

주류생산 부산물인 주박의 특성 규명 및 주박이 작물생육에 미치는 영향

이정훈 · 박성민 · 박치덕 · 정혁준 · 김현수 · 유대식*

계명대학교 미생물학과

Received October 2, 2007 / Accepted October 29, 2007

Characteristics of Ju-Back and Effect of Ju-Back Fertilizer on Growth of Crop Plants. Jung-Hoon Lee, Sung-Min Park, Chi-Duck Park, Hyuck-Jun Jung, Hyun-Soo Kim and Tae-Shick Yu*. Department of Microbiology, Keimyung University, Daegu, 701-704, Korea - This experiment was conducted to develop fertilizer which promotes plant growth as well as suppressing pathogenic fungi. The fertilizer was made from the mixture of Ju-Back (Korean rice wine cake) and indigenous rhizosphere-bacterium. The main ingredients of Ju-Back were investigated as 6.04% total nitrogen, 42.59% total carbohydrate, 1.01% available phosphate, 73.42% organic matter, 7.72% potassium oxide, 1.35% calcium oxide, 0.53% magnesium oxide. The enzyme activities of Ju-Back were estimated to be 980 units/g for α -amylase, 300 units/g for glucoamylase, and 1800 units/g for acid protease. Indigenous rhizosphere bacteria which produced antifungal agent were isolated from soil, and was selected KMU-13 strain which can antagonize against various plant pathogenic fungi (*Botrytis cinerea* KACC 40573, *Sclerotinia sclerotiorum* KACC 41065, *Fusarium oxysporum* KACC 40052, *Pythium aphanidermatum* KACC 40156, *Phytophthora capsici* KACC 40476 and *Glomerella cingulata* KACC 40299). KMU-13 strain was identified as *Bacillus subtilis* KMU-13 by biochemical and 16s rDNA analysis. The organic fertilizer was made as prototype which was composed 20% Ju-Back, 70% carrier, 9.7% microorganism cultivated solution, 0.3% trace-element. We also investigated an application of fertilizer using Ju-Back for cultivating lettuce (*Lactuca sativa*) which were grown in three soil conditions that had chemical fertilizer, barnyard manure, lime power, urea, potassium chloride and superphosphate as a control, the whole quantity (80 kg/10a) of posted fertilizer with the control and the half quantity (40 kg/10a) with the control. The growth characteristics were examined and analysed with several weeks interval from 3 weeks to 8 weeks on head length (cm), head width (cm/head), number of leaf and fresh weight (g/plant). The results are summarized as follows. The head width and fresh weight of lettuce were the highest at posted fertilizer 1 (whole quantity) was applied chemical, organic matter (Ju-Back) and carrier. The head length was the highest at posted fertilizer 2 (whole quantity) was applied Ju-Back only.

Key words : Ju-Back, fertilizer, plant pathogenic fungi

서 론

청주, 약주 등의 양조부산물인 주박은 알코올, 효소, 유기산 등을 포함하고 있으며[6,28,29], 일본에서는 식용, 합성청주와 소주의 향미액 원료, 사료첨가제 등으로 이용되고 있다. 우리나라에서는 일부 사료첨가제로만 이용되며, 현재 폐기물로 등록되어 전량 폐기물 등록업체를 통해 처리되고 있다.

주류양조부산물의 퇴비화는 유기성 폐기물처리의 안정화 개념과 농산물 생산에 필요한 토양 개량제를 확보한다는 2가지 측면이 있다. 따라서 환경 분야는 가급적 유기성 폐기물을 퇴비화로 전환시키는데 관심이 크다. 그러나 농업분야는 퇴비로서 가치가 있고 유해물질이 함유되지 않는 깨끗한 원료만을 선택적으로 이용하여 양질의 퇴비를 생산하려는 노력을 기울이고 있다.

주박은 C/N율이 낮고 질소, 인산, 칼리 등 비료성분함량이 높아서 오래 전부터 유기질비료의 원료로 활용가능성이 대두되고 있으며, 주류생산에 이용된 주박미생물은 알코올 및 효소의 안정적 생산, 균체 자체로서 풍부한 영양분을 함유하고 있다. 그러나 퇴비화에 적절한 가공방법의 개발과 산업화에 대한 연구가 미흡한 실정이다. 현재 우리농업은 화학비료의 편중시용으로 인한 부작용을 인지하고 유기물비료와 토양개량제 등의 사용이 늘고 있는 추세이지만, 과용으로 인하여 양분흡수력이 낮은 작물은 농도장애를 보이고, 토양의 부영양화를 초래하여 비료 효과조절이 되지 않아 오히려 생산성이 감소하는 부작용이 발생[11]하고 있다. 또한 토양 내에서 물질순환을 통해 질소, 인 등 주요한 영양분을 작물에 공급하고 균권에 공생하면서 작물의 내병성증진에 기여 하고 있는 토양미생물상이 파괴되고 있다[5,24]. 작물의 생육과 생산성 측면에서 유기질비료의 성분과 사용량을 정확히 검증하고 토양미생물관리[25]에 대한 체계적인 연구가 필요하다.

본 연구에서는 (주)경주볍주에서 생산되는 주박의 특성 및

*Corresponding author

Tel : +82-53-580-5252, Fax : +82-53-580-5164

E-mail : tsyu@kmu.ac.kr

본인들이 제조한 주박을 이용한 비료 시제품에 대한 정확한 작물의 생육과 수량에 미치는 영향 등을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

주박성분 분석

이화학성분 분석에서 총 질소는 습식분해하여 중류법으로 측정하였다. 유효인산은 Lancaster법[13], 유기물은 Tyurin법 [13]으로 각각 분석하였다. 중금속은 0.1 M-HCl로 추출하여 유도 결합플라즈마분석기(Perkin Elmer, Optima 3200RL)를 이용하여 분석하였다.

Glucoamylase 활성 측정

주박 5 g에 0.5% NaCl 용액 25 ml을 가하고 4°C에서 하룻밤 침전한 다음 실온(15~20°C)에서 3시간동안 천천히 교반시켜 여과한 후, 그 여과액을 4°C, 8,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 그 상등액 10 ml를 0.01 M sodium acetate buffer (pH 5.0)에서 15시간 투석한 후, 그 효소액을 20 ml로 fill up하여 조효소액으로 사용하였다[2].

