

최 종
연구보고서

***Phytophthora capsici* 제어 항곰팡이 방선균 제제의 개발과 상용화**

Commercialization and development of antifungal *Streptomyces* agent controlling *Phytophthora capsici*

Phytophthora capsici 제어 항곰팡이 방선균제제의 재배활성 검정

Field trials of antifungal *Streptomyces* agent against *Phytophthora capsici*

Phytophthora capsici 제어 항곰팡이 방선균제제의 상용화를 위한 대량생산 기술 및 품질관리 기법의 개발

Development of mass production technology and quality control technology for the commercialization of antifungal *Streptomyces* agent controlling *Phytophthora capsici*

(주)케이아이비씨
충북대학교
한국에너지기술연구원

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “*Phytophthora capsici* 제어 항곰팡이 방선균 제제의 개발과 상용화에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001 년 10 월 18 일

주관연구기관명 : (주)케이아이비씨

총괄연구책임자 : 서 형 원

연 구 원 : 양 장 석

연 구 원 : 박 진 서

연 구 원 : 최 예 훈

위탁연구기관명 : 충북대학교

위탁연구책임자 : 차 병 진

위탁연구기관명 : 한국에너지기술연구원

위탁연구책임자 : 박 순 철

요 약 문

I. 제 목

Phytophthora capsici 제어 항곰팡이 방선균 제제의 개발과 상용화

II. 연구개발의 목적 및 중요성

독성이 강한 화학농약을 사용하지 않고 고추생산에 큰 피해를 주는 고추역병을 환경친화적으로 예방 및 방제하는 것은 지속적인 농업 경제활동뿐만 아니라 환경을 보존하고 안전한 농산물의 생산에 있어 중요한 요소이다. 따라서 본 연구는 고추역병을 일으키는 *Phytophthora capsici* 제어 신기능 방선균을 선발하고 대량생산 생물발효공정과 안정화 전달매체 기술의 개발로 약효를 지속적으로 유지하는 환경친화적 첨단 미생물제제의 실용화에 목표가 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

Phytophthora capsici 제어 활성이 우수한 방선균 IBT 1245를 선발하고 생물발효배지 및 공정의 최적화를 통해 방선균 IBT 1245를 효과적으로 대량생산한다. 대량생산한 방선균 IBT 1245를 효율적으로 회수 할 수 있는 공정을 개발한다. 또한 대량생산한 IBT 1245를 안정화하는 전달매체나 공정을 개발하여 효율적으로 방선균 IBT 1245 미생물제제를 생산하는 공정을 개발한다. 개발된 방선균 IBT 1245 미생물제제가 실제 포장재배 시험에서 고추역병을 효과적으로 예방 및 방제 할 수 있는지를 검증한다. 또한 고추 역병의 예방과 방제를 위해 개발된 방선균 IBT 1245 미생물제제의 효과적인 사용법을 도출한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

Phytophthora capsici 제어 활성이 우수한 방선균 IBT 1245를 선발하고 생물발효공정의 최적화를 통해 대량생산과 대량생산한 활성 방선균 IBT 1245를 막 분리공정을 통해 효율적으로 회수하는 공정을 개발하였다. 대량생산 공정의 개발로 대량생산이 가능해졌고 안정화 전달매체 개발로 IBT 1245의 활성을 안정화하는 데 성공하였으며 포장 재배시험을 통해 개발한 방선균 IBT 1245 미생물제제가 효과적으로 고추역병을 제어함을 확인하였다. 또한 개발한 방선균 IBT 1245 미생물제제는 기주 식물인 고추에 전혀 해가 없고 고추의 생육 증진효과가 있다.

“*Phytophthora capsici* 제어 항곰팡이 방선균 제제의 개발과 상용화”과제로 최종 연구 목표에 따라 과제의 성공적인 연구 성과를 상용화 할 계획이다.

SUMMARY

I. Title

Commercialization and development of antifungal *Streptomyces* agents controlling *Phytophthora capsici*.

II. Objectives and Importance

Prevention of *Phytophthora* blight of hot pepper by environmentally friendly method without use of toxic chemical pesticides is necessary for economically sustainable agriculture and for the environmental conservation and production of safe agricultural produces. Thus, the objective of this research is commercialization of biocontrol agent by achieving selection of *Streptomyces* controlling *Phytophthora capsici* causing *Phytophthora* blight and development of microbial fermentation processes for the large scale production and delivery medium for microbial stabilization.

III. Contents and Scope

The contents of this research cover selecting *Streptomyces* IBT 1245 controlling *Phytophthora capsici* and production of IBT 1245 in large scale by developing optimized fermentation processes using optimized production medium. It is necessary to develop

effective recovery process of IBT 1245 produced in large scale. It is also necessary to develop delivery medium and effective production process of microbial stabilization for the production of IBT 1245 biocontrol agent. Furthermore, it is required confirming the effectiveness of developed biocontrol agent of IBT 1245 in preventing hot pepper from *Phytophthora capsici* causing *Phytophthora* blight at agricultural field trials. It is also necessary developing usage of developed biocontrol agent of IBT 1245 in controlling *Phytophthora* blight.

IV. Results and Suggestions

Processes have been developed by selecting *Streptomyces* IBT 1245 controlling *Phytophthora capsici* and producing IBT 1245 in large scale by developing optimized fermentation processes and recovering IBT 1245 using developed membrane process. Stabilization of IBT 1245 have been achieved by developing delivery medium and effective production process of microbial stabilization for the production of IBT 1245 biocontrol agent. Furthermore, it is confirmed that developed biocontrol agents of IBT 1245 were effective in preventing hot pepper from *Phytophthora capsici* causing *Phytophthora* blight at agricultural field trials. The biocontrol agents of IBT 1245 also showed that harmless to hot pepper and improvement of plant growth of hot pepper. It is planning to commercialize the developed biocontrol agents of IBT 1245 according to the objective of this research.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	-----	15
I. Necessity of technology development	-----	15
1. Summary of technology (or product) development	--	15
2. Importance of technology development and status of related technology in the world	-----	17
3. Effect of technology development	-----	22
4. Market	-----	25
5. Utilization and commercial plan	-----	26
 Chapter 2. Objective and contents of technology development		
-----		28
I. Final objective of technology development	-----	28
II. Yearly main developments	-----	31
III. The first year development contents and scope	-----	32
IV. Previous research results	-----	35
V. The second year development contents and scope	-----	39
VI. The second year development contents and scope	-----	41
VII. Field trials of antifungal Streptomyces agents against <i>Phytophthora capsici</i> (<i>in vivo</i>)	-----	42
1 Objective and content of technology development	--	42

A. Final objective of technology development	--	42
B. Yearly main developments	-----	44
C. The first year development contents and scope	-----	45
D. The second year development contents and scope	-----	46
E. The third year development contents and scope	-----	47
VIII. Development of mass production technology and quality control technology for the commercialization of antifungal <i>Streptomyces</i> agent controlling <i>Phytophthora capsici</i> .	-----	49
1. Objective and content of technology development		
A. Final objective of technology development	--	49
B. Yearly main developments	-----	50
C. The first year development contents and scope	-----	51
D. The second year development contents and scope	-----	51
E. The third year development contents and scope	-----	52
VIV. Diagram for technology development	-----	53

Chapter 3. Results	-----	54
I. Results of the first year technology development	-----	54
A. The first year objective of research development and evaluation point	-----	54
B. Achievement of objective of research development	--	56
C. Research method	-----	59
D. Research content and result	-----	59
a. Product formations and field trials of antifungal <i>Streptomyces</i> agent of IBT 1245 controlling <i>Phytophthora capsici</i> .	-----	59
b. Field trials of antifungal <i>Streptomyces</i> agent of IBT 1245 controlling <i>Phytophthora capsici</i> .(<i>in vivo</i>)	-----	66
c. Development of mass production technology and quality control technology for the commercialization of antifungal <i>Streptomyces</i> agent controlling <i>Phytophthora capsici</i> .	-----	71
II. The second year result of research development	-----	76
1. The objective and content of research development and evaluation point	-----	76
2. Achievement of objective of research development	--	78
3. Research method and content	-----	79
A. Establishment of commercialization of <i>Streptomyce</i>		

s IBT 1245 produced by optimized mass production media and fermentation process.	-----	79
B. Field trials of antifungal <i>Streptomyces</i> agents against <i>Phytophthora capsici</i> (<i>in vivo</i>)	-----	82
C. Development of mass production technology and quality control technology for the commercialization of antifungal <i>Streptomyces</i> agent controlling <i>Phytophthora capsici</i> .	-----	84
4. Research content and result	-----	85
A. Establishment of commercialization of <i>Streptomyces</i> IBT 1245 produced by optimized mass production media and fermentation process.	-----	85
B. Field trials of antifungal <i>Streptomyces</i> agents against <i>Phytophthora capsici</i> (<i>in vivo</i>)	-----	94
C. Development of mass production technology and quality control technology for the commercialization of antifungal <i>Streptomyces</i> agent controlling <i>Phytophthora capsici</i> .	-----	99
III. The third year result of research development	---	107
1. The third year objective and content of research development and evaluation point	-----	107
2. Objective and content of research development	--	108
3. Research method and content	-----	109

A. Registration of biocontrol agent of <i>Streptomyces</i> IBT 1245 controlling <i>Phytophthora capsici</i> --	109
B. Field trials of antifungal <i>Streptomyces</i> agents against <i>Phytophthora capsici</i> (<i>in vivo</i>) ----	118
1. The 3'rd year content and scope of technology development -----	118
2. Research method -----	119
3. Research result -----	127
4. Discussion -----	140
C. Development of mass production technology and quality control technology for the commercialization of antifungal <i>Streptomyces</i> agent controlling <i>Phytophthora capsici</i> . -----	141
1.The third year content and scope of technology development -----	141
Chapter 4. Discussion -----	145
Referances -----	147

목 차

제1장 서론	15
제1절. 개발기술의 필요성	15
1. 개발대상기술(또는 제품)의 개요	15
2. 대상기술 개발의 중요성 및 국내·외 관련기술의 현황	17
3. 기술개발의 효과	22
4. 시장현황	25
5. 활용방안 및 사업화 계획	26
제2장. 기술개발의 목표 및 내용	28
제1절. 기술개발의 최종 목표	28
제2절. 연도별 주요개발 내용	31
제3절. 1차년도 개발내용 및 개발범위(상세히 기재)	32
제4절. 선행연구결과	35
제5절. 2차년도 개발내용 및 개발범위	39
제6절. 3차년도 개발내용 및 개발범위	41
제7절. <i>Phytophthora capsici</i> 제어 항곰팡이 방선균제제의 재배활성 검정 (<i>in vivo</i>)	42
1. 기술개발의 목표 및 내용	42
가. 기술개발의 최종 목표	42
나. 연도별 주요개발 내용	44

다. 1차년도 개발내용 및 개발범위	-----	45
라. 2차년도 개발내용 및 개발범위	-----	46
마. 3차년도 개발내용 및 개발범위	-----	47
제8절. <i>Phytophthora capsici</i> 제어 항곰팡이 방선균제제의 상용화 를 위한 대량생산 기술 및 품질관리 기법의 개발	----	49
1. 기술개발의 목표 및 내용	-----	49
가. 기술개발의 최종 목표	-----	49
나. 연도별 주요개발 내용	-----	50
다. 1차년도 개발내용 및 개발범위	-----	51
라. 2차년도 개발내용 및 개발범위	-----	51
마. 3차년도 개발내용 및 개발범위	-----	52
제9절. 기술개발 추진체계	-----	53
제3장. 결과	-----	54
제1절. 1차년도 기술개발 결과	-----	54
1. 1차년도 연구개발목표와 내용 및 평가의 착안점	----	54
2. 연구개발 목표의 달성도	-----	56
3. 연구수행 방법	-----	59
4. 연구수행 내용 및 결과	-----	59
가. <i>Phytophthora capsici</i> 제어 방선균의 IBT 1245 제제화 및 포장 활성 검증	-----	59
나. <i>Phytophthora capsici</i> 제어 항곰팡이 방선균 제제의 재배활성 검정 (<i>in vivo</i>)	-----	66

다. <i>Phytophthora capsici</i> 제어 항곰팡이 방선균 제제의 상용화를 위한 대량생산 기술 및 품질관리 기법의 개 발	-----	71
제2절. 2차 연도 기술개발 결과	-----	76
1. 연구개발목표와 내용 및 평가의 착안점	-----	76
2. 연구개발 목표의 달성도	-----	78
3. 연구수행 방법 및 내용	-----	79
가. 대량생산 생물발효배지 및 생물발효공정의 최적화를 통한 방선균 IBT 1245 미생물제제의 실용화 구축	-----	79
나. <i>Phytophthora capsici</i> 제어 항곰팡이 방선균제제의 재배활성 검증(<i>in vivo</i>)	-----	82
다. <i>Phytophthora capsici</i> 제어 항곰팡이 방선균제제의 상용화를 위한 대량생산 기술 및 품질관리 기법의 개 발	-----	84
4. 연구수행 내용 및 결과	-----	85
가. 대량생산 생물발효배지 및 생물발효공정의 최적화를 통한 방선균 IBT 1245 미생물제제의 실용화 구축	-----	85
나. <i>Phytophthora capsici</i> 제어 항곰팡이 방선균제제의 재배활성 검증(<i>in vivo</i>)	-----	94
다. <i>Phytophthora capsici</i> 제어 항곰팡이 방선균제제의 상용화를 위한 대량생산 기술 및 품질관리 기법의 개		

발	-----	99
제3절. 3차 연도 기술개발 결과	-----	107
1. 3차 연도 연구개발목표와 내용 및 평가의 착안점	---	107
2. 당해년도 연구개발 목표 및 내용	-----	108
3. 연구수행 내용	-----	109
가. <i>Phytophthora capsici</i> 제어 방선균 IBT 1245 미생물 제제등록	-----	109
나. <i>Phytophthora capsici</i> 제어 항곰팡이 방선균제제의 재배활성 검증(<i>in vivo</i>)	-----	118
1. 3차 연도 개발내용 및 개발범위	-----	118
2. 연구수행 방법	-----	119
3. 연구수행 결과	-----	127
4. 결 론	-----	140
다. <i>Phytophthora capsici</i> 제어 항곰팡이 방선균제제의 상용화를 위한 대량생산 기술 및 품질관리 기법의 개 발	-----	141
1. 3차 연도 개발내용 및 개발범위	-----	141
제4장. 결론	-----	145
참고문헌	-----	147

제1장. 서 론

제1절. 개발기술의 필요성

1. 개발대상기술(또는 제품)의 개요

미생물을 이용한 응용기술이 다변화되고 첨단화되면서 유용 미생물을 자원화하고 이를 이용하려는 응용기술이 크게 발전하고 있다. 생물학적제어에 대한 연구는 과도한 화학합성 독성 농약 및 화학비료를 사용한 결과 내성병원균의 출현과 생태계 파괴와 농산물의 잔류독성에 의한 사회적 문제 및 지속적인 농업의 위기의식 등으로 구미 선진국을 중심으로 활발히 진행되었다. 지구환경파괴가 인류의 생존까지 위협함에 따라 국제적인 환경보호 논의가 활발하게 진행되었으며, 1993년 12월 우루과이 라운드 협상의 타결과 1995년 WTO가 출범하면서 WTO에 무역환경특별위원회를 설치하여 환경문제에 대한 논의를 계속하고 있다. 우리나라에서도 환경농업을 추진하고 있으며 환경농업육성법이 제정되어 1998년 11월부터 시행하게 된다.

고추 역병의 원인균은 *P. capsici* 로서 고추생산에 가장 큰 저해 요인이 되고 있으며, 토양 속에서 장기간 생존하여 연작장애의 주원인이 되고 있다. 1986년도 고추주산지의 실태조사 결과를 보면 고추역병이 발병 포장이 전체의 63%에 이르고 있고 그중 60% 이상의 피해를 당한 농가만도 33%에 달하고 있다. 지금까지 연구된 기존의 역병방제 방법은 유기합성 농약의 사용과 저항성 고추품종의 육성 보급에 관한 것이었으나, 약제내성으로 기존의 유기합성 농약을 사용해도 방제가 어려운 상황도 많이 관찰되고 있다.

최근에는 고추역병에 대한 길항균에 의한 생물학적 방제방법이 연구되고 있으나 실용화는 이루어지지 않고 있다. *Phytophthora capsici* 는 병원성이 매우 강하며 균핵을 형성하여 환경조건이 불리한 토양조건이나 작물의 debris 에 장기간 존재하고, 또한 약재내성으로 화학농약에 의한 효과적인 방제가 어려우며 성장속도도 빨라 한번 발병하면 화학농약으로 쉽게 제어 할 수 없는 상황에 이르게 된다. 이러한 *Phytophthora capsici*의 독특한 병리적 특성을 고려할 때 유용 항곰팡이 미생물을 이용한 생물학적제어 방법으로 토양에 존재하는 *Phytophthora capsici* 개체수를 제어하고 발병을 억제할 수 있는 조건으로 미생물 균상을 변화시켜줌으로써 예방적인 차원에서 *Phytophthora capsici* 에 의한 발병을 제어하는 것이 바람직하다 사료된다.

방선균은 토양에 광범위하게 존재하며 항곰팡이 대사물질을 생산하여 곰팡이 병원균들의 성장을 저해함으로써 식물체의 뿌리를 보호하고 식물체의 성장을 증진하는 근권 미생물로 양적으로나 질적으로 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 방선균을 생물학적제제의 미생물원제로 사용하고자 하는 연구는 1960-70 년대에 아주 기초적인 단계의 연구가 진행되기 시작하여 1980년대에 들어 본 연구자를 비롯한 일부 선두그룹의 연구자들에 의해 본격적으로 연구가 진행되었으며 실용화가 일부 진행되고 있다.

화학합성 농약과는 달리 살아있는 미생물을 이용하는 생물학적제어제는 미생물을 대량생산하고 생산한 미생물의 활성을 유지하고 최종사용자가 안전하게 사용할 수 있도록 효과적인 제제화 기술이 개발되어 생물학적제어제의 약효성분인 미생물의 활성을 장기간 유지하는데 고도의 기술이 요구되고 있다.

따라서 본 연구의 목적은 고추역병 곰팡이 병원균인 *Phytophthora capsici*에 제어활성을 갖는 신기능성 방선균을 개발하고 품질과 가격 경쟁력을 갖는 대량생산공정과 활성을 유지하는 제제화 기술 개발을 통하여 *Phytophthora capsici* 제어 항곰팡이 방선균제를 실용화하는데 있습니다.

2. 대상기술 개발의 중요성 및 국내·외 관련기술의 현황

미생물 자체를 이용하거나, 미생물이 생산하는 생리활성 물질에 대한 국내의 연구 및 개발은 외국에 비해 30-50년 뒤늦은 1980년대에 기초적 연구가 수행되어 왔으며 1985년부터 국가연구기관 및 대학의 병리학자를 주축으로 담배의 TMV, Bacterial wilt, 오이의 *Fusarium* wilt, 고추의 *Phytophthora* blight, 딸기의 *Fusarium* wilt, *Rhizoctonia* bud rot, 사탕무우의 Damping-off, 벼 도열병, 문고병 방제 등에 관한 연구가 보고됐으며 표1에 요약하여 나타내었다.

[표1]. 국내에서 미생물에 의한 각종 작물병해 방제연구

작 물	대 상 병	미생물의 종류	보고년도
Tobacco	TMV	Virulence virus	'85
	Bacterial wilt	Non pathogenic <i>P. solanacearum</i>	'85
Cucumber	<i>Fusarium</i> wilt	<i>Rhizoctonia</i> antagonists	'87
		<i>Pseudomonas gladioli</i>	'92
		Non pathogenic strain of <i>Fusarium oxysporum f. sp.</i> <i>cucumerinum</i>	'93
		<i>Gliocladium virens</i>	'95
		<i>Pseudomanas putida</i>	
Red pepper	<i>Phytophthora</i> blight	<i>Bacillus</i> sp.(AC-1)	'86
		<i>Pseudomanas cepacia</i>	'88
		<i>Trichoderma harzianum</i>	'89
		<i>Enterobacter agglomerans</i>	
		Non pathogenic strain of <i>Phytophthora capsici</i>	'92
Strawberry	<i>Fusarium</i> wilt	<i>Trichoderma</i> sp.	'88
		<i>T. harzianum</i>	'95
		<i>Pseudomonas gladioli</i>	'90
		<i>Rhizoctonia</i> bud rot	Antagonistic microorganisms
Sugar beet	Damping-off	<i>Pseudomonas</i> sp.	'88
Rice	Blast, sheath blight	<i>Pseudomonas</i> sp.	'90

미생물을 이용한 고추역병 제어 제에 대한 미생물제제 연구는 표2에 나타낸 것처럼 *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma* 등의 연구보고가 주류를 이루고 있다.

▶ 일부 농약회사에서도 미생물제제(농약)의 개발 필요성을 인지하고 미생물제제(농약)의 개발에 관심을 갖고는 있지만 그동안 화학농약회사로서의 인식 부족과 미생물제제(농약)개발 전문 인력이 전무한 상태에서 섭세하고 고도의 기술집약적 신기술을 요하는 환경친화적 미생물제제의 개발에 어려움을 안고 있는 상태이다.

▶ 환경문제가 전 세계적으로 심각하게 대두되면서 특정 항균성 미생물을 이용하여 토양 병원균을 제어하고자 하는 연구가 일부 선진연구그룹과 구미 Biotechnology 회사를 중심으로 은밀하고도 심도 있게 진행되고 있다. 각종 병원균에 길항미생물을 이용하는 연구로는 1927년 미국에서 감자 더듬이 병 방제에 방선균을 이용한 것이 미생물 자체를 이용한 병해방제 시초이다. 일본에서는 1962년에 담배허리 마름병 *Trichoderma* 생균제제를 시초로 많은 제품이 사용되고 있으나, 대부분의 실용화 제품은 묘 잘록병 방제용으로 개발되었다. 병해방제용 생물농약 중 가장 성공적 제품은 화학농약으로 방제가 안되는 다년생 목 본류의 뿌리에 발생되고 있는 뿌리혹 세균병 (Crown gall)에 길항미생물인 agrocin을 생산하는 *Agrobacterium radiacter* strain 84 및 K1026 균주를 이용한 Galltrol, Dygall, Nogall, Bakuterozu 등을 들 수 있다.

그 외에도 표2에 나타낸 미생물들이 생물농약의 원제로 사용되고 있듯이 보고되고 있다. 현재 수신품종의 생물농약이 등록되고 실용화가 이루어지고 있

으나 대부분의 연구가 *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma* 등에 집중되고 있다. 현재 상용화되고 있는 생물농약의 대부분은 *Bacillus thuringiensis*를 원제로 한 미생물살충제가 90% 이상을 차지하고 나머지가 미생물 살균제 및 기타에 속하는 실정으로 세계무역자유화 시대에 있어서 환경문제를 선진국의 실리를 지키는 전략으로 이용됨에 따라 환경친화적 생물학적제제 시장은 크게 성장될 것이 자명하다. 방선균에 대한 연구는 본사와 미국의 IBS사 핀란드의 Kimera 등에서 주력하여 연구를 수행하고 있다. 본사는 세계적인 기술우위 확보를 위해서 신기능성 방선균제 개발에 역점을 두고 있다. 신기능 미생물 제제의 실용화는 신기능 미생물 소재의 선발과 선발한 미생물원제를 대량생산하고 제제화하는 섬세하고 높은 수준의 기술을 요하며 대상 병원균에 활성이 우수한 미생물농약의 생산은 선진국 미생물농약 시장진출에 필수적이라 사료된다.

▶ 본사는 국내에서는 최초로 잔디병 방제 항곰팡이 방선균제제를 개발하고 국산신기술(KT mark)을 획득하였다. 본사는 새로운 신기술의 개발과 상용화에 필수적인 식물곰팡이 병원균의 예방에 관한 신기능 방선균 소재 선발과 제제화에 기본적인 기초기술을 보유하고 있으며 환경보존이라는 세계적인 대세에 생물학적제제에 관한 시장성장이 예상됨에 따라 본 기술의 개발과 실용화는 산업적으로나 학술적으로도 매우 가치가 크다고 사료된다.

▶ 미국을 비롯한 선진 외국의 경우 화학합성 독성농약 대체제로서의 차세대 환경친화적 미생물제제(농약)에 대한 연구가 매우 활발히 진행되고 있으며 대표적으로는 미국의 텍사스에 본사를 두고 있는 Gustafson사를 들 수 있는데 Gustafson사는 *Bacillus*를 원제로한 미생물제제를 개발하여 종자처리제로

전 세계적으로 판매하고 있는 회사이다. 고도의 기술력을 요하는 첨단 미생물제제의 개발은 짧은 기간 안에 개발할 수 있는 기술이 아니며 생물산업이 발달하지 못한 우리나라에서는 생물산업 특히 미생물농약 개발이 전무하다.

▶ 미생물농약의 개발은 식물학, 식물병리학, 미생물학, 생화학, 생물화학공학 등의 전문지식이 복합적으로 요구되고 실제 포장 활성 검증을 해야하는 등의 개발단계를 거쳐야하기 때문에 장시간의 개발기간이 요구된다. 본사는 이미 신규 방선균 첨단 미생물제제인 액티노그린을 개발하여 국산신기술을 획득하였다.

