

발간등록번호

11-1541000-001400-01

BT 기술을 활용한 주요 농산물 저장병 방제용 천연물
바이오농약 개발 및 상용화
(Development of Natural Biochemicals for Postharvest Diseases
Control of Major Crops Using Biotechnology)

(주)바이오셀드

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “BT 기술을 활용한 주요 농산물 저장병 방제용 천연물바이오농약 개발 및 상용화에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 04 월 09 일

주관연구기관명 : (주)바이오셀드

주관연구책임자 : 유 성 준

연 구 원 : 이 병 찬

연 구 원 : 김 대 중

연 구 원 : 김 은 주

연 구 원 : 안 재 은

협동연구기관명 : 충남대학교

협동연구책임자 : 김 홍 기

연 구 원 : 최 진 수

연 구 원 : 이 지 현

위탁연구기관명 : 국립원예특작과학원

제주 감귤시험장

위탁연구책임자 : 현 재 욱

요 약 문

I. 제 목

BT기술을 활용한 주요 농산물 저장병 방제용 천연바이오톤약 개발 및 상용화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목적은 항균활성을 갖는 물질들을 감귤 저장병 방제뿐만 아니라 딸기, 마늘, 양파, 인삼 등의 작물에도 적용하여 저장 기간 향상과 보다 친환경 고품질의 작물을 소비자에게 보급하고자 하며 나아가 농산물의 수출증대에도 기여하고자 함이다.

국내 주요 채소류의 저장병에 의한 피해상황은 평균 5%에서 심할 경우 70%까지 이르는 것으로 밝혀졌다. 채소 종류별로 저장 유통 중 발생하는 병에 의한 피해정도를 조사한 결과 배추, 무 등 엽채류는 5-10%, 과채류 1-3%, 그리고 근채류는 10-70%로서 저장기간이 긴 근채류에서 피해가 가장 심하였다. 특히 과실의 저장병 피해는 더욱 심하여 감귤의 경우 푸른곰팡이 병균들에 의한 피해는 매년 10% 이상으로 그 피해 액수만도 300억 내지 500억에 달하는 것으로 추정된다. 현재까지 과채류 저장병 방제를 위해 주로 유기합성농약 및 무기성분을 이용한 방제가 시도되어지는 실정이다. 하지만 저항성 균의 발생으로 인해 그 효과가 미미해지고 있다. 국내 농가에서 이용되고 있는 대부분의 농약은 98%가 유기합성농약으로 이를 대처하기 위한 천연물질의 생화학 농약 개발은 거의 없는 실정이다. 따라서 저장병에 대한 천연물 유래 친환경 방제제의 개발이 절실한 실정이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 국내 감귤 저장 시 큰 피해를 주고 있는 감귤 녹색곰팡이병을 비롯한 작물의 주요 저장병을 억제할 수 있는 천연물 제제를 개발하기 위해 천산용 추출물로부터 생리활성물질의 분리 및 동정, 항균활성 증대 방안 모색, 유용물질 다량 생산기술개발, 제제화 기술의 개발, 약해 검정을 포함한 포장효과시험 등의 과정으로부터 얻은 내용을 통해 논문 게재 및 발표, 특허 등록을 추진하고 다양한 형태로 제품화하여 인축에 무해하고 환경오염 문제가 전혀 없으며 값이 싼 천연물질 유래의 저장병 방제제를 개발하고자 한다.

IV. 연구개발결과

감귤은 생산지에서 소비자의 식탁에 도달하기 까지 1달 이상의 시간이 소요된다. 이 과정에

서 감귤은 상처를 입게 되고 이 상처를 통하여 1주일 이내에 *P. digitatum*과 *P. italicum* 등에 의하여 곰팡이가 발생하게 된다. 이러한 과정을 거치는 동안 감귤의 손실율은 10 ~ 30%까지 이르게 되고 이에 따라 감귤의 상품성이 저하된다. 이와 같은 저장과정에서의 문제점을 해결하고자 본 연구를 수행하였다.

우선 감귤의 저장병과 관련된 *P. digitatum*과 *P. italicum*을 분리하여 동정하여 그 특성을 확인하고 저장병에 관련된 균주 5종을 KACC로부터 분양 받아서 기본적인 항균 활성을 조사하였다

충남대학교 및 관련 기관으로 115종의 천연자원을 분양 받아 agar diffusion test 법에 의하여 항균 실험을 수행한 결과 천산용이 강한 항균활성을 보였다. 천산용의 항균 활성 기작은 다음 3가지의 기작에 의하여 유도된 것으로 실험 결과 확인되었다. 즉 균사에서 이상 팽윤 현상과 비대 증식에 의한 것이 있으며 또한 균사의 비정상적인 분지에 의한 것과 포자의 발아 억제 현상에 의한 것으로 사료된다.

이에 따라 천산용 분획을 세부 분획으로 나누어 실험한 결과 butanol 분획에서 강력한 항균 활성이 확인되었다. 이 분획을 activity directed separation 방법에 따라 silica column과 LH-20 column을 활용하여 세부 분획화 하며 항균 활성을 확인하였다. 또한 TLC상에서의 Rf 값을 확인하고 최종적으로 1H-, 13C- NMR analysis를 수행하여 이 물질이 protodioscin임을 확인하였다. 이후 protodioscin의 상업화를 위하여 대량 추출 및 분리 방법을 확립하였다.

실증 실험에 앞서서 현장예비실험을 실시하였다. 즉 감귤의 일정 부위에 상처를 입힌 후 *P. digitatum*과 *P. italicum*에 대한 방제 효과 실험에서 protodioscin의 항균효과는 400 ppm에서 높은 방제 효과를 나타내었으며 그 이상의 농도에서도 약해가 발생하지 않았다. 효과를 나타내는 protodioscin 농도에서 사용 시 안전성을 세포 독성 실험과 급성독성 시험을 통하여 확인하였다. 또한 유통 상에서의 안정성을 확인하기 위하여 열, 산도 및 자외선에 대한 안정성을 확인하였다. 그 결과 protodioscin은 안전성과 안정성에 문제가 없는 것으로 판명되었다. 아울러 안정적으로 protodioscin의 활성을 발현할 수 있는 보조제를 선발하였다. 보조제는 분산제로 tween 20을 사용하고 점착제로 xanthan gum을 사용하였다. 보조제를 첨가한 이 후에도 활성에 변화를 주지 않았다. Protodioscin의 적용 범위를 확인하기 다양한 병원균을 이용하여 그 효과를 검증한 결과 *P. digitatum*과 *P. italicum* 이외의 병원균에서는 방제 효과를 확인할 수 없었다.

감귤에 자생하는 자생균이 저장병의 방제에 효과가 있을 것으로 생각되어 감귤의 잎에서 미생물을 분리 동정하였다. 그 결과 *P. digitatum*에 강력한 항균을 보이는 603 균주를 분리 동정할 수 있었다. 이 균주로부터 생성되는 유효 성분은 itrulin 5로 1×10^5 cfu /ml의 *P. digitatum* 처리한 예비실증실험에서 67%의 방제 효과를 나타내었다. 또한 적용 범위를 확인한 결과 *Alternaria solani*를 비롯한 7개의 식물 병원균에서 강력한 균사 억제 효과를 확인할 수 있었다.

이들 603 균주와 천산용 추출물의 조합에 의한 항균효과를 조사한 결과 603 균주의 여액과 protodioscin 100 ppm에서 70%에 가까운 강력한 항균 활성을 보였다. 이는 천산용 추출물을 단독 처리한 결과와 비교하여 4배의 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

이와 같은 결과를 바탕으로 제주도에 위치한 감귤 시험장에서 각 단계별로 실증시험을 실시하였으나 지난 2년간의 기상 조건이 평년과 상이하여 큰 효과를 확인할 수 없었으나 지금까지의

현장예비실험 결과로 보아 추후 이들에 대한 효과가 확인될 수 있을 것으로 사료된다. 지금까지의 결과로 보아 천산용과 603균주의 여액은 상처를 입은 감귤의 방제에 뛰어난 효과를 나타낸 것으로 생각되어 상용화 가능성 또한 대단히 높다고 사료된다.

V. 연구 성과 및 성과활용 계획

연구 성과로 지적재산권을 2건 출원하였으며 한국식물병리학회에 '생물학적 방제제로서 천산용 추출물의 실용적 적용' 등 총 4편의 논문을 투고 중에 있다. 또한 인력 양성 효과로 7명의 석사를 배출하였다.

본 과제는 감귤 저장병 방제용 천연물 미생물 농약을 개발하는 과제로서 저장병의 원인균으로 지목되고 있는 녹색곰팡이병균(*Penicillium digitatum*)과 푸른곰팡이병균 (*Penicillium italicum*)의 방제를 목표로 하였다.

본 실험실은 천산용으로 강력한 항진균 효과를 지닌 protodioscine을 확인하였고 아울러 *Bacillus velezensis*의 배양액에서 *P. italicum*과 *P. digitatum*에 강력한 항진균 활성을 나타내는 것으로 확인하였으며 또한 두 물질을 혼합 처리한 결과 항진균 활성이 상승효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

또한 농약 살포시 문제점으로 지적되고 있는 균일한 살포와 살포 후 효과를 지속시키기 위한 점착제 문제를 해결하였다. 일차적으로 균일한 살포를 위하여 여러 가지 분산제를 실험한 결과 Tween-20이 가장 효과적으로 분산효과가 있었으며 점착제에 대한 실험에서는 Xanthan Gum이 효과적임을 확인할 수 있었다. 이들 결과를 바탕으로 시제품을 제작하였으며 실험동물인 Sprague Dawly Rat을 이용한 급성독성 실험을 안전성을 확인하였다.

지금까지의 성과를 이용하여 만들어진 시제품을 보완하여 제품 출시를 할 계획이고, 학회 및 세미나, 전시회, 발표회 등에 참가하여 연구결과를 알리고, 간접적으로 시제품을 홍보할 예정이다. 또한 천연물농약 등록을 통하여 소비자에게 신뢰를 주고, 해외에 원제를 판매할 수 있는 기틀을 마련할 계획이다. 그리고 계속적으로 제주 감귤시험장과의 지속적인 연구협력을 통하여 지속적으로 보완 및 효력을 증가시켜 유사제품 및 경쟁제품과의 차별화를 도모하고 타 천연물에 기술을 적용하여 신규제품 개발 시에 기초자료로 활용할 계획이다.

SUMMARY

As in citrus, it takes above 1 month from citrus farm to customers. In this process, citrus get wounded. From these wounds, fungi such as *P. digitatum* and *P. italicum* were occurred within 1 week. During these processes, lose rate of citrus was 10 ~ 30%. This make decrement of productivity of citrus. So we performed this study to solve problems in the process of storages of citrus.

First of all, we isolated *P. digitatum* and *P. italicum* from leaf of citrus and identified and then characterized. We performed basic antibiotic activity of 5 species of storage related microbes donated from KACC.

We tested antifungal effect of the 115 plant extracts using agar diffusion test. The 115 species of plants were donated from Chungnam Nation university and related institution. *Dioscorea quinqueloba* Thunb. extract showed the most effective in the test. It assumed that antifungal mechanisms of *Dioscorea quinqueloba* Thunb. are as bellows; 1) swelling of spawn and hypertrophy 2) extraordinary branching 3) germinating inhibition of spore.

From this on, We tested antifungal effect of subdivided extract of *Dioscorea quinqueloba* Thunb. and it showed that butanol fraction was most potent of the subdivide extract. According to the activity directed separation method, the fraction was separated using silica column and LH-20 column. And Rf value on the spot of TLC was checked. Finally, we determined the protodioscin by using ¹H-, ¹³C NMR analysis. After that we established the mass exaction - purification method for commercial use of protodioscin.

We performed the pre field test before the field test afterward. By using needles, we stabbed the certain part of citrus. After that we infected *P. digitatum* and *P. italicum*. 7 hours late, we sprayed the various concentration of protodioscin. As a result, it was most potent at the concentration of 400 ppm protodioscin and phytotoxicity was not shown above this concentration.

We tested stability and safety on the concentration of most effect range of protodioscin. It showed that no cytotoxicity and no acute toxicity in this test. For the purpose of stability on the distribution periods, we tested the pH stability, heat stability and protecting effect of UV ray irradiation. The stabilities of above matters were qualified by this test. We used supplemental agent for settled effect of protodioscin. We chose tween 20 for deflocculator and xanthan gum for sticking agent. It showed no harmful effect by using supplemental agent. For antifungal spectrum of protodioscin, we test various microbes on protodioscin. It showed no effect on various microbes except *P. digitatum* and *P. italicum*.

We thought that microbes living on the leaf of citrus are effective on storage disease. So we isolated and identified the microbes living on the leaf of citrus and we found the 603

species which have potent antifungal activity. From this species, we isolated itrulin 5 in the filtrate of growth media. In the antifungal pre field test, we treated *P. digitatum* of 1×10^5 cfu/ml. As a result, it showed 67% of antifungal effect. In addition, antifungal spectrum of various microbes, it showed potent effective antifungal activity on 7 plant microbes including *Alternaria solani*.

We examined the combinational treatment of 603 species and extract of *Dioscorea quinqueloba* Thunb. on antifungal activity. As a result, it showed 70% of antifungal activity in the combinational treatment of filtrate of growth media of 603 media and 100 ppm of plant extract. It is more potent than protodioscin alone treatment by 4 times.

In the bases of these results, we tested phased field test in citrus test site located in Jeju Island. It showed no effect because the climate condition in previous 2 years is somewhat different from average climate. However, as the result of pre field test, we conformed antifungal activity in near future. These results were filed 2 cases on patent application and applied to 4 issue to scientific journal includes plant pathology journal as titled 'Practical Application of *Dioscorea quinqueloba* Thunb. Extract as a Biological Control Agent'. As results, we think that it has potent antifungal activity on citrus by combining material of filtrate on growth media of 603 species and extract of *Dioscorea quinqueloba* Thunb. and the great possibility of commercial usage.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	11
Section 1. Research Purpose	11
1. Background of research	11
2. Contents of research and development	13
Section 2. Research Necessity	14
1. Necessity of technical development	14
Section 3. Research scope	15
1. Strategy of research and development	15
2. System diagram of research and development	16
Chapter 2. Research background and current status	17
Section 1. current status of product and related business	17
1. Product and related business in domestic market	17
2. Product and related business in foreign market	19
Chapter 3. Results and Discussion	21
Section 1. Material and Method	21
1. Identification of microbes and securement	21
2. Exploration and selection of useful material as natural pesticide	21
3. Test of antifungal activity with citrus	25
4. Test of safety and stability of useful material	27
Section 2. Results	31
1. Identification of storage related microbes	31
2. Selection of plant extract and mass production	33
3. Selection of beneficial microbes	50
4. Additional selection of beneficial microbes for microbial pesticide	56
5. Selection of antagonistic microorganism for field test of citrus storage related disease	61
6. Exploration of supplemental agent for promotion of effectiveness	63
7. Protective effect of natural material on green molds disease of citrus	65
8. Antifungal activity of antagonistic microorganism on induced wound	70
9. Effective Protection with various combination	72
10. Making of prototype	77
11. Field test of natural material on storage related disease	78
12. Evaluation of Safety and Stability	80
13. Disease spectrum of protodioscin	94
Chapter 4. Achievement and Devotion	99
Section 1. Achievement of purpose	99

1. The 1 st year	99
2. The 2 nd year	100
3. The 3 rd year	101
Section 2. Expected effects on related area	102
1. Technical aspect	102
2. Economic and industrial aspect	102
Chapter 5. Application plans of Research results	104
Section 1. Performance of research	104
1. Filing of patent	104
2. Publication	104
3. promotion of scientific personal	104
Section 2. Promotion of Industrialization	107
1. Planing of industrialization	107
2. Necessity of additional research	107
Chapter 6. Novel information collected	108
Chapter 7. References	109

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	11
제 1 절 연구의 목적	11
1. 연구배경	11
2. 년차별 연구개발 내용 및 범위	13
제 2 절 연구개발의 필요성	14
1. 기술개발의 필요성	14
제 3 절 연구개발의 추진체계	15
1. 연구개발의 추진전략	15
2. 연구개발의 추진체계	16
제 2 장 국내외 기술개발 현황	17
제 1 절 생산 및 시장 현황	17
1. 국내 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황	17
2. 국외 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황	19
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	21
제 1 절 재료 및 연구 방법	21
1. 병원균의 분리 및 확보	21
2. 천연물 농약으로 이용 가능한 유용물질 탐색 및 선발	21
3. 감귤을 이용한 항균 활성 검정	25
4. 유용물질의 안전성 및 안정성 확인	27
제 2 절 결과	31
1. 저장병 원인대상병원균 동정	31
2. 식물추출물의 선별 및 대량 생산	33
3. 유용균의 선별	50
4. 미생물 농약으로 이용 가능한 유용세균의 추가 선발 및 동정	56
5. 감귤저장병의 현장평가를 위한 길항미생물의 선정	61
6. 약효증진용 보조제의 탐색	63
7. 천연물질의 감귤 녹색곰팡이병 방제효과	65
8. 실내 상처접종 실험을 통한 길항 내생세균의 활성 검정	70
9. 다양한 조합을 통한 효과적인 방제 방법	72
10. 시제품 제작	77
11. 저장병 방제용 천연물농약의 포장적용 시험	78
12. 안전성 및 안정성 평가	80
13. Protodioscin의 병인별 항균능력 조사	94
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	99

제 1 절 연구개발목표의 달성도	99
1. 1차년도	99
2. 2차년도	100
3. 3차년도	101
제 2 절 관련분야 기대효과	102
1. 기술적 측면	102
2. 경제적·산업적 측면	102
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	104
제 1 절 연구개발 실적	104
1. 특허 출원	104
2. 연구 논문 발표 준비	104
3. 인력양성	104
제 2 절 기업화 추진 방향	107
1. 사업화 계획	107
2. 추가연구의 필요성	107
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	108
제 7 장 참고문헌	109

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구의 목적

1. 연구배경

과실류에 있어서 *Penicillium*속 균들에 의한 병은 작물의 생육기간에 발병하기보다는 주로 수확 후 포장하고 저장, 운송되는 과정에서 상처에 의해 발생하는 병으로(Paster and Bullerman, 1988), 이로 인한 작물의 손실은 전체 수량의 10~30%가 되며, 일부 후진국들은 30% 이상의 큰 비중을 차지한다. 또한 부가가치가 높은 배, 사과, 감귤, 포도 등 과실류의 저장중에 병이 발생하게 되면 상품성이 크게 떨어져 경제적으로 큰 손실을 입게 된다. 특히 감귤류의 저장병 중에서도 우리가 보통 “푸른곰팡이병”으로 혼용해서 부르는 *P. digitatum*에 의한 녹색곰팡이병과 푸른곰팡이병을 일으키는 *P. italicum*에 의한 손실은 전체 저장중에 발생하는 손실의 90% 이상을 차지하고 있다(Brown and Eckert, 2000)(그림 1). 특히 그 가운데에서도 감귤의 저장시 가장 큰 피해를 입히는 병은 녹색곰팡이병으로서 *P. digitatum*에 의한 녹색곰팡이병은 감염부위에서 수백만 개의 포자가 형성되어 비산함으로써 이들이 집중원으로 작용하게 되며 병 발생 최적 온도는 25℃ 내외로 6~37℃에서 성장할 수 있다(Hocking and Pitt, 1979; Lacey, 1989). 반면, *P. italicum*은 *P. digitatum*보다 더 낮은 온도에서 생장이 가능하고, 심지어 0℃에서도 성장할 수 있다(Wyatt and Parish, 1995).

이 두 병원균 중에서도 *P. digitatum*은 과실 저장병을 일으키는 *Penicillium*속 병원균들 중에서도 가장 강력한 병원성을 지니고 있고, 포자 형성량 또한 매우 많아 녹색곰팡이병에 의한 경제적인 손실이 매우 크다. 따라서 녹색곰팡이병 방제가 그만큼 매우 중요하다.

이렇게 주요 감귤 저장 부패병인 녹색곰팡이병과 푸른곰팡이병의 가장 효과적인 방제제로 유기합성농약인 sodium bicarbonate, imazalil (IMZ), thiabendazole (TBZ), pyrimethanil (PYR), fludioxonil (FLUD)과 sodium *o*-phenylphenate의 단제 및 혼합제가 널리 사용되어져 왔다(Larrigaudière *et al.*, 2002; Palou *et al.*, 2001; Smilanick *et al.*, 2005; Smilanick *et al.*, 2006). 하지만 imazalil, thiabendazole과 sodium *o*-phenylphenate에 대한 약제 저항성을 나타내는 *P. digitatum* 균이 발생함에 따라(Fogliata *et al.*, 2001; Spotts and Cervantes, 1986; Viñas *et al.*, 1993) 새로운 방제제의 개발이 요구되어져 왔다(Holmes and Eckert, 1999). 국내의 경우 감귤 저장병 방제를 위한 약제가 활성화되어 있지 않으며 남 등(1993)은 수확 10일 전에 유기합성농약인 thiophanate-methyl 1,000배액을 수상 살포하면 방제에 효과가 있다고 보고하였다. 그러나 이 약제 또한 저항성균이 발생하면서 방제 효과가 매우 떨어져 있는 실정이다. 따라서 유기합성 농약을 대체할 수 있고 저항성균 출현 등의 문제를 해결할 수 있는 새로운 방제 방법이 요구되어졌다.

전세계적으로 식물병 방제에 있어서 화학적 합성농약의 사용은 Rio협약 등에 의하여 감소 추세에 있으며 인체에 무해하고 친환경적인 병 방제 방법이 요구되면서(Wisniewski and Wilson, 1992) 저장 과실의 부패를 막기 위해 저독성, 친환경 농약을 이용한 방제 방법들의 개발이 중요시 되고 있다.

따라서 저독성이면서도 친환경적인 *Penicillium* 방제법으로 식물 추출물을 이용한 방제와 미생물을 이용한 방제가 시도되고 있다(Costa *et al.*, 2001; Janisiewicz and Korsten, 2002; Smilanick and Denis-Arrue, 1992). 또한 *P. digitatum*에 대한 과일의 병에 대한 저항성을 향상시키기 위해 식물생장을 조절하는 jasmonic acid (JA; Droby *et al.*, 1999), amino acid와 그 유도체인 β -aminobutyric acid (BABA; Porat *et al.*, 1999b)와 같은 천연 화합물의 이용과 UV (Droby *et al.*, 1993; Porat *et al.*, 1999a)와 뜨거운 물로 씻는 등(Porat *et al.*, 2000)의 물리적인 병 방제 방법에 관한 연구가 수행되어지고 있다.

유기합성농약의 사용을 극소화하고 인축에 무해하며 병해에 대한 활성이 높은 우수한 천연 농약을 개발하고자 제충국, 담배 및 데리스의 주성분인 pyrethrin, nicotine 및 rotenone이 유기인계나 carbamate계 등의 유기합성농약에 비해 저독성을 띄는 근연화합물 농약으로 개발되었다 (Briggs *et al.*, 1983; Huff, 1980; Okada *et al.*, 1980). 또한 최근에도 역시 이러한 추세에 발맞추어 여러 종의 식물체로부터 많은 병 방제 물질을 탐색하고 있으며(Alzoreky and Bakahara, 2003; Bishop, 1998; Nikos and Kostas, 2007; Pang *et al.*, 2002; Sholberg *et al.*, 2000) 일부 물질의 강한 항균성분도 확인되었다(Agnioni *et al.*, 1998; Capdeville *et al.*, 2002; Meepagala *et al.*, 2002).

그러나 아직까지 천연물의 방대한 자원에 비해 천연물 유래의 생물농약개발은 매우 극소수에 불과하다. 또한 *Penicillium* 균은 자체 분비하는 항생물질로 인해 미생물에 항균성을 갖고 있으므로 미생물농약의 개발 및 이용이 매우 어렵다. 이러한 의미에서 천연물 유래 생물농약의 방제 방법은 미생물 제제가 갖는 문제점을 해결할 수 있고, 화학농약에 비해 개발비가 저렴한 장점이 있다. 게다가 추후 병해충 종합관리(IPM) 방법은 필수적이며, 생물적 방제법이 함께 이용되어야 하기 때문에 친환경 천연물 유래 농약의 개발이 필수적인 상황이다.

본 연구는 *Penicillium digitatum*에 강력한 항균활성을 갖는 천연물 유래 물질을 탐색하고 그 물질을 이용하여 *P. digitatum*이 일으키며 국내 감귤 저장에서 가장 큰 피해를 주고 있는 감귤 녹색 곰팡이병 방제와 그 물질의 농업적 적용 가능성을 확인하고자 수행하였다.

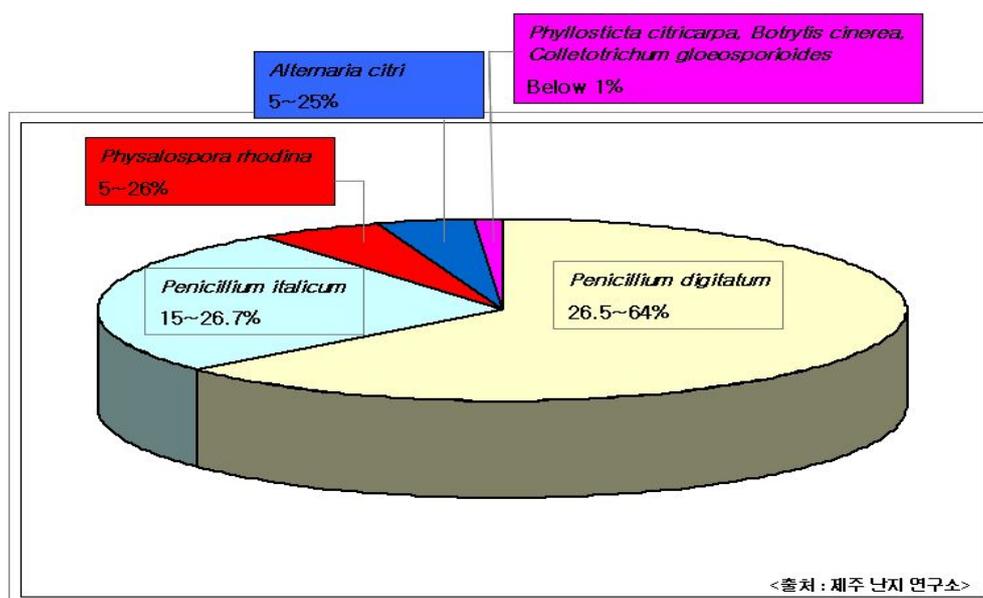


그림 52. Major storage diseases of citrus fruit in Korea.

2. 년차별 연구개발 내용 및 범위

구분	연도	연구개발의 목표		연구개발의 내용
1차년도	2009	제1세부	○ 원료물질표준화 및 연구체제화를 위한 생산공정 연구	- 선발미생물 유효대사물질 대량생산 - 식물추출물 대량 생산 - 기본제형 연구 - 약효증진용 보조제 탐색 - 원물 표준화 연구
		제1협동	○ 항공광이 작용기작 평가시스템 개발 및 유효추출물 및 성분 연구	- 약용작물 함유성분의 저장병균에 대한 억제 기작 연구 - Activity guided fractionation - 유효성분의 구조분석 - 유용 추출물 다량 획득방법 개발
2차년도	2010	제1세부	○ <i>in vitro</i> 유효성 평가 test 및 유효성분 물질규명	- 유효성분, 표준추출물 평가 - 유효추출물의 병인별, 배양조건 별 적용 spectrum 조사 - 특허출원 - 안전성 평가 (급성, 환경독성)
		제1협동	○ 천연물 항공광이능 작용기작 구명 연구	- 추출물의 유효성분 분석 - 유효성분 작용기작 규명 - 신규추출물의 항공광이능 약효평가 - 생산 공정 적용 연구 - 지표성분 선정 및 표준분석법 개발 - 논문투고
		위탁	○ 기존 시장제품과의 현장 비교 시험 및 온도조건별, 병인별 현장시험	- 약용작물 유효추출물에 대한 field test - 기존 미생물제제와 비교평가 및 결과 정리 - 계절별, 병인별 field test 결과정리
3차년도	2011	제1세부	○ 시제품 활성검정을 통한 실용화 및 마케팅	- 농약등록 시험평가기관 연계평가 - 제제, 제형 개발 - 재배지역 확보 및 원료물질 표준화 확립 - 마케팅 전략 수립
		제1협동	○ 항공광이능 작용기작 확대 구명 및 천연농약 등록추진	- 적용 Spectrum 평가 및 결과정리 - 원료 생산 공정 확립 - 제제, 제형 검토 - 허가자료 작성 및 농약 등록 추진
		위탁	○ 저장병 방제용 천연물농약의 포장적용 시험	- 약효, 약해 시험 - 제제, 제형 검토 및 특허출원 - 계절별, 병인별 Field test 결과정리 및 보고서 작성

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술개발의 필요성

국내 주요 채소류의 저장병에 의한 피해상황은 평균 5%에서 심할 경우 70%까지 이르는 것으로 밝혀졌다. 채소종류별로 저장·유통 중 발생하는 병에 의한 피해정도를 조사한 결과 배추, 무등 엽채류는 5-10%, 과채류 1-3%, 그리고 근채류는 10-70%로서 저장기간이 긴 근채류에서 피해가 가장 심하였다. 특히 과실의 저장병 피해는 더욱 심하여 감귤의 경우 푸른곰팡이 병균들에 의한 피해는 매년 10%이상으로 그 피해 액수만도 300억 내지 500억에 달하는 것으로 추정된다.

천연물을 이용한 친환경농약의 개발 및 필요성이 거의 무시되어왔다. 현재도 대부분의 농가에서는 과채류 저장병 방제를 위해 주로 유기합성농약 및 무기성분을 이용한 방제가 시도되어지고 있다. 국내 농가에서 이용되고 있는 대부분의 농약은 98%가 유기합성농약이지만 국내에서 개발된 것이 아닌 외국에서 도입된 것이다. 또한 유기합성농약에 대한 저항균의 발생으로 인해 그 효과가 미미한 실정이다(김용기.; 2000 채소 저장병해 생물적 방제기술). 그렇기 때문에 최근에는 천연물을 이용한 저독성 친환경농약의 개발 및 그 필요성이 높게 인식되어지고는 있지만 천연물의 방대한 자원에 비해 천연물 유래의 농약개발은 매우 극소수이다.

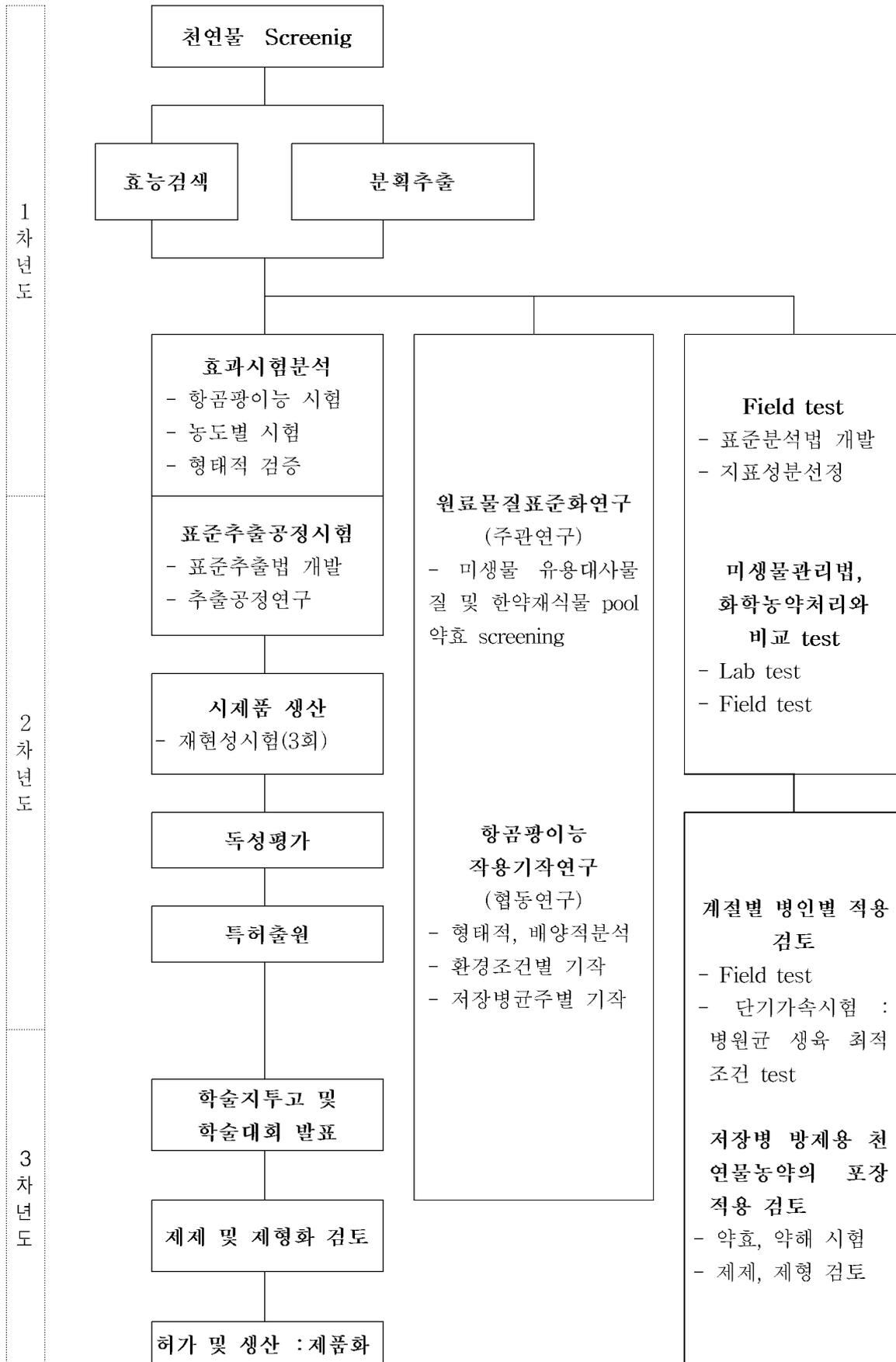
천연물 농약에 대한 기술 개발은 제충국의 꽃에 함유되어 있는 살충성분인 pyrethrin의 개발 이래 rotenone제 및 nicotine제 등이 발견되어 왔으며, 전 세계적으로는 현재 작물보호제로서는 725종이 농약으로 개발되고 있다. 유기인계나 carbamate계 등의 유기합성농약에 비해 저독성 및 범용성 근연화합물 농약으로써 개발되었고 그 외의 천연식물에서도 많은 병해 방제 물질을 탐색하고 있으며 항균성분도 확인되었다(김태수 *et. al.*, 2005; 천연물소재 기피제 및 살충물질 개발 기본 연구). 현재 해충방제용으로 약용식물 추출물을 이용한 제품이 판매되고 있으나(왕중왕, 푸른손등 : 경농) 식물 병을 방제하기 위한 제품은 상용화되어 있지 않다. 효모 *Candida oleophila*와 세균 *Pseudomonas syringae* 등의 미생물 농약이 상품화되어 시판되고 있고, 이외에 여러 바이오농약을 이용한 방제가 시도되고 있으나 뛰어난 효과를 보이지 않고 있다. 천연물 유래 생화학 농약은 저독성, 저약량, 저잔류성 등의 환경적 측면뿐만 아니라 농약시장에서도 매우 큰 부가가치가 기대되는 분야이다. 따라서 선행연구를 통해 저장병의 주 원인균인 *P. digitatum*의 억제능이 확인된 천산용을 이용한 저장병 방제제 개발은 성공가능성이 매우 높으며, 특히 천산용은 전통적으로 약제로 사용하고 있는 식물로써 인체에 대한 안전성이 입증되어져 있다. 따라서 곰팡이에 특이적인 방제능과 인체에 무해한 안전한 친환경 농약의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

제 3 절 연구개발의 추진체계

1. 연구개발의 추진전략

구분	추진전략	추진방법
1	원료물질 표준화	<ul style="list-style-type: none"> - 유통생약 조사 - 10종 이상의 동일생약을 구입하여 원산지 추적 및 채취시기 등의 원물 정보를 수집하여 지역 및 계절에 따른 최적 생약선정 - 최적생약 조건과 동일한 조건의 생육조건을 고안하여 재배연구기관과 연계하여 재배를 통한 원물표준화 연구 수행
2	표준분석법 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 성분연구를 물질 구조 동정과정을 통한 지표성분과 유효성분을 설정하고 향후 품질관리 및 공정관리에 용이한 표준분석법을 개발 - 표준분석법을 기초로 한 기준 및 시험방법 개발
3	표준추출공정 확립 및 표준추출물 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 유효성분의 최대 함량을 가지는 표준 추출공정법을 개발 - 지표성분을 이용하여 5회 반복추출 공정시험을 통하여 안정된 최적화 추출공정 확립
4	항곰팡이능 기작확립	<ul style="list-style-type: none"> - 저장병균 life cycle의 blocking mechanism을 형태학적 연구로 구명 - 저장병균 생장억제기작의 세포 유전학적 연구를 통한 생화학적 작용기작 구명
5	Field test를 통한 현장 적용 확인	<ul style="list-style-type: none"> - 현장적용이 가능한 환경 하에서 field test를 추진하여 가능성 확인 - 기존 화학농약 및 미생물제제와의 비교시험을 통한 비교우위성 확립
6	특허 및 논문	<ul style="list-style-type: none"> - 2차년도 원료물질특허, 3차년도 제형특허를 통하여 기술독점성 확보 - 특허이후 해당 연구내용의 논문 등재를 통한 객관적 기술인정 획득
7	제품화	<ul style="list-style-type: none"> - 농약등록 인증기관과의 사전조율을 통한 조속한 제품화 추진 - 약효약해 시험, 독성시험 등 등록시험 진행 - 등록허가 추진을 통한 과제 종료 시 허가완료 목표
8	판매 및 마케팅	<ul style="list-style-type: none"> - 친환경 및 농산업 활성화를 목표 - 지역사회와 협력하여 지역특화사업으로 활성화

2. 연구개발의 추진체계



제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 생산 및 시장 현황

1. 국내 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황

1997년 산업자원부 평가 국내 생물산업의 시장규모는 세계시장대비 2% 수준이나 2010년에는 4.6%로 90억\$ 규모로 성장할 것으로 예측되어지고 있다(제2차 천연물신약연구개발촉진계획, 한국보건산업진흥원, 2006).

국가 차원의 생물자원관리 통합전산 시스템을 구축은 고부가가치의 농업용 및 의약용 신기능 물질, 기능식품, 의약품, 신기능 유전자 발굴 등의 제반 연구의 신속한 정보를 제공함으로써 생명공학을 통한 생물자원의 산업적개발 기술에 막대한 파급효과 제공하였고, 그로인해 국내 생명공학분야 시장은 1995년 2,500억원 규모에서 1998년 6,500억원 규모로 급성장 하였으며, 연평균 22%의 성장을 예상 적용할 경우 2010년에는 9조원의 시장이 형성될 것으로 예상된다.

가. 농업용 신물질

농업용 신물질 개발에 관련된 기술은 선진국에서 노하우로 철저히 감추어진 기술이었기 때문에 국내에서는 전무한 상태에서 그에 관한 연구를 시작할 수밖에 없었다. 그 후 수년 동안의 신물질 개발에 대한 과학기술부에서 시행한 특정 연구 개발 사업을 수행한 경험을 바탕으로 1992년에 시작된 두 단계로 구성된 6년 동안의 선도 기술 개발 사업은 신물질의 연구개발에 관련된 기반시설 및 유기합성, 스크리닝, 독성, 그리고 대사연구에 이르는 여러 분야의 기술축적을 가져왔다. 그러한 노력의 결과의 일부로 LG화학에서 제초제, 피리벤족심 (피안커), 살균제, 에타복삼 (가디안), 그리고 성보화학에서 살충제 프루피라조포스 등이 국내에 등록을 마쳤거나 등록을 진행 중에 있고 시장에 출범하는 개가를 올렸다. 여러 가지 장점이 있는 생물농약의 개발을 위해서 일부 기업과 여러 연구소에서 연구 중에 있고 일부는 시장에 출시 중에 있다. (예: 한국과학기술원, 한국화학연구소 등)

나. 저장병 방제용 천연물질

국내 주요 채소류의 저장병에 의한 피해상황은 평균 5%에서 심할 경우 70%까지 이르는 것으로 밝혀졌다. 채소종류별로 저장·유통 중 발생하는 병에 의한 피해정도를 조사한 결과 배추, 무등 엽채류는 5-10%, 과채류 1-3%, 그리고 근채류는 10-70%로서 저장기간이 긴 근채류

에서 피해가 가장 심하였다(농촌진흥청 농과원 병리과). 특히 과실의 저장병 피해는 더욱 심하여 감귤의 경우 푸른곰팡이 병균들에 의한 피해는 매년 10%이상으로 그 피해 액수만도 300억 내지 500억에 달하는 것으로 추정된다(농촌진흥청 감귤시험장).

