

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

작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업 2023년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004596-01

곤충병원미생물을 이용한 대파 해충 방제 기술

2024. 06. 12.

안동대학교 /
한국표준과학연구원, 고려바이오 (주) /

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

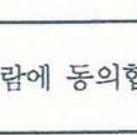
농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “곤충병원미생물을 이용한 대파 해충 방제 기술”(개발기간 : 2021. 04. 01. ~ 2023. 12. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2024. 06. 12.

주관연구기관명 : 안동대학교 산학협력단 임우택 (인)
공동연구기관명 : 한국표준과학연구원 이호성 (인)
공동연구기관명 : 고려바이오(주) 김영권 (인)

주관연구책임자 : 김용균
공동연구책임자 : 김일환 (인)
공동연구책임자 : 윤여준 (인)



국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)						
내역사업명 (해당 시 작성)		방제기술개발				연구개발과제번호		321100-3				
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB0304	70%	LB0307	20%	LB0203	10%					
	농림식품 과학기술분류	RA0303	70%	RA0302	20%	AA0203	10%					
연구개발과제명		곤충병원미생물을 이용한 대파 해충 방제 기술										
전체 연구개발기간		2021. 04. 01 - 2023. 12. 31(2년 9개월)										
총 연구개발비		총 930,000천원 (정부지원연구개발비: 825,000천원, 기관부담연구개발비: 105,000천원, 지방자치단체지원연구개발비: 천원, 그 외 지원연구개발비: 천원)										
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[●] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]			기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점기준(3단계) 종료시점목표(9단계)					
연구개발 목표 및 내용		최종 목표		곤충병원세균을 이용하여 대파에 피해를 주는 주요 해충에 대한 고효율 미생물 작물보호제 개발								
		전체 내용		곤충면역억제 기능을 갖는 <i>Xenorhabdus</i> 와 <i>Photorhabdus</i> 세균 배양액을 이용하여 기존의 미생물약제로 사용되는 비티와 곤충병원선곰팡이에 첨가하여 고효율 맞춤형 방제제를 개발한다.								
		1단계	목표	<i>Xenorhabdus/Photorhabdus</i> 세균 배양액과 미생물제제와 협력 효과 검증								
			내용	○ <i>Xenorhabdus/Photorhabdus</i> 유래 이차대사물질 활성 검증 ○ 세균배양액과 다양한 Bt 균주의 복합 제제 살충효과 ○ NRPS-PKS 유전자 발현 조절한 고효율 세균배양액 생성기술 ○ 혼합 세균-세균 및 세균-곰팡이 제형화 기술 개발								
		2단계	목표	2종 이상의 IBC 미생물제제의 산업화 기술 개발								
내용	○ IBC 미생물제제 유용 생리활성 물질 결정 및 표준 생산 기술 ○ IBC 미생물제제의 환경 안정화 기술 개발 ○ 대파 작형별 해충 발생 정보 및 IBC 미생물제 포장 약효검증 ○ 대파 농가의 IBC 처리제 사용 매뉴얼 제작											
연구개발성과		SCI 논문 11건, 비SCI 4건, 학술발표 17건, 특허출원 3건, 생명자원 30건 등록, 기술이전 2건, 기술료 수입료 7백만원, 제품화 2건, 매출액 7백만원, 고용창출 4명, 홍보 2건의 성과로 연구개발 목표 달성										
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과		○ IBC 미생물제제 - 제노비티 및 제노메타 산업화 및 매출액 2.2억 예상 ○ 제품 QC를 위한 GXP 표준물질 등록 ○ GXP 및 cPF의 신규 기능물질의 향후 화학농약 개발을 위한 선도물질로서 유용성										
연구개발성과의 등록·기탁 건수		논문	특허	학술 발표	기술 이전	기술 료	제품화	표준	생명자원		기타	
		15	3	30	2	7백만원	2	1	30	-	2	4
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)		살충제		미생물		선충		친환경		생물농약		
영문핵심어 (5개 이내)		insecticide		microorganism		nematode		eco-friendly		biological pesticide		

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요/.....	1
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용/.....	6
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도/.....	161
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)/.....	171
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도/.....	172
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획/.....	173

최종보고서										보안등급	
										일반[●], 보안[]	
중앙행정기관명		농림축산식품부			사업명		사업명		작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술 개발사업		
전문기관명		농림식품기술기획평가원			내역사업명		방제기술개발				
공고번호		제 농축2012-55호			총괄연구개발 식별번호						
					연구개발과제번호		321100-3				
기술분류	국가과학기술 표준분류		LB0304	70%	LB0307	20%	LB0203	10%			
	농림식품과학기술분류		RA0303	70%	RA0302	20%	AA0203	10%			
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문		곤충병원미생물을 이용한 대파 해충 방제 기술							
		영문		Control techniques against insect pests infesting green onion using insect pathogenic microbes							
연구개발과제명		국문		곤충병원미생물을 이용한 대파 해충 방제 기술							
		영문		Control techniques against insect pests infesting green onion using insect pathogenic microbes							
주관연구개발기관		기관명		안동대학교		사업자등록번호		508-82-06009			
		주소		(우)36729 경북안동시 송천동		법인등록번호		508-83-00341			
연구책임자		성명		김용균		직위		교수			
		연락처		직장전화 054-820-5638		휴대전화		010-8218-5638			
				전자우편 hosanna@anu.ac.kr		국가연구자번호		10070846			
연구개발기간		전체		2021. 04. 01 - 2023. 12. 31(2년 9개월)							
		단계		1년차		2021. 04. 01 - 2021. 12. 31(9개월)					
				2년차		2022. 01. 01 - 2022. 12. 31(1년)					
				3년차		2023. 01. 01 - 2023. 12. 31(1년)					
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				연구개발비 외 지원금	
		현금		현금		현금		현금		합계	
		현물		현물		현물		현물		합계	
총계		825,000		8,000		97,000				833,000 97,000 930,000	
1단계		1년차		225,000		0		25,000		225,000 25,000 250,000	
		2년차		300,000		4,000		36,000		304,000 36,000 340,000	
		3년차		300,000		4,000		36,000		304,000 36,000 340,000	
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편	
		한국표준과학연구원		김일환		선임연구원		010-4416-8417		ihkim@kriss.re.kr	
		고려바이오(주)		윤여준		과장		010-5469-8408		lovefluter@ate.com	
연구개발담당자 실무담당자		성명		김용균		직위		교수			
		연락처		직장전화 054-820-5638		휴대전화		010-8218-5638			
				전자우편 hosanna@anu.ac.kr		국가연구자번호		10070846			

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

2024년 2월 22일

연구책임자: 김용균

주관연구개발기관의 장: 안동대학교 산학협력단 (직인)
 공동연구개발기관의 장: 한국표준과학연구원 (직인)
 공동연구개발기관의 장: 고려바이오(주) (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하



1. 연구개발과제의 개요

1) 연구개발과제의 최종 목표

○ 대파(*Allium fistulosum*)를 가해하는 6종 해충에 대한 미생물 원제의 작물보호제를 개발하여 유기농 재배 농가에 필요한 해충관리 기술을 제공한다.

2) 연구개발과제의 단계별 목표

○ 살충 미생물을 작물보호제로 개발하기 위해 연도별 단계별 목표를 세웠다. 초기 단계에서는 고효율 미생물약제 선발에 목표를 두었고, 이후 산업화를 위한 실용화 단계로 점차적 연구 단계를 설정하였다.

- 1단계: 해충별 맞춤형 미생물 제제 선발 단계
- 2단계: 선발 미생물의 대사체 공학을 통한 고효율 방제제 개발
- 3단계: 유기농 재배 농가를 통한 해충 관리 매뉴얼 제작
- 4단계: 농가 피드백 및 현장 적용형 미생물제제 완성

3) 연구개발과제의 내용

○ 대파에 피해를 주는 주요 해충 6종을 선발하였다. 이를 대상으로 효과적 살충 미생물 제제를 각각 비티플러스 및 팡이플러스로 개발 제품군을 설정하였다. 비티플러스는 비티기반의 살충제에 면역억제제로서 Xh/Ptt 배양액을 배합하는 방향으로 개발 전략을 세운다. 팡이플러스 곤충병원균팡이를 대상으로 면역억제 미생물 배양액을 추가하여 개발하게 된다.

가. 방제 대상 대파 해충

- | | |
|---------------------------------------|---|
| 1. 파밤나방(<i>Spodoptera exigua</i>) | 2. 파좁나방(<i>Acrolepiopsis sapporensis</i>) |
| 3. 고자리파리(<i>Delia antiqua</i>) | 4. 작은뿌리파리(<i>Bradysia agretis</i>) |
| 5. 파굴파리(<i>Liriomyza chinensis</i>) | 6. 파총채벌레(<i>Thrips tabaci</i>) |

나. 미생물 방제제 개발 약제

1. 비티플러스(BtPlus101 ~ BtPlus801)

- (1) BtPlus101: *Xenorhabdus hominickii* 배양액 + *Bacillus thuringiensis kurstaki* 포자
- (2) BtPlus201: *Xenorhabdus hominickii* 배양액 + *Bacillus thuringiensis aizawai* 포자
- (3) BtPlus301: *Xenorhabdus hominickii* 배양액 + *Bacillus thuringiensis israelensis* 포자
- (4) BtPlus401: *Xenorhabdus hominickii* 배양액 + *Bacillus thuringiensis tenebrionis* 포자
- (5) BtPlus501: *Photorhabdus temperata temperata* 배양액 + *Bacillus thuringiensis kurstaki* 포자
- (6) BtPlus601: *Photorhabdus temperata temperata* 배양액 + *Bacillus thuringiensis aizawai* 포자
- (7) BtPlus701: *Photorhabdus temperata temperata* 배양액 + *Bacillus thuringiensis israelensis* 포자
- (8) BtPlus801: *Photorhabdus temperata temperata* 배양액 + *Bacillus thuringiensis tenebrionis* 포자

2. 팡이플러스(FangiPlus101 ~ FangiPlus601)

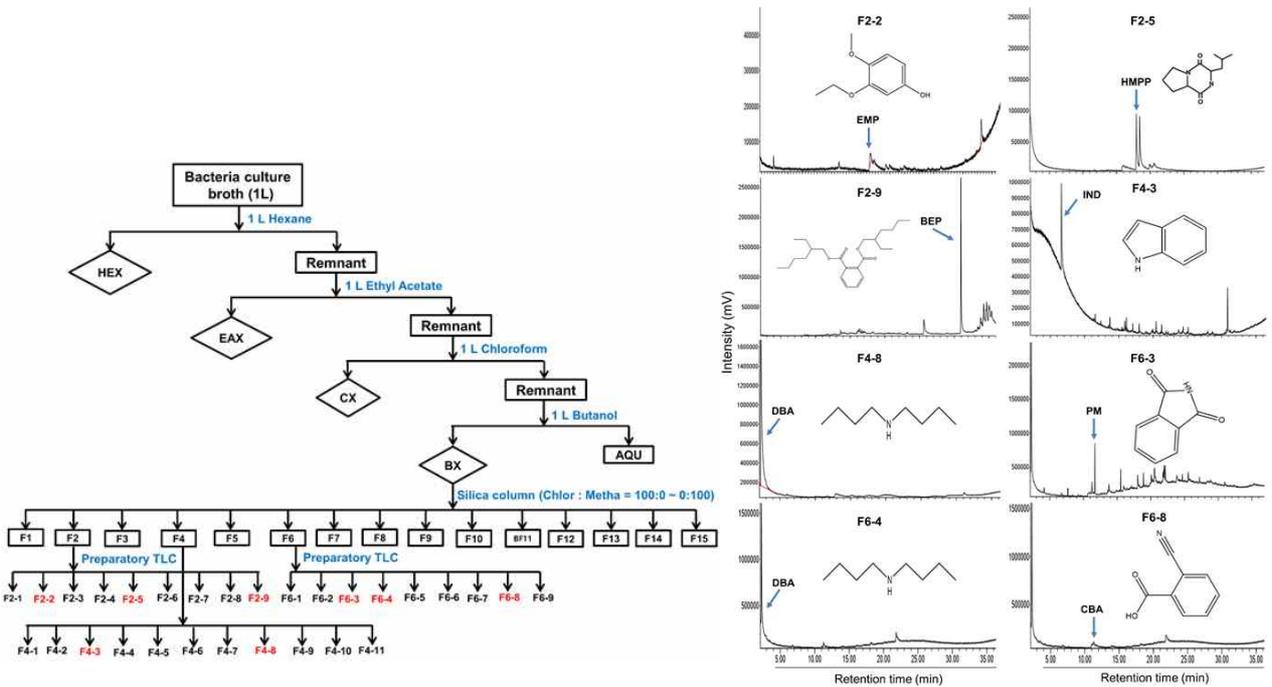
- (1) FangiPlus101: *Xenorhabdus hominickii* 배양액 + *Metarhizium rileyi* 포자
- (2) FangiPlus201: *Xenorhabdus hominickii* 배양액 + *Beauveria bassiana* 포자
- (3) FangiPlus301: *Xenorhabdus hominickii* 배양액 + *Metarhizium guizhouense* 포자
- (4) FangiPlus401: *Photorhabdus temperata temperata* 배양액 + *Metarhizium rileyi* 포자
- (5) FangiPlus501: *Photorhabdus temperata temperata* 배양액 + *Beauveria bassiana* 포자

(6) FangiPlus601: *Photorhabdus temperata temperata* 배양액 + *Metarhizium guizhouense* 포자

이상과 같이 개발된 IBC 미생물 제제는 제품의 QC를 위해 다양한 생리활성물질 가운데 가장 높은 면역억제 효과를 주는 물질을 선별하여 표준품으로 개발하여 작물보호제 제품 평가에 이용되게 한다.

다. 곤충병원세균 이차대사산물을 바탕으로 제품 QC 표준화 기술 확립

(1) *X. hominickii* 이차대사산물 분리 및 화학 동정



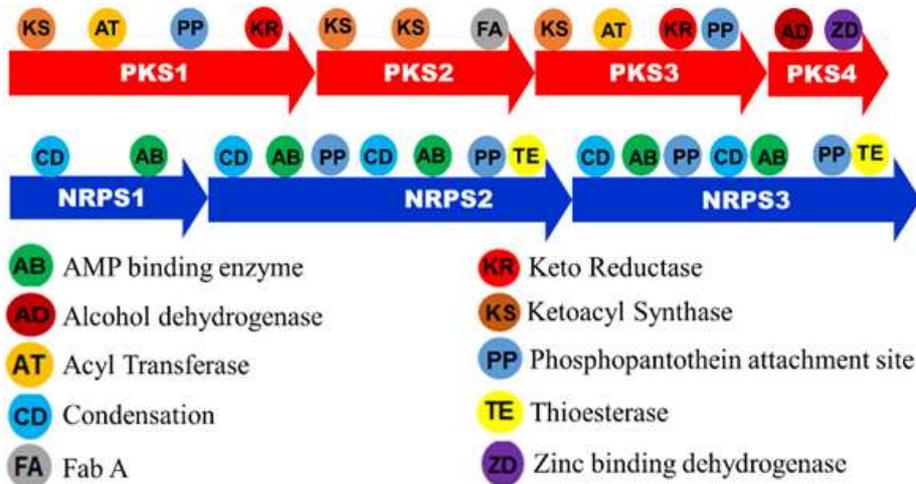
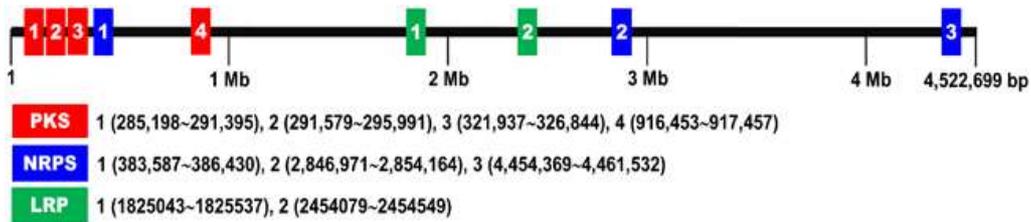
이상의 최근 동정된 화합물은 *X. hominickii*는 물론이고 Ptt에서도 생산되는 물질이다. 이렇게 동정된 화합물은 곤충면역을 조절하는 DAMP 분자인 DSP1에 강한 결합력(Kd)을 주었다.

Compounds	Kd (μM) ± SD
3-Ethoxy-4-methoxyphenol	0.119 ± 0.02 c
Hexahydro-3-(2-methylpropyl)pyrrolopyrazine-1,4-dione	0.155 ± 0.04 bc
Bis(2-ethylhexyl) phthalate	0.211 ± 0.03 b
Indole	0.145 ± 0.03 bc
Dibutylamine	0.379 ± 0.07 a
Phthalimide	0.142 ± 0.02 bc
o-Cyanobenzoic acid	0.166 ± 0.02 bc
Salicylic acid	0.238 ± 0.04 b

부탄올 분획구로부터 곤충 면역을 억제하는 다수의 화합물을 분리하였다. 이는 GC-MS를 통해 구조가 확인되었다. 이를 기반으로 개발될 약제의 QC 표준화를 확립할 계획이다.

라. 세균 대사체 공학 기술 개발

○ *X. hominickii*의 게놈 크기는 약 4.5 Mb이다. 여기에 곤충면역을 조절하는 이차대사산물을 만들어내는 유전자군으로 여겨지는 NRPS-PKS가 아래의 그림처럼 존재한다.



○ 3개의 NRPS와 4개의 PKS는 각각 펩타이드 형성 및 지방산 구조 변경에 관여하여 다양한 이차대사산물을 만들어내고 있다. 여기서 이들 유전자의 발현을 조절하는 regulon에 해당하는 유전자들의 발현이 환경 조건과 밀접하게 연동되고 있다. 이를 착안하여 배지 조건 및 inducer를 이용한 NRPS-PKS 유전자 발현 조절은 고효율의 미생물제제를 개발하는 원천 기술을 제공하게 된다.

마. 생산 단가 저감화 및 약효 안정적 제제화 기술

○ 유효 이차대사산물 생산을 촉진하면서 저렴한 미생물생산 기술을 개발하며, 환경에 안정적인 제형을 만들어 약제 보존 기간을 높이고 약효증진을 꾀한다.

(1) 곤충병원성미생물 및 이차대사산물의 대량생산 공정 최적화

- ① 산업용배지를 이용하여 곤충병원성미생물 배양 및 이차대사산물의 최대 생산수율 조건 확립 (배양온도, 교반속도, aeration, pH, 배양시간)
- ② 곤충병원미생물 배양액 및 이차대사산물의 보관 온도별 물리/화학적 및 생물학적 안정성 경시적 확인

(2) 최적 배합에 따른 제제화 및 제형화 기술개발

- ① pot시험 및 소규모 포장시험을 통한 곤충병원성미생물 및 이차대사산물의 최적투입비율 결정
- ② 보조제 선발(효력증진제, 부착성증진제, 보습제 및 자외선차단제, 물성조정제 및 안정제, 증량제 등)



Bacillus thuringiensis



Beauveria bassiana



보습제(나노 캐글라이트 등)



(3) 시제품 제작

- ① 제형별 시제품 배합 결정 및 제조
- ② 제형별 시제품 생산공정 확립
- ③ 시제품의 경시적 안정성 확인(물리화학적, 생물학적)
- ④ ”농축산용미생물산업육성센터”의 자문을 받아 개발에 차질이 없도록 할 계획

(4) 시제품의 효과 검정

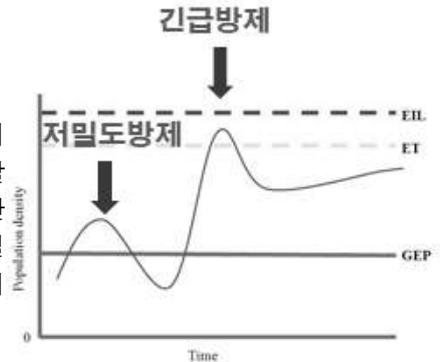
- ① pot시험 및 소규모 포장시험을 통한 시제품의 대상해충별 살충효과 검정
- ② 제형에 따른 시제품의 살충효과 확인을 통한 최종제형 결정

(5) 제품화

- ① 시제품의 유기농업자재 공시 기준에 따른 시험
 - 미생물 시험(동정, 생균수, 병원성미생물(5종)검사)
 - 독성 시험(포유류 독성 및 환경생태계생물 영향 시험)
 - 농약피해(유식물 5종)시험, 잔류농약(322성분)검사
- ② 유기농업자재 총해관리용 공시 2건

바. 대파 재배 유기농 농가 해충 관리 매뉴얼 제작

○ 해충 모니터링 기술 기반 요방제 수준을 결정하고 이를 기반으로 미생물농약 약효에 적합한 지속가능한 저밀도방제 전략을 추구하고 돌발 발생에 따른 긴급방제 처방을 포함한 고효율 방제 가이드라인을 제공한다. 저밀도방제를 위해서는 미생물 농약을 이용한 집단 자율적 해충 밀도 관리가 이뤄지며, 환경 변화에 따라 급격하게 증가하는 해충 밀도에 대한 위기관리 차원의 속효성 긴급방제가 이뤄지게 된다.



(1) 시제품의 농가실증시험

- ① 시제품의 대상해충별 농가적용방법 최적화(최적 처리농도 구명, 처리방법, 처리시기, 처리간격 및 처리 횟수)
- ② 경쟁제품군과의 비교평가

(2) 대파 재배 유기농 해충관리 매뉴얼 제작

① 대파 재배 기술

- **춘파재배**: 2~3월에 파종하고 6~7월에 정식하여 11월부터 이듬해 3월에 걸쳐 수확하는 작형으로 면적 및 출하량이 가장 많다. 중부지방은 12월이 되면 기온이 낮아 파의 지상부는 상품으로서의 가치가 없어지고 땅이 얼어 수확작업이 곤란하므로 11월 말까지 출하를 완료하는 것이 좋으며, 남부지방에서는 겨울에도 파의 잎이 살아있고 땅이 깊게 얼지 않으므로 수확이 가능하다.
- **추파재배**: 8월 하순~9월 상순에 파종하여 10월 하순에 정식하거나 묘상에서 월동시켜 해동 후에 정식하여 5~9월에 수확하는 작형이다.

② 대상해충 발생 시기별 시제품 사용 매뉴얼 제작

춘파재배



추파재배



- ③ 타 제품군과의 혼용성 평가
- ④ 시제품의 국내외 전시회 홍보

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

[1차년도]

<제1세부과제> IBC 미생물 작물보호제 개발

제1절 대파재배지 6종 해충 발생 현황

춘파 재배지 해충 발생 현황 3월 하순에 정식하여 7월말에 재배하는 춘파에 대해서 안동지역을 중심으로 3개의 서로 다른 재배지(YS-1, YS-2, SC)를 중심으로 모니터링하였다. 이들 지역은 상이한 재배 환경을 가지고 있다. YS-1은 시설재배 밀집 지역 근처의 노지, YS-2는 주변이 트인 단독 노지 재배지, SC는 시설재배지 형태를 지녔다. 이때 황색점착트랩과 성페로몬 트랩을 이용하여 주 단위로 모니터링을 실시하였다. 총 5종의 해충(파좀나방, 파밤나방, 파총채벌레, 파굴파리, 작은뿌리파리)이 비교적 높은 밀도로 지속적으로 채집되었다. 고자리파리도 채집되었으나, 포장별 불규칙적 발생으로 전체 모니터링 자료에 추가하지 않았다.

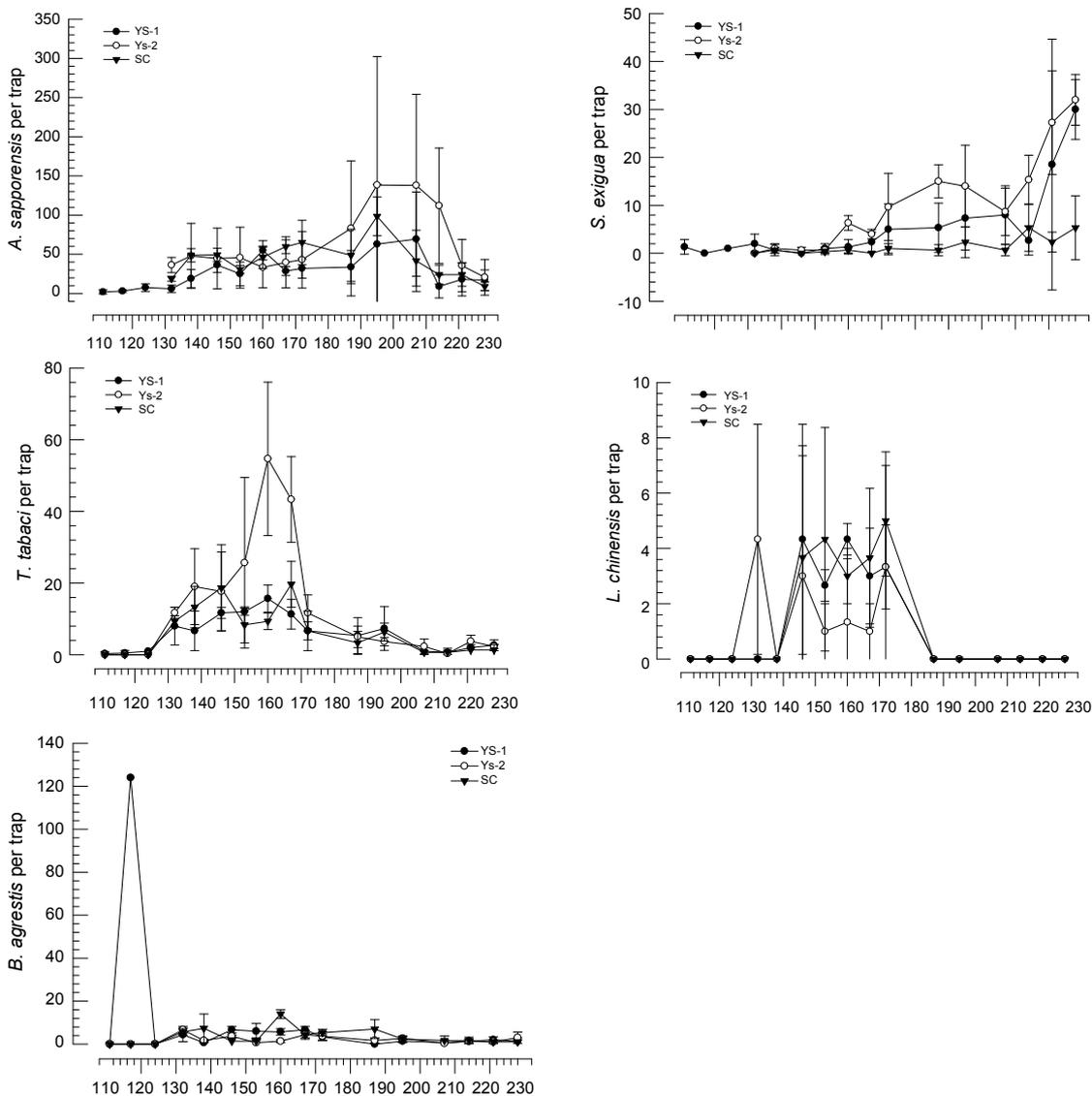


Fig. 1. Field monitoring insect pests occurring in Welsh onion-cultivating areas.

제2절 유용균주 확보 현황 - *Xenorhabdus/Photorhabdus* 및 *Bacillus thuringiensis/Beauveria/Metarhizium*

Xenorhabdus 와 *Photorhabdus* 세균은 각 각 KACC로부터 동결건조된 상태로 분양받거나 실험실에서 가지고 있던 세균들이다. 분양 받은 세균은 클린벤치 안에서 앰플을 70%에탄올로 멸균되었고 앰플절단기로 앰플을 개방한 뒤 멸균수 0.5 mL을 넣어 세균현탁액을 만들었다. 세균 현탁액을 각 각 LB, TSA, NBTA에서 희석도말하여 각 각 배양되었다. 각 배양된 세균들은 다시 NBTA에서 희석도말하여 배양되어 파란 균총 혹은 갈색 균총을 이용하여 TSB 배지에서 액체배양 된 후 30% 글리세린에 넣어 -80°C에서 보관되었다. DNA 염기서열 분석을 위해서 TSB 액체 배지에 24시간 배양한 뒤 원심분리기로 13500 rpm/min의 속도로 상온에서 원심분리를 진행한 뒤, 상층액을 제거 한 후 5% Chelex 100 Resin (Biorad, USA)을 첨가한 뒤 침전물을 녹여주었다. 그 뒤 95°C에서 5분간 열처리를 한 후 원심분리기를 이용하여 13500 rpm/min의 속도로 5분간 원심분리를 진행한 뒤 상층액 100 µL를 얻어 DNA를 추출하였다. 세균의 분자적 동정을 위하여 16s rRNA 영역을 27F, 1492R 프라이머를 이용하여 초기 변성 95°C- 2분, 변성 95°C- 1분, 어닐링 52°C-1분, 연장 72°C-1분, 최종 연장 72°C- 10분의 과정으로 변성, 어닐링, 연장을 35회 반복 후 4°C에서 보관 되었다. 증폭된 PCR산물은 PCR SV (Geneall, Kroea) 제품으로 정제되었다. 그 뒤 마크로젠(대전, 한국)에 의해 Sanger 방법으로 염기서열이 분석되었다.

각 분양받거나 분리된 세균은 NBTA에서 파란 콜로니를 형성하였고 이들 콜로니를 이용하여 16S rRNA 영역의 염기서열을 바탕으로 종명을 확인하였다.

KACC 11928

```

GAACATAATCGACGATGCTGATCTACGATTAACAGTAATCCGACTTCATGGAGTGGAGTTGAGACTCCAAATCG 80
GACTAGCAGACTTTGTGTGTCGCGTCTGCTCGCGAGGTCGCTTCACTTTGTATCCGCAITGTAGCAGGTGTGTAG 160
CCCTACTCGTAAGGCGCATGATGACTTGAAGTCAATCCGACCTTCTCCGCTTTATCACCAGGAGTCTCCTTTGAGTTC 240
CGCTTTCAGCGCTGGCAACAAGAGTAAAGGTTGCGCTGTTGCGGAGCTTAACCCCAACTTTCACACAGAGCTGAC 320
GACAGCCATGACGACTGTCTCTCAGTCCCGAAGGCACTTCGCTGTCCAGCAATTTGAGGATGTCAAGAGTAG 400
TAAGGTTCTTGGGTTGATGAAATTAACACATGCTCCAGCGTGTGCGGGCCCGCTCAATTCATTTAGTTTTAA 480
CCTTGGCGGCTACTCCCGAGCGGTGATTAAGCGTTAGCTCCGGAAGCCAGCTCAAGACCGCACTCCCAATC 560
GACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAAGGTTATTAATCTGTTTCTCCCGACGCTTTCGACACTGAGCTCAGTCTCG 640
TCCAGGGGCGGCTTCGCGACCGGTTACTTCCGACATCTCTGACATTTCCGCGTACACATGAAATTTTACCCCCCTC 720
TACGAGACTCCAGTCAACAGTCTTAGATGCCATTCGAGGTTGAGCCCGGGGATTCACATTAATTAATCAGCGCC 800
TSGTTCGCTTTACCGCCGATTCATCCGATTAACGCTTGCACCTCGSTATTACCGCGCTCTGCGAGGATTAAGCG 880
GTGCTCTTCTGGGTTAAGTCAAAATTAATCTTTCAGCAACTTCTTCTCCCGGCTGAAAGTACTTTTCAACCC 960
CGAAGGCTTCTTATACAGCGGCAATGCTGATCAGGCTTGGCCCAATTTGCAATATTCGCCACTGCTGCTCCGCT 1040
AGGAGTCTGGGCGTGTCTCAGTCCGACTGTTGCTGCTCACTCTCAGACAGCTAGAG 1100
    
```

KACC 12282

```

TGGGATTAGCTGTTAGGTTAGGTTAATGGCTACTTAGCGACGATCCCTAGCTGCTGAGAGGATGACAGCCACTG 80
GGACTGAGACACGGCCAGACTCTCTAGCGAGGCGAGTGGGGAATTTGCAAAATGGGCGCAAGGCTGATGCAAGCAT 160
GCCGCGTGTATGAAGAAGGCTTCCGGTTGTAAGTACTTTCAGCGGGAGGAGGAAATTAATCTGAACAGGTTGAGAT 240
TTGACTTACCCGAGAAAGCAAGCGTAACTCCGTCGCGAGCAGCCCGGTAATACGAGGTTGCAAGGTTAATCGG 320
AATGACTGGGCGTAAAGCGCACAGCGGCTCAATTAAGTTAGATGTAAGATCCCGGCGCTCAACCTGGGAGCGCATCT 400
AAGACTGTTGACTGGAGTCTGTAAGAGGTTGAGAAITCCATGTGTAGCGGTGAAATGCTAGAGATGTGGAGAAATA 480
CCGTTGGCGAAGCGCGCCCTTGGACGAAGTCAAGCTCAGGTCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATAGATACCTCT 560
GGTAGTCCAGCTGTAAACGATGTGCAATTTGGAGTTGTGGCCCTGAGCTGTGGCTTCCGAGCTAAGCGGTTAAATCGA 640
CCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAACAATCAATGAATGACGGAGCCCGCACAAAGCGGTTGAGCATGTGGTTTA 720
ATTGATGCAACCGAAAGCACTTACTACTTGTGACATCTCATAATTTGCTGGAGCAGGAGGCTGCTTGGGAACT 800
GAGAGCAGGTTGCTGATGGCTGTGTCAGCTGCTGTTGAAATGTTGGGTTAATTCGCGCAAGCAAGCATCCCTTAT 880
CCTTTGTTCCAGCAGCTCAAGTGGGACTCAAGGAGCTCCGCGTAATAACCGAAGAAAGTGGGATGACCTCGAGT 960
ATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACCCCTGCTCAATGGCGGATCCAAAGTGAAGCAACTCGCCATAACCCAGGAA 1040
CCCCAAGTC 1050
    
```

KACC 12254

```

GAGACCAGTGGGGACCTGAAGGGCCCTCAGCCGCTCGGATGAACCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTTAAGG 80
CCTACTAGCGGACGATCCCTAGCTGCTGAGAGGATGACCCAGCAGACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTTACG 160
GGAGCGAGCAGTGGGGAATTTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCTTCGGGT 240
TGTAAAGTACTTTCAGCGGGAGGAGGTTTCACTTGAACAGAGCTGAAITTTGACTTACCCGAGAAAGCAGCCGG 320
CTAACTCCGTCGCGAGCAGCCGCGTAATACGAGGTTGCAAGGCTTAATCGGAATGACTGGGCTAAAGCGCACGAGGC 400
GGTCAATTAAGTTAGATGTGAAATCCCGGGCTCAACTGGGATGGCTAATCACTGTTGCTGGGTTCTGCTAGAG 480
GGGGGTAGAAITTCATGTGTAGCGGTTAAATGCTAGAGATGTGGAGGAAATCCGTTGGCAGGCGCCGCTGGACGA 560
AGACTGAGCTCAGTTCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATACATACCTGGTAGCCGCTGTAACGATGTGAT 640
TTGAGGTTGTGGCTTGTAGCTGGCTTCCGAGCTAAGCGGTTAAATGACCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTA 720
AACTCAAATGAATTTGACGGGGCCCGCAGCAAGCGGTTGAGAGCTGTGGTTAATTCGATGCAACCGGAAAGCACTT 800
ACTCTGACATCCAGAGAGACTCATAGATGAGGTTGGCGCTTCCGAGGACTCTGAGACAGGTTGCTGATGGCTGTGCT 880
AGCTCTGTTGTAAGTGTGGGTTAAGTCCCGCAAGCGGATCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGATGCTGGTGAAC 960
TCAGAGACTCCGCGGTGATAACCGGAGAAAGTGGGATGAGCTCAGTCACTGCTGGCCCTGACCAATAGGCTACCCCTGC 1020
TAAATGGCGGAT 1052
    
```

KACC 122583

```

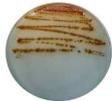
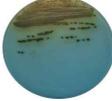
ATGCTGTTCAAGATTACTAGGATTCGAACTTCTAGGAGTGGAGTTGAGACTCCAAATCCGACTAGCAGACTTGT 80
GTCTCCGCTTCTCTCGGAGGTCCTTCACTTTGTATCCGCAITGTACACGTTGTAGCGCTACTGCTAAGGGGCA 160
TGATGACTGAGCTCATCCCGACTTCTCCGCTTATCAGCGGACTCTCCTTTGAGTCCCACTTCCAGCTGCTGGCA 240
ACAAAGGATAAGGTTGCGCTGTTGGGAGTAAACCAACATTCACACAGAGCTGAGCAGGATGAGCAGCACT 320
GTCTCTCAGTTCCTAAGGCACTTCCGCTGTCTCCAGCAATTTGAGAGATGTCAAGAGTAGTAAGGTTCTTCTGCTTC 400
ATCAAAATAACCAAGCTGCTCTCCGCTGGTGGGCGCCCGCTCAATTCCTTTGAGTTTAACTTGGCGGCTACTGCC 480
CAGGCGTCAATTAAGCGTTAGCTTCCGAGCCAGCGTTCAAGACCGCAACTCCAAATGACATGCTTTACAGCGTGG 560
ACTACAGGTTACTTAATCTGTTGCTCCCGAGCTTTCGCACTGAGCGTCACTGCTGCTCAGGGGGCGGCTTCCG 640
CACCGTATTCCTCCAGATCTTACGCAITTCACCGCTACAGATGAAITCTACCCCTCTACGAGACTCCAGTCAAC 720
AGTCTTAGATGCAATCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTCACTTAACTTAAATGACCGCTGCTGCTGCTTACGCGCA 800
GTCAITCCGATTAAGCTTGCACCTCTGCTATTACCGCGGCTGCTGGCAGGATGAGCGGTTCTTCTTGGGGTAA 880
CGTCAAGTCCAGGCTCTTCAAGCTAAACCTTCTCCCGCTGAAAGTACTTTACACCCGAAAGGCTTCTTCAATCA 960
CGGCGATGGCTCAGGCTTGGCCGCTTGTGCAATATCCCACTGCTGCTCCGTTAGGAGTCTGGGCGGCTGCT 1040
CAGTCCAGTGTGGCTGCTCCTCTCAGACAGCTAGATGCTGCGCTAGGCTAGGCACTTACCTACTACAGCTA 1120
ATCCACTCTGGGTTCACTCCAGCGGCTGAGGCGCTTTCAGGCTCCCGACTTGGCTTCCGCAATATGCGGATTAAGC 1200
ACCGTTTCCAGTGG 1214
    
```

KACC12184

KACC 91042

```

80 GTTGCAGACTCCAATCCGACTACGACAGACTTTATGTGTTCCGCTTCTCCTCGCGAGGTGCTTCACTTTTGTATCCGCC
160 ATTGTAGCAGGTGTGTAGCCCTACTGTAAGGGCCATGATGACTTGAOCTCATCCCACCTTCTCTCCGGTTTATCACGGG
240 CAGTCTCCTTTGAGTTCACCACATTACGTGCTGCAACAAAGGATTAAGGGTTCGCTGCTGTTGCGGGACTTAACCCAACT
320 TTCACAACAGAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGTCTCAGTTCGCGAAGGCACTTCTGCTGTCTCCAGCAAAATCT
400 GAGGATGTCAAGAGTAGTAAGTTCCTTCGCGTTCATCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGCTC
480 AATTCATTTGAGTTTTACCTTTCGCGCGTACTCCCCAGGGGGTCAATTAACGGGTAGCTCCGGAAAGCCACTCCTCTT
560 AAGGAACACACTCCAAATCGACATCGTTTACCGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCGACGCTTTCGC
640 ACCTGAGCGTCAGTCTTCGTCAGGGGGCGCGCTTCCGCCACGGTATTCTCCACATCTCTACGCAATTCACCGGTACAC
720 ATGSAATTCACCCCGCTCTACGAGACTTAGCCACACAGTCTTAGATGCGGTTCGCCAGTTAAGCCCGGGGATTTCACA
800 TCTAACTTAATGACCGCTCGTTCGCGCTTACGCCCCAGTCAITTCGATTAACGCTTGCACCTCCGCTATTACCGCGCT
880 GCTGGCAGCGAGTTAGCGCGTGTCTTCTTCGCGGTACGCTACACATACCGCTCTGTTCAAGCGATATCCTCTCCCGCT
960 CTGAAAGTACTTTACACCCGAAAGGCTTCTTCATACACGCGGATGCTCATCAGGCTTCCGCGCAATGTGCAATAT
1020 CCCCCTGCTGCTCCGCTAGSAACTTGGGCGGTGTCTCAGTCCCACTGTGCTGCTCAT
80 TATGAAAGGGCTTCCGGTTGTAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAAGGTTAGCCTGAACAGGGTTGAATTTGACGTT
160 ACCCGCAGAAGAGCACCGGCTAATCCCTGCGCAGCGCGGTAATACGAGGGTCAACAGCTTAATCGAAGTACTG
240 GCGTAAAGCGCACGACCGGCTCAATTAAGTTAGATGTGAATCCCCGGGTTAACCCTGGAAACGGCATTAAGACTG
320 TTGCTAGAGTCTCTAGAGGGGGTASAAATCCATGTGTAGCGGTGAATGCTAGAGATGTGGAGAAATACCGTGGC
400 GAAGGGCGCCCCCTGGACGAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGGCAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGCC
480 ACGCGTAAACGATGTCAATTTGGAGGTTGTTCCCTTAGAGAGTGGCTCCGAGACTAACCGGTTAAATCGACCGCTG
560 GGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATGACGGGGGCGCCACAGCGGTGAGCATGTGTTTTAATCGAT
640 GCACCGGAAGAACCTTACTACTCTTGACATCCTCAGAACTACACAGAGTGGTGGAGTGCCTTCGGGCACTGAGAGAC
720 AAGTGTGCATGGCTGTGCTCAGCTGCTGTGTTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATCCTTGT
800 TGCCAGCGGTGATGGCGGAACTCAAGGAGACTGCGCGGTGATAAACCGGAGGAGTGGGATGACGTCAGTCAATCA
880 TGGCCCTTACGASTAGGGCTACACAGCTGCTACAATGGCGSATAAAGTGAAGCGACTCCGCGAGCAAGCGGAACRC
960 ATAAAGTCTGTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCACTCGACTCCATGAAGTGGAAATCGTAGTAATCTAGATCAGAA
1020 GCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACCGCGCTCACACATGGGATGGGTTGALLAGAAAGTGGTAGCT
1506 TAACCTGTGGAGGCGCTGACCACCTTGTGATTGATGACTGGGTGAAGTGCATCAAGGTAGCC
    
```

종명	균주명	출처	보유현황
<i>Xenorhabdus nematophila</i>	K1	<i>Steinernema carpocapsae</i>	KACC12145 
<i>Xenorhabdus hominickii</i>	ANU101	<i>Steinernema monicum</i>	안동대 
<i>Xenorhabdus hominickii</i>	DY1	<i>Steinernema monticolum</i>	안동대 
<i>Xenorhabdus ehlersii</i>	ANU101	<i>Steinernema longicaudum</i>	안동대
<i>Xenorhabdus bovienni</i>	CS03	<i>Steinernema feltiae</i>	안동대
<i>Photorhabdus temperata temperata</i>	ANU101	<i>Heterorhabditis megidis</i>	KACC91042 
<i>Photorhabdus luminescens luminescens</i>	-	<i>Heterorhabditis sp.</i>	KACC12254 
<i>Photorhabdus luminescens akhustii</i>	-	<i>Heterorhabditis sp.</i>	KACC12282 
<i>Photorhabdus kayaii</i>	-	<i>Heterorhabditis sp.</i>	KACC11928 
<i>Photorhabdus laumondii</i>	-	<i>Heterorhabditis sp.</i>	KACC12283 
<i>Photorhabdus thracensis</i>	-	<i>Heterorhabditis sp.</i>	KACC12184 

Bacillus thuringiensis aizawai (BtA)의 DNA 동정을 위하여 TSB (Tryptic soy broth) 배지에 200rpm/min의 속도로 24시간 동안 28°C에서 진탕배양한 뒤 13,500 rpm/min의 속도로 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거한 뒤 5% Chelex를 넣은 뒤 95°C에서 5분간 가열 하였다. 그 뒤 13,500 rpm에서 5분간 원심분리를 하여 상층액을 사용하여 PCR을 진행하였다. PCR은 16S rRNA 영역을 증폭하기 위하여 27F, 1492R 프라이머가 사용되었다. PCR의 조건은 초기변성 95°C-2분, 변성 95°C-1분, 어닐링 52°C-1분, 연장 72°C-1분, 최종연장 72°C-10분의 과정으로 35회 반복된 뒤 4°C에 보관되었다. 증폭된 PCR 산물은 정제된 뒤 마크로젠에서 염기서열 분석되었다. BtA의 내생포자관찰을 위해 광학현미경(DM-2500, Leica, 독일)으로 1,000 배의 배율로 관찰되었다.

```

AACTCTCGTGGTGTGACGGGGCGTGTGTACAGGCCCGGAACTTACCGGGGATGCTGATCCGGGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAAGCGTTTTATGAG 140
ATTAGCTCCACTCGGGCTTTGACGCTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGATGATGATTTGACGCTCATCCCCACTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCACTCATTAGAGTGGCC 280
AACTTAAGTATGGCACTAAGATTAAGGTTGGCGTGTGGGGACTTAAACCACTATCACGACAGAGTGTAGCAGACACTGCACCACTGTCTACTCTCCCGAGGAGAGCCCTATCTTAGGTTTCAG 420
AGGATGTCAAGACTGGTAAGGTTCTTCGCGTGTCTCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTGTGGGGCCCGCTCAATTCCTTGAAGTTTCAGCCTTGGGGCCGTACTCCCGAGGGAGTCTTAATGCGTTAAC 560
TTCAGCACTAAGGGGGAACCCCTTACACTTACACTTACACTTACCGGCTGACAGGTTATCCAGGCTAATAAATCCGTTTCCCGCCAGCTTCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCT 700
TGGTGTCTCCATATCTACAGCATTTCACCGTACACTTGAATTCACCTTTCCTCTTCCGCACTAAGTTCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCT 840
CGCGCGCTTACCGCCAAATAATTCGGATAACCGTTCACCACTACGATTACCGGGTCTGCTGGCACTAAGTTCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCT 980
ACAACAGAGTTTACAGCCCGAAGGCTTCATCACTCACCGGGGCTTCCCGTCAGACTTTCCGCTTTCGGGAAGATTCCTACTGTGCTCCCGTAGGAGTCTGGGGCGTGTCTCAGTCCCAAGTGTGGCCGATCAC 1120
CTCTCAGGTCGGCTACCGATGGTGGCTTGGTAGCCCTACTCACCACTAGCTAATGCGAGCGGGTCCATCCATTAAGTGACAGCCGAGCCGCTTCAATTCGAACTAGCAATTCAAAATTTATCCGGTAT 1260
TAGCCCGGTTCCCGGATATCCAGTCTTATGGCAGGTATCCCACTGTACTACCCGTCGGCGCTAAC 1335

```



BtA의 염기서열(위) 및 내생포자(아래)

백장균과 녹장균 동정을 위해 HiGeneTM Genomic DNA prep Kit (BIOFACT, Korea)를 통하여 DNA가 추출되었다. 추출된 DNA는 ITS 영역을 프라이머(F: TTGATTACGTCCCTGCCCTTT, R: TTTCCTCGCCGTTACTAAGG)를 이용하여 PCR을 진행하였다. PCR은 초기변성 95°C-5분, 변성 95°C-1분, 어닐링 50°C-1분, 연장 72°C-1분, 최종연장 72°C-10분의 과정을 35회 반복하였다. 증폭된 PCR산물은 Macrogen에 염기분석이 의뢰되었다.

(A) 백장균(*Beauveria bassiana*)

```

AAGTCTCCGTTGGTGAACGAGCGGGGATCATTACCAGTTTTCAACTCCCCAACCCCTCTGTGAACCTACCTATCGTT 80
GCTTCGGCGGACTCGCCCCAGCCGACGCGGACTGGACCAGCGGCCCGGGGACCTCAAATCCTGTATTCCAGCAT 160
CTTCTGAATAACGCCGCAAGGCAAAAACAAATGAATCAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGA 240
ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAATGAAATGCAAGAATCCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCA 320
GCATTCGCGGGCATGCTGTTTCGAGCGCTATTCAACCTCGACCTCCCTTGGGGAGGTGCGGCTTGGGGACCGGCA 400
GCACACCGCGCCCTGAAATGGAGTGGCGGCCCTCGCGGCGACCTCTGCTAGTAATAACAGCTCGCACCGGAACCCC 480
GACGCGGCCACCGCGTAAACACCCAACTTCTGAACGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCT 547

```



(B) 녹장균(*Metarhizium rileyi*)

```

TACTACCATTGAATGGCTCAGTGGGGCTCCGGACTGGCCAGAGAGGTGGGCACTACCCTCAGGGCCGAAAGCTC 80
TCCAACTCGGTCATTTAGAGGAAAGTAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACAGCGGAGGGATCATTACCAGT 160
TTACAACCTCCAAACCCATGTGAATTTATACCTTTTCTGTTGGCTCGCGGGTCAATTCGCCCGGACCGGGCTCGTC 240
CAGAGCCCGCCCGAAGAGGCGCCCGCGGGGACCGAACTCTGATCTCTTACGCTTTGGCCAGTCTGAGTGAATC 320
ATACAAAATGAATCAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGCAAAATGCGATAAGT 400
AATGTGAATGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCCGCCGATTTCTGGCGGGCATGCTC 480
GTTCCGAGGCTCATTTCAACCTCAAGCCCGCGGGTTGGTGTGGGGCCGGGATTTGTCAGTGGGGCCCTCAGGCGG 560
TTCCCTCGGGCGCGCCGAAATGAAATGGCGGCCCGTCGCGGCTCCTCTGCGTATAGCAACAACCTCGCAACAGG 640
AGCGCGCGCGGCTGCGGTAAAACGCAAACTTCTCCAAGAGTGTGACCTCGAATCAGGTAGGAATACCCGCTGATA 720
CTTAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAACC 754

```



제3절 곤충병원세균 대사체 생리 기능 연구(I) - GameXPeptide 생리교란 물질

Xenorhabdus/Photorhabdus 이차대사산물 GameXPeptide (GXP) 대한 기초 자료

GXP는 세포독성을 지니는 sansalvamide (Fig. 1)와 유사한 depsipeptide 구조의 화합물이다. Sansalvamide는 해양 곰팡이 유래 화합물로서 HSP90와 결합하여 이 단백질이 세포자연치사 과정을 조절하는 것을 교란하여 세포독성을 나타내는 것으로 알려져 있다.

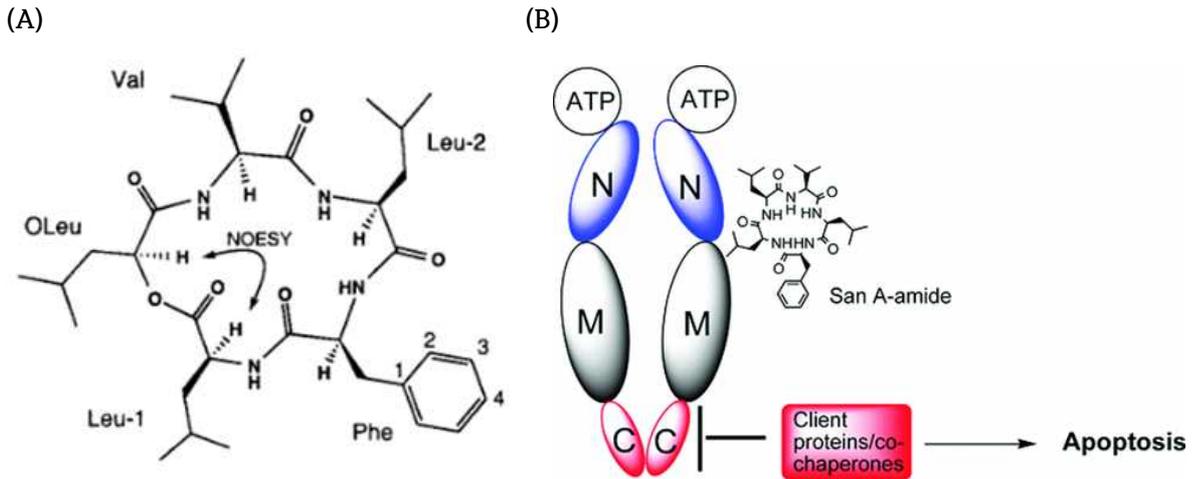


Fig. 1. Sansalvamide and its biological function. (A) Chemical structure (B) Its interaction with HSP90 to prevent control of apoptosis. ACS Med. Chem. Lett. (2010) 1: 4-8.

곤충에서 HSP90는 곤충의 변태를 조절하는 유약호르몬과 탈피호르몬의 신호전달과정에 관여한다(Fig. 2). 특히 JH의 막수용체 작용에 기인한 PKC의 활성화는 HSP90를 인산화하여 JH 신호전달에 관여하는 반면 탈인산화된 HSP90는 탈피호르몬 신호전달을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 여기에 포유동물과 같이 이 단백질이 아포토시스 과정을 조절할 것으로 추정한다.

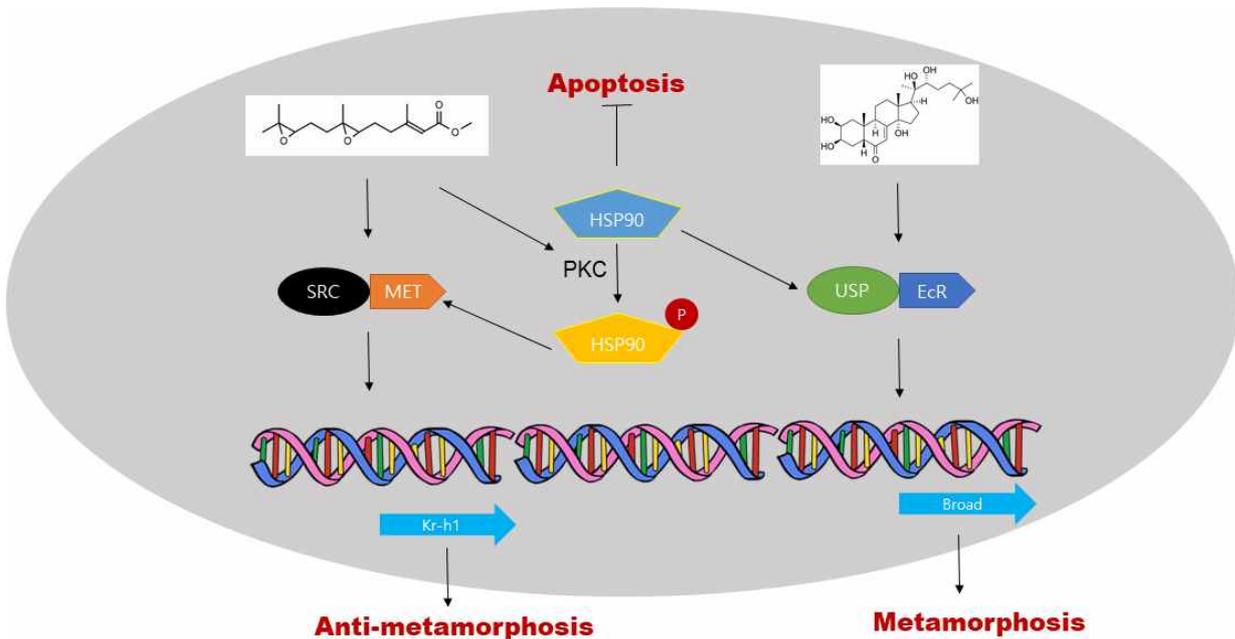
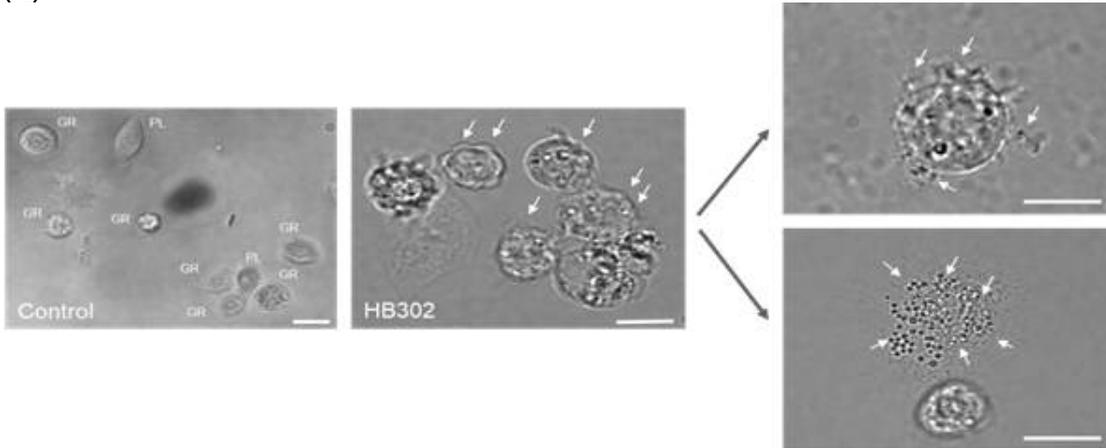


Fig. 2. Roles of HSP90 in insect metamorphosis and apoptosis

GXP의 곤충 세포독성 효과

파밤나방을 대상으로 GXP가 곤충 세포독성 효과를 갖는 지를 검정하였다. 파밤나방 혈구세포를 대상으로 GXP를 노출시킨면서 나타나는 세포독성을 형태적으로 분석하였다(Fig. 3).

(A)



(B)

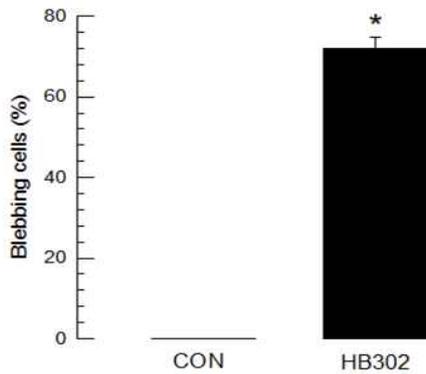
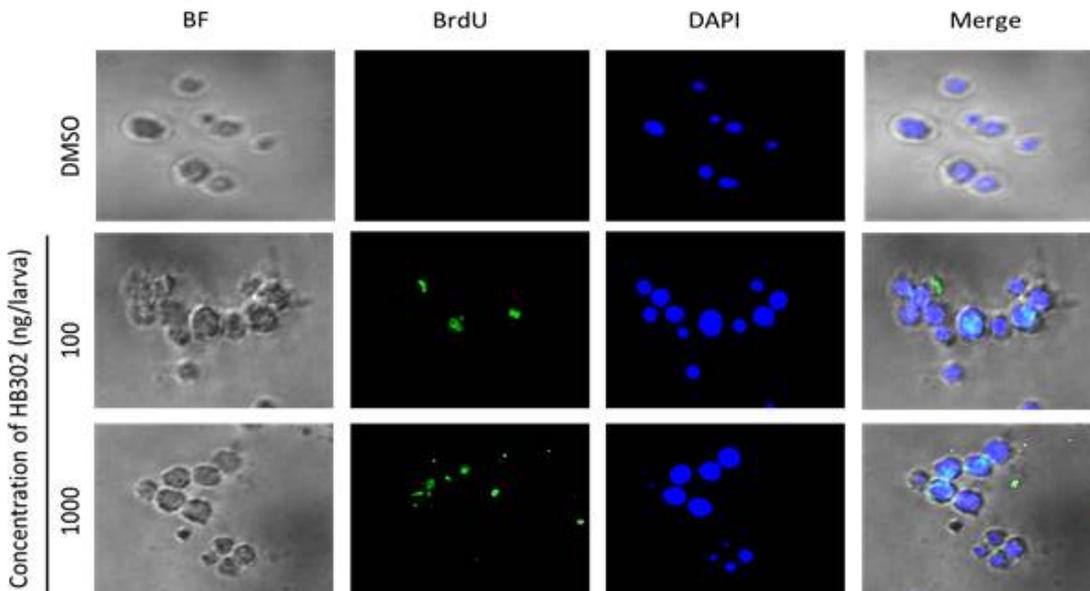


Fig. 3. Cytotoxicity of GXP against *S. exigua* hemocytes

이상의 세포독성이 아포토시스에 의해 기인되었는 지를 TUNEL 분석법으로 진행하였다(Fig. 4). 아포토시스가 진행되면서 일어나는 DNA 절단을 bromouridine을 이용하여 절단말단을 표시하였다.

(A)



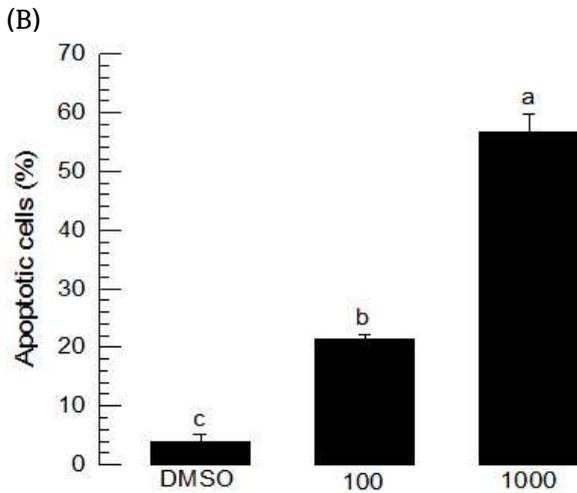


Fig. 4. TUNEL assay of GXP against hemocytes

GXP는 혈구세포의 핵내에 DNA 절단을 유도하여(Fig. 4A) 아포토시스를 유발하였다. 이러한 세포독성 효과는 농도가 올라감에 따라 증가하였다(Fig. 4B).

GXP 유도체 곤충 생리 교란 분석

4 가지 상이한 GXP 유도체 물질들(Fig. 5A) 가운데 세포독성의 차이를 규명한 결과 HB302가 가장 높은 세포독성을 지녔다(Fig. 5B). HB302의 농도별 세포독성을 분석한 결과 전형적 양독반응을 나타냈다(Fig. 5C)

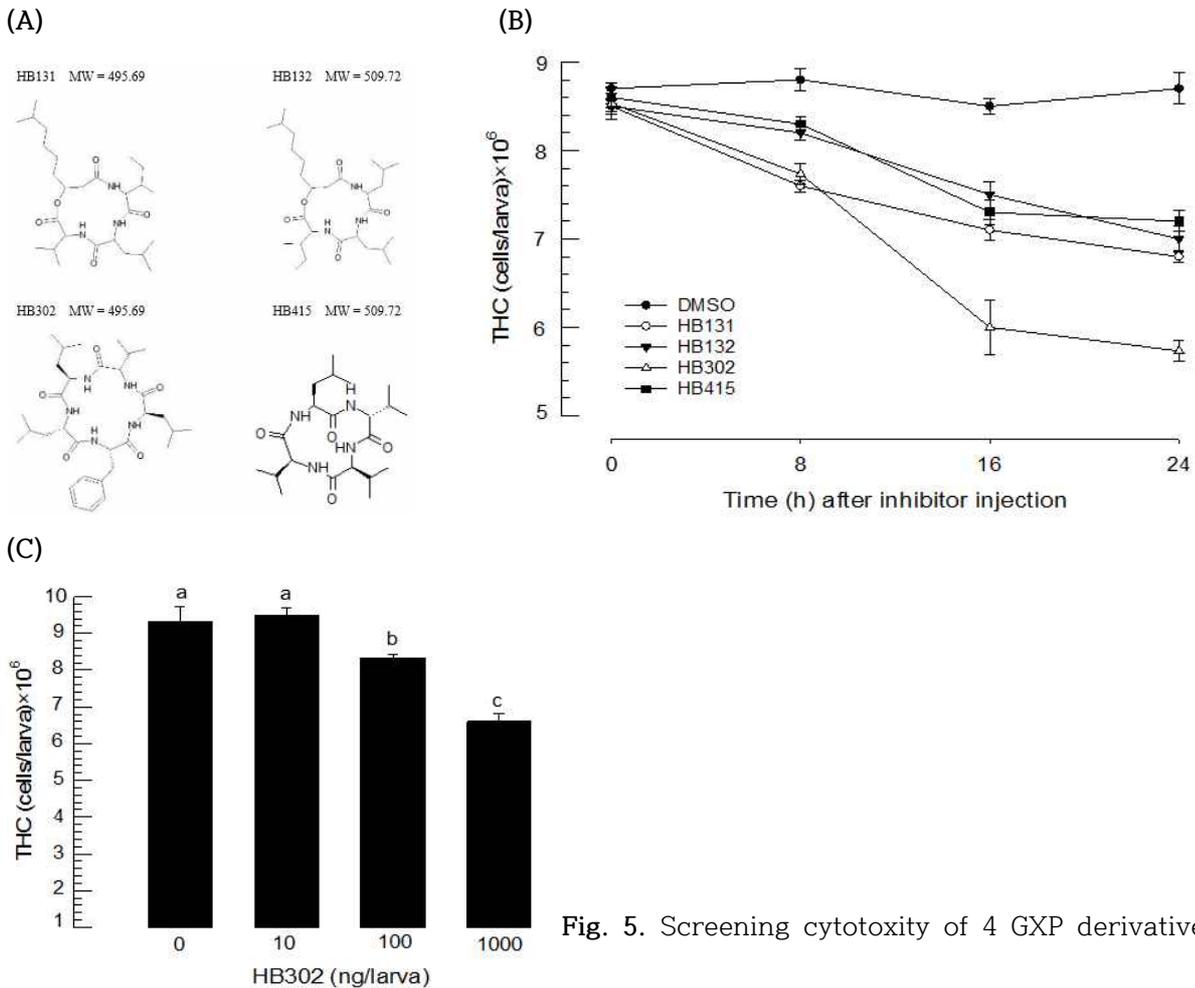


Fig. 5. Screening cytotoxicity of 4 GXP derivatives

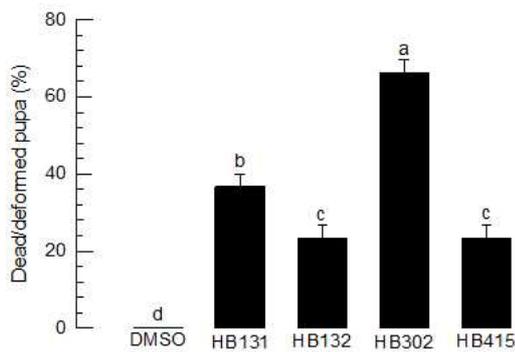
GXP 변태 억제 기능

4 가지 상이한 GXP 유도체들의 파밤나방에 대한 변태 교란 효과를 분석하였다(Fig. 6A). 이들 가운데 HB302가 가장 높은 발육 교란효과를 주었으며(Fig. 6B) 이러한 효과는 농도에 따라 증가하였다(Fig. 6C). 또한 HB302는 유충 발육 속도를 늦추었다(Fig. 6D). 이 효과는 혈강 주입으로 나타났지만, 몸 표면에 처리한 국부 처리로는 나타나지 않은 것으로(Fig. 6E) 미뤄 HB302의 표피층 투과는 어려운 것으로 판단된다.

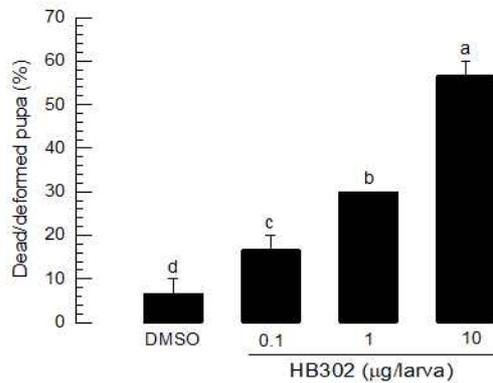
(A)



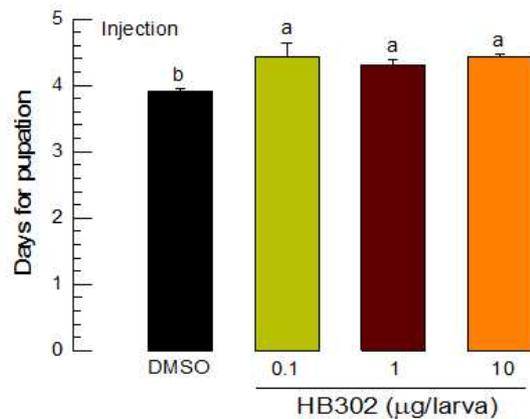
(B)



(C)



(D)



(E)

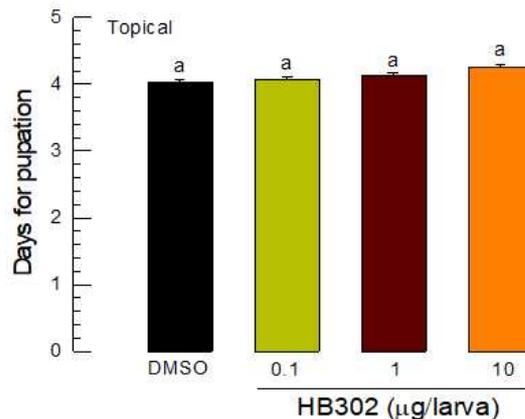


Fig. 6. Effect of GXP derivatives on pupal metamorphosis of *S. exigua*. (A) Malformed pupae treated with GXP (B) Different efficacy of GXP derivatives to form malformed pupae (C) Dose-response of HB302. (D, E) Effect of GXP on larval developmental rate by injection and topical applications.

파밤나방 HSP90의 혈구세포 행동에 미치는 영향

파밤나방의 HSP90 유전자를 계놈에서 얻어 이 유전자의 발현을 발육시기별 및 조직별로 분석하였다(Fig. 7). 모든 발육태에서 이 유전자의 발현이 확인되었다(Fig. 7A). 이 가운데 5령 유충에서 가장 높은 발현량을 보였다. 5령 유충의 상이한 조직에서 분석한 결과 혈구세포에서 가장 많은 발현량을 나타냈다(Fig. 7B).

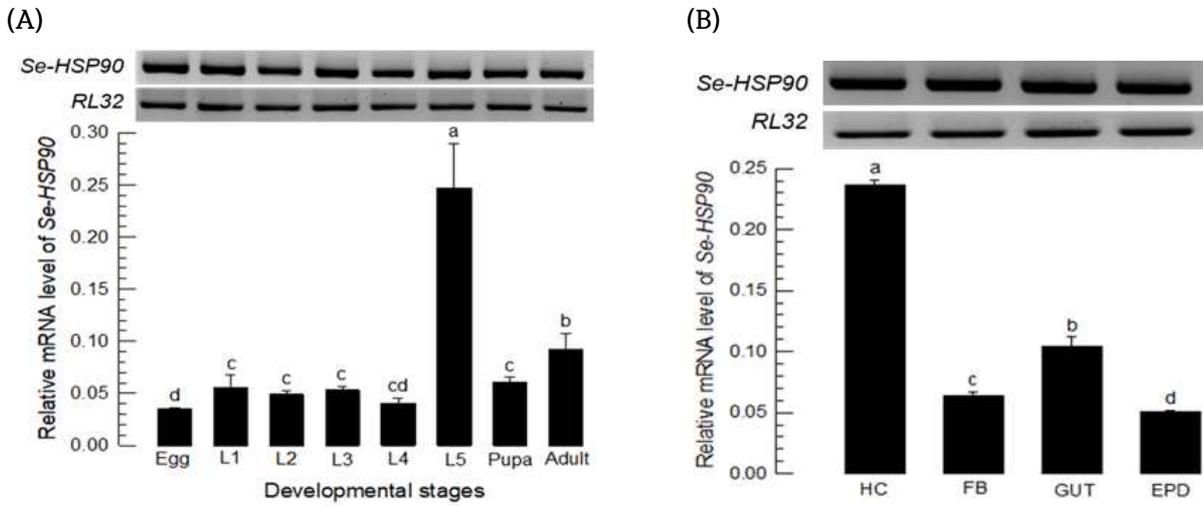


Fig. 7. Expression analysis of HSP90 of *S. exigua*. (A) Different developmental stages (B) Different tissues in L5 larvae

HSP90의 기능을 분석하기 위해 이 유전자의 발현을 억제하는 RNAi가 시도되었다. dsRNA 처리는 이 유전자의 발현을 크게 억제하였다(Fig. 8). 이러한 억제는 적어도 주입 후 48시간 동안 유지되었다.

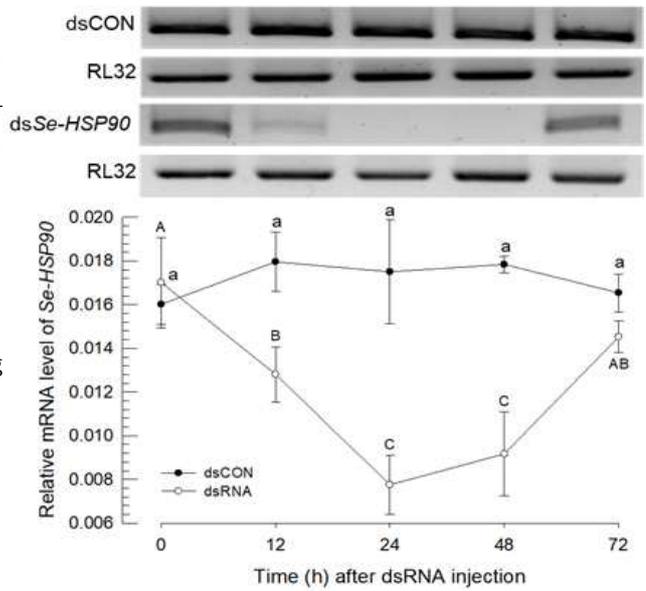
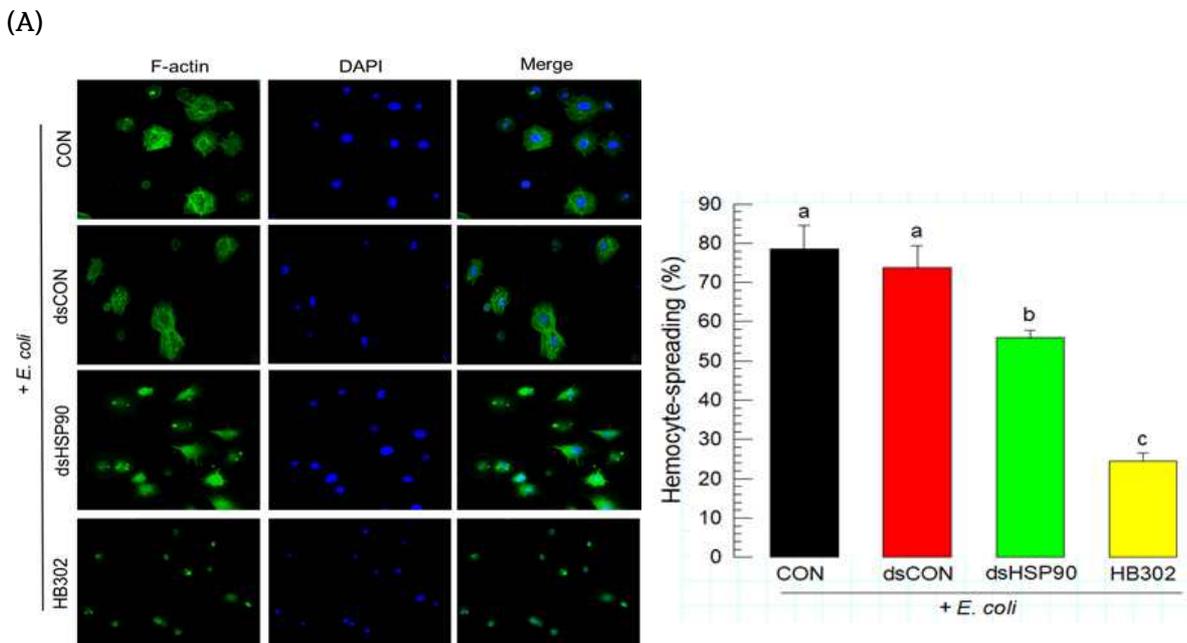


Fig. 8. RNAi of HSP90 in *S. exigua* by injecting dsRNA to L5 larvae



(B)

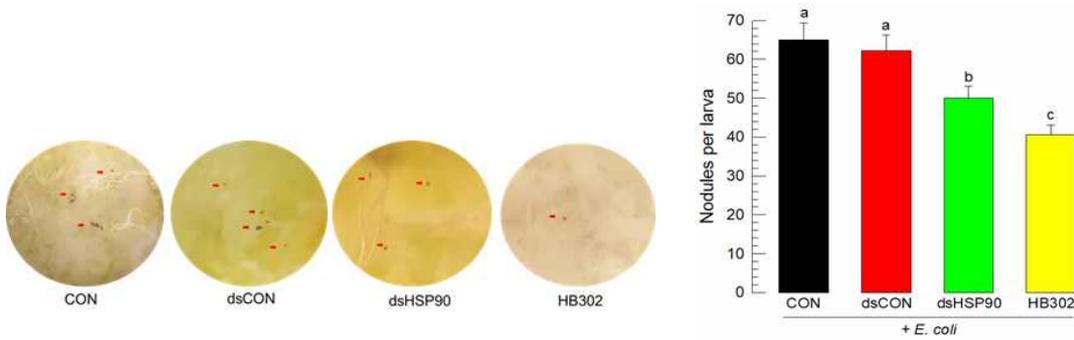


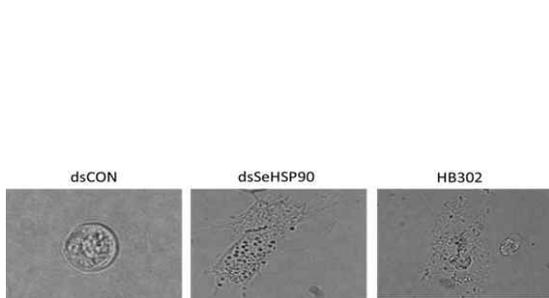
Fig. 9. Effect of HSP90 in cellular activity in hemocytes of *S. exigua*. (A) Hemocyte-spreading activity (B) Nodulation assay

HSP90 발현에 대한 RNAi 처리를 진행한 후 혈구세포 활동을 분석하였다(Fig. 9). 혈구세포의 활착행동을 분석한 결과 HSP90 발현을 억제하는 경우 이러한 세포 활동이 크게 억제되었다(Fig. 9A). 이러한 세포활동 억제는 혈구의 병원균에 대한 세포성 면역인 소낭형성을 크게 억제하였다(Fig. 9B).

파밤나방 HSP90의 세포사멸에 미치는 영향

HSP90 유전자 발현이 세포사멸에 미치는 영향을 분석하기 위해 이 유전자의 발현을 RNAi로 억제하였다(Fig. 10). 이 유전자의 발현을 억제할 경우 아폽토시스 유발과 연관된 세포 소낭 형성이 나타났다(Fig. 10A). 이러한 현상은 HB302를 처리하였을 때에도 동일하게 나타났다(Fig. 10B).

(A)



(B)

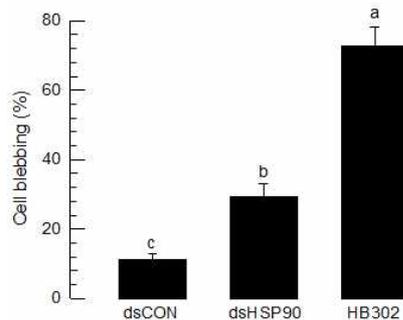
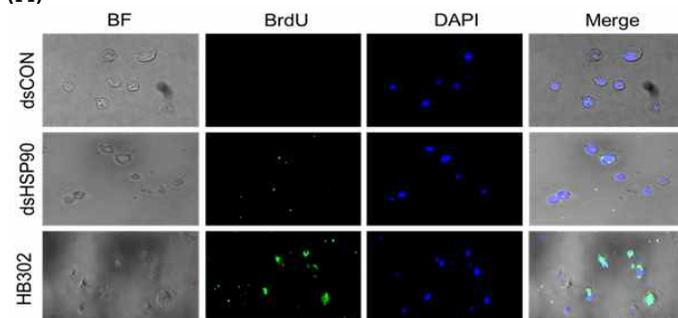


Fig. 10. Effect of HSP90 RNAi on cell death of hemocytes in *S. exigua*

HSP90 유전자 발현 억제가 아폽토시스 유발에 기여했는 지를 분석하기 위해 TUNEL assay를 진행하였다 (Fig. 11). HB302 처리와 유사하게 HSP90 RNAi 처리는 DNA 절단을 유도하는 아폽토시스를 유발하였다.

