

121046-2

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)

유용농생명자원산업화기술개발사업 2022년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004378-01

미생물 유래 바이오폴리머 생합성 배양기술을 이용한 나노리포좀 캡슐 제제 개발

2023. 05. 22.

주관연구기관 / 전남대학교 산학협력단
협동연구기관 / (주)현농

2022

미생물 유래 바이오폴리머 생합성 배양기술을
이용한 나노리포좀 캡슐 제제 개발

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “미생물 유래 바이오폐리머 생합성 배양기술을 이용한 나노리포좀 캡슐
제제 개발”(개발기간 : 2021. 04. ~ 2022. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2023.05.22

주관연구기관명 : 전남대학교 산학협력단 (대표자) 민 정 준 (인)

협동연구기관명 : (주) 현 농 (대표자) 김 철 홍 (인)

주관연구책임자 : 강 범 용

협동연구책임자 : 한 송 희

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

| 최종 보고서 | | | | | | | | 보안등급 일반(√), 보안() | | | | |
|-------------------------|-----------------|--|------------------------------------|--------------------|----------|----------------------|-----|----------------------|------------------------------|---------|---------|--|
| 중앙행정기관명 | 농림축산식품부 | | | 사업명 | 사업명 | 유용농생명자원산업화 기술개발사업 | | | | | | |
| 전문기관명 (해당 시 작성) | 농림식품기술기획평가원 | | | 내역사업명 (해당 시 작성) | - | | | | | | | |
| 공고번호 | 제 농축2021-24호 | | | 총괄연구개발 식별번호 | - | | | | | | | |
| | | | | 연구개발과제번호 | 121046-2 | | | | | | | |
| 기술 분 류 | 국가과학기술 표준분류 | 1순위 LB0304 | 50% | 2순위 LB0401 | 30% | 3순위 BC0204 | 20% | | | | | |
| | 농림식품과학기술 분류 | 1순위 CA0104 | 50% | 2순위 RA0203 | 30% | 3순위 RA0303 | 20% | | | | | |
| 총괄연구개발명 (해당 시 작성) | 국문 | | | | | | | | | | | |
| | 영문 | | | | | | | | | | | |
| 연구개발과제명 | 국문 | 미생물 유래 바이오폴리머 생합성 배양기술을 이용한 나노리포좀 캡슐 제제 개발 | | | | | | | | | | |
| | 영문 | Development of nanoliposome-capsule formulation using microbial-derived biopolymer biosynthetic culture technology | | | | | | | | | | |
| 주관연구개발기관 | 기관명 | 전남대학교 산학협력단 | | | 사업자등록번호 | 409-82-11942 | | | | | | |
| | 주소 | (601186)광주광역시 용봉로 77 | | | 법인등록번호 | 417-82-06488 | | | | | | |
| 연구책임자 | 성명 | 강 범 용 | | | 직위 | 연구교수 | | | | | | |
| | 연락처 | 직장전화 | | | | 휴대전화 | | | | | | |
| | 전자우편 | | | | 국가연구자번호 | | | | | | | |
| 연구개발기간 | 전체 | 2021. 04. 01 - 2022. 12. 31(1년 9개월) | | | | | | | | | | |
| | 단계 (해당 시 작성) | 1단계 | YYYY. MM. DD - YYYY. MM. DD(년 개월) | | | | | | | | | |
| | n단계 | YYYY. MM. DD - YYYY. MM. DD(년 개월) | | | | | | | | | | |
| 연구개발비 (단위: 천원) | 정부지원 연구개발비 | 기관부담 연구개발비 | 그 외 기관 등의 지원금 자량자치단체 기타() | | | | 합계 | | 연구 발의 외 자 원 금 | | | |
| | 현금 | 현금 | 현물 | 현금 | 현물 | 현금 | 현물 | 합계 | | | | |
| 총계 | 518,000 | 3,000 | 49,500 | - | - | - | - | 521,000 | 49,500 | 570,500 | - | |
| 1단계 | 1년차 | 222,000 | - | 27,000 | | | | | 222,000 | 27,000 | 249,000 | |
| | 2년차 | 296,000 | 3,000 | 22,500 | | | | | 299,000 | 22,500 | 321,500 | |
| 공동연구개발기관 등 (해당 시 작성) | 기관명 | 책임자 | 직위 | 휴대전화 | 전자우편 | 비고 역할 기관유형 | | | | | | |
| 공동연구개발기관 | (9)현농 | 한송희 | 연구소장 | | | 공동 | | 중소기업 | | | | |
| 연구개발담당자 실무담당자 | 성명 | 류광록 | | | 직위 | 연구원 | | | | | | |
| | 연락처 | 직장전화 | | | | 휴대전화 | | | | | | |
| | | 전자우편 | | | | 국가연구자번호 | | | | | | |

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재 처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2023 년 05 월 22 일

연구책임자: 강 범 용

주관연구개발기관의 장: 전남대학교산학협력단장

공동연구개발기관의 장: 김 철 흥



농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약 문 >

| | | | | | | | | |
|------------------------|----------------|--|-----|------------|--------------------------|------------|------------------------|--|
| 사업명 | | 유용농생명자원산업화기술개발사업 | | | 총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성) | | | |
| 내역사업명 (해당 시 작성) | | | | | 연구개발과제번호 | | 121046-2 | |
| 기술 분류 | 국가과학기술 표준분류 | 1순위 LB0304 | 50% | 2순위 LB0401 | 30% | 3순위 EC0204 | 20% | |
| | 농림식품 과학기술분류 | 1순위 CA0104 | 50% | 2순위 RA0203 | 30% | 3순위 RA0303 | 20% | |
| 총괄연구개발명 (해당 시 작성) | | | | | | | | |
| 연구개발과제명 | | 미생물 유래 바이오폴리머 생합성 배양기술을 이용한 나노리포좀 캡슐 제제 개발 | | | | | | |
| 전체 연구개발기간 | | 2021. 04. 01. - 2022. 12. 31 | | | | | | |
| 총 연구개발비 | | 총 570,500 천원 (정부지원연구개발비: 518,000천원, 기관부담연구개발비: 49,500천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원) | | | | | | |
| 연구개발단계 | | 기초[] 응용[] 개발[✓] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[] | | | 기술성숙도 (해당 시 기재) | | 착수시점 기준() 종료시점 목표() | |
| 연구개발과제 유형 (해당 시 작성) | | | | | | | | |
| 연구개발과제 특성 (해당 시 작성) | | | | | | | | |
| 연구개발 목표 및 내용 | 최종 목표 | 본 연구는 생분해성 아미노산-당으로 된 고분자 물질을 이용한 지질 반응성 전달시스템에 의한 미생물 배양 합성 기반의 대사유도체 물질 개발을 목표로 하고 있으며, 개발 대사유도체 폴리머는 천연물의 유효성분에 의한 직접적인 항균활성 효과와 더불어 식물과의 상호작용 과정에 의한 면역증진의 간접적인 효과로 벼 도열병을 방제하는 신개념의 고효율 천연식물보호제를 개발하고 이를 산업화하는데 그 최종목표가 있음. | | | | | | |
| | 전체 내용 | 최종 목표를 달성하기 위하여 미생물 배양액 형식의 방제제를 탈피하여 1) 생분해성 고분자 아미노당과 리포솜-펩타이드 결합체의 친화성에 의한 콜로이드성 입자간 블록 반응 합체의 미생물 대사유도체 개발과 2)이를 이용한 항진균제의 안정적인 대량생산을 통한 사업화임. 이를 위하여 생물적 방제능력, 특히 식물 곰팡이병에 대한 억제 효과가 검증된 특허균주와 기질 특이성에 의한 배양공정기술을 보유하고 있으면서, 천연 원료에서 순수 유효성분의 분리정제능력과 분석의 노하우를 지닌 개발팀과 유기농자재의 제형 개발과 농자재 등록 등 산업화와 연구능력을 보유한 팀으로 구성되어 식물과 상호작용의 통합 시스템에 의한 고분자-지질 블록합체 반응 기반의 하이브리드 나노리포좀 캡슐의 천연식물보호제를 개발하고자 함. | | | | | | |
| 연구개발성과 | | ○ 기질 특이성 미생물 유래 대사유도체 제작 및 생물검정 평가 시스템 구축 <ul style="list-style-type: none">• 콜로이드성 고분자아미노당, 생합성 바이오폴리머 추출 및 기질 선발• 미생물 유래 대사유도체 제작 및 항진균 활성 평가• 항진균 활성 증진을 위한 최적 혼합 조건별 방제효과 검정• 항진균 선발 화합물의 유효성분 표준 분석법 개발 및 적용 | | | | | | |

| | |
|------------------------------------|---|
| | <ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물 유래 항진균제 대량 생산 시스템 표준화 확립 <ul style="list-style-type: none"> ● 선발된 미생물을 이용하여 지표성분 검정 ● 벼 도열병에 효능을 가지는 미생물 추출물 유효성분 정량 ● 유효성분의 항균활성 능력 및 실내 및 소포장 시험을 통한 방제가 확인 ● 유효성분의 약효 약해 시험 및 시제품 제형화 ○ 미생물 유래 대사유도체 및 제형의 물리·화학적 특성 평가 <ul style="list-style-type: none"> ● 항진균 활성 증진을 위한 항진균 대사 화합물 생산능력 검정 ● 혼합 조건별 리포솜 캡슐 제형화 및 대사유도체 함량 분석 ● 리포솜 캡슐의 형태, DLS 분석, FTIR 등 물리화학적 및 구조적 특성 분석 ● 리포솜 캡슐화 효율 및 유효물질 방출양상, 물리적 안정성 특성 분석 |
| <p>연구개발성과 활용계획 및 기대 효과</p> | <ul style="list-style-type: none"> ○ 연구개발성과 활용계획 <ul style="list-style-type: none"> ● 기질 특이성 이용 미생물 유래 대사유도체 활성물질 특성연구 및 작용기작(논문, 특허) ● 개발 시제품의 생산공정 및 제형화 연구(특허) ● 개발 시제품의 산업화 관련 언론매체 홍보(언론홍보) ● 개발 시제품의 제품화, 유기농자재 인증 및 산업화 공정 개발(기술실시/제품화/산업화) <ul style="list-style-type: none"> - 제형에 적합한 보조증진제, 분산제, 안정제 등 이용한 시제품 개발 - 안전성 평가 시험 실시(인축 독성 및 환경독성 시험) - 대상 작물 병해충 약효/약해 및 비효/비해 시험 - 타작물 병해충 약효/약해 시험 - 본 시스템의 기술이전 및 농가 보급 ○ 연구개발성과 기대효과 <ul style="list-style-type: none"> ● 학문적·기술적 측면 <ul style="list-style-type: none"> - 항진균 생물소재에 의한 벼 도열병 억제기작 구명으로 다양한 식물병 방제제 개발 연구 활성화 - 나노입자 기반 천연물 활성물질의 식물면역유도 기전 이해를 통한 새로운 연구방향 제시 - 다양한 식물병원균 억제 연구의 문제점 해결에 응용 및 기회 제공 - 안정적인 농산물 생산을 위한 주요 병해충 피해경감 방제기술 보급 - 친환경 및 유기농산물 재배 종합관리 매뉴얼 개발로 현장 애로기술 사항 해결 - 항진균 생물소재 개발로 식물병 방제에 관한 농업의 원천기술 확보 - 병해충 방제효과를 높일 수 있는 사용지침서 보급 ● 경제적·산업적 측면 <ul style="list-style-type: none"> - 병해충관리 농자재 등록을 통한 농업인의 식물병해에 대한 방제제 수요 충족 - 천연식물보호제 확대를 통한 관련 산업 발전의 토대 마련 - 농산물 안전 재배를 통한 농산물 수확 증대로 양질의 농산물 공급 확대 - 고품질 농산물 생산으로 농가 소득 증대가 기대 - 천연물 유래 식물병 억제 기능규명으로 국내자원 보존 및 우수자원 산업화 - 농업 현장의 가장 큰 애로사항인 고질적인 식물병 방제용 자재를 개발하여 농가소득 창출 - 화학농약 사용량 저감을 통한 환경 개선 효과 및 국민 건강 증진 |

| | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|---|--------------|-----------|-------------|----------------|--------------------------|--------------|-------------|----------|--------------|--------------|----|
| | <div>- 무분별한 불량 농자재의 사용으로 인한 농가 피해 경감</div> <div>- 합성농약 대체물질 사용으로 유기 농산물 생산의 친환경적 관리체계 구축으로 농업 생태계 보호</div> <div>- 고품질 안전 유기농산물 생산으로 생산자와 소비자의 요구 충족</div> | | | | | | | | | | | |
| 연구개발성과의 비공개여부 및 사유 | | | | | | | | | | | | |
| 연구개발성과의 등록·기탁 건수 | 논문 | 특허 | 보고서 원문 | 연구 시설·장비 | 기술 요약 정보 | 소프트 웨어 | 표준 | 생명자원 | | 화합물 | 신품종 | |
| | | | | | | | | 생명 정보 | 생물 자원 | | 정보 | 실물 |
| | 3 | 6 | 1 | | 1 | | | | | | | |
| 연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황 | 구입 기관 | 연구시설· 장비명 | | 규격 (모델명) | 수량 | 구입 연월일 | 구입가격 (천원) | 구입처 (전화) | | 비고 (설치장소) | ZEUS 등록번호 | |
| | | | | | | | | | | | | |
| 국문핵심어 (5개 이내) | 항진균제 | | | 바이오폴리머 | | 대사유도체 | | 벼 도열병 | | | 배양기질 | |
| 영문핵심어 (5개 이내) | Antifungal agent | | | Biopolymer | | Metabolic derivatives | | Rice blast | | | Substrate | |

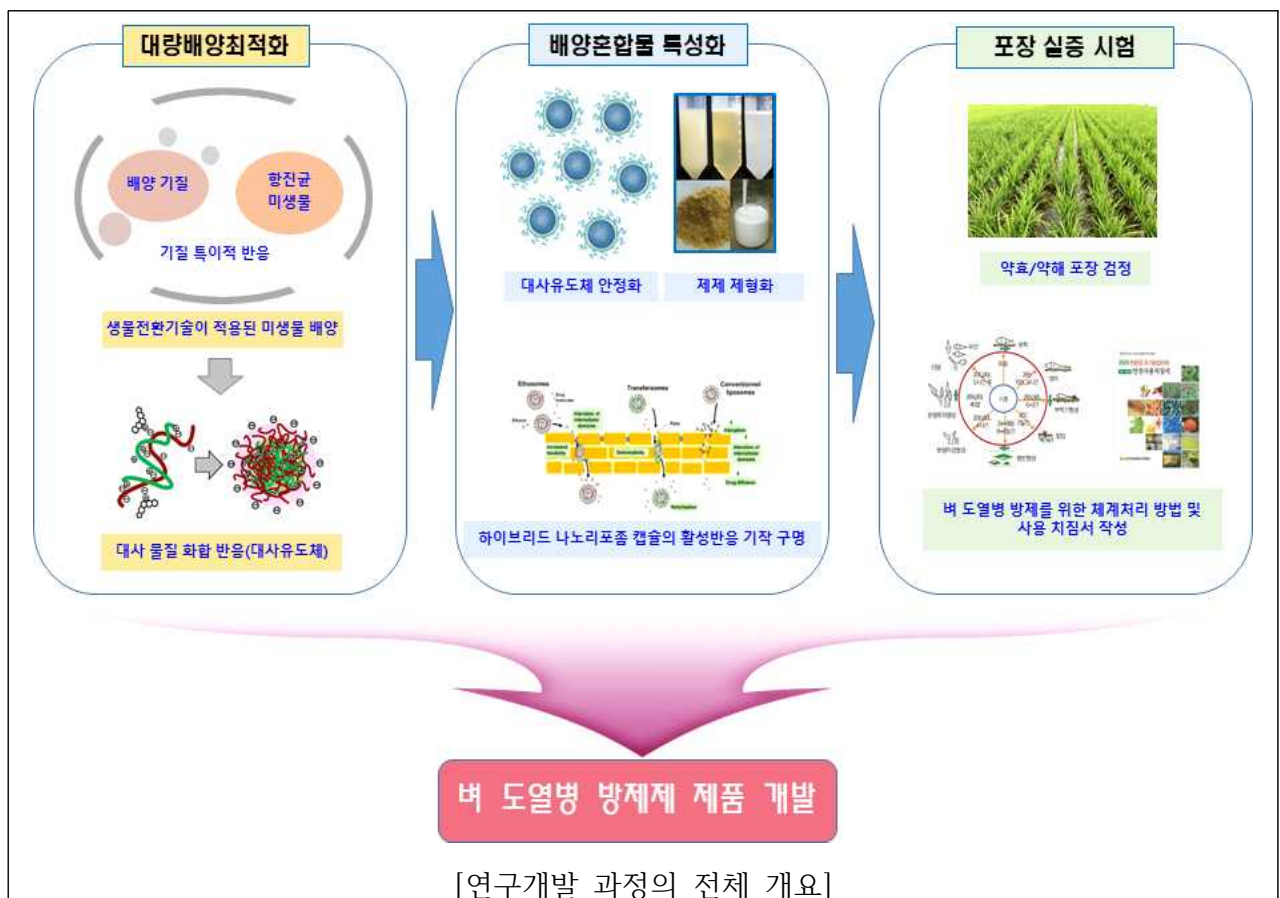
〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

1. 연구개발과제의 개요

(1) 연구개발의 목적

○ 본 연구는 생분해성 아미노산-당으로 된 고분자 물질을 이용한 지질 반응성 전달시스템에 의한 미생물 배양 합성 기반의 대사유도체 물질 개발을 목표로 하고 있으며, 개발 대사유도체 폴리머는 천연물의 유효성분에 의한 직접적인 항균활성 효과와 더불어 식물과의 상호작용 과정에 의한 면역 증진의 간접적인 효과로 벼 도열병을 방제하는 신개념의 고효율 천연식물보호제를 개발하고 이를 산업화하는데 그 최종목표가 있음.



(2) 연구개발의 범위

- 1) 기질 특이성 미생물 유래 대사유도체 제작 및 생물검정 평가 시스템 구축
- 2) 미생물 유래 항진균제 대량 생산 시스템 표준화 확립
- 3) 유기농자재 등록 및 포장검정에 의한 방제지침서 개발

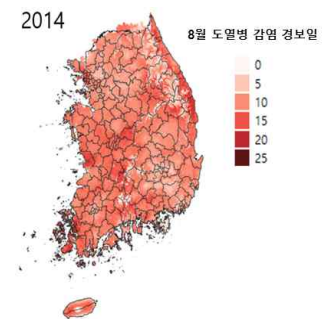
(3) 연구개발의 필요성

1) 연구개발 대상의 국내·외 현황 및 문제점과 전망

- 최근 기후변화로 인해 한반도 전역의 기온이 지속적으로 상승함과 동시에 전에 없었던 강도와 빈도의 이상 기후 현상이 증가하고 있음(2018~2019 기후보고, 한국기상청). 이러한 기후 현상은 농작물의 생산성뿐만 아니라 수량에 직접적인 영향을 미치는 병해충 발생 양상 변화가 예상됨.
- 기후변화로 인한 세계적 피해 규모는 10년내 17조달러(1경8436조원)의 위험비용이 예상되며, 이중 아시아 지역은 약 8조 5000억달러(9218조원)이 몰릴 것으로 조사되었음(Nikkei Asia, 세계자원연구소, 2020). 이와 같은 기후변화로 인한 재해가 계속 늘어나는 이유 중 가장 큰 요인은 인간의 경제활동에 의한 지구 온실가스 증가로 인한 지구온난화이며, 최근 2015년부터 현재까지 평균온도는 산업화 이전보다 1.1도 올랐음(2015~2019 지구기후보고서, 세계기상기구, 2020).
- 기후변화, 서식지 감소에 의한 곤충 개체수 감소, 농수부족, 침입 외래종 등에 의한 환경 위기에 따른 대한민국의 경제적 손실은 2050년까지 약 11조8760억의 국내총생산(GDP) 손실이 예상됨(지구의 미래, 세계자연기구, 2020).
- 기후변화로 인한 기상조건의 변화는 작물생육에 직접적인 영향을 미치며, 특히 병해충 발생에 급격한 변화를 주는 가장 큰 요인 중의 하나임. 기후변화로 인한 변동 병해충 종류 변화와 외래 병해충 출현 및 국내 토착화로 발생빈도, 발생기간, 피해면적 증가로 농업생산에 직간접적으로 큰 영향을 줄 수 있음.
- 급격한 기후변화와 국제 농산물 교역 증대로 외래병해충 유입과 돌발 병해충의 피해가 증가하면서 안정적인 농산물 생산을 크게 위협하고 있음. 따라서, 전 세계적으로 병해충 방제용 농약 사용을 절감하여 온실가스 배출을 줄이기 위한 대응이 강구되고 있지만, 급격한 기후변화 및 기상 이변에 따른 병해충 발생위험이 높아지면서 국가농작물병해충관리체계를 구축하고 필요한 기초 및 응용 연구와 정보화 기술들을 개발하고 있음 (농림수산식품부, 2020).
- 향후 기후변화에 따른 병해충 방제를 위해 저항성을 이용한 방제는 전반적으로 부정적인 영향을 끼치고, 약제 방제는 작용기작에 따라 긍정적 및 부정적인 영향을 미치고, 생물적 방제는 긍정적인 영향으로 작용함(한림연구보고서, 2010).
- 현시점에서 합성농약 시장에 비해 생물농약 시장 규모는 작고 성장률이 낮은 것으로 파악되나, 생물농약은 친환경 농산물의 생산유통량 증가와 선호도가 높아지는 추세에서 점진적으로 합성 농약 시장을 잠식하여 대체하고 있음.

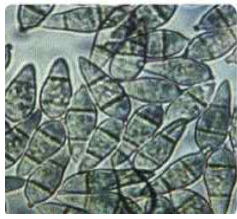
- 생활 패턴의 변화와 친환경 농산물의 수요 증대로 합성농약을 대체할 친환경 제품 개발의 필요성이 증대하고 있음. 과거 합성농약 과다사용으로 농업환경 생태계 파괴와 농약잔류, 중독, 염류집적 등의 부작용을 겪으면서 친환경 농자재의 사용 확산으로 농업환경 생태계 보존과 수입 농산물과 차별화되어 가격 경쟁력 향상 제고 등으로 친환경 농자재 개발의 필요성이 증대되고 있음.
- 현재 시장에서 판매되는 생물농약 및 친환경 농자재들은 가격이 비싸 친환경·유기 농산물의 가격 경쟁력이 저하되는 주 원인이 되고 있으며, 기존 화학 합성농약에 의해 해결하기 어려운 각종 식물병을 해결할 수 있는 방안을 제시할 수 있는 소재 개발의 필요성이 증대되고 있음.
- 급격한 기후변화, 잦은 집중 폭우로 인한 일조량 부족, 갑작스런 저온 등으로 최근 벼 도열병의 피해 면적이 급격히 증가하고 있으며, 침수, 냉해 등 기상여건으로 인한 농업재해로 인정하는 사례가 증가하고 있음.
- 2014년 저온 기상여건으로 벼 이삭도열병이 농업재해(전남 나주와 영암)로 최초로 인정받았으며, 그 당시 전남과 경남지역의 벼 도열병 피해규모가 50ha 이상인 시군만 8개 시군 6,100ha에 이르고, 농가피해액은 770억원이 넘었음.

| 지역 | 병든이삭률 (%) | 출수기 (월.일) | 일평균기온 (°C) | 총강우량 (mm) | 강우일수 (일) | 평균일조시간 (시간/일) |
|----|-----------|-----------|------------|-----------|----------|---------------|
| 창원 | 3.8 | 8.16 | 24.1 | 236.5 | 7 | 3.7 |
| 밀양 | 68.8 | 8.20 | 24.3 | 271.5 | 7 | 2.6 |
| 의령 | 16 | 8.22 | 22.8 | 334.5 | 9 | 1.7 |
| 함안 | 11.5 | 8.20 | 22.8 | 291.5 | 8 | 2.2 |
| 창녕 | 5 | 8.22 | 23.6 | 244 | 8 | 2.6 |
| 산청 | 2.1 | 8.20 | 23.1 | 235.5 | 9 | 3.5 |



[2014년 8월 벼 이삭도열병 대발생시 발병환경 분석과 도열병 감염 경보 발생일수(2014, 식물병연구)]

- 2014년 전국적으로 대발생한 도열병은 큰 피해를 주었으며, 이때 8월 중 도열병 감염 경보 발생일수는 전국적으로 대부분 지역에서 10일 이상 경보발생일수를 나타냄. 특히, 2014년 전남, 충남, 전북 등과 2018년 제주, 충남, 동해안 지역 등에서 높은 경보 발생일수를 보였음.
- 2014년 대발생시 경남지역의 벼 예찰포를 대상으로 기상조건에 의한 이삭도열병 발생을 조사한 결과 출수일과 강우일수에 관계가 없고, 일평균기온이 급격히 낮아지면서 총강우량이 많고 평균일조시간이 짧았음.



병원균
(*Magnaporthe grisea*)



벼알도열병



잎도열병

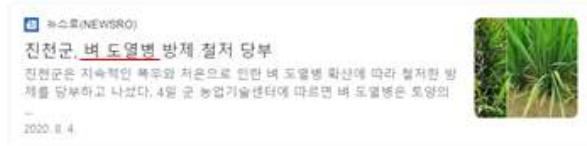


이삭도열병



피해포장

- 매년 벼 도열병 발생은 안정적인 농작물 생산에 가장 큰 위협요인으로 영향을 미치고 있으며, 농업현장에서는 도열병이 가장 큰 치명적인 장애물로 인해 심각한 문제를 겪고 있으며, 이 문제 해결을 위해 지난 30여 년 동안 분자 생물학, 유전학 세포생물학 및 생화학 등 도열병 저항성 기작연구 및 분석이 이루어지고 있지만, 병원균의 변이, 약제 내성, 불규칙한 기후변화 등에 의해 현재까지 완전히 정복되지 않은 고질적으로 방제하기 어려운 대표적인 식물병원균임.
- 벼 도열병 피해는 종종 감염 초기에는 증상이 보이지 않아 크게 피해가 없을 것이라 과소평가 되고 있지만, 최근에는 급작스런 대발생 또는 다른 병원균들과 복합 감염이 되면서 경제적 손실이 크게 발생되고 있음.
- 벼 종자에서부터 수확기까지 전반적으로 발생하는 도열병에 감염될 경우 주로 잎에 방추형 병반, 이삭목과 이삭가지 마름과 꺾임, 생육멈춤(좌지), 쪽정이 등의 병징을 보이며 최종적으로 생산물의 수량과 상품 가치를 크게 저하시킴.



[매년 벼 도열병 피해 언론보도]

- 도열병은 발병이 되면 확산이 빨라 벼 병해 중 가장 피해가 심하기 때문에 조기에철에 의한 철저한 방제를 강조 있으나, 매년 폭우, 침수, 홍수 등 잦은 기상변화 때문에 벼 도열병 주의와 방제를 당부하는 뉴스가 보도됨. 잎도열병 방제를 소홀히 하면 벼 이삭이 나올 때 병원균에 감염되어 이삭도열병까지 이어져 쌀 수확 감소로 큰 피해를 줌. 도열병은 벼의 유묘기부터 수확기까지 전 생육기를 걸쳐 발생하며, 피해부위 또한 잎, 줄기, 목, 가지, 벼알까지 광범위하게 발생됨.
- 벼 도열병의 경제적, 사회적 특성상 농업연구기관에서 벼 연구와 관련 연구인력들은 상대적으로 다른 병을 연구하는 사람들에 비해서 많고, 1970년대 말부터 꾸준히 도열병 방제를 위한 연구를 하고 있지만, 병원균의 변이, 약제 내성, 불규칙한 기후 변화로 인한 도열병 방제에 어려움이 있음.
- 벼와 관련된 병의 종류는 흰잎마름병, 잎집무늬마름병, 모썩음병, 키다리병, 및 도열병 등이 있으며, 이들 가운데 도열병은 벼 재배면적과 생산에서 가장 큰 피해를 주는 병임. 도열병은 *Magnaporthe grisea*에 의해 발병하며 잎의 경우 암녹갈색의 작은 무늬가 생겨 나중에 긴 타원형이 되며, 전체의 성장을 저해하기도 함. 벼 도열병균에 의해 연간 최대 30%의 감소 수율이 보고되어 있으며, 벼 도열병균의 감염을 초기에 억제하면 벼 수율 및 질을 극적으로 개선할 수 있음.
- 벼 도열병균을 포함한 병해충 방제를 위해 합성농약을 주로 이용하고 있으며, 합성 농약의 남용으로 인해 자연 생태계의 파괴는 물론 잔류독성, 인축에 대한 독성, 약제 내성인 새로운 병해충의 출현 등의 문제가 야기되고 있음. 이를 대체하기 위하여 신소재 천연물질을 이용한 방제제 개발을 위한 연구가 진행되고 있으나 그 개발속도가 수요를 충족시키지 못하고 있음.
- 미생물로 방제하는 방법은 여러 가지가 있으나 대표적인 방제방법 중 하나는 미생물 배양액을 직접 방제에 사용하는 경우임. 미생물 배양액은 미생물이 살아가기 위한 일차대사물 외에 특수한 목적에 사용되는 이차대사물을 포함하고 있으며, 이와 같은 미생물 배양액이 항균효과를 보이는 것으로 보고되고 있음.
- 벼, 고추 등 국내 주요 작물들을 대상으로 바이러스를 포함한 벼 도열병 저항성 내병성 식물을 개발을 위해 관련된 유전자 동정 및 기능 연구들이 수행되고 있으나 현실적으로 적용하기에는 많은 시간과 노력이 필요함.
- 경제적 피해가 큰 벼 도열병은 대부분 저항성 품종 재배시 포장에서 2~3년내 저항성을 극복하는 새로운 변이가 출현되어 단일 저항성 유전자보다는 2개 이상의 작용기전이 다른 저항성 유전자 활용을 하는 연구와 노력이 필요함.
- 내병성 품종 개발을 위해서는 식물-병원체 상호작용 연구 뿐만 아니라 내병성에 관련된 유전자 연구 및 식물들을 개발하고 있지만 아직은 상용화된 기술은 미미함. ○ 벼 도열병 방제제의 기능 및 약효에 대한 품질 개선 요구

- 현재 국내의 다양한 미생물 및 천연물 소재를 이용한 병충해 방제용 제품들은 대부분 효능 향상이 요구됨. 이를 위해 배양공정기술, 안정적 효능의 제형화 기술 등 기술개발의 가속화를 위한 정부와 기업들의 관심이 필요한 상황임.
- 매년 내성이나 저항성 문제와 이를 극복하기 위해서 벼 도열병 방제용 작물보호제(농약)가 출시되고 있으며, 우수한 약효와 사용 편리성, 안전성 강화의 내용으로 단제 또는 합제 형태로 등록되고 있음.
- 미생물 및 식물추출물 성분의 유기농자재 등록 자재들은 병원균 내성 및 저항성 측면에서 합성 농약에 비해 유효성이 상대적으로 높은 것으로 알려졌지만, 기존 제품들의 효과와 기능면에서는 보완하거나 향상되어 생산되는 사례는 거의 없음.
- 최근에는 천연식물보호제 중 미생물 농약 뿐만 아니라 생화학 농약에 대한 연구와 관심이 증가되고 있으며, 기존 친환경농자재에 대한 관리와 기능적인 효과 저하에 대한 개선을 위해 다양한 방법으로 접근·시도하고 있음.
- 효과적인 식물병 방제법을 강구하기 위해서 최근 기술들은 대부분 최신생명공학기술과 다양한 식물-병원균 상호작용에 대한 연구결과로 식물체내 저항성 유전자나 식물 게놈상의 특정부위 수정을 통해 형질 개선을 목적으로 식물체내 유전자를 조작하여 저항성 작물을 개발하는데 집중되어 있음.
- 하지만 천적 및 길항미생물과 식물추출물 등 천연물을 이용한 생물적 방제기술과 새로운 생리활성물질을 이용한 환경친화성 신농약을 개발하여 농약사용을 절감시키는 방법들의 연구도 병행되어야 함.
- 천연 고분자 물질, 지질 성분 및 미생물 자원으로부터 유래한 천연물의 대사 반응물을 이용한 식물병원균에 대한 항진균제 개발은 세계적으로도 미개척 분야에 속하며, 사람 질병을 억제하기 위한 전달체계 시스템으로 이용되어 약으로 개발된 사례는 있음(스티렌, 조인스정, 푸로스판, 살사라진, 아피톡신, 편자환 등).
- 미생물, 천연물 및 바이오 생합성을 응용한 자원과 신소재 시장이 확대되면서 기능적으로 생리활성기능이 증진된 식물, 미생물, 미네랄 및 이들로부터 유래된 소재나 생화학적 기술이 적용된 천연식물보호제 시장이 형성되고 있음.
- 특히, 최근 생화학 농약에 대한 등록기준 마련 등으로 미생물, 천연물질 관련 농업소재들이 정식으로 등록되면서 친환경 식물보호자재 시장규모도 전문화되고 확대되고 있는 추세이며, 관련 인프라 개선으로 그 영세성을 탈피하는 방향으로 전환중임.
- 천연 식물보호제 개발은 지식 집약 고부가 가치 산업으로서 젊고 유능한 인력들이 몰려 있는 벤처기업들이 대부분 사업을 추진하고 있는바 상당한 개발비 부담을 정부에서 정책적으로 꾸준히 지원할 경우 이 분야에서 국가경쟁력을 갖게 될 것임.

- 기존 천연 작물보호제는 우수한 미생물과 식물자원을 보유하면서 제품개발의 공정개발에 성공한 반면에, 개발인력의 부족, 제품화와 산업화 연관 기술력의 취약, 상업화 전략의 취약성, 농민에 대한 기술보급 미흡, 합성농약에 비해 가격 경쟁력의 취약성 등으로 현장에서 충분한 효과를 발휘하기가 어려운 상황임.
- 국내 미생물농약 외에 다른 병해충 방제제들은 등록 가이드라인이 설정되어 있어도 시장이 초기 형성 단계에 머물러 있고, 아직은 합성농약에 비해 비교적 적은 범위의 병해충에 대한 제품군으로 개발되어 마케팅에 어려움이 있음.
- 다양한 학문과 기술들의 융합연구에 의한 합성반응기술은 생명분야 및 광범위한 응용분야에서 사용되고 있으며, 특히 질병진단 및 신약개발을 위해 합성기술 분야를 적용하여 새로운 도구와 기술개발을 촉진시키고 있음.
- 미세입자에 의한 캡슐화 기술 및 마이셀, 리포솜, 지질 성분 기반 나노에멀전 기술 등은 전달체 입자를 사용하여 생리활성물질을 포집하고 외부 환경으로부터 보호하며 흡수 및 작용점까지 전달하여 이들의 안정성과 이용률을 증진시키기 위해 응용되어 이용되고 있음.
- 천연 및 합성 폴리머 등의 전달체들은 세포보다 작은 크기의 지름 1~200 nm 사이로서 분해될 경우 입체의 표면적이 약 1,000만배 증가하여 다양한 물리·화학적 특징(강도, 전도성, 촉매활성, 광학적 및 자기 특성 등)이 변화되기 때문에 생체분자의 결합을 통한 생물학적 응용 연구들의 범위에서 사용되고 있음.
- 국내외 여러 기관에서 리포솜에 다양한 기능성 물질을 포접하는 기술과 리포솜 자체의 안정성을 높이는 연구가 진행되고 있음. 하지만 대부분 식품과 의학 분야로서 예를 들어 철분 강화 식품 첨가제용 리포솜을 제조함으로써 ferrous sulfate와 hemin을 혼합한 철분 함유 리포솜의 철분 생이용성을 증진하고자 하였음. 이러한 철분 함유 리포솜을 제조하는데 가장 큰 문제점은 ferrous sulfate의 자체 산화와 ferrous sulfate와 hemin으로 인한 리포솜의 지질산화로 지적되었고, 최종적으로 리포솜에 ascorbic acid와 토코페롤의 항산화제를 복합하여 사용함으로써 제품 내에서 철분으로 인한 반응성을 최소화하였음.
- Ascorbic acid의 불안정성을 극복하기 위하여 탈수화/재수화의 방법을 이용하여 soybean phosphatidyl choline으로 제조한 리포솜에 ascorbic acid를 미세캡슐화 하였음. Ascorbic acid는 48.6%의 효율로 리포솜 내에 포집되었으며, 리포솜 내에서 ascorbic acid는 수용액에 서보다 안정성이 매우 증대되었음.
- 나노리포솜을 이용한 astaxanthin의 안정화를 연구에서는 이중결합을 가진 불포화화합물로 제조나 저장시 열과 산화(빛)에 의해 쉽게 파괴되어 활성이 감소하여 응용범위에 한계가 있는 아스타잔틴의 안정성 향상을 위하여 나노리포솜 제형기술을 이용하였음. 제형 안정성 평가를 통하여 리포솜 제조 조건 및 조성비를 확립하였고, 포접 나노리포솜을 제조하여 포접전의 아스타잔틴과 안정성을 비교 검토하였음.

- 생약 추출물인 단삼, 월굴나무 추출물, 황금, 황련, 울무, 백복령, 감잎, 살구씨, 마황 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 추출물을 안정화한 나노 리포솜을 유효 성분으로 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물을 제조하는 데 사용되었음. 화장품 조성물의 나노 리포솜화는 미백 효과에 의한 멜라닌 생성의 저해, 티로시나아제 활성의 억제, 항산화 능력을 향상시켰음.
- 2009년에 미국에서 발표된 한 특허는 수용성 콜라겐을 lipid vesicle에 포집하여 피부건강을 증진하는 효과를 관찰하였음. 기능성 물질을 리포솜에 포집하여 경구용이 아닌 직접 피부에 적용하여 그 효능을 연구한 것으로 노화 방지를 위한 미용 제품 제조시 효과적인 공정으로 판단되었음.
- 2012년 미국의 한 대학에서는 키토산으로 코팅된 리포솜에 기능성 물질을 포집하고 피부 개선력 및 피부 내 침투력을 관찰하였음. 키토산 코팅에 의한 리포솜은 저장 안정성이 비교적 약한 리포솜에 키토산으로 다중층을 형성함으로써 리포솜과 포집된 기능성 물질의 안정성을 한층 증진시켰음.

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

1. 미생물 유래 대사유도체 특성 구명 및 시제품 소포장 검정

(제 1 세부 전남대산학협력단)

가. 항진균제 개발을 위한 생물적 방제균 및 기질 특이성에 의한 대사유도체 생산

분리·동정된 유용 미생물의 생리활성 물질의 생산성과 병원성 곰팡이에 대한 항진균성을 검정하고, 시제품 제작을 위한 분리 균주들의 최종 선발을 위한 항진균 활성 증진 및 대량 배양 시스템 구축을 위한 선발 균주의 기질 특이성 및 유효성분 표준 분석법 개발을 위한 대사 유도체 추출과 유효물질의 항진균성 평가 및 분석을 수행하였다.

(1) 유용 미생물 분리 및 동정

유용 미생물 원천자원을 확보하기 위하여 토양 및 작물 근권에서 분리 수집한 미생물 3종에 대하여 분류학적인 동정을 실시하였다. 본 연구에 사용된 공시균주들은 벼 재배지의 논 토양을 수집한 후 분리하였다. 논에서 채취한 토양 10g을 멸균수를 이용하여 10^5 까지 희석하고, 각 희석액을 tributyrin agar (KisanBio Co., Ltd., Seoul, South Korea)에서 평판배지 분리법에 의해 각 희석액을 도말 한 후 28°C에서 3일간 배양하였다. 토양으로부터 분리된 균주들은 20% glycerol을 첨가하고 -80°C에서 보관하면서 각 균주들의 특성 및 효소 활성 분석에 사용하였다. 유용 미생물의 동정은 유전적 특성인 16S rRNA 유전자 분석을 통해 수행되었으며, 최종적으로 계통도를 통해 분류하였다. 각 분리한 유용 미생물들은 Tryptic soy broth(TSB; Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) 또는 Luria-Bertani(LB; Becton Dickinson GmbH)를 이용하여 28°C에서 3일 동안 배양한 후 유전자 염기서열 분석을 위해 genomic DNA를 추출하였다. 각 유용 미생물은 Genomic DNA Prep Kit(NanoHelix Co., Ltd, Daejeon, South Korea)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였으며, 추출된 DNA로부터 16S rRNA 유전자 증폭을 위해 PCR을 수행하였다. PCR에 사용된 universal primer는 27F(5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGATACCTT GTTACGACTT-3')을 이용하였다. 증폭된 1.5 kb 16S rRNA 유전자들의 염기서열 분석은 Solgent ASSA service (Solgent Co., Ltd, Daejeon, South Korea)에 의뢰하여 결과를 얻었으며, 각 유용 미생물들의 16S rRNA 염기서열 분석결과는 미국 국립 생물정보센터(National Center for Biotechnology Information)의 자료와 비교하면서 Molecular Evolutionary Genetics Analysis software 11.0(www.megasoftware.net)으로 도표화하고 분류 계통도를 구성하였다. 각 계통도는 neighbor joining 알고리즘을 이용하여 작성하였고, Bootstrapping을 1,000회 반복하여 견고성을 확인하였다.

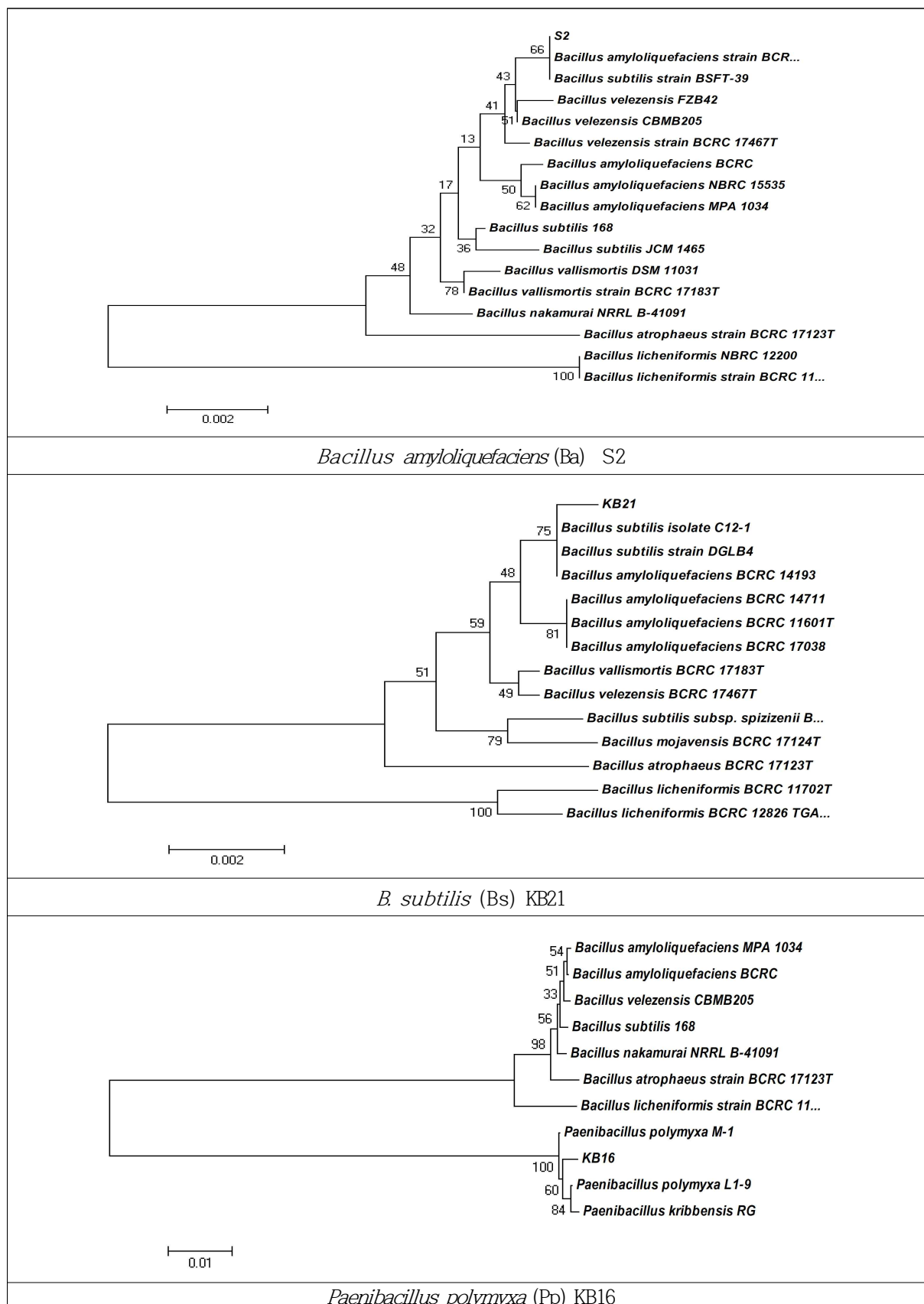
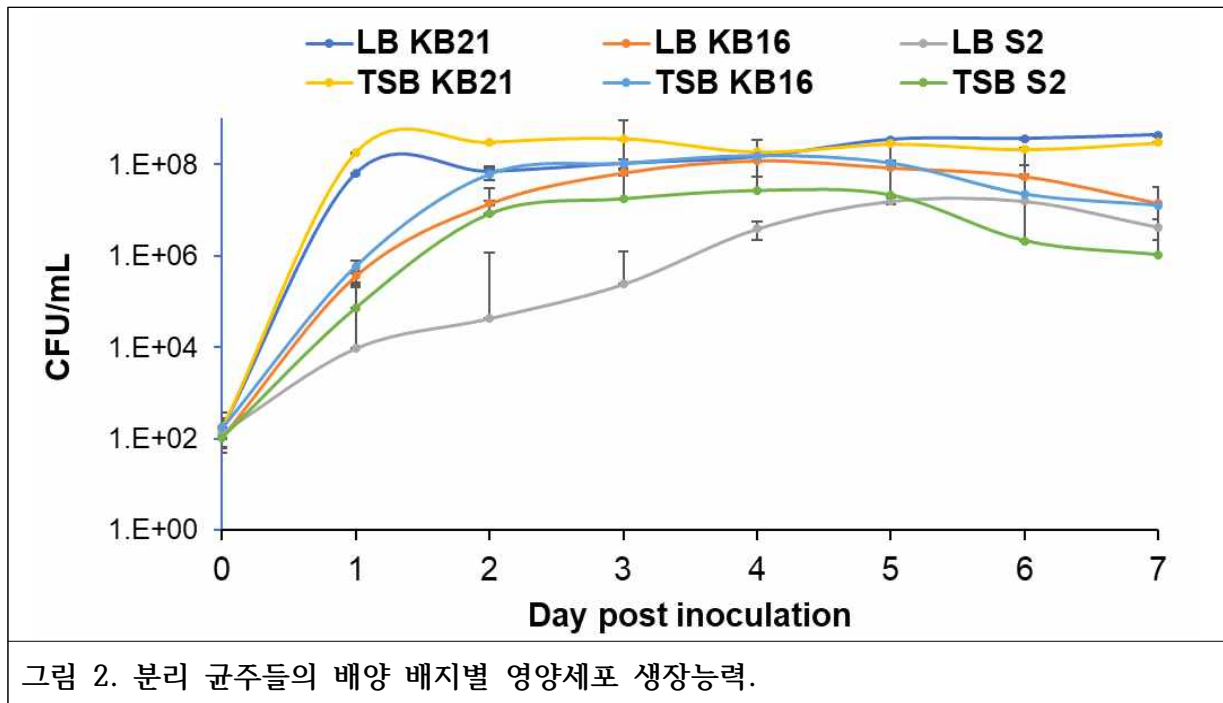


그림 1. 유용 미생물의 분리 및 동정.

Neighbor-Joining tree showing the phylogenetic positions of strain PPL and representatives of some other related taxa, based on 16S rRNA gene sequences. Boots trap values (expressed as percentages of 1000 replications) are shown at branch points.

(2) 선발 균주들의 생장 특성 및 항진균 활성 검정

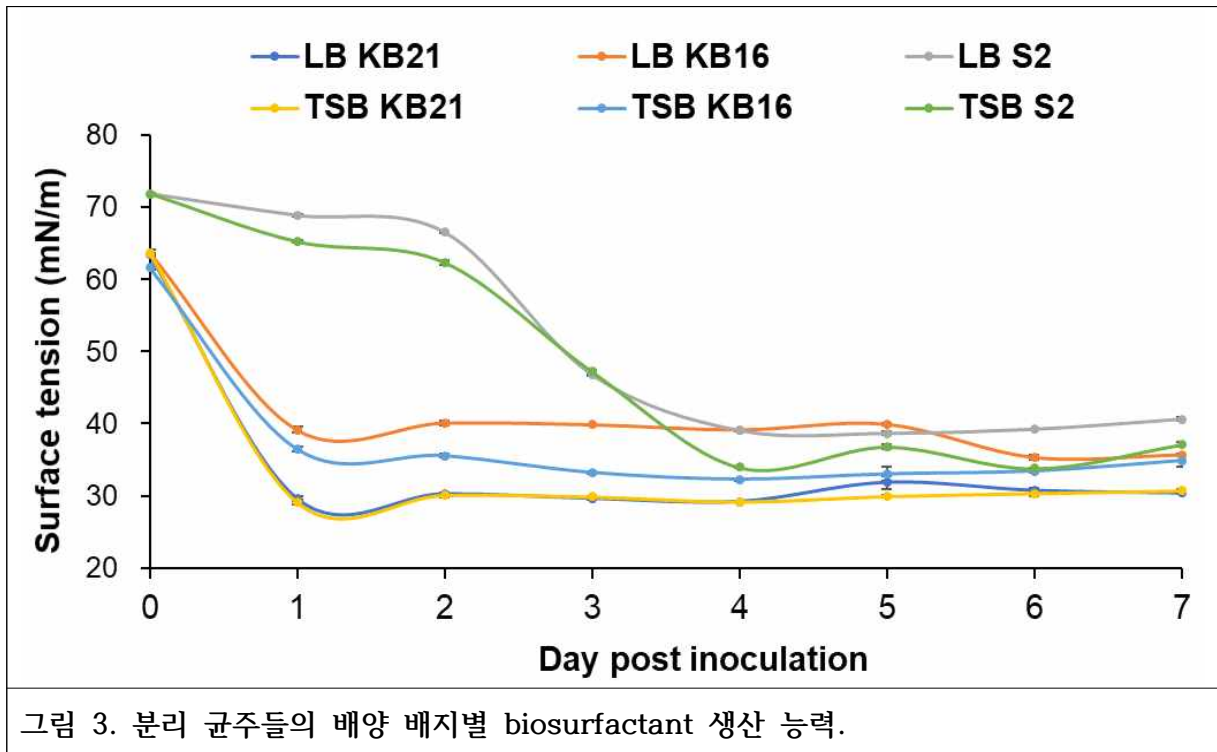
1) 배양 영양원별 각 균주들의 생장 능력 검정



유용 미생물 3종에 대한 생장능력은 TSB와 LB 배지에서 28°C, 150 rpm 조건에서 7 일 동안 진탕 배양하면서 OD 600 nm에서 생육을 측정하였고, 균주 밀도(colony-forming units, CFU)는 TSB agar에서 조사하였다. 그림 2는 TSB 배지와 LB 배지에서 각 균주들의 생육을 조사한 것을 나타냈다. 각 균주들의 세포 성장 밀도는 TSB agar 배지에서 배양액을 희석하면서 도말하여 생장한 콜로니들의 CFU로 나타낸 결과, Bs KB21은 TSB 배지 배양에서 접종 3시간 후에 lag phase (9.3×10^2 CFU/mL)에 도달하였다. Exponential phase는 접종 후 9-12시간째에 이르렀다(8.9×10^6 ~ 6.2×10^7 CFU/mL). TSB 배지에서 24시간 동안 성장한 후, Bs KB21 성장 곡선의 감소로 표시된 바와 같이 stationary phase(1.8×10^8 CFU/mL)에 진입하였다. LB 배지에서 Bs KB21의 성장도 TSB 배양 결과와 유사했으며, exponential phase와 stationary phases의 뚜렷한 세포 성장 패턴을 나타냈다. 각 배양 배지에서 Bs KB21의 생장 능력에서 log phase가 2일 동안 지속되었으며, stationary phase는 3일~4일 동안 유지되었다. TSB 배지와 LB 배지 조건에서 9일째 배양에서 영양분 고갈로 인한 세포 사멸과 대사 산물 축적으로 사멸기가 시작되었지만, 균주의 생장 밀도는 변화가 있더라도 세포 분열이 지속적으로 일어나고 있는 것을 확인하였다. 또한 TSB 배지에서 배양된 Pp KB16의 세포 성장은 접종 3 시간 후에 lag phase(8.1×10^2 CFU/mL)를 거치면서 생육과정에서 생산되는 대사 산물과 효소들의 합성이 시작되었다. 접종 후 24시간 (6.0×10^5 CFU/mL)에서 균주는 빠른 속도로 성장하고 분열하기 시작하면서 log(exponential) phase를 나타냈다. TSB 배지 조건에서 성장한 Pp KB16 균주는 접종 72시간 후에 세포 분

열과 동시에 세포 사멸이 시작되었으며, 3일째부터 성장 곡선에서 나타난 것과 같이 생육 감소로 stationary phase(1.1×10^8 CFU/mL)에 진입하였다. Pp KB16 균주도 TSB 배지 조건에서 log phase와 stationary phase가 뚜렷한 세포 성장 패턴을 나타냈다. Pp KB16의 LB 배지 배양에서도 유사한 결과의 경향을 나타냈으며, 배양 4일째에 1.2×10^8 CFU/mL으로 가장 높은 밀도를 나타냈다. 하지만 Pp KB16은 TSB와 LB 배지 모두에서 5일 배양 후부터는 급속히 성장이 감소하고 밀도가 낮아지는 것을 확인하였다. Ba S2는 다른 균주들보다 모든 배지상태에서 생육 밀도가 낮고 분열 속도도 급속히 감소되는 것을 확인하였다. 특히, LB 배지 배양에서는 초기 배양 4일 동안 세포 밀도가 최대 3.9×10^6 CFU/mL으로 생육 상태가 다른 균주들에 비해 높지 않았다. 따라서 각 균주들의 장기 보관과 항균성의 유지를 위해서 이를 보완하고 향상시킬 수 있는 배양 영양 기질 또는 영양원의 선택이 중요한 것을 확인하는 결과였다.

