최 종
연구보고서

감귤 수확후 장기선도 유지를 위한 신소재 개발

Development of New Material for Long-term Freshness Maintenance after Harvest in Mandarin

고려대학교

농 림 부

〔별지 제7호 서식]

최 종 보 고 서

190mm×268mm

2000 년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 감귤 수확후 장기선도유지를 위한 신소재 개발에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

2. 최종보고서 디스켓 1매

2000 년 10 월 8 일

주관연구기관 : 고려대학교

총괄연구책임자 : 이 창 후 (인)

주관연구기관장 : 김 정 배 (직인)

농 림 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “감귤 수확후 장기선도 유지를 위한 신소재 개발에 관한 연구”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000 년 10 월 8 일

주관연구기관명 : 고려대학교
총괄연구책임자 : 이 창 후
연 구 원 : 김 정 선
반 수 정
협동연구기관명 : (주)그린바이오텍
협동연구책임자 : 최 성 원
위탁연구기관명 : 제주 감귤연구소
위탁연구책임자 : 최 영 훈

요 약 문

Ⅰ. 제 목

감귤 수확후 장기 선도유지를 위한 신소재 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

현재 제주도에서 재배되고 있는 감귤은 주로 온주밀감(*Citrus unshiu*)이며, 생산량을 숙기별로 보면 극조생온주가 35,650톤으로 전체 감귤 생산량의 6.8%을 차지하고 있다. 생산량을 보면 조생온주는 400,630톤으로 76.8%, 보통온주 79,800톤으로 15.3%을 차지하고 있으나, 보통온주의 생산량은 줄어드는 반면 조생온주 재배면적과 생산량은 매년 증가하고 있는 추세이다.

온주밀감은 대부분 노지에서 재배되고 있으며 11 12월에 걸쳐 대부분 수확되고 있다. 대부분의 온주밀감 출하는 2월 중순경까지로 그 이후에는 하우스감귤이 첫 출하되는 5월 하순까지 단경기가 형성되고 있는 실정이다. 감귤은 저장 특성상 시설 투자 후 1년 중 약 2 3개월밖에 사용할 수 없어 비경제적이며, 재래의 저장방법인 상온 노지 저장의 경우, 약 40%가 부패하여 농가 소득 감소 및 가격 상승요인 발생의 원인이 되고 있다. 또한, 장기선도유지를 위한 저온저장(4℃ 저장고)을 이용할 경우 막대한 시설비 투자가 요구된다. 우수품종인 조생종 감귤의 경우, 현재 저온저장에 고비용이 소요되어 약 50%의 영세 재배농의 경우 저장 기피하고 있다.

따라서, 본 연구에서는 이러한 제주 농민들의 현장애로를 해결하고자 일반 농가에서도 사용이 용이하며, 저비용·무독성·환경친화형의 감귤 수확후 선도유지를 위한 신소재 개발을 목적으로 실시되었다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 제주 농민들의 현장애로를 해결하고자 일반 농가에서도 사용이 용이하며, 저비용·무독성·환경친화형의 감귤 수확후 선도유지를 위한 신소재 개발을 목적으로 실시되었으며, 1) 감귤의 수확후 장기선도유지 신소재 처리기술 개발, 2) 항진균활성 미생물분리와 천연활성제의 대량생산, 그리고 3) 항진균활성 미생물과 천연활성제를 이용한 감귤의 대규모 노지적용의 3가지 세부과제로 구성되어 있다.

본 과제의 연구범위는 다음과 같다.

(1) 감귤의 수확후 장기선도유지 신소재 처리 기술 개발

1) 선발균주의 감귤 수확후 부패억제를 위한 처리방법 실험
- 선발균주들을 침지, 살포 등의 여러 가지 방법으로 감귤에 처리
- 처리방법에 따른 최적의 조건 모색
- 항진균성 미생물의 최적 처리 농도 검사

2) 항진균성 미생물로 선발된 균주들의 감귤 수확후 부패 억제 실험
- 항진균성 미생물에 의한 감귤 장기선도유지에 대한 효능 검증 (균주선발 목적)
- 항진균성 선발균주들을 상온과 저온에서 감귤에 처리
- 처리후 부패억제율 조사 및 우수균주 확보
- 처리방법에 따른 저장성의 감소 및 이차적 병해의 발생 검토

3) 감귤 수확후 장기선도유지를 위한 천연활성제의 처리방법 및 최적농도 구명
- 처리방법에 따른 저장성 증가 및 감소율 조사
- 사용되는 천연활성제의 최적농도 구명

4) 항진균성 천연활성제의 감귤 수확후 부패억제 시험
- 항진균성 천연활성제를 감귤에 소규모로 처리
- 부패율 / 당산비 등 부패억제율 및 선도유지정도 실험
- 항진균성 천연활성제의 감귤 처리후 상품성 확인

- **항진균성 천연활성제로 인한 감귤 처리후 이차적 병해 발생 확인**
- **항진균성 천연활성제 생산의 경제성 검토**

(2) **항진균활성 미생물과 천연활성제의 대량생산**

1) **항진균 활성 미생물의 배양특성조사**
- **감귤 수확후 주요 부패 곰팡이에 대하여 검색된 항진균성 미생물의 동정**
- **항진균성 미생물의 생물학적 특성검사**
- **독성검사**

2) **감귤 수확후 장기선도유지를 위한 유용 미생물 선발균주의 생산 최적화**
- **분리균주의 배양특성 조사**
- **균체 생산의 배지 최적화**
- **최적의 산업용 배지 선택**

3) **천연활성제의 개발**
- **항진균활성 미생물로부터 항진균활성 천연활성제 분리**
- **항진균활성 천연활성제의 안전성 시험**
- **항진균활성 천연활성제의 생산최적화**

4) **장기선도유지를 위한 항진균성 미생물과 천연활성제의 대량 생산 및 제제화 연구**
- **항진균성 미생물과 천연활성제의 적용확대 시험과 제제화 확립**
- **부형제 선택 등 제제화 시험 (액제, 분제 등)**
- **액상, 분말 등 기존 농가의 농기구류로 활용이 용이한 형태 제제화**

(3) **항진균활성 미생물과 천연활성제를 이용한 감귤의 대규모 노지적용**
- **항진균성 미생물과 항진균 천연활성제를 실제로 사용되어질 제주 농가에 시험 적용**
- **대규모 노지 적용성 검토**
- **경제성의 검토**

Ⅳ. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

본 연구과제의 결과는 다음과 같다.

(1) 감귤의 수확후 장기선도유지 신소재 처리 기술 개발

1) 감귤 저장중 발생하는 곰팡이에 대한 항진균활성 미생물의 활성 검정을 검정한 결과 GB-017과 GB-0365, 그리고 GB-017 + GB-0365 처리구 모두 *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., 그리고 *Alterhenza* sp.에 대하여 매우 뛰어난 길항성을 보여주었으며, 그 효과는 6.3×106 spores/ml에서 부터 6.3×104 spores/ml 까지 다양하게 나타났다.

2) 감귤 수확후 장기저장을 위한 항진균활성 미생물의 최적농도는 GB-0365 균주의 경우 1/2 희석액, GB-017은 1/10 희석액, GB-0365+GB-017은 1/2희석액으로 결정되었으며, 이후의 항진균성 미생물을 이용한 흥진조생 감귤의 저장실험에 적용되었다.

3) 흥진조생 감귤에 항진균성 미생물의 처리결과 무처리구에서는 저장 10일 이후부터 과피에 흰곰팡이가 발생하기 시작하여 저장후 105일(3달 반)까지 거의 모두 부패하였으며, 미생물 처리구는 저장 후 85일째까지는 곰팡이 발생율이 매우 낮았다. 또한, 무처리구에서는 부패과의 다른 과실로의 전이율이 매우 높았으나, 항진균성 미생물 처리구에서는 모두 부패전이율이 낮았다.

4) 항진균성 미생물 균주 중 GB-0365를 이용하여 궁천조생밀감에 수상처리 및 침지처리를 실시한 결과, 수상처리가 더 효과적임이 밝혀졌다. 수상처리는 무처리(68.2%)에 비하여 50일 이후의 부패율이 매우 낮았으며(17%), 침지처리(32.2%)의 경우에도 무처리에 비하여 부패율이 낮은 경향을 나타내었다.

5) 항진균활성 미생물 유래의 천연활성제가 감귤 저장에 미치는 효과를 알아보기 위하여 무처리구, 천연활성제 1/20, 1/40, 1/60 희석액 처리구로 침지처리한 결과, 무처리구에 비하여 천연활성제 희석액 모든 처리구에서의 부패율이 상당량 감소되었다. 특히 천연활성제 1/20 희석액 처리구에서는 부패율이 저장기간 90일 경과후 10.2%로 부패억제효과가 아주 뛰어났으며, 외관상 상품성의 변화에도 거의 영향을 미치지 않았다.

(2) 항진균활성 미생물과 천연활성제의 대량생산

1) 분리주 GB-0365를 전자현미경으로 관찰하면 간균의 형태를 띠고 있었고, 그람

염색결과 그람양성으로 확인되었으며, 운동성을 지니고 있었다. 이 균주는 *Bacillus subtilis*로 동정되었고, *Bacillus subtilis* GB-0365로 명명하였다. 또한 분리주 GB-017의 경우는 전자현미경으로 관찰하였을 때 간균의 형태를 띠고 있었고, 그람양성이었으며, 운동성을 지니고 있었다. 이 균주 또한 *Bacillus* sp.로 동정되었고, *Bacillus* sp. GB-017로 명명하였다.

2) 길항미생물 *Bacillus subtilis* GB-0365 균주와 식물 병원균과의 길항효과 검정결과, 잿빛곰팡이병의 원인이 되는 보트리티스 시네리아(*Botrytis cineria*)에 대하여 생육저지효과를 나타내어 균사생육억제 현상이 높았으며 작물의 시들음병의 원인이 되는 푸사리움(*Fusarium* sp.), 입고병과 잘록병의 원인균 피시움속(*Pythium* sp.), 잔디의 주요 병원성 균인 브라운패취(*R. solani* MAFF 511103), 라지패취(*R. solani* MAFF 305245)에 대하여서도 억제효과를 나타내었다. 반면, 세균과 효모에 대해서도 생육 억제효과가 없는 것으로 보아 식물성 병원균에 대해서만 선택적인 활성을 갖는 것으로 나타났다. 한편, 바실러스속 GB-017의 경우, 입고병과 잘록병의 원인균 피시움속(*Pythium* sp.)에 대하여 생육 저지효과가 높았으며 잿빛곰팡이병의 원인이 되는 보트리티스 시네리아(*Botrytis cineria*), 시들음병의 원인이 되는 푸사리움(*Fusarium* sp.), 브라운패취(*R. solani* MAFF 511103), 라지패취(*R. solani* MAFF 305245)에 대하여서도 억제효과를 나타내었다. 세균과 효모에 대해서도 생육 억제효과가 없는 것으로 보아, 식물성 병원균에 대해서만 선택적인 활성을 갖는 것으로 나타났다.

3) 항진균활성 미생물들의 대량생산을 위한 배지조성은 경제성을 고려하여 질소원으로는 soybeam meal를 탄소원으로는 starch를 선정하였다. 또한 배지의 완충효과를 주기 위해 들어가는 지나친 인산염을 배제하고 pH 조정이 가능한 발효조의 이용을 전제로 material balance를 고려하여 보다 단순한 조성을 갖는 균체 및 항진균성 대사산물의 생산배지를 고안하였다.

4) 항진균성 미생물 *B. subtilis* GB-0365의 포자형성 유도를 위하여 금속이온(Ca^{2+})과 dipicolinic acid(DPA)의 첨가에 의한 내생포자유도를 검토한 결과, 10mM의 Ca^{2+} 이온을 배양초기에 첨가하는 것이 효과적인 것으로 판명되었으며, DPA를 배양초기에 배지에 함께 첨가하면 균의 생육과 항균활성물질 생산이 크게 억제되는 현상이 관찰되었다. 또한 포자형성유도는 통상 DPA의 첨가 후 6 10시간 내에 완료되는 것으로 판단되었다.

5) *Bacillus* sp. GB-017도 autolysis에 의한 불안전함을 보였고, 이를 해결하기 위해 前記와 같이 영양세포수, 내생포자수 그리고 항균활성을 비교하면서, 배지의 일부를 개량하거나 첨가제의 첨가시기 및 농도를 결정하였다.

6) *B. subtilis*를 입상으로 제제화할 경우에 값싼 콩비지를 이용한 고체배양이 액체배양이 액체배양에 비하여 보다 균밀도가 높은 미생물원제를 공급할 수 있다는 면에서 경제성이 있을 것으로 판단된다.

7) 항균활성물질이 배양액 중에 균체 내·외에 어느 정도 존재하는 지의 여부를 알기 위해서 배양액 30 ml를 8,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액과 균체를 분리한 결과, 항균활성물질이 균체내·외에 모두 분포하고 있었다.

8) 항균활성물질의 pH와 온도에 따른 안정성을 조사한 결과 본 항균활성물질은 산성과 약알칼리성 영역에서 비교적 안정한 활성을 유지하는 것으로 나타났으며, 비교적 열에 안정한 물질임을 알 수 있었다.

(3) 항진균활성 미생물과 천연활성제를 이용한 감귤의 대규모 노지적용

1) 노지감귤의 침적처리에 의한 대규모 노지적용을 통한 항진균미생물제 능력검정 결과 흥진조생 및 궁천조생품종에서는 부패과 발생 및 감모 억제에 효과가 우수함이 인정되었다.

2) 하우스감귤의 침적처리에 의한 대규모 노지적용을 통한 항진균미생물제 능력검정에서도 부패과율에서 항진균제재 처리가 무처리에 비해 부패과율 발생이 적어 각종저장병해 억제효과가 인정 되었다

3) 극조생, 조생 및 하우스감귤에 항진균미생물제 희석 배수별 수상처리 농가실증을 통한 적용시험 결과 부패과 발생억제는 항진균미생물제재 20배액 처리구가 무처리구에 비해 2배이상 우수한 효과를 보였다. 감모율억제 및 경도유지에서도 항진균미생물제 20배액 처리가 가장 효과적 이었다.

4) 항진균미생물제재(*Bacillus sp*. GB-0365, GB-017)를 처리하여 저장을 할 경우에는 항진균미생물제재 20배액으로 수상살포하여 처리하면 농가노동력절감 및 부패억제 및 선도유지저장에 효과가 있어 농가부가가치 향상에 기여할 것으로 사료된다.

S U M M A R Y

The objective of this project was to develop the new storage materials with low cost, nonpoisonous, and environmental affinity for showing the solution of filed bottleneck in Jeju. This project was made up 1) development of treatment technology with new materials for long-term storage in mandarin, 2) mass production of anti-fungal bacteria and the natural active substance, and 3) the large scale field application using the anti-fungal bacteria and the natural active substance in mandarin.

The results were follows:

(1) Development of treatment technology with new materials for long-term storage in mandarin

1) All of *Bacillus* strain GB-017, GB-0365, and GB-017+GB-0365 were showed prominently antagonisms against *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., and *Alterhenza* sp. The effects of bacterial concentration had appeared from 6.3×106 spores/ml to 6.3 ×104 spores/ml.

2) The optimal concentrations of anti-fungal bacteria were determined 1/2 dilution of GB-0365, 1/10 dilution of GB-017, and 1/2 dilution GB-0365+GB-017 strains.

3) White fungi were generated on the pericap after 10 days from storage and almost mandarins were decayed until 105 days in control, on the other hands, rates of fungal occurrence was very low until 85 days in anti-fungal bacterial treatments.

4) Using GB-0356 strain, dipping treatment was evaluated more effective on mandarin storage between tree spraying and dipping. In tree spraying treatment, the rate of decay after 50 days was very low compared with control, and the case of dipping was inclined lower than that of control.

5) For the purpose of examining the effect of the natural active substance mediated anti-fungal bacteria to mandarin storage, we had treated with control, 1/20, 1/40, 1/60 of the natural active substance. As the result of this test, the rate of decay was considerably decreased in all of dilution treatments. The natural active substance treatment of 1/20 dilution was especially fine to effective on decay suppression after 90 days, and had no affected in the change of external

appearance.

(2) Mass production of anti-fungal bacteria and the natural active substance

1) GB-0365 strain was bacillus form with the electron microscope observation, gram-positive with gram-staining, and having motional activity. This strain was characterized *Bacillus subtilis*, and called *Bacillus subtilis* GB-0365. In the case of GB-017 strain, it was bacillus form with the electron microscope observation, gram-positive with gram-staining, and having motional activity. This strain was also characterized *Bacillus* sp., and called *Bacillus* sp. GB-017.

2) As the results of the antagonism between *Bacillus subtilis* GB-0365 and plant pathogens, GB-0365 showed the repression effect to *Botrytis cineria*, *Fusarium* sp., *Pythium* sp., *R. solani* MAFF 511103, and *R. solani* MAFF 305245. Also, in the case of *Bacillus* sp. GB-017, it had the repression effect to *Pythium* sp., *Botrytis cineria*, *Fusarium* sp., *R. solani* MAFF 511103, and *R. solani* MAFF 305245. All of two, they had the selectable activity in plant pathogens out of consideration for lacking the repression effect to bacteria and yeast.

3) For the mass production of anti-fungal bacteria, we made a selection of soybean meal as N source and starch as C source to the medium.

4) In order to the induction of spore formation in *B. subtilis* GB-0365, the addition of 10 mM Ca^{2+} was effective in initiation culture. However, it had made observation of bacterial growth suppression with dipicolinic acid (DPA) addition in initiation culture.

5) *Bacillus* sp. GB-017 also showed the imperfection by autolysis.

6) Granular manufacture was more economical efficiency than liquid in *B. subtilis.*

7) Anti-fungal active substances were distributed in and out of bacteria.

8) Anti-fungal active substances were comparatively stable in pH and temperature.

(3) The large scale field application using the anti-fungal bacteria and the natural active substance in mandarin

1) As the results of dipping treatment in field mandarin, the effect of anti-fungal bacteria had approved in 'Heungjin' and 'Koongcheon' mandarin with low decay rate and depreciation.

2) In the dipping treatment of house mandarin, the rate of decay was considerably

decreased than control.

3) As the results of the tree spraying of the natural active substance mediated anti-fungal bacteria to the large scale field application in mandarin storage, the natural active substance treatment of 1/20 dilution was especially fine to effective on decay suppression.
4) In conclusion, the treatments of *Bacillus sp*. GB-0365, GB-017 will contribute to value added of farmhouse with 1/20 dilution by tree spraying.

CONTENTS

목 차

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

현재 제주도에서 재배되고 있는 감귤은 주로 온주밀감(*Citrus unshiu*)이며, 생산량을 숙기별로 보면 극조생온주가 35,650톤으로 전체 감귤 생산량의 6.8%을 차지하고 있다. 생산량을 보면 조생온주는 400,630톤으로 76.8%, 보통온주 79,800톤으로 15.3%을 차지하고 있으나, 보통온주의 생산량은 줄어드는 반면 조생온주 재배면적과 생산량은 매년 증가하고 있는 추세이다.

온주밀감은 대부분 노지에서 재배되고 있으며 11 12월에 걸쳐 대부분 수확되고 있다. 대부분의 온주밀감 출하는 2월 중순경까지로 그 이후에는 하우스감귤이 첫 출하되는 5월 하순까지 단경기가 형성되고 있는 실정이다. 감귤은 저장 특성상 시설 투자 후 1년 중 약 2 3개월밖에 사용할 수 없어 비경제적이며, 재래의 저장방법인 상온 노지 저장의 경우, 약 40%가 부패하여 농가 소득 감소 및 가격 상승요인 발생의 원인이 되고 있다. 또한, 장기선도유지를 위한 저온저장(4℃ 저장고)을 이용할 경우 막대한 시설비 투자가 요구된다. 우수품종인 조생종 감귤의 경우, 현재 저온저장에 고비용이 소요되어 약 50%의 영세 재배농의 경우 저장 기피하고 있다.

따라서, 본 연구에서는 이러한 제주 농민들의 현장애로를 해결하고자 일반 농가에서도 사용이 용이하며, 저비용·무독성·환경친화형의 감귤 수확후 선도유지를 위한 신소재 개발을 목적으로 실시되었으며, 1) 감귤의 수확후 장기선도유지 신소재 처리기술 개발, 2) 항진균활성 미생물분리와 천연활성제의 대량생산, 그리고 3) 항진균활성 미생물과 천연활성제를 이용한 감귤의 대규모 노지적용의 3가지 세부과제로 구성되어 있다.

본 과제의 연구범위는 다음과 같다.

(1) 감귤의 수확후 장기선도유지 신소재 처리 기술 개발

1) 선발균주의 감귤 수확후 부패억제를 위한 처리방법 실험
- 선발균주들을 침지, 살포 등의 여러 가지 방법으로 감귤에 처리
- 처리방법에 따른 최적의 조건 모색

- **항진균성 미생물의 최적 처리 농도 검사**

2) **항진균성 미생물로 선발된 균주들의 감귤 수확후 부패 억제 실험**
   - **항진균성 미생물에 의한 감귤 장기선도유지에 대한 효능 검증 (균주선발 목적)**
   - **항진균성 선발균주들을 상온과 저온에서 감귤에 처리**
   - **처리후 부패억제율 조사 및 우수균주 확보**
   - **처리방법에 따른 저장성의 감소 및 이차적 병해의 발생 검토**

3) **감귤 수확후 장기선도유지를 위한 천연활성제의 처리방법 및 최적농도 구명**
   - **처리방법에 따른 저장성 증가 및 감소율 조사**
   - **사용되는 천연활성제의 최적농도 구명**

4) **항진균성 천연활성제의 감귤 수확후 부패억제 시험**
   - **항진균성 천연활성제를 감귤에 소규모로 처리**
   - **부패율 / 당산비 등 부패억제율 및 선도유지정도 실험**
   - **항진균성 천연활성제의 감귤 처리후 상품성 확인**
   - **항진균성 천연활성제로 인한 감귤 처리후 이차적 병해 발생 확인**
   - **항진균성 천연활성제 생산의 경제성 검토**

(2) **항진균활성 미생물과 천연활성제의 대량생산**

1) **항진균 활성 미생물의 배양특성조사**
   - **감귤 수확후 주요 부패 곰팡이에 대하여 검색된 항진균성 미생물의 동정**
   - **항진균성 미생물의 생물학적 특성검사**
   - **독성검사**

2) **감귤 수확후 장기선도유지를 위한 유용 미생물 선발균주의 생산 최적화**
   - **분리균주의 배양특성 조사**
   - **균체 생산의 배지 최적화**
   - **최적의 산업용 배지 선택**

3) 천연활성제의 개발

- 항진균활성 미생물로부터 항진균활성 천연활성제 분리
- 항진균활성 천연활성제의 안전성 시험
- 항진균활성 천연활성제의 생산최적화

4) 장기선도유지를 위한 항진균성 미생물과 천연활성제의 대량 생산 및 제제화 연구

- 항진균성 미생물과 천연활성제의 적용확대 시험과 제제화 확립
- 부형제 선택 등 제제화 시험 (액제, 분제 등)
- 액상, 분말 등 기존 농가의 농기구류로 활용이 용이한 형태 제제화

(3) 항진균활성 미생물과 천연활성제를 이용한 감귤의 대규모 노지적용

- 항진균성 미생물과 항진균 천연활성제를 실제로 사용되어질 제주 농가에 시험 적용
- 대규모 노지 적용성 검토
- 경제성의 검토

제 2 장 감귤의 수확후 장기선도유지 신소재 처리 기술 개발

제 1 절 서 설

원예산물은 수확후 진균류 발생에 의한 부패로 실제 저장과 유통과정 중에 전체 생산물의 25-80%가 손실되고 있다. 감귤류도 예외는 아니어서 청색곰팡이병(blue mold; *Penicillium italicum*)과 녹색곰팡이병(lemon green mold; *Penicillium digitatum*) 등으로 인한 저장중 과실 연화 및 부패의 피해가 매우 크다. 이러한 저장 중 부패의 원인인 진균류는 식물체를 공격하여 세포막의 산화반응을 일으켜 식물의 성숙 및 노화에 관련된 호르몬인 에틸렌의 생산과 작용을 촉진시킴으로써 식물의 노화를 빠른 속도로 증가시킨다(Abeles 등, 1992; Elad, 1988; Elad, 1992; Evensen, 1995). 또한 이에 따른 막의 손상은 진균류의 식물세포내로 침투 및 생장을 도와주게 되며, apoplast solution의 조성에 변화를 일으킴으로써 세포벽이 가수분해되고 세포가 더 빨리 죽음에 이르게 하여 원예 생산물의 저장력을 간접적으로 떨어뜨리는 원인이 되고 있다(Cronshaw와 Pegg, 1976; Droillard 등, 1987).

과실의 부패를 방제하기 위한 방법으로 fungicide의 처리와 함께 가시광선, UV, X-ray, gamma ray radiation, 열처리, 훈연처리 등이 있다(Louise 등, 1959). 그러나, fungicide에 대한 각국의 규제와 기존의 처리방법이 식품오염과 잔류성으로 인체에 미치는 유해성이 문제가 되어 다른 방제방법을 개발할 필요성이 대두되고 있으며, 최근 antagonistic microorganism이 'living fungicide'로서 수확후 부패를 방제하기 위한 방법으로 개발·발달되기 시작하였다(Kohl 등, 1995; Wisniewsli와 Wilson, 1992).

