

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

작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업 2023년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004632-01

# 리모넨 유도체를 유효성분으로 함유하는 식물병 방제제 개발

납본일자 2024. 06. 13.

주관연구기관 / 한국원자력연구원

공동연구기관 / 전남대학교

(재)전주농생명소재연구원

(주)마이크로자임

농림축산식품부  
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “리모넨 유도체를 유효성분으로 함유하는 식물병 방제제 개발”(개발기간 : 2021.04.01. ~ 2023.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

납본일자 2024. 06. 13.

주관연구기관명 :	한국원자력연구원	(대표자) 주한규	(인)
공동연구기관명 :	전남대학교	(대표자) 하준석	(인)
	(재)전주농생명소재연구원	(대표자) 김인태	(인)
	(주)마이크로자임	(대표자) 심영근	(인)

주관연구책임자 : 이성범

공동연구책임자 : 윤철호

이건웅

심영근

국가연구개발혁신법 제17조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서							보안등급							
							일반[√], 보안[ ]							
중앙행정기관명		농림축산식품부		사업명	사업명		작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업							
전문기관명		농림식품기술기획평가원			내역사업명		방제기술 개발							
공고번호		농축2021-85호		총괄연구개발 식별번호										
				연구개발과제번호		RS-2021-IP321102								
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0401	60%	LB0404	30%	LB0304	10%							
	농림식품과학기술 분류	RA0303	60%	RA0203	30%	RA0399	10%							
총괄연구개발명		국문												
		영문												
연구개발과제명		국문		리모넨 유도체를 유효성분으로 함유하는 식물병 방제제 개발										
		영문		Development of composition for plant disease control comprising limonene derivatives as active ingredients										
주관연구개발기관		기관명		한국원자력연구원		사업자등록번호		314-82-00813						
		주소		(34057)대전광역시 유성구 대덕대로 989번길 111		법인등록번호		160122-0000307						
연구책임자		성명		이성범		직위		책임연구원						
		연락처	직장전화		-		휴대전화		-					
			전자우편		-		국가연구자번호		10665584					
연구개발기간		전체		2021. 04. 01 - 2023. 12. 31 (2년 9개월)										
		단계	1단계		2021. 04. 01 - 2022. 12. 31 (1년 9개월)									
			2단계		2023. 01. 01 - 2023. 12. 31 (1년)									
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금		합계		연구개발 비외 지원금				
		현금		현물		지방자치단체		기타( )						
총계		1,100,000	2,500	71,000	-	-	-	-	1,102,500	71,000	1,173,500	-		
1단계	1년차	300,000	0	23,500	-	-	-	-	300,000	23,500	323,500	-		
	2년차	400,000	0	25,000	-	-	-	-	400,000	25,000	425,000	-		
2단계	1년차	400,000	2,500	22,500	-	-	-	-	402,500	22,500	425,000	-		
공동연구개발기관 등		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편		비고		
		전남대학교		윤철호		교수		-		-		공동 대학		
공동연구개발기관		(재)전주농생명소재연구원		이건웅		팀장		-		-		공동 지자체출연연		
		(주)마이크로자임		심영근		대표		-		-		수요 중소기업		
연구개발담당자 실무담당자		성명		이성범		직위		책임연구원						
		연락처	직장전화		-		휴대전화		-					
			전자우편		-		국가연구자번호		10665584					

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

2024년 2월 13일

연구책임자: 이성범 (인)

주관연구개발기관의 장: 한국원자력연구원 주한규 (직인)

공동연구개발기관의 장: 전남대학교 하준석 (직인)

공동연구개발기관의 장: (재)전주농생명소재연구원 김인태 (직인)

공동연구개발기관의 장: (주)마이크로자임 심영근 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

## < 요약 문 >

사업명		작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업		총괄연구개발 식별번호				
내역사업명		방제기술 개발		연구개발과제번호		RS-2021-IP321102		
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB0401	60%	LB0404	30%	LB0304	10%	
	농림식품 과학기술분류	RA0303	60%	RA0203	30%	RA0399	10%	
총괄연구개발명								
연구개발과제명		리모넨 유도체를 유효성분으로 함유하는 식물병 방제제 개발						
전체 연구개발기간		2021. 04. 01 - 2023. 12. 31 (2년 9개월)						
총 연구개발비		총 1,173,500천원 (정부지원연구개발비: 1,100,000천원, 기관부담연구개발비 : 73,500천원)						
연구개발단계		기초[ ] 응용[ ] 개발[√] 기타[ ]		기술성숙도		착수시점 기준(5단계) 종료시점 목표(8단계)		
연구개발과제 유형								
연구개발과제 특성								
연구개발 목표 및 내용		최종 목표		리모넨 유도체를 유효성분으로 함유하는 조성물의 식물병 방제 기술 고도화를 통한 시제품 제작 및 제품의 사업화				
		전체 내용		식물병원균 생장억제 효과가 확인된 리모넨 유도체를 이용하여 현장실증시험을 통한 식물병 방제제를 개발하며, 이온화에너지 /P450 생물전환시스템을 이용하여 식물병원균 생장 억제 효과 가 있는 신규 리모넨 유도체의 발굴 및 구조 동정				
		1단계		목표	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 리모넨 유효성분 조성물의 식물병 방제 기술 고도화</li> <li>▪ 시제품 등록을 위한 기초자료 작성</li> </ul>			
				내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 선행연구에서 효과가 확인된 리모넨 유도체 10종을 이용하여 방제 최적 조합을 선발하고 처리조건을 확립하여 현장평가를 위한 조성물을 개발</li> <li>▪ 리모넨 유효성분 조성물을 이용하여 농가 현장 평가를 시행 (1차 현장 검증)</li> <li>▪ 이온화에너지를 이용하여 리모넨 전구체의 물질구조를 변환시켜 병원균 생장 억제 효능을 가진 신규 리모넨 유도체 후보를 발굴</li> <li>▪ 리모넨 신규 유도체 제조에 활용할 P450 효소를 재설계하고 생물전환용 GRAS 미생물 균주를 개발</li> <li>▪ 선행연구에서 사용하였던 리모넨 유도체 10종 및 신규로 발굴된 리모넨 유도체를 이용하여 원예작물 주요 세균/곰팡이 병의 생장 억제 효과를 검정</li> <li>▪ 리모넨 유도체 조성물을 이용하여 간접접촉(휘발)에 의한 병원균 억제 효능 검정</li> <li>▪ 리모넨 유효성분 조성물의 산업용 대량생산 공정 확립</li> <li>▪ 리모넨 유효성분 조성물의 시제품 1종 개발</li> </ul>			
		2단계		목표	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 수도용 또는 원예시설용 천연 작물보호제 제품 1종 등록 및 매뉴얼 제작</li> <li>▪ 원예작물병 방제용 천연 작물보호제 시제품 1종 제작</li> <li>▪ 등록 제품 마케팅 및 사업화</li> </ul>			

		내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>수도용 및 원예시설용 시제품을 대상으로, 환경 안정성 검정(제품등록 완료)</li> <li>GC-MS 및 NMR 기법을 이용한 신규 리모넨 유도체의 구조동정 및 물질 분석법의 표준화</li> <li>신규 리모넨 유도체 제조에 활용될 GRAS 미생물 균주의 생물 전환 시스템 확립</li> <li>리모넨 유효성분 조성물을 이용하여 원예시설 농가 현장 평가를 시행(2차 현장 검증)</li> <li>신규 리모넨 유도체를 이용한 원예작물 식물병 방제제 시제품 1종 제작</li> <li>농가 보급용 매뉴얼 제작 및 사업화 마케팅</li> </ul>
--	--	----	--

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>이온화에너지 이용 리모넨 유도체의 항균활성 증대 확인</li> <li>P450 효소 이용 신규 리모넨 유도체 3종 발굴</li> <li>리모넨 유도체 단일물질 최적 조합 검증</li> <li>현장 실증 평가 검증 조건 확인</li> </ul>
--------	--

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	리모넨 유도체 등으로 구성된 친환경 식물병 방제제의 실용화를 통해 친환경 농업을 시행하는 농업인에게 실질적인 도움을 주며, 국내 친환경 작물보호제 개발 기업 등에 새로운 제품개발을 위한 아이디어 기술 및 병방제용 천연물 lead compound의 화학구조 정보를 제공함으로써, 지속적 농업 환경 생태계 보전에 기여하고 국내 작물보호 산업의 경쟁력을 높여 원자재 국산화 실현을 기대함
---------------------	---

연구개발성과의 비공개여부 및 사유	-해당사항 없음
--------------------	----------

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
2		4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

국문핵심어 (5개 이내)	리모넨 유도체	식물병 방제	천연물	식물 병원균	바이오활성물질
영문핵심어 (5개 이내)	Limonene Derivatives	Plant Disease Control	Natural Products	Plant Pathogens	Bioactive Compounds

## < 목 차 >

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

별첨 자료

# 1. 연구개발과제의 개요

## ■ 국내 작물보호제 현황 및 필요성

### 가. 작물보호제의 개발

- 인간의 삶을 영위하기 위한 가장 기본적인 항목인 의식주는 필수 불가결한 항목이며, 이를 해결하고 발전시키기 위하여 다양한 기술들을 개발하고 있음
- 특히, 전세대를 아울러 먹는 것을 해결하기 위한 문제는 다른 어떠한 항목들보다 중요하게 여겨졌으며 이를 해결하기 위하여 식물의 재배 환경의 변화 및 과실 등의 대량 생산 등의 방법을 연구 개발하였음
- 재배(육종) 환경 변화를 통하여 선발된 우수한 형질들은 식량 부족의 문제를 해결하고 기후 재해 등의 피해로부터 생산량을 확보하였음
- 그러나, 식물병에 의한 생산량 감소는 식량 확보에 막대한 지장을 주게 되었으며, 식물보호제를 사용하지 않고서는 채소 44%, 곡류 59%, 과수 11%의 낮은 수준으로 출하하는 것으로 알려져 식물보호제 기술개발은 매우 중요한 연구임

### 나. 작물보호제의 분류 및 현황

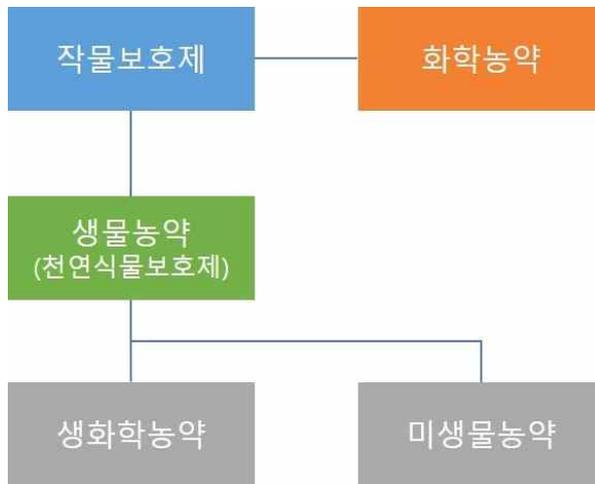
- 작물보호제는 작물 재배 중 유해생물로부터 농작물을 보호하기 위한 약제를 의미하며, 농작물의 생육을 조절하고 병해충의 침입을 막아 농작물의 생산성을 높이는 역할을 함
- 작물보호제는 사용목적에 따라 살균제, 살충제, 살균·살충제, 제초제, 성장조정제, 유인제, 기피제, 전착제로 나눌 수 있으며, 농작물의 보호를 위하여 식물병원균 또는 해충 등 유해한 생물의 침입 시 사용되어 농작물을 보호하게 됨

[천연식물보호제와 화학농약 비교]

구 분	천연식물보호제	화학농약
원료	동물, 식물, 박테리아나 바이러스 및 특정 무기물에서 추출된 성분	인공적으로 합성된 화학물질
사용방법	병해충의 예방적 구제를 위한 사용에 적절 종합 병해충 관리의 일환으로서 다른 방제법과 통합적인 사용에 적절	즉각적이고 강력한 구제를 위한 사용에 적절
비용	개발 비용: 상대적으로 낮음 생산·사용·저장 비용: 높음	개발비용: 높음 생산·사용·저장 비용: 낮음
지속성	지속적인 약효	약효 지속성 낮음
안정성	불인정적 약효(기후, 사용시기 등 다양한 원인으로 인한 영향)	안정적인 약효
독성	독성문제 없음	독성문제 발생
환경호르몬	환경호르몬 문제없음	환경호르몬 약제 보고
생태계영향	목표 대상에게만 영향을 주어 생태계 영향 적음	환경오염 및 생태계 파괴 문제

(출처. 천연식물보호제의 특성과 시장 동향, 2015)

- 이러한 유해생물을 방제하기 위한 유효성분을 포함하는 제품은 보조제로 가공되어 희석살포제(수용제, 수화제, 고상제 등), 직접살포제(미립제, 대립제, 수면전개제 등) 및 특수형태(과립혼연제, 도포제, 마이크로캡슐혼증제 등) 등의 제형이 이루어짐



**[작물보호제의 분류]**

(출처. 식물에서의 살충제 저항성 및 유해성에 따른 천연 식물보호제, 2020)

- 천연식물보호제인 생물농약은 자연에 존재하는 미생물, 식물 등을 추출 또는 원재료로 활용하여 작물보호제로 활용하는 방법으로 환경에 주는 영향이 적고, 잔류 위험이 없음
- 생물농약인 천연식물보호제는 미생물 농약과 생화학농약으로 나눌 수 있으며, 미생물 농약은 특정 병원균 또는 해충에 대하여 방제 기작을 보이므로 화학농약에서 우려되는 환경 위험성 등이 낮음
- 또한 생화학농약은 자연계에서 유래되는 천연화합물을 추출하거나 이용하여 방제하는 방법으로 이를 이용한 기술개발이 많이 연구되고 있음

**다. 친환경 농산물의 비중 증가**

- 위와 같이 다양한 작물보호제를 활용하여 안정적인 농산물을 생산할 수 있게 되었으나, 환경오염 및 생태계 파괴 등으로 국내외 국가들은 작물보호제 중 화학농약에 대한 규제를 강화하고 있음
- 또한, 최근 소비자들은 농산물에 대한 안전성 분야의 관심이 높아져 각종 친환경 농산물에 대한 수요가 증가하고 있음
- 15년에는 친환경 농산물에 대한 인증 중 저농약에 대한 인증이 전면 폐지되고 유기와 무농약으로 개편되면서 친환경농산물인증에 대한 내용이 강화되었음

**친환경농산물출하량**



(출처. 국립농산물품질관리원 친환경 인증관리 정보시스템)

**[연도별 친환경 농산물 출하량]**

## 라. 식물 유래 작물보호제 원천기술 확보 필요

- 친환경 작물보호제의 경우 대부분 미생물을 활용한 제품이 다수 개발되어 활용되고 있으나, 지속성 및 약효, 보관에 대한 문제들로 농가 활용에 어려움을 겪고 있음
- 이러한 친환경 작물보호제 기술 개발에 대한 다른 원료로 식물 유래 물질을 활용한 병원균 방제 방법들이 연구되고 있으며, 일부 상용화가 되어지고 있으나 국내 원천기술 개발이 지속적으로 요구되는 상황임
- 특히, 식물의 2차 대사산물은 과거 불필요한 생성물로 여겨졌으나, 근래에는 식물의 상호작용 및 병해충과 관련되어 있음이 밝혀지고 있음
- 생성되는 2차 대사산물 중 알칼로이드(alkaloid), 페놀(phenol) 및 터펜류(terpenoid) 등은 식물의 생장과 발육에 깊이 관여하고 있는 것으로 보고되고 있음
- 식물의 방어와 상호작용 등에 이러한 이차대사산물들이 영향을 미치고 있으며, 이를 타감작용(allelopathy)이라고 함
- 타감작용은 식물체에서 합성 분비 또는 축적 물질에 따라 나타날 수 있으며, 특정한 식물체 또는 미생물의 성장촉진 및 억제가 일어날 수 있음
- 이와 관련한 타감작용물질(allelochemical)은 식물체 및 미생물의 생장에 관여할 수 있으므로 활용에 따라 천연생물농약(natural pesticide)으로 활용 가능함

## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### 1) 연구개발과제의 수행 과정

본 연구과제는 총 2단계(1년 9개월 + 1년)로 구성되어 있음

단계 구분	수행 연도	단계 목표
1단계	2021.04~2022.12 (1년 9개월)	• 리모넨 유효성분 조성물의 식물병 방제 기술 고도화
		• 시제품 등록을 위한 기초자료 작성
2단계	2023.01~2023.12 (1년)	• 원예작물병 방제용 천연 작물보호제 시제품 1종 제작
		• 수도용 또는 원예작물병 방제용 천연 작물 보호제 제품 1종 등록 및 방제 매뉴얼 제작
		• 등록 제품 마케팅 및 사업화

### 2) 연구개발과제의 수행 내용

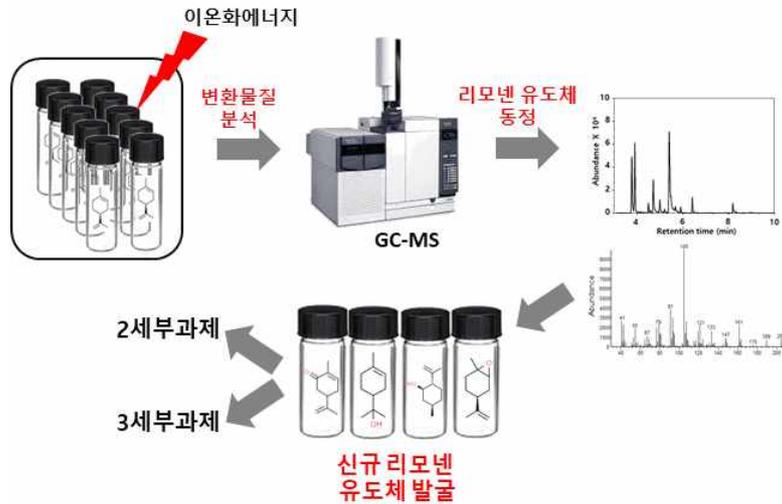
#### ■ 1단계 (2021.04~2022.12)

- ① 후보물질에 따른 방제 최적 조합 선발 및 처리조건 확립
- ② 리모넨 유효성분 조성물의 농가 현장 평가(1차 검증)
- ③ 리모넨 물질구조변환을 통한 신규 후보 유도체 발굴
- ④ 리모넨 신규 유도체 제조에 활용할 P450 재설계 및 GRAS 미생물 균주 개발
- ⑤ 원예작물 주요 세균/곰팡이병 생장 억제 효과 검정
- ⑥ 간접접촉(휘발)에 의한 병원균 억제 효능 검정
- ⑦ 리모넨 유효성분 조성물의 산업용 대량생산 공정 확립
- ⑧ 리모넨 유효성분 조성물의 시제품 1종 개발

#### 가. 주관과제

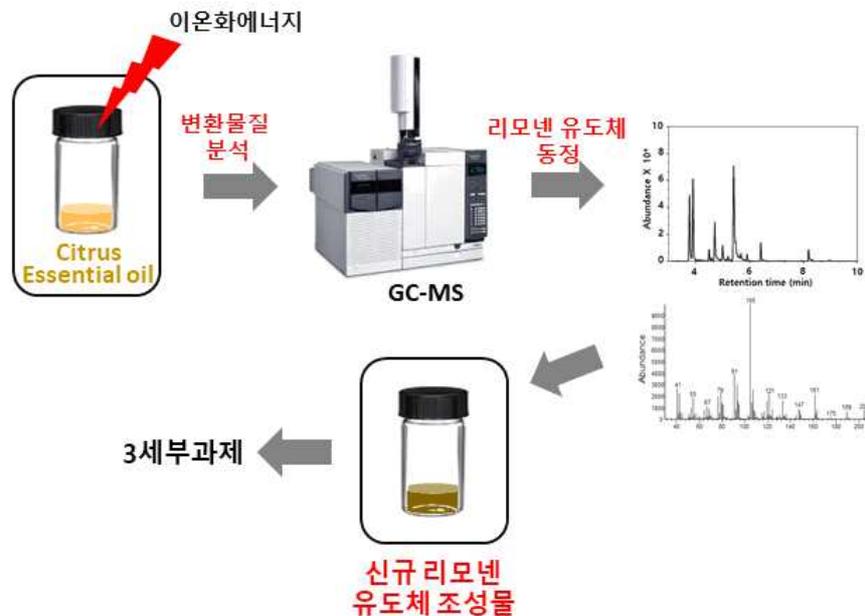
##### (1) 리모넨 유도체 생성을 위한 이온화에너지 물질구조변환 기술 최적화 및 유도체 발굴

- 선행연구를 통해 수도용 세균 및 곰팡이병의 생육 억제 활성이 검증된 총 11종의 리모넨 및 리모넨 유도체[리모넨, L-카베올, S-(+)-카본, R-(+)-카본, (+)-리모넨 산화물, (-)-리모넨 산화물, (S)-(-)-페릴릴 알콜,  $\alpha$ -테르피네올, 카바크롤, (-)-아이소폴렉올, 그리고 (-)-아이소폴렉올]을 대상으로, 새로운 화학구조를 가지는 리모넨 유도체를 발굴하기 위한 이온화에너지 조사(gamma-irradiation) 최적 조건 확립



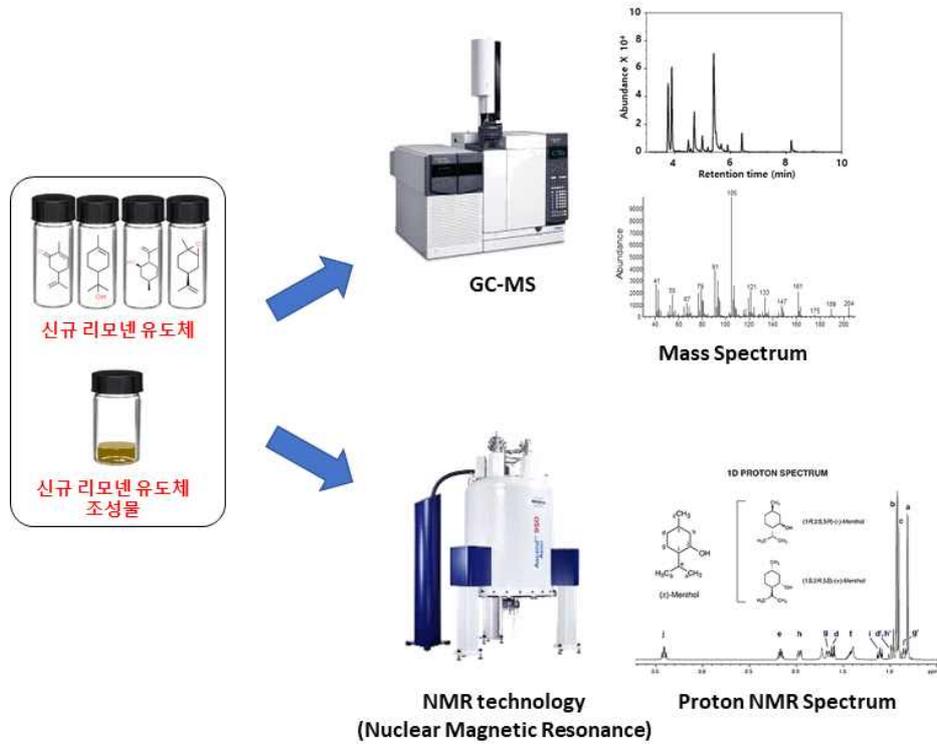
## (2) 시트러스 천연 추출 정유(Citrus essential oil) 대상 이온화에너지 물질 구조변환기술 최적화 및 유도체 발굴

- 리모넨이 70% 이상 주요 성분으로 함유된 시트러스 정유(Citrus essential oil)를 대상으로 이온화에너지를 이용하여 리모넨 유도체 혼합물 제조
- 시트러스 정유는 주성분인 리모넨 이외에도 다양한 리모넨 유도체(카본, 페릴릴 알콜 등)를 이미 함유하고 있으며, 이온화에너지를 가하면 추가적인 새로운 리모넨 유도체가 이온화 반응을 통해 생성



## (3) 이온화에너지/P450 이용 신규 리모넨 유도체 구조 동정

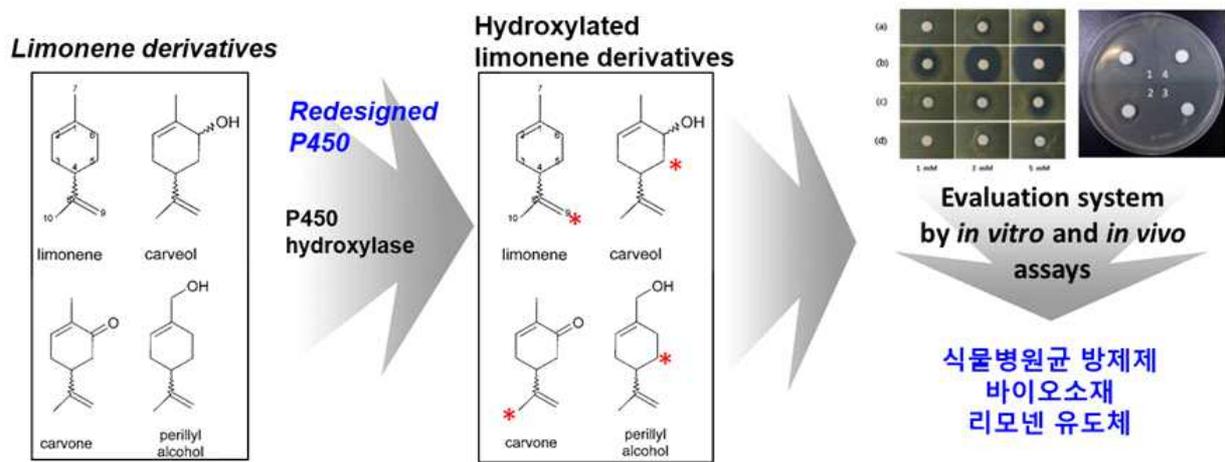
- 신규 물질 구조 동정은 GC-MS를 이용하여 수행할 예정이며, 기존에 보고되어 있지 않은 구조이기에 MS 라이브러리에서 검색이 안 되는 물질의 경우 NMR 분석을 진행할 예정임



## 나. 공동과제 1

### (1) Cyclic monoterpene계 화합물 리모넨 유도체로 히드록실화 대사체/유도체 제조

- 리모넨 화합물을 P450 생촉매와 반응시켜 히드록실화 대사체/유도체 제조, 활성 분석, 화학구조 분석
- 가장 안정한 화학결합인 C-H결합을 P450 효소의 산화반응으로 절단하고 반응성이 높은 hydroxyl group(-OH)을 첨가한 대사체와 유도체를 고농도 고효율로 생산함
- 제조 방법
  - 가) Cyclic monoterpene계 화합물(limonene, carveol, carvone, perillyl alcohol, isopiperitenol)을 P450 효소반응을 통해서 산물(product)를 제조 및 분석: HPLC, LC/MS, NMR
  - 나) 제조한 유도체를 순수 분리하여 식물병원균 성장 저해 효과 검증 : *in vivo* system 활용
  - 다) 높은 방제제 효과를 나타내는 유도체의 구조 분석 및 확인: GC/MS, LC/MS 및 NMR
  - 라) 히드록실화 대사체/유도체를 GRAS 미생물 균주에서 대량 생산하여 식물병원균 성장 저해 활성 검증



## (2) Cytochrome P450 재설계 전략

- 대상 P450 유전자:
  - 미생물 *Bacillus subtilis* 유래 CYP102A2 및 CYP102A3
  - Bacillus megaterium* P450 활용: *Bacillus megaterium* 유래 높은 활성의 phloretin 3-hydroxylase 활성을 가지는 CYP102A1의 돌연변이체
  - 선행연구에서 개발한 파이토케미컬 히드록실화 활성을 가지는 *B. megaterium* 유래 CYP102A1와 *B. subtilis* 유래 CYP102A2와 CYP102A3는 아미노산 서열 수준에서 57-58%의 identity를 나타내므로 3차구조 측면에서는 아주 유사한 구조를 가지고 있고 거의 유사한 active site를 나타냄
  - 선행연구에서 개발한 높은 파이토케미컬 히드록실화 활성을 가지는 *B. megaterium* 유래 CYP102A1의 돌연변이체와 57-58% identity와 77-79% similarity를 나타내므로 CYP102A1의 돌연변이체의 돌연변이된 아미노산 서열과 동일하게 돌연변이를 만들어 template로 사용하고자 함

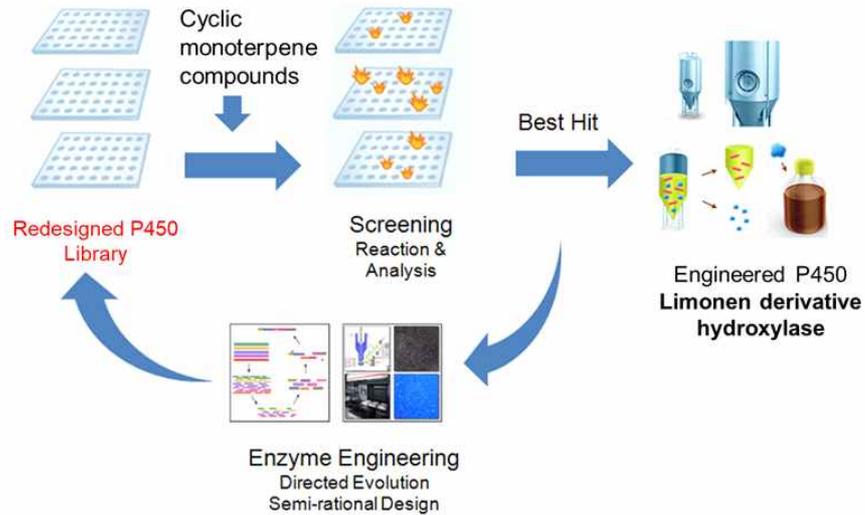
<i>B. megaterium</i> 유래 CYP102A1의 돌연변이체	고활성 부위 돌연변이 서열	Active site 안에 존재하는 돌연변이
A29	R47L/F87V/L188Q/N192K/I401V	R47L/F87V/L188Q
A32	R47L/F87V/L188Q/I254V/D351E	R47L/F87V/L188Q
A33	R47L/F87V/L188Q/P248Q/V281A	R47L/F87V/L188Q
A42	R47L/F87V/L188Q/A335V/Q359R	R47L/F87V/L188Q

- CYP102A2: G48V/F88V/M189Q triple mutant를 library 제작 template로 활용
- CYP102A3: V48V/F88V/S189Q triple mutant를 library 제작 template로 활용

## (3) P450 genome library 제조 전략

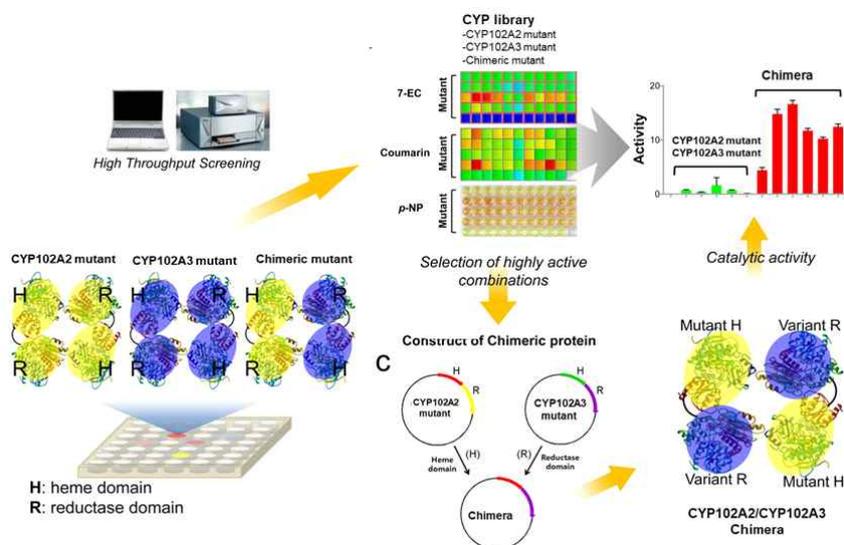
- 대상 P450 유전자:
  - 미생물 *Bacillus megaterium* 유래 CYP102A2, CYP102A3 돌연변이체 사용:
    - CYP102A2: G48V/F88V/M189Q triple mutant
    - CYP102A3: V48V/F88V/S189Q triple mutant
  - Library 제조 방법:
    - Random mutagenesis

- Combinatorial mutagenesis
- Domain shuffling
  - 여러 round를 통해서 높은 활성과 안정성 특성을 갖는 P450 효소 개발
  - 활성측정:
- Chromogenic substrates 활용한 발색 이용: 4-nitrophenol
- Fluorogenic substrates 활용한 형광 이용: coumarin, 7-ethoxycoumarin
- 얻어진 돌연변이체의 리모넨 유도체 히드록실화 활성을 확인하여 활성이 높은 돌연변이체를 히드록실화 유도체 제조에 이용



#### (4) 리모넨 유도체 히드록실화 생산에 활용할 P450 기반 생촉매 개발

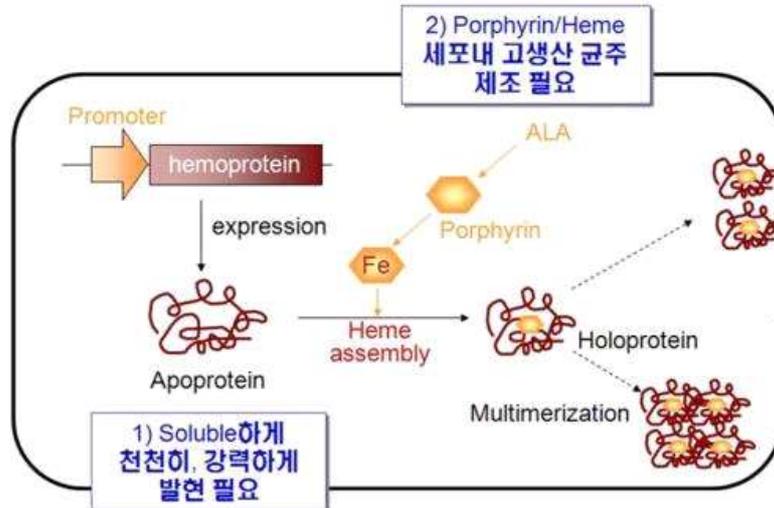
- GRAS 미생물 *Bacillus subtilis* 사용
- P450: *Bacillus subtilis* 유래 CYP102A2, CYP102A3
- Site directed mutagenesis와 directed evolution 방법으로 제조한 CYP102A2 및 CYP102A3 mutants를 직접 활용하거나 CYP102A2 mutant와 CYP102A3 mutant의 chimera 활용
- 이들 P450 유전자를 *Bacillus subtilis*에 발현시켜 whole-cell biocatalyst로 활용



## (5) P450 효소의 미생물 발현, 활성 측정기술, HTS system

- P450 유전자의 대장균에서의 발현, 순수분리, 활성측정, 변이체 효소의 활성분석의 기술은 연구책임자가 이미 보유하고 있음. 따라서 P450 효소가 미생물에 발현되었을 때 필요한 효소 분석 기술이 확보된 상태이므로 쉽게 P450 유전자 확보 기술 및 HTS system을 활용한 초고속 탐색 기술 확립이 가능함
- *Bacillus subtilis* 고발현 시스템들은 총단백질 양의 20-30%까지 발현이 가능하고, 발현하기 어려운 단백질의 고발현에도 사용할 수 있고 발효 최적화를 통해 손쉽고 값싸게 탐색된 효소의 생산이 가능함

## (6) 효소의 발현 system 접근 전략



## 다. 공동과제 2

### (1) 후보물질에 따른 방제 최적 조합 선발 및 처리조건 확립

- 리모넨유도체[리모넨, L-카베올, S-(+)-카본, R-(+)-카본, (+)-리모넨 산화물, (-)-리모넨 산화물, (S)-(-)-페릴릴 알콜, α-테르피네올, 카바크롤, (-)-아이소폴렉올, 그리고 (-)-아이소폴렉올]을 조합하여 수도작물병 방제의 최적조합을 확립하기 위하여 단일 또는 복합물 형태의 조합비를 구성할 것이며, 병원균(세균 및 곰팡이)의 접종 시기에 따른 처리 조건 등의 확립을 위한 시험을 수행할 예정
- 최적 조합 선발 및 처리 조건의 환경 조건은 병원균 억제 활성 평가 전용 컨테이너 및 온실 환경에서 실험을 진행할 것이며, 1) 병원균(세균 및 곰팡이)의 병원성 확인, 2) 병원균 강제 접종 또는 발병 유발을 통한 접종 시기 확립, 3) 병원균 접종 전/후 처리를 통한 활용 가능성 검정 순으로 평가 진행할 예정
- 신규 물질 중에서 활성이 있는 것으로 선발된 물질을 이용하여, 수도작물 주요 병원균과 원예작물 주요 병원균에 대해 강한 성장 억제 활성을 보이는 최적 조합을 도출할 예정임

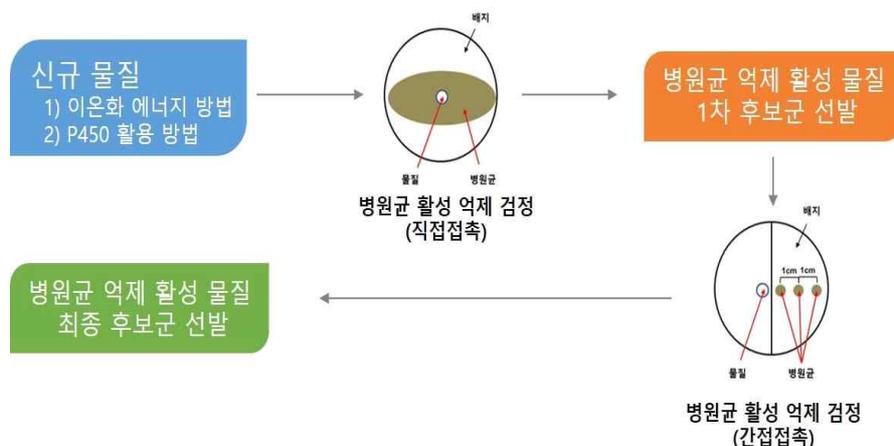
### (2) 신규물질의 주요 세균/곰팡이병 성장 억제 효과 검정

- 주요 병원균(세균 및 곰팡이)의 성장억제 효과를 대치배양법을 통하여 스크리닝할 것이며, 1) 선행연구를 통하여 밝혀진 리모넨 유도체 및 2) 발굴된 신규 물질을 활용하여 병원균의 억제 활성을 검정할 것임

- 신규 물질은 1) 이온화 에너지를 이용하여 구조가 변형된 리모넨 유도체 또는 2) P450을 통하여 생성된 리모넨 유도체로, 수도작물 주요 병원균 또는 원예작물에 주로 발생하는 병원균을 중점으로 하여 활용 가능한 범위를 확립할 것임
- 신규 물질 활성 시험은 병원균의 성장배지에서 물질과 대치배양을 통하여 성장을 억제 또는 투명환(clear zone)의 형성 여부로 판별하여 억제능을 평가할 것이며, 이를 통하여 선발된 물질은 병원균 억제 활성 평가 전용 컨테이너 또는 제약된 공간 내에서 선발 물질을 처리하여 병원균의 억제 활성을 검정할 것임

### (3) 간접접촉(휘발)에 의한 병원균 억제 효능 검정

- 병원균의 억제 효능을 확인하는 방법으로 직접 접촉 방법을 통한 억제능 검정과 휘발성 물질의 특성을 고려한 간접 접촉 방법을 통한 억제능 검정 방법이 있음
- 직접 접촉 방법에서 세균의 경우 1) 액체 배지에 배양된 병원균을 영양배지에 도말한 후 2) Paper disc(8mm)를 올리고 물질을 흡수시킨 후 밀봉하여 병원균 성장 온도에 24~48시간 보관 후 3) Paper disc 주변에 생성되어지는 투명환(clear zone)의 범위를 측정하여 억제능을 평가함
- 곰팡이의 경우 1) 성장된 곰팡이를 cork bore를 활용하여 편칭하여 주고 2) 곰팡이가 성장하는 배지 중앙에 올려놓은 후 3) 일정한 거리를 유지하여 paper disc를 접촉하고 물질을 흡수시킴 4) 억제능은 약 60~72시간 후 paper disc 주변으로 성장하지 못하는 균사체의 억제된 거리를 측정하여 평가함
- 간접 접촉 방법에 있어서는 Biplate를 활용하여 1) 한편에는 paper disc를 위치하고 물질을 흡수시키고, 2) 격벽으로 반대편에는 액체배지에서 배양된 세균 희석액 또는 곰팡이의 경우 포자가 희석된 희석액을 일정량 만큼 떨어뜨리고 간격을 두어 2~3개의 격차로 희석액을 추가로 접종함, 3) 이후 세균과 곰팡이의 배양시간에 맞추어 배양하고 희석액 거리에 따라 병원균의 생장이 억제된 결과를 측정하여 간접 접촉에 의한 효과와 억제능을 평가할 것임



### [신규 물질 병원균 억제 활성 검정 스크리닝 및 후보군 선발 방법]

### (4) 수도용 시제품에 대한 병원균 억제 활성 및 유효 처리 농도 산출

- 공동과제 2에서 제공한 시제품의 직접 혹은 간접 처리 방법을 통한 병원균 억제 활성의 재현성 및 유효 처리 농도를 산출하며, 제품 제형의 상업적 재현성 여부를 확인한 후 최적 생산 공정 설계에 반영함

## 라. 공동과제 3

### (1) 리모넨 유효성분 조성물의 현장 실증 평가(1차 검증)

- 공동과제 2에서 제공한 선행 리모넨 유도체 10종 중 상대적으로 항균력이 우수한 소재를 대상으로 제형화된 시제품 2종 이상을 국립식량과학원 내 위치한 시험포에서 현장 시험을 실시함
- 적용 제형으로는 병증이 노출될 때 활용되어지는 엽면시비용 약제 형태로 식물 침투성 및 목적부위의 약제 잔류성이 우수한 미탁제형으로 실시함.
- 각 시제품의 처리별 개선효과를 비교하기 위해, 제품 처리에 따른 병반 발생 여부 및 방제가를 도출하였고 상용약제 대비 방제가 및 제조 단가 등의 경쟁력을 평가함.

#### [현장 실증 분석 항목]

항목	적용대상	대조구	실험구
방제가(%)	흰잎마름병	무처리구 상용제품	D-limonene 소재 처리
			Carveol 소재 처리
			Carvacrol 소재 처리

### (2) 리모넨 유효성분 조성물의 대량생산 공정 최적화

- 공동연구 2에서 제공한 최적 조합비를 기본으로, 벼도열병 및 벼흰잎마름병 유발 병원균의 현장 서식 환경을 고려한 효과적 제형을 개발함
- 후보 제형으로는 병증이 노출될 때 활용되어지는 1) 엽면 시비용 약제 또는 2) 고농도 항공방제용 약제, 3) 병원성 미생물의 침투를 억제할 수 있는 목적부위에 대한 체류성 약제로 예상됨
- 유도체의 추출이 원활히 진행될 수 있도록 고농도 산업화 추출법을 확립하고, 이를 산업용 단계까지 구현하여, 추출법의 산업적 달성 여부를 판단하며, 각 도출 제형별 가혹경시를 통한 제품의 안전성을 평가하겠음.
- 최종 사업화 1단계에서는 Lab-scale 단계에서 산업화 100L pilot 규모 이상의 생산 구현도를 제시하겠음

### (3) 리모넨 유효성분 조성물의 현장 실증 평가(2차 검증)

- 제3세부에서 제공받을 후속 리모넨 유도체 단독 혹은 복합비를 기본으로 한 최적 제형화 시제품 2종 이상을 수도작 농가에 현장 적용을 실시함
- 후보 제형으로는 병증이 노출될 때 활용되어지는 엽면 시비용 약제 형태로 식물 침투성 및 목적부위의 약제 잔류성이 우수한 미탁제형등으로 예상됨
- 각 시제품의 처리별 개선효과를 비교하기 위해, 비교구, 시험구, 양성대조구(상용제품)의 처리에 따른 시기별 1) 병반 발생 우무, 2) 방제가 산출을 평가함
- 이와 같은 실험과 동반하여, 유기농업자재 공인분석기관에 효능효과실험(현장포장 시험)을 의뢰하여, 공인 시험성적을 발부 받아, 객관적인 현장 방제가를 추가적으로 제시토록 하겠음
- 이를 기반으로 시제품 적용에 따른 농가 현장 처리 실험 및 방제 프로그램 도출을 실시함
- 사용매뉴얼 도출 내용 : 작물별, 장소별, 시기별, 처리 방법별 방제 방법

항목	적용대상	대조구	실험구
방제가(%)	도열병 또는 흰잎마름병	-	방제가 50% 이상 상용제품과 유사 또는 향상
공인 방제가(%)	도열병 또는 흰잎마름병	-	방제가 50% 이상 상용제품과 유사 또는 향상

## ■ 2단계 (2023.01~2023.12)

- ① 천연 작물보호제의 환경 안정성 검정 및 제품 1종 등록
- ② 신규 후보 유도체 구조 동정 및 물질 분석법 표준화
- ③ 리모넨 신규 유도체 제조 활용 GRAS 미생물 균주개발 및 생물전환 시스템 확립
- ④ 신규 리모넨 유도체 이용 식물병 방제제 시제품 1종 개발
- ⑤ 리모넨 유효성분 조성물의 원예시설 농가 현장 실증
- ⑥ 매뉴얼 제작 및 사업화 마케팅

### 가. 주관과제

#### (1) 시트러스 천연 추출 정유(Citrus essential oil) 대상 이온화에너지 물질 구조변환기술 최적화 및 유도체 발굴(2년차 이후 계속)

- 리모넨을 70% 이상 주요 성분으로 함유하는 시트러스 정유(Citrus essential oil)를 대상으로 이온화에너지를 이용하여 리모넨 유도체 혼합물 제조
- 시트러스 정유는 주성분인 리모넨 이외에도 다양한 리모넨 유도체(카본, 페릴릴 알콜 등)를 이미 함유하고 있으며, 이온화에너지를 가하면 추가적인 새로운 리모넨 유도체가 이온화 반응을 통해 생성

#### (2) 이온화에너지/P450 이용 신규 리모넨 유도체 구조 동정(2년차 이후 계속)

- 신규 물질 구조 동정은 GC-MS를 이용하여 수행할 예정이며, 기존에 보고되어 있지 않은 구조이기에 MS 라이브러리에서 검색이 안 되는 물질의 경우 NMR 분석을 진행할 예정임

#### (3) 신규로 발굴된 물질의 분석 표준화

- 이온화에너지/P450 이용 신규 리모넨 유도체의 물질 표준화는 원료의 밸리데이션에 대한 가이드를 참고하여 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 정량한계 등을 분석하여 신규 물질에 대한 표준화를 진행하고 원료의 활용을 위한 분석 방법을 제시할 것임

### 나. 공동과제 1

#### (1) 리모넨 신규 유도체 제조 활용 GRAS 미생물 균주를 이용한 생물 전환 시스템 확립

##### 가) 반응 조건 최적화

- Enzyme refactoring parameters 최적화: cofactor dependence

- Domain reconstitution에 의한 chimeric construction 최적화
- 회수 효율 증가를 위한 요소 최적화: pH, buffer type, salt 효과, cell 농도, 기질 농도, 반응시간
- 막 투과성 조절을 활용한 전세포 반응 효율 증가를 위한 detergent 효과 분석: Tween 80, CHAPS

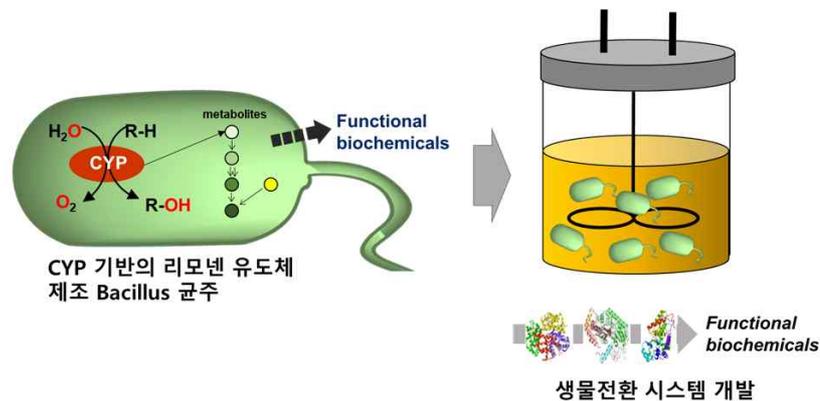
나) 반응 목표치

- Turnover number: 10/min 이상
- 리모넨 유도체 히드록실화 효소 2종: CYP102A2 및 CYP102A3 유래 각 1종

(2) 리모넨 물질구조변환을 통한 신규 유도체 고농도 생산

가) 신기능 리모넨 유도체 히드록실화 효소 반응 최적화

- Total turnover number (생성물/효소) 1,000 이상
- 1 g 이상/3일이내



다. 공동과제 2

(1) 후보물질에 따른 방제 최적 조합 선발 및 처리조건 확립

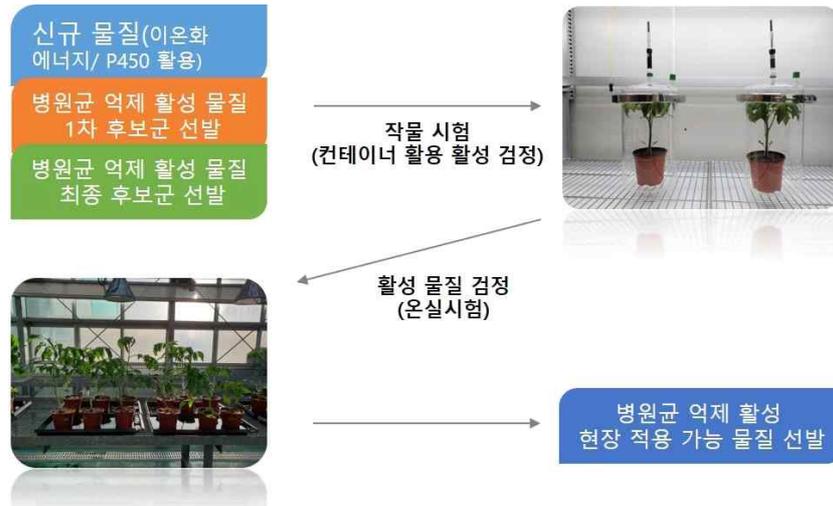
- 신규 물질의 수도작물병 방제와 원예작물 병방제를 위한 최적 조합 및 처리 조건을 확립하기 위하여 신규 물질의 단일 또는 복합물 형태의 조합비를 구성할 것임
- 배지 환경에서 선발되어진 병원균 억제 활성을 갖는 신규 물질의 최적 조합 선발 및 병원균 억제 활성 평가 전용 컨테이너 및 온실 환경에서 실험을 진행할 것이며, 1) 병원균(세균 또는 곰팡이)의 병원성 확인, 2) 병원균 강제 접종 또는 발병 유발을 통한 접종 시기 확립, 3) 병원균 접종 전/후 처리를 통한 활용 가능성 검정 순으로 평가 진행할 것임
- 억제능은 접종된 작물의 병징 정도와 물질 처리된 작물을 대조군과 실험군으로 비교하여 병징 정도 및 범위를 평가하고 측정하여 억제효과를 판별할 것임

(2) 신규 물질의 주요 세균/곰팡이병 생장 억제 효과 검정

- 주요 병원균(세균 또는 곰팡이)의 생장억제 효과를 보이는 신규물질은 온실에서 억제 활성 검정을 통하여 현장평가의 기초자료로 활용할 것이며, 이를 위하여 포트 수준에서 억제 효능을 평가할 것임
- 억제효과를 갖는 신규 물질은 1) 이온화에너지를 이용하여 구조가 변환된 리모넨 유도체 또는 2) P450을 통하여 생성된 리모넨 유도체로 온실 내에서 포트 시험을

통하여 병원균 억제 효과를 검정할 것이며, 병원균의 접종 후 처리 또는 처리 후 접종을 통하여 효과를 분석할 것임

- 억제 효과는 병원균만 접종된 작물을 대조군으로 하여 물질이 처리된 실험군에서 병징의 발생 여부 및 범위를 측정하여 활성을 평가할 것임
- 온실 시험은 실험 반복 당 6포트 이상을 대상으로 진행할 것이며, 온실시험의 범위는 신규 물질의 선발수를 고려하여 반복수를 확립하고 수행할 것임



[컨테이너 및 온실을 활용한 병원 억제 효과 활성 검정]

### (3) 최종 시제품에 대한 병원균 억제 활성 및 유효 처리 농도 산출

- 수도용, 원예시설용 시제품의 병원성 균체의 생장억제 효과 및 간접접촉(휘발) 분석법을 활용한 대상 병원균의 억제 활성 재현성 및 유효 처리 농도를 산출하여, 최종 제품 제형의 상업적 재현성 여부를 확인함
- 또한 시제품을 적용한 온실 내에서의 포트 실험을 통한 작물 검정 실험을 병행토록 함

## 라. 공동과제 3

### (1) 원예시설 방제용 조성물의 제형 및 대량생산 공정 최적화

- 본 과제에서 사용될 리모넨과 그 유도체를 포함하는 추출물의 경우, 잔류농약 분석 및 유효성분 분석을 통해 원료의 Q/C를 검증하는 체계를 구축함
- 공동과제 2에서 제공한 최적 조합비를 기본으로, 주요 원예작물 별 병원균에 대한 방제 효과를 극대화할 수 있는 다양한 제형을 재배 여건을 고려하여 개발함
- 후보 제형으로는 1) 토양 내 잔류 병원균의 밀도를 저감할 수 있는 토양 시비용 분말제 2) 작물 내 병원성 균체의 침입 시 이를 억제할 수 있는 식물 침투성 제형, 3) 병반의 발현 시 병원성 미생물의 농도를 줄일 수 있는 경엽 처리제 등이 있음
- 또한 유도체의 추출이 원활히 진행될 수 있도록 고농도 산업화 추출법을 확립하고, 이를 산업용 단계까지 구현하여, 추출법의 산업적 달성 여부를 판단하며, 토양시비용 자제의 경우 보존력이 우수한 분말 건조 제형을 확립하고 가혹시험을 통한 원말에 대한 제품 품질인증을 진행할 예정임
- 최종 Lab-scale 단계에서 산업화 100L pilot 규모 이상의 생산 구현도를 제시하겠음

## (2) 원예시설에 대한 농가현장평가

- 2단계에 주관과제에서 발굴될 후속 리모넨 유도체 및 공동과제 1에서 개발될 신규 리모넨 생성 균체의 시제품을 생산하도록 함
- 이를 신속히 현장에 적용하여, 추가 후보물질들의 방제효율 도출의 재현성을 세부 기관 및 협력기관에서 평가하고, 이를 기반으로 후속 리모넨 유도체 물질의 유기농 업자재 후보물이 과제 기간 내 도출될 수 있도록 함
- 조사 내용: 약제의 약해 평가, 병반 확인 및 방제가 도출, 최종 수확량 개선 효과 등
- 이를 기반으로 시제품 적용에 따른 농가 현장 처리 실험 및 방제 프로그램 도출을 실시함
- 사용매뉴얼 도출 내용: 작물별, 장소별, 시기별, 처리 방법별 방제 방법

### [현장 실증 분석 항목]

항목	적용대상	대조구	실험구
방제가(%)	향후 선발될 원예시설	-	대조구 대비 50% 이상
약해평가(유/무)	적용 대상 병원균체	-	약해 발생 없음
수확량 개선(%)	인위접종 작물체	-	대조구 대비 20% 이상

## (3) 리모넨 유효성분 조성물의 산업용 대량생산 공정 확립

- 연구개발 2단계에서 도출되는 공동과제 1의 신규 균체에 대한 최적 생육용 배지를 개발하고, 리모넨 유도체 생산 최적화용 공정을 확립함
- 단위 시간별 리모넨 유도체를 전환할 수 있는 최적 생장 및 전환 최적화 배지를 개발하며, 최종 리모넨 유도체 함량 최적화를 기본으로, Lab < 5L < 100L < 1ton < 5ton 규모의 pilot scale up 단계를 진행하여, 산업용 생산 재현성을 확보하겠음
- 상업적 생산 최적화 공정에 있어, Bacillus 계열인 유도체 생성 균주의 17hr 이내의  $1.0 \times 10^9$  Cfu/mL 이상의 균체밀도를 형성하고, 배양물 내 히드록실화 효소 다량 생성을 촉진한 후 본 효소의 최적 활성화 공정을 추가로 도입하여, 전환되는 전구 물질 대비 80% 이상의 리모넨 유도체 생산을 목적으로 함
- 또한 연구개발 1단계에서 도출된 유기농업자재의 생산 환경인 100L 이상인 Pilot 생산 조건에서 리모넨 유도체의 물질 함량 최적화 생산 공정을 도출하겠음
- 이와 같은 목표는 리모넨 유도체의 유효물질 농도 및 균체의 수율 등에 대한 공인 시험기관의 시험성적으로 달성도를 객관적으로 제시토록 하겠음

## (4) 리모넨 유효성분 활용 천연 작물보호제 제품화

- 도출된 수도용 혹은 원예시설용 시제품 1종에 대한 유기농업자재 등록을 함
- 약해실험의 경우, 수도 혹은 원예작물을 포함한 작물 5종에 대한 본제 처리 후 약해여부를 평가하며, 0-5단계가 있음(0에 가까울수록 작물에 해가 없음을 나타냄)
- 약효 실험의 경우, 고시기관의 모사환경의 생물검정 실험을 통해 병해에 대해 방제효율을 평가하며, 현행 도열병의 방제가 기준인 50-60% 수준, 원예 병원성 미생물의 경우 현행 방제와 동일 혹은 그 이상의 방제가가 구현될 수 있도록 목표를 설정하고, 제품을 고시하겠음
- 생태독성 평가의 경우, 유기농업자재 관리법령인 “친환경 농어업 육성 및 유기식물등의 관리 및 지원에 관한 법률”에 의거 피부자극성, 안점막 자극성, 급성 경

구 독성시험, 급성 경피 독성시험, 담수 어종 독성시험 + 꿀벌 독성등을 수행하여야 하며, 유기농업자재의 경우 LD50이 100mg/kg 이상에 준하여야 함

- 잔류농약 분석, 병원성 미생물 분석 및 이화학 분석(유효물질 분석) 등이 있으며, 유기농업자재 관련 법령에 근거하여 적합한 제품 등록하겠음

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

---

#### 가. 주관과제

##### (1) 리모넨 유도체 생성을 위한 이온화에너지 물질구조변환 기술 최적화 및 유도체 발굴

###### 가) 실험 목적

- 선행연구를 통해 수도용 세균 및 곰팡이병의 생육 억제 활성이 검증된 총 11종의 리모넨 및 리모넨 유도체[리모넨, L-카베올, S-(+)-카본, R-(+)-카본, (+)-리모넨 산화물, (-)-리모넨 산화물, (S)-(-)-페릴릴 알콜,  $\alpha$ -테르피네올, 카바크롤, (-)-아이소폴렉올, (-)-아이소폴렉올]를 대상으로 이온화에너지 물질구조변환 최적 조건 탐색 및 신규 유도체를 발굴하고자 함
- 1차년도(2021년)에는 5종[리모넨,  $\alpha$ -테르피네올, L-카베올, S-(+)-카본, R-(+)-카본], 2차년도(2022년)에는 6종[(+)-리모넨 산화물, (-)-리모넨 산화물, (S)-(-)-페릴릴 알콜, 카바크롤, (-)-아이소폴렉올, (-)-아이소폴렉올]을 대상으로 이온화에너지 조사(gamma-irradiation)를 통해 리모넨 유도체의 방사선 물질구조변환 최적 조건 확립을 통해 <공동과제 2>와 연계하여 주요 식물병원균들에 대한 항균 효과를 검증하고자 함

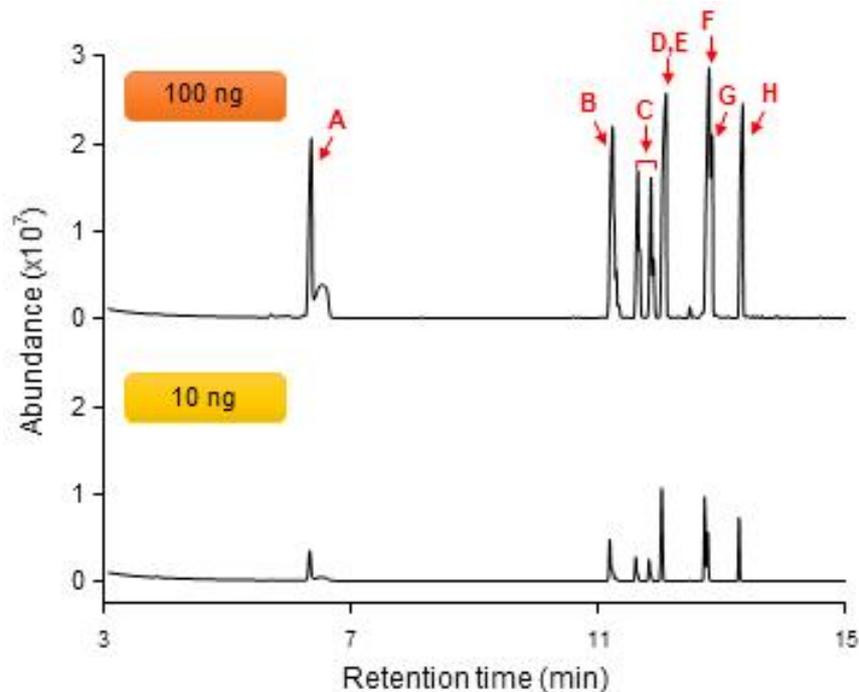
###### 나) 실험 재료 및 실험 방법

- 유도체 확보 : 11종[리모넨, L-카베올, S-(+)-카본, R-(+)-카본, (+)-리모넨 산화물, (-)-리모넨 산화물, (S)-(-)-페릴릴 알콜,  $\alpha$ -테르피네올, 카바크롤, (-)-아이소폴렉올, (-)-아이소폴렉올]을 시그마 업체에서 구입, 지식재산권 보호를 위해 유도체명은 알파벳으로 대체함
- 방사선 조사를 위한 시료 준비 및 조사 조건
  - 시료 준비 : 유도체들은 5종[에탄올, 메탄올, 에틸 아세트산, 헥산, 클로로포름]의 유기용매에 각각 희석하여 감마선 조사, 지식재산권 보호를 위해 용매명은 로마숫자로 대체함
  - 감마선 총선량 : 100, 1k, 10k, 20kGy (4시간)
  - 조사 시료는 GC-MS 장비(GCMS-7890A/5975C)를 이용하여 분석
- 크로마토그램(GC) 분석 조건
  - column : DB-5MS (0.25mm i.d.×30m length, 0.25  $\mu$ m film thickness)
  - carrier gas : helium
  - flow rate : 1 mL/min
  - oven temperature : 80° C (3 min hold)  $\rightarrow$  3° C/min  $\rightarrow$  100° C  $\rightarrow$  20° C/min  $\rightarrow$  180° C  $\rightarrow$  60° C/min  $\rightarrow$  300° C (3 min hold)
  - injection temperature : 250° C
  - transfer line temperature : 280° C
- 질량 스펙트럼(MS) 분석 조건
  - ionization potential : 70 eV
  - scan range : 40 - 600 amu
  - source temperature : 230° C

- quadrupole temperature : 150° C
- 물질구조변환된 대사체 분석
  - 구조변환된 대사체는 분석 프로그램(Mass spectrometry program version 2.3)을 이용하였으며, 대사체 동정 분석은 2종 라이브러리(Wiley 12th Edition libraries, National Institute of Standards and Technology (NIST) 2020 Mass Spectral libraries)를 통해 대사체를 분류함

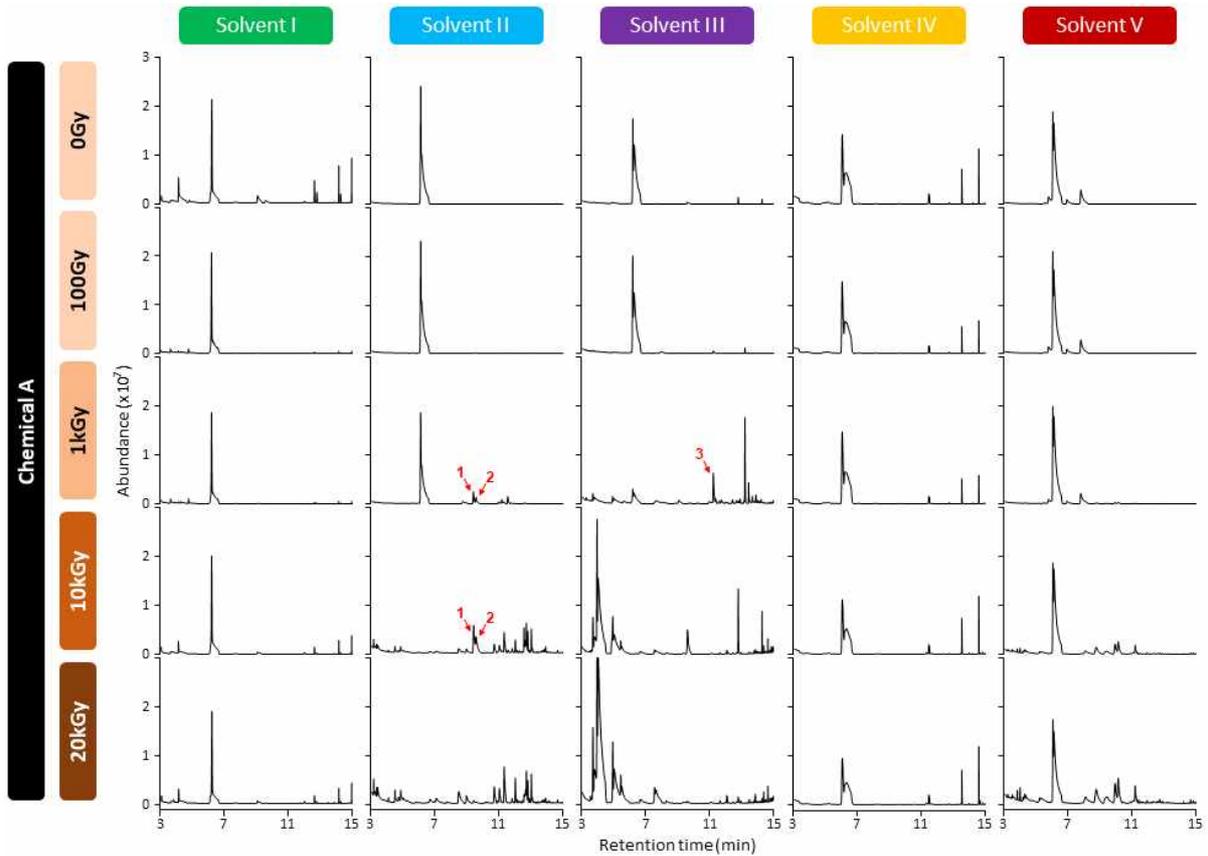
다) 실험 결과

- 유도체의 농도별 GC-MS 분석
  - 유도체들의 GC-MS 분석을 위한 최적의 농도를 확인하기 위해 우선적으로 에탄올을 이용하여 100 ng/μl 및 10 ng/μl 농도로 GC-MS 분석을 수행함
  - 분석 결과, 8종 유도체(2021년도 5종 수행 완료)의 10 ng/μl 농도는 peak의 abundance 값이 낮음을 확인하였고, GC-MS 분석을 위해서는 100 ng/μl의 농도가 최적임을 확인함

