



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0130876
(43) 공개일자 2017년11월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 63/02 (2017.01) A01N 25/28 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A01N 63/02 (2013.01)
A01N 25/28 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0061654
(22) 출원일자 2016년05월19일
심사청구일자 2016년05월19일

(71) 출원인
이광수
경상남도 진주시 석갑로53번길 10, 110동 203호
(평거동, 들말대경아파트)

(72) 발명자
이광수
경상남도 진주시 석갑로53번길 10, 110동 203호
(평거동, 들말대경아파트)

정만훈
경상남도 의령군 대의면 망용로 300-32
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
윤대웅, 공병욱

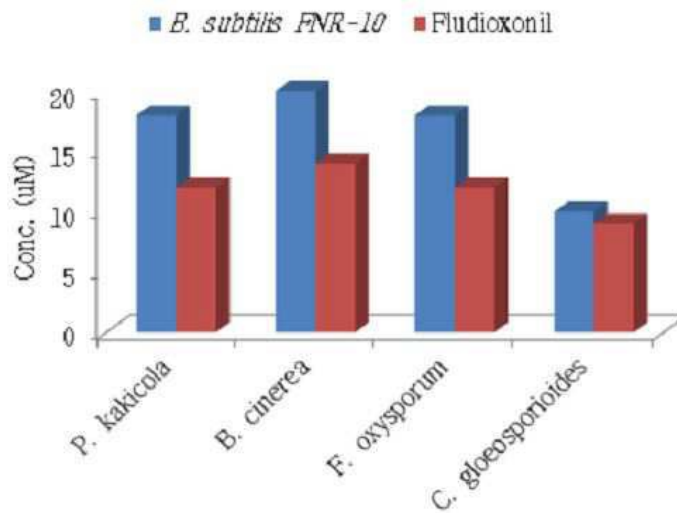
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 바실러스 서브틸리스 FNR-10 균주를 유효성분으로 포함하는 딸기 병원균에 대한 방제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 KCTC 12583BP로 기탁된 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) FNR-10 균주 또는 상기 균주 배양물을 포함하는 딸기 병원균에 대한 방제용 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 딸기 병원균에 대해 항균활성을 나타내며, 딸기 생장에 부정적인 어떠한 영향도 나타내지 않는다. 본 발명의 조성물은 동물 및 어류 안정성 시험에서 어떠한 독성이나 자극도 발생시키지 않은 안전한 물질이며, 딸기 병원균의 생장을 효과적으로 억제시키므로 딸기 생산을 증가시키는 목적으로 유용하게 이용 가능하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 1/20 (2013.01)

Y10S 424/10 (2013.01)

Y10S 514/919 (2013.01)

(72) 발명자

정남준

대전광역시 유성구 유성대로 1741, 101동 402호

배영일

경상남도 진주시 초장로 14번길 27, 106동 701호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 S2244637

부처명 중소기업청

연구관리전문기관 중소기업기술정보진흥원

연구사업명 2014년도 창업성장기술개발사업(건강진단연계창업과제)

연구과제명 딸기 곰팡이병 방제 병해관리용 미생물제제 개발 및 상용화

기 여 율 1/1

주관기관 팜누리

연구기간 2014.11.26 ~ 2015.11.25

명세서

청구범위

청구항 1

KCTC 12583BP로 기탁된 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) FNR-10 균주 또는 상기 균주 배양물을 포함하는 딸기 병원균에 대한 방제용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 균주는 서열목록 제1서열의 16S rRNA 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 딸기 병원균은 흰가루병 병원균(*Phyllactinia kakicola*), 잿빛곰팡이병 병원균(*Botrytis cinerea*), 시들음병 병원균(*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*) 및 탄저병 병원균(*Colletotrichum gloeosporioides* 또는 *Glomerella cingulata*)으로 구성된 균으로부터 선택되는 병원균인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 FNR-10 균주는 Na-알지네이트, K-카라기닌 및 젤란검으로 이루어진 균으로부터 선택되는 캡슐화 소재를 이용하여 마이크로캡슐화하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 캡슐화 소재는 안정제로서 추가적으로 전분 또는 CMC(Carboxymethyl Cellulose)를 포함하는 것을 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바실러스 서브틸리스 FNR-10 균주를 유효성분으로 포함하는 딸기 병원균에 대한 방제용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 딸기 곰팡이병 방제는 주로 화학적 방제에 의존하고 있으나 농약 잔류, 내성균 출현 등의 문제가 있어 방제가 쉽지 않으며, 특히 딸기의 전생육기에 걸쳐 발생하는 곰팡이병 방제에는 많은 어려움이 발생되고 있다. 딸기 곰팡이병은 병원균의 군사 성장 억제 및 포자 발아 불활성 등에 관여하는 항진균 활성 물질을 생산하는 미생물에 의한 방제가 탁월한 효과가 있음이 입증된 바 있다. 딸기 곰팡이병 방제 효과를 가지는 국내 토착형 미생물의 선발과 효과적인 제형에 의한 약효가 지속적이고 우수한 제품 개발이 필요하다. 매년 발생하는 딸기 곰팡이병에 의한 경제적 손실이 전체 딸기 시장의 10-15%를 차지하고 있는 실정이고 고소득의 수출 작목으로 친환경적인 재배에 적합한 제품 개발이 국가적 차원에서 시급한 것으로 판단된다.

[0004] 미생물을 이용한 농약은 기존 화학농약에 비해 여러 가지 장점을 보유하고 있으나 효과 측면에서 서서히 나타나

는 경우가 있다. 따라서 이를 극복할 수 있는 기술이 요구되고 있다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 등록특허 제10-0817428호
 (특허문헌 0002) 등록특허 제10-1403304호
 (특허문헌 0003) 등록특허 제10-1098304호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 딸기에서 질병을 일으키는 병원균의 생육을 억제할 수 있는 항균활성을 나타내는 조성물을 개발하기 위해 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 버섯재배농가의 폐면배지로부터 분리 동정한 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) FNR-10 균주(KCTC 12583BP) 또는 상기 균주 배양물이 딸기 병원균에 대해 항균 활성을 가지고 있음을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 KCTC 12583BP로 기탁된 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) FNR-10 균주 또는 상기 균주 배양물을 포함하는 딸기 병원균에 대한 방제용 조성물을 제공하는데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 KCTC 12583BP로 기탁된 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) FNR-10 균주 또는 상기 균주 배양물을 포함하는 딸기 병원균에 대한 방제용 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명자들은 딸기에서 질병을 일으키는 병원균의 생육을 억제할 수 있는 항균활성을 나타내는 조성물을 개발하기 위해 예의 연구 노력하였고 그 결과, 버섯재배농가의 폐면배지로부터 분리 동정한 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) FNR-10 균주(KCTC 12583BP) 또는 상기 균주 배양물이 딸기 병원균에 대해 항균 활성을 가지고 있음을 규명하였다.