2) 배양 영양원별 각 균주들의 biosurfactant 생산력 검정

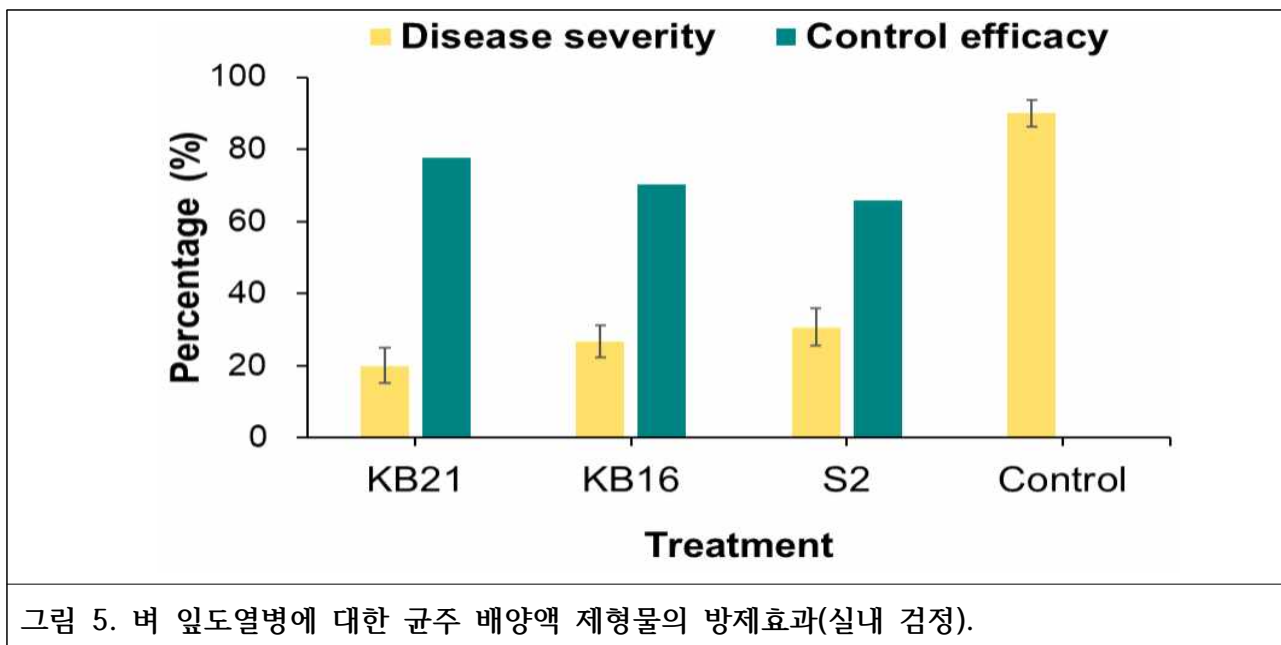
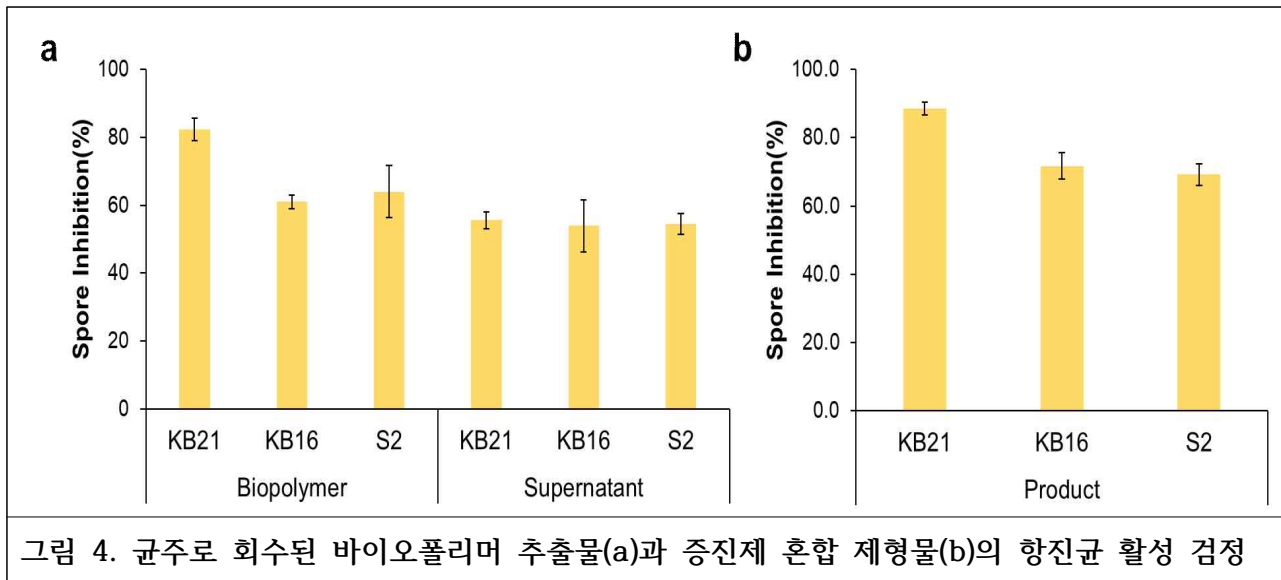


각각 배지 조건에서 7일 배양동안 배양 여액 내 biosurfactant 함량을 surface tensiometer를 이용하여 surface tension을 측정한 결과, Ba S2 균주를 제외한 모든 균주들은 TSB와 LB 배지 조건에서 접종 24시간 후부터 평균 29.1~39.1 mN/m으로 급속히 감소하기 시작하였다(그림 3). 각 균주간의 surface tension 값의 변화는 상당한 차이를 나타냈으며, Bs KB21은 배지 조건과 상관없이 7일 배양 동안 surface tension 값은 29.9~30.2 mN/m로 가장 높은 수준으로 감소하였으며 배양기간 동안 값을 일정하게 유지하였다. Bs KB21은 접종 24시간 후부터 stationary phase에 진입하였기 때문에 surface tension 수준

도 다른 균주의 배양조건에서보다 더 낮은 값을 유지하면서 감소되는 속도도 빠르게 나타났다. 이러한 결과는 Bs KB21는 다른 균주들보다 배양 조건에 관계없이 영양원 이용에 의한 대사산물 생산 속도가 빠르면서 biosurfactant 생성을 가장 잘 촉진함을 보여주는 결과이다. Bs KB21에 의한 biosurfactant 생산은 배양 기간 내내 발생하였으며, 잔류 영양소를 모두 소비한 후에도 계속되었다. 미생물의 log phase와 stationary phase 사이의 성장 기간 동안 생성 및 축적되는 대부분의 biosurfactant는 surface tension을 감소시키는 보고와 일치하는 결과를 나타냈다. Pp KB16 균주도 Bs KB21과 유사한 surface tension 감소와 값을 나타냈지만, Ba S2는 접종 2일 후부터 surface tension이 감소하기 시작하였으며, 4일 배양 후부터 평균 35.4~39.4 mN/m으로 일정하게 유지되었다. Ba S2는 배지내 영양분 흡수가 원활하지 못한 결과 낮은 생육 밀도와 함께 세포 사멸이 진행되었고 biosurfactant 생산에도 큰 영향을 미쳤다. Ba S2는 일반 액상의 합성배지의 선택보다는 지속적인 생장 환경을 조성시킬 수 있는 고체형 배지 선택으로 지속적인 영양원 공급이 필요함을 나타낸 결과였다. 따라서 Ba S2는 고체형 배지에서 우수한 항균 활성을 나타내지만, 대량 배양에 의한 산업화를 고려하면서 생물공정의 표준화를 위해서 본 연구에서 필요로 하는 균주를 선발하기 위해서 각 균주들을 이용한 제형화에 대한 항진균 활성 검정을 하였다.

3) 각 균주 제형물의 항진균 활성 검정 및 증진제 혼합에 의한 벼 도열병 방제효과 검정

각 균주 배양액에서 회수된 바이오폴리머의 항진균 활성 검정을 위해 벼 도열병 병원균의 포자 발아 억제 효과를 검정하였다(그림 4a). 벼 도열병 병원균 포자(2×10^4 spore/mL)에 대해 각 균주들의 바이오폴리머(200배)와 바이오폴리머 추출전 회수된 균주들의 상등액(100배)을 처리한 후 24시간 후 포자 발아 여부를 조사하였다. 평균적으로 바이오폴리머 처리구는 균주들의 상등액 처리구보다 벼 도열병 병원균 포자 발아에 대해서 7.0~26.8% 더 높은 값으로 억제 효과를 나타냈다. 각 균주들의 상등액은 평균적으로 병원균 포자 발아 억제 효과면에서 54~56%로 균일한 효과가 있었지만, 균주로부터 회수된 바이오폴리머는 61~82% 이상의 높은 향상 효과가 있었다. 각 균주 배양액의 바이오폴리머로부터 제작한 제형물의 벼 도열병 병원균의 포자 발아는 89~82% 이상 억제하는 효과를 나타냈다(그림 4b). 증진제 혼합에 의한 병원균 포자 발아 억제 효과는 폴리머에 의한 억제보다 5~11% 이상 더 높게 향상시키는 효과를 나타냈다. 특히, 위의 결과들에서 KB21 균주는 가장 높은 항진균 활성 효과를 나타냈으며, 균주 배양액으로부터 혼합 증진제를 첨가한 제형물 중에서 항진균 활성 효과가 가장 안정적으로 높게 증가하였다.



각 균주 배양액의 바이오폴리머로부터 제작한 제형물의 벼 도열병에 대한 방제효과를 검정하였다(그림 5). 각 제형물은 *M. oryzae*에 의해 발병된 벼 잎도열병 방제효과 검정 결과, 무처리구 벼 잎에 *M. oryzae* 포자를 접종한 지 5일 후 발병도(0-5), 4.3으로 전형적인 도열병 병반이 나타났으며, 90%의 발병율을 나타냈다. 각 균주로부터 제조된 제형들 중 KB21 제형물은 20% 발병율로 78% 이상의 방제효과를 나타냈다. 또한 다른 제형 처리구들도 26~30%의 발병율을 나타냈으며, 모두 66% 이상의 높은 방제효율을 나타냈다.

균주 배양액의 바이오폴리머로 제형물의 살포 농도별 벼 도열병에 대한 방제효과 검정을 온실에서 검정하였다(그림 6, 그림 7). 사용된 호평벼 종자는 2%(w/v) 차아염소산나트륨 용액에서 살균 처리한 후 온실 내에서 플라스틱 포트에 파종하고 $28 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 발아시키면서 유

묘를 관리하였다. 제형물의 살포 농도는 200배와 500배의 희석범위에서 벼 도열병에 대한 방제효과를 평가하였다. 각 제형물은 200배와 500배 농도로 희석한 후 벼 유묘에 살포하고 병원균의 포자 현탁액(5×10^4 spore/mL)을 접종하여 상대 습도 90% 이상과 26°C를 유지하면서 온실에서 병 방제효과를 조사하였다. 각 처리별 벼 도열병 발병 조사는 위의 그림 6과 같은 방법에 의해 평가하였다. 무처리구 벼 잎에 *M. oryzae* 포자를 접종한 지 3일 후부터 1mm 미만의 갈색 또는 회색 반점(발병도, 1~2)이 나타났으며, 7일 후에 5mm 이상 진전되면서 전형적인 도열병 병반과 함께 일부 고사하였으며, 무처리 대조군의 발병도는 3.5~3.6을 나타냈다. KB21와 KB16 제형물을 200배로 살포한 경우 도열병은 29%와 34% 발생하였고 59%와 52% 이상의 방제효과를 나타냈다(그림 6). 하지만 500배 희석농도 살포 조건에서는 도열병이 43% 이상 발생하였으며, 39% 이하의 방제 효과를 나타냈다(그림 7). S2 처리구에서 200배로 처리할 경우 도열병은 55% 발생하였으며, 23% 이하의 낮은 방제효과를 나타냈다.

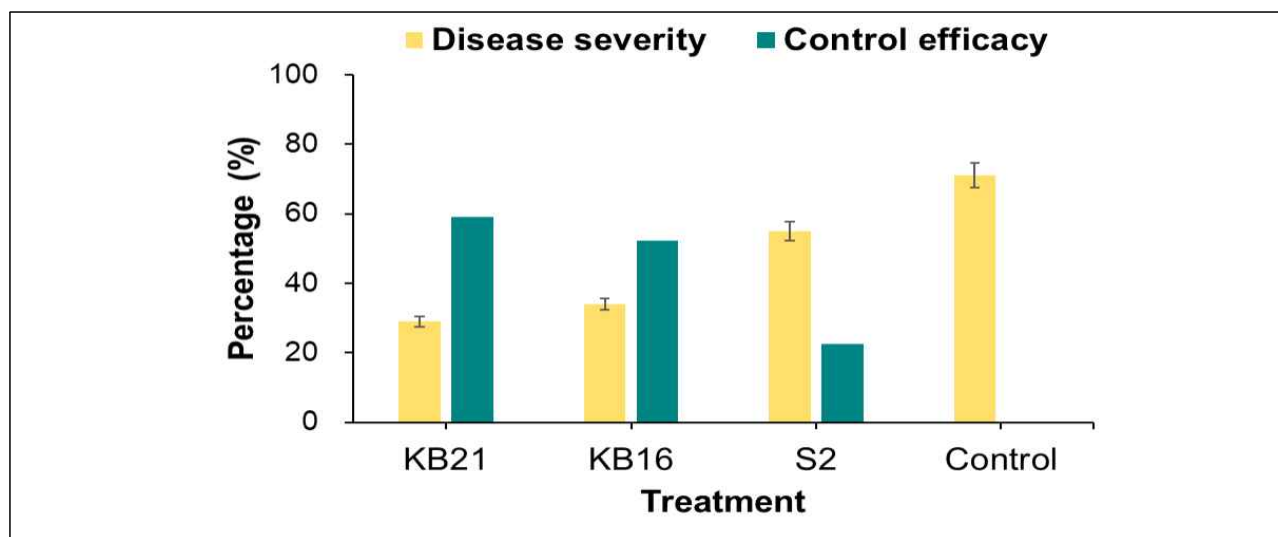


그림 6. 벼 잎도열병에 대한 균주 배양액 제형물의 온실 방제효과(200배).

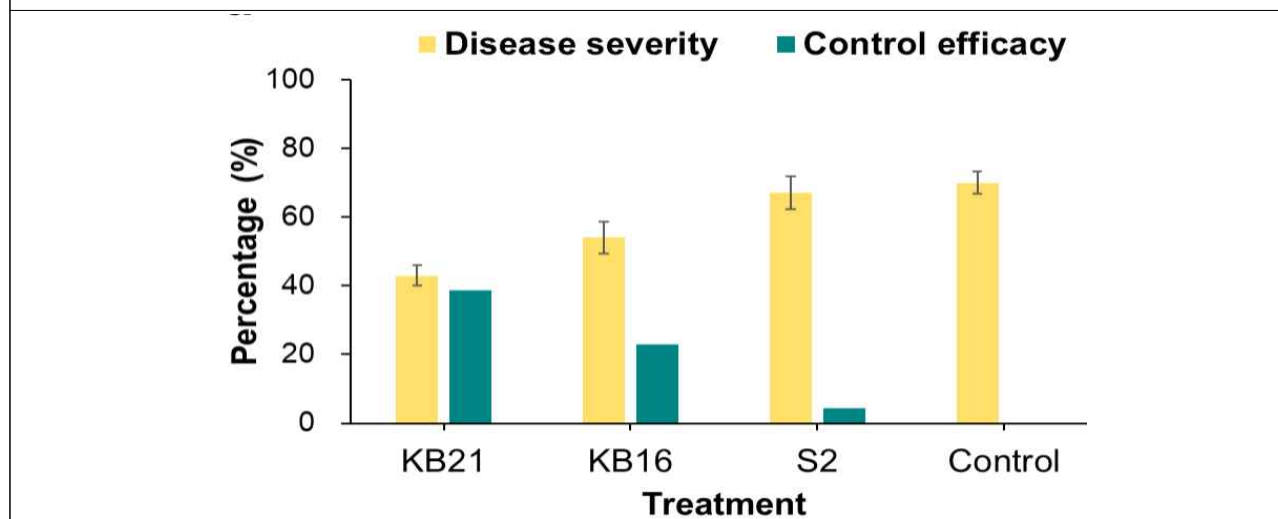
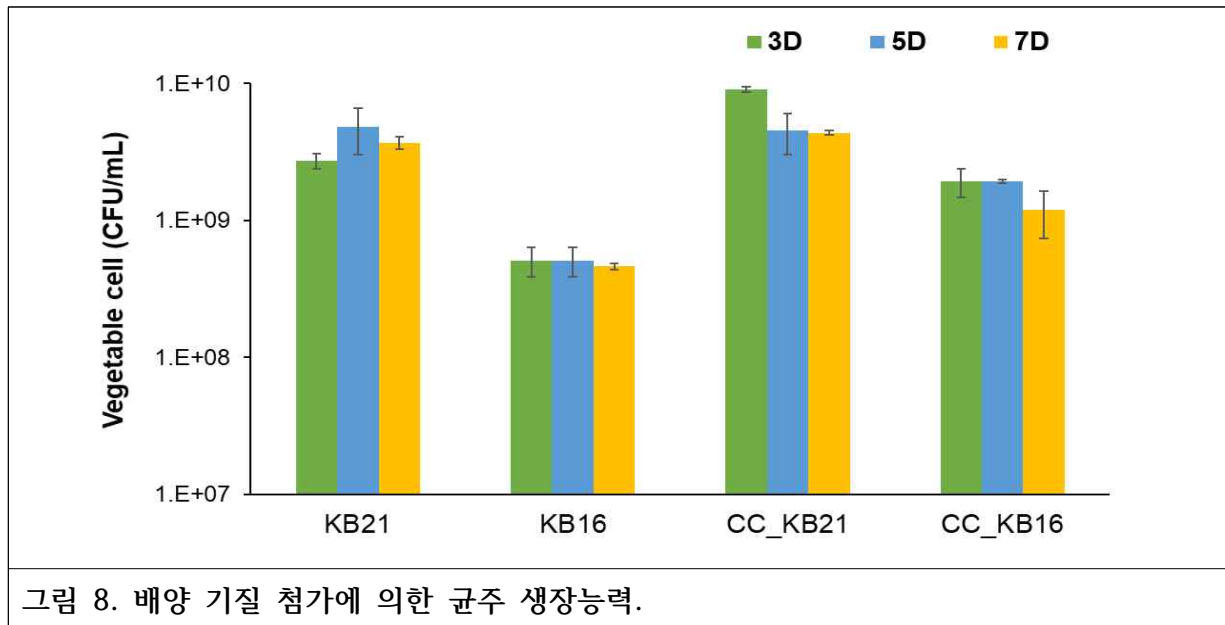


그림 7. 벼 잎도열병에 대한 균주 배양액 제형물의 온실 방제효과(500배).

(3) Bs KB21과 Pp KB16 균주의 배양 기질 특이성에 의한 대사 유도체 생산

1) CS 기질에 의한 성장능력 분석



TSB 배지에서 배양된 두 균주는 5일 배양까지 성장 밀도가 $4.82 \times 10^9 \sim 5.12 \times 10^8$ CFU/mL 까지 증가하였으며, 7일 배양부터 성장 밀도가 감소하였다(그림 8). CC를 첨가한 후 배양한 조건에서의 성장 능력은 CC 기질을 첨가하지 않은 배양의 성장 밀도보다 높은 성장 능력을 나타냈다. CC 함유한 배양 조건에서 모두 3일 배양 시 가장 높은 성장 밀도를 나타냈으며, 5일 배양부터 밀도가 감소하였다.

2) CS 기질에 의한 항균활성 능력 분석

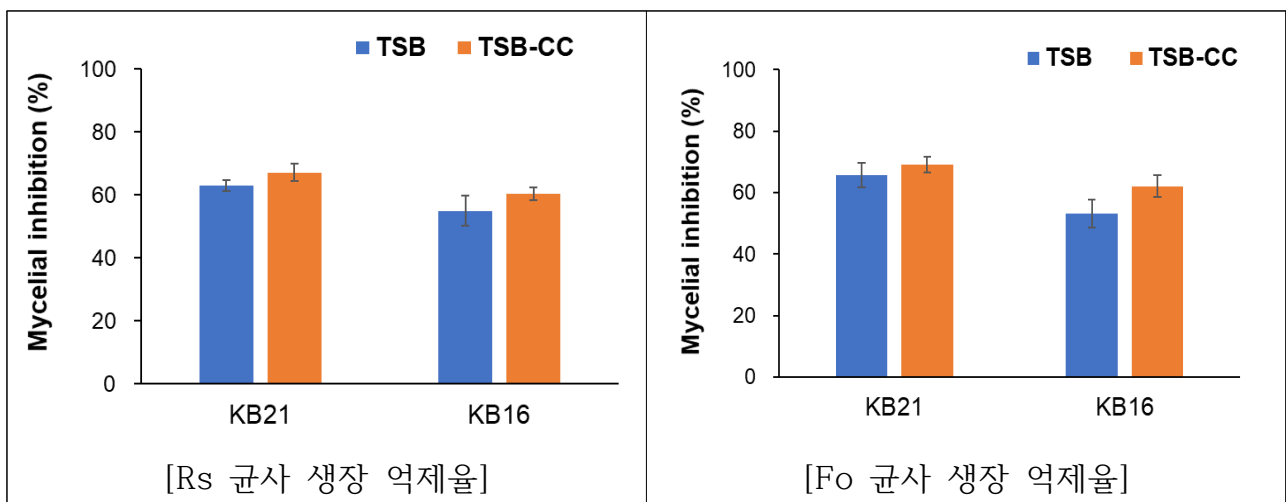


그림 9. 배양 기질 첨가에 의한 균주의 항균 활성능력.

Rs, *Rhizoctonia solani*; *Fo*, *Fusarium oxysporum*

CC 기질이 함유된 TSB 배지에서 5일 배양된 Bs KB21과 Pp KB16의 식물 병원성 곰팡이균에 대한 항진균 활성을 평가하였다 (그림 9). 병원균 균사체 생장 억제율(%)은 대조군 PDA의 Rs와 Fo 균사체 생장 대비 Bs KB21과 Pp KB16 배양액의 Rs/Fo 균사체 생장 억제를 측정하였다. 각 처리구 중에서 CC 함유 배양 조건의 균주 처리구에서 Rs/Fo 병원균의 균사 생장 억제 효과가 더 높았다. Rs 균사 생장 억제에서 CC 함유 배양 조건의 균주들은 4.1~5.3% 더 높은 항진균 활성을 나타냈으며, Fo 균사 생장 억제력에서는 3.5~8.8% 더 높았다.

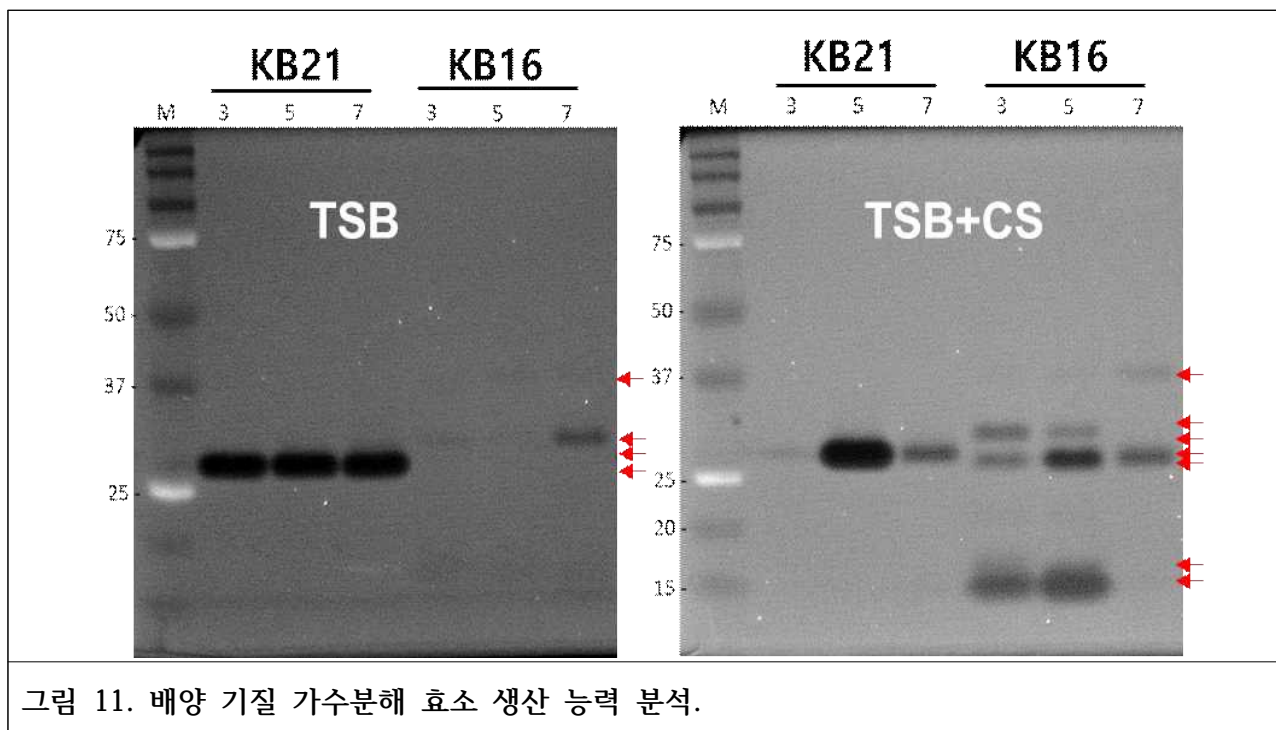
3) CS 기질에 의한 biosurfactant 생산 분석

CC 기질이 함유된 TSB 배지에서 Bs KB21과 Pp KB16는 생장 능력과 식물 병원성 곰팡이균에 대한 항진균 활성을 향상시키는 결과를 나타냈다. 각 배양액 내의 주요 생리활성 물질의 biosurfactant 유효성분을 분석하기 위해 TLC(thin layer chromatography) plate를 이용하여 분석하였다. 표준물질의 *Bacillus*의 항균 대사물질 중 cyclic lipopeptide(LP) 종류인 fengycin(CAS Number 102577-03-7), surfactin(CAS Number 24730-31-2), iturin A(CAS Number 52229-90-0) 등을 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다. TLC plate에 전개된 biosurfactant들은 우선 알려진 표준물질의 Rf 값과 비교해서 KB21 균주는 surfactin, iturin A, fengycin LP들과 그 외 biosurfactant들이 검출되었다. 하지만, KB16 균주는 KB21 균주와 다르게 surfactin LP외에는 다른 종류의 *Bacillus* LP는 검출되지 않았으며, LP 표준물질 외의 다수의 biosurfactant들이 검출되었다. 기질 함유 조건의 TSB 배양액 내에 생산된 biosurfactant들은 많은 종류의 물질들이 생산되었으며, 각 생산된 biosurfactant 생산 수준도 훨씬 높은 수준으로 검출되었다. KB21 균주에서 생산된 LP 중에서 CS 함유된 조건에서 surfactin, fengycin과 iturin A는 상당히 높은 수준으로 검출되었다. 특히, iturin과 fengycin LP는 2 또는 3 type의 homologue가 검출되어 TSB 배양 조건에서 생산되지 않았던 biosurfactant가 CS 기질 배양 조건에서는 LP homologue type이 증가하였다.

4) CS 기질의 가수분해 효소의 activity staining 분석

Bs KB21과 Pp KB16는 TSB 배지 생육상에서 CC 기질의 항진균 대사물질 생산 유도에 영향을 미쳤다. TSB 배양 조건에서 각 균주들의 기질 이용에 관여하는 가수 분해 효소의 생산 수준을 SDS-PAGE에서 분리하였다 (그림 11). TSB 배지와 기질 함유한 TSB 배지에서 7일 배양된 배양 상등액 내 조효소액을 SDS-PAGE gel에서 분리하여 가수분해 효소인 chitinase 생산의 전기영동 패턴을 조사하였다. 전기영동은 Bio-Rad Mini-PROTEAN 시스템(80 × 73 × 1.5 mm)을 이용하여 수행하였으며, chitinase의 activity staining은 0.01% glycolchitosan(G7753, Sigma-Aldrich, USA)이 포함된 10% polyacrylamide gel을 이용하여 수행하였다. 분리된 gel은 1%(v/v) Triton X-100 및 1% skim milk가 포함된

50mM sodium acetate buffer (pH 5.0)에서 37°C에서 반응시켰다. 0.01% Calcofluor White M2R(F3397, Sigma-Aldrich)이 포함된 500mM Tris-HCl (pH 8.9) 용액을 이용하여 염색 후 lysis zone을 확인하였다.



각 균주의 TSB 배지 내 0.1% CC 기질 함유 배양 조건은 surface tension 값과 biosurfactant 수준 및 패턴 검정에서 나타난 것과 같이 생육 과정에서 대사 물질 유도에 큰 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 기질 특이성에 의한 대사물질의 유도 생산과 화합물 비율 형성에 관련해서 생육 조건별 대사유도 가수분해 효소의 발현을 조사하였다(그림 12). 그 결과 KB21은 7일 동안 배양한 각 조건에서 CS 기질 분해에 관여하는 chitosanase는 SDS-PAGE gel에서 일정하게 생산되는 것을 확인하였으며, 0.1% CS가 함유된 경우 3일 배양까지 chitosanase 활성은 낮았다. 5일 배양에서 chitosanase 활성이 가장 높은 수준으로 증가하였으며, 7일부터는 다시 감소하였다. 또한 Pp KB16은 TSB 배양에서는 chitosanase 활성이 거의 없었지만, CS 기질이 함유된 경우에는 5 종류의 chitosanase 패턴을 나타내면서 그 활성은 증가하였다. 이러한 결과는 KB21 균주는 생육 과정에서 TSB 배지 내 영양원을 우선으로 이용하면서 대사 물질을 생산하였으며, 5일째 stationary phase 이후 영양원 고갈 시 CS 기질을 이용하여 대사 물질의 생산을 유도하였다. 또한 KB16은 TSB 배지 내 일반 영양원과 같이 CS 기질을 동시에 이용하는 영양 생리적인 특성을 나타내었다. 이러한 결과들은 두 균주 생육별 세포 밀도 등 생장 능력의 결과들을 뒷받침해 주는 결과이다. 따라서 본 연구에서는 기질 특이성 배양에 의한 미생물 생장 능력과 대사 유도체 생산 능력 등을 고려하여 나노리포좀 캡슐 제작을 위한 미생물로 Bs KB21을 대상으로 제형화하였다.

나. Bs KB21 유래 대사 유도체 제작 및 최적 혼합 조건별 물리·화학적 특성 평가

(1) 항진균 활성 증진을 위한 Bs KB21 유래 항진균성 대사 화합물 생산

TSB 배지 배양에 의한 각 균주들로부터 바이오폴리머를 추출하여 증진 혼합제 첨가에 의한 제형물을 제조하였다(그림 4). KB21과 KB16 균주의 배양 영양원에 의한 배양액의 상등액과 S2 균주의 고체 배양 배지로부터 회수율에서는 KB21이 가장 높았으며, 각 대사유도체 물질들을 고형화한 후 증진제들을 혼합한 후 최종적으로 제형물을 제작하였다.

(2) Bs KB21 유래 대사 유도체 화합물의 혼합 조건별 리포솜 캡슐(CCL) 제형화

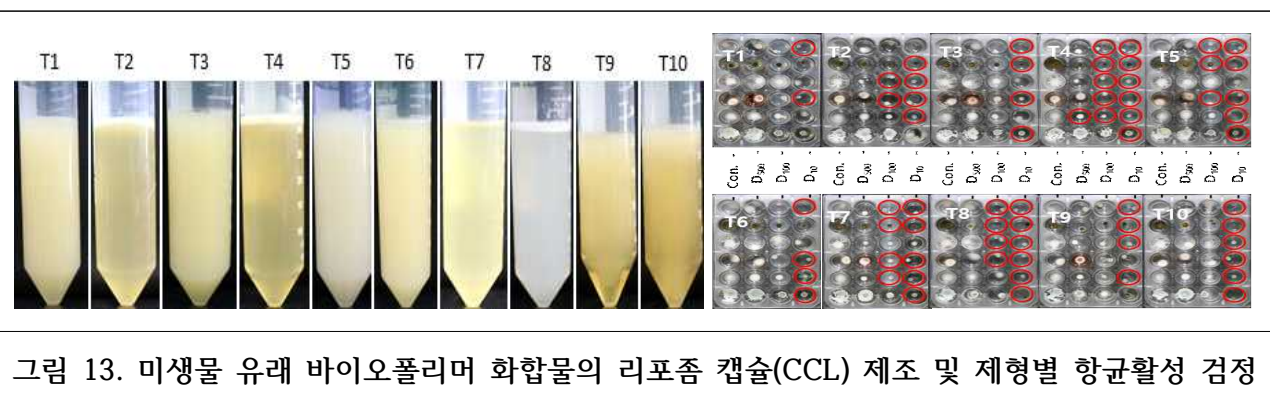


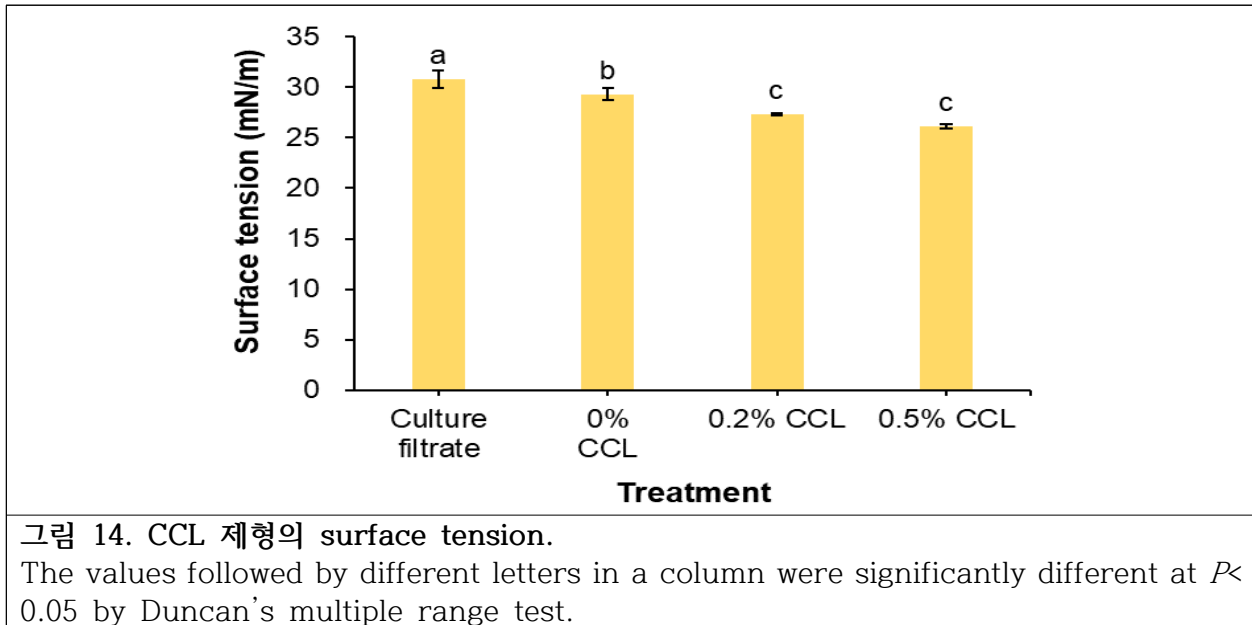
그림 13. 미생물 유래 바이오폴리머 화합물의 리포솜 캡슐(CCL) 제조 및 제형별 항균활성 검정

CS 기질 특이성에 의해 생산된 미생물 유래 대사 유도체를 포집하기 위해 리포솜을 이용하여 캡슐화하였다. 나노리포솜 캡슐화를 위한 blank 리포솜 제조를 위해, 레시틴을 ultrasonic bath를 사용하여 에탄올에 용해 시켰다. 이 과정에서 시스템의 40°C 온도 및 자기 교반을 유지하면서 레시틴을 완전히 분산시킨 후, 미생물 유래 대사 유도체 용액을 레시틴 상에 첨가하고 균일한 혼합물이 얻어질 때까지 교반하면서 리포솜에 유효 성분들을 포집하였다. 생성된 물질을 에탄올 중 레시틴 분산액과 혼합 과정 후, 형성된 대사 유도체가 로딩된 리포솜을 함유하는 최종 생산물은 에탄올 증발과 함께 구조적인 안정성 향상을 위한 합성을 위해 4°C에서 냉각 시켰다. 미생물 유래 대사 유도체가 로딩된 리포솜은 단층 리포솜으로 양친매성 지질의 혼합물로 둘러싸인 구형 리포솜으로 내부에 미생물 유래 대사 유도물질의 수용액을 포함하고 있지만, 구조적으로 안정성을 향상시키기 위해 CS로 외부 코팅을 하였다. 따라서 제조된 리포솜 현탁액을 동일한 부피의 CS 용액과 혼합하여 제조하였다. CS 용액을 제조하기 위해 CS powder를 아세트산(1% v/v)에 녹이고 25°C에서 16시간 동안 교반하여 1%(w/v) 용액을 제조하였다. 이어서, 미생물 유래 대사 유도물질이 로딩된 리포솜을 실온에서 30분 동안 교반하면서 제조된 CS 용액에 첨가한 다음 4°C에서 보관하였다. 최종적으로 제조된 미생물 유래 대사 유도물질을 포집한 리포솜을 CS 폴리머로 코팅하여 캡슐화(CCL)한 제형을 제조하였다(그림 13). 제조 과정의 용액 pH 값은 NaOH(1M) 및 HCl(1M)로 조정하였다. 미생물 유래 바이오폴리머의 함유 및 제형 형태별로 10종의 시제품을 제작하여 식물 병원균에 대한 항균활성 검정을 수행하였다. 시

제품 제형을 200배 농도로 처리한 각 처리구에서 식물 병원균의 군사 생육을 가장 강하게 억제하는 제형과 미생물을 선발한 후 본 연구과제에서 사용하였다.

(3) CCL 캡슐 제형의 바이오폴리머 혼합 조건별 대사유도체 함량 분석

1) Bs KB21 유래 바이오폴리머 혼합 조건별 CCL 제형의 surface tension 분석

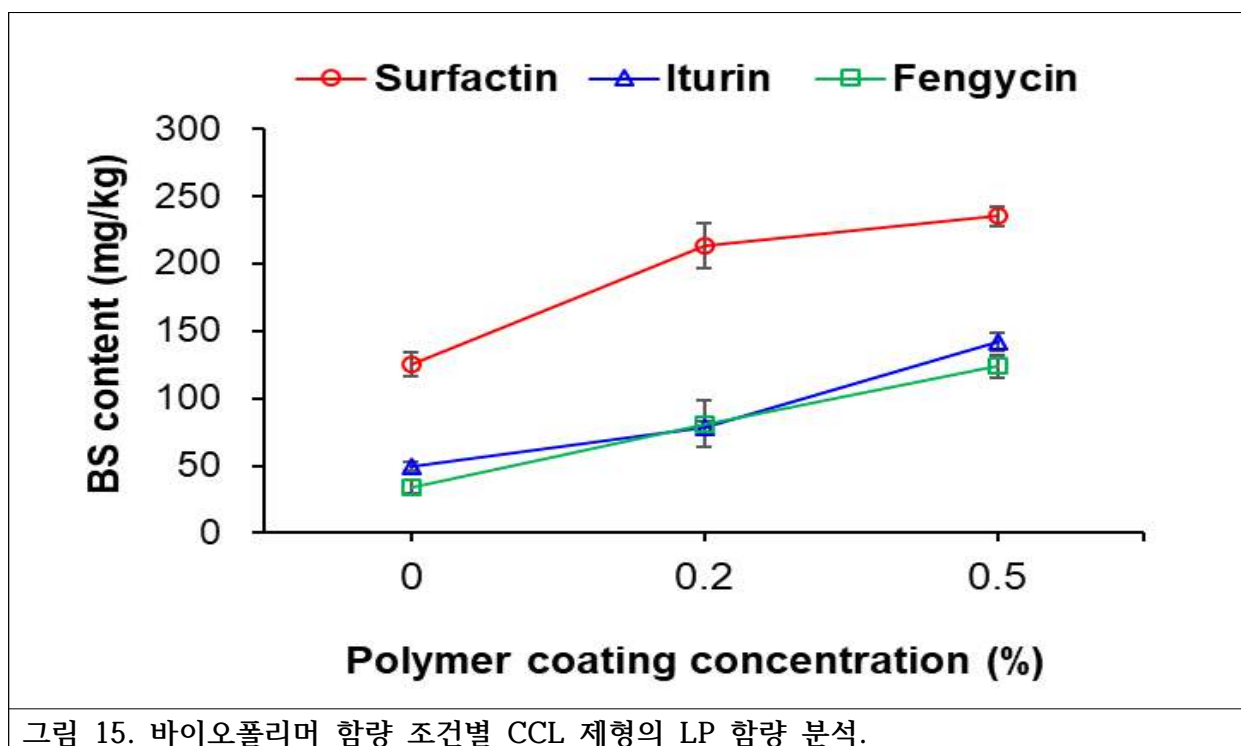


제조된 CCL 제형의 항진균성 대사 유도 물질의 함량 분석은 surface tension(mN/m) 값의 변화와 LC-MS/MS에 의해 Bacillus lipopeptide(LP) 함량을 분석하였다. 그림 14에 나타난 바와 같이, surface tension은 KB21 균주의 배양 여액(culture filtrate) 33.0 mN/m 수준에 비해 0.5% 농도의 CS로 코팅된 CCL(0.5% CCL) 제형은 26.2 mN/m으로 낮았다. 일정한 수준의 레시틴이 함유된 리포솜에 CS 코팅 농도가 증가할수록 CCL 제형의 surface tension은 감소하였다. 0.2%와 0.5% 농도의 CS로 코팅된 CCL은 배양 여액(culture filtrate)과 CS가 코팅되지 않은 리포솜(0% CCL)에 비해 현저히 감소하였다. 이러한 감소는 LP를 포집하고 있는 리포솜 사이에 CS가 코팅되어 나노리포솜의 형성을 나타낸 결과이며, 이는 캡슐화된 나노리포솜을 성공적으로 형성하기 위한 완전한 혼성화를 나타낸다. 또한 이것은 CS 코팅이 리포솜 내에서 분자의 구조 전이로 인해 수소 결합과 소수성 및 정전기적 상호 작용과 같은 분자 내 또는 분자간 상호 작용의 변화를 일으킨 것을 확인할 수 있었다.

2) 바이오폴리머 혼합 조건별 CCL 제형의 대사 유도체의 유효성분 함량 분석

Bs KB21은 대사 산물로서 surfactin, iturin, fengycin LP들을 생산하여 강력한 항진균 활성을 나타낸다. 따라서 CCL 제형에 함유된 KB21의 항진균성 대사 유도물질인 LP의 함량을 분석하기 위해 LC-MS/MS를 이용하였다(그림 15). Biosurfactant LP의 표준용액은

Sigma-Aldrich에서 구입하였다: fengycin (CAS Number 102577-03-7), surfactin (CAS Number 24730-31-2), iturin A (CAS Number 52229-90-0). 각 분석값의 검출농도에 의한 상대적인 정량은 다음과 같이 수행하였다. 구입한 표준용액을 농도별로 희석하여 LC-MS/MS로 측정된 후 얻어진 크로마토그램상의 peak 면적을 검량선과 비교하여 정량하였다. LP 정량 결과, 리포솜 내의 인지질 농도와 상관없이 0~0.5% 농도 범위에서 CS 코팅에 의해 평균 LP 함량이 증가하였다(그림 15). 0.5% CCL의 경우, LP 수준은 surfactin, iturin A, fengycin LP를 포함하여 총 500.8 mg/kg이었다. 제작된 CCL 제형에서 분석된 각각의 LP 총 평균 함량은 surfactin 125.2-235.4 mg/kg, iturin A LP 49.4-141.9 mg/kg, fengycin LP 34.2-123.6 mg/kg를 함유하고 있었으며, surfactin LP가 모든 CCL 제형의 LP 함량 중 가장 높았다.



(4) CCL 캡슐 제형의 바이오폴리머 혼합 조건별 물리·화학적 및 구조적 특성 분석

나노리포솜 캡슐 제형 CCL의 DLS 분석 결과와 캡슐화 효율화를 표 1에서 정리하였다. 입도 분석기에 의한 CCL 제형의 입자 크기 분포 분석 결과, 0.5% CCL에서 Z-average는 121.67 ± 2.23 nm이었고(그림 17), PDI는 0.25 ± 0.02 , 제타 전위 값은 -10.47 ± 0.44 mV를 나타냈다(표 1). 0.5% CCL의 Z-average 값은 코팅되지 않은 CS(0% CCL)에 비해 증가하였다. CCL 제형의 경우 CS 코팅된 리포솜 제형의 PDI는 0.29 미만이지만, 코팅되지 않은 샘플은 0.38 이상으로 PDI 값이 CS가 코팅되지 않은 리포솜보다 낮았다. 따라서 본 연구의 결과에서 주목할 만한 특성으로 나노리포솜 캡슐 제형은 CS 코팅이 증가할수록 제타 전위의 절대값 감소에도 불구하고 나노리포솜 캡슐의 안정성과 monomodal 입자 크기 분포를 나타

내는 PDI를 나타낸 것이다. 본 연구 개발은 CS 코팅층을 추가할수록 제타 전위가 일정한 수준으로 증가하였다(표 1).

표 1. 0.5% CCL 제형의 평균 직경, polydispersity index, 제타 전위

| Treatment | Z-average (nm) | Polydispersity index | Zeta potential (mV) |
|-----------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| Blank liposomes | 72.83 ± 4.72^c | 0.22 ± 0.04^d | -44.10 ± 2.50^c |
| 0% CCL | 83.45 ± 3.21^b | 0.38 ± 0.02^c | -27.30 ± 1.48^b |
| 0.2% CCL | 118.47 ± 6.38^a | 0.29 ± 0.03^b | -11.77 ± 0.71^a |
| 0.5% CCL | 121.67 ± 2.23^a | 0.25 ± 0.02^a | -10.47 ± 0.44^a |

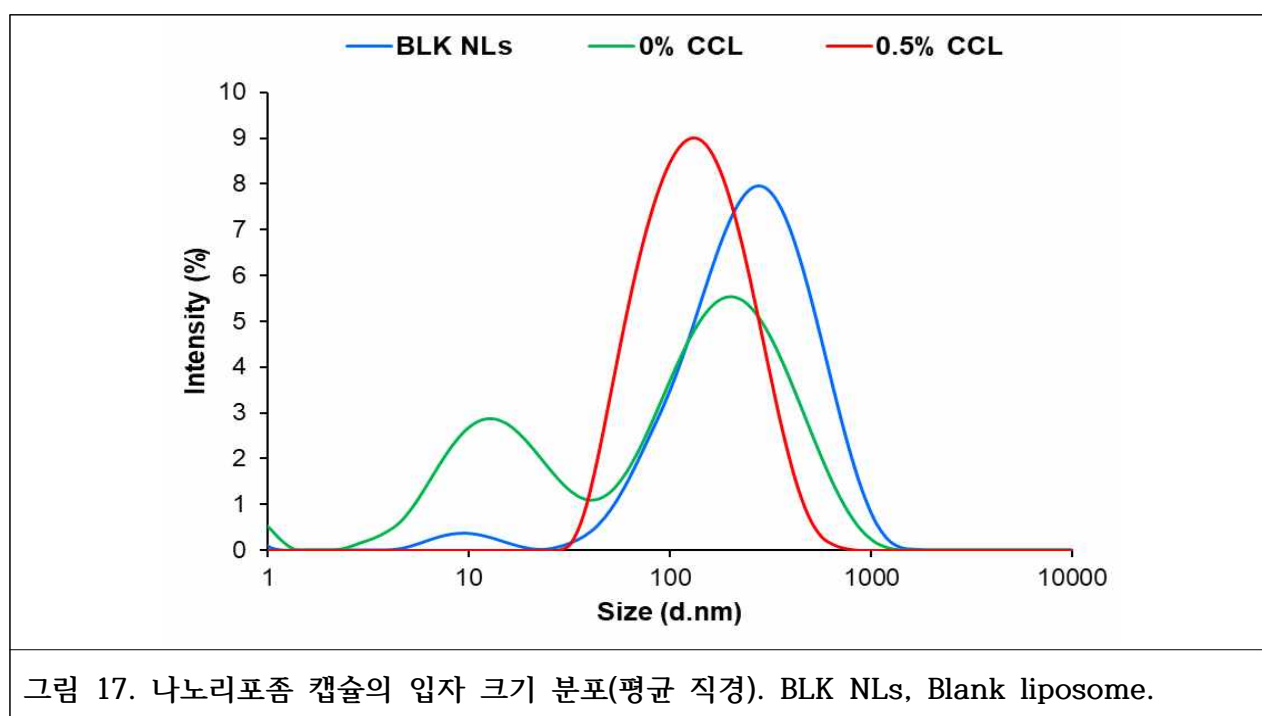


그림 17. 나노리포좀 캡슐의 입자 크기 분포(평균 직경). BLK NLs, Blank liposome.

2) 푸리에 변환 적외선 분광 광도(FTIR spectroscopy)에 의한 CCL 제형의 유효성분 결합반응 분석

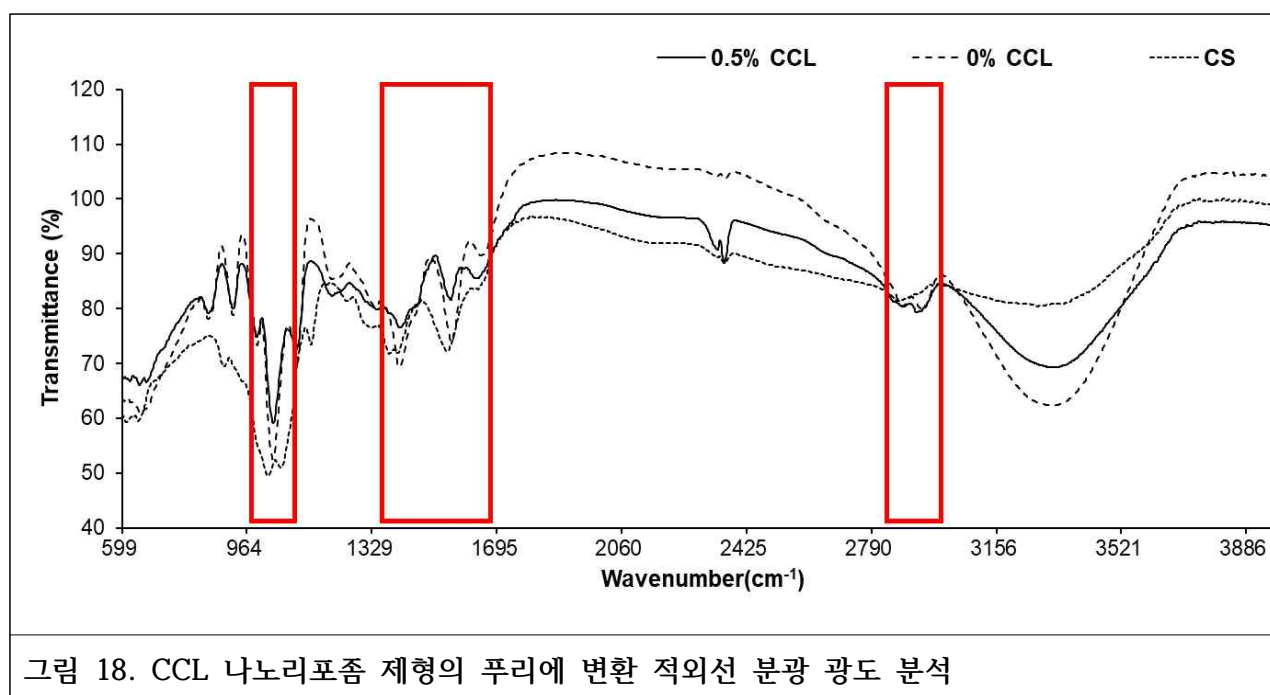


그림 18. CCL 나노리포좀 제형의 푸리에 변환 적외선 분광 광도 분석

FT-IR 분광법을 사용하여 구성 요소와 나노복합체의 물리 화학적 구성 및 구조적 변화 특성을 분석하였다(그림 18). 결과는 Bs KB21의 LP와 로딩된 리포좀, 그리고 CS에 의해 코팅된 최종적인 CCL 제형을 비교하였을 때 고유 특성의 피크 변화가 확인되었고, 공정 중 각 물질들간 물리 화학-구조적 변화가 있었음을 확인하였다. 따라서 FTIR의 분석 결과는 최종적으로 LP가 로딩된 지질 리포좀에 CS 코팅이 효율적으로 캡슐화 되었음을 보여준다.

다. CCL 나노리포좀 캡슐의 항진균 활성 평가

(1) 항진균 활성 증진을 위한 최적 혼합 조건별 방제효과

1) CCL 나노리포좀 제형의 식물 병원균 곰팡이 균사 생육 억제 검정

0.5% CCL 나노리포좀 제형은 벼 도열병 병원균 *M. oryzae*의 균사 성장을 대조구 대비 통계적으로 유의하게 억제하였다(그림 19). 벼 도열병의 병원균 생장억제 검정에서 TSB 배양된 Bs KB21 세포 처리구가 병원균 균사 성장 억제 효과에서 가장 높았고, 0.5% CCL 나노리포좀 제형 처리도 70.8% 이상으로 *M. oryzae*의 균사 성장을 강력하게 억제하였다. 0.5% CCL 제형 처리의 균사 생장 억제 효과는 대조군에 비해 66.2% 더 높았으며, 0% CCL 제형, KB21 배양 여액 처리보다 13~15% 더 높은 억제 효과를 나타냈으며, 통계적으로도 유의한 차이($P < 0.05$)를 나타냈다. 0.5% CCL 나노리포좀 제형의 균사 생장 억제효과와 비교해서 각 제형물 요소인 0.1% CS, 리포좀 현탁액, 배양 배지액에서는 항균활성 효과가

나타나지 않았다.

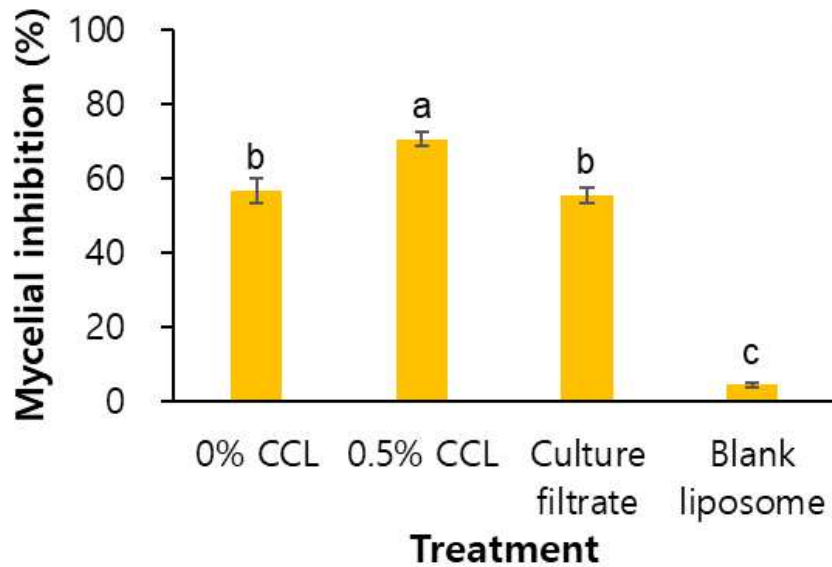


그림 19. CCL 나노리포솜 제형의 벼 도열병 병원균 생장 억제효과.