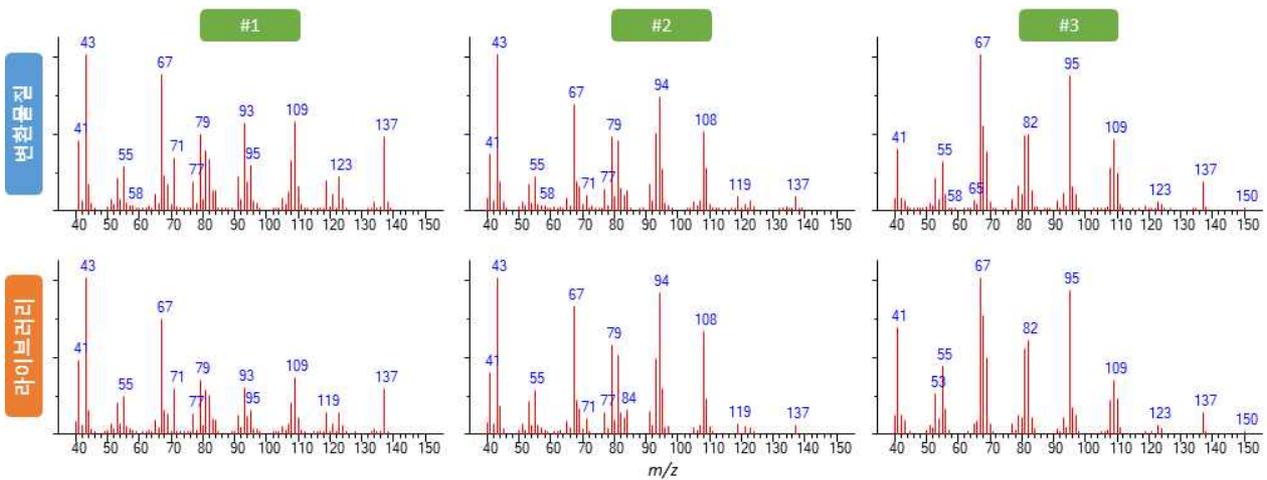


[8종 유도체의 최적 분석 조건 확립을 위한 크로마토그램 결과]

- 용매 및 감마선 선량별 처리 후 물질구조변환 패턴 분석
  - 유도체 A의 크로마토그램 분석 결과 : 유도체 A는 용매 II에서 10kGy 및 20kGy의 감마선에 의해 대부분의 유도체가 다른 물질로 변환됨을 보임. 용매 III에서는 1kGy 이상에서 다른 물질로 변환되었으며, 용매 V에서는 20kGy에서 일부 유도체 A가 다른 물질로 변환됐지만, 용매 I 및 용매 IV에서는 큰 변화를 보이지 않음
  - 질량 스펙트럼 분석 결과 : 용매 II에서는 2종의 변환된 리모넨 유도체(#1, RT=9.5; #2, RT=9.6)가 생성되었으며, 용매 III에서는 1종의 리모넨 유도체(#3, RT=11.2)가 생성됨을 확인함

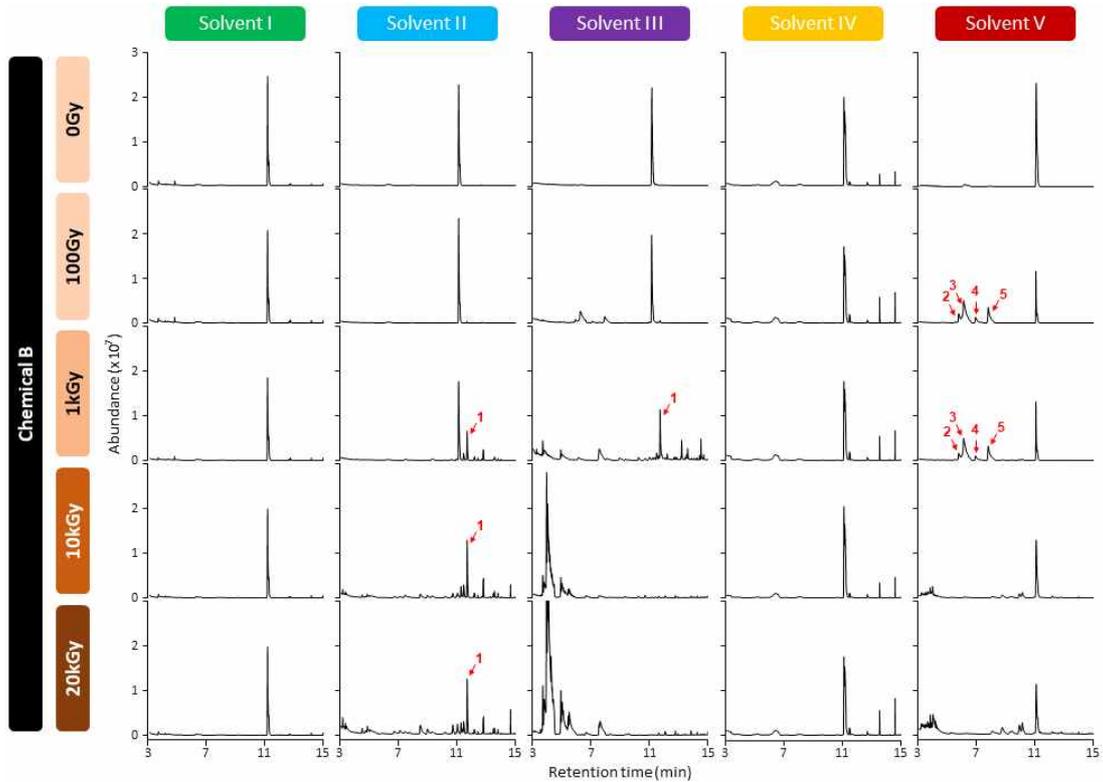


[유도체 A의 용매 및 감마선 선량에 따른 물질 변환 패턴 분석 결과]

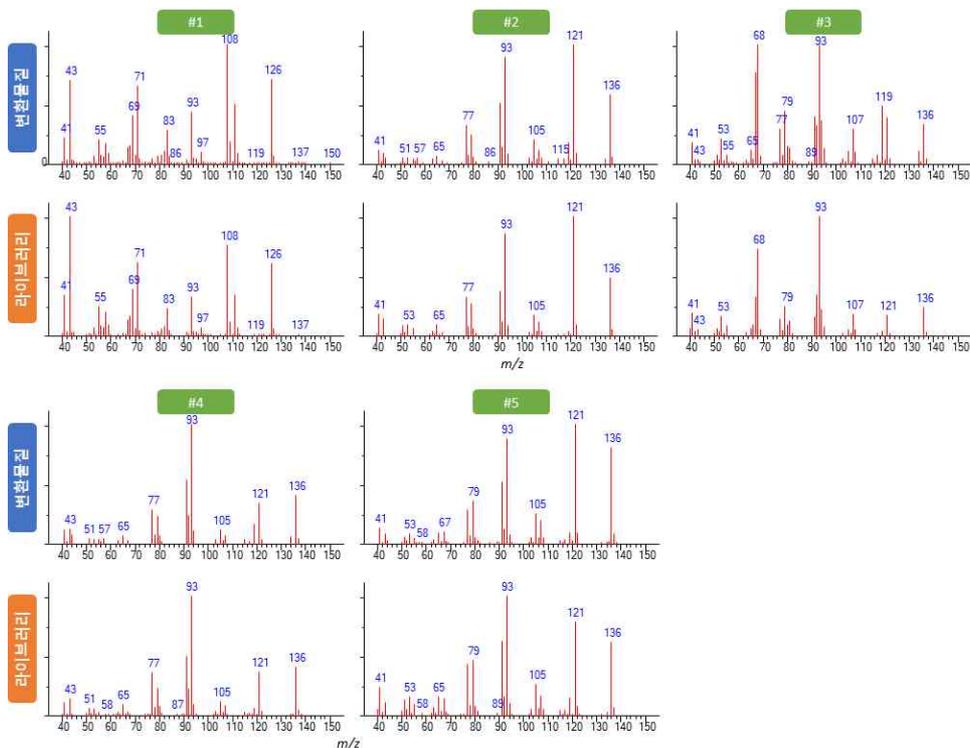


[유도체 A로부터 변환된 물질의 질량 스펙트럼 분석 결과]

- 유도체 B의 크로마토그램 분석 결과 : 유도체 B는 용매 II에서 1kGy 및 10kGy, 20kGy의 감마선에 의해 다른 물질로 변환됨. 용매 III에서는 1kGy 이상에서 물질 구조변환되었으며, 용매 V에서는 100Gy와 1kGy에서 생성된 물질들이 10kGy와 20kGy에서 분해되었음. 용매 I 및 용매 IV에서는 큰 변화를 보이지 않음
- 질량 스펙트럼 분석 결과 : 용매 II 및 용매 III에서는 각각 1종의 변환된 리모넨 유도체(#1, RT=11.7)가 생성되었으며, 용매 V에서는 4종의 리모넨 유도체(#2, RT=5.8; #3, RT=6.2; #4, RT=7.0; #5, RT=7.8)가 생성됨



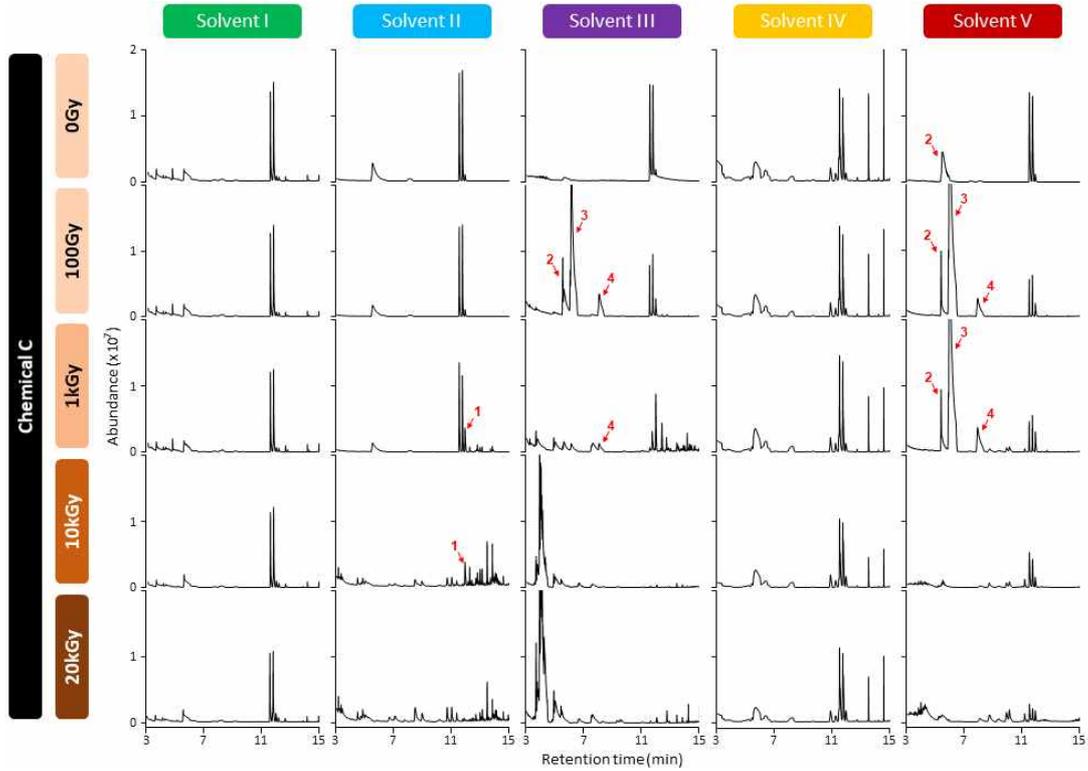
[유도체 B의 용매 및 감마선 선량에 따른 물질 변환 패턴 분석 결과]



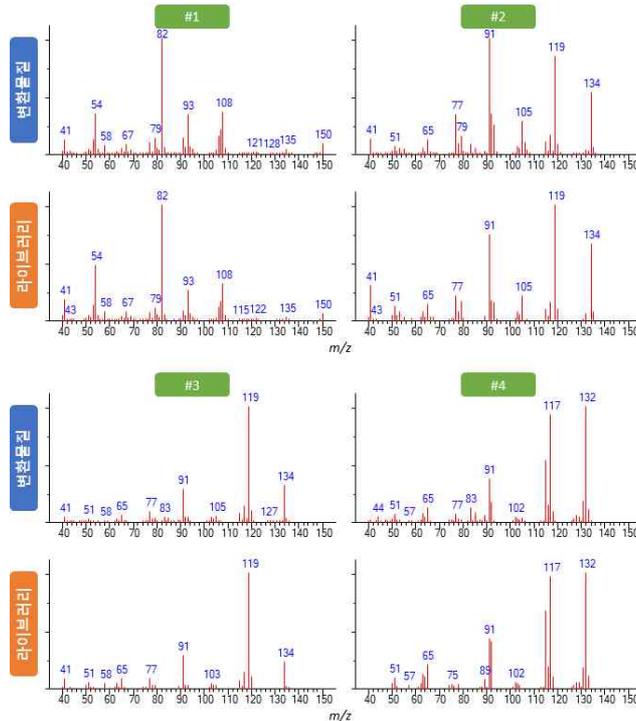
[유도체 B로부터 변환된 물질의 질량 스펙트럼 분석 결과]

- 유도체 C의 크로마토그램 분석 결과 : 유도체 C는 용매 II에서 1kGy 및 10kGy, 20kGy의 감마선에 의해 구조변환됨. 용매 III에서는 100Gy에서 생성된 물질들이 1kGy 이상에서 분해되는 패턴을 보였고, 용매 V에서는 100Gy와 1kGy에서 생성된 물질들이 10kGy와 20kGy에서 분해되었음. 용매 I 및 용매 IV에서는 큰 변화를 보이지 않음
- 질량 스펙트럼 분석 결과 : 용매 II에서는 1종의 리모넨 유도체(#1, RT=12.0)가 증가함을 보이며, 용매 III 및 용매 V에서는 각각 3종의 리모넨 유도체(#2,

RT=5.6; #3, RT=6.1; #4, RT=8.1)가 생성 또는 함량이 증가됨

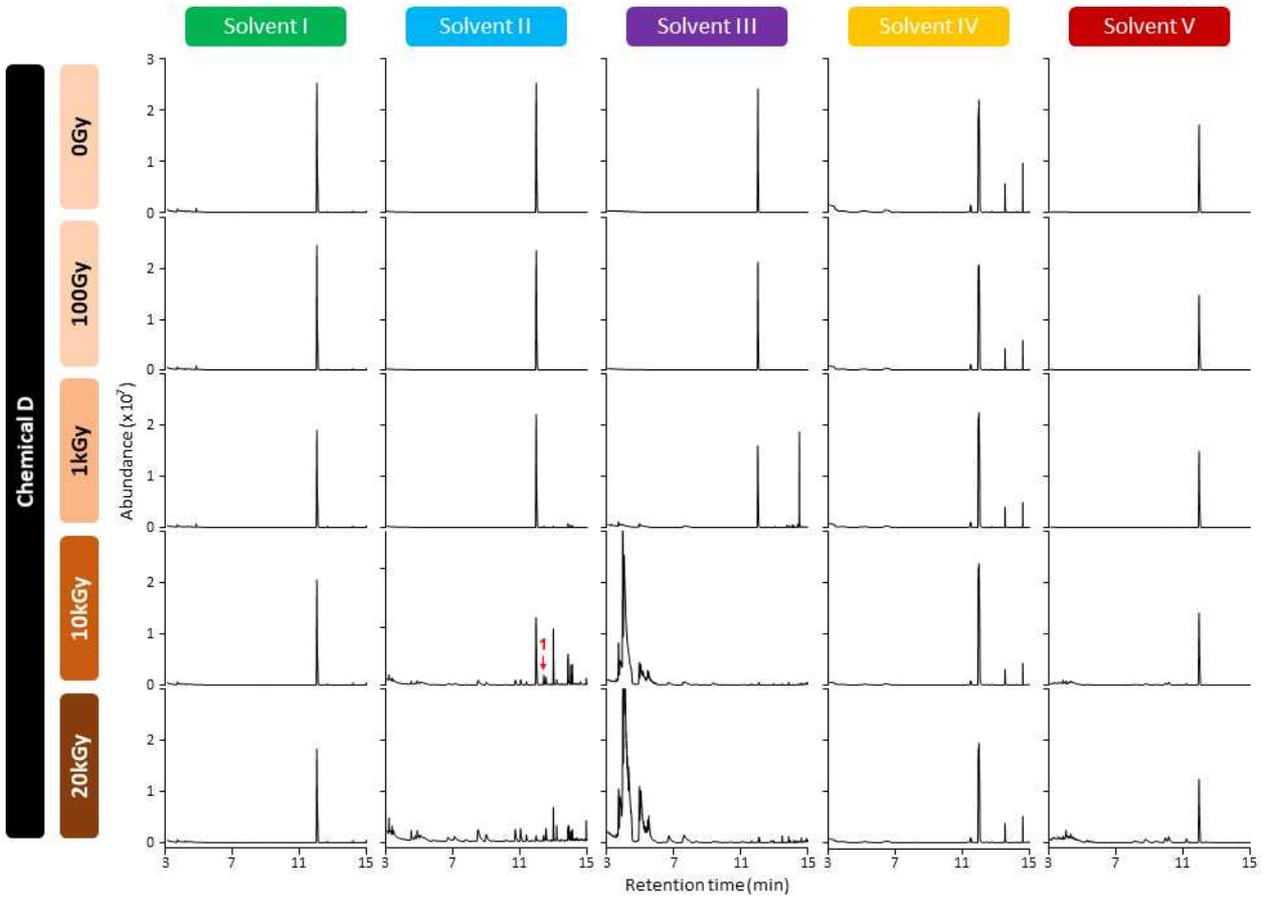


[유도체 C의 용매 및 감마선 선량에 따른 물질 변환 패턴 분석 결과]

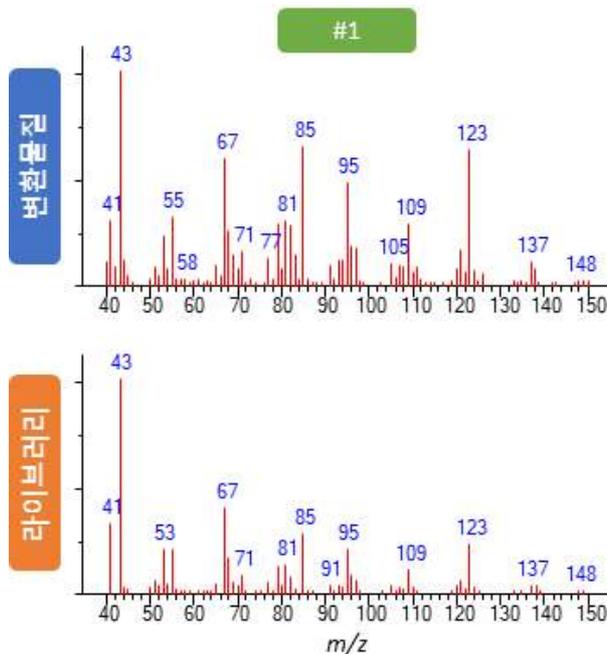


[유도체 C로부터 변환된 물질의 질량 스펙트럼 분석 결과]

- 유도체 D의 크로마토그램 분석 결과 : 유도체 D는 용매 II에서 10kGy 및 20kGy에 의해 다른 물질로 변환됨을 보임. 용매 III에서는 10kGy 이상에서 분해됨을 확인함. 용매 I 및 용매 IV, 용매 V에서는 큰 변화를 보이지 않음
- 질량 스펙트럼 분석 결과 : 용매 II에서만 1종의 리모넨 유도체(#1, RT=12.5)를 생성함



[유도체 D의 용매 및 감마선 선량에 따른 물질 변환 패턴 분석 결과]

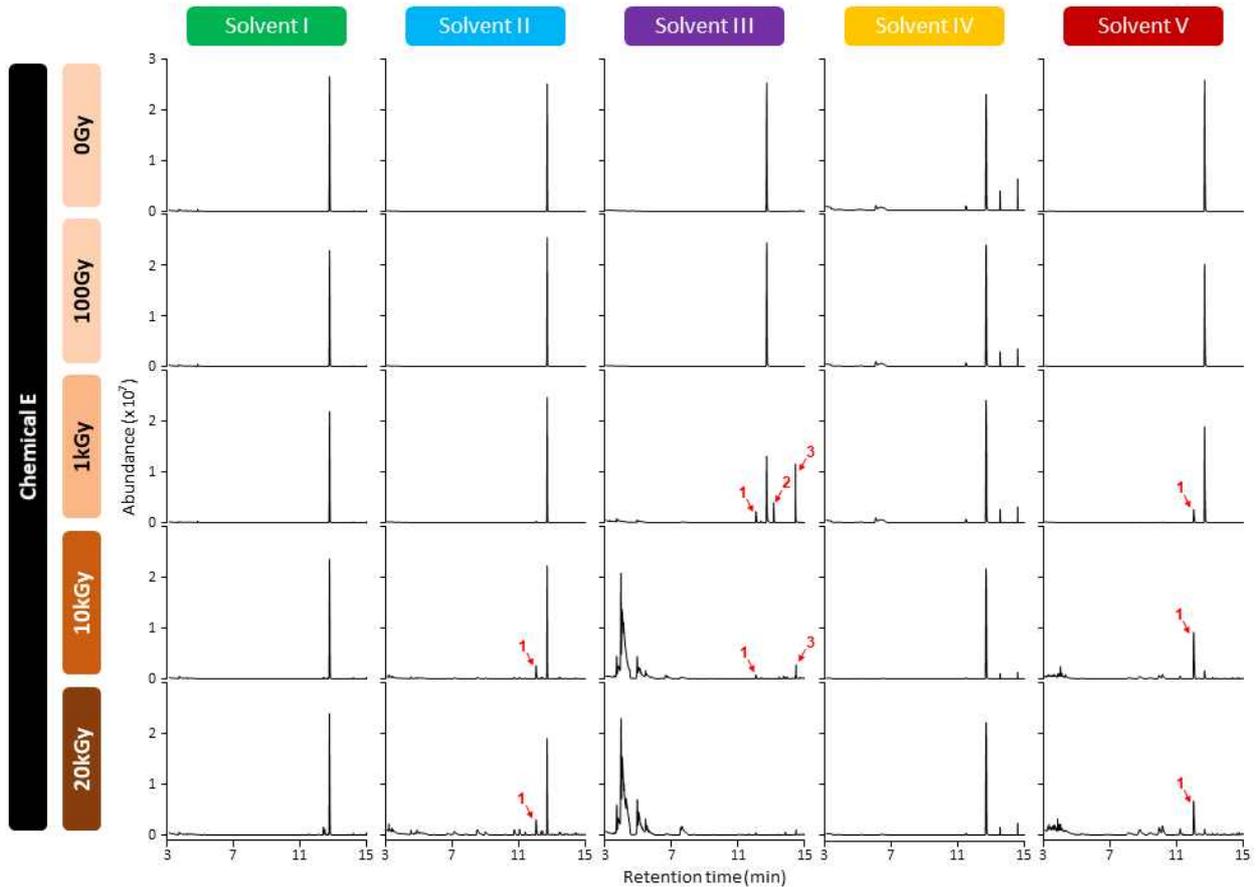


[유도체 D로부터 변환된 물질의 질량 스펙트럼 분석 결과]

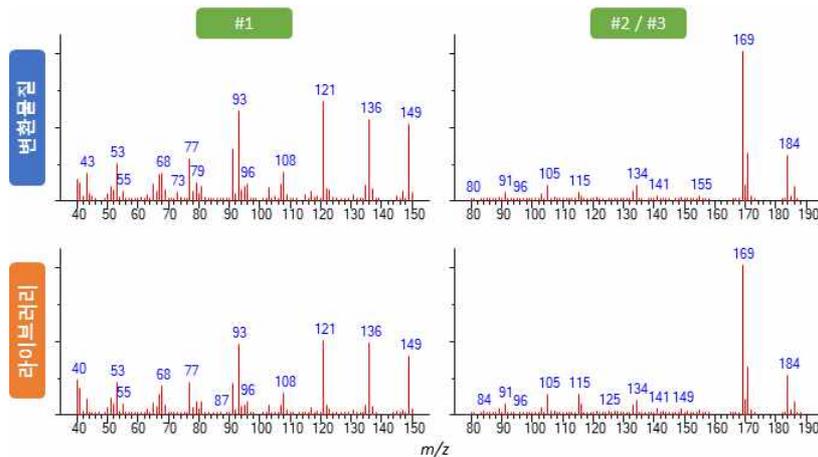
- 유도체 E의 크로마토그램 분석 결과 : 유도체 E는 용매 II에서 10kGy와 20kGy의 감마선에 의해 구조변환됨. 용매 III에서는 1kGy 이상에서 다른 물질로 변환되지만, 10kGy와 20kGy에서는 분해되는 패턴을 보임. 용매 V에서는 1kGy 이상에서 변환된 물질을 나타냄. 용매 I 및 용매 IV에서는 큰 변화를 보이지 않음
- 질량 스펙트럼 분석 결과 : 용매 II 및 용매 V에서는 각각 1종(#1, RT=12.1)의 변환된 터핀류의 물질이 생성되었으며, 용매 III에서는 3종(#1, RT=12.1; #2,

RT=13.1; #3, RT=14.4)이 생성됨

- 참고사항 : 용매 III의 구조변환유도체 2(RT=13.1) 및 구조변환유도체 3(RT=14.4)은 질량 스펙트럼 분석에 의해 다른 시간대에서 같은 물질로 분석되었으며, 이후 표준시료를 이용하여 정확한 물질을 구분 가능할 것으로 사료됨



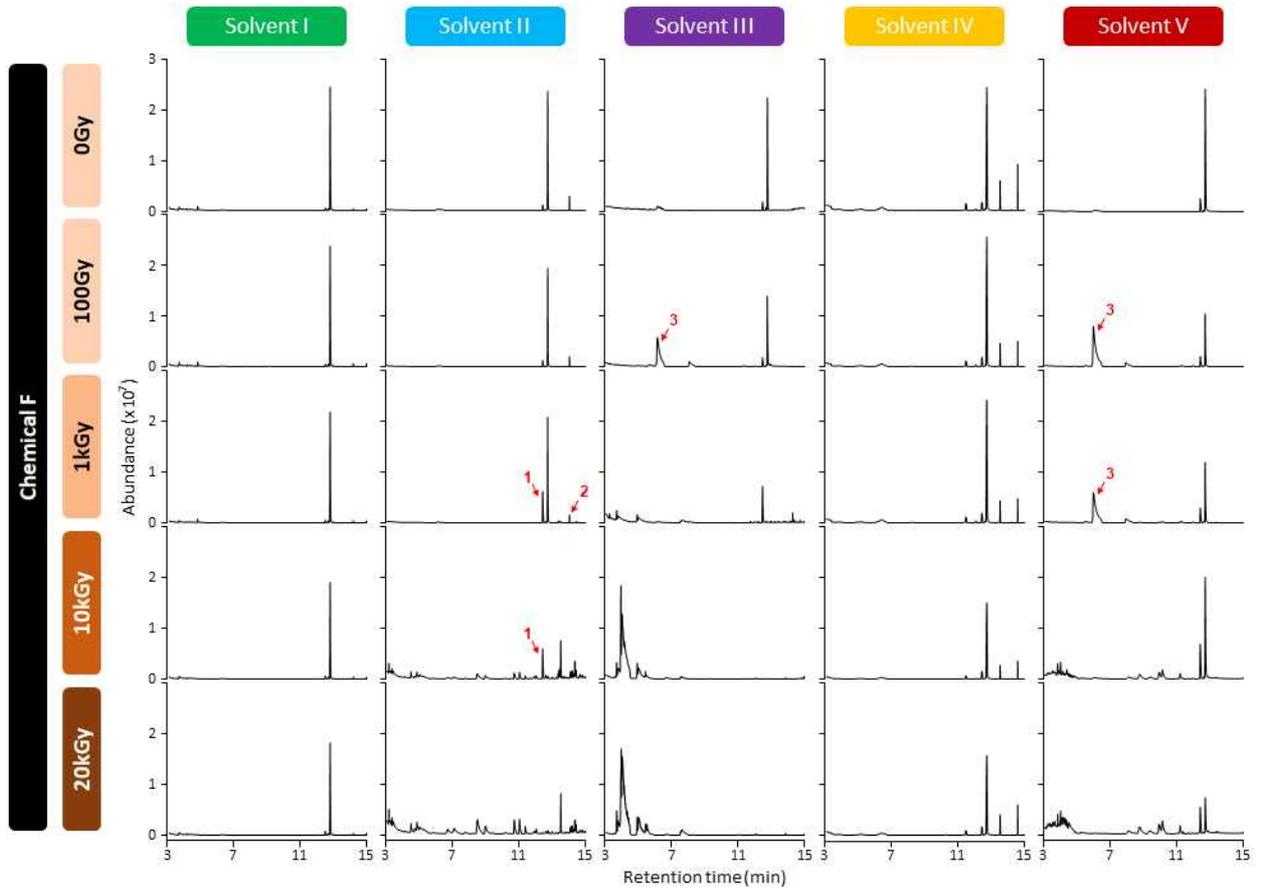
[유도체 E의 용매 및 감마선 선량에 따른 물질 변환 패턴 분석 결과]



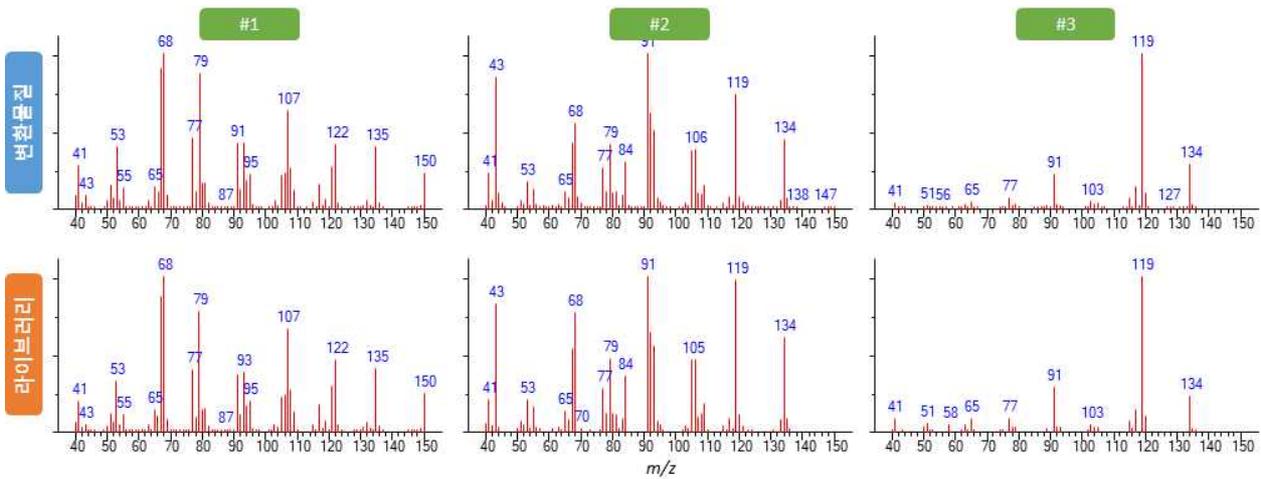
[유도체 E로부터 변환된 물질의 질량 스펙트럼 분석 결과]

- 유도체 F의 크로마토그램 분석 결과 : 유도체 F는 용매 II에서 1kGy 이상에서 다른 물질로 변환됨을 보임. 용매 III에서는 100Gy 이상에서 다른 물질로 변환되었지만, 10kGy와 20kGy에서는 분해되는 양상을 보임. 용매 V에서는 100Gy와 1kGy에서 생성된 물질들이 10kGy와 20kGy에서 분해되었음. 용매 I 및 용매 IV에서는 큰 변화를 보이지 않음
- 질량 스펙트럼 분석 결과 : 용매 II에서는 2종의 변환된 터펜류(#1, RT=12.5; #2, RT=14.1)가 생성되었으며, 용매 III 및 용매 V에서는 각각 1종의 터펜류(#3,

RT=6.2)가 생성됨

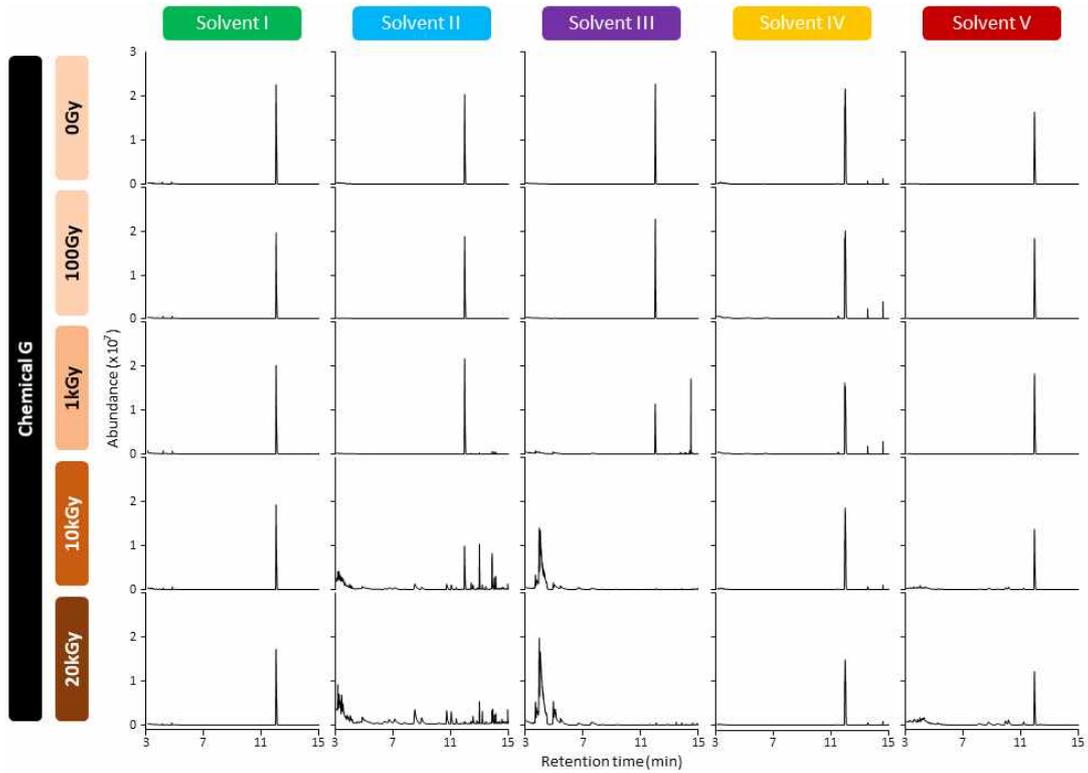


[유도체 F의 용매 및 감마선 선량에 따른 물질 변환 패턴 분석 결과]



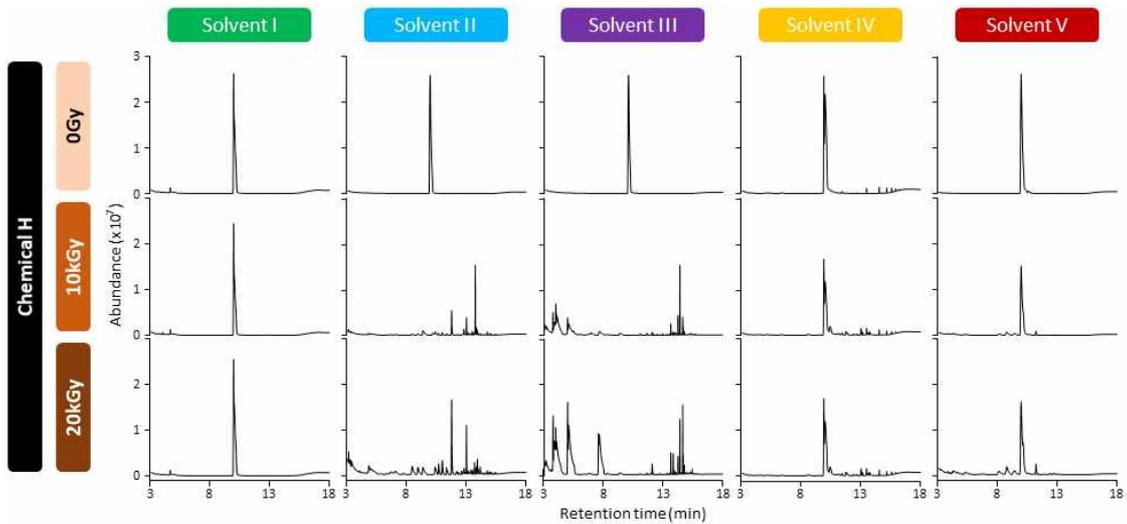
[유도체 F로부터 변환된 물질의 질량 스펙트럼 분석 결과]

- 유도체 G의 크로마토그램 분석 결과 : 유도체 G는 용매 II에서 10kGy 및 20kGy의 감마선에 의해 구조변환됨. 3용매 III에서는 100Gy에서 생성된 물질들이 1kGy 이상에서 분해됨을 확인하였고, 용매 I 및 용매 IV, 용매 V에서는 큰 변화를 보이지 않음
- 질량 스펙트럼 분석 결과 : 감마선에 의해 변환된 리모넨 유도체를 검출할 수 없었음



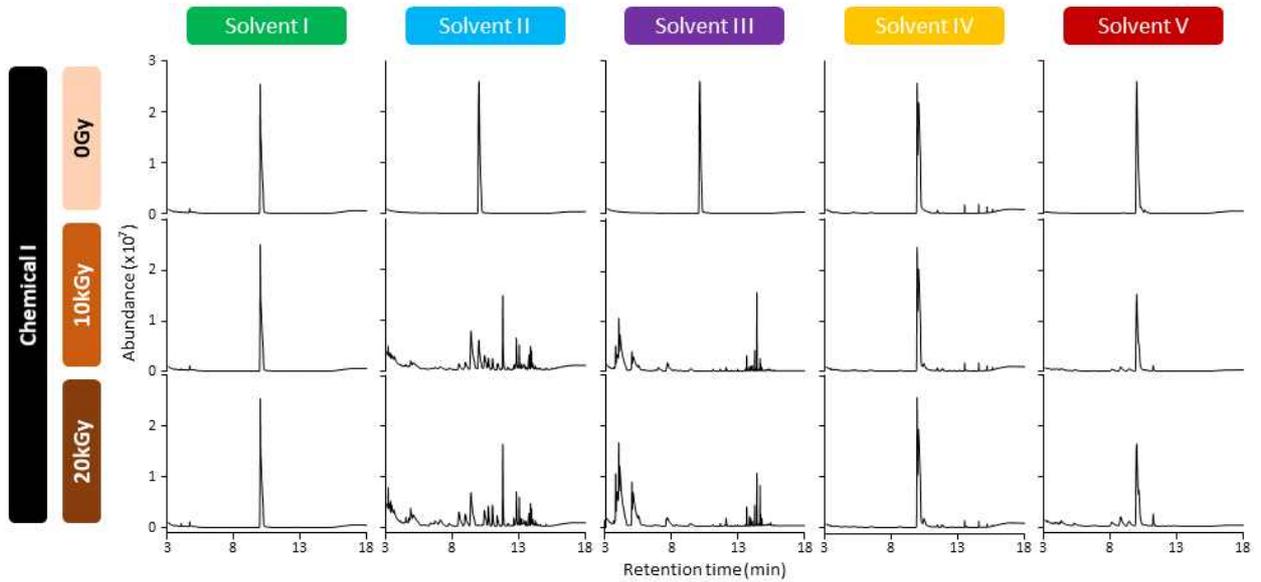
[유도체 G의 용매 및 감마선 선량에 따른 물질 변환 패턴 분석 결과]

- 유도체 H의 크로마토그램 분석 결과 : 유도체 H는 용매 II에서 10kGy 및 20kGy에서 구조변환됨. 용매 III에서는 감마선에 의해 구조변환 및 분해되는 패턴을 나타냄. 용매 I 및 용매 IV, 용매 V에서는 큰 변화를 보이지 않음
- 질량 스펙트럼 분석 결과 : 감마선에 의해 변환된 리모넨 유도체를 검출할 수 없었음



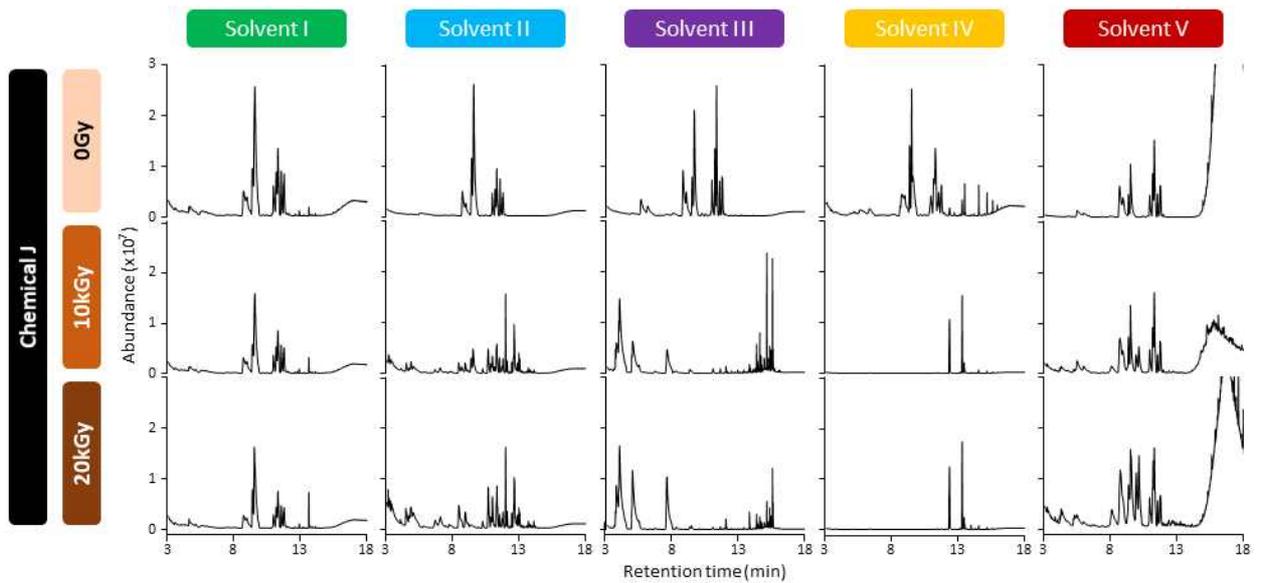
[유도체 H의 용매 및 감마선 선량에 따른 물질 변환 패턴 분석 결과]

- 유도체 I의 크로마토그램 분석 결과 : 유도체 I는 용매 II에서 10kGy 및 20kGy에서 구조변환됨. 용매 III에서는 감마선에 의해 구조변환 및 분해되는 패턴을 나타냄. 용매 I 및 용매 IV, 용매 V에서는 큰 변화를 보이지 않음
- 질량 스펙트럼 분석 결과 : 감마선에 의해 변환된 리모넨 유도체를 검출할 수 없었음



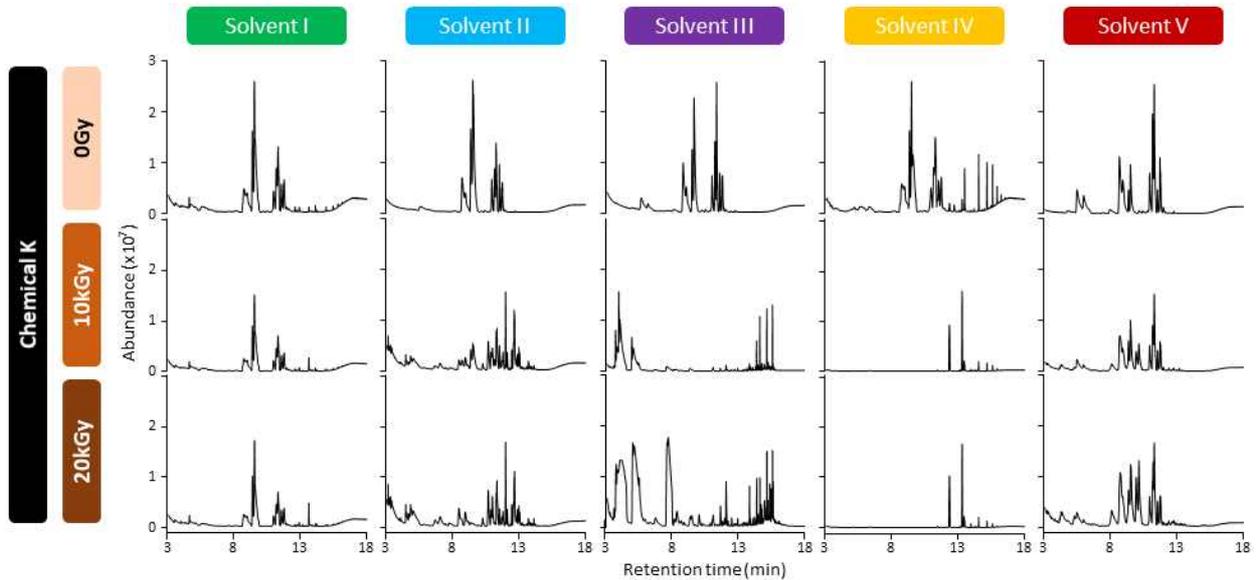
[유도체 I의 용매 및 감마선 선량에 따른 물질 변환 패턴 분석 결과]

- 유도체 J의 크로마토그램 분석 결과 : 유도체 J는 용매 II 및 용매 IV, 용매 V에서 10kGy 및 20kGy에서 구조변환되는 패턴을 나타냄. 용매 III에서는 감마선에 의해 구조변환 및 분해되는 패턴을 나타냄. 용매 I에서는 큰 변화를 보이지 않음
- 질량 스펙트럼 분석 결과 : 감마선에 의해 변환된 리모넨 유도체를 검출할 수 없었음



[유도체 J의 용매 및 감마선 선량에 따른 물질 변환 패턴 분석 결과]

- 유도체 K의 크로마토그램 분석 결과 : 유도체 K는 용매 II 및 용매 IV, 용매 V에서 10kGy 및 20kGy에서 구조변환되는 패턴을 나타냄. 용매 III에서는 감마선에 의해 구조변환 및 분해되는 패턴을 나타냄. 용매 I에서는 큰 변화를 보이지 않음
- 질량 스펙트럼 분석 결과 : 감마선에 의해 변환된 리모넨 유도체를 검출할 수 없었음



[유도체 K의 용매 및 감마선 선량에 따른 물질 변환 패턴 분석 결과]

라) 실험 결론

- 11종의 리모넨 및 리모넨 유도체[리모넨, L-카베올, S-(+)-카본, R-(+)-카본, (+)-리모넨 산화물, (-)-리모넨 산화물, (S)-(-)-페릴릴 알콜, α-테르피네올, 카바크롤, (-)-아이소폴렉올, (-)-아이소폴렉올]로부터 5종의 유기용매(메탄올, 에탄올, 에틸아세트산, 클로로포름, 헥산)와 감마선 선량별(100Gy, 1kGy, 10kGy, 20kGy) 조사에 의해 생성되는 17종의 방사선 변환 터펜 계열의 유도체가 생성됨
- 5종 유기용매에 의한 대사체 변환률을 살펴본 결과, 용매 II 및 용매 III, 용매 V에서 터르펜 계열의 대사체가 생성됨을 확인하였지만, 용매 I와 용매 IV에서는 터르펜류의 대사체가 검출되지 않음
- 감마선 선량별 대사체 변환률을 살펴본 결과, 낮은 선량인 100Gy와 1kGy에서 기존에 보고된 리모넨 유도체들이 생성된 반면 10kGy와 20kGy에서는 신규 리모넨 유도체들이 생성됨
- 이러한 결과를 통해 이온화에너지 물질구조변환 최적 조건을 확립하였으며, 유기용매 II에 희석 후 10kGy 및 20kGy의 감마선 조사를 통해 신규 구조변환 대사체를 생성 가능함
- 이온화에너지 물질구조변환 최적화를 바탕으로 다음 연구에서 시트러스 천연 추출 정유(citrus essential oil)의 신규 유도체 발굴을 수행함

(2) 시트러스 천연 추출 정유(Citrus essential oil) 대상 이온화에너지 물질구조변환기술 최적화 및 유도체 발굴

가) 실험 목적

- 앞의 연구 결과를 통해 11종의 리모넨 및 리모넨 유도체들의 이온화에너지(감마선)의 선량별 및 유기용매별에 따른 물질구조변환 최적조건을 확립하였으며, 이를 기반으로 하여, 시트러스 천연 추출 정유(citrus essential oil)를 대상으로 감마선 10kGy 및 20kGy의 선량 조건과 용매 II를 이용하여 이온화에너지에 의한 물질구조변환된 신규 유도체를 발굴하고자 함
- 시트러스 정유(Citrus essential oil)는 리모넨이 70% 이상 주요 성분으로 함유하고 있고, 주성분인 리모넨 이외에도 다양한 리모넨 유도체(카본, 페릴릴 알콜 등)도 또한 이미 함유하고 있어 이온화에너지를 가하면 추가적인 새로운 리모넨 유도

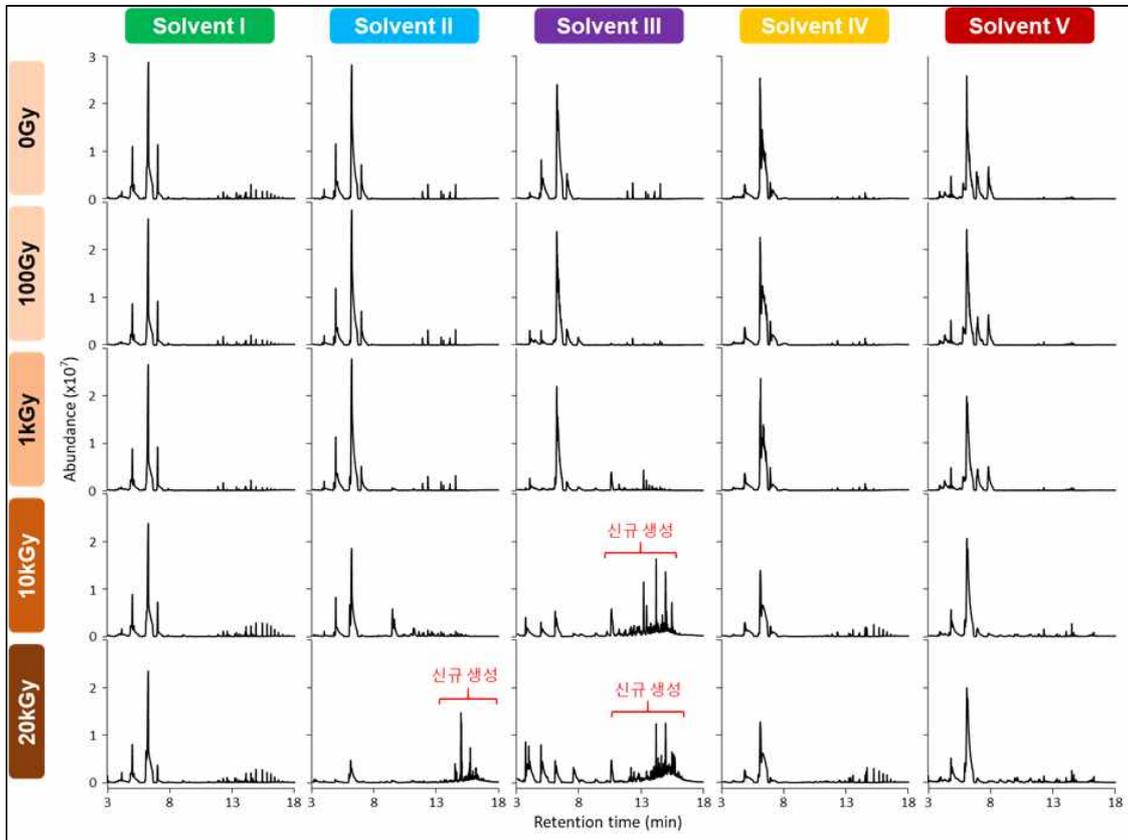
## 체가 이온화 반응을 통해 생성 가능함

### 나) 실험 재료 및 실험 방법

- 시트러스 정유 확보 : 상업적으로 판매되는 시트러스 정유를 구입함
- 방사선 조사를 위한 시료 준비 및 조사 조건
  - 시료 준비 : 시트러스 정유는 유기용매 II에 1/1,000로 희석하여 감마선을 조사함, 지식재산권 보호를 위해 용매명은 로마숫자로 대체함
  - 감마선 총선량 : 10k, 20kGy (4시간)
  - 조사 시료는 GC-MS 장비(GCMS-7890A/5975C)를 이용하여 분석
- 크로마토그램(GC) 분석 조건
  - column : DB-5MS (0.25mm i.d.×30m length, 0.25 μm film thickness)
  - carrier gas : helium
  - flow rate : 1 mL/min
  - oven temperature : 80° C (3 min hold) → 3° C/min → 100° C → 20° C/min → 180° C → 60° C/min → 300° C (3 min hold)
  - injection temperature : 250° C
  - transfer line temperature : 280° C
- 질량 스펙트럼(MS) 분석 조건
  - ionization potential : 70 eV
  - scan range : 40 - 600 amu
  - source temperature : 230° C
  - quadrupole temperature : 150° C
- 물질구조변환된 대사체 분석
  - 구조변환된 대사체는 분석 프로그램(Mass spectrometry program version 2.3)을 이용하였으며, 대사체 동정 분석은 2종 라이브러리(Wiley 12th Edition libraries, National Institute of Standards and Technology (NIST) 2020 Mass Spectral libraries)를 통해 대사체를 분류함

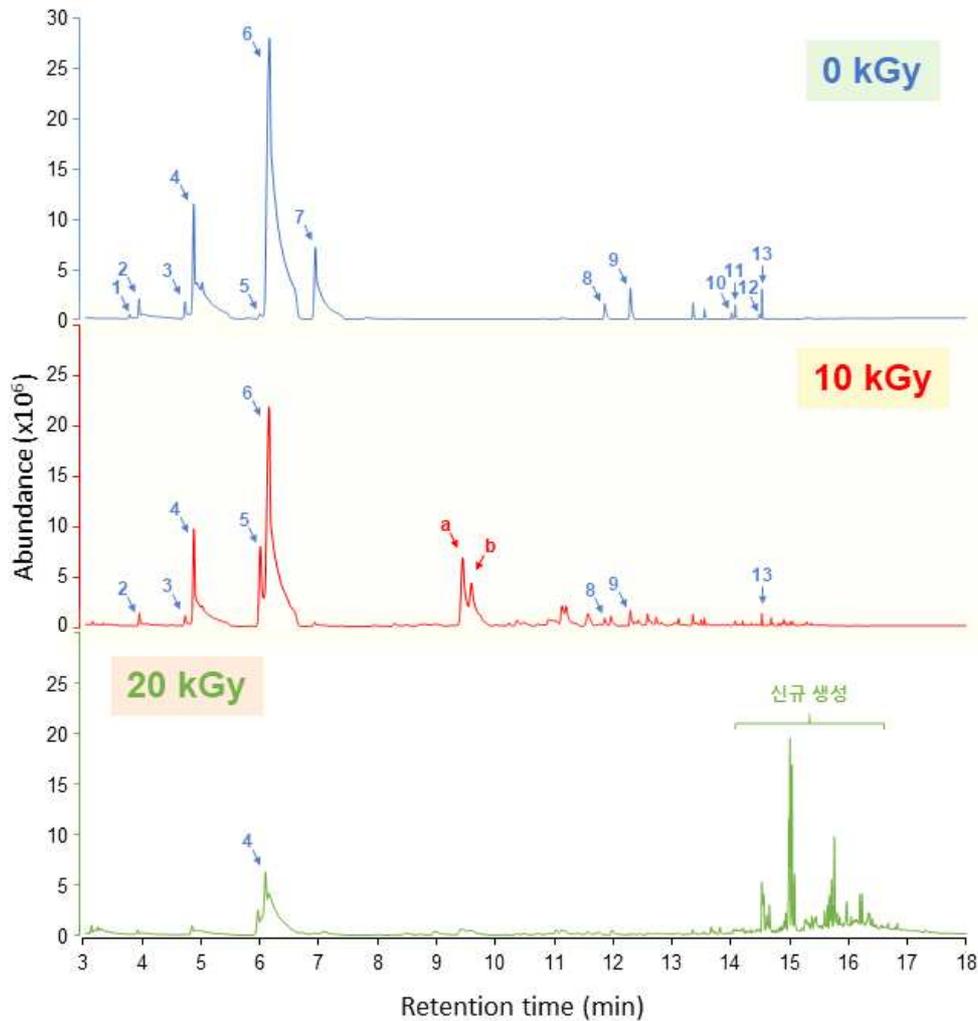
### 다) 실험 결과

- 시트러스 정유의 감마선 선량 및 용매에 따른 물질구조변환 분석
  - 크로마토그램 분석 결과 : 이온화에너지 물질구조변환 최적화 분석 조건을 탐색하기 위해 시트러스 정유는 5종의 용매와 감마선 선량별로 처리 후 분석을 수행한 결과, 용매 II와 용매 III에서 고준위 조사(10kGy 및 20 kGy) 조건에서 신규 유도체가 생성됨을 확인함. 용매 III에서는 용매 II에 비해 더 많은 신규 유도체가 생성됨을 확인함



[시트러스 정유의 방사선 물질구조변환 분석 결과(chromatogram)]

- 시트러스 정유의 감마선 이용 물질구조변환 분석
  - 크로마토그램 분석 결과 : 이온화에너지 물질구조변환 최적화 분석 조건을 이용하여 시트러스 정유는 용매 II에 희석 후 10kGy 및 20kGy 선량의 감마선을 조사하여 구조변환 여부를 확인하였음. 그 결과, 10kGy에서는 무처리군(0kGy)의 주요 peak들이 소량 감소하여 9-10분 사이의 물질이 증가함을 확인하였고, 20kGy에서는 주요 peak들이 대부분 감소하여 14-17분 사이의 물질들이 생성됨을 확인하였음



[시트러스 정유의 감마선에 의한 물질구조변환 크로마토그램 분석 결과]

- 질량 스펙트럼 분석 결과 : 무처리군(0kGy)의 시트러스 정유는 13종의 테르펜을 다량 함유함. 10kGy 처리시 물질구조변환된 신규 테르펜은 질량 스펙트럼 분석에 의해 *cis*-limonene oxide와 (+)-*cis*-limonene 1,2-epoxide의 유도체임을 확인하였음
- 10kGy 처리군의 2종 외에도 10kGy 및 20kGy 처리군에서 20여종의 신규 유도체들 분석을 위해 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료됨
- 이온화에너지에 의해 물질구조변환된 시트러스 정유 샘플들은 <공동연구 2>의 병원균 억제 활성 평가 연구를 진행하였으며, 높은 병원균 억제능을 확인하였음

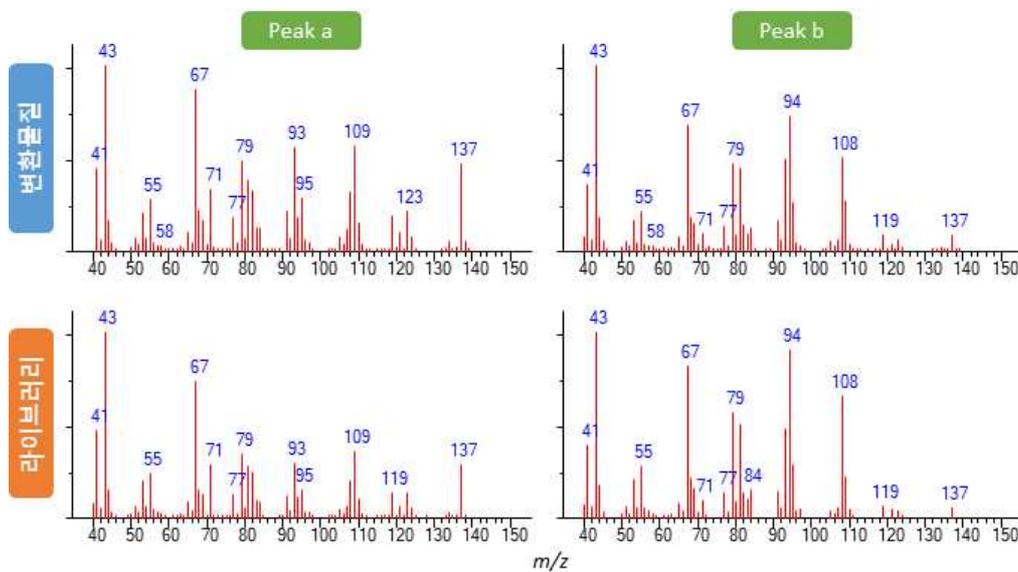
[시트러스 정유(0kGy)의 질량 스펙트럼 라이브러리 분석 결과]

#	Peak No.	Name	RT	MW	Formula	Qual	CAS #	Ref #
1	1	3-Thujene	3.84	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	94	002867-05-2	39684
2	2	(+)- $\alpha$ -Pinene	4.00	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	96	007785-70-8	39593
3	3	Sabinene	4.78	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	96	003387-41-5	39751
4	4	$\beta$ -Pinene	4.93	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	94	000127-91-3	39963
5	5	$\sigma$ -Cymene	6.06	134	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	95	000527-84-4	36897
6	6	D-Limonene	6.22	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	99	005989-27-5	40012
7	7	$\gamma$ -Terpinene	7.00	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	97	000099-85-4	40037
8	8	Neral	11.89	152	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	95	000106-26-3	66961
9	9	Citral	12.32	152	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	96	005392-40-5	66958

10	10	Caryophyllene	14.04	204	C15H24	99	000087-44-5	203814
11	11	trans-.alpha.-Bergamotene	14.10	204	C15H24	99	013474-59-4	204346
12	12	cis-alpha-Bisabolene	14.51	204	C15H24	92	029837-07-8	204320
13	13	beta-Bisabolene	14.55	204	C15H24	98	000495-61-4	204294

[시트러스 정유(10kGy)의 질량 스펙트럼 라이브러리 분석 결과]

#	Peak No.	Name	RT	MW	Formula	Qual	CAS #	Ref #
1	a	cis-Limonene oxide	9.48	152	C10H16O	98	013837-75-7	65996
2	b	(+)-cis-Limonene 1,2-epoxide	9.63	152	C10H16O	90	006909-30-4	65998



[cis-limonene oxide와 (+)-cis-limonene 1,2-epoxide의 질량 스펙트럼 비교 분석 결과]

### (3) 이온화에너지/P450 이용 신규 리모넨 유도체 구조 동정

#### 가) 실험 목적

- <공동과제 1>의 “Cyclic monoterpene계 화합물 리모넨 유도체로 히드록실화 대사체/유도체 제조” 연구에서 발굴한 리모넨 유도체 유래 신규 히드록실화 유도체의 구조 동정을 위해 GC-MS를 이용한 2종의 화학물질 라이브러리(Wiley 12th Edition libraries, National Institute of Standards and Technology (NIST) 2020 Mass Spectral libraries)를 비교 분석 및 NMR 분석을 수행함

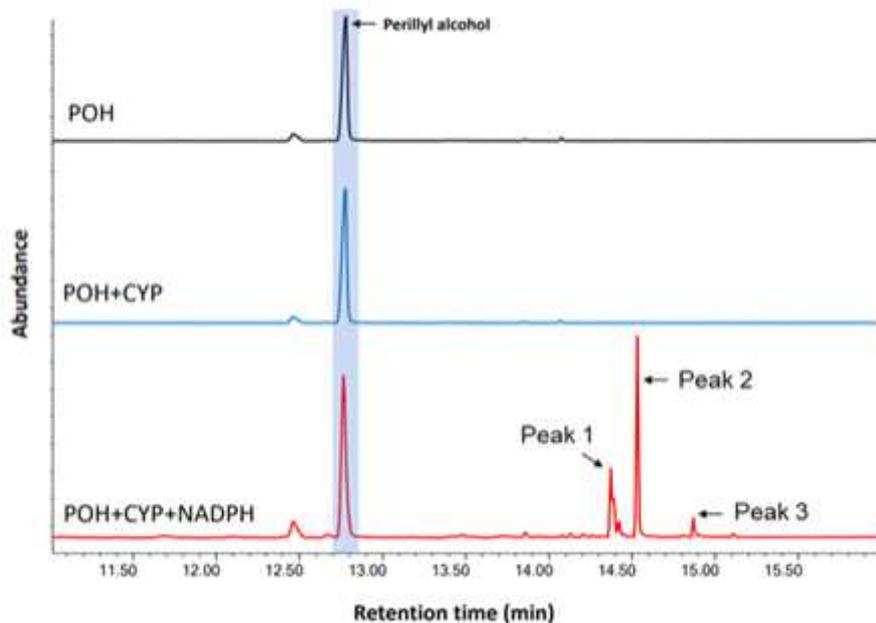
#### 나) 실험 재료 및 실험 방법

- 페릴릴 알콜 및 터피넨 4-올 히드록실화 유도체 확보 : <공동과제 1>에서 페릴릴 알콜을 P450 생촉매와 반응시켜 히드록실화 유도체 제조하여 분석 가능한 총분량을 확보함
- 유도체 샘플 준비 : <공동과제 1>로부터 확보한 시료는 ethyl acetate 추출을 통해 분석 시료를 준비하여 GC-MS 장비(GCMS-7890A/5975C)를 이용하여 분석
- 크로마토그램(GC) 분석 조건
  - column : DB-5MS (0.25mm i.d.×30m length, 0.25 μm film thickness)
  - carrier gas : helium
  - flow rate : 1 mL/min

- oven temperature : 80° C (3 min hold) → 3° C/min → 100° C → 20° C/min → 180° C → 60° C/min → 300° C (3 min hold)
- injection temperature : 250° C
- transfer line temperature : 280° C
- 질량 스펙트럼(MS) 분석 조건
  - ionization potential : 70 eV
  - scan range : 40 - 600 amu
  - source temperature : 230° C
  - quadrupole temperature : 150° C
- 대사체 분석
  - 구조변환된 대사체는 분석 프로그램(Mass spectrometry program version 2.3)을 이용하였으며, 대사체 동정 분석은 2종 라이브러리(Wiley 12th Edition libraries, National Institute of Standards and Technology (NIST) 2020 Mass Spectral libraries)를 통해 대사체를 분류함
- NMR 분석
  - Avance NEO-600 NMR (Bruker, Karlsruhe, Germany)
  - <sup>1</sup>H NMR : 600 MHz
  - <sup>13</sup>C NMR : 150 MHz
  - Solvent : CDCl<sub>3</sub> (δ<sub>H</sub> 7.26, δ<sub>C</sub> 77.16) in TMS
  - J<sub>CH</sub> value : 8 Hz

다) 실험 결과

- 페릴릴 알콜 히드록실화 유도체의 크로마토그램 분석
  - 페릴릴 알콜 및 페릴릴 알콜의 P450 생촉매 반응 물질인 페릴릴 알콜 히드록실화 유도체의 GC-MS 분석 결과, 3종의 major peak를 확인함



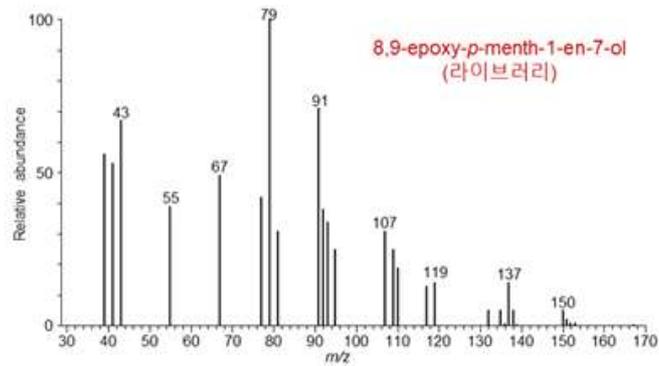
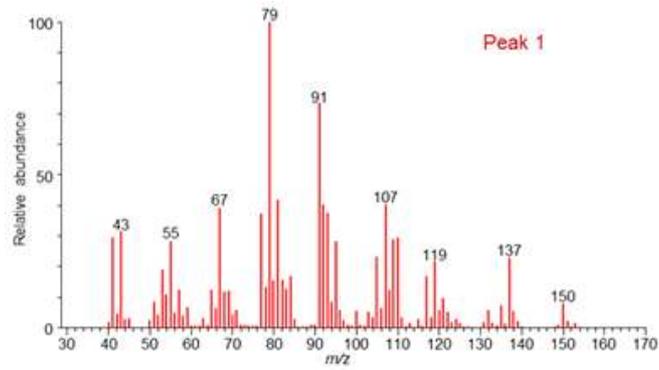
[페릴릴 알콜 히드록실화 유도체의 크로마토그램 분석 결과]