수확후 저장전 오렌지에 *Pseudomonas cepacia*를 처리하였더니 *Alternaria* rot과 푸른곰팡이의 발생이 억제되어 수확후 손실을 줄일 수 있었으며(Huang 등, 1993), 과수원 토양에서 분리한 antagonist를 사과의 과실과 잎에 처리하였더니 *Botrytis cinerea*와 *P. expansum*의 포자형성을 억제하였다(Janisiewiez, 1985). 또한 배에서 분리한 *Sporobolomyces roseus* (pink yeast)는 사과의 저장중 부패를 감소시켰고(Janisiewiez, 1994), 딸기에 *Trichoderma virid, T. harzianum*을 스프레이 처리하였더니 곰팡이의 포자형성을 억제하였으며(Pratella와 Mari, 1993), 항진균성 세균으로 자주 이용되는 *Pseudomonas cepacia*를 사과와 배에 처리한 결과 푸른곰팡이와 회색곰팡이 모두에 효과적이었다(Janisiewiez와 Roitman, 1988; Janisiewiez등, 1991).

그러나, 세균을 처리할 경우에는 대상 식물에 다른 phytotoxicity를 나타내지 않는 것이 중요하다. 사과의 Botrytis rot에 *Trichomoderma pseuokoningii*를 처리하였더니 진균류는 방제하면서 사과에는 다른 부패병을 일으키지 않았으며(Tronsmo와 Raa, 1977), 복숭아에 자주 발생하는 brown rot의 방제에 *Bacillus subtilis*를 처리하였더니 접종후 70% 정도의 부패방제에 성공하였고, 과실의 경도에 영향을 미치지 않았으며 어떠한 독성 또한 나타나지 않았다(Pusey 등, 1987; Charles 등, 1987).

페튜니아, 제라늄, 절화장미 등 화훼류를 대상으로도 antagonist의 실험이 이루어져 왔는데, 여기에서 또한 꽃이나 꽃받침에 아무런 phytotoxicity의 증상없이 진균류의 방제에 효과가 있었다(Gould 등, 1996; Hammer등, 1993; Mooreman 등, 1992; Redmond 등, 1987).

감귤은 저장 특성상 시설 투자후 1년중 약 2 3개월밖에 사용할 수 없어 비경제적이며, 재래의 저장방법인 상온 노지 저장의 경우, 약 40%가 부패하여 농가 소득 감소 및 가격 상승요인 발생의 원인이 되고 있다. 또한, 장기선도유지를 위한 저온저장(4℃ 저장고)을 이용할 경우 막대한 시설비 투자가 요구된다. 우수품종인 조생종 감귤의 경우, 현재 저온저장에 고비용이 소요되어 약 50%의 영세 재배농의 경우 저장 기피 (현재 제주도 감귤중 조생종이 73.2% 차지)하고 있다. 또한, 감귤 수확후 화학농약 사용을 대체할 수 있는 무독성 환경친화형 신소재 개발이 요구되고 있고, 일반 농가에서 사용이 용이한 저비용의 수확후 선도유지를 위한 신소재 개발이 시급한 실정이다.

따라서, 본 연구과제에서는 상기와 같은 현장애로사항을 해결하기 위하여 무독성·환경친화형 저장소재를 개발하고자 실시되었으며, 제 1 세부과제에서는 개발한 항진균활성 미생물 및 항진균활성 미생물 유래의 천연활성제의 효과 검증 및 다양한 처리법을 개발하고자 수행되었다.

제 2 절 재료 및 방법

제 1 항 감귤 저장중 발생하는 곰팡이에 대한 항진균활성 미생물의 활성 검정

본 연구에서 확보한 균주는 *Bacillus* spp.이며 균주들 중에서 감귤 저장중에 발생하는 여러 가지 진균류들에 접종한 결과 가장 항진균성 효과가 뛰어난 strain을 선발하여 GB-017과 GB-0365로 명명하였다.

감귤의 저장중 발생하는 진균류의 분리를 위하여, 감귤을 상온에 두어 과실 표면에 자연적으로 발생한 fungi를 접종침으로 분리하여 Potato Dextrose Agar 배지에 접종한 후 25℃ 항온기에서 3-5일간 배양하였으며, 배양한 fungi는 단일종으로 분리하기 위하여 순수분리하였다(그림 1-1, 그림 1-2).

발생한 fungi 포자는 각각 멸균 filter paper에 묻혀 PDA배지의 가운데 부분에 접종한 후, fungi를 접종한 부위의 둘레에 GB-017과 GB-0365, 그리고 GB-017+LSH55의 현탁액에 침지한 멸균 paper를 치상하였다.

균주의 농도는 GB-0365 (원액, 1/2, 1/10, 1/50, 1/100 희석액), GB-017 (원액, 1/2, 1/10, 1/50, 1/100 희석액), 그리고 GB-0365 + GB-017 (원액, 1/5, 1/10, 1/50 희석액)로 처리하였다.

Fungi와 bacteria를 접종한 petridish는 30℃ 항온기에서 3-5일간 배양하였고, 배지에서 fungi가 생장한 정도와 bacteria가 생장한 정도를 관찰하여 petridish 내에서 fungi의 생장을 억제하는 것으로 보이는 bacteria를 길항성이 있는 세균으로 판단하였다.

제 2 항 감귤 수확후 장기저장을 위한 항진균활성 미생물의 최적농도 선발실험

감귤 수확후 장기저장을 위한 항진균성 미생물의 최적농도를 선발하기 위하여 공시재료로 궁천조생을 사용하였다. 저장 온도는 8-11℃로 조절하였으며, 온도 기준은 1998년 11월말에서 1999년 3월 중순까지의 제주도 현지온도에 맞추어서 조절하였다. 저장 처리는 총 15개 처리구로 무처리구, GB-0365 (원액, 1/2, 1/10, 1/50, 1/100 희석액), GB-017 (원액, 1/2, 1/10, 1/50, 1/100 희석액), 그리고 GB-0365 + GB-017 (원액, 1/5, 1/10, 1/50 희석액)로 처리하였다. 원액은 30℃에서 균주를 LB+soluble starch 배지에 24시간 배양한 액(6.3×106 spores/ml), 그리고 희석액은 배양배지만을 첨가하여 희석한 것을 사용하였다. 위의 처리구들은 품종별로 각각 15kg씩 4반복으로 box처리하였으며, 과실의 무게 감소율 및 유기산, 당산비의 변화율을 조사하였다.

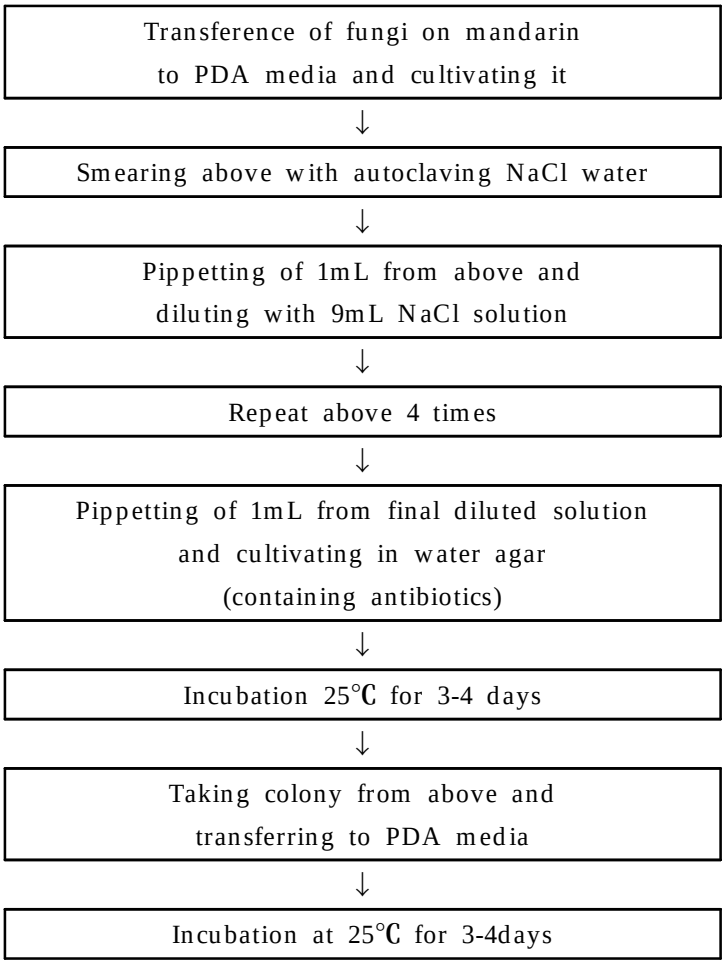

Fig. 1-1. Flow diagram of purification and isolation of fungi applied for the present studies.

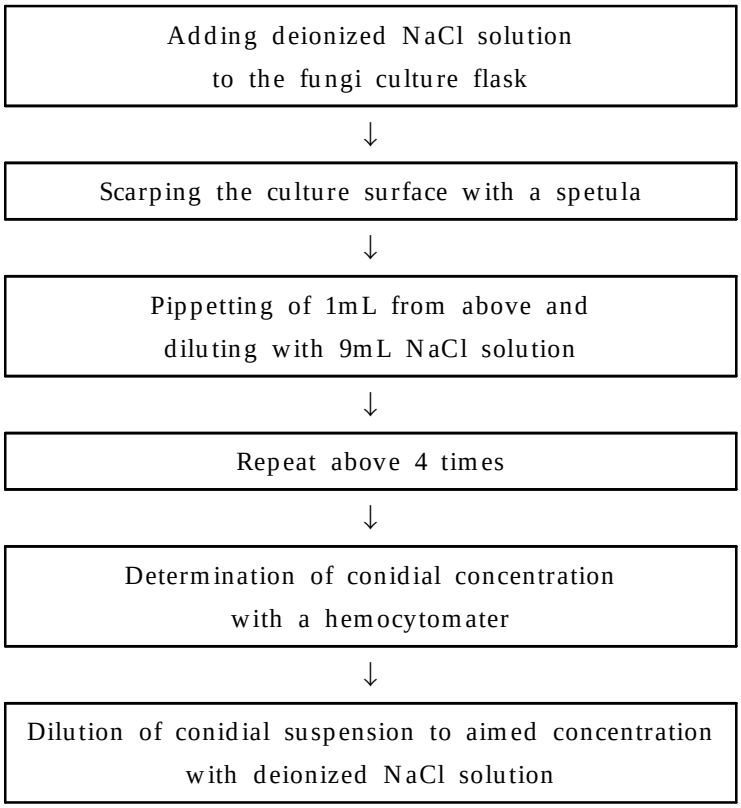

Fig. 1-2. Flow diagram of determination of conidial suspension concentration applied for the present studies (Rohrbach and Pfeiffer, 1976).

제 3 항 항진균활성 미생물을 이용한 감귤저장

항진균성 미생물을 이용한 감귤저장의 공시재료로 흥진조생을 사용하였다. 저장 온도는 8-11℃로 조절하였으며, 온도 기준은 1998년 11월말에서 1999년 3월 중순까지의 제주도 현지온도에 맞추어서 조절하였다. 처리방법은 침지처리를 사용하였으며, 총 4개 처리구로 무처리구, GB-0365, GB-017, 그리고 GB-0365+GB-017로 처리하였다. 처리농도는 각 균주별로 항진균성 미생물 최적농도선발실험에서 결정된 농도를 사용하다. 또한, 위의 처리구들은 품종별로 각각 15kg씩 4반복으로 box처리하였으며, 과실의 무게 감소율 및 유기산, 당산비의 변화율을 조사하였다.

제 4 항 항진균성 미생물 처리방법 실험

공시재료는 궁천조생을 사용하였으며, 제 2 항의 결과에서 가장 좋은 결과를 나타낸 GB-0365 균주를 1/2희석액 농도로 처리하였다. 처리방법은 제주도 현지에서 침지처리와 수체살포 두 가지 방법으로 실시하였으며, 저장온도는 농가에서 실제로 적용할 수 있는 상온저장에 기준을 두었다.

제 5 항 항진균활성 미생물 유래의 천연활성제를 이용한 감귤의 저장

항진균활성 미생물 유래의 천연활성제를 이용한 감귤의 저장을 위한 공시재료는 궁천조생을 사용하였다. 저장 온도는 8-11℃로 조절하였으며, 온도 기준은 1999년 12월초에서 2000년 3월말까지의 제주도 현지온도에 맞추어서 조절하였다. 저장 처리는 총 4개 처리구로 무처리구, 천연활성제 1/20, 1/40, 1/60 희석액을 사용하였다. 위의 처리구들은 각각 15kg씩 4반복으로 box처리하였으며, 과실의 무게 감소율 및 유기산, 당산비의 변화율을 조사하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

제 1 항 감귤 저장중 발생하는 곰팡이에 대한 항진균활성 미생물의 활성 검정

순수분리된 fungi는 *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., 그리고 *Alterhenza* sp.가 주종을 이루었다.

이들 중 *Penicillium* sp. fungi 포자를 각각 멸균 filter paper에 묻혀 PDA배지의 가운데 부분에 접종 한 결과, GB-017과 GB-0365, 그리고 GB-017 + GB-0365 처리구 모두 매우 뛰어난 길항성을 보여주었으며, 그 효과는 6.3×106 spores/ml에서 부터 6.3×104 spores/ml 까지 다양하게 나타났다 (그림 1-3, 그림 1-4, 그림 1-5). 특히 GB-017과 GB-0365 혼용처리구에서는 항진균성 효과가 아주 뛰어났다.

이외에도 *Fusarium* sp. (그림 1-6), *Alterhenza* sp. (그림 1-7), *Rhizophus* sp. (그림 1-8)에 실험한 결과 역시 항진균활성을 보여주었으나, *Penicillium*에 실험한 결과보다는 그 효율이 낮았다.

제 2 항 감귤 수확후 장기저장을 위한 항진균활성 미생물의 최적농도 선발실험

항진균활성 미생물을 무처리, GB-0365(원액, 1/2, 1/10, 1/50, 1/100 희석액), GB-017(원액, 1/2, 1/10, 1/50, 1/100 희석액), 그리고 GB-0365+GB-017(원액, 1/5, 1/10, 1/50 희석액)로 처리한 결과, GB-0365 균주의 경우 1/2 희석액, GB-017은 1/10 희석액, GB-0365+GB-017은 1/2희석액의 부패율이 가장 낮았다(데이타 미제시).

과실의 무게 감소율을 비교해보면 (표 1-1) 무처리구에 비하여 GB-0365 1/2 희석액 처리구가 가장 낮았으며, GB-017 1/2 처리구의 경우 무게감소율이 25.78%에 달하여 과피가 쭈글쭈글해짐으로서 저장 90일 이후에는 상품성이 없는 것으로 판단되었다.

유기산의 함량은 모든 처리구에서 저장기간이 지날수록 감소하는 경향을 보였으며 (표1-2), 오히려 당산비는 증가하는 경향을 나타내었으나(표 1-3) 처리구간의 큰 차이는 없었다. 또한, 2차적인 병해는 발생하지 않았으나, 저장온도가 5℃ 이하로 떨어지는 경우 항진균 미생물의 항진균성 효과는 크게 반감되었다.

이상의 결과로서, 감귤 수확후 장기저장을 위한 항진균활성 미생물의 최적농도는 GB-0365 균주의 경우 1/2 희석액, GB-017은 1/10 희석액, GB-0365+GB-017은 1/2희석액으로 결정되었으며, 이후의 항진균성 미생물을 이용한 흥진조생 감귤의 저장실험에 적용되었다.

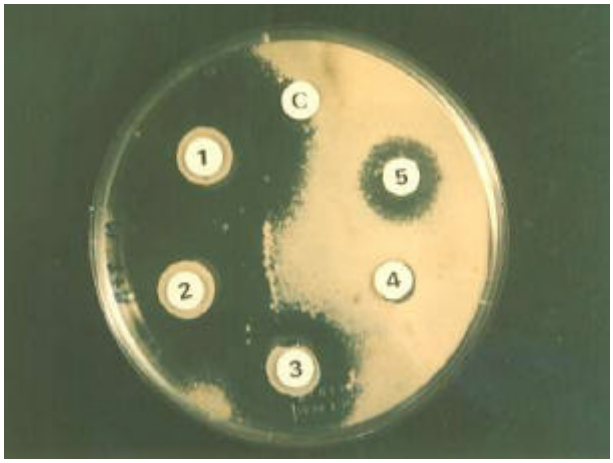

Fig. 1-3. Results of in vitro antagonism test after 5 days from *Penicillium* sp. and bacterial strains (GB-017).

C) control, 1) 6.3×10¢, 2) 3.15×10¢, 3) 6.3×10£, 4) 3.15×10⁵ , 5) 6.3×104 spores/ml

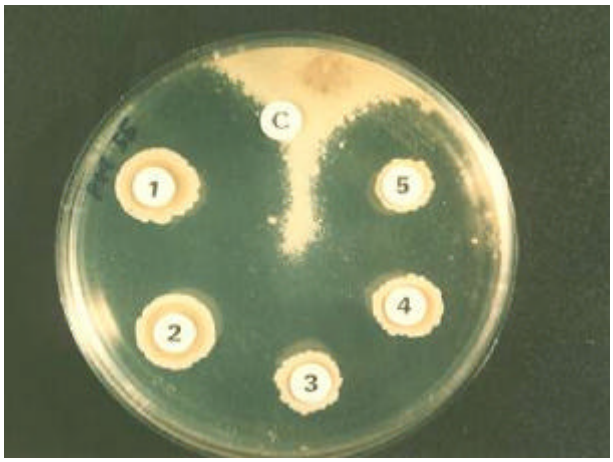

Fig. 1-4. Results of in vitro antagonism test after 5 days from *Penicillium* sp. and bacterial strains (GB-0365).

C) control, 1) 6.3×10¢, 2) 3.15×10¢, 3) 6.3×10£, 4) 3.15×10£, 5) 6.3×104 spores/ml

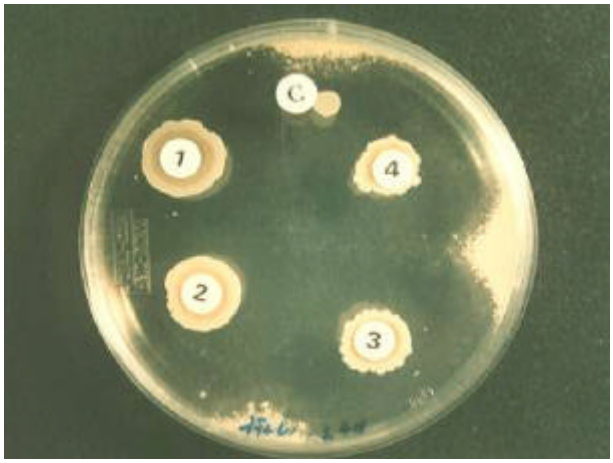

Fig. 1-5. Results of in vitro antagonism test after 5 days from *Penicillium* sp. and bacterial strains (GB-017+GB-0365).
C) control, 1) 6.3×10⁶, 2) 3.15×10⁶, 3) 6.3×10⁵, 4) 3.15×105 spores/ml

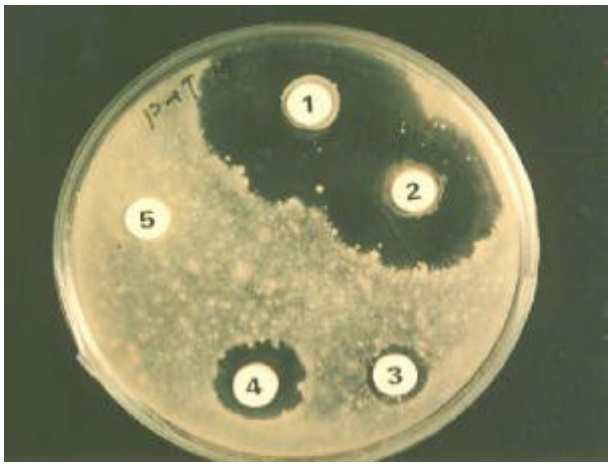

Fig. 1-6. Results of in vitro antagonism test after 5 days from *Fusarium* sp. and bacterial strains (GB-0365).
1) 6.3×10⁶, 2) 3.15×10⁶, 3) 6.3×10⁵, 4) 3.15×10⁵, 5) 6.3×104 spores/ml

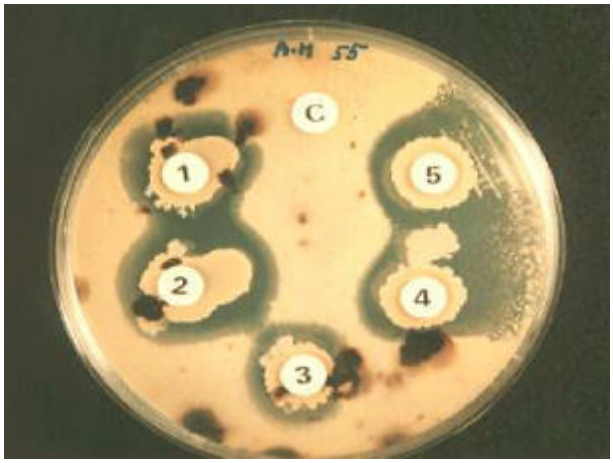

Fig. 1-7. Results of in vitro antagonism test after 5 days from *Alterhenza* sp. and bacterial strains (GB-0365).

C) control, 1) 6.3×10€, 2) 3.15×10€, 3) 6.3×10Ε, 4) 3.15×105 , 5) 6.3×104 spores/ml

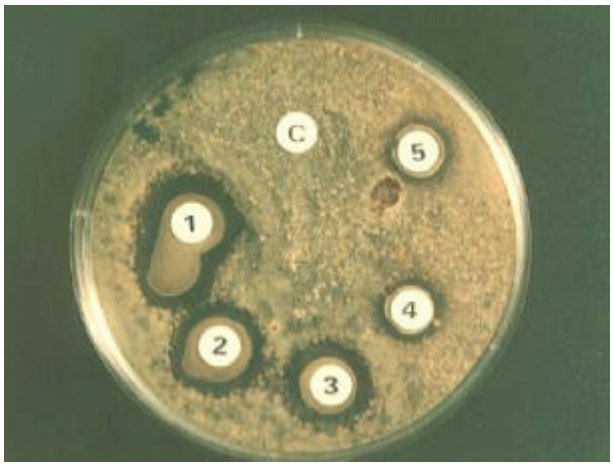

Fig. 1-8. Results of in vitro antagonism test after 5 days from *Rhizcphus* sp. and Bacterial strains (GB-017).

C) control, 1) 6.3×10€, 2) 3.15×10€, 3) 6.3×10Ε, 4) 3.15×10Ε, 5) 6.3×104 spores/ml

Table 1-1. Decreasing rate of fresh weight with each treatment after 90 days in mandarin.

Treatmernt \ Storage date		15	30	45	60	75	90
Control		0.95z	1.92	3.15	4.24	4.76	5.90
GB-0365	1/ 100	0.96	1.65	6.77	12.03	3.70	5.25
	1/ 20	0.96	1.76	3.07	3.01	4.34	5.97
	1/ 10	0.93	1.66	3.41	11.34	4.08	19.21
	1/ 2	0.96	1.53	2.70	3.27	16.84	4.47
	1	0.82	1.67	5.09	3.62	11.77	18.83
GB-017	1/ 100	0.77	1.79	4.27	3.10	3.27	6.13
	1/ 20	1.00	1.29	2.88	2.87	9.09	8.34
	1/ 10	0.84	1.62	3.11	3.48	4.23	5.21
	1/ 2	0.95	1.66	9.94	3.53	4.13	25.78
	1	0.97	1.77	2.83	3.51	3.68	19.51
GB-0365+GB-017	1/ 50	0.83	1.58	4.54	6.48	30.96	16.51
	1/ 10	0.92	1.89	2.76	3.07	4.07	5.28
	1/ 2	0.83	1.93	3.04	7.61	5.48	6.44
	1	0.76	1.86	2.76	2.98	3.98	13.27

z Decreasing rate of fresh weight (%)

Table 1-2. Organic acids content of each treatment after 90 days in mandarin.

Treatment \ Storage date		15	30	45	60	75	90
Control		0.87z	1.27	0.61	0.43	0.71	0.52
GB-0365	1/ 100	0.78	1.12	0.67	0.67	0.53	0.63
	1/ 20	0.80	0.70	0.49	0.63	0.47	0.56
	1/ 10	0.95	0.97	0.54	0.69	0.50	0.59
	1/ 2	0.72	0.47	0.92	0.73	0.67	0.53
	1	0.84	0.67	1.08	0.59	0.72	0.73
GB-017	1/ 100	0.96	0.67	0.86	0.64	0.77	0.71
	1/ 20	0.61	0.82	0.82	0.63	0.46	0.52
	1/ 10	1.10	0.59	0.82	0.42	0.70	0.51
	1/ 2	0.79	0.66	0.98	0.74	0.32	0.67
	1	0.96	0.85	0.62	0.43	0.60	0.47
GB-0365+GB-017	1/ 50	1.12	0.57	0.87	0.75	0.50	0.73
	1/ 10	0.92	0.76	0.46	0.60	0.59	0.57
	1/ 2	0.95	0.96	0.76	0.80	0.38	0.57
	1	0.72	0.43	0.95	0.59	0.74	0.58

z Organic acids contents (mg/100g fresh weight)

Table 1-3. Soluble solid and acid ratio of each treatment after 90 days in mandarin.

