

KAERI/RR-3226/2010

방사선이용 생분해성 항진균제 개발

Development of Biodegradable
Fungicide by Radiation

KAERI

한국원자력연구원

제 출 문

한국원자력연구원장 귀하

본 보고서를 2010년도 “방사선이용 생분해성 항진균제 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2011. 01.



KAERI

연구기관명 : 한국원자력연구원

과제책임자 : 이 영 근

참 여 자 : 김 동 섭
정 일 윤

요 약 문

I. 제 목

방사선이용 생분해성 항진균제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

II-1) 목 적

방사선을 이용한 미생물 유래의 생분해성 항진균제를 개발

II-2) 필요성

부차적인 환경오염을 유발하는 화학농약을 대체할 수 있는 생분해성 항진균제의 개발이 요구되며, 방사선을 이용하여 항진균성을 향상시킨 돌연변이체 개발 연구가 바람직함.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 항진균성 기작 연구
- 생물제제 제조
- 생물제제의 포장시험
- 특허출원 및 생물제제 제조기술 이전

IV. 연구개발결과

전년도 발견된 항진균성 생물질의 항진균 기작을 규명하기 위하여 형질전환 및 발현 연구를 통해 *srb* 유전자와 깊은 관련이 있음을 확인하였고, 27번 분획 (WJ5a17-27)의 최저저해농도가 $100\mu\text{g}/\ell$ 인 것으로 나타났음.

- 담체(carrier), 흡착제(sticker), 자외선차단제(UV protectant), 영양원(polymer), 계면활성제(adhesion aid)의 조합을 통하여 최적 제제를 제조하였음.
: Zeolite + CMC + Congo red + Starch + Tween 80
- 포트시험을 통하여 작물병 방제효과를 확인하였음.
 - 탄저병의 경우, 고추 52.4%, 배추 50.0%, 무 60.0%의 방제효과를 보였음.
: 시비 방법 개선 및 타 제제와의 병행처리가 요구됨.
 - 고추 역병의 경우 90.0%의 방제효과를 보였음.
 - 뿌리썩음병의 경우, 고추, 배추, 무 모두 95% 이상의 방제효과를 보였음.
- 특허출원을 위하여 특허균주기탁을 완료하였으며(한국미생물 보존센터, KFCC 11474p, KFCC 11475p), 기술이전을 위한 생산단가 조사 결과 수익성이 있을 것으로 생각됨.

단위(원)

연구실	기술이전 후 (1-2년차)		기술이전 후 (3년차 이후)
	0.64 톤	2 톤	6 톤
월 생산규모 비용(/kg제품)			
생산단가	11,560	7,620	4,620
년간 생산량	640 개 × 12 월 = 7,680	2,000 개 × 12 월 = 24,000	6,000 개 × 12 월 = 72,000
년간 매출액	115,200,000	240,000,000	720,000,000
제품단가	15,000	10,000	10,000
순익(/년)	26,419,200	41,120,000	360,360,000

V. 연구개발결과의 활용계획 및 건의사항

- 발견된 생물제제를 제조하고, 실제 경작지에서 포장시험을 실시한 후 실용화 추진.
- 방사선기술을 바탕으로, 화학농약을 대체하는 친환경적인 생물제제 제조의 기반기술 전파 및 화학비료를 대체하는 생물비료 제조 연구 활성화 기대.



SUMMARY

I. Project Title

Development of Biodegradable Fungicide by Radiation

II. Objective and Objective of the Project

II-1) Objective

Development of biodegradable and microbiological fungicide by radiation

II-2) Objective

It is essential to develop the alternative and biodegradable fungicide instead of chemical pesticide by which substantial environmental pollution could occur. So it is promising to study and develop the mutants of the enhanced antifungal activity by using radiation.

III. Scope and Contents of Project

- Research for Antifungal action mechanism
- Production of Biopesticide
- Pot Experiment of Biopesticide
- Economic Evaluation for Technology Transfer

IV. Result of Project

The expression of *srb* gene was proven to be closely related to the antifungal activity. Minimum inhibition concentration (MIC) of fraction number 27 (WJ5a17-27) was $100\mu\text{g}/\ell$.

- Optimum manufacturing formulae was made in combination with carrier(Zeolite), sticker(CMC), UV protectant(Congo red), polymer(Starch) and adhesion aid(Tween 80).

- Antifungal activities were analysed by the pot experiments.
- ; Protection rates against Anthrax in pepper, Chinese cabbage and radish were 52.4%, 50.0% and 60.0%.
- ; Protection rate against phytophthora blight of pepper was 90.0%.
- ; Protection rates against root rot in pepper, Chinese cabbage and radish were more than 95%.
- Two cell culture collections were registered for the patent submission (KFCC 11474p and KFCC 11475p).

V. Proposal for Applications

- Industrialization of developed biopesticide possibly expected to be followed by the verification of the authorized field experiments.
- Radiation technology and the basic technology of the biopesticide production could be disseminated environmentally friendly instead of chemical pesticide production technology.

The logo for KAERI (Korea Atomic Energy Research Institute) is centered on the page. It features a stylized, light gray graphic of a particle or atom with three spheres and curved lines, positioned above the word "KAERI" in a bold, sans-serif font.

KAERI

CONTENTS

Chapter 1 Introduction.....	1
Chapter 2 Current status.....	2
Chapter 3 Project content and result	3
Section 1 Research for antifungal action mechanism.....	5
Section 2 Production of Biopesticide.....	9
Section 3 Pot Experiment of Biopesticide.....	13
Section 4 Economic Evaluation for Technology Transfer	16
Chapter 4 Achievement.....	18
Chapter 5 Prospect.....	19
Chapter 6 Reference.....	20

목 차

제 1 장 서론	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황	2
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	3
제 1 절 항진균성 기작 연구	5
제 2 절 생물제제 제조	9
제 3 절 생물제제 포장시험	13
제 4 절 특허출원 및 생물제제 제조기술 이전.....	16
제 4 장 연구개발목표 달성도	18
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	19
제 6 장 참고문헌	20

KAERI

제 1 장 서론

1. 연구개발의 필요성

산업화와 현대문명의 발달로 환경오염이 가중되고 있다. 농작물의 재배와 관련하여 발생할 수 있는 경작지 오염원중에는 각종 화학합성 농약이 대표적이다. 적은 유효성분 살포량으로도 기존 농약과 대등 혹은 우월한 약효를 나타내면서 환경오염 유발을 최소화할 수 있는 미생물제제를 개발하고 도입하는 것이 시급하다. 이를 위하여, 미생물유래 환경친화적이며 생분해성인 항진균제의 개발이 요구된다.

가. 기술적 측면

- 방사선을 이용한 돌연변이체 유도기술은 유전자조작이나 화학물질을 사용하는 기술의 단점인 환경교란 또는 오염의 가능성이 배제됨.
- 미생물제제의 경우 환경적응을 위한 인위적인 조성물 첨가가 어려운 반면, 생분해성 농약제제의 경우 최소한의 첨가물만으로 제조가 가능하여 효율적인 기술임.

나. 경제·산업적 측면

- 유기농 채소·작물의 효율적 생산이 가능하여 국민의 생활수준 향상에 따른 폭증하는 수요를 충족할 수 있게 되고,
- 한·미 FTA 등 농산물 개방시대에도 국제 경쟁력을 보유한 유기농 산업화가 가능.

다. 사회·문화적 측면

- 유기농의 활성화로 안정적 농업 생산활동 및 국민의 건강 증진에 기여하며,
- 방사선의 유익한 이용의 현실적 이해 및 전파가 가능.

