaken, R. (1993). Peroxidase activity and presence of phenolic substances in peduncle of rose flowers. *Plant Physiol. Biochem.* 31, pp. 333 - 339.
- 한국식물병리학회. 2004. 한국식물병명목록(제4판). 한국식물병리학회. 779 pp.