Treatment \ Storage date		15	30	45	60	75	90
Control		6.44z	4.44	9.22	13.99	7.17	10.40
GB-0365	1/ 100	7.54	4.96	7.96	7.70	10.75	8.09
	1/ 20	7.95	9.37	11.95	9.00	12.58	9.58
	1/ 10	5.73	5.54	10.15	5.53	11.31	6.62
	1/ 2	8.60	13.00	6.65	7.47	6.43	9.85
	1	6.93	8.63	4.83	9.46	6.20	6.79
GB-017	1/ 100	6.25	9.02	6.65	8.98	7.41	6.31
	1/ 20	8.61	6.67	6.84	9.54	11.32	8.38
	1/ 10	5.40	9.78	7.32	14.19	8.01	10.00
	1/ 2	7.20	8.04	5.37	7.81	17.36	6.46
	1	6.33	6.23	8.86	12.94	8.96	8.17
GB-0365+GB-017	1/ 50	4.83	10.37	6.00	6.92	8.47	5.40
	1/ 10	5.98	6.83	12.11	9.69	8.84	10.14
	1/ 2	5.98	6.36	8.00	6.41	13.79	8.84
	1	7.77	11.84	6.90	9.87	8.04	8.86

z Soluble solid and acid ratio

제 3 항 항진균활성 미생물을 이용한 감귤저장

흥진조생 감귤에 항진균성 미생물의 처리결과 무처리구에서는 저장 10일 이후부터 과피에 흰곰팡이가 발생하기 시작하여 저장후 105일(3달 반)까지 거의 모두 부패하였으며, 미생물 처리구는 저장 후 85일째까지는 곰팡이 발생율이 매우 낮았다(그림 1-9). 또한, 무처리구에서는 부패과의 다른 과실로의 전이율이 매우 높았으나, 항진균성 미생물 처리구에서는 모두 부패전이율이 낮았다(그림 1-10).

과실의 무게 감소율 및 유기산, 당산비의 변화율을 조사한 결과 처리간의 유의한 차이는 보이지 않았다 (그림 1-11, 그림 1-12, 그림 1-13).

제 4 항 항진균성 미생물 처리방법 실험

항진균성 미생물 균주 중 GB-0365를 이용하여 궁천조생밀감에 수상처리 및 침지처리를 실시한 결과, 수상처리가 더 효과적임이 밝혀졌다(표 1-4). 수상처리는 수확 3일전에 수체에 미생물을 직접 살포하는 방법으로 처리하였으며, 과피에 미생물이 완전히 코팅되었다고 판단되는 시기에 수확하여 box 저장을 하였다. 수상처리는 무처리(68.2%)에 비하여 50일 이후의 부패율이 매우 낮았으며(17%), 침지처리(32.2%)의 경우에도 무처리에 비하여 부패율이 낮은 경향을 나타내었다.

궁천조생 밀감의 상온저장 중 당도의 변화를 조사해 본 결과(표 1-5) 무처리에 비하여 수상처리는 당도가 좀 낮아지는 경향이었고, 침지처리는 당도가 높아지는 것으로 나타났다.

산도의 경우 저장기간이 경과함에 따라 모든 처리구에서 감소하는 경향을 나타내었으며(표 1-6), 수상처리의 경우 50일 이후의 산도가 상당량 감소되는 것으로 나타났다.

과실의 경도는 저장기간이 지남에 따라 모두 감소되었으며, 특히 침지처리구의 경도는 매우 낮았다(표 1-7).

CO_2 발생율의 경우 항진균성 미생물의 수상처리 및 침지처리구에서는 저장 40일까지는 증가하였다가 40일 이후에는 급격히 낮아졌으나, 무처리구의 경우에는 고농도의 CO_2가 50일 이후까지 계속 발생하였다(표 1-8).

외적인 상품성을 판단하고자 착색도 L, a, b값을 조사한 결과(표 1-9, 1-10, 1-11), 무처리와 비교하여 착색도 차이가 거의 없었으며, 따라서 항진균성 미생물 처리후의 상품성 하락은 없는 것으로 판단되었다.

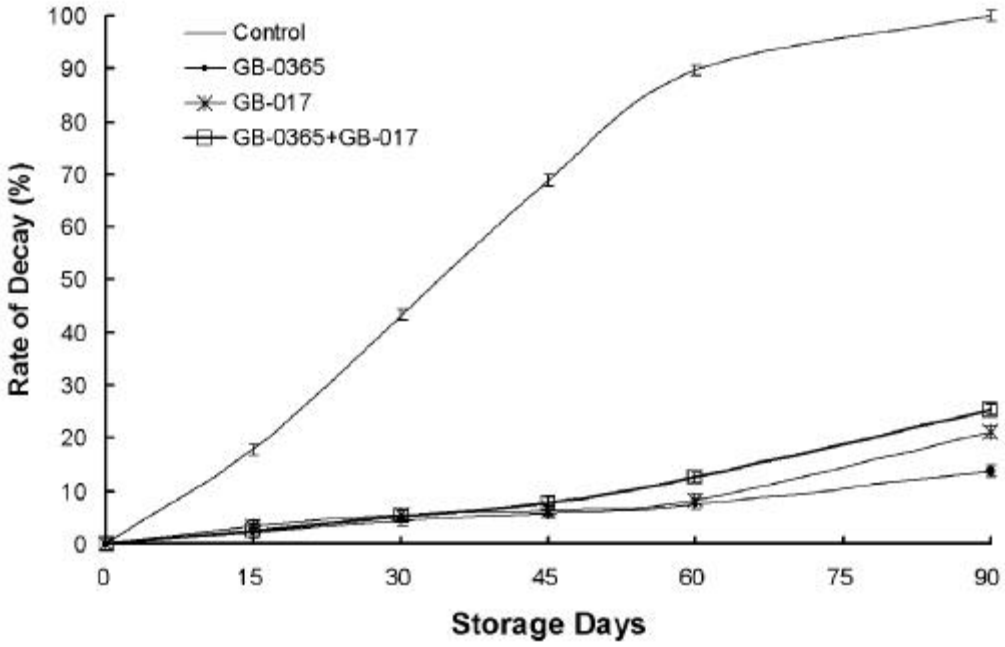

Fig. 1-9. Decay rate of each treatment after 90 days in mandarin. Bars are standard error.

(A)

(B)

(C)

Fig. 1-10. Results of each treatment after 85 days in bacteria suspension dipping treatment test.

(A) Control, (B) GB-017, (C) GB-0365

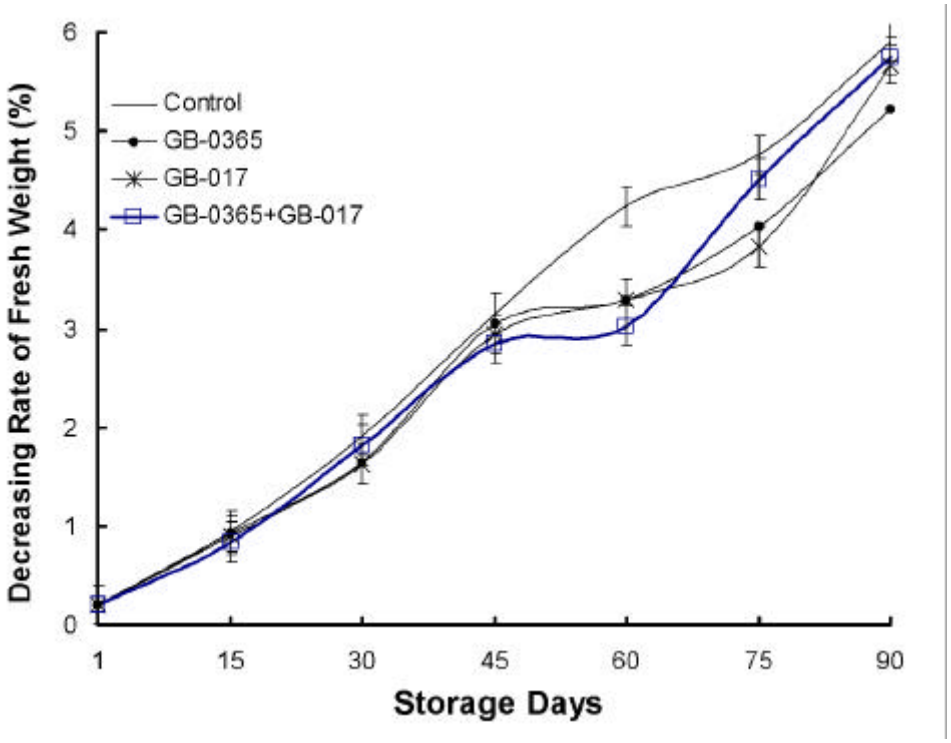

Fig. 1-11. Decreasing rate of fresh weight with each treatment after 90 days in mandarin. Bars are standard error.

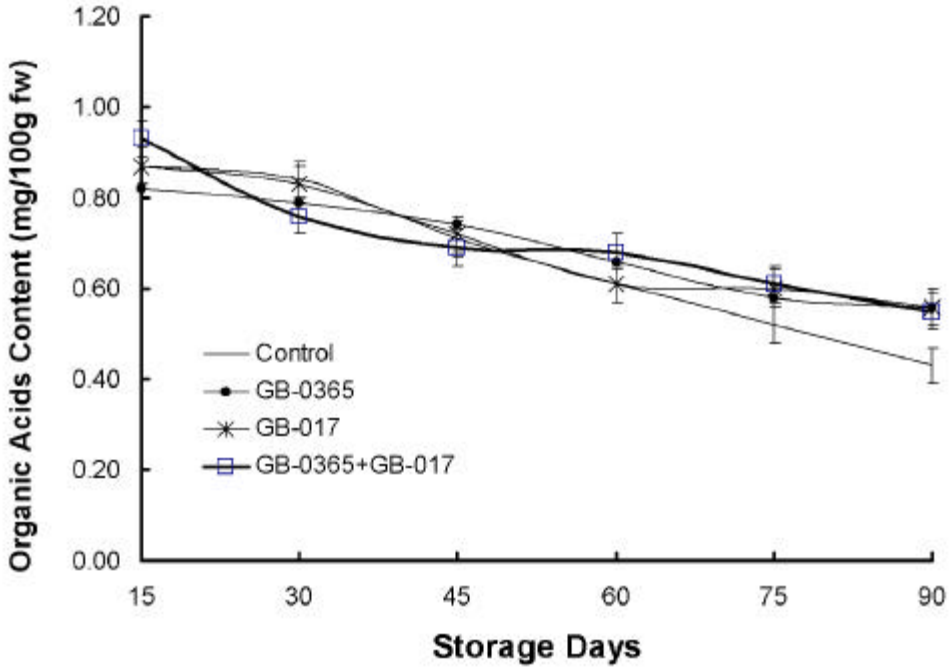

Fig. 1-12. Organic acids content of each treatment after 90 days in mandarin. Bars are standard error.

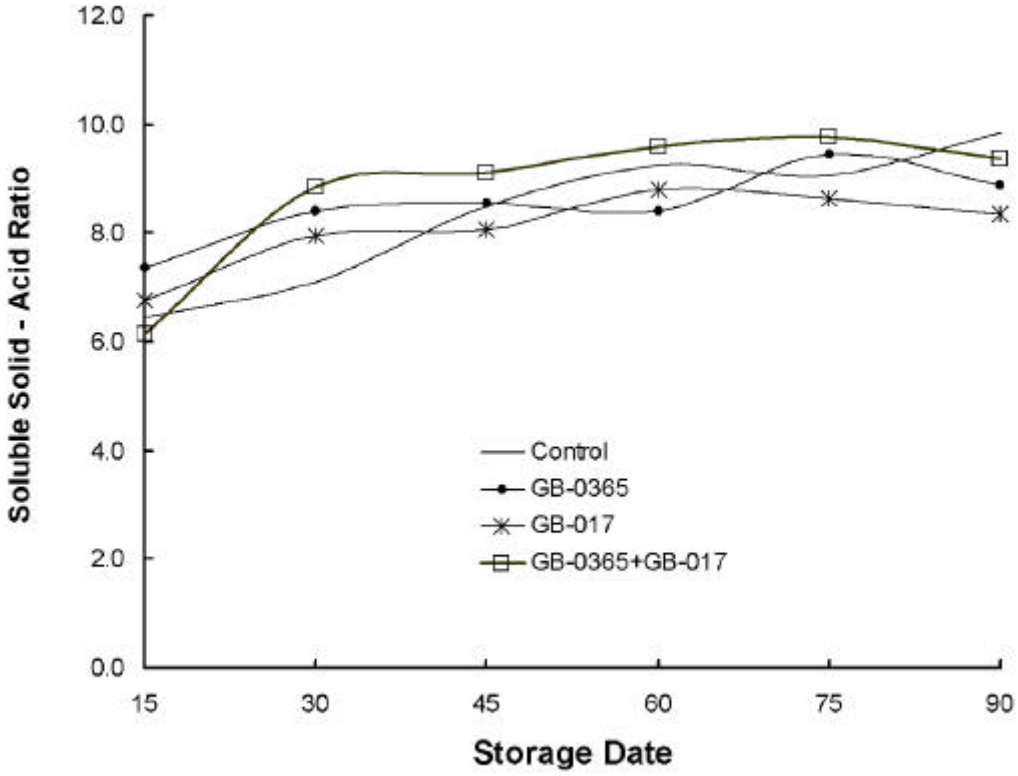

Fig. 1-13. Soluble solid and acid ratio of each treatment after 90 days in mandarin. Bars are standard error.

Table 1-4. Decay rate (%) of mandarin during the room temperature storage.

Storage date / Treatment	0	10	20	30	40	50
Control	0	1.5	15.9	26.7	48.9	68.2
Dipping	0	0	1.1	7.8	20.0	32.2
Tree spraying	0	1.4	2.7	5.7	8.9	17.0

Table 1-5. Change of soluble solid Solid (cBrix) during the room temperature storage in mandarin.

Storage date / Treatment	0	10	20	30	40	50
Tree spraying	10.5	10.3	9.5	9.8	9.8	9.6
Dipping	10.5	10.9	10.5	10.2	10.9	11.0
Control	10.5	10.1	10.0	10.1	9.8	10.6

Table 1-6. Change of organic acid content (%) during the room temperature storage in mandarin.

Storage date / Treatment	0	10	20	30	40	50
Tree spraying	0.90	0.95	0.92	0.70	0.70	0.49
Dipping	0.90	0.83	0.92	0.69	0.60	0.51
Control	0.90	0.91	0.89	0.65	0.59	0.76

Table 1-7. Change of hardness (§3㎜/g) during the room temperature storage in mandarin.

Storage date / Treatment	0	10	20	30	40	50
Tree spraying	862.5	888.5	776.7	772.4	741.5	721.1
Dipping	862.5	780.5	743.0	748.8	730.7	674.0
Control	862.5	792.5	821.1	872.6	768.1	751.6

Table 1-8. Rate of CO2 occurrence (%) during the room temperature storage in mandarin.

Storage date / Treatment	30	40	50
Tree spraying	2.78	3.45	1.94
Dipping	3.41	3.56	1.74
Control	2.65	4.12	3.95

Table 1-9. Change of coloring L value during the room temperature storage in mandarin.

Storage date / Treatment	30	40	50
Tree spraying	53.16	52.95	51.86
Dipping	54.40	55.96	53.86
Control	53.86	52.98	53.36

Table 1-10. Change of coloring a value during the room temperature storage in mandarin.

Storage date / Treatment	30	40	50
Tree spraying	34.31	34.17	33.19
Dipping	34.52	31.80	33.91
Control	33.80	33.90	32.30

Table 1-11. Change of coloring b value during the room temperature storage in mandarin.

Storage date / Treatment	30	40	50
Tree spraying	29.03	29.71	28.30
Dipping	30.35	30.89	30.27
Control	29.82	28.85	29.40

제 5 항 항진균활성 미생물 유래의 천연활성제를 이용한 감귤의 저장

항진균활성 미생물 유래의 천연활성제가 감귤 저장에 미치는 효과를 알아보기 위하여 무처리구, 천연활성제 1/20, 1/40, 1/60 희석액 처리구로 침지처리한 결과, 무처리구에 비하여 천연활성제 희석액 모든 처리구에서의 부패율이 상당량 감소되었다(그림 1-14). 특히 천연활성제 1/20 희석액 처리구에서는 부패율이 저장기간 90일 경과후 10.2%로 부패억제효과가 아주 뛰어났으며, 외관상 상품성의 변화에도 거의 영향을 미치지 않았다.

저장기간 동안 무게감소를 보면 (그림 15) 무처리구의 경우 거의 10% 정도의 무게감소가 이루어졌으나, 1/20 희석액 처리구에서는 5% 미만의 무게감소가 이루어졌으며, 저장기간동안 완만한 무게감소를 보여주었다.

당도의 변화는 저장기간이 지날수록 모든 처리구에서 당도가 증가되었으며(그림 16), 산도의 경우에는 서서히 감소되는 경향이 나타났다(그림 17).

상기의 결과로 항진균성 미생물 유래의 천연활성제를 사용시에는 1/20 희석액이 가장 효과가 좋은 것으로 나타났으며, 차후 제주도 현지에서의 감귤노지저장에 적용토록 하였다.

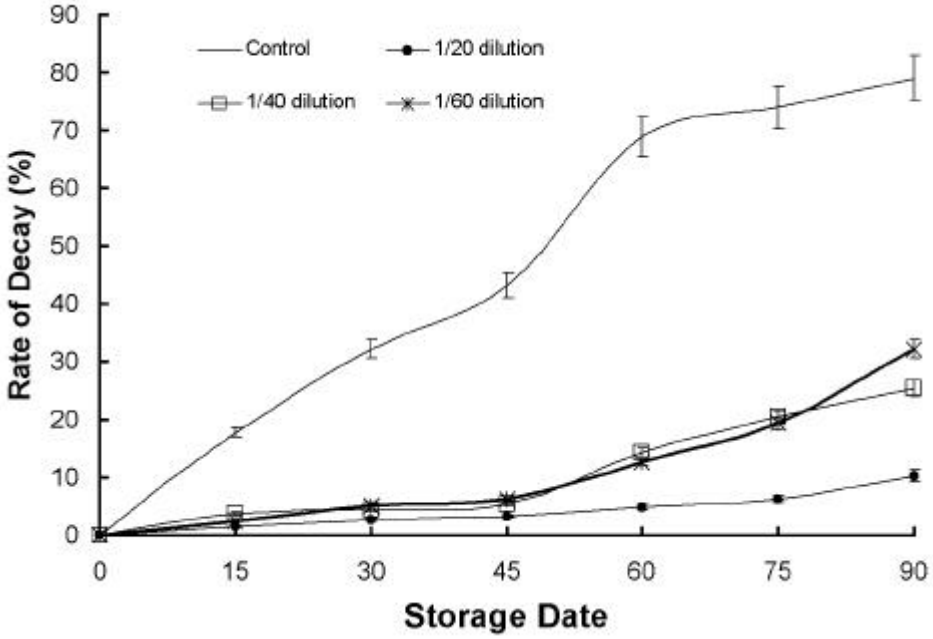

Fig. 1-14. Decay rate of each treatment with natural active substance in mandarin. Bars are standard error.

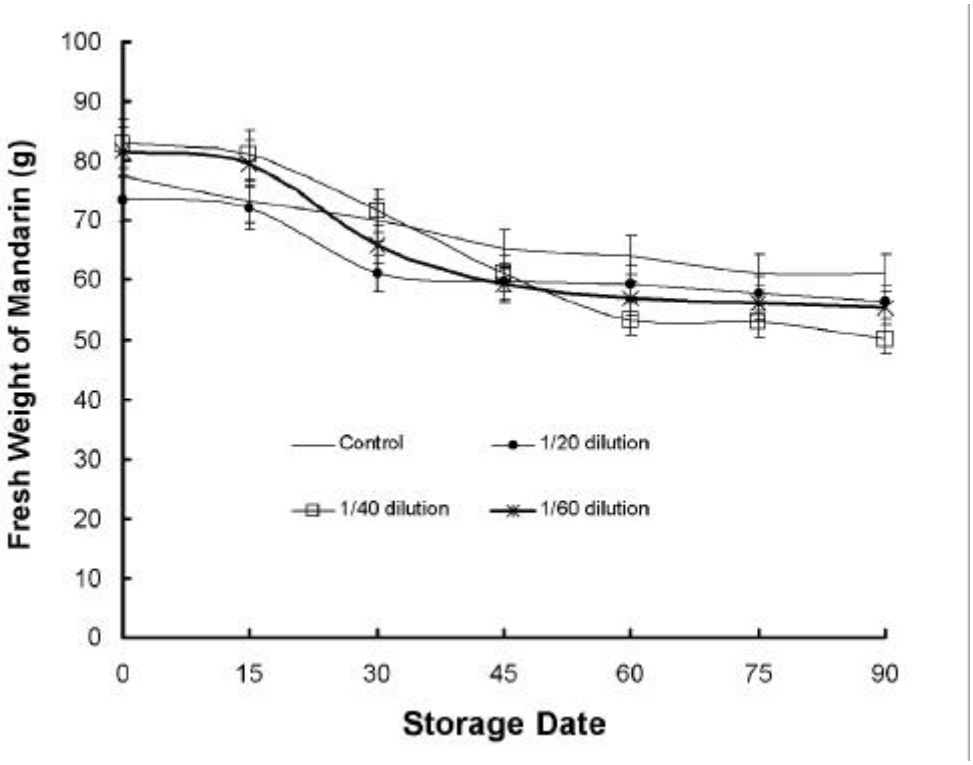

Fig. 1-15. Change of fresh weight of each treatments with natural active substance after 90 days storage in mandarin. Bars are standard error.

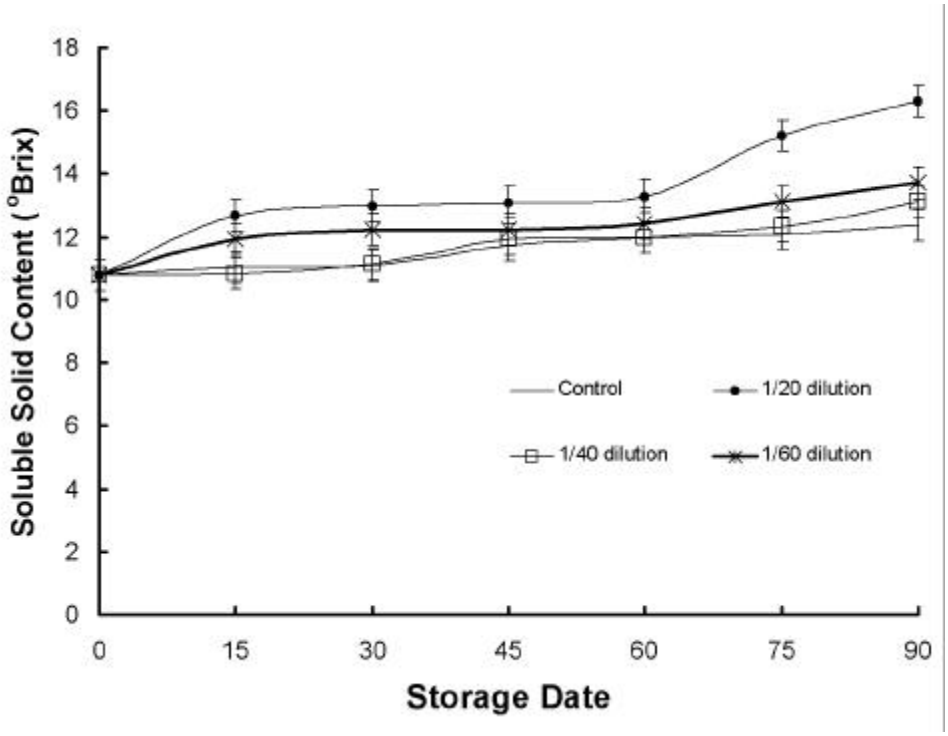

Fig. 1-16. Change of soluble solid content of each treatments with natural active substance after 90 days storage in mandarin. Bars are standard error.

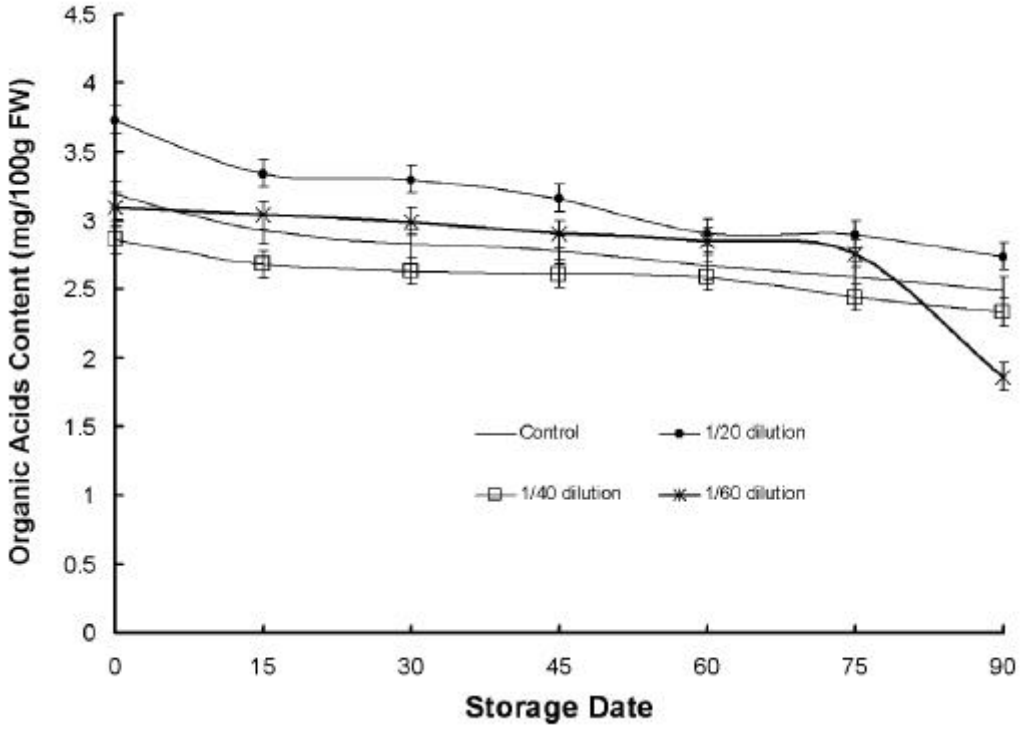

Fig. 1-17. Change of organic acids contents of each treatments with natural active substance after 90 days storage in mandarin. Bars are standard error.