- 페릴릴 알콜 히드록실화 유도체(Peak 1)의 질량 스펙트럼 라이브러리 분석
  - 3종의 신규 페릴릴 알콜 히드록실화 유도체 중 Peak 1의 질량 스펙트럼 라이브러리 비교 분석 결과, 2종의 라이브러리 중 1종의 라이브러리(PBM\_Wiley library search)에서 Peak 1 물질의 구조를 검출함. 다른 라이브러리(NIST library

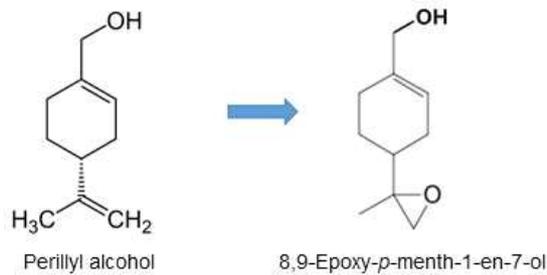
- search)에서는 유사한 질량 스펙트럼을 갖는 물질을 검출하지 못함
- PBM\_Wiley library search 결과, 상위 20종의 예상 유도체를 검출하였으며, 그중 랭크 1의 유도체만이 질량 스펙트럼 유사도(Qual)가 90%임을 확인하였으며, 유도체는 “8,9-epoxy-*p*-menth-1-en-7-ol” 로 명명됨
  - 라이브러리에 검출된 19종의 물질들은 질량 스펙트럼 유사도(Qual)가 50% 이하로 유사 가능성이 없다고 판단함

[페릴릴 알콜 히드록실화 유도체(Peak 1)의 질량 스펙트럼 라이브러리 분석 결과]

Rank	Name	MW	Formula	Qual	CAS #	Ref #
1	(4S,8R)- and (4S,8S)-8,9-epoxy- <i>p</i> -menth-1-en-7-ol (1:1 mixture)	168	C10H16O2	90	990029-38-7	101858
2	1-Decen-3-yne	136	C10H16	46	033622-26-3	39565
3	1-Decen-3-yne	136	C10H16	46	033622-26-3	39562
4	Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptan-3-ol	110	C7H10O	46	000695-04-5	13339
5	Bicyclo[2.2.1]hept-2-en-7-ol	110	C7H10O	45	053783-87-2	13352
6	(anti)-7-Hydroxy-nor-bornene	110	C7H10O	45	053783-87-2	13354
7	2,5-Methanopentalen-1-ol, octahydro-, (1.alpha.,2.beta.,3a.alpha.,5.beta.,6a.alpha.)-	138	C9H14O	43	018117-75-4	42233
8	Benzyl ethyl ether-3'-D1	137	C9H11DO	38	053966-35-1	38855
9	3-Oxabicyclo[3.3.0]octan-2-one, 4-methoxy-7-methylene-	168	C9H12O3	38	990028-62-6	100398
10	Bicyclo[4.2.0]oct-7-ene	108	C8H12	30	000616-10-4	12314
11	Docosahexaenoic Acid methyl ester	342	C23H34O2	30	990407-77-3	681961
12	1-Oxaspiro[2.5]oct-5-ene, 2,6-dimethyl-, (S)-	138	C9H14O	30	125354-05-4	42563
13	8-Methylene-3-oxatricyclo[5.2.0.0(2,4)]nonane	136	C9H12O	25	990007-38-7	39435
14	Icosa-9,11-diyne	274	C20H34	22	028393-07-9	452945
15	Cyclohexene, 1-(2-nitro-2-propenyl)-	167	C9H13NO2	22	080255-20-5	98481
16	Azetidine, 1-(methylsulfonyl)-	135	C4H9NO2S	22	013595-45-4	37022
17	5-Methyl-5-(1'-methylethyl)-1,3,6-heptatriene	150	C11H18	22	990014-53-0	62573
18	4-Hexadecen-6-yne, (Z)-	220	C16H28	14	074744-54-0	258750
19	3-Cyclohexene-1-carboxaldehyde	110	C7H10O	14	000100-50-5	13227
20	Linolenic Acid Methyl Ester	292	C19H32O2	14	990284-75-5	516591



[페릴릴 알콜 히드록실화 유도체 (Peak 1)의 질량 스펙트럼 분석 결과]



[페릴릴 알콜 히드록실화 유도체 8,9-epoxy-p-menth-1-en-7-ol의 분자 구조]

- 페릴릴 알콜 히드록실화 유도체 (Peak 2)의 질량 스펙트럼 라이브러리 분석
  - 페릴릴 알콜 히드록실화 유도체 Peak 2의 질량 스펙트럼 라이브러리 비교 분석 결과, 2종의 라이브러리 모두 유사한 질량 스펙트럼을 갖는 물질을 검출하지 못함
  - 라이브러리에 검출된 20종의 물질들은 질량 스펙트럼 유사도(Qual)가 60% 이하로 유사 가능성이 없다고 판단하였음

[페릴릴 알콜 히드록실화 유도체(Peak 2)의 질량 스펙트럼 라이브러리 분석 결과]

Rank	Name	MW	Formula	Qual	CAS #	Ref #
1	3-Cyclohexene-1-carboxaldehyde	110	C7H10O	58	000100-50-5	13227
2	3-Cyclohexene-1-carboxaldehyde	110	C7H10O	50	000100-50-5	13224
3	1-Methyl-4,5-epoxy-1-cyclohexene	110	C7H10O	49	990001-60-0	13447
4	(anti)-7-Hydroxy-nor-bornene	110	C7H10O	49	053783-87-2	13355
5	Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptan-3-ol	110	C7H10O	47	000695-04-5	13339
6	1-Oxaspiro[2.5]oct-4-ene	110	C7H10O	46	099495-32-6	13403
7	1-Oxaspiro[2.5]oct-4-ene	110	C7H10O	46	098126-65-9	13402
8	5H-Inden-5-one, octahydro-2-methylene-, cis-	150	C10H14O	38	092464-28-3	62171
9	1H-Benzocycloheptene, 4,4a,5,6,7,8,9,9a-octahydro-4a-methyl-, trans-	164	C12H20	38	055103-61-2	92355
10	(2Z,4Z,6E)-2,4,6-Undecatriene	150	C11H18	25	085615-64-1	62646
11	2(1H)-Pyrimidinone, 5-methyl-	110	C5H6N2O	25	041398-85-0	12986
12	(2E,4Z,6E)-2,4,6-Undecatriene	150	C11H18	25	085615-64-1	62647
13	(E,E)-1,3,5-Undecatriene	150	C11H18	25	019883-29-5	62519
14	3-Tetradecen-5-yne, (Z)-	192	C14H24	22	074663-68-6	166505
15	(2S,3S)-2-ethenyl-2-methyl-3-(3-methylbut-2-enyl)oxirane	152	C10H16O	22	990015-64-9	66088
16	(3Z)-3-Tetradecen-5-yne	192	C14H24	22	074663-68-6	166507
17	1H-Pyrazole, 1,3,5-trimethyl-	110	C6H10N2	22	001072-91-9	13115
18	(2E,4E,6Z)-2,4,6-Undecatriene	150	C11H18	18	990014-56-0	62649
19	4-Amino-2(1H)-pyridinone	110	C5H6N2O	14	038767-72-5	12980
20	1,4-Cyclononadiene	122	C9H14	14	027538-12-1	23230

- 페릴릴 알콜 히드록실화 유도체(Peak 3)의 질량 스펙트럼 라이브러리 분석
  - 페릴릴 알콜 히드록실화 유도체 Peak 3의 질량 스펙트럼 라이브러리 비교 분석 결과, 2종의 라이브러리 모두 유사한 질량 스펙트럼을 갖는 물질을 검출하지 못함
  - 라이브러리에 검출된 20종의 물질들은 질량 스펙트럼 유사도(Qual)가 50% 이하로 유사 가능성이 없다고 판단하였음

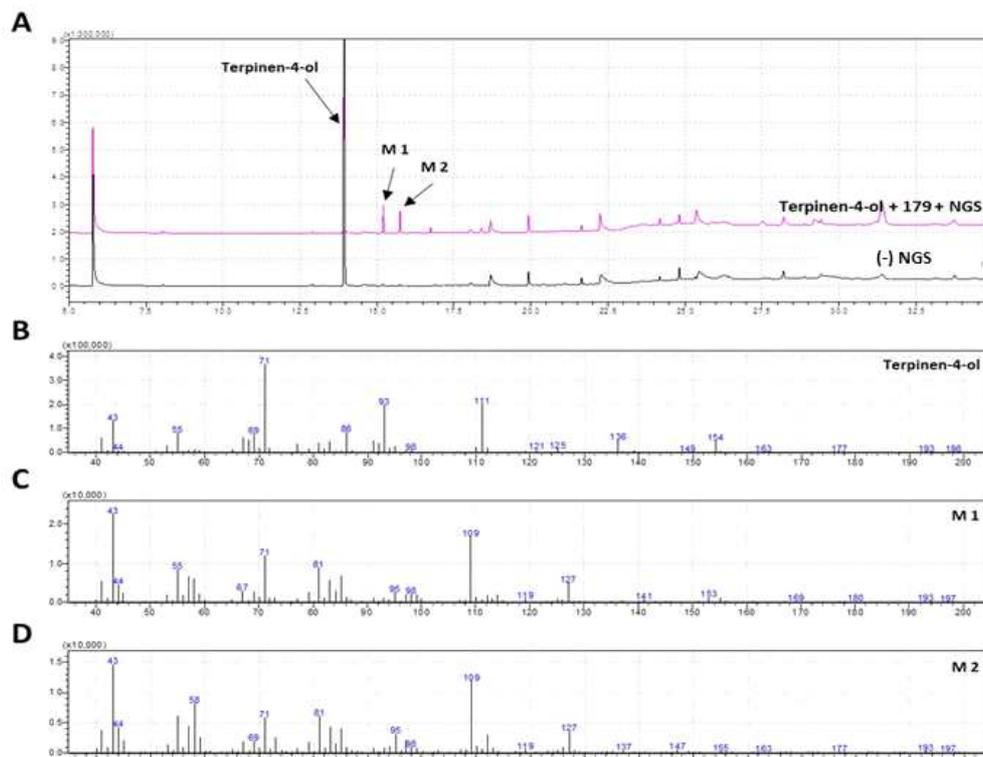
[페릴릴 알콜 히드록실화 유도체(Peak 3)의 질량 스펙트럼 라이브러리 분석 결과]

Rank	Name	MW	Formula	Qual	CAS #	Ref #
1	2,5-Methano-1H-inden-8-ol, 2,3,3a,4,5,7a-hexahydro-	150	C10H14O	43	084580-97-2	61774
2	2,5-Methano-1H-inden-8-ol, 2,3,3a,4,5,7a-hexahydro-	150	C10H14O	43	084580-97-2	61772
3	2-Methyl-1-octen-3-yne	122	C9H14	38	017603-76-8	23215
4	1-Octen-3-yne, 2-methyl-	122	C9H14	38	017603-76-8	23216
5	2-Ethenylbenzaldehyde	132	C9H8O	30	043145-54-6	34524
6	1,3-bis(vinylidene)cyclohexane	132	C10H12	30	990006-24-9	34702
7	Cyclohexa-2,4-dienylmethanol	110	C7H10O	25	154916-94-6	13331
8	Bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-triene, 2,4-dimethyl-	132	C10H12	25	028749-81-7	34674
9	Methyl 4,7,10,13-hexadecatetraenoate	262	C17H26O2	25	990208-55-2	408458
10	6-Methyl-1,4-cyclooctadiene	122	C9H14	25	990003-41-7	23335
11	1-[(E)-3-methylbut-1-enyl]cyclohexene	150	C11H18	25	990014-50-2	62491
12	2H-Cyclopenta[d]pyridazine, 2-methyl-	132	C8H8N2	25	022291-85-6	34403
13	cis-[2-(1Z,3-Butadienyl)-3-cyclopenten-1-yl]methanol	150	C10H14O	25	990014-30-5	61741

14	6-Methylenebicyclo[3.1.1]heptane	108	C8H12	25	990001-39-2	12311
15	2H-Cyclopenta[d]pyridazine, 2-methyl-	132	C8H8N2	25	022291-85-6	34404
16	3-Methylene-1,6-heptadiene	108	C8H12	25	016626-48-5	12259
17	1H-Indol-6-amine	132	C8H8N2	18	005318-27-4	34449
18	1H-Indol-6-amine	132	C8H8N2	18	005318-27-4	34448
19	(1S,2S,5R,6R)-Tricyclo[4.2.1.0*2,5*]nonan-9-ol	138	C9H14O	18	990008-29-9	42549
20	Cycloheptanol, 1-methyl-2-methylene-	140	C9H16O	18	990009-30-4	45597

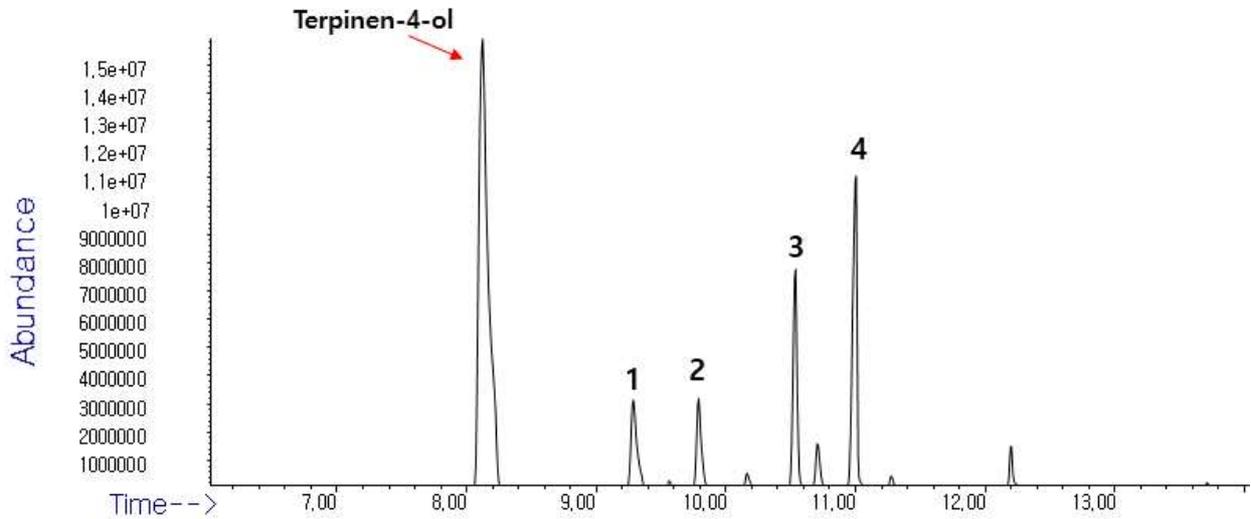
■ 터피넨 4-올 히드록실화 유도체의 크로마토그램 분석

- <공동과제 1>에서 터피넨 4-올 및 터피넨 4-올의 P450 생촉매 반응 물질인 터피넨 4-올 히드록실화 유도체의 GC-MS 분석 결과, 2종의 후보 물질 (M-1 및 M-2)를 확인하였으며, 재확인을 위해 위에 서술된 실험 방법의 분석 조건으로 재분석을 실시함



[<공동과제 1>에서 공유한 터피넨 4-올 히드록실화 유도체의 크로마토그램 분석 결과]

- 터피넨 4-올의 P450 생촉매 반응 물질인 터피넨 4-올 히드록실화 유도체의 GC-MS 분석 결과, 4종의 후보 물질(Peak #1, #2, #3, #4)을 확인함
- 앞의 결과에서의 M-1 및 M-2는 각각 peak #3과 peak #4일 것으로 추정됨



[터피넨 4-올 히드록실화 유도체의 크로마토그램 분석 결과]

- 터피넨 4-올 히드록실화 유도체(Peak 1)의 질량 스펙트럼 라이브러리 분석
  - 4종의 터피넨 4-올 히드록실화 유도체 중 Peak 1의 질량 스펙트럼 라이브러리 비교 분석함. PBM\_Wiley library search 결과, 상위 20종의 예상 유도체를 검출하였으며, 그중 랭크 1의 유도체만이 질량 스펙트럼 유사도(Qual)가 47%임을 확인하였으며, 유도체는 “1,4-dihydroxy-p-menth-2-ene” 로 명명됨
  - 낮은 유사도로 인해 추가 분석이 필요할 것으로 사료됨

[터피넨 4-올 히드록실화 유도체(Peak 1)의 질량 스펙트럼 라이브러리 분석 결과]

Rank	Name	MW	Formula	Qual	CAS #	Ref #
1	1,4-dihydroxy-p-menth-2-ene	170	C10H18O2	47	990031-81-8	107364
2	4-Ethyl-1-methylpyrrolidin-2-one	127	C7H13NO	18	990004-77-8	28324
3	Oxirane, pentyl-	114	C7H14O	18	005063-65-0	17404
4	2,3-Pyridinediamine	109	C5H7N3	18	000452-58-4	12575
5	2(1H)-Pyridinone, 1-methyl-	109	C6H7NO	18	000694-85-9	12619
6	Ethanone, 1-(1,3-dimethyl-3-cyclohexen-1-yl)-	152	C10H16O	18	051733-68-7	66522
7	1,2,4,4-Tetramethylcyclopentene	124	C9H16	18	065378-76-9	25119
8	Ethanone, 1-(1,3-dimethyl-3-cyclohexen-1-yl)-	152	C10H16O	18	051733-68-7	66521
9	2-Cyclopenten-1-one, 3,4,4-trimethyl-	124	C8H12O	14	030434-65-2	24551
10	1-Penten-3-ol, 2-methyl-	100	C6H12O	14	002088-07-5	8681
11	Carbonic acid, 2-ethylhexyl nonyl ester	300	C18H36O3	14	990305-29-4	544691
12	(4-Fluorophenyl) methanol, 1-methylpropyl ether	182	C11H15FO	14	990045-45-6	137277
13	Diethyl (4-fluorobenzyl)phosphonate	246	C11H16F03P	14	063909-58-0	347609
14	2-Oxo-2,3-dihydro-1H-imidazole-4-carbonitrile	109	C4H3N3O	10	990001-41-9	12514
15	1-Azabicyclo[2.2.2]octan-3-ol	127	C7H13NO	10	001619-34-7	28254
16	Undecane, 5-methyl-	170	C12H26	10	001632-70-8	108091
17	3-Quinuclidinol	127	C7H13NO	10	001619-34-7	28251
18	Tetradecane, 5-methyl-	212	C15H32	10	025117-32-2	231699
19	2H-Azepin-2-one, hexahydro-7-methyl-	127	C7H13NO	10	001985-48-4	28257
20	trans-3-Penten-2-ol	86	C5H10O	10	003899-34-1	4026

- 터피넨 4-올 히드록실화 유도체(Peak 2)의 질량 스펙트럼 라이브러리 분석

- 4종의 터피넨 4-올 히드록실화 유도체 중 Peak 2의 PBM\_Wiley library search 결과, 상위 20종의 예상 유도체를 검출함. 그중 랭크 1 및 랭크 2의 유도체만이 질량 스펙트럼 유사도(Qual)가 각각 47% 및 43%임을 확인하였으며, 유도체는 “(S)-5-Oxo-hept-3,6-dien-2-ol” 과 “trans-Ascaridol glycol” 로 명명됨
- 낮은 유사도로 인해 추가 분석이 필요할 것으로 사료됨

[터피넨 4-올 히드록실화 유도체(Peak 2)의 질량 스펙트럼 라이브러리 분석 결과]

Rank	Name	MW	Formula	Qual	CAS #	Ref #
1	(S)-5-Oxo-hept-3,6-dien-2-ol	126	C7H10O2	47	990004-36-3	26747
2	trans-Ascaridol glycol	170	C10H18O2	43	021473-37-0	107365
3	2-Fluorobenzyl alcohol, 2-methylpropionate	196	C11H13F02	35	990065-77-7	177432
4	Hexadecanal, 2-methyl-	254	C17H34O	35	055019-46-0	380502
5	1-isopropyl-4-methyl-cyclohex-2-ene-1,4-diol	170	C10H18O2	30	021473-37-0	107368
6	trans-Carveol	152	C10H16O	25	990015-61-1	65968
7	Vinyl 2-ethyl-2,5-dimethylhexanoate	198	C12H22O2	22	990069-57-7	184729
8	Benzeneacetic acid, 4-fluoro-, hydrazide, TFA derivative	264	C10H8F4N2O2	22	990211-24-0	412296
9	2(1H)-Pyridinone, 1-methyl-	109	C6H7NO	11	000694-85-9	12619
10	3.alpha.-Hydroxymethyl-2,2-dimethylpenam S,S-dioxide	155	C8H13NO2	11	000000-00-0	72561
11	3-Octen-2-ol, 2-methyl-, (Z)-	142	C9H18O	10	018521-07-8	49336
12	2H-Azepin-2-one, hexahydro-7-methyl-	127	C7H13NO	10	001985-48-4	28256
13	Ethanone, 1-cyclopentyl-	112	C7H12O	10	006004-60-0	14991
14	4-Amino-2-methylpyrimidine	109	C5H7N3	10	000074-69-1	12540
15	Phenol, 3-amino-	109	C6H7NO	10	000591-27-5	12598
16	2-((1R,2S)-1,2-dimethyl-3-methylenecyclopentyl)ethan-1-ol	154	C10H18O	10	990017-57-0	71632
17	2-Acetylthiazole	127	C5H5NOS	10	024295-03-2	27903
18	2-Cyclopenten-1-one, 3,4,5-trimethyl-	124	C8H12O	10	055683-21-1	24703
19	1-Methylcyclooctanol	142	C9H18O	10	059123-41-0	49654
20	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-[R*,R*-(E)]]-	296	C20H40O	10	000150-86-7	531098

- 터피넨 4-올 히드록실화 유도체(Peak 3)의 질량 스펙트럼 라이브러리 분석
  - 4종의 터피넨 4-올 히드록실화 유도체 중 Peak 3의 PBM\_Wiley library search 결과, 상위 20종의 예상 유도체를 검출함. 그중 랭크 1 및 랭크 2의 유도체만이 질량 스펙트럼 유사도(Qual)가 각각 50% 및 49%임을 확인하였으며, 유도체는 “[1,1'-Bicyclopentyl]-2-one” 과 “2-n-Hexylcyclopentanone” 로 명명됨
  - 47% 이하의 낮은 유사도로 인해 추가 분석이 필요할 것으로 사료됨

[터피넨 4-올 히드록실화 유도체(Peak 3)의 질량 스펙트럼 라이브러리 분석 결과]

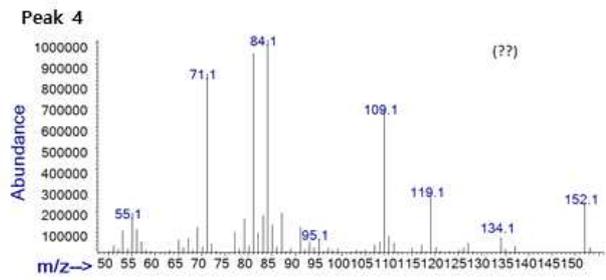
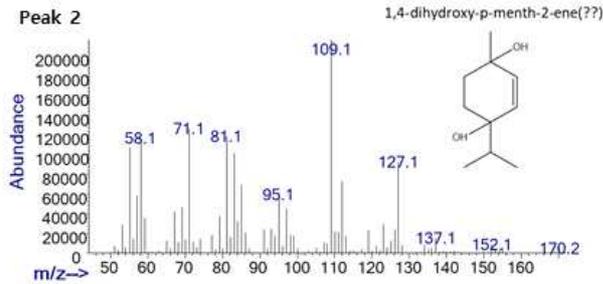
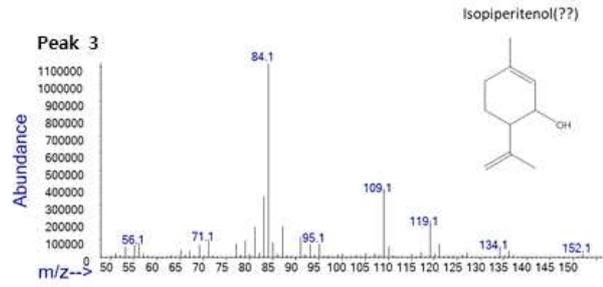
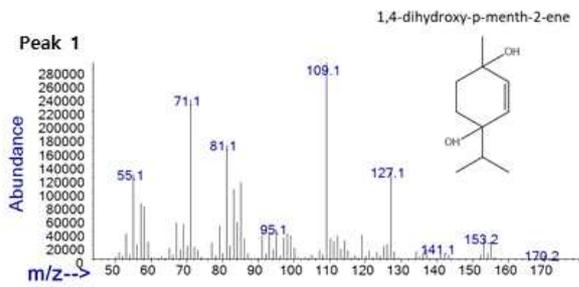
Rank	Name	MW	Formula	Qual	CAS #	Ref #
1	[1,1'-Bicyclopentyl]-2-one	152	C10H16O	50	004884-24-6	66042
2	2-n-Hexylcyclopentanone	168	C11H20O	49	013074-65-2	102404
3	2-(1-Adamantyl)piperidine	219	C15H25N	47	195243-62-0	253406
4	3,6,6-Trimethyl-cyclohex-2-enol	140	C9H16O	47	073741-62-5	45806
5	3-Methyl-6-propan-2-yl-cyclohex-3-ene-1,2-diol	170	C10H18O2	45	990031-56-3	106819
6	2-n-Hexylcyclopentanone	168	C11H20O	43	013074-65-2	102406
7	1-Chloro-2,6,6-trideuterocyclohexene	119	C6H6D3Cl	42	017616-78-3	18569
8	D-Campholic acid	170	C10H18O2	40	031147-56-5	106827

9	4-Fluoroethylphenidate	265	C15H20FN02	40	990215-26-6	418054
10	Piperidine, 2-(2,2-dicyclohexylethyl)-	277	C19H35N	38	006621-47-2	462540
11	Methylphenidate	233	C14H19N02	38	000113-45-1	302793
12	2-n-Hexylcyclopentanone	168	C11H20O	37	013074-65-2	102405
13	Methylphenidate	233	C14H19N02	35	000113-45-1	302791
14	2-Piperidinemethanol, .alpha.,.alpha.-diphenyl-	267	C18H21N0	35	000467-60-7	426742
15	Methylphenidate	233	C14H19N02	35	000113-45-1	302792
16	Methylphenidate	233	C14H19N02	35	000113-45-1	302788
17	Pyrrolidine, N-(4-methyl-3-pentenyl)-	153	C10H19N	35	990016-49-0	68438
18	Coniine	127	C8H17N	35	000458-88-8	28478
19	Pyrrolidine, 1-(2-phenoxyethyl)-	191	C12H17N0	35	000074-54-4	162158
20	N,N-Dimethyl-3-piperidinamine, N'-heptafluorobutyryl-	324	C11H15F7N20	32	990362-34-4	622002

- 터피넨 4-올 히드록실화 유도체(Peak 4)의 질량 스펙트럼 라이브러리 분석
  - 4종의 터피넨 4-올 히드록실화 유도체 중 Peak 4의 PBM\_Wiley library search 결과, 상위 20종의 예상 유도체를 검출함. 그중 랭크 1의 유도체만이 질량 스펙트럼 유사도(Qual)가 90%임을 확인하였으며, 유도체는 “3-Isopropyl-6-methyl-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ene” 로 명명됨
  - 비록 90%의 높은 유사도를 보이지만, NIST library search 결과에서는 동일 유도체가 검출되지 않아, 추가 분석이 필요할 것으로 사료됨

[터피넨 4-올 히드록실화 유도체(Peak 4)의 질량 스펙트럼 라이브러리 분석 결과]

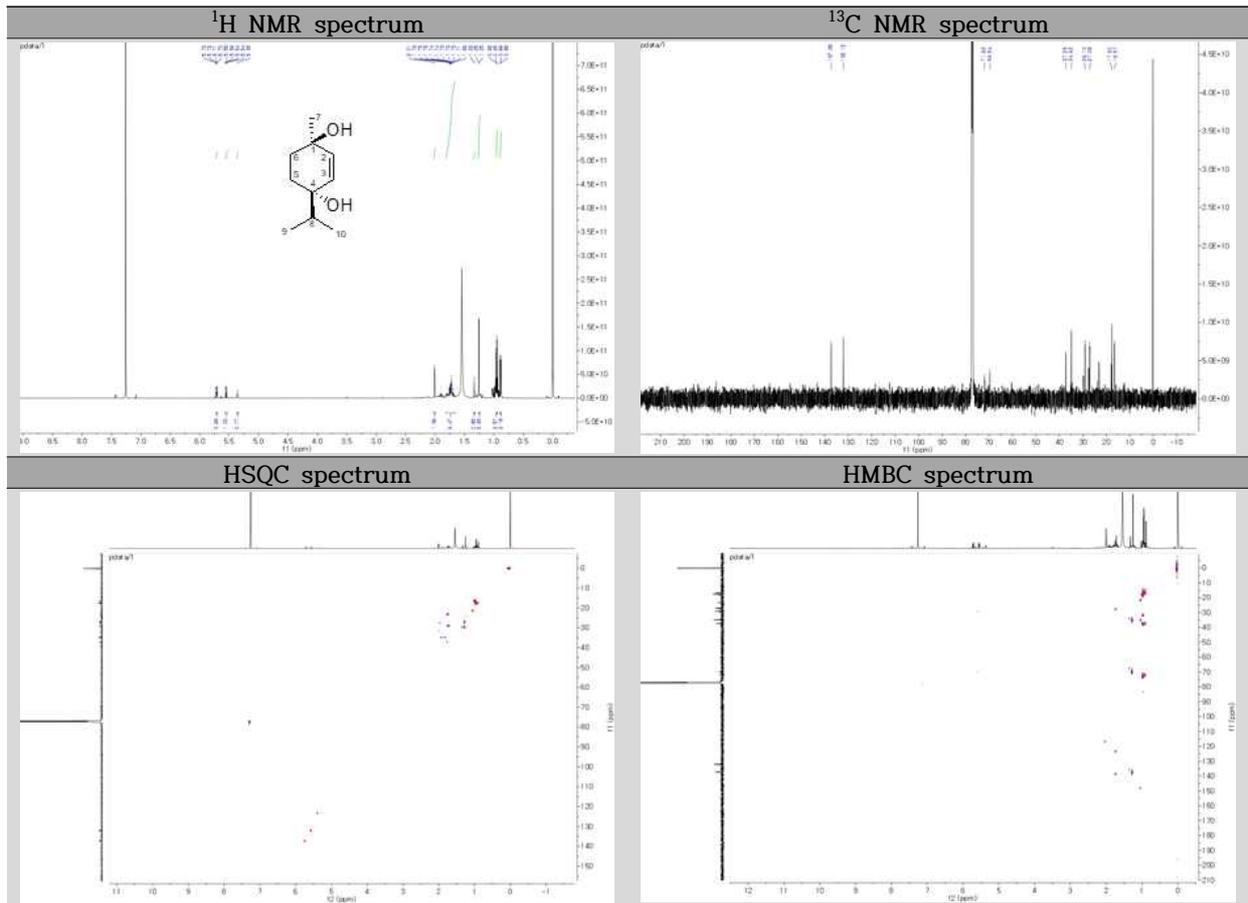
Rank	Name	MW	Formula	Qual	CAS #	Ref #
1	3-Isopropyl-6-methyl-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ene	152	C10H16O	90	990015-74-3	66309
2	Methylamine, N-(1-propylbutylidene)-	127	C8H17N	22	010599-78-7	28525
3	[1,1'-Bicyclopentyl]-2-one	152	C10H16O	14	004884-24-6	66042
4	Fenchone	152	C10H16O	14	001195-79-5	66396
5	3-Methyl-1-penten-4-yn-3-ol	96	C6H8O	11	003230-69-1	6421
6	Furan, 2-butyl-	124	C8H12O	11	004466-24-4	24760
7	2-Amino-oxazole	84	C3H4N2O	10	004570-45-0	3123
8	3-Buten-2-ol, 2-methyl-	86	C5H10O	10	000115-18-4	4050
9	Pyrrolidine, 1-methyl-2-octyl-	197	C13H27N	10	003447-06-1	181583
10	[1,1'-Bicyclopentyl]-2-one	152	C10H16O	10	004884-24-6	66043
11	2,3-Diazabicyclo[2.2.1]hept-2-ene, 1,4-dimethyl-	124	C7H12N2	10	071312-54-4	24479
12	N-(Methyl-D3)pyrrole	84	C5H4D3N	10	990000-15-6	2666
13	Amyl cyclopentenone	154	C10H18O	10	004819-67-4	71624
14	3-Buten-2-ol, 2-methyl-	86	C5H10O	10	000115-18-4	4053
15	Cyclohexene, 3-(2-propynyl)-	120	C9H12	10	055956-43-9	21761
16	1-Ethyl-5-methylcyclopentene	110	C8H14	10	097797-57-4	13511
17	1-(4-bicyclo[2.2.2]octanyl)ethanone	152	C10H16O	10	057032-01-6	66785
18	1,6-Heptadien-4-ol	112	C7H12O	10	002883-45-6	15169
19	4-(Chloromethyl)cyclohexene	130	C7H11Cl	10	002555-08-0	32026
20	4-Hexen-3-ol	100	C6H12O	10	004798-58-7	8782

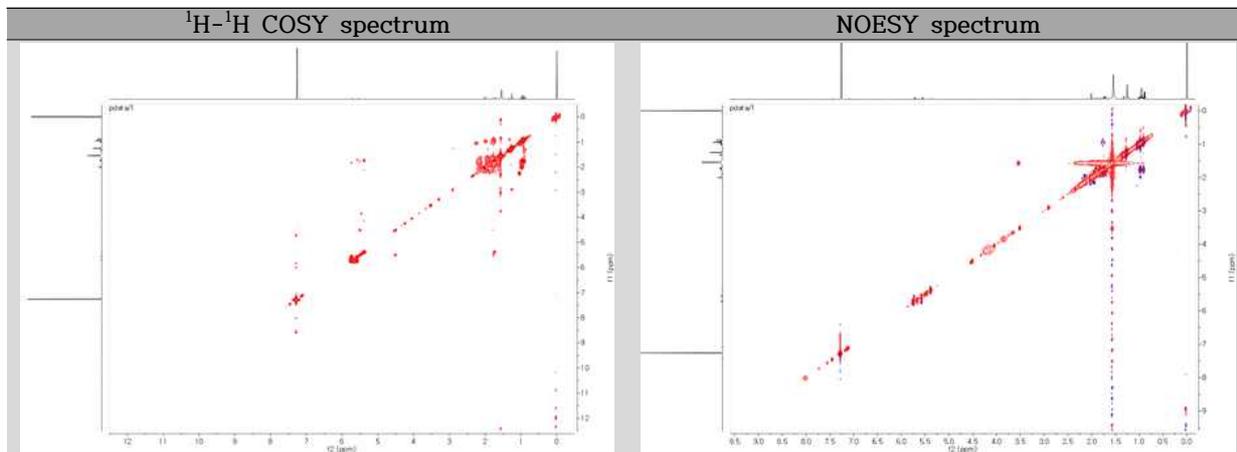


[터피넨 4-올 히드록실화 유도체들의 질량 스펙트럼 라이브러리 분석 결과]

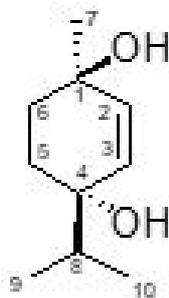
- 터피넨 4올 히드록실화 유도체의 NMR 분석
  - 터피넨 4올을 P450 효소를 이용하여 산화 반응을 유도하여 신규 생성물을 확인을 위해 주로 변환된 유도체(M-1)를 분리함. prep.HPLC로 단일물질을 분리 정제한 후 NMR 분석으로 화합물의 구조 동정을 수행함

[M-1의 NMR 스펙트럼 분석 결과]



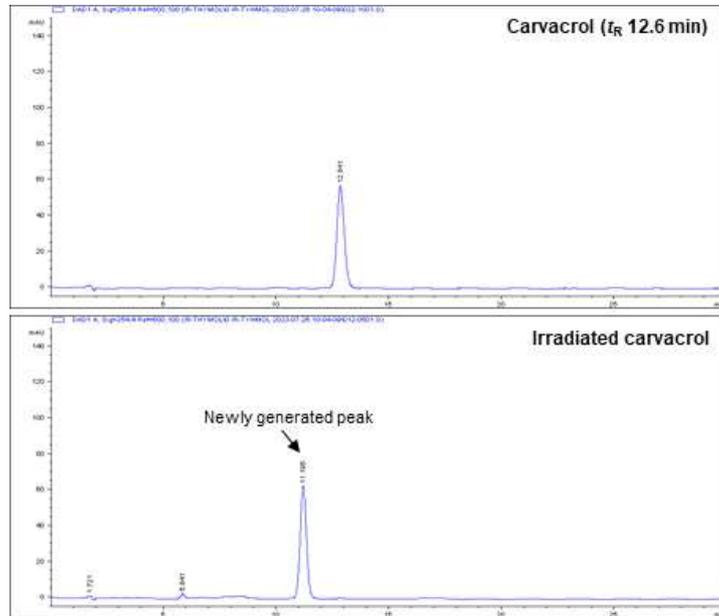


- M-1은 무색의 오일상으로 화합물을 분리 하였으며,  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼 측정된 결과, 한쌍의 이중결합에 해당하는 수소 시그널이  $\delta_{\text{H}}$  5.71 (1H, dd,  $J = 9.6, 1.8$  Hz, H-3) 및 5.55 (1H, dd,  $J = 9.6, 1.8$  Hz, H-2)에서 관찰되었으며, 두 개의 methylene 수소 시그널이  $\delta_{\text{H}}$  1.60-1.68 (4H, m, H-5, 6)와 함께 한 개의 methine 수소 시그널이  $\delta_{\text{H}}$  1.54 (1H, m, H-8), 3개의 methyl기가  $\delta_{\text{H}}$  1.28 (3H, s, H-7), 0.95 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-9), 및 0.89 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-10)에서 관찰되어 모노터르펜 유도체임을 시사함
- $^{13}\text{C}$  NMR 및 HSQC 스펙트럼에서 두 개의 quaternary 카본이  $\delta_{\text{C}}$  71.8 (C-4) 및 69.6 (C-1)가 측정됨에 따라 화합물 M-1은 3개의 methyl기가 결합된 *p*-methn-diol 유도체임을 확인함
- 정확한 결합 위치 및 입체배열을 증명하기 위하여 HMBC 및 NOESY 스펙트럼을 측정 하였으며, M-1은 (1*R*\*, 4*S*\*)-1,4-dihydroxy-*p*-menth-2-ene로 구조를 동정함
- M-1: Colorless oil,  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz):  $\delta$  5.71 (1H, dd,  $J = 9.6, 1.8$  Hz, H-2), 5.55 (1H, dd,  $J = 9.6, 1.8$  Hz, H-3), 1.60-1.68 (4H, m, H-5, 6), 1.54 (1H, m, H-8), 1.28 (3H, s, H-7), 0.95 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-10), 0.89 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-9);  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz):  $\delta$  137.3 (C-2), 132.1 (C-4), 71.9 (C-4), 69.6 (C-1), 37.3 (C-8), 34.9 (C-6), 29.1 (C-7), 27.1 (C-5), 17.6 (C-9), 16.5 (C-10), EIMS  $m/z$  170 [ $\text{M}$ ] $^+$



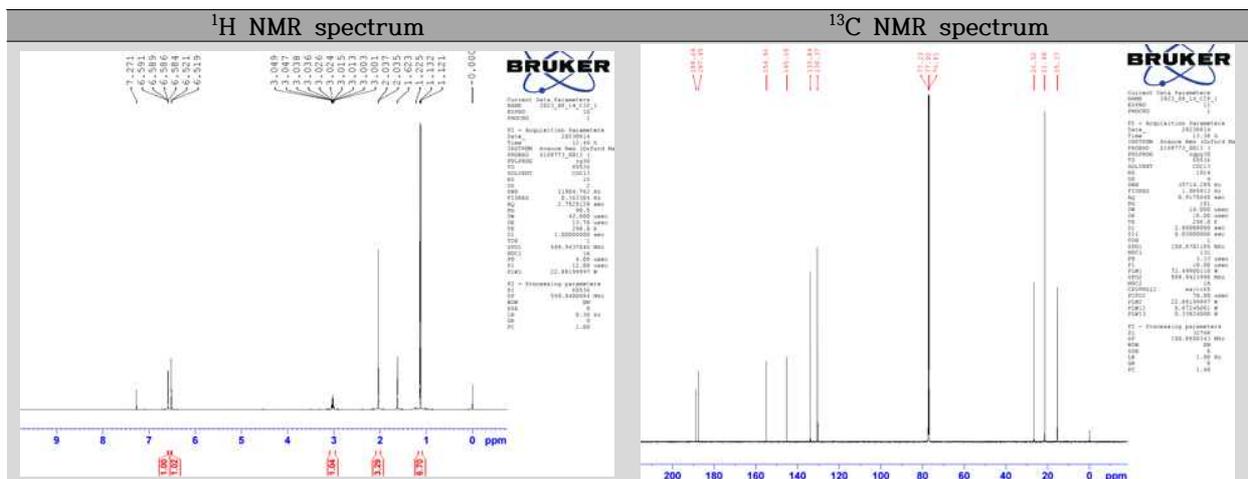
[터피넨 4올 히드록실화 유도체 M-1의 화학적 구조]

- 이온화에너지 이용 카바크롤(Cheical E) 신규 유도체의 NMR 분석
  - 카바크롤( $t_{\text{R}}$  12.6분)을 10 kGy 선량으로 감마선을 조사한 결과 카바크롤 이외에 신규 생성된 물질이  $t_{\text{R}}$  11.8분에서 검출됨
  - 이에 따라 ODS겔을 충전제로 활용한 칼럼크로마토그래피를 수행하여 신규 생성된 물질을 단일물질로 정제하였고, NMR 분석을 수행하여 화합물의 구조 동정을 수행 함



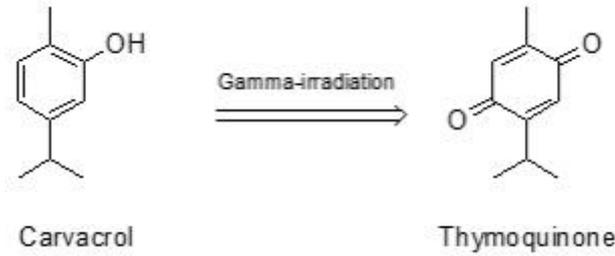
[카바크롤 유도체의 HPLC 크로마토그램 분석 결과]

- 감마선 조사된 카바크롤에서 분리된 물질은 갈색의 무결정형 분말상 형태로 화합물을 분리함
- $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼 측정 결과, 1,2,4,5-tetrasubstituted aromatic 수소 시그널이  $\delta_{\text{H}}$  6.58 (1H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-6) 및 6.52 (1H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-3)에서 관찰되었으며, 한 개의 methine 수소 시그널이  $\delta_{\text{H}}$  3.03 (1H, q,  $J = 7.2$  Hz, H-8) 및 3개의 methyl기가  $\delta_{\text{H}}$  2.04 (3H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-7) 및 1.13 (6H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-9 및 10)에서 관찰되어 methyl기가 결합된 퀴논 유도체임을 시사함
- 추가적으로  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼에서 두개의 carbonyl기가 각  $\delta_{\text{C}}$  188.7 (C-4) 및 187.5 (C-1)이 관찰되었고, 3개의 methyl기가  $\delta_{\text{C}}$  21.4 (C-9 및 10) 및 15.4 (C-7)에서 관찰됨
- 이상의 결과 및 참고 문헌치와의 비교로 감마선 조사된 카바크롤의 주요 생성 물질은 티모퀴논으로 구조를 동정함



[카바크롤 유도체의 NMR 스펙트럼 분석 결과]

- $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz):  $\delta$  6.59 (1H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-6), 6.52 (1H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-3), 3.03 (1H, q,  $J = 7.2$  Hz, H-8), 2.04 (3H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-7), 1.13 (6H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-9 and 10);  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz):  $\delta$  188.7 (C-4), 187.5 (C-1), 155.0 (C-2), 145.2 (C-5), 133.9 (C-6), 130.4 (C-3), 26.5 (C-8), 21.4 (C-9 and 10), 15.4 (C-7), EIMS  $m/z$  164  $[\text{M}]^+$



[카바크롤 유도체인 티모퀴논의 화학적 구조]

라) 실험 결론

- 3종의 신규 페릴릴 알콜 히드록실화 유도체 중, Peak 1 유도체는 GC-MS 라이브러리 분석을 통해 8,9-epoxy- *p*-menth-1-en-7-ol임을 확인함
- 터피넨 4올 히드록실화 유도체들은 GC-MS 라이브러리 분석을 통해 구조 동정이 불가능하였으나, NMR 분석을 통해 (1*R*\*, 4*S*\*)-1,4-dihydroxy-*p*-menth-2-ene이 주요 유도체임을 동정함
- 카바크롤(Chemical E)의 이온화에너지 구조변환 유도체의 NMR 분석을 통해 thymoquinone임을 재확인함

(4) 신규로 발굴된 물질의 분석 표준화

가) 실험 목적

- 이온화에너지/P450 효소를 이용한 신규 리모넨 유도체 발굴 연구를 통해 리모넨 유도체로 물질구조변환된 신규 생성물의 분석법을 표준화하고자 함
- <주관과제> 및 <공동과제 1>의 연구 방법 및 수행 결과로부터 얻어진 분석 표준 방법을 제시하고자 함

나) 이온화에너지 이용 신규 리모넨 유도체 분석 표준법

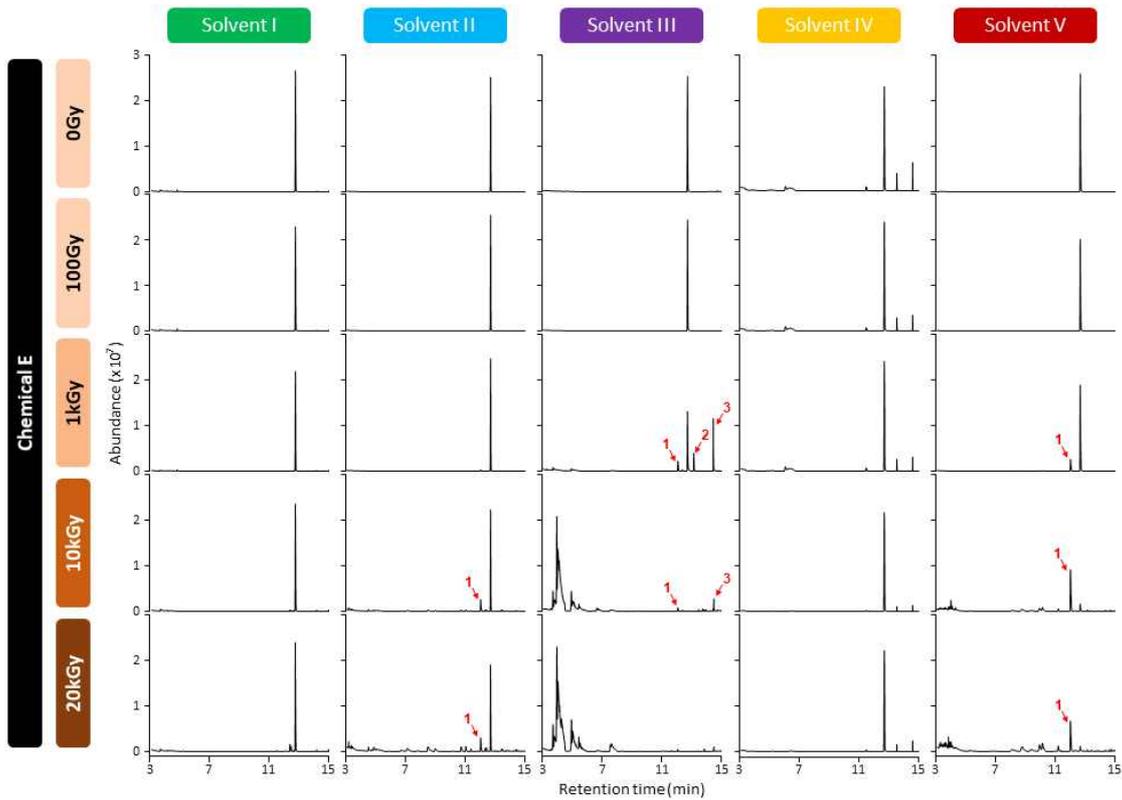
- 목표 시료 설정
  - 본 과제에서는 11종의 리모넨 및 리모넨 유도체[리모넨, L-카베올, S-(+)-카본, R-(+)-카본, (+)-리모넨 산화물, (-)-리모넨 산화물, (S)-(-)-페릴릴 알콜, α-테르피네올, 카바크롤, (-)-아이소폴렉올, (-)-아이소폴렉올]를 목표 시료로 설정하여 이온화에너지를 이용한 신규 유도체를 발굴하고자 함
  - 시료 농도는 1mM이 효과적이며, 고농도(3mM 이상)의 시료 이용시 보다 높은 준위의 방사선 처리에 의해 분자구조변환이 일어남
  - 리모넨과 같은 테르펜 대사체 뿐만 아니라 플라보이드와 같은 이차대사산물을 대상으로도 적용 가능할 것으로 판단됨
- 이온화에너지 선원 및 선량 설정
  - 본 과제에서는 감마선을 선원으로 하여 4시간동안 100Gy에서 20kGy의 총선량을 처리함
  - 낮은 준위(100Gy 이하)의 감마선 처리시 분자구조변환이 거의 일어나지 않으며, 높은 준위(20kGy 이상)의 감마선 처리시 대사체가 분해되는 경향을 나타냄
  - 감마선 이외에도 전자선 및 양성자, 중성자 등의 선원을 사용 가능할 것으로 판단되며, 입자선을 이용시 다양한 종류의 신규 물질을 발굴 가능할 것으로 판단됨
- 유기용매 설정
  - 본 과제에서는 5종의 유기용매(에탄올, 메탄올, 에틸 아세트산, 헥산, 클로로포

름)를 사용하였음

- 목표 시료와 유기용매의 극성 및 분자결합 에너지의 차이에 따라 분자구조변환이 다양하고 용이하게 일어나는 것으로 판단되며, 목표 시료에 따라 여러 종류의 유기용매를 이용하는 것이 신규 대사체 발굴에 유리할 것으로 판단됨
- 가스 크로마토그램(GC) 분석 조건
  - (본 과제에서 이용한 조건) 휘발성 대사체 분석을 위해 가스 크로마토그램 분석이 효율적이며, 대사체 라이브러리 분석에 매우 용이함
  - column : DB-5MS (0.25mm i.d.×30m length, 0.25 μm film thickness)
  - carrier gas : helium
  - flow rate : 1 mL/min
  - oven temperature : 80° C (3 min hold) → 3° C/min → 100° C → 20° C/min → 180° C → 60° C/min → 300° C (3 min hold)
  - injection temperature : 250° C
  - transfer line temperature : 280° C
  - (목표 시료에 따라) 크로마토그램 분석 조건이 필요하며, 비휘발성 대사체는 액체 크로마토그램 분석법이 필요함
- 질량 스펙트럼(MS) 분석 조건
  - (본 과제에서 이용한 조건) 대사체 라이브러리 분석에 매우 효율적임
  - ionization potential : 70 eV
  - scan range : 40 - 600 amu
  - source temperature : 230° C
  - quadrupole temperature : 150° C
- 대사체 분석
  - 구조변환된 대사체는 분석 프로그램(Mass spectrometry program version 2.3)을 이용하였으며, 대사체 동정 분석은 2종의 대사체 라이브러리(Wiley 12th Edition libraries, National Institute of Standards and Technology (NIST) 2020 Mass Spectral libraries)를 통해 대사체를 분류함
  - GC-MS를 이용한 대사체 라이브러리 분석이 불가능한 경우, NMR 분석을 통해 대사체 구조 분석이 필요함
- NMR 분석
  - GC-MS를 이용한 대사체 라이브러리 분석을 통해 대사체 구조 분석이 가능하나, 검증 위해 NMR 분석과 병행하여 구조 분석을 수행함
  - Avance NEO-600 NMR (Bruker, Karlsruhe, Germany)
  - <sup>1</sup>H NMR : 600 MHz
  - <sup>13</sup>C NMR : 150 MHz
  - Solvent : CDCl<sub>3</sub> (δ<sub>H</sub> 7.26, δ<sub>C</sub> 77.16) in TMS
  - J<sub>CH</sub> value : 8 Hz
- 감마선 및 리모넨 유도체(Chemical E, 카바크롤)를 이용한 신규 대사체 발굴의 예
  - 정성적 연구개발성과에서 서술한 목표 시료(카바크롤) 및 이온화에너지 선원/선량, 유기용매 설정을 통해 도출한 결과를 바탕으로 신규 유도체 분석 표준법을 제시하고자 함
    - ✓ 목표 시료 : 카바크롤(Chemical E)
    - ✓ 감마선 총선량 : 100, 1k, 10k, 20kGy (4시간)
    - ✓ 용매 : 에탄올, 메탄올, 에틸 아세트산, 헥산, 클로로포름
  - 감마선 처리된 카바크롤의 크로마토그램 분석 결과 : 카바크롤은 용매 I과 용매

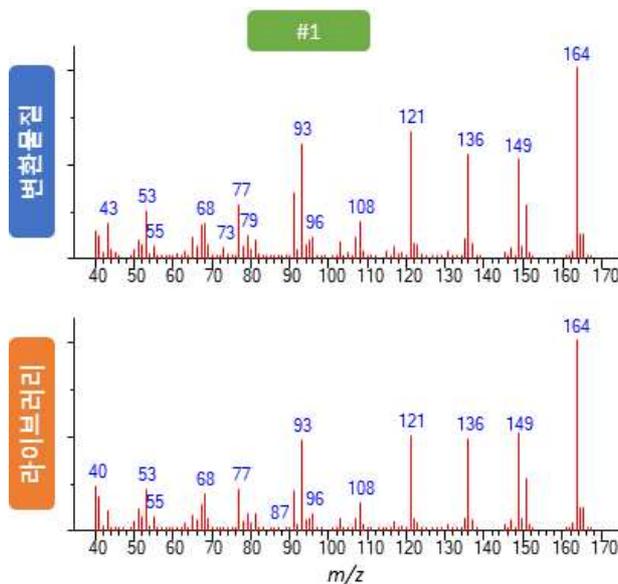
IV에서는 감마선 처리에 의해 거의 변화되지 않음. 용매 II에서 10kGy와 20kGy의 감마선에 의해 일부 구조변환되며, 용매 III에서는 1kGy 이상에서 다른 물질로 변환되지만, 10kGy와 20kGy에서는 분해되는 패턴을 보임. 용매 V에서는 1kGy 이상에서 구조변환된 유도체를 나타냄

- ✓ 이러한 결과는 목표 시료 및 용매에 따라 감마선에 의해 분자구조변환 정도가 다를 것을 나타냄. 카바크롤은 용매 V에서 1번 피크의 유도체가 다량 생성됨. 용매 II에서는 매우 낮은 구조변환율을 나타냄
- ✓ 용매 III에서는 다양한 종류의 피크가 생성됨에 따라 효율적인 단일 유도체 생성에는 어려움이 있어 보임



[카바크롤의 용매 및 감마선 선량에 따른 물질 변환 패턴 분석 결과]

- 질량 스펙트럼 분석 결과 : 용매 V에서 분자구조변환된 유도체 1은 질량 스펙트럼 분석 및 대사체 라이브러리 비교 분석을 통해 thymoquinone으로 판명됨



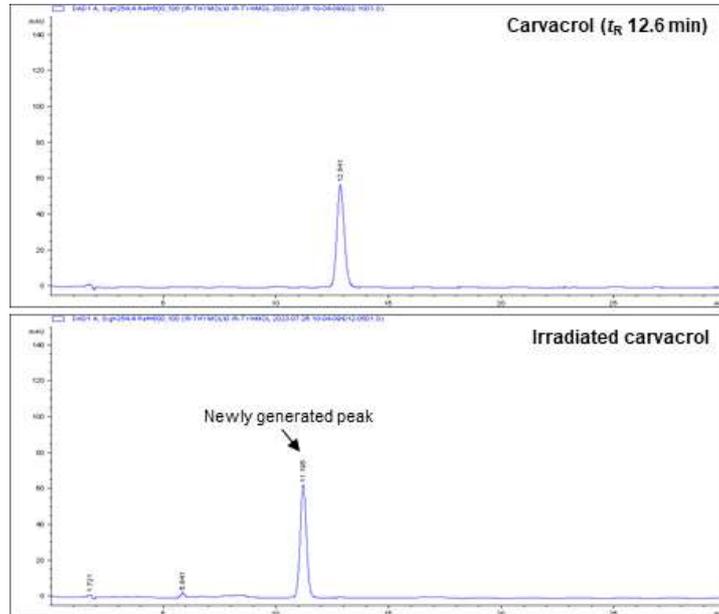
[카바크롤로부터 구조변환된 유도체 1의 질량 스펙트럼 분석 결과]

[카바크롤로부터 구조변환된 유도체 1의 대사체 라이브러리 분석 결과]

Rank	Name	MW	Formula	Qual	CAS #	Ref #
1	Thymoquinone	164	C10H12O2	97	000490-91-5	90616
2	2,5-Cyclohexadiene-1,4-dione, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-	164	C10H12O2	93	000490-91-5	90619
3	Thymoquinone	164	C10H12O2	93	000490-91-5	90618
4	2,5-Cyclohexadiene-1,4-dione, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-	164	C10H12O2	93	000490-91-5	90621
5	(E)-3-Ethyl-6-methyl-4-ethylidene-2-cyclohexen-1-one	164	C11H16O	76	990025-07-2	91709

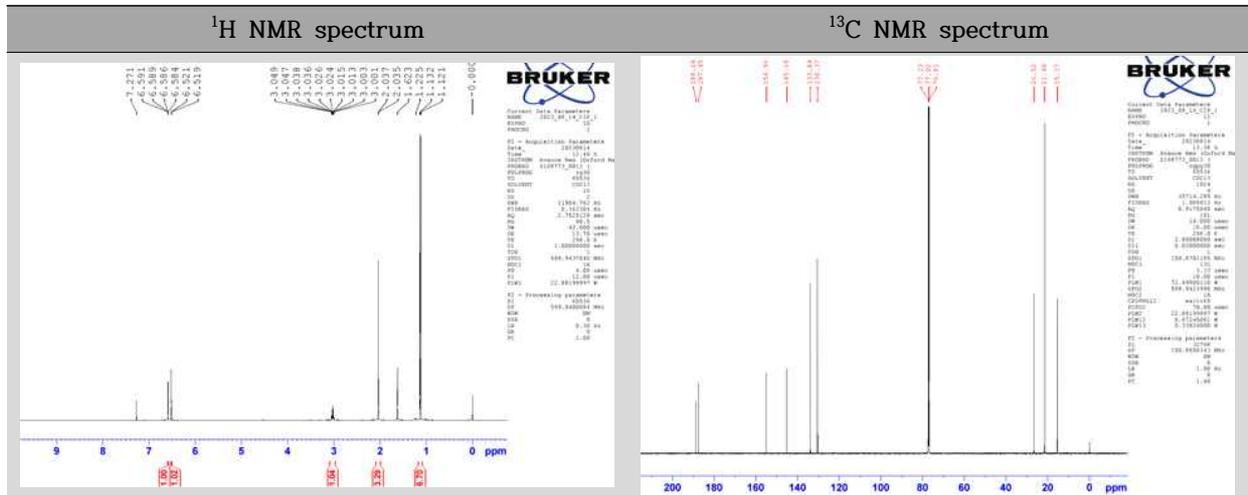
- 카바크롤 구조변환 유도체 1의 순수 분리 및 NMR 분석 결과

- ✓ 카바크롤의 구조변환 유도체 1의 NMR 분석을 위해 ODS겔을 충전제로 활용한 칼럼크로마토그래피를 수행하여 유도체 1을 순수 분리 정제함.