The values followed by different letters in a column were significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

2) CCL 나노리포솜 제형의 식물 병원균 곰팡이 포자 발아 억제 검정

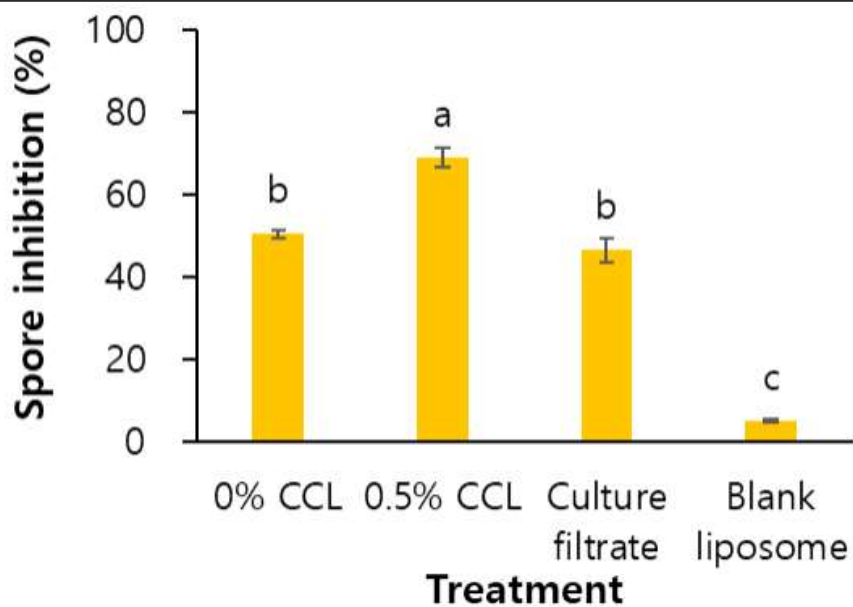


그림 20. CCL 나노리포솜 제형의 벼 도열병 병원균 포자 발아 억제효과.

The values followed by different letters in a column were significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

0.5% CCL은 대조군에 비해 포자 발아에 의한 균사 성장을 통계적으로 유의하게 억제하였다(그림 20). 접종 후 18시간 후, 무처리 대조군의 발아율은 PDB 배지에서 91.7%였다. 0%, 0.2%, 0.5% 농도별 CCL 나노리포좀 제형의 포자 발아율은 무처리 대비 최대 68.9%에서 50.4%를 나타냈다. 0.5% CCL은 배양 여액 처리구보다도 22.3% 더 높은 포자 발아 억제 효과를 나타냈으며, 무처리 대비 63.7% 높게 억제하였다. 각 제형 농도별 포자발아에 의한 균사억제효과도 그림 18b에 나타난 것처럼, 0.5% 처리구에서는 다른 처리구보다 포자 생육을 강하게 억제하는 것을 확인하였다.

(2) CCL 나노리포좀 제형 시제품의 벼 도열병에 대한 방제 효과 검정

1) 시제품의 벼 도열병 방제 효과(실내 검정)

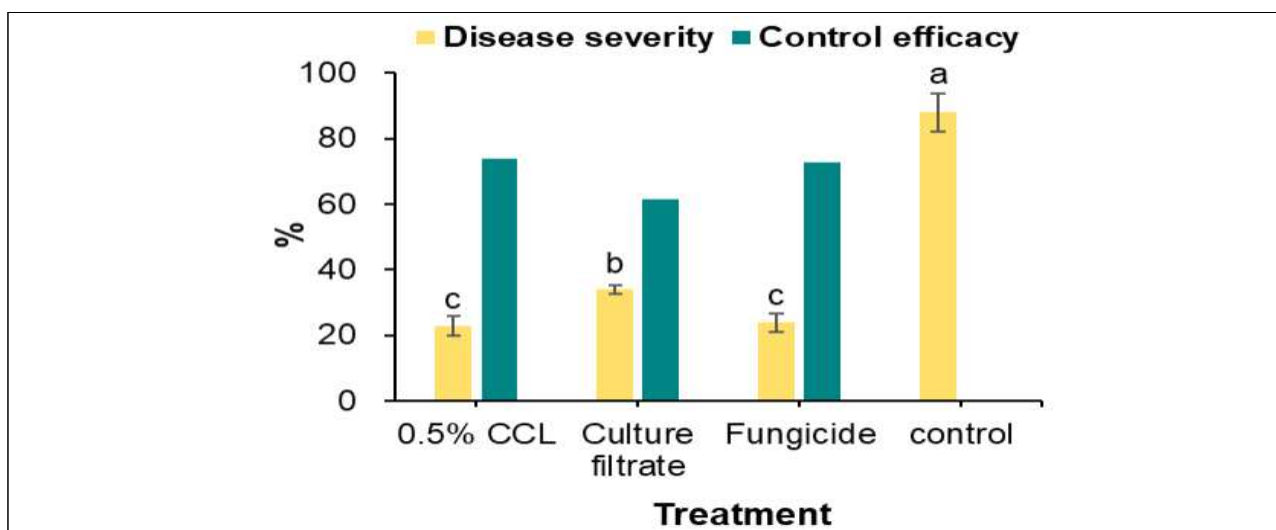


그림 23. 벼 잎에서 벼 도열병에 대한 나노리포좀 시제품의 방제효과.

The values followed by different letters in a column were significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

*M. oryzae*에 의해 발생하는 벼 도열병에 대한 CCL 나노리포좀 제형의 방제효과 검정은 온실에서 재배된 벼 잎에서 수행하였다(그림 23). 무처리구 벼 잎에 *M. oryzae* 포자를 접종한 지 24시간 후 핀헤드 크기(발병도(0-5), 1) 또는 갈색 반점(발병도, 2)이 나타났다. 5일 후에 5mm 이상 진전되면서 전형적인 도열병 병반이 나타났다. 접종 6일 후 무처리 대조군의 발병도는 4.4였으며, 5% CCL과 아족시스트로빈·프로피코나졸 농약 처리와 달리 무처리구에서의 병 발생율은 88.3%로 가장 높은 발병을 나타냈다. 5% CCL 나노리포좀 캡슐 제형으로 처리한 벼 잎은 23.1%의 발병율을 나타냈고, 이는 24% 발병한 살진균제 대조군과 통계적으로 유의하게 유사한 발병율을 나타냈다. 또한 벼 도열병에 대한 5% CCL 처리구의 병 발생율은 Bs KB21 배양 여액 처리구보다 34.5% 더 낮았으며, 5% CCL과 KB21 배양 여액 처리구의 방제효과는 각각 73.9%와 61.4%로 높은 방제효율을 나타냈다.

2) 시제품의 처리농도별 벼 도열병 방제 효과(온실 검정)

본 연구에서 사용된 벼(*Oryza sativa* L. cv. 호평)는 2%(w/v) 차아염소산나트륨 용액에서 10분 동안으로 표면 살균한 후 사용하였다. 소독한 종자는 온실내에서 플라스틱 포트에 파종하고 $28\pm5^{\circ}\text{C}$ 에서 발아시키면서 유묘를 관리하였다.

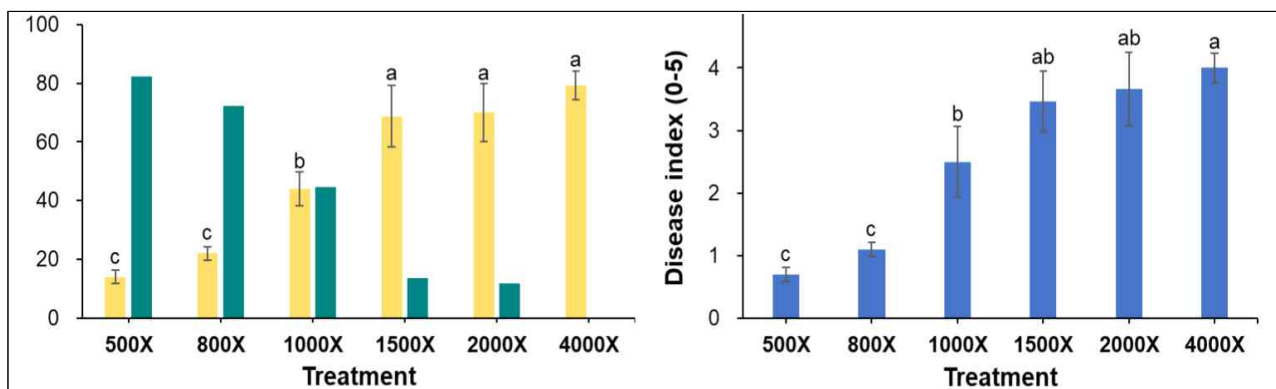


그림 24. 나노리포좀 캡슐 시제품의 살포농도별 벼 도열병 방제효과(온실 검정).

The values followed by different letters in a column were significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

시제품의 살포 농도를 확립하기 위해 500배~4000배의 희석범위에서 벼 도열병에 대한 방제효과를 조사하였다(그림 24). 처리구에서 가장 높은 농도인 500배로 살포할 경우 도열병은 14%만 발생하였고 83% 이상의 방제효과를 나타냈다. 또한 800배 희석농도 살포시에는 도열병은 22% 발생하였으며, 72% 이상의 높은 방제 효과를 나타냈다. 하지만 1000배~4000배 희석 처리구에서는 도열병은 44% 이상 발생하였으며, 45% 이하의 방제효과를 나타냈다. 위의 결과에서 벼 도열병에 대한 나노리포좀 시제품 제형의 살포농도는 500배~800배에서 60% 이상의 방제효과를 나타냈기 때문에 온실 및 포장 검정을 위한 살포농도로 결정하였다.

3) 처리농도별 시제품의 벼 잎도열병 방제 효과(밭못자리 포장 검정)

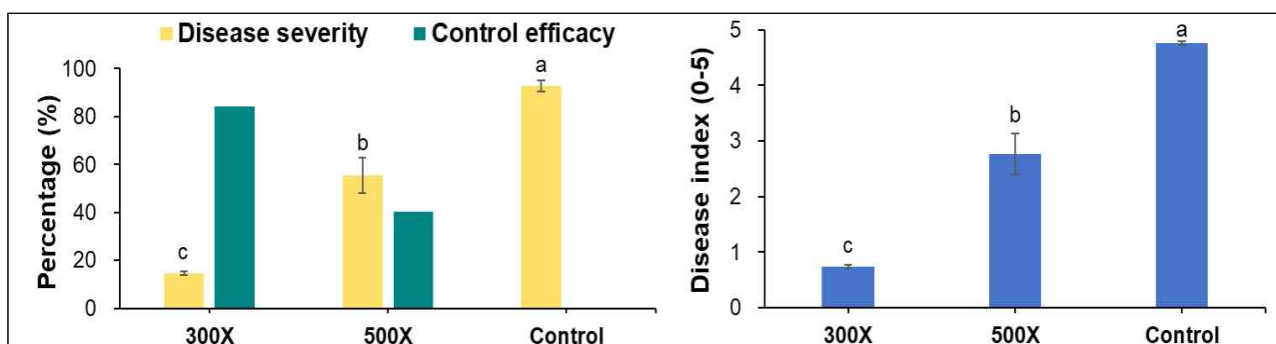


그림 25. 벼 잎도열병에 대한 시제품의 살포농도별 포장 방제효과(밭못자리 검정).

The values followed by different letters in a column were significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

본 연구에서 사용된 벼(*Oryza sativa* L. cv. 호평)는 2%(w/v) 차아염소산나트륨 용액에서 10분 동안으로 표면 살균한 후 사용하였다. 파종 3주후에 시제품을 농도별로 살포하였으며, 병 발생은 자연 발생을 유도하였다. 시제품 살포 7일 후부터 잎도열병 이병도에 의한 발병율과 함께 방제효과를 조사하였다(그림 25). 시제품 제형의 발못자리 포장 검정 결과, 300배 희석 살포 처리구는 14.7% 병발생으로 84.2%의 높은 방제효과를 나타냈다. 또한 시제품의 표준 살포 농도인 500배 처리구에서는 55.3% 발생하였으며, 40% 이상의 방제효과를 나타냈다.

4) 시제품의 벼 잎도열병 방제 효과(포장 검정)

나노리포좀 캡슐화에 의한 시제품을 벼 재배지 포장에서 벼 잎도열병에 대한 방제효과를 검정하였다.



그림 26. 나노리포좀 캡슐 시제품의 벼 도열병 방제효과 검정 포장(2021년~2022년 전남 강진).

시제품은 500배와 1000배 농도로 7일 간격으로 3회 살포하였으며, 최종 살포 15일 후에 벼 잎도열병 발병율과 포장 방제효과를 조사하였다(그림 27). 시제품의 벼 잎도열병 방제 효과 검정을 위해 사용된 대조구는 미생물 배양 여액(50배) 대조구, 농약(아족시스트로빈·프로피코나졸) 대조구, 무처리 대조구와 비교하면서 평가하였다.

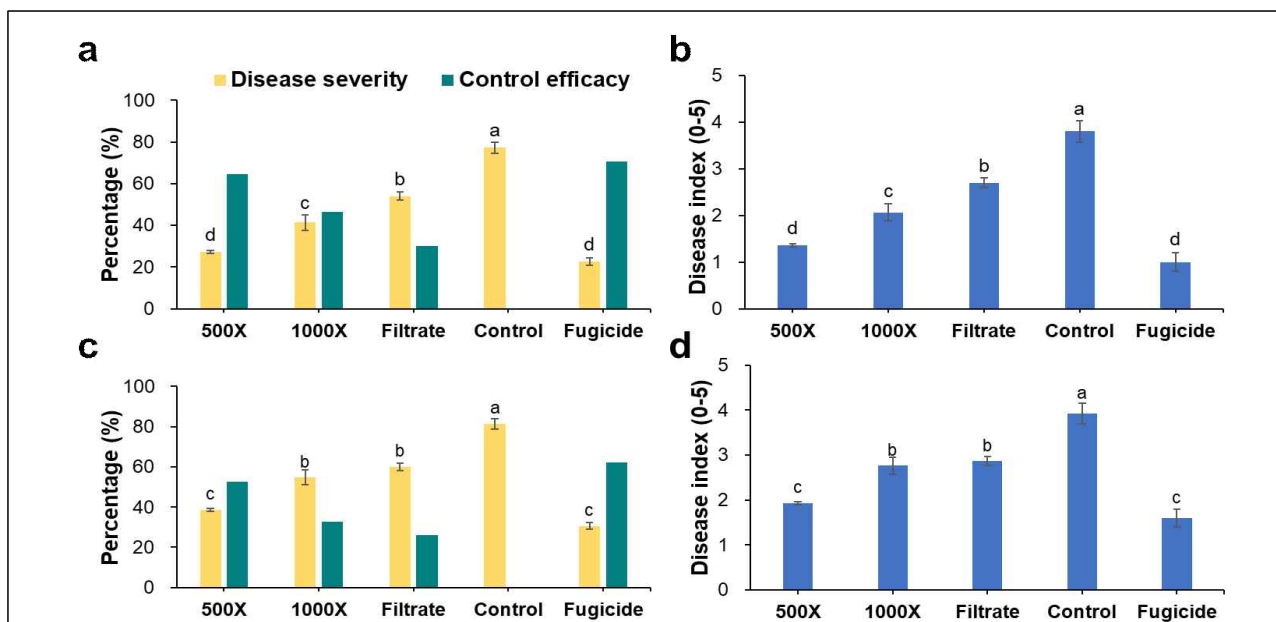


그림 27. 벼 잎도열병에 대한 나노리포좀 캡슐 시제품의 살포농도별 포장 방제효과(포장 검정). 시험포장 1의 벼 잎도열병 발생을 및 방제효과(a)와 발병지수(b). 시험포장 2의 벼 잎도열병 발생을 및 방제효과(c)와 발병지수(d). The values followed by different letters in a column were significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

벼 잎도열병에 대한 약효 평가는 최소 처리구당 30주를 대상으로 3 반복으로 병반면적을 조사하였으며, 조사주수에 대한 병반면적율의 총합에 대한 발병율로 표기하였다. 시험포장 1과 시험포장 2의 무처리 대조구에서 발생한 벼 잎도열병은 각각 평균 77%와 86%로 시제품의 약효 평가를 위해 충분하였다. 최종 처리 후 무처리구에서는 벼 잎도열병에 의해 하위엽 2~3매가 고사되었고 보통 한 잎에 5~6개 정도의 대형 병반이 산재하였다. 각 시험포장에서 시제품 500배로 처리한 구에서 벼 잎도열병은 27%~38% 발생하였으며, 1000배 농도로 처리한 구에는 41%~54% 발생하였다. 시험포장 1과 시험포장 2에서의 시제품의 벼 잎도열병에 대한 방제 효과는 500배 처리구에서는 65%~53%를 나타냈다. 또한 1000배 농도 처리구에서는 평균적으로 각각 47%와 33% 이상 나타냈다. 시제품 500배 처리구에서 벼 잎도열병 증상은 벼 하위엽에서 대형 병반은 2개 이하 또는 소형 병반이 10개 이내 발생하였으며, 1000배 처리구에서는 평균적으로 하위엽에 대형 병반 2~5개 또는 대형 병반 주위에 소형 병반이 40개 이하로 산재되어 있었거나, 하위엽 1~2매가 병반으로 거의 덮히거나 대형 병반이 주로 하엽에 산재되어 있었다. 본 연구에서 개발한 시제품(타지마)은 2021년부터 2022년까지 실내 검정을 통한 온실 및 포장 검정을 한 결과, 평균 50% 이상의 방제 효과를 나타냈다. 따라서 위의 결과들을 통해서 Bs KB21 유래 나노리포좀 캡슐 시제품은 벼 잎도열병에 대해 방제 가능한 제품임을 충분한 검정을 통해서 평가 완료하였다.

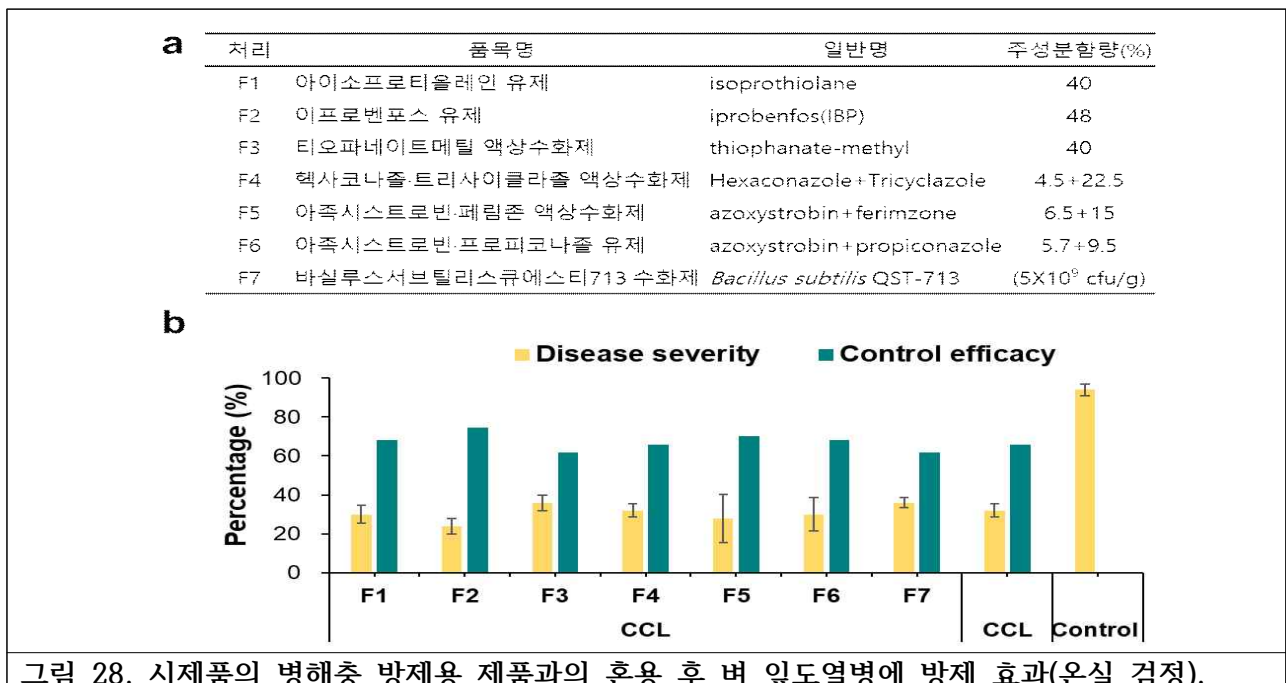
라. 시제품의 병해충 방제 스펙트럼 검정 및 사용지침서 작성

(1) 시제품의 병해충 방제용 제품과의 혼용 가능성 검토

시험에 사용한 벼 도열병 방제용 합성농약과 생물농약 7종을 대상으로 시제품과 혼용한 후 벼에 살포한 후 벼 도열병에 대한 방제 효과를 조사하였다(그림 28). 시험 약제들의 제형은 수화제와 유제를 대상으로 하였고, 살포 희석농도는 추천농도로 혼용하였으며, 유효성분과 목록은 그림 31a와 같다. 시제품과 혼용한 각 처리구들은 본 연구에서 사용한 벼 온실 유묘 검정법에 의해 처리한 후 발병도에 의한 발병율로 방제 효과를 조사하였다. 합성농약과 생물농약을 혼용한 처리구에서 벼 잎도열병에 대한 유묘 검정 결과, 합성농약 6종과 생물농약 1종은 무처리 대비 60% 이상의 방제 효과를 나타냈다(그림 31b). 시제품 단독 처리보다 방제 효과가 더 높은 제품은 4종이 있었으며, 나머지 3종 약제는 시제품과 혼용할 경우 벼 잎도열병에 대한 약효가 감소되는 것을 확인하였다. 시제품과 혼용한 미생물농약은 벼 잎도열병 방제에서 일반 합성 농약의 방제효과보다 낮아지는 결과를 얻었지만, 50% 이상의 방제 효과를 나타냈다. 시험 약제 목록 중에서 벼 잎도열병 방제 약제로 등록된 약제와 혼용하여 살포할 경우 벼에 나타나는 약해 여부를 검정하였다. 따라서 위의 결과를 통해서 시제품과 벼 잎도열병에 대해 등록되어 있는 약제들과 혼용하여 살포하는 방법도 가능한 것을 확인하였다.

(2) 시제품의 벼 깨씨무늬병 방제 적용 확대 검정(포장 검정)

나노리포솜 캡슐 시제품의 병해충 방제를 위한 적용 확대 검정을 위해 벼 재배지 포장에서 벼 깨씨무늬병을 대상으로 방제효과를 검정하였다.



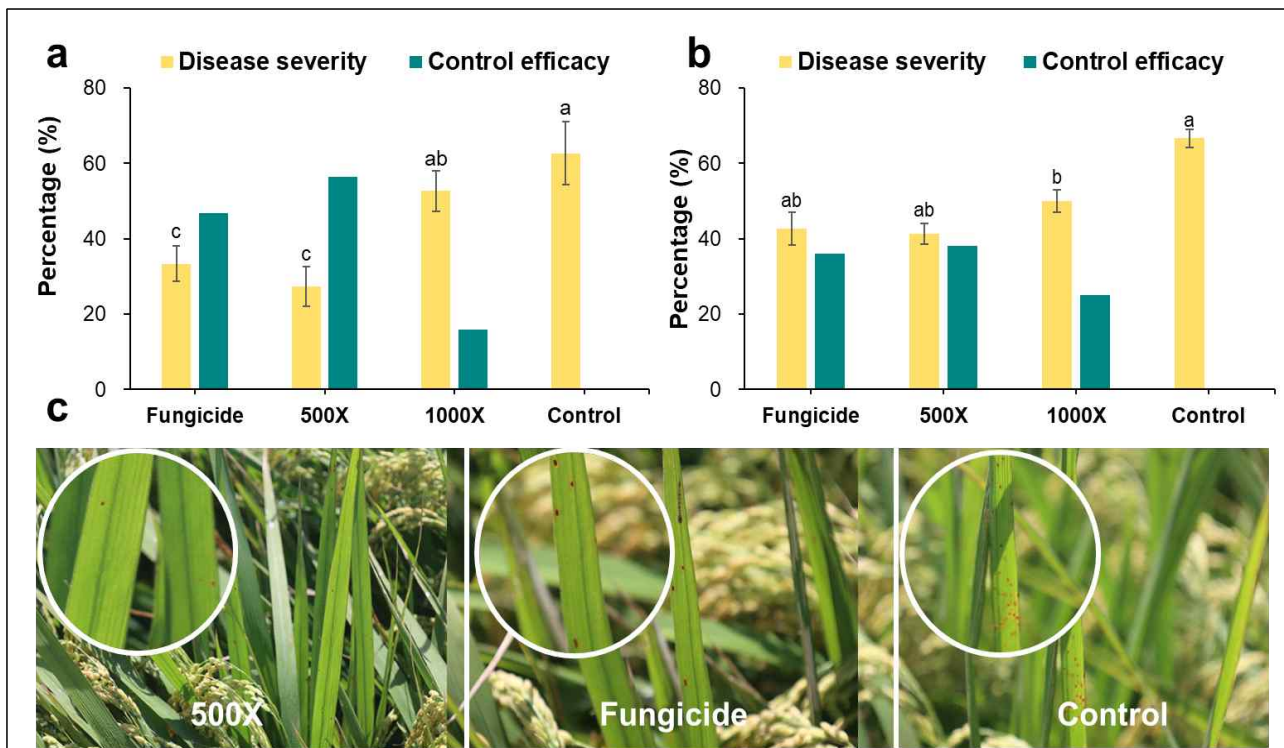


그림 29. 벼 깨씨무늬병에 대한 나노리포좀 캡슐 시제품의 살포농도별 포장 방제효과(포장 검정). 시험포장 1의 벼 깨씨무늬병 발생을 및 방제효과(a). 시험포장 2의 벼 깨씨무늬병 발생을 및 방제효과(b). 각 처리구별 벼 깨씨무늬병 발생 및 포장사진(c). 500X, 500배 농도 처리구; 1000X, 1000배 농도 처리구; Control, 무처리 대조구; Fungicide, 농약(아족시스트로빈·프로피코나졸) 대조구. The values followed by different letters in a column were significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

시험포장 1과 시험포장 2의 무처리 대조구에서 발생한 벼 깨씨무늬병은 각각 평균 62.7%와 66.7%로 시제품의 약효 평가를 위해 충분하였다. 무처리구에서 벼 깨씨무늬병은 묘령이 증가할수록 병반면적율이 증가하였으며, 출수기 이전까지는 벼의 하엽에 주로 발생하였다. 벼 깨씨무늬병은 수확기경에는 지엽에 이르기까지 다수 나타났다. 각 처리구 중 시제품 500배 처리구에서 벼 깨씨무늬병은 27%~41% 발생하였으며, 무처리 대비 방제효과는 56%~38%를 나타냈다. 시제품 1000배 농도 처리구에서는 각 포장에서 벼 깨씨무늬병은 53%~50% 발생하였으며, 50% 이하의 방제효과를 나타냈다. 또한 농약 대조구의 각 포장에서는 벼 깨씨무늬병에 대해 33%~43% 발생하였으며, 50% 이하의 방제효과를 나타냈다. 따라서 위의 결과들을 통해서 Bs KB21 유래 나노리포좀 캡슐 시제품의 벼 깨씨무늬병에 대해 적용 확대 가능성을 포장에서 검정한 결과 500배 처리구에서 50% 이상의 방제효과를 나타내었으며, 벼 잎도열병과 깨씨무늬병에 대한 동시 복합적인 병 방제 가능성을 충분한 검정을 통해서 평가 확인하였다.

(3) 시제품의 벼 잎도열병 방제를 위한 사용지침서 작성

벼 생육기간 동안 발생하는 병해충 발생 및 개발된 시제품을 이용한 벼 잎도열병 방제를 위한 살포시기를 작성하였다(그림 30). 벼 병해충 발생은 본 과제 수행 중 발생한 주요 병해

충 발생을 조사한 결과를 근거로 작성하였으며, 벼 잎도열병 방제를 위한 시제품의 살포시기는 화살표로 표기하였다. 시제품의 사용 방법은 모내기 이후 출수전 또는 벼 잎도열병 발생 전에 500배 권장농도로 7~10일 간격으로 2~3회 살포하면 50% 이상의 방제 효과를 얻을 수 있다. 위의 방법에 의한 시제품의 살포 방법의 적용은 벼 잎도열병 외에 본 연구에서 검정한 벼 깨씨무늬병에 대한 발생 밀도도 감소시킬 수 있다. 또한 시제품 사용에 의한 벼 병해충에 대한 종합적인 관리를 위해서 본 연구과제에서 제시된 합성농약에 준하여 혼용 처리가 가능하며, 농약 사용에 의한 벼 잎도열병 방제에 대한 방제효과를 향상시킬 수 있다.

| 기간 | 4월 | | 5월 | | 6월 | | 7월 | | 8월 | |
|---------|---|---|---|---|---|--|---|---|----|--|
| 생육 단계 | 볍씨소독 | 파종기 | 육묘기 | 이앙기 | 분얼기 | 출수기 | 등숙기 | 수확기 | | |
| |  |  |  |  |  |  |  |  | | |
| 병해충 | 키다리병 | | | | 잎도열병 잎집무늬마름병 | | 도열병 흰잎마름병 세균벼알마름병 | | | |
| 발생 | | | 모잘록병 물바구미 | | 이화명나방 멸강나방 | | | | | |
| 방제 | | | | | | ↑ ↑ ↑ | | | | |
| 벼 잎도열병 | 살포 시기 | 출수기 전 또는 발병 초 | | | | | | | | |
| | 살포 농도 | 500배 | | | | | | | | |
| | 살포 회수 | 2회 또는 3회 | | | | | | | | |
| 방제 스펙트럼 | 혼용 살포 | 벼 도열병 등록 농약 또는 생물 농약 등 권장 살포 방법으로 혼용 가능 | | | | | | | | |
| | 대상 병해 | 벼 잎도열병, 벼 깨씨무늬병, 딸기 잣빛곰팡이병, 고추 탄저병 | | | | | | | | |

그림 30. 벼 잎도열병 방제를 위한 시제품 사용지침서 작성

그림 30. 벼 잎도열병 방제를 위한 시제품 사용지침서 작성

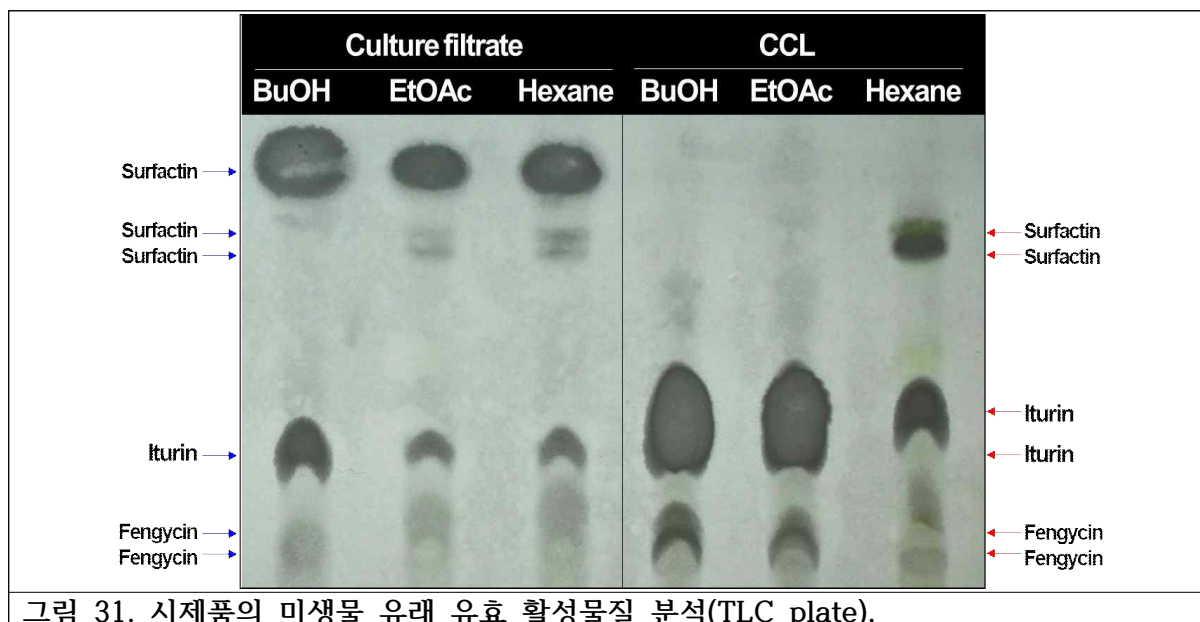
마. 나노리포좀 캡슐 제형 화합물의 유효성분 표준 분석법 개발 및 적용

(1) 시제품의 미생물 유래 활성물질 유효성분 탐색 및 분석

1) 대량 생산 표준화를 통한 제품 안정성과 품질 QC를 위한 유효 성분 분석(TLC 전개법)

기질 특이성 배양에 의한 KB 21 균주의 상등액과 이를 이용한 나노리포좀 시제품에 함유되어 있는 미생물 유래 활성물질의 유효성분을 탐색하기 위해 TLC plate를 사용하여 추출물을 전개시켰다. KB 21 균주의 항진균에 관련된 활성물질의 주요 유효성분은 surfactin, iturin, fengycin 등의 Bacillus lipopeptide(LP)로 확인되었다(그림 31). 시제품에서 유효물질을 추출하여 분리한 결과 BuOH와 EtOAc 추출물은 iturin과 fengycin LP가 높은 수준의 양으로 검출되었으며, Hexane 추출물은 surfactin, iturin, fengycin LP가 검출되었으나 검출량은 다소 감소하였다. KB21 유래 대사유도체 물질을 이용한 시제품은 제조 과정에서

surfactin 함량은 감소하였지만, 항진균 활성이 강력한 iturin과 fengycin의 함량은 증가한 것을 TLC 분석을 통해 확인하였다. 따라서 KB21을 이용한 나노리포좀 캡슐 제형 과정에서 유효성분의 표준 분석법으로 TLC plate를 이용한 biosurfactant LP 검출 방법을 적용하였다. 또한 위의 분석 방법을 적용하여 대량 생산 표준화를 위한 안정성과 품질 QC 검사를 통해 제품 보안을 수행하였다.



2) 시제품 대량 생산 표준화에 의한 유효 성분 함량 분석(LC-MS/MS)

시제품의 Bacillus LP의 검출값은 iturin, surfactin, fengycin LP 표준물질 peak값과 추출물질의 크로마토그램 peak 값 비교를 통해 실시하였다. iturin과 surfactin LP 표준물질과 시제품의 유효 물질은 단일 peak로 검출되었으며, 유효 검출 시간은 각각 6.4~8.9분과 14.3~15.3분이었다. 또한 fengycin LP는 7.9~11.7분으로 3개의 peak가 검출되었다.

| Compound | Precursor ion (m/z) | Product ion (m/z) | DP ^{b)} (V) | EP ^{c)} (V) | CE ^{d)} (V) | Ionization mode |
|-----------|---------------------|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------------|
| Iturin A | 1043.47 | 70.1 ^{a)} | 161.0 | 6.0 | 177.0 | Positive ESI ^{e)} |
| | | 183.9 | 161.0 | 14.0 | 107.0 | |
| Surfactin | 1036.59 | 86.0 ^{a)} | 196.0 | 6.0 | 119.0 | Positive ESI ^{e)} |
| | | 685.5 | 196.0 | 14.0 | 45.0 | |
| Fengycin | 732.26 | 70.1 | 121.0 | 6.0 | 133.0 | Positive ESI ^{e)} |
| | | 84.0 | 121.0 | 14.0 | 121.0 | |

그림 32. LC-MS/MS MRM transition. ^{a)}Quantitation ion, ^{b)}Declustering potential, ^{c)}Entrance potential, ^{d)}Collision energy

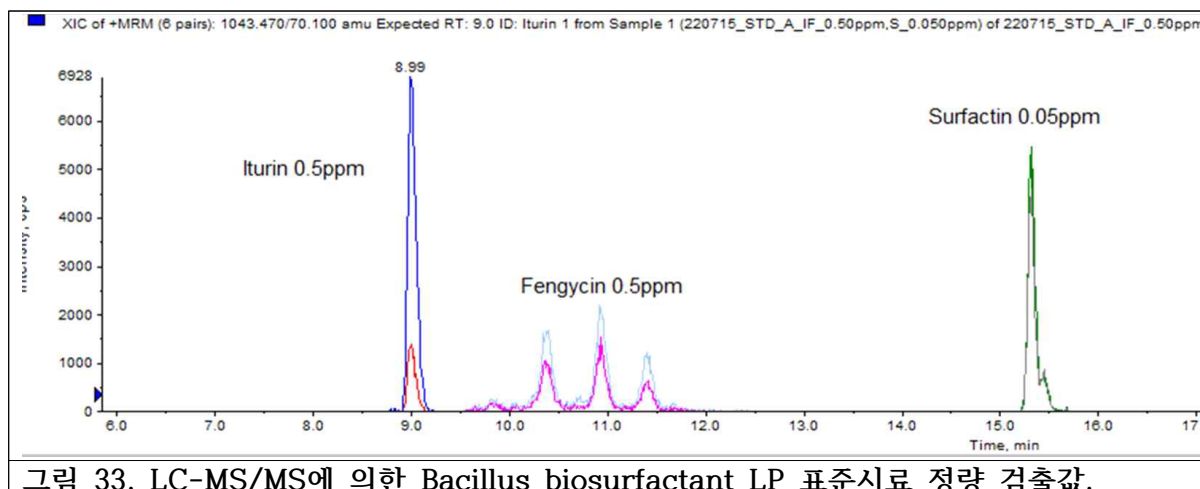


그림 33. LC-MS/MS에 의한 Bacillus biosurfactant LP 표준시료 정량 검출값.

(2) 시제품 나노리포좀 캡슐화 효율 및 유효물질 LP의 방출양상 분석

1) 시제품의 나노리포좀 캡슐화 효율

시제품 나노리포좀 제형의 캡슐화 효율은 총 LP 함량에서 LP 잔류량을 백분율로 계산하였다. 시제품 나노리포좀 제형의 캡슐화 효율 분석은 다음 공식을 사용하여 캡슐화에 사용된 LP의 총량과 캡슐화된 현탁액을 원심분리 후 상등액에 존재하는 잔류 LP 함량 사이의 차이로 계산되었다.

iturin, surfactin, fengycin 잔류 LP는 시제품 제형을 원심분리(8,000×g, 10분, 4°C)한 후 분리된 상등액에 캡슐화되지 않은 LP와 코팅되지 않은 CS를 제거하기 위해 100 kDa AMICON® Ultra-15 centrifugal filter (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)를 사용하여 여과하였다. iturin, surfactin, fengycin LP를 LC-MS/MS에서 동시에 검출하기 위해 gradient mode에서 이원 용매 시스템으로 실행했다. 모든 화합물은 MRM (multiple reaction monitoring) 모드에서 분석되었다(그림 32). 그 결과 LP 및 CS 코팅 농도가 증가함에 따라 캡슐화 효율도 향상되었다(표 2).

표 2. 시제품 제형의 리포좀 캡슐화 효율

| Treatment | Encapsulation efficiency (%) |
|-----------|------------------------------|
| 0% CCL | 54.0 ^b |
| 0.2% CCL | 63.4 ^b |
| 0.5% CCL | 82.5 ^a |

0.5% CCL 시제품 제형의 LP 캡슐화 효율은 82.5%로 제형화 된 모든 제제 중에서 가장 높았다. 하지만 CS를 최종적으로 코팅하지 않은 리포솜 시제품은 54% 캡슐화를 나타내었으며, CCL 리포솜 제형에 CS 코팅하는 시제품의 효율성에 큰 영향을 미치는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 CS 코팅 때문에 LP 화합물이 리포솜에 효율적으로 로딩되었음을 보여주는 결과다.

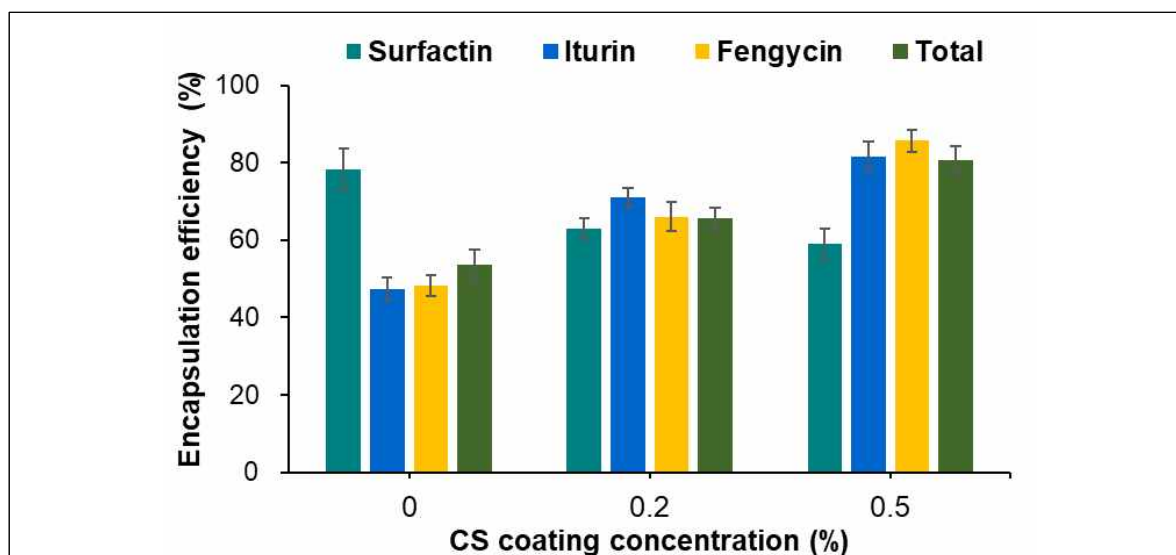
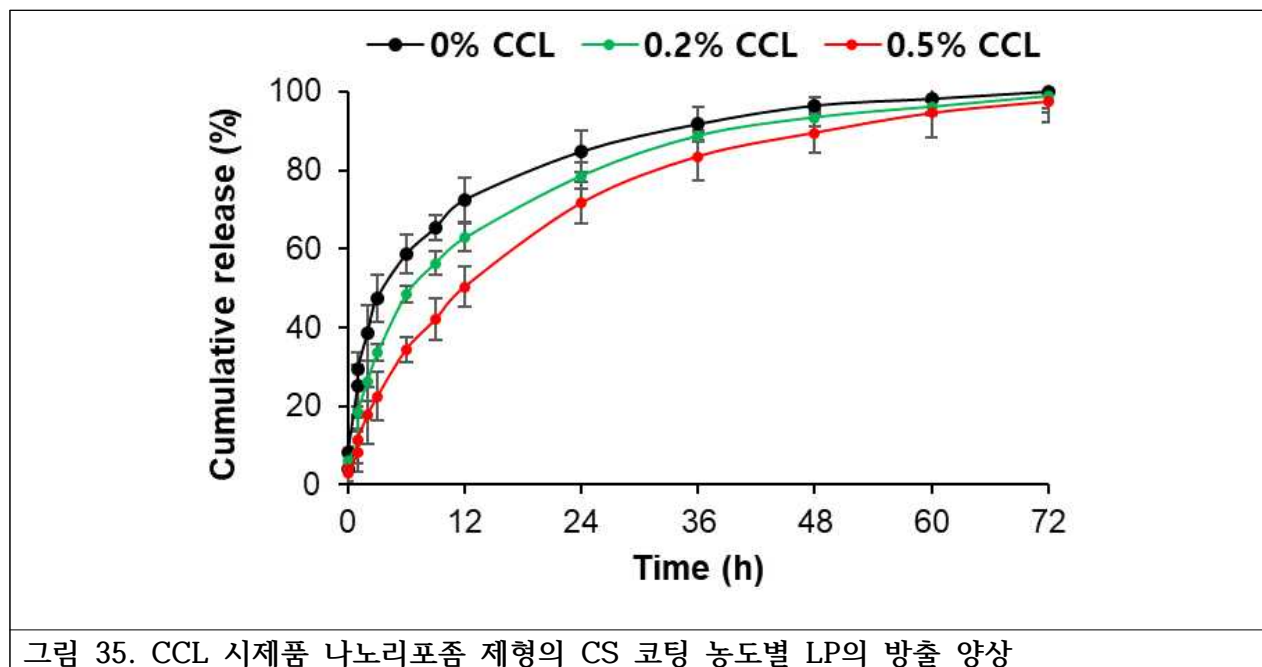


그림 34. 시제품 나노리포솜 제형의 LP 캡슐화 효율.

The values followed by different letters in a column were significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

나노리포솜 캡슐 제형별로 각각의 biosurfactant LP 함량을 분석했다. 리포솜 캡슐의 CS 코팅 함량이 높을수록 iturin과 fengycin LP 포집율은 증가하였고, surfactin LP 함량은 감소하였다(그림 34). 0.5% CS 함량의 시제품 제형은 fengycin LP(85.7%)과 iturin LP(81.7%)가 surfactin LP보다 더 높은 포집율로 캡슐화되었다. 또한, CCL 시제품 제형 과정에서 fengycin LP는 CS 코팅 농도가 증가함에 따라 KB21 미생물에서 유래한 bioisurfactant LP 중에서 가장 높은 포집율의 리포솜 캡슐화 효율을 보였다. 따라서 본 연구 개발은 KB21 유래 대사 유도체 바이오폴리머에 대한 CS 코팅을 통한 표면 나노 공학이 리포솜의 안정성을 더욱 더 향상시키는 결과를 나타냈으며 이러한 개선된 공정으로 나노리포솜 캡슐 제형을 완성시키는 제조 과정을 완성 시킬 수 있었다.

2) CCL 시제품 나노리포솜 제형의 LP 방출 양상 분석



CS 코팅 농도에 따라 제조된 시제품 CCL에서 리포솜 내 포집된 KB21 유래 biosurfactant LP의 방출양상을 조사하였다. CS 농도별로 제조된 CCL 시제품 제형의 biosurfactant LP의 방출을 *in vitro*에서 측정하기 위해 CCL 시제품을 PBS(pH 7.4)에 현탁 시키고 37°C에서 활성을 조사하였다(그림 35). 그림 35에서처럼, CS가 코팅되지 않은 리포솜(0% CCL)내 존재하는 LP는 3시간 후에 연속적으로 방출되면서 약 47.5%가 방출되었다. 24시간 후에는 총 포집된 LP량의 약 84.8%가 방출되었다. 하지만, 0.5% CCL 시제품 제형은 검출 시간의 다른 제형들보다 포집된 LP 방출이 낮았으며 72시간 내에 97% 이상이 방출되었다. 0.5% 시제품 제형은 3시간 후부터 총 LP량은 약 22.4% 방출되었으며 24시간에는 약 71%이상 방출 양상을 나타냈다. 또한 0.2% CS 코팅에 의한 리포솜 제형과 LP 방출변화 비교에서는 0.5% CS 코팅 제형은 3시간 후 11.1%와 24시간 후 6.9%로 0.2% CS 코팅 제형보다 방출된 LP량과 속도에서 낮았다. 따라서 LP가 로딩된 리포솜에서 CS 코팅 농도가 증가할수록 LP 방출 속도는 감소하였으며, 리포솜 캡슐에 대한 CS 코팅은 LP의 용해 및 방출 속도에 상당한 영향을 미치는 것을 확인하였다. 60 시간째에 모든 리포솜 캡슐 제형은 총 LP의 90% 이상이 방출되었다. 따라서 이러한 결과는 CS 코팅에 의한 리포솜은 구조적 및 물리·화학적 안정성이 비교적 약한 리포솜 제형의 단점을 CS 코팅의 다중층 형성으로 리포솜과 포집된 기능성 유효 물질의 캡슐화 안정성을 한층 증진시키는 제형 기술을 완성하였다.

(3) 시제품 나노리포솜 캡슐 제형의 물리적 안정성 특성 분석

미생물 KB21 유래 바이오폴리머를 이용한 리포솜 캡슐화에 의해 제조된 시제품 제형의 물리적 특성의 안정성을 분석하였다. 리포솜 캡슐 제형 제작을 위해 바이오폴리머 함유 농도별 시제품을 12주 동안 4°C에서 보관하면서 평균 크기 분포의 변화와 유효 성분 biosurfactant LP의 포집 효율 등을 모니터링하면서 물리적 안정성을 분석하였다. 장기 보관하면서 4, 8, 12주 간격으로 각 시제품들로부터 분산된 리포솜들의 평균 직경을 측정하고, 각 제형들로부터 리포솜 캡슐 내 LP 함량을 분석 그 포집량을 LC-MS/MS로 정량 분석하여 캡슐 효율을 통하여 안정성을 분석하였다.

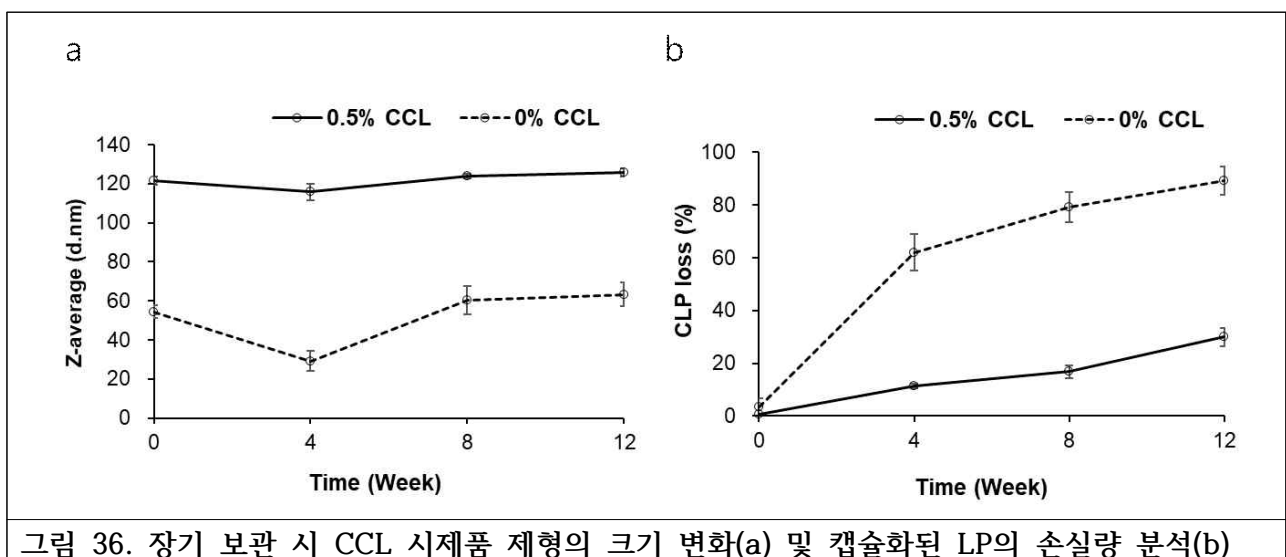


그림 36. 장기 보관 시 CCL 시제품 제형의 크기 변화(a) 및 캡슐화된 LP의 손실량 분석(b)

장기 보관 시 CCL 리포솜 캡슐 제형의 안정성을 평가하기 위해 4°C, 12주 동안 제형의 크기 분포 변화를 모니터링하였다(그림 21a). 나노리포솜 캡슐 제형들을 12주 동안 저장한 결과 모든 제형들은 평균 크기가 증가하였다. 그러나, CS가 코팅된 CCL 제형의 저장 전·후 크기는 통계적인 유의미한 차이를 나타내지 않았다. 12주 보관 후 0% CCL의 크기는 보관 전보다 16.1% 더 커졌으나 0.5% CCL은 3.4% 커지는 분포상을 나타냈다. 각 제형들은 저장 4주 후에는 모두 일시적으로 크기가 줄어드는 분포 변화를 나타냈으나, 지속적인 저장 기간 동안에 리포솜 캡슐 크기는 증가하였다. 같은 조건에서 각 제형들을 보관하면서 제형들로부터 유출된 LP의 손실량도 측정하였다(그림 21b). 0% CCL의 대부분 LP 손실은 CS 코팅이 안된 리포솜의 인지질 이중층을 통한 확산으로 장기간 보관시 손실율이 높았다. CS의 첨가에 의한 리포솜 코팅은 4°C에서 12주 동안 저장하는 동안 리포솜 제형 캡슐 현탁액을 안정화시켰으며, 제형의 직경과 유효성분 LP를 리포솜 내에서 장기간 유지할 수 있었던 능력은 CS 코팅 때문으로 확인할 수 있었다.

II. 시제품 대량 생산 시스템 구축에 의한 제품화

(제 1 협동 (주)현농)

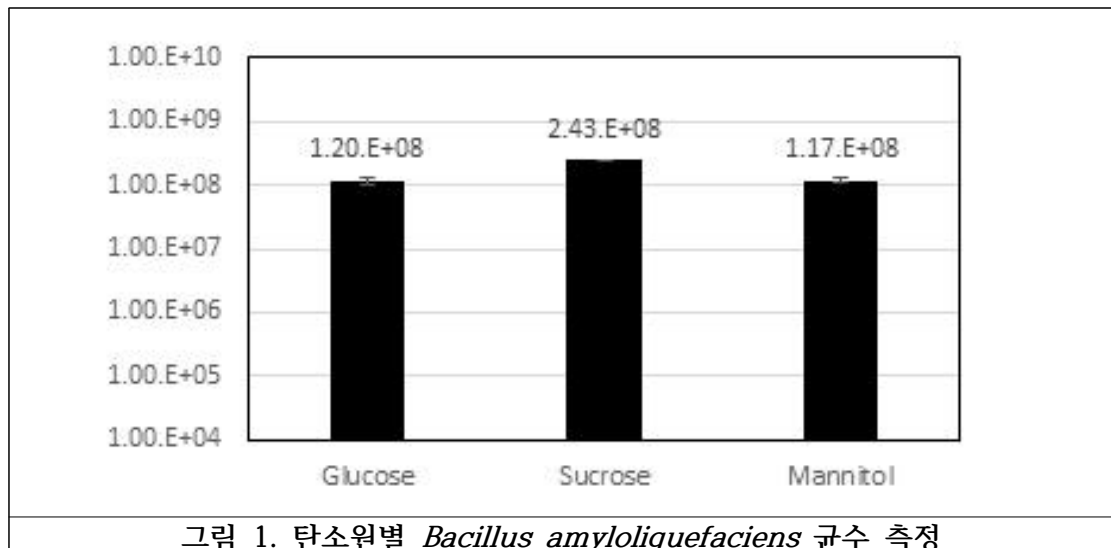
가. 미생물 유래 활성 화합물의 대량 생산 시스템 및 생산공정 확립

제 1 세부(전남대학교 산학협력단)에서 개발한 나노 리포좀 캡슐 제조를 위해 미생물 유래 대사 산물 biosurfactant LP의 대량 생산을 위하여 제 1 협동((주)현농)에서 대량 배양 공정 개선으로 생산 공정을 확립하였다.

