

보안과제(), 일반과제(○) 과제번호 109073-3

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001403-01

토양방선균을 이용한 주요 경제작물에서 발병하는
토양전염성병해 방제제 개발

(Development of biopesticide using *Streptomyces* sp.
against soil born diseases for major economic crops)

(주)해강바이오부설연구소

농림수산식품자료실



0009281

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “토양방선균을 이용한 주요 경제작물에서 발병하는 토양전염성병해 방제제 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 7 월 23 일

주관연구기관명 : (주)해강바이오

주관연구책임자 : 이은정

연 구 원 : 이종식

연 구 원 : 변영각

연 구 원 : 한규동

연 구 원 : 김성우

연 구 원 : 허경무

협동연구기관명 : 고려대학교

협동연구책임자 : 정남현

연 구 원 : 이지영

연 구 원 : 김병일

연 구 원 : 정혜진

연 구 원 : 김희진

요 약 문

I. 제 목

토양방선균을 이용한 주요 경제작물에서 발병하는 토양전염성병해 방제제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 주요 과채류에 문제가 되는 잣빛곰팡이병, 역병, 탄저병 등에 활성을 지니는 방선균을 이용하여 이의 병해방제용 친환경농자재를 공업화, 상업화 하는 것으로 목표로 함.

■ 주요 경제작물의 식물병 발생동향

- 주요 식량 및 경제 작물들에 대한 병, 해충, 잡초 등에 의한 생육 중 피해율은 잠재 생산량의 42%에 달하며 경제적으로 산출하면 3,000억 달러에 달하는 것으로 나타나는데, 이 중 병해에 의한 피해율은 약 15%에 달하는 것으로 나타남(Oerke 등, 1995).
- 국내에서 발병되는 병해는 약 1,535종으로 특히, 딸기, 토마토, 고추와 같은 주요 경제작물에는 매년 반복적으로 발병되는 고질적인 병해가 잣빛곰팡이병, 역병, 탄저병 등과 같은 토양전염성 병해로 이러한 병해에 의한 손실액은 국내외적으로 수십억원에서 수천억 원에 이르고 있음(한성숙, 2009).
- 토양에 의한 병해 매개는 전염매개체 중 60% 이상을 차지하는 매개체이며, 토양전염성 병원균은 부생능력이 강하여 분리한 환경하에서는 곧바로 휴면상태로 돌입하여 불리한 환경조건에서도 장기간 생존이 가능한 성질로 인해 기개발된 화학농으로는 효과적인 방제가 어려워 세계적으로 문제가 되고 있어 미생물을 이용한 살균제의 개발이 시급히 요구되고 있음(김용기, 2009; 배영석, 2009).
- 역병은 병원성이 강하고 기주 특이성이 높은 것으로 알려져 있으며, 이들 중 *Phytophthora capsici*, *P. infestans*, *P. cactorum* 등은 해마다 전국적으로 발생되고 있고(지형진, 2009), 특히, 국내의 고추 재배 현황은 연간 생산량이 1조 4,500억원에 이르는 데 이 중 역병과 탄저병에 의한 피해는 20%, 15%에 각각 달한다고 보고됨(한성숙, 2009; Garcia C., et al., 2004).
- 잣빛곰팡이병도 화학약제에 의한 방제가 어려운데, *Trichoderma* spp.와 *Pseudomonas* spp. 균주를 이용하여 미생물농약을 개발하였으나, 60% 정도의 방제효과를 나타내고 있으나, 환경조건에 따라 방제효과가 많은 차이가 있는 것으로 나타나 다양한 조건에서 보

다 안정된 효과를 나타낼 수 있는 방법에 대한 연구가 절실히 요구되고 있음(배영석, 2009).

- 이에 따라, 본 연구의 목표는 농가에서 방제에 어려움을 겪고 있는 병해에 대하여 미생물을 이용한 친환경농자재의 개발과 이의 사용방법을 확립하는 것임.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

주요 과채류에 문제가 되는 잿빛곰팡이병, 역병, 탄저병 등에 활성을 지니는 방선균을 이용하여 병해방제용 친환경농자재를 공업화, 상업화 함.

1. 길항방선균의 고농도, 고효성 배양조건 확립

- 선발된 균주의 배양조건을 flask 수준에서 검토한 후 이 결과를 바탕으로 Jar fermenter scale에서 scale up factor를 도출하여 대량배양 조건을 확립함.
- Scale; 500L 이상, 포자수; $1.0E+7$ cfu/mL 이상

2. 배양액을 이용한 제형화 소재 개발 및 제제화 공정 확립

- 최적화된 조건에서 배양된 배양액을 액상, 분상으로 제형화하고, 각각의 제형 공정을 확립하고, 각 제형에 따라 계면활성제, 건조부재, 보조제를 선발함.
- 보존기간 2년 이상, 보증균수: $1.0E+7$ cfu/g 이상

3. 대상병해에 대한 사용방법의 최적화 - POT test

- 최종 개발된 제품을 POT 수준에서 생물검정한 결과를 확보하여 제품의 최적 사용방법 확립.

4. 대상병해에 대한 방제효과 검정 - Field test

- 1차년도 시험결과를 바탕으로 시설 및 노지 재배에 적용하여 최종 개발된 제품의 방제가 60% 이상 확보.

5. 공업화, 상업화 완료

- 최종 상업화된 제품의 유효성분의 보존성과 사용상의 문제점 등 시장반응 조사

6. 친환경자재 및 토양미생물제제 등록시험 진행

- 독성 및 약효, 약해 시험

7. 길항방선균으로부터 생성되는 항균물질의 분리, 정제 및 구조동정

- *Streptomyces* sp. A1022 배양액 균체로부터 용매분획, silical gel chromatography, Sephadex chromatography, prep. HPLC 등의 분석을 통해 식물병원균에 활성을 지니는 단일물질을 분리함.
- 최종 물질은 1H , ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC, DEPT 등의 분석을 통해 당지질 (glycolipid)로 예상되며 정확한 구조는 동정 중임.

IV. 연구개발결과

1. 길항방선균의 고농도, 고효성 배양조건 확립

- flask 수준에서 배지조성과 물리적 조건을 검토한 결과, 항균활성이 우수한 균주 중 배양 공정 scale up과 제제화 공정을 고려할 때 A1022균주가 가장 유리할 것으로 판단되어, A1022균주를 대상으로 포자수 확보, 탄저병, 벼도열병에 대한 활성을 기준으로 최적화함.
- A1022 균주의 최적배지조건, 0.75% soya flour, 0.3% yeast extract, 3.375% glucose, 0.025% CaCO₃, 0.025% MgSO₄·7H₂O.
- A1022 균주를 5L, 50L, 500L 순으로 시생산 성공하였으며, 이 결과를 바탕으로 배양공정 표준화 함.

2. 배양액을 이용한 제형화 소재 개발 및 제제화 공정 확립

<제형화 소재 개발>

- 제형의 입도 상용성 확보
 - *Streptomyces* sp. A1022 배양액을 60 ± 5℃에서 30분간 열처리 시 활성물질과 포자의 안정성 및 보존성이 무처리구에 비해 우수한 것으로 나타남. 이는 배양 완료 후 열처리 공정 추가로 소량의 비활성물질과 영양세포(vegetative cell)의 제거 효과가 있어 배양액의 안정성과 보존성이 증가한 것으로 판단되며, 이 공정을 후공정에 추가 할 예정임.
 - *Streptomyces* sp. A1022의 활성물질과 포자는 물리적 분쇄와 이때 발생하는 열에 대한 안정성이 확보됨. 따라서 후 공정 중 분쇄 및 기타 공정에서 발생하는 물리적 마찰과 열에 대한 안정성이 확보됨.
 - *Streptomyces* sp. A1022 배양액 분쇄 후 입도가 200mesh(75 μ m) 98% 통과함으로 현재 농가에서 가장 많이 사용하고 있는 동력분무기 및 SS살포기 등에 사용이 가능하므로 사용상의 편리성도 확보됨.
- 동결안정제 선발
 - *Streptomyces* sp. A1022 활성물질과 포자는 부재를 처리하지 않은 조건에서 냉동 안정성과 보존성을 확보하였으나, 보조제 검토를 통해 액상수화제와 동결건조 수화제의 동결방지제를 선발함.
 - 액상수화제는 동결기 동결안정제는 액상 형태의 glycerol을 선발함.
 - 동결건조 수화제의 동결안정제는 분상형태의 lactose를 선발함.
- 건조부재 선발
 - 증량제는 흡습율이 높고, 건조 후 경도가 낮은 부재가 농업용 증량제로 적합함. 따라서 검토결과, silicon dioxide가 수화제 형태의 제형에 가장 적당한 증량제로 선발됨.

○ 계면활성제 선별

- 시험한 계면활성제 중 polyoxyethylene nonylphenyl ether, polyoxyethylene castor ether, polyoxyethylene polyoxypropylene derivatives 등이 사용 가능하나, 습윤, 분산, 침투, 유화제의 기능이 복합적인 polyoxyethylene nonylphenyl ether가 공업화 공정의 적합한 계면활성제로 판단됨.

<제제화 공정 확립>

- *Streptomyces* sp. A1022를 이용한 시제품은 액상수화제 1종, 수화제 2종 등 총 3종으로 제제화 함.

○ 최종 시제품의 물리성 확인

- *Streptomyces* sp. A1022 시제품의 물리성 검토 결과, 3종 모두 생물농약 기준에 적합한 것으로 확인됨. 특히, 분말도는 현행 물리성 기준에 따르면, 화학농약은 325mesh(45 μ m) 98%, 생물농약은 100mesh(149 μ m) 98% 통과를 기준하는데 본 연구의 시제품 3종은 200mesh(75 μ m) 98% 통과하므로 모두 적합한 것으로 판단됨.
- 아울러 54 \pm 2 $^{\circ}$ C에서 4주일 이상 시험한 결과도 초기의 물리성 결과와 유사한 것으로 확인되어 *Streptomyces* sp. A1022 시제품 3종의 물리성이 생물농약 기준에 적합한 것으로 확인됨.

○ 최종 시제품의 제형간 약효 비교

- *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제 및 수화제 2종 시제품간의 약효 검토결과, 시제품 3종의 약효는 유사한 것으로 확인됨.
- 54 \pm 2 $^{\circ}$ C에서 4주 이상 시험한 결과도 초기의 약효와 유사한 것으로 확인되어 *Streptomyces* sp. A1022 시제품 3종의 약효는 생물농약 기준에 적합한 것으로 확인됨.
- *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품)는 희석배수 100배, *Streptomyces* sp. A1022 수화제(FD type, SD type 시제품)는 희석배수 1,000배가 적합한 것으로 판단됨.
- 제품의 희석배수와 생산단가만을 고려하면, *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품)가 가장 효율적인 제품이라 판단되나, 제품의 보존성, 안정성 및 사용상의 편리성 등은 *Streptomyces* sp. A1022 수화제(FD type, SD type 시제품) 형태가 더 효율적임.

○ 최종 시제품의 포자수 경시안정성 분석

- 각 시제품의 포자 경시안정성 확인 결과, 시간이 경과할수록 포자수가 감소하였으나, 54 \pm 2 $^{\circ}$ C에서 4주 이상 시험한 결과도 1.0E+7cfu/mL(g) 이상의 포자를 보유한 것으로 확인되어 포자의 경시안정성도 안정한 것으로 판단됨.

3. 대상병해에 대한 사용방법의 최적화 - POT test

○ 약제 처리시기 분석

- 고추탄저병 이병 전 · 후 *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품) 처리결과, 이병전 처리구가 이병후 처리구에 비해 방제가가 우수한 것으로 나타남. 아울러, 고추 수확량도 이병전 처리구가 이병후 처리구에 비해 우수한 것으로 나타남.

○ 약제 처리간격 분석

- *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품)을 5일 간격으로 약제 처리한 시험구가 7일 간격으로 약제 처리한 시험구에 비해 방제가가 다소 높게 나타났으나, 약제처리 간격에 따른 방제가의 차이는 크지 않는 것으로 판단됨.
- 따라서 이병율 15% 수준에서 약제 처리간격은 7일이 적당한 것으로 판단됨.

○ 약제 처리농도 분석

- 고추 열매를 이용한 시험결과, *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품) 원액과 10배 희석액 처리구에선 탄저병이 이병되지 않았고, *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품) 100배 처리구는 오티바(신젠타) 1,000배 처리구와 유사한 이병율을 나타냈음.
- 온실과 POT시험에서 *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품) 100배 처리구가 오티바(신젠타) 2,000배 처리구에 비해 우수한 방제가를 나타냈고, *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품) 100배는 오티바 1000배 수준과 유사한 방제효과를 나타냄.

○ 시제품과 타사제품 탄저병에 대한 방제가 비교

- 타사제품과 약효 비교 결과, 7일차 결과는 *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품) 100배 처리구와 대조약제 오티바 1,000배 및 티포라탄 1,000배 처리구가 유사한 방제효과를 나타냈고, Eugenol 500배 처리구는 약효가 매우 떨어지는 것으로 확인됨.
- 12일차 결과는 *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품) 100배 처리구와 대조약제 오티바 1,000배는 유사한 방제효과를 나타냈으나, 티포라탄 1,000배 처리구와 eugenol 500배 처리구는 방제효과가 매우 떨어지는 것으로 확인됨.
- *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품)을 100배 처리시 약 10일간의 약효 지속효과가 있을 것으로 예상됨.

4. 대상병해에 대한 방제효과 검증 - Field test

- 1차년도 시험결과를 바탕으로 시설 및 노지에서 고추, 피망, 토마토 등의 작물에 탄저병, 역병, 젓빛곰팡이병에 대하여 *Streptomyces* sp. A1022 시제품을 희석배수 300배 - 1,000배 적용하여 방제가 60% 이상 확보함.

5. 토양상 변화 관찰

- 토양미생물상은 *Streptomyces* sp. A1022 시제품 처리구가 대조구와 무처리구에 비해 시험 완료 후 토양미생물상이 증가한 것으로 나타남.
- 토양이화학상 변화는 유기물과 수분은 모든 처리구에서 유사한 것으로 나타났고, 질소와 가리는 시험종료 후 모든 처리구에서 감소한 것으로 확인됨. 반면, 인산은 대조구와 무처리구는 시험전 후 비슷한 수준이었으나, *Streptomyces* sp. A1022 시제품 처리구의 인산 함량이 시험 종료 후 줄어든 것으로 확인됨.
- *Streptomyces* sp. A1022는 인산분해능이 어느 정도 있는 것으로 판단되고, 이는 현재 농지에서 문제가 되는 인산집적현상을 다소 해결할 수 있을 것으로 기대됨.
- 뿌리생육은 3개 시험구 모두 뿌리생육은 유사하였으나, 시제품 처리구 > 대조구 > 무처리구 순으로 뿌리의 길이 생육이 활발한 것으로 확인됨.

6. 친환경자재 및 토양미생물제제 등록시험 진행

- 친환경농자재 및 토양미생물제제로 등록함.

7. 길항방선균으로부터 생성되는 항균물질의 분리, 정제 및 구조동정

- *Streptomyces* sp. A1022 배양액 균체로부터 용매분획, silical gel chromatography, Sephadex chromatography, prep. HPLC 등의 분석을 통해 식물병원균에 활성을 지니는 단일물질을 분리함.
- 최종 물질은 ¹H, ¹³C, COSY, HMBC, HSQC, DEPT 등의 분석을 통해 당지질 (glycolipid)로 예상되며 정확한 구조는 동정 중임.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 본 연구에서 *Streptomyces* sp. A1022 균주를 이용하여 개발된 제품은 친환경농자재(상표명; 방선이, 등록번호; 11-유기-4-207) 및 토양미생물제제(등록번호; 경기여주22-가-20201)로 각각 등록함.
- 따라서, 본 과제 종료 후 농림부와 기술이전 협약을 거쳐 주관기관인 (주)해강바이오에서 자체 이전을 통해 판매할 예정임.
- 이후 화학농약 사용량 절감 효과 및 친환경농산물 생산량 증가 등의 부수적인 효과가 기대됨.

SUMMARY

○ Experimental purposes and contents

Economic vegetables such as strawberry, tomato, pepper have a lot of problems because of soilborne diseases such as gray mold, late blight, anthracnose. To control these plant diseases, antagonist microbial strains, especially *Streptomyces*, need to be selected and characterized. These selected strains should be developed into commercial biocontrol agents, which can be produced in industrial scale.

- ① Establishment of cultivation condition for the production of antagonistic streptomyces species which have a high density and high activity; and establishment of its standard operation procedure (SOP) for the production of commercial products by selecting filler and stabilizing materials.
- ② Development of optimal application procedures of the product to the plant diseases in POT test; disease controlling efficacy in field test.
- ③ Registration of the final product as agricultural instrument.
- ④ Separation, purification, structural determination of antibiotic chemical which is produced from selected *Streptomyces* species.

○ Research results

Streptomyces sp. A1022 strains were selected and produced successfully in scale of 5, 50, 500 Liter fermenter. Based on these results, fermentation process was standardized.

- A semi-commercial biofungicide was formulated by selecting filler and stabilizing materials. And its production process (SOP) for 1 solid concentrate and 2 wettable powder was obtained. Final physical properties, efficacy comparison of 3 biofungicides, and change in stability for long period was examined for the final standard operation procedure.
- Biofungicide treatment time table, treatment interval, application concentration, comparison between our product and other's products was performed in POT test, through which various informations for proper usage of the biofungicide was obtained.
- In green house and field trials, the semi-commercial biofungicides were applied by dilution of 300 ~1000 times to vegetables such as pepper, pmang, and tomato against various plant diseases such as gray mold, late blight, and anthracnose. Disease control value was more than 60%.

- Positive change in soil was observed for the increase in microbial population density, phosphate mobilization, root length after application of biofungicides.
- All developed biofungicides was registered as eco-friendly agricultural instrument and soil biofungicides.
- Culture broth and cell mass was solvent-fractionated to pass through classical procedure for the isolation of bioactive compound. The procedure included silica gel chromatography, Sephadex chromatography, preparative HPLC. The bioactive compound was analyzed using ¹H, ¹³C, COSY, HMBC, HSQC, DEPT and estimated as a glycolipid.

○ **Application of research results and planning**

- Our developed commercial biofungicides using *Streptomyces* sp. A1022 was registered as eco-friendly agricultural instrument (Registered name: Bangsune, Registration number: 11-organic-4-207) and soil biofungicide preparation (Registration number: Gyeonggi-Yeaju-22-Ga-20201).
- After finishing our current project, we intended to discuss the agreement on technology transfer between IPET and Haegangbio Company. We planned to make available this developed biofungicides throughout our company network.

CONTENTS

Chapter 1. Summary of research project

Chapter 2. Technical environment for current project

Chapter 3. Research contents and results

Chapter 4. Achievement for research goals and its application

Chapter 5. Application of research results and planning

Chapter 6. Oversea scientific information obtained during research

Chapter 7. References

목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요
- 제 2 장 국내외 기술개발 현황
- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
- 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획
- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보
- 제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발 과제의 개요

본 연구는 주요 과채류에 문제가 되는 잣빛곰팡이병, 역병, 탄저병 등에 활성을 지니는 방선균을 이용하여 이의 병해방제용 친환경농자재를 공업화, 상업화 하는 것으로 목표로 함.

■ 주요 경제작물의 식물병 발생동향

- 주요 식량 및 경제 작물들에 대한 병, 해충, 잡초 등에 의한 생육 중 피해율은 잠재 생산량의 42%에 달하며 경제적으로 산출하면 3,000억 달러에 달하는 것으로 나타나는데, 이 중 병해에 의한 피해율은 약 15%에 달하는 것으로 나타남(Oerke 등, 1995).
- 국내에서 발병되는 병해는 약 1,535종으로 특히, 딸기, 토마토, 고추와 같은 주요 경제작물에는 매년 반복적으로 발병되는 고질적인 병해가 잣빛곰팡이병, 역병, 탄저병 등과 같은 토양전염성 병해로 이러한 병해에 의한 손실액은 국내외적으로 수십억원에서 수천억 원에 이르고 있음(한성숙, 2009).
- 토양에 의한 병해 매개는 전염매개체 중 60% 이상을 차지하는 매개체이며, 토양전염성 병원균은 부생능력이 강하여 분리한 환경하에서는 곧바로 휴면상태로 돌입하여 불리한 환경조건에서도 장기간 생존이 가능한 성질로 인해 기개발된 화학농으로는 효과적인 방제가 어려워 세계적으로 문제가 되고 있어 미생물을 이용한 살균제의 개발이 시급히 요구되고 있음(김용기, 2009; 배영석, 2009).
- 역병은 병원성이 강하고 기주 특이성이 높은 것으로 알려져 있으며, 이들 중 *Phytophthora capsici*, *P. infestans*, *P. cactorum* 등은 해마다 전국적으로 발생되고 있고(지형진, 2009), 특히, 국내의 고추 재배 현황은 연간 생산량이 1조 4,500억원에 이르는데 이 중 역병과 탄저병에 의한 피해는 20%, 15%에 각각 달한다고 보고됨(한성숙, 2009; Garcia C., et al., 2004).
- 잣빛곰팡이병도 화학약제에 의한 방제가 어려운데, *Trichoderma* spp.와 *Pseudomonas* spp. 균주를 이용하여 미생물농약을 개발하였으나, 60% 정도의 방제효과를 나타내고 있으나, 환경조건에 따라 방제효과가 많은 차이가 있는 것으로 나타나 다양한 조건에서 보다 안정된 효과를 나타낼 수 있는 방법에 대한 연구가 절실히 요구되고 있음(배영석, 2009).
- 이에 따라, 본 연구의 목표는 농가에서 방제에 어려움을 겪고 있는 병해에 대하여 미생물을 이용한 친환경농자재의 개발과 이의 사용방법을 확립하는 것임.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내 기술개발 현황

- 국내 농자재시장(비료, 농약, 친환경자재) 산업규모는 약 4.9조원으로 농약 1.3조원, 비료 2.2조원, 친환경농자재 8천억원, 종자 6천억원 수준으로, 화학농약, 화학비료 산업은 정체되고 있는 반면, 친환경유기농자재 산업은 증가 추세임(2012, (사)한국친환경농자재협회 세미나).
- 국내 병해관리용 친환경유기농자재 등록 건수는 2012년 현재 약 170여 종이며, 대부분 식물추출물과 미생물제제에 치중됨(2012, 농진청).
- 친환경농산물 시장과 유기농업 재배면적은 우리나라를 비롯해 전 세계적으로 매년 증가하고 있는 추세인데, 이에 따라 친환경농자재 시장도 함께 성장할 것으로 판단됨.

표. 국내 친환경농산물 시장규모 전망(한국농촌경제연구원, 2010)

년도	2010년	2015년	2020년
시장규모(조원)	3.6	5.3	6.6

- 우리나라는 2003년 생물농약 중 미생물농약 관련 법안이 통과되면서 (주)그린바이오텍, (주)KIBC 등과 같은 벤처기업과 (주)동부하이텍과 같은 대기업에서 본격적인 미생물농약 양산체제에 들어가면서 미생물농약이 가장 먼저 발전하고 있는데, 이는 생화학농약이 발달한 북미나, 천적이 발달한 유럽과는 다소 다른 양상을 나타내고 있음.
- 현재의 미생물농약 시장은 국내·외적으로 BT제가 주도를 하고 있으며, 특히 국내에서는 *Bacillus* 속, *Paenibacillus* 속 등과 같은 세균과 *Ampelomyces* 속, *Beauveria* 속과 같은 중북기생균주를 공업화 및 상품화하여 시장전개를 하고 있다(Russell K.H. & Susan, M.B., 2005; Butt, T. M., et al., 2001).
- 그러나, 기 개발된 1세대 생물농약의 경우 몇몇의 문제점으로 인한 생물농약으로서 한계성 때문에 시장의 전개가 활발히 이뤄지지 않고 있는 실정이며 이를 극복할 수 있는 적극적인 대책이 요구됨(Samuel G. M. & Graham, A. M., 2003; Copping, L. G., 2001).
 - 제품가격은 생물농약 개발기간과 개발의 어려움 때문에 화학농약에 비해 2-3배이상 더 비싼 문제점이 있고, 약효는 일부 제품의 경우 화학농약 대비 방제가가 60%에도 미치지 못하는 문제점이 있음.
 - 또, 일부 제품의 경우 유효성분의 안정성 보증에도 문제가 있어, 냉장보관 및 냉장유통과 같은 cold chain을 이용해야만 하는 유통상의 문제점이 있음(Burges, H. D., 1998).
 - 중북기생균을 포함한 일부 균주의 경우에는 약제 살포시기와 살포간격 등에 대한 제한 있고 살포 후에도 후처리 등의 번거로움 있음.

- 또, 생물농약시장을 주도했던 BT제를 포함한 *Bacillus* 속을 이용한 제품의 경우 저항성에 대한 보고가 있어, 새로운 균주를 이용한 차세대 미생물농약의 개발이 절실함(Samuel G. M. & Graham, A. M., 2003).
- 아울러, 일부 균주의 경우 독성을 유발하는 것으로 알려져 인간을 포함한 포유독성의 문제, 유용생물에 대한 안전성에 대한 문제가 대두되고 있음(Browun, 1978; 배영석, 2009).
- 또한, 미생물농약을 이용한 환경친화적인 농법이나 관리를 권장하기 위하여 2003년 친환경농업육성법과 2007년 친환경농자재 관련법이 시행되어 환경농업의 중요 소재인 미생물농약의 개발에 체계적이고 장기적인 지원이 요구되고 있음.
- 이에 따라, 1세대 생물농약의 한계를 극복하면서 저가이면서 약효가 우수하고(화학농약 대비 80% 이상), 환경에 대한 안전성과 유효 성분의 안정성이 뛰어난 제2세대 생물농약의 개발이 요구되고 있는 시기라 판단됨.

2. 국외 기술개발 현황

- 세계 생물농약 시장은 2001년도에 약 2.5억불로서 전체 농약시장의 1% 정도를 유지하며, 그 중에서도 BT제가 52%로 제일 큰 비중을 차지하며 시장을 주도하며, 매년 약 20% 수준으로 성장하고 있음.
- 미국을 비롯한 서방선진국에서 리드하던 미생물농약 시장이 2005년을 기점으로 인도, 스페인 등의 국가에서 많은 종류의 미생물농약을 저렴한 가격에 세계시장에 공급하고 있으며 원재로 사용되는 유효 미생물은 아직까지 유사한 수준임.
- 주요 업체로는 Valent BioSciences사, Certis USA사, Koppert사 등이 500억원 이상 매출규모의 생물농약 및 천적업체이고, AgraQuest사, BioWorks사 및 E-nema사 등은 규모는 작지만 성공적인 회사로 평가됨.
- 해외에서 미생물농약의 시장은 꾸준히 증가세에 있다. 하지만 식물바이러스를 방제할 목적으로 생산된 제품에 대한 정보부족으로 바이러스를 방제하는 미생물농약에 대한 시장규모 분석을 수행할 수 없었는데 이는 아마도 바이러스 방제 목적으로 많은 제품이 출시가 되지 않았음을 간접적으로 시사 하고 있음.

표. 2014년 해외 미생물농약 시장규모 예측치 (단위 : 100만달러)

재료	유럽	NAFTA	남미	아프리카	아시아	오세아니아	전체
세균	15	80	10	5	20	30	160
바이러스	10	15	10	2	5	10	42
곰팡이	25	45	20	3	15	20	128
합계	50	140	40	10	40	60	330

출처 : International Biocontrol Manufacturer's Association, 2004

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

<제1세부, 주관연구기관>_ 길항방선균을 이용한 토양전염성 병해 방제제 개발

1. 균주선발

(1) 식물병원균

본 연구에 사용한 식물병원균은 한국화학연구원과 고려대학교에서 분양받아 계대배양하면서 사용하였다(표 1).

Table 1. List of phytopathogenes

Test strain	Host	Korean name
<i>Alternaria logipes</i>	담배	깨씨무늬병
<i>Cercospora canescece</i>	녹두	녹두갈색무늬병
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	wide	탄저병
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	오이	오이탄저병
<i>Diaporthe citri</i>	감귤	감귤검은점무늬병
<i>Fusarium oxyaporum f.sp. Cucameris</i>	오이	시들음병
<i>Fusarium oxyaporum f.sp. Lycopersici</i>	토마토	시들음병
<i>Magnaporthe grisea</i>	벼	벼도열병
<i>Phytophthora capsici</i>	고추	고추역병
<i>Phytophthora infestans</i>	토마토	토마토역병
<i>Rhizoctonia solani</i>	잔디	마름병
<i>Sclerotinia soleroforum</i>	wide	균핵병

(2) 항균성 검정

각 식물병원균의 plate에 멸균수를 첨가하고 포자만 회수하여 이를 0.5% soft agar에 포자수가 1.0E+6 spore/mL 수준이 되도록 혼합한 후 PDA 배지에 중층배지를 만들어 약 2시간 가량 건조하여 사용하였다.

검정시료는 배양이 완료된 배양액에 동량의 메탄올을 첨가한 후 24시간 메탄올 추출하여 상등액만 시험에 사용하였다. 배양상등액 65 μ l를 paper disc에 흡수시켜 건조한 후 건조된 중층배지위에 올려놓고 25 $^{\circ}$ C에서 배양하면서 항균활성을 확인한다.

(3) Vegetative cell, Spore cell 계수

Vegetative cell 수 확인은 배양이 완료된 배양액을 전처리 없이 바로 ISP2 배지상에서 희석 평판배지 도말법으로 균수를 확인하였고, spore cell 수 확인은 배양액을 60℃에서, 30 분간 열처리한 후 ISP2 배지상에서 같은 방법으로 균수를 확인하였다.

(4) 균주선발

보유 방선균 중 다양한 식물병원균에 활성을 보이며 특히 탄저병(*Colletotrichum gloeosporioides*)에 대하여 활성이 우수한 균주 A1022와 A1023을 선발하였고, 이들 균주를 대상으로 배양조건 확립 및 항균활성물질의 분리 정제를 실시하였다.

또, A1022와 A1023균주의 주요 토양전염성병해에 대한 항균활성 능력은 기개발 생물농약 및 화학농약과 비교했을 때 활성이 비슷하거나 더 우수한 것으로 확인되었다(표 2, 그림 1, 그림 2).

Table 2. Antifungal activity of strain A1022 and A1023 against phytopathogens

(mm)

Products		Anthracnose	Tomato late blight	Tomato gray mold
Strain A1022		22	18	14
Strain A1023		20	16	13
Biopesticides	G사, 제품C	-	-	-
	Eugenol 20%	12	12	10
Pesticides	Azoxystrobin 20%	20	12	12
	Propamocarb hydrochloride	10	10	10

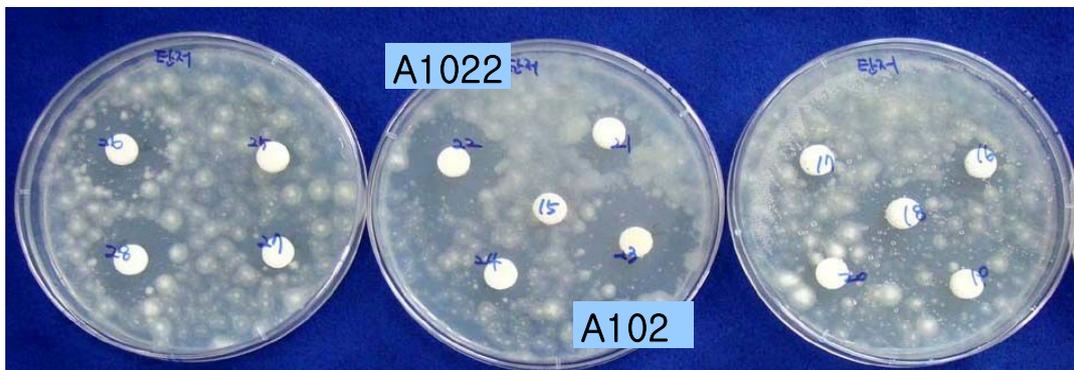


Fig 1. Antifungal activity of strain A1022 and A1023 against *C. gloeosporioides*

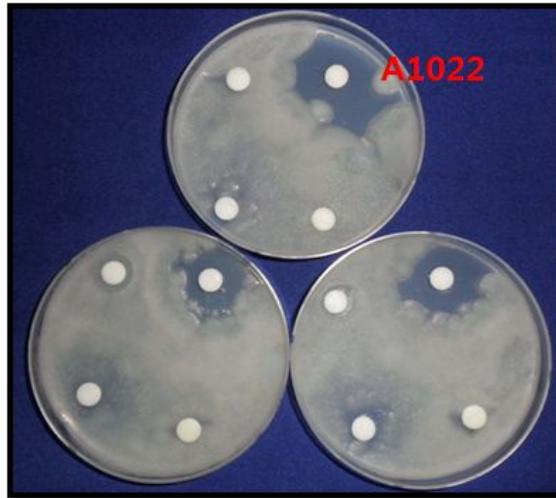


Fig 2. Antifungal activity of strain A1022 against *Phytophthora capsici*

2. 균주동정

(1) 형태 및 생화학적 분석

① 재료 및 방법

선발균주의 배양적 특성 확인을 위하여 International Streptomyces Project and Bergey's Manual of Systematic Bacteriology를 바탕으로 균의 형태 및 생화학적 분석하였다. ISP배지 상에서 성장상태, aerial mycelium, 색소 생성여부 등의 특성을 확인하였고, 주사전자현미경사진 촬영을 통해 aerial mycelium의 형태를 관찰하였다.

② 형태 및 생화학적 분석 결과

A1022 균의 성장은 모든 ISP배지 상에서 양호하였고, ISP 2, 4, 5, 6 배지에서 매우 왕성히 생육하는 것으로 관찰되었다. 연한 연두색의 aerial mycelium을 형성하였고, 생육하면서 갈색 계통의 색소를 생성하는 것으로 확인되었다(표 3).

주사전자현미경을 통해 A1022 균주의 aerial mycelium 형태를 확인한 결과, *Streptomyces* 속의 전형적인 사슬형태로 관찰되었다(그림 3).

A1022 균주의 생육 가능 온도는 22-36℃이나, 30℃가 생육 적온이고, pH5 -pH8 사이에서 생육 가능한 것으로 관찰되었다. 그람염색 양성반응으로 나타났으며, 혐기적 조건에서는 생육하지 못하는 것으로 확인되었다(표 4).

Table 3. Culture characteristics of *Streptomyces* sp. A1022 in different media after 14 days of incubation at 28±1℃

Medium	Growth	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Spores	Pigment
ISP1	Moderate	moderate, light green	Present	light gray	brown
ISP2	Good	abundant, light green	Present	light gray	brown
ISP3	Moderate	moderate, light green	Present	light gray	brown
ISP4	Moderate	moderate, light green	Present	light gray	brown
ISP5	Good	abundant, light green	Present	light gray	brown
ISP6	Good	abundant, light green	Present	light gray	brown

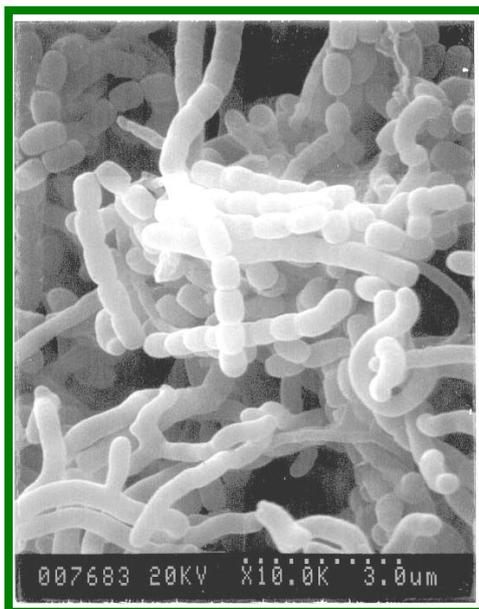


Fig 3. Photography of hypha after 7 days fermentation of A1022 strain by SEM

Table 4. Biochemical and physiological characteristics of *Streptomyces* sp. isolate A1022

Culture	Growth characteristics
Growth under anaerobic conditions	-
Gram staining	positive
shape and growth	long filamentous aerial growth
Motility	None
Range of temperature for growth	22-36°C
Optimum temperature for growth	30°C
Range of pH for growth	5.0-8.0
Growth on MacConkey plates	-
Production of diffusible pigment	+

(2) 균체지방산 조성 분석

A1022 균주의 균체지방산조성 분석결과, 주요 지방산으로 C_{15:0} iso (47.7%), C_{15:0} anteiso (28.46%)를 나타내었으며, C_{13:0} iso, C_{14:0} iso, C_{16:0} iso, C_{17:0} iso, C_{17:0} anteiso 그리고 C_{17:0} 3OH와 같은 다양한 분지형 지방산을 함유하는 특징을 나타내었다(표 5).

Table 5. A1022 균주의 균체지방산 특성

Fatty acid	A1022
Saturated acid	
C13:0	-
C14:0	1.98
C16:0	4.78
C18:0	-
Branched-chain acids	
iso-C14:0	1.68
iso-C15:0	47.4
anteiso-C15:0	28.46
iso-C16:0	2.27
iso 17:1 w5c	2.11
iso-C17:0	3.56
anteiso-C17:0	3.92
iso 17:0 3OH	2.85

(3) 16S rDNA 염기서열 분석

① 재료 및 방법

○ DNA 추출: Benzyl chloride법을 변형하여 이용하였다(표 6).

○ 16S rRNA PCR(polymerase chain reaction) 증폭

- Primer:

5-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3, 5-GGYTACCTTGTTACGACGACTT-3

- PCR 증폭조건: 94°C(5min), 94°C(30s), 55°C(30s), 72°C(1min), 35 cycle 72°C, 10min; 4°C hold

○ 16S rRNA 증폭산물의 정제: 16S rRNA 증폭산물은 PCR product purification kit(Qiagen)을 사용하여 정제하였다.

○ 염기서열 분석: PCR 정제산물은 genetic analyzer 310A(applied biosystems)를 사용하

여 염기서열을 분석하였다.

- 데이터해석: 염기서열은 DDBJ/NCBI/Genebank와 ribosomal database project 2의 database에서 상동성을 검색하였다.

Table 6. Component for amplification

	Sample(ul)	Final con.
DDW	11.5	
buffer (10x)	5.0	1.67 x
MgCl ₂	5.0	
dNTP(2.5mM)	5.0	0.42 mM
Primer A(25 pmol)	1.0	0.83 pmol
Primer B(25 pmol)	1.0	0.83 pmol
template	1.0	
Polymerase(Bioworld)	0.5	
total	30.0	

② 결 과

16S rDNA 염기서열에 기초한 분자계통학적 분석결과, A1022균주는 *Streptomyces* 속의 종을 포함하는 계통학적 그룹에 속하는 균주로서, *Streptomyces odorifer* DSM 40347^T (Z76682), *Streptomyces sampsonii* ATCC25495^T (D63871), *Streptomyces coelicolor* DSM40233^T (Z76678), *Streptomyces limosus* DSM 40131^T (Z76679), *Streptomyces felleus* DSM 40130^T (Z76681), *Streptomyces canescens* DSM 40001^T (Z76684) 등 총 6균주와 100%의 높은 상동성을 나타냈다(그림 4).

Score = 2019 bits (1093), Expect = 0.0
 Identities = 1093/1093 (100%), Gaps = 0/1093 (0%)
 Strand=Plus/Plus

A1022	1	CGATGAACCGCTTTCGGGCGGGGATTAGTGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCT	60
Z76682	36	CGATGAACCGCTTTCGGGCGGGGATTAGTGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCT	95
A1022	61	GCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAACCGGGTCTAATACCGGATATGACTGTCCATC	120
Z76682	96	GCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAACCGGGTCTAATACCGGATATGACTGTCCATC	155
A1022	121	GCATGGTGGATGGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGT	180
Z76682	156	GCATGGTGGATGGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGT	215
A1022	181	TGGTGAGGTAGTGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCC	240
Z76682	216	TGGTGAGGTAGTGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCC	275
A1022	241	ACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCAC	300
Z76682	276	ACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCAC	335
A1022	301	AATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAA	360
Z76682	336	AATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAA	395
A1022	361	CCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACT	420
Z76682	396	CCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACT	455
A1022	421	ACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTA	480
Z76682	456	ACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTA	515
A1022	481	AAGAGCTCGTAGGGCGCTTGTACGTGCGTTGTGAAAGCCGGGGCTTAACCCGGGTCT	540
Z76682	516	AAGAGCTCGTAGGGCGCTTGTACGTGCGTTGTGAAAGCCGGGGCTTAACCCGGGTCT	575
A1022	541	GCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGT	600
Z76682	576	GCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGT	635

A1022	601	GAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTG	660
Z76682	636	GAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTG	695
A1022	661	ACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG	720
Z76682	696	ACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG	755
A1022	721	TAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCAT	780
Z76682	756	TAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCAT	815
A1022	781	TAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGC	840
Z76682	816	TAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGC	875
A1022	841	CCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGGAAGAACCTTACCAAGGC	900
Z76682	876	CCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGGAAGAACCTTACCAAGGC	935
A1022	901	TTGACATACACCGGAAACGTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGT	960
Z76682	936	TTGACATACACCGGAAACGTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGT	995
A1022	961	GCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC	1020
Z76682	996	GCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC	1055
A1022	1021	CCTTGTCCTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGACTCACGGGAGACCGCCGGG	1080
Z76682	1056	CCTTGTCCTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGACTCACGGGAGACCGCCGGG	1115
A1022	1081	GTCAACTCGGAGG	1093
Z76682	1116	GTCAACTCGGAGG	1128

Fig 4. *Streptomyces odorifer* DSM 40347^T (Z76682)와 Strain A1022의 DNA 상동성 비교

(4) DNA gyrase subunit B(*gyrB*) 염기서열에 기초한 분자계통학적 분석 결과

A1022는 *Streptomyces* 속의 종을 포함하는 계통학적 그룹에 속하는 균주로서 *Streptomyces* sp. M46 (DQ445803)와 97.3%의 유연관계를 나타내는 것으로 확인되었다. 따라서 A1022는 *gyrB* 염기서열에 기초하여 *Streptomyces* sp. A1022로 동정되었다(그림 5, 6).

```
CAGCGAGGGGTCTACTCCTTCGCCAACACCATCCACACCCACGAGGGCGGCACCCACGA
GGAGGGCTTCCGCGGCGCGCTGACCACCTGGTCAACAAGTACGCCC GGGACCGCAAGCT
GTTGCGCGACAAGGACGACAACCTCACCGGCGACGACATCCGCGAGGGTCTGACGGCGAT
CATCTCCGTCAAGCTCGGGAGCCGAGTTCGAGGGCCAGACCAAGACCAAGCTGGGCAA
CACCGAGGCCAAGACCTTCGTGCAGAAGGTGGTCTACGAGCACCTGGCCGACTGGTTCGA
CCGGAACCCGAACGAGGCCGCGGACATCATCCGCAAGGGCATCGCCGCCGCCACCGCCCG
TGTGGCGGCCCGCAAGGCGCGGACCTGACCCGCCGCAAGGGTCTGCTGGAGACCGCCTC
GCTCCCCGGCAAGCTCTCGGACTGCCAGTCGAACGACCCGACCAAGTGCAGATCTTCAT
CGTCGAGGGCGACTCGGCCGGCGGCTCCGCCAAGTCCGGCCGTGACCCGATGTACCAGGC
CATCCTGCCGATCCGCGGCAAGATCCTGAACGTCGAGAAGGCCCGTAT//
```

Fig 5. Strain A1022의 DNA gyrase (*gyrB*) 염기서열 분석 (588bp)

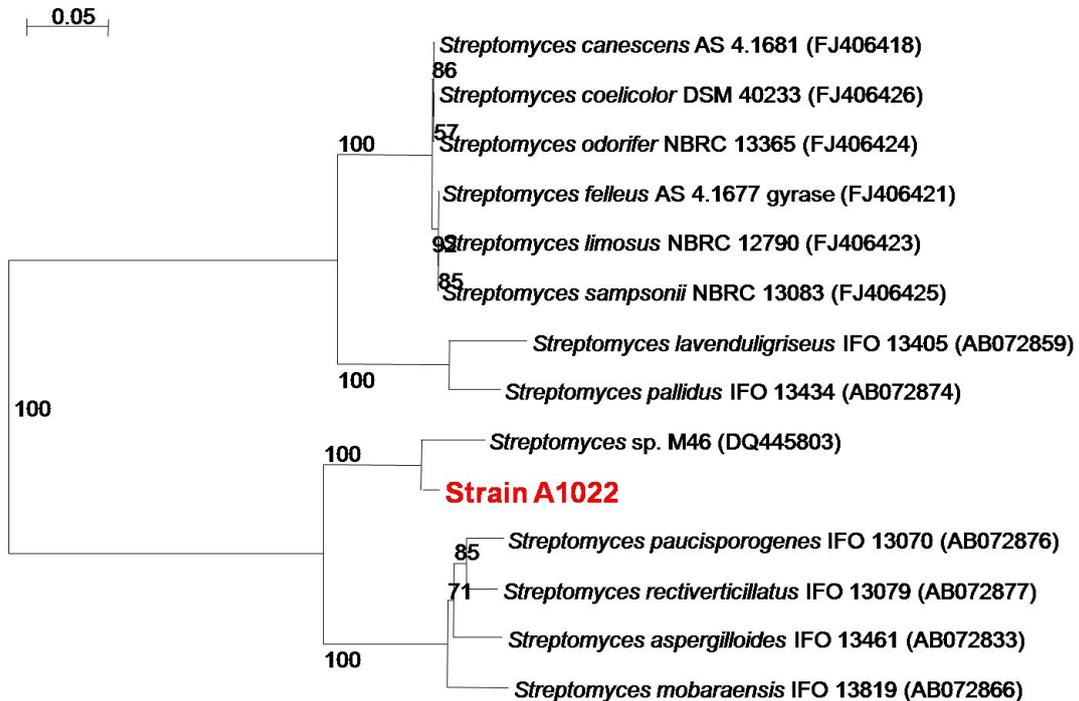


Fig 6. Phylogenetic tree based on *gyrB* sequences showing the position of strain A1022 related bacterial taxa.

Numbers at branches are bootstrap values, derived only for the nodes supported by greater than 50%(1,000 replicates). Bar, 0.05 substitutions per site.

(5) 결론

16S rDNA는 매우 보존적인 염기서열로서 종과 속간의 분화에 따른 다양성이 크고 세균을 종 수준으로 구분할 수 있는 정보를 담고 있는 영역으로 많이 사용되었으나 *Streptomyces* group내의 종들은 16S rRNA 유전자 염기서열이 100%의 매우 높은 유사도를 나타내어 16S rDNA 염기서열에 기초한 동정이 불가능하여 DNA gyrase subunit B 염기서열을 분석한 결과, A1022는 *Streptomyces* 속의 종을 포함하는 계통학적 그룹에 속하는 균주로서 *Streptomyces* sp. M46(DQ445803)와 97.3%의 유연관계를 나타내는 것으로 확인되었다. 따라서 A1022는 gyrB 염기서열에 기초하여 *Streptomyces* sp. A1022로 동정되었다.

3. *Streptomyces* sp. A1022의 고농도, 고효율 배양조건 확립

(1) 기본 배지조성 검토

① 재료 및 방법

방선균 배양에 주로 이용되고 있는 ISP2 배지와 X media, B media를 이용하여, A1022와 A1023 균주를 대상으로 기본 배지의 이용성을 1차적으로 검토하였고, 대상 병해는 탄저병에 대한 항균활성을 검증하였다(표 7).

Table 7. Cultivation media for the selected strain

	(g/L)
ISP. 2	Malt extract 10, Yeast extract 4, Glucose 4
X	Soybean meal 10, glycerol 15, CaCO ₃ 3, MgSO ₄ 0.5, NH ₄ Cl 0.5, KH ₂ PO ₄ 1,
B	Soybean meal 5, Corn starch 15, Yeast extract 0.5, KH ₂ PO ₄ 0.5, KNO ₃ 0.5, CaCO ₃ 3

② 기본 배지조성 검토 결과

A1022와 A1023 균주 모두 X media와 B media에 비해 ISP2배지에서 탄저병에 대한 항균활성이 높았다(표 8).

Table 8. Effect of different medium on antifungal activity of strain A1022 and A1023

Medium	A1022	A1023
ISP. 2	22	20
X	17	16
B	19	17

③ 결론

ISP2배지에는 glucose와 yeast extract와 같은 기본적인 탄소원과 질소원 외에 complex media인 malt extract 함유되어 있는데, 이는 고가의 배지로 공업화에 적합하지 않아, 이를 대체할 수 있는 배지 성분을 검토 하였다. 또, malt extract는 당분 외에 펩톤이나 여러 가지 세균, 효모균, 사상균에 대한 발육인자 물질을 함유하고 있어 탄소원, 질소원, 무기염류와 complex media 쪽으로의 검토가 요구되었다.

(2) 탄소원, 질소원 검토

탄소원과 질소원 검토의 기본배지로는 ISP2 배지 성분 중 malt extract가 빠진 1.5% glucose, 0.4% yeast extract를 기본배지로 하였고, ISP2배지는 매 실험마다 positive control로 사용하였다.

① 재료 및 방법

실험에 사용한 탄소원은 Dextrin, Fructose, Glycerol, Lactose, Soluble starch, Sucrose 등과 complex media 중 Barley flour, Soya flour도 탄소원으로 추가하여 실험하였고, 질소원은 (NH₄)SO₄, Ca(NO₃)₂·4H₂O, Gelatin, Glutamic acid, Peptone, Urea 등과 complex media 중 Corn steep liquor, whey도 질소원으로 추가하여 실험하였다.

기본 배지(1.5% glucose, 0.4% yeast extract)에 탄소원과 질소원을 각각 1%(w/v) 첨가하고, 종배양액을 2%(v/v) 접종하여 30℃, 150rpm에서 6일간 진탕배양한 후 탄저병에 대한 항균활성을 확인하여 이용율이 높은 탄소원과 질소원을 각각 선발하였다.

② 탄소원 검토 결과

Malt extract 대신 사용한 Dextrin, Fructose, Glycerol, Lactose, Soluble starch, Sucrose 등과 barley flour와 같은 탄소원을 사용한 시험구에서는 탄저병에 대한 활성이 약하게 나타났으나, Soya flour을 사용한 시험구에서는 A1022, A1023 균주 모두 control과 유사한 활성이 나타나는 것으로 확인되었다(표 9).

Table 9. Effect of carbon sources on the production of the antifungal metabolite by A1022 and A1023

Medium	(mm)	
	A1022	A1023
Dextrin	13	12
Fructose	14	14
Glycerol	11	12
Lactose	19	16
Soluble starch	13	14
Sucrose	12	10
Barley	15	16
Soya flour	21	19
Control	22	21

③ 질소원 검토 결과

탄소원과 유사한 양상을 보였다. malt extract 대신 사용한 $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Corn steep liquor, Gelatin, Glutamic acid, Peptone, Urea 등과 같은 질소원에서는 활성이 약하게 나타났으나, whey를 사용한 시험구에서는 A1022, A1023 균주 모두 control과 유사한 활성을 나타냈다(표 10).

Corn steep liquor에도 질소원 외에 여러 가지 인자들이 들어있어 배양중 항균활성 물질 생산에 도움이 될 것으로 예상했으나, 예상과 달리 항균활성이 낮았다. 이는 Corn steep liquor로 인해 초기 pH가 낮아지면서 균의 생육에 영향을 미쳐 활성물질 생산에 영향을 줘 최종 항균활성이 낮게 나온 것으로 판단되었다. 이는 물리적조건 검토항목의 초기 pH 최적화 결과와 일치하는 결과이다.

Table 10. Effect of nitrogen sources on the production of the antifungal metabolite by A1022 and A1023

Medium	A1022	A1023
$(\text{NH}_4)\text{SO}_4$	12	11
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	12	13
Corn steep liquor	11	12
Gelatin	13	12
Glutamic acid	13	12
Peptone	14	15
Urea	17	15
whey	17	22
Control	21	21

④ 결론

탄소원과 질소원 검토결과, malt extract를 대체할 배지 성분으로 A1022균주는 Soya flour을 A1023 균주는 whey를 이용할 수 있을 것으로 확인되었다. 그러므로, A1022 균주는 1.0% Soya flour, 0.4% yeast extract, 1.5% glucose로 배지성분을 확정하고, A1023 균주는 1.0% whey, 0.4% yeast extract, 1.5% glucose로 배지성분을 확정 후 이후의 배양 조건을 검토하였다.

(3) 통계적 방법에 의한 배지최적화

배지 조건의 최적화를 위하여 항에서 각 균주별로 확정된 배지성분의 비율을 조정하여 fractional factorial design의 통계적 방법을 연속적으로 적용하여 최종 배지성분의 최적화를 검토하였다. 통계적 방법에 의한 배지 최적화에는 탄저병과 벼도열병에 대한 항균활성을 확인하였다.

배지조성은 0(control)을 기준으로 +run(선발배지 조성을 control 기준으로 50% 증량), -run(선발배지 조성을 control 기준으로 -50%감소)으로 설정하여 연속적으로 실행하였다(표 11).

Table 11. Fractional factorial design

Run	Soya flour (Whey)	Yeast ext.	Glucose
1	-1 ^a	1	1
2	1 ^a	-1	-1
3	-1	-1	-1
4	1	1	1
5	-1	-1	1
6	-1	1	-1
7	1	-1	1
8	1	1	-1
9	0 ^a	0	0

^a + 1. high level; -1. low level; 0. center point

① A1022균주의 통계적 방법에 의한 배지최적화 방법

Table 12. Levels of the variables tested in the fraction factorial design 1 - A1022

Variables (g/L)	+ 1 ^a	-1 ^a	0 ^a
Soya flour	15	5	10
yeast ext.	6	2	4
glucose	22.5	7.5	15

^a + 1. high level; -1. low level; 0. center point

Table 13. Levels of the variables tested in the fraction factorial design 2 - A1022

Variables (g/L)	+ 1 ^a	-1 ^a	0 ^a
Soya flour	7.5	2.5	5
yeast ext.	3	1	2
glucose	33.75	11.25	22.5

^a + 1. high level; -1. low level; 0. center point

② A1022 균주 결과

A1022 균주는 배지성분 중 탄소원인 glucose에 대한 요구도가 매우 높았고, soya flour 과 yeast extract에 대한 요구도는 낮았다. 1차 실험결과 0.5% soya flour, 0.2%, yeast extract, 2.25% glucose로 배지성분을 최적화하였다(표 14).

1차 결과를 바탕으로 2차 fractional factorial design한 결과, 4번 시험구와 같이 0.75% Soya flour, 0.3% yeast extract, 3.375% glucose로 모든 배지 성분 양이 증가하는 쪽으로 최적화되었다. 이는 glucose의 비율이 늘어나면서 soya flour, yeast extract에 대한 요구도도 동반 증가한 것으로 보이며, 이 경우 1차 fraction factorial design 결과가 A1022균주의 최적 배지 조성으로 판단된다(표 15).

Table 14. Fraction factorial design and results - strain A1022

Run	Soya flour	Yeast ext.	Glucose	Antifungal activity (mm)	
				Anthraco-nose	Rice blast disease
1	-1	1	1	15	35
2	1	-1	-1	15	33
3	-1	-1	-1	13	27
4	1	1	1	22	30
5	-1	-1	1	23	33
6	-1	1	-1	19	30
7	1	-1	1	-	-
8	1	1	-1	17	25
9	0	0	0	22	34

Table 15. Fraction factorial design and results - strain A1022

Run	Soya flour	Yeast ext.	Glucose	Antifungal activity (mm)	
				Anthraco-nose	Rice blast disease
1	-1	1	1	19	36
2	1	-1	-1	15	32
3	-1	-1	-1	17	27
4	1	1	1	25	36
5	-1	-1	1	20	31
6	-1	1	-1	19	29
7	1	-1	1	15	25
8	1	1	-1	17	25
9	0	0	0	23	33

③ A1023균주의 통계적 방법에 의한 배지최적화 방법

Table 16. Levels of the variables tested in the fraction factorial design 1 - A1023

Variables (g/L)	+ 1 ^a	-1 ^a	0 ^a
Whey	15	5	10
yeast ext.	6	2	4
glucose	22.5	7.5	15

^a + 1. high level; -1. low level; 0. center point

Table 17. Levels of the variables tested in the fraction factorial design 2 - A1023

Variables (g/L)	+ 1 ^a	-1 ^a	0 ^a
Whey	7.5	2.5	5
yeast ext.	9	3	6
glucose	33.75	11.25	22.5

^a + 1. high level; -1. low level; 0. center point

④ A1023 균주 결과

A1023 균주는 배지성분 중 질소원인 yeast extract와 탄소원인 glucose에 대한 요구도가 높은 것으로 확인되었다. 특히, 1번 시험구와 같이 whey의 양은 줄이고 yeast extract와 glucose의 양을 높여 0.5% whey, 0.6% yeast extract, 2.25% glucose로 배지 성분을 결정하였다(표 18).

위의 결과를 기준으로 2차 fractional factorial design한 결과, 9번 시험구(control)에서 가장 높은 활성을 보였다. 이는 1차 fractional factorial design결과와 같은 결과로 A1023 균주의 배지 조성은 0.5% whey, 0.6% yeast extract, 2.25% glucose로 최종 확정하였다(표 19).

Table 18. Fractorial factorial design and results - strain A1023

Run	Whey	Yeast ext.	Glucose	Antifungal activity (mm)	
				Anthracoese	Rice blast disease
1	-1	1	1	23	40
2	1	-1	-1	14	25
3	-1	-1	-1	13	37
4	1	1	1	22	18
5	-1	-1	1	21	40
6	-1	1	-1	12	25
7	1	-1	1	21	40
8	1	1	-1	12	-
9	0	0	0	22	35

Table 19. Fractorial factorial design and results - strain A1023

Run	Whey	Yeast ext.	Glucose	Antifungal activity (mm)	
				Anthracoese	Rice blast disease
1	-1	1	1	20	32
2	1	-1	-1	19	24
3	-1	-1	-1	21	37
4	1	1	1	12	18
5	-1	-1	1	18	40
6	-1	1	-1	12	25
7	1	-1	1	21	40
8	1	1	-1	17	31
9	0	0	0	23	40

⑤ 결론

본 연구의 제2세부 물질 분리·정제 결과에서 A1022 균주 배양액을 균체와 배양상등액으로 분리하여 항균활성 검정한 결과, 균체에서 활성이 나타나는 것으로 확인되었다.

이 결과를 바탕으로 이상의 최종 결과를 재검토한 결과, 배지성분을 0.5% Soya flour, 0.2%, yeast extract, 2.25% glucose로 배양하였을 경우에는 균체에서만 활성이 나타난 반면, 0.75% Soya flour, 0.3% yeast extract, 3.375% glucose로 배양한 경우에는 균체와 배양상등액 양쪽에서 활성이 나타났다.

이는 향후 제제화시 제형에 따라 배지조성을 달리하여 배양한 후 제제화할 수 있는 유리한 점으로 판단되었다. 즉, 제형을 분상으로 제제화 할 경우엔 0.5% Soya flour, 0.2%, yeast extract, 2.25% glucose 배지를 이용하여 배양하고, 제형을 액상으로 제제화 할 경우엔 0.75% Soya flour, 0.3% yeast extract, 3.375% glucose로 배양하여 제제화 하는 것이 후 공정에 유리할 것으로 판단된다.

(4) 무기염류 검토

① 재료 및 방법

무기염류 CaCO₃, CaCl₂, KCl, K₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O, MnCl₂, NaCl, CuSO₄, ZnSO₄ 등을 최적화된 배지에 0.025%씩 각각 첨가한 후 증배양액을 2%(v/v) 접종하여 30℃, 150rpm에서 6일간 진탕배양한 후 포자수(spore cell)에 영향을 주는 무기염류를 검토하였다.

② 결 과

A1022와 A1023 균주 모두 기본배지에 complex media가 첨가 되므로 어느 정도의 무기 염류가 보충될 것으로 판단되었나, 검토 결과, A1022균주는 CaCO₃와 MgSO₄·7H₂O가 첨가 되었을 때 A1023 CaCO₃와 CuSO₄가 첨가되었을 때 배양 중 spore의 유도와 활성이 안정적인 것으로 확인되었다(표 20).

Table 20. Effect of mineral sources on the production of the antifungal metabolite and spore by A1022 and A1023

Medium	A1022		A1023	
	spore density (cfu/mL)	activity (mm)	spore density (cfu/mL)	activity (mm)
CaCO₃	1.2E+ 7	23	2.3E+ 7	21
CaCl ₂	3.7E+ 6	20	4.6E+ 6	20
KCl	5.8E+ 5	21	4.8E+ 6	19
K ₂ HPO ₄	3.3E+ 6	20	4.4E+ 6	19
MgSO₄·7H₂O	2.1E+ 7	21	2.2E+ 6	19
MnCl ₂ ,	7.3E+ 5	22	8.9E+ 5	21
NaCl	5.2E+ 6	20	3.2E+ 6	20
CuSO ₄	5.0E+ 6	20	2.2E+ 7	22
ZnSO ₄	4.1E+ 6	19	3.0E+ 6	20
Control	4.5E+ 6	23	5.2E+ 6	22

(5) Flask 수준에서 물리적 조건 검토

위에서 최적화된 배지를 이용하여 초기 pH , 배양온도, 배양기간 등을 검토하였다.

(가) 초기 pH 검토

① 재료 및 방법

초기 pH가 미치는 영향을 검토하기 위하여 나. 1) 항에서 선발된 배지의 pH를 0.1N HCl, NaOH를 이용하여, 5, 7, 9로 각각 조정하여 멸균하고, 증배양액을 2%(v/v) 접종한 후 30 °C, 150rpm에서 6일간 진탕배양한 후 탄저병에 대한 항균성의 차이를 확인하였다.

② 결 과

A1022와 A1023 균주 모두 초기 pH가 산성인 경우에는 탄저병에 대한 항균활성이 낮은

반면, 중성과 알칼리성에서는 활성이 높았고, 특히 중성에서 활성이 가장 높은 것으로 확인되어 A1022균주 배양시 초기 pH는 6.5로 확정하였다(그림 7).

배지 멸균 후의 pH가 6.5 정도이므로 pH 조정 없이 바로 접종 가능할 것으로 판단된다. 또, 초기 pH가 산성일 경우, 초기 균사 성장을 억제하여 활성물질의 생성에 좋지 않은 영향을 주는 것으로 나타나는데, 이는 질소원 중 Corn steep liquor를 사용한 경우와 유사한 결과를 보였다.

