

碩士學位論文

감자 더덩이병 방제를 위한 친환경적
미생물제제 개발



濟州大學校 大學院

食品工學科

李 소 금

2005年 12月

碩士學位論文

감자 더덩이병 방제를 위한 친환경적
미생물제제 개발

濟州大學校 大學院



李 소 금

2005年 12月

감자 더덩이병 방제를 위한 친환경적
미생물제제 개발

指導教授 高영환 : 김창진

李 소 금

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 제출함



李소금의 工學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長	<u>강 영 주</u>	Ⓜ
委 員	<u>김 창 진</u>	Ⓜ
委 員	<u>고 영 환</u>	Ⓜ

濟州大學校 大學院

2005年 12月

Development of Sustainable Biocontrol Agents
against Potato Common Scab Disease

So Keum Lee

(Supervised by professors Young Hwan Ko & Chang-Jin Kim)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF ENGINEERING

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND ENGINEERING
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

DECEMBER 2005

목 차

Summary	1
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	
1. 균 생육도 측정	
1) 생균수 측정(Viable cell counting)	6
2) 균체량 측정(Packed cell volume)	6
2. 항균활성 검정	7
3. 최적 배양조건 탐색	7
1) 플라스크상에서의 최적 배양조건	
(1) 최적 탄소원 및 질소원	8
(2) 최적 탄소원/질소원 비율	10
(3) 인산염 농도에 따른 배양효과	11
(4) 기타성분 농도에 따른 배양효과	12
2) Jar fermenter상에서의 최적 배양조건	
(1) 최적 배지조성을 이용한 발효조 실험	13
(2) 교반속도에 따른 효과	14

3) Pilot plant상에서의 적용 및 균체생산	
(1) 발효조건	15
(2) 균체생산	16
4. 제제화 연구	
1) 제제의 조성	17
2) 제제화 공정	18
3) 수소이온농도	18
4) 수중 입자 붕괴성	19
5) 수중 균 용출성	20
6) 저장 안정성	21

III. 결과 및 고찰



1. 최적 배양조건 탐색

1) 플라스크상에서의 최적 배양조건

(1) 최적 탄소원 및 질소원	22
(2) 최적 탄소원/질소원 비율	26
(3) 인산염 농도에 따른 배양효과	28
(4) 기타성분 농도에 따른 배양효과	30

2) Jar fermenter상에서의 최적 배양조건

(1) 최적 배지조성을 이용한 배양	32
(2) 교반속도에 따른 효과	35

3) Pilot plant상에서의 적용 및 균체생산	38
2. 제제화 연구	
1) 수소이온농도	39
2) 수중 입자 붕괴성	40
3) 수중 균 용출성	44
4) 저장 안정성	48
IV. 요약	50
참고문헌	52



Summary

To develop sustainable biocontrol agents against potato common scab disease, two Streptomycete strains A010321 and A020645, were selected through paper disc diffusion and streak-inoculation methods out of 10,000 strains including the 7,000 of actinomycetes isolated from domestic soil samples. Optimization studies for fermentation and formulation of pelleted granule type of agents were carried out. In the case of *Streptomyces* sp. A010321, galactose, starch and dextrin were selected as effective carbon sources and soybean meal as a nitrogen source. Optimal carbon to nitrogen ratio was 30g:30g. On the other hand, *Streptomyces* sp. A020645 well utilized galactose, maltose and soybean meal. Optimal carbon to nitrogen ratio was determined as 30g:30g. Also, it is confirmed by the scale-up test of 5L-jar fermenter and the best agitation condition was 200 and 300rpm, respectively. Finally selected optimal fermentation condition was applied to pilot plant using 300L volume of fermenter. Culture broth was lyophilized and used as ingredient for formulation. Various kinds of carrier such as clay, perlite, bentonite, etc. were applied to forming pelleted granule type agent. As a result of release profile of *Streptomyces* sp. A010321 and formulation particle breakdown rate, talc and bentonite combined agent was thought as the most effective formulation. Also, bentonite formulation showed the best stability.

I. 서 론

감자(*Solanum tuberosum*)는 가지과에 속하는 다년초식물로 총생산량에 있어서 세계 4위의 중요한 식량자원이다. 우리나라에는 1824년에 도입되었는데 오늘날 식품의 소비경향이 서구화 하면서 감자의 생산 및 소비량이 점차 증가하여 1999년 국내의 총생산량이 67만 8천 톤에 이르고 있다(Ham, 2000).

감자는 무름병, 풋마름병, 마른썩음병, 더덩이병등의 여러 질병에 대해 감수성이 크다고 보고되고 있으며(Agrios, 1997) 우리나라의 경우 감자에 발생하는 병은 16종으로 이중 무름병, 역병과 함께 더덩이병이 주요 병으로 보고 되어있다. 특히 최근 수 년 동안 대지(Daejima) 품종을 씨감자로 사용하는 제주도 지역에서는 심한 경우 감자 더덩이 병과 관련하여 90%의 발병율을 기록한 바 있다(Ham, 2000), (Hong 등, 2000).

감자 더덩이병은 전 세계적으로 감자를 재배하는 곳에서 가장 일반적으로 퍼져있는 식물병이며 상대적으로 건조한 해에 중성 또는 약 알칼리 토양에서 발병이 잘 일어나는 것으로 알려져 있다(Bouchek-Mechiche 등, 2000). 일반적으로 괴경이나 뿌리의 더덩이병으로 인한 표면적인 상처는 수량보다는 상품의 가치를 감소시키고 심한 감염은 수량을 감소시킬 수도 있으며, 감자 표피속으로 깊게 침투한 더덩이병은 표피를 제거할 때 손실을 증가시킨다. 대부분 괴경에 피해를 주는데, 더덩이병에 감염된 감자는 처음에 작은 갈색의 분기된 반점을 발달시킨다. 후에 분기된 반점은 대부분 커지고 서로 합해져서 코르크화 되고 병반은 3~4mm 깊이까지 감자속으로 확장된다(Agrios, 1997). 감자더덩이병은 방선균의 일종인 *Streptomyces scabies*(*S. scabiei*) Thaxter에 의해 발생하는 토양병으로 토양 내 분포가 광범위하고 잔류기간이 길어 경종적 방제법만으로는 방제

가 어려우며, 공시된 약제도 거의 없는 실정이다(Agrios, 1997). 특히 우리나라에서는 더뎡이 병원균에 대해 감수성이 큰 것으로 알려진 대지품종이 2기작이 가능한 이유로 많이 경작되고 있으며, 현재 대지품종을 대체할 수 있는 품종도 보급되어 있지 않은 실정이어서 그 피해도 막대한 실정이다. 더뎡이병은 괴경 표면의 병징에 따라 russet, netted, turtle back, deep-pitted scab 등으로 나뉜다(Loria 등, 1997), (Scholte 등, 1985), (Alchuleta, 1981). 감자 더뎡이병을 일으키는 병원균으로서 *Streptomyces scabiei*가 가장 우점종으로 알려져 있으며, 산성조건에서도 잘 견디는 *Streptomyces acidiscabies* 및 erumpent lesion을 일으키는 *Streptomyces turgidiscabies*가 새로운 종으로 보고된 바 있고(Miyajima 등, 1998), 기타 *Streptomyces europaeiscabiei*, *Streptomyces stelliscabies* 및 *Streptomyces reticuliscabiei* 균주등 여러 신종 병원균이 감자 재배 토양에서 분리되는 것으로 보고되어지고 있다(Bouchek-Mechiche 등, 2000), (Takeuchi 등, 1996). 최근 국내의 감자 재배지역에서도 *Streptomyces acidiscabies* 및 *Streptomyces turgidiscabies*가 더뎡이병과 관련하여 자주 분리되는 것으로 보고 된 바 있다(Park 등, 2002).

생물농약은 자연계에 존재하는 미생물을 이용한 환경친화적 작물보호제로서 합성농약의 기능을 대신하여 작물의 생산량을 증대시킴과 동시에 합성농약이 해결하지 못하는 문제점인 생태계 교란, 토양 및 지하수 등의 환경오염 등의 문제점을 해결할 수 있는 방안으로 부각되고 있으며, 감자 더뎡이병의 경우 *Streptomyces diastatochromogenes* strain PonSSII에서 분리한 항생물질이 *Streptomyces scabiei*를 억제한다는 보고가 있다(Liu 등 1995), (Liu 등 1996), (Menzies, 1959), (Paulsrud, 1996), (Schottel 등, 2001), (Weinhold 와 Bowman, 1968), (Eckwall 와 Schottel, 1997). 국내의 미생물농약에 대한 연구는 2001년에 제정된 “미생물농약 등록을 위한

가이드라인(guideline)”이 있으며, 그 이전에는 미생물농약이 아닌 비료로 등록되어 미생물제제로서 판매되는 형태를 띠었다. 국내 34개의 기업으로부터 57개의 미생물제제 품목이 등록되어진 것으로 보고되어 있으며, 현재 일부 생물학적 방제 법 개발 연구가 이루어지고 있으나 실용화 연구는 크게 미흡한 편이다(Hong, 2001), (Park 등, 2002).

본 연구실에서는 선행연구를 통해 길항균의 선발 및 활성검정, 동정이 이루어져 왔으며 분리·동정된 균주를 본 실험에 이용하였다. 이들 균주의 선발은 다양한 국내토양시료에서부터 방선균 7,000여주를 포함 총 10,000여 미생물 균주를 희석평판배양법으로 분리하여 감자 더덩이 병원균 중 우점 균주인 *Streptomyces scabiei*에 대한 항균활성 및 길항력 검정, 토양 정착력 확인실험을 통해 이루어졌다(이 등, 2004). 최종적으로 길항방선균 2주 A010321, A020645가 선발되었으며 이들 균주에 대한 동정 결과 두 균주 모두 *Streptomyces*속에 속하는 것으로 확인되었다. 본 논문에서는 선발된 균주 *Streptomyces* sp. A010321과 *Streptomyces* sp. A020645에 대한 최적 배양조건 탐색과 선발균주 제제화 연구를 수행하고자 하였다.

본 연구의 주요 테마인 균주의 대량 배양 기술은 생물농약을 상품화 단계로 이끌어 가는데 필수 요소 기술이다. 생물농약의 상품화 역시 다른 산업분야와 마찬가지로 효과대비 가격경쟁력이 모든 것에 우선하는데 대량생산-대량수출-생산비절감 시스템을 갖춘 외국기업들도 생물제제의 상품화를 위해 생산 비용을 절감할 수 있는 대량생산체계 체계 확립을 위한 연구가 계속적으로 수행되고 있다. 에보트, 에코젠 등 세계적인 생물농약회사가 지금도 미생물의 대량배양 기술의 획득을 위해 지속적인 연구를 수행하는 것 역시 본 기술의 중요성을 말해주고 있다(농약 개발 보고서, 1997). 본 연구실에서도 역시 감자 더덩이병원균에 대한 길항균주의 대량 배양을 위해 고

체배지를 통한 연구가 이루어진 바 있다(이 등, 2004).

실제 포장조건에서 유효한 생물농약이 되기 위한 조건으로서는 지리적 또는 기후 등 환경조건에 잘 적응하고, 이미 포장 내에 존재하는 토착 균주들과의 경쟁력과 토양 정착력을 갖춘 제제의 개발이 중요하다. 본 연구에서는 국내 감자 재배환경과 실용성, 편의성 등을 종합 판단하고 방선균 제제화에 적합한 입상제제를 공시하여 최적화 조건들을 검토하고자 하였다. 선발된 길항균주가 적응할 수 있는 조건을 제공하기 위한 수단으로서 다양한 형태의 제제 중 입상의 형태를 선택하여 제조하였다. 이러한 입제의 장점으로서는 특별한 산포 장치 없이 처리가 용이하다는 점과 형태가 입상이므로 목표 산포 구역에 확실한 살포가 가능하다는 점, 또한 입자의 크기와 경도에 입각한 제제의 서방성을 들 수 있으며 목적에 맞게 용출 제어가 비교적 쉽다는 점, 일일 생산량이 많아 대량생산에 용이하다는 점 등의 있다. 입제 제조 시 포함되는 성분으로는 계면활성제, 증량제, 결합제 등을 비롯하여 다양하며 이는 table 1과 같다. 본 실험에서는 이들 성분 중 상대적으로 소량이 첨가되는 계면활성제, 안정제, 붕괴 촉진제의 첨가량을 고정시키고 가장 많은 비중을 차지하는 증량제의 종류와 수분함량과 관련하여 중점적으로 연구하였다. 노지에 처리되었을 때 어떤 영향을 미칠 수 있는지 알아보기 위해 제조된 입제의 붕괴성 시험 및 균 수중 용출성 실험을 수행하였으며 이를 통해 각 제제에 대한 특징을 확인하였다. 또한 제제의 생균수를 주기적으로 확인하여 제제의 안정성을 확인하고자 하였다.