효소의 활성은 일본국세청 주류 분석규정(1993년 개정)에 따라 분광광도계를 사용하여 505 nm에서 흡광도를 측정하였다. 2% soluble starch 용액 1 ml와 0.2 M acetate buffer (pH 5.0) 0.2 ml를 혼합하여 40°C에서 5분간 예열시킨 다음, 이 혼합액에 효소액 0.1 ml를 첨가하여 40°C에서 20분간 반응시켜 1 N NaOH 0.1 ml를 가하고 30분간 방치하여 효소반응을 정지시키고 1N HCl 0.1 ml를 첨가하여 중화시켰다. 대조구의 경우 기질용액에 먼저 1 N NaOH를 첨가한 다음 효소액을 넣고 다음의 반응을 따랐다.

효소분석 색소용액과 glucose oxidase와 peroxidase 효소용액을 1:1 혼합한 포도당 정량시약 3 ml에 위의 반응액 0.1 ml를 첨가하여 이를 40°C에서 40분간 반응시켰으며, 같은 방법으로 중류수와 표준포도당 용액에 대하여 반응시킨 다음, 505 nm에서 흡광도를 측정하고 역가를 계산하였다. 효소 활성도 1 unit는 40°C에서 1시간 가용성 전분에 작용하여 1 mg의 포도당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

$$\text{생성포도당 (mg/ml)} = E_1 - E_2 / E_s - E_2 \times 0.5$$

E_1 : 검체를 사용한 경우의 O.D.

E_2 : 검체 대신 중류수를 사용한 경우의 O.D.

E_s : 검체 대신 표준포도당 용액을 사용한 경우의 O.D.

α -Amylase 활성 측정

주박을 각각 2 g씩 취하여 10 ml의 40 mM acetate buffer (pH 5.0)로 혼탁한 후, 25°C에서 1시간 진탕배양하고 8,000 rpm에서 10분간 원심분리한 상등액을 조효소액을 사용하였다. 기질용액(1% soluble starch in 40 mM acetate buffer pH 5.0) 2 ml를 40°C에서 5분간 예열하고 적당한 양으로 회석한

조효소액 0.1 ml를 취하여 이 반응액으로 부터 효소활성을 측정하였다. 즉, 반응액 0.1 ml에 0.00025 N 요오드 용액 10 ml를 첨가한 다음, 이 반응액을 670 nm에서 투과도로 측정하였다. 효소의 활성도(unit)는 Wohlgemuth value에 준한 아래의 식으로 산출하였다.

$$U (\text{units/g koji}) = [12.75 \times (T_{30\text{min}} - T_{0\text{min}}) / 30\text{min}] \times 5$$

Acid protease 활성 측정

주박 5 g에 중류수 100 ml를 넣어 잘 파쇄한 후, 실온에서 서서히 교반하면서 1시간 방치하고, 8,000 rpm에서 10분간 원심분리한 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

산성 pH에서 작용하는 acid protease 활성측정을 위해 hammarsten milk casein을 0.6%가 되게 McIlvaine buffer (pH 2.7)에 용해한 기질용액 5 ml에 조효소액 1ml를 가하고 37°C에서 10분간 반응시킨 다음, 0.44 M TCA 5 ml를 첨가하여 반응을 중지시키고 37°C에서 20분 간 방치한 후, 여과하였다. 여액 1 ml에 0.55 M Na₂CO₃ 용액 5 ml와 phenol reagent (3배희석액) 1 ml를 혼합한 후, 37°C에서 20분간 발색하고 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 효소액 1 ml에 0.44 M TCA 5 ml를 가한 후, 기질 5 ml를 첨가한 것에 대하여 같은 방법으로 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 대조구와의 흡광도의 차로 나타내었다.

유용토양미생물의 분리 및 동정

균주의 분리 및 선발은 경상남북도, 충청남도, 전라남도 지역의 균권 토양을 분리원으로 우점, 토착, 복귀등이 강한 항진균 물질을 생산하는 토착미생물과 계명대학교 미생물 생리학 연구실에 보관중인 균 종 토양으로부터 분리한 세균을 사용하였다. 시료로부터 항진균 물질을 생산하는 균을 분리하기 위하여 80°C water bath에서 30분간 열처리하고 nutrient agar 배지(NA)에 접종하여 생존하는 균주를 분리하였다.

순수 분리한 균주들을 대상으로 잿빛곰팡이병을 야기시키는 *Botrytis cinerea* KACC 40573, 오이균핵병을 야기시키는 *Sclerotinia sclerotiorum* KACC 41065, 마른썩음병을 야기시키는 *Fusarium oxysporum* KACC 40052, 잔디마름병을 야기시키는 *Pythium aphanidermatum* KACC 40156, 고추역병을 야기시키는 *Phytophthora capsici* KACC 40476, 사과나무탄저병을 야기시키는 *Glomerella cingulata* KACC 40299, 잎집무늬마름병을 야기시키는 *Rhizoctonia solani* AG-1(IA) KACC 40101, 고추탄저병을 야기시키는 *Colletotrichum gloeosporioides* KACC 40804와 오이/토마토 뿌리역병을 야기시키는 *Phytophthora capsici* KACC 40177에 대하여[1,3,4,7,8,27] 길항균주의 분리, 선발하기 위하여 분리균주의 배양액을 원심분리하여 상등액 20 μl를 여지 디스크에 흡수시키고 PDA평판 배지에 식물병원성 진균을 접종한 다음, 25°C에서 7일간 배양시켜 disc diffusion법으로 항진균 활성을 측정하고 항진

균 활성이 가장 높은 균주를 선별하였다. 시험병원성 진균은 농촌진흥청 농업생명공학연구원 한국농업미생물보존센터 (Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에서 분양 받아 사용하였다.

분리한 길항세균의 동정은 chromosomal DNA를 추출하여 16s rDNA 부분염기서열을 NCBI Genebank에 등록된 균주와 비교, 분석하여 동정하였다.