제 3 장 항진균활성 미생물과 천연활성제의 대량생산

제 1 절 서 설

원예산물에 감염되는 진균은 세포를 파괴하여 과실을 부패시키는 기생균인가, 단지 과실의 표면에 기생하는 부생균인가에 관계없이, 외견상 상품성을 크게 하락시키고 외부적으로는 품질을 저하시키기 때문에, 저장중 발생하는 진균류의 방제는 반드시 필요하며, 대상 식물과 인체에 유해한 영향을 미치지 않는 안전한 방법의 고안이 반드시 필요하다.

따라서, 원예산물에 피해를 주는 진균류를 방제하기 위한 가장 손쉬운 수단의 하나가 방제제인 농약이라 할 수 있으며, 으레 원예산물의 수확 전후에 농약을 사용하는 것이 당연한 것으로 인식되어 왔다.

그러나, 편리한 방제수단인 농약이 최근에 들어 안정성 문제, 잔류문제(원예산물, 토양, 환경 등), 자연생태계에 미치는 여러 가지 문제, 공해유발 등 유해론이 제기되면서 부정적인 시각이 점차 증대되는 경향이 있다. 이러한 여러 가지 문제점이 있다 하여도, 현재 사용중인 모든 농약의 사용을 제지할 수 없는 현실로 볼 때 현재의 농약보다 안전하고 부작용이 없는 저독성의 안전한 합성농약과, 또 이들과는 전혀 차원이 다른 미생물을 활용한 생물학적 방제방법이 각국에서 연구되어 많은 제품들이 실용화되기에 이르렀다.

현재 미생물을 이용한 미생물농약은 생물농약의 범주에 포함시키고 있고, 외국에서는 농약관리시 기존의 유기합성농약과는 차이를 두어 쉽게 사용할 수 있는 방법이 제시되고 있으나, 국내에서는 미생물농약도 유기합성 농약과 동일한 조건의 등록조건에 준하여 취급되므로 새로운 등록기준 설정이 필요한 과제라고 할 수 있다.

미생물 자체를 이용한 병해방제 시도로서, 각종 식물병원균에 대해 증식억제작용, 기생작용, 항생작용 및 포식작용을 나타내는 길항미생물을 이용하는 연구로 1927년 미국에서 감자 더뎅이병 방제에 방선균을 이용한 것이 최초이며, 일종의 면역작용을 나타내게 하는 교차보호를 이용한 바이러스 방제, 곰팡이를 이용한 고구마줄기 썩음병에 대한 연구가 1951년 시도되었다.

미생물을 이용한 병해 방제제는 1960년 이후부터 농약의 형태로 실용화 되었고, 일본에서는 1962년에 담배허리 마름병 Trichoderma 생균제제를 시초로 많은 제품이 나오고 있으나, 대부분의 실용화 제품은 묘잘록병 방제용으로 개발되었다.

병해방제용 생물농약중 가장 획기적이며 성공적인 제품은 각종 작물, 특히 다년생 목본류의 뿌리에 발생하고 있는 뿌리혹세균병(crown gall)에 길항미생물인 *Agrobacterium radiacter* strain 84 및 K1026 균주를 이용한 Galltrol, Dygall, Nogall 등의 제품이라 하겠다. 현재 사용되고 있는 유기합성농약이 모든 세균병에 방제효과가 저조하지만 특히 뿌리혹세균병은 유기합성농약이 효과를 나타낼 수 없는데 비해, 이 생물농약은 확실한 효과를 나타냄으로서 우수한 방제제로 이용되고 있다.

미생물농약 중 국내에 도입되어 실용화중인 것으로 B. t. kurstaki, B. t. aizawari 균주를 이용한 제품이 1981년에 등록되어, 초기에는 흰불나방을 대상해충으로 사용되었으나, 1989년 이후 배추좀나방의 발생과 유기합성농약의 약제 저항성 출현으로 1995년에는 출하량 1백2톤 (매출액38억원)에 이르는 급성장한 제품으로 알려져 있으며, 최근에는 Bt 농약 원제도 국내에서 생산 공급하고 있는 상태이다.

미생물 자체를 이용하거나, 미생물이 생산하는 생리활성물질에 대한 국내의 연구 및 개발은 외국에 비해 30-50년 뒤늦은 1980년 후반에 기초적인 연구가 수행되어 왔으며, 전문가가 부족한 실정과 체계가 갖추어 있지 않은 상황에 따라 실용화되어 있는 제품이 없는 실정이다.

생물농약이 세계적으로 차지하는 매출액은 전체농약 300억불 중 1%에 해당하는 3억불에 지나지 않으며, 개발 실용화된 70여종중 각국에서 많이 사용되고 있는 미생물 살충제인 Bt제를 제외하면 대부분의 생물농약 사용량은 많지 않은 편이다. 현재 Bt제 이외의 생물농약은 화학농약보다 효과가 우수하거나, 화학농약에 의한 문제점으로 도출된 약제저항성 문제 또는 방제가 어려운 뿌리혹 세균병의 방제제로 이용되고 있다.

그러나, 이제까지 사용되고 있는 화학농약이 과학기술원의 발달에 의해 밝혀지지 않았던 독성의 문제점이 점차 밝혀짐에 따라 저독성 혹은 무독성의 안전한 생물농약의 개발 및 실용화는 더욱 촉진될 것으로 생각된다.

특히, 생물농약은 환경생태계에 안전하며, 약제저항성 출현이 없고, 농산물의 안전성 및 부존자원을 이용한 저렴한 개발비 등으로 볼 때 개발이 반드시 필요하다고 여겨진다.

따라서, 국내의 입장으로 볼 때 농약을 필수적으로 사용하지 않으면 안 될 상황에서는 자체개발 생물농약이야말로 필요한 자재이며, 외국에서 개발된 것보다는 국내자원을 이용한 생물농약이 국내환경에 잘 적응할 뿐만 아니라 기술적인 측면에서 육성시켜야할 분야이며, 21세기에 화학농약 대체로 생물농약 사용이 바람직할 것으로 볼 때, 실용화 촉진은 필수적인 과제라 생각되어 진다.

제 2 절 재료 및 방법

제 1 항 항진균활성 미생물의 동정

균주의 동정은 Bergey's manual of determinative bacteriology, Microbiological methods, Manual of methods for general bacteriology, Microbiology - a laboratory manual, Bergey's manual of systematic bacteriology 및 식품공학실험 등에 수록되어 있는 일반적인 세균동정법에 따라 행하였다.

제 2 항 항균활성의 측정

식물병원균으로는 식물에 가장 피해를 많이 주는 병원균인 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cineria*), 시들음병균(*Fusarium* sp.), 입고병·잘록병(*Pythium* sp.), 고추역병균(*Phytcphtora capsici*), 흑부병균(*Alternaria citri*), 흑성병균(*Cladosporium cucumerium*), 탄저병균(*Colletotrichum gloeosporiodes*), 점무늬병(*Pleospora* sp.), 브라운 패취(*Rhizoctonia solani* MAFF 511103), 라지 패취(*Rhizoctonia solani* MAFF 305245)의 10종을 사용하였으며 그람양성세균으로 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, 그람음성세균으로 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aerusinosa*, 효모로는 *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*등을 이용하였다.

감자한천배지를 살균한 후 50℃의 배지에 각 병원균의 균사, 세포, 포자를 혼합 평판하고 배지가 완전히 굳은 다음 길항미생물을 배양한 배양액 50㎕를 페이퍼디스크(직경 8mm)에 묻힌 후 병원균이 혼합된 페트리디쉬에 올려놓고 각종 병원균의 생육이 잘되는 온도에서 3 4일 배양한다. 길항미생물이 각종 병원균에 미치는 영향을 저지원의 직경으로 조사하였다.

제 3 항 균체량의 측정

사면 배양한 분리균주를 백금이로 1회 접종하고 30℃에서 진탕배양하였다. 배양액을 24시간 간격으로 취하여 12,000×g에서 20분간 원심분리하였다. 분리된 균체를 증류수로 1회 세척하여 100 105℃에서 항량이 될 때까지 건조시킨 후, 무게를 측정하여 균체량을 측정하였다.

제 4 항 종균 배양

100㎖ 삼각 플라스크에 NB 배지 20㎖를 첨가하고 사면 배양한 분리 균주를 백금이로 1회 접종한 후, 30℃에서 24시간 진탕배양한 균주를 본 실험의 종균으로 사용하였다.

제 5 항 천연활성제의 개발

Bacillus subtilis GB-0365이 생산하는 유효 항균활성물질은 WK-10(H^+form) cation exchange chromatography, HP-20 adsorption column chromatography, ethyl acetate extraction, silica gel chromatography, prep-HPLC을 이용하여 분리·정제하였다.

1) 항균활성물질의 분포측정

배양액 중에 항균활성물질이 균체 내와 외에 어느 정도 존재하는 지의 여부를 알기 위해서 우선 8,000rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액과 균체를 분리하였다. 증류수로 3회 세척 및 원심분리하여 얻은 균체에 동량의 acetone을 첨가하여 하룻밤 침적시킨 후 여과하여 acetone 추출액을 얻고 이를 농축하여 acetone을 제거하고 균체 추출액을 얻었다. 균체를 분리한 상등액과 함께 이 여액의 항균활성 측정을 통하여 항균활성물질의 존재 여부를 확인하였다.

2) 항균활성물질의 pH 및 온도에 따른 안정성

시료를 각각의 pH로 조절하고 4℃에서 24시간 방치한 후 이를 다시 pH 7로 조절하여 항균활성을 각각 측정하였다.

열안정성의 검토는 배양시료액을 각 온도에서 일정 시간동안 열처리한 시료를 이용하여 항균활성이 감소된 정도를 조사하여 온도 안정성을 살펴보았다.

3) 이온교환과 흡착수지 column chromatography

항균물질 시료를 pH 3, 7 그리고 10으로 조절한 후 표 2-1에서와 같이 여러 종류의 양·음이온교환수지 및 흡착수지를 사용하여 항균활성물질의 이온교환 및 흡착 여부를 검토하였다. 강이온교환 수지의 경우에 있어서는 pH를 3, 7 그리고 10으로 각기 나누어 행하였으며 약이온교환수지의 경우는 수지의 pH 범위에 맡춰 pH 3, 7, 10 중에서 선택하여 사용하였다. SA20AP(OH^-), SA20AP(Cl^-), Amberlite IRA 45(OH^-),

WK-10(H^+), WK-10(Na^+), SK1B(H^+) 등의 이온교환수지 20 ml를 1x32 cm column에 충진한 다음 전처리한 배양액을 pH 3, 7, 10으로 조절하여 통과시켰다. 수지에 흡착된 물질을 이온교환법에 의하여 교환처리하기 전에, 물로 수지용량의 5배 가량을 통과시켜 이온교환이 되지않은 물질들을 충분히 세척·용출시킨 후 각각을 acetic acid, NH_4OH등의 용매를 사용하여 탈착시켰다. 흡착 수지의 경우 HP-20 수지를 사용하여 pH를 3, 7 그리고 10으로 나누어 위와 같은 방법으로 행하였으며 100% 2-propanol (IPA)로 탈착하여 활성물질의 용리 정도를 측정하였다.

4) WK-10 cation exchange column chromatography

항균활성물질 시료를 pH 7로 조절하고 활성화시킨 WK-10(H+) 약산성 양이온 교환수지 약 5 L를 채운 column(11×50 cm)에 통과하였다. pH 7로 조절한 증류수를 이용하여 UV detector로 A_{254nm}에서 물질이 더 이상 나오지 않을 때까지 용리한 후 0.2, O.5 N NH_4OH로 순차적으로 용리시켜 탈착하였다. 12 L/hr의 속도(space velocity=2.4)로 column을 통과한 용출액은 U.V. detector(254 nm)로 U.V.흡광도를 측정하여 recoder에 기록하고 4 L씩 분획하였다.

5) HP-20 adsorption column chromatography

합성흡착제로 대표되는 Diaion HP-20은 polystyrene과 divinylbenzene이 중합된 역상(reversed phase)의 흡착제로서, 구상의 polymer로 다공성이며 표면적이 크므로 흡착력이 강하며 또한 polymer의 표면이 소수성의 성질을 갖고 있어 조추출물로부터 역상적으로 물질을 분리하는데 이용된다. 즉, 조추출물의 수용액이 이 흡착제를 통하게 하여 극성이 낮은 물질(지용성 물질)을 흡착제에 흡착시킨 다음, 증류수를 가하여 흡착제에 흡착되지 않은 물질(주로 수용성물질이 대부분)을 제거하고 적당한 유기용매로서 흡착물질을 용출시킨다.

WK-10 cation exchange chromatography에서의 활성분획을 모아 pH를 3으로 조절한 시료를 HP-20 흡착수지 5 L를 채운 column(11×50 cm)에 통과하고 증류수를 이용하여 A_{254nm}에서 물질이 더 이상 나오지 않을 때까지 용리한 후 30, 50, 100% IPA로 순차적으로 용리시켜 탈착하였다.

Table 2-1. Ion-exchange and adsorption resins used in experiment.

Resins	Characteristics
SA20AP	Strong anion exchange resin
Amberlite IRA45	Strong anion exchange resin
SK1B	Strong cation exchange resin
WK-10	Weak anion exchange resin
HP20	Adsorbent resin

6) 항균활성물질의 유기용매 추출성의 검토

HP-20 adsorption column chromatography에서의 활성분획을 모아 10 ml씩 취하여 pH를 3, 7, 10으로 조정한 뒤 동량의 hexane, chloroform, ethyl acetate, 1-butanol를 가하여 1시간 간격으로 3회에 걸쳐 반복 추출한 후 유기용매층과 물층을 분리하여 감압농축하여 항균활성을 측정하였다.

7) Buthanol extraction

HP-20 adsorption column chromatography에서의 활성분획은 감압농축하여 IPA을 제거한 후 pH를 3으로 조절하여 동량의 buthanol로 3회추출하였다. 분액여두상에서 진탕추출시 처음에는 매우 천천히 진탕하여 emulsion이 생기지 않도록 한 다음 강하게 진탕하였으며, 적당량의 NaCl을 가하여 층의 분리를 원활하게 하였다.

8) Silica gel column chromatography

Ethyl acetate층을 sodium sulfate로 탈수시키고 여과한 다음 감압농축하여 소량의 ethyl acetate에 녹여 소량의 silica gel에 coating한 후 column에 loading였다. 실험에서 사용된 silica gel은 100-200 mesh(Merck Co.)이었으며 column의 크기는 4×30 cm 이었다. Silica gel column chromatography에 사용된 용매는 hexane-ethyl acetate(7:3, 3:7, 0:10)을 사용하여 단계적으로 용리하였다. 10 ml/min의 속도로 column을 통한 용출액은 U.V. detector (254 nm)로 U.V.흡수도를 측정하여 recoder에 기록하고 fraction collector를 이용하여 50 ml씩 분획하였다. 분획된 용출액을 항균활성을 측정하여, 활성이 나타나는 분획들을 모아서 감압 농축시켜 다음 분리정제과정의 시료로 사용하였다.

10) Preperative high performance liquid chromatography(Prep-HPLC) 및 HPLC

Prep-HPLC column은 Waters Delta pak C-18 column(7.8×300 mm)을 사용하였으며 55% MeOH을 용매로 2 ml/min속도로 fraction collector에서 분획하였다. Silica gel column chromatography에서 각 분획의 항균활성을 측정하여, 각 활성 peak에 해당하는 분획들을 모아서 감압농축한 후 MeOH에 녹여 prep-HPLC를 행하였다. prep-HPLC에 조시료를 100 μl씩 반복하여 injection하고 활성 peak에 해당 되는 물질을 선택적으로 분리 채취하였다.

HPLC를 이용하여 각 항균활성물질들의 순수도를 확인하였다. 사용된 분석용 column은 Waters μBondapakTMC18(3.9 × 150 mm)이었으며, 유속은 1 ml/min, UV흡수파장은 254 nm이었다.

제 3 절 결과 및 고찰

제 1 항 항진균활성 미생물의 동정

분리주 GB-0365를 전자현미경으로 관찰하면 간균의 형태를 띠고 있었고, 그람염색결과 그람양성으로 확인되었으며, 운동성을 지니고 있었다. 토양유래의 항진균성 미생물의 분류학적 특성을 Bergey's Mannual에 따라 그 형태학적 및 생화학적 성질을 조사한 결과 표 2-2과 같았고, 이 균주는 *Bacillus subtilis*로 동정되었고, *Bacillus subtilis* GB-0365로 명명하였다.

또한 분리주 GB-017의 경우는 전자현미경으로 관찰하였을 때 간균의 형태를 띠고 있었고, 그람양성이었으며, 운동성을 지니고 있었다. 항진균미생물 GB-017의 분류학적 특성을 Bergey's Mannual에 따라 그 형태학적, 생화학적 성질을 조사한 결과 표 2-3와 같았다. 이 균주는 *Bacillus* sp.로 동정되었고, *Bacillus* sp. GB-017로 명명하였다.

제 2 항 항진균성 미생물의 항균 spectrum

식물병원균으로는 식물에 가장 피해를 많이 주는 병원균인 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cineria*), 시들음병균(*Fusarium* sp.), 입고병·잘록병(*Pythium* sp.), 고추역병균(*Phytcphtora capsici*),흑부병균(*Alternaria citri*), 흑성병균(*Cladosporium cucumerium*), 탄저병균(*Colletotrichum gloeosporiodes*), 점무늬병(*Pleospora* sp.), 브라운 패취(*Rhizoctonia solani* MAFF 511103), 라지 패취(*Rhizoctonia solani* MAFF 305245)의 10종을 사용하였으며 그람양성세균으로 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, 그람음성세균으로 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aerusinosa*, 효모로는 *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*등을 이용하였다.

감자한천배지를 살균한 후 50℃의 배지에 각 병원균의 균사, 세포, 포자를 혼합 평판하고 배지가 완전히 굳은 다음 길항미생물을 배양한 배양액 50㎕를 페이퍼디스크(직경 8mm)에 묻힌 후 병원균이 혼합된 페트리디쉬에 올려놓고 각종 병원균의 생육이 잘되는 온도에서 3 4일 배양한다. 길항미생물이 각종 병원균에 미치는 영향을 저지원의 직경으로 조사하였다.

표 2-4에서 볼 수 있는 바와 같이, 길항미생물 바실러스 섭틸리스 GB-0365 균주와 식물 병원균과의 길항효과 검정결과, 잿빛곰팡이병의 원인이 되는 보트리티스 시네리아(*Botrytis cineria*)에 대하여 생육저지효과를 나타내어 균사생육억제 현상이 높았으며

Table 2-2. Characteristics of the isolated strain GB-0365

형태학적 특성		결 과
형 태		단간균
그람염색		양성
포자형성유무		내성포자형성
운동성		있음
생화학적 특성		**결 과**
생육온도범위		form 5℃ to 50℃
최적생육온도		25 35℃
생육pH범위		5.0 8.0
산소요구성		facultative anaerobic
카탈라제		+
Voges-Proskauer 반응		-
Starch분해력		+
Casein분해력		+
Gelatin분해력		+
Citrate 자화성		+
Indole생산		-
Nitrate의 환원		+
NaCl내성		up to 10.0(w/v)%
탄소원으로부터 산생성	Glucose	+
	Arabinose	+
	Xylose	-
	Mannitol	+
세포지방산분석	C15: 0 anteiso	43.8%
	C15: 0 iso	26.1%
	C17: 0 anteiso	7.6%
	C16: 0 iso	4.5%
	C16: 0	4.1%
	C14: 0 iso	2.5%

Table 2-3. Characteristics of the isolated strain GB-017

형태학적 특성		결 과
형태		단간균
그람염색		양성
포자형성유무		내성포자형성
운동성		있음
생화학적 특성		**결 과**
생육온도범위		form 5℃ to 45℃
최적생육온도		25 35℃
생육pH범위		5.0 8.0
산소요구성		facultative anaerobic
카탈라제		+
Voges-Proskauer 반응		+
Starch분해력		+
Casein분해력		+
Gelatin분해력		+
Nitrate의 환원		+
NaCl내성		up to 10.0(w/v)%
탄소원으로부터 산생성	Glucose	-
	Arabinose	+
	Xylose	-
	Mannitol	-
세포지방산분석	C15: 0 anteiso	38.1%
	C15: 0 iso	27.2%
	C17: 0 anteiso	12.7%
	C16: 0 iso	4.3%
	C16: 0	2.1%
	C14: 0 iso	2.0%

Table 2-4. Antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* GB-0365 및 *Bacillus* sp. GB-017

시험균주	생육저지효과(mm)	
	B. subtilis GB-0365	*Bacillus* sp. GB-017
Bacillus subtilis	0	0
Staphylococcus aureus	0	0
Escherichia coli	0	0
Pseudomonas aurusinosa	0	0
Candida albicans	0	0
Saccharomyces cerevisiae	0	0
쟈빛곰팡이병 (*Botrytis cinera*)	21	17
시들음병균 (*Fusarium* sp.)	18	15
입고병 · 잘록병균 (*Pythium* sp.)	17	18
고추역병균 (*Phytophtora capsici*)	14	11
흑부병균 (*Alternaria citri*)	14	15
흑성병균 (*Cladosporium cucumerium*)	0	0
탄저병균 (*Colletotrichum gloeosporiodes*)	15	15
점무늬병 (*Pleospora* sp.)	17	14
브라운패치 (*Rhizoctonia solani* MAFF5 11103)	14	17
라지패치 (*R. solani* MAFF 305245)	16	15

작물의 시들음병의 원인이 되는 푸사리움(*Fusarium* sp.), 입고병과 잘록병의 원인균 피시움속(*Pythium* sp.), 잔디의 주요 병원성 균인 브라운패취(*R. solani* MAFF 511103), 라지패취(*R. solani* MAFF 305245)에 대하여서도 억제효과를 나타내었다. 반면, 세균과 효모에 대해서도 생육 억제효과가 없는 것으로 보아 식물성 병원균에 대해서만 선택적인 활성을 갖는 것으로 나타났다.

한편, 바실러스속 GB-017의 경우, 입고병과 잘록병의 원인균 피시움속(*Fythium* sp.)에 대하여 생육 저지효과가 높았으며 잿빛곰팡이병의 원인이 되는 보트리티스 시네리아(*Botrytis cineria*), 시들음병의 원인이 되는 푸사리움(*Fusarium* sp.), 브라운패취(*R. solani* MAFF 511103), 라지패취(*R. solani* MAFF 305245)에 대하여서도 억제효과를 나타내었다. 세균과 효모에 대해서도 생육 억제효과가 없는 것으로 보아, 식물성 병원균에 대해서만 선택적인 활성을 갖는 것으로 나타났다.

제 2 항 항진균 미생물의 대량배양최적화

(1) 기본배지의 설정

항진균성 미생물의 대량배양최적화를 위해 안정된 균체의 생산과 대사산물의 생산을 전제로 균의 생육과 대사산물 생산에 미치는 제인자에 대해 검토하고, 소규모(3 ℓ) 및 대규모(5k ℓ) 배양를 실시하였다.

우선, *B. subtilis* GB-0365와 *Bacillus* sp. GB-017의 배양에 따른 활성대사산물에 미치는 질소원 및 탄소원의 영향을 조사하기 위해 표 2-5의 배지를 기본배지로 이용하였다. 전배양 배지로는 LB 배지에 starch가 1% 함유된 LBS를 배지를 이용하였다. 접종물의 농도는 2(v/v)%이었다. 배양은 rotatory shaker(운동반경 2.0㎝)를 이용하여 200rpm의 교반속도로 30℃에서 이뤄졌다. 항진균성 대사산물의 활성은 쟈빛곰팡이병(Botyritis cinera)의 균사 및 포자현탁액을 이용하여. 균사의 생육 및 포자의 발아를 억제하는 활성으로 표시하였다. 즉 원심분리하여 균체를 제거한 배양상등액에 대한 항균활성을 투명환(mm)의 크기로 측정하였다. 그리고 쟈빛곰팡이병은 생육이 느리므로 실험의 원할한 진행을 위해 병원성세균을 포함한 42종의 세균에 대해 항균성을 조사하여 분리균주의 항진균성 대사산물에 대해 가장 민감한 *Achromobacter aceris* IFO3166를 데스트 균주로 병용하였다.