Table 1. Formulation ingredients for granular formulation

Ingredient	Function	Example
Surfactant	emulsification, dispersion, hydration, penetration, disintegration, lubrication	alkylsulfate, fatty acid salt, parafin sulfonate
Diluent	dilution and adsorption of active ingredient	bentonite, clay, diatomaceous earth, talc, agalmatolite, calcium carbonate, zeolite
Binder	increase of particle binding	starch, dextrin, bentonite, lignosulfonate
Disintegrator	improvement of granule disintegration and dispersion in water environment	cellulose, dextrin, starch, maleic acid, polyvinyl pyrrolidone
Stabilizer	increase of microbial stability	polyethylene glycol, polyvinyl alcohol
Anticaking compound	inhibition of microbial crystallization on the surface of granule	starch, sodium alginate, mannose, galactose
Others	decrease of toxicity, improve formula, improve effective activity, improve fluidity	

II. 재료 및 방법

1. 균 생육도 측정

1) 생균수 측정(Viable cell counting)

생균수의 측정은 10배 희석법을 이용하였다. 배양액 혹은 제제 1g을 취하여 멸균증류수 9ml에 넣고 충분히 vortexing한 후 멸균수 9ml이 들어있는 다른 튜브에 1ml을 옮기는 방식을 반복하여 $10^3 \sim 10^8$ 까지 희석하여 Bennett's agar(Glucose 10g, peptone 2g, yeast extract 1g, beef extract 1g, agar 16g)배지에 도말하고 28℃에서 3일간 배양한 후 형성된 colony를 통해 생균수(CFU, colony forming unit)를 측정하였다.

2) 균체량 측정(Packed cell volume)

50ml 용량의 flask에서 28℃ 5일간 배양한 배양액을 conical tube(50ml volume)로 옮겨 20,000rpm으로 10분간 원심분리한 후 침전된 균체량(Packed cell volume : PCV)을 백분율(%)로 나타내었다.

2. 항균활성 검정

항균활성 검정에는 paper disc(8mm, Advantec, Toyo Roshi Kaisha, Japan)를 이용하여 수행하였으며 활성검정용 배지로는 감자더듬이병원균(*Streptomyces scabiei*)의 고체배양체로부터 loop를 이용하여 소량 떼어내어 stock solution(1ml)을 만들어 Bennet's agar 배지 분주전에 넣고 충분히 교반해 준 후 활성검정용 배지로 사용하였다. 배양상등액 50 μ l를 paper disk에 분주한 후 60 $^{\circ}$ C 건조기에서 2시간 건조시켜 활성검정용 배지 위에 올려놓고 28 $^{\circ}$ C에서 3일간 배양한 후 병원균에 대한 생육저지환의 직경(mm)의 크기를 측정하여 활성을 검정하였다.

3. 최적 배양조건 탐색



가장 이용성이 좋은 탄소원, 질소원의 탐색과 더불어 탄소원의 질소원에 대한 최적 비율, 인산염과 그 외 NaCl, CaCO₃의 최적농도를 탐색하였다. 균 생육도(PCV) 및 항균활성을 평가 기준으로 하여 선정하였으며, 선발된 조합을 5L-jar fermenter상에 적용하여 발효조상에서의 최적 배양조건을 탐색하고 종적으로 pilot plant 상에 적용, 배양하여 배양액을 수거하고 이를 동결건조 한 후 동결건조 된 시료를 제제화에 이용하였다.

1) 플라스크상에서의 최적 배양조건

(1) 최적 탄소원 및 질소원

균주의 대량 배양을 위해서는 그 선발된 균주가 가장 잘 이용하는 영양원으로서 적합한 최적 탄소원 및 질소원 이용실험을 하였다. 총 25종의 탄소원 및 16종의 질소원을 기본 배지로 사용한 GSS medium(Table 2)에 적용해 이용하였으며 최적 탄소원 탐색시험에서는 질소원으로 yeast extract를, 최적 질소원 탐색시험에는 glucose를 탄소원으로 고정시켰다. 250ml 플라스크에 50ml 용량으로 28℃에서 5일간 진탕배양하여 균체량(PCV) 및 항균활성결과를 확인하였다.

Table 2. Basal medium composition to determine carbon and nitrogen sources

GSS medium (g/L)	
Glucose	20g
Soluble starch	10g
Soybean meal	25g
Yeast extract	4g
Beef extract	1g
NaCl	2g
CaCO ₃	2g
K ₂ HPO ₄	0.25g
pH	7.2

Table 3. Carbon and nitrogen source candidates to determine optimal media composition

Carbon source	[monosaccharide]	g lucose, xylose, fructose, galactose, mannose, arabinose, rhamnose,
	[disaccharide]	lactose, sucrose, maltose, molasses
	[trisaccharide]	raffinose
	[polysaccharide]	starch, cellulose, dextrin, maltodextrin (DE 11), maltodextrin(DE 11-14), maltodextrin(DE 14-20), maltodextrin (DE 18-20), inulin, cotton seed flour
	[polyalcohol]	g lycerol, solbitol, mannitol, inositol
Nitrogen source	yeast extract, beef extract, malt extract, fish meal, soybean meal, soytone, tryptone, asparagine, N-Z amine, pharmamedia, corn steep liquor, ammonium sulfate, ammonium acetate, ammonium nitrate, NaNO ₃ , urea	

(2) 최적 탄소원/질소원 비율

첨가되는 탄소원과 질소원의 비율을 달리 하였을 때 균체량 및 항균활성에 미치는 영향을 분석하였다. 탄질원의 비율은 10g : 10g부터 50g : 50g까지 총 16가지 조합에 대하여 조사하였으며 각각의 비율은 아래의 Table 4에 나타내었다. 결과에 대한 판단은 균체량과 항균활성을 종합적으로 판단하여 최적 비율을 결정하였다.

Table 4. Carbon to nitrogen ratio and composition(g/L)

C/N Ratio	Carbon source	Nitrogen source	Other element
1:1 10g:10g	Glu 7, Starch 3	Soybean 8.0 , Y.ext 1.5, B.ext 0.5	
1:1 20g:20g	Glu 14, Starch 6	Soybean 17 , Y.ext 2.4, B.ext 0.6	
1:1 30g:30g	Glu 20, Starch 10	Soybean 25 , Y.ext 4.0, B.ext 1.0	
2:1 20g:10g	Glu 14, Starch 6	Soybean 8.0 , Y.ext 1.5, B.ext 0.5	
3:1 30g:10g	Glu 20, Starch 10	Soybean 8.0, Y.ext 1.5, B.ext 0.5	
3:2 30g:20g	Glu 20, Starch 10	Soybean 17 , Y.ext 2.4, B.ext 0.6	
3:3 30g:30g	Glu 20, Starch 10	Soybean 25 , Y.ext 4.0, B.ext 1.0	
3:4 30g:40g	Glu 20, Starch 10	Soybean 33, Y.ext 5.5, B.ext 1.5	NaCl 2
4:2 40g:20g	Glu 27, Starch 13	Soybean 17, Y.ext 2.4, B.ext 0.6	CaCO ₃ 2
4:3 40g:30g	Glu 27, Starch 13	Soybean 25, Y.ext 4.0, B.ext 1.0	
4:4 40g:40g	Glu 27, Starch 13	Soybean 33, Y.ext 5.5, B.ext 1.5	K ₂ HPO ₄ 0.25
4:5 40g:50g	Glu 27, Starch 13	Soybean 42, Y.ext 6.4, B.ext 1.6	
5:1 30g: 6g	Glu 20, Starch 10	Soybean 5.0 , Y.ext 0.8, B.ext 0.2	
5:5 50g:50g	Glu 34, Starch 16	Soybean 42, Y.ext 6.4, B.ext 1.6	
10:1 30g: 3g	Glu 20, Starch 10	Soybean 2.5 , Y.ext 0.4, B.ext 0.1	
20:1 30g:1.5g	Glu 20, Starch 10	Soybean 1.25, Y.ext 0.2, B.ext 0.05	
30:1 30g: 1g	Glu 20, Starch 10	Soybean 0.8 , Y.ext 0.15, B.ext 0.05	

* Glu, glucose; Y. ext, yeast extract; B. ext, beef extract

(3) 인산염 농도에 따른 배양효과

일반적으로 인산염의 첨가유무 또는 첨가 농도는 미생물의 2차대사산물 생산에 영향을 주는 것으로 알려져있다. 본 연구에서는 선발된 두 길항균 주의 배양시 인산염이 균 생육과 활성물질 생산성에 미치는 영향을 검토 하였다. 첨가되는 인산염의 농도를 GSS배지 기본 첨가 농도대비 0.5배~3 배로 달리해 준 후 배양효과를 균체량(PCV) 및 항균활성을 기준으로 하여 상대 비교하였다.

Table 5. Phosphate concentration added GSS medium

Basal medium(g/L)		K ₂ HPO ₄ (g/L)	
Glucose	20	0.5 fold	0.125
Soluble starch	10		
Soybean meal	25	1 fold	0.25
Yeast extract	4		
Beef extract	1	2 fold	0.5
NaCl	2		
CaCO ₃	2	3 fold	0.75

(4) 기타성분 농도에 따른 배양효과

인산염과 함께 선발된 균주가 가장 잘 생육하고 활성물질 생산을 잘 하는 염(NaCl) 및 CaCO₃의 최적 농도 탐색을 위하여, 각 성분의 농도를 달리하여 배양하였다. 배양 후의 효과를 균체량(PCV) 및 항균활성을 기준으로 평가하였으며 첨가 비율은 아래의 table 6과 같다.

Table 6. NaCl, CaCO₃, K₂HPO₄ concentration on GSS medium(g/L)

Basal composition		Other element	
Glucose	20	0.5 fold	NaCl 1g, CaCO ₃ 1g, K ₂ HPO ₄ 0.125
Soluble starch	10	1 fold	NaCl 2g, CaCO ₃ 2g, K ₂ HPO ₄ 0.25
Soybean meal	25	2 fold	NaCl 4g, CaCO ₃ 4g, K ₂ HPO ₄ 0.5
Yeast extract	4	3 fold	NaCl 6g, CaCO ₃ 6g, K ₂ HPO ₄ 0.75
Beef extract	1		

2) Jar fermenter상에서의 최적 배양조건

(1) 최적 배지조성을 이용한 발효조 실험

Flask 상에서 최종 선발된 조성과 비율을 5L-jar fermenter 상에 적용하여 대량배양 적용 가능여부를 확인실험 하였으며, 배양시간별 생균수, 항생물질 생성량 및 pH의 변화를 조사하여 그 변화 추이를 확인하였다. 발효조 시험에 이용하기 위한 선발된 조성은 Table 7에 나타내었다.

Table 7. Selected optimal media composition for *Streptomyces* sp. A010321 and *Streptomyces* sp. A020645(g/L)

Ingredient	A010321	A020645
Galactose	10	15
Soluble starch	10	-
Dextrin	10	-
Maltose	-	15
Soybean meal	30	28
NaNO ₃	-	2
NaCl	4	2
CaCO ₃	4	2
K ₂ HPO ₄	0.5	0.25
pH	7.2	7.2

(2) 교반속도에 따른 효과

방선균의 배양시 교반속도는 통기량과 함께 균 생육 및 활성물질 생산에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이에 impeller의 회전 속도를 200, 300, 400rpm으로 조정해 주어 발효조를 가동하였으며 5L-jar fermenter에서 3L-작업용량으로 실험에 임하였으며 1vvm의 aeration, 28℃에서 5일간 배양하며 각 조건에서의 생균수, 항생물질 생성량, pH의 변화를 12시간 간격으로 조사하여 상호간 비교하였다.

3) Pilot plant상에서의 적용 및 균체생산

(1) 발효조건

플라스크 및 fermenter상에서의 결과를 바탕으로 얻어진 최적 배양조건을 pilot plant상에 적용하였다(Fig. 1). 300L-volume의 발효조에서 100L-작업용량으로 5일간 28℃, 1vvm의 통기량의 조건을 적용하였으며 교반속도의 경우 *Streptomyces* sp. A010321균주의 배양에는 200rpm, *Streptomyces* sp. A020645균주의 배양에는 300rpm을 각각 적용하였다.



Fig. 1. Fermentation in 300L fermenter.

(2) 균체생산

Pilot plant상(300L-volume fermenter)에서 배양된 배양액을 -86°C , 48시간 동결건조 하여 2.2kg의 동결건조 된 균체 분말을 제조하였다(Fig. 2). 동결건조 된 균체 분말은 이후 4°C 에서 보관하면서 제제화 실험에 이용하였다.



Fig. 2. Lyophilization through vacuum freeze dryer.

4. 제제화 연구

1) 제제의 조성

제조한 제제의 성분 중 계면활성제로서 HY1910(Sodium poly acrylate 고형분 50%) 1.5%, 안정제로서 glycerol 1%, 결합제 및 붕괴·확전제로서는 dextrin을 2%, *Streptomyces* sp. A010321 동결건조 균체 분말을 2.2% 비율로 고정시켜 첨가하였으며 증량제로서는 clay, bentonite, perlite, talc, zeolite, dialite, pyrophyllite를 이용하였다. 예비실험을 통해 압출 공정 시 반죽이 압출되는데 무리가 없는 조합비율 범위를 탐색하였으며 이 범위 내에서 수분 및 증량제 함량 비율을 조정하여 서로 다른 경도를 지닌 제제를 조립하였다. 각 제제에 대한 조합은 table 8에 나타내었다.