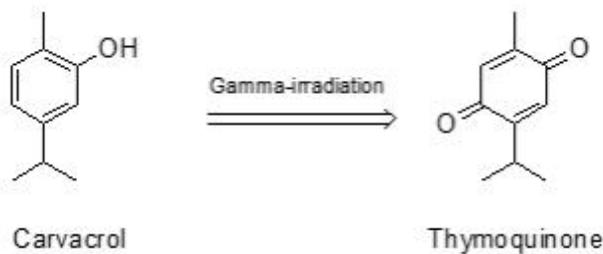
[카바크롤 유도체 1의 HPLC 크로마토그램 분석 결과]

- ✓ 카바크롤 구조변환 유도체 1의 NMR 분석 결과 : <sup>1</sup>H NMR 스펙트럼 및 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼 측정을 통해 참고 문헌치와 비교하여, 감마선에 의해 구조변환된 유도체 1은 티모퀴논임을 구조 동정함



[카바크롤 유도체의 NMR 스펙트럼 분석 결과]

✓ 이러한 결과는 GC-MS를 이용한 대사체 라이브러리 분석 결과와 일치하였음



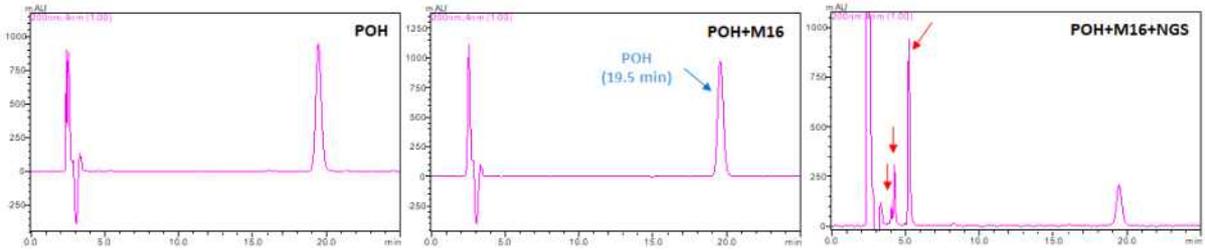
[카바크롤 유도체인 티모퀴논의 화학적 구조]

다) P450 효소 이용 신규 리모넨 유도체 분석 표준법

- 목표 시료 설정
  - 본 과제에서는 4종의 리모넨 및 리모넨 유도체 [페릴릴 알콜, 페릴릭산, α-테르피네올, 테르피넨 4-올]를 목표 시료로 설정하여 P450 효소를 이용한 신규 히드록실화 유도체를 발굴하고자 함
  - 최적 시료 농도 설정을 위해 0.5mM ~ 5mM를 이용함
  - 본 과제에서 사용한 리모넨과 같은 테르펜 대사체 뿐만 아니라 플라보이드와 같은 이차대사산물을 대상으로도 적용 가능할 것으로 판단됨
- P450 효소 설정 및 효소 반응 조건
  - 본 과제에서는 4종의 리모넨 및 리모넨 유도체를 P450 효소인 32종의 BM3 돌연변이체 및 CYP 돌연변이체와 반응시킴
  - 효소 반응을 위해 0.2μM 효소, 200μM 시료, 250μL의 100mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)에 넣은 후 NADPH generating system(NGS; 10mM glucose-6-phosphate, 0.5mM NADP+ 및 1IU/mL의 glucose-6-phosphate dehydrogenase)를 넣고 반응을 개시함. 37°C에서 30분 반응 후 600μL의 ethyl acetate를 넣어 반응을 종결시키고 원심분리하여 상층액을 질소가스로 증발시킨 다음 이동상으로 녹여 히드록실화 유도체를 준비함
- 히드록실화 유도체 분석 조건
  - 효소 반응 유도체는 C18 column(150 x 4.6mm, 5μm; Agilent technologies)가 장착된 HPLC(LC-20AD, SHIMADZU)에 주입하고 이동상 A(물 + 0.1% formic acid)와 이동상 B(acetonitrile + 0.1% formic acid)를 60:40(v/v)의 비율로 0.5mL/min의 유속으로 25분 동안 흘려주었으며, 시료를 HPLC에 장착된 SPD-M20A(SHIMADZU)로 200nm에서 검출함

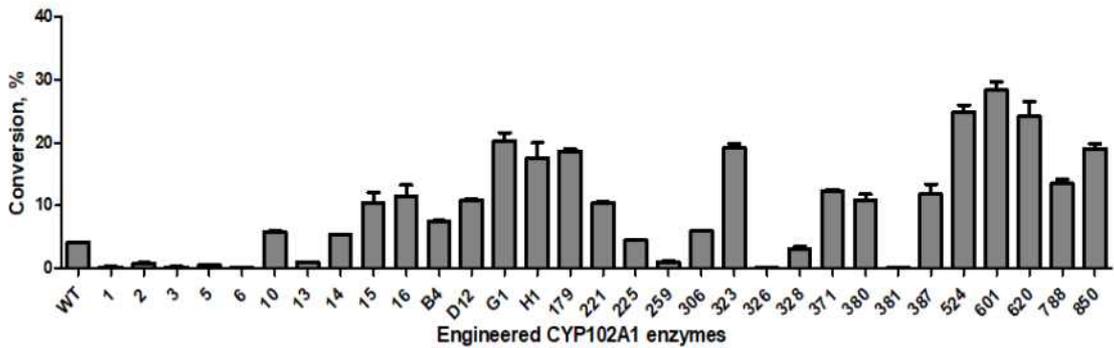
- 신규 히드록실화 유도체의 최적조건 탐색
  - 최적 효소 전환율을 나타내는 최적 온도 및 pH, 기질 농도를 산출하고자 여러 조건에서의 효소 반응 전환율을 탐색함
  - 온도 : 25 ~ 50°C
  - pH : pH 5 ~ pH 9
  - 기질(목표 시료) 농도 : 0.5mM ~ 5mM
- 가스 크로마토그램(GC) 및 질량 스펙트럼(MS) 분석 조건
  - 히드록실화 유도체 동정을 위해 우선적으로 대사체 라이브러리 분석을 수행하고자 가스 크로마토그램 분석을 사용함
  - column : DB-5MS (0.25mm i.d.×30m length, 0.25µm film thickness)
  - carrier gas : helium
  - flow rate : 1 mL/min
  - oven temperature : 80° C (3 min hold) → 3° C/min → 100° C → 20° C/min → 180° C → 60° C/min → 300° C (3 min hold)
  - injection temperature : 250° C
  - transfer line temperature : 280° C
  - ionization potential : 70 eV
  - scan range : 40 - 600 amu
  - source temperature : 230° C
  - quadrupole temperature : 150° C
- 대사체 분석
  - 구조변환된 대사체는 분석 프로그램(Mass spectrometry program version 2.3)을 이용하였으며, 대사체 동정 분석은 2종의 대사체 라이브러리(Wiley 12th Edition libraries, National Institute of Standards and Technology (NIST) 2020 Mass Spectral libraries)를 통해 대사체를 분류함
  - GC-MS를 이용한 대사체 라이브러리 분석이 불가능한 경우, NMR 분석을 통해 대사체 구조 분석이 필요함
- NMR 분석
  - GC-MS를 이용한 대사체 라이브러리 분석이 불가능한 경우, NMR 분석을 통해 대사체 구조 분석을 수행함
  - Avance NEO-600 NMR (Bruker, Karlsruhe, Germany)
  - <sup>1</sup>H NMR : 600 MHz
  - <sup>13</sup>C NMR : 150 MHz
  - Solvent : CDCl<sub>3</sub> (δ<sub>H</sub> 7.26, δ<sub>C</sub> 77.16) in TMS
  - J<sub>CH</sub> value : 8 Hz
- P450 효소 및 페릴릴 알콜을 이용한 신규 대사체 발굴의 예
  - 정성적 연구개발성과에서 서술한 목표 시료(페릴릴 알콜) 및 P450 효소 및 반응 조건, 분석 조건 설정을 통해 도출한 결과를 바탕으로 신규 유도체 분석 표준법을 제시하고자 함
    - ✓ 목표 시료 : 페릴릴 알콜
    - ✓ P450 효소 : 32종의 P450 돌연변이체 라이브러리
  - P450 효소 반응에 의한 페릴릴 알콜의 크로마토그램 분석 결과 : P450 돌연변이체 라이브러리를 이용한 효소 반응에 의해 페릴릴 알콜은 5.3분에서 구조변환된 주요 피크를 나타냄
    - ✓ 4.3분과 4분에서도 낮은 수준의 피크가 나타났으나, 주요 피크에 비해 매우 낮

은 함량을 나타냄



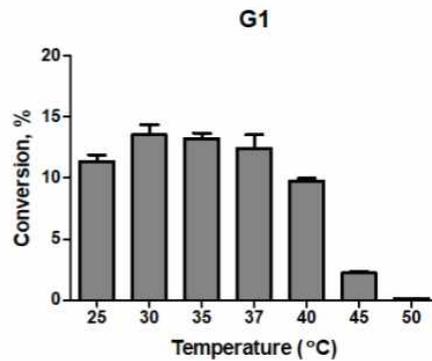
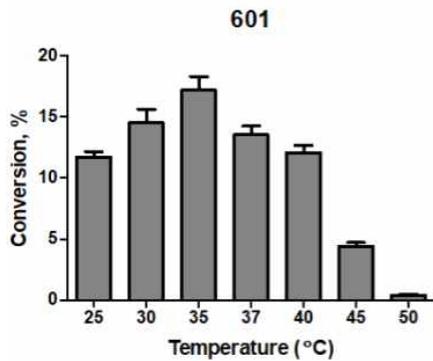
[Perillyl alcohol과 BM3 mutant 16의 효소 반응 후 반응액의 HPLC 크로마토그램]

- ✓ 32종의 P450 돌연변이체 라이브러리에 의해 구조변환된 유도체의 전환율은 601 효소가 28% 가장 높았음

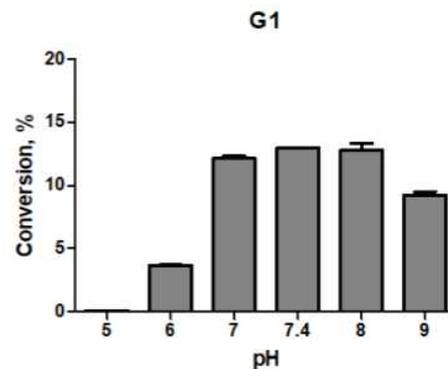
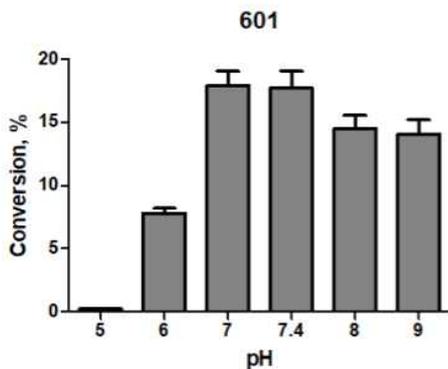


[P450 mutants library의 POH major product에 대한 conversion rate]

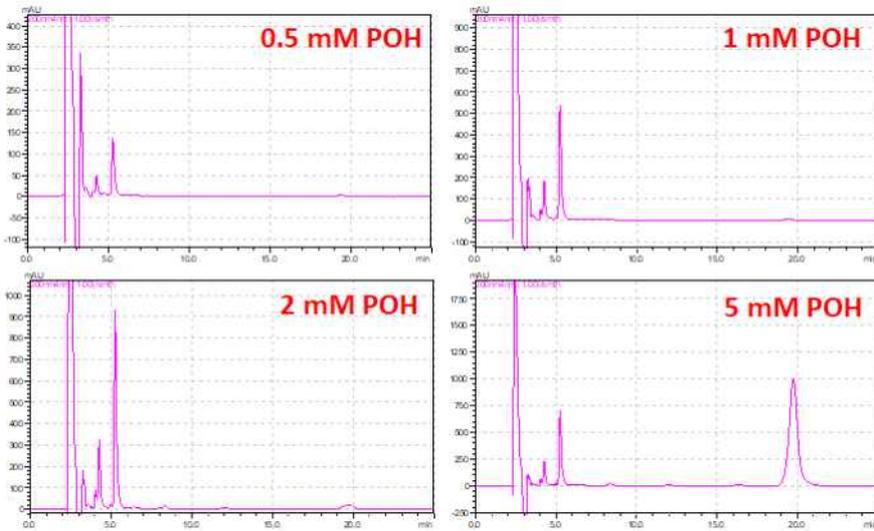
- 구조변환 유도체의 최적 생산을 위한 최적 조건 탐색 : 다양한 조건의 온도 및 pH, 기질 농도에 따라 효소에 의해 생성된 유도체의 생산을 위한 최적 조건을 탐색함



[POH 대사체 생산을 위한 최적 온도]

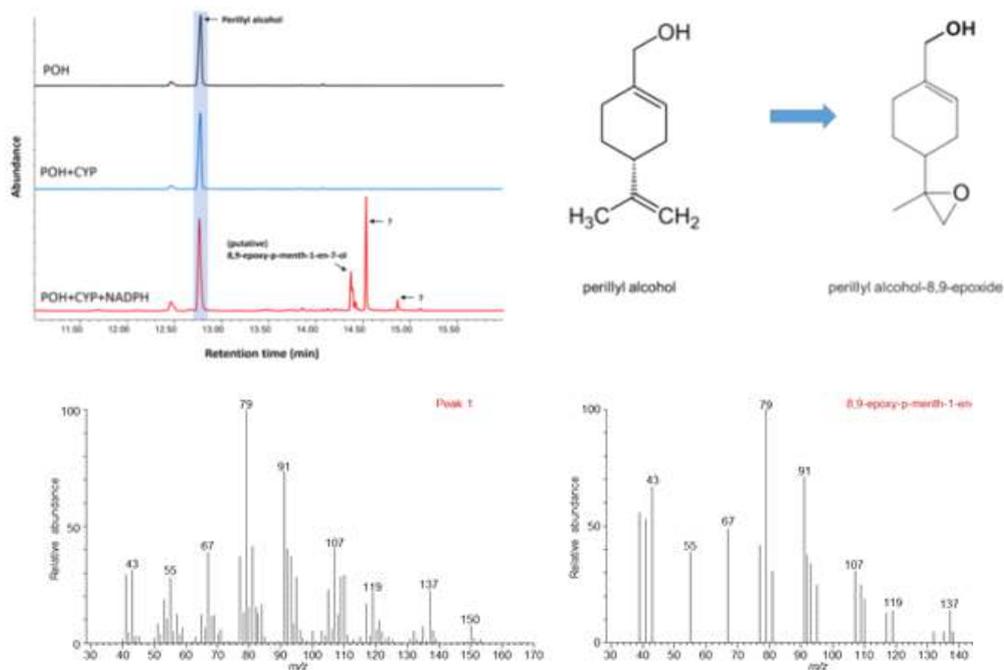


[POH 대사체 생산을 위한 최적 pH]



[기질 농도에 따른 대사체의 HPLC 크로마토그램]

- 질량 스펙트럼 분석 결과 : 페릴릴 알콜의 P450 효소에 의한 구조변환 유도체는  $m/z$  값이 페릴릴 알콜의  $m/z$  값 보다 16이 증가되었으며, 대사체 라이브러리 분석을 통해 perillyl alcohol-8,9-epoxide로 판명됨



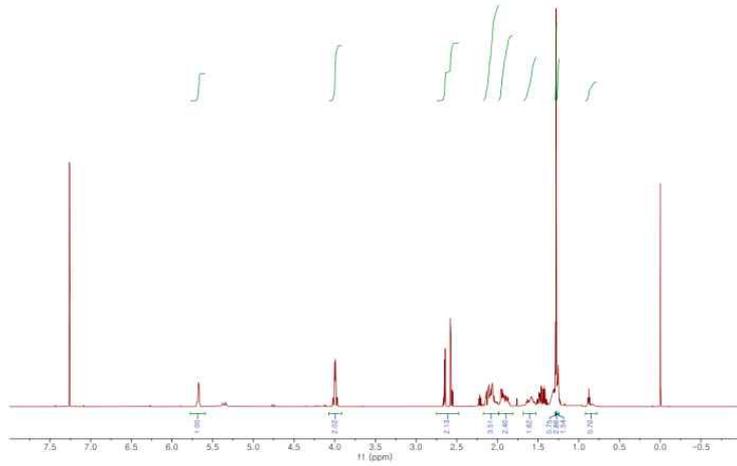
[페릴릴 알콜 유래 구조변환 유도체의 질량 스펙트럼 분석 결과]

[페릴릴 알콜 유도체의 대사체 라이브러리 분석 결과]

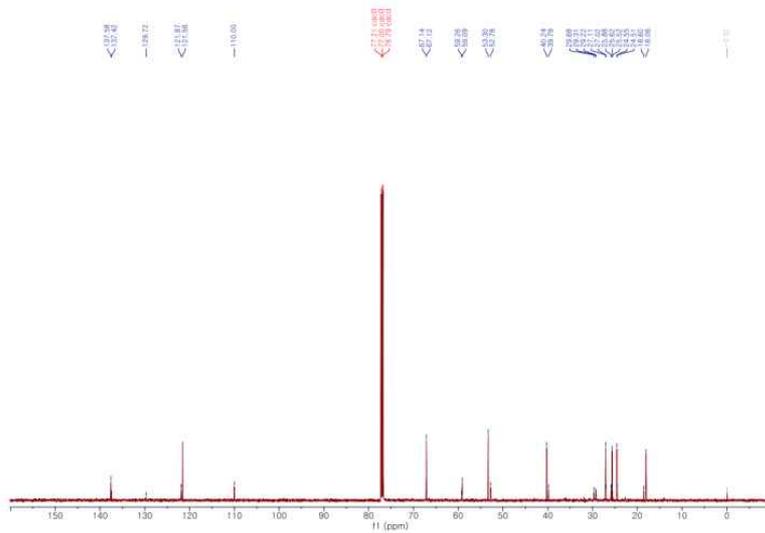
Rank	Name	MW	Formula	Qual	CAS #	Ref #
1	Perillyl alcohol-8,9-epoxide	168	C10H16O2	90	990029-38-7	101858
2	1-Decen-3-yne	136	C10H16	46	033622-26-3	39565

- 페릴릴 알콜 구조변환 유도체의 순수 분리 및 NMR 분석 결과
  - ✓ 페릴릴 알콜의 구조변환 유도체의 NMR 분석을 위해 ODS겔을 충전제로 활용한 칼럼크로마토그래피를 수행하여 유도체를 순수 분리 정제함
  - ✓ 페릴릴 알콜 구조변환 유도체의 NMR 분석 결과 :  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼 및  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼 측정을 통해 참고 문헌치와 비교하여, P450 효소에 의해 구조변환된

유도체는 perillyl alcohol-8,9-epoxide임을 구조 동정함

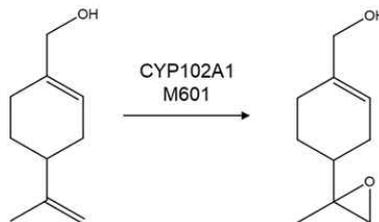


[페릴릴 알콜 구조변환 유도체의  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼 분석 결과]



[페릴릴 알콜 구조변환 유도체의  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼 분석 결과]

✓ 이러한 결과는 GC-MS를 이용한 대사체 라이브러리 분석 결과와 일치하였음



[페릴릴 알콜의 P450 효소 반응에 의해 생성된 유도체의 분자구조]

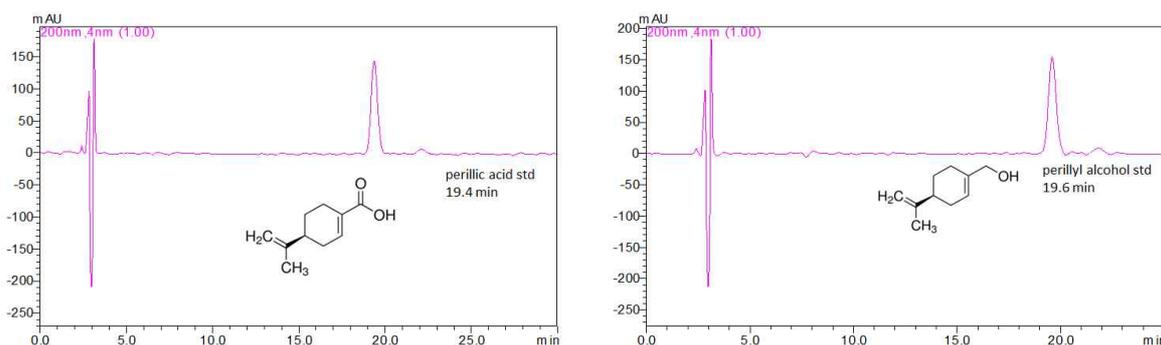
## 나. 공동과제 1

### (1) Cyclic monoterpene계 화합물 리모넨 유도체로 히드록실화 대사체/유도체 제조

가) 리모넨 유도체의 HPLC 분석조건 확립

▪ 분석 결과

- 리모넨 유도체인 perillic acid(PA)과 perillyl alcohol(POH)의 히드록실화 대사체 제조 전 HPLC 분석 조건을 확립하기 위해 0.2 mM 농도로 리모넨 유도체를 메탄올에 희석한 후 표준시료를 제조함
- 표준시료 30  $\mu$ L을 C18 column(150 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m; Agilent technologies)가 장착된 HPLC(LC-20AD, SHIMADZU)에 주입하고 이동상 A(물 + 0.1% formic acid)와 이동상 B(acetonitrile + 0.1% formic acid)를 60:40(v/v)의 비율로 0.5 mL/min의 유속으로 25분 동안 흘려주었으며, 시료를 HPLC에 장착된 SPD-M20A(SHIMADZU)로 200 nm에서 검출함
- 그 결과, PA와 POH 표준시료는 각각 19분과 19.5분에서 용출되었음

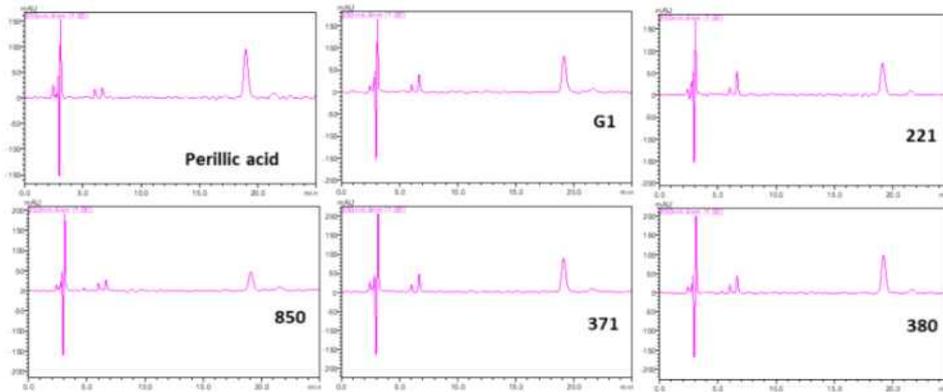


[리모넨 유도체인 perillyl alcohol(POH)과 perillyl acid(PA) 표준시료의 HPLC 분석 결과]

나) Cyclic monoterpene계 화합물 리모넨 유도체의 히드록실화 대사체/유도체 제조

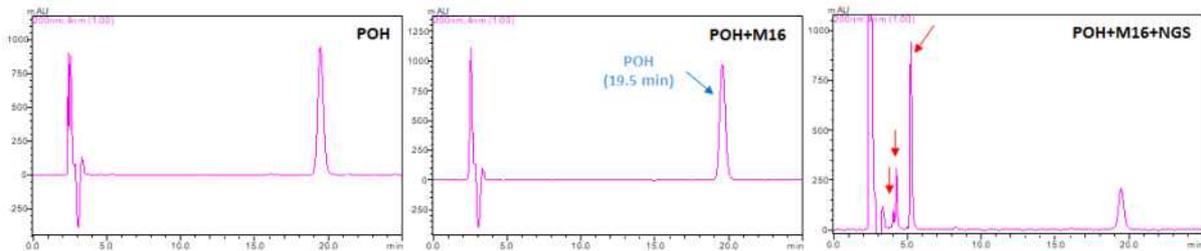
▪ BM3 mutants library screening

- PA의 히드록실화 대사체/유도체 제조를 위해 wild type(WT)을 포함한 BM3 mutants library를 사용하여 PA에 대한 반응성을 조사하였음
- 0.2  $\mu$ M enzyme를 200  $\mu$ M PA가 포함된 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) 250  $\mu$ L에 넣은 후 NADPH generating system(NGS; 10 mM glucose-6-phosphate, 0.5 mM NADP<sup>+</sup> 및 1 IU/mL의 glucose-6-phosphate dehydrogenase)를 넣고 반응을 개시함. 37°C에서 30분 반응 후 600  $\mu$ L의 ethyl acetate를 넣어 반응을 종결시키고 원심분리하여 상층액을 질소가스로 증발시킨 다음 이동상으로 녹여 샘플을 준비함
- PA 반응 샘플을 C18 column이 장착된 HPLC로 위 분석 조건과 동일하게 분석하였으며 그 결과, PA는 BM3 mutants와 반응하지 않았음



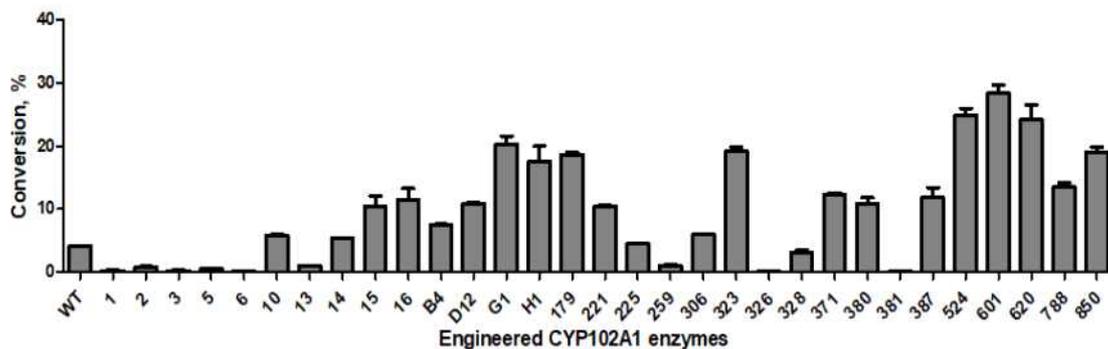
[Perillic acid와 P450 효소 반응 후 반응액의 HPLC 크로마토그램]

- POH의 히드록실화 대사체/유도체 제조를 위해 WT을 포함한 BM3 mutants library를 사용하여 POH에 대한 반응성을 조사하였음
- 0.2  $\mu$ M enzyme을 5 mM POH가 포함된 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) 250  $\mu$ L에 넣은 후 NGS를 넣고 반응을 개시함. 37°C에서 10분 반응 후 25  $\mu$ L의 2 M HCl을 넣어 반응을 종결시키고 원심분리하여 상층액을 0.2  $\mu$ m filter(ADVANTEC)에 통과시킨 후 침전물이 제거된 샘플을 준비함
- 위 샘플을 C18 column이 장착된 HPLC로 위 분석 조건과 동일하게 분석하였으며 그 결과, POH는 BM3 mutants와 반응하여 major product 1개와 minor product 2개를 생성하였으며 각 products는 각각 5.3분, 4.3분과 4분에서 용출됨



[Perillyl alcohol과 BM3 mutant 16의 효소 반응 후 반응액의 HPLC 크로마토그램]

- WT의 conversion rate는 4%이었으며 테스트한 32 종의 효소 중 601의 conversion rate가 28%로 가장 높았음



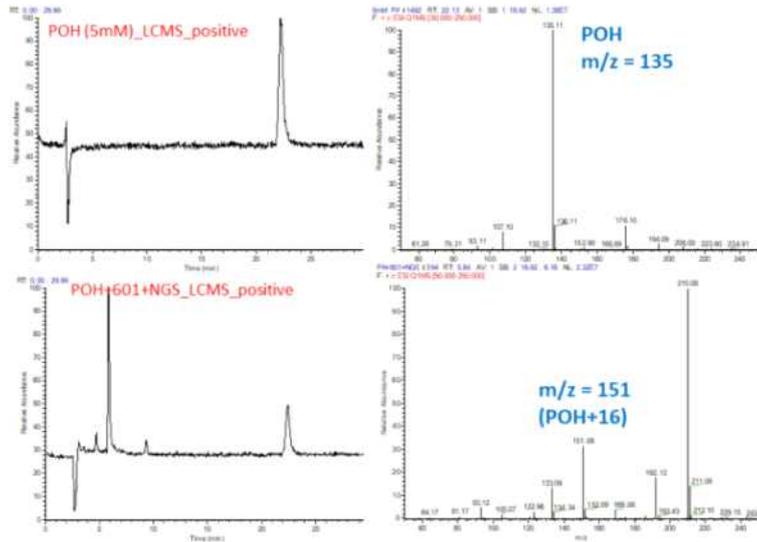
[BM3 mutants library의 POH major product에 대한 conversion rate]

■ POH 대사체의 동정

- POH의 major product(5.3분)를 동정하기 위해 LC-MS 분석을 수행함. 위 HPLC 분석 샘플과 동일한 방법으로 0.2  $\mu$ M M16을 5 mM POH과 반응시킨 후 샘플을 준비함
- 샘플 5  $\mu$ L을 ZorBax SB-C18 (4.6 x 250 mm, 5  $\mu$ m, Agilent technologies, USA)가 장착된 Thermo Scientific AccelaTM (Thermo fisher scientific)에 주입하고 이동

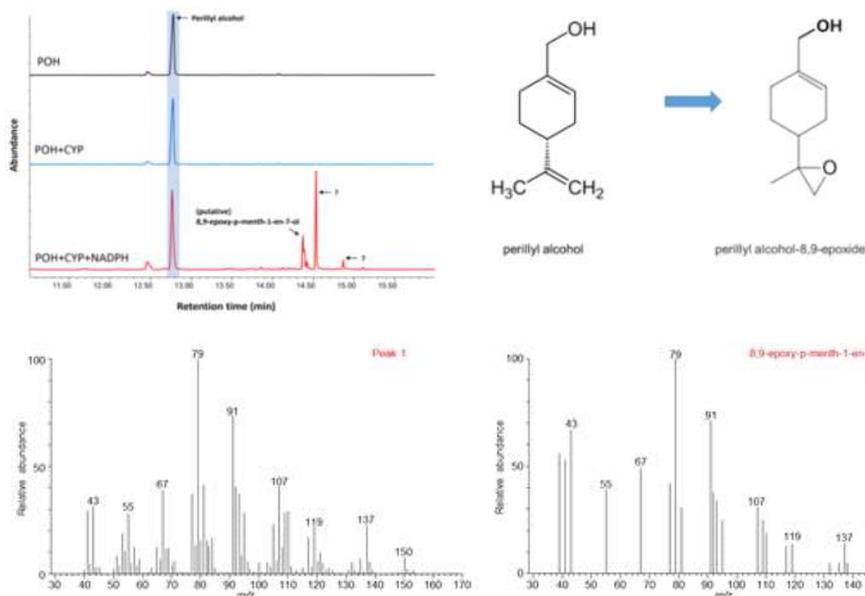
상 A(물 + 0.1% formic acid)와 이동상 B(acetonitrile + 0.1% formic acid)를 60:40(v/v)의 비율로 0.7 mL/min의 유속으로 30분 동안 흘려주었으며, 시료를 TSQ Quantum™ Access MAX (Thermo fisher scientific)로 분석함

- 그 결과, POH와 major product는 각각 22분과 5.5분에서 용출되었으며 POH의 m/z 값은 135이고 BM3에 의해 생성된 POH의 major product의 분자량은 POH보다 16 증가된 151임. 따라서 BM3가 산소 한개를 첨가하는 반응을 촉매함을 확인함



[POH와 major product의 LC-MS spectra]

- 또한, POH의 major product(5.3분)를 동정하기 위해 GC-MS 분석을 수행함. 위 HPLC 분석 샘플과 동일한 방법으로 0.2 μM 601을 2 mM POH과 반응시킨 후 ethyl acetate로 반응을 종결시켜 샘플을 준비함
- GC-MS 분석 결과, major product의 m/z값이 POH의 m/z값보다 16이 증가되었으며, MS database에서 perillyl alcohol-8,9-epoxide임을 확인함

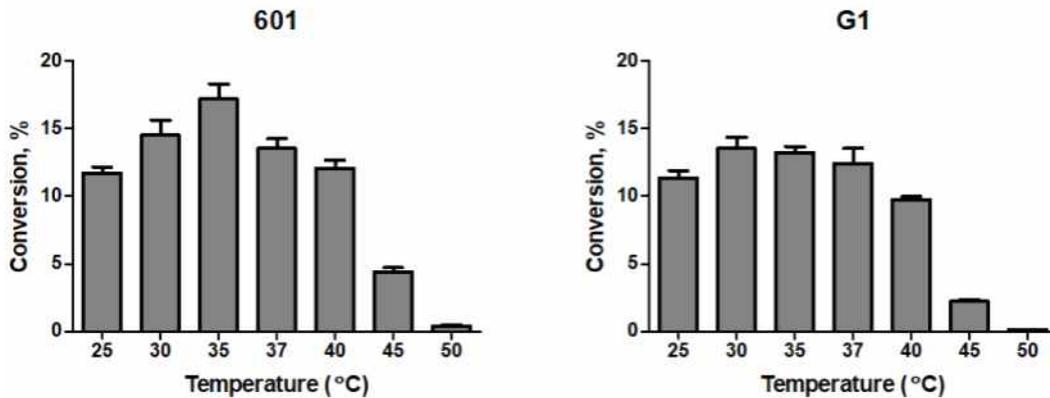


[POH와 major product의 GC-MS spectra]

- POH 대사체 생산을 위한 최적조건 탐색
  - BM3 mutants의 POH 대사체인 perillyl alcohol-8,9-epoxide를 생산하기 위한 최적 온도를 조사하기 위해 0.2 μM 601 또는 G1 enzyme을 5 mM POH가 포함된 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) 250 μL에 넣은 후 NGS를 넣고 반응을 개시

함. 25, 30, 35, 37, 40, 45 또는 50°C에서 10분 반응 후 25  $\mu$ L의 2 M HCl을 넣어 반응을 종결시키고 원심분리하여 상층액을 0.2  $\mu$ m filter(ADVANTEC)에 통과시킨 후 침전물이 제거된 샘플을 준비함

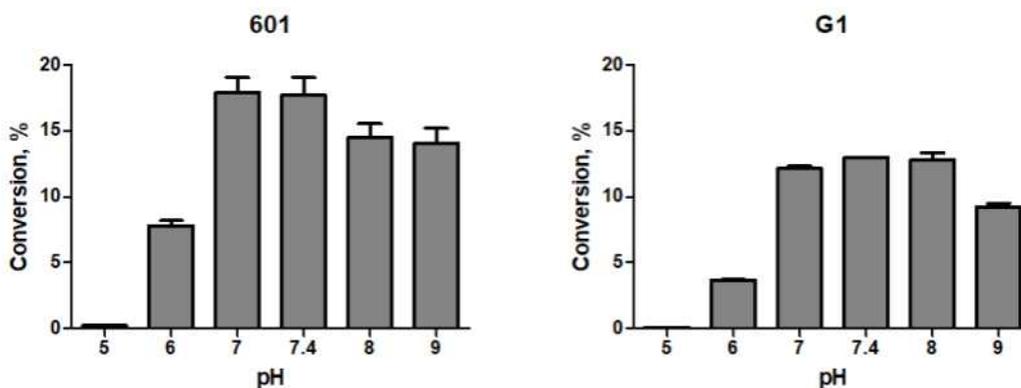
- 위 샘플을 C18 column이 장착된 HPLC로 위 분석 조건과 동일하게 분석하였으며 그 결과, 601과 G1은 25-40°C 온도범위에서 10% 이상의 conversion rate를 보였고 45°C 이상의 온도에서 그 활성이 감소하였음. 또한, 35°C에서 최대 활성을 나타내었으며, 이때 601과 G1의 conversion rate는 각각 17%와 15%임



[POH 대사체 생산을 위한 최적 온도]

- BM3 mutants의 POH 대사체인 perillyl alcohol-8,9-epoxide를 생산하기 위한 최적 pH를 조사하기 위해 0.2  $\mu$ M 601 또는 G1 enzyme을 5 mM POH가 포함된 100 mM potassium phosphate buffer (pH 5, 6, 7, 7.4, 8, 또는 9) 250  $\mu$ L에 넣은 후 NGS를 넣고 반응을 개시함. 35°C에서 10분 반응 후 25  $\mu$ L의 2 M HCl을 넣어 반응을 종결시키고 원심분리하여 상층액을 0.2  $\mu$ m filter(ADVANTEC)에 통과시킨 후 침전물이 제거된 샘플을 준비함

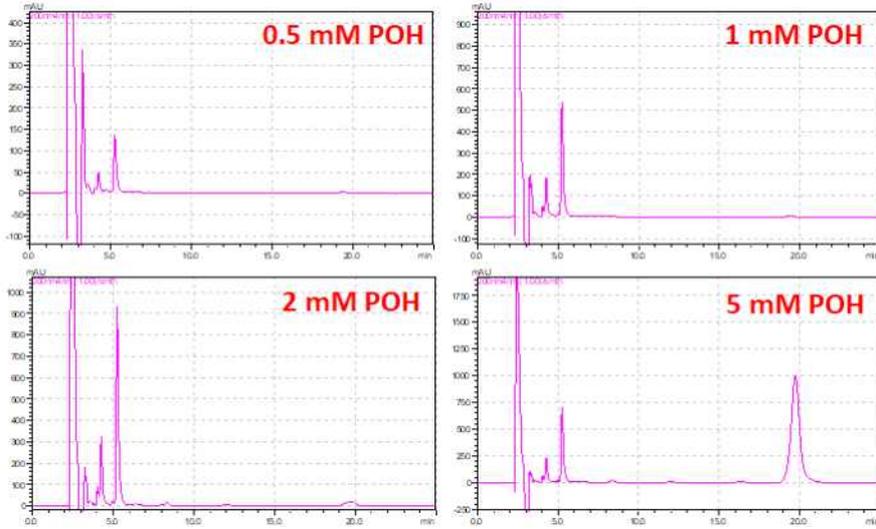
- 위 샘플을 C18 column이 장착된 HPLC로 위 분석 조건과 동일하게 분석하였으며 그 결과, 601과 G1은 pH 6-9 범위에서 모두 활성을 나타내었고 pH 5에서는 perillyl alcohol-8,9-epoxide를 생성하지 못함. pH 7.4에에서 최대 활성을 나타내었으며, 이 때 601과 G1의 conversion rate는 각각 18%와 13%임



[POH 대사체 생산을 위한 최적 pH]

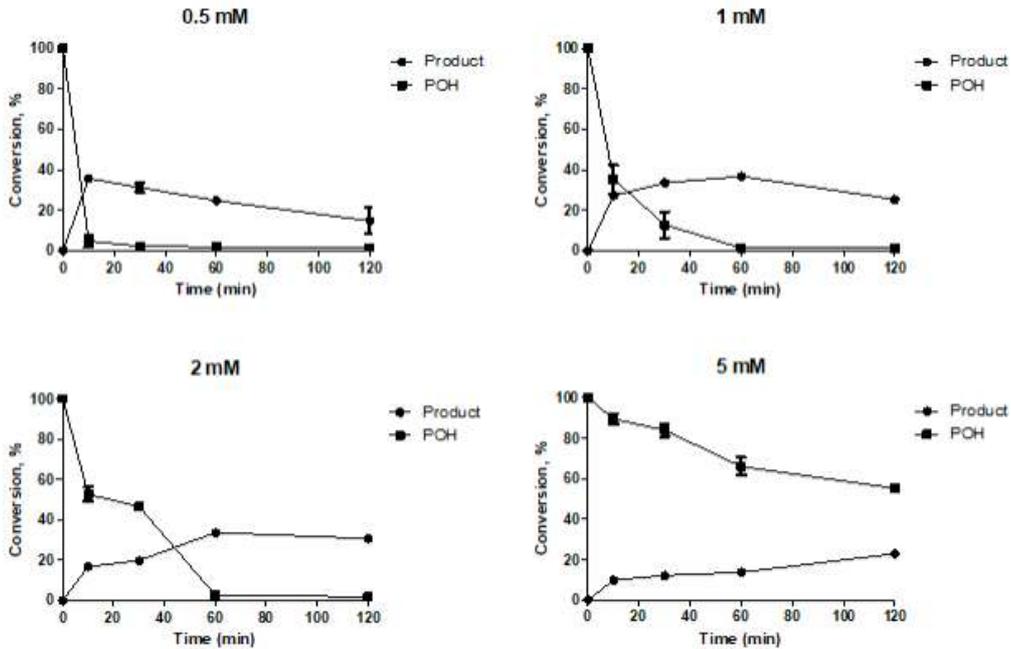
- BM3 mutants의 POH 대사체인 perillyl alcohol-8,9-epoxide를 생산하기 위한 최적 기질농도와 반응 시간을 조사하기 위해 0.2  $\mu$ M 601 enzyme을 0.5, 1, 2 또는 5 mM POH가 포함된 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) 250  $\mu$ L에 넣은 후 NGS를 넣고 반응을 개시함. 35°C에서 0, 10, 30, 60, 또는 120분 반응 후 25  $\mu$ L의 2 M HCl을 넣어 반응을 종결시키고 원심분리하여 상층액을 0.2  $\mu$ m filter(ADVANTEC)에 통과시킨 후 침전물이 제거된 샘플을 준비함

- 위 샘플을 C18 column이 장착된 HPLC로 위 분석 조건과 동일하게 분석하였음. 그 결과, 0.5-2 mM POH를 601과 1 시간 동안 반응 시키면 기질이 모두 대사되며, 5 mM POH일 때는 50% 이상의 기질이 남아있음을 확인함



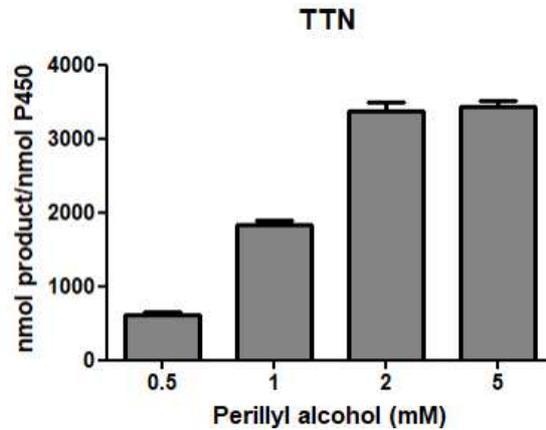
[기질 농도에 따른 대사체의 HPLC 크로마토그램]

- 기질 농도가 0.5 mM일 때, 10분에서 기질이 모두 생성물로 전환되었으며, 이때 perillyl alcohol-8,9-epoxide로의 conversion rate는 36%임. 기질 농도가 1 또는 2 mM일 때, 기질이 60분에서 모두 생성물로 전환되었으며, 이때 생성물로의 conversion rate는 각각 37% 또는 34%임. 기질 농도가 5 mM 이고 120분 반응했을 때 기질은 50% 이상 남아있으며 생성물로의 conversion rate는 22%임



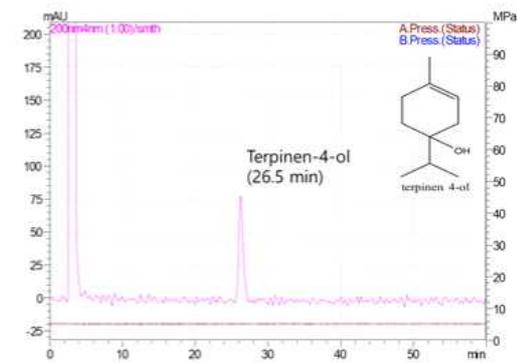
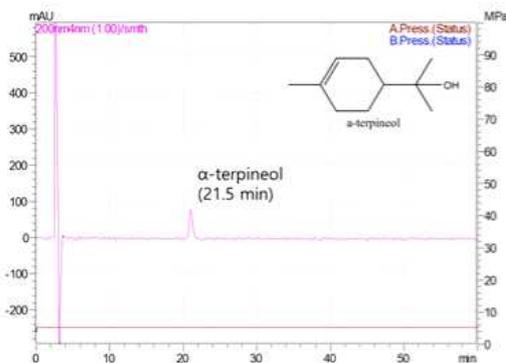
[POH 대사체 생산을 위한 최적 기질 농도 및 반응 시간]

- 0.5-5 mM POH를 601과 1시간 동안 반응 시, total turnover number(TTN)은 각각 619, 1835, 3366, 그리고 3437 nmool product/nmol P450이었으며, 2 mM 기질 농도에서 반응이 포화됨



[기질 농도에 따른 대사체의 Total turnover number(TTN)]

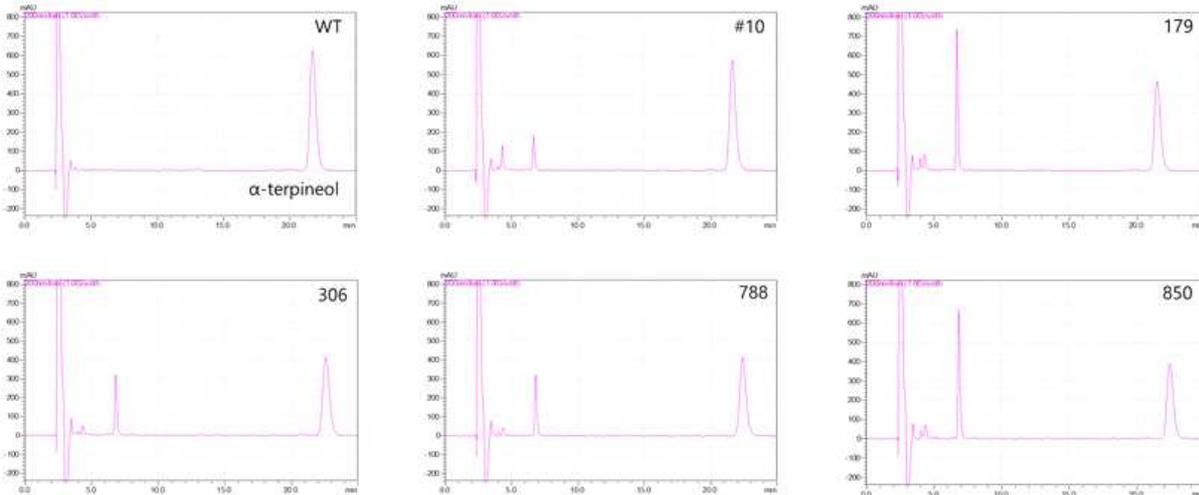
- 따라서, BM3 mutants의 POH 대사체인 perillyl alcohol-8,9-epoxide를 생산하기 위한 최적 조건은 2 mM POH를 0.2  $\mu$ M 601을 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)에 넣고 35°C에서 1시간 동안 반응하는 조건임
- 터피네올로 히드록실화 대사체/유도체 제조를 위한 터피네올의 HPLC 분석조건 확립
  - 터피네올 계열인  $\alpha$ -terpineol과 terpinen-4-ol의 HPLC 분석 조건을 확립하기 위해 0.5 mM 농도로 각각  $\alpha$ -terpineol을 메탄올에 희석하고 terpinen-4-ol을 Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 희석하여 표준시료를 제조함
  - 표준시료 30  $\mu$ L을 C18 column(150 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m; Agilent technologies)가 장착된 HPLC(LC-20AD, SHIMADZU)에 주입하고 이동상 A(물 + 0.1% formic acid)와 이동상 B(acetonitrile + 0.1 formic acid)를 60:40(v/v)의 비율로 0.5 mL/min의 유속으로 35분 동안 흘려주었으며, 시료를 HPLC에 장착된 SPD-M20A(SHIMADZU)로 200 nm에서 검출함
  - 그 결과,  $\alpha$ -terpineol과 terpinen-4-ol은 각각 21.5분과 26.5분에서 용출되었음



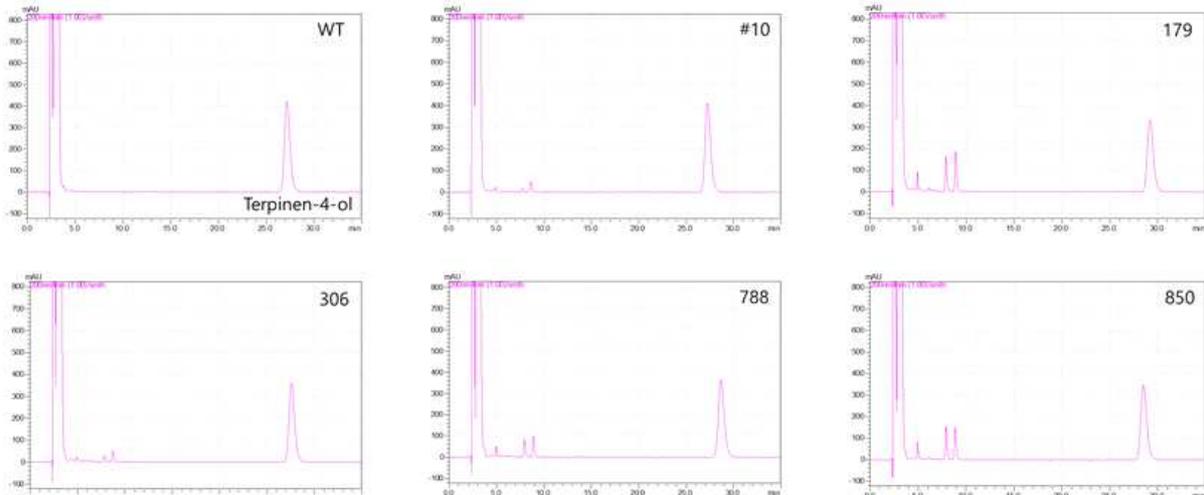
[터피네올 계열인  $\alpha$ -terpineol과 terpinen-4-ol 표준시료의 HPLC 크로마토그램]

- BM3 mutants library screening
  - $\alpha$ -terpineol과 terpinen-4-ol의 히드록실화 대사체/유도체 제조를 위해 wild type(WT)을 포함한 BM3 mutants library를 사용하여 터피네올에 대한 반응성을 조사하였음
  - 0.2  $\mu$ M enzyme을 200  $\mu$ M 터피네올이 포함된 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) 250  $\mu$ L에 넣은 후 NADPH generating system(NGS; 10 mM glucose-6-phosphate, 0.5 mM NADP<sup>+</sup> 및 1 IU/mL의 glucose-6-phosphate dehydrogenase)를 넣고 반응을 개시함. 30°C에서 10분 반응 후 25  $\mu$ L의 HCl(2M)를 넣어 반응을 종결시키고 원심분리한 후 반응액을 0.2  $\mu$ m filter(ADVANTEC)으로 필터링 하여 이동상으로 녹여 샘플을 준비함

- 터피네올 반응 샘플 30  $\mu$ L을 C18 column이 장착된 HPLC로 위 분석 조건과 동일하게 분석하였으며 그 결과, 터피네올은 CYP102A1 wild type과 반응하지 않았으나 BM3 mutants 일부와는 반응함을 확인함

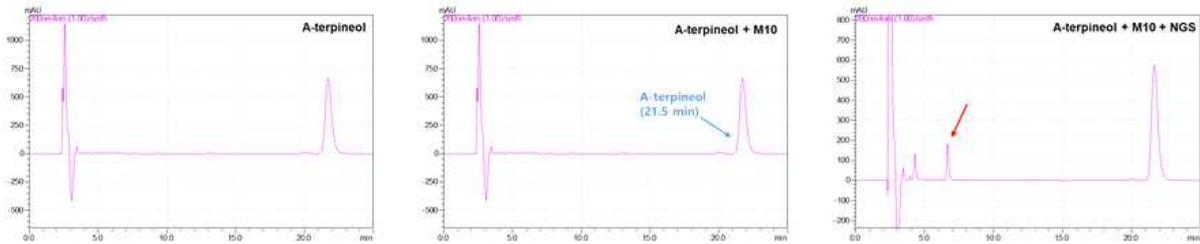


[ $\alpha$ -terpineol과 P450 효소 반응 후 반응 샘플의 HPLC 크로마토그램]

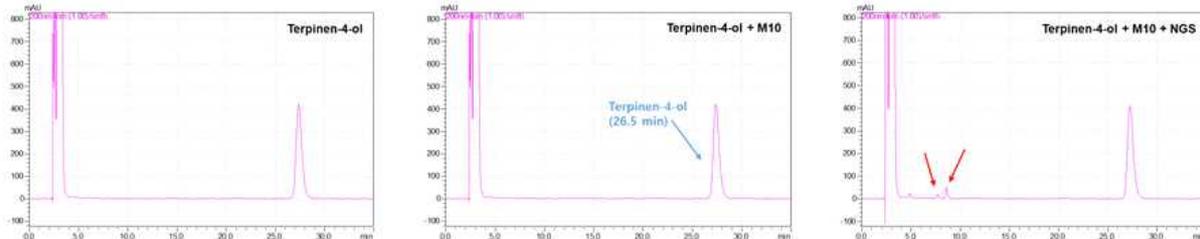


[Terpinen-4-ol과 P450 효소 반응 후 반응 샘플의 HPLC 크로마토그램]

- 터피네올의 히드록실화 대사체/유도체 제조를 위해 WT을 포함한 BM3 mutants library를 사용하여 터피네올에 대한 반응성을 조사하였음
- 0.2  $\mu$ M enzyme을 5 mM 터피네올이 포함된 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) 250  $\mu$ L에 넣은 후 NGS를 넣고 반응을 개시함. 37°C에서 10분 반응 후 25  $\mu$ L의 2 M HCl을 넣어 반응을 종결시키고 원심분리하여 0.2  $\mu$ m filter(ADVANTEC)에 통과시킨 후 침전물이 제거된 샘플을 준비함
- 위 샘플을 C18 column이 장착된 HPLC로 위 분석 조건과 동일하게 분석하였으며 그 결과,  $\alpha$ -terpineol(21.5분)은 BM3 mutants와 반응하여 1개의 product를 생성하였으며 product는 6.5분에서 용출되었음. Terpinen-4-ol (26.5분)은 BM3 mutants와 반응하여 2개의 product를 생성하였으며 product 1은 7.5분, product 2는 8.5분에서 용출되었음

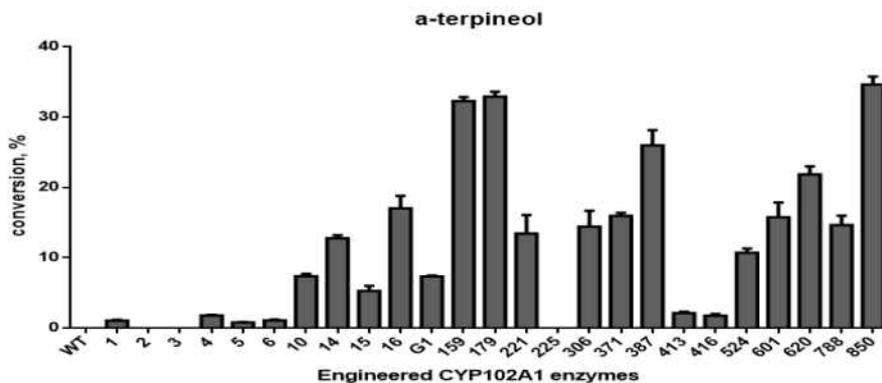


[a-terpineol과 BM3 mutant 10의 효소 반응 후 반응액의 HPLC 크로마토그램]



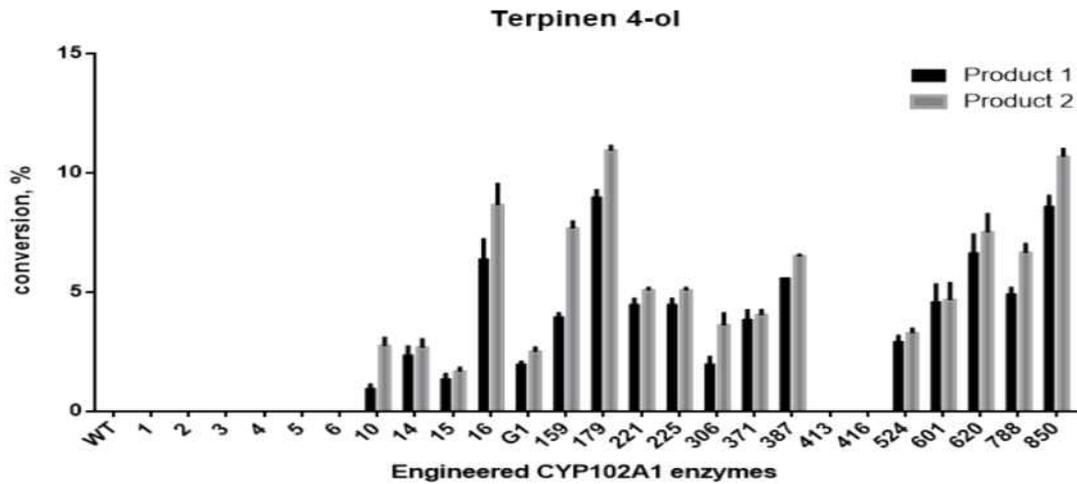
[Terpinen-4-ol과 BM3 mutant 10의 효소 반응 후 반응액의 HPLC 크로마토그램]

- 터피네올의 히드록실화 대사체/유도체 제조를 위해 가장 효율적인 개체를 조사하기 위해 WT를 포함한 BM3 mutants library를 사용하여 터피네올에 대한 반응성을 조사하였음
- 위와 동일한 조성을 이용하여 샘플을 제작하고 C18 column이 장착된 HPLC로 위 분석 조건과 동일하게 분석하였으며 product 생산 정도를 conversion rate로 그래프로 나타내었음
- Wild type을 이용한 a-terpineol의 대사에서는 conversion 되지 않았으며 테스트한 26종의 효소 중 850의 conversion rate가 34.6%로 가장 높았고 179가 32.9%로 두 번째로 높았음



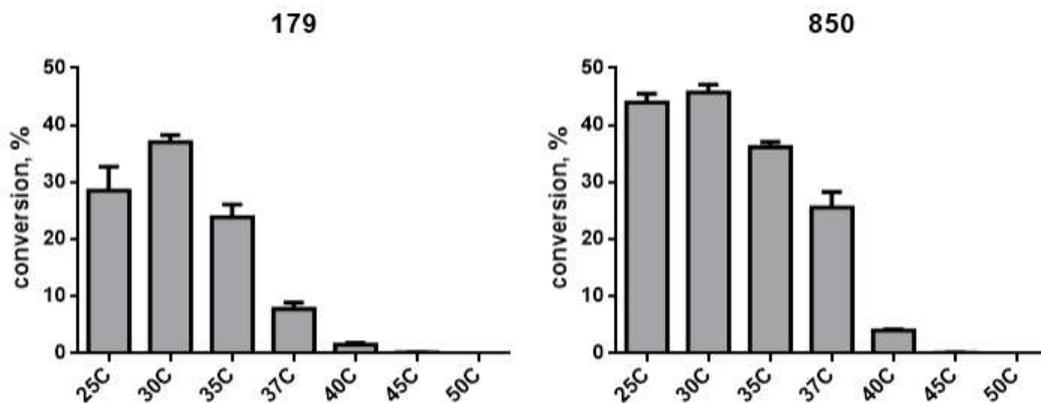
[BM3 mutants library의 a-terpineol product에 대한 conversion rate]

- Wild type을 이용한 terpinen-4-ol의 대사에서는 conversion 되지 않았으며 테스트한 26종의 효소 중 179를 이용한 product 1이 9%, product 2가 10.9% 전환되었으며, 850를 이용한 product 1이 8.6%, product 2가 10.7%가 전환되었음



[BM3 mutants library의 terpinen-4-ol product에 대한 conversion rate]

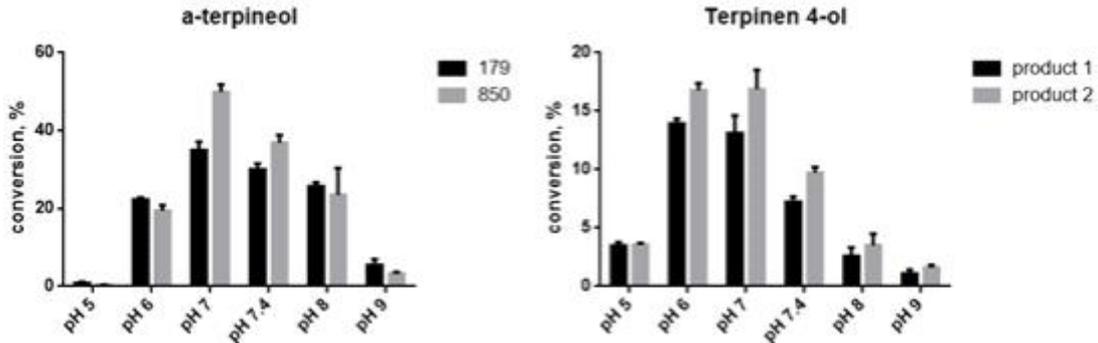
- 터피네올 대사체 생산을 위한 최적조건 탐색
  - BM3 mutants의 터피네올 대사체를 생산하기 위해 최적 온도를 조사하기 위해 0.2  $\mu$ M 179와 850 enzyme을 5 mM 터피네올이 포함된 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) 250  $\mu$ l에 넣은 후 NGS를 넣고 반응을 개시함. 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50  $^{\circ}$ C에서 10분 반응 후 25  $\mu$ l의 2 M HCl을 넣어 반응을 종결시키고 3900 rpm에서 10분간 원심분리 하였음. 반응액을 0.2  $\mu$ m filter(ADVANTEC)를 사용하여 필터링하여 반응 샘플을 준비하였음
  - 위 샘플을 C18 column이 장착된 HPLC로 위 분석 조건과 동일하게 분석하였으며 그 결과, 30 $^{\circ}$ C에서 최대 활성을 나타냈으며 이때 179와 850의 conversion rate는 각각 37% 45.7%임



[a-terpineol 대사체 생산을 위한 최적 온도]

- BM3 mutants의 터피네올 대사체를 생산하기 위한 최적 pH를 조사하기 위해 0.2  $\mu$ M 179와 850 효소를 5 mM 터피네올이 포함된 100 mM potassium phosphate buffer (pH 5, 6, 7, 7.4, 8, 9) 250  $\mu$ l에 넣은 후 NGS를 넣음으로써 반응을 개시하였음. 30  $^{\circ}$ C 항온 수조에서 10분간 반응 후 25  $\mu$ l의 2 M HCl을 넣어 반응을 종결시키고 3900 rpm으로 10분간 원심분리 하였음. 반응액을 0.2  $\mu$ m filter(ADVANTEC)를 사용하여 필터링 하여 반응 샘플을 준비하였음
  - 위 샘플을 C18 column이 장착된 HPLC로 위 분석 조건과 동일하게 분석하였으며 그 결과, a-terpineol을 활용한 반응에서 179과 850은 pH 5에서는 활성이 거의 보이지 않았으며, pH 6에서부터 활성이 보이기 시작하였으며 pH 7에서 최대 활성을 나타내었음. pH 7에서의 179, 850의 conversion rate는 각각 35%와 50%임
  - 179를 이용하여 terpinen-4-ol과 반응했을 때 pH 5-9에서 모두 활성을 나타냈음

며, pH 7에서 최대 활성을 나타냄. pH 7 조건에서 product 1의 conversion rate는 13%, product 2의 conversion rate는 17%임



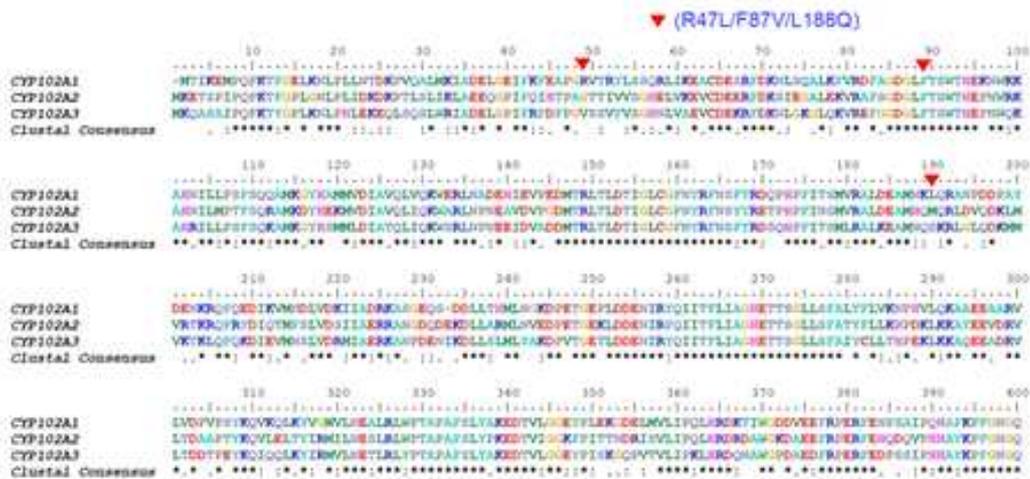
[터피네올 대사체 생산을 위한 최적 pH]

## (2) Cytochrome P450 재설계 전략

가) Bacillus subtilis P450 gene cloning: CYP102A2 및 CYP102A3

- Bacillus subtilis P450 genome 분석
  - 기존 Bacillus megaterium 유래 CYP102A1과 50%이상 아미노산 서열 상동성을 나타내는 CYP102A2 및 CYP102A3 존재
  - CYP102A1의 높은 phloretin 3-hydroxylation 활성을 나타내는 많은 mutants에 공통적으로 heme domain에 triple mutation이 공유함

A29	R47L/F87V/L188Q/N192K/I401V	R47L/F87V/L188Q
A32	R47L/F87V/L188Q/I254V/D351E	R47L/F87V/L188Q
A33	R47L/F87V/L188Q/P248Q/V281A	R47L/F87V/L188Q
A42	R47L/F87V/L188Q/A335V/Q359R	R47L/F87V/L188Q



- CYP102A2: G48V/F88V/M189Q triple mutant 제작
- CYP102A3: V48L/F88V/S189Q triple mutant 제작

나) Bacillus subtilis P450 gene cloning: CYP102A2 및 CYP102A3

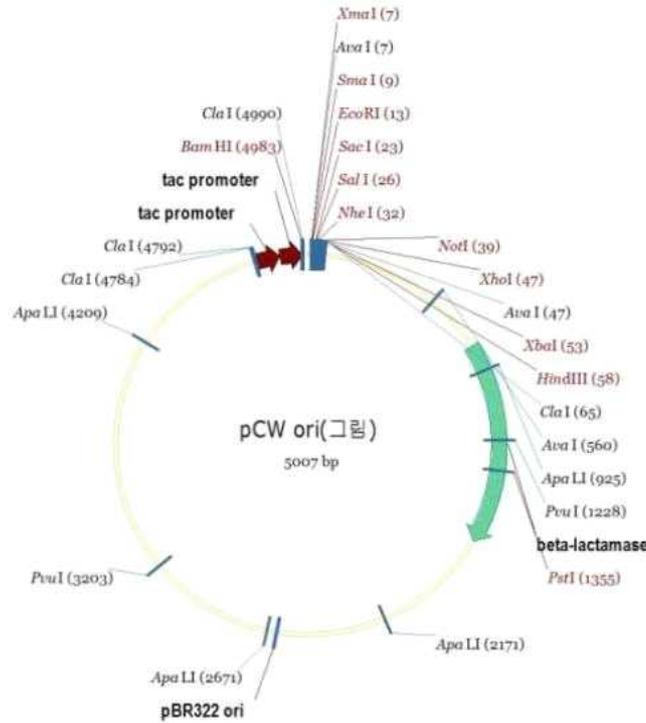
- Cloning of CYP102A2 and CYP102A3 to pCW vector
  - Bacillus subtilis 균주로부터 genomic DNA 분리
- CYP102A2 (yet0)
  - genomic DNA를 template로 이용한 PCR product : enzyme cut
  - CYP102A2 in pCW vector



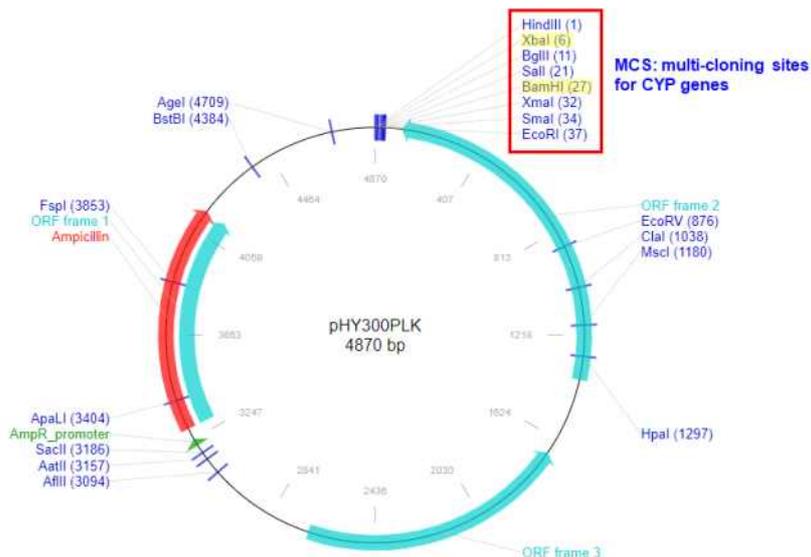
- CYP102A3 (yrhJ)
  - genomic DNA를 template로 이용한 PCR product : enzyme cut
  - CYP102A3 in pCW vector



- pCW expression vector



- Cloning of CYP102A2 and CYP102A3 into Escherichia coli and Bacillus subtilis shuttle vector (pHY300PLK)



다) Heme domain에 돌연변이를 도입한 Triple Mutant 제작

- pCW-CYP102A3 Triple mutant (BA4)
  - 높은 활성의 CYP102A1 mutants의 공통된 R47L/F87V/L188Q 사이트를 template로 할



[CYP102A3 Triple mutant 제조를 위한 PCR에서 사용한 primer의 조성]

	Forward primer	Reverse primer
CYP102A3 triple mutant	ATCCTTATGGCGGATAGCTGATGAATTGGGACCG	TCATTCTATCAACCAGGGAGTTCATGACTTCTAT
Backbone	ATAGAAGTCATGAACTCCCTGGTTGATAGAATGA	CGGTCCCAATTCATCAGCTATCCGCCATAAGGAT

[CYP102A2 Triple mutant 제조를 위한 PCR에서 사용한 primer의 조성]

CYP102A2_F1	AAACCGACGCTTTTCGCTGATCAAACCTGGCGGAAG
CYP102A2_R2	TCGACTAACGAAAACATCGTTTGAATATCATAGC
CYP102A2_F2	GCTATGATATTCAAACGATGTTTTTCGTTAGTCGA
CYP102A2_R1	CTTCCGCCAGTTTGATCAGCGAAAGCGTCGGTTT

- PrimeSTAR® Max DNA Polymerase 25  $\mu$ l, 증폭할 DNA 1  $\mu$ l, 10 pmol의 primer를 각각 1  $\mu$ l, 1 $\mu$ l, 증류수 22  $\mu$ l를 사용해 아래 표와 같은 조건으로 PCR을 수행하였음

[PCR 조건]

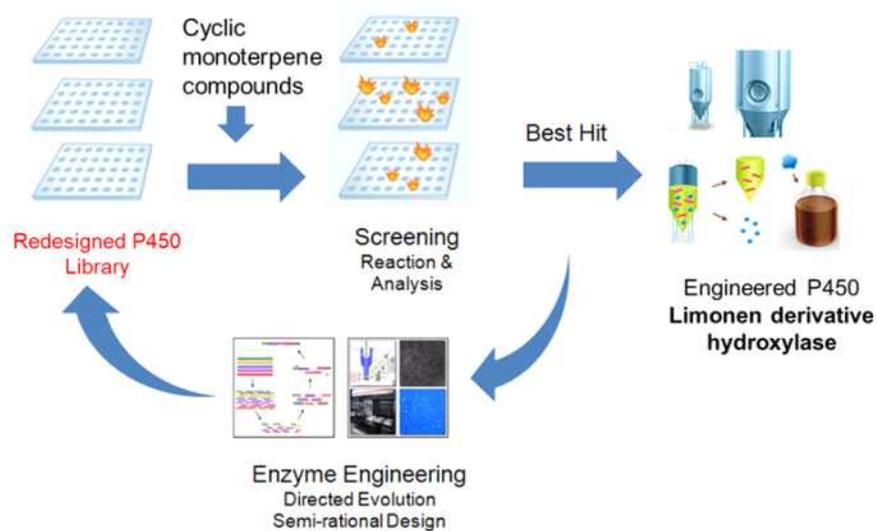
(1-3) Cycle : 30		
1	2	3
98°C	62°C	72°C
10 sec	15 sec	90 sec

- PCR의 결과는 1 % Agarose gel을 통해 확인. 추출된 DNA는 Gibson Assembly® Master Mix 5  $\mu$ l와 Triple mutant 1  $\mu$ l, Backbone 4  $\mu$ l를 PCR 튜브에 넣어 50°C로 6시간 동안 PCR 하여 ligation 하였음

### (3) P450 genome library 제조 전략

#### 가) CYP102A2 Heme domain Library 제작 전략

- Random mutagenesis: 여러 round를 통해서 높은 활성과 안정성 특성을 갖는 P450 효소 개발
- 활성측정: Chromogenic substrates 활용한 발색 이용: 4-nitrophenol
- 얻어진 돌연변이체의 리모넨 유도체 히드록실화 활성을 확인하여 활성이 높은 돌연변이체를 히드록실화 유도체 제조에 이용



나) CYP102A2 Heme domain Library 제작 과정

- 앞서 서술한 CYP102A2 Triple mutant를 확보한 뒤, Heme domain 부분을 타겟으로 Error prone PCR을 수행. 도 2는 CYP102A2 heme library 제작의 vector map 임. Triple mutant에 대한 Primer를 제작한 후, 10 pmol로 희석하여 사용. 10X Titanium Taq buffer 10  $\mu$ l, MnSO<sub>4</sub>(8 mM) 4  $\mu$ l, dGTG(2 mM) 2  $\mu$ l, 50X diversity dNTP mix 2  $\mu$ l, primer F 1  $\mu$ l, primer R 1  $\mu$ l, triple mutant DNA 2  $\mu$ l, Titanium Taq polymerase 2  $\mu$ l, PCR grade water 76  $\mu$ l을 사용. 1-3번 과정을 25 cycle 수행한 후 마지막으로 4번을 1 cycle 하여 PCR 반응을 수행. 자세한 온도 조건을 아래 표에 기술함

[CYP102A2 Heme domain Library 제작에 활용한 primers]

102A2.5 (bamHI)_F	5'-GGA AAC AGG ATC CAT GAA GGA AAC AAG CC-3'
102A2.5(SacI)-R	5'-TGT TTG ATA TGG AGC TCA TAA TTC TCA TG-3'
PCW-102A2.5-F	5'-CAT GAG AAT TAT GAG CTC GAT ATC AAA CA-3'
PCW-102A2.5-R	5'-GGC TTG TTT CCT TCA TGG ATC CTG TTT CC-3'

[Error prone PCR-condition]

(1-3) cycle : 25 cycle			1 cycle
1	2	3	4
94°C 30 sec	60°C 30 sec	68°C 2 min	68°C 1 min