항 진균 활성 측정 및 최적배양 조건

식물병원균은 PDA(potato dextrose agar; potato infusion form 20%, glucose 2%, agar 1.5%) 배지에서 30°C, 4~7일간 배양하여 0.8% Tween-80 용액으로 포자 및 균사체를 현탁한 후, cotton filter로 여과하여 포자현탁액을 제조하였고. 항진균 활성 측정을 위해 포자현탁액을 PDA배지에 접종하여 사용하였다.

분리균주의 항진균 활성을 위한 최적배지를 조사하기 위하여 Davis minimal medium (K_2HPO_4 0.7%, KH_2PO_4 0.2%, Glucose 0.5%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%)에 glucose를 80% 제거시키고, 8종의 탄소원 arabinose, fructose, lactose, xylose, maltose, saccharose, glycerol, galactose 을 0.5%씩 첨가하여 30°C에서 2일간 균주를 배양한 후, 원심-분리한 상등액을 다시 제균한 배양액을 disc diffusion법으로 항진균 활성을 측정하였다. 질소원은 Davis minimal medium에 질소원인 ammonium sulfate를 제거시키고 상기 결과에서 선택된 탄소원을 최적농도로 넣어 yeast extract, bacto peptone, soybean meal, malt extract 등을 0.5%씩 첨가하여 항진균 활성과 균주의 생육을 검토하였으며 무기염은 상기최소배지에 $FeCl_3$, $BaCl_2$, Na_2HPO_4 , $NaCl$, $CaCO_3$, $ZnSO_4$, $MgSO_4$, K_2HPO_4 를 1 mM 농도로 첨가하고 pH 7.0으로 조정 후, 항진균 활성을 조사하였다.

주박 가공방법

알코올 발효시킨 약주를 압착시켜 생산된 판상의 주박은 실온에서 급격한 당화작용을 나타내어 접성이 증가하므로, 4°C cold chamber에 보관하였다. 먼저 냉장 보관된 주박을 14인치 철 유압식 스테인레스 스틸 분쇄기(크기: 1300×900×2000, main motor : 3P × 15HP, 생산능력 : 100 Kg/h)에서 가공이 용이하도록 분쇄하였고, 이어 동결건조와 열풍건조 두 가지 방법으로 가공하였다. 동결건조는 분쇄된 주박을 동결건조기(온도범위: -45°C, 제습용량: 2L/batch, trap크기: 210 × 250 hmmm, 냉매: 특수혼합냉매)에서 세포 및 유기성 물질을 급속 동결하여 수분의 이동을 억제하여 진공 하에서 대부분의 수분을 승화시킨 후 얼지 않은 수분을 제거시켰으며, 동결건조된 주박은 공기 중 수분을 차단하기 위해 저밀도 폴리에틸렌(LDPE)재질의 bag에 담아 실온에서 보관하였다. 열풍건조는 열량에 의한 단순건조를 실시하였는데, 분쇄된 주박

을 열풍건조기(크기: 1260×760×1750, 채반크기: 450×620×40, 채반갯수: 20개)에 두께 3~5 cm로 펼친 후, 30°C~60°C 범위 내에서 10°C 간격으로 건조하였다.

시제품 제작

분리균주의 고정화 담체로는 시판중인 제오라이트, 셀라이트, 펠라이트을 사용했으며, 담체에 대해 미생물 흡착능과 수분 흡수, 제품제작 시 성상 등을 검토, 적용하였다.

제품의 품질, 성상, 단가 등을 검토하여 분리한 토양유용 미생물과 담체, 주박, 기타성분간 혼합비율을 결정하고, 시제품은 가공주박에 적합한 담체를 검토하고, 담체, 가공주박과 분리된 토착미생물의 배양액을 혼합하여 제조한 시제품 1과 가공주박만으로 구성된 시제품 2를 제조하였다.

시제품 2는 동결 건조시킨 주박을 사용했으며, 시제품 1의 제조방법은 미생물배양액 97 ml를 질석 200 g에 고정시킨 후, 중량제인 셀라이트와 제오라이트를 500 g에 혼합, 전조하고 동결건조주박 200 g과 미량원소로서 시약용 H_3BO_3 0.5 g, $ZnCl_2$ 0.5 g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.5 g, $MnCl_2 \cdot 7H_2O$ 0.5 g과 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.5 g이 각각 포함된 미량요소혼합물 3.0 g을 첨가하여 리본형 혼합기(크기 : 1700×600×1200, main motor : 3 P×5 HP, 용량 : 100l)로 혼합/교반하여 제조했다.

시제품의 노지포장시험을 위한 공시토양 및 품종

경북대학교 농산물 품질·안정성 평가연구소에 의뢰하여 대구광역시 북구 동호동 경북농업기술원내 시험포장을 이용하여 포장시험[9,14,15,18,20]을 실시했으며, 공시토양은 pH 가 6.5, 총 질소 1.17%, 유기물 1.75%인 미사질 식토였다. 공시 품종은 적치마 상추(*Lactuca sativa*)[10,21-23,26]를 사용하였으며, 2005년 5월 6일 파종하여 2005년 6월 30일 수확하였다.

시제품 사용

시제품의 사용 방법은 공시비료로서는 가공주박에 담체와 미생물을 혼합하여 배양한 공시비료 1과 가공주박인 공시비료 2를 이용하였다.

처리내용은 관행구, 관행구 + 공시비료1의 전량, 관행구 + 공시비료1의 반량, 관행구 + 공시비료2의 전량, 관행구 + 공시비료2의 반량 처리구로 구분하여 3반복 난괴법으로 수행하였다. 관행구는 질소, 인산, 가리 각각 10 kg/10a, 5.9 kg/10a, 6.4 kg/10a, 퇴비 1500 kg/10a, 석회 200 kg/10a이 처리되어 있다. 공시비료1의 처리량은 전량기준 80 kg/10a, 반량구는 40 kg/10a으로 하였고, 공시비료2의 처리량은 전량기준 5 kg/10a, 반량구는 2.5 kg/10a으로 처리하였다.