Table 8. Composition of pelleted granular biocontrol agent(g/kg)

Formulation	HY1910	Glycerol	Dextrin	A010321	D.W	Clay	Bentonite	Perlite	Talc	Zeolite	Dialite	Pyrophyllite
A2C2	15	10	20	22	170	763						
A2C3	15	10	20	22	203	730						
A2B1	15	10	20	22	234		233		466			
A2B2	15	10	20	22	200		483		250			
A2B3	15	10	20	22	200		250		483			
A2P3	15	10	20	22	333	460		140				
A2T1	15	10	20	22	203				730			
A2T2	15	10	20	22	237				696			
A2Z1	15	10	20	22	203				354	376		
A2Z2	15	10	20	22	237				333	363		
A2D1	15	10	20	22	273	493					167	
A2Y1	15	10	20	22	203							730
A2Y2	15	10	20	22	237							696
A2Y3	15	10	20	22	270							663

* A2C2의 A2 : *Streptomyces* sp. A010321, C2 : secondary formulation with clay
 * C : clay, B : bentonite, P : perlite, T : talc, Z : zeolite, D : dialite,
 Y : pyrophyllite

2) 제제화 공정

길항균주의 제제화 공정은 입제 성분의 칭량, 반죽, 압출, 건조, 입자화, 포장단계를 통해 이루어 졌다(Fig. 3). 증량제를 제외한 성분을 칭량한 후 증류수로 모두 녹인 후 증량제를 넣어 균이 고르게 분포할 수 있도록 충분히 반죽을 해 준다. 압출기를 통해 제제의 성형을 하였으며 압출된 제제를 실온에서 2일간 건조시켜 일정한 크기로 절단한 후 포장하여 4℃에 보관하였다.

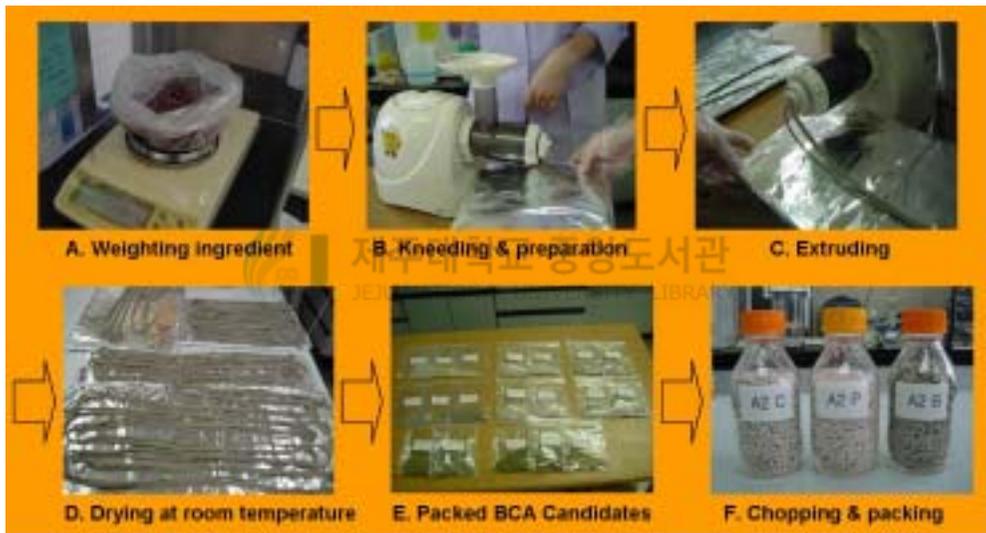


Fig. 3. Whole manufacturing process of granular formulations

3) 수소이온농도

제조된 각 입제의 1g분량을 취한 후 증류수와의 비율을 1:4로 혼합하여 제제별 수소이온농도를 측정하였다.

4) 수중 입자 붕괴성

제조된 제제의 1g을 취하여 시험관에 넣고 10ml의 증류수를 서서히 첨가한 후 정착시킨 채 제제의 형태가 붕괴되는 정도를 경과시간별로 육안 관찰하였으며 제제가 붕괴되는 정도를 10%단위별로 표시하였다(Fig. 4).

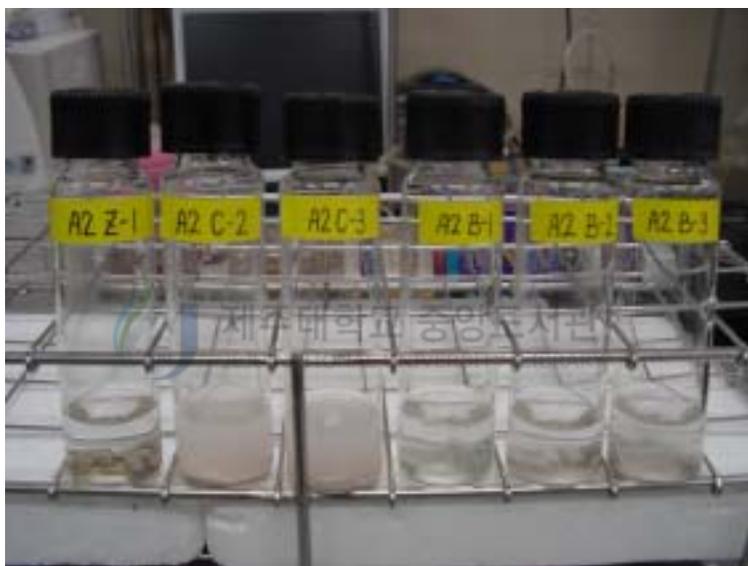


Fig. 4. Breakdown of pellet of granulated biocontrol agents

5) 수중 균 용출성

각각의 제제 1g씩을 시험관에 넣고 10ml의 증류수를 서서히 첨가한 후 시험관 밑 부분으로부터 1cm 부근에서 시간대별로 시료를 채취하여 용출되어 나오는 생균수를 측정하였다(Fig. 5).



Fig. 5. Release profile of the *Streptomyces* sp. A010321 from granulated biocontrol agents into water.

6) 저장 안정성

완성된 제제를 4℃에서 보관하며 제조 후 1일에서부터 2개월까지 주기적으로 확인하였다. 평판회석법을 이용해 확인하였으며, 제제 제조일로부터 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월까지의 시간 간격을 두어 평균수를 측정함으로써 제조된 각 제제의 안정성을 검토하였다.



III. 결과 및 고찰

1. 최적 배양조건 탐색

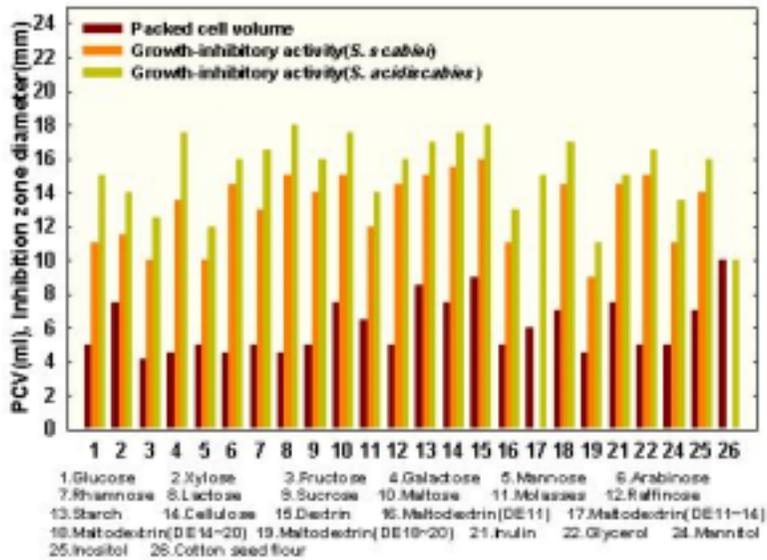
1) 플라스크상에서의 최적 배양조건

(1) 최적 탄소원 및 질소원

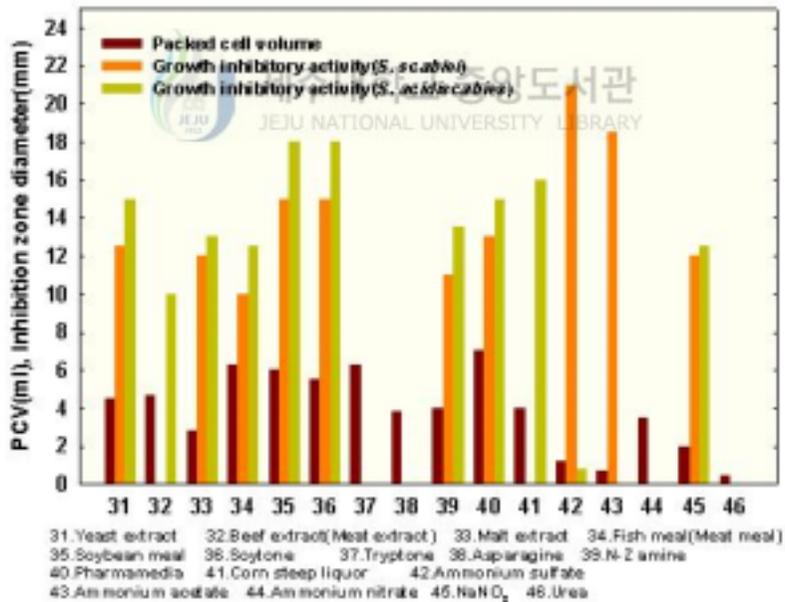
선발된 길항균주 *Streptomyces* sp. A010321, *Streptomyces* sp. A020645에 대한 최적 탄소원 및 질소원 탐색실험을 실시한 결과(Fig. 6, Fig. 7), *Streptomyces* sp. A010321균주의 경우 단당류로는 xylose, galactose, arabinose, rhamnose의 이용성이 좋은 것으로 나타났으며 이당류로는 maltose, molasses를, 다당류로는 starch, cellulose, dextrin, maltodextrin, inulin을, poly-alcohol로는 glycerol, mannitol, inositol, cotton seed flour의 이용성이 대조구인 glucose보다 좋았으며 질소원으로는 soybean meal, soytone, pharmamedia의 이용성이 대조구인 yeast extract에 비해 높은 것으로 나타났다. Starch 와 dextrin이 균체량(PCV : packed cell volume)면에서 대조구의 균체량 5% pcv에 비해 각각 8.5, 9%의 균체량을 보였고 항균활성 면에서도 *Streptomyces scabiei*에 대해 각각 15, 16mm의 생육 저지환을 나타내었다. Soybean meal을 질소원으로 첨가한 경우 균체량은 6% pcv였으며 생육저지환은 15mm로 나타났다. *Streptomyces* sp. A020645균주의 경우 단당류 중에서는 xylose, galactose, mannose, rhamnose를, 이당류 중에서는 lactose, sucrose, maltose, molasses를 잘 이용하였고, 삼당류인 raffinose와 다당류 중에서도 starch, cellulose, dextrin, maltodextrin, inulin, cotton seed flour의 이용성이 좋은 것으로 나타났다. 한편, polyalcohol계통의 mannitol과

inositol을 상대적으로 잘 이용하는 것으로 나타났으며 질소원으로는 malt extract, soybean meal의 이용성이 좋은 것으로 확인되었다. 이용성이 좋은 각 탄소원 및 질소원에 대해 최종 선발과정을 거쳐 *Streptomyces* sp. A010321 균주에 대해서는 galactose, soluble starch, dextrin 및 soybean meal을, *Streptomyces* sp. A020645 균주에 대해서는 galactose, maltose 및 soybean meal을 최적 배지조성의 탄소원, 질소원으로 결정하였다.



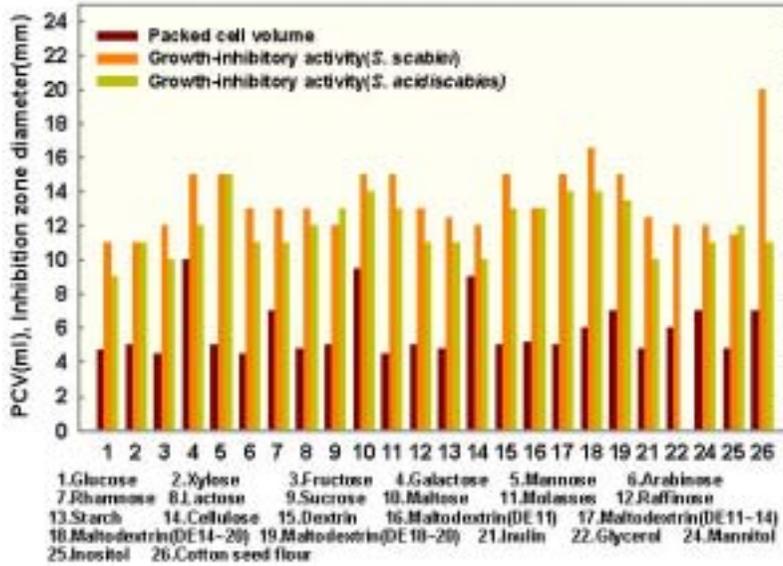


(A) Carbon source

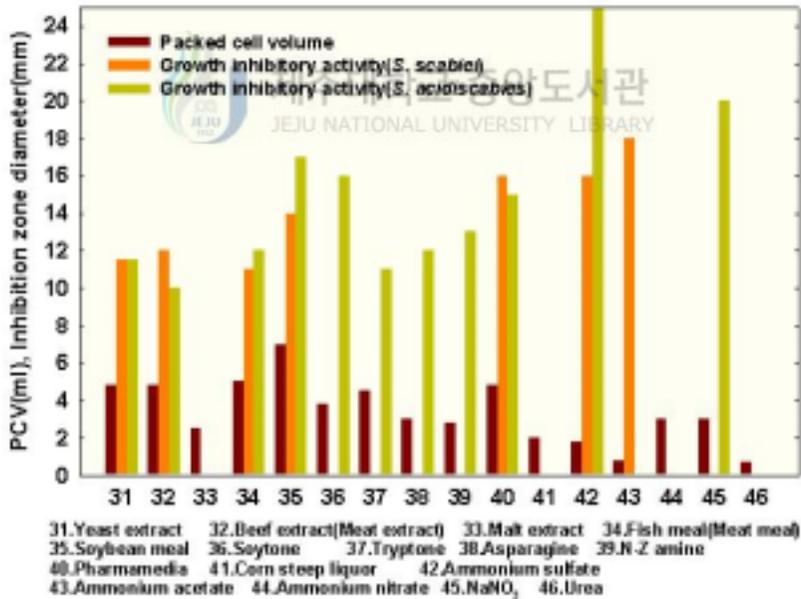


(B) Nitrogen source

Fig. 6. Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces* sp. A010321.