(2) 질소원 및 탄소원의 영향

질소원으로 meat extract, peptone, corn steep liquor, soybean meal, casamino acid,

Table 2-5. Composition of the basal medium

성 분	농 도
Carbon sources	0.8%
Nitrogen sources	0.8%
Minimal salt solution	200ml
0.1M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	10ml
Distilled H_2O	up to 1ℓ
Minimal salts solution (per 1ℓ)	
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	85g
KH_2PO_4	15g
NaCl	2.5g
NH_4Cl	5.0g

tryptone, urea, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3, yeast extract 그리고 polypeptone에 대해 조사하였으며, 탄소원으로 glucose, sucrose, starch, xylose, glycerol, molasses, dextran(M.W. 70,000, 8,000, 40,000)에 대해 조사하였다. 질소원으로는 soybean meal를 이용하였다. 예비실험 결과 항진균성 대사산물은 배양 6시간째부터 생산되며, 12시간째부터 포화되는 경향을 나타내었으므로, 기질에 대한 이용성을 고려하여 배양시간은 24시간으로 고정하였다. 기본배지를 이용하여 질소원 및 탄소원이 항진균성 대사산물에 미치는 영향을 검토한 결과 표 2-6과 표 2-7과 같았다.

상기 결과로부터 *B. subtilis*의 경우, 항진균활성 대사산물의 생산은 무기질소원보다 유기질소원에 의해 다소 촉진되는 것으로 판단되었으며, 동물성 유기질소원으로는 beef extract가 식물성 유기질소원으로는 soybean meal (대두박)이 효과적이었다. *Bacillus* sp. GB-017의 경우 부가적인 질소원에 의한 항진균활성 대사산물의 생산이 크게 연동되지 않는 것으로 관찰되었으며, 이는 두 균주의 생리적 및 대사산물의 차이에서 오는 것으로 생각된다.

상기 결과로부터 *B. subtilis*는 탄소원에 따른 항진균성 대사산물의 생산이 크게 영향을 받는 것으로 생각되며, *Bacillus* sp. GB-017의 경우는 탄소원에 따른 대사산물의 생산은 크게 연동되지 않는 것으로 생각되었다. 이들 결과로부터 대량생산을 전제로 경제성을 고려하여 질소원으로는 soybeam meal를 탄소원으로는 starch를 선정하여, 계속적인 실험에 이용하였다. Starch가 선정된 이유는 다른 병원성곰팡이에 대한 스펙트럼을 조사하는 과정에서 glucose보다 전분을 이용하는 편이 항균스펙트럼이 높은 것으로 관찰되었기 때문이다.

이상의 결과로부터 배지의 완충효과를 주기 위해 들어가는 지나친 인산염을 배제하고 pH 조정이 가능한 발효조의 이용을 전제로 material balance를 고려하여 다음의 표8과 같이 보다 단순한 조성을 갖는 균체 및 항진균성 대사산물의 생산배지로 고안하였다.

(3) 항진균성 미생물 *B. subtilis* GB-0365의 포자형성 유도

한편 *B. subtilis* GB-0365과 *Bacillus* sp. GB-017은 내생포자를 형성하는 특징이 있으며, 배양 시간의 경과에 따라 자기분해(autolysis)에 의한 영양세포수의 급격한 감소가 이뤄지는 현상이 관찰되었으며, 안정적인 미생물원제의 공급 면에서, 이 문제점을 개선할 필요가 있는 것으로 판단되어 안정적인 내생포자의 형성을 유도하였다.

Bacillus subtilis GB-0365의 안정한 내생포자의 형성을 위해, 내생포자의 cortex 형성에 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있는 금속이온(Ca^{2+})과 dipicolinic acid(DPA)의 첨가효과 그리고 열처리에 의한 내생포자유도를 검토하였다. 배양종료 후 열처리(60℃)

Table 2-6. Effect of nitrogen sources on the antifungal activity of *B. subtilis* GB-0365 and *Bacillus sp.* GB-017

Nitrogen sources	Antifungal activities*	
	B. subtilis GB-0365	*Bacillus* sp. GB-017
Meat extract	18mm	21mm
Peptone	16mm	18mm
Corn steep liquor	15mm	19mm
Soybean meal	19mm	19mm
Casamino acid	15mm	19mm
Tryptone	12mm	18mm
Urea	18mm	18mm
Ammonium sulfate	15mm	19mm
Ammonium nitrate	15mm	18mm
Yeast extract	10mm	17mm
Polypeptone	16mm	18mm

* Diameter of clear zone againt *Botyritis cinera*

Table 7. Effect of carbon sources on the antifungal activities of *B. subtilis* GB-0365 and *Bacillus* sp. GB-017

Carbon sources	Antifungal activities*	
	Bacillus subtilis GB-0365	*Bacillus* sp. GB-017
Glucose	20mm	23mm
Dextran(MW=70,000)	16mm	21mm
Dextran(MW=8,000)	20mm	22mm
Dextran(MW=40,000)	15mm	22mm
Xylose	12mm	21mm
Sucrose	20mm	21mm
Starch	18mm	18mm
Glycerol	20mm	21mm
Molasses	17mm	21mm

* Diameter of clear zone *Botyritis cinera*

Table 2-8. The compositions of the biomass and active metabolite produciton

Ingredients	Concentrations	
	B. subtilis GB-0365	Bacillus sp. GB-017
Soybean meal	0.8%	0.8%
Starch	1.0%	1.0%
KH_2PO_4	0.3%	0.3
$(NH_4)_2SO_4$	0.25%	0.25%
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.049%	0.049%
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	20mM	-
$MnCl_2$	-	10^{-3}mM

에서 30분간 처리 또는 80℃에서 10분간 처리)한 경우에는 배지 내의 대사산물활성이 급격히 감소하는 현상을 나타내었기 때문에 적용이 불가능한 것으로 판단되어서(배양종료후 초기 항균활성은 19mm이었으나 60℃에서 150분간 처리한 경우 11mm로 급속히 감소하였으며, 잔여활성을 나타내는 항진균성 대사산물은 autoclave 조건에서도 안정적으로 유지된다), 금속이온 및 DPA의 첨가에 의한 포자형성을 유도하였다. Ca^{2+} 이온은 배양초기 또는 배양중간에 첨가하여도 균의 생육과 대사산물형성에 큰 영향을 주지 않았으나, DAP의 경우에는 배양초기에 배지에 첨가하면 대사산물형성을 크게 저해하였으므로 배양과정 중에 첨가하여 안정적인 항진균성 대사산물의 생산과 내생포자를 유도하였다.

첨가되는 Ca^{2+} 이온의 농도가 포자형성에 미치는 영향은 다음의 표 2-9과 같았다. 상기의 결과로부터 Ca^{2+} 농도의 증가에 따라 균의 생육이 증가되는 경향을 보이다 20mM 이상에서 다소 감소하는 경향을 나타내었으며, 형성된 포자를 볼 때 포자형성율이 다소 떨어지나 포자수가 가장 많은 10mM이 포장형성에는 최적인 농도로 판단되었으며, 50mM 이상의 Ca^{2+} 농도에서는 활균활성도 감소하였다. 따라서 영양세포수, 포자수 그리고 항균활성을 고려하여 10mM의 Ca^{2+} 이온을 배양초기에 첨가하기로 하였다.

한편 DPA 농도가 포자형성에 미치는 영향은 DPA를 배양초기에 배지에 함께 첨가하면 균의 생육과 항균활성물질 생산이 크게 억제되는 현상이 관찰되었으므로(무첨가구에 비하여 1/2 수준 이하로 격감), 항균활성을 살리면서 원할하게 포자형성능을 유도하기 위하여 DPA의 첨가시기를 결정하였으며, 그 결과는 다음의 표 2-10와 같았다.

위의 결과로부터 최종적으로 얻어지는 내생포자수는 배양개시 후 12 14시간째에 첨가하는 것이 가장 적합한 것으로 판단되었으며, 무첨가의 경우에는 항균활성은 유지되나 내생포자수가 감소함을 알 수 있었다. 활성물질은 배양개시 후 4시간째부터 생성되기 시작하며, 6시간째와 8시간째와 같이 첨가하면 활성물질형성과 생육에 큰 부정적 효과를 미침을 알 수 있었다.

한편, 첨가하는 DPA의 농도를 결정하기 위해 배양후 10시간째에 다음의 표 2-11과 같은 농도로 첨가하고 20시간째에 영양세포수, 내생포자수 그리고 항균활성을 조사하였다.

위의 결과로부터 DPA 농도에 증가에 따라 영양세포수는 다소 감소하는 경향이 보였으나 포자형성유도는 증가하는 경향을 나타내었다. 이 때 항균활성물질의 변화는 거의 무시할 수준으로 유지되었고, 따라서 항균활성과 영양세포수가 모두 양호한 50 μM을 첨가농도로 결정하였다.

상기 결과들을 정리하여 기본배지에 탄소원으로 starch, 질소원으로 soybean meal,

Table 2-9. Effect of the concentrations of Ca^{2+} ion on the sporulation of *B. subtilis*

Concentrations of Ca^{2+} ion	Vegetative cells	Spores	% of spore formation	Antifungal activities[1)]
0 mM	4.5 x 10^9	1.0 x 10^9	22	19
5 mM	5.3 x 10^9	1.6 x 10^9	30	19
10 mM	7.2 x 10^9	3.4 x 10^9	47	19
20 mM	4.9 x 10^9	2.7 x 10^9	55	19
50 mM	2.4 x 10^9	1.5 x 10^9	62	17

1) Diameter of clear zone against *Achromobacter aceris* IFO3166

Table 2-10. Effect of addtion time of DPA[1)] on the sporulation of *B. subtilis*

Feed time		at 6hr	at 8hr	at 10hr	at 12hr	at 14hr	Control
	pH	6.5	6.8	7.0	7.1	7.2	-
	Vegetative cells	8.0 x 10^7	5.0 x 10^8	8.0 x 10^8	1.0 x 10^9	2.0 x 10^9	-
	Spores[2)]	1.0 x 10^6	2.0 x 10^7	4.0 x 10^7	2.0 x 10^8	2.0 x 10^8	-
Analysis at 24hr	pH	7.4	7.4	7.5	7.6	7.5	7.5
	Vegetative cells	2.0 x 10^9	2.0 x 10^9	3.0 x 10^9	3.0 x 10^9	3.0 x 10^9	2.0 x 10^9
	Spores	1.6 x 10^9	1.5 x 10^8	1.5 x 10^9	2.5 x 10^9	2.5 x 10^9	9.0 x 10^8
	Fungal Activity[3)]	11	13	18	18	18	18

1) The concentration of dipicolinic acid added : 50ppm(30 μM)
2) Sporulation was induced by heat treatment at 80℃ for 10min
3) Diameter of clear zone (mm) against *Achromobacter aceris* IFO3166

Ca^{2+} 10mM을 첨가하고 접종물 5(v/v)%를 이용한 30ℓ 배양에서의 경시적 변화를 다음의 표 2-11과 2-12에 정리하였다. 위의 결과로부터 균의 생육에 따라 항균활성물질의 생산은 증가하나 pH는 미약하게 감소하다 포자형성유도기에 증가되는 경향을 나타내었다. 배양 10시간째 DPA를 첨가하였을 때, 용존산소농도가 증가하는 경향을 나타내는데, 이는 영양증식세포의 활동이 DPA의 첨가에 의해 중단됨으로써 영양증식세포에 의한 용존산소의 소비가 이뤄지지 않음을 의미하며, 흡광도의 증가는 영양증식세포가 내생포자로의 전환에 따른 것으로 판단되었다. 포자형성유도는 통상 DPA의 첨가 후 6 10시간 내에 완료되는 것으로 판단되었다.

(4) 항진균성 미생물 *B. subtilis* GB-017의 포자형성 유도

한편, *Bacillus* sp. GB-017도 autolysis에 의한 불안전함을 보였고, 이를 해결하기 위해 前記와 같이 영양세포수, 내생포자수 그리고 항균활성을 비교하면서, 배지의 일부를 개량하거나 첨가제의 첨가시기 및 농도를 결정하였다.

몇몇 금속이온들은 포자형성에 중요한 역할을 하며 휴면상태와 내열성 등에 관련된 특성에 직간접적으로 관여하고, Co^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{2+} 이온 등은 spore lytic enzyme를 활성화하는 것으로 알려져 있다. 또한 일부 금속이온 들은 포자형성의 activator로 작용하기도 한다. 포자형성의 촉진제로 알려진 Ca^{2+} 이온을 이용한 포자형성의 유도를 시험한 결과는 표 2-13와 같다.

상기 결과로부터 *Bacillus* sp. GB-017의 경우에는 Ca^{2+} 이온에 의해 영양세포수, 포자형성유도 그리고 활성물질의 생산이 모두 크게 저해됨을 알 수 있었다. 따라서 본 균주의 배양에 있어서는배양배지에 Ca^{2+} 이온의 혼입을 배제할 필요가 있을 것으로 판단되었다.

따라서, 금속이온으로서 Mn^{2+} 이온의 효과에 대해 검토하였으며, 결과는 표 2-14과 같다.

상기의 결과로부터 Mn 이온의 첨가에 의해 포자형성률이 높아지고 항균할성물질의 생산도 다소 개선되는 것으로 판단되었으며, 적정 첨가농도는 10^{-3}mM로 생각되었다.

이상의 결과를 활용(배양중의 pH 변화, O.D 값으로 모니터한 균밀도, D.O 값의 변화)하여 본 기간에서 보유하고 있는 4.2ton 배양조를 이용하여 항균활성을 유지하면서 포자형성율이 높은 조건에서 운전하여 현장에 적용할 수 있는 배양조건을 set-up하였다. 통상의 운전조건은 100rpm, 30℃, 1vvm, pH7.0±0.5의 조건으로 항균대사산물이 최대일 때, DPA를 첨가하여 포자형성을 유도하고 D.O 값을 모니터하여 일정한 값을 유지하는 시점에서 발효를 종료하면 최적의 배양물이 얻어진다.

Table 2-11. Effect of the concentrations of DPA on the sporulation induction of *B. subtilis*

Concentation of DPA	Vegetable cells	Spores1)	% of spore fromation	Fungal activities2)
0 μM	5.2 x 109	2.2 x 109	42	18
12.5 μM	2.5 x 109	1.1 x 109	44	18
25 μM	1.7 x 109	1.2 x 109	65	18
50 μM	1.5 x 109	1.3 x 109	87	18
100 μM	1.4 x 109	1.1 x 109	78	18

1) Sporulation was induced by heat treatment at 80℃ for 10min
2) Diameter of clear zone(mm) against *Achromobacter aceris* IFO3166

Table 2-12. Time course of the *B. subtilis* on 30L jar fermenter.

Time	0hr	4hr	6hr	9hr	10hr	11hr	15hr	20hr	24hr
pH1)	6.86	6.68	6.74	6.86		7.01	7.09	7.19	7.23
OD660nm	4.7	6.7	7.1	8.2		8.3	12.1	15.6	14.2
D.O	39.1	15.7	1.5	0.1	DAP1) of addition	0.4	2.1	25.4	24.6
Vegetative cell				9.1x108		1.2x109	3.8x109	4.2x109	2.0x109
Spores2)				9.0x107		9.5x108	2.0x109	3.4x109	1.2x109
Fungal activity3)	0	12	16	19		19	19	19	19

1) The concentration of dipicolinic acid added : 50 μM
2) Sporulation was induced by heat treatment at 80℃ for 10min
3) Diameter of clear zone(mm) against *Achromobacter aceris* IFO3166

Table 2-13. Effect of Ca^{2+} ion on the sporulation induction of *Bacillus* sp. GB-017.

Concentration of Ca^{2+} ion	Vegetative cells	Spores	% of spore formation	Fungal activities*
0mM	2.7x109	4.1x108	15.2	18
1mM	1.9x109	2.5x108	13.2	16
5mM	1.3x109	2.1x108	16.2	12
10mM	2.5x108	1.0x107	4.0	10
20mM	3.0x108	1.0x107	3.3	10
50mM	1.2x108	5.6x106	4.7	10

* Diameter of clear zone(mm) against *Achromobacter aceris* IFO3166

Table 2-14. Effect of Mn^{2+} ion on the sporulation induction of *Bacillus* sp. GB-017.

Concentration of Mn^{2+} ion	Vegetative cells	Spores	% of spore formation	Fungal activities*
0mM	3.1x109	1.2x108	3.9	17
10^{-5}mM	2.1x109	6.4x108	30.5	17
10^{-4}mM	2.0x109	1.3x109	65.0	18
10^{-3}mM	3.1x108	1.0x108	83.0	19
10^{-2}mM	8.2x108	1.0x107	40.4	19
10^{-1}mM	8.1x107	5.6x107	46.1	19

* Diameter of clear zone(mm) against *Achromobacter aceris* IFO3166

(5) 제제화(액상)

상기에서 얻어진 배양물을 현장에 재현성 있게 이용될 수는 액상 제제로 하고자 표 2-15와 같은 배합비로 미생물배양물을 이용한 제제를 만들고, 제제의 안정성을 조사한 결과 표 2-15와 같았다.

위의 결과로부터 포자형성유도가 불안전하거나 열처리에 의해 포자형성유도가 이뤄지면, 균수의 감소와 항균활성이 매우 저하됨을 알 수 있고, DPA와 Ca^{2+} 또는 Mn^{2+}에 의한 포자형성유도가 안정적이며, formulation에 사용된 부형제들도 제제에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다.

(5) 고체배양조건의 확립 및 제제화(고상)

본 실험에 사용된 *B. subtilis*는 단백질 분해능과 전분 분해능이 우수한 특징이 있었으며, 이를 활용하고자 우리의 식생활과 밀접한 관계가 있는 두부 공장에서 폐기물로 나오는 비지(통상 C/N ratio가 10 12:1로 알려져 있음)를 배양배지로 이용하여 고체배양하고, 이 배양물을 토양개량제로 오래전부터 사용되어 온 zeolite에 흡착하여 입제 형태의 미생물제제를 만들어보고자 시도하였다. 우선 두부공장에서 공급받은 비지 30g를 통상의 Petri dish에 고루 펼쳐지도록 한 다음, 30분간 autoclave하고 전배양물을 10^{6}/ml의 농도로 희석한 다음, 5ml 정도씩을 배지표면에 고로 묻도록 접종하고, 30℃에서 36시간 배양한 다음, 멸균증류수를 이용하여 현탁한 다음, 콩비지 단위 g당 생균수를 측정하였다. 반면 비교구로서 전기의 액체배양용 배지와 콩비지 30%, KH_2PO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%로 구성되는 액체배지를 이용하여 고체배양과 액체배양의 장단점을 검토하고자 하였다. 그리고 콩비지 배지를 이용하여 배양한 배양물을 1 중량과 zeolite 10 중량을 혼합·흡착·풍건하여 입제상 미생물제제를 만들었다. 이들에 대해 결과는 다음의 표 2-16과 같다.

상기 결과로부터 *B. subtilis*를 입상으로 제제화할 경우에 값싼 콩비지를 이용한 고체배양이 액체배양이 액체배양에 비하여 보다 균밀도가 높은 미생물원제를 공급할 수 있다는 면에서 경제성이 있을 것으로 판단된다(표 2-17).

Table 2-15. Formulation of the culture broth.

Ingredients	Percent	Functions
Cultures	87	Active ingredient
Glycerol	5	Thickner
Sodium chloride	5	Preservative
Potassium propionate	0.3	Preservative
Sodium sorbate	0.2	Preservative
Methyl-*p*-benzoate	0.1	Preservative
Tween 80	1.5	Dispersant
H_2SO_4	pH4.5	pH adjustant
Final volume with H_2O	to 1L	

Table 2-16. Stability of the formulated microbial preparations.

Preparation Date	Sample		Initial/ observed cell numbers	Observed date	Fungal activities* (initial/ observed)
98/ 10/ 31	Sporulation induction	No	9x10^9/ 7x10^7	98/ 12/ 30	18/ 17mm
		Heat	1x10^9/ 5x10^8	98/ 12/ 30	18/ 12mm
		DPA + Ca^{2+}	1x10^9/ 1x10^9	98/ 12/ 30	18/ 18mm
98/ 01/ 25		Formulation 1	5x10^9/ 5x10^9	99/ 02/ 02	18/ 18mm
			5x10^9/ 3x10^9	99/ 03/ 20	18/ 17mm
			5x10^9/ 8x10^8	99/ 05/ 07	18/ 16mm

* Diameter of clear zone(mm) against *Achromobacter aceris* IFO3166

Table 2-17. Comparision of the submerged and solid culture.

	Solid cultures	Submerged cultures		Solid preparation
		Basal production medium	Bean-curd refuse medium	
Cell number	2.5x10[10]/ g	5.4x10[9]/ ml	4.0x10[9]/ ml	2.4x109
Antifungal activity[1)]	17mm*	18ml	19mm	ND

1) Diameter of clear zone
2) ND : not determined
3) Cultures was diluted with sterilized water into the equal volume of Bean-curd refuse medium

제 3 항 천연활성제의 개발

1) 항균활성물질의 분포 측정

항균활성물질이 배양액 중에 균체 내와 외에 어느 정도 존재하는 지의 여부를 알기 위해서 배양액 30 ml를 8,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액과 균체를 분리하였다. 증류수로 3회 세척 및 원심 분리하여 얻은 균체에 동량의 acetone을 첨가하여 하룻밤 침적시킨 후 여과하여 acetone 추출액을 얻고 이를 농축하여 acetone을 제거하고 균체 추출액을 얻었다. 균체를 분리한 상등액과 함께 이 여액의 항균 활성 측정을 통하여 항균활성물질의 존재 여부를 확인한 결과 균체 내에 40% 가량 존재하였으며 균체 외에 나머지 60%가 존재하였다. 이들의 추출물을 농축하여 TLC로 분석하였을 때 항균활성물질이 균체내·외에 모두 분포하고 있었다.

따라서, *Bacillus subtilis* GB-0365 균주가 생산하는 항균활성물질은 세포 내·외에 모두 존재하므로 최적 배양 조건에서 배양한 배양액을 8,000 rpm에서 연속원심분리기를 이용하여 원심분리하여 상등액을 회수하고, 원심분리하여 얻은 균체는 acetone을 가하여 교반하고 다시 원심분리하여 균체 내부의 항균활성물질들을 회수하였으며 acetone을 제거한 액과 상등액을 혼합하여 다음 실험의 시료로 사용하였다.

2) 항균활성물질의 pH와 온도에 따른 안정성

배양액을 전처리하여 얻은 시료를 pH 3.0 - 11.0으로 조정하고 4℃에서 24시간 방치한 후 이를 pH 7.0로 조절하여 활성을 검토하였다. 그 결과 pH 9.0 까지의 영역에서는 활성을 유지하였으며 pH 11.0의 경우 4℃에서 24시간 방치한 결과 초기활성에 비하여 85%의 활성을 유지하는 것으로 보아 본 항균활성물질은 산성과 약알칼리성 영역에서 비교적 안정한 활성을 유지하는 것으로 나타났다. 또한 60, 80, 100℃에서 시간별로 온도 안정성을 관찰한 결과 100℃에서는 시간이 지남에 따라 활성이 급격하게 떨어지는 결과를 보였지만 80℃에서 1시간까지는 초기활성과 비교하여 90%이상의 활성을 나타내었으며 60℃에서 방치한 경우는 1시간까지 측정하여도 항균활성의 감소를 보이지 않는 결과를 나타내어 본 물질은 비교적 열에 안정한 물질임을 알 수 있었다.

3) Ion exchange and adsorption column chromatography

사용한 이온교환 수지 및 흡착 수지는 표 2-1에 나타내었으며 강이온교환 수지의 경우에 있어서는 pH를 3, 7 그리고 10으로 각기 나누어 행하였으며 약이온교환수지의 경우는 수지의 pH범위에 맡춰 pH 3, 7, 10 중에서 선택하여 사용하였다.

SA20AP(OH-), SA20AP(Cl-), Amberlite IRA 45(OH-), WK-10(H^+), WK-10(Na^+), SK1B(H^+) 등의 이온교환수지 20 ml를 1 × 32 cm column에 충진한 다음 전처리한 배양액을 pH 3.0, 7.0, 10.0으로 조절하여 통과시켰다. 수지에 이온교환된 물질을 이온교환법에 의하여 교환처리하기 전에, 물로 수지용량의 5배 가량을 통과시켜 이온교환이 되지 않은 물질들을 충분히 세척·용출시킨 후 각각을 acetic acid, NH_4OH등의 용매를 사용하여 탈착시켰다. 흡착 수지의 경우 HP-20 수지를 사용하여 pH를 3.0, 7.0 그리고 10.0으로 나누어 위와 같은 방법으로 행하였으며 100% IPA로 탈착하였다. 여러 종류의 양·음이온 교환수지 및 흡착 수지를 사용하여 항균활성물질의 이온교환과 흡착 여부를 확인한 결과는 표 18과 같았다. 항균물질은 SA20AP(OH-)을 사용하였을 때 pH 3.0에서 이온교환이 일어나고 용리되었고 pH 7.0과 pH 10.0에서는 이온교환이 일어나지 않았다. SA20AP(Cl-)의 경우에는 pH 3.0에서 항균활성물질의 일부가 이온교환이 되었으나 pH 7.0과 pH 10.0에서는 대부분이 통과하였다. Amberlite IRA 45(OH-)는 항균활성물질의 대부분이 이온교환되었으나, 용리되어 나오지 않았다. WK-10(H^+)은 pH 7.0에서 항균활성물질은 전혀 이온교환이 일어나지 않았으며, pH 10.0에서는 일부만 교환이 일어났다. WK-10(Na^+)에서는 pH 7.0, 10.0에서 항균활성물질의 일부만이 교환되었다. SK1B(H^+)의 경우는 항균활성물질의 일부가 교환되고 용리되었다. HP-20의 경우는 pH 3.0에서 흡착율이 높고 100% IPA로 용리하였을 때 탈착율도 높았다. 그러나, pH 7.0에서도 흡착율이 높았으나 탈착율이 pH 3.0보다 낮았고 pH 10.0의 경우는 흡착과 탈착이 잘 되지 않았다. 이상의 결과로부터 pH 7.0에서 WK-10(H^+)수지를 통과시켜 불순물을 제거하고 통과한 액을 pH 3.0으로 조절하여 HP-20에 항균활성물질을 흡착시킨 후 IPA로 용리하므로서 효율적으로 불순물을 제거하고 농축할 수 있을 것으로 생각되었다. 배양액으로부터 1차적으로 이온교환수지나 흡착수지를 사용하게 되면 온화한 조건에서 효율성 높게 목적하는 물질을 분리할 수 있으며 또한 분리정제시에 필요한 탈염조작을 이용할 수 있다.

