

최 중
연구보고서

청과류 부패방지를 위한
환경친화형 항진균제 개발
Development of Biocontrol Compound
for Decay Prevention of Fruits

고려대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “청과류 부패방지를 위한 환경친화형 항진균제 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 8 월 16 일

주관연구기관명 : 고려대학교
총괄연구책임자 : 이 창 후
연 구 원 : 김 정 선
연 구 원 : 반 수 정
협동연구기관명 : (주)그린바이오텍
협동연구책임자 : 최 기 현
연 구 원 : 김 지 태
연 구 원 : 홍 순 진
연 구 원 : 양 재 성

요 약 문

I. 제 목

청과류 부패방지를 위한 환경친화형 항진균제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

현재 우리나라에서는 청과류 수확후 청색곰팡이병, 녹색곰팡이병, 잿빛곰팡이병 등의 진균류 발생에 의한 과실연화 및 부패로 실제 저장과 유통과정 중에 전체 생산물의 25-80%가 손실되고 있다. 과실의 부패를 방제하기 위한 방법으로는 농약(fungicide)의 처리와 함께 가시광선, UV, X-ray, gamma ray radiation, 열처리, 훈연처리 등이 이용되어 왔다. 그러나, 과실의 부패방지를 위하여 가장 손쉽게 사용하는 농약이 최근에 들어 안정성 문제, 잔류문제, 자연생태계에 미치는 여러 가지 문제, 공해유발 등 유해론이 제기되면서 부정적인 시각이 점차 증대되고 있는 현실이다. 특히, 청과류 수확후에는 부패방지를 위한 농약사용이 금지되어 있으며, 해외 수출시에는 농약을 사용할 경우 잔류농약 검사를 통과하기 어렵다. 현재 사용중인 모든 농약의 사용을 제지할 수 없는 현실로 볼 때 현재의 농약보다 안전하고 부작용이 없는 저독성의 안전한 합성농약과, 또 이들과는 전혀 차원이 다른 미생물을 활용한 생물학적 방제방법이 각국에서 연구되어 많은 제품들이 실용화되기에 이르렀다.

따라서, 본 연구는 환경생태계에 안전하며, 약제저항성 출현이 없고, 농산물의 안전성 및 부존자원을 이용한 저렴한 개발비 등의 강점을 지닌 무독성·환경친화형의 획기적인 청과류 부패방지제 개발을 위하여 시행되었다. 또한 청과류 시장출하 및 저장

중의 과실부패방지를 통한 가격안정 및 고부가가치화로 지역경제 활성화 및 농가소득 증대를 유도하기 위하여 실시되었다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구의 연구개발 최종목표는 국내산 청과류 부패방지를 위한 저비용, 환경친화형 신소재 및 기술 개발이며, 개발 기술 내용은 국내산 청과류 중 대표적 과실인 사과, 배, 포도, 단감의 출하시기별 부패율 10% 미만을 목표로 항진균성 미생물 확보 및 항진균성 미생물 유래의 제제 개발이다.

연구범위는 다음과 같다.

- 1) 청과류 수확후 발생하는 주요 부패 곰팡이에 대하여 검색된 항진균 활성 미생물의 동정, 독성검사 및 배양특성조사
- 2) 선발균주의 청과류 수확후 최고의 부패 억제력을 위한 처리방법 실험 - 수확후 미생물제제에 침지한 후 상온저장 및 저온저장. 당산비변화, 부패억제율 및 선도 유지정도 관찰.
- 3) 청과류 선도유지를 위한 유용 미생물 선발균주의 생산 최적화 및 제제화
- 4) 미생물제제와 키토산 및 칼슘제제의 종류와 농도별 혼용시험
 - Oligo 수용성, glyco 키토산 등을 각각 0.1%, 0.2%로 미생물제제에 혼용, 청과류 부패방지에 가장 효율적인 최적의 키토산 종류 및 농도 선발
 - Calcium chloride, calcium carbonate 등을 각각 1%, 2%로 미생물-키토산 제제에 혼용, 청과류 부패방지에 가장 효율적인 최적의 칼슘 종류 및 농도 선발
 - 처리방법에 따른 과실의 당산비변화, 부패억제율 및 선도 유지정도 관찰 및 저장성의 감소 검토
- 5) 최종적으로 선발된 미생물-키토산-칼슘제제의 대량생산 및 제제화 연구
 - 미생물-키토산-칼슘의 경제적 대량배양배지 선발

- 실험 규모 이상의 생산체계 구축
(수확 및 보관방법 연구)
- 부형제 선택 등 제제화 실험 (액제, 분제 등)

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구과제의 연구결과를 정리하면 다음과 같다.

1) 청과류 부패방지용 제제 처리 기술 개발

본 연구에서 확보한 균주는 *Bacillus* sp.이며 균주들 중에서 청과류 저장중에 발생하는 여러 가지 진균류들에 접종한 결과 가장 항진균성 효과가 뛰어난 strain을 선발하여 GB-019로 명명하였다. GB-019는 청과류 저장중 발생하는 진균류에 매우 뛰어난 길항성을 보여주었으며, 그 효과는 6.3×10^6 cells/ml에서 부터 6.3×10^4 cells/ml 까지 다양하게 나타났다.

청과류 수확후 장기저장을 위한 항진균성 미생물과 PE-film 두께의 최적 조건을 선정한 결과, 사과 ‘후지’는 GB-019 처리 후 PE-film 0.045mm로 packing을 하여 4℃에서 약 84일, 배 ‘신고’는 GB-019 처리 후 PE-film 0.075mm로 packing을 하여 4℃에서 약 90일, 감 ‘부유’는 GB-019 처리 후 PE-film 0.045mm로 packing을 하여 4℃에서 약 60일, 포도 ‘새단’은 GB-019 처리 후 PE-film 0.045mm로 packing을 하여 4℃에서 약 45일 정도를 저장하면 상품성의 저하없이 저장이 가능하였다.

또한, 미생물제제 GB-019 구성시 0.2%의 glyco 키토산과 2% calcium carbonate를 첨가하면 더욱 더 부패방지 효과를 증가할 수 있다.

2) 청과류 부패 방지용 미생물 제제 개발

분리주 strain 19를 전자현미경으로 관찰하면 간균의 형태를 띠고 있었고, 그람염색 결과 그람양성으로 확인되었다. 또한 동정결과 *Bacillus* sp.로 동정되었고, *Bacillus* sp. GB-019로 명명하였다.

길항미생물 *Bacillus* sp. GB-019의 식물 병원균과의 길항효과 검정결과, 잭빛곰팡이병의 원인이 되는 *Botrytis cineria*와 푸른곰팡이병의 원인이 되는 *Penicillium* sp.에 대하여 생육저지효과가 높았으며 그 외의 식물병원균에 대해서 비교적 억제효과를 나타내었다.

항진균활성 미생물들의 대량생산을 위한 배지조성은 균의 성장과 활성 그리고 경제성을 고려하여 질소원으로는 soybean meal을 탄소원으로는 starch를 선정하였다. 또한 RPI 기법을 통한 결과에 따라 지나친 인산염을 배제하고 pH 조절이 가능한 발효조의 이용을 전제로 material balance를 고려하여 보다 단순한 조성을 갖는 생산배지를 고안하였다.

항진균활성을 갖는 미생물 *Bacillus* sp. GB-019의 포자형성 유도를 위하여 금속이온(Mn^{2+})을 배양초기에 첨가하였고 배양중간에 DPA를 첨가함으로써 내생포자의 유도를 검토한 결과 금속이온 10mM 첨가와 DPA 50 μ M를 배양 8시간 후에 첨가함으로써 약 90% 이상의 포자 전환률을 얻었다.

항진균활성을 갖는 미생물 *Bacillus* sp. GB-019의 배양물에 기타 첨가물을 이용하여 액상으로 제제화 할 경우 40℃에서 안정성을 살핀 결과 균수 및 활성에 있어서 어느정도 유지되는 것으로 판단되며 상용화 유통시 약 1년 정도는 안정성에 문제가 없는 것으로 나타났다.

항진균활성을 갖는 미생물 *Bacillus* sp. GB-019의 배양물을 고상으로 제제화 할 경우 부형제의 종류는 lactose를 이용하는 것이 좋은 것으로 보이며 그 함량은 약 10% 수준이 적당한 것으로 나타났다.

SUMMARY (영문 요약문)

The objective of this project was to develop the new storage materials with low cost, nonpoisonous, and environmental affinity for fruits storage. This project was made up 1) development of treatment technology with new materials for long-term storage in apple, pear, persimmon, and grape, 2) and mass production of anti-fungal bacteria and the natural active substance.

The results were follows:

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

- 1) All of *Bacillus* strain GB-019 was showed prominently antagonisms against *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici*, *Colletotricum gloeosporioides*, and *Rhizoctonia solani*. The effects of bacterial concentration had appeared from 6.3×10^6 cells/ml to 6.3×10^4 cells/ml.
- 2) The optimal concentrations of anti-fungal bacteria were determined 6.3×10^6 cells/ml GB-019 strains.
- 3) In PE-film treatment at 4°C after GB-019 dipping, PE-film 0.045mm packing was suitable to apple 'Fuju' during 84 days, PE-film 0.075mm to pear 'Niitaka' during 90 days, PE-film 0.045mm to persimmin 'Fuju' during 60 days, and PE-film 0.045mm to grape 'Sheridan' during 45 days.
- 4) Additional compounds, 0.2% glyco chitosan and 2% calcium carbonate, were risen to prevention of decay rate.

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

- 1) GB-019 strain was bacillus form with the electron microscope observation, gram-positive with gram-staining, and having motional activity. This strain was characterized *Bacillus* sp., and called *Bacillus* sp. GB-019.
- 2) As the results of the antagonism between *Bacillus subtilis* GB-019 and plant pathogens, GB-019 showed the repression effect to *Botrytis cineria*, *Fusarium* sp., and *Penicillium* sp.
- 3) For the mass production of anti-fungal bacteria, we made a selection of soybean meal as N source and starch as C source to the medium.
- 4) In order to the induction of spore formation in *B. subtilis* GB-019, the addition of 10 mM Ca²⁺ was effective in initiation culture. However, it had made observation of bacterial growth suppression with dipicolinic acid (DPA) addition in initiation culture.
- 5) *Bacillus* sp. GB-019 also showed the imperfection by autolysis.
- 6) Granular manufacture was more economical efficiency than liquid in *Bacillus* sp
- 7) Anti-fungal active substances were distributed in and out of bacteria.
- 8) Anti-fungal active substances were comparatively stable in pH and temperature.

CONTENTS

Chapter 1	Summary of Project	1
Chapter 2	The Present State of Domestic and International Development about Project	5
Chapter 3	Project Content and Result	7
	1. Development of treatment technology with new materials for long-term storage in fruits.	7
	2. Mass production of anti-fungal bacteria and the natural active substance	44
Chapter 4	Degree of Achievement and Contribution Related Field	75
Chapter 5	The Plan of Application of Developed Results	76
Chapter 6	International Scientific Information Collection	77
Chapter 7	References	79

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	1
	제1절 연구개발의 목적 및 필요성과 범위	1
제 2 장	국내외 기술개발 현황	5
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	7
	제1절 청과류 부패방지용 제제 처리기술 개발	7
	제2절 청과류 부패방지용 미생물 제제 개발	44
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	75
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	76
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	77
제 7 장	참고문헌	79

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

제 1 항 기술적 측면

원예산물은 수확후 진균류 발생에 의한 부패로 실제 저장과 유통과정 중에 전체 생산물의 25-80%가 손실되고 있는 현실이다. 청과류도 예외는 아니어서 청색곰팡이병(blue mold; *Penicillium italicum*)과 녹색곰팡이병(lemon green mold; *Penicillium digitatum*), 잿빛곰팡이병(gray mold, *Botrytis cineria*) 등으로 인한 저장중 과실 연화 및 부패의 피해가 매우 크다. 과실의 부패를 방제하기 위한 방법으로 농약(fungicide)의 처리와 함께 가시광선, UV, X-ray, gamma ray radiation, 열처리, 훈연처리 등이 이용되어 왔다. 그러나, 편리한 방제수단인 농약이 최근에 들어 안정성 문제, 잔류문제(원예산물, 토양, 환경 등), 자연생태계에 미치는 여러 가지 문제, 공해유발 등 유해론이 제기되면서 부정적인 시각이 점차 증대되는 경향이 있다.

이러한 여러 가지 문제점이 있다 하여도, 현재 사용중인 모든 농약의 사용을 제한할 수 없는 현실로 볼 때 현재의 농약보다 안전하고 부작용이 없는 저독성의 안전한 합성농약과, 또 이들과는 전혀 차원이 다른 미생물을 활용한 생물학적 방제방법이 각국에서 연구되어 많은 제품들이 실용화되기에 이르렀다. 특히, 생물농약은 환경생태계에 안전하며, 약제저항성 출현이 없고, 농산물의 안전성 및 부존자원을 이용한 저렴한 개발비 등으로 볼 때 개발이 반드시 필요하다고 여겨진다. 국내의 입장으로 볼 때 농약을 필수적으로 사용하지 않으면 안 될 상황에서는 자체개발 생물농약이야말로 필요한 자재이고, 외국에서 개발된 것보다는 국내자원을 이용한 생물농약이 국내환경에 잘 적응할 뿐만 아니라 기술적인 측면에서 육성시켜야 할 분야이며, 21세기에 화학농약 대체로 생물농약 사용이 바람직할 것으로 볼 때 실용화 촉진은 필수적인 과제라 생각되어 진다.

따라서, 본 연구과제에서는 청과류 수확후 화학농약 사용을 대체할 수 있는 무독성

환경친화형 신소재 개발을 하고자 하며, 특히, 수확후 진균성 부패가 많이 발생하는 과일류에 적용가능한 범용의 신기술 개발을 병행하려고 한다.

○ 우리나라 과일류의 주요 출하 패턴

- 유통경로 : 생산자 → 도매상 → 소매상 → 소비자의 3단계가 주류를 이루고 있음

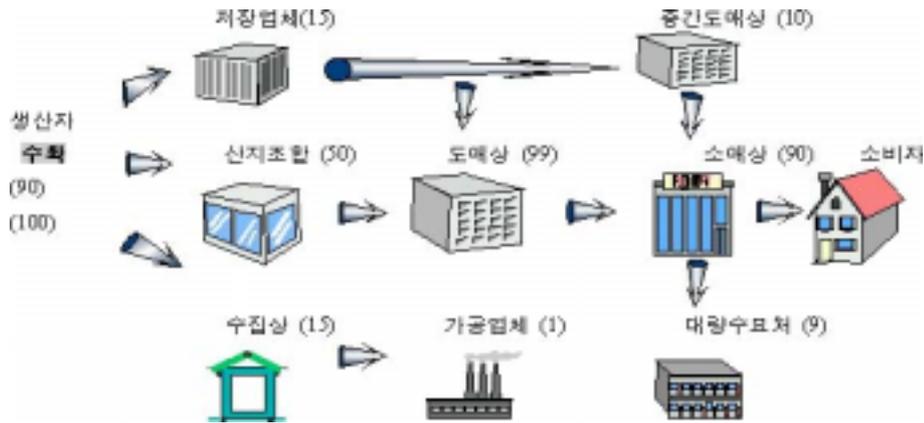


그림 1. 현재 국내산 과일류의 주요 유통 경로

○ 사과·배의 유통

- 수확후 사과 '후지', 배 '신고' 등은 저장력이 높아 성출하기를 피해 저장한 후 출하하며, 저장방법에 따라 상온저장, 저온저장하여 이듬해 여름까지 출하 가능.
- 9, 10, 11월에는 수확하여 바로 출하하며, 1, 2, 3월에 출하하는 것들은 상온저장, 4월부터 다음해 수확기인 8월까지의 저온저장한 것을 출하.
- 가격변동을 보면 이듬해 출하시기전까지 상승세를 보임.
- 그러나, 상온저장시 약 30%가 부패하여 농가소득 감소 및 가격상승요인 발생.
- 저온저장의 경우 막대한 시설비가 투자되고 있어 약 50%의 영세 재배농의 경우 저장을 기피하고 있음.
- 또한, 저장후 유통시 발생하는 진균류병 및 생리적 장애로 인하여 산물의 손실이 큼.
- 따라서, 수확 후부터 저장·유통시 발생하는 곰팡이병류를 제어한다면 농수산물 가격안정 및 연간 농가소득의 안정 유도.