(A)



(B)

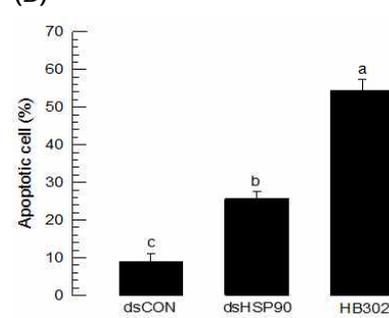


Fig. 11. Effect of HSP90 RNAi on apoptosis of *S. exigua* hemocytes (A) TUNEL assay (B) Frequencies of apoptotic cells

파밤나방 HSP90의 유충발육에 미치는 영향

HSP90 유전자 발현이 파밤나방 유충 발육 및 변태에 미치는 영향을 분석하였다(Fig. 12). 이 유전자의 RNAi 처리는 dsRNA 처리 농도가 증가함에 따라 유충 발육을 지연시키고, 변태를 억제하였다.

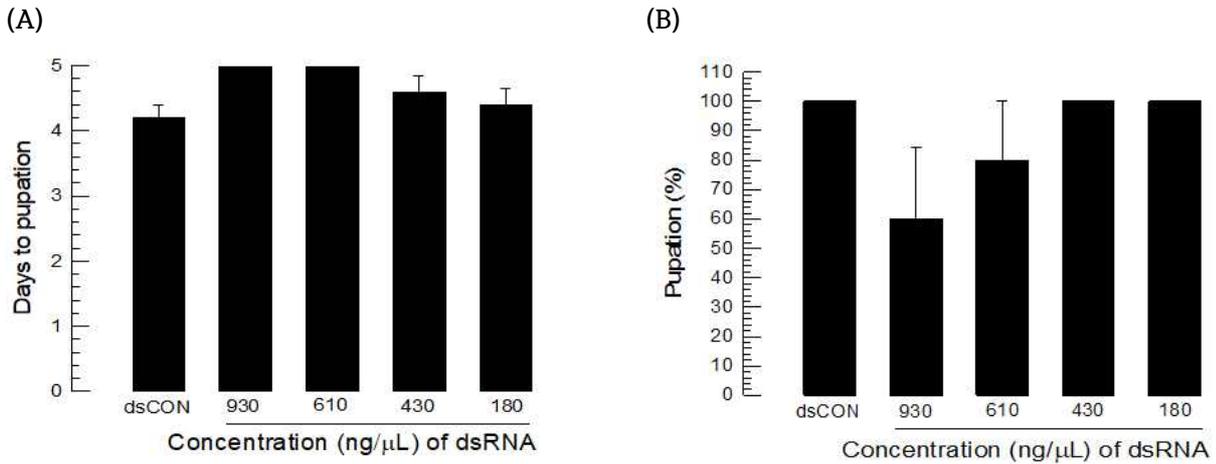


Fig. 12. Effect of HSP90 RNAi on larval development (A) and pupation rate (B) of *S. exigua*

HB302 살충력 생물검정

이상의 자료는 HB302가 HSP90 생리 작용을 교란하여 세포독성을 일으키고, 이에 따라 면역 억제 및 발육 억제로 이어진 것으로 해석된다. 이러한 생리 교란은 살충력으로 이어지기에 다양한 해충을 대상으로 HB302의 생물검정이 이뤄졌다(Fig. 13). HB302는 분석된 4종의 곤충에 대해서 모두 살충력을 나타냈다. 이 가운데 파밤나방에 대한 살충력이 뚜렷이 나타났다.

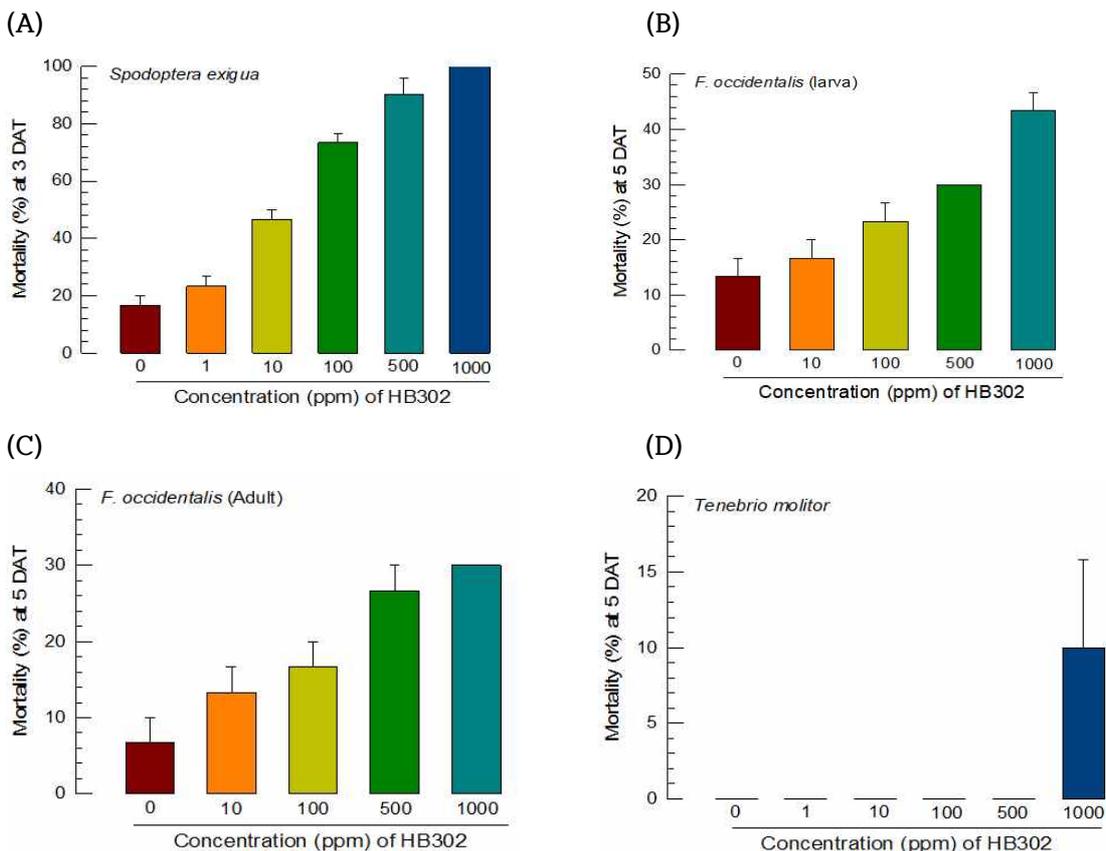


Fig. 13. Bioassay of HB302 on different insect species by leaf-dipping assay

제4절 곤충병원세균 대사체 생리 기능 연구(II) - Phurealipid 생리교란 기능물질

Phurealipid 화학적 특성

Photorhabdus 세균류에서 동정된 이차대사산물로서 10-13개 탄소로 구성된 포화지방산 지질골격에 urea가 연결된 화합물이다(Fig. 1). 구조적으로 곤충의 유약호르몬과 유사한 화학 구조를 지니고 있다.

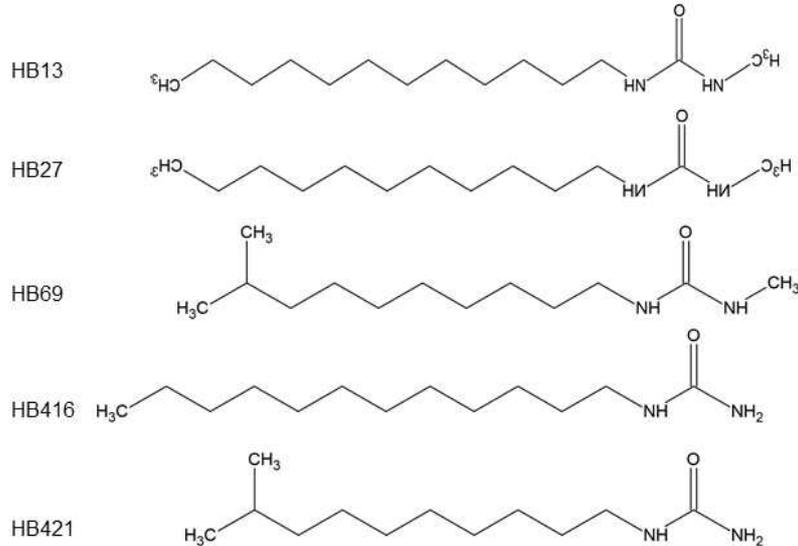
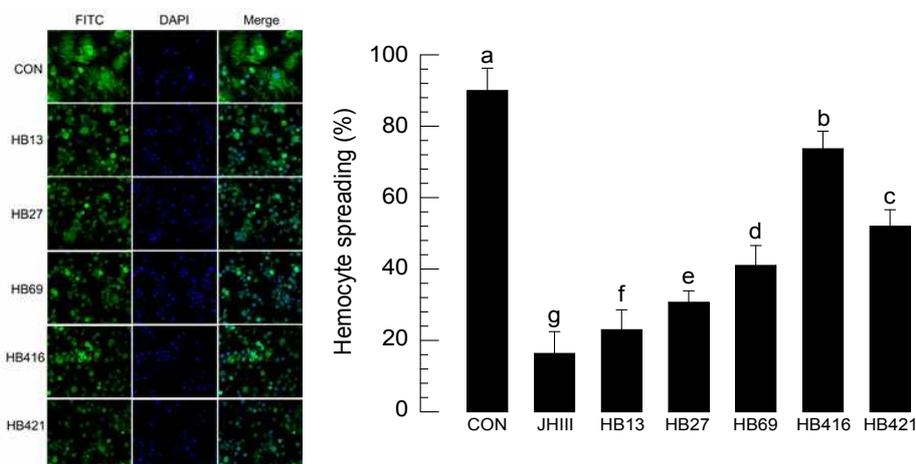


Fig. 1. Phurealipid derivatives

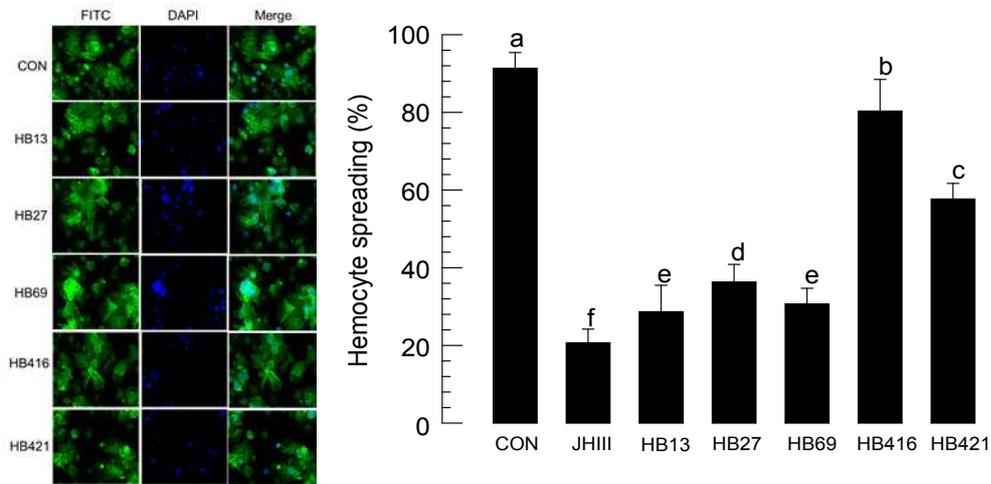
유약호르몬의 세포성 면역억제와 Phurealipid 동일한 생물활성

유약호르몬은 파밤나방 혈구세포의 활착활동을 억제한다(Kim et al., 2010). 이러한 유약호르몬의 활성이 Phurealipid 유도체에서 일어나는 지 분석되었다(Fig. 2). 5종류의 phurealipids 모두는 혈구세포의 활착행동을 억제하였다. 이러한 혈구행동 억제능력은 농도가 높아질수록 높아지는 양독반응을 나타냈다. 이들 phurealipid의 구조적 차이를 보면 말단에 메틸기의 존재 유무로서 이 메틸기를 가진 HB13, HB27 그리고 HB69가 억제활성이 높았다. 특히 HB13의 억제효과가 가장 높았는데, 이는 포화탄화수소의 길이가 가장 긴 12개 탄소를 지녔다.

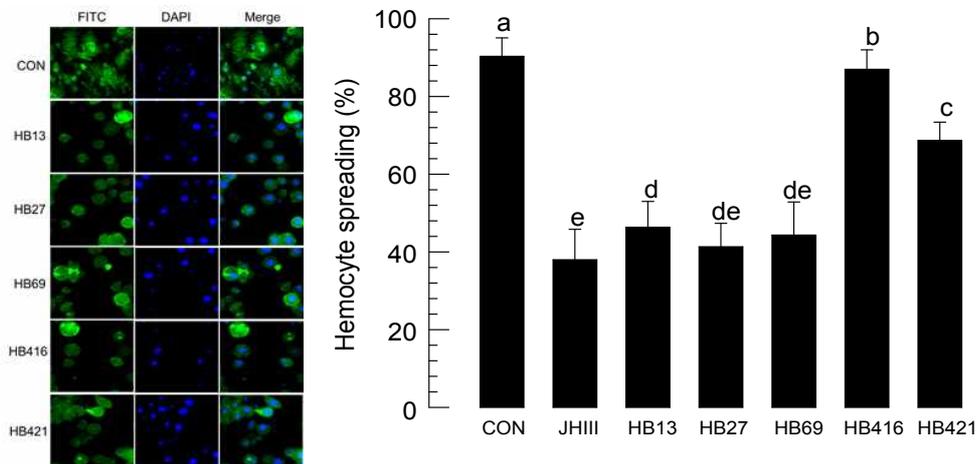
(A)



(B)



(C)



(D)

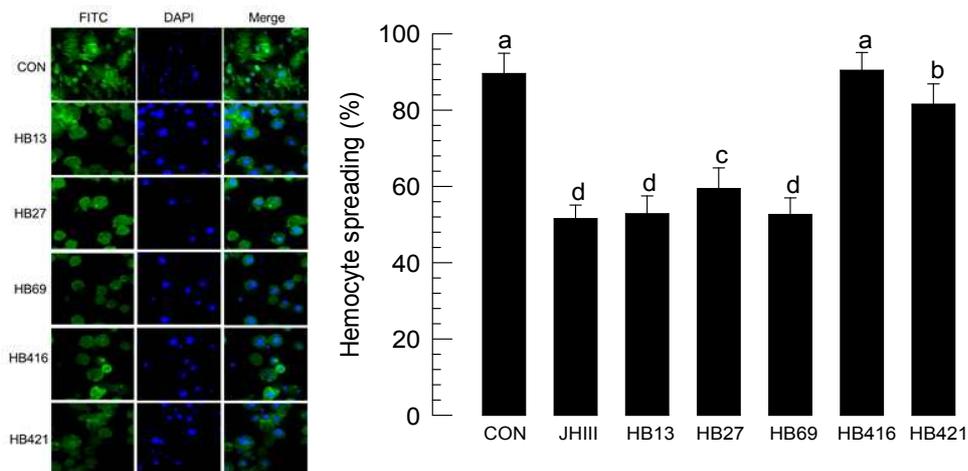


Fig. 2. Inhibitory activity of JH and phurealipids against hemocyte-spreading behavior of *S. exigua*. (A) 1,000 ppm (B) 500 ppm (C) 250 ppm (D) 125 ppm

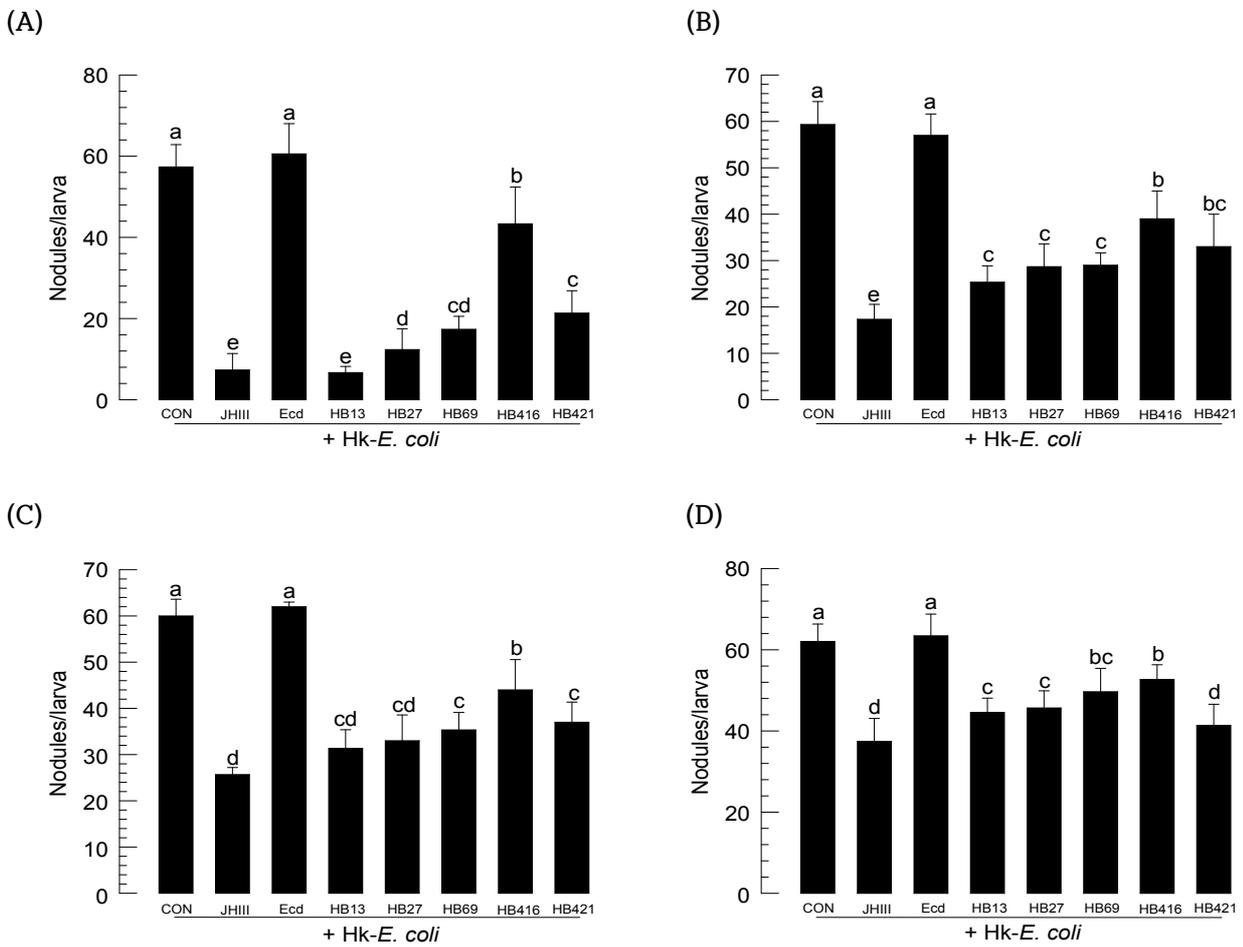


Fig. 3. Inhibitory activity of JH and phurealipids against hemocyte nodulation of *S. exigua*. (A) 1,000 ppm (B) 500 ppm (C) 250 ppm (D) 125 ppm

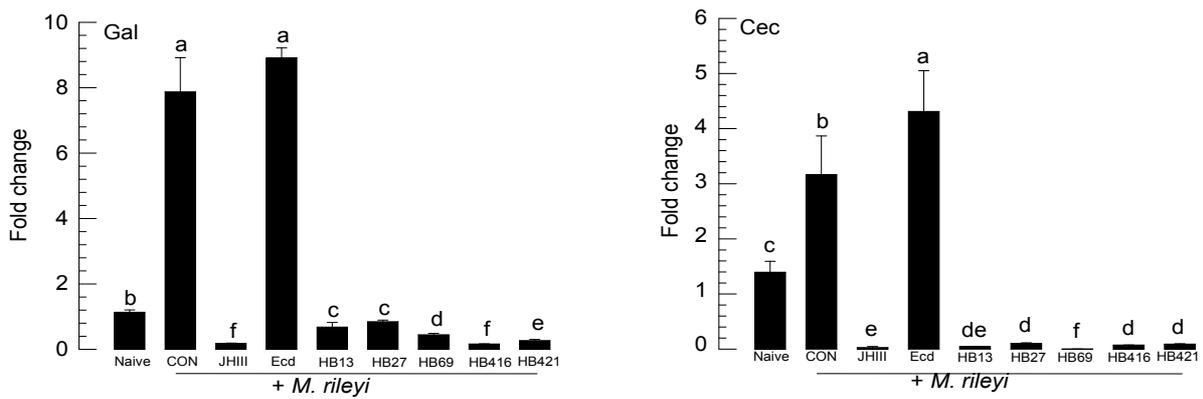


Fig. 4. Inhibitory activity of JH and phurealipids against AMP expression of *S. exigua* at 1,000 ppm

제5절 곤충병원세균 대사체 생리 기능 연구(Ⅲ) - 파 검은무늬병 방제효과

대파 병원균 분리 및 배양

경상북도 안동시 용상동 대파 경작지에서 병반 주위가 회갈색으로 변하는 병징을 관찰하였다. 대파의 병징이 나타난 부분의 일부를 PDA 배지에 배양하여 병원균을 분리하였다(Fig. 1a). 순수분리한 병원균을 동정하기 위하여 형태학적 동정과 분자생물학적 동정을 실시하였다. 형태학적 동정을 위하여 25°C 배양 온도에서 PDA 배지를 통해 배양한 병원균을 4°C에서 48시간 동안 방치한 후 분생포자를 형성하게 하였다. 그 결과 *Alternaria* 속의 포자 형태로 흔히 알려진 종격벽과 횡격벽을 가지는 수류탄 모양의 분생포자를 관찰할 수 있었다(Fig. 1b).

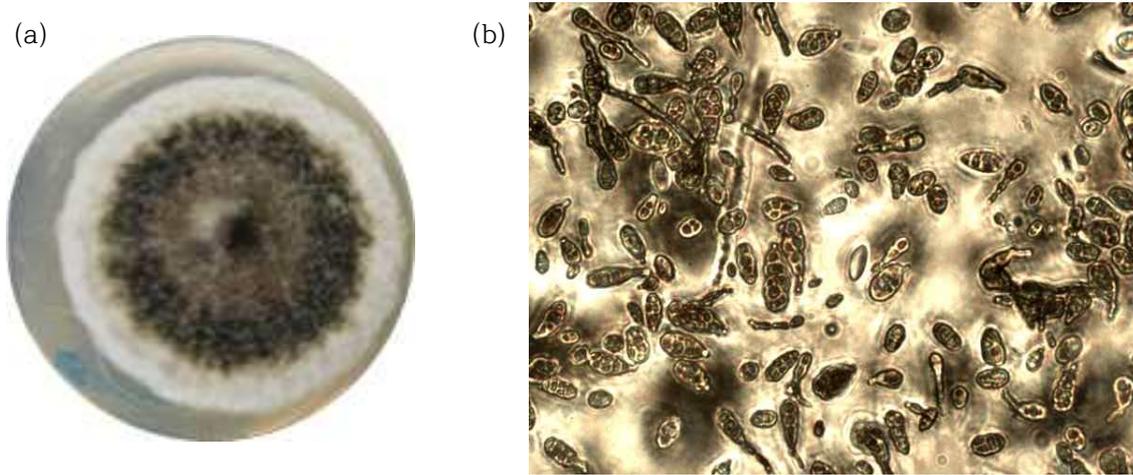


Fig. 1. A fungal disease on Welsh onion cultivating in Andong. (a) A fungal pathogen isolated from the infected onion tissue. (b) Conidiospores classified in *Alternaria*.

분자생물학적 동정을 위해서 병원균의 DNA를 추출하여 ITS 프라이머를 이용하여 염기서열을 분석한 결과 (Fig. 2a) *Alternaria alternata* 로 동정되었다(Fig. 2b). 이 서열은 GenBank OL468587 번호로 등록되었다.

(A)

```
GATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAAAGTTGAAAAAAGGCTTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAG
TGCGACTTGTGCTGCGCTCCGAAACAGTAGGCCGGCTGCCAATTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGCCCAACAC
CAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCA
CTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATTATT
AATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTTGTCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCCAAAAGA
CAAGGGTGAATAATTCAGCAAGGCTGAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATGATCCCTCC
```

(B)

Description	Max score	Total score	E value	Per. ident
<i>Alternaria alternata</i> voucher AUMC 15264	998	998	0.0	100.00%
<i>Alternaria alternata</i> FC-7054	998	998	0.0	100.00%
<i>Alternaria alternata</i> isolate CO1	998	998	0.0	100.00%
<i>Alternaria alternata</i> isolate PBR-Aa2	998	998	0.0	100.00%
<i>Alternaria alternata</i> isolate MBPER0018	998	998	0.0	100.00%

Fig. 2. ITS sequence analysis of a fungal isolate of *Alternaria* from Welsh onion. (A) ITS sequence (B) Blast search

포장별 파 검은무늬병 발병률 조사

겨울철 (11월 16일) 경상북도 안동시의 대파 포장 3곳에서 파 검은무늬병이 얼마나 발병하는지에 유관 조사하였다. 그 결과 노지 조건인 Field 1에서는 발병한 개체를 찾아보지 못했지만, 시설재배지인 36.9% (Field 2) 그리고 38.4% (Field 3)의 발병률을 기록하였다(Fig. 3).

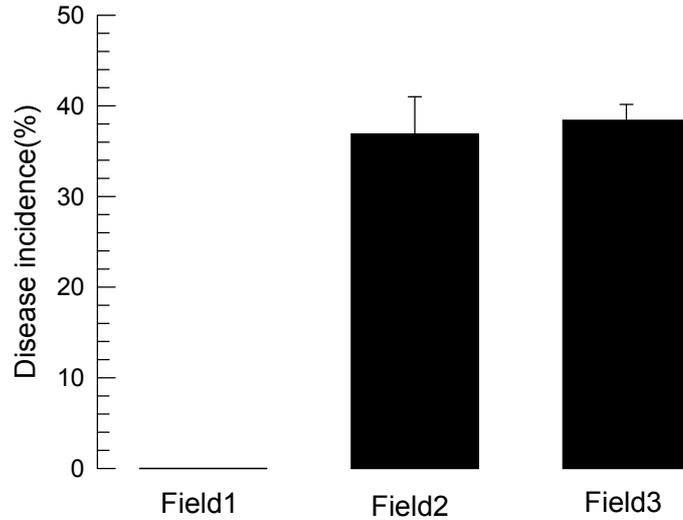


Fig. 3. Field monitoring of the disease symptoms in three different Welsh onion fields in winter season at Nov 16, 2021 in Andong. Field 1 cultivated the opions in open field conditions. Fields 2 and 3 cultivated the onions in greenhouses.

대파 병원균 병원성 검증

순수분리하여 동정한 병원균을 1.56×10^4 농도의 포자현탁액을 만들어 1% NaOCl을 이용하여 표면살균한 대파에 10 μ l 씩 분주한 후 습실처리하였다. 2일 간격으로 병징을 관찰한 결과 5일차부터 병징이 관찰되었다 (Fig. 4). 즉, 이 결과는 분리된 균이 대파에 병원성이 있다는 것을 의미하였다. 병징이 나타난 부위의 포자를 다시 관찰한 결과 접종한 병원균의 포자와 동일한 포자라는 것을 확인하였다.

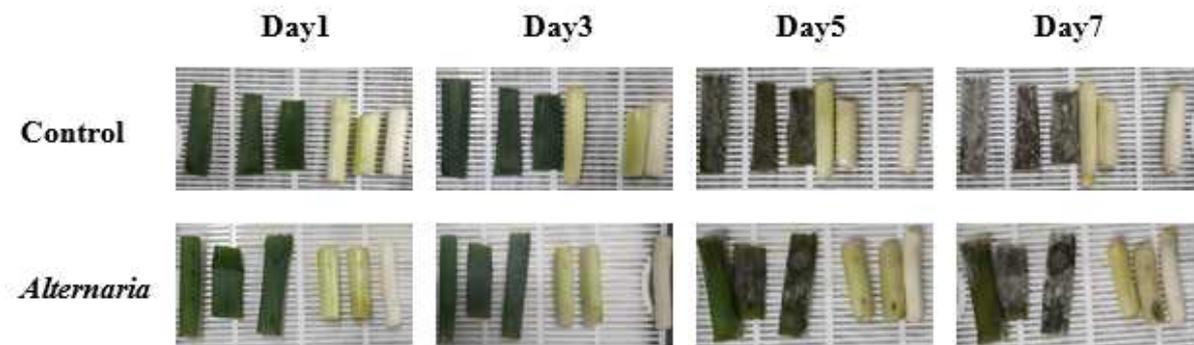
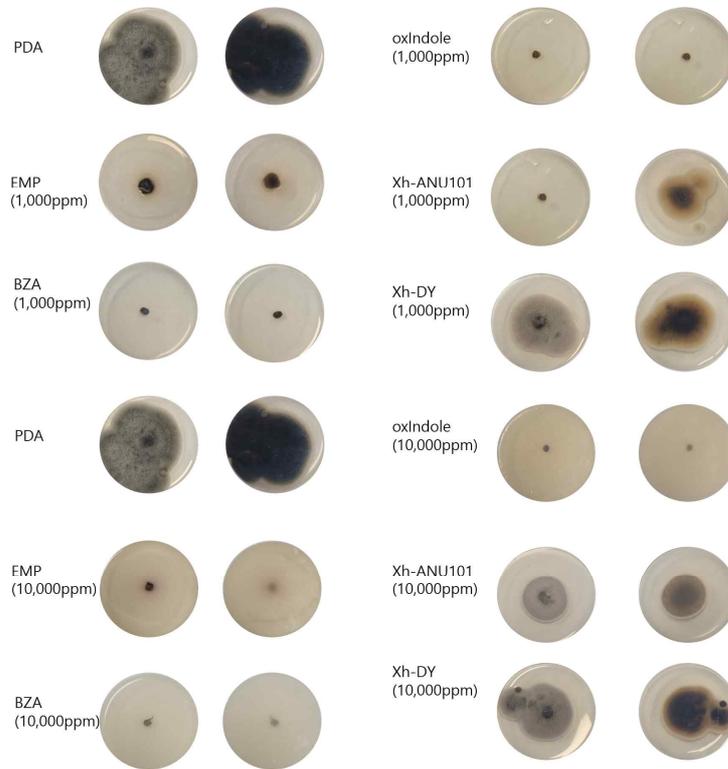


Fig. 4. Disease symptom on Welsh onion by inoculating the isolated conidiospores

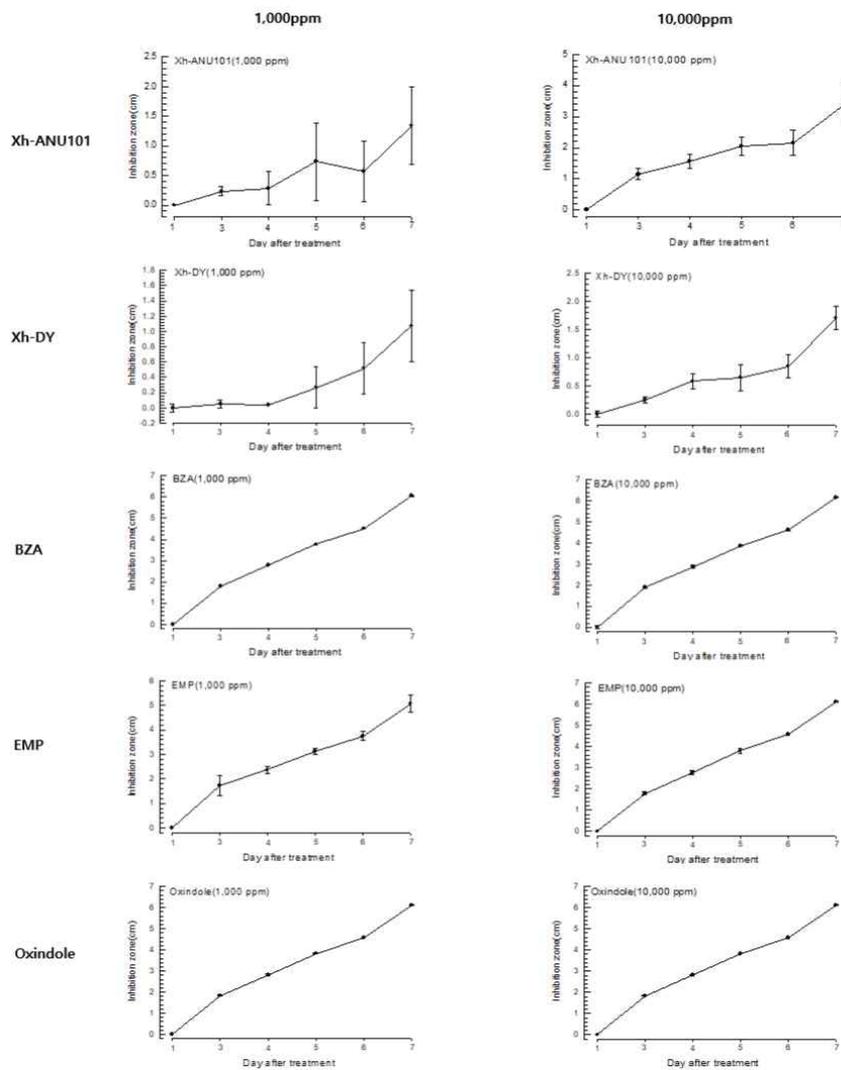
곤충병원세균 대사체의 대파검은무늬병 방제효과 검증실험

곤충병원성세균의 일종인 *Xenorhabdus hominikii* ANU101와 *Xenorhabdus hominikii* DY의 세균 배양액과 이들의 대사체 화합물인 Oxindole, EMP, BZA이 파 검은무늬병 방제에 효과가 있는 지 확인하였다. 물질을 PDA 배지에 첨가하여 페트리디쉬에 동일하게 각각 20 mL씩 분주한 후 각 배지에 병원균을 올려 배양하였다(Fig. 5A). 하루 간격으로 병원균의 지름을 측정하여 대조군 대비 실험군의 억제능력을 측정하였다(Fig. 5B). 이를 토대로 방제가를 계산하였다(Fig. 5C).

(A)



(B)



(C)

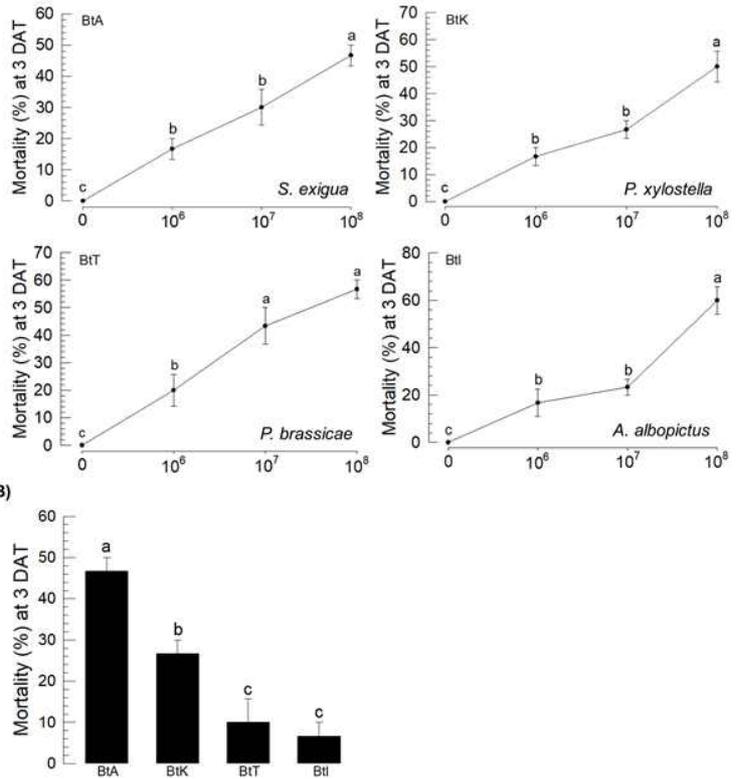
Chemical	Dose (ppm)	Inhibition Zone (cm)				Control value (%)
		Rep I	Rep II	REP III	Average	
Xh-ANU101	1,000	0.74	2.04	1.24	1.34	19.88
	10,000	3.94	3.54	2.74	3.40	50.54
Xh-DY	1,000	0.54	1.44	1.24	1.07	15.92
	10,000	1.54	1.64	1.94	1.70	25.32
BZA	1,000	6.09	6.04	6.04	6.05	89.86
	10,000	6.19	6.14	6.14	6.15	91.34
EMP	1,000	4.74	5.44	5.04	5.07	75.27
	10,000	6.14	6.09	6.14	6.12	90.85
oxIndole	1,000	6.14	6.09	6.14	6.12	90.85
	10,000	6.24	6.04	6.14	6.14	91.09

Fig. 5. Control efficacy test of secondary metabolites of *Xenorhabdus hominickii* against *Alternaria alternata* on PDA culture assay. (A) Fungal growth at 7 days after inoculation along with 1,000 ppm and 10,000 ppm. Photos were obtained in front and back sides of the Petri dish. (B) Daily measurements of the fungal growth. (C) Control efficacy based on the growth inhibition.

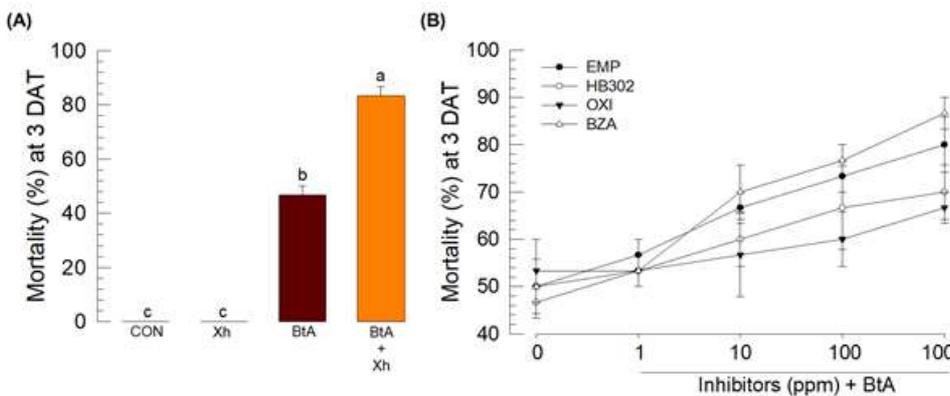
세균들의 배양액은 검은무늬병 방제 효과를 나타냈다. 특히 ANU101은 DY 균주에 비해 높은 방제력을 가지고 있어 10,000 ppm에서 50% 이상의 방제효과를 보였다(Fig. 5C). 이들 배양액에 존재할 것으로 추정되는 3 가지 물질 가운데 oxindole과 BZA가 1,000 ppm의 농도에서도 90% 가량의 방제력을 주어 이들 물질을 이용한 효과적인 식물병 방제 효과를 기대할 수 있다. 또한 향후 ANU101 배양액을 혼합한 IBC 살충제가 개발되면, 이 결과는 병 방제효과가 함께 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

제6절 파밤나방 IBC 방제 기술(I) - Bt 선발과 Xh 혼합효과

Bacillus thuringiensis (Bt)는 효과적으로 대 상 해충을 치사시키는 곤충병원세균이다. 그러나 화학 약제에 비해 살충력이 낮고 느리기 때문에 농민으로부터 사용빈도가 줄어들고 있다. 이를 보완하기 위해 개발된 개념이 종합 생물방제(IBC: Integrated Biological Control)로서 작용점이 다른 두 가지 이상의 미생물제제를 혼합하여 화학농약과 같은 높은 방제력을 보이는 미생물약제를 개발하는 데 목표를 갖는다. 본 연구에서는 *Xenorhabdus hominickii*라는 곤충병원세균을 이용하여 이 세균이 생산하여 분비하는 다양한 이차대사산 물을 포함한 세균 배양액을 Bt와 혼합하여 새 (A) 로운 방제제를 개발하는 기술이다. 4 가지 상 이한 Bt 균주 가운데 파밤나방에 대해서 선택 적으로 높은 살충력을 보인 균주가 BtA였다. 그러나 초기(3일 이내) 살충력이 50%에 그쳐 현장에서 방제효과를 발휘하기에는 부족하였 다.



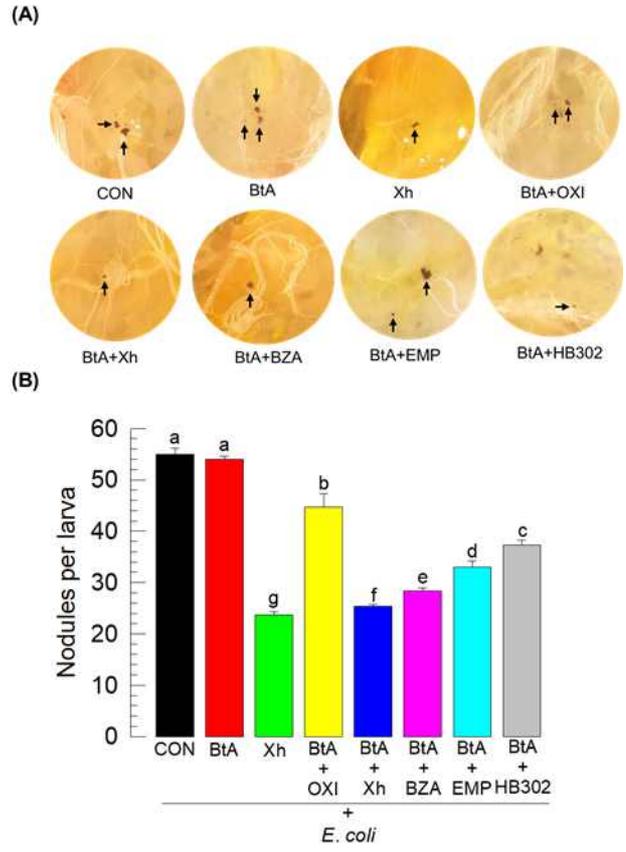
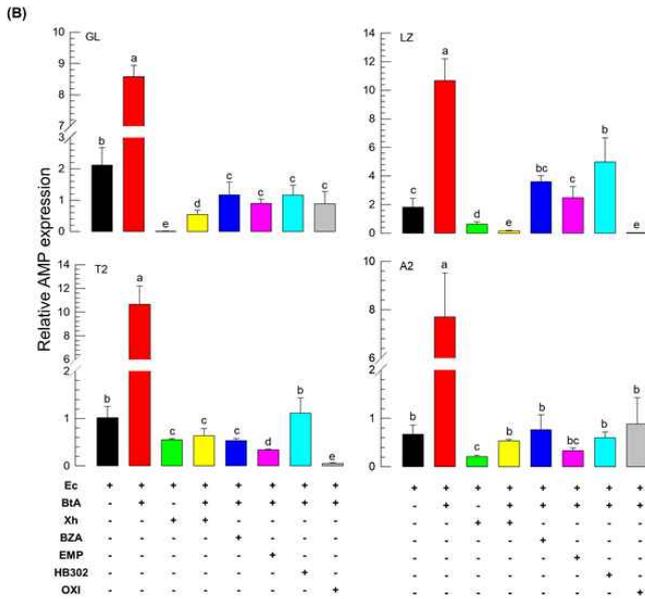
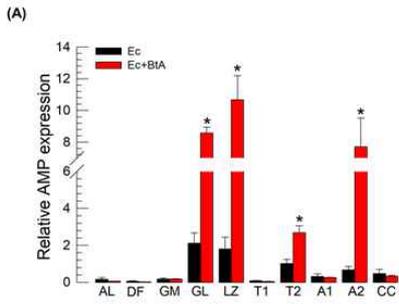
이를 보완하고자 BtA 균주에 Xh 배양액을 첨가하면 살충력 거의 2배 증가하게 된다. 이러한 살충력 증가가 이 배양액에 있는 이차대사산물인지를 알아보기 위해 이 세균류가 분비하는 물질 4종을 대상으로 BtA에 대한 살충력 상승효과를 분석한 결과 유사한 살충력 증가 효과를 나타냈다.



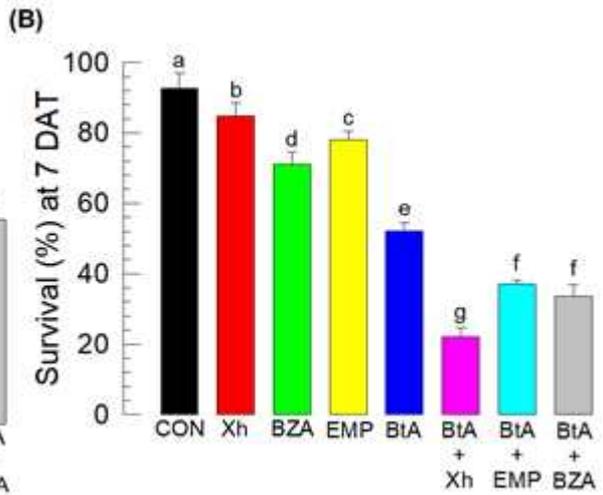
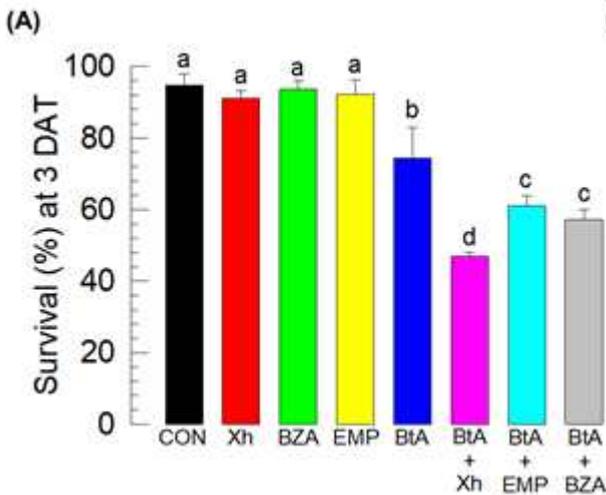
이러한 살충력 증가가 이들 물질이 갖는 대상 곤충에 대한 면역력 감소에 의해 기인되었는지를 분석하기 위해 이 물질 첨가에 따른 곤충의 면역반응 변화를 추적하였다. 대장균을 이용한 세균 처리에 대해 파밤나방은 10가지 항생단백질을 발현하였다. Bt에

미리 처리된 곤충에 대장균을 주입한 결과 특히 4 가지 항생단백질의 발현이 더욱 크게 증가하였다. 이들은 gloverin, lysozyme, attacin-2, 그리고 transferrin-2이다. 이들 항생단백질을 대상으로 Bt 처리에 Xh 배양액 및 이차대사산물을 추가한 결과 이들 항생단백질의 발현이 크게 줄었다. 즉, Bt에 대해서 민감하게 반응하는 항생단백질의 발현을 Xh 배양액 또는 여기에 포함된 이차대사산물이 발현을 억제한 것으로 해석된다.

혈구세포의 소낭형성으로 세포성 면역을 분석하였다. 이때 대조구에 비해 처리구에서는 현격하게 낮은 소낭 형성 능력을 보였다. 물질별로 보면 benzylideneacetone과 EMP의 효과가 가장 높았으며, oxindole의 효과가 가장 낮았다. 이들 물질의 효과는 모두 Xh 배양액이 갖는 억제력 보다 낮았다. 이러한 결과는 Xh 배양액에 있는 대사물질이 곤충의 면역을 낮추고 이러한 환경에서 Bt는 자신의 병원력을 크게 높여 높은 살충력을 초래했을 것으로 사료된다.

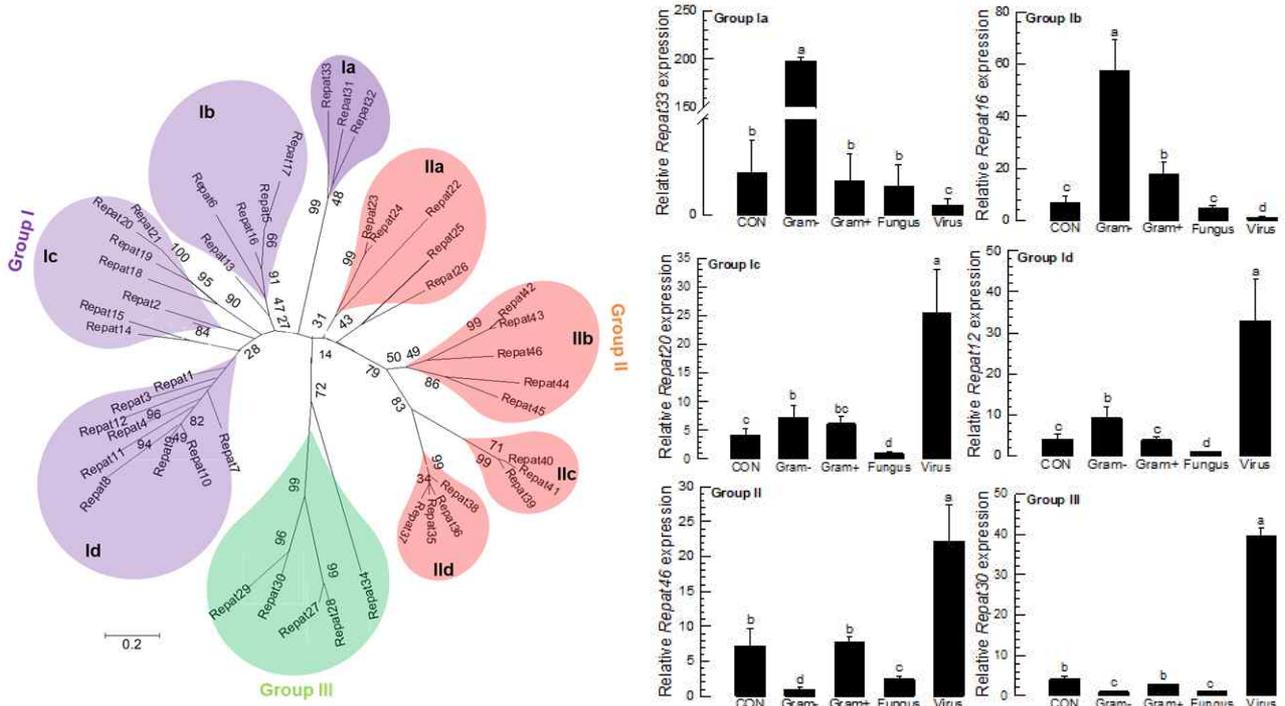


이상의 결과를 토대로 시설재배지에서 재배되는 대파에 발생한 파밤나방에 처리하였다. 이 결과 혼합 처리의 효과가 가장 높았으며, 이차대사물질과 혼합하면 benzylideneacetone 또는 EMP의 혼합 효과가 가장 높았다.

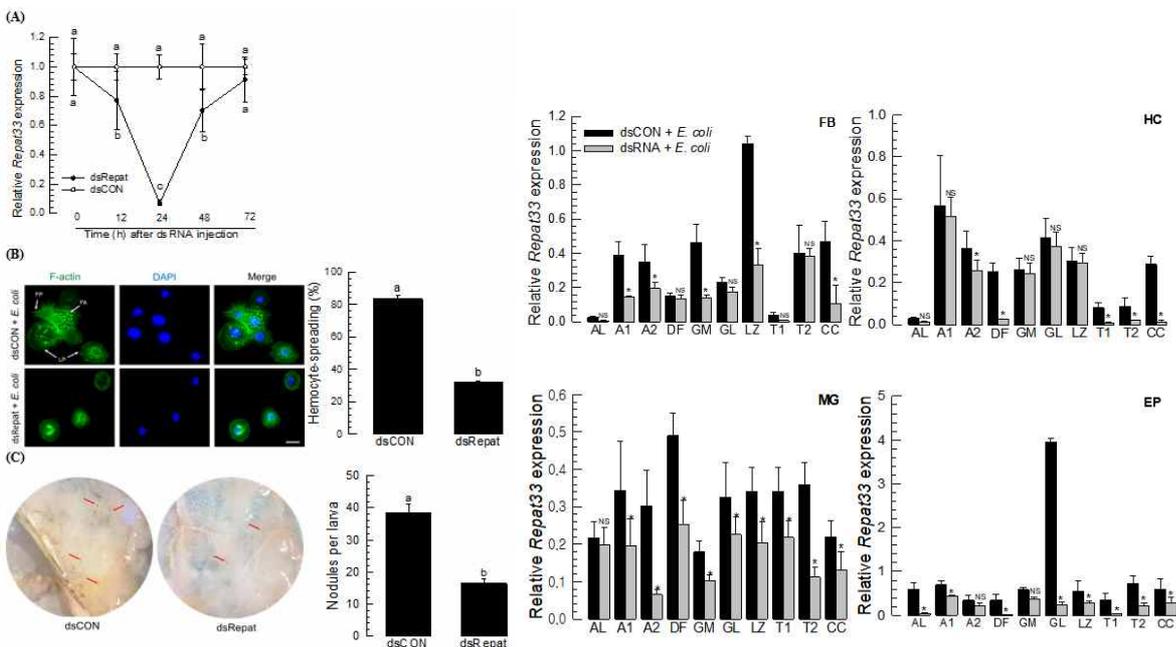


제7절 파밤나방 IBC 방제기술(II) - 아이코사노이드 하위신호로서 Repat33

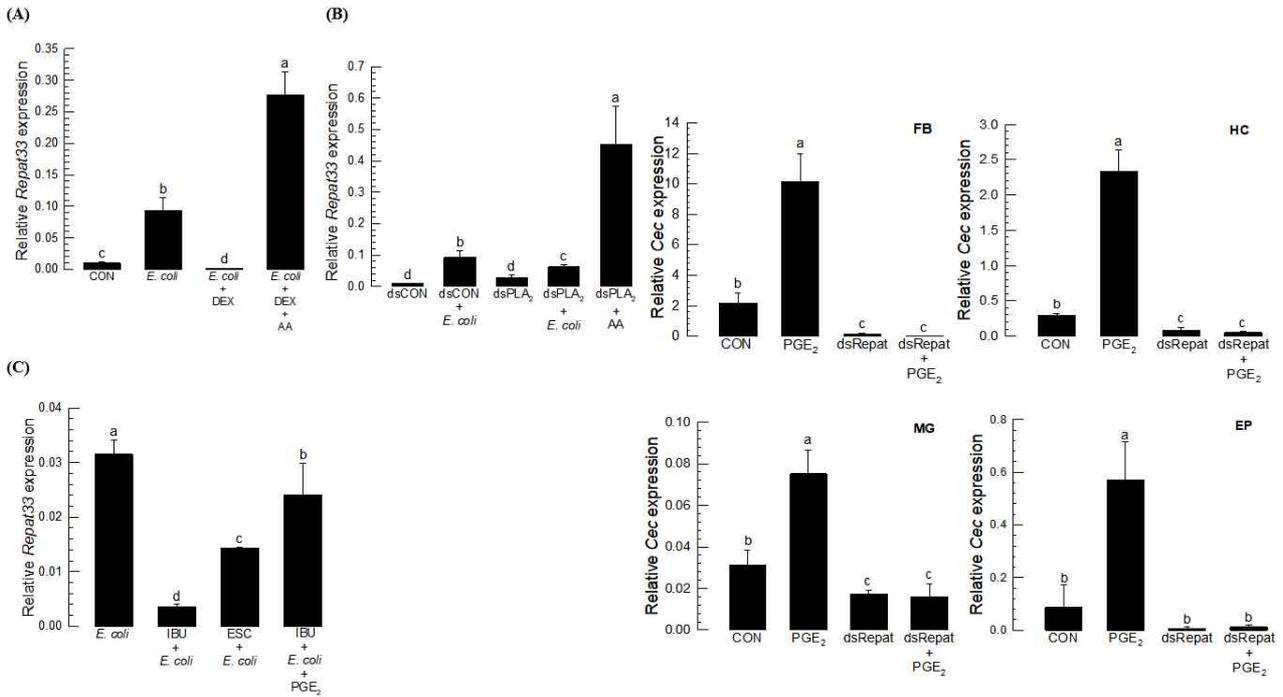
병원체 감염에 반응하는 단백질로서 Repat (response to pathogen)은 파밤나방에 46 개 유전자(Repat1 - Repat46)가 존재한다. 이를 다음의 분자계통수를 이용하여 3 개 그룹으로 분류하였다. 본 연구에서 대상으로 하는 Repat33는 제1그룹에 속하며 이 가운데 4 개의 소그룹 가운데 a 소그룹에 속하였다. 이들 Repat 유전자들은 서로 다른 병원체에 대해서 상이하게 발현 패턴을 보였다. Repat33는 주로 그람음성균에 민감하게 반응하였다.



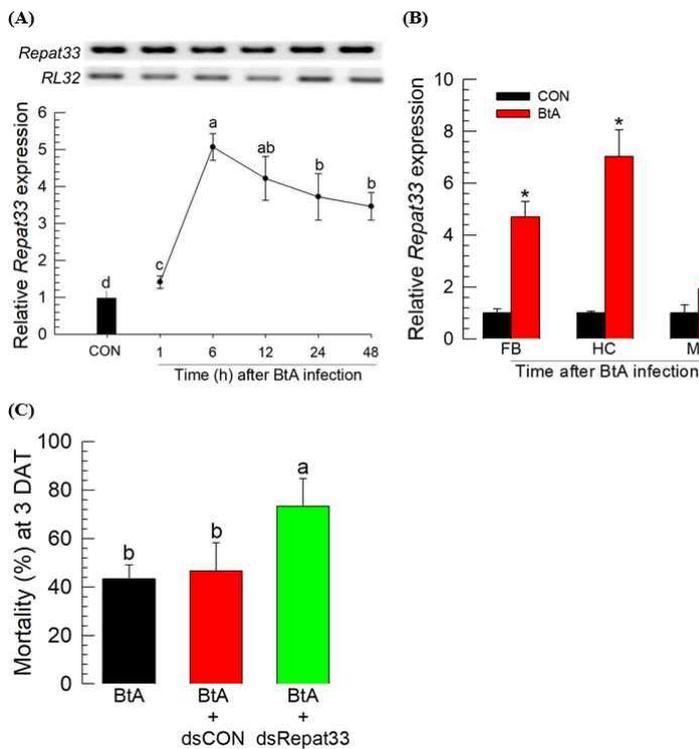
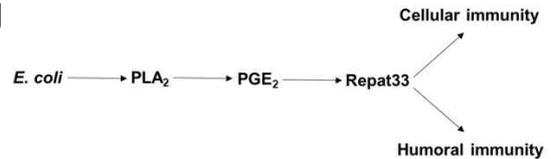
Repat33 유전자 발현을 RNAi 처리에 의해 억제하였다. 이 유전자 발현이 억제되는 경우 혈구세포의 활착이 줄어들고 이에 따라 세균 감염에 따른 혈구 소낭형성이 크게 줄어 세포성 면역반응을 억제한 것으로 해석된다. 이러한 면역억제 효과는 항생단백질 유전자의 발현도 억제하여 체액성 면역에도 Repat33가 관여하는 것으로 나타났다.



여기서 궁금한 사항이 Repat33에 의한 면역조절과 아이코사노이드의 기능적 관계성이다. 이를 증명하기 위해 이들의 신호전달 전후 관계를 분석하였다. 아이코사노이드 억제자인 Ibuprofen 또는 Esculetin을 처리하면 Repat33의 발현이 줄고 다시 PGE2를 첨가하면 발현량이 증가하였다. 이러한 경향은 세포성 및 체액성 면역 반응에서도 나타났다.

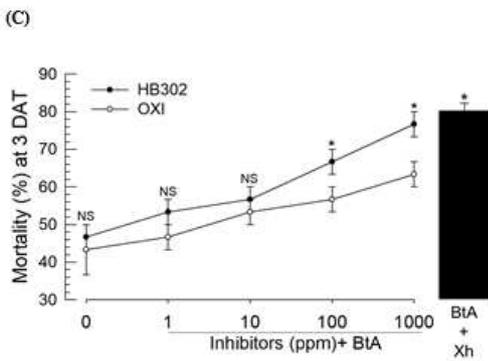
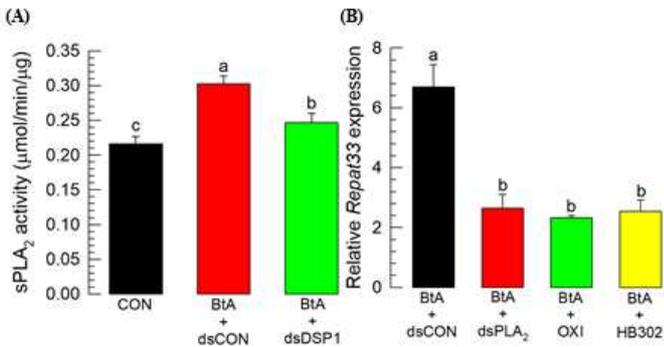
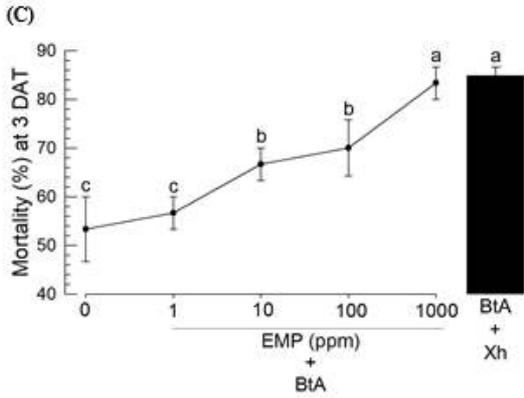
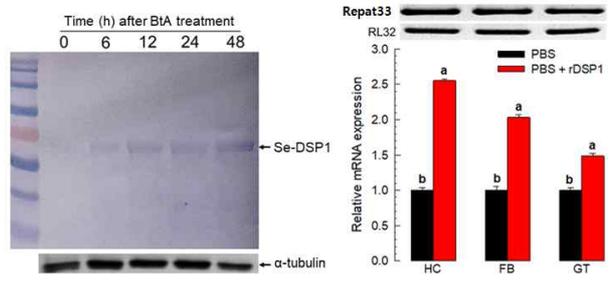
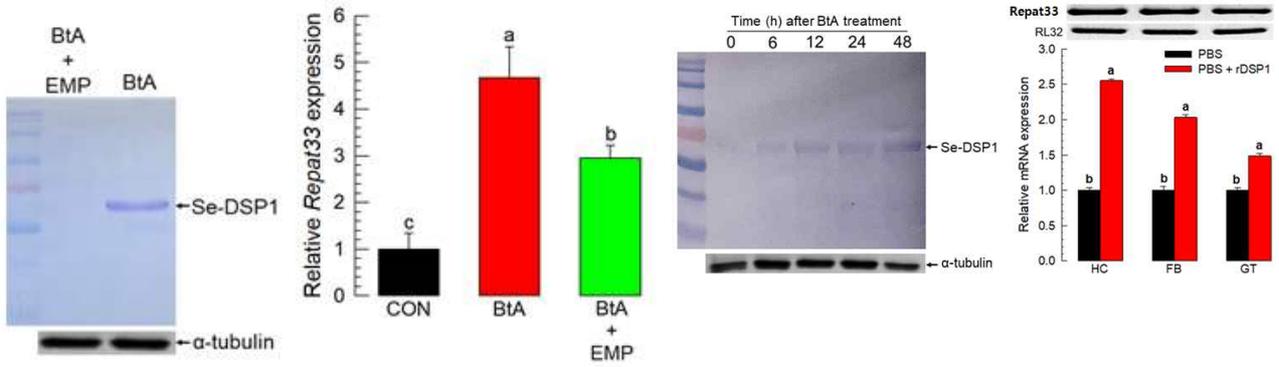


즉, Repat33는 아이코사노이드에 의해 발현이 조절되는 하위 단계의 조절자로 판명되었다.

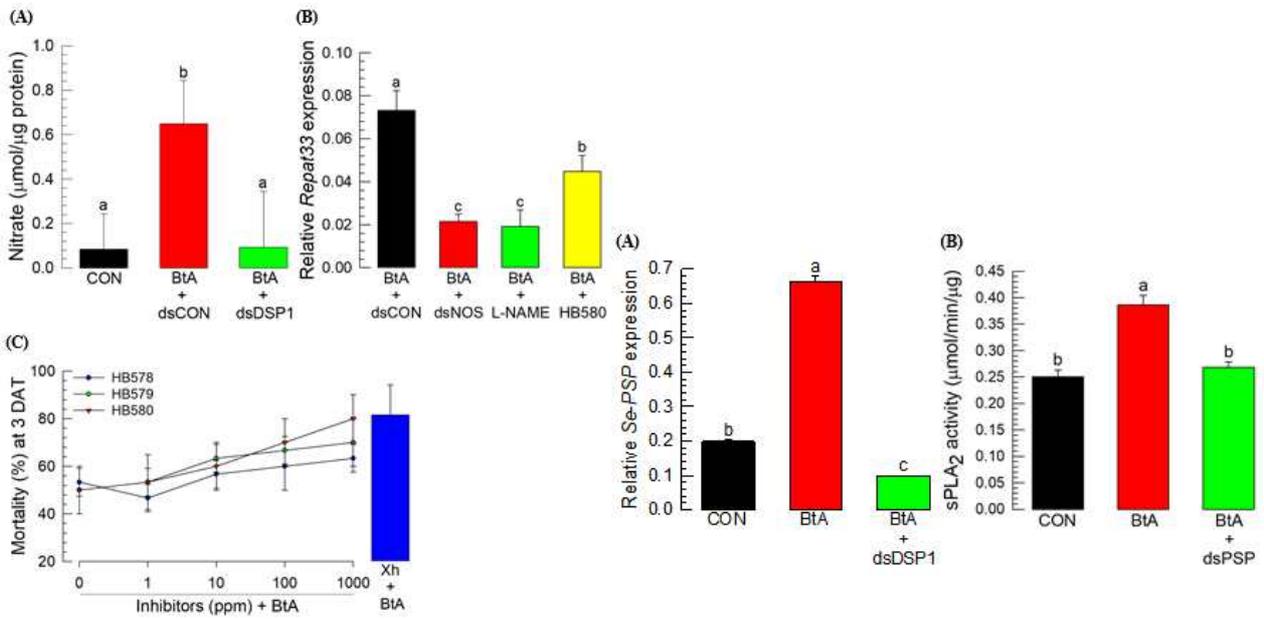


아이코사노이드에 대한 Repat33의 하위 신호는 아이코사노이드 이전 단계의 면역신호전달과정에 대한 궁금증을 갖게 하였다. 특히 본 과제에서 진행하는 Bt 약제에 대한 곤충의 면역신호가 어떻게 진행되는 지에 대한 근본적 궁금증을 갖게 하였다. 이를 증명하기 위해 중장에서 Bt의 침입 이후 일어나는 신호전달과정을 분석하였다. 최근에 알려진 소화관 면역의 신호는 DSP1 (dorsal switch protein 1)에서 비롯된다는 것을 알게 되었다. 이 DSP1과 Bt 처리와의 관계를 다음에서 본다. 먼저 Bt 처리는 Repat33의 발현을 증가시켰고, 이 유전자의 발현은 Bt에 대한 방어기작에 필수적이었다.

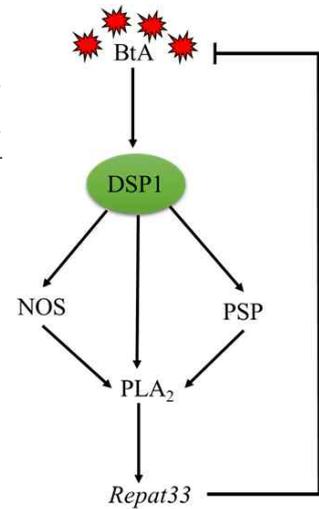
한편 Bt 처리 이후 혈림프 안에서는 DSP1의 함량이 증가하였다. 이 DSP1은 Repat33의 발현을 증가시켰다. 이는 Bt에 의해 손상된 중장세포에서 DSP1이 빠져나와 중장을 포함한 다른 조직에서 Repat33의 발현을 증가시킨 것으로 해석된다. 이를 증명하기 위해 DSP1에 특이적 억제자인 EMP를 처리한 경우 DSP1의 방출을 억제하면서 DSP1이 Repat33의 발현 촉진을 막아 궁극적으로 Bt의 병원력을 증가시켰다.



혈림프로 방출된 DSP1은 sPLA₂의 활성을 촉진시켜 Repat33의 발현을 촉진한 것으로 여겨진다. 따라서 아이코사노이드 생합성 억제자들은 모두 Repat33의 발현을 억제하였다.

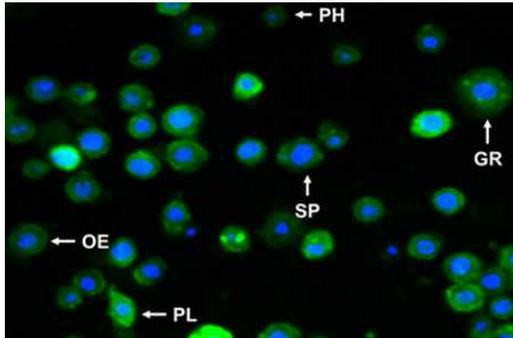


DSP1은 또한 NO synthase (NOS)의 발현을 증가시켜 NO 수준을 증가시켰고, PSP의 발현을 증가시켰다. 이상의 결과를 종합하면 Bt 감염에 따라 감염신호인 DSP1이 혈림프로 방출되고, 이는 PLA₂ 활성을 증가시키고 또한 NOS와 PSP 발현을 촉진시켜 궁극적으로 Repat33의 발현 증가로 이어졌다. 이 Repat33가 다시 하위 면역 관련 유전자의 발현 또는 기능을 촉진시켜 Bt에 대한 방어기작을 발휘한 것으로 해석된다.



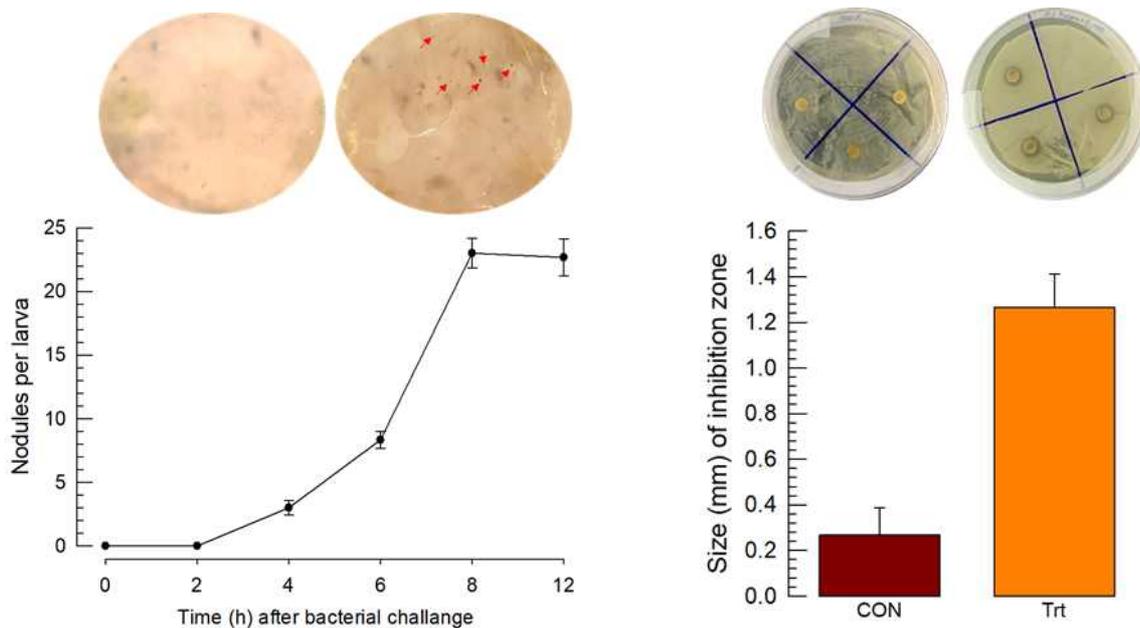
제8절 파좀나방 면역생리

파좀나방에 대한 IBC 기술을 개발하기 위해서는 이 곤충의 면역 기작에 대해서 먼저 분석할 필요가 있었다. 우선 이 곤충의 혈구 세포를 조사하였다. 원시혈구, 부정형혈구, 과립혈구, 소구형혈구, 편도혈구가 관찰되었다. 이들의 상대빈도를 보면, 과립혈구가 가장 많은 수를 차지하고, 부정형혈구가 다음으로 많은 혈구 종류였다. 특별히 편도혈구의 빈도가 다른 나비목 곤충에 비해 2배 이상 높아 보였다. 전체 혈구수는 mL 당 230만 개로 다른 곤충과 유사한 밀도를 보였다.



Insect	Hemocytes	DHC (%)	THC (cells/ml)
<i>A. sapporensis</i>	GR	47.1±1.09	2.3×10 ⁶
	PL	26.8±1.21	
	OE	11.1±0.59	
	PH	8.8±0.60	
	SP	5.23±0.23	
	Total		

이들 혈구세포가 보이는 세포성 면역반응 가운데 하나인 소낭형성이 파좀나방에서도 관찰되었다. 대장균을 10⁴ 마리 밀도로 혈강에 주입한 후 시간에 따라 소낭의 수는 증가하였고, 주입 후 8시간 이후가 지나면 최대 밀도인 마리당 23개의 소낭수를 기록하였다. 반면에 체액성 면역을 관찰하기 위해 Inhibition zone assay를 진행하였다. 세균 감염 중에서는 대장균의 성장을 억제하는 항생물질이 존재하였다.



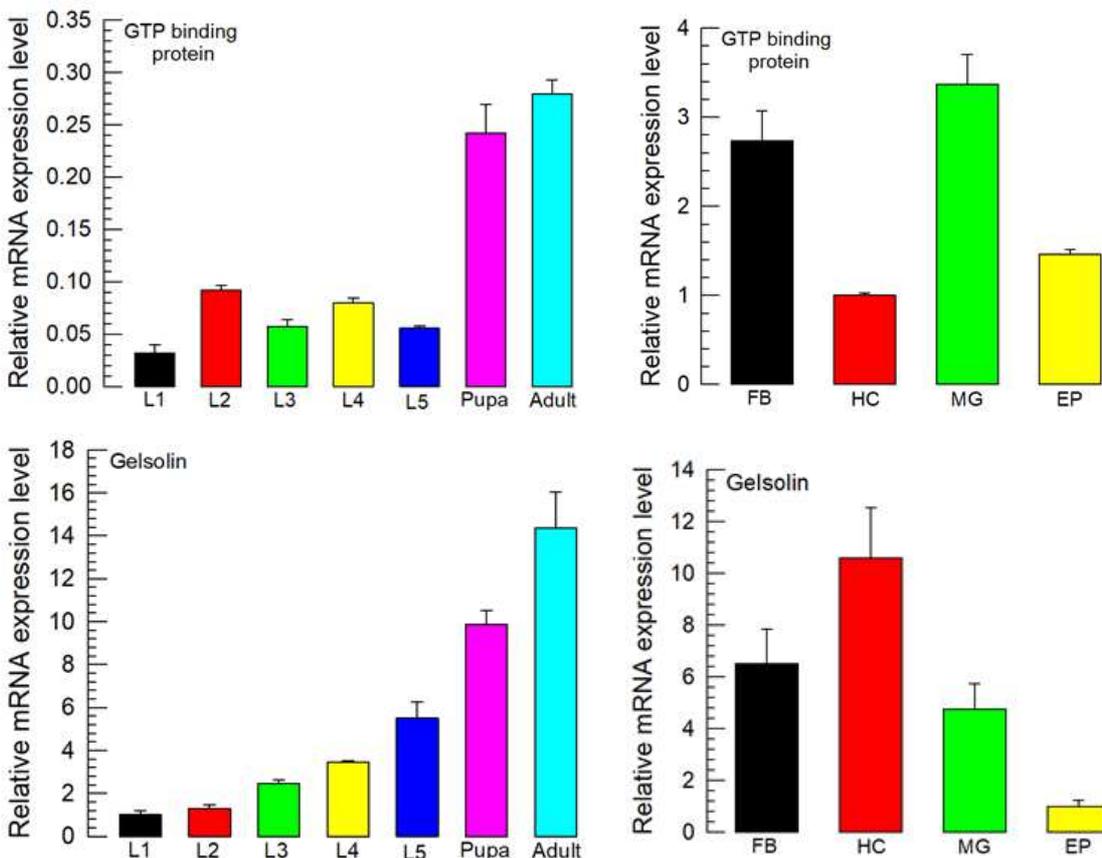
이러한 면역반응을 유전자 발현 수준에서 찾아 보기 위해 항생단백질의 유전자 클로닝이 ApoLpIII를 대상으로 진행되었다. 이 유전자의 부분 사열을 가지고 있으면 3'RACE와 5'RACE를 통해 전장 서열을 얻으려 한다.

ATGGTCCGCCGGGAGGCGCCCGCCCGTCTAGCGAGCTACAGGAGATAGAGAAGAACCTGAAGGAGATCTCTACGAGCTTACTCCCCAGTGCAAGAGCATCGCCGACTCCAAGAACACCAAGGACGTGGAGAAGGCGATCAAGGA

AGGCAGTGATTTCGATCTTCCAGCAGCTCAACAAGCTCTCCAGCTCCTGGAGGAAGCGAACGGCAAGGCTAAGG
 AGGTGCTGGAGACATCGCGCGCTCAGATCCAGCGCACCGCCGAGGAGCTGCGCAAGAACCACCCCGCCGTAGA
 GAAGAAGGCCGCCGAGCCTCGCCAAGGAGATCTCCACCAACGTGAGCAGACCAACCAGAAGCTCGCGCCCAA
 GATCAAGGAGGCCTACGAACACTTGGTCAAGACCGCTCAGGAGGTCAGCAGAAGATCCCCGAGGCTGCCAAC
 ACCCAGT

✓	PREDICTED: <i>Plutella xylostella</i> acolicochorin-3-like (LOC119633854), transcript variant X2, mRNA <i>Plutella xylostella</i>		143	143	98%	1e-29	64.76%	739	XM_038118676.1
✓	PREDICTED: <i>Plutella xylostella</i> acolicochorin-3-like (LOC119633854), transcript variant X1, mRNA <i>Plutella xylostella</i>		143	143	98%	1e-29	64.76%	1212	XM_038118675.1
✓	Sesia aciformis genome assembly, chromosome_21	Sesia aciformis	137	222	53%	2e-27	81.88%	15623285	OL611960.1
✓	Plutella xylostella strain Adono KB acolicochorin-III mRNA, partial cds	Plutella xylostella	136	136	100%	2e-27	64.59%	513	HM589211.1
✓	Lycena phlaeas genome assembly, chromosome_6	Lycena phlaeas	133	223	56%	2e-26	81.62%	19663286	HG995169.1
✓	Phaera bucephala genome assembly, chromosome_20	Phaera bucephala	125	343	53%	3e-24	79.17%	26052215	LR990629.1

이 이외에 GenBank에 수록된 파좀나방의 유전자 서열 가운데 번역과 관련이 있는 두 유전자를 찾아 이들의 발현을 파좀나방에서 분석하였다. 특히 세포골격 조절에 관여할 것으로 추정되는 Gelsolin의 경우는 혈구세포에서 발현량이 많았다. 반면 다양한 세포 신호에 관여할 것으로 보이는 GTP binding protein은 중장과 지방체에서 발현이 높았다.



이상의 결과는 파좀나방이 세포성 및 체액성 면역반응을 모두 지니고 있다는 것을 보여 주고 있다. 또한 병원체 감염에 따라 유전자의 발현이 조절되는지가 현재 집중적으로 분석되고 있다. 향후 이 곤충의 면역에 대한 본질적 연구를 위해서는 전사체 분석이 필요하다. 이상의 세포성 및 체액성 면역 반응에 전사체의 발현 정도를 비교하면서 이 곤충의 면역에 대한 거시적 시각을 갖게 될 것이다.