2. 연구개발 목표 및 내용

가. 연구개발 목표

- 항진균제 제조
- 포장시험 및 실용화

나. 연구개발 내용

- 항진균성 기작 연구
- 생물제제 제조
- 생물제제 포장시험
- 특허출원 및 생물제제 제조기술 이전

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 방사선을 이용한 돌연변이체 유도 연구는 세계적으로 전무하고, 본 연구실에서 1997년 이후 수행되어 왔음. 섬유소분해 증강.소멸 돌연변이체(*Pleurotus ostreatus*), 니켈저항성 증강.소멸 돌연변이체(*Entrobacter* spp.), 납결합성 증강.소멸 돌연변이체(*Acinotobacter* spp.), 등.
- 1960년대 벼의 고사병에 효능이 있는 blasticidin-S와 kasugamycin을 발견하였고, 의료용 항진균제인 griseofulvin이 미생물로부터 발견되어 사용됨.
- 1970년대에는 괄목할만한 polyoxin과 validamycin이 일본에서 발견되어 대부분의 벼의 병해 방제에 사용됨 (*Streptomyces* spp.).
- 1990년대부터 *Pseudomonas* spp.로부터 분리된 phenylpyrrole과 *Strobilurus tenacellus*로부터 분리된 strobilurin이 함유된 상품이 널리 사용되고 있음.
- 항진균 활성을 갖는 미생물 균주를 이용한 미생물제제는 동부한농에서 2000년에 처음으로 제품을 출시. Ecobiomed(주) 등 총 6개 벤처기업이 토양부숙제, 토양첨가제 등의 미생물제제를 개발하여 상용화를 추진중. 이와 같이 미생물제제는 지금까지 세계적으로 180여종 800여 품목이 개발중이나 미생물유래 항진균성 생물질 개발은 미약한 상태임.
- 방사선을 이용한 돌연변이 유도 및 응용기술 개발이 편리하고 환경친화적임에도 선행연구가 없다는 이유로 초기 단계에 있음.
- 미생물자체를 사용하는 농약의 개발이 시도되고 있으나(미생물제제), 누적된 사용으로 인하여 대상 병원균에 대해 저항성을 보유하게 되는 경향이 있음(*Bacillus subtilis*에 대한 *Botrytis cinerea*의 저항성 생성). 또한, 환경에 시비하였을 때 활성이 있는 균집수를 일정하게 유지하기가 힘들고, 뿐만아니라 실온에서의 저장 후에도 안정적인 활성을 유지할 수 있는 보조조성물의 조합이 여의치 않은 상태임. 따라서 이러한 단점이 저감된 생분해성.항진균성 생물질의 개발이 필요함.
- 미생물유래 생분해성 항진균성 물질의 발견이 쉽지도 않고, 발견되어도 기존에 알려진 것이거나 복합체 형태로 되어 있어서 분리.정제가 어려운 실정임.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

미생물을 이용한 생물학적 방제 연구는 1990년대 초부터 세균과 곰팡이를 이용한 식물병원성 진균류 제어연구에 집중되어 수행되어오고 있다. 현재까지 알려진 미생물 살균제제의 대부분은 *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Agrobacterium*, *Burkholderia* 등의 세균과 *Trichoderma*, *Gilocladium*, *Fusarium*과 같은 진균으로부터 유래한 것이다(Fravel 등, 1998). 현재 40여개에 달하는 미생물 살균제가 등록된 상태이며 대부분의 제품들은 토양전염성인 *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Phytophthora* 등의 식물병원성 진균류의 방제용 제품으로서 시장점유율이 아직 미비한 실정이다. 식물병원성 곰팡이들에 대하여 길항성을 보이는 미생물들은 각종 대사산물과 세포벽 분해효소들을 분비하여 길항작용을 하는 것으로 알려져 있다(Fravel 등, 1998). 또한 병원균이 접근할 수 없도록 미리 식물 표면을 점유하여 새로운 장벽을 형성하거나 필수 영양물질을 먼저 섭취함으로써 병원균의 생장을 억제하기도 한다. *B. subtilis*의 경우, iturin 계열의 항생물질을 분비하여 복숭아 brown rot의 병원균인 *Monilinia fructicola*을 억제하였고(Arrendale 등, 1988) *B. subtilis* NB22를 분리하여 그 활성 물질의 성분이 iturin A 물질임이 증명되었다(Ohno 등, 1996). *Pseudomonas*의 경우, 밀에 뿌리병을 일으키는 *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*에 강력한 길항작용을 보이는 *P. fluorescens*을 토양에서 분리하는데 성공하였고(Weller, 1988; Cook, 1992; Weller 등, 1986), phenazine계(Keel 등, 1992; Thomashow 등, 1990) 및 2,4-diacetylphloroglucinol이란 항생물질이 밀의 뿌리썩음병 방제에 효과를 보이는 요인임이 밝혀졌다(Keel 등, 1992). *Trichoderma*의 경우, 키틴을 분해하는 chitinase을 생산하여 체외로 분비함으로써 병원성 진균의 세포벽을 분해함으로써 병원성 진균의 방제에 효과를 나타내는 것으로 알려졌다. 최근 Myxobacteria에서 발견된 soraphen 화합물이 진균류의 acetyl-CoA carboxylase를 억제하여 항진균 효과를 나타냄으로써(Gerth 등, 1994), 진균류의 tubulin(Butters 등, 1995), 미토콘드리아 호흡, 포도당 수송과 연관된 인산화 대사(Arima 등, 1965) 등이 새로운 살균제 탐색의 대상이 되고 있어 이들의 생리 활성을 억제하는 화합물들을 미생물이 분비하여 항진균 작용을 할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 식물체가 생성하는 chitinase (PR-3)와 osmotin (PR-5) 등의 PR 단백질(Lorito 등, 1996; Yun 등, 1997)을 비롯한 식물체 유래 항진균 단백질에 대한 관심 또한 증가되고 있는 실정이다.

*B. subtilis*는 높은 온도 내성, 액체 배양 시 빠른 성장, 저항성포자의 형성 등 대량생산이 용이하기 때문에 많은 연구자들의 관심을 모으고 있으며, *Saccharomyces cerevisiae* 및 *Lactobacillus* sp. 등과 더불어 미국 식품의약국

(FDA)에 의해 인체 및 환경에 무해한 미생물로 인정받고 있다. 따라서 안전하고 환경 친화적인 농산물 생산에 기여할 수 있는 유익한 미생물이라 할 수 있다. 현재 *B. subtilis*는 주로 토양전염성 식물병 방제용 종자처리제나 수확 후 야채 등의 부패방지용으로 사용되고 있다(Fravel 등, 1998).

향진균성 미생물의 기능을 개량하고 특성을 연구하기 위해서는 야생형으로부터 유전자 돌연변이체를 확보해야 효과적이다. 이러한 목적으로 종래에 주로 이용되는 화학적 돌연변이원인 EMS(ethylmethane sulfonate), EtBr(ethidium bromide), MNNG (N- methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) 등은 인체에 치명적인 발암원으로 판명되어 그 사용이 극히 제한되고 있으며, UV를 이용한 돌연변이체 유도는 그 효율이 낮은 것으로 알려져 있다. 방사선은 생체고분자에 여기와 이온화를 일으키며, 적은 조사량에서도 비교적 큰 효과를 일으켜 다양한 구조적 변화를 초래하여 기능의 변화를 가져온다. 방사선은 생체고분자의 주사슬결합을 분해하거나 분자사이의 화학적 결합인 가교를 형성한다(von Sonntag, 1987). UV나 X-ray의 특성과는 달리 감마선은 투과력이 크고 선량의 강도가 커 조작의 시행횟수를 최대한 줄일 수 있어 시간과 경제적 효과 또한 뛰어나다. 생물은 감마선과 같은 이온화 방사선에 노출되면 세포 내 DNA에서 다양한 돌연변이가 야기된다 (Hutchinson, 1985; Halliwell 등, 1991; Becker 등, 1993). DNA에 나타나는 여러 종류의 손상은 한 가닥 절단(single strand break, SSB), 두 가닥 절단(double strand break, DSB), 염기 손상, 염기 손실, 변성대(denatured zone) 형성, 분자 내 가교형성, DNA-단백질 가교형성 등이다(Cerutti, 1974). 이처럼 방사선에 의해 생체고분자인 DNA에 변화가 유도되면 세포 내 DNA 회복 기작이 작동하여 회복되거나 일부의 변화는 회복되지 못하여 DNA 서열의 변화를 초래하는 원인이 된다. 감마선을 이용하여 균주의 돌연변이를 유도하는 방법은 물리적 힘을 이용한 유전자 조작방법이다. 방사선은 진화 과정을 통해 얻게 되는 유전적 변이를 단시간에 생물의 유전자에 축적시키는 효과를 주게 된다(Lee 등, 2000). 따라서 방사선 조사로 생성된 돌연변이체는 환경적응성이 높고 생태계 교란의 위험성이 미미할 것으로 추정 된다(Lee 등, 2000). 기존의 화학합성농약은 대부분 유기인 제제의 난분해성 물질로 단기간의 농산물 증산에는 도움을 주나 토양에 잔류하여 토양의 오염을 야기하고 토양 내 유용 영양원의 생물학적 최적 이용비율 및 분해능을 변화시켜 일차적으로는 토양 내에 존재하는 미생물의 성장을 억제하여 식물의 생장에 필요한 유용영양원 및 에너지원의 mineralization에 영향을 받게 된다. 따라서 이차적으로는 이러한 요인들에 의한 작물의 생산량이 감소와 비례하여 농가의 소득에 큰 영향을 미치게 된다. 따라서 미생물이나 미생물의 생산 물질을 이용한 미생물제제의 개발 및 농업에의 이용은 시