표 1. 사과 '후지'의 월별 가격변동

단위 : 원/10개

연도	1월	2월	3월	4월	5월	6월	7월	8월	9월	10월	11월	12월
1997	8,640	8,636	7,960	8,960	-	-	-	-	12,087	10,000	7,816	11,892
1998	12,273	11,754	13,915	14,758	15,125	17,360	22,538	23,172	19,362	14,433	14,000	14,000
1999	16,438	17,548	22,139	23,000	23,000	20,596	20,462	20,000	20,000	20,000	20,000	20,000

표 2. 배 '신고'의 월별 가격변동

단위 : 원/10개

연도	1월	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1997	20,000	20,000	20,600	22,400	-	-	-	-	30,435	24,423	18,680	19,538
1998	20,000	20,000	20,000	20,000	20,000	20,000	22,292	23,108	20,085	19,088	20,000	20,000
1999	20,667	22,000	26,135	27,920	28,500	34,500	50,000	50,000	40,870	24,808	20,000	20,000

○ 포도의 유통

- 다른 과실류보다 보구력이 낮은 포도는 수확후 바로 출하하는 경향이 강함.
- 포도의 경우 바로 출하를 하더라도, 소매단계에서 과실의 연화 및 곰팡이병으로 인한 부패에 의하여 1% 정도가 폐기됨.
- 포도 만생종인 '새단'의 경우, 11월 이후까지 저장한다 하더라도 저장중의 진균류 발생으로 상품가치가 하락, 가격하락의 원인이 됨.
- 또한, 수입개방화 후 칠레산 포도 및 캘리포니아산 포도들이 거의 1년 내내 유통되고 있으며, 상대적으로 저장성이 약한 국내산 포도들이 11월 이후의 가격경쟁에서 비교하위에 섬.
- 따라서, 현재의 수입개방화에 대처하여 국내산 청과류들의 상품가치 하락 없이 각 과실의 저장 상한선에서 1-2개월 정도만 출하를 연장할 수 있다면 수입량을 대폭 줄여 무역적자 해소에 일익을 담당할 수 있으며, 수출증대, 농가소득보장 및 소비자에게 안정된 공급의 확보가 가능함.

○ 단감의 유통

- 단감 '부유'는 만생종으로서 수확기가 11월 상, 중순경이며 전체 수확량의

15-20% 정도가 저온 저장후 출하

- 단감 저장시 조직의 연화 정도는 저장 온도에 크게 영향을 받아 온도가 높을수록 쉽게 연화되어 상품성이 크게 저하, 장기 저장을 위한 단감의 적정 저장 온도는 $-0.5 \sim 0^{\circ}\text{C}$ 가 최적 온도로 알려져 있음.
- 그러나 단감을 그대로 저장할 경우에는 저장 2개월이 지나면 과실이 연화되면서 증산에 의한 탈수로 상품 가치를 상실. 따라서 단감의 장기 저장에는 폴리에틸렌 봉지(PE film)에 밀봉하여 저온 저장하는데 이는 과실의 호흡에 의해 산소 농도의 감소와 이산화탄소의 증가로 호흡이 억제되고 이에 따라 노화가 지연됨으로써 과실의 저장 수명을 연장시킴.

제 2 항 경제·산업적 측면

맛과 당도에서 우수한 청과류의 재배 및 저장을 확산시킴으로써 지역경제 활성화 및 농민소득을 증대시킬 수 있으며, 수출시 잔류농약검사 및 부패문제를 해결함으로써 수출량 증대를 유도할 수 있다. 또한 저비용의 신소재 공급으로 국내산 청과류 및 관련제품의 가격안정을 유도하고, 우수한 신소재개발을 통한 제품 개발시 관련 제품의 수입억제 및 수출이 가능하다고 보여진다. 그리고, 청과류 수확후 선도유지 향상으로 과실류를 이용한 가공식품 개발 유도로 관련산업 발전에 기여할 수 있다.

제 3 항 사회·문화적 측면

이제까지 사용되고 있는 화학농약이 과학기술원의 발달에 의해 밝혀지지 않았던 독성의 문제점이 점차 밝혀짐에 따라 저독성 혹은 무독성의 안전한 생물농약의 개발 및 실용화는 더욱 촉진될 것으로 생각된다. 특히, 무독성 환경친화형 신소재(항진균활성 미생물의 처리 및 항진균활성 유래의 천연활성제)의 적용을 통한 바른 먹거리 공급으로 국민보건향상에 기여하고, 연간 수천억원에 이르는 부패에 의한 폐기 농산물의 감소로 폐기물 감소 및 처리비용 감소로 생활환경을 개선할 수 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

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

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

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

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

Biocontrol agent에 관한 연구는 미국 농무성, 이탈리아, 호주를 비롯 주요 선진국가에서 그 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 미국 Ecogen社에서는 효모를 이용한 과실류 수확후 장기 선도유지용 미생물 농약 시판하고 있다. 특히, *Bacillus*, *Pseudomonas*속의 세균, *Candida*, *Debaryomyces*속의 효모류를 중심으로한 연구가 활발히 진행중이다.

국내에서는 현재 태동단계로 관련 연구개발실적이 미미한 상태이기는 하나, 주관기관과 협동연구기관이 98년 10월 - 2000년 10월(2년)에 농림기술개발연구과제의 일환으로 현장애로기술개발사업을 수행, '감귤 수확후 장기저장을 위한 신소재 개발'에 항진균성 미생물을 시험적용 결과 감귤 상온저장에 있어서 곰팡이에 의한 부패율이 현저히 감소하는 성과를 확인하여 이를 보고한 바 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 청과류 부패방지용 제제 처리기술 개발

제 1 항 재료 및 방법

1. 청과류 저장중 발생하는 곰팡이에 대한 항진균활성 미생물의 활성 검정 및 최적농도 선발실험

본 연구에서 확보한 균주는 *Bacillus* sp.이며 균주들 중에서 청과류 저장중에 발생하는 여러 가지 진균류들에 접종한 결과 가장 항진균성 효과가 뛰어난 strain을 선발하여 GB-019와 GB-65로 명명하였다.

청과류의 저장중 발생하는 진균류의 분리를 위하여, 청과류를 상온에 두어 과실 표면에 자연적으로 발생한 fungi를 접종침으로 분리하여 Potato Dextrose Agar 배지에 접종한 후 25℃ 항온기에서 3-5일간 배양하였으며, 배양한 fungi는 단일종으로 분리하기 위하여 순수분리하였다(Fig. 1.1, Fig. 1.2).

발생한 fungi 포자는 각각 멸균 filter paper에 묻혀 PDA배지의 가운데 부분에 접종한 후, fungi를 접종한 부위의 둘레에 GB-019와 GB-65의 현탁액에 침지한 멸균 paper를 치상하였다. 균주의 농도는 GB-019 6.3×10^6 , 3.15×10^6 , 6.3×10^5 , 3.15×10^5 , 6.3×10^4 cells/ml로 처리하였다.

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

제 2 항 청과류 수확후 장기저장을 위한 항진균성 미생물과 PE film의 최적 조건 실험

청과류 수확후 장기저장을 위한 항진균성 미생물과 PE-film 두께의 최적 조건을 선발하기 위하여 공시재료로 사과 '후지', 배 '신고', 단감 '부유', 그리고 포도 '새단'을 사용하였다. 저장 온도는 4℃를 기준으로 하였으며, 항진균성 미생물 선발에서 효과가 탁월했던 GB-019 균을 각 과종에 침지처리한 후 0.025, 0.045, 0.075mm의 PE-film을 각각 처리하였다. 사과 '후지'와 배 '신고'는 예비실험의 결과를 토대로 미생물 처리후 각각 0.045mm와 0.075mm의 PE-film을 처리하여 상온에 저장하였다.

PE-film 처리구들은 각 과종별로 4개씩 1단위 포장을 한 후 7반복으로 처리하였으며, 과실의 부패율, 무게 감소율 및 유기산, 당산비의 변화율을 조사하였다. GB-019 균주는 30℃에서 균주를 LB+soluble starch 배지에 24시간 배양한 액(6.3×10⁶ spores/ml)을 사용하였다.

제 3 항 미생물제제와 키토산 종류 및 농도별 혼용시험

항진균성 미생물제제와 키토산의 혼용효과를 알아보기 위한 공시재료로 사과 '후지', 그리고 단감 '부유'를 사용하였다. Oligo chitosan, 식품용 키토산, glyco 키토산 등 3가지 키토산을 각각 0.1%, 0.2%의 농도로 미생물제제에 혼용하여 최적의 농도를 선발하고자 하였다. 저장온도는 각 과종별로 1차년도에서 확인된 최적의 미생물제제 처리 저장온도인 4℃ 조건에 맞추어 저장하였으며, 각 처리구들은 각 과종별로 4개씩 1단위 포장을 한 후 7반복으로 처리한 후, 처리방법에 따른 과실의 당산비변화, 부패억제율 및 자연감모율을 검토하였다.

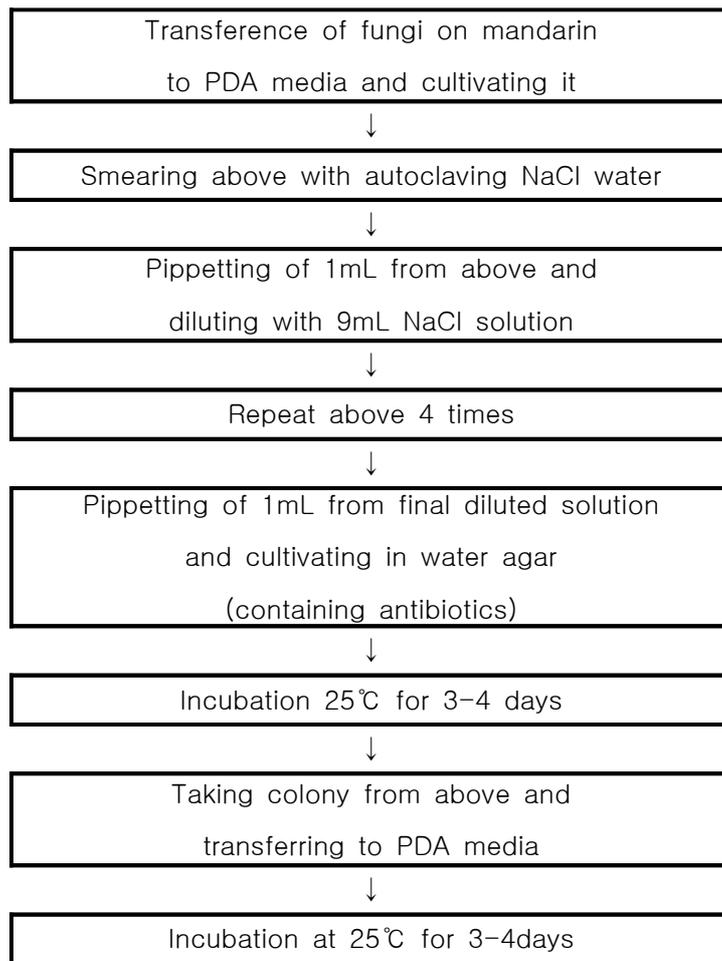


Fig. 1.1. Flow diagram of purification and isolation of fungi applied for the present studies.

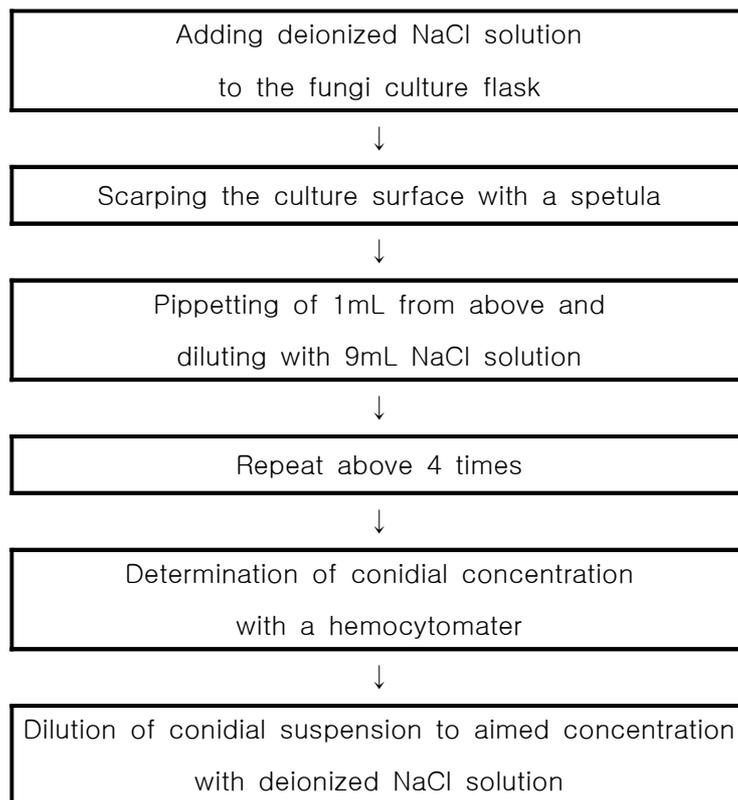


Fig. 1.2. Flow diagram of determination of conidial suspension concentration applied for the present studies (Rohrbach and Pfeiffer, 1976).

제 4 항 미생물-키토산 제제와 칼슘제제의 종류 및 농도별 혼용시험

앞서 실험한 미생물-키토산의 혼용제제 중 효과가 가장 높았던 0.2% glyco chitosan 처리구에 calcium chloride, calcium carbonate 등의 칼슘제제를 농도별로 처리하여 미생물제제의 최대 효과를 알아보기 위하여 본 실험을 수행하였다. 공시재료는 사과 ‘후지’, 배 ‘신고’, 단감 ‘부유’, 그리고 포도 ‘새단’을 사용하였으며, 각각의 칼슘제제를 1%, 2%의 농도로 미생물-키토산 제제에 혼용하였다. 저장온도는 각 과종별로 1차년도에서 확인된 최적의 미생물제제 처리 저장온도 및 MA 조건에 맞추어 저장하였으며, 각 처리구들은 각 과종별로 4개씩 1단위 포장을 한 후 7반복으로 처리한 후, 처리방법에 따른 과실의 당산비변화, 부패억제율 및 자연감모율 등을 검토하였다.

제 2 항 결과 및 고찰

1. 청과류 저장중 발생하는 곰팡이에 대한 항진균활성 미생물의 활성 검정 및 최적농도 선발실험

순수분리된 fungi는 *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici*, *Colletotricum gloeosporioides*, 그리고 *Rhizoctonia solani*가 주종을 이루었다.