[표2]. 주요생물농약 후보 활성미생물 및 산업화 현황

후보 미생물	산업화 미생물	용 도	회 사 명
<i>Acremonium</i>			
<i>Actinoplanes</i>			
<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	과수뿌리혹병 방제	호주
<i>Alcaligenes</i>	K84		
<i>Arthrobacter</i>			
<i>Azotobacter</i>			
<i>Bacillus</i>			Gustafson, Inc.
<i>Burkholdria</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	종자처리제	미국
<i>Cellulomonas</i>			
<i>Enterobacter</i>			
<i>Flavobacterium</i>			
<i>Gliocladium</i>			
<i>Micromonospora</i>			
<i>Pseudomonas</i>			
<i>Serratia</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	화초 입고병 방제	Ecogen, Inc. 미국
<i>Streptomyces</i>			
<i>Trichoderma,</i> etc.	<i>Streptomyces</i> spp.	토양 곰팡이병 방제	Kimera, 핀란드

3. 기술개발의 효과

가. 기술개발에 따른 기대효과

세계적으로 독성농약의 사용이 제한되는 반면 생물학적제제(미생물제제

/농약) 사용은 증가 추세에 있다. 본 연구는 WTO체제에서의 자유경쟁무역 및 Green Round에 적절히 대처할 수 있는 환경친화적 고부가가치 첨단 미생물제제의 국내 실용화 정착에 의한 환경보호와 세계시장 수출을 겨냥하고 있다. 미생물농약은 독성 화학농약으로 인한 피해와 민원을 근본적으로 해결할 수 있는 첨단 생물공학기술을 이용하는 기술집약적인 고부가가치의 제품으로 화학농약원제를 수입하는 국내의 경우 수입대체 효과가 매우 크고(96년도 살균제 원제 수입 만도 1024억원) 수출시장 진출이 용이하여 생태계보존 및 국가 경제에 미치는 파급효과가 매우 크다고 사료된다. 원제를 수입하는 화학농약과는 달리 국내 기술연구결과 개발된 미생물을 생산하게 되면 외부환경 변화에 따른 생산원가상승에 유연성을 크게 확보하게 되어 가격과 품질경쟁력이 크게 제고될 것으로 사료된다. 이처럼 상용화에 초점을 둔 기술개발로 공정을 합리화하고 단순화함으로써 경쟁력 있는 고부가가치 생물학적제제를 개발하는 것이 중요하다고 사료된다. 특히 본 연구는 미생물농약의 실용화에 크게 기여 할 뿐만 아니라 WTO 자유 경쟁시대에 세계 경쟁력을 확보함으로써 수출시장 개척에 매우 유리한 고지를 확보함으로써 매년 크게 성장되고 있는 선진국의 생물농약 시장 선점에 독보적인 경쟁력을 확보하게 될 것이다.

1). 수입대체효과

- ▶ 화학농약 원제를 수입대체 효과가 매우 크고 (96년도 살균제 원제 수입 만도 1024억원) 독자적인 수출 시장 확보와 생태계보존 및 국가경제에 미치는 파급효과가 크다.
- ▶ 향후 선진국의 미생물농약제품이 국내시장에 진출하게 되면 수천억의 내수 시장 잠식이 예상됨에 따라 국내시장의 보호 효과가 크다.

2). 수출효과

▶ 본 연구는 WTO 자유 경쟁시대에 세계 경쟁력을 확보함으로써 수출시장 개척에 매우 유리한 고지를 확보함으로써 매년 크게 성장되고 있는 선진국의 생물농약 시장 선점이 가능하다.

3). 기타효과

- ▶ 미생물신소재의 자원화
- ▶ 생물농약 실용화로 환경친화형 생물농약의 조기정착.
- ▶ 화학합성농약에 의한 생태계의 파괴방지.
- ▶ 첨단 생물농약 개발에 기여
- ▶ 무공해 생물농약 개발로 국민건강 증진과 삶의 질 개선
- ▶ 선도기술의 자체개발로 기술 도입비 절약 및 무역수지 개선

4). 무역수지 개선 효과

- ▶ 1996년도 살균제 원제의 수입만해도 US\$72,994,000에 달하여 10%의 원제수입만 대체하여도 100억원의 외화절약효과, 장기적으로는 수백억원의 외화절약이 기대된다.
- ▶ 수입되는 완제품과 합성원료를 합치면 더 많은 외화절약이 기대된다.
- ▶ 독성 화학농약에 의한 환경파괴와 생태계 파괴로 감수하는 경제적 손실을 고려한다면 커다란 경제적 이득 창출효과가 있다.
- ▶ 본 연구과제 기술은 선진국의 미생물농약 시장을 성공적으로 진입하는 교두보를 확보하는 것과 같은 것으로 수출주력 첨단 기술제품으로 외화획득 효과가 매우 크다.

4. 시장현황

가. 시장규모

미국을 비롯한 선진국에서는 독성 농약의 위험성을 간파하고 30년 전부터 독성농약을 대체할 수 있는 생물농약 개발을 심도 있게 연구해 왔으며 1996년 현재 수십 종의 생물농약이 등록되고 실용화가 빠른 속도로 진행되고 있으나 대부분이 *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma* 등에 집중되고 있으며 방선균에 대한 연구는 본사와 일부 외국 회사에서 활발히 진행되고 있다.

국내농약 시장은 약7,000억원 규모이고 2000년대 전 세계 농약시장의 규모가 약30조원이 이를 것으로 예측되고 있다. 생물학적 제제 시장은 지난 10 여 년간 연평균 10 - 20%의 높은 성장을 기록하였으며 2000년대 초까지 국내의 생물학적 제제 시장도 1000-2000억원에 도달할 것으로 예측된다.

삶의 질적 향상에 대한 욕구가 크게 증가함에 따라 농산물의 잔류 독성과 환경오염의 피해를 심각하게 인지하면서 무공해 농산물에 대한 구매력이 상승되고 있다.

농산물 수출입이 개방됨에 따라 자국의 농산물 시장 보호를 목적으로 농산물의 잔류량 검사와 독성농약 검사가 강화됨에 따라 미생물농약 개발로 잔류독성문제로 인한 수출 농산물의 반송문제소지를 미연에 방지하고 국내 농산물시장을 안정적으로 확보 하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

5. 활용방안 및 사업화 계획

▶ 소득증대로 건강과 환경보호에 대한 관심이 고조됨에 따라 농약사용 작물을 기피하는 현상이 늘어나고 무공해 작물에 대한 선호도가 크게 증가하였다. 따라서 환경 친화적이고 무공해 미생물농약의 독자적인 시장을 구축하게 되었다. 신기술 생물산업 제품인 미생물농약은 전세계시장을 겨냥하여 수출을 할 수 있는 환경 친화적 첨단 제품이다. 미생물농약은 기술집약적 제품으로 품질관리와 기술관리가 매우 중요한 분야로 제품의 판매와 사후 지도가 중요하다. 미생물농약은 환경 친화적이므로 독성농약 사용규제로 인한 화학농약 사용규제 문제해결, 인건비절약, 작물의 품질향상, 농약으로 인한 피해와 민원해소, 무공해 작물생산으로 우수 고객 확보, 시설 재배자의 이미지 재고 등의 장점을 부각시켜 소비자가 구매력을 갖도록 유도한다.

▶ 최근에는 환경부, 농림부, 지방자치단체 및 민원인들의 독성농약에 대한 토양 및 수질 오염과 생태계파괴에 대한 우려와 자각이 증가함에 따라 환경부나 농림부에서는 독성농약 대신 미생물제제나 미생물농약 그리고 유기질비료의 사용을 적극 권장하고 있는 추세이다. 유기농가 측에 미생물제제를 이용하도록 유기농가의 고객을 효율적으로 확보한다. 수도권 시설 재배자와 유기농, 자연농단체, 정농회, 작목반 및 농협을 대상으로 충분한 시장이 형성되어 있으며 이들 조직을 통해 판매망을 구축한다.

▶ 개발된 미생물농약 수출시장 개척을 위하여 미국, 일본, 캐나다 등을 중심으로 기술제휴를 통한 협력업체나 기술이전을 통한 지역분할방식의 단독이나 공동 시장진출로 수출시장을 확보한다.

▶ 청정 고추재배에서 직면하는 농약 잔류량과 토양 및 수질 환경오염으로 인한 환경부나 지방자치단체의 규제나 민원을 과학적이고 근본적으로 해결할 수 있도록 사후관리 함으로써 농가의 부가가치를 제고 시켜준다.

제2장. 기술개발의 목표 및 내용

제1절. 기술개발의 최종 목표

1. 기술개발 목표

첨단 미생물제제 개발은 단순히 활성이 우수한 미생물의 선발에만 그치지 않으며 미생물을 대량생산 했을 때도 고효성을 유지하도록 하는 기술과 미생물의 활성을 안정화하는 고도의 제제화 기술이 요구된다. 독성 화학농약에 의한 수질 및 토양 오염과 생태계 및 환경파괴 등의 문제를 해결하기 위한 생물학적제제의 많은 노력과 연구가 최종 실용화 단계에서 상당한 어려움을 지니고 있음은 주지의 사실이다. 따라서 생물학적제제 실용화를 위해 *Phytophthora capsici* 제어 신기능 방선균을 선발하고 대량생산 생물발효공정과 안정화 전달매체 기술의 개발로 약효를 지속적으로 유지될 수 있도록 생물학적제제를 개발함으로써 WTO 체제에서의 자유경쟁무역 및 Green Round에 적절히 대처할 수 있는 환경친화적 고부가가치 첨단 미생물제제를 실용화하고자 합니다. 본 연구는 무공해 생물농약의 국내 실용화함에 최종 목표가 있습니다.

2. 평가방법 및 평가항목

1차년도 : *Phytophthora capsici* 제어 방선균 IBT 1245 제제화 및 포장활성

검증

- ▶ *Phytophthora capsici* 제어 방선균 IBT 1245의 발효 생산
- ▶ *Phytophthora capsici* 제어 방선균 IBT 1245가 생산하는 활성 대사산물 발효 생산
 - ▶ 방선균 IBT 1245 균체를 이용한 제형의 활성 검증
 - ▶ 방선균 IBT 1245 대사산물 함유제형의 활성 검증
 - ▶ IBT 1245를 이용한 *Phytophthora capsici* 전파속도 제어 방안 모색
 - ▶ 방선균 IBT 1245 균체 제형의 포장 활성 검증을 통한 사용 조건 최적화
 - ▶ 방선균 IBT 1245 대사산물 함유 제형의 포장 활성 검증 및 사용 조건의 최적화

2차년도 : 대량생산 생물발효배지 및 생물발효공정의 최적화를 통한

방선균 IBT 1245 미생물제제의 실용화 구축

- ▶ 실용화를 위한 대량생산 생물발효배지 개발 (1500L 발효)
- ▶ 방선균 IBT1245 대량발효조건의 최적화 (1500L 발효)
- ▶ 방선균 IBT1245 발효공정의 최적화 (1500L 발효)
- ▶ 활성검증 (*Phytophthora capsici* 제어 능력)
- ▶ 포장검증 (*Phytophthora capsici* 제어 능력)

3차년도 : *Phytophthora capsici*제어 방선균 IBT 1245 미생물제제 등록

- ▶ 고체배양을 이용한 고체상 미생물제제의 개발
- ▶ 포장 검증 (*Phytophthora capsici* 제어 능력)

- ▶ 액상 및 고체상 미생물제제의 시작품 제작
- ▶ *Phytophthora capsici* 제어 신기능 방선균 미생물제제 등록

제2절. 연도별 주요개발 내용

구분	연구목표	주요개발내용 및 범위
1차년도 (1998.10 - 1999. 9)	<i>P. capsici</i> 제어 방선균 IBT 1245 제화 및 포장 활성 검증	<ul style="list-style-type: none"> ▶ <i>P. capsici</i> 제어 방선균 IBT 1245의 발효 생산 ▶ <i>P. capsici</i> 제어 방선균 IBT 1245가 생산하는 활성 대사산물 발효 생산 ▶ 방선균 IBT 1245 균체를 이용한 제형의 활성 검증 ▶ 방선균 IBT 1245 대사산물 함유제형의 활성 검증 ▶ IBT 1245를 이용한 <i>P. capsici</i> 전파속도 제어 방안모색 ▶ 방선균 IBT 1245 균체 제형의 포장 활성 검증을 통한 사용조건의 최적화 ▶ 방선균 IBT 1245 대사산물 함유 제형의 포장 활성 검증 및 사용조건의 최적화
2차년도 (1999.10 - 2000. 9)	대량생산 생물 발효배지 및 생물발효공정의 최적화를 통한 방선균 IBT 1245 미생물제제의 실용화 구축	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 실용화를 위한 대량생산 생물발효배지 개발 ▶ 방선균 IBT 1245 대량발효조건의 최적화 ▶ 방선균 IBT 1245 발효공정의 최적화 ▶ 활성검증 (<i>Phytophthora capsici</i> 제어 능력) ▶ 포장검증 (<i>Phytophthora capsici</i> 제어 능력)
3차년도 (2000. 10 - 2001. 9)	고체배양 기술의 개발과 시작품의 제작 및 활성검증, 미생물제제의 등록	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 고체배양을 이용한 고체상 미생물제제의 개발 ▶ 포장 검증 (<i>Phytophthora capsici</i> 제어 능력) ▶ 액상 및 고체상 미생물제제의 시작품 제작 ▶ <i>Phytophthora capsici</i> 제어 신기능 방선균 미생물제제 등록

제3절. 1차년도 개발내용 및 개발범위

1. 당해연도 개발목표

- ▶ *Phytophthora capsici* 제어 방선균 IBT 1245 제제화 및 포장 활성 검증

2. 당해연도 개발내용 및 범위

- ▶ *Phytophthora capsici* 제어 방선균의 IBT 1245의 발효 생산
IBT 1245의 소량 Flask 배양과 Pilot plant 150L 배양으로
IBT 1245 균체생산
- ▶ *Phytophthora capsici* 제어 방선균의 IBT 1245가 생산하는 활성 대사산물 발효 생산
IBT 1245가 생산하는 활성대사산물의 활성검증을 통한 제제화 연구
- ▶ 방선균 IBT 1245 균체를 이용한 제형 및 대사산물 함유제형의 활성 검증
IBT 1245 균체를 이용한 제형과 대사산물 함유제형의 활성검증을 통하여 *Phytophthora capsici* 제어 활성 검증
- ▶ IBT 1245를 이용한 *Phytophthora capsici*전파속도 제어방안

모색

IBT 1245를 이용하여 *Phytophthora capsici*의 발병 전파속도를 제어할 수 있는 효과적인 처리방법 연구

- ▶ 방선균 IBT 1245 균체 제형의 포장 활성 검증을 통한 사용 방법의 최적화
포장활성검증을 통해 *Phytophthora capsici* 제어 효과가 우수한 최적 제형을 선발하고 효과적인 사용 방법 결정

- ▶ 방선균 IBT 1245 대사산물 함유 제형의 포장 활성 검증 및 사용 방법의 최적화
포장활성검증을 통해 *Phytophthora capsici* 제어 효과가 우수한 IBT 1245 대사산물 함유 최적 제형을 선발하고 효과적인 사용 방법 결정

3. 당해연도 개발기술의 평가방법 및 평가항목

- ▶ *Phytophthora capsici* 제어 방선균 IBT 1245의 포장 활성 검증 (*in vivo/in vitro*)
→ 방선균 IBT 1245를 이용한 고추역병 예방의 경제성

- ▶ 활성 검증
→ *Phytophthora capsici* 제어 활성 정도

- ▶ 미생물제제의 제형에 따른 *Phytophthora capsici* 제어 효과
 - 방선균 IBT 1245 균체 제형과 대사산물 함유 제형의 *Phytophthora capsici* 제어 효과

제4절. 선행연구결과

고추역병을 유발하는 *Phytophthora capsici*는 토양유래 foliar disease로 고추줄기, 잎, 과육 등에 발병하여 고추생산량에 치명적인 손실을 가져오는 병이다. 고추역병을 효과적으로 방제하기 위해서는 병원균인 *Phytophthora capsici*의 효과적인 제어가 필수적이며 이는 고추재배의 경우 육묘하여 정식을 하게 되는 특성을 고려하고 고온다습한 우기에 발병한다는 것을 감안하면 육묘 초기부터 예방차원에서 *Phytophthora capsici*의 조기제어 미생물제제의 사용이 매우 효과적이라 사료된다.

고추역병 제어를 위한 연구를 수행하여 방선균 IBT 1245를 이용한 *Phytophthora capsici* 제어 활성을 검증하고 노지재배실험을 결과를 근거로 방선균을 이용하여 효과적으로 *Phytophthora capsici* 제어할 수 있음을 인지하고 아래 표1에 그 결과를 간단히 기술하였다.

1. 고추 재배를 통한 방선균 IBT 1245의 고추역병 제어 활성 분석

고추 식물을 대상으로 포트 씨들링 분석을 통하여 방선균 IBT 1245의 고추역병 제어 활성을 측정하였다. 멸균수에 2일간 침지하여 두었던 고추 종자를 방선균 IBT 1245 배양액에 18시간 동안 침지 처리하였다 (실험군). 종자 처리 직전, 방선균 IBT 1245의 세포수를 각각 1.2×10^7 cfu/ml 로 조정하였다. 비처리 대조군으로는 2일간 멸균수에 침지시킨 고추 종자를 18시간 새로운 멸균수에 침지시킨 것을 이용하였다. Potato dextrose broth 에서 14

- 21 일간 배양 (25℃)된 *P. capsici*를 회수하여, 비처리 대조군의 발병률이 약 80% 이상이 되도록 멸균된 상토에 혼합하여 이병토양을 만든 후, 상기 실험군과 대조군의 고추 종자를 파종하여 본 발명의 미생물제제의 고추 역병 제어 활성을 측정하였다.

파종 포트로는 지름이 9cm 의 일회용 종이컵을 이용하였고, 포트당 3개의 종자를 파종하였으며 처리군 별로 14개씩의 파종 포트를 준비하였다. 파종한 포트를 랜덤블록배열 방식으로 유리온실에 배열하고 습도를 80%로 유지하였으며 필요에 따라 주기적으로 물을 공급하였다. 또한 온도는 25℃ - 32℃를 유지시켰으며, 빛은 자연광을 이용하였다. 종자의 발아와 고추역병의 발병을 관찰 기록하여 표3에 나타내었다.

[표3]. 방선균 IBT 1245 에 의한 고추 역병 제어 활성역가 검정

처 리 구 분	파종한 고추종자수	발아한 고추종자수 (발아율 : %)	역병 발생 종묘수 (발아율 : %)
		14일	14일
무병원균 + 비처리 대조군	42	37(88a ^x)	0(0c ^x)
<i>P. capsici</i> + 비처리 대조군	42	34(81a)	28(82a)
<i>P. capsici</i> + 방선균 IBT 1245 처리군	42	34(81a)	12(35b)

^x동일 칼럼의 비처리 대조군과 처리실험군의 결과치를 비교할 때 통계적으로 p=0.05 범위에서 차이가 나는 경우 서로 다른 알파벳으로 (a,b,c) 나타냄.

표3에 나타난 바와 같이, 방선균 IBT 1245로 처리한 고추 종자의 경우 *P. capsici* 에 의한 고추 역병의 발병이 크게 억제되었으며 통계적으로 유의성을 나타내어 역병균인 *P. capsici* 의 활성을 억제하는데 매우 효과적이었다.

2. 고추 재배를 통한 미생물제제의 활성 분석

고추 식물을 대상으로 노지 포장시험을 실시하여 미생물제제의 활성을 측정하였다. 고추 종자 처리 직전의 방선균 IBT 1245의 세포수는 1.2×10^7 cfu/g이었다. 파종 전 종자를 물에 침지하여 적신 후 상기 방선균제제를 처리하였다. 비처리 대조군으로는 종자를 물로만 적시고 상기 방선균제제를 처리하지 않은 것을 이용하였다. 이들 처리 및 비처리 종자를 묘포에 파종하여 물을 주기적으로 공급하고 25-30℃로 유지하였다. 고추 묘가 1.5- 2.0cm 크기로 자랐을 때 25개의 씨들링 포트 (5cmx5 cm, 깊이 6cm) 당 방선균제제 2.5g (즉, 포트 1개당 방선균제제 0.1g)을 모래-흙으로 된 배합토양에 혼합하여 포트마다 채워넣은 다음 고추 묘를 모판에 이식하였다. 비처리 대조군의 경우에는 방선균제제를 첨가하지 않은 배합토양을 사용하였다. 필요에 따라 물을 추가로 공급하면서 15℃ - 35℃의 그린하우스에서 재배하였다. 이때에도 마찬가지로 포트를 랜덤블락배열 방식으로 배열하였다. 처리 및 비처리 대조군의 고추 묘를 그린하우스에서 10주간 재배한 후 노지에 이식하였다.

식물의 성장, 크기, 수확량 및 질병발생은 이식 후 70일과 106일 재배 후 평균값과 발병율(%)을 각각 관찰하여 기록하였다. 그 결과를 처리군과 비처리 대조군 모두 600주에 대한 평균값으로서 표4에 나타내었다.

[표4]. 방선균 IBT 1245 에 의한 고추 역병 제어 활성역가 검정

처 리 구 분	발병율 (%)x	식물의 크기 (cm/plant)		고추 수확량 (kg)
	70 일	106 일	70 일	106 일
무처리 대조군	4.1	17.9	61.5	86.7
방선균 IBT 1245 처리군	1.4a	0.6a	68.8a	98.5a

^a대조군과 비교할 때 처리군의 값이 p=0.05 범위에서 크게 다른 경우

^x곰팡이 병원균 감염에 의한 뿌리 질병으로 지상부 식물의 질병 징후가 현저히 나타난 식물의 퍼센트(%)

표4에 나타나 있는 바와 같이, 방선균 IBT 1245가 처리된 경우에는 발병율이 매우 낮고, 매우 왕성하게 자랐고 고추 수확량도 현저히 증가하였다 (21.87%). 이는 방선균 IBT 1245가 실제 노지포장시험에서도 곰팡이 병원균 제어와 성장촉진 및 수확증진에 매우 효과적임을 나타내는 것이다.

선발된 IBT 1245(*Streptomyces* sp.)로 처리한 구의 고추와 무처리구의 고추 묘를 재배하면서 생장을 비교 하였을 때 무처리구의 고추생장은 토양 유해균에 의해 성장장애를 심하게 받은 반면에 처리구의 고추 묘는 생장이 왕성하고 정상적인 고추생산을 함을 보여주어 새로운 고추 역병 제어 미생물농약으로 개발될 수 있음을 보여주었다.

제5절. 2차년도 개발내용 및 개발범위

1. 당해연도 개발목표

- ▶ 대량생산 생물발효배지 및 생물발효공정의 최적화를 통한 방선균 IBT 1245 미생물제제의 실용화 구축

2. 당해연도 개발내용 및 범위

- ▶ 실용화를 위한 대량생산 생물발효배지의 개발 (1500L 발효)
선발된 *Phytophthora capsici* 항균성 방선균의 특성에 맞는 생물발효배지 개발
- ▶ 방선균 IBT 1245 대량발효조건의 최적화 (1500L 발효)
온도, pH, 산소분압, 교반 속도등에 의한 역가 검증, 수율 증대, 배지조성에 의한 단가등을 통하여 대량생산 발효공정의 단순화, 최적화, 가격 경쟁력을 확보
- ▶ 방선균 IBT 1245 발효공정의 최적화 (1500L 발효)
방선균 IBT 1245의 균체 회수 공정의 최적화 및 제어 효과 안정성을 향상 시킬 수 있는 최적 공정의 설계

- ▶ 활성검증 (*Phytophthora capsici* 제어 능력 : *in vivo/in vitro*)
배양배지 조성, 배양조건의 최적화를 통해 생산된 미생물제제의 가격경쟁력과 수율이 향상되었는가 검증

- ▶ 포장 검증 (*Phytophthora capsici* 제어 능력)

최적화된 배양배지 조성, 발효 공정에 의해 IBT 1245를 생산하여 포장에서의 *Phytophthora capsici* 제어 능력 검증

3. 당해연도 개발기술의 평가방법 및 평가항목

- ▶ 온도, pH, 산소분압, 교반 속도, 수율, 배지조성 등에 의한 단가, 활성을 평가하여 종합적으로 최저단가에서 활성을 극대화할 수 있는 배양조건 및 배양배지 조성을 확립한다.

제6절. 3차년도 개발내용 및 개발범위

1. 당해연도 개발목표

- ▶ 활성의 유지, 보존 기간의 연장을 위하여 고체배양기술의 개발과 시작품의 제작 및 활성검증, *Phytophthora capsici* 제어 방선균 제제의 등록.