Vegetable	Damages(%)	Pathogen
Chinese cabbage	5-10	<i>Erwinia carotovora</i>
Radish	5-10(100)	<i>Erwinia carotovora</i> , Unidentified isolates
Tomato	1-2	<i>Botrytis cinerea</i> , Yeast, <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Pythium</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., <i>Septoria</i> sp., <i>Alternaria</i> spp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Pseudomonas</i> spp.
Cucumber	1-2	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Geotrichum</i> sp.
Oriental melon	2-3	<i>Fusarium</i> spp., <i>Geotrichum</i> sp.
Water melon	1-2	<i>Phytophthora nicotianae</i> , <i>Fusarium</i> spp.
Paprika	1-2	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Geotrichum</i> sp., <i>Alternaria</i> sp., <i>Rhizopus stolonifer</i>
Carrot	5-10(30)	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Alternaria radiciana</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Pythium</i> sp., yeast(<i>Geotrichum</i>), <i>Cylindrocarpon</i> sp.
Garlic	10-70	<i>Penicillium</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Stemphyllium</i> sp., <i>Aspergillus niger</i> , <i>Botrytis</i> sp. <i>Corticium rolfsii</i>
Onion	10-40	<i>Penicillium</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Stemphyllium</i> sp., <i>Aspergillus niger</i> , <i>Botrytis</i> sp., <i>Colletotrichum</i> spp., <i>Pseudomonas marginalis</i>

국내 채소류의 저장병에 의한 피해현황. 농촌진흥청

천연물을 이용한 친환경농약의 개발 및 필요성이 거의 무시되어왔다. 현재도 대부분의 농가에서는 과채류 저장병 방제를 위해 주로 유기합성농약 및 무기성분을 이용한 방제가 시도되어지고 있다. 국내 농가에서 이용되고 있는 대부분의 농약은 98%가 유기합성농약이지만 국내에서 개발된 것이 아닌 외국에서 도입된 것이다. 또한 유기합성농약에 대한 저항균의 발생으로 인해 그 효과가 미미한 실정이다(김용기.; 2000 채소 저장병해 생물적 방제기술). 그렇기 때문에 최근에는 천연물을 이용한 저독성 친환경농약의 개발 및 그 필요성이 높게 인식되어지고는 있지만 천연물의 방대한 자원에 비해 천연물 유래의 농약개발은 매우 극소수이다.

천연물 농약에 대한 기술 개발은 제충국의 꽃에 함유되어 있는 살충성분인 pyrethrin의 개발 이래 rotenone제 및 nicotine제 등이 발견되어 왔으며, 전 세계적으로는 현재 작물보호제로서 725종이 농약으로 개발되고 있다. 유기인계나 carbamate계 등의 유기합성농약에 비해 저독성 및 범용성 근연화합물 농약으로써 개발되었고 그 외의 천연식물에서도 많은 병해 방제 물질을 탐색하고 있으며 항균성분도 확인되었다(김태수,2005;김 *et. al.*, 천연물소재 기피제 및 살충물질 개발 기본 연구). 현재 해충방제용으로 약용식물 추출물을 이용한 제품이 판매되고 있으나(왕중왕, 푸른손등 : 경농) 식물 병을 방제하기 위한 제품은 상용화되어 있지 않다. 효모 *Candida oleophila*와 세균 *Pseudomonas syringae* 등의 미생물 농약이 상품화되어 시판되고 있고, 이외에 여러 바이오농약을 이용한 방제가 시도되고 있으나 뛰어난 효과를 보이지 않고

있다. 천연물 유래 생화학 농약은 저독성, 저약량, 저잔류성 등의 환경적 측면뿐만 아니라 농약시장에서도 매우 큰 부가가치가 기대되는 분야이다.

2. 국외 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황

전반적인 신물질 개발에 대한 최근의 세계적인 경향을 요약하면 다음과 같다.

- 연구개발에 관한 의욕은 감소되지 않고 있으며 경우에 따라서 증가하고 있다.
- 주요 농약회사 중에서 몬산토, 듀퐁, 그리고 사이나미드는 다른 회사보다 신물질 개발에 비교적 덜 적극적이었다.
- 소수의 조그만 회사 (예, 에코젠, 일본 토바코, 등)도 연구개발을 열중하여 신물질 개발에 상당히 기여하고 있다.

지난 8년간 200개 이상의 신물질의 개발이 시도되었다 (25개/년). 이것은 그 지난 10년 동안 (30개/년)의 비율보다 낮지만 신물질의 개발에 따른 매출액은 전체 농약시장의 14-15%로 유사한 비율을 유지하고 있다. 100만불 이상의 매출을 갖는 중요한 신물질의 등장은 년 평균 10개 정도로 꾸준하였다. 날이 갈수록 농약 개발에 투자한 비용을 매출로부터 회수하고자 최대한 노력을 기울일 필요가 있는 것이다.

미국 스미소니언 국립자연사박물관, 영국 왕립 Kew 식물원, 일본 국립유전자원센터가 중심이 되어 체계적인 유용생물자원의 국가적인 수집, 확보, 보전 및 생명공학을 이용한 기능성 물질 및 기능개발연구의 총력을 기울이고 있다.

가. 생물농약, 천적, 천연물을 이용한 연구개발

화학농약이 갖는 단점을 보완할 수 있다는 장점이 있음에도 현재의 생물농약의 세계시장은 미미하다. 이러한 기술은 20-30년 전부터 개발이 시도되었으며 최근 3년간 총 104개의 제품이 개발되었고 이중 42개가 상품화되었다. 여기에는 대량배양기술과 제제 기술이 유효한 식물자원 및 미생물의 발견 못지않게 중요한 핵심기술이다.

세계 생명공학산업은 1995년-2005년 사이 22%에 달하는 고도성장이 예상되어 반도체 등의 타 첨단 산업분야의 성장률을 크게 앞설 것으로 예상되고 있고, 이와 같은 추세를 적용할 경우 세계 생물산업의 시장규모는 2010년 1900억\$를 초과할 것으로 예상되고 있다. 한편 세계 의약품 시장은 2000년 현재 3,709억\$에서 2004년에는 5,060억\$로 연평균 8.1의 증가율을 보일 것으로 전망되어진다.

미국에서 감귤 저장병에 사용되는 유기합성농약인 Imazalil은 미국의 애리조나와 캘리포니아에서 널리 이용되고 있으나 미국을 제외한 기타 다른 국가에서는 잔류허용치를 초과하여 사용하고 있지 않는다. 일본에서 널리 이용되고 있는 albesilate 합성농약은 푸른곰팡이 뿐 만 아니라 잿빛곰팡이에도 효능이 있다는 장점이 있지만 이는 인체에 대한 독성 문제로 인해 사

용이 감소되는 추세로 국외의 전체적인 합성농약 시장의 성장률은 둔화되고 있는 실정이다. 따라서 점차 미생물농약, 생화학농약 및 천적 등을 이용하는 환경친화형 농업으로 전환되는 추세에 있다는 것을 볼 때 조만간 시장이 확대될 것으로 예상됨에 따라 국내 시장 활성화의 방법으로 천연물 유래의 저독성 농약 개발과 바이오농약의 개발 등이 실현되어야 할 것이다. 특히, 작물 저장병 방제의 경우 국내와 마찬가지로 국외에서의 연구도 이루어지지 않고 있어 관련 자료를 찾기 어려울 정도이다(KISTI 산업시장정보 - 바이오농약의 기술, 특히, 시장동향 및 전망).

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 재료 및 연구 방법

1. 병원균의 분리 및 확보

가. 병원균의 분리

*Penicillium*속에 의한 저장병 방제 연구를 위해 우선적으로 실제 과실상에서 발생하는 *Penicillium*균을 분리하여 동정하였다. 병해를 입은 과실로부터 병원균 분리를 위해 무균상에서 감귤과실 표면에 발생한 병원균의 포자 및 균사를 분리, PDA 배지에 접종 후 24℃ 배양기에서 24시간 배양 후 자라난 것을 단균사 및 단포자 분리하여 각각 PDA배지에 옮기고 24℃ 배양기에서 3일간 배양하였다. 배양된 것들의 동정을 위해 배지상에서 자라는 형태 및 포자의 색 등을 확인하였고, 현미경상에서 400배로 검경하여 포자 및 균사 모양을 관찰하였다.

나. 병원균의 확보

저장병을 일으키는 *Penicillium*속 균주의 확보를 위해 KACC로부터 5가지의 *Penicillium*속을 분양 받아 실험에 사용하였다

2. 천연물 농약으로 이용 가능한 유용물질 탐색 및 선발

가. 약용작물을 이용한 유용물질 선발

1). 천연물 농약으로 이용 가능한 약용작물의 선발 및 유용물질 추출

가) 약용작물의 선발

충남대학교 식물병리학 연구실에 보관 중이거나 국립원예특작과학원 인삼특작부 인삼약초 가공팀으로부터 분양받은 총 101가지의 Methanol 식물추출물을 본 실험에 시료로 사용하였다. 식물추출물의 항균활성을 검정하기 위해 식물추출물을 8 mm의 paper disc에 50 μ l 점적하여 자연건조 시켰다. *P. digitatum*의 포자를 수거하여 중층 배지를 만들어 그 위에 식물추출물을 점적하여 건조시킨 paper disc를 치상하고 25℃에서 7일간 배양 후 병원균의 inhibition zone의 지름을 측정하여 가장 강력한 활성을 보인 식물추출물을 선발하였다.

나) 식물 추출물의 항균 활성

*Penicillium*속 저장병균인 *P. italicum*, *P. expansum*, *P. polonocum*, *P. solitum*에 대한 항균활성을 검정을 수행하였다. 선발된 식물 추출물 원액을 5 mg/ml 농도로 함유한 PDA배지에 4종의 *Penicillium*속 과실 저장병원균을 접종하여 20°C 항온기에 5일간 배양시켜 균사 성장 정도를 측정하여 경시적으로 항균활성 스펙트럼을 조사하였다.

다) 선발된 식물 추출물의 배지상 항균활성 기작 조사

식물 추출물을 100배 농도로 조정된 후 paper disc에 50 μ l씩 점적한 다음 *Penicillium* 속 균주를 도말한 PDA 배지에 올려놓고 clear zone이 형성된 부분을 현미경 상에서 균사 및 포자 등을 관찰하여 선발된 식물 추출물의 항균활성 기작을 조사하였다.

2) 식물추출물의 유용물질 분리 및 검정

가) 분획별 항균활성 검정

조추출물을 증류수에 녹인 뒤 hexane, ethyl ether, chloroform, ethyl acetate, butanol 순으로 분별갈대기를 이용해 용매별로 분획하였다.

분획별로 나뉘어진 것을 회전 감압농축기를 이용하여 용매를 완전히 제거한 후 paper disc assay method를 이용하여 *P. digitatum*이 도말된 배지에 올려놓고 활성을 확인하였다.

나) 유효성분의 분석

천산용 추출물을 용매분획법에 의해 *n*-hexane, ethyl ether, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol, H₂O분획을 얻었고 agar diffusion method을 이용하여 이들의 항균활성 분획을 확인하였다. 이를 통해 강력한 항균활성을 나타내는 것으로 확인된 *n*-butanol 분획에 대하여 column chromatography을 수행하였다. Silica gel open column (70~230 mesh, column chromatography용, Merck, Germany)을 통하여 chloroform : methanol (100:0~60:40, V/V)을 순차적으로 내려 chloroform : methanol (80:20) fraction을 수거하고 Sephadex™사의 LH-20 (column chromatography용, Sweden)을 이용하여 Methanol 100%로 순차적으로 용출하였고 활성 fraction은 agar diffusion method를 통해 검정하며 수행되었다.

n-butanol 분획에 column chromatography를 수행하여 수거된 분획 중 항균작용을 강하게 보이는 분획에 대하여 ODS Thin layer chromatography를 수행하여 *p*-anisaldehyde (Sigma, USA)를 이용, 발색시켜 spot을 확인하였으며, 각 spot의 항균활성을 검정하여 Rf값을 정하였고, ¹H-, ¹³C- NMR analysis 물질분석을 수행하였다. 분리 정제된 항균활성 물질의 분자량을 밝히고자 ESI-Mass로 측정하고, ¹H-¹H COSY, HMBC spectrum을 측정하여 구조를 해석하였으며, 항균물질을 동정하였다.

3) 선발된 식물 추출물의 유용 추출물 다량 획득 및 대량 분리 방법 모색

추출물의 다량 획득을 위해 acetone, methanol, ethanol, 열수를 이용하여 넣고 24°C에서

48시간 진탕배양 후 추출물을 거즈와 filter paper를 이용하여 3회 여과하였다. 여과되어 나온 물질은 회전 감압농축기를 이용하여 용매를 완전히 제거하고 무게를 측정하거나 항균활성을 확인하였으며, 기존의 물질의 분리 정제 방법에서 필요한 여러 단계를 간소화하기위해 비효율적인 단계를 제거하고 기존의 분리방법과 효율성을 비교하였다.

나. 유용 미생물을 이용한 유용물질 선발

1) Citrus 식물 속 내생균을 분리

제주도내 여러 과수원에서 채집한 감귤 잎과 충남대학교 주변 온실에서 채집한 식물체의 표면을 소독한 후, Nutrient agar 배지에 각각 3개의 절편을 올려 30℃ 항온기에서 24~48시간 배양하였다. 배양 후 식물체로부터 누출되는 세균을 분리하고, 분리한 균을 새로운 Nutrient agar배지로 여러 차례 계대하여 단일 콜로니를 분리하였다. 분리된 균은 20% glycerol 용액에 현탁하여 deep-freezer(-70℃)에 보관하였다.

가) 미생물 농약으로 이용 가능한 유용세균의 선발

분리한 내생세균과 주요 저장병원균인 *P. digitatum*, *P. italicum*을 PDA배지 상에서 대치배양을 실시하여 항균활성을 갖는 유용균주를 1차 선발하였다. 선발된 유용균을 16S rDNA를 Primer를 이용, PCR을 통해 증폭한 다음 sequencing하였다. Nucleotide BLAST search를 통해 균을 동정하였다. 인체 유해균 및 배양에 용이하지 않은 균주를 제외하고 본 연구에 이용한 유용 내생세균을 선발하였다.

나) 선발된 내생세균 동정

NA 배지상에서의 colony 형태분석 및 그람 염색을 수행하여 기본적인 형태적 특성에 대한 파악이 이루어 졌으며, 최근 형태가 유사한 세균의 분류에 많이 사용되는 API kit(BioMerieux, France)를 이용하여 생화학적 분석을 하였다. 그리고 좀 더 정확한 분석을 위하여 분자생물학적 분석을 수행하였다. 기존 16S rDNA를 Primer 27F/1492R (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG/GGYTACCTTGTTACGACTT)를 이용하여 분석된 결과와 형태적, 생화학적 특성을 토대로 *Bacillus* 속 세균으로 확인됨에 따라 본 속의 종 동정에 더 정확성을 확인하고자 *gyr A* 유전자 분석을 위하여 *gyrA-f* / *gyrA-r* (CAGTCAGGAAATGCGTACGTCCTT / CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT) Primer를 연구에 사용하였다.

다) 길항 내생세균의 항균활성 기작

대표적인 감귤 저장병원균 *P. digitatum*에 대한 길항세균의 항균활성 특성을 관찰하기 위해 대치배양을 통해 inhibition zone이 형성된 부분에 lactophenol을 처리하여 고정시킨 다음, 현미경을 통해서 항균활성 특성을 분석하였다.

라) 길항 내생세균의 활성물질 규명

길항세균이 생산하는 항균물질이 배양여액 중에 다량으로 존재하는바 유기용매에 따른 분획결정을 실시하였다. 유기용매 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol을 이용하여 각 단계별로 분획하고 *P. digitatum*에 대하여 항균활성을 확인하였다. 먼저 항균물질의 생산을 위하여 길항세균을 배양실험에서 가장 생육효과가 좋았던 Molasses broth에 접종하여 30℃, 150 rpm으로 72시간 진탕배양 후, 배양액 2ℓ를 13,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액은 0.22 μm filter로 여과시켜 배양여액을 수거하였으며, 배양여액에 대하여 유기용매에 따른 분획을 수행하였다. 활성이 보인 분획 중 분석이 가능한 물질에 대하여 standard 물질과 비교하여 HPLC 분석을 실시하였다.

마) 길항 내생세균의 최적 배양 조건 탐색

배지 조건에 따른 최적 배양 조건선발을 위하여 일반적으로 세균 배양에 사용되는 Luria-Bertani(LB) Broth, Nutrient Broth(NB), Tryptic Soy Broth(TSB), Potato Dextrose Broth(PDB), Molasses Broth를 공시하여 각 배지별 균의 생육을 조사하였다. 조건별 각각의 배지에 전배양액을 접종하고 진탕배양기(150 rpm / 30℃)에서 배양하여 배양액 중의 균체량을 72시간 동안 12시간 간격으로 측정하여(OD값, 600 nm) 생육정도를 조사하였다.

초기 pH의 영향에 따른 최적 조건을 선발을 위하여 최적 배지로 선발된 Molasses broth를 pH 4에서 9까지 각각 조정하여 전배양한 세균을 접종하였다. 전배양액을 접종한 조건별 배지를 진탕배양기(150 rpm / 30℃)에서 72시간 동안 배양을 하며 12시간 간격으로 배양액 중의 균체량을 측정하여(OD값, 600 nm) 생육정도를 조사하였다.

2) 미생물 농약으로 이용 가능한 유용세균의 추가 선발 및 동정

다양한 기주로부터 유용 내생균을 분리하여 저장병 방제에 더욱 효과적인 균주를 분리하고자 추가적으로 citrus 외 다른 식물체로부터 내생균 분리를 수행하였다. 분리한 내생세균과 주요 저장병원균인 *P. digitatum*, *P. italicum*을 PDA배지 상에서 대치배양을 실시하여 항균활성을 갖는 유용균주를 1차 선발하여 비로부터 분리된 RB2균주가 선발되었다. 선발된 RB2균주를 NA 배지상에서의 colony 형태분석 및 그람 염색을 수행하여 기본적인 형태적 특성에 대한 파악이 이루어 졌으며, 최근 형태가 유사한 세균의 분류에 많이 사용되는 API kit(BioMerieux, France)를 이용하여 생화학적 분석을 하였다. 그리고 좀 더 정확한 분석을 위하여 분지생물학적 분석을 수행하였다. RB2의 16S rDNA 유전자는 universal primer set인 27F/1492R primer를 이용하여 증폭하였으며, 더 정확한 균의 동정을 위하여 이전 보고된 논문들을 토대로 *Burkholderia* spp.를 확인하고자 BUR3/BUR4 (GARAAGCAGTTCCGCAA/GAGTCGATGACGATCAT) primer를 활용하여 *recA* 유전자 증폭을 수행하였다(Payne *et al.*, 2005).

가) 길항 내생세균의 항균 스펙트럼 및 항균 기작

선발 길항 내생세균의 감귤 저장병원균에 대한 항균 활성능을 평가하기 위해 검정균 *P. digitatum*과 *P. italicum* 2개의 균주, 그리고 길항세균의 항균 spectrum 조사를 위해 대표적인

식물 병원균 *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Stemphylium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* 등 7균주를 사용하였다. 9개 병원균과 길항세균을 2.5 cm간격으로 PDA에 대치 접종하였다. 이들을 25℃에서 병원균의 성장 속도에 따라 7~15일간 배양한 뒤 길항세균에 의한 식물병원균의 inhibition zone의 길이를 측정하였다.

그리고 대표적인 감귤 저장병원균 *P. digitatum*에 대한 길항세균의 항균활성 특성을 관찰하기 위해 대치배양을 통해 inhibition zone이 형성된 부분에 lactophenol을 처리하여 고정시킨 다음, 현미경을 통해서 항균활성 특성을 분석하였다.

나) 길항세균의 최적 배양 조건 탐색

길항세균 배양의 최적 조건을 선별하여 실험에 이용하고자 다음 조건에 따른 실험을 수행하였다. 배지 조건에 따른 최적 배양 조건선발을 위하여 일반적으로 세균 배양에 사용되는 Luria-Bertani(LB) Broth, Nutrient Broth(NB), Tryptic Soy Broth(TSB), Potato Dextrose Broth(PDB), Molasses Broth를 공시하여 각 배지별 균의 생육을 조사하였다. 조건별 각각의 배지에 전배양액을 접종하고 진탕배양기(150 rpm / 30℃)에서 배양하여 배양액 중의 균체량을 72시간 동안 12시간 간격으로 측정하여(OD값, 600 nm) 생육정도를 조사하였으며, 초기 pH의 영향에 따른 최적 조건을 선발을 위하여 최적 배지로 선별된 Molasses broth를 pH 4에서 9까지 각각 조정하여 전배양한 세균을 접종하였다. 배지 조건에 따른 조건 탐색과 동일한 방법을 수행하였다.

3) 길항 내생세균의 항균 스펙트럼

선발 길항 내생세균의 감귤 저장병원균에 대한 항균 활성능을 평가하기 위해 검정균 *P. digitatum*과 *P. italicum* 2개의 균주, 그리고 길항세균의 항균 spectrum 조사를 위해 대표적인 식물 병원균 *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Stemphylium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* 등 7균주를 사용하였다. 9개 병원균과 길항세균을 2.5 cm간격으로 PDA에 대치 접종하였다. 이들을 25℃에서 병원균의 성장 속도에 따라 7~15일간 배양한 뒤 길항세균에 의한 식물병원균의 inhibition zone의 길이를 측정하였다.

3. 감귤을 이용한 항균 활성 검정

가. 실내 상처접종 실험을 통한 항균성 식물 추출물 또는 길항 내생세균의 활성 검정

상처가 없는 한 개의 감귤(품종: 조생) 당 3개의 침으로 1 mm 깊이의 상처를 3반복 주고, 350 ml volume의 플라스틱 용기에 6개씩 넣은 뒤, *P. digitatum*의 포자현탁액 1×10^5 spores/ml을 감귤 표면에 접종하였다. 3시간 뒤 각각의 처리구인 항균성 식물추출물 100, 250, 500

ppm 농도의 희석액을 감귤 표면에 분무하거나 식물 내생균 603의 경우 배양여액과 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 cfu/ml의 배양액을 처리하였다 그리고 RB2의 경우는 배양여액, 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 cfu/ml을 처리하여 실험을 수행하였다. 밀폐된 상태로 23℃, 7일 저장한 뒤 발병도와 방제가를 조사하였다.

$$\text{발병도}(\%) = \{ \sum(\text{발병지수}^a) \times \text{계수} \} / (4 \times \text{접종 수}) \times 100$$

a) 0: 발병무, 1: 1-5%, 2: 6-20%, 3: 21-50%, 4: 51% 이상

$$\text{방제가}(\%) = \{ 1 - (\text{처리구의 발병도} / \text{무처리구의 발병도}) \} \times 100$$

나. 다양한 조합을 통한 효과적인 방제 방법 연구

항균성 식물추출물과 길항 내생세균의 조합을 이용하여 효과적인 방제방법을 연구하고자 식물추출물이 혼합된 조건하에서 선발된 길항 내생세균의 안정적인 성장가능 여부를 조사하였다. 항균성 식물추출물을 100, 250, 500 ppm 농도로 함유하고 있는 molasses broth에 내생세균 배양액을 접종하였고, 대조구는 동일조건에 항균성 식물추출물을 함유하지 않은 배지를 사용하였다. 이를 진탕배양기(150 rpm / 30℃)에서 배양하여 배양액 중의 균체량을 72시간 동안 12시간 간격으로 측정하여(OD값, 600 nm) 균의 생육정도를 비교 조사하였다.

식물추출물이 길항 내생세균의 성장에 영향을 미치지 않음이 확인됨에 따라 길항 내생세균과 항균성 식물추출물의 혼합 처리 활용가능성을 평가하고자 RB2의 경우, 배양여액과 식물추출물 100, 250 ppm의 조성과 1×10^8 cfu/ml과 식물추출물 100, 250 ppm 조성으로 각각 혼합처리를 하였고, 603균주의 경우, 배양여액과 식물추출물 100, 250 ppm과의 조성, 1×10^7 cfu/ml과 식물추출물 100, 250 ppm과의 조성으로 혼합처리를 하였다. 그리고 대조약제로 기존에 시판되어 감귤 저장병 방제제로 상용화되고 있는 농약 벨쿠트와 스포로곤을 권장 사용농도 1000 ppm으로 사용하여 비교하였다. 방제효과를 검정하기 위한 처리 방법은 실내실험을 통한 항균성 식물 추출물 또는 내생세균의 활성 검정 실험과 동일하게 수행하고 평가하였다.

다. 고농도 활성물질의 약해검정

활성물질은 butanol 층에서 녹으나 물과 완전히 섞이지 않는 성질 때문에 물에 희석하여 뿌릴 경우 물만 분사되거나 정확한 농도로 분사가 되지 않을 경우가 있어 고농도의 활성물질이 분사되면 약해가 발생할 수 있기에 Protodioscin의 처리농도로 결정된 200 ppm의 농도 이상에서의 과실에 대한 약해 유무를 검정하기 위하여 감귤을 멸균수로 3회 헹구낸 뒤 tray에 넣고 protodioscin을 각각 물 2ml로 녹여 1,000 ppm과 배량인 2,000 ppm의 농도로 만들고 분무기를 이용하여 감귤 과실에 분무하였다. 3, 5, 7일 후에 달관 조사 방법으로 약해 유무를 검정하였고, 처리구는 3반복으로 수행하였다.

라. 보조제 탐색

활성물질의 균질화를 위해 NaH_2CO_3 1,000 ppm과 tween 20 1,000 ppm, chitosan (MW 300 thousand upper) 1,000 ppm의 분산제를 사용하여 항균활성 검정 실험을 실시하였다. 또한, protodioscin의 방제 효과를 유지시키기 위해 생분해성 접착제 CMC, Xanthan gum, Rosin, Glycerol, Starch를 DW에 녹여 안정성/접착성이 양호한 10 ppm의 농도로 준비하고 protodioscin 역시 DW에 녹여 과실에 처리하는 농도인 1000 ppm로 준비한 후 서로 혼합하여 *P. digitatum*과 *P. italicum*이 접종된 PDA배지에서 균사 생장 저해율을 측정하였다.

4. 유용물질의 안전성 및 안정성 확인

가. 식물추출물의 기본특성

1) 식물 추출물의 특성 확인(pH, 열, UV 안정성 및 휘발성)

항균물질의 pH에 대한 안정성을 알아보기 위하여 고압 멸균한 PDA 배지의 pH를 3.0-7.0으로 조절하였다. 활성물질 5 mg/ml 농도로 배지에 혼합하여 분주한 후 *P. digitatum*을 접종하여 균사생육 억제 활성을 검정하였다. 대조구는 pH를 조절하지 않은 PDA 배지에 *P. digitatum*을 접종하여 사용하였다.

또한 항균활성 물질의 온도에 대한 안정성을 알아보기 위하여 5 mg/ml 농도로 PDA 배지를 만들어 121°C, 21분간 고압 멸균한 후 *P. digitatum*을 접종하여 균사생육 억제 활성을 검정하였다. 대조구는 고압 멸균한 PDA 배지를 만든 다음 배지 온도가 50°C일 때 활성물질 5 mg/ml 농도로 혼합하여 특성을 분석하였다.

활성물질을 UV와 햇빛에서 24시간 방치한 후 5 mg/ml 농도로 PDA 배지에 혼합하고 *P. digitatum*을 접종하여 균사생육 억제 활성을 검정하는 방법으로 UV에 대한 안정성을 확인하였다. 대조구는 활성물질을 갈색 시약병에 넣어 UV 및 햇빛에 노출시키지 않고 24시간 보관한 후 5 mg/ml 농도로 혼합하여 분주하여 사용하였다.

휘발성 분석을 위하여 PDA 배지에 *P. digitatum*을 접종한 후 1,000 µl/disc 농도로 활성물질을 점적하여 petri dish 뚜껑에 부착시켜 *P. digitatum*에 대한 균사 생육 억제율을 검정하였다.

2) 식물추출물 유래 항균물질의 지표성분 선정 및 표준분석법 개발

Standard 물질과의 항곰팡이능을 비교하기 위하여 JIAHERB로부터 구매한 40% Protodioscin에서 유효성분만을 순수 분리하여 천산용으로부터 추출한 유효성분과의 활성을 비교하고자 하였다. 각 분리한 유효성분을 100배 희석한 후, PDA배지에 *P. digitatum* 중층배지에 형성된 저지원을 생성 유무, 억제 기작을 비교하였다.

3) 식물추출 protodioscin과 Standard 물질과의 비교

가) pH에 따른 안정성 검정

PDA 배지의 pH를 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0으로 각각 조절하여 상온에서 *P. digitatum*균과 *P. italicum*을 도말한 후 천산용으로부터 butanol에 의해 추출한 protodioscin과 시중에서 판매되는 protodioscin의 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm, 1000 ppm 농도로 paper disc에 접종하여 72시간 이후의 *P. digitatum*과 *P. italicum*의 균사생육 억제 활성을 조사하였다.

나) 열에 대한 안정성 검정

항균활성 물질인 protodioscin의 열에 대한 안정성을 알아보기 위하여 JIAHERB로부터 구입한 protodioscin을 멸균조건인 121°C에서 15분간 방치하여 열에 의한 외부적 및 내부적 안정성을 평가하였다. 실험방법은 상온에서 *P. digitatum*균과 *P. italicum*을 도말한 후 protodioscin(JIAHERB, china)의 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm 농도로 paper disc에 접종하여 72시간 이후의 *P. digitatum*과 *P. italicum*의 균사생육 억제 활성을 측정하였다

다) 중금속평가

카드뮴 검출을 위하여 시료에 10% 염산히드록실아민용액 1 ml, 10% 구연산이암모늄용액 5 ml, 10% 수산화나트륨용액 10 ml 및 1% 시안화탄소용액 5 ml을 이용하여 사염화탄소층을 추출한 후 2% 주석산용액 20 ml을 이용하여 사염화탄소층을 분리하여 사염화탄소층을 분리하였다. 카드뮴을 검출하기 위하여 A530 nm에서 카드뮴의 양을 구하고 농도를 산출하였다.

납을 검출하기 위하여 납이온이 시안화칼륨 공존하에 알칼리성에서 디티존과 반응하여 생성하는 납 디티존착염을 사염화탄소로 추출하고 과잉의 디티존을 시안화칼륨용액으로 씻은 다음 납착염의 흡광광도를 520 nm에서 측정하는 방법인 흡광광도법을 이용하였다.

수은을 황산 산성에서 디티존사염화탄소로 일차추출하고 브롬화칼륨 존재하 황산산성에서 역추출하여 방해성분과 분리한 다음 인산-탄산염완충액 존재하에서 디티존사염화탄소로 수은을 추출하여 490 nm에서 흡광도를 측정하는 방법을 이용하였다.

나. 길항 내생세균으로부터 유래된 항균활성 물질의 기본특성

활성물질의 열에 대한 안정성을 평가하기 위해 배양여액을 70°C, 100°C로 20분간 열처리한 후, 상온에서 식힌 배양여액의 항균활성을 한천배지확산법으로 조사하였다. 대조구로 열처리하지 않은 배양여액을 사용하여 항균활성의 감소 정도를 비교하였다.

UV에 대한 안정성을 확인하고자 배양여액 80 μ l을 점적한 9 mm paper disc에 254 또는 365 nm의 UV를 10 mm 거리에서 30분간 처리하여 처리하지 않은 배양여액과 항균활성의 감소 정도를 비교하였다.

또한 휘발성 유무를 확인하고자 *P. digitatum*을 PDA 배지에 접종한 후, 25°C에서 7일간 배

양시킨 균주를 검정균으로 사용하였다. PDA 배지 중앙 부위의 배지를 10 mm 제거한 다음, 검정균의 균사 선단부와 603균주를 4.5 cm 거리를 두어 접종하였다. 7일 후 검정균의 inhibition zone 형성 여부를 관찰하여 휘발성 유무를 조사하였다.

다. 세포독성평가

안전성평가를 위한 세포 독성 실험을 수행하기 위한 세포는 mouse abdominal macrophage cell(RAW 264.7)을 사용하였다. RAW 264.7의 세포 독성 실험은 MTT assay를 이용한 세포생존율을 측정 하여 확인하였는데 이 세포들은 10% FBS(Fetal Bovine Serum)와 PS(penicillin , streptomycin) 1% 를 포함한 DMEM 배지를 넣어 5% CO₂가 포함된 37 °C에서 배양하였다. 실험을 위해 RAW 264.7 세포가 24 시간 동안 배양한 후 천산용으로부터 추출한 protodioscin과 JIAHERB로부터 구입한 protodioscin을 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm, 1,000 ppm을 처리하고 다시 24시간 동안 배양한 후 1×10⁴ cells/well만큼 배양된 96-well culture plate에 넣어 용매에 MTT를 첨가하고 4 시간 배양 후 ELISA microplate reader(Bio-Tak instruments.Winooski, VT, USA)를 사용하여 450 nm 에서 OD 값을 측정하고 세포 생존율을 확인하였다.

라. 급성독성평가

1) 시험계

가) 종(계통)

Sprague-Dawley rat

나) 성별 및 입수 시 주령

수컷 약 6주령

다) 시험계의 선택이유

본 시험에 사용 될 rat는 독성시험에 적당한 실험동물로서 독성시험에 흔히 사용되는 동물로서 그 기초자료도 충분하여 결과해석이 용이하다.

라) 공급원

대한바이오링크

주소 : 충청북도 음성군삼성면 대야리 113

마) 입수 시 동물 수

수컷 30마리

바) 순화기간

입수 후 약7일간(순화기간 중 일반 증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 제공)

사) 투여개시 시 주령 및 체중범위

수컷 약 7주령

아) 사용 동물 수

수컷 20마리

2) 시험물질

가) 시험물질

- (1) 명 칭 : 단풍마(천산용) 추출물
- (2) 보관조건 : 4℃

나) 시험물질의 조제

- (1) 조제법 : T1 - 단풍마(천산용) : EtOH 1:6 비율로 추출한 추출물질

3) 투여방법

- (1) 투여경로 : 경구투여
- (2) 투여횟수 및 투여기간 : 단회 투여
- (3) 투여액량 : 단풍마(천산용) 추출물 원액을 1 ml씩 투여한다.

제 2 절 결과

1. 저장병 원인대상병원균 동정

과실 및 채소의 저장병은 작물의 생육기간에 발병하기보다는 주로 수확 후 포장하고 저장, 운송되는 과정에서 발생하는 병으로 이로 인한 작물의 손실은 전체 수량의 10~30%가 되며, 일부 후진국들은 30% 이상의 큰 비중을 차지한다. 이러한 저장병원균들 중 대표적인 병원균이 *Penicillium* 속이다. 이중 *Penicillium digitatum*에 의한 녹색곰팡이병에 의한 손실은 전체 저장중 *Penicillium* 속에 의해 발생하는 손실의 65% 이상을 차지하고 있다.

*Penicillium digitatum*은 배, 사과, 감귤, 포도 등 과실류 및 저장 마늘이나 채소 등의 저장병에도 크게 관여하며 병 발생 시 상품성이 크게 떨어져 경제적으로 큰 손실을 입게 된다. 특히 감귤 저장 시 가장 큰 피해를 입히는 병으로서 녹색곰팡이병이라 불리운다.

1차 감염 시 감염부위에서 수백만 개의 포자가 형성되어 비산함으로서 이들이 2차 접종원으로 작용하게 되며 병 발생 최적 온도는 25℃ 내외로 6~37℃에서 성장할 수 있다. 때문에 저온 저장 시에도 발생이 가능하다. 또한 *P. digitatum*은 과실 저장병을 일으키는 *Penicillium*속 병원균들 중에서도 가장 강력한 병원성을 지니고 있고, 포자 형성량 또한 매우 많다. 방제법으로는 약제 방제 외에는 특별한 방제방법이 없으나 약제 저항성 균의 등장으로 이 또한 확실한 방제 방법이 되지 못하다. 따라서 본 연구에서는 녹색곰팡이병의 친환경적 방제를 위해 천연물을 이용한 방제법을 연구하였다.

가. 병원균의 동정

*Penicillium*속에 의한 저장병 방제 연구를 위해 우선적으로 실제 과실상에서 발생하는 *Penicillium*균을 분리하여 동정하였다. 병해를 입은 과실로부터 병원균 분리를 위해 무균상에서 감귤과실 표면에 발생한 병원균의 포자 및 균사를 분리, PDA 배지에 접종 후 24℃ 배양기에서 24시간 배양 후 자라난 것을 단균사 및 단포자 분리하여 각각 PDA배지에 옮기고 24℃ 배양기에서 3일간 배양하였다. 배양된 것들의 동정을 위해 배지상에서 자라는 형태 및 포자의 색 등을 확인하였고, 현미경상에서 400배로 검경하여 포자 및 균사 모양을 관찰하였다. 확인 결과, 감염된 감귤과실로부터 *Penicillium digitatum*과 *Penicillium italicum*을 순수분리 동정할 수 있었다(그림 2).

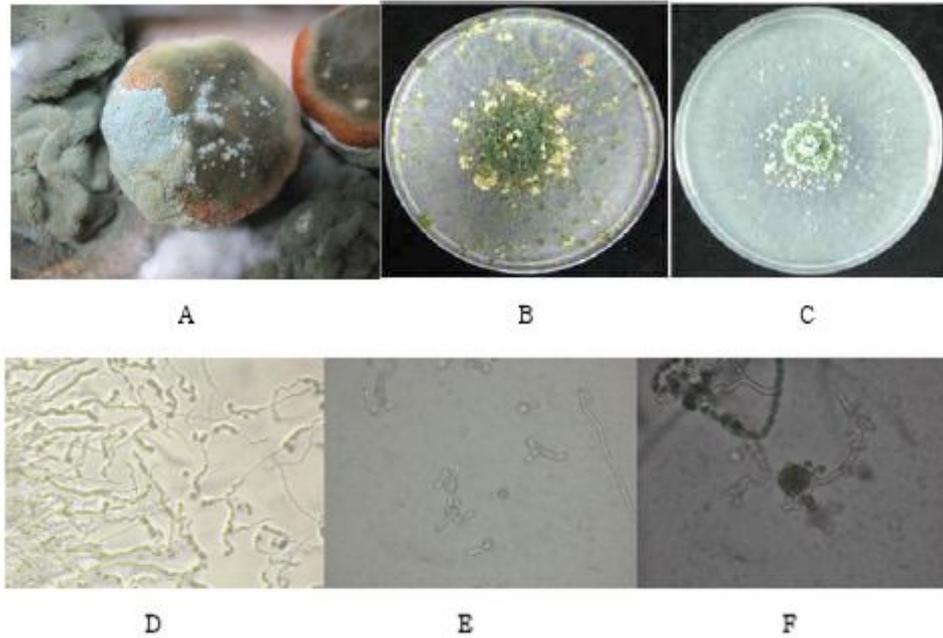


그림 2. Identification pathogen by observing shape of mycelium and spores from infested citrus. A: infested citrus B: *Penicillium digitatum* in PDA media, C: *Penicillium italicum* in PDA media, D, E, F : shape of mycelium and spores.

나. 저장 병원균의 확보

위에서 분리한 2가지의 병원균 외에도 저장병을 일으키는 *Penicillium*속 균주의 확보를 위해 KACC로부터 5가지의 *Penicillium*속을 분양 받아 실험에 사용하였다(표 1).

분양 받은 *Penicillium*속들은 감귤, 배, 포도, 사과 등 부가가치가 높은 과실 뿐만 아니라 버섯, 마늘 및 채소 등의 저장 시에도 발생하는 주요 *Penicillium*속 병원균들이다.

표 1. *Penicillium* spp. used in this study

<i>Penicillium</i> spp.	Source (KACC No.)
<i>Penicillium digitatum</i>	KACC41898
<i>Penicillium italicum</i>	KACC43474
<i>Penicillium expansum</i>	KACC40814
<i>Penicillium solitum</i>	KACC40818
<i>Penicillium polonicum</i>	KACC41353

KACC; Korean Agricultural Culture Collection center.