시제품 2는 상추 파종 3주일 후, 기비량 수준으로 추비하였다. 표준시비구의 화학비료, 퇴비 및 석회의 사용량은 작물별 시비처방기준[12,19]에 준하여 시비하였으며, 질소는 요소, 인산은 용과린, 칼리는 염화칼리를 사용하였다.

토양의 이화학적 특성 분석

토양의 이화학적 분석은 농촌진흥청 토양화학분석법[13]에 준하여 pH는 초자전극법, EC는 전기전도도 측정기(Mettler, MC226)를 사용하여 측정하였으며, 총 질소는 습식 분해하여 중류법으로 측정하였다. 치환성 양이온은 1 N-CH₃COONH₄로 침출하여 ICP로 분석하였으며, 유효인산은 Lancaster법[13], 유기물은 Tyurin법[13]으로 각각 분석하였다. 토양의 이화학적 변화는 시비 전 토양과 수확한 후 토양의 특성의 변화를 비교·조사하였다.

생육현황 분석

상추의 생육현황 조사는 파종하여 3주, 5주 및 8주 간격으로 수행하였으며, 생체중, 엽수, 엽장 및 엽폭 등을 조사하였다.

결과 및 고찰

주박의 효소학적 특성

약주의 알코올 발효 후 배출된 주박자체의 효소활성을 분석한 결과, α -amylase, glucoamylase와 acid protease 활성은 980 units/g, 300 units/g와 1,800 units/g로 나타났는데(결과 미기재), Han 등[2]의 연구결과와 비교해서, glucoamylase는 15-20%정도 낮은 활성을 보였으나 α -amylase와 acid protease 활성은 유사하였다. 알코올 발효에 사용되는 당화제의 초기 효소활성에는 미치지 못하지만 비교적 안정된 효소역가를 나타내었다. 토양의 비옥도는 일반적으로 건강한 토양 근원 미생물상과, 영양분의 저장 및 분해 그리고 원활한

통기성을 확보하기 위한 토양의 입단화 등 여러 요인들이 있는데, 주박자체의 유기물과 효소활성은 기비처리 초기에 효소의 유기물분해에 의한 안정된 영양분 공급과 토양미생물의 활성증가로 인해 생육초기 작물의 안정된 성장을 도우리라 사료된다.

토양유용미생물 분리 및 항 진균 활성 측정

유기농법을 수행하는 각 지역의 저 병해 경작지 토양에서 분리된 토착미생물 150균주와 본 연구실에서 보관하고 있던 35종의 세균을 이용하여 항 진균 활성을 측정한 결과, 다양한 식물병원균에 우수한 항 진균 활성을 가진 9균주를 최종 선발하였다. 분리한 KMU-88균주와 KMU-134균주는 마른썩음병과 탄저병에 양호한 결과를 나타냈으며, KMU-33균주는 잣빛곰팡이병, 잎집무늬마름병과 고추탄저병에 높은 항진균 활성을 나타냈다. KMU-13균주의 세균은 잣빛곰팡이병, 오이균핵병, 마른썩음병, 잔디마름병과 사과나무탄저병 등 다양한 식물병원균에 대해 양호한 항 진균 활성을 나타내어 시험균으로 최종 선발하였다(Table 1, Fig. 1). KMU-13균주의 항 진균 활성은 다양한 작물 병원성 곰팡이에 대하여 높은 항 진균 활성을 나타내었다고 보고된 *B. licheniformis* KMU-3[17]과 유사한 정도의 활성을 나타내었다.

분리 동정된 KMU-13균주의 최적 대량생산배지 조건 및 배지성분에 따른 항 진균 활성 조사한 결과, 탄소원인 glycerol, galactose를 제외하고 다양한 종류의 탄소원을 잘 이용하였으며, 질소원은 유기질소원인 soybean meal이 가장 우수하였다. 항 진균 물질의 생산성과 경제성을 고려하여, 최적

Table 1. Antifungal spectrum of the selected strains against various plant pathogenic fungi

Pathogenic fungi	Plant disease	Inhibitory zone(mm) by selected strains								
		KMU-13	KMU-19	KMU-33	KMU-62	KMU-77	KMU-85	KMU-88	KMU-102	KMU-134
<i>Botrytis cinerea</i> KACC 40573	Gray mold	10	9	10	8	5	8	9	5	6
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> KACC 41065	Sclerotinia rot	9	7	0	0	0	6	9	5	0
<i>Fusarium oxysporum</i> KACC 40052	Dry rot	12	8	10	7	10	0	12	9	11
<i>Pythium aphanidermatum</i> KACC 40156	Pythium blight	11	10	9	10	8	8	9	10	9
<i>Phytophthora capsici</i> KACC 40476	Phytophthora blight	7	2	2	8	3	0	2	2	8
<i>Glomerella cingulata</i> KACC 40299	Bitter rot	16	13	10	9	11	7	9	10	5
<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1(IA) KACC 40101	Sheath blight	10	9	12	5	7	0	0	5	12
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> KACC 40804	Athracnose	11	12	10	8	9	7	10	6	11
<i>Phytophthora capsici</i> KACC 40177	Phytophthora root rot	9	0	0	10	11	0	9	5	7

배지조성을 조사한 결과, glucose 0.5%, soybean meal 1%, yeast extract 0.2%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, (NH₄)₂SO₄ 0.09%, KH₂PO₄ 0.03%, CaCO₃ 0.03%, CaCl₂ 0.0025% pH 6.8이였다 (결과 미기재). 이러한 최적배지조성은 glucose와 yeast extract를 첨가하였을 때 양호한 항 진균 활성을 나타내었다고 보고한 박[16] 등의 결과와 유사하였다.