대적 흐름이며, 21세기를 주도할 생명과학산업 분야의 한 축을 형성한다.

본 연구진은 방사선을 이용한 생물 폐자원의 재이용에 관한 연구를 수행하는 과정에서 돌연변이를 이용한 유용한 폐자원 분해균주 개발 및 청정사료화 기술을 확립하였다. 이러한 기술을 바탕으로 청정사료화와 각종 농작물의 재배 시 문제되는 각종 유해곰팡이를 효과적으로 방제할 수 있는 방사선을 이용한 미생물제제의 개발은 폐자원의 효율적 이용과 이를 통한 환경오염원의 분해의 부가적 기능뿐만 아니라 농업의 생산성 향상에 기여할 것이며, 원자력의 평화적 이용에 대한 대국민홍보에도 필수적이다.

국내외적으로 항진균 활성 세균의 돌연변이체(활성 소실 혹은 증가된 특성을 갖는)의 유도에 관한 연구는 전무한 실정이다. 특히, 방사선 조사시설이 필요하고 방사성 동위원소를 이용해야 하는 특수성으로 인해 소수의 선진국에 국한되어 방사선 처리기술이 연구되고 있으며 미생물에 관련해서는 주로 식품이나 의료기기 등의 멸균에 이용되고 있고, 유용균주의 돌연변이 유도기술에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 다만 국내의 본 연구진에 의해서 유용 돌연변이체를 유발한 연구가 유일하다(Lee 등, 2000). 본 연구는 다양한 미생물로부터 새로운 항진균 활성을 나타내는 생물질을 탐색하고, 방사선으로 항진균 활성이 증강된 돌연변이체를 유도하여, 관련 생물질을 이용한 식물병원성 진균의 방제 및 환경 친화적 생물체제제로서의 가능성을 확인하고자 하였다.

제 1 절 항진균성 기작 연구

1. 재료 및 방법

P. lentimorbus WJ5a17 균주의 항진균 활성 기작을 연구하고자, 방사선조사에 의해 항진균 활성을 잃은 *P. lentimorbus* WJ5m12 균주에 여러 방법으로 *srbL* 유전자의 형질전환을 시도하였다. *E. coli* M15 와 항진균 활성 결핍 돌연변이체 (*P. lentimorbus* WJ5m12)를 각각 5 ml의 LB 액체배지와 NB에서 배양하여 20 ml의 LB 액체배지와 NB 배지에 1 ml씩을 접종한 후 4-5시간 배양하여 흡광도 0.5-0.6일 때 세포를 원심분리기로 회수하고 이를 10% glycerol 용액으로 세 차례 세척하였다. 세척된 미생물을 2 ml의 10% glycerol 용액에 분주하여 -70℃에 보관하여 electro-competent cell로 사용하였다. 클로닝한 vector를 각각 1 µg/10 µl 씩 사용하여 electro-competent cell 90 µl와 섞어 4℃에서 30분간 방치하였다. Electroporation(40 µF, 500 V)을 수행한 후 각각 900 µl의 LB 액체배지와 NB배지를 첨가하여 30℃에서 1시간 동안 배양하였고 LB와 NA에 50 µg/ml의 ampicillin이 첨가된 배지에 도말하여 형질전환체를 유기하였다. 또한 CaCl₂를 이용한 간접전달

방법, 직접전달 방법으로 0.1 μm bead를 이용하여 직접 세포막에 물리적 자극을 주어 세포막의 불안정성을 유도하는 Bead beater method(Biospec Products, INC. USA), Osmolarity 조절에 의한 형질전환, 그리고 방사선을 이용하여 세포막의 불안정성을 유도하는 Gamma-ray irradiation method를 사용하였다. *srb* 염기서열로부터 설계한 K868-(5)와 K868-(3) primer를 사용하여 *B. lentimorbus* WJ5의 *srb* 상동유전자인 *srbL*을 증폭하여 pQE30 vector에 클로닝 하였다(pSRBL). 이를 *E. coli* XL1에 형질전환하여 SDS-PAGE를 이용하여 발현을 관찰하였다. *P. lentimorbus* WJ5a17 균주의 항진균 활성 기작을 연구하고자, 방사선조사에 의해 항진균 활성을 잃은 *P. lentimorbus* WJ5m12 균주에 여러 방법으로 *srbL* 유전자의 형질전환을 시도하였다. *E. coli* M15 와 항진균 활성 결핍 돌연변이체 (*P. lentimorbus* WJ5m12)를 각각 5 ml의 LB 액체배지와 NB에서 배양하여 20 ml의 LB 액체배지와 NB 배지에 1 ml씩을 접종한 후 4-5시간 배양하여 흡광도 0.5-0.6일 때 세포를 원심분리기로 회수하고 이를 10% glycerol 용액으로 세 차례 세척하였다. 세척된 미생물을 2 ml의 10% glycerol 용액에 분주하여 -70°C 에 보관하여 electro-competent cell로 사용하였다. 클로닝한 vector를 각각 1 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ 씩 사용하여 electro-competent cell 90 μl 와 섞어 4°C 에서 30분간 방치하였다. Electroporation(40 μF , 500 V)을 수행한 후 각각 900 μl 의 LB 액체배지와 NB배지를 첨가하여 30°C 에서 1시간 동안 배양하였고 LB와 NA에 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ampicilin이 첨가된 배지에 도말하여 형질전환체를 유기하였다(Dower 등, 1988; Hanahan, 1983). 또한 CaCl_2 를 이용한 간접전달 방법, 직접전달 방법으로 0.1 μm bead를 이용하여 직접 세포막에 물리적 자극을 주어 세포막의 불안정성을 유도하는 Bead beater method(Biospec Products, INC. USA), Osmolarity 조절에 의한 형질전환, 그리고 방사선을 이용하여 세포막의 불안정성을 유도하는 Gamma-ray irradiation method를 사용하였다. *srb* 염기서열로부터 설계한 K868-(5)와 K868-(3) primer를 사용하여 *B. lentimorbus* WJ5의 *srb* 상동유전자인 *srbL*을 증폭하여 pQE30 vector에 클로닝 하였다(pSRBL). 이를 *E. coli* XL1에 형질전환하여 SDS-PAGE를 이용하여 발현을 관찰하였다.

2. 결과 및 논의

CaCl_2 를 이용한 간접전달을 이용한 형질전환 시스템은 비교적 *E. coli*를 대상으로 할 때, 높은 효율을 나타낸 반면, *Bacillus*를 host로 한 경우는 거의 효율이 없었다(Table 1). Ca 대신 Mg를 사용한 경우도 유사한 결과를 관찰할 수 있었으며, 두 양이온을 혼합한 용액에서도 비슷한 결과를 얻었다.