이들 fungi 포자를 각각 멸균 filter paper에 묻혀 PDA배지의 가운데 부분에 접종한 결과, GB-019와 GB-65 두 균주 모두 뛰어난 길항성을 보여주었으며, 그 효과는 6.3×10^6 cells/ml에서 부터 6.3×10^4 cells/ml 까지 다양하게 나타났다 (Fig. 1.3, Fig. 1.4).

그러나, GB-65 균주들이 대량배양에 있어서 매우 불안정한 상태를 보였으며, 길항 효과도 GB-019가 더 뛰어나 차 실험에서는 GB-019 균주만을 선택하여 사용하였다.

GB-019의 사용 농도는 대부분의 곰팡이 균들에 뛰어난 길항성을 보이는 6.3×10^6 cells/ml 농도를 사용하기로 결정하여 PE-film 처리구들에 적용하였다.

제 2 항 청과류 수확후 장기저장을 위한 항진균성 미생물과 PE film의 최적 조건 실험

청과류 수확후 장기저장을 위한 항진균성 미생물과 PE-film 두께의 최적 조건을 선 발하기 위하여 공시재료로 사과 '후지', 배 '신고', 단감 '부유', 그리고 포도 '새단'을 사용한 결과, 과종마다 다른 양상을 나타내었다.

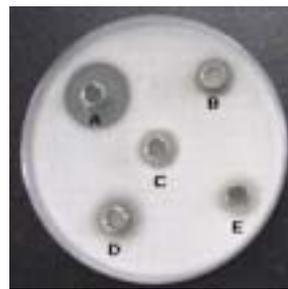
사과 '후지'의 경우, PE-film 처리 후 4℃에서 저온저장을 실시한 결과, 부패율이 84 일까지는 PE-film 0.075mm에서 가장 낮은 부패율을 나타내었으나 112일째에는 PE-film 0.045와 비슷한 양상을 보였으며(Fig. 1.5), 자연감모율은 PE-film 0.045 처리 구에서 가장 낮게 나타났다(Fig. 1.6).



Botrytis cinerea



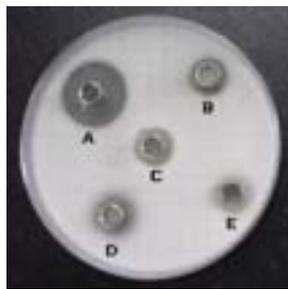
Fusarium oxysporum



Pythium aphanidermatum



Phytophthora capsici



Colletotricum gloeosporioides



Rhizoctonia solani

Fig. 1.3. Results of in vitro antagonism testing after 5 days for bacterial strain GB-019.

A) 6.3×10^6 , B) 3.15×10^6 , C) 6.3×10^5 , D) 3.15×10^5 , E) 6.3×10^4 cells/ml



Fusarium oxysporum



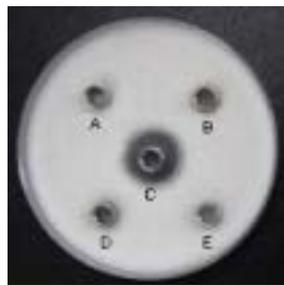
Botrytis cinerea



Rhizoctonia solani AG1-1A



Phytophthora capsici



Pythium aphanidermatum



Pyricularia oryzae

Fig. 1.4. Results of in vitro antagonism testing after 5 days for bacterial strain GB-65.

A) 6.3×10^6 , B) 3.15×10^6 , C) 6.3×10^5 , D) 3.15×10^5 , E) 6.3×10^4 cells/ml

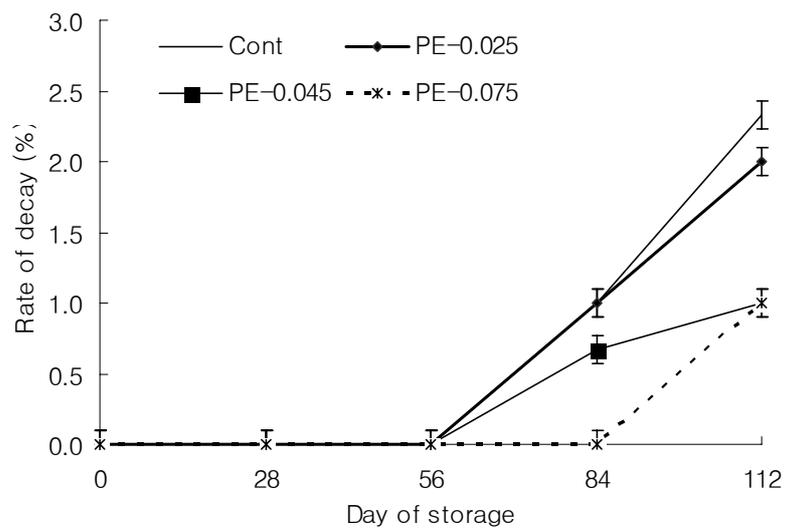


Fig. 1.5. Decay rate with various thickness of PE-film treatment at 4°C during 112 days in apple 'Fuji'. Bars are standard error.

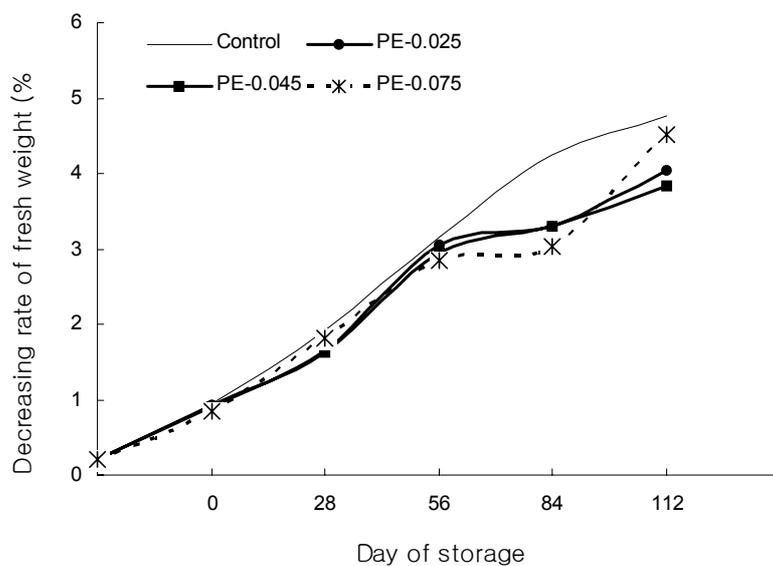


Fig. 1.6. Decreasing rate of fresh weight with various thickness of PE-film treatment at 4°C during 112 days in apple 'Fuji'.

배 ‘신고’는 PE-film별 차이가 뚜렷하게 나타났는데, PE-film 0.075mm 사용시 부패율이 현저하게 저하되었으며(Fig. 1.7), 자연감모율 또한 PE-film 0.075mm 처리구에서 가장 낮았다. 따라서 배 ‘신고’의 경우에는 미생물 처리후 PE-film 0.075mm로 packing하여 112일(약 4달)까지 장기저장이 가능한 것으로 나타났다.

상기의 결과를 토대로 사과 ‘후지’와 배 ‘신고’를 미생물처리후 PE-film처리와 무처리구로 하여 저온저장과 상온저장을 한 후 부패율과 자연감모율을 비교해 본 결과, 사과 ‘후지’와 배 ‘신고’ 모두 미생물 처리후 PE-film으로 packing 한 처리구에서 부패율과 자연감모율이 낮은 것으로 나타났다. 그러나, 상온저장시에는 두 과종 모두 자연감모율이 매우 높아져 70일 이후에는 외관상 품질이 너무 떨어지므로 상품성이 없었다.

당도변화와 산도변화를 살펴본 결과 항진균 미생물 처리후 PE-film 처리 및 저장기간별에 따른 뚜렷한 변화를 볼 수 없었다. 이에 대한 원인으로서는 내부품질이 갖는 개체간의 다양성에 의한 것으로 사료된다(Table 1.5, 1.6).

단감 ‘부유’를 미생물 처리후 PE-film을 처리하여 4℃에 저장한 결과, 부패율은 PE-0.075mm와 PE-0.045mm 처리구에서 가장 낮게 나타났으나(Fig. 1.9), 자연감모율은 PE-0.075mm 처리구에서 최저치로 나타났다(Fig. 1.10). 그러나 저장 56일째를 기준으로 과실이 매우 연화되고 84일째에는 내부갈변이 뚜렷하게 나타나 상품성의 저하가 매우 심각하게 나타났다(Fig. 1.11).

포도 ‘새단’의 경우에는 다른 과종들의 저장과는 저장기간에 있어서 다른 양상을 보여주었다. 부패율은 PE-0.045mm 처리구에서 가장 낮았으며(Fig. 1.12), 자연감모율은 0.045mm 처리구에서 낮은 것으로 나타났으나 유의한 차이는 없었다(Fig. 1.13). 포도는 과립하나만이라도 곰팡이균에 감염이되면 그 전이율이 매우 높아 저장 30일 이후의 부패율이 급격하게 증가하였으며, 또한 상품성도 크게 하락하여 미생물을 이용한 장기저장에 적합하지 않은 것으로 나타났다. 그러나, control과 비교하였을 때, PE-film 모든 처리구가 부패율 및 자연감모율에서 수치가 낮은 것으로 나타났다. 또한 PE-film 0.045mm 처리후 4℃에서 저장한 결과, 45일 정도는 상품성의 하락없이 저장이 가능한 것으로 나타났다(Fig. 1.14).

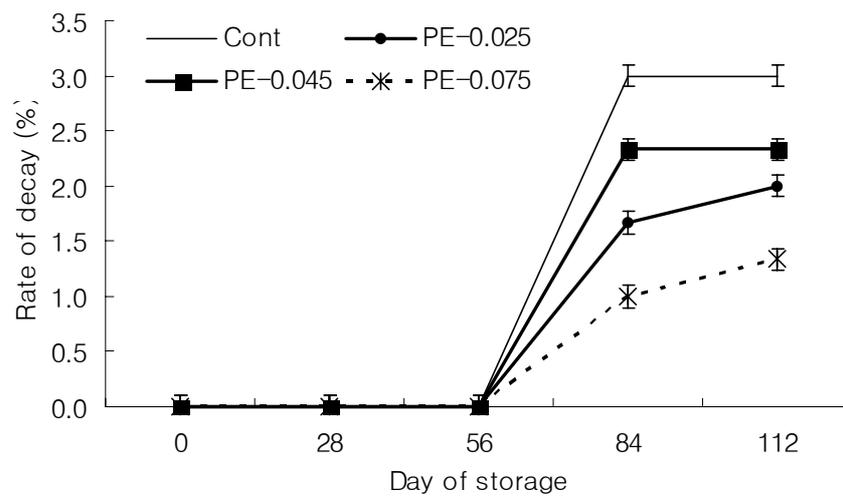


Fig. 1.7. Decay rate with various thickness of PE-film treatment at 4°C during 112 days in pear 'Nittaka'. Bars are standard error.

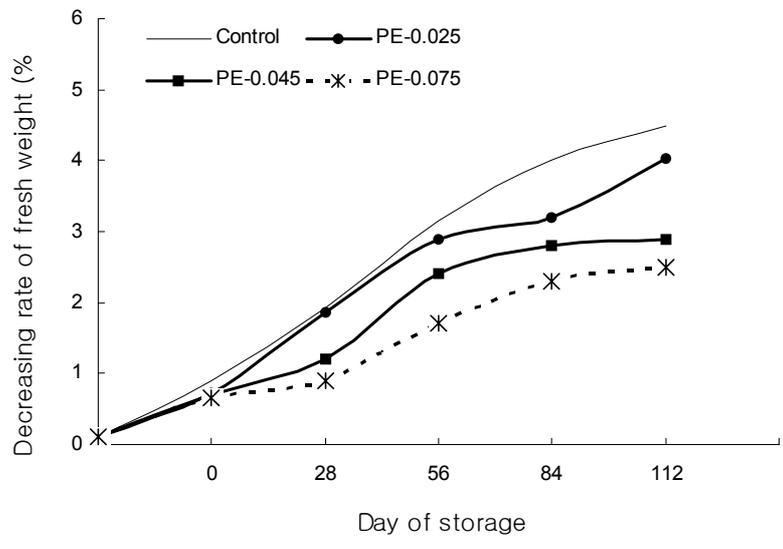


Fig. 1.8. Decreasing rate of fresh weight with various thickness of PE-film treatment at 4°C during 112 days in pear 'Niiitaka'.

Table 1.1. Decay rate (%) according to storage time and temperature with GB-019 and PE-0.045mm treatment in apple 'Fuji'.

Temp.	Treatment	Storage day									
		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Room	GB-019+PE-0.045mm	1.1a ^z	1.5b	2.2b	2.6b	3.3b	4.1b	5.6b	6.7b	7.4b	8.5b
	GB-019	1.5a	2.2a	3.3a	4.4a	5.6a	6.3a	8.5a	10.0 a	10.7 a	11.1a
4±1 °C	GB-019+PE-0.045mm	0	0	0	0	0.7c	1.5c	2.2c	2.6d	3.0d	3.7d
	GB-019	0	0	0	1.1c	1.5c	2.2c	3.3c	4.8c	5.2c	6.3c

^z DMRT. P=0.05

Table 1.2. Decay rate (%) according to storage time and temperature with GB-019 and PE-0.075mm treatment in pear 'Naitaka'.

Temp.	Treatment	Storage day									
		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Room	GB-019+PE-0.045mm	0.7a	1.1b	1.9b	2.2b	2.6b	3.0b	3.7b	4.8b	5.9b	7.0b
	GB-019	1.1a	1.9a	3.0a	3.7a	4.8a	5.6a	6.3a	9.6a	11.1a	11.9a
4±1 °C	GB-019+PE-0.045mm	0	0	0	0	0	0.7c	1.9c	2.2c	2.6d	3.0d
	GB-019	0	0	0	0	0.4c	1.1c	2.2c	4.1b	4.4c	5.6c

^z See Table 1.1.

Table 1.3. Decreasing rate of fresh weight according to storage time and temperature with GB-019 and PE-0.045mm treatment in apple 'Fuji'.

Temp.	Treatment	Storage day									
		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Room	GB-019+PE-0.045mm	2.0	3.8	6.7	11.1	13.8	14.2	15.0	15.9	16.9	18.0
	GB-019	4.3	5.6	9.7	11.9	13.3	15.7	16.4	17.8	18.3	19.3
4±1 °C	GB-019+PE-0.045mm	1.4	2.3	3.7	4.0	5.0	5.9	6.7	8.1	9.9	11.4
	GB-019	1.4	2.2	3.5	5.0	6.0	7.1	8.0	9.0	10.3	12.6

Table 1.4. Decreasing rate of fresh weight according to storage time and temperature with GB-019 and PE-0.075mm treatment in pear 'Niiitaka'.

Temp.	Treatment	Storage day									
		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Room	GB-019+PE-0.045mm	2.1	3.9	6.9	12.0	13.9	15.2	15.8	16.2	17.1	19.1
	GB-019	4.2	5.3	8.8	13.2	14.8	16.2	17.5	18.4	19.6	21.1.
4±1 °C	GB-019+PE-0.045mm	1.3	2.4	3.7	4.1	5.3	6.0	6.9	8.5	9.5	12.0
	GB-019	1.5	2.6	4.3	4.7	5.9	7.2	8.1	9.3	10.6	13.2

Table 1.5. Change of soluble solid content (°Brix) according to storage time and temperature with GB-019 and PE-film treatment in apple 'Fuji' and pear 'Niitaka'.