[0017] 본 발명의 조성물에서 유효성분으로 포함되는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) FNR-10 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures)에 2014년 4월 29일자로 기탁하였고, 기탁번호 KCTC 12583BP를 부여받았다.

[0018] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) FNR-10(KCTC 12583BP) 균주는 서열목록 제1서열의 16S rRNA 유전자 서열을 갖는다.

[0019] 본 발명의 조성물은 딸기 병원균에 대해 항균활성을 발휘한다. 본 발명의 조성물은 딸기 병원성 곰팡이 흰가루병 병원균(*Phyllactinia kakicola*), 잿빛곰팡이병 병원균(*Botrytis cinerea*), 시들음병 병원균(*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*) 및 탄저병 병원균(*Colletotrichum gloeosporioides* 또는 *Glomerella cingulata*)

a)에 대해 항균 활성을 나타내며, 딸기 성장에는 영향을 미치지 않는다.

- [0020] 본 발명의 조성물은 딸기에 대한 주요 병해충인 흰가루병, 잣빛곰팡이병, 시들음병 및 탄저병에 대하여 방제 효과를 나타낸다.
- [0021] 본 발명의 조성물이 방제 효과를 나타내는 흰가루병은 *Phyllactinia kakicola*에 의해 발생하며, 상기 병원균은 살아 있는 식물체에서만 생활할 수 있는 절대적 기생자로 표피 세포내에 흡기라는 기관을 형성하여 기생생활을 한다. 흰가루병은 딸기의 잎, 엽병, 꽃, 화경, 과일 등 여러 부분에 발생한다. 잎에서는 흰가루 모양의 작은 반점을 형성하며, 하엽의 뒷면에 적갈색의 반점 형성이 진전되면 회백색의 곰팡이가 발생하게 되며 잎이 휘어진다. 꽃에 발생하면 꽃잎에 안토시아닌 색소가 형성되어 자홍색으로 변한다. 과일에서는 침해된 부분이 생육이 늦어지고, 착색이 진행되지 않고 하얗게 되어 상품 가치가 떨어진다. 발병 주에서 주변포기로 포자가 비산하여 주로 전염되며 화분매개용 꿀벌에 부착되어 전염되기도 한다. 포자의 비산은 12시 전후, 습도 55% 이하, 날씨가 맑은 날 활발하게 이루어진다. 이전에 감염된 식물의 조직에서 월동한다.
- [0022] 본 발명의 조성물이 방제 효과를 나타내는 잣빛곰팡이병은 잣빛의 곰팡이를 형성하는 병원균 *Botrytis cinerea*에 의해 발생한다. 과실, 꽃받침, 과경, 잎, 엽병 등 지상부위에 주로 피해가 나타나며, 특히 과실에 큰 피해를 입힌다. 어린 과실에 침입하여 갈색으로 마르고 심하면 흑갈변하고 다습시에는 부패하고 잣빛의 병원균이 발생한다. 꽃에 침입할 경우 수정 후 꽃잎이 떨어지지 않고 붙어 있을 때 꽃받침이 적색으로 되며 갈변 또는 흑갈변하며 썩는다. 처음에 하엽의 고사한 부분에 병원균이 분생포자를 형성하여 비바람에 의하여 비산 전염된다. 잣빛곰팡이병균은 포자에 의한 눈마름병 발생부위, 상처부위나 꽃잎, 암술, 수술 등 꽃의 각 기관을 통해 침입한다. 화분매개용 벌의 몸에 부착되어 꽃을 통해 전염되기도 한다.
- [0023] 본 발명의 조성물이 방제 효과를 나타내는 시들음병은 *F. oxysporum* f.sp. *fragariae*라는 곰팡이균에 의해 발생한다. 새잎이 황록색이 되거나 작아지고, 3개 소엽중 1-2소엽이 기형으로 작아져 짝엽이 되어 나온다. 피해 포기의 관부와 엽병을 잘라보면 도관을 따라 갈변하고 병이 진전되면 하엽이 시들고 하얀 뿌리는 거의 없고 흑갈색으로 부패한 것이 많고 포기전체가 위축되고 말라 죽는다. 피해포기의 관부, 엽병, 과병을 절단해 보면 도관의 일부 또는 전체가 갈색이나 흑갈색으로 변하고 채묘상의 모주에 발생하면 런너 발생수가 적어지고 런너의 새잎에도 기형엽이 발생한다. 수확기에 발생하면 착과가 적게 되고 과실 비대도 나빠진다. 토양 중에 있는 후막포자가 주 전염원으로 딸기의 뿌리로 들어가 도관 안에 균사를 신장하여 증식한다. 고온기 육묘기에 많이 발생하며, 감염된 모주로부터 런너줄기(도관)를 타고 자묘로 이동하여 전염원이 되고 분생포자는 토양입자가 비산할 경우 전염하고 관계수를 통해서 전염한다.
- [0024] 본 발명의 조성물이 방제 효과를 나타내는 탄저병은 *Colletotrichum gloeosporioides* 또는 *Glomerella cingulata*라는 곰팡이에 의해 발생하는 병으로 런너와 엽병에 나타나기 쉽고 분홍색의 분생자충을 형성한다. 크라운부에 침입할 경우 크라운 부위를 잘라보면 바깥부분 안쪽으로 갈변하며 묘 전체가 시들어죽는 형태를 나타내며 엽병, 런너에 발병할 경우 수침상으로 움푹하게 들어가는 검은색 병반을 형성하며 다습시 분홍색의 포자 퇴 형성한다. 탄저병은 잠재감염주와 이병잔해물이 1차전염원이며 강우나 관수에 의해 포자가 이동하여 2차전염원이 된다. 또한, 비바람이나 위에서 강한 관수시 감염주에서 형성된 분생포자가 물방울과 함께 비산하여 주위 건전주에 쉽게 전염된다.
- [0025] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물에 유효성분으로 포함되는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) FNR-10 균주에 의해 딸기에 대한 흰가루병 병원균(*Phyllactinia kakicola*), 잣빛곰팡이병 병원균(*Botrytis cinerea*), 시들음병 병원균(*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*) 및 탄저병 병원균(*Colletotrichum gloeosporioides* 또는 *Glomerella cingulata*)의 생장이 완전히 억제되는 최소농도는 각각 15-25 μ M, 17-27 μ M, 15-25 μ M 및 5-15 μ M이다. 최소 억제 농도(minimum inhibitory concentration, MIC)는 주어진 생장 조건에서 시험세균의 생장이 완전히 억제되는 최소농도를 의미한다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물에 유효성분으로 포함되는 FNR-10 균주에 의해 딸기에 대한 흰가루병 병원균, 잣빛곰팡이병 병원균, 시들음병 병원균 및 탄저병 병원균의 생장이 완전히 억제되는 최소농도는 각각 15-22 μ M, 17-25 μ M, 15-22 μ M 및 7-14 μ M이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물에 유효성분으로 포함되는 FNR-10 균주에 의해 딸기에 대한 흰가루병 병원균, 잣빛곰팡이병 병원균, 시들음병 병원균 및 탄저병 병원균의 생장이 완전히 억제되는 최소농도는 각각 16-20 μ M, 19-24 μ M, 16-20 μ M 및 8-12 μ M이다.
- [0026] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 딸기 시들음병에 대하여 대조군 대비 50-80%의 방제 효과를 나타낸다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 딸기 시들음병에 대하여 대조군 대비 55-75%의 방제 효과를 나타낸다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 딸기 시들음병에 대하여 대