Table 1. Transformation efficiency by 100 mM CaCl₂ method

Strains	Transformants/ μ g DNA		
	pQE30: <i>srbL</i>	pDL276	pMK3
<i>Bacillus lentimorbus</i> WJ5	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i> 168	-	0	0
<i>E. coli</i> XL1	1 \times 10 ⁹	1 \times 10 ⁸	1 \times 10 ⁹
<i>E. coli</i> DH5 α	1 \times 10 ⁹	-	1 \times 10 ⁹

0.1 μ m bead를 이용하여 직접 세포막에 물리적 자극을 주어 세포막의 불안정성을 유도하였다. Table 2는 습식조건(bead vol. < cell suspension vol.)으로 4,000 rpm에서 1분 동안 처리한 조건에서의 형질전환율을 나타낸다. *B. lentimorbus* WJ5m12에 pQE30:*srbL*을 형질전환시켰을 때, double crossing-over에 의한 chromosomal DNA로 integration되어 항생제 저항성을 획득하였으나, plasmid 형태로 존재는 확인되지 않았다. 건식조건(bead vol. > cell suspension vol.), 시간, DNA 첨가 시기(beating 전/후) 등과 같은 변수를 추가로 조절하였다.

Table 2. Transformation efficiency by bead beater method

Strains	Transformants/ μ g DNA		
	pQE30: <i>srbL</i>	pC194	pMK3
<i>Bacillus lentimorbus</i> WJ5	< 1 \times 10	< 1	< 1
<i>Bacillus subtilis</i> 168	< 1	< 1	< 1

Bacillus 균주에 대하여 NaCl 농도를 1.6, 3.2, 6.4, 12.8, 29%로 조절하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 후, plasmid DNA가 녹아있는 ddH₂O에 incubation시켜 세포막의 불안정성을 높여 형질전환을 유도하였으며, 그 결과 0의 효율을 보였다.

방사선 역시 세포막의 불안정성을 유도할 수 있는 좋은 물리적 에너지이다. 변수로 DNA 첨가 조건(조사 전/후), Ca/Mg ion 첨가 유/무, 조사선량(0.16-2.4 kGy)을 조절하였다. *E. coli*와 *Bacillus* 균주에 대하여 test한 결과, test 변수 내에서 방사선만으로는 *E. coli*와 *Bacillus* 균주 모두에 대해서 형질전환이 유도되지는 않았

으나, 2가 양이온 첨가시 형질전환율이 0.16 kGy에서 약 $1 \times 10^8 / \mu\text{g}$ DNA으로 방사선 조사에 의한 치사율을 고려하지 않았을 때, 방사선 조사하지 않은 시료에 비하여 약 10배 정도 감소하는 경향을 나타내었다. 앞으로 치사율을 고려한 저선량에서의 형질전환 유도 가능성에 대한 연구가 요구된다.

Electroporation 법을 이용한 형질전환의 변수는 전압(2.5-0.6 kV), 전극길이(1-2 mm), 저항(100-800 Ω), capacity(25-50 μF), electroporation buffer(ddH₂O, 10% glycerol, sorbitol-mannitol-glycerol, PEB, OTB), DNA 농도를 조절하여 형질전환 시험하였다. 이 변수들 중, *E. coli*의 경우는 2.0 kV, 1 mm 전극길이, 200 Ω , 25 μF , 10% glycerol buffer 조건에서 Table 에 나타낸 가장 높은 효율을 얻을 수 있었다. *B. subtilis* 168과 *B. lentimorbus* WJ5의 경우는 LB-sorbitol 배지에서 배양 후, 1 kV, 200 Ω , 50 μF , 2 mm 전극, OTB buffer 조건에서 가장 높은 효율을 나타내었다(Table 3). *B. lentimorbus* WJ5의 경우는 초기 항생제 저항성이 형성되었으나, plasmid 분리에서 plasmid가 분리되지 않는 경향을 보였다.

Table 3. Transformation efficiency by electroporation method

Strains	Transformants/ μg DNA			
	pQE30: <i>srb</i>	pDL276	pMK3	pC194
	<i>L</i>			
<i>Bacillus</i>				
<i>lentimorbus</i> WJ5	-	< 1	< 1	< 1
<i>subtilis</i> 168	-	-	1×10^2	1×10^2
<i>E. coli</i>				
XL1	1×10^9	1×10^8	1×10^9	1×10^9
DH5 α	1×10^9	1×10^8	1×10^9	1×10^9

제 2 절 생물제제 제조

1. 재료 및 방법

*P. lentimorbus*로부터 유래되어 항진균 활성이 41% 증강된 방사선 돌연변이체 *P. lentimorbus* WJ5a17로부터 유효성분을 추출하였다. Fraction No. 9 (WJ5a17-9)와 Fraction No. 27 (WJ5a17-27)을 이용하여 식물병원성 진균 8 종에 대한 활성 검증을 하였다. 실험에 사용한 식물병원성 진균은 *Colletotrichum gloeosporioides* KACC 40804(C.g), *Colletotrichum higginsianum* KACC 40807(C.h), *Fusarium oxysporum* KACC 40239(F.o), *Phytophthora capsici* KACC 40475(P.c), *Pythium ultimum* KACC 40705(P.u), *Rhizoctonia solani* KACC 40124(R.s), *Rhizopus stolonifer*(R.st) 및 *Sclerotinia sclerotiorum* KACC 40923(S.s)으로 한국농업과학기술원 농업미생물 보존센터(KACC)로부터 분양 받았다(Table 4).

Table 4. Plant pathogenic fungi in this study

Strain	Symptom
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> KACC 40804(C.g)	Anthracnose(Red pepper, Bean, Ginseng, Strawberry etc.)
<i>Colletotrichum higginsianum</i> KACC 40807(C.h)	Anthracnose(Chinese cabbage, Radish)
<i>Fusarium oxysporum</i> KACC 40239(F.o)	Fusarium wilt(Chinese cabbage, Radish, Tomato, Potato, Sweet potato, Lettuce, Pine tree etc.)
<i>Phytophthora capsici</i> KACC 40475(P.c)	Phytophthora blight(Red pepper, Eggplant, Cucumber, Tomato etc.)
<i>Pythium ultimum</i> KACC 40705(P.u)	Pythium root rot(Red pepper, Chinese cabbage, Radish, Cucumber etc.), Damping-off(Cucumber)
<i>Rhizoctonia solani</i> KACC 40124(R.s)	Damping-off(Welsh onion, Red pepper, Water melon, Chinese cabbage, Oriental melon, Pumpkin etc.), Rhizoctonia root rot(Cabbage, Radish), Bottom rot(Chinese cabbage)
<i>Rhizopus stolonifer</i> (R.st)	Rhizopus fruit rot(Red pepper), Rhizopus soft rot(Chinese cabbage, Radish)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> KACC 40923(S.s)	Sclerotinia(Carrot, Red pepper, Eggplant, Radish, Water melon, Chinese cabbage etc.)

식물병원성 진균에 대하여 항진균 활성이 있는 미생물유래 생물질을 제제로 활용하기 위하여, WJ5a17-27 추출물에 보충제를 첨가하여 대량생산을 추구하고자, 환경 내에서 활성을 유지시키기 위한 최적 formulae 제조를 수행하였다.

Table 5는 생물제제를 구성하는 구성성분들로서 증량제(Filler/Carrier), 전착제(Sticker/Binder), 자외선차단제(UV protectants), 영양원(Polymer/ Nutrients) 및 계면활성제(Adhesion aids)로 구분되는 데 이들의 적절한 조합을 찾고자 하였다(Bernhard 등, 1998).