KMU-13 세균의 동정

KMU-13균주는 Gram 양성의 rod form으로 호기성 세균

으로 catalase, gelatin liquefaction, nitrate reduction은 양성을 나타내었으나, indole test, oxidase 생성, voges-proskauer test, citrate utilization은 음성을 나타내었다. 이러한 결과를 바탕으로 하여 *Bacillus* sp.으로 동정되었으며 보다 명확한 동정을 위하여 chromosomal DNA를 Wizard genomic DNA purification kit (Promega, USA)를 이용해 분리하여 16s rDNA sequencing에 사용하는 universal primer인 27F (5'-AGAGTTGATGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGATAC CTTGTTACGACTT-3') primer를 사용하여 PCR로 증폭하였

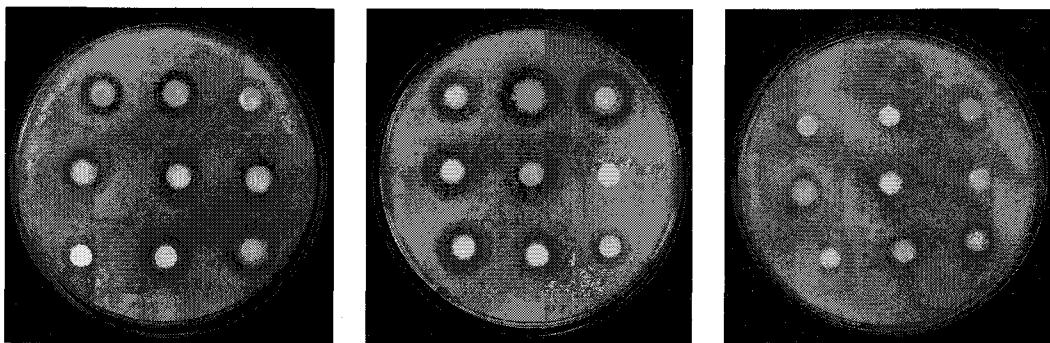


Fig. 1. Antifungal activity of *Bacillus subtilis* KMU-13 against *Colletotrichum gloeosporioides* (A), *Fusarium oxysporum* (B), and *Phytophthora capsici* (C). No: 1; KMU-88, 2; KMU-33 strain, 3; KMU-77 strain, 4; KMU-13 strain, 5; KMU-19 strain, 6; KMU-85 strain, 7; KMU-102 strain, 8; KMU-134 strain, 9; KMU-62 strain.

```

GCGCTATCTGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGGCTTGCTCCCTGATGTTAG
CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATA
ACTCCGGAAACCBBBBCTAACCGGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTT
CAGACATAAAAGGTGGCTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCCGGCGC
ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGCTCACCAAGGGCAGCGATGGTAGCCG
ACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
AGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGT
TAGGGAAGAACAAAGTGGCGTTCAAATAGGGCGCACCTTGACGGTACCTA
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGG
TGGCAAGCGTTGTCGGATTATTGGCGTAAAGGGCTCGCAGGGGGTT
CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAA
ACTGGGGAACTTGAGTGAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCCACGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTG
GTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGAAACGATGAGTGCTAAGTGTAAAGGGGT
TTCCGCCCCCTTAATGCTGCAGCTAACGCATTACCACTCCGCCTGGGA
GTACCGCCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTAACCGAAGCAACCGCGAAGAACCTTACCAAGGT
CTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTGGGGCAG
AGTGACAGGTGGTGCATGGTTGCGTCAGCTGTTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGAACCCCTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGT
TGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTACAAACCCGGAGGAAGGTGGGATG
ACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGACAGAACAAAGGGCAGCGAACCCCGGAGGTTAAGCCAATCCCACAAAT
CTGTTCTCAGTTGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAA
TCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCT
TGTACACACCGCCCCGTACACCACGAGAGGTTGTAACACCGAAGTCGGT
GAGGTAACCTTTAGGAGGCCAGCCGCCGAAGTGACAGATTGG

```

Fig. 2. 16s rDNA sequences of KMU-13.

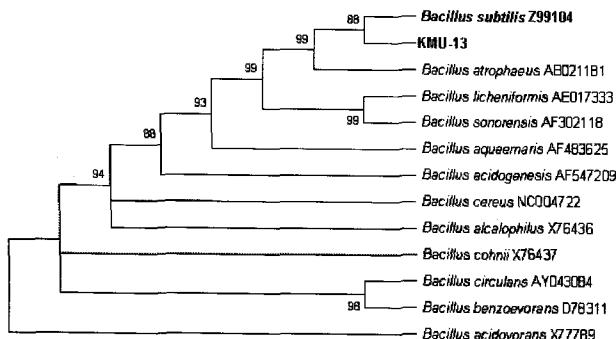


Fig. 3. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of *B. subtilis* KMU-13.

다. 증폭된 PCR 산물은 Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega, USA)을 이용하여 정제하였고, 정제된 PCR 산물은 ABI PRISM 3700 DNA Analyzer를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과를 BLASTN 프로그램을 이용하여 GENE BANK의 ribosomal DNA sequence와 비교하였으며, sequence의 상동성은 Clustal X program을 이용하여 비교, 분석하였다(Fig. 2, 3). 그 결과, *B. subtilis* (Gene Bank Data homology search result : 99%)로 동정되었으며 최종적으로 *B. subtilis* KMU-13으로 명명하였다.

시제품의 제작 및 성분분석

주박의 열풍건조 시, 과도한 당화효소작용으로 주박의 점성이 증가하여 시제품 제작시 비료성분 및 담체와 혼합이 매우 어려웠으며, 시험된 모든 온도 범위 내에서 갈변화로 관능상 색상이 어두우며, 과도한 유기산 발효로 향기도 좋지 않았다.

동결건조 시 주박 내 미생물세포는 휴지상태에 도달할 때 까지 저온, 탈수 등의 과정을 거치게 되지만, 미생물과 유기 영양분을 비교적 안정하게 보존할 수 있었다.

Table 2. The main ingredients of a posted fertilizer

Sample	The main ingredients(%)						
	T-N	T-C	Av-P ₂ O ₅	O.M	K ₂ O	CaO	MgO
Sample 1	0.71	4.69	0.84	8.08	8.16	1.49	0.59
Sample 2	6.04	42.59	1.01	73.42	7.72	1.35	0.53

T-N; Total nitrogen ,T-C; Total carbohydrate , Av-P₂O₅; Available phosphate, O.M; Organic matter , K₂O; Potassium oxide , CaO; Calcium oxide , MgO; Magnesium oxide.