4) WK-10 cation exchange column chromatography

앞서의 실험에서 여러가지 이온교환 수지를 이용하여 이온교환 여부를 확인한 결과 WK-10 H+ form 에서 항균활성물질의 95%정도가 이온교환이 일어나지 않고 통과되어 나왔기 때문에 WK-10 H^+이온교환수지를 이용하여 불순물은 제거하고 항균활성물질은 통과시킬 목적으로 활성화시킨 WK-10 이온교환수지 5L를 11 x 50 cm column에 충진하고 전처리한 배양액을 pH 7.0로 조정해 통과시킨 후 pH 7.0의 증류수로 수지용량의 5배 가량을 통과시켜 이온교환이 되지않은 물질들을 충분히 세척하였다. A_{254nm}로 분석하여 더 이상 물질이 흘러나오지 않을 때까지 용리한 이후 0.05, 0.1 M

Table 2-18. Result of ion-exchange and adsorption column chromatography of the antibiotics produced by *Bacillus subtilis* sp. GB-0365

Resin	pH	Activity of un-binding fraction*	Activity of elution fraction*
Control		+++	
SA20AP OH-	3.0	-	++
	7.0	++	-
	10.0	++	-
SA20AP Cl-	3.0	+	+
	7.0	++	-
	10.0	++	-
Amberlite IRA45 OH-	3.0	-	+
	7.0	-	+
	10.0	+	-
WK-10 H+	7.0	+++	-
	10.0	++	+
WK-10 Na+	7.0	++	-
	10.0	+	+
SKIB H+	3.0	++	+
	7.0	+	+
	10.0	+	+
HP20	3.0	-	+++
	7.0	-	++
	10.0	+	+

* - : Inhibition % < 20% + : Inhibition % 20% ~ 50%
++ : Inhibition % 50%-70% +++ : Inhibition % ＞70%

NH4OH을 이용하여 용리하였다. 이 경우 항균활성물질의 대부분이 이온교환이 일어나지 않고 통과하였으며 활성분획을 모아 다음 정제 단계에 사용하였다.

5) HP-20 adsorption column chromatography

HP-20 흡착 수지 pH 3.0에서 항균활성물질이 흡착되었기 때문에 HP-20 흡착 수지 5L를 채운 5 x 11 cm column에 WK-10을 통과한 활성분획을 pH 3.0 으로 조정한 후에 통과하였다. 먼저 증류수로 A254nm에서 흡광되는 물질이 흘러나오지 않을 때까지 용리하여 불순물을 제거하고 흡착된 물질을 용리하기위하여 30, 50, 100% IPA로 순차적으로 극성을 변화시키면서 탈착시켰다. 대부분의 항균활성물질은 수지에 흡착되었으며 30% IPA로 용리하였을 때 항균활성은 거의 없는 색소물질들이 용출되어 나왔고 50%IPA로 용리하였을 때 항균활성물질의 대부분이 용출되었다. 50% IPA에서 탈착된 활성분획을 모아 다음 정제 과정을 진행하였다.

6) 항균활성물질의 유기용매 추출성

HP-20 흡착수지 column에서 50% IPA로 탈착시킨 활성분획을 rotary evaporator로 감압농축하여 IPA를 증발시킨 후에 그 여액의 pH를 3.0, 7.0 그리고 10.0으로 조정한 뒤 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol을 사용해 각각 3회 반복 추출하여 나온 유기용매층과 물층에 잔존하는 항균활성물질의 활성을 측정한 결과 항균활성물질이 pH 3.0에서 ethyl acetate와 butanol 층에 많이 존재하는 결과를 보였다. 따라서 항균활성물질은 산성물질임을 알 수 있었다. 본 실험은 배양여액의 pH에 따라서 달라질 때가 있는데 이는 활성물질에 해리이온분자가 있는 경우이다. 예를 들어 활성물질이 pH 3에서는 유기용매층으로 pH 10에서는 물층에 남아있으면 산성물질로 추정할 수 있으며 마찬가지로 그 반대인 경우에는 염기성 물질이라고 할 수 있다. Ethyl acetate 보다는 butanol에서 추출율이 더 높지만 butanol층을 선택할 경우에 농축이 어렵고 또한 butanol층으로는 여러 가지 물질이 함께 추출되는 단점이 있어 수율에서는 약간 차이가 나지만 비점이 낮은 ethyl acetate를 추출을 위한 용매로 선정하였다.

HP-20 adsorption column chromatography에서의 활성분획은 감압농축하여 IPA을 제거한 후 pH를 3.0으로 조절하여 동량의 ethyl acetate로 3회 추출하였다. 분액여두상에서 진탕추출시 처음에는 매우 천천히 진탕하여 emulsion이 생기지 않도록 한 다음 강하게 진탕하였으며, 적당량의 NaCl을 가하여 층의 분리를 원활하게 하였다.

7) Silica gel column chromatography

Ethyl acetate층을 sodium sulfate로 탈수시키고 여과한 다음 감압농축하여 소량의

ethyl acetate에 녹여 silica gel column chromatography를 하기 위한 시료로 사용하였다 Silica gel 400 ml를 4 x 30 cm column에 채우고 위의 시료를 충진하여 hexane-ethyl acetate의 조성이 7:3,. 3:7, 0:10으로 조합된 용매를 이용하여 순차적으로 용리하였다. 그 중, 활성이 강한 hexane-ethyl acetate의 조성이 3:7의 용매에서 용출된 활성분획에 대하여 분리정제 과정을 진행하였다.

8) Prep-HPLC

Silica gel column chromatography에서 얻어진 활성분획을 감압농축하여 55% methanol에 녹인 후 Prep-HPLC column(Water Delta pak C18, 7.8 ×300 mm)에 injection 하고 55% methanol을 이동상으로하여 retention time 24분에서 얻어진 활성분획을 분리하였다(그림 2-1).

9) 구조분석

① 물리화학적 성질

Bacillus subtilis GB-0365이 생산하는 항균활성물질의 TLC상에서 각종 전개용매계에 대한 이동성을 검토한 결과는 표 19와 같았다. 각 전개용매계에 대한 Rf치는 methylene chloride의 경우 0.14, ethyl acetate의 경우 0.83, acetone의 경우 0.91로 나타났다. TLC plate상에서 hexane : ethyl acetate(4:6)로 전개시킨 다음 각종 발색시약을 분무하여 나타나는 결과를 관찰하였을 때 vanillin-perchloric acid에 발색되어 구조 내에 hydroxyl기나 ketone기가, anisaldehyde, phenol sulfuric acid등에 발색되므로 당이 존재하는 것으로 추측되었으며 bromophenol blue, bromophenol green에 발색되지 않아 aliphatic carboxylic acid가 존재하지 않으며 ninhydrin에 발색되지 않는 것으로 보아 구조 내에 아미노산이 존재하지 않는 것으로 추정되었다(표 2-20). 각종 유기용매에 대한 용해도를 측정한 결과 methanol, ethanol, ethyl acetate 및 chloroform 등의 용매에는 잘 용해되었으며, H_2O, Hexane 등의 용매에는 용해되지 않았다.

② 기기분석

위의 시료를 methanol에 녹인 후 UV scanning을 행하였다. UV 흡수 spectrum은 231, 259 nm에서 major peak를 나타내었으며 polyene과 lactone과 같은 발색단을 가지고 있을 것으로 예측되었다(그림 2-2). 정제된 시료를 methanol에 녹인 후 KI로 처리하여 fast atom bombardment mass spectrum(FAB MS)으로 분석한 결과 441 m/z에서 peak가 확인되었으며 192, 205, 370 m/z에서 주요 peak가 나타나는 것으로 확인되었다. 분자량은 402로 추정되었다(그림 2-3).

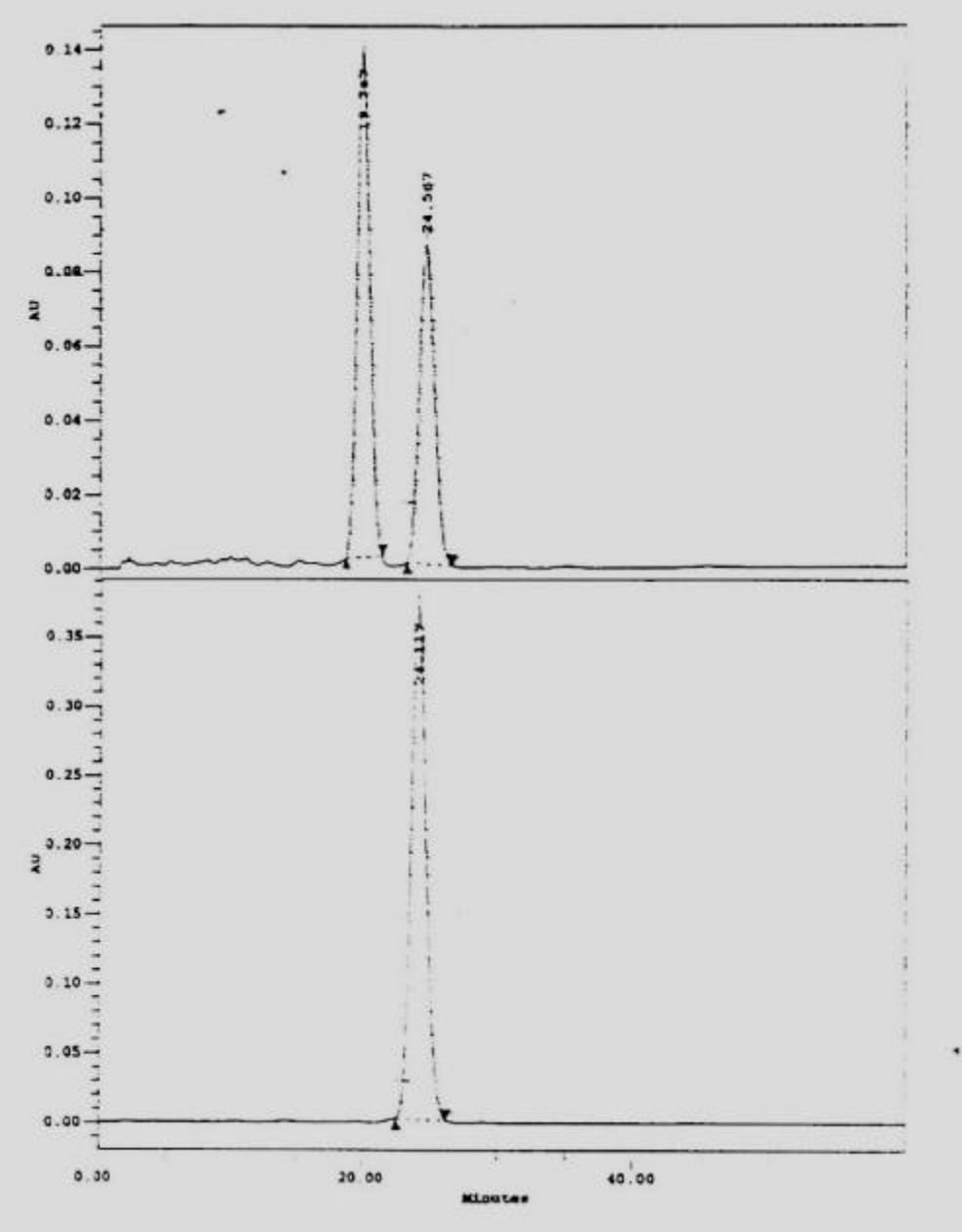

Fig. 2-1. HPLC the antibiotics produced by *Bacillus subtilis* GB-0365

Table 2-19. Rf values to the antibiotics on the organic solvents

Solvents	Rf values
Hexane	0
Cyclohexane	0
Methylene cholide	0.14
Ethyl ether	0.44
Ethyl acetate	0.83
Butyl alcohol	0.90
Isopropyl alcohol	0.85
Acetone	0.91
Ethyl alcohol	0.75
Methyl alcohol	0.80

Table 2-20. Results of visualization method of the antibiotics produced by *Bacillus subtilis* GB-0365

Reagents	Detected compound	Results
Aluminum chloride	Flavonoid	+
Anisaldehyde	Sugar	+
Anthrone	Ketose and oligosaccharide	+
Bromophenol blue	Aliphatic carboxylic acid	-
Bromophenol green	Dicarboxylic acid	-
Iodine	Universal	+
Ninhydrin	Amino acid and Amines	-
Orinol	Glycolipid	-
Perchloric acid	Steroid, Thiophosphate ester	+
Phenol sulfuric acid	Carbohydrate	+
Silver Nitrate-Pyrogallol	Carboxylic acid	-
Sulfuric acid	Universal	+
Vallin-Perchloric acid	Higher alcohol and ketone	+

+ : detected, - : not detected

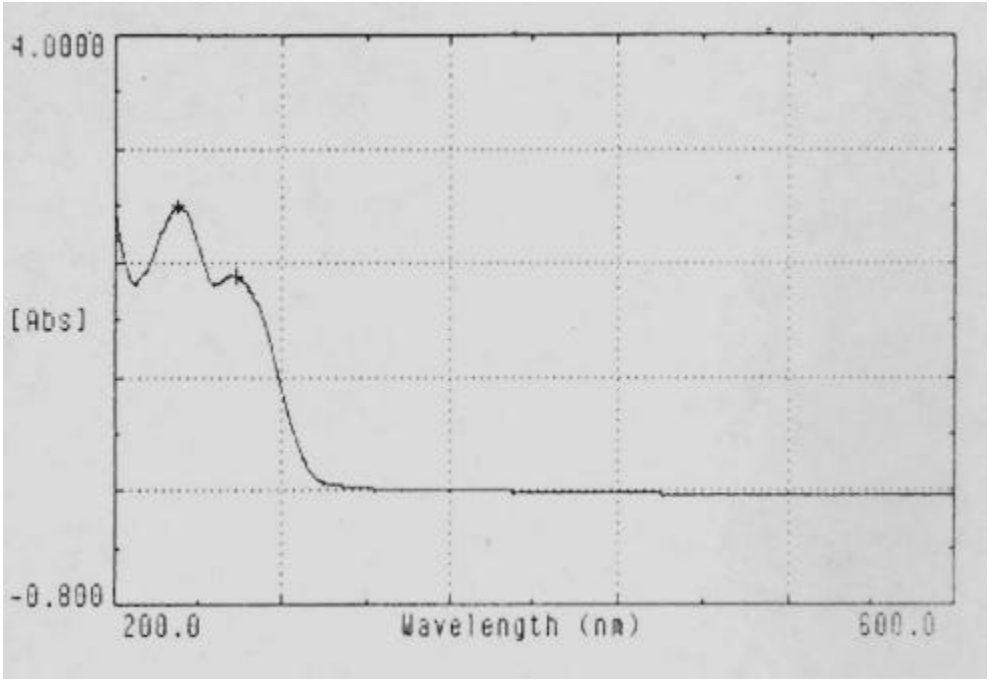

Fig. 2-2. UV spectrum of the antibiotics produced by *Bacillus subtilis* GB-0365

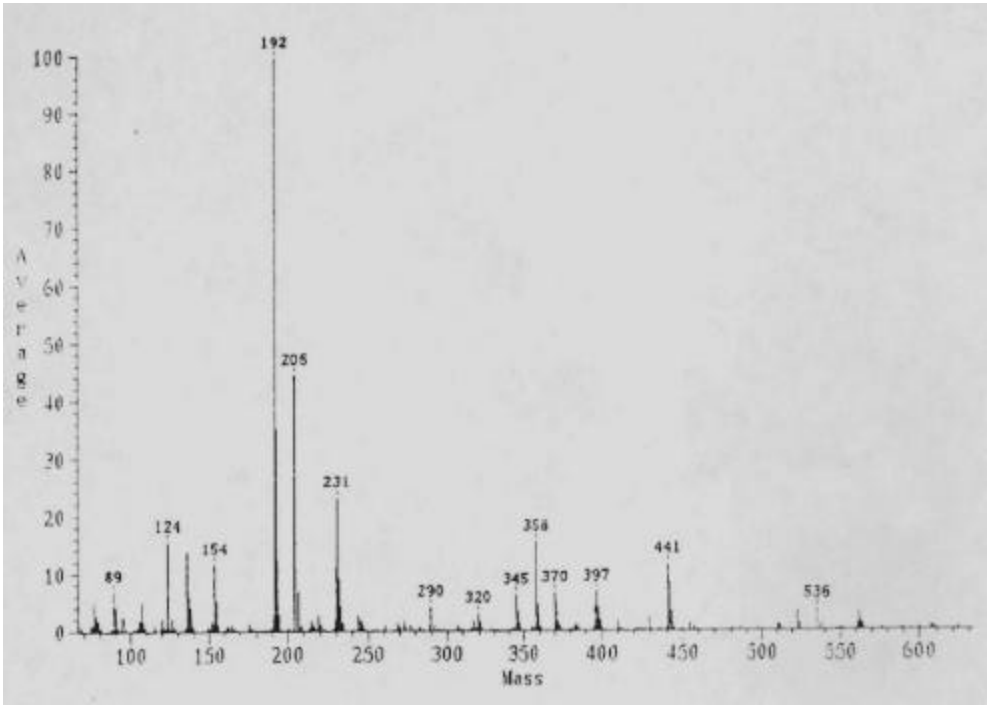

Fig. 2-3. Mass spectrum of the antibiotics produced by *Bacillus subtilis* GB-0365

제 4 장 항진균활성 미생물과 천연활성제를 이용한 감귤저장의 대규모 노지적용

제 1 절 서 설

제주에서 재배되고 있는 감귤은 주로 온주밀감(*Citrus unshiu*)이며, 생산량을 숙기별로 보면 극조생온주가 35,650톤으로 전체 감귤 생산량의 6.8%을 차지하고 있고 조생온주는 400,630톤으로 76.8%, 보통온주 79,800톤으로 15.3%을 차지하고 있으나 보통온주 생산량은 줄어드는 반면 조생온주 재배면적과 생산량은 매년 증가하고 있다(제주도, 1997; 제주감귤협동조합, 1998).

온주밀감은 대부분 노지에서 재배되고 있으며 11 12월에 걸쳐 대부분 수확되고 있다(제주도, 1997). 대부분의 온주밀감 출하는 2월 중순경까지로 그 이후에는 하우스감귤이 첫 출하 되는 5월 하순까지 단경기가 형성되고 있는 실정이다. 또한 수확기 집중 출하로 가격이 하락되고 이를 피하기 위해 보통 상온저장고를 이용하여 저장하고 있는데 저장중 온도상승 등 여러 가지 악조건 등으로 인한 부패율 증가로 인해 농가 손실이 가중되고있는 실정에 있다. 부패를 억제하기 위해 지금까지 여러 가지 방법을 이용하였지만 대부분이 화학제재 및 예조시설 등 값비싼 시설이 요구되는 방법만 보고되고 있다(박노풍 등, 1972; 전창곤, 1999).

현재 소비자들의 농산물에 대한 추세를 보면 잔류농약성분 등에 매우 민감하여 조금이라도 농약성분이 검출이 된 사실이 보고될 경우에는 즉시 외면해 버리고 또한 비싼 값을 주더라도 무농약 농산물을 선호하고 있다(전창곤, 1999). 이에 발맞추어 본 시험은 세계적으로 인기가 증가 되고있는 미생물제를 이용하여 온주밀감의 저장기간 연장을 위한 방법을 모색하여 보다 유효적절한 시기에 출하될 수 있도록 저장기간 연장에 대한 효과를 구명하고 저온저장 중 감귤의 품질유지 방법을 구명코자 본시험을 수행하게 되었다.

제 2 절 재료 및 방법

본시험은 제주에서 생산되는 작형별 온주밀감에 항진균미생물제재(*Bacillus sp.* GB-0365, GB-017)를 처리한 후 저장 중 품질 변화를 검토하였다. 시험처리는 1998년 12월 상순 2000년 8월에 걸쳐 작형별로 서귀포시, 남제주군, 북제주군 농가에 재식되어 있는 궁본조생, 궁천조생 및 흥진조생 15년생 성목에서 숙도와 크기가 균일한 과실을 수확 선과한 후 1년차에는 노지에서 침적처리한 후 자연건조(24시간)하여 농가형 상온저장고에 입고한 후 저장하였고, 2년차에는 수확 1 2일전 수상에서 분무 처리하여 충분히 건조시켜 수확한후 저장하였다.

과실의 부패과율 조사는 각처리당 저장고에 쌓여진곳 상자중 상·중·하 세곳을 정하여 발생 과실수를 조사한 뒤 총과수로 나누어 백분율로 환산하였고 감모도 위와 동일하게 3곳을 정한 뒤 상자내과실중 10과를 선정하여 시기별로 과중을 측정한 뒤 손실되는 과중을 초기무게로 나누어 백분율로 나누어 환산하였다.

분석방법은 감귤의 상품성에 영향을 주는 당도, 산함량, 경도 등을 분석시료 1점당 3회 측정하여 평균값으로 나타내었다. 과즙의 가용성고형물은 과즙을 Abbe 굴절계(Attago, 일본)를 사용하여 측정하였으며, 착즙한 과즙의 산 함량 측정은 0.1N NaOH 용액으로 적정하여 정량한 다음 구연산으로 환산하는 적정법으로 측정하였다(A.O.A.C. 1990; 주현규, 1989).

감귤 경도는 직경이 3 mm (No.17) probe가 부착된 texture analyzer(model TA-XT2, 영국)을 사용하여 측정하였다. 유리당 분석은 Bio-LC(Dionex, DX-500, 미국)를 이용하였고 detectors는 ED 40 INT amperometry를 사용하였다. Column은 CarbopacTM PA1 column을 사용하였으며, 이동상은 100mM NaOH로 유속을 0.6 ml/min로 하였고, Injector 주입량은 0.5 μl를 기준하여 주입하였다. 유리당 정량을 위한 표준물질로서는 fructose, glucose, sucrose(Sigma, GR)를 20 ppm농도로 희석 혼합하여 측정하였다. CO2의 분석은 감귤 꼭지부의 정중앙에 주사바늘(16 gauge)을 꼽아 1 ml 채취하여 GC(HP 5890)에서 TCD로 분석하였다. Column은 80 mesh chacaol이 충진된 자체제작 column (SUS, ∮2.4 mm, length 2.0 mm)을 사용하였으며 Carrier gas는 He을 유속 30 ml/min, 오븐온도는 110℃로 설정하여 분석하였다(A.O.A.C. 1990).

제 3 절 결과 및 고찰

제 1 항 노지감귤의 침적처리에 의한 대규모 노지적용을 통한 항진균미생물제 능력검정

제주에서 생산되는 노지감귤의 대표적인 품종인 흥진조생 및 궁천조생품종을 시험 재료로 하여 침적처리에 의한 항진균미생물을 이용한 대규모 노지적용시험을 수행한 결과. 본 시험의 가장 중요한 핵심인 부패과 발생 조사에서는 표 3-1, 3-2에서 보는 바와 같이 항진균미생물제재 처리구가 무처리구에 비해 우수한 결과를 보였다. 특히 궁천조생품종이 흥진조생품종에 비해 항진균미생물제재 처리 효과가 좋은 경향을 보였다.

저장기간별 감모율 발생율을 검토해본결과 표 3-3, 3-4에서와 같이 항진균제재 처리가 상온, 저온저장 모두 무처리에 비해 감모 발생이 억제되는 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과를 바탕으로 노지감귤저장을 위해 저장전 침적처리하여 저장할 경우 저장중 가장 문제가 되고있는 부패 및 감모억제에는 효과가 있을 것으로 사료되었다.

저장기간별 경도 변화 검토에서는 표 3-5에서 보는바와 같이 항진균제 처리구가 무처리구에 비해 경도의 감소가 다소 완만한 경향을 보였다. 본 결과는 상기의 감모발생 결과와 연계되는 것으로 감모억제에 의한 과피 및 과육의 장력 유지로 인해 발생된 것으로 사료된다(樽谷과 北川博敏, 1990; 青果物豫冷貯藏施設協議會, 1991; 別府英治와 石田善一, 1979; 長谷川美典, 1986; 久本直哉와 萩沼之孝; 1980).

당도변화 검토에서는 품종별, 저장기간별 및 처리에 따른 뚜렷한 변화를 볼수 없었다(표 3-6). 이에 대한 원인으로는 감귤 내부품질이 갖는 개체간의 다양성에 의한 것으로 사료된다(박노풍 등, 1972).

표 3-7에서와 같이 적정산도변화에서는 궁천조생품종의 항진균제 침적처리가 저장초기에 급격한 감소를 보이는 경향을 보인 반면 무처리구에서는 초기에 적정산도가 유지되다 후기로 갈수록 감소가 두드러진 결과를 보였다. 본 표에서와 같이 적정산도 유지는 과실의 선도와 직접적인 관련을 갖는 인자로서 항진균제 침적처리가 선도 유지에도 다소 유리한 영향을 미치는 것으로 사료되었다(樽谷과 北川博敏, 1990; 牧田好高, 1987; 伊庭慶昭과 福田博之, 1985; 別府英治와 石田善一, 1979; 牧田好高, 1989; 長谷川美典, 1986; 靜岡縣農業水産部, 1988; 久本直哉와 萩沼之孝, 1980 Fishman 등, 1989; Iwasaki 등, 1986; 박노풍 등, 1972).