Table 5. Formulation of microbial bio-controller

Carriers/ Fillers	Stickers/ Binders	UV protectants	Polymers/ Nutrients	Adhesion aids
Almond oil	Alginic acid	Acid Orange 8	Alginate	Mineral oil
Corn oil	Carboxymethyl-	Acridine yellow	Compost	Tween 20
Olive oil	cellulose(CMC)	Alkali blue	Glucose	Tween 80
Palm oil	Gelatin	Bismark brown	Glycerol	Montanox 80
Clay	Glycerol	Congo red	Lactose	Flavonoid
Bentonite clay	Ethyl cellulose	Lissamine green	Peat	
Vermiculite	Methyl cellulose	Methyl orange	Peptone	
Alginate	Gum xanthan	Melanin	Rice flour	
Pyrex	Acrylic polymer	Riboflavin	Sawdust	
Zeolite	Gum arabic		Starch	
Charcoal			Potato dextrose	
Rise flour			Ethyl cellulose	
Wheat bran			Gelatin	
			Nitrocellulose	
			Sodium alginate	
			Polyacrylamide	
			CMC	
			Wheat bran	

이들 중 증량제(Filler/Carrier)로 zeolite, charcoal 및 powdered wheat bran, 전착제(Sticker/Binder)로 glycerol 및 CMC, 자외선차단제(UV protectants)로 congo red 및 riboflavin, 영양원(Polymer/Nutrients)으로 starch, PDB 및 CMC를 배합으로 36가지의 조합을 실험하였다. *R.stolonifer*에 대한 항진균 활성 및 포자발아 억제 정도를 조사하여 선별하였다(Lewis 등, 2001).

2. 결과 및 논의

Fig. 1에서 보는 바와 같이 WJ5a17-27 분획을 lyophilization 후 100 μ g 농도로 적용하였을 때가 최소저해농도인 것으로 나타났다.

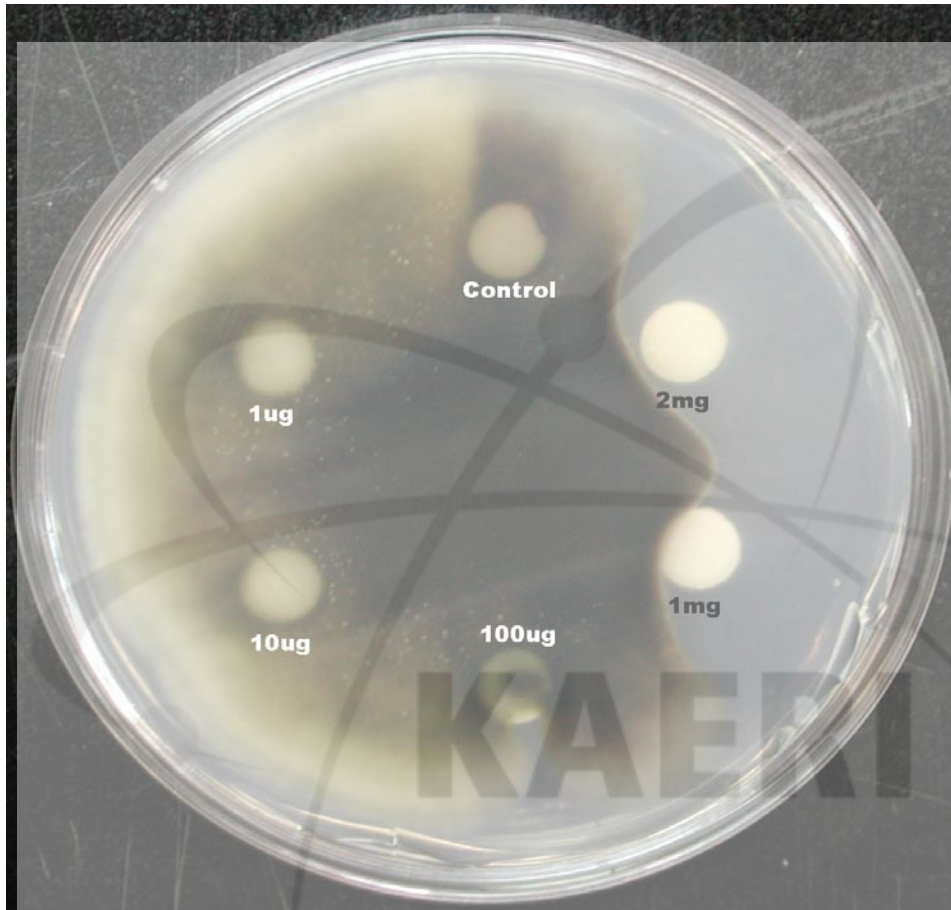


Fig. 1. Antifungal activity of fraction No. 27 (WJ5a17-27) from *P. lentimorbus* WJ5a17

선별된 생물제제 F1(7번, Zeolite + CMC + Congo red + Starch), F2(8번, Zeolite + CMC + Congo red + PDB) 및 F3(33번, Powered wheat bran + CMC + Congo red + CMC) 제제를 사용하여 식물병원성 진균에 대한 포자발아 억제효과를 조사하였다.

선별된 3 종류의 제제는 전체적으로 *C. g*에 대하여 87.0~93.0%의 포자발아 억제효과를 보였으며, F1 제제가 F2 및 F3 제제에 비하여 4.2, 1.1% 이상의 억제효과가 있었다. *C. h*에 대하여는 F1 제제는 54.5~66.1%의 포자발아 억제효과가 있었지만

F2 및 F3 제제는 11.0%이하의 낮은 억제효과가 있었다. 그러나 *F. o* 및 *P. c*에 대하여 F1 제제는 92% 이상의 포자 발아 억제 효과가 있었다. Singh 등(Singh 등, 2001)은 Withametelin의 *Colletotrichum* sp.에 대한 포자발아는 control이 90.5%이었고, Withametelin의 농도가 125, 250, 500, 750, 1000 ppm에서 발아율은 각각 85.2, 84.2, 83.7, 82.2, 81.7% 이었으며, *Fusarium* sp.는 control 78.7% 이었으며, 각각 78.3, 66.0, 63.0, 61.0, 48.7% 이었다고 하였는데 *C. g*와 *F. o*의 포자발아 억제율은 Singh 등의 실험에서보다 억제효율이 높았다. Getha 등은 항진균의 식물병원성 진균에 대한 포자 발아율을 시험한 것으로 slide glass에 진균 포자와 AF균을 함께 접종하여 발아하는 것을 현미경사진과 전자현미경 사진을 이용하여 관찰하였으며, AF균과 진균을 대치 배양하여 활성존의 형성을 사진으로 나타내었다(Getha 등, 2002). Paper disc에 항생물질 농도별로 접종하고 병원성 진균 *Alternaria*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Colletotrichum*, *Fusarium* 및 *Phomopsis* 속의 포자를 접종하여 포자 발아 저해정도를 조사하여 저해율이 50%일 때의 a total bifunctional inhibitor(ATBI)의 농도가 0.3~5.9 $\mu\text{g/ml}$ 이었다고 하였다(Dash 등, 2001). 8 종의 식물병원성 진균 각각에 대한 포자발아 억제능을 검증한 실험에서 F1 조합이 다른 조합보다 포자의 발아 억제율이 좋은 것으로 보아 F1 조합으로 생물제제를 조제하는 것이 적합하다고 판단된다 (Zeolite + CMC + Congo red + Starch).

KAERI

제 3 절 생물제제의 포장시험

1. 재료 및 방법

탄저병의 방제 효과 실제 pot상에서 검증하기 위해 배추, 무에 탄저병을 일으키는 *C. h*와 고추에 탄저병을 일으키는 *C. g*를 작물에 적용하여 검증하였다. *C. h* 및 *C. g*를 PDA에 1주일간 배양 후 자연광 조건에서 포자를 형성시켰으며, 형성된 포자를 회수하여 3.4×10^5 spore/ml 및 2.8×10^5 spore/ml의 농도로 하여 배추, 무 및 고추가 이식된 pot당 20 ml을 분무하여 접종하고 제제를 살포하여 탄저병의 방제 효과를 검증하였다. 실험은 3 반복 난괴법으로 수행하였으며 처리 20 일 후 배추 및 무의 잎 및 30일 후 고추의 과실에 나타난 발병상황을 조사하였다.(Hong 등, 2002; Kumar, 1999; Chai 등, 2002).