가. 유효성분의 대량 생산 배양 공정 확립

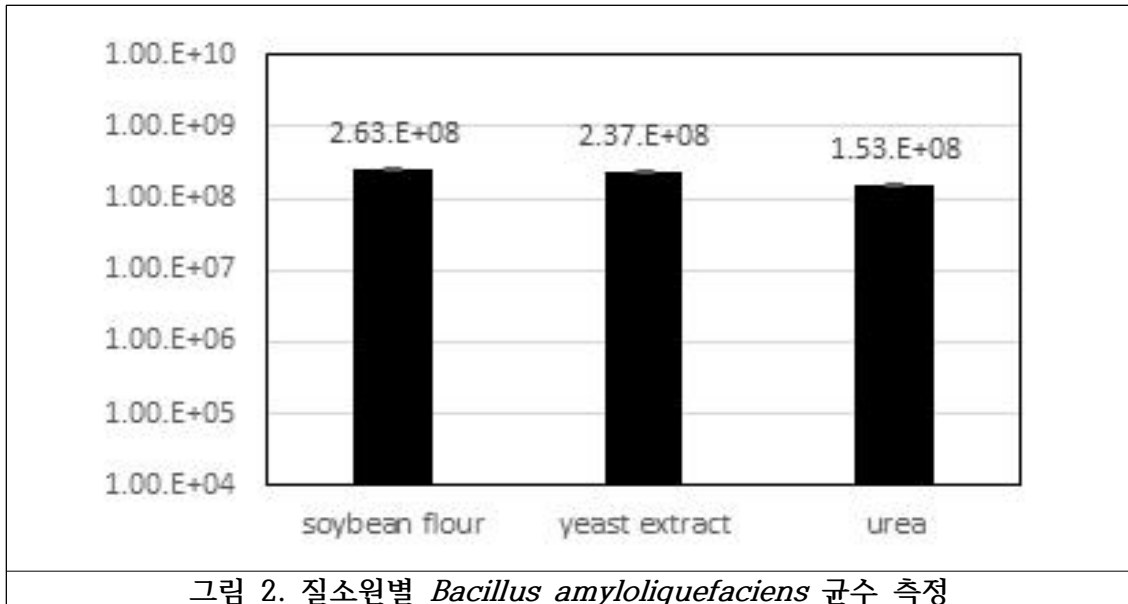
(1) 선발된 미생물의 배지 조건 설정

1) 탄소원 선택



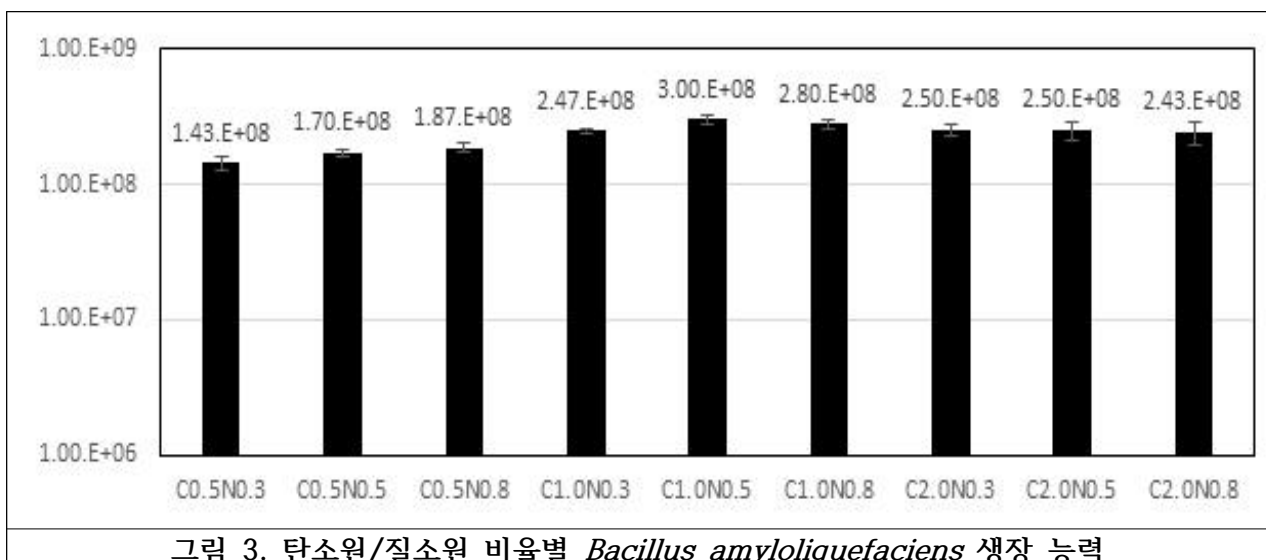
Yeast extract 0.3%, KH₂PO₄ 0.03%, K₂HPO₄ 0.03%, MgSO₄ 0.03%, 의 기본 조건에 탄소원은 Glucose, Sucrose, Mannitol을 시험하였으며 질소원은 Yeast extract와 soybean flour, urea를 이용하여 32도 150rpm에서 72시간 동안 균주를 배양하여 가장 균수가 높게 나오는 조건을 선발하였다. 탄소원의 농도는 1%로 설정하여 그림1과 같이 glucose, sucrose, mannitol을 각각의 탄소원으로 배지를 조성하였다. *Bacillus amyloliquefaciens* 균주를 각각의 배지에 접종 후 32도 150rpm에서 72시간 배양한 후 균수를 측정하였다. 탄소원으로 glucose를 이용하였을 때 1.2E+08을 나타냈으며 mannitol을 이용하여 1.17E+08의 균수가 측정되었다. sucrose를 탄소원으로 이용하였을 때 2.43E+08로 균수가 가장 높게 측정되는 것을 확인하고 시제품 제작 시에 탄소원은 sucrose로 선택하였다.

2) 질소원 선택



앞서 선택 된 Sucrose 1.0%를 탄소원으로 하고 KH₂PO₄ 0.03%, K₂HPO₄ 0.03%, MgSO₄ 0.03%를 기본배지로 조제한 후 질소원 농도를 0.3%로 설정하여 각각의 질소원으로 배지를 조성하였다. *Bacillus amyloliquefaciens* 균주를 32도 150rpm 3일 배양한 후 CFU 측정하였다. 그 결과 질소원을 urea를 이용하였을 때 1.53E+08의 균수를 보였으나 yeast extract와 soybean flour을 이용하였을 때 각각 2.63E+08와 2.37E+08로 urea를 사용했을 때 보다 높은 균수가 확인되었다(그림2). 두 가지의 질소원은 유의성 있는 범위 내에서 균수가 확인되었으나 단가 부분을 고려하였을 때 soybean flour이 경쟁력이 있기에 질소원으로는 soybean flour를 선택하였다.

3) 탄소원/ 질소원의 비율 선택

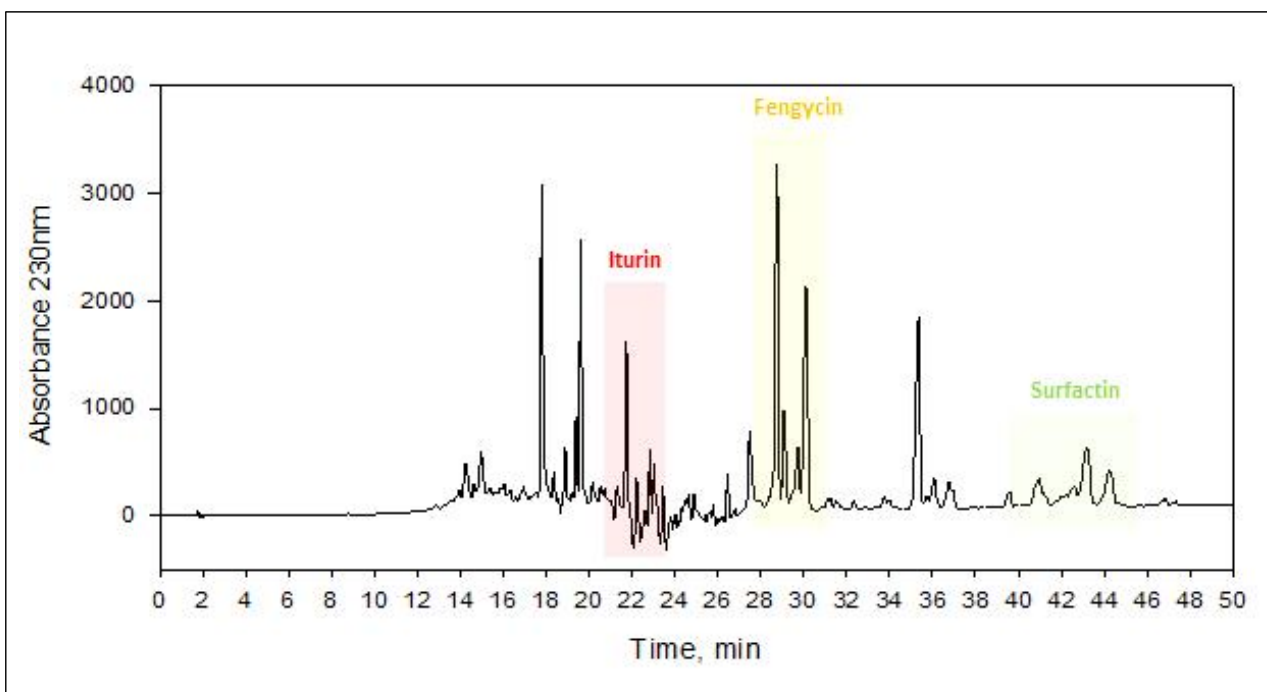


탄소원은 Sucrose로 선택 후 함유량을 0.5%, 1.0%, 2%로, 질소원은 Soybean flour으로 선택하고 함유량을 0.3%, 0.5%, 0.8%로 각각의 배지를 조성하여 균수를 측정하였다. 그 결과 그림 3에서 보는 바와 같이 Sucrose 1.0%, Soybean flour 0.5%일때 *Bacillus amyloliquefaciens* 균주가 가장 잘 자라는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 해당 비율로 최종 배양배지 조건을 확립하였다.

나. 선발된 미생물을 이용하여 지표성분 및 유효성분 검정

*Bacillus amyloliquefaciens*의 지표성분을 검정하기 위해 선택배지(Yeast extract 0.3%, KH₂PO₄ 0.03%, K₂HPO₄ 0.03%, MgSO₄ 0.03%, Sucrose 1%, soybean flour 0.5%)에 32도 150 rpm 에서 72시간 배양 후 10분 동안 4000rpm에서 centrifuge를 통해 상등액을 분리하여 100% MeOH을 이용하여 용매 추출하였다. 지표성분과 유효성분의 항생물질을 검정하기 위해 Agilent 1100 series, API 3200 Q TRAP 의 장비를 사용하였으며 Column은 X-Bridge (2.1 x 100mm, 3.5 µm, C₁₈)를 이용하였다. 분석 방법은 다음과 같이 적용하였다. 5-95% (45 min), 500-1700 Da/Buffer A : 100% H₂O + 0.05% TFA / Buffer B : 100% ACN + 0.05% TFA / Flow rate : 0.2 mL/min / Injection volume : 5 µL

(1) 선발된 미생물을 이용하여 지표성분 검정



| area (mAU x min) | | | |
|-----------------------|--------|----------|-----------|
| Bacillomycin D | Iturin | Fengycin | Surfactin |
| C B.amyloliquefaciens | - | 42876.57 | 77077.48 |
| | | | 29293.25 |

그림 4. *Bacillus amyloliquefaciens*에 의해 생성되는 항균물질 분석

*Bacillus amyloliquefaciens*의 지표 성분을 검정하기 위해 폴리펩타이드를 분석한 결과 Iturin, Fengycin 그리고 surfactin의 항균활성 물질이 생성됨을 확인하였다. 각각의 항생물질들을 LC-MS를 이용해 측정한 결과 위와 같은 결과를 얻을 수 있었다(그림4).

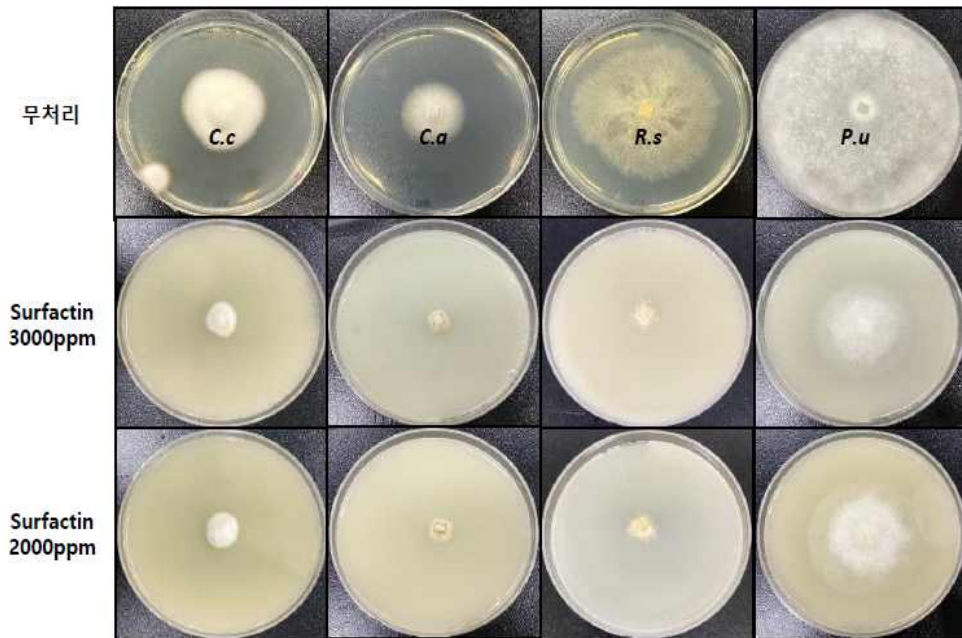
(2) 벼 도열병에 효능을 가지는 미생물 추출물 유효성분 정량

선발되어진 배양배지 조건을 기본으로 하고 0.07%의 레시틴과 4%의 키토산 콜로이드를 0.1% 첨가하여 최종으로 선택한 배지에서 배양한 *Bacillus amyloliquefaciens* 배양액과 배양액에 보조 증진제를 첨가하여 만든 시제품에서 생성된 항균물질들을 정량하여 그 값을 확인하였다. 선발된 배지에서 72시간동안 배양된 균주와 시제품의 상등액을 분리하여 solid-phase extraction한 후 100% MeOH에 녹여 시료를 준비하였다. Agilent 1100 series, API 3200 Q TRAP 의 장비로 분석하였으며 Column은 X-Bridge (2.1 x 100mm, 3.5 μ m, C₁₈)를 사용하였다. 5-95% (45 min), 500-1700 Da/Buffer A : 100% H₂O + 0.05% TFA / Buffer B : 100% ACN + 0.05% TFA / Flow rate : 0.2 mL/min / Injection volume : 5 μ L의 분석방법을 사용하였다. 그 결과 *Bacillus amyloliquefaciens* 배양액에서 Iturin은 546.4 μ g/mL, surfactin은 6259.3 μ g/mL의 값을 나타내었다. 시제품에서는 surfactin의 함량이 90739 μ g/mL의 값을 나타내었다.

다. 유효성분의 항균활성 능력 및 기내시험을 통한 방제가 확인

유효 성분 중의 하나인 surfactin을 농도별로 첨가한 배지를 만들어 각각의 병원성 곰팡이의 생육저해 능력을 확인하였다. Surfactin의 농도별로 PDA 배지에 1000~3000ppm의 농도를 넣고 패트리디쉬에 부은 후 하루 뒤에 배지 중앙에 곰팡이균을 접종하여 항생물질이 들어가지 않은 PDA 배지와 비교하여 곰팡이 균의 생장을 비교하였다. 곰팡이균은 26도에서 3일에서 7일 동안 배양하였으며 활성 검정 곰팡이병원균으로 *Collectotrichum cocodes*, *collectotrichum accutatum*, *Rhizoctonia solani*, *pythium ultimum*을 사용하였다. . 탄저병을 일으키는 *collectotrchum cocodes*, *Collectotrichum acutatum*, 모잘록병을 유발하는 *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*에 대해 항균활성 능력을 검정하였다. 그 결과 surfactin 1,000ppm의 농도에서 탄저병균에 대해 50%의 방제가를 보였으며 2,000ppm이상의 농도에서는 *collectotrchum cocodes* 병원균에 대해서 100%의 방제능력을 나타내었다.

*Rhizoctonia solani*에 대해서는 1,000ppm부터 77% 이상의 방제가를 보였으나 *Pythium ultimum*에 대해서는 3,000ppm이상의 농도에서 52%의 방제가가 나타남을 알 수 있었다(그림 5).



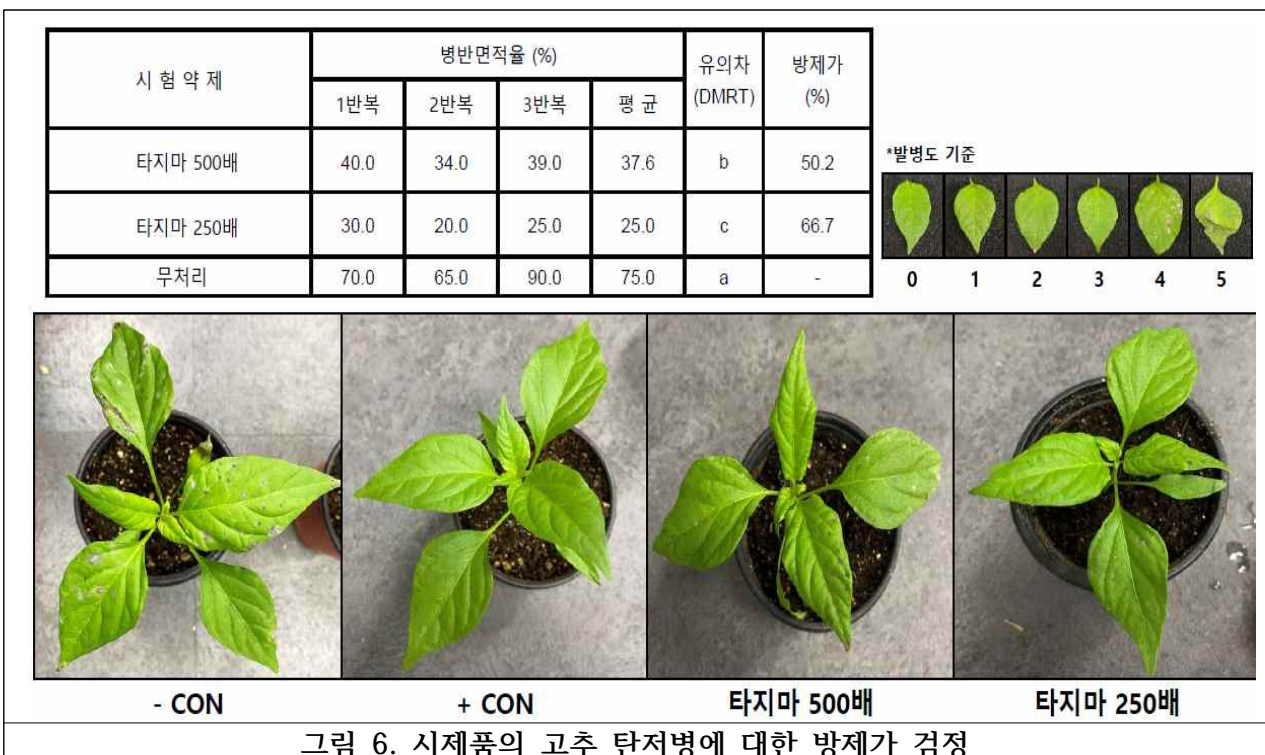
| 물질명 | working 농도 | <i>Colletotrichum cocodes</i> | | <i>Colletotrichum acutatum</i> | | <i>Rhizoctonia solani</i> | | <i>Pythium ultimum</i> | |
|-----------|---------------|-----------------------------------|------------|------------------------------------|------------|-------------------------------|------------|------------------------|------------|
| | | 지름 (mm) | 방제가 (%) | 지름 (mm) | 방제가 (%) | 지름 (mm) | 방제가 (%) | 지름 (mm) | 방제가 (%) |
| Surfactin | (-)control | 29 | 0.0 | 38 | 0.0 | 67 | 0.0 | 85 | 0.0 |
| | 3000ppm | 0 | 100.0 | 14 | 63.2 | 12 | 82.1 | 40 | 52.9 |
| | 2000ppm | 0 | 100.0 | 16 | 57.9 | 14 | 79.1 | 50 | 41.2 |
| | 1000ppm | 13 | 55.2 | 19 | 50.0 | 15 | 77.6 | 68 | 20.0 |

그림 5. 유효성분의 병원성 곰팡이균에 대한 농도별 항균활성 능력 검정

라. 유효성분의 약효 약해 시험

(1) 시제품의 기내 약효 검정

선발된 배지 조건에서는 유효성분의 종류인 Surfactin이 가장 많이 나오는 조건이 확인되어 항균활성 능력검정에서 가장 방제가가 높게 나온 고추 탄저병을 대상으로 기내 약효 시험을 진행하였다. 시제품(타지마)의 정량은 500배 희석액으로 결정하였으며 배량은 250의 농도로 시험하였다. 시험작물의 품종은 청양이었으며 파종 후 잎이 4엽이 나왔을 때 시험약제를 250배, 500배 희석액을 각각 처리하였으며 (-)control은 물만 처리하여 24시간 후 *Collectotrchum cocodes* 1×10^6 spore/ml을 분무 접종한 후 26도 100% 습실 조건에서 72시간동안 처리 후 병반 면적율을 조사하였다. (+)control로 병원균을 처리하지 않은 대조구를 설정하여 고추 탄저병에 대한 방제능력을 비교분석하였다. 그 결과 무처리구와 비교하여 정량에서는 50.2%의 방제가를 보였으나 250배에서는 66.7%의 방제가로 유의성 있는 효과가 있음을 확인할 수 있었다(그림 6).

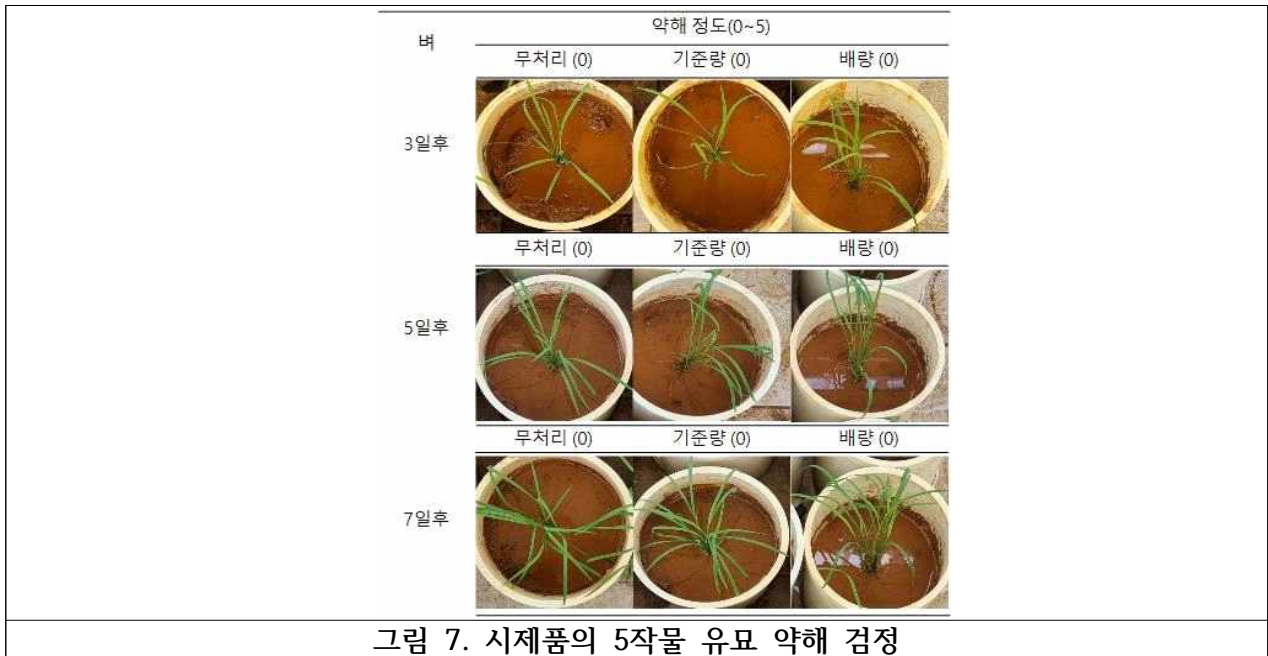


(2) 시제품의 약해 시험

최종시제품의 작물체 유묘에서 약해유무를 알아보고자 5작물 유묘 약해시험을 진행하였다. 소독된 고추, 당근, 시금치, 상추 종자를 발아시킨 후, 본엽 1~2엽 전개 된 유묘를 멸균된 원예용 상토를 담아 10cm×10cm 이색 원형포트에 정식하였다. 벼는 새청무 종자를 소독하여 최아시킨 뒤 모판에 파종하여 10일 동안 육묘한 유묘를 수도용 상토가 담긴 25x30cm 와그너포트에

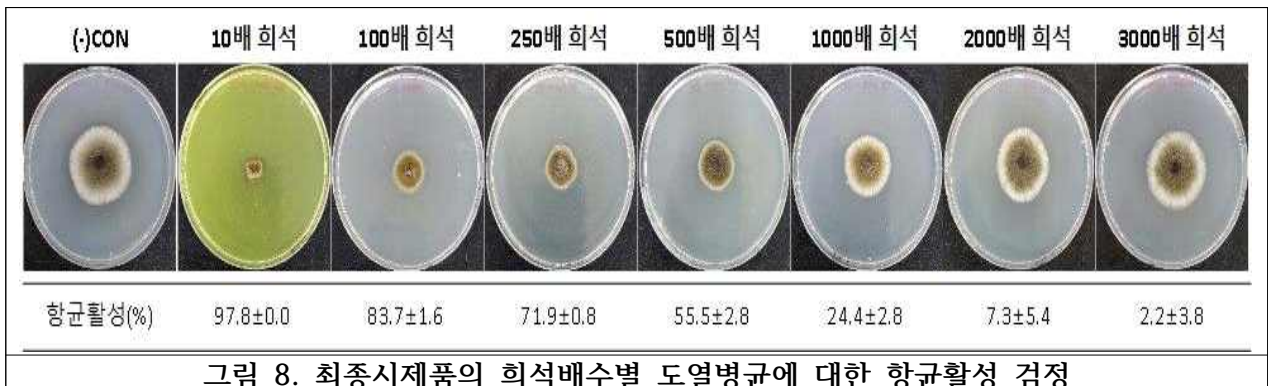
이식하였다. 최종시제품 타지마를 기준량 500배와 배량 250배액으로 조제하여 분무살포 하였으며 처리 후 3, 5, 7일날 반점, 위조, 고사 등 외관상 약해유무를 육안으로 관찰하였다. 그 결과 5작물 모두 기준량, 배량에서 무처리 대비 약해 증상이 없음을 확인하였다(그림7).





마. 시제품의 살포농도 및 횡수 결정

(1) 최종시제품 희석배수별 도열병균에 대한 항균활성 측정



최종시제품을 이용하여 10배~3000배까지 희석배수별로 PDA 배지를 만든 후 1일 건조시켜 배지 중앙에 도열병균 plug를 치상하여 항생물질이 들어가지 않은 PDA 배지와 비교해 도열병균의 생장을 비교하였다. 도열병균은 26도에서 7일 동안 배양하였으며 활성 검정은 도열병균의 지름을 측정하여 항균활성능력을 산출하였다(그림8). 그 결과 최종시제품의 10배 희석액에서 97.8%의 항균활성을 확인하였으며 100배 희석액에서 83.7%, 250배에서 71.9%, 500배에서 55.5%의 항균활성이 확인되었으며 희석배수가 커질수록 항균활성도가 낮아지는 것을 확인하였다. 500배 희석 이상에서는 항균활성이 낮아져 1000배 희석액에서는 24.4%, 2000배 희석액에서는 7.3%로 항균활성이 거의 미미한 수준임을 확인하였다. 위 결과를 토대로 최종시제품의 실제 사용농도는 항균활성이 50% 이상인 500배 희석으로 설정하였다.

(2) 최종시제품 희석배수별 식물병원균에 대한 항균활성 측정

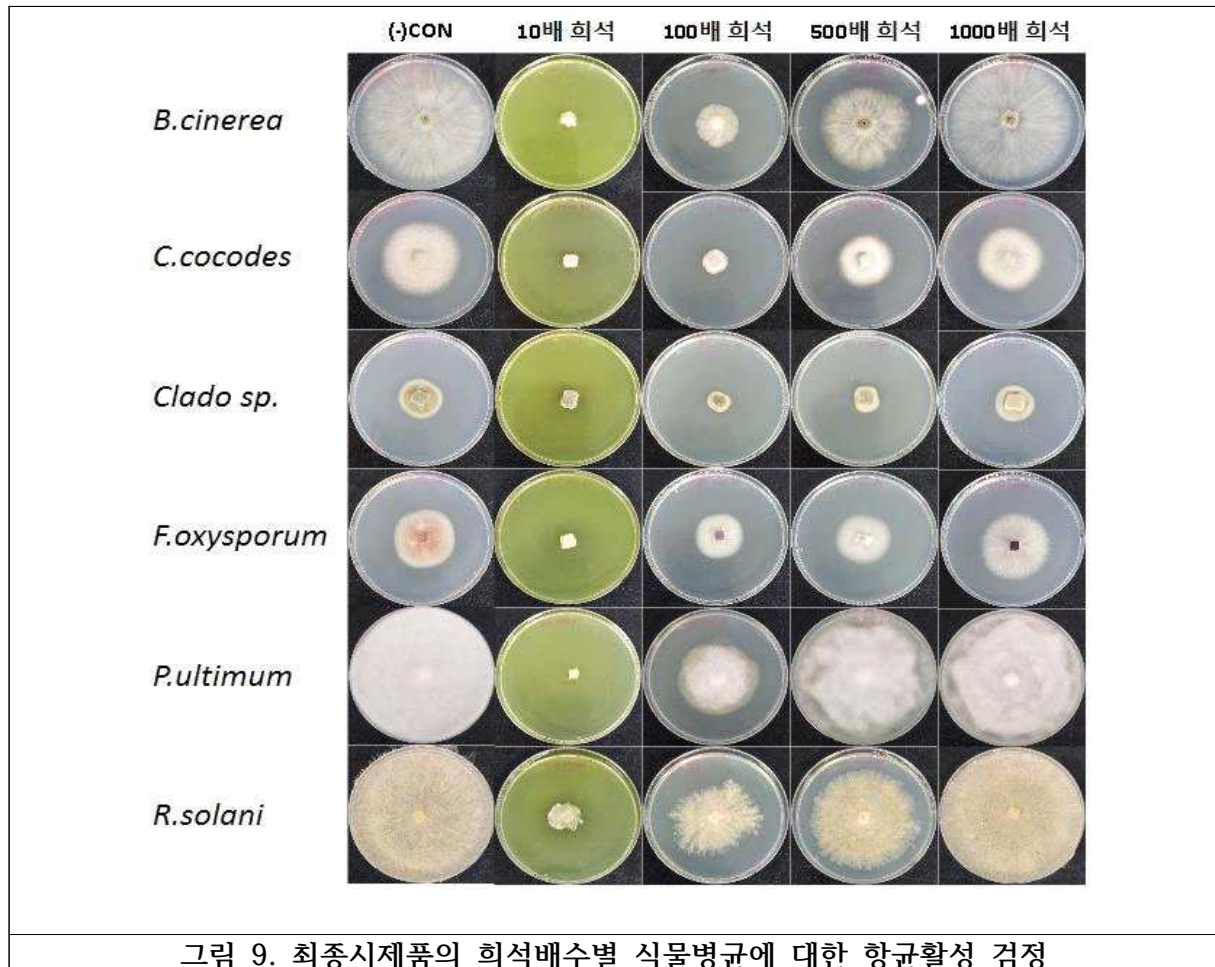


표 1. 최종시제품 희석배수별 식물병원균에 대한 항균활성 및 방제가

| | 방제가(%) | | | |
|--------------------|-----------|------------|------------|-------------|
| | 10배 희석 | 100배 희석 | 500배 희석 | 1000배 희석 |
| <i>B.cinerea</i> | 94.4±0.0 | 83.3±1.1 | 45.6±1.1 | 5.6±0.0 |
| <i>C.cocodes</i> | 88.3±0.2 | 83.6±2.3 | 54.7±3.1 | 15.6±1.5 |
| <i>Clado sp.</i> | 72.7±0.8 | 70.9±3.7 | 63.6±2.8 | 25.4±2.9 |
| <i>F.oxysporum</i> | 86.1±0.4 | 48.1±0.8 | 42.5±3.1 | 3.6±4.1 |
| <i>P.ultimum</i> | 94.4±0.0 | 47.4±0.6 | ND | ND |
| <i>R.solani</i> | 85.6±1.1 | 45.9±1.7 | 13.0±1.7 | ND |

도열병균에 대한 항균활성뿐만 아니라 여러 가지 식물병원균에 대하여 농도별 항균활성시험을 진행하였다(그림9). 시험방법은 도열병 항균활성측정 방법과 동일하게 진행하였다. 대상 식물병원균으로는 잣빛곰팡이병을 일으키는 *Botrytis cinerea*, 탄저병을 일으키는 *Collectotrichum cocodes*, 점무늬병을 일으키는 *Cladosporium* sp., 시들음을 유발하는 *Fusarium oxysporum*, 잘록병을 일으키는 *Pythium ultimum*과 *Rhizoctonia solani*를 사용하였다. 26도에서 7일 동안 배양한 뒤 항균활성을 측정한 결과, *Botrytis cinerea*, *Collectotrichum cocodes*, *Cladosporium* sp., *Fusarium oxysporum*에 대해서는 500배 희석액에서 42.5~63.6%의 수치의 항균활성을 나타내었고, *Pythium ultimum*과 *Rhizoctonia solani*에 대해서는 최종시제품 100배 희석액에서 동일 수준(47.4%, 45.9%)의 항균치를 확인하였다. 이로써 제작된 최종시제품은 도열병뿐만 아니라 여러 식물병원균에 대해서도 500배 희석액에서 항균효과가 있다는 것을 확인하였으며 잘록병균에 대해서는 5배 정도 더 높은 농도가 요구된다는 것을 확인하였다(표1).

바. 농약/유기농업자재/영양제와의 혼용 가능 여부 확인

(1) 농약 혼용 후 Iturin과 Surfactin 함량 분석

최종시제품의 농약 혼용 시 제품 안정성 시험을 위해 살충제와 살균제 혼합 후 유효성분인 Iturin과 Surfactin 함량 변화 여부를 측정하였다. Iturin과 Surfactin 함량분석은 시마즈 LCMS-8050으로 분석하였으며 자세한 분석조건은 그림10과 같다. Iturin과 Surfactin standard는 시그마 시약(S3523 & I1774, Sigma)을 구매하여 사용하였으며, 분석에 사용된 각 표준물질정량곡선의 R2값은 0.99 이상임을 확인하였다.(그림11).

| | | | | | | |
|--------------------|--|---------------|----------------|--------------|----------------|----------------|
| LC Parameters | | | | | | |
| Instrument | SHIMADZU LCMS-8050 | | | | | |
| Column | OSAKA SODA, CAPCELL CORE-C18, 2.1 × 150 mm, 2.7 μm | | | | | |
| Flow rate | 0.3 mL/min | | | | | |
| Mobile phase | A: Water (0.1% formic acid) | | | | | |
| | B: MeOH (0.1% formic acid) | | | | | |
| Gradient condition | Time (min) | Flow (mL/min) | Mobile A (%) | Mobile B (%) | | |
| | 0 | 0.3 | 85 | 15 | | |
| | 1 | 0.3 | 85 | 15 | | |
| | 7 | 0.3 | 60 | 40 | | |
| | 11 | 0.3 | 10 | 90 | | |
| | 13 | 0.3 | 10 | 90 | | |
| | 13.1 | 0.3 | 85 | 15 | | |
| | 25 | 0.3 | 85 | 15 | | |
| Total run Time | 25 min | | | | | |
| Injection volume | 5 μL | | | | | |
| Column oven temp | 40℃ | | | | | |
| MS Parameters | | | | | | |
| Ionization | Electro spray ionization mode (ESI, Positive mode) | | | | | |
| compound | Precursor ion | Product ion | Q1 Pre Bias(V) | CE | Q3 Pre Bias(V) | Ionizationmode |
| Iturin | 1043.6 | 1026.65 | -32 | -28 | -30 | Positive ESI |
| | | 135.90 | -40 | -50 | -24 | |
| Surfactin | 1036.7 | 423.25 | -40 | -39 | -21 | Positive ESI |
| | | 685.5 | -40 | -32 | -40 | |
| | | 342.3 | -40 | -48 | -17 | |

그림 10. 유효성분의 LC-MS/MS 분석 조건

그림 10. 유효성분의 LC-MSMS 분석 조건

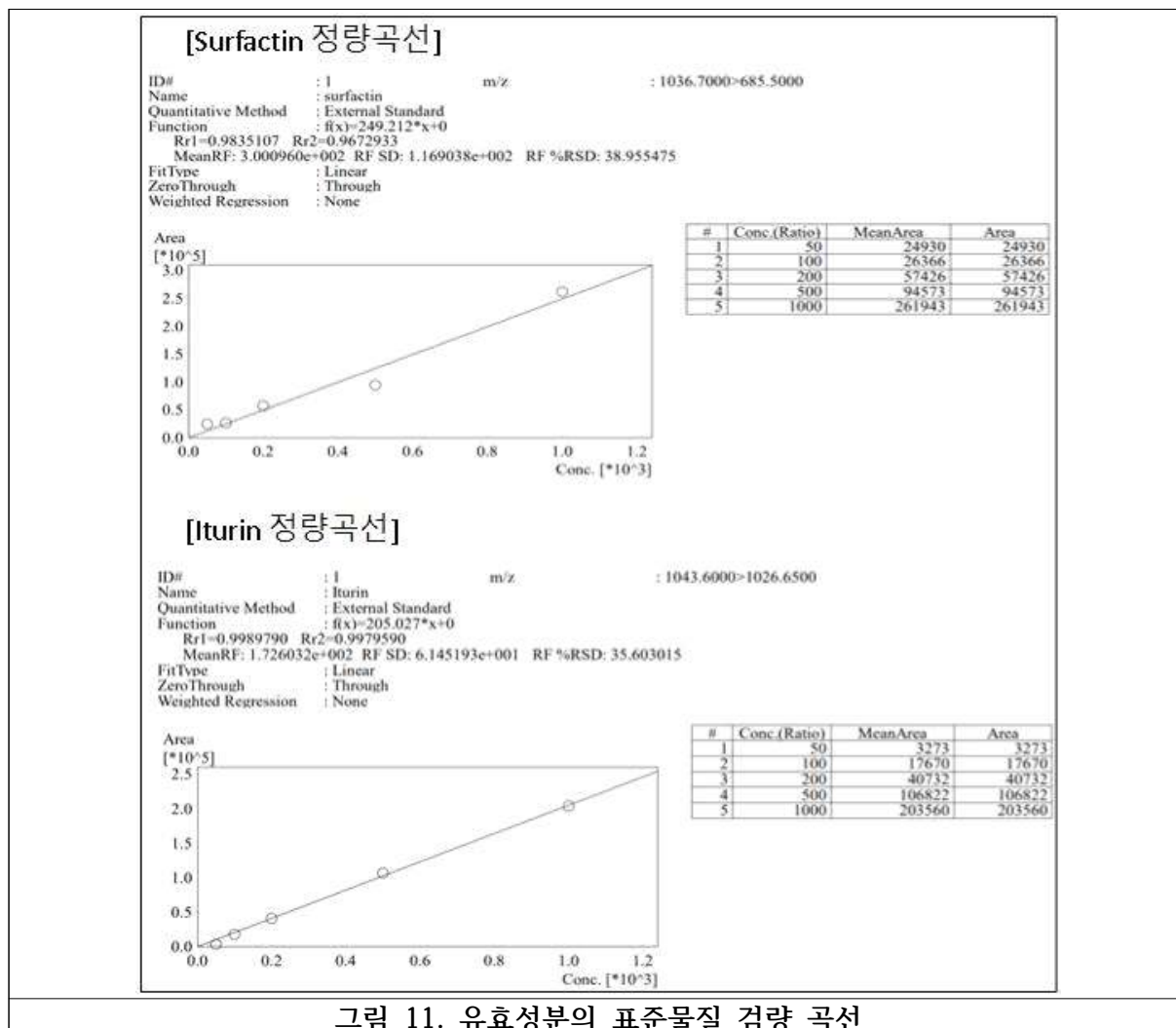


그림 11. 유효성분의 표준물질 검량 곡선

혼용 약해시험에 사용된 살충제와 살균제는 에토펜프록스 10%(명타자)와 플루디옥소닐 20%(사파이어) 품목을 사용하였으며 타지마 시제품 250배와 해당 농약 추천사용량으로 혼합하여 상온에 일주일 방치 후 유효성분인 Iturin과 Surfactin의 함량을 측정하였다. Control로 사용된 타농약과 혼용하지 않은 시제품 250배에서는 surfactin 함량이 477.3ppm, Iturin함량이 42.9ppm이 검출되었고, 살충제인 etofenprox와 혼용구에서는 surfactin 481.1ppm, Iturin 함량이 36.9ppm이 검출되었으며 살균제 fludioxonil과의 혼용구에서는 surfactin 473.0ppm, Iturin 43.4ppm이 검출되었다. 이로써 살충제와 살균제 혼용구 모두에서 Iturin과 Surfactin의 함량이 안정적으로 유지되는 것이 확인되었으며 실제 상용화 시 에토펜프록스와 플루디옥소닐 품목과 혼용 가능할 것으로 사료된다(표2, 그림12).

표 2. 농약 혼용 후 Iturin 및 Surfactin의 유효성분 함량

| Compound | Condition | Conc.(ppm) | Compound | Condition | Conc.(ppm) |
|-----------|---------------|--------------------|----------|---------------|-------------------|
| | Control | 477.3 ^a | | Control | 42.9 ^a |
| Surfactin | Fludioxonil + | 473.0 ^a | Iturin | Fludioxonil + | 43.4 ^a |
| | Etofenprox + | 481.1 ^a | | Etofenprox + | 36.9 ^a |

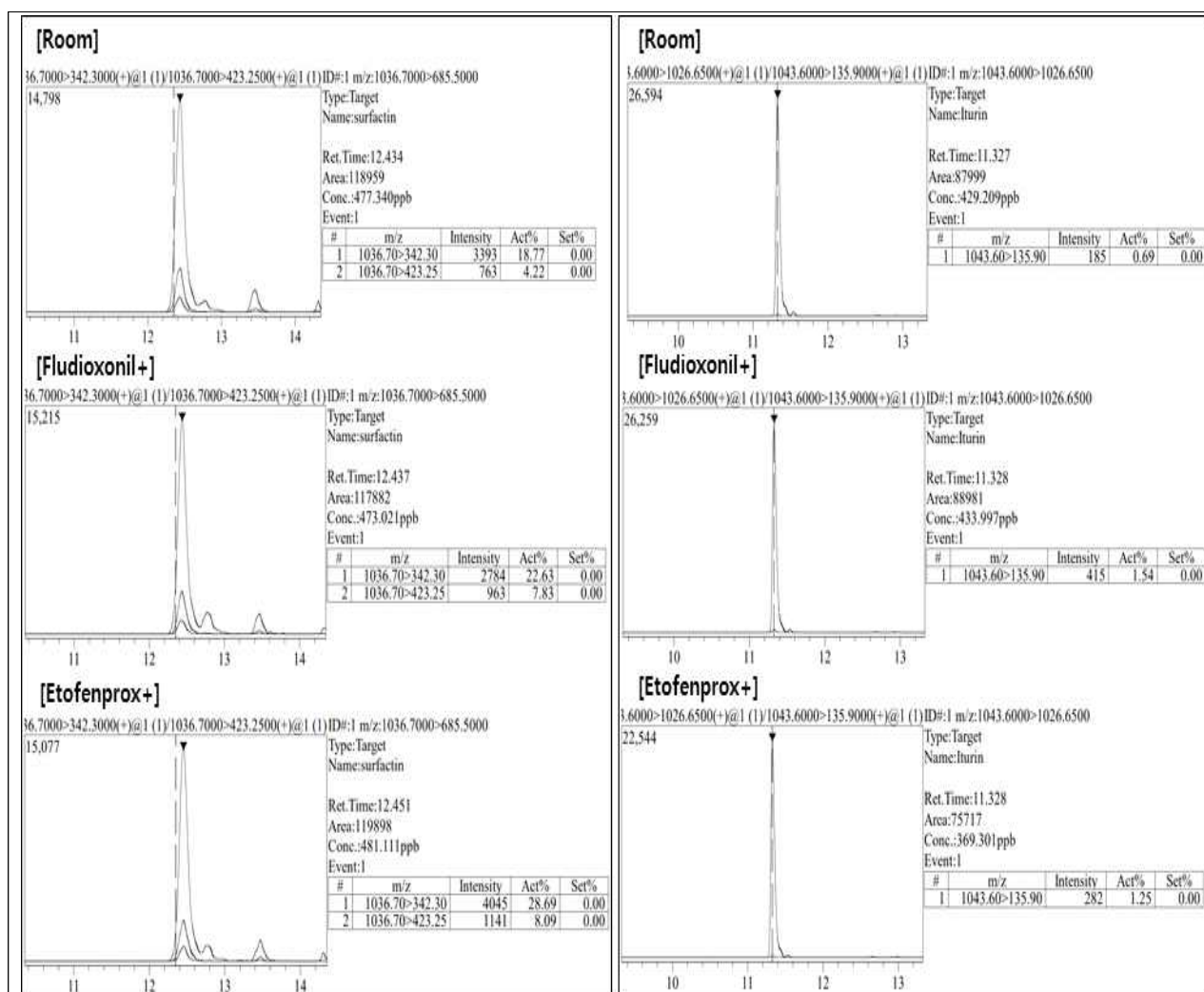


그림 12. 농약 혼용 후 Iturin 및 Surfactin의 크로마토그램

(2) 유기농업자재 및 영양제 혼용 후 물리적 성상 분석

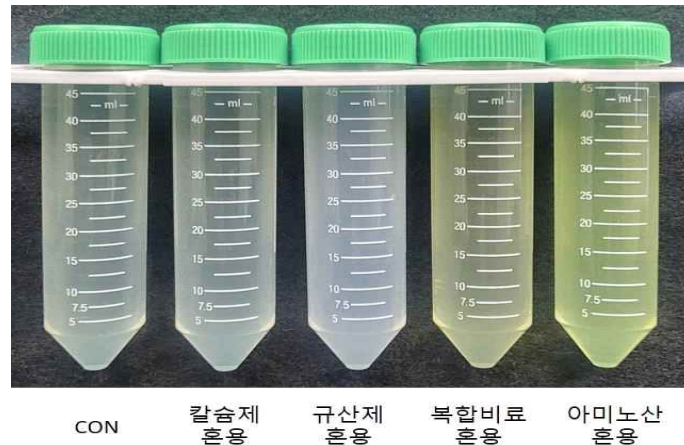


그림 13. 유기농업자재 및 영양제 혼용후 물리적 성상 비교

최종시제품과 영양제와의 혼용가능성을 확인하기 위하여 칼슘제, 규산제, 미량요소복합비료, 아미노산제를 시제품과 혼용하여 7일간 상온에 정치 후 물리적 성상을 조사하였다. 그 결과 수화성은 99% 이상으로 조사되었으며 침강성은 관찰되지 않았고 hard caking 및 결정이 생성되지 않아 영양제와 혼용이 가능함을 확인하였다(그림13).

사. 유통 및 보관상의 유용성 검정 및 화학적 안정성 확인

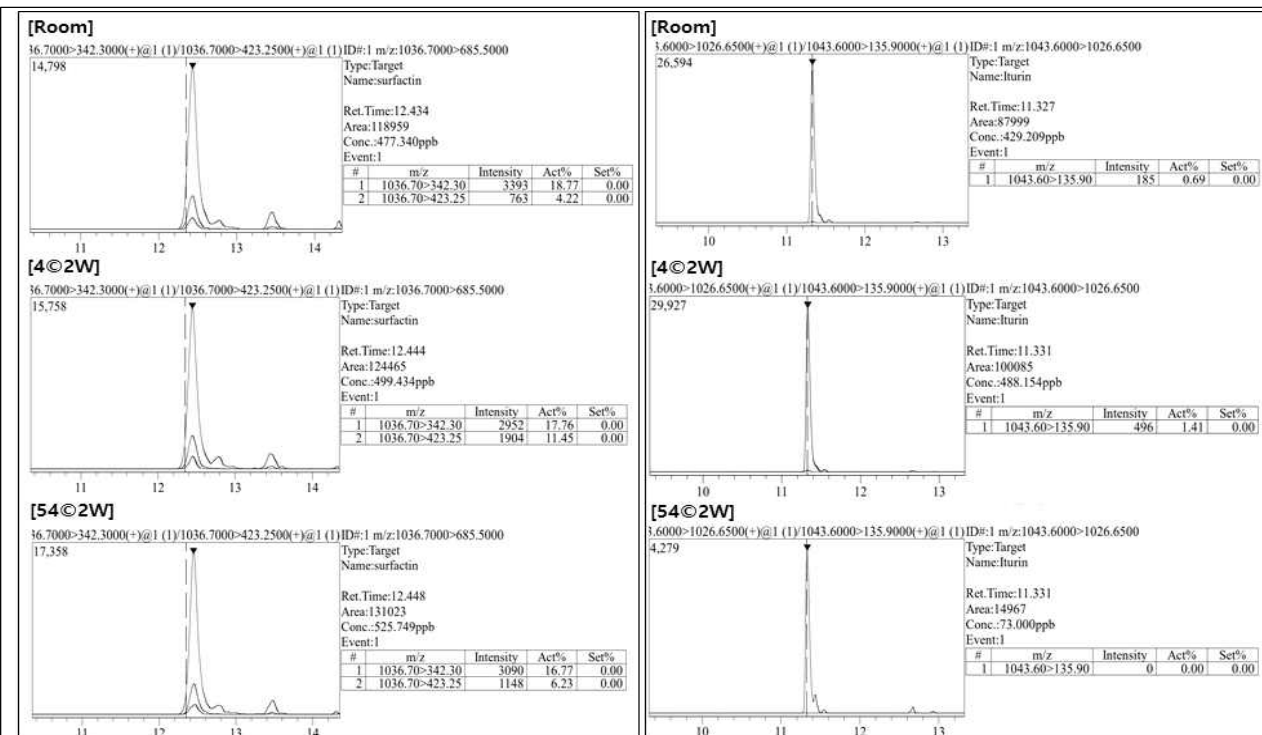


그림 14. 유기농업자재 및 영양제 혼용후 물리적 성상 비교

유통 및 보관상의 유용성 검정 및 화학적 안정성 확인을 위하여 최종시제품을 250배 희석하여 4도 2주, 54도 2주간 온도처리 후 유효성분인 Iturin과 Surfactin의 함량을 측정하였다(그림14). 그 결과 두 온도 조건 모두에서 Surfactin의 함량은 477.3ppm에서 499.4ppm 이 확인되었으나, Iturin의 함량이 54도에서 20% 이하로 낮아지는 것으로 보아 Iturin 성분이 고온에 민감하게 작용하여 분해되는 것으로 추정되며 시제품 유통·보관 시 서늘한 음지에서 이루어져야 할 것으로 판단된다(표3).

아. 방제 매뉴얼 작성 및 포장에서의 방제가 검정

(1) 벼 도열병에 대한 약제방제효과 시험

표 4. 최종시제품 처리횟수 및 농도별 벼 도열병 병반면적 증가율

| | 병반 면적 증가율(%) | | | |
|------|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 1 st appl | 5DAA1 st appl | 5DAA2 nd appl | 5DAA3 rd appl |
| 무처리 | 0.0 | 133.6 | 238.3 | 328.3 |
| 정량1회 | 0.0 | 37.4 | 61.6 | 112.6 |
| 정량2회 | 0.0 | 41.3 | 53.3 | 79.2 |
| 정량3회 | 0.0 | 31.9 | 41.2 | 77.9 |
| 배량1회 | 0.0 | 26.9 | 40.8 | 52.6 |
| 배량2회 | 0.0 | 16.2 | 37.4 | 48.6 |
| 배량3회 | 0.0 | 26.7 | 26.7 | 39.0 |

표 5. 최종시제품 처리횟수 및 농도별 벼 도열병에 대한 약제 방제 효과

| | 방제가(%) | | |
|------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 5DAA1 st appl | 5DAA2 nd appl | 5DAA3 rd appl |
| 정량1회 | 72.0 | 74.1 | 65.7 |
| 정량2회 | 69.1 | 77.6 | 75.9 |
| 정량3회 | 76.1 | 82.7 | 76.3 |
| 배량1회 | 79.9 | 82.9 | 84.0 |
| 배량2회 | 87.9 | 84.3 | 85.2 |
| 배량3회 | 80.0 | 88.8 | 88.1 |

최종시제품의 처리농도와 처리횟수별 벼 도열병에 대한 약제방제효과를 알아보기 위하여 담양에서 필드시험을 진행하였다. 2022년 8월 1일부터 8월 11일까지 5일 간격 3회 경엽살포 하였고, 약효조사는 1차 약제살포 후 5일부터 3차 약제처리 후 5일 뒤인 8월 16일까지 5일 간격 총 4회 병반면적을 측정하였으며 처리 시마다 병반 면적 증가율을 측정하였다. 병반면적 증가율은 시제품 처리전 0day의 병반면적을 측정한 뒤 약효조사 시마다 증가되는 병반면적을 측정하였고

그 차이를 초기 병반면적으로 나누어 백분율로 환산하여 최종 병반 면적 증가율을 산출하였다. (그림15). 그 결과 최종 약효조사 시 병반면적 증가율을 조사하였을 때 무처리구는 약제 처리 전보다 328%로 증가한 반면 정량 1회, 2회, 3회 처리구는 112.6% ~ 77.9%로 처리 횟수가 증가함에 따라 병반면적 증가폭이 감소하는 경향치를 보였고 배량 1,2,3회 처리구는 52.3%~39.0%로 정량 처리구보다도 병반면적 증가폭이 낮았으며 정량구와 마찬가지로 처리회수가 증가함에 따라 그 수치가 줄어드는 것을 확인하였다(표4). 방제가로 환산하였을 때 정량 처리구는 65.7% ~ 76.3%의 방제가를 보여주었으며 배량처리구는 무처리구 대비 84.0~88.1%의 높은 방제율을 보여주었다(표5).