(A) Carbon source



(B) Nitrogen source

Fig. 7. Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces* sp. A020645.

(2) 최적 탄소원/질소원 비율

Streptomyces sp. A010321균주의 경우 비교적 적은양의 질소원으로도 생육이 가능한 것으로 나타났다. 즉, 질소원 첨가량이 1g인 경우에도 균체량(PCV)에 있어서 20g을 첨가한 구간의 결과와 큰 차이를 보이지 않았으나 항생물질 생산성에 있어서는 큰 차이를 보였다(Fig. 8). 영양원을 가장 많이 첨가해 준 50g:50g의 시험구에서 균체량 8% pcv, 생육저지환 16mm로 가장 좋은 효과를 보였으나 첨가되는 양에 비해 상대적으로 높은 결과를 보인 30g:30g의 비율(균체량 5% pcv, 생육저지환 16.5mm)을 발효조시험을 위한 최적 비율로 결정하였다.

Streptomyces sp. A020645균주의 경우 질소원 함량에 크게 의존적인 결과를 보였다. 특히 균체량 증가에 대한 영향이 컸으며 또한 이때 탄소원과의 비율에도 영향을 받는 것으로 나타났다. 질소원 첨가량이 상대적으로 적은 조합(질소원 함량 1g, 1.5g)에서는 항생물질 생산성이 낮았으며 탄소원대 질소원 비율이 30:20g 일때 균체량이 10% pcv였고 30g:30g의 비율에서는 12% pcv로 증가됨을 보였다. 탄소원대 질소원 비율이 30g:40g부터 균체량 및 활성환이 커짐을 보였으며 40g:50g 비율에서 균체량 수율이 14.5% pcv로 최고조에 이르렀다. 산업적인 이용성과 항생물질 생성량, 생균수 등을 모두 고려하였을 때 탄소원과 질소원의 비율은 30g:30g으로 적용하는 것이 최적인 것으로 판단되었다. 이러한 결과를 바탕으로 최적의 탄소원, 질소원 비율은 30g:30g으로 결정하였으며 산업적인 생산을 위해 저렴한 영양원을 이용할 경우 비율을 높여 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

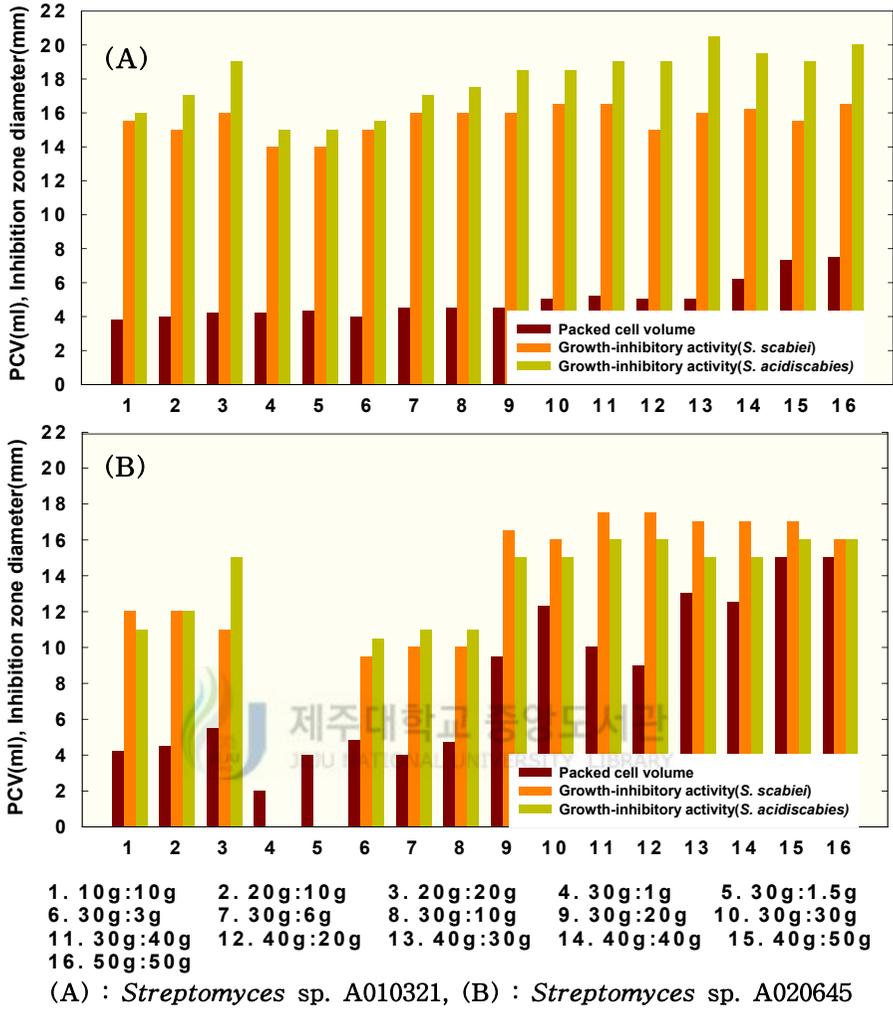
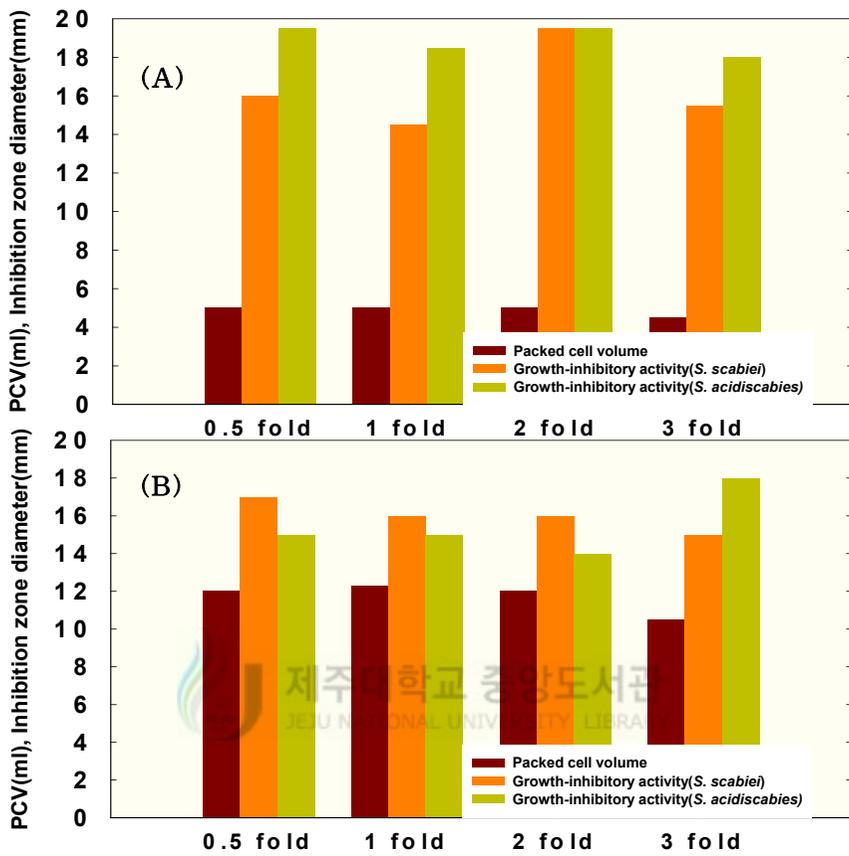


Fig. 8. Effect of different carbon to nitrogen ratio on

Streptomyces sp. A010321 and *Streptomyces* A020645.

(3) 인산염 농도에 따른 배양효과

대조구에 첨가된 인산염의 농도는 0.25g/L인데 이를 0.5배, 2배, 3배로 각각 조정하였을 경우의 균체량(PCV) 및 항균활성을 확인해 본 결과(Fig. 9), *Streptomyces* sp. A010321균주의 경우 대조구의 2배량을 첨가한 실험구에서 *Streptomyces scabiei*, *Streptomyces acidiscabies* 두 병원균주에 대한 생육저지환이 20mm까지 증가함을 보였다. 한편, 인산염 농도를 3배량으로 가해준 경우에는 오히려 활성이 감소하여 0.5배의 실험구간과 같은 16mm에 그쳤으며 균체량에 있어서는 모든 시험구에서 큰 변화를 보이지 않고 유지되는 경향을 보였다. *Streptomyces* sp. A020645균주의 경우 인산염이 0.5배량 첨가된 경우 *Streptomyces scabiei*에 대한 활성이 17mm로 증가하였으며 3배량을 첨가한 구간에서는 균 생육을 저해하는 결과를 보였다. 또한 인산염 농도가 높아질수록 항균활성이 조금씩 감소함을 확인하였다.

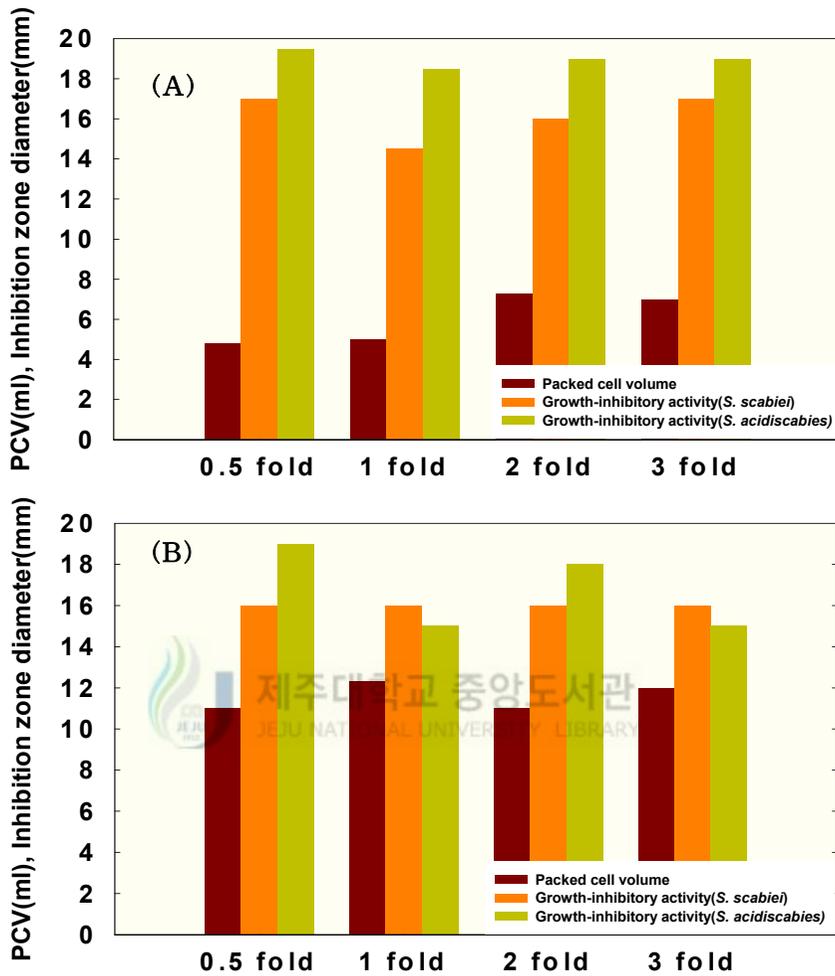


(A) : *Streptomyces* sp. A010321, (B) : *Streptomyces* sp. A020645

Fig. 9. Effect of different phosphate concentration on *Streptomyces* sp. A010321 and *Streptomyces* sp. A020645.

(4) 기타성분 농도에 따른 배양효과

첨가되는 NaCl, CaCO₃, K₂HPO₄의 농도를 달리하였을 때(Fig. 10), *Streptomyces* sp. A010321 균주의 경우 NaCl 및 CaCO₃의 첨가량이 2배 일 때 가장 많은 균체량(7% pcv)을 얻었으며 활성 면에서도 두 병원균주 *Streptomyces scabiei*, *Streptomyces acidiscabies*에 대해 각각 16, 18mm의 생육저지환을 나타내었다. 이는 0.5배량을 첨가한 실험구의 17, 19mm와 3배량을 첨가한 구간의 17, 18.5mm에 비해 상대적으로 낮았으나 균체량의 결과를 함께 고려하여 2배량을 첨가해 주는 것을 최적 농도로 판단하였다. 반면, *Streptomyces* sp. A020645 균주의 경우 1배 함량의 시험구에서 균체량이 12% pcv로 가장 많았으며 *Streptomces acidiscabies*에 대한 활성 면에서는 0.5배량을 첨가한 실험구에서 가장 높은 것으로 나타났으나 우점균으로 알려진 *Streptomyces scabiei*에 대한 활성에서는 동일한 결과를 보여 0.5배량을 첨가하는 것이 적당하다고 판단하였다. 이 결과를 인산염 농도탐색 실험결과와 종합해 보았을 때 인산염농도를 0.5배량, NaCl 및 CaCO₃는 1배량 첨가해 줄때 효과가 가장 좋을 것으로 판단된다.