고추 역병 방제 효과를 pot상에서 검증하기 위하여 *P. c*는 V8 agar배지에 균을 접종하여 28℃ 항온기에서 1주일간 배양한 다음 광조건하의 20~23℃에 3일간 노출하여 포자를 형성시켰으며, 형성된 포자를 회수하여 4~6엽기의 고추가 이식된 pot에 3.2×10^4 zoospore/ml의 농도로 1 ml/pot을 접지부에 접종하고 제제를 살포하여 고추역병의 방제 효과를 검증하였다. 실험은 20 반복 난괴법으로 수행하였으며 처리 10 일 후 발병상황을 조사하였다(Lee 등, 2001).

뿌리썩음병 방제 효과를 pot상에서 검증하기 위해 *P. u*를 V8 agar에 배양한 petri dish 6 개를 원예용상토 5 호 20 kg과 골고루 혼합하고 혼합한 상토를 직경 15 cm의 pot에 담고 고추, 배추, 무를 이식하였다. 이식 후 제제를 각 pot당 10 ml씩 처리하였다. 실험은 6 반복 난괴법으로 수행하였으며 처리 20 일 후 생육상황 및 발병상황을 조사하였다(Mao 등, 1997; Hong 등, 2002).

2. 결과 및 논의

탄저병 방제효과는 고추 열매만을 가지고 수행한 실험에서는 80%이상으로 효과적이었다. 비닐하우스 상에서 고추가 이식된 pot에 병원균과 제제를 살포하여 방제 효과를 확인한 결과는 병원균 단독처리한 곳에서는 75.4%의 발병율을 나타냈으며, 방제효과가 52.4% 이상으로 효과적이었다. 배추에서의 탄저병원균 단독처리는 46.6% 발병하였으며, 제제의 방제효과도 전체적으로 약 50%수준으로 비교적 낮은 효과를 나타냈다. 무에서는 병원균 단독처리는 77.4% 발병하였으며, 60%이상의 방제 효과가 있었다. Hong 등은 진균을 분리하여 PDA에 배양 후 10% V8 juice에서 conidial harvesting ($3 \sim 5 \times 10^6$ ml)하고 식물체에 분무하였다. 21℃에서 48 시간 동안 발병유도 후 온실로 옮기고 병증 관찰을 하였다. Park 등은 *Colletotrichum dematium*으로 고추, 양배추, 배추 및 오이에 발병시켜 양배추는 89%이상, 배추는

40.3% 병이 발생하였으며, 고추와 오이는 병이 발생하지 않았다고 하였으며(Park 등, 2001). Lee는 *C. gloeosporioides* 은 기주범위가 넓고 배양적 특성 등에도 부분적으로 차이를 나타낸다고 하였다(Lee, 1997). Kim 등은 딸기 탄저병의 화학적 방제를 효과적으로 선발하고 적용방법을 구명하여 농가에서 활용할 수 있는 방제방법을 개발코자 하였다. 화학적 방제에 관한 연구로는 모주 정식시 베노밀 500 배액에 30 분간 침지하면 예방효과를 볼 수 있다고 하였다. 그러나 Benomyl은 저항성 균의 출현이 빨라 세계 각국에서 저항성 문제가 심각하게 대두되고 있으며 현재 약효 감소에 따라 사용량이 현저하게 줄어들고 있다. 사용한 화학농약으로는 Carbendazim, Benomyl, Tolclofos-methyl, Azoxystrobin, Propineb, Tricyclazole 수화제를 사용하였으며, 포장시험에서 공시 살균제의 엽면살포 및 토양관주효과는 없었다. 그러나 공시 포장에서 약제를 처리하지 않은 무처리구에서의 발병율이 2.0과 1.7%로 지극히 낮았다. 이와 같은 무처리구에서의 낮은 발병율 때문에 공시한 살균제의 방제효과를 논하기 어렵다고 하였다(Kim 등, 2002; Jennings 등, 2001; Al-Samarrai 등, 2002).

고추 역병원균 만을 처리한 구에서는 100%발병하였으며, 제제 처리시 90%의 방제효과가 나타났다. Shen 등은 in vitro와 in vivo에서 활성이 있는 생물학적 조절물질로 *Serratia plymuthica* A21-4를 분리하여 고추역병균인 *P. c*에서 방제효과를 검증하였는데, in vitro에서 포자와 포자낭의 형태로 발아율을 조사하였고 균사의 성장저해정도를 조사하였다. pot 실험에서 고추역병에 제제를 처리하지 않은 처리구는 처리 14 일 후 100% 발병하였으며, *S. plymuthica* A21-4를 처리한 구에서는 병이 발생하지 않았다. 비닐하우스 실험에서 제제 무처리구는 74.5%, *S. plymuthica* A21-4 처리구는 12.6%만이 발병하였다(Shen 등, 2002; Lee 등, 2001). 살균제 살포에 의해서 고추역병을 효율적으로 방제할 수 있다. metalaxyl, oxadixyl, propamocarb, copper oxychloride, chlorothalonil, dithianon등이 한국에서 고추역병 방제약제로 사용되고 있다. 이들 살균제 중에서 metalaxyl-copper oxychloride, metalaxyl-dithianon, oxadixyl-chlorothalonil 등의 혼합제가 고추재배에서 가장 자주 살포되고 있다. 고추역병을 효율적으로 방제하기 위하여 10 일 간격으로 6 회의 엽면살포가 현재 농부들에게 권장되고 있다. 그러나, 역병방제를 위해 살균제 살포가 효과가 없을 때가 자주 발생한다. 고추줄기 주변에 관주하여 살균제를 살포하는 것이 엽면살포하는 것보다 역병방제효과가 더 컸다. 1982년의 포장시험에서 metalaxyl을 3번 토양관주 했을 때 역병발생수율을 3%까지 억제할 수 있었으나 엽면살포시 역병이 20% 발생하였고 이때 무살포구는 31% 역병이 발생하였다. 그러나 살균제의 토양관주는 비교적 가격이 비싸서 농민들에게 실용화되지 못하고 있는 실

정이다. 또한 살균제 살포시기가 고추역병을 효율적으로 방제하기 위하여 매우 중요한 것 같다. 비가 오기 바로 전에 살균제를 살포하는 것이 비가 온 후 즉시 살포하는 것보다 훨씬 더 방제효과가 크다고 하였다(Hwang, 2002; Lee 등, 2001).

뿌리썩음병 방제효과를 pot상에서 검증하기 위해 *P. u*를 처리한 상토를 pot에 담고 고추, 배추, 무를 이식하였다. 이식 후 생물제제를 각 pot당 10 ml씩 처리하였으며, 처리 20 일 후 생육상황 및 발병상황을 조사한 결과는 다음과 같다. 고추, 배추, 무에서 병원균만을 처리한 구에서는 뿌리 및 줄기의 생육이 부진하였으며 생물제제를 처리한 모든 처리구에서 병원균 무처리구와 비슷한 정도의 생육상황을 나타내었다(95% 방제). 그 중에서도 배추의 경우가 보다 뚜렷한 효과를 보여주었다.



제 4 절 특허출원 및 생물제제 제조기술 이전

1. 특허출원

특허출원을 위하여 특허규주기탁을 완료하였음 (한국미생물 보존센터, KFCC 11474p, KFCC 11475p).

2. 경제성 평가

통계청 자료에 의하면 국내에서 2005년도 현재 농업에 종사하고 있는 농가수는 전국적으로 1,272,908 호에 달하고 있으며, 논벼에 관련한 농가수가 약 51%를 차지하고 있고, 채소 재배농가가 약 18%, 과수 및 일반 밭작물을 경작하는 농가가 약 11% 및 10%를 차지하고 있다. 지역별로는 경상도와 전라도가 가장 많고, 충청도, 경기도, 전체 광역시, 강원도, 제주도 순이었다. 그러나 경지이용면적에서는 전라도가 가장 넓은 면적을 차지하였고, 경상도, 충청도 순이었다.