조건 대비 60-70%의 방제 효과를 나타낸다.

- [0027] 본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물에 유효성분으로 포함되는 FNR-10 균주의 생존력을 안정적으로 유지할 수 있도록 Na-알지네이트, K-카라기닌 및 젤란검으로 이루어진 균으로부터 선택되는 캡슐화 소재를 이용하여 마이크로캡슐화할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, FNR-10 균주의 마이크로캡슐화에 이용되는 캡슐화 소재는 Na-알지네이트 또는 K-카라기닌이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, FNR-10 균주의 마이크로캡슐화에 이용되는 캡슐화 소재는 추가적으로 안정제로서 전분 또는 CMC(Carboxymethyl Cellulose)를 포함한다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, FNR-10 균주의 마이크로캡슐화는 1.0% 전분 및 1.5% Na-알지네이트를 혼합하여 실시한다. 상기 마이크로캡슐화에 의해 FNR-10 균주의 생존수 감소가 억제된다.
- [0028] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 방제용 조성물을 딸기 재배 시 희석 살포하여 딸기 병원균의 성장을 억제함으로써 딸기 생산율을 증가시킬 수 있다.

발명의 효과

- [0030] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0031] (i) 본 발명은 KCTC 12583BP로 기탁된 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) FNR-10 균주 또는 상기 균주 배양물을 포함하는 딸기 병원균에 대한 방제용 조성물을 제공한다.
- [0032] (ii) 본 발명의 조성물은 딸기 병원균에 대해 항균활성을 나타내며, 딸기 생장에 부정적인 어떠한 영향도 나타내지 않는다.
- [0033] (iii) 본 발명의 조성물은 동물 및 어류 안정성 시험에서 어떠한 독성이나 자극도 발생시키지 않은 안전한 물질이며, 딸기 병원균의 성장을 효과적으로 억제시키므로 딸기 생산을 증가시키는 목적으로 유용하게 이용 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1은 미량 희석법에 의한 *B. subtilis* FNR-10의 딸기 병원성 곰팡이에 대한 최소억제농도를 보여주는 결과이다.
- 도 2는 *B. subtilis* FNR-10 균주의 제형화에 대한 모식도이다.
- 도 3은 *B. subtilis* FNR-10 균주를 포함하는 공시자재의 약해 시험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0036] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0038] **실시예**

[0039] **실험방법**

[0040] 1. *B. subtilis* FNR-10 균주의 항진균 활성 측정

[0041] 딸기 병원성 곰팡이 흰가루병(*Phyllactinia kakicola*), 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*), 시들음병(*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*) 및 탄저병(*Colletotrichum gloeosporioides* *Glomerella cingulata*) 항진균 실험 표준 균주들은 PDB(Potato dextrose broth, Difco, USA) 액체 배지에서 28℃ 에서 96시간 동안 배양한 후에 배양액을 새로운 PDB 배지로 2×10^4 cfu/ml이 되도록 희석하였다. *B. subtilis* FNR-10의 500 L 발효조 대량 배양한 여액은 무균 상태인 멸균된 NB 배지로 단계 희석하였다. 그런 다음에 항진균 실험 표준 미생물 균주 100 μl를 96-웰 폴리프로필렌 마이크로타이터 플레이트(Costar 3790, Corning, USA)의 각각의 웰에 넣고 웰에 준비된 농도의 *B. subtilis* FNR-10의 배양 희석 여액을 혼합하였다. *B. subtilis* FNR-10의 항진균 활성을 보

기 위해 28℃에서 48시간 동안 배양 후에 ELISA Reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 620 nm에서 흡광도를 읽어 최소 억제 농도(MIC, Minimal Inhibition Concentration)를 측정하여 조사하였다. 대조군으로 사용한 광범위 딸기 살균제 화학 농약인 플루디옥소닐(상품명:사파이어)은 항진균 활성 대조 약제로 사용하였으며 표기되어 있는 사용 농도로 희석하여 동일한 조건에서 조사하였다.