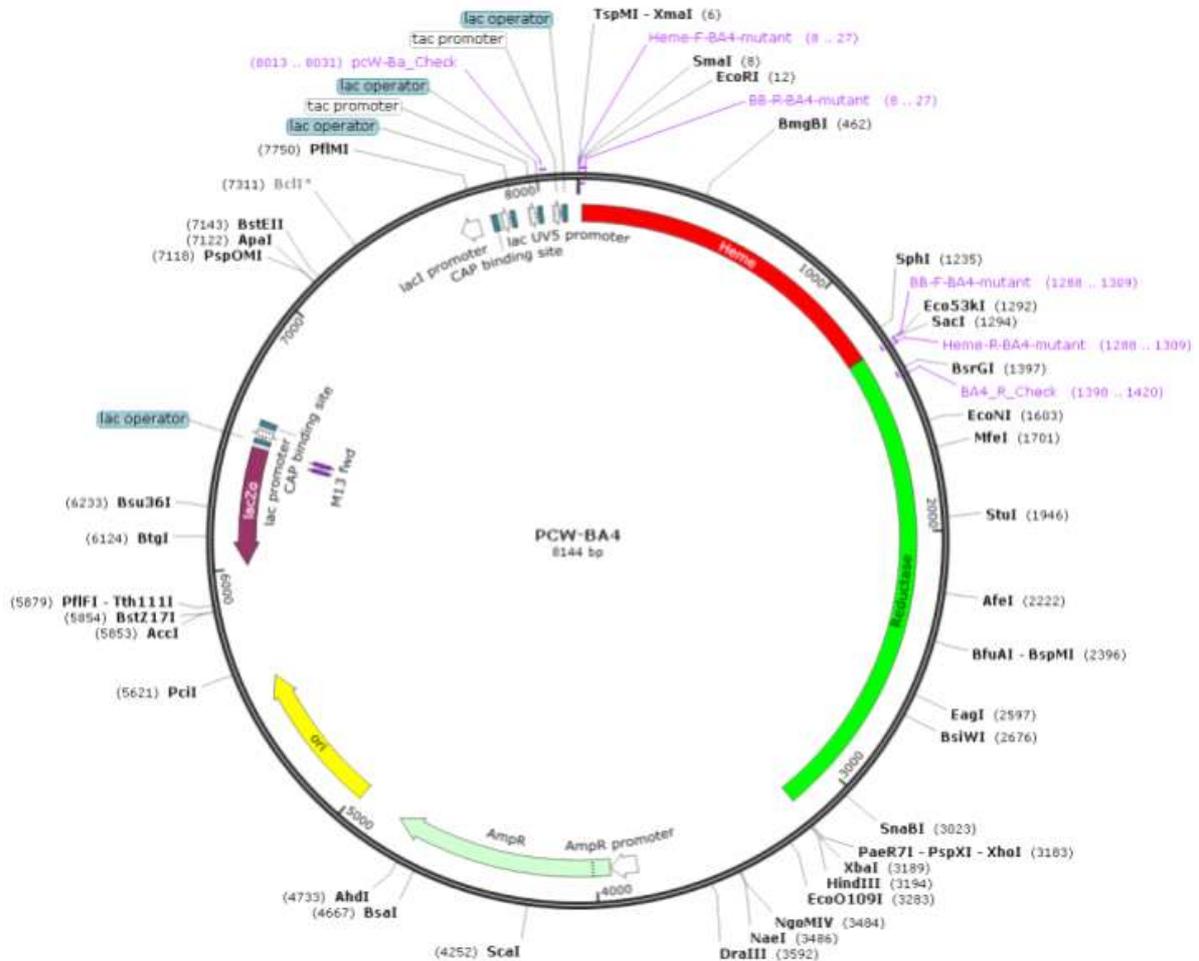
다) CYP102A3 Heme domain Library 제작 과정

- 앞서 서술한 CYP102A3 Triple mutant를 확보한 뒤, Heme domain 부분을 타겟으로 Error prone PCR을 수행. 도 2는 CYP102A3 heme library 제작의 vector map임. Triple mutant에 대한 Primer(F:cggggaattcATGAAACAGG, R:CCAGTATGGTTTATGAGCTCAA)를 제작한 후, 10 pmol로 희석하여 사용. 10X Titanium Taq buffer 10  $\mu$ l, MnSO<sub>4</sub>(8 mM) 4  $\mu$ l, dGTG(2 mM) 2  $\mu$ l, 50X diversity dNTP mix 2  $\mu$ l, primer F 1  $\mu$ l, primer R 1  $\mu$ l, triple mutant DNA 2  $\mu$ l, Titanium Taq polymerase 2  $\mu$ l, PCR grade water 76  $\mu$ l을 사용. 1-3번 과정을 25 cycle 수행한 후 마지막으로 4번

을 1 cycle 하여 PCR 반응을 수행. 자세한 온도 조건을 아래 표에 기술함

[Error prone PCR-condition]

(1-3) cycle : 25 cycle			1 cycle
1	2	3	4
94°C	60°C	68°C	68°C
30 sec	30 sec	2 min	1 min



[Triple mutant (BA4)의 heme library vector map 모식도]

(4) 리모넨 유도체 히드록실화 생산에 활용할 P450 기반 생촉매 개발

[리모넨 유도체 제조에 활용한 CYP102A2 mutants]

Mutant	Mutations	Number of mutations
Wilde-type		
triple mutant (BA1)	G48L/F88V/M189Q	3
BAN1	G48L/F88V/M189Q/S215P	4
BAN2	G48L/F88V/M189Q/G404C	4
BAN3	G48L/ V53A/F88V/H172R/M189Q/K290N/E295G	7
BAN5	T45P/G48L/F88V/N180Y/M189Q/L311M/R354S/E375G	8
BAN6	G48L/F88V/M189Q/Q205R	4
BAN7	G48L/F88V/D152N/ N176Y/ M189Q/R201G	6
BAN8	P14L/G48L/F88V/I128S/M189Q/I316L/M418V	7

BAN9	G48L/F88V/M189Q/ E246D/K308N/A330S	6
BAN10	A34V/G48L/F88V/M189Q/N227Y/Y280D	6
BAN11	G48L/F88V/M189Q/K308N/A332T	5
BAN12	G48L/F88V/M189Q/N352D	4
BAN13	I31L/G48L/F88V/M189Q	4
BAN14	G48L/F88V/Q129R/M189Q/V310M/D340G	6
BAN17	G48L/F88V/M189Q/K233N	4
BAN20	G48L/F88V/M189Q/G267S	4
BAN22	S29L/H44Y/G48L/F88V/M189Q/ I265V/Y280F	7
BAN23	G48L/F88V/ I175T/M189Q	4
BAN24	G48L/F88V/H117L/M189Q/S356P/V415M	6
BAN25	G48L/F88V/M189Q/N352I/Q384P	5
BAN30	G48L/F88V/M189Q/ I265V/ Q406L/K421R	6
BAN32	G48L/E73G/F88V/N102Y/M189Q/H268L/K346R	7
BAN34	G48L/F88V/M189Q/T329S/K393R	5
BAN35	G48L/F88V/M189Q/K203E	4
BAN36	G48L/F88V/M189Q/K203E	4
BAN38	G48L/E94G/M189Q/ I221N/M319T/E322G	6

[리모넨 유도체 제조에 활용한 CYP102A3 mutants]

Mutant	Mutated Amino Acid Residues	Number of mutations
Wild-type		
Triple mutant (BA4)	V48L/F88V/S189Q	3
BA4-5G	V48L/F88V/S189Q/F396L	4
BA4-9H	V48L/F88V/S189Q/ I40L/N397S	5
BA4-12F	V48L/F88V/S189Q/A34V	4
BA4-B1(D7)	V48L/F88V/S189Q/M199K/V218A/N367D	6
J1	V48L/F88V/S189Q/S54Y	4
J3	V48L/F88V/S189Q/D69V/M199L/E269G	6
J7	V48L/F88V/S189Q/Q188H/V319I	5
J10	V48L/F88V/S189Q/D141G	4
J15	V48L/F88V/S189Q/D303V	4
J16	V48L/F88V/S189Q/L238P/V299M	5
J18	V48L/F88V/S189Q/C63Y/R224Q	5
J21	V48L/F88V/S189Q/H172R	4
J25	V48L/F88V/S189Q/N227S	4
J26	V48L/F88V/S189Q/ I33L	4
J27	V48L/F88V/S189Q/T301A	4
J33	V48L/F88V/S189Q/L151F/E339G	5
J34	V48L/F88V/S189Q/M198I/N227D	5
J35	V48L/F88V/S189Q/Q293L	4
J36	V48L/F88V/S189Q/ I260T	4
J39	V48L/F88V/S189Q/M220L/V342A/S385P	6
J44	V48L/F88V/S189Q/Y392H	4
J45	V48L/F88V/S189Q/R67S/T176N	5

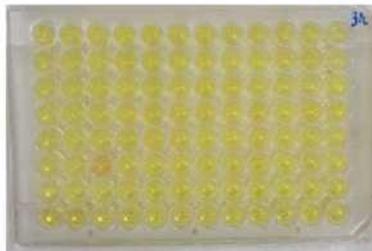
J46	V48L/F88V/S189Q/S385L	4
J47	V48L/F88V/S189Q/I260V	4
J48	V48L/F88V/S189Q/L179H	4
J49	V48L/F88V/S189Q/Y327N	4
J50	V48L/F88V/S189Q/H56L/S109G/T247S	6
J56	V48L/F88V/S189Q/A296T/A412S	5
J58	V48L/F88V/S189Q/D229Y	4
J60	V48L/F88V/S189Q/K66E	4
J62	V48L/F88V/S189Q/K23R	4
J66	V48L/F88V/S189Q/K197I/D234G	5
J70	V48L/F88V/S189Q/Q205L	4
J71	V48L/F88V/S189Q/I261L	4
J72	V48L/F88V/S189Q/L58P/F108L	5

(5) P450 효소의 미생물 발현, 활성 측정기술, HTS system

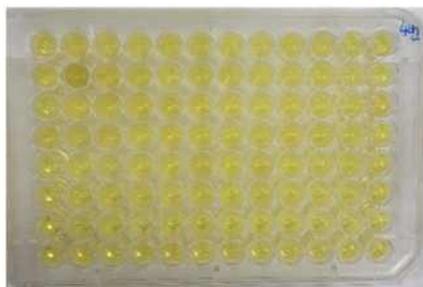
가) HTS system 방법

- 96 deep well plate
- Substrate : 80  $\mu$ M p-nitrophenol, 37°C, 15 min, 400 rpm
- Detection : 510 nm
- 예시

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.0865	0.0628	0.1665	0.0754	0.119	0.0868	0.1132	0.0626	0.0697	0.0634	0.0708	0.0877
B	0.0768	0.0723	0.0925	0.1037	0.0575	0.0637	0.1041	0.0713	0.0655	0.064	0.0628	0.0798
C	0.0752	0.1107	0.094	0.1081	0.1077	0.0625	0.0623	0.1005	0.079	0.0729	0.0741	0.0637
D	0.0668	0.0689	0.0614	0.0697	0.0632	0.0765	0.0996	0.063	0.0662	0.0649	0.0614	0.0882
E	0.0811	0.0897	0.0629	0.103	0.106	0.0702	0.0625	0.0669	0.06	0.1128	0.0627	0.0594
F	0.1082	0.0701	0.063	0.1114	0.0912	0.0637	0.112	0.0633	0.0823	0.1017	0.0602	0.0603
G	0.0919	0.0963	0.0724	0.1208	0.062	0.0605	0.07	0.0653	0.061	0.0963	0.0629	0.0848
H	0.0779	0.0785	0.1103	0.0625	0.0618	0.0622	0.063	0.0665	0.0705	0.0636	0.0723	0.0853
											WT	Triple

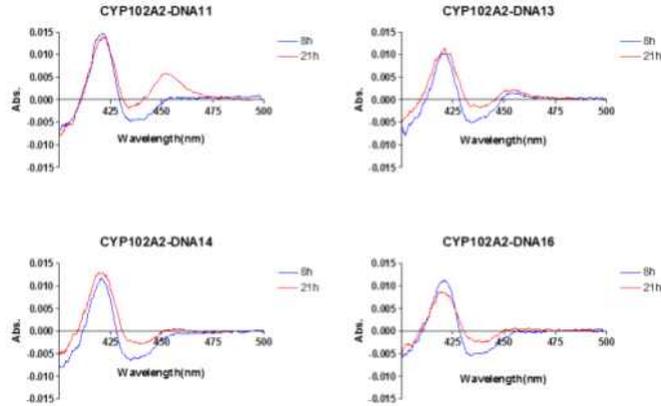


	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.0865	0.0628	0.1665	0.0754	0.119	0.0868	0.1132	0.0626	0.0697	0.0634	0.0708	0.0877
B	0.0768	0.0723	0.0925	0.1037	0.0575	0.0637	0.1041	0.0713	0.0655	0.064	0.0628	0.0798
C	0.0752	0.1107	0.094	0.1081	0.1077	0.0625	0.0623	0.1005	0.079	0.0729	0.0741	0.0637
D	0.0668	0.0689	0.0614	0.0697	0.0632	0.0765	0.0996	0.063	0.0662	0.0649	0.0614	0.0882
E	0.0811	0.0897	0.0629	0.103	0.106	0.0702	0.0625	0.0669	0.06	0.1128	0.0627	0.0594
F	0.1082	0.0701	0.063	0.1114	0.0912	0.0637	0.112	0.0633	0.0823	0.1017	0.0602	0.0603
G	0.0919	0.0963	0.0724	0.1208	0.062	0.0605	0.07	0.0653	0.061	0.0963	0.0629	0.0848
H	0.0779	0.0785	0.1103	0.0625	0.0618	0.0622	0.063	0.0665	0.0705	0.0636	0.0723	0.0853
											WT	Triple

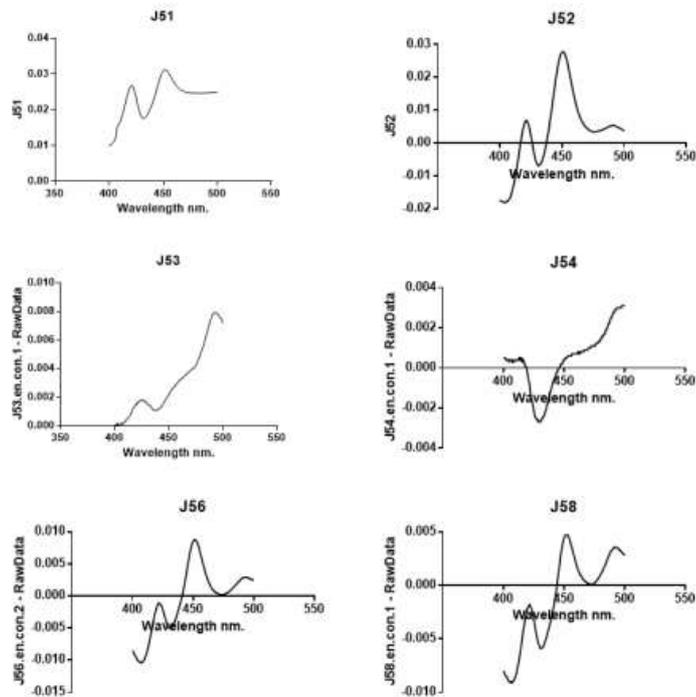


나) P450 효소의 미생물 발현 확인

- CYP102A2 mutants : CO binding spectra 이용하여 발현이 높은 mutants 선별



- CYP102A2 mutants : CO binding spectra 이용하여 발현이 높은 mutants 선별



(6) CYP를 이용한 신규 리모넨 유도체 발굴

가) CYP102A1 mutant와  $\alpha$ -terpineol을 이용한 신규 리모넨 유도체 발굴

- CYP102A1 M850의  $\alpha$ -terpineol에 대한 kinetic parameter 결정

- 실험 목적

- ♦ CYP102A1의 mutant 중 하나인 M850의  $\alpha$ -terpineol에 대한 기질 친화도와 기질에 대한 최대 속도를 확인함

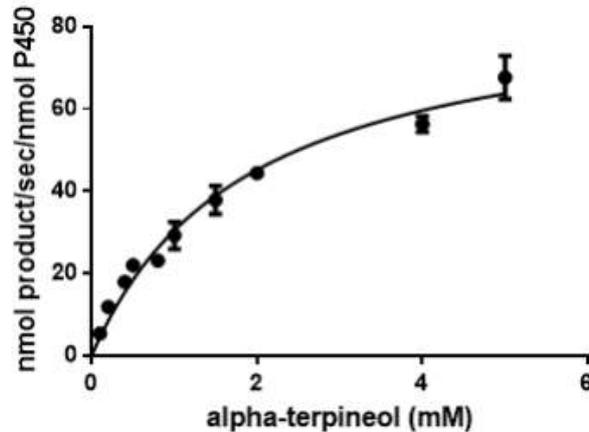
- 실험 방법

- ♦ 총 볼륨 250  $\mu$ l의 반응 용액에는 0.05  $\mu$ M의 CYP102A1 M850와 100 mM potassium phosphate (pH 7),  $\alpha$ -terpineol (0.1-5 mM), NGS (NADPH generating system)가 들어감
- ♦ 반응 용액과 NGS를 30°C에서 5분간 항온 수조에서 pre-incubation 해준 뒤, 반응 용액에 NGS가 첨가되면서 효소 반응이 시작되고 2분 동안 반응함

- ◆ HCl (2 M)를 25  $\mu$ l 첨가하여 효소 반응을 멈추고 3900 rpm에서 10분간 원심 분리함. 0.2  $\mu$ m의 PVDF filter를 이용하여 필터링 하여 샘플링을 완료함
- ◆ HPLC 분석에 이용한 mobile phase는 2가지로 구성됨. mobile phase A는 0.1% formic acid가 들어간 3차수, mobile phase B는 0.1% formic acid가 들어간 acetonitrile로 구성됨. Agilent C18 column (5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로 B(40%)의 조건에서 30분간 샘플 분리를 수행함

- 실험 결과

- ◆  $k_{cat}$ 은  $88 \pm 4.1 \text{ min}^{-1}$ ,  $K_m$ 은  $1.9 \pm 0.2 \text{ mM}$ ,  $k_{cat}/K_m$ 은  $46 \pm 5.3 \text{ min} \cdot \text{mM}^{-1}$  으로 결정됨



[ $\alpha$ -terpineol에 대한 CYP102A1 M850의 kinetic parameters 결정]

■ CYP102A1 M850과  $\alpha$ -terpineol의 time course assay

- 실험 목적

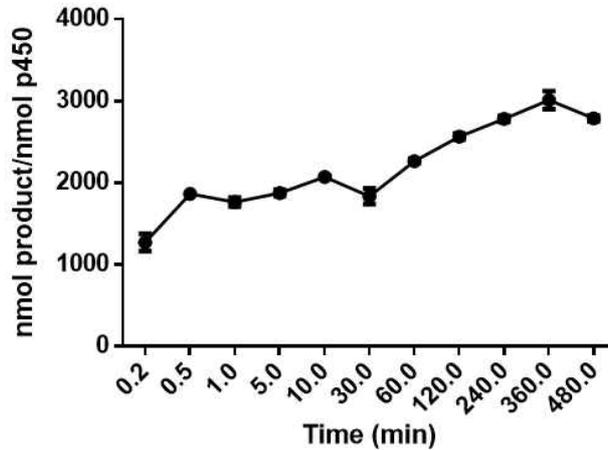
- ◆ CYP102A1 M850과  $\alpha$ -terpineol을 효소 반응하여 시간 경과에 따른 생성물의 차이를 확인하여 최적의 리모넨 유도체를 생산하기 위한 시간을 알아보기 위함

- 실험 방법

- ◆ 총 볼륨 250  $\mu$ l의 반응 용액에는 0.2  $\mu$ M의 CYP102A1 M850와 100 mM potassium phosphate (pH 7), 5 mM의  $\alpha$ -terpineol, NGS (NADPH generating system)가 들어감
- ◆ 반응 용액과 NGS를 30 $^{\circ}$ C에서 5분간 항온 수조에서 pre-incubation 해준 뒤, 반응 용액에 NGS가 첨가되면서 효소 반응이 시작되고 10초-8시간 동안 반응함
- ◆ HCl (2 M)를 25  $\mu$ l 첨가하여 효소 반응을 멈추고 3900 rpm에서 10분간 원심 분리함. 0.2  $\mu$ m의 PVDF filter를 이용하여 필터링 하여 샘플링을 완료함
- ◆ HPLC 분석에 이용한 mobile phase는 2가지로 구성됨. mobile phase A는 0.1% formic acid가 들어간 3차수, mobile phase B는 0.1% formic acid가 들어간 acetonitrile로 구성됨. Agilent C18 column (5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로 B(40%)의 조건에서 30분간 샘플 분리를 수행함

- 실험 결과

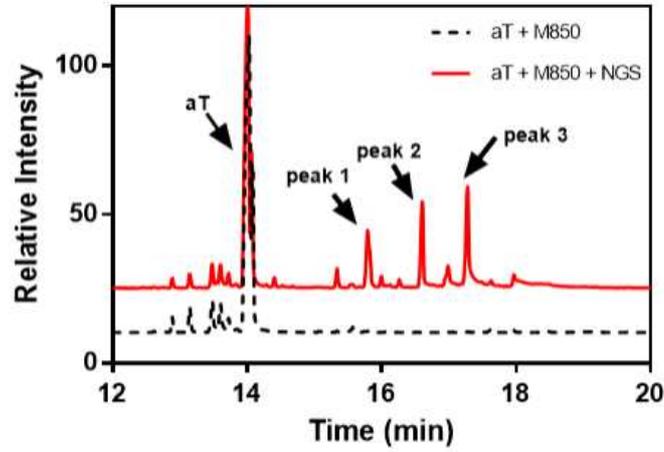
- ◆ M850은  $\alpha$ -terpineol에 대한 유도 물질을 빠른 속도로 만들어냄을 확인함
- ◆ 반응 시간 10초에서 생성물이 1000 nmol product/nmol p450 이상 만들어지는 것을 확인함
- ◆ 생성물은 전반적으로 시간이 지날수록 증가하는 형태를 보임



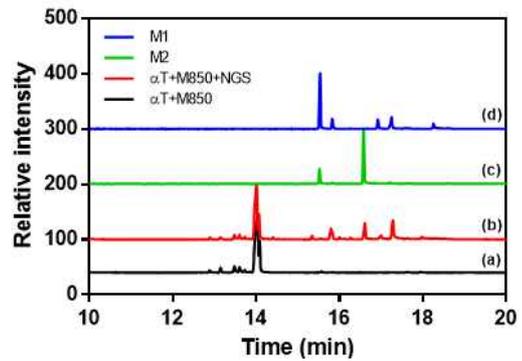
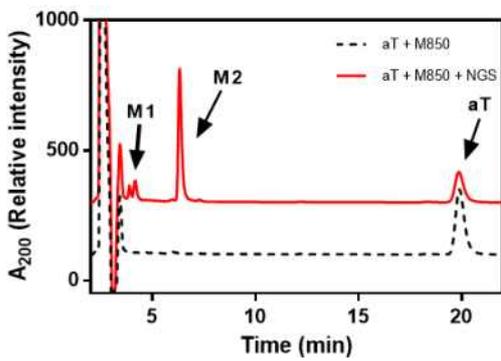
[M850과  $\alpha$ -terpineol의 time course assay]

- CYP102A1 M850과  $\alpha$ -terpineol 반응 결과물 gas chromatography 분석
  - 실험 목적
    - ◆ CYP102A1 M850과  $\alpha$ -terpineol을 효소 반응하여 생긴 대사 물질이 무엇인지 동정하기 위함
  - 실험 방법
    - ◆ 효소 반응 샘플 준비
      - : 총 볼륨 2500  $\mu$ l의 반응 용액에는 0.2  $\mu$ M의 CYP102A1 M850과 100 mM potassium phosphate (pH 7), 5 mM의  $\alpha$ -terpineol, NGS (NADPH generating system)가 들어감
    - ◆ 효소 반응의 시작과 정지
      - : 반응 용액과 NGS를 30 $^{\circ}$ C에서 5분간 항온 수조에서 pre-incubation 해준 뒤, 반응 용액에 NGS가 첨가되면서 효소 반응이 시작되고 2시간 동안 반응함
      - : Ethyl acetate를 6 ml 첨가하여 효소 반응을 멈추고 3900 rpm에서 10분간 원심 분리함. 분리된 상층액을 gas chromatography를 이용하여 분석함
    - ◆ HPLC를 이용한 생성물의 분리
      - : mobile phase A는 0.1% formic acid가 들어간 3차수, mobile phase B는 0.1% formic acid가 들어간 acetonitrile로 구성됨. Agilent C18 column (5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로 B(25%)의 조건에서 생성물을 분리 및 수확함
      - : 이를 다시 ethyl acetate로 추출하여 GC 분석에 사용함
    - ◆ Gas chromatography 분석
      - : DB-5MS UI column (30 m x 0.25 mm, 0.25  $\mu$ m Agilent)을 이용하여 분석함
      - : Injector의 온도는 250  $^{\circ}$ C로 설정하였으며, 오븐 온도는 50  $^{\circ}$ C에서 5분간 유지한 뒤 250  $^{\circ}$ C까지 1분당 10  $^{\circ}$ C만큼 증가하게 설정함
  - 실험 결과
    - ◆ Major한 peak가 1개만 보였던 HPLC chromatogram과 달리 GC chromatogram에서는 3개의 major peak와 매우 작은 peak들이 확인됨
    - ◆ HPLC로 분리한 생성물을 각각 gas chromatography로 분석한 결과, HPLC에서 major하게 보였던 peak는 gc chromatogram에서 peak 2로 명명한 것과 일치함을 확인함
    - ◆ GC 라이브러리와 대조 결과 peak 2는 3-Cyclohexene-1-methanol, 2-hydroxy- $\alpha$ ,  $\alpha$ ,4-trimethyl-와 일치도가 97%로 확인되었으며, peak 3는 3-Cyclohexene-1-methanol, 5-hydroxy- $\alpha$ ,  $\alpha$ ,4-trimethyl-와 90% 정도의 일치도

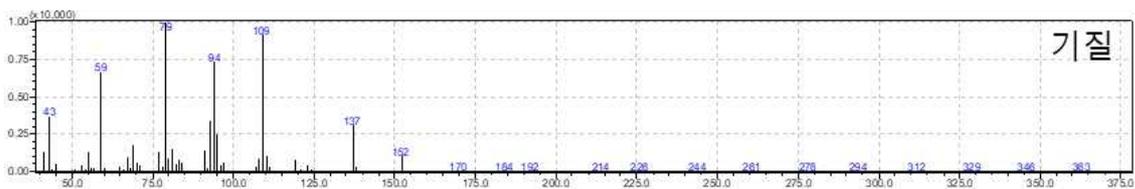
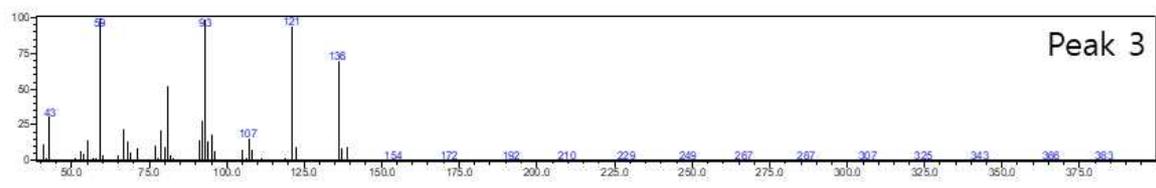
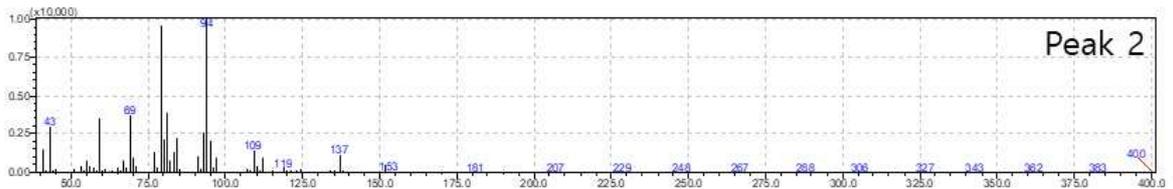
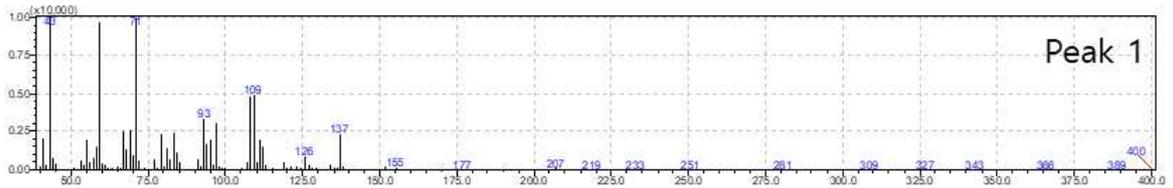
붙임



[CYP102A1 M850과  $\alpha$ -terpineol을 반응한 gas chromatogram]



[HPLC 크로마토그램과 GC 크로마토그램]



[ $\alpha$ -terpineol 대사체에 대한 fragmentation pattern]

3-Cyclohexene-1-methanol, 2-hydroxy- $\alpha$ , $\alpha$ ,4-trimethyl-	3-Cyclohexene-1-methanol, 5-hydroxy- $\alpha$ , $\alpha$ ,4-trimethyl-

[GC 분석 결과 peak 2, peak 3로 예상되는 물질들]

▪ CYP102A1 M850의  $\alpha$ -terpineol에 대한 LC-MS 분석

- 실험 목적

- ◆ CYP102A1 M850과  $\alpha$ -terpineol을 효소 반응하여 만들어진 대사체의 물질 동정을 하기 위함

- 실험 방법

◆ 효소 반응 샘플 준비

: 총 볼륨 2500  $\mu$ l의 반응 용액에는 0.2  $\mu$ M의 CYP102A1 M850와 100 mM potassium phosphate (pH 7), 5 mM의  $\alpha$ -terpineol, NGS (NADPH generating system)가 들어감

◆ 효소 반응의 시작과 정지

: 반응 용액과 NGS를 30 $^{\circ}$ C에서 5분간 항온 수조에서 pre-incubation 해준 뒤, 반응 용액에 NGS가 첨가되면서 효소 반응이 시작되고 2시간 동안 반응함

: HCl (2 M) 250  $\mu$ l 첨가하여 효소 반응을 멈추고 3900 rpm에서 10분간 원심 분리한 뒤 추출액을 준비함

◆ LC-MS를 이용한 물질 분석

: ZorBax SB-C18 (4.6 x 250 mm, 5  $\mu$ m, 80 Å; Agilent Technologies) column과 Thermo Scientific Accela and TSQ Quantum Access Max system을 이용하여 분리 및 분석함

: 주입 용량은 5  $\mu$ l 이며 mass spectrometer의 vaporizer와 heated capillary는 320  $^{\circ}$ C로 설정함

: Nitrogen sheath gas와 auxiliary gas pressure는 40과 15 psi로 설정함

: Spray voltage는 3700 V, scan speed는 0.8로 설정함

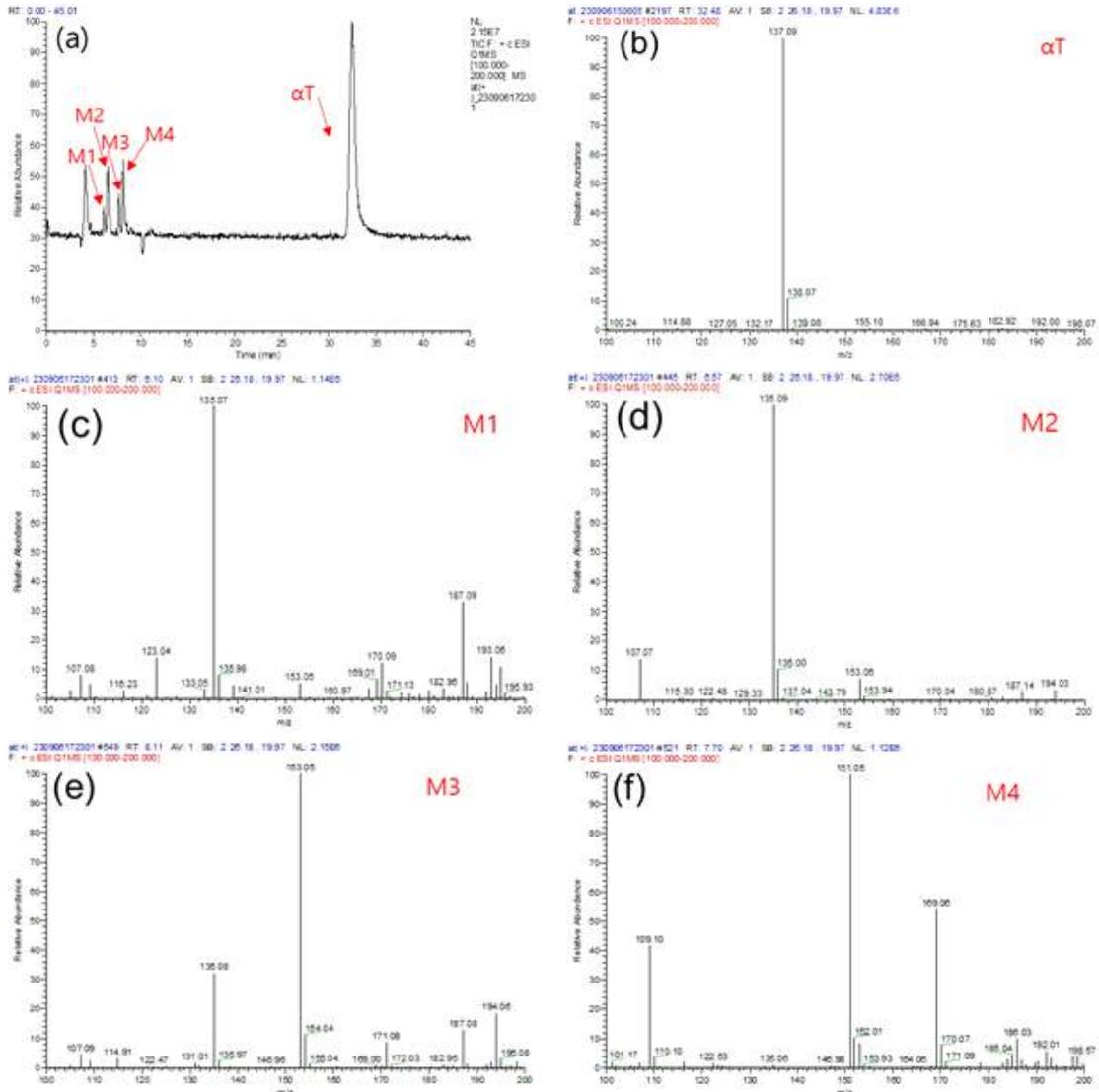
: 샘플은 positive mode로 분석함

- 실험 결과

◆  $\alpha$ -terpineol의 base peak 값은 137.09 (m/z)로 확인됨

◆ M1, M2, M3, M4의 base peak는 각각 135.07, 135.09, 153.05, 151.05 (m/z)로 확인됨

◆  $\alpha$ -terpineol과 M3의 base peak 값을 비교해보았을 때, +16만큼의 증가는 M3 기질에 hydroxylation 반응이 된 물질로 유추 가능함



■ CYP102A1 M850과  $\alpha$ -terpineol 반응 결과물 NMR 분석

- 실험 목적

- ◆ CYP102A1 M850과  $\alpha$ -terpineol을 효소 반응하여 생긴 대사 물질이 무엇인지 동정하기 위함

- 실험 방법

◆ 효소 반응 샘플 준비

- : 총 볼륨 10 ml의 반응 용액에는 0.2  $\mu$ M의 CYP102A1 M850와 100 mM potassium phosphate (pH 7), 5 mM의  $\alpha$ -terpineol, NGS (NADPH generating system)가 들어감
- : 위와 같은 샘플을 총 4세트 준비함

◆ 효소 반응의 시작 및 대사체 추출

- : 반응 용액과 NGS를 30°C에서 5분간 항온 수조에서 pre-incubation 해준 뒤, 반응 용액에 NGS가 첨가되면서 효소 반응이 시작되고 2시간 동안 반응함
- : Ethyl acetate를 반응 용액의 양의 3배 만큼 첨가하여 반응을 종료함
- : 3900 rpm에서 20분간 분리하여 상층액만 따로 glass tube에 옮김
- : 질소 가스를 이용하여 충분히 건조하여 용매를 제거함

◆ HPLC를 이용한 생성물의 분리

- : mobile phase A는 3차수, mobile phase B는 acetonitrile로 구성됨. Agilent C18 column (5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로 B(25%)의 조건에

서 생성물을 분리 및 수확함

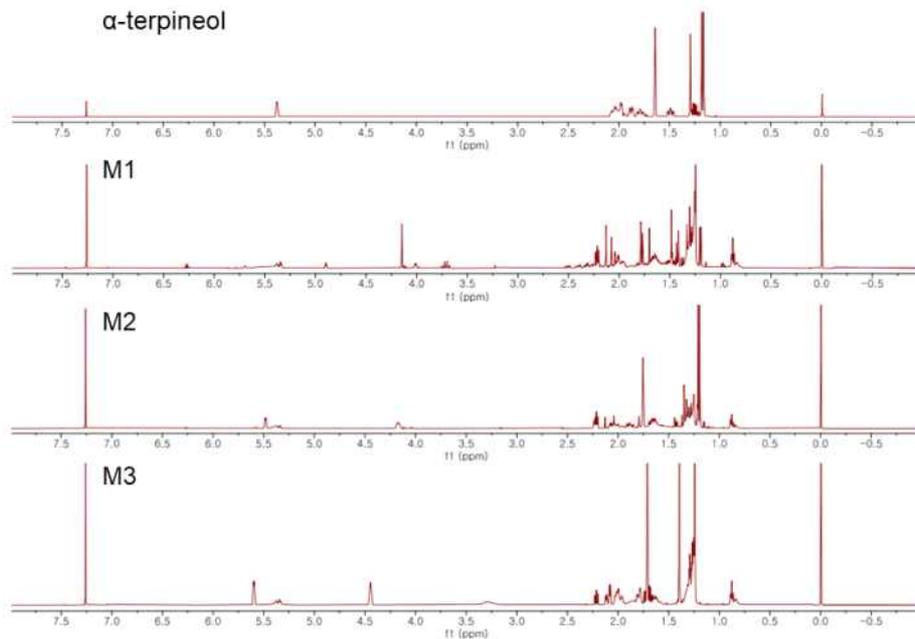
: 분리한 물질에 ethyl acetate를 넣고 잘 섞어준 후 3900 rpm에서 10분간 원심분리한 뒤 상층액만 추출하여 질소 가스로 용매를 날려줌

◆ NMR분석

:  $\text{CDCl}_3$ 에 생성물을 넣고  $^1\text{H}$  NMR을 수행함

- 실험결과

- ◆  $\alpha$ -terpineol은 1.0-2.0 ppm 사이에 spectrum이 몰려있음을 확인함
- ◆ M3의 경우 유일하게 1.2 ppm 정도의 peak가 없어짐을 확인함. 이는  $\alpha$ -terpineol의 하단부에 있는  $-\text{CH}_3$  부분에 변화가 있었음을 추정할 수 있음
- ◆ 물질 특성상 chemical shift가 특정 ppm에 몰려있어 peak의 중첩 현상이 일어나기 쉽고, 물질의 순도 및 양이 온전치 않았던 것으로 보여 기존의 분석 방법과 다른 방향으로의 접근이 필요한 것으로 파악됨



[ $\alpha$ -terpineol과 대사체들의  $^1\text{H}$  NMR spectrum]

■ CYP102A1 M179과  $\alpha$ -terpineol의 time course assay

- 실험 목적

- ◆ CYP102A1 M179과  $\alpha$ -terpineol을 효소 반응하여 시간 경과에 따른 생성물의 차이를 확인하여 최적의 리모넨 유도체를 생산하기 위한 시간을 알아보기 위함

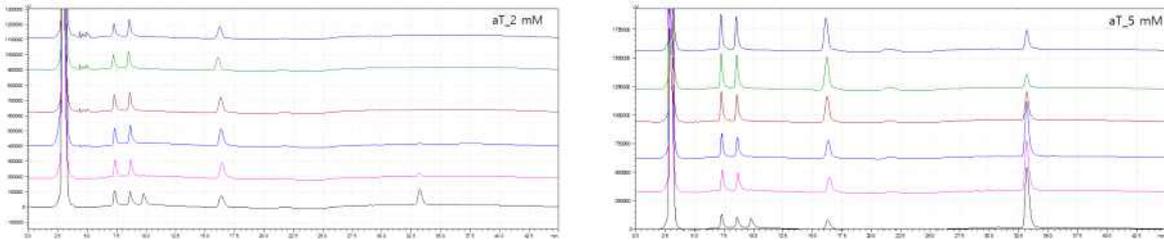
- 실험 방법

- ◆ 총 볼륨 250  $\mu\text{l}$ 의 반응 용액에는 0.2  $\mu\text{M}$ 의 CYP102A1 M179와 100 mM potassium phosphate (pH 7.4), 2.5 mM의  $\alpha$ -terpineol, NGS (NADPH generating system)가 들어감
- ◆ 반응 용액과 NGS를 30°C에서 5분간 항온 수조에서 pre-incubation 해준 뒤, 반응 용액에 NGS가 첨가되면서 효소 반응이 시작되고 10분-6시간 동안 반응함
- ◆ 3900 rpm에서 10분간 원심 분리함. 0.2  $\mu\text{m}$ 의 PVDF filter를 이용하여 필터링 하여 샘플링을 완료함
- ◆ HPLC 분석에 이용한 mobile phase는 2가지로 구성됨. mobile phase A는 3차수, mobile phase B는 acetonitrile로 구성됨. Agilent C18 column (5  $\mu\text{m}$ , 4.6 x 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로 B(25%)의 조건에서 샘플 분리를 수행

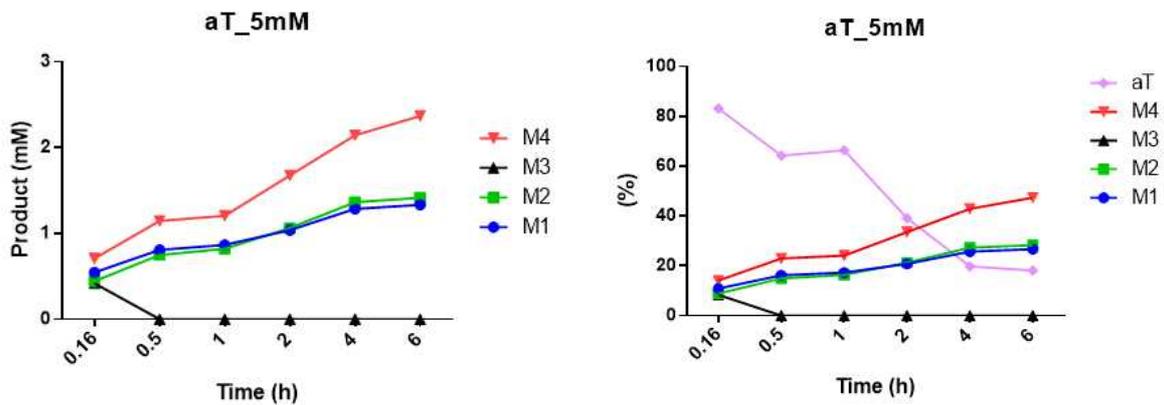
합

- 실험 결과

- ◆  $\alpha$ -terpineol (2 mM)과 0.2  $\mu$ M의 M179를 10분 반응했을 때, 약 10분의 retention time에서 다른 반응시간 조건에서는 보이지 않는 생성물이 용출됨을 확인함
- ◆  $\alpha$ -terpineol (2 mM)의 조건에서는 30분 정도 효소 반응했을 때, 효소 반응에 의해 기질이 거의 남지 않음을 확인함
- ◆  $\alpha$ -terpineol (5 mM)과 0.2  $\mu$ M의 M179를 10분 반응했을 때, 약 10분의 retention time에서 다른 반응시간 조건에서는 보이지 않는 생성물이 용출됨을 확인함
- ◆  $\alpha$ -terpineol (5 mM)의 조건에서는 6시간의 반응조건 때까지 꾸준히 생성물 (M1,M2,M4)이 증가함을 확인함
- ◆  $\alpha$ -terpineol (5 mM)과 6시간 동안 반응했을 때 생성물의 양이 가장 많았으며, 그 양은 M1, M2, M4이 각각 약 1.3, 1.4, 2.3 mM로 확인됨



[CYP102A1 M179와  $\alpha$ -terpineol(2 mM,5 mM)의 시간 반응 HPLC 크로마토그램]



[CYP102A1 M179와  $\alpha$ -terpineol(5 mM)의 time course 반응]

나) CYP102A1 mutant와 terpinen-4-ol을 이용한 신규 리모넨 유도체 발굴

- CYP102A1 M179의 terpinen-4-ol에 대한 kinetic parameter 결정

- 실험 목적

: CYP102A1의 mutant 중 하나인 M179의 terpinen-4-ol에 대한 기질 친화도와 기질에 대한 최대 속도를 확인함

- 실험 방법

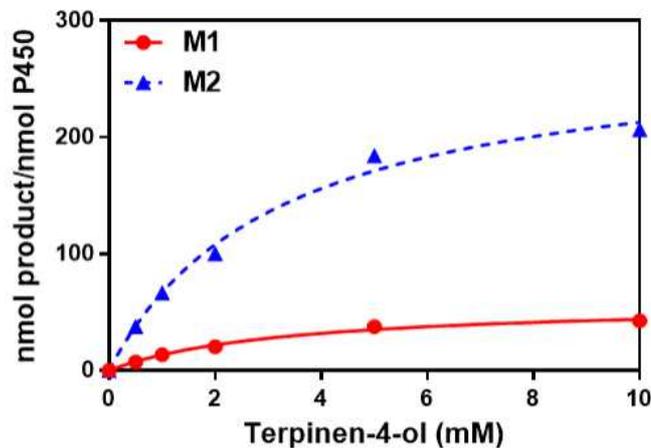
- ◆ 총 볼륨 250  $\mu$ l의 반응 용액에는 0.2  $\mu$ M의 CYP102A1 M179와 100 mM potassium phosphate (pH 7), terpinen-4-ol (0.5-10 mM), NGS (NADPH generating system)

가 들어감

- ◆ 반응 용액과 NGS를 30°C에서 5분간 항온 수조에서 pre-incubation 해준 뒤, 반응 용액에 NGS가 첨가되면서 효소 반응이 시작되고 10분 동안 반응함
- ◆ HCl (2 M)를 25  $\mu$ l 첨가하여 효소 반응을 멈추고 3900 rpm에서 10분간 원심 분리함. 0.2  $\mu$ m의 PVDF filter를 이용하여 필터링 하여 샘플링을 완료함
- ◆ HPLC 분석에 이용한 mobile phase는 2가지로 구성됨. mobile phase A는 0.1% formic acid가 들어간 3차수, mobile phase B는 0.1% formic acid가 들어간 acetonitrile로 구성됨. Agilent C18 column (5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로 B(40%)의 조건에서 30분간 샘플 분리를 수행함

- 실험결과

- ◆ 생성물1 (M1)에 대한  $k_{cat}$ 은 58.7  $\text{min}^{-1}$ , 생성물2 (M2)에 대한  $k_{cat}$ 은 281  $\text{min}^{-1}$ 으로 결정됨
- ◆ 생성물1 (M1)에 대한  $K_m$ 은 3.4 mM, 생성물2 (M2)에 대한  $K_m$ 은 3.2 mM으로 결정됨
- ◆  $k_{cat}/K_m$ 은 M1과 M2 각각 17  $\text{min} \cdot \text{mM}^{-1}$ , 88  $\text{min} \cdot \text{mM}^{-1}$ 으로 결정됨



[CYP102A1의 terpinen-4-ol에 대한 kinetic parameters 결정]

- CYP102A1 M179과 terpinen-4-ol의 time course assay

- 실험 목적

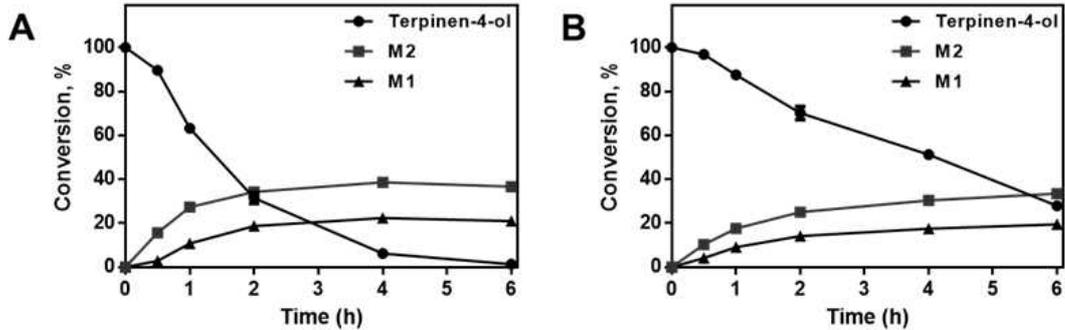
- CYP102A1 M179과 terpinen-4-ol을 효소 반응하여 시간 경과에 따른 생성물의 차이를 확인하여 최적의 리모넨 유도체를 생산하기 위한 시간을 알아보기 위함

- 실험 방법

- ◆ 총 볼륨 250  $\mu$ l의 반응 용액에는 0.2  $\mu$ M의 CYP102A1 M179와 100 mM potassium phosphate (pH 7), 5,10 mM의 terpinen-4-ol, NGS (NADPH generating system)가 들어감
- ◆ 반응 용액과 NGS를 30°C에서 5분간 항온 수조에서 pre-incubation 해준 뒤, 반응 용액에 NGS가 첨가되면서 효소 반응이 시작되고 30분-6시간 동안 반응함
- ◆ HCl (2 M)를 25  $\mu$ l 첨가하여 효소 반응을 멈추고 3900 rpm에서 10분간 원심 분리함. 0.2  $\mu$ m의 PVDF filter를 이용하여 필터링 하여 샘플링을 완료함
- ◆ HPLC 분석에 이용한 mobile phase는 2가지로 구성됨. mobile phase A는 0.1% formic acid가 들어간 3차수, mobile phase B는 0.1% formic acid가 들어간 acetonitrile로 구성됨. Agilent C18 column (5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로 B(40%)의 조건에서 30분간 샘플 분리를 수행함

- 실험 결과

- ◆ Terpinen-4-ol은 수용액 상태에서 자연적으로 분해되는 것을 확인함
- ◆ M179은 terpinen-4-ol과 반응하여 M2가 M1보다 더 많이 생기는 것을 확인함
- ◆ 5 mM의 기질과 반응하여 4시간이 경과했을 때 M1은 기질에서 약 20%가 전환되고 M2는 약 40%가 전환됨
- ◆ 생성물(M1,M2)은 약 4시간까지 전반적으로 증가하는 것으로 확인됨



[CYP102A1 M850과 terpinen-4-ol의 time course assay]

■ CYP102A1 M179의 terpinen-4-ol과 반응 gas chromatography 분석

- 실험 목적

- ◆ CYP102A1 M179와 terpinen-4-ol을 효소 반응하여 얻은 생성물의 물질 동정을 하기 위함

- 실험 방법

◆ 효소 반응 샘플 준비

: 총 볼륨 250  $\mu$ l의 반응 용액에는 0.2  $\mu$ M의 CYP102A1 M179와 100 mM potassium phosphate (pH 7), 5 mM의 terpinen-4-ol, NGS (NADPH generating system)가 들어감

◆ 효소 반응의 시작과 정지

: 반응 용액과 NGS를 30 $^{\circ}$ C에서 5분간 항온 수조에서 pre-incubation 해준 뒤, 반응 용액에 NGS가 첨가되면서 효소 반응이 시작되고 2시간 동안 반응함

: Ethyl acetate를 600  $\mu$ l 첨가하여 효소 반응을 멈추고 3900 rpm에서 10분간 원심 분리함. 분리된 상층액을 gas chromatography를 이용하여 분석함

◆ HPLC를 이용한 생성물의 분리

: mobile phase A는 0.1% formic acid가 들어간 3차수, mobile phase B는 0.1% formic acid가 들어간 acetonitrile로 구성됨. Agilent C18 column (5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로 B(25%)의 조건에서 생성물을 분리 및 수확함

: 이를 다시 ethyl acetate로 추출하여 GC 분석에 사용함

◆ Gas chromatography 분석

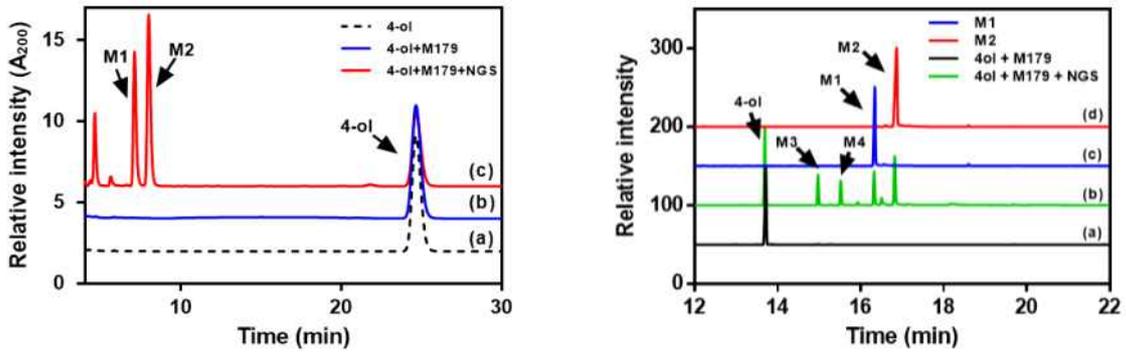
: DB-5MS UI column (30 m x 0.25 mm, 0.25  $\mu$ m Agilent)을 이용하여 분석함

: Injector의 온도는 250  $^{\circ}$ C로 설정하였으며, 오븐 온도는 50  $^{\circ}$ C에서 5분간 유지한 뒤 250  $^{\circ}$ C까지 1분당 10  $^{\circ}$ C만큼 증가하게 설정함

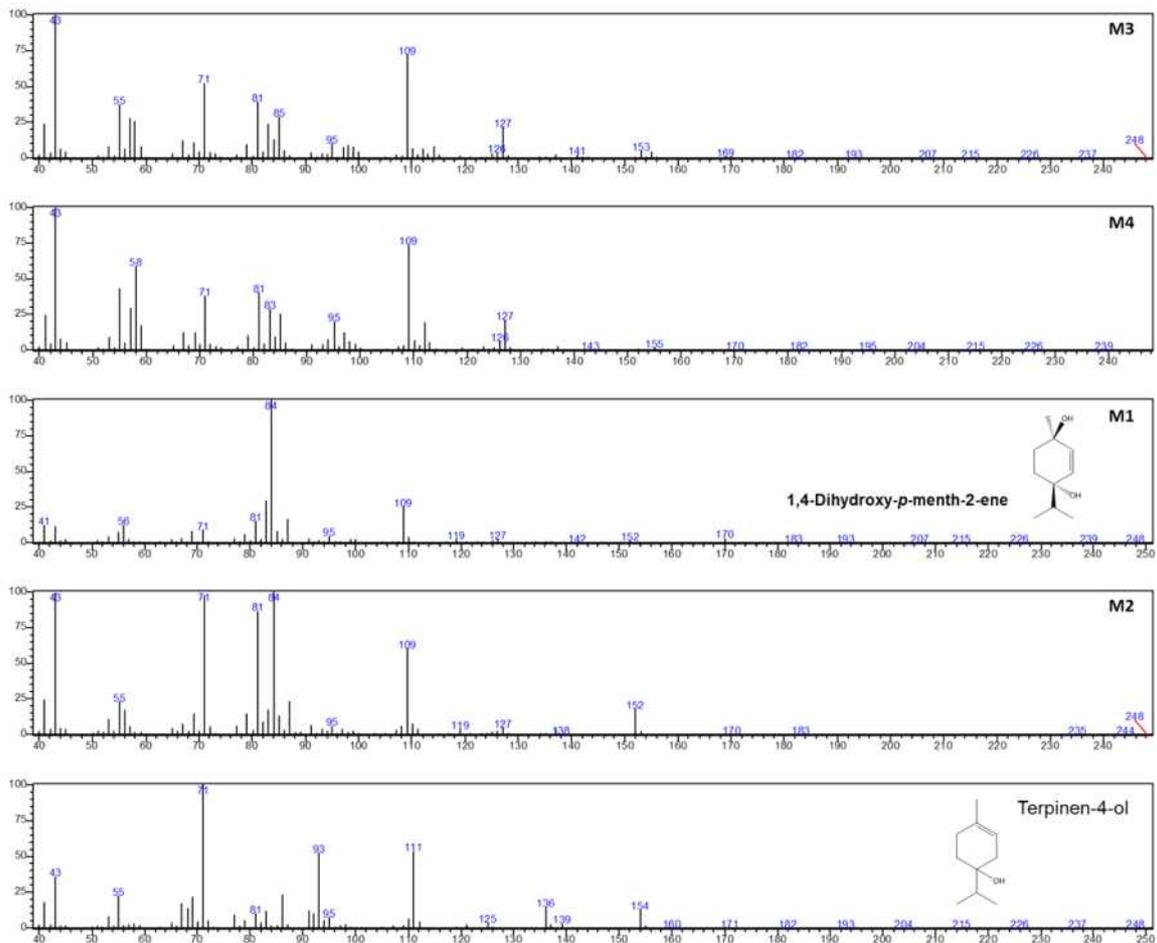
- 실험 결과

- ◆ NGS가 들어가지 않은 샘플과 NGS가 들어간 샘플을 비교했을 때, NGS가 들어간 샘플에서는 4개의 major한 peak가 확인됨
- ◆ fragmentation pattern을 확인한 결과 M1,M2의 모양이 비슷하고 M3,M4의 모양이 비슷함을 확인함

- ◆ HPLC를 이용하여 분리한 생성물 1 (M1)과 생성물 2 (M2)를 각각 gc 분석한 결과 4개의 major한 peak 중 M1과 M2의 정확한 peak 위치를 확인함



[CYP102A1 M179와 terpinen-4-ol을 반응한 HPLC 크로마토그램, GC 크로마토그램]



[CYP102A1 M179과 terpinen-4-ol이 반응 생성물의 fragmentation patterns]

- CYP102A1 M179의 terpinen-4-ol에 대한 LC-MS 분석
  - 실험 목적
    - ◆ CYP102A1 M179과 terpinen-4-ol을 효소 반응하여 만들어진 대사체의 물질 동정을 하기 위함
  - 실험 방법
    - ◆ 효소 반응 샘플 준비
      - : 총 볼륨 2500  $\mu$ l의 반응 용액에는 0.2  $\mu$ M의 CYP102A1 M179와 100 mM potassium phosphate (pH 7), 5 mM의 terpinen-4-ol, NGS (NADPH generating system)가 들어감

- ◆ 효소 반응의 시작과 정지

: 반응 용액과 NGS를 30℃에서 5분간 항온 수조에서 pre-incubation 해준 뒤, 반응 용액에 NGS가 첨가되면서 효소 반응이 시작되고 1시간 동안 반응함

: HCl (2 M) 2500 μl 첨가하여 효소 반응을 멈추고 3900 rpm에서 10분간 원심 분리한 뒤 추출액을 준비함

- ◆ LC-MS를 이용한 물질 분석

: ZorBax SB-C18 (4.6 x 250 mm, 5 μm, 80 Å; Agilent Technologies) column과 Thermo Scientific Accela and TSQ Quantum Access Max system을 이용하여 분리 및 분석함

: 주입 용량은 5 μl 이며 mass spectrometer의 vaporizer와 heated capillary는 320 °C로 설정함

: Nitrogen sheath gas와 auxiliary gas pressure는 40과 15 psi로 설정함

: Spray voltage는 3700 V, scan speed는 0.8로 설정함

: 샘플은 positive mode로 분석함

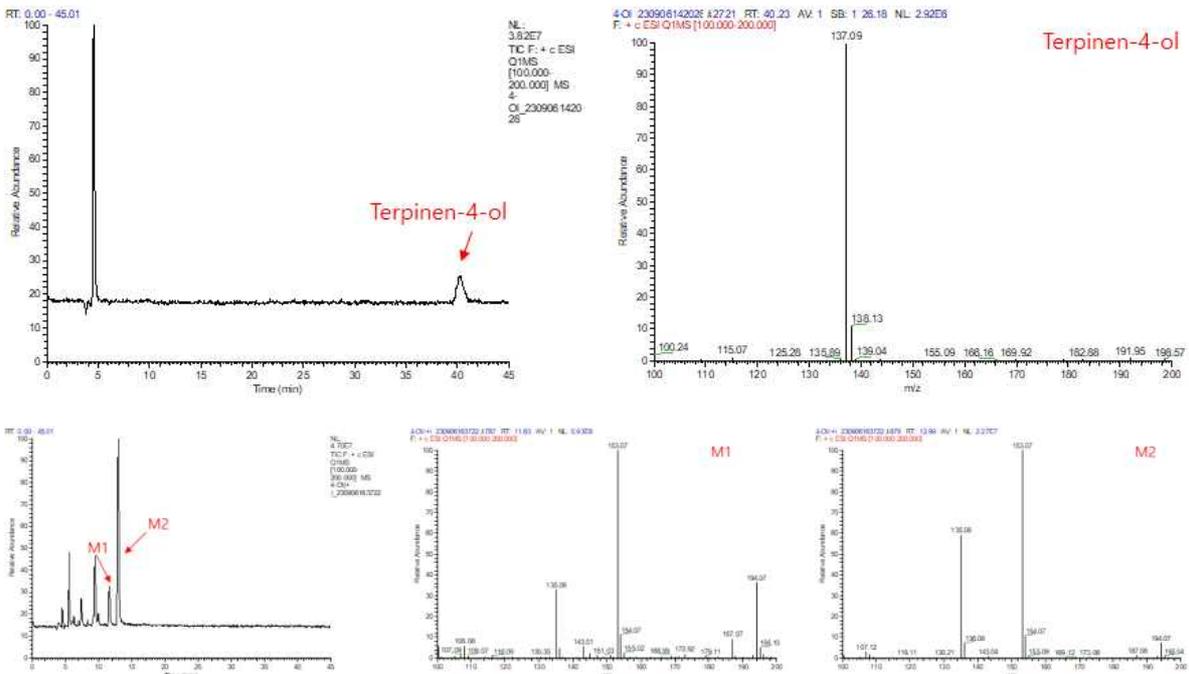
- 실험 결과

- ◆ Terpinen-4-ol의 LC-MS의 base peak 값은 137.09 (m/z)로 확인됨

- ◆ M1과 M2의 base peak 값은 모두 153.07 (m/z)로 확인됨

- ◆ 기질과 생성물의 base peak 값을 비교한 결과 생성물은 기질에서 +16 만큼의 증가가 있음을 확인함

- ◆ 생성물은 terpinen-4-ol에 hydroxylation이 된 물질로 추정됨



[Terpinen-4-ol과 CYP102A1 M179에 의해 생성된 물질의 LC-MS 결과]

- CYP102A1 M179과 terpinen-4-ol 반응에 의해 생긴 물질의 NMR 분석

- 실험 목적

- ◆ CYP102A1 M179과 terpinen-4-ol을 효소 반응하여 만들어진 대사체의 물질 동정을 하기 위함

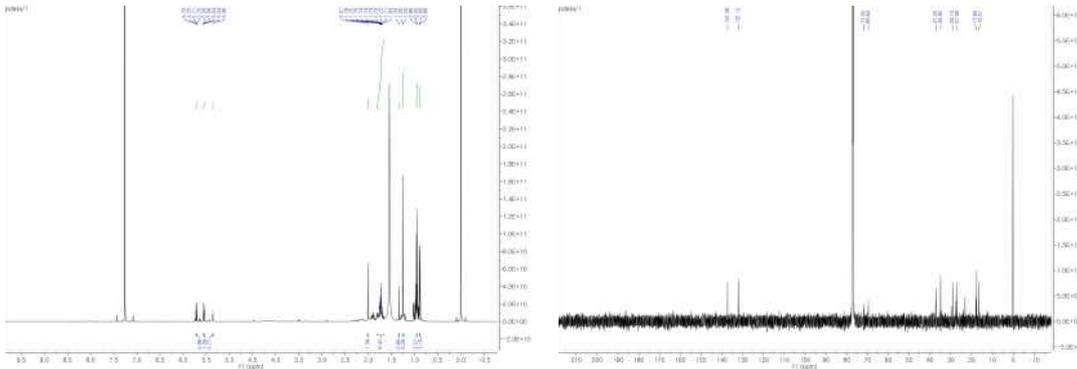
- 실험 방법

- ◆ 효소 반응 샘플 준비

- : 총 볼륨 10 ml의 반응 용액에는 0.2  $\mu$ M의 CYP102A1 M179와 100 mM potassium phosphate (pH 7), 5 mM의 terpinen-4-ol, NGS (NADPH generating system)가 들어감
- : 위와 같은 샘플을 총 3세트 준비함
- ◆ 효소 반응의 시작 및 대사체 추출
  - : 반응 용액과 NGS를 30°C에서 5분간 항온 수조에서 pre-incubation 해준 뒤, 반응 용액에 NGS가 첨가되면서 효소 반응이 시작되고 2시간 동안 반응함
  - : Ethyl acetate를 반응 용액의 양의 3배 만큼 첨가하여 반응을 종료함
  - : 3900 rpm에서 20분간 분리하여 상층액만 따로 glass tube에 옮김
  - : 질소 가스를 이용하여 충분히 건조하여 용매를 제거함
- ◆ HPLC를 이용한 생성물의 분리
  - : mobile phase A는 3차수, mobile phase B는 acetonitrile로 구성됨. Agilent C18 column (5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로 B(25%)의 조건에서 생성물을 분리 및 수확함
  - : 분리한 물질에 ethyl acetate를 넣고 잘 섞어준 후 3900 rpm에서 10분간 원심분리한 뒤 상층액만 추출하여 질소 가스로 용매를 날려줌
- ◆ NMR분석
  - :  $\text{CDCl}_3$ 에 생성물을 넣고  $^1\text{H}$  NMR과  $^{13}\text{C}$  NMR을 수행함

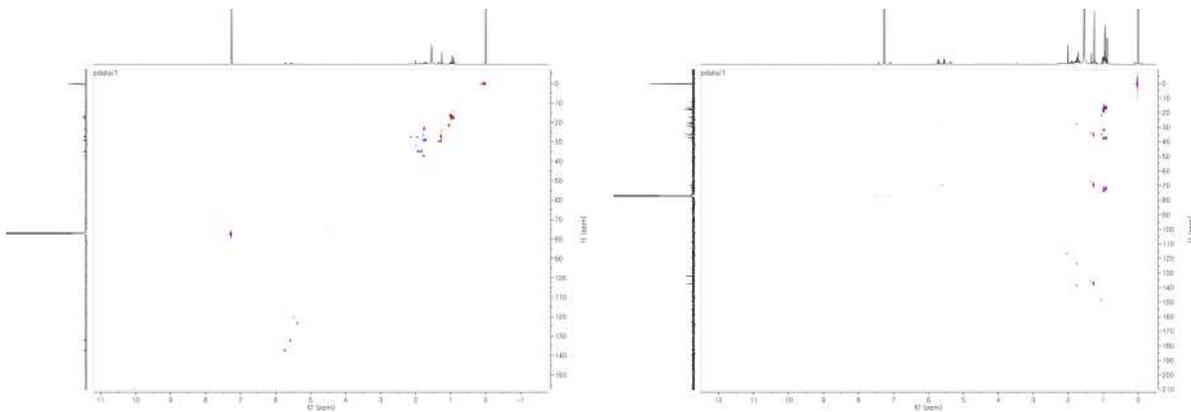
- 실험 결과

- ◆ M1은 1,4-dihydroxy-*p*-menth-2-ene로 확인됨
- ◆ M2는 NMR 분석이 명확하게 판명되지 않음



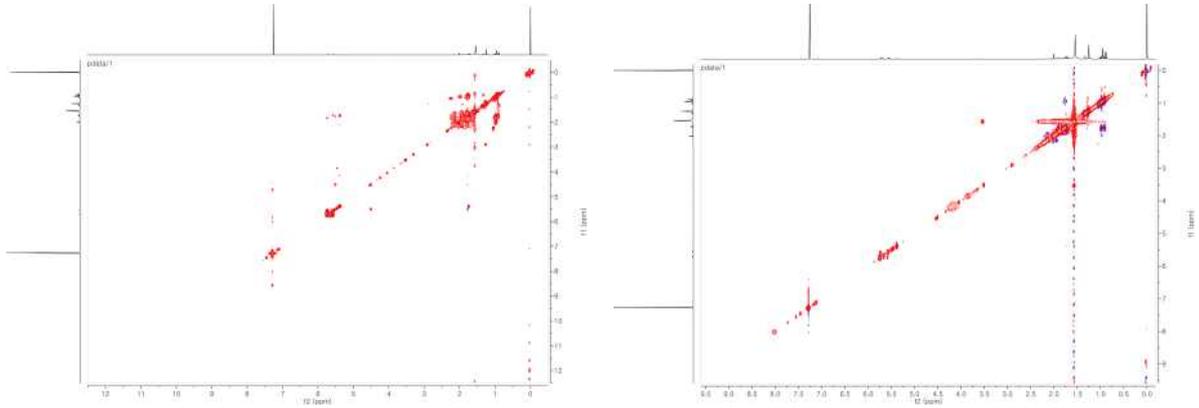
[(좌)  $^1\text{H}$  NMR spectrum of M1 in  $\text{CDCl}_3$  (600 MHz)