2. 당해연도 개발내용 및 범위

- ▶ 미생물제제의 활성 보증 기간의 연장과 활성 유지를 위한 고체배양기술의 개발
IBT 1245의 활성을 장기간 연장하고 활성 저하를 방지할 수 있는 고체배양기술의 개발
- ▶ 시작품의 최종 포장 검증 (*Phytophthora capsici* 제어 능력)
- ▶ 최적화된 배양배지 및 대량발효를 통한액상 및 고체상 미생물제제의 시작품제작
- ▶ *Phytophthora capsici* 제어 방선균 IBT 1245 미생물제제 등록

3. 당해연도 개발기술의 평가방법 및 평가항목

- ▶ 미생물제제의 활성 보증 기간의 연장이 가능한 고체배양 기술 개발
- ▶ 고체배양 기술 개발을 통한 미생물제제의 안정성 및 저장성을 평가
- ▶ 시작품의 최종 활성 검증 (*Phytophthora capsici* 제어 능력)
- ▶ 등록에 필요한 활성 검증 포장 실험 실시

제7절. *Phytophthora capsici* 제어 항공팡이 방선균 제제의 재배 활성 검정 (*in vivo*) - 충북대학교

1. 기술개발의 목표 및 내용

가. 기술개발의 최종 목표

1). 기술개발 목표

주관 연구기관에서 선발, 실용적으로 개발한 고추 역병 제어 기능성 미생물제의 온실 및 포장효과를 검정하여 개발 미생물제제의 실용성 여부를 판단한다.

2). 평가방법 및 평가항목

환경조절실 내에서의 *in vitro* 실험을 통하여 고추 역병 제어력이 있는 방선균을 선발하며, 다음 단계로는 농가 포장에서의 적용시험을 통하여 실제 농업현장에서의 효과를 검정한다. 또한, 여러가지 제형의 미생물제제 중 보관성 등 현실적으로 가장 실용적인 것을 선발한다. 모든 평가는 포트 및 포장에서 자라고 있는 고추 모에 선발 미생물 또는 개발한 미생물제제를 접종하고 병 발생률을 조사하여 미생물 또는 미생물제제의 효과를 판정한다. 미생물제의 예방효과 검정에서는 미생물제제를 먼저 처리하고 역병균인 *Phytophthora capsici*를 접종하며, 치료효과 검정에서는 병원균을 먼저 접종하고 미생물제제를 처리한다. 미생물제의 효과는 농촌진흥청에서 확립하여 현재 합성농약의 효과 검정에 사용하는 방법(농약품목고시 평가 기준 및 방법)에 따라

서 이병주율을 조사하여 결정한다. 포트시험에서는 반드시 역병균을 인위적으로 접종하여 발병시키며, 포장시험에서는 역병의 자연 발병을 기대하지만, 이것이 여의치 않을 때는 역병균을 인공배양하여 접종한다. 예방효과는 지속성을 알아보기 위하여 미생물제제 처리 시기 및 회수에 몇 가지 변화를 주어 실시한다.

나. 연도별 주요 개발 내용

구 분	연구목표	주요 개발내용 및 범위
1차년도 (1998.10 - 1999. 9)	선발 방선 균의 온실 및 포장 효 과 검정	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 여러 지역의 역병균주들을 수집하여 병원성이 강한 균주들을 확보하고, 또한, 주관 연구기관이 확보한 균주들과 공유하여 실험에 사용. ▶ 주관 연구기관이 선발한 방선균들을 온실의 포트에 다양한 밀도로 접종하여 병억제 가능 최저 밀도 조사 ▶ 주관 연구기관이 선발한 방선균들을 온실의 포트 시험, 또는 일반 포장의 노지 시험에 적용하여 역병 발생률을 조사함으로써 역병 제어효과를 검정. ▶ 미생물 접종시 접종현탁액에 종류를 달리하는 몇가지 부제들을 첨가하여 미생물의 활동에 미치는 영향 조사
2차년도 (1999.10 - 2000. 9)	방선균 미 생물 제의 온실 및 포 장 효과 검 정	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 주관 연구기관에서 만든 미생물제를 온실 및 포장에 처리하고 역병 발생률을 조사하여 방제효과 검정 ▶ 미생물제를 시간적 차이를 두며 병원균보다 먼저 접종하여 미생물제의 예방 효과 및 미생물활력 지속기간 검정 ▶ 역병균 접종 또는 역병 발생 직후 다양한 횃수와 간격으로 미생물제를 처리하여 미생물제의 치료효과와 최적 처리 횃수 검정
3차년도 (2000.10 - 2001. 9)	최적 미생 물 제 형의 선발	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 대량 배양성, 접종력, 특히 상온에서의 저장성 등에 중점을 두어 주관 연구기관이 개발한 미생물제를 직접 포장에 적용하여 효과가 가장 좋은 제형의 미생물제를 선발, 농민들에게 바로 공급할 수 있도록 준비

다. 1차년도 개발내용 및 개발범위

1). 개발목표

주관 연구기관이 선발한 방선균의 온실 및 포장 효과 검정하여 사용 가능한 균주를 최종적으로 선발하고, 그에 따라 주관 연구기관이 다음 단계연구를 수행하는데 시행착오를 줄임

2). 개발내용 및 범위

실험실 내에서의 효과 검정을 통하여 선발된 방선균 균주들의 실제 농업환경에서의 제어효과 검정

- ▶ 역병균주 확보 : 역병에 걸린 고추를 수집하여 지역별로 병원성이 강한 균주들을 분리하고 확보, 이를 주관 연구기관의 확보균주들과 공유하며 실험에 사용.
- ▶ 최저 처리 밀도 조사 : 실내 실험에서 역병 제어력이 가장 좋았던 공시 방선균을 병든 고추에 다양하게 밀도 변이를 주며 접종하여 병이 억제되는 최저 밀도를 알아냄
- ▶ 공시균의 역병 제어효과 검정 : 주관 연구기관이 선발한 방선균 전체를 대상으로 온실에서 포트에, 또는 일반 농가포장의 노지에 처리하고 역병 발생률을 조사. 미생물은 장마가 시작되기전인 6월 초순 또는 중순경부터 10일 간격으로 토양에 관주 처리.

- ▶ 부제(첨가제)의 효과 조사 : 토양에 관주하기 위한 미생물 현탁액을 만들 때, 미생물의 영양원, 유무기물 등 종류를 달리하는 몇 가지 부제들을 첨가하여 미생물의 활동(역병 발생률)에 미치는 영향 조사

3). 개발기술의 평가방법 및 평가항목

실제에 적용할 균주가 제대로 선정되었는지를 확인하는 것은 선발된 방선균을 고추에 접종하여 병 발생상황을 대조구(방선균 무처리구)와 비교하여 보면 쉽게 판정할 수 있다.

라. 2차연도 개발내용 및 개발범위

1). 개발목표

선발한 방선균을 농업에 직접 이용할 수 있는 제형으로 만들었을 때, 그 제제의 온실 및 포장 제어효과를 검정하고 효과적인 처리법을 확립.

2). 개발내용 및 범위

미생물제제 효과를 온실 및 포장에서 검정, 최적 제형을 규명

- ▶ 미생물제제의 예방효과 검정 : 역병이 발생하기 전 부터 일정한 간격으로 미생물제제를 꾸준히 처리하였을 때, 처리 간격과 처리량의 변화가 병 발생에 어떤 영향을 미치는지 발병률 조사

- ▶ 미생물제제의 치료효과 검정 : 역병균 접종 또는 역병 발생 직후 다양한 횃수와 간격으로 미생물제제를 처리하고 병발생률을 조사하여 미생물제제의 치료효과와 최적 처리 횃수 검정
- ▶ 토양 내에서의 미생물 지속성 조사 : 간격과 횃수를 달리하는 각 처리 토양을 일정시간 경과후 처리 농도별로 각각 채취하여 흙 속의 미생물상, 특히 방선균의 밀도 조사

3). 개발기술의 평가방법 및 평가항목

검정 결과에 따라서 미생물제제를 고추에 접종하여 병 발생 상황을 대조구(무처리구)와 비교한다.

마. 3차년도 개발내용 및 개발범위

1). 개발목표

선발된 방선균의 대량배양 및 효과와 저장성 등 여러 면에서 가장 성능이 우수한 미생물제 제형의 선발하여 농민들에게 공급할 수 있는 시간을 최대한 단축한다.

2). 개발내용 및 범위

고품질의 제품을싼 값에 공급하기 위하여 선발한 방선균을 대량 배양 할 방법을 찾으며, 사용상의 편리를 위하여 가능한 한 오랫동안

저장할 수 있도록 저장성을 향상시키는 제형을 선발한다.

▶ 최적 제형의 선발 : 여러 가지 제형의 미생물제제들 중 배양 시간의 단축과 대량 배양성, 접종력, 특히 무엇보다도 상온에서의 저장성을 향상시킨 제형의 미생물제제를 선발한다.

3). 개발기술의 평가방법 및 평가항목

선발된 제형의 미생물제제 생산단가를 비교하며, 미생물제제를 일정 기간씩 상온에 보관한 뒤 고추에 접종하여 병 발생상황을 대조구(방선균 무처리구)와 비교, 효과 지속기간을 판단한다.

제8절. *Phytophthora capsici* 제어 항곰팡이 방선균 제제의 상용화를 위한 대량생산 기술 및 품질관리 기법의 개발 - 한국에너지기술연구원

1. 기술개발의 목표 및 내용

가. 기술개발의 최종 목표

1). 기술개발의 목표

주관 연구기관에서 선발되어 포장 효과를 검정을 통하여 효과가 탁월한 고추 역병 제어 방선균 제제의 상용화를 위한 대량발효 및 발효최적화와 품질관리 기법의 개발

2). 평가방법 및 평가항목

배양배지의 최적화와 배양조건의 최적화로 선발된 방선균의 역가가 기초실험과 동일하거나 향상되었는가를 검증한다.

나. 연도별 주요개발 내용

연도	연구 목표	연구 범위
1차년도 (1998. 10 - 1999. 9)	▶기능성 방선균의 유효성분 발현 극대화를 위한 배지 최적화	▶선발한 방선균의 생리적 특성조사, 배지성분이 유효활성성분 생산에 미치는 영향을 실험
2차년도 (1999. 10 - 2000. 9)	▶고생산성 고농도 배양을 위한 발효조건의 최적화 ▶고생산성 고농도 배양조건의 Scale-up 및 경제성 제고	▶발효기 용적 생산성 극대화 (유가식 배양 등)와 Scaled-up 발효를 시험하며 온도, pH, 산소분압의 영향을 검토하여 발효조건을 최적화 함. ▶유효성분의 용적 생산성 극대화를 위한 30L, 300L 발효 및 기질(저가) 최적화 실험(오염방지, 발효조건 등)과 조업 Pattern 결정
3차년도 (2000. 10 - 2001. 9)	▶제품 가공 기술개발 ▶제품 가공기술 확립 ▶제품 품질관리 기술 개발	▶제품의 계획생산을위한 균체관리, 장기보관 실험 ▶고체 제품 성상 확정 및 시제품 생산 ▶유효성분 정량실험 및 제품포장과 보관방법 확립 ▶유효기간 입증실험

다. 1차년도 개발내용 및 개발범위

1). 개발목표

선발된 방선균의 배지 및 배양조건 최적화를 위한 균주의 특성연구

2). 개발내용 및 범위

선발된 방선균의 생리적 특징, 발효 특징에 대한 기초연구

3). 개발기술의 평가방법 및 평가항목

배지조건과 배양환경에 따른 선발 방선균의 생리적 특성 조사와 생산성의 증대를 가질 수 있는 최적조건의 확립.

라. 2차년도 개발내용 및 개발범위

1). 개발목표

배양조건 및 배지 최적화를 기초로 20L, 300L의 대량발효 조건 및 공정 최적화 확립

2). 개발내용 및 범위

방선균 대량발효의 역가 향상을 위한 배지조건의 검색과 온도, pH, 산소분압의 영향성에 관한 최적화 확립

3). 개발기술의 평가방법 및 평가항목

- ▶ Scaled-up 후에 소량발효 역가와 비교하기 위하여 생산성 향상 요인 및 역가 검증
- ▶ 공정의 최적화 : 단가, 수율, 품질

마. 3차년도 개발내용 및 개발범위

1). 개발목표

미생물제제의 가공기술의 개발과 품질관리 기술의 확립

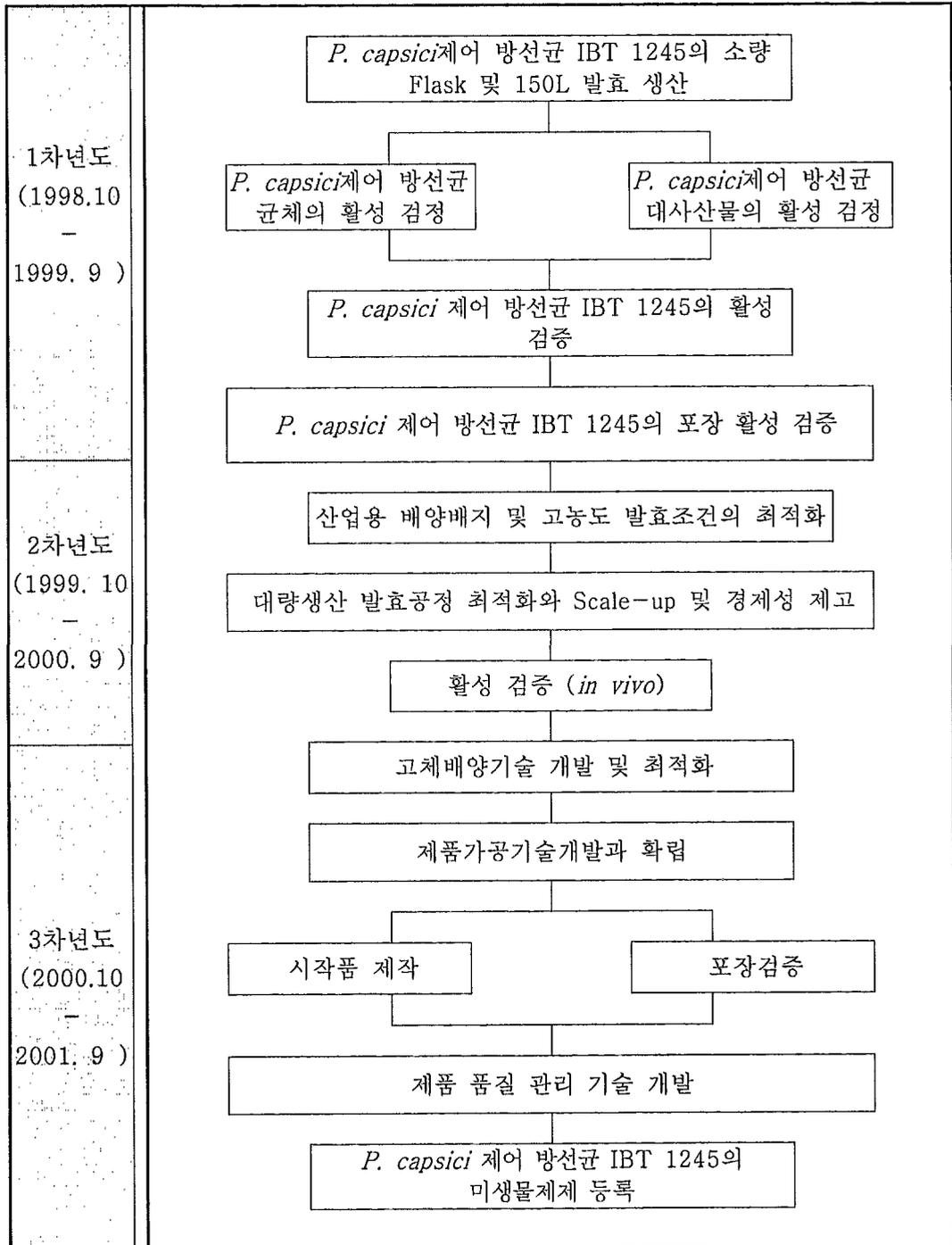
2). 개발내용 및 범위

미생물 균체와 배양액의 분리 공정, 장기보관 유지, 제품포장 및 보관방법의 검증

3). 개발기술의 평가방법 및 평가항목

각 공정에 따른 활성의 검증 : 활성의 유지

제9절. 기술 개발 추진 체계



제3장. 결 과

제1절. 1차 연도 기술개발 결과

1. 1차년도 연구개발목표와 내용 및 평가의 착안점

가. 연구개발 목표

세부과제명	연구개발 목표 및 내용
<p><i>Phytophthora capsici</i> 제어 방선균 IBT 1245 제제화 및 포장 활성화 검증 ((주)케이아이비씨)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ <i>Phytophthora capsici</i> 제어 방선균 IBT 1245의 발효 생산 ▶ <i>Phytophthora capsici</i> 제어 방선균 IBT 1245가 생산하는 활성대사산물 발효 생산 ▶ 방선균 IBT 1245 균체를 이용한 제형의 활성검증 ▶ 방선균 IBT 1245 대사산물 함유제형의 활성 검증 ▶ IBT 1245를 이용한 <i>Phytophthora capsici</i> 전파속도 제어방안 모색 ▶ 방선균 IBT 1245 균체 제형의 포장 활성화 검증을 통한 사용조건의 최적화 ▶ 방선균 IBT 1245 대사산물 함유 제형의 포장 활성화 검증 및 사용조건의 최적화

세부과제명	연구개발 목표 및 내용
<p>○ 선발 방선균의 온실 및 포장 효과 검증 (충북대학교)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 여러 지역의 역병균주들을 수집하여 병원성이 강한 균주들을 확보하고, 또한, 주관 연구기관이 확보한 균주들과 공유하여 실험에 사용. ▶ 주관 연구기관이 선발한 방선균들을 온실의 포트에 다양한 밀도로 접종하여 병억제 가능 최저 밀도 조사 ▶ 주관 연구기관이 선발한 방선균들을 온실의 포트 시험, 또는 일반 포장의 노지 시험에 적용하여 역병 발생률을 조사함으로써 역병 제어효과를 검증. ▶ 미생물 접종시 접종현탁액에 종류를 달리하는 몇 가지 부제들을 첨가하여 미생물의 활동에 미치는 영향 조사
<p>○ 기능성 방선균의 유효 성분 발현 극대화를 위한 배지최적화 (한국에너지기술연구원)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 선발한 방선균의 생리적 특성조사, 배지성분이 유효활성성분 생산에 미치는 영향을 실험

나. 연구평가의 착안점

- ▶ *Phytophthora capsici* 제어 방선균 IBT 1245의 포장 활성 검증(*in vivo/in vitro*)
→ 방선균 IBT 1245를 이용한 고추역병 예방의 경제성
- ▶ 활성 검증
→ *Phytophthora capsici* 제어 활성 정도
- ▶ 미생물제제의 제형에 따른 *Phytophthora capsici* 제어 효과
→ 방선균 IBT 1245 균체 제형과 대사산물 함유 제형의 *Phytophthora capsici* 제어 효과
- ▶ 선발 방선균의 온실 및 포장 효과 검정 (충북대학교)
- ▶ 기능성 방선균의 유효성분 발현 극대화를 위한 배지 최적화 (한국에너지기술연구원)

2. 연구개발 목표의 달성도

- ▶ 당해연도의 연구개발 목표는 *Phytophthora capsici* 제어 방선균 IBT 1245 제제화 및 포장 활성검증과 기능성 방선균의 유효성분 발현 극대화를 위한 배지 최적화로 이를 위해서 세부 연구를 수행하였다.

▶ 먼저 제제화와 포장 활성검증을 위해서 방선균 IBT 1245와 대사산물의 생산이 필요한데 이는 소량발효생산과 배양배지·발효공정 최적화를 연구를 통하여 포도당 20g/L, 질소원인 CSL 7g/L를 이용한 배지에서 세포수가 단위 mL당 108 이상과 항균활성을 달성하였다.

▶ 특히 IBT 1245를 이용한 *Phytophthora capsici* 전파속도 제어 방안 및 제형 모색의 일환으로 포장 재배실험을 통하여 발효생산한 *Phytophthora capsici* 제어 방선균 IBT 1245와 IBT 1245가 생산하는 활성 대사산물 함유 제형의 활성 검증 연구에서 방선균 IBT 1245 (대사산물함유) 제제를 처리하였을 때 무처리 대조군과 비교할 때 40-90%까지의 방제가를 갖는 역병 제어 효과와 20% 정도의 고추 증수 효과를 얻었다.

▶ 소량발효생산

Phytophthora capsici 제어 방선균 IBT 1245의 대량생산을 위한 일정한 종균의 생산을 위한 배양조건과 세포생장이 가능한 배양배지를 조성하였다.

▶ 배양배지·발효공정 최적화

Phytophthora capsici 제어 방선균 IBT 1245와 IBT 1245가 생산하는 활성 대사산물 발효 생산과 최적화를 통해 IBT 1245의 세포생산과 대사산물의 생산이 가능하도록 최적화하였다.

▶ 활성검증

방선균 IBT1245 균체를 이용한 제형과 IBT 1245 대사산물 함유제형의 활성 검증

IBT 1245를 이용한 *Phytophthora capsici* 전파속도 제어 방안을 역병 제어 활성 조사를 통해 조사하였다.

▶ 포장검증

방선균 IBT 1245 균체 제형과 대사산물 함유 제형의 포장 활성 검증을 통한 사용조건을 비교하였다.

▶ 고추 역병 균주의 분리 및 배양

역병균주들을 수집하여 병원성이 강한 균주들을 확보하고, 또한, 주관 연구기관이 확보한 균주들과 공유하여 실험에 사용하였다.

▶ 미생물의 최적 밀도 조사

주관 연구기관이 선발한 방선균 IBT 1245을 온실의 포트에 다양한 밀도로 접종하여 병 억제 가능 최저 밀도 조사를 진행하였다.

▶ 선발 미생물의 효과 검정

주관 연구기관이 선발한 방선균들을 온실의 포트 시험, 또는 일반 포장의 노지 시험에 적용하여 역병 발생률을 조사함으로써 역병 제어효과를 진행하였다.

▶ 부제의 영향 조사

미생물 접종 시 접종현탁액에 종류를 달리하는 몇 가지 부제들을 첨가하여 미생물의 활동에 미치는 영향을 조사하였다.

▶ 배양특성 및 배지최적화

선발한 방선균의 생리적 특성조사, 배지성분이 유효활성성분 생산에 미치는 영향을 실험하였다.

3. 연구수행 방법

▶ 본 과제는 *Phytophthora capsici* 제어 향곰팡이 방선균 제제의 개발과 상용화로 당해연도의 목표는 *Phytophthora capsici* 제어 방선균 IBT 1245 제제화 및 포장 활성검증에 주안점이 있다. 또한 기능성 방선균의 유효성분 발현 극대화를 위한 배지 최적화를 통해 역가를 극대화하는데 주력하였다. 따라서 주관연구기관은 IBT 1245 방선균 생산 및 대사산물을 생산하고 제제화를 통해 포장 재배실험을 실시하여 제제 활성을 검증하고 IBT 1245 생산을 위한 최적화로 실용화시 필요한 대량생산과 경제성을 확보하고자 하였다. 자세한 연구방법은 연구내용 및 결과에 기술하였다.

4. 연구수행 내용 및 결과

가. *Phytophthora capsici* 제어 방선균의 IBT 1245 제제화 및 포장활성 검증-
(주)케이아이비씨

▶ *Phytophthora capsici* 제어 방선균의 IBT 1245의 발효 생산

IBT 1245는 고추역병 병원균인 *Phytophthora capsici*에 대해 항균 활성이 우

수한 방선균으로 modified 벤넛한천배지에서 30℃에서 배양하고 보관하였다.

IBT 1245의 배양은 벤넛한천배지 상에서 자란 IBT 1245를 접종봉을 사용하여 액체배지에 접종한 후 진탕 배양하였다. 배양조건은 상기의 액체배지 50 ml이든 250ml baffled flask에 접종한 후 30℃의 진탕 배양기에서 200 rpm으로 교반하면서 24시간 배양하여 접종 종균으로 사용하였다.

IBT 1245의 균체 생산을 위한 소량 Flask 배양과 Pilot plant(150L) 배양배지의 조성은 포도당 20 g/L, CSP 3 g/L, peptone 3 g/L, KH₂PO₄ 1.2 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1.2 g/L, NaCl 1.2 g/L, CaCO₃ 5g/L와 미량원소액 1ml/L로 구성되었다. 미량원소의 조성은 MnCl₂ · 4H₂O 0.07 g과 ZnSO₄ · 7H₂O 0.01 g을 증류수 100 ml에 녹인 후 사용하였다.

균체 측정은 세포 배양액 1 ml를 4000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포를 회수하고 멸균증류수 1ml에 현탁한 후 세포수를 CFU(Colony forming unit)로 측정하였다. IBT 1245 세포수 측정은 연속희석방법으로 10⁻³ - 10⁻⁵까지 희석하고 TSA(Tryptic Soy Agar) plate에 도말한 후 30℃ 항온배양기에서 배양하여 세포수를 측정하였다.

△flask 배양과 150L 발효에서 IBT 1245는 상기 배양조건과 배양배지에서 107 CFU/ml의 세포생장을 나타내었으며 충북대학교 포장 활성 검증을 위한 고추묘의 재배를 위하여 미생물제제 형태로 공급하였다.

▶ *Phytophthora capsici*제어 방선균의 IBT 1245가 생산하는 활성대사산물

발효 생산

지시균 *Phytophthora capsici*에 대한 방선균 IBT 1245가 생산하는 대사산물의 항균활성은 PDA 배지상에서 수행하였다.

항균활성 측정은 PDA 배지에서 배양된 *Phytophthora capsici* 한천블락을 (5 mm) PDA plate 상에 놓고 4000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포를 제거한 상등액으로 항균활성 분석하였다. 항균활성은 *Phytophthora capsici*의 생장 저해준으로 측정하였다.