[0043] 2. *B. subtilis* FNR-10 균주의 병해관리용 유기농업자재 실용화를 위한 제제 기술 확립

[0044] (1) *B. subtilis* FNR-10 균주의 밀도와 항진균 활성 물질 안정성 조건

[0045] 기존의 보급된 바실러스 속의 균주의 제형들은 일반적으로 배양 균주의 사멸에 의한 장기보관의 어려움과 항균 또는 항진균 활성 물질들이 부적합한 환경조건에 노출됨으로 활성이 소멸되는 안정성의 두 가지의 문제점을 가지고 있으므로 기존에 보급된 기술로는 제품의 장기보관과 안정성이 확보되지 않기 때문에 *B. subtilis* FNR-10 균주 배양액 주원료와 부원료에 의한 마이크로캡슐 최적 제형 조건 연구가 필요하다. 일반적으로 식품이나 의약품의 경우 단백질이나 다당류 등 고분자 물질의 담체를 이용한 마이크로캡슐 연구는 효모나 유산균의 마이크로캡슐화에 많은 연구가 이루어졌고 실용화되었다. 농업용 미생물체제의 경우에는 미생물 고정화 기술은 상용화로 확립되지 않고 다양한 충전제에 흡착시키는 기술로 입단화시키는 제제로 상용화가 되어 있는 실정이나 생균수의 감소가 가장 큰 문제점으로 되어 있다. 식품 미생물체제에 비해 부가가치가 낮은 농업용 미생물체제, 특히 액상제품의 생존율을 높일 수 있는 저렴한 마이크로캡슐화 소재와 공정기술이 다소 연구는 이루어져 있으나 상용화가 미흡한 실정이다. 본 연구에서 사용된 마이크로캡슐 방식은 저속의 연동펌프를 이용한 마이크로노즐 방식을 채택하여 사용하였다. 마이크로캡슐화의 알갱이(Bead)를 형성하는 생균력을 안정적으로 유지할 수 있는 저렴한 비용으로 구입이 가능한 소재 중에서 잘 알려져 있는 Na-알지네이트와 K-카라기닌 그리고 젤란 겐을 사용하였다. 또한 경화용액에서 알갱이를 형성한 후에 경화용액과 알갱이를 분리할 수 있는 스크린망(Mesh)을 부착하여 분리 정제하였다.

[0047] (2) *B. subtilis* FNR-10 균주의 제형화 조건

[0048] *B. subtilis* FNR-10 균주를 42℃ 환경에서 24시간 최적화 배지에서 배양한 독립 균락을 5 ml 최적화 배지에 동일한 조건으로 배양한 배양액을 500 ml 최적화 배지로 옮겨 동일한 조건에서 배양하였다. 배양한 500 ml 배양액의 300 ml를 30 L 최적화 배지에 옮겨 50 L 배양기에서 최적 배양 조건과 항균 활성이 가장 높은 조건에서 배양하였다. 최종적으로 배양한 50 L 배양액의 30 L를 300 L 최적화 배지에 옮겨 500 L 배양기에서 최적 배양 조건과 항균 활성이 가장 높은 조건에서 배양한 $1.0 - 1.2 \times 10^7$ cfu/ml *B. subtilis* FNR-10 균주 배양액과 제품 효력 증진제로 식품 첨가물인 효모 추출물 Yeastex LSP [Yeast Extract, Leiber GmbH, 독일, 수입원 (주)비전 바이오캡]을 5% 첨가하여 조성 배합 비율로 혼합하여 제형화하였다(도 6).

[0050] 3. 고유 *B. subtilis* FNR-10 균주 배양액을 포함하는 시제품의 약효 포장시험

[0051] 유기농업자재인 귀족바실러스플러스의 딸기 흰가루병(*Phyllactinia kakicola*), 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*), 시들음병(*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*) 및 탄저병(*Colletotrichum gloeosporioides* *Glomerella cingulata*)에 대한 방제 효과를 검정하고 제품개발의 기초자료로 이용하고자 약효 시험 방법은 농촌진흥청 고시 “농약의 등록기준 약효 및 약해 시험기준과 방법”에 준하여 실시하였다. 시험작물(품종)은 딸기(장희)를 사용하였으며 대상 병해 발생 상황은 딸기 곰팡이병 무처리 평균 이병주율 20.0% 이상으로 약효를 검토하기에 충분하였다. 약제 처리는 귀족바실러스플러스를 500배(3L/m²)로 희석하여 사용하였으며 정식 후 10일 간격으로 3회 관주 처리하여 실시하였다. 경종 방법으로는 시설재배, 축성재배, 비닐멀칭을 20×25cm 간격으로 정식하였고, 실험기간 동안에 타 살균제는 살포하지 않았다. 시험구 배치와 면적은 처리수 2개체, 반복수 3로 총구수는 6개체로 구당면적은 10m²으로 소요면적은 60m²로 설정하였다. 약제 살포 전후 기상상황은 약효에 영향을 미칠만한 기상변화는 없었다. 시험의 약효시험 평가는 시험구내 구당 전체 200주 이상에 대한 이병주수를 조사하여 이병주율로 표기하였으며, 평균간 유의차 검정은 Duncan’s multiple range test(DMRT)로 95% 수준에서 유의성을 검정하였다.