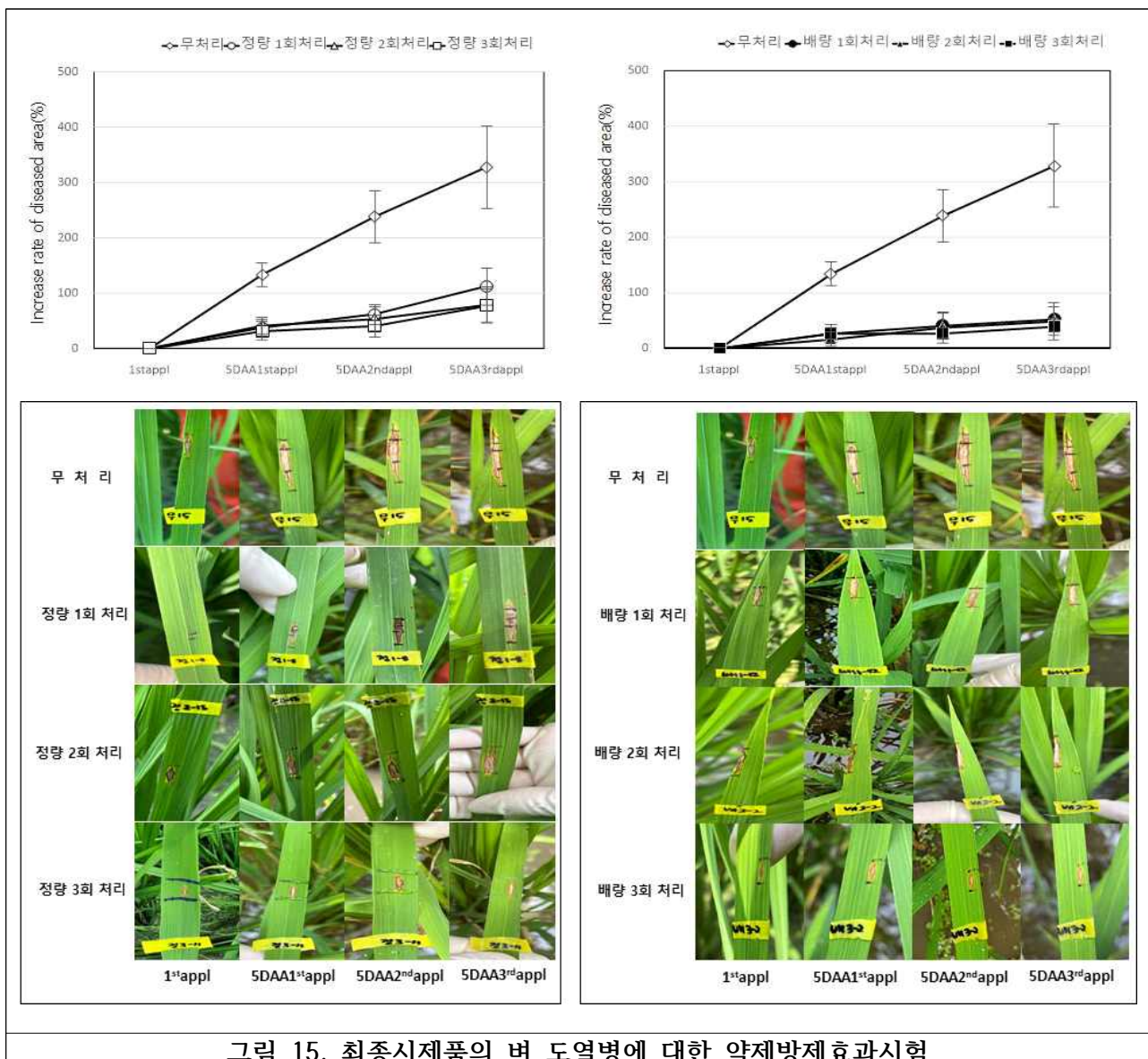


그림 15. 최종시제품의 벼 도열병에 대한 약제방제 효과시험

(2) 최종시제품 벼 잎집무늬마름병에 대한 약제방제효과 시험

표 6. 최종시제품 처리횟수 및 농도별 벼 잎집무늬마름병 피해도

| | 피해도(%) | | |
|------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 5DAA1 st appl | 5DAA2 nd appl | 5DAA3 rd appl |
| 무처리 | 17.7 | 25.0 | 30.3 |
| 정량1회 | 9.3 | 15.7 | 23.7 |
| 정량2회 | 8.3 | 11.0 | 14.3 |
| 정량3회 | 8.3 | 10.3 | 13.0 |
| 배량1회 | 9.0 | 14.0 | 21.0 |
| 배량2회 | 8.3 | 8.7 | 12.0 |
| 배량3회 | 7.7 | 8.3 | 11.0 |

최종시제품의 처리농도와 처리횟수별 벼 잎집무늬마름병에 대한 약제방제효과를 알아보기 위하여 담양에서 필드 시험을 진행하였다. 2022년 8월 4일부터 8월 24일까지 10일 간격 3회 경엽 살포 하였고, 약효조사는 1차 약제살포 후 10일부터 3차 약제 처리 후 10일 뒤인 9월 3일까지 10일 간격 총 4회 피해도를 측정하였다(그림16). 피해도 조사방법은 「농약 및 원제의 등록기준, 고시 제2021-33호」의 고시 방법에 따라 산출하였으며 총 100개의 경수를 조사하였고, 발병도를 지엽, 차엽, 3엽까지 발병한 3단계로 나누어 백분비로 산출하였다. 그 결과, 최종 약효조사 시 피해도가 무처리구는 30.3%인 반면 정량 1회, 2회, 3회 처리구는 23.7%, 14.3%, 13.0%로 처리 횟수가 증가함에 따라 피해도가 감소하는 경향치를 보였고 배량 1, 2, 3회 처리구는 21.0%~11.0%로 정량 처리구보다도 피해율이 낮았으며 정량구와 마찬가지로 처리 횟수가 증가함에 따라 그 수치가 줄어드는 것을 확인하였다(표6). 방제가로 환산하였을 때 정량 처리구는 21.8% ~ 57.1%의 방제가를 보여주었으며 배량 처리구는 무처리구 대비 30.7%~63.7%의 높은 방제율을 보여주었다(표7).

표 7. 최종시제품 처리횟수 및 농도별 벼 잎집무늬마름병에 대한 약제방제효과

| | 방제가(%) | | |
|------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 5DAA1 st appl | 5DAA2 nd appl | 5DAA3 rd appl |
| 정량1회 | 47.5 | 37.2 | 21.8 |
| 정량2회 | 53.1 | 56.0 | 52.8 |
| 정량3회 | 53.1 | 58.8 | 57.1 |
| 배량1회 | 49.2 | 44.0 | 30.7 |
| 배량2회 | 53.1 | 65.2 | 60.4 |
| 배량3회 | 56.5 | 66.8 | 63.7 |

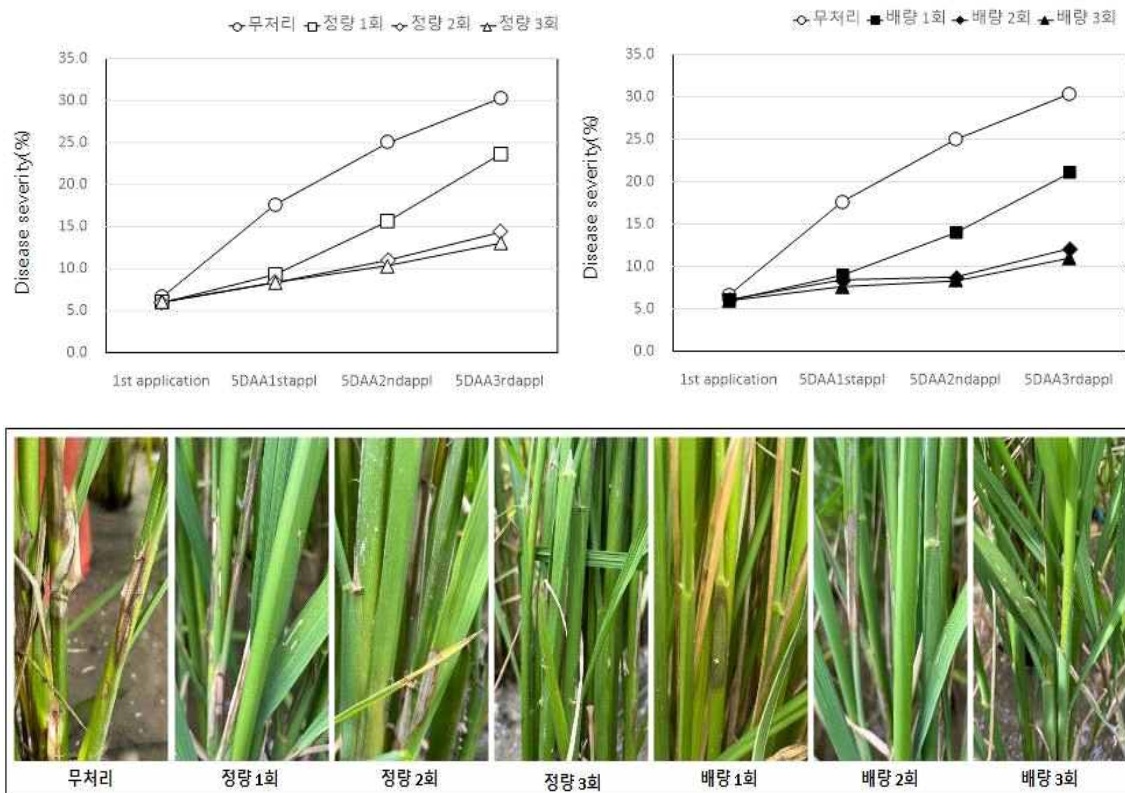
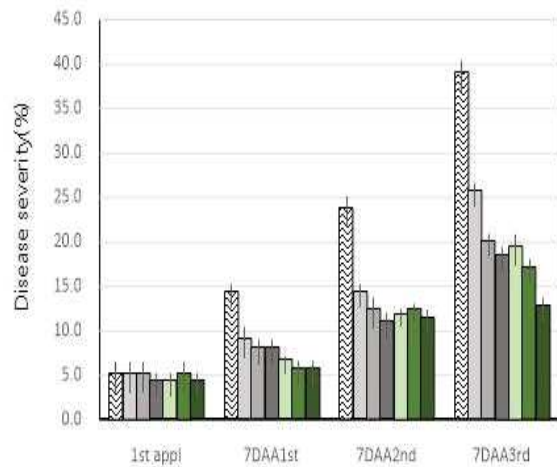


그림 16. 최종시제품의 벼 잎집무늬마름병에 대한 약제방제효과시험

(3) 최종시제품 벼 흰잎마름병에 대한 약제방제효과 시험

최종시제품의 처리농도와 처리횟수별 벼 흰잎마름병에 대한 약제방제효과를 알아보고자 장성에서 필드시험을 진행하였다. 2022년 8월 19일부터 9월 2일까지 7일 간격 3회 경엽살포 하였고, 약효조사는 1차 약제살포 후 7일부터 3차 약제처리 후 7일 뒤인 9월 2일까지 7일 간격 총 4회 발병도를 측정하였다. 발병도 조사방법은 「농약 및 원제의 등록기준, 고시 제2021-33호」의 고시 방법에 따라 산출하였으며 반복구당 10엽을 조사하여 총 조사엽수에 대한 발병도에 따른 발병엽수의 합을 백분비로 산출하여 발병도를 표시하였다. 그 결과 최종 약효조사 시 발병도가 무처리구는 39.0%인 반면 정량 1회, 2회, 3회 처리구는 25.7%, 20.0%, 18.6%로 처리 횟수가 증가함에 따라 발병도가 감소하는 경향치를 보였고 배량 1,2,3회 처리구는 19.5%~12.9%로 정량 처리구보다도 발병율이 낮았으며 정량구와 마찬가지로 처리회수가 증가함에 따라 그 수치가 줄어드는 것을 확인하였다. 방제가로 환산하였을 때 정량 처리구는 34.1% ~ 52.4%의 방제율을 보여주었으며 배량 처리구는 무처리구 대비 50.0%~67.0%로 비교적 높은 방제율을 보여주었다(그림17).



| | 방제가(%) | | |
|------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 7DAA1 st appl | 7DAA2 nd appl | 7DAA3 rd appl |
| 정량1회 | 36.8 | 39.9 | 34.1 |
| 정량2회 | 43.6 | 47.9 | 48.7 |
| 정량3회 | 43.6 | 53.9 | 52.4 |
| 배량1회 | 53.6 | 50.0 | 50.0 |
| 배량2회 | 60.1 | 47.9 | 56.1 |
| 배량3회 | 60.1 | 52.0 | 67.0 |



그림 17. 최종시제품의 벼 흰잎마름병에 대한 약제방제효과시험

(4) 최종시제품 벼 모썩음병에 대한 약제방제효과 시험

최종 시제품의 벼 모썩음병에 대한 약제방제효과를 검정하였다. 모썩음 병원균인 *Pythium ultimum*을 1/2 PDA에 7일간 배양하여 1×1cm로 자른 mycelia plug를 수도용 상토와 1plug/g로 혼합하여 이병토를 만들어 모판에 담은 후, 최종시제품 500배 희석액 1L를 관주처리하였고, 소독 후 최아시킨 벼 종자(새누리)를 이병토에 파종하여 28도, 70% humidity, 14시간 2500LUX 조건에서 25일간 모썩음병 진전도를 관찰하였다. 그 결과 파종 15일, 20일, 25일 뒤 모썩음 이병주를 조사하였을 때 무처리구 32.7%, 43.5%, 61.8%로 이병율이 증가하는 반면, 최종 시제품 처리구는 15일 4.8% 수준의 이병율이 25일까지 유지되어 더 이상 발병이 진행되지 않은 것을 확인하였다(그림18).



자. 유기농업자재등록 시험

(1) 약효약해 시험

1) 벼 도열병에 대한 약제방제효과시험(전남 영암)

최종시제품의 도열병에 대한 약제방제효과 시험을 전남 영암 신북면에서 실시하였다. 시험방법 및 결과는 아래와 같다.

1. 시험 개요

- 1.1 시험기관 : (주)현농
- 1.2 시험년도 : 2021년
- 1.3 시험책임자 : 한송희
- 1.4 시험장소 : 전남 영암군 신북면 학동리 ***
- 1.5 시험입지조건(토성) : 미사질양토

2. 시험목적

(주)현농 의뢰제품인 「타지마」의 벼 잎도열병에 대한 약효·약해를 검토하여 유기농업자재 공시자료로 활용하기 위함.

3. 시험방법

3.1 대상충해 : 벼 잎도열병 (*Magmaporthae grisea*)

3.2 시험작물(품종) : 벼(호평)

3.3 대상병해 발생상황 : 무처리구에서 병반면적율이 4.4%로 약효를 조사하기에 충분하였음.

3.4 처리내용

| 시험 약제명 | 주원료 투입비율(%) | 약 효 시 험 | | 약 해 시 험 | |
|--------|----------------|---------------|---------------------------|----------------|----------------|
| | | 희석배수 및 사용량 | 처리시기 및 방법 | 기준량 | 배 량 |
| 타 지 마 | 미생물 추출액(100%) | 500배 | 발생 초 1회 경엽살포 (7/14) | 500배 (7/14) | 250배 (7/14) |
| 무 처 리 | - | - | - | - | - |

3.4.1 시험약제 처리 내용

3.4.1.1 시험약제

- 타지마

3.4.1.2 시험약제의 조제

- 약효시험 - 약제 20ml, 물 10L, 전체약량 30L
- 약해시험(정량) - 약제 4ml, 물 2L 전체약량 6L
- 약해시험(배량) - 약제 8ml, 물 2L 전체약량 6L

3.4.1.3 시험구당 처리 약제의 양 : 처리구당 10L(약효), 2L(약해) 살포

3.4.1.4 분무기(살포기) 제원 : SUN전동분무기/신일종합농기계, 2구 노즐

3.5 경종개요

3.5.1 재배방법

| | 재배조건 | 재식간격 | 이앙일자 | 기타 |
|----|------|---------|------------|-------------|
| 영암 | 노지재배 | 20x20cm | 2020.06.03 | 타약제 처리하지 않음 |

3.6 시험구배치 및 면적 : 난괴법 3반복

| 구 분 | 처리수 | 반복수 | 총구수 | 구당면적 | 소요면적 | 총소요면적 |
|-----|-----|-----|-----|------------------|-------------------|-------------------|
| 약 효 | 2 | 3 | 6 | 30m ² | 180m ² | 225m ² |
| 약 해 | 3 | 3 | 9 | 5m ² | 45m ² | |

3.7 약제처리(살포) 전후 기상상황 : 약제처리나 약효조사에 영향을 끼칠 큰 기상변화 없었음.

| 월/일 | 강우량(mm) | 최고/최저 기온(°C) | 평균기온(°C) |
|------|---------|--------------|----------|
| 7/13 | - | 32.9/24.6 | 28.4 |
| 7/14 | - | 31.4/24.8 | 27.5 |
| 7/15 | - | 32.7/23.4 | 27.7 |

※처리일자, 기상정보 :강진(무) 기상관측소

4. 조사방법

| 구분 | 조사항목 | 조사 횟수 | 조사일자 | 조사방법 |
|-------|----------|-------|------------------|---|
| 약효 시험 | 병반면적율(%) | 1회 | 8/04 | 최종 약제처리 21일 후 구당 30주당 병반 면적율 조사 |
| 약해 시험 | 외관상 약해유무 | 3회 | 7/17, 7/19, 7/21 | 최초 약제처리 7일 이내 3회(약제처리 후 3,5,7일) 외관상 약해유무 달관조사 |

5. 시험성적










5.1 약효시험

5.1.1 벼 잎도열병에 대한 약제방제 효과(최종약제처리 21일 후)

| 시험약제 | 병반면적율(%) | | | | 유의차 (DMRT) | 방제가(%) |
|-------|----------|-------|--------|-----|---------------|--------|
| | I 반복 | II 반복 | III 반복 | 평균 | | |
| 타지마 | 1.2 | 1.0 | 1.1 | 1.1 | b | 75.0 |
| 무 처 리 | 4.3 | 4.6 | 4.4 | 4.4 | a | - |

CV(%)-7.1

5.2 약해시험 : 경엽의 위조, 고사, 반점, 황변, 낙엽여부 등 약해 증상 없음.

| 조사일 | 무처리 | 기준량 | 배량 |
|---------------|---|--|---|
| 3일후 (7/17) |  |  |  |
| 5일후 (7/19) |  |  |  |
| 7일후 (7/21) |  |  |  |

6. 결과요약

6.1 약효

○ 타지마 제품은 벼 잎도열병에 대하여 75.0%의 우수한 방제효과를 나타냄.

6.2 약해

○ 타지마 제품을 기준량, 배량 처리 후 7일간 약해 조사 결과 경엽의 위조, 고사, 반점, 황변, 낙엽여부 등 약해 증상 관찰되지 않음.

7. 시험담당자 의견

○ 타지마 제품은 벼 잎도열병에 대하여 우수한 방제효과를 나타내고, 약해증상도 발견되지 않아 벼 잎도열병 방제 약제로 사용 가능할 것으로 판단됨.

8. 시험적합성 증빙자료

8.1 시험약제



8.2 시험포장

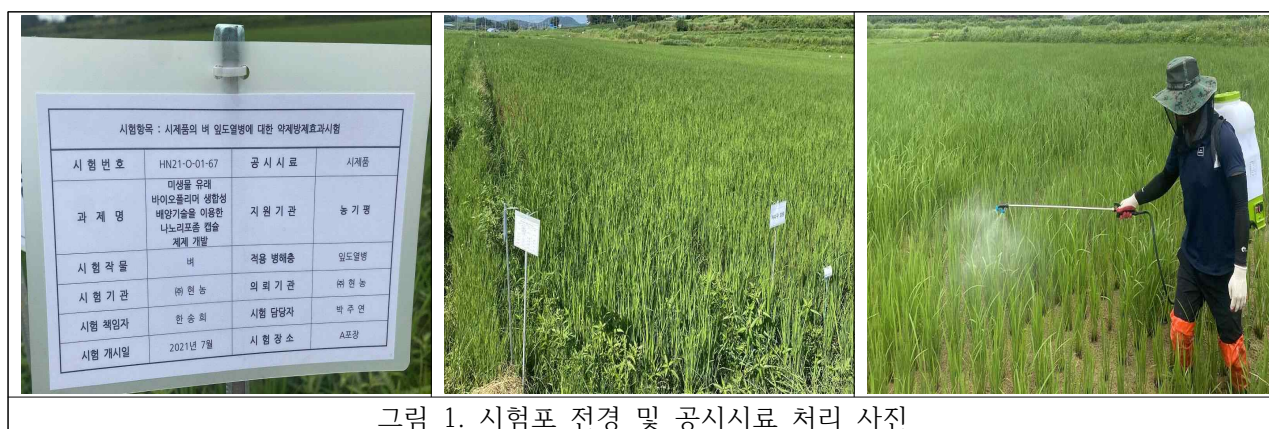
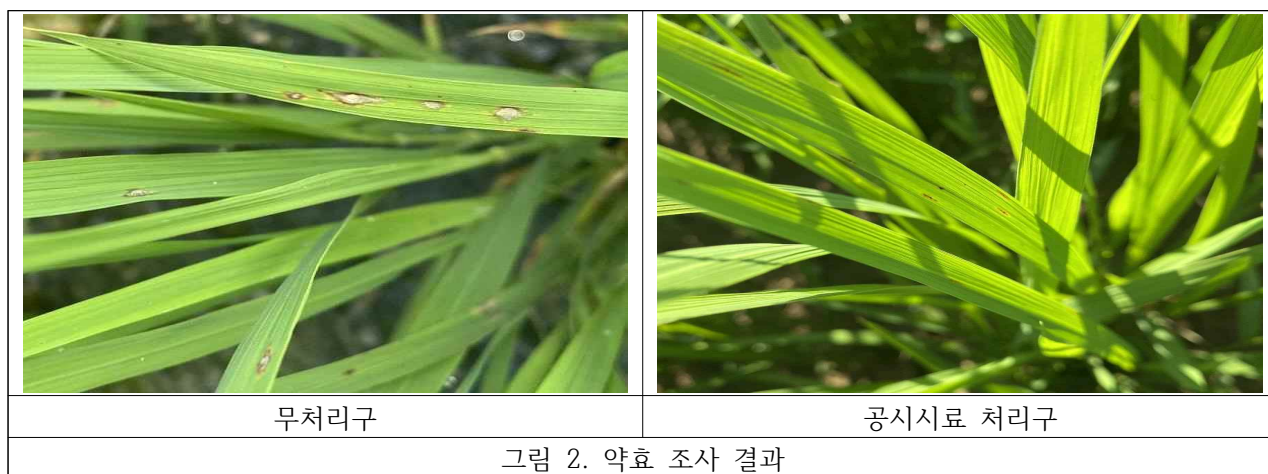


그림 1. 시험포 전경 및 공시시료 처리 사진



2) 벼 도열병에 대한 약제방제효과시험(전북 순창)

최종시제품의 도열병에 대한 약제방제효과 시험을 전북 순창 유등면에서 실시하였다. 시험방법 및 결과는 아래와 같다.

1. 시험 개요

- 1.1 시험기관 : (주)현농
- 1.2 시험년도 : 2021년
- 1.3 시험책임자 : 한송희
- 1.4 시험장소 : 전북 순창군 유등면 오교리 ****
- 1.5 시험입지조건(토성) : 양토

2. 시험목적

(주)현농 의뢰제품인 「타지마」의 벼 잎도열병에 대한 약효·약해를 검토하여 유기농업자재 공시자료로 활용하기 위함.

3. 시험방법

- 3.1 대상충해 : 벼 잎도열병 (*Magmaporthae grisea*)
- 3.2 시험작물(품종) : 벼(호평)

3.3 대상병해 발생상황 :무처리구에서 병반면적율이 5.0%로 약효를 조사하기에 충분하였음.

3.4 처리내용

| 시험 약제명 | 주원료 투입비율(%) | 약 효 시 험 | | 약 해 시 험 | |
|--------|----------------|---------------|---------------------------|----------------|----------------|
| | | 희석배수 및 사용량 | 처리시기 및 방법 | 기준량 | 배 량 |
| 타 지 마 | 미생물 추출액(100%) | 500배 | 발생 초 1회 경엽살포 (7/13) | 500배 (7/13) | 250배 (7/13) |
| 무 처 리 | - | - | - | - | - |

3.4.1 시험약제 처리 내용

3.4.1.1 시험약제

- 타지마

3.4.1.2 시험약제의 조제

- 약효시험 - 약제 20ml, 물 10L, 전체약량 30L
- 약해시험(정량) - 약제 4ml, 물 2L 전체약량 6L
- 약해시험(배량) - 약제 8ml, 물 2L 전체약량 6L

3.4.1.3 시험구당 처리 약제의 양 : 처리구당 10L(약효), 2L(약해) 살포

3.4.1.4 분무기(살포기) 제원 : SUN전동분무기/신일종합농기계, 2구 노즐

3.5 경종개요

3.5.1 재배방법

| | 재배조건 | 재식간격 | 이앙일자 | 기타 |
|----|------|---------|------------|-------------|
| 순창 | 노지재배 | 20x20cm | 2020.06.08 | 타약제 처리하지 않음 |

3.6 시험구배치 및 면적 : 난괴법 3반복

| 구 분 | 처리수 | 반복수 | 총구수 | 구당면적 | 소요면적 | 총소요면적 |
|-----|-----|-----|-----|------------------|-------------------|-------------------|
| 약 효 | 2 | 3 | 6 | 30m ² | 180m ² | 225m ² |
| 약 해 | 3 | 3 | 9 | 5m ² | 45m ² | |

3.7 약제처리(살포) 전후 기상상황 : 약제처리나 약효조사에 영향을 끼칠 큰 기상변화 없었음.

| 월/일 | 강우량(mm) | 최고/최저 기온(℃) | 평균기온(℃) |
|------|---------|-------------|---------|
| 7/12 | - | 33.4/23.8 | 28.0 |
| 7/13 | - | 33.7/23.0 | 28.5 |
| 7/14 | - | 32.5/24.0 | 27.8 |

※순창(무) 기상관측자료

4. 조사방법

| 구분 | 조사항목 | 조사 횟수 | 조사일자 | 조사방법 |
|-------|----------|-------|------------------|---|
| 약효 시험 | 병반면적율(%) | 1회 | 8/03 | 최종 약제처리 21일 후 구당 30주당 병반 면적율 조사 |
| 약해 시험 | 외관상 약해유무 | 3회 | 7/16, 7/18, 7/20 | 최초 약제처리 7일 이내 3회(약제처리 후 3,5,7일) 외관상 약해유무 달관조사 |

5. 시험성적










5.1 약효시험

5.1.1 벼 잎도열병에 대한 약제방제 효과(최종약제처리 21일 후)

| 시험약제 | 병반면적율(%) | | | | 유의차 (DMRT) | 방제가(%) |
|-------|----------|-------|--------|-----|------------|--------|
| | I 반복 | II 반복 | III 반복 | 평균 | | |
| 타지마 | 1.2 | 1.2 | 1.3 | 1.2 | b | 76.0 |
| 무 처 리 | 5.0 | 4.8 | 5.1 | 5.0 | a | - |

CV(%)=4.9

5.2 약해시험 : 경엽의 위조, 고사, 반점, 황변, 낙엽여부 등 약해 증상 없음.

| 조사일 | 무처리 | 기준량 | 배량 |
|----------------|--|---|--|
| 3일 후 (7/16) |  |  |  |
| 5일 후 (7/18) |  |  |  |
| 7일 후 (7/20) |  |  |  |

6. 결과요약

6.1 약효

○ 타지마 제품은 벼 잎도열병에 대하여 76.0%의 우수한 방제효과를 나타냄.

6.2 약해

○ 타지마 제품을 기준량, 배량 처리 후 7일간 약해 조사 결과 경엽의 위조, 고사, 반점, 황변, 낙엽여부 등 약해 증상 관찰되지 않음.

7. 시험담당자 의견

○ 타지마 제품은 벼 잎도열병에 대하여 우수한 방제효과를 나타내고, 약해증상도 발견되지 않아 벼 잎도열병 방제 약제로 사용 가능할 것으로 판단됨.

8. 시험적합성 증빙자료

8.1 시험약제



8.2 시험포장



그림 1. 시험포 전경 및 공시시료 처리 사진

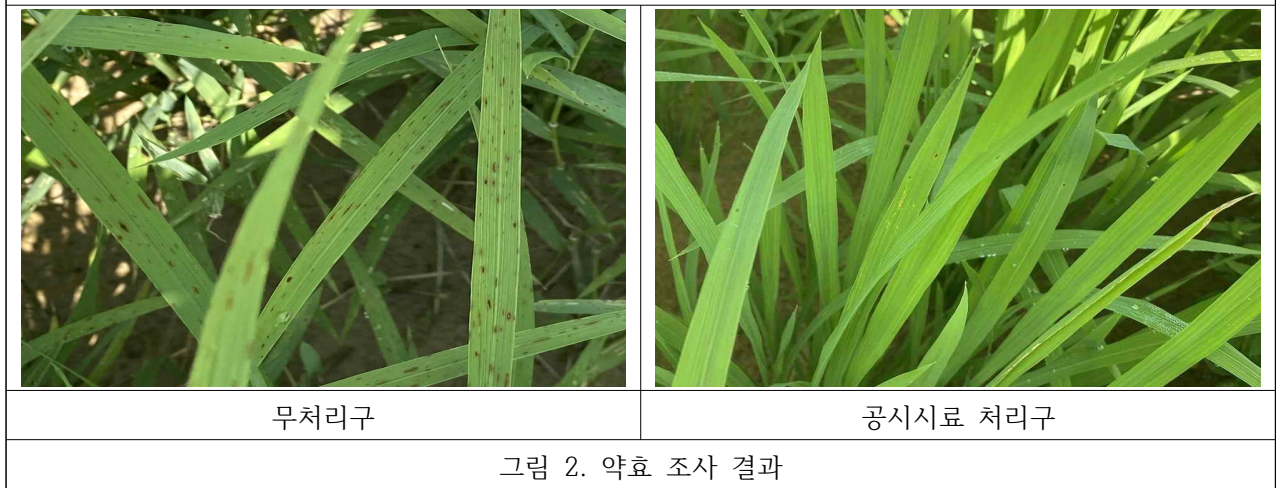


그림 2. 약효 조사 결과

3) 벼 잎집무늬마름병에 대한 약제방제효과시험

최종시제품의 벼 잎집무늬마름병에 대한 약제방제효과 시험을 전남 담양에서 실시하였다.
시험방법 및 결과는 아래와 같다.

1. 시험 개요

- 1.1 시 험 기 관 : (주)현농
- 1.2 시 험 년 도 : 2022년
- 1.3 시험 책임자 : 한송희
- 1.4 시 험 장 소 : 전남 담양 대덕면 비차리 ***
- 1.5 시험입지조건(토성) : 미사질양토

2. 시험목적

(주)현농 의뢰제품인 「타지마」의 벼 잎집무늬마름병에 대한 약효약해를 검토하여 유기농업자재
공시자료로 활용하기 위함.

3. 시험방법

- 3.1 대상병해 : 벼 잎집무늬마름병(*Rhizoctonia solani*)
- 3.2 시험작물(품종) : 벼(신동진)
- 3.3 대상병해 발생상황 : 무처리구에서 피해도가 32.6% 이상으로 약효를 조사하기에
충분하였음.
- 3.4 처리내용

| 시험 약제명 | 주원료투입비율 | 약 효 시 험 | | 약 해 시 험 | |
|-----------|-------------|---------------|--|---------------|---------------|
| | | 희석배수 및 사용량 | 처리시기 및 방법 | 기준량 | 배 량 |
| 타지마 | 미생물추출물(100) | 500배 | 유수형성기 및 수잉기 각 1회 경엽처리 (7/6, 8/1) | 500배 (7/6) | 250배 (7/6) |
| 무 처 리 | - | - | - | - | - |

3.4.1 시험약제 처리 내용

3.4.1.1 시험약제

- 타지마

3.4.1.2 시험약제의 조제

- 약효시험 - 약제 10ml, 물 5L, 전체약량 15L
- 약해시험(정량) - 약제 2ml, 물 1L, 전체약량 3L
- 약해시험(배량) - 약제 1ml, 물 1L, 전체약량 3L

3.4.1.3 시험구당 처리 약제의 양 : 처리구당 5L(약효), 1L(약해) 살포

3.4.1.4 분무기(살포기) 제원 : SUN전동분무기/신일종합농기계, 2구 노즐

3.5 경종개요

3.5.1 재배방법

| 재배조건 | 재식간격 | 이앙일자 | 출수일자 | 기타 |
|------|-----------|------|------|-------------|
| 노지재배 | 25cm×25cm | 5/25 | 8/14 | 타약제 처리하지 않음 |

3.6 시험구배치 및 면적 : 난괴법 3반복

| 구 분 | 처리수 | 반복수 | 총구수 | 구당면적 | 소요면적 | 총소요면적 |
|-----|-----|-----|-----|------------------|-------------------|-------------------|
| 약 효 | 2 | 3 | 6 | 30m ² | 180m ² | 225m ² |
| 약 해 | 3 | 3 | 9 | 5m ² | 45m ² | |

3.7 약제처리(살포) 전후 기상상황 : 약제처리나 약효조사에 영향을 끼칠 큰 기상변화 없었음.

| 월/일 | 강우량(mm) | 최고/최저 기온(°C) | 평균기온(°C) |
|------|---------|--------------|----------|
| 7/5 | 7.3 | 32.0/25.2 | 27.4 |
| 7/6* | - | 34.5/25.0 | 29.1 |
| 7/7 | 4.9 | 33.0/26.0 | 28.8 |
| 7/31 | 26.4 | 28.5/25.3 | 26.4 |
| 8/1* | 1.5 | 30.0/25.5 | 27.6 |
| 8/2 | 1.7 | 31.4/25.4 | 28.0 |

4. 조사방법

| 구분 | 조사항목 | 조사 횟수 | 조사일자 | 조사방법 |
|----------|----------|----------|-----------------|--|
| 약효 시험 | 피해도 | 1회 | 9/3 | 출수 20일 후 구당 30주 피해도 조사 |
| 약해 시험 | 외관상 약해유무 | 3회 | 7/9, 7/11, 7/13 | 약제처리 7일 이내 3회(약제처리 후 3, 5, 7일) 외관상 약해유무 달관조사 |










5. 시험성적

5.1 약효시험

5.1.1 벼 잎집무늬마름병에 대한 약제방제 효과(출수 20일 후)

| 시험약제 | 피해도(%) | | | | 유의차 (DMRT) | 방제가(%) |
|-------|--------|-------|-------|------|---------------|--------|
| | I 반복 | II 반복 | III반복 | 평균 | | |
| 타지마 | 14.4 | 13.6 | 13.8 | 13.9 | b | 57.4 |
| 무 처 리 | 34.4 | 31.1 | 32.2 | 32.6 | a | - |

5.2 약해시험 : 경엽의 위조, 고사, 반점, 황변, 낙엽여부 등 약해 증상 없음.

| 조사일 | 무처리 | 기준량 | 배량 |
|---------------|---|---|---|
| 3일후 (7/9) |  |  |  |
| 5일후 (7/11) |  |  |  |
| 7일후 (7/13) |  |  |  |

6. 결과요약

6.1 약효

○ 타지마는 벼 잎집무늬마름병에 대하여 57.4%의 방제효과를 나타냄.

6.2 약해

○ 타지마를 기준량, 배량 처리 후 7일간 약해 조사 결과 경엽의 위조, 고사, 반점, 황변, 낙엽여부 등 약해 증상 관찰되지 않음.

7. 시험담당자 의견

○ 타지마는 벼 잎집무늬마름병에 대하여 우수한 방제효과를 나타내고, 약해증상도 발견되지 않아 벼 잎집무늬마름병 방제 약제로 사용 가능할 것으로 판단됨.

8. 시험적합성 증빙자료

8.1 시험약제



8.2 시험포장



4) 벼 흰잎마름병에 대한 약제방제효과시험

최종시제품의 벼 마름병에 대한 약제방제효과 시험을 전남 장성에서 실시하였다. 시험방법 및 결과는 아래와 같다.

1. 시험 개요

- 1.1 시험기관 : (주)현농
- 1.2 시험년도 : 2022년
- 1.3 시험책임자 : 한송희
- 1.4 시험장소 : 전남 장성군 삼계면 상도리 ***
- 1.5 시험입지조건(토성) : 양토

2. 시험목적

(주)현농 의뢰제품인 「타지마」의 벼 흰잎마름병에 대한 약효약해를 검토하여 유기농업자재 공시자료로 활용하기 위함.

3. 시험방법

- 3.1 대상병해 : 벼 흰잎마름병(*Xanthomonas campestris*)
- 3.2 시험작물(품종) : 벼(강대찬)
- 3.3 대상병해 발생상황 : 무처리구에서 발병도가 19.2%로 약효를 조사하기에 충분하였음.
- 3.4 처리내용

| 시험 약제명 | 주원료투입비율(%) | 약 효 시 험 | | 약 해 시 험 | |
|-----------|-------------|------------------|---------------------------------------|----------------|----------------|
| | | 희석배수 및 사용량 | 처리시기 및 방법 | 기준량 | 배 량 |
| 타지마 | 미생물추출물(100) | 500배 | 발병직전 7일 간격 2회 경엽처리 (8/26, 9/02) | 500배 (8/26) | 250배 (8/26) |
| 무 처 리 | - | - | - | - | - |

3.4.1 시험약제 처리 내용

3.4.1.1 시험약제

- 타지마

3.4.1.2 시험약제의 조제

- 약효시험 - 약제 10ml, 물 5L, 전체약량 15L
- 약해시험(정량) - 약제 2ml, 물 1L, 전체약량 3L
- 약해시험(배량) - 약제 1ml, 물 1L, 전체약량 3L

3.4.1.3 시험구당 처리 약제의 양 : 처리구당 5L(약효), 1L(약해) 살포

3.4.1.4 분무기(살포기) 제원 : SUN전동분무기/신일종합농기계, 2구 노즐

3.5 경종개요

3.5.1 재배방법

| 재배조건 | 재식간격 | 이앙일자 | 출수일자 | 기타 |
|------|-----------|------------|------------|-------------|
| 노지재배 | 25cm×25cm | 2022.06.03 | 2022.08.15 | 타약제 처리하지 않음 |

3.6 시험구배치 및 면적 : 난괴법 3반복

| 구 분 | 처리수 | 반복수 | 총구수 | 구당면적 | 소요면적 | 총소요면적 |
|-----|-----|-----|-----|------------------|-------------------|-------------------|
| 약 효 | 2 | 3 | 6 | 30m ² | 180m ² | 225m ² |
| 약 해 | 3 | 3 | 9 | 5m ² | 45m ² | |

3.7 약제처리(살포) 전후 기상상황 : 약제처리나 약효조사에 영향을 끼칠 큰 기상변화 없었음.

| 월/일 | 강우량(mm) | 최고/최저 기온(°C) | 평균기온(°C) |
|--------------|---------|--------------|----------|
| 8/25 | - | 29.9/21.8 | 24.9 |
| *8/26 | - | 29.9/21.0 | 24.5 |
| 8/27 | - | 26.8/19.0 | 22.8 |
| 9/01 | - | 26.4/20.2 | 22.6 |
| *9/02 | - | 27.1/20.1 | 23.1 |
| 9/03 | 0.0 | 28.9/21.9 | 24.9 |

4. 조사방법

| 구분 | 조사항목 | 조사 횟수 | 조사일자 | 조사방법 |
|----------|----------|----------|-----------------|---|
| 약효 시험 | 발병도(%) | 1회 | 9/09 | 최종약제처리 7일 후 구당 30주에 대한 발병도 조사 |
| 약해 시험 | 외관상 약해유무 | 3회 | 8/29, 8/31, 9/2 | 약제처리 7일 이내 3회(약제처리 후 3, 5, 7일) 외관상 약해유무 달관조사 |

○ 타지마는 벼 흰잎마름병에 대하여 53.6%의 방제효과를 나타냄.

6.2 약해

○ 타지마 시료를 기준량, 배량 처리 후 7일간 약해 조사 결과 경엽의 위조, 고사, 반점, 황변, 낙엽여부 등 약해 증상 관찰되지 않음.

7. 시험담당자 의견

○ 타지마는 벼 흰잎마름병에 대하여 우수한 방제효과를 나타내고, 약해증상도 발견되지 않아 벼 흰잎마름병 방제 약제로 사용 가능할 것으로 판단됨.

8. 시험적합성 증빙자료

8.1 시험약제

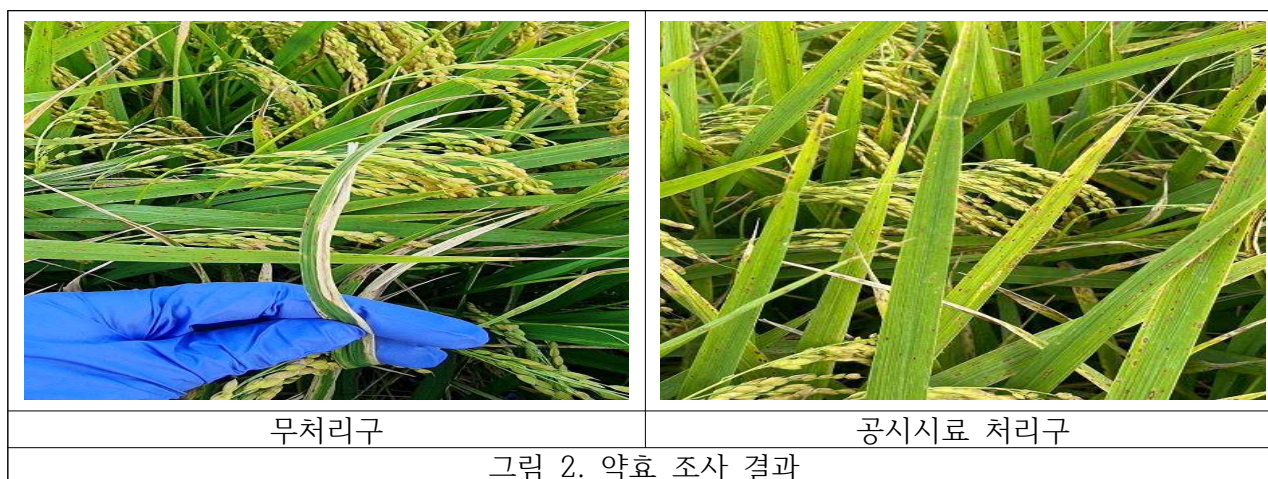


타지마

8.2 시험포장



그림 1. 시험포 전경 및 공시시료 처리 사진



| 구 분 | 조 사 항 목 | 조사회수 | 조 사 일 자 | | 조 사 방 법 |
|-----|----------|------|-----------------------------|---|-----------------------|
| 약 해 | 외관상 약해유무 | 3 | 고추 당근 배추 상추 시금치 | 10/09, 10/11, 10/13 10/16, 10/18, 10/20 10/04, 10/06, 10/08 10/05, 10/07, 10/09 10/07, 10/09, 10/11 | 경엽의 외관상 약해 유무 달관조사 |

(4) 시험성적

| 시험약제 | 시험작물 | 약해정도 (0 ~ 5) | | 비 고 |
|------|------|--------------|-----|------|
| | | 기 준 량 | 배 량 | |
| 타지마 | 고추 | 0 | 0 | 약해없음 |
| | 당근 | 0 | 0 | |
| | 배추 | 0 | 0 | |
| | 상추 | 0 | 0 | |
| | 시금치 | 0 | 0 | |

(5) 엽수 조사







| 시험약제 | 시험작물 | 엽수 (처리후 7일) | | |
|------|------|-------------|-------|-----|
| | | 무 처 리 | 기 준 량 | 배 량 |
| 타지마 | 고추 | 4 | 4 | 4 |
| | 당근 | 3 | 3 | 3 |
| | 배추 | 4 | 4 | 4 |
| | 상추 | 4 | 4 | 4 |
| | 시금치 | 4 | 4 | 4 |

(6) 초장 조사







| 시험약제 | 시험작물 | 초장 (처리후 7일) | | |
|------|------|-------------|-------|-----|
| | | 무 처 리 | 기 준 량 | 배 량 |
| 타지마 | 고추 | 9 | 9 | 9 |
| | 당근 | 12 | 12 | 12 |
| | 배추 | 8 | 8 | 8 |
| | 상추 | 8 | 8 | 8 |
| | 시금치 | 7 | 7 | 7 |




(7) 처리구별 전경


| 처리구 작물 | 무처리구 | 추천구 | 배량구 |
|-----------|---|--|---|
| 당근 |  |  |  |
| |  |  |  |

| 처리구 작물 | 무처리구 | 추천구 | 배량구 |
|-----------|---|--|---|
| 배추 |  |  |  |
| |  |  |  |







나. 공시시료 처리 후 5일째 유식물체 생육모습







| 처리구 작물 | 무처리구 | 추천구 | 배량구 |
|-----------|---|--|---|
| 배추 |  |  |  |
| |  |  |  |







| 처리구 작물 | 무처리구 | 추천구 | 배량구 |
|-----------|---|--|---|
| 상추 |  |  |  |
| |  |  |  |







| 처리구 작물 | 무처리구 | 추천구 | 배량구 |
|-----------|---|--|---|
| 시금치 |  |  |  |
| |  |  |  |







다. 공시시료 처리 후 7일째 유식물체 생육모습

| 처리구 작물 | 무처리구 | 추천구 | 배량구 |
|-----------|---|--|---|
| 고추 |  |  |  |
| |  |  |  |

| 처리구 작물 | 무처리구 | 추천구 | 배량구 |
|-----------|---|--|---|
| 당근 |  |  |  |
| |  |  |  |

| 처리구 작물 | 무처리구 | 추천구 | 배량구 |
|-----------|---|--|---|
| 배추 |  |  |  |
| |  |  |  |

| 처리구 작물 | 무처리구 | 추천구 | 배량구 |
|-----------|---|--|---|
| 상추 |  |  |  |
| |  |  |  |

| 처리구 작물 | 무처리구 | 추천구 | 배량구 |
|-----------|---|--|---|
| 시금치 |  |  |  |
| |  |  |  |

(9) 결과요약

공시시료의 처리에 의한 약해 발생 유무를 조사하기 위하여 공시시료를 정량, 2배량으로 나누 어 작물 약해 시험을 실시하였다. 각각의 농도를 정식 후 엽면살포 처리하여 생육장해 및 피해 증상을 달관 조사한 결과, 2배량은 물론 추천 배율에서도 약해가 발생하지 않음을 확인하였다.

(10) 시험담당자 의견

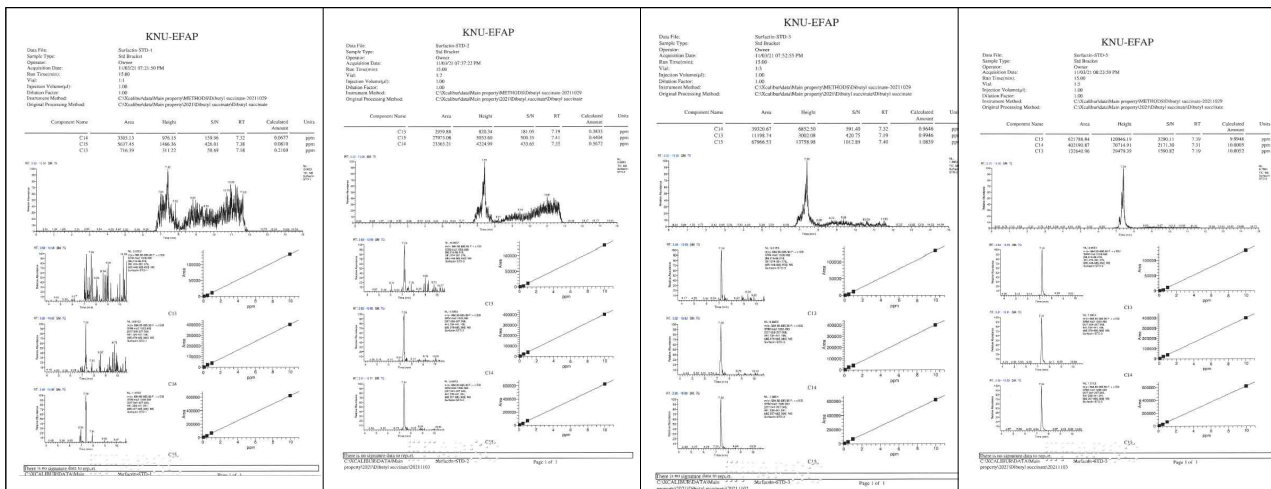
본 공시시료에 대한 작물의 약해 발생 유무를 분석하기 위하여 공시시료 정량, 2배량을 엽면살포 처리 후 3, 5, 7일간 관찰한 결과 모든 처리구에서 약해가 발생하지 않았다.

(3) 시제품 유효물질 성분의 이화학적 분석 성적서

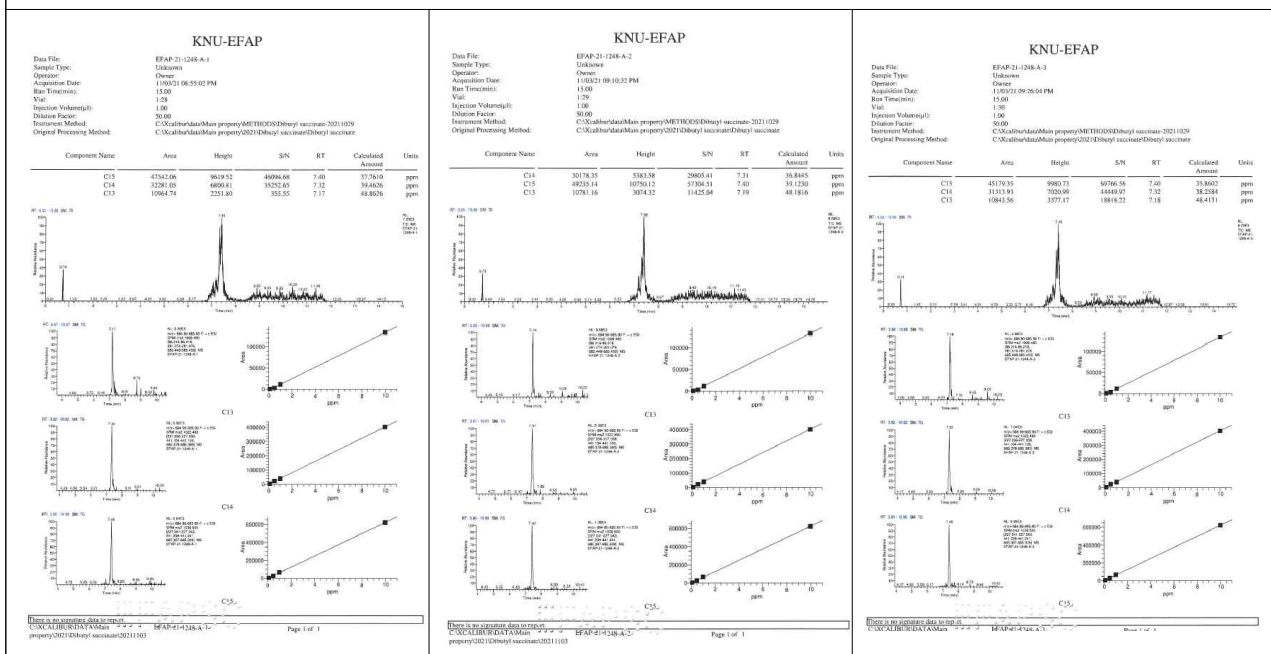
시제품 타지마의 유효물질 검출에 대한 이화학적 분석 성적서는 강원대학교 산학협력단의 친환경농산물안전성센터에서 분석하였으며 분석결과 성적서는 다음과 같다.

| | | | | | | | |
|---|---------------|-------------|--------------------------|-------|---|---------------------------|--|
| 발급번호 제 EFAP-21-1248-A-1 호 | | | | | | | |
| 이화학적 분석성적서 | | | | | | | |
| 분 석 년 월 일 | 2021. 11. 03. | | 제조(수입)년월일 (Batch No.) | | - | | |
| 시 험 책 임 자 | 소 속 | 친환경농산물안전성센터 | 성 명 | 김 희 곤 |  | | |
| 분 석 의뢰자 | (주)현농 | | | | | | |
| 품 목 명 | 타지마 | | | | | | |
| 유효성분의 명칭 및 함유량 | Surfactin | | | | | | |
| 분 석 결 과 | | | | | | | |
| 분석항목 | 분석회수 | 분석치(mg/kg) | | | | 분석방법 | |
| 1. 유효성분 | 1 | 39.643 | | | | LC-MS/MS를 이용한 정량 분석 | |
| | 2 | 39.387 | | | | | |
| | 3 | 38.153 | | | | | |
| | 평균치 | 39.06 | | | | | |
| | 표준편차 | 0.79 | | | | | |
| 2. 물리성 | 항목 | 검사결과 | | | | | |
| | 수화성 | - 해당사항 없음 - | | | | | |
| | 분말도 | - 해당사항 없음 - | | | | | |
| 3. 외관 | 성상 | - | 색상 | - | 냄새 | - | |
| 4. 시험항목 (의뢰자 기재) | | | | | | | |
| 첨부 자료 ○ 성적계산서 및 크로마토그램 | | | | | | | |
| 1) 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로써 전체제품에 대한 품질을 보증하지는 않음. 2) 본 성적서의 결과는 광고, 전단, 홍보 및 소송 등의 수단으로 사용하실 수 없음. | | | | | | | |
| 2021 년 11 월 09 일 | | | | | | | |
| 강원대학교 산학협력단 친환경농산물안전성센터  | | | | | | | |

이화학적 분석 성적서



유효물질의 농도별 표준물질 검량




시제품 유효물질 분석 결과

(4) 유해 성분 분석 시험 및 성적

시제품에 대한 유해 중금속 8종 분석을 통하여 안전성을 검사하였다. 분석 결과에 대한 성적서는 다음과 같다.