제9절 파총채벌레 IBC 방제 기술(I) - Thelytokous 생리기작

춘파 재배지 파총채벌레 발생소장

안동지역의 봄철 대파재배는 3월에 파종하여 4월에 정식하게 된다. 7월에 성숙하여 8월에 거의 모두 수확하게 된다. 이를 기준으로 정식한 4월 20일을 기준으로 수확이 종료되는 8월 10일까지 파총채벌레의 발생 모니터링이 황색점착트랩을 이용하여 진행하였다(Fig. 1). 정식 직후 파총채벌레는 트랩에 포획되어 수확기에 이르기까지 지속적으로 발생하였다. 최대발생기는 6월에 나타났다. 세 개 지역의 재배환경은 차이가 있어 SC는 비가온 시설재배지, YS-1은 개방형 시설재배지, 그리고 YS-2는 노지 재배지였다. 가장 많은 포획 밀도는 노지 재배지에서 나타났고, 두 가지 시설재배지는 유사한 포획 밀도를 나타냈다.

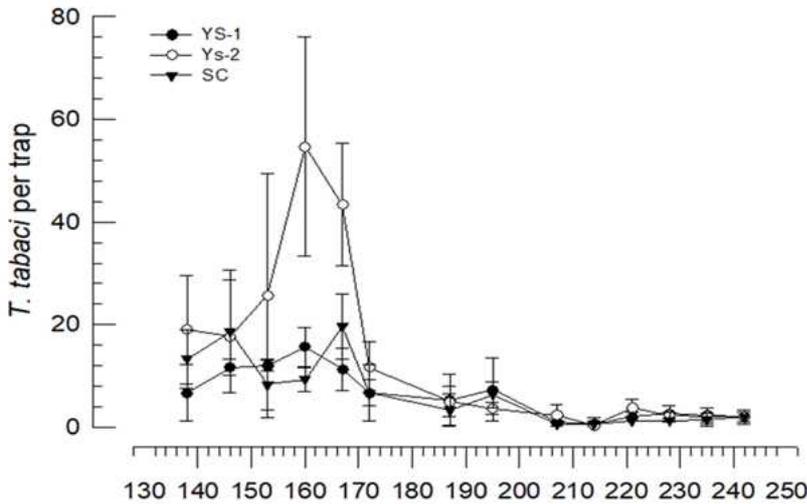


Fig. 1. Occurrence of onion thrips, *Thrips tabaci*, infesting welsh onion during spring cultivation (Apr ~ Aug) in 2021. Yellow sticky trap was used in this monitoring. Three places are separated by more than 1 Km.

야외 파총채벌레 집단은 모두 암컷

춘파 재배지에서 포획한 파총채벌레 성충은 모두 1079 개체였다. 이들은 전형적 산란관을 지닌 형태로 모두 암컷이었다(Fig. 2).

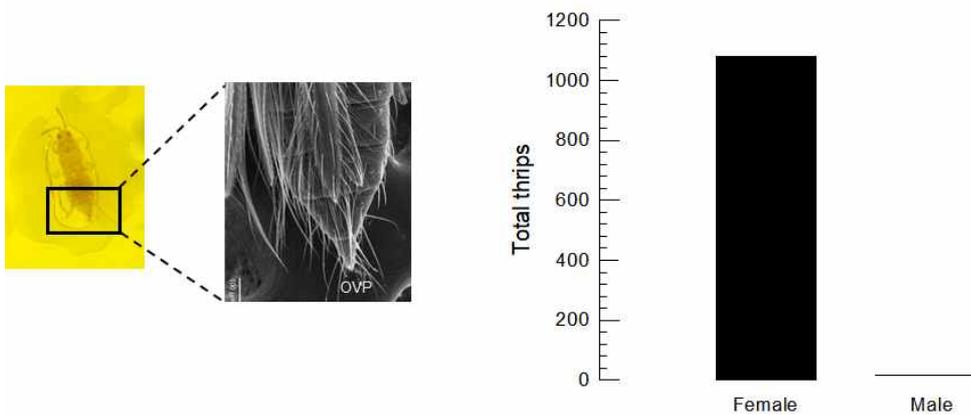


Fig. 2. Onion thrips collected in fields are all females.

야외 조사 결과를 증명하기 위해 실내에서 사육하는 파총채벌레의 집단에서 임의로 상이한 밀도로 성충교배를 시도하였다(Table 1). 한 마리의 성충에서도 생존한 개체는 모두 암컷 자손을 생산했다. 2 마리 이상의 교배에서도 생산된 자손은 모두 암컷이었다. 이러한 결과는 대파 재배지에서 발생하는 파총채벌레는 단성생식이 가능하며 이때 암컷만 생산하는 자성생산 단성생식(Thelytokous)을 보이는 집단으로 판명되었다.

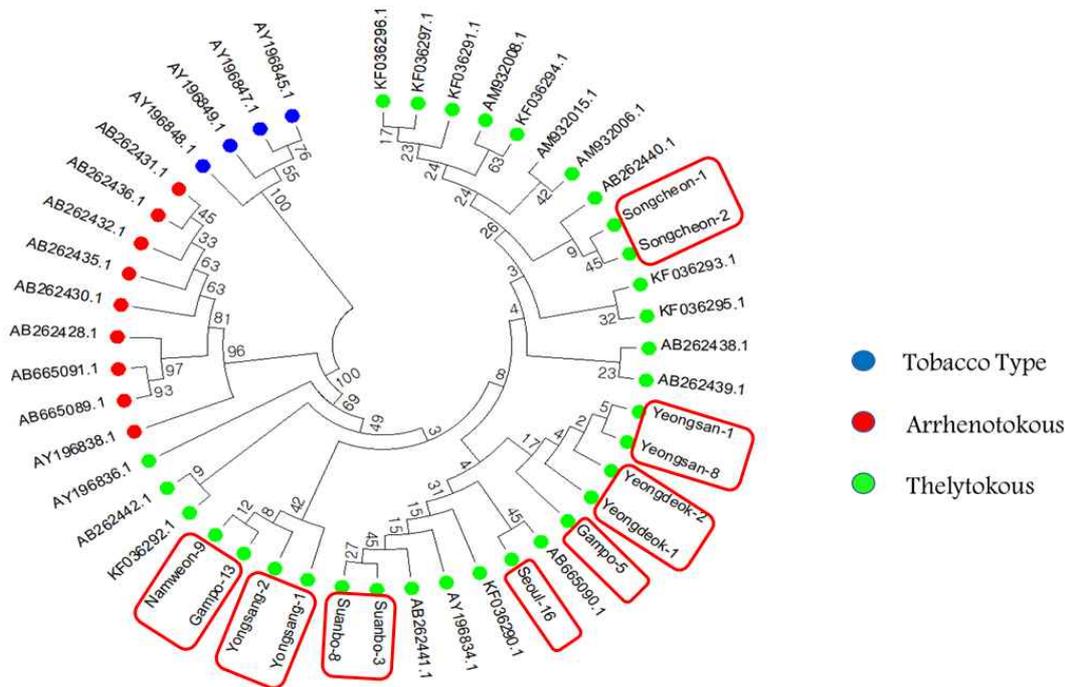
Table 1. Progeny test after different number of mating parents

Mating Parents	Replication	Alive adults	Total progeny	Progeny/parent	
				Female	Male
1	30	13	37	5.4 ± 0.9	0
4	10	26	96	3.6 ± 0.3	0
10	5	25	75	3.1 ± 0.2	0

집단유전분석과 자성생산 단성생식

야외 및 실내 교잡 실험으로 판명된 자성생산형 단성생식형인 파총채벌레가 유전적 구성에서 양성생식을 보이는 파총채벌레와 근연관계를 CO-I 유전자 서열로 비교 분석하였다(Fig. 3). 분자계통수는 생식형태가 상이한 집단끼리 분지하는 양상을 보였다. 이때 국내 대파에서 채집한 파총채벌레는 모두 자성생산 단위생식 집단과 함께 분지하여 앞의 결과를 뒷받침하였다.

(A)



(B)

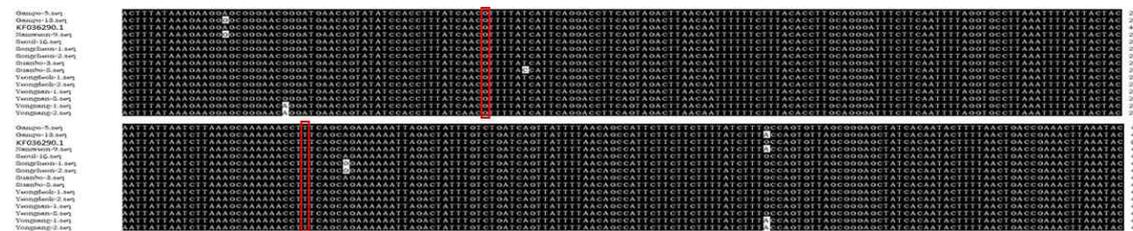


Fig. 3. Phylogeny tree of three different reproductive types of *T. tabaci*: thelytokous, arrhenotokous, and tobacco types. (A) Clustering of Korean populations with other thelytokous populations. (B) Conserved sequence (red rectangle) characteristic to thelytokous parthenogenesis.

단성생식 파충채벌레의 유전적 다양성

자성생산 단성생식을 보이는 파충채벌레의 집단은 어미를 중심으로 집단 내 변이는 크지 않지만 상이한 지역 별 유전적 다양성을 보일 가능성이 있다. 이를 분석하기 위해 RAPD 기술을 이용하여 국내 상이한 지역에서 채집한 개체들의 변이를 조사하였다(Fig. 4). 전체 11개 프라이머를 선행 분석한 결과 본 연구의 RAPD 프라이머로 N-8041과 N-8017을 이용하였다.

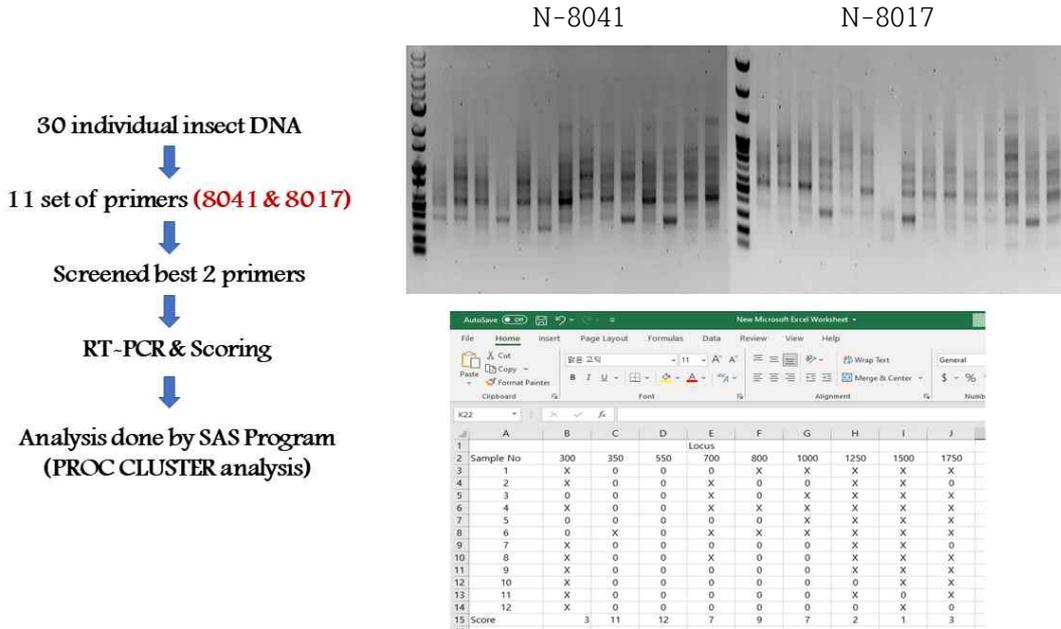
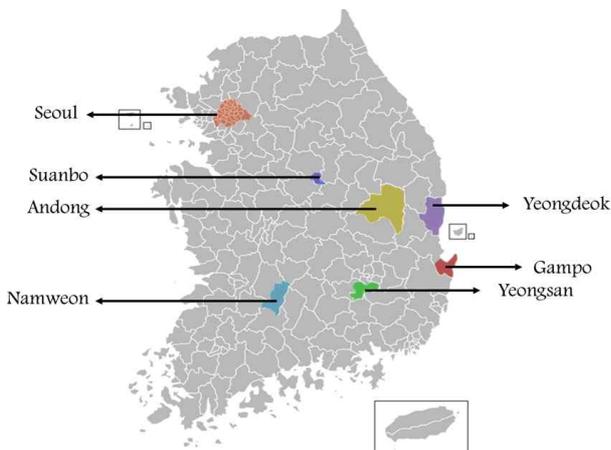


Fig. 4. RAPD analytical procedure to analyze local population of *T. tabaci*.

전체 6개 지역에서 재배되는 대파에 발생한 파충채벌레를 채집하여 유전적 거리를 RAPD 두 프라이머로 각각 분석하였다(Fig. 5). 상이한 지역집단 간 유전적 유사성은 상호 떨어진 거리의 차이에 따라 유사성을 보이지 않았다. 예를 들어, 두 RAPD 프라이머 분석 결과 모두는 동일한 안동지역의 두 소집단이 유전적으로 상이하게 나뉘어져 각각 다른 지역 집단과 유사성성을 나타냈다. 즉, 파충채벌레의 단성생식에 따라 각 집단이 임의유전적부동(random genetic drift) 결과로 각 집단의 고유성을 지닌 것으로 추정된다.

(A)



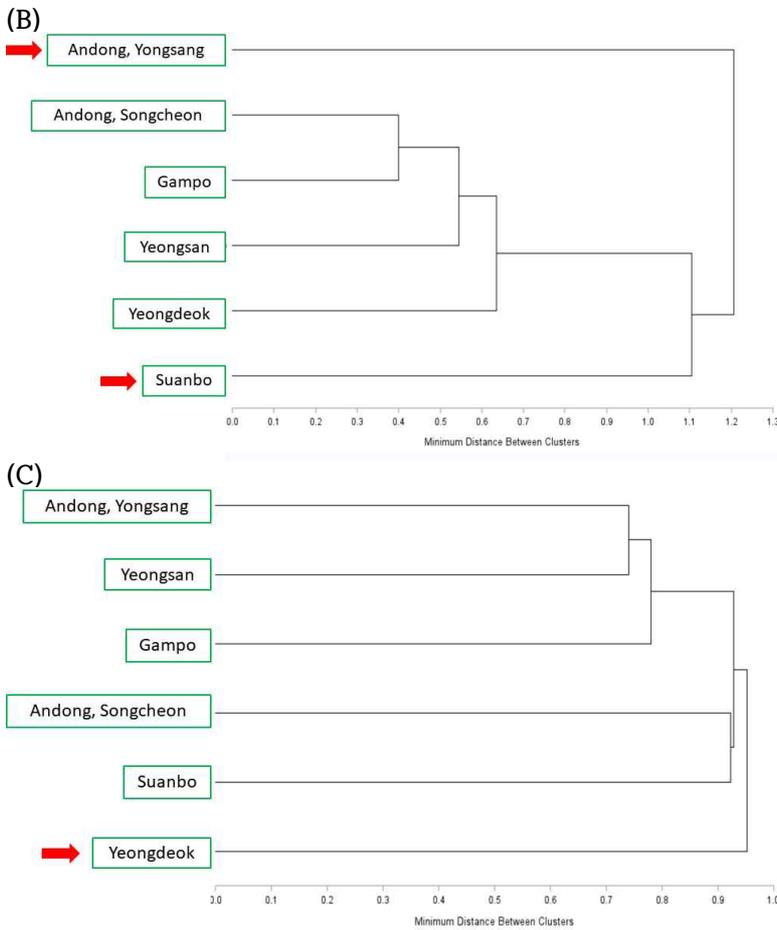


Fig. 5. Random genetic drift of local populations of *T. tabaci* infesting Welsh onion

이러한 random genetic drift에 의한 집단분화가 실제로 약제 감수성 반응에 대한 차이를 보여주는지를 분석하였다(Fig. 6). 미생물제제인 *Beauveria bassiana* (Bb)를 성충에 처리한 결과 전체적으로 약제 감수성에 큰 차이를 보이지는 않았다($F = 1.60$; $df = 5,9$; $P = 0.1968$). 그러나 일부 집단에서 감수성의 차이를 보여 영덕과 감포지역 집단들이 안동과 양산지역 집단들보다 높은 감수성을 나타냈다. 이는 화학농약인 spinosad (Sp)를 처리한 결과에서도 집단 큰 차이는 없지만($F = 2.26$; $df = 5,9$; $P = 0.0719$) 일부 집단에서는 다소 감수성 변이를 나타내 영덕집단이 양산집단보다 큰 감수성을 보였다.

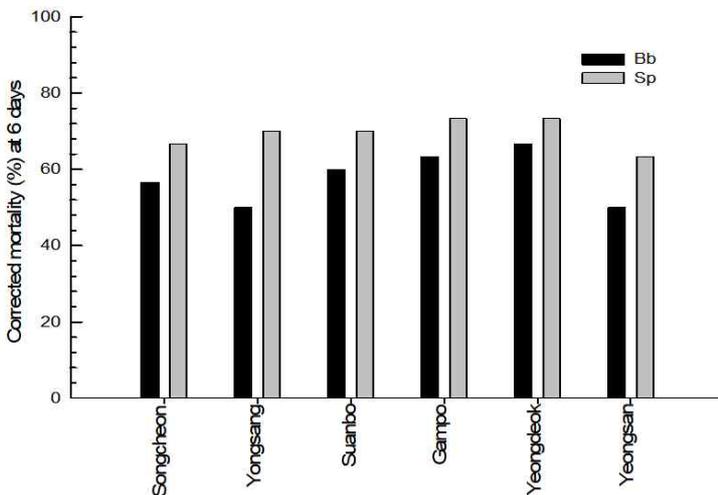


Fig. 6. Local variation in insecticide susceptibility of *T. tabaci* infesting Welsh onion. *Beauveria bassiana* (Bb) and spinosad (Sp) were used to assess their susceptibility.

제10절 파총채벌레 IBC 방제 기술(II) - 곤충병원성 곰팡이 선발과 세균 대사체 혼합효과

상용 화학살충제에 대한 파총채벌레의 감수성 변이

14종의 화학살충제에 대한 파총채벌레의 감수성 차이를 비교하였다(Fig. 1). 3가지 살충제(팬텀, 부메랑, 더윈)가 파총채벌레에 대해서 높은 살충력을 나타냈다(Fig. 1A). 이들의 양독반응을 분석한 결과 거의 유사한 높은 살충력을 보였지만 이 가운데 부메랑의 효과가 다소 높았다(Fig. 1B).

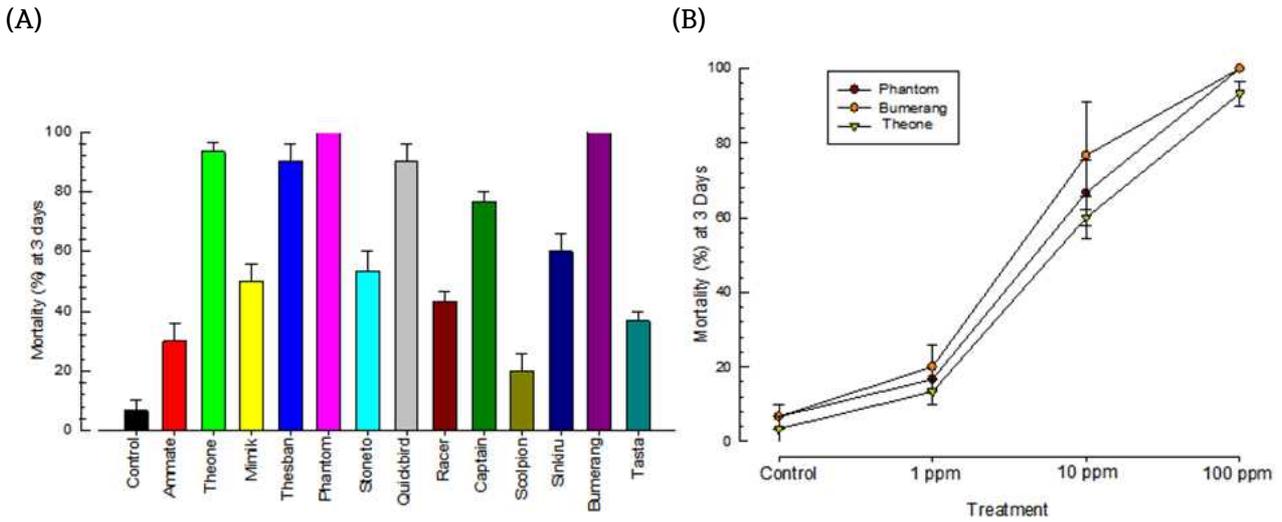
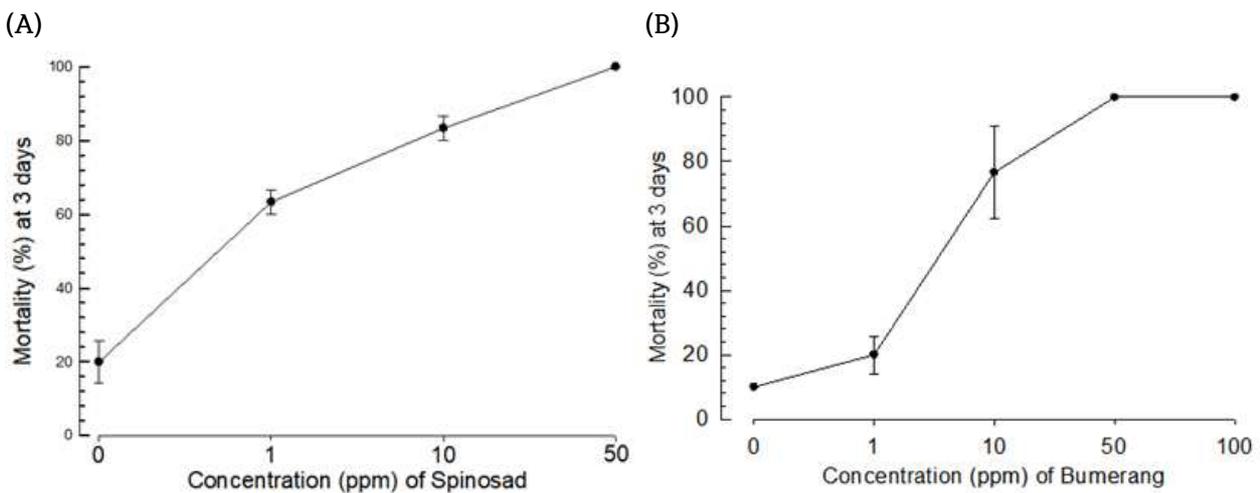


Fig. 1. Screening commercial insecticides against onion thrips, *T. tabaci* (A) Screening 14 insecticides (B) Dose-mortality curve of three selected insecticides

Spinosad의 파총채벌레에 대한 살충력 생물 검정

파총채벌레 유충과 성충에 대한 Spinosad의 살충력을 섭식 처리를 통해 비교하였다(Fig. 2).



Stage	N	LC ₅₀ (ppm)	Slope ± SE	χ ²	df	R ²
Larva	3	7.2 (3.2~16.5)	1.3 ± 0.2	0.846	2	0.963
Adult	3	0.9 (0.2~4.7)	0.7 ± 0.4	0.886	1	0.975

Fig. 2. Comparative toxicity of Bumerang (= Spinosad) against larvae (A) and adults (B) of *T. tabaci*

곤충병원성 곰팡이에 대한 파총채벌레의 감수성 변이

3종의 곤충병원성 곰팡이에 대한 파총채벌레의 감수성 차이를 비교하였다(Fig. 3). 3가지 병원균 가운데 유충과 성충 모두에서 *Beauveria bassiana* (Bb)가 가장 높은 병원력을 나타냈다.

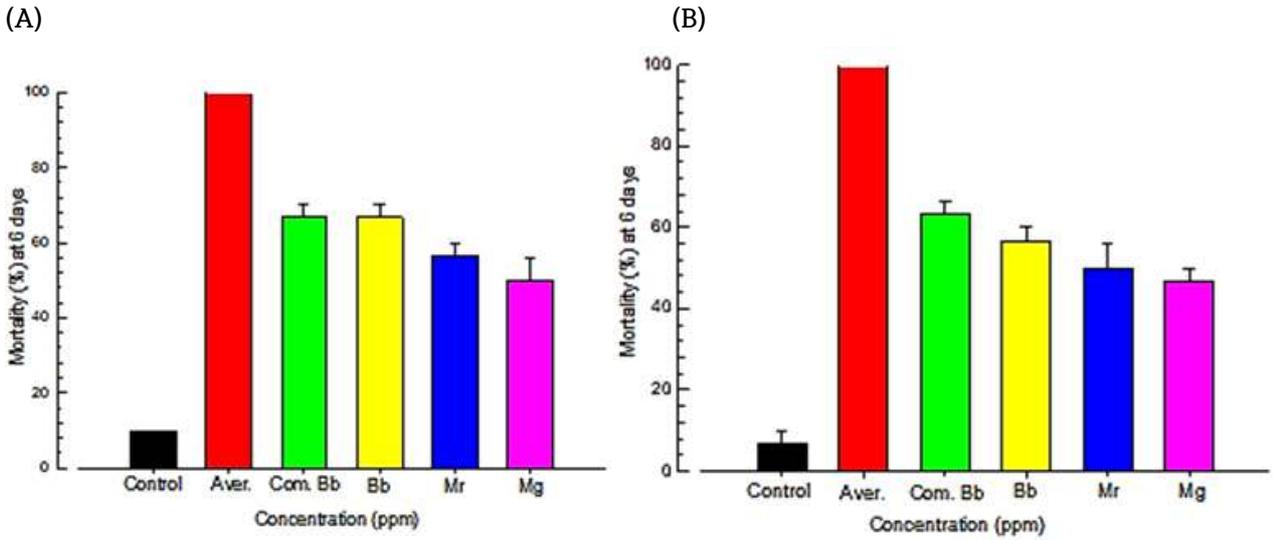
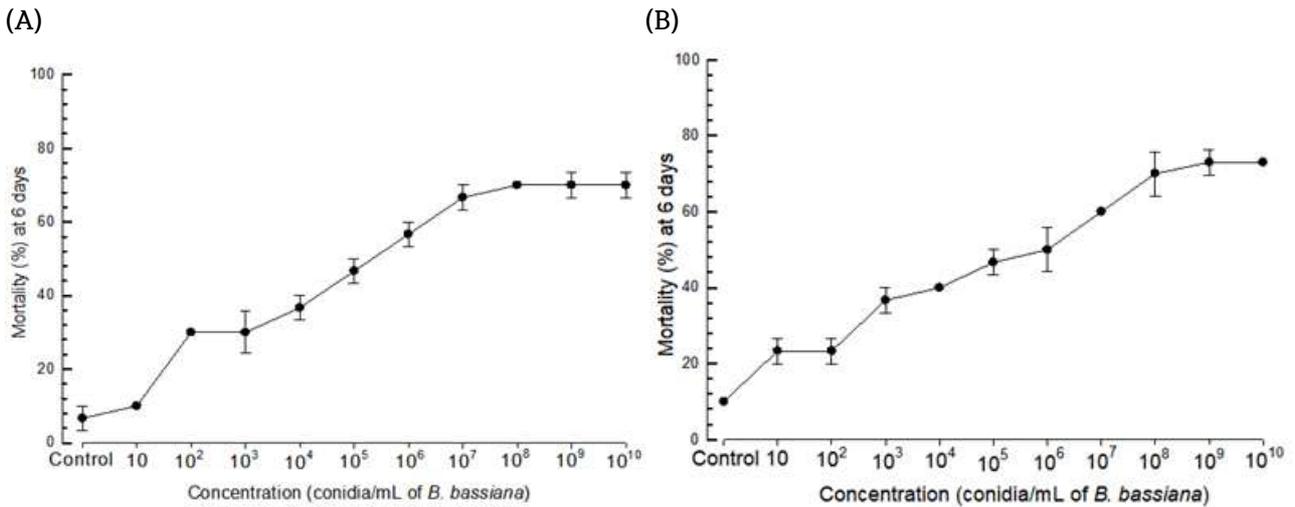


Fig. 3. Screening entomopathogenic fungi against onion thrips, *T. tabaci*: *Beauveria bassiana* (Bb), *Metarhizium rileyi* (Mr), and *Metarhizium guizhouense* (Mg). (A) Larvae (B) Adults

Bb의 파총채벌레에 대한 살충력 생물 검정

파총채벌레 유충과 성충에 대한 Bb의 살충력을 섭식 처리를 통해 비교하였다(Fig. 4).



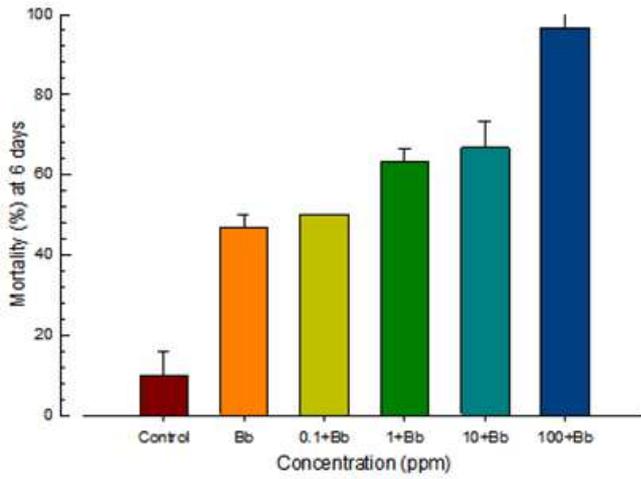
Stage	N	LC ₅₀ (ppm)	Slope ± SE	χ^2	df	R ²
Larva	3	1.42 x 10 ⁶ (8.25x10 ⁴ ~2.45x10 ⁷)	0.216 ± 0.631	0.528	7	0.836
Adult	3	1.01 x 10 ⁷ (2.66x10 ⁵ ~3.86x10 ⁸)	0.165 ± 0.806	0.909	7	0.886

Fig. 4. Comparative toxicity of Bb against larvae (A) and adults (B) of *T. tabaci*

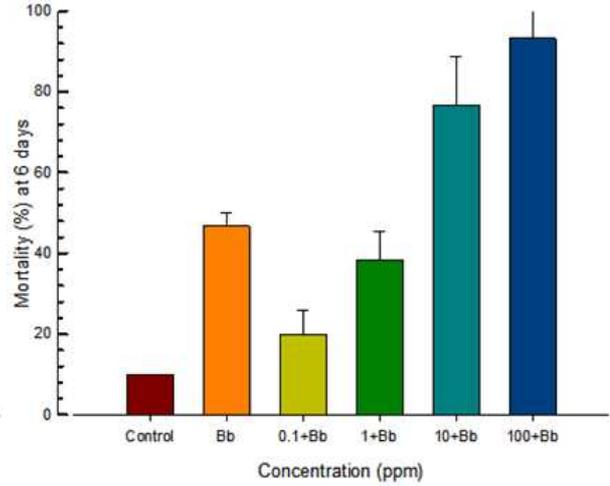
세균 이차대사물질의 파총채벌레에 Bb 병원력 제고 효과

4종류의 세균 유래 이차대사산물이 파총채벌레에 대한 Bb의 병원력을 제고시켰다(Fig. 5).

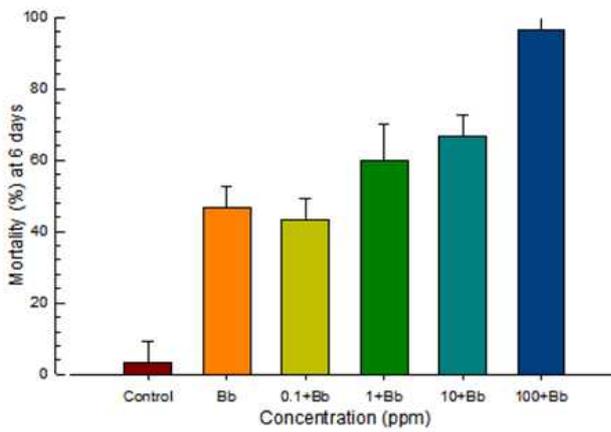
(A) HB302



(B) Oxindole



(C) EMP



(D) BZA

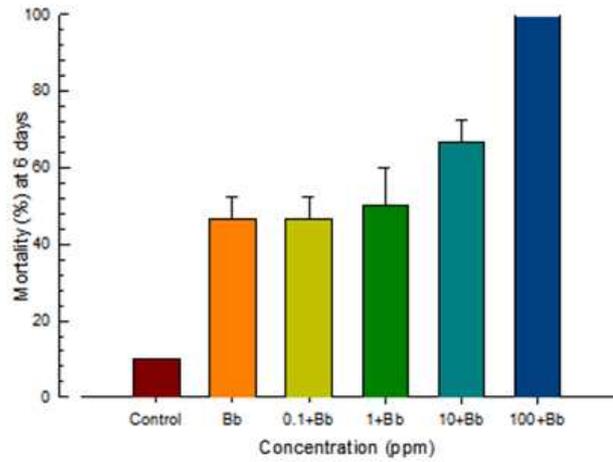


Fig. 5. Enhancement of Bb pathogenicity against *T. tabaci* by adding four bacterial metabolites

<제2세부과제> 미생물공학과 세균 이차대사산물 생산 표준화 기술 개발

제1절 *Xenorhabdus/Photorhabdus* NRPS-PKS 발현조절 기작 규명

- 유도프로모터를 이용한 *Xenorhabdus hominickii* GamexPeptide(GxpS) mutant 개발
 - 유전체 분석을 통해 *X. hominickii* 의 *gxpS* 유전자를 확보함 (PLU3262)
 - *gxpS*의 첫 554bp를 증폭 대상으로 선정 후 추출된 *X. hominickii*의 genomic DNA를 이용해 해당 유전자를 증폭함
 - 유도프로모터를 가진 벡터는(pCEP-Km) 독일 Max Planck Institute의 Helge B. Bode 교수님으로부터 증여받음. *E. coli* S17-1 strain에 형질전환 후 pCEP-Km 벡터를 대량으로 추출함

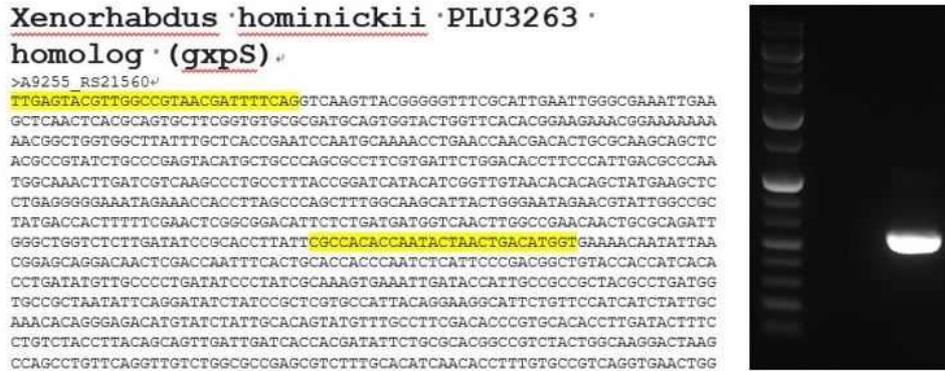


그림. *X. hominickii* *gxpS* PCR 타겟 및 genomic DNA를 template으로 증폭한 *gxpS* PCR 결과물

- pCEP-Km 벡터의 NdeI-SacI 제한효소 인식 염기서열 위치에 증폭된 *gxpS*를 삽입한 후 *E. coli* S17-1에 형질 전환함. LB-Kanamycin 고체배지에서 얻은 클론(pCEP-gxpS)을 PCR과 제한효소 절단을 통해 확인함

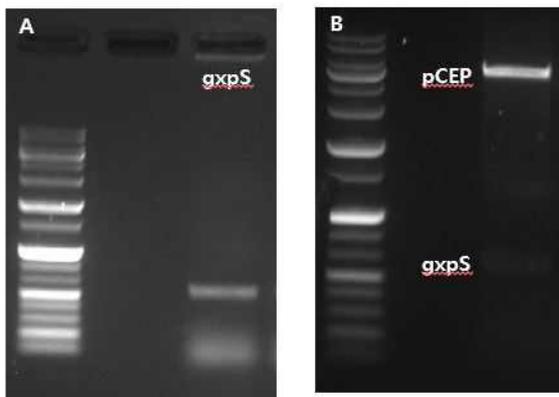


그림. pCEP-gxpS 클론 검증. (A) *E. coli* S17-1-pCEP-gxpS 클론에서 추출된 DNA를 이용한 *gxpS* PCR 결과 (B) 동일 클론에서 NdeI과 SacI 제한효소를 이용해 절단한 pCEP과 *gxpS*

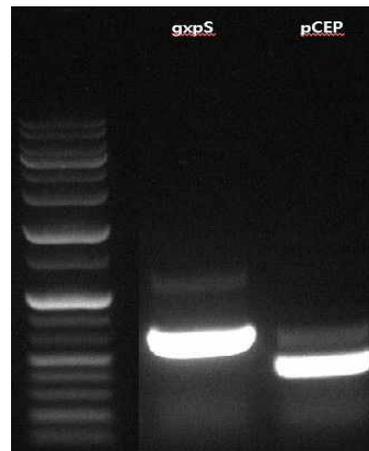


그림. *Xenorhabdus hominickii*-pCEP-gxp 클론의 pCEP 특이적 유전자와 *gxpS* 유전자의 PCR 결과

- pCEP-gxpS를 가진 *E. coli* S17-1을 *X. hominickii*와 1:1(donor:host)의 비율로 섞어 conjugation 실험을 진행함. Conjugation이 진행된 *X. hominickii*와 *E. coli* S17-1-pCEP-gxpS의 혼합 배양액을 LB-ampicillin-kanamycin 고체배지를 이용해 *X. hominickii*-pCEP-gxpS를 스크리닝함. 또한, pCEP 특이적 유전자와 *gxpS* 유전자의 PCR과 sequencing을 통해 해당 클론을 확인함

- Droplet digital PCR(ddPCR) 시스템을 이용해 *X. hominickii*-pCEP-gxpS의 유전자 발현량 차이를 구분함. *gxpS* RNA 정량을 위한 프라이머와 프로브 서열 선정 후, WT *X. hominickii* RNA를 추출해 one-step RT-ddPCR 최적화 연구를 진행함

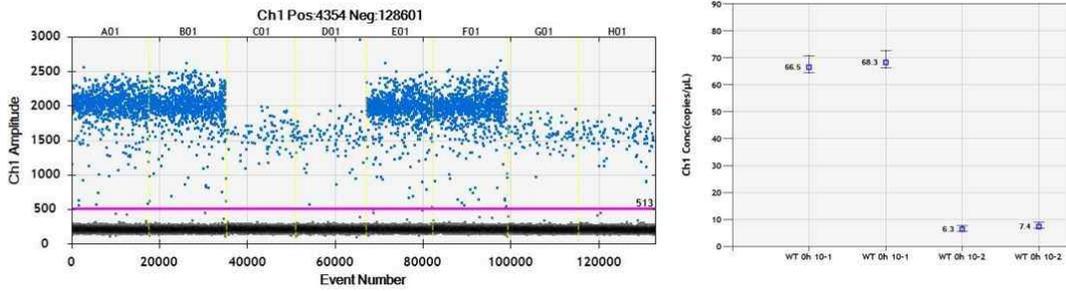


그림 *X. hominickii* RNA를 template으로 이용해 *gxpS* 유전자를 증폭한 one-step RT-ddPCR 1D amplitude 및 concentration(copies/ul) 결과

- 유도프로모터를 이용한 *Photobacterium aerophilum* GxpS mutant 개발
 - 유전체 분석을 통해 *P. aerophilum*의 *gxpS* 유전자를 확보함
 - *X. hominickii*에서 사용된 방법과 같이 연구를 진행하여 차년도에 mutant 개발을 목표함

제2절 NPRS/PKS 발현조절 regulon 규명 및 최적 세균 배지조성 결정

- *Xenorhabdus* global regulator인 Lrp 유전자 mutant 개발
 - 유전체 분석을 통해 *X. hominickii*에서 두개의 *lrp* 유전자를 확보함 (*lrp1*-A9255_RS08905; *lrp2*-A9255_RS11450). *lrp1*과 *lrp2*의 첫 350bp를 증폭 대상으로 선정 후 추출된 *X. hominickii*의 genomic DNA를 이용해 *lrp1* 과 *lrp2* 유전자를 각각 증폭함

LRP-1

Xenorhabdus hominickii^{ANU1-PRJNA224116}--chromosome-NZ_CP016176.1

>A9255_RS08905

ATGATGATTAAGAAAGCTCCAGTAAAGATCTTGATCGCATAGACCGAAATATCCCTTAATGAGTTGCA
 AAAGACGGCCGTTATTTCTAATGTGGATTATCCAAGCGTGTGGTTGTCCACCAACGCCCTTGTCTGGAGC
 GTGTACGTCGCTTAGAGCGTCAAGGTTTCATTTCGGCTATACAGCTTTGCTGAATCCCTCATTTATTTGGAC
 GCATCATGCTGGTGTGTTGTGAATTAACGCTGAATCGTGTGTCAGCGGACGATTTGAACRATTCRATAC
 AGCAGTCCAGAACTGGAAGAAATCCAAGAAATGCCATTTAGTTTTCGGTGAATGACATAATGCAAGAAA
 CGCGTGTGCCAGATATGCTGCATACCGTAAACTACTGGGTGAACGTTGCTCGCTCCCGGGGTGTTAAC
 GATACTCGTACTTATGTTGTTATGGAAGAAGTGAACAGAGTAATCGTTTGGTGATTAAGACTCGTTAA

LRP-2

Xenorhabdus hominickii^{ANU1-PRJNA224116}--chromosome-NZ_CP016176.1

>A9255_RS11450

ATGCTAGACAAAATAGACCCTAAGCTACTGGAACTGCTCCCAACAGGATTGTAGTCTATCTCTGAATACGCT
 GGCCGAAGCTGTTAATTTGACTTCTACACCCTGCTGGAAACGCTAAAAAGACTTGAAGATGAAGGATATA
 TTGTTGGAAGATAGCCTTGCTAAATGGTCCAAACTTGGGCTTAGTCTGACGGTGATAGTGAATGATTAAA
 ACTCAGCAGCACAGTAGTGAATGGTATGAACAGTTTGTTCATTCAAAAAGAGATGCCGGAAGTTTAAAC
 ATTTTATCGAATGGCAGGAGAAATATGATTATCTAATGCATGTAGAAGTTGTTGATATGAAAAGTTATGATC
 CCTTCATATAACGCATGGTAAATGGGGTTCCTGGCTTGATTGATGTAACCTCCAACCTTTCRATGGAGAAA
 ATAAAATATACACCGGCTTGCCAATACAGATTCAATATGA

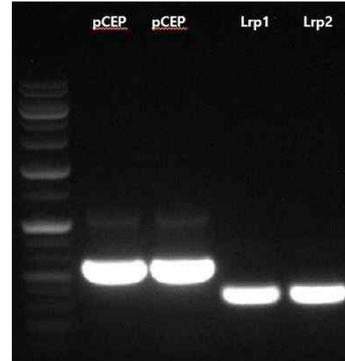


그림 *Xenorhabdus hominickii*-pCEP-Lrp1과 -Lrp2 클론의 pCEP 특이적 유전자와 Lrp1 또는 Lrp2 유전자의 PCR 결과

그림 X. hominickii Lrp1과 Lrp2 유전자 및 PCR 증폭 대상 서열 위치

- pCEP-Km 벡터의 NdeI-SacI 제한효소 인식 염기서열 위치에 증폭된 *lrp1* 또는 *lrp2*를 삽입한 후 *E. coli* S17-1에 형질 전환함. LB-Kanamycin 고체배지에서 얻은 클론(pCEP-*lrp1* 과 pCEP-*lrp2*)을 PCR과 제한효소 절단을 통해 확인함

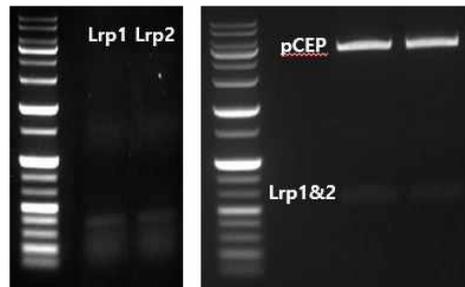


그림 pCEP-Lrp1과 pCEP-Lrp2 클론 검증. *E. coli* S17-1-pCEP-Lrp1 또는 -Lrp2 클론에서 추출된 DNA를 이용한 Lrp1과 Lrp2 PCR 결과 및 동일 클론에서 NdeI과 SacI 제한효소를 이용해 절단한 pCEP과 Lrp1 또는 Lrp2

- pCEP-*lrp1* 또는 pCEP-*lrp2*를 가진 *E. coli* S17-1을 *X. hominickii*와 1:1(donor:host)의 비율로 섞어 conjugation 실험을 진행함. Conjugation이 진행된 *X. hominickii*와 *E. coli* S17-1-pCEP-*lrp1* 또는 *X. hominickii*와 *E. coli* S17-1-pCEP-*lrp2* 혼합 배양액을 LB-ampicillin-kanamycin 고체배지를 이용해 *X. hominickii*-pCEP-*lrp1*과 -*lrp2*를 각각 스크리닝함. 또한, PCR과 sequencing을 통해 해당 클론을 각각 확인함
- ddPCR 시스템을 이용해 *X. hominickii*-pCEP-*lrp1*과 -*lrp2*의 유전자 발현량 차이를 구분함. 이를 위해 Lrp1과 Lrp2 RNA 정량을 위한 프라이머와 프로브를 디자인함
- *Photorhabdus* global regulator인 leucine-responsive regulatory protein(Lrp) 유전자 mutant 개발
 - 유전체 분석을 통해 *P. temperata*의 *lrp1*과 *lrp2* 유전자를 각각 확보함
 - *X. hominickii*에서 사용된 방법과 같이 연구를 진행하여 차년도에 mutant 개발을 목표함

<제3세부과제> IBC 미생물 작물보호제 산업화 기술 개발

제1절 IBC 미생물의 투입비율 결정

파밤나방 살충효과 검정

IBC 미생물의 유효농도를 확인하기 위해 당사에서 누대사육 중인 파밤나방 2령 유충을 이용하여 살충효과를 검정하였다. 파밤나방 인공사료를 *X. hominickii*와 *B. thuringiensis* 4종(a, I, k, t)의 배양액을 농도별 희석액에 30초간 침지 후 자연건조시켜 파밤나방 2령 유충에 제공하였으며, 72시간 후 움직임을 멈춘 개체를 사충으로 판단하였다. 시험결과, *X. hominickii*는 1×10^8 CFU/ml의 농도에서 48%로 충분한 살충효과가 나타나지 않았으며, *B. thuringiensis*는 1×10^7 CFU/ml 이상의 농도에서 60% 이상의 살충효과를 보였다.

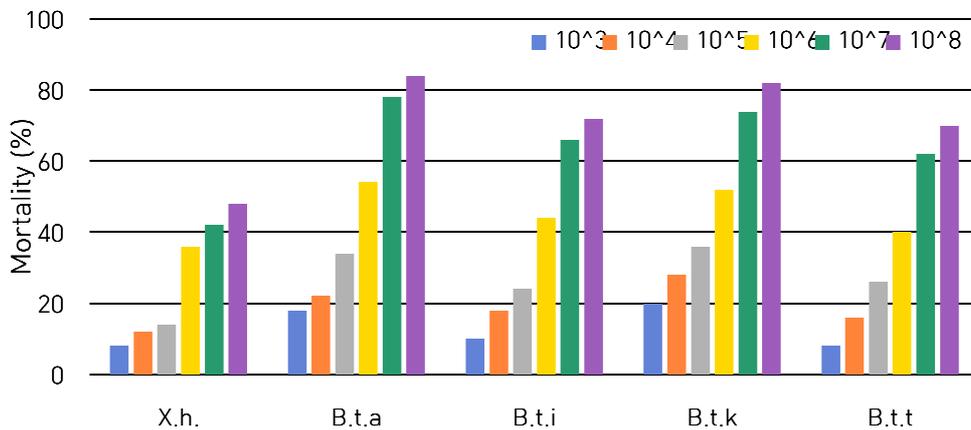


그림. 파밤나방에 대한 IBC 미생물 농도별 살충효과 검정

두 미생물의 혼용처리 시 *X. hominickii*는 1×10^4 CFU/ml, *B. thuringiensis*는 1×10^6 CFU/ml 이상의 농도에서 *B. thuringiensis*의 동일농도 단독처리 시보다 높은 60% 이상의 살충효과를 보였다(그림2). 본 시험결과를 토대로 *X. hominickii*의 synergist로서의 가능성에 초점을 맞추어 각각의 미생물 단독처리보다는 두 미생물을 혼용처리 시 유효농도를 확인하였다.

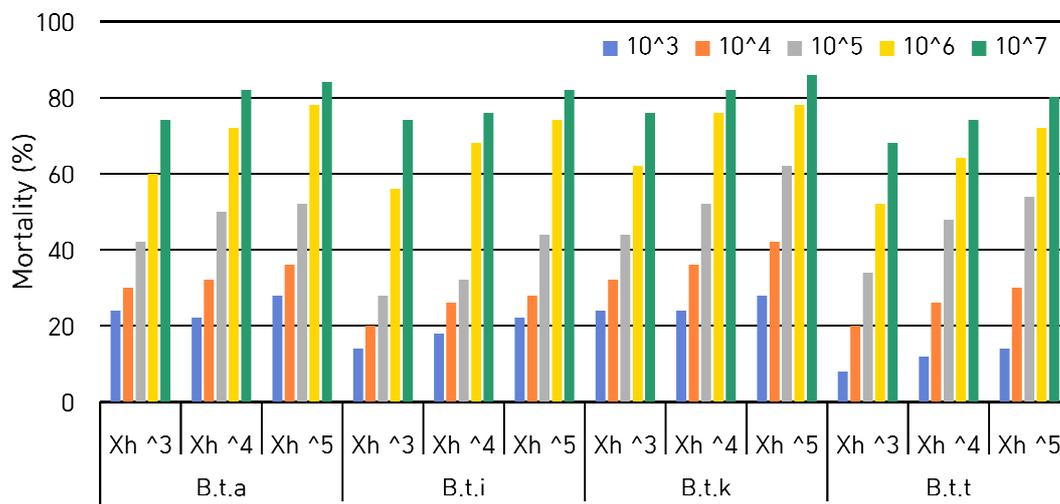


그림. 파밤나방에 대한 IBC 미생물 혼용 농도별 살충효과 검정

아메리카잎굴파리 살충효과 검정

상기 연구결과를 토대로 아메리카잎굴파리가 발생된 경기도 화성시 소재 애호박 재배농가에서 간이 소포장시험을 진행하였다. IBC 미생물 배양액을 농도별로 혼용하여 작물에 살포하였으며, 농약등록시험 방법에 따라 각 처리구의 피해엽율을 조사하여 무처리구 대비 방제가를 계산하였다. *B. thuringiensis*의 농도는 1×10^6 CFU/ml로 고정하였고, *X. hominickii*를 농도별로 혼용하여 처리한 결과, 상기의 시험결과와 유사한 양상의 결과가 확인되었으며, *B. thuringiensis* 1×10^6 CFU/ml의 농도에 *X. hominickii*는 1×10^4 CFU/ml 이상의 농도로 혼용 시 60% 이상의 방제가를 보였다.

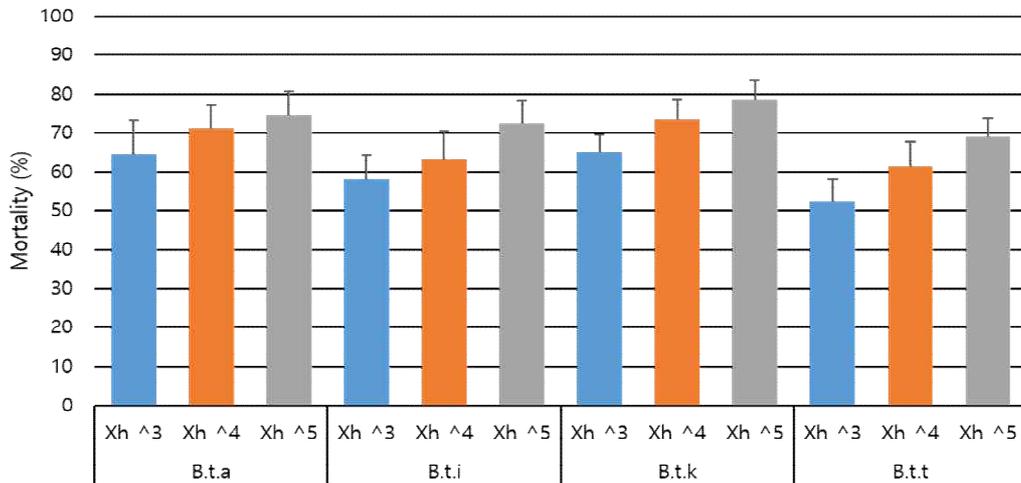


그림. 아메리카잎굴파리에 대한 IBC 미생물 방제효과 검정

고자리파리 살충효과 검정

IBC 미생물의 유효농도를 확인하기 위해 경기도 양평군 양파 재배농가에서 채집한 고자리파리 유충을 당사 온실에서 재배 중인 대파 유묘에 접종하여 살충효과를 검정하였다. 유묘포트에 *B. bassiana* 와 *M. rileyi* 배양물을 *X. hominickii* 배양액과 혼용하여 관주처리(50ml/pot)하였으며, 농약등록 시험방법에 따라 각 처리구의 피해율을 조사하여 무처리구 대비 방제가를 계산하였다. *B. bassiana* 와 *M. rileyi*의 농도는 1×10^7 CFU/ml로 고정하였고, *X. hominickii*를 농도별로 혼용하여 처리한 결과, *M. rileyi*는 충분한 효과를 보이지 않았으며, *B. bassiana* 1×10^7 CFU/ml의 농도에 *X. hominickii*는 1×10^5 CFU/ml 이상의 농도로 혼용 시 60% 이상의 방제가를 보였다.

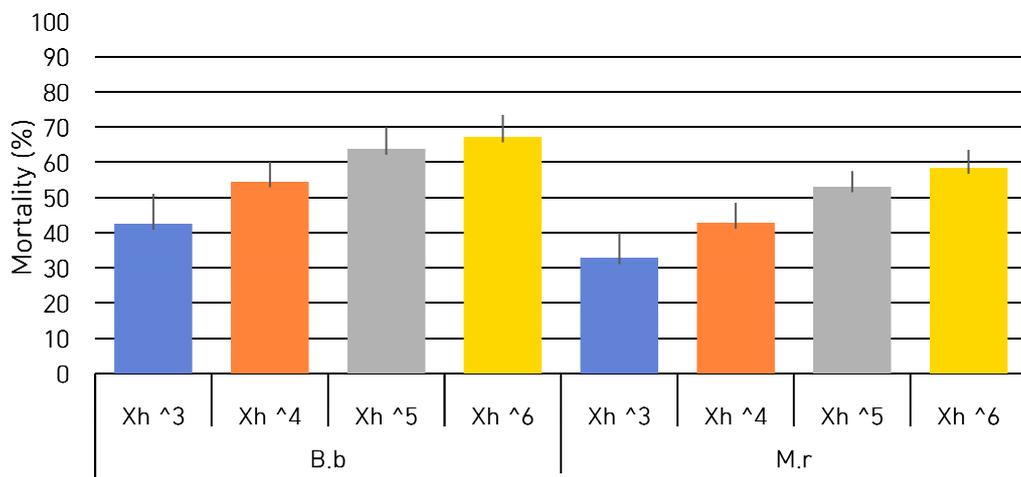


그림. 고자리파리에 대한 IBC 미생물 방제효과 검정

제2절 보조제 선발

미생물제의 성공적인 개발을 위해 제제화 과정에서의 미생물의 안정성과 식물체 살포 후 자연환경의 영향 및 사용상의 편의성을 확보하고 미생물이 안정적으로 생존할 수 있는 제형을 선택해야 한다. 본 연구에서는 두 개의 제형(수화제, 액상수화제)으로 시제품을 제조하여 IBC 미생물의 경시적 안정성을 확인하였으며, 유기농업자재로 활용 가능한 물질과 EPA inerts ingredient list 4에 해당하는 보조제 중 각각의 제형에 알맞는 보조제를 선발하였다. 최종 시제품 제조 시에는 IBC 미생물과 보조제의 이화학적 안정성 및 사용 시 희석배수 등을 고려하여 투입농도를 결정할 예정이다.

보호제 선발

미생물은 햇빛이나 온도, 습도 등의 외부 환경에 매우 민감하여 대부분의 미생물제가 실제 농가포장에서는 활성이 크게 감소된다. 본 연구에서는 미생물제 살포 후 목적 부위에서의 미생물의 생존 및 활성 감소를 최소화하기 위한 자외선차단제와 보습제를 선발하였다. 선발된 안정제는 두 개의 제형(수화제, 액상수화제)에 공통적으로 사용하였다.

1) 자외선차단제 선발

미생물제 살포 후 목적 부위에 부착된 미생물은 자외선에 의해 활성이 급격히 낮아지게 된다. 이를 방지하기 위해 자외선을 차단 또는 흡수할 수 있는 보조제를 선발하여 제제화에 적용하였으며, 선행 연구를 통해 선발된 Lowilite-62의 유효농도를 재확인한 결과, 2.0% 이상의 투입이 필요한 것으로 확인되었다.

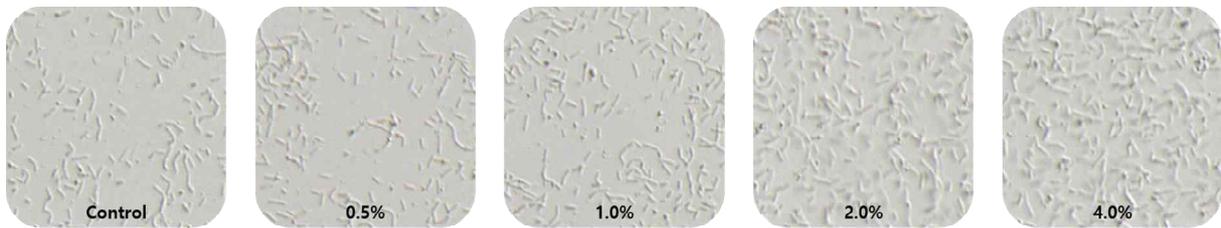


그림. 자외선차단제(Lowilite-62) 유효농도 검정

2) 보습제 선발

IBC 미생물의 발아를 위해서는 적정습도가 요구되며, 미생물제 살포 후 미생물 주변의 미세 환경 내 습도를 유지할 수 있는 보조제를 선발하였다. 선행 연구를 통해 선발된 Na-PCA의 유효농도를 재확인하였으며, 1.0% 이상에서 높은 발아 수를 보였다.

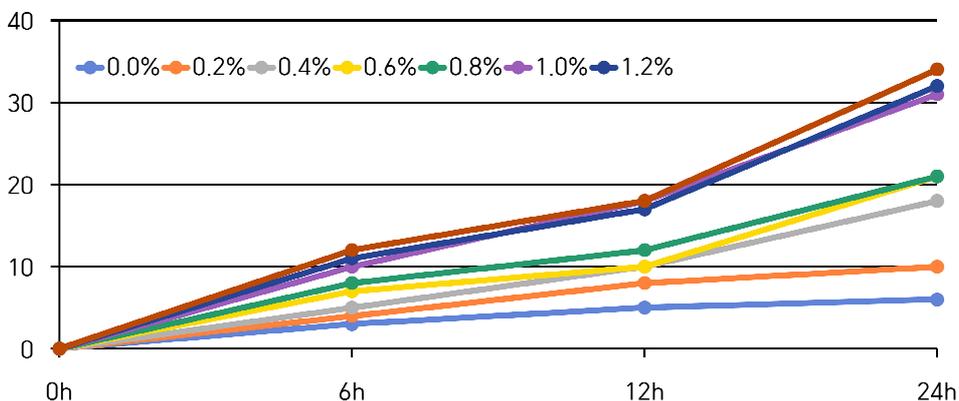


그림. 보습제(Na-PCA) 유효농도 검정

액상수화제용 보조제 선발

1) 생분해성 부착제 선발

미생물제 살포 후 IBC 미생물을 목적 부위에 최대한 오래 유지시켜 효과를 증진시키고자 보조제를 선발하였다. Rosin, Paraffin oil, Canola oil을 미생물배양액과 혼합하여 식물체 잎에 경엽살포하였으며, 식물체 잎 1g 내에 존재하는 미생물의 양상을 현미경으로 관찰한 결과 Rosin 3.0% 이상에서 우수한 부착성을 보였다.

표. 생분해성 부착제 선발 및 유효농도 검정

	처리농도 (%)						
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5
Rosin	△*	△	○	○	○	◎	◎
Paraffin oil	×	×	△	△	△	○	○
Canola oil	×	×	×	△	△	△	○

*부착정도 : ×; 불량, △; 보통, ○; 양호, ◎; 우수

2) 분산제 선발

대부분의 식물체와 곤충의 표면은 약제가 잘 묻지 않는 큐티클층과 키틴층으로 이루어져 있다. 이를 보완하기 위해 확산정도와 분산정도가 우수한 보조제를 선발한 결과, Polyalkyleneoxide modified heptamethyltrisiloxane 4.0% 이상에서 우수한 효과를 보였다.

표. 분산제 선발 및 유효농도 검정(확산성)

	EPA List	처리농도 (%)				
		1.0	2.0	4.0	6.0	8.0
Polyalkyleneoxide modified heptamethyltrisiloxane	4B	○*	○	◎	◎	◎
Polyxyethylene tridecylether	3	×	△	△	○	◎
Oleic acid	4A	×	×	△	○	○
Methylloleate	4B	×	×	△	○	◎

*분산정도 : ×; 불량, △; 보통, ○; 양호, ◎; 우수

표. 분산제 선발 및 유효농도 검정(분산성)

	EPA List	처리농도 (%)				
		1.0	2.0	4.0	6.0	8.0
Polyalkyleneoxide modified heptamethyltrisiloxane	4B	△*	○	◎	◎	◎
Polyxyethylene tridecylether	3	×	△	△	○	○
Oleic acid	4A	×	×	△	○	○

Methylloleate	4B	△	△	○	○	◎
---------------	----	---	---	---	---	---

*확산정도 : ×; 불량, △; 보통, ○; 양호, ◎; 우수

3) 유화제 선발

상기 연구를 통해 선발된 보조제를 미생물배양액과 혼합 시 유화 및 물성안정을 위해 EPA inerts ingredient list 4에 속하는 보조제를 농도별로 IBC 미생물 배양액과 혼합하여 유화정도를 육안으로 확인하였으며, Polyoxyethylene methylloleate 5.0%에서 우수한 유화성을 보였다.

표. 유화제 선발 및 유효농도 검정

	EPA List	처리농도 (%)					
		1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0
Polyoxyethylene dodecyl mono ether	4B	×*	×	×	△	○	○
Polyoxyethylene methylloleate	4B	×	△	○	○	◎	◎
Methylloleate	4B	×	×	△	○	○	○
Polyoxyethylene sorbitan monooleate	4B	×	×	△	○	○	◎

*유화정도 : ×; 불량, △; 보통, ○; 양호, ◎; 우수

수화제용 보조제 선발

1) 동결건조보호제 선발

수화제 제형 개발을 위해 IBC 미생물배양액을 Freeze dryer를 통해 건조 후 분쇄하였다. 동결건조 과정에서 발생하는 미생물 손실을 최소화하기 위한 보조제로 Skim milk, Glucose, Maltose, Lactose, Sucrose를 미생물배양액에 첨가하여 동결건조 전후의 미생물 밀도를 확인하였다. 각각의 미생물배양액은 2×10^8 CFU/ml로 희석하여 사용하였으며, 각각의 보조제를 10%씩 첨가하였다. Skim milk 처리구와 Glucose 처리구에서 충분한 미생물 보존율을 보였다.

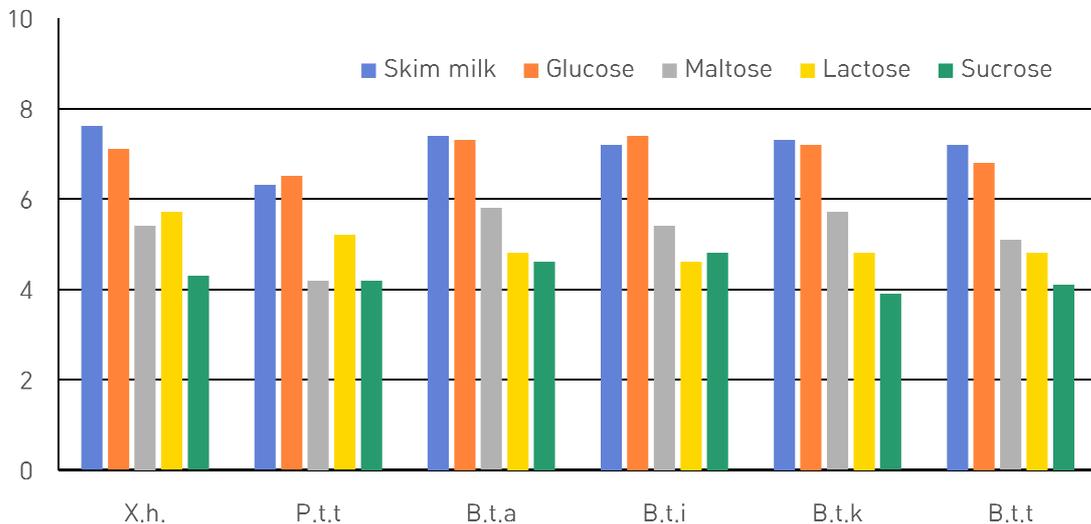


그림. 동결건조보호제 선발

2) 계면활성제 선발

IBC 미생물의 동결건조물의 물과의 혼용성을 보완하기 위해 미생물 동결건조물에 천연 유래물질인 Saponine과 Xanthan gum을 농도별로 혼합하여 식물체 잎에 경엽살포하였으며, 식물체 잎 1g 내에 존재하는 미생물의 양상을 현미경으로 관찰한 결과 Saponine 2.0% 이상에서 우수한 부착성을 보였다.

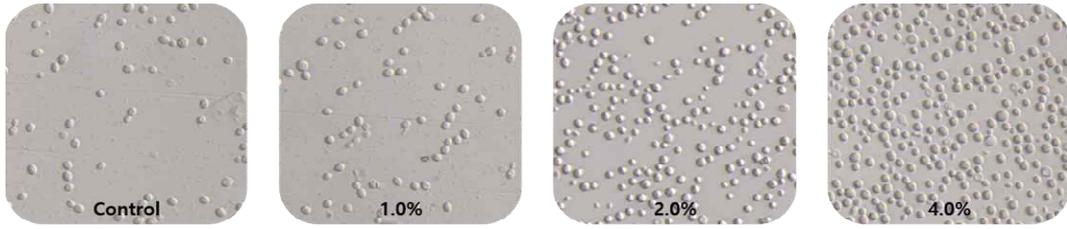


그림. 계면활성제 선발(Saponine)



그림. 계면활성제 선발(Xanthan gum)

제3절 시제품 제작

제형별 시제품 배합 결정

상기의 연구결과를 토대로 각각의 IBC 미생물을 조합하여 두 개의 제형(액상수화제, 수화제)별 시제품 배합을 결정하고 총 3종(액상수화제 2종, 수화제 1종)의 시제품을 제작하였다.

표. 액상수화제 시제품 배합

구분	원료명	투입비율(%)
IBC 미생물	Xh	5
	Bt	80
보호제	Lowilite-62	2
	Na-PCA	1
생분해성 부착제	Rosin	3
분산제	Polyalkyleneoxide modified heptamethyltrisiloxane	4
유화제	Polyoxyethylene methylolate	5
합 계		100

표. 수화제 시제품 배합

구분	원료명	투입비율(%)
IBC 미생물	Xh	5
	Bt / Bb	90
안정제	Lowilite-62	2
	Na-PCA	1
계면활성제	Saponine	2
합 계		100

시제품의 경시적 안정성 확인

제형별 시제품의 이화학적/생물학적 경시적 안정성을 확인하여 최종제품의 제형을 결정하기 위해 상기의 배합으로 제조한 시제품을 -4, 25, 50°C에 보관하면서 1주일 간격으로 9주차까지 시제품의 이화학적(pH, 외관물성(충분리, 침전), 폴림성), 생물학적(미생물 밀도) 경시적 변화를 확인하였다.

표. 액상수화제 시제품의 보관 온도별 이화학적 경시적 변화

	0w			1w			2w			3w			4w		
	-4°C	25°C	50°C												
pH	7.3			7.2	7.2	7.2	7.4	7.3	6.9	7.2	7.2	7.1	7.2	6.9	7.1
충분리*	○			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
침전**	○			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
폴림성***	○			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	5w			6w			7w			8w			9w		
	-4°C	25°C	50°C												
pH	7.1	7.1	6.9	7.3	7.2	6.8	7.3	7.1	7.0	7.3	7.2	7.2	7.3	7.2	7.1
충분리	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
침전	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
폴림성	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

*충분리정도 : ×; 불량, △; 보통, ○; 양호, ◎; 우수(충분리 없음)

**침전정도: ×; 불량, △; 보통, ○; 양호, ◎; 우수(침전 없음)

***폴림성 : ×; 불량, △; 보통, ○; 양호, ◎; 우수

액상수화제 시제품은 보관온도에 따른 이화학적 경시적 변화는 확인되지 않았으나, 25, 50°C 보관 시 생

물학적(미생물 밀도) 경시적 변화로 인해 최종 제품화는 포기하였다. 수화제 시제품은 보관온도에 따른 이화학적 경시적 변화는 확인되지 않았으며, 생물학적(미생물 밀도) 경시적 변화도 확인되지 않아 최종 시제품 제형으로 수화제 제형을 결정하였다.

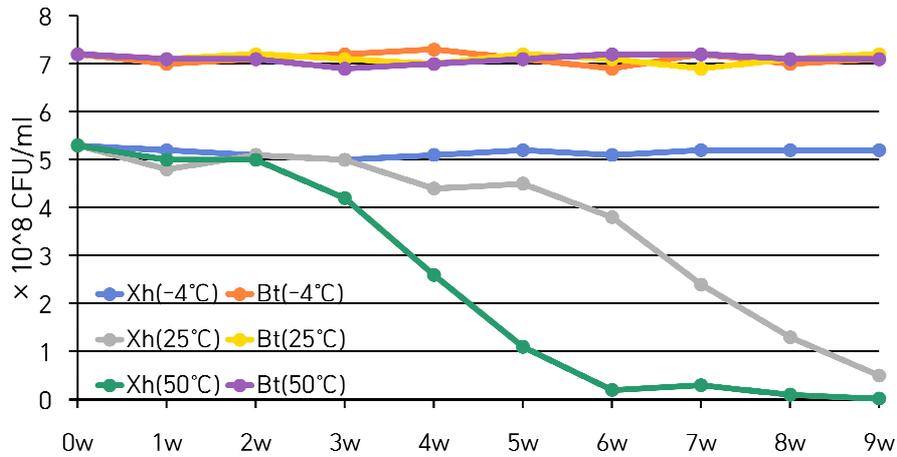


그림. 액상수화제 시제품의 보관 온도별 생물학적 경시적 변화

표. 수화제 시제품의 보관 온도별 이화학적 경시적 변화

	0w			1w			2w			3w			4w		
	-4°C	25°C	50°C												
pH	6.4			6.4	6.5	6.3	6.3	6.5	6.2	6.5	6.4	6.4	6.4	6.3	6.5
층분리*	◎			◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
침전**	◎			◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
폴립성***	◎			◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
	5w			6w			7w			8w			9w		
	-4°C	25°C	50°C												
pH	6.6	6.5	6.4	6.4	6.4	6.3	6.5	6.6	6.2	6.4	6.5	6.3	6.3	6.4	6.2
층분리	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
침전	◎	◎	○	◎	◎	○	◎	◎	○	◎	◎	○	◎	◎	○
폴립성	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎

*층분리정도 : ×; 불량, △; 보통, ○; 양호, ◎; 우수(층분리 없음)

**침전정도: ×; 불량, △; 보통, ○; 양호, ◎; 우수(침전 없음)

***폴립성 : ×; 불량, △; 보통, ○; 양호, ◎; 우수

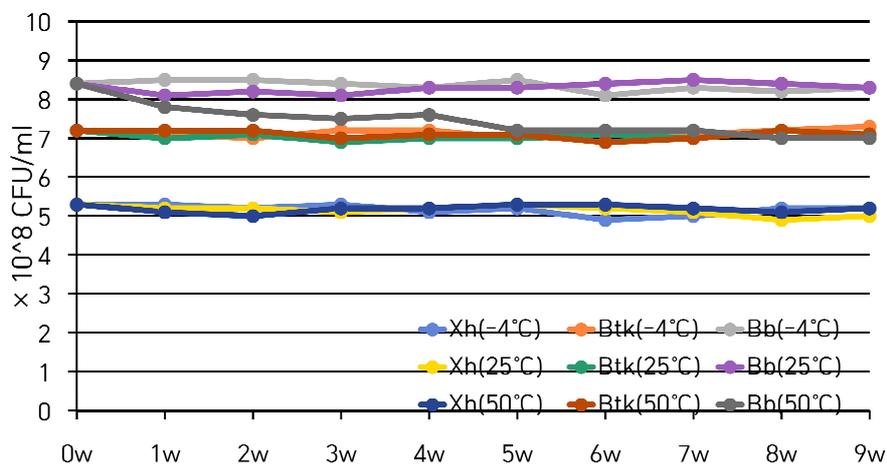


그림. 수화제 시제품의 보관 온도별 생물학적 경시적 변화

시제품 생산공정 확립

시제품 제조를 위해 IBC 미생물 각각의 균종에 맞는 대량배양조건과 상기의 연구결과로 선발된 수화제 시제품의 생산공정을 확립하였다.

1) 세균(Xh, Bt) 대량배양조건 확립

IBC 미생물 중 세균에 속하는 Xh, Bt는 선행연구를 통해 개발된 산업용 배지와 대량배양조건을 이용하였으며, 균종별 특성에 맞추어 약간의 변형을 통해 대량생산공정을 아래와 같이 확립하였다.

① 종균배양 : 산업용 배지로 당사에서 개발한 KAM배지 1L에 계대배양한 균주를 화염살균한 백금이를 이용하여 직접 접종하였으며, 선행연구를 통해 확인된 배양조건(28°C, 120rpm)으로 shaking incubator에서 48시간 동안 배양한 결과, 2.73×10^9 CFU/ml의 밀도로 확인되었다.



그림. IBC 미생물(세균) 대량배양조건 확립

② 대량배양 : 300L fermenter(working vol. 250L)에 KAM배지를 이용하여 종균배양한 배양액 1%(v/v)를 접종하고 28°C, 120rpm, 70lpm의 조건으로 48시간 동안 배양한 결과, 8.20×10^8 CFU/ml의 밀도로 확인되었으며 제품화에 충분한 밀도가 배양된 것으로 판단되어 상기의 조건으로 대량배양 조건을 확립하였다.

2) 곰팡이(Bb) 대량배양조건 확립

IBC 미생물 중 곰팡이에 속하는 Bb는 선행연구를 통해 개발된 대량배양조건을 이용하여 대량생산공정을 아래와 같이 확립하였다.

① 종균배양 : PDB 배지 1L에 계대배양한 균주를 화염살균한 백금이를 이용하여 직접 접종하였으며, 선행연구를 통해 확인된 배양조건(25°C, 70rpm)으로 shaking incubator에서 72시간 동안 배양한 결과, 2.14×10^8 CFU/ml의 밀도로 확인되었다.



그림. IBC 곰팡이 대량배양조건 확립

② 대량배양 : 종균병에 물에 불린 기장 100g을 넣고, 멸균기로 멸균하여 대량배양용 배지를 제조하였다. 제조한 배지에 종균배양한 배양액 1%(v/w)를 접종하고 25°C에서 암조건으로 7일간 배양하고 채진동기를 이용하여 포자를 회수한 결과, 3.4×10^9 CFU/ml의 밀도로 확인되어 상기의 조건으로 대량배양 조건을 확립하였다.

4) 동결건조

DISK 원심분리기에서 5,000rpm으로 원심분리하여 배양여액을 제거하고 침전물에 동결건조보호제로 선발한 Glucose를 10% 첨가하여 동결건조기를 이용하여 -82°C에서 48시간 동결건조한다. Xh는 배양여액에 살충성물질이 함유되어 있으므로 원심분리과정을 생략하고 배양액을 그대로 동결건조하여 분쇄한다.

5) 보조제 혼합

Bt 동결건조물 90%, Xh 동결건조물 5%, 자외선차단제(Lowilite-62) 2%, 보습제(Na-PCA) 1%, 계면활성제(Saponine) 2%를 혼합기를 이용해 혼합한다.

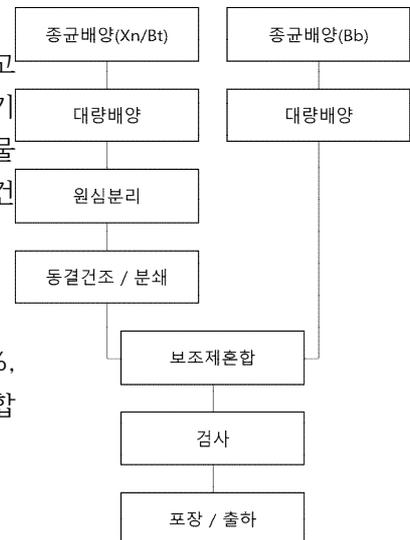


그림. IBC 미생물제 시제품 생산공정도

[2차년도]

[주관기관-안동대] 연구내용

○ 2022년도 춘파 해충 발생 모니터링

요약

2022년 춘파를 대상으로 6종의 해충에 대한 발생 소장이 분석되었다. 경북 안동과 경기도 구리를 대상으로 이 지역들에서 대파 해충 발생을 성페로몬 트랩과 황색점착트랩을 이용하였다.

파밤나방(*Spodoptera exigua*)은 대파 정식 이전부터 포획되었다. 이후 월동 세대를 거치며 야외 발생 세대로 이어졌다. 두 지역 사이에 발생 소장 정도는 차이를 보이지 않아 이 해충이 국내에 월동하면서 차세대 대파 재배지에 유입된 것으로 추정된다. 파좀나방(*Aprolepiopsis sapporensis*)은 월동세대 이후 야외 3세대가 진행되고 있다. 파총채벌레(*Thrips tabaci*)는 대파 정식이후에 트랩에 포획되었다. 이들의 발생은 지속적으로 증가하는 양상을 보이고 있다. 파굴파리(*Liriomyza chinensis*)는 가장 낮은 밀도로 포획되고 있고, 정식이후 지속적으로 발견된다. 고자리파리(*Delia antiqua*)와 작은뿌리파리(*Bradysia agretis*)는 월동세대를 보이며 정식 이후 적어도 3회의 발생 피크를 나타내고 있다.

결과

1. 2022년도 파밤나방 연중 발생 상황

구리와 안동 두 지역 모두 이른 봄부터 성페로몬 트랩에 유입되었다(그림 1). 대파가 정식되기 전에 포획되었기에 월동세대로 추정된다. 4월에 월동세대 피크를 이루며, 5월 이후 최소 3세대를 보였다.

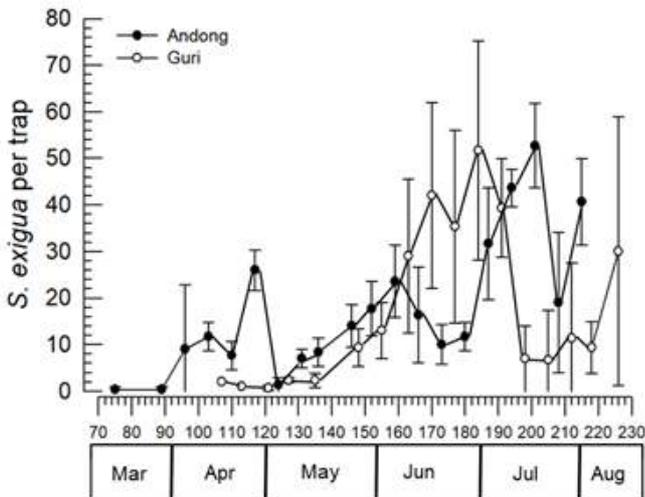


그림 1. 춘파 재배지 파밤나방 발생 소장

시기에 따라 파밤나방의 발생 정도는 상이하였다.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	36	24944.96573	692.91571	6.32	<.0001
Error	70	7675.33333	109.64762		
Corrected Total	106	32620.29907			

지역에 따라 파밤나방 발생정도는 차이가 없었다.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	13.03204	13.03204	0.04	0.8381
Error	105	32607.26702	310.54540		
Corrected Total	106	32620.29907			

2. 2022년도 파좀나방 연중 발생 상황

파좀나방은 3월의 월동 세대가 안동에서 발견되었으며, 소규모 4-5월 제1야외세대 이후 5-6월 제2야외세대가 구리와 안동지역에서 나타났다(그림 2). 이후 감소하면서 수확기에는 낮은 밀도를 보여 저온성 해충으로 간주된다.