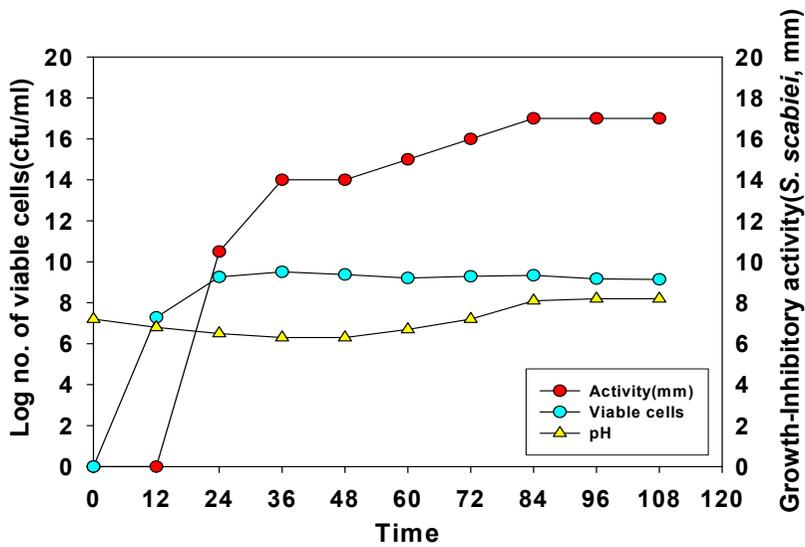
(A) : *Streptomyces* sp. A010321, (B) : *Streptomyces* sp. A020645

Fig. 10. Effect of NaCl, CaCO₃, K₂HPO₄ concentration on *Streptomyces* sp. A010321 and *Streptomyces* sp. A020645.

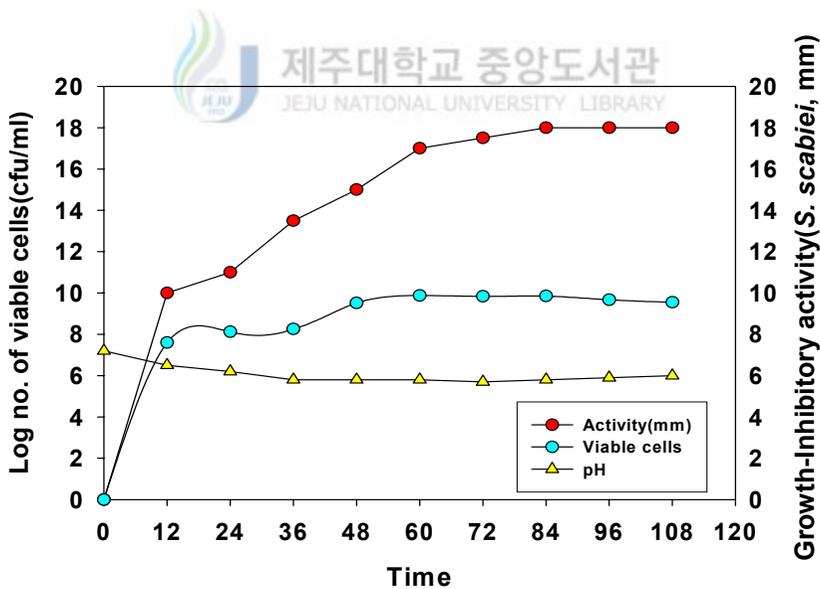
2) Jar fermenter상에서의 최적 배양조건

(1) 최적 배지조성을 이용한 배양

플라스크상에서 가장 좋은 효과를 보인 탄소원, 질소원의 조합을 5L-jar fermenter상에 적용하여 생균수, 항생물질생산량, pH의 변화를 경시적으로 조사하였다. 그 결과 적합한 배지 조성으로는 *Streptomyces* sp. A010321균주의 경우 galactose 10g, soluble starch 10g, dextrin 10g, soybean meal 30g, NaCl 4g, CaCO₃ 4g, K₂HPO₄ 0.5g의 조합에서 우수한 결과를 보였으며 배양 48시간부터 생균수에 있어서 5.2×10^9 cfu/ml으로 대조구(GSS)를 넘어섰고, 생균수가 가장 높은 구간을 비교함에 있어서 대조구인 GSS medium에서는 배양 36시간으로 5.1×10^9 cfu/ml이었고 modified medium에서는 배양 후 60시간에서 8.8×10^9 cfu/ml로 나타났다 (Fig. 11). 항생물질 생산시간이 다소 단축되는 경향을 보였으며 배양 48시간부터는 항생물질 생산량이 서로 다른 차이를 보였으며 항생물질 생산량이 가장 많은 시간은 배양 후 84시간으로 이는 대조구 및 modified medium 모두 동일하였다. 하지만 항생물질량에 있어서는 대조구가 17mm의 활성환을 보인 반면 modified medium에서는 18mm의 활성환을 나타내어 modified medium의 이용성이 좋은 것으로 확인되었다. 한편, *Streptomyces* sp. A020645균주는 galactose 15g, maltose 15g, soybean meal 28g, NaNO₃ 2g, NaCl 2g, CaCO₃ 2g, K₂HPO₄ 0.25g의 조성에서 좋은 결과를 보였으며 균의 생육이 비교적 빠른 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 12). 항균활성물질 생산은 상대적으로 배양초반에 다소 완만한 양상을 보였으나 배양 84시간에 항생물질 생산량이 최고조에 달하였으며 modified medium에서 활성환이 16.5mm, 대조구에서 16mm 이상의 활성환을 보였다.

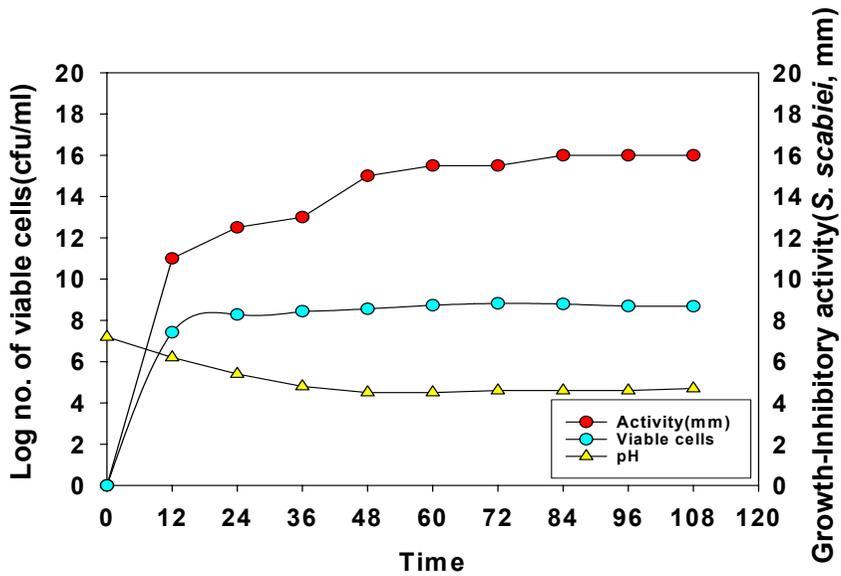


(A) GSS medium

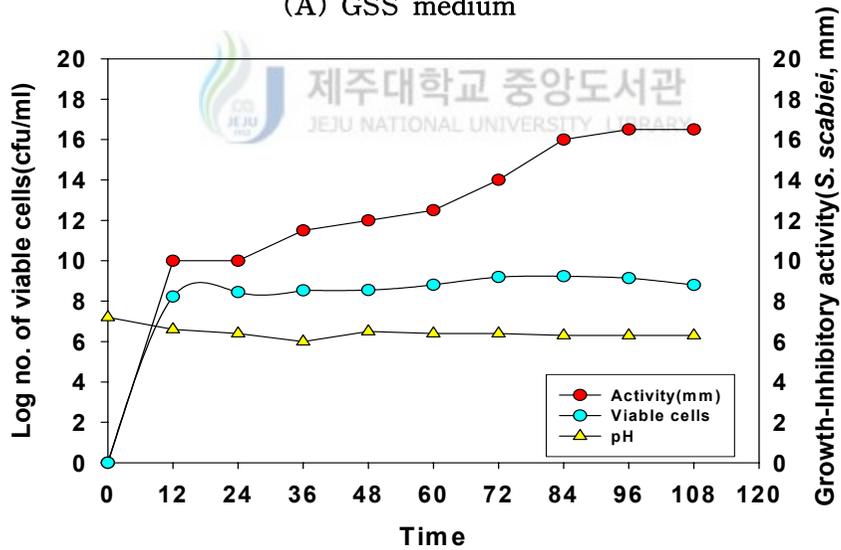


(B) Modified medium

Fig. 11. Growth curve comparison of *Streptomyces* sp. A010321 in modified media to GSS.



(A) GSS medium



(B) Modified medium

Fig. 12. Growth curve comparison of *Streptomyces* A020645 in modified media to GSS.

(2) 교반속도에 따른 효과

교반속도를 200, 300, 및 400rpm으로 각각 달리하여 배양시간에 따른 생균수, 항생물질축적량, pH의 변화를 관찰한 결과 *Streptomyces* sp. A010321 균주의 경우 200rpm에서 가장 좋은 결과를 보였다(Fig. 13). 배양 12시간 만에 1.3×10^8 cfu/ml의 생균수를 나타냈으며 배양 36시간에는 균 밀도가 8.3×10^9 cfu/ml로 가장 높았다. 항생물질 생성에 있어서도 배양 48시간 안에 높은 수준의 활성을 나타내었으며 배양72시간에 가장 많은 항생물질을 생성(활성환 17mm)하는 것으로 확인되었다. 또한 배양 5일째에도 물질생성량의 지속적인 증가를 보인 것을 감안했을 때 배양시간을 연장시키고 교반속도를 좀 더 낮은 조건에서 추가적인 확인실험이 필요할 것으로 생각된다. *Streptomyces* sp. A020645 균주의 경우 300rpm에서의 배양효과가 가장 뛰어났다(Fig. 14). 배양 24시간에서 항생물질생성량의 차이가 나타나기 시작하였고 48시간 무렵에는 그 차가 급격해 짐을 보였으며 배양 72시간에 균 밀도가 8.2×10^8 cfu/ml로 가장 높았으며 항생물질 생성은 84시간에 16mm 활성환을 보여 가장 많은 양을 생성하는 것으로 나타났다. 두 균주 모두 400rpm에서는 배양효과가 다소 떨어짐을 보였는데 이는 고속으로 회전하는 impeller에 의해 균사체가 절단되기 때문인 것으로 사료된다.

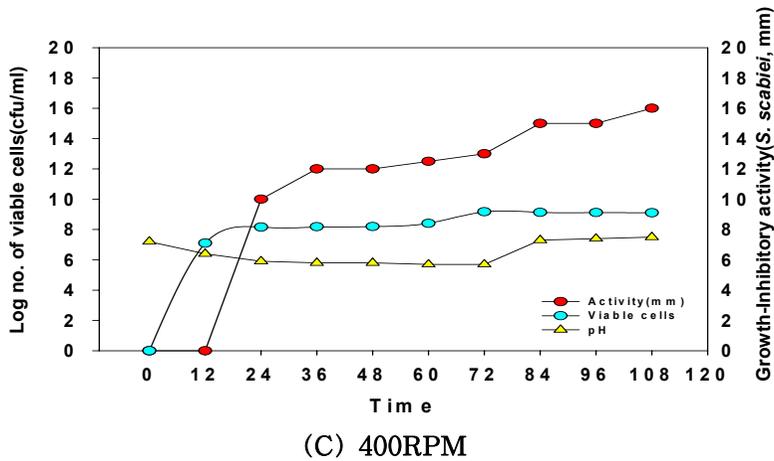
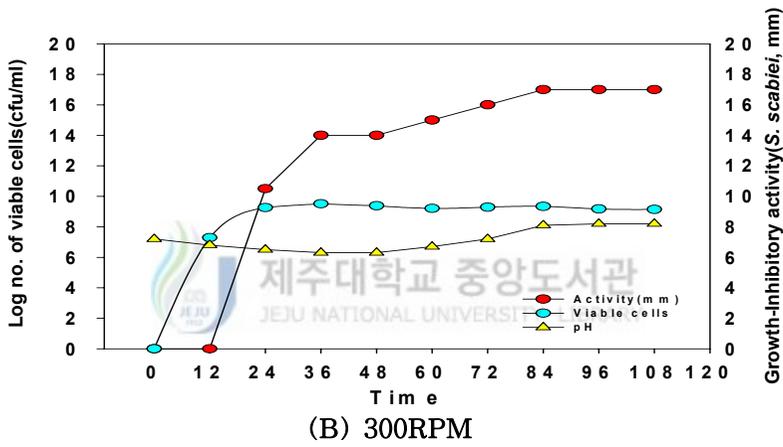
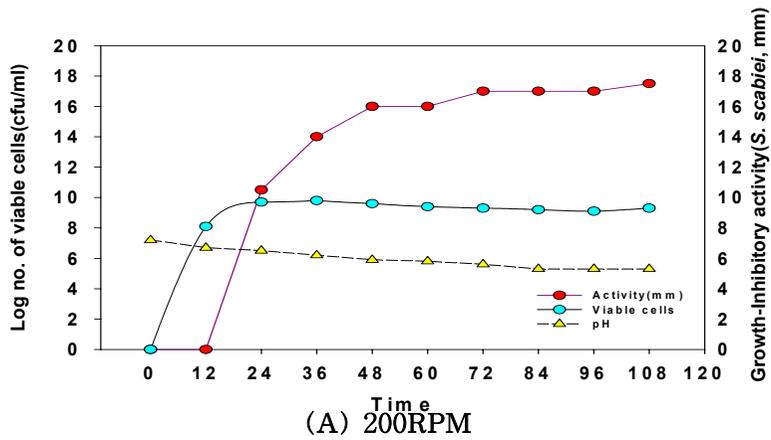


Fig. 13. Effect of agitation condition on *Streptomyces* sp. A010321.