(우)  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of M1 in  $\text{CDCl}_3$  (150 MHz)]

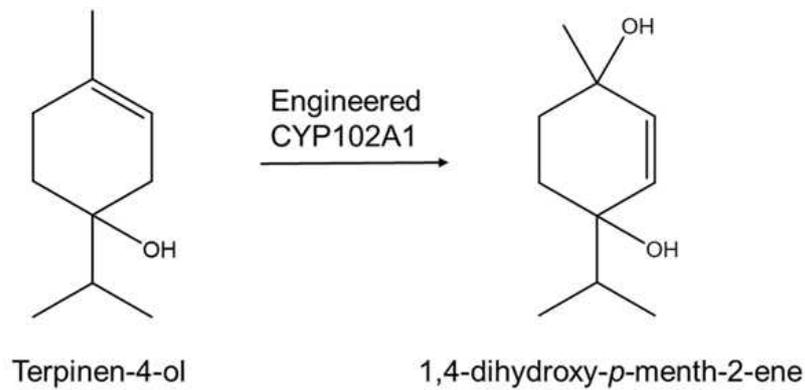


[(좌) HSQC spectrum of M1 in  $\text{CDCl}_3$  (600 MHz)

(우) HMBC spectrum of M1 in  $\text{CDCl}_3$  (600 MHz)]



[(좌) 1H-1H COSY spectrum of M1 in CDCl<sub>3</sub> (600 MHz)  
(우) NOESY spectrum of M1 in CDCl<sub>3</sub> (600 MHz) ]



[CYP102A1 M179와 terpinen-4-ol의 반응에 의해 생긴 대사체의 모식도]

다) CYP102A1 mutant와 perillyl alcohol을 이용한 신규 리모넨 유도체 발굴

■ CYP102A1 M601과 perillyl alcohol이 반응하여 생긴 물질의 분석

- 실험 목적

- ◆ CYP102A1 M601과 perillyl alcohol의 효소 반응 결과 생성된 물질의 성분이 어떤 것인지 동정하기 위함

- 실험 방법

◆ 효소 반응 샘플 준비

: 총 볼륨 10 ml의 반응 용액에는 0.2 μM의 CYP102A1 M601과 100 mM potassium phosphate (pH 7), 5 mM의 perillyl alcohol, NGS (NADPH generating system)가 들어감

: 위와 같은 샘플을 총 3세트 준비함

◆ 효소 반응의 시작 및 대사체 추출

: 반응 용액과 NGS를 30 °C에서 5분간 항온 수조에서 pre-incubation 해준 뒤, 반응용액에 NGS가 첨가되면서 효소 반응이 시작되고 2시간 동안 반응함

: Ethyl acetate를 반응 용액의 양의 3배 만큼 첨가하여 반응을 종료함

: 3900 rpm에서 20분간 분리하여 상층액만 따로 glass tube에 옮김

: 질소 가스를 이용하여 충분히 건조하여 용매를 제거함

◆ HPLC를 이용한 생성물의 분리

: mobile phase A는 0.1% formic acid가 들어간 3차수, mobile phase B는 0.1% formic acid가 들어간 acetonitrile로 구성됨. Agilent C18 column (5 μm, 4.6 x 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로 B(25%)의 조건에서 생성물을 분리 및 수

## 확합

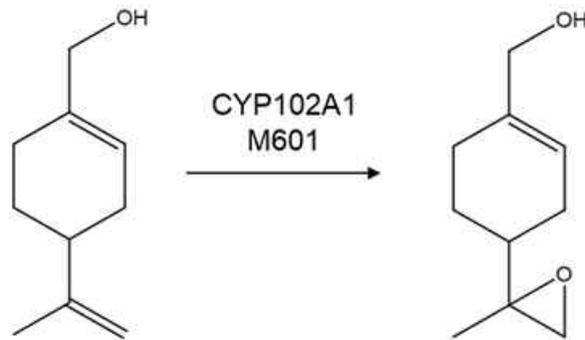
: 분리한 물질에 ethyl acetate를 넣고 잘 섞어준 후 3900 rpm에서 10분간 원심분리한 뒤 상층액만 추출하여 질소 가스로 용매를 날려줌

### ◆ NMR분석

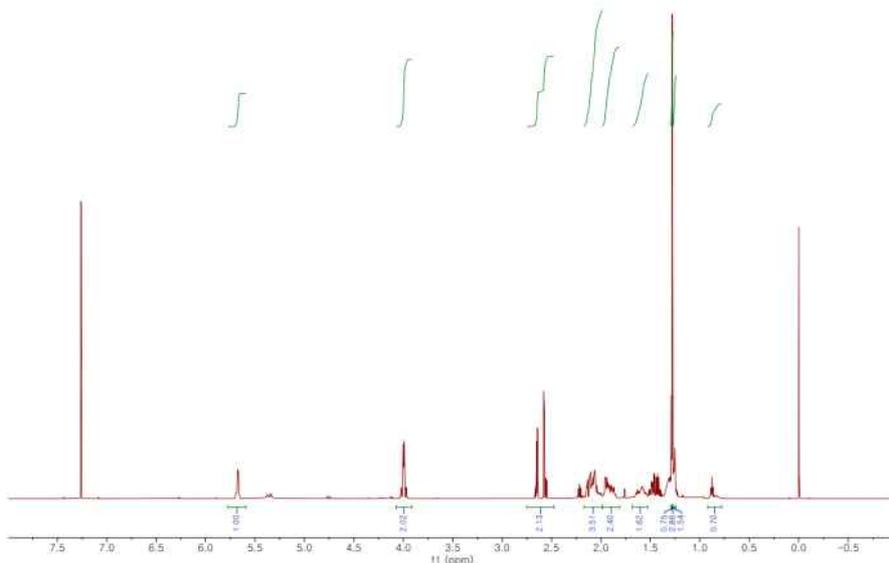
:  $\text{CDCl}_3$ 에 생성물을 넣고  $^1\text{H}$  NMR과  $^{13}\text{C}$  NMR을 수행함

### - 실험 결과

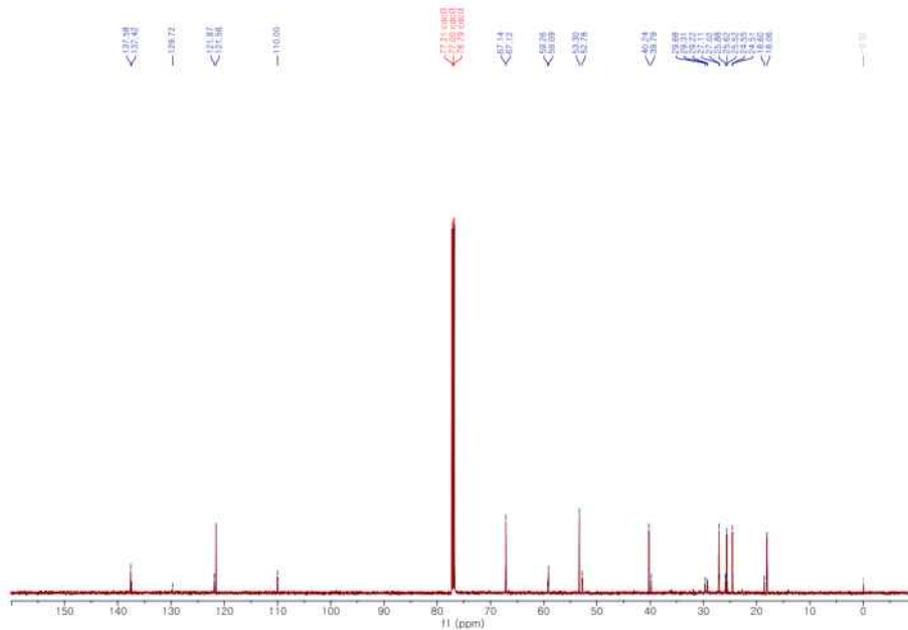
- ◆  $^1\text{H}$  NMR :  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{cdcl}_3$ )  $\delta$  5.71 - 5.64 (m, 2H), 4.04 - 3.95 (m, 4H), 2.65 (dd,  $J = 7.7, 4.7$  Hz, 2H), 2.56 (dd,  $J = 13.2, 4.8$  Hz, 2H), 2.26 - 1.98 (m, 5H), 2.08 (s, 2H), 1.98 - 1.84 (m, 3H), 1.60 - 1.48 (m, 1H), 1.51 - 1.46 (m, 1H), 1.48 - 1.42 (m, 1H), 1.45 - 1.38 (m, 1H), 1.34 - 1.21 (m, 8H), 0.91 - 0.81 (m, 1H).
- ◆  $^{13}\text{C}$  NMR :  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{cdcl}_3$ )  $\delta$  137.58, 137.42, 129.72, 121.87, 121.56, 110.00, 67.14, 67.12, 59.26, 59.09, 53.30, 52.78, 40.24, 39.79, 29.68, 29.22, 27.11, 27.02, 25.88, 25.62, 25.52, 24.55, 24.51, 18.60, 18.06
- ◆ Perillyl alcohol과 M601의 대사체는 (4-(2-methyloxiran-2-yl)cyclohex-1-en-1-yl)methanol 로 확인되었음



[CYP102A1 M601과 perillyl alcohol의 반응에 의해 생긴 대사체의 모식도]



[Perillyl alcohol 대사체의  $^1\text{H}$  NMR]



[Perillyl alcohol 대사체의 13C NMR]

▪ CYP102A1 M601의 E.coli whole cell assay

- 실험 목적

- ◆ CYP102A1 M601을 E.coli에서 발현하여 perillyl alcohol과의 반응성을 테스트함. Whole cell 반응을 통해 비싼 NADPH가 필요한 효소 반응의 단점을 개선할 방안을 모색하기 위함

- 실험 방법

- ◆ CYP102A1 M601을 E.coli (DH5a-F' IQ, JM109, C2566)에 transformation 하여 발현을 유도하고 cell을 harvest하여 perillyl alcohol과의 whole cell 반응성을 확인함
- ◆ CYP102A1 M601을 15 g/L 만큼 준비하고 POH 5 mM 조건에서 37°C로 각각 5분, 1시간 동안 incubation함
- ◆ CYP102A1 M601을 15 g/L 만큼 준비하고 POH 2 mM 조건에서 37°C로 1시간 동안 incubation 하여 기질 농도 차이에 따른 생성물의 양 차이가 발생하는지를 확인함

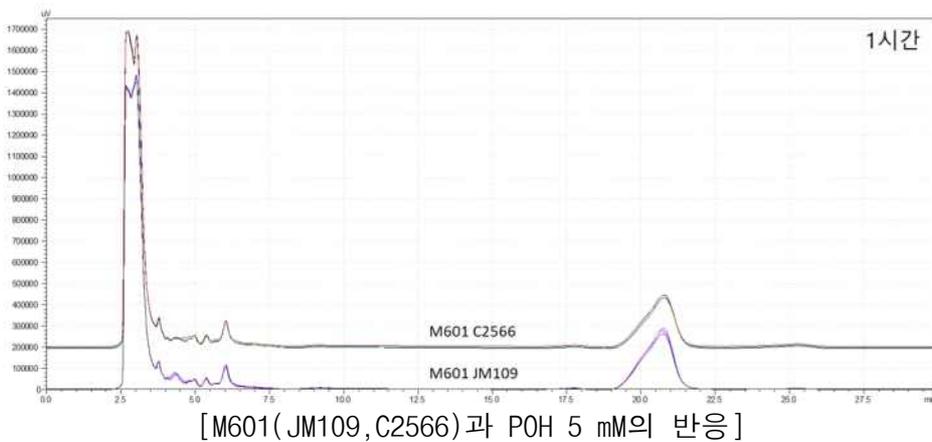
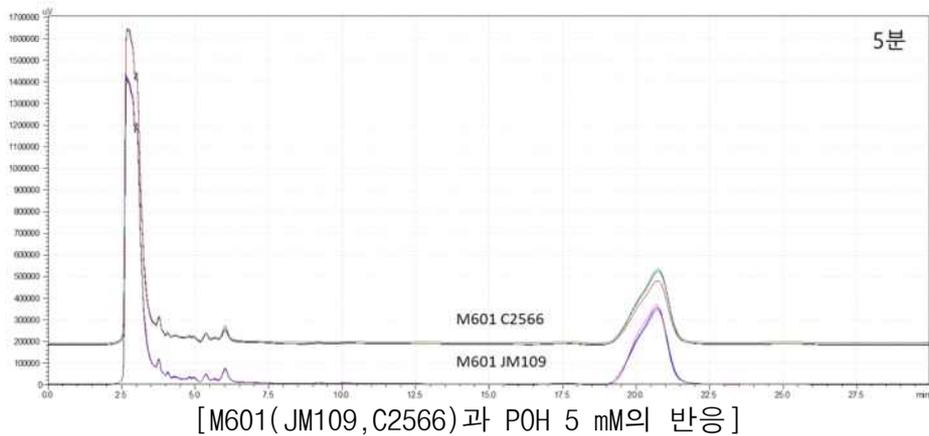
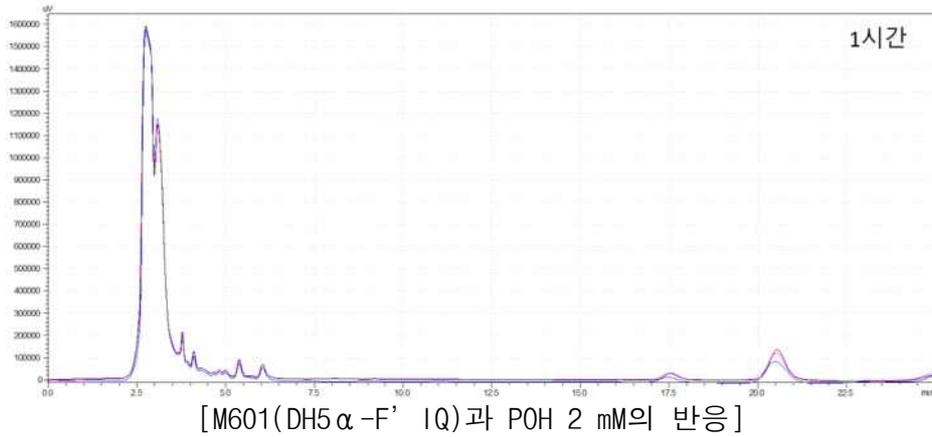
◆ HPLC 분석

- : HPLC 분석에 이용한 mobile phase는 2가지로 구성됨
- : mobile phase A는 0.1% formic acid가 들어간 3차수, mobile phase B는 0.1% formic acid가 들어간 acetonitrile로 구성됨
- : Agilent C18 column (5 μm, 4.6 x 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로 B(40%)의 조건에서 30분간 샘플 분리를 수행함

- 실험 결과

- ◆ CYP102A1 M601(DH5α-F' IQ)과 POH 2 mM의 반응
  - : 37°C에서 1시간 동안 incubation 진행함
  - : 기존 효소 반응과 같은 위치에서 product peak가 존재하지만 소량 생성됨이 확인됨
- ◆ CYP102A1 M601(JM109,C2566)과 POH 5 mM의 반응
  - : 37°C에서 5분, 1시간 동안 incubation 진행함

: 기존 효소 반응과 같은 위치에서 product peak가 존재하지만 소량 생성됨이 확인됨. 반응 시간이 증가해도 생성물의 양은 큰 차이를 보이지 않음을 확인함



라) CYP102A3를 이용한 신규 리모넨 유도체 발굴

- CYP102A3과 리모넨 유도체 3종의 반응성 확인

- 실험 목적

- ◆ Bacillus subtilis에서 유래한 CYP102A3를 이용하여 perillyl alcohol, terpinen-4-ol, α-terpineol과 반응시켜 신규 리모넨 유도체 발굴 가능성을 확인함

- 실험 방법

- ◆ 효소 반응 샘플 준비

: 총 볼륨 250  $\mu$ l의 반응 용액에는 0.4  $\mu$ M의 CYP102A3 mutants와 100 mM potassium phosphate (pH 7.4), 5 mM의 기질 (perillyl alcohol, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol), NGS (NADPH generating system)가 들어감

◆ 효소 반응의 시작과 정지

: 반응 용액과 NGS를 30°C에서 5분간 항온 수조에서 pre-incubation 해준 뒤, 반응 용액에 NGS가 첨가되면서 효소 반응이 시작됨

: HCl (2 M)를 25  $\mu$ l 첨가하여 효소 반응을 멈추고 3900 rpm에서 10분간 원심 분리함. 0.2  $\mu$ m의 PVDF filter를 이용하여 필터링 하여 샘플링을 완료함

◆ HPLC 분석

: HPLC 분석에 이용한 mobile phase는 2가지로 구성됨

: mobile phase A는 0.1% formic acid가 들어간 3차수, mobile phase B는 0.1% formic acid가 들어간 acetonitrile로 구성됨

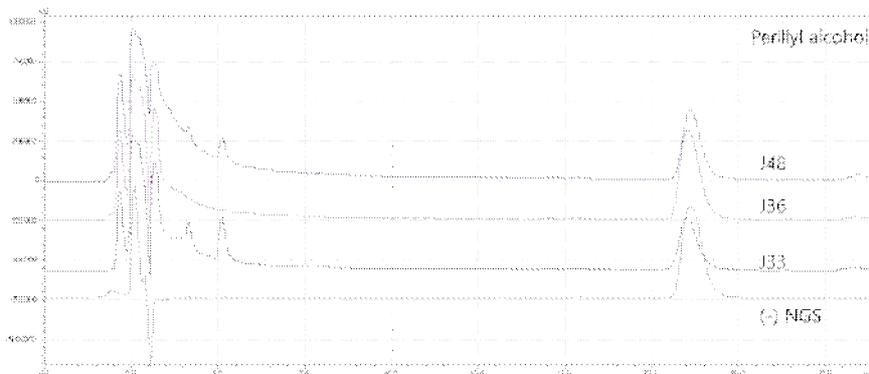
: Agilent C18 column (5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로 B(40%)의 조건에서 30분간 샘플 분리를 수행함

- 실험 결과

◆ CYP102A3 mutants와 perillyl alcohol의 반응

: CYP102A3 mutants (J33, J36, J48)와 perillyl alcohol과 효소 반응 진행함

: NADPH generating system이 들어가지 않은 (-)NGS와 비교했을 때, 두 가지의 mutants(J33, J48)에서 5분 정도의 retention time에서 peak가 관찰됨



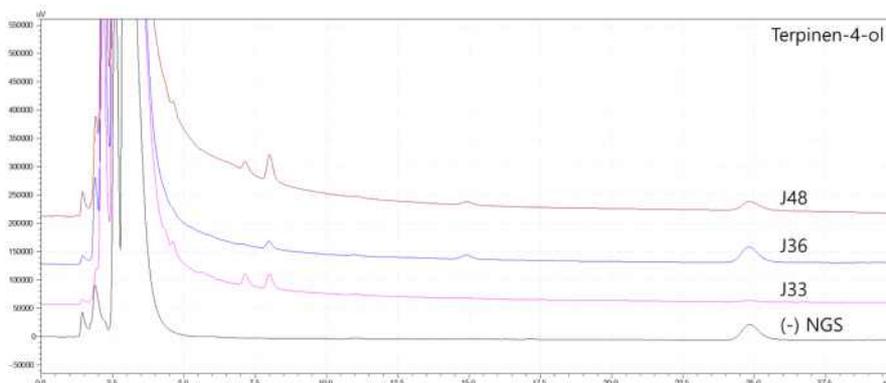
[Perillyl alcohol과 CYP102A3 mutants의 반응성 테스트]

◆ CYP102A3 mutants와 terpinen-4-ol의 반응

: CYP102A3 mutants (J33, J36, J48)와 terpinen-4-ol과 효소 반응 진행함

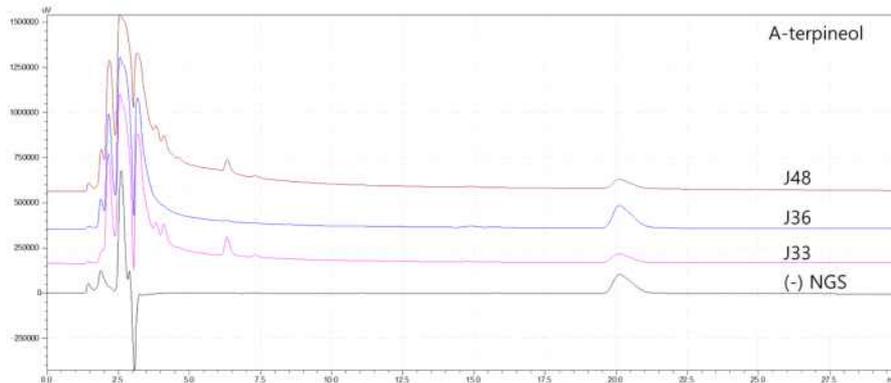
: NADPH generating system이 들어가지 않은 (-)NGS와 비교했을 때, J33, J48에서는 약 7분, 8분에서 peak가 각각 측정되었음.

: J36의 경우 product peak가 8분에서만 관찰됨



[Terpinen-4-ol과 CYP102A3 mutants의 반응성 테스트]

- ◆ CYP102A3 mutants와  $\alpha$ -terpineol의 반응
  - : CYP102A3 mutants (J33, J36, J48)와  $\alpha$ -terpineol과 효소 반응 진행함
  - : NADPH generating system이 들어가지 않은 (-)NGS와 비교했을 때, 2가지의 mutants (J33, J48)가  $\alpha$ -terpineol과 반응하여 6.5분 정도에서 product peak가 관찰됨



[ $\alpha$ -terpineol과 CYP102A3 mutants의 반응성 테스트]

## (7) GRAS 미생물 균주의 생물전환 시스템을 이용한 신규 리모넨 유도체 제조 확립

가) Integrated bacillus subtilis를 이용한 신규 리모넨 유도체 발굴

- Integrated bacillus subtilis와 리모넨 유도체 3종의 반응성 확인

- 실험 목적

- ◆ GRAS 인증으로 안정성이 확보된 bacillus subtilis를 리모넨 유도체 3종 (perillyl alcohol, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol)과 whole-cell 반응하여 신규 리모넨 유도체 발굴 가능성을 탐구함
- ◆ NADPH와 같은 고가의 조효소가 필요하지 않은 bacillus subtilis를 이용한 whole-cell 반응으로 신규 리모넨 유도체 생성 가능성을 확인하여 경제적인 부담을 줄이고 상업적 활용 가능성을 탐구함

- 실험 방법

- ◆ Bacillus subtilis cell 준비

: 돌연변이를 염색체에 integration 시킨 bacillus subtilis 3종 (M10, A32, A42)를 확보함

: 야생형의 bacillus subtilis와 돌연변이 subtilis (M10, A32, A42)를 LB 배지에 overnight으로 씨딩 후 250 ml의 LB 배지에 분배양함

: O.D 값이 0.6-0.8이 되었을 때, IPTG를 첨가하여 발현을 유도함

: 약 20시간 정도 180 rpm, 30°C의 조건에서 incubation을 진행함

: CO spectral assay를 통해 발현의 정도를 확인함

: 3900 rpm에서 20분간 원심 분리한 뒤, 상층액은 버리고 cell을 확보함

- ◆ Whole-cell assay

: 반응 용액은 각각 whole-cell buffer와 bacillus subtilis cell(15 g/L), 2 mM의 기질(perillyl alcohol, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol)으로 구성됨

: 37°C의 향온 수조에서 30분 동안 반응을 진행함

: Whole-cell 반응은 에틸아세테이트 600  $\mu$ l를 넣어서 종료함

: 3900 rpm으로 20분간 원심 분리하여, 상층액 중 300  $\mu$ l를 추출함

: 추출한 에틸 아세테이트를 질소 가스를 이용하여 말리고 mobile phase (A: 0.1%

formic acid in 3DW B : 0.1% formic acid in acetonitrile, 60:40, v/v)에 녹여서 샘플링 함

◆ HPLC 분석

: HPLC 분석에 이용한 mobile phase는 2가지로 구성됨

: mobile phase A는 0.1% formic acid가 들어간 3차수, mobile phase B는 0.1% formic acid가 들어간 acetonitrile로 구성됨

: Agilent C18 column (5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로 B(40%)의 조건에서 30분간 샘플 분리를 수행함

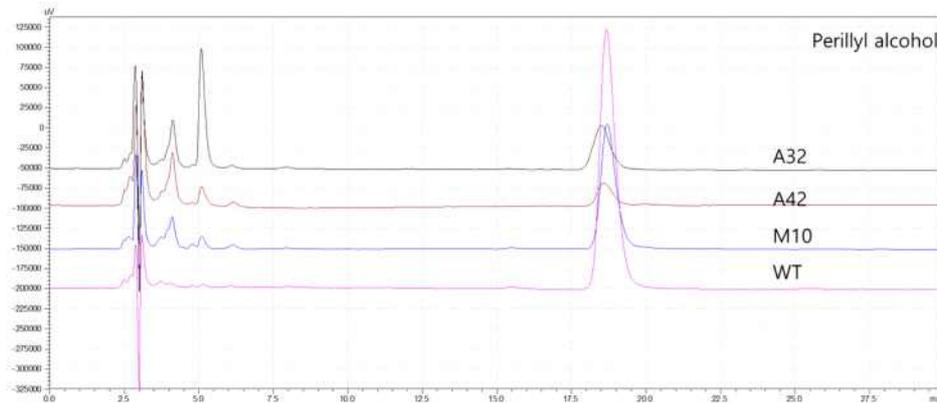
- 실험 결과

◆ Perillyl alcohol과 bacillus subtilis 야생형 및 돌연변이 3종 (M10,A32,A42) 과의 반응

: 야생형 bacillus subtilis는 별다른 peak가 확인되지 않음

: M10, A32, A42는 야생형과 비교했을 때 4.5분, 5분의 retention time 에서 뚜렷한 새 peak가 관측되었으며, 6.5분 정도에서는 매우 작은 peak가 생성됨을 확인함

: 15 g/L의 조건에서 perillyl alcohol과의 반응성은 A32가 가장 좋은 것으로 확인됨



[perillyl alcohol과 bacillus subtilis의 반응 테스트]

◆ Terpinen-4-이과 bacillus subtilis 야생형 및 돌연변이 3종 (M10,A32,A42) 과의 반응

: 질소 가스를 이용하여 에틸 아세테이트를 말리는 과정에서 volatile한 기질의 특성으로 인해 휘발되어서 HPLC에서는 기질 peak가 확인되지 않음

: 야생형 bacillus subtilis는 terpinen-4-이과의 반응에서 별다른 peak가 확인되지 않음

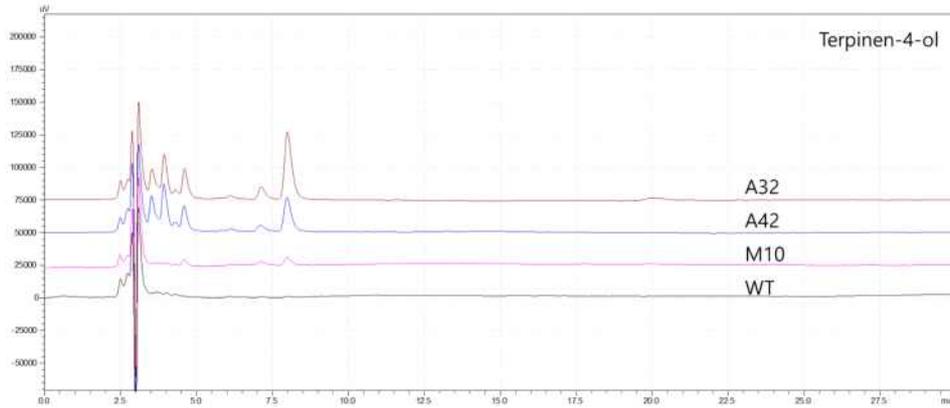
: M10, A32, A42는 terpinen-4-이과 반응하여 새 peak들이 측정됨

: A32와 A42는 5개 정도의 새 peak가 관측됨

: M10은 3개 정도의 새 peak가 관찰됨

: 3.5-4.5분 사이의 retention time에서는 A32와 A42가 만들어낸 생산물의 양이 비슷한 것으로 생각되지만, 8분의 retention time에서는 A32가 A42보다 더 많은 생산물을 만들어내는 것으로 확인됨

: A32가 terpinen-4-이과의 반응성이 가장 좋은 것으로 생각됨



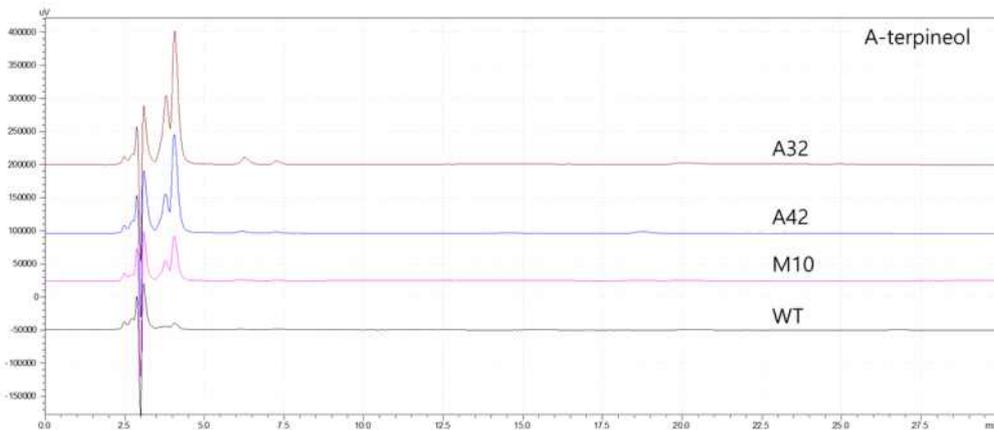
[Terpinen-4-ol과 bacillus subtilis의 반응 테스트]

- ◆  $\alpha$ -terpineol과 bacillus subtilis 야생형 및 돌연변이 3종 (M10, A32, A42) 과의 반응

: 질소 가스를 이용하여 에틸 아세테이트를 말리는 과정에서 volatile한 기질의 특성으로 인해 휘발되어서 HPLC에서는 기질 peak가 확인되지 않음

: 야생형 bacillus subtilis는  $\alpha$ -terpineol과의 반응에서 별다른 peak가 확인되지 않음

: M10, A32, A42 모두 4분 정도의 retention time에서 2개의 peak가 확인됨



[ $\alpha$ -terpineol과 bacillus subtilis의 반응 테스트]

- Perillyl alcohol과 A32 cell mass 양 변화로 인한 생성물 비교

- 실험 방법

- ◆ 반응 샘플 준비

: Bacillus subtilis cell은 리모넨 유도체 반응성 확인 실험 때와 동일하게 준비함

: 반응용액은 총 볼륨 250  $\mu$ l이며 반응 용액은 whole-cell buffer, A32 (5,10,15,20,25 g/L), 5 mM의 perillyl alcohol으로 구성됨

: 반응용액은 37°C에서 2시간 동안 incubation을 진행함

: 3900 rpm에서 20분 동안 원심분리 후 상층액만 추출하여 0.2  $\mu$ m PVDF filter를 사용하여 필터링함

: 필터링 된 상층액은 HPLC로 분리 및 분석함

- ◆ HPLC 분석

: HPLC 분석에 이용한 mobile phase는 2가지로 구성됨

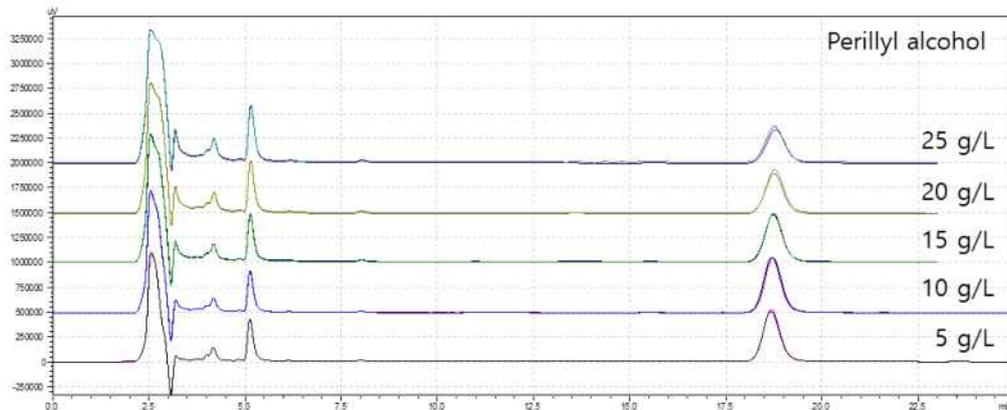
: mobile phase A는 0.1% formic acid가 들어간 3차수, mobile phase B는 0.1% formic acid가 들어간 acetonitrile로 구성됨

: Agilent C18 column (5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로

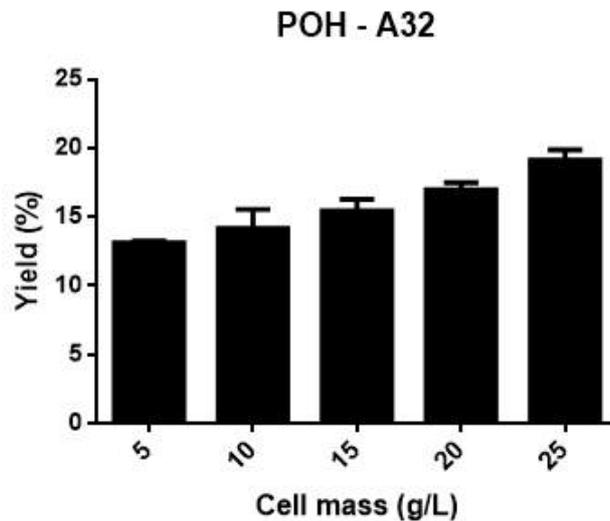
B(40%)의 조건에서 30분간 샘플 분리를 수행함

- 실험 결과

- ◆ HPLC 결과 4.2분, 5분에 각각 생성물의 존재를 확인함
- ◆ Cell mass의 양이 늘어날수록 5분에 용출되는 생성물도 증가함을 확인함
- ◆ Cell mass가 5 g/L일 때 산출량은 13%이었으며, 25 g/L일 때 산출량은 18%로 확인됨



[perillyl alcohol과 bacillus subtilis A32의 cell mass 변화에 따른 생성물 비교]



[Bacillus subtilis A32 cell mass(g/L)와 생성물의 산출량]

■ Perillyl alcohol의 시간 변화 정도로 인한 생성물 비교

- 실험 방법

◆ 반응 샘플 준비

: Bacillus subtilis cell은 리모넨 유도체 반응성 확인 실험 때와 동일하게 준비함

: 반응용액은 총 볼륨 250  $\mu$ l이며 반응 용액은 whole-cell buffer, A32 (15 g/L), 5 mM의 perillyl alcohol으로 구성됨

: 반응용액은 37°C에서 30분, 1, 2, 4, 6 시간 동안 incubation을 진행함

: 3900 rpm에서 20분 동안 원심분리 후 상층액만 추출하여 0.2  $\mu$ m PVDF filter를 사용하여 필터링함

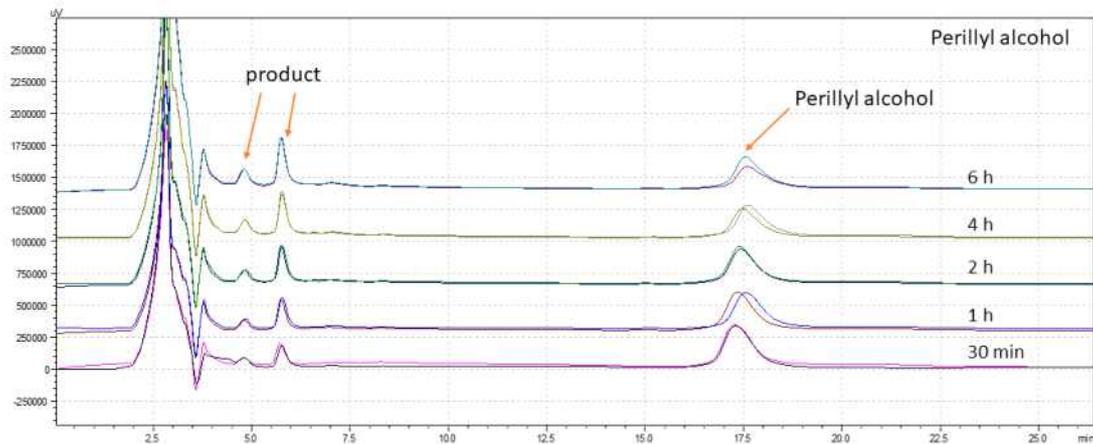
: 필터링 된 상층액은 HPLC로 분리 및 분석함

◆ HPLC 분석

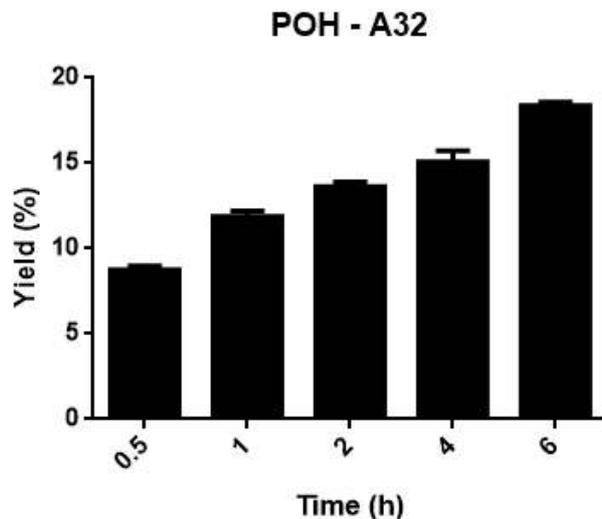
: HPLC 분석에 이용한 mobile phase는 2가지로 구성됨  
 : mobile phase A는 0.1% formic acid가 들어간 3차수, mobile phase B는 0.1% formic acid가 들어간 acetonitrile로 구성됨  
 : Agilent C18 column (5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로 15분까지 B(40%), 16-25분은 B(40-50%)까지 증가, 26-45분은 B(100%), 46-60분까지 B(40%)으로 총 60분간 샘플 분리를 수행함

- 실험 결과

: HPLC 결과 4.8분, 5.8분에 각각 생성물의 존재를 확인함  
 : 반응 시간이 늘어날수록 용출되는 생성물도 증가함을 확인함  
 : 반응 시간이 6시간일 때 생성물의 전환은 18%로 가장 높았음



[반응 시간의 변화에 따른 perillyl alcohol 대사체의 HPLC chromatogram]



[A32를 이용하여 perillyl alcohol과 발생하는 yield]

▪ Terpinen-4-이과 A32 cell mass 양 변화로 인한 생성물 비교

- 실험 방법

◆ 반응 샘플 준비

: Bacillus subtilis cell은 리모넨 유도체 반응성 확인 실험 때와 동일하게 준비함  
 : 반응용액은 총 볼륨 250  $\mu$ l이며 반응 용액은 whole-cell buffer, A32 (5, 10, 15, 20, 25 g/L), 2 mM의 terpinen-4-이므로 구성됨  
 : 반응용액은 37°C에서 1시간 동안 incubation을 진행함

: 3900 rpm에서 20분 동안 원심분리 후 상층액만 추출하여 0.2 μm PVDF filter를 사용하여 필터링함

: 필터링 된 상층액은 HPLC로 분리 및 분석함

◆ HPLC 분석

: HPLC 분석에 이용한 mobile phase는 2가지로 구성됨

: mobile phase A는 0.1% formic acid가 들어간 3차수, mobile phase B는 0.1% formic acid가 들어간 acetonitrile로 구성됨

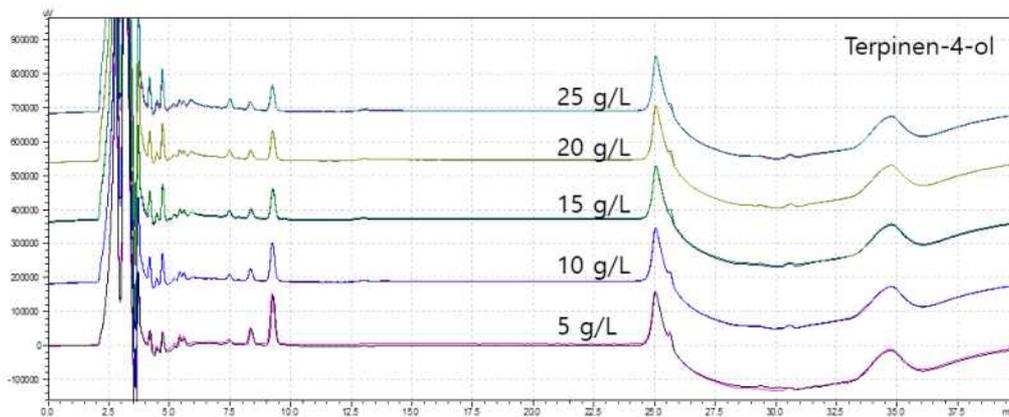
: Agilent C18 column (5 μm, 4.6 x 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로 B(40%)의 조건에서 30분간 샘플 분리를 하고 B(100%)의 조건에서 washing 과정을 수행함

- 실험 결과

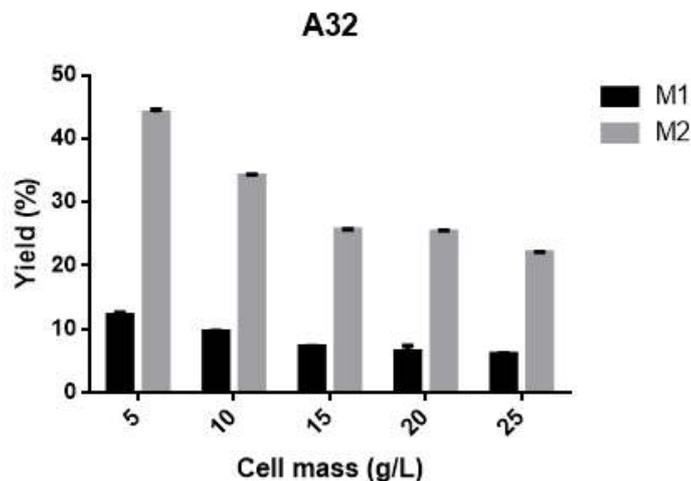
: 3.5-5.5분 사이의 retention time에서 여러 생성물을 확인함

: 7.5-9.3분에서 3개의 peak가 생성됨을 확인함

: Cell 양이 많아질수록 3번째 peak (9.3분)의 양이 감소하고 첫 번째 peak (7.5분)의 양이 소폭 증가함을 확인함



[Bacillus subtilis A32의 cell mass 변화에 따른 생성물 HPLC chromatogram]



[perillyl alcohol과 A32를 반응하여 얻은 생성물 yield]

■ Terpinen-4-ol과 A32를 이용한 time course assay

- 실험 방법

◆ 반응 샘플 준비

: Bacillus subtilis cell은 리모넨 유도체 반응성 확인 실험 때와 동일하게 준비함

: 반응용액은 총 볼륨 250  $\mu$ l이며 반응 용액은 whole-cell buffer, A32 (15 g/L), 5 mM의 terpinen-4-ol이므로 구성됨

: 반응용액은 37°C에서 30분, 1, 2, 4, 6시간 동안 incubation을 진행함

: 3900 rpm에서 20분 동안 원심분리 후 상층액만 추출하여 0.2  $\mu$ m PVDF filter를 사용하여 필터링함

: 필터링 된 상층액은 HPLC로 분리 및 분석함

◆ HPLC 분석

: HPLC 분석에 이용한 mobile phase는 2가지로 구성됨

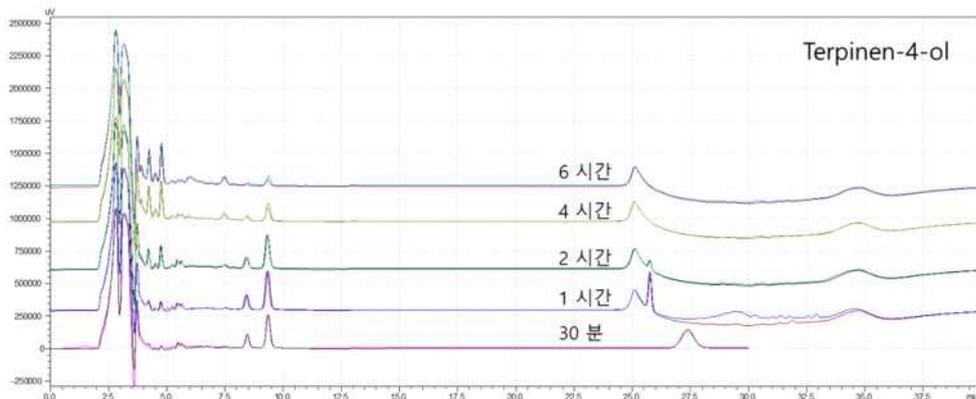
: mobile phase A는 0.1% formic acid가 들어간 3차수, mobile phase B는 0.1% formic acid가 들어간 acetonitrile로 구성됨

: Agilent C18 column (5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm)을 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로 B(40%)의 조건에서 30분간 샘플 분리를 하고 B(100%)의 조건에서 washing 과정을 수행함

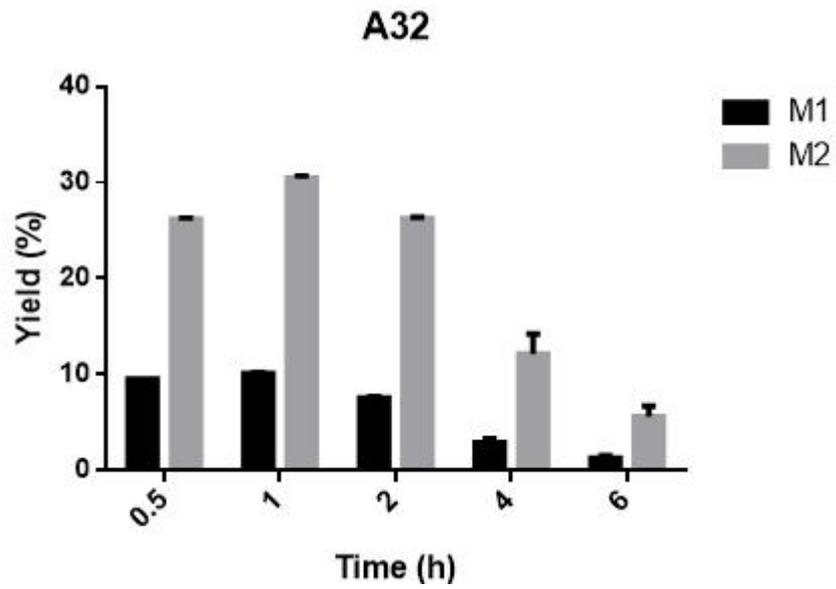
- 실험 결과

: 8.5분과 9.5분에서 생성물 2개가 용출됨을 확인함

: 각각의 생성물의 양이 시간에 비례하여 증가하는 것이 아니고 다른 retention time에서 새로운 peak가 생성됨을 확인함



[A32와 terpinen-4-ol의 time course assay]



[Terpinen-4-ol과 A32를 반응하여 얻은 생성물 yield]

## 다. 공동과제 2

### (1) 후보물질에 따른 방제 최적 조합 선발 및 처리조건 확립

#### 가) 실험 목적

- 선행연구를 통하여 얻어진 리모넨 유도체 중 효과가 있을 것으로 예상되는 물질의 최적 농도를 확보하기 위한 단일 및 복합 효과 검정

#### 나) 실험 재료 및 방법

- 식물병원균의 확보 및 배양
  - 실험에 사용된 식물병원균은 세균 3종, 곰팡이 5종으로 총 8종의 병원균에 대하여 후보물질의 생장 억제 효과를 실험하였음
  - 총 8종의 병원균은 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*(벼흰잎마름병), *Ralstonia solanacearum*(꽃마름병원균), *Erwinia carotovora*(무름병), *Alternaria alternata*(검은무늬병), *Alternaria porri*(검은무늬병), *Botrytis cinerea*(잿빛곰팡이병), *Pyricularia oryzae*(도열병) 그리고 *Fusarium* spp.(시들음병) 균주에 대하여 실험을 진행하였음
  - 확보된 식물병원성 균주들은 NA(nutrient agar), LB(Luria-Bertani agar), PDA(potato dextrose agar) 배지에 생육 적정 온도에 따라 28~37℃로 2~5일 동안 배양하여 성장시킨 후 계대 배양하여 실험을 진행하였음



[식물성 병원균의 균주]

- 후보물질
  - (1차년도) 방제 물질 선발을 위해 후보물질로 carveol 및 carvacrol을 사용하였으며, 복합 형태는 carveol과 carvacrol을 섞은 혼합물이 사용되었음
  - (2차년도) 방제 최적 조합 선발을 위해 후보물질로 D-limonene, L-limonene 및 carveol을 단일 형태로서 사용하였음
  - (2차년도) 복합 형태는 D-limonene, L-limonene 및 carveol을 2종류씩 섞은 혼합물(D-limonene + L-limonene, D-limonene + carveol 및 L-limonene + carveol)이 사용되었음
- Disk diffusion assay를 통한 억제 효과 검정
  - 후보물질의 억제 효과 검정은 paper disc 방법으로 각각의 식물성 병원균을 배지에 접종하여 28~37℃, 180rpm, 2~5일 동안 배양하였으며 배양액을 농도 OD600=0.8~1.0으로 현탁하여 배지에 평판 도말하였음
  - (1차년도) 도말한 배지위에 paper disc(φ 8mm, Avantec, Japan)를 올려놓고 Carveol, Carvacrol, Carveol+Carvacrol(1:1)을 농도별로 30μl씩 처리 후 적절한

배양온도에 2~5일 배양하여 paper disc 주변에 형성된 clear zone(세균성장 억제 존)의 크기에 따라 항균 활성 정도를 확인하였음

- (2차년도) 도말한 배지위에 paper disc (φ8mm, Avante, Japan)를 올려놓고 D-limonene, L-limonene, carveol, D-limonene + carveol, L-limonene + carveol, D-limonene + L-limonene을 농도별로 40μl씩 처리 후 적절한 배양온도에 2~5일 배양하여 paper disc 주변에 형성된 clear zone (세균성장 억제 존)의 크기에 따라 항균 활성 정도를 확인하였음

▪ Drop plate assay를 이용한 병원균 억제 효과

- 후보물질의 억제 효과 검정은 Drop method로 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*를 배지에 접종하여 28~37°C, 180rpm, 2~5일 동안 배양하였으며 배양액을 농도 OD<sub>600</sub>=0.8~1.0으로 현탁하여 배지에 평판 도말하였음
- (2차년도) 도말한 배지위에 각각의 compound (D-limonene, L-limonene, carveol, D-limonene + carveol, L-limonene + carveol, D-limonene + L-limonene)를 용매 (DMSO, 70% Ethanol) 및 농도별(100, 50, 10mM)로 배지위에 직접 5μl씩 처리 후 적절한 배양온도에 2~5일 배양하여 inhibition zone (세균성장 억제 존)의 생성 유무에 따라 항균 활성 정도를 확인하였음

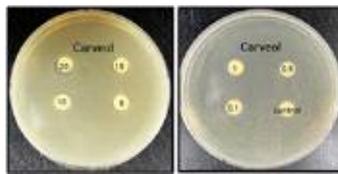
다) 실험 결과

▪ Carveol의 식물병원균 억제 효과

- Carveol을 농도별(20, 15, 10, 5, 1, 0.5, 0.1mM)처리한 결과 농도 의존적으로 억제 효과를 보였으며, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*(벼흰잎마름병)에서는 10mM부터 효과를 보였으며, *Ralstonia solanacearum*(풋마름병원균)에 대해서는 5mM에서부터 병원균의 성장 억제 효과가 있는 것을 확인하였음
- 그러나 실험에 사용된 5종의 곰팡이 병원균과 무름병원균에서는 효과를 보이지 않았음



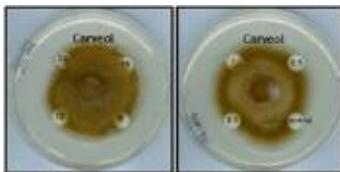
[*X. oryzae* 억제 효과 결과]



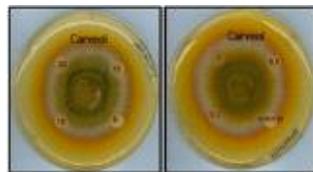
[*R. solanacearum* 억제 효과 결과]



[*E. carotovora* 억제 효과 결과]



[*A. alternata* 억제 효과 결과]



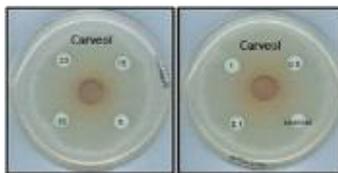
[*A. porri* 억제 효과 결과]



[*B. cinerea* 억제 효과 결과]



[*P. oryzae* 억제 효과 결과]



[*Fusarium* spp. 억제 효과 결과]

[Carveol의 식물병원균 성장 억제 효과]

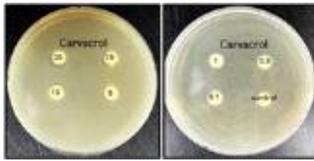
[Carveol의 식물성 병원균에 대한 항균력]

(mM /disc)	Diameter of inhibition zone (mm) <sup>a</sup>							
	Carveol							
	<i>X.oryzae</i>	<i>R. solanacerum</i>	<i>E.carotovora</i>	<i>A.alternata</i>	<i>A.porri</i>	<i>B.cinerea</i>	<i>P.oryzae</i>	<i>Fusarium spp.</i>
20	11.23±0.2	11.50±0.3	-	-	-	-	-	-
15	10.52±0.1	10.00±0.2	-	-	-	-	-	-
10	10.22±0.3	9.50±0.1	-	-	-	-	-	-
5	-	9.00±0.1	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5	-	-	-	-	-	-	-	-
0.1	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Diameter of clear zone including disc diameter 8.0mm

■ Carvacrol의 식물병원균 억제 효과

- Carvacrol를 농도별(20, 15, 10, 5, 1, 0.5, 0.1mM)처리한 결과 실험에 사용된 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*(벼흰잎마름병), *Ralstonia solanacearum*(풋마름병원균), *Erwinia carotovora*(무름병) 모든 병원균에서 억제 효과가 있는 것으로 확인 되었으며, 풋마름병원균에서 가장 큰 효과를 나타내는 것으로 확인되었음
- 그러나 실험에 사용된 5종의 곰팡이 병원균에서는 효과를 보이지 않았음



[*X. oryzae* 억제 효과 결과]



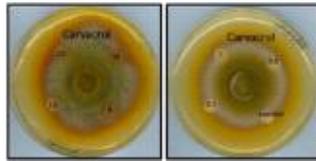
[*R. solanacearum* 억제 효과 결과]



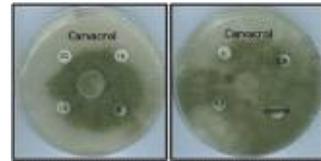
[*E. carotovora* 억제 효과 결과]



[*A. alternata* 억제 효과 결과]



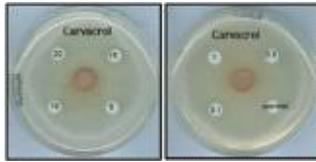
[*A. porri* 억제 효과 결과]



[*B. cinerea* 억제 효과 결과]



[*P. oryzae* 억제 효과 결과]



[*Fusarium spp.* 억제 효과 결과]

[Carvacrol의 식물병원균 성장 억제 효과]

[Carvacrol의 식물성 병원균에 대한 항균력]

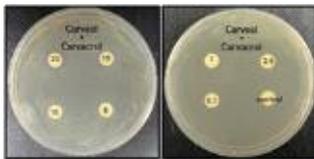
(mM /disc)	Diameter of inhibition zone (mm) <sup>a</sup>							
	Carvacrol							
	<i>X.oryzae</i>	<i>R. solanacerum</i>	<i>E.carotovora</i>	<i>A.alternata</i>	<i>A.porri</i>	<i>B.cinerea</i>	<i>P.oryzae</i>	<i>Fusarium spp.</i>
20	12.95±0.3	13.50±0.3	12.25±0.2	-	-	-	-	-
15	11.05±0.1	12.25±0.3	11.75±0.1	-	-	-	-	-
10	10.00±0.1	12.00±0.4	10.05±0.2	-	-	-	-	-
5	10.00±0.1	11.25±0.1	-	-	-	-	-	-

1	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5	-	-	-	-	-	-	-	-
0.1	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Diameter of clear zone including disc diameter 8.0mm

▪ 복합물(Carveol + Carvacrol)의 식물병원균 억제 효과

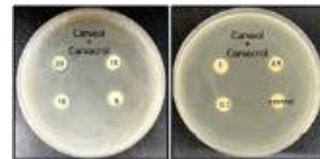
- Carveol + Carvacrol의 농도별(20, 15, 10, 5, 1, 0.5, 0.1mM)처리한 결과 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*(벼흰잎마름병), *Ralstonia solanacearum*(풋마름병원균), *Erwinia carotovora*(무름병)에 성장 억제 효과가 있는 것으로 확인하였음



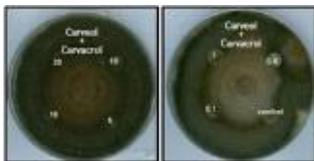
[*X. oryzae* 억제 효과 결과]



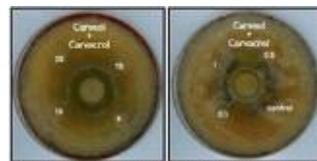
[*R. solanacearum* 억제 효과 결과]



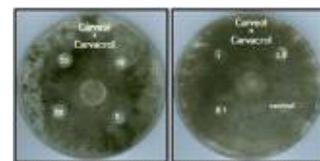
[*E. carotovora* 억제 효과 결과]



[*A. alternata* 억제 효과 결과]



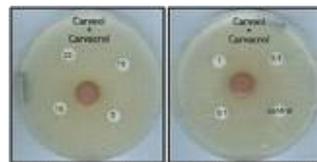
[*A. porri* 억제 효과 결과]



[*B. cinerea* 억제 효과 결과]



[*P. oryzae* 억제 효과 결과]



[*Fusarium* spp. 억제 효과 결과]

[복합물(Carveol + Carvacrol)의 식물병원균 성장 억제 효과]

[Carveol + Carvacrol의 식물성 병원균에 대한 항균력]

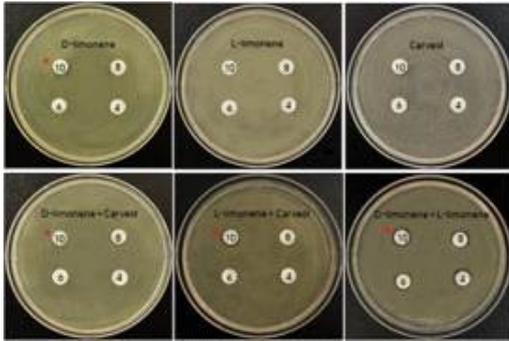
(mM /disc)	Diameter of inhibition zone (mm) <sup>a</sup>							
	Carveol+Carvacrol							
	<i>X.oryzae</i>	<i>R. solanacerum</i>	<i>E.carotovora</i>	<i>A.alternata</i>	<i>A.porri</i>	<i>B.cinerea</i>	<i>P.oryzae</i>	<i>Fusarium</i> spp.
20	12.85±0.5	17.00±0.4	11.50±0.3	-	-	-	-	-
15	10.05±0.4	14.50±0.3	10.05±0.0	-	-	-	-	-
10	-	13.00±0.3	-	-	-	-	-	-
5	-	12.25±0.2	-	-	-	-	-	-
1	-	11.25±0.3	-	-	-	-	-	-
0.5	-	10.00±0.0	-	-	-	-	-	-
0.1	-	10.00±0.0	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Diameter of clear zone including disc diameter 8.0mm

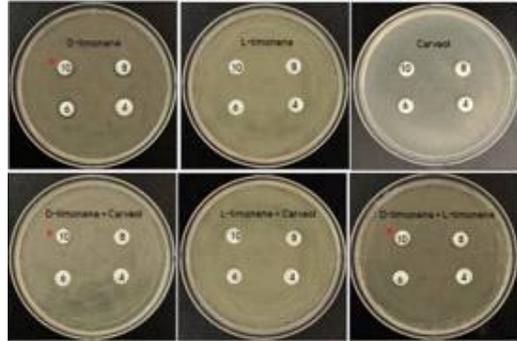
- Carveol과 Carvacrol 단독 처리시 억제 효과를 보이는 식물병원균에서 Carvacrol의 활성이 우수하였으나, 복합처리시 풋마름병원균에 대하여 억제 효과가 증가하는 것을 확인하였음

▪ Disk diffusion assay를 통한 억제 효과 검정

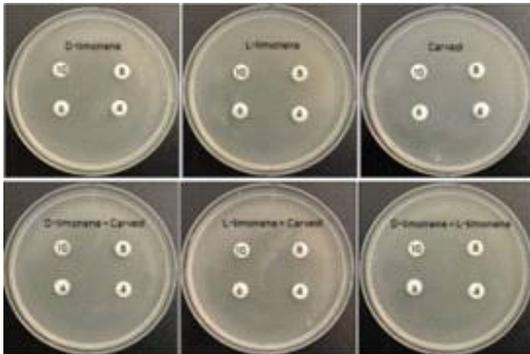
- 각각의 compound를 농도별(10, 8, 6, 4mM) 처리한 결과, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*에서 D-limonene, D-limonene + carveol, L-limonene + carveol, D-limonene + L-limonene의 억제 효과를 확인함
- *Ralstonia solanacearum*에서는 복합 형태인 D-limonene + carveol의 억제 효과를 확인함
- 검은무늬병을 포함한 5종의 곰팡이에서는 억제 효과를 확인할 수 없었음



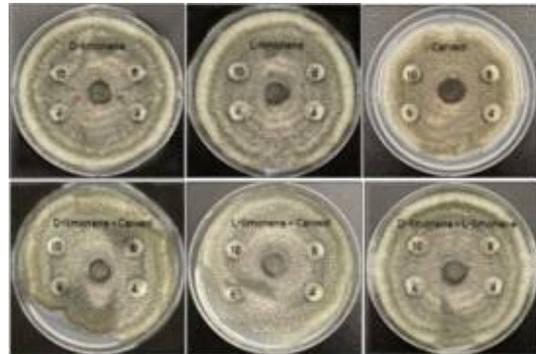
[*X. oryzae* 억제 효과 결과]



[*R. solanacearum* 억제 효과 결과]



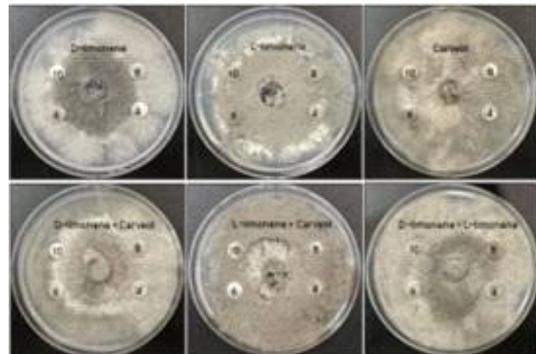
[*E. carotovora* 억제 효과 결과]



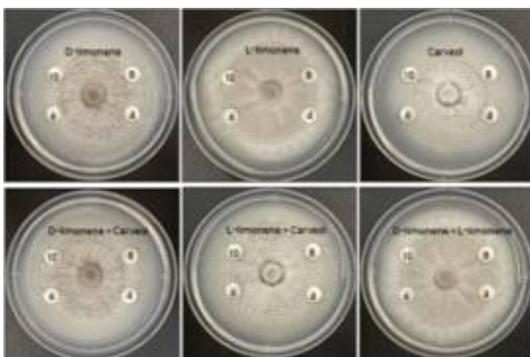
[*A. alternata* 억제 효과 결과]



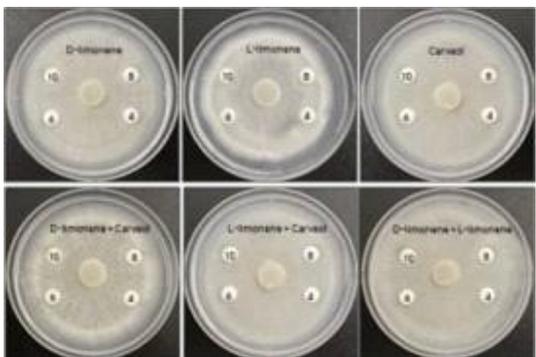
[*A. porri* 억제 효과 결과]



[*B. cinerea* 억제 효과 결과]



[*P. oryzae* 억제 효과 결과]



[*Fusarium* spp. 억제 효과 결과]

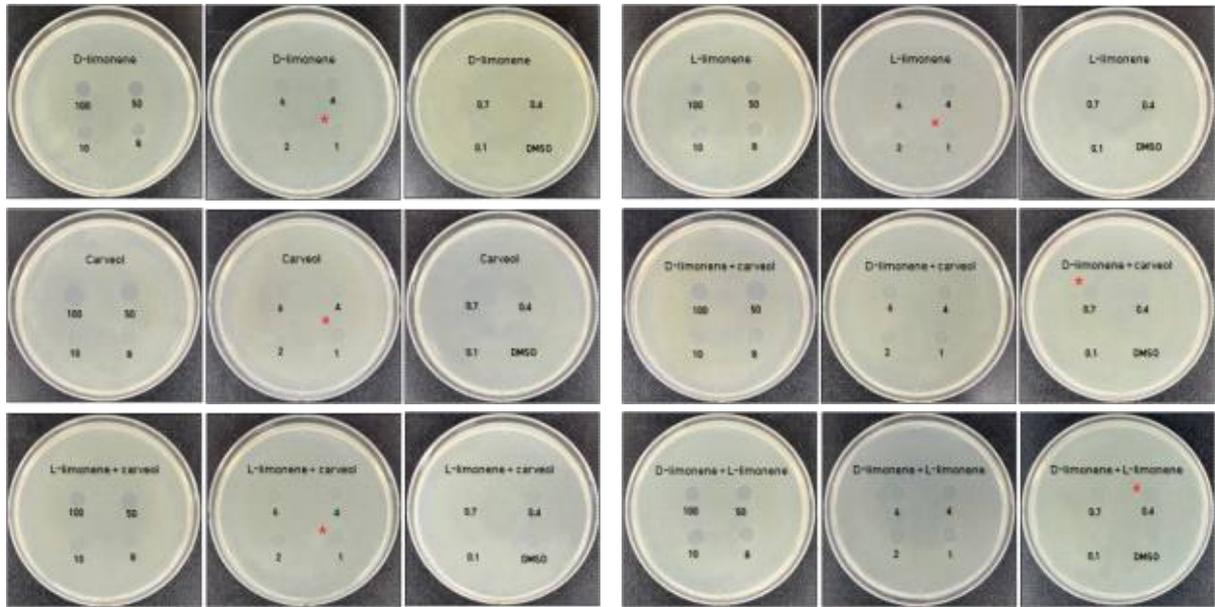
[후보물질의 식물 병원균 성장 억제 효과]