- [0053] 4. *B. subtilis* FNR-10 균주 배양액을 포함하는 제품의 약해 평가
- [0054] 유기농업자재인 귀족바실러스플러스의 작물 약해 효과를 검정하고 제품개발의 기초자료로 이용하고자 약효 시험 방법은 농촌진흥청 고시 “농약의 등록기준 약효 및 약해 시험기준과 방법”에 준하여 실시하였다. 시험작물(품종)은 토마토(호용), 고추(독야청청), 배추(베타후레쉬), 오이(백봉다다기), 딸기(설향)를 사용하였다. 약제 처리는 귀족바실러스플러스를 기준량(1,000배 희석)과 배량(500배 희석)으로 사용하였으며 유묘기 경엽 처리하여 실시하였다. 경종 방법으로는 포트는 \varnothing 10cm 규격, 토성은 양토, 재배 평균온도는 27.8℃로 실시하였다. 시험구 배치와 면적은 작물에 따라서 처리수 3개체, 반복수 3로 총구수는 45개체로 구당 포트수는 5포트로 총 소요 포트수는 225포트를 사용하였다. 시험의 약해시험 평가는 경엽처리 후에 3, 5, 7일차에 외관상 약해 유무 달관 조사로 시행하였다.
- [0056] 5. 딸기 곰팡이병 병해관리용 유기농업자재 공시 제품 신청 및 등록
- [0057] (1) 시제품 생산
- [0058] 미생물 배양은 (재)진주바이오산업진흥원의 500 L 발효기를 이용하여 생산하였고 본사 생산부에서 친환경 유기농 자재 목록 공시 신청서에 제출한 제품 공정 규정에 따라 실시하였다.
- [0060] (2) 제품 허가 등록 출원
- [0061] 「친환경농업육성법 시행규칙」 제7조제2항 및 농촌진흥청 고시 「친환경유기농자재 목록공시 요령」 제3조제1항에 따라 친환경 유기농 자재 작물 병해 관리용 자재로 관련 서류와 함께 신청하였다.
- [0063] (3) 제품 공정 시스템 확립
- [0064] 미생물 제제 코마에이치(액제) 제품 공정, 미생물 제제 코마에이치(입제) 제품 공정, 미생물 제제 코마에이치(액제/입제) 제품 품질 관리공정 및 미생물 제제 코마에이치(액제/입제) 제품 적용 대상 및 사용 방법에 대한 시스템은 친환경 유기농 목록 공시 요령에 따른 친환경 유기농 목록 공시 신청서의 제조 공정 등 품질 관리에 관한 자료를 기준으로 확립하였다.
- [0066] **실험결과**
- [0067] 1. *B. subtilis* FNR-10 균주의 항진균 활성 측정
- [0068] *B. subtilis* FNR-10 균주의 산업용 배양 조건에서 성장한 배양 희석 여액을 농도별로 딸기 병원성 곰팡이 흰가루병(*Phyllactinia kakicola*), 잭빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*), 시들음병(*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*) 및 탄저병(*Colletotrichum gloeosporioides* Glomerella cingulata)에 대하여 미량 희석법에 의하여 항진균 활성에 대한 최소 억제 농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 조사하였다(도 1). 최소 억제 농도는 주어진 생장 조건에서 시험세균의 생장이 완전히 억제되는 최소농도를 의미한다.
- [0069] 대조군으로 사용한 광범위 딸기 살균제 화학 농약인 플루디옥소닐(상품명:사파이어)보다는 다소 낮은 항균 활성을 보였지만, 특히 탄저병에 대한 항진균 활성 효과는 탁월한 것으로 나타났다(도 1). 딸기 병원성 곰팡이 흰가루병(*Phyllactinia kakicola*), 잭빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*), 시들음병(*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*) 및 탄저병(*Colletotrichum gloeosporioides* 또는 *Glomerella cingulata*)에 대한 항진균 활성은 전반적으로 우수한 것으로 조사되었으며 병해관리용 유기농업자재 미생물제제로 상용화 가능성을 확인하였다.
- [0071] 2. 고유 *B. subtilis* FNR-10 균주의 병해관리용 유기농업자재 실용화를 위한 제제 기술 확립
- [0072] (1) *B. subtilis* FNR-10 균주의 밀도와 항진균 활성 물질 안정성 조건
- [0073] 본 연구에서 *B. subtilis* FNR-10 균주를 이용하여 마이크로캡슐화의 알갱이(Bead)를 형성하는 생균력을 안정적으로 유지할 수 있는 저렴한 비용으로 구입이 가능한 소재 중에서 잘 알려져 있는 Na-알지네이트와 K-카라기닌

그리고 젤란검을 사용하여 상기의 조건을 만족할 수 있는 캡슐화 소재 선발을 위한 조사를 실시하였다. 각각의 소재들은 1.0, 1.5, 2.0% 농도에서 조사되었으며 K-카라기닌과 Na-알지네이트 순서대로 알갱이 형성이 우수하게 나타났으며 젤란검의 경우에는 2.0% 이상의 농도를 첨가한 경우에 알갱이가 형성되었다. K-카라기닌과 Na-알지네이트 1.5%에서 형성된 알갱이에서의 생균수는 1.2×10^7 cfu/g과 1.1×10^7 이었으나 2.0% 농도의 젤란검의 경우에는 2.0×10^6 cfu/g로 6배 정도의 높은 생균수를 나타내었다. 또한 K-카라기닌과 Na-알지네이트의 알갱이 형성되는 농도와 생균수는 유사하지만 경제적인 측면에서 비교하였을 때는 K-카라기닌보다는 Na-알지네이트를 5배 이상 저렴한 것으로 조사되었다.

[0074] 마이크로캡슐 내 미생물 생존력을 유지하는 캡슐막의 효과를 나타낼 수 있는 안정제로는 흡착성분이 강한 CMC(Carboxymethyl Cellulose)와 저렴한 가격으로 구입이 용이한 전분(Satrch)을 안정제로 이용하여 생균력 증진 효과를 조사하였다. 흡착성분이 강한 1.0% CMC 보다는 가격이 저렴하고 구입이 용이한 1.0% 전분을 1.5% Na-알지네이트와 혼합하여 마이크로캡슐로 사용할 경우에 90일 경과 후에 따른 생균수 감소가 가장 적게 나타났으며 1.0% CMC를 안정제를 사용한 경우와 안정제를 사용하지 않은 마이크로캡슐보다는 10-100배 이상 높은 생균수를 나타내었다. 본 연구에서 상용화 기술로 개발된 식품 미생물제제에 비해 부가가치가 낮은 농업용 미생물제제의 생존율을 높일 수 있는 저렴한 마이크로캡슐화 소재와 공정기술이 제품의 유통 및 보관 기간 중 생균수의 저하를 방지하고 제품의 품질을 보장할 수 있으므로 농가의 경제적 부담을 줄이고 생산성이 증대하는 효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

[0076] (2) *B. subtilis* FNR-10 균주의 제형화 조건

[0077] *B. subtilis* FNR-10 균주를 42℃ 환경에서 24시간 최적화 배지에서 배양한 독립 균락을 5 ml 최적화 배지에 동일한 조건으로 배양한 배양액을 500 ml 최적화 배지로 옮겨 동일한 조건에서 배양하였다. 배양한 500 ml 배양액의 300 ml를 30 L 최적화 배지에 옮겨 50 L 배양기에서 최적 배양 조건과 항균 활성이 가장 높은 조건에서 배양하였다. 최종적으로 배양한 50 L 배양액의 30 L를 300 L 최적화 배지에 옮겨 500 L 배양기에서 최적 배양 조건과 항균 활성이 가장 높은 조건에서 배양한 $1.0 - 1.2 \times 10^7$ cfu/ml *B. subtilis* FNR-10 균주 배양액을 1.5% Na-알지네이트와 1.0% 전분 혼합용액으로 마이크로캡슐화 한 다음에 제품 효력 증진제로 식품 첨가물인 효모 추출물 Yeastex LSP[Yeast Extract, Leiber GmbH, 독일, 수입원 (주)비전바이오캡]을 5% 첨가하여 조성 배합 비율로 혼합하여 제형화하였다.