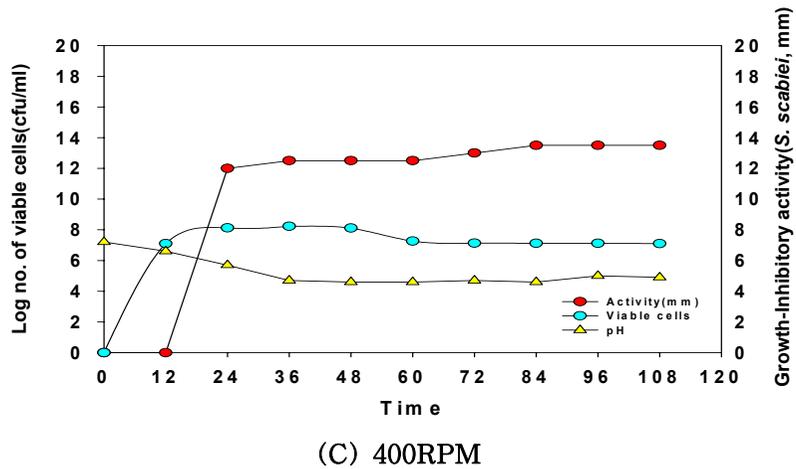
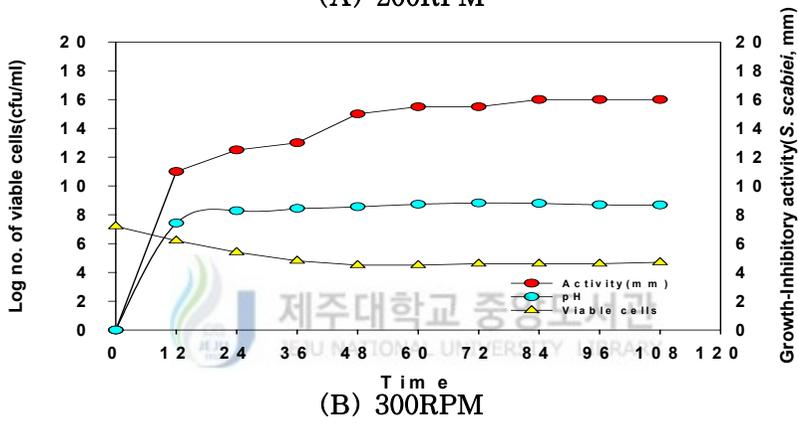
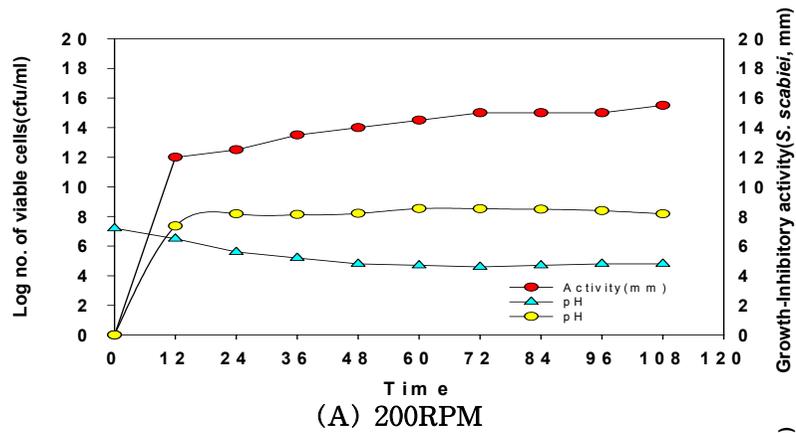
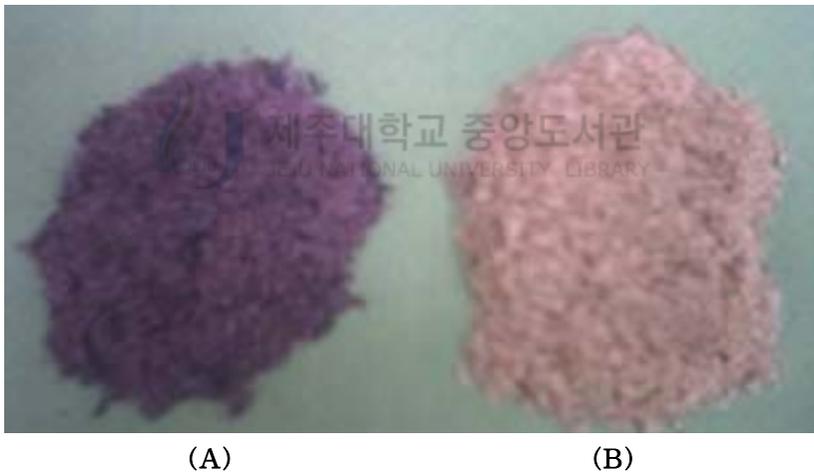


Fig. 14. Effect of agitation condition on *Streptomyces* sp. A020645.

3) Pilot plant상에서의 적용 및 균체생산

선발된 최적 배지조성 및 발효조건을 pilot plant(300L-fermenter)에 적용하여 배양하였다. 배양 후 균체를 분리하여 동결건조 한 결과 fig. 15.와 같은 동결건조 균체를 얻을 수 있었으며 균체분말의 균 밀도는 10^{11} cfu/g 수준인 것으로 확인되었다. 이렇게 얻어진 동결건조 균체를 4℃에 보관하면서 제제화 과정에 사용하였다.



(A) : *Streptomyces* sp. A010321, (B) : *Streptomyces* sp. A020645

Fig. 15. Cell powder of *Streptomyces* sp. A010321 and
Streptomyces sp. A020645 obtained through lyophilization

2. 제제화 연구

1) 수소이온농도

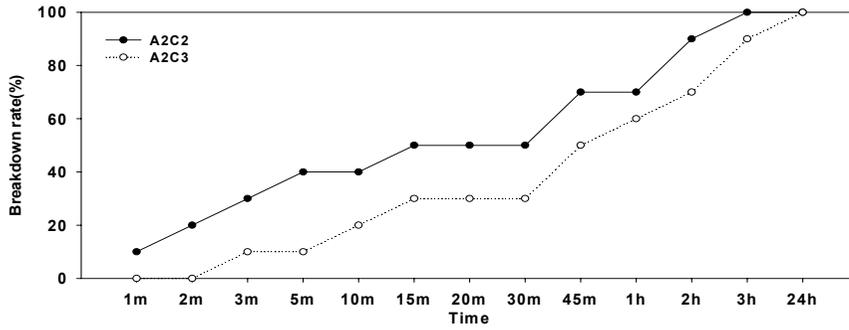
제제의 pH가 균주에 미치는 영향을 고려하기 위하여 각 제제의 수소이온농도를 측정하였다. 그 결과, 전체적으로 pH 6.1~8.1까지의 범위로 확인되었다(Table 9). 길항균주 *Streptomyces* sp. A010321와 *Streptomyces* sp. A020645는 산성 pH에서부터 약 알칼리 사이에서 매우 안정한 것으로 확인된 바 있기 때문에 제제 pH는 균주에 대해 영향을 주지 않을 것으로 판단된다.

Table 9. Hydrogen ion concentration of formulations

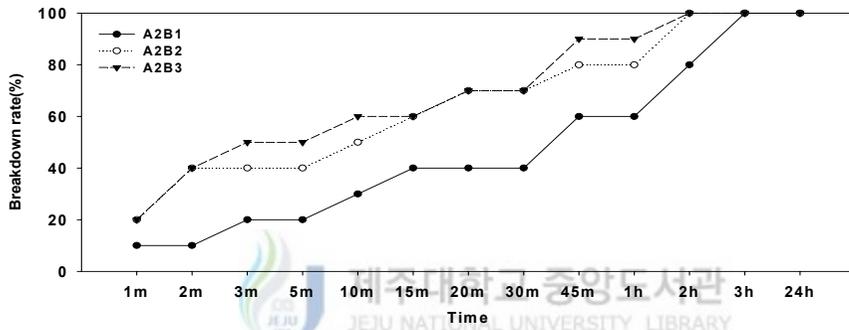
Formulations	pH
A2 C2	7.2
A2 C3	7.3
A2 B1	7.3
A2 B2	7.5
A2 B3	7.7
A2 P3	7.5
A2 T1	8.1
A2 T2	8.1
A2 Z1	6.1
A2 Z2	6.2
A2 D1	6.9
A2 Y1	6.9
A2 Y2	6.9
A2 Y3	7.0

2) 수중 입자 붕괴성

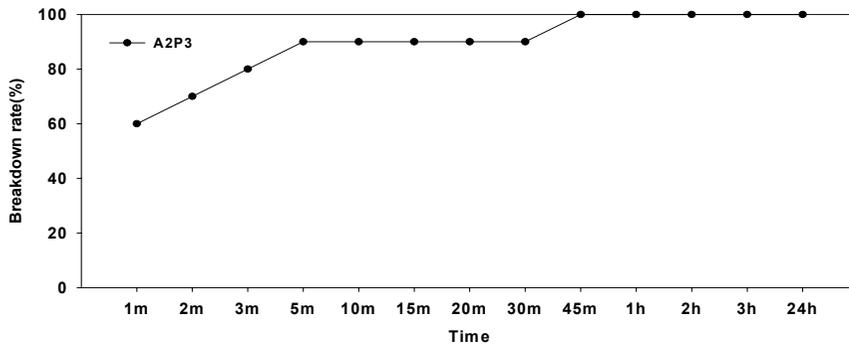
실험결과 입자 붕괴성은 제제의 경도와 매우 밀접한 관계에 있었으며 clay, bentonite, talc, pyrophyllite를 증량제로 사용한 제제의 경우 상대적으로 강한 경도를 나타냈고, 수분을 함유하면서 제제의 붕괴는 서서히 일어나는 경향을 보였다. 경도가 약한 Perlite제제의 경우 수분과 접촉 시 매우 짧은 시간에 60% 수준의 붕괴율을 보였으며 5분경과 후 90%가 붕괴되는 것으로 확인 되었다. 같은 증량제를 이용하였지만 증량제와 수분 함량의 비율을 달리한 제제들 간에도 결과의 차이를 보였는데 clay의 경우 제제가 50%까지 붕괴되는데 소요된 시간은 A2C2제제가 15분인 반면 A2C3의 제제는 45분이 소요됨을 보였다. 또한 Bentonite의 경우 A2B3제제가 3분 소요됨으로서 가장 빨랐고 상대적으로 경도가 강한 A2B1의 경우 40분까지 소요되는 것으로 나타났다. Talc의 경우도 비슷한 수준으로 붕괴 되어 감을 보였다. 따라서 talc를 증량제로 이용하고 bentonite를 일부 결합제로 첨가해 준 A2B제제 중 가장 적합한 수준의 경도를 지닌 A2B3의 조합을 이용하는 것이 적합할 것으로 사료되며 이상의 결과에 따라 이들 제제의 증량제의 종류 및 수분과의 비율을 조절하고 적합한 보조제를 제제성분으로 첨가해 주었을 때 적합한 경도를 가진 제제로서 조립, 이용할 수 있을 것으로 판단된다.