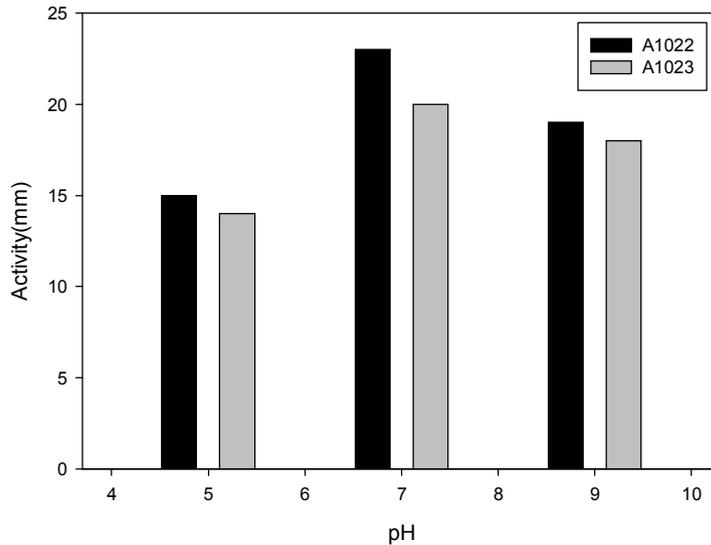


Fig 7. Effect of initial pH on the production of the antifungal metabolite by A1022 and A1023

(나) 배양온도

① 재료 및 방법

배양온도에 따른 항균활성의 차이를 검토하기 위하여 나. 1) 항에서 선발된 배지에 종배양액 2%(v/v) 접종한 후 25, 30, 35℃에서 150rpm으로 6일간 각각 배양한 후 탄저병에 대한 항균활성의 차이를 확인하였다.

② 결과

A1022와 A1023 균주 모두 25℃에서 35℃ 사이에서 균 성장은 하나, 30℃에서 적당한 균사 생육과 탄저병에 대한 활성물질 생성이 가장 효과적인 것으로 확인되었다(그림 8). 25℃에서는 균사의 생육속도가 다소 느려졌고, 35℃에서는 균사의 생육만 빠른 속도로 나타났다.

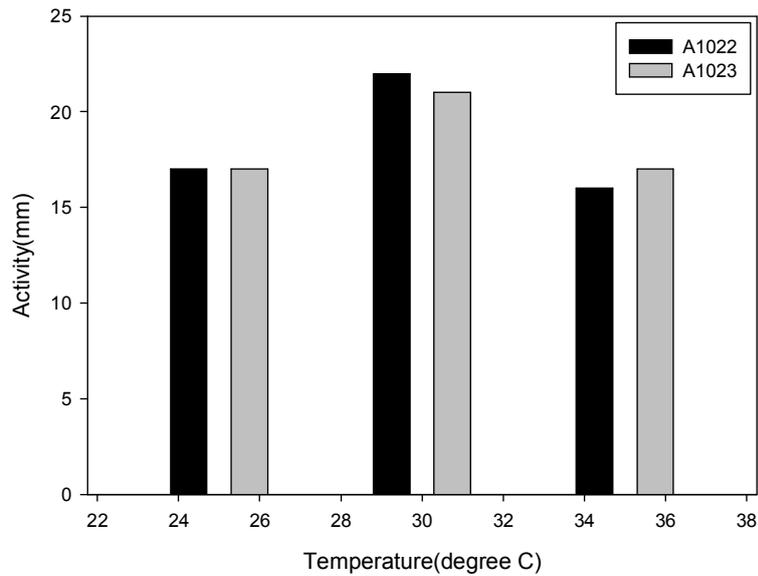


Fig 8. Effect of temperature on the production of the antifungal metabolite by A1022 and A1023

(다) 배양기간

① 재료 및 방법

배양기간에 따른 각 균주의 항균활성의 차이를 확인하기 위하여 나. 1) 항에서 선발된 배지에 종배양액 2%(v/v) 접종한 후 배양 72시간부터 216시간까지 24시간 간격으로 시료를 취하여 탄저병 및 벼도열병에 대한 항균활성을 검정하여 적정 배양기간을 확인하였다.

② 결 과

탄저병은 72시간부터 활성이 나타나 120시간 정도에 최대 활성을 보이며 안정화되었고, 벼도열병은 96시간부터 활성이 나타나 144시간째 최대 활성을 보이며 안정화되었다. 즉, 탄저병에 대한 활성물질은 배양 전반부에 도열병에 대한 활성물질은 탄저병에 비해 약 24시간 후에 시간차를 두고 생산되는 것으로 확인되어, Flask 수준에서의 적정 배양기간은 배양 120시간 정도에서 2가지 식물병원균에 대하여 활성이 가장 높은 것으로 나타나 이 시점을 end point로 결정하였다(그림 9, 10).

향후 500L까지 scale up 할 경우, end point는 24-48시간 정도 앞당겨져 총 배양기간은 3일-4일 정도가 될 것으로 예측된다.

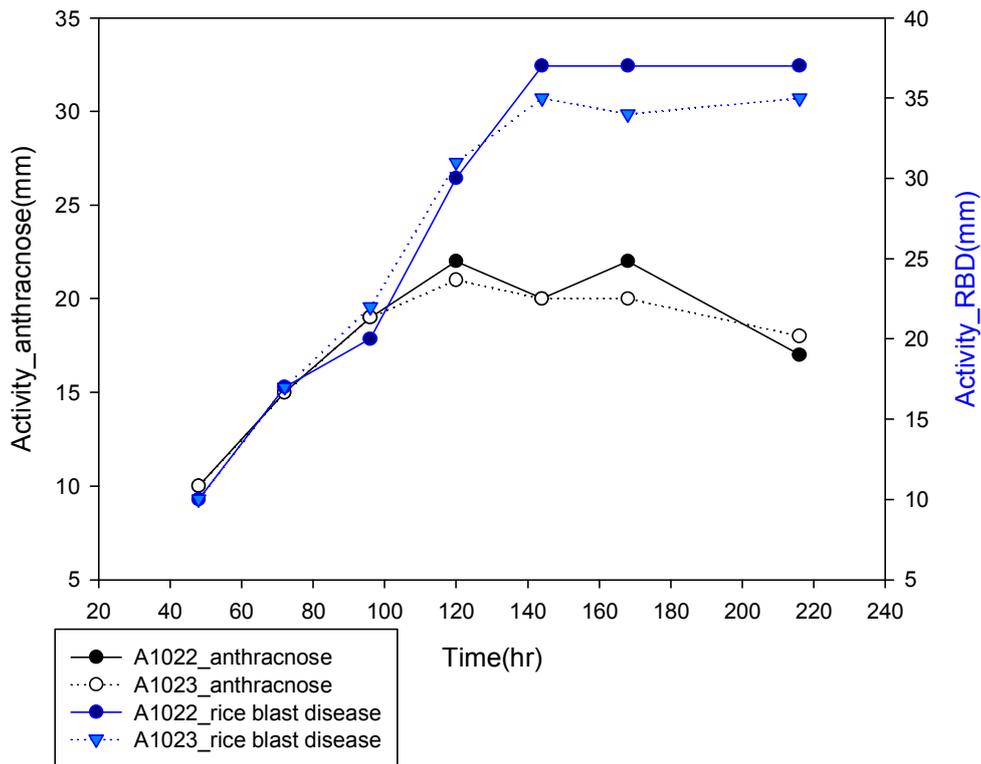


Fig 9. Culture profile of the strain A1022 and A1023 on the selected medium based on time course

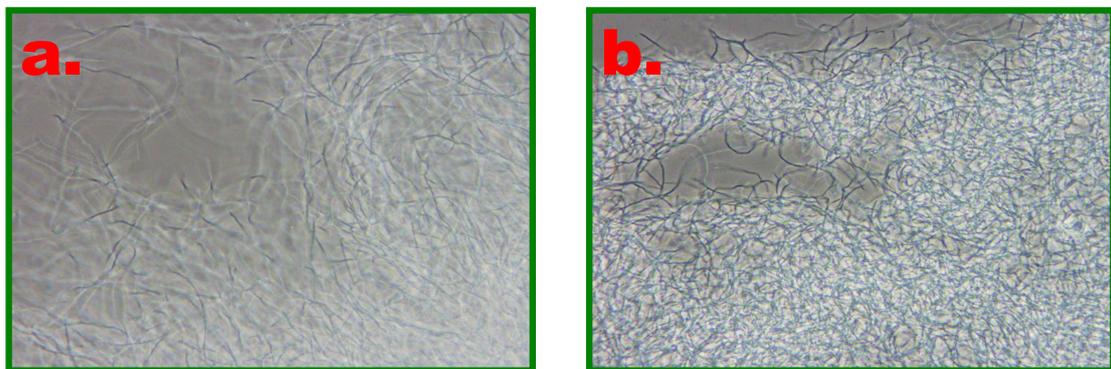


Fig 10. Light microscope observation of *Streptomyces* sp. A1023 mycelium at 48h(a,1,000) and 148hr(b,1,000)

③ 결론

flask 수준에서 배지조성 및 물리적 조건을 검토한 결과, A1022 및 A1023 모두 항균활성이 우수한 것으로 나타났으나, 배양 공정 scale up과 제제화 공정을 고려할 때 A1022균주가 더 유리할 것으로 판단되어 이후의 실험은 A1022균주를 대상으로 포자수 확보, 탄저병, 벼도열병에 대한 활성을 기준으로 최적화 하였다.

(6) Jar fermenter 수준에서 물리적 조건 검토

(가) aeration 조건 검토

① 재료 및 방법

5L jar fermenter에 working volume 3L로 조정하고, 종배양액을 2%(v/v) 접종한 후 aeration 조건을 0.1~1.0vvm으로 각각 조정하여 배양하면서 항균활성 및 포자수에 미치는 영향을 검토하였다.

② aeration 검토 결과

A1022균주는 호기성 세균으로 산소량이 높아질수록 포자수 확보, 탄저병, 벼도열병에 대한 활성이 높아지는 것으로 나타났으나, 배양 초기부터 60시간 사이에는 foam이 발생되어 산소량 0.5vvm 조건으로 배양하고, 배양 60시간 이후에는 0.7vvm 수준까지 산소량을 높이는 것이 항균활성 및 포자수 확보에 적합한 것으로 확인되었다(표 21).

Table 21. Effect of aeration on the production of the antifungal metabolite and spore by A1022

Aeration (vvm)	spore density (cfu/mL)	activity (mm)	
		Anthraco-nose	Rice blast disease
0.1	2.9E+7	23	36
0.2	3.5E+7	23	35
0.4	4.4E+7	23	36
0.8	5.6E+7	23	36
1.0	6.1E+7	24	37

(나) agitation 조건

① 재료 및 방법

5L jar fermenter에 working volume 3L로 조정하고, 종배양액 2%(v/v) 접종한 후 agitation 조건을 200~400rpm으로 각각 조정하여 배양하면서 항균활성 및 포자수에 미치는 영향을 검토하였다.

② agitation 검토 결과

호기성 세균인 A1022는 agitation 계수가 높아질수록 포자수 확보, 탄저병, 벼도열병에 대한 활성이 높아지는 것으로 나타나 aeration 결과와 일치한다. 배양 초기부터 60시간 사이에는 foam이 발생되어 agitation 계수를 300rpm으로 배양하고, 배양 60시간 이후에는

400rpm 수준까지 높이는 것이 항균활성 및 포자수 확보에 적합한 것으로 확인되었다(표 22).

Table 22. Effect of agitation on the production of the antifungal metabolite and spore by A1022

	spore density (cfu/mL)	activity (mm)	
		Anthracnose	Rice blast disease
200	4.0E+ 7	23	35
300	5.1E+ 7	24	36
400	5.8E+ 7	24	37

(다) 종배양액 접종농도 조건

① 검토 방법

5L jar fermenter에 working volume 3L로 조정하고, 종배양액을 1%~10%(v/v) 접종한 후 각각 배양하면서 항균활성 및 포자수에 미치는 영향을 검토하였다.

② 결 과

접종농도 4%까지는 종배양액의 접종농도가 증가할수록 배양일수가 줄어드는 반면, 접종농도가 8% 이상이 되면 배양일수도 더 이상 줄어들지 않을 뿐만 아니라, 배양 중 vegetative cell의 관찰이 증가되는 것이 확인되었다. 이는 종배양액의 접종농도가 높아질수록 한정된 배지 성분에서 균들의 생육경쟁에 의한 결과로 판단된다(표 23).

따라서 종배양액의 접종농도는 5% 이내가 적절한 것으로 나타나, 이후 실험에서는 접종농도를 4%를 기준하였다.

Table 23. Effect of inoculum size on the spore density and culture period

Inoculum size (%)	spore density(cfu/mL)	culture period (hrs)
1	2.6E+ 7	115
2	4.0E+ 7	110
4	7.2E+ 7	105
8	5.4E+ 7	107
10	4.1E+ 7	109

(7) 시생산

(가) Jar fermenter

① 재료 및 방법

Working volume 3L, agitation 300rpm, aeration 0.5 vvm, 종배양액 4%(v/v)되게 접종한 후 120시간 배양하면서 활성물질과 포자수, pH, 용존산소량(DO)의 변화를 검토하여 5L 규모에서의 배양 profile을 확보하였다.

② 결 과

pH는 초기 6.2 ± 0.2 에서 시작하여 초기에 다소 떨어지다가 60시간 이후 급격히 상승하여 end point에서 7.5이상으로 상승하였고, 용존산소는 초기에는 95% 정도의 산소포화도를 보이다가 50시간 이후 50% 이하로 감소하여 agitation을 400rpm, aeration을 0.7vvm 수준으로 증가시켜 용존산소량을 50% 수준 이상으로 유지시켰다. 전체배양기간은 flask 배양에 서보다 11시간 앞당겨져 109시간째 배양이 종결되었으며, 포자수와 항균활성도 다소 상승하는 것으로 나타났다(표 24, 그림 11).

Table 24. Culture conditions of the strain A1022 on 5L jar fermenter

Conditions	
Culture Vol.(L)	3.0 / 5.0
Inoculum size (%)	4
Culture period (hrs)	109
Agitation (rpm)	300(0-60hr) → 400(60hr-end point)
Aeration (vvm)	0.5(0-60hr) → 0.7(60hr-end point)
Culture temp. (°C)	30 ± 1°C
Initial pH	6.2 ± 0.2
Media composition	0.75% soya flour, 0.3% yeast extrac, 3.375% glucose 0.025% CaCO ₃ , 0.025% MgSO ₄ ·7H ₂ O

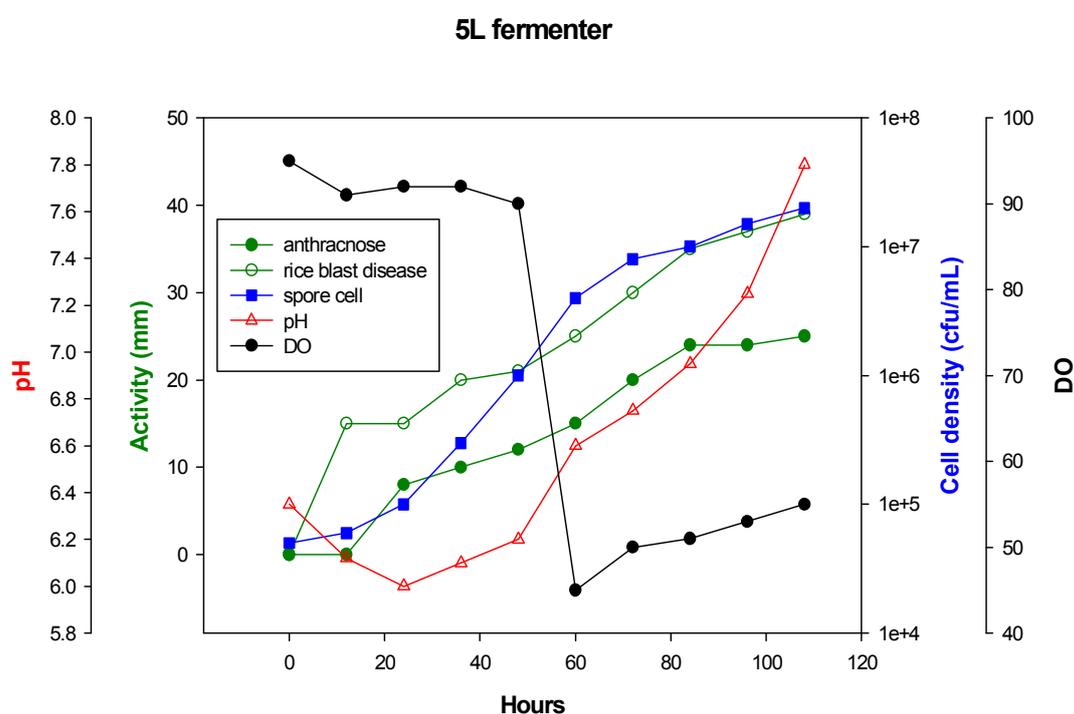


Fig 11. Culture profile of the strain A1022 on the selected conditions based on time course (5L)

(나) 50L 발효

① 재료 및 방법

Working volume 30L, agitation 200rpm, aeration 0.5 vvm, 종배양액 4%(v/v)되게 접종한 후 120시간 배양하면서 활성물질과 포자수의 변화를 검토하여 50L 규모에서의 배양 profile을 확보하였다.

② 결 과

pH는 초기 6.2 ± 0.2 에서 시작하여 초기에 다소 떨어지다가 40시간 이후 급격히 상승하여 end point에서 7.5이상으로 상승하였고, 용존산소는 초기에는 95% 정도의 산소포화도를 보이다가 36시간 이후 50% 이하로 감소하여 agitation을 300rpm, aeration을 0.7vvm 수준으로 증가시켜 용존산소량을 50% 수준 이상으로 유지시켰다. 전체배양기간은 jar fermenter에 비해 13시간 정도 앞당겨져 96시간째 배양이 종결되었으며, 이 때 항균활성과 spore의 회수율도 가장 안정적인 것으로 나타났다.

50L 배양을 500L의 종배양액으로 사용 시에는 등 point를 72정도로 정한 후 이를 500L의 종배양액으로 사용하는 것이 적합하였다. 이는 완전 성숙된 spore를 seed로 사용하는 것에 비해 균사의 생장이 활발하여 성장을 멈추기 직전이 적정 시기로 판단되었다(표 25, 그림 12).

Table 25. Culture conditions of the strain A1022 on 50L fermenter

Conditions	
Culture Vol.(L)	30 / 50
Inoculum size (%)	4
Culture period (hrs)	96
Agitation (rpm)	200(0-44hr) → 300(44hr-end point)
Aeration (vvm)	0.5(0-44hr) → 0.7(44hr-end point)
Culture temp. (°C)	$30 \pm 1^\circ\text{C}$
Initial pH	6.2 ± 0.2
Media composition	0.75% soya flour, 0.3% yeast extrac, 3.375% glucose 0.025% CaCO ₃ , 0.025% MgSO ₄ ·7H ₂ O

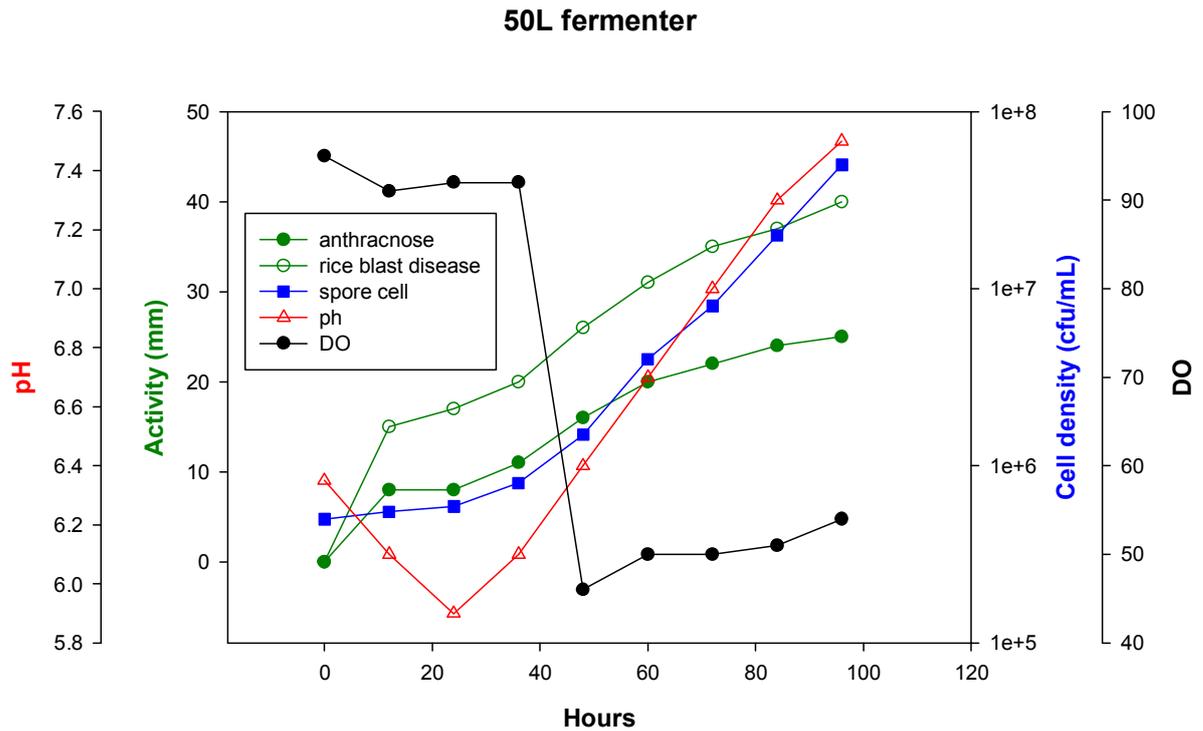


Fig 12. Culture profile of the strain A1022 on the selected conditions based on time course (50L)

(다) 500L 발효

① 재료 및 방법

Working volume 300L, agitation 150rpm, aeration 0.3 vvm, 종배양액 4%(v/v)되게 접종한 후 120시간 배양하면서 활성물질과 포자수의 변화를 검토하여 50L 규모에서의 배양 profile을 확보하였다.

② 결과

pH는 초기 6.2 ± 0.2 에서 시작하여 초기에 다소 떨어지다가 24시간 이후 급격히 상승하여 end point에서 7.5이상으로 상승하였고, 용존산소는 초기에는 95% 정도의 산소포화도를 보이다가 30시간 이후 50% 이하로 감소하여 agitation을 200rpm, aeration을 0.5vvm 수준으로 증가시켜 용존산소량을 50% 수준 이상으로 유지시켰다. 전체배양기간은 50L fermenter에 비해 14시간 정도 앞당겨져 82시간째 배양이 종결되었으며, 이 때 항균활성과 spore의 회수율도 가장 안정적인 것으로 나타났다(표 26, 그림 13).

Table 26. Culture conditions of the strain A1022 on 500L fermenter

Conditions	
Culture Vol.(L)	300 / 500
Inoculum size (%)	4
Culture period (hrs)	82
Agitation (rpm)	150(0-31hr) → 200(31hr-end point)
Aeration (vvm)	0.3(0-31hr) → 0.5(31hr-end point)
Culture temp. (°C)	30 ± 1°C
Initial pH	6.2 ± 0.2
Media composition	0.75% soya flour, 0.3% yeast extract, 3.375% glucose 0.025% CaCO ₃ , 0.025% MgSO ₄ ·7H ₂ O

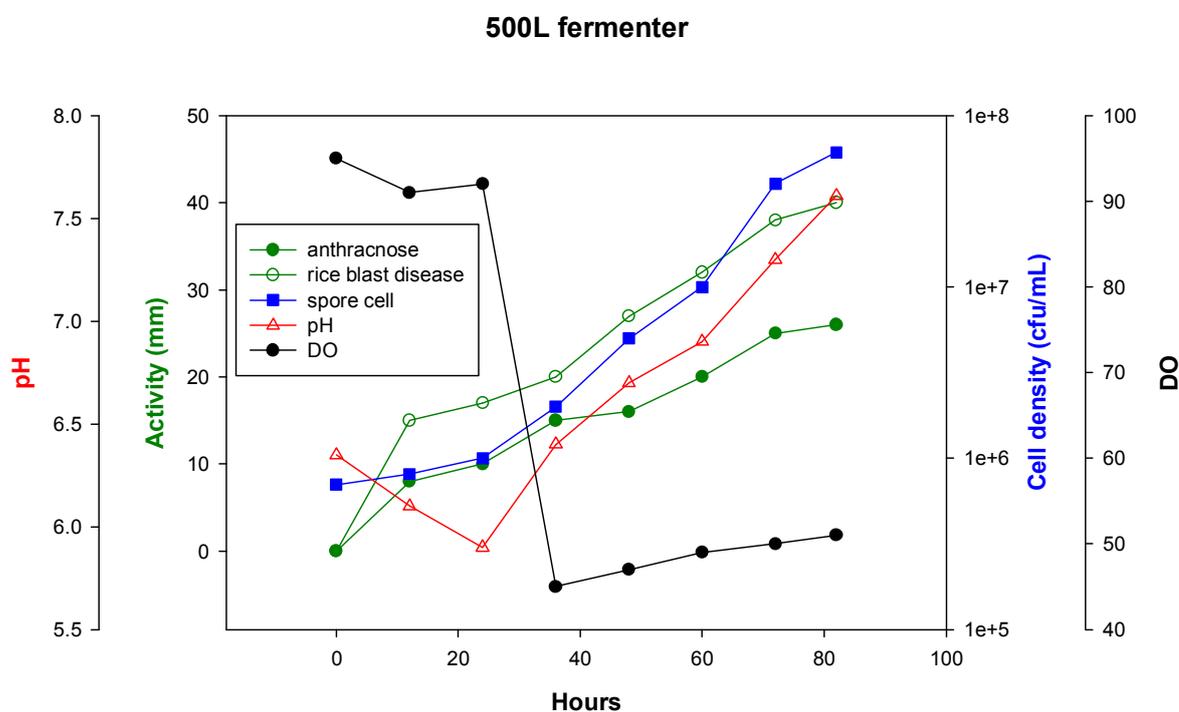


Fig 13. Culture profile of the strain A1022 on the selected conditions based on time course (50L)



Fig 14. 50L, 500L fermenter

(라) 시생산 결론

A1022 균주를 5L, 50L, 500L 순차적으로 시생산 결과, 전체적으로는 균주는 호기성 세균으로 배양 초기 균사성장 등 1차 성장을 하다가 배양 중반 이후 산소요구량이 급격히 늘어나면서 탄저병 및 벼도열병에 대한 활성물질을 생성하는 것으로 확인되었다(표 27).

또, 벼도열병에 대한 활성물질은 탄저병에 대한 활성물질에 비해 약 20시간 먼저 생성이 되는데, 이 요인은 공업화 상품화 시 매우 유리한 조건으로 필요에 따라 배양기간을 달리하여 배양하면 매우 효율적 요인으로 판단된다.

표 27. 발효공정 표준 지침

	Flask (1st seed)	jar fermenter	50L (2nd seed)	500L (Main culture)
Culture Vol.(L)	0.25/1	3/5	30/50	300/500
Inoculum size (%)	4	4	4	4
Culture period (hrs)	120	109	96	82
Agitation (rpm)	150	300 → 400	200 → 300	150 → 200
Aeration (vvm)		0.5 → 0.7	0.5 → 0.7	0.3 → 0.5
Culture temp. (°C)	29 ± 1°C	29 ± 1°C	29 ± 1°C	29 ± 1°C
Initial pH	6.1 ± 0.2	6.1 ± 0.2	6.1 ± 0.2	6.1 ± 0.2
Media composition	0.75% soya flour, 0.3% yeast extract, 3.375% glucose 0.025% CaCO ₃ , 0.025% MgSO ₄ ·7H ₂ O			
Activity anthracnose(mm)	23	25	25	26
Activity rice blast disease(mm)	37	39	40	40
Spore density (cfu/mL)	5.1E+6	2.2E+7	5.6E+7	6.1E+7

4. *Streptomyces* sp. A1022의 제형화 소재 개발 및 제제화 공정 확립

가. *Streptomyces* sp. A1022 배양액을 이용한 제형화 소재 개발

Streptomyces sp. A1022의 제제화 소재개발 및 공정 검토는 농촌진흥청 고시 제 2010-3호에 준하여 수화제 및 액상수화제의 검토항목을 기준으로 시험하였으며, *Streptomyces* sp. A1022의 항균활성 및 포자수의 경시변화 등을 기준으로 적정부제 및 보조제를 선별하고, 최종 제제화 공정을 확립함.

(1) 배양액의 물리적 안정성 검토

물리적 안정성 검토는 가) 열안정성, 2) 물리적 안정성 등을 검토함.

(가) 열 안정성

본 시험의 목적은 *Streptomyces* sp. A1022의 활성물질과 포자의 제제화 과정에서 발생하는 열(저온과 고온)에 대한 안정성과 제제화 후 경시보존성 확보를 목표로 함. 열 안정성 확보는 장비 사용 가능성 여부 및 공정 진행의 중요 판단 요건임.

① 재료 및 방법

Streptomyces sp. A1022 배양액을 멸균증류수로 희석하여 포자수를 $1.0E+7$ cfu/mL로 일정하게 맞춘 후 각각 열처리함.

냉동, 냉장, 상온(28℃)은 각 온도에서 시료를 보존하면서 *Streptomyces* sp. A1022의 활성 및 포자수에 대한 경시를 관찰하였고, 60℃, 90℃ 조건은 각 온도에서 30분간 각각 열처리한 후 상온(28℃)에 보존하면서 *Streptomyces* sp. A1022의 활성 및 포자수에 대한 경시 관찰 하였음. 121℃ 조건은 배양액을 autoclave 한 후 상온(28℃)에 보존하면서 활성 및 포자수에 대한 안정성 및 보존성을 경시관찰 함.

활성검정은 고추탄저병과 벼도열병을 대상으로 약 240일간(2010. 5. 11. ~ 2011. 1. 6.) 관찰하였고, 고추열매를 이용한 생물검정은 중간에 한 번씩 실시하였음.

② 결과

냉동조건은 0일부터 최종 240일까지 *Streptomyces* sp. A1022의 활성물질과 포자의 안정성 및 보존성이 매우 안정적임.

냉장과 상온 조건에서는 *Streptomyces* sp. A1022 활성물질과 포자의 안정성 및 보존성이 날씨가 경과함에 따라 일정하게 감소하는 것으로 나타남.

60℃ 열처리구는 *Streptomyces* sp. A1022 활성물질과 포자의 안정성 및 보존성은 냉동 보존에 비해서는 떨어지는 것으로 확인되나, 냉장과 상온에 비해 안정적인 것으로 나타남.

90℃와 121℃ 열처리 시험구는 *Streptomyces* sp. A1022 활성물질과 포자의 안정성 및 보존성을 감소시키는 것으로 나타남(표 28, 29, 30).

표 28. 열처리 배양액의 고추탄저병에 대한 항균활성 경시

(단위: mm)

경과일수	냉동	냉장	상온	60℃열처리	90℃ 열처리	autoclave
0	22.5	22.0	22.5	22.0	18.5	12.0
10	22.5	21.7	19.5	21.0	17.0	11.0
30	22.0	21.0	18.2	20.5	16.7	10.0
60	21.7	20.5	16.6	21.0	17.2	
90	21.5	19.2	15.2	20.7	15.4	
120	21.0	18.5	14.3	20.4	14.2	
150	20.7	17.0	13.0	20.0	13.1	
200	21.0	16.1	12.2	19.5	12.0	
240	20.6	15.0	12.5	19.6	12.5	

표 29. 열처리 배양액의 벼도열병에 대한 항균활성 경시

(단위: mm)

경과일수	냉동	냉장	상온	60℃열처리	90℃ 열처리	autoclave
0	41.0	41.0	41.0	39.0	37.0	14.5
10	41.0	40.5	40.2	39.0	36.1	11.0
30	41.0	40.5	40.5	39.0	35.6	10.0
60	41.0	39.5	39.2	39.0	35.2	
90	41.0	37.2	37.7	38.0	34.6	
120	39.6	35.1	35.1	38.5	34.1	
150	40.2	34.7	33.8	38.7	33.2	
200	41.0	32.2	32.2	38.6	33.0	
240	41.2	32.1	31.3	38.5	32.5	

표 30. 열처리 배양액의 포자수 경시

(단위: cfu/mL)

경과일수	냉동	냉장	상온	60℃ 열처리	90℃ 열처리	autoclave
0	1.0E+7	1.0E+7	1.2E+7	9.8E+6	9.2E+5	-
10	9.7E+6	9.5E+6	9.8E+6	9.6E+6	9.2E+5	
30	1.0E+7	1.0E+7	1.0E+7	9.7E+6	9.0E+5	
60	6.5E+6	9.6E+6	6.4E+6	9.8E+6	8.0E+5	
90	5.8E+6	8.9E+6	3.2E+6	8.5E+6	4.5E+5	
120	5.2E+6	7.5E+6	9.2E+5	7.6E+6	2.6E+5	
150	4.1E+6	5.7E+6	5.7E+5	6.2E+6	9.2E+4	
200	3.4E+6	3.8E+6	3.7E+5	6.1E+6	6.7E+4	
240	1.5E+6	2.6E+6	5.4E+5	5.6E+6	5.6E+4	

(나) 물리적 안정성

본 시험의 목적은 *Streptomyces* sp. A1022 제제화 과정 중 공정상에서 발생하는 물리적 마찰력, 그 때 발생하는 열에 대한 안정성 확보, 제제화 후 사용상의 편리성 확보를 목표로 함. 즉, *Streptomyces* sp. A1022를 수화제로 제제화시 배양액 중 균체는 살포시 노즐 막힘의 원인이 될 수 있으므로 분쇄공정을 추가하여 균체를 분쇄하여야 함.

① 재료 및 방법

Streptomyces sp. A1022 배양액을 실험실용 분쇄기로(Waring, Model No. 51BL30) 22,000rpm, 3분간 연속 분쇄한 후 *Streptomyces* sp. A1022 활성물질과 포자수의 안정성 및 보존성을 경시관찰 함.

활성검정은 고추탄저병과 벼도열병을 대상으로 약 240일간(2010. 5. 11. ~ 2011. 1. 6.) 관찰하였고, 고추열매를 이용한 생물검정은 중간에 한 번씩 실시하였음.

② 결과

배양액 분쇄 전에는 균체의 입도가 50mesh(300 μ m)에서 98% 통과하는 반면, 분쇄 후에는 200mesh(75 μ m)에서 98% 통과하는 것으로 확인됨.(그림 15).

Streptomyces sp. A1022 배양액을 분쇄한 시험구의 활성물질과 포자의 안정성 및 보존성은 분쇄하지 않은 무처리구와 유사한 수준인 것으로 확인되어 분쇄에 대한 물리적 힘과 이때 발생하는 열에 대한 안정성 확보됨(그림 16).



그림 15. *Streptomyces* sp. A1022 배양액 분쇄 전 · 후 입도 비교
A. 분쇄전 배양액, B. 분쇄후 배양액

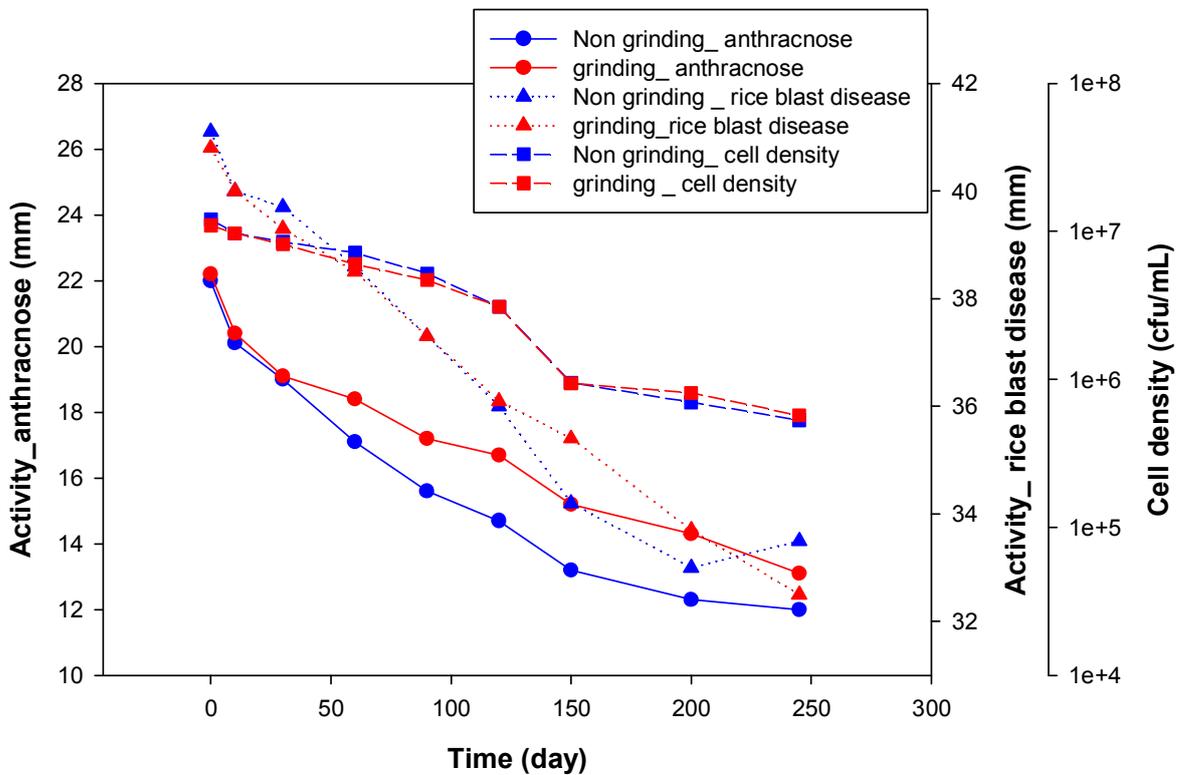


그림 16. 고추탄저병, 벼도열병 및 포자수의 분쇄시험구와 무처리구의 안정성비교

(2) 제형화 소재 개발

본 시험의 목적은 *Streptomyces* sp. A1022 제제화의 용이성 확보와 제제화 후 시제품의 활성물질과 포자의 안정성 및 보존성에 기여하고, 포장에서 시제품 살포시 보조적 역할을 할 수 있는 보조제 및 증량제 선발을 목표로 함.

가) 아미노산, 나) 계면활성제, 다) 증량제 물성 확인, 라) 증량제 선발 등을 검토함.

(가) 아미노산

① 재료 및 방법

Streptomyces sp. A1022 배양액에 Tryptophan, Tyrosine, Histidine, Arginine, Proline, Valine, Leucine, Methionine 등 8가지의 아미노산을 5%(w/v)씩 각각 처리한 후 아미노산의 처리가 *Streptomyces* sp. A1022 활성물질과 포자의 안정성 및 보존성에 미치는 영향을 경시관찰 함. 활성검정은 고추탄저병과 벼도열병을 대상으로 약 210일간(2010. 6. 8. ~ 2011. 1. 3.) 관찰하였고, 고추열매를 이용한 생물검정도 실시하였음.

② 결과

고추탄저병에 대한 활성은 tryptophan, histidine, valine, leucine 등의 아미노산 처리구가 무처리구에 비해 높은 것으로 나타남(표 31). 벼도열병에 대한 활성은 tryptophan, tyrosine, proline, valine, leucine 등의 아미노산 처리구가 무처리구에 비해 높은 것으로 나타남(표 32). 포자보존성은 tyrosine, leucine 등의 처리구가 무처리구에 비해 높은 것으로 나타남(표 33). Arginine과 methionine 처리구는 활성물질과 포자의 안정성 및 보존성이 모두 좋지 않은 것으로 확인됨.

표 31. 아미노산 처리 배양액의 고추탄저병에 대한 항균활성 경시

(단위: mm)

경과 일수	L-Try	L-Tyr	L-His	L-Arg	L-Pro	L-Val	L-Leu	L-Met	무처리
0	21.5	22.0	21.9	21.7	22.1	22.0	21.6	21.8	22.1
30	20.1	21.3	20.3	20.5	20.9	20.7	20.0	20.1	20.5
60	18.2	18.3	19.0	18.3	16.0	16.3	16.3	16.7	17.3
90	18.4	19.7	19.3	16.3	18.0	18.0	18.0	17.7	17.3
120	18.0	18.7	19.3	18.7	19.0	18.7	19.0	17.7	17.7
150	17.0	18.0	17.7	17.3	16.7	17.0	16.7	15.3	16.7
180	16.3	17.0	15.7	14.3	16.7	17.0	16.7	15.0	17.3
210	15.8	14.0	16.0	14.7	14.0	16.3	17.3	12.3	16.3

표 32. 아미노산 처리 배양액의 벼도열병에 대한 항균활성 경시

(단위: mm)

경과 일수	L-Try	L-Tyr	L-His	L-Arg	L-Pro	L-Val	L-Leu	L-Met	무처리
0	41.0	40.7	40.2	40.3	40.8	40.6	40.2	40.3	41.0
30	40.2	39.7	39.3	39.5	39.3	40.8	40.7	40.9	40.1
60	41.5	39.5	39.5	28.0	40.1	40.0	40.5	39.0	39.2
90	39.1	39.0	38.5	27.0	40.2	40.0	40.0	38.0	38.0
120	39.7	39.3	37.3	21.3	40.3	40.3	40.0	35.3	36.8
150	38.7	38.7	33.3	21.0	40.0	40.0	39.3	32.3	35.5
180	37.1	39.0	31.0	22.0	38.5	38.5	38.5	26.5	33.5
210	35.0	38.2	23.5	19.2	37.1	36.4	37.1	20.2	32.7

표 33. 아미노산 처리 배양액의 포자수 경시

(단위: cfu/mL)

경과 일수	L-Try	L-Tyr	L-His	L-Arg	L-Pro	L-Val	L-Leu	L-Met	무처리
0	1.7E+7	1.9E+7	1.5E+7	1.3E+7	1.9E+7	1.2E+7	1.0E+7	1.6E+7	1.5E+7
30	1.1E+7	1.3E+6	9.8E+6	9.6E+6	8.2E+6	9.6E+6	1.8E+7	8.9E+6	1.0E+7
60	9.4E+6	4.3E+5	1.0E+6	6.7E+5	6.9E+5	3.9E+6	9.2E+6	1.9E+6	8.8E+6
90	8.2E+6	6.1E+3	4.3E+5	2.9E+5	1.8E+4	6.7E+5	8.5E+6	8.0E+5	4.2E+6
120	7.3E+6	7.5E+2	3.6E+5	8.8E+4	3.7E+2	2.7E+5	7.3E+6	2.3E+5	1.7E+6
150	6.1E+6	-	1.0E+5	3.6E+4	-	8.4E+4	4.9E+6	7.2E+4	8.2E+5
180	5.2E+6	-	5.4E+4	7.7E+3	-	3.1E+4	3.2E+6	8.0E+3	5.7E+5
210	3.1E+6	-	2.1E+4	4.3E+3	-	4.2E+3	1.9E+6	8.3E+2	3.5E+5

(나) 계면활성제

본 시험의 목적은 *Streptomyces* sp. A1022 활성물질과 포자의 안정성 및 보존성을 유지 하면서, *Streptomyces* sp. A1022을 포장에서 살포시 외부환경에서 고착성, 보습성, 확산성 등을 증가시키는 계면활성제 선발을 목표로 함.

① 재료 및 방법

농업용으로 사용되는 계면활성제 6종을 표 34과 같이 미리 선발한 후 *Streptomyces* sp. A1022 배양액에 각각 5%(w/v)씩 각각 처리한 후 계면활성제의 처리가 *Streptomyces* sp. A1022 활성물질과 포자수의 안정성 및 보존성에 미치는 영향을 경시관찰 함.

활성검정은 고추탄저병과 벼도열병을 대상으로 약 30일간(2010. 7. 1. ~ 2010. 7. 30.) 관찰하였고, 고추 유묘와 성체를 이용한 생물검정은 중간에 한 번씩 실시함.

표 34. 계면활성제 list

No.	Composition	CAS. No.	Remarks
1	polyoxyethylene lauryl amine	61791-14-8	농약공업용; 액제용 유화제
2	polyoxyethylene tallow amine	26635-92-7	농약공업용; 액제용 유화제
3	polyethylene glycol mono ether	99734-09-5	
4	polyoxyethylene nonylphenyl ether	68412-54-4	농약공업용; 습윤, 분산, 침투, 유화제
5	polyoxyethylene castor ether	61791-12-6	농약공업용; 유화제, 가용화제
6	polyoxyethylene polyoxypropylene derivatives	9003-11-6	농약공업용

② 결과

계면활성제 처리에 의해 *Streptomyces* sp. A1022 활성과 포자의 안정성 및 보존성이 크게 영향을 받지 않는으나, 4.polyoxyethylene nonylphenyl ether, 5.polyoxyethylene castor ether, 6.polyoxyethylene polyoxypropylene derivatives 등의 처리구가 무처리구에 비해 고추탄저병과 벼도열병에 대한 활성과 포자의 보존성이 다소 높은 것으로 확인됨(그림 17, 18, 표 35).

또, 자사온실에서 고추유묘를 대상으로 한 살포시험에서는 polyoxyethylene nonylphenyl ether가 분산력 및 고착력이 뛰어난 것으로 확인되었고, 계면활성제 자체적으로 습윤, 분산, 침투, 유화제의 기능이 있어 본 공업화 공정의 적합한 계면활성제로 판단됨.

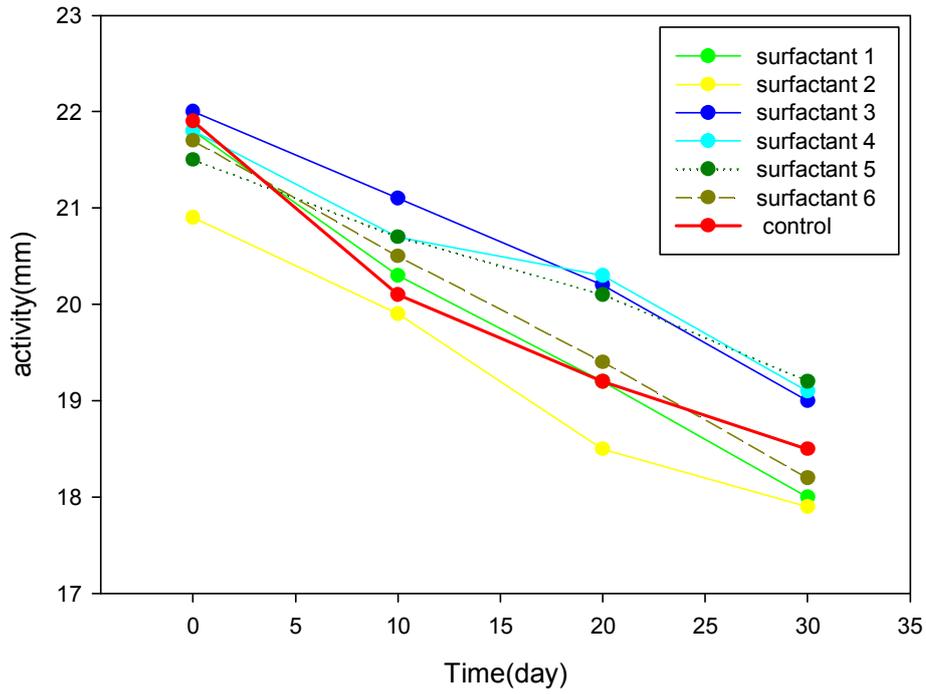


그림 17. 계면활성제 처리 배양액의 고추탄저병에 대한 항균활성 경시

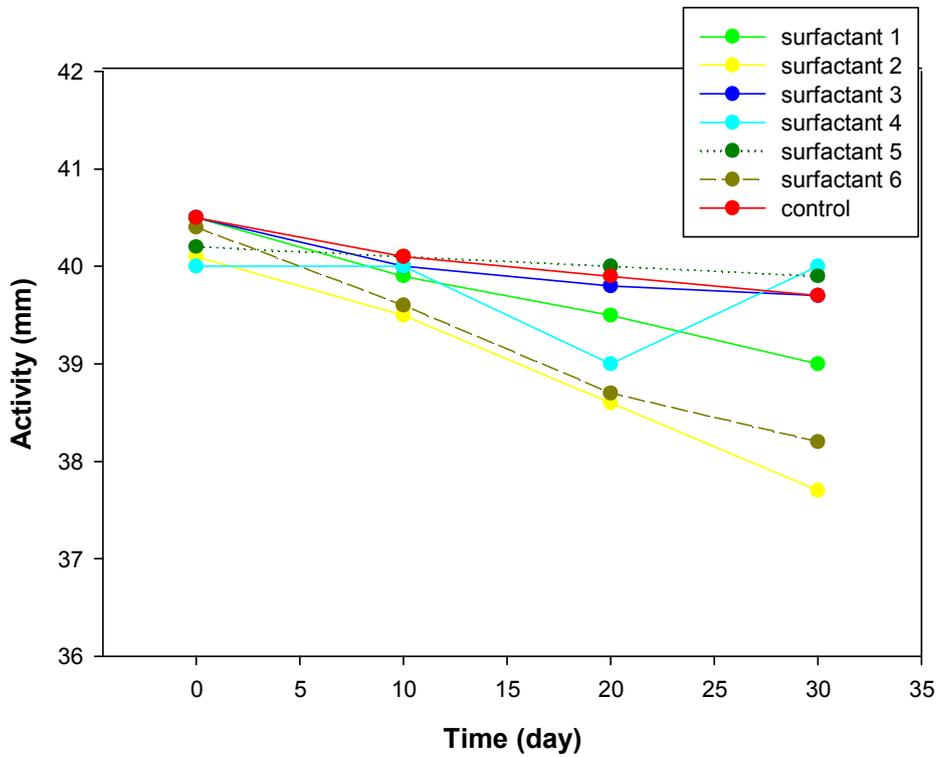


그림 18. 계면활성제 처리 배양액의 벼도열병에 대한 항균활성 경시

표 35. 계면활성제 처리 배양액의 포자수 경시

(단위: cfu/mL)

경과일수	1	2	3	4	5	6	무처리
0	1.2E+7	1.1E+7	1.2E+7	1.2E+7	1.1E+7	1.2E+7	1.1E+7
10	9.7E+6	9.5E+6	9.5E+6	1.0E+7	9.7E+6	9.5E+6	9.9E+6
20	9.3E+6	9.1E+6	9.5E+6	9.7E+6	9.6E+6	9.4E+6	9.8E+6
30	8.9E+6	9.0E+6	9.6E+6	9.7E+6	9.5E+6	9.2E+6	9.5E+6

(다) 증량제 선발

본 시험의 목적은 액상수화제 또는 수화제 형태의 제형화에 사용된 증량제가 *Streptomyces* sp. A1022 활성물질과 포자의 안정성 및 보존성에 미치는 영향을 검토한 후 적합한 증량제를 선발함.

농업용으로 사용할 수 있는 증량제는 mineral carrier와 miscellaneous carrier 등이 있고, 그 종류로는 celite, clay, perlite, silicon dioxide, vermiculite, zeolite, glucose, lactose 등이 있고, 이 중 celite와 silicon dioxide는 흡습성이 강해 수화제 형태의 생물농약에 적합하고, glucose와 lactose는 보조제 및 동결방지제로서 적합함.

① 재료 및 방법

Streptomyces sp. A1022 배양액에 증량제를 5%(w/v)씩 각각 처리한 후 증량제의 처리가 *Streptomyces* sp. A1022 활성물질과 포자수의 안정성 및 보존성에 미치는 영향을 경시 관찰 함.

실험에 사용한 증량제는 표 36와 같고, 포도당, 글리세롤, 락토오즈는 시약급 사용함.

활성검정은 고추탄저병과 벼도열병을 대상으로 항균활성시험과 고추 유묘와 성체를 이용한 생물검정을 실시하였고, 시험기간은 2010. 7. 1.부터 2010. 7. 30.까지 30일간 관찰함.

표 36. 증량제 list

항목	상품명	제조원	비고
Celite	Microcell	World Minerals, USA	증량제
	Celite	World Minerals, USA	
Silicon dioxide	Zeosil	Rhodia Silica, 국산	
Zeolite	Zeolite	캠월드테크, 국산	

② 결과

Streptomyces sp. A1022 활성과 포자수의 안정성 및 보존성이 증량제 처리구와 무처리구가 유사한 수준으로 확인되어 사용한 증량제가 유효성분의 안정성 및 보존성에 직접적인 영향을 미치지 않는 것으로 확인됨(표 37, 38, 39). 따라서 증량제의 물성과 제형의 특성에 맞춰서 증량제 선발이 가능한 것으로 판단됨.

포도당, 글리세롤, 락토오즈는 보조제 및 동결방지제로 사용 가능한 부재들인데, 이 3가지 부재도 *Streptomyces* sp. A1022 활성과 포자수의 안정성 및 보존성에 영향을 미치지 않는 것으로 확인됨. 따라서 글리세롤은 액상수화제, 락토오즈는 동결건조 수화제의 동결방지제에 적합한 것으로 판단됨.

표 37. *Streptomyces* sp. A1022 수화제의 고추탄저병에 대한 항균활성 경시

(단위: mm)

경과일수	Microcell	Celite	Zeosil	Zeolite	포도당	글리세롤	락토오즈	무처리
0	22.0	21.9	21.9	22.0	22.0	21.9	21.8	22.0
10	21.3	20.5	20.6	20.5	21.1	20.5	20.7	21.1
20	19.2	19.3	19.2	19.4	20.2	19.7	19.3	19.2
30	18.2	18.1	18.3	18.3	18.0	18.2	18.4	18.3

표 38. *Streptomyces* sp. A1022 수화제의 벼도열병에 대한 항균활성 경시

(단위: mm)

경과일수	Microcell	Celite	Zeosil	Zeolite	포도당	글리세롤	락토오즈	무처리
0	41.0	40.5	41.0	40.4	40.5	40.7	40.5	40.5
10	39.8	39.8	41.7	39.8	40.1	40.2	40.0	40.1
20	39.5	38.9	40.0	38.9	39.7	39.9	39.9	39.9
30	3.91	38.1	39.9	38.4	39.6	39.6	39.7	39.7

표 39. *Streptomyces* sp. A1022 수화제의 포자수에 대한 경시

(단위: cfu/mL)

경과일수	Microcell	Celite	Zeosil	Zeolite	포도당	글리세롤	락토오즈	무처리
0	1.0E+7	1.1E+7	1.1E+7	1.2E+7	1.2E+7	1.1E+7	1.0E+7	1.0E+7
10	9.4E+6	9.4E+6	9.7E+6	9.5E+6	9.6E+6	9.5E+6	9.6E+7	9.7E+6
20	9.2E+6	9.1E+6	9.4E+6	9.2E+6	9.3E+6	9.4E+9	9.2E+6	9.4E+6
30	9.0E+6	8.9E+6	9.1E+6	9.0E+6	9.0E+6	9.1E+6	9.0E+6	9.2E+6

(라) 증량제 물성 확인

본 시험의 목적은 증량제 자체의 흡습율, 경도, 수화성 등을 확인하여 수화제 물리성에 적합한 증량제를 선발함.

① 재료 및 방법

각각의 증량제 100g에(사용한 증량제는 표 36와 같음) 배양액을 최대한 흡수시켜 최대 수분 흡습능력을 확인하였고, 배양액이 흡수된 증량제를 50℃에서 수분율이 3% 이하가 될 때까지 건조한 후 건조물의 경도, 수화성 등 관찰함.

② 결과

수분에 대한 흡습성은 silicon dioxide(zeosil)가 가장 높았고, 건조 후 경도는 celite (microcell 형태)와 silicon dioxide의 경도가 낮은 것으로 확인됨(표 40). 건조 후 경도가 강하면 건조물의 분쇄시간과 유효성분의 안정성 유지에 문제가 있으므로 경도가 낮은 증량제 선발이 유리함. 수화성은 20분 내외의 증량제가 적합함.

따라서, 수화제의 증량제로는 silicon dioxide(zeosil)가 가장 적합한 것으로 확인됨.

표 40. 증량제 물성

항목	상품명	흡습율(mL/100g)	경도	수화성
Celite	Microcell	350	5.7	27
	Celite	240	7.8	16
Silicon dioxide	Zeosil	440	3.7	26
Zeolite	Zeolite	170	8.2	12

(3) 결론 _ 제형화 소재 개발

○ 제형의 입도 상용성 확보

- *Streptomyces* sp. A1022 배양액을 60 ± 5°C에서 30분간 열처리 시 활성물질과 포자의 안정성 및 보존성이 무처리구에 비해 우수한 것으로 나타남. 이는 배양 완료 후 열처리 공정 추가로 소량의 비활성물질과 영양세포(vegetative cell)의 제거 효과가 있어 배양액의 안정성과 보존성이 증가한 것으로 판단되며, 이 공정을 후공정에 추가함.
- *Streptomyces* sp. A1022의 활성물질과 포자는 물리적 분쇄와 이때 발생하는 열에 대한 안정성이 확보됨. 따라서 후 공정 중 분쇄 및 기타 공정에서 발생하는 물리적 마찰과 열에 대한 안정성이 확보됨.
- *Streptomyces* sp. A1022 배양액 분쇄 후 입도가 200mesh(75 μ m) 98% 통과함으로 현재농가에서 가장 많이 사용하고 있는 동력분무기 및 SS살포기 등에 사용이 가능하므로 사용상의 편리성도 확보됨.

○ 동결안정제 선발

- *Streptomyces* sp. A1022 활성물질과 포자는 부재를 처리하지 않은 조건에서 냉동 안정성과 보존성을 확보하였으나, 보조제 검토를 통해 액상수화제와 동결건조 수화제의 동결 방지제를 선발함.
- 액상수화제는 동결기 동결안정제는 액상 형태의 glycerol을 선발함.
- 동결건조 수화제의 동결안정제는 분상형태의 lactose를 선발함.

○ 건조부재 선발

- 증량제는 흡습율이 높고, 건조 후 경도가 낮은 부재가 농업용 증량제로 적합함. 따라서 검토결과, silicon dioxide가 수화제 형태의 제형에 가장 적당한 증량제로 판단됨.

○ 계면활성제 선발

- 시험한 계면활성제 중 polyoxyethylene nonylphenyl ether, polyoxyethylene castor ether, polyoxyethylene polyoxypropylene derivatives 등이 사용 가능하나, 습윤, 분산, 침투, 유화제의 기능이 복합적인 polyoxyethylene nonylphenyl ether가 공업화 공정의 적합한 계면활성제로 판단됨.

○ 아미노산 선발

- 아미노산 검토결과, tryptophan과 leucine이 *Streptomyces* sp. A1022 활성물질과 포자의 안정성 및 보존성에 보조적 역할을 하는 것으로 판단됨. 이는 향후 제품생산단가와 연결하여 제품군을 나눌 예정이다.

나. *Streptomyces* sp. A1022의 제제화 공정 확립 및 SOP 작성

(1) 공정 최적화

Streptomyces sp. A1022의 시제품 제형은 액상수화제(SC; solid concentrate)와 분상수화제(WP; wettable powder) 2가지 형태로 제형화 하였으며, 분상수화제는 Freeze Dryer(F/D)와 Spray Dryer(S/D) 2가지를 이용하여 제제화 공정을 확립하였음. 따라서 *Streptomyces* sp. A1022는 총 3가지 형태로 제형화함(표 41).

표 41. 제형종류 및 사용기기

	제형구분	사용기기
1	액상수화제(SC; solid concentrate)	
2	분상수화제(WP; wettable powder)	Freeze Dryer(F/D)
3	"	Spray Dryer(S/D)

(가) 액상수화제

액상수화제의 배양완료 후 전처리, 습식분쇄, 부재혼합 순으로 공정이 진행되며, 제조공정도는 그림 19, 표준제조처방서(SOP)는 표 16, 최종 제품의 성상은 그림 20과 같음.

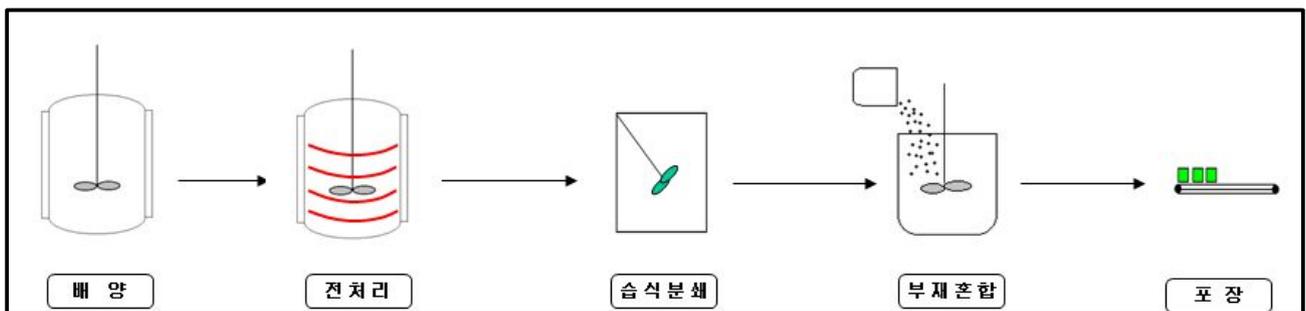


그림 19. 액상수화제 제조공정도

○ 열처리 공정

Streptomyces sp. A1022의 열안정성 예비실험 검토결과(1) 가)항), 열에 대한 안정성이 확보됨에 따라 본 공정을 추가함.

Streptomyces sp. A1022 배양 종료 후 발효조의 온도 60℃±5.0, agitation 50~100rpm, DO 50%를 유지하면서 배양액을 30분간 열처리하여 영양세포(vegetative cell)와

기타 소수 발효물질을 제거하여 *Streptomyces* sp. A1022의 주 활성 물질과 포자수의 안정성 및 보존성을 확보함.

○ 습식분쇄 공정

본 공정의 목적은 *Streptomyces* sp. A1022 배양액 중의 균체를 분쇄하여 최종 시제품이 포장에서 살포시 사용상 편리성 확보를 목적으로 함.

Streptomyces sp. A1022 분쇄안정성 예비시험결과, blade type 분쇄기에서 22,000rpm, 3min 간의 물리적 마찰력과 이때 발생하는 열에 대한 안정성이 확보됨.