Treatment		Storage days										
		0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
'Fuji'	4°C	GB-019+PE-0.045mm	12.9	11.7	11.5	10.8	12.3	12.9	11.5	12.5	11.1	11.7
		GB-019	12.9	12.7	12.5	12.9	12.4	11.2	12.0	11.9	11.2	11.2
	Room Temp.	GB-019+PE-0.045mm	12.9	12.4	12.2	11.9	11.1	12.2	11.1	12.2	11.5	12.4
		GB-019	12.9	11.4	12.8	12.2	12.0	12.5	12.0	12.6	11.1	12.2
'Niitaka'	4°C	GB-019+PE-0.075mm	12.5	12.5	11.8	11.6	12.6	12.2	11.6	11.8	11.5	11.3
		GB-019	12.5	12.4	11.1	11.1	11.1	12.6	11.2	11.8	11.4	11.2
	Room Temp.	GB-019+PE-0.075mm	12.5	11.8	11.3	11.1	11.5	11.9	12.0	11.2	11.4	12.7
		GB-019	12.5	12.4	12.1	12.1	11.7	12.2	11.4	11.8	12.2	11.6

Table 1.6. Change of organic acids content (%) according to storage time and temperature with GB-019 and PE-film treatment in apple 'Fuji' and pear 'Niitaka'.

Treatment		Storage days										
		0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
'Fuji'	4°C	GB-019+PE-0.045mm	0.81	0.66	0.68	0.60	0.63	0.71	0.56	0.58	0.62	0.56
		GB-019	0.81	0.76	0.66	0.70	0.65	0.60	0.64	0.54	0.55	0.50
	Room Temp.	GB-019+PE-0.045mm	0.81	0.63	0.68	0.70	0.64	0.74	0.60	0.53	0.57	0.59
		GB-019	0.81	0.88	0.70	0.72	0.74	0.65	0.56	0.47	0.48	0.44
'Niitaka'	4°C	GB-019+PE-0.075mm	0.95	0.86	0.75	0.68	0.72	0.75	0.52	0.67	0.64	0.69
		GB-019	0.95	0.77	0.72	0.59	0.86	0.73	0.58	0.68	0.63	0.61
	Room Temp.	GB-019+PE-0.075mm	0.95	0.84	0.68	0.69	0.63	0.76	0.62	0.57	0.52	0.51
		GB-019	0.95	0.81	0.60	0.82	0.69	0.67	0.63	0.49	0.46	0.41

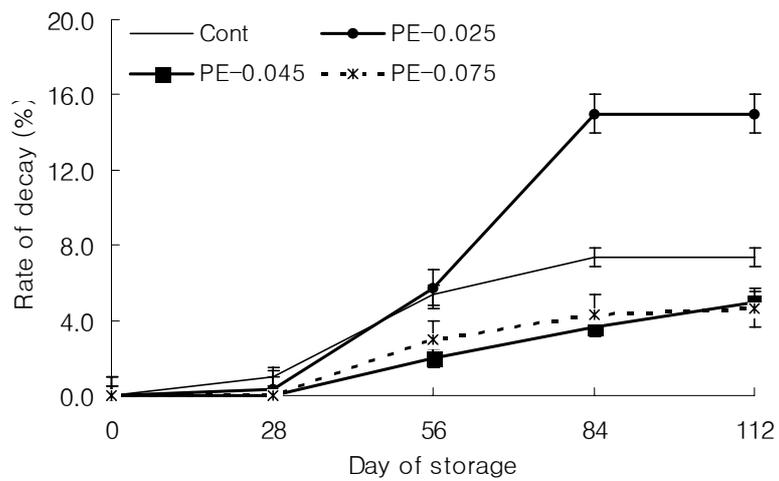


Fig. 1.9. Decay rate with various thickness of PE-film treatment during 112 days at 4°C in persimmon 'Fuju'. Bars are standard error.

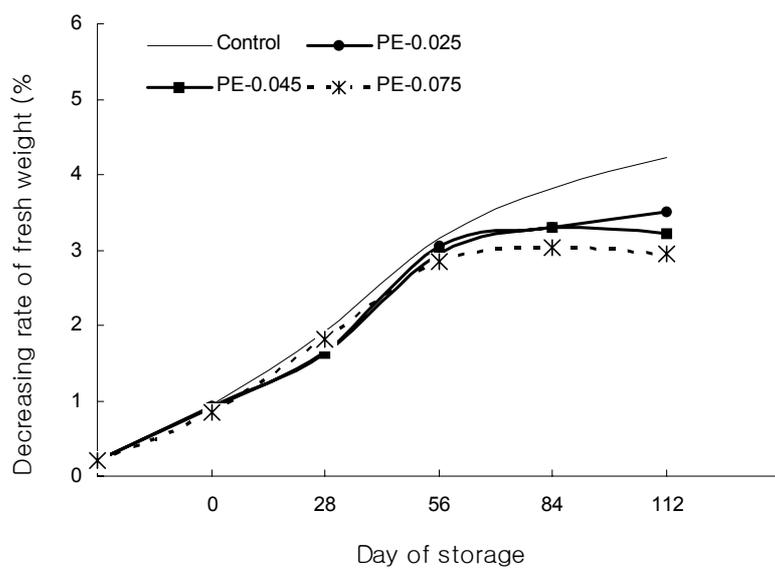


Fig. 1.10. Decreasing rate of fresh weight with various thickness of PE-film treatment at 4°C during 112 days in persimmon 'Fuju'.

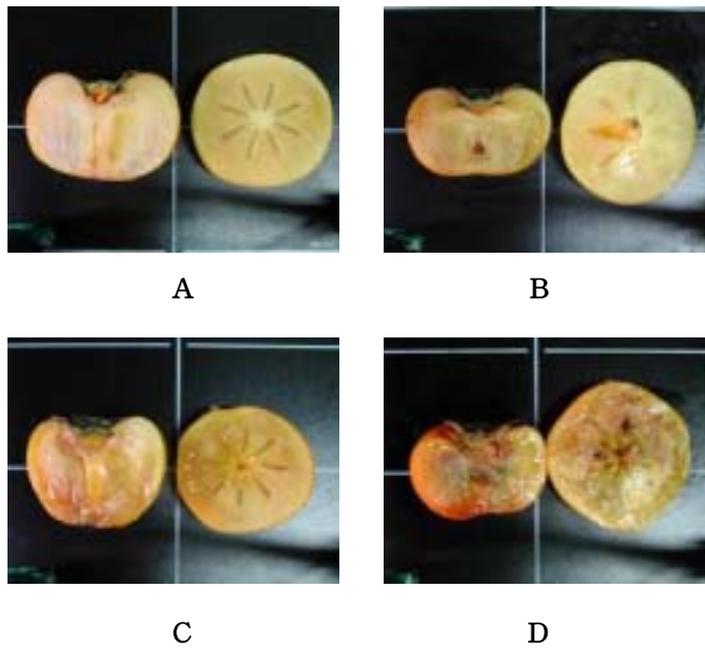


Fig. 1.11. Internal browning and flesh softening during storage in persimmon 'Fuju'.

A: 15 days, B: 30days, C: 50 days, D: 70days after storage.

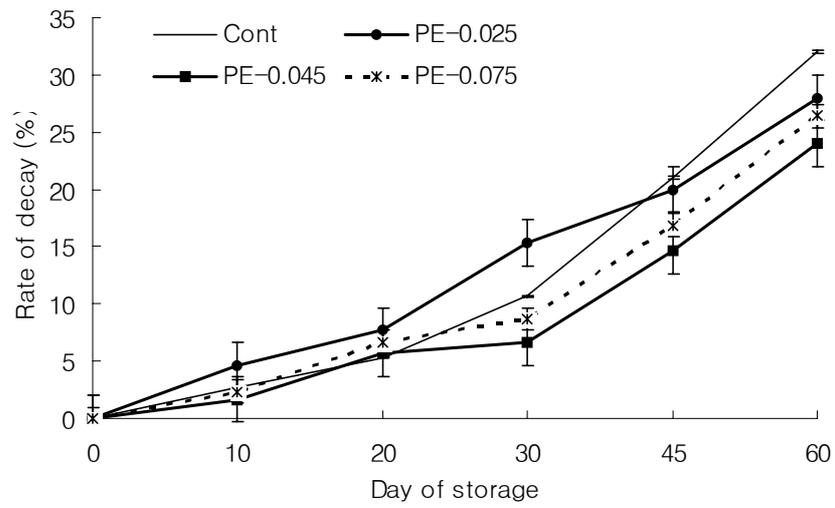


Fig. 1.12. Decay rate with various thickness of PE-film treatment during at 4°C 60 days in grape 'Sheridan'. Bars are standard error.

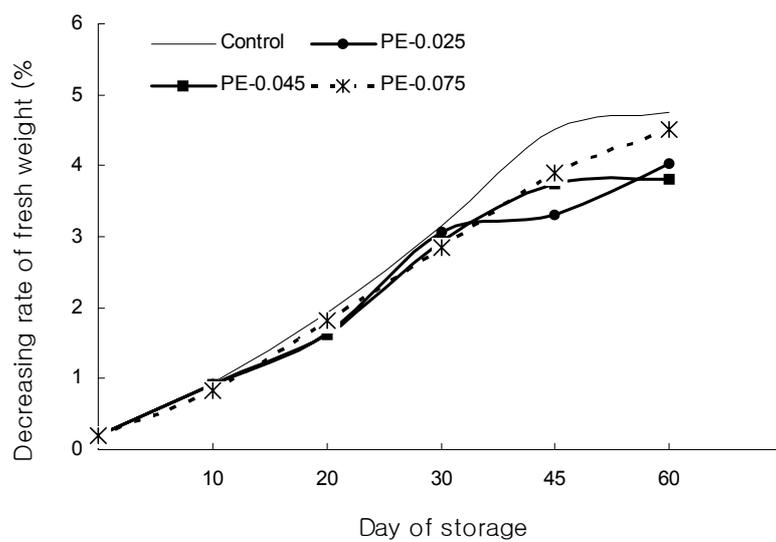


Fig. 1.13. Decreasing rate of fresh weight with various thickness of PE-film treatment at 4°C during 60 days in grape 'Sheridan'.

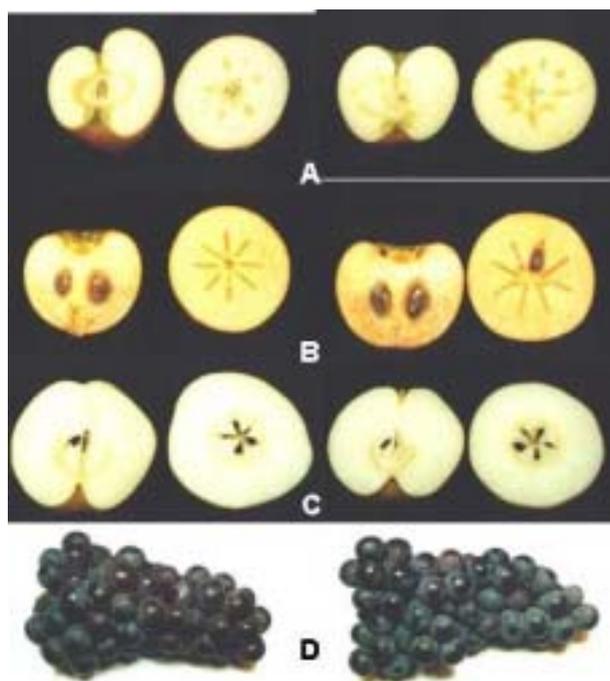


Fig. 1.14. Width and length section of fruits after storage with GB-019 strain dipping and PE-film packing treatment.

A: apple 'Fuji' with PE-0.045mm treatment after 84 days,

B: persimmon 'Fuji' with PE-0.045mm treatment after 60days,

C: pear 'Niiitaka' with PE-0.075mm treatment after 90days,

D: grape 'Sheridan' with PE-0.045mm treatment after 45 days.

제 3 항 미생물제제와 키토산 종류 및 농도별 혼용시험

항진균성 미생물제제와 키토산의 혼용효과를 알아보기 위한 공시재료로 사과 ‘후지’, 단감 ‘부유’를 사용하였다. Oligo chitosan, 식품용 키토산, glyco 키토산 등 3가지 키토산을 각각 0.1%, 0.2%의 농도로 미생물제제에 혼용하여 최적의 농도를 선발하고자 하였다.

사과 ‘후지’의 경우, 0.2% 식품용 키토산과 0.2% glyco 키토산의 첨가가 부패율 억제에 큰 효과가 있었으며(Fig. 1.15), 자연감모율 또한 낮춰주어 외관상의 품질저하도 막아주었다(Fig. 1.16). 이는 키토산의 피막효과에 기인한 것으로 사료된다.

단감 ‘부유’의 경우, 0.2% glyco 키토산의 첨가가 다른 처리구들에 비해 부패율을 현저하게 낮춰주었다(Fig. 1.17). 이는 한라봉에 다양한 키토산을 처리했던 예비결과와 달랐다(Fig. 1.18). 한라봉의 경우에는 oligo 키토산 0.2%의 처리가 가장 부패방지 효과가 큰 것으로 나타난 반면 본 실험에서는 glyco 키토산 0.2% 처리가 좋은 것으로 나타났는데, 이는 사과나 단감의 과피 구성이 감귤류와는 다른 데서 기인한 것으로 사료된다.

단감의 상온저장 중 당도의 변화를 조사해 본 결과(Table 1.7) 저온저장에 비하여 무처리구의 당도가 좀 낮아지는 경향이 있었으나, 0.2% glyco chitosan을 처리한 GB-019 침지처리구에서는 저장기간동안 저장온도에 관계없이 당도가 높아지는 경향을 나타내었다.

단감의 산도변화의 경우 저장기간이 경과함에 따라 모든 처리구에서 감소하는 경향을 나타내다가 일정기간이 지나면 모두 산도가 증가하는 경향을 보였는데, 이는 단감 내부 성분의 변화로 초산이 발효되며 산도가 다시 증가하는 것으로 사료된다. 따라서 저온저장의 경우 60일 정도까지는 내부성분이 상품성을 가지는 것으로 생각된다(Table 1.8).

단감 과실의 경도는 저장기간이 지남에 따라 모두 감소되었으며, 특히 무처리구의 상온저장에서의 매우 낮은 것으로 나타났다(Table 1.8).