2. 식물추출물의 선별 및 대량 생산

가. 항균활성 약용작물의 선별

유용 항균물질 함유 가능성이 높을 것으로 예상되는 101가지의 약용 식물에서 저장병해인 녹색곰팡이병균 *Penicillium digitatum*에 대한 항진균활성을 screening하기 위하여 군사생육 저해 정도를 확인하였다. 각각의 식물을 분쇄기로 곱게 분쇄하여 각각 건조시킨 후 100g을 100% Methanol 5 l에 넣고 24℃에서 48시간 진탕배양 후 추출물을 거즈와 filter paper를 이용하여 3회 여과하였다. 여과되어 나온 물질은 회전 감압농축기를 이용하여 Methanol을 완전히 제거하고 동결 건조하였다. 동결 건조된 식물 추출물을 100배 농도로 조정한 후 paper disc에 점적한 다음 *Penicillium digitatum*을 도말한 PDA 배지에 올려놓고 항균활성을 검정한 결과, 천산용 추출물이 20 mm이상의 큰 inhibition zone을 형성하며 아주 강한 항균활성을 보였으며, 자귀나무, 낙지다리의 추출물은 10 mm이상 20 mm미만의 억제, 까마중, 금마타리 2종의 식물추출물은 10 mm미만의 약한 항균활성이 확인되었다(표 2, 그림 4). 따라서 *P. digitatum*에 가장 강력한 항균활성을 나타낸 천산용을 본 실험의 재료로 선별하였다. 이 가운데 군사생육 억제효과가 뚜렷한 천산용 추출물에 대해 녹색곰팡이병 방제를 위한 보다 세부적인 실험을 수행하였으며, 천산용의 모습은 그림 3과 같다.

천산용은 마속에 속하는 단풍마(*Dioscorea quinqueloba* Thunb.)의 뿌리로서 마속의 식물은 50종류 이상의 steroid saponin을 함유하고 있다. 그동안 민간요법 치료제나 건강식품으로 널리 사용되어져 왔으나 아직까지 식물병해 방제제 등 농업용으로 사용된 적은 없다.

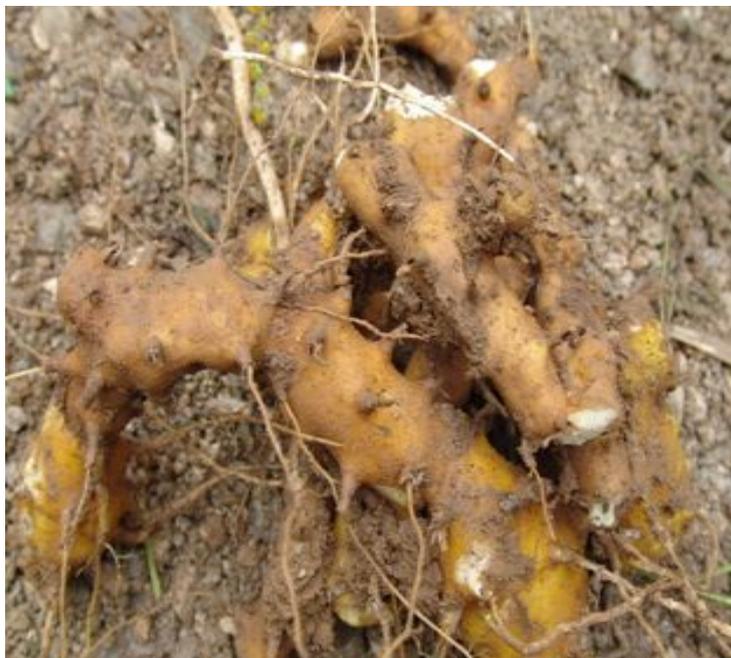


그림 3. Photograph of *Dioscorea quinqueloba*.

표 2. Screening for antifungal activity of several plant extracts against *Penicillium digitatum*

Korean name	Inhibition zone ^{a)}	Korean name	Inhibition zone	Korean name	Inhibition zone
독말풀	-	석결명	-	미나리	-
까치수염	-	일당귀	-	시호	-
족제비싸리	-	비수리	-	파리	-
신나무	-	자귀나무	+	지황	-
유채	-	아스파라거스	-	노루오줌	-
쑥류	-	딱지꽃	-	황벽나무	-
사철쑥	-	돌마타리	-	운향초	-
싸리	-	닥풀	-	뱀무	-
큰제비쑥	-	스테비아	-	사위질빵	-
산훈쑥	-	장백도라지	-	큰까치수염	-
괴불나무	-	여주	-	좁쌀풀	-
나비나물	-	(붉은)접시꽃	-	수박풀	-
평의다리	-	수리취	-	선이질풀	-
조밥나물	-	쇠무를	-	단풍마	+++
복자기	-	천일홍	-	고마리	-
꼭두서니	-	짚레꽃	-	보골지	-
개소시랑개비	-	무늬둥굴레	-	대극	-
쉬땅나무	-	서양민들레	-	솔채꽃	-
물오리나무	-	섬초롱꽃	-	낙지다리	+
층층나무	-	쇠뜨기	-	꽃다지	-
지리산오갈피	-	매화나무	-	나래가막사리	-
비쭈기나무	-	돌나물	-	산비장이	-
가시나무	-	순비기나무	-	삼잎국화	-
해홍나물	-	산수유	-	개미취	-
자작나무	-	층꽃나무	-	산톱풀	-
단풍잎돼지풀	-	눈개승마	-	공심채	-
아마	-	감초	-	능소화	-
개쑥갓	-	갯패랭이	-	느티나무	-
꾸지뽕나무	-	거북꼬리	-	방울비짜루	-
삼백초	-	까마중	++	흰제비꽃	-
끈끈이대나물	-	갈퀴꼭두서니	-	넓은잎쥐오줌풀	-
오크라	-	복분자딸기	-	구릿대	-
사스타데이지	-	금마타리	++		
당귀	-	고수	-		

^{a)}Growth inhibition was determined after 7days of incubation at 25°C. Inhibition zone: -: 0 mm, +: <10 mm, ++: <20 mm, +++: ≥20 mm.

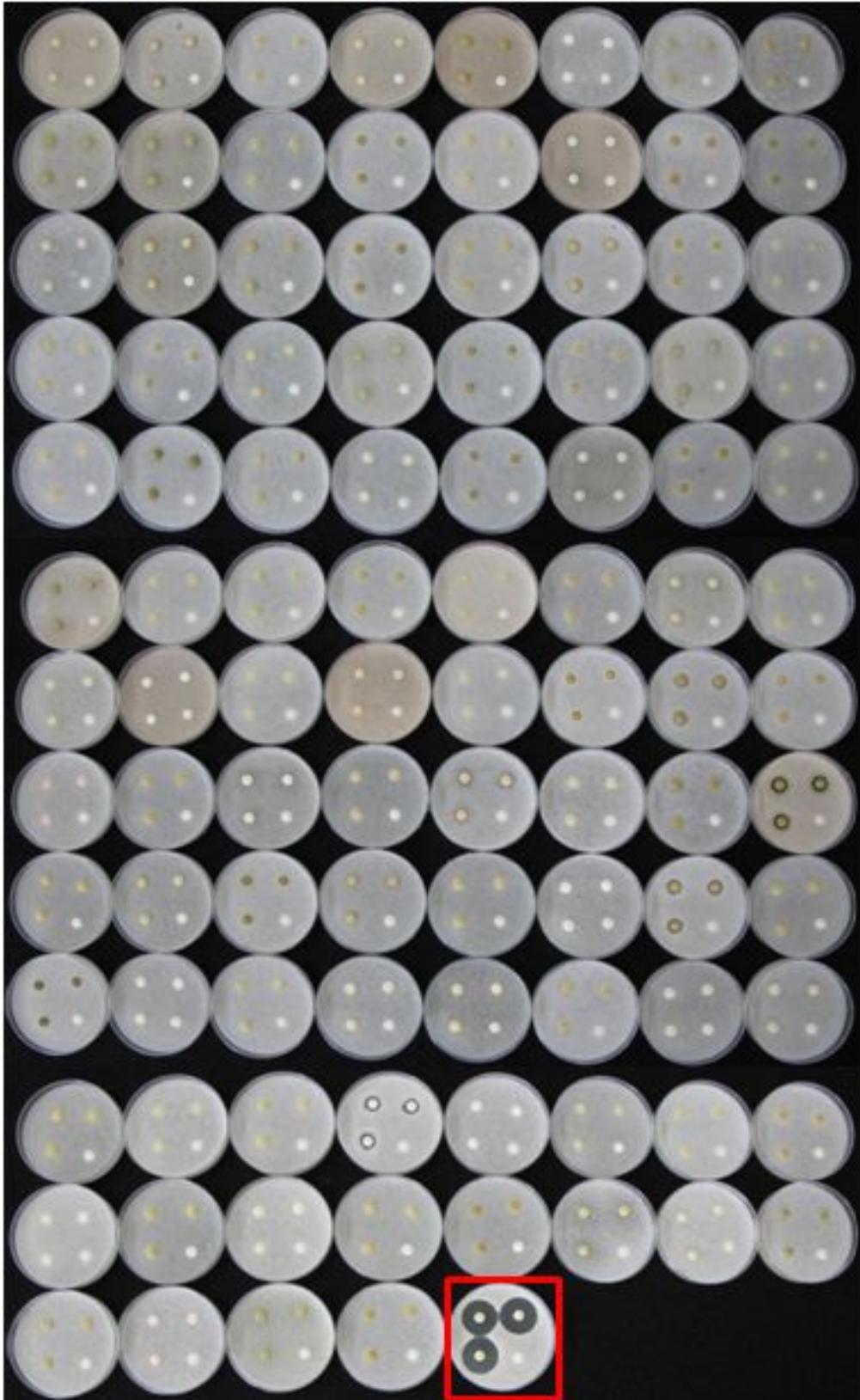


그림 4. Screening of antifungal activity on *Penicillium digitatum* of several plant analysed in this study based on the mycelial growth inhibition.

1차 실험으로 유용 항균물질 함유 가능성이 높을 것으로 예상되는 101가지의 약용 식물에서 저장병해인 녹색곰팡이병균 *Penicillium digitatum*에 대한 항진균활성을 screening한 결과 단풍마(*Dioscorea quinqueloba* Thunb.)의 추출물에서 균사 생육이 억제된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 보다 세밀한 실험을 위하여 문헌조사에 따라 선별된 유용 항균물질 함유가 높다고 1차 선별실험에서 선정된 천산용과 항균물질 함유 가능성이 높을 것으로 예상되는 14가지의 약용 식물들을 추가로 추출하여 저장병균인 *Penicillium*속 균주를 이용하여 보다 세부적인 추가 실험을 수행하였다(표 3, 그림 5). 실험결과 부채마(*Dioscorea nipponica* Makino)에서도 항균활성이 높게 나타났으며, 이밖에 백리향에서도 녹색곰팡이병 방제효과가 나타났다.

표 3. Screening of antifungal activity on *Penicillium digitatum* of each herb plant analysed in this study based on the mycelial growth inhibition

Plant	Activity	Plant	Activity
백리향	++	모감주나무	-
쓴나물(호스래디쉬)	-	부채마	+++
숨나물	-	산황나무	-
서양톱풀	-	익모초	-
박하	-	삼주	-
페퍼민트	-	치커리	-
황금	-	해바라기	-

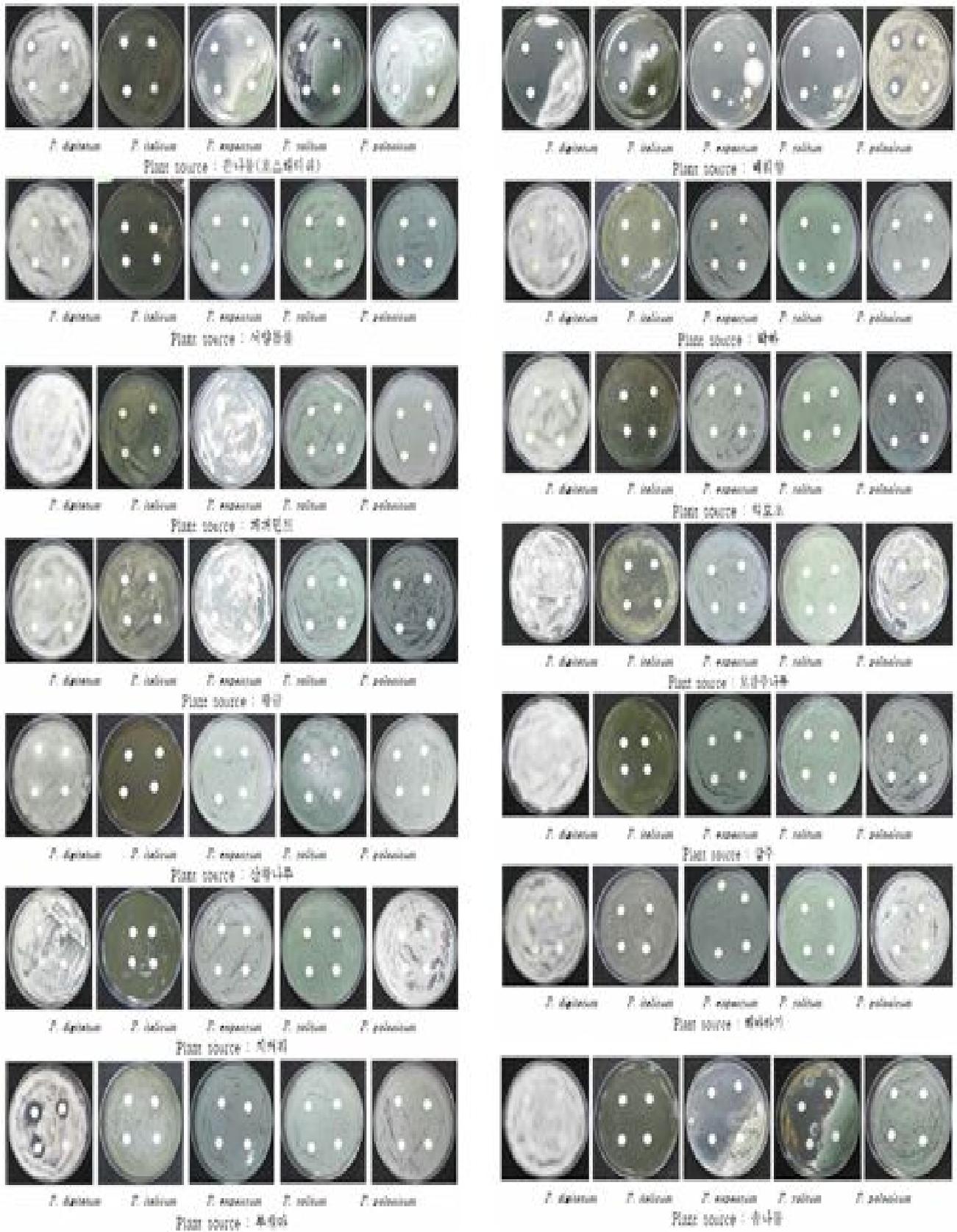


그림 5. Screening of antifungal activity on *Penicillium* spp. of each herb plant analysed based on the mycelial growth inhibition.

나. 배지상 항균활성 기작 조사

선발된 천산용 천연추출물에 의한 균사생장 억제 기작을 조사하기 위해 추출물을 무균상 안에서 paper disc에 50 μ l씩 넣고 충분히 용매를 증발시킨 후 PDA 배지상에 *Penicillium digitatum*과 대치배양하여 항균활성을 검정하였다(그림 6, 7). 25°C에서 5일간 배양한 후 병원균의 발아 및 균사생육억제 기작을 광학 현미경하에서 400배로 검경을 통하여 조사하였다. 배지상에서는 억제 영역이 나타났으며 현미경으로 그 영역을 검경 시 균사 선단부의 생장이 강하게 억제되어 균사가 부풀어 오른 모습이 관찰되었고, 거의 모든 균사에서 이상팽윤과 비대 증식을 보이며 일반적이지 않은 형태의 분지가 나타났으며 포자발아의 억제도 관찰되었다.

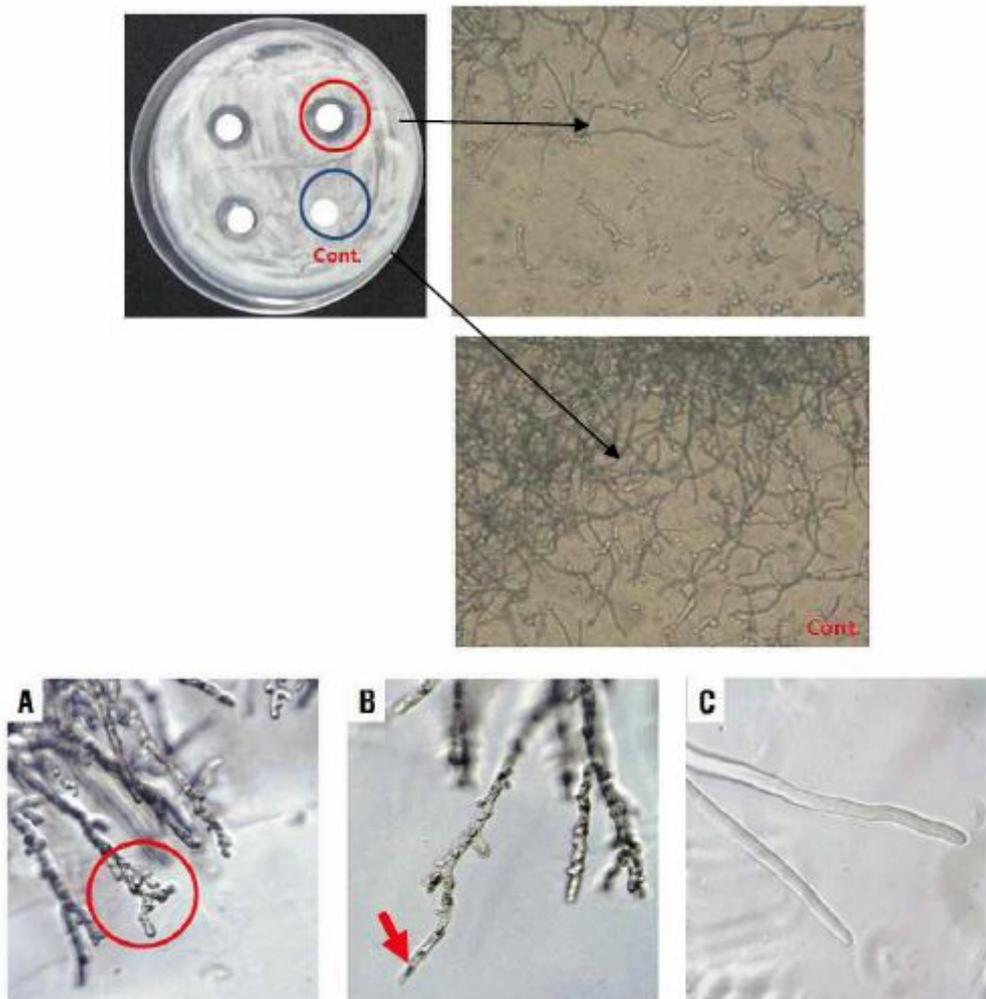


그림 6. Antifungal mechanisms of *Dioscorea quinqueloba* extract.
 A: Mycelial swelling and irregular growth, B: Inhibition of mycelial growth, C: Normal mycelia.

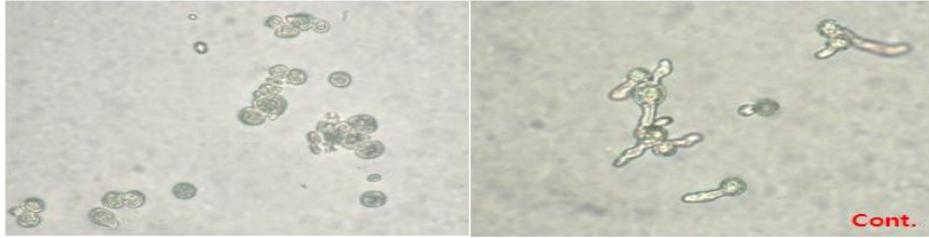


그림 7. Antifungal mechanism of plant extract; Inhibition of mycelium growth, and spore germination .

다. 식물 추출물의 항균 활성

천산용 추출물의 *P. digitatum*을 비롯한 *Penicillium*속의 주요 과실 저장병원균에 대한 항균활성 범위를 조사하였을 때, 4종의 *Penicillium*속 저장병원균 중 *P. italicum*에 대하여 30~50%의 균사생장 억제율이 보인 반면 *P. expansum*, *P. polonocum*, *P. solitum*에 대해서는 생육 억제효과가 전혀 나타나지 않았다(표 4). 특히 주요 감귤 저장병원균 *P. digitatum*에 특이적으로 강력한 항균 활성을 나타내고 있으며, *P. italicum*에도 낮지만 항균력을 가지고 있음이 확인되었다. 천산용 추출물은 감귤 저장 시 주로 큰 피해를 주고 있는 *P. digitatum*과 *P. italicum*에 대한 항균 활성이 스펙트럼이 확인됨에 따라 추후 감귤 저장병 방제용 천연물로서 가능성이 더욱 높아졌다.

표 4. Antifungal activity of extracts of medicinal plant *Dioscorea quinqueloba* Thunb. on mycelial growth of *Penicillium* spp. pathogens.

Pathogen	Activity (5mg/ml)	Pathogen	Activity (5mg/ml)
<i>P. digitatum</i>	+++	<i>P. italicum</i>	+
<i>P. polonocum</i>	-	<i>P. expansum</i>	-
<i>P. solitum</i>	-		

* (-: no mycelial growth inhibition, +: under 30%, ++: 30~50% , +++: 50~70% inhibition).

라. 식물추출물의 분획별 활성 검정

선발된 항균활성 물질의 용매별 분획 활성을 검정하고자 용매별 분획 항균활성검정 실험을 하였다.

조추출물을 얻기 위해 식물체를 마쇄하여 건조 시킨 것 10g을 100% MeOH 1ℓ에 넣고 48시간 동안 진탕 배양한 다음 filter paper를 이용하여 걸러내고, 회전 감압농축기를 이용하여

용매를 완전히 제거하였다. 이 물질을 증류수에 녹인 뒤 분별깔대기를 이용하여 hexane 200mℓ 과 혼합시켜서 hexane 분획을 얻고 남겨진 수층에 보다 극성의 용매인 ethyl ether, chloroform, ethyl acetate, butanol 순으로 hexane의 방법과 동일하게 실시하여 각각의 용매별 분획을 얻었다. 이어 용매들을 회전 감압농축기를 이용하여 농축하고 최종 1mℓ의 추출물을 얻었다. 이와 같은 방법을 통해 얻어진 용매별 추출물을 무균상 안에서 paper disc에 점적하고 *P. digitatum*을 도말한 PDA배지 상에 올려놓고 항균 활성을 검정하였다. 활성 검정 결과 butanol fraction에서 가장 강력한 항균활성이 나타났다(그림 8). 이 Butanol 분획을 감압 농축하여 연한 갈색을 띠는 조추출물을 얻을 수 있었으며, *P. digitatum*에 항균활성을 나타내는 천산용의 butanol fraction을 silica gel open column (70~230 mesh, column chromatography용, Merck, Germany)을 통하여 chloroform : methanol (80:20, V/V)에서 강한 항균활성의 분획을 얻었다. 그 후 Methanol : water (60:40, V/V) 용매를 매우 천천히 흘려 내리면서 소량씩 분획한 뒤 항균활성을 나타내는 분획을 수거하여 항균활성 물질을 분리하였다. 분리된 항균활성 물질을 ODS TLC plate를 이용하여 2μℓ 씩 점적한 후 물질의 분리가 가장 잘 이루어진 80% methanol을 전개용매로 사용하여 chromatography 한 뒤 ρ - anisaldehyde 시약으로 발색시켰다. 나타난 spot을 토대로 prep TLC를 이용하여 항균활성물질을 수거하고 100% methanol에 용출시켜 감압 농축하여 획득하였으며, 항균활성을 검정한 결과 R_f 0.5의 spot이 항균활성을 갖고 있음을 확인하였다(그림 9).

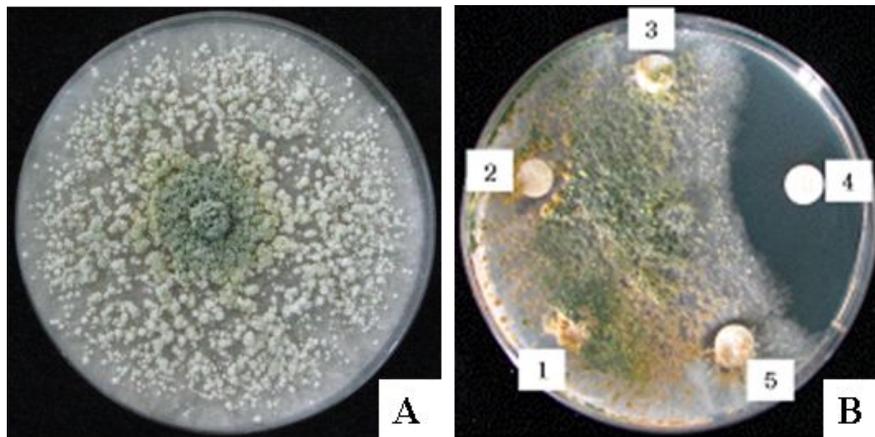


그림 8. Antifungal activity of each solvent fraction extracted from 100% methanol extracts of *Dioscorea quinqueloba* against *Penicillium digitatum*. A; Control, B; 1: hexane fraction, 2: chloroform fraction, 3: ethyl acetate, 4: butanol fraction, 5: H₂O fraction.

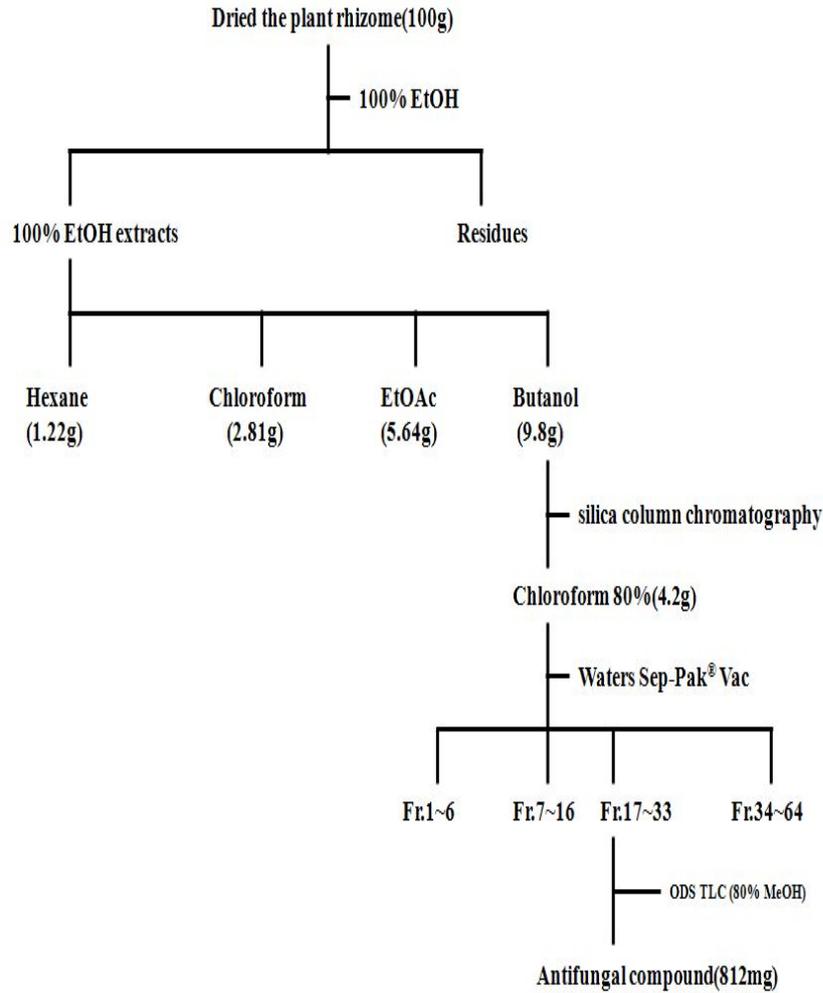


그림 9. Scheme for the isolation of antifungal compound from *Dioscorea quinqueloba* against *Penicillium digitatum*.

마. 유효성분의 구조분석

물질의 open column chromatography용 silica gel은 MERCK사의 Silica gel 60(70~230 mesh, Germany)을 이용하였다. butanol 분획에서 얻어진 물질을 silica gel open column chromatography를 수행한 결과 항균활성을 나타내는 분획을 320mg 얻었다. 이 분획에서 활성물질을 동정하기 위해 구조를 분석하고자 $^1\text{H-NMR}$, C-NMR 을 실시하였다(그림 10). 분자량 확인을 위해 LC-MS(Liquid chromatograph / mass spectrometer)을 이용하였으며 기기는 HP 1100 series LC/MSD(U.S.A)를 사용하였다(그림 11). 분석 결과 항균활성을 갖는 물질의 분자량과 구조를 확인할 수 있었고 Protodioscin으로 동정되었다(그림 12).

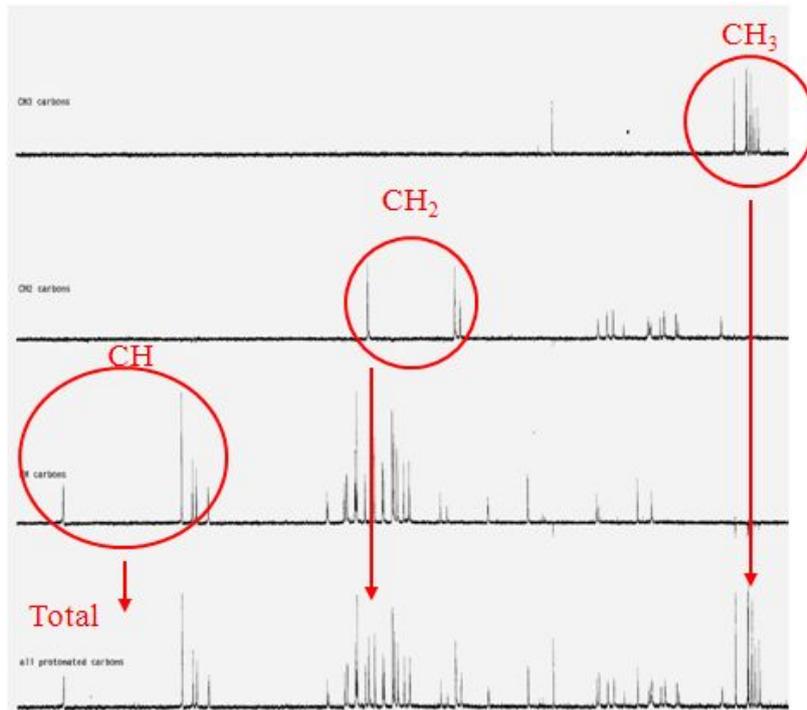
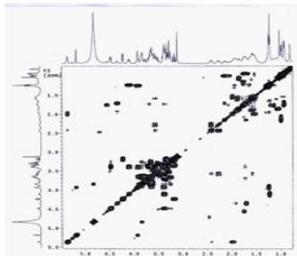
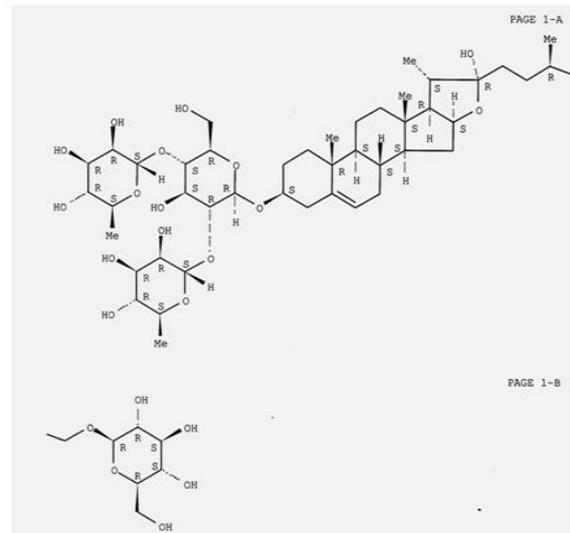
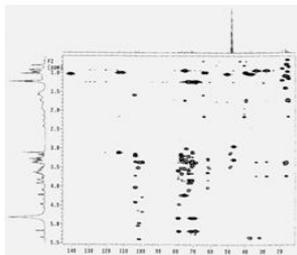


그림 11. LC-MS spectrum of antifungal compound. Molecular weight of compound were calculated. (= 1049.4)

^1H - ^1H COSY



HMBC



Protodioscin

그림 12. Result of Analysis by ^1H - ^1H COSY and HMBC, compound was identified as steroid saponin (Protodioscin).

바. 식물체의 다량획득방법

천연자원식물을 이용한 천연물 신약이나 천연물 농약을 개발하는데 있어서 대다수의 연구자들이 천연자원식물들로부터 신약후보물질이나 천연물농약 후보물질로서 가치 있는 식물을 찾아 우수한 많은 연구결과를 내고 많은 우수한 논문과 업적들을 발표하고 있다. 그럼에도 불구하고 대다수의 연구자들에게 그 자원식물로부터 안정적 원료물질 확보방안에 대해 문의해보면 정확한 답을 하지 못하고 있다. 대부분 원료물질을 중국으로부터 싼값에 구입하거나 중국 현지 재배 등을 말하고 있었고 국산은 값이 비싸 생산가격을 맞출 수 없다는 내용으로 일관하고 있는 실정이다. 이와 같은 문제점을 극복할 수 있는 물질 확보 방안을 찾기 위해 1차년도 연구를 통해 최종 선발된 천산용의 안정적 확보를 위해 천산용에 대한 다양한 각도로 조사한 결과 국내에서 천산용의 재배방법과 재배특성 등을 확인할 수 있었고 그 결과는 다음과 같다.

1차년도 연구수행 과정에서 실험에 사용된 약제는 대전의 한약 약전상가에서 구입하여 실험을 공시하였지만 구입할 때마다 재료의 모습이나 형태가 다르고 특히 뿌리에서 나는 향기나 맛에 차이가 있었다. 현재 국내에 유통되고 있는 한약 재료는 대다수가 중국산이며 간혹 국산의 경우 매우 고가였다. 항균활성 실험에서 우수한 결과를 나타낸 천산용은 국산천산용이었고 안정적으로 활성이 있는 물질을 얻어 낼 수 있었으나 중국산 천산용을 이용하였을 때는 그 결과가 일정하지 않았다. 시중에 유통되는 천산용은 중국산 북경천산용과 한국산 천산용이라는 통용 명으로 유통되고 있었다. 따라서 국내 자생하는 천산용의 특성과 재배 농가 등을 조사한 결과 국내에서 천산용의 대량 재배 가능성을 확인할 수 있었다. 천산용의 인공 재배방법은 좀 더 구체적인 연구결과가 필요하지만 1년간 조사한 결과들을 토대로 분석한 결과 인삼재배방법과 매우 흡사하다고 판단된다. 하지만 본 연구과제 수행내용 및 성격과는 전혀 다른 내용이므로 이에 대한 실험을 진행할 수는 없으며 다만 천산용의 재배는 소규모 산간지방에서 이루어지고 있으며 병에 의한 피해도 거의 없고 앞으로 인삼재배와 비슷하게 농가의 고소득 작물로서 가치가 있을 것으로 예상되기 때문에 천산용의 재배방법 개선을 통해 다수확을 할 수 있다고 생각된다. 결론적으로 국내 토양에서 인위적으로 대량 재배를 통해야만 국산 자생 천산용을 안정적으로 확보할 수 있다고 판단된다.

사. 항균활성 물질 분리 단계의 간소화

항균활성 물질을 분리하고자 기존에 수행하였던 방법은 조추출물을 얻기 위해 식물체를 마쇄하여 건조 시킨 물질 10g을 100% MeOH 1ℓ에 넣고 48시간 동안 진탕 배양한 다음 filter paper를 이용하여 걸러내고, 회전 감압농축기를 이용하여 용매를 완전히 제거하여 증류수에 녹인 뒤 분별깔대기를 이용하여 hexane, ethyl ether, chloroform, ethyl acetate, butanol순으로 각각의 용매별 분획을 얻었다. *P. digitatum*에 항균활성을 나타내는 천산용의 butanol fraction을 silica gel open column (70~230 mesh, column chromatography용, Merck, Germany)을 통하여 chloroform : methanol (80:20, V/V)에서 강한 항균활성의 분획을 얻었다. 그 후 Methanol : water (60:40, V/V) 용매를 매우 천천히 흘려 내리면서 소량씩 분획한 뒤 항균활성을 나타내는 분획을 수거하여 항균활성 물질을 분리하였다. 분리된 항균활성 물질을 ODS TLC plate를 이용하여 나타난 spot을 토대로 prep TLC를 이용하여 항균활성물질을 수거하고 100%

methanol에 용출시켜 감압 농축하여 획득하였으며, 항균활성을 검정한 결과 R_f 0.5의 spot이 항균활성을 갖고 있음을 확인하였다(그림 13A).

기존 방법을 개선하여 용매별 분획 단계를 간소화 하고자 불필요한 단계를 제거하고자 ethyl acetate과 혼합시켜 ethyl acetate보다 낮은 극성의 물질을 모두 제거한 후, butanol fraction을 얻어냄으로서 5~10일간의 실험 기간을 단축하였다. 다음 단계로 천산용의 butanol fraction을 silica gel open column과정을 제거하고 바로 다음 단계로 진행하여도 항균활성 물질 분리가 가능하였다. 이로서 실험단계에서의 항균 활성 물질의 유실, 실험 비용 및 실험기간 단축에 도움이 됨을 확인할 수 있었다(그림 13B).

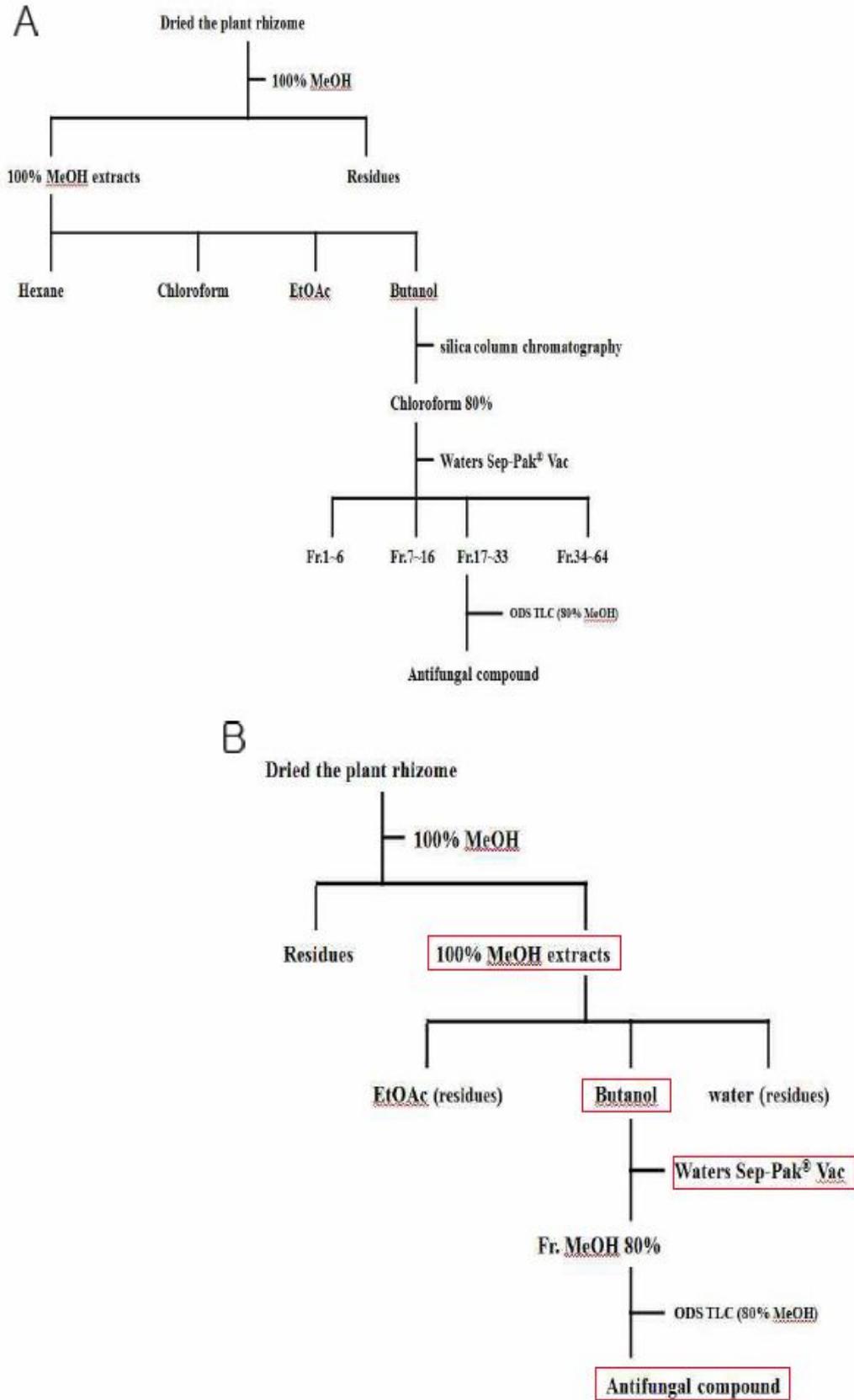


그림 13. Comparison of scheme for the isolation of antifungal compound from *Dioscorea quinqueloba* against *Penicillium digitatum*.