(A) Clay formulation

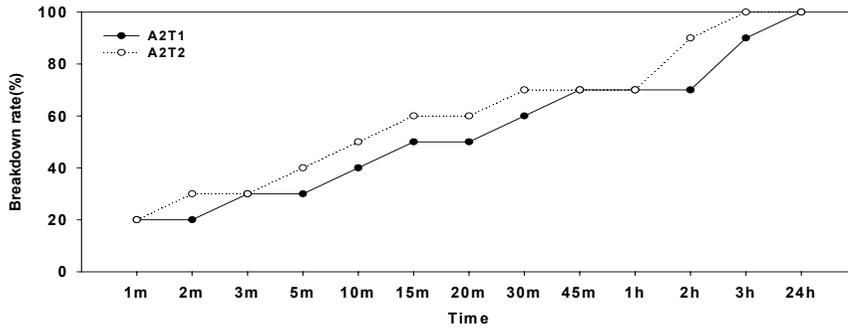


(B) Bentonite formulation

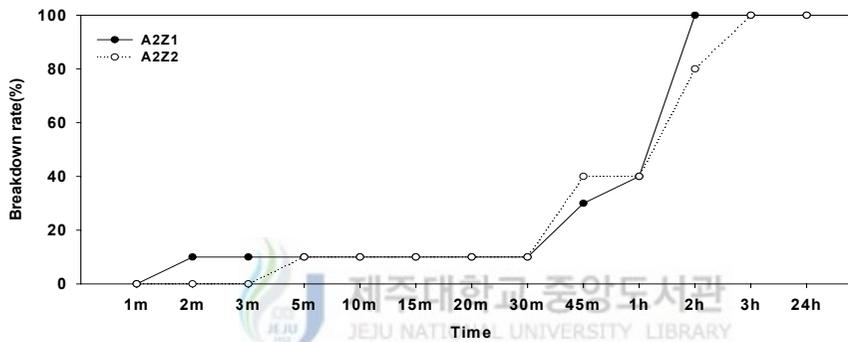


(C) Perlite formulation

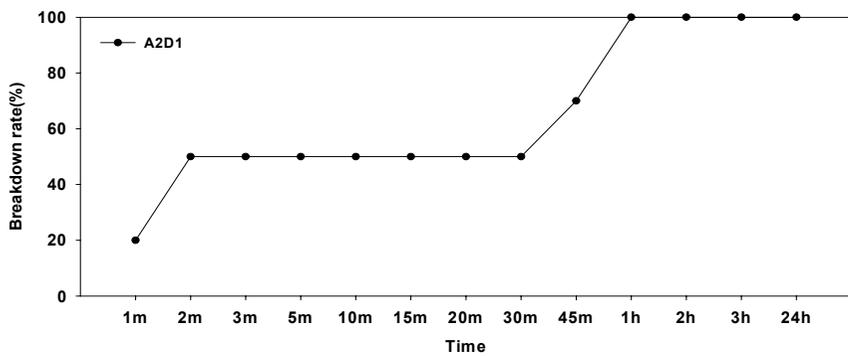
Fig. 16. Particle breakdown rate of the clay, bentonite and perlite formulations.



(D) Talc formulation

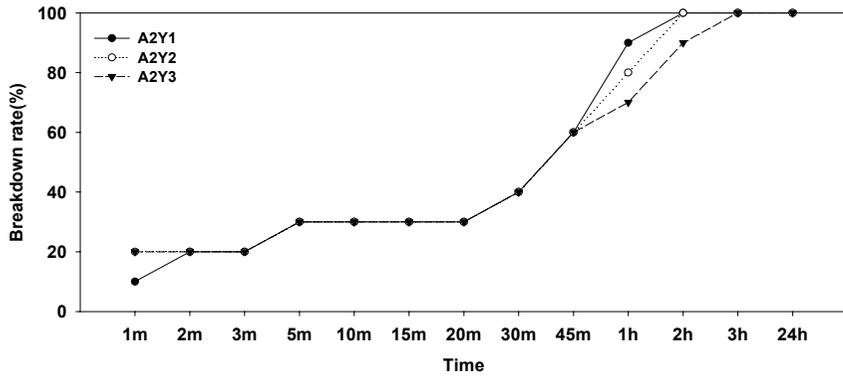


(E) Zeolite formulation



(F) Dialite formulation

Fig. 17. Particle breakdown rate of the talc, zeolite and dialite formulations.

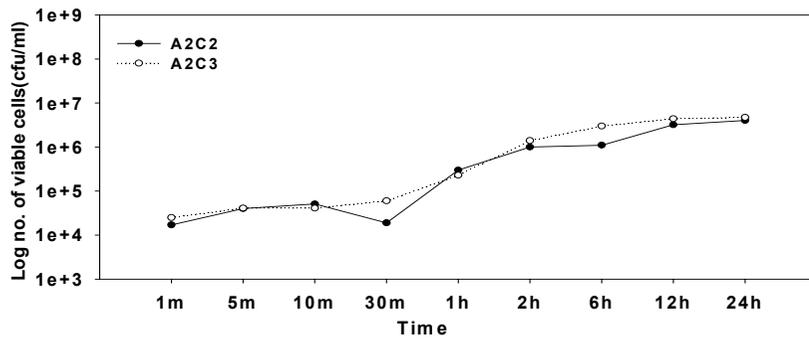


(G) Pyrophyllite formulation

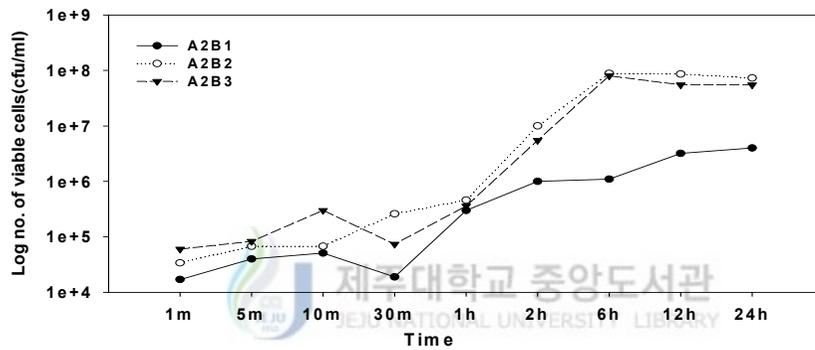
Fig. 18. Particle breakdown rate of the pyrophyllite formulations.

3) 수중 균 용출성

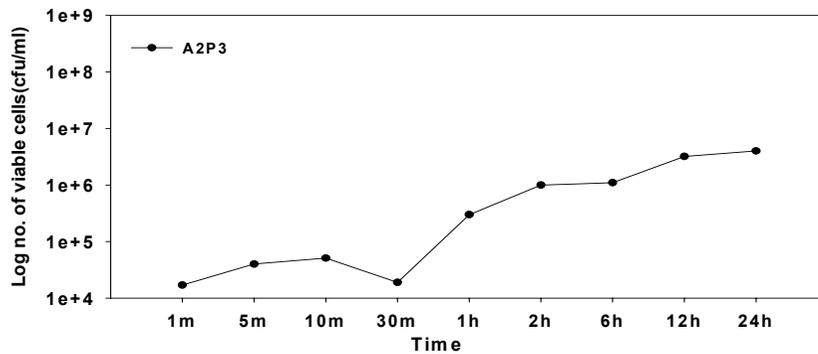
실험결과 균 용출성 또한 제제의 경도와 상호 관련되어 있었다. 상대적으로 경도가 약한 perlite의 경우 초반부터 7.4×10^5 cfu/g수준의 균 용출이 이루어 졌으며 비교적 강한 경도의 제제인 clay, bentonite, talc등의 경우 각각 $10^4 \sim 10^5$ cfu/g수준의 균 용출성을 보였다(Fig. 19, Fig. 20 그리고 Fig. 21). Zeolite의 경우 입자의 공극에 의한 흡수성이 커서 균의 용출성이 다소 떨어지는 것으로 생각되며 dialite제제의 경우 약한 정도에도 불구하고 균 용출성면에서는 다소 떨어지는 것으로 나타났다. 가장 좋은 결과를 나타낸 것은 붕괴성 실험결과와 마찬가지로 talc를 증량제로 이용하고 bentonite가 결합제로 적당량 첨가된 조합이었는데, talc제제의 초반기 우수한 균 용출성과 지속적인 용출성에 의한 안정된 효과와 함께 같은 증량제로서의 특징과 균 용출성 및 붕괴성에 큰 영향을 미치는 것으로 알려진 bentonite를 결합제로 첨가해 준 것이 그 원인으로 생각된다. 균의 용출성 실험을 수행함에 앞서 용출되는 양의 목표수준을 충분히 활성을 보일 수 있는 수준인 10^5 cfu/g으로 설정하였는데 균의 용출성 실험결과를 제제 붕괴성 실험 결과와 종합해 볼 때 제제의 형태가 50% 붕괴 되었을 때 균주의 용출양이 10^5 cfu/g이상인 경우가 일반적이었으며 이에 BD_{50} (50% breakdown rate)으로 기준을 설정하여 제제의 효과가 충분히 나타나는 시간대를 table 10에 나타내었다.



(A) Clay formulation

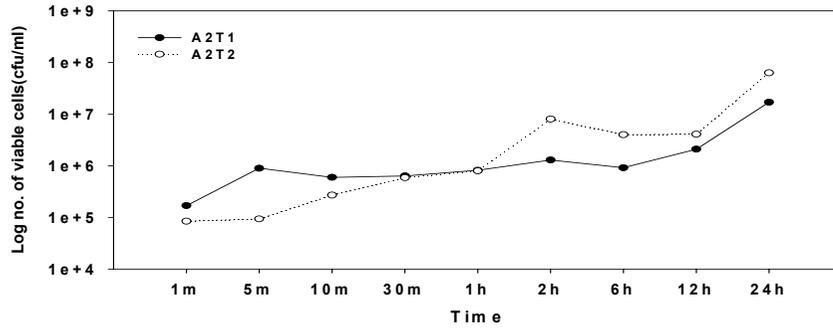


(B) Bentonite formulation

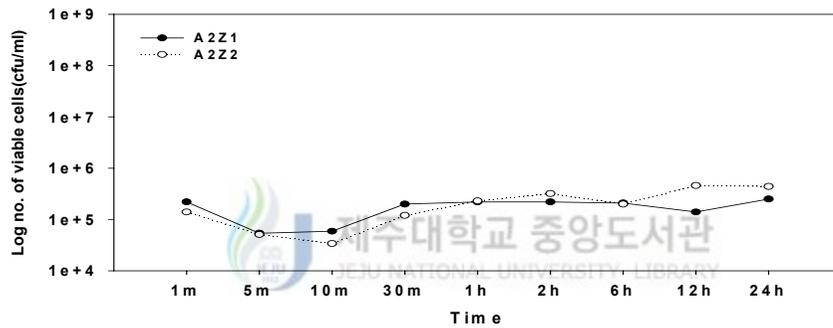


(C) Perlite formulation

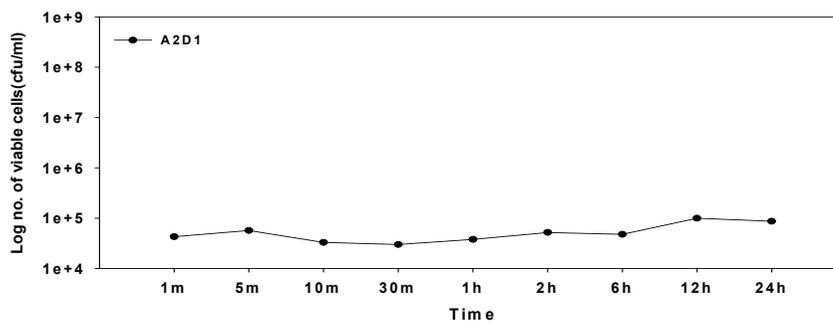
Fig. 19. Release profile of the *Streptomyces* sp. A010321 from the clay, bentonite and perlite formulations into water under static condition.



(D) Talc formulation

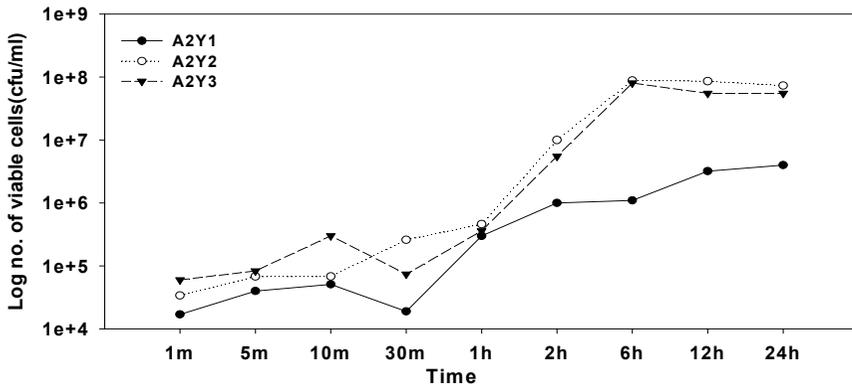


(E) Zeolite formulation



(F) Dialite formulation

Fig. 20. Release profile of the *Streptomyces* sp. A010321 from the talc, zeolite and dialite formulations into water under static condition.



(G) Pyrophyllite formulation

Fig. 21. Release profile of the *Streptomyces* sp. A010321 from the pyrophyllite formulations into water under static condition.



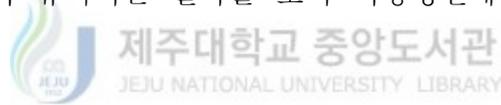
Table 10. 50% breakdown rate on various kinds of granular formulations

Formulation	BD50	Formulation	BD50	Formulation	BD50
A2 C2	15min	A2 P3	30sec	A2 D1	2min
A2 C3	45min	A2 Z1	90min	A2 GC1	30min
A2 B1	40min	A2 Z2	90min	A2 GC2	40min
A2 B2	10min	A2 Y1	40min	A2 GC3	180min
A2 B3	3min	A2 Y2	40min	A2 GT1	40min
A2 T1	15min	A2 Y3	40min	A2 GT2	45min
A2 T2	10min				

* BD₅₀ : 50% breakdown rate

4) 저장 안정성

제조된 각 입제에 대한 안정성 실험을 수행하였다. 제제의 경도를 대표할 수 있는 세 종류의 제제 clay, bentonite, 및 perlite를 선발하여 확인한 결과 제조 1일 후 10^9 cfu/g 수준의 균 밀도를 지녔던 모든 제제가 1주 후에는 각각 3.8×10^8 cfu/g, 8.2×10^8 cfu/g, 2.6×10^8 cfu/g으로 유지됨을 보였으며 저장 2주째에는 clay를 이용한 제제의 균 밀도가 6.5×10^7 cfu/g으로 감소하였으나 저장 2개월까지 4.4×10^7 cfu/g이상의 수준을 유지하였다(Fig. 22). Perlite제제 역시 저장 2개월까지 6.5×10^7 cfu/g 수준을 유지하여 양호한 안정성을 보였다. 특히 talc를 주 증량제로 이용하고 bentonite를 결합제로 첨가해준 제제의 경우 제제 내 생균수가 2.0×10^8 cfu/g 수준까지 유지되는 결과를 보여 저장성면에서도 가장 우수하였다.