[0079] 3. 고유 *B. subtilis* FNR-10 균주 배양액을 포함하는 제품(귀족바실러스플러스) 제작

[0080] 주성분 및 함량: *Bacillus subtilis* (1.0×10^5 CFU/ml) 95.0%

[0081] 실증량 : 300 ml

[0082] 사용 방법 : 1,000배 희석하여 살포한다.

[0083] 보관·사용 시 주의 사항 :

[0084] · 농약 혼용 시 일부 지역에 사용한 후 약해 유무를 확인하고 사용한다.

[0085] · 적용대상 작물 조직이 충분히 젖을 수 있도록 흠뻑 살포한다.

[0086] · 이른 아침이나 오후 늦게 살포하여야 효과적이며 햇빛이 너무 강한 시기는 피한다.

[0087] · 사용한 후 남은 것은 냉암소에 보관한다.

[0088] 약해시험 적용 작물 : 토마토, 고추, 배추, 오이, 딸기

[0090] 4. 고유 *B. subtilis* FNR-10 균주 배양액을 포함하는 제품의 약효 시험

[0091] 본 시험은 유기농업자재 공시를 위하여 농촌진흥청 고시 '유기농업자재 공시 및 품질인증 기준'에 의거하여 시험을 실시하였다. 공시자재(상표명: 귀족바실러스플러스)를 딸기 시들음병에 대하여 약효 시험은 시험작물(딸기)의 정식 후에 10일 간격으로 기준량으로 희석하여 3회 관주 처리한 후에 10일 후에 이병주를 관찰하였다.

시험 약제 귀족바실러스플러스를 처리하지 않은 무처리군은 이병주율이 22.0%로 나타났으며 시험 약제 귀족바실러스플러스를 처리한 군에서의 이병주율은 8.1%로 나타났다. 시험 약제 귀족바실러스플러스를 처리한 군에서의 딸기 시들음병에 대한 방제가는 63.2% 방제 효과를 나타내었다.

[0092] 미생물제제의 경우에는 병충해관리용으로 공시 제품을 등록할 경우에는 방제가가 50% 이상이므로 본 시험결과 공시자재(상표명: 귀족바실러스 플러스)는 유기농업자재 공시용으로 적합할 것으로 판단되며 개발기술의 목표 방제가 70% 이상을 위해서는 살균 활성물질 생산성을 높이는 기술개발 연구가 더 이루어져야 한다고 사료된다.

표 1

약효 시험

[0094]

시험약제	이 병 주 율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평 균		
귀족바실러스플러스	4.9	12.2	7.3	8.1	b	63.2
무 처 리	19.5	24.4	22.0	22.0	a	-
C.V.(%)	-----				(6.7)	

[0097] 5. 고유 *B. subtilis* FNR-10 균주 배양액을 포함하는 제품의 약해 시험

[0098] 본 시험은 유기농업자재 공시를 위하여 농촌진흥청 고시 ‘유기농업자재 공시 및 품질인증 기준’에 의거하여 시험을 실시하였다. 공시자재(상표명: 귀족바실러스플러스) 약해 시험은 시험작물 토마토, 고추, 배추, 오이 딸기의 유묘기에 기준량과 배량으로 희석하여 경엽 처리한 후에 각 작물의 신초 및 경엽에 대하여 3, 5, 7일차 외관상 약해 유무를 달관 조사하였다. 시험 약제 귀족바실러스플러스를 처리하지 않은 무처리군, 기준량 및 배량을 처리한 각 시험작물들에서 약해가 없는 것으로 판정되어 본 시험결과 공시자재(상표명: 귀족바실러스 플러스)는 유기농업자재 공시용으로 적합할 것으로 판단되었다(도 3a-f).

표 2

약해 시험

[0099]

시험작물 (품종)	처리내용	약해정도(0~4)			최종결과
		처리 후 3일차	처리 후 5일차	처리 후 7일차	
토마토 (호용)	기준량	0	0	0	약해없음
	배량	0	0	0	약해없음
고추 (독야청청)	기준량	0	0	0	약해없음
	배량	0	0	0	약해없음
배추 (베타후레쉬)	기준량	0	0	0	약해없음
	배량	0	0	0	약해없음
오이 (백봉다다기)	기준량	0	0	0	약해없음
	배량	0	0	0	약해없음
딸기 (설향)	기준량	0	0	0	약해없음
	배량	0	0	0	약해없음

[0102] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

수탁번호

[0104]

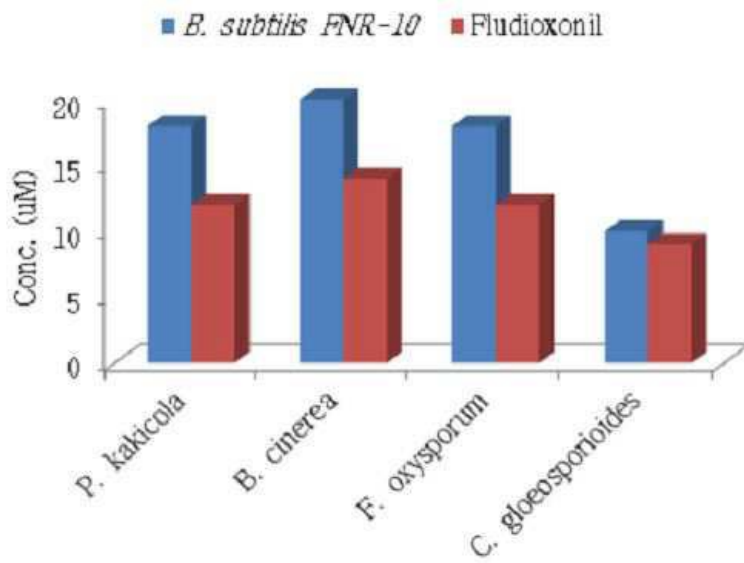
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터