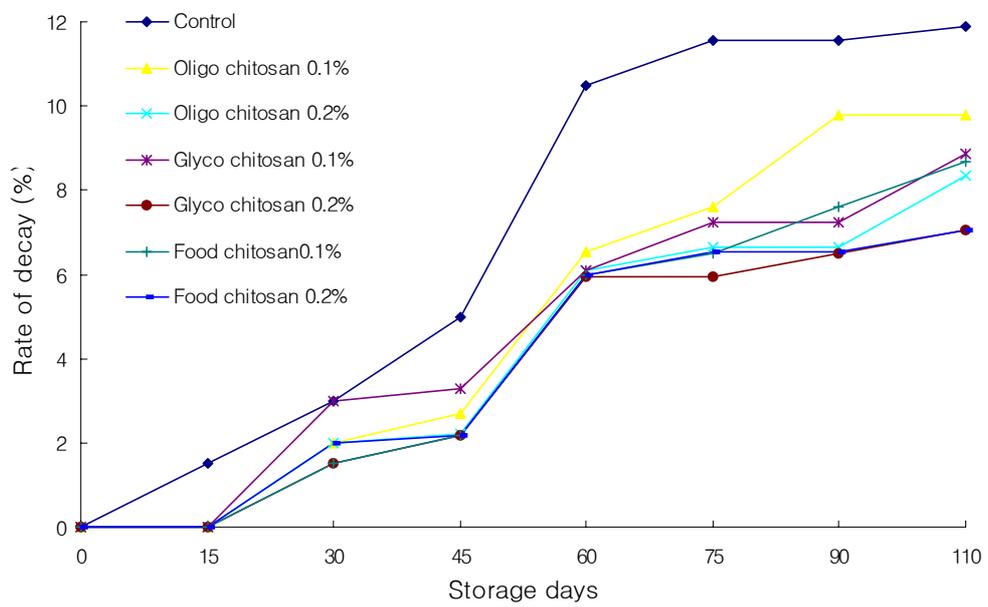


Fig. 1.15. Decay rate with various kind of chitosan treatment at 4°C during 110 days in apple 'Fuji'.

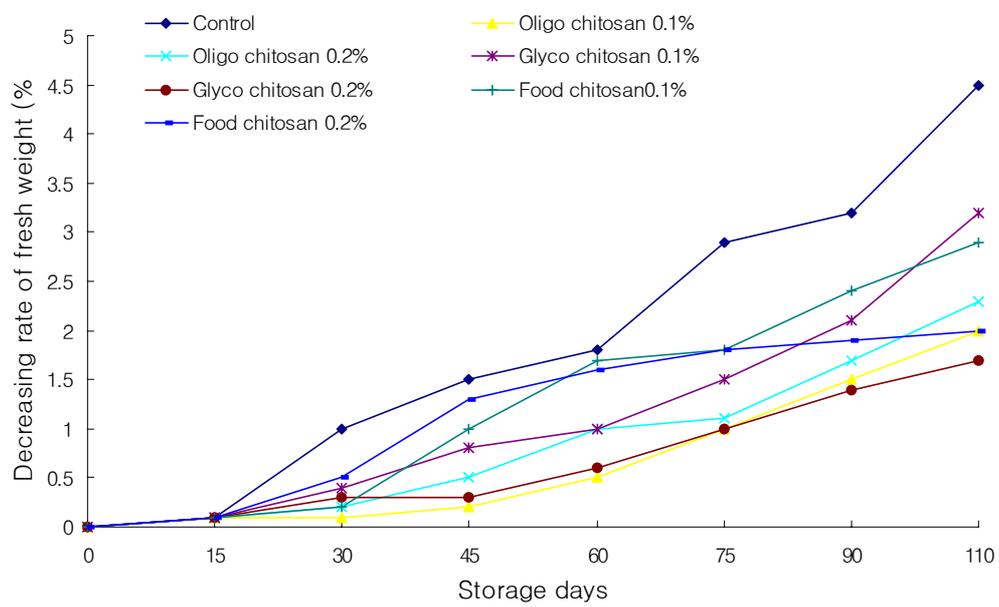


Fig. 1.16. Decreasing rate of fresh weight with various kind of chitosan treatment at 4°C during 110 days in apple 'Fuji'.

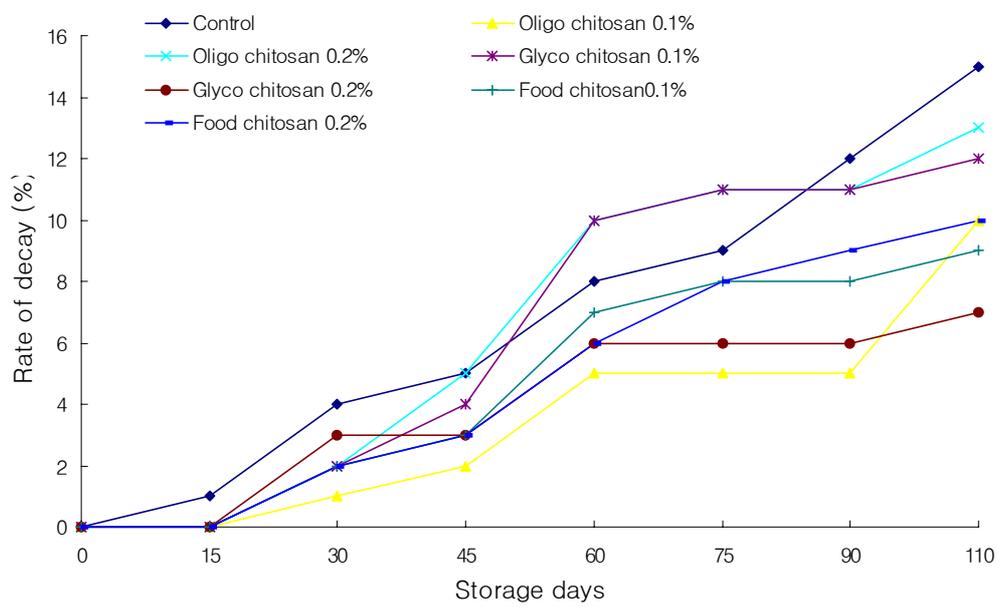


Fig. 1.17. Decay rate with various kind of chitosan treatment at 4°C during 110 days in persimmon 'Fuju'.



Fig. 1.18. Effect of biological control and chitosan treatment for long-term storage in tangor.

Table 1.7. Change of solid content (° Brix) during storage with GB-019, 0.2% glyco chitosan, and 0.045mm PE-film treatment in persimmin 'Fuju'.

	Treatment	Storage days									
		0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
4°C	0.2% Glyco chitosan	10.5	10.5	9.8	9.6	10.6	10.2	9.6	9.8	9.5	11.3
	Control	10.5	10.4	9.9	9.1	11.1	10.6	9.2	9.8	9.4	11.2
Room Temp.	0.2% Glyco chitosan	10.5	9.8	9.3	9.9	9.5	9.9	10.0	9.2	9.4	10.7
	Control	10.5	10.4	10.1	10.1	9.7	10.2	9.4	9.8	10.2	9.6

Table 1.8. Change of organic acids content (%) during storage with GB-019, 0.2% glyco chitosan, and 0.045mm PE-film treatment in persimmin 'Fuju'.

Treatment	Storage days										
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
4°C	0.2% Glyco chitosan	0.81	0.66	0.68	0.60	0.63	0.58	0.51	0.62	0.71	0.85
	Control	0.81	0.76	0.66	0.65	0.67	0.69	0.71	0.76	0.84	0.91
Room Temp.	0.2% Glyco chitosan	0.81	0.63	0.68	0.70	0.64	0.60	0.62	0.63	0.77	0.83
	Control	0.81	0.88	0.70	0.92	0.84	0.95	0.86	0.87	0.86	0.95

Table 1.9. Change of firmness (5mm ϕ /g) during storage with GB-019, 0.2% glyco chitosan, and 0.045mm PE-film treatment in persimmin 'Fuju'.

Treatment		Storage days									
		0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
4°C	0.2% Glyco chitosan	1028.3	1036.0	823.7	804.7	1014.8	859.9	761.8	869.3	696.0	796.6
	Control	1028.3	894.5	818.1	911.3	835.1	719.6	711.4	686.3	744.8	699.1
Room Temp.	0.2% Glyco chitosan	1028.3	1006.4	890.8	792.0	776.8	888.1	731.1	684.2	534.0	658.5
	Control	1028.3	781.8	889.6	905.5	760.4	719.8	857.4	709.1	722.1	650.3

제 4 항 미생물-키토산 제제와 칼슘제제의 종류 및 농도별 혼용시험

앞서 실험한 미생물-키토산의 혼용제제 중 효과가 가장 높았던 0.2% glyco chitosan 처리구에 calcium chloride와 calcium carbonate 등의 칼슘제제를 농도별로 처리하여 미생물제제의 최대 효과를 알아보기 위하여 본 실험을 수행하였다. 그 결과 사과 ‘후지’, 배 ‘신고’, 단감 ‘부유’ 모두 calcium carbonate 2% 첨가가 부패방지에 매우 효과적인 것으로 나타났다 으며(Table 1.10), 자연감모율에 있어서는 calcium chloride와 calcium carbonate 모든 처리구에서 유의한 차이가 없었다(Table 1.11). 그러나, 제제를 만드는 데에 있어 calcium carbonate의 첨가는 결정이 생긴다거나, 혹은 발열이 되어 약간의 문제가 제기되었다. 또한 calcium carbonate를 첨가하게 되면, 침지처리후에 과피에 하얗게 분말이 생기게 되는데, 이를 소비자들이 농약으로 잘 못 인식을 하지 않을까 우려되어 이 부분에 대한 부수적인 연구가 더욱 필요하다.

Fig 1.19는 GB-019 strain과 0.2% glyco chitosan, 그리고 2% calcium carbonate를 첨가하여 만든 제제로 사과 ‘후지’, 배 ‘신고’, 단감 ‘부유’를 90일간 저장한 과실들의 단면을 보여준다. 그림에서 보는 것과 같이 사과 배, 단감은 위의 제제로 침지한 후 PE-film을 처리하면 90일까지는 상품성이 유지되나, 포도의 경우에는 4℃에 저장을 하더라도 60일을 고비로 저장이 불가능했다.

상기의 연구결과를 정리하면 다음과 같다.

사과 ‘후지’는 GB-019 처리 후 PE-film 0.045mm로 packing을 하여 4℃에서 약 84일, 배 ‘신고’는 GB-019 처리 후 PE-film 0.075mm로 packing을 하여 4℃에서 약 90일, 감 ‘부유’는 GB-019 처리 후 PE-film 0.045mm로 packing을 하여 4℃에서 약 60일, 포도 ‘새단’은 GB-019 처리 후 PE-film 0.045mm로 packing을 하여 4℃에서 약 45일 정도를 저장하면 상품성의 저하없이 저장이 가능하다.

또한, 미생물제제 GB-019 구성시 0.2%의 glyco 키토산과 2% calcium carbonate를 첨가하면 더욱 더 부패방지 효과를 증가할 수 있다.

Table 1.10. Decay rate (%) of fruits treated with various concentration of calcium compounds after 90 days storage.

		Apple 'Fuji'	Pear 'Niiitaka'	Persimmon 'Fuju'	Grape 'Sheridan'
Control		2.3	3.0	15.0	56.0
Calcium chloride	1%	2.0	2.5	7.3	50.0
	2%	2.1	2.0	7.3	32.0
Calcium carbonate	1%	1.5	2.3	6.4	28.0
	2%	1.5	1.3	4.7	26.0

Table 1.11. Decreasing rate of fresh weight (%) of fruits treated with various concentration of calcium compounds after 90 days storage.

		Apple 'Fuji'	Pear 'Niiitaka'	Persimmon 'Fuju'	Grape 'Sheridan'
Control		4.76	5.27	3.28	8.6
Calcium chloride	1%	4.04	4.45	2.97	7.0
	2%	4.38	4.24	2.97	7.1
Calcium carbonate	1%	4.51	4.26	3.10	6.79
	2%	4.42	4.30	3.12	7.0

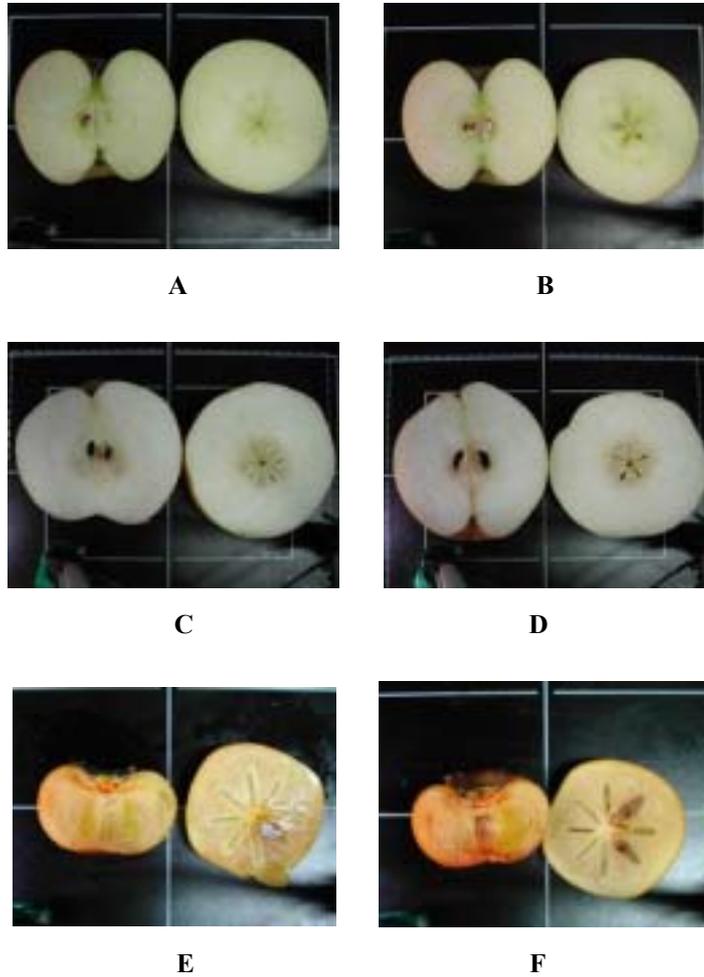


Fig. 1. 19. Effect of GB-019, 0.2% glyco chitosan, and 2% calcium carbonate with PE-film treatment for storage in fruits.

A, B: apple 'Fuji', C, D: pear 'Niiitaka', E, F: persimmon 'Fuju'

A, C, E: before storage, B, D, F: after 90days in storage

제 2 절 청과류 부패방지용 미생물 제제 개발

제 1 항 재료 및 방법

1. 항진균활성 미생물의 screening

1) 토양으로부터 토양미생물의 분리

청과류 재배지 토양으로부터 소량의 토양시료를 채취한 후 토양시료 1.0g을 멸균 식염수 10ml에 현탁하여 내생포자를 형성하는 *bacillus*류 균주의 분리를 위해 60℃에서 30분간 열처리 하였고, 상등액 100 μ l를 LB-agar plate (1% Tryptone, 0.5% NaCl, 0.5% Yeast extract, 1.5% Agar)에 도말하여 30℃에서 2일간 배양하였다. 각각의 plate 에서 분리한 colony를 다시 백금이를 이용하여 single colony로 분리하였고 이를 항진균활성을 갖는 길항미생물 screening에 이용하였다.

2) 항진균 활성을 나타내는 길항미생물의 1차 screening

토양으로부터 분리된 균주로부터 청과류 저장 중 과실의 연화 및 부패의 피해를 주는 청색곰팡이병, 녹색곰팡이병 및 잿빛곰팡이병을 일으키는 곰팡이(*Penicillium* sp., *Botrytis cinerea*)에 대한 길항력을 갖는 균주를 screening 하기 위하여 중층배지를 이용한 in vitro assay법을 사용하였다.

중층배지용 접종원은 병원성 곰팡이를 PDA(Potato Dextrose Agar) plate에서 25℃에서 5일간 배양한 후 사용하였다. 중층배지의 제조는 포자가 형성된 병원성 곰팡이의 plate에 멸균식염수 10ml를 첨가한 후 glass rod를 이용하여 서서히 도말하여 포자현탁액을 제조한 후 이 포자현탁액을 또 다른 멸균식염수에 연속 희석하여 전자현미경을 통해 10⁶ 수준이 되도록 하였다. 이 병원성 곰팡이 포자현탁액을 soft agar(0.8% agar) 5ml에 200 μ l 넣어 현탁 한 후 이것을 PDA plate위에 부어 병원균 중층배지를 만들었다.