[후보물질의 식물 병원균 생장억제능 평가]

	처리농도 (mM)	Diameter of inhibition zone (mm) <sup>a</sup>							
		<i>X.oryzae</i>	<i>E.carotovora</i>	<i>R.solanacearum</i>	<i>A.alternata</i>	<i>A.porri</i>	<i>B.cinerea</i>	<i>P.oryzae</i>	<i>Fusarium spp.</i>
D-limonene	10	9.3±0.06	-	9.0±0.00	-	-	-	-	-
	8	-	-	8.7±0.06	-	-	-	-	-
	6	-	-	8.3±0.06	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
L-limonene	10	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
Carveol	10	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
D-limonene + carveol	10	9.3±0.06	-	8.7±0.06	-	-	-	-	-
	8	9.2±0.03	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
L-limonene + carveol	10	9.3±0.06	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
D-limonene + L-limonene	10	10.0±0.00	-	8.7±0.06	-	-	-	-	-
	8	9.7±0.06	-	8.3±0.06	-	-	-	-	-
	6	9.3±0.06	-	8.3±0.06	-	-	-	-	-
	4	9.3±0.06	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Diameter of clear zone including disc diameter 8.0mm

- Drop plate assay를 이용 통한 농도별 병원균 억제 효과
  - 단일 및 복합 compound를 농도별(100, 50, 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0.7, 0.4, 0.1mM) 처리한 결과, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*에서 D-limonene과 L-limonene 1mM, Carveol 4mM, D-limonene + carveol 0.7mM, D-limonene + carveol 1mM, D-limonene + L-limonene 0.4mM까지의 억제 효과를 확인함



[농도에 따른 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 억제 효과]

[농도에 따른 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 억제 효과 평가]

	Zone of inhibition										
	100	50	10	8	6	4	2	1	0.7	0.4	0.1
D-limonene	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	- <sup>a</sup>	-	-
L-limonene	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-	-
Carveol	+++	+++	++	++	+	+	+	+	-	-	-
D-limonene + carveol	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	-	-
L-limonene + carveol	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-	-
D-limonene + L-limonene	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	-	-

<sup>a</sup> Not active

## (2) 신규물질의 주요 세균/곰팡이병 성장 억제 효과 검정

### 가) 실험 목적

- 리모넨 유도체를 활용한 신규 물질의 식물병원균 억제 효과를 검정하여 활용가능한 물질 탐색 및 선발

### 나) 실험 재료 및 방법

- 식물병원균의 확보 및 배양
  - 실험에 사용된 식물병원균은 세균 3종, 곰팡이 5종으로 총 8종의 병원균에 대하여 후보물질의 성장 억제 효과를 실험하였음
  - 총 8종의 병원균은 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*(벼흰잎마름병), *Ralstonia solanacearum*(풋마름병원균), *Erwinia carotovora*(무름병), *Alternaria alternata*(검은무늬병), *Alternaria porri*(검은무늬병), *Botrytis cinerea*(젓빛곰팡이), *Pyricularia oryzae*(도열병) 그리고 *Fusarium* spp.(시들음병) 균주에 대하여 실험을 진행하였음

- 확보된 식물병원성 균주들은 NA(nutrient agar), LB(Luria-Bertani agar), PDA(potato dextrose agar) 배지에 생육 적정 온도에 따라 28~37°C로 2~5일 동안 배양하여 성장시킨 후 계대 배양하여 실험을 진행하였음

■ 후보물질

- (1차년도) 주관기관에서 방사선 처리를 통하여 얻어진 신규 물질 4종(L14, L16, L17, L18)에 대하여 식물병원균 생장억제 효능 검정 시험 수행
- (2차년도) 주관기관에서 방사선 처리를 통하여 얻어진 신규 물질 6종(RA21, RA22, RA23, RA24, RA34, RA35)에 대하여 식물병원균 생장억제 효능 검정 시험 수행

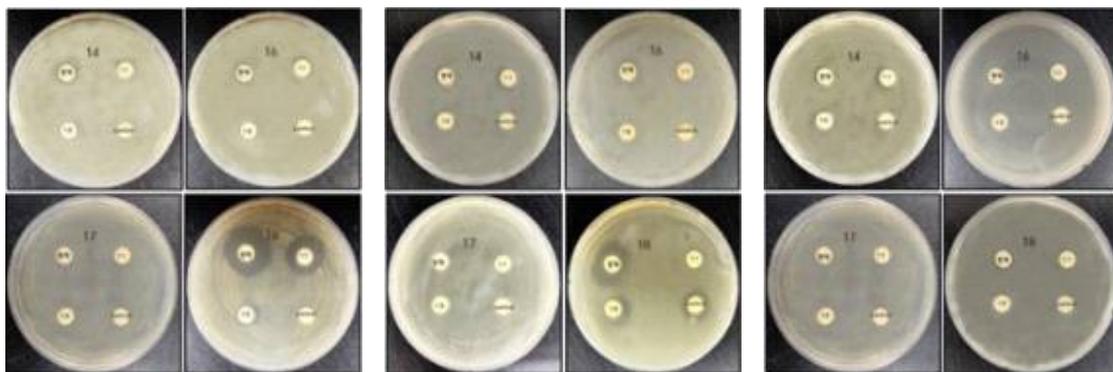
■ Disk diffusion assay를 통한 신규 물질의 억제 효과 검정

- 후보물질의 억제 효과 검정은 paper disc 방법으로 각각의 식물성 병원균을 배지에 접종하여 28~37°C, 180rpm, 2~5일 동안 배양하였으며, 배양액을 농도 OD<sub>600</sub>=0.8~1.0으로 현탁하여 배지에 평판 도말하였음
- 도말한 배지위에 paper disc (φ8mm, Avante, Japan)를 올려놓고 신규물질 처리 후 적절한 배양온도에 2~5일 배양하여 paper disc 주변에 형성된 clear zone (세균성장 억제존)의 크기에 따라 항균 활성 정도를 확인하였음

다) 실험 결과

■ 신규물질 4종(L14, L16, L17, L18)의 식물병원균 억제 효과

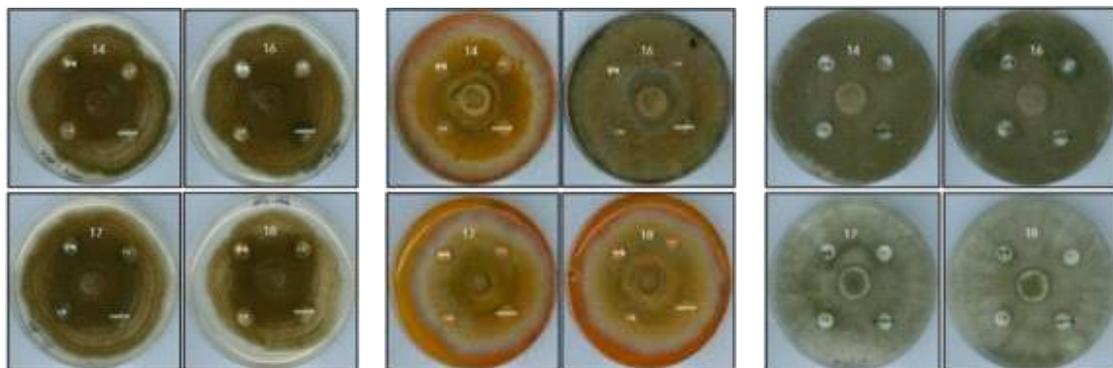
- 신규물질 L14, L16, L17, L18를 희석별(원액, 1:1, 1:5)로 처리한 결과 L17를 제외한 모든 물질에서 세균 식물병원균에 대한 활성을 확인 할 수 있었으며 곰팡이 식물성 병원균에 대한 활성은 관찰되지 않았음
- L16와 L18은 세균의 식물병원균에 처리 시 다른 물질들보다 우수한 항균활성을 보였으며, L16는 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*(벼흰잎마름병)에서 우수한 효과를 보였으며, L18는 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*(벼흰잎마름병)와 *Ralstonia solanacearum*(풋마름병원균)에서 우수한 효과를 보였음



[*X. oryzae* 억제 효과 결과]

[*R. solanacearum* 억제 효과 결과]

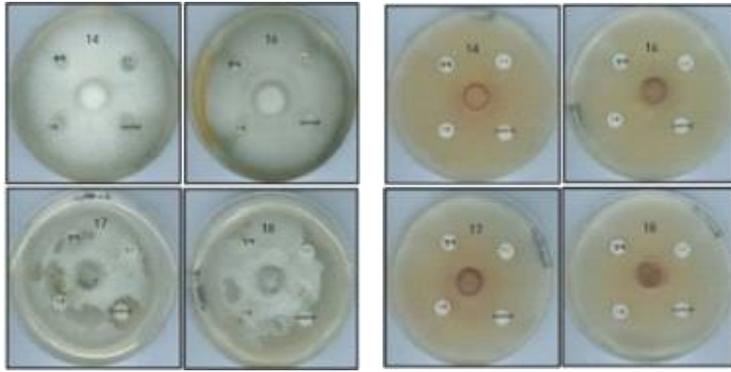
[*E. carotovora* 억제 효과 결과]



[*A. alternata* 억제 효과 결과]

[*A. porri* 억제 효과 결과]

[*B. cinerea* 억제 효과 결과]



[*P. oryzae* 억제 효과 결과]

[*Fusarium* spp. 억제 효과 결과]

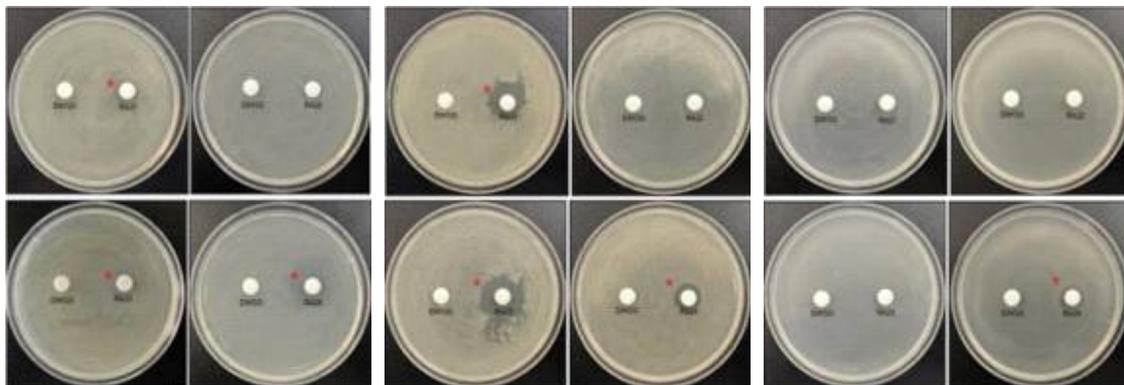
[신규물질 4종(L14, L16, L17, L18)의 식물성 병원균에 대한 억제 효과]

[신규물질 4종(L14, L16, L17, L18)의 식물성 병원균에 대한 항균력]

	처리농도	Diameter of inhibition zone (mm) <sup>a</sup>							
		<i>X. oryzae</i>	<i>R. solanacearum</i>	<i>E. carotovora</i>	<i>A. alternata</i>	<i>A. porri</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>P. oryzae</i>	<i>Fusarium</i> spp.
L14	원액	10.50±0.2	11.50±0.1	11.00±0.4	-	-	-	-	-
	1:1	10.50±0.2	10.00±0.0	10.25±0.1	-	-	-	-	-
	1:5	10.50±0.1	-	-	-	-	-	-	-
L16	원액	23.25±0.3	12.75±0.3	11.50±0.1	-	-	-	-	-
	1:1	17.75±0.4	11.55±0.4	9.50±0.0	-	-	-	-	-
	1:5	12.25±0.1	11.00±0.2	-	-	-	-	-	-
L17	원액	-	-	-	-	-	-	-	-
	1:1	-	-	-	-	-	-	-	-
	1:5	-	-	-	-	-	-	-	-
L18	원액	21.75±0.6	18.75±0.8	11.00±0.5	-	-	-	-	-
	1:1	19.00±0.7	14.25±0.6	10.50±0.3	-	-	-	-	-
	1:5	11.25±0.2	12.50±0.5	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Diameter of clear zone including disc diameter 8.0mm

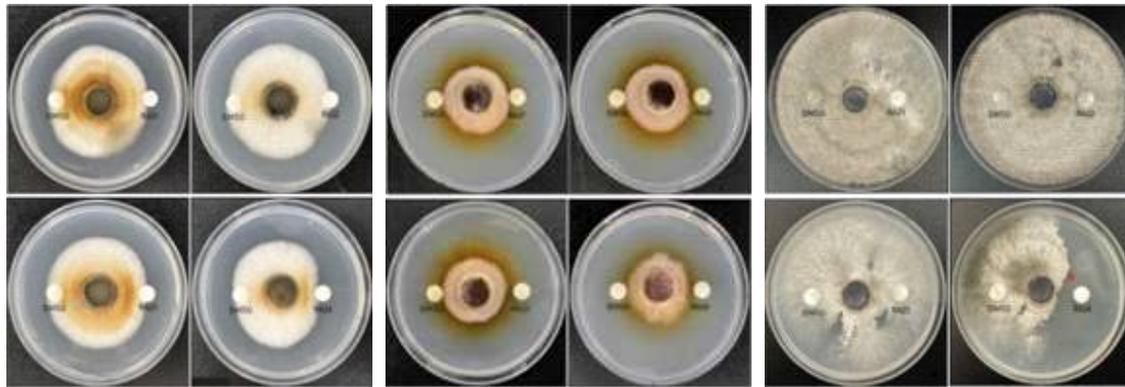
- RA21, RA22, RA23, RA24의 식물 병원균 억제 효과
  - 각각의 물질을 원액으로 처리한 결과, RA21는 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Ralstonia solanacearum*에서 억제 효과를 확인하였음
  - RA22는 모든 물질에서 효과를 확인할 수 없었음
  - RA23은 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Ralstonia solanacearum*에서 억제 효과를 확인함
  - RA24는 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Erwinia carotovora*, *Ralstonia solanacearum* 곰팡이인 *Botrytis cinerea*에서 억제 효과를 확인할 수 있었음



[*X. oryzae* 억제 효과 결과]

[*R. solanacearum* 억제 효과 결과]

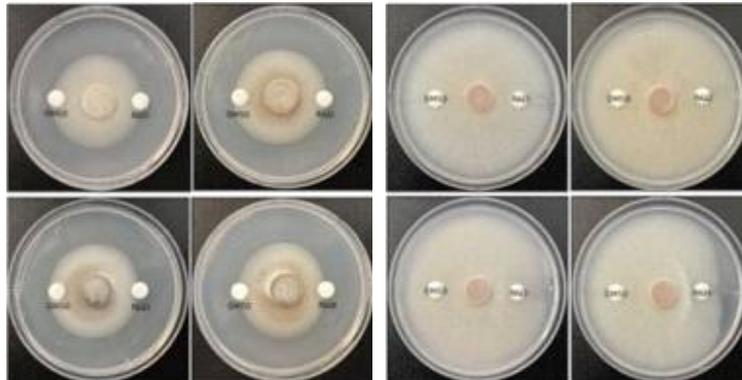
[*E. carotovora* 억제 효과 결과]



[*A. alternata* 억제 효과 결과]

[*A. porri* 억제 효과 결과]

[*B. cinerea* 억제 효과 결과]



[*P. oryzae* 억제 효과 결과]

[*Fusarium* spp. 억제 효과 결과]

[신규물질의 식물 병원균 성장 억제 효과]

[RA21, RA22, RA23, RA24 물질의 식물 병원균에 대한 성장 억제능]

(mM/disc)	Diameter of inhibition zone (mm) <sup>a</sup>							
	<i>X.oryzae</i>	<i>Ecartovora</i>	<i>R.solanacearum</i>	<i>A.alternata</i>	<i>A.porri</i>	<i>B.cinerea</i>	<i>P.oryzae</i>	<i>Fusarium</i> spp.
RA21	11.50±0.06	-	11.50±0.06	-	-	-	-	-
RA22	-	-	-	-	-	-	-	-
RA23	11.80±0.05	-	12.30±0.05	-	-	-	-	-
RA24	14.80±0.05	14.30±0.05	15.00±0.08	-	-	저해	-	-

<sup>a</sup> Diameter of clear zone including disc diameter 8.0mm

▪ RA34, RA35의 식물 병원균 억제 효과

- 각각의 물질을 50mM 농도로 처리한 결과 RA34는 모든 물질에서 효과를 확인할 수 없었으며, RA35은 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Ralstonia solanacearum*에서 억제 효과를 확인함
- 그러나 실험에 사용된 6종의 곰팡이 병원균에서는 효과를 보이지 않았음



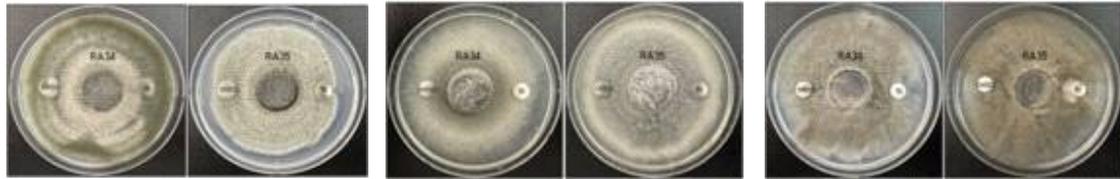
[*X. oryzae* 억제 효과 결과]



[*R. solanacearum* 억제 효과 결과]



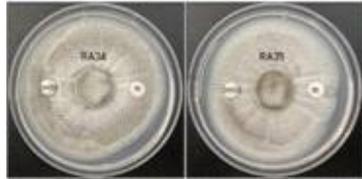
[*E. carotovora* 억제 효과 결과]



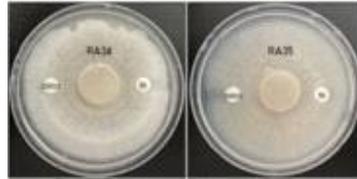
[*A. alternata* 억제 효과 결과]

[*A. porri* 억제 효과 결과]

[*B. cinerea* 억제 효과 결과]



[*P. oryzae* 억제 효과 결과]



[*Fusarium* spp. 억제 효과 결과]

[RA34, RA35 물질의 식물 병원균 성장 억제 효과]

[RA34, RA35 물질의 식물 병원균에 대한 성장 억제능]

	처리 농도 (mM)	Diameter of inhibition zone (mm) <sup>a</sup>							
		<i>X.oryzae</i>	<i>E.caryovora</i>	<i>R.solanacearum</i>	<i>A.alternata</i>	<i>A.porri</i>	<i>B.cinerea</i>	<i>P.oryzae</i>	<i>Fusarium</i> spp.
RA34	50	-	-	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-
RA35	50	16.80±0.15	-	13.50±0.10	-	-	-	-	-
	30	14.50±0.07	-	10.50±0.07	-	-	-	-	-
	15	10.50±0.06	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Diameter of clear zone including disc diameter 8.0mm

### (3) 간접접촉(휘발)에 의한 병원균 억제 효능 검정

#### 가) 실험 목적

- 리모넨 유도체의 휘발 효과를 이용하여 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 성장 억제능을 확인하였음

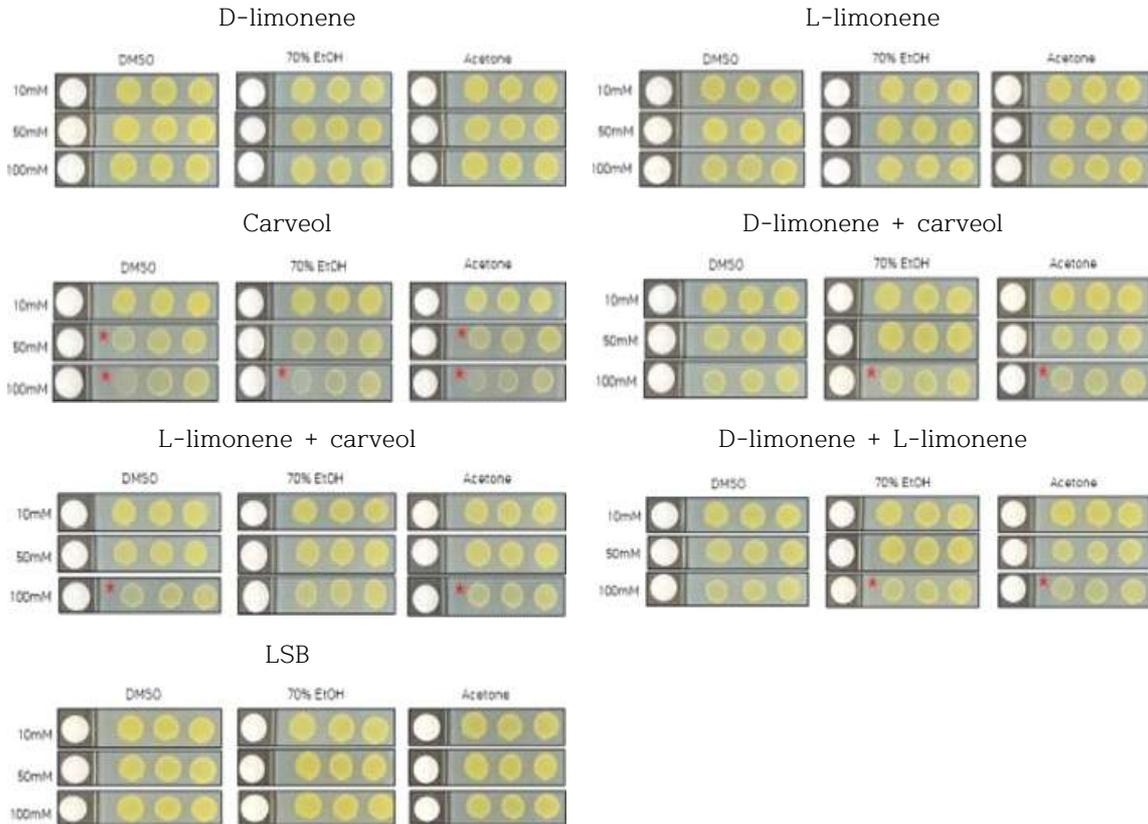
#### 나) 실험 재료 및 실험 방법

- 식물병원균의 배양
  - Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*를 NA배지에 28°C에 16~24시간 동안 배양하여 생장시킨 후 계대 배양하여 실험을 진행하였음
- 억제 검정
  - 격벽으로 나누어진 biplate에 한 구역에는 NA배지를 준비하고 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*를 OD<sub>600</sub>=0.5 현탁하여 1cm 간격으로 5μl씩 접종함
  - 다른 한편에는 paper disc를 위치하여 리모넨 유도체 물질(D-limonene, L-limonene, carveol, D-limonene + carveol, L-limonene + carveol, D-limonene + L-limonene)을 용매 및 농도별 40μl씩 처리하여, 28°C에서 24~48시간 배양하여 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 성장 억제정도를 확인하였음

#### 다) 실험 결과

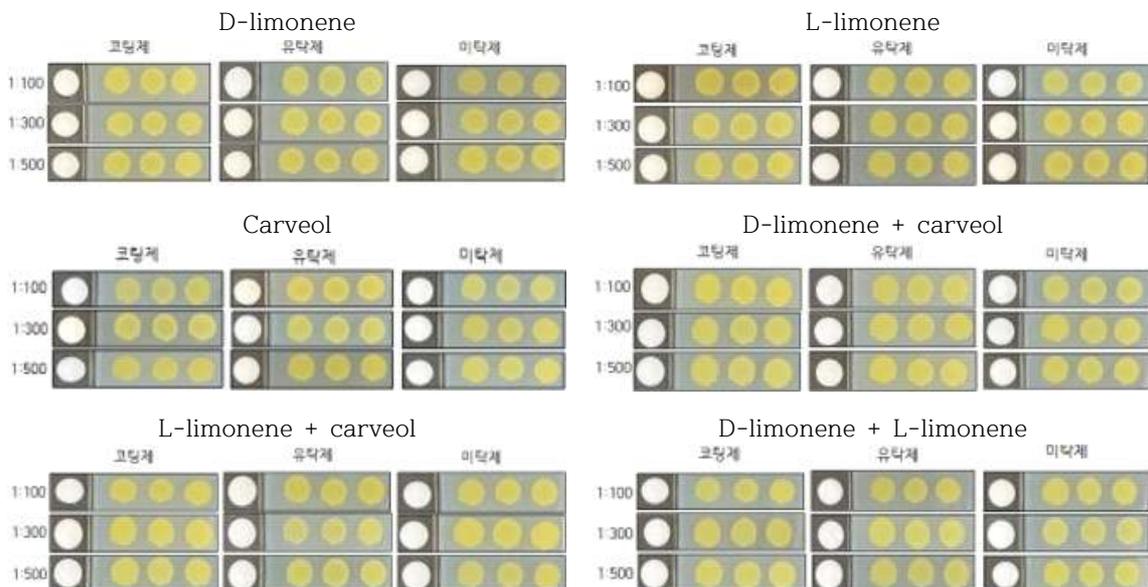
- 리모넨 유도체 물질의 휘발성을 이용한 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 억제 효과
  - 각각의 compound를 농도별(100, 50, 10mM)과 용매별(DMSO, 70% ethanol, acetone) 처리한 결과, carveol의 모든 용매에서 휘발 효과를 이용한 억제 효과를 확인함

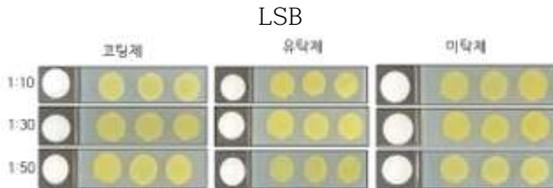
- D-limonene + carveol에서는 DMSO, acetone에서 휘발 효과를 이용한 억제 효과를 확인하였고, L-limonene + carveol에서는 70% ethanol, acetone에서 휘발 효과를 이용한 억제 효과를 확인함
- 다른 compound의 휘발 효과를 이용한 억제 효과는 확인할 수 없었음



[간접접촉을 통한 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 생장 억제 효과]

- 제형 (코팅제, 유탁제, 미탁제)의 휘발성을 이용한 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 억제 효과
  - 각각의 제형을 농도별(1:100, 300, 500) 처리한 결과, 모든 제형에서 휘발 효과를 이용한 억제 효과를 확인할 수 없었음





[제형의 간접접촉을 통한 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 성장 억제 효과]

#### (4) 수도용 시제품에 대한 병원균 억제 활성 및 유효 처리 농도 산출

##### 가) 실험 목적

- 리모넨 유도체 물질 중 활용가능한 물질의 상용화를 위하여 제형화된 시제품의 활성을 검증
  - 제조된 시제품은 시료C, 시료F, 시료G, 시료H로 제품의 희석 배수에 따른 활성을 검증하였음



[시료 C,F,G,H]

##### 나) 실험 방법

- 식물병원균의 확보 및 배양
  - 실험에 사용된 식물병원균은 세균 3종, 곰팡이 5종으로 총 8종의 병원균에 대하여 시험물질의 성장 억제 효과를 실험하였음
  - 총 8종의 병원균은 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*(벼흰잎마름병), *Ralstonia solanaceum*(풋마름병원균), *Erwinia carotovora*(무름병), *Alternaria alternata*(검은무늬병), *Alternaria porri*(검은무늬병), *Botrytis cinerea*(잿빛곰팡이), *Pyricularia oryzae*(도열병) 그리고 *Fusarium* spp.(시들음병) 균주에 대하여 실험을 진행하였음
  - 확보된 식물병원성 균주들은 NA(nutrient agar), LB(Luria-Bertani agar), PDA(potato dextrose agar) 배지에 생육 적정 온도에 따라 28~37℃로 2~5일 동안 배양하여 성장시킨 후 계대 배양하여 실험을 진행하였음
- 억제 효과 검증
  - 후보물질의 억제 효과 검증은 paper disc 방법으로 각각의 식물성 병원균을 배지에 접종하여 28~37℃, 180rpm, 2~5일 동안 배양하였으며 배양액을 농도 OD600=0.8~1.0으로 현탁하여 배지에 평판 도말하였음
  - 도말한 배지위에 paper disc (φ8mm, Avante, Japan)를 올려놓고 시제품 4종에 대하여 희석배수에 따라 희석 후 30μl씩 처리 하고 적정한 배양온도에 2~5일 배양하여 paper disc 주변에 형성된 clear zone(세균성장 억제존)의 크기에 따라 항균 활성 정도를 확인하였음
- 시료 4종의 방제 효율 평가(온실 시험)
  - *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*(벼흰잎마름병)에 대한 방제 효율을 평가하기 위하

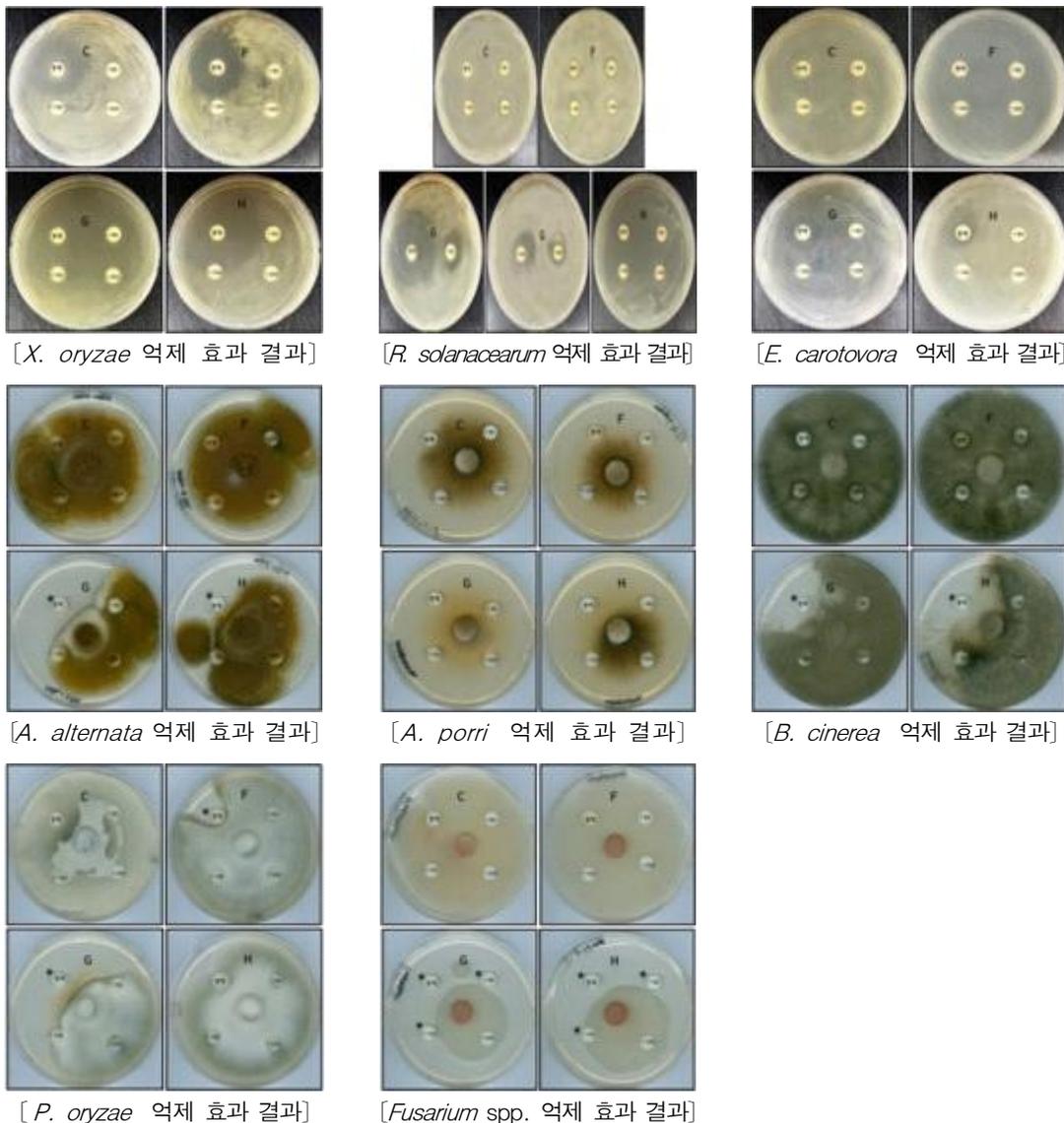
여 공시품종인 신동진에 대하여 방제 실험을 진행하였음

- 흰잎마름병을 유발하는 균주인 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*를 NB(nutrient broth) 배지에 접종하여 28℃, 180rpm, 2일 동안 배양하였으며 농도는 OD600=0.5으로 현탁하였음
- *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 균주를 가위에 문혀 (scissors clipping) 3개의 잎을 3반복하여 접종하였으며 접종 2주 후 병증을 측정하였음
- 병증측정은 접종한 부위로부터 감염되어 상처난 길이(lesion lengths)를 측정하였고 대조군으로는 어떠한 처리도 하지 않은 공시품종을 사용하였으며 양성대조군으로는 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*만을 접종하여 평가하였음

다) 실험 결과

- 시료C, 시료F, 시료G, 시료H의 활성 검정

- (주)마이크로자임으로부터 제공된 제형화 시료 4종은 식물병원균 8종에 대하여 활성을 확인한 결과



[약제(C,F,G,H)의 식물성 병원균에 대한 생장 억제 효과]

[약제(C,F,G,H)의 식물성 병원균에 대한 항균력]

	처리 농도	Diameter of inhibition zone (mm) <sup>a</sup>							
		<i>X. oryzae</i>	<i>R. solanacearum</i>	<i>E. carotovora</i>	<i>A. alternata</i>	<i>A. porri</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>P. oryzae</i>	<i>Fusarium</i> spp.
C	원액	31.00±0.9	-	-	-	+	-	-	-

	1:50	10.00±0.2	-	-	-	-	-	-	-
	1:100	- <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-
	1:200	-	-	-	-	-	-	-	-
F	원액	30.25±0.8	-	-	-	++	-	++	-
	1:50	-	-	-	-	++	-	-	-
	1:100	-	-	-	-	+	-	-	-
	1:200	-	-	-	-	+	-	-	-
G	원액	39.50±0.8	40.25±1.0	20.75±0.8	+++	+++	+++	+++	+++
	1:50	22.00±1.0	17.75±0.8	10.52±0.8	-	++	-	-	++
	1:100	19.75±0.9	13.00±0.9	10.45±0.1	-	+	-	-	++
	1:200	10.00±0.2	11.00±0.6	10.45±0.1	-	+	-	-	-
H	원액	49.50±1.1	46.67±0.5	17.66±1.0	+++	+++	+++	-	+++
	1:50	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	-	-	++	-	-	++
	1:100	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	-	-	+	-	-	-
	1:200	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Diameter of clear zone including disc diameter 8.0mm

<sup>b</sup> 원액 활성으로 측정 불가

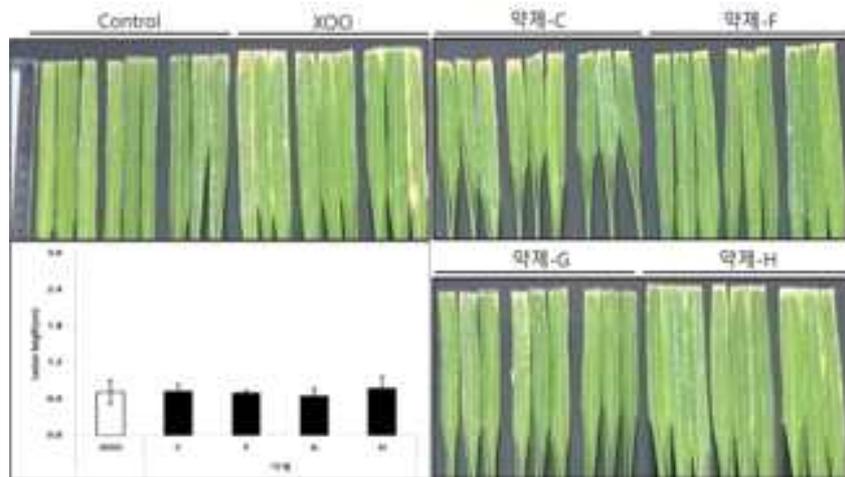
+++; 강 활성, ++; 중 활성, +; 약 활성, -; 효과 없음

■ 시료 4종의 방제 효율 평가(온실 시험)

- *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*(벼흰잎마름병)에 대한 약제 병 저항성 실험 결과 양성 대조군을 포함 모든 약제에서 병변 침투를 확인할 수 있었으며 시료C는 0.75±0.09, 시료F는 0.75±0.07, 시료G는 0.73±0.12, 시료H는 0.87±0.13로 병반장을 확인하였음
- 시료 4종 모두 양성대조군과 유사한 병반 침투를 확인하였으나, 시료에 대한 효과를 확인할 수 없어 시료 희석 배수 및 배합비 조절을 통한 재실험 진행 예정임



[시료(C,F,G,H)의 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 실험군]



[시료(C,F,G,H)의 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 억제 효과 검정]

## (5) 시제품에 대한 병원균 억제 활성 및 유효 처리 농도 산출

### 가) 실험 목적

- 리모넨 유도체 물질 중 활용가능한 물질의 상용화를 위하여 제형화된 시제품의 활성을 검증

### 나) 실험 재료 및 방법

- 병원균 억제 활성 확인을 위한 시제품
  - 제형화된 시제품의 활성을 검증하기 위해 (주)마이코자임으로부터 코팅제, 유탁제 및 미탁제로 제형화된 carveol, D-limonene, L-limonene, D-limonene + L-limonene, D-limonene + carveol 및 L-limonene + carveol을 확보함
- Disk/drop assay를 통한 제형의 억제 효과 검정
  - 후보물질의 억제 효과 검정은 paper disc 방법으로 각각의 식물성 병원균을 배지에 접종하여 28~37°C, 180rpm, 2~5일 동안 배양하였으며, 배양액을 농도 OD<sub>600</sub>=0.8~1.0으로 현탁하여 배지에 평판 도말하였음
  - Disk diffusion assay: 도말한 배지위에 paper disc (φ8mm, Avante, Japan)를 올려놓고 시제품을 처리 후 적정한 배양온도에 2~5일 배양하여 paper disc 주변에 형성된 clear zone (세균성장 억제존)의 크기에 따라 항균 활성 정도를 확인하였음
  - Drop assay: 도말한 배지위에 각각의 시제품을 배지위에 직접 5μl씩 처리 후 적정한 배양온도에 2~5일 배양하여 inhibition zone (세균성장 억제존)의 생성 유무에 따라 항균 활성 정도를 확인하였음
- 액체 배양을 통한 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 성장 억제 효과
  - 제형화된 화합물의 처리는 1:10, 1:30, 1:50, 1:100, 1:300, 1:500 및 1:1000배로 처리하였으며, 화합물의 희석은 nutrient broth를 활용하였음
  - OD<sub>600</sub>이 1.0에 도달한 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 20% (v/v)를 제형화된 화합물이 첨가된 배지에 접종 한 후 28°C, 200rpm shaking incubator에서 48시간동안 배양하였음
  - UV/Visible Spectrophotometer를 사용하여 OD<sub>600</sub>을 측정하여 아무것도 처리하지 않은 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 성장률과 제형화된 화합물을 처리한 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 성장률을 비교하였음

▪ 온실 실험

- 병원균 억제 작물 시험(포트)은 벼 2품종(신동진과 참동진)을 묘목 시기에 포트에 이식 한 후 온실에서 약 3개월간 재배한 후 실험에 사용하였음
- *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*를 nutrient broth에서 OD<sub>600</sub>이 1.0에 도달할 때까지 진탕배양하고, OD<sub>600</sub>=1.0에 도달한 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*에 carveol과 D-limonene + L-limonene의 유탁제 1:100, 1:300 및 1:500배를 처리하고 30분간 반응 후 가위접종을 실시하였음
- 대조군은 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*를 성장시킨 nutrient broth와 화합물의 제형을 첨가하여 반응시키지 않은 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*가 사용되었으며, 감염시킨 후 2주 및 4주 동안 온실에 두고 병변을 관찰 확인하였음

다) 실험 결과

▪ 시제품의 유효 처리 농도 산출

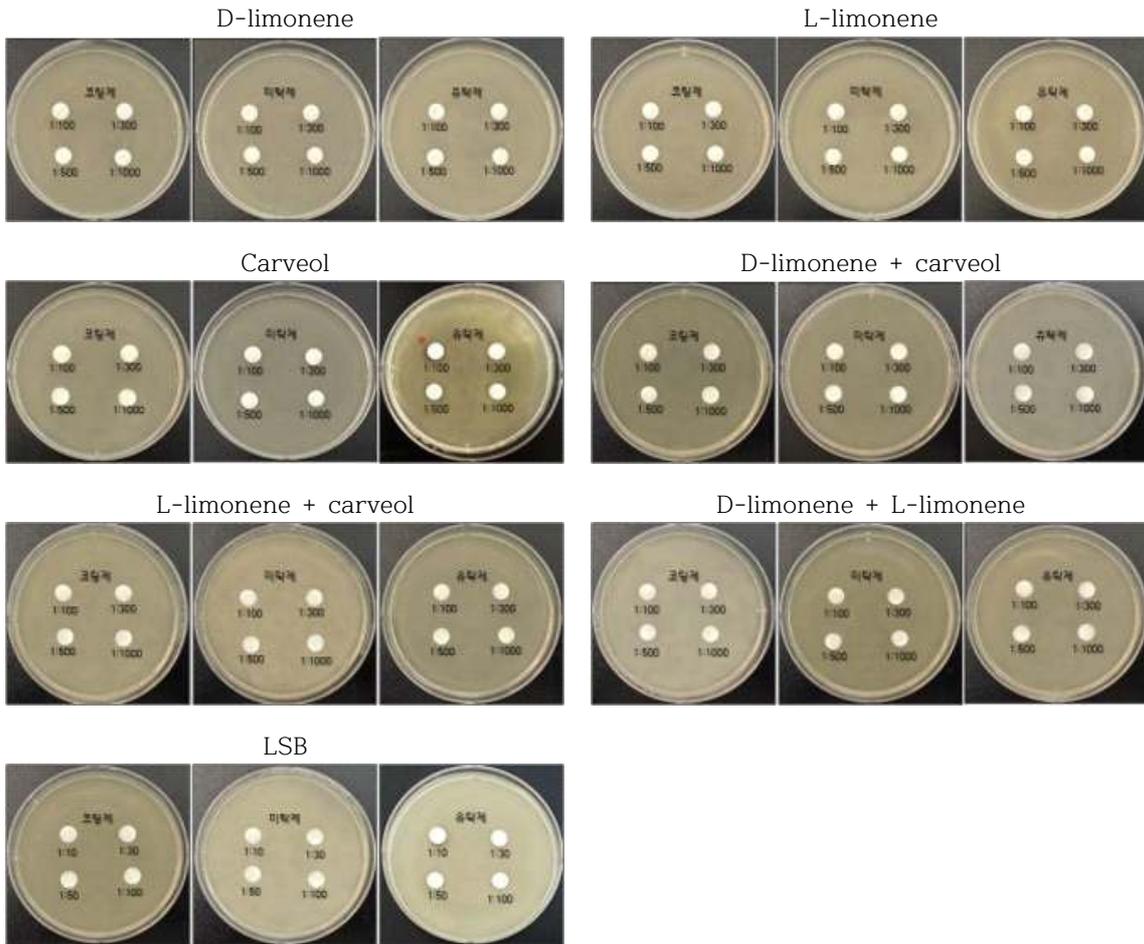
[제형의 완제 기준 유효물질 농도 (단위: mM)]

제형제제 / Compound 종류	코팅제	유탁제	미탁제
D-limonene	1,172.9	2,345.7	1,172.9
L-limonene	925.94	1,851.9	925.94
Carveol	1,258.6	2,517.2	1,258.6
D-limonene + carveol	1,251.7	2,431.5	1,251.7
L-limonene + carveol	1,092.3	2,184.6	1,092.3
D-limonene + L-limonene	1,049.4	2,098.8	1,049.4
LSB	31.56	63.12	31.56

[시제품의 희석에 따른 유효물질 농도 (단위: mM)]

제형제제 / Compound 종류	코팅제				유탁제				미탁제			
	1:100	1:300	1:500	1:1000	1:100	1:300	1:500	1:1000	1:100	1:300	1:500	1:1000
D-limonene	11.73	3.91	2.35	1.17	23.46	7.82	4.69	2.35	11.73	3.91	2.35	1.17
L-limonene	9.26	3.09	1.85	0.93	18.52	6.17	3.70	1.85	9.26	3.09	1.85	0.93
Carveol	12.59	4.20	2.52	1.26	25.17	8.39	5.03	2.52	12.59	4.20	2.52	1.26
D-limonene + carveol	12.16	4.05	2.43	1.22	24.32	8.11	4.86	2.43	12.16	4.05	2.43	1.22
L-limonene + carveol	10.92	3.64	2.18	1.09	21.85	7.28	4.37	2.18	10.92	3.64	2.18	1.09
D-limonene + L-limonene	10.49	3.50	2.10	1.05	20.99	7.00	4.20	2.10	10.49	3.50	2.10	1.05
LSB	3.16	1.05	0.63	0.01	6.31	2.10	1.26	0.02	3.16	1.05	0.63	0.01

- Disk diffusion assay를 통한 시제품의 억제 효과 검정
  - 각각의 시제품을 농도별(1:100, 300, 500, 1000)로 disc assay 실험한 결과, carveol의 유탁제에서 억제 효과를 확인함
  - 추가 억제 효과를 확인하기 위해 Drop plate assay를 진행함



[시제품의 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 생장 억제 효과 결과]

[시제품의 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 억제 효과 결과 평가]

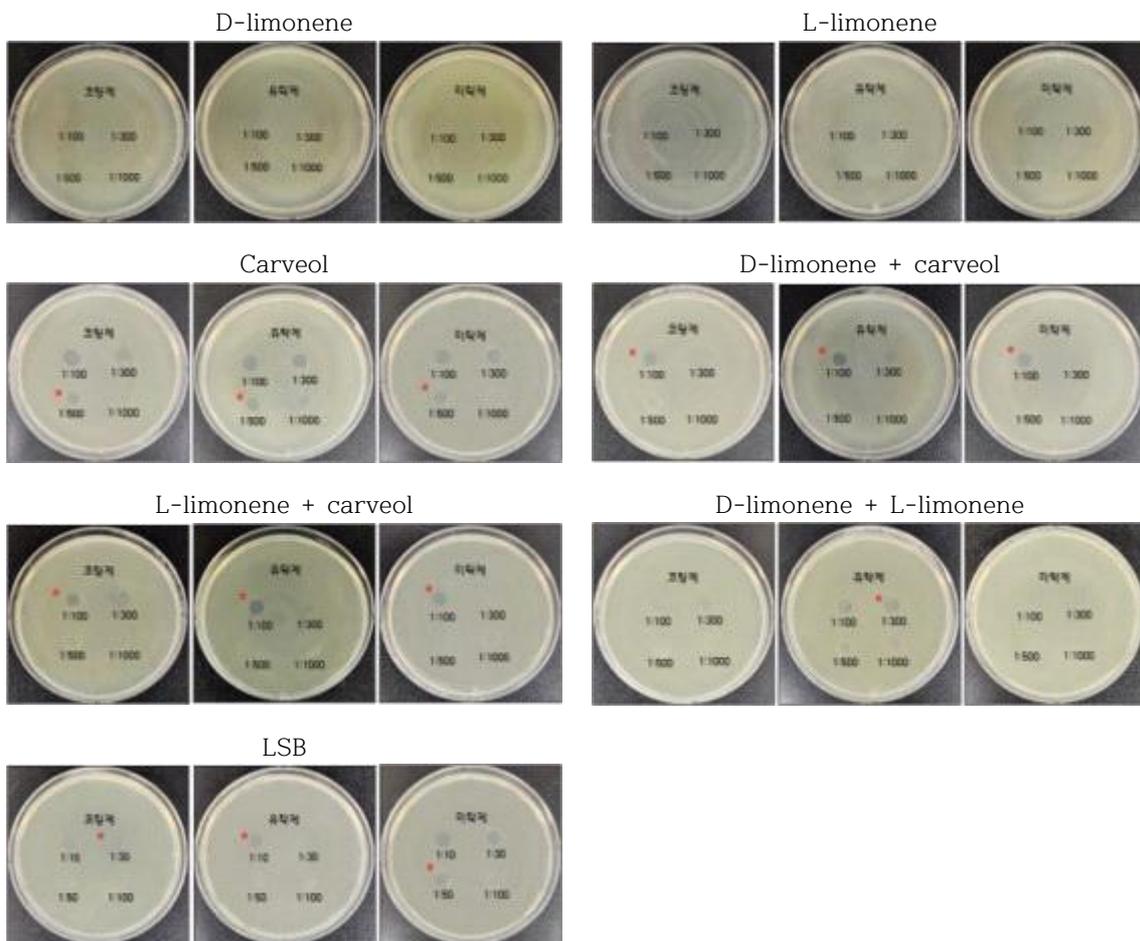
		Diameter of inhibition zone (mm) <sup>a</sup>		
		코팅제	유탁제	미탁제
D-limonene	1:100	- <sup>b</sup>	-	-
	1:300	-	-	-
	1:500	-	-	-
	1:1000	-	-	-
L-limonene	1:100	-	-	-
	1:300	-	-	-
	1:500	-	-	-
	1:1000	-	-	-
Carveol	1:100	-	10.33±0.58	-
	1:300	-	-	-
	1:500	-	-	-
	1:1000	-	-	-
D-limonene + carveol	1:100	-	-	-
	1:300	-	-	-
	1:500	-	-	-

	1:1000	-	-	-
L-limonene + carveol	1:100	-	-	-
	1:300	-	-	-
	1:500	-	-	-
	1:1000	-	-	-
D-limonene + L-limonene	1:100	-	-	-
	1:300	-	-	-
	1:500	-	-	-
	1:1000	-	-	-
LSB	1:10	-	-	-
	1:30	-	-	-
	1:50	-	-	-
	1:100	-	-	-

<sup>a</sup> Diameter of clear zone including disc diameter 8.0mm

<sup>b</sup> Not active

- 제형별(코팅제, 미탁제, 유탁제)의 Drop plate assay를 이용한 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 억제 효과
  - 각각의 제형을 농도별(1:100, 300, 500, 1000) 처리한 결과, carveol, D-limonene + carveol, L-limonene + carveol, D-limonene + L-limonene, LSB에서의 억제 효과를 확인함



[시제품의 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 억제 효과 결과]

[시제품의 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 억제 효과 결과 평가]

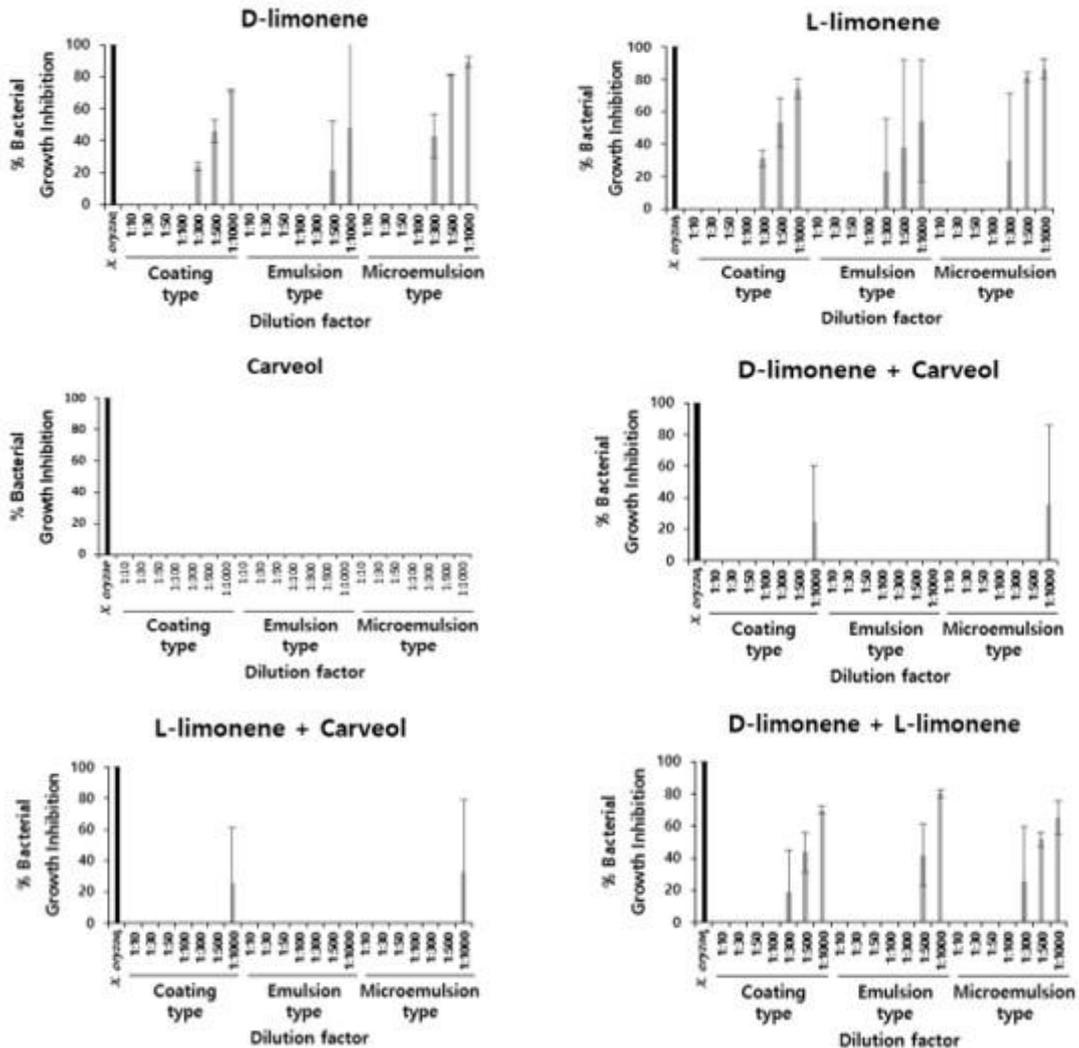
		Zone of inhibition		
		코팅제	유탕제	미탁제
D-limonene	1:100	- <sup>a</sup>	-	-
	1:300	-	-	-
	1:500	-	-	-
	1:1000	-	-	-
L-limonene	1:100	-	-	-
	1:300	-	-	-
	1:500	-	-	-
	1:1000	-	-	-
Carveol	1:100	+++	+++	+++
	1:300	++	++	++
	1:500	+	+	+
	1:1000	-	-	-
D-limonene + carveol	1:100	++	++	++
	1:300	+	+	+
	1:500	-	-	-
	1:1000	-	-	-
L-limonene + carveol	1:100	++	++	++
	1:300	-	-	-
	1:500	-	-	-
	1:1000	-	-	-
D-limonene + L-limonene	1:100	-	++	-
	1:300	-	+	-
	1:500	-	-	-
	1:1000	-	-	-
LSB	1:10	++	+	+++
	1:30	+	-	++
	1:50	-	-	+
	1:100	-	-	-

<sup>a</sup> Not active

- 제형화된 화합물의 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 성장 억제 효과
  - Carveol의 경우, 모든 제형과 희석배수에서 완전히 억제된 성장률을 보였음. D-limonene은 코팅제 및 미탁제에서 1:100배 희석배수부터 성장률이 완전 억제되었으며, 유탕제는 1:300배부터 억제되었음. L-limonene은 모든 제형에서 희석 배수 1:100부터 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 성장이 완전 억제되었음
  - D-limonene이 10mM에서 양성 대조군에 비하여 50% 이하의 성장률을 보인 것에 반해, 제형화된 유탕제 원액을 1:300배로 희석하여 유효물질 농도가 7.82mM인 실험군에서 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 성장이 완전히 억제된 것으로 보아 유탕제를 제형화하는데 첨가된 성분이 영향을 미친 것으로 보임
  - 2가지 화합물을 혼합하여 제형화한 경우, D-limonene + L-limonene은 유탕제는 1:300배부터 억제되었으나, 코팅제 및 미탁제에서 1:100배 희석배수부터 성장률이 완전히 억제되었음. D-limonene + carveol 및 L-limonene + carveol의 경우, 유탕

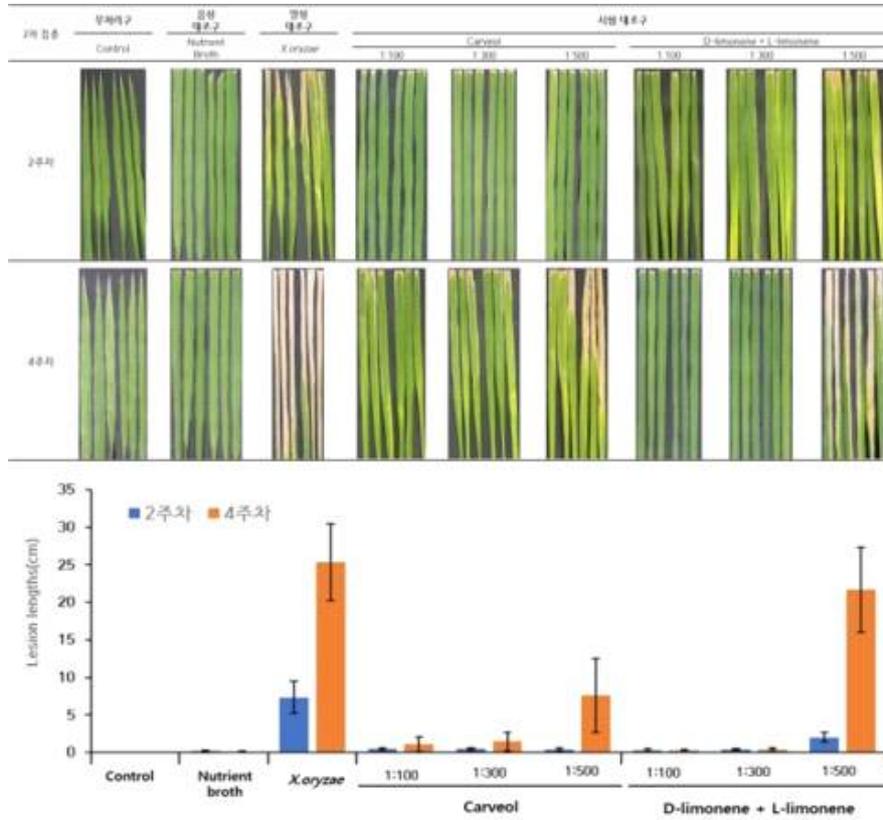
제에서는 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 성장이 완전히 억제되었으며, 코팅제와 미탁제 제형을 1:1000배로 희석한 실험군에서만 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*가 성장하였음

- 제형화하지 않은 D-limonene + L-limonene의 결과에서 화합물을 첨가하지 않은 배지에서 성장한 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*에 비해 유의하게 성장이 억제되지 않았으며, 농도별로도 차이가 없는 억제율을 보인 반면, 제형화된 유탁제에서 1:300배로 희석하여 유효물질 농도가 8.105mM인 실험군에서 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*가 성장하지 않은 것으로 보아 유탁제의 제형화를 위한 성분의 영향을 받았을 것으로 보임

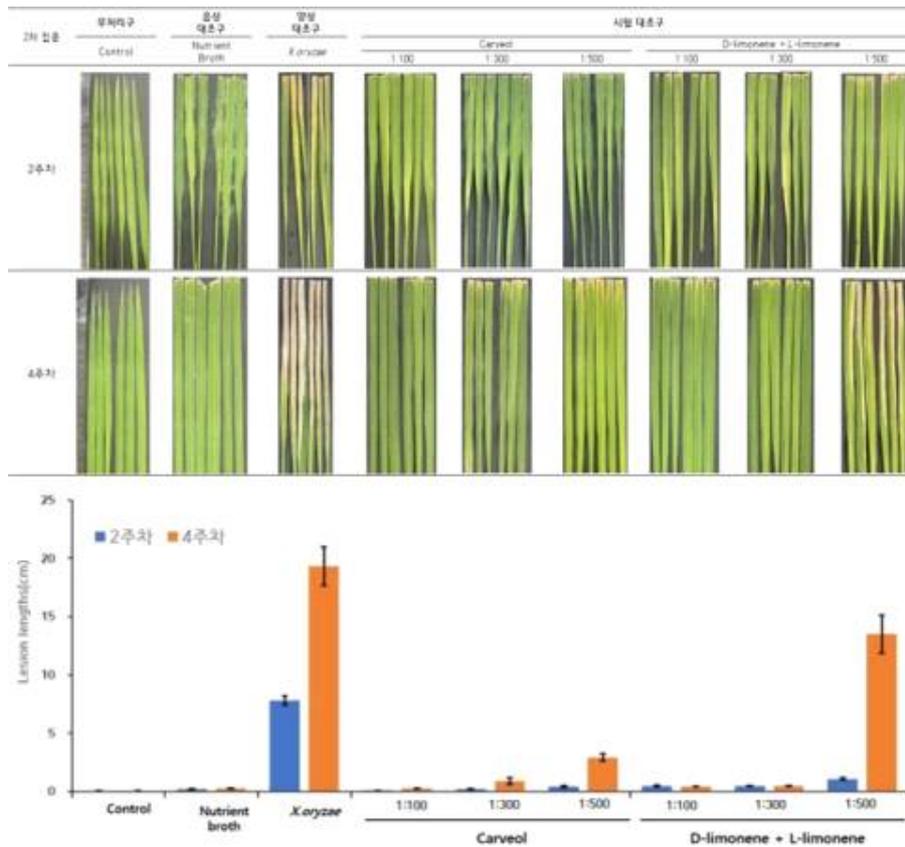


[시제품의 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 액체배양시 성장 억제 효과]

- 온실 실험
  - *In vitro* 실험에서 효과가 우수했던 D-limonene + L-limonene, carveol의 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*에 대한 시제품의 병 저항성 확인을 위해 농도별 (1:100, 300, 500)로 2주차, 4주차 실험결과 양성대조군을 포함하여 병변 침투를 확인할 수 있었음
  - 선발된 Carveol 유탁제와 D+L-limonene 유탁제는 신동진과 참동진 모두에서 우수한 효과를 보여주었음



[신동진 품종에서 시제품의 벼흰잎마름병 방제 효과]



[참동진 품종에서 시제품의 벼흰잎마름병 방제 효과]

(6) *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 병원성 관련 유전자 발현 분석

가) 실험 목적

- 유전자 발현 분석을 통해 후보 물질이 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 virulence gene에 어떤 영향을 미치는 확인할 수 있음

나) 실험 재료 및 실험 방법

- 유전적 분석을 위한 RNA 추출 및 cDNA 합성
    - 액체 배양을 통한 성장 억제 확인 실험에서 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*에 대한 효과를 보인 carveol과 D-limonene + L-limonene에 대해 유전적 분석을 수행하였음. 각 화합물의 농도는 억제 효과를 보인 최저 농도로 각 0.7과 10mM을 사용하였음
    - OD<sub>600</sub>이 1.0에 도달한 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*에 액체 배양을 통한 성장 억제 효과를 보인 농도의 stock 용액의 1% (v/v) 부피를 첨가하여 30분간 반응시켰음
    - 반응물을 centrifugation한 후 bacterial cell pellet을 수집하였음. 수집한 cell pellet에 TRI Reagent® (Molecular Research Center, Inc., TR118)을 사용해 lysis 시킨 후 chloroform으로 상 분리를 하였음. RNA 층만 분리하여 RNeasy® Plus Mini Kit (QIAGEN, 74136)를 사용하여 column 기반 washing 작업을 수행하였음. DNA 오염을 방지하기 위해 washing 작업 중 Recombinant DNase I (TaKaRa, 2270A)를 사용하여 DNA를 제거하였음. RNA 추출 후 RNA 상태를 확인하기 위해 전기영동을 진행하였으며, Nanodrop Spectrophotometer (NanoDrop, ND-1000)을 사용하여 RNA의 농도와 quality를 확인하였음. 또한 DNA 오염을 확인하기 위해 추출된 RNA를 template로 사용하여 16S rRNA primer를 이용한 PCR을 진행하였음. PCR 후 전기영동 결과, 16S rRNA의 specific band가 뜨지 않은 RNA는 cDNA 합성을 수행하였음. cDNA 합성은 PrimeScript™ IV 1st strand cDNA Synthesis Mix (TaKaRa, 6215A)를 사용하였음
  - Real-time PCR
    - SYBR® Green I으로서 2X Real-Time PCR Master Mix (BioFACT, DQ383-40h)를 사용하였음
    - CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD)를 사용하여 95°C 15분 + 40X (95°C 20초 + 58°C 30초)의 PCR condition으로 real-time PCR을 진행하였음
- [*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 병원성 관련 유전자]

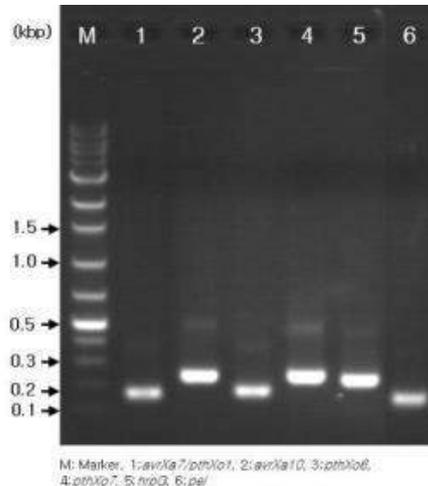
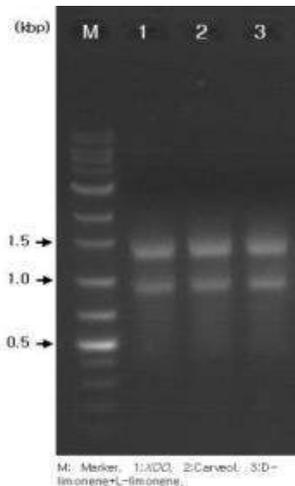
Gene	Encoding protein	Primer sequence		기능
		Foward	Reverse	
<i>avrXa7/</i> <i>pthXo1</i>	AvrXa7/ PthXo1	GAGAGCATTGT TGCCAGTT	CGGCGATTGATT CTTCTGAT	현장 조건에서 박테리아 공격성에 기여; 증상 발달에 기여; hypersensitive respode (HR) 억제제 활동; DNA에 결합
<i>avrXa10</i>	AvrXa10	CGTGATGTGG GAACAAGATG	GTGTTGTAGAGG GCGACGAT	HR 억제제 활동
<i>pthXo6</i>	PthXo6	TCAGCAGCAG CAAGAGAAGA	CAACGCCCTGAT TATGTCCT	독성에 기여; 전사 인자 유전자 OsTFX1의 발현 유도

<i>pthXo7</i>	PthXo7	GGCTTGGTACA GCTCTTTCG	GTCTGATCTCCC TCGTGCAT	독성이 감소된 Xoo 균주에서 발현될 때 병변 길이와 박테리아 성장에 기여
<i>hrpG</i>	HrpG	ACTCAGCGTTG GTCCATACC	TGCGCAGCTTGT AGATATGC	박테리아가 식물 apoplast에 들어갈 때 상당하게 유도
<i>pel</i>	pectate lyase	TGCGTTTCGGT AAGGTGCATCT	ACCGCTGATCTC GAACACATTACG	식물 세포벽의 pectin 분해

다) 실험 결과

▪ RNA 추출 및 Real-time PCR 결과

- Carveol과 D-limonene + L-limonene이 처리된 시험군은 병원성 관련 유전자 6종에 대하여 시료를 처리하지 않은 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*에서보다 낮은 발현량을 보이며, Carveol 시험군은 D-limonene + L-limonene에서 보다 낮은 발현 정도를 보였음
- 두 시료를 처리한 시험군은 대조군과 비교하였을 때 병원성 관련 유전자 모두 낮은 발현 정도를 보여주었으나, 다양한 조건에서 생장 억제 효과 및 병원성 관련 유전자의 추가적인 실험을 통하여 관련 규명이 요구됨