수탁번호 : KCTC12583BP

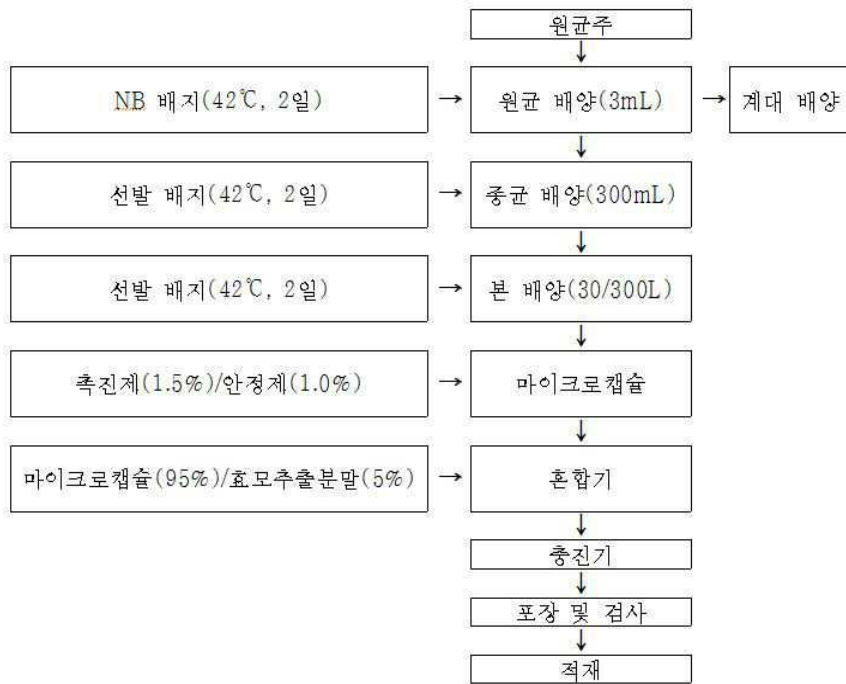
수탁일자 : 20140429

도면

도면1



도면2



도면3a

○ 시험 전 작물 유묘



○ 정식 후 작물



도면3b

○ 토마토



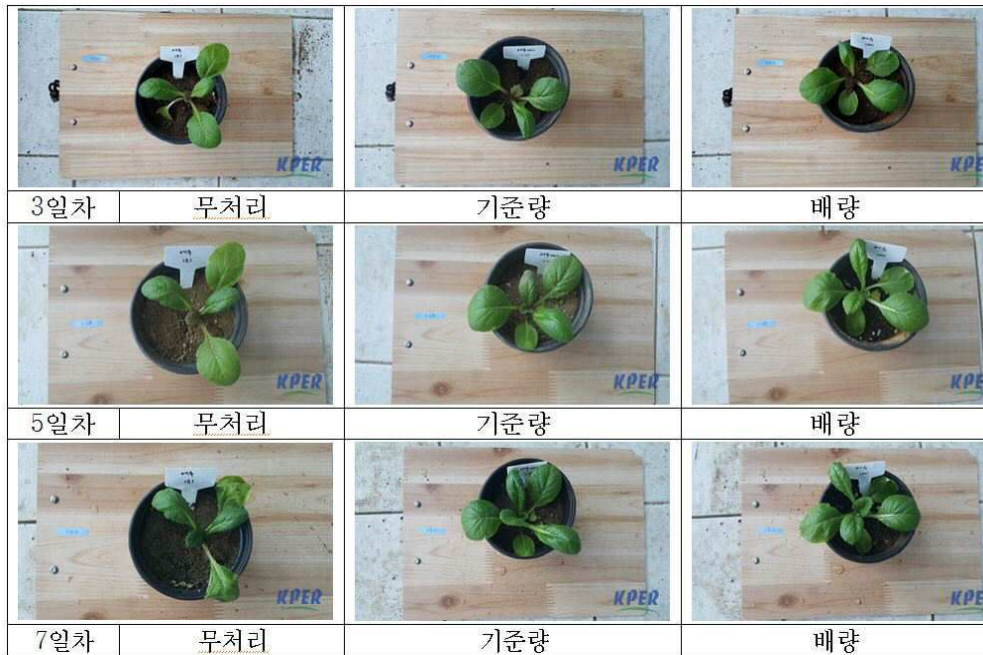
도면3c

○ 고추



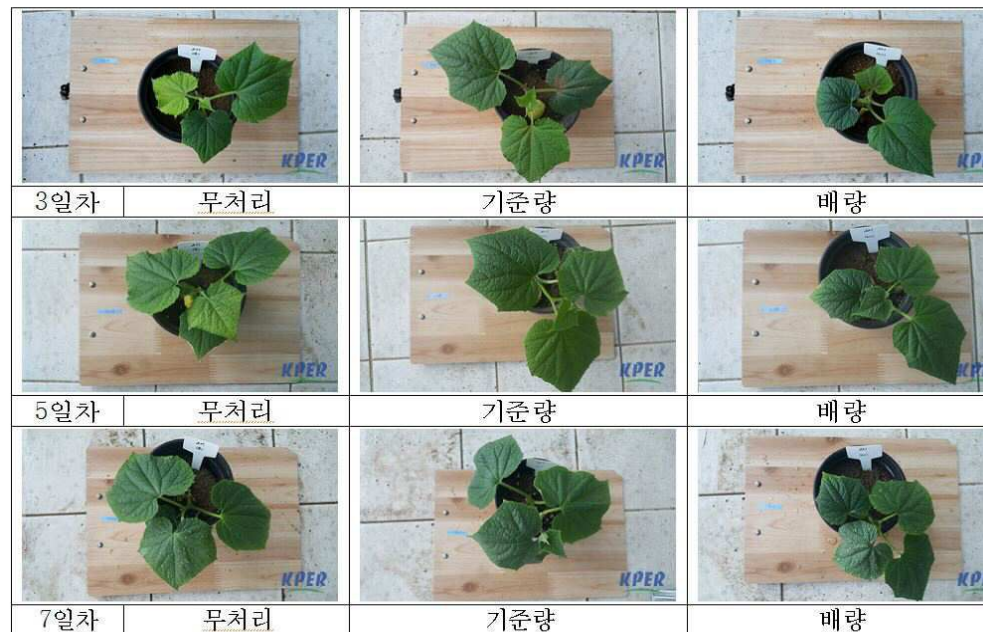
도면3d

○ 배추



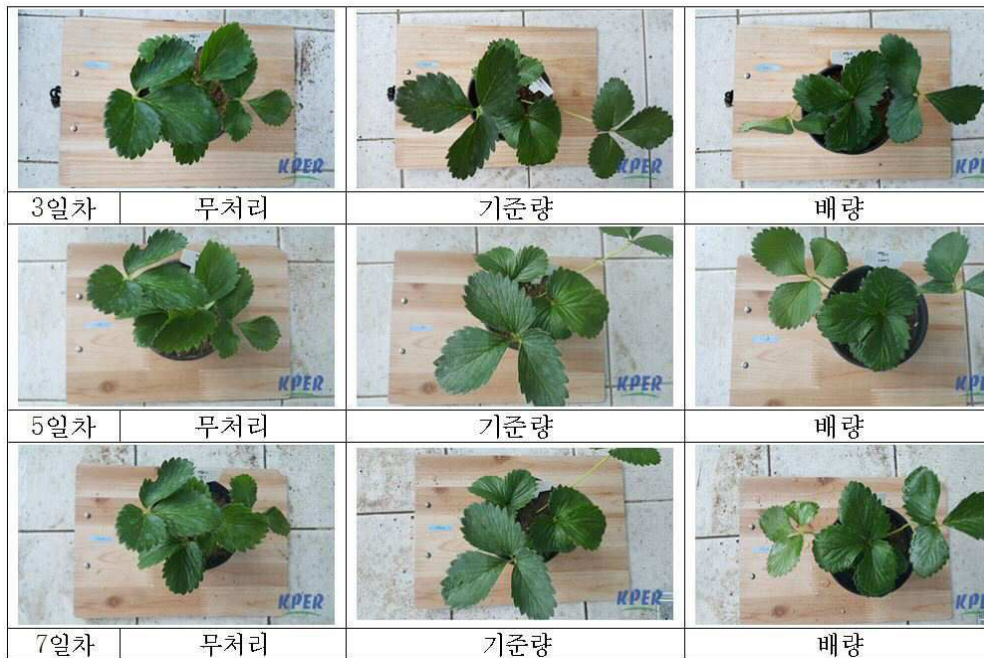
도면3e

○ 오이



도면3f

○ 딸기



서열 목록

<110> Farmnuri

<120> Composition for Controlling Strawberry Pathogen Comprising Bacillus subtilis FNR-10 As an Active Ingredient

<130> PN160161

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1393

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis FNR-10 16S rRNA

<400> 1

```

gtcgagcgga cagatgggag cttgctccct gatgttagcg gcggacgggt gagtaacacg      60
tgggtaacct gcctgtaaga ctgggataac tccgggaaac cggggctaata accggatggt      120
tgtctgaacc gcatggttca gacataaaag gtggcttcgg ctaccactta cagatggacc      180

cgcggcgcac tagctagtgt gtgaggtaac ggctcaccaa ggcgacgatg cgtagccgac      240
ctgagaggggt gatcgccac actgggactg agacacggcc cagactccta cgggaggcag      300
cagtagggaa tcttccgcaa tggacgaaag tctgacggag caacgccgcg tgagtgatga      360
aggttttcgg atcgtaaagc tctgtgttta gggaagaaca agtgccgttc aatagggcg      420
gcaccttgac ggtacctaac cagaaagcca cgctaacta cgtgccagca gccgcggtaa      480
    
```

tacgtagggt gcaagcgttg tccggaatta ttgggcgtaa agggctcgca ggcggtttct 540
 taagtctgat gtgaaagccc ccggtcaac cggggagggt cattggaac tggggaactt 600

gagtgcagaa gaggagagtg gaattccacg ttagcgggtg aaatgcgtag agatgtggag 660
 gaacaccagt ggcaaggcg actctctggt ctgtaactga cgctgaggag cgaagcgtg 720
 gggagcgaac aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacgatgag tgctaagtgt 780
 tagggggttt ccgcccctta gtgctgcagc taacgcatta agcactccgc ctggggagta 840
 cggtcgcaag actgaaactc aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt 900
 ggtttaattc gaagcaacgc gaagaacctt accaggtctt gacatcctct gacaatccta 960