제조된 병원균 중층배지에 Fig 1.과 같이 토양에서 분리한 후보균주를 접종한 후 25℃에서 3일간 배양하여 병원성 곰팡이균주에 대하여 항진균활성을 갖는 균주를 1차

선별하였다.

3) RPI 기법을 통한 항진균활성 길항미생물의 2차 screening

1차 선별된 후보균주에 대하여 병원성 곰팡이에 대한 길항력과 후보균의 성장속도를 고려 인자로 하는 RPI(Relative Performance Indies)기법¹⁾을 통하여 최종 후보 길항균을 선정하였다.

Efficacy는 PDA (Potato Dextrose Agar) plate에서 대칭배양을 하여 후보균들의 inhibition rate을 측정하였다. *Penicillium* sp.의 경우 성장속도가 빨라 대칭배양시 후보균과의 거리를 5cm로 하였고(2일 배양). *Botrytis cinerea*는 4cm로 하였다(3일 배양).

Kinetics는 후보균들을 5ml LBS배지 (1% soluble starch, 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)가 함유된 test tube에 30°C, 16시간 1차 배양 후 10ml의 LBS배지가 함유된 test tube에서 2차 배양 (30°C, 12hr)하여 최종 OD₆₀₀값을 이용하였다.

후보균들의 *Penicillium* sp. 및 *Botrytis cinerea*에 대한 길항력과 성장속도를 고려하여 RPI_{overall}값이 큰 균주를 최종선별 하였다.

2. 선별된 길항미생물의 동정

최종 선별된 균주의 동정은 Bergey's manual of determinative bacteriology, Microbiological method, Manual of methods for general bacteriology, Microbiology-

1) 길항균 선정시 RPI (Relative Performance Indies) 기법

i) 식물병원균의 길항력에 대한 RPI_{Efficacy}

$$RPI_{Efficacy} = [\{ (x - \bar{x}) / \sigma \} - 2] \times 25$$

\bar{x} : single observation value, x : average observation value standard deviation

ii) 후보균의 성장속도에 대한 RPI_{Kinetics}

$$RPI_{Kinetics} = [\{ (x - \bar{x}) / \sigma \} + 2] \times 25$$

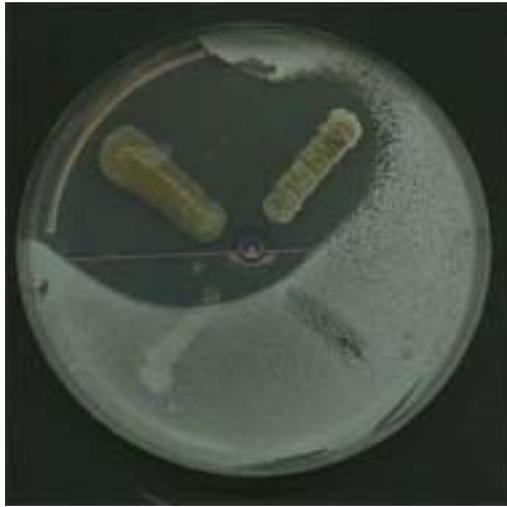


Fig 1. Screening of antifungal activity strain by in vitro assay.

a laboratory manual, Bergey's manual of systemic bacteriology 및 식품공학실험 등에 수록되어 있는 일반적인 세균동정법에 따라 행하였다.

3. 선별된 길항미생물의 항균 spectrum

최종 선별된 균주의 각종 식물병원균에 대한 항균 spectrum을 검토하기 위하여 식물에 일반적으로 피해를 많이 주는 병원균인 잿빛곰팡이병(*Botrytis cineria*), 시들음병(*Fusarium* sp.), 입고병,잘록병(*Pythium* sp.), 고추역병(*Phytophthora capsici*), 무름병(*Erwinia carotovora*), 모잘록병(*Rhizoctonia solani*), 푸른곰팡이병(*Penicillium* sp.), 균핵병(*Sclerotinia sclerotiorum*)을 사용하였다. 항균활성은 선별균주를 5ml LBS 배지가 함유된 test tube에 접종한 후 30℃에서 24h 배양하였다. 배양완료 후 배양액을 원심분리(8,000rpm, 10min)하여 상등액 50 μ l를 취하여 paper disc(직경 8mm)에 묻힌 후 각각의 병원균을 포함한 PDA 중층배지위에 올려놓고 각각의 병원균의 최적생육 온도에서 3-5일 배양한다. 각종 병원균에 미치는 영향은 형성된 생육 저지원(clear zone)의 직경으로 조사하였다.

4. 선별된 길항미생물의 배양조건 검토

1) 배양 시간에 따른 영향

최종 선별균주의 성장속도를 위하여 1L Δ flask에 LBS 배지를 200ml씩 분주한 후 초기 접종원의 농도를 2%로 하여 접종한 후 30℃에서 24h 진탕배양 하였다. 세포 생장은 viable cell count 및 optical density (600nm)로 측정하였다.

2) 초기 pH에 따른 영향

최종 선별균주의 배양을 위한 pH 조건을 위하여 1L Δ flask에 LBS 배지를 200ml씩 분주한 후 1N HCl, 1N NaOH를 이용하여 초기 pH를 각각 3, 5, 7, 9, 11로 조절한다.

후 접종원의 농도를 2% 접종한 후 30℃에서 24h 진탕배양 하여 균의 생장을 측정하였다.

3) 배양온도에 따른 영향

최종 선별균주의 최적 생육 온도를 검토하기 위하여 1L Δ flask에 LBS 배지를 100ml를 분주한 후 접종원의 농도를 2%로 하여 접종한 후 이를 10ml씩 취하여 멸균된 L flask에 분주하여 gradient temperature를 이용하여 20 - 40℃까지 온도 조건에서 12h배양하여 균의 생장을 측정하였다.

5. 선별된 길항미생물의 배지조건 검토

1) 기본배지의 설정

최종 선별균주의 배양을 위한 배지 조건을 위하여 일반적으로 *bacillus*류 배양배지로 알려진 공업용 GB 배양배지(soluble starch, soybean meal, yeast extract, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , MgSO_4)를 기본배지로 이용하였으며 기본배지 성분들이 세포생장에 미치는 영향을 측정하기 위해 Plackett-Burman experimental design (Table 1)을 이용하여 각 배지성분들의 main effect를 계산하였다.

2) 질소원 및 탄소원의 영향

질소원은 기본배지에서 무기질소원인 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 함량을 고정된 후 유기질소원인 yeast extract, soybean meal과 동일한 함량으로 다른 질소원으로 meat extract, peptone, corn steep liquor, yeast extract, soybean meal, casamino acid, tryptone, urea, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 ,를 사용하였으며, 탄소원은 기본배지의 soluble starch와 동일한 함량으로 다른 탄소원인 glucose, sucrose, xylose, glycerol, molasses, dextrin를 사용하였다. 각각의 질소원 탄소원에 대한 영향은 균의 생장과 병원성 곰팡이인 *penicillium* sp.에 대한 활성으로 검정하였다. 균의 생장은 viable cell counting을 통하여 생균수를 측정하였으며 활성은 paper disc법을 이용하여 측정하였다.

Table 1. Plackett-Burman experimental design.

Run	Soybean meal	Soluble starch	Yeast extract	(NH ₄) ₂ SO ₄	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄
1	+	-	+	-	-	+
2	+	+	-	+	-	-
3	-	+	+	-	+	-
4	+	-	+	+	-	-
5	+	+	-	+	+	+
6	+	+	+	-	+	-
7	-	+	+	+	-	+
8	-	-	+	+	+	+
9	-	-	-	+	+	-
10	+	-	-	-	+	+
11	-	+	-	-	-	+
12	-	-	-	-	-	-
13	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
+(g/L)	8	10	5	2.5	3	1.5
-(g/L)	0.8	1	0.5	0.25	0.3	0.15
0(g/L)	4.4	5.5	2.75	1.375	1.65	0.825

3) 금속이온에 대한 영향

내생포자를 생성하는 Bacillus류 균의 경우 포자형성 및 활성물질의 생산을 위해 금속이온에 대한 영향성을 요구하는 경우가 있으므로 Co^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mo^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} 의 +2가 이온을 10mM 농도로 첨가하여 포자생성 유무와 활성을 측정하였다. 포자 측정은 배양완료 후 배양액을 60°C에서 30분 열처리한 후 viable cell counting을 통하여 측정하였으며 활성은 paper disc법을 이용하여 측정하였다.

6. 항진균 활성을 나타내는 미생물의 최적 대량배양조건 검토

최종 선별 균주의 최적배양을 위하여 얻어진 배지조건을 기초로 발효조를 이용하여 배양시간에 따른 균의 성장 및 활성을 검토하였다. 아울러 pH 및 DO의 조절에 따른 배양 수율의 증가를 확인하였다. 배양은 5L 발효기를 이용하여 working volume을 2L로 하여 배양(Temp 30°C, Agitation rate 200rpm, Aeration rate 0.5vvm)하였다.

7. 제제화

대량배양을 통한 미생물 배양물이 현장에서 재현성 있게 이용될 수 있도록 배양물에 존재하는 포자 및 활성물질이 장기간 유지될 수 있도록 액상 및 고상의 형태로 제형화 하였으며 각각의 제형에는 안정제, 보존제 및 기타 각종 부재료의 첨가를 통하여 제형의 안정성을 검토하였다. 안정성 시험은 formulation된 제제를 40°C에서 보관하며 viable cell 및 활성을 측정하였다.

제 2 항 결과 및 고찰

1. 항진균활성 미생물의 screening

1) 토양으로부터 토양미생물의 분리

청과류 재배지 토양으로부터 토양시료를 채취한 후 토양시료로부터 내생포자를 생성하는 Bacillus류 균주를 분리한 결과 약 300여종의 균주를 분리하였다.

2) 항진균활성을 갖는 길항미생물의 1차 screening

토양으로부터 분리된 300여종의 균주로부터 청과류 저장중 과실의 연화 및 부패에 피해를 주는 병원균인 *Penicillium* sp. *Botrytis cinerea*에 대한 길항력을 갖는 균주 선별을 위해 중층배지를 이용한 in vitro assay 결과 병원균에 대한 항진균활성이 높은 6종을 선정하였다.

3) RPI 기법을 통한 항진균활성 길항미생물의 2차 screening

1차 선별된 6종의 균주에 대하여 *Penicillium* sp. *Botrytis cinerea*에 대한 길항력과 LBS 배지를 이용하여 배양 시 성장속도를 고려인자로 하여 RPI기법을 통하여 검토한 결과 Fig 2.에서 보는과와 같이 #19 후보균이 가장 큰 13.1의 RPI_{overall} 값을 보였다.

2. 선별된 길항미생물의 동정

일반적인 세균동정법에 따라 동정한 결과 #19 균주를 전자현미경으로 관찰하면 간균의 형태를 띠고 있었고, 그람염색 결과 그람양성으로 확인되었으며, Bergey's manual에 따라 그 형태학적, 생화학적 성질을 조사한 결과 Table 2와 같았고, 이 균주는 *Bacillus* sp.로 확인되었고, *Bacillus* sp GB-019로 명명하였다.

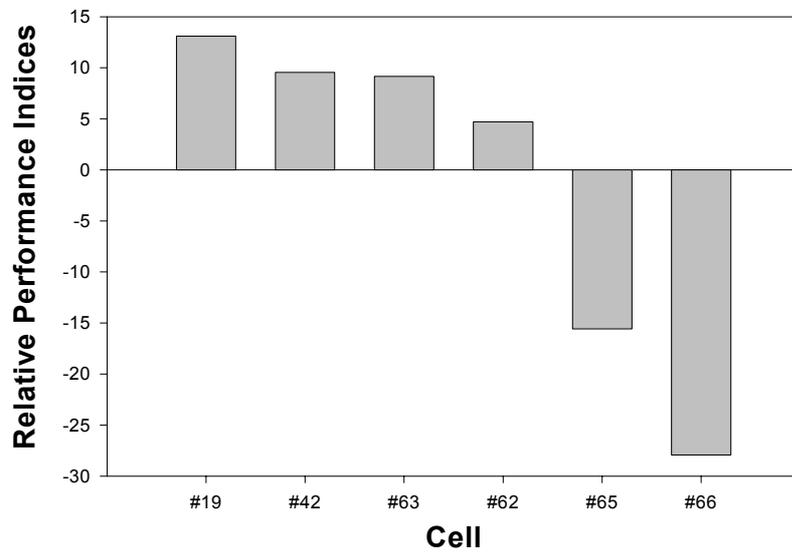


Fig. 2. Strain Performance/Selection (Growth, Antifungal activity)

Table 2. Characteristics of the isolated strain GB-019.

Morphological Characteristic		Result
Shape		Bacillus
Gram-staining		Positive
Endospore form		Ellipsoidal shape
Motility		Present
Biological Characteristic		Result
Range of growth temperature		from 15°C to 45°C
Optimal growth temperature		25 ~ 35°C
Range of growth pH		5.0 ~ 8.0
Biochemical oxygen demand		facultative anaerobic
Catalase		+
Voges-Proskauer response		+
Starch catabolic ability		+
Casein catabolic ability		+
Gelatin catabolic ability		+
Reduction of Nitrate		+
Tolerance to NaCl		up to 10.0(W/v)%
Acid production from carbohydrate sources	Glucose	+
	Arabinose	+
	Xylose	-
	Mannitol	-
Analysis of fatty acid in cell	C15 : 0 anteiso	41.8 %
	C15 : 0 iso	26.2 %
	C17 : 0 anteiso	7.7 %
	C16 : 0 iso	4.5 %
	C16 : 0	2.4 %
	C14 : 0 iso	2.1 %

3. *Bacillus* sp GB-019의 항균 spectrum

최종 선별된 GB-019 균주의 식물병원균인 잣빛곰팡이병(*Botrytis cineria*), 시들음병(*Fusarium* sp.), 입고병,잘록병(*Pythium* sp.), 고추역병(*Phytophthora capsici*), 무름병(*Erwinia carotovora*), 모잘록병(*Rhizoctonia solani*), 푸른곰팡이병(*Penicillium* sp.), 균핵병(*Sclerotinia sclerotiorum*)에 대한 항균 spectrum을 살펴본 결과 Table 3에서 나타난 결과와 같이 *Botrytis cineria*에 대한 활성이 가장 높았으며 *Erwinia carotovora*, *Sclerotinia sclerotiorum*에 대해서는 활성이 거의 없었다.

4. *Bacillus* sp GB-019의 배양조건 검토

1) 생육속도

최종선별된 *Bacillus* sp. GB-019를 LBS 배지에 배양하여 생육속도를 검토한 결과 Fig 3.과 같이 배양시작 후 8h 후에 최대성장을 하며 10h 이후에는 급격히 사멸하는 것으로 나타났다. 또한 600nm에서 흡광도를 측정한 결과 시간에 따라 흡광도는 viable cell number와는 달리 계속적으로 증가하였다. 그러나 배양시작 후 약 8h 정도 까지는 viable cell number와 O.D. 값의 증가가 일치하는 것으로 나타났다.

2) 초기 pH

최종선별된 *Bacillus* sp. GB-019를 LBS 배지에 초기 pH를 3, 5, 7, 9, 11로 적정한 후 배양하여 생육속도를 검토한 결과 Fig 4.과 같이 초기 pH 7에서의 생육이 가장 좋았으며 pH 3, 9, 11의 경우 생육이 거의 일어나지 않았다. 이결과 배양초기 pH는 7.0으로 하였다.