Table 3. The metal microconstituents of a posted fertilizer

Sample	The metal microconstituents(mg/kg)									
	Fe	Mn	Cu	Zn	Pb	Cd	Cr	As	Hg	Ni
Sample 1	1173.2	78.8	T*	16.6	T	T	649.1	T	T	119.7
Sample 2	9.4	9.0	10.1	50.0	0.26	T	T	T	0.02	0.3

* T: Trace

토양유용미생물을 고정할 담체와 증량제로서 벤토나이트, 질석, 펄라이트, 셀라이트, 제오라이트 등을 이용하였는데 미생물 고정 및 수분흡수능은 질석과 벤토나이트가 가장 우수하였으나 벤토나이트는 점성이 높아 통기성이 가장 낮게 나타나 제외시켰으며, 제품성상은 셀라이트가 가장 우수하였고 최종적으로 제품단가를 검토한 결과, 미생물 고정담체로서 질석과 증량제로 제오라이트와 셀라이트를 선택하였다.

시제품 2의 성분은 유기물, 총 질소 및 유효인산 함량이 각각 73.42, 6.04 및 1.01%로서 높게 나타났다. 그러나 시제품 1은 시제품 2에 비해 유기물 및 총질소의 함량은 8.08 및 0.71%로서 매우 낮게 나타났으며, 인산 및 양이온의 함량은 약간 낮은 경향을 나타내었다(Table 2).

시제품 2의 중금속함량은 아연, 구리 및 망간이 각각 50.0, 10.1 및 9.0 mg/kg으로서 비교적 낮았으며, 그 외 납, 카드뮴, 크롬, 비소, 수은 및 니켈의 함량은 1.0 mg/kg 이하 또는 흔적으로 대단히 낮게 나타났다. 그러나 시제품 1에서는 망간, 크롬 및 니켈의 함량이 혼합된 담체에 의해 높은 경향을 나타내었으며, 이 중에서도 크롬의 함량이 649.1 mg/kg으로 대단히 높게 나타나 문제점으로 대두되어 중금속 함량을 줄이는 연구를 계속하고 있다(Table 3).

공시토양의 이화학적 특성

재배시험 전 토양에 비해 재배시험 후 토양의 화학성 특성에 있어 3요소비료, 퇴비 및 석회의 관행처리에 따라 약간 높아지는 것으로 나타났으나 토양의 화학성 변화는 거의 없는 것으로 판단된다. 또한 비료시제품의 처리에 의해 뚜렷한 토양 이화학성의 변화는 나타나지 않았다(Table 4, 5).

상주의 생육현황 및 수량구성요소의 변화

공시비료의 처리가 상주의 생육 및 수량 구성요소에 미치는 영향을 조사하기 위하여 파종하여 3주, 5주, 8주 간격으로,

Table 4. Characteristics of physico chemistry of soil before the test

pH (1:5)	EC (dS/m)	T-N (%)	O.M (%)	P ₂ O ₅ (mg/kg)	Ex.-cations(cmol ⁺ /kg)			CEC (cmol ⁺ /kg)	Texture
					K	Ca	Mg		
6.5	0.82	1.17	1.75	97	0.70	8.34	2.40	13.17	미사질 식토(SiC)

EC; Electric conductivity, T-N; Total nitrogen, O.M; Organic matter, P₂O₅; Phosphate, Ex.-cations; Exchangeable cations, CEC; Cation exchange capacity.

Table 5. Characteristics of physico-chemistry of soil after the test

pH (1:5)	EC (dS/m)	T-N (%)	O.M (%)	P ₂ O ₅ (mg/kg)	Ex. cations(cmol ⁺ /kg)			CEC (cmol ⁺ /kg)	
					K	Ca	Mg		
1	7.2	0.98	1.45	22.48	174	0.75	12.08	4.4	12.45
2	7.4	1.04	1.56	23.99	196	0.74	11.96	3.37	12.85
3	7.5	1.06	1.52	22.85	187	0.88	12.42	3.61	12.25
4	7.4	0.75	1.55	24.55	211	0.74	12.90	3.20	13.01
5	7.1	0.69	1.82	24.09	245	0.91	11.69	2.34	13.05

1; Control, 2; 80 kg/10a-prototype 1, 3; 40 kg/10a-prototype 1, 4; 5 kg/10a-prototype

2, 5; 2.5 kg/10a-prototype 2.

생체중, 엽수, 엽장 및 엽폭을 조사하였다.

상추재배지에 관행처리 및 비료시제품을 시비한 후, 파종 3주 후에 엽장, 엽폭, 엽수 및 생체중량을 각 처리구별로 비교·조사하여 Table 6에 나타내었다. 파종 3주 후, 시제품 1과 시제품 2를 시비하여 상추의 생육현황을 조사한 결과, 엽장은 시제품 2(5 kg/10a)가 7.88 cm로서 가장 높았으며, 시제품 1(80 kg/10a)은 7.22 cm로서 관행구보다 오히려 낮게 측정되었으나 생체중은 7.90 g으로 가장 높게 조사되었다. 엽폭, 엽수는 관행처리구에 비해 뚜렷한 생육 촉진 효과는 없었다.

상추재배지에 관행처리 및 시제품을 시비한 후, 파종 5주 일 재배하면서 엽장, 엽폭, 엽수 및 생체중량을 조사하여 각 처리구별로 비교·분석한 결과는 Table 7에 나타내었다. 파종 5주일 후, 상추의 수량구성요소의 변화에서 관행처리구에 비해 시제품 시비구의 엽수는 약간 감소하는 경향을 나타내었으나, 엽장, 엽폭 및 생체중량은 시제품 1(80 kg/10a)이 각각 14.42 cm, 7.67 cm, 12.79 g이었고, 시제품 2(5 kg/10a)는 각각 15.50 cm, 7.40 cm, 11.49 cm로서 증가하는 경향을 나타내었고, 특히 시제품 2(2.5 kg/10a)의 생체중은 12.39 g으로 비교적 높게 측정되었다. 이와 같은 결과는 비료시제품의 시비에 의한 효과적인 것으로 추측되며, 상추의 엽수가 증가할수록 엽장, 엽폭 및 생체중량은 약간 감소하는 경향을 나타내었다.