지시균 *Phytophthora capsici*는 PDA(Potato Dextrose Agar, Difco)배지에서 배양 보관하면서 IBT 1245의 항균활성분석에 사용하였다.

△flask 배양과 150L 발효에서 IBT 1245는 상기 배양조건과 배양배지에서 *Phytophthora capsici*에 우수한 항균활성을 나타내었으며 충북대학교 포장 활성 검증을 위한 고추묘의 재배를 위하여 제형으로 공급하였다.

▶ 방선균 IBT 1245 균체를 이용한 제형 및 대사산물 함유제형의 활성 검증
IBT 1245 균체를 이용한 제형과 대사산물 함유제형의 *Phytophthora capsici* 제어 활성 검증을 위하여 고추 묘에 IBT 1245 함유 액상제형과 대사산물 함유 멸균 처리한 액상제형을 처리하여 활성 재배실험을 실시하였다 (위탁연구기관).

▶ IBT 1245를 이용한 *Phytophthora capsici* 전파속도 제어 방안 모색
IBT 1245 함유제형과 대사산물 함유제형 처리를 통해 *Phytophthora capsici*

의 발병 전파속도를 제어하기 위한 활성 조사를 위한 풋트실험을 아래의 방법으로 수행하였다.

풋트 씨들링 분석을 위하여 방선균 IBT 1245 또는 대사산물의 처리는 각기 멸균수에 2일간 침지하여 두었던 고추 종자를 방선균 IBT 1245 배양액 또는 대사산물함유 제형에 10시간 동안 침지 처리하였다 (실험군). 종자 처리 직전, 방선균 IBT 1245의 세포수를 각각 $1.0 \sim 2.4 \times 10^7$ cfu/ml 로 조정하였으며 대사산물 함유제형에는 생균을 제거하였다. 비처리 대조군으로는 2일간 멸균수에 침지시킨 고추 종자를 10시간 새로운 멸균수에 침지시킨 것을 이용하였으며 멸균 상토에서 본엽이 2-4잎의 유묘로 재배한 후 이병토양의 풋트에 이식하여 역병 발병율을 조사하였다. Potato dextrose broth 이용하여 28℃에서 21 일간 배양한 *P. capsici*를 회수하여, 비처리 대조군의 발병률이 약 80%가 되도록 멸균된 상토에 혼합하여 이병토양을 만든 후, 상기 실험군과 대조군의 고추 유묘를 이식하였다. 이식 직후 200배 희석한 풋트당 10mL의 각 제형을 관주처리 하였으며 이식 1주일 후 두 번째 처리를 하였다. 대조군에는 동일량의 멸균수를 관주 처리하였다.

파종 풋트로는 지름이 9cm 의 일회용 종이컵을 이용하였고, 풋트당 1개의 종자를 파종하였으며 처리군별로 10개씩의 파종 풋트를 3반복으로 준비하여 2회를 실시하였다. 파종한 풋트를 랜덤블록배열 방식으로 배열하고 주기적으로 물을 공급하였다. 온도는 25℃ - 32℃를 유지하였으며, 빛은 자연광을 이용하였다. 고추역병의 발병을 관찰 기록하여 표5에 나타내었다.

[표5]. 방선균 IBT 1245와 대사산물에 의한 고추역병 제어활성역가 검정

처 리 구 분	고추모종수	역병 발병율(%) (15일)		
		1차	2차	평균
무병원균 + 비처리 대조군	10주 x 3반복	0a ^x	0a ^x	0a ^x
<i>P. capsici</i> + 비처리 대조군	10주 x 3반복	70b	80b	75b
<i>P. capsici</i> + 대사산물 처리군	10주 x 3반복	50c	40c	45c
<i>P. capsici</i> + 방선균 IBT 1245 처리군	10주 x 3반복	20d	30d	25d

^x동일 칼럼의 비처리 대조군과 처리살균군의 결과치를 비교할 때 통계적으로 p=0.05 범위에서 차이가 나는 경우 서로 다른 알파벳으로 (a,b,c,d) 나타냄.

표5에 나타낸 바와 같이, 방선균 IBT 1245 또는 대사산물함유 제형으로 처리한 고추묘의 경우 *P. capsici* 에 의한 고추 역병의 발병이 크게 억제되었으며 통계적으로 유의성을 나타내었다. 특히 대사산물 함유 제형의 처리보다는 대사산물을 함유하는 생균제의 처리 시에 고추역병 제어활성이 우수하게 나타나 효과적인 역병 제어를 위해서는 대사산물이 함유된 생균제제를 사용하는 것이 효과적인 것으로 나타났다.

▶ 방선균 IBT 1245 균체 및 대사산물 함유 제형의 포장 활성 검증

IBT 1245 균체 및 대사산물 함유제형을 이용하여 역병 제어활성 확인을 위한 재배실험을 실시하였다.

상기에서 기술한 고추종자 처리방법으로 방선균 IBT 1245 (1.2×10^7 cfu/mL) 제형을 처리하여 재배한 고추 모종을 포트에서 7주 동안 키운 후 포장에 정식하여 고추역병 제어 활성을 조사하였다. 대조군으로는 IBT 1245가 함유되지 않은 멸균수를 이용하여 종자 처리하여 재배한 고추 모종을 이용하였다. IBT 1245 ($1.2 \sim 3.2 \times 10^7$ cfu/mL) 처리군은 1주 간격으로 3회에 걸쳐 200배 희석한 제제를 주당 20ml씩 흠뻑 관주처리 하였다.

정식은 5월 10일에 충북 괴산의 고추재배 일반농가 노지에 정식 후 30일 경과한 6월 10일부터 200배 희석한 IBT 1245 및 대사산물 함유 제제 (200평당 100L사용)를 10일 간격으로 시비 하였다. 식물의 역병 발생율(%), 식물체 크기 및 수확량 등을 정식 후 65일과 90일 재배 후 조사하여 기록하였으며 처리군과 대조군 모두 200주에 대한 평균값으로서 표6에 나타내었다.

[표6]. 방선균 IBT 1245에 의한 고추 역병 제어 활성 재배실험

처 리 구 분	발병율 (%)		식물의 크기 (cm/plant)		고추 수확량 (kg)
	65 일	100 일	65 일	90 일	90 일
대조군	3.5a ^x	15.9a ^x	56.1a ^x	82.3a ^x	89a ^x
방선균 IBT1245 처리군	1.1b	1.5b	63.8b	95.4b	107b

^x대조군과 비교할 때 처리군의 값이 p=0.05 범위에서 크게 다른 경우 서로 다른 알파벳 a, b로 나타냄.

표6과 같이 방선균 IBT 1245 및 대사산물 함유제형으로 처리한 경우에는 발병율이 매우 낮고, 매우 왕성하게 자랐고 고추 수확량도 현저히 증가하였으며 (20%) 포장에서도 역병제어활성이 우수하고 생장촉진 및 수확증진을 기대할 수 있을 것으로 나타났다.

나. *Phytophthora capsici* 제어 항곰팡이 방선균 제제의 재배활성 검정 (in vivo) - 충북대학교

1). 연구 목표

선발 방선균의 온실 및 포장 효과 검정: IBT 1245의 고추역병 제어 기능성 미생물제제의 온실 및 포장 효과 검정

2). 개발내용 및 범위

IBT 1245의 실제 농업환경에서의 제어효과 검정

▶ 역병균주 확보

확보하고 있는 역병균 균주들을 대상으로 고추 묘에 병원성 검정을 통하여 병원성이 강한 균주를 선발하여 계속 증식 보관.

균주의 병원성을 검정하는 방법은 본잎이 7-8장 나 있는 어린 고추 묘의 아랫부분 줄기에 불꽃 소독 칼로 가벼운 상처를 낸 뒤, 그 상처에 멸균한 솜을 붙이고 역병 곰팡이의 유주 포자낭 현탁액을 일정량씩 적셔 주었음. 발병 여부는 접종 부위 줄기의 변색, 변형 및 역병 발생 징후로 판단.

확보 균주의 병원성 상실을 막기 위해 균을 주기적으로 고추 묘에 접종하여 발병시킨 뒤 병원균을 재 분리하여 보관.

▶ 최적 처리 밀도 조사 : IBT 1245의 밀도 변이를 주며 처리하고 있으며 역병 제어 최적 밀도를 조사.

▶ 방선균의 효과 검정 - 포트 시험

어린 고추 모에 IBT 1245를 처리한 뒤 역병 발병 제어능 조사를 위하여 재배하고 있음. 환경조절실 안에서 49공 포트에 고추를 파종하고 받아시켜 재배한 것을 사용하고 있으며, 병원균 접종은 고추 모가 어리기 때문에 앞에서와 같은 줄기의 상처접종 대신에 포트 내의 뿌리에 상처를 주고 고추 역병균 유주포자낭 현탁액을 부여하는 방법을 사용함. 아울러 무상처 토양접종의 효과도 검정 중임. 각각에 대하여 방선균 IBT 1245를 역병균 접종 전과 후에 처리하여 예방효과와 치료효과를 수행.

▶ 방선균 IBT 1245의 효과 검정 - 포장 시험/역병 제어 효과 검정

주관 연구기관에서 공급한 방선균 IBT 1245 제제를 충북대학교 농장과 충북 괴산의 일반 농가 포장에서 자라고 있는 고추에 처리하여 농약시험기준법에 따라서 고추 역병 발병주수를 기준으로 역병 제어 활성을 조사.

고추 모는 충북대학교 첨단유리온실에서 키웠으며, 6엽기 정도에 이른 모를 5월 15일에 노지에 정식하여 농가의 관행대로 재배.

충북대 농장의 고추는 6월 1일부터 처리를 시작하여 7월 13일까지 1주 간격으로 7회 처리하고 7월 13일과 20일에 발병주수를 조사하였으며, 일반 농가 포장의 고추는 6월 9일에 처리를 시작하여 8월 5일까지 1주 간격으로 9회 처리하였고 8월 5일과 12일에 발병주수를 조사하였다. 각 처리당 3반복, 1반복

당 40주 이상씩을 정식.

노지에서의 처리는 미생물제제(생균제) 또는 멸균 미생물제제 200배 희석액을 식물체가 흠뻑 젖도록 처리(10 a 당 희석액 150 리터씩)하였다.

조사 결과, 미생물제제(생균제) 처리는 무처리구에서의 발병률에 비하여 80% 내외의 방제가를 보여 효과가 우수한 것으로 나타났다. 따라서, 균의 밀도 및 처리 시 희석배수 등을 조절한다면 실제로 농가에 보급할 수 있는 제품을 개발할 수 있을 것으로 사료된다. 발병률(발병주수/전체주수) 조사 결과는 아래 표7에 나타내었다.

[표7]. 방선균 IBT 1245 제제의 고추역병 제어 활성 재배실험 결과

지역	처리구분	역병 발병율 (%)							
		1 차 조 사				2 차 조 사			
	정식후	1반복	2반복	3반복	평 균	1반복	2반복	3반복	평 균
청주 충북 대포장	무처리	50.0	81.1	27.8	53.0a ^x	53.3	81.1	30.6	55.0a ^x
	생균제	11.8	10.0	5.7	9.2b	14.7	17.5	11.4	14.5b
	멸균액	19.4	31.6	29.4	26.8c	22.2	42.1	38.2	34.2c
괴산 일반 농가 포장	무처리	60.0	63.3	48.4	57.2a ^x	60.0	70.0	61.3	63.8a ^x
	생균제	22.6	13.3	5.7	13.9b	32.3	26.7	5.7	21.5b
	멸균액	31.3	24.3	27.0	27.5c	43.8	29.7	37.8	37.1c

^x무처리와 비교할 때 처리군의 값이 p=0.05 범위에서 크게 다른 경우 서로 다른 알파벳 a,b,c로 나타냄.

▶ 부재의 영향 조사

부재로 탄소원과 질소원을 첨가하였을 때 IBT 1245의 활성 변화를 조사하였으며 부제를 첨가하지 않은 상태보다 생균수의 증감을 조사하였으며 아래

표8에 나타낸 것처럼 부재의 사용 시 생균수의 안정을 가짐을 보여주었다.

[표8]. 부재의 사용시 생균수의 안정화 효과

구 분	초기 세포수 (cfu/ml)	최종 세포수 (cfu/ml)
대조군	1.2×10^6	1.2×10^6
탄소원(0.2%)+질소원(0.1%)	1.2×10^6	3.2×10^6
탄소원(0.4%)+질소원(0.2%)	1.2×10^6	6.1×10^6
탄소원(0.6%)+질소원(0.3%)	1.2×10^6	1.6×10^7

다. *Phytophthora capsici* 제어 항공팡이 방선균 제제의 상용화를 위한
대량생산 기술 및 품질관리 기법의 개발 - 한국에너지기술연구원

1). 개발목표

방선균 IBT 1245의 배지 및 배양조건 최적화를 위한 균주 특성연구

2). 개발내용 및 범위

IBT 1245의 생리적 특징, 발효 특징에 대한 기초연구

3). 배지조성의 최적화 배양조건

▶ 본 배양조건은 500ml baffled flask에 working volume을 100 ml로 하여 배양하였으며 30℃ 진탕배양기에서 200 rpm으로 교반하면서 배양하였다.

①. 탄소원의 선별 및 농도결정

▶ 탄소원은 포도당, 전분, Hydrol, 밀기울, 당밀등을 사용하여 탄소원의 선별 및 농도를 결정하는 실험을 수행하였으며 IBT 1245의 성장과 항균활성의 미치는 영향을 조사하여 표9에 나타내었다. 본 실험에 사용한 탄소원을 제외한 기타의 성분은 주관연구기관에서 개발한 배지 조성을 사용하였다.

[표9]. 탄소원에 따른 세포생장 및 항곰팡이 활성에 미치는 영향조사

탄소원 (10g/L)	세포수 (cfu/ml)	항균활성 생장저해존 (mm)
포도당	1.9×10^7	14
Hydrol	1.1×10^7	14
전 분	2.2×10^6	10
밀기울	3.7×10^6	10
당 밀	7.2×10^5	8

▶ 탄소원 조사 실험에서 IBT 1245는 포도당, Hydrol을 탄소원으로 했을때와 전분, 밀기울, 당밀을 탄소원으로 했을때의 생장과 항균활성 조사에서 IBT 1245 는 포도당과 Hydrol을 탄소원으로 사용했을때는 10^7 cfu/ML를 나타낸 반면 전분, 밀기울, 당밀 등에서는 10^{5-6} cfu/ML로 생장이 낮았다. 항균활성 조사에서는 포도당과 Hydrol이 같은 정도의 항균활성을 나타낸 반면 전분, 밀기울, 당밀에서는 항균활성이 다소 감소함을 보여주었다.

▶ 세포수 및 항균활성을 높이기 위해서는 탄소원의 최적화가 중요하므로 세포생장과 항균활성에 저해 받지 않는 최적 탄소원의 선별 및 농도를 결정하는 연구를 수행하였으며 포도당을 10 g/L, 20 g/L, 40 g/L 농도에서 배양함으로써 세포수와 항균활성의 변화를 조사하였으며 실험결과는 표10에 나타내었다.

[표10]. 포도당 농도에 따른 세포생장과 항균활성에 미치는 영향

포도당 농도	세포수 (cfu/ml)	항균활성 성장저해존 (mm)
10 g/L	1.2×10^7	14
20 g/L	3.0×10^7	14
40 g/L	5.2×10^5	10

▶ 표10에 나타난 것처럼 IBT 1245는 포도당 농도가 10 g/L에서 보다 20 g/L에서 세포수가 증가하였으나 40 g/L에서는 감소함을 나타냄으로써 Substrate Inhibition을 받는 것으로 나타났다.

▶ IBT 1245의 대사산물 항균활성은 10 g/L 와 20 g/L에서 40 g/L에서보다 우수하였다.

② 질소원의 선별 및 농도결정

▶ 세포수 및 항균활성을 높이기 위한 적합한 질소원의 선별 및 농도를 결정하기 위한 실험을 수행하였다. 탄소원의 농도가 IBT 1245의 성장과 항균활성에 미치는 영향에 대한 조사에서 선발된 포도당 20 g/L에 여러 질소원의 영향 및 농도를 결정하는 실험을 수행하였다. 질소원으로 대두박 7 g/L, CSP 7 g/L, CSL 7 g/L 및 10 g/L를 사용하여 실험하였으며 그 결과를 표11에 나타내었다.

[표11]. 질소원에 따른 세포생장과 항균활성에 미치는 영향

질소원 (g/L)	세포수 (cfu/ml)	항균활성 성장저해존 (mm)
효모엑기스 7g/L	1.3×10^7	10
대두박 7g/L	1.0×10^8	11
CSP 7g/L	1.5×10^6	11
CSL 7g/L	4.0×10^8	12
CSL 10g/L	7.3×10^7	8

▶ 포도당을 탄소원으로 하고 서로 다른 질소원을 대상으로 IBT 1245의 생장과 항균활성 실험을 수행한 결과 IBT 1245의 생장과 항균활성에서 대두박과 CSL이 적합하였으며 CSL 7g/L에서 세포수 4.0×10^8 cfu/mL와 항균활성 12mm의 성장저해 활성을 나타내었다.

③. 탄소원/질소원 비율 최적화

▶ 포도당 농도 20 g/L에 질소원 CSL 3 g/L, 5 g/L, 7 g/L, 10 g/L, 15 g/L으로 하여 세포생장과 항균활성의 최대 C/N ratio의 농도를 결정하는 실험을 수행하였는데 결과는 표12에 나타내었다.

[표12]. 탄소 및 질소농도에 따른 세포생장과 항균활성에 미치는 영향

탄소원과 질소원 (g/L)	세포수 (CFU/ml)	항균활성 생장저해존(mm)
포도당 20 g/L + CSP 3 g/L	5×10^6	7
포도당 20 g/L + CSL 5 g/L	7×10^7	8
포도당 20 g/L + CSL 7 g/L	5×10^8	12
포도당 20 g/L + CSL 10 g/L	6×10^7	9
포도당 20 g/L + CSL 15 g/L	2.5×10^7	7

▶ IBT 1245는 표12에 나타낸 바와 같이 포도당 20 g/L에 질소원 CSL 7 g/L에서 최대 세포생장과 항균활성을 나타내었으며 CSL이 7g/L 이하나 이상에서는 세포생장이나 항균활성이 감소하였다.

제2절. 2차 연도 기술개발 결과

1. 연구개발목표와 내용 및 평가의 착안점

가. 연구개발 목표

세부과제명	연구개발 목표 및 내용
<p>○ 대량생산 생물발효 배지 및 생물발효공정의 최적화를 통한 방선균 IBT 1245 미생물제제의 실용화 구축 (주)케이아이비씨</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 실용화를 위한 대량생산 생물발효배지 개발 (1500L 발효) ▶ 방선균 IBT 1245 대량발효조건의 최적화 (1500L 발효) ▶ 방선균 IBT 1245 발효공정의 최적화 (1500L 발효) ▶ 활성검증 (<i>Phytophthora capsici</i> 제어 능력) ▶ 포장검증 (<i>Phytophthora capsici</i> 제어 능력)
<p>○ 방선균 미생물제의 온실 및 포장 효과 검정 (충북대학교)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 주관 연구기관에서 만든 미생물제를 온실 및 포장에 처리하고 역병 발생률을 조사하여 방제효과 검정 ▶ 미생물제를 시간적 차이를 두며 병원균보다 먼저 접종하여 미생물제의 예방 효과 및 미생물활력 지속기간 검정 ▶ 역병균 접종 또는 역병 발생 직후 다양한 횟수와 간격으로 미생물제를 처리하여 미생물제의 치료효과와 최적 처리 횟수 검정

세부과제명	연구개발 목표 및 내용
<p>○ 고생산성 고농도 배양을 위한 발효조건의 최적화</p> <p>○ 고생산성 고농도 배양조건의 Scale-up 및 경제성 제고 (한국에너지기술연구원)</p>	<p>▶ 발효기 용적 생산성 극대화 (유가식 배양 등)와 Scaled-up 발효를 시험하며 온도, pH, 산소분압의 영향을 검토하여 발효조건을 최적화 함.</p> <p>▶ 유효성분의 용적 생산성 극대화를 위한 30L, 300L 발효 및 기질(저가) 최적화 실험(오염방지, 발효조건 등)과 조업 Pattern 결정</p>

나. 연구평가의 착안점

▶ 온도, pH, 산소분압, 교반 속도, 수율, 배지조성 등에 의한 단가, 활성을 평가하여 종합적으로 최저단가에서 활성을 극대화 할 수 있는 배양조건 및 배양 배지 조성을 확립한다.

▶ 검정 결과에 따라 미생물제제를 고추에 접종하여 병 발생상황을 무처리구와 비교한다. (충북대학교)

▶ Scaled-up 후에 소량발효 역가와 비교하기 위하여 생산성 향상 요인 및 역가 검증, 공정의 최적화 : 단가, 수율, 품질 (한국에너지기술연구원)

2. 연구개발 목표의 달성도

▶ 당해연도의 연구개발 목표인 대량생산 생물발효배지 및 생물발효공정의 최적화(대량생산 발효조건, 및 경제성 제고)를 통한 방선균 IBT 1245 미생물제제의 실용화 구축을 위하여 세부연구를 수행하였다. 또한 대량생산 발효공정으로 생산한 방선균 미생물제제의 역병제어효과를 온실 및 포장 효과 검정을 수행하였다.

▶ 미생물제제의 실용화를 위해서는 미생물제제의 대량생산이 가능하고 경제성이 있어야 하며 2차년도 연구는 1차년도 연구에서 선정된 소량발효배양배지 및 배양조건 최적화 연구결과를 토대로 대량발효공정(300L, 1,500L)을 통해 미생물제제를 대량생산하는 연구를 수행하였다. 포도당과 CSL을 이용한 대량생산 발효에서 방선균 IBT 1245는 세포수가 단위 mL당 108 을 달성하였다.

▶ 대량발효공정으로 생산한 IBT 1245 미생물제제를 이용한 *Phytophthora capsici* 제어 온실 및 포장 재배실험에서 방선균 IBT 1245 미생물제제를 처리하였을 때 무처리 대조군과 비교할 때 약 40-70%까지의 방제가를 갖는 역병 제어효과를 얻었다.

3. 연구수행 방법 및 내용

가. 대량생산 생물발효배지 및 생물발효공정의 최적화를 통한 방선균 IBT 1245 미생물제제의 실용화 구축-(주)케이아이비씨

1). 당해연도 개발목표

▶ 대량생산 생물발효배지 및 생물발효공정의 최적화를 통한 방선균 IBT 1245 미생물제제의 실용화 구축

2). 당해연도 개발내용 및 범위

▶ 실용화를 위한 대량생산 생물발효배지의 개발 (1500L 발효)

선발된 *Phytophthora capsici* 항균성 방선균의 특성에 맞는 생물발효배지 개발

→ 1차년도에 소규모 액체배양 연구결과를 기초로 포도당, Hydrol을 탄소원으로 하고 Yeast extract, corn steep powder등을 질소원으로 하는 발효배지를 중심으로 IBT 1245의 대량생산에 적합한 생물발효배지 개발 진행.

IBT 1245는 *Phytophthora capsici*에 대해 항균 활성이 우수한 방선균으로 modified 벤넛한천배지를 이용하여 30℃에서 배양하고 보관하면서 대량발효의 종균으로 사용.

대량발효를 위한 IBT 1245의 배양은 벤넛한천배지 상에서 자란 IBT 1245를 접종봉을 사용하여 배양배지에 접종한 후 진탕배양하였으며, 배양조건은 배양

배지 100 ml이든 500 ml baffled flask에 접종한 후 30℃의 진탕배양기에서 200 rpm으로 교반하면서 24시간 배양하여 접종 종균으로 사용.

IBT 1245의 균체 생산을 위한 소규모 발효용 종균 배양배지의 조성은 포도당 20 g/L, CSP 3 g/L, peptone 3 g/L, KH₂PO₄ 1.2 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1.2 g/L, NaCl 1.2 g/L, CaCO₃ 5 g/L와 미량원소액 1ml/L로 구성되었다. 미량원소의 조성은 MnCl₂ · 4H₂O 0.07 g과 ZnSO₄ · 7H₂O 0.01 g 을 증류수 100 ml에 녹인 후 사용.

▶ 방선균 IBT 1245 대량발효조건의 최적화 (1500L 발효)

온도, pH, 산소분압, 교반 속도 등에 의한 역가 검증, 수율 증대, 배지조성에 의한 단가 등을 통하여 대량생산 발효공정의 단순화, 최적화, 가격 경쟁력 확보

→ 최적의 대량생산 발효공정을 결정하기 위하여 IBT 1245의 대량 발효에 적합한 배양온도, pH, 산소분압, 교반속도에 따른 항곰팡이 활성, 수율, 경제성등을 고려한 발효조건의 최적화 진행.

→ 균체 측정은 세포 배양액 1 ml를 4000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포를 회수하고 멸균증류수 1ml에 현탁한 후 세포수를 CFU(Colony forming unit)로 측정하였다. IBT 1245 세포수 측정은 연속희석방법으로 10⁻³ - 10⁻⁵까지 희석하고 TSA(Tryptic Soy Agar) plate에 도말한 후 30℃ 항온배양기에서 배양하여 세포수 측정.