표 3-1. 노지감귤 궁천조생품종에 항진균미생물제 침적처리에 따른 시기별 부패과율 (%)

처 리		조 사 일(일)									
		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
상온 (8±1℃)	처리*	1.1az	1.5b	2.2b	2.6b	3.3b	4.1b	5.6b	6.7b	7.4b	8.5b
	무처리	1.5a	2.2a	3.3a	4.4a	5.6a	6.3a	8.5a	10.0a	10.7a	11.1a
저온 (4±1℃)	처리	0	0	0	0	0.7c	1.5c	2.2c	2.6d	3.0d	3.7d
	무처리	0	0	0	1.1c	1.5c	2.2c	3.3c	4.8c	5.2c	6.3c

* 시험처리일 12월 8일

z DMRT. P=0.05

표 3-2. 노지감귤 흥진조생품종에 항진균미생물제 침적처리에 따른 시기별 부패과율 (%)

처리		조 사 일(일)									
		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
상온 (8±1℃)	처리*	0.7a	1.1b	1.9b	2.2b	2.6b	3.0b	3.7b	4.8b	5.9b	7.0b
	무처리	1.1a	1.9a	3.0a	3.7a	4.8a	5.6a	6.3a	9.6a	11.1a	11.9a
저온 (4±1℃)	처리	0	0	0	0	0	0.7c	1.9c	2.2c	2.6d	3.0d
	무처리	0	0	0	0	0.4c	1.1c	2.2c	4.1b	4.4c	5.6c

* 시험처리일 12월 8일 z DMRT. P=0.05

표 3-3. 노지감귤 궁천조생품종의 항진균미생물제 침적처리에 따른 시기별 감모율(%)

처 리		조 사 일									
		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
상온 (8±1℃)	처리*	2.0	3.8	6.7	11.1	13.8	14.2	15.0	15.9	16.9	18.0
	무처리	4.3	5.6	9.7	11.9	13.3	15.7	16.4	17.8	18.3	19.3
저온 (4±1℃)	처리	1.4	2.3	3.7	4.0	5.0	5.9	6.7	8.1	9.9	11.4
	무처리	1.4	2.2	3.5	5.0	6.0	7.1	8.0	9.0	10.3	12.6

표 3-4. 노지감귤 흥진조생품종의 항진균미생물제 침적처리에 따른 시기별 감모율(%)

처 리		조 사 일(일)									
		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
상온 (8±1℃)	처리*	2.1	3.9	6.9	12.0	13.9	15.2	15.8	16.2	17.1	19.1
	무처리	4.2	5.3	8.8	13.2	14.8	16.2	17.5	18.4	19.6	21.1.
저온 (4±1℃)	처리	1.3	2.4	3.7	4.1	5.3	6.0	6.9	8.5	9.5	12.0
	무처리	1.5	2.6	4.3	4.7	5.9	7.2	8.1	9.3	10.6	13.2

표 3-5. 노지감귤의 항진균미생물제 침적 처리에 따른 저장기간별 경도의 변화(3㎜ ∮/g)

처 리		조사일(일)									
		0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
궁천조생	저온 처리	794.3	743.9	861.3	674.8	554.0	656.6	649.0	760.8	721.6	604.1
	저온 무처리	794.3	672.1	621.9	821.0	634.5	569.6	606.9	601.4	702.9	623.2
	상온 처리	794.3	817.8	772.7	676.9	749.1	748.6	718.0	595.4	467.2	522.8
	상온 무처리	794.3	750.0	782.8	826.4	731.9	858.6	683.3	483.3	505.6	555.1
흥진조생	저온 처리	1028.3	1036.0	823.7	804.7	1014.8	859.9	761.8	869.3	696.0	796.6
	저온 무처리	1028.3	894.5	818.1	911.3	835.1	719.6	711.4	686.3	744.8	699.1
	상온 처리	1028.3	1006.4	890.8	792.0	776.8	888.1	731.1	684.2	534.0	658.5
	상온 무처리	1028.3	781.8	889.6	905.5	760.4	719.8	857.4	709.1	722.1	650.3

표 3-6. **노지감귤의 항진균미생물제 침적처리에 따른 저장기간별 당도 변화**(。Brix)

처 리			조사일(일)									
			0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
궁천조생	저온	처 리	10.9	9.7	9.5	8.8	10.3	10.9	9.5	10.5	9.8	9.7
		무처리	10.9	10.9	10.5	10.9	10.4	11.2	10.0	9.9	9.2	11.2
	상온	처 리	10.9	10.4	10.2	9.9	9.8	10.2	9.8	10.2	9.5	10.4
		무처리	10.9	9.4	10.8	10.2	10.0	10.5	10.0	10.6	9.9	10.2
흥진조생	저온	처 리	10.5	10.5	9.8	9.6	10.6	10.2	9.6	9.8	9.5	11.3
		무처리	10.5	10.4	9.9	9.1	11.1	10.6	9.2	9.8	9.4	11.2
	상온	처 리	10.5	9.8	9.3	9.9	9.5	9.9	10.0	9.2	9.4	10.7
		무처리	10.5	10.4	10.1	10.1	9.7	10.2	9.4	9.8	10.2	9.6

표 3-7. **노지감귤의 항진균미생물제 침적처리에 따른 저장기간별 산도의 변화**(%)

처 리			조사일(일)									
			0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
궁천조생	저온	처 리	0.81	0.66	0.68	0.60	0.63	0.71	0.56	0.58	0.62	0.56
		무처리	0.81	0.76	0.66	0.70	0.65	0.60	0.64	0.54	0.55	0.50
	상온	처 리	0.81	0.63	0.68	0.70	0.64	0.74	0.60	0.53	0.57	0.59
		무처리	0.81	0.88	0.70	0.72	0.74	0.65	0.56	0.47	0.48	0.44
흥진조생	저온	처 리	0.95	0.86	0.75	0.68	0.72	0.75	0.52	0.67	0.64	0.69
		무처리	0.95	0.77	0.72	0.59	0.86	0.73	0.58	0.68	0.63	0.61
	상온	처 리	0.95	0.84	0.68	0.69	0.63	0.76	0.62	0.57	0.52	0.51
		무처리	0.95	0.81	0.60	0.82	0.69	0.67	0.63	0.49	0.46	0.41

노지감귤의 항진균제 침적처리에 따른 저장기간별 CO2 발생율을 검토해본 결과 전체적으로 항진균제 침적처리구가 저장 후기로 갈수록 CO2 발생율이 높은 경향이었는데 이러한 원인은 항진균제 침적처리에 의해 과피에 코팅 효과가 발생되어 과실 내부로부터 발생된 CO2의 외부 발산이 차단 됐을 것으로 사료된다(표 3-8).

착색도 명도(L), 황청도(b) 및 적록도(a)값의 검토에서는 품종별, 저장 시기별, 및 처리별 차이를 볼 수 없었다. 본 결과로서 항진균제는 감귤과피의 착색도변화에는 영향을 미치지 못함을 알 수 있었다(표 3-9, 3-10, 3-11).

제 2 항 하우스감귤의 침적처리에 의한 대규모 노지적용을 통한 항진균미생물제 능력검정

하우스감귤의 침적처리에 의한 항진균미생물제 능력을 검토하기 위해 감귤을 수확후 즉시 프로피온산 0.2%가 첨가된 UNFOMULATION 및 프로피온산이 첨가되지 않은 FOMULATION 항진균미생물제재에 침지한 후 풍건하여 저장해본 결과, 부패과율 검토에서는 표 3-12에서 보는바와 같이 저장기간이 경과 될수록 항진균제재 처리가 무처리에 비해 부패과율 발생이 적었다. 노지 감귤과 마찬가지로 하우스감귤도 항진균미생물제재 처리 효과가 있음을 알 수 있었다.

표 3-13 에서와 같이 항진균미생물제 침적처리에 따른 저장기간별 감모율에서는 항진균미생물제 침적처리구가 무처리구에 비해 감모의 발생이 완만함을 알 수 있었다.

저장기간별 경도 변화 검토에서는 표 3-14에서와 같이 항진균미생물제 처리구가 무처리구에 비해 경도의 감소가 다소 완만한 경향을 보였다.

당도변화 검토에서는 저장기간별 및 항진균미생물처리에 따른 뚜렷한 변화를 볼 수 없었다. 이에 대한 원인으로는 노지감귤과 같은 원인으로 내부품질이 갖는 개체간의 다양성에 의한 것으로 사료된다(표 3-15).

적정산도의 검토에서는 항진균미생물제 침적처리구가 뚜렷한 억제 효과를 보이지 않았다. 이에 대한 원인은 기후적인 원인에 의해 하우스감귤의 선도유지기간이 짧기 때문에 자체적인 산성분의 소모가 적은 것으로 사료된다(표 3-16).

항진균미생물제 침적처리에 따른 저장기간별 CO2 발생율을 검토해 본 결과 처리별, 저장 시기별 뚜렷한 차이를 볼 수 없었다(표 3-17).

표 3-8. 노지감귤의 항진균미생물제 침적처리에 따른 저장기간별 CO2 발생율(%)

처 리			조사일(일)		
			70	80	90
궁 천	저 온	처 리	6.93	8.17	1.53
		무 처 리	5.65	6.53	1.90
	상 온	처 리	4.21	3.80	2.88
		무 처 리	2.41	3.42	2.41
흥 진	저 온	처 리	7.43	7.60	2.24
		무 처 리	5.02	6.64	2.22
	상 온	처 리	6.36	6.43	4.48
		무 처 리	6.81	4.31	3.05

표 3-9. 노지감귤의 항진균미생물제 침적처리에 따른 저장기간별 착색도 L값의 변화

처 리			조사일(일)		
			70	80	90
궁 천	저 온	처 리	53.94	54.41	51.86
		무 처 리	53.43	53.62	53.57
	상 온	처 리	52.53	52.48	53.23
		무 처 리	52.33	52.77	53.27
흥 진	저 온	처 리	52.12	52.91	52.19
		무 처 리	51.92	52.60	52.43
	상 온	처 리	51.84	52.74	52.25
		무 처 리	53.47	53.54	52.69

표 3-10. 노지감귤의 항진균미생물제 침적처리에 따른 저장기간별 착색도 a값의 변화

처 리			조사일(일)		
			70	80	90
궁 천	저 온	처 리	32.64	34.44	33.36
		무 처 리	32.95	33.73	31.85
	상 온	처 리	33.51	30.21	32.31
		무 처 리	31.81	31.61	32.28
흥 진	저 온	처 리	34.09	34.74	31.33
		무 처 리	33.35	32.84	32.33
	상 온	처 리	32.75	32.88	34.46
		무 처 리	33.44	34.19	33.11

표 3-11. 노지감귤의 항진균미생물제 침적처리에 따른 저장기간별 착색도 b값의 변화

처 리			조사일(일)		
			70	80	90
궁 천	저 온	처 리	29.88	30.58	29.00
		무 처 리	29.71	29.93	29.60
	상 온	처 리	29.00	28.21	29.17
		무 처 리	28.78	28.95	29.21
흥 진	저 온	처 리	29.27	29.75	28.37
		무 처 리	28.97	29.08	29.09
	상 온	처 리	28.82	29.16	28.99
		무 처 리	29.68	29.68	29.11

표 3-12. 하우스감귤의 항진균미생물제 침적처리에 따른 저장기간별 부패율(%)

처리	조 사 일(일)				
	처리일	5	10	15	20
UNFOMULATION	0	1.30b	2.04b	2.78b	6.67b
FOMULATION	0	1.11b	1.67b	2.61b	4.65b
무 처 리	0	8.33a	12.60a	19.20a	30.00a

표 3-13. 하우스감귤의 항진균미생물제 침적처리에 따른 저장기간별 감모율(%)

처리	조 사 일(일)				
	처리일	5	10	15	20
UNFOMULATION	0	2.08	4.00	5.15	8.48
FOMULATION	0	2.22	4.12	5.15	8.35
무 처 리	0	3.40	5.42	6.85	10.90

*Unfomulation : 프로피온산 0.2%첨가

표 3-14. 하우스감귤의 항진균미생물제 침적처리에 따른 저장기간별 경도변화(3mm ∮/g)

처 리	조 사 일(일)				
	처리전	5	10	15	20
UNFOMULATION	613.7	616.6	559.7	573.4	727.6
FOMULATION	613.7	552.2	568.8	469.9	451.2
무 처 리	613.7	633.5	623.9	568.7	587.6

표 3-15. **하우스감귤의 항진균미생물제 침적처리에 따른 저장기간별 당도변화** (° Bx)

처 리	조 사 일(일)				
	처리전	5	10	15	20
UNFOMULATION	9.4	9.0	9.4	8.7	8.5
FOMULATION	9.4	10.8	9.2	9.6	9.0
무 처 리	9.4	8.6	8.7	10.0	9.2

표 3-16. **하우스감귤의 항진균미생물제 침적처리에 따른 저장기간별 적정산도변화** (%)

처 리	조 사 일(일)				
	처리전	5	10	15	20
UNFOMULATION	0.65	0.57	0.57	0.53	0.58
FOMULATION	0.65	0.55	0.53	0.59	0.55
무 처 리	0.65	0.62	0.60	0.64	0.55

표 3-17. **하우스감귤의 항진균미생물제 침적처리에 따른 저장기간별** internal CO2 **생성량**(%)

처 리	조 사 일(일)			
	처리전	5	10	15
UNFOMULATION	0.96	1.55	1.74	1.60
FOMULATION	0.96	2.27	1.58	1.74
무 처 리	0.96	1.28	2.64	1.70

제 3 항 극조생 감귤에 항진균미생물제 희석 배수별 수상처리 농가실증을 통한 적용시험

극조생감귤의 유통기간은 대부분 10월중순에서부터 11월에 걸쳐 유통된다 이러한 근거에 의해 대부분 저장이 1개월 정도 이루어지며 특히 우리나라 감귤의 주요 수출국인 캐나다의 경우 매년 10,000M/T 가량 수입을 하고 있다(제주도, 1997; 제주감귤협동조합; 1998). 이에 대한 원인은 극조생 생산시기가 캐나다의 오랜지수입 단경기이고 이시기에 일본 및 중국으로부터도 온주밀감 계통이 다량 수입이 이루어지고 있다(제주감귤협동조합; 1998). 1999년에는 우리나라산 감귤이 캐나다로 8,000M/T이 수출되었으나 수출과정중 부패과 발생이 평균 18.5%로 다량 발생되어 이에 대한 대책이 시급한 실정이다. 현재 수출시 선적에서부터 하역에 이르기까지 소요되는 기간은 대체적으로 1개월이 소요되며 이시기까지 부패억제에 효과가 있는 처리가 요망된다(전창곤, 1999). 이러한 것을 바탕으로 제주에서 생산되는 극조생감귤의 대표적인 품종인 궁본조생 품종을 시험 재료로 하여 항진균미생물제재를 처리가 가장 생력적이며 손쉬운 수상처리하여 저장 시험을 수행한 결과. 부패과 발생 조사에서는 그림 3-1에서 보는 바와 같이 항진균미생물제재 20배 희석액 처리구가 무처리구에 비해 2배 이상 부패과 발생이 적은 우수한 결과를 보였다.

항진균미생물 수상 처리 후 저장기간별 감모율 검토에서는 표 3-18에서 보는 바와 같이 항진균미생물제 처리구가 무처리에 비해 다소 감모 발생이 완만함을 보였다.

저장기간별 경도를 검토해 본 결과 항진균미생물제 20배 희석액 처리구가 다른 처리구 들에 비해 경도가 저장기간 전체에 걸쳐 유지되는 경향을 보였다(표 3-19).

저장기간별 당도를 검토해 본 결과 처리별, 저장기간별 뚜렷한 차이는 없었으며 특히 무처리구는 저장기간이 경과될수록 수분감모에 의해 당도의 증가가 이루어지는 양상을 보였다(표 3-20).

1개월 가량의 극조생 감귤이 유통되는 것을 바탕으로 적정산도의 변화를 검토 해본 결과 대체적으로 저장기간 경과에 따른 적정산도의 급격한 변화는 볼 수가 없었다(표 3-21).

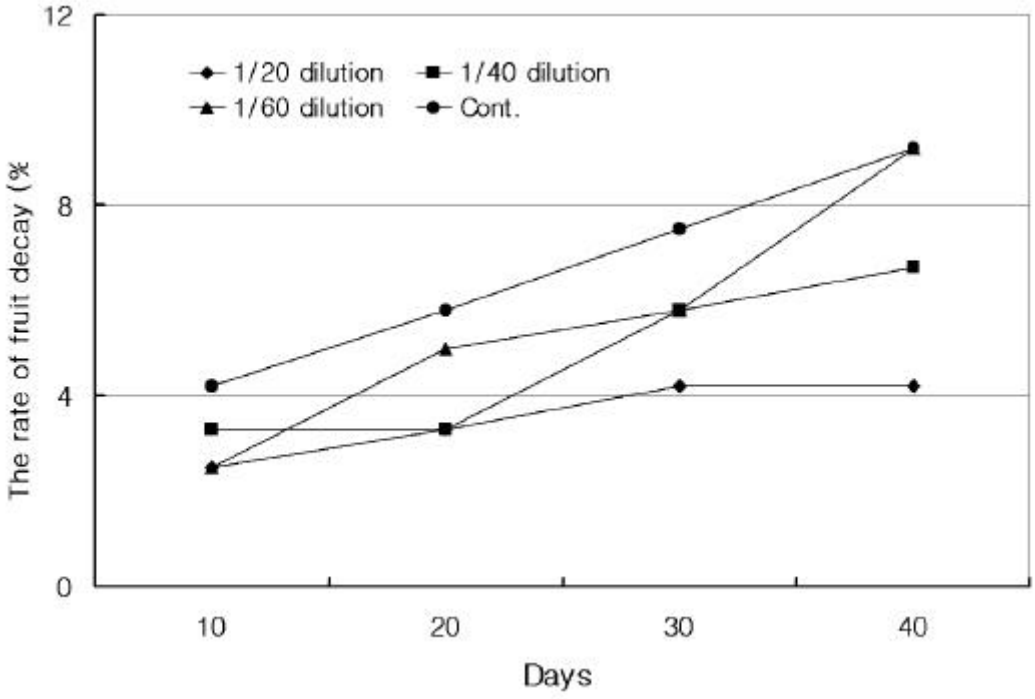

그림 3-1. **극조생감귤의 항진균미생물제 수상 처리 후 시기별 부패과 발생**

표 3-18. 극조생감귤의 항진균미생물제 수상 처리 후 저장기간별 감모율(%)

처 리	조 사 일(일)			
	10	20	30	40
20배 희석	3.68	7.65	10.88	13.55
40배 희석	3.16	7.75	10.85	13.79
60배 희석	3.61	7.36	10.48	13.80
무 처 리	4.23	8.19	10.99	14.74

*시험처리일 1999. 11. 4

표 3-19. 극조생감귤의 항진균미생물제 수상 처리 후 저장기간별 경도(∮3mm/g)

처 리	조 사 일(일)				
	처리일	10	20	30	40
20배 희석	607.1	657.7	575.6	584.3	627.8
40배 희석	607.1	621.4	707.6	604.9	574.7
60배 희석	607.1	611.1	601.4	587.6	495.6
무 처 리	607.1	577.6	552.1	557.4	569.8

표 3-20. 극조생감귤의 항진균미생물제 수상 처리 후 저장기간별 당도(cBx)

처 리	조 사 일(일)				
	처리일	10	20	30	40
20배 희석	9.34	9.0	9.7	10.0	9.7
40배 희석	9.34	9.5	10.1	10.0	9.5
60배 희석	9.34	9.1	9.4	9.5	9.5
무 처 리	9.34	9.2	9.8	10.0	10.0

* 처리일(11.4)

표 3-21. 극조생감귤의 항진균미생물제 수상처리 후 저장기간별 적정산도변화(%)

처리	조 사 일(일)				
	처리일	10	20	30	40
20배 희석	1.08	0.99	0.93	0.89	0.83
40배 희석	1.08	1.03	0.95	0.87	0.94
60배 희석	1.08	1.00	0.94	0.84	0.86
무 처 리	1.08	1.03	0.98	0.94	0.91

* 처리일(11.4)

제 4 항 조생 감귤에 항진균미생물제 희석 배수별 수상처리 농가실증을 통한 적용시험

1999년 조생 온주밀감의 생산량은 638.7천 M/T로 제주도 목표생산량의 600.0천 M/T보다 초과되어 소비지에서의 가격 저하가 심하였다(전창곤, 1999). 이에 따라 감귤 농가 대부분은 출하시기 분산을 위해 저장을 실시하였는데 저장중 부패발생으로 인한 손실이 심하였다. 이에 따라 본시험을 수행하는데 농가들의 많은 호응도 있었으며 보다 확실한 효과를 검토하는데 중점을 두고 시험 수행에 임하였다. 항진균미생물제를 수상 처리한 후 저장기간별 부패과 발생 양상을 조사 조사해 본 결과 그림 3-2에서 보는바와 같이 20배 희석액 처리가 저장기간 80일에서 부패과 발생이 9.3%로 무처리의 13.3%에 비해 효과가 뚜렷함을 알 수 있었다. 본 결과로 항진균미생물제의 적정 희석 농도는 20배 희석액이 가장 타당할 것으로 사료되었다.

표 3-22에서의 시기별 감모율 검토에서도 항진균미생물제 20배 희석액 처리가 타 처리구에 비해 감모발생이 완만하였다.

항진균미생물제 처리 후 시기별 경도에서는 처리별, 시기별 뚜렷한 차이를 볼 수 없었으나 무처리 과실은 저장 시기별 경도의 증가가 이루어 졌다(표 3-23). 이에 대한 원인은 과피 위조에 의해 발생된 것으로 사료된다(樽谷과 北川博敏, 1990; 牧田好高, 1987; 伊庭慶昭과 福田博之, 1985; 別府英治와 石田善一, 1979; 牧田好高, 1989; 長谷川美典, 1986; 靜岡縣農業水産部, 1988; 久本直哉와 萩沼之孝, 1980 Fishman 등, 1989; Iwasaki 등, 1986; 박노풍 등, 1972).

저장기간별 당도를 검토해 본 결과 극조생감귤 처리와 유사한 양상을 보였는데 항진균미생물제 처리별, 저장기간별 뚜렷한 차이는 없었으며 특히 전처리구 모두 저장기간이 경과될수록 수분감모에 의한 당도 증가가 이루어지는 경향을 보였다(표 3-24).

적정산도는 감귤에서 과실선도 지표로 이용된다(Kader, 1992; 久本直哉와 萩沼之孝, 1980). 표 3-25에서 항진균미생물제 20배 희석액 처리구가 저장기간 80일 까지 다른 처리구에 비해 유지되는 경향을 보였다.