농업에 종사하는 농가 중에서 친환경 농업 실천농가는 총농가 대비 약 4.4%로 아직까지는 매우 낮은 수준이었다. 그러나 현재 전체 농산물의 4% 수준인 친환경농산물의 비율을 2010년까지 10% 수준으로 높이고, 2013년까지 농약과 화학비료 사용량을 각각 2003년 대비 40% 감축하겠다는 목표를 세우고 친환경농업 정책을 적극적으로 추진하고 있고, 고품질 안전농산물과 환경보전에 대한 국민들의 인식이 높아지면서 친환경농산물 인증농가, 면적 및 생산량도 매년 급격히 증가되고 있는 추세이다. 친환경 농가 중에서 논벼 재배 농가가 68.8%, 과수 농가 13.1%, 채소농가 31.2%, 특용작물 및 기타농가 7.8%로 조사되었으며 전체 농가수 및 경지면적에 비하여 각각의 농가수 및 경지면적의 합이 약 21% 정도 더 많은 것으로 조사되었는데, 이는 각 농가에서 경지활용이 높은 것으로 생각된다.

국내 제조업 관련기업은 340,000 여종이 등록되어 있으며, 농산물 생산과 관련한 화학합물 제조업, 농약 제조업, 비료 제조업, 기타 관련 제조업들의 총 기업수 합이 국내 총 제조업 수에 비해 3%로 미비한 상태이다. 그러나 위와 관련한 업종에 종사하고 있는 종사자의 수는 제조업 총 종사자의 약 7% 정도 차지하고 있다.

2006년 현재 친환경농자재를 생산 및 판매하고 있는 기업체는 국내 기업체의 경우 총 농약시장의 1% 정도를 미생물제제 매출이 차지하고 있다. 동부한농(주), KG 케미칼, 휴바이론, 바이오메디아(주), (주)서울바이오 및 대상주식회사 등 상장기업이 있고 기타 중소기업이 60여개 업체 운영되고 있다. 국내 총농가 1,383,468호 중에 친환경농업실천 농가는 60,275(4.4%)호에 달하고 있으며 그중 채소방면이 18,776(31.2%)호로 점차적으로 늘어나는 추세에 있다(통계청, 2000). 본 과제에서 개발된 생물제제는 살균제에 속하는데, 총살균제 시장(1,051,510백만 원)의 35.6%인

374,044백만원 규모로 형성되어 있다.

시중에 판매되고 있는 대부분의 미생물제제의 단가는 2만원/(500 g, 500 ml, 등) 내외로 유통되고 있으나 본 과제에서 개발한 생물제제를 제품화하였을 때 0.6 톤, 2 톤 및 6 톤 배양이 가능할 경우 1만원/kg 정도로 제품가격을 인하할 수 있을 것으로 추정된다(Table 6).

Table 6. 제품생산 규모별 예상 소요단가

단위: 원

월 생산규모 비용(/kg제품)	연구실	기술이전 후 (1-2년차)	기술이전 후 (3년차 이후)
	0.64 톤	2 톤	6 톤
시약	(제조원료) 500	500	500
포장	(용기+스티커+박스) 570	570	570
인건비 (3백만원/인)	(2.3 명) 10,940	(4 명) 6,000	(6 명) 3,000
관리비	0	1,000	1,000
생산단가	12,010	8,070	5,070
기자재	발효기(14L x 2): 280 L 배양기(6L x 6): 360 L	발효조(1톤): 1억원/10년 원심분리기: 6천 만원/10년	발효조(2톤): 2억원/10년 동결건조기(0.5톤): 2천만원/10년 공장(250평): 5천만원/10년
년간 생산량	640 개 × 12 월 = 7,680	2,000 개 × 12 월 = 24,000	6,000 개 × 12 월 = 72,000
년간 매출액	115,200,000	240,000,000	720,000,000
제품단가	15,000	10,000	10,000
순익(/년)	22,963,200	46,320,000	354,960,000

제 4 장 연구개발목표 달성도

연구목표	연구결과	달성도(%)
<ul style="list-style-type: none"> ○생물제제 제조 ○특허출원 및 생물제제 제조기술 이전 	<ul style="list-style-type: none"> ○srb 관련 항진균기작 확인 ○생물제제 조성물 공식 결정(3건) ○포트 실험을 통한 생물제제 효과 입증 (고추, 배추, 무, 1건) ○특허출원을 위한 특허군주 기탁 (2건) 	100 %



KAERI

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 제조한 생물제제를 국가에서 공인된 경작지에서의 포장시험을 실시한 후 실용화 추진.
- 후속연구기간에 생물제제의 효과 향상을 위한 질소고정성 및 인가용성 등 보조제제의 개발 수행.
- 생물질 및 생물제제에 대한 특허출원을 완료하고 (현재, 특허출원을 위한 균주 기탁 완료, 2종), SCI 저널에 발표하며, 기업체에 생산 및 실용화 기술이전 계약체결.
- 방사선기술을 바탕으로, 화학농약을 대체하는 친환경적인 미생물제제 제조의 기반기술 전파 및 화학비료를 대체하는 생물비료 제조 연구 활성화 기대.
- 본 연구과제 분야를 확대하여, 국가시책인 ‘저탄소 녹색성장’에 적합한 ‘방사선을 이용한 복합기능성 생물비료의 개발’ 등 새로운 과제의 창출/수주를 추진.
- 주로 중소기업체에서 생물제제를 생산하고 있는 실정이어서 국가 차원에서의 부양책을 시행하여야 하며, 저렴한 비용으로 기술이전을 유도하여 실용화를 촉진해야함.

제 6 장 참고문헌

- Al-Samarrai T. H., P. A. Sullivan, M. D. Templeton and P. C. Farley, 2002, Peptide inhibitors of appressorium development in *Glomerella cingulata*, FEMS Microb. Letters, 209(2002), 203-207.
- Arima, K.H., M. Imanaka, A. Kousaka, A. Fukuda, and G. Tamura, 1965. Studies on pyrrolnitrin: Isolation and properties of pyrrolnitrin. J. Antibiot. 18: 201-204.
- Arrendale, R.F., R.C. Gueldner, O.T. Chortyk and F.G. Crumley, 1988, Characterization of the amino acids of antifungal peptides from *B. subtilis* by cold on-column injection capillary GC/MS, Journal of Microbiological Methods, 8: 249-257.
- Becker, D. and M. Sevilla, 1993. The chemical consequences of radiation damage to DNA. Adv. Radiat. Biol. 17:121-180.
- Butters, J. A., S.J. Kendall, I.E. Wheeler, and D.W. Hollomon. 1995. Tubulins: lessons from existing products that can be applied to target new antifungals, pp. 131-142. In G.K. Dixon, L.G. Copping and D.W. Hollomon(eds). Antifungal agents-discovery and mode of action. Bios Scientific Publisher, Oxford.
- Chai B., S. B. Maqbool, R. K. Hajela, D. Green, J. M. Vargas, D. Warkentin, R. Sabzikar and M. B. Sticklen, 2002, Cloning of a chitinase-like cDNA(*hs2*), its transfer to creeping bentgrass(*Agrostis palustris* Huds.) and development of brown patch(*Rhizoctonia solani*) disease resistant transgenic lines, Plant Sci., 163(2002), 183-193.
- Cook, R.J. 1992. Wheat root health management and environmental concern. *Can. J. Plant Pathol.* 14: 76-85.
- Dash C., A. Ahmad, D. Nath and M. Rao, 2001, Novel bifunctional inhibitor of xylanase and aspartic protease: Implications for inhibition of fungal growth, Antimicrob. Agents and Chemother., 45, 2008-2017.
- Fravel, D.R., W.J Connick, and J.A. Lewis 1998. Formulation of microorganisms to control plant diseases. pp. 187-202. In H.D. Burges(eds). Formulation of microbial biopesticides, beneficial microorganisms and nematodes and seed treatments. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, London.
- Gerth, K., N. Bedrof, H. Irschik, G. Hofle, and H. Reichenbath. 1994. The