▶ 방선균 IBT 1245 발효공정의 최적화 (1500L 발효)

방선균 IBT 1245의 균체 회수 공정의 최적화 및 제어 효과 안정성을 향상시킬 수 있는 최적 공정의 설계

→ 대량 발효 생산한 방선균 IBT 1245의 균체회수를 효율적으로 할 수 있는 공정의 조사와 매체의 사용 등 효율성을 높이기 위한 연구 진행.

▶ 활성검증 (*Phytophthora capsici* 제어 능력 : *in vivo/in vitro*)

배양배지 조성, 배양조건의 최적화를 통해 생산된 미생물체제의 가격경쟁력과 수율의 향상 여부 검증

→ 상기에서 최적화를 통해 생산된 IBT1245의 수율과 *Phytophthora capsici* 제어활성이 향상되었는가를 확인.

▶ 포장 검증 (*Phytophthora capsici* 제어 능력)

최적화된 배양배지 조성, 발효 공정에 의해 IBT 1245를 생산하여 포장에서의 *Phytophthora capsici* 제어 능력 검증

→ 최적화된 배양배지와 발효공정으로 생산한 IBT 1245의 활성을 포장 재배 실험을 통하여 *Phytophthora capsici* 제어 활성 검증.

→ 최적화된 배양배지와 발효공정으로 생산한 IBT 1245를 충북대학교 포장 활성 검증을 위한 고추 묘의 재배를 위하여 공급.

나. *Phytophthora capsici* 제어 항공팡이 방선균 제제의 재배활성 검증
(in vivo) - 충북대학교

1. 2차년도 개발내용 및 개발범위

1). 개발목표

선발한 방선균을 농업에 직접 이용할 수 있는 제형으로 만들었을 때, 그 제제의 온실 및 포장 제어효과를 검정하고 효과적인 처리법을 확립.

2). 개발내용 및 범위

미생물제제 효과를 온실 및 포장에서 검정, 최적 제형을 규명

▶ 미생물제제의 예방효과 검정 : 역병이 발생하기 전부터 일정 간격으로 미생물제제를 꾸준히 처리하였을 때, 처리 간격과 처리량의 변화가 병 발생에 어떤 영향을 미치는지 발병률 조사

▶ 미생물제제의 치료효과 검정 : 역병균 접종 또는 역병 발생 직후 다양한 횟수와 간격으로 미생물제제를 처리하고 병발생률을 조사하여 미생물제제의 치료효과와 최적 처리 횟수 검정

▶ 토양 내에서의 미생물 지속성 조사 : 간격과 횟수를 달리하는 각 처리 토양을 일정시간 경과후 처리 농도별로 각각 채취하여 흙 속의 미생물상, 특히 방선균의 밀도 조사

→ 온실에서 고추를 파종하여 키우면서 주관 연구기관에서 의뢰한 제제를 처리하여 역병 방제효과 검증.

→ 시험에 사용하는 균주는 본 연구진이 1차 연도의 연구에서 충북 괴산의 농가 포장에서 수집한 균주로 실험실 내에서 계대배양을 통하여 보관하여 사용. 고추 역병균의 역병 발병활성을 유지하기 위하여 계대배양 3-4세대마다 한번씩 포트에서 자라는 고추 식물체 또는 열매에 접종하여 병을 유발한 뒤 병이 유발된 식물체나 열매에서 다시 균을 분리 보관.

→ 주관기관에서 공급하는 미생물제제는 냉장보관하며 사용하였으며 신선한 상태의 것을 사용.

다. *Phytophthora capsici* 제어 항곰팡이 방선균 제제의 상용화를 위한
대량생산 기술 및 품질관리 기법의 개발 - 한국에너지기술연구원

1. 2차 연도 개발내용 및 개발범위

1). 개발목표

배양조건 및 배지 최적화를 기초로 20L, 300L의 대량발효 조건 및 공정 최적화 확립

2). 개발내용 및 범위

방선균 대량발효의 역가 향상을 위한 배지조건의 검색과 온도, pH, 산소분압의 영향성에 관한 최적화 확립

→ 대량발효 조건 및 공정을 최적화하기 위하여 300L 발효를 수행중에 있다. 주관기관에서 공급한 IBT 1245는 주관기관에서와 같이 modified 벤넛한천배지에서 배양하여 보관하면서 사용하였다. 대량발효를 위한 종균의 배양은 500ml 삼각플라스크에 배양배지를 100 ml로 하여 30℃ 진탕배양기에서 200 rpm으로 교반하면서 배양한 후 발효기에 접종하여 사용.

→ 대량발효를 위한 배지는 포도당, hydrol을 탄소원으로 하고 효모 엑기스, corn steep powder를 질소원으로 사용하여 연구를 진행하고 있으며 배양온도, pH, 산소량등에 따른 IBT 1245의 수율과 *Phytophthora capsici* 제어 항균 활성 등을 조사.

▶ 유효성분의 용적 생산성 극대화를 위한 30L, 300L 발효 및 기질(저가) 최적화 실험(오염방지, 발효조건 등)과 조업 Pattern 결정

→ 대량발효 공정에서 수율과 활성을 향상시키기 위한 연구와 더불어 오염의 방지 및 조업을 원활히 하기 위한 조업 조건 제시.

▶ 본 과제는 *Phytophthora capsici* 제어 항곰팡이 방선균 제제의 개발과 상용화로 당해연도의 목표는 대량생산 생물발효배지 및 생물발효공정의 최적화를 통한 방선균 IBT 1245 미생물제제의 실용화 구축 및 포장 활성검증에 주안점이 있다. 또한 기능성 방선균의 유효성분 발현 극대화를 위한 배지 최적화를 통해 역가를 극대화하는데 주력하였다. 따라서 주관연구기관은 방선균 IBT 1245 미생물제제를 대량생산 공정으로 생산하고 포장 재배실험을 실시하여 제제 활성을 검증하며 IBT 1245 생산을 위한 최적화로 실용화시 필요한 대량생산과 경제성을 확보하고자 하였다. 자세한 연구방법은 연구내용 및 결과에 기술하였다.

4. 연구수행 내용 및 결과

가. 대량생산 생물발효배지 및 생물발효공정의 최적화를 통한 방선균 IBT 1245 미생물제제의 실용화 구축-(주)케이아이비씨

▶ 실용화를 위한 대량생산 생물발효배지의 개발
선발된 *Phytophthora capsici* 항균성 방선균의 특성에 맞는 생물발효배지 개발

방선균 IBT 1245는 modified 벤넛한천배지에서 30℃에서 배양하고 보관하면서 사용하였다.

1차 연도 연구결과를 기초로 포도당, Hydrol을 탄소원으로 하고 Yeast extract, corn steep liquor등을 질소원으로 하는 발효배지를 중심으로 IBT 1245의 대량생산에 적합한 생물발효배지를 조사하였다.

배양배지에 접종한 후 진탕배양하였으며, 배양조건은 배양배지 100 ml이든 500 ml flask에 접종한 후 30℃의 진탕배양기에서 200 rpm으로 교반하면서 24시간 배양하여 접종 종균으로 사용하였다.

IBT 1245의 기본 발효 배지의 조성은 포도당 20 g/L, CSP 3g/L, peptone 3 g/L, KH_2PO_4 1.2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 g/L, NaCl 1.2 g/L, CaCO_3 5 g/L와 미량원소액 1ml/L로 구성되었다. 미량원소의 조성은 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.07 g과 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g 을 증류수 100 ml에 녹인 후 사용하였다. 연구 목적에 따라 기본 발효 배지 조성의 탄소원과 질소원을 대체하여 사용하였다.

▶ 1차 연도 결과에 따라 탄소원을 포도당으로 하고 질소원을 CSL로 하는 발효 배지 조성을 이용하여 150L 발효조와 1500L 발효조에서의 세포생장과 항균활성을 조사하였으며 결과는 표1에 나타내었다. 150L 발효 결과 포도당 (20g/L)과 질소원인 CSL에 사용량에 따라 세포수와 항균활성에 차이가 나타났으며 포도당 20g/L에 CSL 10g/L를 사용하였을 때 세포수가 10배 증가하였고 항균활성도 40%정도 증가하였다(표13).

[표13]. 탄소 및 질소농도에 따른 세포생장과 항균활성에 미치는 영향(150L 회분식 발효)

탄소원과 질소원 (g/L)	세포수 (CFU/ml)	항균활성 성장저해존(mm)
포도당 10 g/L + CSL 5 g/L	1.7×10^6	9
포도당 20 g/L + CSL 5 g/L	2.3×10^7	10
포도당 20 g/L + CSL 10 g/L	1.5×10^8	14
포도당 20 g/L + CSL 15 g/L	3.2×10^8	10
포도당 20 g/L + CSL 20 g/L	1.2×10^8	8

IBT 1245의 세포수는 연속희석도말법으로 TSA배지를 이용하여 조사하였다. 항균활성 측정은 PDA 배지에서 배양된 *Phytophthora capsici* agar block을 (5 mm) PDA plate 상에 놓고 4000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포를 제거한 상등액으로 항균활성 분석하였다. 항균활성은 *Phytophthora capsici*의 성장저해존으로 측정하였다. 지시균 *Phytophthora capsici*는 PDA (Potato Dextrose Agar, Difco)배지에서 배양 보관하면서 IBT 1245의 항균활성분석에 사용하였다.

▶ 방선균 IBT 1245 대량발효조건의 최적화 (1500L 발효)

온도, pH, 산소분압, 교반 속도등에 의한 역가 검증, 수율 증대, 배지조성에 의한 단가 등을 통하여 대량생산 발효공정의 단순화, 최적화, 가격경쟁력 확보

→ 최적의 대량생산 발효공정을 결정하기 위하여 IBT 1245의 대량 발효에 적합한 배양온도, pH, 산소분압, 교반속도에 따른 항곰팡이 활성, 수율, 경제성 등을 고려하여 발효조건의 최적화를 진행하였다.

IBT 1245의 대량발효 종균 배양은 1차년도와 같은 방법으로 진탕배양하여 150리터 종균 발효를 통해 1500리터 대량발효 종균으로 사용하였다. 세포수 측정은 세포 배양액 1 ml를 4000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포를 회수하고 멸균증류수 1ml에 현탁한 후 세포수를 CFU(Colony forming unit)로 측정하였다. IBT 1245 세포수 측정은 연속희석방법으로 10^{-3} - 10^{-5} 까지 희석하고 TSA(Tryptic Soy Agar) plate에 도말한 후 30℃ 항온배양기에서 배양하여 세포수 측정하였다.

IBT 1245의 연구결과와 배양특성 및 대량발효 생산 시 고려해야 할 Operation 인자와 조건들을 고려하여 1500리터 발효조건 최적화는 150L에서 최적화한 발효배지 조성을 이용하여 교반속도와 공기 주입량에 따른 세포생장과 항균활성을 조사하였다. 일차적으로 교반속도가 세포생장과 항균활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 발효 온도를 30℃로 유지하고 통기량을 1v/v/m으로 하였으며 종균 접종량은 2 v/v %로 발효는 120시간으로 수행하여 결과를 표14에 나타내었다.

[표14]. 대량 발효생산시 교반속도가 IBT 1245의 세포생장과 항균활성에 미치는 영향.

교반속도 (rpm)	세포수 (CFU/ml)	항균활성 성장저해존(mm)
100	2.1×10^6	11
150	2.3×10^7	10
200	3.7×10^8	15
250	3.4×10^8	13

표14에 나타낸바와 같이 교반속도가 상승하면 어느 선까지는 세포생장이 증가하는 것을 알 수 있다. 본 연구에서는 교반속도 200rpm에서 세포가 10^8 cfu/ml까지 성장하였으며 항균활성도 소량발효와 비교하여 대등한 활성도를 유지하였다.

▶ 상기 결과를 참고하여 통기량이 세포생장과 항균활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 상기와 동일한 조건에 교반속도를 200 rpm으로 하고 통기량에 따른 세포생장과 항균활성 변화를 조사하여 결과를 표15에 나타내었다.

[표15]. 대량 발효생산시 통기량이 IBT 1245의 세포생장과 항균활성에 미치는 영향.

통기량 (v/v/m)	세포수 (CFU/ml)	항균활성 성장저해존(mm)
0.3	1.1×10^5	6
0.5	3.2×10^6	9
0.8	1.3×10^7	12
1.0	2.9×10^8	16

표15에 나타낸바와 같이 통기량이 감소하면 세포생장과 항균활성이 감소하였다. 본 연구에서 IBT 1245는 통기량을 1 v/v/m으로 하였을 때 세포생장이 10^8 cfu/ml으로 0.3 v/v/m으로 하였을 때보다 크게 향상되었다. 항균활성도 통기량이 감소하면 감소하는 양상을 보여주었다.

▶ 방선균 IBT 1245 발효공정의 최적화 (1500L 발효)

방선균 IBT 1245의 균체 회수 공정의 최적화 및 제어 효과 안정성을 향상시킬 수 있는 최적 공정의 설계

대량 발효 생산한 방선균 IBT 1245의 균체 회수를 효율적으로 할 수 있는 공정을 조사하기 위하여 먼저 발효를 종료한 후 자연 침강의 속도를 조사한 결과 30 v/v%를 성취하는데 10시간 정도의 시간이 소요되었다. 세포의 회수

수율을 향상 시키기 위해서는 산업적으로 사용되고 있는 원심분리기나 막 분리 방법의 사용을 고려할 수 있으며 경제성과 공정상의 편리성을 고려할 때 막 분리 방법이 타당할 것으로 사료되며 막분리 공정을 통하여 IBT 1245는 100리터 95 v/v % 농축하는데 약 2시간이 소요되어 톤 단위의 공정에 적용하는데 어려움이 없을 것으로 사료된다.

▶ 활성검증 (*Phytophthora capsici* 제어 능력 : *in vivo/in vitro*)

배양배지 조성, 배양조건의 최적화를 통해 생산된 미생물제제의 가격경쟁력과 수율이 향상되었는가 검증

상기에서 대량발효 최적화를 통해 생산된 IBT 1245의 수율과 *Phytophthora capsici* 제어활성이 상기에 기술한 바와 같이 대등하거나 향상된 결과를 얻었다.

▶ 방선균 IBT 1245 미생물제제의 포장 활성 검증

IBT1245 미생물제제의 *Phytophthora capsici* 제어 활성재배실험을 실시하였다.

Phytophthora capsici 제어 포장 재배활성 검증을 위하여 각기 멸균수에 2일간 침지하여 두었던 고추 종자를 방선균 IBT 1245 세포배양액(1.0×10^7 cfu/ml)에 10시간 동안 침지 처리하였다 (실험군). 비처리 대조군으로는 2일간 멸균수에 침지시킨 고추 종자를 10시간 새로운 멸균수에 침지 시킨것을 이용하였으며 본엽이 2-4잎의 유묘기에 포트에 이식하여 고추묘를 재배하였다. 포트 이식 직후 200배 희석한 IBT 1245를 포트당 10mL을 관주처리 하

였으며 이식 1주일 후 두 번째 처리를 하였다. 대조군에는 동일량의 물을 관주 처리하였다.

파종 포트는 지름이 9cm 의 일회용 종이컵을 이용하여 포트당 1개의 묘를 재배하였으며 온도는 25℃ - 32℃를 유지하였으며, 빛은 자연광을 이용하여 포장 활성검증을 위한 처리군 대조군의 고추 묘를 생산하였다. 고추 묘는 포트에서 7주 동안 키운 후 포장에 정식하여 고추역병 제어 활성을 조사하였다. 대조군으로는 IBT 1245가 함유되지 않은 물을 이용하여 종자 처리하여 재배한 고추 모종을 이용하였다. IBT 1245 ($1.0 \sim 3.0 \times 10^7$ cfu/mL) 처리군은 1주 간격으로 3회에 걸쳐 200배 희석한 미생물제제를 주당 10ml씩 흠뻑 관주처리 하였다.

정식은 5월 15일에 충북 괴산의 고추재배 일반농가 노지에 정식후 25일 경과한 6월 10일부터 200배 희석한 IBT 1245 미생물제제 (200평당 100L사용)를 10일 간격으로 시비 하였다. 식물의 역병 발생율(%), 식물체 크기 및 수확량등을 정식 후 60일과 75일 재배 후 조사하여 기록하였으며 처리군과 대조군 모두 200주에 대한 평균값으로서 표16에 나타내었다.

[표16]. 방선균 IBT 1245에 의한 고추 역병 제어 활성 재배실험

처 리 구 분	발병율 (%)		식물의 크기 (cm/plant)		고추수확 량 (kg)
	60 일	75 일	60 일	75 일	75 일
대조군	2.5a ^x	15.4a ^x	53.1a ^x	77.3a ^x	70.0a ^x
방선균 IBT1245 처리군	0.7b	4.2b	61.8b	82.4b	78.4b

^x대조군과 비교할 때 처리군의 값이 p=0.05 범위에서 크게 다른 경우 서로 다른 알파벳 a,b로 나타냄.

표16와 같이 방선균 IBT 1245 미생물제제로 처리한 경우 발병율이 감소하고, 왕성하게 자랐으며 고추 수확량도 증가하였으며 역병제어 활성도 우수하였다.

나. *Phytophthora capsici* 제어 항공팡이 방선균 제제의 재배활성 검증
(in vivo) - 충북대학교

1). 연구 목표

▶ 선발한 방선균을 농업에 직접 이용할 수 있는 제형으로 만들었을 때, 그 제제의 온실 및 포장 제어효과를 검정하고 효과적인 처리법을 확립

2). 개발내용 및 범위

▶ 미생물제제의 예방효과 검정을 위하여 미생물제제를 주기적으로 처리 하여 역병 예방 효과를 수행 (온실, 및 포장시험).

▶ 미생물제제의 사용비율과 처리에 따른 미생물제제의 치료효과 검정을 위하여 온실 및 포장시험 수행.

(1). 온실시험

▶ 49공 연결포트에 각 포트 당 1개의 고추씨를 파종하여 육묘한 뒤 본잎이 3-4장 나왔을 때 30 x 45 cm의 트레이에 트레이당 8주씩 이식.

▶ 본 잎이 7-8장 되었을 때부터 주관기관으로부터 공급받은 미생물제제를 100배와 200배로 희석하여 트레이당 1리터씩 10일 간격으로 4회 토양에 관

주.

▶ 미생물제제 1회 처리가 끝난 뒤 3일째에 in vitro 상태에서 배양한 *Phytophthora capsici*의 유주 포자낭 현탁액(1×10^3 zoosporangia/ml)을 트레이당 80 ml씩 뿌리 근처에 관주하고 물을 충분히 주어 발병을 유도.

▶ 미생물제제 4회 처리가 끝난 뒤 10일 만에 이병주 수를 조사하였으며 이 병주 수 조사가 끝난 뒤 각 트레이의 토양을 트레이당 3-4군데에서 모두 50cc씩 채취하여 5 배량의 증류수에 잘 풀은 뒤 EC 값을 측정.

▶ 효과를 비교하기 위한 대조약제로는 농촌진흥청의 농약시험기준에 따라 메타실동(50%) 1000배액을 사용.

▶ 약해 유발은 미생물제제 50배 및 100 배액을 고추 유묘에 처리하여 외관상의 이상을 육안 달관 조사.

(2). 포장시험

▶ 충북대학교 포장은 시중에서 본 잎 10-12장의 프리그 묘(품종: 녹광)를 구입하여 정식하였다. 반면에 농가포장은 농장주가 식재하여 놓은 것을 사용하였다(품종: 마니파).

▶ 미생물제제는 주관연구기관으로부터 공급받아서 100배 및 200배로 희석하

여 m²당 1리터씩 10일 간격으로 4회, 자동분무기로 엽면 살포하였다.

▶ 농가포장은 자연발병에 의존하였으나, 충북대 포장은 올해 처음 농사를 지은 땅으로서 고추 역병균의 밀도가 아주 낮을 것으로 예상하여 뿌리에 상처를 내고 1x10⁴ zoosporangia/ml의 유주포자낭 현탁액을 m² 당 약 100 ml 씩 토양에 관주하여 접종하였다.

▶ 충북대 포장은 농가포장보다 2주 늦게 미생물제제 처리를 시작하였다.

▶ 미생물제제의 효과는 마지막 처리가 끝난 뒤 10일째에 발병 주 수로 조사하였다. 효과를 비교하기 위한 대조약제로는 농촌진흥청의 농약시험기준에 따라 메타실동(50%) 1000배액을 사용하였다.

▶ 약해유발 여부는 미생물제제 50배 및 100배액을 고추 유묘에 처리하여 외관상의 이상을 육안 달관 조사를 하였다.

(3). 연구 결과

1). 온실시험

- 약효검정

[표17]. IBT 1245 미생물제제 처리에 따른 고추 역병 발병주율
(%, 발병주x100/전체) 및 토양 전기전도도(ms/cm) 변화

	1반복	2반복	3반복	평균	토양 전기전도도
100배 희석	40.0	52.5	40.0	44.2	1.6
200배 희석	62.0	51.5	50.5	54.7	1.3
메타실동 50% (1000배 희석)	25.0	50.0	37.5	37.5	1.8
대조구 (수도물 처리)	87.5	100.0	87.5	91.7	1.5

- 약해: 외관상 아무런 이상이 없었음

2). 포장시험 - 농가포장

- 약효검정

[표18]. IBT 1245 미생물제제 처리에 따른 고추 역병주율 및 방제가(단위:%)

	1반복	2반복	3반복	평균	방제가
100배 희석	21.9	27.1	26.1	25.0	40.3
200배 희석	26.8	29.0	27.0	27.6	34.1
메타실동 50% (1000배 희석액)	10.4	8.5	14.6	11.2	73.3
무처리(대조구)	45.8	42.6	37.2	41.9	-

발병주율: (발병주/전체)100

방제가 : (1-처리구발병주율/무처리발병주율)100

- 약해 : 외관상 아무런 이상이 없었음

다. *Phytophthora capsici* 제어 항곰팡이 방선균 제제의 상용화를 위한
대량생산 기술 및 품질관리 기법의 개발-한국에너지기술연구원

1). 개발목표

배양조건 및 배지 최적화를 기초로 20L, 300L의 대량발효 조건 및 공정 최적화 확립

2). 개발내용 및 범위

▶ 방선균 대량발효의 역가 향상을 위한 배지조건의 검색과 온도, pH, 산소분압의 영향성에 관한 최적화 확립

→ 대량발효 조건 및 공정을 최적화하기 위하여 300L 발효를 수행중에 있다. 주관기관에서 공급한 IBT 1245는 주관기관에서와 같이 modified 벤넛한천배지에서 배양하여 보 관하면서 사용하였다. 대량발효를 위한 종균의 배양은 500ml 삼각플라스크에 배양배지를 100 ml로 하여 30℃ 진탕배양기에서 200 rpm으로 교반하면서 배양한 후 발효기에 접종하여 사용하였다.

→ 대량발효를 위한 배지는 포도당, hydrol을 탄소원으로 하고 효모엑기스, corn steep powder를 질소원으로 사용하여 연구를 진행하고 있으며 배양온도, pH, 산소량등에 따른 IBT 1245의 수율과 *Phytophthora capsici* 제어 항균 활성 등을 조사.

▶ 유효성분의 용적 생산성 극대화를 위한 30L, 300L 발효 및 기질(저가) 최적화 실험(오염방지, 발효조건 등)과 조업 Pattern 결정

→ 대량발효 공정에서 수율과 활성을 향상시키기 위한 연구와 더불어 오염의 방지 및 조업을 원활히 하기 위한 조업 조건 제시.

▶ 본 연구는 *P. capsici* 제어 항곰팡이 방선균 제제 IBT 1245의 대량생산을 위한 배지 및 공정 최적화를 목적으로 수행되었다. 본 연구에서는 첫째, 온도, pH, 산소 분압 등의 발효공정 조건 최적화, 둘째, 저가 탄소원(기질) 및 질소원을 활용한 발효제제의 생산 가능성, 그리고 탄소원의 단속적 추가 공급(유가식 배양)을 통한 제제의 발효 생산성 향상의 가능성을 검토하였다.

①. 발효조건 (온도, pH, 산소분압) 최적화 와 발효방법

▶ 방선균 IBT 1245의 배지는 기질로서 포도당(혹은 Hydrol)을 실험에서 주어진 농도, CSP 3g/L, peptone 3g/L (실험 조건에 따라 효모추출물, Corn steep liquor로 대체 사용) KH_2PO_4 1.2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 g/L, NaCl 1.2 g/L, CaCO_3 5 g/L과 미량원소액 1Mℓ/L로서 구성되었고, 미량원소액은 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.07 g와 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g을 100Mℓ에 녹여 제조하였다.

▶ 발효온도는 선행연구에서 30℃가 최적임이 밝혀졌으며 동 실험에서도 이를 따랐다. 발효액의 pH는 초기 pH를 7.0으로 조절하면 정상적 발효가 가능하였고 발효가 진행됨에 따라 약 40시간 이후부터 증가하였으며 지수성장기 및 후기 발효 중점에서는 약 8.7까지 상승하였으나 pH를 조절(7.0으로)하여도 균체의 생장에 크게 영향을 미치지 않으며 초기 pH를 낮추면(예로서 5.0인 경우, 결과 미표시) 도리어 균체의 초기생장이 저하되므로 초기 pH를 중성(7.0)으로 하여 조절하지 않고 자연적으로 상승하도록 하였다.