A: old scheme, B: new scheme.

아. 천산용 추출물의 대량생산

유용항균물질을 함유하여 최종적으로 저장병원균인 *Penicillium digitatum*에 대한 항균능력을 나타내는 천산용 추출물의 대량생산을 위하여 1Kg의 건조된 천산용을 500L 반응기내에서 100% Methanol 500 ℓ에 넣고 24℃에서 48시간 진탕 배양하였다. 이후 추출물은 한약재용 거즈를 통하여 5회 여과되었으며, 여과된 물질은 20L 대형 회전감압농축기를 이용하여 용매를 제거하고 200L 대형 감압농축기에서 동결건조 되었다.

자. 지표성분 선정 및 표준분석법 개발

감귤 저장병의 주요 원인이 되는 대표적 병원균인 *P. digitatum*균과 *P. italicum*에 대한 식물추출물의 항균실험 결과로서 가장 우수한 항균능력을 나타낸 천산용의 butanol 추출물에 대한 물질분석결과 protodioscin이라는 성분에 의하여 *P. digitatum*과 *P. italicum*에 대한 항균능력이 나타나는 것으로 확인되었다. 따라서 protodioscin 이라는 활성물질에 대한 항균능력을 알아보기 위하여 시판되고 있는 Protodioscin을 구입한 것을 standard로 실험을 수행하였다(그림 14). JIAHERB로부터 구매한 40% Protodioscin(JIAHERB, China)을 좀 더 순수한 Protodioscin을 이용하고자 MeOH을 용매로 희석시켜 C18 Waters Sep-Pak® Vac open column에서 항균활성이 나타나는 분획을 확인하고 항균활성물질을 분리하였다. 분리된 항균 활성 물질을 ODS TLC plate를 이용하여 나타난 spot을 토대로 prep TLC를 이용, 항균활성 물질을 수거하였고 100% methanol에 용출시킨 다음 감압 농축하여 최종적으로 활성물질을 분리하였다. 기존에 추출물에서 확인된 Protodioscin과 같은 R_f 0.5를 띄는 부분을 수거하여 실험에 사용하였다. 수거한 물질은 MeOH로 1000배 희석하여 paper disc assay한 결과 구매한 Protodioscin에서도 같은 항균 활성능을 확인하였다(그림 15).



그림 14. Extracted from *Dioscorea quinqueloba* protodioscin(left), JIAHERB's 40% Protodioscin(right).

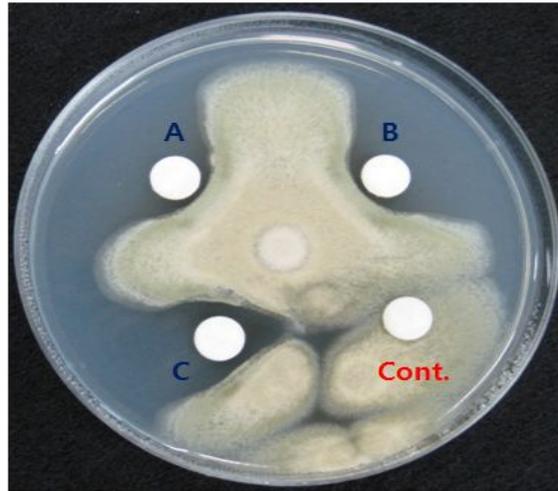


그림 15. Antifungal activity of protodioscin standard material.

차. 배지상 protodioscin 의 활성검정

protodioscin 이라는 활성물질에 대한 항균능력을 알아보기 위하여 천산용으로부터 protodioscin추출한 과 JIAHERB로부터 구입한 protodioscin을 TDW에 녹여 각각 50ppm, 100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm, 500ppm의 농도로 제작하였으며, *P. digitatum*과 *P. italicum*이 접종된 PDA 배지에서 균사 성장 저해율을 측정하였다(그림 16).

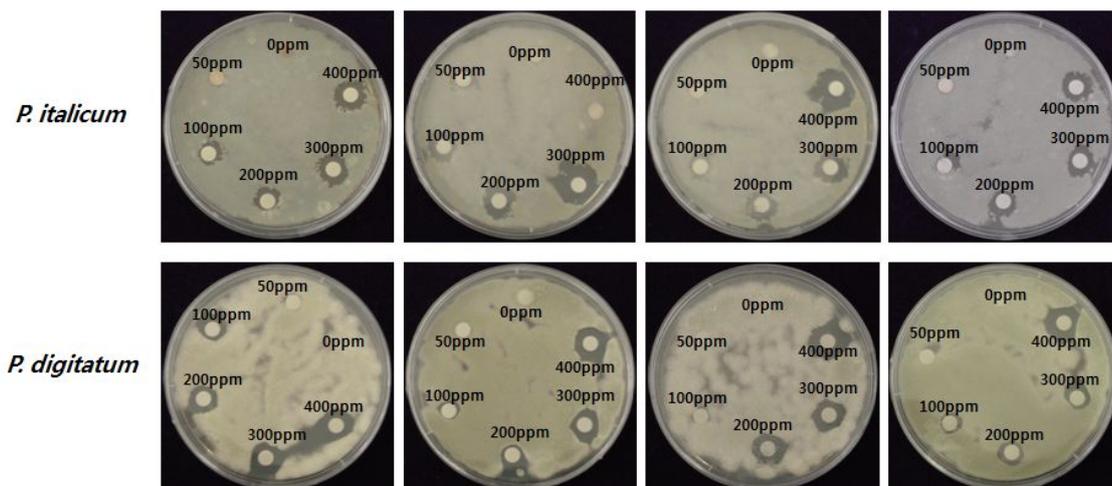


그림 16. Antifungal activity of protodioscin in PDA medium

*P. digitatum*에 대한 protodioscin의 균사 성장 저해율을 측정한 결과 당사에서 추출한 protodioscin의 경우 50ppm에서 21.3%의 균사 성장 억제율을 보여 JIAHERB로부터 구입한

protodioscin의 50ppm에서의 4.2%의 억제효과 대비 5.1배의 균사 성장 억제 효과를 나타내었다. 그러나 100ppm 이상의 농도에서는 평균 6.3% 활성이 떨어지는 것을 확인하였으며, 이는 전문적 추출물 생산 기업과의 추출물 생산 공정의 차이에 따른 것으로 파악된다(그림 17).

*P. italicum*에 대한 protodioscin의 균사 성장 저해율을 측정된 결과는 상대적 저농도인 50ppm에서 모두 균사성장 억제 효과가 나타나지 않았다. 당사에서 추출한 protodioscin의 100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm, 500ppm 에서는 34.6%, 45.8%, 56.4%, 62.5%, 62.8%의 균사생육 억제가 나타났으며, Jiaherb로부터 구입한 protodioscin의 100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm, 500ppm 에서는 35.5%, 47.7%, 60.1%, 61.2%, 63.9%의 균사생육 억제가 나타나 *P. italicum*에 대한 protodioscin의 균사 성장 저해효과는 같은 것으로 확인되었다(그림 18).

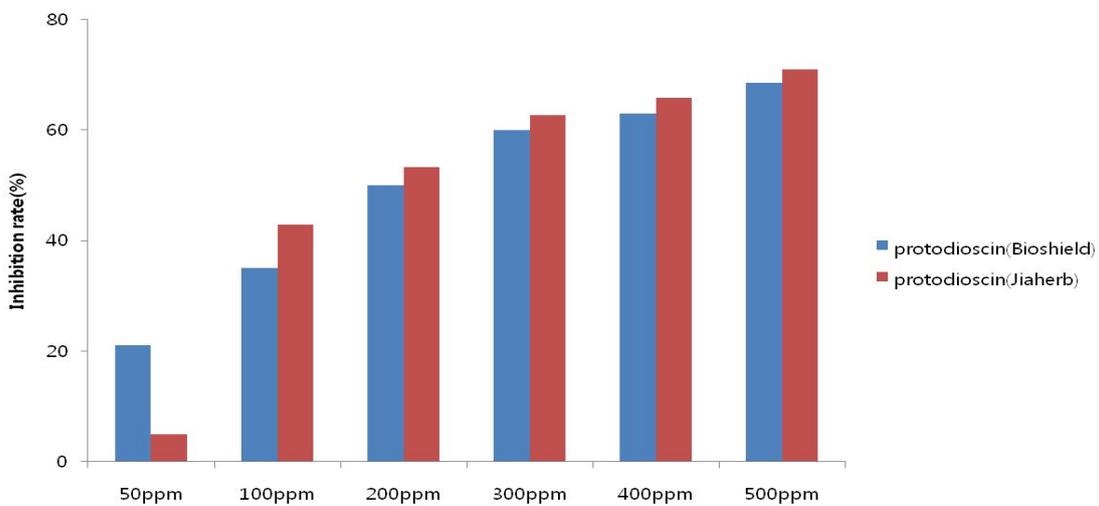


그림 17. Antifungal activity of protodioscin against *P. digitatum*

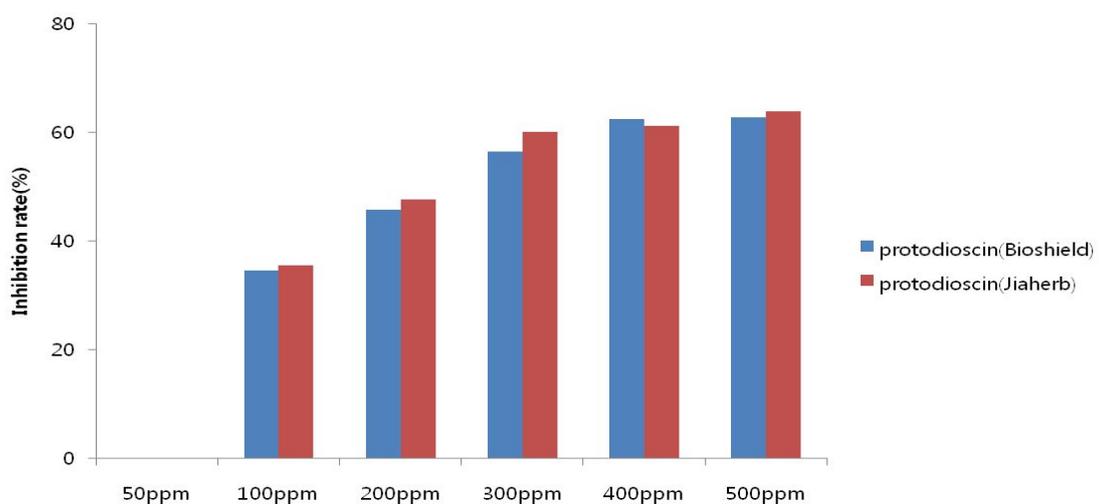


그림 18. Antifungal activity of protodioscin against *P. italicum*

배지상 protodioscin의 항균능에 대한 실험결과 같은 농도의 protodioscin에서도 *P.*

digitatum 대비 *P. italicum*의 균의 균사억제 효과가 평균 7.25% 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 결과에 따라 현장 평가 및 제형화를 위한 타겟은 *P. digitatum*이 적절하다고 판단되며, 또한 현장실험 및 제품화를 위해서는 protodioscin 200ppm 이상의 농도가 사용되어야 하거나 효과증진을 위한 보조제의 탐색 및 연구가 필요하다고 평가되었다.

3. 유용균의 선별

가. Citrus 식물 속 내생균 분리

제주도에서 7개의 다른 포장으로부터 수집된 citrus 잎으로부터 내생균 분리를 수행하였다(그림 19). 채집한 citrus 잎을 표면 소독한 후 Nutrient agar 배지에 각각 3개의 식물체 절편을 올리고 항온기에서 24~48시간/30℃ 동안 배양하였다. 식물체로부터 나온 세균을 Nutrient agar 배지에 계대하였고, 총 21개의 내생균이 분리되었다. 7개의 다른 포장에서 나온 균주를 분류하기 위해 1~7까지 첫 자리 번호를 백의 자리 숫자로 부여하고 십의 자리와 일의 자리는 나오는 순서대로 정하였다. 분리된 내생균은 세균의 변이가 잘 일어나는 특성상 20% glycerol 용액에 소량의 세균을 접종하거나 40% glycerol :Nutrient broth 배양액을 1:1로 혼합하여 deep-freezer(-70℃)에 보관하는 두 가지 형태로 보관하였다.



그림 19. Used in the experiment of seven citrus leaf.

나. 유용균의 선발

분리된 21개의 내생균을 PDA배지 상에 *P. digitatum*, *P. italicum*과 대치배양을 실시하여 길항작용에 의한 저지원을 형성을 확인하였다. 실험 결과 21개의 내생균 중 7개의 균주가 clear zone을 형성하였다. 선발된 유용균를 16S rDNA의 증폭을 위해 Universal primer 27F와 1492R로 PCR 증폭을 시행하였다. 얻어진 PCR 산물을 (주)마크로젠에 의뢰하여 sequencing을 하여, 선발된 유용균의 염기서열을 NCBI에서 제공하는 Nucleotide BLAST search를 수행하여 상동성을 분석하였다. 그 결과 대부분의 종이 *Bacillus*속의 균이었으며, 그 중 4개의 세균이 사람에게 식중독을 유발시키는 세균인 *B. pumilus*, *B. cereus*와 99~100%의 match가 확인되었다(표 5). 4개의 인체 병원균은 실제 포장 적용 안정성을 높이기 위해 차후 실험에서는 제외되고 3개의 유용균으로 차후 실험을 진행하였다. *In vitro* 상에서의 항균활성 확인하기 위해서 Citrus 잎에서 분리된 유용균 중 본 연구 진행 중 사전실험에서 항균활성을 보이는 것 중 인체에 해로운 유해세균을 제외한 3개의 균을 대표적인 감귤 저장병인 *P. digitatum*, *P. italicum*과 PDA평판배지 상에서 대치배양을 통해 균사생육억제 효과를 조사하였다. 3개의 균에서는 매우 높은 저지대를 나타내었다(표 6, 그림 20). 특히, 주요 감귤 저장병균 *P. digitatum*에 강력한 항균활성을 보이며 균주의 성장 또한 빠른 603균주를 실험균주로 선발하였다.

표 5. Assumed identification of bacteria isolates from citrus leaves collected in Jeju island.

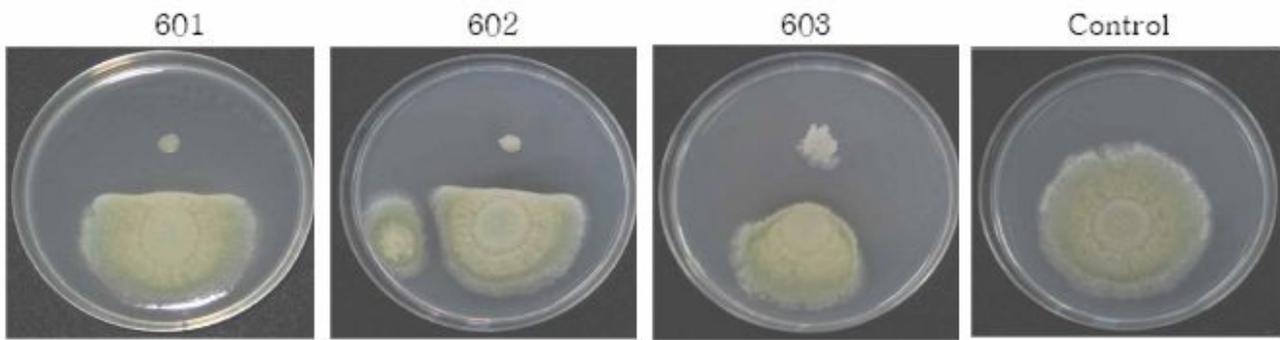
Antagonistic bacteria isolate	Assumed identification
102	<i>Bacillus pumilus</i>
204	<i>B. cereus</i>
205	<i>B. cereus</i>
404	<i>B. pumilus</i>
601	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
602	<i>P. polymyxa</i>
603	<i>Bacillus</i> sp.

표 6. Inhibitory effect of 3 antagonistic bacteria from citrus leaf against mycelial growth of 2 citrus postharvest pathogens

Citrus postharvest pathogen	Antagonistic bacteria	Inhibition zone(mm) ^a
<i>Penicillium digitatum</i>	601	9.9
	602	10.9
	603	11.7
<i>P. italicum</i>	601	9.9
	602	9.8
	603	9.6

^aGrowth inhibition was determined after 14 days of incubation at 25°C

Penicillium digitatum



Penicillium italicum

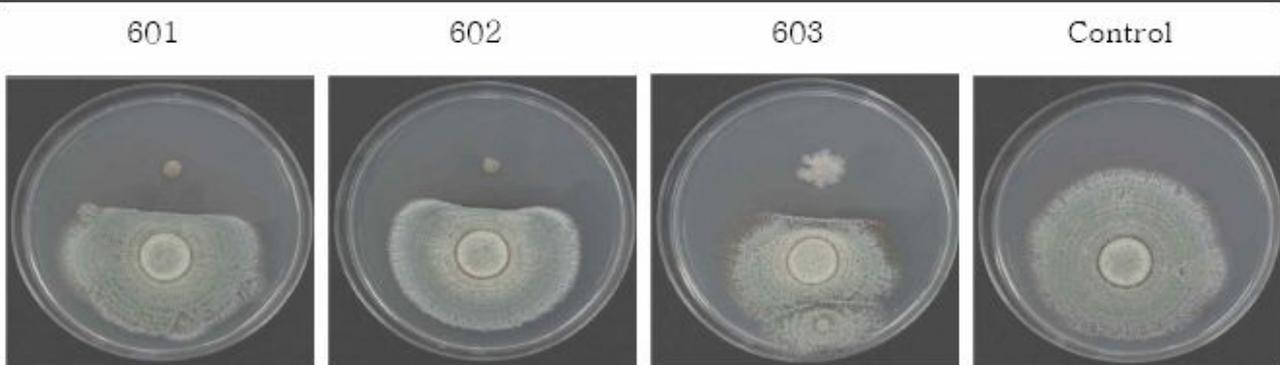


그림 20. Inhibition of mycelial growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* by 3 antagonistic bacteria.

다. 선발된 내생세균의 동정

선발된 603균주의 정확한 동정을 위해 NA 배지 상에서 형태학적 특징을 관찰한 결과, 603균주의 colony의 형태는 undulant round한 cream 색으로 관찰되었으며, 그람 염색 후 광학현미경($\times 400$)하에서 그람 양성의 간균 형태를 보였다(그림 21). 49가지의 탄수화물의 발효 여부를 통하여 *Bacillus*속을 동정하는 API 50 CHB kit을 이용하여 분석한 결과 유용 길항미생물제제의 소재로 가장 널리 사용되고 있는 *Bacillus*속과 유사한 특성이 확인되었다(표 7). 좀더 정확한 동정을 위하여 분자생물학적 분석을 위하여 *gyrA-f* / *gyrA-r*로 염기 서열 분석을 수행하고(Chun *et al.*, 2000), 유사도를 확인한 결과 *B. velezensis*와 99.9%의 높은 유사도를 보였다(그림 22). 최근 연구에서 *B. amyloliquefaciens*와 표현형과 유전형이 유사한 *B. velezensis*를 *B. amyloliquefaciens*의 분류학적 이명으로 보고한 바 있으나(Wang *et al.*, 2008), 603균주는 형태학적, 생화학적 특성 및 분자생물학적 분석에서 *B. velezensis*와 높은 유사도를 보였으므로, 최종적으로 *B. velezensis*로 동정하고 *Bacillus velezensis* 603로 명명하였다.

미생물농약으로 가능성 있는 연구 재료로 *Bacillus* spp.는 높은 내생포자 생성률과 UV, 열, 유기용매, 건조 등의 악조건에서도 저항성을 가지며 생존이 가능함에 따라 높은 잠재성을 가진 균주로 많이 연구되어왔던 균주이다. 본 연구에서 선발된 *B. velezensis* 또한 이러한 제형화나 제제화에 유리한 특성을 가지고 있음에 따라 추후 생물농약으로서의 적용 시 많은 장점을

가지고 있을 것으로 판단된다.

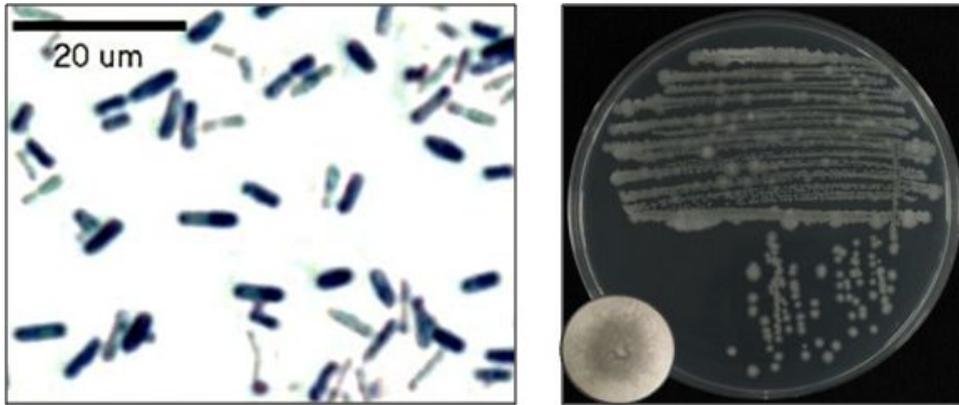


그림 21. Optical micrograph of bacterium 603 with Gram reaction (left) and colony morphology (right).

표 7. Morphological, biochemical and carbohydrates fermentation characteristics using API 50 CHB kit of 603 isolate

Characteristic		Characteristic	
Physiological property		Sorbose	- Trehalose +
Colony morphology	Undulant round, cream	Rhamnose	- Inulin -
Cell shape	Rods	Dulcitol	- Melezitose -
Gram reaction	+	Inositol	+ Raffinose -
Carbohydrate		Mannitol	+ Starch -
Glycerol	+	Sorbitol	- Glycogen -
Erythritol	-	Adonitol	- Xylitol -
D-arabinose	-	Galactose	+ Gentiobiose -
L-arabinose	+	Glucose	+ D-turanose -
Ribose	+	Amygdalin	+ D-lyxose -
D-xylose	-	Arbutin	+ D-tagatose -
L-xylose	-	Esculin	+ D-fucose -
Methyl-B-D-xylopyranside	-	Salicin	- L-fucose -
Methyl- α -D-mannopyranside	-	Cellobiose	+ D-arabitol -
Methyl- α -D-glucoside	+	Maltose	+ L-arabitol -
N-acethyl-glucosamine	-	Lactose	+ Gluconate -
2-keto-gluconate	-	Melibiose	- Fructose +
5-keto-gluconate	-	Sucrose	+ Mannose -

+, Positive; -, negative.

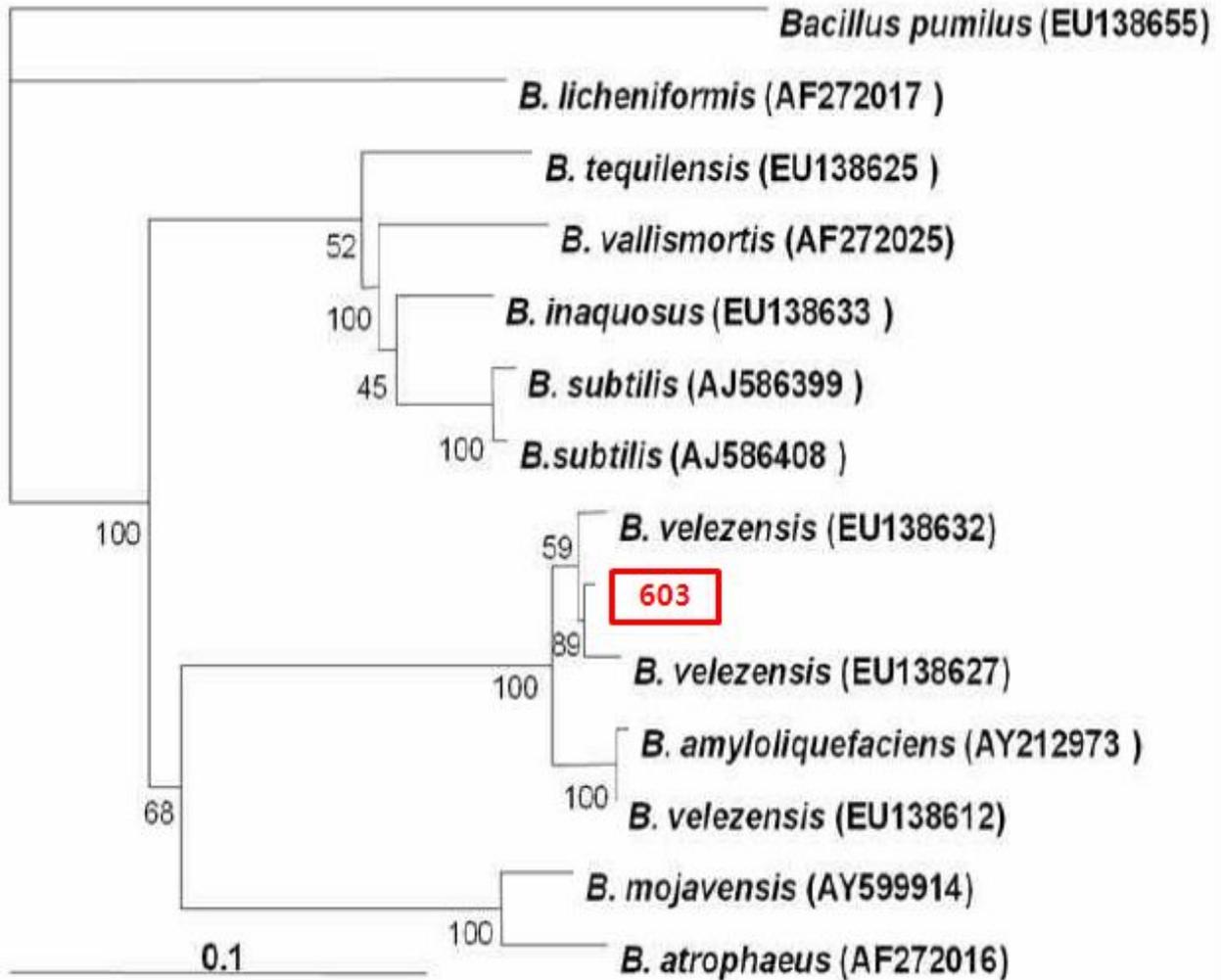


그림 22. Phylogenetic tree based on *gryA* gene sequence comparison showing the position of 603 isolate among related species of the genus *Bacillus*.

라. 선발된 길항 내생세균의 항균활성 기작

대치배양에 의해 603균주에 의해 생육이 억제된 *P. digitatum*의 균사 선단부를 현미경으로 관찰한 결과, 이상 균사의 모습이 관찰되었다(그림 23).

603균주와 유사한 관계에 있는 균주 *B. amyloliquefaciens*로부터 항균기작을 조사한 결과 균사체의 이상팽윤 증상과 이상비대 증식, 용균 현상을 확인된 바와 유사하게 본 균주에서도 대부분의 균사는 비정상적인 균사를 보였고 균사의 팽윤 현상과 용균 현상을 나타내어 기존 보고와 유사한 항균기작이 확인되었고, 특히 용균 현상에 의한 비정상적인 생장이 강하게 나타났다.

일반적으로 길항세균에 의해 저해되는 식물 병원균은 균사의 팽윤, 용균, 비대증식, 세포벽 분해, 세포막 분해 등의 현상으로 인해 정상적인 생장이 억제되는데, 본 연구에서 사용한 길항세균 603균주에서도 이런 항균 기작들이 고루 나타났으며, 특히 강력한 용균 현상이 확인되었다.

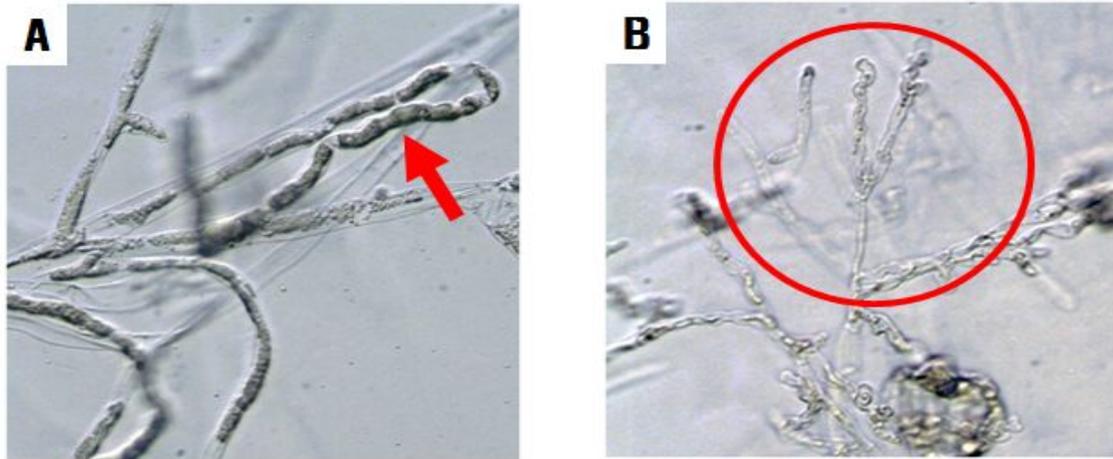


그림 23. Antagonism of *P. digitatum* in opposite culture with 603 on PDA.
A: Mycelial swelling, B: Cell lysis.

마. 길항 내생세균의 최적 배양 조건 탐색

선발된 5가지의 배지에서 603균주의 생육정도를 비교한 결과, 24시간 배양 후의 수치에서 널리 이용되고 있는 세균 배양용 배지 Nutrient broth에서 보다 molasses broth에서 월등하게 높은 수치가 확인됨에 따라 molasses broth에서의 효과적인 균 생육이 관찰되었으며, 특히 molasses broth에서 12~24시간 사이에 폭발적인 균 생육을 보이며 효과적인 균 생육이 관찰되었다(그림 24). 또한 최적의 성장을 보인 초기 pH 4~9범위로 조절한 molasses broth에서의 균 생육을 관찰한 결과, 산도가 높은 pH 4~5에서 거의 생육하지 못했으며 알카리성이 높아진 pH 9에서도 정상적인 생육은 미약했다. 한편 pH 6~8의 중성 범위에서 균 생육이 활발하게 일어났으며, 특히 pH 6에서 가장 생육이 우수하였다(그림 25). 본 실험 결과를 통하여 초기 pH 6의 molasses broth를 603균주를 상업적으로 생산하기 위한 대량 배양의 최적 조건으로 결정하였다.

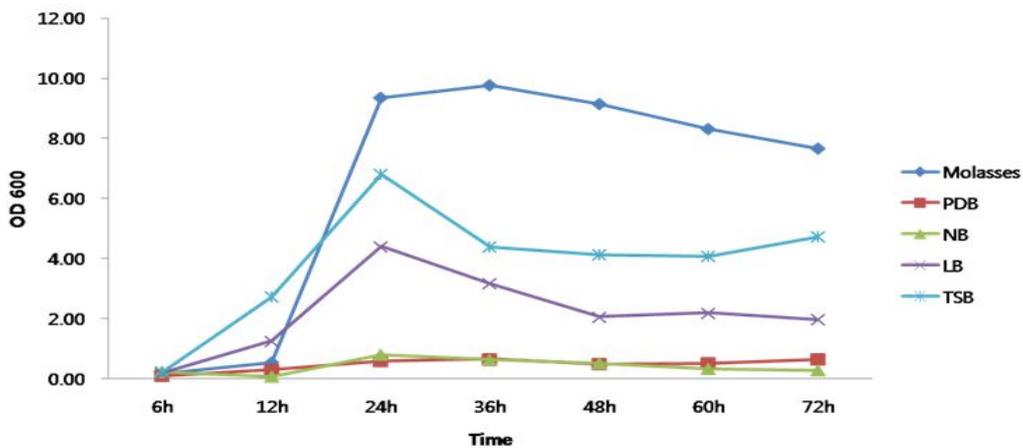


그림 24. Propagation of 603 isolate in five broth media (Molasses; Molasses Broth, PDB; Potato Dextrose Broth, NB; Nutrient Broth, LB; Luria-Bertani Broth, TSB; Tryptic Soy Broth).

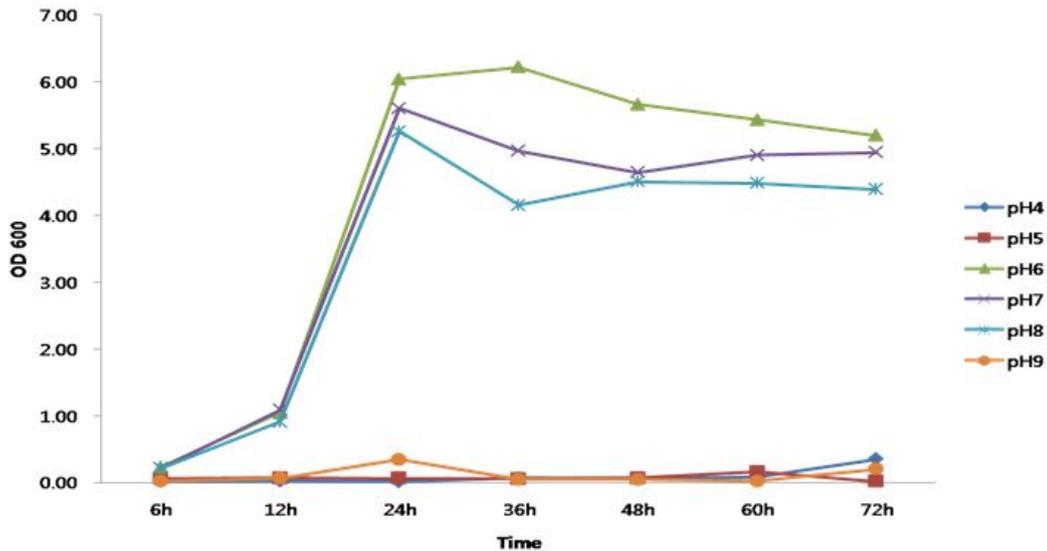


그림 25. Change of propagation of 603 isolate according to the initial pH of Molasses broth medium.

4. 미생물 농약으로 이용 가능한 유용세균의 추가 선발 및 동정

가. 유용세균의 추가 선발 및 동정

다양한 기주로부터 유용 내생균을 분리하여 저장병 방제에 더욱 효과적인 균주를 분리하고자 추가적으로 citrus 외 다른 식물체로부터 내생균 분리를 수행하였다. 분리한 내생세균과 주요 저장병원균인 *P. digitatum*, *P. italicum*을 PDA배지 상에서 대치배양을 실시하여 항균활성을 갖는 유용균주를 1차 선발하여 벼로부터 분리된 RB2균주가 선발되었다. RB2균주는 NA 배지 상에서 round, ivory, glossy한 colony의 형태를 보였으며, 그람 염색 후 광학현미경($\times 400$)하에서 관찰한 결과, 그람 음성의 간균 형태가 관찰되었다(그림 26). 생화학적 특성을 API 20 NE kit을 이용하여 분석한 결과 근래 유용 길항세균으로 주목받고 있는 *Burkholderia*속과 유사한 생리학적, 생화학적 특성이 확인되었다(표 8). RB2균주의 16S rDNA를 분석한 결과 *Burkholderia vietnamiensis*와 99.9%의 유사도를 보였다(그림 27A). 그러나 16S rDNA 분석 결과는 *Burkholderia cepacia* complex와의 유사도가 매우 높아서 *Burkholderia*속내 종 간에 더 정확한 균 동정이 가능한 *recA* 유전자의 염기서열 분석을 실시하였고, *recA* 유전자의 염기서열을 분석한 결과에서도 *B. vietnamiensis*와 98.3%로 가장 높은 유사도를 보였다(그림 27B). 또한 기타 형태학적, 생화학적 특성에서도 유사한 결과를 보였으므로 RB2를 *B. vietnamiensis*로 동정하고 *Burkholderia vietnamiensis* RB2로 명명하였다. *B. vietnamiensis*가 포함되는 *Burkholderia cepacia* complex내의 세균 중 일부는 섬유성 낭포증 환자의 폐에 침입하는 기회감염성 인체 병원균으로 알려져 있음에도 불구하고 인체에 무해한 일부 균주는 농업적·의학적인 관점에서도 매우 높은 잠재성을 가진 미생물체제로 농업분야에서 지속적인 관심을 끌고 있다. 특히 이 그룹 중 *B. cepacia*의 경우 미생물 살균제나 종자처리제로서 개발되어 시판되고 있으며 *B.*

*vietnamiensis*의 경우 질소고정과 불용성 인 분해를 통한 유용 미생물로서의 가능성, 종자 처리제로서의 가능성 정도만 보고된 바 있으므로 다양한 방법의 방제제로서 연구 가능성을 보인다(Miche *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2010).

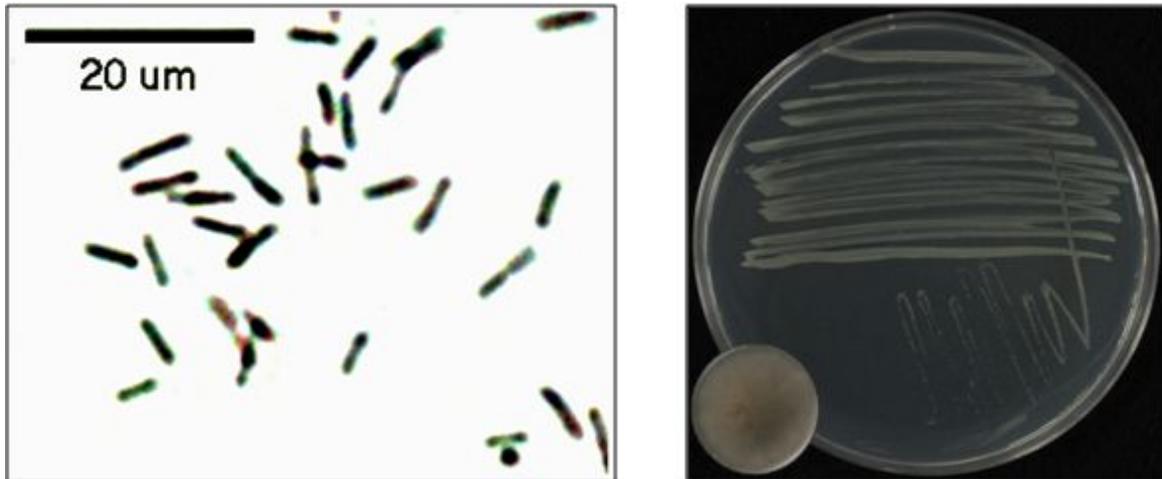


그림 26. Optical micrograph of antagonism bacterium RB2 with Gram reaction (left) and colony morphology (right).

표 8. Morphological, biochemical and physiological characteristics using API 20 NE kit of RB2 isolate.

Characteristic		Characteristic	
Morphological property		Carbohydrate fermentation	
Colony morphology	Round, glossy, Ivory	D-glucose	+
Cell shape	Rods	L-arabinose	-
Gram reaction	-	D-mannose	+
Reaction		D-mannitol	+
Reduction of nitrates to nitrites	+	N-acetyl-glucosamine	+
Indole production	-	D-maltose	-
Fermentation (glucose)	-	Potassium gluconate	+
Arginine dihydrolase	-	Capric acid	+
Urease	-	Adipic acid	-
β -glucosidase	+	Malic acid	+
Protease	+	Trisodium citrate	+
β -galactosidase	+	Phenylacetic acid	+

+, Positive; -, negative.