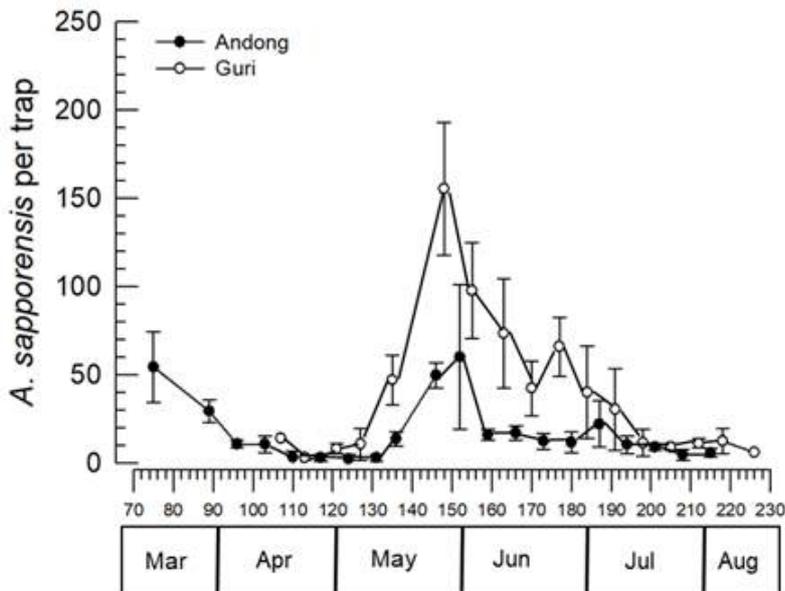


그림 2. 춘파 재배지 파좀나방 발생 소장

계절 진행에 따라 이들의 발생 정도는 상이하였다.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	36	107440.4906	2984.4581	13.22	<.0001
Error	69	15576.0000	225.7391		
Corrected Total	105	123016.4906			

두 지역 사이에 발생 정도는 차이를 보였다. 6월 야외 2세대의 경우 구리 지역의 발생량이 안동지역에 비해

높았다.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	14037.3225	14037.3225	13.40	0.0004
Error	104	108979.1681	1047.8766		
Corrected Total	105	123016.4906			

3. 2022년도 파총채벌레 연중 발생 상황

파총채벌레는 4월 정식 이후에 트랩에 포획되었다(그림 3). 이후 계단형으로 집단의 발생 밀도가 증가하는 양상이 구리와 안동지역 모두에서 나타났다. 그러나 7월 고온기에 발생이 감소하다 8월중순에 폭발적 밀도 증가가 구리 지역에서 나타났다.

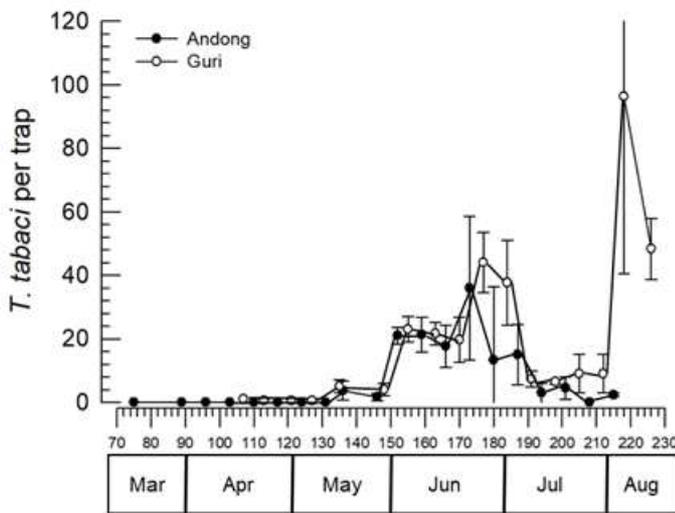


그림 3. 춘파 재배지 파총채벌레 발생 소장

시기에 따라 파총채벌레의 발생량은 큰 차이를 보였다.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	36	40072.50623	1113.12517	7.98	<.0001
Error	70	9764.16667	139.48810		
Corrected Total	106	49836.67290			

두 조사 지역에서 발생량에 차이를 보였다. 이는 8월 시기의 구리 지역에서 높은 발생에 기인된 것으로 보인다. 이때 안동은 대파가 수확된 이후이다. 따라서 안동에서도 이 시기의 대파에서는 파총채벌레의 밀도가 높았을 것으로 추정된다.

4. 2022년도 파굴파리 연중 발생 상황

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	5528.16651	5528.16651	13.10	0.0005
Error	105	44308.50638	421.98578		
Corrected Total	106	49836.67290			

파굴파리는 낮은 밀도로 발생하였다(그림 4). 정식 이후에 포획되어 두 지역 모두에서 지속적으로 발생되고 있다. 8월초에 구리 지역에서 높은 밀도를 보였다.

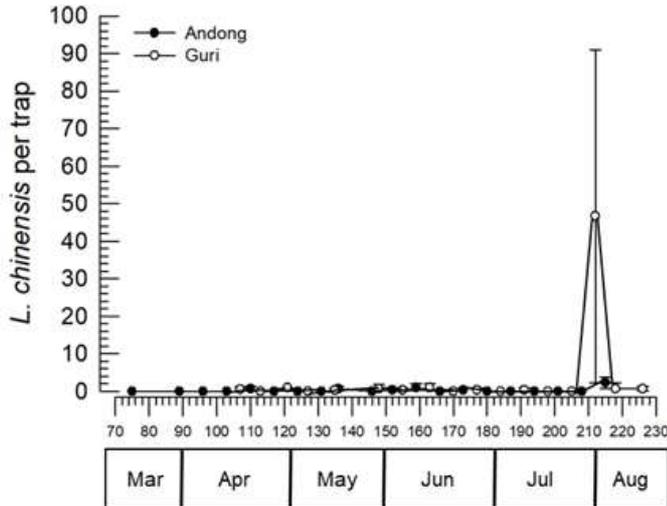


그림 4. 춘파 재배지 파굴파리 발생 소장

발생량은 시기별로 큰 차이를 보였다.지역 사이에 발생량에서도 차이를 보이지 않았다.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	36	6290.34735	174.73187	3.09	<.0001
Error	70	3959.16667	56.55952		
Corrected Total	106	10249.51402			

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	245.56792	245.56792	2.58	0.1114
Error	105	10003.94610	95.27568		
Corrected Total	106	10249.51402			

5. 2022년도 고자리파리 연중 발생 상황

고자리파리는 정식 이전에 발생을 보였으며, 이후 6회 이상의 발생 피크를 보였다(그림 5).

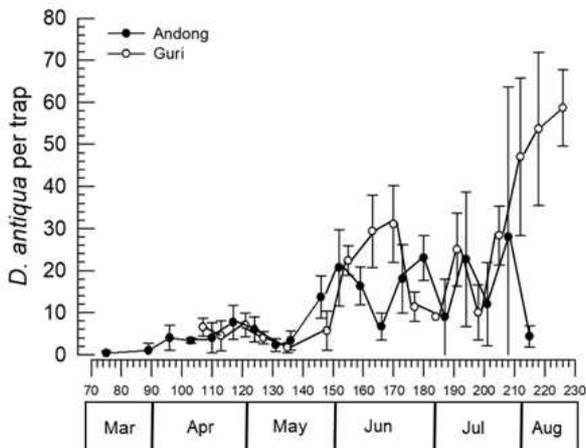


그림 5. 춘파 재배지 고자리파리 발생 소장

시기에 따라 고자리파리의 발생량은 큰 차이를 보였다.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	35	22623.34762	646.38136	7.06	<.0001
Error	69	6313.16667	91.49517		
Corrected Total	104	28936.51429			

두 지역 사이에 발생 정도는 차이를 보였다. 6월 야외세대의 경우 구리 지역의 발생량이 안동지역에 비해 높았다.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	4253.35317	4253.35317	17.75	<.0001
Error	103	24683.16111	239.64234		
Corrected Total	104	28936.51429			

6. 2022년도 작은뿌리파리 연중 발생 상황

작은뿌리파리는 정식 이전에 발생하여 5회 이상의 발생피크를 보였다(그림 6).

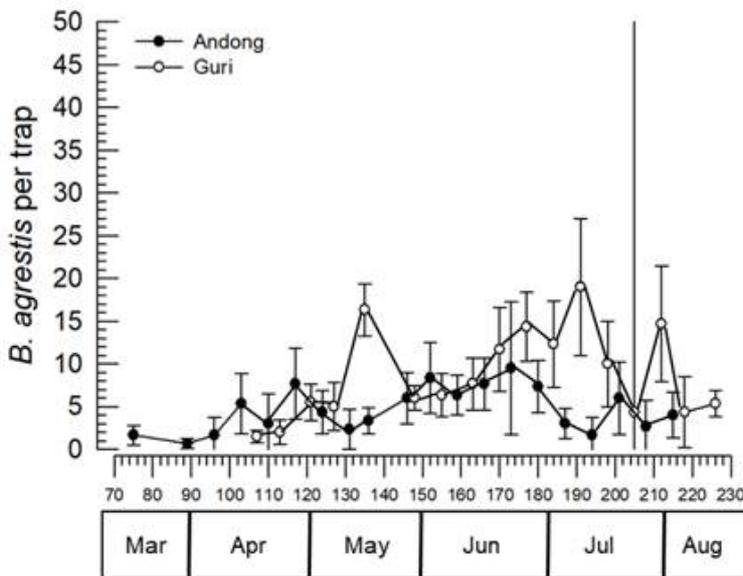


그림 6. 춘파 재배지 작은뿌리파리 발생 소장

시기에 따라 작은뿌리파리의 발생량은 큰 차이를 보였다.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	36	2078.081761	57.724493	4.38	<.0001
Error	69	908.333333	13.164251		
Corrected Total	105	2986.415094			

두 지역 사이에 발생 정도는 차이를 보였다. 5,6월 야외세대의 경우 구리 지역의 발생량이 안동지역에 비해 높았다.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	521.754438	521.754438	22.02	<.0001
Error	104	2464.660656	23.698660		
Corrected Total	105	2986.415094			

○ XP 세균 대사 유전체 및 GXP 기능 분석

요약

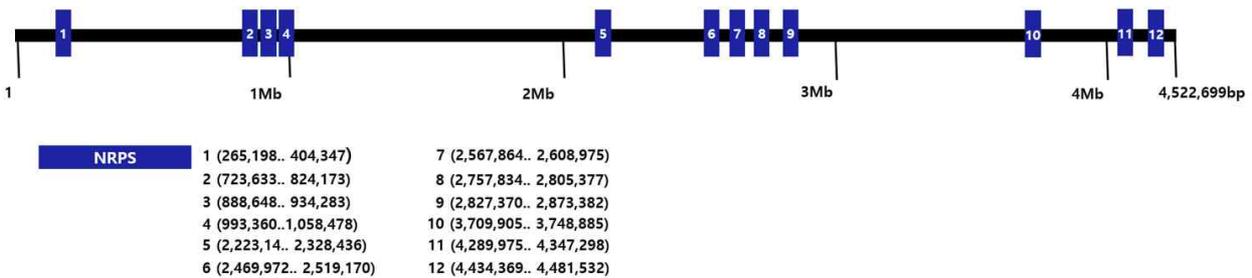
Xenorhabdus/Photorhabdus 계놈으로부터 NRPS 유전체가 분석되었다. 이들 가운데 GameXPepptide를 생산하는 NRPS를 추정하였다. 이를 기반으로 이들 세균이 생산하는 GXP-A의 함량을 LC-MS/MS로 분석하였다. 이 결과 *P. temperata temperata* (Ptt)가 가장 많은 GXP를 생산하는 것을 확인하였다. Ptt의 GXP 발현을 세균 성장곡선에 대비하여 분석하였을 때 물질 생산과 유전자 발현시기 사이에 의미있는 상관관계를 보였다. 이 물질을 생산하는 NRPS를 *gxpS* 라는 유전자라 명명하고 이 유전자의 발현을 조절하기 위해 pBAD 프로모터를 *gxpS*의 프로모터와 교체하는 돌연변이체를 형성하였다. 이 돌연변이체는 *gxpS*의 발현이 유도자인 arabinose (ARA)가 존재하지 않은 경우에 거의 발현하지 않게 하였다. 야생형 Ptt와 비교할 때 돌연변이체는 면역억제 능력에서 현격하게 줄어드는 결과를 얻었다. GXP 자체는 곤충 PLA₂ 효소 활성을 억제하는 것으로 나타나, 이 물질이 곤충의 면역을 아이코사노이드 생합성을 억제하면서 일어나는 것을 확인하였다.

결과

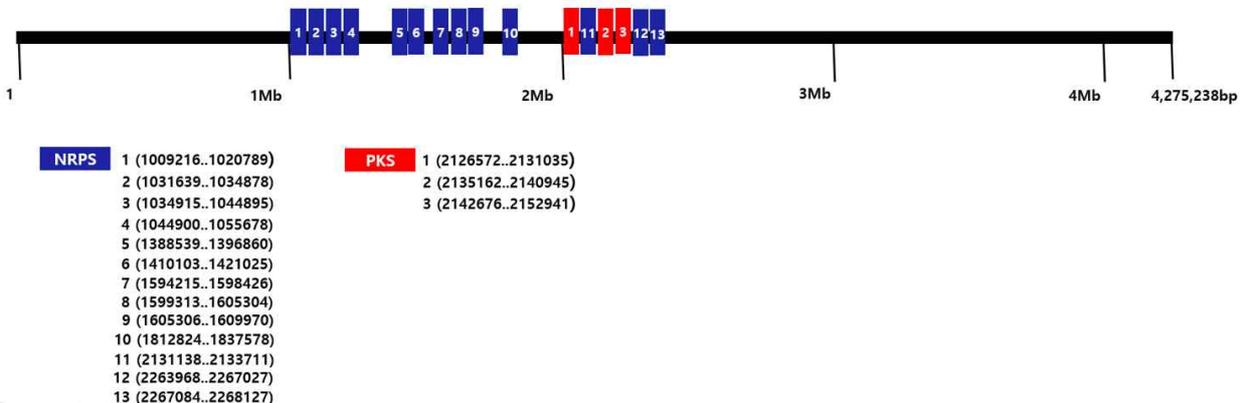
1. 곤충병원선충 공생세균별 NRPS 유전자 추정

곤충병원선충 공생세균인 *Xenorhabdus/Photorhabdus* (X/P) 속 세균들의 전체 DNA 염기서열을 NCBI를 통해 얻은 후 antiSMASH software를 이용하여 전체 NRPS (non-ribosomal peptide synthase) 유전자의 수와 위치를 추정하였다(그림 1). NRPS는 세균, 식물, 곰팡이 등에 존재하는 시스템이며 아미노산 단량체를 빌딩블럭으로 사용하여 다양한 짧은 구조의 고리형 펩타이드를 형성한다. 이러한 NRPS는 특히 세균의 이차 대사산물 생성에 중요한 역할을 한다.

Xenorhabdus hominickii ANU101



Xenorhabdus nematophila



Photorhabdus temperata temperata Meg1(JGVH0000000.1)

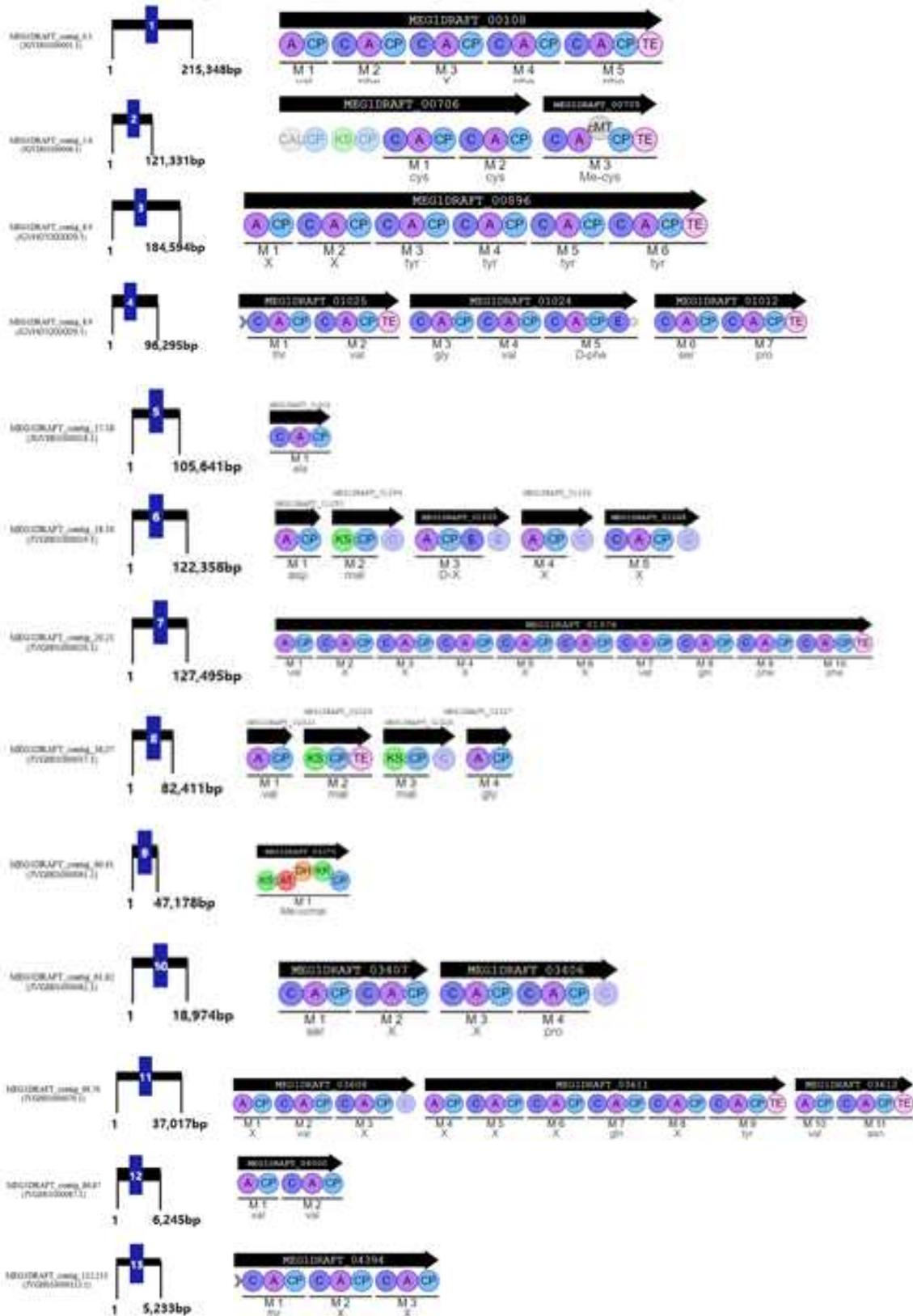


그림 1. *Xenorhabdus/Photorhabdus* (X/P) 속의 세균의 전체 DNA 염기서열에서 전체 NRPS 유전자의 수와 위치를 추정하여 도식화한 결과

2. 곤충병원선충 공생세균 종류별 GXP 생산 NRPS 유전자 구조 상호 비교

곤충병원선충 공생세균인 *Xenorhabdus/Photorhabdus* (X/P) 속 세균의 GXP 생산 NRPS 유전자를 antiSMASH software를 이용하여 분석하였다. GameXPepptide는 X/P에서 NRPS라는 시스템에 의하여 생성된다. *Xenorhabdus* 속 세균 2종 *Photorhabdus* 속 세균 6종, 총 8종의 세균의 GXP 생산 NRPS를 각 세균의 DNA sequence를 이용하여 NRPS를 구성하는 아미노산 단량체와 아미노산 단량체 안의 도메인을 분석하였다(그림 2). 분석 결과를 토대로 각 세균의 구조를 상호 비교해 보면 *Xenorhabdus* 속은 4개의 아미노산 단량체로 이루어진 GXP를 생산하며 *Photorhabdus*는 5개의 아미노산 단량체로 이루어진 GXP를 생산하는 구조적 차이점을 가진다.

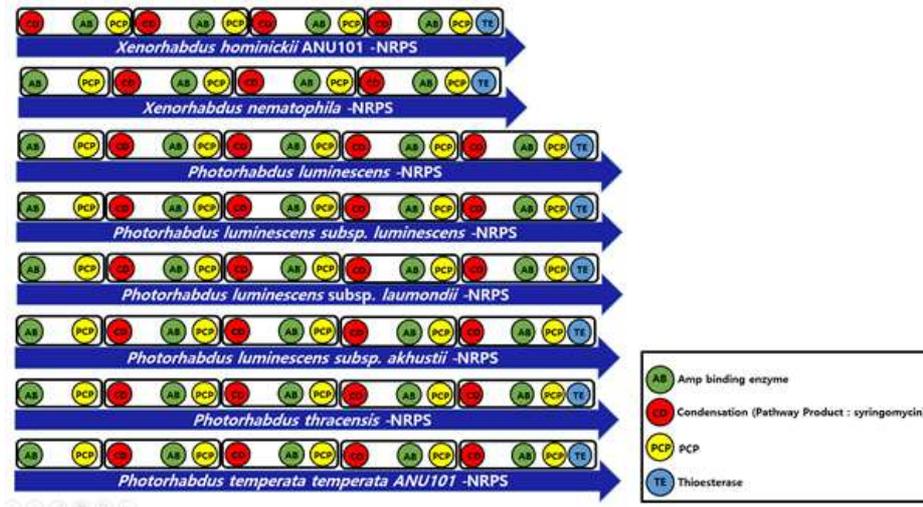


그림 2. *Xenorhabdus* 속, *Photorhabdus* 속 세균의 GXP 생산 NRPS 분석 결과

3. 곤충병원선충 공생세균 별 GXP A 생성량

Xenorhabdus 속 세균 3종과 *Photorhabdus* 속 세균 5종을 각각 TSB 배지 1L에서 72시간 동안 배양하여 이차대사산물을 유기용매인 Ethyl Acetate 3L를 이용하여 추출하였다. 이를 회전 증발기를 이용하여 농축한 후 LC-MS/MS를 이용하여 각 세균별 GXP-A 생성량을 분석하였다(표 1).

표 1. *Xenorhabdus/Photorhabdus* 속 세균들이 생산하는 GXP-A 함량

그 결과 8종의 세균 중 *Photorhabdus temperata temperata*가 가장 많은 양의 GXP A를 생성했다(그림 3). 전체적인 경향으로는 *Photorhabdus* 속이 *Xenorhabdus* 속보다 많은 양의 GXP-A를 생성했다. 이는 GXP 생산 NRPS 유전자 구조 상호 비교에서 얻은 결과로 볼 때 *Xenorhabdus* 속이 GXP를 생산하지 않거나 적게 생성한다기 보다는 GXP-A가 아닌 구조가 유사한 다른 GXP를 생성하는 것으로 추정된다.

Bacteria	GameXPeptide A (ng/mL)			Bacterial culture (ng/L)
	Rep1	Rep2	Rep3	
<i>Photorhabdus temperata temperate</i> ANU101	7169.367	9497.633	7717.893	8128.3 ± 702.74
<i>Photorhabdus laumondii</i>	4,611.7	4,728.8	4,582.6	4,641.0 ± 44.7
<i>Photorhabdus luminescens akhurstii</i>	2,960.7	3,051.3	2,939.4	2,983.8 ± 34.3
<i>Photorhabdus luminescens luminescens</i>	758.38	1332.905	1879.67	1323.6 ± 323.7
<i>Xenorhabdus hominikii</i> A	226.2	258.0	258.5	247.5 ± 10.7
<i>Xenorhabdus nematophila</i> K1	136.5	137.4	139.7	137.8 ± 1.0
<i>Photorhabdus thracensis</i>	2706.05	1.61	5510.1	2739.2 ± 1590.2
<i>Xenorhabdus hominikii</i> DY	-	-	-	-

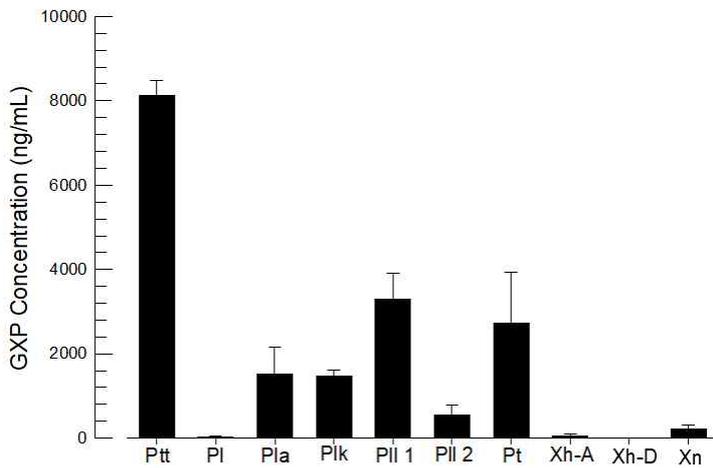


그림 3. *Xenorhabdus/Photorhabdus* 속 세균의 GXP-A 함량

4. 곤충병원선충 공생세균 *Photorhabdus temperata temperata*의 *gxpS* 발현양상

GXP A를 많이 생성하는 *Photorhabdus temperata temperata* (Ptt)의 세균 성장시간에 따른 GXP의 발현양상을 RNA와 단백질 수준에서 측정하였다. Ptt는 0~6시간에서 유도기, 12~36시간에서 대수성장기, 42~90시간에서 정지기를 보였다. 이에 따른 *gxpS*의 발현양상을 측정하기 위하여 각 배양시간별 세균의 RNA를 추출하여 cDNA를 이용하여 qPCR을 진행하였다. 그 결과 36시간에서 mRNA가 가장 많이 발현되었다(그림 4A). 세균 성장시기별 실제 GXP 발현량을 알아보기 위하여 각 시간별 세균 이차대사산물 추출액을 이용하여 LC-MS/MS를 진행했다. 그 결과 84시간에서 가장 많은 발현량을 보였다(그림 4B). 이러한 두 실험 결과의 차이로 미루어 볼 때 36시간에서 많이 만들어지는 GXP 합성 mRNA에 의하여 GXP의 합성이 시작되며 이러한 합성의 결과가 누적되어 84시간에서 가장 많은 양의 GXP가 발현되는 양상이 나타나는 것으로 여겨진다.

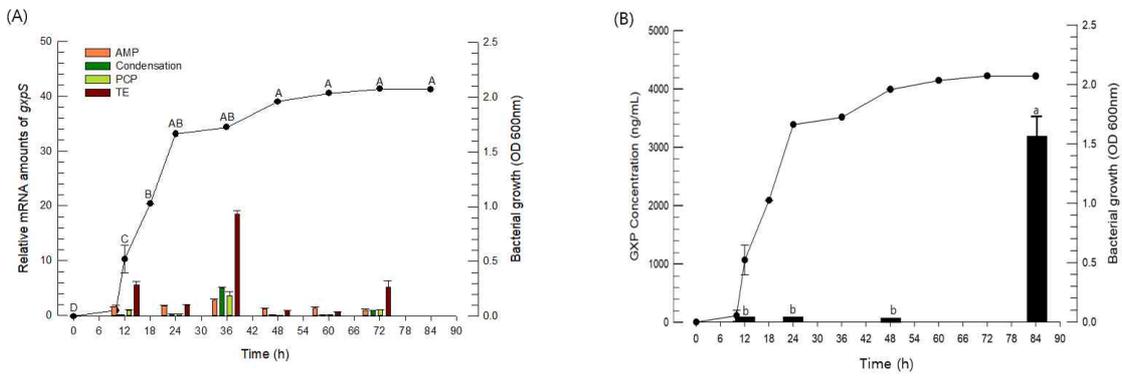


그림 4. *Ptt* 세균 성장과 GXP-A 물질생산. (A) 세균 성장시간에 따른 *Ptt gxpS* mRNA 발현양상. (B) 세균 성장시간에 따른 *Ptt* GXP-A 발현양상

5. *Photorhabdus temperata temperata*의 *gxpS* 돌연변이체 완성

Mutagenesis 기술을 이용하여 *Photorhabdus temperata temperata*의 *gxpS* 돌연변이체를 제작하였다. 아라비노스의 유무에 따라 발현이 조절되는 PBAD Promoter를 상동재조합을 통해 야생형의 *Ptt*의 GXP NRPS 프로모터와 교환하는 방식으로 돌연변이체를 제작하였다(그림 5). 이러한 돌연변이체 *Ptt*의 경우 GXP 발현 프로모터가 아라비노스 오페론에 의하여 조절되므로 아라비노스 첨가유무 및 첨가량에 따라 GXP의 발현량에 차이가 나타난다.

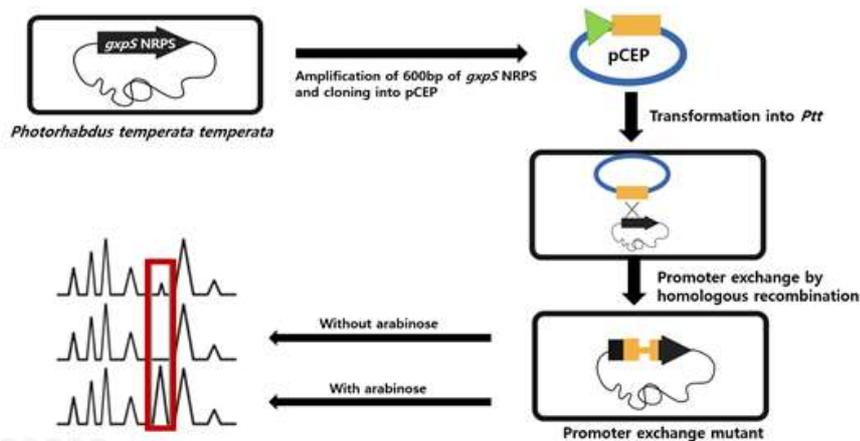


그림 5. *Photorhabdus temperata temperata*의 *gxpS* 돌연변이체 제작 전략

이러한 전략을 바탕으로 *gxpS* 돌연변이체를 생성한 후 제대로 제작이 되었는지 확인하기 위하여 몇가지 확인 과정을 거쳤다. PBAD 프로모터로 *Ptt gxpS*의 프로모터를 교환하기 위하여 사용한 pCEP 벡터의 큰 특징은 Kanamycin 저항성과 pBAD 프로모터이다(그림 6A). 이러한 벡터의 특성을 이용하여 돌연변이체가 제대로 이루어졌는지 확인하기 위해 Kanamycin이 포함된 LB 배지에서 야생형 *Ptt*와 돌연변이체 *Ptt*를 배양하였다(그림 6B). 그 결과 야생형은 자라지 못하였으며 돌연변이체만이 Kanamycin에 저항성을 가지는 것으로 나타났다. 이를 기반으로 상동재조합이 일어났음을 확인하였다.

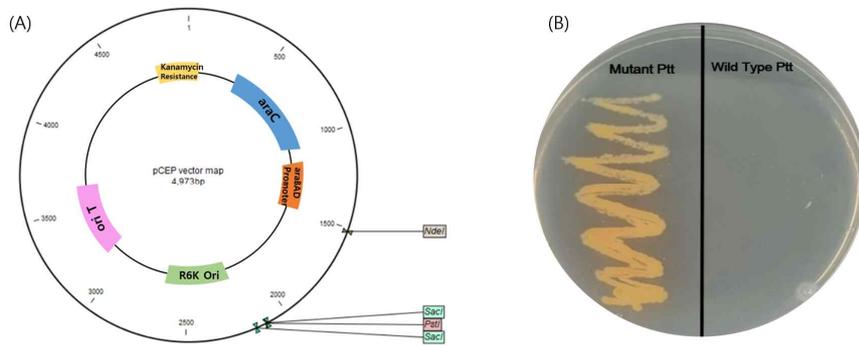


그림 6. *gxpS* 유전자 발현 조절을 위한 Ptt 돌연변이 세균 형성. (A) pCEP vector map. (B) LB kanamycin 50 ppm 배지에서 배양한 야생형 Ptt와 돌연변이체 Ptt

상동재조합이 원하는 부분인 GXP 프로모터와 pBAD 프로모터에서 일어났는지 확인하기 위하여 프라이머를 제작하여 PCR한 후 전기영동하여 야생형과 돌연변이체의 밴드 사이즈 차이를 확인하였다(그림 7). 그 결과 예상 bp와 동일한 사이즈의 밴드를 확인할 수 있었으며 특히 야생형과 돌연변이체 사이에 밴드 사이즈에서 큰 차이가 존재하였다.

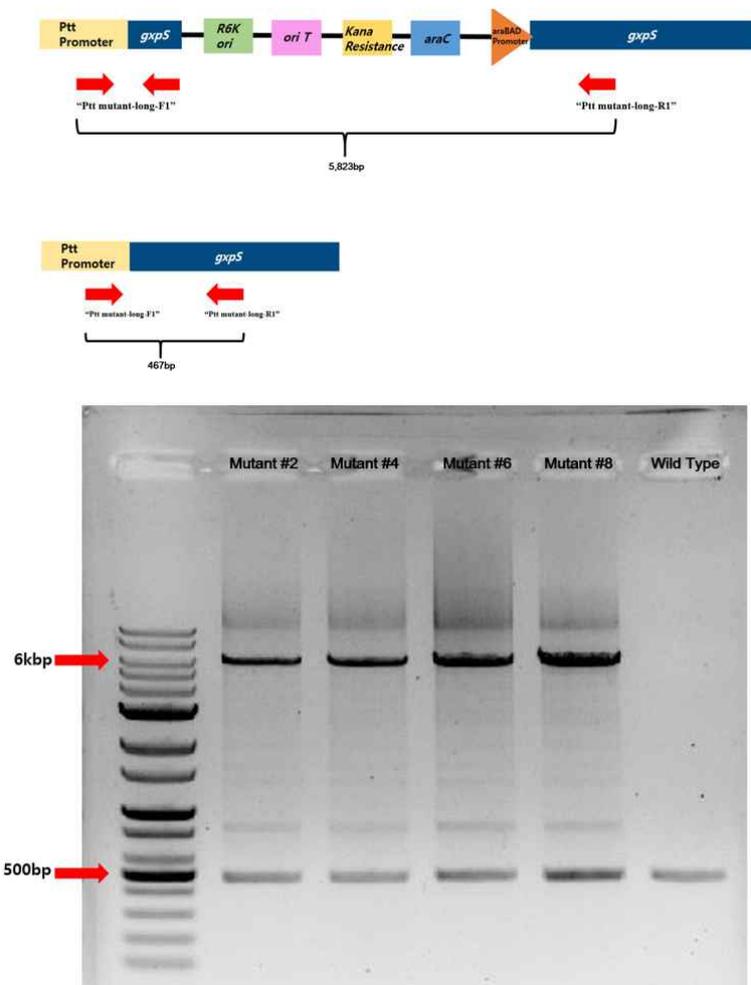


그림 7. *gxpS* 유전자 발현 조절을 위한 Ptt 돌연변이 세균 형성. 프라이머를 제작하여 PCR한 후 전기영동하여 야생형과 돌연변이체의 밴드 사이즈 차이를 확인한 결과임.

이를 통해 우리가 원하는 부분에서 상동재조합이 일어났다고 판단하였고 이를 더 정확하게 확인하기 위하여 sequencing을 진행하였다. 야생형 Ptt의 *gxpS* 프로모터와 pBAD 프로모터의 교환여부가 가장 중요한 사항이므로 이를 중점으로 하여 프라이머를 제작한 후 PCR 후 sequencing 하였다(그림 8). 그 결과 예상되는 sequence와 유사하므로 *gxpS* 돌연변이체를 제작하였다고 여겨진다.

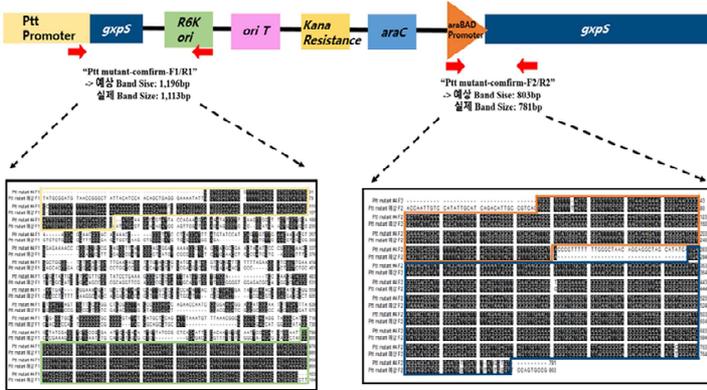


그림 8. *gxpS* 유전자 발현 조절을 위한 Ptt 돌연변이 세균 형성. 야생형 Ptt의 *gxpS* 프로모터와 pBAD 프로모터의 교환여부가 가장 중요한 사항이므로 이를 중점으로 하여 프라이머를 제작한 후 PCR하여 sequencing 한 결과임.

6. *gxpS* 돌연변이체의 생물적 특성

Ptt 야생형과 돌연변이체의 이차대사산물 생성 차이를 알아보기 위하여 이차대사산물을 추출하고 추출액을 TLC(Thin layer chromatography)를 통하여 분석하였다(그림 9). 그 결과 야생형과 아라비노스를 넣어 배양한 돌연변이체는 9개의 동일한 수의 밴드를 확인할 수 있었으나 아라비노스를 넣지 않고 배양한 돌연변이체에서는 이들보다 하나 적은 8개의 밴드를 관찰할 수 있었다. 이러한 차이점은 pBAD 프로모터에 의하여 아라비노스를 넣어주지 않았을 때 GXP가 발현되지 않았기 때문으로 여겨진다.

그림 9. Ptt 야생형과 배양시 아라비노스 첨가 돌연변이체, 아라비노스 무첨가 돌연변이체의 이차대사산물 추출물을 TLC를 통하여 확인한 결과임.

Rf	Wild Type Ptt	Mutant (with arabinose)	Mutant (without arabinose)
1			
0.96			
0.93	*		
0.9			
0.86			
0.83			
0.8			
0.76		*	*
0.73			
0.7			
0.66			
0.63	*	*	*
0.6			
0.56			
0.53	*	*	*
0.5			
0.46			
0.43	*	*	*
0.4			
0.36			
0.33			
0.3			
0.26	*	*	*
0.23	*	*	*
0.2			
0.17	*	*	*
0.14			
0.11	*	*	*
0.08			
0.05	*	*	*
0.02			
Σ	9	9	8

이러한 차이점을 기반으로 돌연변이체의 생물적 특성을 알아보기 위하여 곤충의 면역과 관련된 실험을 진행하였다. 곤충의 세포성 면역 억제 여부를 알아보기 위하여 Nodulation assay와 Hemocyte-spreading assay를 파밤나방 5령충을 대상으로 진행하였다. 먼저 Nodulation assay에서 nodule의 수는 곤충의 면역과 비례한다. 이 실험의 결과 대조군에 비하여 세균배양시 아라비노스 첨가 유무에 상관 없이 Ptt 돌연변이체 추출물 모두 nodule의 수가 줄어들어 면역을 억제하는 능력을 가지는 것으로 여겨진다(그림 10A). 이 두 추출물의 차이점은 GXP의 함유여부로 이 실험 결과 두 물질 사이의 면역억제능력에 차이가 없는 것으로 보아 GXP 이외에도 많은 이차대사산물이 곤충에 면역에 관여하여 이러한 결과가 일어난 것으로 해석할 수 있다. Hemocyte-spreading assay 결과 대조군에 비하여 GXP를 첨가하였을 때 혈구세포의 Spreading 비율이 줄어든 것으로 보아 GXP가 곤충의 세포성 면역을 억제한다고 추정할 수 있다. 아라비노스를 넣어 배양한 돌연변이체 추출물이 아라비노스를 넣지 않고 배양한 돌연변이체에 비하여 혈구세포의 spreading 비율이 통계적으로 유의미하게 적은 것을 확인하였다(그림 10B). 이러한 점들로 미루어볼 때 GXP가 곤충의 세포성 면역을 억제하는 것으로 추정될 수 있다.

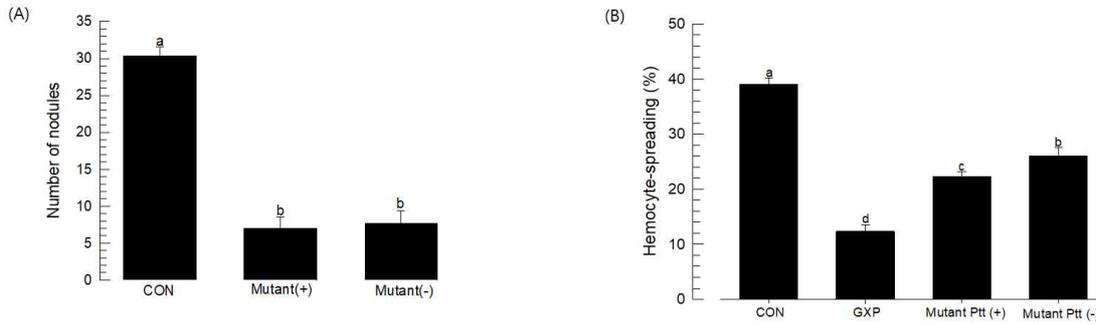


그림 10. Ptt 세균의 *gxpS* 돌연변이체 생물적 특성. (A) 아라비노스 유무에 따른 돌연변이체 이차대사산물 추출액을 파밤나방 유충에서 소낭형성 분석 (B) 아라비노스 유무에 따른 돌연변이체 이차대사산물 추출액을 파밤나방 유충에서 혈구활착분석

7. *gxpS* 돌연변이체를 이용한 GXP 살충력 조사

이차대사산물로 서로 다른 양의 GXP를 만들어내는 돌연변이체 세균을 각 곤충에 농도별로 주입하여 살충력을 조사하였다. 이때 곤충은 파밤나방, 콩명나방, 갈색거저리를 이용하여 실험을 진행하였다(그림 11). 그 결과 콩명나방과 갈색거저리에서는 서로 다른 세균 간의 유의미한 차이가 나타나지 않았다. 그러나 파밤나방에서 야생형, 아라비노스 무첨가 돌연변이체, 아라비노스 첨가 돌연변이체의 경우 세균수를 250마리 주입하였을 때부터 통계적으로 유의미한 서로 다른 사망률을 나타내었다. 250마리의 세균을 주입하였을 때 야생형과 아라비노스 첨가 돌연변이체에 비하여 아라비노스 무첨가 돌연변이의 살충력이 낮게 나타났다. 이러한 세균 간의 차이는 GXP 생성량으로 아라비노스 무첨가 돌연변이체의 경우 GXP를 생성하지 못하므로 이는 GXP가 파밤나방에 대하여 살충력을 가진다고 추정될 수 있다.

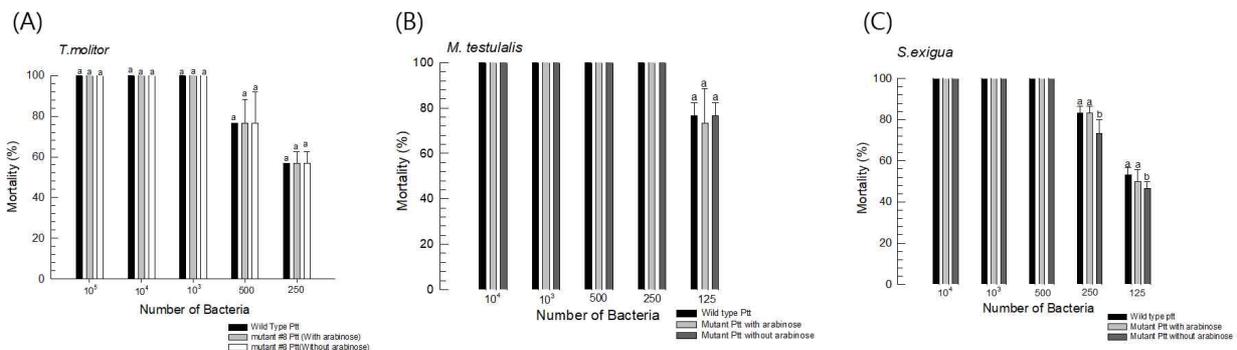


그림 10. Ptt 야생형과 배양시 아라비노스 첨가 돌연변이체, 아라비노스 무첨가 돌연변이체를 곤충에 주입하였을 때 곤충의 살충력을 나타낸 그래프임. (A) 갈색거저리 (B) 콩명나방 (C) 파밤나방

8. GXP의 곤충 면역 억제능력 검증

이러한 차이점을 기반으로 돌연변이체의 생물적 특성을 알아보기 위하여 곤충의 면역과 관련된 실험을 진행하였다. 아이코사노이드류는 곤충에서 면역 중개에 중심적인 역할을 하며 이는 아라키도닉산을 전구물질로 하여 생산되며 이는 PLA2의 촉매작용으로 아라키도닉산이 유리된다. 즉 이러한 PLA2는 곤충의 면역에서 중요한 역할을 한다. 따라서 PLA2 activity 조사를 통하여 GXP가 PLA2를 억제할 수 있는지 실험을 진행하였다

(그림 12). 그 결과 파밤나방의 sPLA2에 GXP가 억제효과를 보이기는 하지만 기존에 잘 알려진 Inhibitor인 BPB에 비하여 그리 높은 억제력을 보이지 못하였다. 즉 GXP는 곤충의 PLA2의 효과적인 억제제로 작용하지는 않았다.

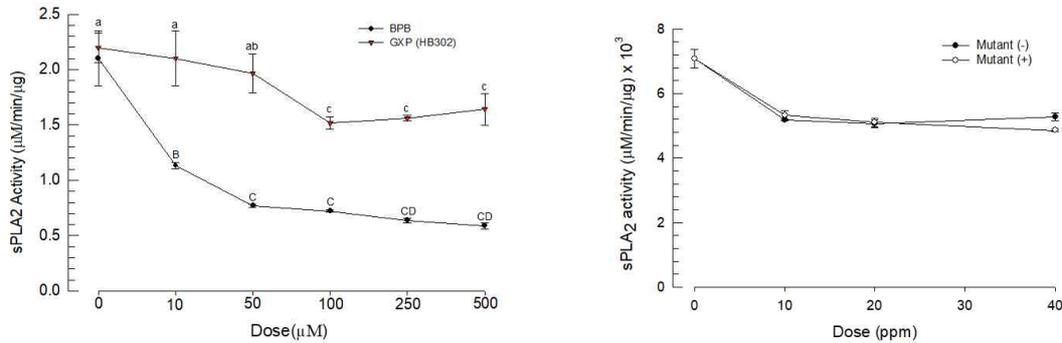


그림 12. 아라비노스 유무에 따른 돌연변이체 이차대사산물 추출액을 파밤나방 유충에서 PLA₂ 활성 억제

곤충의 면역 중 세포성 면역반응에 GXP가 미치는 영향을 알아보기 위하여 nodulation assay와 Hemocyte-spreading assay를 파밤나방 5령충을 대상으로 진행하였다. 먼저 Nodulation assay에서 nodule의 수는 곤충의 면역과 비례한다. 이 실험의 결과 대조구에 비하여 세균배양시 아라비노스 첨가 유무에 상관 없이 Ptt 돌연변이체 추출물 모두 nodule의 수가 줄어들어 면역을 억제하는 능력을 가지는 것으로 여겨진다(그림 13). 이 두 추출물의 차이점은 GXP의 함유여부로 이 실험 결과 두 물질 사이의 면역억제능력에 차이가 없는 것으로 보아 GXP 이외에도 많은 이차대사산물이 곤충에 면역에 관여하여 이러한 결과가 일어난 것으로 해석할 수 있다.

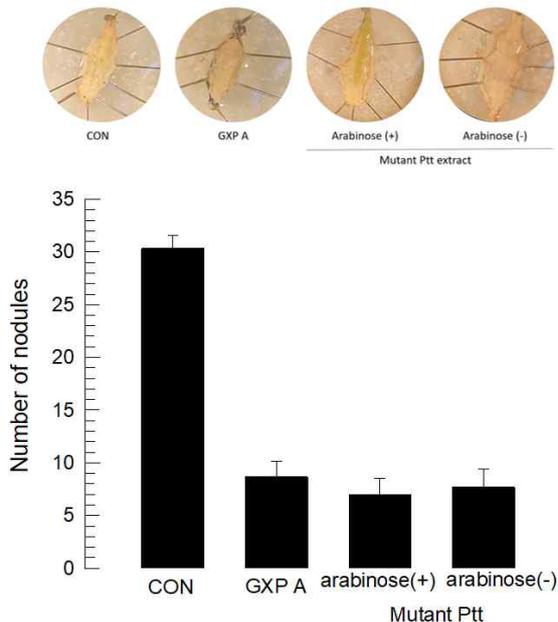


그림 13. 아라비노스 유무에 따른 돌연변이체 이차대사산물 추출액 소낭형성 분석

Hemocyte-spreading assay 결과 대조군에 비하여 GXP를 첨가하였을 때 혈구세포의 Spreading 비율이 줄어든 것으로 보아 GXP가 곤충의 세포성 면역을 억제한다고 추정할 수 있다. 아라비노스를 넣어 배양한 돌연변이체 추출물이 아라비노스를 넣지 않고 배양한 돌연변이체에 비하여 혈구세포의 spreading 비율이 통계적으로 유의미하게 적은 것을 확인하였다(그림 14). 이러한 점으로 미루어볼 때 GXP가 곤충의 세포성 면역을 억제하는 것으로 추정될 수 있다.

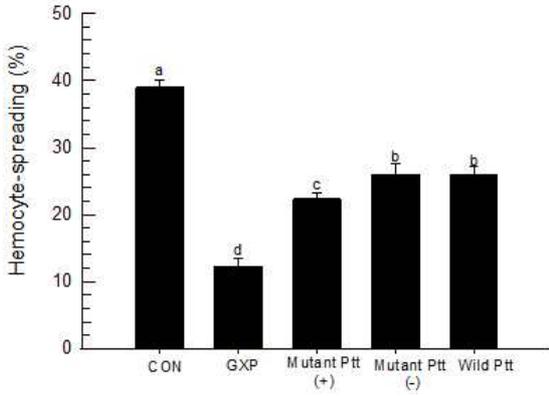


그림 14. 아라비노스 유무에 따른 돌연변이체 이차대사산물 추출액을 파밤나방 유충에서 혈구확산분석

곤충의 면역에서 체액성 피낭형성은 혈구의 도움 없이도 외래체 표면에 멜라닌이 축적되는 경우이다. 일반적으로 이때 프로페놀옥시데이즈를 혈림프로 방출하여 세린 단백질분해효소의 활성화 단계를 통하여 페놀옥시데이즈로 활성화되어 비로서 페놀을 퀴논으로 전환시켜 퀴논이 멜라닌을 형성하게 된다. 즉 페놀옥시데이즈의 활성화는 곤충의 체액성 피낭형성과 비례한다. 따라서 GXP의 체액성 피낭형성 억제 여부를 알아보기 위하여 페놀옥시데이즈 활성화 측정실험을 진행하였다 (그림 15). 그 결과 GXP가 무처리구에 비하여 페놀옥시데이즈 활성을 억제시킨 것으로 나타났다. 또한 야생형 및 돌연변이체 이차대사산물 추출액에서 야생형과 아라비노스 무첨가 돌연변이체에 비하여 아라비노스 첨가 돌연변이체가 높은 페놀옥시데이즈 활성화 억제를 보였다. 이러한 추출물 사이의 차이점은 GXP 함유량으로 이는 GXP가 페놀옥시데이즈 활성을 억제하므로써 곤충의 체액성 피낭형성을 억제한 결과라고 해석될 수 있다.

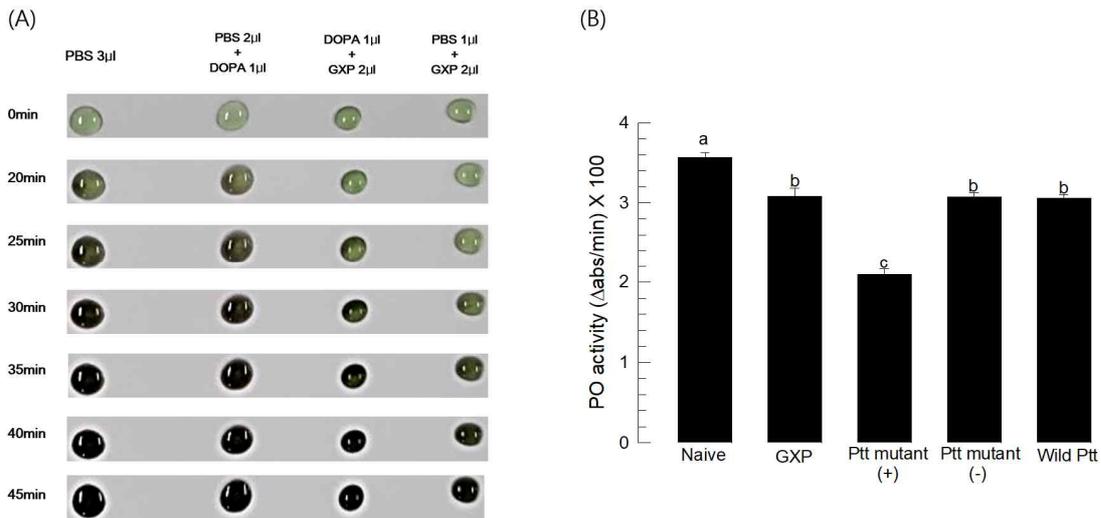


그림 15. Ptt 야생형과 배양시 아라비노스 첨가 돌연변이체, 아라비노스 무첨가 돌연변이체 추출물의 페놀옥시데이즈 활성화도 조사 결과임. (A) 페놀옥시데이즈 활성을 시각화하기 위하여 GXP 첨가와 무첨가 혈림프의 시간 경과별 변화를 촬영한 사진임. (B) 스펙트로포티미터를 이용하여 수치적으로 페놀옥시데이즈 활성을 정량화한 결과임.

9. GXP의 세포독성 검증

MTT는 3개의 방향족 고리를 가지는 Heterocyclic compound의 일종이다. 이 물질은 미토콘드리아 안의

Reductase에 의해 환원되어 발색을 나타내는 Formazan이 된다. 즉 살아있는 세포의 수가 많을수록 Reductase의 양이 많으므로 발색을 나타내어 보라색을 빛을 나타내게 된다. GXP의 세포독성을 검증하기 위해 GXP-A와 야생형과 돌연변이체 이차대사산물 추출물을 배양된 cell에 농도에 맞추어 넣은 후 배양한 후 MTT 용액을 첨가하여 이를 스펙트로포터미터를 이용하여 흡광도를 측정하였다(그림 16). 그 결과 570nm에서 아라비노즈 무첨가 돌연변이체, 야생형, GXP, 아라비노즈 첨가 돌연변이체의 순으로 측정되었다. 이는 아라비노즈 첨가 돌연변이체가 가장 높은 세포독성을 가지며 그 다음은 GXP임을 의미한다. 즉 GXP는 세포독성을 가진다고 판단된다.

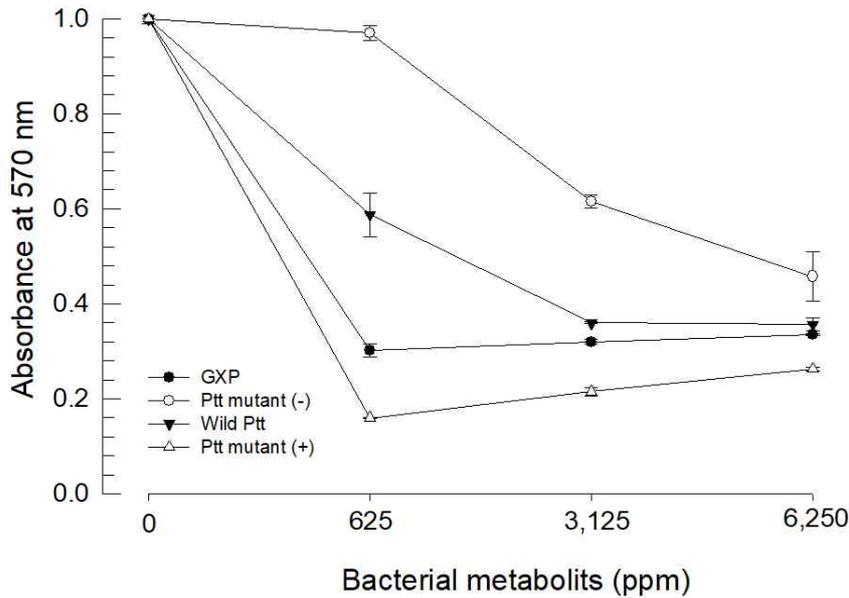
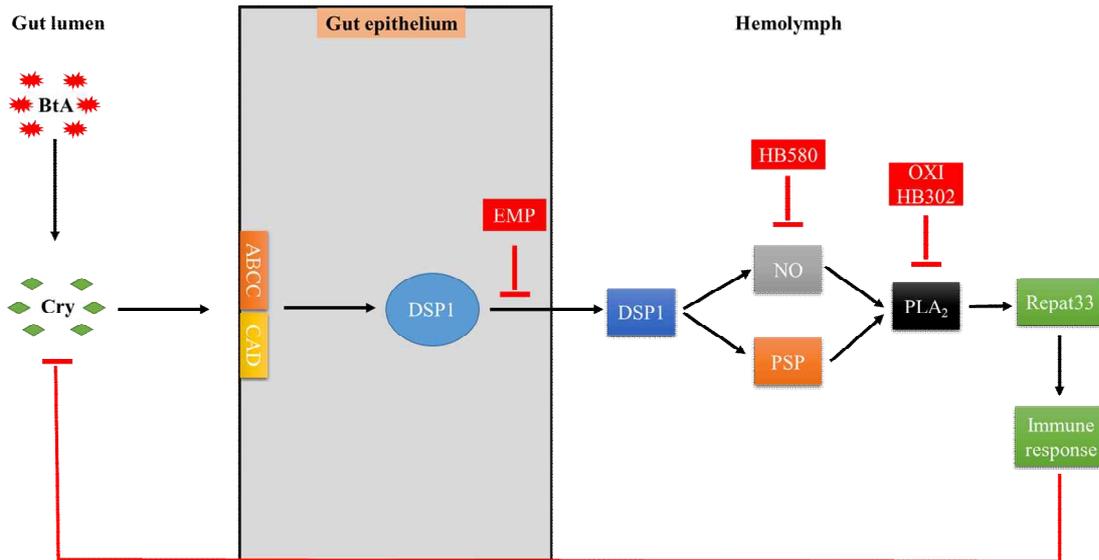


그림 16. Ptt 야생형과 배양시 아라비노즈 첨가 돌연변이체, 아라비노즈 무첨가 돌연변이체 추출물의 MTT test 결과임.

○ 세균 대사체 면역억제 기능

요약

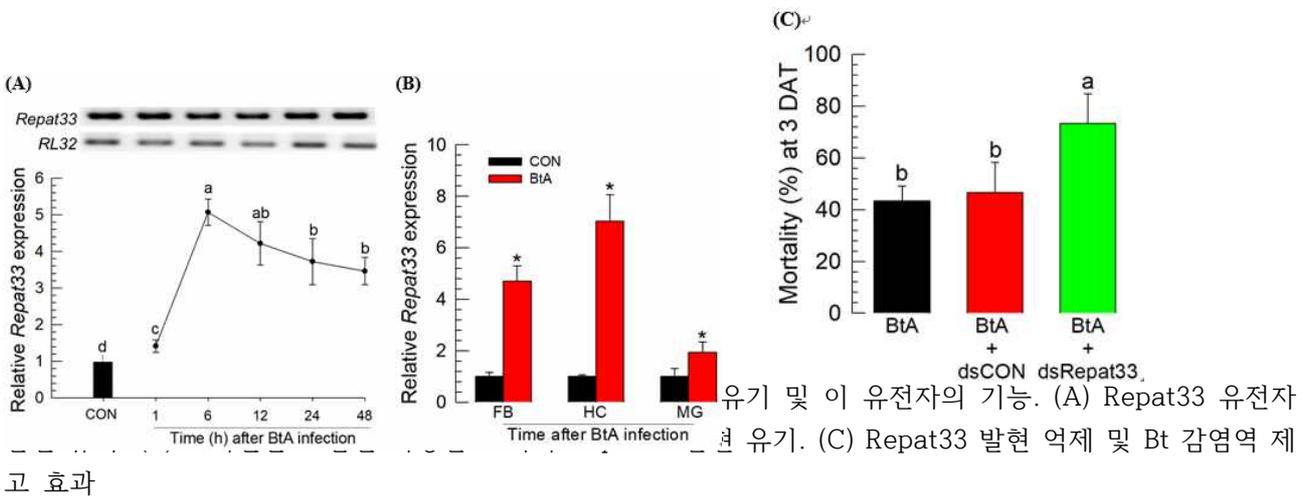
파밤나방을 대상으로 세균 유래 물질의 면역억제 기능을 분석하였다. 특별히 Bt와 같이 소화관에서 감염을 일으키는 경우에 소화관 면역이 중요하기에 이 부위를 중심으로 곤충의 면역반응을 조사하였다. 결과적으로 다음과 같은 Bt 감염에 대해서 곤충 소화관 면역 작용이 관여할 것으로 본다.



결과

1. Bt 감염에 대응하여 Repat33 방어기능

파밤나방에서 Bt의 감염은 Repat33의 발현을 유발하였다(그림 1). 이 Repat33는 전체적으로 44개의 Repat 유전자 가운데 세균감염에 반응하는 유전자로서 특히 아이코사노이드 생합성에 관여 유전자 발현에 전사인자로 여겨진다. Repat33 유전자의 발현을 억제하면 Bt의 감염력을 증가시켜 파밤나방을 이 세균 감염에 더욱 감수성으로 전환시키게 된다. 이는 dsRNA를 이용하여 Repat33 유전자 발현을 억제하여 증명하였다.



2. Bt 감염에 따라 소화관 상피세포 핵 단백질 DSP1의 방출

DSP1은 핵내 존재하는 단백질이고 파밤나방 소화관 상피세포 핵에 존재하였다(그림 2A). 이 단백질이 Bt 감염에 따라 혈장으로 방출되었다. 이는 western blot 결과로 입증하였다(그림 2B).

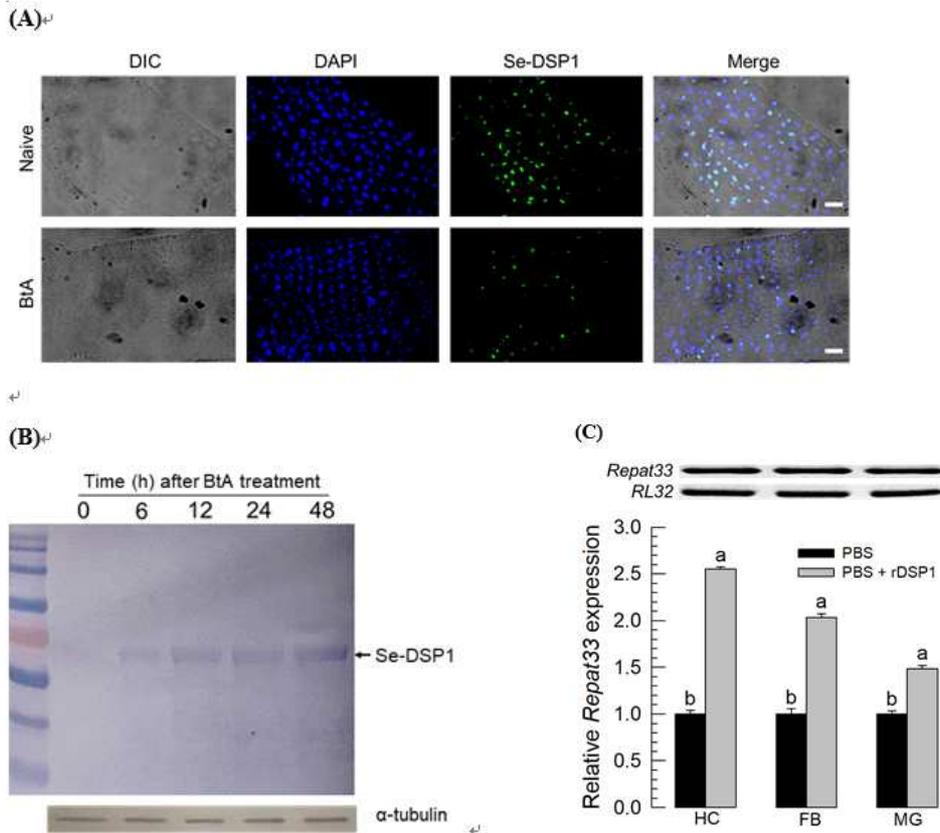


그림 2. Bt 감염에 따라 소화관 상피세포 DSP1 방출. (A) 핵 존재 (B) 혈장 방출 (C) 재조합 단백질의 Repat33 발현 증가

3. 세균 대사체 EMP의 DSP1 방출 억제 효과

Xh의 대사체에서 동정된 EMP는 DSP1의 방출을 억제한다. 이를 이용하여 소화관에 처리한 결과 Bt의 감염에도 불구하고 DSP1의 방출을 억제하였다(그림 3A). 방출 억제는 Repat33의 발현을 막았고, 다시 이는 Bt의 감염력을 증가시켰다(그림 3B,C).

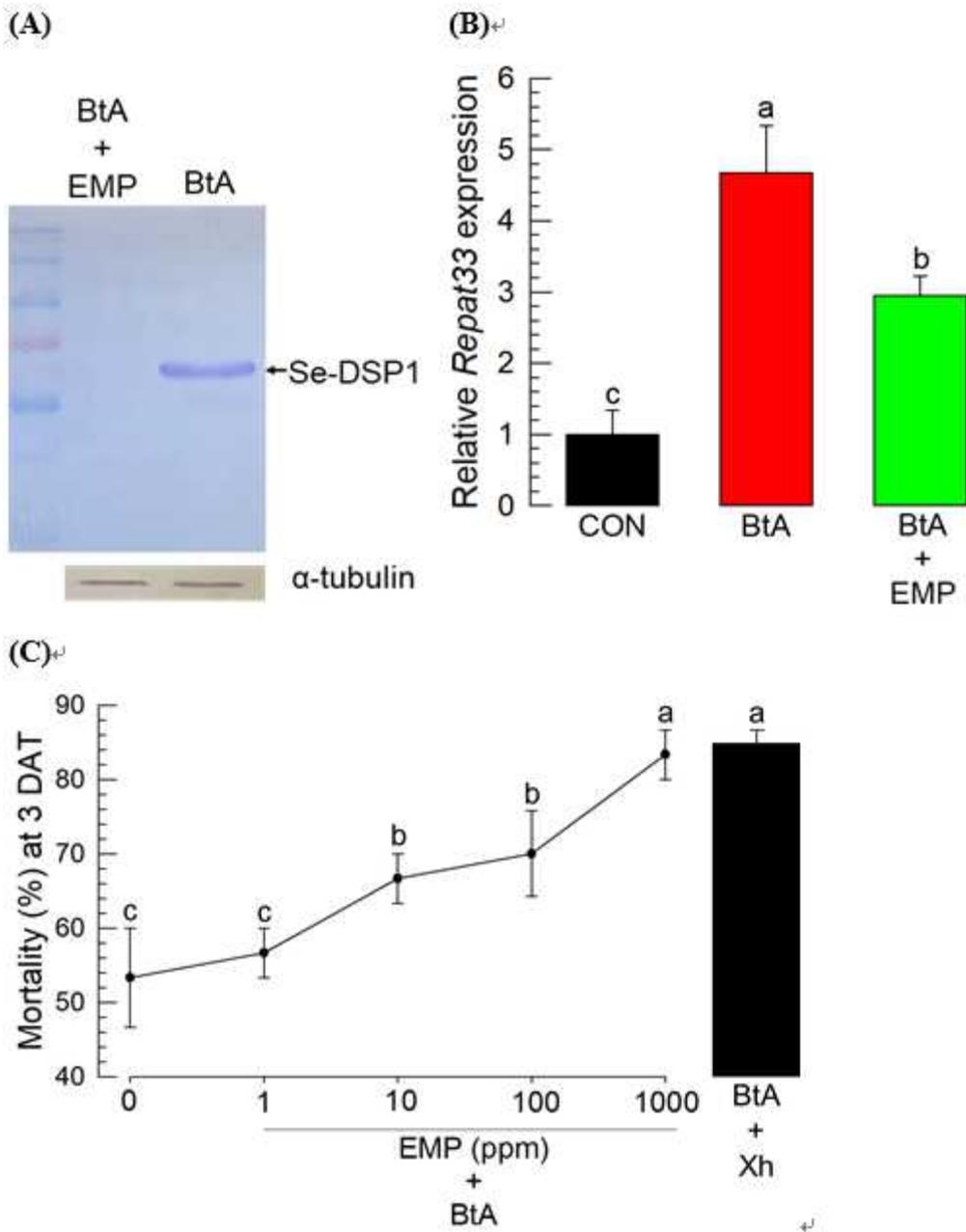


그림 3. DSP1 방출 억제와 면역억제. (A) EMP에 의한 DSP1 방출 억제 효과 (B) 이에 따른 Repat33 발현 억제 (C) Bt 살충력 증가 효과

4. Bt 수용체에 기인한 Bt의 소화관 결합은 DSP1 방출

DSP1은 소화관 손상신호로 여겨진다. 이를 위해서는 Bt가 자신의 수용체와 결합이 필수적이다. 이들 수용체를 RNAi로 억제하면 Bt의 병원력이 떨어지고, DSP1의 방출이 억제되며, 이에 따라 Repat33의 발현 감소로 기인된다(그림 4).

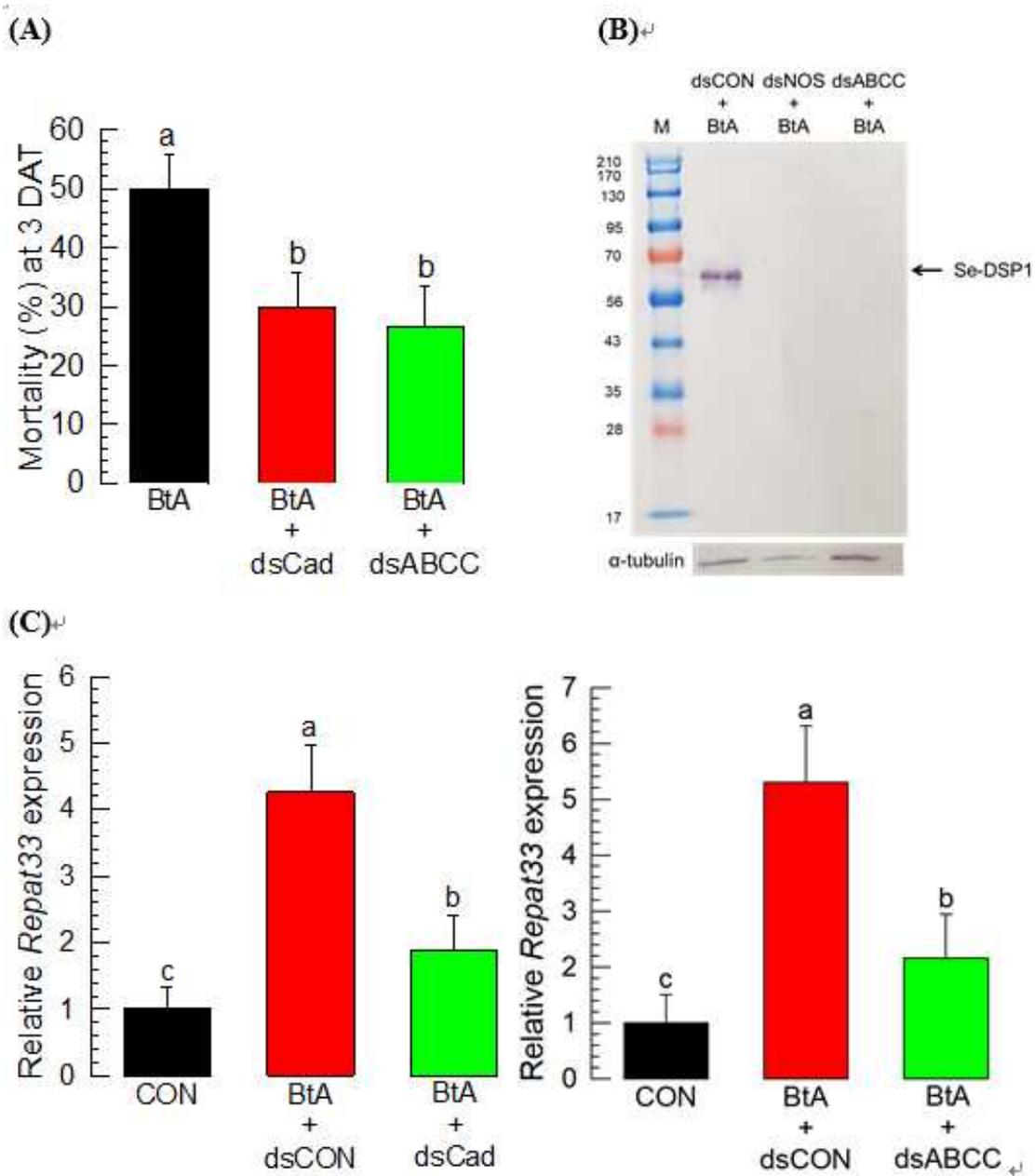


그림 4. Bt 수용체에 따른 Bt 감염 신호는 DSP1의 방출 유도. (A) Bt 수용체 발현 억제는 Bt 감염력을 억제 (B) 이는 DSP1의 방출을 억제 (C) Repat33 발현 억제

5. DSP1/PLA2/Repat33 신호

Bt 감염에 따라 방출된 DSP1은 PLA2 활성화를 유도한다(그림 5). 활성화된 PLA2는 아이코사노이드 생합성을 유도하고 이는 다시 Repat33를 발현시키게 된다.

6. DSP1/NO/Cytokine/PLA2/Repat33 신호

Bt 감염에 따라 방출된 DSP1은 산화질소 또는 사이코카인을 활성화하고 이는 PLA2 활성화를 유도한다(그림 6). 활성화된 PLA2는 아이코사노이드 생합성 및 Repat33를 발현시키고 이는 다시 Bt 병원력을 억제하게 된다.

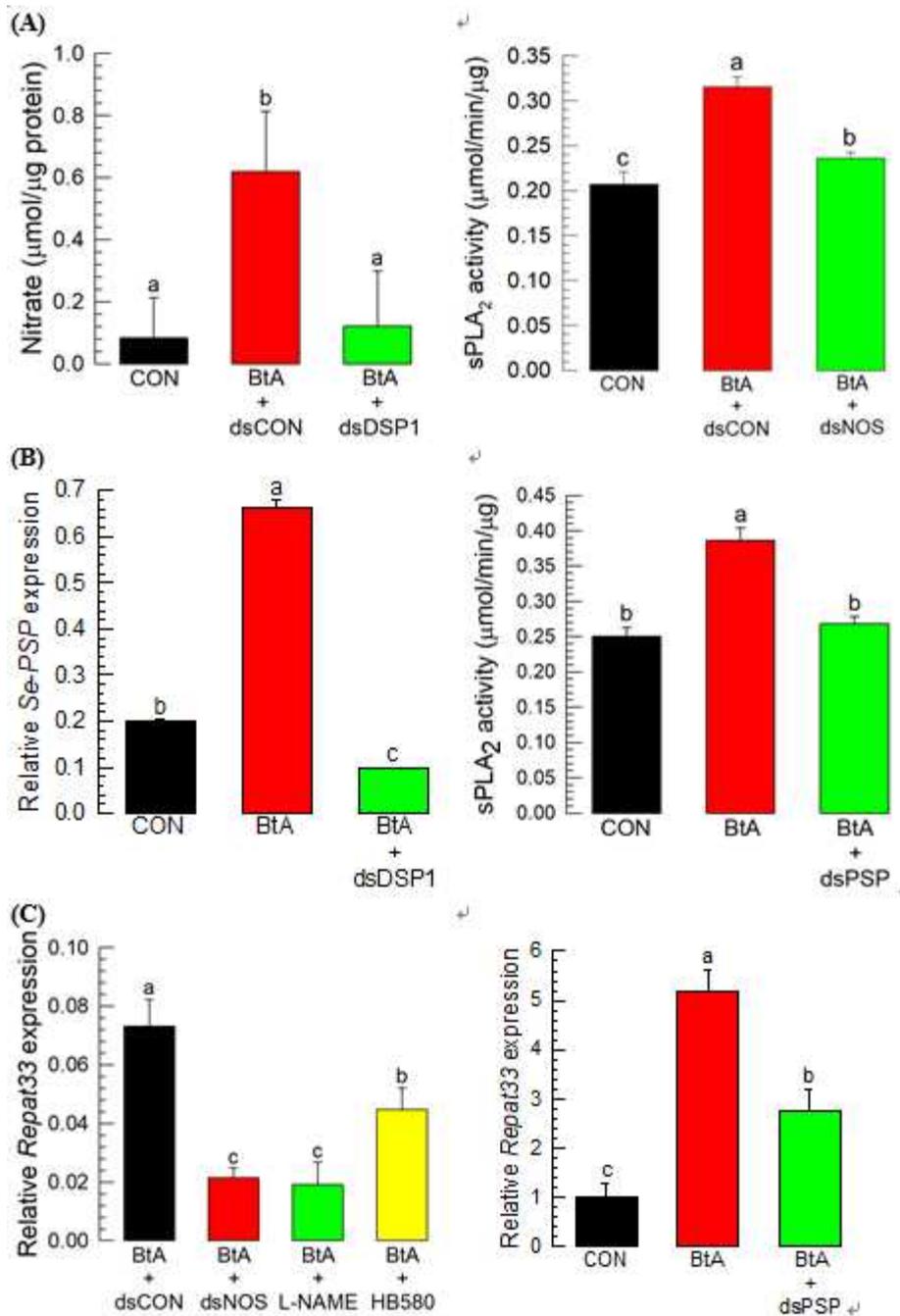


그림 6. DSP1/NO/Cytokine/PLA2/Repat33 면역신호

○ 대파 나방류/총채벌레류 IBC 농약 개발

[대파 나방류 IBC 농약 개발]

요약

파밤나방(*Spodoptera exigua*)에 대한 *Bacillus thuringiensis* (Bt)의 살충력을 증가시키기 위해 곤충병원세균인 *Xenorhabdus hominickii* (Xh)의 배양액 추출물을 이용하여 종합생물방제(IBC) 기술을 개발하였다. Bt aizawai (BtA) 균주가 파밤나방에 대한 살충력이 높았고, 여기에 Xh 배양액을 첨가하면 Bt의 살충력을 크게 증가시켰다.

결과

1. 파밤나방 방제에 효과적 Bt 스크리닝

파밤나방(*Spodoptera exigua*)에 대한 종합생물방제(IBC) 기술을 개발하기 위해 상이한 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 균주를 스크리닝하였다(그림 1). 네가지 Bt 약제는 모두 파밤나방에 살충력을 발휘하였다(그림 1A). 그러나 Bt aizawai (BtA)가 가장 높은 방제 효과를 주었다(그림 1B).