▶ 발효조의 산소분압은 교반속도 300rpm, 포기량 2L/min에서 약 9.2 mg/L을 나타내었으며 지수성장기에는 약 3.5 mg/L로 저하하였다가 발효가 종료되면서 상승하여 본래 치를 나타내었다. 산소 분압은 탄소원(glucose) 농도 10g/L에서는 적정선인 것으로 판단되었으며 다른 농도에서의 산소분압 최적화는 시도하지 않았다. 발효는 300L 발효기에서 수행되었으며 실 발효용적은 200L로 하였다. IBT 1245는 벤넷 한천배지로 계대하였으며 종균 배양은 250ml flask, 30L 발효기에 각각 1일간 배양하여 300L 발효기로 접종량 2%(v/v)로 접종하여 발효를 하였다. 실험결과의 최적 조건은 다음 표19에 요약하였다.

[표19]. IBT 1245의 최적화 발효조건

발효조건 항목	적정 범위	비 고
온도	30℃ 내외	운전 편의상도 가장 좋은 조건임
pH	초기 pH 7.0	pH 조절 효과 없음, 후기 pH 상승
산소 분압	3 ~ 9 mg/L	10g/L 포도당 농도의 경우

②. 탄소원 및 질소원 최적화 연구

▶ 선행연구결과 IBT 1245의 탄소원과 질소원이 포도당과 CSL로 선정됨에 따라 이들 조성과 발효시에 세포생장과 항균활성을 조사하였다. 발효 배양 후 세포 생장은 TSA(Tryptic Soy Agar) 배지상에서 CFU(colony forming

unit) 조사하였으며 항균활성은 PDA (Potato Dextrose Agar) 배지상 *P. capsici* 성장 저해로 비교하였다.

▶ 포도당 농도에 따른 세포생장과 항균활성 영향. 미생물은 성장 과정에서 기질저해, 생산물 저해 혹은 catabolic repression 등으로 회분식 발효배양의 경우 고농도 배양이 쉽지 않다. 최적 탄소원 농도를 구하기 위하여 포도당 농도 10g/L, 20g/L, 30 g/L, 40 g/L에서 세포수와 항균활성을 각각 검토하고 결과를 표20에 나타내었다. 결과에서 IBT 1245는 10g/L, 20 g/L 포도당 농도에서 세포수가 증가하였으나 40g/L에서는 배양후 세포수와 항균활성이 현저히 저하되었으며 이결과는 플라스크 배양에서와 같은 양상을 보여주었다.

[표20]. 포도당 농도에 따른 IBT 1245의 성장과 활성

포도당 (g/L)	세포수 (cfu/Mℓ)	항균활성 성장 저해존 직경(mm)
10	1.7×10^7	15
20	3.9×10^7	16
30	1.9×10^6	13
40	1.5×10^5	11

▶ 질소원 따른 세포생장과 항균활성 영향

선행연구에서 CSL이 질소원으로 선발됨에 따라 CSL 질소원에 따른 발효배양의 세포의 성장과 활성을 검토하였으며 CSP와도 비교하여 결과를 표21에 나

타내었다.

[표21]. 질소원에 따른 IBT 1245의 성장과 활성

질소원 (6 g/L)	세포수 (cfu/Ml)	항균활성 성장 저해존 직경(mm)
CSL	4.9×10^7	17
CSP	3.4×10^6	15
효모 추출물	1.8×10^7	13

질소원으로 CSL이나 효모추출물을 사용시 CSP를 사용할 경우보다 세포의 생장이 양호하였으며, 항균활성은 CSL에서 가장 우수하였다. 효모추출물을 이용하여 발효배양하였을 때 항균활성은 다소 감소하였다.

▶ 기질 및 배지 최적화의 결과

기질 및 배지 최적화의 결과 탄소원은 포도당이 적합하였으며 포도당이 농도는 20g/L가 최적 농도선이었다. 질소원으로는 세포생장을 고려할 때 CSL이나 효모 추출물을 사용할 수 있으나 가격과 항균활성을 고려할 때 CSL이 적합하였다. 탄소원은 원가 상승에 미치는 영향이 그다지 크지 않지만 고가의 질소원의 사용은 실용화 차원에서는 미생물체제의 단가에 미치는 영향이 크므로 저가의 질소원을 확보한 것은 바람직하다. 한편 본 연구에서 상기의 탄소원의 초기발효농도를 10g/L로 하고 이것이 고갈되는 시점에서 일정량의 탄소원을 추가 공급하여 세포를 성장시키는 방안이 검토될 수 있다

③. 회분식 및 유기식 발효 실험

실험 방법

▶ 회분식 발효(비교 대조군)에서 발효조 제원(주발효조 유효용적 200L, 발효시동조 유효용적 20L), 운전 조건(온도, pH, 산소분압) 및 접종방법, 배지 조성은 상기에 기술한 바와 같다. 탄소원은 포도당 10g/L을 사용하였으며 질소원은 CSP/peptone을 각 3 g/L 사용하였다.

▶ 반면에 유기식 발효배양은 포도당의 고갈시부터 (약 100시간) 일정량 (1000Mℓ)의 포도당 용액 (120 g/L 농도)을 매 8시간 및 16시간마다 하루 2회 공급하면서 발효를 수행하였다.

실험결과 및 고찰

▶ 본 연구 발효 실험에서 발효기내 산소분압, 포도당 농도 변화, 균체 농도 변화(dry weight)를 매일 2회 (8시간, 16시간 마다) 시료채취 측정하였다.

▶ 회분식 발효는 IBT 1245는 105시간 이내에 log phase에서 stationary phase에 도달하고 이후에는 세포의 사멸현상을 나타내는 징후로서 발효조 내용존 산소의 상승 (산소소비 감소), 포도당의 고갈, 세포의 감소 등이 관찰되었다. 따라서, 이 시간대에 발효를 종료하는 것이 항균활성을 최대화하는데 가장 유리할 것으로 평가되며 최종 biomass 농도는 약 2g/L 로서 제품화에

크게 어려움이 없을 것으로 판단되었다.

▶ 유가식 배양의 경우를 보면 회분식 발효에서와 마찬가지로 발효 초기에는 세포생장이 미미하였으며 그 이후로 약 96 시간까지 지수성장기가 지속되었다. 동 시점에서 1L의 포도당 농축액을 투입하여 추가적 탄소원을 공급하자 세포의 지수적 성장이 계속되었다. 발효는 약 225 시간까지 지속되었으며 조금 둔화되긴 했지만 균체의 증가도 계속되었다, 최종 biomass 농도는 약 3.4 g/L로서 회분식 발효에서 보다 높았다.

▶ 상기하는 결과를 먼저 기질 양에 따른 균체의 수율면에서 비교하여 보면 회분식 발효에서는 균체 수율이 0.10 g biomass/g glucose 이었으며, 유가식 발효에서는 0.19 g biomass/g glucose로서 약 2배 향상되었다. 한편, 발효기의 용적 생산성을 살펴보면 회분식 발효의 종료를 약 115 시간으로 보면 0.2g biomass/L.d를 나타내었으며 유가식 발효의 종료 시점은 225시간이므로 0.27 g biomass/L.d를 나타내었다. 따라서, 발효기의 용적 생산성도 약 35% 증가되었다. 따라서, 탄소원의 간헐적 추가를 통한 유가식 배양은 균체의 수율과 용적 생산성 향상에 효과적일 수 있다는 결론을 얻었다. 그러나, 실제 조업상황에서는 우선 회분식의 경우보다 유가식 배양의 경우 조업 시간이 약 2배로 늘어나서 제품생산 주기가 늘어나게 되고 또한 발효기의 오염 가능성 등이 증가할 수 있으므로 실제 조업 pattern을 어떻게 가져갈 것인가는 제품의 판매상황, 제형등을 종합적으로 고려하여 실 규모 운전을 실시하여야 할 것이다.

▶ 지체현상(lag)은 기질의 초기농도를 높게 하였을 경우 악화되는 것으로

flask 실험에서 관찰된 바 있다. 따라서, 기질의 초기 발효 농도와 접종량을 적정선에서 유지하여 지체기간을 줄여나가는 것이 생산성 증가를 위하여 필요하다며 이는 더 큰 발효조를 운전할 경우 매우 중요한 변수가 될 것이다.

▶ 산소분압은 지수 성장기에 급격히 떨어져 성장에 절대적 영향을 미치는 인자로 파악되어 폭기량과 교반속도 등을 에너지 비용, 물리적 가능성을 고려하여 비용효과의 측면에서 실 규모(1500L 발효조) 발효조로 최적화 해나가는 것이 효과적일 것으로 판단되었다.

제3절 3차 연도 기술개발 결과

1. 3차 연도 연구개발목표와 내용 및 평가의 착안점

가. 연구개발 목표

연구목표	주요개발내용 및 범위
고체배양 기술의 개발과 시작품의 제작 및 활성검증, 미생물제제의 등록 (주)케이아이비씨)	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 고체배양을 이용한 고체상 미생물제제의 개발 ▶ 포장 검증 (Phytophthora capsici 제어 능력) ▶ 액상 및 고체상 미생물제제의 시작품 제작 ▶ Phytophthora capsici 제어 신기능 방선균 미생물제제 등록
최적 미생물제형의 선발 (충북대학교)	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 대량 배양성, 접종력, 특히 상온에서의 저장성 등에 중점을 두어 주관 연구기관이 개발한 미생물제를 직접 포장에 적용하여 효과가 가장 좋은 제형의 미생물제를 선발, 농민들에게 바로 공급할 수 있도록 준비
제품 가공 기술개발 제품 가공기술 확립 제품 품질관리 기술 개발 (한국에너지기술연구원)	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 제품의 계획생산을위한 균체관리, 장기보관실험 ▶ 고체 제품 성상 확정 및 시제품 생산 ▶ 유효성분 정량실험 및 제품포장과 보관방법확립 ▶ 유효기간 입증실험

나. 연구평가의 착안점

- ▶ 미생물제제의 활성 보증 기간의 연장이 가능한 고체배양 기술 개발
- ▶ 고체배양 기술 개발을 통한 미생물제제의 안정성 및 저장성을 평가
- ▶ 시작품의 최종 활성 검증 (*Phytophthora capsici* 제어 능력)
- ▶ 등록에 필요한 활성 검증 포장 실험 실시

2. 당해년도 연구개발 목표 및 내용

세부과제명	연구개발 목표 및 내용
<p>○ 고체배양 기술의 개발과 시작품의 제작 및 활성검증, 미생물제제의 등록 ((주) 케이아이비씨)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 고체배양을 이용한 고체상 미생물제제의 개발 ▶ 포장 검증 (<i>Phytophthora capsici</i> 제어 능력) ▶ 액상 및 고체상 미생물제제의 시작품 제작 ▶ <i>Phytophthora capsici</i> 제어 신기능 방선균 미생물제제 등록
<p>○ 최적 미생물제형의 선발 (충북대학교)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 대량 배양성, 접종력, 특히 상온에서의 저장성 등에 중점을 두어 주관 연구기관이 개발한 미생물제를 직접 포장에 적용하여 효과가 가장 좋은 제형의 미생물제를 선발, 농민들에게 바로 공급할 수 있도록 준비
<p>○ 제품가공기술개발 ○ 제품가공기술확립 ○ 제품품질관리기술개발(한국에너지기술연구원)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 미생물 균체와 배양액의 분리공정 개발 ▶ 배양액의 장기보관 유지 방법의 활성 검증 ▶ 유효성분 정량실험 및 제품포장과 보관방법 확립

3. 연구수행 내용

가. *Phytophthora capsici* 제어 방선균 IBT 1245 미생물제제 등록 -
(주) 케이아이비씨

1). 3차 연도 개발목표

▶ 활성의 유지, 보존 기간의 연장을 위하여 고체배양기술의 개발과 시
작품의 제작 및 활성검증, *Phytophthora capsici* 제어 방선균제제의 등록.

2). 당해연도 개발내용 및 범위

▶ 미생물제제의 활성 보증 기간의 연장과 활성 유지를 위한 고체배양기
술의 개발

IBT 1245의 활성을 장기간 연장하고 활성 저하를 방지할 수 있는 고체
배양기술의 개발

IBT 1245의 생장과 활성유지와 고체배양에 적합한 다양한 매체를 대상으로
고체배양을 실시하였다. 특히 톱밥, 밀기울, 키틴, 콘파우더, 질산암모늄으로
구성하는 다양한 조성물을 이용하여 IBT 1245의 생장과 활성 안정성에 미
치는 영향을 조사하였다.

IBT 1245는 *Phytophthora capsici*에 대해 항균 활성이 우수한 방선균
으로 modified 벤넷 한천배지를 이용하여 30℃에서 배양하고 보관하면
서 종균으로 사용하였다.

조성물의 멸균은 각각의 조성물 500g에 500ml의 증류수를 첨가한 다음 121°C에서 60분간 멸균하고 12시간동안 상온에 두었다가 같은 방법으로 1회 더 멸균하여 고체배양 조성물을 제조하였다. 톱밥은 분쇄기를 이용하여 분쇄한 후 250 μ m 이하로 이용하였다.

고체 배양을 위한 IBT 1245 종균 배양은 Δ flask 와 150L 발효기를 이용하여 2년차 연구에서 개발된 배지 조성인 포도당 20 g/L, CSP 3 g/L, peptone 3 g/L, KH₂PO₄ 1.2 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1.2 g/L, NaCl 1.2 g/L, CaCO₃ 5 g/L 와 미량원소액 1 μ l/L로 구성되었다. 미량원소의 조성은 MnCl₂ · 4H₂O 0.07 g과 ZnSO₄ · 7H₂O 0.01 g을 증류수 100 ml에 녹인 후 사용하였다. IBT 1245는 2년차 연구결과에 따른 발효조건으로 배양하여 log phase에서 IBT 1245를 수확하여 종균으로 이용하였다.

세포수 측정은 세포 배양물 1g을 멸균 증류수 9ml에 현탁한 후 세포수를 CFU(Colony forming unit)로 측정하였다. IBT 1245 세포수 측정은 연속희석방법으로 10⁻³ - 10⁻⁵까지 희석하고 TSA(Tryptic Soy Agar) plate에 도말한 후 30°C 항온배양기에서 배양하여 세포수를 측정하였다.

(1) 고체배양 방선균 IBT 1245 미생물제제의 제조.

톱밥 30~80 중량%, 밀기울 10~65 중량%, 키틴 1~2 중량%, 콘 파우더 3~8 중량%를 균일하게 혼합하였다. 질산암모늄은 전체중량에 대해 0.3중량%가 되도록 첨가하였다. 성형과정에서 부스러짐 현상 없이 펠릿으로 성형이 되는 경우에는 “양호”로, 부스러짐 현상이 일어나 펠릿으로 성형되기가 곤란한 경우는 “저조”로, 그 결과를 아래 표22에 나타내었다. 또한, 제조된 펠

릿형 고체배지의 통기성과 세포성장정도도 조사하여 상대적인 결과를 “저조”, “보통”, “양호”로 나타내었다.

[표22]. 안정화 전달매체 고체배지의 성형성

(단위: 중량%)

구 분	툽밥	밀기울	키티	콘파우더	펠릿성형 여부	통기정도	세포성장정도
실험군 1	30	65	2	3	양호	보통	보통
실험군 2	30	65	1	4	양호	보통	보통
실험군 3	45	45	2	8	양호	양호	양호
실험군 4	50	45	1	4	양호	양호	양호
실험군 5	60	30	2	8	저조	양호	-
실험군 6	70	20	2	8	저조	양호	-
실험군 7	80	10	2	8	저조	양호	-

- : 시험되지 않음

툽밥 30~50 중량%, 밀기울 45~65 중량%, 키티 1~2 중량%, 콘 파우더 3~8 중량%의 조성물 고체배지는 펠릿으로의 성형성이 양호하고, 통기성 및 세포성장성도 보통 이상으로 유지되었다.

사출성형기를 이용하여 각각의 조성물에 대한 물성을 조사하여 적절한 조성물을 이용하여 고체배양에 사용하였다. 선택된 조성물로 제조된 조성물 펠릿은 121℃에서 30~40분간 멸균한 후 고체배양에 사용하였다.

상기의 멸균한 고체배지에 최적화된 배지 조건과 생물발효공정을 통해 생산된 항균성 미생물균체 IBT 1245 배양액 200ml(10^5-10^7 cfu/ml)을 200g 고체배지 비율로 균일하게 접종하였다. 접종한 고체배지는 30℃에서 2주간 배양한 후 수확하여, 자외선으로 멸균한 클린 벤치 안에서 건조시키고, 분쇄하여 미생물제제를 제조하였다.

(2) 액체형 방선균 IBT 1245 미생물제제의 제조.

최적조건에서 생산된 항균성 미생물 IBT 1245 배양액에 1.0 중량%의 펙틴을 첨가하여 (1.5×10^7 cfu/ml: cuf(colony forming unit)) 액체형 미생물제제를 제조하였다. 펙틴은 첨가하기 전에 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 액체형 미생물제제를 4℃에서 보관하였으며 물에 희석하여 관주처리에 적합하였다.

(3) 미생물제제의 세포수 결정

분말형 미생물제제 1.0g 을 멸균수 99ml에 넣고 균일한 현탁액을 만든 후 연속희석 및 도말법으로 TSA 배지상에서 단위 g당의 콜로니 형성단위 colony forming unit(cfu)로 세포수를 결정하였다. 액체형 미생물제제의 세포수는 세포배양액 1 μ l을 멸균 증류수 9ml에 현탁한 후 연속 희석 및 도말법으로 측정하였다. IBT 1245 세포수 측정은 연속희석방법으로 $10^{-3} - 10^{-5}$ 까지 희석하고 TSA(Tryptic Soy Agar) plate에 도말한 후 30℃ 항온 배양기에서 배양하여 세포수를 측정하였다.

이때, 항균성 미생물 균주는 분말형 미생물 전달매체 1g에 대해 cfu로서 $1.0 \times 10^5 - 10^7$ 개 존재하도록 조정하였다. 이렇게하여 얻은 시료를 각각의 미

생물 균주에 대해 다시 2개의 균으로 나누어 4℃와 25℃에서 3개월간 보관하였다. 보관과정에서 미생물 균주의 생존성과 생존 미생물의 재생장 활성을 측정하였다. 구체적 방법으로는, 상기 최종적으로 얻은 시료에 대해 각각 1g을 채취하여 멸균된 증류수 9ml에 용해한 후 그 상등액에 대해 콜로니 형성 단위 (cfu)를 측정하고 생존세포의 재생장정도를 측정하여 그 결과를 하기 표23에 나타내었다.

[표23]. 방선균 IBT 1245 미생물제제의 활성 안정도

구 분	톱밥	밀기울	키티	콘과우더	IBT 1245의 초기 세포수 (cfu/g)	3개월 후 IBT 1245의 세포수 (cfu/g)		생존세포의 재생장정도
						4℃ 저장	25℃ 저장	
실험군 1	30	65	2	3	1.3×10^7	1.1×10^6	1.3×10^5	양호
실험군 2	30	65	1	4	1.7×10^7	1.3×10^6	1.5×10^5	양호
실험군 3	45	45	2	8	2.1×10^7	2.6×10^6	3.5×10^5	양호
실험군 4	50	45	1	4	1.8×10^7	2.5×10^6	3.1×10^5	양호

또한 고체배지에서 배양한 후 생산한 미생물제제의 활성 세포수가 3개월 후에도 미생물제제로서의 역가를 나타내는데 필요한 10^6 cfu/g 이상으로 유지되었다.

▶ 시작품의 최종 포장 검증 (*Phytophthora capsici* 제어 능력)

포장시험은 환경변화 가능성을 고려하여 서로 다른 포장에서 방제시험 실시할 수 있도록 충북 괴산과 용인에 고추 재배 시험 포장을 준비하고 농가의 일반적인 고추 재배 관행에 따라 고추 묘를 5월 7일, 5월 10일에 정식하였다.

고체 및 액체형 IBT1245 미생물제제의 고추 역병 제어 활성은 고추 식물을 대상으로 노지 포장시험을 실시하여 IBT 1245 미생물제제의 고추역병 제어 활성을 측정하였다.

액체형 IBT 1245 미생물제제의 처리는 멸균수에 2일간 침지하여 두었던 고추 종자를 액체형 IBT 1245 미생물제제에 12시간 동안 침지 처리하였다 (실험군). 종자 처리 직전, IBT 1245 미생물제제의 세포수는 2.1×10^6 cfu/ml로 조정하였다. 무처리 대조군으로는 2일간 멸균수에 침지시킨 고추 종자를 12시간 동안 새로운 멸균수에 침지시킨 것을 이용하였다(대조군 1).

고체배양하여 생산된 IBT 1245 미생물제제의 처리는 멸균수에 2일간 침지시킨 고추 종자를 회수하여, 실험군 3의 조성물로 생산된 IBT 1245 미생물제제 (250개 종자/g)를 코팅 처리하였다. 종자 처리 직전의 IBT 1245 미생물제제의 세포수는 2.0×10^6 cfu/ml로 조정하였다 (실험군). 무처리 대조군으로는 멸균수에 2일간 침지한 고추종자를 멸균수에 3시간 더 침지시킨 후 미생물이 첨가되지 않은 동일한 고체배양 배지로 처리한 고추 종자를 이용하였다(대조군 2).

이들 실험군과 무처리 대조군의 종자를 파종하고 고추 묘가 2.0cm 가량 자랐을 때, 고체 배양하여 생산한 IBT 1245 미생물제제를 포트 1개당 미생물제제 0.1g 비율로 모래와 흙으로 된 배합토양과 혼합하여 포트마다 채워 넣은 후 고추 묘를 모판에 이식하였다. 무처리 대조군은 활성 미생물 IBT 1245가 함유되지 않은 동일한 고체배양 배지만을 함유하는 배합토양을 사용하였다. 고추 육묘는 농가에서 행하는 관행의 방법으로 관리하였다. 고추 묘를 비닐하

우스에서 8주간 육묘한 후 노지에 정식하였다. 노지 정식 7일전, 액체형 IBT 1245 미생물제제 처리군에는 액체형 IBT 1245 미생물제제를 물에 희석하여 1.5×10^5 cfu/ml 이 되도록 조정하여, 실험군의 포트 1개당 10 ml씩의 양으로 관주 처리하였다. 대조군에 대해서는 동일한 양의 물을 관주하였다.

정식은 5월 7일과 10일에 경기도 용인과 충북 괴산의 고추재배 일반농가 노지에 정식 후 25일 경과 후부터 고체배양을 통해 생산된 IBT 1245 미생물제제와 액체형 IBT 1245 미생물제제를 각기 물에 100배 희석하여 (200평당 100L사용) 10일 간격으로 시비하였다. 고체배양을 통해 생산된 IBT 1245 미생물제제는 물에 희석하여 사용하였다. 식물의 역병 발생률(%), 식물체 크기 및 수확량 등을 정식 후 60일과 70일 재배 후 조사하여 기록하였으며 처리군과 대조군 각각 100주에 대한 평균값으로서 표24과 표25에 나타내었다.

[표24]. 방선균 IBT 1245 미생물제제의 고추 역병 제어 활성 재배실험

처 리 구 분	발병율 (%)		식물의 크기 (cm/plant)		고추수 확량 (kg)
	60 일	70 일	60 일	70 일	70 일
대조군 1	3.1a ^x	18.5a ^x	52.2a ^x	76.5a ^x	69.5a ^x
액체상 방선균 IBT1245 처리군	1.1b	5.2b	60.9b	81.9b	77.2b

^x대조군과 비교할 때 처리군의 값이 p=0.05 범위에서 크게 다른 경우 서로 다른 알파벳 a,b로 나타냄.

[표25]. 방선균 IBT 1245 미생물제제의 고추 역병 제어 활성 재배실험

처 리 구 분	발병율 (%)		식물의 크기 (cm/plant)		고추수 확량 (kg)
	60 일	70 일	60 일	70 일	70 일
대조군 2	2.4a ^x	15.1a ^x	55.3a ^x	80.4a ^x	74.5a ^x
고체상 방선균 IBT1245 처리군	0.6b	3.9b	63.7b	86.2b	82.3b

*대조군과 비교할 때 처리군의 값이 p=0.05 범위에서 크게 다른 경우 서로 다른 알파벳 a,b로 나타냄.

표24과 표25에 나타낸바와 같이 고체배양하여 생산한 방선균 IBT 1245 미생물제제와 액체형 방선균 IBT 1245 미생물제제로 처리한 경우 발병율이 감소하고, 왕성하게 자랐으며 고추 수확량도 증가하였으며 역병제어 활성도 우수하였다.

▶ 최적화된 배양배지 및 대량발효를 통한 액상 및 고체상 미생물제제의 시작품제작

포장에서 방선균 제제의 고추 역병 방제효과를 높일 수 있도록 미생물제제 제작하고, 제형에 따른 처리방법과 처리시기를 고려한 방제효과 검토하였다.