[인증현황: 농촌진흥청 비료시험연구기관 제60호 & 국립농산물품질관리원 유기농업자재시험연구기관 제47호]



비토분석센타(주)

| | |
|--------|----------|
| 시험 책임자 | 전유민, 김대환 |
| 시험 담당자 | 전유민, 김대환 |

분 석 성 적 서

| | | | | |
|------|--------------|--------------------|------------|---------------|
| 의뢰인 | 상 호 | (주)현농 | 사업자등록번호 | 08-8111-00000 |
| | 주 소 | 전라남도 장성군 남면 나노산단3로 | | |
| 접수일자 | 2021. 10. 28 | 용 도 | 유기농업자재목록공시 | |
| 접수번호 | 2021-10-E024 | 시 료 명 | 타지마 | |


분석(시험)성적 결과 :

| 분석항목(단위) | 분석결과 | 분석항목(단위) | 규격 | 분석결과 |
|------------|--------|---|-------|------|
| 질소전량(%) | 0.34 | 비소(mg/kg) | 20이하 | 불검출 |
| 수용성인산(%) | 0.12 | 카드뮴(mg/kg) | 2이하 | 불검출 |
| 수용성칼리(%) | 0.17 | 수은(mg/kg) | 1이하 | 불검출 |
| 수용성고토(%) | 불검출 | 납(mg/kg) | 50이하 | 불검출 |
| 수용성망간(%) | 불검출 | 크롬(mg/kg) | 90이하 | 불검출 |
| 수용성붕소(%) | 0.001 | 구리(mg/kg) | 120이하 | 0.51 |
| 수용성철(%) | 0.0009 | 니켈(mg/kg) | 20이하 | 불검출 |
| 수용성몰리브덴(%) | 0.0002 | 아연(mg/kg) | 400이하 | 불검출 |
| 수용성석회(%) | 0.01 | <small>* 유해성분 규격은 토양개량 및 작물생육용 유기농업자재 중 시행규칙 별표13 제1호 다목2)에 따라 농관원장이 정하는 유해중금속의 최대허용량[고상은 건물기준, 역상은 원물 기준]을 기재하였음</small> | | |
| 수용성규산(%) | 불검출 | | | |
| - | - | | | |

귀하가 당사에 의뢰한 시료에 대한 분석 성적입니다.

2021년 11월 1일

비토분석센타 주식회사



이 성적은 신청인이 제출한 시료를 분석한 것으로 관련사항 이외의 선전, 소송 등 증거자료로 사용하실 수 없습니다.

주소: 경기도 안산시 단원구 지원로107, 시화지식산업센터205호 TEL:(031)364-0101.FAX:(031) 364-0105

유해 성분 분석 성적서

(5) 병원성 미생물 분석 시험 성적서

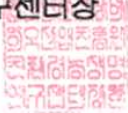
시제품의 병원성 미생물 5종에 대한 분석 결과에 대한 성적서는 다음과 같다.



U21031A

061-393-0000

시험성적서

| | | | | | | | | | | | | | | |
|--|------------|---|-----|--------------------|----------------------------|-----|---------------------------|-----|-----------------------------------|-----|------------------------------------|-----|-----------------------------|-----|
| 신청인 | 성명 | 김철홍 | 업체명 | ㈜현농 | | | | | | | | | | |
| | 주소 | 전남 장성군 남면 나노산단3로 [REDACTED] | | | | | | | | | | | | |
| | 전화 | 061-393-[REDACTED] | FAX | 061-393-[REDACTED] | | | | | | | | | | |
| 공시품 | 명칭 | 타지마 | | | | | | | | | | | | |
| | 형태 | 액상 | | | | | | | | | | | | |
| 검사항목 | 미생물 분석 | 병원성미생물검사(<i>E.coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> sp., <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Bacillus cereus</i>) | | | | | | | | | | | | |
| 용도 | 유기농업자재 공시용 | | | | | | | | | | | | | |
| 시험책임자 | 양현주 (인) | | | | | | | | | | | | | |
| <h3>시험결과</h3> <table border="1"> <tr> <td><i>E.coli</i> O157:H7 (정성)</td> <td>불검출</td> </tr> <tr> <td><i>Salmonella</i> sp.(정성)</td> <td>불검출</td> </tr> <tr> <td><i>Staphylococcus aureus</i> (정성)</td> <td>불검출</td> </tr> <tr> <td><i>Listeria monocytogenes</i> (정성)</td> <td>불검출</td> </tr> <tr> <td><i>Bacillus cereus</i> (정성)</td> <td>불검출</td> </tr> </table> | | | | | <i>E.coli</i> O157:H7 (정성) | 불검출 | <i>Salmonella</i> sp.(정성) | 불검출 | <i>Staphylococcus aureus</i> (정성) | 불검출 | <i>Listeria monocytogenes</i> (정성) | 불검출 | <i>Bacillus cereus</i> (정성) | 불검출 |
| <i>E.coli</i> O157:H7 (정성) | 불검출 | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Salmonella</i> sp.(정성) | 불검출 | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (정성) | 불검출 | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Listeria monocytogenes</i> (정성) | 불검출 | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Bacillus cereus</i> (정성) | 불검출 | | | | | | | | | | | | | |
| <p>2021년 11월 08일</p> <p>(재)전남바이오산업진흥원 친환경농생명연구센터장</p>  | | | | | | | | | | | | | | |

병원성 미생물 분석 시험성적서

시험성적서



(재)전남바이오산업진흥원
친환경농생명연구센터장

농촌진흥청지정
유기농업자재시험연구기관
비료시험연구기관
농약등의시험연구기관



(재)전남바이오산업진흥원
친환경농생명연구센터

전남 곡성군 입면 임면로 495
Tel. 061) 362-0630
Fax. 061) 362-0631
www.jbc.re.kr

U21031A

[주]현농

병원성미생물 검사 시험성적서

1. 시험의뢰자 및 시험연구기관 정보

1) 시험의뢰자 관련 정보

- 회사명 : [주]현농
- 대표자 : 김철홍
- 사업자등록번호 : [REDACTED]
- 회사주소지 : 전남 곡성군 남면 나노산단3로 [REDACTED]

2) 시험연구기관 정보

- 시험연구기관 : (재)전남바이오산업진흥원 친환경농생명연구센터
- 시험책임자 : 기능성유기농연구팀 양현주 연구원

2. 시험분석 항목

- 1) 병원성대장균 (*Escherichia coli* O157:H7)
- 2) 살모넬라 (*Salmonella* sp.)
- 3) 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*)
- 4) 리스테리아 모노사이토제네스 (*Listeria monocytogenes*)
- 5) 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*)

3. 시험분석의뢰 시료 : 『타지마』



4. 병원성 미생물 검사 결과

1) 병원성대장균 (*Escherichia coli* O157:H7)

① 검사방법

- mEC broth에서 증균 배양한 후 MacConkey sorbitol agar plate에서 분리배양한다.
- sorbitol을 분해하지 않는 무색 colony를 위해 EMB agar plate에 접종한다.
- EMB agar plate에서 녹색의 금속성광택이 보이는 colony를 선택하여 혈청형 시험을 실시한다.

② 검사결과



- EMB agar plate 상에서 녹색의 금속성광택을 보이는 colony가 검출되지 않아 병원성대장균에 대해 음성으로 판정

③ 최종결과

- 병원성대장균 (*Escherichia coli* O157:H7) : 불검출

2) 살모넬라 (*Salmonella* sp.)

① 검사방법

- Rapport-Vassiliadis(RV) broth에서 배양한다.
- RV broth에서 배양한 배양액을 Xylose Lysine Desoxycholate(XLD) agar plate에서 배양한다.
- 중앙에 검은환이 있는 분홍 집락을 선택하여 혈청응집 시험을 통해 확인하거나 VITEK 기기를 이용하여 동정한다.

② 검사결과



- XLD agar plate에서 중앙에 검은환이 있는 분홍 colony가 검출되지 않아 *Salmonella*에 대해 음성으로 판정

③ 최종결과

- 살모넬라 (*Salmonella* sp.) : 불검출

3) 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*)

① 검사방법

- 10% NaCl을 첨가한 Tryptic Soy broth에서 배양한다.
- 배양 후 Baird-Parker agar plate에 접종하여 배양한 후 중심부에 환을 띠고 검은빛이 나는 colony를 선택하여 확인시험을 실시한다.

② 검사결과



- Baird-Parker agar plate에서 환이 있는 검은빛이 나는 colony가 검출되지 않아 *Staphylococcus aureus*에 대해 음성으로 판정

③ 최종결과

- 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*) : 불검출

4) 리스테리아 모노사이토제네스 (*Listeria monocytogenes*)

① 검사방법

- Oxford agar plate에 배양한 후 투명한 colony 주변으로 검은색을 띠는 colony를 선택하여 확인시험을 실시한다.

② 검사결과



- Oxford agar plate에서 투명하고 주변에 검은색을 띠는 colony가 검출되지 않아 *Listeria monocytogenes*에 대해 음성으로 판정

③ 최종결과

- 리스테리아 모노사이토제네스 (*Listeria monocytogenes*) : 불검출

5) 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*)

① 검사방법

- MYP agar에 접종 배양 후 colony 주변에 lecithonase를 생성하는 혼탁한 환이 있는 분홍색 colony를 *Bacillus cereus* 양성으로 판정

② 검사결과



- MYP agar에 접종 배양 후 colony 주변에 lecithonase를 생성하는 혼탁한 환이 있는 분홍색 colony가 검출되지 않아 *Bacillus cereus*에 대해 음성으로 판정

③ 최종결과

- 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*) : 불검출



* 상기내용은 검수물 시료에 대한 결과로써 시험한 결과를 유사 대상 시료에 적용할 수 없습니다.
* 본 성적서는 시험의뢰 목적 이외의 광고, 선전 등 상업적인 용도나 반역의 행위의 용도로 사용할 수 없습니다.

(재) 전남바이오산업진흥원
친환경농생명연구센터장



(6) 잔류농약분석 시험

시제품의 유기농업자재 공시 및 안전성 검사를 위해 잔류농약성분에 대한 분석 검사를 실시하였으며 분석 결과 성적서는 다음과 같다.

|  <div> (주) 현농 기업부설연구소 - (주) 500-757 광주광역시 북구 동북로 77 전남대학교 현농기업연구소 510호 - 전화 062) 530-5312, 팩스 062) 530-5311 - 분양책임자: 김동훈, 시험책임자: 박주현, 시험담당자: 이정훈 </div> | |  <div> (주) 현농 기업부설연구소 - (주) 500-757 광주광역시 북구 동북로 77 전남대학교 현농기업연구소 510호 - 전화 062) 530-5312, 팩스 062) 530-5311 - 분양책임자: 김동훈, 시험책임자: 박주현, 시험담당자: 이정훈 </div> | |
|---|--------------------------|---|---------------|
| ■ 문서번호 : HNN21-10-203 ■ 시험일자 : 2021. 10. 26. | | ■ 문서번호 : HNN22-10-92 ■ 시험일자 : 2022. 04. 18. | |
| ■ 제 목 : 잔류농약검사성적서 교부 반 응 참 조 | | ■ 제 목 : 잔류농약검사성적서 교부 반 응 참 조 | |
| <h3>시험 성적서</h3> | | | |
| 1. 의뢰인 | | | |
| 접수번호 | HNN21-10-203 | 접수일자 | 2021. 10. 26. |
| 신청인 | 현농 | | |
| 수거지번 | 전남 장성군 남면 나노산단8로 | | |
| 비고 | | | |
| 2. 의뢰내역 | | | |
| 검사항목 | 타지마 | | |
| 검사항목 | 잔류농약 322성분 (Abamectin 외) | | |
| 용도 | 유기농업자재 공시용 | | |
| 인증구분 | 유기농업자재 | | |
| 비고 | | | |
| 3. 시험결과 | | | |
| 검사항목 | 검출성분 | 검출량 (mg/kg) | 비고 |
| 타지마 | 322성분 불검출 | | |
| * 상기내용은 제출된 시료에 대한 결과로써 시험한 결과를 유사 대상 시료에 적용할 수 없습니다. * 본 성적서는 시험뢰의 목적 이외의 광고, 선전등 상업적인 용도나 별개의 책임의 유도로 사용할 수 없습니다. | | | |
| 2021년 10월 26일 (주) 현농 기업부설연구소장 | | | |
| 잔류농약 322 성분 | | 잔류농약 464 성분 | |
| 잔류농약 분석 성적서 | | | |

(7) 토끼를 이용한 시제품의 피부자극성 시험

시제품의 뉴질랜드 white계 토끼를 이용한 피부자극성에 대한 시험 분석을 의뢰 실시하였으며 분석 결과 최종 보고서는 다음과 같다.

최종보고서

New Zealand White계 토끼를 이용한 타지마의
피부자극성시험

ATD-22012



(주)한국생물안전성연구소

KBSI

KBSI

1 page of 17

제 출 문

시험물질 : 타지마

시험제목 : New Zealand White계 토끼를 이용한 타지마의 피부자극성시험

상기 독성시험을 “농약 및 원제의 등록기준” [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법
(농촌진흥청 고시 제2022-4호)에 준하여 실시하고 그 결과를 다음과 같이 제출합니다.

2022년 04월 27일

(주)한국생물안전성연구소

시험책임자 박 이 슬

KBSI

KBSI

2 page of 17

목 차
[Contents]

| | |
|--|----|
| 보고서표지 | 1 |
| 제출문 | 2 |
| 목차 [Contents] | 3 |
| 1. 요약 [Summary] | 5 |
| 2. 시험실시의 개요 [Introduction] | 6 |
| 2.1. 시험제목 | 6 |
| 2.2. 시험물질 | 6 |
| 2.3. 시험목적 | 6 |
| 2.4. 시험방법 | 6 |
| 2.5. 시험의뢰자 | 6 |
| 2.6. 시험기관 | 6 |
| 2.7. 시험장소 | 6 |
| 2.8. 시험책임자 | 6 |
| 2.9. 시험관계자 | 7 |
| 2.10. 시험일정 | 7 |
| 2.11. 시험물질의 보관 | 7 |
| 2.12. 시험자료의 보관 | 7 |
| 3. 시험재료 및 방법 [Materials and methods] | 8 |
| 3.1. 시험물질 | 8 |
| 3.2. 시험동물 | 8 |
| [표 1. 시험동물의 체중범위] | 8 |
| 3.3. 사육환경 및 관리 | 9 |
| 3.4. 시험물질의 처리 | 9 |
| 4. 관찰 및 측정 [Observation and determination] | 10 |
| 4.1. 일반중독증상 및 치사 | 10 |
| 4.2. 체중측정 | 10 |
| 4.3. 처리부위 관찰 | 10 |
| 4.4. 피부반응의 평가 및 자극성의 판정 | 10 |
| [표 2. 피부반응 평가표] | 10 |
| [표 3. 피부 1차 자극표] | 11 |
| 5. 시험결과 [Results] | 12 |
| 5.1. 일반중독증상 및 치사동물 수 | 12 |
| 5.2. 체중변화 | 12 |
| 5.3. 피부반응의 평가 | 12 |

KBSI

KBSI

3 page of 17

| | |
|--|----|
| 5.4. 자극성의 판정 | 12 |
| 6. 참고문헌 [References] | 13 |
| 7. Tables | 14 |
| Table 1. Mortality and clinical signs | 14 |
| Table 2. Body weight changes | 15 |
| Table 3. Evaluation of skin irritation | 16 |
| Table 4. Calculation of mean value - 24, 48 and 72 hours | 17 |

KBSI

KBSI

4 page of 17

시제품의 토끼를 이용한 피부자극성 시험 성적서

1. 요약 [Summary]

New Zealand White계 토끼를 이용한 타지마의 피부자극성시험을 수행하여 일반중독증상, 치사수, 체중변화 및 피부자극성을 관찰·조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험기간 중 시험물질의 처리에 기인된 치사개체가 관찰되지 않았다.
- 일반증상 관찰 시 시험물질의 처리에 기인된 중독증상이 관찰되지 않았다.
- 개체별 체중결과, 시간이 경과함에 따라 증가추세를 보였다.
- 시험물질 제거 후 처리부의 국소자극성을 관찰한 결과, 피부자극이 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 New Zealand White계 토끼를 이용한 시험물질의 피부 처리는 [표 3. 피부 1차 자극표]에 의거 자극성 없는 물질인 것으로 구분되었다.



KBSI

5 page of 17

2. 시험실시의 개요 [Introduction]

2.1. 시험제목

New Zealand White계 토끼를 이용한 타지마의 피부자극성시험

2.2. 시험물질

타지마

2.3. 시험목적

토끼를 이용한 피부자극성시험을 통하여 유기농업자재 공시에 관한 기초자료로 활용코자 한다.

2.4. 시험방법

“농약 및 원제의 등록기준” [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제2022-4호) 중 12-1-4. 피부자극성 시험에 준하여 실시하였다.

2.5. 시험의뢰자

명칭 ㈜현농
소재지 전라남도 장성군 남면 나노산단3로 33-5

2.6. 시험기관

명칭 ㈜한국생물안전성연구소
소재지 충청북도 음성군 감곡면 성주로 362-20
연락처 Tel : 043-882-0297, Fax : 043-882-0298

2.7. 시험장소

명칭 ㈜한국생물안전성연구소 동물실험실
소재지 충청북도 음성군 감곡면 성주로 362-20

2.8. 시험책임자

성명 박이슬
소속 ㈜한국생물안전성연구소 독성연구팀



KBSI

6 page of 17

2.9. 시험관계자

시험물질의 조제 이항진, 염지영, 박이슬
시험물질의 노출 이항진, 염지영, 박이슬
관찰/측정/평가 이항진, 염지영, 박이슬
동물사육관리 이항진, 박이슬

2.10. 시험일정

동물입수일 2022년 03월 08일
검역순화기간 2022년 03월 08일 ~ 2022년 03월 14일
2022년 03월 08일 ~ 2022년 03월 21일
시험동물 제모일 2022년 03월 14일
2022년 03월 21일
시험물질 처리일 2022년 03월 15일
2022년 03월 22일
일반증상관찰기간 2022년 03월 15일 ~ 2022년 03월 29일
2022년 03월 22일 ~ 2022년 03월 29일
실험종료일 2022년 03월 29일
2022년 03월 29일
최종보고서 제출일 2022년 04월 27일

2.11. 시험물질의 보관

본시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질보관고에 보관하였다.
시료번호 22-1-012
시험물질보관기간 유기농업자재 공시 후 3년

2.12. 시험자료의 보관

본시험의 시험기초자료 및 관계시험성적서는 당 연구소 자료보관실에 보관하였다.
시험번호 ATD-22012
시험기초자료 자료보관실
최종보고서 자료보관실
자료하드디스크 자료보관실
자료보관기간 유기농업자재 공시 후 3년
자료관리담당자 최윤규



KBSI

7 page of 17

3. 시험재료 및 방법 [Materials and methods]

3.1. 시험물질

3.1.1. 물질명 타지마
3.1.2. 입수일 2022년 02월 18일
3.1.3. 입수량 500 mL
3.1.4. 시료번호 22-1-012
3.1.5. 성상 및 외관 액상, 황갈색
3.1.6. 주원료 미생물 추출물
3.1.7. 주원료 투입비율 90%
3.1.8. 보관조건 실온 (그늘진 곳)
3.1.9. 공급원 ㈜현농

3.2. 시험동물

3.2.1. 시험계 토끼 (New Zealand White계)
3.2.2. 공급원
- 명칭 한림실험동물연구소
- 소재지 경기도 화성시 봉담읍 최루백로 313
- 연락처 031-227-5955

3.2.3. 시험계의 선택사유
농촌진흥청 고시 제2022-4호 인축독성시험 기준과 방법에 백색토끼를 사용하도록 되어 있으며 New Zealand White계 토끼는 농약의 독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다.

3.2.4. 체중범위

[표 1. 시험동물의 체중범위]

| 구 분 | 입수 시 체중 (kg) | 처리 시 체중 (kg) |
|------|--------------|--------------|
| 시험동물 | 1.7 ~ 2.2 | 2.1 ~ 2.2 |

3.2.5. 순화 및 검역

동물들 구입한 후 초기 및 확인시험으로 각각 7일, 14일 동물실험실의 환경 하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체만을 시험에 이용하였다.

3.2.6. 군분리

제모를 실시하여 피부에 이상이 없는 동물만 선택하여 시험하였다.

3.2.7. 개체식별

사육 상자에 개체식별정보를 부착하여 식별하였다.



KBSI

8 page of 17

3.3. 사육환경 및 관리

3.3.1. 사육환경

본 시험의 사육환경은 온도 20±3℃, 상대습도 50±20%, 환기시설 (공조기), 조명시간 12시간 (오전8시~오후8시) 및 조도 150~300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

3.3.2. 사육상자

순화 및 시험기간 중 stainless steel 사육상자 (380×490×346 mm)안에 넣어 사육하였다.

3.3.3. 사료 및 음용수

사료는 토끼용 펠렛사료 [Cargill Agri Purina Korea Inc.]를 자유 급식시켰으며 음용수는 정수필터 통과 및 자외선 살균한 수도수를 자유 섭취시켰다.

3.4. 시험물질의 처리

3.4.1. 시험군의 구성

실험동물은 건강하고 어린 동물로서 초기시험 1마리, 확인시험 2마리를 사용하였다.

3.4.2. 시험물질 조제

시험물질이 액상으로 처리부위에 직접 처리함으로써 조제하지 않고 처리하였다.

3.4.3. 처리량 설정

처리량은 처리 군별 공히 0.5 mL로 설정하였다.

3.4.4. 처리방법

실험동물은 시험물질 처리 24시간 전에 전기면도기를 이용하여 경배부 (등 부위)의 털을 15×15 cm 넓이로 제모한 다음 건강하고 깨끗한 피부를 가진 동물만을 사용하였다. 2×3 cm로 절개한 거즈를 이용하여 0.5 mL의 시험물질을 처리부위에 도포한 후 시험물질의 유실 및 방출을 방지하기 위해 비자극성테이프 (Tegaderm™, 3M)와 Coban™ (self-adherent wrap, 3M)으로 고정 및 유지시켜 시험물질이 경구 및 안점막 등 타 경로로 유입되지 않게 처리하였다. 대조부위는 증류수로 처리하여 처리부위와 증상관찰 비교 용도로 활용하였다.

3.4.5. 시험물질의 제거

초기시험은 3개의 시험물질 점포를 순차적으로 적용하여 각각 3분, 1시간, 4시간 후 패치를 제거하고 확인시험은 단일 점포를 4시간 노출 후 제거하여 피부에 묻은 잔여물질은 증류수로 세척하여 모두 제거한 후 의료를 탈지면으로 물기를 흡수시킨 다음 케이지에 넣어 두었다.



4. 관찰 및 측정 [Observation and determination]

4.1. 일반중독증상 및 치사

시험물질 처리 후 14일까지 일반증상의 변화, 중독증상 및 치사동물의 유무를 관찰하였다.

4.2. 체중 측정

시험물질 처리직전과 처리 후 48, 72시간, 7일 및 14일에 개체별 체중을 측정하였다.

4.3. 처리부위 관찰

시험물질 도포 종료 후 1, 24, 48, 72시간, 7일 및 14일까지 부종, 홍반 및 가피형성 유무를 관찰하였고, 초기시험은 확인시험 여부를 판정하기 위해 각각 3분, 1시간, 4시간 후 점포를 제거한 뒤 피부 반응을 관찰하였다.

4.4. 피부반응의 평가 및 자극성의 판정

피부반응의 평가는 [표 2. 피부반응 평가표]에 준하여 실시하였고 결과에 대한 자극성은 [표 3. 피부 1차 자극표]의 자극성기준에 따라 자극성을 판정하였다.

[표 2. 피부반응 평가표]

| | |
|---------------------------------------|---|
| (1) 홍반과 가피형성 | |
| 홍반이 전혀 없음 | 0 |
| 아주 가벼운 홍반 (육안으로 겨우 식별할 정도) | 1 |
| 명확한 홍반 | 2 |
| 중간정도부터 심한 홍반 | 3 |
| 심한 홍반과 홍반을 평가할 수 없을 정도의 가피형성 | 4 |
| 총 가능한 홍반과 가피 점수 | |
| | 4 |
| (2) 부종형성 평가 | |
| 부종이 전혀 없음 | 0 |
| 아주 가벼운 부종 (육안으로 겨우 식별할 정도) | 1 |
| 가벼운 부종 (뚜렷하게 부어올라서 노출부위가 분명히 구별될 정도) | 2 |
| 중간정도의 부종 (약 1 mm 정도 부어오른 상태) | 3 |
| 심한 부종 (1 mm 이상 부어오르고 노출부위 밖까지 확장된 상태) | 4 |
| 총 가능한 부종 점수 | |
| | 4 |



[표 3. 피부 1차 자극표]

| 구분 | 분류기준 |
|----|---|
| 강도 | 다음 어느 하나에 해당하는 물질 ① pH 2 이하 또는 pH 11.5 이상인 물질 ② 동물시험 결과 3마리 중 1마리 이상에서 시험 물질 노출 즉시 또는 4시간 노출 중에 피부 손상(부식 세포손상 등)이 나타나고 관련 증상이 14일까지 지속되는 경우 |
| 중도 | 다음 어느 하나에 해당하는 물질 ① 동물시험(3마리, 최대 4시간 노출 조건) 결과 24, 48 및 72시간에 대한 개체별 평균값이 적어도 2마리에서 해당 범위에 포함될 경우 (단, 반응이 늦게 발현된 경우에는 피부 반응 발생 후 3일간을 연속평가) 2.3 ≤ 홍반 or 부종 평균값 ≤ 4.0 ② 동물시험(3마리, 최대 4시간 노출 조건) 결과 적어도 2마리의 시험동물에서 통상 14일간의 관찰기간 종료까지 염증, 특히 (제한된 부위에 대한)탈모증, 각화증, 비후(증식), 피부각질화 증상 등이 지속되는 경우 |
| 경도 | 동물시험(3마리, 최대 4시간 노출 조건) 결과 24, 48 및 72시간에 대한 개체별 평균값이 적어도 2마리에서 해당 범위에 포함될 경우 (단, 반응이 늦게 발현된 경우에는 피부 반응 발생 후 3일간을 연속평가) 1.5 ≤ 홍반 or 부종 평균값 < 2.3 |
| 없음 | 경도이상 분류기준에 해당하지 않는 경우 |



5. 시험결과 [Results]

5.1. 일반중독증상 및 치사동물 수 (Table 1.)

모든 시험동물에 있어서 어떠한 일반증상도 관찰되지 않았으며, 치사동물 또한 발견되지 않았다.

5.2. 체중변화 (Table 2.)

시험물질 처리직전, 처리 후 48시간, 72시간, 7일 및 14일에 개체별 체중을 측정한 결과, 시간이 경과함에 따라 증가추세를 보였다.

5.3. 피부반응의 평가 (Table 3.)

초기시험 동물에 각각 3분, 1시간, 4시간 후 점포를 제거한 뒤 피부 반응 관찰 시 증상이 관찰되지 않았다. 따라서 4시간 점포를 기준으로 시험물질 노출 종료 후 1, 24, 48, 72시간, 7일 및 14일까지 [표 2. 피부반응 평가표]를 이용하여 피부반응을 관찰한 결과, 시험물질 처리 후 홍반 및 부종 등의 어떠한 피부반응도 관찰되지 않았다. 이후 동일한 방법으로 확인시험을 진행하였으며 확인시험 또한 시험물질 처리 후 7일째 관찰 시까지 홍반 및 부종 등의 어떠한 피부반응도 관찰되지 않았다.

5.4. 자극성의 판정 (Table 4.)

초기시험과 확인시험을 [표 2. 피부반응 평가표]에 의해 개체별 평균값을 산출한 결과, 각 개체의 24, 48 및 72 시간의 홍반 및 가피, 부종의 평균점수 모두 "0.00" 이었고 [표 3. 피부 1차 자극표]에 의해 자극성을 구분하면 "없음"이었다. 이상의 결과로부터 타지마는 New Zealand White계 토끼의 피부에 처리 시 자극성이 없는 물질로 구분되었다.



6. 참고문헌 [References]

- 농촌진흥청 고시 제2022-4호 「농약 및 원제의 등록기준」 [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법, 12-1-4. 피부자극성 시험 (2022.03.08)
- 국립농산물품질관리원 고시 제2020-20호 「유기농업자재 공시 기준」 (2020.12.08)
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals, No. 404 「Acute Dermal Irritation/Corrosion」 (Adopted : July 28, 2015)

KBSI

13 page of 17

7. Tables

Table 1. Mortality and clinical signs

| Number of animals | Days after treatment | | | | | | Mortality |
|-------------------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------------|
| | 0 (1hr) | 1 | 2 | 3 | 7 | 14 | |
| 1 | NOR ^a | NOR | NOR | NOR | NOR | NOR | 0/3 ^b |
| 2 | NOR | NOR | NOR | NOR | NOR | - | |
| 3 | NOR | NOR | NOR | NOR | NOR | - | |

a : Normal

b : Number of dead animals/Number of tested animals

KBSI

14 page of 17

Table 2. Body weight changes

| Number of animals | Days after treatment (g) | | | | | |
|-------------------|--------------------------|--------|--------|--------|--------|-------|
| | 0 | 2 | 3 | 7 | 14 | Gain |
| 1 | 2130.9 | 2180.2 | 2209.1 | 2283.0 | 2302.5 | 171.6 |
| 2 | 2156.4 | 2183.0 | 2212.6 | 2250.1 | - | 93.7 |
| 3 | 2236.9 | 2293.1 | 2329.0 | 2379.8 | - | 142.9 |
| Mean | 2174.7 | 2218.8 | 2250.2 | 2304.3 | 2302.5 | 136.1 |
| S.D. ^a | 55.3 | 64.4 | 68.2 | 67.4 | - | - |

a : Standard Deviation

KBSI

15 page of 17

Table 3. Evaluation of skin irritation (1/2)

| Sites | Phases | Number of animals | Times after treatment | | |
|------------|-------------------|-------------------|-----------------------|-----|-----|
| | | | 3 min | 1hr | 4hr |
| Test sites | Erythema & Eschar | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | Edema | 1 | 0 | 0 | 0 |

Table 3. Evaluation of skin irritation (2/2)

| Sites | Phases | Number of animals | Days after treatment | | | | | |
|---------------|-------------------|-------------------|----------------------|---|---|---|---|----|
| | | | 0 (1hr) | 1 | 2 | 3 | 7 | 14 |
| Control sites | Erythema & Eschar | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| | | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| | Edema | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| | | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| Test sites | Erythema & Eschar | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| | | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| | Edema | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| | | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |

KBSI

16 page of 17

Table 4. Calculation of mean value – 24, 48 and 72 hours

| Number of animal | Erythema & Eschar | Edema |
|------------------|-------------------|-------|
| 1 | 0.00 | 0.00 |
| 2 | 0.00 | 0.00 |
| 3 | 0.00 | 0.00 |

KBSI

(8) 토끼를 이용한 시제품의 안점막 자극성 시험

시제품의 뉴질랜드 white계 토끼를 이용한 안점막 자극성에 대한 시험 분석을 의뢰 실시하였으며 분석 결과 최종 보고서는 다음과 같다.

최종보고서

New Zealand White계 토끼를 이용한 타지마의
안점막자극성시험

ATE-22012



(주) 한국생물안전성연구소

KBSI

KBSI

1 page of 18

제 출 문

시험물질 : 타지마

시험제목 : New Zealand White계 토끼를 이용한 타지마의 안점막자극성시험

상기 독성시험을 “농약 및 원제의 등록기준” [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법
(농촌진흥청 고시 제2022-4호)에 준하여 실시하고 그 결과를 다음과 같이 제출합니다.

2022년 04월 27일

(주)한국생물안전성연구소

시험책임자 박 이 슬 성

KBSI

KBSI

2 page of 18

목 차
[Contents]

| | |
|--|----|
| 보고서표지 | 1 |
| 제출문 | 2 |
| 목차 [Contents] | 3 |
| 1. 요약 [Summary] | 5 |
| 2. 시험실시의 개요 [Introduction] | 6 |
| 2.1. 시험제목 | 6 |
| 2.2. 시험물질 | 6 |
| 2.3. 시험목적 | 6 |
| 2.4. 시험방법 | 6 |
| 2.5. 시험의뢰자 | 6 |
| 2.6. 시험기관 | 6 |
| 2.7. 시험장소 | 6 |
| 2.8. 시험책임자 | 6 |
| 2.9. 시험관계자 | 7 |
| 2.10. 시험일정 | 7 |
| 2.11. 시험물질의 보관 | 7 |
| 2.12. 시험자료의 보관 | 7 |
| 3. 시험재료 및 방법 [Materials and methods] | 8 |
| 3.1. 시험물질 | 8 |
| 3.2. 시험동물 | 8 |
| [표 1. 시험동물의 체중범위] | 8 |
| 3.3. 사육환경 및 관리 | 9 |
| 3.4. 시험물질의 투여 | 9 |
| [표 2. 시험군] | 9 |
| 4. 관찰 및 측정 [Observation and determination] | 10 |
| 4.1. 일반중독증상 | 10 |
| 4.2. 체중측정 | 10 |
| 4.3. 안반응의 평가 | 10 |
| 4.4. 자극성의 평가 | 10 |
| [표 3. 안반응 평가표] | 10 |
| [표 4. 안점막 자극표] | 11 |
| 5. 시험결과 [Results] | 12 |
| 5.1. 일반중독증상 및 처사동물 수 | 12 |
| 5.2. 체중변화 | 12 |

KBSI

KBSI

3 page of 18

1. 요약 [Summary]

New Zealand White계 토끼를 이용한 타지마의 안점막자극성시험을 수행하여 일반중독증상, 처사수, 체중변화 및 안점막 자극증상을 관찰·조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험물질 0.1 mL를 New Zealand White계 토끼에 투여한 결과 시험기간 중 일반중독증상 및 처사동물은 관찰되지 않았다.
- 체중측정결과 모든 개체에서 체중이 시간이 경과함에 따라 증가하였다.
- 시험물질 처리 후 24, 48 및 72시간의 개체별 평균값을 산출한 결과, 각 개체의 각막혼탁, 홍채반응의 평균점수는 모두 “0.00” 이었고, 결막의 발적 및 부종의 평균점수 또한 모두 “0.00” 이었다.

이상의 결과, 타지마의 안점막자극성시험에서 비세척군의 자극성은 [표 4. 안점막 자극표]에 의거 “없음”으로 구분되었다.

KBSI

KBSI

5 page of 18

1. 요약 [Summary]

New Zealand White계 토끼를 이용한 타지마의 안점막자극성시험을 수행하여 일반중독증상, 치사수, 체중변화 및 안점막 자극증상을 관찰·조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험물질 0.1 mL를 New Zealand White계 토끼에 투여한 결과 시험기간 중 일반중독증상 및 치사동물은 관찰되지 않았다.
- 체중측정결과 모든 개체에서 체중이 시간이 경과함에 따라 증가하였다.
- 시험물질 처리 후 24, 48 및 72시간의 개체별 평균값을 산출한 결과, 각 개체의 각막혼탁, 홍채반응의 평균점수는 모두 "0.00" 이었고, 결막의 발적 및 부종의 평균점수 또한 모두 "0.00" 이었다.

이상의 결과, 타지마의 안점막자극성시험에서 비세척군의 자극성은 [표 4. 안점막 자극표]에 의거 "없음"으로 구분되었다.



KBSI

5 page of 18

2. 시험실시의 개요 [Introduction]

2.1. 시험제목

New Zealand White계 토끼를 이용한 타지마의 안점막자극성시험

2.2. 시험물질

타지마

2.3. 시험목적

토끼를 이용한 안점막자극성시험을 통하여 유기농업자재 공시에 관한 기초자료로 활용코자 한다.

2.4. 시험방법

"농약 및 원재의 등록기준" [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제2022-4호) 중 12-1-5. 안점막자극성시험에 준하여 실시하였다.

2.5. 시험의뢰자

명칭 ㈜현농
소재지 전라남도 장성군 남면 나노산단3로 33-5

2.6. 시험기관

명칭 ㈜한국생물안전성연구소
소재지 충청북도 음성군 감곡면 성주로 362-20
연락처 Tel : 043-882-0297, Fax : 043-882-0298

2.7. 시험장소

명칭 ㈜한국생물안전성연구소 동물실험실
소재지 충청북도 음성군 감곡면 성주로 362-20

2.8. 시험책임자

성명 박이슬
소속 ㈜한국생물안전성연구소 독성연구팀



KBSI

6 page of 18

2.9. 시험관계자

시험물질의 조제 이항진, 염지영, 박이슬
시험물질의 노출 이항진, 염지영, 박이슬
관찰/측정/평가 이항진, 염지영, 박이슬
동물사육관리 이항진, 박이슬

2.10. 시험일정

동물입수일 2022년 03월 08일
검역숙화기간 2022년 03월 08일 ~ 2022년 03월 14일
2022년 03월 08일 ~ 2022년 03월 21일
시험물질 처리일 2022년 03월 15일
2022년 03월 22일
일반증상관찰기간 2022년 03월 15일 ~ 2022년 03월 18일
2022년 03월 22일 ~ 2022년 03월 25일
실험종료일 2022년 03월 18일
2022년 03월 25일
최종보고서 제출일 2022년 04월 27일

2.11. 시험물질의 보관

본시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질보관고에 보관하였다.
시료번호 22-1-012
시험물질보관기간 유기농업자재 공시 후 3년

2.12. 시험자료의 보관

본시험의 시험기초자료 및 관계시험성적서는 당 연구소 자료보관실에 보관하였다.
시험번호 ATE-22012
시험기초자료 자료보관실
최종보고서 자료보관실
자료하드디스크 자료보관실
자료보관기간 유기농업자재 공시 후 3년
자료관리담당자 최윤규



KBSI

7 page of 18

3. 시험재료 및 방법 [Materials and methods]

3.1. 시험물질

3.1.1. 물질명 타지마
3.1.2. 입수일 2022년 02월 18일
3.1.3. 입수량 500 mL
3.1.4. 시료번호 22-1-012
3.1.5. 색상 및 외관 액상, 황갈색
3.1.6. 주원료 미생물 추출물
3.1.7. 주원료 투입비율 90%
3.1.8. 보관조건 실온 (그늘진 곳)
3.1.9. 공급원 ㈜현농

3.2. 시험동물

3.2.1. 시험계 New Zealand White계 토끼
3.2.2. 공급원
- 명칭 한림실험동물연구소
- 소재지 경기도 화성시 봉담읍 최루백로 313
- 연락처 031-227-5955

3.2.3. 시험계의 선택사유

농촌진흥청 고시 제2022-4호 인축독성시험 기준과 방법에 백색토끼를 사용하도록 되어 있으며 New Zealand White계 토끼는 안점막자극성시험에 널리 사용되고 있으며 본 계통에 대한 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다.

3.2.4. 체중범위

[표 1. 시험동물의 체중범위]

| 구 분 | 입수시 체중 (kg) | 처리시 체중 (kg) |
|------|-------------|-------------|
| 비세척군 | 1.7 ~ 2.2 | 2.2 ~ 2.4 |

3.2.5. 순화 및 검역

동물들을 구입한 후 초기 및 확인시험 각각 7일, 14일 동안 동물실험실의 환경 하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체를 선별, 시험에 사용하였다.

3.2.6. 군분리

시험동물은 시험물질 투여 24시간 전에 육안으로 양쪽 눈을 검사하여 눈에 이상이 없는 동물들을 사용하였다.



KBSI

8 page of 18

3.2.7. 개체식별

사육 상자에 개체식별정보를 부착하여 식별하였다.

3.3. 사육환경 및 관리

3.3.1. 사육환경

본 시험의 사육환경은 온도 20±3°C, 상대습도 50±20%, 환기시설 (공조기), 조명시간 12시간 (오전8시~오후8시) 및 조도 150~300Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

3.3.2. 사육 상자

순화 및 시험기간 중 stainless steel 사육상자 (380×490×345 mm)안에 넣어 사육하였다.

3.3.3. 사료 및 음용수

사료는 토끼용 펠렛사료 [Cargill Agri Purina Korea Inc.]를 자유 급식시켰으며 음용수는 정수필터 통과 및 자외선 살균한 수도수를 자유 섭취시켰다.

3.4. 시험물질의 투여

3.4.1. 시험군의 구성

[표 2. 시험군]

| 군 | 동물수 | 좌우구분 | 처리 |
|------|-----|------|------|
| 비세척군 | 3 | 좌 안 | 시험물질 |
| | | 우 안 | 무 처리 |

3.4.2. 시험물질 조제

시험물질이 액상으로 처리부위에 직접 처리함으로 조제하지 않고 처리하였다.

3.4.3. 투여량 설정

투여량은 투여 개체별로 0.1 mL로 설정하였다.

3.4.4. 투여방법

초기시험은 1마리의 동물을 사용하였으며 시험동물은 시험개시 전 24시간 이내에 육안으로 양쪽 눈을 검사하여 눈에 이상이 없는 동물로서 약제처리는 좌안의 하안검을 가볍게 잡아당겨 결막낭 내에 시험물질 0.1 mL를 한 번에 넣어 처리하고 시험물질의 손실을 막기 위해 양안검을 느슨하게 맞춰 잡고 약 1초간 유지하였다. 무처리한 우안은 대조부위로 하여 처리부위와 증상관찰 비교 용도로 활용하였다. 초기시험에서 어떠한 눈 손상도 관찰되지 않아 이후 2마리의 동물을 사용하여 확인시험을 진행하였다.

4. 관찰 및 측정 [Observation and determination]

4.1. 일반증독증상

시험물질 처리 후 72시간까지 일반증상의 변화, 증독증상 및 치사동물의 유무를 관찰하였다.

4.2. 체중 측정

시험물질 처리직전과 처리 후 48, 72시간에 개체별 체중을 측정하였다.

4.3. 안반응의 평가

안반응의 평가는 [표 3. 안반응 평가표]에 따라 실시하였다. 시험물질 처리 후 1, 24, 48 및 72시간에 각막혼탁, 홍채이상, 결막 발적, 부종 평점을 기록하였다.

4.4. 자극성의 평가

[표 3. 안반응 평가표]에 의해 개체별 자극정도를 평가하고 이 결과로 [표 4. 안점막 자극표]에 따라 자극성의 정도를 구분하였다.

[표 3. 안반응 평가표]

| | |
|---|----|
| 1) 각막 | |
| 혼탁 : 안구의 농후한 정도(가장 농후한 자점을 관찰함) | 평점 |
| • 화농이나 혼탁이 없음 | 0 |
| • 혼탁이 분산 혹은 밀집되어 있으나(정상적인 투명성이 약간 둔화된 것과는 다름) 홍채의 말단이 정확히 관찰됨 | 1 |
| • 반투명한 부분이 쉽게 관찰되면서 홍채의 말단이 약간 불명확함 | 2 |
| • 진주색깔을 나타내면서 홍채의 말단이 관찰되지 않음, 동공의 크기가 가파스로 관측됨 | 3 |
| • 각막이 불투명하고 혼탁 때문에 홍채가 관찰 안됨 | 4 |
| 2) 홍채 | |
| 반응치 | |
| • 정상 | 0 |
| • 현저한 주름의 형성, 중첩, 중창 혹은 각막주위에 중첩도의 중첩을 보이거나 홍채가 빛에 대해 반응함 | 1 |
| • 홍채가 빛에 대해 반응이 없거나 출혈 또는 대부분 파괴된 상태 | 2 |

3) 결막

발적(안검결막, 안구결막에 한함, 홍채 제외)

| | |
|--------------------------------|---|
| • 혈관 정상 | 0 |
| • 일부 혈관 충혈 | 1 |
| • 옅은 심홍색을 띄거나 각각의 혈관이 쉽게 관찰 안됨 | 2 |
| • 짙은 심홍색 | 3 |

결막부종

| | |
|--------------------------|---|
| • 부종이 없음 | 0 |
| • 정상보다 약간 중창(순막 포함) | 1 |
| • 안검의 부분적 외전을 동반한 현저한 중창 | 2 |
| • 눈이 반쯤 잠길 정도의 안검의 중창 | 3 |
| • 눈이 반 이상 잠길 정도의 안검의 중창 | 4 |

[표 4. 안점막 자극표]

| 구분 | 분류기준 |
|----|--|
| 강도 | 다음 어느 하나에 해당하는 물질 ① 피부 강도 자극성인 부식성 물질 ② pH 2 이하 또는 pH 11.5 이상인 물질 ③ 최소한 1마리의 동물에서 각막, 홍채 또는 결막에 대한 영항이 회복되지 않을 것이라 예상되거나 일반적으로 관찰기간 21일 내에 완전히 회복되지 않는 경우 |
| | ④ 시험동물 3마리 중 최소한 2마리에서, 시험물질 주입 후 24, 48 및 72시간에서의 평균 점수로서 계산된 수치가 아래 기준에 어느 하나라도 해당하는 경우: ○ 각막 불투명도 ≥ 3 ○ 홍채 > 1.5 |
| 중도 | 다음 어느 하나에 해당하는 물질 ① 피부 중도 자극성 물질 ② 동물 시험결과 3마리 중 최소한 2마리에서, 아래 기준에 어느 하나라도 해당되고, 관찰기간 21일 이내에 완전히 회복되는 경우 ○ 각막 불투명도 점수 ≥ 1 ○ 홍채 점수 ≥ 1 ○ 결막 발적 점수 ≥ 2 ○ 결막 부종 점수 ≥ 2 |
| | 경도 중도 조건에 해당하는 자극성이 7 일 이내에 완전히 회복되는 경우 |
| 없음 | 경도 이상에 해당하지 않는 경우 |

5. 시험결과 [Results]

5.1. 일반증독증상 및 치사동물 수 (Table 1.)

모든 시험동물에 있어서 어떠한 일반증상도 관찰되지 않았으며, 치사동물 또한 발견되지 않았다.

5.2. 체중변화 (Table 2.)

시험물질 처리직전, 처리 후 48, 72시간에 개체별 체중을 측정한 결과, 시간이 경과함에 따라 증가추세를 보였다.

5.3. 안반응의 평가 결과 (Table 3, 4.)

초기시험 후 어떠한 눈 손상도 관찰되지 않아 동일한 방법으로 확인시험을 진행하였다. 초기시험 및 확인시험의 안반응 평가 결과는 아래와 같다.

비세척군-1 (초기시험)

- 무처리 대조군인 우안에서는 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다.
- 1 시간째 관찰 시부터 72 시간째 관찰 시까지 시험물질 처리군에서 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다.

비세척군-2 (확인시험 1)

- 무처리 대조군인 우안에서는 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다.
- 1 시간째 관찰 시부터 72 시간째 관찰 시까지 시험물질 처리군에서 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다.

비세척군-3 (확인시험 2)

- 무처리 대조군인 우안에서는 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다.
- 1 시간째 관찰 시부터 72 시간째 관찰 시까지 시험물질 처리군에서 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다.

5.4. 자극성의 판정 (Table 5.)

초기시험과 확인시험을 [표 3. 안반응 평가표]에 의해 24, 48 및 72시간의 개체별 평균값을 산출한 결과, 각 개체의 각막혼탁, 홍채반응의 평균점수는 모두 "0.00" 이었고, 결막의 발적 및 부종의 평균점수도 모두 "0.00" 이었다. 이상의 시험결과, New Zealand White계 토끼를 이용한 타지마의 안점막자극성시험에서 자극성은 [표 4. 안점막 자극표]에 의거 "없음"으로 구분되었다.

6. 참고문헌 [References]

- 농촌진흥청 고시 제2022-4호 「농약 및 원제의 등록기준」 [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법, 12-1-5. 안점막자극성시험 (2022.03.08)
- 국립농산물품질관리원 고시 제2020-20호 「유기농업자재 공시 기준」 (2020.12.08)
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals, No. 405 「Acute Eye Irritation/Corrosion」 (Corrected : Jun 26, 2020)

7. Tables

Table 1. Mortality and clinical signs

| Group | Number of animals | Days after application | | | | Mortality |
|---------------|-------------------|------------------------|-----|-----|-----|------------------|
| | | 0 (1hr) | 1 | 2 | 3 | |
| No eye washed | 1 | NOR ^a | NOR | NOR | NOR | 0/3 ^b |
| | 2 | NOR | NOR | NOR | NOR | |
| | 3 | NOR | NOR | NOR | NOR | |

a : Normal

b : Number of dead animals/Number of tested animals

Table 2. Body weight changes

| Group | Number of animals | Days after application (g) | | | |
|---------------|-------------------|----------------------------|--------|--------|------|
| | | 0 | 2 | 3 | Gain |
| No eye washed | 1 | 2200.7 | 2248.0 | 2290.2 | 89.5 |
| | 2 | 2321.7 | 2363.5 | 2391.5 | 69.8 |
| | 3 | 2401.8 | 2447.1 | 2474.4 | 72.6 |
| | Mean | 2308.1 | 2352.9 | 2385.4 | 77.3 |
| | S.D. ^a | 101.2 | 100.0 | 92.3 | - |

a : Standard Deviation

Table 3. No eyes washed evaluation of eye irritation (Non-treatment)

| Time | Number of animals | Corneal opacity : degree of density | Iris | Conjunctiva | |
|-------|-------------------|-------------------------------------|------|-------------|-------|
| | | | | Redness | Edema |
| 1 hr | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 hr | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 48 hr | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 72 hr | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Table 4. No eyes washed evaluation of eye irritation (Treatment)

| Time | Number of animals | Corneal opacity : degree of density | Iris | Conjunctiva | |
|-------|-------------------|-------------------------------------|------|-------------|-------|
| | | | | Redness | Edema |
| 1 hr | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 hr | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 48 hr | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 72 hr | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |

KBSI

Table 5. Calculation of mean value – 24, 48 and 72 hours

| Number of animal | Corneal opacity : degree of density | Iris | Conjunctiva | |
|------------------|-------------------------------------|------|-------------|-------|
| | | | Redness | Edema |
| 1 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 2 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 3 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

KBSI

(9) 랫드를 이용한 시제품의 급성 경구 독성시험

시제품의 랫드를 이용한 급성 경구 독성에 대한 시험 분석을 의뢰 실시하였으며 분석 결과 최종 보고서는 다음과 같다.

최종보고서

랫드를 이용한 타지마의 급성경구독성시험

ATO-22016



(주) 한국생물안전성연구소



KBSI

1 page of 18

제 출 문

시험물질 : 타지마

시험제목 : 랏드를 이용한 타지마의 급성경구독성시험

상기 독성시험을 "농약 및 원제의 등록기준" [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제2022-4호)에 준하여 실시하고 그 결과를 다음과 같이 제출합니다.

2022년 04월 27일

(주)한국생물안전성연구소

시험책임자 박 이 슬

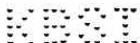


KBSI

2 page of 18

목 차
[Contents]

| | |
|---|----|
| 보고서표지 | 1 |
| 제출문 | 2 |
| 목차 [Contents] | 3 |
| 1. 요약 [Summary] | 5 |
| 2. 시험실시의 개요 [Introduction] | 6 |
| 2.1. 시험제목 | 6 |
| 2.2. 시험물질 | 6 |
| 2.3. 시험목적 | 6 |
| 2.4. 시험방법 | 6 |
| 2.5. 시험의뢰자 | 6 |
| 2.6. 시험기관 | 6 |
| 2.7. 시험장소 | 6 |
| 2.8. 시험책임자 | 6 |
| 2.9. 시험관계자 | 7 |
| 2.10. 시험일정 | 7 |
| 2.11. 시험물질의 보관 | 7 |
| 2.12. 시험자료의 보관 | 7 |
| 3. 시험재료 및 방법 [Materials and methods] | 8 |
| 3.1. 시험물질 | 8 |
| 3.2. 시험동물 | 8 |
| [표 1. 시험동물의 주형 및 체중범위] | 8 |
| 3.3. 사육환경 및 관리 | 9 |
| 3.4. 투여약량수준설정 및 억제조제 | 9 |
| 3.5. 시험물질의 투여 | 10 |
| 4. 관찰 및 측정 [Observation and determination] | 11 |
| 4.1. 일반중독증상 및 치사동물 관찰 | 11 |
| 4.2. 체중측정 | 11 |
| 4.3. 부검 | 11 |
| 4.4. 반수치사약량 (LD ₅₀) 산출 | 11 |
| [표 2. Classification systems of Acute toxicity for pesticides in Korea and Globally Harmonized classification System] | 11 |
| 5. 시험결과 [Results] | 12 |
| 5.1. 일반중독증상 및 치사동물 | 12 |
| 5.2. 체중변화 | 12 |



KBSI

3 page of 18

| | |
|--|----|
| 5.3. 부검소견 | 12 |
| 5.4. 반수치사약량 (LD ₅₀) | 12 |
| 6. 참고문헌 [References] | 13 |
| 7. Tables | 14 |
| Table 1. Mortality and clinical signs | 14 |
| Table 2. Mean body weights | 14 |
| Table 3. Mortality of rats | 15 |
| Table 4. Clinical signs of rats | 16 |
| Table 5. Body weights | 17 |
| Table 6. Macroscopical findings necropsy | 18 |



KBSI

4 page of 18

1. 요약 [Summary]

랫드를 이용한 타지마의 급성경구독성시험 (급성독성등급법)을 2000 mg/kg B.W.의 투여 용량으로 수행하여 치사 수, 일반증상증상 및 체중변화를 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- 1단계 투여량 2000 mg/kg B.W.에서 14일 동안 치사개체가 관찰되지 않았다.
- 2단계 투여량 2000 mg/kg B.W.에서도 14일 동안 치사개체가 관찰되지 않았다.
- 생존한 모든 개체에서 일반증상증상은 관찰되지 않았다.
- 각 개체의 체중은 약제투여 후 경과일수에 따라 증가하였다.
- 부검결과 이상 소견은 관찰되지 않았다.

이상의 시험결과, 랫드를 이용한 타지마의 급성경구독성시험 결과, LD₅₀값은 2000 mg/kg B.W. 초과이며 농약관리법 시행규칙 [별표 3의5] 농약 등의 독성 및 잔류성정도별 구분에서 의거 IV급 (저독성)으로 구분되었다.



KBSI

5 page of 18

2. 시험실시의 개요 [Introduction]

2.1. 시험제목

랫드를 이용한 타지마의 급성경구독성시험

2.2. 시험물질

타지마

2.3. 시험목적

랫드를 이용한 타지마의 급성경구독성시험을 통하여 유기농업자재 공시에 관한 기초자료로 활용코자 한다.

2.4. 시험방법

“농약 및 원제의 등록기준” [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제2022-4호) 중 12-1-20. 급성경구독성시험 (급성독성등급법)에 준하여 실시하였다.