나. 선발된 길항 내생세균의 항균활성 기작

RB2균주와의 대치 배양에 의해 항균활성이 나타나는 부위를 현미경 상에서 관찰한 결과 항균활성을 보이는 대부분의 균사에서 생장이상이 나타났으며, 균사 선단부 및 균사체에 이상팽윤 증상과 이상비대 증식을 보이며 용균 현상도 관찰되었다(그림 28). 이런 비정상적인 균사가 발생함으로 RB2균주가 *P. digitatum*에 대하여 항균활성을 보이는 것으로 확인되었다.

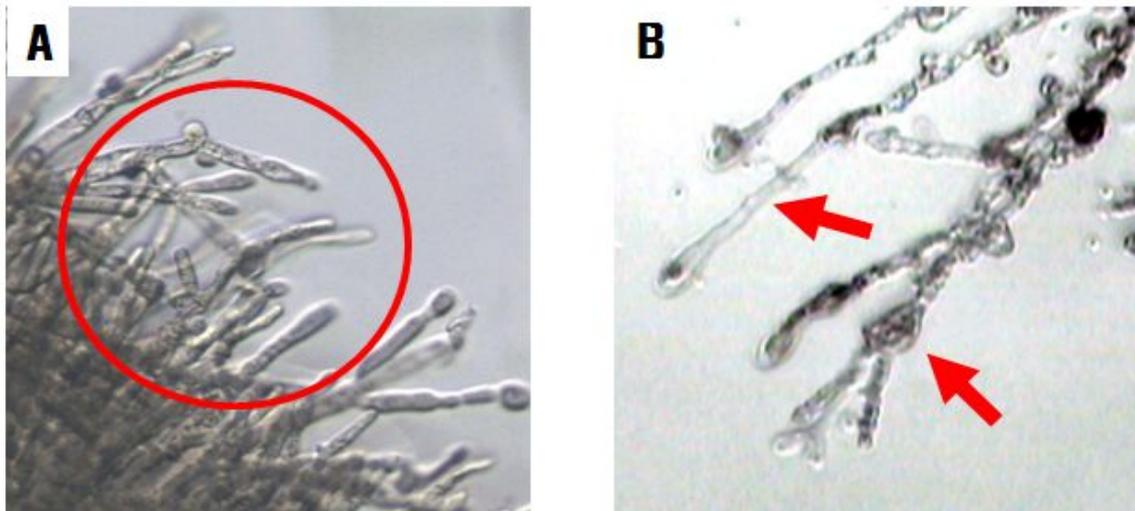


그림 28. Shapes of irregular mycelia of *P. digitatum* in opposite culture with RB2 on PDA. A: Inhibition of mycelial growth, B: Mycelial swelling and cell membrane lysis.

다. 길항 내생세균의 최적 배양 조건 탐색

세균 배양에 일반적으로 널리 사용되는 LB broth, NB, TSB, PDB, Molasses broth를 이용하여 배양시간대 별로 흡광도를 측정하여 균 생육정도를 비교한 결과 초기 성장속도는 저조했을지라도, 36시간 이후부터는 molasses broth에서의 균 생육이 가장 우수하였고 48시간에 molasses broth에서 PDB broth보다 8배 이상의 OD값 수치를 보이며 매우 활발한 생육하였다.(그림 29). 주로 자당(sucrose) 성분으로 구성된 molasses broth는 초기 영양공급이 활발하지 못하다가 일정시간(24시간) 이후로 구성성분이 이용하기 용이한 양분의 형태가 되어 생육이 급격히 빨라진 것이라 판단된다. 그리고 최적의 생장을 보인 molasses broth의 초기 pH를 4~9범위로 조절한 결과, pH 4의 강산에서는 균의 생육이 저조하였으며, pH 5부터 균 생육이 본격적으로 시작되어 pH 8에서 최적의 균 생육이 확인되었다. 그리고 pH 9의 강알칼리 범위에서도 강산과 같이 생육이 불량하였다(그림 30). 이 결과를 통해 RB2의 최적 배양조건은 pH 8의 molasses broth로 결정하여 추후 실험에 이용하였다.

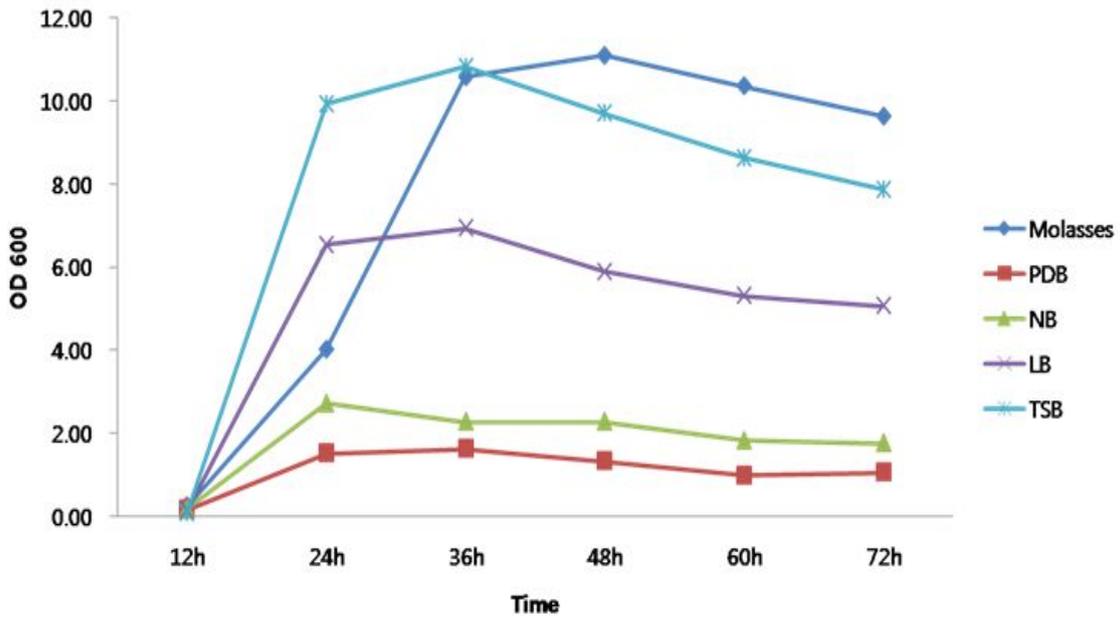


그림 29. Propagation of RB2 isolate in five broth media (Molasses; Molasses Broth, PDB; Potato Dextrose Broth, NB; Nutrient Broth, LB; Luria-Bertani Broth, TSB; Tryptic Soy Broth).

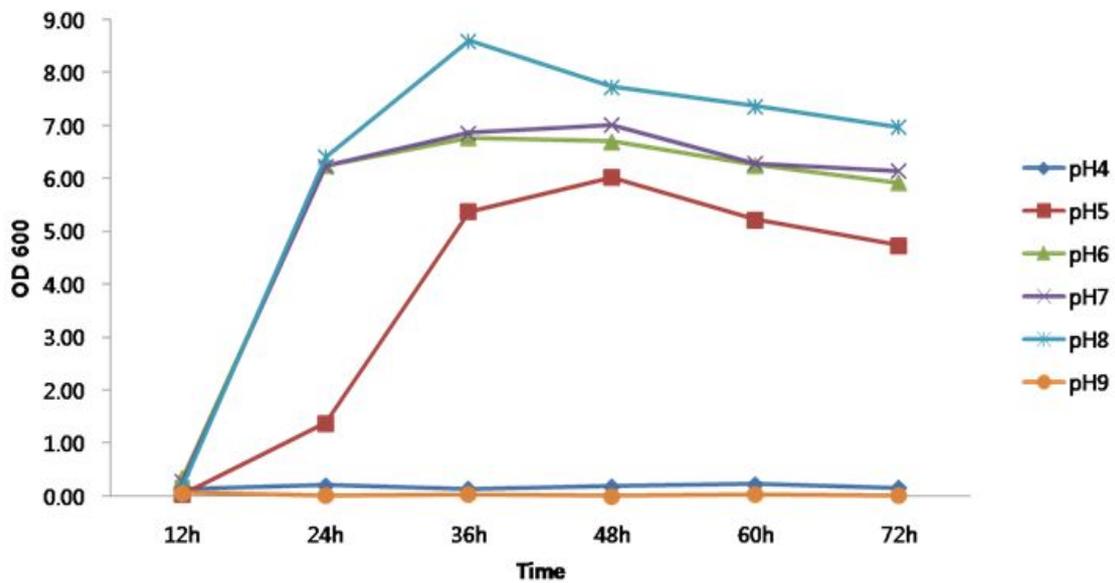


그림 30. Change of propagation of RB2 isolate according to the initial pH of Molasses broth medium.

5. 감귤저장병의 현장평가를 위한 길항미생물의 선정

가. 길항균의 항균 활성 검증

감귤 저장병원균에 대한 보조물질 및 저장병 현장평가 실험을 위하여 *P. digitaum*과 *P. italicum*에 대한 당사에서 보유 및 타사에서 판매하고 있는 길항균의 항균 활성을 검증하였다 (그림 31).

실험에 이용된 길항미생물은 모두 각각의 식물병원균에 대한 길항효과를 나타내어 시판되는 제품에 이용되고 있는 안전성과 안정성이 입증된 *Bacillus*속의 15종류의 제품들을 사용하였다.

실험에 이용된 길항미생물명은 당사의 보안자료이기 때문에 당사의 보안자료 규정에 따라 밝힐 수 없으며, *P. digitaum*과 *P. italicum*에 대하여 항균활성을 나타내는 길항균명만을 제시한다.

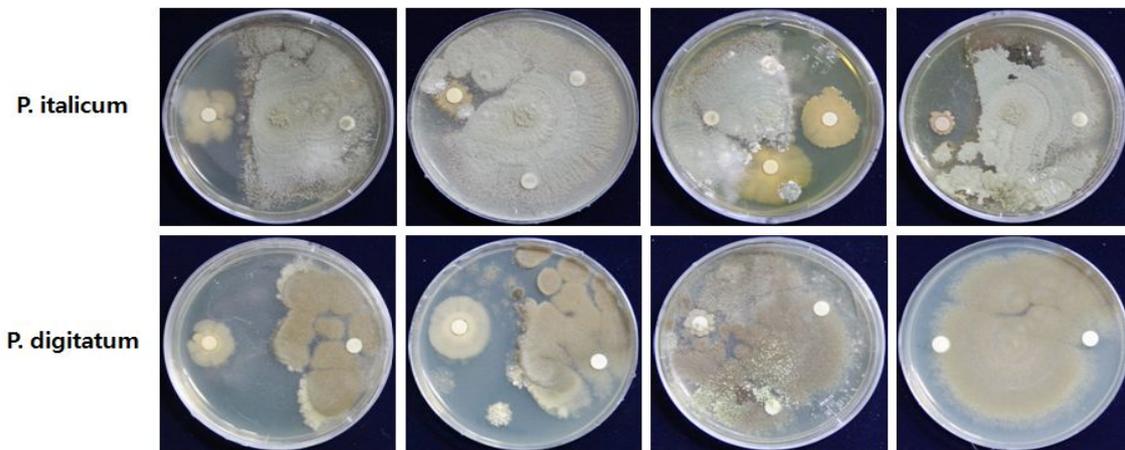


그림 31. Inhibition of mycelial growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* by 15 antagonistic bacterial

실험결과 15종의 세균성 길항미생물 중 *Penicillium digitatum*에 대해서는 세 종의 길항미생물이 항균 활성을 나타냈으며, 이 중 (주)바이오셀드 보유균주 BS87(*Bacillus velezensis*)이 가장 높은 항균활성을 나타내었다. *Penicillium italicum*에 대한 길항 효과 검증결과로서는 *Penicillium digitatum* 결과와 같이 세 종의 길항미생물에서만 항균활성이 검증되었으며, 이 중 BS87과 RK1(*Bacillus* sp.)에서 가장 높은 항균효과가 검증되었다(표 9).

실험결과에 따라 protodioscin과 함께 천연보조물질로서 감귤저장병에 대한 항균효과 검증 및 항균 활성 실험에 이용될 길항미생물은 BS87로 선정되어 제주도에서 현장 실험에 이용되었다.

표 9. Inhibition of mycellial growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* by 15 antagonistic bacterial

<i>Penicillium digataum</i>		<i>Penicillium italicum</i>	
길항미생물	항균 활성	길항미생물	항균 활성
16P5	+	16P5	++
BS87	+++++	BS87	+++++
P30-3	-	P30-3	-
L-13	++++	L-13	+
KJ-13	-	KJ-13	-
RK-1	+++	RK-1	+++++
RK-3	-	RK-3	-
RK-5	-	RK-5	-
BSK-1	-	BSK-1	-
BSK-6	-	BSK-6	-
B3	-	B3	-
S130-3	-	S130-3	-
SNS-2	-	SNS-2	-
P15-1	-	P15-1	-
SI-115-1	-	SI-115-1	-

* (-:promotion, +:1mm 이하, ++:5mm 이하, +++:1Cm 이하, ++++:2Cm 이하, +++++:3Cm 이상)

나. 유용균으로부터 신규물질의 유효성분 분석

항균물질을 생산하는 균주에 대하여 Nutrient Broth에 접종하고 30℃에 3일간 진탕배양한 후, 0.02µm membrane filter를 이용해 균체를 분리한 배양여액을 100% Acetone과 1:3비율로 혼합하여 24시간 보관 후, Rotary Evaporator를 이용하여 농축하여 물질을 분리 및 확인하고자 한다(그림 32).

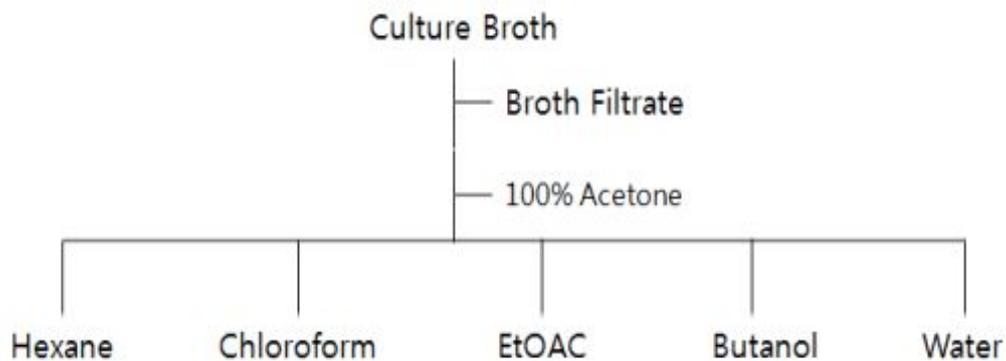


그림 32. Bioassay for antifungal activity of fractions classified by four organic solvent.

다. 길항 내생세균의 활성물질 규명

603균주의 항균활성 물질을 분리하고자 4가지 유기용매 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol를 통한 분획 가운데 butanol층에서 가장 강력한 항균활성이 확인되었고 standard 물질과 비교하여 HPLC를 수행한 결과 iturin A5로 규명되었다(그림 33). 이 또한 정확한 동정을 위해서는 좀 더 다양한 물리·화학적 분석이 요구된다. *Bacillus* 속 균주들은 다양한 항균활성 물질을 분비하며, 그 중 항균활성의 성분으로 많이 보고되고 있는 iturin A는 *Bacillus* 속의 주요한 항균활성 물질로 알려져 있다(Yu *et al.*, 2002; Arrebola *et al.*, 2009). 본 실험에서 얻어진 iturin A5도 동일한 효과를 지니고 있을 것이기에 분리된 603균주는 앞으로 감귤 녹색곰팡이병 뿐만 아니라 다양한 식물병의 방제를 위한 재료로 매우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 추정된다.

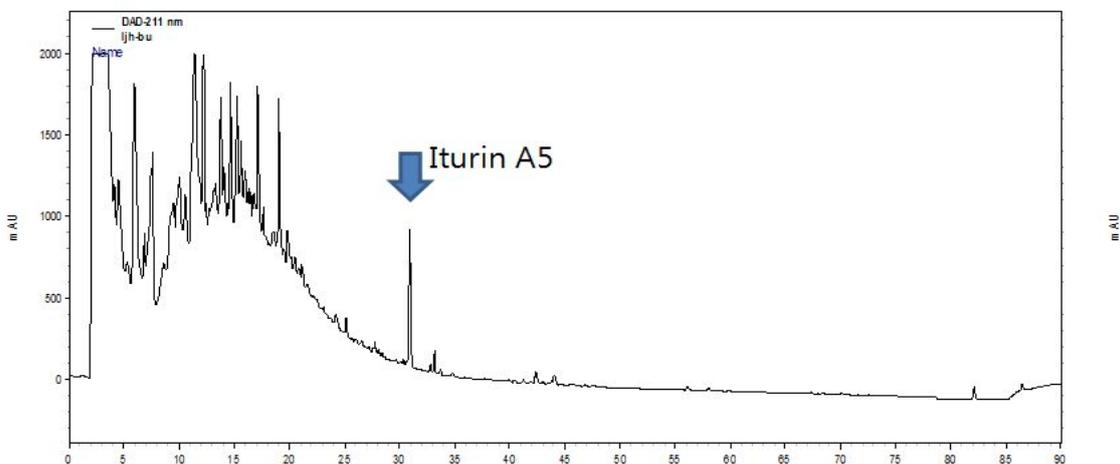


그림 33. HPLC analysis of antifungal activity of the compound produced by 603.

6. 약효증진용 보조제의 탐색

가. 분산제

활성물질은 butanol 층에서 녹으나 물과 완전히 섞이지 않는 성질 때문에 물에 희석하여 뿌릴 경우 물만 분사되거나 정확한 농도로 분사가 되지 않을 경우가 있어 고농도의 활성물질이 분사되면 약해가 발생할 것이라 판단되었다. 또한, 정량의 활성물질을 사용하는 것보다 약량을 줄이고 비슷하거나 오히려 더 강한 항균활성을 보일 수 있는 보조제의 사용을 선택하였다. *In vitro* 검정에서 *P. digitatum*에 대한 항균활성이 없었던 NaH_2CO_3 1,000ppm과 tween 20 1,000ppm, chitosan (MW 300 thousand upper) 1,000ppm이 보조제로 선발되었다.

활성물질과 혼합함으로써 보다 나은 방제효과를 발휘할 수 있을 것으로 판단하여 선발된 보조제로 NaH_2CO_3 과 tween 20, chitosan (MW 300 thousand upper)을 사용하였고, NaH_2CO_3 1,000ppm과 tween 20 1,000ppm, chitosan (MW 300 thousand upper) 1,000ppm 농도로 추출된 유용항균물질과 혼합하여 *P. digitatum*의 생육 억제율을 검정한 결과 항균물질 단독 처리와 큰 차이점을 보이지 않았다(그림 34). 따라서 *in vivo* 검정을 수행할 때 보조제의 혼합이 활성물질의 방제효과에 영향을 주지 않기 때문에 보조제로서의 사용이 가능하다고 판단하였다.

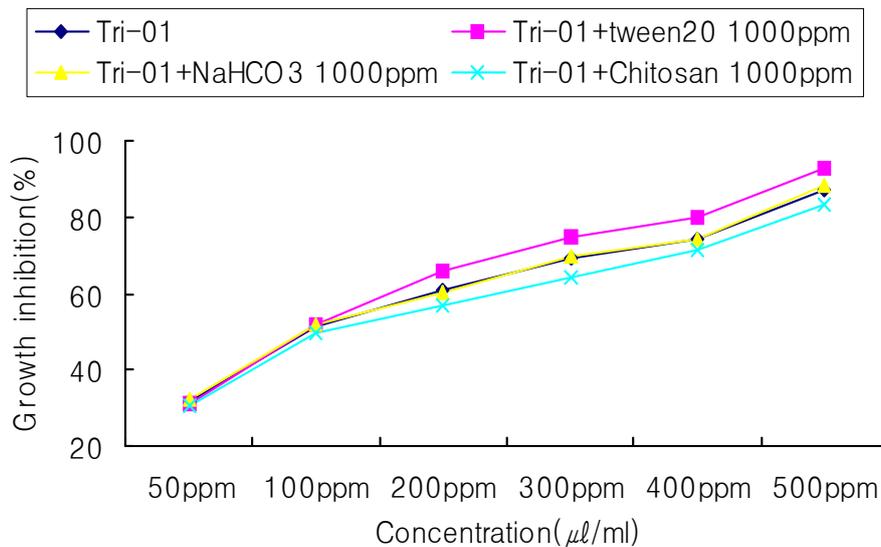


그림 34. Antifungal activities of substances as co-agents against *Penicillium digitatum* on PDA.

나. 점착제

최적 제형은 과실에 살포하였을 때 살포된 유효성분이 과실에 오래 남아 방제효과를 계속 유지될 수 있도록 하는 것이다. 따라서 protodioscin의 방제 효과를 유지시키기 위해 생분해성 접착제인 5종의 부착성 증진제를 첨가하였고, 첨가물이 protodioscin의 항균능력에 영향을 미치는지 확인하였다. 후보 물질로는 CMC, Xanthan gum, Rosin, Glycerol, Starch 이고, 상기 성분들의 점질성을 이용하여 제형화에 적용함으로써, 과실에 적정 농도의 protodioscin이 유지될 수 있도록 점착성을 증가시키고자 하였다.

각각의 부착성 증진제를 DW에 녹여 안정성/점착성이 양호한 10ppm의 농도로 준비하고 protodioscin 역시 DW에 녹여 과실에 처리하는 농도인 200ppm으로 준비한 후 서로 혼합하여 *P. digitatum*과 *P. italicum*이 접종된 PDA배지에서 균사 생장 저해율을 3반복으로 측정하였다.

그 결과 *P. digitatum*에 대한 부착성 증진제가 protodioscin에 미치는 영향은 없는 것으로 보인다. control과 비교했을 때 CMC, Xanthan gum, Rosin은 거의 변화가 없고 Glycerol,

Starch는 약하게 protodioscin의 길항능력이 줄어드는 것을 확인할 수 있다. 특히 xanthan gum이 15.8 mm로 control과 차이가 없었다(그림 35).

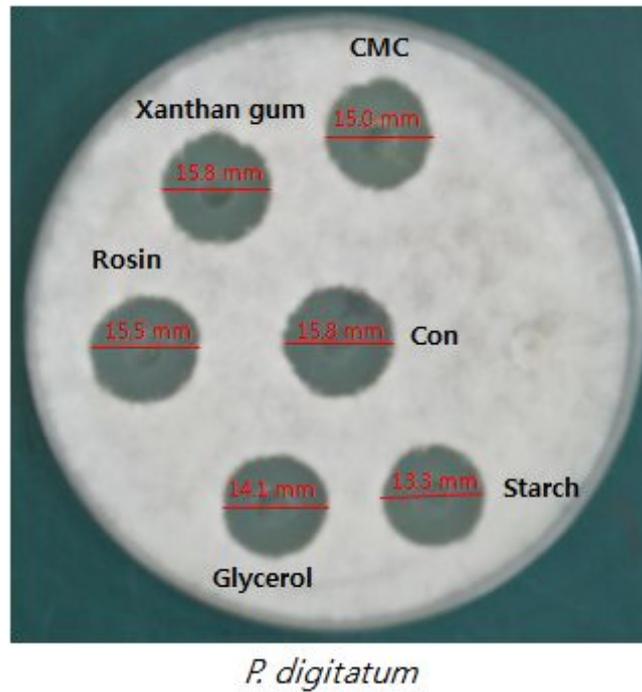


그림 35. Supplements effect on Antifungal activities of protodioscin.

7. 천연물질의 감귤 녹색곰팡이병 방제효과

가. 농도별 방제 효과

시판중인 서귀포 감귤(온주밀감)을 구매하여 활성물질의 방제 효과를 검정하였다. 활성물질 : EtOH : water 1g/1ml/8ml의 비율로 활성물질 제제 stock을 만들었고, 감귤 과실에 살포하기 전에 100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm, 500ppm 농도로 희석하여 농약살포기를 이용하여 격렬하게 흔들어서 섞어준 후 분무하였다. 감귤은 감귤 상자에 15개씩 넣어서 준비하고, *P. digitatum* 균을 접종하지 않고 물질을 처리하였다. 대조약제는 현재 시판되고 있는 벨쿠트와 스포르곤을 각각 1,000배 농도로 희석하여 사용하였다. 감귤은 뚜껑을 덮어 밀봉한 상태로 실온(22°C)에서 10일간 보관한 후 감귤의 녹색곰팡이병에 대한 방제 효과를 조사하였다. 감귤 보관시 온도와 습도를 유지시켜 발병 최적 조건을 만들어 주었으며, 2차례에 걸쳐 3반복 수행하였다.

시판중인 서귀포 감귤을 구매하여 활성물질의 녹색 곰팡이병 방제를 검정한 결과 200ppm 처리구에서 80.1%의 높은 방제효과를 보였고, 300ppm에서 100%의 완벽한 방제효과를 보였다(표 10, 그림 36). 대조약제로 시판중인 벨쿠트, 스포르곤을 사용하여 비교하였을 때 활

성물질의 방제효과가 거의 비슷하여 추후 친환경적인 천연물 농약의 개발에 매우 큰 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

표 10. Control effects against *Penicillium digitatum* by using different concentration of antifungal compound on citrus fruits.

Treatment	Concentration (ppm)	Diseased rate (%)	Control value (%)
Antifungal compound	50	33.3 b	20.1
	100	33.3 b	20.1
	200	8.3 a	80.1
	300	0 a	100
Control	벨쿠트 1000ppm	0 a	100
	스포르곤 1000ppm	6.7 a	83.9
	-	41.7 b	-

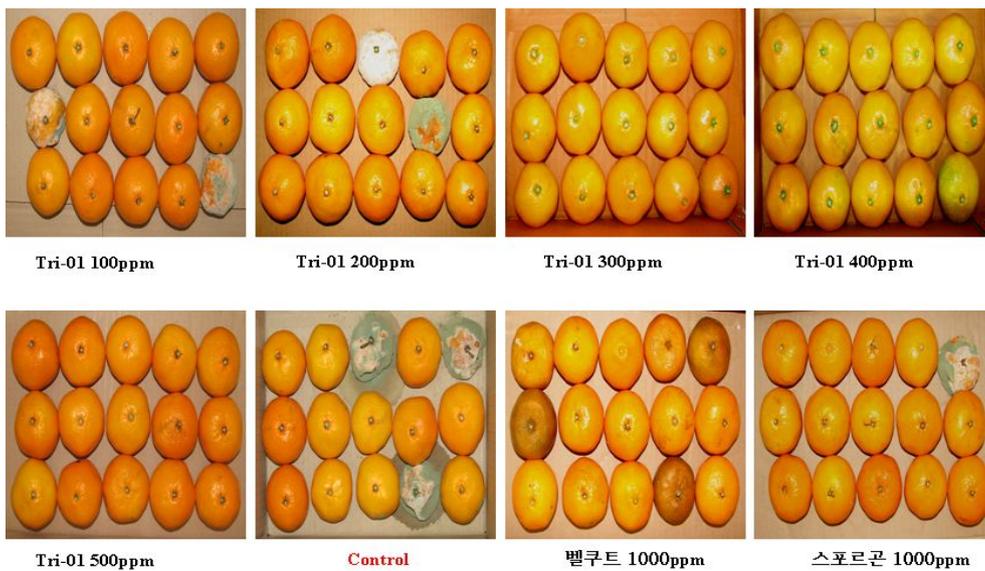


그림 36. Control effects of antifungal compound against *Penicillium digitatum* in storage condition. The citrus fruits were stored at room temperature(22°C).

나. 병원균 접종 후 방제 효과

접종 처리구는 시판중인 서귀포 감귤을 구매하여 방제 효과를 분석하였다. *P. digitatum*을 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 spores/ml의 밀도로 조정 한 후 접종하여 대발생 호적환경을 임의적으로 만들어 주었다. 균 접종 7시간 후, 활성물질을 활성물질 : EtOH : water 1g/1ml/8ml의 비율

로 활성물질 제제 stock (유효 protodioscin 농도 100,000ppm)을 만든 다음 감귤 과실에 살포하기 전에 300ppm, 400ppm, 500ppm 농도로 희석하여 농약살포기를 통하여 분무하였다. 물기가 완전히 마를 때까지 기다린 후 골판지 상자에 넣어 보관하였다. 활성물질 제제는 1회 살포하였으며, 감귤은 1처리구에 15개씩 3반복으로 배치하였다. 실험이 진행되는 동안 습도를 충분히 유지시켜줬고, 22℃ 실온에 보관하여 본 실험에 최적의 조건을 만들었다(Fig. 37).

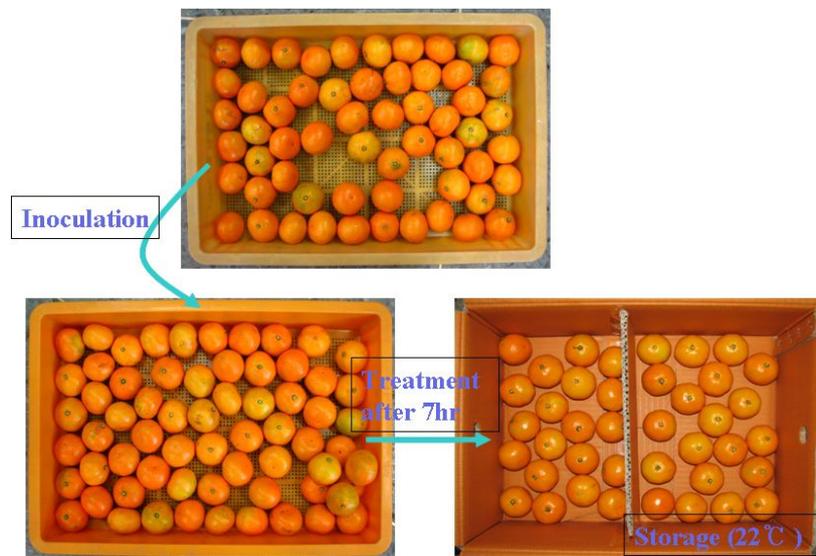


그림 37. Treatment of an antifungal compound after *Penicillium digitatum* inoculation on citrus fruits.

녹색곰팡이병 발생에 호조건을 만들어준 환경에서 활성물질의 병 방제 효과 검정을 위해 수행한 결과 5일째에는 모든 처리구에서 발병이 거의 일어나지 않았고, 특히 500ppm 농도 처리구는 전혀 병 발생이 일어나지 않아 녹색곰팡이 병 방제에 매우 효과적임을 알 수 있었다(표 11, 그림 38).

10일이 지난 후 방제 효과를 조사한 결과 1×10^4 농도로 접종한 처리구는 400ppm에서 70% 정도의 방제 효과를 보인 반면, 500ppm에서는 100%의 매우 높은 방제 효과를 보였다. 1×10^5 균밀도로 접종한 무처리구에서는 46.7% 발병했지만, 500ppm에서는 단지 2.2%만이 발병하여 95.3%의 매우 높은 방제 효과를 확인할 수 있었다(표 12, 그림 39).

이처럼 *P. digitatum* 균을 접종하여 병 발생에 매우 유리하도록 환경을 조성하였음에도 불구하고, 500ppm 농도 처리구에서 매우 높은 방제효과를 보여 추후 이 활성물질을 이용한 친환경적인 감귤 저장병 방제제 개발이 충분히 가능할 것으로 생각된다.

표 11. Control effects of antifungal compound against *Penicillium digitatum* treated with different inoculum density on citrus stored at 22°C, 5 days after inoculation.

Treatment	Concentration (ppm)	Diseased rate (%)	Control value (%)
1×10^3	300	0	100
	400	0	100
	500	0	100
1×10^4	300	4.4	66.9
	400	2.2	83.5
	500	0	100
1×10^5	300	8.9	50
	400	6.7	62.4
	500	0	100
Cont.	1×10^3	2.2	-
	1×10^4	13.3	-
	1×10^5	17.8	-

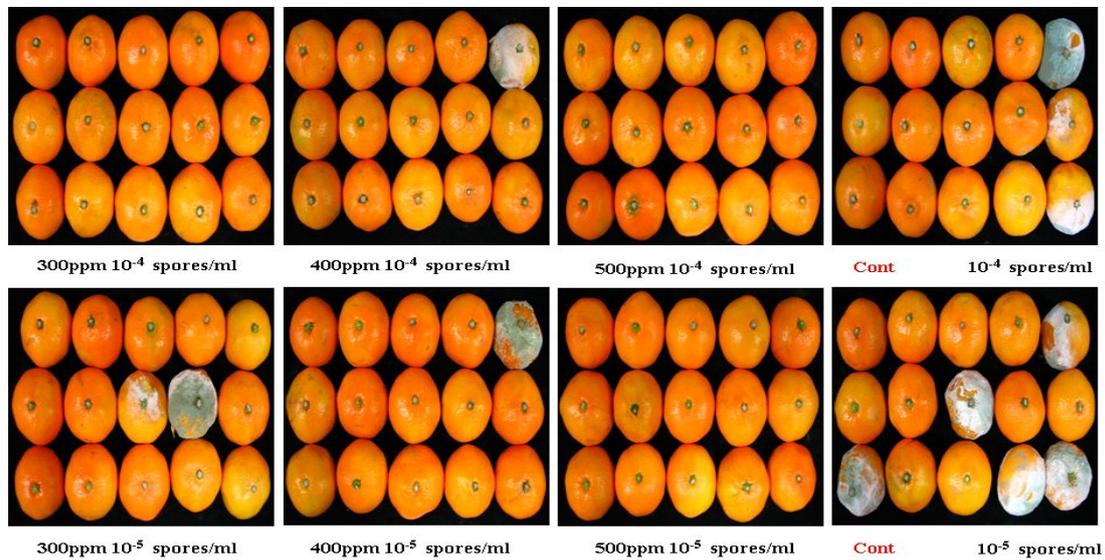


그림 38. Control effects of the antifungal compound against *Penicillium digitatum* treated with different concentration of *P. digitatum* on citrus stored at 22°C, 5 days after inoculation.

표 12. Disease control efficacy of antifungal compound against *Penicillium digitatum* treated with different concentration of *P. digitatum* on citrus stored at 22°C, 10 days after incultation.

Treatment	Concentration (ppm)	Diseased rate (%)	Control value (%)
1×10 ³	300	4.4	75.3
	400	0	100
	500	0	100
1×10 ⁴	300	17.8	52.9
	400	11.1	70.6
	500	0	100
1×10 ⁵	300	24.4	47.8
	400	13.3	71.5
	500	2.2	95.3
1×10 ³	-	17.8	-
Cont. 1×10 ⁴	-	37.8	-
1×10 ⁵	-	46.7	-

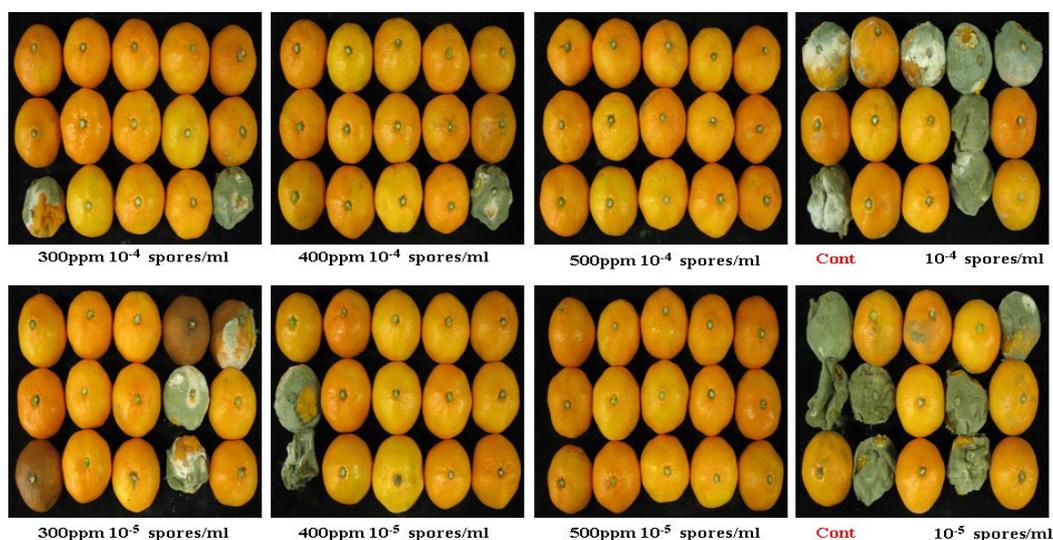


그림 39. Disease control efficacy of the antifungal compound against *Penicillium digitatum* treated with different concentration of *P. digitatum* on citrus stored at 22°C, 10 days after incultation.

다. Protodioscin 고농도 처리에 대한 과실의 육안 약해검정

Protodioscin의 처리농도로 결정된 200ppm의 농도 이상에서의 과실에 대한 약해 유무를 검정하기 위하여 감귤을 멸균수로 3회 헹궈낸 뒤 tray에 넣고 protodioscin을 각각 물 2ml로 녹여

1,000ppm과 배량인 2,000ppm의 농도로 만들고 분무기를 이용하여 감귤 과실에 분무하였다. 3, 5, 7일 후에 달관 조사 방법으로 약해 유무를 검정하였고, 처리구는 3반복으로 수행하였다.

실험결과 7일이 지난 후에도 고농도로 처리하였을 때 발생할 수 있는 과실의 무름, 반점, 탈색 및 당질과 같은 성분의 용탈 등이 일어나지 않아 외관상 약해가 전혀 없음을 확인하였다(그림 40).

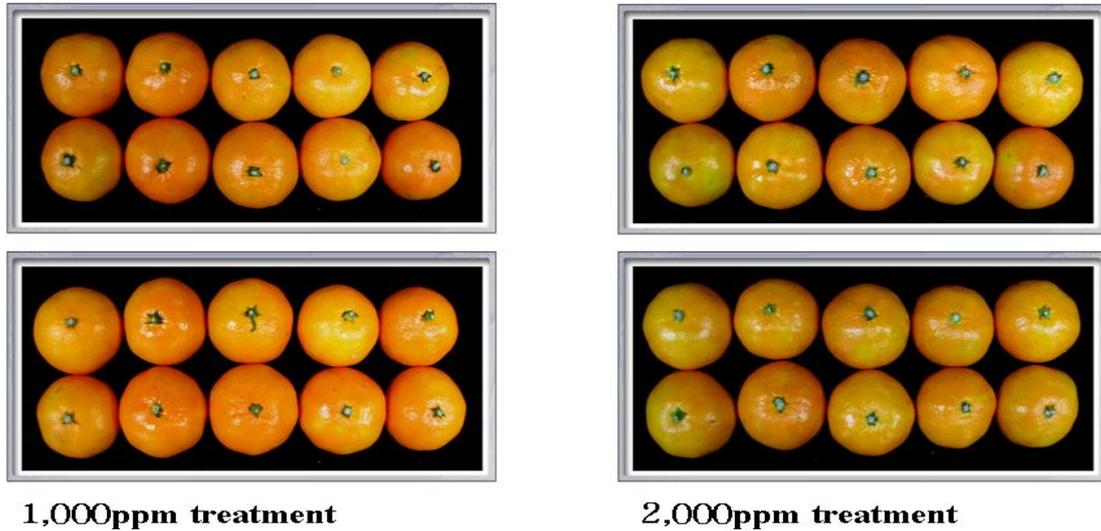


그림 40. Phytotoxicity for citrus of protodioscin 1,000ppm, 2,000ppm treatment.