2차년도 연구를 통해 개발된 IBT 1245 대량생산 발효공정을 통한 액상 미생물제제와 상기의 고체배양기술에서 개발된 고체배양 IBT 1245 미생물제제의 고추 역병 방제효과를 검증하기 위하여 제형에 따라 처리방법과 처리시기를 고려하여 포장시험을 진행하였다. 위에서 표에 나타낸 결과와 같이 고체배양을 통해 생산된 IBT 1245

미생물제제와 액체형 IBT 1245 미생물제제 모두 고추 역병방제에 효과적이었다. 고체배양을 통해 생산된 IBT 1245 미생물제제는 고추 종자에 처리하거나 육묘 기간 중에 포트에 처리하고 액체형 IBT 1245 미생물제제 또한 육묘 기간 중에 물에 희석하여 관주처리하여 적절히 사용할 수 있다. 정식 후에는 고체배양을 통해 생산된 IBT 1245 미생물제제와 액체형 IBT 1245 미생물제제를 물에 100배 희석하여 분무처리 하는 방법으로 살포하였다. 이상의 방법에서 제형에 따라 적절히 사용할 수 있는 방법과 시기가 도출되었으며 사용자의 사정이나 재배시기에 따라 적절히 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

▶ *Phytophthora capsici* 제어 방선균 IBT 1245 미생물제제의 등록

IBT 1245는 1~3차 년도의 연구 결과를 토대로 본 연구과제의 최종목표인 *Phytophthora capsici* 제어 방선균 IBT 1245 미생물제제의 상용화를 위하여 미생물제제 등록을 진행하고 있다.

나. *Phytophthora capsici* 제어 항곰팡이 방선균 제제의 제배활성 검증(in vivo) - 충북대학교

1. 3차 연도 개발내용 및 개발범위

1). 개발목표

선발된 방선균의 대량배양 및 효과와 저장성 등 여러 면에서 가장 성능이 우수한 미생물제제 제형의 선발하여 농민들에게 공급할 수 있는 시간을 최대한 단축한다.

2). 개발내용 및 범위

고품질의 제품을싼 값에 공급하기 위하여 선발한 방선균을 대량배양할 방법을 찾으며, 사용상의 편리를 위하여 가능한 한 오랫동안 저장할 수 있도록 저장성을 향상시키는 제형을 선발한다.

▶ 최적 제형의 선발 : 여러 가지 제형의 미생물제들 중 배양 시간의 단축과 대량 배양성, 접종력, 특히 무엇보다도 상온에서의 저장성을 향상시킨 제형의 미생물제를 선발한다.

대상병원균인 역병균을 계대 배양하는 한편 고추 포장을 정리하고 고추 묘를 구입하여 주관연구기관으로부터 미생물제를 공급받아 미생물제제를 처리한다.

3). 개발기술의 평가방법 및 평가항목

선발된 제형의 미생물제제 생산단가를 비교하며, 미생물제제를 일정 기간씩 상온에 보관한 뒤 고추에 접종하여 병 발생상황을 대조구(방선균 무처리구)와 비교, 효과 지속기간을 판단한다.

2. 연구수행 방법

1). 고추 역병 균주의 수집

1998년, 1999년, 2000년도 시험에 사용하였던 균주는 1998년 여름에 고추 역병이 심하게 발병하였던 충북 괴산군 감물면 도로변의 고추 포장에서 채집한 병든 고추 식물체의 지체부에서 분리한 것이었다. 채집한 식물체는 실험실 내에서 일반 관행에 따라 분리하였으며, 배지 상에서 자라는 콜로니의 특성과 그 위에 만들어진 유주 포자낭의 모양 등의 특성, 고추에 대한 병원성 등에 기초하여 고추 역병균 *Phytophthora capsici*로 동정하였다. 균주의 병원성 검정은 본잎이 7-8장 나 있는 어린 고추 모의 아랫부분 줄기에 불꽃 소독한 칼로 가벼운 상처를 낸 뒤, 그 상처에 멸균한 솜을 붙이고 분리균의 유주 포자낭 현탁액을 일정량씩 적셔주고 나서 일정 기간이 지난 다음에 접종 부위 줄기의 변색 및 변형으로 판단하였다. 분리된 균주는 감자한천배지(PDA: potato dextrose agar) 또는 오토밀배지(OA: oatmeal agar)에 계대배양하여 보관 균주를 유지하였다. 계대 배양은 일정한 간격 없이 균의 성장정도를 보아가며 새로운 배지에 옮겨 지속하였으며, 20℃ 정도에 보관하였다. 보관 균주가 계대 배양 과정에서 병원성을 잃어버리는 것을 막기 위하여 계대 배양 4-5세대마다 한번씩 포트에서 자라는 고추 식물체에 접종하여 병을 유발한 뒤 거기서 다시 균을 분리하고 보관하였다. 이 균주는 2000년 겨울에 실험실에서 보관 균주로 유지하던 중 활력을 잃고 도태되어 더 이상 사용하지 않고, 2001년에는 농업과학기술원의

지형진 박사님으로부터 병원성이 강한 고추 역병 균주를 분양받아 이를 위와 같은 방법으로 계대 배양하면서 사용하였다.

2). 고추 역병균의 증식 및 접종

고추에 접종하기 위한 균의 증식은 배지에서 배양하는 방법과 호박에서 유주 포자낭을 형성시키는 방법 등 두 가지 방법을 사용하였다. 일반적으로 온실 실험 등 접종원의 양이 많이 필요하지 않을 때는 *P. capsici*를 오토밀배지에서 배양하였는데, 배지에 균사 조각을 올려놓은 뒤 20℃ 항온기에서 약 7일간 배양하였으며, 균총이 배지를 완전히 덮도록 자란 뒤에 실험실 내로 옮겨서 각 plate 마다 균총이 완전히 잠기도록 살균수를 부어서 24 시간 이상 방치하여 유주 포자낭의 형성을 유도하였다. 고추에 접종할 때는 plate에 증류수를 일정량씩 부어서 가볍게 긁어내어 유주 포자낭 현탁액을 만들었으며, 현미경으로 관찰하여 유주 포자의 밀도가 10^4 - 10^5 /ml 정도 되도록 증류수로 희석하여 사용하였다.

고추 포장에 접종하기 위하여 많은 양의 접종원이 필요할 때는 배지보다는 호박을 사용하였다. 시중에서 25-30cm 정도 되는 호박을 구입하여 70% ethyl alcohol로 표면 소독한 다음 길이 방향으로 칼집을 내고, 그 틈에 균사조각들을 집어넣었다. 균을 접종한 호박은 비닐 봉투에 넣고 봉투의 입구를 묶어서 습도가 유지되도록 하였으며, 실온에 2-3일간 방치하였다. 접종한 부위를 중심으로 *P. capsici*의 균사가 피어나고 호박을 덮기 시작하면 호박을 통째로 갈아서 증류수로 희석한 다음 희석액을 고추에 접종하였다.

온실 시험에서 접종할 때는 고추가 자라고 있는 tray에 유주 포자 현탁액을 주당 50ml 씩 뿌리 들레에 관주하였으며, 포장의 고추에 접종할 때는 고추 줄기 바로 옆의 땅을 손가락으로 파낸 다음 거기에 유주 포자 현탁액을 30ml 씩 붓고 다시 흙을 덮었다.

3). 첨가제의 효과

주관연구기관에서 미생물제제의 최적제형을 고정하여 생산하였으므로, 본 위탁연구에서는 특별한 첨가제에 대한 시험은 하지 않았으며, 처리시의 첨가제로서 농가에서 많이 사용하고 있는 흑설탕의 효과를 검정하였다. 미생물제제를 처리하기 위하여 물로 희석한 다음, 희석 액 20L 당 흑설탕 5, 10, 20g을 첨가하여 고추에 처리한 다음 병 방제효과를 검정하였다.

고추는 지름 15cm의 포트에서 자라고 있는 본 잎 4-5장 정도의 어린모를 이용하였으며, 100배로 희석한 미생물제제에 상기의 농도대로 흑설탕을 첨가한 것을 고추 한 주당 50ml 씩 식물체 전체에 분무하여, 잎과 줄기에는 물론 토양에도 스며들도록 하였다. 미생물제제 처리는 4회 하였으며, 2회 처리 3일 뒤에 고추의 뿌리에 상처를 내고 *P. capsici* 유주 포자 현탁액(10^4 - 10^5 zoosporangia/ml)을 토양에 부어 주었다. 발병 여부 조사는 4회 처리가 끝나고 10일 뒤에 하였다. 처리 당 고추 5주, 즉 5포트씩 조사하였다.

4). 온실에서 미생물제제의 역병 방제가 검정

① 역병 방제가 검정

유리 온실 내에서 49공 연결포트에 각 포트당 1립씩 고추씨를 파종하여 육묘한 뒤 본 잎이 3-4장 나왔을 때 30x45 cm의 트레이에 트레이당 8주씩 고추 모를 옮겨 심었다. 고추의 본 잎이 7-8장 되었을 때부터 주관기관으로부터 공급받은 미생물제제를 100배와 200배로 희석하여 트레이당 1리터씩 10일 간격으로 4회 토양에 관주하였다. 미생물제제 1회 처리가 끝난 뒤 3일 째 트레이에 물을 충분히 준 상태에서 포트 내의 뿌리에 상처를 주고, 위와 같은 방법으로 in vitro 에서 배양한 *Phytophthora capsici*의 유주 포자낭 현탁액(10^4-10^5 zoosporangia/ml)을 트레이당 80ml 씩 뿌리 근처에 관주하여 발병을 유도하였다.

이병 정도 조사는 미생물제제 4회 처리가 끝난 뒤 10일 만에 조사하였으며, 이병주 수를 기준으로 방제가를 구하였다. 또한, 이병주 수 조사가 끝난 뒤 각 트레이의 토양을 트레이 당 3-4군데에서 모두 50cc 씩 채취하여 5배 량의 증류수에 잘 풀은 뒤 전기전도도(EC) 값을 측정하였다.

효과를 비교하기 위한 대조약제로는 농촌진흥청의 농약시험기준에 따라 메타실동(50%) 1000배액을 사용하였고, 약해 유발 유무 역시 농약시험기준에 따라서 미생물제제 50배 및 100 배액을 어린 고추 모에 처리하여 외관상의 이상을 육안 달관 조사하였다. 각 처리 당 3 트레이씩 조사하였다.

② 역병 예방효과 검정

미생물제제가 역병을 예방하는 효과를 검정하기 위하여 위의 '역병 방제가 검정'에서와 같은 방법으로 시험을 수행하였다. 다만, 미생물제제를 4회까지 모두 처리한 다음 날에 위에서와 같은 방법으로 *P. capsici* 유주 포자낭 현탁액을 접종하고, 접종 9일 뒤에 발병주 수를 조사하였다.

③ 역병 치료효과 검정

미생물제제의 역병 치료 효과 역시 *P. capsici* 유주 포자낭의 접종 시기만 다를 뿐, 위의 '역병 방제가 검정'에서와 같은 방법으로 시험을 수행하였다. 이 시험에서는 *P. capsici*가 식물체에 정착하는 시간을 주기 위하여 고추 모에 아무 것도 처리하지 않은 상태에서 *P. capsici* 유주 포자낭 현탁액을 위에서와 같은 방법으로 접종하고, 접종 3일 뒤에 미생물제제 1차 처리를 시작하였다.

5) 포장에서의 미생물제제의 역병 방제효과 검정

① 최적처리법 확립

주관 연구기관에서 공급한 미생물제제를 노지 포장에서 재배하고 있는 고추에 처리하여 방제 효과를 검정하였다. 고추 모는 충북대학교 첨단유리온실에서 키웠으며, 키우는 동안 주관 연구기관에서 설계한 대로 유효기 때부터 미생물

제제를 처리하였으며, 6엽기 정도에 이른 모를 5월 15일에 노지에 정식하여 농가의 관행대로 재배하였다.

미생물제제 처리는 육묘기에 무처리, 그리고 1주 간격으로 1회 처리, 3회 처리, 5회 처리의 4처리가 있었으며, 이들을 노지에 정식한 뒤 다시 각각에 대하여 무처리, 미생물제제 처리, 그리고 멸균미생물제제 처리 등 3처리를 하였다. 따라서, 총 처리구 수는 12처리였으며, 각 처리당 3반복, 1반복당 40주 이상 씩이 되도록 시험구를 설정하였다.

육묘기의 처리에서 미생물제제 처리농도는 100배 희석액으로 고정하였으며, 주당 10 ml 씩 처리하였다. 노지 처리에서도 미생물제제(생균제) 또는 멸균미생물제제의 처리농도는 200배 희석액으로 고정하였으며, 식물체 전체가 흠뻑 젖도록 처리하였다(10 a 당 미생물제제 희석액 150 리터 정도).

포장 시험은 충북 청주시 소재 충북대학교 농과대학 실습농장과 괴산의 일반 농가 포장 등 두 곳에서 수행하였는데, 충북대에서의 미생물제제 처리는 6월 1일부터 시작하였으며, 7월 13일까지 1주 간격으로 7회 처리하고 7월 13일과 20일에 발병주 수를 조사하였다. 괴산 농가에서의 처리는 6월 9일에 처리를 시작하여 8월 5일까지 1주 간격으로 9회 처리하였고, 8월 5일과 12일에 발병주 수를 조사하였다.

방제가 검정은 발병률로써 조사하였는데, 농약시험기준법에 따라서 발병주 수를 전체주 수로 나눈 값을 발병률로 하였다.

② 포장 적용시험

앞 시험의 성적들을 참고로 하여 주관연구기관에서 생산한 미생물제제의 효과를 충북대학교 포장과 일반 충북 청주시 정봉동의 농가 포장 등 두 곳에서 검정하였다.

충북대 농장에는 시중에서 구입한 본 잎 10-12장의 고추 모(품종: 녹광)를 5월 6일에 정식하였으며, 농가포장은 농장주가 식재하여 재배하고 있는 것을 사용하였다(품종: 녹광).

미생물제제는 주관연구기관으로부터 공급받은 것을 냉장고에 보관하며 사용하였으며, 100배 및 200배로 희석하여 고추 4주 당 1리터씩 10일 간격으로 5회, 자동분무기로 엽면 살포하였다. 충북대 포장과 농가 포장 모두 6월 3일에 미생물제제 처리를 처음 시작하였다. 농가포장은 자연 발병에 의존하였으나, 충북대 포장에서는 2차 처리 4일 뒤에 뿌리에 상처를 내고 1×10^4 zoosporangia/ml의 유주 포자낭 현탁액을 고추 주당 약 30 ml 씩 토양에 관주하여 접종하고, 3차 처리 2일 뒤에 똑같은 방법으로 다시 한 번 접종하였다.

효과를 비교하기 위한 대조약제로는 농촌진흥청의 농약시험기준에 따라 메타실동(50%) 1000배액을 사용하였으며, 미생물제제의 효과는 마지막 처리(5회 처리)가 끝난 뒤 10일째에 발병주 수로 조사하였다. 또한, 약해유발 여부 역시 농약시험기준에 따라서 미생물제제 50배 및 100배액을 고추 유묘에 처리하였으며, 외관상의 이상을 육안 달관 조사하였다.

③ 최종 미생물제제의 역병 방제효과 검정

본 시험은 주관연구기관에서 최종적으로 확정하여 생산한 미생물제제의 고추 역병 방제효과를 검정한 것으로서 연구 마지막 연도인 3차년에 충북대학교 농과대학 실습농장과 괴산의 일반 농가 포장에서 수행하였다.

충북대 농장에 정식한 고추 모는 본잎이 10-12장인 프리그묘(품종: 녹광)를 한미 프리그로부터 구입한 것으로서 5월 19일에 정식하였으며, 농가포장은 농장주가 식재하여 재배하고 있는 것을 사용하였다(품종: 마니파). 충북대 포장에 정식한 고추는 정식하기 4일 전에 뿌리 부분을 묘판 제로 미생물제제 50배 희석 액에 약 10분 정도 담그는 방법으로 정식전 미생물제제 처리를 하였다.

포장적용시험에서와 대체로 같은 방법으로 시험을 수행하였으며, 본 시험에서 약간의 변화가 있었던 부분들은 다음과 같다. 충북대 포장은 정식이 늦어서 고추의 초기 생육이 그다지 좋지 않았기 때문에 농가포장보다 2주 늦게 6월 15일에 미생물제제 처리를 처음 시작하였다(농가 포장은 6월 1일에 시작). 또한, 농가포장은 자연 발병에 의존하였으나, 충북대 포장은 올해 처음 농사를 지은 땅으로서 고추 역병균의 밀도가 아주 낮을 것으로 예상하여 1차 처리 4일 뒤에 뿌리에 상처를 내고 1×10^4 zoosporangia/ml의 유주포자낭 현탁액을 고추 주당 약 30ml 씩 토양에 관주하여 접종하였다. 하지만, 봄부터 초여름에 걸쳐서 비가 거의 내리지 않는 등 3차 년도의 기상상황이 병 발생에 매우 부적당하여 1차 접종에도 불구하고 역병 발병상태가 미흡하여, 미생물제제 3차 처리가 끝난 뒤 위 농도의 현탁액을 잎에 분무하는 방법으로 또 다시 접종하였다.

효과를 비교하기 위한 대조약제로는 농촌진흥청의 농약시험기준에 따라 메타실롱(50%) 1000배액을 사용하였으며, 미생물제제의 효과는 마지막 처리(5회 처리)가 끝난 뒤 10일째에 발병주 수로 조사하였다. 또한, 약해유발 여부 역시 농약시험기준에 따라서 미생물제제 50배 및 100배 액을 고추 유묘에 처리하였으며, 외관상의 이상을 육안 달관 조사하였다.

3. 연구수행 결과

1). 첨가제 흑설탕의 효과

흑설탕의 첨가는 농도에 관계없이 미생물제제의 고추 역병 방제효과에 아무런 영향도 미치지 않는 것으로 나타났다. 본 시험에서는 처리 당 조사 주 수가 5주로서 매우 작았기 때문에 현실성 있는 정확한 결과라고는 하기 힘든 것이 사실이지만, 시험 결과에 나타난 경향을 볼 때 흑설탕의 첨가는 방제가에는 영향을 미치지 않았으며, 고추의 성장에도 눈에 띄만한 변화가 나타나지 않았다(표26).

[표26]. 흑설탕 첨가가 미생물제제의 고추역병 방제효과에 미치는 영향

처 리	발병주율(%)	방제가(%)
무 처 리	80	-
미생물제 100배액	40	50
미생물제 100배액 + 흑설탕 0.025%	40	50
미생물제 100배액 + 흑설탕 0.05%	60	25
미생물제 100배액 + 흑설탕 0.1%	40	50

2). 온실에서 역병 방제효과 검정

미생물제제는 역병을 방제하는 효과가 있는 것으로 나타났다(표27). 아무 것도 처리하지 않았던 대조구에서는 전체의 91.7%가 역병 증상을 나타내었는데 비하여, 미생물제제를 100배로 희석하여 처리하였을 때는 44.2%로 약 51.8%의 방제효과를 보였다. 200배 희석 액에서는 방제가가 40.3%로 나타났다. 고추 역병 방제약제로 등록되어 있는 메타실동의 방제가가 약 60%인 것을 감안하면 200배 희석 액의 방제가도 그리 낮은 것은 아니라고 할 수 있다. 미생물제제 100배 희석 액의 경우 대조약제의 87.6%에 가까운 효과를 내고 있어 방제약제로의 개발 가능성이 매우 높다고 하겠다.

약해 시험에서는 어떠한 처리에서도 아무런 이상 증상이 나오지 않았으므로, 본 미생물제제는 고추에 사용하여도 안전한 것으로 판단되며, 본 시험에서 대조약제의 방제가가 낮게 나온 것은 트레이에서 자라고 있는 고추에 *P. capsici* 유주포자 현탁액을 인위적으로 접종하였기 때문인 것으로 생각한다.

[표27]. 미생물제제 처리에 따른 고추 역병 발병주율 및 방제가 (단위: %)

	1반복	2반복	3반복	평균	대조구대비 방제가	대조약제대비 방제가
100배 희석	40.0	52.5	40.0	44.2	51.8	87.6
200배 희석	62.0	51.5	50.5	54.7	40.3	68.2
메타실동 50% (1000배 희석)	25.0	50.0	37.5	37.5	59.1	-
대조구 (수도물 처리)	87.5	100.0	87.5	91.7	-	-

한편, 시험 종료 후 조사한 토양의 전기 전도도는 미생물제제를 처리하지 않은 토양을 포함하여 모든 토양에서 1.3-1.8 ms/cm으로 미생물제제 처리에 따른 변화를 인정하기 힘들었다(표28). 따라서, 미생물제제는 토양의 전기 전도도에는 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.

[표28]. 미생물제제 처리에 따른 토양 전기전도도(ms/cm) 변화

	1반복	2반복	3반복	토양 전기전도도
100배 희석	1.5	1.3	1.9	1.6
200배 희석	1.5	1.2	1.3	1.3
메타실동 50% (1000배 희석)	1.8	2.0	1.7	1.8
대조구 (수도물 처리)	2.0	1.4	1.2	1.5

3). 온실에서서의 예방효과 검증

트레이에 심겨진 고추 모를 대상으로 한 예방효과 시험에서 미생물제제는 방제제로서의 가능성을 보여주고 있었다. 미생물제제나 살균제를 처리하지 않았던 대조구에서는 대부분의 고추가 역병 증상을 보이고 있었던데 비해, 미생물제제 100배액 처리구에서는 약 삼분의 일 정도에서만 병징이 나타나 무처리 대비 60%가 넘는 방제효과를 보이고 있었다(표29). 200배 액 처리구에서의 방제가는 100배 액보다는 약간 떨어지는 48.5% 였으나, 둘 사이에 통계적인 유의차는 보이지 않았다. 한편, 대조약제 처리구에서는 95%라는 높은 방제가를 보였다. 따라서, 대조약제에 대한 미생물제제의 방제가 비율은 최고 64% 정도로서, 고추 역병을 예방하는 효과가 상당히 있는 것으로 나타났다.

[표29]. 미생물제제 처리에 따른 고추 역병 예방효과

	1반복	2반복	3반복	평균	대조구대비 방제가(%)	대조약제대비 방제가(%)
100배 희석	26.1	38.7	34.5	33.1 b	60.9	64.1
200배 희석	42.8	38.7	55.3	43.6 b	48.5	51.1
메타실동 50% (1000배 희석)	8.3	0	4.2	4.2 c	95.0	—
대조구 (수도물 처리)	83.3	95.8	75.0	84.7 a	—	—

* 역병균 접종: 미생물제제 4차 처리 종료 24시간 뒤

4). 온실에서서의 치료효과 검정

미생물제제의 처리가 고추 역병의 예방에 효과를 보여 준 반면, 역병 균을 먼저 접종하고 미생물제제를 처리하였던 처리구에서는 무처리구에 비하여 큰 차이가 나지 않고 거의 모든 고추들이 역병 증상을 나타내고 말라죽었다. 미생물제제 100배 액 처리구에서는 총 72주 중 7주 만이 살아남았으며, 200배 희석 액 처리 구에서는 총 72주 중 8주 만이 살아남았다. 무처리 구에서는 1주를 제외하고는 모든 고추가 역병에 감염되어 죽었던 반면, 대조약제 처리구에서는 80% 정도의 방제가를 보여주었다(표30). 따라서, 미생물제제는 고추가 역병 균에 감염되기 전에 사용하여야 효과를 얻을 수 있으며, 고추가 이미 감염된 뒤에 사용한다면 아무런 방제효과도 기대할 수 없을 것으로 보인다.

[표30]. 미생물제제 처리에 따른 고추 역병 치료효과

	1반복	2반복	3반복	평균	대조구대비 방제가(%)	대조약제대비 방제가(%)
100배 희석	95.8	83.3	91.7	90.3 a	8.4	10.5
200배 희석	87.5	95.8	83.3	88.9 a	9.8	12.2
메타실동 50% (1000배 희석)	12.5	25.0	20.8	19.4 b	80.3	-
대조구 (수도물 처리)	100.0	95.8	100.0	98.6 a	-	-

* 역병균 접종: 미생물제제 1차 처리 시작 3일 전

5). 미생물제제의 최적 처리법 확립

온실 내에서 어린 고추 모를 육성할 때부터 미생물제제를 사용한 결과, 미생물제제 처리구의 고추는 처리하지 않은 고추들에 비하여 생육상태(초장 및 엽색)가 눈에 띄게 좋았으며, 이러한 현상은 미생물제제의 처리 횟수가 많을수록 뚜렷하였다. 따라서, 이 미생물제제는 고추의 초기 생육에도 도움을 주는 것으로 보이므로, 고추 역병 방제 효과와 아울러 식물체의 생육 증진에 대한 효과도 검토해 볼 필요가 있을 것으로 생각한다.

정식 전부터 여러 가지 방법으로 미생물제제를 처리하여 고추 역병의 발생을 조사한 결과, 미생물제제(생균제) 처리구는 대체로 무처리구에서의 발병률에 비하여 80% 내외의 방제가를 보여 효과가 우수한 것으로 나타났으며, 평균 미생물제제 처리구 등 다른 처리구에서의 효과는 다소 떨어졌다(표31, 표32). 따라서, 균의 밀도 및 처리 시 희석배수 등을 조절한다면 더 높은 방제가를 보이도록 개량할 수 있을 것으로 생각한다.

충북대 포장에서 가장 높은 방제가를 보이는 것은 유폐기에 미생물제제를 처리하지 않고 포장에 정식한 이후에 미생물 생균제를 처리하였던 처리 구였으며, 유폐 상태에서 미생물제제를 3회 또는 5회 처리하였던 고추에서도 역병 발생이 적었다(표31).