- soraphens: A family of novel antifungal compounds from *Sorangium cellulosum*(Myxobacteria). I. Soraphen A1 alpha: fermentation, isolation, biological properties. *J. Antibiot.* 47: 23-31.
- Getha K. and S. Vikineswary, 2002, Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 of *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense race 4: Indirect evidence for the role of antibiosis on the antagonistic process, *J. Indust. Microbiol. Biotech.*, 28, 303-310.
- Halliwell, B. and Aruoma, O.I. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian cells. *FEBS Lett.* 281: 9-19.
- Hong S. K., W. G. Kim, W. D. Cho and H. G. Kim, 2002, Occurrence of tulip fire caused by botrytis tulipae on Korea, *Plant Pathol.*, J. 18(2), 106-108.
- Hutchinson, F. 1985. Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. *Prog. Nucleic. Acid Re.* 32: 115-154.
- Hwang B. K., 2002, Studies of resistance of pepper to Phytophthora blight and its control, *Res. Plant Dis.*, 8(3), 131-145.
- Jennings J. C. , P. C. A.-Birkhold, N. M. Mock, C. J. Baker, J. D. Amderson, B. A. Bailey, 2001, Induction of defense responses on tobacco by the protein Nep1 from *Fusarium oxysporum*, *Plant Sci.*, 161, 891-899.
- Keel. C., U. Schnider, M. Maurhofer, C. Voisard, J. Laville, U. Burger, P. Wirthner, D. Haas, and G. Defago. 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5: 4-13.
- Kim S.-H., S.-Y. Choi, Y.-S. Lim, J.-T. Yoon and B.-S. Choi, 2002, Effect of chemical treatment on the control of strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum* sp., *Res. Plant Dis.*, 8(1), 50-54.
- Kumar B. S. D., 1999, Fusarial wilt suppression and crop improvement through two rhizobacterial strains in chick pea growing in soils infested with *Fusarium oxysporum* f.sp. ciceris, *Biol. Fertil. Soils*, 29, 87-91.
- Lee D.-H., 1997, Culture characteristics of chromogenic and teleomorphic strains of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from apple and red pepper, *Korea J. Mycol.*, 25(4), 340-347.
- Lee, Y.-K., H.-H. Chang, J.-S. Kim and K.-S. Lee 2000. Lignocellulolytic mutants of *Pleurotus ostreatus* induced by gamma-ray radiation and their

- genetic similarities. *Radiat. Phys. Chem.* 57: 145-150.
- Lee, Y.-K., Kim, J.-K., Song, I.-G., Chung, H.-Y. and Chang, H.-H. 2001. Characteristics of antifungal bacterium, *Bacillus subtilis* YS1 and its mutant induced by gamma radiation, *Kor. J. Microbiol.* 37: 305-311.
- Lewis K. A., R. D. Lumsden, 2001, Biocontrol of damping-off of greenhouse-grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp., *Crop Protect.*, 20(2001), 49-56.
- Lorito, M., S.L. Woo, M.D' Ambrosio, G.E. Harman, C.K. Hayes, C.P. Kubicek, and F. Scala. 1996. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Mol. Plant Microb. Interact.* 9: 206-213.
- Mao W., J. A. Lewis, P. K. Hebbar and R. D. Lumsden, 1997, Seed treatment with a fungal or a bacterial antagonist for reducing corn damping-off caused by species of *Pythium* and *Fusarium*, *Plant dis.*, 81(5), 450-454.
- Ohno, A., T. Ano and M. Shoda, 1996, Use of soybean curd residue, okara, for the solid state substrate in the production of a lipopeptide antibiotic, iturin A, by *Bacillus subtilis* NB22, *Process Biochemistry*, 31: 801-806 .
- Park K. and C. H. Kim, 2001, Occurrence of anthracnose on cabbage caused by *Colletotrichum dematium*, *Mycobiol.*, 29(1), 61-62.
- Shen S.-S., O.-H. Choi, S.-M. Lee and C.-S. Park, 2002, *In vitro* and *in vivo* activities of a biocontrol agent, *Serratia plymuthica* A21-4, against *Phytophthora capsici*, *Plant Pathol. J.*, 18(4), 221-224.
- Thomashow, L.S., D.M. Weller, R.F. Bonsall, and L.S. Pierson III. 1990. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 908-912.
- von Sonntag, C. 1987. The chemical base of radiation biology. London. Taylor & Francis.
- Weller, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26: 379-407.
- Weller, D.M. and R.J. Cook. 1986. Increased growth of wheat by seed treatment with fluorescent *Pseudomonas*, and implications of *Pythium* control. *Can. J. Plant Pathol.* 8: 328-334.

Yun, D.J., Y. Zhao, J.M. Pardo, M.L. Narasimhan, B. Damsz, H. Lee, L.R. Abad, M.P. D'Urzo, P.M. Hasegawa, and R.A. Bressan. 1997. Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 7082-7087.



서 지 정 보 양 식

수행기관보고서번호	위탁기관보고서번호	표준보고서번호	INIS 주제코드
KAERI/RR-3226/2010			
제목 / 부제	방사선이용 생분해성 항진균제 개발		
연구책임자 및 부서명	이영근(방사선생명공학연구부)		
연구자 및 부서명	김동섭(방사선식품육종연구부), 정일윤(방사선식품육종연구부)		
출판지	대한민국	발행기관	한국원자력연구원
발행년	2011		
페이지	25 p.	도표	있음(○), 없음()
크기	Cm.		
참고사항			
공개여부	공개(○), 비공개()	보고서종류	연구보고서
비밀여부	대외비 (X), _ 급비밀		
연구위탁기관		계약번호	
초록 (15-20줄내외)	<p>부차적인 환경오염을 유발하는 화학농약을 대체할 수 있는 생분해성 항진균제의 개발을 위하여 방사선을 이용하여 항진균성을 향상시킨 돌연변이체 개발 연구를 수행하였다. 작물병 방제용 미생물의 분리 및 동정, 생화학적 생육조건 연구, 방사선을 이용하여 항진균 활성이 향상된 미생물 돌연변이체 제조, 항진균성 생물질 분리 및 정제, 항진균성 생물질 생화학적 특성연구 및 구조를 밝혔다. 담체, 흡착제, 자외선차단제, 영양원, 계면활성제의 조합을 최적화하여 생물제제를 제조하였다. 포트시험 결과 탄저병의 경우 고추 52.4%, 배추 50.0%, 무 60.0%의 방제효과를 보였다. 고추역병의 경우 90.0% 이상의 방제효과를 보였으며, 뿌리썩음병의 경우, 고추, 배추, 무 모두 95% 이상의 방제효과가 있었다. 향후 공인기관의 효과검증 시험 후 실용화가 기대된다.</p>		
주제명키워드 (10단어내외)	생분해성, 항진균제, 방사선, 돌연변이, 항진균성 생물질		

BIBLIOGRAPHIC INFORMATION SHEET							
Performing Org. Report No.		Sponsoring Org. Report No.		Standard Report No.		INIS Code	Subject
KAERI/RR-3226/2010							
Title / Subtitle		Development of biodegradable fungicide by radiation					
Project Manager and Department		Young-Keun Lee, Radiation application division for biotechnology					
Researcher and Department		Dong Sub Kim, Radiation application division for food and agriculture					
Publication Place	Korea	Publisher	KAERI	Publication Date	2011		
Page	25 p.	Ill. & Tab.	Yes(○), No ()	Size	Cm.		
Note							
Open	Open(○), Closed()		Report Type		Research		
Classified	Restricted(X), Document		___Class				
Sponsoring Org.				Contract No.			
Abstract (15-20 Lines)		<p>To develop the fungicide which is biodegradable and alternative to chemical pesticide that has an side effect of environmental pollution, Mutant induction of the enhanced antifungal activity was studied by using radiation. Characteristics and structure of antifungal biomaterials derived from these mutants were analysed. Two biomaterials related to the antifungal activity from the above mutant were isolated and purified. Microbial pesticide were manufactured in combination of various additives. Antiphytopathogenic effects were proven by pot experiment and It was promising to prevent pepper, Chinese cabbage and radish from anthrax, phytophthora and root rot.</p>					
Subject Keywords (About 10 words)		Biodegradable, Fungicide, Radiation, Mutant, Antifungal biomaterial					