습식분쇄공정에는 homogenizer, colloidal miller 등의 기기 검토가 가능함. 본 연구에서 공업화중인 *Streptomyces* sp. A1022 균체 size는 50mesh(300 μ m) 85% 통과 수준이므로 homogenizer에 비해서는 미분쇄가 가능한 colloidal miller가 적합한 것으로 판단됨. 따라서, colloidal miller(신원산업기기)를 이용하여 공정을 완료함.

① 재료 및 방법

Colloidal miller는 2개의 grinder가 회전하면서 분쇄되는데, 두 grinder 사이의 간극을 조정하여 분쇄물의 입도를 조절할 수 있음. 따라서 grinder 간극을 1/200, 3/200, 5/200 mm 3가지로 나눠 조건에 따라 배양액을 100L씩을 분쇄 후 물리적 자료와 *Streptomyces* sp. A1022 활성과 포자의 안정성 및 보존성을 비교하여 최적 조건을 판단함.

② 결과

Streptomyces sp. A1022 균체 size가 50mesh(300 μ m) 85% 통과 수준으로 물리적 마찰력과 열에 안정하여 분쇄 조건에 따른 *Streptomyces* sp. A1022 활성과 포자의 안정성 및 보존성은 무처리구와 유사함. 따라서, 분쇄시간과 분쇄 후 배양액 온도가 적합한 3/200mm 조건을 효율적인 조건으로 판단됨(표 42).

표 42. Colloidal miller에 의한 분쇄효과

grinder 간극(mm)	RPM	분쇄시간 (hr)	분쇄 후 배양액 온도(°C)	spore density (cfu/mL)	Anthracnose (mm)
Control	-	-	-	1.3E+7	22.0
5/200	3,500	2	25	1.2E+7	22.2
3/200	3,500	3	26	1.1E+7	22.4
1/200	3,500	5	32	1.1E+7	22.1

○ 부재혼합 공정

Streptomyces sp. A1022의 동결안정제와 계면활성제를 첨가함. 보조제 검토결과 액상수화제의 동결안정제는 glycerol, 계면활성제는 액상형태의 폴리옥시에틸렌 노닐페닐 에테르 (polyoxyethylene nonylphenyl ether: CAS No. 68412-54-4)를 첨가, 혼합함.

1차 부재혼합 glycerol을 배양액 전체 부피에 대하여 10%(w/v)를 첨가하여 약 10분간 혼합함.

2차 부재혼합 액상형태의 계면활성제 폴리옥시에틸렌 노닐페닐 에테르(polyoxyethylene nonylphenyl ether: CAS No. 68412-54-4)를 배양액 전체 부피에 대하여 5%(w/v) 첨가하여 10분간 혼합하여 액상수화제 공정을 완료함.

표 43. 액상수화제 SOP

공정	사용기기	공정 조건	Mass balance	Q.C.		
				탄저병 (mm)	벼도열병 (mm)	포자수 (cfu/mL)
1. 배양	발효조	1차년도 보고서 참조	100 / 200L	20↑	40↑	5.0E+ 7↑
2. 열처리	발효조	60℃±5.0, 30min	100 / 200L	20↑	35↑	2.0E+ 7↑
3. 습식분쇄	Colloidal miller	grinder 간극: 3/200mm 분쇄속도: 30L/hr	100 / 200L	20↑	35↑	1.0E+ 7↑
4. 부재혼합①	Homo mixer	① Glycerol 10%(w/v) 첨가 후 10분간 혼합	10kg / 100L			
5. 부재혼합②	Homo mixer	② polyoxyethylene nonylphenyl ether (CAS No. 68412-54-4): 액상형태 5%(w/v) 첨가 후 10분간 혼합	5kg / 100L	20↑	35↑	1.0E+ 7↑
6. 포장	액체충진형 포장기					



그림 20. 시제품 _ *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(solid concentrate, SC)

(나) 수화제 _ 동결건조 (freeze dry)

동결건조를 이용한 수화제는 배양완료 후 전처리, 원심분리, 1차 부재혼합, 건조, 2차 부재혼합, 건식분쇄 순으로 공정이 진행되며, 제조공정도는 그림 21, 표준제조처방서(SOP)는 표 18, 최종 제품의 성상은 그림 23과 같음.

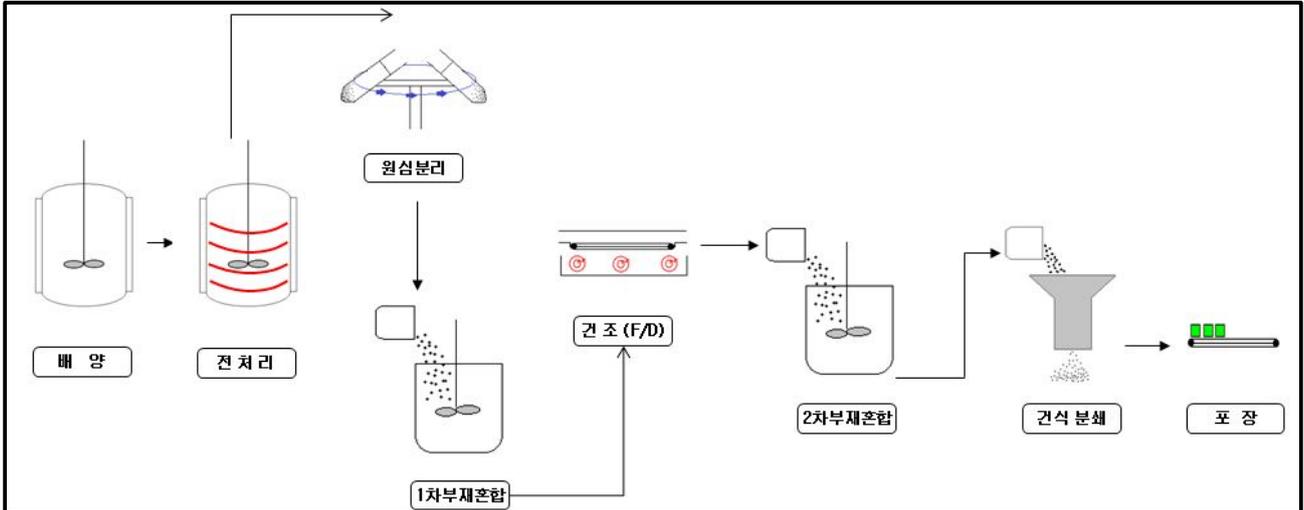


그림 21. 수화제 제조공정도 _ 동결건조 (freeze dry)

○ 열처리 공정

Streptomyces sp. A1022의 열안정성 예비실험 검토결과(1) 가)항), 열에 대한 안정성이 확보됨에 따라 본 공정을 추가함.

Streptomyces sp. A1022 배양 종료 후 발효조의 온도 $60^{\circ}\text{C} \pm 5.0$, agitation 50~100rpm, DO 50%를 유지하면서 배양액을 30분간 열처리하여 영양세포(vegetative cell)와 기타 소수 발효물질을 제거하여 *Streptomyces* sp. A1022의 주 활성 물질과 포자수의 안정성 및 보존성을 확보함.

○ Cell 회수 공정

Cell 회수 공정에는 continuous centrifuge(연속원심분리기), filter press, pollsep, 등의 기기 검토가 가능함. Filter press는 균체회수 시 손실율이 높아 배양여액 회수에 적합하였고, pollsep은 기기 작동 시 전체 배양액이 계속 순환하면서 농축되는 방식인데, 이는 고형분을 50% 정도까지 액상농축에 적합한 기기로 판단됨.

본 공정에서는 *Streptomyces* sp. A1022 균체회수가 목적이므로 cell 회수율이 높은 연속원심분리기가 적합함. 따라서 연속원심분리기(continuous centrifuge)를 이용하여 공정을 완료함.

① 재료 및 방법

연속원심분리기(continuous centrifuge)를 이용하여 9,000rpm의 속도로 *Streptomyces*

sp. A1022 cell만 회수함. *Streptomyces* sp. A1022 배양액 중 cell의 비율은 10%(w/v)로 배양액 100L를 원심분리하면 10Kg 정도의 cell이 회수됨(그림 8, 9).

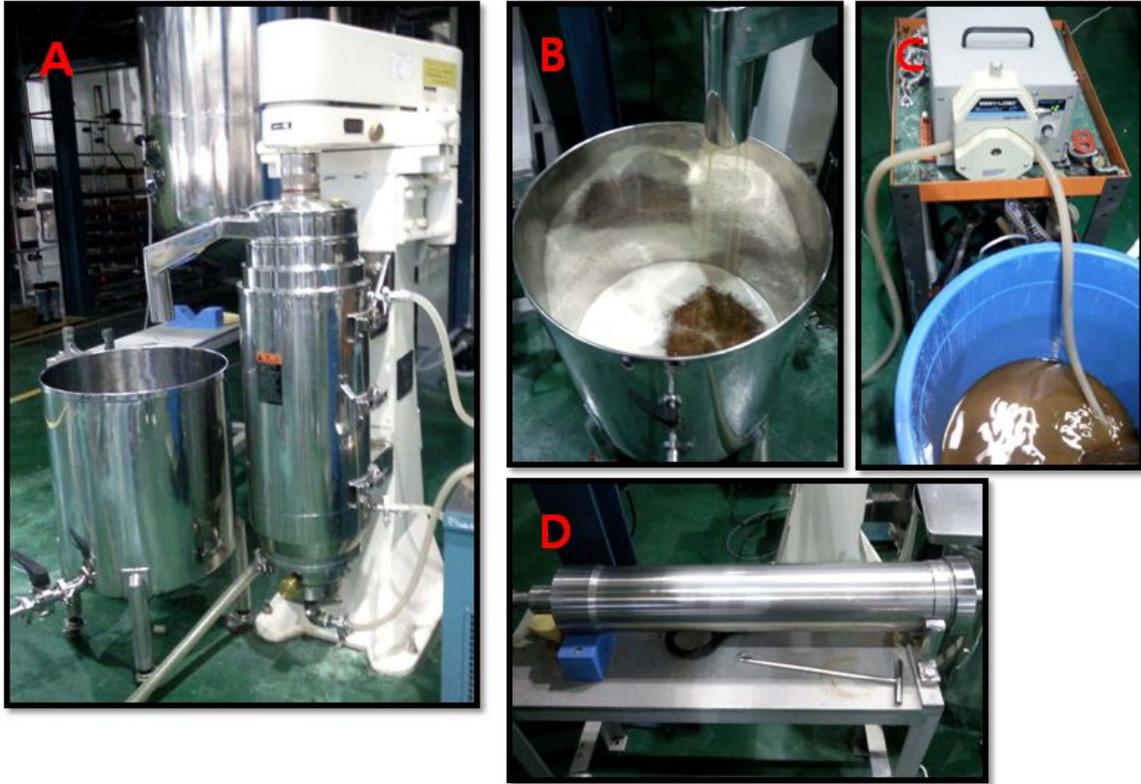


그림 22. 연속원심분리기(continuous centrifuge)

B. In let; 배양액 원심분리기로 들어가는 라인,

C. Out let; 원심 후 제거되는 상등액, D. cell만 회수됨.

○ 1차 부재혼합

본 공정의 목적은 최종 회수된 유효성분의 건조 중 안정성 확보로 동결안정제와 증량제를 혼합함. 보조제 검토결과, freeze dryer를 이용한 수화제의 동결안정제는 lactose, 증량제는 silicon dioxide를 혼합함.

원심하지 않은 배양액 5L에 cell무게 기준으로 lactose 7%(w/w)를 넣고 homo mixer를 이용하여 10분간 1차 부재 혼합함.

1차 혼합된 혼합액에 cell무게 기준으로 silicon dioxide 3%(w/w)을 넣고 homo mixer를 이용하여 10분간 2차 혼합함.

2차 혼합된 배양액에 회수한 cell 10Kg을 넣고 homo mixer를 이용하여 20분간 3차 혼합함.

최종 혼합된 시료를 건조 tray 높이에 절반 정도 되도록 부어 -70℃, 24시간 동결함.

○ 건조

동결건조는 일반적으로 -50℃ ~ +30℃ 사이에서 건조가 진행되는데, -5℃ ~ +5℃ 구간이 건조 구간으로 볼 수 있어, 이 구간에서 시간을 충분히 투자해야 함. -5℃이하 구간은 동결된 시료가 변성이 일어나지 않도록 천천히 온도를 올려줘야 하고, +5℃ 이후 구간은 건조된 시료의 수분율을 최소화하고, 건조 후 실온에 노출 시 흡습하지 않도록 온도를 조절해주는 작업이 중요함.

Streptomyces sp. A1022 동결건조 조건은 표 44과 같음.

표 44. 동결건조시 온도에 따른 시간구분

온도 (℃)	시간 (hr)	누적시간 (hr)	비고
-40	7	7	
-20	7	14	
-5	12	26	
0	12	38	
5	12	50	
15	7	57	
25	20	77	

- 트랩온도: -70℃, 진공: 7mtorr

○ 2차 부재혼합

건조가 완료된 건조물에 선발된 분상형태의 계면활성제 폴리옥시에틸렌 노닐페닐 에테르 (polyoxyethylene nonylphenyl ether : CAS No. 68412-54-4)을 10%(w/w) 혼합함.

○ 건식분쇄

본 공정의 목적은 건조물을 분쇄하여 최종 시제품이 포장에서 살포시 사용상의 편리성 확보와 건조물과 계면활성제의 일정한 혼합임.

계면활성제까지 혼합된 시료는 분쇄기(Pin Mill)를 이용하여 분쇄함.

표 45. 수화제 SOP _ 동결건조 (freeze dry)

공정	사용기기	공정조건	Mass balance	Q.C.		
				탄저병 (mm)	벼도열병 (mm)	포자수 (cfu/mL, g)
1. 배양	발효조	1차년도 보고서 참조	100/ 200L	20↑	40↑	5.0E+ 7↑
2. 열처리	발효조	60℃±5.0, 30min	100/ 200L	20↑	35↑	2.0E+ 7↑
3. 원심분리	연속원심분리기	9,000rpm	10kg/ 100L			
4. 부재 혼합①	Homo mixer	① lactose 7%(w/w) 첨가 후 10분간 1차 혼합	700g/ 10kg			
5. 부재 혼합②	Homo mixer	② white carbon 3%(w/w) 첨가 후 10분간 1차 혼합	300g/ 10kg			
6. 동결	Deep Freezer	-70℃, 24hr				
7. 건조	Freeze dryer		5kg	25↑	45↑	5.0E+ 7↑
8. 부재 혼합③	Homo mixer	③ polyoxyethylene nonylphenyl ether(CAS No.68412-54-4) 분상형태, 10%(w/w)	500g/ 5kg			
9. 건식분쇄	Pin Mill		5.5kg	25↑	45↑	5.0E+ 7↑
10. 포장	분말충진형 포장기					



그림 23. 시제품 2(F/D 이용) _ *Streptomyces* sp. A1022 수화제(wettable powder, WP)

(다) 수화제 공정 _ 분무건조(spray dry)

분무건조를 이용한 수화제는 배양완료 후 전처리, 1차 부재혼합, 건조, 2차 부재혼합, 건식 분쇄 순으로 공정이 진행되며, 제조공정도는 그림 26, 표준제조처방서(SOP)는 표 19, 최종 제품의 성상은 그림 25과 같음.

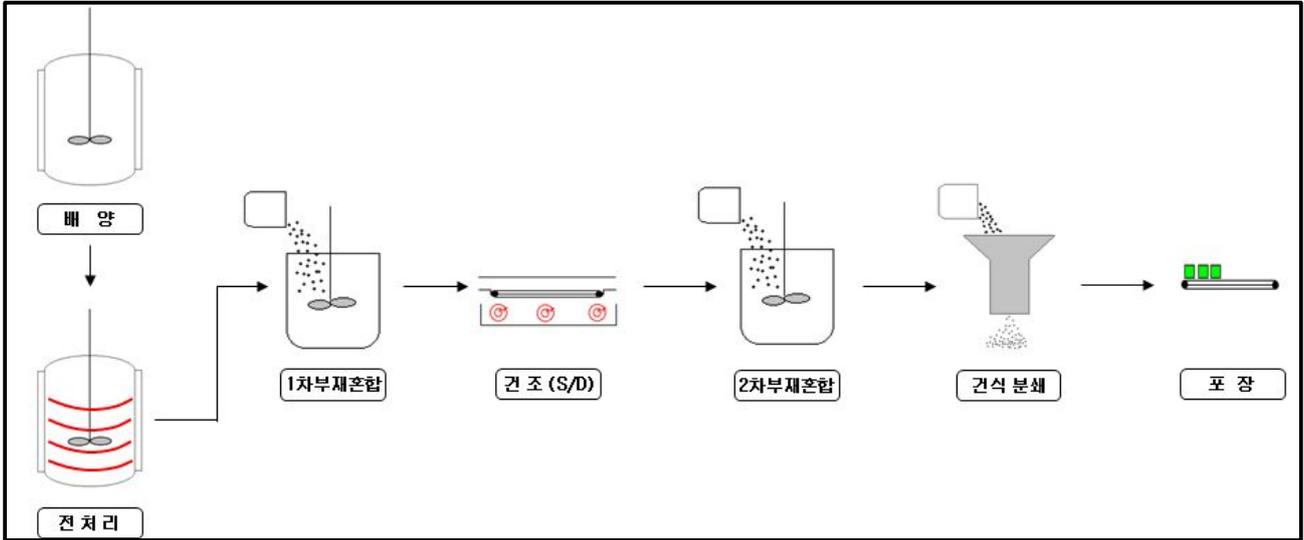


그림 24. 수화제 제조공정도 _ 분무건조(spray dry)

○ 열처리 공정

Streptomyces sp. A1022의 열안정성 예비실험 검토결과(1) 가)항), 열에 대한 안정성이 확보됨에 따라 본 공정을 추가함.

Streptomyces sp. A1022 배양 종료 후 발효조의 온도 $60^{\circ}\text{C} \pm 5.0$, agitation 50~100rpm, DO 50%를 유지하면서 배양액을 30분간 열처리하여 영양세포(vegetative cell)와 기타 소수 발효물질을 제거하여 *Streptomyces* sp. A1022의 주 활성 물질과 포자수의 안정성 및 보존성을 확보함.

○ 1차 부재 혼합

본 공정의 목적은 최종 회수된 유효성분의 건조 중 안정성 확보로 보조제와 증량제를 혼합함. 분무건조(spray dry)는 고형분 함량을 15%(w/v) 수준으로 유지하는 것이 건조에 유리함. *Streptomyces* sp. A1022는 배양액 중 고형분량이 약 10%(w/v)수준이므로 나머지 5% 정도를 보조제와 증량제를 첨가하여 맞춰서 건조할 예정임.

보조제 검토결과, 분무건조공정의 보조제는 glucose, 증량제는 silicon dioxide를 혼합함.

배양액에 glucose 2%(w/v)를 넣고 homo mixer를 이용하여 10분간 1차 부재 혼합함.

1차 혼합된 배양액에 silicon dioxide 3%(w/v)을 넣고 homo mixer를 이용하여 10분간 2차 혼합 후 다음 단계로 넘어감.

○ 분무건조(spray dry)

분무건조는 액을 분사시켜 고온에서 순간적으로 액체를 고체로 건조하는 방식이므로 공업화 대상의 활성물질과 포자가 열안정성을 지니고 있어야 함.

Streptomyces sp. A1022 열안정성 결과(가. 1)항), 90℃, 30min, 121℃(autoclave 조건)에서 다소 불안정하였으나, 60℃, 30min 열처리시 매우 안정하였음. 분무건조는 시료가 노즐을 통과하여 건조하는데 소요시간이 1분 안에 이뤄지므로 *Streptomyces* sp. A1022 활성물질과 포자의 안정성에는 영향이 없다고 판단됨.

최종 혼합된 시료에 air pump를 넣어, 혼합한 부재가 가라앉지 않도록 유지하면서 In let 온도 180℃, Out let 온도 110℃, 분사속도 20,000rpm으로 조정하여 1kg/hr 속도로 건조함(그림 12).



그림 25. 분무건조기

○ 2차 부재 혼합

건조가 완료된 건조물에 선발된 분상형태의 계면활성제 폴리옥시에틸렌 노닐페닐 에테르 (polyoxyethylene nonylphenyl ether : CAS No. 68412-54-4)을 10%(w/w) 혼합함.

○ 건식분쇄

본 공정은 건조물과 계면활성제를 일정하게 혼합하는 것과 혼합물을 분쇄하여 최종 시제품이 포장에서 살포시 사용상의 편리성 확보를 목적으로 함.

계면활성제까지 혼합된 시료는 분쇄기(Pin Mill)를 이용하여 분쇄와 혼합함.

표 46. 수화제 SOP _ 분무건조(spray dry)

공정	사용기기	공정조건	Mass balance	Q.C.		
				탄저병 (mm)	벼도열병 (mm)	포자수 (cfu/mL, g)
1. 배양	발효조	1차년도 보고서 참조	100/ 200L	20↑	40↑	5.0E+ 7↑
2. 열처리	발효조	60℃±5.0, 30min	100/ 200L	20↑	35↑	2.0E+ 7↑
4. 부재혼합①	homo mixer	glucose 2%(w/v) 첨가 후 10분간 1차 혼합	2kg/ 100L			
5. 부재혼합②	homo mixer	silicon dioxide 3%(w/v) 첨가 후 10분간 2차 혼합	3kg/ 100L			
7. 건조	spray dry	1kg/hr	6kg	25↑	45↑	5.0E+ 7↑
8. 부재혼합③	homo mixer	polyoxyethylene nonylphenyl ether(CAS No. 68412-54-4) 분상, 10%(w/w) 첨가	600g/ 6kg			
9. 건식분쇄	Pin Mill		6.6kg	25↑	45↑	5.0E+ 7↑
10. 포장	분말충진형 포장기					



그림 26. 시제품 3 (S/D 이용) _ *Streptomyces* sp. A1022 수화제(wettable powder, WP)

(2) 최종 시제품의 물리성 확인

약효보증기간 2년 설정약제는 $54\pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 4주일 이상 시험한 약효와 물리성 성적이 요구됨. 따라서 최종 시제품의 물리성은 0주와 4주차에 각각 비교 분석함.

○ 검토대상

- *Streptomyces* sp. A1022; 액상수화제(시제품)
- *Streptomyces* sp. A1022; 수화제(FD type 시제품)
- *Streptomyces* sp. A1022; 수화제(SD type 시제품)

○ 검토항목: 수화성, 경도, 분말도 수분율

① 재료 및 방법

○ 수화성

제제를 물에 수화시 현탁정도를 측정함. 즉, 500mL 비이커에 3도 경도수 300mL을 넣고, 수면에 유동이 없을 때 수면으로부터 10cm의 높이에서 시료 5g을 떨어뜨린 후 젖어 가라앉는 시간을 측정함. 단 수표면에 미세입자의 피막형태로 남은 것은 무시함.

○ 경도

건조 후 건조물의 경도 측정은 시료를 표준체 20메쉬로 체질하여 가루분을 제거하고 100g을 평량한 후 규격병에 넣고 규격구슬 3개를 넣은 후 32rpm에서 5분간 회전시켜 다시 20메쉬 체로 체질하여 가루분을 제거한 후 잔유물을 평량함.

계산식: $\text{경도}(\%) = \text{잔유물중량} / 100 \times 100$

○ 분말도

제형별 관리 규격체의 해당 mesh의 통과율을 측정하여 평가함. 즉, 시료 20g을 100mesh($149\mu\text{m}$), 200mesh($75\mu\text{m}$), 325mesh($45\mu\text{m}$) 체로 체질 후 체망을 통과하지 못한 잔유물을 평량함.

계산식: $\text{분말도} = (20 - b) / 20 \times 100$

b = 체를 통과하지 못한 잔사의 건조 후 무게

○ 수분측정

시료 5g을 평량 후 $105\pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 8시간 건조 후 방랭한 후 무게를 재서 수분량을 측정함.

② 결과

Streptomyces sp. A1022 시제품 3종 모두 물리성이 생물농약 기준에 적합한 것으로 확인됨(표 47). 특히, 분말도는 현행 물리성 기준에 따르면, 화학농약은 325mesh($45\mu\text{m}$)

98%, 생물농약은 100mesh(149 μ m) 98% 통과를 기준으로 하는데, *Streptomyces* sp. A1022 시제품 3종 모두 적합함.

아울러 54 \pm 2 $^{\circ}$ C에서 4주일 이상 시험한 결과도 초기의 물리성 결과와 유사한 것으로 확인되어 *Streptomyces* sp. A1022 시제품 3종의 물리성이 생물농약 기준에 적합한 것으로 확인됨.

표 47. 최종 시제품 3가지의 물성 비교

항목	시간	수화성	경도	분말도	수분율
<i>Streptomyces</i> sp. A1022, 액상수화제	0주	3분	11.6%	200mesh(75 μ m) 98% pass	-
	4주	3분	11.6%	200mesh(75 μ m) 98% pass	-
<i>Streptomyces</i> sp. A1022, 수화제(FD type)	0주	15분	4.3%	200mesh(75 μ m) 98% pass	3.0% ↓
	4주	16분	4.3%	200mesh(75 μ m) 98% pass	3.0% ↓
<i>Streptomyces</i> sp. A1022, 수화제(SD type)	0주	24분	3.2%	200mesh(75 μ m) 98% pass	3.0% ↓
	4주	23분	3.2%	200mesh(75 μ m) 98% pass	3.0% ↓

(3) 최종 시제품의 제형간 약효 비교

약효보증기간 2년 설정약제는 $54\pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 4주일 이상 시험한 약효성적이 요구됨. 따라서 최종 *Streptomyces* sp. A1022 시제품 3종의 약효는 0주와 4주차에 제형간 각각 비교 분석함.

① 재료 및 방법

- 시험장소: 성장상(growth chamber), POT시험
- 시험작물: 고추
- 시험병해: 고추탄저병(*Colletotrichum gloeosporioides*)
- 시험약제:
 - *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품), 희석배수 100배
 - *Streptomyces* sp. A1022 수화제(FD type 시제품), 희석배수 1,000배
 - *Streptomyces* sp. A1022 수화제(SD type 시제품), 희석배수 1,000배
- 대조약제: 오티바(azoxystrobin 20%, Syngenta Korea) 액상수화제, 희석배수 2,000배
- 시험내용:
 - 모든 시험구는 3POT씩 3반복하여 총 9POT 각각 시험함.
 - 고추유묘에 탄저병을 이병시킨 후 각각의 약제를 7일 간격, 3회 살포 후 방제가 도출함.

② 결과

무처리 이병과율 15% 이상으로 실험요건 충족함(표 48).

액상수화제 및 수화제 2종 시제품간의 약효는 유사한 것으로 확인됨.

$54\pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 4주일 이상 시험한 결과도 초기의 약효와 유사한 것으로 확인되어 *Streptomyces* sp. A1022 시제품 3종의 약효는 생물농약 기준에 적합한 것으로 확인됨.

제품의 희석배수와 생산단가만을 고려하면, *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품)가 가장 효율적인 제품이라 판단되나, 제품의 보존성, 안정성 및 사용상의 편리성 등은 수화제 형태가 더 효율적임.

이는 3차년도 진행될 다양한 작물의 포장실증 시험을 통해 향후 제품군을 나눠서 개발 할 예정임.

표 48. 최종 시제품 3종의 약효 비교

시험약제	시간(주)	반복	이병과율	평균이병과율	방제가
대조구	0	1	4.5%		
		2	16.2%		
		3	6.7%	9.1%	60.8%
	4	1	12.5%		
		2	16.2%		
		3	8.9%	12.5%	51.9%
<i>Streptomyces</i> sp. A1022, 액상수화제	0	1	8.3%		
		2	5.3%		
		3	8.3%	7.3%	68.6%
	4	1	8.3%		
		2	7.9%		
		3	7.7%	8.0%	69.4%
<i>Streptomyces</i> sp. A1022, 수화제 (FD type)	0	1	8.1%		
		2	5.1%		
		3	5.3%	6.2%	73.5%
	4	1	7.7%		
		2	7.5%		
		3	8.1%	7.8%	70.2%
<i>Streptomyces</i> sp. A1022, 수화제 (SD type)	0	1	8.1%		
		2	5.4%		
		3	5.3%	6.3%	73.1%
	4	1	7.7%		
		2	8.1%		
		3	8.1%	8.0%	69.4
무처리구	0	1	28.0%		
		2	28.0%		
		3	13.9%	23.3%	
	4	1	33.3%		
		2	28.1%		
		3	16.7%	26.0%	

(4) 최종 시제품의 포자수 경시안정성 분석

약효보증기간 2년 설정약제는 $54\pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 4주일 이상 시험한 약효성적이 요구됨. 따라서 최종 *Streptomyces* sp. A1022 시제품 3종의 포자 경시안정성을 0주와 4주차에 제형간 각각 비교 분석함.

① 재료 및 방법

Streptomyces sp. A1022 시제품 3종 모두 포자수 $5.0\text{E}+7\text{cfu/mL(g)}$ 로 맞춘 후 온도조건 $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 시료를 각각 보관하면서 0주, 1주, 2주, 3주 4주차에서 제형간 포자수의 변화를 관찰함.

② 결과

각 시제품의 포자 경시안정성 확인 결과, 시간이 경과할수록 포자수가 감소하였으나, $54\pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 4주 이상 시험한 결과도 $1.0\text{E}+7\text{cfu/mL(g)}$ 이상의 포자를 보유한 것으로 확인되어 포자의 경시안정성도 안정한 것으로 판단됨(그림 27).

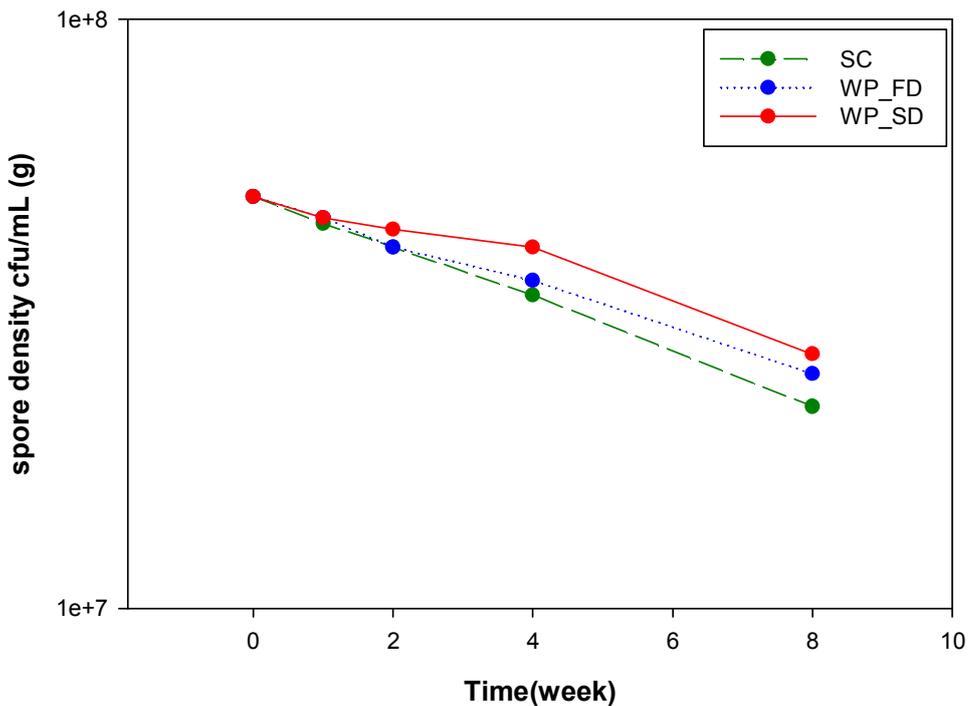


그림 27. 최종 시제품 3종의 포자안정성 비교

(5) 결론 _ 제제화 공정 확립

○ *Streptomyces* sp. A1022를 이용한 시제품은 액상수화제 1종, 수화제 2종 등 총 3종으로 제제화 함.

○ 최종 시제품의 물리성 확인

- *Streptomyces* sp. A1022 시제품의 물리성 검토 결과, 3종 모두 생물농약 기준에 적합한 것으로 확인됨. 특히, 분말도는 현행 물리성 기준에 따르면, 화학농약은 325mesh(45 μ m) 98%, 생물농약은 100mesh(149 μ m) 98% 통과를 기준하는데 본 연구의 시제품 3종은 200mesh(75 μ m) 98% 통과하므로 모두 적합한 것으로 판단됨.
- 아울러 54 \pm 2 $^{\circ}$ C에서 4주일 이상 시험한 결과도 초기의 물리성 결과와 유사한 것으로 확인되어 *Streptomyces* sp. A1022 시제품 3종의 물리성이 생물농약 기준에 적합한 것으로 확인됨.

○ 최종 시제품의 제형간 약효 비교

- *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제 및 수화제 2종 시제품간의 약효 검토결과, 시제품 3종의 약효는 유사한 것으로 확인됨.
 - 54 \pm 2 $^{\circ}$ C에서 4주일 이상 시험한 결과도 초기의 약효와 유사한 것으로 확인되어 *Streptomyces* sp. A1022 시제품 3종의 약효는 생물농약 기준에 적합한 것으로 확인됨.
 - *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품)는 희석배수 100배, *Streptomyces* sp. A1022 수화제(FD type, SD type 시제품)는 희석배수 1,000배가 적합한 것으로 판단됨.
- 제품의 희석배수와 생산단가만을 고려하면, *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품)가 가장 효율적인 제품이라 판단되나, 제품의 보존성, 안정성 및 사용상의 편리성 등은 *Streptomyces* sp. A1022 수화제(FD type, SD type 시제품) 형태가 더 효율적임.

○ 최종 시제품의 포자수 경시안정성 분석

- 각 시제품의 포자 경시안정성 확인 결과, 시간이 경과할수록 포자수가 감소하였으나, 54 \pm 2 $^{\circ}$ C에서 4주 이상 시험한 결과도 1.0E+7cfu/mL(g) 이상의 포자를 보유한 것으로 확인되어 포자의 경시안정성도 안정한 것으로 판단됨.

5. 대상병해에 대한 사용방법 최적화

시제품의 사용방법 최적화를 위하여 시제품의 (1)처리시기, (2)처리간격, (3)처리농도, (4) 시제품과 타사제품에 대한 방제가 비교, (5)기타 방제효과 등을 검토함.

(1) 처리시기

본 시험의 목적은 *Streptomyces* sp. A1022 시제품의 적정 처리시기를 판단하기 위하여 시험구를 고추탄저병 이병전(시험구 _ A)과 이병후(시험구 _ B)로 나누어 시험한 후 방제가를 확인함.

(가) 재료 및 방법

- 시험장소: 자사온실
- 시험기간: 2010. 5. ~ 2010. 10. (5개월)
- 시험작물: 고추
- 시험병해: 고추탄저병(*Colletotrichum gloeosporioides*)
- 시험약제: *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품), 희석배수 100배
- 대조약제: 오티바(azoxystrobin 20%, Syngenta Korea) 액상수화제, 희석배수 2,000배
- 시험내용:
 - 대조구와 시제품 처리구는 각각 3반복 시험하였으며, 무처리구는 5반복 시험함.
 - 처리구마다 1줄에 5개씩의 고추유묘를 정식하였고, 각 이랑 사이의 간격은 90cm, 모종 사이의 간격은 50cm으로 함.
 - 이병과율 조사는 약제처리 직전에 실시하였고, 약제 살포 시기는 표 49와 같으며, 이병 전 처리구와 이병후 처리구 모두 5회 처리함.
 - 시험구배치도는 그림 28, 29과 같음.

표 49. 탄저병 및 약제 살포 시기

유묘 정식시기	2010. 5. 29.
탄저병 살포시기 - 총 4회 살포	① 2010. 6. 28. ② 2010. 7. 05. ③ 2010. 7. 12. ④ 2010. 7. 19.
약제 살포시기(A. 이병전 처리구) - 총 5회 살포	① 2010. 6. 29. ② 2010. 7. 13. ③ 2010. 7. 27. ④ 2010. 8. 03. ⑤ 2010. 8. 10.
약제 살포시기(B. 이병후 처리구) - 총 5회 살포	① 2010. 7. 13. ② 2010. 7. 27. ③ 2010. 8. 03. ④ 2010. 8. 10. ⑤ 2010. 8. 17.
이병과율 조사 - 총 6회 (3개월)	① 2010. 7. 13. ② 2010. 7. 27. ③ 2010. 8. 24. ④ 2010. 9. 14. ⑤ 2010. 9. 28. ⑥ 2010. 10. 12.

측창	A. 이병전 시험구	여단이 문 통로	B. 이병후 시험구	측창
	대조구 _ 1		시제품처리구 _ 1	
	무처리구 _ 1		무처리구 _ 1	
	시제품처리구 _ 1		대조구 _ 1	
	무처리구 _ 2		무처리구 _ 2	
	대조구 _ 2		시제품처리구 _ 2	
	무처리구 _ 3		무처리구 _ 3	
	시제품처리구 _ 2		대조구 _ 2	
	무처리구 _ 4		무처리구 _ 4	
	대조구 _ 3		시제품처리구 _ 3	
	무처리구 _ 5		무처리구 _ 5	
	시제품처리구 _ 3	대조구 _ 3		
A. 이병전 시험구	여단이 문	B. 이병후 시험구		

그림 28. 시험구 배치도



그림 29. 방제시험 포장

A. 고추탄저병 이병 전 약제 처리구, B. 고추탄저병 이병 후 약제 처리구

(나) 결과

고추탄저병 2개 시험구(이병전, 이병후) 모두 7, 8, 9월(4회 조사 시까지) 무처리 이병과율 15% 이상으로 실험요건 충족함(표 23, 24). 이병과율은 2010. 7. 13. 이후 증가 추세를 보이다가 2010. 8. 24. 최고 20% 이상 이병하였고, 9월말 이후 감소 추세임.

고추탄저병에 대한 이병과율 조사를 3개월간 시험한 결과(표 50, 51; 그림 30, 31), 고추탄저병 이병전, 이병후 시험구 모두 약제 5회 살포하였으나(약제 살포 시기 표 49), **이병전 처리구가 이병후 처리구에 비해 방제가가 우수한 것으로 나타남.** 이병후 처리구는 탄저병이 한창 이병하는 2010. 8. 17.에 약제를 살포하였음에도 불구하고 이병전 처리에 비해 방제가가 떨어지는 것으로 나타남.

고추수확량 조사결과(표 52), 이병전 처리구가 이병후 처리구에 비해 수확량도 우수한 것으로 나타남. 고추수확량은 탄저병이 최고로 이병하는 8월에 최대 수량과 개당 무게를 나타냄. 즉, 고추의 수량이 많으므로 병 이병도 높게 일어나는 것으로 판단됨.

대조구에 비해 시제품처리구의 방제가가 더 높은 것으로 나타났는데 이는 희석배수의 차이 때문인 것으로 판단됨. 본 시험에서 *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품)의 희석배수를 100배로 시험하였으나, 향후 희석배수를 더 증가 할 수 있는 여유가 있는 것으로 판단되었고, 대조약제는 희석배수를 1,000배로 낮춰서 시험 할 필요가 있는 것으로 판단됨.

표 50. 고추탄저병 이병전 약제처리 방제가

조사일	시험구	반복	이병과율	평균이병과율	방제가	
2010. 07. 13.	대조구	1	11.1%	11.7%	23.8%	
		2	17.6%			
		3	6.3%			
	시제품처리구	1	0.0%	1.4%	90.5%	
		2	0.0%			
		3	4.3%			
	무처리구	1	25.0%	15.3%		
		2	9.1%			
		3	12.5%			
		4	16.7%			
		5	13.3%			
	2010. 07. 27.	대조구	1	6.7%	5.5%	68.2%
			2	5.1%		
			3	4.7%		
		시제품처리구	1	0.0%	1.4%	92.0%
2			4.2%			
3			0.0%			
무처리구		1	19.4%	17.3%		
		2	12.5%			
		3	16.7%			
		4	16.7%			
		5	21.1%			
2010. 08. 24.		대조구	1	22.0%	15.9%	20.9%
			2	15.5%		
			3	10.2%		
		시제품처리구	1	14.1%	9.4%	53.4%
	2		5.9%			
	3		8.1%			
	무처리구	1	24.4%	20.1%		
		2	17.3%			
		3	18.2%			
		4	18.7%			
		5	22.1%			

표 50. (계속)

조사일	시험구	반복	이병과율	평균이병과율	방제가	
2010. 09. 14.	대조구	1	17.6%	13.2%	21.4%	
		2	9.8%			
		3	12.1%			
	시제품처리구	1	11.6%	8.1%	51.9%	
		2	9.1%			
		3	3.5%			
	무처리구	1	26.8%	16.8%		
		2	11.1%			
		3	10.5%			
		4	24.0%			
		5	11.4%			
	2010. 09. 28.	대조구	1	6.5%	9.4%	11.8%
			2	15.4%		
			3	6.5%		
		시제품처리구	1	5.3%	6.3%	41.1%
2			9.1%			
3			4.5%			
무처리구		1	4.2%	10.7%		
		2	16.0%			
		3	21.7%			
		4	4.9%			
		5	6.7%			
2010. 10. 12.		대조구	1	2.1%	3.6%	17.1%
			2	6.1%		
			3	2.5%		
		시제품처리구	1	4.3%	3.9%	9.5%
	2		4.7%			
	1		2.7%			
	무처리구	2	4.1%	4.3%		
		3	10.2%			
		4	1.5%			
		5	2.6%			
		3	3.2%			

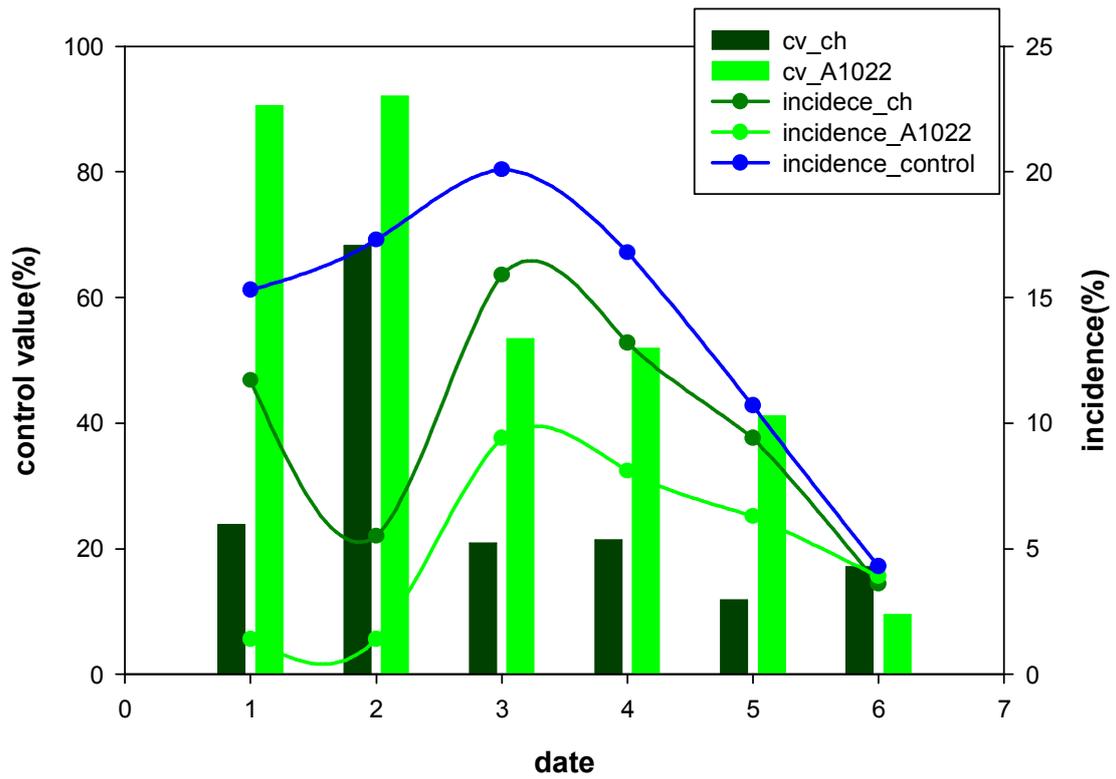


그림 30. 고추탄저병 이병전 약제처리 방제가
 date: 1. 2010. 7. 13.; 2. 2010. 7. 27.; 3. 2010. 8. 24.;
 4. 2010. 9. 14.; 5. 2010. 9. 28.; 6. 2010. 10. 12.

표 51. 고추탄저병 이병후 약제처리 방제가

조사일	시험구	반복	이병과율	평균이병과율	방제가	
2010. 07. 13.	대조구	1	6.7%	7.3%	55.2%	
		2	5.3%			
		3	10.0%			
	시제품처리구	1	9.5%	10.3%	36.8%	
		2	13.0%			
		3	8.3%			
	무처리구	1	18.2%	16.3%		
		2	25.0%			
		3	13.8%			
		4	9.5%			
		5	15.0%			
	2010. 07. 27.	대조구	1	10.7%	10.1%	36.1%
			2	6.5%		
			3	13.2%		
		시제품처리구	1	5.4%	4.6%	71.2%
2			5.8%			
3			2.6%			
무처리구		1	18.4%	15.8%		
		2	14.3%			
		3	14.7%			
		4	12.9%			
		5	18.9%			
2010. 08. 24.		대조구	1	28.6%	17.5%	20.2%
			2	11.4%		
			3	12.6%		
		시제품처리구	1	10.9%	10.0%	54.6%
	2		12.1%			
	3		6.9%			
	무처리구	1	26.6%	22.0%		
		2	23.2%			
		3	20.0%			
		4	21.3%			
		5	18.6%			

표 51. (계속)

조사일	시험구	반복	이병과율	평균이병과율	방제가	
2010. 09. 14.	대조구	1	10.3%	10.7%	39.7%	
		2	14.6%			
		3	7.1%			
	시제품처리구	1	8.7%	5.1%	71.1%	
		2	6.7%			
		3	0.0%			
	무처리구	1	11.6%	17.7%		
		2	25.7%			
		3	19.6%			
		4	14.9%			
		5	16.7%			
	2010. 09. 28.	대조구	1	6.5%	10.6%	3.3%
			2	18.9%		
			3	6.5%		
		시제품처리구	1	5.3%	6.3%	42.6%
2			9.1%			
3			4.5%			
무처리구		1	4.2%	11.0%		
		2	17.4%			
		3	21.7%			
		4	4.9%			
		5	6.7%			
2010. 10. 12.		대조구	1	0.8%	1.3%	68.2%
			2	1.1%		
			3	2.1%		
		시제품처리구	1	2.2%	1.8%	56.4%
	2		1.9%			
	3		1.4%			
	무처리구	1	8.4%	4.2%		
		2	4.3%			
		3	3.3%			
		4	3.1%			
		5	2.0%			

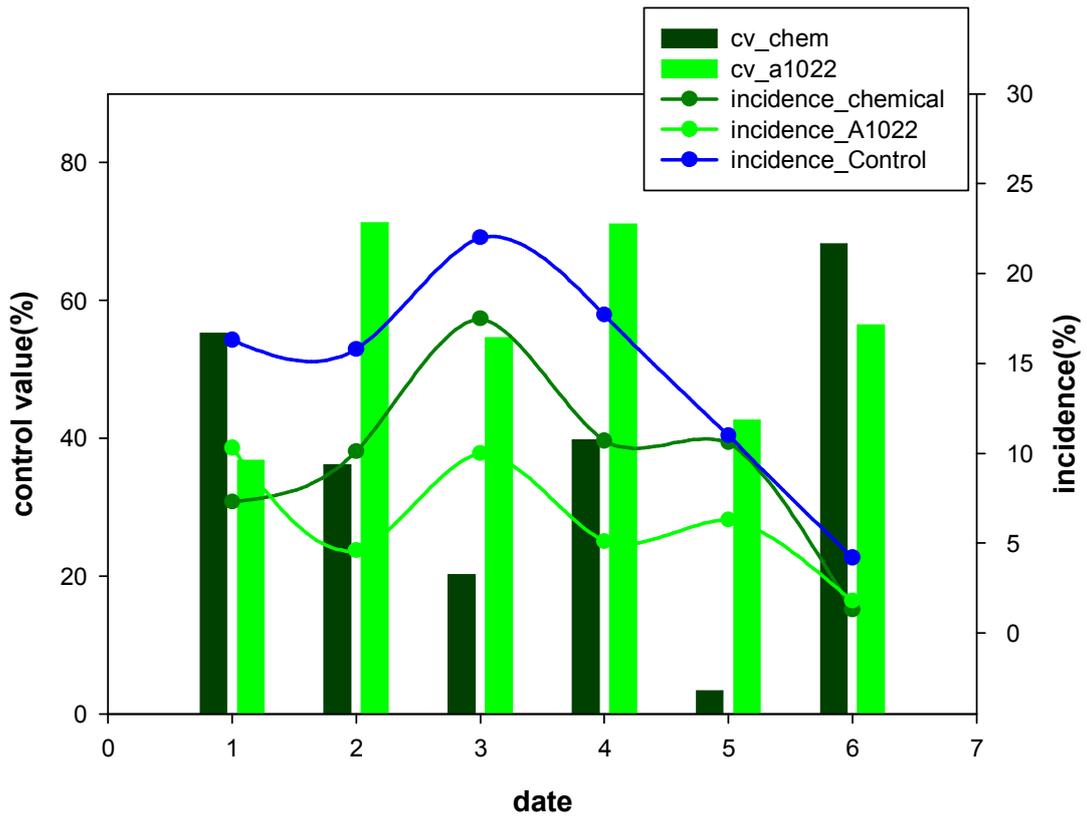


그림 31. 고추탄저병 이병후 약제처리 방제가
 date: 1. 2010. 7. 13.; 2. 2010. 7. 27.; 3. 2010. 8. 24.;
 4. 2010. 9. 14.; 5. 2010. 9. 28.; 6. 2010. 10. 12.

표 52. 시험구별 수확량 비교

수확일	시험구	반복수	수량(개)	무게(g)	개당무게(g)
2010. 07. 13.	대조구	3	29	277.5	9.6
	시제품처리구	3	28	270.0	9.6
	무처리구	5	39	369.2	9.5
2010. 07. 27.	대조구	3	40	473.0	11.8
	시제품처리구	3	40	499.0	12.5
	무처리구	5	102	1202.0	11.8
2010. 08. 24.	대조구	3	208	2525.0	12.1
	시제품처리구	3	278	3417.5	12.3
	무처리구	5	498	6344.5	12.7
2010. 09. 14.	대조구	3	122	1419.7	11.6
	시제품처리구	3	130	1521.2	11.7
	무처리구	5	181	2022.5	11.2
2010. 09. 28.	대조구	3	88	884.0	10.0
	시제품처리구	3	85	945.9	11.1
	무처리구	5	159	1541.0	9.7
2010. 10. 12.	대조구	3	304	2569.5	8.5
	시제품처리구	3	321	3690.0	11.5
	무처리구	5	691	5859.5	8.5

(2) 처리간격

본 시험은 *Streptomyces* sp. A1022 시제품 적정 처리간격(application interval) 판단을 목적으로 함.

(가) 재료 및 방법

- 시험장소: 성장상(growth chamber), POT시험
- 시험작물: 고추
- 시험병해: 고추탄저병(*Colletotrichum gloeosporioides*)
- 시험약제: *Streptomyces* sp. A1022 수화제(시제품), 희석배수 1,000배
- 대조약제: 오티바(Azoxystrobin 20%, Syngenta Korea) 액상수화제, 희석배수 2,000배
- 시험내용:
 - 모든 시험구는 5POT씩 3반복하여 총 15POT 각각 시험함.
 - 고추유묘에 탄저병을 이병시킨 후 각각의 약제를 5일과 7일 간격으로 각각 3회 연속 살포 후 방제가 도출함.

(나) 결과

무처리 이병과율 15% 이상으로 실험요건 충족함(표 53). 시험결과, 5일 간격으로 약제 처리한 시험구가 7일 간격으로 약제 처리한 시험구에 비해 방제가가 다소 높게 나타났으나, 약제처리 간격에(5일과 7일) 따른 방제가의 차이는 크지 않는 것으로 판단됨. 따라서, **약제 처리간격은 7일 간격이 적당한 것으로 판단됨.**

대조구에 비해 시제품처리구의 방제가가 더 높은 것으로 나타났는데 이는 (1)항과 유사한 결과로 판단됨.

표 53. 약제처리간격에 따른 방제가 비교

처리간격	시험구	반복	이병율	평균이병율	방제가
5일	대조구	1	13.6%	10.5%	42.5%
		2	9.7%		
		3	8.3%		
	시제품처리구	1	10.3%	8.0%	56.2%
		2	6.9%		
		3	7.0%		
	무처리구	1	23.1%	18.3%	
		2	16.0%		
		3	15.9%		
7일	대조구	1	17.6%	11.5%	40.8%
		2	7.8%		
		3	9.1%		
	시제품처리구	1	11.6%	9.4%	51.7%
		2	13.0%		
		3	3.5%		
	무처리구	1	19.5%	19.5%	
		2	22.2%		
		3	16.7%		

(3) 처리량(처리농도)

본 시험의 목적은 *Streptomyces* sp. A1022 시제품의 적정처리농도 즉, 희석배수를 결정하기 위하여 실시함.

(가) 재료 및 방법

- 시험장소: 생장상(growth chamber)
- 시험작물: 고추 열매
- 시험병해: 고추탄저병(*Colletotrichum gloeosporioides*)
- 시험약제: *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품), 희석배수 원액, 10배, 100배
- 대조약제: 오티마(azoxystrobin 20%, Syngenta Korea) 액상수화제, 희석배수 1,000배

○ 시험내용:

- 생물검정에 사용한 뚜껑이 있는 플라스틱 상자는 멸균 후 여지를 여러 겹 깔고 멸균된 증류수를 뿌려 상자 안이 완전 수분으로 차도록 미리 처리함.
- 고추열매는 물로 세척 후 1% NaOCl(차아염소산나트륨, sodium hypochloride)과 70% 에탄올로 표면을 깨끗이 닦아서 말린 후 멸균된 코르크보러로 8mm 정도의 구멍을 뚫음.
- 고추탄저병원균(*C. gloeosporioides*) 회수액을 50 μ l(1.0E+6 spore/mL \uparrow)씩 paper disc에 처리한 후 완전히 말려서 고추열매에 올려놓고, 멸균된 플라스틱 상자에 넣어 뚜껑을 덮어 28 $^{\circ}$ C, 75%의 습도가 유지되는 생장상(growth chamber)에서 24시간 처리하여 병원균이 고추열매에 미리 침투하도록 함.
- 24시간 후 대조약제 및 시험 약제를 고추탄저병이 처리된 paper disc에 50 μ l씩 각각 처리함.
- 대조약제는 희석배수 1,000배, *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품)은 원액, 10배 희석액, 100배 희석액 처리함.
- 약제 처리 후 28 $^{\circ}$ C, 75%의 습도가 유지되는 생장상(growth chamber)에서 7일간 처리 후 병의 이병정도를 관찰함.

(나) 결과

고추 열매를 이용한 희석배수 시험 결과, *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품) 원액과 10배 희석액 처리구에선 탄저병이 이병되지 않음. *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품) 100배 처리구와 오티바(신젠타) 1,000배 처리구의 고추탄저병 이병도가 유사한 수준으로 타나남(그림 32).

온실과 POT시험에서 *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품) 100배 처리구가 오티바(신젠타) 2,000배 처리구에 비해 우수한 방제가를 나타냈고, *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품) 100배는 오티바 1000배 수준과 유사한 방제효과가 있을 것으로 판단됨.

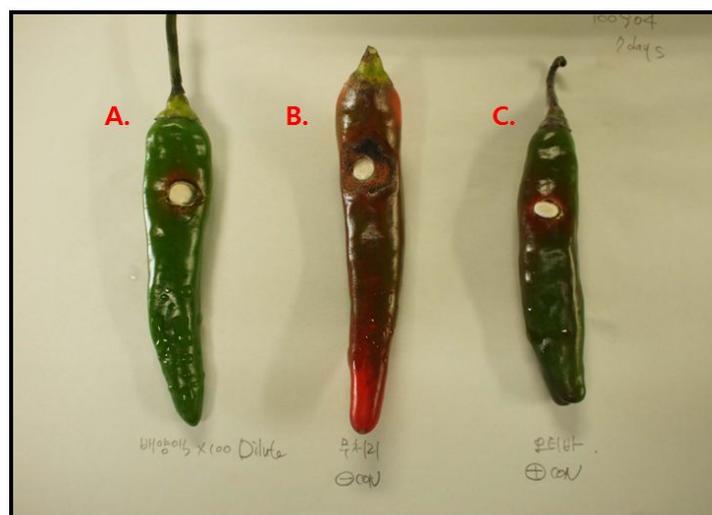


그림 32. 고추열매를 이용한 *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품)의 희석배수 비교
A. *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품) 100배 희석 처리구, B. 무처리구, C. 대조구

(4) 시제품과 타사제품 탄저병에 대한 방제가 비교

Streptomyces sp. A1022 시제품(액상수화제)의 방제가를 판매되는 화학농약 및 생물농약과 비교함.

(가) 재료 및 방법

- 시험장소: 성장상(growth chamber), 고추열매 이용한 시험.
- 시험작물: 고추 열매
- 시험병해: 고추탄저병(*Colletotrichum gloeosporioides*)
- 시험약제: *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품), 희석배수 100배
- 대조약제
 - 오티바 (azoxystrobin 20%, Syngenta Korea) 액상수화제, 희석배수 1,000배
 - 티포라탄 (tebuconazole 12%, 한얼싸이언스) 분산성액제, 희석배수 1,000배
 - Eugenol (고삼추출물) 액상수화제, 희석배수 500배 → 천연물추출물로 최근 유기농업에 많이 사용되는 원제임.
- 시험내용: 실험방법은 (3)항 처리량(처리농도) 방법과 같음.

(나) 결과

타사제품과 약효 비교 결과, 7일차 결과는 *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품) 100배 처리구와 대조약제 오티바 1,000배 및 티포라탄 1,000배 처리구가 유사한 방제효과를 나타냈고, Eugenol 500배 처리구는 약효가 매우 떨어지는 것으로 확인됨(그림 33).

12일차 결과는 *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품) 100배 처리구와 대조약제 오티바 1,000배는 유사한 방제효과를 나타냈으나, 티포라탄 1,000배 처리구와 eugenol 500배 처리구는 방제효과가 매우 떨어지는 것으로 확인됨(그림 34).

위의 결과로부터 *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품)을 100배 처리 시 약 10일간의 약효 지속효과가 있을 것으로 예상됨.

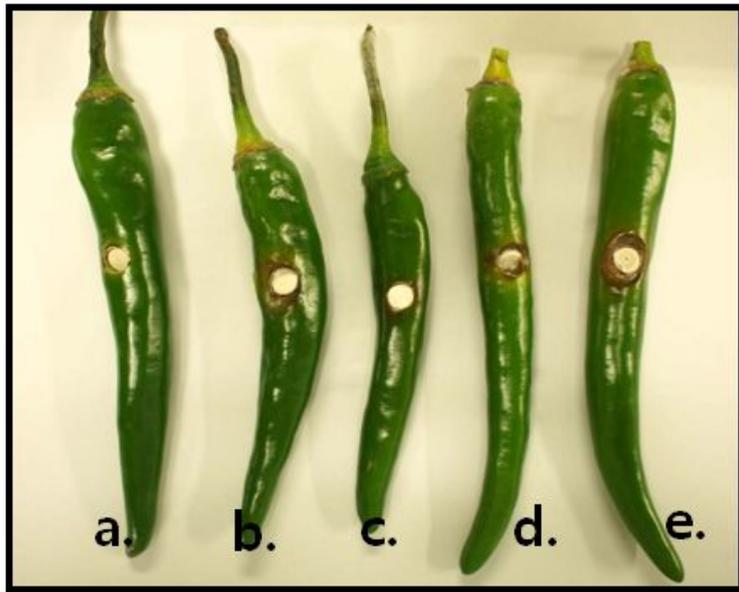


그림 33. 약제 처리 후 7일 경과
 a. 시제품, b. 무처리, c. 오티바, d. 티포라탄, e. Eugenol



그림 34. 약제 처리 후 12일 경과
 a. 시제품, b. 무처리, c. 오티바, d. 티포라탄, e. Eugenol

(5) 기타 방제효과 _ 토마토 탄저병

- 시험장소: 성장상(growth chamber)
- 시험작물: 방울토마토 열매
- 시험병해: 토마토탄저병(*Colletotrichum* sp.)
- 시험약제: *Streptomyces* sp. A1022 수화제(시제품), 희석배수 1,000배
- 시험내용: 실험방법은 (3)항 처리량(처리농도) 방법과 같음.

1차년도 시험결과, *Streptomyces* sp. A1022는 고추탄저병 외에 기타 작물의 다른 병해에 대해서도 방제효과를 지니고 있었음. 따라서 토마토 탄저병에 대하여 방제시험을 실시한 결과, 방제효과가 있는 것으로 확인됨(그림 35).

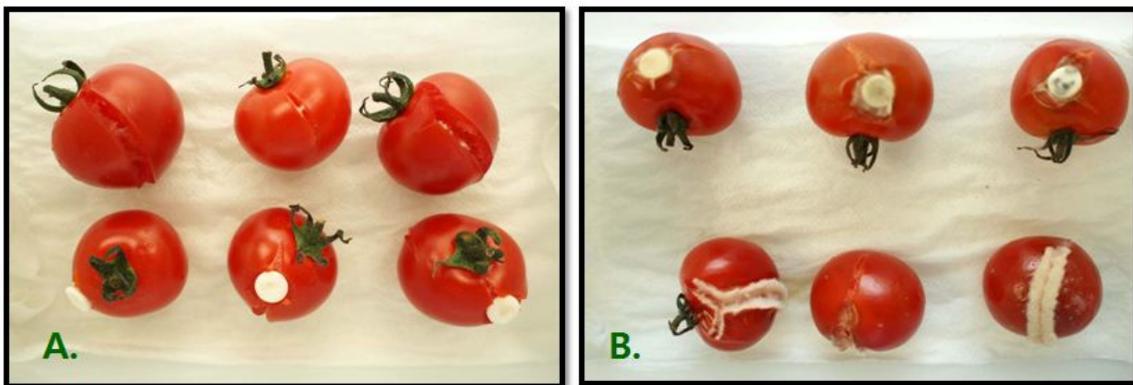


그림 35. 토마토탄저병에 대한 *Streptomyces* sp. A1022 수화제(시제품) 처리 효과
A. *Streptomyces* sp. A1022 수화제(시제품)처리구, B. 무처리구

(6) 기타 방제효과 _ 토마토 역병

- 시험장소: 성장상(growth chamber)
- 시험작물: 토마토 모종
- 시험병해: 역병(*Phytophthora blight*)
- 시험약제: *Streptomyces* sp. A1022 수화제(시제품), 희석배수 1,000배
- 대조약제: 오티바(azoxystrobin 20%, Syngenta Korea) 액상수화제, 희석배수 1,000배
- 시험내용:
 - 토마토 파종 직후 역병 포자를 $1.0E+6$ spore/mL 수준으로 각 포트당 20mL 처리한 후 28℃, 습도 75%의 성장상(growth chamber)에서 생육시킴.
 - 24시간 경과 후 각각의 약제를 처리한 후 토마토 발아율을 관찰함. 각 처리구당 10POT 반복 시험함.