8. 실내 상처접종 실험을 통한 길항 내생세균의 활성 검정

길항세균 603의 감귤 녹색곰팡이병 방제활성을 검정하기 위해 접종한 감귤에 603균주의 배양여액과 배양액 균주를 처리하였다. 고농도의 감귤 녹색곰팡이병균을 접종한 후 평가되었음에도 불구하고 처리 결과 배양여액에서 55.6%, 1×10^8 cfu/ml 처리에서 66.7%의 매우 실용적인 방제가가 나타났다(그림 41, 표 13). 그리고 RB2균주의 배양여액과 배양액을 처리한 결과, 배양여액 단독 처리에 의해서 53.1%, 1×10^8 cfu/ml 처리시 71.9%에 이르는 방제가가 나타났으며, 1×10^9 cfu/ml 처리시에는 90.6%의 방제가를 보일 정도로 병 발생이 거의 일어나지 않아 녹색곰팡이병 방제에 아주 효과가 좋았다(그림 42, 표 14). 본 실험에서 고농도(1×10^5 spores/ml)의 감귤 녹색곰팡이병균이 상처 접종된 후 방제가를 확인한 결과이므로 자연상태 하에서는 이보다 저농도의 병원균에 노출된다는 점을 고려하여 볼 때 더 뛰어난 방제효과를 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

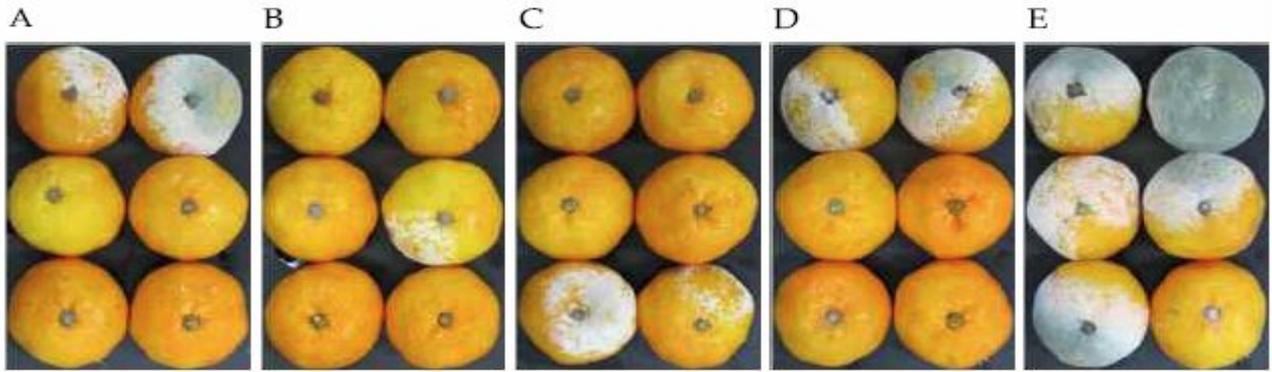


그림 41. Control effect of 603 against *P. digitatum* on citrus at 23 °C, 7 days after artificial inoculation. A; Culture filtrate, B; 1×10^6 cfu/ml, C; 1×10^7 cfu/ml, D; 1×10^8 cfu/ml, E; Control.

표 13. Control effect of 603 with different concentration against *P. digitatum* on citrus at 23°C, 7 days after inoculation.

	Treatment		Disease incidence (DI, %)	Control value (CV, %)
	<i>P. digitatum</i>	603		
1×10^5 spores/ml	Culture filtrate		33.3	55.6
	1×10^6 cfu/ml		31.3	58.3
	1×10^7 cfu/ml		31.3	58.3
	1×10^8 cfu/ml		25.0	66.7
Cont.	1×10^5 spores/ml	-	75.0	-
	-	-	0	-

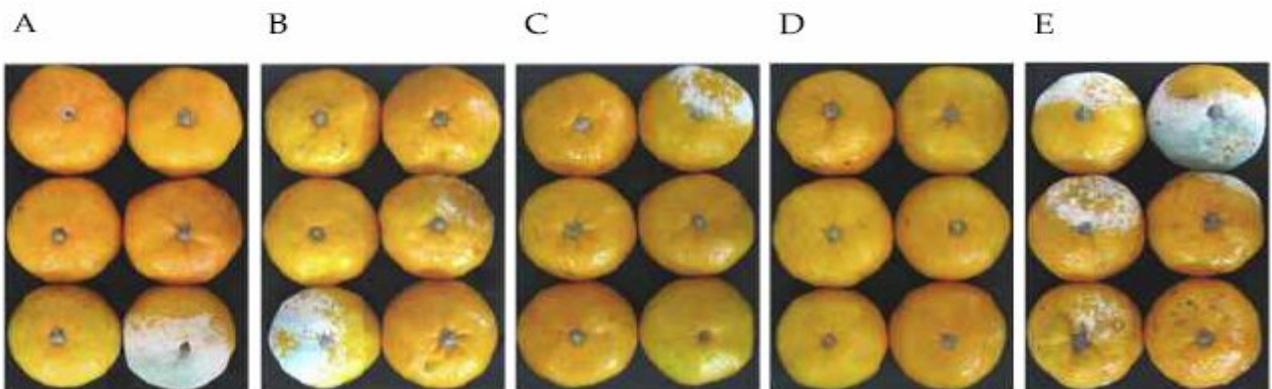


그림 42. Control effect of RB2 against *P. digitatum* on citrus at 23 °C, 7 days after artificial inoculation. A; Culture filtrate, B; 1×10^7 cfu/ml, C; 1×10^8 cfu/ml, D; 1×10^9 cfu/ml, E; Control.

표 14. Control effect of RB2 with different concentration against *P. digitatum* on citrus at 23°C, 7 days after inoculation.

Treatment		Disease incidence (DI, %)	Control value (CV, %)
<i>P. digitatum</i>	RB2		
1×10 ⁵ spores/ml	Culture filtrate	31.3	53.1
	1×10 ⁷ cfu/ml	27.1	59.4
	1×10 ⁸ cfu/ml	18.8	71.9
	1×10 ⁹ cfu/ml	6.3	90.6
Cont.	1×10 ⁵ spores/ml	66.7	-
	-	0	-

9. 다양한 조합을 통한 효과적인 방제 방법

항균성 식물추출물 protodioscin을 길항 내생세균과 혼합 처리 시에도 균주가 안정적으로 생육하는지 확인하고자 최적 배지로 선발된 molasses broth에 100, 250, 500 ppm 농도의 protodioscin과 균주를 혼합 접종 뒤 균주의 OD값을 측정하였다. 603균주이나 RB2균주와의 혼합 처리 시에도 균주는 무처리에 비해 전반적으로 유사한 안정적인 생육을 보였다(그림 43, 44). 이를 통해 protodioscin은 길항세균의 정상적인 생육에 아무런 부정적인 영향을 미치지 않으며, protodioscin과 길항세균간의 안정성이 확인됨과 동시에 추후 실용적 측면에서 병 방제를 위해 이들을 혼합 처리해도 효과적인 방제에 별다른 문제가 없을 것으로 생각되었다.

또한 protodioscin과 *Bacillus velezensis* 배양 여액의 상승효과를 확인하기 위하여 각 농도의 protodioscin을 처리한 후 *Bacillus velezensis*균을 배양하였다. 그림 43에서 표시된 바와 같이 배양 36시간 후 protodioscin과 500 ppm 과 *Bacillus velezensis*를 처리한 균에서는 균주의 생장을 표현할 수 있는 O.D 값이 7.6인 반면 *Bacillus velezensis*만을 배양한 대조군에서는 6.2로 생장이 낮은 것을 확인할 수 있었다. 또한 표 13에서 확인된 바와 같이 미생물 처리 효과와 배양 여액의 처리 효과는 유사한 효력을 지니므로 안전성을 고려하여 배양여액을 사용하였다. 즉 길항미생물 성장력 증가 및 항균력의 증가를 의미하므로 protodioscin을 처리한 *Bacillus velezensis* 성장력 증가는 저장병에 대한 상승효과로 표현 할 수 있을 것으로 사료된다.

603균주의 경우, 배양여액과 식물추출물 100, 250 ppm과의 조성, 603 1×10⁷ cfu/ml과 식물추출물 100, 250 ppm과의 조성으로 혼합 처리하였을 때, 1×10⁷ cfu/ml 농도의 균주와 식물추출물 100 ppm 처리에 의해 69.4%의 높은 방제가가 확인되었다(그림 45, 표 15). 항균활성이 높았던 RB2균주와 항균성 식물추출물 Protodioscin과의 혼합 처리를 통하여 보다 효과적인 감귤 저장병 방제가 가능할 것으로 판단되어 배양여액과 식물추출물 100, 250 ppm의 조성과 RB2 1×10⁸ cfu/ml과 식물추출물 100, 250 ppm 조성으로 혼합 처리한 결과, 배양여액과 protodioscin 250

ppm 혼합 처리에서 93.8%의 아주 높은 방제가가 확인되었다(그림 46, 표 16). 이는 대조 약제로 현재 시판중인 농약 벨쿠트와 스포르곤에 비교하여 동일하거나 그보다 더 효과적이며 혼합 시 보인 강력한 항균 상승효과로 보아 앞으로 감귤 저장병에 대한 유용 친환경 방제제로서 높은 활용 가능성이 기대된다.

본 연구에서 수행한 길항 내생균주와 식물추출물의 혼합 처리는 식물성 정유 계통의 식물추출물에 국한되지 않고 제형화에 더욱 용이한 수용성의 식물추출물 protodioscin과 길항세균과의 새로운 조합을 통한 추후 효과적인 친환경적 감귤 저장병 방제제 개발의 가능성을 갖게 한다. 그리고 현재 우리나라의 친환경 미생물농약의 합격 방제가가 50%에 불과한 점을 고려하여 볼 때 본 실험 결과 얻어진 50~94%의 방제가를 보인 길항 내생 균주 및 식물추출물과 그 혼합은 농업현장에 활용되었을 때 기대 이상의 큰 방제효과를 거둘 수 있을 것으로 판단되며 미생물농약으로서 높은 개발 가능성이 기대된다.

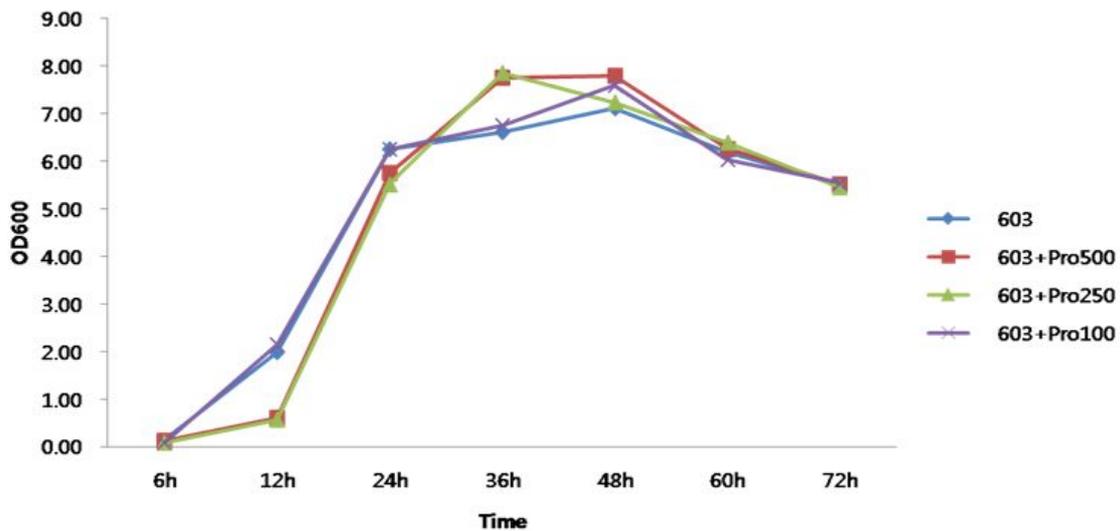


그림 43. Effect of Protodioscin on propagation of *Bacillus velezensis* 603 with and without 100, 250 or 500 ppm protodioscin. 603 indicates *B. velezensis* 603, Pro100 indicates protodioscin at 100 ppm, Pro250 indicates protodioscin at 250 ppm, Pro500 indicates protodioscin at 500 ppm.

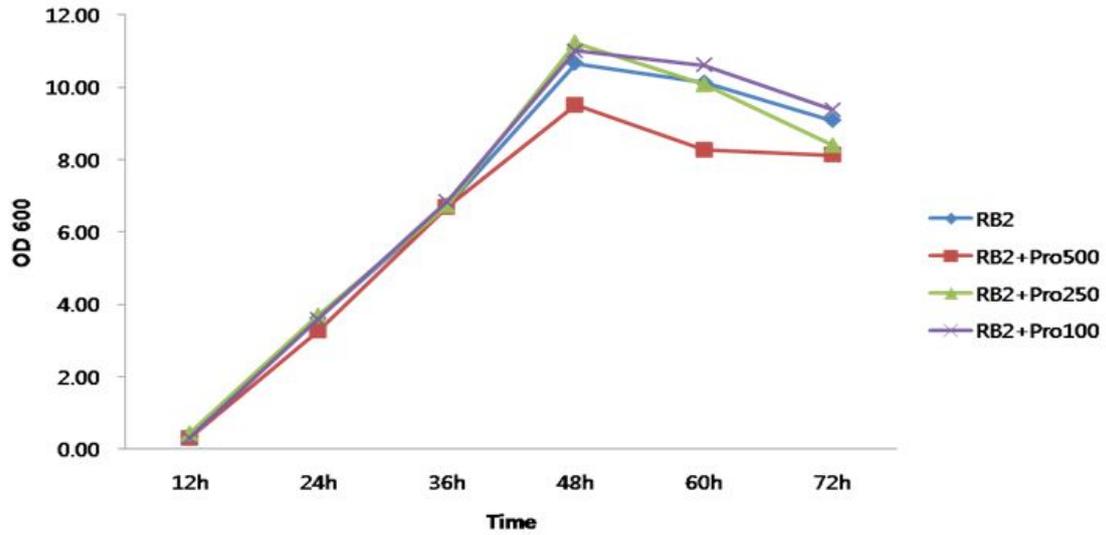


그림 44. Effect of Protodioscin on propagation of *Burkholderia vietnamiensis* RB2 with and without 100, 250 or 500 ppm protodioscin. RB2 indicates *B. vietnamiensis* RB2, Pro100 indicates protodioscin at 100 ppm, Pro250 indicates protodioscin at 250 ppm, Pro500 indicates protodioscin at 500 ppm.

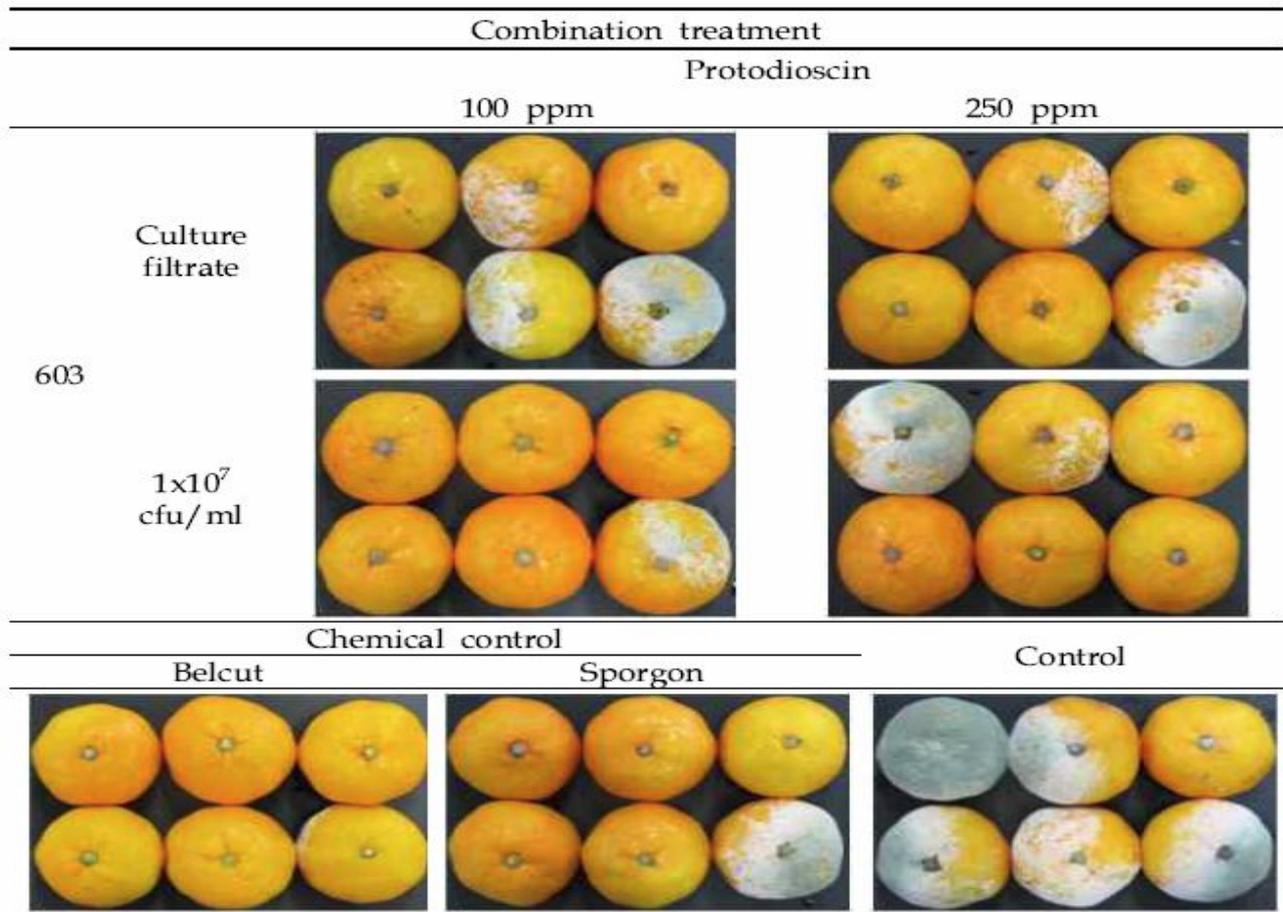


그림 45. Antifungal effect of 603 with protodioscin against *P. digitatum* on citrus at 23 °C 7 days after inoculation.

표 15. Comparison of 603 combined with protodioscin and commercial fungicides against *P. digitatum* on citrus.

Combination treatment		DI(%)	CV(%)
Culture filtrate	Protodioscin 100 ppm	39.6	50.0
	250 ppm	31.3	58.3
1x10 ⁷ cfu/ml	Protodioscin 100 ppm	22.9	69.4
	250 ppm	35.4	52.8
Chemical control	Belcut	6.3	91.7
	Sporgon	14.6	80.7
	Control	75.0	-

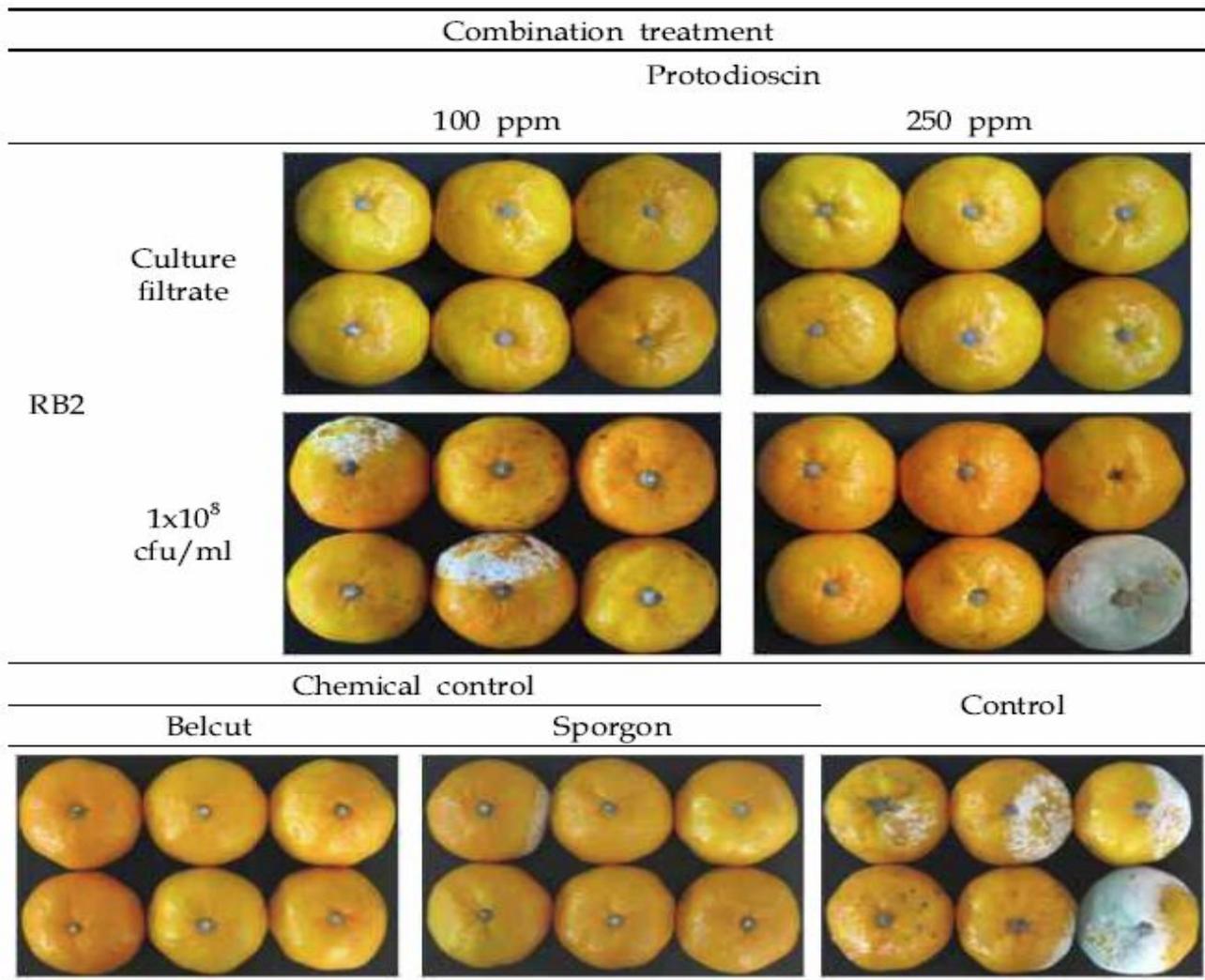


그림 46. Antifungal effect of RB2 with protodioscin against *P. digitatum* on citrus at 23 °C 7 days after inoculation.

표 16. Comparison of RB2 combined with protodioscin and commercial fungicides against *P. digitatum* on citrus.

Combination treatment		DI (%)	CV (%)
Culture filtrate	Protodioscin 100 ppm	8.3	87.5
	250 ppm	4.2	93.8
1x10 ⁸ cfu/ml	Protodioscin 100 ppm	18.8	71.9
	250 ppm	14.6	78.1
Chemical control	Belcut	4.2	93.8
	Sporgon	8.3	87.5
	Control	66.7	-

10. 시제품 제작

추출 및 생산 공정의 적용과 농약 제제로의 개발을 위한 제제 검토를 위하여 시제품 생산을 실시하였다(그림 47). Protodioscin과 *Bacillus velezensis*의 배양여액, 분산제, 점착제를 최적의 비율로 배합하고 정확한 칭량과 수율을 측정하여 생산하였다.

시제품 생산 시 첨가된 물질의 기능은 다음 Table 17 과 같으며 조성비는 Table 18과 같다.

표 17. Function of material used for control agent prototype

조성	기능
Protodioscin	P. digitatum과 P. italicum에 강한 항진균 활성을 지닌 물질
균주 배양 여액	P. digitatum과 P. italicum에 길항작용을 지닌 균체인 <i>Bacillus Velezensis</i> 의 배양여액으로 항진균 활성을 지닌 물질
분산제	농약 살포시 균질성을 유지하고 약해를 방지하기 위하여 사용하며 실험 결과 tween-20이 가장 적합함
점착제	살포 후 약효를 유지하기 위하여 사용하며 측정 결과 xanthan gum이 약효를 저하하지 않고 효율적으로 항진균 활성이 유지됨

표 18. Formulation of Control Agent Prototype (per 20 L)

조성	함량	근거
Protodioscin	4 g	200 ppm
균주 배양 여액 (BS87)	4 ml	1 X 10 ⁹ CFU/ml
분산제 (Tween-20)	20 ml	1000 ppm
점착제 (Xanthan Gum)	20 ug	10 ppm

생산된 시제품은 밝은 갈색을 띠고 있으며 한약재의 냄새가 약간 나며 점성이 거의 없다. 생산된 시제품을 이용하여 현장 대비 실험 및 현장 적용 시험을 실시하였다.



그림 47. Prototype of control agents to environmentally friendly citrus Storage Diseases.

11. 저장병 방제용 천연물농약의 포장적용 시험

2010년 12월 1일 길항균추출물, protodioscin (2,000 ppm)을 6개 나무에 분무기로 살포하고 1주일 후 12월 8일에 수확하여 상온 저장고에 저장하였다(그림 48). 저장용기는 25Kg용 플라스틱 상자를 사용하였다. 이때 대조약제로는 이미녹타던트리스 알베실레이트 수화제(2,000배)를 사용하였다. 길항균추출물과 protodioscin은 (주)바이오셀드에서 제공한 것을 사용하였다.



그림 48. Room temperature storage at Jeju Citrus Research Station

저장 1개월 후 모든 처리구에서 병든과율이 0.5에서 0.7%로써 미미하였으며 처리간 큰 차이가 없었다. 저장 2개월째에도 병든 과율이 0.6에서 1.3%로써 처리간 큰 차이는 없었다(표 19).

또한 식물성 왁스에 혼용하여 과실표면에 코팅함으로써 병 방제 결과를 알아보았다. 코팅 양은 과실 10Kg당 25ml을 코팅하였으며 침지처리는 용액에 과실을 약 30초 동안 침적한 후 풍건시킨 후 25kg용 플라스틱 박스에 옮기고 상온 저장고 속에서 저장 하였다.

결과로써 저장 1개월에는 모든 처리구에서 병든 과실이 크게 발생하지 않았으며 저장 2개월째에는 이미녹타딘트리스알베실레이트수화제 수상처리나 침지처리에서 가장 효과가 좋았다(표 20, 21). 하지만 무처리구에서의 부패율이 높지 않아 정확히 처리간 방제효과를 구명하기에 아직까지 충분치가 않은 것으로 생각된다.

기존 2009년도 감귤시험장 보고서 성적을 보면 저장 2개월, 3개월째에는 녹색곰팡이병이 주류를 이루지만 본 실험에서는 녹색곰팡이병과 푸른곰팡이병 발생이 크게 차이가 나지 않는다. 이는 올해 기온이 낮아 비교적 저온에 강한 푸른곰팡이병이 상대적으로 발생이 많은 것으로 생각된다. 또한 *Penicillium*이외에 병 발생이 상대적으로 많은 데 대부분이 꼭지썩음병이었다(표 22).

통상 저장 2개월째에는 병든과율이 5%정도 발생하지만 금년에는 온도가 매우 낮아 저장 중 병든과실이 적게 발생한 것으로 생각된다(표 23).

표 19. Storage Diseases control efficacy by spraying before harvest.

처 리	병든 과율(%)	
	1개 후	2개월 후
Protodioscin	0.6 ± 0.3	0.9 ± 0.8
길항균추출물	0.6 ± 0.3	1.3 ± 1.2
이미녹타딘트리스알베실레이트수화제(대조)	0.5 ± 0.7	0.6 ± 0.4
무처리	0.7 ± 0.8	0.8 ± 1.2

표 20. Storage Diseases control efficacy By mixing with the fruit surface wax coating.

처 리	병든 과율(%)	
	1 개월	2 개월
Protodioscin +왁스	1.3 ± 0.6	3.7 ± 2.2
길항균추출물 +왁스	0.9 ± 0.6	3.7 ± 2.5
이미녹타딘트리스알베실레이트수화제 수상처리(대조)	0.0 ± 0.0	1.8 ± 1.2
이미녹타딘트리스알베실레이트수화제 침지처리	0.1 ± 0.3	1.4 ± 1.5
물 침지	1.3 ± 1.2	4.8 ± 4.2
왁스	1.0 ± 0.9	3.2 ± 1.5
무처리	0.6 ± 1.0	3.3 ± 2.9

표 21. Distribution rate of fungus on citrus rotting disease after treatment

처 리	저장기간	분포비율(%)		
		녹색곰팡이병	푸른곰팡이병	기타
침지 및	1개월	42.6	16.2	41.2
왁스코팅	2개월	16.0	13.9	70.1
수상살포	1개월	29.5	17.9	52.6
	2개월	7.2	7.1	85.7

표 22. Occurrence rate and type of disease accordance of storage periods

저장 기간	이병과율(%)					기타
	녹색 곰팡이병	푸른 곰팡이병	꼭지 썩음병	잿빛 곰팡이병	검은 썩음병	
30일	2.1	0.3	0.1	0.4	0.1	0.3
60일	8.5	1.2	3.1	0.8	0.6	0.6
90일	23.6	11.4	11.3	2.2	0.9	0.0

※ Citrus stored at farm level (room temperature)

표 23. Climate condition at year 2010 during citrus storage

기간	기 온(°C)		
	평균	최고	최저
2010. 12월	4.5	19.1	-5.2
2011. 01월	-0.1	9.8	-7.7
2011. 02월	2.6	13.8	-7.0

12. 안전성 및 안정성 평가

가. 유효물질의 안전성 및 안정성 확인

1) 식물 추출물의 특성 확인(pH, 열, UV 안정성 및 휘발성)

선발된 천산용 천연추출물의 제형화를 위한 물질 기본 특성을 확인하기 위해 고열·고압, UV, 일광, pH변화에 따른 안전성 등을 조사하였다. 또한 이전 연구에서 식물유래 물질들이 휘발성이 있었던 것을 고려해 휘발성 유무 또한 검정하였다. 고열·고압 처리는 고압멸균기를 이용하였고, UV 처리는 UV light 상에서 24시간 노출시켜 처리하였다. 일광처리는 태양광 아래서 24시간동안 처

리하였고, pH안정성 검사는 수용액의 산도를 산과 염기를 이용해 임의적으로 조절하여 처리하였다. 각각의 처리물질의 활성 변화정도를 확인하기 위해 PDA배지 상에서 대치배양을 통해 확인한 결과 열과 고압, 일광 및 UV, pH 변화에 대하여 안정적으로 활성을 유지하는 것을 확인할 수 있었다(그림 49, 50, 51). 또한 휘발성 확인을 위해 배지의 뚜껑가운데에 물질 50 μ l를 점적한 paper disc를 놓고 배지에 *Penicillium digitatum*을 접종 후 거꾸로 놓아 활성을 검정한 결과 휘발성은 없는 것으로 확인되었다(그림 52). 본 물질은 열, pH, UV 및 광 처리 시에도 활성의 변화가 없었으므로 매우 안정한 구조의 화합물임을 알 수 있었다.

pH, 온도, 광의 영향에도 안정적으로 활성이 유지되는 본 항균활성 물질의 특성은 차후 천연물 농약으로서 이용하기 위한 제품 생산이 가능할 것으로 생각된다. 또한 이 안정성은 제형화 과정에서 강력한 항균활성이 유지가 가능할 것이며, 제품화 된 이후 보관 과정에서도 활성을 잃지 않고 그대로 유지할 수 있어 상당히 긴 유효기간을 가질 것으로 추정된다.

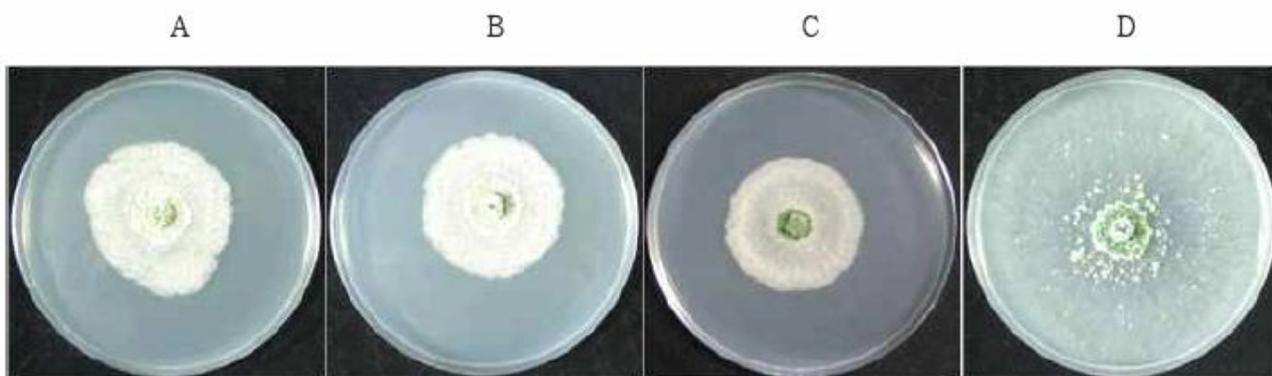


그림 49. Stability of the antifungal compound against UV or day light.
 A: UV treatment, B: Day light treatment, C: Plant extract treatment(positive Cont.), D: Control(No treatment)

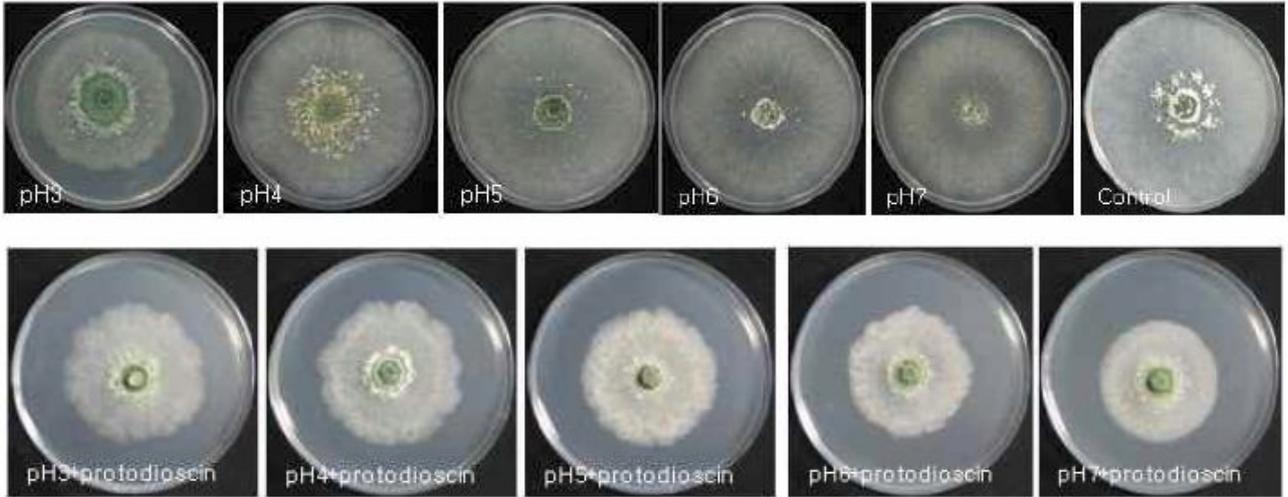


그림 50. Stability of the antifungal compound against *Penicillium digitatum* with different pH in PDA.



그림 51. Stability of the antifungal compound against Heat treatment.

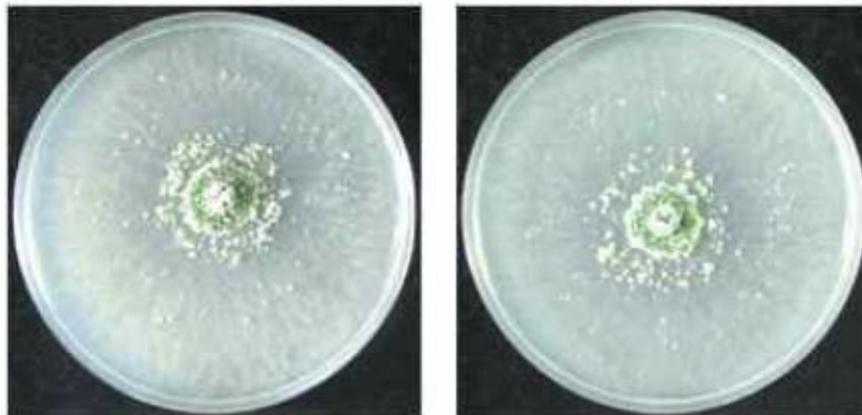


그림 52. Stability of the antifungal compound against volatile.

2) 식물추출 protodioscin과 standard 물질과의 비교

가) pH에 대한 안정성 평가

사업화를 위한 protodioscin의 구입과 물질추출방법의 보완에 따라 protodioscin의 *P. italicum*에 대한 항균활성이 추가로 증명되었다. 이에 따라 항균활성 물질의 pH에 대한 안정성을 알아보기 위하여 PDA 배지의 pH를 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0으로 각각 조절하여 상온에서 *P. digitatum*균과 *P. italicum*을 도말한 후 천산용으로부터 buthanol에 의해 추출한 protodioscin과 시중에서 판매되는 protodioscin(JIAHERB, china)의 100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm, 500ppm, 600ppm, 1000ppm 농도로 paper disc에 접종하여 72시간 이후의 *P. digitatum*과 *P. italicum*의 군사생육 억제 활성을 조사하였다.

pH 2.0과 3.0의 PDA 배지의 제조시에는 강산의 조건으로 인한 배지의 구성이 이루어지지 않기 때문에 두 배수의 agar를 첨가하여 배지를 제조하였으며, 군사생육의 억제활성은 Hiview microscope(걸우트레이딩, korea)를 이용하여 군사생육 활성억제 정도를 거리로 측정하여 환산하여 계산하였다(그림 53).

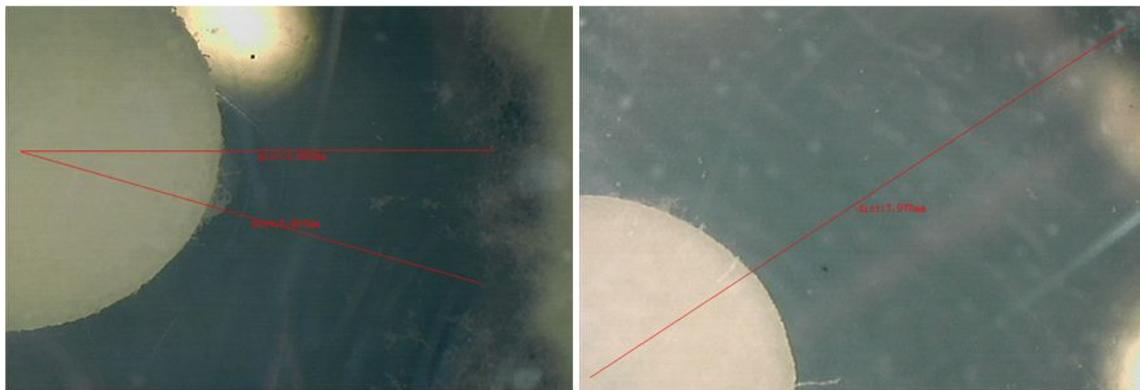


그림 53. Measurement of activity inhibition by protodioscin against *P. digitatum* and *P. italicum*

천산용으로부터 추출한 protodioscin의 *P. digitatum*에 대한 pH 안정성 실험결과 그림 9와 같이 강산의 조건인 pH2의 처리조건에서는 대조군에서도 52%의 생육저해 효과가 나타나고 있으나, pH 4이상부터 안정적으로 활성이 유지되고 있으며, 천산용으로부터 추출한 protodioscin 100ppm부터 1000ppm 까지의 처리 구간에서 역시 pH 4 이후 초기 물질의 활성이 유지되어 균 일한 생육저해효과를 유지하였기 때문에 pH에 대한 안정함을 확인할 수 있었다(그림 54).

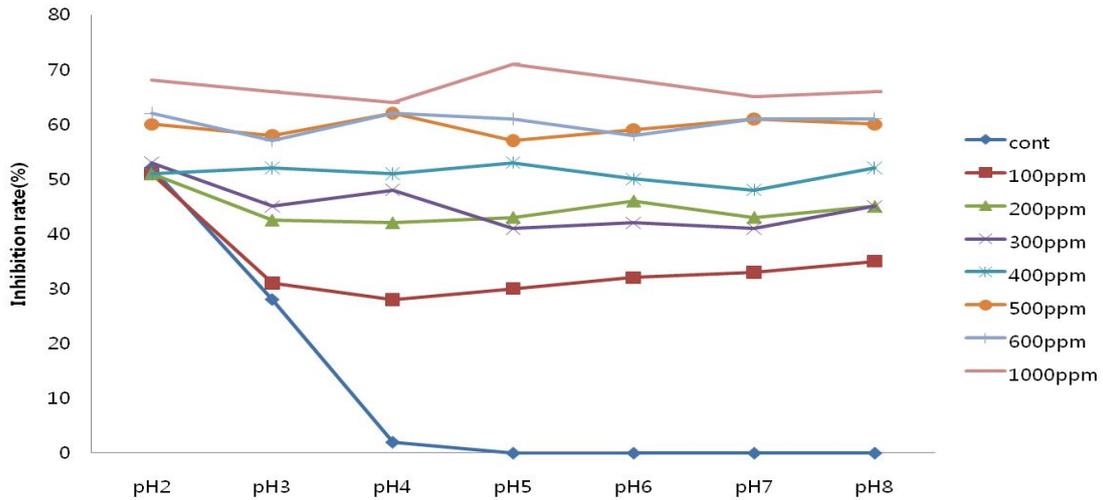


그림 54. pH stability of protodioscin against *P. digitatum* extracted by Bioshield

JIAHERB로부터 구입한 protodioscin의 *P. digitatum*에 대한 pH 안정성 실험결과는 천연물로부터 추출한 protodioscin과 동일한 결과를 나타내었다. 실험결과 그림 10과 같이 강산의 조건인 pH2의 처리조건에서는 대조군에서도 53%의 생육저해 효과가 나타나고 있으나, pH 4이상부터 안정적으로 활성이 유지되고 있으며, 천산용으로부터 추출한 protodioscin 100ppm부터 1000ppm 까지의 처리 구간에서 역시 pH 4 이후 초기 물질의 활성이 유지되어 균일한 생육저해 효과를 유지하였기 때문에 protodioscin의 pH에 대한 안정함을 확인할 수 있었다(그림 55).