2.5. 시험의뢰자

명칭 (주)한농
소재지 전라남도 장성군 남면 나노산단3로 33-5

2.6. 시험기관

명칭 (주)한국생물안전성연구소
소재지 충청북도 음성군 감곡면 성주로 362-20
연락처 Tel : 043-882-0297, Fax : 043-882-0298

2.7. 시험장소

명칭 (주)한국생물안전성연구소 동물실험실
소재지 충청북도 음성군 감곡면 성주로 362-20

2.8. 시험책임자

성명 박이슬
소속 (주)한국생물안전성연구소 독성연구팀



KBSI

6 page of 18

2.9. 시험관계자

시험물질의 조제 엄지영, 이향진, 박이슬
시험물질의 노출 엄지영, 이향진, 박이슬
관찰/측정/평가 엄지영, 이향진, 박이슬
동물사육관리 이향진, 박이슬

2.10. 시험일정

동물접수일 2022년 03월 08일 (6 females)
검역숙화기간 2022년 03월 08일 ~ 2022년 03월 14일 (3 females)
2022년 03월 08일 ~ 2022년 03월 17일 (3 females)
시험물질 투여일 2022년 03월 15일 (3 females, 2000 mg/kg B.W.)
2022년 03월 18일 (3 females, 2000 mg/kg B.W.)
일반증상관찰기간 2022년 03월 15일 ~ 2022년 03월 29일 (2000 mg/kg B.W.)
2022년 03월 18일 ~ 2022년 04월 01일 (2000 mg/kg B.W.)
실험종료 / 부검일 2022년 03월 29일 (3 females, 2000 mg/kg B.W.)
2022년 04월 01일 (3 females, 2000 mg/kg B.W.)
최종보고서 제출일 2022년 04월 27일

2.11. 시험물질의 보관

본 시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질 보관고에 보관하였다.
시료번호 22-1-012
시험물질보관기간 유기농업자재 공시 후 3년

2.12. 시험자료의 보관

본 시험의 시험기초자료 및 관계시험성적서는 당 연구소 자료보관실에 보관하였다.
시험번호 ATO-22016
시험기초자료 자료보관실
최종보고서 자료보관실
자료하드디스크 자료보관실
자료보관기간 유기농업자재 공시 후 3년
자료관리담당자 최윤규



KBSI

7 page of 18

3. 시험재료 및 방법 [Materials and methods]

3.1. 시험물질

3.1.1. 물질명 타지마
3.1.2. 입수일 2022년 02월 18일
3.1.3. 입수량 500 mL
3.1.4. 시료번호 22-1-012
3.1.5. 성상 및 외관 액상, 황갈색
3.1.6. 주원료 미생물 추출물
3.1.7. 주원료 투입비율 90%
3.1.8. 보관조건 실온 (그늘진 곳)
3.1.9. 공급원 (주)한농

3.2. 시험동물

3.2.1. 시험계 Sprague-Dawley (SD), SPF
- Rat
3.2.2. 공급원 한림실험동물연구소
- 명칭 경기도 화성시 봉담읍 최루백로 313
- 소재지 031-227-5955
- 연락처

3.2.3. 시험계의 선택사유

농촌진흥청 고시 제2022-4호 인축독성시험 기준과 방법에 시험동물로 랫드를 추천하고 있으며, 본 계통에 대한 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험 결과 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다.

3.2.4. 주령 및 체중범위

[표 1. 시험동물의 주령 및 체중범위]

| 시험약제 투여 시 | 1단계 (2000 mg/kg B.W.) | 2단계 (2000 mg/kg B.W.) |
|-----------|--------------------------|--------------------------|
| 주령(주) | 8 | 8 |
| 체중(g) | 203.2 ~ 216.1 | 203.7 ~ 215.3 |

3.2.5. 순화 및 검역

시험단계별로 동물을 구입한 후 1단계 및 2단계 시험은 각각 7일, 10일 동안 동물실험실의 환경 하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체를 선별, 본 시험에 사용하였다.



KBSI

8 page of 18

3.3. 사육환경 및 관리

3.3.1. 사육환경

본 시험의 사육환경은 온도 22±3℃, 상대습도 50±20%, 환기시설 (공조기), 조명시간 12시간 (오전8시~오후8시) 및 조도 150~300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

3.3.2. 사육상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육상자 (260×420×180 mm)에 3마리씩 넣어 갈집을 잡아 사육하였다.

3.3.3. 사료 및 음용수

사료는 방사선 멸균된 사료 [LabDiet]를 자유 급식시켰으며 음용수는 정수필터 통과 및 자외선 살균한 수도수를 자유 섭취시켰다.

3.4. 투여약량수준설정 및 약제조제

3.4.1. 투여약량수준설정

본 시험물질은 당면구소에서 유기농자재들의 시험한 자료들을 검토하여 1단계 시험에서 최고투여약량인 2000 mg/kg B.W.로 투여하였고, 투여 후 72시간 동안 치사 및 일반중독증상이 관찰되지 않아, 동일한 농도로 투여약량을 설정하여 2단계 시험을 실시하였다.

3.4.2. 실험동물 수 / 개체식별

실험동물 수는 각 단계별 암컷 3마리를 1군으로 하였으며, 개체식별은 유성 매직을 사용하여 각 개체의 미부에 표시하고, 사육상자에 개체식별 라벨을 부착하여 식별하였다.

3.4.3. 용매대조군의 설정

멸균수로 시험물질을 조제하여 용매대조군은 따로 설정하지 않았다.

3.4.4. 용매의 선택과 시험용액 조제

- 1단계 / 2단계 시험 (2000 mg/kg B.W.)
시험용액은 1단계 및 2단계 시험에서 투여직전 각각 동일하게 조제하여 시험에 사용하였고, 시험용액 조제 시 용매는 멸균수를 사용하였으며 액상인 시험물질을 저용량 2.0 g을 정확히 칭량하여 10 mL의 volumetric flask에 넣고 멸균수를 표선까지 정용한 후 vortex로 충분히 혼합하여 시험용액 (test solution)으로 사용하였다.

3.4.5. 투여용량 (volume) 설정

투여용량은 10 mL/kg B.W.로 설정하였다.



KBSI

9 page of 18

3.5. 시험물질의 투여

3.5.1. 사료의 절식

시험물질 투여개시 하룻밤 전부터, 시험물질 투여 후 3시간 동안은 먹이를 주지 않았다.

3.5.2. 투여경로 및 투여방법

렛드 경구투여용 зонде (zonde)를 이용하여 투여 전 체중 측정치를 기준으로 소정의 시험물질 투여약량을 산출한 후, 경구투여 경로로 위내 1회에 한하여 강제 투여하였다.



KBSI

10 page of 18

4. 관찰 및 측정 [Observation and determination]

4.1. 일반중독증상 및 치사동물 관찰

치리 당일은 치리 후 30분, 1시간에서 4시간까지 매 시간마다 일반중독증상 및 치사수를 관찰하였으며, 익일부터는 매일 1회씩, 투여 개시 후 14일째까지 관찰 및 조사하였다.

4.2. 체중측정

시험된 모든 동물에 대하여 시험물질 투여 직전에 체중을 측정하였고 생존한 동물에 한하여 투여 후 3일, 7일, 실험종료일인 14일째 개체별 체중을 측정하였다.

4.3. 부검

실험종료일에 모든 개체에 대하여 부검을 실시하였다.

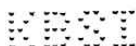
4.4. 반수치사약량 (LD₅₀) 산출

급성경구독성 시험을 독성등급법에 의해 실시하여 LD₅₀을 산출하였으며, 농약관리법 시행규칙 [별표 3의5] 농약 등의 독성 및 잔류성정도별 구분에 준하여 독성을 구분하였다.

[표 2. Classification systems of Acute toxicity for pesticides in Korea and Globally Harmonized classification System]

| Classification criteria | | | | | | |
|-------------------------|-------------------------------|---------------|---------------|---------------|------------------|--|
| Class ^a | LD ₅₀ (mg/kg B.W.) | | | | GHS ^b | LD ₅₀ (mg/kg B.W.) Acute Oral |
| | Acute Oral | | Acute Dermal | | | |
| | Solids | Liquids | Solids | Liquids | | |
| I (Extremely) | < 5 | < 20 | < 10 | < 40 | I | ≤ 5 |
| II (Highly) | ≥ 5, < 50 | ≥ 20, < 200 | ≥ 10, < 100 | ≥ 40, < 400 | II | ≤ 50 |
| III (Moderately) | ≥ 50, < 500 | ≥ 200, < 2000 | ≥ 100, < 1000 | ≥ 400, < 4000 | III | ≤ 300 |
| IV (Slightly) | ≥ 500 | ≥ 2000 | ≥ 1000 | ≥ 4000 | IV | ≤ 2000 |
| | | | | | V | ≤ 5000 |

a : Classification systems of Acute toxicity for pesticides in Korea
b : Globally Harmonized Classification System



KBSI

11 page of 18

5. 시험결과 [Results]

5.1. 일반중독증상 및 치사동물 (Table 1., 3., 4.)

타지마는 1단계 및 2단계 시험 투여약량 2000 mg/kg B.W.에서 일반중독증상을 보이지 않거나 치사한 개체가 관찰되지 않았다.

5.2. 체중변화 (Table 2., 5.)

1단계 및 2단계 시험군의 모든 시험동물은 시간이 경과함에 따라 체중이 증가하였다.

5.3. 부검조건 (Table 6.)

관찰종료 후 모든 단계의 시험동물들 CO₂ gas로 마취시켜 주요 장기에 대한 육안적 관찰을 실시한 결과 약제투여에 의한 특이한 이상증상은 관찰되지 않았다.

5.4. 반수치사약량 (LD₅₀)

렛드를 이용한 타지마의 급성경구독성시험 결과, LD₅₀값은 2000 mg/kg B.W. 초과이며 농약관리법 시행규칙 [별표 3의5] 농약 등의 독성 및 잔류성정도별 구분에 의거 IV급 (저독성)으로 구분되었다.



KBSI

12 page of 18

6. 참고문헌 [References]

- 농촌진흥청 고시 제2022-4호 「농약 및 원제의 등록기준」 [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법, 12-1-20. 급성경구독성시험 (급성독성등급법) (2022.03.08)
- 국립농산물품질관리원 고시 제2020-20호 「유기농업자재 공시 기준」 (2020.12.08)
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals, No. 423 「Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method」 (2001.12.17)

KBSI

13 page of 18

7. Tables

Table 1. Mortality and clinical signs

| Group | Dose (mg/kg B.W.) | Sex | Number of animals | Clinical signs | Mortality | LD ₅₀ |
|-------|-------------------|--------|-------------------|-------------------------|------------------|--------------------------|
| 1 | 2000 | Female | 3 | No abnormality detected | 0/3 ^a | >2000 ~ ≤5000 mg/kg B.W. |
| 2 | 2000 | Female | 3 | No abnormality detected | 0/3 | |

a : Number of dead animals/Number of tested animals

Table 2. Mean body weights

| Group | Dose (mg/kg B.W.) | Sex | Number of animals | Days after administration (g) | | | |
|-------|-------------------|--------|-------------------|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | | | | 0 | 3 | 7 | 14 |
| 1 | 2000 | Female | 3 | 210.2 ± 6.5 ^a | 231.1 ± 4.5 | 254.1 ± 2.1 | 274.5 ± 2.7 |
| 2 | 2000 | Female | 3 | 207.8 ± 6.5 | 229.8 ± 3.8 | 241.2 ± 1.1 | 255.4 ± 9.3 |

a : Mean ± standard deviation

KBSI

14 page of 18

Table 3. Mortality of rats

| Group | Dose (mg/kg B.W.) | Sex | Number of animals | Days after administration | | | | | | | | | | |
|-------|-------------------|--------|-------------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 0 | | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| | | | | 30 min | 1hr | 2hr | 3hr | 4hr | | | | | | |
| 1 | 2000 | Female | 3 | 0 ^a | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 2000 | Female | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| Group | Dose (mg/kg B.W.) | Sex | Number of animals | Days after administration | | | | | | | | | | |
|-------|-------------------|--------|-------------------|---------------------------|---|---|---|----|----|----|----|----|--|--|
| | | | | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | | |
| 1 | 2000 | Female | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 2 | 2000 | Female | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |

a : Number of dead animals

KBSI

15 page of 18

Table 4. Clinical signs of rats

| Group | Dose (mg/kg B.W.) | Sex | Number of animals | Days after administration | | | | | | | | | | |
|-------|-------------------|--------|-------------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | 0 | | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| | | | | 30 min | 1hr | 2hr | 3hr | 4hr | | | | | | |
| 1 | 2000 | Female | 1 | NAD ^a | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |
| | | | 2 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |
| | | | 3 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |
| 2 | 2000 | Female | 1 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |
| | | | 2 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |
| | | | 3 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |

| Group | Dose (mg/kg B.W.) | Sex | Number of animals | Days after administration | | | | | | | | | | |
|-------|-------------------|--------|-------------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| | | | | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | | |
| 1 | 2000 | Female | 1 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | | |
| | | | 2 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | | |
| | | | 3 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | | |
| 2 | 2000 | Female | 1 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | | |
| | | | 2 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | | |
| | | | 3 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | | |

a : No abnormality detected

KBSI

16 page of 18

Table 5. Body weights

| Group | Dose (mg/kg B.W.) | Sex | Number of animals | Days after administration (g) | | | | |
|-------|-------------------|--------|-------------------|-------------------------------|-------|-------|-------|------|
| | | | | 0 | 3 | 7 | 14 | Gain |
| 1 | 2000 | Female | 1 | 216.1 | 232.8 | 252.1 | 271.4 | 55.3 |
| | | | 2 | 211.3 | 234.4 | 253.8 | 276.3 | 65.0 |
| | | | 3 | 203.2 | 226.0 | 256.3 | 275.8 | 72.6 |
| Mean | | | | 210.2 | 231.1 | 254.1 | 274.5 | 64.3 |
| S.D.* | | | | 6.5 | 4.5 | 2.1 | 2.7 | - |
| 2 | 2000 | Female | 1 | 203.7 | 225.5 | 242.2 | 248.7 | 45.0 |
| | | | 2 | 215.3 | 231.0 | 240.1 | 266.1 | 50.8 |
| | | | 3 | 204.4 | 232.8 | 241.2 | 251.5 | 47.1 |
| Mean | | | | 207.8 | 229.8 | 241.2 | 255.4 | 47.6 |
| S.D. | | | | 6.5 | 3.8 | 1.1 | 9.3 | - |

a : Standard Deviation

KBSI

17 page of 18

Table 6. Macroscopical findings necropsy

- Group 1 (2000 mg/kg B.W.)

Animal 1 Planned necropsy (Final necropsy) 29-Mar-2022

No Findings Noted

Animal 2 Planned necropsy (Final necropsy) 29-Mar-2022

No Findings Noted

Animal 3 Planned necropsy (Final necropsy) 29-Mar-2022

No Findings Noted

- Group 2 (2000 mg/kg B.W.)

Animal 1 Planned necropsy (Final necropsy) 01-Apr-2022

No Findings Noted

Animal 2 Planned necropsy (Final necropsy) 01-Apr-2022

No Findings Noted

Animal 3 Planned necropsy (Final necropsy) 01-Apr-2022

No Findings Noted

KBSI

18 page of 18

(10) 랫드를 이용한 시제품의 급성 경피 독성시험

시제품의 랫드를 이용한 급성 경피 독성에 대한 시험 분석을 의뢰 실시하였으며 분석 결과 최종 보고서는 다음과 같다.

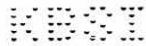
최종보고서

랫드를 이용한 타지마의 급성경피독성시험

ATP-22016



(주) 한국생물안전성연구소



KBSI

1 page of 16

제 출 문

시험물질 : 타지마

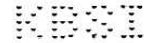
시험제목 : 랫드를 이용한 타지마의 급성경피독성시험

상기 독성시험을 "농약 및 원제의 등록기준" [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제2022-4호)에 준하여 실시하고 그 결과를 다음과 같이 제출합니다.

2022년 04월 27일

(주)한국생물안전성연구소

시험책임자 박 이 슬



KBSI

2 page of 16

목 차
[Contents]

| | |
|--|----|
| 보고서표지 | 1 |
| 제출문 | 2 |
| 목차 [Contents] | 3 |
| 1. 요약 [Summary] | 5 |
| 2. 시험실시의 개요 [Introduction] | 6 |
| 2.1. 시험제목 | 6 |
| 2.2. 시험물질 | 6 |
| 2.3. 시험목적 | 6 |
| 2.4. 시험방법 | 6 |
| 2.5. 시험의뢰자 | 6 |
| 2.6. 시험기관 | 6 |
| 2.7. 시험장소 | 6 |
| 2.8. 시험책임자 | 6 |
| 2.9. 시험관계자 | 7 |
| 2.10. 시험일정 | 7 |
| 2.11. 시험물질의 보관 | 7 |
| 2.12. 시험자료의 보관 | 7 |
| 3. 시험재료 및 방법 [Materials and methods] | 8 |
| 3.1. 시험물질 | 8 |
| 3.2. 시험동물 | 8 |
| [표 1. 시험동물의 주령 및 체중범위] | 8 |
| 3.3. 사육환경 및 관리 | 9 |
| 3.4. 투여약량수준설정 및 약제조제 | 9 |
| 3.5. 시험물질의 투여 | 9 |
| 4. 관찰 및 측정 [Observation and determination] | 10 |
| 4.1. 일반중독증상 및 치사동물 관찰 | 10 |
| 4.2. 체중측정 | 10 |
| 4.3. 부검 | 10 |
| 4.4. 반수치사약량 (LD ₅₀) 산출 | 10 |
| 5. 시험결과 [Results] | 11 |
| 5.1. 일반중독증상 및 치사동물 | 11 |
| 5.2. 체중변화 | 11 |
| 5.3. 반수치사약량 (LD ₅₀) | 11 |
| [표 2. 급성독성정도에 따른 농약 등의 구분] | 11 |



KBSI

3 page of 16

| | |
|---------------------------------------|----|
| 6. 참고문헌 [References] | 12 |
| 7. Tables | 13 |
| Table 1. Mortality and clinical signs | 13 |
| Table 2. Mean body weights | 13 |
| Table 3. Mortality of rats | 14 |
| Table 4. Clinical signs of rats | 15 |
| Table 5. Body weights | 16 |



KBSI

4 page of 16

1. 요약 [Summary]

랫드를 이용한 타지마의 급성경피독성시험을 4000 mg/kg B.W.의 약량으로 단회 경피 투여한 후 14일 동안 지사수, 일반증독증상, 체중변화를 관찰·조사한 결과는 다음과 같다.

- 한계시험의 투여약량수준인 4000 mg/kg B.W.에서 지사개체가 관찰되지 않았다.
- 일반증독증상은 관찰되지 않았다.
- 체중변화는 약제투여 후 경과일수에 따라 증가추세를 보였다.

따라서, 랫드를 이용한 타지마의 급성경피독성시험 LD₅₀값은 4000 mg/kg B.W. 초과이며 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급 (저독성)에 해당되었다.



KBSI

5 page of 16

2. 시험실시의 개요 [Introduction]

2.1. 시험제목

랫드를 이용한 타지마의 급성경피독성시험

2.2. 시험물질

타지마

2.3. 시험목적

랫드를 이용한 타지마의 급성경피독성시험을 통하여 유기농업자재 공시에 관한 기초자료로 활용코자 한다.

2.4. 시험방법

"농약 및 원제의 등록기준" [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제2022-4호) 중 12-1-2. 급성경피독성시험에 준하여 실시하였다.

2.5. 시험의뢰자

명칭 (주)현농
소재지 전라남도 장성군 남면 나노산단3로 33-5

2.6. 시험기관

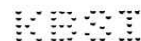
명칭 (주)한국생물안전성연구소
소재지 충청북도 음성군 감곡면 성주로 362-20
연락처 Tel : 043-882-0297, Fax : 043-882-0298

2.7. 시험장소

명칭 (주)한국생물안전성연구소 동물실험실
소재지 충청북도 음성군 감곡면 성주로 362-20

2.8. 시험책임자

성명 박이솔
소속 (주)한국생물안전성연구소 독성연구팀



KBSI

6 page of 16

2.9. 시험관계자

시험물질의 조제 염지영, 이향진, 박이솔
시험물질의 노출 염지영, 이향진, 박이솔
관찰/측정/평가 염지영, 이향진, 박이솔
동물사육관리 이향진, 박이솔

2.10. 시험일정

동물입수일 2022년 03월 08일
검역순화기간 2022년 03월 08일 ~ 2022년 03월 14일
시험동물 제모일 2022년 03월 14일
시험물질 투여일 2022년 03월 15일
일반증상관찰기간 2022년 03월 15일 ~ 2022년 03월 29일
실험종료일 2022년 03월 29일
최종보고서 제출일 2022년 04월 27일

2.11. 시험물질의 보관

본시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질보관고에 보관하였다.
시료번호 22-1-012
시험물질보관기간 유기농업자재 공시 후 3년

2.12. 시험자료의 보관

본시험의 시험기초자료 및 관계시험성적서는 당 연구소 자료보관실에 보관하였다.
시험번호 ATP-22016
시험기초자료 자료보관실
최종보고서 자료보관실
자료하드디스크 자료보관실
자료보관기간 유기농업자재 공시 후 3년
자료관리담당자 최윤규



KBSI

7 page of 16

3. 시험재료 및 방법 [Materials and methods]

3.1. 시험물질

3.1.1. 물질명 타지마
3.1.2. 입수일 2022년 02월 18일
3.1.3. 입수량 500 mL
3.1.4. 시료번호 22-1-012
3.1.5. 성상 및 외관 액상, 황갈색
3.1.6. 주원료 미생물 추출물
3.1.7. 주원료 투입비율 90%
3.1.8. 보관조건 실온 (그늘진 곳)
3.1.9. 공급원 (주)현농

3.2. 시험동물

3.2.1. 시험계 Sprague-Dawley (SD), SPF
- Rat
3.2.2. 공급원 한림실험동물연구소
- 명칭 경기도 화성시 봉담읍 최루백로 313
- 소재지 031-227-5955
- 연락처

3.2.3. 시험계의 선택사유

농촌진흥청 고시 제2022-4호 인축독성시험 기준과 방법에 시험동물로 랫드를 추천하고 있으며, 본 계통에 대한 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험 결과 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다.

3.2.4. 주령 및 체중범위

[표 1. 시험동물의 주령 및 체중범위]

| 시험약제 투여시 | Male | Female |
|----------|---------------|---------------|
| 주령 (주) | 8 | 8 |
| 체중 (g) | 285.6 ~ 296.9 | 207.2 ~ 220.9 |

3.2.5. 순화 및 검역

동물 입수 후 7일 동안 동물실험실의 환경 하에서 순화시키면서 일반 건강 상태를 관찰하여 건강한 개체를 선별, 본 시험에 사용하였다.



KBSI

8 page of 16

3.3. 사육환경 및 관리

3.3.1. 사육환경

본 시험의 사육환경은 온도 22±3℃, 상대습도 50±20%, 환기시설 (공조기), 조명시간 12시간 (오전8시~오후8시) 및 조도 150~300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

3.3.2. 사육상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육상자 (260×420×180 mm)에 5마리씩 넣어 깔짚을 깔아 사육하였다.

3.3.3. 사료 및 음용수

사료는 방사선 멸균된 사료 [LabDiet]를 자유 급식시켰으며 음용수는 정수필터 통과 및 자외선 살균한 수도수를 자유 섭취시켰다.

3.4. 투여약량수준설정 및 억제조제

3.4.1. 투여약량수준설정

암수 모두 한계투여약량인 4000 mg/kg B.W.로 설정하여 시험을 실시하였다.

3.4.2. 실험동물 수 / 개체식별

시험 동물 수는 암수 각각 5마리씩 10마리를 1군으로 하였으며, 개체식별은 유성매직을 사용하여 각 개체의 피부에 표시하고, 사육상자에 개체식별 라벨을 부착하여 식별하였다.

3.4.3. 용매대조군의 설정

멸균수를 이용하여 시험물질을 조제하였기에 용매대조군은 따로 설정하지 않았다.

3.4.4. 용매의 선택과 시험용액 조제

시험용액 조제 시 용매는 멸균수를 사용하였으며 시험물질 16.0 g을 정확히 정량하여 20 mL의 volumetric flask에 넣고 멸균수를 표시까지 정용한 후 vortex로 충분히 혼합하여 시험용액 (test solution)으로 사용하였다.

3.4.5. 처리액량 (volume) 설정

처리액량은 처리약량수준별 공히 5 mL/kg B.W.로 설정하였다.

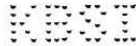
3.5. 시험물질의 투여

3.5.1. 억제처리경로 및 처리방법

시험동물은 시험물질처리 하루 전에 등 부위에 제모기를 이용하여 체표의 10% 이상 (5×6 cm 이상) 크기 넓이로 제모하고, 4×4 cm 크기 면적의 거즈에 시험용액을 균일하게 묻힌 다음 제모 된 부위에 Coban (self-adherentwrap, 3M)으로 고정/유지 시켰다.

3.5.2. 시험물질의 제거

등 부위에 도포시킨 시험물질은 24시간 후 제거하고 피부에 묻은 잔여 물질을



은 증류수로 잘 닦고 의약품 탈지면으로 물기를 흡수시킨 다음 케이지에 넣어두었다.

4. 관찰 및 측정 [Observation and determination]

4.1. 일반중독증상 및 치사동물 관찰

처리 당일은 처리 후 30분, 1시간에서 4시간까지 매 시간마다 일반중독증상 및 치사수를 관찰하였으며, 익일부터는 매일 1회씩, 투여 개시 후 14일째까지 관찰 및 조사하였다.

4.2. 체중측정

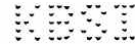
시험된 모든 동물에 대하여 시험물질 투여 직전에 체중을 측정하였고 생존한 동물에 한하여 투여 후 3일, 7일, 실험종료일인 14일째 개체별 체중을 측정하였다.

4.3. 부검

시험물질 처리 후 모든 시험동물에게서 특이한 중독증상 및 치사개체가 발견되지 않아 부검을 실시하지 않았다.

4.4. 반수치사약량(LD₅₀) 산출

농촌진흥청 고시 제2022-4호 농약 및 원제의 등록기준에 의해 시험을 실시한 결과, 시험고시의 최고용량에서 모든 시험동물이 생존하여 시험종료 후 통계처리는 생략하였다.



5. 시험결과 [Results]

5.1. 일반중독증상 및 치사동물 (Table 1, 3, 4)

타지마는 한계투여약량 4000 mg/kg B.W.로 경피 노출한 결과 일반중독증상 및 치사개체는 발생하지 않았다.

5.2. 체중변화 (Table 2, 5)

모든 시험동물의 체중은 약제투여 후 경과 일애 따라 증가추세를 보였다.

5.3. 반수치사약량 (LD₅₀)

랫드를 이용한 타지마의 급성경피독성시험 시험 결과, LD₅₀값은 4000 mg/kg B.W. 초과이며 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급 (저독성)에 해당되었다.

[표 2. 급성독성정도에 따른 농약 등의 구분]

| 구 분 | 시험동물의 반수를 죽일 수 있는 양 (mg/kg B.W.) | |
|--------------|----------------------------------|-----------------|
| | 급성경피 | |
| | 고 체 | 액 체 |
| I 급 (맹독성) | 10 미만 | 40 미만 |
| II 급 (고독성) | 10 이상, 100 미만 | 40 이상, 400 미만 |
| III 급 (보통독성) | 100 이상, 1000 미만 | 400 이상, 4000 미만 |
| IV 급 (저독성) | 1000 이상 | 4000 이상 |

※ 고체 및 액체의 분류는 농약 등의 물리적 상태에 의함.



6. 참고문헌 [References]

- 농촌진흥청 고시 제2022-4호 「농약 및 원제의 등록기준」 (별표 12) 인축독성시험 기준과 방법, 12-1-2. 급성경피독성시험 (2022.03.08)
- 국립농산물품질관리원 고시 제2020-20호 「유기농업자재 공시 기준」 (2020.12.08)



Study No. : ATP-22016

Final Report

7. Tables

Table 1. Mortality and clinical signs

| Group | Dose (mg/kg B.W.) | Sex | Number of animals | Clinical signs | Mortality (dead / total) | LD ₅₀ |
|-------|-------------------|--------|-------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------|
| 1 | 4000 | Male | 5 | No abnormality detected | 0% (0 / 5) ^a | > 4000 mg/kg B.W. |
| 2 | 4000 | Female | 5 | No abnormality detected | 0% (0 / 5) | |

a : Number of Death animals / Number of tested animals

Table 2. Mean body weights

| Group | Dose (mg/kg B.W.) | Sex | Number of animals | Days after administration (g) | | | |
|-------|-------------------|--------|-------------------|-------------------------------|-------------|--------------|--------------|
| | | | | 0 | 3 | 7 | 14 |
| 1 | 4000 | Male | 5 | 293.1 ± 4.5 ^a | 303.8 ± 5.0 | 333.9 ± 8.5 | 352.4 ± 16.0 |
| 2 | 4000 | Female | 5 | 214.5 ± 5.7 | 222.3 ± 5.9 | 243.0 ± 10.4 | 260.2 ± 13.3 |

a : Mean ± standard deviation

KBSI

13 page of 16

KBSI

13 page of 16

Study No. : ATP-22016

Final Report

Table 4. Clinical signs of rats

| Group | Dose (mg/kg B.W.) | Sex | Number of animals | Days after administration | | | | | | | | | |
|-------|-------------------|--------|-------------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | 0 | | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| | | | | 30 min | 1hr | 2hr | 3hr | 4hr | | | | | |
| 1 | 4000 | Male | 1 | NAD ^a | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |
| | | | 2 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |
| | | | 3 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |
| | | | 4 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |
| | | | 5 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |
| 2 | 4000 | Female | 1 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |
| | | | 2 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |
| | | | 3 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |
| | | | 4 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |
| | | | 5 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |

| Group | Dose (mg/kg B.W.) | Sex | Number of animals | Days after administration | | | | | | | | | |
|-------|-------------------|--------|-------------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | |
| 1 | 4000 | Male | 1 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |
| | | | 2 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |
| | | | 3 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |
| | | | 4 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |
| | | | 5 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |
| 2 | 4000 | Female | 1 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |
| | | | 2 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |
| | | | 3 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |
| | | | 4 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |
| | | | 5 | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |

a : No abnormality detected

KBSI

15 page of 16

KBSI

15 page of 16

Study No. : ATP-22016


Final Report

Table 3. Mortality of rats

| Group | Dose (mg/kg B.W.) | Sex | Number of animals | Days after administration | | | | | | | | | |
|-------|-------------------|--------|-------------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|---|---|---|---|---|
| | | | | 0 | | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| | | | | 30 min | 1hr | 2hr | 3hr | 4hr | | | | | |
| 1 | 4000 | Male | 5 | 0 ^a | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 4000 | Female | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| Group | Dose (mg/kg B.W.) | Sex | Number of animals | Days after administration | | | | | | | | |
|-------|-------------------|--------|-------------------|---------------------------|---|---|---|----|----|----|----|----|
| | | | | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
| 1 | 4000 | Male | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 4000 | Female | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

a : Number of dead animals



KBISI

14 page of 16

KBSI

14 page of 16


Study No. : ATP-22016

Final Report

Table 5. Body weights

| Group | Dose (mg/kg B.W.) | Sex | Number of animals | Days after administration (g) | | | | | | |
|-------------------|-------------------|--------|-------------------|-------------------------------|-------|-------|-------|------|--|--|
| | | | | 0 | 3 | 7 | 14 | Gain | | |
| 1 | 4000 | Male | 1 | 293.8 | 305.1 | 333.0 | 353.9 | 60.1 | | |
| | | | 2 | 296.9 | 311.1 | 346.4 | 378.2 | 81.3 | | |
| | | | 3 | 296.2 | 303.7 | 326.5 | 343.7 | 47.5 | | |
| | | | 4 | 285.6 | 297.7 | 325.8 | 335.9 | 50.3 | | |
| | | | 5 | 292.8 | 301.3 | 337.7 | 350.4 | 57.6 | | |
| Mean | | | | 293.1 | 303.8 | 333.9 | 352.4 | 59.4 | | |
| S.D. ^a | | | | 4.5 | 5.0 | 8.5 | 16.0 | - | | |
| 2 | 4000 | Female | 1 | 207.2 | 221.5 | 253.1 | 269.1 | 61.9 | | |
| | | | 2 | 217.5 | 223.5 | 237.9 | 256.3 | 38.8 | | |
| | | | 3 | 209.8 | 212.8 | 227.5 | 239.2 | 29.4 | | |
| | | | 4 | 217.0 | 228.6 | 250.6 | 273.0 | 56.0 | | |
| | | | 5 | 220.9 | 224.9 | 246.0 | 263.6 | 42.7 | | |
| Mean | | | | 214.5 | 222.3 | 243.0 | 260.2 | 45.8 | | |
| S.D. | | | | 5.7 | 5.9 | 10.4 | 13.3 | - | | |

a : Standard deviation



KBSI

16 page of 16

KBSI

16 page of 16

(11) 꿀벌을 이용한 시제품의 급성 접촉 독성시험

시제품의 꿀벌(*Apis mellifera*)를 이용한 급성 접촉 독성에 대한 시험 분석을 의뢰 실시하였으며 분석 결과 최종 보고서는 다음과 같다.

최종보고서

타지마의
꿀벌 (*Apis mellifera*) 급성접촉독성시험

ETBC-22006



(주)한국생물안전성연구소



KBSI

1 page of 16

제 출 문

시험물질: 타지마

시험제목: 타지마의 꿀벌 (*Apis mellifera*) 급성접촉독성시험

상기 독성시험을 “농약 및 원재의 등록기준” [별표 13] 환경생물 독성 시험기준과 방법 (농촌진흥청고시 제2022-4호)에 준하여 실시하고 그 결과를 다음과 같이 제출합니다.

2022년 04월 27일

(주)한국생물안전성연구소

시험책임자 장희섭



KBSI

2 page of 16

목 차

[Contents]

| | |
|--|----|
| 보고서표지 | 1 |
| 제출문 | 2 |
| 목차 [Contents] | 3 |
| 1. 요약 [Summary] | 4 |
| 2. 서론 [Introduction] | 5 |
| 2.1 시험일반정보 | 5 |
| 2.2 시험책임자 | 5 |
| 2.3 시험관계자 | 5 |
| 2.4 시험일정 | 5 |
| 2.5 시험목적 | 5 |
| 2.6 시험법 | 5 |
| 2.7 시험물질의 보관 | 6 |
| 2.8 시험자료의 보관 | 6 |
| 3. 재료 및 방법 [Materials and Methods] | 7 |
| 3.1 시험물질 | 7 |
| 3.2 시험생물 | 7 |
| 3.3 시험재료 및 준비 | 8 |
| 3.4 시험방법 | 8 |
| 4. 관찰 및 측정 [Observation and Determination] | 10 |
| 4.1 관찰 | 10 |
| 4.2 실내온도 및 상대습도 | 10 |
| 4.3 시험결과와 표시 및 통계처리방법 | 10 |
| 5. 시험결과 [Results] | 11 |
| 5.1 시험환경 조건 | 11 |
| 5.2 치사개체 및 이상증상 | 11 |
| 5.3 급성접촉독성시험 결과 | 11 |
| 6. 참고문헌 [References] | 12 |
| 7. Tables | 13 |
| Table 1. Cumulative mortality of honeybees | 13 |
| Table 2. Behavioral abnormalities of honeybees | 14 |
| 8. Appendices | 15 |
| Appendix 1. Positive control study | 15 |
| Appendix 2. Temperature and relative humidity | 16 |



KBSI

3 page of 16

1. 요약 [Summary]

타지마의 꿀벌에 대한 급성적 영향을 평가하고, 반수치사약량 (LD₅₀)을 산출하기 위해 48시간동안 급성접촉독성시험을 수행하였다.

시험의 약량은 무처리군과 음성대조군 (distilled water+acetone (5:5), 1 µL/bee) 및 제품 (100%) 기준 100,000 µg/bee로 설정하였다.

시험생물은 무처리군과 음성대조군 및 시험물질 처리군 당 각각 10마리씩 3반복으로 노출시켰다.

시험물질 노출 후 48시간동안 관찰한 결과, 무처리군과 음성대조군 그리고 시험물질 처리군의 모든 개체는 정상으로 관찰되었다.

본 시험의 결과는 아래와 같다.

| Observation time (hr) | LD ₅₀ ^a (µg/bee) |
|-----------------------|--|
| 24 & 48 | > 100,000 |

a: Based on product-nominal dose

타지마의 꿀벌에 대한 24, 48시간 반수치사약량 (LD₅₀)은 제품 기준으로 모두 100,000 µg/bee 초과이었다.



KBSI

4 page of 16

2. 서 론 [Introduction]

2.1 시험일반정보

시험제목: 타지마의 꿀벌 (*Apis mellifera*) 급성접촉독성시험
 시험물질: 타지마
 시험의뢰자: ㈜현농
 전라남도 장성군 남면 나노산단3로 33-5
 시험기관: ㈜한국생물안전성연구소
 충청북도 음성군 감곡면 성주로 362-20
 Tel: 043-882-0297, Fax: 043-882-0298
 시험장소: ㈜한국생물안전성연구소 GLP 연구 A동 꿀벌실험실

2.2 시험책임자

장희섭
 ㈜한국생물안전성연구소 독성연구팀
 충청북도 음성군 감곡면 성주로 362-20
 Tel: 043-882-0297, Fax: 043-882-0298

2.3 시험관계자

시험물질의 조제/노출: 이대경
 관찰/측정/평가: 장희섭, 이대경
 꿀벌사육관리담당자: 장희섭, 이대경

2.4 시험일정

시험물질 노출일: 2022.04.11
 관찰/측정/평가: 2022.04.11 ~ 2022.04.13
 관찰 종료일: 2022.04.13
 최종보고서 제출일: 2022.04.27

2.5 시험목적

꿀벌 (*Apis mellifera*)에 대한 급성접촉독성시험을 통하여 유기농업자재 공시에 관한 기초자료로 활용코자 한다.

2.6 시험법

농촌진흥청 고시 제2022-4호 (2022.03.08) “농약 및 원제의 등록기준”, [별표 13] “환경생물 독성 시험기준과 방법”, “13-1-4. 꿀벌급성독성시험”, “13-1-4-1. 꿀벌접촉 독성”에 따라 수행되었다.



2.7 시험물질의 보관

본시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질보관고에 보관하였다.
 시료번호: 22-1-012
 시험물질보관기간: 유기농업자재 공시 후 3년

2.8 시험자료의 보관

본시험의 시험기초자료 및 관계시험성적서는 당 연구소 자료보관실에 보관하였다.
 시험번호: ETBC-22006
 시험기초자료: 자료보관실
 최종보고서: 자료보관실
 자료하드디스크: 자료보관실
 자료보관기간: 유기농업자재 공시 후 3년
 자료관리담당자: 최윤규



3. 재료 및 방법 [Materials and Methods]

3.1 시험물질

물질명: 타지마
 입수일: 2022.02.18
 입수량: 500 mL
 시료번호: 22-1-012
 외관 및 색상: 액상, 황갈색
 주원료: 미생물 추출물
 주원료 투입비율: 90%
 보관조건: 실온 (그늘진 곳)
 공급원: ㈜현농

3.2 시험생물

3.2.1 시험생물

시험종: 꿀벌 (*Apis mellifera*)
 공급원: ㈜한국생물안전성연구소
 주소: 충청북도 음성군 감곡면 성주로 362-20
 입수일: 2018.06.08

3.2.2 사육

사육장소: ㈜한국생물안전성연구소 꿀벌 야외사육소
 사육상자: 장방형 나무소재 벌통
 사육조건: 당 연구소의 기존 생물군으로부터 분봉된 꿀벌 세력을 입수일 부터 본 시험 시까지 꿀벌 야외사육소에서 순화 및 자연사육 하였다.
 사육관리: 입수 이후 동절기 (월동), 장마 기간 등 사육관리자의 판단에 의해 필요시 고농도 (60% 이상) 자당용액을 급이 하였으며, 하절기 (3월~10월)에는 월 2회 이상 벌집 내부를 점검하여 봉군의 건강상태를 확인하고, 세력이 강할 경우 분봉 등을 통하여 관리하였다.

3.2.3 시험종의 선정이유

본 시험에 사용된 꿀벌 (*Apis mellifera*)은 환경생물독성 시험생물로 널리 사용되고 있고, 본 계통에 관한 비교할 수 있는 충분한 시험 기초자료가 축적되어 있으며, 해당 시험가이드라인에서 추천된 종이기 때문에 선정하였다.



3.3 시험재료 및 준비

3.3.1 시험용 용기

스테인리스 철망을 이용하여 길이 15 cm, 직경 5 cm 크기의 원통형으로 만들어진 시험용케이지에 입구를 원통형 유리제 급식관 (직경 1 cm, 길이 5 cm 정도)을 끼울 수 있도록 구멍을 뚫은 스펀지 마개를 사용하였다.

3.3.2 먹이

실험실시 전 50% 자당용액을 유리급식관에 2 mL 이상 채워 준비하였다.

3.3.3 시험물질 노출 전 시험생물 처리

환기구멍이 있는 밀폐통에 한 벌통에서 생산된 건강하고 활동성이 좋은 일벌을 채집하여 CO₂ gas로 마취시킨 후, 어린 개체를 제외하고 한 케이지 당 10마리씩 벌을 넣어 25±2°C의 암조건에서 회복시킨 다음 시험에 사용하였다.

3.4 시험방법

3.4.1 시험약량 설정

꿀벌에 대해 시험물질의 독성이 낮을 것으로 예상되어 제품 (100%) 기준 100.000 µg/bee 약량에서 한계시험으로 진행하였다.

3.4.2 시험용액 조제

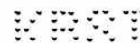
시험물질 타지마는 acetone 등의 용매를 사용하여 시험용액 조제 시, 소량의 침전 발생 등 온전히 용해되지 않아 증류수와 acetone을 5:5의 비율로 희석한 용매를 사용하여 시험용액을 조제하였다.
 시험물질 1.000 g을 10 mL-volumetric flask에 넣고, 용매를 일부 가해 현탁시킨 다음 표선까지 정용하였다.
 이후 vortex mixer를 이용해 충분히 용해시켜 제품 기준 100.000 µg/µL의 시험용액 (test solution)을 조제하였다.

3.4.3 시험물질 노출

케이지 안에 10마리씩 수용된 꿀벌들을 밀봉팩에 담아 CO₂ gas로 마취시킨 후 여과지 위에 올려놓고, 조제된 시험용액을 micro applicator를 사용하여 마취된 꿀벌의 흉부 (등부위)에 각각 1 µL 처리하였다.

3.4.4 노출 생물수

무처리군과 음성대조군 그리고 시험물질 처리군 당 10마리씩 3반복으로 수행하였다.



3.4.5 대조군 설정

무처리군: 마취 후 어떠한 자극도 주지 않았다.
음성대조군: 시험용액 조제 시 사용된 용매를 개체 당 1 µL씩 처리하였다.
양성대조군: 가장 최근에 실시한 시험결과로 대체하였다 (Appendix 1).

3.4.6 시험환경

기간: 48시간
광주기: 암조건 (관찰시간 제외)
온도: 25±2°C
상대습도: 50~70%
먹이공급: 시험물질이 처리된 벌을 다시 케이지에 옮긴 후, 50% 자당용액이 들어있는 급식관을 공급하였다.

4. 관찰 및 측정 [Observation and Determination]

4.1 관찰

시험물질 노출 후 4, 24시간 및 48시간 경과 시에 이상증상 및 치사 개체를 관찰하였다. 이상증상은 일반중독증상, 특이증상 등을 관찰하였으며, 치사 개체의 판정은 육안으로 관찰하여 움직임이 없고 주사침을 이용하여 건드렸을 때 더듬이, 다리 및 몸통의 움직임이 중단된 경우 치사로 간주하였다.

4.2 실내온도 및 상대습도

실험실 실내온도 및 상대습도는 시험개시부터 60분 간격으로 자동 전자 온도습도기록계 (Thermo recorder TR-72U, Thermo Scientific™, USA)를 이용하여 측정하였다.

4.3 시험결과의 표시 및 통계처리방법

본 시험이 한계시험 단계에서 종료됨에 따라 제품 기준으로 설정한 한계시험 약량의 초과로서 24, 48시간 반수치사약량 (LD₅₀)을 표기하였다.

5. 시험결과 [Results]

5.1 시험환경 조건

시험기간 동안 꿀벌실험실의 실내온도는 평균 25.2°C (24.3~26.2°C), 상대습도는 평균 52.9% (49~60%)로 측정되었다.

일부 시간대의 상대습도가 시험 가이드라인의 범위 (50~70%)로부터 벗어나 이탈이 발생하였으나, 대조군에 미치는 영향이 없었던 것으로 보아 시험에 미치는 영향은 적은 것으로 판단하였다 (Appendix 2).

5.2 치사개체 및 이상증상

시험물질 노출 후 48시간동안 관찰한 결과, 무처리군과 음성대조군 (distilled water+acetone (5:5), 1 µL/bee) 그리고 시험물질 처리군 (100,000 µg/bee)의 모든 개체는 정상으로 관찰되었다 (Table 1, 2).

5.3 급성접촉독성시험 결과

이상의 시험 결과, 타지마의 꿀벌에 대한 24, 48시간 반수치사약량 (LD₅₀)은 제품 기준으로 모두 100,000 µg/bee 초과이었다.

| Observation time (hr) | LD ₅₀ ^a (µg/bee) |
|-----------------------|--|
| 24 & 48 | > 100,000 |

a: Based on product-nominal dose

6. 참고문헌 [References]

- 1) 농촌진흥청 고시 제2022-4호 (2022.03.08) "농약 및 원재의 등록기준", [별표 13] "환경생물 독성 시험기준과 방법", "13-1-4. 꿀벌급성독성시험", "13-1-4-1. 꿀벌접촉 독성"
- 2) 국립농산물품질관리원 고시 제2020-20호 (2020.12.08) "유기농업자재 공시기준"
- 3) OECD guidelines for the testing of chemicals, No. 214 "Honeybees, Acute Contact Toxicity Test (adopted: Sep. 21, 1998)"

7. Tables

Table 1. Cumulative mortality of honeybees

| Nominal dose ^a (μg/bee) | Exposed honeybees | Cumulative mortality | | | Mortality (Death / Total) | |
|---------------------------------------|----------------------|----------------------|-------|-------|------------------------------|------------------|
| | | 4 hr | 24 hr | 48 hr | 24 hr | 48 hr |
| Untreated control | 10 | 0 | 0 | 0 | 0.0% (0 / 30) | 0.0% (0 / 30) |
| | 10 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 10 | 0 | 0 | 0 | | |
| Negative control ^b | 10 | 0 | 0 | 0 | 0.0% (0 / 30) | 0.0% (0 / 30) |
| | 10 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 10 | 0 | 0 | 0 | | |
| 100.000 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0.0% (0 / 30) | 0.0% (0 / 30) |
| | 10 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 10 | 0 | 0 | 0 | | |

a: Based on product

b: Distilled water+acetone (5:5), 1 μL/bee

KBSI

13 page of 16

Table 2. Behavioral abnormalities of honeybees

| Nominal dose ^a (μg/bee) | Exposed honeybees | Abnormal response | | |
|---------------------------------------|----------------------|--------------------|-------|-------|
| | | 4 hr | 24 hr | 48 hr |
| Untreated control | 10 | N(10) ^b | N(10) | N(10) |
| | 10 | N(10) | N(10) | N(10) |
| | 10 | N(10) | N(10) | N(10) |
| Negative control ^c | 10 | N(10) | N(10) | N(10) |
| | 10 | N(10) | N(10) | N(10) |
| | 10 | N(10) | N(10) | N(10) |
| 100.000 | 10 | N(10) | N(10) | N(10) |
| | 10 | N(10) | N(10) | N(10) |
| | 10 | N(10) | N(10) | N(10) |

a: Based on product

b: Number of honeybees

c: Distilled water+acetone (5:5), 1 μL/bee

※ Observation key

N: Normal

A: Hyperactivity

B: Mobile but not working or flying normally

C: Alive but unable to walk or fly

NA: Not applicable, not observed because of 100% mortality

KBSI

14 page of 16

8. Appendices

Appendix 1. Positive control study

- Recently study data

| Study No. | Study period | LD ₅₀ ^a (μg a.i./bee) | |
|---------------|----------------------------------|--|-------|
| | | 24 hr | 48 hr |
| 22-KET-PBC001 | Mar. 29, 2022 ~ Apr. 11, 2022 | 0.115 | 0.102 |

a: Based on nominal dose

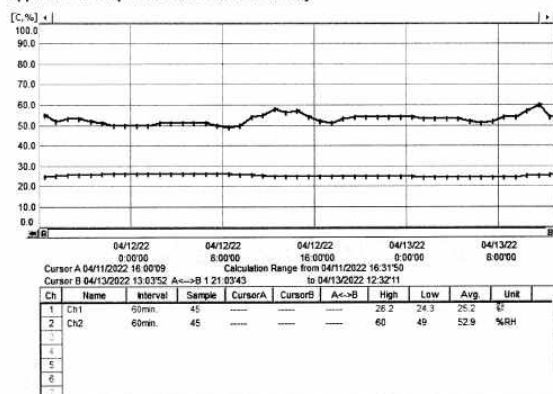
* Test substance: Dimethoate

* Test species: *Apis mellifera*

KBSI

15 page of 16

Appendix 2. Temperature and relative humidity






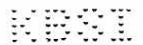
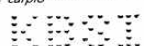

- Recording period: Apr. 11, 2022 ~ Apr. 13, 2022

KBSI

16 page of 16

(12) 담수어류를 이용한 시제품의 급성 독성시험

시제품의 담수어류 잉어(*Cyprinus carpio*)를 이용한 급성 독성에 대한 시험 분석을 의뢰 실시하였으며 분석 결과 최종 보고서는 다음과 같다.

| | |
|--|---|
| <p>Study No. : ETF-22010 Final Report</p> <p style="text-align: center;">최종보고서</p> <p style="text-align: center;">타지마의 담수어류 (잉어, <i>Cyprinus carpio</i>) 급성독성시험</p> <p style="text-align: center;">ETF-22010</p> <p style="text-align: center;"> (주) 한국생물안전성연구소</p> <p style="text-align: center;"></p> <p>KBSI 1 page of 17</p> | <p>Study No. : ETF-22010 Final Report</p> <p style="text-align: center;">제 출 문</p> <p>시험물질: 타지마 시험제목: 타지마의 담수어류 (잉어, <i>Cyprinus carpio</i>) 급성독성시험</p> <p>상기 독성시험을 "농약 및 원제의 등록기준" [별표 13] 환경생물 독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청고시 제2021-33호)에 준하여 실시하고 그 결과를 다음과 같이 제출합니다.</p> <p style="text-align: right;">2022년 04월 27일 (주)한국생물안전성연구소 시험책임자 오 현 택 </p> <p style="text-align: center;"></p> <p>KBSI 2 page of 17</p> |
| <p>Study No. : ETF-22010 Final Report</p> <p>목 차 [Contents]</p> <p>보고서표지 1</p> <p>제출문 2</p> <p>목차 [Contents] 3</p> <p>1. 요약 [Summary] 5</p> <p>2. 시험실시의 개요 [Introduction] 6</p> <p>2.1. 시험제목 6</p> <p>2.2. 시험물질 6</p> <p>2.3. 시험목적 6</p> <p>2.4. 시험방법 6</p> <p>2.5. 시험의뢰자 6</p> <p>2.6. 시험기관 6</p> <p>2.7. 시험장소 6</p> <p>2.8. 시험책임자 6</p> <p>2.9. 시험관계자 7</p> <p>2.10. 시험일정 7</p> <p>2.11. 시험물질의 보관 7</p> <p>2.12. 시험자료의 보관 7</p> <p>3. 시험재료 및 방법 [Materials and Methods] 8</p> <p>3.1. 시험물질 8</p> <p>3.2. 시험생물 8</p> <p>3.3. 시험방법 8</p> <p>4. 관찰 및 측정 [Observation and Determination] 10</p> <p>4.1. 관찰 10</p> <p>4.2. 시험환경측정 10</p> <p>4.3. 전장 및 체중 측정 10</p> <p>4.4. 시험결과와 표시 및 통계처리 10</p> <p>5. 시험결과 [Results] 11</p> <p>5.1. 치사개체 및 이상증상 11</p> <p>5.2. 시험환경조건 11</p> <p>5.3. 전장 및 체중 11</p> <p>5.4. 급성독성시험결과 11</p> <p>6. 참고문헌 [References] 12</p> <p>7. Tables 13</p> <p>Table 1. Cumulative mortality of <i>Cyprinus carpio</i> 13</p> <p style="text-align: center;"></p> <p>KBSI 3 page of 17</p> | <p>Study No. : ETF-22010 Final Report</p> <p>Table 2. Abnormal response of <i>Cyprinus carpio</i> 13</p> <p>Table 3. Temperature 14</p> <p>Table 4. pH-values 14</p> <p>Table 5. Dissolved oxygen concentration 14</p> <p>Table 6. Hardness 14</p> <p>Table 7. Total organic carbon 15</p> <p>Table 8. Illuminance 15</p> <p>Table 9. Measurement of length for <i>Cyprinus carpio</i> 15</p> <p>Table 10. Measurement of body weight for <i>Cyprinus carpio</i> 15</p> <p>8. Appendix 16</p> <p>Appendix 1. Physical and chemical properties of dilution water 16</p> <p>Appendix 2. Positive control study 17</p> <p style="text-align: center;"></p> <p>KBSI 4 page of 17</p> |

1. 요약 [Summary]

타지마의 담수어류에 대한 급성 독성 영향을 평가하고, 반수치사농도 (LC₅₀)를 산출하기 위해 잉어 (*Cyprinus carpio*)를 이용하여 급성독성시험을 96시간 동안 지수식으로 실시하였다.

시험용액 중 시험물질의 농도는 제품 100% 기준으로 기초시험농도 100.0 mg/L 및 음성대조군으로 구분하였으며 결과는 아래와 같다.

| Time | LC ₅₀ ^a (mg/L) | 95% confidence limits | NOEC ^b (mg/L) |
|------------|---|--------------------------|-----------------------------|
| 48 & 96 hr | > 100.0 | - | 100.0 |

a: Median lethal concentration

b: No observed effect concentration

해당시험 조건하에서, 유기농업자재 타지마의 잉어에 대한 48시간 및 96시간 반수치사농도 (LC₅₀)는 제품 100% 기준으로 기초시험농도 100.0 mg/L를 초과하였다.