○ 시험결과

토마토 유묘를 이용한 역병 방제 효과 시험 결과, 무처리구에서 토마토 발아율이 약 30%인 반면, *Streptomyces* sp. A1022 수화제(시제품) 1,000배 처리구와 오티바(신젠타) 1,000배 처리구에선 고추역병이 발병되지 않은 것으로 확인됨(그림 36).

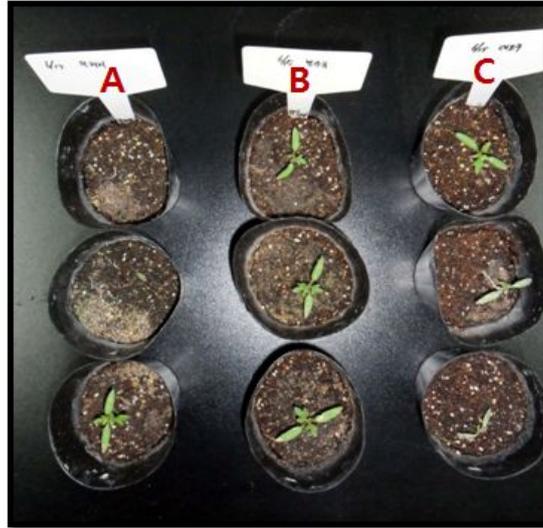


그림 36. 고추역병 항균활성 및 토마토 모종을 이용한 *Streptomyces* sp. A1022 액상수화제(시제품) 역병 방제 효과 검정

A. 무처리, B. *Streptomyces* sp. A1022 수화제(시제품) 1,000배 희석 처리구, C. 대조구

6. 포장실증시험

2010년- 2011년 전국의 농가포장에서 10회 이상 *Streptomyces* sp. A1022 시제품의 방제효과를 시험함.

병해는 무처리 발병을 약 10% 이상 자연발병 된 농가 또는, 역병에 한해 인위적으로 발병 시킨 후 방제시험을 실시함. 희석배수는 처리 시 마다 차등 적용하였고, 처리간격은 7일, 3회 처리를 기본으로 하였음.

처리결과, 액상수화제(solid concentrate, S.C.)는 희석배수 300배, 수화제(wettable powder, W.P.)는 희석배수 500에서 60% 이상의 방제효과를 확보하였음. 또, 노균병과 벼도열병에 대한 방제효과도 확보함. 개발한 제형은 일반농가의 분무기 사용 시에도 사용상의 문제점이 발견되지 않았으며, 약혼, 약해 등의 문제점도 발견되지 않음.

처리내역은 표 55와 같으며, 상세내역은 첨부함.

표 55. 포장실증시험 내역

적용작물	적용병해	제형	희석배수	일자	주소
고추	탄저병	액상수화제	100	2010. 5.	경기도 여주군 외룡리
고추	탄저병	액상수화제	300	2011. 7.	경북 의성군 단촌면 방하리
고추	탄저병	액상수화제	300	2011. 7.	충북 충주시 금가면 하담리
고추	탄저병	수화제	1,000	2011. 6.	경기도 양평군 지평면 일신2리
고추	역병	액상수화제	300	2011. 6.	경기도 양평군 원덕리
고추	역병	액상수화제	300	2011. 7.	경기도 여주군 외룡리
고추	역병	수화제	500	2011. 7.	경기도 여주군 여주읍
고추	역병	수화제	1,000	2011. 8.	경기도 여주군 내룡리
토마토	잣빛곰팡이병	수화제	1,000	2011. 5.	경기 파주시 교하읍 서패리
피망	잣빛곰팡이병	액상수화제	300	2011. 7.	강원도 횡성군 둔내면 화동리
상추	노균병	액상수화제	300	2011. 6.	경기도 양평군 지평면 송현리
벼	도열병	수화제	500	2011. 6.	전남 영광군 불갑면 방마리

(1) 포장실증 _ 1

항 목 명 : 방선균의 고추 탄저병 약제방제 효과시험

◦ 시험기관 : (주) 한국생물안전성연구소	◦ 시험기간 : 2011. 07. 28 ~ 2011. 8. 25
◦ 시험책임자 : 정기채	◦ 시험장소 : 경북 의성군 단촌면 방하리 1061- 4
◦ 시험담당자 : 이상준	◦ 시험입지조건(토양) : 노지(사양토)

1. 시험목적

해강바이오의 고추 탄저병 대한 방제효과를 구명하여 친환경농자재 목록공시 기초자료로 활용코자 함.

2. 시험방법

가. 대상병해 : 고추탄저병 (*Glomerella cingulata*)

나. 시험작물(품종) : 고추 (청양)

다. 대상병해 발생상황 : 무처리 이병과율이 58.0%로 약효검토에 충분하였음.

라. 처리내용

시험약제	유효성분 함량 (%)	약효시험		약해시험		시험 년차	의뢰 회사
		희석배수 및 사용량	처리시기 및 방법	기준량	배량		
방선균	90%	300배	발병초 10일간격 4회 경엽처리 (7/28, 8/7, 17, 27)	300배	150배	1	(주)해강 바이오
무처리	-	-	-	-	-	-	-

마. 경종개요 : 고추 재배농가 관행에 준하였으며 (2011년 05월 3일 80 x 45 cm 간격으로 정식, 비닐피복) 기타 사항은 농가 일반관행에 준하여 재배하였음.

바. 시험구 배치 및 면적 : 난괴법 3반복

구 분	처리수	반복수	총구수	구당면적	소요면적	총면적
약효	2	3	6	20㎡	120㎡	165㎡
약해	3	3	9	5㎡	45㎡	

사. 약제 살포전후 기상상황

월/일	강수량(mm)	최고기온(℃)	최저기온(℃)	평균기온(℃)
7/28	-	34.1	22.0	27.7
7/29	0.5	33.5	23.5	27.2
8/7	0.5	32.6	23.5	28.0
8/8	12.5	33.2	23.5	28.3
8/17	0.1	30.7	23.7	26.8
8/18	28.0	31.4	22.8	25.6
8/27	-	29.2	19.9	23.9
8/28	-	29.4	18.1	23.9

3. 조사 방법

구 분	조사항목	조사회수	조사일자	조사방법
약효시험	이병과율	1	9/6	구당 전과에 대한 이병과수 조사
약해시험	약해유무	3	7/31, 8/2, 4	경엽에 나타나는 약해유무 달관조사

4. 시험성적

가. 약효시험

◦ 고추 탄저병에 대한 약제방제 효과(최종 약제처리 후 10일차)

시험약제	이 병 과 율(%)				유의성 (DMRT)	방제가(%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평 균		
방선균	21.6	27.0	12.7	20.4	a	64.8
무처리	58.7	49.5	65.9	58.0	b	-

C.V.(%)27.7

나. 약해시험(약제처리 3, 5, 7일 후)

시험약제	시험작물 (품 종)	약해정도(0~5)		비고
		기준량	배량	
방선균	고추(청양)	0	0	약해없음

5. 결과요약

가. 약 효 : 시험 대상인 친환경농자재 해강바이오는 고추 탄저병 대하여 64.8%의 방제효과를 보였음.

나. 약 해 : 시험 대상인 친환경농자재 해강바이오는 기준량 및 배량에서 약해증상이 없었음.

6. 담당자 의견

친환경농자재 방선균은 고추 탄저병에 대하여 64.8%의 방제효과를 나타내 고추 탄저병에 대한 방제효과가 인정되며 고추에 대한 약해가 없어 농가 실용성이 있을 것으로 판단됨.

◦ 시 험 책 임 자 : 정 기 채 인

◦ 시 험 담 당 자 : 이 상 준 인

(주) 한국 생물 안전성 연구 소장 인

(2) 포장실증 _ 2

<시험방법>

- 대상병해: 고추탄저병(*Colletotrichum gloeosporioides*)
- 시험작물: 고추
- 시험장소: 충북 충주시
- 대상병해 발생상황: 무처리 이병과율 16.2% 자연발병.
- 조사항목: 이병과율, 최종 약제 처리 후 7일차(2011. 8. 10.)
- 경중개요: 기타 사항은 농가 일반 관행에 준하여 재배함.
- 시험일시: 1차 약제처리 - 2011. 7. 20.
 2차 약제처리 - 2011. 7. 27.
 3차 약제처리 - 2011. 8. 3.
 최종조사 - 2011. 8. 10.

표 56. 약제 처리 내용

시험약제	희석배수	처리시기 및 방법
azoxystrobin 20%	1,000배	발병초 7일 간격 3회 경엽처리
<i>Streptomyces</i> sp. A1022, S.C.	300배	
무처리구		

<시험결과>

표 57. 고추탄저병 시험 결과(2011. 8. 10.)

시험약제	이병과율 (%)				유의성 (DMRT)	방제가 (%)
	1	2	3	평균		
azoxystrobin 20%	13	13	14	13.3	a	68.0
<i>Streptomyces</i> sp. A1022	17	15	16	16.0	a	61.6
무처리	40	44	41	41.7	b	-

(3) 포장실증 _ 3

<시험방법>

- 대상병해: 고추역병(*Phytophthora blight*)
- 시험작물: 고추
- 시험장소: 경기도 여주군 외룡리
- 대상병해 발생상황: 역병균을 1.0E+6 spore/mL 농도로 주당 150mL씩 각각 관주 처리하고, 24시간 경과 후 처리구별로 약제 살포함.
- 조사항목: 이병주율, 최종 약제 처리 후 7일차(2011. 7. 26.)
- 경중개요: 기타 사항은 농가 일반 관행에 준하여 재배함.
- 시험일시: 1차 약제처리 - 2011. 7. 5.
2차 약제처리 - 2011. 7. 12.
3차 약제처리 - 2011. 7. 19.
최종조사 - 2011. 7. 26.

표 58. 약제 처리 내용

시험약제	희석배수	처리시기 및 방법
azoxystrobin 20%	1,000배	발병초 7일 간격 3회 관주처리
<i>Streptomyces</i> sp. A1022, S.C.	300배	
무처리구		

<시험결과>

- 최종 조사 후 10월까지, 고추 최종 수확 후에도 약 4개월간 관찰 결과, *Streptomyces* sp. A1022 처리구와 대조구는 전혀 발병하지 않음.

표 59. 고추역병 시험 결과(2011. 7. 26.)

시험약제	이병주율(%)	유의성 (DMRT)	방제가
<i>Streptomyces</i> sp. A1022	0	a	100
무처리	100	b	

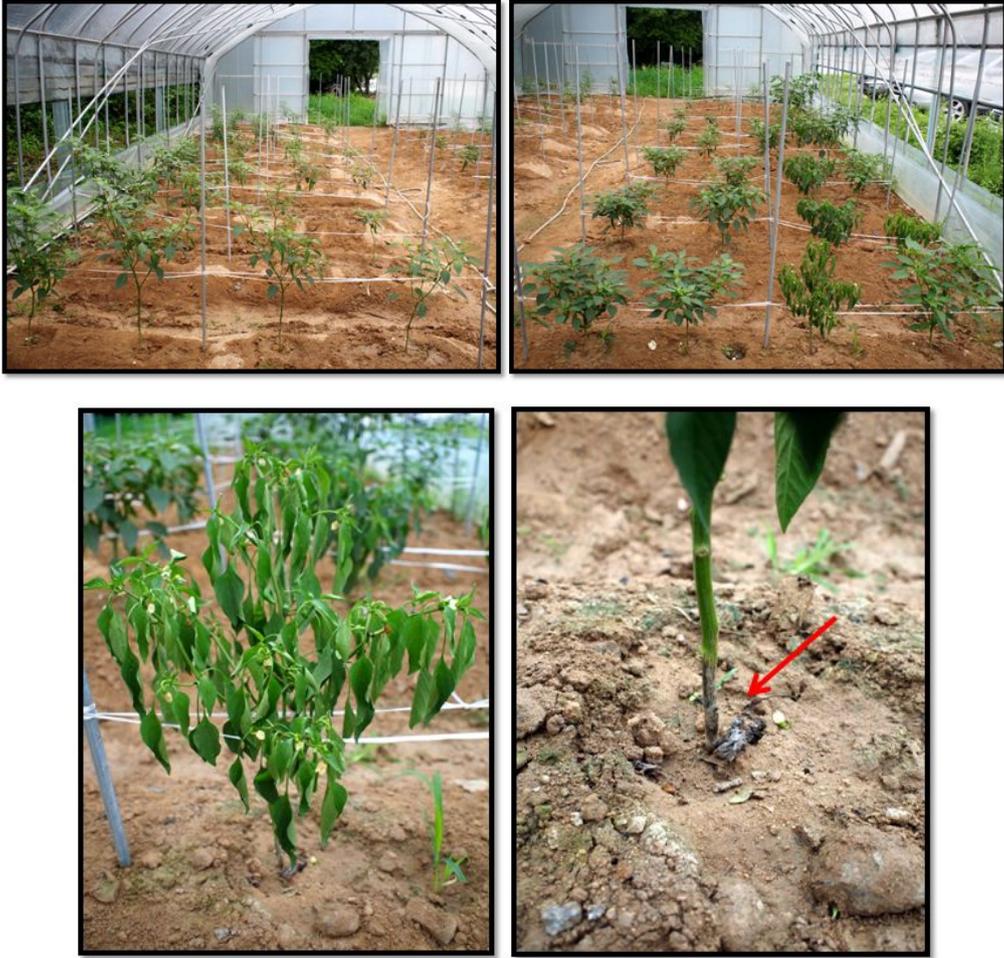


그림 37. 고추역병 발병 현황

(4) 포장실증 _ 4

<시험방법>

- 대상병해: 고추역병(*Phytophthora blight*)
- 시험작물: 고추
- 시험장소: 경기도 여주군 여주읍
- 대상병해 발생상황: 역병균을 1.0E+6 spore/mL 농도로 주당 150mL씩 각각 관주 처리하고, 24시간 경과 후 처리구별로 약제 살포함.
- 조사항목: 이병주율, 최종 약제 처리 후 7일차(2011. 8. 18.)
- 경중개요: 기타사항은 농가 일반 관행에 준하여 재배함.
- 시험일시: 1차 약제처리 - 2011. 7. 28.
2차 약제처리 - 2011. 8. 4.
3차 약제처리 - 2011. 8. 11.
최종조사 - 2011. 8. 18.

표 60. 약제 처리 내용

시험약제	희석배수	처리시기 및 방법
azoxystrobin 20%	1,000배	발병초 7일 간격 3회 관주처리
<i>Streptomyces</i> sp. A1022, W.P.	500배	
무처리구		

<시험결과>

- 최종 조사 후 10월까지, 고추 최종 수확 후에도 약 3개월간 관찰 결과, *Streptomyces* sp. A1022 처리구와 대조구는 전혀 발병하지 않음.

표 61. 고추역병 시험 결과(2011. 8. 18.)

시험약제	이병주율(%)	유의성 (DMRT)	방제가(%)
azoxystrobin 20%	0	a	100
<i>Streptomyces</i> sp. A1022	0	a	100
무처리	100	b	0

(5) 포장실증 _ 5

<시험방법>

- 대상병해: 고추역병(*Phytophthora blight*)
- 시험작물: 고추
- 시험장소: 경기도 여주군 내룡리(2011. 8. 26.)
- 대상병해 발생상황: 무처리 이병주율 14%로 자연발병 됨.
- 조사항목: 이병주율, 최종 약제 처리 후 7일차
- 경중개요: 기타사항은 농가 일반 관행에 준하여 재배함.
- 시험일시: 1차 약제처리 - 2011. 8. 5.
2차 약제처리 - 2011. 8. 12.
3차 약제처리 - 2011. 8. 19.
최종조사 - 2011. 8. 26.

표 62. 약제 처리 내용(2011. 8. 26.)

시험약제	희석배수	처리시기 및 방법
azoxystrobin 20%	1,000배	발병초 7일 간격 3회 관주처리
<i>Streptomyces</i> sp. A1022, W.P.	1,000배	
무처리구		

<시험결과>

- 역병 자연발병 초기에 시험 실시함. 최종 조사 후 10월까지, 고추 최종 수확 후에도 약 3개월간 관찰 결과, 무처리구는 8월말 모두 고사하였고, *Streptomyces* sp. A1022 처리구와 대조구는 9월초 역병 발병 시작하여 10월 초 모두 고사함.
- 이는 약제의 희석배수가 1,000배로 늘어난 이유와 자연발병에 따른 문제로 판단됨.
- 그러나, *Streptomyces* sp. A1022 처리가 고추역병의 발병 시기를 약 1개월간 늦추는 효과가 있는 것으로 판단됨.

표 63. 고추역병 시험 결과 - 2011. 8. 26.

시험약제	이병주율(%)	유의성 (DMRT)	방제가(%)
azoxystrobin 20%	0	a	100
<i>Streptomyces</i> sp. A1022	0	a	100
무처리	100	b	0

(6) 포장실증 _ 6

<시험방법>

- 대상병해: 토마토 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*)
- 시험작물: 토마토
- 시험장소: 경기도 파주시 교하읍
- 대상병해 발생상황: 무처리 이병과율 12%로 약효 검토에 충분하였음.
- 조사항목: 이병주율, 최종 약제 처리 후 7일차
- 경종개요: 기타사항은 농가 일반 관행에 준하여 재배함.
- 시험일시: 1차 약제처리 - 2011. 5. 4.
 2차 약제처리 - 2011. 5. 11.
 3차 약제처리 - 2011. 5. 18.
 최종조사 - 2011. 5. 25.

표 64. 약제 처리 내용

시험약제	희석배수	처리시기 및 방법
Boscalid 47%	1,000배	발병초 7일간격 3회 경엽처리
<i>Streptomyces</i> sp. A1022, W.P.	1,000배	
무처리구		

<시험결과>

표 65. 토마토 잿빛곰팡이병 처리 결과

시험약제	이병주율(%)				유의성 (DMRT)	방제가 (%)
	1	2	3	평균		
Boscalid 47%	12	12	11	11.7	a	67.3
<i>Streptomyces</i> sp. A1022	15	13	14	14.0	a	60.7
무처리	37	34	36	35.7	b	

7. 토양상 변화 관찰

Streptomyces sp. A1022를 CAS(chrome azurol S)배지상에서 관찰한 결과, orange색의 환을 형성하지 않아 siderophore를 생성하지 않는 것으로 판단되어, 토양과 작물을 통해 *Streptomyces* sp. A1022의 영향을 관찰함. 토양 미생물상 및 이화학상 관찰은 실험농지에서 실험 전/후 토양을 채취하여 비교 분석함.

대조구와 무처리구의 토양미생물상은 시험완료 후 전체적으로 감소한 반면, *Streptomyces* sp. A1022 시제품 처리구는 시험 완료 후에도 토양미생물상이 그대로 유지되는 것으로 확인됨(표 66). 토양이화학상 변화는 유기물과 수분은 모든 처리구에서 유사한 것으로 나타났고, 질소와 가리는 시험 종료 후 모든 처리구에서 감소한 것으로 확인됨.

인산은 대조구와 무처리구는 시험전/후 비슷한 수준이었으나, *Streptomyces* sp. A1022 시제품 처리구의 인산 함량은 시험 종료 후 줄어든 것으로 확인됨. 이는 *Streptomyces* sp. A1022가 인산분해능이 어느 정도 있는 것으로 판단됨. 이는 현재 농지에서 문제가 되는 인산집적현상을 다소 해결할 수 있을 것으로 기대됨(표 67).

뿌리생육 비교결과, 3개 시험구 모두 뿌리생육은 유사하였으나, 시제품 처리구 > 대조구 > 무처리구 순으로 뿌리의 길이 생육이 활발한 것으로 확인됨(표 68, 그림41, 42).

표 66. 처리구에 따른 토양미생물상 변화 _ 비닐하우스 시험구

(단위: cfu/g)

시험구	균종	2010. 05. 21.	2010. 09. 29.
대조구	곰팡이균	1.8E+ 06	7.5E+ 04
	방선균	2.0E+ 05	1.1E+ 04
	세균	1.8E+ 06	1.3E+ 06
시제품	곰팡이균	2.1E+ 06	1.4E+ 06
	방선균	1.8E+ 05	6.5E+ 06
	세균	1.7E+ 06	2.5E+ 06
무처리	곰팡이균	1.4E+ 06	6.5E+ 04
	방선균	2.2E+ 05	9.1E+ 04
	세균	2.2E+ 06	1.3E+ 06

표 67. 처리구에 따른 토양의 이화학상 변화 _ 비닐하우스 시험구

(단위: %)

시험구	항목	100521	100929
대조구	질소(TN)	1.27	0.28
	인산(P ₂ O ₅)	2.05	2.06
	가리(K ₂ O)	0.88	0.98
	유기물(OM)	5.67	4.02
	수분(moisture)	1.89	2.19
시제품	질소(TN)	1.08	0.14
	인산(P ₂ O ₅)	2.08	1.13
	가리(K ₂ O)	0.59	0.86
	유기물(OM)	5.17	5.68
	수분(moisture)	1.75	3.26
무처리	질소(TN)	1.09	0.34
	인산(P ₂ O ₅)	2.31	2.08
	가리(K ₂ O)	1.11	0.97
	유기물(OM)	5.99	5.82
	수분(moisture)	0.83	2.99

표 68. 처리구에 따른 작물의 뿌리생장 비교 _ 비닐하우스 시험구

(단위: cm)

조사일	시험구	1	2	3	4	5	average	SD
2010. 11. 03.	대조구	22	28	30	29	28	27.4	3.13
	방선균	31	28	26	27	31	28.6	2.30
	무처리	24	27	24	26	25	25.2	1.30



그림 38. *Streptomyces* sp. A1022 시제품 처리구와 무처리구의 뿌리생장 비교 _ 비닐하우스 시험



그림 39. *Streptomyces* sp. A1022 시제품 처리구와 무처리구의 뿌리생장 비교 _ POT 시험

관리번호 제 2011-1034호

검 사 성 적 서			
위탁자	사업자번호	126-81-40278	
	업체명	(주)해강바이오	성명 홍성오
	주소	경기도 여주군 북내면 외룡리 321-8	
공시품	명칭	토양미생물제제(방선이)	
계약기간	2011. 08. 31 ~ 2011. 11. 30		
용도	관공서제출용		
검 사 성 적			
명칭	항목	성적	비고
토양 미생물제제 (방선이)	비소(mg/kg)	흔적	
	카드뮴(mg/kg)	흔적	
	수은(mg/kg)	흔적	
	납(mg/kg)	흔적	
	크롬(mg/kg)	흔적	
	구리(mg/kg)	2.1	
	니켈(mg/kg)	흔적	
아연(mg/kg)	2.2		
<p>*비고: 흔적(정량한계 이하)</p> <p>농촌진흥청시험·분석 및 검정의뢰규칙 제8조의 규정에 의하여 2011년 08월 31일 자로 의뢰한 시료에 대한 분석결과를 위와 같이 통지합니다.</p> <p>『이 성적은 위탁자가 임의로 제출한 시료의 분석치로서 소송 및 기타 구속력이 있는 자료로 사용하는 데는 적합하지 않으며, <u>관공서제출용</u>으로 사용이 가능합니다.』</p> <p style="text-align: right;">2011. 11. 21</p> <p style="text-align: right; font-weight: bold;">연구기관 : (주)판코리아 농업환경과학연구소장 (직인)</p> <div style="text-align: right;">  </div>			

검 사 성 적 서				
신 청 인	성 명	홍 성 오	업 체 명	(주) 해강바이오
	주 소	경기도 여주군 북내면 외룡리 321-8번지		
	전 화	031-881-0771	FAX	031-881-0773
공 시 품	명 칭	방선이		
	형 태	미생물제제		
검 사 방 법		병원성미생물 선택배지를 이용한 확인시험		
용 도		관공서 제출용		
분 석 결 과				
병원성미생물 검사		검 출 여 부		
병원성 대장균(<i>Escherichia coli</i>)		불 검 출		
병원성 살모넬라(<i>Salmonella</i> sp.)		불 검 출		
<i>Staphylococcus aureus</i>		불 검 출		
<i>Bacillus cereus</i>		불 검 출		
<i>Listeria monocytogenes</i>		불 검 출		
2011 년 9 월 6 일				
농촌진흥청지정 비료 시험연구기관 농촌진흥청지정 농약품목등록 시험연구기관				
목원대학교 미생물생태자원연구소장				
※ 본 결과성적서의 내용은 신청인이 의뢰한 시료에 대한 분석 결과로서 용도 이외의 목적으로 사용함에 따라 발생하는 모든 사항에 대해서, 본 연구소는 그 어떠한 법적책임을 지지 않습니다.				

원본대조필 (정밀)



병원성미생물 검사 시험성적서

의뢰자 : 홍성오

소속기관 : (주) 해강바이오

주소 : 경기도 여주군 북내면 외룡리 321-8번지

접수번호 : 제11-106-1호

1. 검사항목

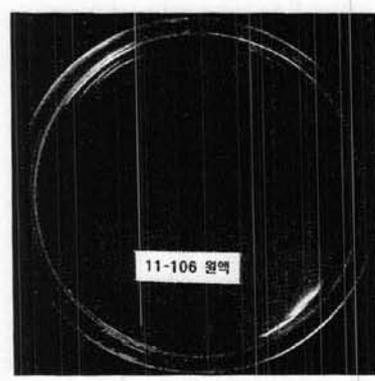
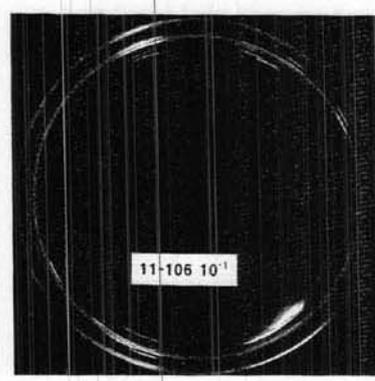
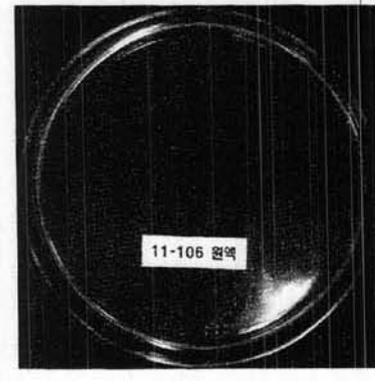
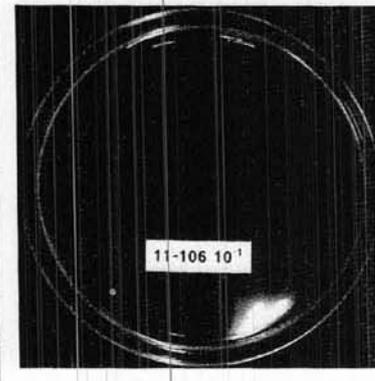
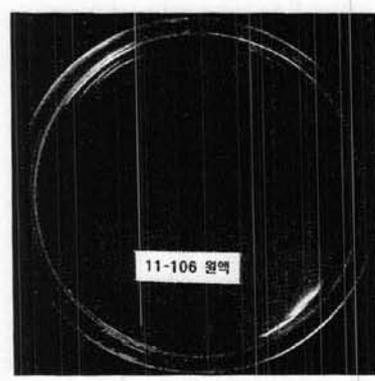
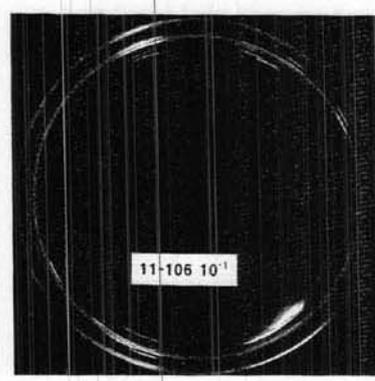
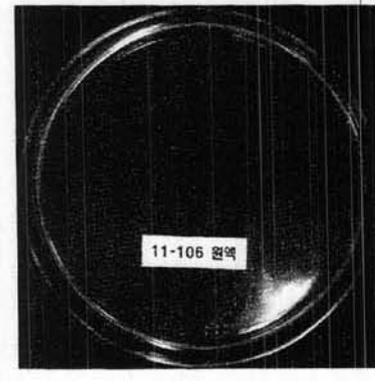
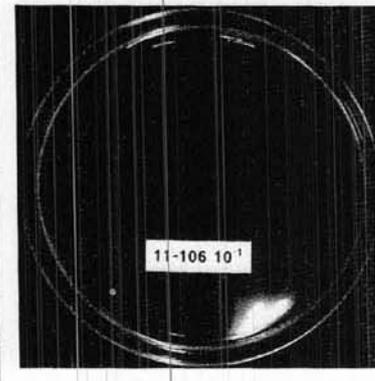
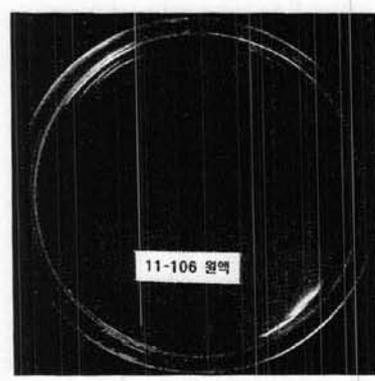
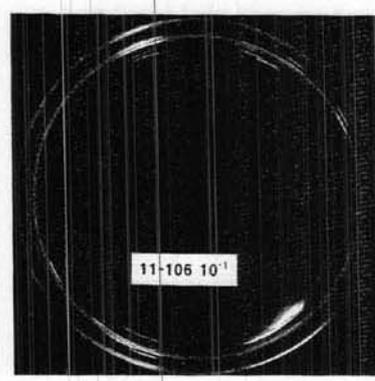
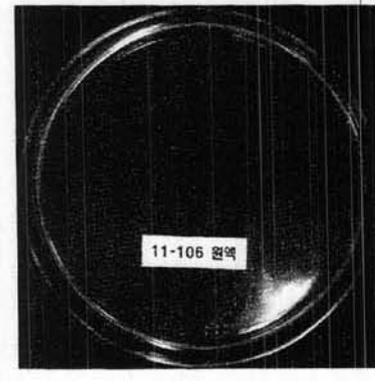
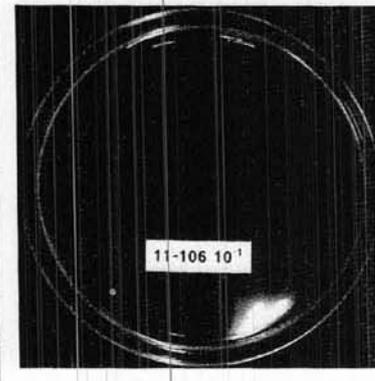
- 1) 병원성 대장균(*Escherichia coli*)
- 2) 병원성 살모넬라(*Salmonella* sp.)
- 3) *Staphylococcus aureus*
- 4) *Bacillus cereus*
- 5) *Listeria monocytogenes*

2. 검사의뢰 시료 : 방선이

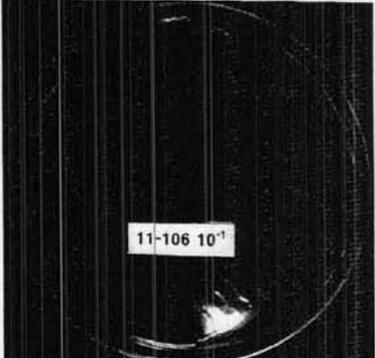
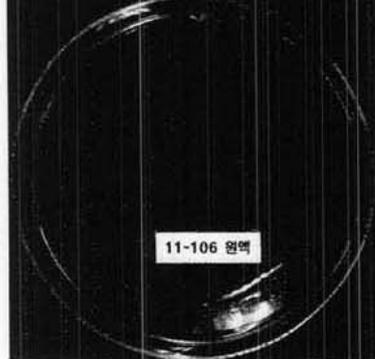
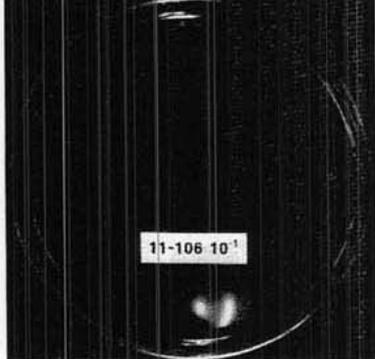
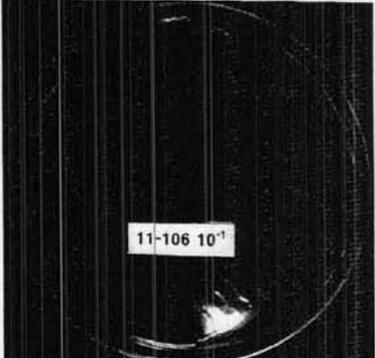
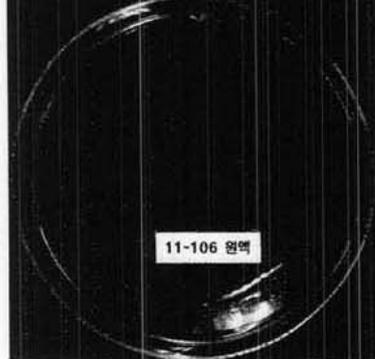
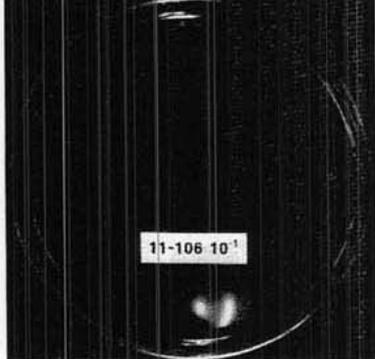
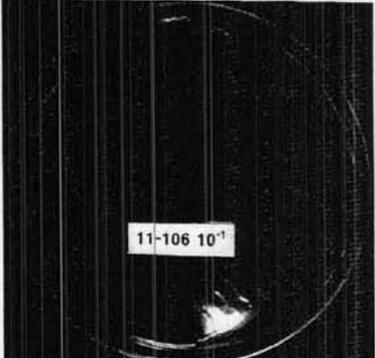
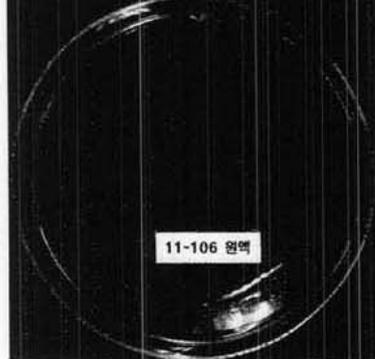
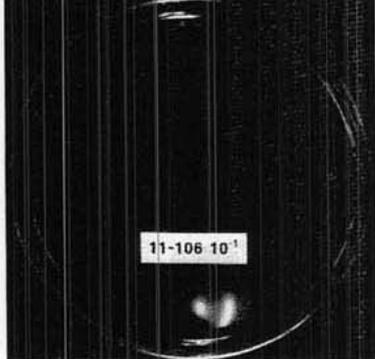


방선이

3. 병원성 대장균 검사결과

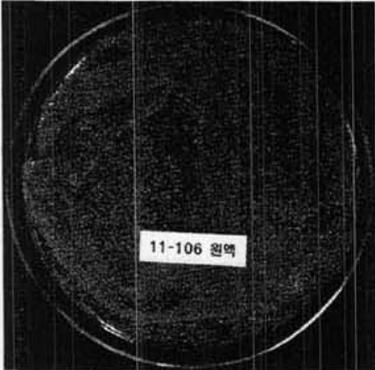
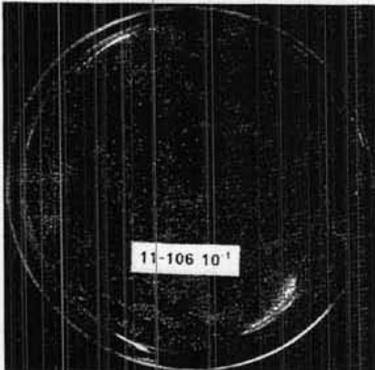
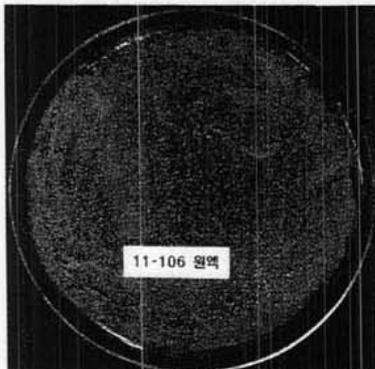
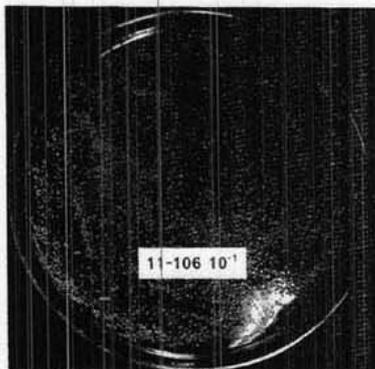
<p>검 사 방 법</p>	<p><i>E. coli</i>를 판별하는 전용배지인 Coliform agar(Merck)에 「방선이」를 접종한 후 평판상에 형성된 콜로니가 청록색 또는 적색을 띄는 콜로니를 양성으로 판정함.</p>						
<p>검 사 결 과</p>	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="438 660 845 1086">  <p>11-106 원액</p> </td> <td data-bbox="845 660 1252 1086">  <p>11-106 10⁻¹</p> </td> </tr> <tr> <td data-bbox="438 1086 845 1534">  <p>11-106 원액</p> </td> <td data-bbox="845 1086 1252 1534">  <p>11-106 10⁻¹</p> </td> </tr> <tr> <td data-bbox="438 1500 845 1556"> <p>원액시료</p> </td> <td data-bbox="845 1500 1252 1556"> <p>10⁻¹ 희석시료</p> </td> </tr> </table>	 <p>11-106 원액</p>	 <p>11-106 10⁻¹</p>	 <p>11-106 원액</p>	 <p>11-106 10⁻¹</p>	<p>원액시료</p>	<p>10⁻¹ 희석시료</p>
 <p>11-106 원액</p>	 <p>11-106 10⁻¹</p>						
 <p>11-106 원액</p>	 <p>11-106 10⁻¹</p>						
<p>원액시료</p>	<p>10⁻¹ 희석시료</p>						
	<p>(주) 해강바이오 「방선이」에 대한 대장균의 1차 추정시험 결과, 청록색 또는 적색을 띄는 콜로니가 검출되지 않아 병원성 대장균 음성으로 판정됨.</p>						
<p>최 종 결 과</p>	<p>병원성 대장균(<i>Escherichia coli</i>) 불검출</p>						

4. 병원성 살모넬라 검사결과

<p>검 사 방 법</p>	<p>살모넬라를 판별하는 전용배지인 SS Agar(Difco)에 「방선이」를 접종한 후 평판상에 형성된 콜로니의 특징이 흑갈색을 띄는 콜로니를 양성으로 판정함.</p>						
<p>검 사 결 과</p>	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="454 660 861 1064">  <p>11-106 원액</p> </td> <td data-bbox="869 660 1276 1064">  <p>11-106 10⁻¹</p> </td> </tr> <tr> <td data-bbox="454 1075 861 1478">  <p>11-106 원액</p> </td> <td data-bbox="869 1075 1276 1478">  <p>11-106 10⁻¹</p> </td> </tr> <tr> <td data-bbox="454 1489 861 1534"> <p>원액시료</p> </td> <td data-bbox="869 1489 1276 1534"> <p>10⁻¹ 희석시료</p> </td> </tr> </table>	 <p>11-106 원액</p>	 <p>11-106 10⁻¹</p>	 <p>11-106 원액</p>	 <p>11-106 10⁻¹</p>	<p>원액시료</p>	<p>10⁻¹ 희석시료</p>
 <p>11-106 원액</p>	 <p>11-106 10⁻¹</p>						
 <p>11-106 원액</p>	 <p>11-106 10⁻¹</p>						
<p>원액시료</p>	<p>10⁻¹ 희석시료</p>						
	<p>(주) 해강바이오 「방선이」에 대한 살모넬라의 1차 추정시험 결과, 흑갈색을 띄는 콜로니가 검출되지 않아 병원성 살모넬라 음성으로 판정됨.</p>						
<p>최 종 결 과</p>	<p>병원성 살모넬라(<i>Salmonella</i> sp.) 불 검 출</p>						

5. *Staphylococcus aureus* 검사결과

검 사 방 법	<i>Staphylococcus</i> sp.를 판별하는 전용배지인 Mannitol salt agar(Difco)에 「방선이」를 접종한 후 평판상에 형성된 콜로니 주변의 배지색이 황색으로 변한 콜로니를 양성으로 판정함.
------------	--

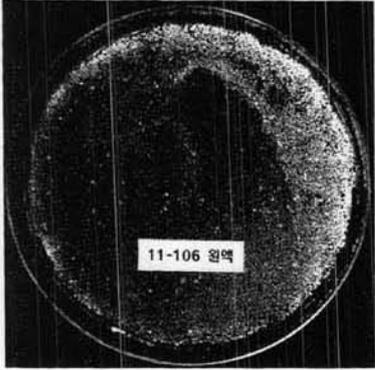
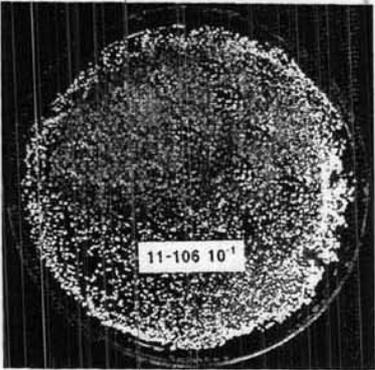
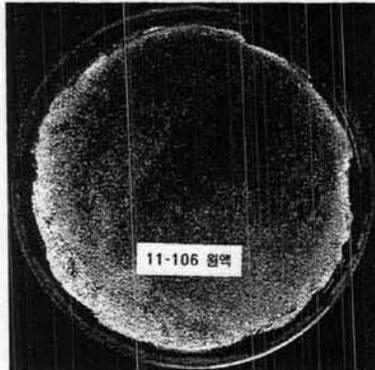
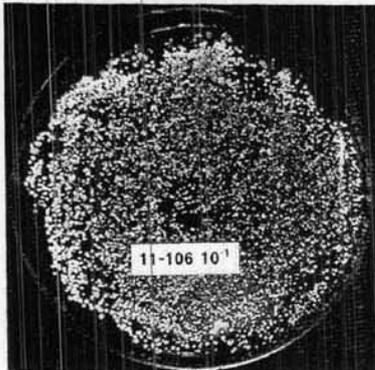
1차 검 사 결 과		
		
	원액시료	10^{-1} 희석시료

(주) 해강바이오 「방선이」에 대한 *Staphylococcus aureus*의 1차 추정시험 결과, 콜로니 주변에 황색을 띄는 세균이 검출되지 않아 *Staphylococcus aureus* 음성으로 판정됨.

최 종 결 과	<i>Staphylococcus aureus</i> 불검출
------------	----------------------------------

6. *Bacillus cereus* 검사결과

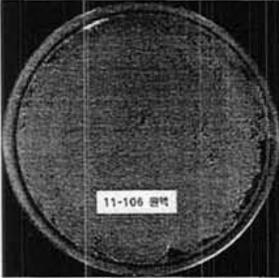
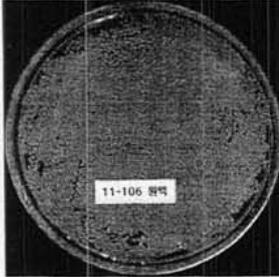
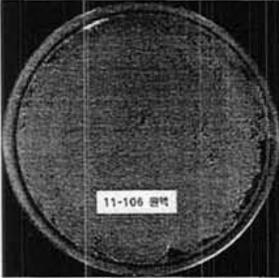
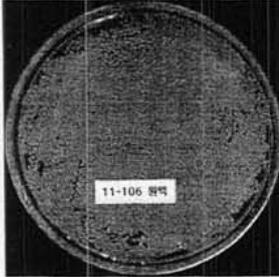
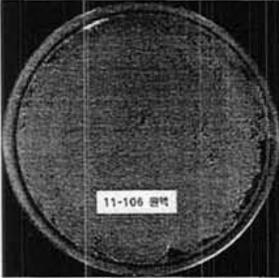
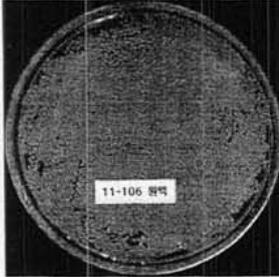
검 사 방 법	<i>Bacillus cereus</i> 를 판별하는 전용배지인 MYP Agar(Difco)에 「방선이」를 접종한 후 평판상에 형성된 콜로니가 연분홍색을 띄는 콜로니를 양성으로 판정함.
------------------	---

1차 검 사 결 과	 <p>11-106 원액</p>	 <p>11-106 10¹</p>
	 <p>11-106 원액</p>	 <p>11-106 10¹</p>
	원액시료	10 ¹ 희석시료

(주) 해강바이오 「방선이」에 대한 *Bacillus cereus*의 1차 추정시험 결과, 연분홍색을 띄는 세균이 검출되지 않아 *Bacillus cereus* 음성으로 판정됨.

최 종 결 과	<i>Bacillus cereus</i> 불검출
------------------	----------------------------

7. *Listeria monocytogenes* 검사결과

검사 방법	리스테리아를 판정하는 전용배지인 <i>Listeria</i> Enrichment Broth(Difco)에 「방선이」를 접종한 후 평판상에 형성된 콜로니의 특징이 청록색 콜로니를 양성으로 판정함.						
검사 결과	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="456 651 871 936">  <p>11-106 원액</p> </td> <td data-bbox="871 651 1281 936">  <p>11-106 10⁻¹</p> </td> </tr> <tr> <td data-bbox="456 936 871 1220">  <p>11-106 원액</p> </td> <td data-bbox="871 936 1281 1220">  <p>11-106 10⁻¹</p> </td> </tr> <tr> <td data-bbox="456 1220 871 1279">원액시료</td> <td data-bbox="871 1220 1281 1279">10⁻¹ 희석시료</td> </tr> </table>	 <p>11-106 원액</p>	 <p>11-106 10⁻¹</p>	 <p>11-106 원액</p>	 <p>11-106 10⁻¹</p>	원액시료	10 ⁻¹ 희석시료
 <p>11-106 원액</p>	 <p>11-106 10⁻¹</p>						
 <p>11-106 원액</p>	 <p>11-106 10⁻¹</p>						
원액시료	10 ⁻¹ 희석시료						
	(주) 해강바이오 「방선이」에 대한 <i>Listeria monocytogenes</i> 의 1차 추정시험 결과, 청록색을 띄는 콜로니가 검출되지 않아 <i>Listeria monocytogenes</i> 음성으로 판정됨.						
최종 결과	<i>Listeria monocytogenes</i> 불검출						

2011년 9월 6일

농촌진흥청지정 비료 시험연구기관 **원본대조필** (인)
농촌진흥청지정 농약품목등록 시험연구기관

목원대학교 미생물생태자원연구소장 (인)

방선이의
급성경구독성시험 결과보고서

T.N. : ET0-1129



(주) 한국생물안전성연구소



시험제목 : 방선이에 대한 급성경구독성시험

시험물질 : 방선이

시험목적 : 방선이에 대한 급성경구독성의 정보를 얻기 위하여 실시하였다.

시험방법 : 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2010-29호)에 준하여 실시하였다.

시험일정

- 시험계획서 승인일 : 2011년 07월 27일
- 동물입수일 : 2011년 08월 12일
- 검역순화기간 : 2011년 08월 12일 ~ 08월 15일
- 시험물질투여일 : 2011년 08월 16일
- 시험종료일 : 2011년 08월 30일
- 최종보고서 제출일 : 2011년 09월 06일

시험의뢰자

- 명 칭 : (주) 해강바이오
- 소재지 : 경기도 여주군 북내면 외룡리 321-8
- 대표자 : 홍성오

시험기관

- 명 칭 : (주) 한국생물안전성연구소
- 소재지 : 충청북도 음성군 감곡면 단평리 420-6
- 대표자 : 대표이사 이해근
- 운영책임자 : 대표이사 이해근

시험관계자

- 시험책임자 : 독성연구실장 이 병 목
 - 소속 : (주) 한국생물안전성연구소 독성연구실
- 본시험은 시험책임자의 책임하에 하기의 각 시험담당자가 실시하고 시험성적의 종합 평가를 시험책임자가 중심이 되어 실시하였다.

- 시험담당자 : 이승일, 박상민, 김보라
- 병리조직 책임자 : 이승일
- 동물관리 책임자 : 김명진
- 동물실험실 : 소동물-1호실

시험물질의 보관

본시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질보관고에 보관하였으며 시료번호 (2011-1-30)를 부여하였다.

시험자료의 보관

본시험의 시험기초자료 및 관계시험성적서는 당 연구소 자료 보관실에 보관하였으며 시험번호(ETO-1129)를 부여하였다.

- 시험기초자료(문서류) : 중앙자료보관실
- 시험계획서, 최종보고서(원본) : 중앙자료보관실
- 자료입력하드디스크 : 중앙자료보관실
- 검체류 : 중앙자료보관실
- 자료보관기간 : 5년
- 자료보관 책임자 : 이해근

시험결과 평가에 참여한 연구자 성명 및 날인(또는 서명)

2011년 09월 06일

- 시험 책임자 : 이 병 목 
- 시험 담당자 : 이 승 일 
- 병리조직책임자 : 이 승 일 
- 동물관리책임자 : 김 명 진 

목 차

보고서 표지	페이지
제출문	
시험개요	1
시험관계자 및 책임자 승인	2
목차	3
1. 요약	4
2. 시험물질	5
3. 재료 및 방법	
가. 시험생물	5
나. 사육환경	5
다. 투여약량수준설정 및 억제조제	6
라. 시험물질의 투여	6
마. 관찰 및 검사항목	6
바. LD ₅₀ 산출	7
4. 시험결과	
가. 치사동물 및 LD ₅₀ 값	7
나. 일반중독증상	7
다. 체중변화	7
라. 부검소견	7
5. 참고문헌	7
6. 첨부자료	
◦ 일별치사동물수 조사결과	8
◦ 임상관찰결과	8
◦ 체중변화측정결과	8
◦ 부검소견결과	9

1. 요약 (Summary)

방선이에 대한 급성경구독성을 마우스(ICR계통)를 공시하여 1회 경구투여한 후 14일동안 치사수, 일반중독증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- 기초시험의 투여약량 수준인 5,000 mg/kg에서 치사동물은 없었다.
- 일반중독증상은 관찰되지 않았다.
- 체중변화는 약제투여 후 경과일수에 따라 암수 모두에서 1일째까지 감소를 보였으나 3일째부터는 회복되어 증가추세를 보였다.
- 부검소견은 투여약량 5,000 mg/kg에서 특이한 증상은 없었다.

이상의 시험결과, 본 시험에서 각 장기에 미치는 영향은 없는 것으로 사료되었으며 수컷과 암컷 모두에 대한 LD₅₀값은 5,000 mg/kg 이상으로서 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급(저독성)으로 분류되었다.

2. 시험물질

- 명 칭 : 방선이
- 시료번호 : 2011-1-30
- 시험번호 : ETO-1129
- 입 수 일 : 2011년 07월 27일
- 입 수 량 : 1ℓ
- 시험물질특성 : 갈색의 액상
- 시험의뢰자 : (주) 해강바이오

3. 재료 및 방법

가. 시험동물

1) 동물종(계통) : SPF mouse (ICR계)

2) 공급원

- 명 칭 : (주) 한림실험동물연구소
- 주 소 : 경기도 화성시 봉담읍 유리 254-1(031-227-5955)
- 대 표 : 김 길 수

3) 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제 2010-29호 농약의 독성시험기준과 방법에 마우스를 사용하도록 되어 있으며, ICR계통은 농약의 독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가가 용이하기 때문이다.

4) 주령 및 체중범위

구 분	수 컷	암 컷
구입시 주령	4	4
구입시 체중(g)	19.4 ~ 21.8	18.2 ~ 20.5
투여시 주령	5	5
투여시 체중(g)	21.4 ~ 25.3	21.9 ~ 23.2

5) 순화 및 검역

동물을 구입한 후 4일 동안 동물실험실의 환경하에서 순화시키면서 일반건강상태를 관찰한 후 건강한 개체를 선별하여 시험에 공시하였다.

나. 사육환경

1) 사육환경

본 시험의 사육환경은 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기시설(공조기계), 조명시간 12시간(오전7시~오후7시) 및 조도 200 ~ 300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

2) 사육상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육상자(26 × 20 × 12 cm)에 5마리씩 넣어 깔짚을 깔아 사육하였다.

3) 사료 및 물의 급여방법

사료는 실험동물용 고품사료[E.P 슈퍼피드(주)]를 자외선 멸균시켜 자유급식 시켰으며 물은 정수필터를 통과한 지하수(수질검사: 2010. 11. 25)를 자유 섭취시켰다.

다. 투여약량수준설정 및 약제조제

1) 투여약량수준설정

기초시험으로 수컷과 암컷 모든 동물의 투여약량은 5,000 mg/kg으로 설정하였다.

2) 투여약량수준별 실험동물수

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

3) 대조군의 설정

시험물질이 액상으로 투여약제 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 50 ml의 메스플라스크에 넣고 증류수를 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 주지않았다.

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 1시간에서 4시간째까지 매시간 그리고 익일부터는 매일 1회씩 일반중독증상 및 치사된 동물수를 14일간 관찰 조사하였다.

2) 체중측정

시험된 모든 동물에 대하여 투여 당일, 투여 후 1일 및 7, 14일째 개체별 체중을 측정하였다.

3) 부검

관찰기간 종료 후 에테르 마취시켜 내부장기의 육안적 이상유무를 관찰하였다.

바. LD₅₀ 산출

기초시험에서 시험이 종료되어 통계처리는 수행하지 않았다.

4. 결과 및 고찰

가. 치사동물 및 LD₅₀ 값

기초시험결과 투여약량 5,000 mg/kg에서 치사동물은 없었으며, 급성경구독성의 LD₅₀값은 수컷과 암컷 모두 5,000 mg/kg이상으로 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급(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

부검은 시험 종료 후 에테르로 마취시켜 각 주요 장기에 대한 육안적 관찰을 실시하였고 약제투여에 의한 특이한 증상은 관찰되지 않았다.

5. 참고문헌

- 농촌진흥청(2010) : 농약의 독성시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제 2010-29호, 2010.10.13)

6. 첨부자료

표1. 시험물질 처리 후 일별치사동물수 조사결과

성 별	투여약량 (mg/kg)	투여 후 치사동물수														합계	
		분		시 간				일 수									
		10	30	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	~ 14		
수 컷	5,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	~ 0	0/5
암 컷	5,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	~ 0	0/5

표2. 시험물질 처리 후 임상관찰결과

성 별	투여약량 (mg/kg)	투여 후 증독증상															
		분		시 간				일 수									
		10	30	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	~ 14		
수 컷	5,000	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	~ -	-
암 컷	5,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	~ -	-

-* : 정상

표3. 시험물질 처리 후 체중변화측정결과

(단위 : g)

성 별	투여약량 (mg/kg)	투여 후 경과일수				
		0	1	3	7	14
수 컷	5,000	23.7±1.4(5)*	22.3±2.4(5)	24.1±1.8(5)	26.3±1.5(5)	30.4±2.1(5)
암 컷	5,000	22.7±0.5(5)	21.7±1.0(5)	23.1±1.1(5)	25.3±0.9(5)	28.3±1.2(5)

(*) : 마리

표4. 시험종료 후 부검소견결과

성 별	투여약량 (mg/kg)	주요 장기명	육안적 소견
수 컷	5,000	신 장	N*
		비 장	N
		간 장	N
		심 장	N
		소화기계	N
		폐 장	N
		이외의 장기	N
암 컷	5,000	신 장	N
		비 장	N
		간 장	N
		심 장	N
		소화기계	N
		폐 장	N
		이외의 장기	N

N* : 정상

방선이의
급성경피독성시험 결과보고서

T.N. : ETP-1129



(주) 한국생물안전성연구소



제 출 문

시험물질 : 방선이

시험제목 : 방선이에 대한 급성경피독성시험

상기 독성시험을 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제 2010-29호, 2010. 10. 13.)에 준하여 실시하고 그 결과를 다음과 같이 제출합니다.

2011년 09월 06일

(주) 한국생물안전성연구소 독성연구실
운영책임자 이 해



시험제목 : 방선이에 대한 급성경피독성시험

시험물질 : 방선이

시험목적 : 방선이에 대한 급성경피독성의 정보를 얻기 위하여 실시하였다.

시험방법 : 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2010-29호)에 준하여 실시하였다.

시험일정

- 시험계획서 승인일 : 2011년 07월 27일
- 동물입수일 : 2011년 08월 12일
- 검역순화기간 : 2011년 08월 12일 ~ 08월 16일
- 시험물질투여일 : 2011년 08월 17일
- 시험종료일 : 2011년 08월 31일
- 최종보고서 제출일 : 2011년 09월 06일

시험의뢰자

- 명 칭 : (주) 해강바이오
- 소 재 지 : 경기도 여주군 북내면 외릉리 321-8
- 대 표 자 : 홍성오

시험기관

- 명 칭 : (주) 한국생물안전성연구소 독성연구실
- 소 재 지 : 충청북도 음성군 감곡면 단평리 420-6
- 대 표 자 : 대표이사 이해근
- 운영책임자 : 대표이사 이해근

시험관계자

- 시험책임자 : 독성연구실장 이 병 목
- 소 속 : (주) 한국생물안전성연구소 독성연구실

본시험은 시험책임자의 책임하에 하기의 각 시험담당자가 실시하고 시험성적의 종합 평가를 시험책임자가 중심이 되어 실시하였다.

- 시험담당자 : 이승일, 박상민, 김보라
- 병리조직 책임자 : 이승일
- 동물관리 책임자 : 김명진
- 동 물 실험 실 : 소동물-1호실

시험물질의 보관

본시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질보관고에 보관하였으며 시료번호 (2011-1-30)를 부여하였다.

시험자료의 보관

본시험의 시험기초자료 및 관계시험성적서는 당 연구소 자료 보관실에 보관하였으며 시험번호(ETP-1129)를 부여하였다.

- 시험기초자료(문서류) : 중앙자료보관실
- 시험계획서, 최종보고서(원본) : 중앙자료보관실
- 자료입력하드디스크 : 중앙자료보관실
- 검체류 : 중앙자료보관실
- 자료보관기간 : 5년
- 자료보관 책임자 : 이해근

시험결과 평가에 참여한 연구자 성명 및 날인(또는 서명)

2011년 09월 06일

◦ 시험 책임자 : 이 병 목



◦ 시험 담당자 : 이 승 일



◦ 병리조직책임자 : 이 승 일



◦ 동물관리책임자 : 김 명 진



목 차

보고서 표지	페이지
제출문	
시험개요	1
시험관계자 및 책임자 승인	2
목차	3
1. 요약	4
2. 시험물질	5
3. 재료 및 방법	
가. 시험생물	5
나. 사육환경	5
다. 투여약량수준설정 및 약제조제	6
라. 시험물질의 투여	6
마. 관찰 및 검사항목	6
바. LD ₅₀ 산출	7
4. 시험결과	
가. 치사동물 및 LD ₅₀ 값	7
나. 일반중독증상	7
다. 체중변화	7
라. 부검소견	7
5. 참고문헌	7
6. 첨부자료	
◦ 일별치사동물수 조사결과	8
◦ 임상관찰결과	8
◦ 체중변화측정결과	8
◦ 부검소견결과	9

1. 요약 (Summary)

방선이에 대한 급성경피독성을 랫드(S.D.계통)를 공시하여 1회 약제 처리후 14일동안 치사수, 일반중독증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- 기초시험의 처리약량수준인 4,000 mg/kg에서 치사동물은 없었다.
- 일반중독증상은 관찰되지 않았다.
- 체중변화는 약제투여 후 경과일수에 따라 암수 모두에서 1일째까지 감소를 보였으나 3일째부터는 회복되어 증가추세를 보였다.
- 부검소견은 처리약량 4,000 mg/kg에서 특이한 증상은 없었다.

이상의 시험결과, 본시험에서 각 장기에 미치는 영향은 없는 것으로 사료되었으며 수컷과 암컷 모두에 대한 LD₅₀값은 4,000 mg/kg 이상으로서 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급(저독성)에 해당되었다.

2. 시험물질

- 명 칭 : 방선이
- 시료번호 : 2011-1-30
- 시험번호 : ETP-1129
- 입 수 일 : 2011년 07월 27일
- 입 수 량 : 1 l
- 시험물질특성 : 갈색의 액상
- 시험의뢰자 : (주) 해강바이오

3. 재료 및 방법

가. 시험동물

1) 동물종(계통) : SPF Rat (S.D.계)

2) 공급원

- 명 칭 : (주) 한림실험동물연구소
- 주 소 : 경기도 화성시 봉담읍 유리 254-1(031-227-5955)
- 대 표 : 김 길 수

3) 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제2010-29호 농약의 독성시험기준과 방법에 랫드를 사용 하도록 되어 있으며 S.D.계통은 농약의 독성시험에 널리 사용되고 있고 또한 시험기초 자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가가 용이하기 때문이다.

4) 주령 및 체중범위

구 분	수 컷	암 컷
구입시 주령	7	7
구입시 체중(g)	250 ~ 260	180 ~ 190
투여시 주령	8	8
투여시 체중(g)	260 ~ 280	190 ~ 210

5) 순화 및 검역

동물을 구입한 후 5일 동안 동물실험실의 환경조건하에서 순화시키면서 외관상 건강한 동물을 선별, 무작위로 추출하여 시험에 공시하였다.