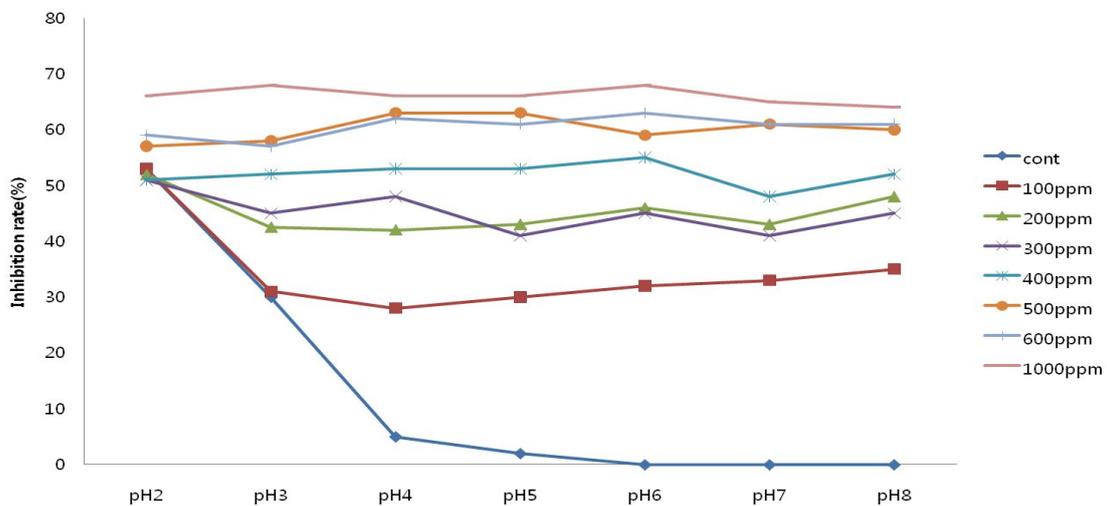


그림 55. pH stability of protodioscin against *P. digitatum* extracted by JIAHERB

천산용으로부터 추출한 protodioscin의 *P. italicum*에 대한 pH 안정성 실험(그림 56) 및 JIAHERB로부터 구입한 protodioscin의 *P. italicum*에 대한 pH 안정성 실험결과(그림 57) 위의 실험인 *P. digitatum*의 pH 안정성 실험결과와 같이 protodioscin의 각각의 농도별에서 균일한 생육저해효과를 유지하였다.

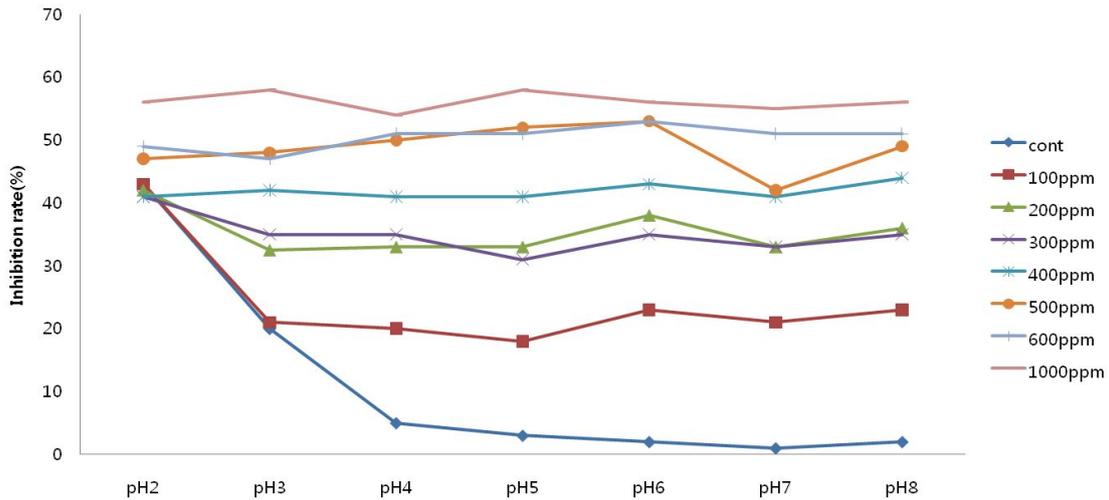


그림 56. pH stability of protodioscin against *P. italicum* extracted by Bioshield

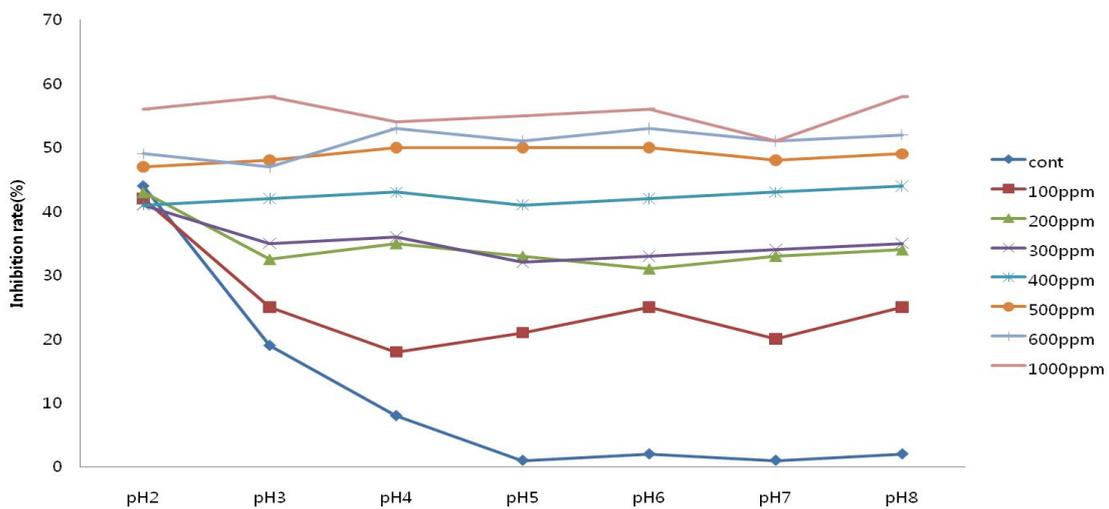


그림 57. pH stability of protodioscin against *P. italicum* extracted by JIAHERB

각각의 pH에 대한 천산용 부탄을 추출물인 protodioscin의 안정성 평가 결과 및 JIAHERB로부터 구입한 protodioscin의 100ppm부터 1000ppm까지의 농도별 평가결과 강산의 조건인 pH 2 및 pH 3에서는 대조군에서도 *P. digitatum*과 *P. italicum*에 대한 활성저해효과가 나타나 강산의 조건에서는 *P. digitatum*과 *P. italicum*의 pH에 대한 억제효과를 최대 52%, 42% 나타내었으며, 중성의 조건으로부터는 억제효과를 균일하게 유지하였다. 또한 각각의 pH에 대한 protodioscin의 농도별 실험수행결과 역시 초기의 활성이 유지되는 결과를 확인하여 protodioscin의 pH에 대한 안정성을 입증할 수 있었다(그림 58).

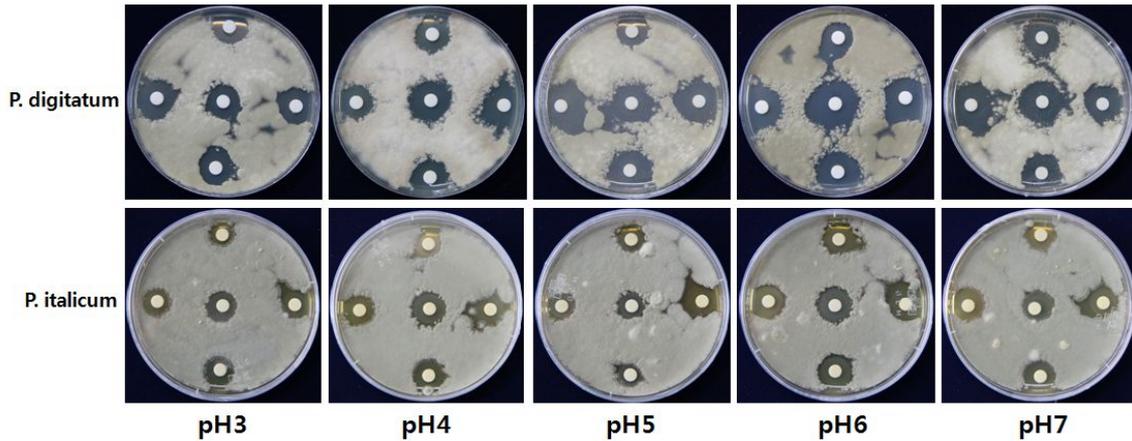


그림 58. pH stability of protodioscin against *P. digitatum* and *P. italicum*

나) 열처리에 대한 안정성 평가

항균활성 물질인 protodioscin의 열에 대한 안정성을 알아보기 위하여 JIAHERB로부터 구입한 protodioscin을 멸균조건인 121℃에서 15분간 방치하여 열에 의한 외부적 및 내부적 안정성을 평가하였다. 실험방법은 상온에서 *P. digitatum*균과 *P. italicum*을 도말한 후 protodioscin(JIAHERB, china)의 50ppm, 100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm 농도로 paper disc에 접종하여 72시간 이후의 *P. digitatum*과 *P. italicum*의 균사생육 억제 활성을 측정하였다.

Protodioscin의 열처리 후의 외부적 변화를 평가한 결과 천산용으로부터 추출한 protodioscin과 JIAHERB로부터 구입한 protodioscin 모두 열처리 후 농도의 증가에 따라 색이 짙어지 변화를 나타내었으며, 냄새 또한 짙어져 흡사 약재의 냄새를 나타내어 열처리에 따른 protodioscin의 변화 가능성을 나타내었다(그림 59).

JIAHERB로부터 구입한 protodioscin의 열처리 후 항균능력 실험결과 200ppm 이상의 protodioscin의 농도에서 열처리한 샘플과 비열처리한 샘플간의 항균능력이 유사하나 상대적 저농도인 50ppm, 100ppm의 경우 열처리시 *P. digitatum*균에 대한 항균활성이 4.5%로서 87.5%의 항균활성이 저해되는 결과를 확인하였으며(그림 60), *P. italicum*에 대한 실험결과 *P. digitatum*균에 대한 열처리 안정성 실험 결과와 유사하게 상대적 저농도인 100ppm에서 86% 항균능력이 저해되는 결과가 확인되었다(그림 61, 62).

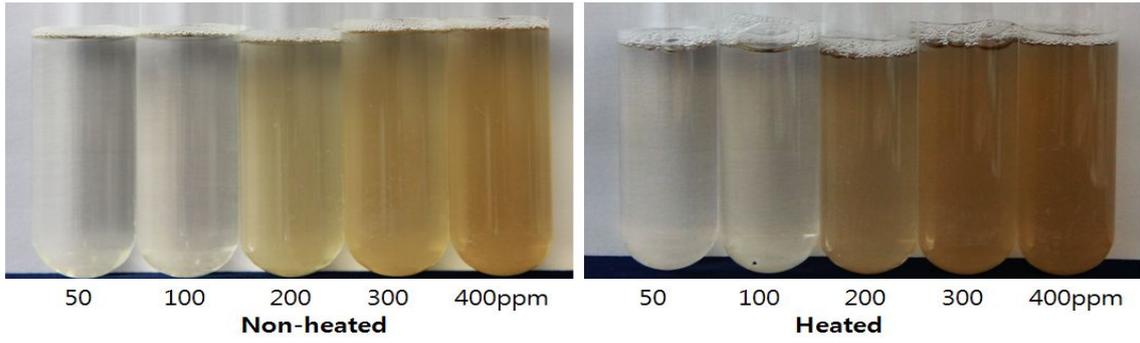


그림 59. Apparent change of Protodioscin after heat treatment

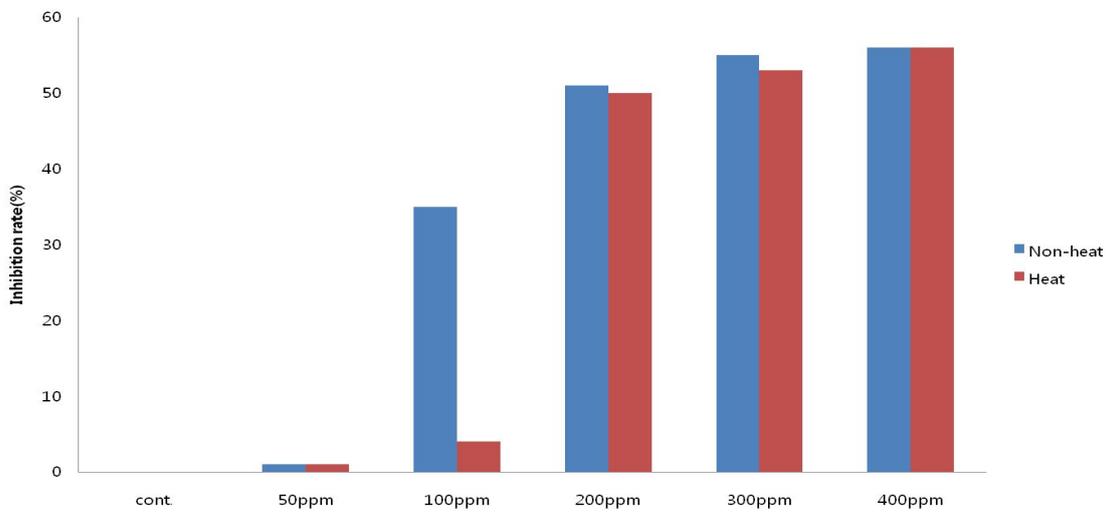


그림 60. Antifungal activity of protodioscin(JIAHERB) against *P. digitatum* after heat treatment

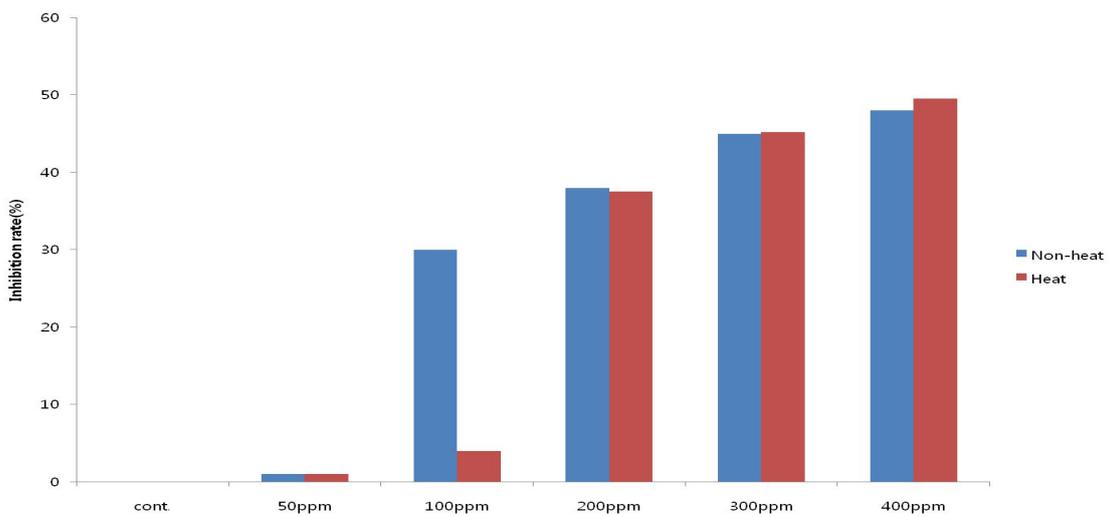


그림 61. Antifungal activity of protodioscin(JIAHERB) against *P. italicum* after heat treatment

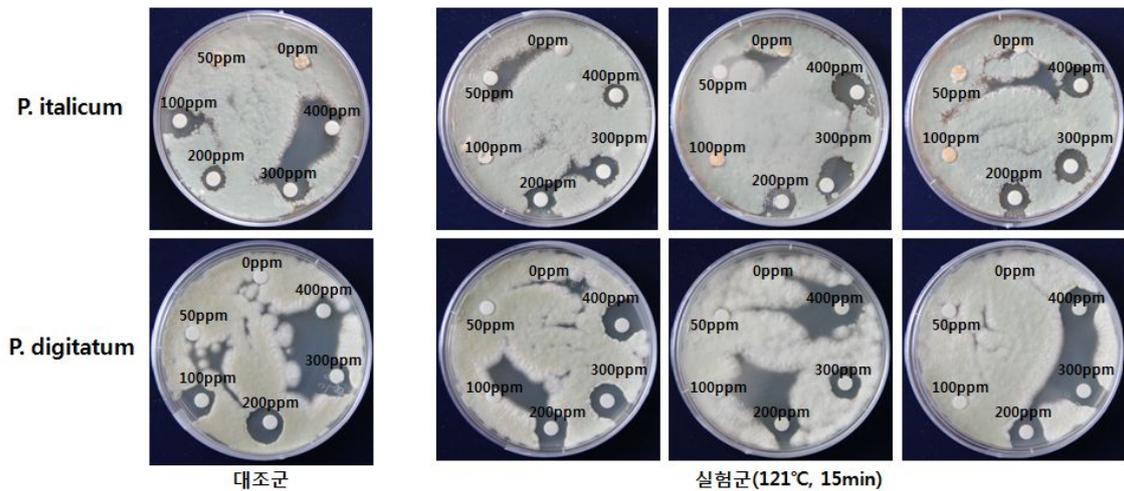


그림 62. Antifungal activity of protodioscin (JIAHERB) against *P. digitatum* and *P. italicum* after heat treatment

실험결과 상대적 저농도인 50ppm과 100ppm 농도에서 열처리로 인한 *P. digitatum*의 균사 억제 능력이 감소하는 것을 확인하였으나, 이전의 protodioscin 활성검정 실험 결과 200ppm 이상에서 50% 이상의 항균능력이 나타나는 결과에 비추어 볼 때 제품 및 현장에서 이용하기 위해서는 200ppm의 농도가 필요하다고 확인되었었다. 따라서 50% 이상의 항균능력을 보이는 200ppm 이상의 protodioscin 농도에서는 열처리 이후의 항균능력의 변화가 확인되지 않기 때문에 protodioscin의 열에 대한 안정성이 인정된다고 판단된다.

다) Protodioscin의 중금속 성분 평가

천산용으로부터 추출한 유효성분인 protodioscin의 감귤의 저장을 위해 살포 되었을시에 인체에 대한 평가를 가늠하기 위하여 중금속 함유량에 대한 평가를 수행하였다(그림 63).

실험은 protodioscin 추출물에 대한 카드뮴(Cadmium, Cd), 납(Lead, Pb), 수은(Mercurt, Hg)의 함유량을 흡광광도법을 통하여 농도(mg/kg)를 산출하였다.

카드뮴을 검출하기 위하여 카드뮴이온을 시안화칼륨이 존재하는 알카리성에서 디티존과 반응시켜 생성하는 카드뮴착염을 사염화탄소로 추출하고, 추출한 카드뮴착염을 주석산용액으로 역추출한 다음 다시 수산화나트륨과 시안화칼륨을 넣어 디티존과 반응하여 생성하는 적색의 카드뮴착염을 사염화탄소로 추출하고 그 흡광도를 530 nm에서 측정하는 흡광광도법을 이용하였다. 카드뮴 검출을 위하여 시료에 10% 염산히드록실아민용액 1ml, 10% 구연산이암모늄용액 5ml, 10% 수산화나트륨용액 10ml 및 1% 시안화탄소용액 5ml을 이용하여 사염화탄소층을 추출한 후 2% 주석산용액 20ml을 이용하여 사염화탄소층을 분리하여 사염화탄소층을 분리하였다. 카드뮴을 검출하기 위하여 A530nm에서 카드뮴의 양을 구하고 농도를 산출하였다.

납을 검출하기 위하여 납이온이 시안화칼륨 공존하에 알카리성에서 디티존과 반응하여 생성하는 납 디티존착염을 사염화탄소로 추출하고 과잉의 디티존을 시안화칼륨용액으로 씻은 다

음 납착염의 흡광광도를 520 nm에서 측정하는 방법인 흡광광도법을 이용하였다. 시료에 10% 구연산이암모늄용액 5ml, 10% 염산히드록실아민용액 1ml을 첨가하고 1:1 비율로 암모니아수를 첨가하여 pH를 9로 조정한 후 5% 시안화칼륨용액 5ml을 이용하여 사염화탄소층을 분리한 뒤 0.005% 디티존사염화탄소용액 3ml을 이용하여 사염화탄소층을 분리하여 납을 검출하였다. 납을 검출하기 위하여 A520nm에서 납의 양을 구하고 농도를 산출하였다.

수은을 황산 산성에서 디티존사염화탄소로 일차추출하고 브롬화칼륨 존재하 황산산성에서 역추출하여 방해성분과 분리한 다음 인산-탄산염완충액 존재하에서 디티존사염화탄소로 수은을 추출하여 490 nm에서 흡광도를 측정하는 방법으로서 0.005% 디티존사염화탄소용액 20 ml을 넣어 사염화탄소층을 분리한다. 다시 수층에 디티존사염화탄소층을 분리하고, 사염화탄소층을 0.25N 황산용액 50 ml와 40% 브롬화칼륨용액 10 ml를 넣고 사염화탄소층을 분리한다. 이후 수은시험용 인산-탄산염 완충액 20 ml과 0.001% 디티존 사염화탄소용액 10 ml를 넣은 후 A490 nm에서 시료용액의 흡광도를 측정하여 수은의 농도를 산출하였다.

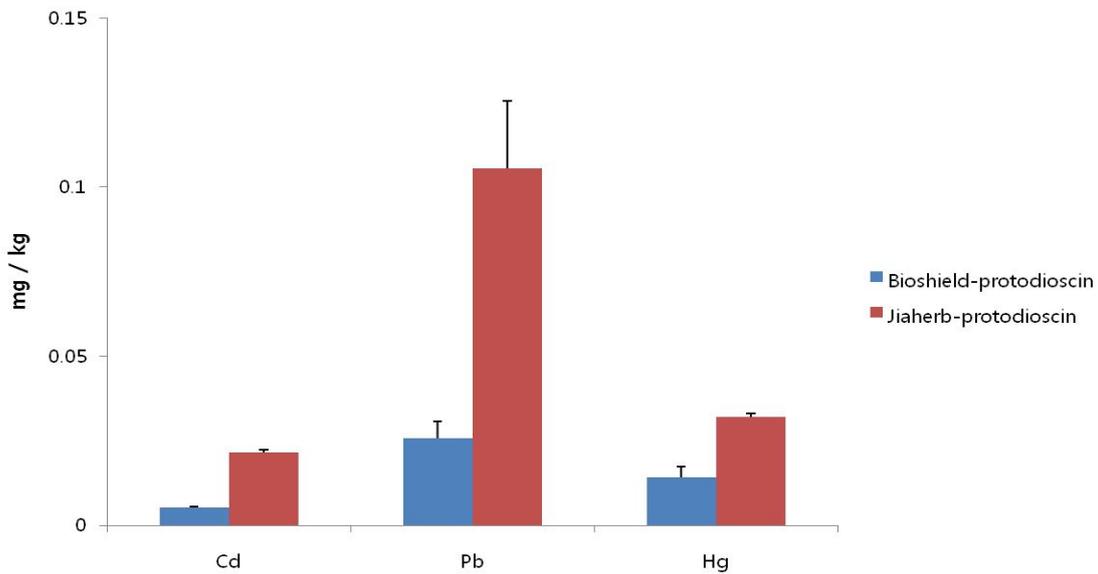


그림 63. Heavy metal contents within protodioscin

실험결과 당사에서 천산용을 이용하여 추출한 protodioscin과 JIAHERB에서 구입한 protodioscin의 중금속 성분을 분석 비교한 결과는 그림 1과 같다. JIAHERB로부터 구입한 protodioscin에서 카드뮴(Cd), 납(Pb), 수은(Hg)에서 각각 4배, 4.1배, 2.26배가 당사 추출물 대비 높은 수치로 확인되었다. 비록 당사의 추출물과 비교하여 중금속의 함유량이 높은 이유로서는 대량의 공정에 따른 당사 실험실 대비 낮아지는 순도 때문이라고 판단되며, 카드뮴(Cd), 납(Pb), 수은(Hg)의 안전 기준치가 각각 1.0mg/kg 이하, 3.0mg/kg 이하, 0.1mg/kg 이하이기 때문에 JIAHERB로부터 구입한 protodioscin의 사업화 이용도 충분히 가능하다고 판단된다.

나. 길항 내생세균으로부터 유래된 항균활성 물질의 특성 분석(열, UV 안정성 및 휘발성)

603균주의 활성물질은 70℃와 100℃ 열 처리에 모두 안정적이며, 254 nm와 365 nm의 UV 조사 결과에도 무처리에 비해 항균활성의 감소를 보이지 않았다. 그리고 휘발성 검정에서도 항균력을 보이지 않는 비휘발성 물질로 판단되었다. 603균주의 주 활성물질은 비휘발성의 열과 UV에도 강한 안정적인 구조의 화합물임을 알 수 있었다(표 24). 이 물질은 열과 UV에 안정적이며 항균활성을 보인다는 면에서 *Bacillus*속이 생산하는 iturin과 유사한 것으로 나타났다.

물질의 열안정성, UV 안정성은 물질의 특성으로 볼 수 있으며, 이러한 안정성은 차후 균주들을 이용한 생물농약의 제형화 과정에서 발생할 수 있는 항균활성의 감소를 극복할 수 있어 미생물제제의 재료로서 아주 우수한 특성을 지닌 것으로 생각된다.

표 24. Stability and volatility of antifungal compounds produced by 603 isolate

Treatment	Antifungal activity ^{a)} (mm)	Reduced rate (%)
Culture filtrate	23	0
UV		
254nm	23	0
365nm	23	0
Heat		
70℃	23	0
100℃	23	0
Volatility	-	-

^{a)}Antifungal activity against *Penicillium digitatum* was measured by paper disk method based on inhibition zone.

다. 유효성분의 안전성 평가

1) Protodioscin의 세포독성 평가

안전성평가를 위한 세포 독성 실험을 수행하기 위한 세포는 mouse abdominal macrophage cell(RAW 264.7)을 사용하였다. RAW 264.7의 세포 독성 실험은 MTT assay를 이용한 세포생존율을 측정 하여 확인하였는데 이 세포들은 10% FBS(Fetal Bovine Serum)와 PS(penicillin , streptomycin) 1% 를 포함한 DMEM 배지를 넣어 5% CO₂가 포함된 37 ℃에서 배양하였다. 실험을 위해 RAW 264.7 세포가 24 시간 동안 배양한 후 천산용으로부터 추출한 protodioscin과 JIAHERB로부터 구입한 protodioscin을 100ppm, 200ppm, 400ppm,

600ppm, 800ppm, 1,000ppm을 처리하고 다시 24시간 동안 배양한 후 1×10^4 cells/well만큼 배양된 96-well culture plate에 넣어 용매에 MTT를 첨가하고 4 시간 배양 후 ELISA microplate reader(Bio-Tak instruments.Winooski, VT, USA) 를 사용하여 450 nm 에서 OD 값을 측정하고 세포 생존율을 확인하였다(그림 64).

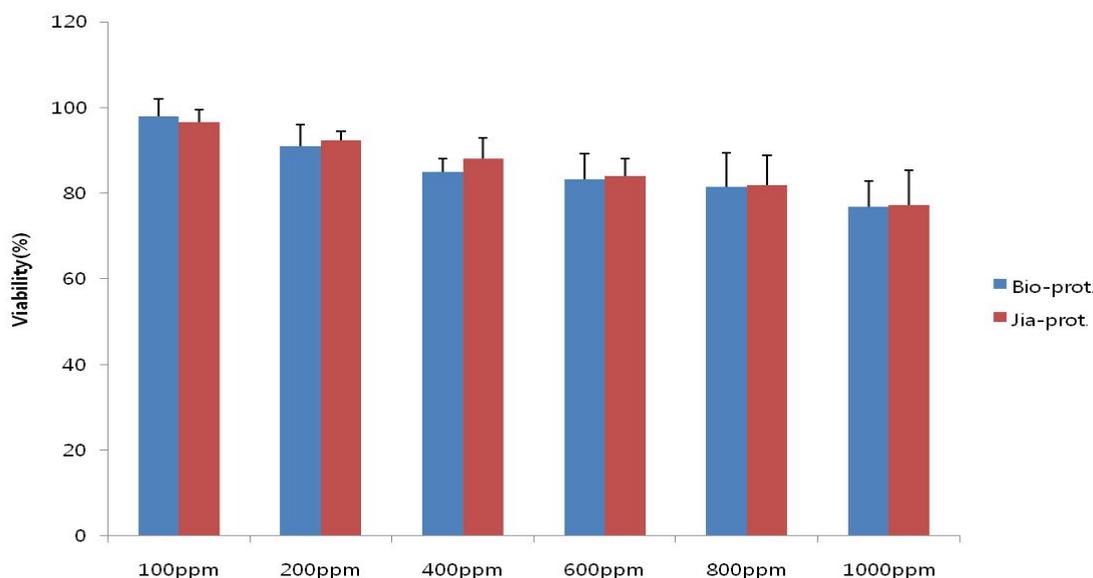


그림 64. Cytotoxicity evaluation of protodioscin using MTT assay

실험결과에서도 확인할 수 있듯이, 천산용으로부터 추출한 protodioscin과 JIAHERB로부터 구입한 protodioscin의 농도별 세포생존율을 확인한 결과 제품 및 현장평가에 이용되는 농도인 200ppm의 protodioscin 농도에서 세포 생존율이 90%이상인 것을 확인할 수 있었다. 따라서 protodioscin의 감귤에 대한 처리시 감귤의 표면에 존재하는 protodioscin은 인체에 무해함은 물론, 인체에 사용이 가능할 것으로 생각된다.

2) 실험동물을 이용한 급성독성평가

급성독성평가를 수행하기 위하여 SD Rat을 사용하였다. 군분리는 투여여부에 따라 control 군, T1군으로 나누었고 Con군은 무처리, T1군은 천산용 추출물을 단회 투여하였다. 시험기간(순회, 투여)에 걸쳐 1일 1회 관찰하였고 증상의 종류, 발현일 및 필요에 따라 증상의 정도를 관찰하였다. 각 실험군은 입수 시, 군분리 전, 투여 전, 투여 후 7일간 매일 체중을 측정하였다(그림 65).

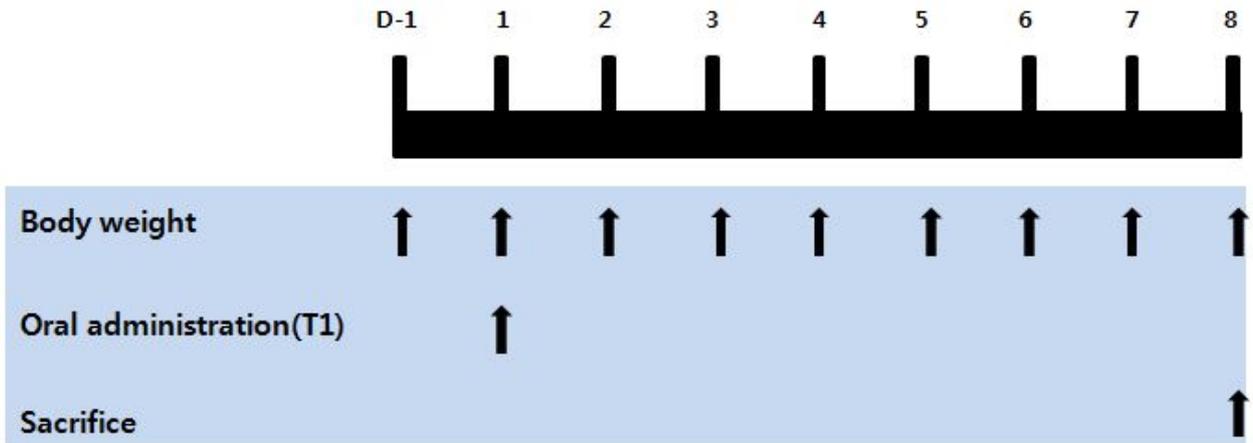


그림 65. Acute toxicity of Animal experiments using extract of *Dioscorea quinqueloba* schedule

가) 체중변화

천산용 추출물을 경구투여로 단회 투여 후 7일간의 체중변화를 살펴보았다(그림 66). 그 결과 단회 투여군은 대조군과 큰 차이를 나타내지 않았다.

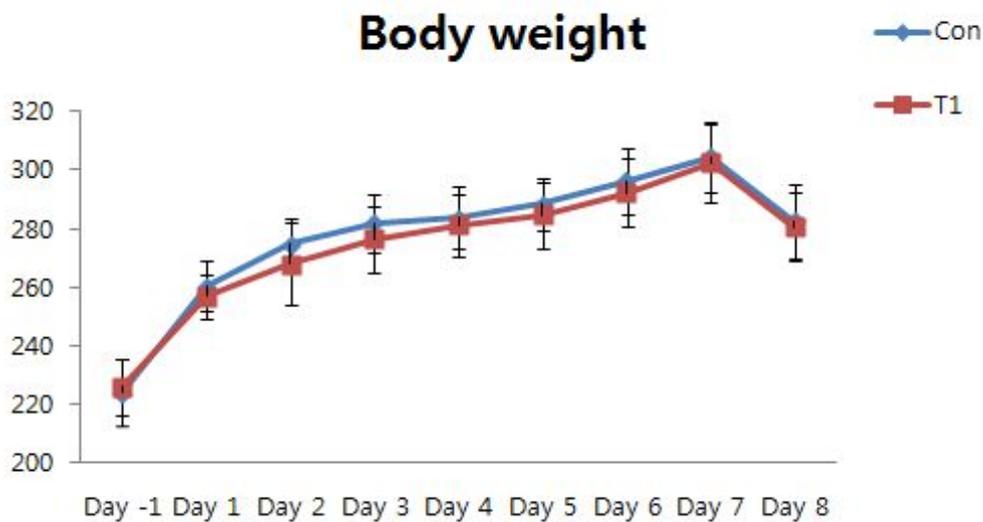


그림 66. Monitoring of body weight in protodioscin-treated group compared to control group.

나) 장기중량 측정

천산용 추출물을 경구 투여한 후 부검을 실시하였고 간, 신장, 비장을 적출하여 절대중량 및 상대중량을 대조군과 비교하였다(그림 67). 장기 무게 역시 대조군과 비교하여 간, 신장, 비장의 무게가 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다.

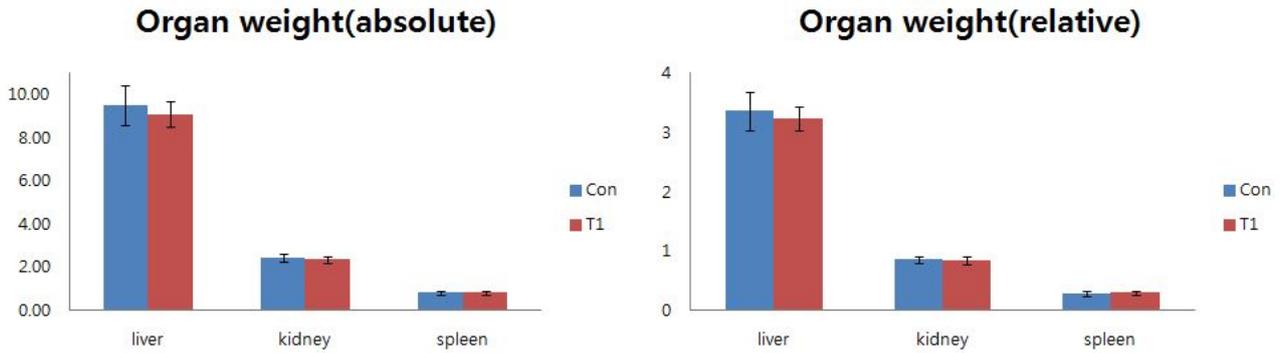


그림 67. Weight of organ in protodioscin-treatd group compared with control group.

다) 혈액생화학검사

천산용 추출물을 경구 투여한 후 부검을 하고 복대정맥에서 채혈을 실시하였고 원심분리를 통해 serum을 얻었다. 혈액학적 데이터를 얻기 위해 서울의과학연구소에 sample을 의뢰하여 간독성 지표를 확인하였다(그림 68). 그 결과 대조군과 비교하여 큰 차이를 보이지 않았다. 본 시험에서 시험물질 투여와 관련된 어떠한 독성 증상도 관찰되지 않았으며 그 결과 1주일간의 경구투여 급성독성시험에서 안전한 물질인 것으로 판단되어진다.

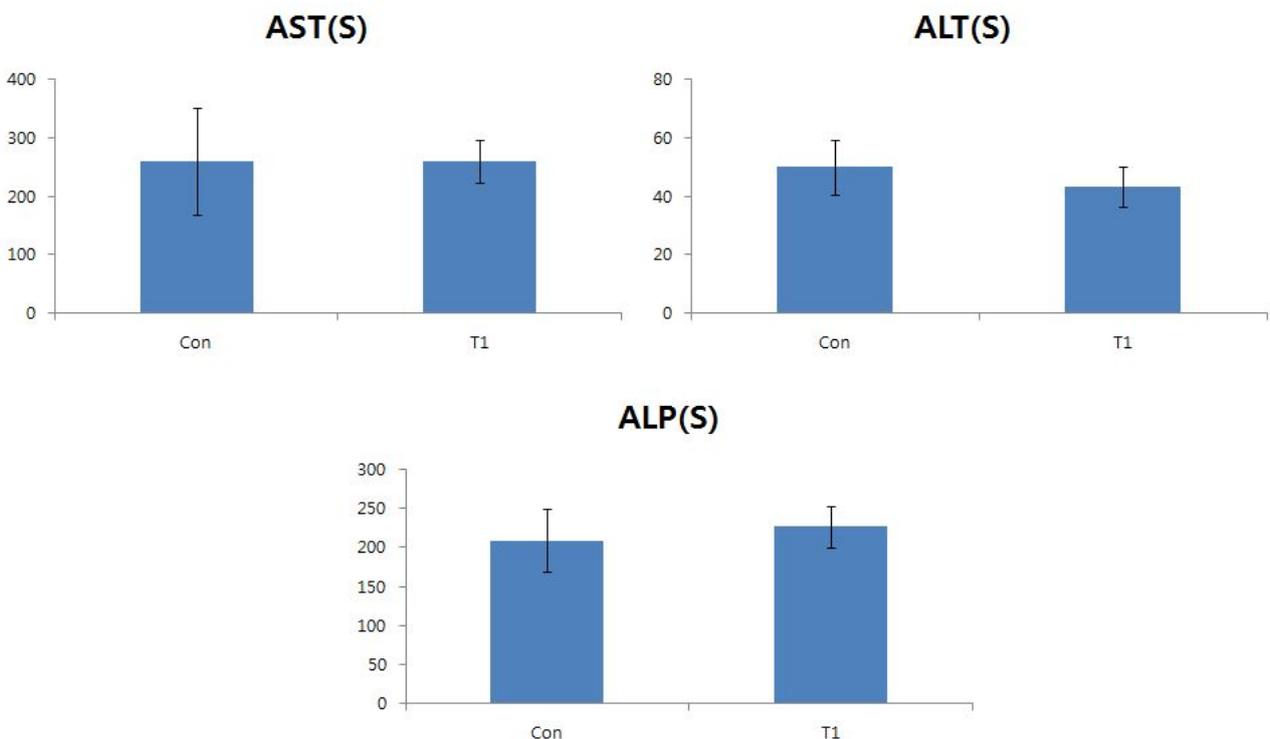


그림 68. Measurement of hematological values in protodioscin-treatd group compared with control group.