3) 배양온도

최종선별된 *Bacillus* sp. GB-019를 temperature gradient를 이용하여 배양 한 결과 Fig 5.와 같이 30±2℃에서 생장이 가장 좋았다. 이결과 최적 배양온도는 30℃로 하였다.

Table 3. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. GB-019.

Name of test organism	Effect of growth repression (mm)
<i>Botrytis cineria</i>	27
<i>Fusarium</i> sp.	20
<i>Pythium</i> sp.	19
<i>Phytophthora capsici</i>	11
<i>Erwinia carotovora</i>	0
<i>Rhizoctonia solani</i>	18
<i>Penicillium</i> sp.	26
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	0

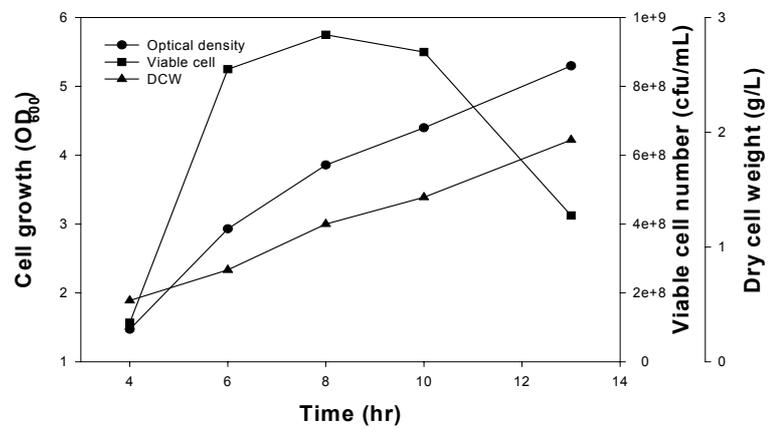


Fig. 3. O.D. and Viable cell number on cell growth of strain GB-019.

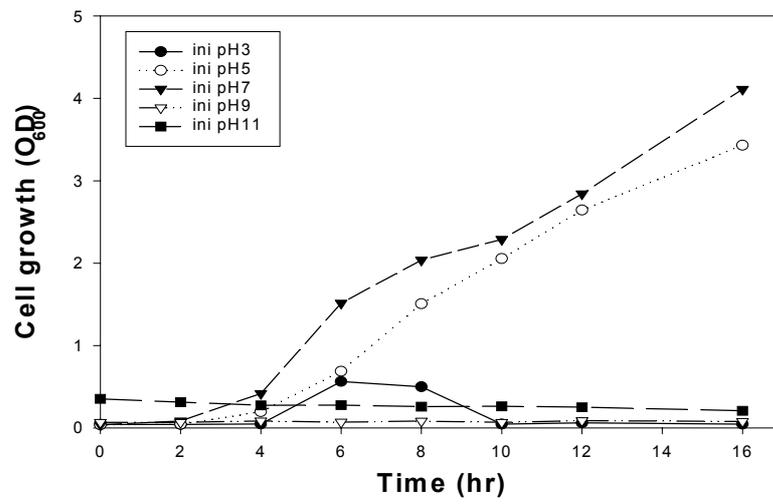


Fig. 4. Effect of initial pH on cell growth of strain GB-019.

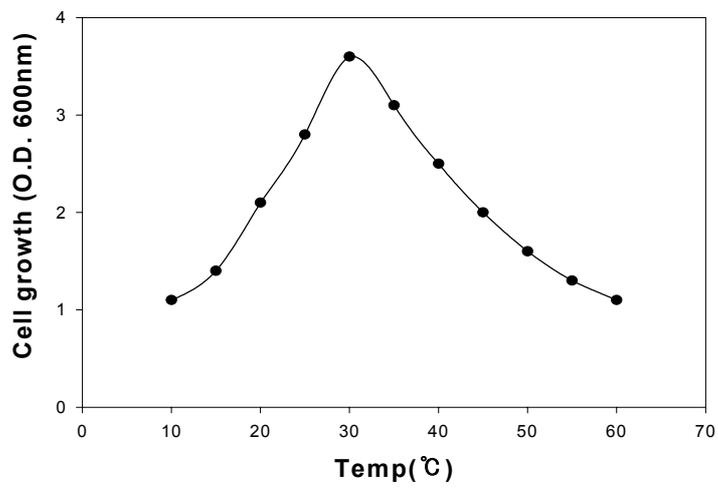


Fig. 5. Effect of growth temperature on cell growth of strain GB-019.

5. *Bacillus* sp GB-019의 배지조건 검토

1) 기본배지의 설정

최종선별된 *Bacillus* sp GB-019의 기본배지(soluble starch, soybean meal, yeast extract, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , MgSO_4) 성분들이 세포생장에 미치는 영향을 측정하기 위해 Plackett-Burman experimental design을 이용하여 각 배지성분들의 main effect를 계산한 결과 Fig 6.과 같이 Soybean meal이 생균수 증진에 미치는 영향이 가장 컸으며 KH_2PO_4 는 고농도로 배지에 존재시 균수 증진을 방해하였다.

2) 질소원 및 탄소원의 영향

최종선별된 *Bacillus* sp GB-019의 기본배지(soluble starch, soybean meal, yeast extract, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , MgSO_4)를 기초로 하여 배양온도 30℃, 배양시간 12h으로 고정한 후 질소원의 영향을 검토한 결과 Table 4.와 같이 viable cell number 및 *Penicillium* sp. 병원균에 대한 활성에 있어 meat extract, soybean meal 등이 우수하였다.

탄소원의 영향을 검토한 결과 Table 5.와 같이 xylose를 제외하고 전반적으로 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 또한 탄소원을 기본배지의 soluble starch로 사용하였을 경우 starch 농도에 따른 영향을 살펴본 결과 Fig 7.에서 나타나는 것처럼 함유농도 2%에서 생장이 가장 좋은 것으로 나타났다. 이들 결과로부터 대량생산을 전제로 경제성을 고려하여 질소원으로는 soybean meal을 탄소원으로는 starch를 선정하여 계속적인 실험에 이용하였다. starch가 선정된 이유는 다른 병원균에 대한 스펙트럼을 조사하는 과정에서 glucose 보다 전분을 이용하는 편이 평균스펙트럼이 높았으며 배양에 있어 탄소원에 대한 영향이 비교적 적은점에 있어 경제적인 측면을 고려하여 선정하였다.

3) 금속이온에 대한 영향

최종선별된 *Bacillus* sp GB-019의 각종 금속이온에 대한 영향을 검토한 결과 Table 6, 7과 같이 Mn^{2+} 첨가시 포자 생성에 가장 좋았으며 *Penicillium* sp.에 대한

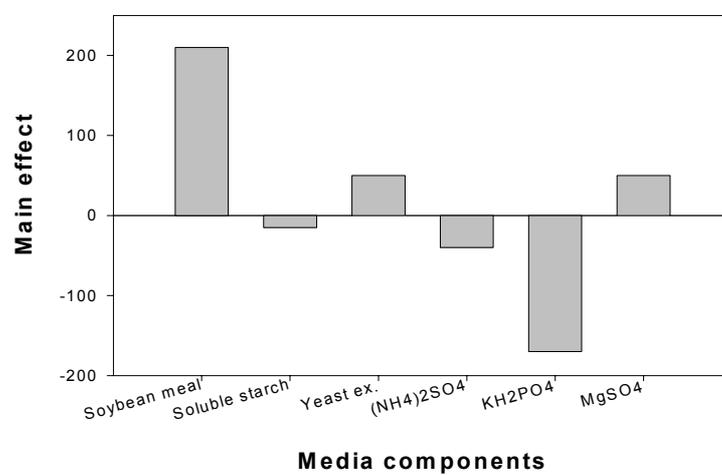


Fig 6. Effects of medium components on cell.

Table 4. Effect of nitrogen sources on the antifungal activity of starin GB-019.

Nitrogen sources	Viable cell number(cfu/ml)	Antifungal activity(mm)
Meat extract	5.2×10^9	28
Peptone	1.5×10^9	21
Corn steep liquor	7.8×10^9	19
Soybean meal	4.1×10^9	25
Casamino acid	9.2×10^7	17
Tryptone	2.8×10^9	21
Urea	1.2×10^7	15
Ammonium sulfate	4.2×10^8	17
Ammonium nitrate	3.1×10^8	16
Yeast extract	1.2×10^9	20
Control	1.9×10^9	27

Table 5. Effect of carbon sources on the antifungal activity of starin GB-019.

Nitrogen sources	Viable cell number(cfu/ml)	Antifungal activity(mm)
Glucose	2.9×10^9	28
Sucrose	1.5×10^9	26
Xylose	5.3×10^8	21
Glycerol	1.1×10^9	26
Molasses	1.2×10^9	25
Dextran	1.8×10^9	26
Control	1.9×10^9	27

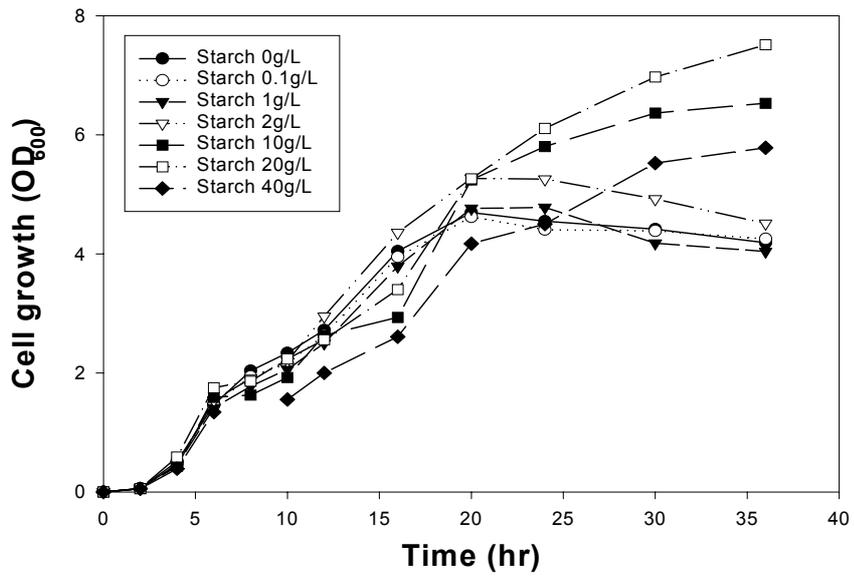


Fig 7. Effect of soluble starch concentration on cell growth of strain GB-019.

Table 6. Effect of concentration of mineral sources on sporulation of strain GB-019.

Mineral sources	Vegetative cells (cfu/ml)	Spore(cfu/ml)	Antifungal activity(mm)
Co ²⁺	9.2 x 10 ⁸	4.5 x 10 ⁸	25
Ca ²⁺	1.1 x 10 ⁹	7.8 x 10 ⁸	26
Fe ²⁺	8.3 x 10 ⁸	5.1 x 10 ⁸	25
Cu ²⁺	8.9 x 10 ⁸	4.8 x 10 ⁸	26
Mn ²⁺	2.2 x 10 ⁹	9.8 x 10 ⁸	28
Mo ²⁺	7.8 x 10 ⁸	4.3 x 10 ⁸	26
Ni ²⁺	8.9 x 10 ⁸	6.1 x 10 ⁸	27
Zn ²⁺	9.5 x 10 ⁸	8.5 x 10 ⁸	26
Control	1.9 x 10 ⁹	3.8 x 10 ⁸	27

Table 7. Effect of concentration of Mn²⁺ ion on the sporulation of strain GB-019.

Concentrations of Mn ²⁺ ion	Vegetative cells (cfu/ml)	Spore (cfu/ml)	% of spore formulation	Antifungal activity
0 mM	1.9 x 10 ⁹	3.8 x 10 ⁸	20	27
5 mM	2.7 x 10 ⁹	7.8 x 10 ⁸	29	28
10 mM	2.2 x 10 ⁹	9.8 x 10 ⁸	45	28
20 mM	1.5 x 10 ⁹	7.9 x 10 ⁸	53	25
50 mM	9.5 x 10 ⁸	6.5 x 10 ⁸	68	25

활성은 영향이 없는 것으로 나타났다. 또한 그 첨가 농도에 따라 포자로의 전환율은 높았으나 전체 균수 및 포자 수에 있어서는 10mM 농도가 가장 좋게 나타났다.

4) 최적배지 선정

최종선별된 *Bacillus* sp GB-019의 배양을 위한 최적배지원으로 탄소원으로는 starch를 질소원으로는 soybean meal을 포자 형성을 위한 금속이온은 Mn^{2+} 을 선정하였으며 Plackett-Burman experimental design을 이용하여 각 배지성분들의 main effect 결과 배지의 완충효과를 주기 위해 들어가는 지나친 인산염을 배제하고 pH 조정이 가능한 발효조의 이용을 전제로 material balance를 고려하여 다음의 Table 8.과 같이 단순한 조성을 생산배지를 고안하였다.

5) *Bacillus* sp GB-019의 포자형성 유도

Bacillus sp GB-019은 내생포자를 형성하는 특징이 있으므로 미생물의 안정성을 고려하여 영양세포의 포자로의 전환이 필요한 것으로 판단되어 안정적인 내생포자의 형성을 유도하였다. 이에 앞서 금속이온을 이용하여 어느정도 포자 전환율을 높였으나 좀더 높은 포자 전환율을 얻기 위하여 내생포자의 형성을 위해 내생포자 cortex 형성에 중요하게 작용하는 것으로 알려진 dipicolinic acid(DPA)의 첨가효과를 검토하였다. 금속이온의 경우 초기 배지성분에 넣어주어도 무방하나 DPA의 경우 배양초기에 배지에 첨가하면 대사산물 형성을 크게 저해하므로 배양과정 중에 첨가하여 안정적인 항진균성 대사산물의 생산과 내생포자를 유도하였다.

DPA의 첨가 시간은 생육이 최대를 이루고 포자의 형성을 시작하는 시기로 판단되는 배양 8시간 정도에 첨가를 하였다, 한편 첨가하는 DPA의 농도를 결정하기 위해 배양 후 8시간째 다음의 Table 9.와 같은 농도로 첨가하고 20시간째에 영양세포수, 내생포자수 그리고 항균활성을 조사하였다. 그 결과 DPA 농도에 따라 영양세포수는 감소하는 경향을 보였으나 포자형성 유도는 증가하는 경향을 나타냈다. 이 때 항균물질의 변화는 거의 없는 것으로 나타났다. 따라서 PDA 첨가농도는 배양완료 후 영양세포가 다량 존재하면 후발효의 문제가 발생하므로 포자전환률이 가장 높고 항균활성과 영양세포수가 모두 양호한 50 μ M을 첨가농도로 결정하였다.

Table 8. The compositions of the biomass and activity metabolite production.

Ingredients	Concentration
Soybean meal	1.0 %
Soluble starch	2.0 %
KH_2PO_4	0.3 %
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.25 %
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.049 %
MnCl_2	10 mM

Table 9. Effect of the concentration of DPA on the sporulation induction of *Bacillus* sp. GB-019.