나. 사육환경

1) 사육환경

본 시험의 사육환경은 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기시설(공조기계), 조명시간 12시간(오전7시~오후7시) 및 조도 200 ~ 300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

2) 사육상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육상자(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 자유급식 시켰으며 물은 정수필터를 통과한 지하수(수질검사: 2010. 11. 25)를 자유 섭취시켰다.

다. 처리약량수준설정 및 약제조제

1) 처리약량설정

기초시험으로 수컷과 암컷 모든 동물의 약제처리 약량은 4,000 mg/kg으로 설정하였다.

2) 약제처리 약량수준별 실험동물수

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

3) 대조군의 설정

시험물질이 액상으로 투여약제 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 50 ml의 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 cm이상 크기 넓이로 제모하고, 4×5 cm 크기 면적의 거즈에 조제된 시험물질을 체중 측정치를 기준으로 소정 액량을 산출한 후 균일하게 묻힌 다음 제모 된 부위에 도포한 후 의료용 반창고로 고정·유지시켰다.

2) 시험물질의 제거

흉복배부에 도포시킨 시험물질은 24시간 후 제거하고 피부에 묻은 잔여 물질은 생리 식염수로 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 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 에테르 마취시켜 내부장기의 육안적 이상유무를 관찰하였다.

바. LD₅₀ 산출

기초시험에서 시험이 종료되어 통계처리는 하지 않았다.

4. 결과 및 고찰

가. 치사동물 및 LD₅₀ 값

기초시험결과 수컷과 암컷 모두 처리약량 4,000 mg/kg수준에서 치사동물은 없었으며, 수컷과 암컷 모두에 대한 급성경피독성 LD₅₀값은 4,000 mg/kg이상으로 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급(저독성)으로 분류되었다.

나. 일반중독증상

본 시험에서 약제처리 후 일반중독증상은 관찰되지 않았다.

다. 체중변화

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

라. 부검소견

부검은 시험 종료 후 에테르로 마취시켜 각 주요 장기에 대한 육안적 관찰을 실시하였고 약제투여에 의한 특이한 증상은 관찰되지 않았다.

5. 참고문헌

- 농촌진흥청(2010) : 농약의 독성시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제 2010-29호, 2010.10.13)

6. 첨부자료

표1. 시험물질 처리 후 일별치사동물수 조사결과

성 별	처리약량 (mg/kg)	투여 후 치사동물수													합계			
		분		시 간				일 수										
		10	30	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7		~	14	
수 컷	4,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	~	0	0/5
암 컷	4,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	~	0	0/5

표2. 시험물질 처리 후 임상관찰결과

성 별	처리약량 (mg/kg)	투여 후 중독증상															
		분		시 간				일 수									
		10	30	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	~	14	
수 컷	4,000	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	~	-
암 컷	4,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	~	-

-* : 정상

표3. 시험물질 처리 후 체중변화측정결과

(단위 : g)

성 별	처리약량 (mg/kg)	투여 후 경과일수				
		0	1	3	7	14
수 컷	4,000	271.2±5.9(5)*	259.7±5.4(5)	273.0±4.8(5)	291.1±4.8(5)	328.2±4.2(5)
암 컷	4,000	202.2±9.0(5)	192.7±7.7(5)	203.4±8.1(5)	213.6±7.5(5)	231.4±7.8(5)

(*) : 마리

표4. 시험종료 후 부검소견결과

성 별	투여약량 (mg/kg)	주요 장기명	육안적 소견
수컷	4,000	신 장	N*
		비 장	N
		간 장	N
		심 장	N
		소화기계	N
		폐 장	N
		이외의 장기	N
암컷	4,000	신 장	N
		비 장	N
		간 장	N
		심 장	N
		소화기계	N
		폐 장	N
		이외의 장기	N

N* : 정상

방선이의 잉어에 대한
급성어독성시험 결과보고서

T.N. : ETF-1138

 **KBSI** (주) 한국생물안전성연구소
KOREA BIO-SAFETY INSTITUTE

136

제 출 문

시험물질 : 방선이

시험제목 : 방선이의 잉어에 대한 급성어독성시험

상기 독성시험을 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제 2010-29호, 2010. 10. 13)에 준하여 실시하고 그 결과를 다음과 같이 제출합니다.

2011년 09월 06일

(주) 한국생물안전성연구소 독성연구실

운영책임자 이 해규 인



137

시험제목 : 방선이의 잉어에 대한 급성어독성시험

시험목적 : 방선이에 대한 급성어독성정보를 얻기 위하여 실시하였다.

시험방법 : 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2010-29호, 2010. 10. 13.)에
준하여 실시하였다.

시험일정

- 시험어류입수일 : 2011년 07월 04일
- 순화사육기간 : 2010년 07월 04일 ~ 2011년 08월 15일
- 시험물질투여일 : 2011년 08월 16일
- 시험종료일 : 2011년 08월 20일
- 최종보고서 제출일 : 2011년 09월 06일

시험의뢰자

- 명 칭 : (주) 해강바이오
- 소 재 지 : 경기도 여주군 북내면 외룡리 321-8
- 의뢰책임자 : 홍성오

시험기관

- 명 칭 : (주) 한국생물안전성연구소
- 소 재 지 : 충청북도 음성군 감곡면 단평리 420-6
- 대 표 자 : 대표이사 이해근
- 운영책임자 : 대표이사 이해근

시험관계자

- 시험책임자 : 독성연구실장 이병목
- 소 속 : (주) 한국생물안전성연구소 독성연구실

본시험은 시험책임자의 책임하에 하기의 각 시험담당자가 실시하고 시험성적의 종합
평가를 시험책임자가 중심이 되어 실시하였다.

- 시험담당자 : 이승일, 박상민
- 시험어류 관리자 : 김보라
- 신뢰성보증책임자 : 이해근

시험물질의 보관

본시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질 보관고에 보관하였으며 시료번호 (2011-1-30)를 부여하였다.

시험자료의 보관

본시험의 시험기초자료 및 관계시험성적서는 당 연구소 자료 보관실에 보관하였으며 시험번호(ETF-1138)를 부여하였다.

- 자료보관기간 : 5년
- 자료보관 책임자 : 이해근

시험결과 평가에 참여한 연구자 성명 및 날인(또는 서명)

2011년 09월 06일

◦ 시험 책임자 : 이 병 목



◦ 시험 담당자 : 이 승 일



박 상 민



◦ 시험어류 관리자 : 김 보 라



목 차

보고서 표지	페이지
제출문	
시험개요	1
시험관계자 및 책임자 승인	2
목차	3
요약	4
1. 시험물질	5
2. 재료 및 방법	
가. 시험생물	5
나. 시험용기	5
다. 시험용수 및 수온	5
라. 처리방법	5
마. LC ₅₀ 산출법	6
바. 관찰 및 조사항목	6
3. 시험결과	
가. 시험약제 처리 후 경과시간별 치사수	7
나. 시험약제의 LC ₅₀ 및 중독증상	7
다. 요약	8
4. 첨부자료	
◦ 경시적 수질검사 성적서	8
◦ Probit-LC ₅₀ (48H)	9
◦ Probit-LC ₅₀ (96H)	10

요 약 (Summary)

방선이의 잉어(*Cyprinus Carpio*)에 대한 급성어독성시험을 96시간 동안 실시하여 생사수와 일반중독증상을 관찰하고 체중 및 전장을 조사한 결과는 다음과 같다.

농도 (mg/l)	잉어수 (마리)	누적치사수(마리)			
		24h	48h	72h	96h
3.0		0	0	0	0
3.84		0	0	1	1
4.92	10	0	2	2	2
6.30		1	4	6	6
8.06		3	9	10	10
음성대조구		0	0	0	0

- 일반중독증상으로 SUR(수면부상)이 관찰되었다.
- 체중은 평균 1.86 ± 0.22 g, 전장은 평균 4.51 ± 0.45 cm 이었다.
- pH는 평균 6.61(최저 6.11 ~ 최고 7.15), DO는 평균 6.80 mg/l(최저 6.1 ~ 최고 7.4) 이었다.
- 시험기간의 평균 수온은 24.0 °C(최저 23.7°C ~ 최고 24.3°C)이었다.

이상의 시험결과,
본 시험물질의 잉어에 대한 48시간 반수치사농도(LC₅₀)는 6.305 mg/l(5.591 ~ 7.266), 96시간 반수치사농도(LC₅₀)는 5.664 mg/l(5.017 ~ 6.441)으로 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 Ⅲ급으로 분류되었다.

1. 시험물질

- 명 칭 : 방선이
- 시료번호 : 2011-1-30
- 시험번호 : ETF-1138
- 유효성분 : 90%(Streptomyces sp. A1022 1.0×10^5 cfu/ml : 90%)
- 입 수 일 : 2011년 07월 29일
- 입 수 량 : 500 ml
- 시험물질특성 : 갈색의 액상
- 시험의뢰자 : (주) 해강바이오

2. 재료 및 방법

가) 시험생물

- 시험어종(학명) : 잉어(*Cyprinus Carpio*)
- 공급원
 - 명 칭 : 박영택(개인사업자)
 - 주 소 : 충북 충주시 금가면 오석리 527번지
 - 전화번호 : 010-8489-0070
- 순화 및 사육조건
 - 순화기간 : 2011년 07월 04일 ~ 2011년 08월 15일
 - 사육온도 : 22~24℃
 - 광 조 건 : 200~300 Lux
 - 사료급여 : Bio Meal(채색 관상어 사료-EPE타입)제일사료(주)를 1일 2회 급여

나) 시험용기 : 원통형의 유리제품 12.5 l(높이25.5 cm × Ø25.5 cm)용기를 사용하였다.

다) 시험용수 : 지하수

라) 처리방법

◦ 시험물질의 조제

시험물질 1.11 g을 정확히 평량하여 100 ml 용량의 volumetric flask에 넣고 시험용수를 가하여 100 ml를 채운 후 완전히 현탁될 때까지 충분히 현탁시켜 10,000 mg/l stock solution을 조제하였다. 조제된 10,000 mg/l stock solution을 1,000 ml beaker에 넣고 900 ml의 시험용수를 가하여 충분히 현탁시켜 시험물질용액(1,000 mg/l stock solution)을 조제하였다.

시험물질용액(1,000 mg/l stock solution) 30, 38.4, 49.2, 63.0 및 80.6 ml를 취하여 12.5 l의 시험수조에 넣고 시험용수를 전량 10 l가 되도록 가하여 완전히 현탁 될 때까지 충분히 교반시킨 후 시험용액으로 사용하였다.

◦ 시험농도 설정

예비시험결과 48시간 반수치사농도(LC₅₀)값이 3.0 ~ 8.0 mg/l 범위 내에 있을 것으로 추정되어 3.0, 3.84, 4.92, 6.30 및 8.06 mg/l(공비 1.28)의 농도로 시험을 실시하였다.

- 시험어 절식 : 시험물질 처리 24시간 전부터 시험종료시까지 사료급여를 중단시켰다.
- 시험어류수 : 농도당 10마리
- 시험 대조구
 - 음성대조군 : 시험용수인 지하수로 음성대조군시험을 실시하였다.
 - 양성대조군 : PCP-Na염(90%)의 잉어에 대한 급성어독성시험을 실시하였다.

마) LC₅₀ 산출법

시험종료 후 Probit 법을 이용하여 LC₅₀치 및 95% 신뢰한계치를 산출하였다.

바) 관찰 및 조사항목

- 중독증상 및 치사율

시험개시 1시간 후 그리고 24시간 간격으로 일반중독증상 및 치사어를 기록하였으며 치사어의 판정은 공시어에 유리막대로 건드렸을 때 움직임이 없거나 아가미 호흡이 중단된 경우 치사로 판정하였다.

- 수질측정(DO, pH, 수온) 조사시기 및 방법

수질측정은 시험개시전과 24시간 간격으로 시험종료시까지 DO, pH, 수온을 Orion 4 star모델로 측정하여 조사하였다.

3. 시험결과

가) 시험물질처리 후 경과시간별 치사수

농도 (mg/l)	잉어수 (마리)	누적치사수(마리)				치사율(%)	
		24h	48h	72h	96h	48h	96h
3.0		0	0	0	0	0	0
3.84		0	0	1	1	0	10
4.92	10	0	2	2	2	20	20
6.30		1	4	6	6	40	60
8.06		3	9	10	10	90	100

* 시험물질 분시험기간 : 2011. 08. 16. ~ 2011. 08. 20.

나) 시험물질의 LC₅₀ 및 중독증상

구 분	LC ₅₀ (mg/l)		중독증상	체중(g)	전장(cm)
	48h	96h			
시험물질	6.305 (5.591 ~ 7.266)	5.664 (5.017 ~ 6.441)	SUR	1.86±0.22***	4.51±0.45
PCP-Na염*	0.116 (0.103~0.129)**	0.108 (0.096~0.119)	SUR	1.70±0.13	4.08±0.6
음성대조군	-	-	N	1.91±0.13	4.29±0.39

※ 중독증상 : N (정상), SUR(수면부상)

* 양성대조물질 분시험기간 : 2011. 08. 08. ~ 2011. 08. 12.

** 95% 신뢰한계

*** 평균 ± 표준편차

다) 요약

방선이의 잉어에 대한 급성어독성시험결과, 48시간 및 96시간 반수치사농도(LC₅₀)는 각각 6.305 mg/l(5.591 ~ 7.266)와 5.664 mg/l(5.017 ~ 6.441)으로 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 Ⅲ급으로 분류되었다. 이상증상으로는 수면부상이 관찰되었고 음성대조군에서 특이한 증상은 관찰되지 않았다.

4. 첨부자료

◦ 경시적 수질검사 성적서

	구 분	시험물질처리직후 / 시험생물투입전	시험물질처리 48시간후	시험물질처리 96시간후
DO	시험물질	7.4	6.7	6.1
	PCP-Na염*	8.2	6.5	4.6
	음성대조군	7.5	6.7	6.1
pH	시험물질	7.15	6.48	6.11
	PCP-Na염*	7.55	7.16	7.22
	음성대조군	7.21	6.71	6.42
	수 온	23.7	24.2	24.3

EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM
 USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES
 Version 1.5

ETF-1138(48H)

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion	Predicted
				Responding Adjusted for Controls	Proportion Responding
3.0000	10	0	0.0000	0.0000	0.0004
3.8400	10	0	0.0000	0.0000	0.0123
4.9200	10	2	0.2000	0.2000	0.1305
6.3000	10	4	0.4000	0.4000	0.4986
8.0600	10	9	0.9000	0.9000	0.8672

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 1.037
 Chi - Square for Heterogeneity(tabular value at 0.05 level) = 7.815

Mu = 0.799672
 Sigma = 0.095826

Parameter	Estimate	Std. Err.	95% Confidence Limits	
Intercept	-3.345025	2.171668	(-7.601494,	0.911444)
Slope	10.435563	2.741550	(5.062124,	15.809002)

Theoretical Spontaneous Response Rate = 0.0000

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure		
	Conc.	Lower	Upper
LC/EC 1.00	3.774	2.206	4.554
LC/EC 5.00	4.386	2.979	5.078
LC/EC 10.00	4.752	3.484	5.401
LC/EC 15.00	5.016	3.861	5.646
LC/EC 50.00	6.305	5.591	7.266
LC/EC 85.00	7.925	6.963	10.871
LC/EC 90.00	8.365	7.261	12.080
LC/EC 95.00	9.064	7.705	14.159
LC/EC 99.00	10.534	8.572	19.159

EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM
 USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES
 Version 1.5

ETF-1138(96H)

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Proportion		Predicted Proportion Responding
			Observed Proportion Responding	Responding Adjusted for Controls	
3.0000	10	0	0.0000	0.0000	0.0024
3.8400	10	1	0.1000	0.1000	0.0423
4.9200	10	2	0.2000	0.2000	0.2660
6.3000	10	6	0.6000	0.6000	0.6817
8.0600	10	10	1.0000	1.0000	0.9413

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 2.001
 Chi - Square for Heterogeneity(tabular value at 0.05 level) = 7.815

Mu = 0.753106
 Sigma = 0.097844

Parameter	Estimate	Std. Err.	95% Confidence Limits	
Intercept	-2.696999	1.852552	(-6.328001,	0.934003)
Slope	10.220332	2.455513	(5.407527,	15.033137)

Theoretical Spontaneous Response Rate = 0.0000

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure		95% Confidence Limits	
	Conc.		Lower	Upper
LC/EC 1.00	3.353		2.076	4.047
LC/EC 5.00	3.910		2.750	4.533
LC/EC 10.00	4.243		3.184	4.832
LC/EC 15.00	4.484		3.508	5.055
LC/EC 50.00	5.664		5.017	6.441
LC/EC 85.00	7.153		6.318	9.319
LC/EC 90.00	7.560		6.605	10.275
LC/EC 95.00	8.204		7.033	11.908
LC/EC 99.00	9.566		7.871	15.785



[관리번호] 제 2011-1034(1)호

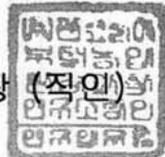
비효 및 피해연구 결과 보고서

(토양미생물제제 # 1)

2011. 11. 21

위탁자 : (주)해강바이오 대표자 홍성오

연구기관 : (주)판코리아 농업환경과학연구소장



**연구과제명 : 토양미생물제제 등록을 위한 비효비해
작물 재배 연구**

- 연구위탁자 : (주)해강바이오 대표자 홍성오
- 연구책임자 : (주)판코리아 농업환경과학연구소장 장기운

1. 계약기간 : 2011. 08. 31 ~ 2011. 11. 30

2. 재료 및 방법

가. 시험장소 : 대전광역시 유성구 세동 125-1번지

나. 시험전 공시토양 : 사양토

다. 시험작물 : 적치마상추(흥농종묘)

라. 시험비료 : 토양미생물제제(방선이)
- *Streptomyces* sp. A1022 1.0×10^5 cfu/g

마. 시험규모

- (1) 처리구당 시험면적 $15\text{m}^2(1.5\text{m} \times 10\text{m})$
- (2) 비닐하우스에서 임의배치법의 3반복으로 수행하였음

바. 처리내용

- (1) 관행구(미생물제제 무처리구) : NPK처리 + 미생물제제 무처리
- (2) 대조구(멸균구) : NPK처리 + 멸균 추천 적량미생물제제
- (3) 적량 처리구 : NPK + 추천 적량미생물제제
- (4) 배량 처리구 : NPK + 추천 배량미생물제제

사. 시용량

처 리 구	N-P ₂ O ₅ -K ₂ O* 시비량(kg/10a)		퇴비** 시용량 (kg/10a)	토양미생물제제 처리량 (희석배수***)
	기비	추비		
관 행 구	5-5-4	5-0-4	1,000	-
대 조 구	5-5-4	5-0-4	1,000	200
적량 처리구	5-5-4	5-0-4	1,000	200
배량 처리구	5-5-4	5-0-4	1,000	100

* N : 요소, P₂O₅ : 용성인비, K₂O : 염화가리, ** 퇴비 : 축분퇴비

*** 추천량 : 면적 660m²에 시험자재 1리터를 200배 희석

아. 경종개요

- (1) 정식 : 2011. 09. 03
- (2) 재식거리 : 20cm×15cm
- (3) 시비방법 : 상추 정식 후 추비로 토양미생물제제를 2011년 10월 05일, 12일, 19일 3회에 걸쳐 처리구에 설정된 양만큼 엽면시비를 실시하였다.
- (4) 생육조사 : 생육기간 중 2011년 10월 12일, 19일, 26일에 걸쳐 3회 실시하여 평균값으로 계산하였다.

3. 시 험 결 과

가. 시험 전 · 후 공시토양의 화학적 특성

처 리 구	pH (1:5)	EC dS/m	T-N %	O.M %	Ava.- P ₂ O ₅ mg/kg	Ex.-cations (cmol _c /kg)				CEC cmol _c /kg	
						Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺		
시험전	6.29	1.16	0.33	2.97	839	6.21	2.21	1.36	0.49	14.0	
시 험 후	관행구	6.15	1.14	0.22	2.69	825	6.08	2.08	1.19	0.51	13.2
	대조구	6.17	1.15	0.23	2.68	828	6.09	2.09	1.17	0.51	13.3
	적량구	6.18	1.13	0.23	2.73	823	6.08	2.05	1.17	0.49	13.4
	배량구	6.16	1.14	0.25	2.77	822	6.11	2.08	1.21	0.47	13.6

나. 생육 및 수량 조사

(1) 토양미생물제제가 상추의 생육에 미치는 효과

처 리 구	엽 장		엽 폭		Chlorophyll	
	길이(cm)	지수(%)	폭(cm)	지수(%)	함량 (mg/100cm ²)	지수(%)
관 행 구	15.9 ^{a*}	98	11.0 ^a	99	2.39 ^a	98
대 조 구	16.3 ^a	100	11.2 ^a	100	2.43 ^a	100
추천 적량 처리구	16.7 ^a	103	11.8 ^a	106	2.51 ^a	103
추천 배량 처리구	17.0 ^a	105	11.9 ^a	107	2.53 ^a	104

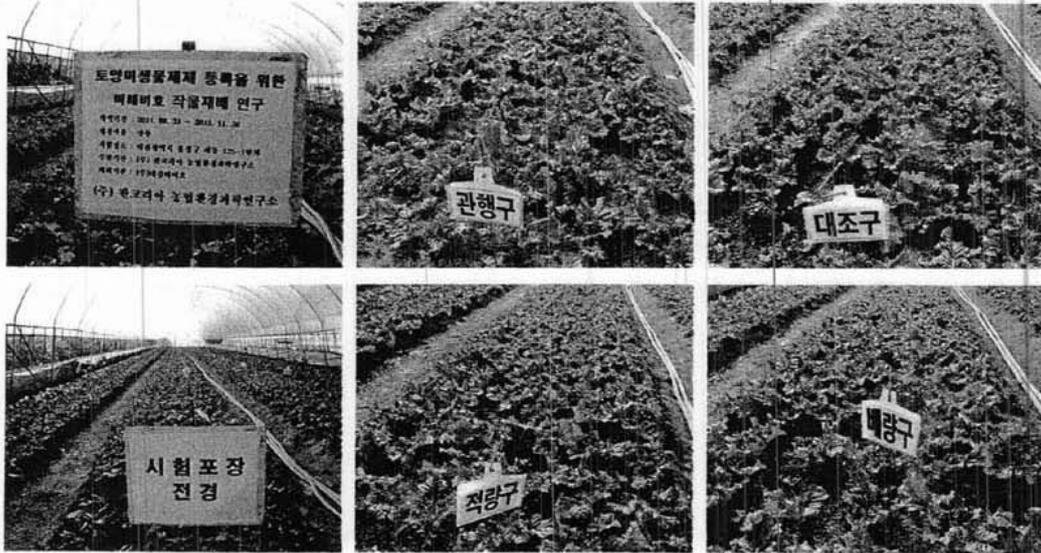
* 던컨 신다중 검정 5% 수준

(2) 수량 조사 결과

처 리 구	수 량		개 체 중 량	
	수량(kg/100주)	지수(%)	중량(g/10엽)	지수(%)
관 행 구	2.48 ^{b*}	99	53.4 ^b	98
대 조 구	2.51 ^b	100	54.2 ^b	100
추천 적량 처리구	2.76 ^a	110	58.5 ^a	108
추천 배량 처리구	2.81 ^a	112	59.4 ^a	110

* 던컨 신다중 검정 5% 수준

다. 상추 작물재배 시험 사진



4. 결과 요약

- 가. 본 연구과제는 토양미생물제제 처리에 따른 상추에 대한 생육 및 수량에 미치는 효과를 검증하기 위하여 본 연구소에서 위탁 연구과제로 실시하였다.
- 나. 시험 전·후 토양의 화학성 변화를 살펴보면, 전질소, 유효인산 등은 약간 감소하는 경향을 보였고, 재배시험 후 처리구간 토양의 화학적 특성은 대조구보다 처리구에서 pH와 유기물함량 등이 증가되었다.
- 다. 토양미생물제제 시비에 따른 상추의 생육조사 결과를 살펴보면, 엽장은 대조구보다 추천 적량 및 배량처리구에서 3~5% 정도의 증가효과를 보였고, 엽폭도 6~7% 정도 증가되었다. 그러나 생육결과에 따른 던컨의 신다중검정 결과 5% 유의 수준에서 각 처리구는 대조구와 유의성이 인정되지 않았다.
- 라. 엽록소 함량 조사결과 토양미생물제제 처리구에서 대조구에 비해 3~4% 정도 높게 나타났으나, 통계처리 결과 유의성은 나타나지 않았다.

마. 상추의 개체중량은 대조구보다 토양미생물제제의 추천 적량 및 배양처리구에서 8~10% 정도 증가되는 결과를 나타내었고, 수량도 대조구보다 10~12% 정도의 증수효과를 보였으며, 통계처리 결과 5% 유의수준에서 수량 및 개체중량은 대조구와 토양미생물제제 적량 및 배양처리구간에 유의성이 인정되었다.

위 결과들을 요약하면, 재배시험 전 기간을 통하여 토양미생물제제 처리에 따른 상추의 피해(피해) 등은 발견되지 않았으며, 상추의 생육 및 개체중량은 대조구보다 처리량에 따라 엽장과 엽폭, 개체중량 등이 증가되었고, 수량도 10~12% 정도 증수되는 효과를 나타내었다.

위 결과는 위탁자가 임의로 제출한 시료로 수행한 시험결과이며, 소송, 광고 및 기타 구속력이 있는 자료로 사용할 수 없고, 자체보관 및 관공서제출용으로만 사용이 가능합니다.



(주)판코리아 농업환경과학연구소
PANKOREA CO.,LTD

[관리번호] 제 2011-1034(2)호

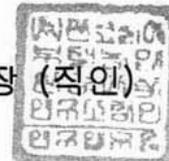
비효 및 비해연구 결과 보고서

(토양미생물제제 #II)

2011. 11. 21

위탁자 : (주)해강바이오 대표자 홍성오

연구기관 : (주)판코리아 농업환경과학연구소장 (직인)



**연구과제명 : 토양미생물제제 등록을 위한 비효비해
작물 재배 연구**

- 연구위탁자 : (주)해강바이오 대표자 홍성오
- 연구책임자 : (주)판코리아 농업환경과학연구소장 장기운

1. 계약기간 : 2011. 08. 31 ~ 2011. 11. 30

2. 재료 및 방법

가. 시험장소 : 충청남도 논산시 은진면 성덕리 533-8번지

나. 시험전 공시토양 : 양토

다. 시험작물 : 적치마상추(권농종묘)

라. 시험비료 : 토양미생물제제(방선이)
- *Streptomyces* sp. A1022 1.0×10^5 cfu/g

마. 시험규모

- (1) 처리구당 시험면적 $15\text{m}^2(1.5\text{m} \times 10\text{m})$
- (2) 비닐하우스에서 임의배치법의 3반복으로 수행하였음

바. 처리내용

- (1) 관행구(미생물제제 무처리구) : NPK처리 + 미생물제제 무처리
- (2) 대조구(멸균구) : NPK처리 + 멸균 추천 적량미생물제제
- (3) 적량 처리구 : NPK + 추천 적량미생물제제
- (4) 배량 처리구 : NPK + 추천 배량미생물제제

사. 시용량

처 리 구	N-P ₂ O ₅ -K ₂ O* 시비량(kg/10a)		퇴비** 시용량 (kg/10a)	토양미생물제제 처리량 (희석배수***)
	기비	추비		
관 행 구	5-5-4	5-0-4	1,000	-
대 조 구	5-5-4	5-0-4	1,000	200
적량 처리구	5-5-4	5-0-4	1,000	200
배량 처리구	5-5-4	5-0-4	1,000	100

* N : 요소, P₂O₅ : 용성인비, K₂O : 염화加里, ** 퇴비 : 축분퇴비

*** 추천량 : 면적 660m²에 시험자재 1리터를 200배 희석

아. 경종개요

- (1) 정식 : 2011. 08. 25
- (2) 재식거리 : 20cm×15cm
- (3) 시비방법 : 상추 정식 후 추비로 토양미생물제제를 2011년 09월 26일, 10월 03일, 10일 3회에 걸쳐 처리구에 설정된 양만큼 엽면 시비를 실시하였다.
- (4) 생육조사 : 생육기간 중 2011년 10월 03일, 10일, 17일에 걸쳐 3회 실시하여 평균값으로 계산하였다.

3. 시 험 결 과

가. 시험 전 · 후 공시토양의 화학적 특성

처 리 구	pH (1:5)	EC dS/m	T-N %	O.M %	Ava.- P ₂ O ₅ mg/kg	Ex.-cations (cmol _c /kg)				CEC cmol _c /kg	
						Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺		
시험전	6.42	1.18	0.32	3.26	258	5.56	1.51	0.62	0.32	13.7	
시 험 후	관행구	6.33	1.15	0.22	3.09	246	5.24	1.30	0.46	0.30	12.8
	대조구	6.34	1.17	0.23	3.07	247	5.28	1.26	0.45	0.32	12.9
	적량구	6.38	1.16	0.24	3.13	240	5.30	1.29	0.47	0.30	13.1
	배량구	6.36	1.18	0.26	3.18	243	5.24	1.26	0.47	0.31	13.3

나. 생육 및 수량 조사

(1) 토양미생물제제가 상추의 생육에 미치는 효과

처 리 구	엽 장		엽 폭		Chlorophyll	
	길이(cm)	지수(%)	폭(cm)	지수(%)	함량 (mg/100cm ²)	지수(%)
관 행 구	15.3 ^{a*}	99	11.4 ^a	98	2.44 ^a	99
대 조 구	15.5 ^a	100	11.6 ^a	100	2.46 ^a	100
추천 적량 처리구	16.1 ^a	104	12.1 ^a	105	2.54 ^a	103
추천 배량 처리구	16.4 ^a	106	12.5 ^a	108	2.57 ^a	104

* 던컨 신다중 검정 5% 수준

(2) 수량 조사 결과

처 리 구	수 량		개 체 중 량	
	수량(kg/100주)	지수(%)	중량(g/10엽)	지수(%)
관 행 구	2.37 ^{b*}	98	51.8 ^b	98
대 조 구	2.41 ^b	100	52.8 ^b	100
추천 적량 처리구	2.70 ^a	112	57.8 ^a	110
추천 배량 처리구	2.72 ^a	113	58.7 ^a	111

* 던컨 신다중 검정 5% 수준

다. 상추 작물재배 시험 사진



4. 결과 요약

- 가. 본 연구과제는 토양미생물제제의 상추에 대한 생육 및 수량에 미치는 효과를 검증하기 위하여 본 연구소에서 위탁 연구과제로 실시하였다.
- 나. 토양의 화학성 변화를 살펴보면, 모든 처리구에서 시험 전 보다 시험 후 전질소, 유기물 및 유효인산 등은 약간 감소하는 경향을 보였다. 그리고 재배시험 후 전체 처리구간 토양의 화학적 특성은 토양미생물제제 처리구에서 pH와 유기물 함량 등이 약간 증가되는 결과를 보였다.
- 다. 토양미생물제제 처리에 따른 상추의 생육조사 결과 엽장은 대조구에 비해 토양미생물제제의 추천 적량과 배량처리구에서 4~6% 정도 증가하였고, 엽폭도 5~8% 정도 커지는 효과를 보였다. 그러나 생육결과에 따른 단권의 신다중 검정 결과 5% 유의 수준에서 각 처리구는 대조구와 유의성이 인정되지 않았다.
- 라. 엽록소함량 조사결과 토양미생물제제의 추천 적량 및 배량처리구에서 대조구 보다 3~4% 정도 높게 나타났으나, 유의성은 나타나지 않았다.

마. 상추의 수량 조사 결과를 살펴보면, 개체중량은 대조구보다 토양미생물제제 추천 적량과 배양처리구에서 10~11% 정도 증수되는 결과를 나타내었으며, 수량은 추천 적량처리구에서 12%, 배양처리구에서 13% 정도 증수되는 결과를 보였다. 그리고 수량은 통계처리 결과 대조구와 처리구간에 5% 유의수준에서 유의성이 인정되었다.

결론적으로 토양미생물제제 처리에 따른 상추의 피해(피해) 등은 발견되지 않았으며, 토양미생물제제의 시비에 따른 상추의 생육상태는 대조구보다 우수한 결과를 보였고, 개체중량도 처리량에 따라 증가되었으며, 수량은 추천 적량 및 배양처리구에서 12~13% 정도 증수되는 결과를 나타내었다.

위 결과는 위탁자가 임의로 제출한 시료로 수행한 시험결과이며, 소송, 광고 및 기타 구속력이 있는 자료로 사용할 수 없고, 자체보관 및 관공서제출용으로만 사용이 가능합니다.

<협동, 고려대학교>_ 길항방선균을 이용한 토양전염성 병해 방제제 개발

1. A1022 균주의 배양과 항균활성물질의 분리

가. 항균활성 물질 확보를 위한 A1022 균주의 배양

(1) 재료 및 방법

ISP2 배지로 A1022를 shaking incubator에서 여러 test를 거쳐 알게 된 최적의 배양조건인 28.5℃, 150rpm의 조건으로 균주의 항균활성이 최대인 168시간동안 배양하였음. 배양 중간에 오염여부를 현미경과 ISP2배지에 striking을 통해 확인하여 오염되지 않은 배양액만을 수집하였음.

(2) 결과

총 18.5L를 배양하였으며, 항균활성물질 추출을 위한 분리과정을 수행하기로 계획.

나. 균체, 배양상등액 분리

(1) 재료 및 방법

A1022 균주의 항균활성 물질이 균체에 존재하는지 배양상등액에 존재하는지 확인하기 위하여 배양액을 5000rpm에서 20분간 centrifuge하고 균체와 배양상등액을 분리 후, 항균활성 검정법을 시행하였음. 균체는 methanol을 가하여 90분간 sonicator로 cell을 분쇄하여 methanol extraction하였음. 활성 테스트는 paper disc method로 수행하였으며, 균체는 methanol extracts를, 배양 상등액은 hexane과 ethyl acetate 용매를 이용하여 극성에 따라 물질을 분획한 후 paper disc에 적셔서 탄저병(F3009)과 벼도열병(F3013)에 대한 항균활성을 평가하였음.

(2) 결과

A1022균주를 탄저병(F3009)과 벼도열병(F3013)으로 활성 테스트를 실시한 결과, 균체와 배양상등액 모두에서 활성이 확인되었으나, 활성의 크기가 균체의 추출물에서 더 크게 나왔으며, 항균물질분리를 위한 물질의 확보에 있어서 수율도 중요한 부분이기때문에, 수율적인 면에서도 고려한다면 균체에서 얻은 methanol extracts가 배양액에서 얻게되는 hexane extracts와 ethyl acetate extracts보다 많은 양을 얻을 수 있기에 균체에서 추출되는 항균물질로 다음과정의 실험을 진행하기로 결정함. 따라서, 균체의 methanol extracts를 evaporator로 농축함.

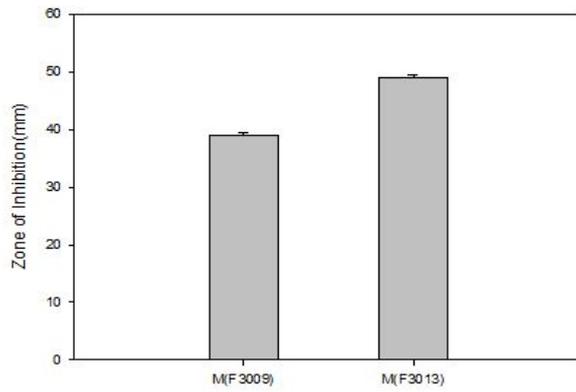
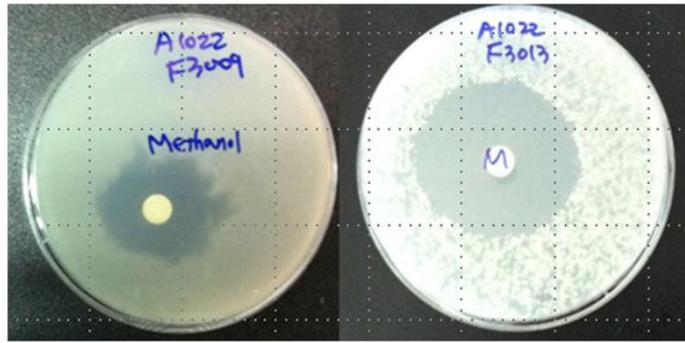
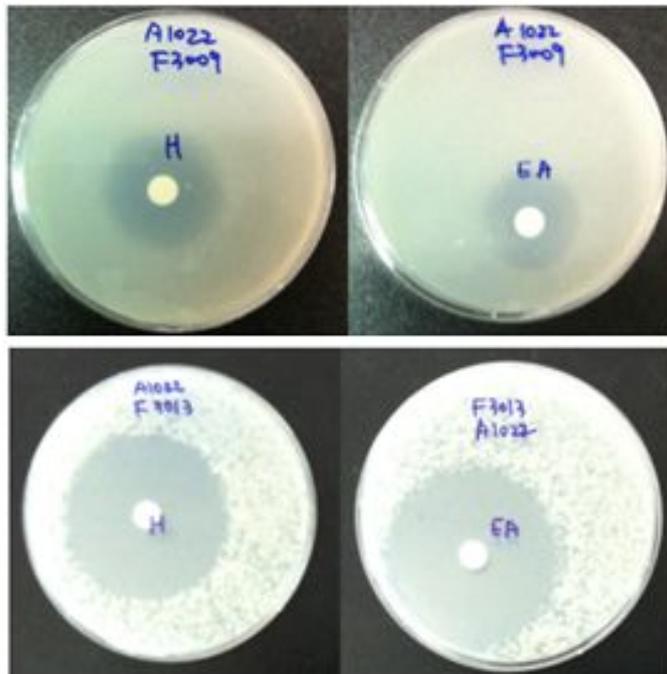


그림 1. 균체(Methanol extracts)의 활성테스트
(F3009=탄저병, F3013=벼도열병)



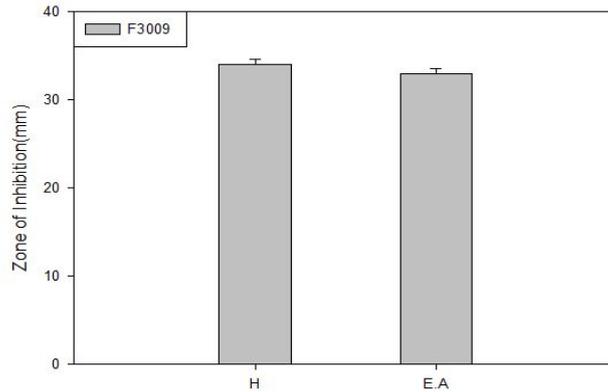


그림 2. 배양상등액의 활성테스트(H-hexane extracts, E.A-ethylacetate extracts)
(F3009=탄저병, F3013=벼도열병)

다. 활성물질의 용매 극성확인

(1) 재료 및 방법

Methanol extracts 10g을 1L의 멸균수에 다시 녹여서 동량의 hexane과 chloroform을 가해서 3회 걸쳐서 극성에 따라 물질을 분획한 후 농축하여 탄저병(F3009)과 벼도열병(F3013)에 대한 항균활성을 테스트하였음.

(2) 결과

탄저병(F3009)과 벼도열병(F3013) 대한 활성물질이 methanol에서 hexane, chloroform solvent층으로 각각 이동하였고, paper disc method를 통해 실험한 결과 항균활성이 chloroform층보다는 hexane층의 활성이 더 크게 나왔으며, 활성물질의 수율도 더 많았음. 이 결과에 따라 다음 진행단계를 hexane 추출물을 통해 진행하기로 결정하였음.

또한, 항균 활성의 비교를 통해 hexane층의 활성이 chloroform층보다도 2배 이상 컸으며, 이 둘의 활성의 합은 methanol extracts와 비슷하거나 조금 크게 나타난 것으로 보아 methanol+D.W.층의 활성물질 대부분이 hexane과 chloroform 층으로 각각 이동한 것을 확인할 수 있었음.

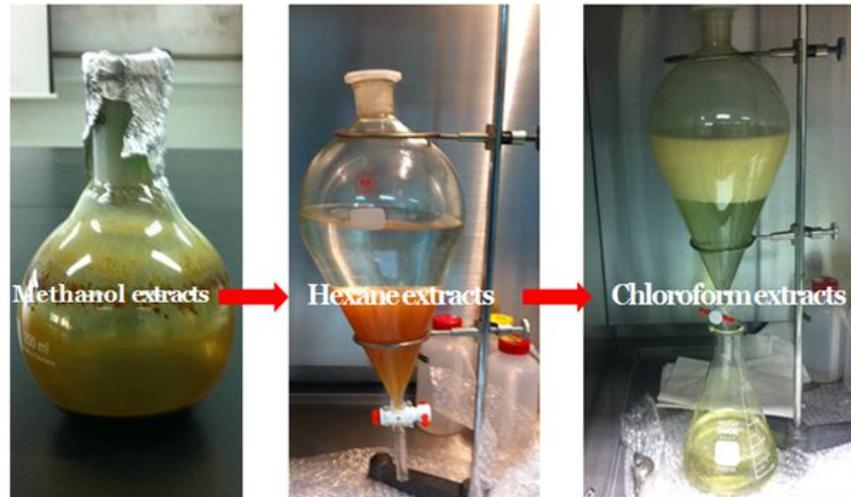


그림 3. Work up과정

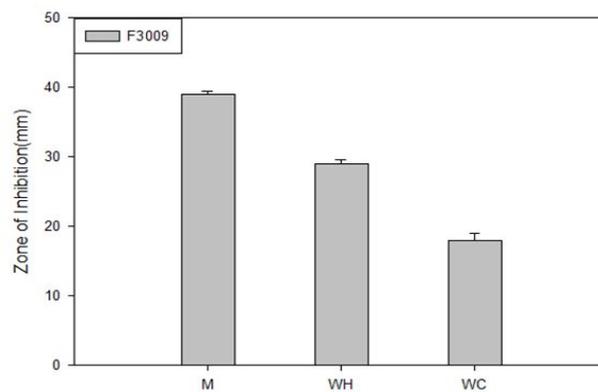
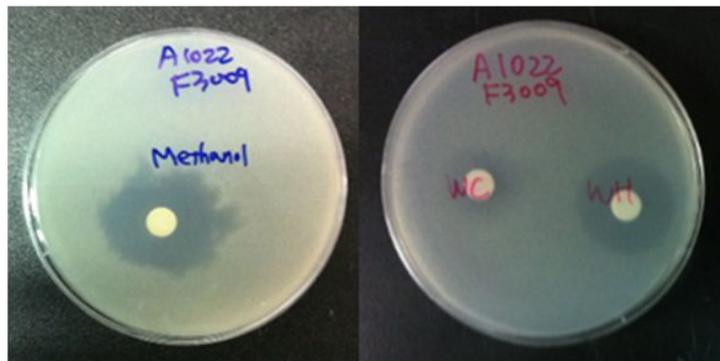


그림 4. Methanol extracts와 hexane extracts, chloroform extracts의 활성테스트
(M-methanol extracts, WH-Hexane extracts, WC-Chloroform extracts)

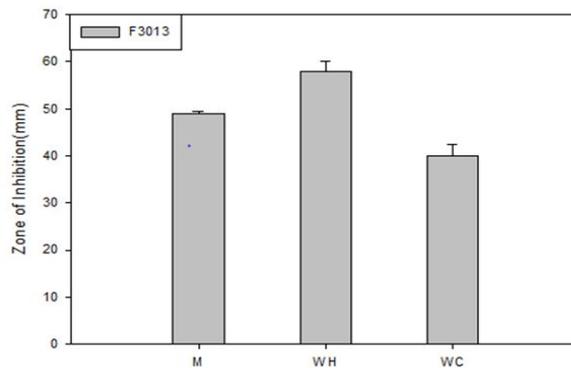
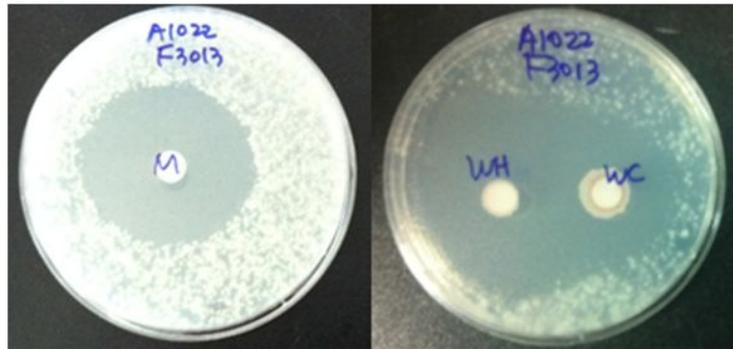


그림 5. Methanol extracts와 hexane extracts, chloroform extracts의 활성테스트
(M-methanol extracts, WH-Hexane extracts, WC-Chloroform extracts)

라. Silica gel column chromatography를 통한 활성 물질 분리

(1) 재료 및 방법

활성테스트를 통해 탄저병(F3009)과 벼도열병(F3013) 대한 활성물질이 hexane 층에 존재하는 것을 확인하였고, 활성의 크기가 chloroform층보다 hexane층이 더 크다는 것과 활성물질의 수율도 높다는 실험 결과를 바탕으로, 활성물질분리를 위하여 hexane 층을 농축한 hexane extracts로 silica gel column chromatography 수행하였음. column의 크기는 36 X 4.5cm이며 column 내부는 silica gel 60 (0.040-0.063 mm, Merck사)로 15 X 4.5cm만큼 충전하였음.

용매조건은 hexane:ethyl acetate = 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100의 순서로 gradient를 주어 각각의 용매를 400ml씩 내렸으며 각 fraction당 400ml을 수집하였고, ethyl acetate 2L를 내려 washing 하였음. Fraction별로 paper disc method, bioautography test, Thin Layer Chromatography 등의 bioassay를 수행하여 활성을 평가함과 동시에 TLC상의 활성band 확인을 하고자 하였음. Paper disc method는 기존 방법 그대로 수행하여 활성을 평가하였고, Thin Layer Chromatography는 TLC plate를 반으로 나누어서 각 fraction별로 TLC 좌우 각각 똑같이 spotting한 것을 전개 용매를 hexane:ethyl acetate = 6:1로 하여 한쪽은 UV 254nm에서 관찰하고, p-anisaldehyde로 staining 하여 TLC상의 물질의 band확인을 하였으며, 나머지 한쪽은

bioautography assay를 하여 TLC상의 band중에서 어느 부분이 실제로 활성이 있는지를 확인하였음.

(2) 결과

Hexane extracts 1.35g을 silica gel column chromatography를 수행하여 총 12개의 fraction을 수집할 수 있었음.

각 fraction을 paper disc방법을 통해서 활성 테스트 한 결과, WHS4-WHS6 fraction이 탄저병(F3009)에 대한 antifungal activity를 보였고, WHS4-WHS7은 벼도열병(F3013)에 대한 antifungal activity를 보였다. 또한, TLC plate에 각각의 fraction을 spotting하여서 hexane: ethyl acetate = 6:1로 전개 후 UV관찰과 staining 후 TLC상의 band pattern을 확인하였음. 그리고 다시 TLC전개용매를 hexane : ethyl acetate =1:1로 하여 각 fraction을 전개시켜서 bioautography assay를 한 결과 antifungal activity pattern이 비슷한 양상을 보이기에 WHS4-WHS6 fraction을 하나의 group으로 grouping하였음. 이는 column에 흘려주는 용매조건이 hexane:ethyl acetate = 70:30, 60:40, 50:50였으며, paper disc method로 테스트했을 때에도 탄저병(F3009)과 벼도열병(F3013)에 공통적인 활성을 보인 부분이었기에 같은 group으로 모았고, 이를 농축을 하였음. 나머지 fraction은 항균 활성이 없었기 때문에 항균활성을 보이는 fraction만을 농축 후, 무게를 재었더니 122.9mg이었음.

따라서, 활성을 보이는 WHS4-WHS6 fraction을 sephadex LH-20으로 충전된 size exclusion chromatography 수행으로 분자량에 따른 활성물질분리를 진행하기로 하였음.

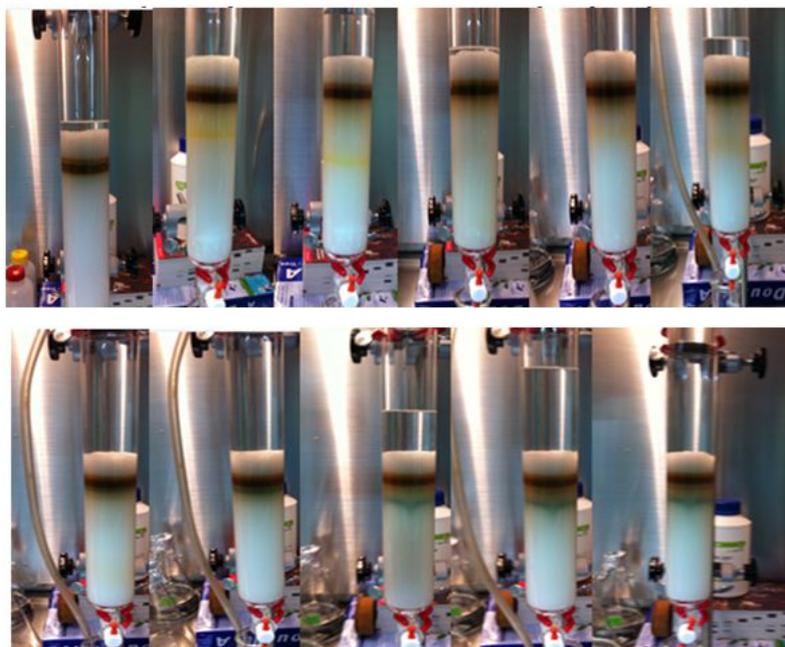


그림 6. Silica gel open column chromatography 실험 모습

위 사진 왼편부터 hexane:ethyl acetate = 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50/
아래사진의 왼편부터 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0 : 100)

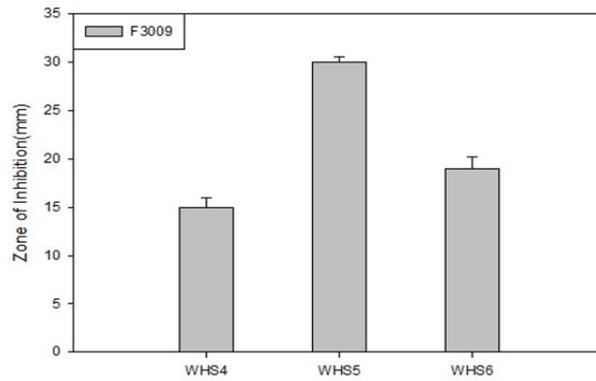


그림 7. Silica gel column chromatography 수행 후 fraction별 탄저병에 대한 활성테스트
 WHS1-H:E.A = 10:0, WHS2-H:E.A = 9:1, WHS3-H:E.A = 8:2, WHS4-H:E.A = 7:3,
 WHS5-H:E.A = 6:4, WHS6-H:E.A = 5:5, WHS7-H:E.A = 4:6, WHS8-H:E.A = 3:7

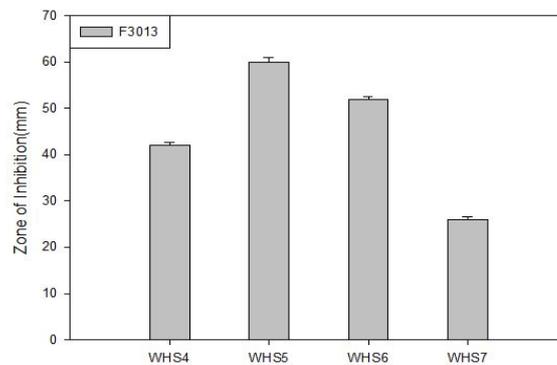


그림 8. Silica gel column chromatography 수행 후 fraction별 버도열병 활성테스트
 WHS1-H:E.A = 10:0, WHS2-H:E.A = 9:1, WHS3-H:E.A = 8:2, WHS4-H:E.A = 7:3,
 WHS5-H:E.A = 6:4, WHS6-H:E.A = 5:5, WHS7-H:E.A = 4:6

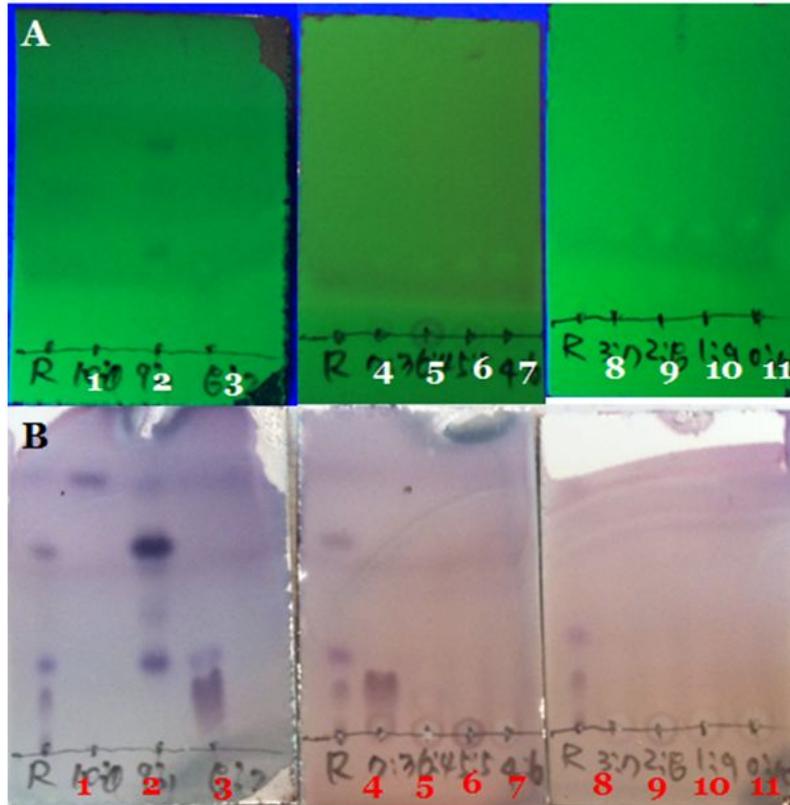


그림 9. Silica gel column chromatography 에서 수집된 fraction의 TLC결과
 R-hexane extracts, 1-WHS1-H:E.A = 10:0, 2-WHS2-H:E.A = 9:1, 3-WHS3-H:E.A = 8:2,
 4-WHS4-H:E.A= 7:3, 5-WHS5-H:E.A= 6:4, 6-WHS6-H:E.A = 5:5, 7-WHS7-H:E.A = 4:6,
 8-WHS8-H:E.A= 3:7, 9-WHS9-H:E.A= 2:8, 10-WHS10-H:E.A= 1:9, 11-WHS11-H:E.A= 0:10
 A. Hexane:ethyl acetate = 6:1으로 수행 후 254nm로 관측
 B. p-anisaldehyde로 발색



그림 10. Silica gel column chromatography에서 수집된 fraction의 탄저병에 대한 bioautography assay
 Hexane:ethyl acetate = 1:1로 수행 후 test

마. Sephadex LH-20 column chromatography를 통한 활성 물질의 분리

(1) 재료 및 방법

Silica gel column chromatography 수행하여 탄저병(F3009)과 벼도열병(F3013)에 공통적으로 활성을 보이는 WHS4-WHS6 fraction에 존재하는 활성물질의 분리를 위해 sephadex LH-20 column chromatography를 수행하였음.

Column의 크기는 100 X 2.5cm 이며 column 내부는 sephadex LH-20 (Amersham)로 충전하였음. HPLC grade methanol을 사용해서 0.18ml/min의 속도로 하나의 fraction 당 2ml 씩 받아서 총 181개의 fraction을 받았음. 총 181개의 fraction을 3~4개 fraction 간격으로 spotting하여 바로 UV 254nm로 관찰하고 bioautography assay로 대략적인 활성을 평가하였음. 그 결과로 활성 있는 fraction 각각을 TLC plate에 spotting후 용매를 hexane:ethyl acetate = 1:1로 하여 TLC plate상의 물질을 전개시켜서 UV 254nm로 관찰, bioautography assay를 통한 탄저병(F3009)에 대한 활성평가와 p-anisaldehyde staining을 하여 각 fraction의 band 양상을 관찰하였음.

(2) 결과

Sephadex LH-20 column chromatography를 통해 수집한 181개의 fraction을 3~4개 fraction의 간격을 두고 spotting 후, UV로 관찰한 결과로는 전개시키지 않고 spotting 후, 바로 관찰을 하였기 때문에 물질에 따라서 UV 254nm에 감지되는 걸 볼 수 있었음. TLC plate를 자세히 보면, WHSS49-70, WHSS97-115, WHSS139-151이 감지되었음.

탄저병(F3009)에 대해 활성 test를 실시하기 위해 WHSS59-72 각각을 TLC plate에 spotting 후 hexane:ethyl acetate = 1:1의 용매로 전개시킨 후, UV 254nm로 관찰하였더니 뚜렷하진 않았으나 희미하게 감지되는 것을 관찰할 수 있었음. 또한, bioautography assay를 통한 탄저병(F3009)에 대한 활성평가에서 WHSS64-71에서 활성을 보였고, p-anisaldehyde staining을 하여 각 fraction의 band 양상을 관찰하였음. 이 결과에 따라 탄저병(F3009)을 억제하고, 비슷한 위치에서 활성band가 나타나는 WHSS64-71을 농축하였으며, 이 활성fraction을 단일 물질로 분리하기 위해 prep HPLC를 진행하기로 하였음.

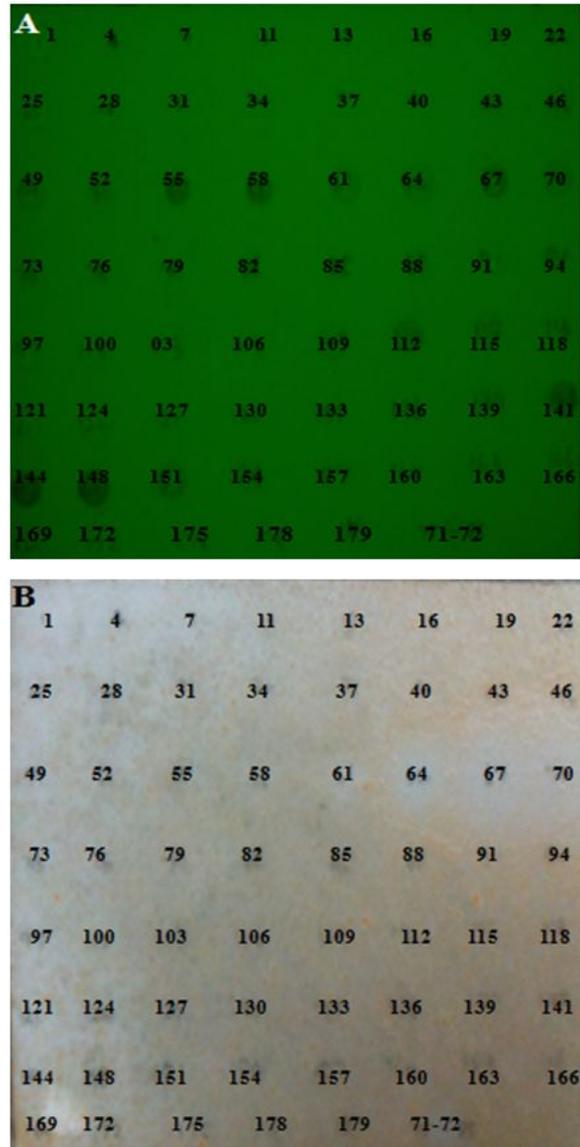


그림 11. Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 분리된 각 fraction
 A. Sephadex LH-20 column chromatography 후 UV 254nm로 관찰한 모습.
 B. Sephadex LH-20 column chromatography 후 bioautography assay. (F3009=탄저병)

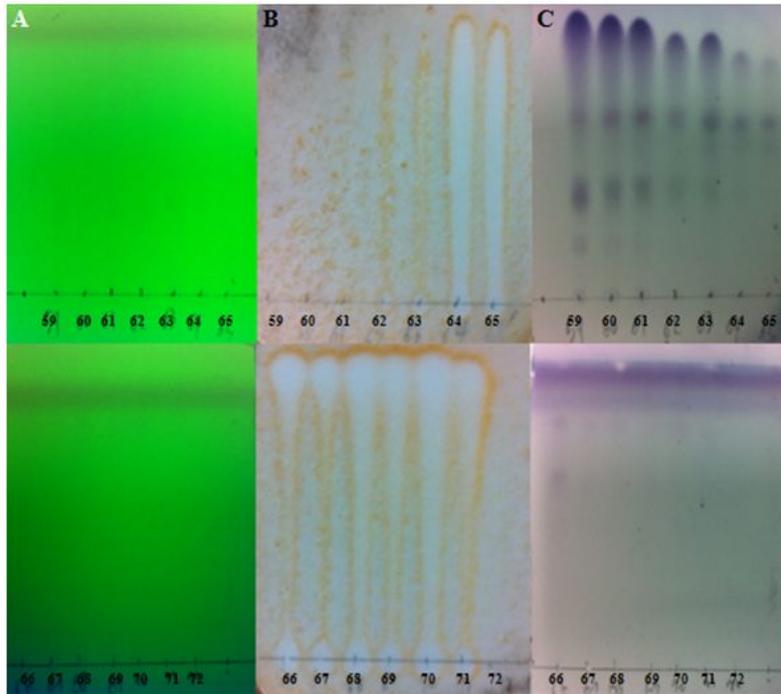


그림 12. Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 분리된 각 fraction (WHSS59-72)

A. UV 254nm로 관찰, B. Bioautography assay. (F3009=탄저병), C. p-anisaldehyde staining

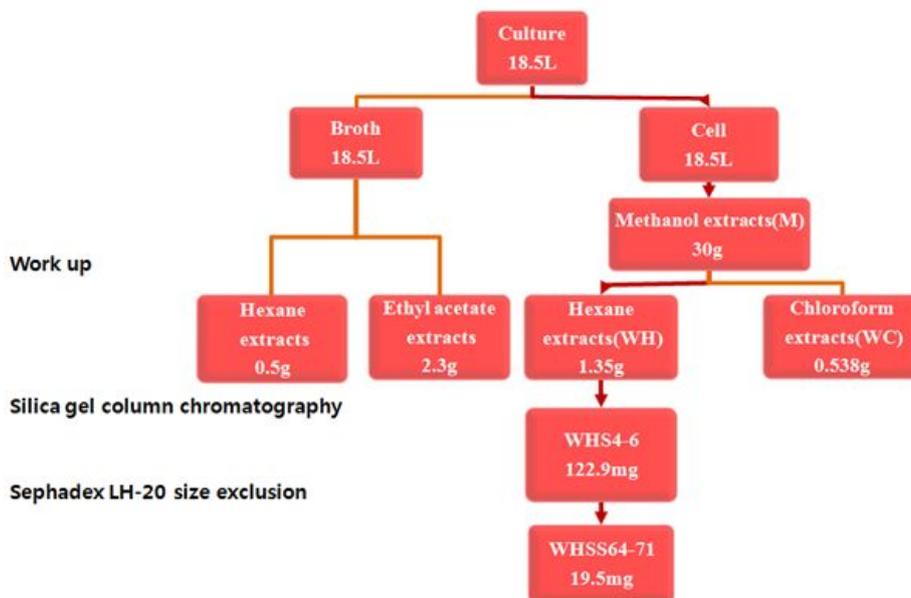


그림 13. *Streptomyces* sp.A1022로부터 생성되는 활성물질의 분리

바. Prep HPLC를 통한 WHSS64-71의 분리

(1) 재료 및 방법

탄저병(F3009)을 억제하는 WHSS64-71을 Hewlett Packard사의 HP Agilent 1100 HPLC 기기와 HECTOR-W C18(250*10.0mm, 5um, 300) column을 사용하여 물질을 분리하였음.