 gagataggac gtccccctcg ggggcagagt gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg 1020

tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgaac cgagcgaac ccttgatctt agttgccagc 1080
 attcagttgg gcaactcaag gtgactgccg gtgacaaacc ggaggaaggt ggggatgacg 1140
 tcaaatcacc atgcccctta tgacctgggc tacacacgtg ctacaatgga cagaacaaag 1200
 ggcaagcgaac ccgagaggtt aagccaatcc cacaaatctg ttctcagttc ggatcgcagt 1260
 ctgcaactcg actcgtgaa gctggaatcg ctgtaatcg cggatcagca tgccgcggtg 1320
 aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca cgagagtttg taacaccgca 1380
 agtcggtgag gta 1393

- <210> 6
- <211> 1035
- <212> DNA
- <213> Bacillus subtilis FNR-10 gyrB gene
- <400> 6

tggaattgac cattcatcgt gccgtaaaa ttcacgaaca agaataccgt catggcgatt 60
 cacagtatcc attaaaagtg gtggcgata ccgatagaac cggactcgt gtccgtttct 120
 ggccaagtgc cgagactttt agtcagacca ttttaatgt tgatattttg gcgcgtcgtt 180
 tgcgtgaact gtcgttcta aacgcagggt tacgtattgt gctgcgtgac gaacgcatta 240
 atgccgagca tgcctttgat tatgaaggcg gctctgtctga gttcgttaaa tatattaacg 300
 aaggcaaac tcacctgaat gatattttcc attttactgc tgcgcaggct gataacggta 360

ttacggtaga agtcgattg cagtggaatg attcttatca ggaaaatgtg cgttgcttta 420
 ccaataacat cccgcaaag gatgggggta cgcatttggc cggtttccgc gctgcgttga 480
 cccgtggttt aaataactac atggacagcg aaaatatcct gaaaaaggaa aaagttgcgg 540
 tatcgggtga tgatgcacgt gaaggtctga ctccatcgt gtcagtcaa gtacctgatc 600

caaaattctc ttcacagacc aaagaaaaac tgggtgctgag tgaagtgaaa accgctgttg	660
agcaagccat gaacaaggca ttttctgaat atttattgga aaatccacaa gcagccaagg	720
cgattgccgg caagattatt gatgcagcac gtgcgcgtga tgcagcgcgt aaagcccgtg	780
aaatgacacg tcgtaagagt gcgctagata ttgccgtct tccaggtaaa ctggccgatt	840
gtcaggaaaa agatccagct ttgtctgaac tgtacctggt cgagggtgat tctgcaggtg	900
gttcagccaa gcaaggtcgt aaccgtaaaa tgcagcgcgt tttaccgctg aaagtaaga	960
tcctgaacgt ggaacgtgcc cgttttgacc gcatgatttc ctctgctgaa gtcggtacgc	1020
tgattactgc cctcg	1035