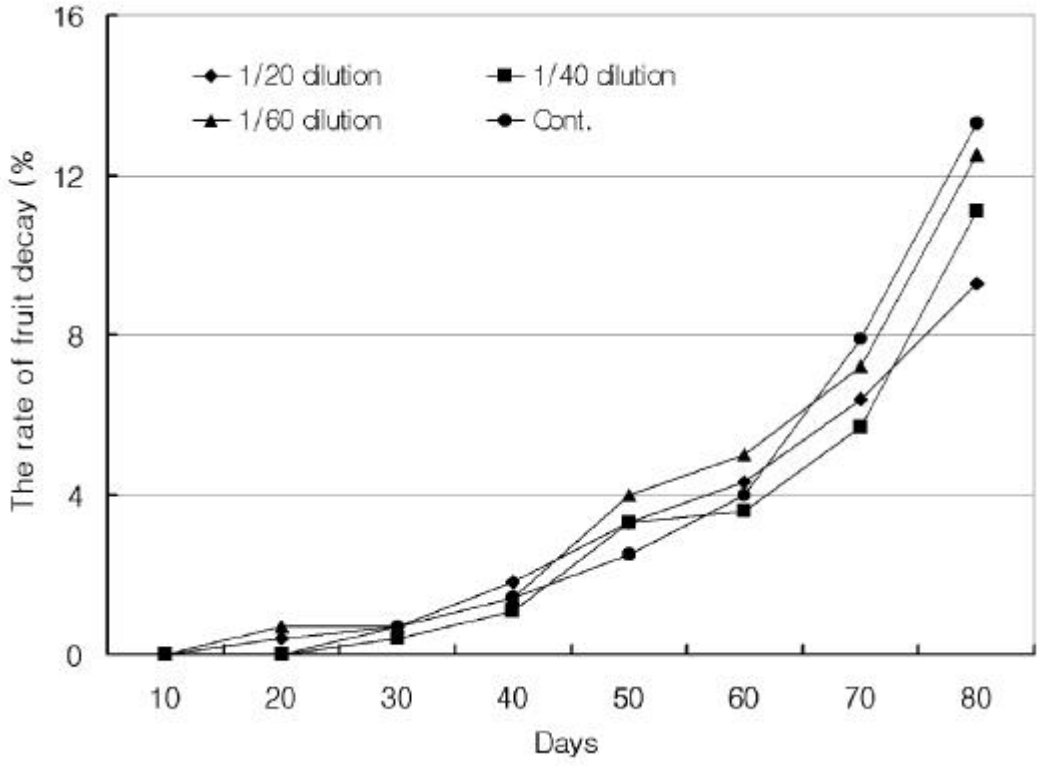

그림 3-2. **조생감귤의 항진균미생물제 수상처리 후 저장기간별 부패과율**

표 3-22. 조생감귤의 항진균미생물제 수상처리 후 저장기간별 감모율(%)

처리	조사일(일)							
	10	20	30	40	50	60	70	80
20배 희석	1.30	2.46	3.16	4.20	5.48	7.07	8.13	9.13
40배 희석	1.46	2.72	3.83	5.37	6.97	8.31	9.61	10.87
60배 희석	1.50	2.78	3.71	5.39	6.73	7.96	9.15	10.35
무 처 리	1.24	2.71	3.69	5.10	6.48	7.87	9.11	10.45

표 3-23. 조생감귤의 항진균미생물제 수상처리 후 저장기간별 경도 (∮3mm/g)

처리	조 사 일(일)								
	처리일	10	20	30	40	50	60	70	80
20배 희석	940.2	1264.3	902.9	638.8	933.0	789.8	717.1	841.6	618.8
40배 희석	940.2	1360.3	805.6	781.5	799.1	713.0	668.1	611.2	564.1
60배 희석	940.2	1093.3	774.7	768.9	810.7	562.1	528.8	580.0	546.0
무 처 리	940.2	1211.4	703.6	640.1	693.1	642.1	714.6	743.4	802.4

** 처리일(12.17)

표 3-24. 조생감귤의 항진균미생물제 수상처리 후 저장기간별 당도(cBx)

처리	조 사 일(일)								
	처리일	10	20	30	40	50	60	70	80
20배 희석	9.53	10.8	12.4	10.8	10.8	10.8	9.9	10.8	10.6
40배 희석	9.53	9.2	10.4	10.1	10.3	10.3	10.7	11.1	10.4
60배 희석	9.53	9.3	11.3	10.6	10.3	11.3	11.1	11.1	10.6
무 처 리	9.53	9.9	10.4	9.7	10.0	9.7	10.6	10.3	10.4

* 처리일(12.17)

표 3-25. 조생감귤의 항진균미생물제 수상처리 후 저장기간별 적정산도(%)

처리	조 사 일(일)								
	처리일	10	20	30	40	50	60	70	80
20배 희석	1.24	1.26	1.32	1.09	0.98	0.94	0.96	0.95	0.91
40배 희석	1.24	1.17	1.11	0.98	1.01	0.90	0.93	0.93	0.88
60배 희석	1.24	1.19	1.19	1.08	0.98	0.96	0.87	0.90	0.86
무 처 리	1.24	1.32	1.17	1.13	1.05	1.04	0.97	0.90	0.86

* 처리일(12.17)

제 5 항 하우스 감귤에 항진균미생물제 희석 배수별 수상처리 농가실증을 통한 적용시험

하우스감귤의 유통기간은 보통 수확후 5일 이내에 이루어진다 또한 하우스감귤의 수출지역은 대부분 일본이며 수송은 항공으로 이것도 국내와 마찬가지로 수확후 5일 이내에 출하지 도매시장에 상장이 이루어지고 있는 실정이다(제주감귤협동조합, 1998; 전창곤, 1999). 이에 따라 소비지역의 최대 유통 기간을 10일 전후로 보고 시험을 수행한 결과 부패과율에서는 그림 3에서 보는 바와 같이 항진균미생물제 처리구중 20배 희석액 처리구가 가장 부패억제에 효과가 있음을 알았다. 이에 따라 항진균미생물제의 효과는 부패과 억제에 우수하여 수출 및 국내시장에 출하전 수상처리를 하여 출하한다면 좋을 것으로 사료되었다.

감모율에 있어서는 항진균미생물제처리에 따른 효과가 하우스 감귤에서는 인정되지 않았다(표 3-26).

경도 변화에서는 표 3-27과 같이 무처리구가 높은 경향이었는데 이에 대한 원인은 과피증산에 의해 수분 감모가 이루어지면서 발생된 것으로 사료된다(樽谷과 北川博敏, 1990; 牧田好高, 1987; 伊庭慶昭과 福田博之, 1985; 別府英治와 石田善一, 1979; 牧田好高, 1989; 長谷川美典, 1986; 靜岡縣農業水産部, 1988; 久本直哉와 萩沼之孝, 1980 Fishman 등, 1989; Iwasaki 등, 1986; 박노풍 등, 1972).

당도의 변화는 전체 처리구 공히 약간씩 증가되는 경향을 보였으나 처리별, 시기별 뚜렷한 차이는 없었다(표 3-28). 산도의 변화에서도 전체 처리구 공히 처리별, 시기별 뚜렷한 차이는 없었다(표 3-29).

저장기간별 CO_2 발생량의 변화는 전체 처리구 공히 약간씩 감소되는 경향을 보였으나 처리별, 시기별 뚜렷한 차이는 없었다(표 3-30).

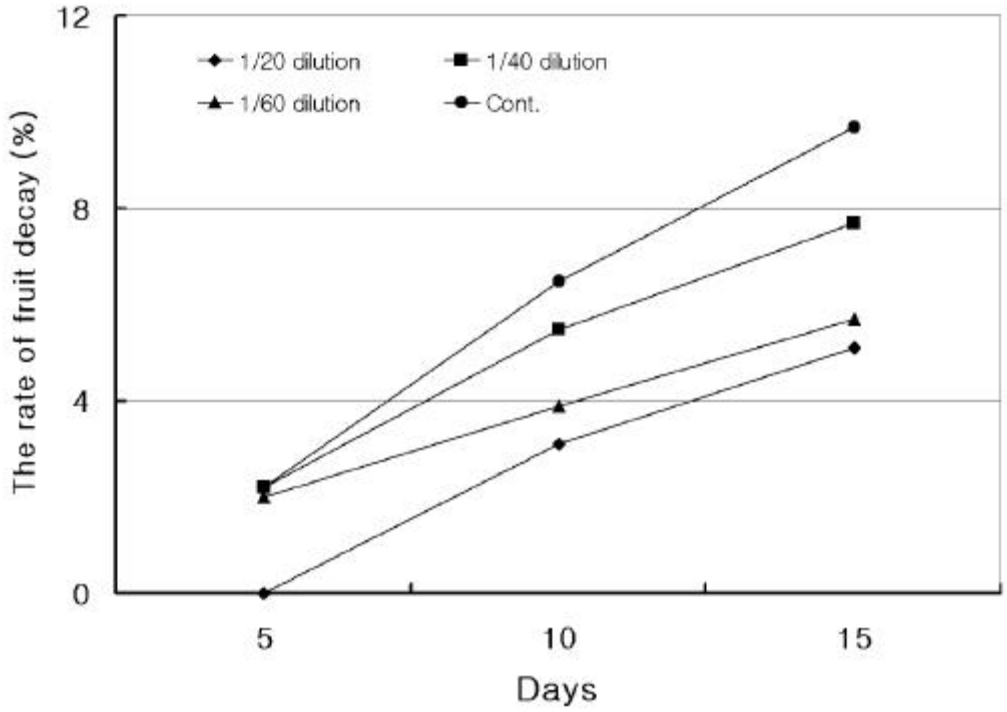

그림 3-3. **하우스감귤의 항진균미생물제 처리후 저장기간별 부패과율**

표 3-26. 하우스감귤의 항진균미생물제 수상 처리후 저장기간별 감모율(%)

저장온도	미생물처리	조 사 일(일)			
		처리시	5	10	15
상온	20배 희석	0	1.7	3.3	4.7
	40배 희석	0	1.1	3.1	4.4
	60배 희석	0	1.7	3.4	4.8
	무 처 리	0	1.8	3.5	4.8
저온	20배 희석	0	1.0	1.3	1.6
	40배 희석	0	1.0	1.5	1.9
	60배 희석	0	0.9	1.1	1.3
	무 처 리	0	1.1	1.3	1.6

표 3-27. 하우스감귤의 항진균미생물제 수상처리후 저장기간별 경도 변화(3㎜ ∮ /g)

저장온도	미생물처리	조 사 일(일)			
		처리시	5	10	15
상온	20배 희석	819.3	629.9	509.7	491.5
	40배 희석	819.3	556.4	480.6	503.6
	60배 희석	819.3	574.3	521.5	512.3
	무 처 리	819.3	653.4	658.6	693.9
저온	20배 희석	819.3	673.3	561.9	568.4
	40배 희석	819.3	562.3	653.4	545.9
	60배 희석	819.3	627.3	573.8	647.4
	무 처 리	819.3	747.0	735.3	647.9

표 3-28. 하우스감귤의 항진균미생물제 수상처리후 저장별 당도 변화(cBx)

저장온도	미생물처리	조 사 일(일)			
		처리시	5	10	15
상온	20배 희석	9.1	9.0	9.6	10.0
	40배 희석	9.1	10.2	9.4	9.4
	60배 희석	9.1	9.8	9.8	9.1
	무 처 리	9.1	9.5	9.1	9.4
저온	20배 희석	9.1	9.5	9.9	10.4
	40배 희석	9.1	9.3	10.7	10.4
	60배 희석	9.1	9.9	9.2	11.2
	무 처 리	9.1	8.9	7.8	9.4

표 3-29. 하우스감귤의 항진균미생물제 수상처리후 저장기간별 산도 변화(%)

저장온도	미생물처리	조 사 일(일)			
		처리시	5	10	15
상온	20배 희석	0.74	0.76	0.78	0.73
	40배 희석	0.74	0.72	0.70	0.78
	60배 희석	0.74	0.74	0.93	1.07
	무 처 리	0.74	0.71	0.78	0.80
저온	20배 희석	0.74	0.75	0.86	0.81
	40배 희석	0.74	0.75	0.68	0.73
	60배 희석	0.74	0.83	0.85	0.85
	무 처 리	0.74	0.66	0.74	0.71

표 3-30. 하우스감귤의 항진균미생물제 처리후 저장기간별 CO2 발생량(%)

저장온도	미생물처리	조 사 일(일)			
		처리시	5	10	15
상온	20배 희석	1.54	1.17	1.42	1.33
	40배 희석	1.54	1.35	1.43	1.85
	60배 희석	1.54	1.97	1.21	1.53
	무 처 리	1.54	1.35	1.33	1.27
저온	20배 희석	1.54	0.43	0.54	0.67
	40배 희석	1.54	0.56	0.85	0.48
	60배 희석	1.54	0.82	1.09	0.77
	무 처 리	1.54	1.20	1.35	1.11

제 5 장 적 요

본 연구는 제주 농민들의 현장애로를 해결하고자 일반 농가에서도 사용이 용이하며, 저비용·무독성·환경친화형의 감귤 수확후 선도유지를 위한 신소재 개발을 목적으로 실시되었으며, 1) 감귤의 수확후 장기선도유지 신소재 처리기술 개발, 2) 항진균활성 미생물분리와 천연활성제의 대량생산, 그리고 3) 항진균활성 미생물과 천연활성제를 이용한 감귤의 대규모 노지적용의 3가지 세부과제로 구성되어 수행되었다.

본 연구의 결과는 다음과 같다.

(1) 감귤의 수확후 장기선도유지 신소재 처리 기술 개발

1) 감귤 저장중 발생하는 곰팡이에 대한 항진균활성 미생물의 활성 검정을 검정한 결과 GB-017과 GB-0365, 그리고 GB-017 + GB-0365 처리구 모두 *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., 그리고 *Alterhenza* sp.에 대하여 매우 뛰어난 길항성을 보여주었으며, 그 효과는 6.3×106 spores/ml에서 부터 6.3×104 spores/ml 까지 다양하게 나타났다.

2) 감귤 수확후 장기저장을 위한 항진균활성 미생물의 최적농도는 GB-0365 균주의 경우 1/2 희석액, GB-017은 1/10 희석액, GB-0365+GB-017은 1/2희석액으로 결정되었으며, 이후의 항진균성 미생물을 이용한 흥진조생 감귤의 저장실험에 적용되었다.

3) 흥진조생 감귤에 항진균성 미생물의 처리결과 무처리구에서는 저장 10일 이후부터 과피에 흰곰팡이가 발생하기 시작하여 저장후 105일(3달 반)까지 거의 모두 부패하였으며, 미생물 처리구는 저장 후 85일째까지는 곰팡이 발생율이 매우 낮았다. 또한, 무처리구에서는 부패과의 다른 과실로의 전이율이 매우 높았으나, 항진균성 미생물 처리구에서는 모두 부패전이율이 낮았다.

4) 항진균성 미생물 균주 중 GB-0365를 이용하여 궁천조생밀감에 수상처리 및 침지처리를 실시한 결과, 수상처리가 더 효과적임이 밝혀졌다. 수상처리는 무처리(68.2%)에 비하여 50일 이후의 부패율이 매우 낮았으며(17%), 침지처리(32.2%)의 경우에도 무처리에 비하여 부패율이 낮은 경향을 나타내었다.

5) 항진균활성 미생물 유래의 천연활성제가 감귤 저장에 미치는 효과를 알아보기 위하여 무처리구, 천연활성제 1/20, 1/40, 1/60 희석액 처리구로 침지처리한 결과, 무처리구에 비하여 천연활성제 희석액 모든 처리구에서의 부패율이 상당량 감소되었다. 특히 천연활성제 1/20 희석액 처리구에서는 부패율이 저장기간 90

일 경과후 10.2%로 부패억제효과가 아주 뛰어났으며, 외관상 상품성의 변화에도 거의 영향을 미치지 않았다.

(2) 항진균활성 미생물과 천연활성제의 대량생산

1) 분리주 GB-0365를 전자현미경으로 관찰하면 간균의 형태를 띠고 있었고, 그람염색결과 그람양성으로 확인되었으며, 운동성을 지니고 있었다. 이 균주는 *Bacillus subtilis*로 동정되었고, *Bacillus subtilis* GB-0365로 명명하였다. 또한 분리주 GB-017의 경우는 전자현미경으로 관찰하였을 때 간균의 형태를 띠고 있었고, 그람양성이었으며, 운동성을 지니고 있었다. 이 균주 또한 *Bacillus* sp.로 동정되었고, *Bacillus* sp. GB-017로 명명하였다.

2) 길항미생물 *Bacillus subtilis* GB-0365 균주와 식물 병원균과의 길항효과 검정결과, 잿빛곰팡이병의 원인이 되는 보트리티스 시네리아(*Botrytis cineria*)에 대하여 생육저지효과를 나타내어 균사생육억제 현상이 높았으며 작물의 시들음병의 원인이 되는 푸사리움(*Fusarium* sp.), 입고병과 잘록병의 원인균 피시움속(*Pythium* sp.), 잔디의 주요 병원성 균인 브라운패취(*R. solani* MAFF 511103), 라지패취(*R. solani* MAFF 305245)에 대하여서도 억제효과를 나타내었다. 반면, 세균과 효모에 대해서도 생육 억제효과가 없는 것으로 보아 식물성 병원균에 대해서만 선택적인 활성을 갖는 것으로 나타났다. 한편, 바실러스속 GB-017의 경우, 입고병과 잘록병의 원인균 피시움속(*Pythium* sp.)에 대하여 생육 저지효과가 높았으며 잿빛곰팡이병의 원인이 되는 보트리티스 시네리아(*Botrytis cineria*), 시들음병의 원인이 되는 푸사리움(*Fusarium* sp.), 브라운패취(*R. solani* MAFF 511103), 라지패취(*R. solani* MAFF 305245)에 대하여서도 억제효과를 나타내었다. 세균과 효모에 대해서도 생육 억제효과가 없는 것으로 보아, 식물성 병원균에 대해서만 선택적인 활성을 갖는 것으로 나타났다.

3) 항진균활성 미생물들의 대량생산을 위한 배지조성은 경제성을 고려하여 질소원으로는 soybeam meal를 탄소원으로는 starch를 선정하였다. 또한 배지의 완충효과를 주기 위해 들어가는 지나친 인산염을 배제하고 pH 조정이 가능한 발효조의 이용을 전제로 material balance를 고려하여 보다 단순한 조성을 갖는 균체 및 항진균성 대사산물의 생산배지를 고안하였다.

4) 항진균성 미생물 *B. subtilis* GB-0365의 포자형성 유도를 위하여 금속이온(Ca^{2+})과 dipicolinic acid(DPA)의 첨가에 의한 내생포자유도를 검토한 결과, 10mM의 Ca^{2+} 이온을 배양초기에 첨가하는 것이 효과적인 것으로 판명되었으며, DPA를

배양초기에 배지에 함께 첨가하면 균의 생육과 항균활성물질 생산이 크게 억제되는 현상이 관찰되었다. 또한 포자형성유도는 통상 DPA의 첨가 후 6 10시간 내에 완료되는 것으로 판단되었다.

5) *Bacillus* sp. GB-017도 autolysis에 의한 불안전함을 보였고, 이를 해결하기 위해 前記와 같이 영양세포수, 내생포자수 그리고 항균활성을 비교하면서, 배지의 일부를 개량하거나 첨가제의 첨가시기 및 농도를 결정하였다.

6) *B. subtilis*를 입상으로 제제화할 경우에 값싼 콩비지를 이용한 고체배양이 액체배양이 액체배양에 비하여 보다 균밀도가 높은 미생물원제를 공급할 수 있다는 면에서 경제성이 있을 것으로 판단된다.

7) 항균활성물질이 배양액 중에 균체 내·외에 어느 정도 존재하는 지의 여부를 알기 위해서 배양액 30 ml를 8,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액과 균체를 분리한 결과, 항균활성물질이 균체내·외에 모두 분포하고 있었다.

8) 항균활성물질의 pH와 온도에 따른 안정성을 조사한 결과 본 항균활성물질은 산성과 약알칼리성 영역에서 비교적 안정한 활성을 유지하는 것으로 나타났으며, 비교적 열에 안정한 물질임을 알 수 있었다.

(3) 항진균활성 미생물과 천연활성제를 이용한 감귤의 대규모 노지적용

1) 노지감귤의 침적처리에 의한 대규모 노지적용을 통한 항진균미생물제 능력검정 결과 흥진조생 및 궁천조생품종에서는 부패과 발생 및 감모 억제에 효과가 우수함이 인정되었다.

2) 하우스감귤의 침적처리에 의한 대규모 노지적용을 통한 항진균미생물제 능력검정에서도 부패과율에서 항진균제재 처리가 무처리에 비해 부패과율 발생이 적어 각종저장병해 억제효과가 인정 되었다

3) 극조생, 조생 및 하우스감귤에 항진균미생물제 희석 배수별 수상처리 농가실증을 통한 적용시험 결과 부패과 발생억제는 항진균미생물제재 20배액 처리구가 무처리구에 비해 2배이상 우수한 효과를 보였다. 감모율억제 및 경도유지에서도 항진균미생물제 20배액 처리가 가장 효과적 이었다.

4) 항진균미생물제재(*Bacillus sp*. GB-0365, GB-017)를 처리하여 저장을 할 경우에는 항진균미생물제재 20배액으로 수상살포하여 처리하면 농가노동력절감 및 부패억제 및 선도유지저장에 효과가 있어 농가부가가치 향상에 기여할 것으로 사료된다.

제 6 장 참고문헌

A.O.A.C. 1990. "Official Methods of Analysis". 15th ed. Association Analytical Chemists, Washington, D.C. pp. 914-915.

Abeles, F. B., P. W. Morgan and M. E. Saltviet. 1992. Ethylene in plant biology. 2nd ed. pp. 120-125. Academic Press, Inc. San Diego, CA.

Charles, L. W., A. E. Ghaouth, C. Edo, S. Droby, C. Stevens, J. Y. Lu, V. Khan and A. Joseph. 1994. Potential of induced resistance to control postharvest disease of fruits and vegetables. Plant Dis. 78(9):837-844.

Cronshow, D. K. and G. F. Pegg. 1976. Ethylene as a toxin synergist in *Verticillium* wilt of tomato. Physiol. Plant Pathol. 9:33-44.

Droillard, M. J., A. Paulin and J. C. Massot. 1987. Free radical production, catalase and superoxide dismutase activities and membrane integrity during senescence of petals of cut carnations (*Dianthus caryophyllus*). Physiol. Plant. 71:197-202.

Elad, Y. 1988. Involvement of ethylene disease caused by *Botrytis cinerea* on rose and carnation flowers and the possibility of control. Ann. Appl. Bot. 113:589-598.

Elad, Y. 1992. The use of antioxidants (free radical scavengers) to control grey mold (*Botrytis cinerea*) and white mold (*Sclerotinia sclerotirum*) in various crops. Plant Pathol. 41:417-426.

Fishman, S., and S. Ben-Yehoshua. Gas exchange in MAP of fruit : Dynamics of Carbon dioxide Concentration. International congress for plastics in agriculture. 80.

Gould, A. B., D. Y. kobayashi, and M. S. Bergen. 1996. Identification of bacteria for biological control of *Botrytis cinerea* on petunia using a petal disk assay. Plant Dis. 80:1029-1033

Hammer, P. E., K. B. Evensen, and W. J. janisiewiez. 1993. Postharvest control of *Botrytis cinerea* on cut rose flowers with pyrrolnitrin. Plant Dis. 77:283-286.

Huang, Y., B. J. Deverall, S. C. Morris, and B. L. Wild. 1993. Biocontrol of postharvest orange disease by a strain of *Pseudomonas cepacia* under semi-commercial conditions. Postharvest Biol. Tech. 3:293-304.

Iwasaki, N. C. Oogaki, M. Iwamasa and K. Ishihata. 1986. Adatability of citrus species based on the relationships between climatic parameters and fruit quality characteristics, J. Japan. Soc. Hort. sci 55(2):153-168.

Janisiewiez, W. J. 1985. Biological control of postharvest disease of pome fruit. Phytopathology 75(11):1301(Abst).

Janisiewiez, W. J. and J. Roitman. 1988. Biological control of blue mold and gray mold on apples and pears with *Pseudomonas cepacia*. Phytopathology 78:1697-1700.

Janisiewiez, W. J., D. L. Peterson, and R. Bors. 1994. Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseus*. Plant Dis. 78:466-470.

Janisiewiez, W. J., L. Yourman, J. Roitman, and N. Mahoney. 1991. Postharvest control of blue mold and gray mold of apples and pears by dip treatment with pyrrolnitrin, a metabolite of *Pseudomonas cepacia*. Plant Dis. 75(5):490-494.

Kohl. J., W. M. L. Molhoek, C. H. van der Plas, and N. J. Fokkema. 1995. Effect of Ulocladium atrum and other antagonists on sporulation of *Botrytis cinerea* on dead lily leaves exposed to field conditions. Phytopatho. 85:393-401.

Louise, B., G. B. Ramsey, M. A. Smith and W. R. Wright. 1959. Effects of gamma radiation on brown rot and *Rizopus* rot of peaches and the casual organism. Phytopatho. 49:354-356.

Moorman, G. W. and R. J. Lease. 1992. Residual efficacy of fungicides used in the management of *Botrytis cinerea* on greenhouse-grown Geraniums. Plant Dis. 76:374-376.

Pratella, G. C. and M. Mari. 1993. Effectiveness of *Trichoderma, Gliocladium* and *Paecilomyces* in postharvest fruit protection. Postharvest Biol. Tech. 3:49-56.

Pusey, P. L. and M. W. Hotchkiss. 1987. Application and effecacy of *Bacillus subtilis* for brown rot control in commercial peach-packing operation. Phytopathology 77:1776(Abst).

Redmond, J. C., J. J. Marois and J. D. McDonald. 1987. Biologcal control of *Botrytis cinerea* on rose with *Epiphyti*c microorganisms. Plant Dis. 71:799-802.

Tronsmo, A. and J. Raa. 1977. Antagonistic action of *Trichoderma pseudokoningii* against the apple pathogen *Botrytis cinerea.*. Phytopath. 89:216-220.

Wisniewsli, M. E. and C. L. Wilson. 1992. Biological control of postharvest diseases of fruit and vegetables: Recent Advances. HortSci. 27:94-98.

久本直哉, 萩沼之孝. 1980. **ウンシュウミカンの品質及び成分に及ぼす貯藏條件の影響**. **日本園藝學會雜誌** 49(2):260-268

牧田好高. 1987. **豫措溫度條件がウンシュウミカンの品質と貯藏性に及ぼす影響**. **園學要指昭**62**年秋**

牧田好高. 1989. 青島溫州の高溫豫措によるキュアリング效果. 農産物流通技術研究會報 11(10):1836-1838.

박노풍, 최언호, 변과의, 백자훈. 1972. 감귤류의 저장에 관한 연구, 한국식품과학회지 4(4): 285-290.

別府英治, 石田善一. 1979. 伊豫甘の豫措.貯藏方法に關する研究. 愛果樹試研報 7, 1-18.

伊庭慶昭. 福田博之등. 1985. 果實の成熟と貯藏. 養賢堂. 250-252.

長谷川美典. 1986. 柑橘の高溫豫措,貯藏技術, 靜岡縣柑橘農業協同組合組合會.

전창곤. 1999. 감귤수출증대방안연구. 감귤산업발전을 위한 연구보고서. 감귤협동조합. 9-19

靜岡縣農業水産部. 1988. 青島溫州の高溫豫措技術, あたらしい農業技術, No 168.

제주감귤협동조합. 1998. 제주산 및 수입감귤류의 시기별 품질조사연구. 조사보고서.

제주도. 1997. '97년산 감귤유통처리분석. 제주도 감귤출하연합회.

주현규. 1989. 식품분석법. pp.355-359.

樽谷, 北川博敏. 1990. 園藝食品の流通・貯藏・加工. 養賢堂. 154-159.

青果物豫冷貯藏施設協議會. 1991. 園藝農産物の鮮度保持. 農林統計協會. pp. 200-203.