실험조건은 run time 을 35분으로 하고, 처음 5분간은 용매의 비율을 20% acetonitrile에서 80% acetonitrile으로 gradient elution조건으로, 5분부터 30분까지는 80% acetonitrile에서 100% acetonitrile으로 gradient elution조건을, 30분부터 35분까지는 100% acetonitrile로 조건으로 분리하였음. Flow는 분당 1ml로 설정하였고, WHSS64-71 fraction 19.5mg을 HPLC로 injection하기 전, acetonitrile과 water를 적절히 혼합하여 농축된 물질을 충분히 녹인 후 절반씩 두 번에 걸쳐서 injection하였음. 또한 210.8nm와 254.8nm의 두 가지 파장대의 UV에서 감지 할 수 있도록 설정하였으며, 5분 간격으로 물질을 prep 하였음. 그 후 각각의 fraction을 paper disc method를 통해서 활성 test를 수행하여 항균활성을 확인하였음.

(2) 결과

HPLC를 이용한 prep은 5분 간격으로 수행하였으며, UV 210.8nm와 254.8nm 두 가지 파장대에서 감지되었음. 항균 물질을 prep한 결과, 아래의 그래프에서처럼 K1에서부터 K7까지 총 7개의 fraction으로 분리되었음. 분리 후엔, 각 fraction을 paper disc method로 탄저병(F3009)에 대해 test한 결과 K1에서부터 K5까지 5개의fraction에서 활성이 확인되었음. 활성의 크기는 K2(1.7mg), K3(4.9mg), K4(5.2mg)가 K1(1.5mg)과 K5(0.3mg)에 비해서 활성이 더 크게 나타나 항균활성을 지닌 주요 fraction이라 할 수 있음.

물질을 5분 간격으로 분획한 그래프를 살펴보면, K3는 두 파장대에서 작게 여러 개의 피크가 나타났으며, K2와 K4의 피크는 UV 210.8nm의 파장대에서 sharp하게 솟아있는 하나의 피크를 관찰할 수 있었음. 또한, K4는 UV 254.8nm에서는 감지되지 않았으나 UV 210.8nm의 파장대에서 높은 하나의 피크가 감지되었기에 다른 fraction에 비해서 purity가 높을 것이라고 예상할 수 있었으며, 항균물질의 구조를 분석하는 데 있어서 가능성 있을 거라 예상되었음. 하지만 항균물질의 구조 분석을 하는 데 있어서 여러 데이터를 얻는 데에는 물질의 양도 어느 정도 확보되어야 가능하기에 fraction 무게로 보았을 때는 K3와 K4가 구조분석을 위한 데이터를 얻을 가능성이 있다고 예측하였음.

따라서, 다음과정으로 K3와 K4을 ELSD검출기를 통한 HPLC수행과 항균물질의 구조동정을 위한 분석에 들어가기로 결정하였음.



그림 14. Prep High Performance Liquid Chromatograph_HP Agilent 1100, Hewlett Packard사.

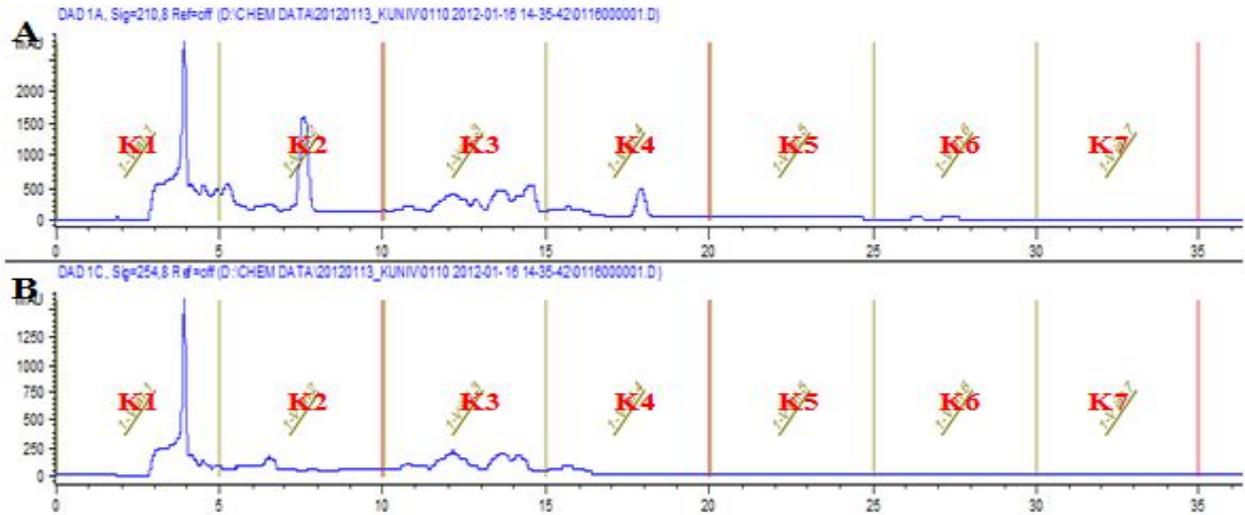
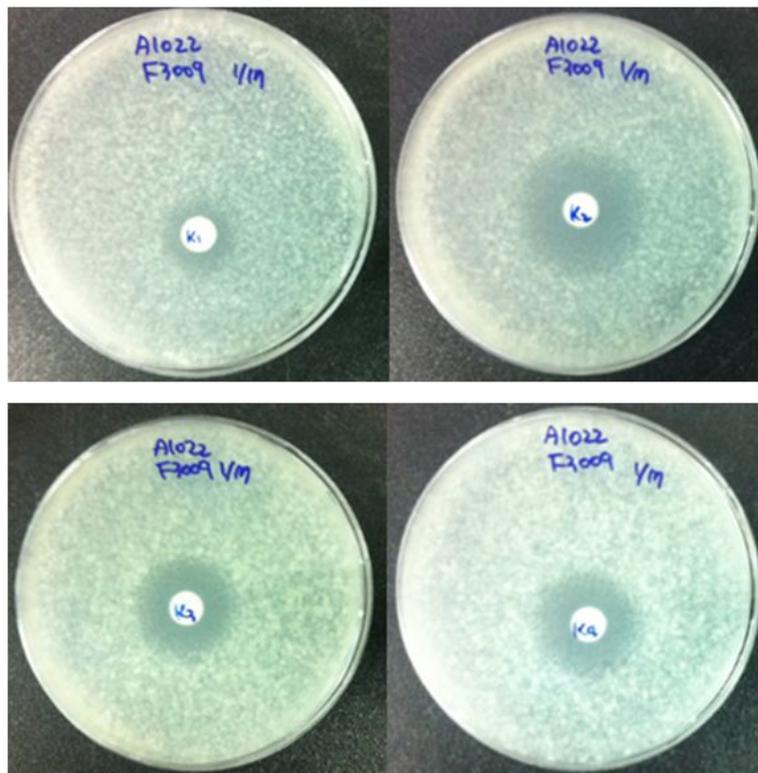


그림 15. Prep High Performance Liquid Chromatography를 수행한 그래프

- A. Prep High Performance Liquid Chromatography를 수행시 UV 210.8nm로 감지
- B. Prep High Performance Liquid Chromatography를 수행시 UV 254.8nm로 감지



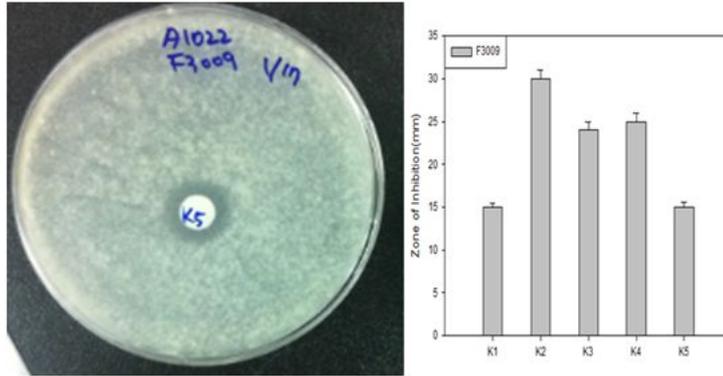


그림 16. Prep High Performance Liquid Chromatography를 수행 후, paper disk method를 통한 활성 test(F3009=탄저병)

사. Analytic HPLC

(1) 재료 및 방법

Prep HPLC를 통해 분리한 K3, K4를 SEDERE사의 SEDEX 80 LT-ELSD와 HECTOR-W C18(150*4.6mm)column을 사용하여 분석하였음.

(가) K3의 실험조건

Run time 을 40분으로 하고, 10분간은 용매의 비율을 20% acetonitrile에서 80% acetonitrile 으로 gradient elution조건으로, 10분부터 40분까지는 80% acetonitrile로 조건으로 설정하였음.

Flow를 분당 1ml로, K3을 1mg/ml의 농도로 30 μ l을 injection 하였으며, ELSD와 254nm, 210nm의 UV에서 감지하도록 하여 분석하였음.

(나) K4의 실험조건

Run time 을 30분으로 하고, 30분간 용매의 비율을 20% acetonitrile에서 80% acetonitrile 으로 gradient elution조건으로 설정하였으며 flow를 분당 1ml로, 1mg/ml의 농도로 30ul을 injection 하였으며, ELSD와 254nm, 210nm의 UV에서 감지하도록 하여 분석하였음.

(2) 결과

K3는 ELSD와 UV 254nm에서의 그래프가 비슷한 경향을 보이고 있으나 28-30분대에서 ELSD에서 감지되는 부분이 254nm나 210nm에서 감지되지 않는 걸로 보아 UV에 보이지 않는 물질이 있는 것을 확인하였음.

K4는 ELSD와 UV 254nm, 210nm에서의 그래프상에서 피크들이 많은 차이를 보이고 있었다. 따라서 K4도 역시 UV에 감지되지 않는 물질이 존재함을 확인하였다.

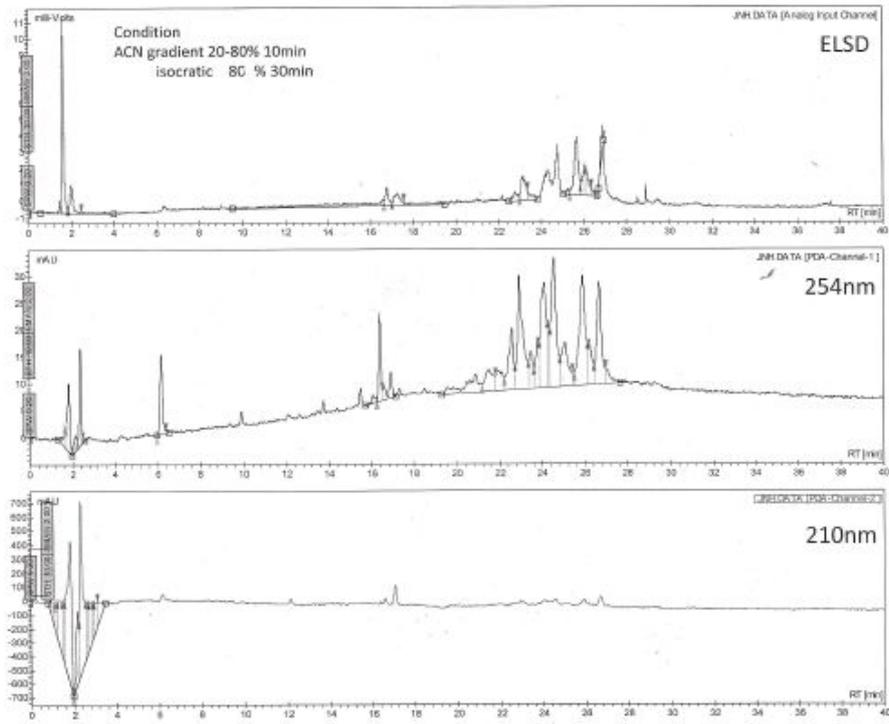


그림 17. High Performance Liquid Chromatograph (K3)

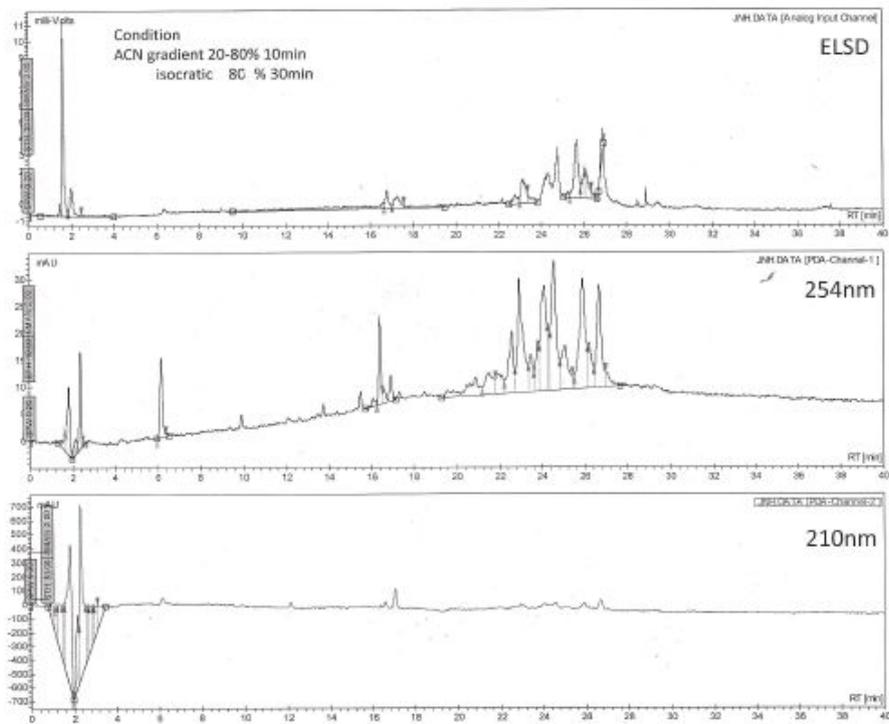


그림 18. High Performance Liquid Chromatograph (K4)

2. A1022 균주로부터 생성되는 항균활성물질의 구조분석

가. 분리된 항균활성 물질의 LC/MS 분석

(1) 재료 및 방법

항균물질이 분리된 상태에서 K3과 K4으로 항균물질의 구조동정을 위해서 먼저 LOW Mass 값을 측정해보았으며, purity가 높고 구조동정 가능성이 가장 높은 K4는 추가적으로 LC/MS를 통해 mass 값을 알아보았다.

LOW Mass는 run time 15분으로 하고 15분 동안 methanol을 흘려주는 조건으로 실험하였다.

LC/MS는 thermoFinnigan사 LCQ Advantage 를 이용하여 측정하였고, 총 run time 30분이며, K4 sample 을 injection 후 0분부터 30분까지 100% acetonitrile로 조건을 주어 mass 값을 측정하였다. Flow는 분당 250ul를 흘려주었다.

(2) 결과

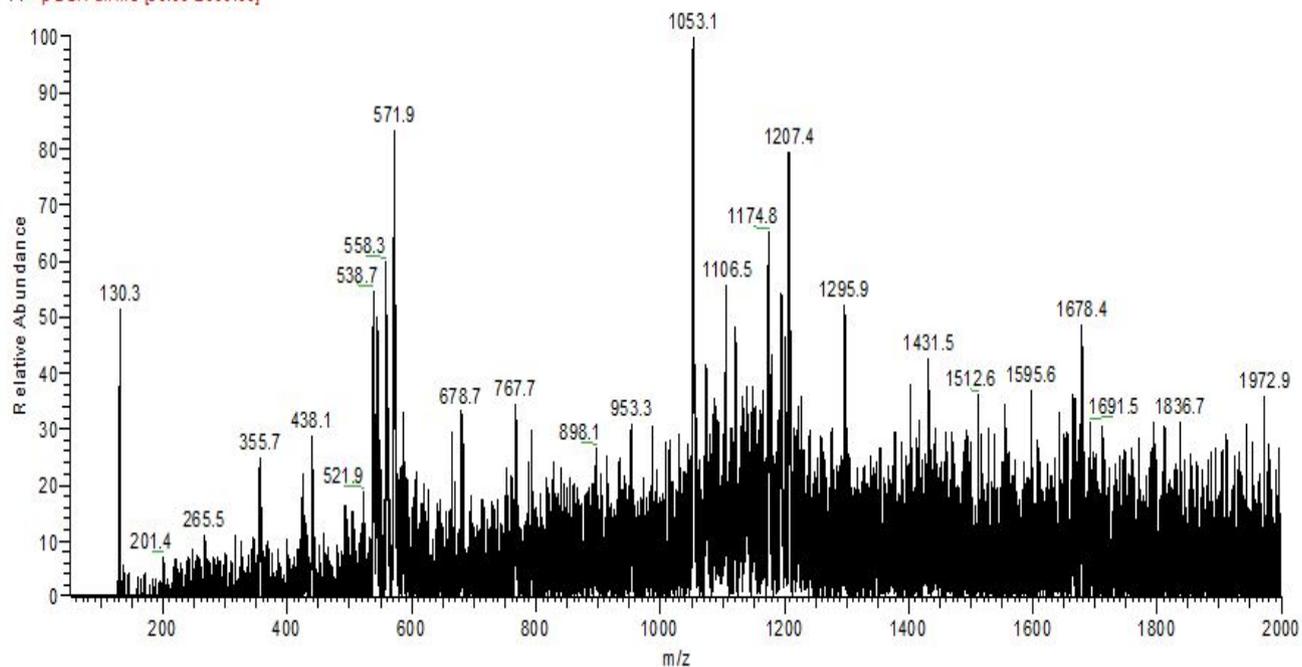
LOW Mass는 처음에 ESI+ 를 측정하였으나 이 값만으로는 알기 어렵기에 K3과 K4의 ESI+, ESI- 둘 다 측정하여 두 그래프를 비교해 가면서 대략적인 mass값을 추정하려 하였음. 하지만, K3와 K4 각각의 ESI+, ESI- mass spectrum에서 일정하게 나오는 mass peak이 없는 것으로 보아 mass값을 예상하기 어려움.

또한, K4의 mass 값을 LCMS를 통해서 30분간 100% acetonitrile을 흘려주어 LC데이터를 보면서 시간대별 peak에 따라서 mass값을 체크하였는데, 그 중에서도 2.59분에서 나온 가장 높은 peak의 mass값을 측정하기 위해 2.40분-3.38분 시간대에서 mass값을 체크한 결과, 1295.7m/z(ESI+)가 나왔음. 하지만, K4의 total mass값인 LOW mass ESI+ 와 ESI-에서의 값과 LCMS의 값의 차이가 너무 컸기에 예측이 힘들.



그림 19. Liquid chromatography and mass spectrometry (LC/MS)-LCQ Advantage, ThermoFinnigan사.

K3 #42-53 RT: 1.44-1.64 AV: 2 NL: 2.97E6
F: + p ESI Full ms [50.00-2000.00]



K3 #37-56 RT: 1.36-1.72 AV: 3 NL: 6.16E6
F: - p ESI Full ms [50.00-2000.00]

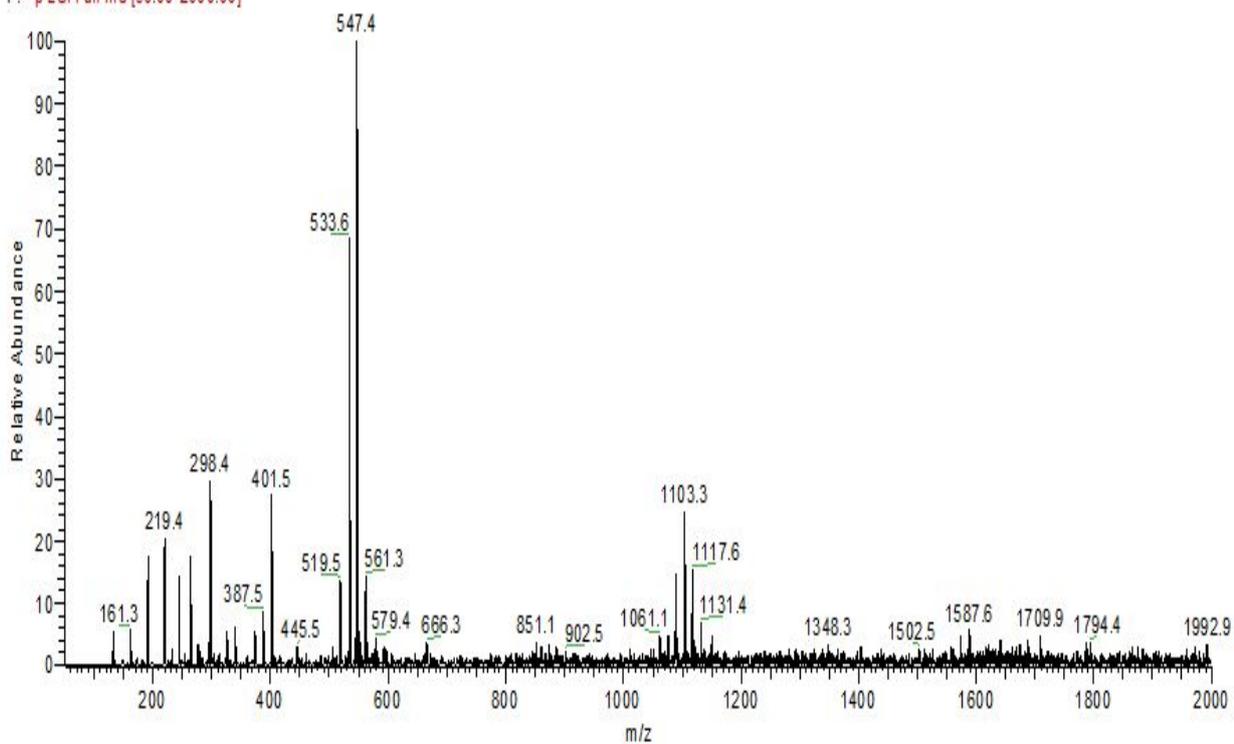
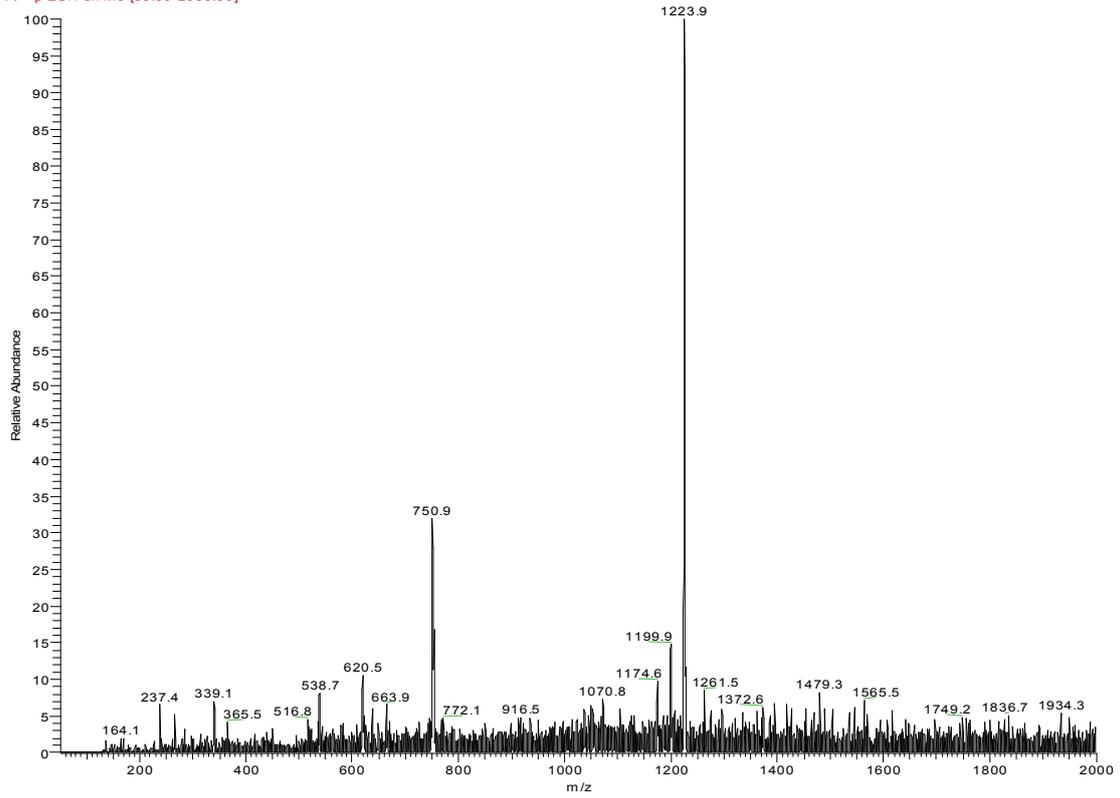


그림 20. LOW mass (K3) (위: ESI+ / 아래: ESI-)

K4 #23-36 RT: 1.37-1.56 AV: 2 NL: 8.83E6
F: + p ESI Full ms [50.00-2000.00]



K4 #37-57 RT: 1.40-1.74 AV: 3 NL: 3.37E6
F: - p ESI Full ms [50.00-2000.00]

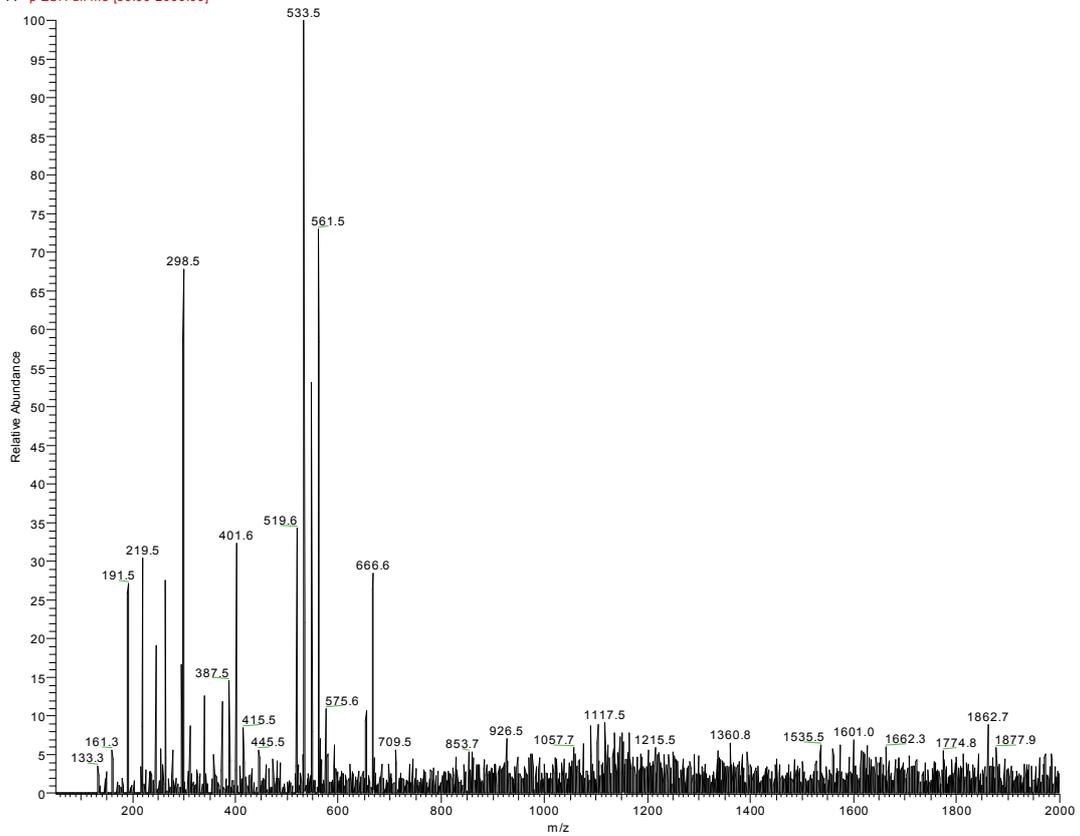


그림 21. LOW mass (K4) (위: ESI+/ 아래: ESI-)

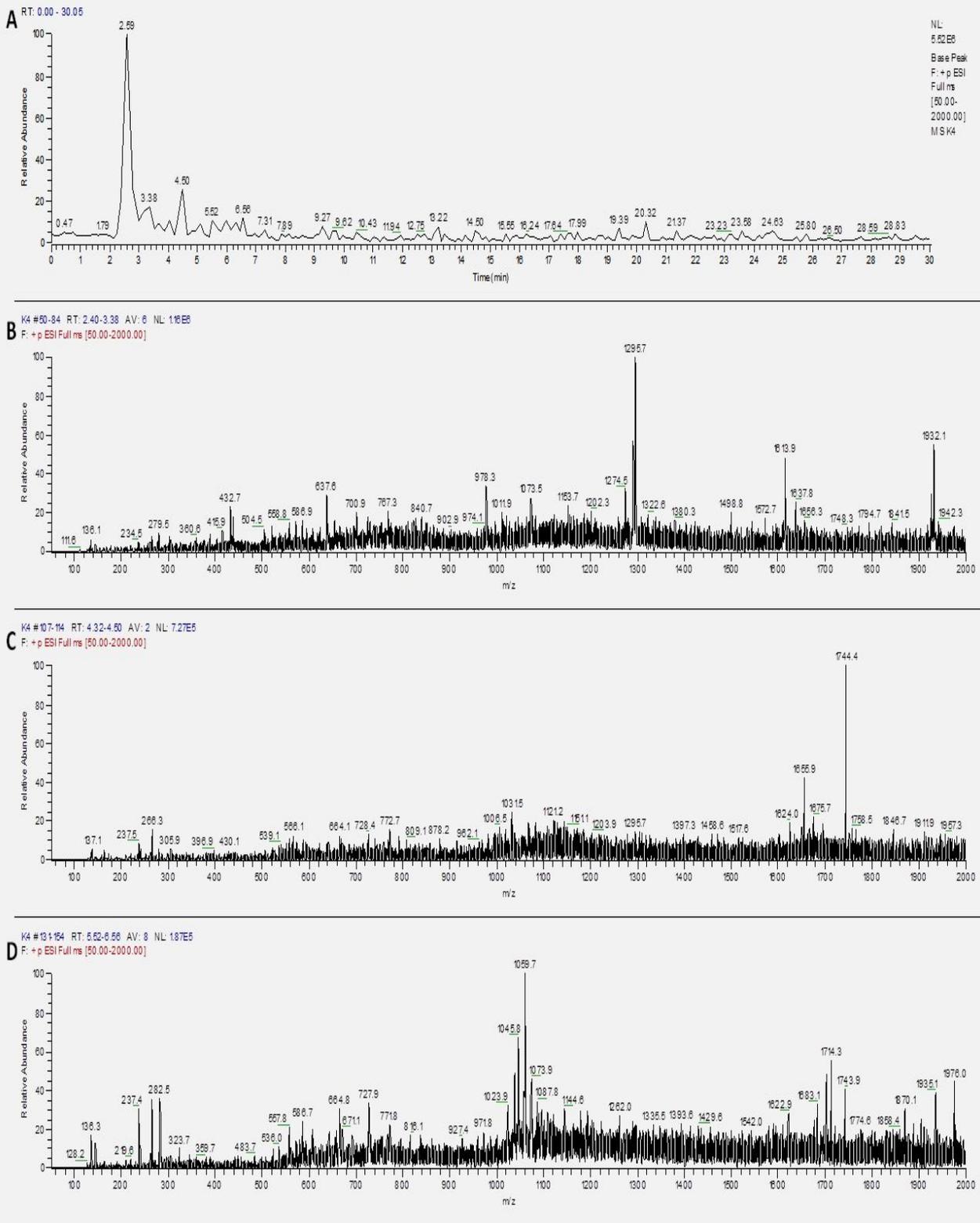


그림 22. LC/MS (Thermo Finnigan사 LCQ Advantage) 그래프 (K4)

A. Chromatogram of total ion counts (Run time: 0.00-30.05), B. Mass spectrum (Run time: 2.40-3.38), C. Mass spectrum (Run time: 4.32-4.50), D. Mass spectrum (Run time: 5.52-6.56)

나. 분리된 향균활성 물질의 NMR 분석

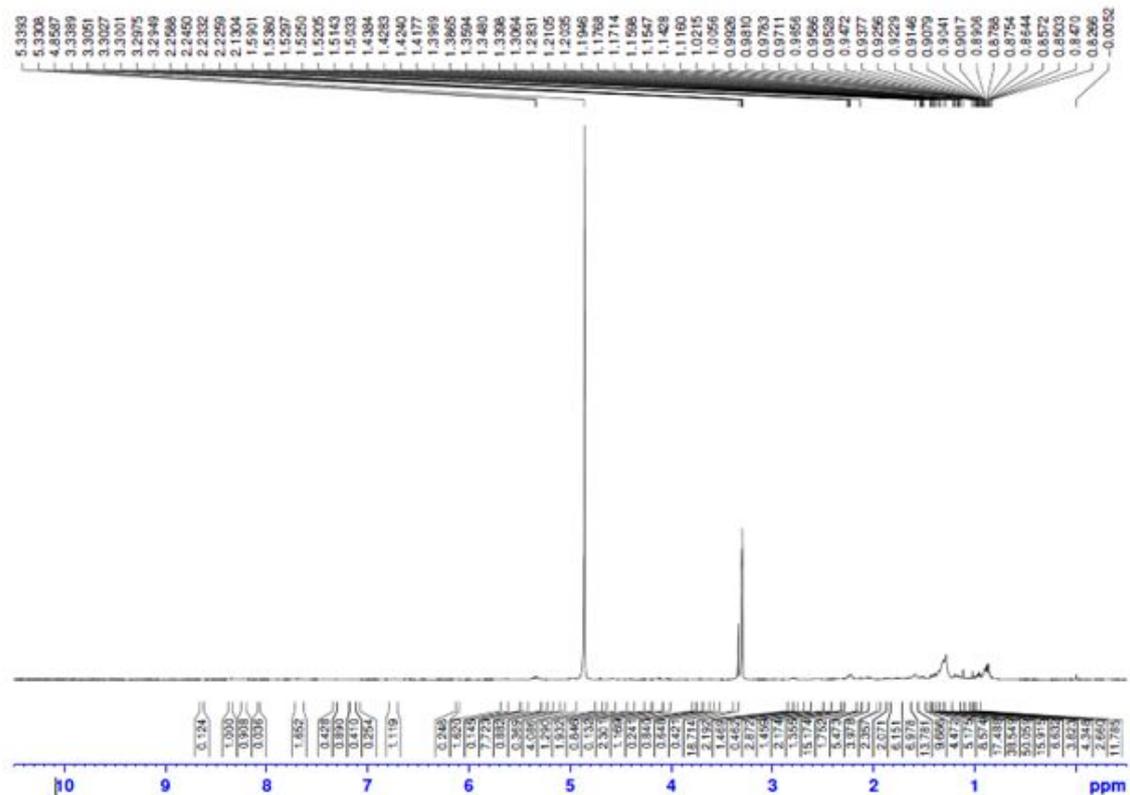
(1) 재료 및 방법

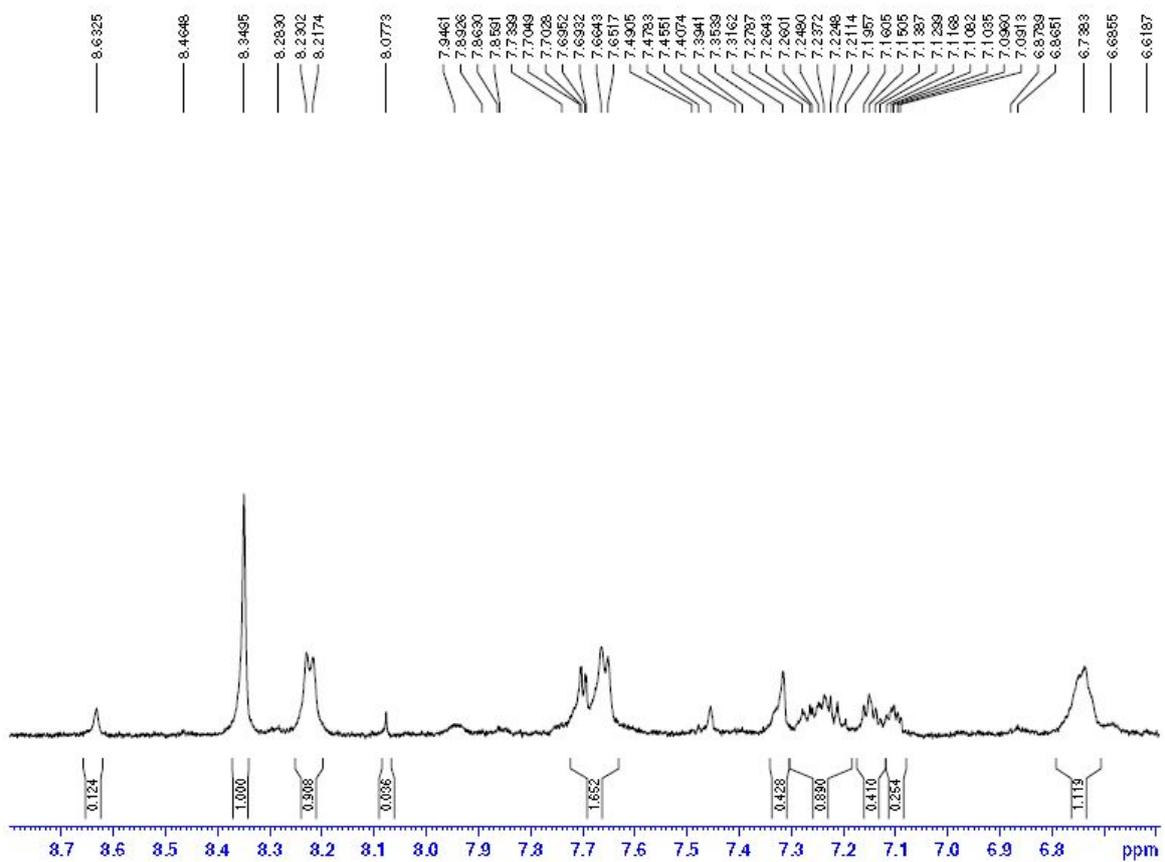
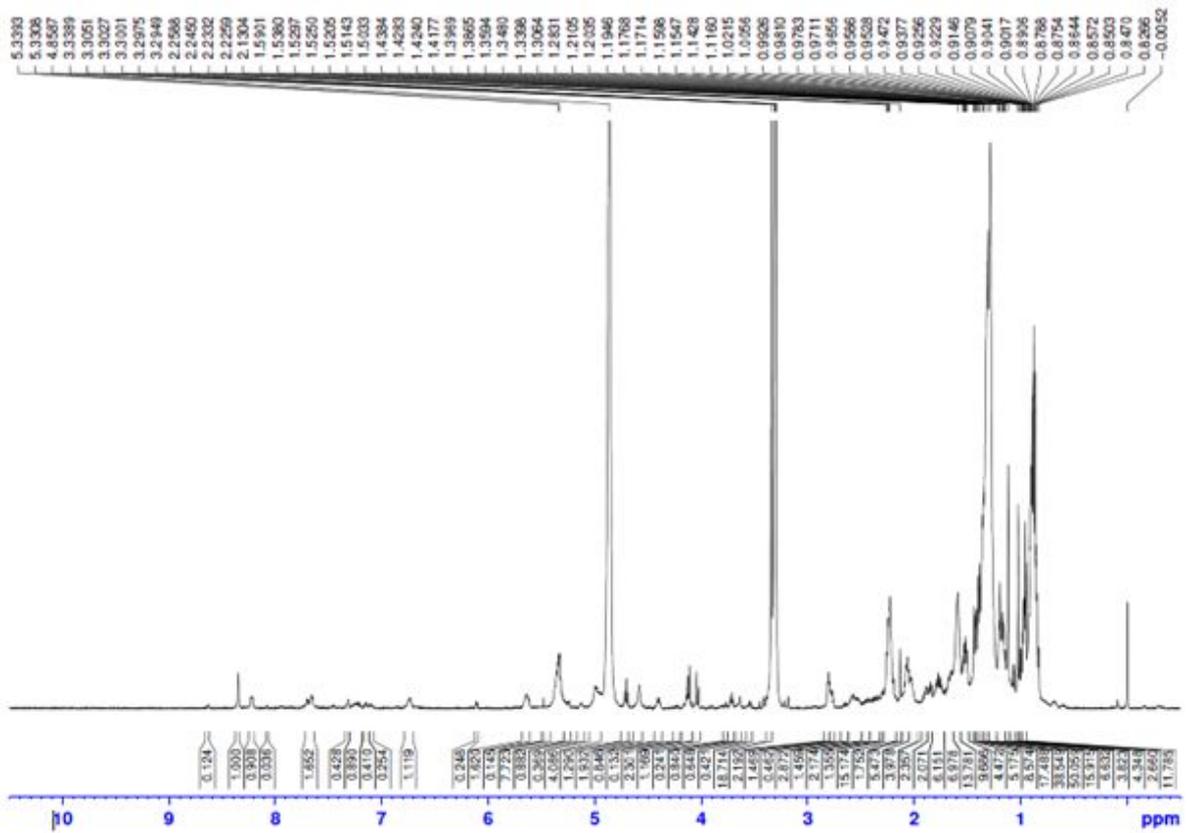
향균물질의 구조동정을 위해서 Bruke사의 AVANCE 600으로 K3(1H)과 K4(1H, 13C, COSY, HMBC, HSQC, DEPT)스펙트럼에 의한 분석을 수행하였음.

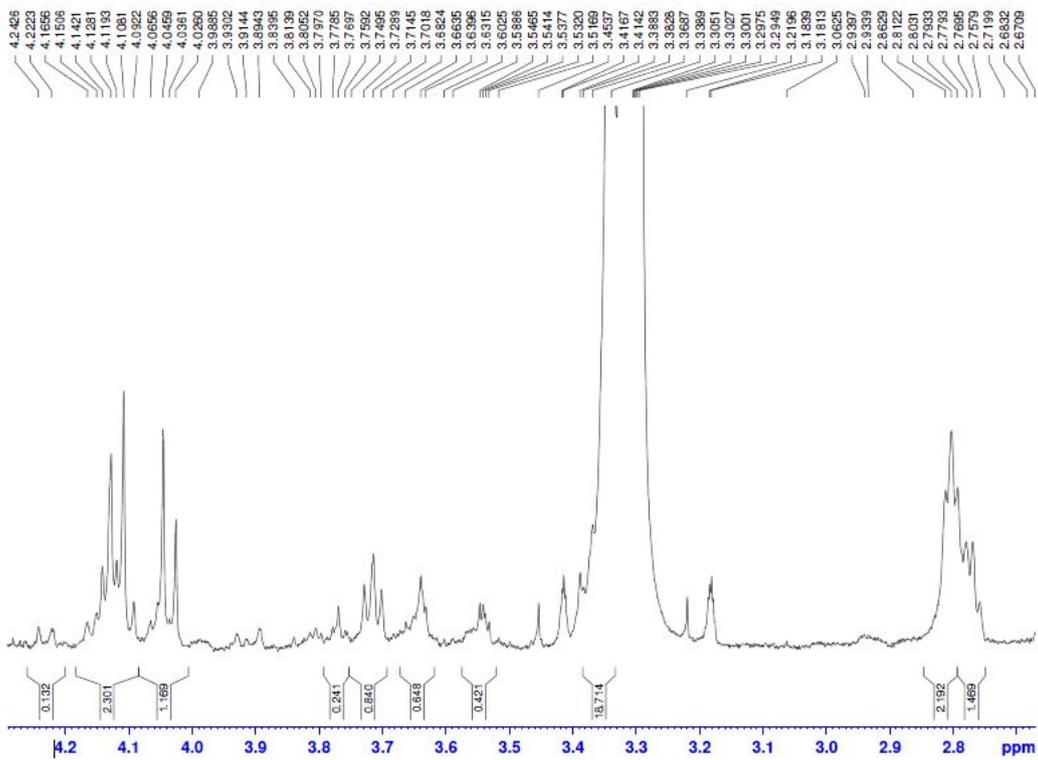
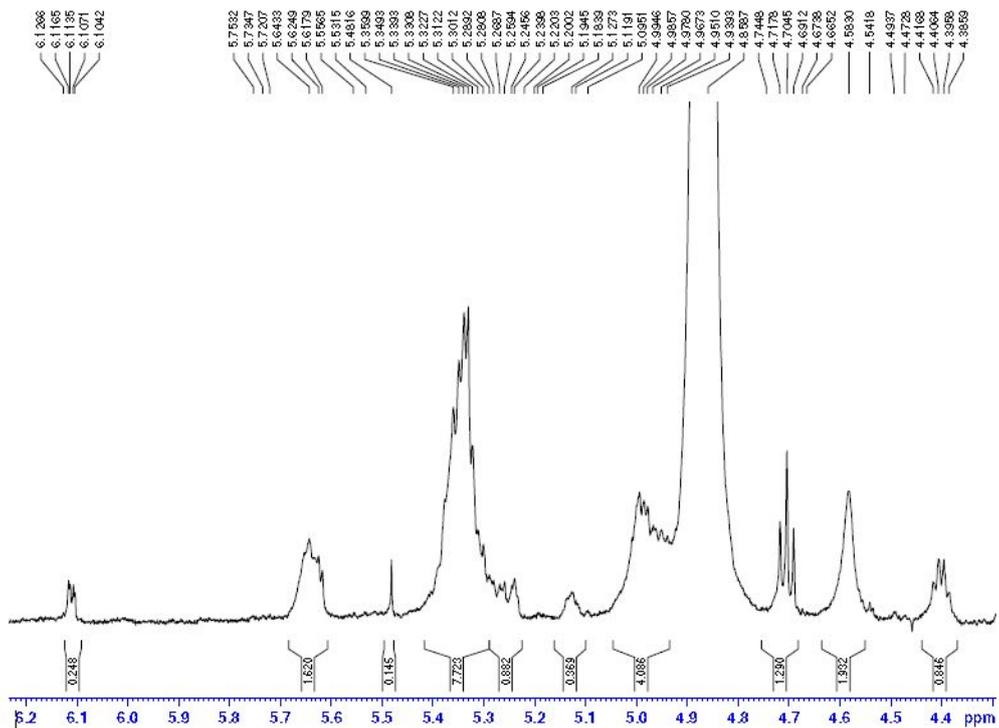
(2) 결과

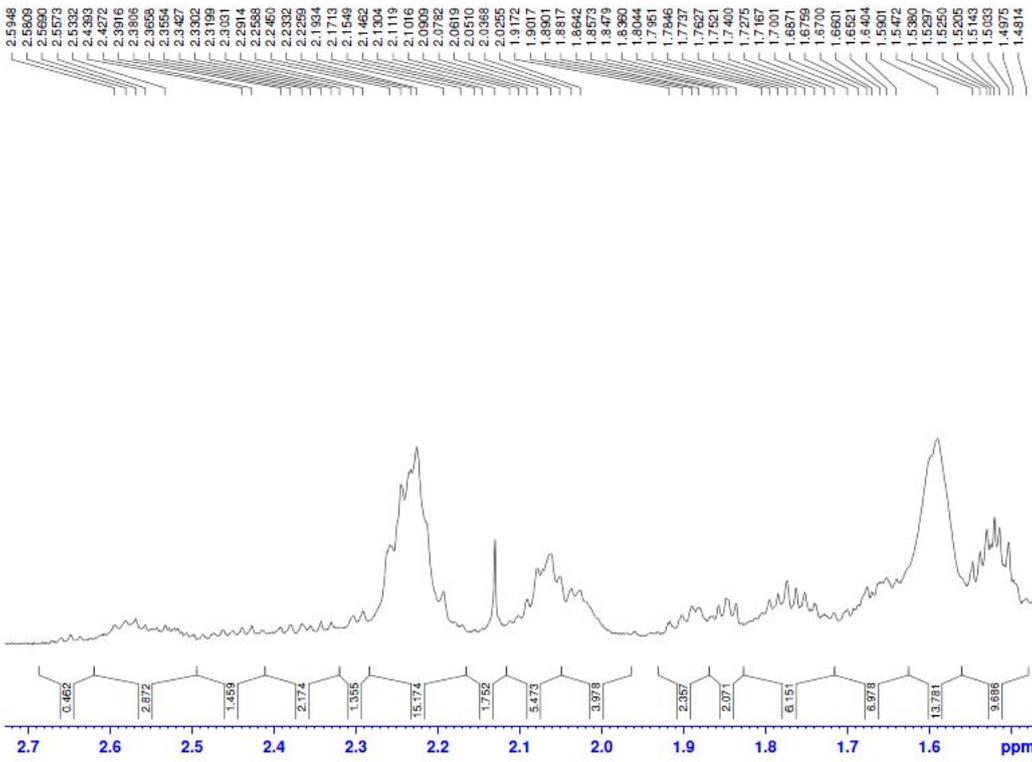
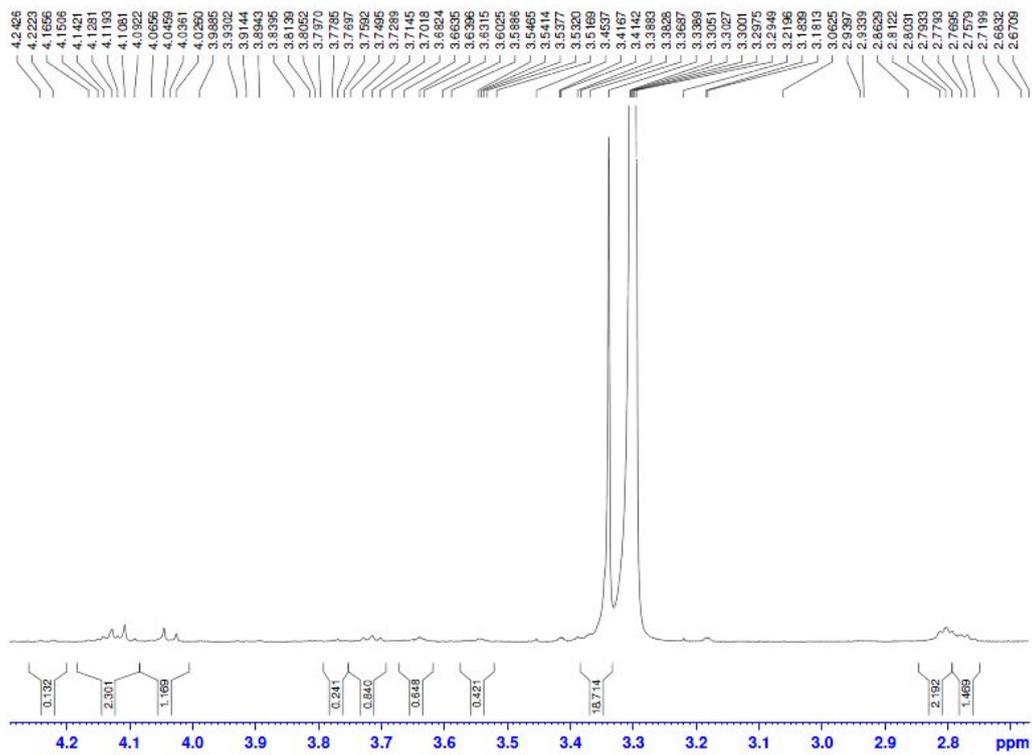
K3의 1H와 K4의 1H 데이터를 비교해 본 결과, 같은 signal이 존재함을 알 수 있었으며 이를 통해 동일 물질이 포함되어 있을 거라고 예측하였음.

NMR 데이터로 보면, K3은 몇 가지의 물질이 섞여있는 것으로 예상되나, K4는 NMR데이터나 LCMS 데이터를 고려해 보았을 때 단일물질일 가능성이 높으며, 이러한 데이터를 통해 분석 시 물질의 구조가 당지질(glycolipid)과 같은 구조로 예측됨.