[표31]. 미생물제제 처리 조합에 따른 고추 역병 방제가 (충북대 포장)

처 리 구		발병주율(1차조사)				발병주율(2차조사)				방 제 가
정식후	유묘기	1반복	2반복	3반복	평 균	1반복	2반복	3반복	평 균	
무처리	0	50.0	81.1	27.8	53.0	53.3	81.1	30.6	55.0	-
무처리	1	77.4	70.0	11.1	52.8	77.4	76.7	22.2	58.8	0
무처리	3	28.6	33.3	21.6	27.8	31.3	36.8	24.3	30.8	44.0
무처리	5	16.2	23.7	27.8	22.6	21.6	26.3	30.6	26.2	52.4
생균제	0	11.8	10.0	5.7	9.2	14.7	17.5	11.4	14.5	73.6
생균제	1	16.2	13.9	15.6	15.2	27.0	19.4	26.7	24.4	55.6
생균제	3	13.9	18.9	10.0	14.3	19.4	24.3	15.0	19.6	64.4
생균제	5	18.9	13.2	12.2	14.8	27.0	21.1	14.6	20.9	62.0
멸균액	0	8.1	32.4	22.5	21.0	10.8	40.5	30.0	27.1	50.7
멸균액	1	19.4	31.6	29.4	26.8	22.2	42.1	38.2	34.2	37.8
멸균액	3	21.6	9.3	7.1	12.7	32.4	18.6	7.1	19.4	64.7
멸균액	5	16.2	24.3	16.7	19.1	21.6	27.0	25.0	24.5	55.5

일반 농가 포장에서도 가장 좋은 방제가를 보이는 것은 유묘기 때는 미생물제제를 처리하지 않고 포장에 정식한 이후에 미생물 생균제를 처리한 처리 구였다(표32). 여기서는 유묘기에 미생물을 처리하였던 고추들과 그렇지 않은 고추들 사이에서 별다른 차이를 느낄 수 없었다.

[표32]. 미생물제제 처리 조합에 따른 고추 역병 방제가 (일반 농가 포장)

처 리 구		1 차 조 사				2 차 조 사				방 제 가
정식후 육묘기		1반복	2반복	3반복	평 균	1반복	2반복	3반복	평 균	
무처리	0	60.0	63.3	48.4	57.2	60.0	70.0	61.3	63.8	-
무처리	1	53.3	43.3	54.8	50.5	70.0	66.7	64.5	67.1	0
무처리	3	43.3	48.5	46.7	46.2	53.3	57.6	66.7	59.2	7.2
무처리	5	46.7	53.1	46.9	48.9	70.0	56.3	56.3	60.8	4.7
생균제	0	22.6	13.3	5.7	13.9	32.3	26.7	5.7	21.5	66.3
생균제	1	20.6	11.1	18.2	16.6	32.4	25.0	33.3	30.2	52.7
생균제	3	16.7	18.9	27.8	21.1	22.2	24.3	36.1	27.6	56.7
생균제	5	29.7	35.3	20.0	28.3	35.1	38.2	26.7	33.3	47.8
멸균액	0	31.3	24.3	27.0	27.5	43.8	29.7	37.8	37.1	41.8
멸균액	1	15.2	21.1	25.0	20.4	36.4	21.1	31.3	29.6	53.6
멸균액	3	44.4	20.0	23.3	29.3	50.0	30.0	26.7	35.6	44.2
멸균액	5	25.8	37.5	18.8	27.4	32.3	46.9	31.3	36.8	42.3

일반적으로 중복대 포장이 농가 포장보다는 더 높은 방제가를 보이고 있었으나, 두 지역의 시험에서 나타나는 경향은 비슷하였다. 정식 후 무처리 구에서의 방제가가 가장 낮았으며, 미생물 생균제의 방제가가 가장 높았다. 멸균한 미생물제제를 처리하였을 때도 미생물 생균제 처리의 약 60-70% 정도의 효과가 난다는 것은 본 미생물의 고추 역병 억제효과가 미생물 자신의 길항 작용보다도 미생물이 생산하는 물질에 의한 것이라는 것을 의미한다고 볼

수 있다.

한편, 정식하기 전 유포기에서의 미생물 생균제 처리는 실제 포장에 정식한 이후에 고추 역병의 발생률에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타나, 본 미생물제제를 사용할 때 묘상에서는 한 두 번의 처리로 충분할 것으로 생각한다. 실제로 묘상에서의 처리보다는 실제로 포장에 나간 이후에 성체에 처리하는 횟수와 농도가 더 중요할 것이다.

6). 포장적용시험

연구 2년 차에 충북대 포장에서 시험한 결과는 1차년도 ‘최적 처리법 확립’에서의 결과보다는 떨어지는 방제가를 보였다(표33). 반면에 대조약제인 메타실동은 80%를 넘는 방제가를 보였으며, 무처리 구에서의 발병률도 36%를 웃돌았다.

[표33]. 미생물제제 처리에 따른 고추역병 발병주율 및 방제가
(충북대포장, 단위: %)

	1반복	2반복	3반복	평균	무처리대비 방제가	대조약제대비 방제가
100배 희석	24.1	22.2	29.7	25.3 b	30.9	37.1
200배 희석	27.3	21.5	27.3	25.4 b	30.6	36.7
메타실동 50% (1000배 희석액)	8.3	3.2	6.7	6.1 c	83.3	-
무처리(대조구)	37.4	41.6	30.7	36.6 a	-	-

농가(표34)에서는 충북대 포장보다 무처리 구에서는 더 발병하였으며, 대조약제의 방제가는 조금 낮았는데, 이는 아마도 병이 너무 심하게 발생하였기 때문이 아닌가 생각한다.

충북대 포장과 농가 포장 모두, 환경 조건 등 여러 가지 시험여건들은 성적을 인정하기에 충분하였다고 생각하는 바, 본 연구에 사용한 미생물제의 효과가 다소 떨어지는 것으로 생각된다. 한편, 포장에 처리한 배량을 유묘에 처리하였을 때도 아무런 약해 증상도 나타나지 않아 식물에 미치는 해는 없다고 할 수 있다.

[표34]. 미생물제제 처리에 따른 고추 역병 발병주율 및 방제가
(농가포장,단위: %)

	1반복	2반복	3반복	평균	무처리대비 방제가	대조약제대비 방제가
100배 희석	21.9	27.1	26.1	25	40.3	55.0
200배 희석	26.8	29.0	27.0	27.6	34.1	46.5
메타실동 50% (1000배 희석액)	10.4	8.5	14.6	11.2	73.3	-
무처리(대조구)	45.8	42.6	37.2	41.9	-	-

7). 최종 미생물제제의 역병 방제효과 검정

주관 연구기관에서 최종적으로 개발한 시제품을 노지 재배 고추에 처리하여 방제효과를 확인한 결과 충북대 포장과 일반 농가 포장 사이에 큰 차이가 있었으나, 미생물제제 100 배액의 방제가는 대조약제 방제가의 40% 이상으로 미생물농약으로 사용 가능한 수준이었다.

충북대 포장에서 수행한 시험에서는 아주 뛰어난 방제효과를 보이고 있었다 (표35). 미생물제제 100배 희석 액은 무처리구 대비 65%라는 매우 높은 방제가를 나타냈으며, 200 배액도 50%의 방제가를 기록하였다. 이러한 방제가는 대조약제 방제가의 각각 82%와 63%에 이르는 것으로서, 고추 역병 방제용 미생물제제로 충분히 사용할 수 있다. 특히, 이 시험의 초기에는 날씨가

가물어서 병이 안 났었기 때문에 두 번에 걸친 병원균 접종, 그리고 병 발생을 유도하기 위한 인위적 관수 등의 요인으로 인하여 후기에는 병이 다 발하여 무처리 구에서 64% 발병이라는 높은 발병주율을 기록한 가운데 얻은 결과이기 때문에 그 효과는 상당한 신뢰성을 가지고 있는 것이라고 할 수 있다.

[표35]. 미생물제제 처리에 따른 고추 역병 발병주율 및 방제가
(충북대 포장, 단위: %)

	1반복	2반복	3반복	평균	무처리대비 방제가	대조약제대비 방제가
100배 희석	16.5	24.2	27.1	22.6 b	64.8	82.2
200배 희석	31.2	35.9	29.4	32.2 b	49.9	63.2
메타실동 50% (1000배 희석액)	7.4	20.7	12.4	13.5 c	79.0	-
무처리(대조구)	53.4	72.8	66.7	64.3 a	-	-

그러나, 농가 포장에서 수행하였던 시험의 결과는 충북대 포장에서 얻은 결과에는 못 미치는 것이었다. 이 시험에서는 전체적으로 병 발생이 그리 많지 않았으며, 무처리 구에서 약 20% 수준에 머물렀다. 미생물제제 100배 액처리 구에서는 방제가가 40%에는 미치지 못하였으나, 대조약제 방제가의 40%는 넘고 있어서(표36), 이 시험에서도 어느 정도의 효과는 보여주고 있는 것이라고 할 수 있겠다.

농가 포장은 고추가 정식되어 있는 상태에서부터 시작하였기 때문에 실제로 충북대 포장에서의 시험보다는 미생물제제 처리가 적었다. 그러나, 이러한 차이가 방제가의 차이로 이어졌다고 말하기는 힘들며, 다만, 미생물제제의 효과가 병원체는 물론, 주변 환경 요인의 영향에 따라 변이가 심하다는 것으로 해석하는 것이 더 바람직할 것으로 생각한다.

[표36]. 미생물제제 처리에 따른 고추 역병 발병주율 및 방제가
(농가포장, 단위: %)

	1반복	2반복	3반복	평균	무처리대비 방제가	대조약제대비 방제가
100배 희석	13.5	14.2	9.3	12.3 b	36.3	42.5
200배 희석	12.3	16.6	18.4	15.8 b	18.1	20.1
메타실동 50% (1000배 희석액)	3.3	0	5.0	2.8 c	85.5	—
무처리(대조구)	17.4	14.8	25.7	19.3 a	—	—

4. 결 론

3년에 걸친 연구에서 주관기관에서 제공해 준 미생물제제는 기주식물인 고추에 전혀 해가 없는 것이었으며, 최종적으로 선발한 미생물제제(3차년도 시험분)은 포장에서의 방제효과가 수준 이상이었던 것을 감안할 때, 제품으로 개발 가능하다고 생각한다. 특히, 이 미생물제제를 유묘기에 처리하였을 때는 고추의 생육이 증진되었다는 것을 감안할 때, 이 미생물제제의 처리를 유묘기 때부터 시작한다면 고추의 생육에도 도움이 될 뿐만 아니라, 포장에 정식된 이후에 역병 발생을 억제하는 효과도 볼 수 있을 것이므로, 본 제품의 사용법은 50배 액을 유묘기에 1-2회 사용하고, 정식 이후 늦어도 6월 초부터 시작하여 8월 초순까지 지속적으로 사용하는 것이 바람직할 것이다.

다. *Phytophthora capsici* 제어 항곰팡이 방선균 제제의 상용화를 위한 대량 생산 기술 및 품질관리 기법의 개발 - 한국에너지기술연구원

1. 3차 연도 개발내용 및 개발범위

1). 개발목표

미생물제제의 가공기술의 개발과 품질관리 기술의 확립

2). 개발내용 및 범위

▶ 미생물 균체와 배양액의 분리 공정

2차 연도 연구결과 최적화한 대량생산 발효공정을 통해 대량생산한 IBT 1245를 배양액으로부터 분리하는 경제적이고 현실적인 공정을 개발하기 위하여 원심분리와 막분리 공정을 고려하였으며 경제적인 측면과 가동상의 현실적인 산업여건을 고려하여 막분리 공정을 이용한 균체 분리를 위하여 막의 여과 면적, 유량의 속도 및 압력, 유량의 온도등의 인자들을 고려하여 막분리에 따른 IBT 1245의 회수 공정 최적화를 진행하였다.

아래 표37에 나타낸바와 같이 막분리 최적화 공정연구를 통해 IBT 1245는 처음 1시간은 55리터의 세포배양액을 처리하였으며 시간이 지남에 따라 세포배양액의 농축과 막 분리 공정의 수율이 조금씩 감소되어 2시간에는 84리터의 세포배양액을 처리하였다. 세포배양액을 90%까지 농축하여 IBT 1245 세포를 회수하는 데에는 약 2시간 10분이 소요되었다. 본 연구에서 수행한 최적조건에서 막 분리 공정의 처리 면적을 생산용량 규모로 scale up 하면 막 분리 수율을 크게 감소시키지 않는 범위에서 IBT 1245를 효율적으로 막 분리 공정을 통해 회수할 수 있음을 확인하였다.

[표37]. 막 분리 공정에 따른 IBT 1245의 회수

Time (min.)	Pump (Hz)	Amp (inch)	Freq (Hz)	P _F (Psi)	P _R (Psi)	P _P (Psi)	T _M P (Psi)	T _P (℃)	F _R (L/min.)	F _P (L/min.)	Flux (LMH)	ΣF _P (L)	VCF (L)
1	85	0.7	53	30	30	0	30	9	7	0.8	99	3	1
10	85	0.7	53	30	30	0	30	9	7	0.8	60	11	1
20	85	0.7	53	30	30	0	30	9	8	0.8	54	31	1
30	85	0.7	53	30	30	0	30	9	8	0.8	54	38	1
40	85	0.7	53	30	30	0	30	9	8	0.8	54	43	1
50	85	0.7	53	30	30	0	30	11	8	0.8	54	52	2
60	85	0.7	53	30	30	0	30	12	8	0.8	54	55	2
70	85	0.7	53	30	30	0	30	13	9	0.8	54	61	2
80	85	0.7	53	30	30	0	30	15	9	0.8	54	71	3
90	83	0.7	53	30	30	0	30	16	9	0.8	54	76	4
100	81	0.7	53	30	30	0	30	17	10	0.7	46	79	4
110	78	0.7	53	30	30	0	30	19	11	0.7	46	82	5
120	74	0.7	53	30	30	0	30	20	11	0.6	36	84	6
130	69	0.7	53	30	30	0	30	21	10	0.5	25	90	10

(주석) Pump(Hz) : pump speed. Amp.(inch) : 막의 진폭.

PF(Psi) : Feeding 압력. PR(Psi) : Recycle 압력.

PP(Psi) : Permeate 압력. TMP(Psi) : 막압력. TP(℃) : Feed 온도.

FR(L/min.) : Recycle 양. FP(L/min.) : Permeate 양.

Flux(LMH) : 단위 막 면적당 처리되는 용량. ΣFP(L) : 처리한 시료량. VCF : 농축된 시료량.

▶ 장기보관 유지, 제품포장 및 보관방법의 검증

전년도에 개발한 대량생산 발효공정을 통해 생산한 IBT 1245를 막분리 공정을 통해 회수한 후 회수된 IBT 1245를 안정화 할 수 있도록 안정화 매체에 도입한 후 냉동건조하여 제품성과 안정성 및 보관방법을 도출하였다.

▶ 대량생산 생물 발효공정을 통해 생산된 방선균 IBT 1245 세포를 위에서 기술한 막 분리 공정을 통하여 농축 회수한 IBT 1245는 주관기관에서 개발한 톱밥, 밀기울, 키틴, 콘파우더로 구성하는 조성물에 도입하여 분말상의 미생물제제를 제조하였다. 즉 회수한 IBT 1245는 톱밥 50 중량%, 밀기울 45 중량%, 키틴 1 중량%, 콘 파우더 4 중량%의 조성물과 톱밥 45 중량%, 밀기울 45 중량%, 키틴 2 중량%, 콘 파우더 8 중량%의 조성물에 각각 현탁한 후 -70°C 에서 급냉하여 냉동시킨 후 각각 냉동건조 하였다. 냉동 건조시 냉동선반의 온도가 30°C 인 상태를 유지하여 온도변화에 따른 생균의 활성이 변화되는 것을 예방하였다. 냉동 건조한 후 생산된 분말상 미생물제제 IBT 1245의 안정성을 조사하였다. IBT 1245의 안정성은 미생물제제에 존재하는 IBT 1245의 세포수로 조사하였다. 세포수는 조성물 단위 g에 대해 cfu (colony forming unit, 콜로니 형성단위)로 나타내었으며 상온에서 시간이 지남에 따른 세포수의 변화를 조사하였다. 세포수 조사는 시료 1g을 취하여 멸균 증류수 9ml에 현탁 한 후 연속희석 및 도말법으로 TSA 배지상에서 단위 g당의 콜로니 형성 단위를 측정하여 조사하였다.

[표38]. 미생물제제의 활성 안정도 조사

구 분	툽밥	밀기울	키티	콘파우더	IBT 1245의 초기세포수 (cfu/g)	6개월 후 IBT 1245의 세포수 (cfu/g)		생존세포의 재생장정도
						4℃ 저장	25℃ 저장	
실험군 3	45	45	2	8	1.7×10^7	1.2×10^6	5.9×10^5	양호
실험군 4	50	45	1	4	1.9×10^7	1.3×10^6	6.1×10^5	양호

표38에 나타낸바 와같이 냉동건조한 분말상 미생물제제 IBT 1245는 미생물 활성이 안정하게 유지되었으며 상온저장능력도 크게 향상되어 미생물제제의 IBT 1245 활성 세포수가 6개월 후에도 미생물제제로서의 역가를 나타내는데 필요한 10^5 cfu/g 이상으로 유지하였다.

제4장. Discussion

Phytophthora capsici 제어 활성이 우수한 방선균 IBT 1245를 선발하고 생물 발효공정의 최적화를 통해 10^7-10^8 cfu/ml의 활성 생균을 대량생산하는 공정을 개발하였다. IBT 1245의 기본 발효 배지의 조성은 포도당 20 g/L, CSP 3g/L, peptone 3 g/L, KH_2PO_4 1.2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 g/L, NaCl 1.2 g/L, CaCO_3 5 g/L와 미량원소액 1ml/L로 구성되었다. 미량원소의 조성은 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.07 g과 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g 을 증류수 100 ml에 녹인 후 사용하였다. 포도당 20g/L에 CSL 10g/L를 사용하였을 때 세포수가 가장 증가하였고 항균활성도 40%정도 증가하였다(표13).

최적화된 생물발효공정으로 대량생산한 활성 방선균 IBT 1245는 액체형, 분말형의 미생물제제로 제품의 안정성을 제고하였다(표38). 또한 대량생산한 활성 방선균 IBT 1245를 효율적으로 생산할 수 있는 막 분리 공정을 개발함으로써 대량생산 발효공정에서 활성 IBT 1245 균체의 대량회수 공정을 해결하였다(표37). 실제로 개발된 최적공정과 미생물제제 시작품을 이용한 최종 연도 고추 역병 예방 및 방제 포장 재배활성 시험에서 IBT 1245를 원제로 한 미생물제제의 고추역병 제어 방제가가 화학농약 대조약제 방제가 대비 최고 40-82%까지 나타내어 우수한 고추역병 제어활성을 보여주었다(표35). 반면에 미생물제제의 활성이 포장에 따라 고추역병의 발병 정도에 따라 방제가 편차가 발생하는 점을 보완해야 할 것으로 사료된다. 이는 화학농약의 경우에도 상당한 편차가 있는 것을 고려하면 이해를 하는데 어렵지 않을 것으로 판단된다.

본 연구에서 개발한 고추 역병제어 미생물제제는 화학농약과는 달리 약해가 없고 고추의 생장 증진과 증수 효과가 있어 유묘기 사용과 정식후 사용을 병행하면 고추역병예방과 방제 그리고 청정한 고추의 생산에 유효할 것으로 사료된다(표24, 표25).

본 연구는 “*Phytophthora capsici* 제어 항곰팡이 방선균 제제의 개발과 상용화”과제로 최종 연구 목표에 따라 과제의 성공적인 연구 성과를 상용화 할 계획이다.

참 고 문 헌

1. Baker, R. 1968. Mechanisms of biological control of soil-borne pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 6:263-294
2. Bakker, P.A.H.M., P.J. Weisbeek, and B. Schippers. 1988. Siderophore production by plant growth-promoting *Pseudomonads* spp. *J. Plant Nutrition* 11:925-933.
3. Chater, K.F., and D.A. Hopwood. 1983. *Streptomyces* Genetics, p.229-286. *In* *Biology of the Actinomycetes*. M. Goodfellow, M.Mordarski, and S.T. Williams(ed.). Academic Press, London.
4. Chen, W., H.A. Hoitink, A.F. Schmittener, and O.H. Tuovinen. 1988. The role of microbial activity in suppression of damping-off caused by *Phythium*. *Phytopathol.* 78:314-322.
5. Cook, R. J. and K. F. Baker. 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. The American Phythological society. St. Paul, Minnesota. p.39.
6. Fravel D.R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant disease. *Anu. Re. Phytopathol.* 26:75-91

7. Goodfellow, M.S., S.T. Williams, and M. Mordarski. 1984. Introduction to and importance of actinomycetes, p. 1–6. *In* M. Goodfellow, M. Mordarski, and S.T. Williams (ed.), *The biology of actinomycetes*. Academic Press, London.
8. Knauss, J.F. 1976. *In vitro* antagonistic activity of several *Streptomyces* spp. against species of *Phythium* and *Phytophthora*. *Plant Dis. Rep.* 60:846–850.
9. Kraft, J.M., and D.W. Burke. 1971. *Phythium ultimum* as a pathogen of beans and peas in Washington. *Plant Dis. Rep.* 55:1056–1060.
10. Lechevalier, M.P. 1989. Actionmycetes in agriculture and forestry, p.327–358. *In* M. Goodfellow, S.T. Williams, and M. Mordarski (ed.), *Actionmycetes in biotechnology*. Academic Press, New York.
11. Lee, W.H. and A. Ogoshi. 1986. Studies on the seed bacterization of sugar beets. Antibiosis to damping-off pathogens and growth stimulation of sugar beets by rhizoplane bacteria. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 52:175–183.
12. Merriman, P.R., R.D. Price, and K.F. Baker. 1974a. The effect of inoculation of seed with antagonists of *Rhizoctonia solani* on the

- growth of wheat. Austr. J. Agr. Res. 25:213–218.
13. Merriman, P.R., R.D. Price, J.F. Kollmorgen, T. Piggott, and E.H. Ridge. 1974b. Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. Austr. J. Agr. Res. 25:219–226.
 14. Panosyan, A.K., Z.v. Marshavina, R.S. Arutunyan, and S.G. Aslanyan. 1965. The nature of physiologically active substances of actinomycetes and the effect of their metabolites on plant growth. *In* Plant Aerobes Relationships. J. Macura and V. Vancura (ed.). Prague: Czechoslovak Academy of Sciences.
 15. Reddi, G.S., and A.S. Rao. 1971. Antagonism of soil actinomycetes to some soil borne plant pathogenic fungi. Indian Phytopathol. 24:649–657.
 16. Rinivasan, M.C., R.S. Laxman, and M.V. Despharde. 1991. Physiology and nutritional aspects of actinomycetes : an overview. World J. Microbiol. Biotechnol. 7:730–733.
 17. Sardi, P., M. Saracchi, S. Quaroni, B. Petrolini, G.E. Borgonovi, and S. Merli. 1992. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. Appl. Environ. Microbiol. 58:2961–2963.

18. Singh, P.J., and R.S. Mehrotra. 1980. Biologiccal control of *Rhizoctonia bataticola* on grain by coating seed with *Bacillus* and *Streptomyces graminis*. var *tritici* and take-all of wheat. *Austr. J. Agr. Res.* 26:773–782.
19. Singh, P.J., and R.S. Mehrotra. 1980. Biologiccal control of *Rhizoctonia bataticola* on grain by coating seed with *Bacillus* and *Streptomyces* spp. and their influence on plant growth. *Plant and soil* 56:475–483.
20. Suh, H.W. 1992. Production of antifungal compounds by *Pisolithus tinctorius* SMF and *Streptomyces* spp. WYEC 108, and their role in biological control. Ph.D. Dissertation. University of Idaho, Moscow, Idaho, U.S.A.
21. Suslow, T.V. 1982. Role of root colonizing bacteria in plant growth. In *Phytopathogenic Prokaryotes*, ed. M.S. Mount, G.H. Lacy. 1:187–223. London : Academic Press.
22. Sutherland, E.D., and G.C.Papavizas, 1991 Evaluation of oospore hyperparasited for the control of *Phytophthora* croen rot of pepper. *J. Phytopathol.* 131:33–39.
23. Tanii, A., H. Horita and T. Takeuchi. 1988. Biological control of

- scab and black Scurf of potatp plant with seed tuber bacterization.
Plant Protection 42:235–240.
24. Thomashow, L.s., D.M.Welter, R.F. Bonsall and L.S. Pierson. 1990.
Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent
Pseudomonads species in the rhizosphere of wheat. Appl. Evironm.
Microbiol. 56:908–912.
25. Ui. T. 1978. Status and prospect of soilborne disease in Japan.
Plant Protection 32:21–26.
26. Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens
in the rhizosphere with bacteria. Ann. Rev. Phytopathol.
26:379–407
27. Weller, D.M., W.J. Howie, and R.J. Cook. 1988. Relationship
between in vitro inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*
and suppression of take-all of wheat by fluoesent pseudomonads.
Phytopathol 78:1094–1100.