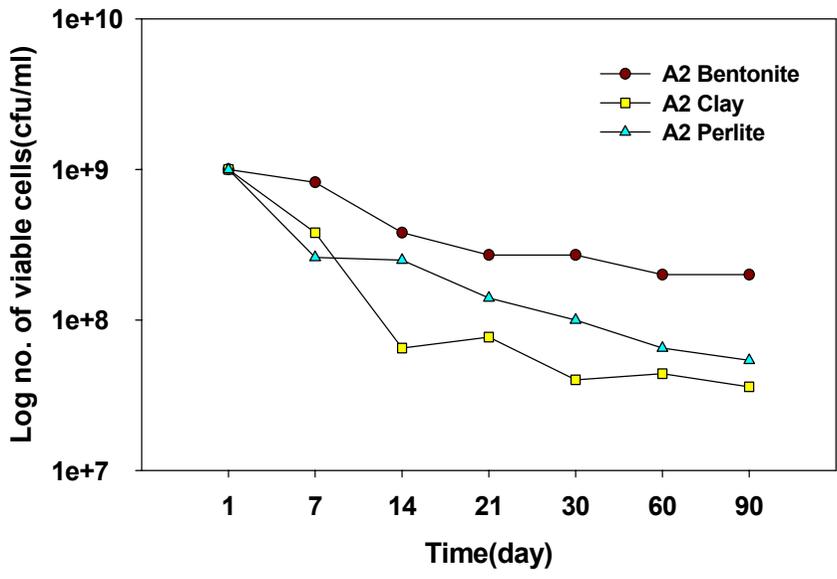


Fig. 22. Stability of the bentonite, clay, and perlite formulations.



IV. 요약

감자 더벵이병원균에 대해 효과적인 두 길항균주 *Streptomyces* sp. A010321 및 *Streptomyces* sp. A020645균주에 대한 최적 발효조건을 탐색하고 최적화 조건으로 배양한 균체를 이용하여 제제화 하는 것을 목적으로 본 실험을 수행하였다. 최적 발효조건 탐색을 위해 flask상에서 탄소원, 질소원의 종류, 탄소원과 질소원의 비율, 인산염 및 기타 성분의 최적 농도를 탐색한 결과 *Streptomyces* sp. A010321 균주의 경우 탄소원으로서는 galactose, dextrin, soluble starch가 적합한 것으로 나타났으며 질소원으로는 soybean meal을 가장 잘 이용하였다. 한편, *Streptomyces* sp. A020645 균주의 경우 galactose, maltose를 탄소원으로, soybean meal을 질소원으로 첨가했을 때 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 이들 두 균주 두 탄소원대 질소원 비율을 3:3(30g:30g)으로 공급해주는 것이 가장 적절한 것으로 판단되었으며 인산염의 농도는 *Streptomyces* sp. A010321 균주와 *Streptomyces* sp. A020645 균주에 대해 각각 2배량, 1배량을 첨가해 주었을 때 가장 좋은 결과를 나타내었다. 기타성분으로서 NaCl, CaCO₃, K₂HPO₄의 농도를 각각 2배, 1배의 양을 조합하였을 때 최적의 결과를 나타내었다. 위의 결과를 바탕으로 한 배지성분 조합을 5L-jar fermenter에 적용하였으며, 생균수, 항생물질생산성, pH변화를 측정하였다. 그 결과 가장 우수한 조합 및 발효조건을 pilot plant(300L-fermenter)에 적용하였고, 배양된 배양액을 동결건조하여 제제화에 이용하였다. 선발된 균주의 제제화에 있어서 첨가 비중 및 영향이 가장 큰 증량제의 종류를 달리하였고, 같은 증량제 내에서도 여러 가지 경도를 갖는 조합을 탐색하여 입제로 제제화 하였다. 이들 입제에 대하여 수중 붕괴성 및 수중 균 용출성 실험을 수행한 결과, 제제가 지니는 정도와 균의 용출성간에는

밀접한 관련이 있음이 확인되었다. Perlite제제는 경도가 약하면서 초반 제제 붕괴도 및 균 용출성이 높았으나 제형의 유지 및 활성 지속성 면에서 clay, bentonite, talc제제가 우수하였고 이 중에서도 talc를 증량제로, bentonite를 결합제로 이용한 조합에서 가장 안정적인 균 용출 및 제형 유지경향을 보여 미생물 제제로서 가장 적합한 것으로 평가되었다. 한편, 제제 제조 후 3개월까지 균 밀도가 2.0×10^8 cfu/g 수준으로 유지되어 제제의 안정성면에서도 bentonite제제가 가장 우수하였다.

참고문헌

Agrios, G.N. (1997) *Plant Pathology*, 4th edn. San Diego, CA: Academic Press

Agrios, G. N. (1997). Bacterial scabs. In: *Plant pathology*. 4th ed. Academic Press. pp. 499-501

Agrios, G. N. (1997). Common scab of potato. In: *Plant Pathology*. 4th ed. Academic Press, CA, USA. pp. 449-451.

Archuleta, J. G. and Easton, G. D. (1981) The cause of deep pitted scab of potatoes. *Am. Potato J.* 58, 385-392.

Bouchek-Mechiche, K., Pasco, C., Andrivon, D. and Jouan, B. (2000) Differences in host range, pathogenicity to potato cultivars and response to soil temperature among *Streptomyces* species causing common and netted scab in France. *Plant Pathol* 49, 3-10.

Bouchek-Mechiche, K., Gardan, L, Normand, P. and Jouan, B.(2000) DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. *Int. J. Evol. Microbiol.* 50, 91-99.

Eckwall, E.C. and Schottel, J.L. (1997) Isolation and characterization of an antibiotic produced by the scab disease-suppressive *Streptomyces diastatochromogenes* strain PonSSII. *J Ind Microbiol Biotechnol* 19, 220-225.

이향범, 조중운, 임치환, 김창진. (2004) 감자 더덩이병원균에 대해 길항활성을 갖는 방선균 탐색 및 항균 활성물질의 분리. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 47(2), 164-169 (2004)

이향범, 노효영, 박동진, 이소금, 고영환, 고정삼, 김창진. (2004) 생물체제 (BCA) 후보균주인 *Streptomyces* sp. A020645의 대량 균체생산 및 항더덩이병 활성증진을 위한 고체배지 조성에 관한 연구. *Res. Plant Dis.* 11(1) : 66-71



Ham, Y. I. (2000) Development of integrated control methods of potato common scab. Res. Rept. Agric. R&D Project. Nat'l Alp. Agric. Exper. Stat(Korean).

Hong, S. Y., Kim, S. H., J. H., Lee, K. S., Jin, S. C., Hru, T. H., Lim, S. O. and Kim, Y. H. (2000) Survey of pathogen and pest occurring on main crops in Jeju island. Res. Rept. Nat'l, Cheju Agric. Exper. Stat. 389-403 (Korean).

Hong, S. Y. (2001) Characterization and control of potato common scab in Jeju island. Ph.D. Thesis, Cheju National Univ.

Liu, D., Anderson, N. A. and Kinkel, L. L. (1995) Biological control of potato scab in the field with antagonistic *Streptomyces scabies*. *Phytopathol.* 85. 827-832.

Liu, D., Anderson, N. A. and Kinkel, L. L. (1996) Selection and characterization of strains of *Streptomyces* suppressive to the potato scab pathogen. *Can. J. Microbiol.* 42. 487-502.

Loria, R., Bukhalid, R. A., Fry, B. A. and King, R. R. (1997) Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Dis.* 81, 836-846.

Menzies, J. D. (1959) Occurrence and transfer of a biological factor in soil that suppresses potato scab. *Phytopathol.* 49, 648-653.

Miyajima, K., Tanaka, F., Takeuchi, T. and Kuninaga, S. (1998) *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 495-502.

농약 개발 보고서. 산자부 기획보고서. (1999) 97.

Park, D. H., Kim, J. S., Cho, J. M., Kwon, S. O., Hur, J. H. and Lim, C. K. (2002) Characterization of *Streptomyces* of potato scab in Korea: Distribution, Taxonomy, and Pathogenicity. Proceedings of the 5th Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions, KRIBB, Korea. pp. 58-70.

Park, Y. B., Yiem, M. S. and Cho, J. L. (2002) Development of integrated control system based on fertilizer, mulching, crop rotation, pH control on potato common scab(*Streptomyces scabies*) of 'Daejima' potatoes. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 143, 710-715.

Paulsrud, B. E. (1996) Characterization of antagonistic *Streptomyces* spp. From potato scab-suppressive soils and evaluation of their biocontrol potential against potato and non-potato pathogens. M.S. Thesis, Univ. of Minnesota, St. Paul, MN.

Scholte, K. and Labryere, R. E. (1985) Netted scab: A new name for an old disease in Europe. *Potato Res.* 28, 443-448.

Schottel, J. L., Shimizu, S. and Kinkel, L. (2001) Relationships of in vitro pathogen inhibition and soil colonization to potato scab biocontrol by antagonistic *Streptomyces* spp. *Biological Control* 20, 102-112.

Takeuchi, T., Sawada, H., Tanaka, F. and Matsuda, I. (1996) Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. causing potato scab based on 16S rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 476-479.

Weinhold, A. R. and Bowman, T. (1968) Selective inhibition of the potato scab pathogen by antagonistic bacteria and substrate influence on antibiotic production. *Plant Soil* 28, 12-24.

감사의 글

시간이 정말 빠르게 지나갑니다. 지난 2년간 알게 된 모든 분들에게서 많은 것을 배웠고 또한 많은 추억을 남길 수 있었습니다. 힘이 되어주신 이 모든 분들에게 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

지난 수년간 격려와 아낌으로 보살펴 주시고 모든 것의 시작을 열어 주신 고영환 교수님께 머리 숙여 감사를 드립니다. 또한 2년간의 시간동안 깊은 관심과 지도로 길을 잡아주시고 많은 것을 몸소 가르쳐 주신 생명공학연구원 김창진 박사님께 깊은 감사를 드립니다.

항상 너그러움과 웃음으로 살피주신 송대진 교수님, 엄하시지만 모든 부족한 면을 하나하나 따뜻하게 챙겨주신 강영주 교수님, 언제나 용기와 자신감을 불어넣어 주신 김수현 교수님, 항상 넉넉한 마음씨를 가르쳐 주시고 많은 배려를 아끼지 않으신 하진환 교수님, 관심어린 눈으로 조언을 해 주신 임상빈 교수님께 감사의 마음을 전합니다.

항상 자식처럼 보살펴 주시고 실험의 기초부터 하나하나 지도해 주신 박동진 선생님께 깊이 감사드립니다. 또한 때로는 멋진 박사님으로, 때로는 큰 형님 같은 모습으로 감싸주신 이재찬 박사님, 아들처럼 보아주시고 항상 걱정해주시는 유인자 선생님께 깊이 감사드립니다.

실험실생활을 함께하며 부족한 점 지적해 주시고 챙겨주신 허윤희 선생님께 감사드립니다.

타지 생활을 즐거운 추억으로 남길 수 있게 도와준 실험실 형님, 누님들에게 감사의 마음을 전하고 싶습니다. 항상 챙겨주고 미소로 실험실 분위기를 꽃밭으로 만들어 주는 윤정이 누나, 항상 너그럽고 따뜻하게 맞아 주는 은미누나, 칭찬과 챙겨줌으로 무장한 실험실에 하나뿐인 형, 상현이

형, 앵앵거리면서 실험실을 혼돈에 빠뜨리는 귀염둥이(?) 지민이 누나, 매일 밤늦게까지 동고동락한 계속이 누나, 힘들어할 때 묵묵히 도움을 준 보람이. 모두 고마운 마음을 전합니다.

함께 졸업을 앞둔 원준이형과 마힌다, 이제는 엄한 조교선생님이 된 호정이 누나, 제빵의 달인 지현이 누나를 비롯한 모든 대학원 선후배님들, 고맙습니다.

생각만 해도 즐겁고 너무나 소중한 내 친구 상필이, 지혁이, 정필이, 정환이, 현정이, 선이, 용담물개 희선이. 정말 고맙다 친구들아!

걱정해주고 챙겨준, 이제는 대전신부가 된 승미누나 정말 고마워!

언제나 말썽만 부리는 손자, 아들 키우시느라 고생하신 분. 세상에서 가장 아끼고 존경하는 할머니, 어머니 사랑합니다. 그리고 아낌없는 조언과 격려, 사랑으로 감싸주신 삼촌, 숙모, 이모, 이모부, 고모, 고모부 모두 고맙습니다. 제게는 친형제 이상의 의미인 재원이형, 원태형, 원성이형, 희선이 누나, 재희누나, 정은이누나, 원정이누나, 지아누나 모두 고마워요. 그리고 선아, 지연이, 권중이, 덕중이, 희상이, 민상이, 지철이. 마음의 힘이 되어줘서 고마워.

마지막으로 믿음으로 함께 해 준 나리에게 고마움을 전합니다.

2005년 12월 16일

이소금 올림