Concentration of DPA (μM)	Vegitable cells (cfu/ml)	Spores (cfu/ml)	% of spore fromation	Antifungal activity ^{a)} (mm)
0	2.5×10^9	1.1×10^9	44	27
12.5	2.1×10^9	1.2×10^9	57	27
25	1.7×10^9	1.2×10^9	71	27
50	1.2×10^9	1.1×10^9	92	26
100	8.9×10^8	6.9×10^8	78	24

a) Diameter of clear zone against *Penicillium* sp.

6. 대량배양을 위한 최적화

최종선별된 *Bacillus* sp GB-019의 배양을 위해 얻어진 최적배지를 이용하여 발효조에서 대량생산을 위한 배양조건을 살펴보았다. 발효기에서 배양시 pH를 7.0 ± 0.2 , DO를 20% sat.로 조절하였다. 그 결과 Fig 8.에서 나타나는 것처럼 생균수의 경우 배양 8시간까지 급격히 증가한 후 점차적으로 감소하였으며, 포자 형성의 경우 배양 8시간 이후 점차적으로 형성되어 최종 포자수는 1.2×10^9 cfu/ml까지 증가하였다. 또한 발효기 배양시 배양시간에 따른 *Penicillium* sp. 와 *Botrytis cineria* 에 대한 항균활성을 측정한 결과 Table 10에서 처럼 배양 후 10시간 이후로 증가하여 약 18시간 후에 최대로 나타났으며 그때의 clear zone의 size는 약 26mm 정도를 나타내었다.

7. 제제화

상기에서 얻어진 배양물을 기본적인 제형인 액상 제제 검토를 위하여 Table 11.과 같은 배합비로 보조제를 첨가하여 미생물배양물을 이용한 제제를 만들고, 40°C에 보관하면서 viable cell number 및 항진균활성 검정을 통하여 제제의 안정성을 검토하였다. 그 결과 저장 4주 후에 10^8 수준으로 감소하였으며 12주 후에 10^7 수준으로 감소하였다. 또한 항진균활성은 점차적으로 감소하나 효과적인 면에서 크게 차이가 나지 않는 것으로 판단되었다. 이상으로 저장 안정성을 검토한 결과 액상제제로는 약 1년 정도 안정성이 유지되는 것으로 나타났다.

또한 고상의 경우 미생물 배양물 1L에 dextrin, soluble starch, lactose를 부형제로 하여 함량별로 첨가 후 동결건조 하여 각각에 대한 viable cell number를 측정하여 그 결과 Table 12의 결과처럼 lactose를 첨가하는 것이 비교적 좋은 것으로 나타났으며 부형제의 첨가량은 약 10% 수준이 바람직한 것으로 나타났다.

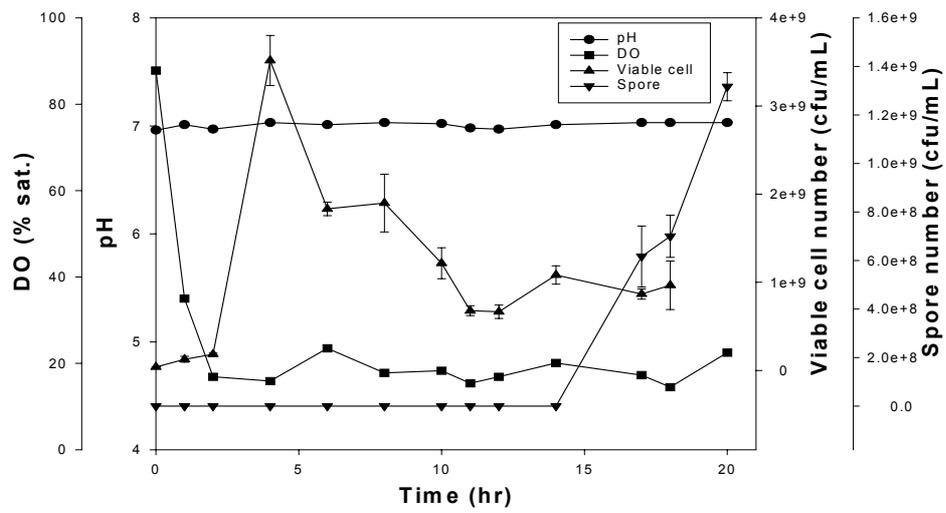


Fig 8. Fermentation of strain GB-019 (pH, DO control, production medium).

Table 10. Viable cell number and antifungal activity of starin GB-019 on jar fermentation.

Time (h)	Viable cell number (cfu/ml)	Antifungal activity ^{a)} (mm)
2	1.1 x 10 ⁸	0
4	3.4 x 10 ⁹	0
6	1.9 x 10 ⁹	11
8	2.0 x 10 ⁹	15
10	1.3 x 10 ⁹	19
12	1.3 x 10 ⁹	23
14	1.2 x 10 ⁹	26
18	1.1 x 10 ⁹	26
20	1.3 x 10 ⁹	26

a) Diameter of clear zone against *Penicillium* sp.

Table 11. Formulation of the culture broth.

Ingredients	Percent	Functions
Cultures	92	Active ingredient
Glycerol	5	Thickner
Potassium propionate	0.3	Preservative
Sodium sorbate	0.2	Preservative
Methyl- ρ -benzoate	0.1	Preservative
Tween 80	1.5	Sticker
H ₂ SO ₄	pH4.2	pH adjustant
Final volume with H ₂ O	to 1L	

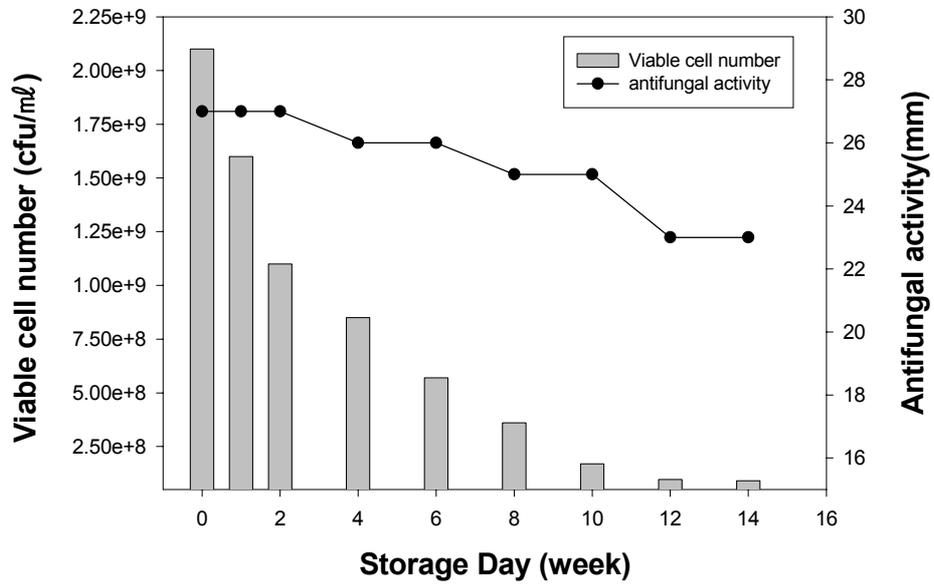


Fig 9. Stability of the formulated liquid type microbial preparations.

Table 12. Effect of concentration adjuvant on the formulated solid type microbial preparations.

Adjuvant		Total No. of viable cells	Total No. of viable cells	Rate of harvest(%)
Component	Content	before lyophilization (cfu/ml)	after lyophilization (cfu/ml)	
Dextrin	5	2.2×10^{12}	8.1×10^{11}	37
	10	2.2×10^{12}	1.3×10^{11}	59
	15	2.2×10^{12}	1.3×10^{12}	59
Soluble starch	5	2.2×10^{12}	8.5×10^{11}	39
	10	2.2×10^{12}	1.2×10^{12}	55
	15	2.2×10^{12}	1.5×10^{12}	68
Lactose	5	2.2×10^{12}	9.1×10^{11}	41
	10	2.2×10^{12}	1.6×10^{12}	73
	15	2.2×10^{12}	1.7×10^{12}	77

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구의 결과는 청과류 중 사과, 배, 포도, 단감 이외의 키위, 딸기 등 다른 주요 과일로 확대 연구가 가능하다. 또한, 수확후 선도유지 외의 재배중 발생하는 병해에도 적용할 수 있는 항진균활성 미생물 및 항진균활성 미생물 유래의 천연활성제 개발로 확대 발전이 가능하며, 일반 농산물의 곰팡이성 부패를 방제할 수 있는 연구로 발전이 가능하다. 따라서, 본 연구의 결과로 환경친화형 농업의 확대를 유도하고자 한다.

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도 (2001.8-2002.8)	1) 청과류 수확후 발생하는 주요 부패 곰팡이에 대한 항진균 활성 미생물의 동정, 독성검사 및 배양특성조사	15
	2) 선발균주의 청과류 수확후 최고의 부패 억제를 위한 처리방법 실험	55
	3) 청과류 선도유지를 위한 유용 미생물 선발균주의 생산 최적화 및 제제화	30
2차년도 (2002.8-2003.8)	1) 미생물제제와 키토산 종류 및 농도별 혼용시험	30
	2) 미생물-키토산 제제와 칼슘제제의 종류 및 농도별 혼용시험	30
	3) 최종적으로 선발된 미생물-키토산-칼슘제제의 대량 생산 및 제제화 연구	40
최종평가	○ 국내산 청과류 수확후 출하기까지 부패율 10% 미만으로 유지할 수 있는 항진균활성의 미생물과 최적의 미생물제제 개발 및 이를 이용한 장기선도유지 기술 확보	60
	○ 제제화 방안 확보	25
	○ 관련 연구분야로의 확대적용 기반 확립	15

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1) 예상 활용 분야

- 농작물의 수확후 장기선도유지제 개발
- 농작물 재배용 미생물농약 : 묘종, 정식, 성장기, 수확기

2) 현장보급 방안

- 과수원 경영 농가를 중심으로 우선 보급 실시
- 일선 농가에서 사용이 용이한 형태로 제제화 (액상 또는 분말)
- 농협, 유기농 협회등 농민단체를 통한 보급 활성화 추진

3) 기업화 방안

- 정부출연 시설화 자금 활용 또는 창업투자사와 연계하여 생산시설 확보
- 국제특허 획득을 통한 수출 적극 추진

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

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

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

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

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

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

생물농약이 세계적으로 차지하는 매출액은 전체농약 300억불 중 1%에 해당하는 3억불에 지나지 않으며, 개발 실용화된 70여종중 각국에서 많이 사용되고 있는 미생물 살충제인 Bt제를 제외하면 대부분의 생물농약 사용량은 많지 않은 편이다. 현재 Bt제

이외의 생물농약은 화학농약보다 효과가 우수하거나, 화학농약에 의한 문제점으로 도출된 약제저항성 문제 또는 방제가 어려운 뿌리혹 세균병의 방제제로 이용되고 있다.

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

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

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

제 7 장 참고문헌

- Asaka, O. and M. Shoda. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4081-4085.
- Benbrook, C.M., E. Groth, J.M. Halloran, M.K. Hansen, and S. Marquardt. 1996. Pest management at the crossroads, P. 272. Consumers Union, Yonkers.
- Brannen, P.M. 1995. Potential modes of action for suppression of root diseases and yield enhancement when using *Bacillus subtilis* seed inoculants on cotton, p. 205-208. *In* Proceedings of the Beltwide Cotton Production Research Conferences. National Cotton Council, Memphis, TN.
- Cook, R.J., W.L. Bruckart, J.R. Coulson, M.S. Goettel, R.A. Humber, R.D. Lumsden, J.V. Maddox, M.L. McManus, L. Moore, S.F. Meyer, P.C. Jr. Quimby, J.P. Stack, and J.L. Vaughn. 1996. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation. *Biol. Control.* 7, 333-351.
- Dernoeden, P.H. and M.S. McIntosh. 1991. Disease enhancement and Kentucky bluegrass quality as influenced by fungicides. *Agron. J.* 83, 322-326.
- Dowling, D.N. and F. O'Gara. 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends in Biotechnol.* 12, 133-141.
- Duke, S.O., J.J. Menn, and J.R. Plimmer. 1993. Challenges of pest control with enhanced toxicological and environmental safety, p. 113. *In* Duke, S.O., J.J. Menn, and J.R. Plimmer (eds.), *Pest Control with Enhanced Environmental Safety*. American Chemical Society, Washington, DC.
- Effler, W.T., R.D. Tanner, and G.W. Malaney. 1989. Dynamic in situ fractional of extracellular proteins produced in a bakers yeast cultivation process, p. 235-255. *In* Fiechter, A., H. Okada, and R.D. Tanner (eds.), *Bioproducts and bioprocesses*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.
- Elmholt, S. 1991. Side effects of propiconazole (Tilt 250 EC) on non-target soil fungi in a field trial compared with natural stress effects. *Microb. Ecol.* 22, 99-108.

- Fiddaman, P.J. and S. Rossal. 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 74, 119-126.
- Fravel, D.R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of diseases. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26, 75-91.
- Gutterson, N. 1990. Microbial fungicides: recent approaches to elucidating mechanisms. *Crit. Rev. Biotechnol.* 10, 69-91.
- Hyun, M., B. Kim, I. Chang, H. Park, H. Kim, G. Kim, M. Kim, and D. Park. 1999. Isolation and identification of an anaerobic dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* IR-1. *J. Microbiol.* 37, 206-212.
- Kenney, D.S., C.R. Howell, and E.B. Minton. 1992. Studies on the mode of action of *Bacillus subtilis* as a biocontrol agent in cotton, P. 198. In Proceedings of the Beltwide Cotton Production Research Conferences. National Cotton Council, Memphis, TN.
- Lewis, J.A. and G.C. Papaizas. 1984. An approach to stimulate population proliferation *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soil. *Phytopathology* 74, 1240-1244.
- Liang, L.N., J.L. Sinclair, L.M. Mallory, and M. Alexander. 1982. Fate in model ecosystems of microbial species of potential use in genetic engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 708-714.
- Linderman, R.G., and R.G. Gilbert. 1975. Influence of volatiles of plant origin on soil borne plant pathogens, p. 90-99. In Bruehl, G.W. (Ed.), *Biology and Control of Soil-Borne Plant Pathogens*. American Phytopathological Society, St Paul, MN.
- Klich, M.A., A.R. Lax, and J.M. Bland. 1991. Inhibition of some mycotoxigenic fungi by iturin A, a peptidolipid produced by *Bacillus subtilis*. *Mycopathologia* 116, 77-80.
- Rubin, A.J., E.A. Cassel, O. Henderson, J.D. Johnson, and J.C. Lamb III. 1966. Microfloatation: new low gas-flow rate foam separation technique for bacteria and algae. *Biotechnol. Bioeng.* 8, 135-151.
- Russell, P.E. 1995. Fungicide resistance: occurrence and management. *J. Agric. Sci.* 124, 317-323.

- Siala, A. and T.R. Gray. 1974. Growth of *Bacillus subtilis* and spore germination in soil observed by a fluorescent-antibody technique. *J. Gen. Microbiol.* 81, 191-198.
- Silo-suh, L.A., B.J. Lethbridge, S.J. Raffel, H. He, J. Clardy, and J. Handesman. 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2023-2030.
- Strange, R.N. 1993. Plant disease control: towards environmentally acceptable methods, p. 354. Chapman and Hall, New York.
- Utkhede, R.S. 1984. Antagonism of isolates of *Bacillus subtilis* to *Phytophthora cactorum*. *Can. Bot.* 62, 1032-1035.
- Weller, D M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26, 379-407.
- Wright, S.J.L. and R.J. Thompson. 1985. *Bacillus* volatiles antagonize cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 30, 263-267.