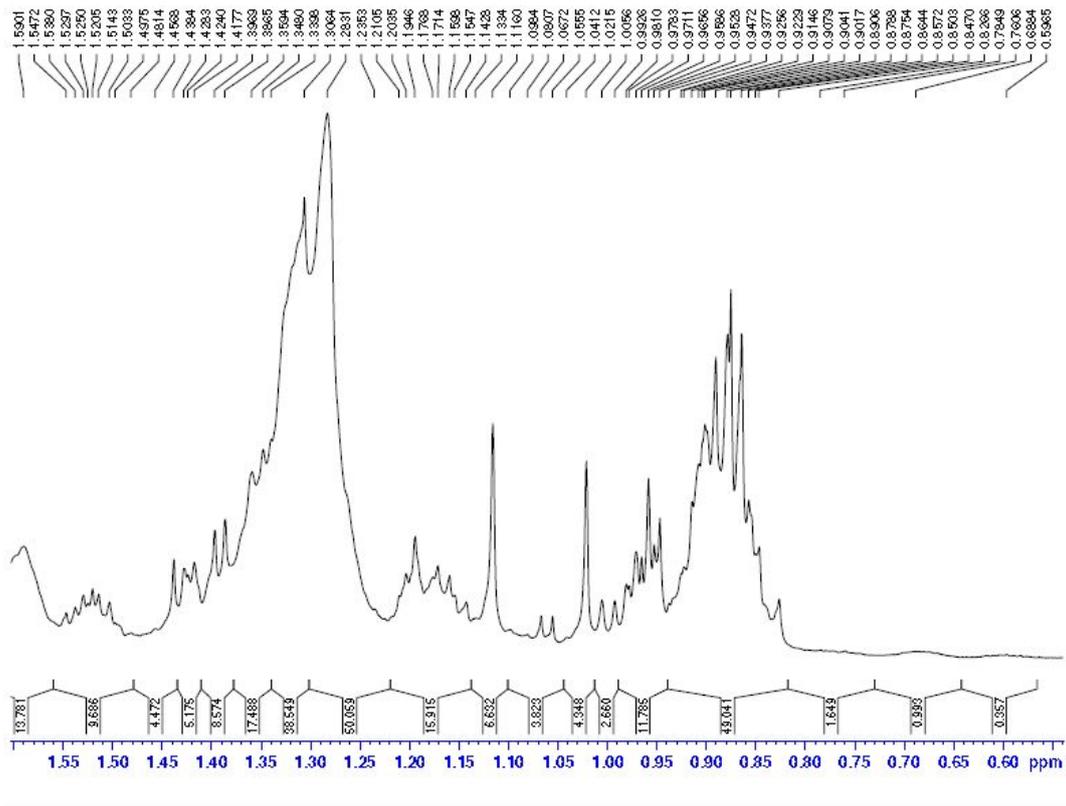
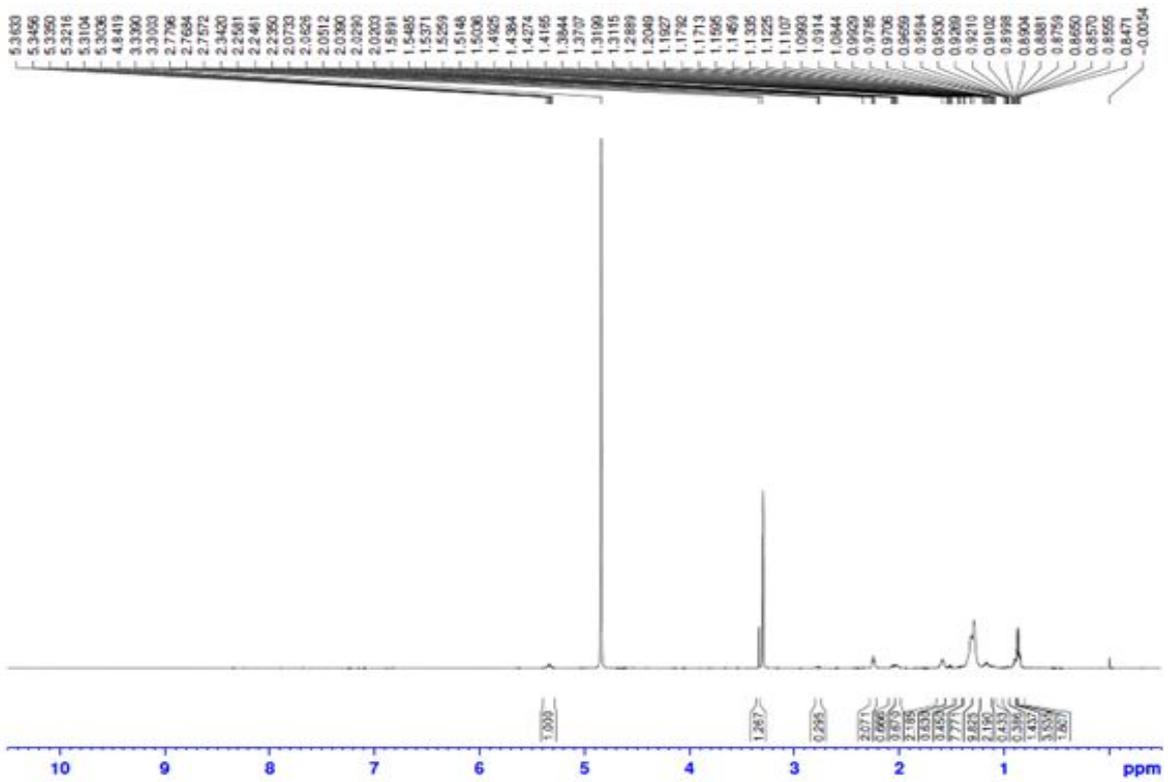
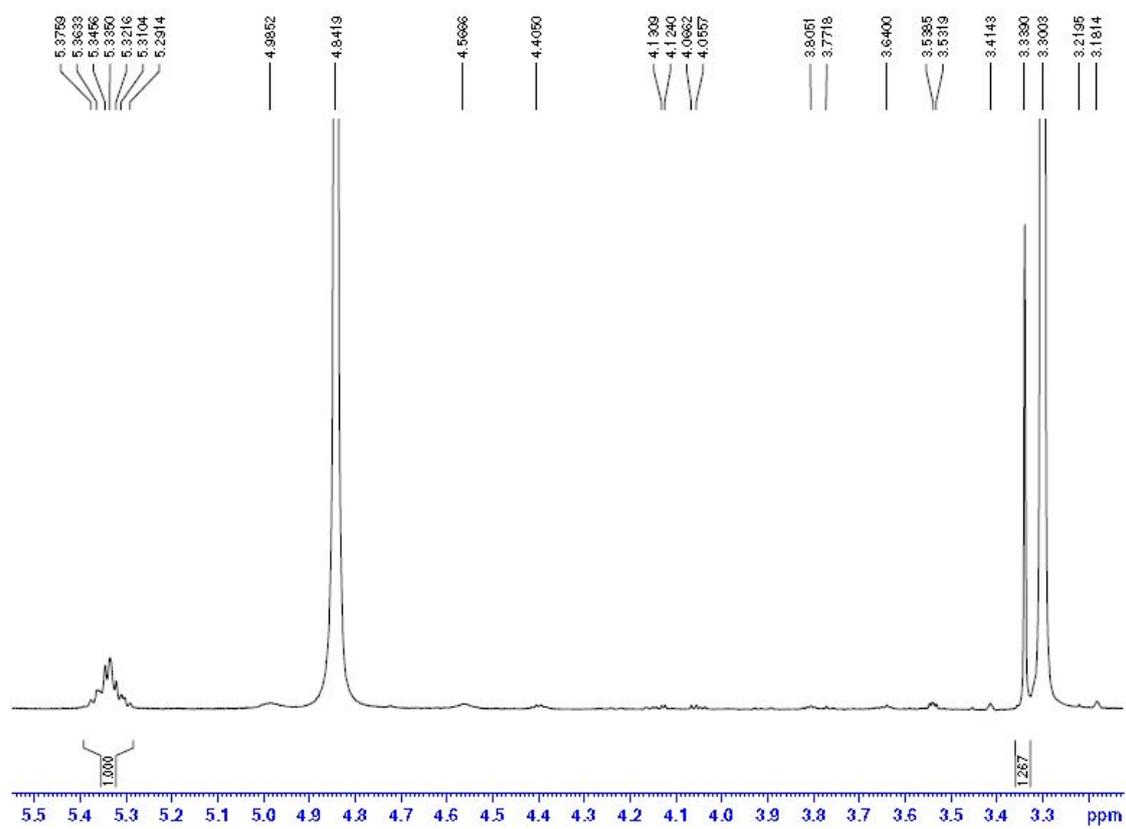
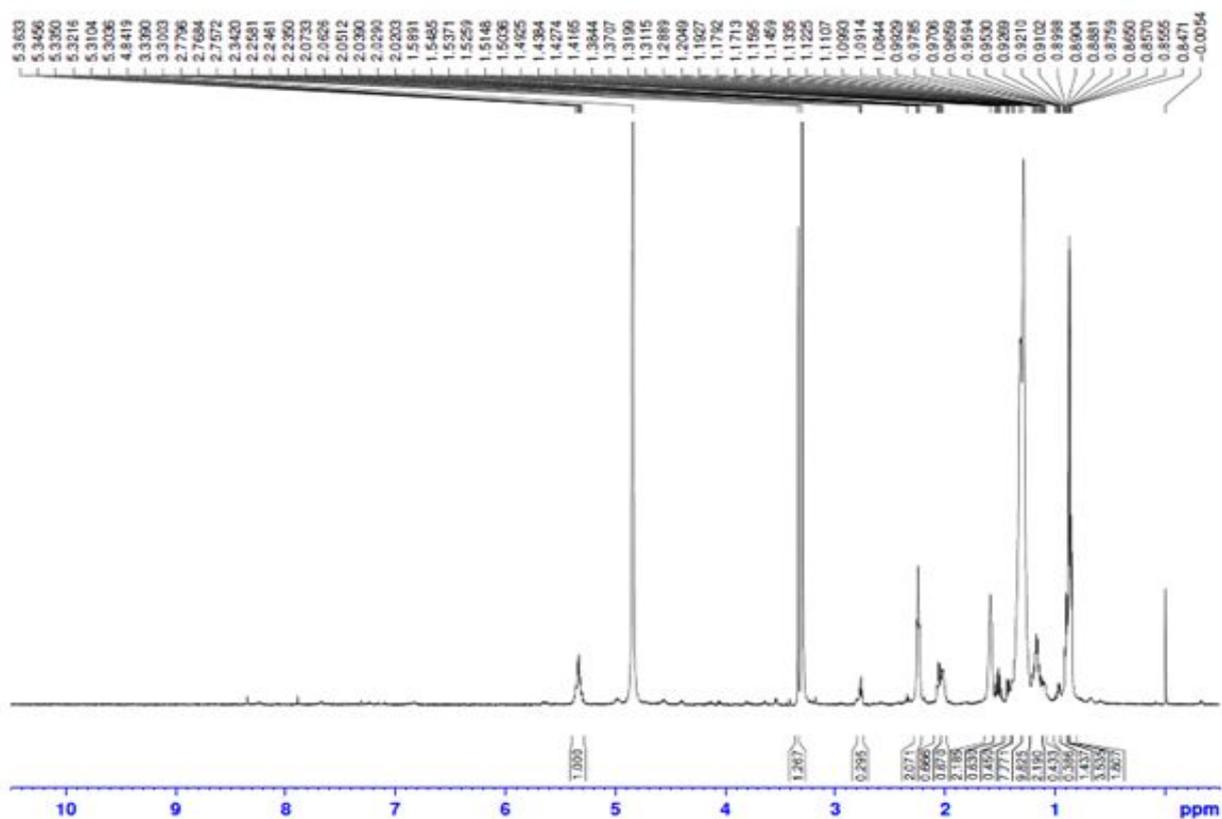


그림 23. NMR(1H)-K3





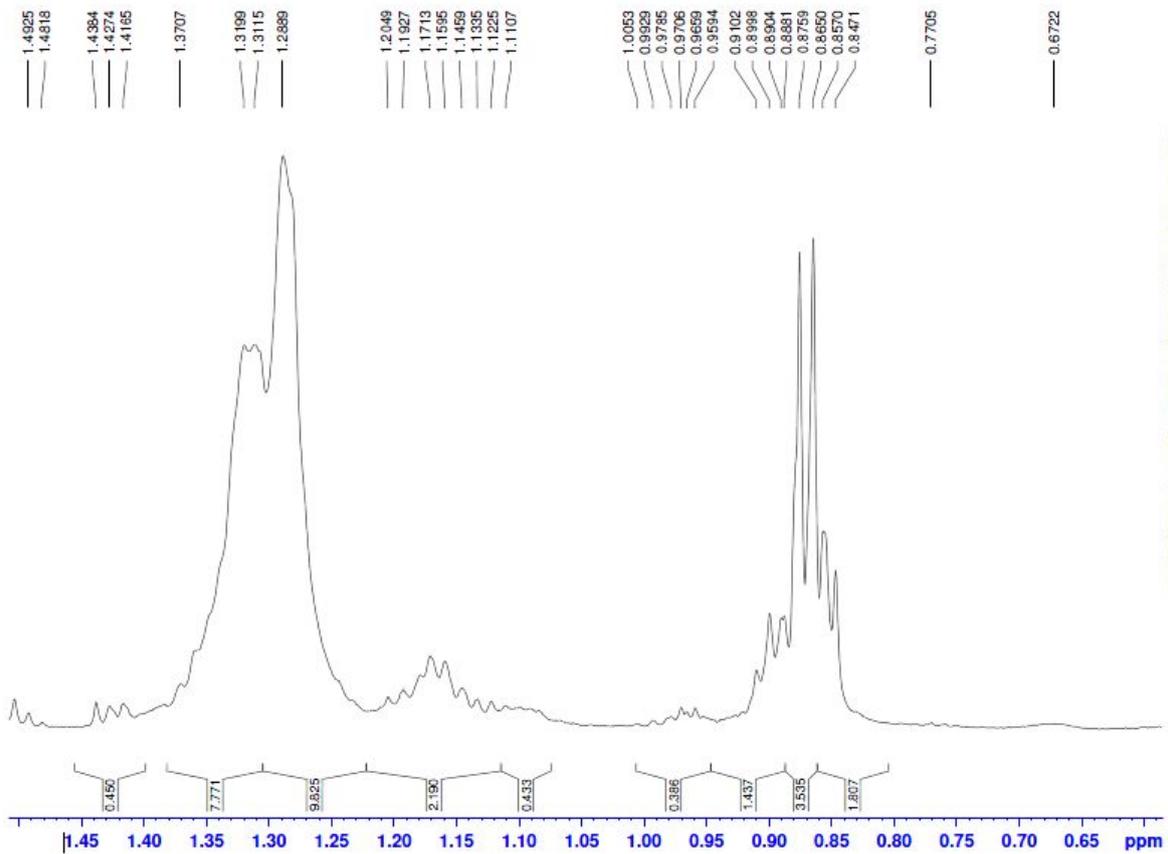
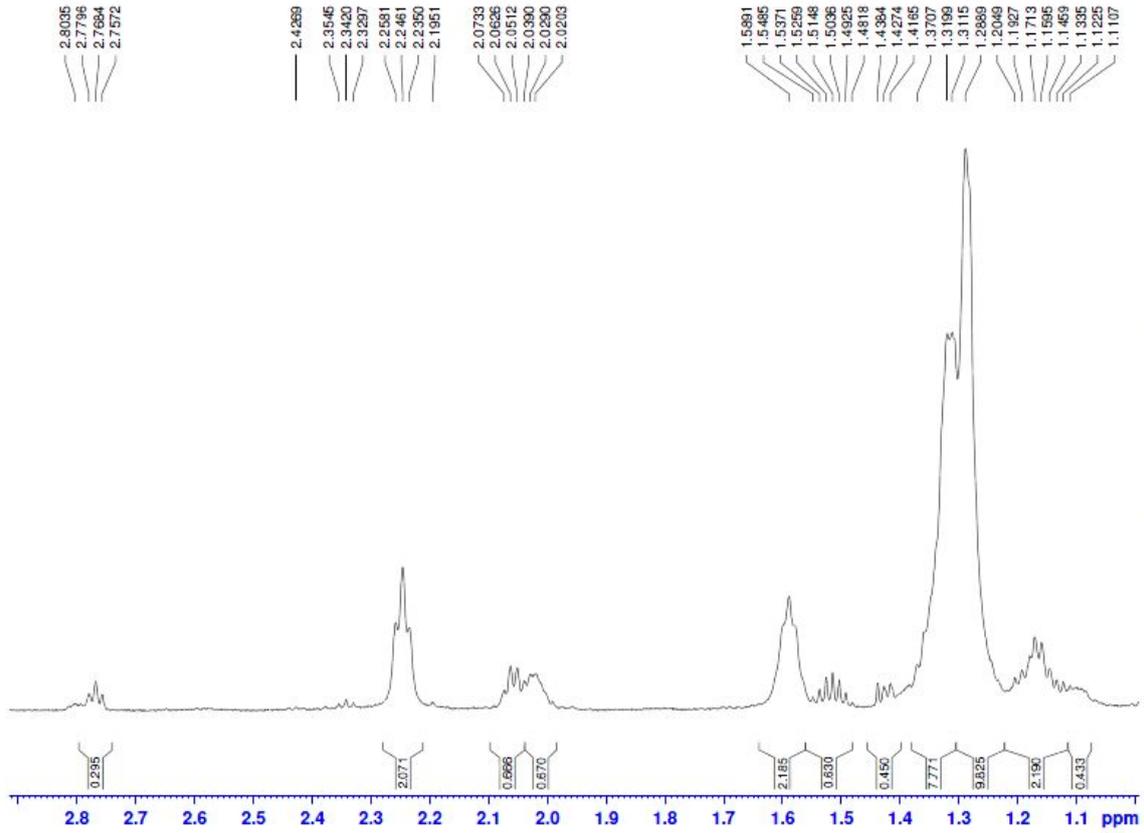
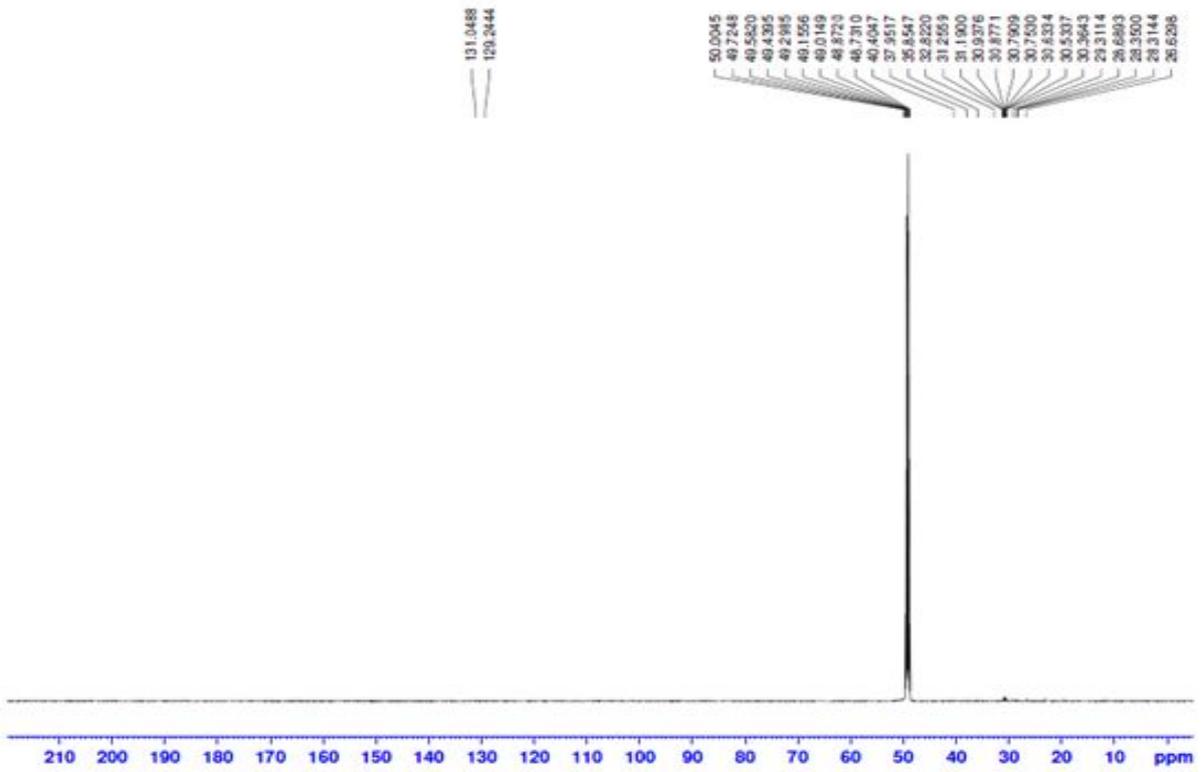
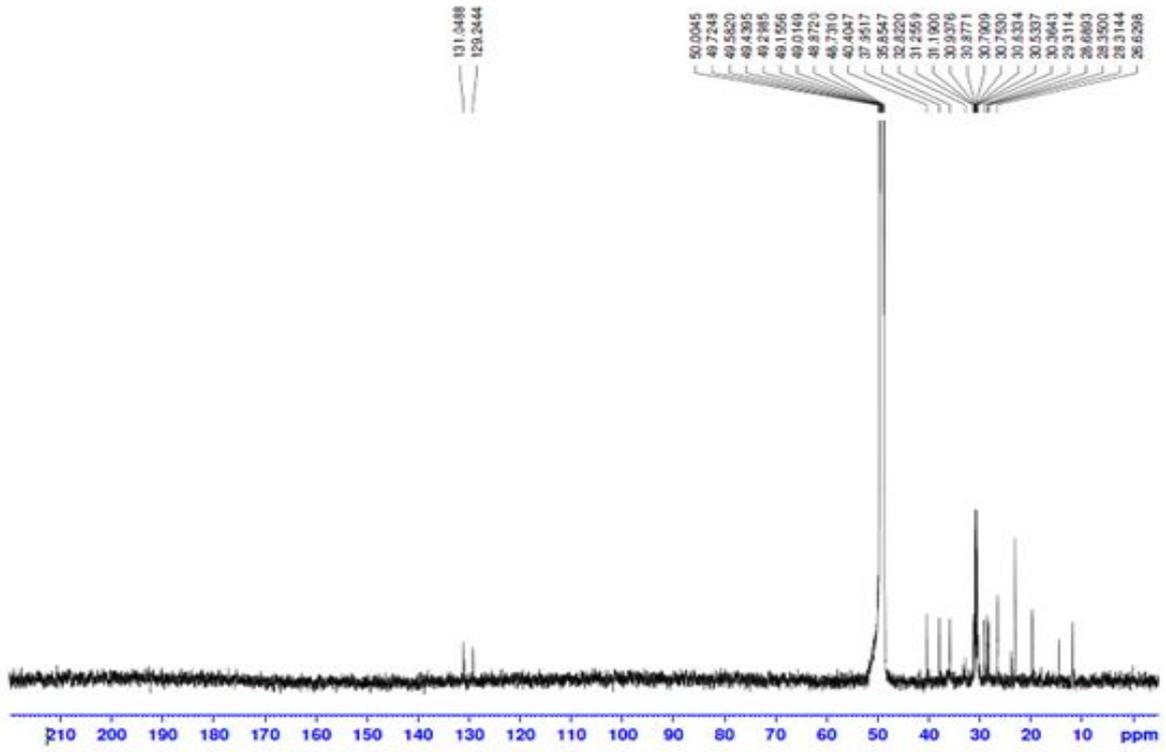
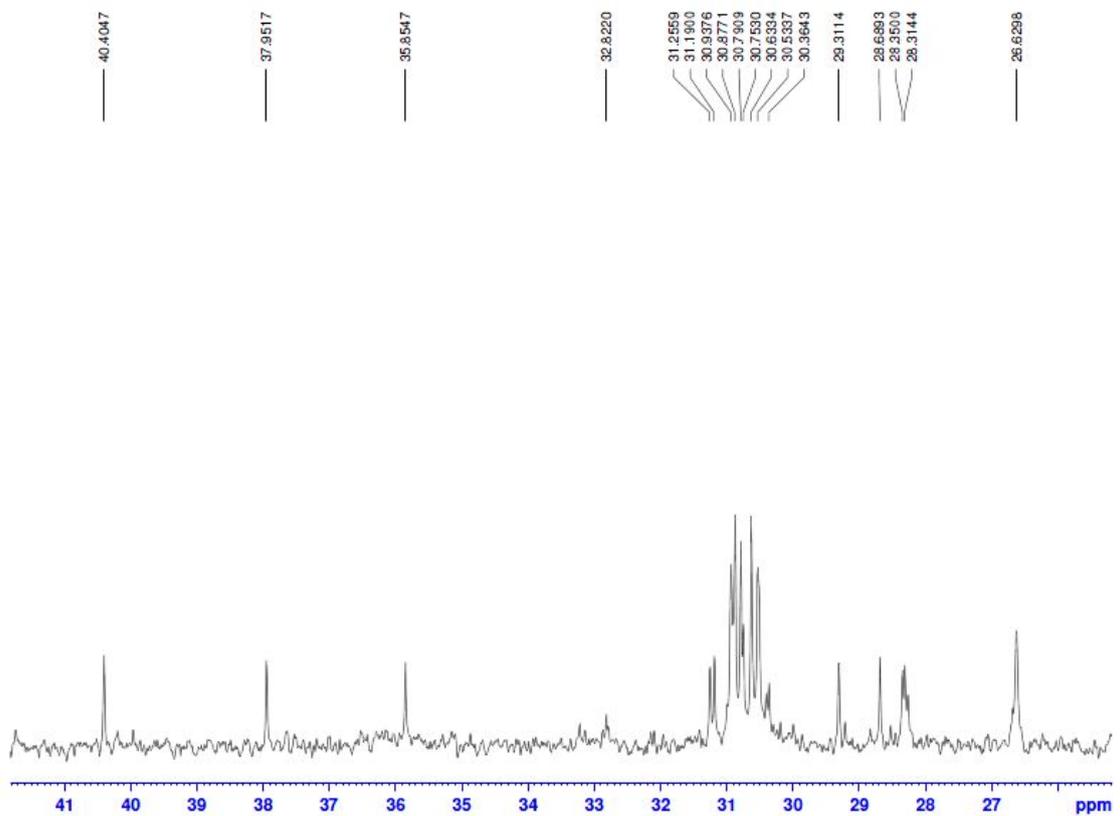
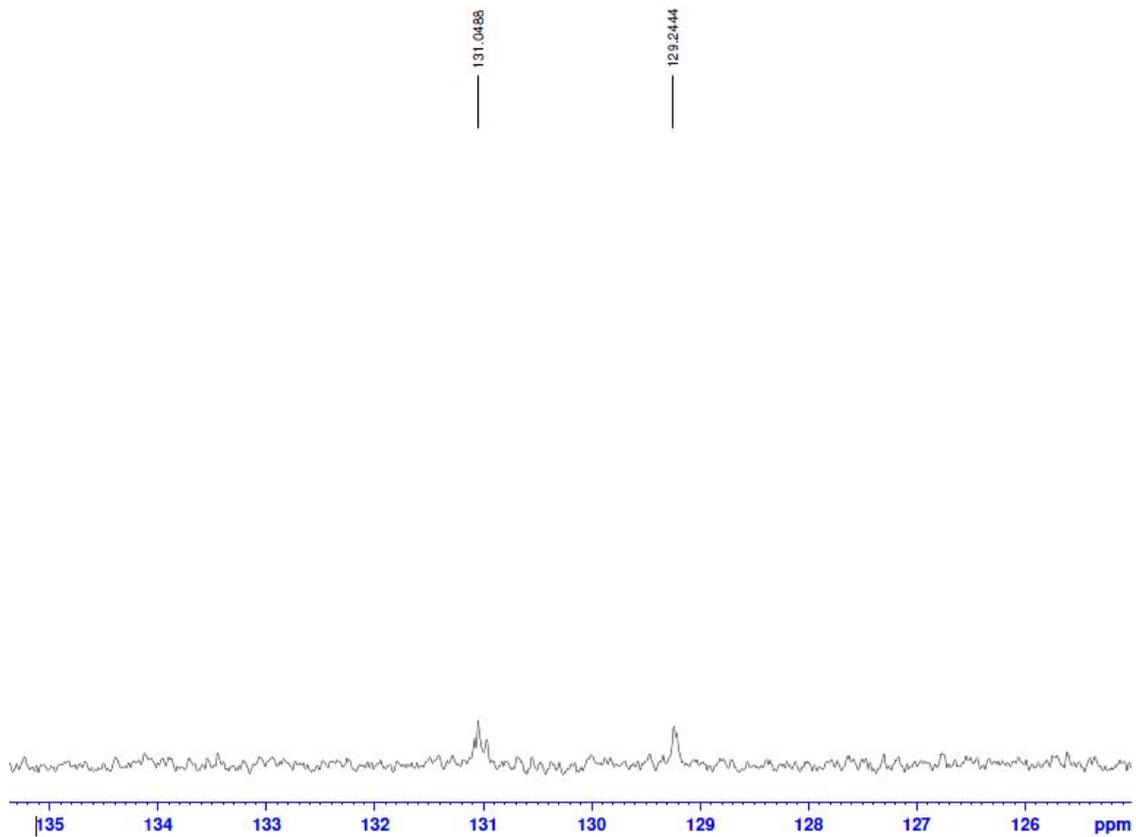


그림 24. NMR(1H)-K4





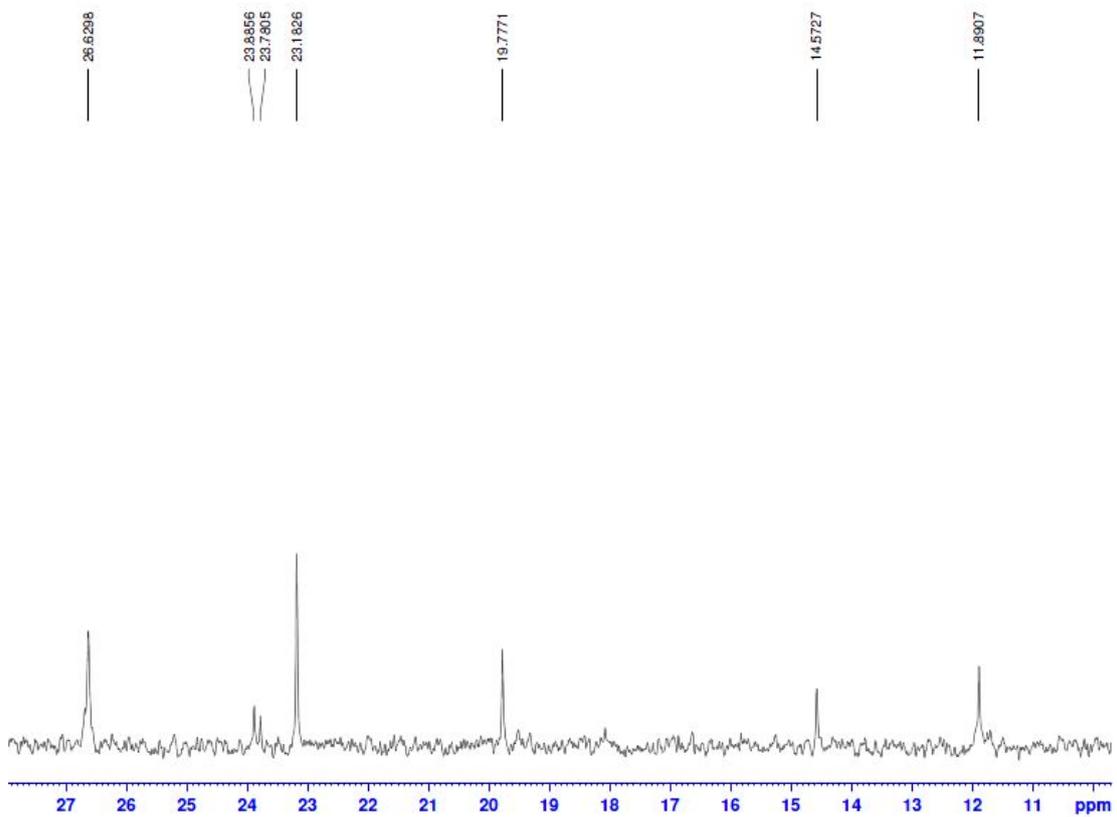
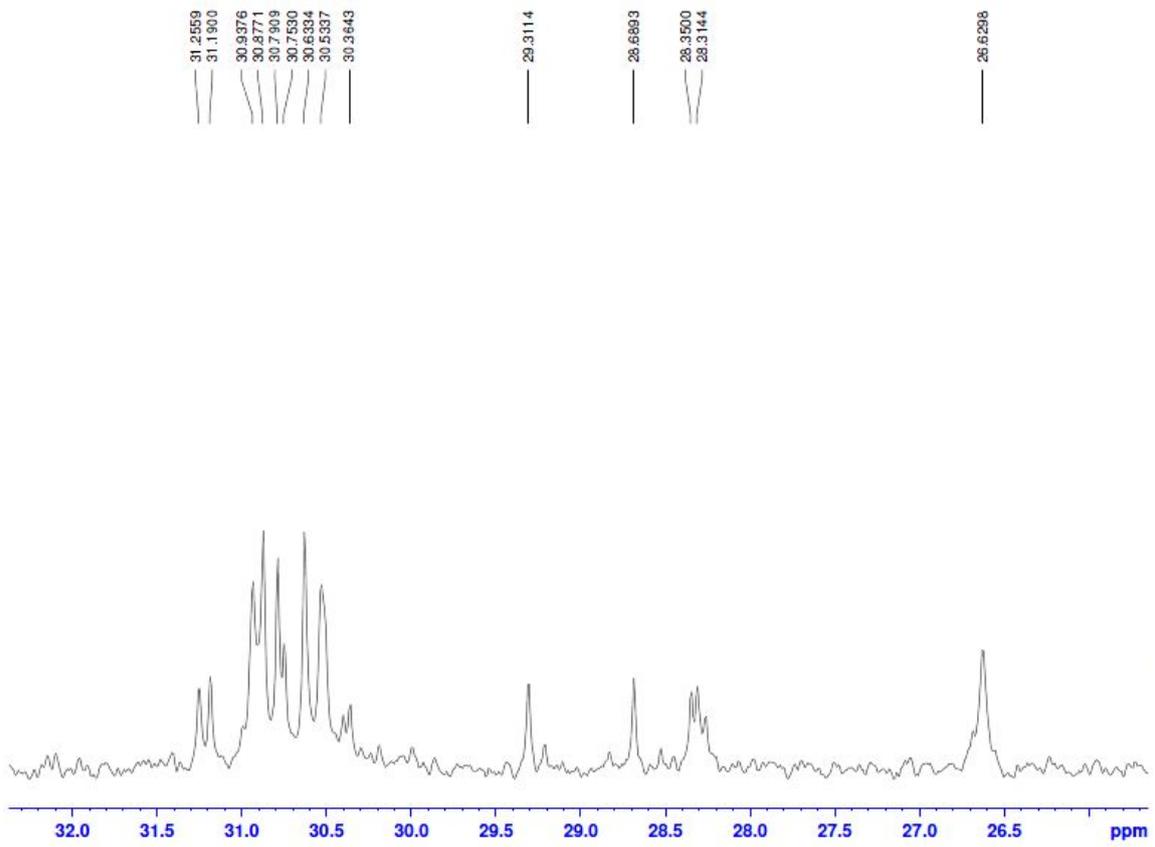
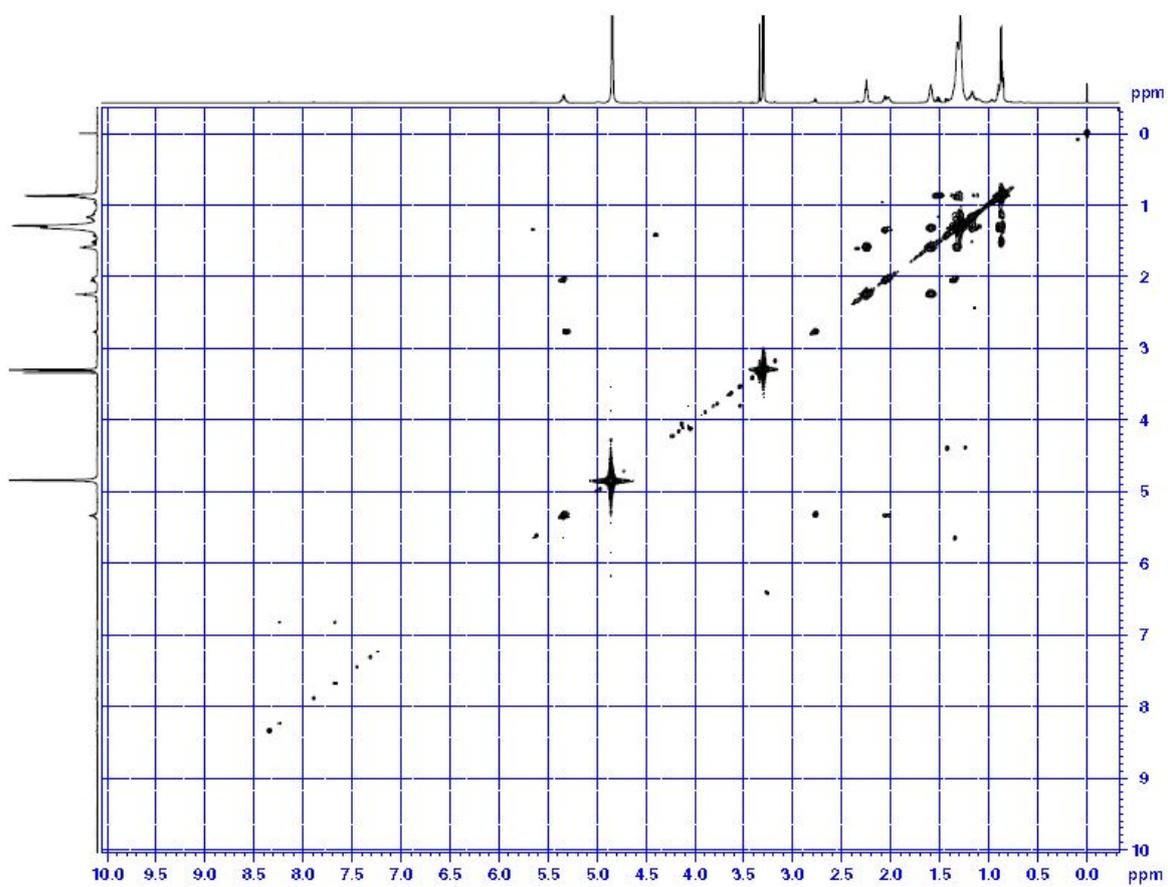
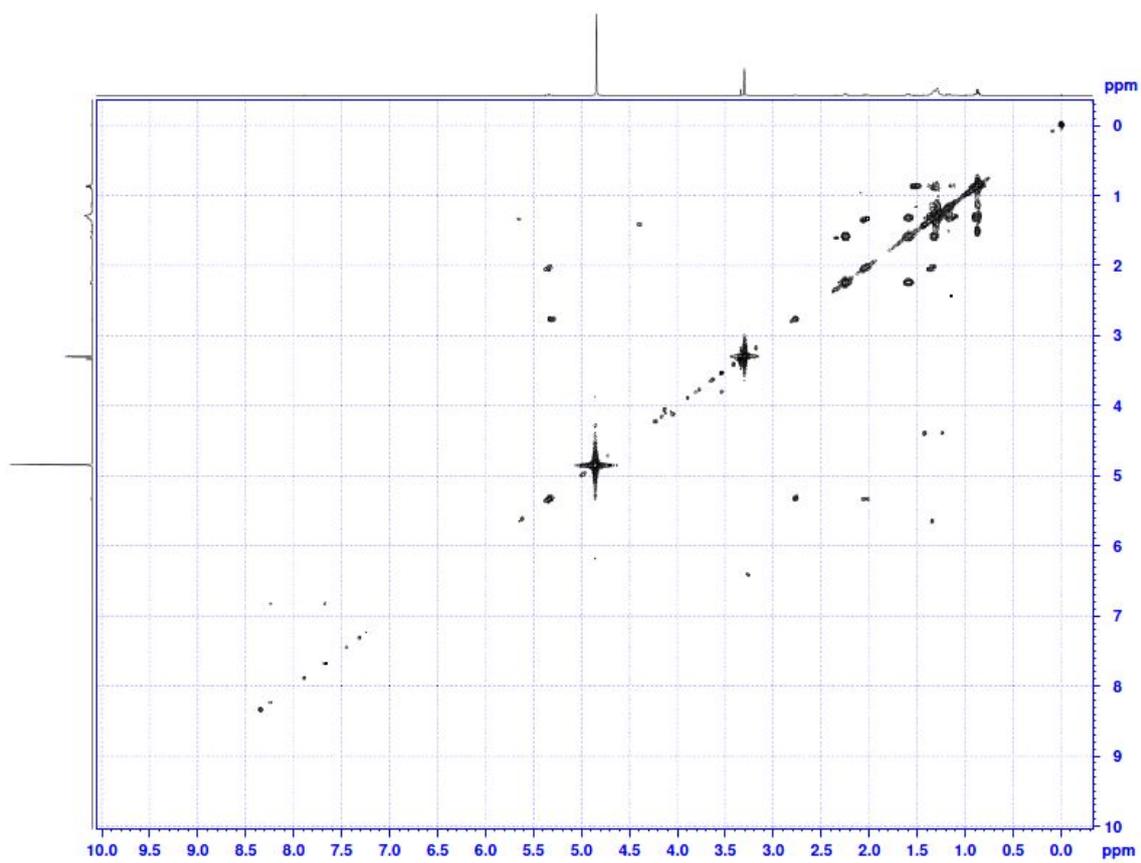


그림 25. NMR(13C)-K4



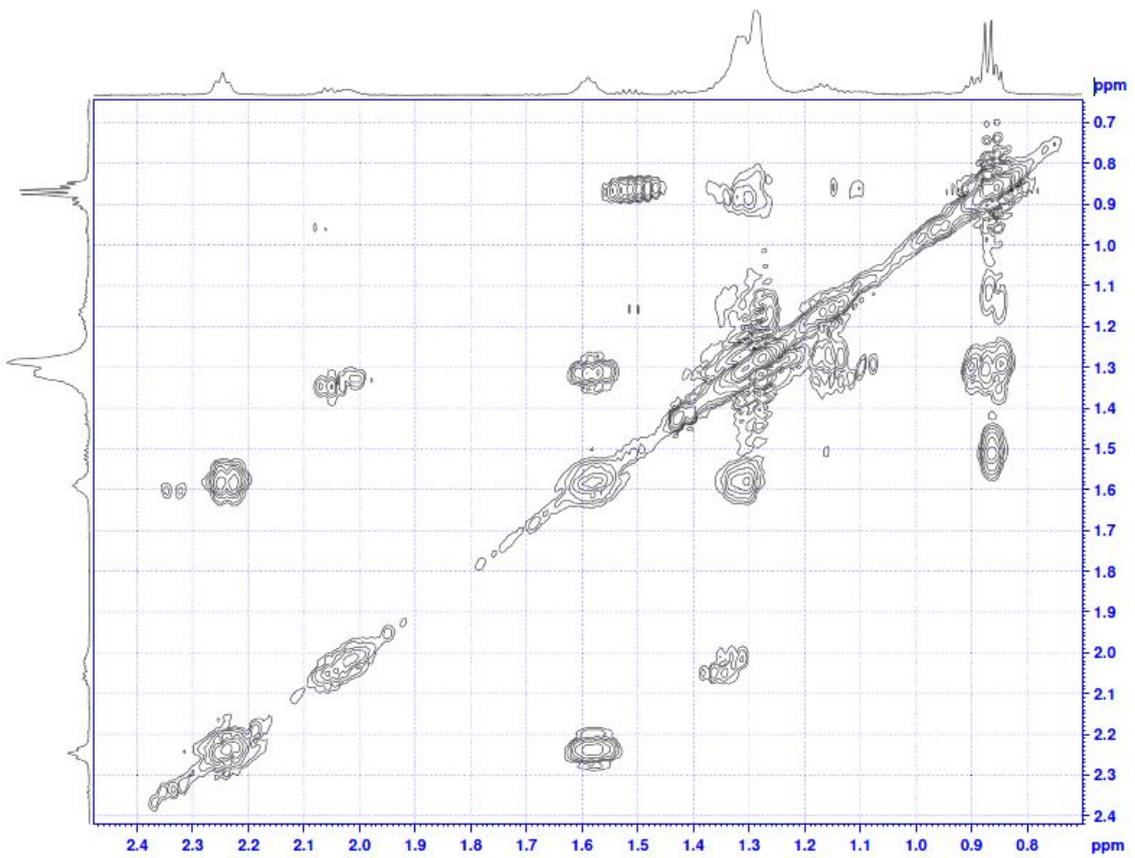
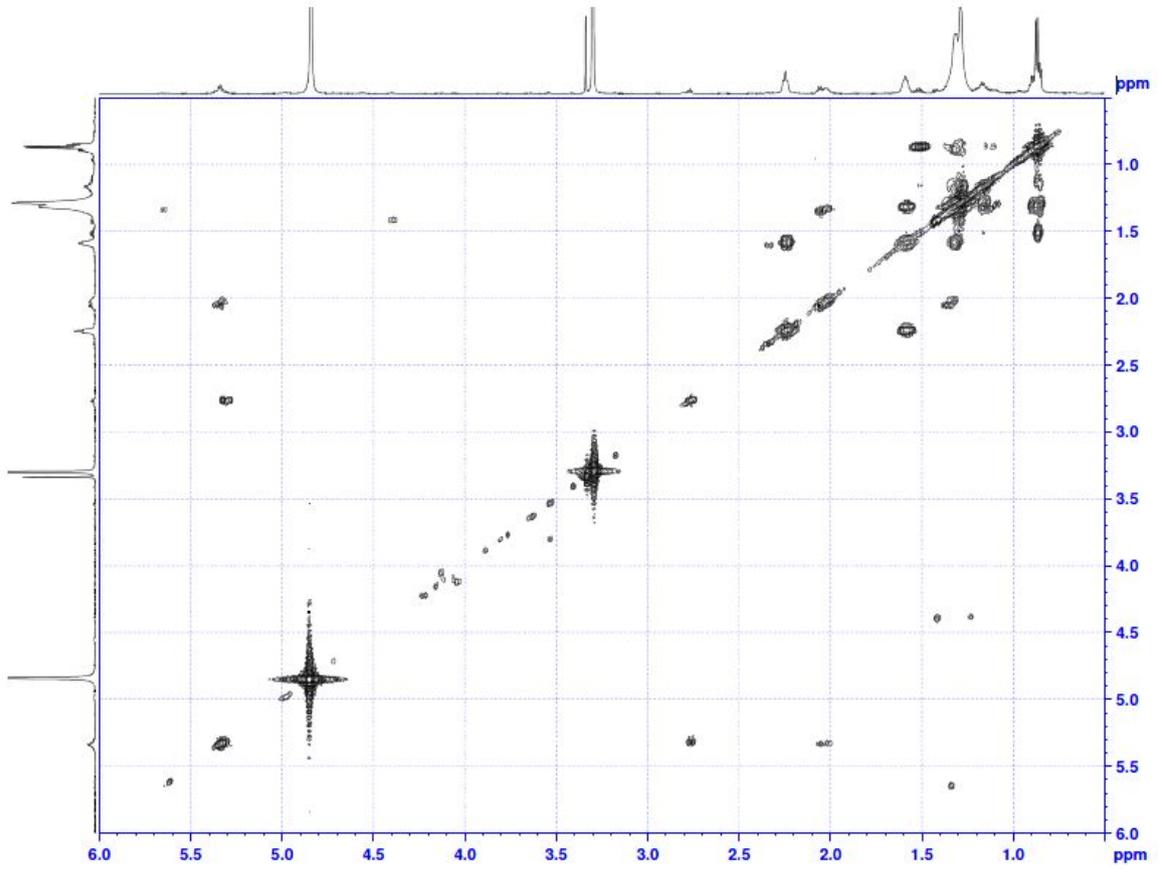
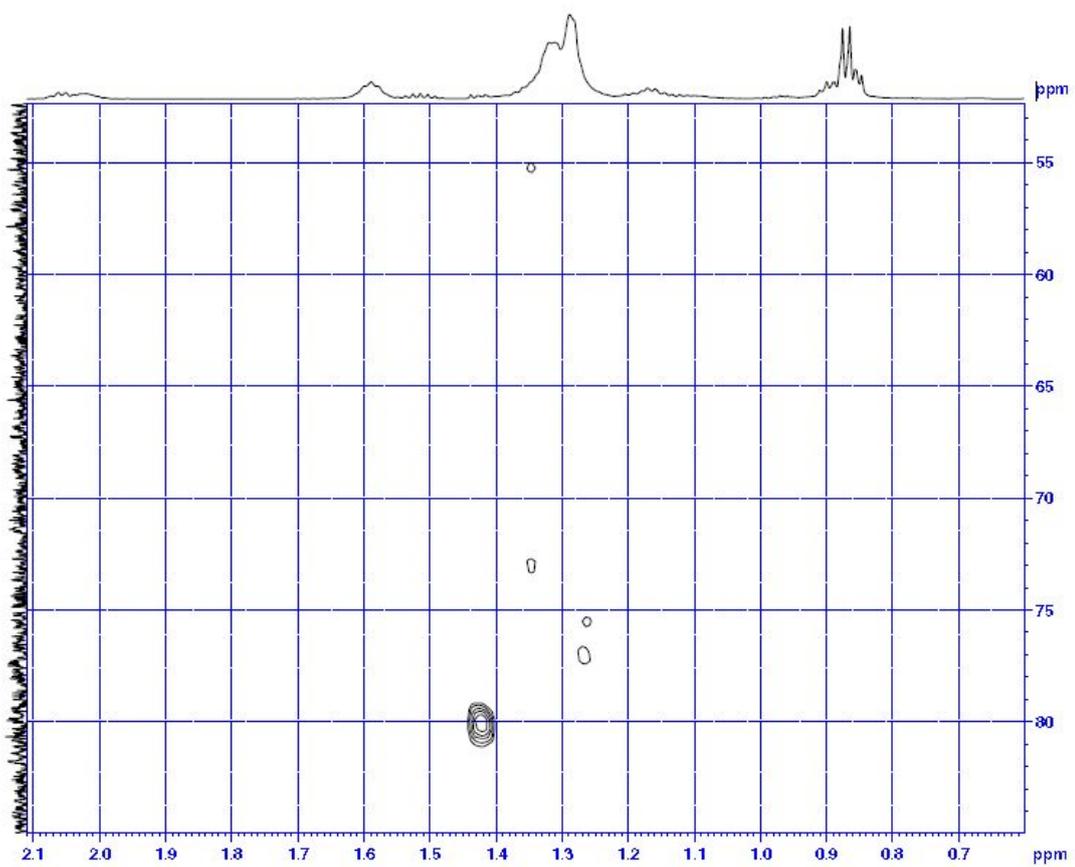
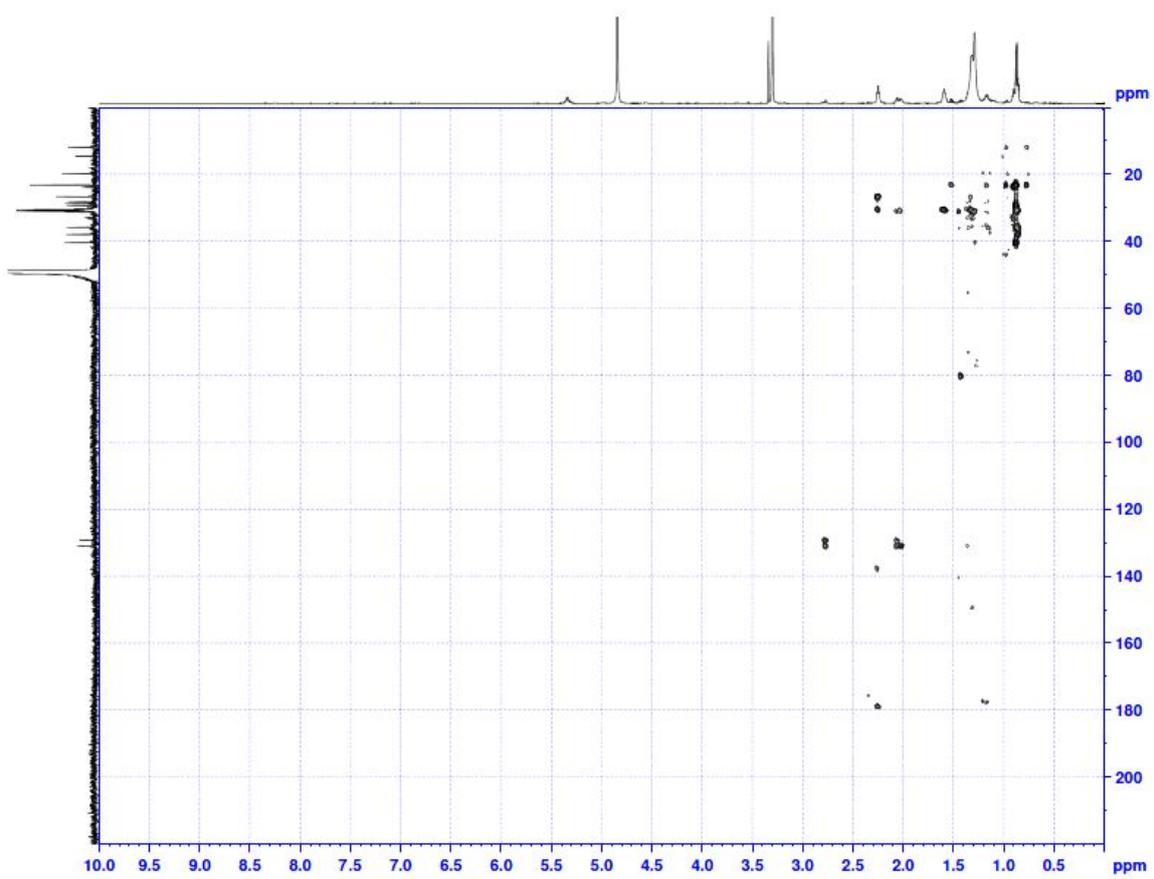
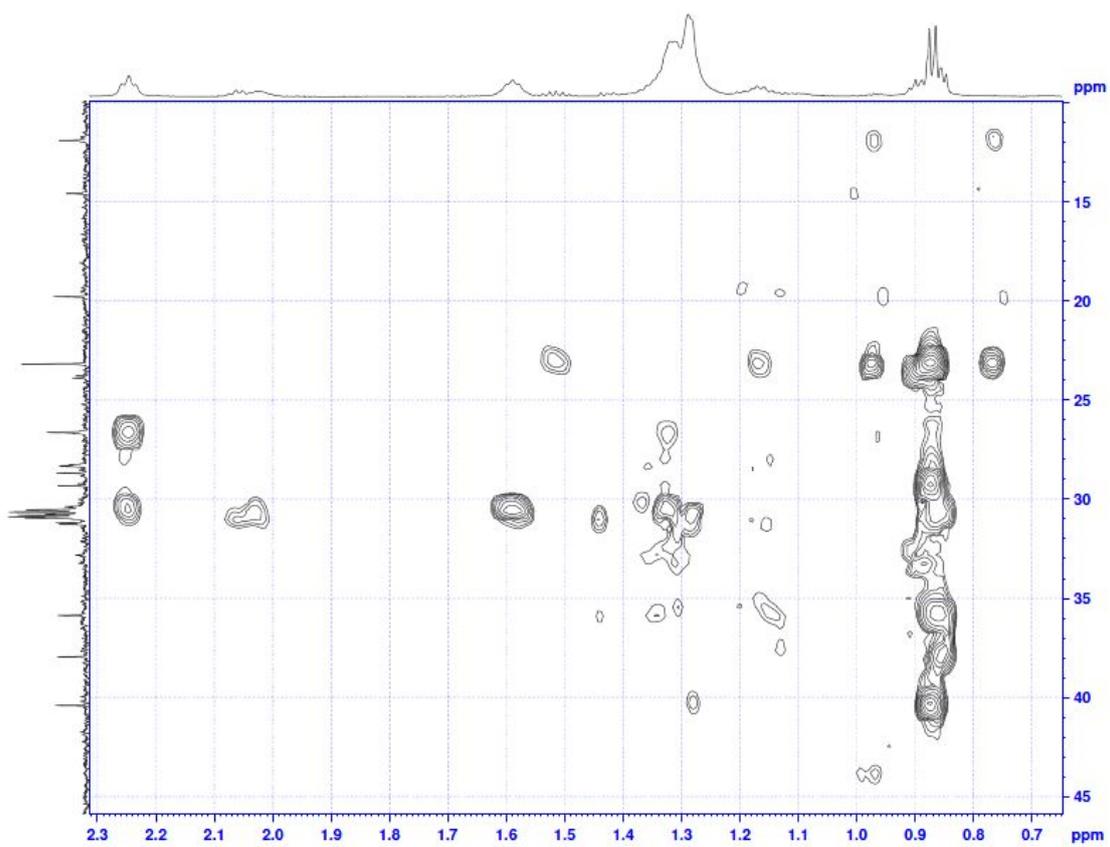
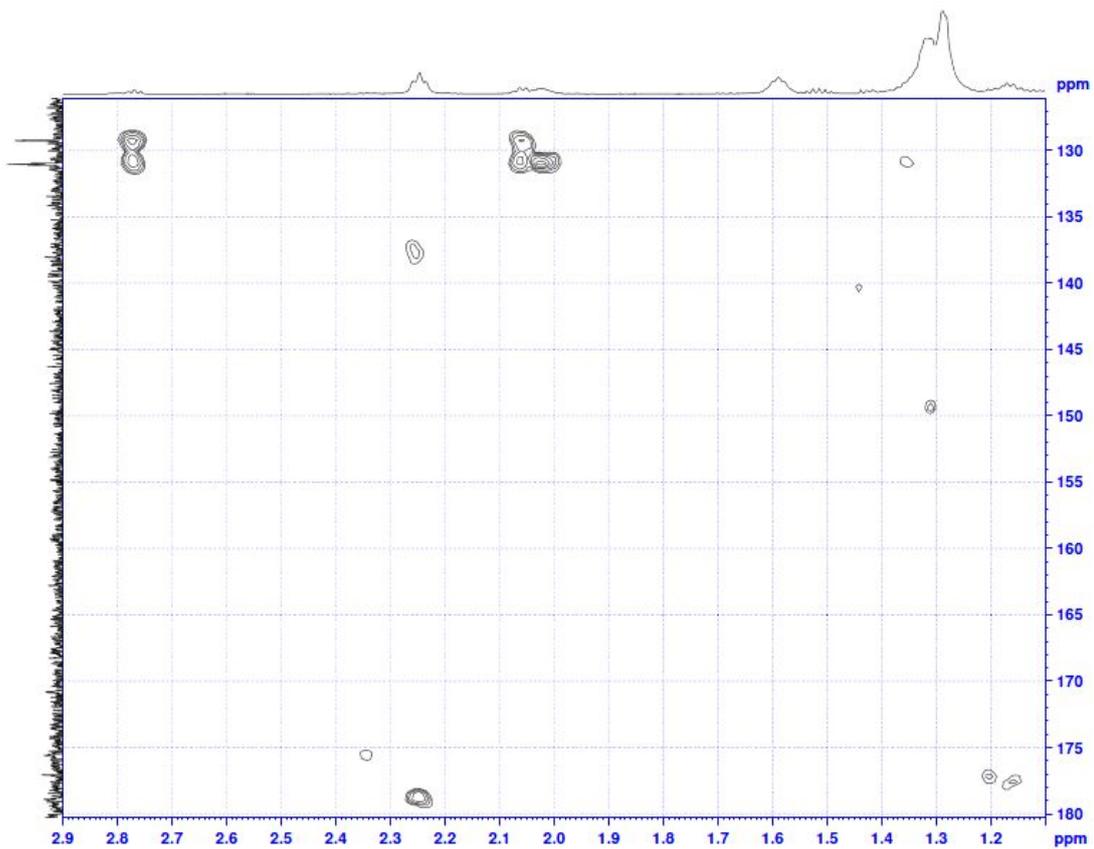


그림 26. NMR(COSY)-K4





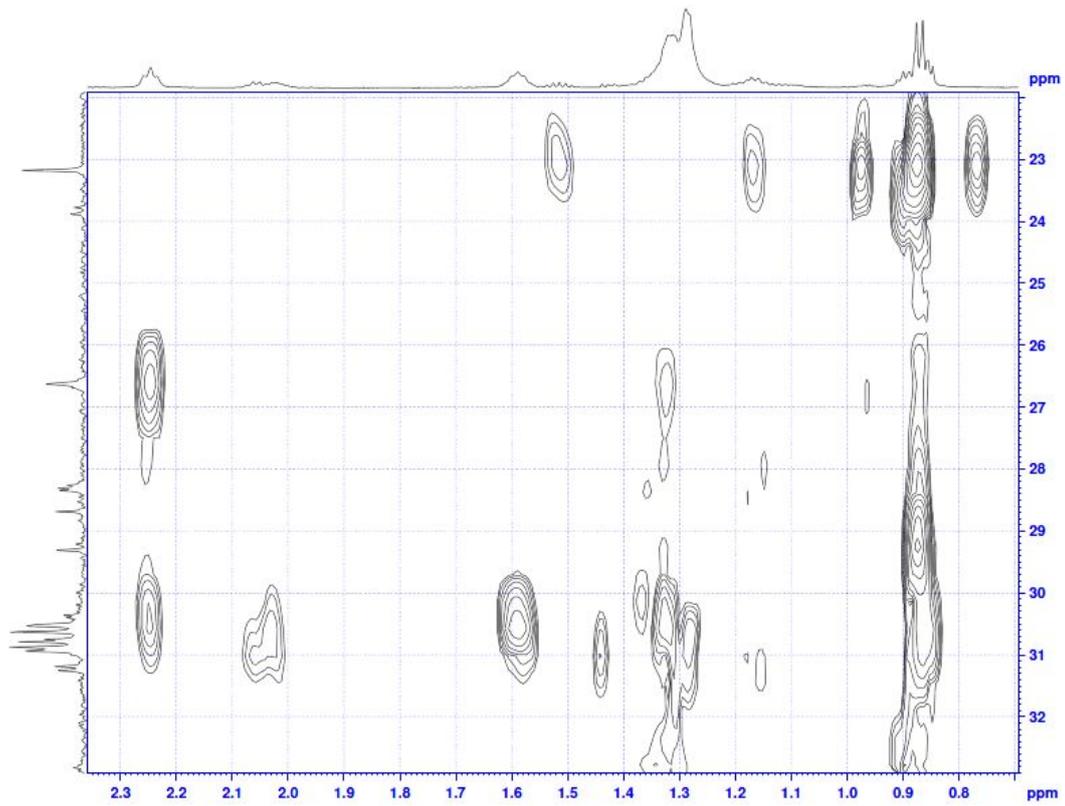
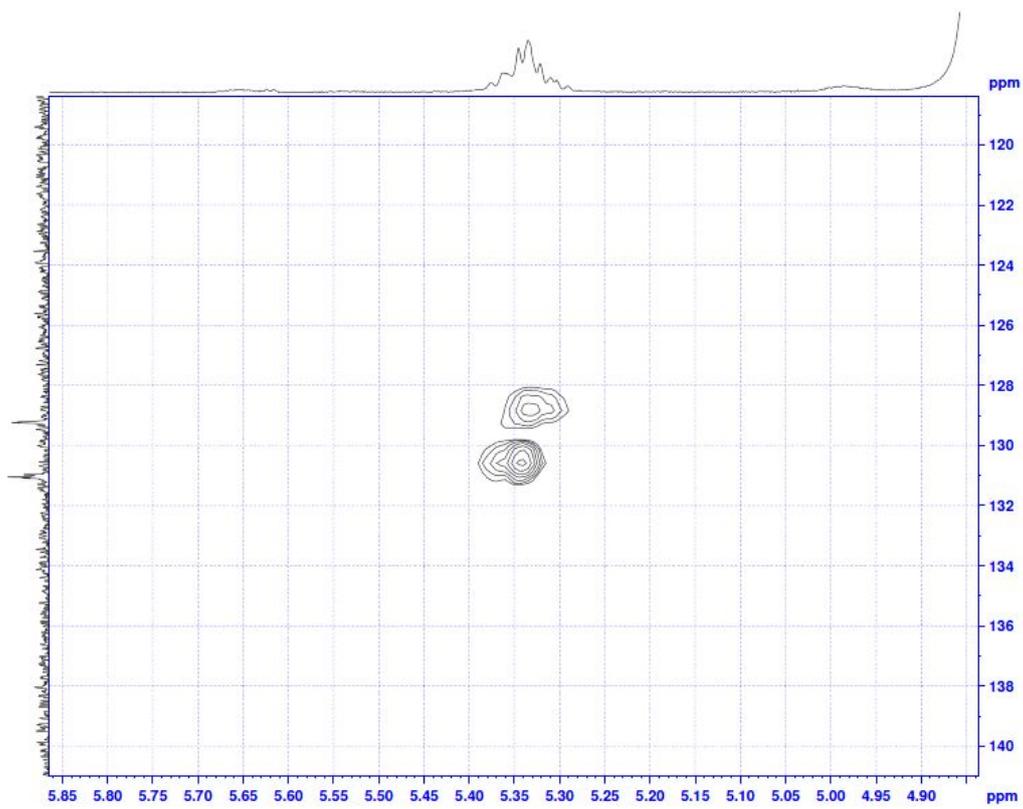
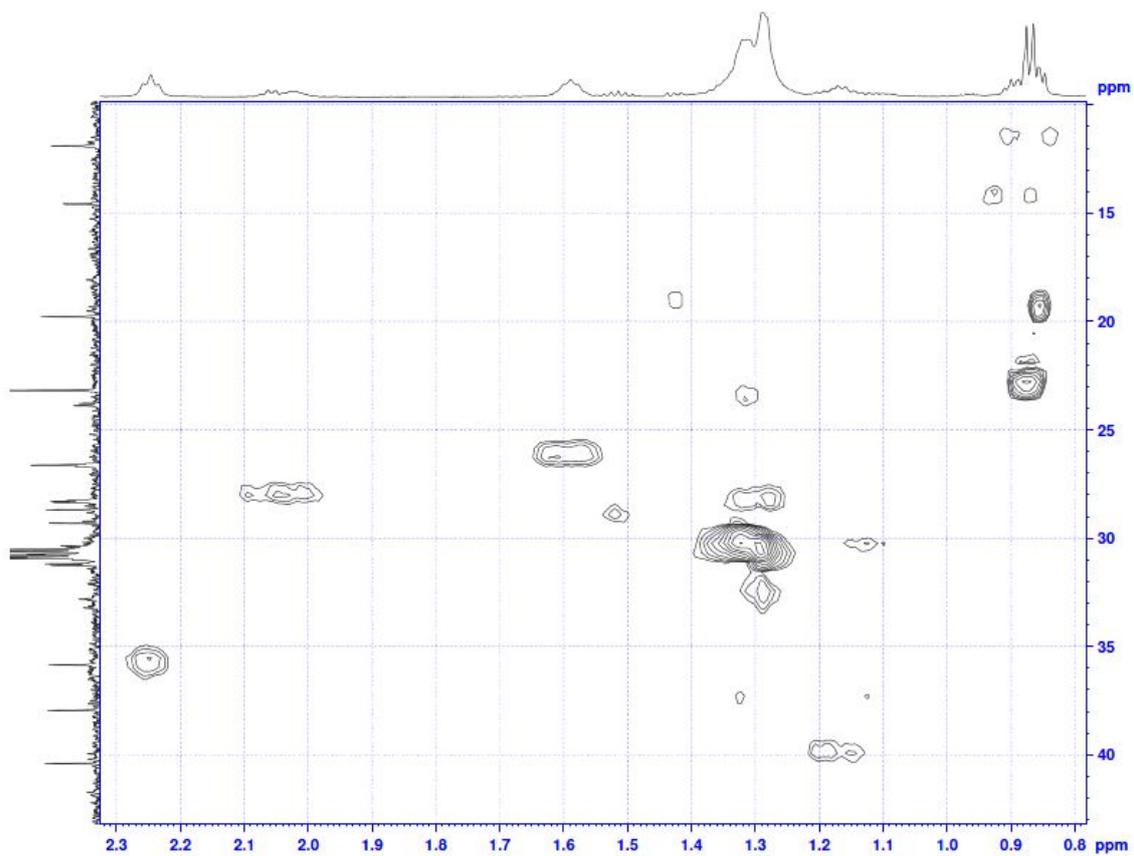
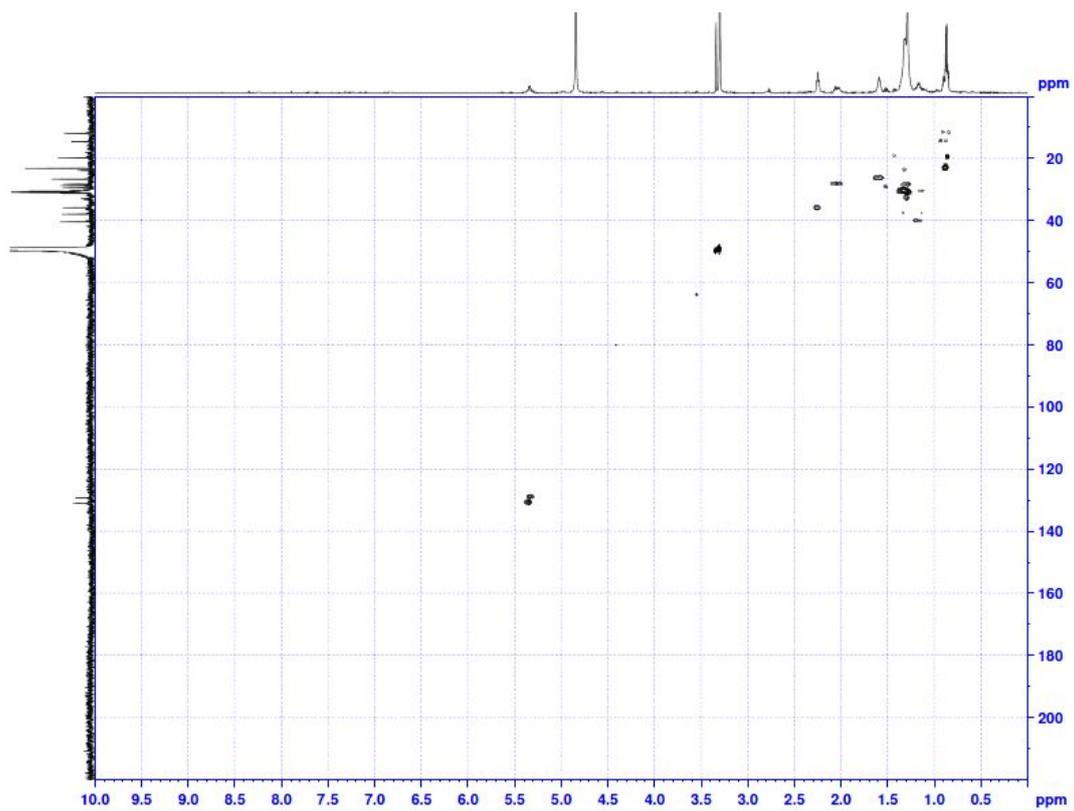
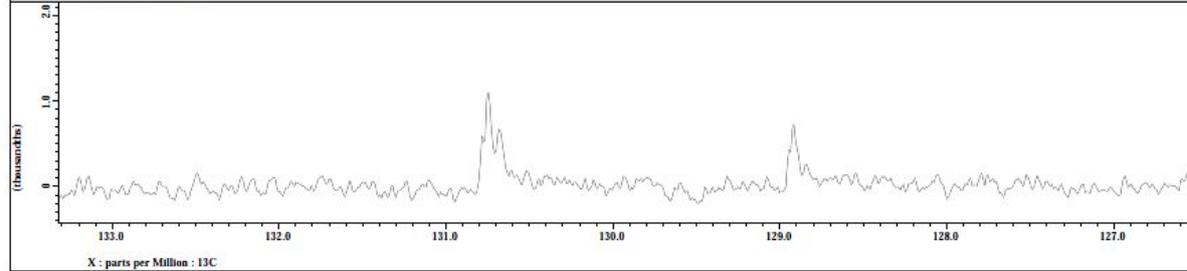
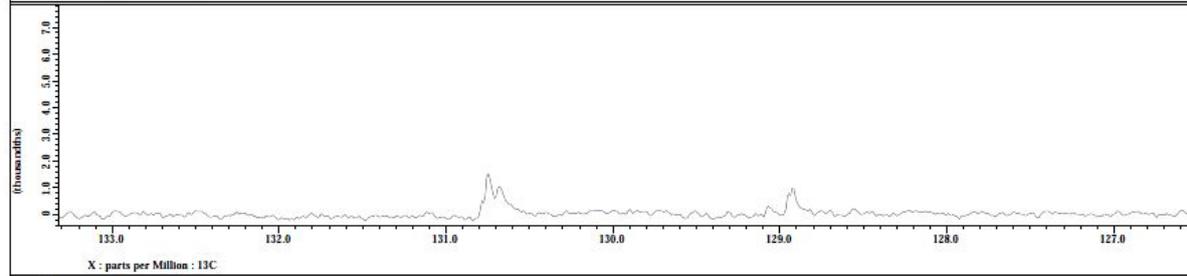
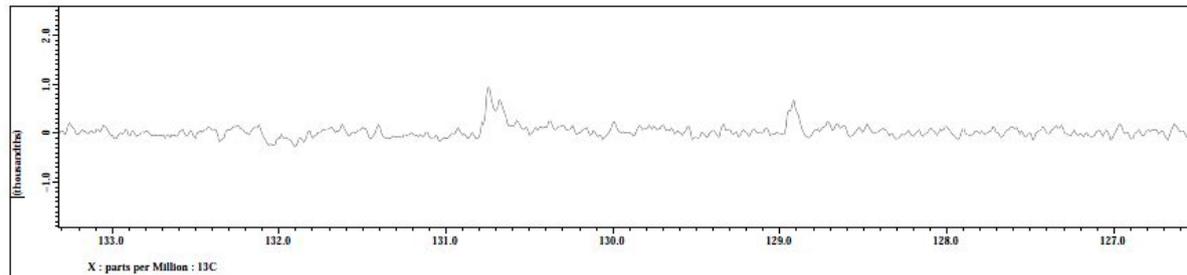
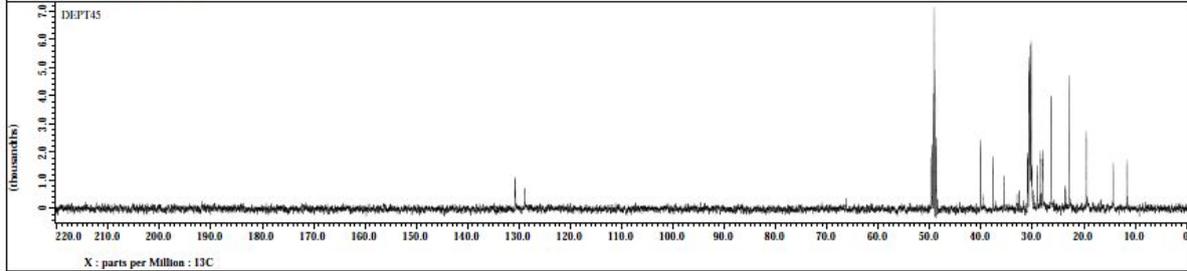
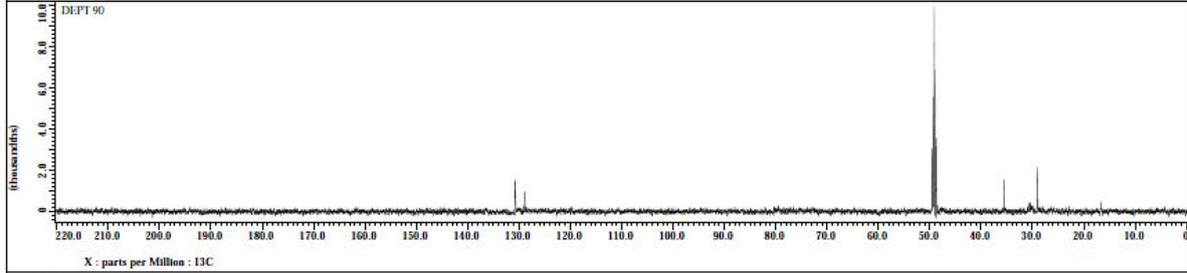
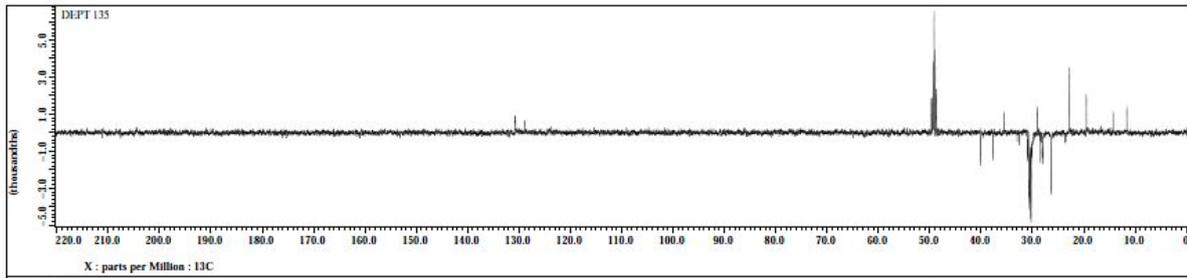