2. 시험실시의 개요 [Introduction]

2.1. 시험제목

타지마의 담수어류 (잉어, *Cyprinus carpio*) 급성독성시험

2.2. 시험물질

타지마

2.3. 시험목적

타지마에 대한 담수어류 급성독성시험을 통하여 유기농업자재 공시에 관한 기초자료로 활용코자 한다.

2.4. 시험방법

"농약 및 원제의 등록기준" [별표 13] 환경생물 독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제2021-33호)에 준하여 실시하였다.

2.5. 시험의뢰자

명칭 ㈜현농

소재지 전라남도 장성군 남면 나노산단3로 33-5

2.6. 시험기관

명칭 ㈜한국생물안전성연구소

소재지 충청북도 음성군 감곡면 성주로 362-20

연락처 Tel: 043-882-0297, Fax: 043-882-0298

2.7. 시험장소

명칭 ㈜한국생물안전성연구소 GLP 연구동 어독성실험실

소재지 충청북도 음성군 감곡면 성주로 362-20

2.8. 시험책임자

성명 오현택

소속 ㈜한국생물안전성연구소 독성연구팀



2.9. 시험관계자

시험물질의 조제 김현정, 이대경
시험물질의 노출 김현정, 이대경
관찰/측정/평가 김현정, 이대경
사육관리 김해경

2.10. 시험일정

예비시험기간 2022년 03월 02일~2021년 03월 04일
본시험순회기간 2022년 03월 07일~2022년 03월 13일
본시험시험물질 노출일 2022년 03월 14일
본시험 종료일 2022년 03월 18일
최종보고서 제출일 2022년 04월 27일

2.11. 시험물질의 보관

본시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질보관고에 보관하였다.
시료번호 22-1-012
시험물질보관기간 유기농업자재 공시 후 3년

2.12. 시험자료의 보관

본시험의 시험기초자료 및 관계시험성적서는 당 연구소 자료보관실에 보관하였다.
시험번호 ETF-22010
시험기초자료 자료보관실
최종보고서 자료보관실
자료하디스크 자료보관실
자료보관기간 유기농업자재 공시 후 3년
자료관리담당자 최윤규



3. 시험재료 및 방법 [Materials and Methods]

3.1. 시험물질

3.1.1. 물질명 타지마
3.1.2. 입수일 2022년 02월 18일
3.1.3. 입수량 500 mL
3.1.4. 시료번호 22-1-012
3.1.5. 성상 및 외관 액상, 황갈색
3.1.6. 주원료 미생물 추출물
3.1.7. 주원료 투입비율 90%
3.1.8. 보관조건 실온 (그늘진 곳)
3.1.9. 공급원 ㈜현농

3.2. 시험생물

3.2.1. 시험어종 (학명) 잉어 (*Cyprinus carpio*)
3.2.2. 시험종 선정이유 본 시험에 사용된 *Cyprinus carpio*는 수생 생태계의 유해성 평가에 널리 사용되고 있고, 본 계통에 관한 비교할 수 있는 충분한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 농촌진흥청 및 OECD 가이드라인에서 추천된 종이기 때문에 선정하였다.

3.2.3. 공급원

- 명칭 자루
- 입수일 2021년 06월 07일
3.2.4. 사육
- 사육장소 GLP 연구동 담수어류 사육실1
- 사육온도 20.0~24.0℃
- 광조건 조명 16시간, 암 8시간
- 먹이급이 1일 1회 급이, Top Meal [관상어 전문사료] 제일사료㈜

3.3. 시험방법

3.3.1. 순화

- 순화장소 GLP 연구동 어독성실험실
- 순화수조 시험어류의 단위체중 0.8 g 당 시험용수의 양이 1 L가 넘도록 사용하였다.
- 순화환경 순화기간동안 시험조건과 동일한 수온에서 유지되도록 하였으며, 순화종인 사육수의 용존산소량을 포화농도의 80% 이상으로 유지하기 위하여 연속폭기로 산소공급을 실시하였다.



- 순화온도 20.0~24.0℃
 - 광조건 조명 16시간, 암 8시간 (명조건시 조도 540~1000 Lux)
 - 마리수 및 기간 독성시험에 필요한 마리의 110% 이상을 시험 시작 전 7일 이상 순화하였다.
 - 먹이급여 사육시 공급한 사료를 1일 1회 시험 시작 24시간 이전부터 절식하였다.
- 3.3.2. 시험농도 및 노출 마리 수
예비시험결과 기초시험농도인 제품 100% 기준으로 100.0 mg/L에서 치사 개체가 관찰되지 않아 제품 100% 기준 100.0 mg/L 단일농도로 재시험을 실시하였으며, 잉어 7마리를 노출시켰다. 대조군은 무처리한 시험용수를 음성대조군으로 하여 시험군과 동일하게 7마리를 노출시켰다.
- 3.3.3. 시험물질의 조제
시험물질 0.500 g을 칭량하여 5 L의 시험용수에 직접 처리한 후 충분히 교반하여 제품 100% 기준 100.0 mg/L의 시험용액을 조제하였다.
- 3.3.4. 시험물질 적용방법
- 시험용기 6 L 용량의 시험용 수조 (원통형 유리제)
 - 노출기간 시험물질 노출 후 96시간
 - 시험용수 독성시험에 사용된 시험용수는 조제수 (ISO 7346-1)를 사용하였다.
 - 수질기준 시험용수의 물리화학적 수질 항목 중 입자상 물질, 총유기탄소 (TOC), 암모니아, 질산염 및 잔류염소는 당소에서 측정하였고, 그 외 항목은 외부 분석기관을 통해 측정하였다 (Appendix 1).
- 또한 조제수는 각 배치마다 질산염과 잔류염소를 측정하여 적합성을 확인한 후 1일 이상 폭기하여 사용하였다. 수온은 순화온도와 동일한 범위 (20.0~24.0℃) 내로 유지되도록 시험기간 중 수온의 변화는 $\pm 1^\circ\text{C}$ 이상 변화되지 않도록 하였다. 또한 시험용수의 용존산소량은 최소한 포화농도 60%를 유지하도록 하였다.
- 3.3.5. 시험 대조군
- 음성대조군 시험용수인 조제수를 음성대조군으로 사용하였다.
 - 양성대조군 가장 최근에 양성대조물질로 시험한 GLP 담수어류급성독성 시험 결과를 적용하였다 (Appendix 2).



4. 관찰 및 측정 [Observation and Determination]

4.1. 관찰

시험생물 투입 후 2, 5시간 및 24시간부터 이른 오전, 늦은 오후에 하루 2번씩 72시간까지 관찰을 실시하였고, 96시간은 오전 관찰만 실시하였다. 관찰 시 형태이상, 유영이상, 출혈 등의 중독증상과 치사 개체수를 관찰하였고, 치사어의 판정은 시험생물을 유리막대로 건드렸을 때 움직임이 없거나 아가미 호흡이 중단된 경우 치사로 판정하였다.

4.2. 시험환경측정

4.2.1. 수질측정

수온과 pH 및 DO는 시험생물 노출기간 동안 1일 1회 측정하였다. 총유기탄소와 경도는 시험생물 노출 시작 시 측정하였다.

4.2.2. 광조건 측정

광조건은 일 기준 명 16시간, 암 8시간으로 하고, 명조건시 노출개시일과 노출종료일에 조도를 측정하였다.

4.3. 전장 및 체중 측정

시험종료 후 음성대조군 전 개체의 전장 및 체중을 측정하였다.

4.4. 시험결과와 표시 및 통계처리

시험물질 투여 후 경과시간별 누적치사율을 사용하여 결과를 나타냈으며, 기초시험 단계에서 시험이 종료되어 통계처리는 하지 않았다.



5. 시험결과 [Results]

5.1. 치사개체 및 이상증상

노출기간 96시간동안, 음성대조군 및 시험물질 처리군인 100.0 mg/L 농도군에서 치사 및 어떠한 중독증상도 관찰되지 않았다 (Table 1, 2).

5.2. 시험환경조건

시험기간 동안 수온은 평균 23.0°C ($22.9\sim 23.2^\circ\text{C}$), pH는 평균 8.03 ($7.72\sim 8.19$), 용존산소농도는 포화용존산소량 대비 평균 89.3% ($77.7\sim 95.4\%$)로 측정되었다. 또한, 조도는 평균 899 Lux ($879\sim 922$ Lux), 사용한 시험용수의 경도는 180 mg CaCO_3/L , 총유기탄소는 0.055 mg/L로 측정되었다 (Table 3~8).

5.3. 전장 및 체중

노출종료 후 음성대조군 시험어의 전장 및 체중을 측정한 결과, 전장은 평균 3.46 cm ($3.19\sim 3.83$ cm), 체중은 평균 0.560 g ($0.391\sim 0.725$ g)으로 측정되었다 (Table 9, 10).

5.4. 급성독성시험결과

유기농업자재 티자마의 담수어류 (잉어, *Cyprinus carpio*)에 대한 48 및 96시간 반수치사농도 (LC_{50})는 모두 제품기준 100.0 mg/L를 초과하였고, 무영향관찰농도 (NOEC)는 모두 100.0 mg/L이었다.



6. 참고문헌 [References]

- 농촌진흥청 고시 제2021-33호 「농약 및 원제의 등록기준」 [별표 13] 환경생물 독성시험 기준과 방법 (2021.12.30)
- 국립농산물품질관리원 고시 제2020-20호 (2020.12.08) “유기농업자재 공시 기준”.
- OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No. 203 “Fish, Acute Toxicity Test (Adopted : June 18, 2019)”



7. Tables

Table 1. Cumulative mortality of *Cyprinus carpio*

| Nominal concentration (mg/L) ^a | Number of fish | Cumulative mortality | | | | | | | | |
|---|----------------|----------------------|------|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|
| | | 2 hr | 5 hr | 24 hr | | 48 hr | | 72 hr | | 96 hr |
| | | | | 1st | 2nd | 1st | 2nd | 1st | 2nd | |
| Control | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 100.0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

a: Based on nominal concentration of test substance itself

Table 2. Abnormal response of *Cyprinus carpio*

| Nominal concentration (mg/L) ^a | Number of fish | Abnormal response | | | | | | | | | |
|---|----------------|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--|
| | | 2 hr | 5 hr | 24 hr | | 48 hr | | 72 hr | | 96 hr | |
| | | | | 1st | 2nd | 1st | 2nd | 1st | 2nd | | |
| Control | 7 | NOR(7) ^b | NOR(7) | NOR(7) | NOR(7) | NOR(7) | NOR(7) | NOR(7) | NOR(7) | NOR(7) | |
| 100.0 | 7 | NOR(7) | NOR(7) | NOR(7) | NOR(7) | NOR(7) | NOR(7) | NOR(7) | NOR(7) | NOR(7) | |

a: Based on nominal concentration of test substance itself

b: Number of fish

※ Observation key

NOR : Normal

NA : Not applicable, not observed because of 100% mortality

KBSI

Table 3. Temperature

| Nominal concentration ^a (mg/L) | 0 hr | 24 hr | 48 hr | 72 hr | 96 hr |
|---|-------------------|-------|-------|-------|-------|
| Control | 23.2 ^b | 23.0 | 22.9 | 22.9 | 23.0 |
| 100.0 | 23.1 | 23.0 | 23.0 | 22.9 | 22.9 |

a: Based on nominal concentration of test substance itself

b: Unit : °C

Table 4. pH-values

| Nominal concentration ^a (mg/L) | 0 hr | 24 hr | 48 hr | 72 hr | 96 hr |
|---|------|-------|-------|-------|-------|
| Control | 8.19 | 8.11 | 8.16 | 8.09 | 8.16 |
| 100.0 | 8.13 | 7.98 | 8.01 | 7.72 | 7.79 |

a: Based on nominal concentration of test substance itself

Table 5. Dissolved oxygen concentration

| Nominal concentration ^a (mg/L) | 0 hr | 24 hr | 48 hr | 72 hr | 96 hr |
|---|-------------------|-------|-------|-------|-------|
| Control | 92.0 ^b | 88.5 | 90.6 | 91.2 | 95.4 |
| 100.0 | 93.9 | 87.4 | 87.6 | 77.7 | 88.4 |

a: Based on nominal concentration of test substance itself

b: Unit : %_{sat}

Table 6. Hardness

| Test group | Hardness (mg/L, CaCO ₃) |
|------------|-------------------------------------|
| Control | 180 |

KBSI

Table 7. Total organic carbon

| Test group | Total organic carbon (mg C/L) |
|------------|-------------------------------|
| Control | 0.055 |

Table 8. Illuminance

| Nominal concentration ^a (mg/L) | 0 hr | 96 hr |
|---|------|-------|
| Control | 912 | 879 |
| 100.0 | 883 | 922 |

a: Based on nominal concentration of test substance itself

b: Unit : Lux

Table 9. Measurement of length for *Cyprinus carpio*

| Group | Length (cm) | | | | | | | Mean (Min~Max) |
|---------|-------------|------|------|------|------|------|------|------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
| Control | 3.19 | 3.47 | 3.23 | 3.47 | 3.51 | 3.49 | 3.83 | 3.46 (3.19~3.83) |

Table 10. Measurement of body weight for *Cyprinus carpio*

| Group | Weight (g) | | | | | | | Mean (Min~Max) |
|---------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
| Control | 0.391 | 0.557 | 0.433 | 0.702 | 0.604 | 0.508 | 0.725 | 0.560 (0.391~0.725) |

KBSI

8. Appendices

Appendix 1. Physical and chemical properties of dilution water

| Parameter | Maximum concentration | Results |
|---|-----------------------|------------|
| Particulate matter | 5 mg/L | 0.040 mg/L |
| Total organic carbon (TOC) | 2 mg/L | 0.048 mg/L |
| Un-ionised ammonia (NH ₃) | 1 µg/L | ND |
| Nitrate (NO ₃) | < 9 mg/L | 5.0 mg/L |
| Residual chlorine | 10 µg/L | ND |
| Total organophosphorus pesticides | 50 ng/L | ND |
| Total organochlorine pesticides plus polychlorinated biphenyls (including PCBs) | 50 ng/L | ND |
| Total organic chlorine | 25 ng/L | ND |
| Aluminium (Al) | 1 µg/L | 0.01 µg/kg |
| Arsenic (As) | 1 µg/L | ND |
| Chromium (Cr) | 1 µg/L | ND |
| Cobalt (Co) | 1 µg/L | ND |
| Copper (Cu) | 1 µg/L | 0.03 µg/kg |
| Iron (Fe) | 1 µg/L | ND |
| Lead (Pb) | 1 µg/L | ND |
| Nickel (Ni) | 1 µg/L | ND |
| Zinc (Zn) | 1 µg/L | 0.11 µg/kg |
| Cadmium (Cd) | 100 ng/L | ND |
| Mercury (Hg) | 100 ng/L | ND |
| Silver (Ag) | 100 ng/L | ND |

KBSI

Appendix 2 Positive control study

| Study No. | Study period | LC ₅₀ ^a (mg/L) |
|--------------|---------------------------|--------------------------------------|
| | | 48 & 96 hr |
| 21-KET-PC002 | 2021.12.01~ 2021.12.31 | 1.278 |

a: Median lethal concentration

b: Based on nominal concentration

* Test substance : 3,5-Dichlorophenol

* Test species : *Cyprinus carpio*

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

가. 연구개발 목표

| 구분 | 내용 |
|------|--|
| 최종목표 | 미생물 유래 바이오폴리머 생합성 배양기술을 이용한 나노리포좀 캡슐 제제 개발 |
| 세부목표 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 콜로이드성 입자 기반의 천연생물소재에 의한 벼 도열병 방제제 개발 ○ 미생물 유래 대사유도체의 대량생산 시스템 공정 확립 ○ 유기농자재 등록 및 포장검정에 의한 방제지침서 개발 |

나. 정성적 연구개발 성과

| 연구범위 | 세부 개발 내용 및 성과 |
|--|--|
| 생물적 방제균 유래 대사유도체 생산 | <ul style="list-style-type: none"> ▶ 유용 미생물 3종 분리 및 동정과 생장 특성에 의한 항진균 활성 검정 <ul style="list-style-type: none"> - <i>B. subtilis</i>, <i>P. polymyxa</i>, <i>B. amyloliquefaciens</i> - 배양 24시간 생장밀도: $1.2 \sim 1.8 \times 10^8$ CFU/mL - biosurfactant 생산 능력검정: 29.1~39.1 mN/m surface tension 유지 - 추출된 바이오폴리머의 벼 도열병균에 대한 항진균 활성 증가: 5~10% - 벼 도열병 실내검정: KB21 균주 우수(78% 방제효과) - 벼 잎도열병 온실 방제효과(200배): KB21 균주 우수(59% 이상) ▶ 배양 기질 특이성에 의한 대사유도체 생산 및 항진균 활성 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 배양 기질: 키토산(CS) 분말 형태와 콜로이드 형태 사용 - 균주 생장밀도 증가: 5일 배양시 $4.82 \times 10^9 \sim 5.12 \times 10^8$ CFU/mL - 항진균 활성 증가: <i>R. solani</i>(4.1~5.3%), <i>F. oxysporum</i>(3.5~8.8%) - biosurfactant 생산 증가: surfactin, fengycin, iturin 생산량 증가 - 배양 기질 가수분해 효소 생산능력 증가: chitosanase 활성 증가 |
| 미생물 유래 대사유도체에 의한 제형 및 최적 혼합 조건별 물리·화학적 특성 평가 | <ul style="list-style-type: none"> ▶ 항진균 활성 증진을 위한 항진균 대사 화합물 생산능력 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 바이오폴리머 생산 및 추출 능력 검정: Bs KB21균주 우수 - 추출 조건 확립: supernatant:ethanol(1:3), 2.5% organic acid 등 ▶ 제형물의 혼합 조건별 리포좀 캡슐 제형화: 10종 제형화 및 항균활성 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 바이오폴리머의 리포좀 제형화: homogenization 방법에 의한 레시틴 이용 리포좀 제형 - 리포좀 제형의 CS 캡슐화(CCL): 0.5% CS 코팅시 surface tension(26.2mN/m) 우수 ▶ CCL 혼합조건별 대사유도체 함량 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 코팅농도별 유효물질 분석 조건 확립: LC-MS/MS 이용 함량분석 - 유효물질 분리 및 정제 조건 확립: iturin, fengycin, surfactin - 0.5% 코팅 CCL 조건: 유효물질 총량 500.8 mg/kg 우수하며 함량 안정적 유지 ▶ CCL 물리·화학적 및 구조적 특성 분석 <ul style="list-style-type: none"> - CCL 형태 관찰: FETEM - 0.5% CCL DLS 분석: Z-average(121.67nm), PDI(0.25), 제타 전위(-10.47mV) |

| | |
|---|--|
| | <ul style="list-style-type: none"> - FTIR 분석: 고유 특성의 피크 변화와 공정 중 각 물질들간 물리화학 구조적 변화 확인 ▶리포좀 캡슐화 효율 분석 <ul style="list-style-type: none"> - CS 코팅 농도별 캡슐화 효율: 0.5%(82.5%) > 0.2%(63.4%) - 캡슐 코팅에 의한 유효물질 함량 증가: 0.5% 코팅 농도 증가 - 유효물질별 성분함량 포집율: fengycin(85.7%), iturin(81.7%) > surfactin ▶리포좀 제형의 유효물질 방출 양상 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 코팅 농도별 방출 양상(37°C, 6시간후): 0%(58.7%) > 0.2%(48.5%) > 0.5%(34.5%) ▶리포좀 제형 시제품의 물리적 안정성 특성 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 시제품의 코팅 농도별 구조적 형태 분석: TEM 분석 - 장기보관시 리포좀 크기 변화(4°C 12주): 0.5% 3.4% 증가로 안정적(0% 16.1%) - 장기보관시 유효물질 손실량: 0% CCL(89.3%) > 0.5% CCL(29.9%) |
| 대량생산 시스템 및 생산공정 확립에 의한 시제품 제작 | <ul style="list-style-type: none"> ▶미생물 대량 생산 조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 대량 배양 조건: 32°C 150rpm, 3~5일 배양 - 탄소원(sucrose), 질소원(soybean flour) 선발: $2.4\sim 2.6 \times 10^8$ CFU/mL - 영양원 혼합 비율: sucrose:soybean flour=1%:0.5%시 3.0×10^8 CFU/mL ▶증진제 혼합 조건 <ul style="list-style-type: none"> - 배양 영양원 첨가: lecithin(0.07%), CS(0.1%) - 지표 성분(surfactin) 함량 증가: 첨가후(90739µg/mL) > 첨가전(6259.3µg/mL) ▶대량배양에 의한 시제품 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 대량배양(500mL→50L→5톤), 생물전환(리포좀 포집), 혼합반응(코팅), 샘플링(QC), 포장 - 시제품 제조 처방전 작성: 원제 66%, 보조제 및 기타 함유한 액상 시제품 제작 |
| CCL 나노리포좀 캡슐 시제품의 항진균 활성 평가 및 사용지침서 작성 | <ul style="list-style-type: none"> ▶CCL 나노리포좀의 외부 코팅 제형 농도별 항진균 활성 실내검정 <ul style="list-style-type: none"> - 균사 생장억제효과: 70.8%(배양여액보다 13~15% 더 우수) - 포자 발아억제효과: 68.9%(배양여액보다 22.3% 더 우수) - CCL 처리시 포자 형태 변화: 비정상 모양, 소포 형성, 뒤틀림, 균사체에 세포질이 없는 빈 세포 형성 ▶살포농도별 벼 도열병 방제효과 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 균사생육 억제: $10 \times (97.8\%) > 100 \times (83.7\%) > 250 \times (71.9\%) > 500 \times (55.5\%) > 1000 \times (24.4\%) > 2000 \times (7.3\%)$ ▶리포좀 캡슐 코팅 농도별 및 살포농도별 벼 도열병 방제효과 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 리포좀 캡슐 시제품 제작 및 대량 배양 생산 조건 확립: 0.2%~0.5% CCL 제형 - 0.5% 제형의 도열병 방제 실내 검정: 73.9% 방제효과(배양여액보다 12.5% 더 우수) - 0.5% 제형의 살포농도별 온실 검정: 500~800배 농도시 83~72% 방제효과 - 0.5% 제형의 잎도열병 발못자리 검정: 500~800배 농도시 84.2~55.3% 방제효과 ▶시제품의 벼 도열병 병반 진전 억제 효과(포장 병반면적을 검정) <ul style="list-style-type: none"> - 500배 살포회수별 병반 증가율: 3회(46%) > 2회(38%) > 1회(75.2%), 무처리(195%) - 250배 살포회수별 병반 증가율: 3회(12%) > 1회(26%) > 2회(32%) - 방제효과: 250배 평균 84.6%, 500배 평균 74.4% ▶시제품의 벼 잎도열병 포장 방제효과 <ul style="list-style-type: none"> - 500배 살포 포장검정(전남 강진): 1포장 65%, 2포장 53% 방제효과 ▶벼 잎도열병 대상 시제품 사용지침서 작성 <ul style="list-style-type: none"> - 사용시기: 출수전 또는 병발생초 - 권장농도 및 살포방법: 500배, 7~10일 간격 2~3회 살포 |
| 시제품 유효성분 표준 분석법 개발 | <ul style="list-style-type: none"> ▶시제품 활성물질 유효성분 탐색 및 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 추출방법: BuOH, EtOAc, hexane 등 이용 추출 정제법 확립 |

| | |
|---|---|
| <p>및 품질 관리, 유통·보관상 유효성 검정</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 분석방법: TLC 전개법 및 LC-MS/MS 분석 조건 확립 - 유효성분 탐색: KB21 균주의 itrurin, fengycin, surfactin 검출 ▶지표성분 검출 및 분석 <ul style="list-style-type: none"> - LC-MS 분석 조건 확립 - 지표성분 검출: fengycin > itrurin > surfactin, Bacillonycin 검출 안됨 - 제품 QC: 지표성분 surfactin 이용 ▶시제품 지표성분 농도별 약효 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 대상병원균: 탄저병(<i>C. cocodes</i>, <i>C. acutatum</i>), 모잘록병(<i>R. solani</i>, <i>P. ultimum</i>) - surfactin 1,000ppm : 균사 생장 41~77% 억제 - surfactin 2,000ppm : 균사 생장 58~100% 억제 - surfactin 3,000ppm : 균사 생장 82% 이상 억제 ▶시제품 지표성분 약효 및 약해 검정(온실 검정) <ul style="list-style-type: none"> - 고추 탄저병 방제효과: 250배(66.7%), 500배(50.2%) 농도 우수 - 약해 검정: 고추, 당근, 시금치, 상추 유묘에 대한 250배와 500배 농도 약해없음 ▶유통 및 보관상 유효물질의 유효성 및 화학적 안정성 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 유통기한 검정(54°C, 2주 보관): surfactin 477 ppm 함량 유지, itrurin 감소 - 유통기한 검정(4°C 2주 보관): surfactin, itrurin 함량 유지 |
| <p>시제품 병해충 방제 스펙트럼 검정 및 타 제품 혼용가능성 평가</p> | <ul style="list-style-type: none"> ▶시제품의 항균활성 스펙트럼 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 대상병원균: <i>B. cinerea</i>, <i>C. cocodes</i>, <i>Cladosporium sp.</i>, <i>F. oxysporum</i>, <i>P. ultimum</i>, <i>R. solani</i> - 살포농도별 균사억제: 10×(94~73%), 100×(83~45%), 500×(64~13%), 1000×(25~4%) ▶시제품의 방제 스펙트럼 적용 확대 검정(포장검정) <ul style="list-style-type: none"> - 벼 깨씨무늬병 포장 방제효과: 500배 처리시 56% 이상 방제효과 - 벼 잎집무늬마름병 포장 방제효과: 250배 3회(62%) > 500배 3회(56%) - 벼 흰잎마름병 포장 방제효과: 250배 3회(60%) > 500배 3회(50%) - 벼 모썩음병 포장 발생율: 500배 3회(4.8%), 무처리(32.7%) ▶시제품의 농약 및 농업자재 혼용에 의한 유효성분 함량 변화 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 시제품 지표 유효성분 함량 분석: LC-MS - 농약(에토펜프록스(10%), 플루디옥소닐(20%)): 혼합전 itrurin/surfactin 함량 유지 - 유기농자재/영양제(4종): 경시적 변화, 화학적 결정 등 외관상 물리화학적 변화 없음 ▶시제품의 타 제품 혼용에 의한 약효 평가 및 방제효과 <ul style="list-style-type: none"> - 벼 대상 합성농약 6종: 무처리 대비 60% 이상 방제효과, 약해 증상 없음 |
| <p>시제품 유기농업자재 등록 및 시험</p> | <ul style="list-style-type: none"> ▶시제품 제품화 및 유기농업자재 등록 <ul style="list-style-type: none"> - 2종 상품화: 타지마(신규), 바이오스트롱(기존 제품 공정 개선) - 주성분: surfactin ▶시제품 약효 및 약해 시험 성적서 <ul style="list-style-type: none"> - 벼 도열병 방제효과: 전남 영암(75%), 전북 순창(76%) - 벼 잎집무늬마름병 방제효과: 전남 담양(57.4%) - 벼 흰잎마름병 방제효과: 전남 장성(53.6%) ▶작물 5종 약해 시험 성적서 - 고추, 당근, 배추, 상추, 시금치: 약해 없음 ▶유효물질 성분의 이화학적 분석 성적서 - surfactin: 평균 39.06mg/kg ▶유해 성분 분석 시험 성적서 - 유해 중금속 8종: 불검출 ▶병원성 미생물 분석 시험 성적서 <ul style="list-style-type: none"> - 병원성 미생물 5종: 불검출 |

| | |
|--|---|
| | ▶ 잔류 농약분석 시험 성적서 - 322 성분 및 464 성분: 불검출 ▶ 독성 시험 성적서 - 피부자극성(토끼), 안점막자극성(토끼), 급성경구독성(랫드), 급성경파독성(랫드), 급성 접촉독성(꿀벌), 담수어류 급성독성(잉어) |
|--|---|

(2) 정량적 연구개발성과

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 백만원)

| 성과지표명 | | | 연도 | 1단계 (2021~2022) | | 계 | 가중치(%) | |
|------------------|--------------|---------|---------|--------------------|-----|-----------|--------|-----|
| 전담기관 등록·기탁 지표 | 특허출원 | 목표(단계별) | | 2 | | 2 | 20 | |
| | | 실적(누적) | | 6 | | 6 | | |
| | 학술발표 | 목표(단계별) | | 4 | | 4 | 5 | |
| | | 실적(누적) | | 13 | | 13 | | |
| | 논문(SCI) | 목표(단계별) | | － | | － | － | |
| | | 실적(누적) | | 2 | | 2 | | |
| | 논(비SCI) | 목표(단계별) | | 1 | | 11 | － | |
| | | 실적(누적) | | 1 | | | | |
| | 논문평균 IF | 목표(단계별) | | － | | － | － | |
| | | 실적(누적) | | 5.189 | | 5.189 | | |
| 연구개발과제 특성 반영 지표 | 기술실시 (건수) | 목표(단계별) | | 1 | | 1 | 20 | |
| | | 실적(누적) | | 1 | | 1 | | |
| | 기술료 (백만원) | 목표(단계별) | | 8 | | 8 | 10 | |
| | | 실적(누적) | | 10 | | 10 | | |
| | 제품화 (건수) | 목표(단계별) | | 1 | | 1 | 20 | |
| | | 실적(누적) | | 2 | | 2 | | |
| | 매출액 (백만원) | 목표(단계별) | | 300 | | 300 | 10 | |
| | | 실적(누적) | | 341.56745 | | 341.56745 | | |
| | 고용창출 | 목표(단계별) | | 2 | | 2 | 10 | |
| | | 실적(누적) | | 2 | | 2 | | |
| | 기술인증 | 목표(단계별) | | 1 | | 1 | 3 | |
| | | 실적(누적) | | 1 | | 1 | | |
| | 홍보전시 | 목표(단계별) | | 1 | | 1 | 2 | |
| | | 실적(누적) | | 1 | | 1 | | |
| | 인력양성 | 목표(단계별) | | － | | － | － | |
| | | 실적(누적) | | 5 | | 5 | | |
| 계 | | | 목표(단계별) | | 321 | | 321 | 100 |
| | | | 실적(누적) | | 391 | | 391 | |

< 연구개발성과 성능지표 >

| 평가 항목 (주요성능) | | 단위 | 전체 항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%) | 세계 최고 | | 연구개발 전 국내 성능수준 | 연구개발 목표치 | 목표설정 근거 |
|-----------------|-----------|----|--|--------------|----------------|-------------------|----------------|------------|
| | | | | 보유국/보유 기관 | 성능수준 | 성능수준 | 1단계(2021~2022) | |
| 1 | 지표성분 | 종 | 20 | 독일/바스프 | | 천연물 지표성분 기준(식약처) | 1종의지표성분 확보 | 공인성적서 |
| 2 | 유해성분 | % | 20 | 미국/FMC | 기준치의1/30이하 | 허용기준 이하 | 중금속 기준치 이하 | 공인성적서 |
| 3 | 잔류농약 | % | 20 | 독일/바이엘 | 기준치이하 | 기준치 이하 | 0.05ppm이하 | 공인성적서 |
| 4 | 약효·약해 방제가 | % | 20 | 독일/바이엘 | 50% | 무처리 대비 50% | 무처리 대비 50% | 공인성적서 |
| 5 | 안전성 평가 | 종 | 20 | 미국 | Food-Grade4급이하 | 저독성 3급이하 | 저독성 3급이하 | 공인성적서 |

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

☐ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

| 번호 | 논문명 | 학술지명 | 주저자명 | 호 | 국명 | 발행기관 | SCIE 여부 (SCIE/비SCIE) | 게재일 | 등록번호 (ISSN) | 기여율 |
|----|---|--------------------------------|------|--------|----|-------------------|-------------------------|----------------|----------------|-----|
| 1 | Effect of Chitosan Coating for Efficient Encapsulation and Improved Stability under Loading Preparation and Storage Conditions of Bacillus Lipopeptides | Nanomaterials | 강범용 | 12(23) | 국외 | MDPI | SCI 5.719 | 2022. 11.25 | 2079-49 91 | 100 |
| 2 | Target Mechanism of Iturinic Lipopeptide on Differential Expression Patterns of Defense-Related Genes against Colletotrichum acutatum in Pepper | Plants | 박준성 | 11(9) | 국외 | MDPI | SCI 4.658 | 2022. 5.9 | 2223-77 47 | 100 |
| 3 | Antifungal Improvement Effect by Metabolic Induction Mechanism of Chitosan, a Culture Nutrient, in Bioprocess Productivity of Paenibacillus polymyxa KB16 | Journal of Chitin and Chitosan | 강범용 | 27(4) | 국내 | 한국키티 키토산학 회 | 비SCI | 2022. 12.15 | 1229-41 60 | 100 |

☐ 국내 및 국제 학술회의 발표

| 번호 | 회의 명칭 | 발표자 | 발표 일시 | 장소 | 국명 |
|----|--|-------------------------------|------------|---------------|----------|
| 1 | 2022 추계 한국식물병리학회 Effect of polymer coating on the properties and the antifungal activity of Bacillus extract loaded liposomes | 류광록, 최준석, 신혜민, 강범용 | 2022.10.18 | 전남 순천대학교 | 대한 민국 |
| 2 | 2022 추계 한국식물병리학회 Antifungal activity of iturin lipopeptides isolated from Bacillus subtilis KB21 against pepper anthracnose | 류광록, 최준석, 신혜민, 강범용 | 2022.10.18 | 전남 순천대학교 | 대한 민국 |
| 3 | 2022 추계 한국식물병리학회 Differential expression of bioactive metabolites produced by polysaccharide polymers-based Bacillus amyloliquefaciens fermentation | 강범용, 류광록 | 2022.10.18 | 전남 순천대학교 | 대한 민국 |
| 4 | 2022 춘계 한국식물병리학회 Biocontrol efficacy of the liposomal nanovesicles systems based the antimicrobial agents and antibiotic delivery platforms to plant protection | 강범용, 류광록, 박준성 | 2022.4.20 | 전북 번산 소노벨 | 대한 민국 |
| 5 | 2022 춘계 한국식물병리학회 Antifungal active of iturin lipopeptides isolated from Bacillus subtilis KB21 against pepper anthracnose disease | 류광록 박준성, 강범용 | 2022.4.20 | 전북 번산 소노벨 | 대한 민국 |
| 6 | 2022 춘계 한국식물병리학회 Antifungal activities of the extracts and constituents fractionated from Rheum undulatum against phytopathogenic fungi. | 강범용, 최준석, 신혜민, 류광록, 정우진 | 2022.4.20 | 전북 번산 소노벨 | 대한 민국 |
| 7 | 2021 추계 한국식물병리학회 Antifungal activity of liposomal nanovesicles based the antimicrobial peptide conjugate produced by Bacillus amyloliquefaciens | 강범용, 정우진, 박준성 | 2021.11.10 | 온라인 학술대회 | 대한 민국 |
| 8 | 2021 추계 한국식물병리학회 Effect of lecithin-induced fengycin lipopeptides produced by Bacillus amyloliquefaciens against Cucumber mosaic virus on pepper plant | 강범용, 박준성 | 2021.11.10 | 온라인 학술대회 | 대한 민국 |
| 9 | 2021 한국응용화학학회 및 국제심포지엄 Multifunctional biocontrol of fengycin-type lipopeptides produced by Bacillus amyloliquefaciens | 강범용, 전승표, 정우진 | 2021.8.23 | 제주 라마다 플라자 | 대한 민국 |
| 10 | 2021 한국응용화학학회 및 국제심포지엄 Antibiotic activity of microbial-derived polysaccharide polymer-coated liposomal peptide conjugate | 강범용, 전승표, 정우진 | 2021.8.23 | 제주 라마다 플라자 | 대한 민국 |
| 11 | 2021 한국유기농업학회 상반기 Evaluation of Bacillus velezensis CE100 Formulation Against Red Pepper Anthracnose (Colletotrichum acutatum) | 강범용, 전승표, 김길용, 정우진 | 2021.6.30 | 온라인 학술대회 | 대한 민국 |
| 12 | 2021 한국유기농업학회 상반기 Antifungal Improvement Effect of Microbial Derived Polymer-coated Peptide Conjugate | 강범용, 정우진 | 2021.6.30 | 온라인 학술대회 | 대한 민국 |
| 13 | 2021 한국유기농업학회 상반기 Analysis of antifungal activity and active substance by Bacillus strain culture | 강범용, 전승표, 정우진 | 2021.6.30 | 온라인 학술대회 | 대한 민국 |

☐ 기술 요약 정보

| 연도 | 기술명 | 요약 내용 | 기술 완성도 | 등록 번호 | 활용 여부 | 미활용사유 | 연구개발기관 외 활용여부 | 허용방식 |
|----|-----|-------|--------|-------|-------|-------|------------------|------|
| | | | | | | | | |

☐ 보고서 원문

| 연도 | 보고서 구분 | 발간일 | 등록 번호 |
|----|--------|-----|-------|
| | | | |

☐ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

| 번호 | 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명 | 등록/기탁 번호 | 등록/기탁 기관 | 발생 연도 |
|----|------------------------|----------|----------|-------|
| | | | | |

[기술적 성과]

☐ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

| 번호 | 지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재) | 국명 | 출원 | | | | 등록 | | | 기여율 | 활용 여부 |
|----|--|----------|-----------------------------|------------|-----------------|----------|-----|-----|----------|-----|----------|
| | | | 출원인 | 출원일 | 출원 번호 | 등록 번호 | 등록인 | 등록일 | 등록 번호 | | |
| 1 | 키토산으로 코팅된 고리형 리포펩타이드 도입 리포솜을 포함하는 항생제 조성물 및 이의 제조 방법 | 대한 민국 | 강범용, 정우진 | 2023.01.27 | 10-2023-0010476 | | | | | 100 | |
| 2 | 대황을 이용한 식물병 방제제 | 대한 민국 | 강범용, 김철홍, 한송희, 박주연 | 2022.10.7 | 10-2022-0128425 | | | | | 100 | |
| 3 | 고삼을 이용한 식물병 방제제 | 대한 민국 | 강범용, 김철홍, 한송희, 박주연 | 2022.10.7 | 10-2022-0128427 | | | | | 100 | |
| 4 | 정향을 이용한 식물병 방제제 | 대한 민국 | 강범용, 김철홍, 한송희, 박주연 | 2022.10.7 | 10-2022-0128426 | | | | | 100 | |
| 5 | 대황추출물을 이용한 벼 도열병 방제제 | 대한 민국 | 강범용, 김철홍, 한송희, 박주연 | 2021.11.29 | 10-2021-0166641 | | | | | 100 | |
| 6 | 정향추출물을 이용한 고추 탄저병 방제제 | 대한 민국 | 강범용, 김철홍, 한송희, 박주연 | 2021.11.29 | 10-2021-0166642 | | | | | 100 | |

○ 지식재산권 활용 유형

| 번호 | 제품화 | 방어 | 전용실시 | 통상실시 | 무상실시 | 매매/양도 | 상호실시 | 담보대출 | 투자 | 기타 |
|----|-----|----|------|------|------|-------|------|------|----|----|
| 1 | √ | | | | | | | | | |

☐ 저작권(소프트웨어, 서적 등) : 해당사항 없음

☐ 신기술 지정 : 해당사항 없음

☐ 기술 및 제품 인증

| 번호 | 인증 분야 | 인증 기관 | 인증 내용 | | 인증 획득일 | 국가명 |
|----|-------------|------------|----------|--------------|------------|------|
| | | | 인증명 | 인증 번호 | | |
| 1 | 농자재 인증 | 강원대학교산학협력단 | 유기농자재 공시 | 공시번호:2-4-120 | 2022.11.24 | 대한민국 |
| 2 | 농자재 인증(등록중) | 강원대학교산학협력단 | 유기농자재 공시 | | | 대한민국 |

☐ 표준화 : 해당사항 없음

[경제적 성과]

☐ 시제품 제작

| 번호 | 시제품명 | 출시/제작일 | 제작 업체명 | 설치 장소 | 이용 분야 | 사업화 소요 기간 | 인증기관 (해당 시) | 인증일 (해당 시) |
|----|-----------|---------|--------|-------|--------|-----------|-------------|------------|
| 1 | HN_타지마 | 2022.1 | (주)현농 | 전남 장성 | 병해충 관리 | 2년 | | |
| 2 | HN_바이오스트롱 | 2022.11 | (주)현농 | 전남 장성 | 병해충 관리 | 2년 | 유기농업자재 공시기관 | 2022.11.24 |

☐ 기술 실시(이전)

| 번호 | 기술 이전 유형 | 기술 실시 계약명 | 기술 실시 대상 기관 | 기술 실시 발생일 | 기술료 (해당 연도 발생액) | 누적 징수 현황 |
|----|----------|------------------------------------|-------------|-----------|-----------------|-------------|
| 1 | 노하우 기술이전 | 나노 플랫폼 기반 미생물 유래 대사물질 전달운반체 제형 노하우 | (주)현농 | 2022.9.20 | 10,000,000원 | 10,000,000원 |

☐ 사업화 투자실적

| 번호 | 추가 연구개발 투자 | 설비 투자 | 기타 투자 | 합계 | 투자 자금 성격* |
|----|------------|-------|-------|----|-----------|
| | | | | | |

☐ 사업화 현황

| 번호 | 사업화 방식 | 사업화 형태 | 지역 | 사업화명 | 내용 | 업체명 | 매출액 | | 매출 발생 연도 | 기술 수명 |
|----|--------|----------|----|-------------|-------|-------|---------|---------|----------|-------|
| | | | | | | | 국내 (천원) | 국외 (달러) | | |
| 1 | 기술이전 | 신제품 개발 | 국내 | 식물병 방제제 제품화 | 제품 판매 | (주)현농 | 180,000 | | 2022 | |
| 2 | 자기실시 | 기존 공정 개선 | 국내 | 식물병 방제제 제품화 | 제품 판매 | (주)현농 | 161,600 | | 2022 | |

☐ 매출 실적(누적)

| 사업화명 | 발생 연도 | 매출액 | | 합계 | 산정 방법 |
|-------------|-------|---------|--------|---------|--------|
| | | 국내(천원) | 국외(달러) | | |
| 식물병 방제제 제품화 | 2022 | 341,567 | | 341,567 | 제품 판매액 |
| 합계 | | 341,567 | | 341,567 | |

□ 사업화 계획 및 무역 수치 개선 효과

| 성과 | | | 신제품 및 기존 공정 개선 제품화 | | |
|--------------------------------|-------------|-------|--------------------|---------|---------|
| 사업화 계획 | 사업화 소요기간(년) | | 3년 | | |
| | 소요예산(천원) | | | | |
| | 예상 매출규모(천원) | | 현재까지 | 3년 후 | 5년 후 |
| | | | 300,000 | 500,000 | 800,000 |
| | 시장 점유율 | 단위(%) | 현재까지 | 3년 후 | 5년 후 |
| | | 국내 | 10 | 15 | 20 |
| | | 국외 | | | |
| 향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획 | | | | | |
| 무역 수치 개선 효과(천원) | 수입대체(내수) | | 현재 | 3년 후 | 5년 후 |
| | | | | | |
| | 수출 | | | | |

□ 고용 창출

| 순번 | 사업화명 | 사업화 업체 | 고용창출 인원(명) | | 합계 |
|----|-------------|--------|------------|-------|----|
| | | | 2021년 | 2022년 | |
| 1 | 식물병 방제제 제품화 | (주)현농 | 1 | 1 | 2 |
| 합계 | | | 1 | 1 | 2 |

□ 고용 효과

| 구분 | | | 고용 효과(명) |
|-------|------|------|----------|
| 고용 효과 | 개발 전 | 연구인력 | 7 |
| | | 생산인력 | |
| | 개발 후 | 연구인력 | 9 |
| | | 생산인력 | |

□ 비용 절감(누적)

| 순번 | 사업화명 | 발생연도 | 산정 방법 | 비용 절감액(천원) |
|----|------|------|-------|------------|
| | | | | |
| | | | | |
| 합계 | | | | |

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

| 구분 | 사업화명 | 수입 대체 | 수출 증대 | 매출 증대 | 생산성 향상 | 고용 창출 (인력 양성 수) | 기타 |
|-------|-------------|-------|-------|---------|--------|--------------------|----|
| 해당 연도 | 식물병 방제제 제품화 | | | 300,000 | | 2 | |
| 기대 목표 | | | | | | | |

☐ 산업 지원(기술지도)

| 순번 | 내용 | 기간 | 참석 대상 | 장소 | 인원 |
|----|----|----|-------|----|----|
| | | | | | |
| | | | | | |

☐ 기술 무역

(단위: 천원)

| 번호 | 계약 연월 | 계약 기술명 | 계약 업체명 | 계약업체 국가 | 기 징수액 | 총 계약액 | 해당 연도 징수액 | 향후 예정액 | 수출/ 수입 |
|----|-------|--------|--------|------------|-------|-------|--------------|-----------|-----------|
| | | | | | | | | | |

[사회적 성과]

☐ 법령 반영

| 번호 | 구분 (법률/시행령) | 활용 구분 (제정/개정) | 명 칭 | 해당 조항 | 시행일 | 관리 부처 | 제정/개정 내용 |
|----|----------------|------------------|-----|-------|-----|-------|-------------|
| | | | | | | | |

☐ 정책활용 내용

| 번호 | 구분 (제안/채택) | 정책명 | 관련 기관 (담당 부서) | 활용 연도 | 채택 내용 |
|----|---------------|-----|------------------|-------|-------|
| | | | | | |

☐ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

| 번호 | 구 분 (설계 기준/설명서/지침/안내서) | 활용 구분 (신규/개선) | 설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭 | 반영일 | 반영 내용 |
|----|---------------------------|------------------|-------------------------|-----|-------|
| | | | | | |

☐ 전문 연구 인력 양성

| 번호 | 분류 | 기준 연도 | 현황 | | | | | | | | | | |
|----|------|-------|-----|----|----|----|----|---|-----|-----|-----|-----|----|
| | | | 학위별 | | | | 성별 | | 지역별 | | | | |
| 1 | 학사학위 | 2022 | 박사 | 석사 | 학사 | 기타 | 남 | 여 | 수도권 | 충청권 | 영남권 | 호남권 | 기타 |
| | | | | | 2 | | 2 | | | | | 2 | |
| 2 | 석사학위 | 2023 | | 2 | | | 1 | 1 | | | | 2 | |

☐ 산업 기술 인력 양성

| 번호 | 프로그램명 | 프로그램 내용 | 교육 기관 | 교육 개최 횟수 | 총 교육 시간 | 총 교육 인원 |
|----|-------|---------|-------|----------|---------|---------|
| | | | | | | |

☐ 다른 국가연구개발사업에의 활용

| 번호 | 중앙행정기관명 | 사업명 | 연구개발과제명 | 연구책임자 | 연구개발비 |
|----|---------|-----|---------|-------|-------|
| | | | | | |

☐ 국제화 협력성과

| 번호 | 구분 (유치/파견) | 기간 | 국가 | 학위 | 전공 | 내용 |
|----|---------------|----|----|----|----|----|
| | | | | | | |

□ 홍보 실적

| 번호 | 홍보 유형 | 매체명 | 제목 | 홍보일 |
|----|-------|---------------------|---------------------------|-----------|
| 1 | 박람회 | 국제 바이러스·박테리아 산업 박람회 | 친환경 살균제, 살충제, 영양제 등 제품 전시 | 2022.7.18 |

□ 포상 및 수상 실적

| 번호 | 종류 | 포상명 | 포상 내용 | 포상 대상 | 포상일 | 포상 기관 |
|----|----|-----|-------|-------|-----|-------|
| | | | | | | |

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

| 구축기관 | 연구시설/ 연구장비명 | 규격 (모델명) | 개발여부 (○/×) | 연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부 | 연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호 | 구축일자 (YY.MM.DD) | 구축비용 (천원) | 비고 (설치 장소) |
|------|----------------|-------------|---------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------|--------------|---------------|
| | | | | | | | | |

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항

○ 전문연구인력 양성

- 학사 학위: 2022년도 기준 학사학위 2명
- 석사 학위: 2023년도 기준 석사학위 2명
- 관련분야 전문인력 양성으로 사회적 가치 및 성과 활용에 기여함

2) 목표 달성 수준

| 추진목표 | 달성내용 | 달성도(%) |
|------------------------------|--|----------------------|
| ○ 미생물 유래 대사유도체 제작 및 평가시스템 구축 | ▶배양 기질 추출 및 조건 확립 ▶배양 기질 특이성 대사 유도체 제작 ▶활성 검정 시스템 확립 및 평가 완료 | ▶100 ▶100 ▶100 |
| ○ 유효 항진균제 선발 및 표준분석법 연구 | ▶나노 캡슐 약해 안전성 검정 ▶우수 혼합 화합물 선발 ▶화합물 표준 분석법 개발 | ▶100 ▶100 ▶100 |
| ○ 생산공정시스템 확립 및 제형 개발 | ▶최적 혼합 조건별 효과검정 ▶대량 생산시스템 및 생산공정 확립 ▶대량 생산 표준화 및 제형 개발 | ▶100 ▶100 ▶100 |
| ○ 시제품 활성 평가 및 활성 물질 검정 | ▶시제품 효과검정 및 사용지침서 작성 ▶시제품 안정성 및 안전성 검정 ▶활성 물질 유효물질 및 작용기작 구명 | ▶100 ▶100 ▶100 |
| ○ 제형 제품화에 따른 현장 적용 평가 및 등록 | ▶벼 병해 관련 항진균제 스펙트럼 분석 ▶포장 방제 매뉴얼 작성 ▶시제품 제품화 및 유기농자재 등록 | ▶100 ▶100 ▶100 |

4. 목표 미달 시 원인분석: 해당사항 없음

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

(단위 : 백만원, %)

| 총괄과제명 | 세부과제명 | 기관명 | 유형 | 총 연구개발비 (A) | 정부지원 연구개발비 (B) | 정부지원 연구개발비 비율 (C=B/A) | 성과 유형 | 기술기여도 | |
|--|--|--------------|--------------|----------------|----------------------|--------------------------------|------------|----------|----|
| | | | | | | | | 산정 근거 | 비율 |
| 미생물 유래 바이오폴리머 생합성 배양기술을 이용한 나노리포좀 캡슐 제제 개발 | 미생물 유래 대사유도체 특성 구명 및 시제품 소포장 검정 | 전남대산 학협력단 | 대학 (비영리) | 348 | 348 | 1.000 | 신규 기술개발 | 해당 없음 | - |
| | 시제품 대량 생산 시스템 구축에 의한 제품화 | (주)현농 | 중소기업 (영리) | 222.5 | 170 | 76.4 | 신규 기술개발 | ①-① | 76 |
| 계 | | | | 570.5 | 518 | - | - | - | - |

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표 >

| 구분(정량 및 정성적 성과 항목) | | 연구개발 종료 후 5년 이내 | | | | |
|--------------------|--------------|-----------------|------|------|------|------|
| | | 2023 | 2024 | 2025 | 2026 | 2027 |
| 특허출원 | 국내 | | | | | |
| | 국외 | | | | | |
| 특허등록 | 국내 | 1 | | | | |
| | 국외 | | | | | |
| 인력양성 | 학사 | | | | | |
| | 석사 | 2 | | | | |
| | 박사 | | | | | |
| 사업화 | 시제품개발 | | | | | |
| | 상품출시 | | | | | |
| | 기술이전 | | | | | |
| | 공정개발 | | | | | |
| | 매출액(단위 : 천원) | 300 | 400 | 450 | 500 | 550 |
| | 기술료(단위 : 천원) | | | | | |

붙임. 참고문헌

- Balleza D, Alessandrini A, García MJB, 2019. Role of lipid composition, physicochemical interactions, and membrane mechanics in the molecular actions of microbial cyclic lipopeptides. *J. Membr. Biol.* 252(2-3), 131-157.
- Baysal Ö, Çalışkan M, Yeşilova Ö, 2008. An inhibitory effect of a new *Bacillus subtilis* strain (EU07) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 73(1-3), 25-32.
- Borriss R. Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents in agriculture. *Bacteria in agrobiolology: Plant growth responses*: Springer; 2011. p. 41-76.
- Geissler M, Heravi KM, Henkel M, Hausmann R. Lipopeptide biosurfactants from *Bacillus* species. *Biobased Surfactants*: Elsevier; 2019. p. 205-240.
- Han JH, Yoon J, Son S, Kim JJ, Lee S, 2015. Combination effects of organic materials and *Bacillus thuringiensis* on *Spodoptera exigua*. *Korean J. Pestic. Sci.* 19,411-417.
- Hanif A, Zhang F, Li P, Li C, Xu Y, Zubair M, Zhang M, Jia D, Zhao X, Liang J, 2019. Fengycin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 inhibits *Fusarium graminearum* growth and mycotoxins biosynthesis. *Toxins* 11(5), 295.
- Jung W.-J., Park R.-D. 2014. Bioproduction of chitooligosaccharides: present and perspectives. *Mar. Drugs*, 12(11), 5328-5356.
- Livak K. J., Schmittgen T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Nanjundan J, Ramasamy R, Uthandi S, Ponnusamy M, 2019. Antimicrobial activity and spectroscopic characterization of surfactin class of lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* SR1. *Microb. Pathog.* 128, 374-380.
- Ongena M, Jacques P, 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16,115-125.
- Shoda M, 2019. *Biocontrol of Plant Diseases by Bacillus subtilis: Basic and Practical Applications*, CRC Press.
- Sun D, Liao J, Sun L, Wang Y, Liu Y, Deng Q, Zhang N, Xu D, Fang Z, Wang W, 2019. Effect of media and fermentation conditions on surfactin and iturin homologues produced by *Bacillus natto* NT-6: LC-MS analysis. *AMB Express* 9(1), 120.
- Yáñez-Mendizábal VFalconí CE, 2018. Efficacy of *Bacillus* spp. to biocontrol of anthracnose and enhance plant growth on *Andean lupin* seeds by lipopeptide production. *Biol. Control* 122, 67-75.
- Yucel S, Ozarslandan A, Colak A, Ay T, 2007. Methyl bromide alternatives for controlling *Fusarium* wilt and root knot nematodes in tomatoes in Turkey. In: *II International Symposium on Tomato Diseases* 808. pp: 381-386.
- Zhao H, Shao D, Jiang C, Shi J, Li Q, Huang Q, Rajoka MSR, Yang H, Jin M, 2017. Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101(15), 5951-5960.
- Zhao Y, Selvaraj JN, Xing F, Zhou L, Wang Y, Song H, Tan X, Sun L, Sangare L, Folly YME, 2014. Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE* 9(3).
- Zihahirwa Kulimushi P, Argüelles Arias A, Franzil L, Steels S, Ongena M, 2017. Stimulation of fengycin-type antifungal lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of the maize fungal pathogen *Rhizomucor variabilis*. *Front. Microbiol.* 8, 850.

[뒷면지]

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 유용농생명자원산업화기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 유용농생명자원산업화기술개발 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.