파종 8주일 후, 수확기에 시제품 1과 시제품 2를 시비한 상추의 생육현황을 관행처리구와 비교·조사한 결과는 Table 8과 Fig. 4에 나타낸 바와 같이, 시제품 1과 시제품 2를 시비한 상추의 엽장, 엽폭, 엽수 및 생체중량은 관행구에 비해 높은 증가를 나타내었다. 특히 시제품 1을 전량으로 처리한 상추의 엽폭 및 생체중량은 각각 15.46 cm 및 78.05 g으로

관행처리구의 13.32 cm 및 69.78 g에 비해 16%와 12% 높게 나타났다. 또한 시제품 2를 시비한 상추의 엽장은 전량처리구가 29.04 cm, 반량처리구가 29.77 cm로서 관행처리구의 27.59 cm에 비해 높게 나타났다. 따라서 시제품 1의 적정시

Table 6. A change of quantity and constituent of the *Lactuca sativar* after sowing in a field (3 weeks)

Treatment	head length (cm)	head width (cm/head)	No. of leaf	fresh wt. (g/plant)
1	7.62	4.48	5.55	7.52
2	7.22	4.86	5.51	7.90
3	7.48	4.62	5.35	7.47
4	7.88	4.70	5.61	7.50
5	7.59	4.68	5.44	7.38

1; Control, 2; 80 kg/10a-prototype 1, 3; 40 kg/10a-prototype 1, 4; 5 kg/10a-prototype 2, 5; 2.5 kg/10a-prototype 2.

Table 7. A change of quantity and constituent of the *Lactuca sativar* after sowing in a field (5 weeks)

Treatment	head length (cm)	head width (cm/head)	No. of leaf	fresh wt. (g/plant)
1	14.39	7.15	7.55	11.24
2	14.42	7.67	7.22	12.79
3	14.29	7.50	7.38	11.56
4	15.50	7.40	7.37	11.49
5	15.23	7.58	7.44	12.39

1; Control, 2; 80 kg/10a-prototype 1, 3; 40 kg/10a-prototype 1, 4; 5 kg/10a-prototype 2, 5; 2.5 kg/10a-prototype 2.

Table 8. A change of quantity and constituent of the *Lactuca sativar* after sowing in a field (8 weeks-the harvesting season)

Treatment	head length (cm)	head width (cm/head)	No. of leaf	fresh wt. (g/plant)
1	27.59	13.32	14.01	69.78
2	28.59	15.46	14.89	78.05
3	27.46	14.58	14.37	71.99
4	29.04	14.55	14.56	73.07
5	29.77	14.33	14.03	72.12

1; Control, 2; 80 kg/10a-prototype 1, 3; 40 kg/10a-prototype 1, 4; 5 kg/10a-prototype 2, 5; 2.5 kg/10a-prototype 2.

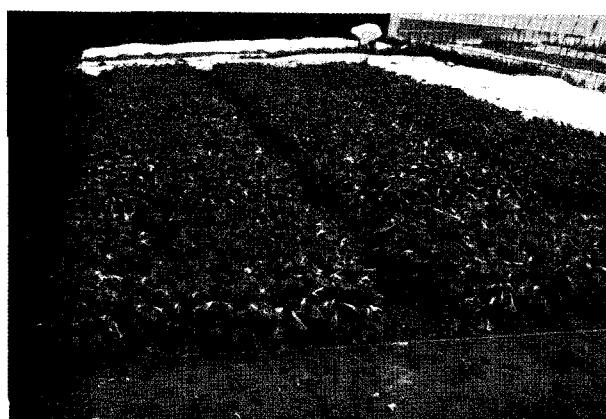


Fig. 4. A complete view of sow a field with seeds of the *L. sativar* (after 8 weeks - the harvesting season).

비량은 80 kg/10a인 것으로 판단되었으나, 시제품 2는 전량 구과 반량구 간의 뚜렷한 차이는 보이지 않았다. 연구에 사용된 비료 시제품에 의한 상추의 생육에 미치는 가스발생, 토양의 이화학적 변화, 병충해 등 피해증상은 전혀 나타나지 않았다.

요 약

본인들은 주류생산 부산물인 주박을 이용한 친환경적인 비료를 개발하고자 한다.

본 시험에 사용된 주박에는 잔존 알코올함량이 평균 5.8%이며, 주요성분으로 6.04% 총질소량, 42.59% 총탄수화물량, 1.01% 유용 인산량, 73.42% 유기물량, 7.72% K₂O, 1.35% CaO와 0.53% MgO을 함유하고 있었다. 주박은 980 units/g의 α -amylase, 300 units/g의 glucoamylase와 1,800 units/g의 산성 protease활성을 나타내어 비교적 높은 수준의 효소 활성을 나타내었다.

토양으로부터 분리한 미생물 중 항 진균활성이 우수한 균권세균인 *Bacillus subtilis* KMU-13을 분리, 생화학적 특성과 16S rDNA 분석에 의하여 *Bacillus subtilis* KMU-13으로 동정

했다. 식물병원성 진균인 *Botrytis cinerea* KACC 40573, *Sclerotinia sclerotiorum* KACC 41065, *Fusarium oxysporum* KACC 40052, *Pythium aphanidermatum* KACC 40156, *Phytophthora capsici* KACC 40476와 *Glomerella cingulata* KACC 40299에 대하여 높은 항 진균활성을 나타내었다.