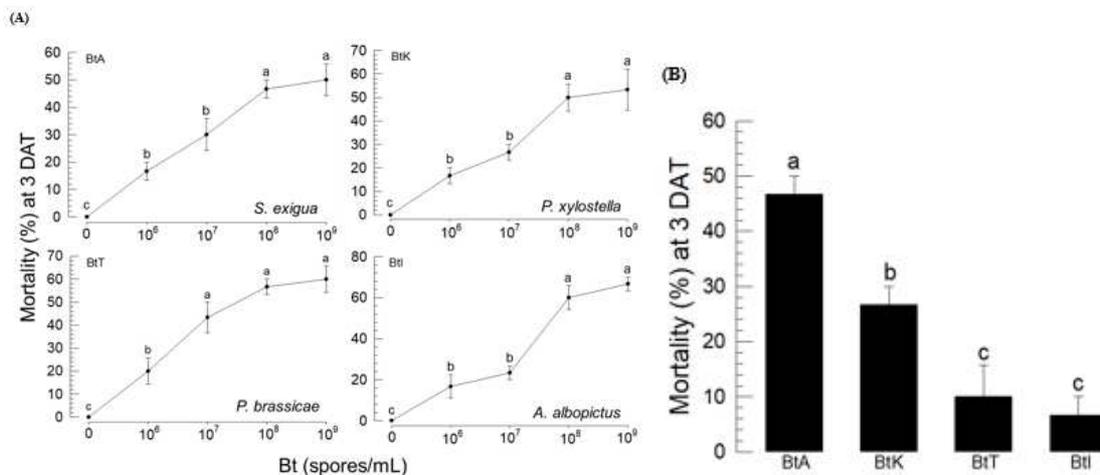


그림 1. 파밤나방 방제를 위한 비티 약제 스크리닝

2. 곤충병원세균 *Xenorhabdus hominickii* (Xh) 배양액의 Bt 살충력 제고 효과

BtA 약제는 파밤나방을 50% 방제 효과를 주었다. 이러한 방제 효과를 제고시키기 위해 면역억제제를 생산하는 X/P 세균 가운데 파밤나방에 살충력이 높은 *Xenorhabdus hominickii* (Xh)를 이용하여 이 세균의 배양액에 포함된 면역억제물질을 이용하려 하였다. 먼저 이 배양액을 Bt에 첨가한 경우 살충력을 현격하게 증가시켰다(Fig. 2A). X/P에 속한 세균류의 배양액 포함된 대사물질 가운데 면역억제와 관련되어 알려진 물질이 GameXPeptide (GXP), oxindole (OXI), 2-ethoxy-3-methoxyphenol (EMP) 그리고 benzylideneacetone (BZA)이 포함된다. 이들 물질이 실제로 Btb의 병원력을 증가시키는 지를 분석하였다(그림 2B). 이들 물질은 실험분석 결과 모두 Bt의 파밤나방에 대한 살충력을 증가시켰다(그림 2C).

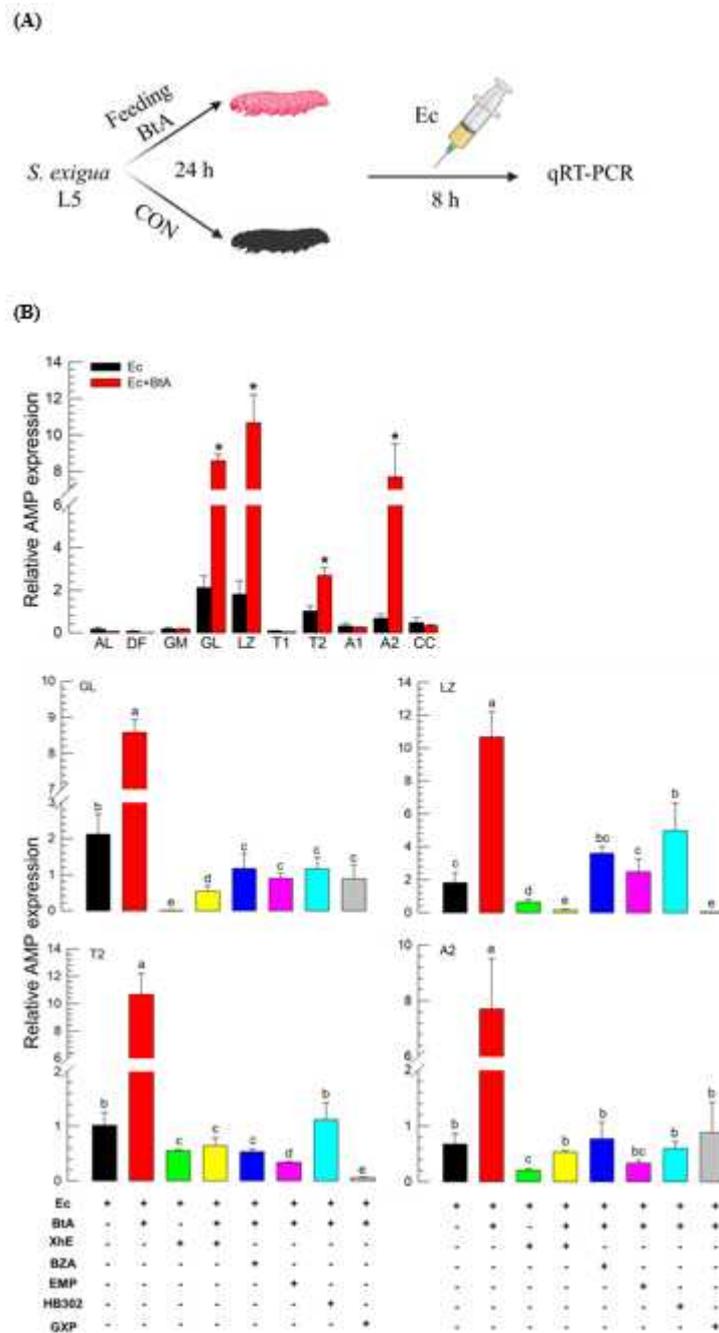


그림 3. Bt 감염에 대한 파밤나방의 면역증가 효과. (A) 실험 개요 (B) Bt 처리 이후 파밤나방의 면역력 증가 효과

4. Xh 대사체에 의한 Bt 감염에 따른 파밤나방 세포성 면역 방어 능력 억제 효과

파밤나방이 Bt 감염에 대해서 세포성 방어능력을 알아보기 위한 실험이 진행되었다. Bt 처리와 함께 Xh의 대사체를 처리한 결과 소낭형성 능력이 현격하게 감소하였다(Fig. 4).

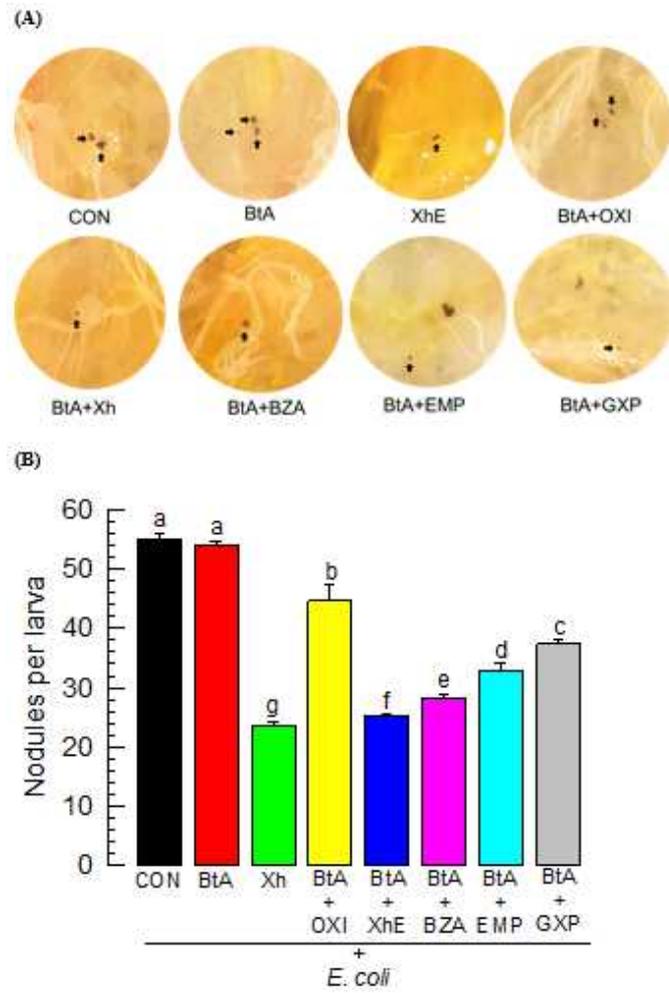


그림 4. Xh 추출물 또는 대사체의 Bt에 대한 세포성 면역억제 기능. (A) 소낭형성 사진 (B) 처리에 따른 소낭형성 수 비교

이상의 결과들은 Xh 배양액을 이용하여 Bt의 활성을 높이는 IBC 살충제 개발이 가능하다는 것을 보여 주었다. 이를 증명하기 위해 이들의 혼합체를 이용하여 포장 조건에서 방제 효과를 검정하였다.

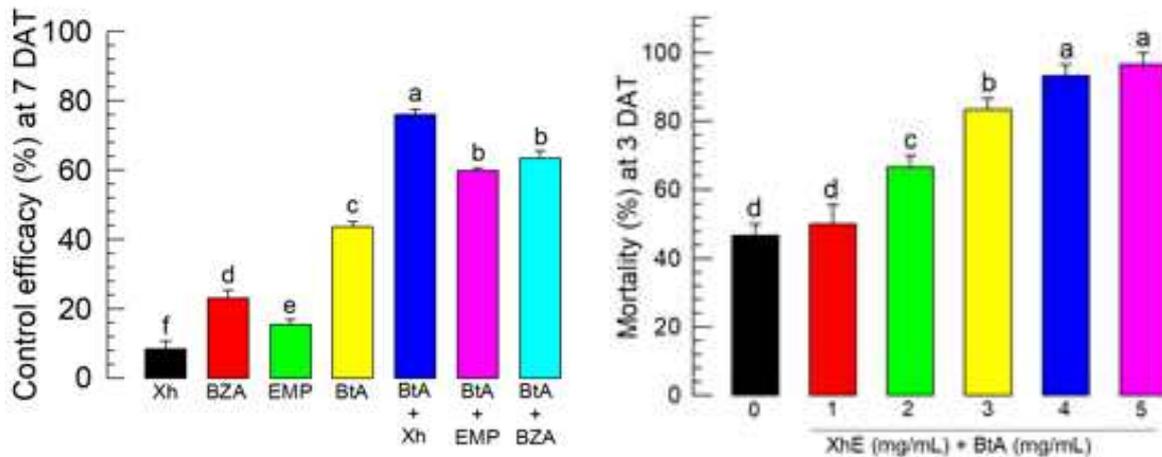


그림 5. Bt+Xh 종합생물방제제의 파밤나방 방제 효과

이상에서 개발된 약제의 적용 범위를 분석하였다. 4종의 나방류, 2종의 딱정벌레류 그리고 1종의 파리를 대상으로 분석한 결과 나방류에 방제 효과가 높았으며, 이 가운데 *Spodoptera* 속에 특이적으로 방제 효과가 높은 것을 알 수 있다(그림 6).

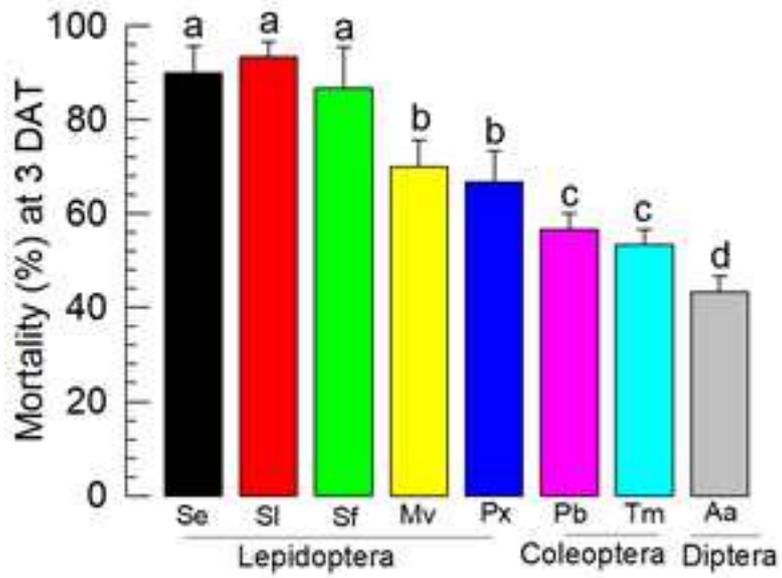


그림 6. Bt+Xh 종합생물방제제의 *Spodoptera* 속 나방류에 대한 선택적 방제 효과

[대파 총채벌레류 IBC 농약 개발]

요약

파총채벌레(*Thrips tabaci*)에 대한 종합생물방제(IBC) 기술을 개발하기 위해 상이한 살충성공팡이의 스크리닝이 진행되었다. 이 가운데 *Beauveria bassiana*와 *Metarhizium rileyi* 두 균주가 높은 살충성을 나타냈다. 그러나 이들의 살충 능력은 화학방제제인 스피노사드 처리에 비해 현격하게 낮고 느렸다. 이를 보완하기 위해 곤충면역억제 효과가 있는 세균 배양액을 첨가하게 되었다. 여기에 사용된 세균은 *Xenorhabdus hominickii*로서 이 세균 배양액을 진균 포자에 첨가하여 IBC 방제제 개발을 시도하였다. 결과적으로 이 IBC 제제는 파총채벌레에 대해서 현격하게 높은 방제 효율을 나타냈다. 그러나 스피노사드 처리에 비해 약 15%의 방제효과 차이를 보여 향후 이를 보완하는 실험이 진행될 필요가 있다.

결과

1. 파총채벌레에 대한 상용 화학농약의 방제 효율

시판되는 총채벌레 방제 약제를 대상으로 파총채벌레에 대해 방제 효과가 높은 약제를 스크리닝하였다(Fig. 1). 총 13종의 살충제는 *Bacillus thuringiensis* (Bt)와 같은 생물농약도 포함되었지만 나머지 12종은 화학농약으로 유기인계, 카바메이트계, 피레스로이드, 네오니코티노이드, 스피노사드, 곤충생장조절제를 포함하였다(Table 1). 이들의 처리는 파총채벌레에게 다양한 방제 효과를 나타냈다(Fig. 1A). 이들 가운데 3종류(벤푸라카브, 디노테퓨란, 스피노사드)가 높은 방제 효과를 주었다. 이들 약제를 대상으로 추가로 상이한 농도별 방제 효과를 분석하였다(Fig. 1B). 이 가운데 스피노사드의 높은 방제효과를 확인하였다. 이를 바탕으로 스피노사드의 상이한 발육태에 대한 방제효과를 분석하였다(Fig. 1C). 결과적으로 스피노사드는 약충과 성충 모두에서 높은 방제효과를 주었다.

Table 1. List of 13 chemical insecticides along with recommended dose of application

Insecticide treatments	Common names	Suppliers	Formulations	Commercial names	Recommended doses (ppm)
T1	Indoxacarb	Kyeong Nong, Dague	WP	Ammate	500
T2	Benfuracarb	Dongbang Agro, Seoul	WG	Theone	1,000
T3	Tebufenozide	Kyeong Nong, Dague	WP	Mimik	1,000
T4	Chlorpyrifos	Hannong, Seoul	WP	Thusban	1,000
T5	Dinotefuran	Youngil, Incheon	WG	Phantom	1,000
T6	Lambda-cyhalothrin + Thiamethoxam	Syngenta Korea, Seoul	WG	Stoneette	500
T7	Pyriproxyfen + spinetoram	Dongbang Agro, Seoul	EW	Quickbird	500
T8	Bistrifluron + Chlorfenapyr	Dongbu Fine Chemical	SC	Racer	500
T9	Fluxametamide	Gyeongnong	EC	Captain	500
T10	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. aizawai	Youngil Chemical	WP	Scorpion	1,000
T11	pyriproxyfen	Dongbang Agro, Seoul	EC	Sinkiru	500
T12	Spinosad	Dongbang Agro, Seoul	WG	Boomerang	500
T13	Bifenthrin	Dongbang Agro, Seoul	WP	Tasta	1,000

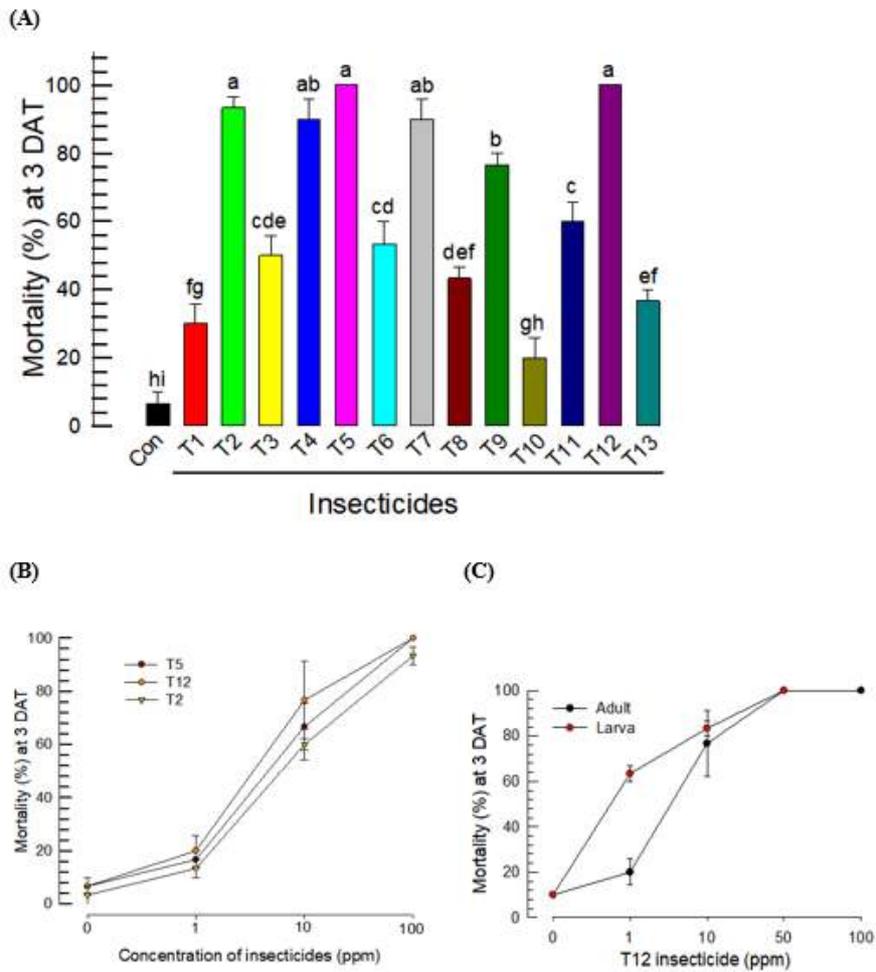


그림 1. 파총채벌레에 대한 상용 살충제 스크리닝. (A) 13 종류의 상용 살충제의 방제효과 비교 (B) 방제가 높은 3종 살충제 양독 반응 (C) 스피노사드(T2)의 약충과 성충에 대한 방제효과

2. 파총채벌레에 대한 곤충병원곰팡이 방제 효율

생물종합방제제로 사용될 곤충병원곰팡이를 선발하기 위해 3종의 곰팡이를 스크리닝하였다(그림 2). *Beauveria bassiana* (Bb), *Metarhizium rileyi* (Mr), *Metarhizium guizhouensis* (Mg) 세 종의 포자를 동일한 농도로 파총채벌레에 살포한 결과 Bb와 Mr이 통계적 차이 없이 높은 방제 효과를 주었다(그림 2A). 그러나 비교한 화학약제인 스피노사드에 비하면 현격하게 낮은 방제효과를 주었다. 방제효과가 높은 두 종의 병원곰팡이 가운데 Bb의 효과가 높기 이를 대상으로 농도별 살충력을 조사한 결과 10^7 포자/mL 농도 이상의 살포액이 가장 높은 방제 효과를 주었다(그림 2B).

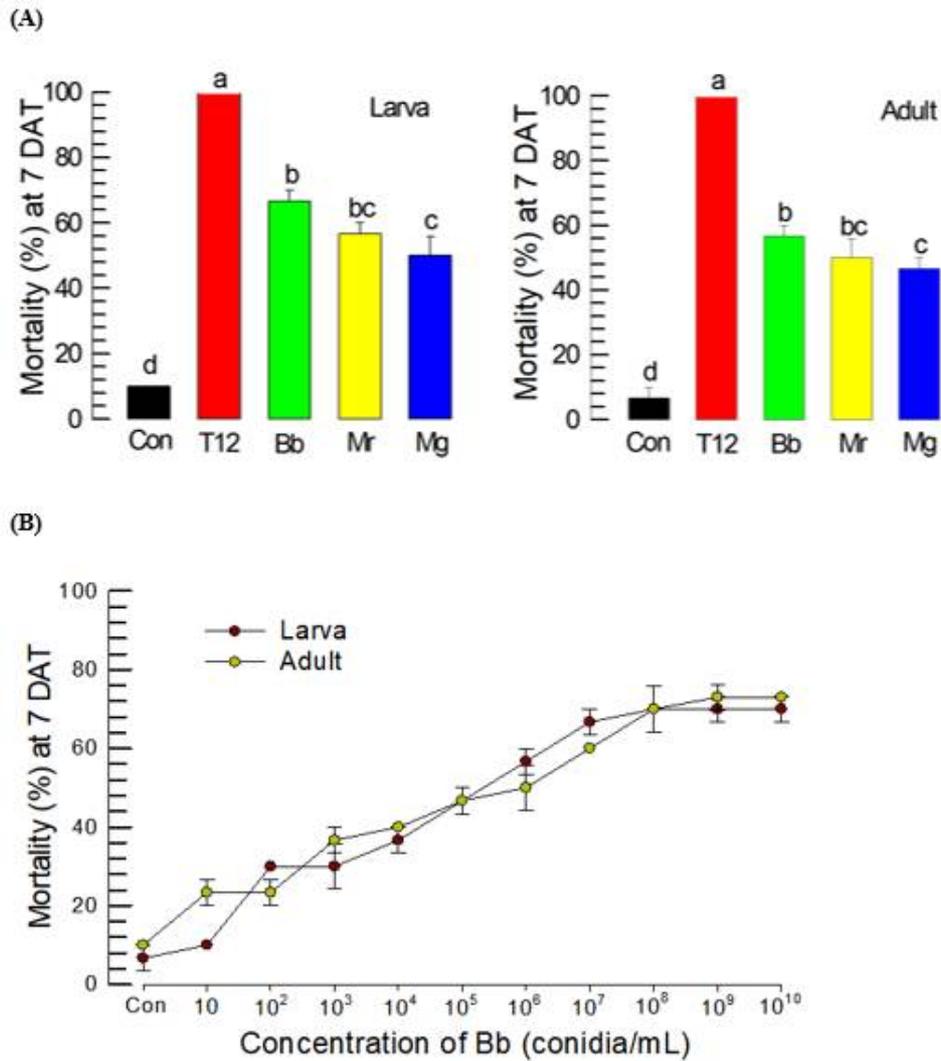


그림 2. 파총채벌레에 대한 곤충병원곰팡이 스크리닝. (A) *Beauveria bassiana* (Bb), *Metarhizium rileyi* (Mr), *Metarhizium guizhouensis* (Mg) 세 종의 곰팡이 방제 효과 (B) Bb 농도별 방제효과

3. 세균 배양액 첨가에 따른 파총채벌레에 대한 곤충병원곰팡이(Bb)의 살충력 제고 효과

*Xenorhabdus*와 *Photorhabdus* (X/P)에 속한 세균류의 배양액이 Bb에 대한 살충력을 제고시키는 효과를 검정하였다(그림 3). 총 6 종의 세균 배양액을 실내에서 생물검정한 결과 *X. hominickii* 배양액이 가장 우수한 살충력 제고 효과를 주었다(그림 3A). 이를 다시 야외 실험을 통해 다시 *X. hominickii* 배양액이 가장 우수한 방제 효과를 준 것을 확인하였다(Fig. 3B).

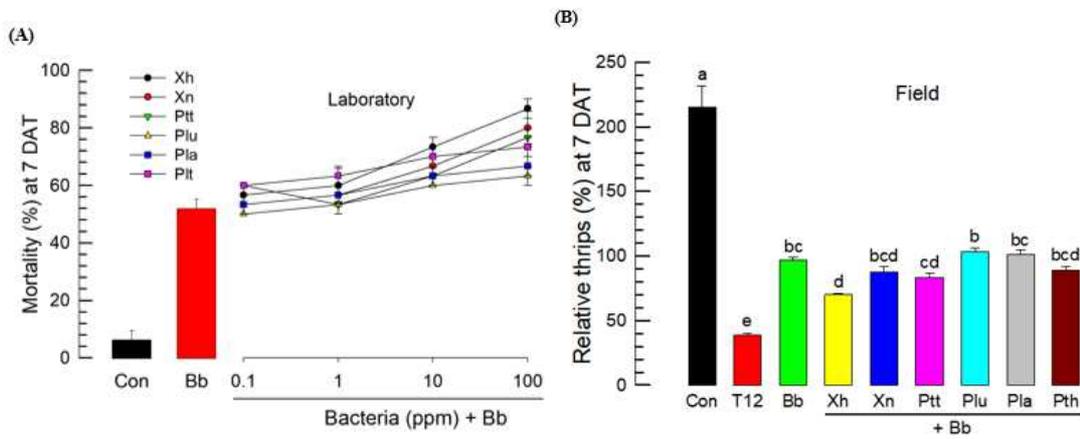


그림 3. X/P 유래 세균 배양액의 파총채벌레에 대한 Bb 살충력 제고 효과. (A) 실내 생물검정 (B) 야외 생물검정

4. 세균 대사물질 첨가에 따른 파총채벌레에 대한 곤충병원곰팡이(Bb)의 살충력 제고 효과

X/P에 속한 세균류의 배양액 포함된 대사물질 가운데 면역억제와 관련되어 알려진 물질이 GameXPeptide (GXP), oxindole (OXI), 2-ethoxy-3-methoxyphenol (EMP) 그리고 benzylideneacetone (BZA)이 포함된다. 이들 물질이 실제로 Bb의 병원력을 증가시키는 지를 분석하였다(그림 4). 이들 물질은 실내분석 결과 모두 Bb의 파총채벌레에 대한 살충력을 증가시켰다(그림 4A). 그리고 야외 검정 결과에서도 살충력을 증가시켰는데, 흥미로운 점은 BZA 첨가는 스피노사드 처리 효과 만큼 높은 방제효과를 기록하였다(Fig. 4B).

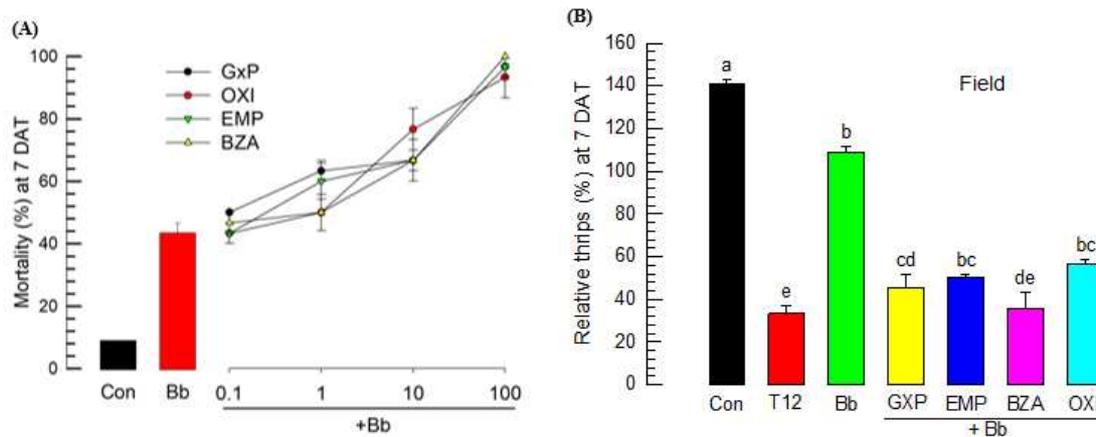


그림 4. X/P 유래 세균 대사물질의 파총채벌레에 대한 Bb 살충력 제고 효과. (A) 실내 생물검정 (B) 야외 생물검정

5. 파총채벌레의 두 가지 항생단백질 유전자

X/P에 속한 세균류의 배양액 포함된 대사물질이 파총채벌레의 면역을 억제하는 지를 분석하기 위해 이 곤충이 발현하는 면역유전자인 항생단백질의 유전자를 추정하였다(그림 5). 세크로핀인 Tt-Cec 유전자와 라이소자임인 Tt-Lyz 유전자가 추정되었다. 이들은 다른 곤충의 ortholog 유전자들과도 높은 상동성을 보여 주었

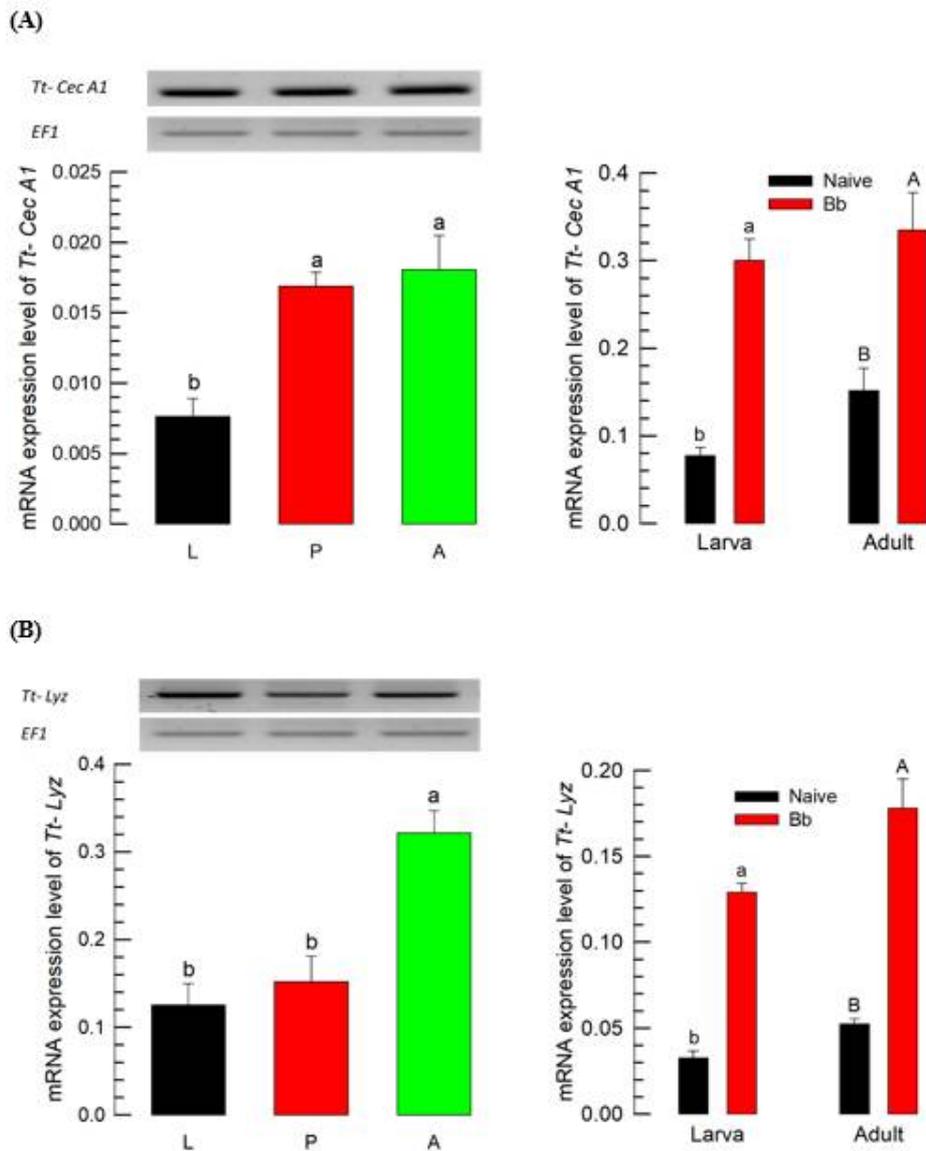


그림 6. 파충채벌레의 발육시기별 및 면역처리에 따른 세크로핀(A)과 라이소자임(B) 유전자의 발현양상

6. 세균 대사물질의 파충채벌레의 항생단백질 발현 억제 효과

Bb 감염에 따라 세크로핀과 라이소자임의 유전자 발현이 증가되었다. 이는 병원체의 감염을 억제하는 수단이 기 때문에 세균 대사물질을 첨가하여 이들 유전자의 발현을 억제할 수 있는 지를 분석하였다(그림 7). Bb 감염에 따라 증가된 이들 유전자의 발현은 이들 물질을 첨가하면서 약 50% 감소하였다. 이는 이들 물질이 면역억제제로서 작용하였고, 이를 통해 Bb의 병원력이 증가된 것으로 해석된다.

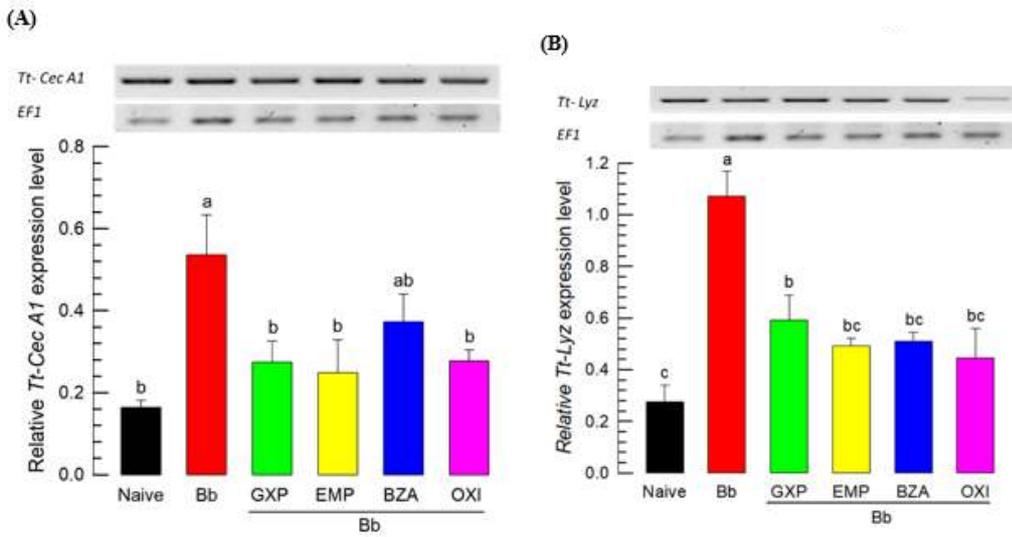


그림 7. X/P 세균 대사물질의 항생단백질 유전자 발현 억제 효과. (A) 세크로핀 발현에 대한 억제효과 (B) 라이소자임 유전자 발현에 대한 억제효과

7. IBC 살충제 파충채벌레에 대한 야외 분석

상이한 혼합 비율을 대상으로 야외 살충력 검정이 실시되었다. 동일한 Bb의 농도에 대해서 Xh 대사체의 함량이 높아질수록 방제효과는 증가하였다(그림 8).

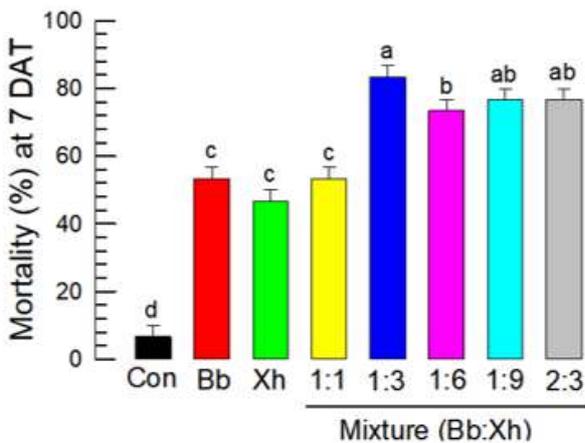


그림 8. IBC 살충제의 파충채벌레에 대한 야외 방제 효과

이상의 결과를 통해 Bb+Xh의 신규 파충채벌레 방제 약제가 개발되었다. 야외 기준으로 80% 이상의 안정적인 방제효과를 얻었다.

○ 파죤나방 유전체 분석 및 면역 기능 단백질

[발현 유전체 분석]

요약

파죤나방(*Acrolepiopsis sapporensis*)에 대한 전사체가 RNASeq 기술로 분석되었고, 전체 218,126개의 contig를 GenBank에 PRJNA834156 accession number로 등록하였다. 이러한 전사체 정보를 기준으로 46,808개의 유전자가 추정되었다. 이 가운데 9,805개는 ORF 전체의 서열을 갖고 있었다. 이들 전사체는 대조구와 면역처리구를 각각 3반복하여 얻은 것으로 처리구는 대조구 반복들과 뚜렷이 구분되었다. 특히 처리구에 발현되는 유전자들은 대조구에 비해 GO를 통한 기능 분류를 진행한 결과 뚜렷한 차이를 보였다. 추정된 46,808 유전자 가운데 5,232개는 대조구에 특이적이고 8,392개는 면역처리구에 특이적으로 발현되었다. 특히 1,330개의 유전자가 면역처리에 따라 2배 이상 증가(782개) 또는 감소(548개)하였다. 면역관련 유전자를 인식, 중개 및 반응의 단계로 나누어 전체 46개를 찾았다. 대부분은 면역 반응에 대해서 발현량을 증가시켰다. 본 연구는 파죤나방에 대한 전사체를 최초로 보고하고 있다. 아울러 이들 유전체 가운데 면역에 관련된 46개의 유전자와 이들의 발현이 면역처리에 따라 유도된다는 것을 보여주었다.

결과

1. 파죤나방 발현 유전체 RNASeq 결과

파죤나방(*Acrolepiopsis sapporensis*)에 대한 전사체가 RNASeq 기술로 분석되었고, 전체 218,126개의 contig를 GenBank에 PRJNA834156 accession number로 등록하였다. 이러한 전사체 정보를 기준으로 46,808개의 유전자가 추정되었다(그림 1). 이 가운데 9,805개는 ORF 전체의 서열을 갖고 있었다. 이들 전사체는 대조구와 면역처리구를 각각 3반복하여 얻은 것으로 처리구는 대조구 반복들과 뚜렷이 구분되었다.

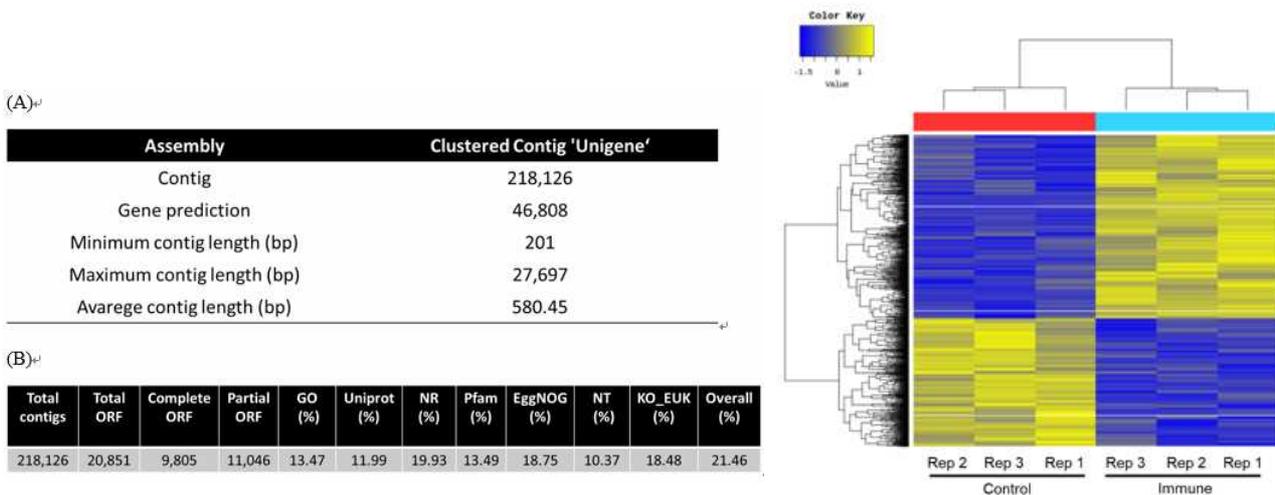


그림 1. RNASeq을 통한 파죤나방 발현체

2. 파죤나방 발현 유전체 분석 결과

특히 처리구에 발현되는 유전자들은 대조구에 비해 GO를 통한 기능 분류를 진행한 결과 뚜렷한 차이를 보였다(그림 2). 추정된 46,808 유전자 가운데 5,232개는 대조구에 특이적이고 8,392개는 면역처리구에 특이적으

로 발현되었다(그림 3). 특히 1,330개의 유전자가 면역처리에 따라 2배 이상 증가(782개) 또는 감소(548개)하였다.

(A) 무처리구

(B) 면역처리구

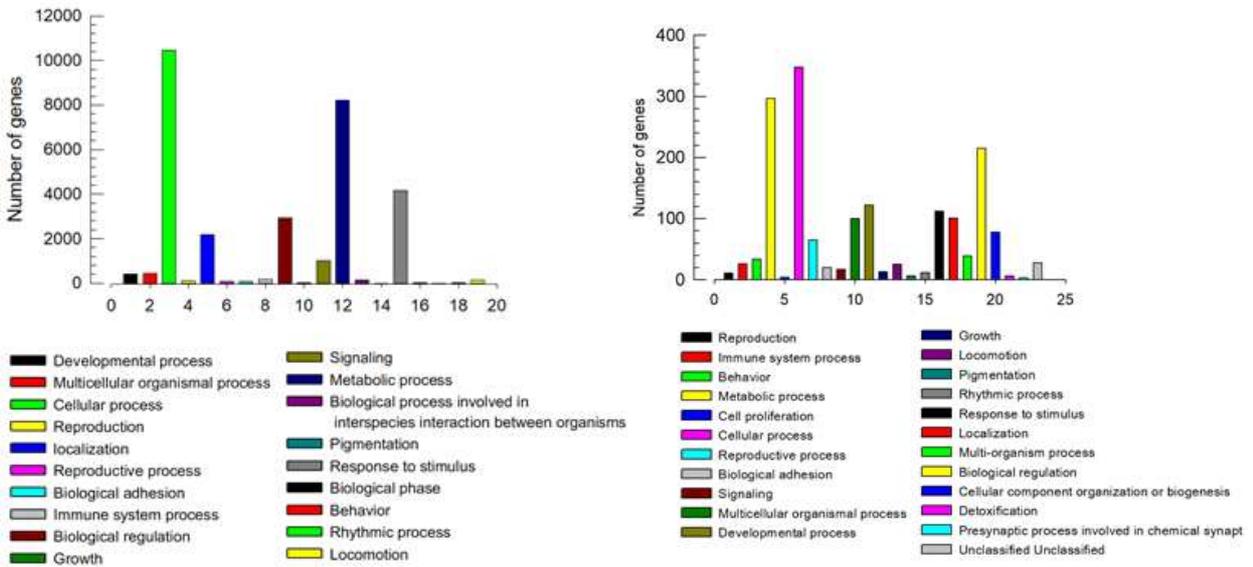


그림 2. GO 분석을 통한 면역처리에 따른 파좁나방의 발현체 변화 양상

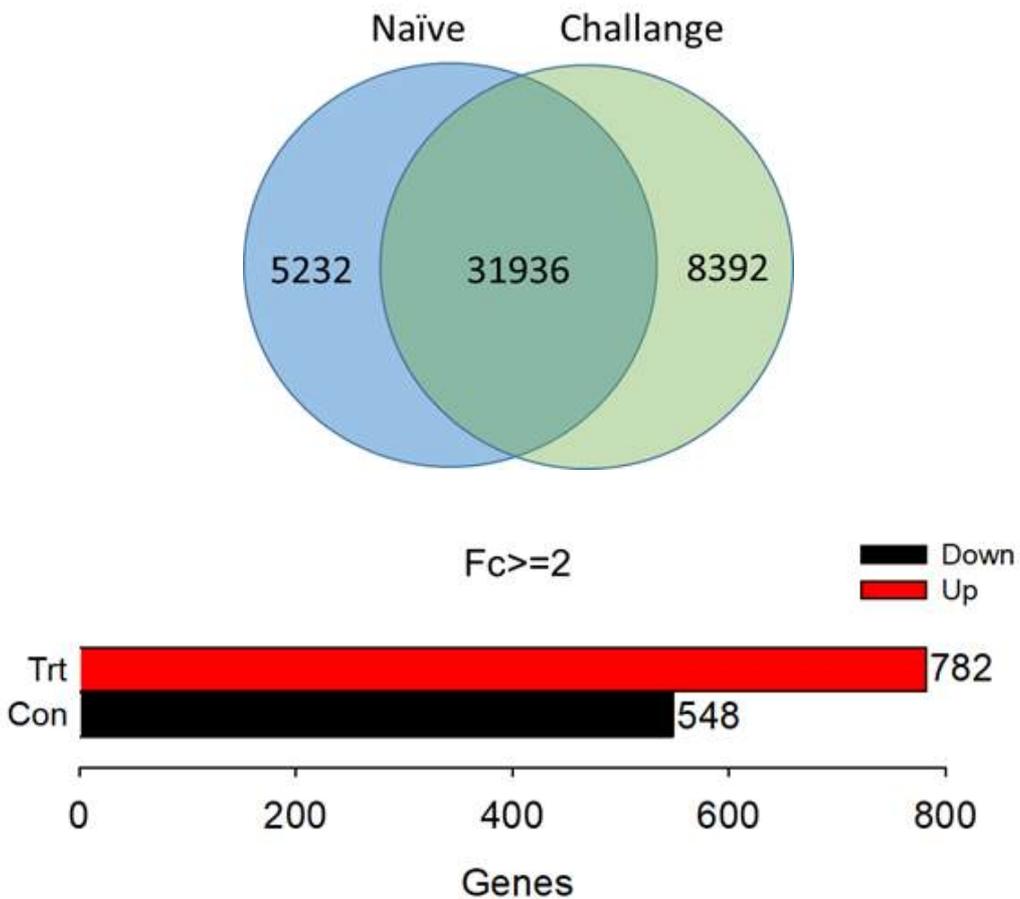


그림 3. DEG 분석을 통한 면역처리에 따른 파좀나방의 발현체 변화 양상

3. 파좀나방 면역 관련 발현 유전자 분석 결과

면역관련 유전자를 인식, 중개 및 반응의 단계로 나누어 전체 46개를 찾았다(그림 4). 대부분은 면역 반응에 대해서 발현량을 증가시켰다(그림 5).

Function	Annotation
Recognition	Peptidoglycan-recognition protein LB
	Peptidoglycan-recognition protein LB-like
	Peptidoglycan recognition protein 2R/S (PGRP2)
Mediation	Protein tyrosine kinase
	Modular serine protease-like Spaetzle 5
	Integrin beta-6-like
	Serine protease 7
	CLIP domain-containing serine protease 2-like
	ecdysone-inducible protein E75
	Transmembrane protease serine 9-like
	Nuclear factor NF-kappa-B p110 subunit
	Flotillin-2
	Secretory phospholipase A2-A
	Secretory phospholipase A2-B
	Secretory phospholipase A2-C
	Secretory phospholipase A2-D
	Relish
	Dopamine neurotransmitter receptor
	Low-density lipoprotein
	Zinc finger protein 718-like
	Serine/threonine-protein kinase NLK
	JAK-STAT cascade
	cAMP-specific 3',5'-cyclic Thiol peroxidase
	Prostaglandin E synthase 2
	Prostaglandin E2 receptor EP2 subtype
	Dopamine neurotransmitter receptor activity
Immune Response	Defensin
	Transferrin2
	Apol-2
	Lysozyme
	Hemolin
	Peroxidase like
	CYP40
	phenoloxidase subunit 1
	phenoloxidase subunit 2-like
	Laccase-2
	laccase-1-like
	laccase-2-like
	laccase 3
	carboxyl-terminal PDZ ligand of neuronal nitric oxide synthase protein isoform

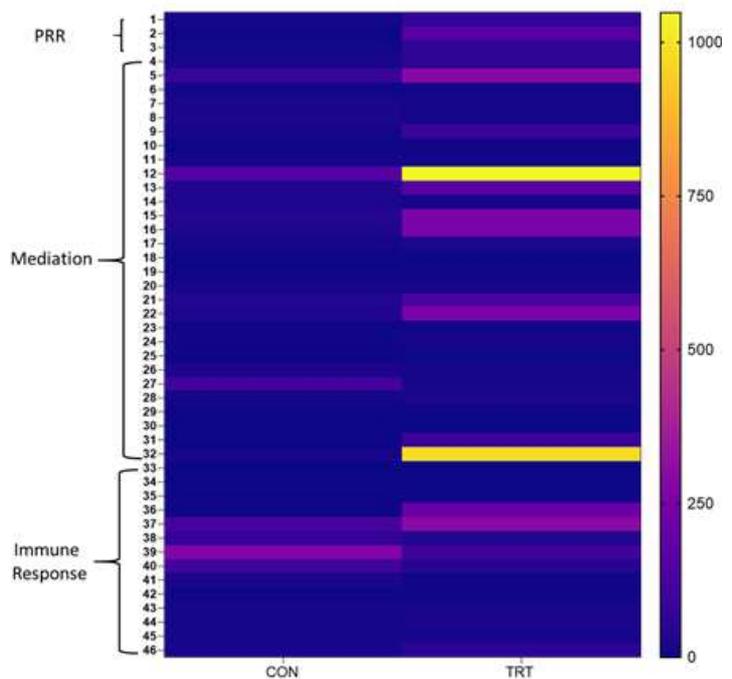


그림 4. 파좀나방의 면역 관련 발현체 변화 양상

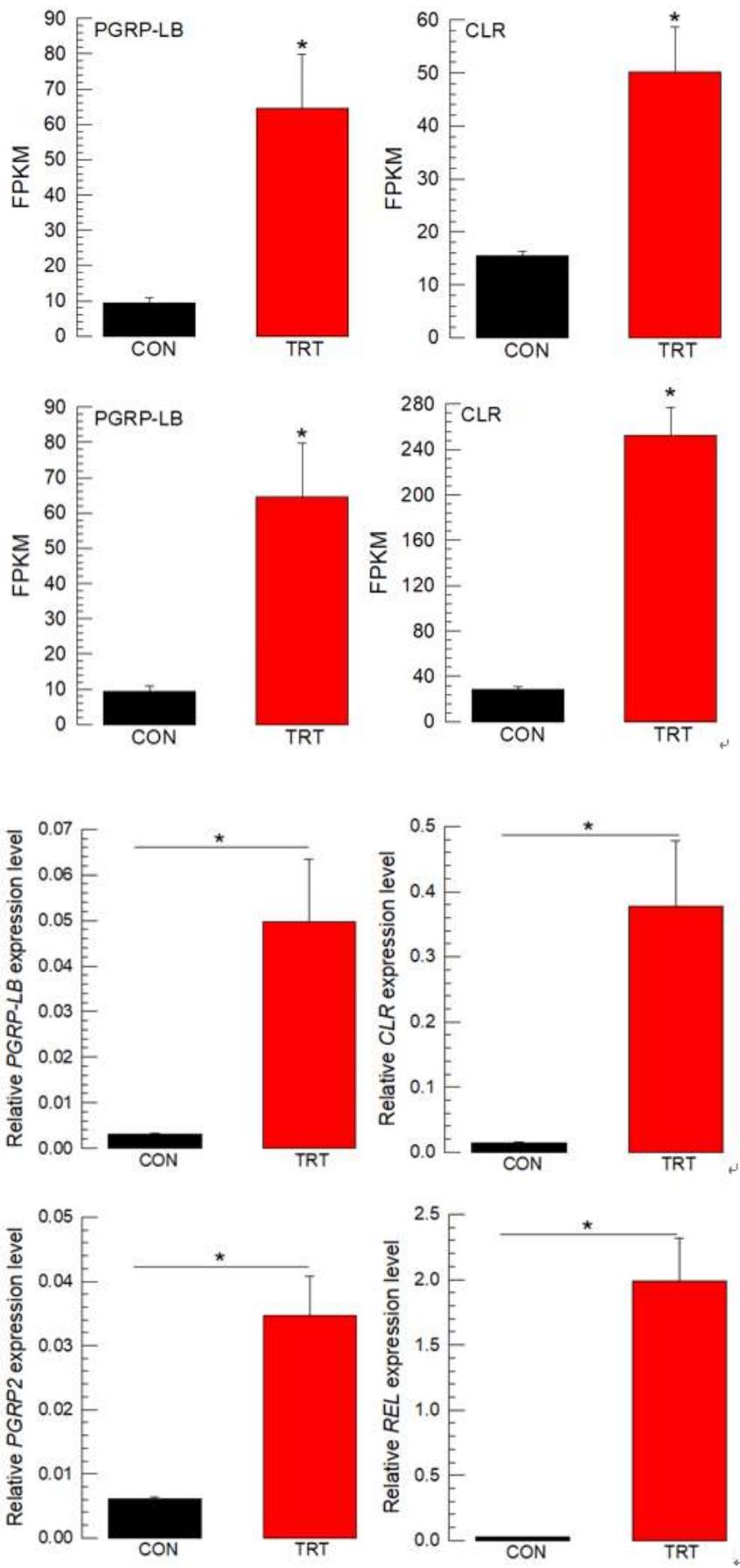


그림 5. 파죤나방의 면역 관련 유전자들의 발현량

[PLA2 유전자 및 단백질 분석]

요약

아이코사노이드 생합성 과정에서 인지질 분해효소인 PLA2는 초기 반응을 촉매하는 주요 인자이다. 파좀나방의 면역에 있어서 이 유전자의 존재 및 이 효소의 활성 변화는 아이코사노이드의 개연성을 제시하게 된다. 본 연구는 먼저 효소학적으로 이 유전자의 존재를 찾았다. 분비성 PLA2와 세포성 PLA2 효소활성을 추정한 결과 모든 발육태에서 이 효소활성을 나타냈다. 유충의 조직별 이 효소의 활성을 조사한 결과 혈구와 지방체에서 높은 활성을 나타냈다. 파밤나방에 대한 PLA2 항체로 western 분석한 결과 최소 4종의 PLA2가 존재할 것으로 추정하였다. 면역처리한 결과 이 효소활성이 시간이 경과하면서 증가했으며 western 결과는 최소 6종의 PLA2가 존재하는 것으로 나타났다. 이들 PLA2는 sPLA2, iPLA2 및 cPLA2 모두가 존재하는 것으로 특이적 억제제 처리는 제시하였다. 파좀나방의 발현 유전체를 분석한 결과 4종의 PLA2 유전자를 얻었다. 이 유전자들은 모두 sPLA2로 판명되었다. 이들의 PLA2는 발육시기 및 상이한 조직에서 발현하였다. 또한 면역 처리는 이들 유전자의 발현을 증가시켰다. 이러한 결과는 파좀나방에 PLA2가 존재하고, 이 유전자 발현 및 효소활성이 병원체 침입에 따라 유도된다는 것을 제시하였다.

결과

1. 파좀나방의 PLA2 활성

아이코사노이드 생합성 과정에서 인지질 분해효소인 PLA2는 초기 반응을 촉매하는 주요 인자이다. 파좀나방의 면역에 있어서 이 유전자의 존재 및 이 효소의 활성 변화는 아이코사노이드의 개연성을 제시하게 된다. 본 연구는 먼저 효소학적으로 이 유전자의 존재를 찾았다. 분비성 PLA2와 세포성 PLA2 효소활성을 추정한 결과 모든 발육태에서 이 효소활성을 나타냈다(그림 1). 유충의 조직별 이 효소의 활성을 조사한 결과 혈구와 지방체에서 높은 활성을 나타냈다. 파밤나방에 대한 PLA2 항체로 western 분석한 결과 최소 4종의 PLA2가 존재할 것으로 추정하였다(그림 2).

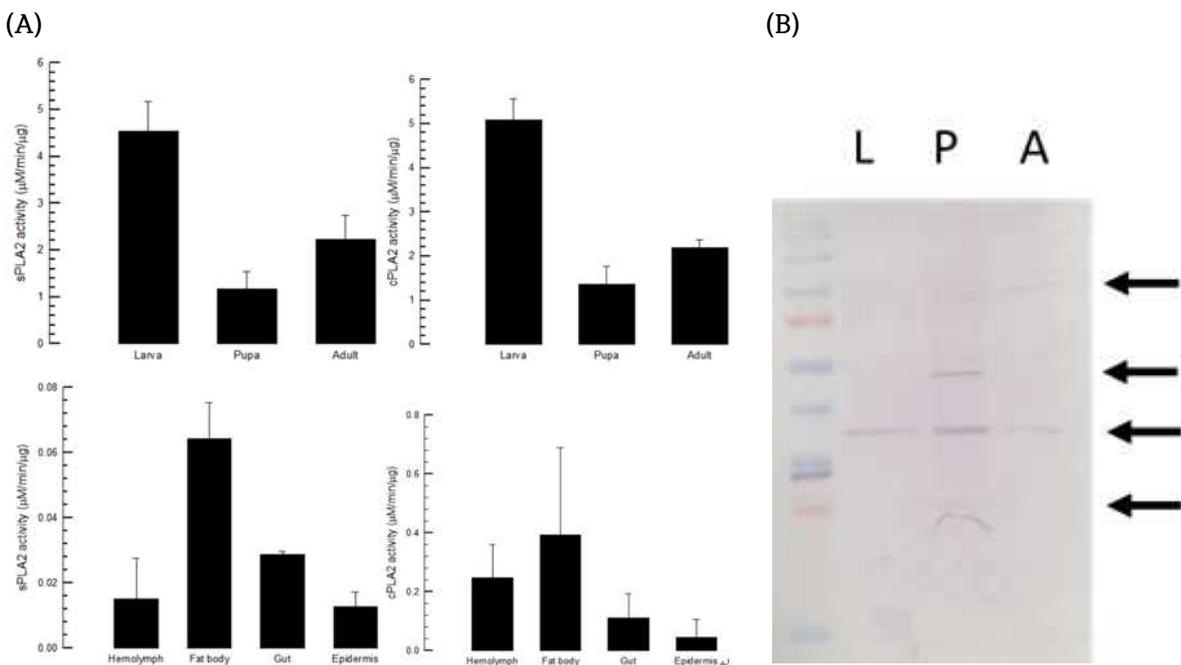


그림 1. 파좀나방의 PLA2 효소활성. (A) 발육시기 (B) 유충 조직

2. 면역 처리에 따른 PLA2 활성 변화

파좀나방 유충에 면역 처리한 결과 이 효소활성이 시간이 경과하면서 증가했으며 western 결과는 최소 6종의 PLA2가 존재하는 것으로 나타났다(그림 2). 이들 PLA2는 sPLA2, iPLA2 및 cPLA2 모두가 존재하는 것으로 특이적 억제자 처리는 제시하였다(그림 3).

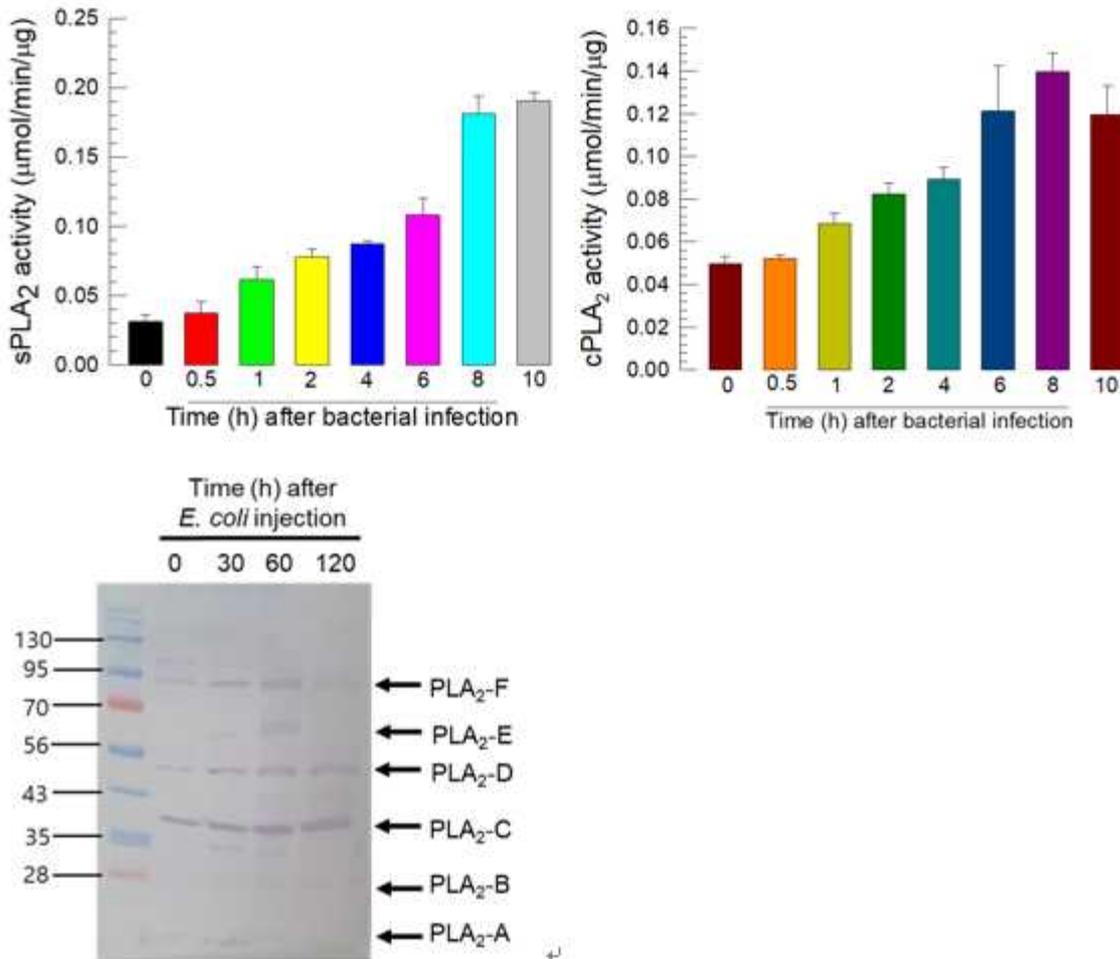
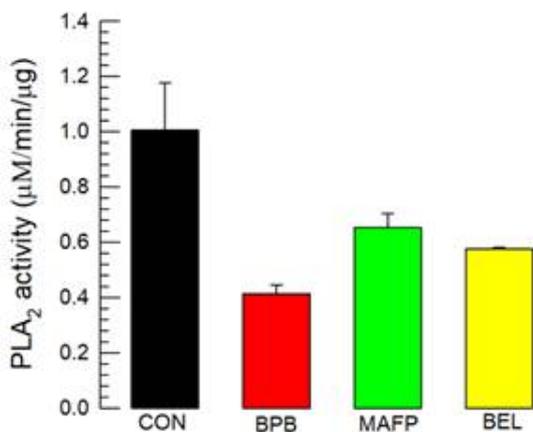


그림 2. 파밤나방 유충에 면역 처리 결과 PLA2 활성과 western 결과 단백질의 종류 분석

(A)



(B)

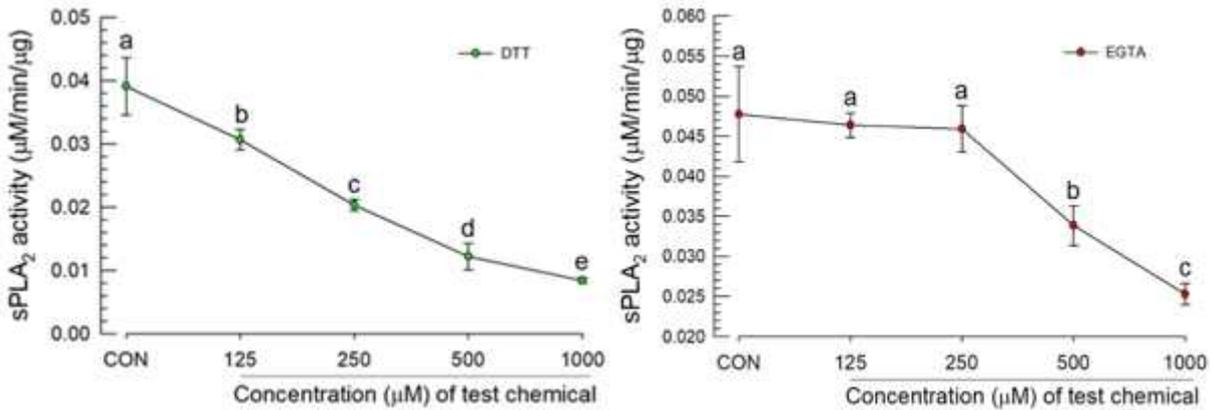
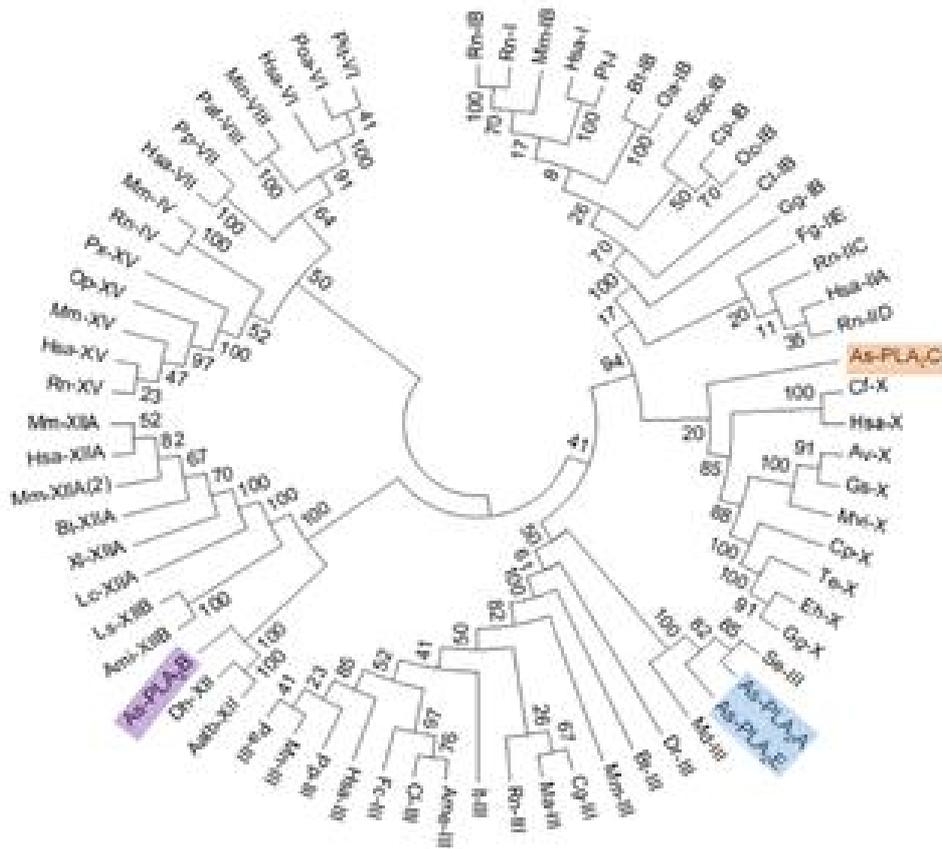


그림 3. 특이적 억제자들의 파좀나방 PLA2 활성 변화

3. 파좀나방 발현 유전체로부터 4 종류의 PLA2 유전자 추정

파좀나방의 발현 유전체를 분석한 결과 4종의 PLA2 유전자를 얻었다(그림 4). 이 유전자들은 모두 sPLA2로 판명되었다. 이들의 PLA2는 발육시기 및 상이한 조직에서 발현하였다. 또한 면역 처리는 이들 유전자의 발현을 증가시켰다(그림 5). 이러한 결과는 파좀나방에 PLA2가 존재하고, 이 유전자 발현 및 효소활성이 병원체 침입에 따라 유도된다는 것을 나타냈다(그림 6).



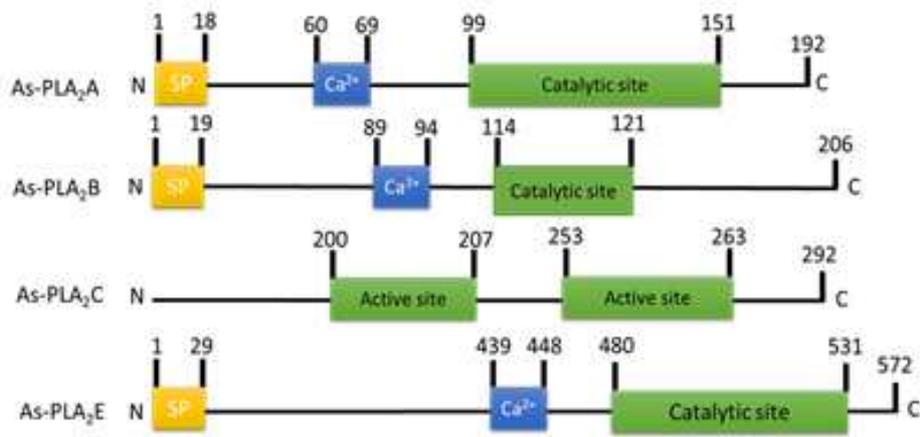


그림 4. 파좀나방 발현 유전체에서 추정된 4개의 PLA2에 대한 분자계통 분류 및 기능영역 분석

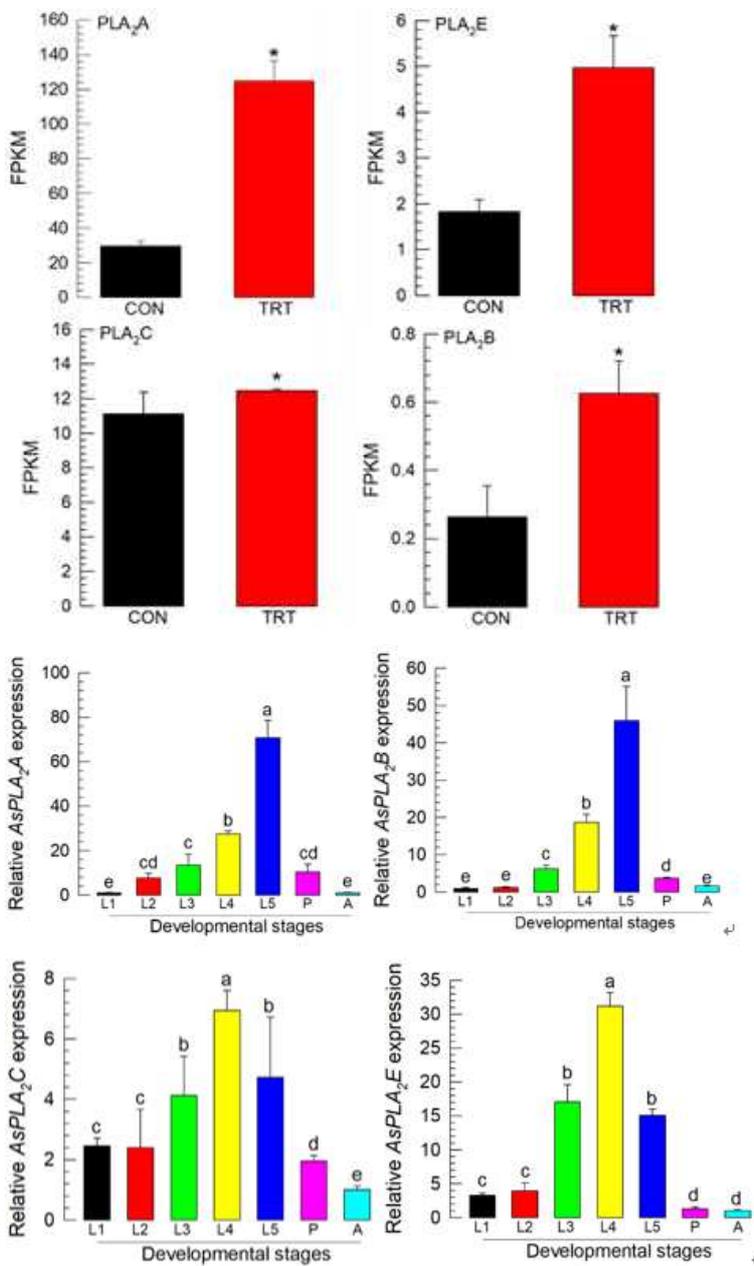


그림 5. 파죤나방 4 종류의 PLA2 유전자 발현 양상

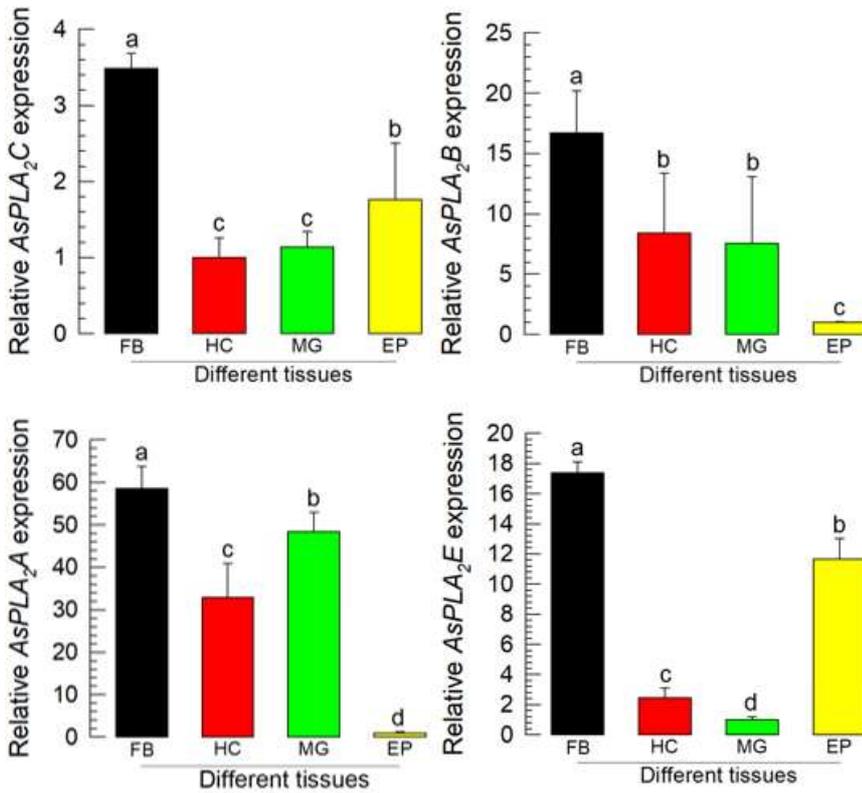
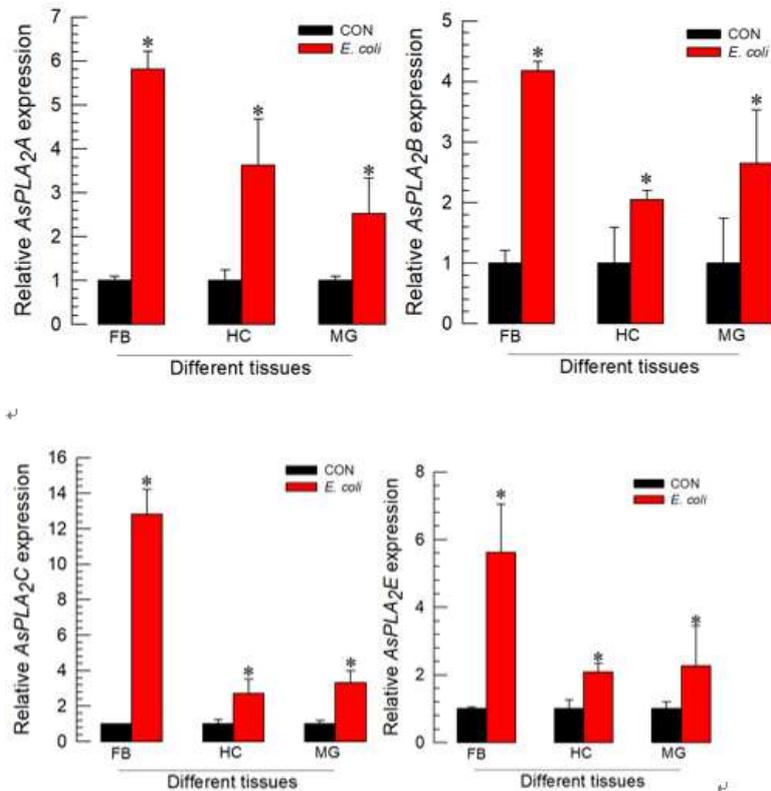


그림 6. 병원체 침입에 따른 파죤나방 4 종류의 PLA2 유전자 발현 유도



[협동기관-표준연] 연구내용

○ 세균 대사체 발현 유전자 조절 및 분석

요약

*Xenorhabdus hominickii*와 *Photorhabdus temperata* 균주의 펩타이드 계열 이차대사산물인 GameXpeptide(Gxp) 발현 유전자(*gxpS*) promoter 부분을 pBAD 프로모터로 교환한다. 해당 과정을 거쳐 제조된 *X. hominickii*와 *P. temperata gxpS* 돌연변이체($\Delta gxpS$)에 arabinose 유도과정(induction)을 통해 두 균주의 Gxp 발현량을 최대화 한다.

결과

1. *Xenorhabdus hominickii*와 *Photorhabdus temperata*의 *gxpS* 유전자 promoter 교환

*X. hominickii*의 *gxpS*의 첫 250 base pair(bp)와 1000bp를 각각 증폭하여 pBAD 프로모터를 가진 pCEP 벡터의 NdeI과 SacI 제한효소 시퀀스 위치에 삽입한다(그림 1). 제작된 pCEP-Xh_ *gxpS*_250 또는 pCEP-Xh_ *gxpS*_1000 플라스미드 DNA를 *E. coli* S-17 λ pir strain에 형질전환 한다(그림 2). pCEP 벡터는 kanamycin 저항성 유전자를 포함하여 해당 항생제를 이용해 selection을 진행하고, 얻어진 미생물의 플라스미드 DNA를 추출해 pCEP-Xh_ *gxpS*_250 또는 pCEP-Xh_ *gxpS*_1000를 확인한다. pCEP-Xh_ *gxpS*_250 또는 pCEP-Xh_ *gxpS*_1000 플라스미드 DNA를 지닌 *E. coli* 세균에서 Wild-type (WT) *X. hominickii*에 conjugation 방법을 통해 플라스미드 DNA를 전달하고, 상동재조합(homologous recombination)을 통해 *gxpS* 유전자 promoter 부분을 pBAD 프로모터로 교환한다. 자연적 ampicillin 저항성을 지닌 *X. hominickii*와 pCEP 플라스미드 DNA의 kanamycin 저항성을 동시에 이용해 ampicillin-kanamycin 항생제로 screending을 진행하고, 얻어진 돌연변이체의 확인을 위해 *X. hominickii* 특이적 유전자(Lrp)와 pCEP 플라스미드 DNA 특이적 유전자 (TraI와 AraC) 증폭을 통해 *X. hominickii*의 변이를 확인한다(그림 3). *Photorhabdus temperata*도 동일한 방법으로 pCEP-Ptt_ *gxpS*_250, pCEP-Ptt_ *gxpS*_500, 또는 pCEP-Ptt_ *gxpS*_1000 플라스미드 DNA를 제작하여 WT *P. temperata*에 해당 유전자를 전달한 후, 위에 언급된 방법으로 *P. temperata*의 변이를 확인한다.