그리고 미생물균주에 대한 안전성검사는 제품화 단계에서 추가 실시할 예정이다.

13. Protodioscin의 병인별 항균능력 조사

가. Protodioscin의 항진균 스펙트럼 조사

감귤 저장병원균인 *P. digataum*과 *P. italicum*에 대한 항균능력을 가지는 유효성분으로 분리된 protodioscin에 대한 각각의 식물병원 진균인 *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* 등 11종의 진균에 대한 항균 활성을 검정하였다(표 25).

표 25. Antifungal activity of protodioscin against various pathogenic fungi

식물성 병원균	병원균명	Protodioscin 처리농도	억제 효과	비고
겹등근무늬 병	<i>Alternaria solani</i>	100~1000ppm (100ppm 단위실험)	0	
감귤수지병	<i>Diaporthe citri</i>	100~1000ppm (100ppm 단위실험)	0	
시들음병	<i>Fusarium oxysporum</i>	100~1000ppm (100ppm 단위실험)	≥5%	1000ppm실험 군에서 평균 4.85% 이하
잎마름병	<i>Rhizoctonia solani</i>	100~1000ppm (100ppm 단위실험)	0	
잿빛곰팡이 병	<i>Botrytis cinerea</i>	100~1000ppm (100ppm 단위실험)	0	
흰가루병	<i>Podosphaera leucotricha</i>	100~1000ppm (100ppm 단위실험)	0	
뿌리썩음병	<i>Cylindrocarpon destructans</i>	100~1000ppm (100ppm 단위실험)	0	
고추역병	<i>Phytophthora capsici</i>	100~1000ppm (100ppm 단위실험)	0	
탄저병	<i>Colletotrichum coccodes</i>	100~1000ppm (100ppm 단위실험)	0	
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100~1000ppm (100ppm 단위실험)	0	
	<i>Colletotrichum acutatum</i>	100~1000ppm (100ppm 단위실험)	0	

실험결과 protodioscin 100ppm, 200ppm, 300ppm ~ 1,000ppm 농도의 주요 식물병원균에 대한 항균 활성을 검정한 결과 감귤 저장병에 이용되기 위한 200ppm의 농도에서는 11종의 식물병원균들에서 어떠한 항균 활성도 나타나지 않았으며, 실험을 위한 상대적 최고농도인

protodioscin 1,000ppm 농도에서 시들음병원균인 *Fusarium oxysporum* 에 대하여서만 5% 이하의 항균 활성을 나타내어 protodioscin의 타 작물에 대한 방제효과 및 적용확대는 기대하기 어렵다고 판단하였다. 1,000 ppm에서 시들음병원균에 대한 항균효과가 나타났기 때문에 2,000 ppm 이상의 protodioscin 농도에 대한 추가 실험이 필요하다고 판단될 수 있으나, 2,000 ppm 이상의 고농도에서 매우 강한 항균 활성결과가 나타날 지라도 사업화가 불가능하다.

나. 길항 내생세균의 항균 스펙트럼

가장 강력한 항균활성을 보인 603균주를 실험 균주로 선발하여 실험에 이용하였다. 603균주는 대표적인 감귤 저장병원균 *P. digitatum*과 *P. italicum* 두 균주 모두에 매우 강력한 항균 활성을 보였다. 그리고 7개의 주요 식물병원균 *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Stemphylium solani*에 대한 항균력을 확인한 결과 *R. solani*에 대해서도 강력한 균사 생육억제가 관찰되었으며, 그 외 다양한 식물 병원균에 대하여 항균력의 정도 차이는 보였으나 다범적인 항균활성을 나타냈다(표 26, 그림 69).

표 26. Antifungal activity of 603 against two citrus postharvest pathogens and seven major plant pathogens.

Pathogen	Inhibition zone (mm)	Antifungal activity ^{b)}
Citrus postharvest pathogen		
<i>Pd</i> ^{a)}	10.55	+++
<i>Pi</i>	8.34	+++
Plant pathogen		
<i>As</i>	5.60	++
<i>Bc</i>	3.26	++
<i>Cd</i>	7.07	++
<i>Fo</i>	5.27	++
<i>Rs</i>	9.77	+++
<i>Scs</i>	2.52	++
<i>Sts</i>	7.08	++

a) *Pd*: *Penicillium digitatum*, *Pi*: *P. italicum*, *As*: *Alternaria solani*, *Bc*: *Botrytis cinerea*, *Cd*: *Cylindrocarpon destructans*, *Fo*: *Fusarium oxysporum*, *Rs*: *Rhizoctonia solani*, *Scs*: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sts*: *Stemphylium solani*.

b) Inhibition zone: -: 0 mm, +: ≤ 2 mm, ++: ≤ 8 mm, +++: > 8 mm.

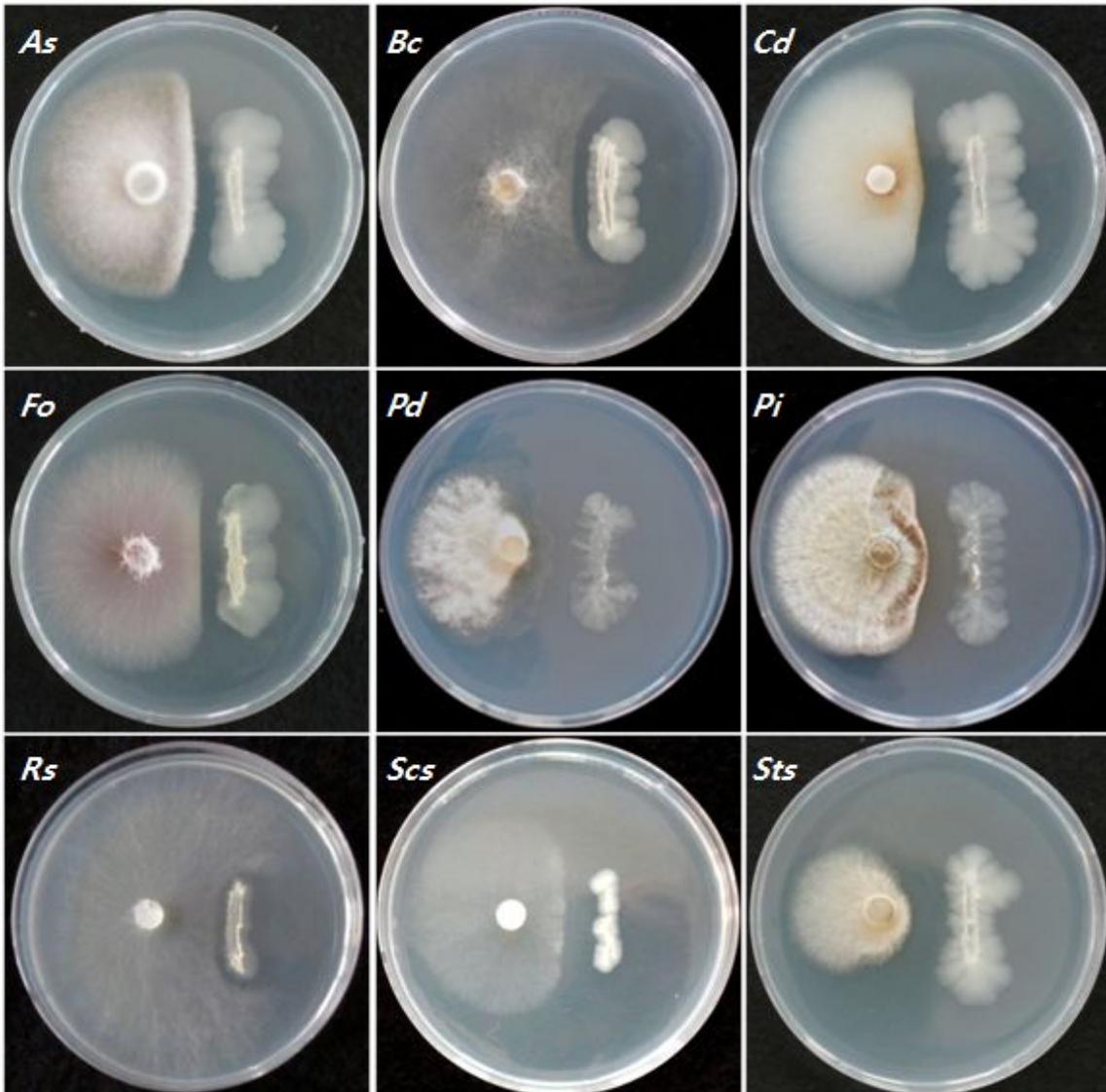


그림 69. Antifungal activity of 603 against two citrus postharvest pathogens and seven plant pathogens on PDA.

(As: *Aternaria solani*, Bc: *Botrytis cinerea*, Cd: *Cylindrocarpon destructans*, Fo: *Fusarium oxysporum*, Pd: *Penicillium digitatum*, Pi: *P. italicum*, Rs: *Rhizoctonia solani*, Scs: *Sclerotinia sclerotiorum*, Sts: *Stemphylium solani*).

다. 길항 유용세균의 항균 스펙트럼 및 항균 기작

RB2균주의 감귤 저장병균에 대한 항균활성을 검정하였을 때 감귤 저장병균 *P. digitatum*에 강한 항균활성을 보였으며, *P. italicum*에 대해서도 정도의 차이는 있었으나 항균활성을 나타내었다. 그리고 길항세균의 항균 spectrum 조사를 수행한 대표적인 식물병원균 *A. solani*, *B. cinerea*, *C. destructans*, *S. sclerotiorum*, *S. solani*에 대해서도 강력한 항균력이 관찰되었다(표

27, 그림 70). 따라서 추후 RB2균주를 활용한다면 감귤 저장병 뿐만 아니라 보다 폭넓은 식물 병의 방제도 가능할 것으로 추정된다.

표 27. Antifungal activity of RB2 against two citrus postharvest pathogens and seven major plant pathogens.

Pathogen	Inhibition zone (mm)	Antifungal activity ^{b)}
Citrus postharvest pathogen		
<i>Pd</i> ^{a)}	10.51	+++
<i>Pi</i>	7.91	++
Plant pathogen		
<i>As</i>	9.23	+++
<i>Bc</i>	9.91	+++
<i>Cd</i>	8.44	+++
<i>Fo</i>	7.12	++
<i>Rs</i>	6.66	++
<i>Scs</i>	9.87	+++
<i>Sts</i>	10.54	+++

^{a)} *Pd*: *Penicillium digitatum*, *Pi*: *P. italicum*, *As*: *Alternaria solani*, *Bc*: *Botrytis cinerea*, *Cd*: *Cylindrocarpon destructans*, *Fo*: *Fusarium oxysporum*, *Rs*: *Rhizoctonia solani*, *Scs*: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sts*: *Stemphylium solani*.

^{b)} Inhibition zone: -: 0 mm, +: ≤ 2 mm, ++: ≤ 8 mm, +++: > 8 mm.

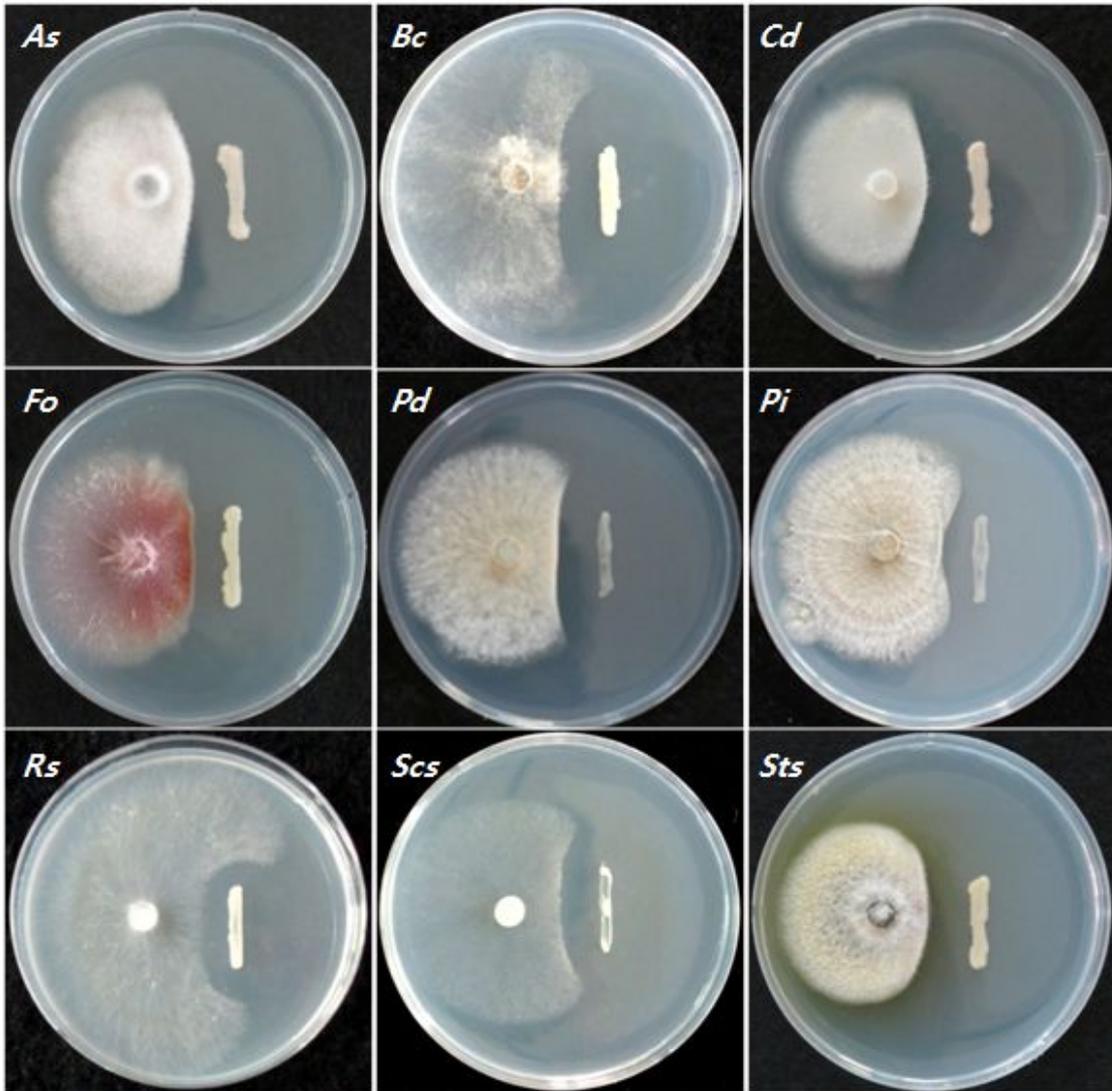


그림 70. Antifungal activity of RB2 against two citrus postharvest pathogens and seven plant pathogens on PDA.

(As: *Aternaria solani*, Bc: *Botrytis cinerea*, Cd: *Cylindrocarpon destructans*, Fo: *Fusarium oxysporum*, Pd: *Penicillium digitatum*, Pi: *P. italicum*, Rs: *Rhizoctonia solani*, Scs: *Sclerotinia sclerotiorum*, Sts: *Stemphylium solani*).

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

1. 1차년도

구분	연도	연구개발의 목표		연구개발의 내용	달성도
1차년도	2009	제1세부	○ 원료물질표준화 및 연구체제화를 위한 생산 공정 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 선발미생물 유효대사물질 대량 생산 - 식물추출물 대량 생산 - 기본제형 연구 - 약효증진용 보조제 탐색 - 원물 표준화 연구 	100%
		제1협동	○ 항공팡이 작용기작 평가시스템 개발 및 유효추출물 및 성분 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 약용작물 함유성분의 저장병균에 대한 억제 기작 연구 - Activity guided fractionation - 유효성분의 구조분석 - 유용 추출물 다량 획득방법 개발 	100%
관련분야에의 기여도					
<ul style="list-style-type: none"> - 저장병균인 <i>P. digitatum</i>에 대한 억제능을 가진 약용작물을 선별하고 선별된 약용작물의 함유성분을 분리 동정하여 친환경 방제제로의 개발 가능성을 확인하였다. - 약용작물의 함유성분 추출 방법에 대한 공정을 간소화하여 대량생산을 가능하게 하였다. 					

2. 2차년도

구분	연도	연구개발의 목표		연구개발의 내용	달성도
2차년도	2010	제1세부	○ <i>in vitro</i> 유효성 평가 test 및 유효성분 물질규명	- 유효성분, 표준추출물 평가 - 유효추출물의 병인별, 배양조건 별 적용 spectrum 조사 - 특허출원 - 안전성 평가 (급성, 환경독성)	100%
		제1협동	○ 천연물 항곰팡이능 작용 기작 규명 연구	- 추출물의 유효성분 분석 - 유효성분 작용기작 규명 - 신규추출물의 항곰팡이능 약효평가 - 생산 공정 적용 연구 - 지표성분 선정 및 표준분석법 개발 - 논문투고	100%
		위탁	○ 기존 시장제품과의 현장 비교 시험 및 온도 조건별, 병인별 현장시험	- 약용작물 유효추출물에 대한 field test - 기존 미생물제제와 비교평가 및 결과 정리 - 계절별, 병인별 field test 결과정리	100%
관련분야에의 기여도					
<p>- 약용작물로부터 추출된 유효성분의 안전성 및 안정성을 검증, 약용작물 유효추출물과 기존 시장제품 비교시험 및 field test를 통해 추후 친환경적인 천연물 농약의 개발에 매우 큰 도움이 될 수 있을 것이다.</p>					

3. 3차년도

구분	연도	연구개발의 목표		연구개발의 내용	기여도
3차년도	2011	제1세부	○ 시제품 활성 검증을 통한 실용화 및 마케팅	- 농약등록 시험평가기관 연계평가 - 제제, 제형 개발 - 재배지역 확보 및 원료물질 표준화 확립 - 마케팅 전략 수립	100%
		제1협동	○ 항공광이능 작용 기작 확대 구명 및 천연농약 등록추진	- 적용 Spectrum 평가 및 결과정리 - 원료 생산 공정 확립 - 제제, 제형 검토 - 허가자료 작성 및 농약 등록 추진	100%
		위탁	○ 저장병 방제용 천연물농약의 포장적용 시험	- 약효, 약해 시험 - 제제, 제형 검토 및 특허출원 - 계절별, 병인별 Field test 결과정리 및 보고서 작성	100%
관련분야에의 기여도					
<p>- 원료물질 표준화 및 최적 제제, 제형을 개발하여 시제품 생산을 하고 시제품의 활성 검증을 통해 최종적인 제품 생산이 가능하게 되었고 현재 농약 등록 추진중이다.</p>					

제 2 절 관련분야 기대효과

1. 기술적 측면

가. 기능성 천연물소재 개발기술은 식/의약품 분야 뿐 만 아니라 농업분야의 기반기술 구축을 가능하게 할 것이며 신기능성 소재 생산 기술은 생물공학기술의 기초 개발에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

나. 첨단 생명공학기술을 이용한 친환경 농약개발을 통하여 국제경쟁력이 있는 고품질 제품의 수출 상품화가 가능할 것으로 사료된다.

다. 천연식물 유래의 천연농약은 기존 합성농약에 비해 인체 및 동물 등에 대한 독성이 적으므로 안전한 친환경적인 농약 개발이 가능하다.

라. 무독성, 범용성을 가지는 천연농약의 개발은 새로운 친환경사업 영역으로 자리매김하여 천연소재의 규격화 기술이 농약분야에서도 접목 되어 표준화 기술과 천연소재개발기술의 발전을 가져올 것으로 기대된다.

2. 경제적 · 산업적 측면

가. 약용작물을 비롯한 한약재는 수요에 따른 재배가 필수적이며 본 과제를 통해 개발될 천연물 농약의 상품화를 위하여 대단위 재배단지를 형성하여 FTA에 대비한 대체작물로서 고부가가치를 창출할 것으로 기대된다.

나. 본 과제로 개발되는 항공광이능 제제는 전세계 시장을 대상으로 개발될 수 있으며 북남미, 아프리카, 남아시아 등의 과실류 수출국가의 대단위 Post harvest 농약시장에도 적용 가능하다.

다. 국내 자생 약용식물을 활용한 천연물 제제의 개발은 국내 산업의 발전 및 보호와 함께 국외로 제재 제조기술 또는 완제품의 수출을 가능하게 하여 외화획득이 가능할 것이다.

라. 앞에서 기술한 바와 같이 현재 사용되고 있는 감귤 저장병 관련 유기화학농약은 Imazalil, albesilate 등이 있으나 잔류 허용치 및 인체 독성 등으로 문제가 있다. 따라서 천연물을 이용한 미생물 농약을 개발됨으로서 시장에 미칠 있는 파급효과는 크다고 생각할 수 있다. 본 제품은 농민에게 보급 시키는 것은 물론이고 감귤 취급 상인에게도 보급될 수 있을 것으로

사료된다. 이는 저장병의 특성 상 감귤재배농민 들만의 문제가 아니라 추후 보관 판매를 담당하는 감귤 취급 상인에게 문제로 인식되므로 시장 개척 가능성은 매우 긍정적이고 생각할 수 있다.

마. 천연물제제를 이용한 신 농약이 개발된다면 농약특허 종료시기인 20년간 세계 시장에서 독점적으로 판매되기 때문에 경제적으로 고부가가치 상품이 될 가능성이 매우 높다.

바. 앞으로 소재로 활용 가능한 특산식물의 대량재배기술의 개발 및 보급을 촉진하여 소득 작물의 다양화를 유도하고 1차 산업 발전에 기여할 뿐 아니라 3차 산업과 연계되어 지역소재 중소기업의 기술 혁신 및 개발에 기여할 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 연구개발 실적

1. 특허 출원

가. 과실 저장병 방제용 천산용 추출물과 그 제조방법(특허 출원번호 : 10-2011-0037250)

나. 천산용 추출물과 미생물 균주를 포함하는 과실 저장병 방제용 조성물(특허 출원번호 : 10-2012-0036506)

2. 연구 논문 발표 준비

가. 저널 명 및 논문 제목

1) 저널 명 : Plant Pathology Journal

논문 제목 : 감귤 녹색곰팡이병균, *Penicillium digitatum* 방제를 위한 식물유래 항균물질의 동정 및 항균활성 분석
(Identification and Antifungal Activity of Plant Extract to Protect Tangerines against Green Mold Pathogen *Penicillium digitatum*)

2) 저널 명 : 식물병 연구

논문 제목 : 생물학적 방제제로서 천산용 추출물의 실용적 적용
(Practical Application of *Dioscorea quinqueloba* Thunb. Extract as a Biological Control Agent)

3) 저널 명 : Mycobiology

논문 제목 : 감귤 녹색곰팡이병균의 생물학적 방제를 위한 식물내생세균 *Burkholderia vietnamiensis* RB2의 분리 및 특성
(Isolation and characterization of an endophytic bacterium *Burkholderia vietnamiensis* RB2, as a biological control agent against a citrus green mold)

4) 저널 명 : 균학회지

논문 제목 : 감귤저장병균 *Penicillium digitatum* 방제를 위한 길항내생세균 *Bacillus velezensis* CB3의 분리 및 특성 규명
(Isolation and characterization of an antagonistic endophytic bacterium *Bacillus velezensis* CB3 for controlling citrus green mold pathogen caused by *Peicillium digitatum*)

3. 인력양성

충남대학교 대학원으로부터 석사 7명을 배출하였다.

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2011.04.21
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2011-0037250 (접수번호 1-1-2011-0297288-80)
출원인명칭 (주)바이오셀드(1-2002-039918-9)
대리인성명 맹성재(9-2010-000522-2)
발명자성명 유성준 박성범 김은주 김대중 김흥기
발명의명칭 과실 저장병 방제용 천산용 추출물과 그 제조방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통보된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 * 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보 변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 * 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 국내출원 건을 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다.
 * 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12월, 상표·디자인은 6월 이내
 * 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 * 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 통보된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2012.04.09
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10- 2012- 0036506 (접수번호 1- 1- 2012- 0279519- 55)
출원인명칭 (주)바이오실드(1- 2002- 039918- 9)
대리인성명 맹성재(9- 2010- 000522- 2)
발명자성명 유성준 김홍기 이지현 이병찬 안재은
발명의명칭 천산용 추출물과 미생물 균주를 포함하는 과실 저장병 방제용 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
* 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보 변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
* 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록 결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 국내출원건을 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다.
* 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12월, 상표·디자인은 6월 이내
* 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
* 특허출원 10- 2010- 0000000, 상표등록출원 40- 2010- 0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

제 2 절 기업화 추진 방향

1. 사업화 계획

가. 활용분야 : 감귤 저장병 방제제

나. 사업화 방향

- 1) 본 연구개발결과로 나온 시제품을 보완하여 제품 출시를 할 계획이다.
- 2) 학회 및 세미나, 전시회, 발표회 등에 참가하여 연구결과를 알리고, 간접적으로 시제품을 홍보할 예정이다.
- 3) 천연물농약 등록을 통하여 소비자에게 신뢰를 주고, 해외에 원제를 판매할 수 있는 기틀을 마련할 계획이다.
- 4) 제주 감귤시험장과의 지속적인 연구협력을 통하여 지속적으로 보완 및 효력을 증가시켜 유사제품 및 경쟁제품과의 차별화를 도모할 계획이다.
- 5) 타 천연물에 기술을 적용하여 신규제품 개발 시에 기초자료로 활용할 계획이다.

2. 추가연구의 필요성

가. 시제품의 적용범위를 넓히기 위해 타 과실 및 엽채류 등에 적용함으로써 생육촉진 및 병억제 효과가 있는지 지속적인 연구가 필요하다.

나. 다른 농약들과 혼용 가능성 여부에 대해 지속적인 연구가 필요하다.

다. 타 천연물과의 조합에 의한 기존 제품의 효능 강화에 대한 연구가 필요하다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

최근 식물 유래 천연물을 이용하여 식물병을 방제 하려는 시도는 국내외적으로 많이 이루어지고 있다. 식물유래 추출물로서는 essential oil이 비교적 많이 분리되어 광범위한 식물병원균에 대한 항균 활성능이 인정되어졌으며, 이를 이용한 농업적 적용이 지속적으로 연구되어지고 있다(Tzortzakis *et al.*, 2007; Al-Reza *et al.*, 2010). 그 중 Yahyazadeh 등 (2008)에 의해 다양한 essential oil이 *Penicillium digitatum*의 균사 생장 억제에 효과를 보이고 있음이 보고된 바 있다.

생물학적 저장병 방제를 위해 *Pseudomonas*나 *Burkholderia*속의 *Pseudomonas*(*Burkholderia*) *cepacia*, *P. glathei*, *P. syringae* 균주 등은 감귤 *P. digitatum*에 의한 녹색곰팡이병과 *P. italicum*에 의한 푸른곰팡이에 대한 항균활성을 보여 우수한 생물적 방제제로서의 가능성을 보였다(Huang *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1995; Bull *et al.*, 1997). *Bacillus*속의 균주는 내열성과 내건성을 가지는 포자를 형성하는 대표적인 그람 양성세균으로서 생물학적 제재의 제형화와 제제화에 많은 장점을 가지고 있는 균주로서(Handelsman and Stabb, 1996), 최근 *B. velezensis*와 동일한 균주라는 보고가 있는 *B. amyloliquefaciens*는 *Thielaviopsis paradoxa*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium verticillioides* 그리고 *Alternaria citri* 등의 다양한 식물 병원균에 대한 생물학적 방제제로서 가능성을 보고한 바 있다(Arrebola *et al.* 2010, Alvindia and Natsuaki, 2009).

또한, 길항 미생물과 식물추출물의 혼합을 통하여 더욱 강력한 친환경적 방제제를 모색하고자 Harish 등 (2008)은 선발된 식물추출물과 길항균 *Trichoderma viride*사이에서 최적의 효과를 내는 조합을 연구하였으며, Akila 등 (2011)은 *Datura metel*의 oil계통 식물추출물과 길항세균 *P. fluorescens*와 *B. subtilis*와의 혼합을 통한 상승효과를 얻었고 Arrebola 등 (2010) 또한 *B. amyloliquefaciens*와 essential oils를 혼합하여 바나나 저장병 방제에 효과를 보았다.

본 연구는 감귤의 대표적인 저장병 녹색곰팡이 병을 방제하기 위해 천산용 추출물과 새로 분리된 두 개의 유용 길항내생세균을 선발하였으며, 천산용 추출물의 주요 항균활성 성분이 protodioscin이라는 것을 확인하였다. 그리고 protodioscin과 두 개의 길항내생세균이 녹색곰팡이 병에 뛰어난 방제효과를 가지고 있음이 나타났고, 길항 균주와 식물추출물의 혼합 처리를 통해 식물성 정유 계통의 식물추출물에 국한되지 않고 제형화에 더욱 용이한 수용성의 식물추출물 protodioscin과 길항세균과의 새로운 조합을 통한 추후 효과적인 친환경적 감귤 저장병 방제제 개발의 가능성을 시사하고 있다.

제 7 장 참고문헌

- Agnioni, A., Cabras, P., Dhallewin, G., Pirisi, F. M., Reniero, F., Schirra, M. (1998).** Synthesis and inhibitory activity of 7-geranoxycoumarin against *Penicillium* species in citrus fruits. *J. Phytochemistry*. 47, 1521-1525.
- Akila, R., Rajendran, L., Harish, S., Saveetha, K., Raguchander, T., Samiyappan R. (2011).** Combined application of botanical formulations and biocontrol agents for the management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (Foc) causing Fusarium wilt in banana. *Biological Control* 57: 175-183.
- Al-Reza, Sharif M., Atiqur Rahman, Yunus Ahmed, Sun Chul Kang (2010).** Inhibition of plant pathogens *in vitro* and *in vivo* with essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 96: 86-92.
- Alvandia, Dionisio G., Natsuaki, Keiko T. (2009).** Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 isolated from banana fruit surface against banana crown rot causing pathogens. *Crop Protection* 28: 236-242.
- Alzoreky, N. S. & Nakahara, K. (2003).** Antimicrobial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology* 80, 223-230.
- Arrebola, E., R. Jacobs and L. Korsten (2009).** Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *Journal of Applied Microbiology* 108: 386-395.
- Arrebola, Eva, Dharini Sivakumar, Romina Bacigalupo, Lise Korsten (2010).** Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. *Crop Protection* 29: 369-377.
- Bishop, C. D. and Reagan, J. (1998).** Control of the storage pathogen *Botrytis cinerea* on Dutch white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) by the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Essential Oil Res.* 10, 57-60.
- Bull, C. T., Stack, J. P., Smilanick, J. L. (1997).** *Pseudomonas syringae* strains ESC-10 and

ESC-11 survive in wounds on citrus and control green and blue molds of citrus. *Biological Control* 8: 81-88.

Briggs, G. G., Elliotte, M. and Janes, N. F. (1983). Pesticide chemistry Pergamon press. International Union of Pure and Applied Chemistry 157-164.

Brown, G. E. and Eckert, J. W. (2000). *Penicillium* Decays. In compendium of Citrus Diseases 2nd. Timmer, L. W., Garnsey, S. M. and Graham, J. H., eds. The American Phytopathological Society, St. Paul, Mn. 41-42.

Capdeville, G., De Wilson, C. L., Beer, S. V., Aist, J. R. (2002). Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested Red Delicious apple fruit. *J. Phytopathology*. 92, 900-908.

Costa, E., Teixidó, N., Usall, J. Atarés, E. and Viñas, I. (2001). Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 using commercial products and by-products. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56, 367-371.

Chun, Jong sik and Bae, Kyung Sook (2000). Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences. *Antonievan Leeuwenhoek* 78: 123-127.

Droby, S., E. Chalutz, B. Horev, L. Cohen, V. Gaba, C. Wilson, M. Wisniewski. (1993). Factors affecting UV-induced resistance in grapefruit against the green mould decay caused by *Penicillium digitatum*. *Plant Pathol.* 42, 418-424.

Droby, S., Porat, R., Cohen, L., Weiss, B., Shapira, B., Philosoph-Hadas, S., Meir, S. (1999). Suppressing green mold decay in grape fruit with postharvest jasmonates application. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 124, 184-188.

Fogliata, G. M., Torres, L. G. J., Ploper, L. D. (2001). Detection of imazalil-resistant strains of *Penicillium digitatum* Sacc. In citrus packing houses of Tucuman Province (Argentina) and their behaviour against current employed and alternative fungicides. *Rev. Ind. Agric. Tucuman.* 77, 71-75.

Handelsman, Jo and Stabb, Eric V. (1996). Biocontrol of Soil borne Plant Pathogens. *The Plant Cell* 8: 1855-1869.

Harish, Sankarasubramanian, Duraiswamy Saravanakumar, Ramalingam Radjacommare, E.

- G. Ebenezar, K. Seetharaman (2008).** Use of plant extracts and biocontrol agents for the management of brown spot disease in rice. *Biological Control* 53: 555-567.
- Hocking, A. D. and Pitt, J. I. (1979).** Water relations of some *Penicillium* species at 25 deg C. *Transactions of the British Mycological Society* 73, 141-145.
- Holmes, G. J. and Eckert, J. W. (1999).** Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *J. Phytopathology*. 89, 716-721.
- Huang, Y., Daverall, B. J., Morris, S. C., Wild, B. L. (1993).** Biocontrol of postharvest orange diseases by a strain of *Pseudomonas cepacia* under semi commercial conditions. *Postharvest Biology and Technology* 3: 293-304.
- Huang, Y., Deverall, B. J., Morris, S. C. (1995).** Postharvest control of green mold on oranges by a strain of *Pseudomonas glathei* and enhancement of its biocontrol by heat treatment. *Postharvest Biology and Technology* 13: 129-137.
- Huff, R. K. (1980).** The synthesis of 3-(2,2-dichloro vinyl)-1-methyl-cyclopropane-1,2-dicarboxylic acid. *Pestic. Sci.* 11, 290-293.
- Hul, Ke, Xin sheng Yao (2002).** Protodioscin(NSC-698796): Its Spectrum of Cytotoxicity Against Sixty Human Cancer Cell Lines in an Anticancer Drug Screen Panel. *Planta Med.* 68: 297-301.
- Janisiewicz, W. J., Korsten, L. (2002).** Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 411-441.
- Lacey, J. (1989).** Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement* 67, 11S-25S.
- Larrigaudière, C., Pons, J., Torres, R., Usall, J. (2002).** Storage performance of clementines treated with hot water, sodium carbonate and sodium bicarbonate dips. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 77, 314-319.
- Meepagala, K. M., Sturtz, G., Wedge, D. E. (2002).** Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Aremisia drancunculus* L. var. *drancunculus*. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6989-6992.

- Miche, Lucie AND Balandreau, Jacques (2001).** Effects of Rice Seed Surface Sterilization with Hypochlorite on Inoculated *Burkholderia vietnamiensis*. Applied and environmental microbiology 3046-3052.
- Nicos, G. and Costas, D. (2007).** Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. Innovative Food Science and Emerging Technologies 8. 253-258.
- Okada, K., Kiyoks, F., Nakanishi, E., Hirano, M., Ohno, L. and Matsuo, N. (1980).** Synthesis of some novel carboxylic acids and insecticidal activity of their esters. Agric. Biol. Chem. 44, 2595-2599.
- Palou, L., Smilanick, J. L., Usall, J., Viñas, I. (2001).** Control of postharvest blue and green molds of oranges by hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate. Plant Dis. 85, 371-376.
- Pang, X., Qun Zhang, Z. Q., Huang Xue, M. (2002).** Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. J. Trop. Subtrop. Bot. 10, 186-192.
- Park, Ki-Hyun, Lee, O-Mi, Jung, Ho-Il, Jeong, Jin-Ha, Jeon, Young-Dong, Hwang, Dae-Youn, Lee, Chung-Yeol, Son, Hong-Joo (2010).** Rapid solubilization of insoluble phosphate by a novel environmental stress-tolerant *Burkholderia vietnamiensis* M6 isolated from ginseng rhizospheric soil. Appl. Microbiol. Biotechnol. 86: 947-955.
- Paster, N. and Bullerman, L. B. (1988).** Mould spoilage and mycotoxin formation in grains as controlled by physical means. International Journal of Food Microbiology 7, 257-265.
- Porat, R., Lers, A. S., Dori, L., Cohen, B., Weiss, A., Daus, C. S., Wilson, S., Droby, S. (1999a).** Induction of chitinase and β -1,3-endoglucanase proteins by UV irradiation and wounding in grapefruit peel tissue. Phytoparasitica 27, 233-238.
- Porat, R., Vinocur, V., Weiss, B., Cohen, L., Droby, S. (1999b).** Effects of various elicitors on the resistance of citrus fruit against pathogens. Phytoparasitica 27, 157-158.
- Porat, R., Pavoncello, D., Peretz, J., Weiss, B., Daus, A., Cohen, L., Ben-Yehoshua, S., Droby, S., Lurie, S. (2000).** Induction of resistance to *Penicillium digitatum* and chilling injury in Star Ruby grapefruit by a short hot water rinse and bryshing treatment. J. Hortic. Sci. Biotechnol. 75, 428-432.
- Payne, George W., Vandamme, Peter, Morgan, Sara H., Li Puma, John J., Coenye, Tom,**

- Weightman, Andrew J., Jones, T. Hefin, and Mahenthiralingam, Eshwar (2005).** Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3917-3927.
- Sholberg, P. L., Haag, P., Hocking, R., Bedford, K. (2000).** The use of vinegar vapor to reduce post harvest decay of harvested fruit. *HortScience.* 35, 898-903.
- Smilanick, J. L. and Denis-Arrue, R. (1992).** Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species. *Plant Dis.* 76; 481-485.
- Smilanick, J. L., Mansour, M. F., Mlikota Gabler, F., Goodwine, W. R. (2006).** The effectiveness of pyrimethanil to inhibit germination of *Penicillium digitatum* and to control citrus green mold after harvest. *Postharvest Biol. Technol.* 42, 75-85.
- Spotts, R. A. and Cervantes, L. A. (1986).** Populations, pathogenicity and benomyl resistance of *Botrytis* spp., *Penicillium* spp. and *Mucor piriformis* in packinghouses. *Plant Disease* 70, 106-108.
- Tang, Sui-Yan, Hara, Shintaro, Melling, Lulie, Goh, Kah-joo and Hashidoko, Yasuyuki (2010).** *Burkholderia vietnamiensis* Isolated from Root Tissues of Nipa Palm(*Nypa fruticans*) in Sarawak, Malaysia, Proved to Be Its Major Endophytic Nitrogen-Fixing Bacterium *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74: 1972-1975.
- Tzortzakis, Nikos G., Economakis Costas D. (2007).** Antifungal activity of lemongrass(*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 8: 253-258.
- Viñas, I., Vallverdú, N., Monallao, S., Usall, J. and Sanchis, V. (1993).** Imazalil resistant *Penicillium* isolated from Spanish apple packinghouse. *Mycopathology* 123, 27-33.
- Wang L. T., Lee F. L., Tai C. J., Kuo H. P. (2008).** *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 671-5.
- Wisniewski, M. E. and Wilson, C. L. (1992).** Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. *Hortscience* 27, 94-98.
- Wyatt, M. K. and Parish, M. E. (1995).** Spore germination of citrus juice-related fungi at low temperatures. *Food Microbiology* 12, 237-243.

- Yahyazadeh, Mahdi, Reza Omidbaigi, Rasoul Zare and Hossein Taheri (2008).** Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. World J. Microbiol Biotechnol. 24: 1445 - 1450.
- Yu, G. Y., Sinclair, J. B., Hartman, G. L. and Bertagnolli, B. L. (2002).** Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. Soil Biol Biochem. 34: 955-963.
- 김용기. 2000.** 마늘·양파 저장병 발생생태 및 피해경감연구. 2000 작물보호연구. 농업과학기술원.
- 김태수, 안태진, 정진교, 방진기, 정해곤. 2005.** 천연물 소재 기피제 및 살충물질 개발 기초연구. 작물과학연구논총 제6권. 615-619.
- 남기웅, 권혁모, 송남현. 1993.** 온주밀저장에 관한 연구 : I. Thiophanate-methyl 처리 및 물리적 상처가 저장력에 미치는 영향. 한국원예학회지. 34, 279-284.