시제품은 동결건조 주박을 직접 시제품으로 사용하는 시제품 1과 동결건조 주박 20%, 담체 70%, *B. subtilis* KMU-13의 배양액 9.7%, 미량원소 0.3%를 혼합하여 시제품 2를 제작했다. 시제품 1과 시제품 2의 상추를 이용한 포장 재배시험에 대한 비료효과 및 토양이화학성 변화를 조사한 결과, 3요소비료, 퇴비 및 석회를 사용한 관행구에 비해 수확기의 엽장, 엽폭, 엽수 및 생체중량 등이 증가하였으며, 토양 이화학성의 변화는 거의 없었다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부의 지역혁신 인력양성사업의 연구결과로 수행되었으므로 이에 감사드리며, 시험병원성 진균을 분양해주신 농업진흥청 농업생명공학연구원 한국농업미생물보존센터에도 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Arima, K., H. Imanaka, M. Kousaka, A. Fukuta and G. Tamura. 1964. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. *Agric. Biol. Chem.* **28**, 575-576.
2. Han, Y. J. and T. S. Yu. 2005. Characterization and two forms of glucoamylase from traditional Korean Nuruk fungi, *Aspergillus coreanus* NR15-1. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 239-246.
3. Jung, H. K. and S. D. Kim. 2004. Purification and characterization of an antifungal antibiotic from *Bacillus megaterium* KL 39, a biocontrol agent of Red-Pepper Phytophthora Blight Disease. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 235-241.
4. Jung, H. K. and S. D. Kim. 2004. Selection and antagonistic mechanism of *Pseudomonas fluorescens* 4059 against Phytophthora Blight Disease. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 312-316.
5. Kim, S. U., J. Y. Nam, B. M. Kwon, K. H. Son and S. H. Bok. 1995. Screening of antifungal compounds from microorganism with preferential activity against the mycelial phase of *Candida albicans*. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 170-177.
6. Lee, D. Y. 1969. Studies on industrialization of the Korean Kockja(I), It's isolation and physiological characteristics of mold from Kockja. *Kor. J. Microbiol.* **5**, 51-54.
7. Lee, E. J., K. S. Kim, S. H. Hong and J. H. Ha. 1995. The mechanism of biological control of *Pseudomonas* sp. against *Fusarium solani* causing plant root-rot disease. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 91-97.
8. Lee, J. M., H. S. Lim, T. H. Chang and S. D. Kim. 1999.

- Isolation of siderophore-producing *Pseudomonas fluorescens* GL7 and its biocontrol activity against root-rot disease. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18**, 142-147.
9. Lee, J. N., E. H. Lee, W. B. Kim, M. R. Lee, S. J. Hong and Y. R. Yeoung. 2005. Changes in productivity and fruit quality of ever-bearing strawberries during summer culture in highland. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **23**, 159-163.
 10. Lee, J. S., J. W. Choi, D. S. Chung, C. I. Lim, T. C. Seo, G. L. Do and C. O. Chun. 2005. Effects of Lettuce(*Lactuca sativa* L.) cultivars and cultivation methods on growth, quality, and shelf-life. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **23**, 12-18.
 11. Lee, J. T., C. J. Lee and H. D. Kim. 2004. Changes in physicochemical properties and microbial population during fermenting process of organic fertilizer. *Kor. J. Soil Sci. Fert.* **37**, 116-123.
 12. NIAST. 1996. Inspection and sampling methods of fertilizers. RDA Publishment, Suwon, Korea.
 13. NIAST. 1988. Soil Chemical methods - soil, plant, microbes. National Institute of Agricultural Science and Technology, Rural Development Administration, Suwon, Korea.
 14. Oh, W. K. 1986. The effect of strawberry compound fertilizer, potassium chloride, potassium sulphate and ammonium nitrate on the yield and quality of strawberry. *Kor. J. Soc. Sci. Fert.* **19**, 9-13.
 15. Park, K. W., Y. B. Lee, N. H. Choi and J. C. Jeong. 1990. Effects of culture media and nutrient solutions on the yield and quality of cucumber and tomato. *Kor. J. Env. Agric.* **9**, 143-151.
 16. Park, S. M., H. S. Kim and T. S. Yu. 2006. Antifungal activity of *Bacillus* sp. KMU-1011 against gray mold causing *Botrytis cinerea*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 63-69.
 17. Park, S. M., S. H. Han and T. S. Yu. 2005. Culture conditions and antifungal activity of *Bacillus licheniformis* KMU-3 against crop pathogenic fungi. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 112-116.
 18. Park, S. W., J. W. Lee, K. Y. Kim, Y. C. Kim and S. J. Hong. 1999. Effect of cultivation season and method on growth and quality of tomato. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **17**, 115-177.
 19. RDA. 1999. Fertilization standard of crop plants. National Institute of Agricultural Science and Technology, Rural Development Administration, Suwon, Korea.
 20. Shon, B. K., J. H. Hong, K. J. Park, W. M. Yang, K. Y. Kim and Y. S. Rim. 1997. Emission of CO₂ and NH₃ from mixed composting cattle manure with rice hull by static windrow and aerated static pile methods, and growth of tomato on it under greenhouse condition. *Kor. J. Env. Agric.* **16**, 119-123.
 21. Sohn, S. M., D. H. Han and Y. K. Kim. 1996. Chemical characteristics of soils cultivated by the conventional farming, NO₃-in Chinese cabbage and lettuce. *Kor. J. Organic Agric.* **5**, 149-165.
 22. Steingrover, E., R. Oosterhuis and F. Wieringa. 1982. Effect of light treatment and nutrition on nitrate accumulation in spinach (*Spinacea oleracea* L.). *Z. Pflanzenphysiol.* **107**, 97-102.
 23. Tarakcioglu, C. and A. Inal. 2002. Changes induced by salinity, demarcating specific ion ratio (Na/Cl) and osmolarity in ion and proline accumulation, nitrate reductase activity and growth performance of lettuce. *J. Plant Nutr.* **25**, 27-41.
 24. Whang, K. S. and K. W. Chang. 1996. Change of microflora in livestock manure during composting process. *Kor. J. Soc. Soil Sci. Fert.* **29**, 303-311.
 25. Whang, K. S., S. J. Yoo and K. W. Chang. 1998. Study on the improvement of soil for high efficient and sustainable agriculture-II changes of population of soil microorganisms in the fertilized soil with organic materials. *Agric. Chem. Biotechnol.* **41**, 457-464.
 26. Yang, Y. J., K. W. Park and J. C. Jeong. 1991. The influence of per-and postharvest factor on shelf life and quality of leaf lettuce. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **23**, 133-140.
 27. Yoo, J. K., K. H. Ryu, J. H. Kwon and S. S. Lee. 1998. Fungicidal activity of oriental medicinal plant extracts against plant pathogenic fungi. *Agric. Chem. Biotechnol.* **41**, 600-604.