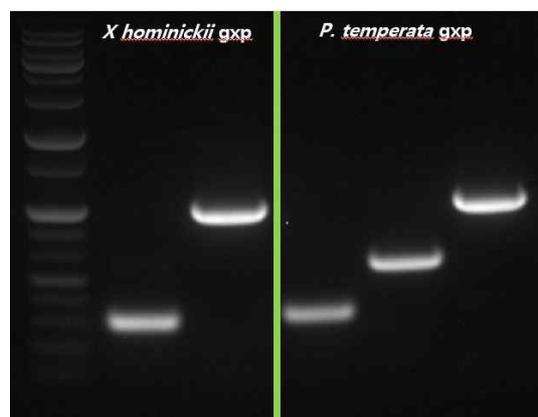


그림 1. PCR을 이용한 *X. hominickii*와 *P. temperata gxpS* 유전자 증폭

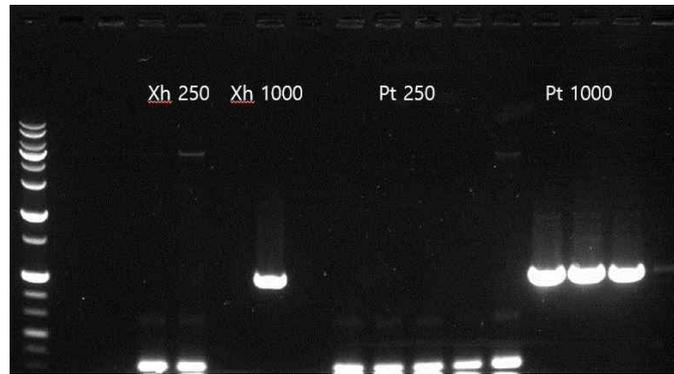


그림 2. Colony PCR법을 이용한 pCEP-Xh_ *gxpS* 또는 pCEP-Ptt_ *gxpS*의 확인

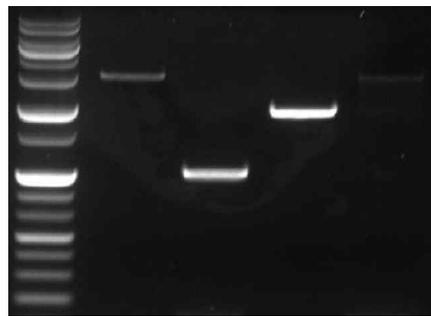


그림 3. Xh_ Δ *gxpS*와 Ptt_ Δ *gxpS*의 pCEP 플라스미드 특이적 유전자인 AraC와 TraI 유전자의 colony PCR 검증

○ 세균 레귤론 (regulon) 조절을 통한 대사체 발현량 조절

요약

유전체 분석을 통해 *Xenorhabdus hominickii*와 *Photorhabdus temperata* 균주에서 이차대사산물 발현 제어 유전자(또는 레귤론)로 알려진 leucine-responsive regulatory protein(Lrp)을 발굴한다. Lrp로 예측된 유전자의 promoter 부분을 조절하여 Lrp에 의해 조절되는 이차대사산물의 발현량 변화를 측정한다.

결과

1. *Xenorhabdus hominickii*와 *Photorhabdus temperata* 유전체 분석을 통한 Lrp 유전자 규명

MicroScope Microbial Genome Annotation & Analysis Platform을 이용해 *Xenorhabdus hominickii* ANU1 PRJNA224116 chromosome NZ_CP016176.1와 *Photorhabdus temperata* subsp. Meg1 WGS JGVH0.1 유전체를 분석한다. *X. hominickii*의 경우 Lrp 유전자 서열이 이미 규명된 *X. nematophila*의 것과 비교 분석해 해당 유전체 안의 Lrp 서열을 찾는다 (A9255_RS08905). *X. hominickii*의 Lrp 유전자는 495bp의 길이를 가지며, *X. nematophila*의 Lrp 유전자와 약 91%의 유사성을 가진다(그림 1).

```

Number of displayed results: 1
Query length: 495

- - - [Xenorhabdus nematophila ATCC19061 chromosome Xnematophila.fna]
- Left-hand Genomic object:  NNC1_1547 | -1 | 1427299-1428258 | trxB | thioredoxin reductase, FAD/NAD(P)-binding
- Overlapping Genomic object:  NNC1_1548 | +3 | 1428876-1429370 | Lrp | Leucine-responsive regulatory protein
- Right-hand Genomic object:  NNC1_1549 | +3 | 1429392-1432925 | Cell division protein

Score = 654 bits (354), Expect = 0.0
Identities = 448/495 (91%), Gaps = 0/495 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      ATGATTGATAATAAAGAAGCGTCCAGGAAAAGATCTTGATGCGATAGACCGAAATATCCCTT  60
            |||
Sbjct 1428876  ATGATTGATAATAAAGAAGCGTCCAGGAAAAGATCTTGATGCGATAGATGTAATATCCCTT  1428935

Query 61     AATGAGTTGCAAAAAGAGCGGCGGTATTTCTAATGGAATTATCCAGCGTGTGGTTTG  120
            |||
Sbjct 1428936  AAGGAGTTGCAAAAAGAGCGGCGGTATTTCTAAGTAGAATTATCCAGCGAGTAGGTTCTG  1428995

Query 121    TCACCAACGCGCTTGTCTGAGCGGTGTADGTCGCTTAGAGCGTCAGGGTTTCATTTCTGG  180
            |||
Sbjct 1428996  TCACCAACACCTTGTCTGAGCGGTGTADGTCGCTTAGAGCGCGAGGGTTTATTTCTGCTG  1429055

Query 181    TATACAGCTTTGCTGAATCCTCATTATTTGGAACGATCATTGCTGCTGTTGTTGAAATT  240
            |||
Sbjct 1429056  TATACAGCTTTGCTGAATCCTCATTATCTGGATGATCATTGCTGCTGTTGTTGAAATT  1429115

Query 241    ACGCTGAATGCTGTGCAAGCGGAGCGTATTTGAACCAATTCATACAGCGTCCAGAACTG  300
            |||
Sbjct 1429116  ACGTGAATGCTGTGCAAGCGAGATGTTATTTGAACCAATTCATACAGCTGTTCCAGAACTA  1429175

Query 301    GAAGAAATCCAAAGATGCCATTTAGTTTCTGTTGATTTTGACTATTTGCTGAAAACGGT  360
            |||
Sbjct 1429176  GAAGAAATCCAAAGATGTCACCTTGGTTTCTGTTGATTTTGACTATTTGTTGAAAACAGT  1429235

Query 361    GTGCCAGATATGCTGCATACDGTAACTACTGGGTGAAAGCTTGGTGGTCTCCCGGGT  420
            |||
Sbjct 1429236  GTACCTGATATGCTGCATACDGTAAATGCTGGGCGAAAGCTTGGTGGTCTCCCGGGT  1429295

Query 421    GTTAACGATACTGCTACTTATGTTGTTATGGAAGAAGTGAACAGAGTAATGTTGGTG  480
            |||
Sbjct 1429296  GTTAACGATACTGCTACTTATGTTGTTATGGAAGAAGTGAACAGAGTAATGTTGGTG  1429355

Query 481    ATTAAGACTCGTTAA 495
            |||
Sbjct 1429356  ATTAAGACTCGTTAA 1429370
    
```

그림 1. *X. hominickii*와 *X. nematophila*의 Lrp 유전자 서열 비교분석

*P. temperata*의 경우 Lrp 유전자 서열이 알려진 *P. luminescens*의 것과 비교 분석해 해당 유전체 안의 Lrp 서열을 찾는다(JGVH01_v1_210052). *P. temperata* Lrp 유전자 또한 495bp의 길이를 가지며, *P. luminescens*의 Lrp 유전자와 약 89%의 유사성을 가진다(그림 2).

© - 2 - - [Photorhabdus luminescens subsp. laumondii HP80 WGS LJP801]
 - Left-hand Genomic object: LJP801_v1_2460004 | -3 | 4231952-4232086 | protein of unknown function
 - Overlapping Genomic object: LJP801_v1_2460005 | -3 | 4232108-4232262 | lrp | DNA-binding transcriptional dual regulator Lrp
 - Right-hand Genomic object: LJP801_v1_2460006 | +2 | 4232735-4232893 | conserved protein of unknown function

Score = 623 bits (337), Expect = 1e-178
 Identities = 441/493 (89%), Gaps = 0/493 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 1 ATGATAGATAATAAAAAACGTCGGGAAAAGATCTTGATGATAGATGTAATATCGTC 60
      |||
Sbjct 4232602 ATGATAGATAATAAAAAACGTCGGGAAAAGATCTTGATGATAGATGTAATATCGTC 4232543

Query 61 AATGAGTTGCAGAAAGATGGTGAATTTCTAACGTAGAAGCTGCTAAACGGGTAGGATTG 120
      |||
Sbjct 4232542 AATGAGTACAGAAAGATGGGCGAATTTCTAACGTAGAAGCTGCTAAACGGGTAGGTTTA 4232483

Query 121 TGGCGACTCCCTTGGTGGAGCGTGTGGCTGGAGGGTCAAGGGTTTATTATTGGC 180
      |||
Sbjct 4232482 TCTCAACCCCATGTTGGAGCGAGTGTGGCTGGAGGGTCAAGGGTTTATTACTGGA 4232423

Query 181 TACACCGCATTGTTGAATCCCTCAATTCTGGATGCGTGGTGGTGGTGGTGGTAAATT 240
      |||
Sbjct 4232422 TACACGGCATTGCTGAATCCCTCAATTCTGGATGCGTGGTGGTGGTGGTGGTAAATT 4232363

Query 241 ACCCTAAATCGTGGTGCACCCGATGTTTTGAACAATTCAATGCTGCTGGAGCAAAATTG 300
      |||
Sbjct 4232362 ACCCTAAACCGGGGCGCTCAGATGTTTTGAACAATTCAACGCTGCTGACAAAATTG 4232303

Query 301 GAAGAGATTCAGGAATGTCATTTGGTTTCCGTTGATTTGGACTTATTGAAAACCCGC 360
      |||
Sbjct 4232302 GAAGAGATTCAGGAATGCCACTTAGTTTTCTGGTATTGCACTATCTATTGAAAACCCGC 4232243

Query 361 GTACCAGATATGTCAGCGTATCGTAAGTTACTGGGCGAAAACCTTGGCGTCTGCCAGGT 420
      |||
Sbjct 4232242 GTACCAGACATGTCAGCTATCGTAAGTTGCTAGGCGAAAACCTTGGCGTCTGCCAGGT 4232183

Query 421 GTTAATGACACCCGACATATGTTGTGATGGAAGAAGTGAAGCAGAGTAACCGTTGGTC 480
      |||
Sbjct 4232182 GTTAATGACACTGACACATATGTTGTGATGGAAGAAGTGAAGCAGAGTAACCGTCTGGTC 4232123

Query 481 ATTAAGACTGCT 493
      |||
Sbjct 4232122 ATTAAGACTGCT 4232110
  
```

그림 2. *P. temperata*와 경우 *P. luminescens*의 Lrp 유전자 서열 비교분석

2. *Xenorhabdus hominickii*와 *Photorhabdus temperata*의 Lrp 유전자 promoter 교환을 위한 유전자 증폭

*X. hominickii*와 *P. temeperata* Lrp 유전자 각각의 첫 400bp를 추출된 genomic DNA에서 PCR 기술을 통해 증폭한다. 증폭된 유전자를 전기영동을 통해 확인한 후 (그림 3), 위에서 언급된 방법으로 pCEP 플라스미드 DNA의 NdeI과 SacI 제한효소 서열 위치에 삽입한다. 이전에 언급된 분자생물학적 실험 방식으로 pCEP_Xh_Lrp와 pCEP_Ptt_Lrp 플라스미드 DNA를 제작한다.

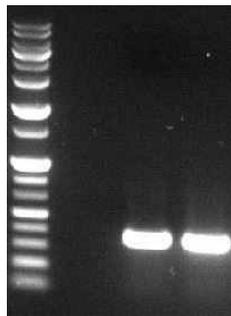


그림 3. *X. hominickii*와 *P. temperata*의 Lrp 유전자 PCR 증폭

3. 디지털 피시알 기술을 이용한 *Xenorhabdus hominickii* WT과 Lrp 유전자 돌연변이의 lrp 및 gxp 유전자 발현량 비교분석

개발된 *X. hominickii* Lrp mutant를 arabinose induction 이후 타겟 유전자 발현량 비교분석을 위해 50 ml의 LB 액상배지에 24시간 동안 배양하고 10% 농도의 arabinose를 이용한 induction을 진행한다. Induction 이후 27시간 동안 추가 배양을 진행하고 OD600에서 희석된 배양액을 측정해 미생물의 정상적인 성장여부를 확인한다 (그림 4).

OD600	Pre-induction	24h post induction
WT	0.47	4.28
Δ Lrp	0.55	2.72
Δ Lrp-induced	0.6	2.47

그림 4. Arabinose induction 전/후 미생물 배양액 UV spectrophotometer 측정(Optical Density at 600 nm)

1 ml의 배양액 샘플을 induction 된 것과 되지 않은 것에서 각각 수집 한 후 RNAprotect Bacteria Reagent and Rneasy RNA Mini Kit (Qiagen)을 이용해 RNA를 각각 추출한다. RNase free water를 이용해 RNA 샘플을 희석하고, One-step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes(BioRad)를 이용해 Lrp와 Gxp 유전자 카피 수를 각각 측정한다 (그림 5).



PCR condition

ddPCR (Lrp or Gxp)				
Component	Volume per Reaction(μL)			
Supermix	5			
Reverse transcriptase	2			
300 mM DTT	1			
Primer-probes sets (Assay)	3			
DW	9			
Template	2			
Total	22			

Cycling step	Temperature(°C)	Time	Ramp rate (%)	Cycle
Reverse transcription	50	60 min	100	1
Enzyme activation	95	10 min	100	1
Denaturation	95	30 sec	20	40
Annealing/Extension	60	1 min	20	
Enzyme deactivation	98	10 min	20	1
Hold	4	-	100	1

그림 5. ddPCR 모식도, Lrp와 Gxp 유전자 카피 수 측정을 위한 ddPCR solution 조성 및 PCR 조건

그림5에서 나타난 PCR조건을 통해 droplet 증폭을 진행하였고, 1D amplitude 상에서 lrp와 gxp 유전자 모두 positive와 negative droplet의 차이가 분석을 위해 적절함을 확인하였다 (그림 6).

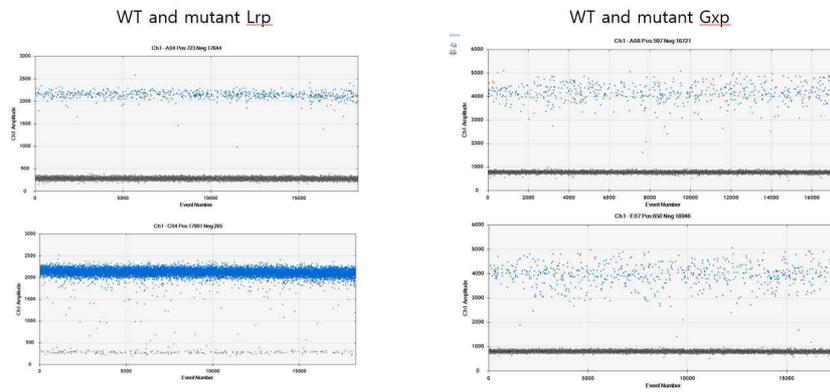


그림 6. Lrp와 Gxp ddPCR 1D amplitude of amplified droplet 결과 얻어진 ddPCR 데이터를 분석해 arabinose induction이 된 lrp mutant와 그렇지 않은 mutant와의 lrp 유전자 발현량을 상대분석 하였고, 더불어 동일 RNA 샘플에서 얻어진 gxp 유전자 발현량을 비교분석 하였다 (그림 7). 예상했던대로 lrp mutant는 arabinose induction을 통해 그렇지 않은 것에 비해 최대 4배 까지 lrp 발현량이 증가하는 것을 확인하였다 (그림 7). 그러나, gxp의 경우, lrp induction이 gxp 발현량을 감소시키는 경향을 확인하였다 (그림 7).

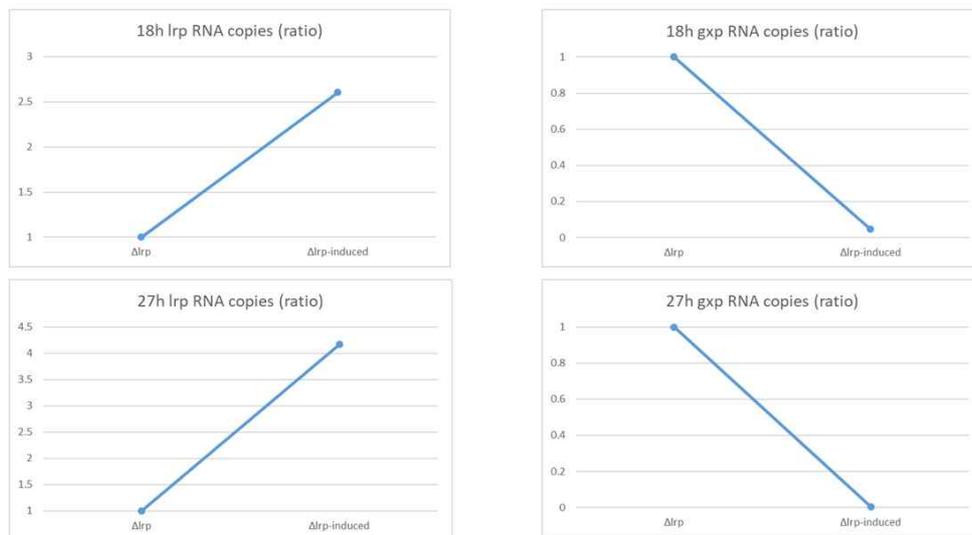


그림 7. Arabinose induction 이 후 lrp mutant의 lrp와 gxp 발현량 변화

○ 대사체 발현 증가를 위한 세균 배양 조건 최적화 및 질량분석법을 이용한 대사체 발현량 측정법 개발

요약

*X. hominickii*와 *P. temperata*를 다양한 액체배지에서 배양한 후, 칼럼 정제법을 통해 GameXPeptide(Gxp)를 배양액에서 정제한다. 액체크로마토그래피-질량분석법 (Liquid chromatography-Mass spectrometry: LC-MS)을 이용해 Gxp 4종, Gxp A, Gxp B, Gxp C, Gxp D의 정량측정을 하기 위한 분석 조건을 선정하고, 분석법의 밸리데이션을 실시하였다. 최적화된 측정 조건을 이용해 다양한 액체배지 조건에서 정제하여 얻어진 Gxp의 발현량을 비교분석 한다. 이를 통해 Gxp 발현을 위한 최적화된 배양 조건을 성립한다.

결과

1. *X. hominickii*와 *P. temperata* 액체배지 비교 분석 및 Gxp 정제법 구축

*X. hominickii*와 *P. temperata*를 대표적 강화 액체배지(enriched media) 중 하나인 Luria-Bertani(LB)에서 배양한다. 24시간 이후 고분자 흡착제 수지인 Amberlite XAD-16을 4% w/v 농도로 배양액에 넣고 48시간을 추가로 배양한다. 배양액에서 XAD-16를 수거한 후 칼럼에 넣고 100% 메탄올(methanol)을 이용해 정제작업을 진행한다. 정제과정을 통해 얻어진 메탄올 fraction을 증발 시킨 후, 물에 재부유(resuspend) 시키고 원심분리 과정을 통해 물에 녹지 않는 불순물을 제거한다. 불순물이 제거된 용액을 Amicon Ultra-0.5 filter (3KDa cutoff)를 이용해 고분자 물질을 제거하고, 얻어진 통과액(flow-through)을 20 μ m PVDF 필터를 이용해 추가 정제한다(그림 1).

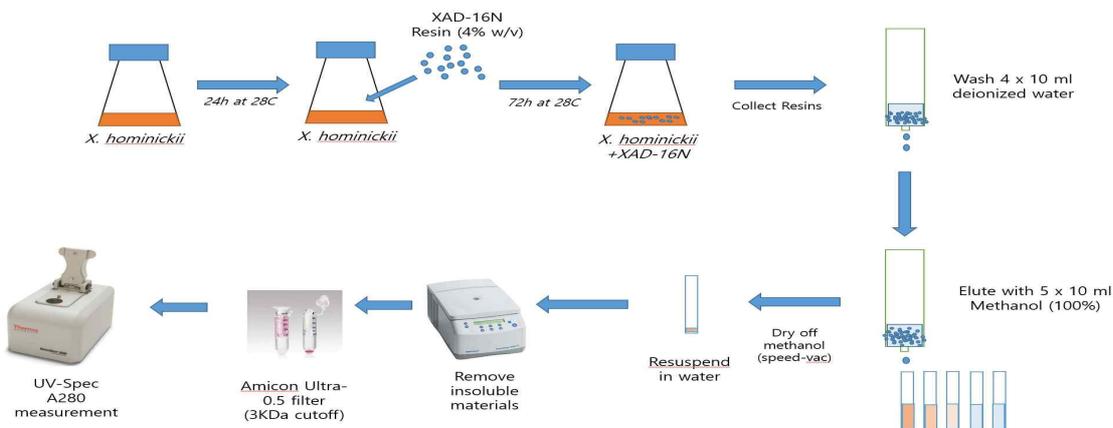


그림 1. *X. hominickii* 또는 *P. temperata*의 배양, 정제 및 측정 과정 모식도

정제된 최종 용액을 물에 10배 희석하여 UV-spectrophotometer를 이용해 A280과 A215를 측정하고 각 fraction의 대략적인 농도를 기록한다(표1, 표2).

표 1. *X. hominickii* LB 배양액에서 정제된 fraction의 A280 및 A215 값

Sample fraction	A280	A215
1	0.356	0.472
2	0.541	-0.911
3	0.08	2.66
4	0.027	0.685

표 2. *P. temperata*의 LB 배양액에서 정제된 fraction의 A280 및 A215 값

Sample fraction	A280	A215
1	1.74	-0.365
2	0.726	1.396
3	0.124	0.89
4	0.03	0.225

*X. hominickii*와 *P. temperata*를 대표적 최소 액체배지(minimal media) 중 하나인 M9에서 배양한다. 위에서 언급된 방법과 동일한 정제과정을 거치고 물로 10배 희석한 후, UV-spectrophotometer를 이용해 A280과 A215를 측정하여 각 fraction의 대략적인 농도를 기록한다(표3, 표4). *X. hominickii*의 경우 M9에서 약 3배 가량 높은 A280 값을 보였으며, *P. temperata* 또한 M9에서 더 높은 A280 값을 보였다.

표 3. *X. hominickii* M9 배양액에서 정제된 fraction의 A280 및 A215 값

Sample fraction	A280	A215
1	1.035	-0.906
2	0.272	1.815
3	0.033	0.344
4	0.007	0.156

표 4. *P. temperata*의 M9 배양액에서 정제된 fraction의 A280 및 A215 값

Sample fraction	A280	A215
1	1.873	-0.146
2	1.072	1.364
3	0.064	0.390
4	0.015	0.180

2. Gxp 표준물질과 질량분석법을 이용한 Gxp 측정법 개발

GameXPepptide(Gxp)는 5개의 아미노산으로 이뤄진 원형 펩타이드 형태를 가지며, 2군데 이상의 변형구조에 따라 A, B, C, D형 등으로 구분된다(그림 2). GxpA, GxpB, GxpC와 GxpD는 기존의 문헌을 통해 분자량, 구조 등이 알려져 있다. 본 연구에서는 Gxp 4종 펩타이드의 표준물질을 합성하여, LC-MS 방법을 이용하여 분리 및 정량할 수 있는 방법을 선정하고 밸리데이션을 진행하였다.

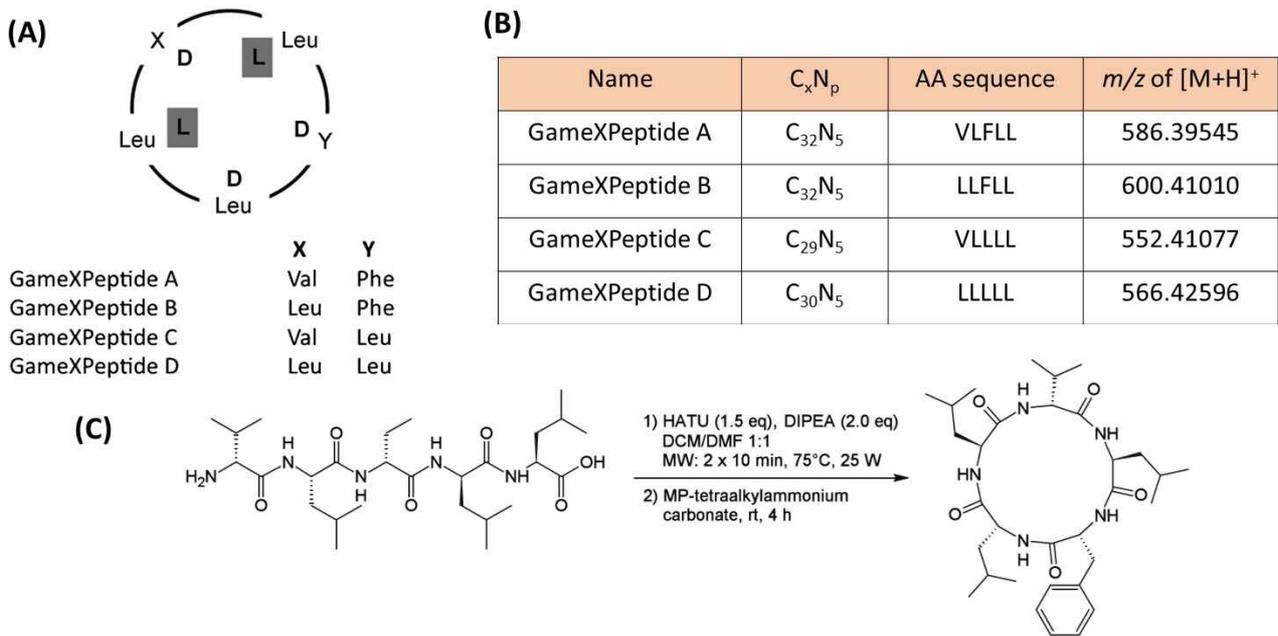


그림 2. (A) 4종류의 Gxp A, B, C와 D의 구조 및 아미노산 서열정보, (B) 4종 Gxp의 화학식 및 MS에서의 molecular ion [M+H]⁺정보, (C) cyclic pentapeptide인 Gxp의 합성과정. 아미노산 약어는 다음과 같다. V: valine, L: leucine, F: phenylalanine, D: D-amino acid, 회색 배경의 L: L-amino acid.

LC-MS 조건을 잡기 위해서는 우선, 물리화학적 성질이 매우 비슷한 4종의 펩타이드에 대한 분리가 필요하다. 분자량이 다르기 때문에 MS만으로도 정성적인 확인은 가능하지만, 미생물 추출물의 정제 정도 및 상태에 따른 분석 방해물질의 유무와 유사한 형태의 Gxp들의 명확한 분리를 통한 더욱 정확한 정량을 위해서는 LC를 이용한 분리가 측정 결과의 품질을 향상시킬 수 있다. 4종의 Gxp 표준물질을 97% 이상의 고순도로 합성하여, 분석 조건을 설정하는데에 활용하였다. 일반적으로 역상 LC의 분석에서 사용되는 C18 고정상과 formic acid만을 이용한 이동상을 사용하였을 때, 그림 3과 같이 LC에서의 분리는 어려웠다. 4종 Gxp의 분리를 위해 Pentafluorophenyl (F5) functional group을 이용하여 기존의 역상 분리의 머무름에 비해 극성도를 높인 고정상을 이용하였고, Formic acid와 Ammonium formate를 포함하며 acetonitrile로 용매강도를 조정한 이동상의 gradient elution을 통해 아래 그림 4와 같이 4종의 Gxp를 분리도 1.5 수준의 완전 분리를 확인할 수 있었다.

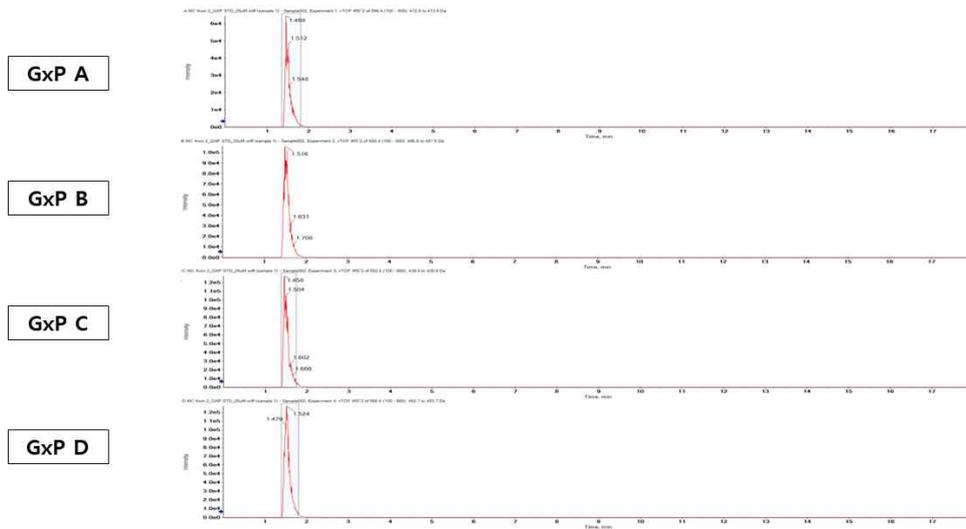


그림 3 . 일반적인 역상 고정상 (C18)을 이용하였을 때, Gxp 4종의 측정의 예

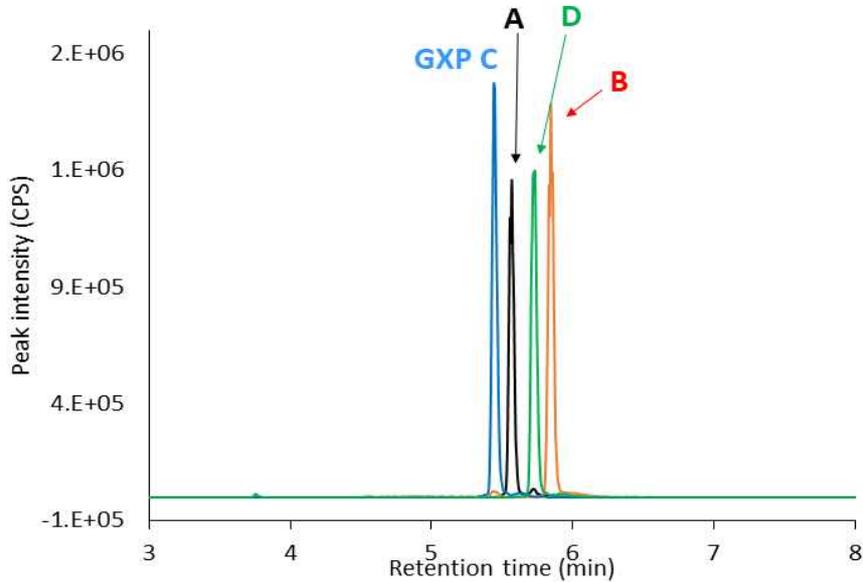


그림 4 . F5 고정상을 이용하였을 때, Gxp 4종의 분리 크로마토그램의 예

분리된 Gxp는 High-resolution MS인 triplequadrupole time-of-flight (qToF) MS분석기를 이용하여 검출하였다. MS 검출을 위한 조건은 각 요소별로 최적화를 하였으며, fragmentation ion pattern을 확인하여 Gxp의 정성과 product ion의 extraction을 통해 고감도, 고선택성의 정량을 할 수 있는 조건을 설정하였다. 다음 표5에 전체 LC-MS 조건을 정리하였다. 그림5은 해당 조건에서의 Gxp 4종의 MS/MS fragmentation scan을 보여주고 있다. MS/MS spectrum에서 fragmentation profile을 측정하였을 때, 기존 문헌과 동일한 profile을 확인하였다.

표5. Gxp 측정을 위한 LC-MS 조건

Descriptions	GameXPepetides analysis																												
System	5600+ TripleTOF (ABSciex) coupled with Prominence 20AD series HPLC (Shimadzu)																												
Column	Kinetex F5 2.6 μm . 2.1 x 100 mm (Phenomenex)																												
Mobile Phase A	0.1 v/v% Formic acid in 20mM Ammonium Formate																												
Mobile Phase B	0.1 v/v% Formic acid in 80/20 v/v Acetonitrile/20 mM Ammonium Formate																												
Flow Rate	0.6 mL/min at column temperature 40 °C with injection volume of 3 μL																												
Gradient Program	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>95</td> <td>5</td> <td>Initial condition</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>70</td> <td>30</td> <td>Linear gradient</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>45</td> <td>55</td> <td>Linear gradient</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>20</td> <td>80</td> <td>Linear gradient</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>20</td> <td>80</td> <td>Cleaning</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>95</td> <td>5</td> <td>Re-equilibration</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	A (%)	B (%)		0	95	5	Initial condition	1	70	30	Linear gradient	2	45	55	Linear gradient	3	20	80	Linear gradient	5	20	80	Cleaning	10	95	5	Re-equilibration
Time (min)	A (%)	B (%)																											
0	95	5	Initial condition																										
1	70	30	Linear gradient																										
2	45	55	Linear gradient																										
3	20	80	Linear gradient																										
5	20	80	Cleaning																										
10	95	5	Re-equilibration																										
Ionization	ESI positive																												
Temperature	500 °C																												
Gas flows	GS1: 50, GS2: 50, CUR: 30																												
IonSpray Voltage	Floating 5500.0																												
TOF scans	100 – 800 Da																												
Ion transition for MRM scans	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Compounds</th> <th>Precursor ion (m/z)</th> <th>Product ion (m/z)</th> <th>DP</th> <th>CE</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>GXP A</td> <td>586.39</td> <td>473.3</td> <td>100</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>GXP B</td> <td>600.41</td> <td>487.3</td> <td>100</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>GXP C</td> <td>552.41</td> <td>439.3</td> <td>100</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>GXP D</td> <td>566.42</td> <td>453.2</td> <td>100</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table>	Compounds	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP	CE	GXP A	586.39	473.3	100	30	GXP B	600.41	487.3	100	30	GXP C	552.41	439.3	100	30	GXP D	566.42	453.2	100	30			
Compounds	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP	CE																									
GXP A	586.39	473.3	100	30																									
GXP B	600.41	487.3	100	30																									
GXP C	552.41	439.3	100	30																									
GXP D	566.42	453.2	100	30																									

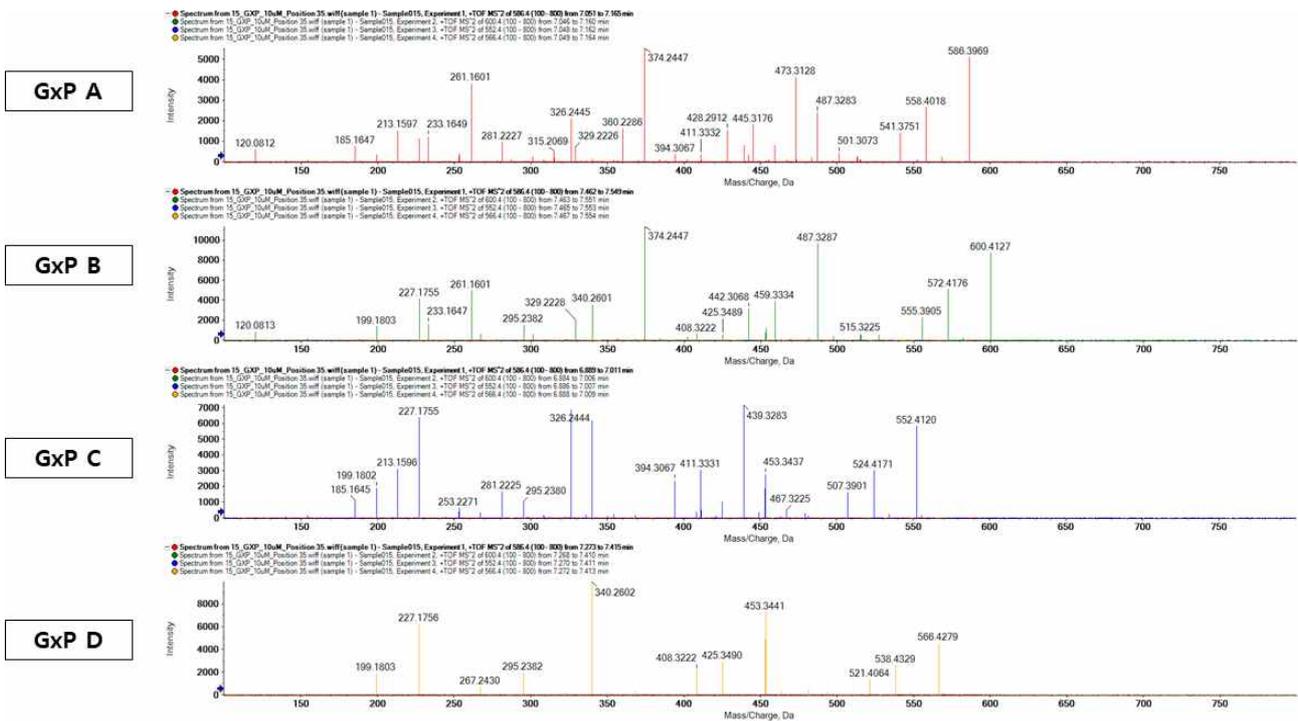


그림 5 . 4종 Gxp의 MS/MS 조각내기 패턴의 예

LC-MS 조건에서 측정방법의 측정 범위, 온건성, 정확성 및 정밀성 등을 검증하기 위한 밸리데이션을 실시하였다. 밸리데이션은 측정 방법의 측정 가능 범위를 설정하기위해, 검출 한계 (Limit of Detection, LOD), 정량 한계 (Limit of Quantification, LOQ) 및 직선성을 가지는 범위 (Linear range)를 설정하며, LOD와 LOQ

는 기본적으로 신호 대 잡음비 (signal-to-noise ratio, S/N)으로서 3과 5를 각각 기준으로 설정하였다. 결과는 다음 표6에 정리하였다. 4가지 Gxp모두 40 nM에서 25 µM범위에서 양호한 직선성을 확인할 수 있었고, 특히 40-250 nM의 저농도 범위에서는 0.999 수준의 높은 직선성을 보였다. 앞으로 적용하게 될 Gxp발현량을 추정하기 어려운 상황에서, 가능한 넓은 범위의 측정 범위를 설정할 필요가 있으나, 고농도의 경우는 희석 비율을 조정하여 한계를 조정할 수 있으나, 저농도의 경우는 농축 등을 하는 번거로운 작업이 필요하거나, 농축을 하더라도 방해 물질등에 의해 절대적인 감도의 확보가 어려울 수 있기 때문에, 측정 범위는 가능한 저농도 부분에서 좋은 직선성을 확보하는 것이 필요하였다. Gxp를 포함하지않는 공시료를 측정하였을 때와 비교하였을 때, LOD는 4개 Gxp모두에서 10 nM수준, LOQ는 40 nM수준으로 설정하였다.

표 6. Gxp 4종의 직선성, 검출한계 및 정량한계

Compounds	Equation ($y=ax+b$ of 0.04 – 25.0 µM)	Correlation (r^2)	LOD (µM, S/N=3)	LOQ (µM, S/N=10)
GXP A	$y=14365.8x + 14201.1$	0.9929	0.01	0.04
GXP B	$y=28093.0x + 33198.2$	0.9887	0.01	0.04
GXP C	$y=23952.9x + 28337.7$	0.9889	0.01	0.04
GXP D	$y=31646.4x + 38212.6$	0.9894	0.01	0.04

분석법의 정확도와 정밀도를 평가하기위해, 일정량의 Gxp를 미생물 배양액 (Gxp발현되기 전의 media)에 첨가하여, 회수율을 일내 (Intra-day), 일간 (Inter-day)측정을 통해 측정 방법의 온건성, 정확도 및 정밀도를 검증하였다. 다음 표 7은 이러한 내용을 정리한 것으로서, 넓은 범위의 농도에서 충분히 활용가능한 측정 방법임을 검증할 수 있었다. 다음 그림 6은, LC-MS를 이용하여 예비실험을 위해 준비되었던 *X. hominickii*와 *P. temperata*의 정제된 배양액 샘플 중의 GxpA, GxpB, GxpC와 GxpD을 측정한 예를 보여주고 있다. 예비 실험으로 측정한 결과이지만, 앞으로 실제 미생물 내 Gxp 발현 실험의 진행에 따라 측정 농도의 범위에 대한 재설정이 필요할 수 있으며, 필요한 경우 추가 밸리데이션을 통해 신뢰성 있는 측정결과를 얻을 수 있도록 지속적인 측정방법의 최적화가 수반될 예정이다.

표 7. Gxp 4종에 대한 Intra-day, Inter-day 반복 실험 결과

Concentration (µM)	Intra-day (Mean of measured values ± SD, n=3)				Inter-day ((Mean of measured values ± SD, n=3)			
	GXP A	GXP B	GXP C	GXP D	GXP A	GXP B	GXP C	GXP D
1.5	0.14 ± 0.03	1.34 ± 0.01	1.41 ± 0.03	1.30 ± 0.05	1.44 ± 0.10	1.42 ± 0.12	1.51 ± 0.16	1.43 ± 0.20
3.1	3.41 ± 0.11	3.54 ± 0.06	3.34 ± 0.03	3.56 ± 0.02	3.32 ± 0.07	3.35 ± 0.13	3.03 ± 0.27	3.36 ± 0.19
6.3	6.56 ± 0.06	6.86 ± 0.41	6.94 ± 0.25	6.90 ± 0.32	6.84 ± 0.51	7.01 ± 0.06	7.11 ± 0.72	6.97 ± 0.64
12.5	12.30 ± 0.24	12.14 ± 0.11	12.14 ± 0.27	12.12 ± 0.42	12.19 ± 0.97	12.10 ± 0.90	12.11 ± 1.07	12.12 ± 1.22
25.0	19.68 ± 0.84	20.09 ± 0.38	19.58 ± 0.22	19.63 ± 0.63	20.05 ± 1.32	19.94 ± 1.48	20.00 ± 1.92	19.26 ± 1.45

Photorhabdus temperata samples

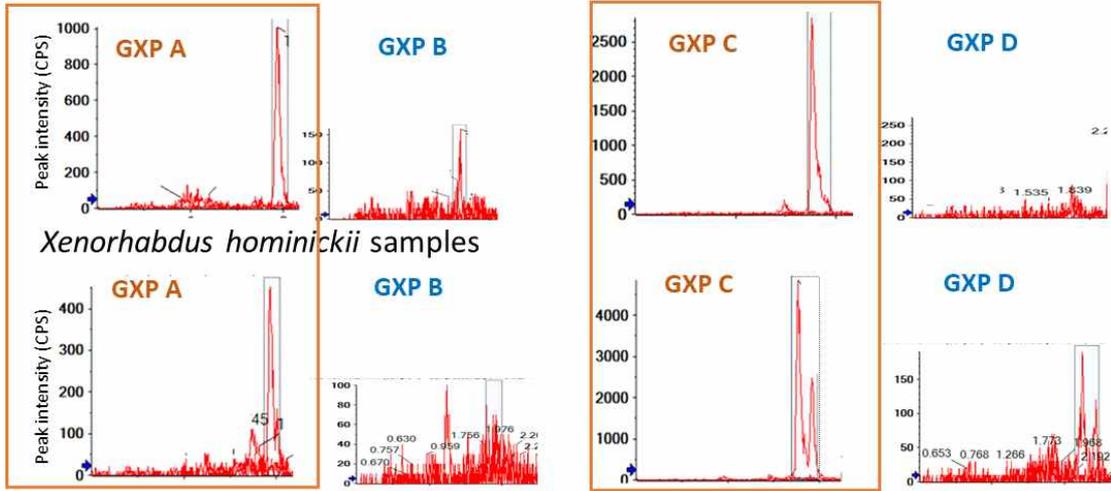


그림 6 . LC-MS를 이용한 측정의 예

[협동기관-고려바이오] 연구내용

○ 시제품의 유기농업자재 공시 기준에 따른 시험 및 유기농업자재 공시 신청

요약

시제품의 주성분, 농약피해, 안정성 평가를 유기농업자재 시험기관에 의뢰하여 수행하였으며, 각각의 시험결과와 유기농업자재 공시기준에 적합함을 확인하였다. 해당 시험성적서를 토대로 유기농업자재 공시기관인 강원대학교 산학협력단에 총해관리용 유기농업자재로 공시 신청하였다.

결과

1. 시제품의 주성분 분석

시제품의 주성분인 *Bacillus thuringiensis*의 동정을 위해 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하고 상동성을 비교한 결과, *Bacillus thuringiensis*에 99% 유사성을 가지고 있는 미생물로 확인되었다(그림 1, 그림 2, 그림 3).

> Strain EFAP-22-1143-M(1474bp)

```
GAACGGCGGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGGCGGACGGGTGA
GTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGG
TTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
GGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAGAACTCTGTTGT
TAGGGAAGAACAAGTGTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAA
GCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGGAAAGCGTGGGGA
GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTAGAGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGAA
GTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTG
GAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCCTAGAGATAGGGCTTCTCC
TTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
CCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
ATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAAT
CTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATG
CCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACC
TTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAG
```

그림 1. 시제품 내 미생물 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과

> Strain EFAP-22-1143-M(1474bp)

Sequences producing significant alignments						
Accession	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	ident
NR_075005.2	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077 16S ribosomal RNA, partial sequence	2695	2695	100%	0.0	99.66%

그림 2. 시제품 내 미생물 NCBI BLAST 상동성 검색 결과(NCBI BLASTSearch: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

> Strain EFAP-22-1143-M(1474bp)

Bacillus thuringiensis strain IAM 12077 16S ribosomal RNA, partial sequence

Sequence ID: [NR_043403.1](#) Length: 1486 Number of Matches: 1

Range 1: 4 to 1477 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2695 bits(1459)	0.0	1469/1474(99%)	0/1474(0%)	Plus/Plus
Query 1		GAACGGCGGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAAGTCGAGCGAATGGATTAAAGAGCTTGCTCTT		60
Sbjct 4		GAACGCTGGCGGGCGTGCCTAATACATGCAAAGTCGAGCGAATGGATTGAAGAGCTTGCTCTC		63
Query 61		ATGAAAGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAAACACGTGGGTAACTGCCCATAAAGACTGGGATA		120
Sbjct 64		AAGAAGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAAACACGTGGGTAACTGCCCATAAAGACTGGGATA		123
Query 121		ACTCGGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAA		180
Sbjct 124		ACTCGGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAA		183
Query 181		AGGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTA		240
Sbjct 184		AGGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTA		243
Query 241		ACGGCTCACCAAGCAACCGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGAC		300
Sbjct 244		ACGGCTCACCAAGCAACCGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGAC		303
Query 301		TGAGACACGGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAAGCAGTAGGGAACTTCCGCAATGGACGAA		360
Sbjct 304		TGAGACACGGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAAGCAGTAGGGAACTTCCGCAATGGACGAA		363
Query 361		AGCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAGTGAAGGGCTTCGGGTGCTAAAACCTCTGTTGT		420
Sbjct 364		AGCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAGTGAAGGGCTTCGGGTGCTAAAACCTCTGTTGT		423
Query 421		TAGGGAGAAACAAGTGTAGTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAAGAAAGC		480
Sbjct 424		TAGGGAGAAACAAGTGTAGTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAAGAAAGC		483
Query 481		CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAACGTAAGTGGCAAGCGTTATCCGGAAT		540
Sbjct 484		CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAACGTAAGTGGCAAGCGTTATCCGGAAT		543
Query 541		TATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTTGGTTCTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCA		600
Sbjct 544		TATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTTGGTTCTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCA		603
Query 601		ACCGTGGAGGGTCAATGGAAACTGGGACTGGGAGCTTGAAGTGCAGAAAGGAAAGTGGAAATCCA		660
Sbjct 604		ACCGTGGAGGGTCAATGGAAACTGGGACTGGGAGCTTGAAGTGCAGAAAGGAAAGTGGAAATCCA		663
Query 661		TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTCTGT		720
Sbjct 664		TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTCTGT		723
Query 721		GTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGT		780
Sbjct 724		GTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGT		783
Query 781		AGTCCACGCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAA		840
Sbjct 784		AGTCCACGCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAA		843
Query 841		GTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAAT		900
Sbjct 844		GTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAAT		903
Query 901		TGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAAC		960
Sbjct 904		TGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAAC		963
Query 961		TTACCAAGGCTTTCATCCTCTGAAAACCCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGA		1020
Sbjct 964		TTACCAAGGCTTTCATCCTCTGAAAACCCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGA		1023
Query 1021		GTGACAGGTGGTGCATGGTGTGCGTCAAGTGTGCGTCAAGTGTGGGTTAAGTCCC		1080
Sbjct 1024		GTGACAGGTGGTGCATGGTGTGCGTCAAGTGTGCGTCAAGTGTGGGTTAAGTCCC		1083
Query 1081		AACGAGCGCAACCCCTTATCTTATGTTGCCATCAATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGC		1140
Sbjct 1084		AACGAGCGCAACCCCTTATCTTATGTTGCCATCAATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGC		1143
Query 1141		CGGTGACAAACCGGAGGAAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGG		1200
Sbjct 1144		CGGTGACAAACCGGAGGAAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGG		1203
Query 1201		GCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAAT		1260
Sbjct 1204		GCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAAT		1263
Query 1261		CTCATAAAACCGTTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAAGCTGGAAT		1320
Sbjct 1264		CTCATAAAACCGTTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAAGCTGGAAT		1323
Query 1321		CGCTAGTAAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG		1380
Sbjct 1324		CGCTAGTAAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG		1383
Query 1381		CCCGTCAACCAACGAGAGTTTGTAAACCCGAAAGTGGTGGGGTAACTTTTGGAGCCA		1440
Sbjct 1384		CCCGTCAACCAACGAGAGTTTGTAAACCCGAAAGTGGTGGGGTAACTTTTGGAGCCA		1443
Query 1441		GCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAG 1474		
Sbjct 1444		GCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAG 1477		

그림 3. 시제품 내 미생물과 동일 형태의 미생물의 유전자 상동성 비교

시제품의 주성분인 *Bacillus thuringiensis*의 생균수를 측정하기 위해 희석평판법에 의거하여 3반복으로 수행한 후, 유효미생물 콜로니와 동일한 형태의 콜로니를 유효미생물로 판정하고 계수하여 평균값을 산출한 결과, 생균수는 3.5×10^8 CFU/g으로 확인되었다(그림 4).



그림 4. 시제품 내 생균수 측정 결과

2. 시제품의 농약피해 평가

시제품의 농약피해를 평가하기 위해 고추(신와매워), 배추(휘모리골드), 상추(청치마), 오이(신아시아은천), 파(아이아흑금장)에 시제품을 기준량과 배량으로 처리하고 3, 5, 7일 후에 육안으로 관찰하여 농약피해의 판정 기준에 따라 농약피해 여부를 판단하였다(표 1). 시험기간 동안 기준량과 배량에서 농약피해는 발견되지 않았으며, 무처리와 비교하여도 농약피해로 판단될 만한 특이사항은 관찰되지 않았다(표 2, 그림 5).

표 1. 농약피해의 판정기준

정도	판정기준
0	육안으로 농약피해가 인정되지 않음
1	아주 가벼운 농약피해로서 작은 약반이 약간 인정됨
2	처리된 잎의 소부분에서 농약피해가 인정됨
3	처리된 잎의 50퍼센트 정도 농약피해가 인정됨
4	상당한 피해를 받고 있으나 아직 건전한 부분이 남아 있음

표 2. 시제품의 농약피해 조사 결과(3, 5, 7일차)

작물명	처리구	판정기준			농약피해 증상
		3일차	5일차	7일차	
고추	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음
배추	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음
상추	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음
오이	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음
파	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음



그림 5. 시제품의 농약피해 시험결과(7일차 / 고추, 배추, 상추, 오이, 파)

3. 시제품의 병원성미생물 검사

시제품의 병원성미생물 5종(*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*)에 대한 검출여부를 확인하기 위해 시제품을 35~37°C에서 24±2 시간 동안 증균배양하여 EMB 한천배지, Xylose Lysine Desoxycholate Agar배지, Baird Parker Agar배지, Oxford Agar배지, Mannitol Egg York Polymyxin Agar배지에 선택배지법을 이용하여 검정한 결과, 5종의 병원성미생물이 불검출되었다(그림 6).

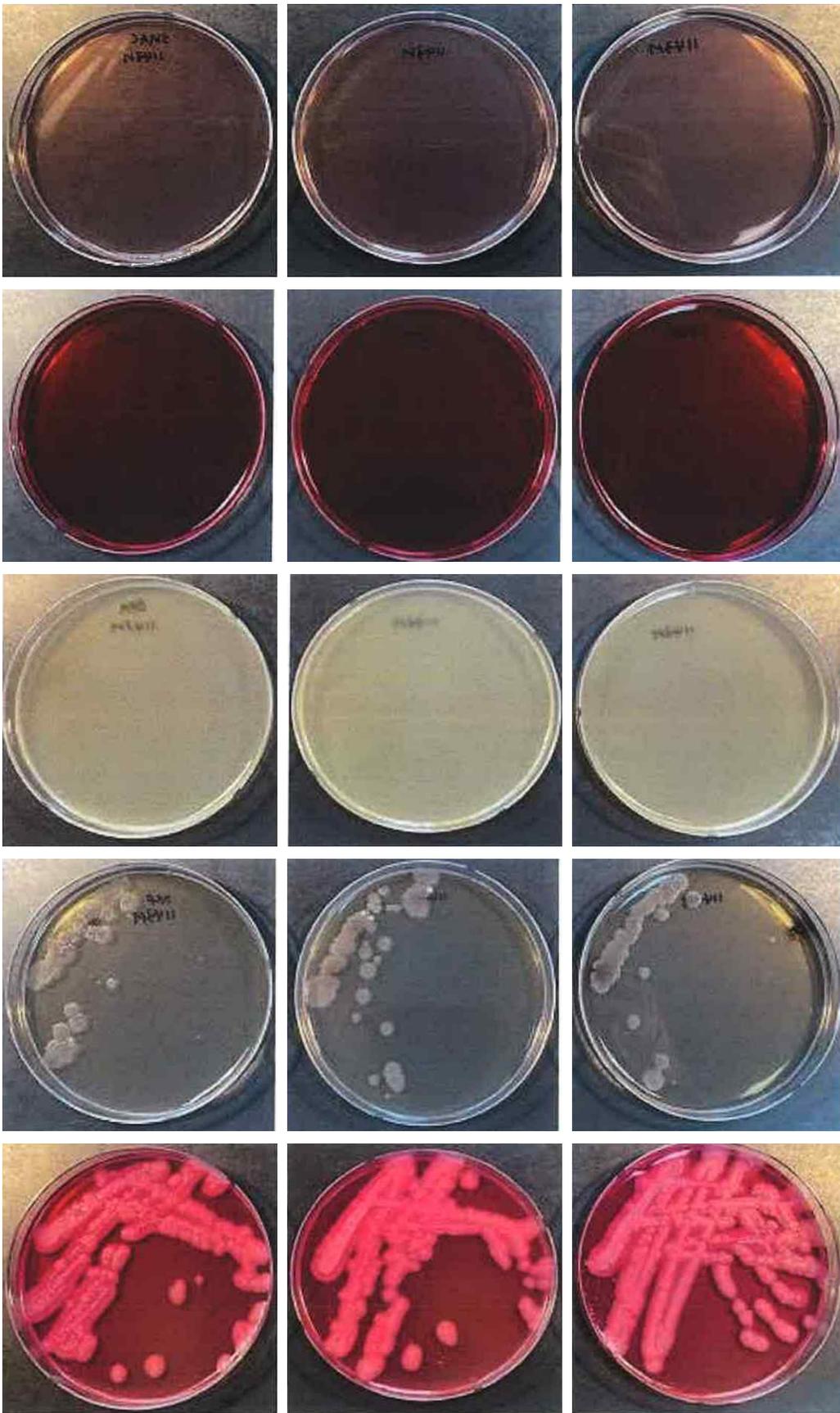


그림 6. 시제품의 병원성미생물 검사 결과(*E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*)

5. 시제품의 독성 및 환경 영향성 평가

시제품의 포유류에 대한 독성 및 환경에 대한 영향성을 평가하기 위해 실시한 급성경구독성/병원성, 급성경피독성, 안점막자극성, 피부자극성, 담수어류영향, 꿀벌영향시험 결과, 유기농업자재 공시 기준에 적합한 결과를 확인하였다(표 3).

표 3. 시제품의 포유류에 대한 독성 및 환경에 대한 영향성 평가 결과 요약

시험항목	시험결과	비고
급성경구독성/병원성	반수치사량 (LD ₅₀ 값): > 1.0×10 ⁸ cfu/개체 “1.0×10 ⁸ cfu/개체”에서 영향 없음	실험동물 : SD랫드
급성경피독성	반수치사량 (LD ₅₀ 값): > 1.0×10 ⁸ cfu/개체 “1.0×10 ⁸ cfu/개체”에서 영향 없음	실험동물 : SD랫드
안점막자극성	급성안자극지수 (A.O.I.): 0.0 (자극없음)	실험동물 : 토끼 (Ne Zealand White)
피부자극성	1차 피부자극지수 (P.I.I.): 0.0 (자극없음)	실험동물 : 토끼 (Ne Zealand White)
담수어류영향	반수치사농도 (LC ₅₀ 값): > 1.0×10 ⁶ cfu/mL 최대무작용량: 1.0×10 ⁶ cfu/mL	실험동물 : 잉어 (<i>Cyprinus carpio</i>)
꿀벌영향	최대무영향농도 > 추천사용약량(1,000배 희석농도)의 1배, 즉 3.5×10 ⁸ cfu/개체	실험동물 : 꿀벌 (<i>Apis mellifera</i>)

○ 사업화 연구

요약

시제품 사업화를 위해 당초 국내외 전시회 홍보를 계획하였으나, COVID-19의 영향으로 국내외 전시회 참가가 제한되어 온·오프라인 미팅을 통해 국내, 멕시코, 페루, 필리핀 바이어에게 시제품에 대한 홍보를 진행하였으며, 올해 11월 Growtech Eurasia에 참가하여 중동 및 유럽 바이어에게 시제품에 대한 홍보를 진행할 예정이다. 시제품과 경쟁제품을 대파 포장에서 파굴파리에 대한 비교 시험을 수행한 결과, 시제품이 경쟁제품에 비해 우수한 효과를 보여 시제품의 충분한 시장경쟁력이 확인되었다.

결과

1. 국내외 전시회 홍보

COVID-19의 영향으로 국내외 전시회를 통한 홍보활동이 제한되어 전시회를 통한 홍보를 대신하여 국내외 바이어와의 온·오프라인 미팅을 통해 시제품에 대한 홍보를 진행하였다. 기존의 BT제와 차별성이 있는 시제품의 컨셉 및 효과에 만족스러운 반응을 보였다.

또한 국내외 COVID-19로 인한 여건이 개선됨에 따라, 11월 23일 ~ 26일에 튀르키예에서 개최 예정인 Growtech Eurasia에 참가하여 중동과 동유럽 지역에 대한 시제품에 대한 적극적인 홍보를 계획하고 있다.

2. 경쟁제품군과의 비교 및 사업화 연구

시제품과 유사한 용도로 사용하거나 주성분이 유사한 경쟁제품군을 선정하여 세종특별시에 소재한 대파(품종 : 대곡) 재배농가에서 파굴파리에 대한 비교 시험을 수행하였다. 무처리구 피해율이 62.8%로 약효를 평가하기에 충분하였다. 경쟁제품으로는 화학농약인 에이팜(에마멕틴벤조에이트 2.15%), 유기농업자재인 비티투(*Bacillus thuringiensis*), 청충불패(고삼추출물 90%)를 선정하여 비교시험을 수행하였다(그림 9).



그림 9. 대파 포장시험 전경 및 파굴파리 피해

시제품은 파굴파리에 대해 기준량 처리구(×1,000)에서 무처리구 대비 82.6%의 방제가를 나타내었으며, 유기농업자재 경쟁제품인 비티투(57.2%)와 청충불패(70.1%)보다 높은 방제가를 보였으며, 화학농약인 에이팜(91.7%)에 비해 방제가는 다소 낮지만 에이팜 대비 90.1%의 방제가를 보여 충분한 경쟁력을 갖춘 것으로 판단된다(그림 10).

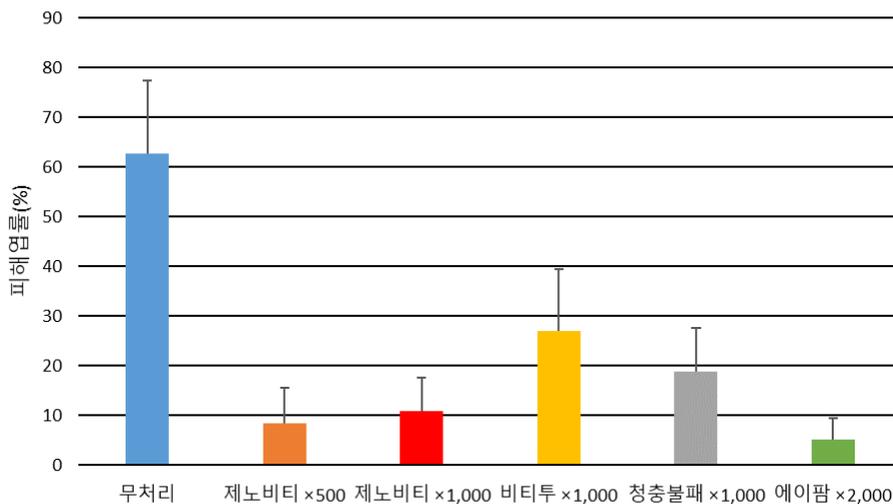


그림 10. 파굴파리에 대한 대파 포장시험 결과

[3차년도]

○ 대파 고자리파리 방제용 IBC 살충제 개발

요약 대파를 가해하는 고자리파리(*Delia antiqua*)를 대상으로 상이한 두 지역에서 모니터링한 결과 월동세대 이후 최소 3회의 성충 발생 피크를 관찰하였다. 이 해충은 대파 지하부에 위치한 줄기를 가해하며 어린 파를 고사시키는 피해를 주었다. 이 해충에 대한 곤충병원성곰팡이의 살충력을 스크리닝한 결과 *Beauveria bassiana*가 가장 높은 활성을 나타내는 것으로 나타났다. 그러나 살충력이 60% 이하로 비교적 낮았다. 이를 높이기 위해 *Photorhabdus temperata temperata* 세균 배양액을 추가한 결과 곰팡이의 병원력이 크게 증가하였다. 이러한 병원성 증가의 원인을 규명하고자 세균 배양액이 고자리파리 유충의 면역에 미치는 영향을 분석하였다. 고자리파리의 혈구세포가 관찰되었으며 이들 세포의 활착현상을 곰팡이 군사 처리에서 나타났다. 이러한 세포성 면역반응은 소낭형성으로 나타났다. 또한 세크로핀과 어태신의 항생단백질의 발현이 증가하였다. 이때 세균 배양액 처리는 이러한 세포성 및 체액성 면역반응 모두 억제하였다. 따라서 세균 배양액의 면역 억제 효과가 곰팡이의 살충력을 증가시킨 것으로 해석된다.

결과

1. 대파 재배지 고자리파리 연중 발생 상황 대파를 가해하는 고자리파리(*Delia antiqua*)는 대파 지하부에 위치한 줄기를 가해하며 어린 파를 고사시키는 피해를 주었다. 상이한 두 대파재배지(안동과 구리)에서 모니터링한 결과 월동세대 이후 최소 3회의 성충 발생 피크를 관찰하였다.

(A)



```

Andong  GTTATGATTAGTCTCGAGTTTATATTTAATTTACCGGGGTCATAGCTGTTCCGAAGAAGGTTCCCTTCCCTCAT 80
Guri    TCTTATGATTAGTCTCGAGTTTATATTTAATTTACCGGGGTCATAGCTGTTCCGAAGAAGGTTCCCTTCCCTCAT 80

Andong  GCATFGCGGGGGGTTCCGGAAATTTATTCATGGCGGGGATCTGGCACAGGATTTACTG9TTACCCACCTTGCACCTA 160
Guri    GCATFGCGGGGGGTTCCGGAAATTTATTCATGGCGGGGATCTGGCACAGGATTTACTG9TTACCCACCTTGCACCTA 160

Andong  ACATCGCTCGTGGCTGAGCTCTGCTGATTTAGCAATTTTTTCCTTACCTTTACCAAGATTTGCTGCATTTAGGAGCC 240
Guri    ACATCGCTCGTGGCTGAGCTCTGCTGATTTAGCAATTTTTTCCTTACCTTTACCAAGATTTGCTGCATTTAGGAGCC 240

Andong  GTAAATTTTATTACTACTGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTAGTTTGGATGSAATACCTTTATTGTTGGATCAG 320
Guri    GTAAATTTTATTACTACTGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTAGTTTGGATGSAATACCTTTATTGTTGGATCAG 320

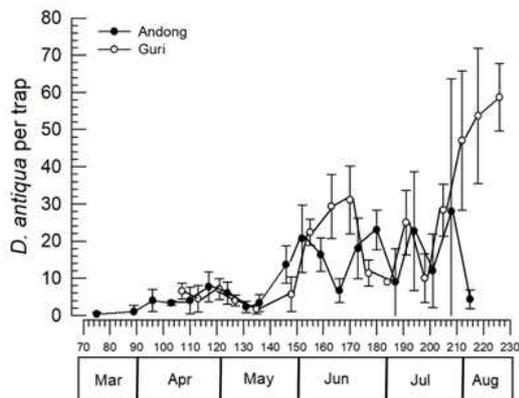
Andong  AGGAATTACAGCATTACTCTCTTTTCGATCTTTACCGGATGACCGG9TGGATCACTACTATTACAGATGGAAATC 400
Guri    AGGAATTACAGCATTACTCTCTTTTCGATCTTTACCGGATGACCGG9TGGATCACTACTATTACAGATGGAAATC 400

Andong  TAAATACATATTTTTGACCCCGGAGGAGGAGATCCACTTTATACCAAGATTTATTTGATCTTTGGGATCCCT 480
Guri    TAAATACATATTTTTGACCCCGGAGGAGGAGATCCACTTTATACCAAGATTTATTTGATCTTTGGGATCCCT 480

Andong  SAAGTTTATATTTTAAATTTTACCGGGGTCATAGCTGTTCCCTGAGGAC 528
Guri    SAAGTTTATATTTTAAATTTTACCGGGGTCATAGCTGTTCCCTGAGGAC 528
    