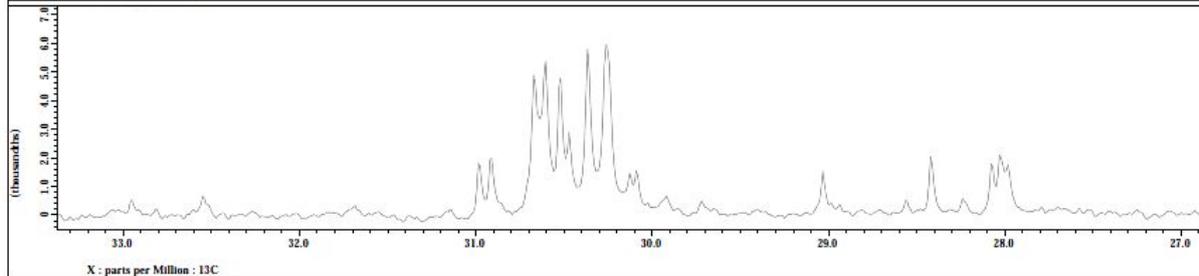
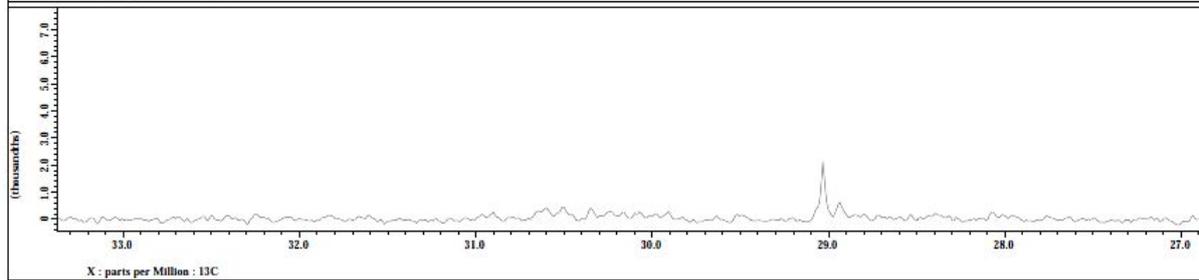
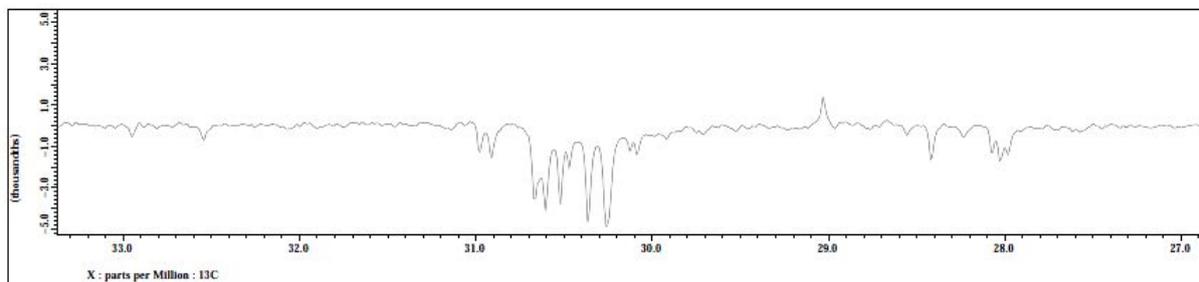
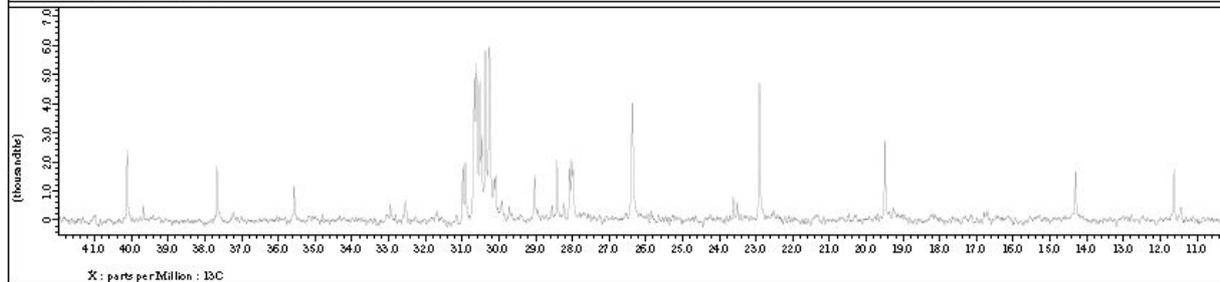
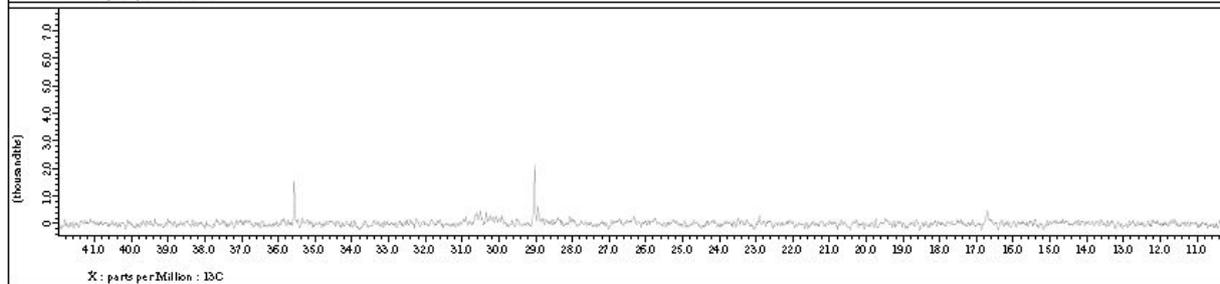
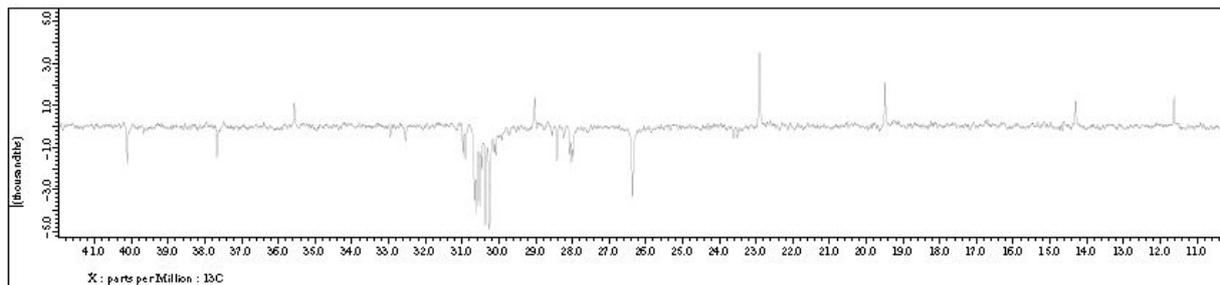
그림 27. NMR(HMBC)-K4





28. NMR(HSQC)-K4





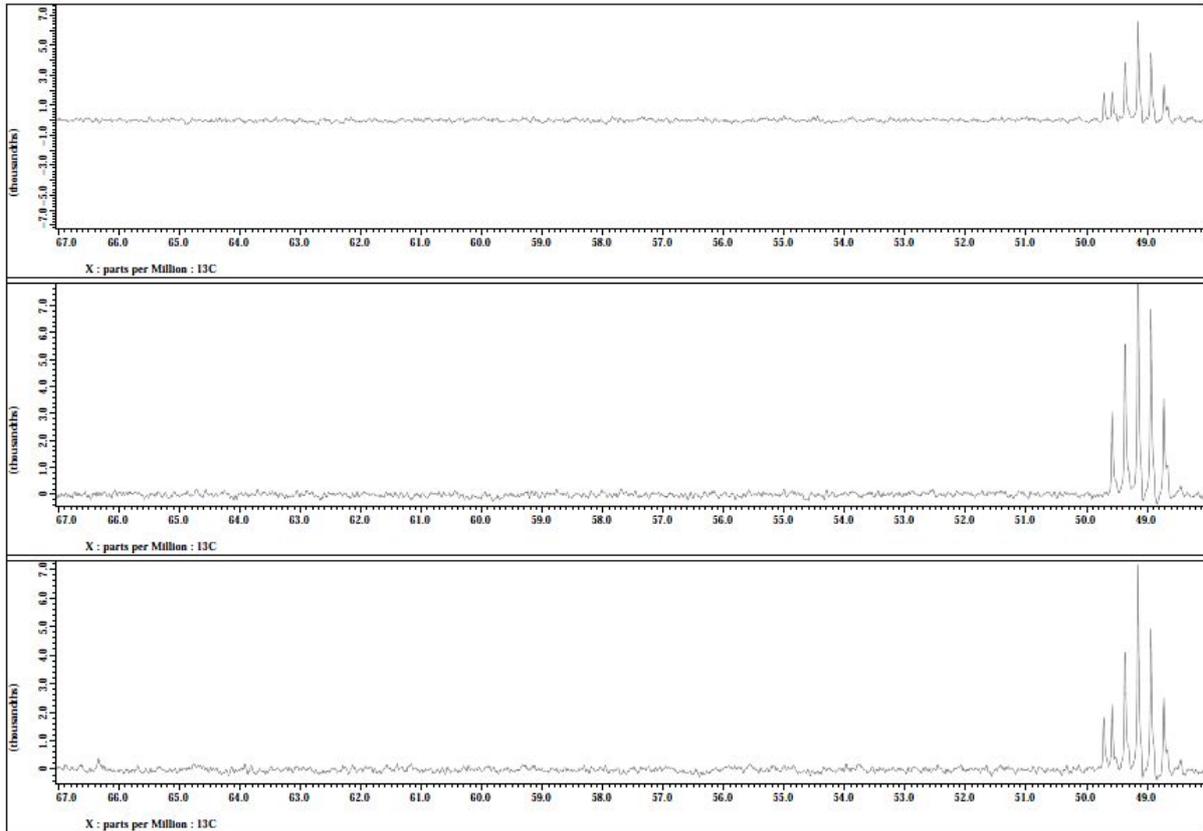


그림 29. NMR(DEPT)-K4

3. 결론 _ 물질 분리 동정

본 연구에서는 *Streptomyces* sp. A1022 배양액 균체로부터 용매분획, silical gel chromatography, Sephadex chromatography, prep. HPLC 등의 분석을 통해 식물병원균에 활성을 지니는 단일물질로 예상됨. 최종 물질은 ¹H, ¹³C, COSY, HMBC, HSQC, DEPT 등의 분석을 통해 당지질(glycolipid)로 추정되어 추가 실험을 통해 확인할 것임.

항균성을 띠는 천연추출물의 구조 동정을 위한 기존의 많은 연구들이 주로 hydrophobic한 특성을 지닌 물질이 주류를 이루고 있고, hydrophilic한 특성을 동시에 지닌 항균물질에 대한 연구의 보고는 적은 편이기에 처음 *Streptomyces* sp. A1022에서 생성되는 항균물질의 구조 동정을 목표로 하였을 때, 주로 hydrophobic한 항균물질을 추출해 내는 실험 방법으로 실험함. 하지만 추가 실험을 통해 hydrophilic 특성을 지닌 물질에 대해서도 연구할 것임.

4. 추가실험

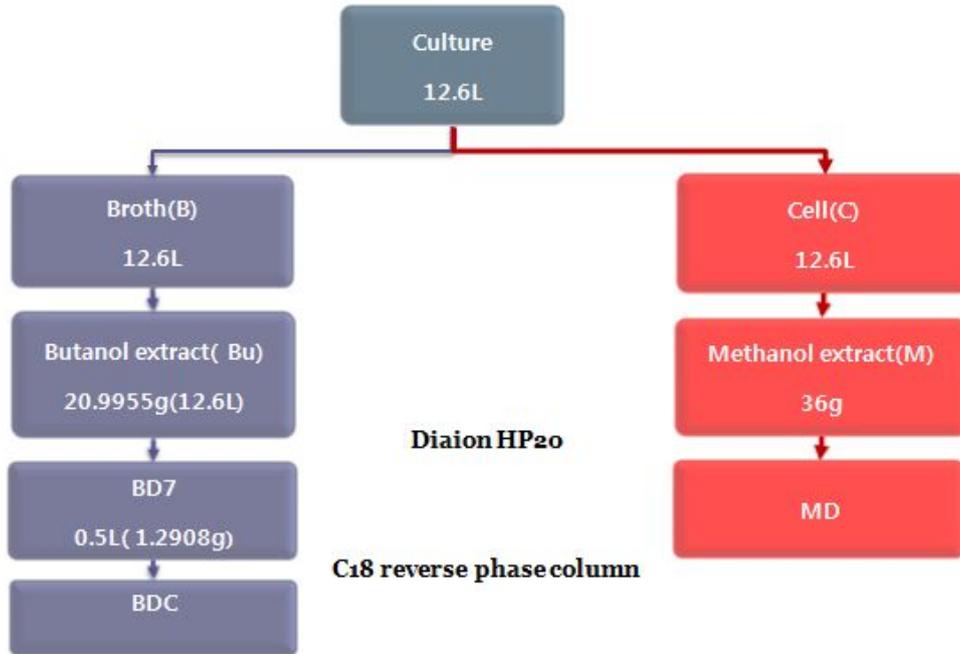


그림30. Flow chart

가. Diaion HP20을 통한 균체의 활성물질분리

(1) 재료 및 방법

추가 실험을 위해 12.6L를 새롭게 배양하여 배양액을 5000rpm에서 20분간 centrifuge하고 균체와 배양상등액을 분리하였다. 균체를 methanol로 추출해낸 후, 이전 실험보다 hydrophilic한 물질을 얻기 위해 새로운 scheme을 통해 균체에 있는 활성물질을 diaion HP20으로 분리함. methanol extract 약 36g를 D.W.500ml에 녹여서 diaion HP20에 loading하고 loading 후 컬럼을 통해 나오는 fraction을 flow, 용매조건을 methanol:H₂O = 0:100, 20:80, 40:60, 60:40, 80:20, 100:0로 하고 acetone(100%)으로 컬럼 resin을 washing함.

(2) 결과

Methanol extract 약36g을 D.W.500ml에 녹인 후 바로 loading하여 나온 fraction이 flow(MD1), Methanol 0% fraction을 MD2, methanol 20% fraction을 MD3, 점점 methanol함량을 증가시켜서 MD4(methanol 40%), MD5(methanol 60%), MD6(methanol 80%), MD7(methanol 100%), MD8(acetone 100%)을 수집함.

총 8개 fraction을 chloroform:methanol = 4:1로 전개시킨 후 TLC상에서의 bioautography assay에서 MD1, MD2, MD6, MD7, MD8에서 활성을 보였으며, p-anisaldehyde로 염색시 여러 색으로 발색이 되는 것을 확인 할 수 있음.

하지만, MD1과 MD2의 경우 너무 hydrophilic한 특성을 가진 fraction이므로 기존의 연구설

비에서 분석을 하기엔 어렵기 때문에 일단은 상대적으로 hydrophobic fraction을 분리하기로 결정하여, MD6-8을 chloroform:methanol = 1.25:1의 전개용매로 TLC상에서 bioautography assay와 UV 254nm로 관찰, p-anisaldehyde로 염색을 하여 관찰하였음. 그 결과, 주요 활성이 MD7에서 관찰이 되었으나 농축과정에서 활성도가 점점 감소하는 경향을 보이며 활성을 잃었으며, 다른 fraction도 같은 경향을 보였음.

따라서, 다음단계를 진행하여 균체에서의 활성물질의 구조를 동정하는 것이 불가능하다고 판단되었음.

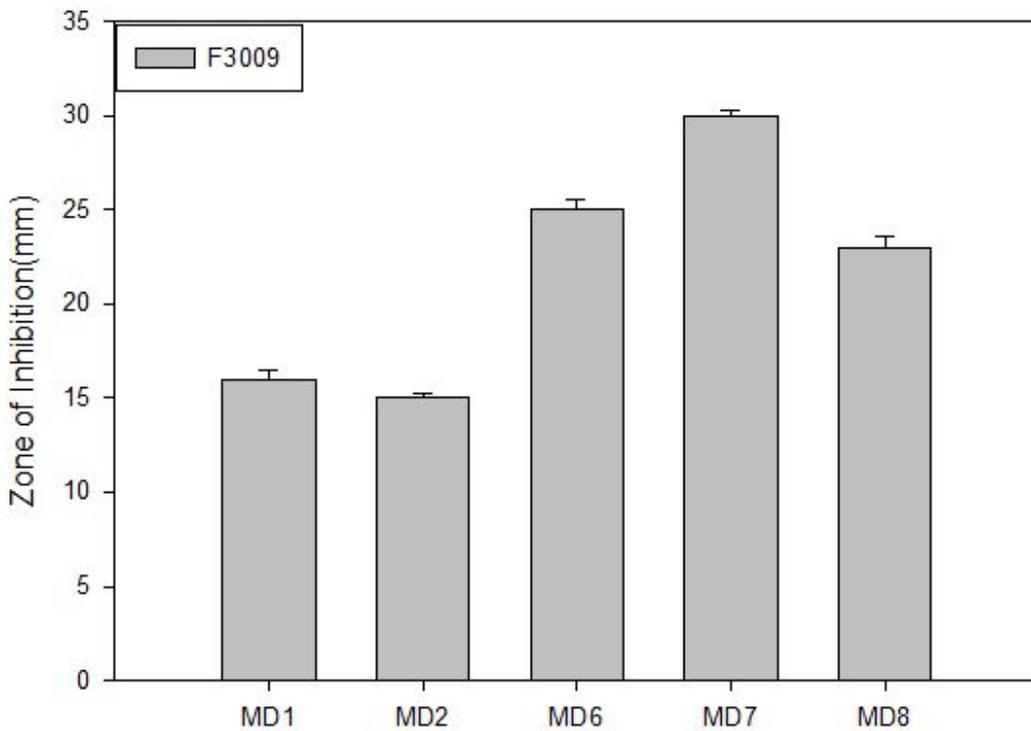
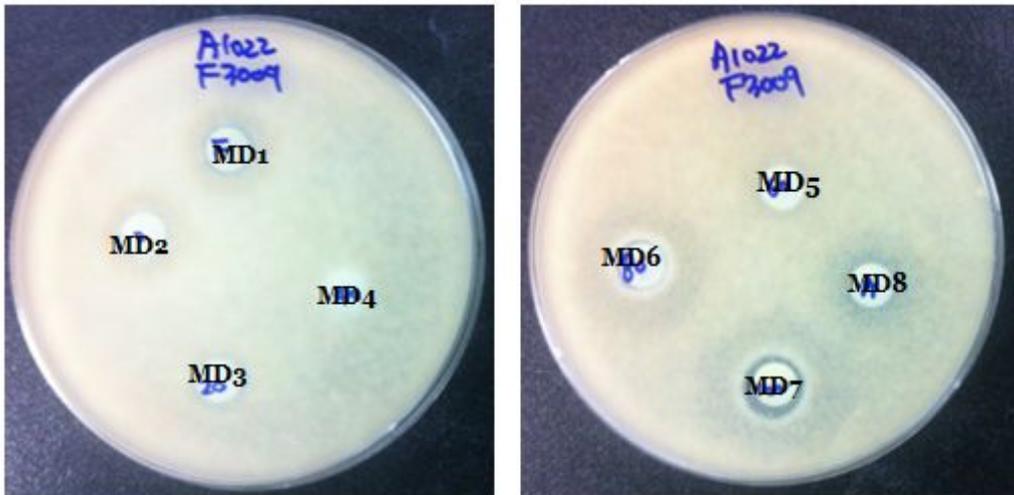


그림31. Diaion HP20 column chromatography를 수행하여 분리된 각 fraction의 paper disc method를 통한 활성테스트(F3009=탄저병)

(MD1(Flow), MD2(M0%), MD3(M20%), MD4(M40%), MD5(M60%), MD6(M80%), MD7(M100%), MD8(Acetone100%))

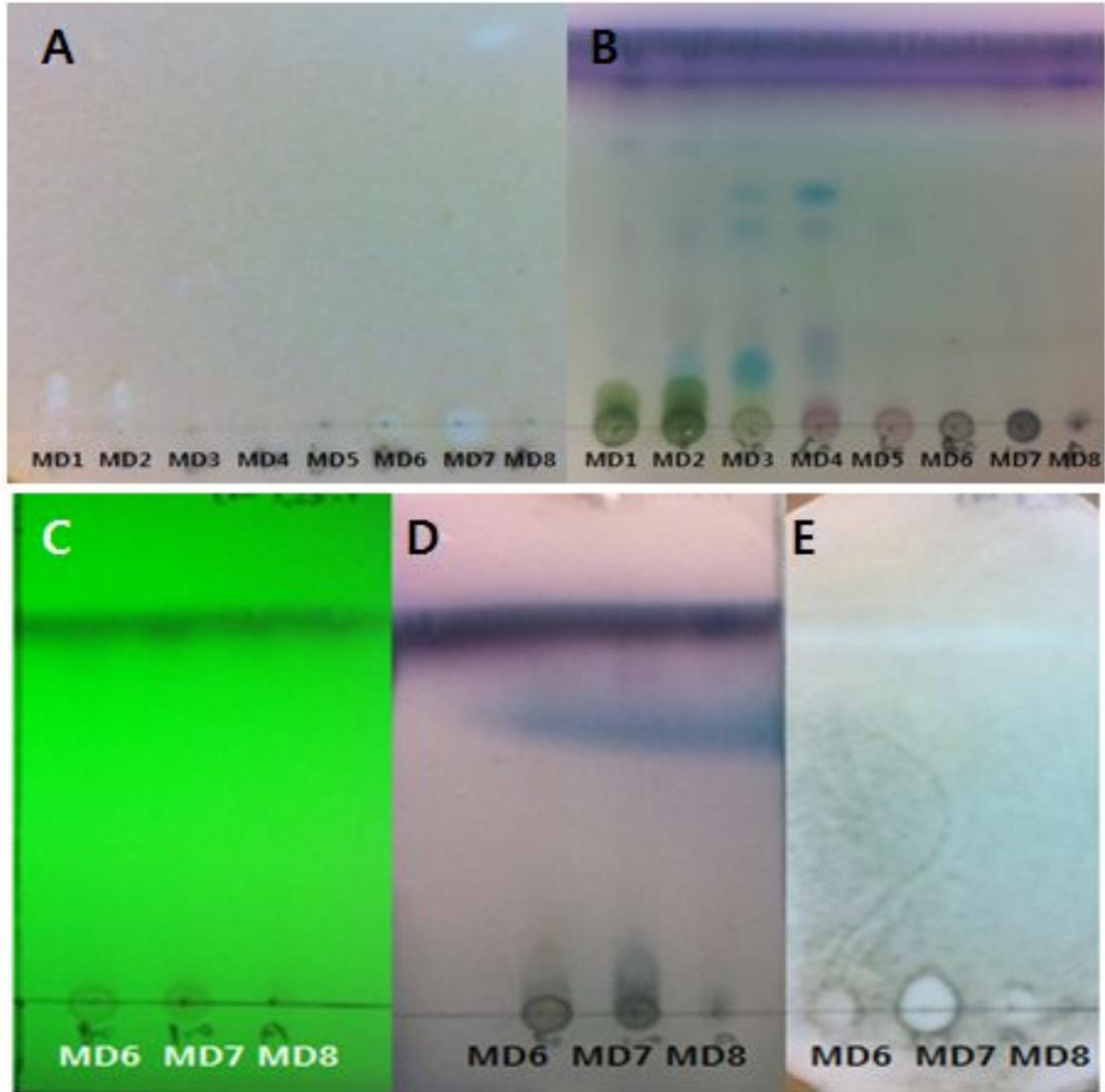


그림32. Diaion HP20 column chromatography를 수행하여 분리된 각 fraction (MD1(Flow), MD2(M0%), MD3(M20%), MD4(M40%), MD5(M60%), MD6(M80%), MD7(M100%), MD8(Acetone100%))

A. Bioautography assay(F3009=탄저병)(MD1-8)
 B. Chloroform:methanol = 4:1로 전개 후 p-anisaldehyde staining(MD1-8)
 C. Chloroform:methanol = 1.25:1로 전개 후 UV 254nm로 관찰(MD6-8)
 D. p-anisaldehyde staining(MD6-8)
 E. Bioautography assay(MD6-8)

나. Diaion HP20을 통한 배양상등액의 활성물질분리

(1) 재료 및 방법

균체 뿐 만이 아니라 배양상등액에서도 항균활성이 있음을 확인하여 배양상등액의 활성물질을 butanol로 work up을 통해 추출. 균체와 분리된 배양상등액 1L당 2L의 butanol을 가하여 추출한 결과 약 20.9955g이었고, 이를 D.W.500ml에 녹여서 diaion HP20 column

chromatography를 시행하였다.

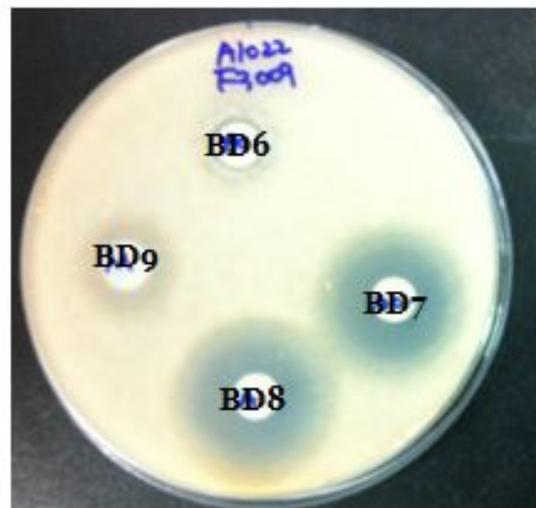
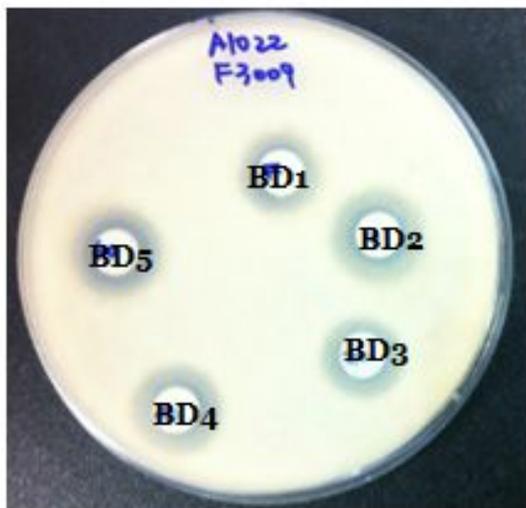
Sample을 loading한 직후 fraction이 flow(BD1), methanol 0%(BD2), methanol 20%(BD3), methanol 40%(BD4), methanol 60%(BD5), methanol 80%(BD6), methanol 100%(BD7)의 조건으로 용매를 흘려주었으며, acetone 100%(BD8)과 methanol 100%(BD9)로 washing하였으며, 각 용매의 용량은 500ml로 하였음.

(2) 결과

Butanol extract 약 20.9955g을 D.W.500 ml 에 녹인 후 diaion HP20에 loading하여 BD1-9 fraction을 수집하였음. 각각을 paper disc method로 활성을 확인하였고 동시에 TLC 상에서 BD1-9를 chloroform:methanol = 2:1로 전개하여 UV 254nm로 관찰, bioautography assay, p-anisaldehyde로 발색하여 확인한 결과, BD1-5와 BD7-9에서 활성이 있었음. 각각의 활성을 비교해 보았더니 BD1-5에 비해 BD7-9에서의 활성이 훨씬 큼을 알 수 있었고, 그 중에서도 주요 활성 fraction은 BD7-8이라고 볼 수 있음.

BD7-8을 전개용매를 chloroform:methanol = 1:1로 하여 TLC상에서 확인. 그 결과 BD8은 시간이 지남에 따라 활성이 크게 감소하였으며 나중에는 활성을 잃게 되었고, BD7은 활성이 크고 시간이 지나고 활성도는 유지가 되었으나, 다음 분리, 정제 과정인 C18 reverse phase column을 내리기 위한 농축과정에서 활성을 잃음. 활성에 영향을 주는 요인을 살펴보기 위해서 활성이 있는 BD7을 vial에 담아 10분, 20분, 30분 경과 후 활성을 살펴보았더니 38℃에서 10분만 경과해도 활성을 잃는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 통해 농축과정에 있어서 가해지는 온도에 의해 활성도가 급격히 감소하는 것으로 보아 온도에 민감한 물질이 항균활성물질이라고 예상. (항균활성을 지닌 폴리머(i.e., 단백질 등)일 가능성)

BD7이 농축과정에서 활성은 감소하였으나 물질의 성질을 파악해보기 위해 C18 column chromatography를 진행하여 물질을 분리, 정제하기로 결정하였음.



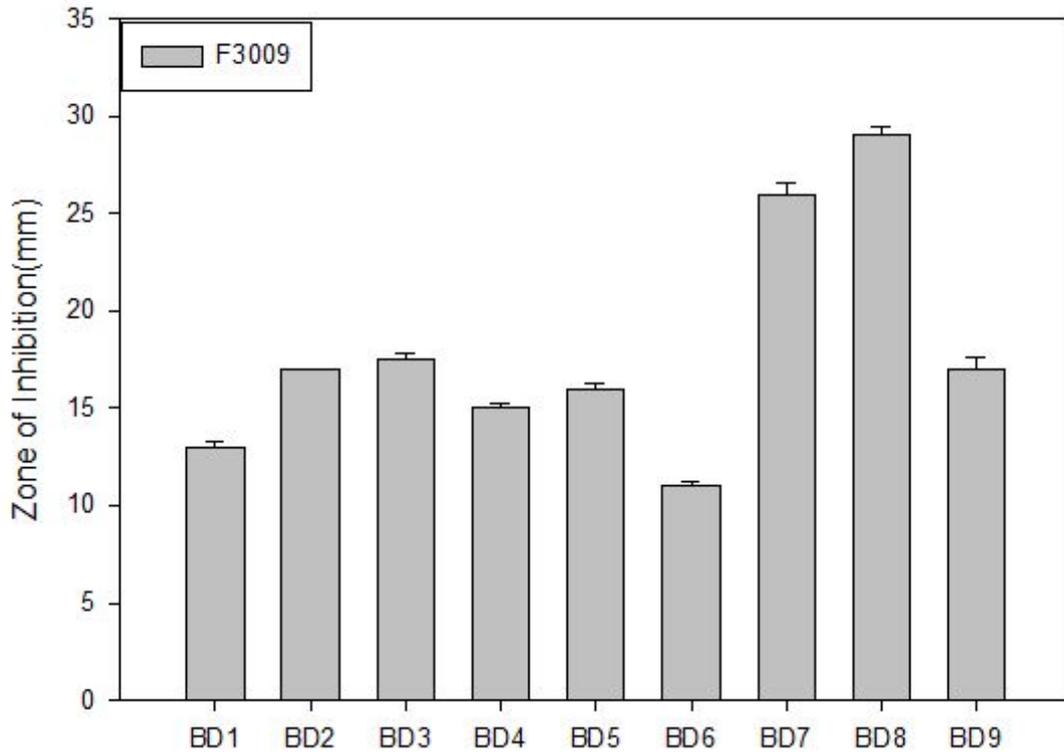
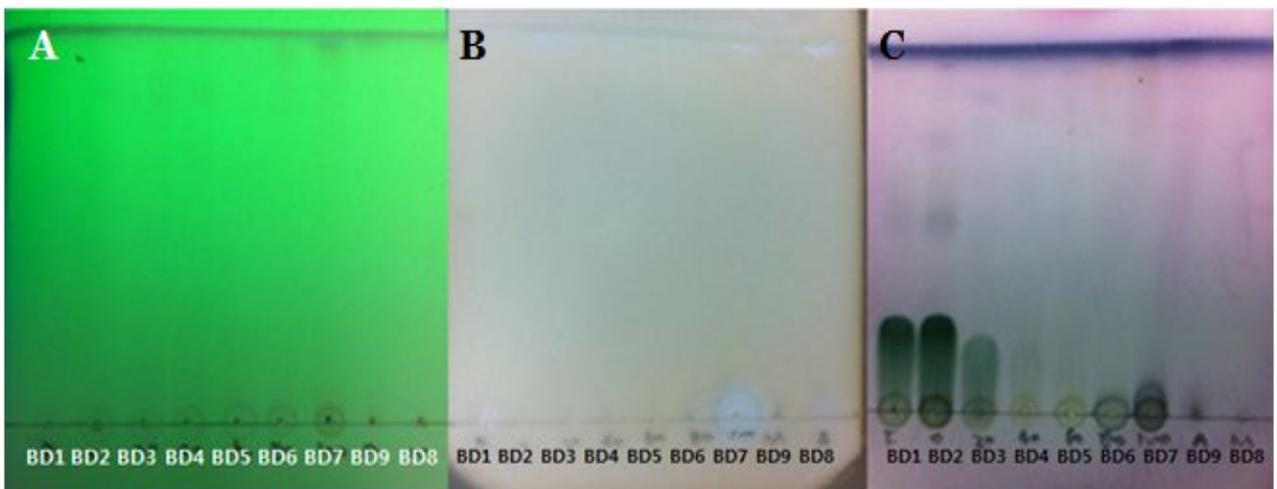


그림33. Diaion HP20 column chromatography를 수행하여 분리된 각 fraction의 paper disc method를 통한 활성테스트(F3009=탄저병)
 (BD1(Flow), BD2(M0%), BD3(M20%), BD4(M40%), BD5(M60%), BD6(M80%), BD7(M100%), BD8(Acetone100%), BD9(Methanol100%))



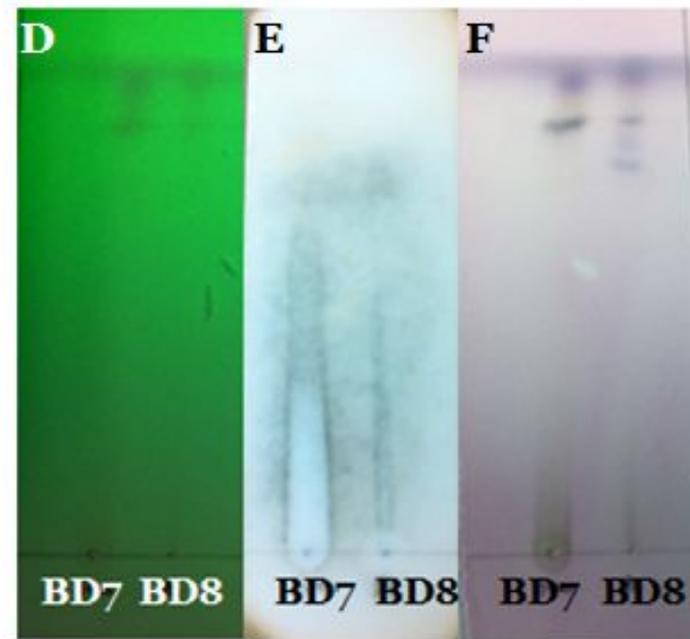


그림34. Diaion HP20 column chromatography를 수행하여 분리된 각 fraction (BD1(Flow), BD2(M0%), BD3(M20%), BD4(M40%), BD5(M60%), BD6(M80%), BD7(M100%), BD8(Acetone100%), BD9(Methanol100%))

- A. Chloroform:methanol=2:1로 전개 후 UV 254nm로 관찰,
- B. Bioautography assay(탄저병)
- C. p-anisaldehyde staining(BD1-9)
- D. Chloroform:methanol=1:1로 전개 후 UV 254nm로 관찰,
- E. Bioautography assay(탄저병)
- F. p-anisaldehyde staining(BD7-8)

다. C18 reverse phase column chromatography를 통한 배양상등액의 활성물질분리& SDS-PAGE

(1) 재료 및 방법

농축되어 활성을 잃은 BD7 1.2908g로 C18 reverse column chromatography를 수행하여 분리를 위해 D.W.500ml로 녹여서 column에 loading하였고, 용매조건은 methanol:H₂O = 0:100, 20:80, 40:60, 60:40, 80:20, 100:0로 하고 methanol로 컬럼 resin을 washing하며, 각 용매의 용량은 500ml로 하였음. Sample을 loading한 직후 fraction이 flow(BDC1), methanol 0%(BDC2), methanol 20%(BDC3), methanol 40%(BDC4), methanol 60%(BDC5), methanol 80%(BDC6), methanol 100%(BDC7)의 조건으로 용매를 흘려주었으며, methanol 100%(BDC8)로 washing함.

물질의 특성을 파악하기 위해서 각 fraction을 활성 test와 SDS-PAGE를 통해 확인함. 각 fraction의 농도를 4mg/ml로 하여 각각을 15ul loading하였음.

(2) 결과

농축된 BD7을 C18 reverse column chromatography를 수행하여 BDC1-8 fraction을 수집하였고 이를 paper disc method로 확인시 역시 활성이 없었으며, 항균활성이 없기 때문에 다시한번 TLC plate상에서 활성확인이나, UV관찰, p-anisaldehyde를 할 필요가 없었음. 하지만, 이전에 TLC상에서 bioautography assay를 하였을 때 활성이 밴드처럼 나타나거나 어느 특정 부위에서 나타나는 것이 아니라 끌려올라가는 경향을 보였기에 charge를 띠는 특성을 지님을 예상할 수 있었고, 온도에 민감하여 38℃정도에서 denaturation되는 특성을 보았을 때 항균활성을 지닌 폴리머(i.e., 단백질)일 가능성이 있어서 SDS를 통해 단백질의 유무를 확인하고자 하였음. SDS-PAGE상에서 명확히 band로 나온 것은 아니지만, Coomassie Brilliant Blue staining을 하여 관찰시 BDC6-7에서 희미하게 끌려서 나오는 무언가가 보였으며 이로써 미지의 단백질 극미량이 존재함을 확인하였음.

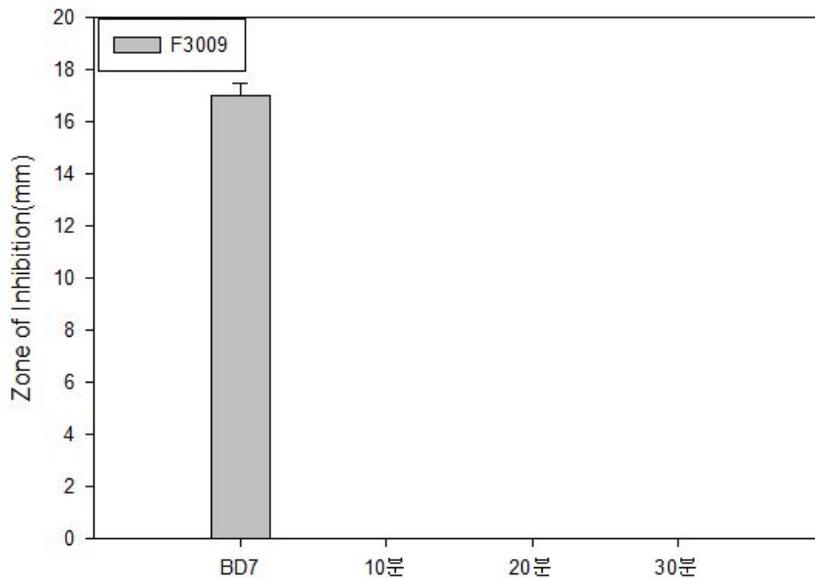
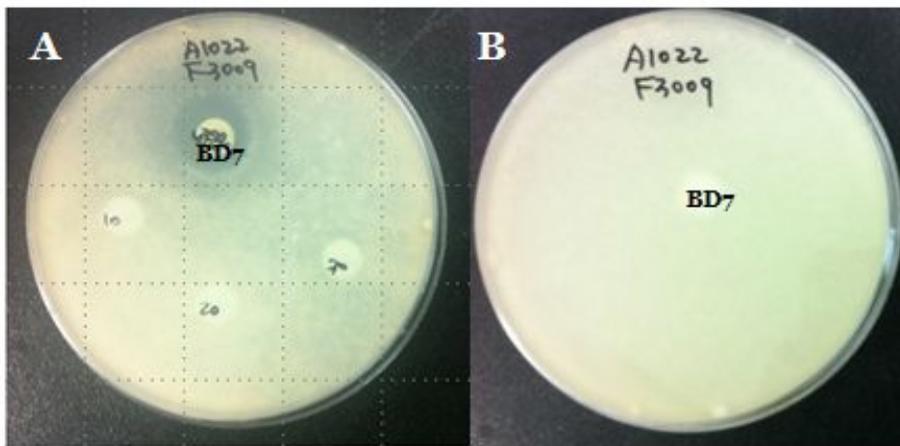


그림35. BD7(M100%) 활성테스트(F3009=탄저병)

A. BD7을 38℃에서 10분, 20분, 30분 노출시킨 후 활성테스트

B. BD7을 완전히 농축시킨 상태에서 활성테스트

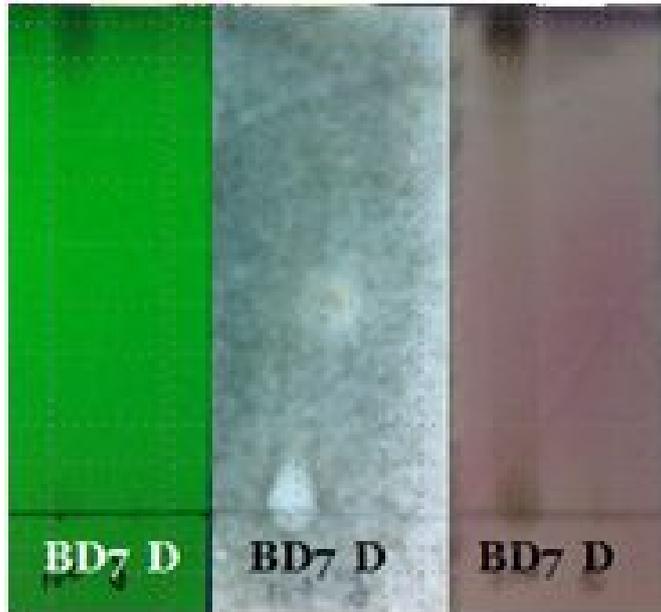


그림36. BD7(M100%), D(38℃에서 BD7 10분 경과후)
 A. Chloroform:methanol=1.5:1로 전개 후 UV 254nm로 관찰,
 B. Bioautography assay (F3009=탄저병),
 C. p-anisaldehyde staining

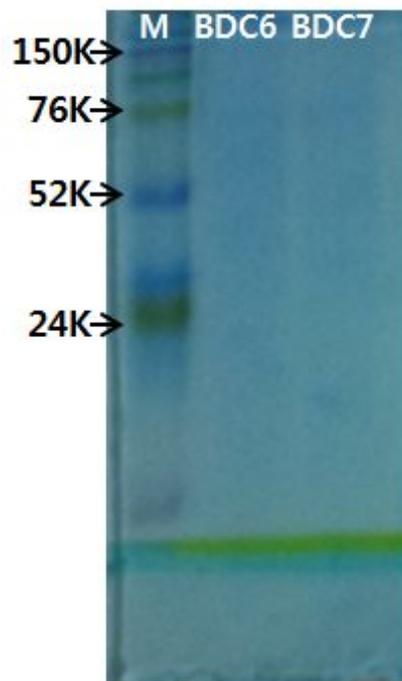


그림37. SDS-PAGE
 M(marker), BDC6(M80%), BDC7(M100%)

5. 최종결론

- 처음 A1022에서 생성된 향균물질의 구조동정을 목표로 하였을 때, 기존의 많은 연구들이 small hydrophobic compound의 경우가 대부분이어서 이를 가정하고 물질을 추출, 정제, 분리하였음.
- 추가 실험을 통해서 밝혀진 실험결과를 보면 곰팡이를 강력하게 억제하는 향균활성물질은 UV에 감지되지 않고, p-anisaldehyde로도 발색되지 않으며, 활성을 가진 물질에 TLC 상에서 끌리는 특성을 가지는 것으로 보아 hydrophilic 성질을 동시에 지닌 polymer로 추정되었음.
- Hexane으로 추출한 경우와 butanol추출에서 이은 SDS-PAGE 결과로 보면 활성물질은 hydrophobic하며 동시에 hydrophilic한 성격을 지닌 그리고 거의 알려지지 않은 antifungal protein으로 보임. (e.g. Woo, J.H., et al., *An antifungal protein from the marine bacterium streptomyces sp. Strain AP77 is specific for Pythium porphyrae, a causative agent of red rot disease in Porphyra spp.* Appl Environ Microbiol, 2002.68(6):p.2666-75의 논문에서 연구된 SAP1(41.7kDa), SAP2(21.7kDa), SAP3(18.7kDa) 등)
- Hexane으로 추출시 활성도가 비교적 안정하게 유지가 되는 것은 antifungal protein과 함께 활성유지에 도움이 되는 다른 여러 가지 물질 때문인 것으로 판단됨.
- Butanol로 추출시 향균활성물질이 상기한 추가의 물질과 함께 분리되지 않아서 빠르게 변성되는 현상이 나타난 것으로 판단됨.
- 상기한 연구는 상당한 연구규모, 비용, 시간이 필요로 하나, 출시될 제품의 신뢰성을 고려하여 완전한 것이 밝혀질 때까지 연구를 할 계획임.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록		SCI	비SCI	
1차년도	1	1	2			
2차년도	1			1		
3차년도				1		1
계	2	1	2	2		1

<특허>

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원 연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록 연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2010				10-2010 - 0011343	2011	항균활성과 살충력이 우수한 신규한 스트렙토마이세스속 균주 및 이의 배양방법과 배양물을 이용한 제제	(주)해강 바이오	대한 민국	10- 1101783
2011	식물병원균에 대한 항균활성이 우수한 신규한 스트렙토마이세스속 균주 및 이의 배양방법과 배양물을 이용한 제제	(주)해강 바이오	대한 민국	10-2011 - 0011601					

<유전자원>

- 등록번호: KACC91521P
- 등록번호: KACC91629P

<논문>

게재연도	논문명	저자		학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자				
2011	Characterization of a new <i>Streptomyces</i> sp. A1022 as a potential biocontrol agent	이은정	정남현	JKSABC (Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry)	54(3)	국내	SCIE
2012	Biocontrol of Pepper Anthracnose by a New <i>Streptomyces</i> sp. A1022 under Greenhouse Condition	이은정	정남현	JKSABC (Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry)		국내	SCIE
2012	Characterization of a new <i>Streptomyces</i> sp. A1022 as a potential biocontrol agent _ 2	이은정	정남현	JKSABC (Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry)		국내	SCIE

2. 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	교육지도	인론홍보	기타
활용건수	1	1	1	1	1

<등록사항>

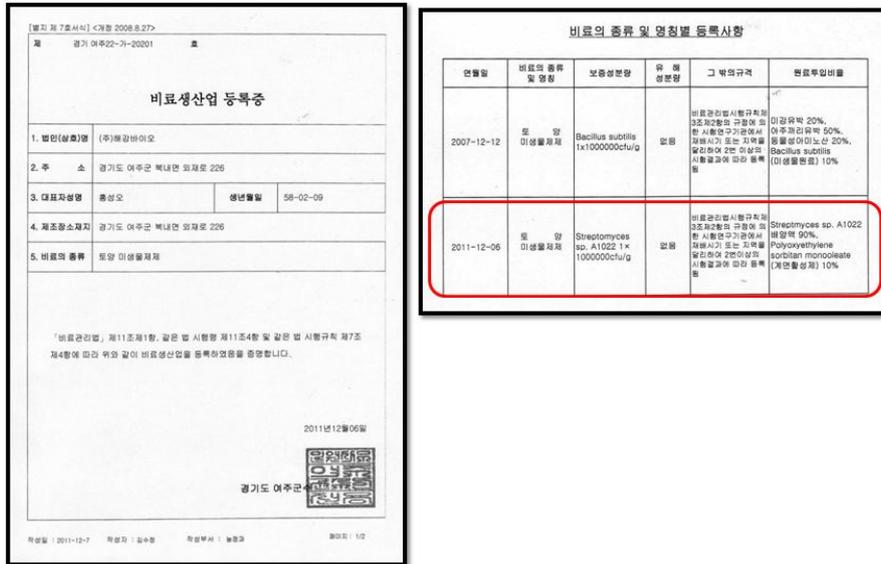
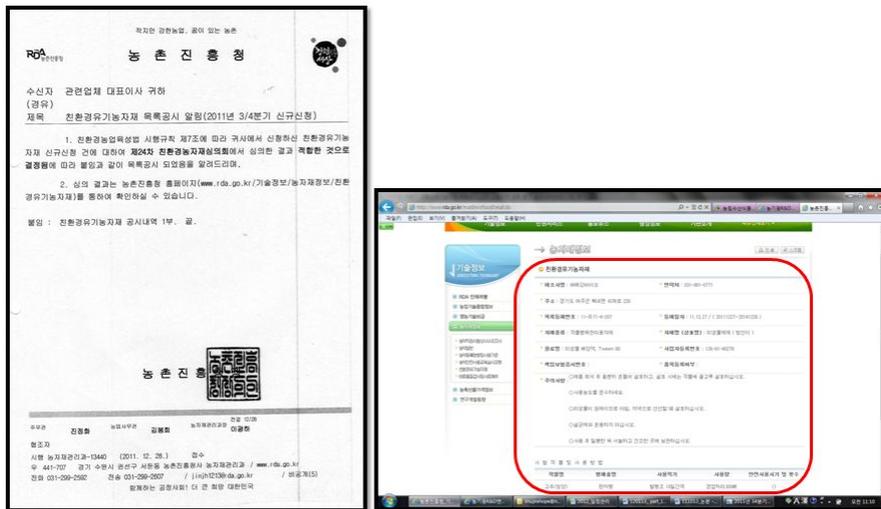


그림 1. 토양미생물제제 등록



구분	등록번호	업체명	자재종류	자재명	상표명	등록공시기간(3년)	검토평가 결과
신규	11-유기-3-610	라하바이오	토양개량 및 작물생육용 자재	혼합유박	문전옥달반이	2011. 12.27~2014. 12.26	적합
신규	11-유기-2-477	라하바이오	작물생육용 자재	공합물질	흑프타글드	2011. 12.27~2014. 12.26	적합
신규	11-유기-4-207	라하바이오	작물병해 관리용 자재	미생물제제	방선이	2011. 12.27~2014. 12.26	적합

그림 2. 친환경농자재 등록

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- 본 연구에서 *Streptomyces* sp. A1022 균주를 이용하여 개발된 제품은 친환경농자재(상표명; 방선이, 등록번호; 11-유기-4-207) 및 토양미생물제제(등록번호; 경기여주22-가-20201)로 각각 등록함.
- 따라서, 본 과제 종료 후 농림부와 기술이전 협약을 거쳐 주관기관인 (주)해강바이오에서 자체 이전을 통해 판매할 예정임.
- 이후 화학농약 사용량 절감 효과 및 친환경농산물 생산량 증가 등의 부수적인 효과가 기대됨.

제 6 장 참고문헌

- Augustine S. K., Bhavsar S. P., and Kapadnis B. P. (2005) A non-polyene antifungal antibiotic from *Streptomyces albidoflavus* PU 23. J. Biosci. 30, 201-211.
- Bano N and Musarrat J (2003) Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potential biocontrol agent. Current Microbiology. 46, 324-328.
- B. J. Naveena a, Md. Altaf a, K. Bhadriah b, G. Reddy (2005) Selection of medium components by Plackett–Burman design for production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6. in SSF using wheat bran Bioresource Technology. 96, 485–490.
- Bourbos, V. A., Michalopoulos, G., Skoudriakis, M. T. (1997) Lutte biologique contre *Fusarium f. sp. radicis-lycopersici* chez la tomate en serre non-chauffée. IOBC/WPRS Bull. 20, 58–62.
- de Cal, A., Pascual, S., Malgarejo, P. (1997) A rapid laboratory method for assessing the biological potential of *Penicillium oxalicum* against *Fusarium* wilt of tomato. Plant Pathol. 46, 699–707.
- Edwards U, Rogall T, Blocker H, Emde M, and Bottger E. C. (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Res. 17, 7843–7853.
- El-Tarabily K. A., Solimana M. H., Nassara A. H., Al-Hassania H. A., Sivasithamparan K, McKennad F, and Hardy G. E. (2000) Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. Plant Pathol. 49, 573-583.
- El-Tarabily K. A. (2006) Rhizosphere-competent isolates of streptomycete and non-streptomycete actinomycetes capable of producing cell-wall-degrading enzymes to control *Pythium aphanidermatum* damping-off disease of cucumber. Can. J. Bot. 84, 211-222.
- Giovanni Pistonea, Maria-Piera Rogantin (2008) Indicator function and complex coding for mixed fractional factorial designs. Journal of Statistical Planning and Inference 138. 787-802
- Gonzalez I., Ayuso A., Anderson A., and Genilloud O. (2005) Actinomycetes

isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiology Ecology*.

Goodfellow M, and Williams S. T. (1983) Ecology of actinomycetes. *Annu Rev. Microbiol.* 37, 189-216.

Hanan M. I., Wan Mohtar Wan Yusoff, Aidil Abdul Hamida, Rosli Md. Illias b, Othman Hassan c, Othman Omara (2005) Optimization of medium for the production of -cyclodextrin glucanotransferase using Central Composite Design (CCD). *Process Biochemistry.* 40, 753-758.

Hasegawa T., Takisawa M, and Tanida S. (1983) A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 29, 319-322.

Holt J. G., Krieg N. R. and Sneath PHA (1994) *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore, MD.

Khamna S., Yokota A., and Lumyong S. (2009) Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils : diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J. Microbiol. Biotrchnol.* 25, 649-655.

K. Zarei., M. Atabati, H. Ilkhani (2006) Catalytic adsorptive stripping voltammetry determination of ultra trace amount of molybdenum using factorial design for optimization. *Talanta.* 69, 816-821

Miller L. T. (1982) Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. *J. Clin. Microbiol.* 16, 584-586.

Minuto, A., Migheli, Q., Garibaldi, A. (1995) Evaluation of antagonistic strains of *Fusarium* spp. in the biological and integrated control of *Fusarium* wilt of cyclamen. *Crop Prot.* 14, 221-226.

Minuto, A., Minuto, G., Migheli, Q., Mocioni, M., Gullino, M. L. (1997) Effect of antagonistic *Fusarium* spp. and different commercial biofungicide formulations on *Fusarium* wilt of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Crop Prot.* 16, 765-769.

Nadia A. Soliman . Mahmoud M. Berekaa . Yasser R. Abdel-Fattah (2005) Polyglutamic acid (PGA) production by *Bacillus* sp. SAB-26: application of Plackett--Burman experimental design to evaluate culture requirements. *Biotechnological products and process*

engineering. 69, 259-267.

- Og LS, Choi GJ, Choi YH, Jang KS, Park DJ, Kim CJ, and Kim JC (2008) Isolation and Characterization of Endophytic Actinomycetes from Chinese Cabbage Roots as Antagonists to *Plasmodiophora brassicae*. J. Microbiol. Biotechnol. 18, 1741-1746.
- Pohanka A. (2006) Antifungal Antibiotics from Potential Biocontrol Microorganisms. Ph.D. thesis, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences Department of Chemistry, Swedish University of Agricultural Sciences, 72 pages, Uppsala.
- Silva Sousa C., Fermino Soares A. C., and Silva Garrido M. (2008) Characterization of Streptomycetes with potential to promote plant growth and biocontrol. Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.). 65, 50-55.
- S.T. Silveira, J.F.M. Burkert, J.A.V. Costa, C.A.V. Burkert, S. J. Kalil (2007) Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. Bioresource Technology. 98, 1629-1634
- Valois D, Fayad K, Barasubiye T, Garon T, Dery C, Brzezinski R, and Beaulieu C (1996) Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. Appl Environ Microbiol. 62, 1630-1635.
- Vauterin L, Yang P, and Swings J (1996) Utilization of fatty acid methyl esters for the differentiation of new *Xanthomonas* species. Int. J. Syst. Bact. 46, 298-304.
- Yamamoto S and Harayama S (1995) PCR Amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *pseudomonas putida* strains. Applied and environmental microbiology. 61, 1104-1109.
- You JL, Cao LX, Liu GF, Zhou SN, Tan HM, and Lin YC (2005) Isolation and characterization of Actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. from near shore marine sediments. World J. Microbiol. And Biotechnol. 21, 679-682.