```

Collection sites	Blast results to <i>D. antiqua</i> (GenBank accession number: NC_028226.1.)		
	Match score	Homology (%)	E-value
Andong	464	86.63	7e-126
Guri	460	86.38	3e-124

(B)



Source	df	SS	MS	F	P
Location	1	2831.30	2831.30	23.53	< 0.0001
Time	35	20748.94	592.82	4.93	< 0.0001
Error	74	8902.66	120.31		

그림 1. 대파 재배지 고자리파리 발생. (A) 고자리파리에 의한 대파 피해 및 분자동정 (B) 두 대파재배지(안동 (AD), 구리(GR)) 연중발생

2. 고자리파리 방제를 위한 IBC 농약 개발 세 종류의 (A) 곤충병원성곰팡이를 처리하여 살충력을 비교한 결과 *Beauveria bassiana* 곰팡이가 가장 우수한 활성을 보였다. 그러나 낮은 살충력을 보완하기 위해 세균 대사물질을 처리하였다. *Photorhabdus temperata temperata* 세균 배양액을 추가한 결과 곰팡이의 병원력이 크게 증가하였다. 세균배양액의 농도를 증가시키면 고자리파리의 살충력이 증가하였다.

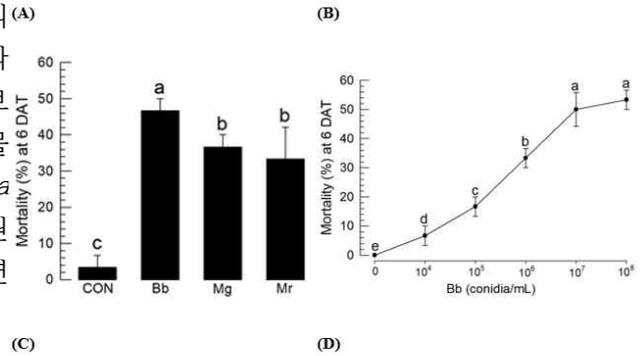


그림 2. 고자리파리에 대한 IBC 살충제 개발. (A) 곤충 병원성 곰팡이 스트리닝 (B) 농도별 살충력 (C) 세균배양액과 협력작용 (D) 세균배양액의 농도별 살충력 증가 효과

3. 고자리파리 면역반응 이러한 병원성 증가의 원인을 규명하고자 세균 배양액이 고자리파리 유충의 면역에 미치는 영향을 분석하였다. 고자리파리의 혈구세포가 관찰되었으며 이들 세포의 활착현상을 곰팡이 균사 처리에서 나타났다. 이러한 세포성 면역반응은 소낭형성으로 나타났다.

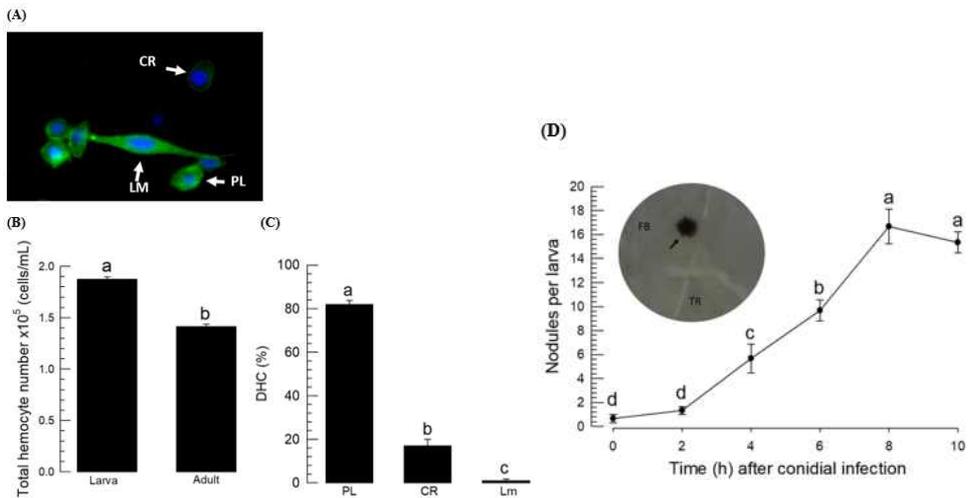


그림 3. 고자리파리 혈구세포와 세포성 면역

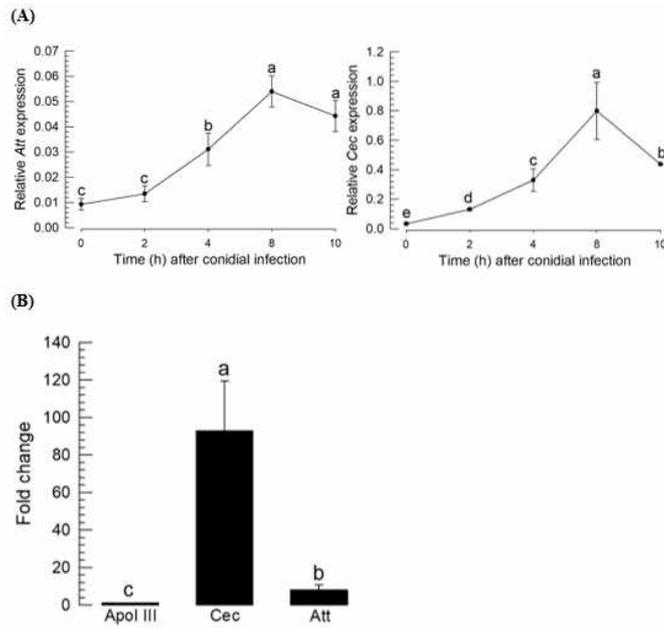


그림 4. 고자리파리 체액성 면역

고자리파리는 곰팡이 균사 처리에 대해서 세크로핀과 어태신의 항생단백질의 발현을 증가시켰다. 이때 세균 배양액 처리는 이러한 세포성 및 체액성 면역반응 모두 억제하였다. 따라서 세균 배양액의 면역억제 효과가 곰팡이의 살충력을 증가시킨 것으로 해석된다.

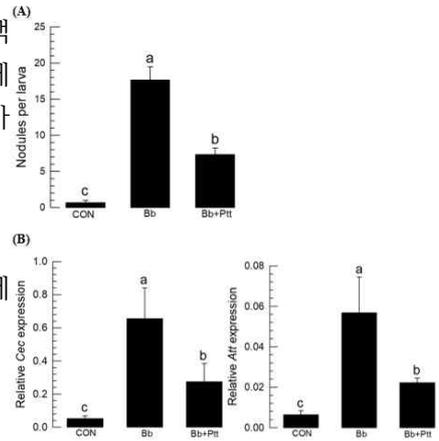


그림 5. *P. temperata temperata* 세균 배양액의 고자리파리 면역 억제 효과

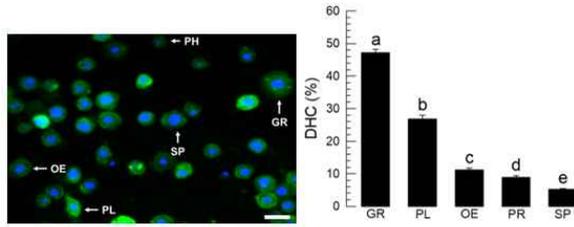
○ 파좁나방 면역전사체 규명

요약 파좁나방(*Acrolepiopsis sapporensis*) 5령 유충의 총 혈구수는 2.33×10^6 cells/mL로 계수되었다. 혈구 종류는 과립혈구(47%), 부정형혈구(26%), 편도혈구(11%), 원시혈구(8%) 및 소구형혈구(5%)로 구성되었다. 면역처리는 혈구세포의 세포골격변화로 활착행동을 증가시켰다. 이러한 혈구 행동은 소낭형성과 같은 세포성 면역반응을 유도했다. 또한, 면역처리된 유충은 페놀옥시다제 효소 활성 증가와 항생단백질 합성 등의 체액성 면역반응을 유도하였다. 이러한 면역반응을 RNA-Seq에 의해 발현전사체를 분석하였다. 약 12Gb 서열은 약 218,116개의 contig로 이어졌고, 이는 약 46,808개의 유전자를 암호화했다. 비교 발현체 분석은 8,392개의 유전자들이 면역반응에 의해 발현이 유도되었다. 일반적으로 발현되는 유전자 중에서 차별적으로 발현된 유전자(DEG) 분석은 782개의 유전자가 상향 조절되었고 548개의 유전자가 세균 감염 후 발현에서 하향 조절되었음을 나타냈다. 이러한 면역 관련 유전자에는 패턴 인식 수용체, 면역 매개/신호 유전자 및 다양한 면역발현체가 포함되었다. 이들은 Toll, IMD 및 JAK/STAT 면역 신호 전달 경로의 유전적 구성 요소가 DEG 데이터베이스에 포함되었다. 이러한 결과는 파좁나방 유충의 면역반응을 제시하고 관련된 유전자를 동정하였다.

결과

1. 파좁나방 혈구 종류와 활착행동

(A)



파좁나방(*Acrolepiopsis sapporensis*) 5령 유충의 총 혈구수는 2.33×10^6 cells/mL로 계수되었다. 혈구 종류는 과립혈구(47%), 부정형혈구(26%), 편도혈구(11%), 원시혈구(8%) 및 소구형혈구(5%)로 구성되었다. 이들은 세포골격 구조 변화로 혈구활착행동을 보였다.

(B)

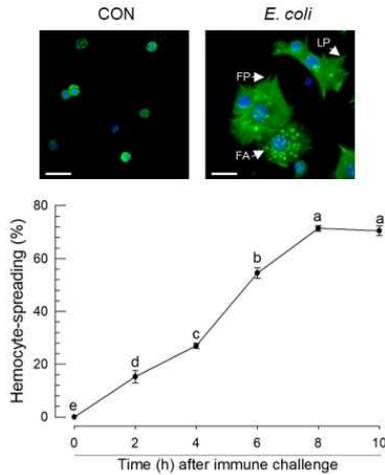


그림 1. 파좁나방 혈구세포 종류와 활착 행동

2. 파좁나방 면역반응 파좁나방 유충에 면역처리는 혈구세포의 세포골격변화로 활착행동을 증가시켰다. 이러한 혈구 행동은 소낭형성과 같은 세포성 면역반응을 유도했다. 또한, 면역처리된 유충은 페놀옥시다제 효소 활성 증가와 항생단백질 합성 등의 체액성 면역반응을 유도하였다.

(C)

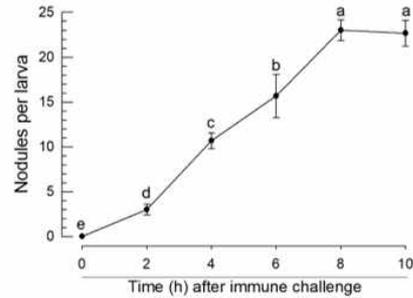
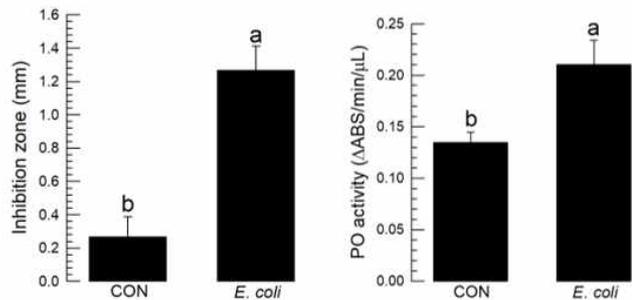


그림 2. 파좁나방 면역반응

3. 파좁나방 면역 전사체 분석 파좁나방 면역반응을 RNA-Seq에 의해 발현전사체로 분석하였다. 약 12Gb 서열은 약 218,116개의 contig로 이어졌고, 이는 약 46,808개의 유전자를 암호화하였다. 비교 발현체 분석은 8,392개의 유전자들이 면역반응에 의해 발현이 유도되었다. 일반적으로 발현되는 유전자 중에서 차별적으로 발현된 유전자(DEG) 분석은 782개의 유전자가 상향 조절되었고 548개의 유전자가 세균 감염 후 발현에서 하향 조절되었음을 나타냈다. 이러한 면역 관련 유전자에는 패턴 인식 수용체, 면역 매개/신호 유전자 및 다양한 면역발현체가 포함되었다. 이들은 Toll, IMD 및 JAK/STAT 면역 신호 전달 경로의 유전적 구성 요소가 DEG 데이터베이스에 포함되었다. 이러한 결과는 파좁나방 유충의 면역반응을 제시하고 관련된 유전자를 동정하였다.

(D)



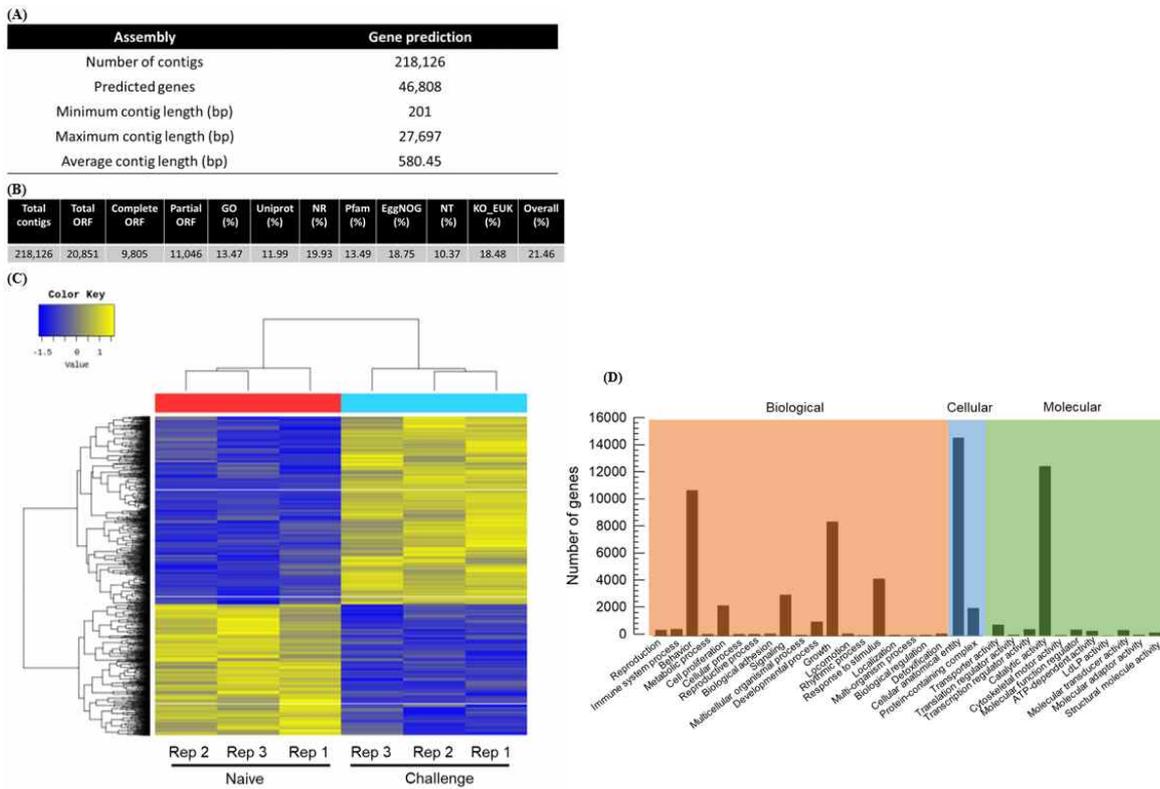


그림 3. RNA-Seq을 통한 파죤나방 전사체 분석 개요

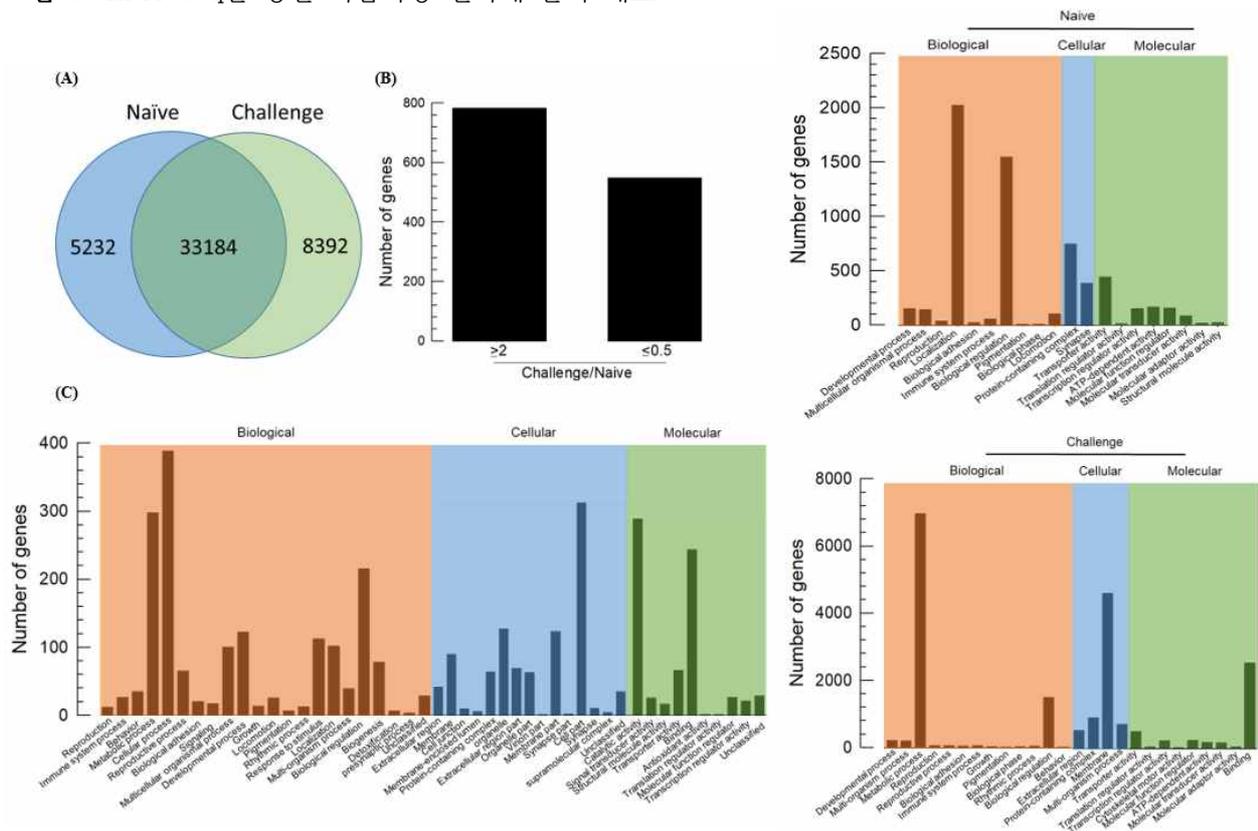


그림 4. 파죤나방 전사체 DEG 분석 및 기능 분류

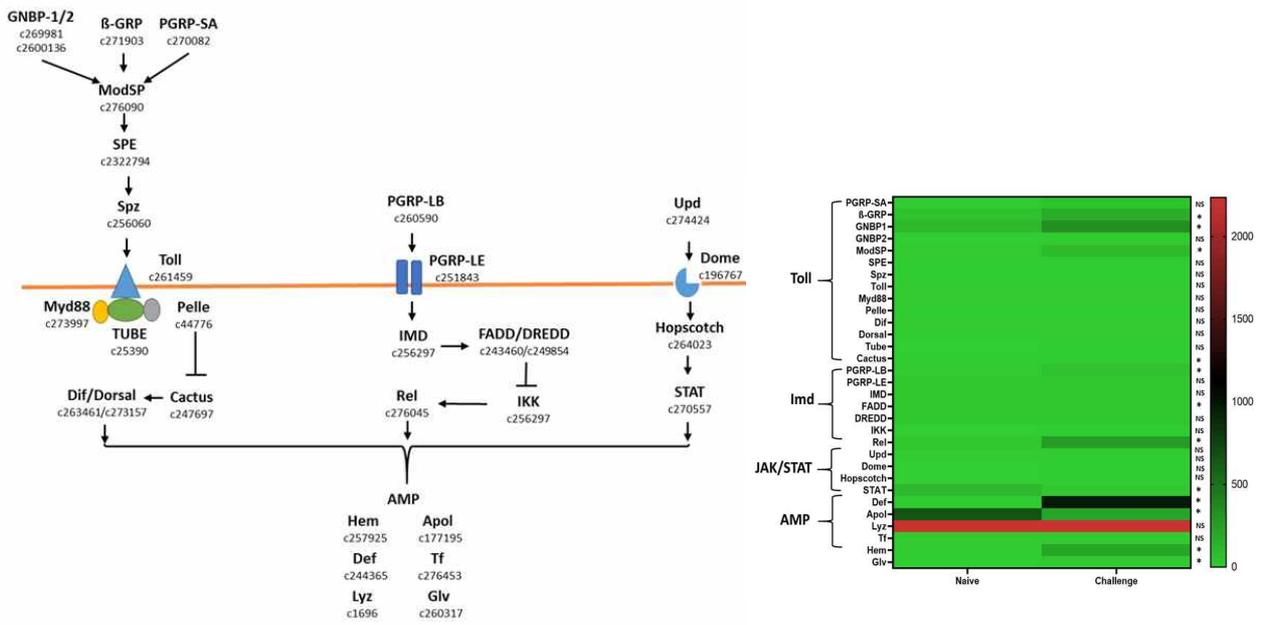


그림 5. 파좀나방 Toll/IMD와 JAK/STAT 면역신호

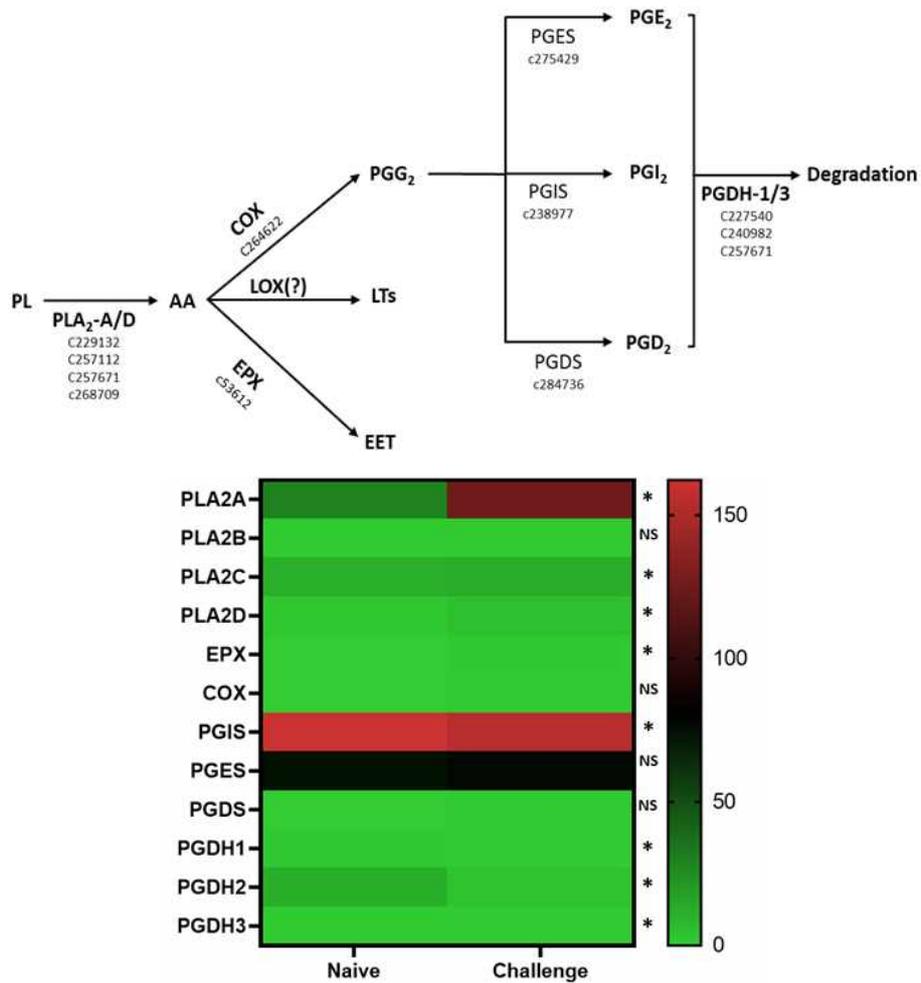


그림 6. 파좀나방 아이코사노이드 생합성 과정과 발현 분석

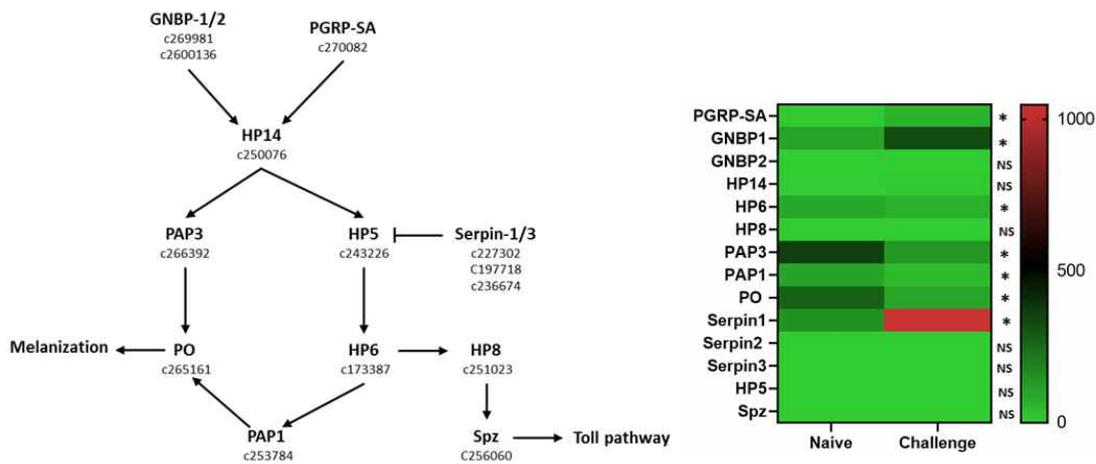


그림 7. 파좀나방 아이코사노이드 생합성 과정과 발현 분석

○ Lrp 조절자를 통한 *Xenorhabdus himinickii* 이차대사산물 조절 기작

요약 두 박테리아 속인 *Xenorhabdus*와 *Photorhabdus*는 각각 곤충병원성 선충인 *Steinernema*와 *Heterorhabditis*와 상호 공생합니다. 감염성 유충은 공생세균을 표적곤충의 혈강에 전달하고, 여기서 세균이 증식하여 숙주선충의 발달을 돕습니다. 선충-박테리아 복합체의 성공적인 기생충 감염은 박테리아의 2차 대사산물을 통한 숙주 면역억제에 달려 있습니다. 류신 반응 조절 단백질(Lrp)은 기생충에 중요한 역할을 하는 글로벌 박테리아 전사 인자입니다. 그러나 곤충 면역을 억제하기 위한 규제 목표는 명확하게 이해되지 않았습니다. 이 연구는 *Xenorhabdus hominickii*에서 Lrp에 의해 조절되는 박테리아 유전자와 후속 2차 대사산물 생산을 조사했습니다. Lrp 발현은 표적 곤충인 *Spodoptera exigua*에서 박테리아의 감염 초기 단계에서 발생했습니다. 예비 *in silico* 스크리닝에서는 *X. hominickii*에서 암호화된 4,075개의 예측 유전자 중 3.7%의 유전자가 2개의 비리보솜 펩타이드 합성효소(NRPS)를 포함하여 프로모터에 Lrp 반응 요소를 가지고 있는 것으로 나타났습니다. 8개의 NRPS(NRPS1-NRPS8) 유전자가 박테리아 게놈에서 예측되며, 여기서 6개의 NRPS(NRPS3-NRPS8) 발현은 *S. exigua*의 감염된 유충에서 Lrp 발현과 양의 상관관계가 있습니다. Lrp 프로모터를 유도성 프로모터로 교환하면 2차 대사산물의 생산과 NRPS 발현 수준이 변경되었습니다. *X. hominickii*의 면역억제 활성은 Lrp 발현 수준에 따라 달라졌습니다. Lrp 발현에 의해 생성된 대사산물에는 에이코사노이드 생합성 억제제와 용혈 인자가 포함되어 있습니다. 고리형 디펩티드(=cPF)는 높은 Lrp 발현에서 생산되었으며 경쟁적 억제 방식으로 *S. exigua*의 포스포리파제 A2 활성을 억제하는 것으로 밝혀졌습니다. 이러한 결과는 Lrp가 *X. hominickii*의 전반적인 전사 인자이며 NRPS 발현을 조절하여 곤충 면역 억제에 중요한 역할을 한다는 것을 시사합니다.

결과

1. Lrp 조절자 유전자의 *Xenorhabdus hominickii* 게놈상 위치

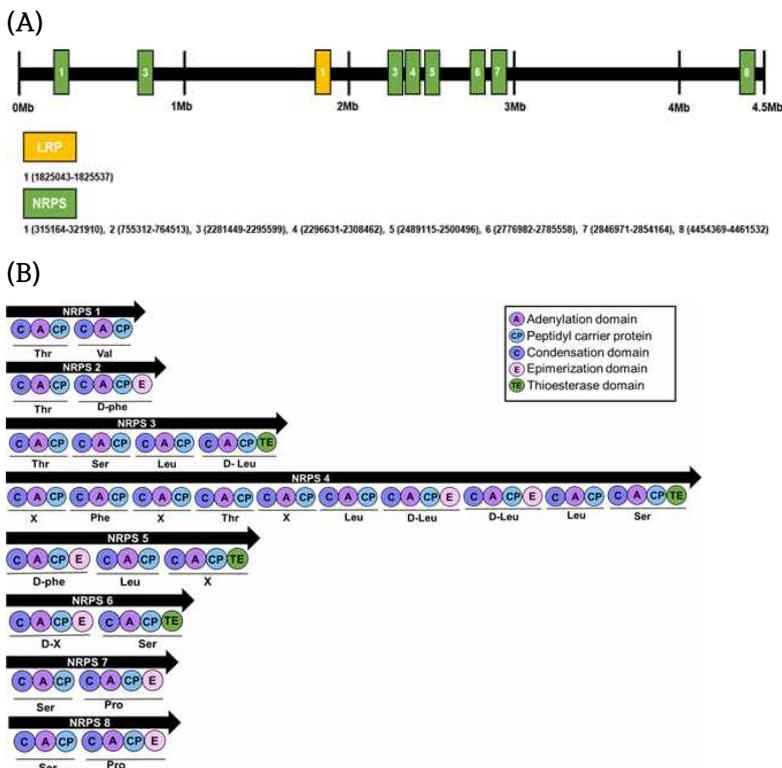
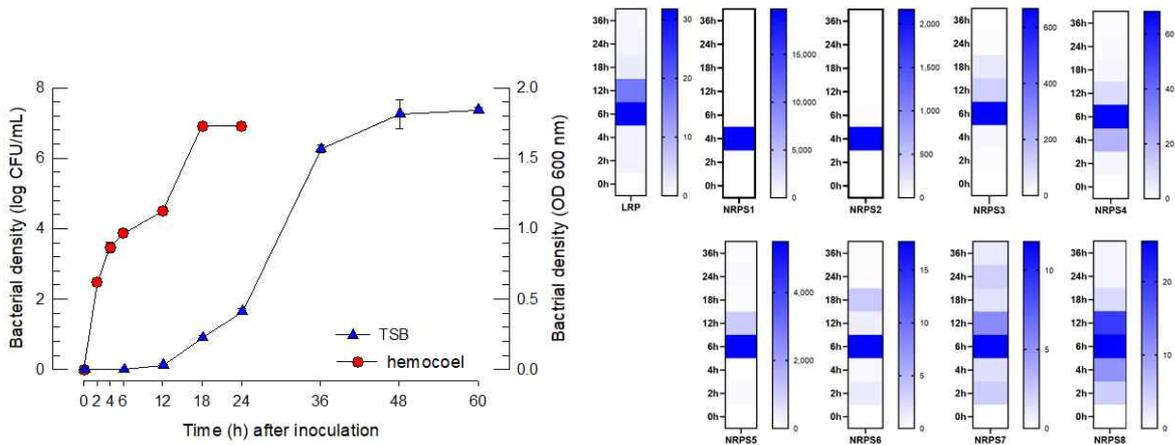


그림 1. *Xenorhabdus hominickii* 게놈 구조 (A) Lrp와 NRPS의 상대적 위치 (B) 8개 NRPS 유전자 기능 모듈 구조

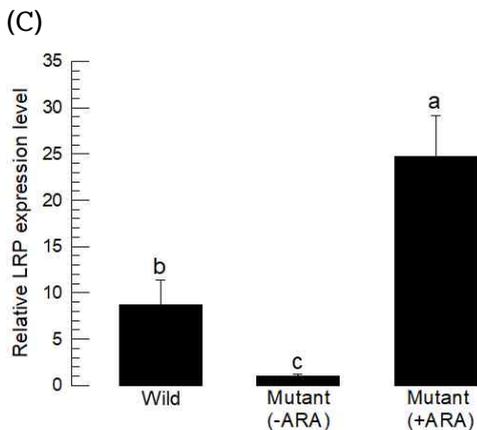
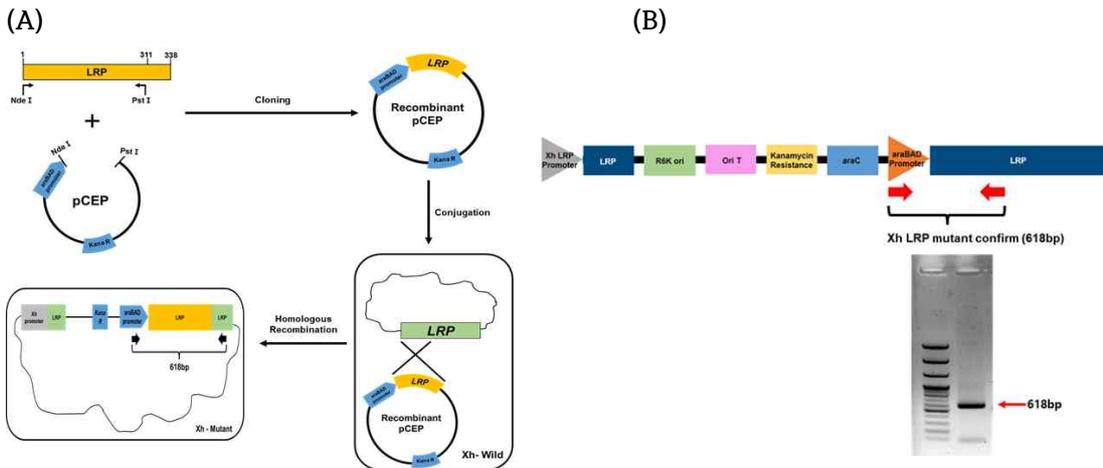
2. NRPS 유전자와 Lrp 유전자 발현 사이의 상관 관계

Xh 세균의 성장은 아래와 같이 총체 안에서 증식 속도와 TSB 배지 사이의 증식 속도에 상대적 차이를 보였다. 총체내에서 Lrp와 NRPS의 발현량 사이에는 일정한 관계성을 보였다.



Correlation Matrix ¹	Expression levels of eight NRPS genes							
	<i>NRPS1</i>	<i>NRPS2</i>	<i>NRPS3</i>	<i>NRPS4</i>	<i>NRPS5</i>	<i>NRPS6</i>	<i>NRPS7</i>	<i>NRPS8</i>
<i>Lrp</i> levels	-0.3573 (0.5546)	-0.3486 (0.5653)	0.9395 (0.0177)	0.8576 (0.0631)	0.9491 (0.0137)	0.8821 (0.0477)	0.9845 (0.0023)	0.9272 (0.0233)

3. Lrp 돌연변이 제작



[공동기관-표준연] 연구내용

○ 곤충병원성 미생물 유래 이차대사산물 발현량 최대화 조건 성립

요약

곤충병원성 미생물인 *Xenorhabdus hominickii*와 *Photorhabdus temperata* 에서 발현되는 이차대사산물인 GameXPeptide(GXP)의 생산 최적화 배양액 조건을 규명하기 위해 다양한 강화 액상배지(enriched media)와 최소 액상배지(minimal media)에서 각각 배양 후 질량분석법을 이용해 GXP 총 발현량과 GXP A, B, C, D 각각의 발현량을 비교분석 하였다. *P. temperata*의 경우 강화 액상배지 중 Brain Heart Infusion(BHI) 배양액에서 가장 많은 GXP가 발현되고 최소 액상배지 중 M9 배지에 L-leucine을 첨가한 배양액에서 가장 많은 양의 GXP가 발현되었다. *X. hominickii*의 경우 강화 액상배지 중 R2A 배양액에서 가장 많은 GXP가 발현되고 최소 액상배지 중 M9 배지에 D-valine을 첨가한 배양액에서 가장 많은 GXP가 발현되었다. 배양액 조건 확립 외에도 유전자 조절을 통한 GXP 발현 최대화 연구도 진행하였다. *X. hominickii*의 regulon 유전자 중 하나인 *hexA*의 프로모터 서열을 상동재조합기술을(homologous recombination) 이용해 pBAD 프로모터로 교환하고 arabinose 유도 이후 GXP 발현 유전자 RNA 양이 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 야생형(wild-type, WT) *X. hominickii*와 *hexA* mutant 배양액의 GXP 농도를 질량분석법을 이용해 각각 측정하였고, *hexA* mutant에서 WT과 비교해 GXP의 양이 약 3배 정도 증가하는 것을 확인하였다. 이를 통해 GXP 생산을 위한 최적화된 배양 조건과 유전자 조작을 통한 GXP 생산 최대화 조건을 확립하였다.

결과

1. 미생물 배지 조건 비교를 통한 이차대사산물 생산 최적화 조건 확립

1) 강화 액상배지 및 최소 액상배지 선정

*X. hominickii*와 *P. temperata*의 성장 및 GXP 발현 최대화를 위한 최적의 액상배지 조건을 규명하기 위해 *Xenorhabdus* 배양에 사용된 다양한 강화 액상배지를 검색하였다. 실험을 위해 Luria-bertani(LB), Brain Heart Infusion(BHI), R2A, King's Medium B(King) 및 in-house 배양액(glucose, yeast extract, NaCl, MgSO₄, L-glutamate)을 포함한 5개의 강화 액상배지를 선정하였다. 최소 액상배지는 미생물의 생장은 강화 액상배지와 비교해 감소 할 수 있지만 이차대사산물의 발현량은 증가하는 것이 이미 여러차례 보고된 바가 있어 M9 배양액(KH₂PO₄, NaCl, Na₂HPO₄, NH₄Cl)에 GXP를 구성하는 아미노산인 D-Valine, L-Leucine, D-Leucine, D-Phenylalanine(표1)을 각각 첨가 또는 모두 첨가한 5개의 최소 액상배지 조건을 선정하였다.

표 1. GameXPeptide 종류 및 아미노산 조성

GameXPeptide (GXP) type	Amino acid composition
GXP A	D-Valine - L-Leucine - D-Phenylalanine - D-Leucine - L-Leucine
GXP B	D-Leucine - L-Leucine - D-Phenylalanine - D-Leucine - L-Leucine
GXP C	D-Valine - L-Leucine - D-Leucine - D-Leucine - L-Leucine
GXP D	D-Leucine - L-Leucine - D-Leucine - D-Leucine - L-Leucine

2) 강화 액상배지 생장곡선 및 GXP 발현량 비교분석

*X. hominickii*와 *P. temperata*는 강화 액상배지와 최소 액상배지 모두 30°C에서 200 RPM shaking 조건에서 진탕 배양기를 이용해 배양하였다. 5 ml의 LB에서 24시간 배양한 후 100 ml의 액상배지에 접종하여 강화 액상배지는 48시간 동안 그리고 최소 액상배지는 96시간 동안 배양하고 24시간마다 UV-Vis spectrophotometer를 이용해 600nm wavelength에서 흡광도(optical density, OD600)를 측정하였다 (그림 1).

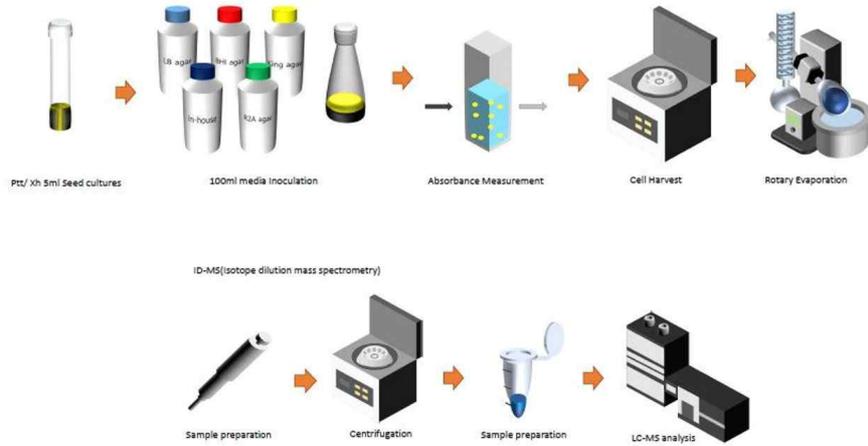


그림 1. GXP 발현 및 측정을 위한 세균 배양, 농축, 질량분석 실험 과정 모식도

5개의 강화 액상배지와 5개의 최소 액상배지에서 *X. hominickii*와 *P. temperata*를 각각 배양하고 OD600 측정값으로 만들어진 성장곡선을 통해 세균 성장 확인 및 배양에 최적화된 배지 조건을 확인하였다. 강화 액상배지에서 배양된 세균의 경우 48시간 이후 원심분리를 통해 상층액을 얻고 회전식 증발 농축기를 이용해 액체를 증발시킨 후 2ml DMSO에 재부유하고 원심분리와 여과작업을 거친 이후 LC-MS를 이용해 GXP의 총량과 GXP A, B, C, D 각각의 양을 측정하였다 (그림 1).

*X. hominickii*의 경우 강화 액상배지에서 24시간 이후 5개의 배양액 모두 OD600에서 2.0 이상의 값을 나타내고 48시간에 모두 정체기(stationary phase)에 들어가는 것을 성장곡선을 통해 확인하였다 (그림 2). King 배양액이 가장 높은 흡광도 값을 나타냈으나 통계적으로 유의하지 않았고 5개의 강화 액상배지 모두 *X. hominickii* 배양으로 적합하다 판단하였다.

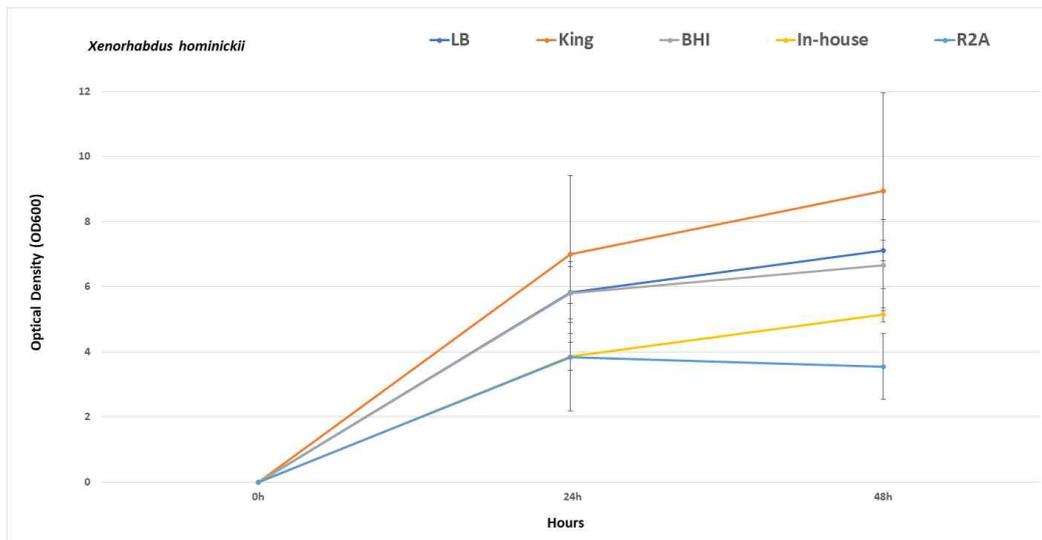


그림 2. 강화 액상 배지에서 48시간 동안 배양한 *X. hominickii*의 성장곡선

*X. hominickii*의 경우 성장곡선에는 배양액 사이의 큰 차이점이 보이지 않았으나 GXP의 발현량은 큰 차이점을 나타냈다. R2A에서 배양된 *X. hominickii*는 0.0452 μ M의 GXP를 발현했으며, 이는 다른 배양액에 비교해 최대 10배 이상 높은 양이었다 (그림 3). 다른 4개의 강화 배지에서 배양된 *X. hominickii*의 경우 모두 비슷한 양의 GXP를 발현했으며 모두 R2A 배양액과 비교해 통계적으로 유의한 차이점을 나타냈다 (그림 3).

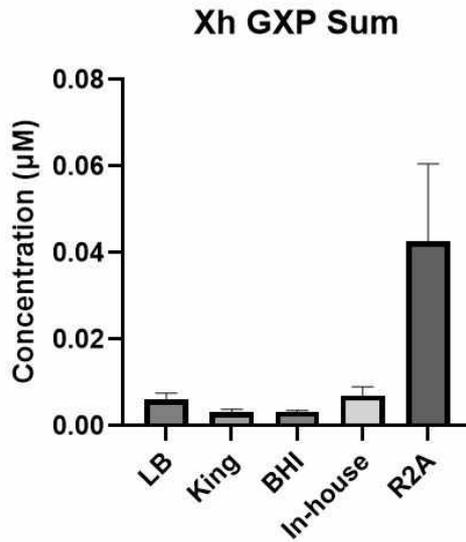


그림 3. 강화 액상배지에서 배양된 *X. hominickii*의 GXP 발현량

GXP 종류별로 발현량을 비교했을 때 GXP A, GXP B, GXP C와 GXP D에서 모두 R2A 배양액이 마찬가지로 다른 배양조건과 비교해 10배 이상 높은 발현량을 보였다 (그림 4). 성장곡선과 GXP 발현량을 고려했을 때 *X. hominickii*의 경우 R2A 액상배지가 세균 성장 및 GXP 생산을 위한 최적화된 강화 액상배지인 것으로 판단하였다.

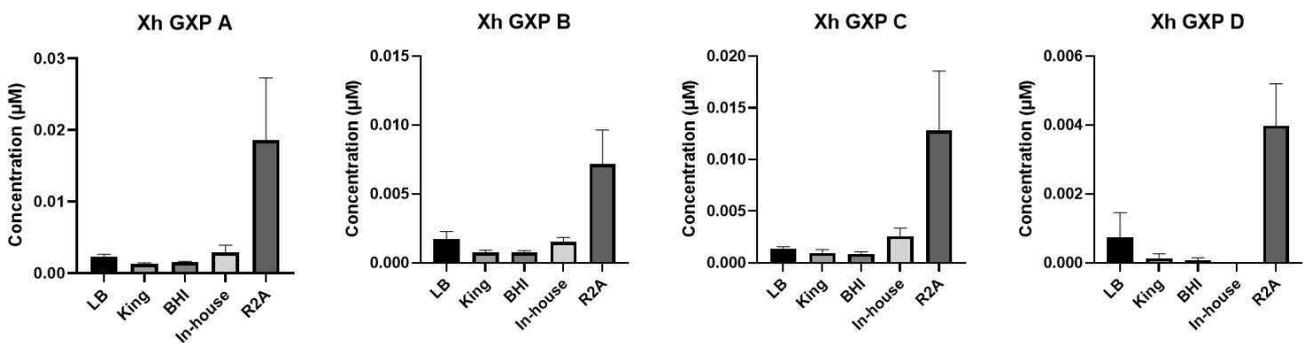


그림 4. 강화 액상배지에서 배양된 *X. hominickii*의 GXP A, B, C, D의 발현량 측정 결과

*P. temperata*의 경우 5개의 강화 액상배지에서 24시간 이후 뚜렷한 대수 성장기(exponential phase)를 보이며 모두 OD600에서 2.0 이상의 값을 보였다(그림 5). 또한, 48시간에 모두 정체기에 들어가는 것을 성장곡선을 통해 확인하였다 (그림 5).

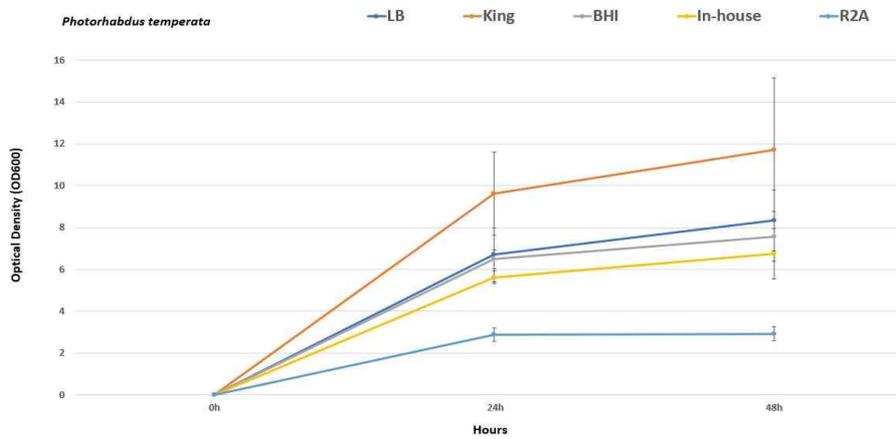


그림 5. 강화 액상 배지에서 48시간 동안 배양한 *P. temperata*의 성장곡선

R2A의 경우 다른 배양액과 비교해 상대적으로 낮은 흡광도를 나타냈으나 성장에는 문제가 없는 것으로 보였다. 나머지 4개의 배양액 모두 비슷한 흡광도 값을 나타내고 차이점 또한 통계적으로 유의하지 않았다 (그림 5). 따라서, 5개의 강화 액상배지 모두 *P. temperata* 배양에 적합하다고 판단하였다.

GXP 발현량을 비교분석 했을 때 *P. temperata*의 경우 BHI 배양액에서 가장 높은 GXP 발현량을 보였다 (그림 6). 또한, in-house 배양액에서 얻어진 GXP의 발현량이 가장 낮았으나 BHI와 비교해서 통계적으로 차이점을 보이지 않았다($p=0.0680$). 따라서, *X. hominickii*와는 달리 *P. temperata*에서는 5개의 강화 액상배지 모두 비슷한 양의 GXP를 생산하였다 (그림 6).

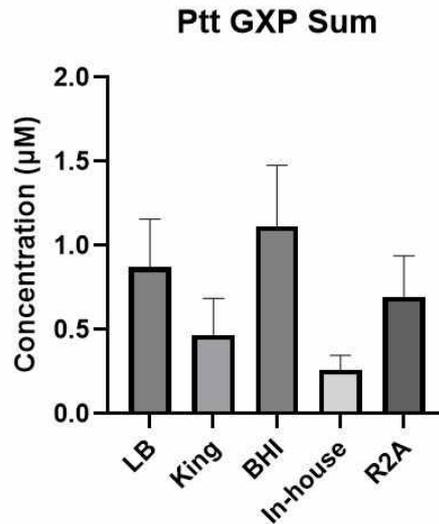


그림 6. 강화 액상배지에서 배양된 *P. temperata*의 GXP 발현량

GXP 종류별로 발현량을 비교했을 때 GXP A, GXP B, GXP C와 GXP D에서 모든 배양액이 비슷한 양의 GXP를 생산하는 것을 확인하였다 (그림 7). 성장곡선과 GXP 발현량을 고려했을 때 *P. temperata*의 경우 BHI 액상배지가 가장 적합한 것으로 보이며, LB와 R2A도 적합한 것으로 판단한다.

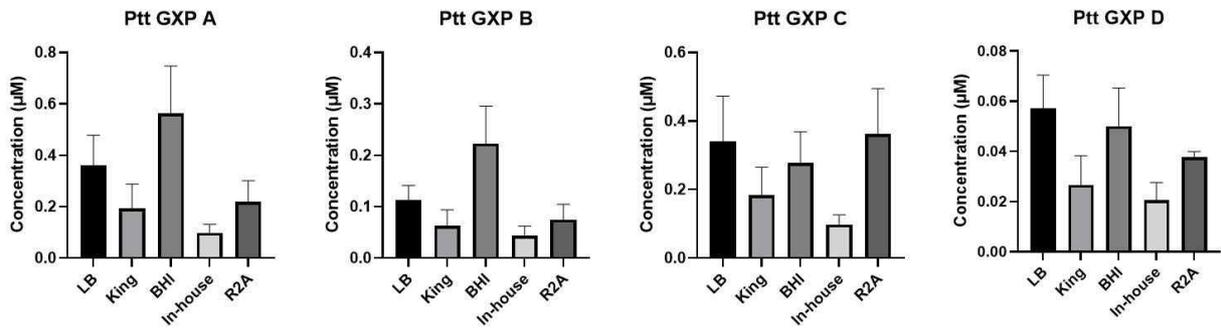


그림 7. 강화 액상배지에서 배양된 *P. temperata*의 GXP A, B, C, D의 발현량 측정 결과

3) 최소 액상배지 성장곡선 및 GXP 발현량 비교분석

그림 1에서 설명된 동일한 실험법으로 5개의 최소 액상배지에서 *X. hominickii*와 *P. temperata*를 각각 배양하고 OD600 측정값으로 만들어진 성장곡선을 통해 세균 성장 확인 및 배양에 최적화된 배지 조건을 확인하였다. 강화 액상배지와 달리 최소 액상배지는 96시간 동안 세균을 배양한 후 상층액의 추출, 농축 및 LC-MS 분석을 진행하였다.

최소 액상배지에서 배양된 *X. hominickii*의 경우 강화 액상배지와 비교하여 생장의 속도가 느린 것을 확인하였으며 흡광도 값도 낮은 것을 확인하였다 (그림 8). 96시간을 배양하였으나 강화 액상배지와 같이 뚜렷한 대수 성장기와 정체기를 보이지 않았다 (그림 8). 뚜렷한 대수 성장기 또는 정체기가 보이지 않았으나 사멸기 (death phase)를 보이지 않았고 더불어 흡광도의 값도 천천히 증가하는 것을 확인하였다. 이를 통해 강화 액상배지보다 생장의 속도 또는 세균의 양이 작을 수 있지만 *X. hominickii* 배양을 위해 최소 액상배지 또한 문제가 없음을 확인하였다 (그림 8).

최소 액상배지에서는 첨가된 아미노산에 따라 흡광도의 차이를 보였다. 4가지의 모든 아미노산이 M9 배양액에 첨가된 *X. hominickii*가 가장 높은 흡광도를 보였으며 D-Valine이 첨가된 M9의 경우 *X. hominickii*가 다른 아미노산과 비교해 상대적으로 낮은 흡광도를 나타냈다 (그림 8). 따라서, *X. hominickii* 배양을 위한 최적화된 최소 액상배지는 M9 배지에 4가지 아미노산이 모두 첨가된 배양액으로 보였으나 각 아미노산이 첨가된 배양액도 문제가 없음을 확인하였다.

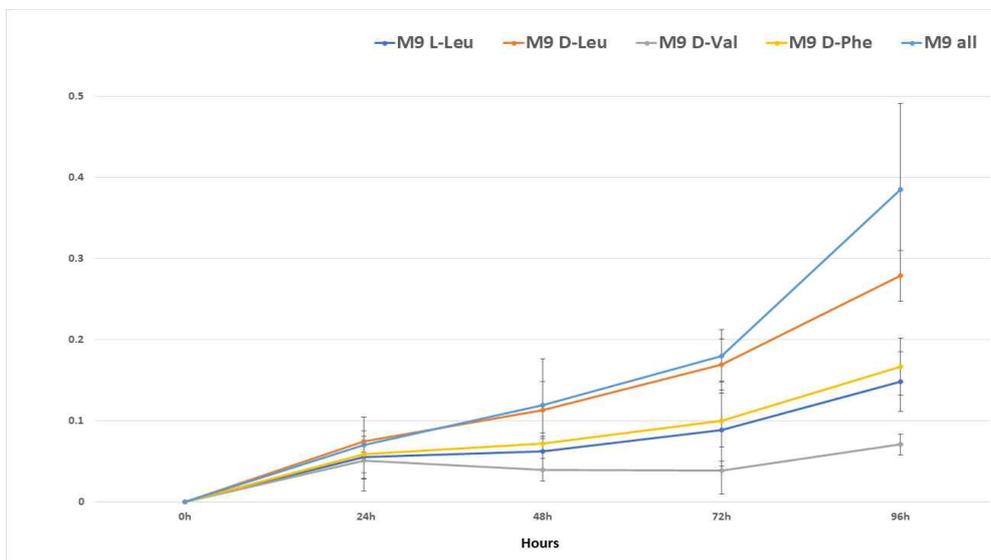


그림 8. 최소 액상 배지에서 96시간 동안 배양한 *X. hominickii*의 성장곡선

GXP 발현량을 비교분석 했을 때 D-Valine과 D-Phenylalanine이 첨가된 M9 배양액이 6.359 μ M와 5.615 μ M로 가장 많은 GXP를 생산하는 것을 확인하였다 (그림 9). 또한, 생장곡선에서는 가장 높은 흡광도를 보인 모든 아미노산이 포함된 M9 배양액이 예상외로 1.484 μ M의 가장 적은 양의 GXP를 발현하였다 (그림 9).

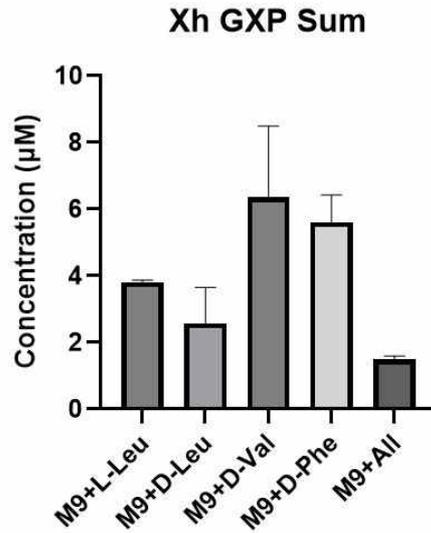


그림 9. 최소 액상배지에서 배양된 *X. hominickii*의 GXP 발현량

GXP 종류별 발현량을 비교분석 했을 때 GXP A에서 D-Valine과 D-Phenylalanine이 첨가된 M9 배양액이 다른 아미노산이 첨가된 배양액과 비교했을 때 2배 이상 높은 발현량을 나타냈다 (그림 10). 또한, GXP A, B, C, D 모두 모든 아미노산이 첨가된 M9 배양액이 상당히 낮은 양의 발현량을 보이며 GXP 생산을 위한 배양액으로는 적합하지 않은 것으로 보였다 (그림 10).

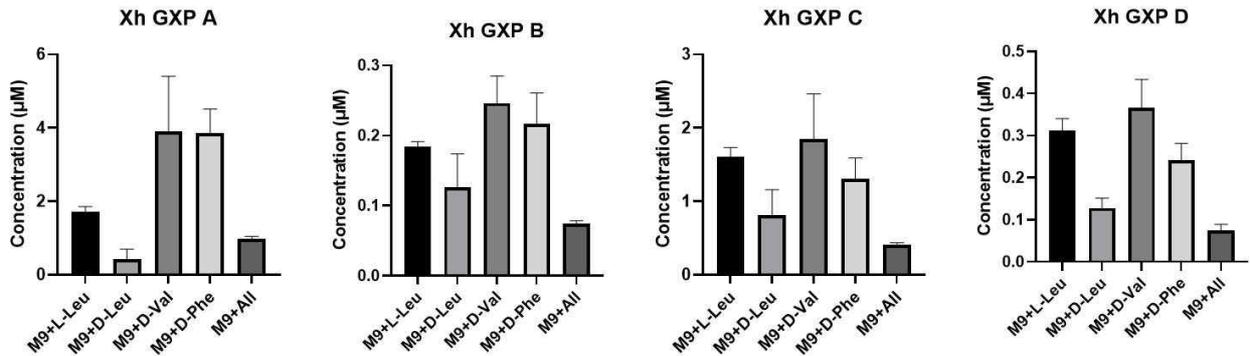


그림 10. 최소 액상배지에서 배양된 *X. hominickii*의 GXP A, B, C, D의 발현량 측정 결과

따라서, *X. hominickii* 세균 생장곡선과 GXP 발현량을 비교분석 했을 때 D-Valine 또는 D-Phenylalanine이 첨가된 M9 배양액이 GXP 생산을 위해 가장 적합한 최소 액상배지로 판단하였다.

최소 액상배지에서 배양된 *P. temperata*의 경우 강화 액상배지와 비교하여 생장의 속도가 느린 것을 확인하였으며 흡광도 값도 낮은 것을 확인하였다 (그림 11). *X. hominickii*와 마찬가지로 *P. temperata*는 96시간을 배양하였으나 강화 액상배지와 같이 뚜렷한 대수 성장기와 정체기를 보이지 않았다 (그림 11). 그러나, 사멸기를 보이지 않았고 더불어 흡광도의 값도 천천히 증가하는 것을 확인하였다. 이를 통해 강화 액상배지보다 생장의 속도 또는 세균의 양이 작을 수 있지만 *P. temperata* 배양을 위해 최소 액상배지 또한 문제가 없음을

확인하였다.

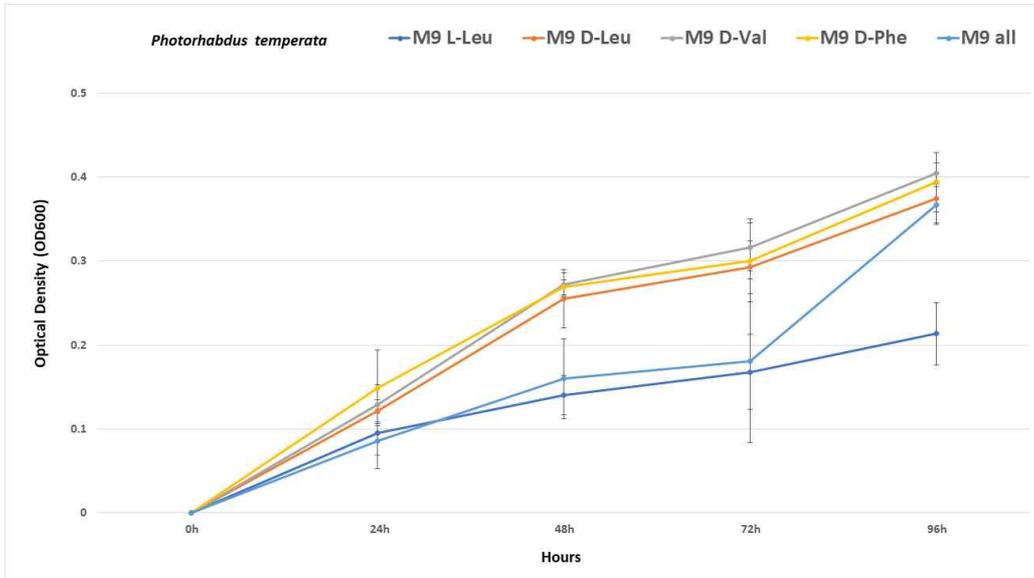


그림 11. 최소 액상 배지에서 96시간 동안 배양한 *P. temperata*의 성장곡선

GXP 발현량을 비교분석 했을 때 L-Leucine을 첨가한 M9 배양액에서 가장 많은 GXP이 생산되는 것을 확인 하였다 (그림 12). L-Leucine을 넣은 M9 배양액의 총 GXP 생산량은 26.01 μ M 이며 이는 다른 아미노산이 첨가된 배양액과 비교해 약 3배 이상 높은 값이었다 (그림 12). 다른 아미노산이 첨가된 배양액의 경우 비슷한 GXP 발현량을 나타냈다 (그림 12).

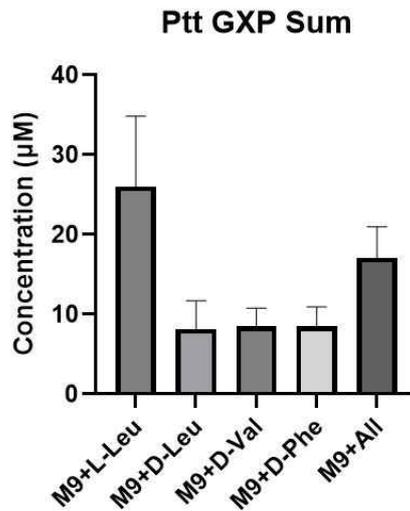


그림 12. 최소 액상배지에서 배양된 *P. temperata*의 GXP 발현량

GXP 종류별 발현량을 비교분석 했을 때 GXP C는 L-Leucine이 첨가된 배양액에서 다른 것과 비교해 약 8배에서 16배 높은 발현량을 보였다 (그림 13). 또한, GXP D에서도 L-Leucine이 첨가된 배양액은 다른 배양액과 비교해 약 9배에서 18배 이상 높은 발현량을 보였다. 따라서, L-Leucine이 GXP C와 GXP D 생산에 중요한 요소로 작용하는 것을 확인하였다 (그림 13). 따라서, *P. temperata* 세균의 성장곡선과 GXP 발현량을 비교분석 했을 때 L-Leucine이 첨가된 M9 배지가 GXP 생산을 위한 가장 적합한 최소 액상배지로 확인되었다.

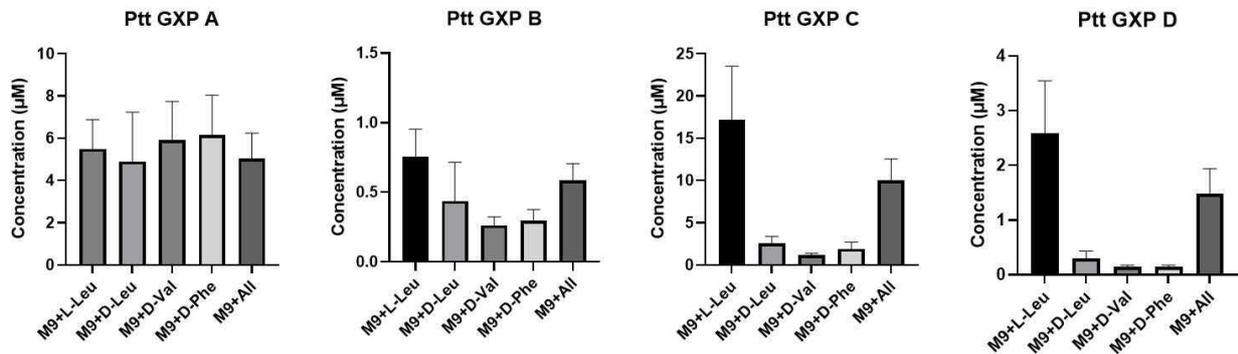


그림 13. 최소 액상배지에서 배양된 *P. temperata*의 GXP A, B, C, D의 발현량 측정 결과

3) 결론

위의 배양액 비교분석 실험을 종합해보면 *X. hominickii*와 *P. temperata*는 강화 액상배지에서 더 잘 자라는 것은 확인하였으나 GXP의 발현량은 최소 배지 배양액이 월등히 높은 것을 두 세균 모두 나타냈다. GXP의 생산량을 높이는 것이 연구과제 목표임을 고려할 때 *X. hominickii*는 D-Valine 또는 D-Phenylalaine이 첨가된 M9 배지가 최적화된 배양액 조건으로 판단되며, *P. temperata*의 경우 L-Leucine이 첨가된 M9 배지가 GXP 생산을 위해 최적화된 배양액으로 판단되었다. 최소 액상배지에서 *X. hominickii*와 *P. temperata*의 생장을 최적화 할 수 있다면 더 높은 양의 GXP를 생산할 수 있을 것으로 예상된다.

2. 유전자 조절을 통한 이차대사산물 발현량 최대화 방법 개발 및 측정법 연구

1) *X. hominickii* regulon 유전자 HexA mutant 제작

다른 *Xenorhabdus* species에서 유전자 조절을 통한 과발현이 진행될 때 GXP가 같이 과발현되는 것으로 알려진 이차대사산물 발현 조절 유전자(Regulon) HexA의 변형을 통해 GXP 발현량 최대화를 진행하였다. *X. hominickii*에서 *hexA* 유전자는 총 866 bp의 크기로 *X. hominickii* ANU1 CP016176으로 확인되었다 (그림 14).



그림 14. *X. hominickii* HexA 유전자 서열정보

NdeI 제한 효소와 PstI 제한효소를 포함한 프라이머 서열을 디자인하여 (표2) HexA 유전자를 증폭하고 Arabinose 유도(induction)를 통해 목표 유전자(Gene of Interest, GOI)를 과발현할 수 있는 프로모터

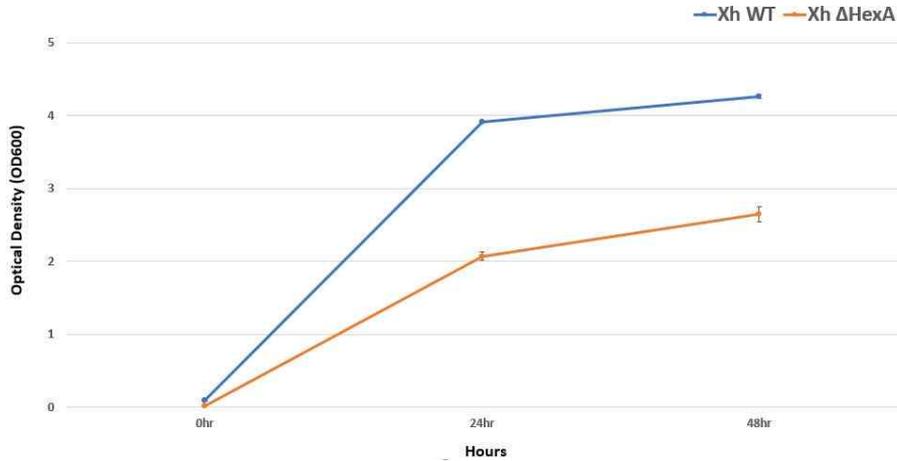


그림 16. WT과 ΔHexA *X. hominickii* 배양액 성장곡선 결과

48시간 배양 이후 RNA 추출을 진행하였고 SuperScript IV Reverse Transcriptase Kit(Thermo Fisher Scientific)을 이용해 cDNA를 합성하였다. 실시간 종합효소 연쇄반응(RT-qPCR) 실험을 진행해 WT과 ΔHexA *X. hominickii*의 HexA 유전자와 GXP 유전자의 발현량 차이를 비교분석 하였다. RT-qPCR 실험 후 얻어진 melt curve와 melt peak 등을 확인하며 유전자 증폭에 문제가 없음을 확인하였다 (그림 17).

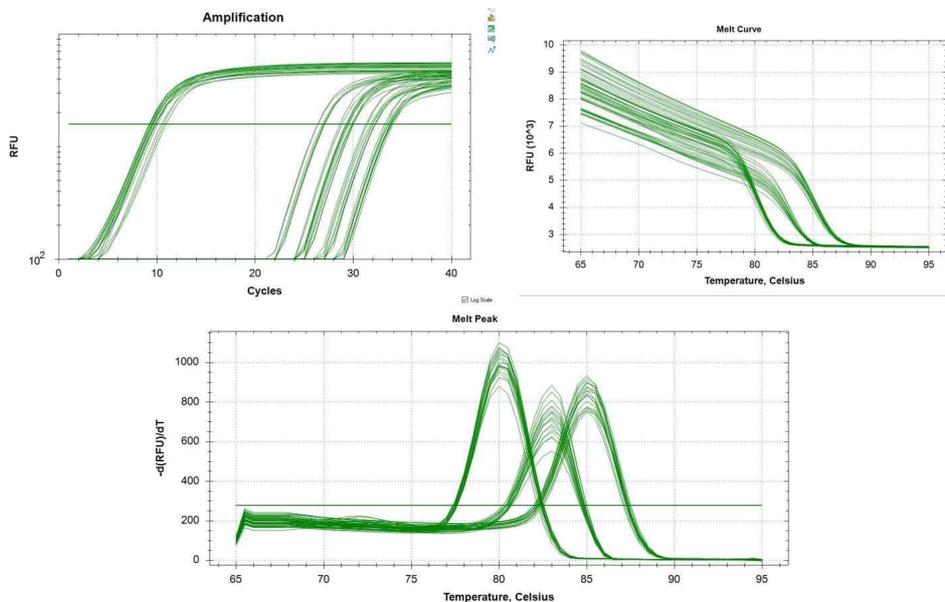


그림 17. RT-qPCR 실험 후 얻어진 Amplification, Melt Curve, Melt Peak 결과

RT-qPCR 결과 분석을 위해 *X. hominickii* 16S 유전자를 housekeeping gene으로 사용하고 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법을 이용해 ΔHexA *X. hominickii*에서 GXP와 HexA 발현 유전자의 상대정량 값을 WT과 비교하여 구했다. Arabinose induction에 의해 HexA mutant에서 WT과 비교해 약 4배 높은 hexA 유전자 발현량이 나타났다 (그림 18). 이는 통계적으로 유의미한 차이점으로 밝혀졌다 ($p=0.0495$). 또한, 동일 cDNA에서 측정된 *gxp* 유전자의 경우 HexA mutant에서 WT과 비교해 약 3배 높은 발현량을 보였으며 통계적으로 유의미한 차이점을 나타냈다 ($p=0.0069$) (그림 18). 따라서, HexA mutant가 성공적으로 제작된 것을 확인하였으며, mutant의 arabinose induction으로 얻어진 HexA 유전자 과발현은 *gxp* 유전자 발현량 또한 3배 이상 증가시키는 것을 확인하였다.

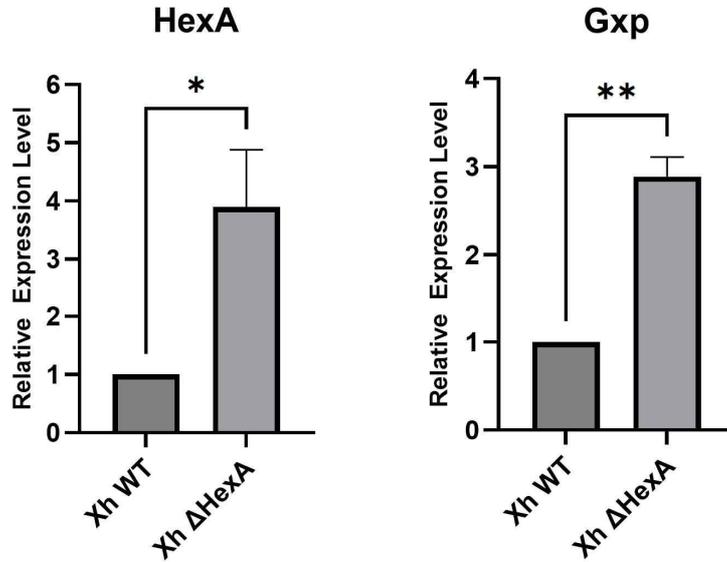


그림 18. *X. hominickii* WT과 HexA mutant의 *hexA* 유전자 및 *gxp* 유전자 RT-qPCR 측정 결과

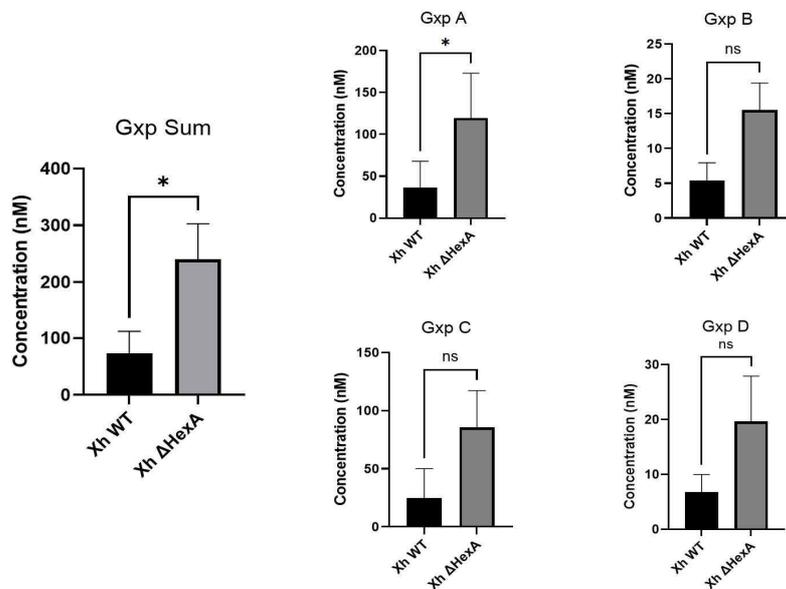


그림 19. *X. hominickii* WT과 HexA mutant의 GXP 발현량 비교분석

유전자 분석에 사용된 WT과 HexA mutant의 배양액을 위에서 설명한 것과 동일한 작업을 거쳐 LC-MS를 이용한 GXP 발현량 비교분석을 진행하였다. Arabinose induction이 된 HexA mutant의 총 GXP 발현량은 WT과 비교하여 약 3배 이상 높은 것으로 확인되었다 (그림 19). 두 배양액의 GXP 발현량 차이는 통계적으로 유의미한 것으로 확인되었다 ($p=0.0485$). GXP 종류별 (A~D) 발현량을 비교분석 했을 때 GXP A에서 가장 높은 발현량 차이를 확인하였다. HexA mutant는 WT과 비교해 3배 이상 GXP A를 생산하는 것으로 밝혀졌으며 이는 통계적으로 유의미한 결과였다 ($p=0.0479$). GXP B, C, D에서도 HexA mutant가 WT과 비교해 최소 2배에서 3배 높은 발현량을 나타냈으나 통계적으로 유의미한 차이는 아니었다.

3) 결론

위의 결과를 종합해보면 *X. hominickii* regulon 유전자 변형을 통해 3배 이상의 GXP 생산량을 얻었다. 따라

서, HexA 유전자 변형 *X. hominickii*를 L-Leucine M9 최소 액상 배지에서 배양을 진행하고 최적화 작업을 거치면 최대량의 GXP를 얻을 것으로 예상된다.

○ GameXPeptide(Gxp) 4 종 펩타이드 배치형 인증표준물질 제조

요약

미생물에서 발견되는 GameXPeptide (GXP)의 정확한 측정을 위하여 GXP 펩타이드 표준물질을 제조하였고, 펩타이드의 정량을 위한 최상위 분석법인 아미노산 기반 정량법을 이용하여 정확한 농도를 정하였다. 이렇게 개발된 표준물질은 기존 명목값으로 기존의 측정값에서 정확성을 확보할 수 있으며, 표준물질 보급을 통해 GXP를 정량하는 다양한 연구의 비교가능성을 확보할 수 있을 것으로 기대한다. 개발된 표준물질을 이용하여 *Xenorhabdus hominickii*와 *Photorhabdus temperata*에서 발견되는 GXP의 양을 측정하였다.

결과

1. Gxp 정량의 측정 표준화를 위한 배치형 표준물질 제조

1) 매질 선정

지난 연구를 통해 시험적으로 합성된 GXP 4종을 이용하여 배치 표준물질로의 제조 가능성을 평가하였고, 사용 편의성 등을 고려하여 농도를 정한 표준용액 형태로의 제조를 결정하였다. GXP는 DMSO에서 가장 잘 용해가 되었으며, DMSO의 함량에 따라 LC-MS 측정 감도가 향상되었고, 반복측정에 따른 표준편차도 100% DMSO를 사용할 경우 가장 정밀한 결과를 확인할 수 있었다 (그림 1). 다만, 시료의 안정성 등을 고려하여 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 매질로 사용하기로 하였으며, DMSO를 사용함에 따른 장단점에 대해서 사용자가 참고할 수 있도록 충분한 정보를 제공해야한다. 예를들면, DMSO 용액 상태이기 때문에 LC-UV와 같은 기기를 이용한 분석에는 적합하지 않을 수 있지만, 일반적으로 GXP측정에 활용할 가능성이 높은 LC-MS 기기에 적용에는 적합하다. DMSO의 물리적 특성에 따라 보관 및 시료 사용 온도를 유의해야한다. 이러한 부분을 감안하고라도 DMSO에서 시료의 균질성과 안정성이 우수했으므로 배치 표준물질의 품질확보를 위해 DMSO를 최종 매질로 선정하였다.

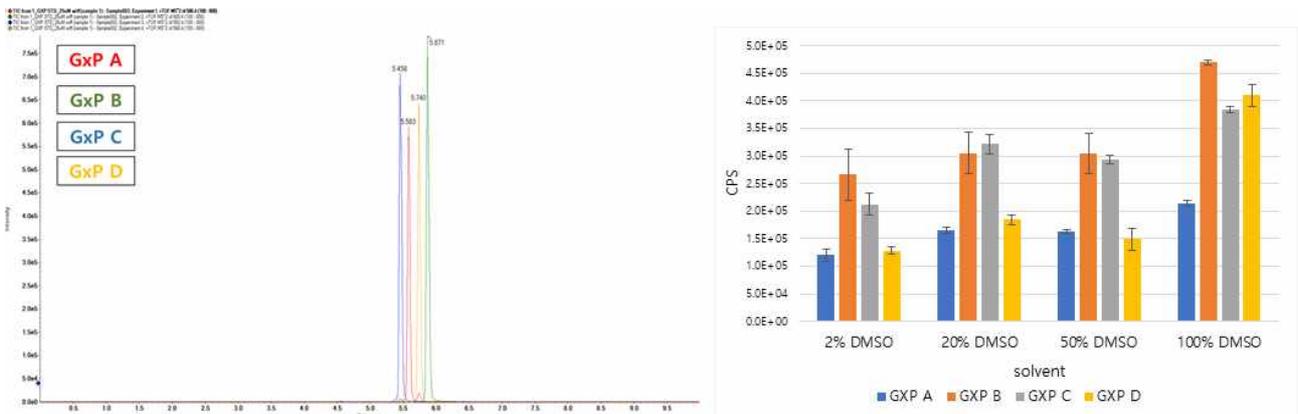


그림 1. GXP 4종 측정 LC-MS 크로마토그램의 예와 GXP 제조 용매에 따른 측정감도 및 반복측정 결과

2) 원료 제조 및 배치 생산

원료는 애니젠(사)에서 97% 이상의 펩타이드 순도를 확보하였다. (표1 및 그림2)

제조사에 보고에 따르면, 합성 펩타이드의 순도는 LC-UV와 MALDI-TOF MS를 이용하여 정하고 있으며, 주문시에 요구한 97%를 상회하는 결과를 확인할 수 있었다.

합성 GXP에 대해 LC-MS 측정으로 사용에 문제가 없음을 재확인하였으며, DMSO에 용해 후 차광조건의 실온에서 24시간 이상 충분히 균질화한 후, 소분하였다. 사용된 용기는 DMSO의 물리적특성을 고려하여 차광용기를 사용하였고, GXP A, B, C, D를 한 세트로 Cryobox에 소포장 후, 알루미늄백에 밀봉하여 안정성을 높였

다. 총 225세트 900개의 시료를 소분 포장하였으며, 펩타이드의 안정성을 고려하여 -70 °C의 초저온 냉동상태에서 보관하였고, 시료 배송과정 중의 안정성을 검증하기위해 실온, 냉장 조건에서의 안정성을 추가로 평가한다 (그림 3).

표 1. 원료로 사용하는 합성 펩타이드에 대한 정보

Compound	Sequence	Molecular weight (g/mol)	Purity	Amount
GameXpeptide A	Cyclo[D-Leu-Leu-D-Val-Leu-D-Phe]	584.8	98.6 %	30 mg
GameXpeptide B	Cyclo[D-Leu-Leu-D-Leu-Leu-D-Phe]	598.9	98.3 %	30 mg
GameXpeptide C	Cyclo[D-Leu-Leu-D-Val-Leu-D-Leu]	550.8	99.1 %	30 mg
GameXpeptide D	Cyclo[D-Leu-Leu-D-Leu-Leu-D-Leu]	564.9	99.4 %	30 mg

Certificate of Analysis

Lot number	K221073	
Product name	GameXpeptide A	
Sequence	Cyclo[D-Leu-Leu-D-Val-Leu-D-Phe]	
Appearance	White amorphous powder	
Quantity ordered	5.0 mg	
Quantity delivered	5.3 mg	

HPLC analysis	Purity	98.6%
	Instrument	Shimadzu HPLC LabSolution
	Column	SHIMADZU C18 analytical column
	Gradient	35-95% B Buffer in 30min.
	Buffer	A Buffer : 0.05% TFA/H ₂ O B Buffer : 0.05% TFA/Acetonitrile
	Flow rate	1 ml/min.
	Wavelength	230 nm
	Oven Temperature	35 °C
	Injection volume	100 µl (Conc. 0.5 mg/ml)

Solubility	Soluble in DMSO	1.0 mg/ml
------------	-----------------	-----------

Mass analysis	Instrument	AXIMA Assurance, MALDI-TOF, Shimadzu
	MS expected	585.8 Da
	MS found	585.8 Da

Remarks

- Not for Human Use, Research Purposes Only
- This peptide contains unspecified amount of trifluoroacetic acid(TFA) unless exchanged with other type of salts.
- Due to unknown stability of this peptide, it is highly recommended that the peptide be retested in medium right prior to use.

Released by: S.J. Kang  Date: 2022. 6. 10

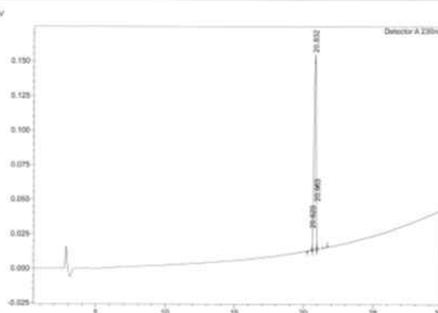
Rm.206, Pilot plant, Gwangju Technopark,
Cheomdanehwagiro 333, Buk-gu, Gwangju, 61008, Korea
T: +82-62-714-1166 F: +82-62-714-1168
E-mail: order@anygen.com

www.anygen.com

SHIMADZU LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>
Sample Name: K221073 (GameXpeptide A)

<Chromatogram>



<Peak Table>

Peak	Ret. Time	Area	Area%
1	20.629	7062	0.490
2	20.632	1427130	98.691
3	20.963	11962	0.820
Total		1441144	100.000

그림 2. GXP 합성 제조사의 분석보고서의 예 (GXP A)



그림 3. GXP 표준물질 생산과정, 표준물질의 제조에 사용된 원료물질인 4종 GXP합성 펩타이드, DMSO 및 배치용 원료 용액의 균질화 (위), 소분, 밀봉 포장 및 냉동 보관 과정 (아래)

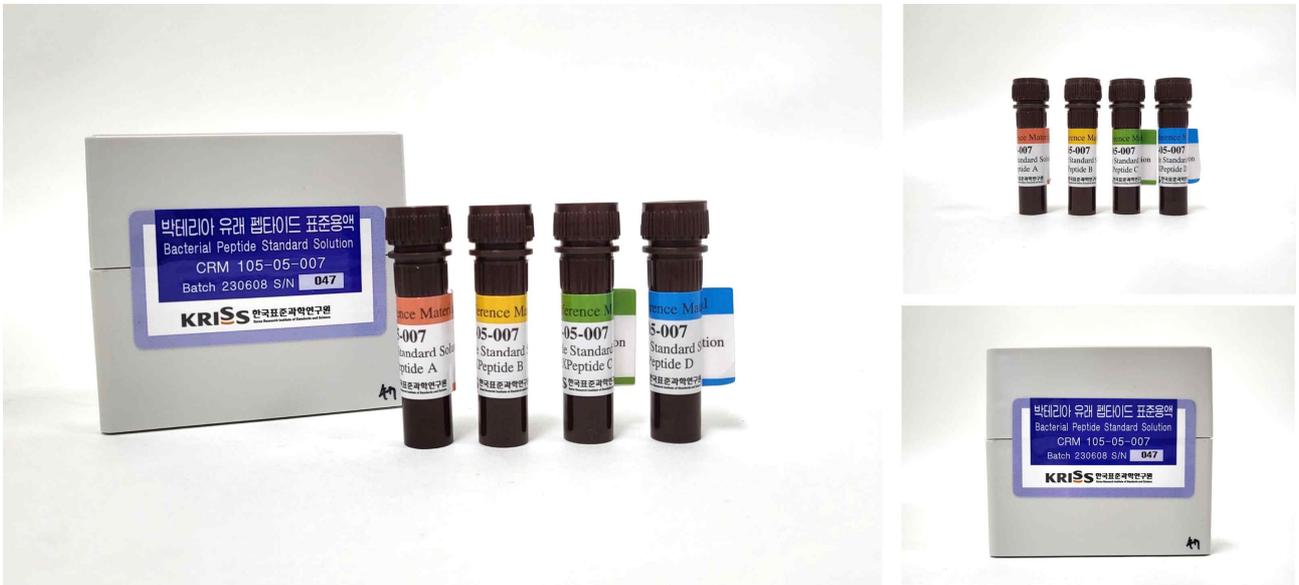


그림 4. 개발된 GXP 표준용액 인증표준물질

2. 아미노산 기반 정량을 통한 Gxp 표준물질의 인증

1) 아미노산 기반 인증에 대한 개요

아미노산 중합체인 펩타이드와 단백질의 경우, 현재 그 자체로 정확하게 측정할 수 있는 방법이 없기 때문에, 아래 그림과 같이 효소반응 혹은 가수분해 반응을 통해 측정할 수 있는 작은 단위로 환원시킨 후에 측정을 하게되는데, 현재 측정학적으로 가장 정확하게 아미노산 중합체를 정량할 수 있는 방법은 산가수분해를 통해 아미노산 단량체화 시킨 후, 아미노산 수준에서 정량하여 stoichiometry에 따라 중합체의 양을 정하는 것을 기본 접근법으로 정하고 있으며, 아미노산을 정량함에 있어서 측정학적으로 가장 직관적이고 정확한 방법인 동위원소희석 질량분석법 (isotope dilution mass spectrometry)를 이용하는 것을 아미노산 중합체로서의 펩타이드의 양을 정하는 최상위측정법 (primary measurement procedure)으로 정하고 있다.

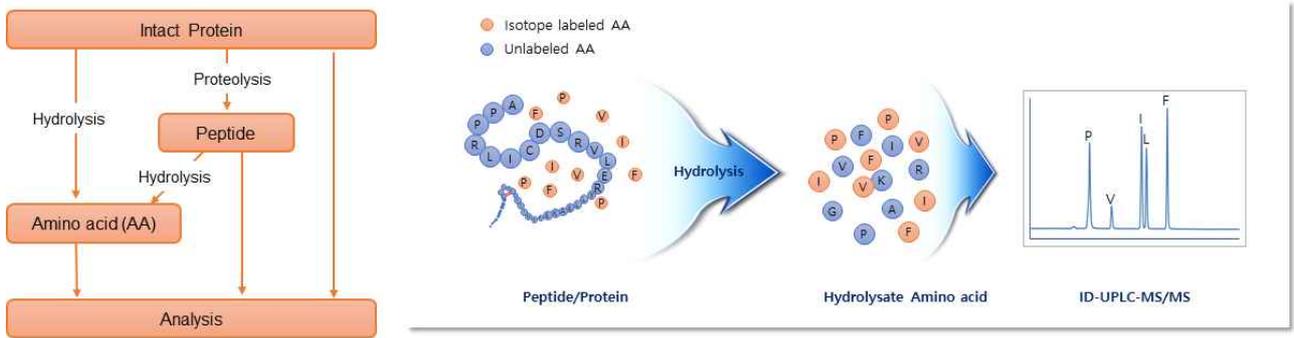


그림 5. 아미노산 기반 펩타이드/단백질 정량 단계 및 동위원소희석 질량분석법의 모식도

아미노산은 고순도 인증표준물질(certified reference material, CRM)은 물론 측정 표준 체계의 전 단계에 걸쳐 명확한 표준 절차와 표준물질이 갖추어져있고, 국제단위계로의 소급성이 완성되어있는 측정대상으로서 아미노산 기반 펩타이드의 측정은 펩타이드의 가수분해과정의 최적화와 합리적인 불확도 평가를 통해 국제단위계로의 소급성을 완전히 확보할 수 있다.

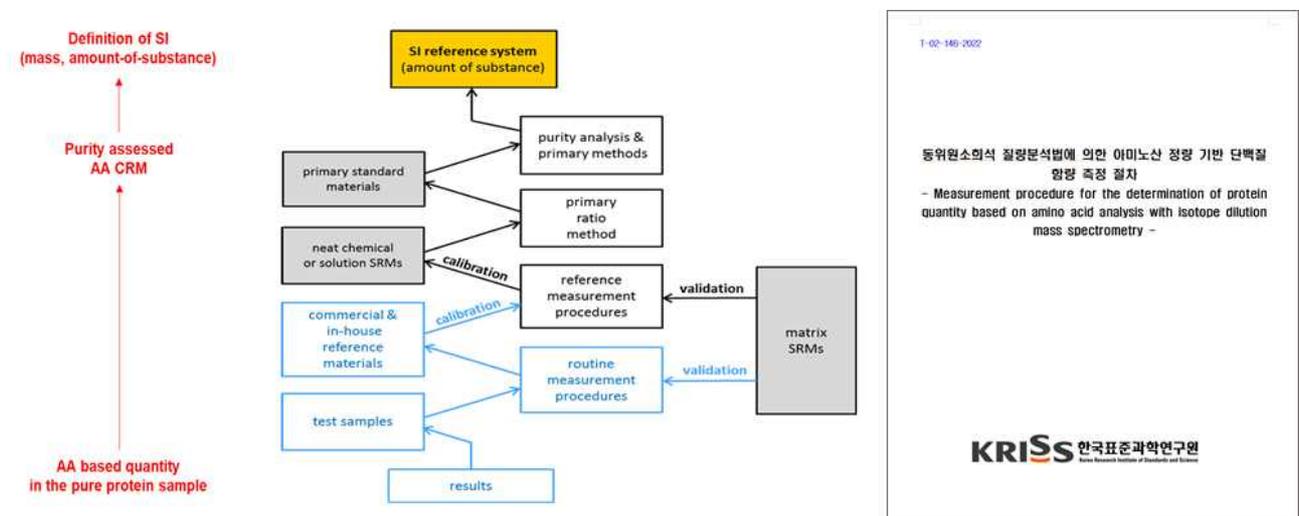


그림 6. (좌) 아미노산 기반 펩타이드/단백질 측정의 소급성 연결 및 측정 표준 체계에 따른 측정 소급성의 연결 (ISO 17511:2020), (우) 아미노산기반 펩타이드 정량 절차

2) 아미노산 기반 GXP 펩타이드의 인증

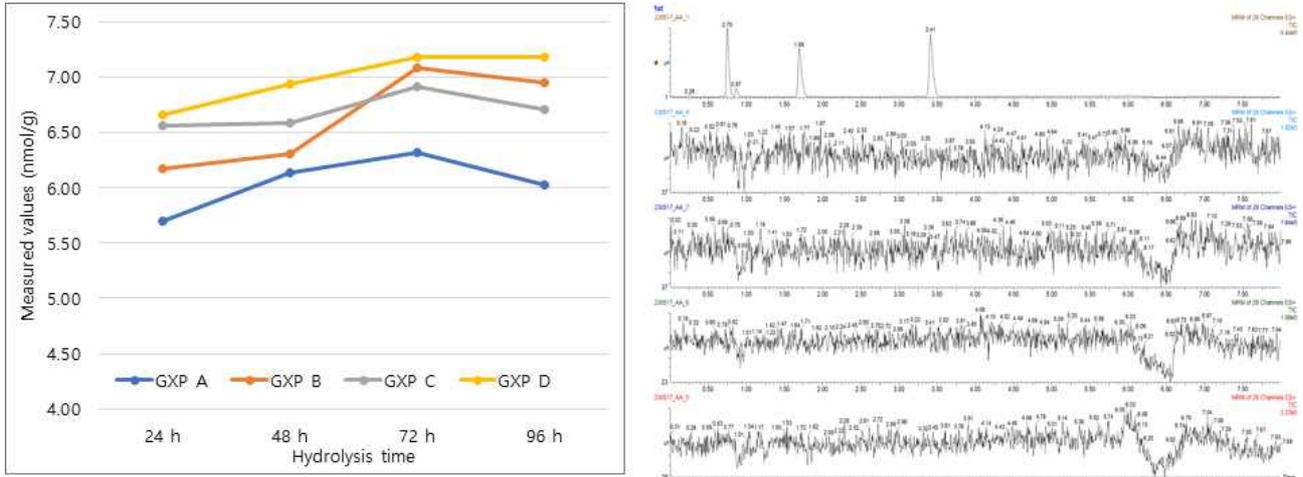
앞서 개발한 GXP 표준물질의 경우, 이러한 아미노산 기반 측정을 통해 인증표준물질로 양을 정할 수 있으며, GXP의 인증을 위해서는 한국표준과학연구원의 내부 품질체계에 따라 아미노산 기반 인증 절차에 따라 GXP의 Leucine을 측정함으로써 GXP의 양을 정하였다.

4종의 GXP는 각각 Leucine을 3개 (GXP A), 4개 (GXP B, C), 5개 (GXP D) 포함하고 있으며, Valine과 Phenylalanine은 GXP에 따라 다르기 때문에 참고용으로만 확인하고 인증 대상으로는 포함하지 않는다.

아미노산 기반 인증 절차는 개별 대상에 따라 가수분해 조건을 최적화하는 것을 권장하고 있다. 특히 GXP와 같은 cyclicpeptide의 구조도 특이사항일 수 있으며, 무엇보다 Leucine을 대상으로 하고 있기 때문에, 가수분해 시간에 대한 검증은 필요하다. Leucine은 아미노산 가운데 peptide bond가 가장 강력하기 때문에 가수분해과정에서 가장 오랜시간이 필요한 것으로 알려져 있다. 따라서, 아래 그림과 같이 정해진 온도와 염산의 농도 조건 하에서 시간을 달리하여 GXP의 측정결과를 비교하여, 72시간의 가수분해가 적절하다고 판단하여, 이번 인증에서는 기존의 8 M 염산, 130 °C, 대기압 조건에서 72시간의 가수분해를 통해 GXP를 완전히 아미노산으로 환원시킨 후, Leucine을 정량함으로써 인증하기로 하였다.

아미노산을 측정하기 때문에, GXP의 바탕시료에 측정대상 아미노산이 포함되어있는지에 따라서 결과에 영향

을 줄 수 있다. 따라서, 아래 그림과 같이 DMSO에 용해시킨 GXP 표준물질 원료에 대해 측정 대상 아미노산 Leucine을 비롯하여 참고로 확인하는 valine과 phenylalalanine이 원료 용액에 포함되어 있는지 확인하였고, 검출감도 이하 (< 6 fmol)임을 검증하였다.



만이 존재하기 때문에 4종 펩타이드의 불확도 평가에 있어서 가수분해 품질은 측정 대상 아미노산간의 일치도를 사용하지 않고, 국제도량형국 산하의 단백질측정 전문가그룹인 Protein Analysis Working Group에서 아미노산 기반 측정에서 일반적으로 설정하는 추산불가능한 가수분해를 위한 불확도 1 %를 임의로 설정하여 불확도를 추산하였다.

표 2. GXP 표준용액 인증표준물질의 인증값 및 확장 불확도

Compounds	mass fraction of GXPs		Amount-of-substance content of GXPs	
	certified value (mg/kg)	Expanded uncertainty* (mg/kg, $k=2$)	Certified value ($\mu\text{mol/kg}$)	Expanded uncertainty* (mg/kg, $k=2$)
GXP A	101.7	6.6	173.5	11.3
GXP B	105.7	6.9	176.1	11.4
GXP C	99.3	6.5	179.9	11.7
GXP D	92.2	6.0	162.9	10.6

*coverage factor in 95% confidence

표 3. 아미노산 기반 펩타이드 인증의 불확도 요소 및 산출 근거

분류	불확도 평가	불확도 요인	산출 근거
계통효과 불확도	B	아미노산 CRM 순도의 합성표준불확도	CRM 인증서
	A	제조재현성 불확도	복수의 표준용액 감도계수의 표준편차
	A	동위원소비 불확도	복수의 표준용액 감도계수의 표준편차
우연효과 불확도	A	표준용액 측정불확도	시료 농도 산출에 사용된 표준용액의 반복 측정 데이터의 표준편차
	A	시료 제조 불확도	사용한 저울의 무게차 불확도에 따른 시료 조제 시 질량측정의 불확도
		동위원소비 불확도	
	A	시료 측정 불확도	복수의 시료에 대한 측정 결과값 간의 표준편차
시료 균질도			
A	전처리 불확도 (가수분해)	전체 결과의 직사각형 분포의 표준편차를 사용하나, 직접 측정에 의한 추산이 어려울 경우, 1%로 설정 (PAWG K151의 PTB, NIM의 가수분해 불확도 추산 준용)	

3. LC-MS 분석법을 이용한 Gxp 발현량 측정

상기 기술한 과정에 따라 얻은 인증값을 기준으로 합성품 내의 펩타이드 중의 목적 GXP의 순도는 97% 이상이지만, 물질의 순도는 약 70%의 수준으로 확인되었다. 이러한 결과는 합성과정에서 함께 동결건조되는 용매, 염 등에 의하여 발생하는 것으로서 일반적으로 합성품 중에 존재하는 펩타이드 중의 목적 물질의 순도를 합성품 자체의 순도로 오인할 수 있음을 시사한다. 따라서 고순도의 펩타이드 합성품이라할지라도 그 양에 대해서는 재평가를 통해 정확한 양을 정함으로써 표준물질로서의 기준을 명확히 할 필요가 있으며, 현재까지로서는 아미노산 기반의 측정방법으로 인증하는 것이 유일한 인증 방법이라고 할 수 있다.

상기 표준물질 인증을 통해서 정해진 표준물질을 기준으로 미생물을 통해 발현된 GXP의 양을 측정하였다. 기존의 합성품의 순도를 GXP 100%로 가정하여 임의로 정한 제조값 대비 인증값이 변화함에 따라서 기존의 측정값도 상향 조정되는 것을 확인할 수 있었다.

이렇게 개발된 표준물질의 보급을 통해 GXP를 측정하는 연구자들이 정확한 값을 기준으로 GXP의 정량을 할 수 있다면, GXP 측정값의 소급성은 표준물질을 통해 국제단위계로 완성될 수 있다.

	제조값 (mg/kg)	인증값 (mg/kg)	합성품 중 GXP의 함량
GXP A	142.7	101.7	71.2%
GXP B	141.6	105.7	74.6%
GXP C	141.9	99.3	70.0%
GXP D	140.9	92.2	65.4%

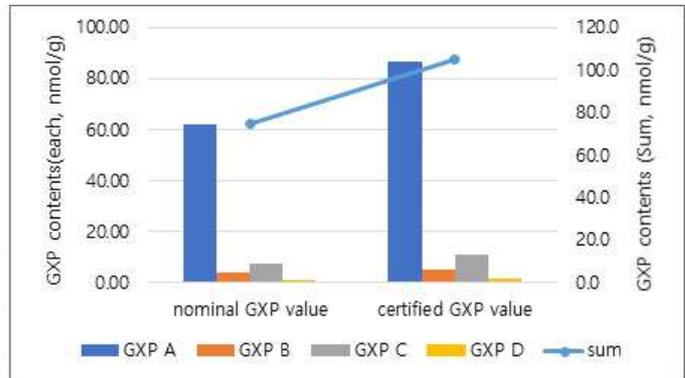


그림 9. 합성품을 칭량하여 제조한 값과 인증값의 비율 및 이를 통한 측정값의 조정의 예

[협동기관-고려바이오] 연구내용

○ 시제품의 유기농업자재 공시 기준에 따른 시험 및 유기농업자재 공시 신청

요약

시제품(제노메타)의 주성분, 농약피해, 안정성 평가를 유기농업자재 시험기관에 의뢰하여 수행하였으며, 각각의 시험결과 유기농업자재 공시기준에 적합함을 확인하였다. 해당 시험성적서를 토대로 유기농업자재 공시기관인 강원대학교 산학협력단에 총해관리용 유기농업자재로 공시 신청 예정이다.

결과

1. 시제품(제노메타)의 주성분 분석

시제품(제노메타)의 주성분인 *Metathizium rileyi*의 동정을 위해 ITS region 유전자 염기서열을 분석하고 상동성을 비교한 결과, *Metathizium rileyi*에 99% 유사성을 가지고 있는 미생물로 확인되었다(그림 1, 그림 2, 그림 3).

> Strain EFAP-23-1679-M(628bp)

```
AAAAATCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCATGTGAACTTAT  
ACCCTTTTCTGTGCTCGGCGGGTCATTTGCCCGGACCGGGCTCGTCCAGAGCCCGCCGGAAACAGGCGCCCGCGCGGG  
ACCGAAACTCTGTATCTCTTAGCCTTTGGCACGTCTGAGTGAATCATACAAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCT  
TGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTGAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC  
GCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCGCGGTTTGGTGTGGG  
GGCCGGCGATTGTCAGCTGGGCGCTCAGGCGGTTCCCTGCGGCGCGCCCGCCCGAAATGAATTGGCGGCCCGTCGCGGCCTCC  
TCTGCGTAGTAGCACAACCTCGCAACAGGAGCGCGGCGGCCACTGCCGTAACGCACAAACTTCTCCAAGAGTTGACCTCG  
AATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATA
```

그림 1. 시제품(제노메타) 내 미생물 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과

> Strain EFAP-23-1679-M(628bp)

Sequences producing significant alignments						
Accession	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	ident
LR792766.1	<i>Metarhizium rileyi</i> strain 936, ITS 1-5.8S-ITS2 gene, complete sequence; 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer1	1155	1155	100%	0.0	99.84%

그림 2. 시제품(제노메타) 내 미생물 NCBI BLAST 상동성 검색 결과(NCBI BLASTSearch: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

> Strain EFAP-23-1679-M(628bp)

**Metarhizium rileyi strain 936, ITS1-5.8S-ITS2 gene, complete sequence;
18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1**

Sequence ID: [LR792766.1](#) Length: 755 Number of Matches: 1

Range 1: 122 to 749 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Ma](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1155 bits(625)	0.0	627/628(99%)	0/628(0%)	Plus/Plus
Query 1	AAAAATCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCA	GCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAA		60
Sbjct 122	AAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCA	GCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAA		181
Query 61	CTCCCAAACCCCATGTGAACCTTATACCCTTTT	CCTGTTGCCTCGGCGGGTCATTTGCCCC		120
Sbjct 182	CTCCCAAACCCCATGTGAACCTTATACCCTTTT	CCTGTTGCCTCGGCGGGTCATTTGCCCC		241
Query 121	GGACCGGGCTCGTCCAGAGCCCGCCGAAACAG	GCGCCCGCCGCGGGACCGAAACTCTG		180
Sbjct 242	GGACCGGGCTCGTCCAGAGCCCGCCGAAACAG	GCGCCCGCCGCGGGACCGAAACTCTG		301
Query 181	TATCTCTTAGCCTTTGGCACGTCTGAGTGGAA	TACATAAAAAATGAATCAAAACTTTCAA		240
Sbjct 302	TATCTCTTAGCCTTTGGCACGTCTGAGTGGAA	TACATAAAAAATGAATCAAAACTTTCAA		361
Query 241	CAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGA	ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTG		300
Sbjct 362	CAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGA	ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTG		421
Query 301	AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT	GAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCT		360
Sbjct 422	AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT	GAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCT		481
Query 361	GGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACC	CTCAAGCCCCCGCGGTTTGGTGTGGG		420
Sbjct 482	GGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACC	CTCAAGCCCCCGCGGTTTGGTGTGGG		541
Query 421	GGCCGGCGATTGTGAGCTGGGCCGCTCAGGCG	GTTCCCTGCGGCGCCGCCCCCGAAATGA		480
Sbjct 542	GGCCGGCGATTGTGAGCTGGGCCGCTCAGGCG	GTTCCCTGCGGCGCCGCCCCCGAAATGA		601
Query 481	ATTGGCGGCCCGTCGCGGCCTCCTCTGCGTAG	TAGCACAACTCGCAACAGGAGCGCGG		540
Sbjct 602	ATTGGCGGCCCGTCGCGGCCTCCTCTGCGTAG	TAGCACAACTCGCAACAGGAGCGCGG		661
Query 541	CGCGGCCACTGCCGTA AAAACGCACAAACTT	CTCCAAGAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGA		600
Sbjct 662	CGCGGCCACTGCCGTA AAAACGCACAAACTT	CTCCAAGAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGA		721
Query 601	ATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA			628
Sbjct 722	ATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA			749

그림 3. 시제품(제노메타) 내 미생물과 동일 형태의 미생물의 유전자 상동성 비교

시제품(제노메타)의 주성분인 *Metathizium rileyi*의 생균수를 측정하기 위해 희석평판법에 의거하여 3반복으로 수행한 후, 유효미생물 콜로니와 동일한 형태의 콜로니를 유효미생물로 판정하고 계수하여 평균값을 산출한 결과, 생균수는 5.3×10^6 CFU/g으로 확인되었다(그림 4).

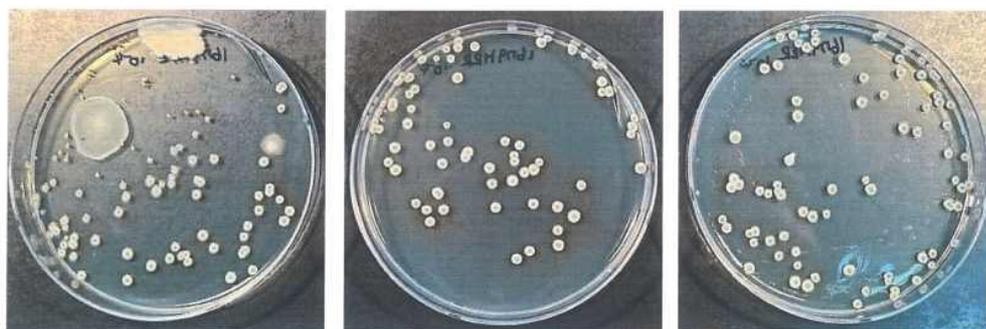


그림 4. 시제품(제노메타) 내 생균수 측정 결과

2. 시제품(제노메타)의 농약피해 평가

시제품(제노메타)의 농약피해를 평가하기 위해 고추(신와매워), 배추(휘모리골드), 상추(청치마), 오이(신아시아은천), 파(아이야흑금장)에 시제품을 기준량과 배량으로 처리하고 3, 5, 7일 후에 육안으로 관찰하여 농약피해의 판정기준에 따라 농약피해 여부를 판단하였다(표 1). 시험기간 동안 기준량과 배량에서 농약피해는 발견되지 않았으며, 무처리와 비교하여도 농약피해로 판단될 만한 특이사항은 관찰되지 않았다(표 2, 그림 5).

표 1. 농약피해의 판정기준

정도	판정기준
0	육안으로 농약피해가 인정되지 않음
1	아주 가벼운 농약피해로서 작은 약반이 약간 인정됨
2	처리된 잎의 소부분에서 농약피해가 인정됨
3	처리된 잎의 50퍼센트 정도 농약피해가 인정됨
4	상당한 피해를 받고 있으나 아직 건전한 부분이 남아 있음

표 2. 시제품의 농약피해 조사 결과(3, 5, 7일차)

작물명	처리구	판정기준			농약피해 증상
		3일차	5일차	7일차	
고추	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음
배추	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음
상추	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음
오이	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음
파	무처리	-	-	-	-
	기준량	0	0	0	없음
	배량	0	0	0	없음

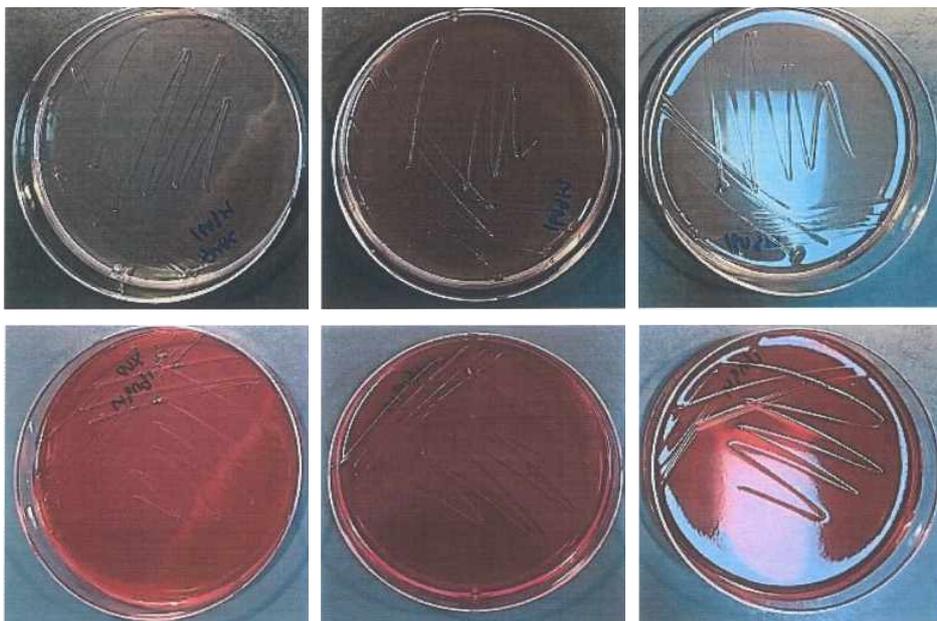




그림 5. 시제품(제노메타)의 농약피해 시험결과(7일차 / 고추, 배추, 상추, 오이, 파)

3. 시제품(제노메타)의 병원성미생물 검사

시제품(제노메타)의 병원성미생물 5종(*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*)에 대한 검출여부를 확인하기 위해 시제품을 35~37°C 에서 24±2시간 동안 증균배양하여 EMB 한천배지, Xylose Lysine Desoxycholate Agar배지, Baird Parker Agar배지, Oxford Agar배지, Mannitol Egg York Polymyxin Agar배지에 선택배지법을 이용하여 검정한 결과, 5종의 병원성미생물이 불검출되었다(그림 6).



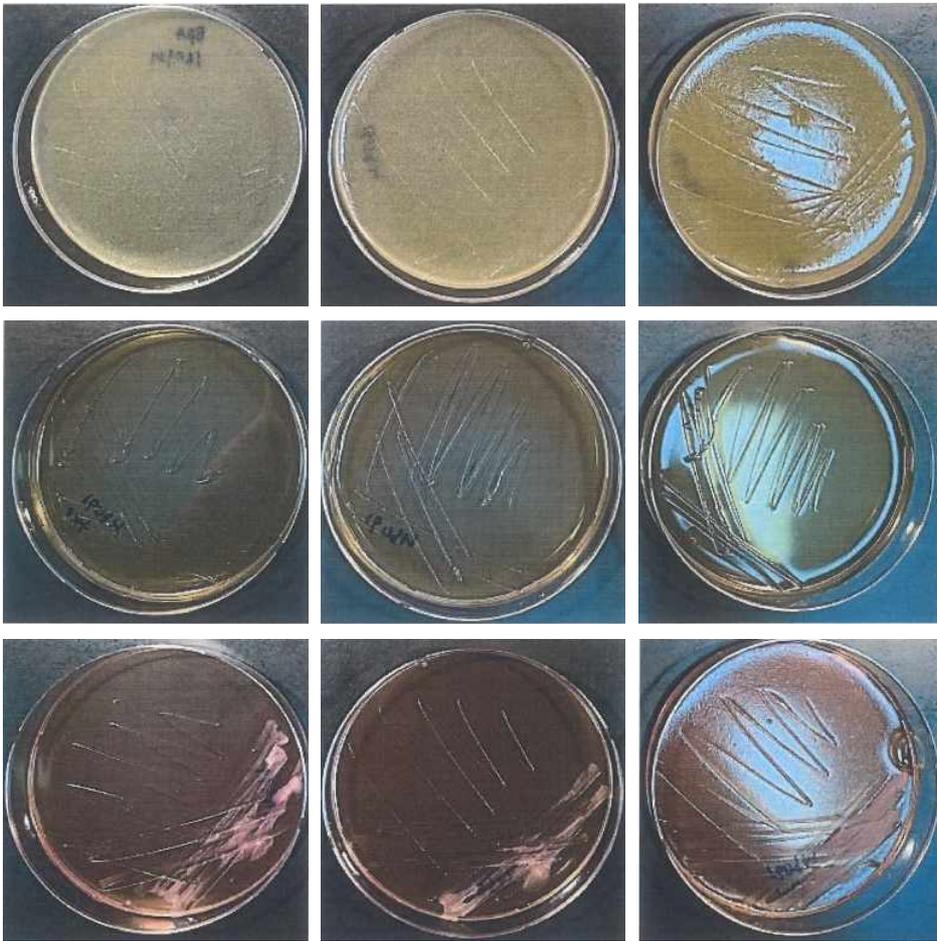


그림 6. 시제품(제노메타)의 병원성미생물 검사 결과(*E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*)

○ 시제품의 농가실증시험

요약

시제품을 가평군에 소재한 대파 재배농가에서 포장시험을 수행하였으며(그림 8), 파밤나방, 파좀나방, 파총채벌레, 작은뿌리파리, 고자리파리에 대한 시험을 수행하여 대상해충별 시제품의 농가적용방법을 최적화하였으며, 시제품과 경쟁제품 비교 시험을 수행하여 시제품의 충분한 시장경쟁력이 확인되었다.



그림 8. 대파 포장시험 전경

결과

1. 대상해충별 농가적용방법 최적화

1) 시제품의 파밤나방에 대한 농가적용방법 최적화

파밤나방에 대한 시제품의 최적 희석배수 결정을 위해 시제품 2종을 각각 250배, 500배, 1,000배로 희석하여 경엽처리하고 5일 후 생충수를 조사한 결과, 제노비티 1,000배 처리구에서 81.0%의 충분한 방제가를 보여 파밤나방 방제용 제품으로는 제노비티를 선정하고, 희석배수는 1,000배로 결정하였다(그림 9).

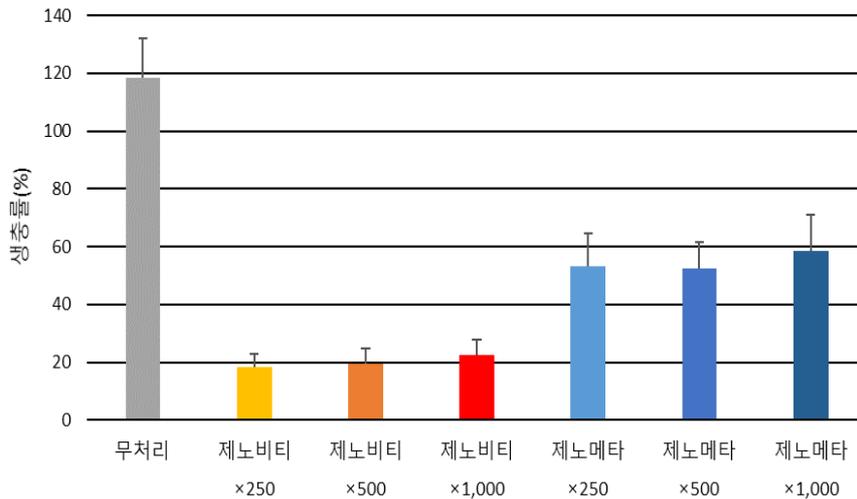


그림 9. 파밤나방에 대한 시제품 희석배수 결정

파밤나방에 대한 시제품의 최적 처리주기 및 횟수 결정을 위해 제노비티 1,000배 희석하여 5일간격, 7일간격으로 각각 2회, 3회 경엽처리하고 최종처리 5일 후 생충수를 조사한 결과, 7일간격 2회 처리구에서 83.0%로 충분한 방제가를 보여 처리주기 및 횟수는 7일 간격 2회 처리로 결정하였다(그림 10).

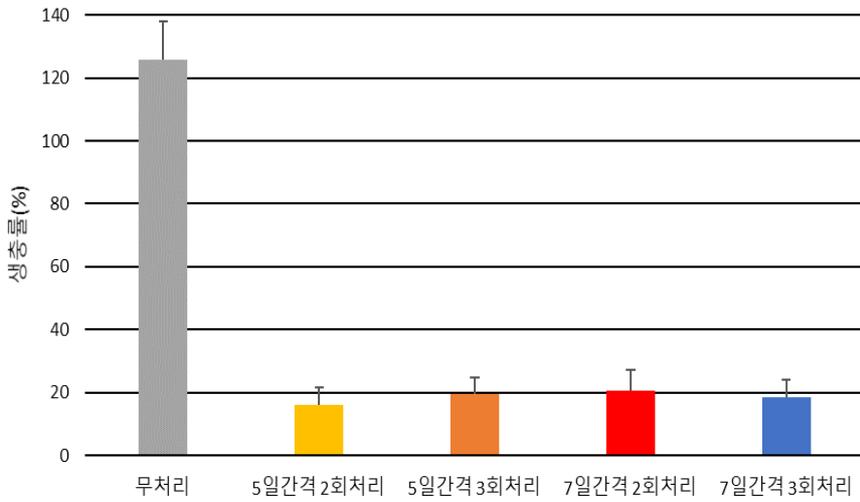


그림 10. 파밤나방에 대한 제노비티 처리주기 및 횟수 결정

2) 시제품의 파좀나방에 대한 농가적용방법 최적화

파좀나방에 대한 시제품의 최적 희석배수 결정을 위해 시제품 2종을 각각 250배, 500배, 1,000배로 희석하여 경엽처리하고 5일 후 생충수를 조사한 결과, 제노비티 1,000배 처리구에서 82.3%의 충분한 방제가를 보여 파좀나방 방제용 제품으로는 제노비티를 선정하고, 희석배수는 1,000배로 결정하였다(그림 11).

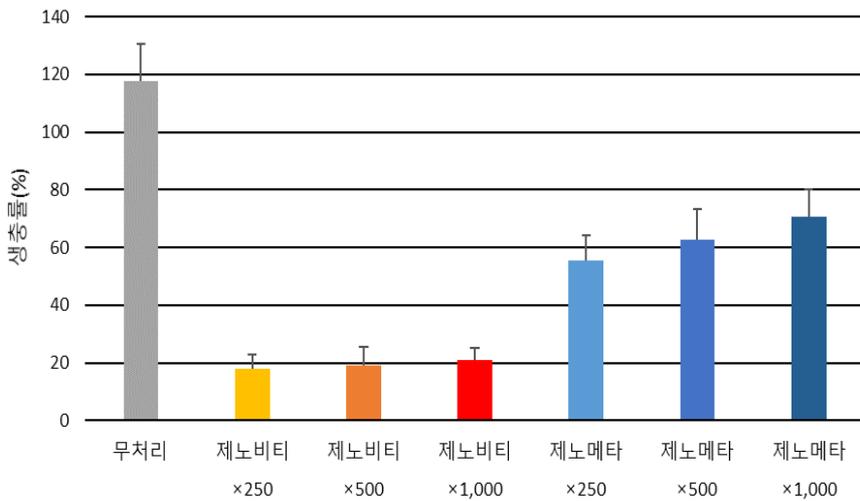


그림 11. 파좀나방에 대한 시제품 희석배수 결정

파좀나방에 대한 시제품의 최적 처리주기 및 횟수 결정을 위해 제노비티 1,000배 희석하여 5일간격, 7일간격으로 각각 2회, 3회 경엽처리하고 최종처리 5일 후 생충수를 조사한 결과, 7일간격 2회 처리구에서 82.7%로 충분한 방제가를 보여 처리주기 및 횟수는 7일 간격 2회 처리로 결정하였다(그림 12).

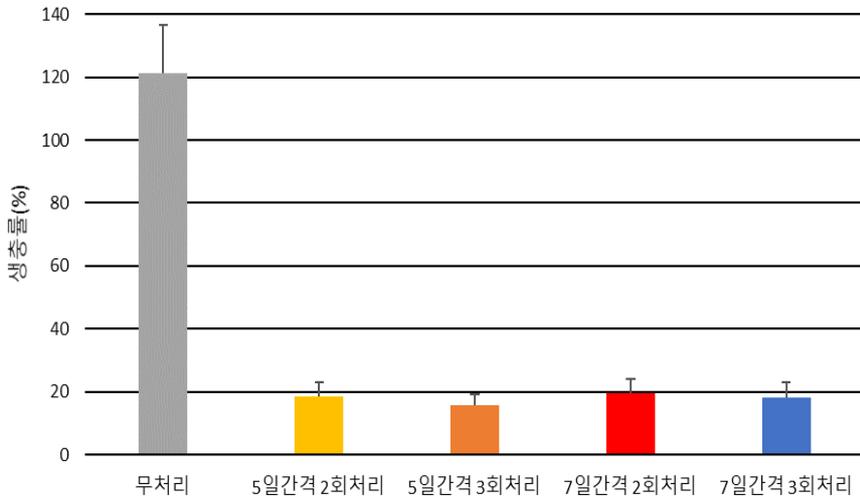


그림 12. 파좀나방에 대한 제노비티 처리주기 및 횟수 결정

3) 시제품의 파총채벌레에 대한 농가적용방법 최적화

파총채벌레에 대한 시제품의 최적 희석배수 결정을 위해 시제품 2종을 각각 250배, 500배, 1,000배로 희석하여 경엽처리 및 근부관주처리하고 7일 후 생충수를 조사한 결과, 제노메타 500배 처리구에서 80.5%의 방제가를 보여 파총채벌레 방제용 제품으로는 제노메타를 선정하고, 희석배수는 500배로 결정하였다(그림 13).

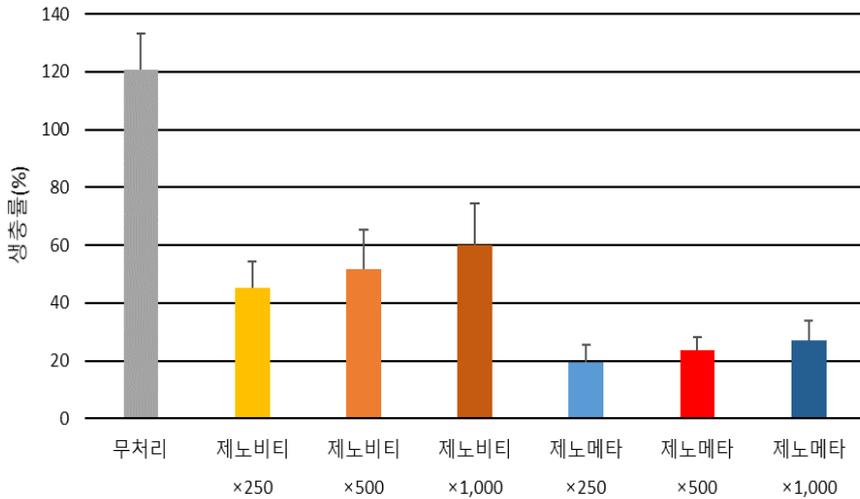


그림 13. 파총채벌레에 대한 시제품 희석배수 결정

파총채벌레에 대한 시제품의 최적 처리주기 및 횟수 결정을 위해 제노메타 500배 희석하여 5일간격, 7일간격으로 각각 2회, 3회 경엽처리 및 근부관주처리하고 최종처리 7일 후 생충수를 조사한 결과, 7일간격 2회 처리구에서 82.9%로 충분한 방제가를 보여 처리주기 및 횟수는 7일 간격 2회 처리로 결정하였다(그림 14).

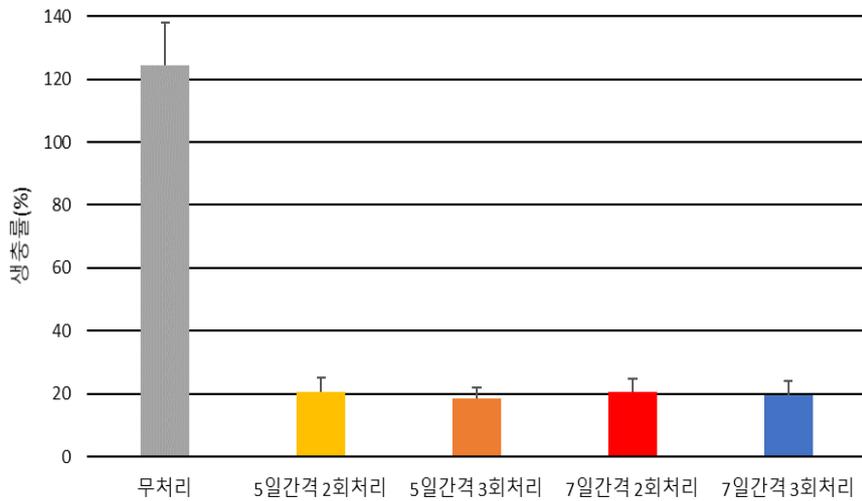


그림 14. 파총채벌레에 대한 제노메타 처리주기 및 횟수 결정

4) 시제품의 파굴파리에 대한 농가적용방법 최적화

파총채벌레에 대한 시제품의 최적 희석배수 결정을 위해 시제품 2종을 각각 250배, 500배, 1,000배로 희석하여 경엽처리하고 14일 후 피해율을 조사한 결과, 제노비티 1,000배 처리구에서 80.9%의 방제가를 보여 파굴파리 방제용 제품으로는 제노비티를 선정하고, 희석배수는 1,000배로 결정하였다(그림 15).

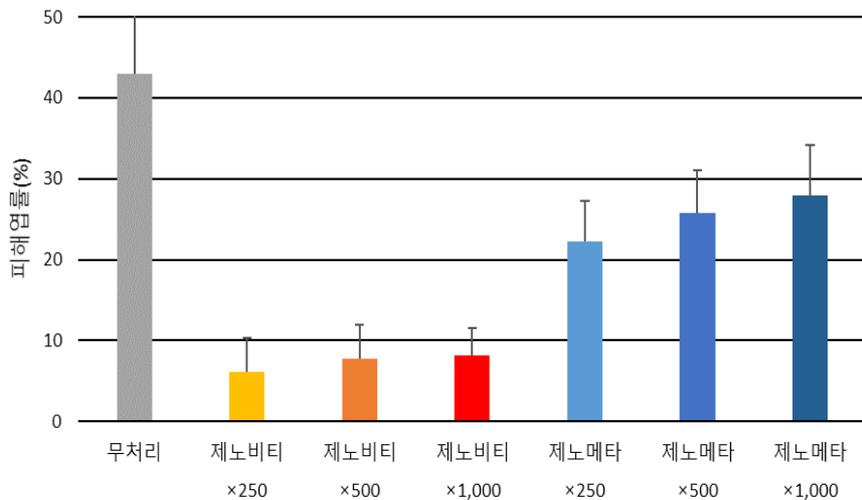


그림 15. 파굴파리에 대한 시제품 희석배수 결정

파굴파리에 대한 시제품의 최적 처리주기 및 횟수 결정을 위해 제노비티 1,000배 희석하여 5일간격, 7일간격으로 각각 2회, 3회 경엽처리하고 최종처리 7일 후 생존수를 조사한 결과, 7일간격 2회 처리구에서 83.7%로 충분한 방제가를 보여 처리주기 및 횟수는 7일 간격 2회 처리로 결정하였다(그림 16).

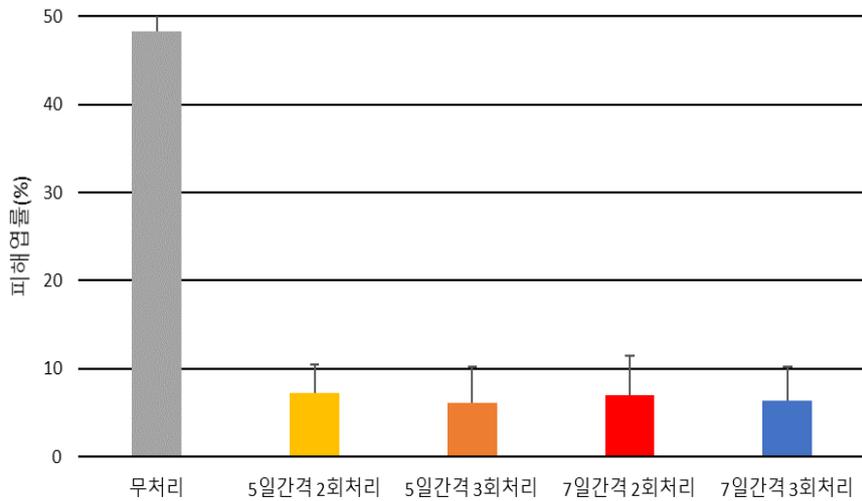


그림 16. 파굴파리에 대한 제노비티 처리주기 및 횟수 결정

5) 시제품의 작은뿌리파리에 대한 농가적용방법 최적화

작은뿌리파리에 대한 시제품의 최적 희석배수 결정을 위해 시제품 2종을 각각 250배, 500배, 1,000배로 희석하여 근부관주처리하고 7일 후 생충수를 조사한 결과, 제노비티 1,000배 처리구에서 85.6%의 방제가를 보여 작은뿌리파리 방제용 제품으로는 제노비티를 선정하고, 희석배수는 1,000배로 결정하였다(그림 17).

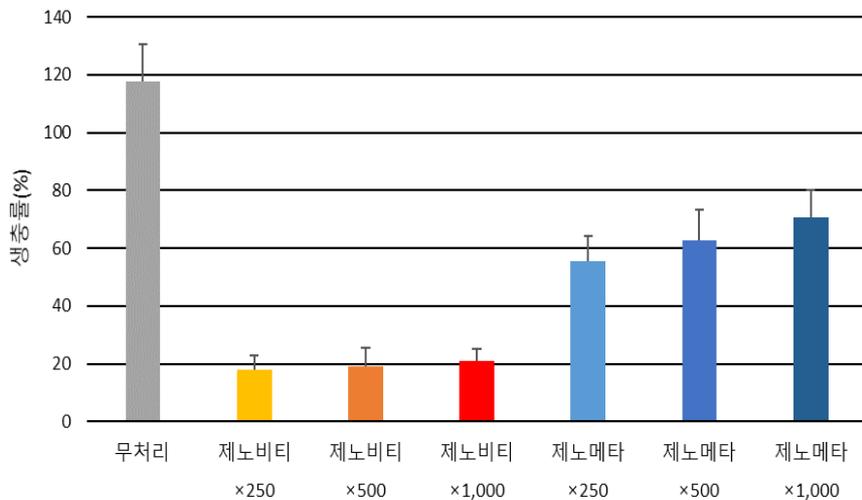


그림 17. 작은뿌리파리에 대한 시제품 희석배수 결정

작은뿌리파리에 대한 시제품의 최적 처리주기 및 횟수 결정을 위해 제노비티 1,000배 희석하여 5일간격, 7일간격으로 각각 2회, 3회 근부관주처리하고 최종처리 7일 후 생충수를 조사한 결과, 7일간격 2회 처리구에서 85.5%로 충분한 방제가를 보여 처리주기 및 횟수는 7일 간격 2회 처리로 결정하였다(그림 18).

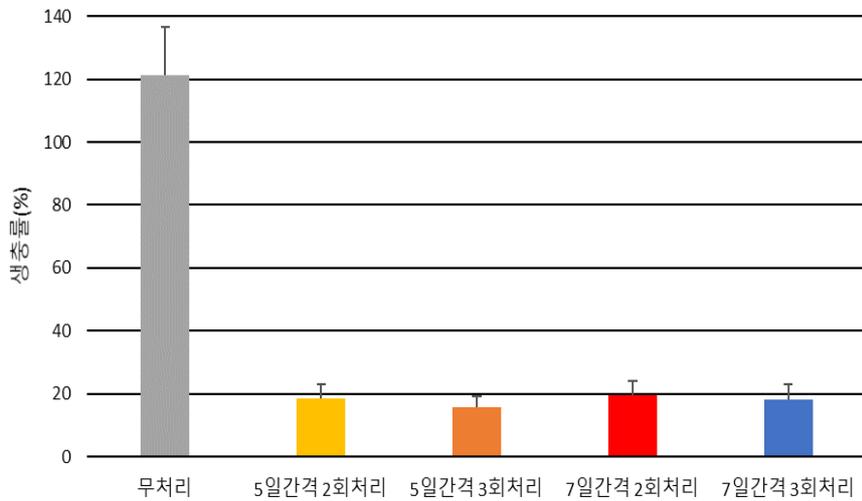


그림 18. 작은뿌리파리에 대한 제노비티 처리주기 및 횟수 결정

5) 시제품의 고자리파리에 대한 농가적용방법 최적화

고자리파리에 대한 시제품의 최적 희석배수 결정을 위해 시제품 2종을 각각 250배, 500배, 1,000배로 희석하여 정식 7일 후 관주처리하고 약제처리 21일 후 피해주수를 조사한 결과, 제노비티 500배 처리구에서 80.9%, 제노메타 500배 처리구에서 80.5%의 방제가를 보여 고자리파리 방제용 제품으로는 제노비티와 제노메타를 선정하고, 희석배수는 500배로 결정하였다(그림 19).

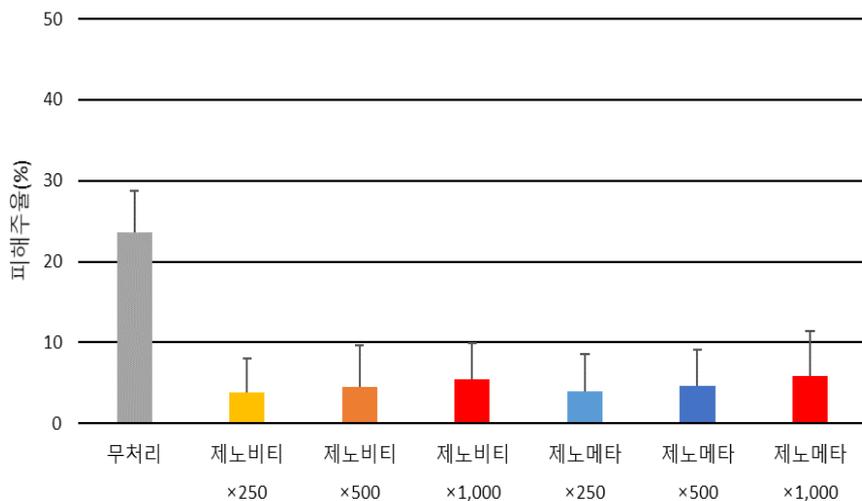


그림 19. 고자리파리에 대한 시제품 희석배수 결정

고자리파리에 대한 시제품의 최적 처리주기 및 횟수 결정을 위해 제노비티, 제노메타 각각 500배 희석하여 5일간격, 7일간격으로 각각 2회, 3회 정식 7일 후 관주처리하고 최종처리 21일 후 피해주수를 조사한 결과, 7일간격 2회 처리구에서 제노비티 82.2%, 제노메타 81.4%로 충분한 방제가를 보여 처리주기 및 횟수는 7일간격 2회 처리로 결정하였다(그림 20).

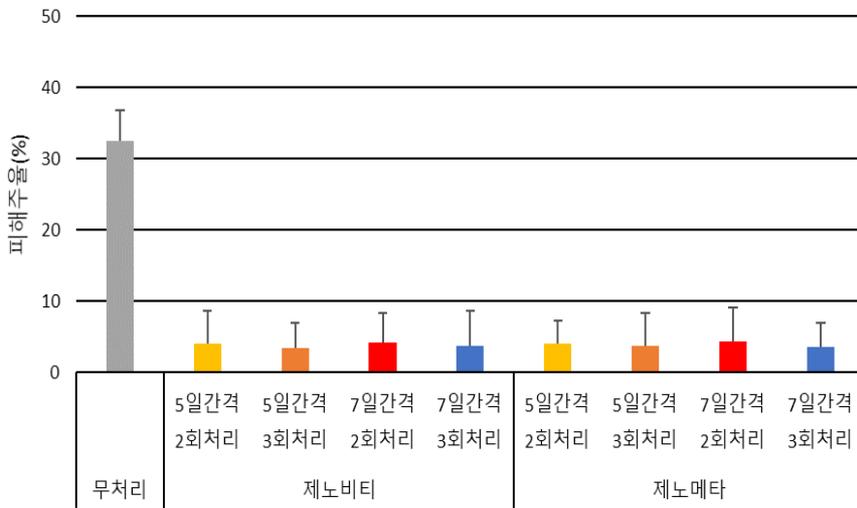


그림 20. 고자리파리에 대한 제노비티, 제노메타 처리주기 및 횟수 결정

2. 경쟁제품군과의 비교평가

1) 제노비티의 파밤나방에 대한 경쟁제품군과의 비교평가

파밤나방 효능효과표시가 되어 있는 유기농업자재 A(식물추출물), 유기농업자재 B(미생물), 대조약제(플록사메타이드 유탁제, 4.5%)와 시제품의 파밤나방에 대한 비교시험을 수행하였다. 제노비티는 파밤나방에 대해 무처리구 대비 81.5%의 방제가를 나타내었으며, 유기농업자재A(77.6%), 유기농업자재B(67.2%)보다 높은 방제가를 나타내었다. 대조약제인 화학농약(91.0%)보다는 낮은 방제가를 보였지만, 대조약제 대비 89.6%의 방제가를 보여 충분한 경쟁력을 갖춘 것으로 판단된다(표 3).

표 3. 제노비티의 파밤나방에 대한 경쟁제품군과의 비교시험 결과

시험약제	생충률(%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균	
제노비티 ×1,000	21.7	23.6	21.4	22.2	81.5
유기농업자재 A ×1,000	28.3	26.5	25.8	26.9	77.6
유기농업자재 B ×1,000	42.4	35.6	40.2	39.4	67.2
대조약제 ×1,000	12.2	9.8	10.6	10.9	91.0
무처리	112.8	125.5	122.1	120.1	-

2) 제노비티의 파좀나방에 대한 경쟁제품군과의 비교평가

유기농업자재 A(식물추출물), 유기농업자재 B(미생물), 대조약제(플록사메타이드 유탁제, 4.5%)와 시제품의 파좀나방에 대한 비교시험을 수행하였다. 제노비티는 파좀나방에 대해 무처리구 대비 83.8%의 방제가를 나타내었으며, 유기농업자재A(80.2%), 유기농업자재B(62.7%)보다 높은 방제가를 나타내었다. 대조약제인 화학농약(93.7%)보다는 낮은 방제가를 보였지만, 대조약제 대비 89.4%의 방제가를 보여 충분한 경쟁력을 갖춘 것으로 판단된다(표 4).

표 4. 제노비티의 파좀나방에 대한 경쟁제품군과의 비교시험 결과

시험약제	생충률(%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균	
제노비티 ×1,000	19.5	22.7	20.6	20.9	83.8
유기농업자재 A ×1,000	26.8	24.5	25.2	25.5	80.2
유기농업자재 B ×1,000	46.7	47.2	50.3	48.1	62.7
대조약제 ×1,000	7.3	8.5	8.7	8.2	93.7
무처리	124.7	133.5	128.4	128.9	-

3) 제노메타의 파총채벌레에 대한 경쟁제품군과의 비교평가

총채벌레 효능효과 표시가 되어 있는 유기농업자재 A(식물성오일+식물추출물), 유기농업자재 B(미생물), 대조약제(클로르페나피르 액상수화제, 10%)와 시제품의 파총채벌레에 대한 비교시험을 수행하였다. 제노메타는 파총채벌레에 대해 무처리구 대비 79.1%의 방제가를 나타내었으며, 유기농업자재A(64.9%), 유기농업자재 B(52.1%)보다 높은 방제가를 나타내었다. 대조약제인 화학농약(87.4%)보다는 낮은 방제가를 보였지만, 대조약제 대비 90.5%의 방제가를 보여 충분한 경쟁력을 갖춘 것으로 판단된다(표 5).

표 5. 제노메타의 파총채벌레에 대한 경쟁제품군과의 비교시험 결과

시험약제	생충률(%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균	
제노메타 ×500	30.3	28.4	27.6	28.8	79.1
유기농업자재 A ×1,000	44.4	50.5	49.7	48.2	64.9
유기농업자재 B ×1,000	62.5	68.7	66.2	65.8	52.1
대조약제 ×3,000	18.5	16.3	17.2	17.3	87.4
무처리	133.3	136.5	142.3	137.4	-

4) 제노비티의 파굴파리에 대한 경쟁제품군과의 비교평가

잎굴파리 효능효과 표시가 되어 있는 유기농업자재 A(식물성오일+식물추출물), 유기농업자재 B(미생물), 대조약제(에마멕틴벤조에이트 유제, 2.15%)와 시제품의 파굴파리에 대한 비교시험을 수행하였다. 제노비티는 파굴파리에 대해 무처리구 대비 80.8%의 방제가를 나타내었으며, 유기농업자재A(75.0%), 유기농업자재 B(63.1%)보다 높은 방제가를 나타내었다. 대조약제인 화학농약(89.2%)보다는 낮은 방제가를 보였지만, 대조약제 대비 90.5%의 방제가를 보여 충분한 경쟁력을 갖춘 것으로 판단된다(표 6).

표 6. 제노비티의 파굴파리에 대한 경쟁제품군과의 비교시험 결과

시험약제	피해율(%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균	
제노비티 ×1,000	11.3	9.8	10.3	10.5	80.8
유기농업자재 A ×1,000	13.6	14.8	12.5	13.6	75.0
유기농업자재 B ×1,000	19.4	22.4	18.5	20.1	63.1
대조약제 ×2,000	6.3	5.7	5.6	5.9	89.2
무처리	50.8	56.7	55.8	54.4	-

5) 제노비티의 작은뿌리파리에 대한 경쟁제품군과의 비교평가

작은뿌리파리 효능효과 표시가 되어 있는 유기농업자재 A(미생물), 유기농업자재 B(미생물), 대조약제(아바멕틴.클로란트라닐리프롤 액상수화제, 6%)와 시제품의 작은뿌리파리에 대한 비교시험을 수행하였다. 제노비티는 작은뿌리파리에 대해 무처리구 대비 84.3%의 방제가를 나타내었으며, 유기농업자재A(70.9%), 유기농업자재B(76.8%)보다 높은 방제가를 나타내었다. 대조약제인 화학농약(95.3%)보다는 낮은 방제가를 보였지만, 대조약제 대비 88.5%의 방제가를 보여 충분한 경쟁력을 갖춘 것으로 판단된다(표 7).

표 7. 제노비티의 작은뿌리파리에 대한 경쟁제품군과의 비교시험 결과

시험약제	생충률(%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균	
제노비티 ×1,000	22.0	25.4	20.5	22.6	84.3
유기농업자재 A ×1,000	38.7	42.5	44.8	42.0	70.9
유기농업자재 B ×1,000	34.8	35.2	30.6	33.5	76.8
대조약제 ×4,000	6.1	7.4	6.7	6.7	95.3
무처리	152.7	148.0	132.7	144.5	-

6) 제노비티, 제노메타의 고자리파리에 대한 경쟁제품군과의 비교평가

고자리파리 효능효과 표시가 되어 있는 유기농업자재 A(미생물), 유기농업자재 B(미생물), 대조약제(감마사이 할로트린 캡슐현탁제, 1.4%)와 시제품의 고자리파리에 대한 비교시험을 수행하였다. 제노비티와 제노메타는 고자리파리에 대해 각각 무처리구 대비 78.0%, 77.7%의 방제가를 나타내었으며, 유기농업자재A(56.6%), 유기농업자재B(63.0%)보다 높은 방제가를 나타내었다. 대조약제인 화학농약(87.2%)보다는 낮은 방제가를 보였지만, 대조약제 대비 제노비티는 89.4%, 제노메타는 89.0%의 방제가를 보여 충분한 경쟁력을 갖춘 것으로 판단된다(표 8).

표 8. 제노비티와 제노메타의 고자리파리에 대한 경쟁제품군과의 비교시험 결과

시험약제	피해주율(%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균	
제노비티 ×500	7.7	9.7	8.3	8.6	78.0
제노메타 ×500	8.3	8.0	9.8	8.7	77.7
유기농업자재 A ×1,000	18.3	17.0	15.4	16.9	56.6
유기농업자재 B ×1,000	14.3	15.4	13.5	14.4	63.0
대조약제 ×2,500	4.8	5.1	5.0	5.0	87.2
무처리	42.5	33.8	40.5	38.9	-

○ 대파 재배 유기농 해충관리 매뉴얼 제작

요약

농민들이 유기농 대파 재배에 활용할 수 있도록 대파에 발생하는 주요 해충 6종(파밤나방, 파좀나방, 파총채벌레, 파굴파리, 작은뿌리파리, 고자리파리)의 발생시기에 따른 시제품의 최적 적용방법을 매뉴얼로 제작하였으며, 시제품과 살충 또는 살균 기능을 갖는 유기농업자재들과의 혼용성을 평가하였다.

결과

1. 대상해충 발생 시기별 IBC 미생물제 사용 매뉴얼 제작

농민들이 유기농 대파 재배에 활용할 수 있도록 대파에 발생하는 주요 해충 6종(파밤나방, 파좀나방, 파총채벌레, 파굴파리, 작은뿌리파리, 고자리파리)의 발생시기에 따른 시제품의 최적 적용방법을 매뉴얼로 제작하였다 (그림 21).

대파 유기농 해충관리 매뉴얼						
	4월		5월	6월	7월	8월
	정식 전	정식 후				
발생해충	작은뿌리파리 고자리파리	파밤나방 파총채벌레 파굴파리	파밤나방 파좀나방 파총채벌레 파굴파리 작은뿌리파리	파밤나방 파좀나방 파총채벌레 파굴파리 작은뿌리파리 고자리파리	파밤나방 파굴파리 작은뿌리파리 고자리파리	파밤나방 파총채벌레 파굴파리 작은뿌리파리 고자리파리
주요 방제해충	작은뿌리파리 고자리파리	파총채벌레	파밤나방 파좀나방 파굴파리	파밤나방 파좀나방 파총채벌레	파밤나방 파굴파리 작은뿌리파리 고자리파리	파밤나방 파총채벌레 파굴파리
제노비티	관주처리	-	경엽처리	경엽처리	경엽처리/근부관주처리	경엽처리
제노메타	관주처리	근부관주처리	-	경엽처리/근부관주처리	경엽처리/근부관주처리	근부관주처리
	주요방제해충		적용시기	사용방법		
	파밤나방		5월~8월	1,000배 희석 경엽처리		
	파좀나방		5월~6월	1,000배 희석 경엽처리		
	파굴파리		5월, 7월, 8월	1,000배 희석 경엽처리		
	작은뿌리파리		4월(정식 전), 7월	4월(정식 전): 500배 희석 관주처리 7월: 500배 희석 경엽처리 및 근부관주처리		
	주요방제해충		적용시기	사용방법		
	파총채벌레		4월(정식 후), 6월, 8월	4월(정식 후): 500배 희석 근부관주처리 6월, 8월: 500배 희석 경엽처리 및 근부관주처리		
	고자리파리		4월(정식 전), 7월	4월(정식 전): 500배 희석 관주처리 7월: 500배 희석 경엽처리 및 근부관주처리		

그림 21. 대파 유기농 해충관리 매뉴얼 제작

2. 타 제품군과의 혼용성 평가

타 제품군과의 혼용 시 미생물제의 안정성을 확인하기 위해, 병해관리용 유기농업자재 9종, 작물생육 및 토양 개량용 유기농업자재 6종을 각각의 추천약량으로 희석하고 제노비티, 제노메타를 각각 100배로 희석하여

TSA와 PDA 배지에 도말하여 밀도를 측정하였다. 병해관리용 유기농업자재 중 보르도액과 중탄산나트륨은 제노비티와 제노메타의 미생물에 항균효과를 나타내어 혼용 및 교호 사용 시 제품 효과에 영향을 미칠 것으로 판단되며, 작물생육 및 토양개량용 유기농업자재와는 항균효과를 나타내지 않았다(표 9).

표 9. 타 제품군과의 혼용성 평가

구분	시험약제	제노비티 (3.8×10^8 CFU/g)	제노메타 (2.2×10^8 CFU/g)
	자재명		
병해관리용 유기농업자재	항	2.7×10^6 CFU/ml	1.9×10^6 CFU/ml
	식물성오일+식물추출물	3.1×10^6 CFU/ml	2.0×10^6 CFU/ml
	규산나트륨	3.2×10^6 CFU/ml	2.3×10^6 CFU/ml
	미생물	3.5×10^6 CFU/ml	1.8×10^6 CFU/ml
	식물성오일	3.3×10^6 CFU/ml	2.1×10^6 CFU/ml
	식물추출물	3.4×10^6 CFU/ml	2.1×10^6 CFU/ml
	항+벤토나이트	2.8×10^6 CFU/ml	2.2×10^6 CFU/ml
	보르도액	5.2×10^4 CFU/ml	6.3×10^4 CFU/ml
	중탄산나트륨	4.6×10^5 CFU/ml	5.4×10^4 CFU/ml
	작물생육 및 토양개량용 유기농업자재	동물부산물	4.0×10^6 CFU/ml
미생물		3.5×10^6 CFU/ml	1.9×10^6 CFU/ml
해조류추출물		3.6×10^6 CFU/ml	1.9×10^6 CFU/ml
유기체+제당산업의 부산물		3.4×10^6 CFU/ml	1.8×10^6 CFU/ml
토탄추출물+항		3.7×10^6 CFU/ml	2.3×10^6 CFU/ml
미생물추출물		3.8×10^6 CFU/ml	2.0×10^6 CFU/ml

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

- 대파 발생 주요 6종 해충(나방류 2종, 파리류 3종, 총채벌레 1종)의 동정 및 농가 재배지 연중 발생 결정
 - 이를 기준으로 방제 시기(= 약제 처리시기)를 결정할 수 있게 되었다.
 - 파밤나방, 파총채벌레, 파좁나방, 씨고자리파리의 전사체 분석으로 이들의 면역 관련 유전자 결정
 - 이를 기준으로 면역억제를 활용한 새로운 방제 개발 가능하게 하였다.
 - Xenorhabdus/Photorhabdus 세균 대사체 유래 면역억제물질 동정 및 기능 규명
 - EMP의 damage-associate molecular pattern 기능 규명
 - GXP의 면역 및 살충 기능 규명
 - GXP 기반으로 표준물질 개발하여 향후 IBC 살충제의 QC 기능 부여함
 - 3종의 IBC 살충제 개발
 - 나방류 방제용 IBC 미생물살충제 개발
 - 파리류 방제용 IBC 미생물살충제 개발
 - 총채벌레 방제용 IBC 미생물살충제 개발
 - 개발 약제의 등록추진 및 상품화로 산업화 추진
-

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

<정량적 연구개발성과표>

(단위 : 건, 천원)

성과지표명		연도	1단계 (2021-2022)	2단계 (2023)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	특허출원	목표(단계별)	1	1	2	10
		실적(누적)	0	3	3	10
	특허등록	목표(단계별)	0	1	1	15
		실적(누적)	0	0	0	0
	품종등록	목표(단계별)	0	1	1	10
		실적(누적)	0	0	0	0
	생명자원	목표(단계별)	0	0	0	0
		실적(누적)	26	4	30	0
	표준화	목표(단계별)	0	0	0	0
		실적(누적)	0	1	1	0
	논문	목표(단계별)	3	2	5	20
		실적(누적)	8	7	15	20
	학술발표	목표(단계별)	3	2	5	10
		실적(누적)	10	7	17	20
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	기술이전	목표(단계별)	0	0	0	0
		실적(누적)	0	1	1	0
	기술료	목표(단계별)	0	0	0	0
		실적(누적)	0	7,000	7,000	0
	제품화	목표(단계별)	1	1	2	15
		실적(누적)	1	1	2	15
	매출액	목표(단계별)	0	0	0	0
		실적(누적)	0	7,000	7,000	0
	인력양성	목표(단계별)	1	1	2	10
		실적(누적)	2	2	4	10
	고용창출	목표(단계별)	0	1	1	10
		실적(누적)	1	3	4	10
	홍보	목표(단계별)	0	0	0	0
		실적(누적)	2	0	2	0
계	목표(단계별)	9건	10건	19건	100	
	실적(누적)	50건	14,000천원	14,000천원	75	

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	PGE2 mediates hemocyte-spreading behavior by activating aquaporin via cAMP and rearranging actin cytoskeleton via Ca ²⁺	Dev Comp Immunol	김용균	125	미국	Elsevier	SCIE	2021.12	0145-305x	100
2	CRISPR/Cas9 mutagenesis against sex pheromone biosynthesis leads to loss of female attractiveness in <i>Spodoptera exigua</i> , an pestt	PLoS ONE		16	미국	PLoS	SCIE	2021.11	1932-6203	100
3	동절기 대파 재배지 파총채벌레 발생 보고	한국응용곤충학회지		60	한국	한국응용곤충학회	비SCIE	2021.06	1225-0171	100
4	Thelytokous Reproduction of Onion Thrips, <i>Thrips tabaci</i> Lindeman 1889, Infesting Welsh Onion and Genetic Variation among Their Subpopulations	Insects		13	스위스	MDPI	SCIE	2022.01	2075-4450	100
5	Enhanced virulence of <i>Beauveria bassiana</i> against <i>Thrips tabaci</i> by the addition of bacterial metabolites derived from <i>Xenorhabdus hominickii</i>	J Asia Pac Entomol		25	한국	한국응용곤충학회	SCIE	2022.12	1226-8615	100
6	What is in a model?	Arch Insect Biochem Physiol		0	미국	Wiley	SCIE	2022.09	1520-6327	100
7	Integrated Biological Control Using a Mixture of Two Entomopathogenic Bacteria, <i>Bacillus thuringiensis</i> and <i>Xenorhabdus hominickii</i> , against <i>Spodoptera exigua</i> and Other Congeners	Insects		13	스위스	MDPI	SCIE	2022.09	2075-4450	100
8	Dorsal switch protein 1 as a damage signal in insect gut immunity to activate dual oxidase via an eicosanoid, PGE ₂	Front. Immunol.		13	스위스	Frontiers	SCIE	2022.11	1664-3224	50
9	대파 재배지 파총나방 (<i>Acrolepiopsis sapporensis</i>) 발생 현황과 '비티플러스'처리 효과	한국응용곤충학회지		62	한국	한국응용곤충학회	비SCIE	2023.12	1225-0171	100
10	The Lrp transcriptional factor of an entomopathogenic bacterium, <i>Xenorhabdus hominickii</i> , activates non-ribosomal peptide synthetases to suppress insect immunity	Dev Comp Immunol		151	미국	Elsevier	SCIE	2023.12	0145-305X	90
11	Immune responses of the Asian onion moth, <i>Acrolepiopsis sapporensis</i> , and their genetic factors from RNA-Seq analysis	Arch Insect Biochem Physiol.		113	미국	Wiley	SCI	2023.07	0739-4462	100
12	<i>Xenorhabdus hominickii</i> 세균 이차대사물질의 대파 검은무늬병에 대한 방제 효과	농약과학회지			한국	한국농약과학회	비SCI	2023.03	1226-6183	100
13	고추 재배지 TSWV 감염 파총채벌레(<i>Thrips tabaci</i>) 발견 및 체내 바이러스 증식	농약과학회지			한국	한국농약과학회	비SCI	2023.06	1226-6183	100
14	Identification of four secretory PLA2 in <i>Acrolepiopsis sapporensis</i>	Front. Endocrinol.		14	스위스	Frontiers	SCI	2023.06	1664-2392	100
15	Manipulation of GameXPeptide synthetase gene expression by a promoter exchange alters the virulence of an entomopathogenic bacterium, <i>Photorhabdus temperata</i> , by modulating insect immune responses	Front. Microbiol.		14	스위스	Frontiers	SCI	2023.11	1664-302X	100

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2021춘계 한국응용곤충학회	김용균	2021.04.29	천안소노벨	대한민국
2	2021추계 한국응용곤충학회	Falguni Khan	2021.10.28	삼척솔비치	대한민국
3	2021미국곤충학회	Roy Milton Chandra	2021.11.01	Virtual	미국
4	2022춘계 한국농약과학회	김용균	2022.04.08	경주 소노벨	대한민국
5	2022춘계 한국응용곤충학회	최두열	2022.04.28	변산 소노벨	대한민국
6	2022춘계 한국응용곤충학회	Falguni Khan	2022.04.28	변산 소노벨	대한민국
7	2022추계 한국응용곤충학회	진가현	2022.10.27	경주	대한민국
8	2022추계 한국응용곤충학회	따핍호사인	2022.10.27	경주	대한민국
9	2022 한국질량분석학회 여름학술대회	정지선, 이형준, 김일환	2022.08.25	창원컨벤션센터(CECO)	대한민국
10	ESA(미국곤충학회)	김용균	2022.11.15	캐나다 밴쿠버	미국
11	SIP 2023(무척추동물병리학회)	진가현	2023.07.31	미국 메릴랜드	미국
12	SIP 2023(무척추동물병리학회)	Heckel	2023.07.31	미국 메릴랜드	미국
13	춘계 응용곤충학회 그랜드플라자(청주)	따핍호사인	2023.04.27	그랜드플라자 청주호텔	대한민국
14	춘계 응용곤충학회 그랜드플라자(청주)	진가현	2023.04.27	그랜드플라자 청주호텔	대한민국
15	춘계 응용곤충학회 그랜드플라자(청주)	권지윤	2023.04.28	그랜드플라자 청주호텔	대한민국
16	Asia-Oceania Mass Spectrometry Conference-Korea Society for Mass Spectrometry (AOMSC-KSMS) 2023	김일환, 이신지, 유슬범, 정지선	2023.08.22	제주국제컨벤션센터	대한민국
17	MSK2023 한국미생물학회 국제학술대회	유슬범, 이신지, 정지선, 김일환	2023.10.26	여수엑스포컨벤션센터	대한민국

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	Spodoptera exigua G protein-coupled receptor 31 (Se-GPCR31)	MZ501853	NCBI-GenBank	2021
2	Spodoptera exigua G protein-coupled receptor 31 (Se-GPCR31)	MZ501856	NCBI-GenBank	2021
3	Spodoptera exigua G protein-coupled receptor 31 (Se-GPCR31)	MZ501836	NCBI-GenBank	2021
4	Spodoptera exigua G protein-coupled receptor 31 (Se-GPCR31)	MZ501848	NCBI-GenBank	2021
5	Spodoptera exigua G protein-coupled receptor 31 (Se-GPCR31)	MZ501845	NCBI-GenBank	2021
6	Spodoptera exigua G protein-coupled receptor 31 (Se-GPCR31)	MZ501857	NCBI-GenBank	2021
7	Spodoptera exigua G protein-coupled receptor 31 (Se-GPCR31)	MZ501858	NCBI-GenBank	2021
8	Spodoptera exigua G protein-coupled receptor 31 (Se-GPCR31)	MZ501850	NCBI-GenBank	2021
9	Spodoptera exigua G protein-coupled receptor 31 (Se-GPCR31)	MZ501835	NCBI-GenBank	2021
10	Spodoptera exigua G protein-coupled receptor 31 (Se-GPCR31)	MZ501841	NCBI-GenBank	2021
11	Spodoptera exigua G protein-coupled receptor 31 (Se-GPCR31)	MZ501839	NCBI-GenBank	2021
12	Spodoptera exigua G protein-coupled receptor 31 (Se-GPCR31)	MZ501854	NCBI-GenBank	2021
13	Spodoptera exigua G protein-coupled receptor 31 (Se-GPCR31)	MZ501837	NCBI-GenBank	2021
14	Spodoptera exigua G protein-coupled receptor 31 (Se-GPCR31)	MZ501842	NCBI-GenBank	2021
15	Spodoptera exigua G protein-coupled receptor 31 (Se-GPCR31)	MZ501855	NCBI-GenBank	2021
16	Spodoptera exigua G protein-coupled receptor 31 (Se-GPCR31)	MZ501844	NCBI-GenBank	2021
17	Spodoptera exigua G protein-coupled receptor 31 (Se-GPCR31)	MZ501849	NCBI-GenBank	2021
18	Spodoptera exigua G protein-coupled receptor 31 (Se-GPCR31)	MZ501851	NCBI-GenBank	2021
19	Spodoptera exigua G protein-coupled receptor 31 (Se-GPCR31)	MZ501840	NCBI-GenBank	2021
20	Spodoptera exigua G protein-coupled receptor 31 (Se-GPCR31)	MZ501838	NCBI-GenBank	2021
21	Spodoptera exigua G protein-coupled receptor 31 (Se-GPCR31)	MZ501843	NCBI-GenBank	2021
22	Spodoptera exigua G protein-coupled receptor 31 (Se-GPCR31)	MZ501852	NCBI-GenBank	2021
23	Spodoptera exigua G protein-coupled receptor 31 (Se-GPCR31)	MZ501834	NCBI-GenBank	2021
24	Spodoptera exigua G protein-coupled receptor 31 (Se-GPCR31)	MZ501847	NCBI-GenBank	2021
25	Spodoptera exigua G protein-coupled receptor 31 (Se-GPCR31)	MZ501846	NCBI-GenBank	2021
26	파즘나방 전사체	PRJNA834156	NCBI-GenBank	2022
27	Acrolepiopsis sapporensis isolate PLA2A sequence	OQ625511.1	NCBI-GenBank	2023
28	Acrolepiopsis sapporensis isolate PLA2B sequence	OQ625512.1	NCBI-GenBank	2023
29	Acrolepiopsis sapporensis isolate PLA2C sequence	OQ625513.1	NCBI-GenBank	2023
30	Acrolepiopsis sapporensis isolate PLA2D sequence	OQ625514.1	NCBI-GenBank	2023

[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	등록인	등록일	등록 번호		
1	제노랍두스 호미니키아이(Xenorhabdus hominickii)의 세균 대사체를 유효성분으로 하는, 파 검은무늬병을 포함한 식물병 방제용 조성물	대한민국	김용균, 진가현, 따팜호사인	2022.02.23	10-2022-0023327				100	
2	EpOME 알콕사이드 유도체를 유효성분으로 하는 곤충 면역 억제용 조성물과 이를 이용한 곤충 방제방법	대한민국	김용균, 부르스해머	2023.08.22	10-2023-0109605				100	
3	프로모터 치환 기술을 이용한 재조합 곤충병원성 세균과 이의 제조방법 및 용도	대한민국	김용균, 진가현	2023.12.28	10-2023-0194288				100	

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1	√			√		√				
2	√			√		√				
3			√	√		√				

표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 ¹⁾	인증여부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	제안/인증일자
	단체규격	인증	박테리아 유래 펩타이드 표준용액	한국표준과학연구원	한국표준과학연구원	신규	2024.06 예정

* 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.

* 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.

* 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	제노비티	2022.10	고려바이오(주)	-	농업	2년		
2	제노메타	2023.10	고려바이오(주)	-	농업	2년		
KRISS CRM 105-05-007	박테리아 유래 펩타이드 표준용액	2024.06예정/ 2023.06	한국표준과학연구원	CRM 저장시설	GXP 발현 및 GXP 관련 정량	1년		

□ 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	특허	곤충병원세균 제노랩두스 호미니키아이 ANU1 및 이를 이용한 해충방제제	고려바이오(주)	2023.07.10	7,000,000	7,000,000

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자기실시	신제품 개발	국내	제노비티	IBC미생물 제	고려바이오(주)	5,000	-	2023	10
2	자기실시	신제품 개발	국내	제노메타	IBC미생물 제	고려바이오(주)	2,000	-	2023	10

* 1) 기술이전 또는 자기실시

* 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등

* 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
제노비티	2023	5,000	-	5,000	출고가 10,000원×500ea
제노메타	2023	2,000	-	2,000	출고가 10,000원×200ea
합계		7,000	-	7,000	

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과		IBC 미생물제(제노비티, 제노메타)			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2년			
	소요예산(천원)	500,000			
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
		7,000	120,000	340,000	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내	-	-	-
국외		-	-	-	
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		-			
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
		-	-	-	
	수출	-	-	-	

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)			합계
			2021년	2022년	2023	
1	2022학년도 하기 계절제 백마인턴십을 통한 인턴생 채용	한국표준과학연구원	0	1		1
2	미생물표준분석	한국표준과학연구원			1	1
3	유기측정기반	한국표준과학연구원			1	1
4	연구개발제품 판매 활성화	고려바이오			1	1
합계			0	1	3	4

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	0
		생산인력	0
	개발 후	연구인력	4
		생산인력	3

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도	IBC미생물제(제노비티, 제노메타)	-	-	7,000	-	1	-
기대 목표	IBC미생물제(제노비티, 제노메타)	-	-	100,000	-	0.5	-

[사회적 성과]

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	학석사 배출	2023		3	1		3	1			4		

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	지방일간지	경북매일신문	안동대 김용균교수 사이언스지 논문게재	2021.08.09
2	인터넷	SBS스브스뉴스	곤충도 비만이 될까?	2021.11.30

[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)
한국표준과학연구원	회전식 증발 농축기	BUCHI Rotavapor R-100	×	미등록 (3천만원 미만)		2023.04.14.	16,170	211동 208호
한국표준과학연구원	PCR Workstation	PW-21	×	미등록 (3천만원 미만)		2022.06.20.	3,905	211동 211호
한국표준과학연구원	CFX Connect Real-Time PCR System	BR1855201	×	미등록 (3천만원 미만)		2022.05.16.	28,523	211동 211호
한국표준과학연구원	VeritiPro 96W Thermal Cycler	A48141	×	미등록 (3천만원 미만)		2021.06.14.	7,260	211동 211호
한국표준과학연구원	VeritiPro 96W Thermal Cycler	A48141	×	미등록 (3천만원 미만)		2021.06.14.	7,260	211동 211호

* 「과학기술기초법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ <i>Xenorhabdus/Photorhabdus</i> 유래 이차대사물질의 생리활성 검증	○ X/P 유래 GXP 및 EMP 물질의 면역억제 및 살충 효과 발견	100%
○ 세균배양액과 다양한 Bt 균주의 복합 제제 살충효과	○ 대상 해충별 살충력이 높은 선택적 세균+Bt 복합 제제 결정	100%
○ NRPS-PKS 유전자 발현을 조절한 고효율 세균 배양액 생성 기술 개발	○ 세균 프로모터 치환 기술을 통해 NRPS-PKS 유전자 발현 조절하여 세균 배양액 생성 최적화 기술 개발	100%
○ 혼합 세균-세균 및 세균-곰팡이 제형화 기술 개발	○ 제노비티(Xh-Bt) 및 제노메타(Ptt-Mr) 혼합 제형 개발	100%
○ IBC 미생물제제의 유용 생리활성 물질 결정 및 표준 생산 기술	○ GXP 기능 물질의 표준화로 미생물제제 표준 생산 기술 개발	100%
○ IBC 미생물제제의 환경 안정화 기술 개발	○ IBC 미생물제제의 인축 독성 및 환경 안정화	100%
○ 대파 작형별 해충 발생 정보 및 IBC 미생물제 포장 약효 검증	○ 대파 작형별 해충 발생 정보 결정 ○ IBC 미생물제 포장 약효 확인	100%
○ 대파 농가의 IBC 처리제 사용 매뉴얼 제작	○ 대파 농가의 IBC 처리제 사용 매뉴얼 제작	100%

4. 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 제노비티 유기농업자재 공시 미완료 : 제노비티의 꿀벌영향시험 결과, 원인을 알 수 없는 현상(꿀벌 사체에서 미생물 검출)으로 인해 공시 심사에서 탈락하여 꿀벌영향시험 재수행 후 유기농업자재 공시 완료할 예정임.
- 제노메타 유기농업자재 공시 미완료 : 제노메타의 독성시험이 생물시험의 특성상 완료되지 않아 아직 수행 중이며, 완료되는 즉시 유기농업자재 공시 완료할 예정임.

2) 자체 보완활동

- 제노비티 : 고려바이오(주)에서 보유한 비료등록증(토양미생물제제)를 활용하여 제품을 출시 하였으며, 일부 매출이 발생함.

3) 연구개발 과정의 성실성

- 제노비티 : 유기농업자재 공시를 위한 관련 시험들을 수행 완료하여 유기농업자재 공시 신청하였으나, 예상치 못한 문제(꿀벌영향시험에서 꿀벌 사체에서 미생물이 검출된 경우가 없었음)로 인해 공시기관, 농진청 담당자와 여러차례 협의하였으나 의견이 수용되지 않아 유기농업자재 공시를 완료하지 못했음. 꿀벌영향시험의 경우 3월부터 9월까지만 시험이 가능하여 지연되고 있음. 독성시험기관과 긴밀히 협의하여 재시험 진행예정이며, 시험이 완료되는 대로 유기농업자재 공시 신청 예정임.
- 제노메타 : 미생물의 대량배양 설비 문제로 시제품의 개발이 당초 계획보다 다소 늦어짐(당초계획 : 23년 5월, 실제개발완료 : 23년 10월). 이에 따라 유기농업자재 공시를 위해 관련 시험들을 수행하였음. 독성시험의 경우 일반적으로 4~5개월이 소요되어 완료되지 않아 유기농업자재 공시가 완료되지 못했음. 독성시험기관과 긴밀히 협의하여 조속히 완료될 수 있도록 조치 중이며, 시험이 완료되는 대로 유기농업자재 공시 신청 예정임.

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
곤충병원미생물을 이용한 대파 해충 방제 기술	IBC 미생물 작물보호제 개발	안동대학교	대학 (비영리)	235	235	1.000	신규 기술개발	해당 없음	-
	미생물공학과 세균 이차대사산물 생산 표준화 기술 개발	한국표준과학연구원	출연연 (비영리)	275	275	1.000	신규 기술개발	해당 없음	-
	IBC 미생물 작물보호제 산업화 기술 개발	고려바이오(주)	중소기업 (영리)	400	315	0.7875	제품화	①-①	78.75
계				910	825	-	-	-	-

- 대파에 대한 해충 발생 정보가 부재하였다. 본 연구로 대파에 발생하는 6종의 해충에 대한 연중 발생 양상을 파악하게 되었다.
- 파좀나방에 대한 발현 유전체를 최초로 분석하였다. 이 결과는 곧 SCI 논문으로 국제적 인증 받게 된다. 또한 이 유전체 정보는 2단계 연구에 기초 정보로 활용하여 이 해충의 방제 기술 개발 및 방제제의 근본적 과학적 토대를 제공하게 된다.
- 파총채벌레에 대한 생식 기작을 최초로 보고하였다. 국내에 있는 모든 파총채벌레는 암컷이며 이들의 생식은 단성생식의 일종인 thelytoky에 의해 지배된다.

○ 두 종류의 IBC 방제제가 개발되었다. 하나는 파총채벌레에 대한 것으로 곤충병원진균과 Xh 배양액의 혼합물이다. 이 혼합체는 파총채벌레를 친환경적으로 방제하게 한다. 둘째로 Bt와 Xh 혼합체로서 이들이 파밤나방 및 파총채벌레에 대해서 방제효과가 높다는 것을 증명하였다. 이를 제품화하였다.

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내				
		2024	2025	2026	2027	2028
국외논문	SCIE	1				
	비SCIE					
국내논문	SCIE	1				
	비SCIE					
특허출원	국내					
	국외					
특허등록	국내					
	국외					
인력양성	학사					
	석사					
	박사					
사업화	시제품개발	1				
	상품출시	3				
	기술이전					
	공정개발					
	매출액(단위 : 천원)	21,000	40,000	60,000	100,000	120,000
	기술료(단위 : 천원)	630	1,260	1,890	3,150	3,780
비임상시험 실시						
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상				
		2상				
		3상				
	의료기기					
진료지침개발						
신의료기술개발						
성과홍보						
포상 및 수상실적						
정성적 성과 주요 내용						

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서