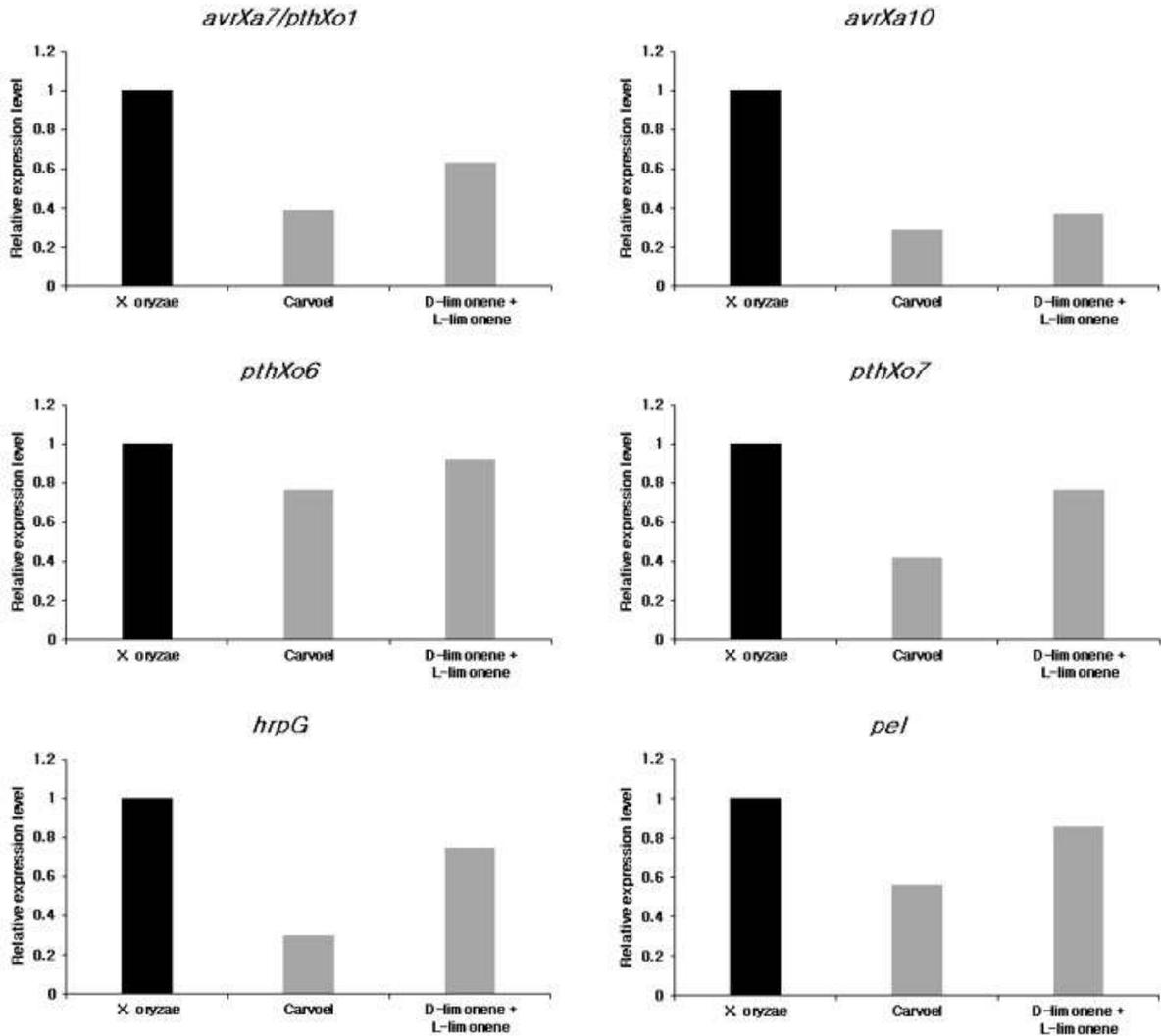
Gene	Product size(bp)
<i>avrXa7/</i> <i>pthXo1</i>	161
<i>avrXa10</i>	235
<i>pthXo6</i>	169
<i>pthXo7</i>	233
<i>hrpG</i>	218
<i>pel</i>	140

RNA 추출 후 전기영동

병원성 관련 유전자 증폭

병원성 관련 유전자 크기

[*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 병원성 유전자 증폭]



[시험구에 따른 병원성 관련 유전자의 발현 비교]

## (7) 원예작물 주요 세균/곰팡이병 생장 억제 효과 검정

### 가) 실험 목적

- 리모넨 유도체를 활용한 원예작물 식물병원균 억제 효과를 검정하여 활용 가능한 물질 탐색 및 선발

### 나) 실험 재료 및 방법

- 원예작물 식물병원균의 확보 및 배양
  - 실험에 사용된 원예작물 식물병원균은 세균 3종, 곰팡이 12종으로 총 15종의 병원균에 대하여 후보물질의 생장 억제 효과를 실험하였음
  - Clavibacter michiganensis*(괘양병), *Xanthomonas perforans*(점무늬병), *Xanthomonas euvesicatoria*(점무늬병), *Alternaria solani*(마름병), *Alternaria tenuissima*(검은곰팡이병), *Alternaria tomatophila*(겉무늬병), *Colletotrichum acutatum*(고추탄저병), *Colletotrichum coccodes*(고추탄저병), *Colletotrichum coccodes*(토마토탄저병), *Corynespora cassiicola*(점무늬병), *Phytophthora capsici*(고추역병), *Phytophthora capsici*(토마토역병), *Phytophthora infestans*(잎마름역병), *Pythium aphanidermatum*(잘록병), *Stemphylium lycopersici*(점무늬병) 총 15종의 균주에 대하여 실험을 진행하였음
  - 확보된 식물병원성 균주들은 NA(nutrient agar), TSA(tryptic soy agar), R2A(Reasoner's 2A agar), PDA(potato dextrose agar) 배지에 생육 적정 온도에

따라 25~28℃로 2~5일 동안 배양하여 성장시킨 후 계대 배양하여 실험을 진행하였음

▪ 처리물질

- 원예작물 식물병원균의 방제 물질 선발을 위해 후보물질로 선정된 carveol, D-limonene + L-limonene의 복합 형태와 제형으로는 D-limonene + L-limonene 유탁제가 사용되었음. 추가적으로 carvacrol도 사용하였음

▪ Disk diffusion assay를 통한 억제 효과 검정

- 후보물질의 억제 효과 검정은 paper disc 방법으로 식물성 병원균을 배지에 접종하여 25~28℃, 180rpm, 2~5일 동안 배양하였으며 배양액을 농도 OD<sub>600</sub>=0.8~1.0으로 현탁하여 배지에 평판 도말하였음
- 도말한 배지위에 paper disc(φ8mm, Avante, Japan)를 올려놓고 각각의 후보물질들을 농도별로 50μl씩 처리 후 적절한 배양온도에 2~5일 배양하여 paper disc 주변에 형성된 clear zone (세균성장 억제존)의 크기를 측정하여 항균 활성 정도를 확인하였음

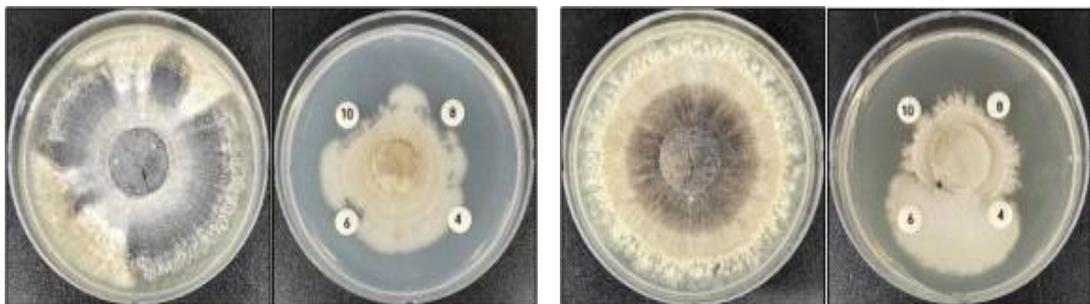
▪ Drop plate assay를 이용한 병원균 억제 효과

- 도말한 배지위에 각각의 후보물질을 배지위에 직접 5μl씩 처리 후 적절한 배양온도에 2~5일 배양하여 inhibition zone (세균성장 억제존)의 생성 유무에 따라 항균 활성 정도를 확인하였음

다) 실험 결과

▪ Carveol의 disk diffusion assay를 이용한 원예작물 식물병원균 억제 효과

- Carveol을 농도별(10, 8, 6, 4mM)처리한 결과 *C. coccodes*(고추탄저병), *C. coccodes*(토마토탄저병)에서 농도 의존적으로 억제 효과를 보였음
- 그러나 실험에 사용된 3종의 세균성 병원균과 나머지 곰팡이 병원균에서는 효과를 보이지 않았음
- 추가적인 억제 효과 확인을 위해 drop plate assay 진행하였음



[*C. coccodes*-고추 억제 효과 결과]

[*C. coccodes*-토마토 억제 효과 결과]

[Disk diffusion assay를 이용한 carveol의 원예작물 식물병원균 성장 억제 효과]

[Carveol의 원예작물 식물병원균에 대한 성장 억제 효과 결과 평가]

식물병원균	(mM/disc)	Diameter of inhibition zone (mm) <sup>a</sup>			
		10	8	6	4
<i>C. michiganensis</i>		-	-	-	-
<i>X. euvesicatoria</i>		-	-	-	-
<i>X. perforans</i>		-	-	-	-
<i>A. solani</i>		-	-	-	-
<i>A. tenuissima</i>		-	-	-	-
<i>A. tomatophila</i>		-	-	-	-
<i>C. acutatum</i>		-	-	-	-
<i>C. coccodes</i> -고추		++ <sup>b</sup>	+	-	-
<i>C. coccodes</i> -토마토		++	+	-	-
<i>C. cassicola</i>		-	-	-	-
<i>P. capsici</i> -고추		-	-	-	-
<i>P. capsici</i> -토마토		-	-	-	-
<i>P. infestans</i>		-	-	-	-
<i>P. aphanidermatum</i>		-	-	-	-
<i>S. lycopersici</i>		-	-	-	-

<sup>a</sup> Diameter of clear zone including disc diameter 8.0mm

<sup>b</sup> +++; 강 활성, ++; 중 활성, +; 약 활성, -; 효과 없음

- Carveol의 drop plate assay를 이용한 원예작물 식물병원균의 억제 효과
  - 농도별(10, 8, 6, 4mM) 처리한 결과 세균성 병원균인 *C. michiganensis*(괘양병)은 8mM, *X. euvesicatoria*(점무늬병)은 10mM, *X. perforans*(점무늬병)은 8mM에서 억제 효과를 확인함
  - 곰팡이 식물병원균에서는 억제 효과를 확인 할 수 없었음



[*C. michiganensis*  
억제 효과 결과]

[*X. euvesicatoria*  
억제 효과 결과]

[*X. perforans*  
억제 효과 결과]

[Drop plate assay를 이용한 carveol의 원예작물 식물병원균 성장 억제 효과]

[Carveol의 원예작물 식물병원균 성장 억제 효과 결과 평가]

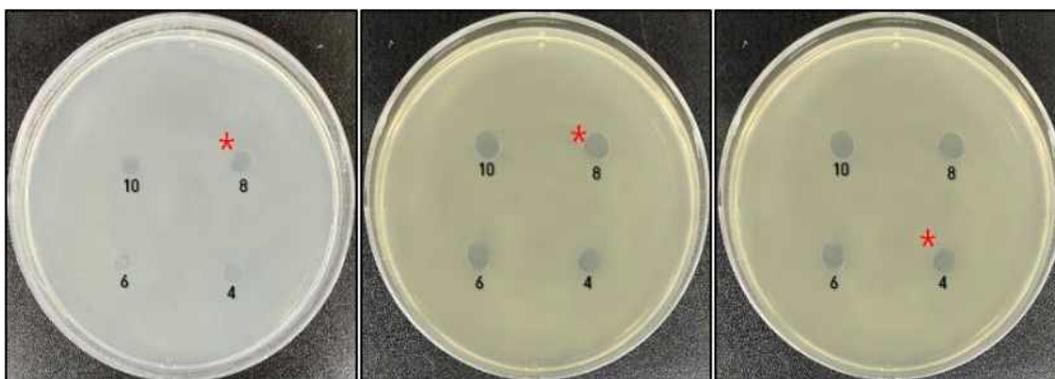
식물병원균	(mM/disc)	Zone of inhibition			
		10	8	6	4
<i>C. michiganensis</i>	+ <sup>a</sup>	-	-	-	-
<i>X. euvesicatoria</i>	++	+	-	-	-
<i>X. perforans</i>	++	+	-	-	-
<i>A. solani</i>	-	-	-	-	-
<i>A. tenuissima</i>	-	-	-	-	-
<i>A. tomatophila</i>	-	-	-	-	-
<i>C. acutatum</i>	-	-	-	-	-
<i>C. coccodes</i> -고추	-	-	-	-	-
<i>C. coccodes</i> -토마토	-	-	-	-	-
<i>C. cassicola</i>	-	-	-	-	-
<i>P. capsici</i> -고추	-	-	-	-	-
<i>P. capsici</i> -토마토	-	-	-	-	-
<i>P. infestans</i>	-	-	-	-	-
<i>P. aphanidermatum</i>	-	-	-	-	-
<i>S. lycopersici</i>	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> +++; 강 활성, ++; 중 활성, +; 약 활성, -; 효과 없음

- D-limonene + L-limonene 복합 형태의 disk diffusion assay를 이용한 원예작물 식물병원균 억제 효과

  - 억제 효과 확인을 위해 D-limonene + L-limonene 복합물을 농도별(10, 8, 6, 4mM) 처리한 결과 모든 세균 및 곰팡이 식물병원균에서 효과를 보이지 않음
  - 추가적인 억제 효과 확인을 위해 Drop plate method 진행하였음
- D-limonene + L-limonene 복합 형태의 drop plate assay를 이용한 원예작물 식물병원균 억제 효과

  - 농도별(10, 8, 6, 4mM) 처리한 결과 세균성 병원균인 *C. michiganensis*(궤양병)과 *X. euvesicatoria*(점무늬병)에서 8mM, *X. perforans*(점무늬병)는 4mM에서 억제 효과를 확인함
  - 곰팡이 식물병원균에서는 억제 효과를 확인 할 수 없었음



[*C. michiganensis* 억제 효과 결과]

[*X. euvesicatoria* 억제 효과 결과]

[*X. perforans* 억제 효과 결과]

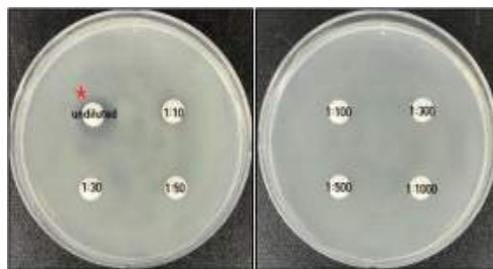
[Drop plate assay를 이용한 복합물의 원예작물 식물병원균 성장 억제 효과]

[복합물의 원예작물 식물병원균 성장 억제 효과 결과 평가]

식물병원균	(mM/disc)	Zone of inhibition			
		10	8	6	4
<i>C. michiganensis</i>	+ <sup>a</sup>	+	-	-	-
<i>X. euvesicatoria</i>	++	+	-	-	-
<i>X. perforans</i>	++	+	+	+	+
<i>A. solani</i>	-	-	-	-	-
<i>A. tenuissima</i>	-	-	-	-	-
<i>A. tomatophila</i>	-	-	-	-	-
<i>C. acutatum</i>	-	-	-	-	-
<i>C. coccodes</i> -고추	-	-	-	-	-
<i>C. coccodes</i> -토마토	-	-	-	-	-
<i>C. cassiicola</i>	-	-	-	-	-
<i>P. capsici</i> -고추	-	-	-	-	-
<i>P. capsici</i> -토마토	-	-	-	-	-
<i>P. infestans</i>	-	-	-	-	-
<i>P. aphanidermatum</i>	-	-	-	-	-
<i>S. lycopersici</i>	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> +++; 강 활성, ++; 중 활성, +; 약 활성, -; 효과 없음

- 제형인 D-limonene + L-limonene 복합물 유탁제의 disk diffusion assay를 이용한 원예작물 식물병원균 억제 효과
  - D-limonene + L-limonene 유탁제를 농도별(원액, 1:10, 30, 50, 100, 300, 500, 1000)처리한 결과 세균성 병원균인 *C. michiganensis*(궤양병)의 원액에서 억제 효과를 확인함
  - 다른 식물병원균에서는 억제 효과를 확인 할 수 없었음
  - 추가적인 억제 효과 확인을 위해 drop plate assay 진행하였음



[*C. michiganensis* 억제 효과 결과]

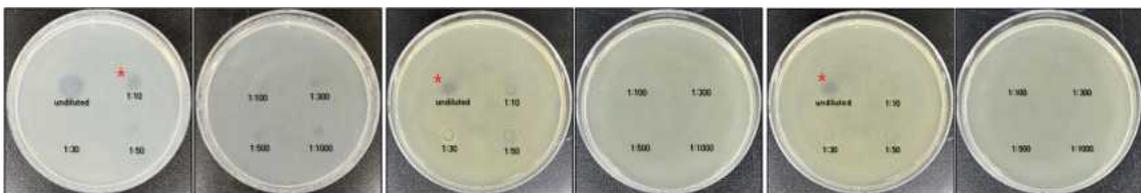
[Disk diffusion assay를 통한 복합물 유탁제의 식물병원균 성장 억제 효과]

[복합물 유탁제의 원예작물 식물병원균에 대한 생장 억제 효과 결과 평가]

식물병원균	(mM/disc)	Diameter of inhibition zone (mm) <sup>a</sup>						
	원액	1:10	1:30	1:50	1:100	1:300	1:500	1:1000
<i>C. michiganensis</i>	11.45 ±0.30	-	-	-	-	-	-	-
<i>X. euvesicatoria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>X. perforans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. solani</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. tenuissima</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. tomatophila</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. acutatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. coccodes</i> -고추	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. coccodes</i> -토마토	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. cassiicola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. capsici</i> -고추	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. capsici</i> -토마토	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. infestans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aphanidermatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. lycopersici</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Diameter of clear zone including disc diameter 8.0mm

- 제형인 D-limonene + L-limonene 복합물 유탁제의 drop plate assay를 이용한 원예작물 식물병원균 억제 효과
  - D-limonene + L-limonene 유탁제를 농도별(원액, 1:10, 30, 50, 100, 300, 500, 1000) 처리한 결과 세균성 병원균인 *C. michiganensis*(궤양병)은 10배 희석 농도에서 *X. euvesicatoria*(점무늬병) 및 *X. perforans*(점무늬병)에서 원액의 농도에서 억제 효과를 확인함
  - 다른 식물병원균에서는 억제 효과를 할 수 없었음



[*C. michiganensis* 억제 효과 결과]

[*X. euvesicatoria* 억제 효과 결과]

[*X. perforans* 억제 효과 결과]

[Drop plate assay를 이용한 복합물 유탁제의 식물병원균 생장 억제 효과]

[복합물 유도체의 원예작물 식물병원균 성장 억제 효과 결과 평가]

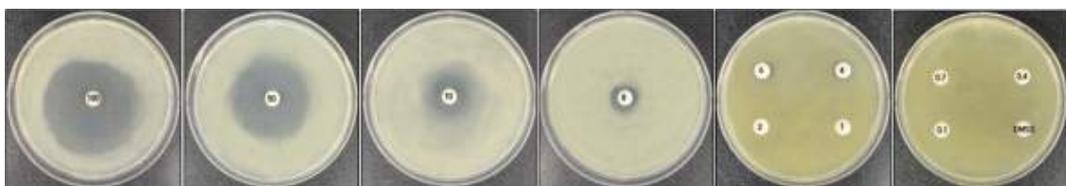
식물병원균	희석배율	Zone of inhibition						
	원액	1:10	1:30	1:50	1:100	1:300	1:500	1:1000
<i>C. michiganensis</i>	++ <sup>a</sup>	+	-	-	-	-	-	-
<i>X. euvesicatoria</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>X. perforans</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. solani</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. tenuissima</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. tomatophila</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. acutatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. coccodes</i> -고추	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. coccodes</i> -토마토	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. cassiicola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. capsici</i> -고추	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. capsici</i> -토마토	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. infestans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aphanidermatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. lycopersici</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> +++; 강 활성, ++; 중 활성, +; 약 활성, -; 효과 없음

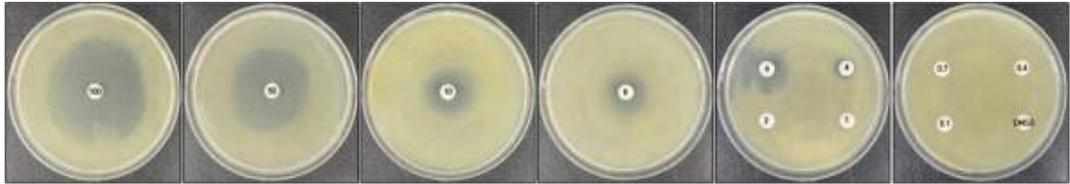
- Carvacrol의 disk diffusion assay를 이용한 원예작물 식물병원균 억제 효과
  - 추가적인 후보물질인 carvacrol을 농도별(100, 50, 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0.7, 0.4, 0.1mM)처리한 결과 *C. michiganensis*(퀘양병), *X. euvesicatoria*(점무늬병), *X. perforans*(점무늬병)에서 8mm부터 효과를 보였으며, *A. tenuissima*(검은곰팡이병), *C. coccodes*(고추탄저병), *C. coccodes*(토마토탄저병), *C. cassiicola*(점무늬병), *P. capsici*(고추역병), *P. capsici*(토마토역병), *P. aphanidermatum*(잘록병)에서 농도 의존적으로 억제 효과를 보였음
  - 다른 식물병원균에 대해서는 효과를 확인 할 수 없었음



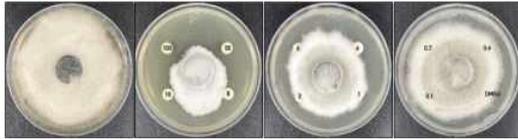
[*C. michiganensis* 억제 효과 결과]



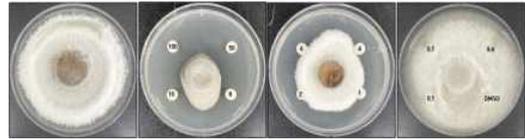
[*X. euvesicatoria* 억제 효과 결과]



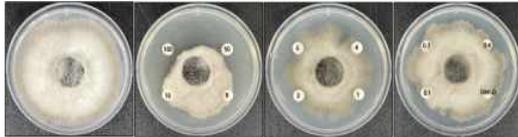
[*X. perforans* 억제 효과 결과]



[*A. solani* 억제 효과 결과]



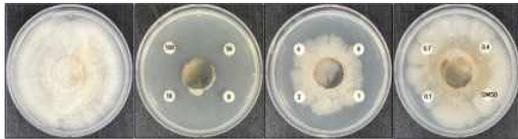
[*A. tenuissima* 억제 효과 결과]



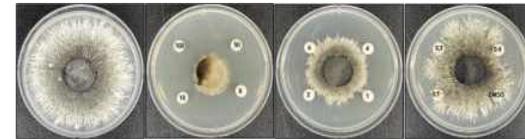
[*A. tomatophila* 억제 효과 결과]



[*C. acutatum* 억제 효과 결과]



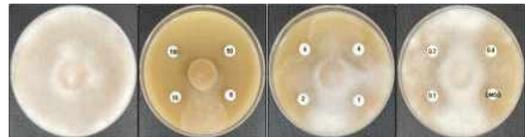
[*C. coccodes*-고추 억제 효과 결과]



[*C. coccodes*-토마토 억제 효과 결과]



[*C. cassiicola* 억제 효과 결과]



[*P. capsici*-고추 억제 효과 결과]



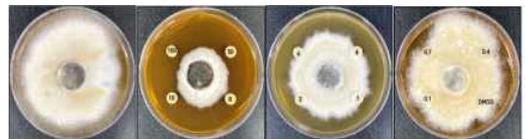
[*P. capsici*-토마토 억제 효과 결과]



[*P. infestans* 억제 효과 결과]



[*P. aphanidermatum* 억제 효과 결과]



[*S. lycopersici* 억제 효과 결과]

[Disk diffusion assay를 이용한 carvacrol의 원예작물 식물병원균 성장 억제 효과 결과]

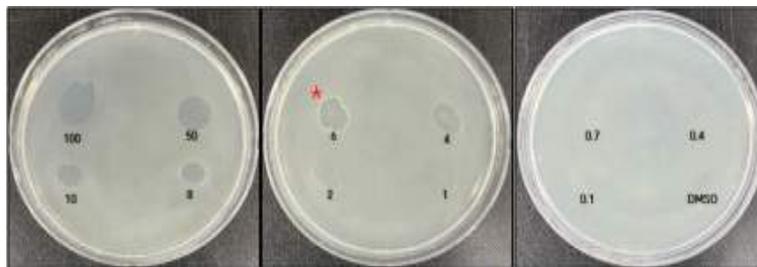
[Carvacrol의 원예작물 식물병원균 성장 억제 효과 결과 평가]

식물병원균	(mM/disc)										
	Diameter of inhibition zone (mm) <sup>a</sup>										
	100	50	10	8	6	4	2	1	0.7	0.4	0.1
<i>C. michiganensis</i>	11.68 ±0.39	11.15 ±0.26	9.80 ±0.08	9.38 ±0.05	- <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-
<i>X. euvesicatoria</i>	11.88 ±0.30	10.75 ±0.21	9.93 ±0.10	9.55 ±0.17	-	-	-	-	-	-	-
<i>X. perforans</i>	13.23 ±0.21	12.63 ±0.15	10.08 ±0.30	9.90 ±0.12	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. solani</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. tenuissima</i>	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. tomatophila</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. acutatum</i>	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. coccodes</i> -고추	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. coccodes</i> -토마토	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. cassiicola</i>	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. capsici</i> -고추	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. capsici</i> -토마토	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. infestans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aphanidermatum</i>	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-
<i>S. lycopersici</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Diameter of clear zone including disc diameter 8.0mm

<sup>b</sup> +++; 강 활성, ++; 중 활성, +; 약 활성, -; 효과 없음

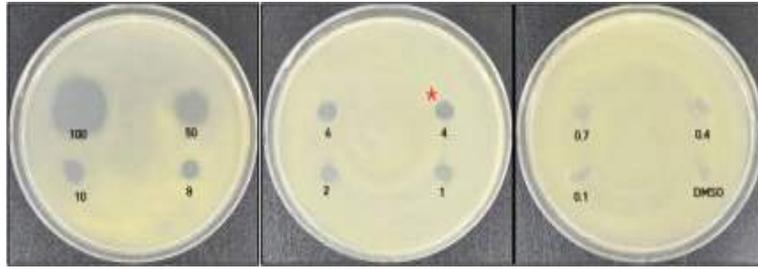
- Carvacrol의 drop plate assay를 이용한 원예작물 식물병원균의 억제 효과
  - 각각의 제형을 농도별(1:100, 300, 500, 1000) 처리한 결과 세균성 병원균인 *C. michiganensis*(괘양병)는 6mM, *X. euvesicatoria*(점무늬병) 및 *X. perforans*(점무늬병)는 4mM에서 억제 효과를 확인함
  - 나머지 곰팡이 식물병원균에서는 효과를 확인 할 수 없었음



[*C. michiganensis* 억제 효과 결과]



[*X. euvesicatoria* 억제 효과 결과]



[*X. perforans* 억제 효과 결과]

[Drop plate assay를 이용한 carvacrol의 원예작물 식물병원균의 성장 억제 효과 결과]

[Carvacrol의 원예작물 식물병원균 성장 억제 효과 결과 평가]

식물병원균	(mM/disc)	Zone of inhibition										
		100	50	10	8	6	4	2	1	0.7	0.4	0.1
<i>C. michiganensis</i>	+++ <sup>a</sup>	+++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>X. euvesicatoria</i>	+++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>X. perforans</i>	+++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>A. solani</i>	- <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. tenuissima</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. tomatophila</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. acutatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. coccodes</i> -고추	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. coccodes</i> -토마토	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. cassiicola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. capsici</i> -고추	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. capsici</i> -토마토	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. infestans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aphanidermatum</i>	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. lycopersici</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> +++; 강 활성, ++; 중 활성, +; 약 활성, -; 효과 없음

## (8) 시제품에 대한 원예작물 식물병원균 억제 활성 및 유효 처리 농도 산출

### 가) 실험 목적

- 리모넨 유도체 물질 중 활용 가능한 물질의 상용화를 위하여 제형화된 시제품의 활성을 검증

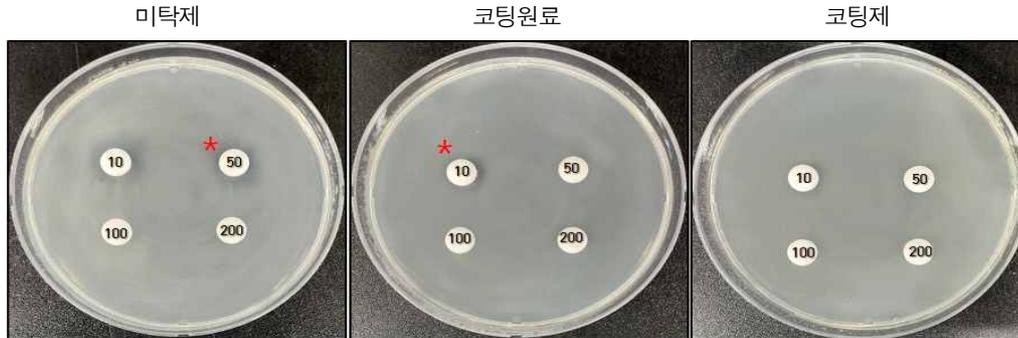
### 나) 실험 재료 및 방법

- Disk/drop assay를 통한 제형의 원예작물 식물병원균의 억제 효과 검정
  - 억제 효과 검정 실험 조건은 동일하게 진행함
- 후보물질
  - 제형화된 시제품의 원예작물 식물병원균 억제 활성을 검증하기 위해 (주)마이크로자임으로부터 미탁제, 코팅원료 및 코팅제를 제형화된 D-limonene + L-limonene를 확

보합

다) 실험 결과

- 제형별(미탁제, 코팅원료, 코팅제) disk diffusion assay를 이용한 시제품의 원예작물 식물병원균 억제 효과 검정
  - 각각의 시제품을 농도별(1:10, 500, 100, 500)로 disk diffusion assay 실험한 결과 세균성 병원균인 *C. michiganensis*(괘양병)의 미탁제는 50배 희석에서 코팅원료는 10배 희석에서 억제 효과를 확인함
  - 다른 원예작물 식물병원균에서는 효과를 확인 할 수 없었으며 추가 억제 효과를 확인하기 위해 drop plate assay를 진행함



[*C. michiganensis* 억제 효과 결과]

[Disk diffusion assay를 이용한 시제품의 원예작물 식물병원균의 성장 억제 효과 결과]

[시제품의 원예작물 식물병원균의 성장 억제 효과 결과 평가]

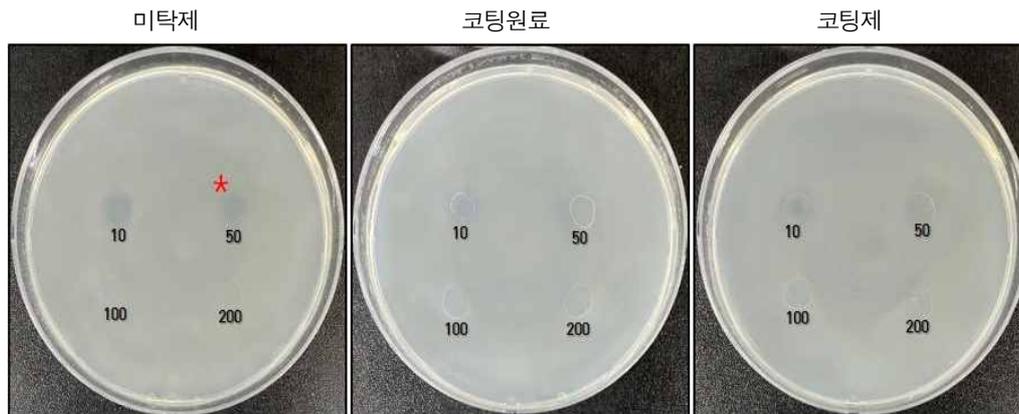
식물병원균	희석배율	Diameter of inhibition zone (mm) <sup>a</sup>			
		1:10	1:50	1:100	1:500
<i>C. michiganensis</i>	미탁제	12.25±0.96	11.50±0.58	- <sup>a</sup>	-
	코팅원료	9.75±0.50	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>X. euvesicatoria</i>	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>X. perforans</i>	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>A. solani</i>	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>A. tenuissima</i>	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>A. tomatophila</i>	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>C. acutatum</i>	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>C. coccodes</i> -고추	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>C. coccodes</i> -토마토	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-

	코팅제	-	-	-	-
<i>C. cassicola</i>	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>P. capsici</i> -고추	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>P. capsici</i> -토마토	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>P. infestans</i>	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>P. aphanidermatum</i>	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>S. lycopersici</i>	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-

<sup>a</sup> Diameter of clear zone including disc diameter 8.0mm

<sup>b</sup> +++; 강 활성, ++; 중 활성, +; 약 활성, -; 효과 없음

- 제형별(미탁제, 코팅원료, 코팅제) drop plate assay를 이용한 시제품의 원예작물 식물병원균 억제 효과
  - 각각의 제형을 농도별(1:100, 300, 500, 1000) 처리한 결과 세균성 병원균인 *C. michiganensis*(괘양병)의 미탁제에서 억제 효과를 확인함
  - 다른 세균 및 곰팡이 식물병원균에서는 효과를 확인 할 수 없었음



[*C. michiganensis* 억제 효과 결과]

[Drop plate assay를 이용한 시제품의 원예작물 식물병원균의 성장 억제 효과 결과]

[시제품의 원예작물 식물병원균의 성장 억제 효과 결과 평가]

식물병원균	희석배율	Zone of inhibition			
		1:10	1:50	1:100	1:500
<i>C. michiganensis</i>	미탁제	+++ <sup>a</sup>	+	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>X. euvesicatoria</i>	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>X. perforans</i>	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-

<i>A. solani</i>	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>A. tenuissima</i>	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>A. tomatophila</i>	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>C. acutatum</i>	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>C. coccodes</i> -고추	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>C. coccodes</i> -토마토	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>C. cassicola</i>	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>P. capsici</i> -고추	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>P. capsici</i> -토마토	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>P. infestans</i>	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>P. aphanidermatum</i>	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-
<i>S. lycopersici</i>	미탁제	-	-	-	-
	코팅원료	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-

<sup>a</sup> +++; 강 활성, ++; 중 활성, +; 약 활성, -; 효과 없음

## (9) 시제품의 원예작물 주요 세균/곰팡이병 생장 억제 효과 검정

### 가) 실험 목적

- 리모넨 유도체 물질 중 활용 가능한 물질의 상용화를 위하여 제형화된 시제품의 활성을 검증

### 나) 실험 재료 및 방법

- 식물병원균의 확보 및 배양
  - 주요 원예작물 식물병원균 및 배양은 동일하게 진행함
- Disk/drop assay를 통한 시제품의 원예작물 식물병원균 억제 효과 검정
  - 억제 효과 검정 실험 조건은 동일하게 진행함
- Spreading plate assay를 이용한 병원균 억제 효과

- 후보물질의 억제 효과 검정은 spreading plate assay로 시제품을 배지에 200  $\mu$ l spreading 한 후 식물병원균을 접종하여 25~28  $^{\circ}$ C, 2~5일 동안 배양하였으며 세균의 경우 배양액을 농도 OD<sub>600</sub>=0.8~1.0으로 현탁하여 접종하였음

■ 후보물질

- 제형화된 시제품의 다양한 활성 검증하기 위해 (주)마이크로자임으로부터 D-limonene + L-limonene의 제형화된 시제품을 확보함

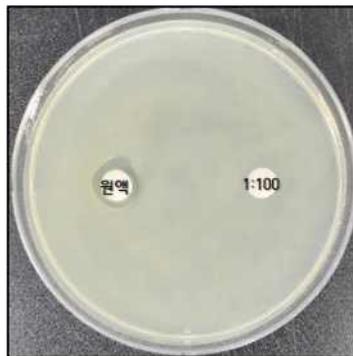
■ 시제품의 방제 효율 평가(온실실험)

- 병원균 억제 작물 시험(포트)은 고추 3품종(파리, 풋, 신와), 토마토 2품종(해니피스, 러브리)를 파종 후 포트에 이식 한 후 온실에서 약 2개월간 재배하여 실험에 사용하였음
- 세균 및 곰팡이 식물병원균의 접종은 세균의 경우 배지에서 OD<sub>600</sub>=0.8~1.0에 도달할 때까지 진탕배양, 곰팡이는 배지에서 배양 후 원예작물에 상처를 낸 후 감염을 진행하였음
- 시제품 처리는 식물 병원균 접종 후 시제품을 1:100, 200 및 500으로 희석하여 detached leaf assay 방법으로 실시하였음
- 대조군은 각각의 작물에 상처와 식물병원균 처리, 작물의 상처만 처리 및 식물병원균만 처리가 사용되었으며, 감염시킨 후 2주 및 4주 동안 온실에 두고 병변을 관찰 확인하였음

다) 실험 결과

■ 시제품의 Disk diffusion assay를 이용한 원예작물 식물병원균 억제 효과

- 시제품을 농도별(원액, 1:100)처리한 결과 세균성 병원균인 *X. euvesicatoria*(점무늬병) 원액 농도에서 효과를 확인하였음
- 다른 원예작물 식물병원균에서는 효과를 확인 할 수 없었으며 추가 억제 효과를 확인하기 위해 drop plate assay를 진행함



[*X. euvesicatoria* 억제 효과 결과]

[Disk diffusion assay를 이용한 시제품의 원예작물 식물병원균 생장 억제 효과 결과]

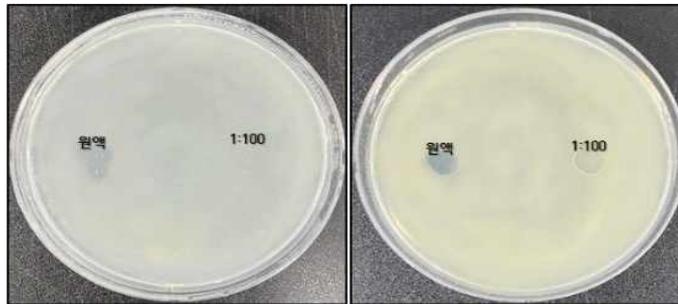
[시제품의 원예작물 식물병원균 생장 억제 효과 결과 평가]

식물병원균	(mM/disc)	Diameter of inhibition zone (mm) <sup>a</sup>	
		원액	1:100
<i>C. michiganensis</i>		-	-
<i>X. euvesicatoria</i>		9.80±0.08	-
<i>X. perforans</i>		-	-
<i>A. solani</i>		-	-
<i>A. tenuissima</i>		-	-

<i>A. tomatophila</i>	-	-
<i>C. acutatum</i>	-	-
<i>C. coccodes</i> -고추	-	-
<i>C. coccodes</i> -토마토	-	-
<i>C. cassiicola</i>	-	-
<i>P. capsici</i> -고추	-	-
<i>P. capsici</i> -토마토	-	-
<i>P. infestans</i>	-	-
<i>P. aphanidermatum</i>	-	-
<i>S. lycopersici</i>	-	-

<sup>a</sup> Diameter of clear zone including disc diameter 8.0mm

- 시제품의 Drop plate assay를 이용한 원예작물 식물병원균 억제 효과
  - 시제품을 농도별(원액, 1:100) 처리한 결과 세균성 병원균인 *C. michiganensis*(괘양병), *X. euvesicatoria*(점무늬병) 원액에서의 억제 효과를 확인함
  - 다른 세균 및 곰팡이 식물병원균에서는 효과를 확인 할 수 없었음



[*C. michiganensis* 억제 효과 결과]

[*X. euvesicatoria* 억제 효과 결과]

[시제품의 원예작물 식물병원균 성장 억제 효과 결과]

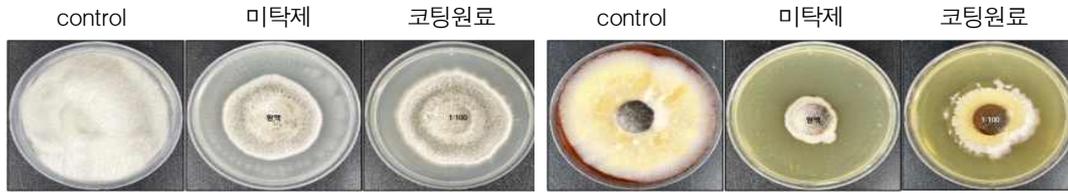
[시제품의 원예작물 식물병원균 성장 억제 효과 결과 평가]

식물병원균	(mM/disc)	Zone of inhibition	
		원액	1:100
<i>C. michiganensis</i>		+ <sup>a</sup>	-
<i>X. euvesicatoria</i>		+	-
<i>X. perforans</i>		-	-
<i>A. solani</i>		-	-
<i>A. tenuissima</i>		-	-
<i>A. tomatophila</i>		-	-
<i>C. acutatum</i>		-	-
<i>C. coccodes</i> -고추		-	-
<i>C. coccodes</i> -토마토		-	-
<i>C. cassiicola</i>		-	-
<i>P. capsici</i> -고추		-	-
<i>P. capsici</i> -토마토		-	-
<i>P. infestans</i>		-	-
<i>P. aphanidermatum</i>		-	-
<i>S. lycopersici</i>		-	-

<sup>a</sup> +++; 강 활성, ++; 중 활성, +; 약 활성, -; 효과 없음

- 시제품의 Spreading plate assay를 이용한 원예작물의 식물병원균 억제 효과
  - 시제품을 농도별(원액, 1:100) 처리한 결과 *C. cassiicola*(점무늬병), *S.*

*lycopersici*(점무늬병)에서 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인함



[*C. cassiicola* 억제 효과 결과]

[*S. lycopersici* 억제 효과 결과]

[시제품의 원예작물 식물병원균의 성장 억제 효과 결과]

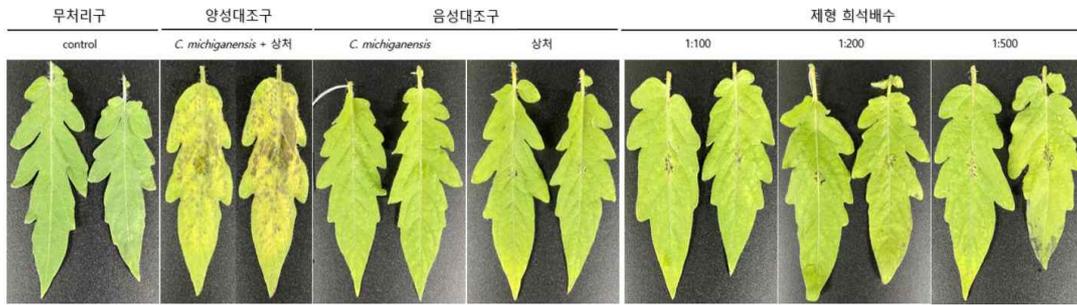
[시제품의 원예작물 식물병원균 성장 억제 효과 결과 평가]

식물병원균 (mM/disc)	Zone of inhibition	
	원액	1:100
<i>C. michiganensis</i>	- <sup>a</sup>	-
<i>X. euvesicatoria</i>	-	-
<i>X. perforans</i>	-	-
<i>A. solani</i>	-	-
<i>A. tenuissima</i>	-	-
<i>A. tomatophila</i>	-	-
<i>C. acutatum</i>	-	-
<i>C. coccodes</i> -고추	-	-
<i>C. coccodes</i> -토마토	-	-
<i>C. cassiicola</i>	++	+
<i>P. capsici</i> -고추	-	-
<i>P. capsici</i> -토마토	-	-
<i>P. infestans</i>	-	-
<i>P. aphanidermatum</i>	-	-
<i>S. lycopersici</i>	+++	++

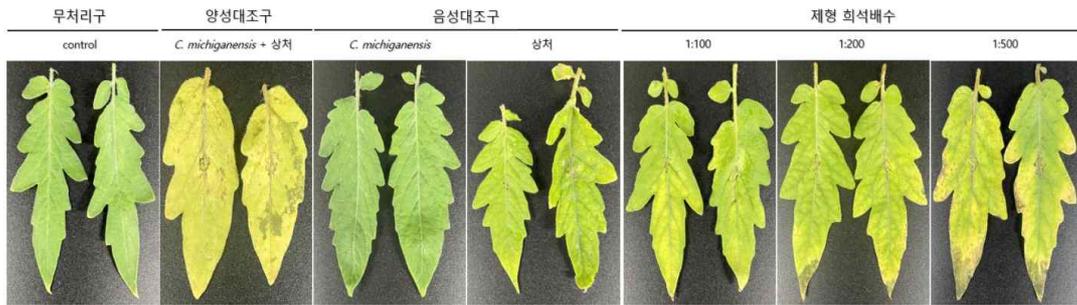
<sup>a</sup> +++; 강 활성, ++; 중 활성, +; 약 활성, -; 효과 없음

■ 온실 실험

- *In vitro* 실험에서 효과를 확인한 *C. michiganensis*(괘양병), *X. euvesicatoria*(점무늬병), *C. cassiicola*(점무늬병), *S. lycopersici*(점무늬병)의 시제품에 대한 작물의 병 저항성 확인을 위해 농도별(1:100, 200, 500)로 실험하였으며 양성 대조구의 병변침투를 확인 할 수 있었음
- 작물별(고추, 토마토) 처리한 결과 토마토에서는 해피니스, 러브리 모두 세균성 식물 병원균인 *C. michiganensis*(괘양병)에서 농도별로 병이 억제되는 것을 확인 할 수 있었음
- 고추에서는 풋과 과리에서 세균성 식물병원균인 *X. euvesicatoria*(점무늬병)에서 병이 억제되는 것을 확인 할 수 있었으며 신와에서는 억제 효과를 확인 할 수 없었음
- 다른 식물병원균에서 병징 억제 효과를 확인 할 수 없었음



[토마토(해피니스)에서의 시제품 처리 후 병징(*C. michiganensis*) 억제 효과 결과]

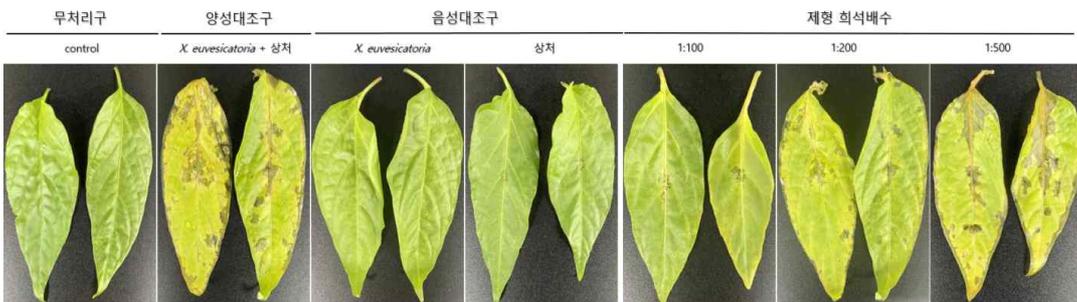


[토마토(러브리)에서의 시제품 처리 후 병징(*C. michiganensis*) 억제 효과 결과]

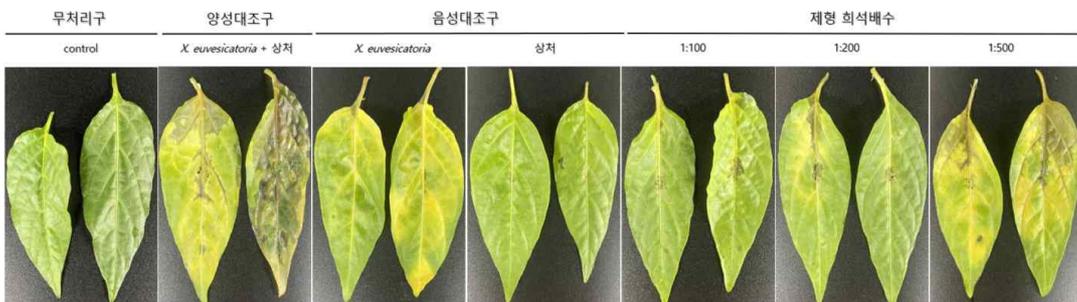
[토마토에서의 시제품 처리 후 병징 억제 효과 결과 평가]

	무처리구	양성대조구	음성대조구	제형 희석배수				
		control	<i>C. michiganensis</i> + 상처	<i>C. michiganensis</i>	상처	1:100	1:200	1:500
토마토	해 피니스	- <sup>a</sup>	+++	-	-	-	-	+
	러브리	-	+++	-	-	+	++	+++

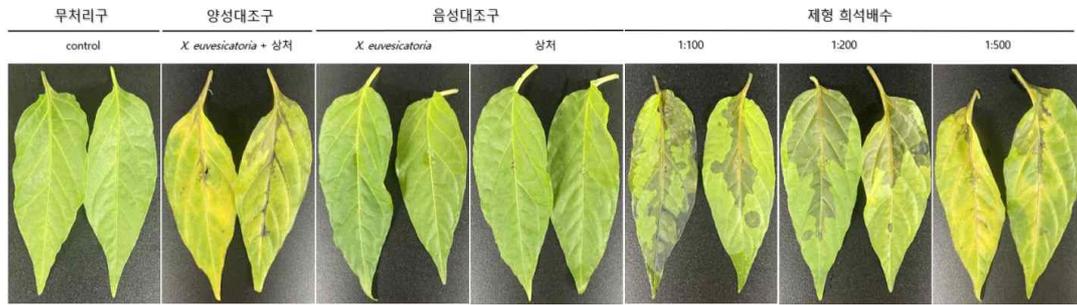
<sup>a</sup> +++: 다소 높음, ++: 높음, +: 보통, -: 낮음



[고추(파리)에서의 시제품 처리 후 병징(*X. euvesicatoria*) 억제 효과 결과]



[고추(풋)에서의 시제품 처리 후 병징(*X. euvesicatoria*) 억제 효과 결과]



[고추(신와)에서의 시제품 처리 후 병징(*X. euvesicatoria*) 억제 효과 결과]

[고추에서의 시제품 처리 후 병징 억제 효과 결과 평가]

		무처리구	양성대조구	음성대조구		제형희석배수		
		control	<i>X. euvesicatoria</i> + 상처	<i>X. euvesicatoria</i>	상처	1:100	1:200	1:500
파리		- <sup>a</sup>	+++	-	-	-	++	+++
고추	꽃	-	+++	-	-	+	+	++
	신와	-	+++	-	-	++	++	+++

<sup>a</sup> +++: 다소 높음, ++: 높음, +: 보통, -: 낮음

## (10) 후보 물질이 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 운동성 및 병원성에 미치는 효과 평가

### 가) 실험 목적

- *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 운동성 및 병원성에 후보 물질이 영향을 미치는 효과 검정

### 나) 실험 재료 및 실험 방법

- 운동성 평가
  - 화합물과 농도 처리에 따른 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 운동성 평가는 swimming 및 swarming 특징을 통해 분석하였음. NB에 swimming 분석을 하기 위해 0.3%의 agar를 첨가하였으며, swarming 분석에는 0.5% agar를 첨가하여 autoclave 하였음. Autoclave 후에 배지를 식힌 후 각 화합물의 stock solution을 1% (v/v) 처리하여 잘 섞고 petri dish에 부어 굳혔음. 제조된 각 배지에 28°C shaking incubator에서 overnight 동안 배양되어 OD<sub>600</sub> = 1.0에 도달한 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 culture를 5 µL 씩 drop하여 접종하고 7일 동안 배양하였음. 각 plate는 배양 후 bacterial zone을 측정함으로써 swarming과 swimming 정도를 평가하였음
- Crystal violet assay를 사용한 Biofilm 발견
  - 5% (w/v) sucrose가 첨가된 Brain heart infusion broth배지를 사용하여 수행하였음. 배지에 각 화합물을 농도별로 첨가하여 96well Cell Culture Plate에 100 µL 씩 분취하였음. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 culture를 접종하고 7일 동안 shaking없이 배양하였음. 배양 후 deionized water를 사용하여 3번 washing하고 0.1% (w/v) crystal violet solution을 200 µL 첨가하여 30분 동안 염색하였음. 염색 후 deionized water를 사용하여 3번 washing하고 air dry하였음. 100% ethanol 200 µL을 첨가하여 30분 동안 탈색시켜준 후 OD<sub>590</sub>을 측정하였음

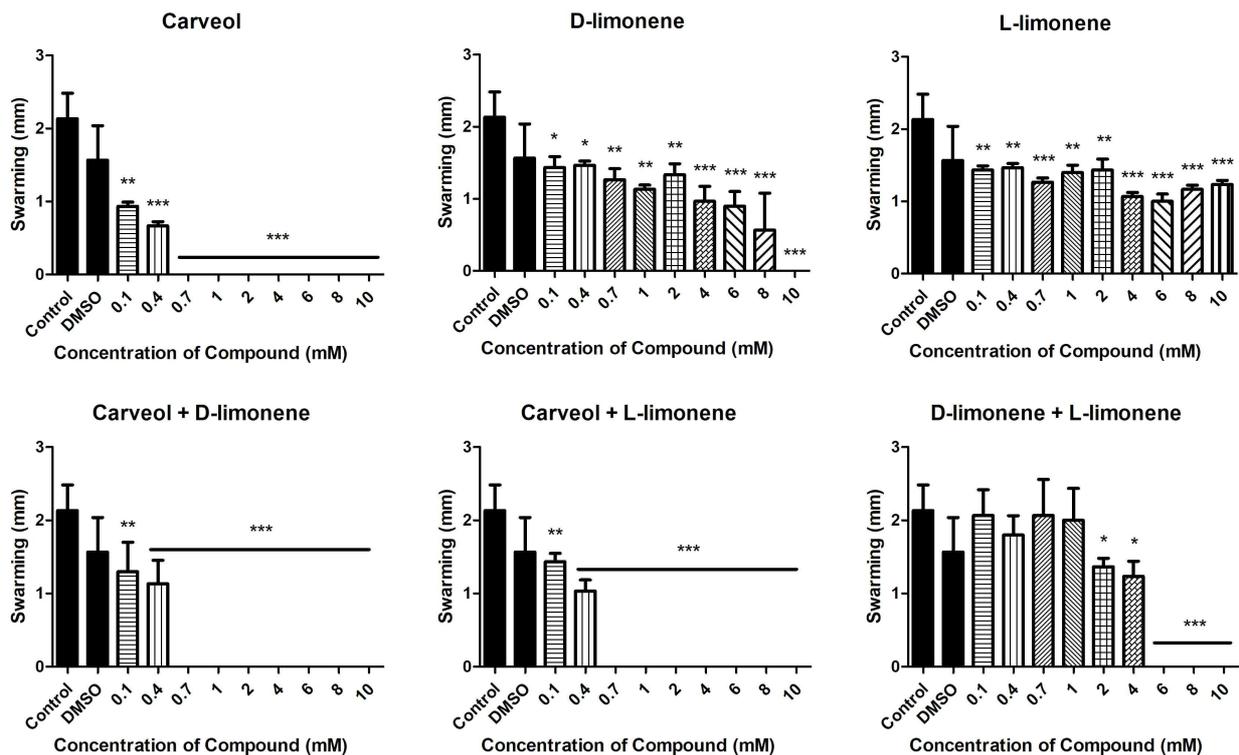
- Xanthomonadin의 추출 및 측정

- Xanthomonadin 색소의 측정은 Wang *et al.* (2015)이 제시한 방법에 따라 수행되었음. 화합물이 있거나 없는 4 mL *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 culture를 원심 분리하여 수집한 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 cells를 100% 메탄올 1 mL와 혼합했음. 혼합물을 shaking incubator에서 10분 동안 어둠 속에서 배양한 후, 12,000g에서 8분 동안 원심 분리하여 상층액을 수집했음. Xanthomonadin 색소는 OD<sub>445</sub>에서의 흡광도를 측정하여 추정하였음

다) 실험 결과

- 운동성 평가

- Carveol을 처리한 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*는 0.1mM부터 swarming zone이 억제되는 양상을 보이며, 0.7mM부터 완전히 억제되는 것을 확인할 수 있었음. D-limonene은 농도 의존적으로 zone의 영역이 감소되는 것으로 보이며, 10 mM에서는 완전히 성장하지 않았음. L-limonene은 감소된 것처럼 보이나, 대조군인 DMSO와 차이가 없어 화합물 처리에 의해 감소된 것으로 보이지 않음
- 각 화합물을 혼합하여 처리한 경우, carveol + D-limonene 및 carveol + L-limonene을 처리한 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 swarming 특징은 carveol을 단독으로 처리한 결과 유사한 결과를 보여주었음. D-limonene과 L-limonene을 혼합하여 처리한 D-limonene + L-limonene의 경우, 처리하지 않은 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*보다 0.1 ~ 1 mM을 처리한 bacterial zone의 지름이 유사하여 효과가 없어 보였으나, 2 mM에서 효과가 나타났으며, 6 mM부터는 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 성장이 완전히 억제되었음.

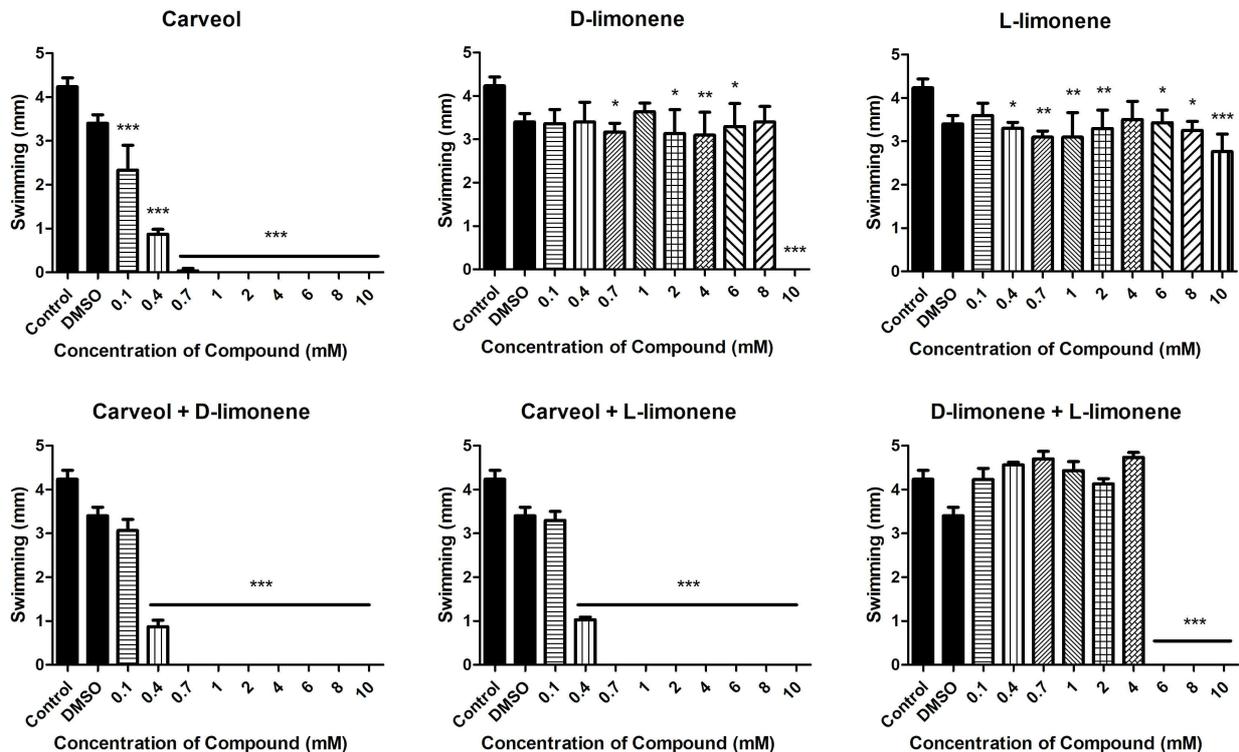


[Swarming 특징에 대한 각 화합물의 억제 효과]

- Swimming 특징을 파악하기 위해 swimming plate에서 배양되어 형성된 bacterial

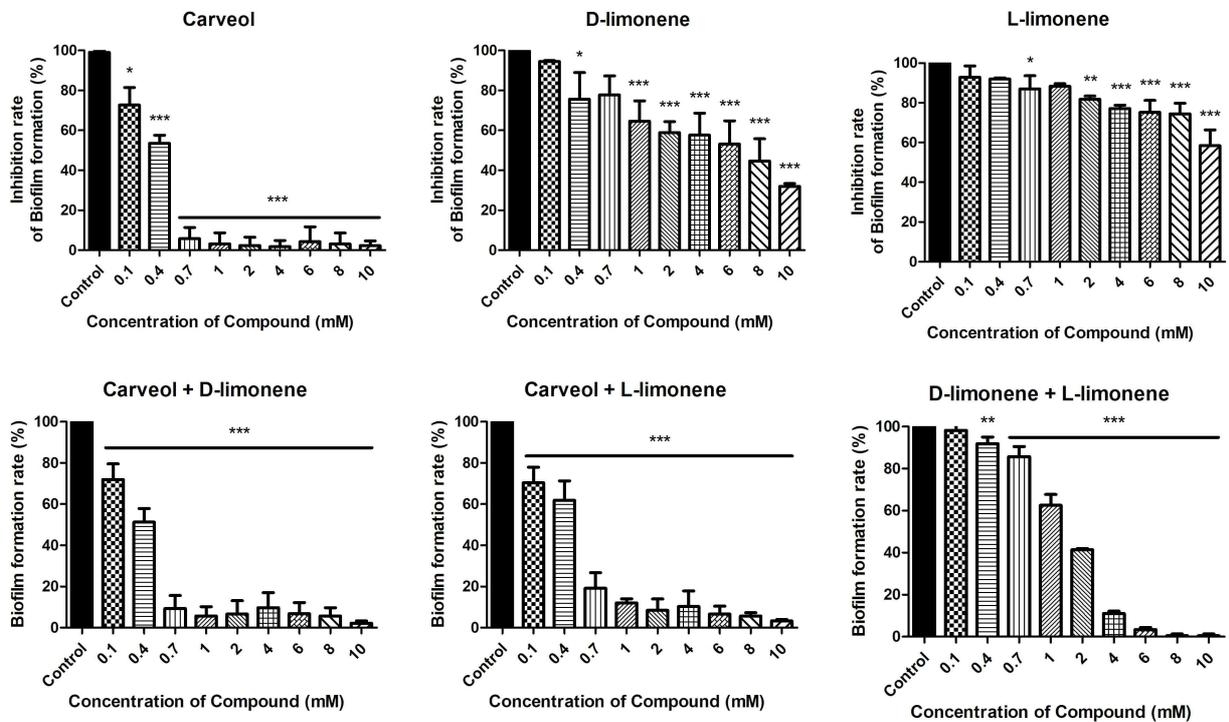
zone의 지름을 비교한 결과, carveol의 0.1m M부터 swimming zone이 억제되는 양상을 보이며, 1 mM부터 완전히 억제되는 것을 확인할 수 있었음. D-limonene은 8 mM까지는 효과가 미비하였으며, 10 mM에서는 완전히 성장하지 않았음. L-limonene은 감소된 것처럼 보이나, 대조군인 DMSO와 차이가 없어 화합물 처리에 의해 감소된 것으로 보이지 않음

- 혼합물의 효과를 확인한 결과, carveol + D-limonene 및 carveol + L-limonene을 처리한 swimming 특징은 단일 화합물인 carveol을 처리한 결과와 유사하였음. D-limonene + L-limonene의 경우, 처리하지 않은 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*보다 0.1 ~ 4 mM을 처리한 bacterial zone의 지름이 커서 효과가 없어 보였으나, 6 mM부터는 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 성장이 완전히 억제되었음



[화합물별 swimming 특징에 미치는 효과 비교]

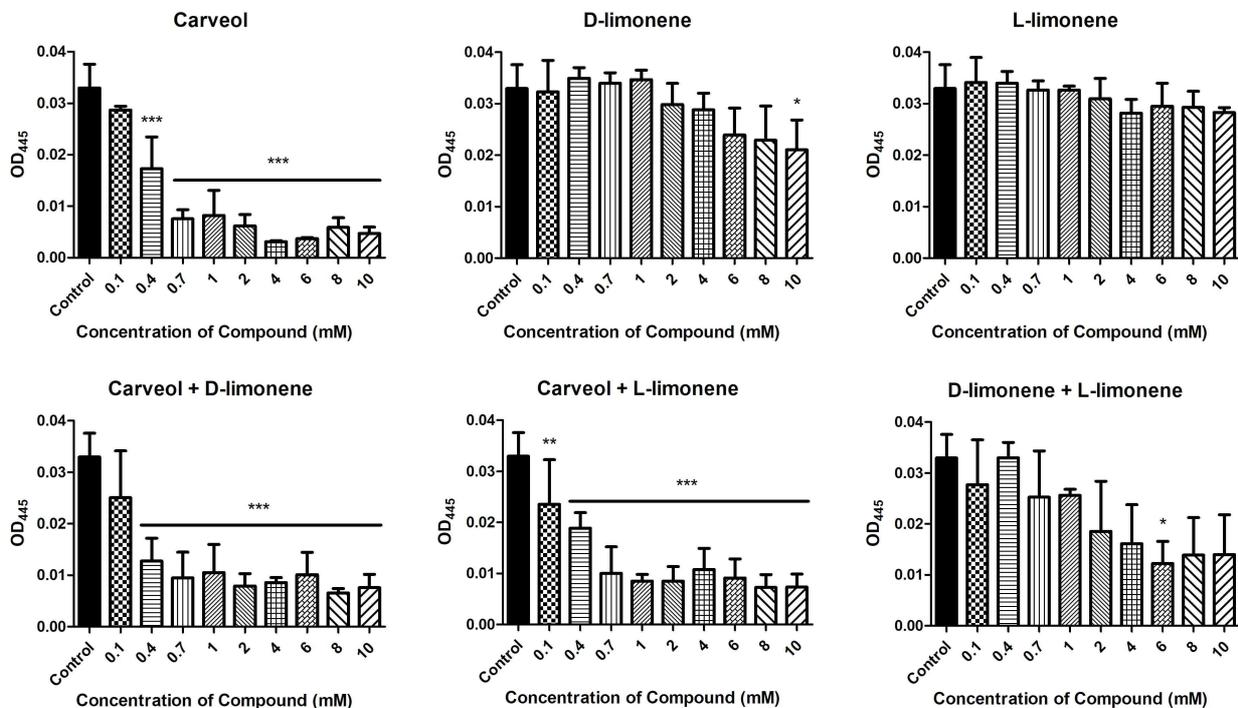
- Crystal violet assay를 사용한 Biofilm 발견
  - Carveol은 0.1mM 농도에서 control보다 약 20%의 biofilm 형성을 억제하였으며, 0.4mM의 농도에서는 약 50%의 억제율을 보여주었음. 또한 0.7mM의 carveol을 처리한 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 biofilm은 상당히 억제되어 거의 생성되지 않았음. 반면 D-limonene과 L-limonene은 농도 의존적으로 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 biofilm 형성을 감소시켰으나 carveol에 비해 효과가 미비하였음
  - Carveol에 D-limonene과 L-limonene을 각각 혼합한 결과, carveol과 유사한 경향을 나타냈음. D-limonene과 L-limonene을 혼합하여 수행한 biofilm 형성 비교 결과는 각 화합물을 단독으로 처리하는 것에 비해 1mM 농도에서 30% 정도 biofilm 형성을 억제하였으며, 4mM부터 거의 생산하지 않은 것을 확인함



[화합물을 농도별로 처리한 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 biofilm 형성 비교]

■ Xanthomonadin의 추출 및 측정

- *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 막에 부착되어 있는 노란색의 색소인 xanthomonadin은 광손상과 과산화 반응으로부터 bacterial cell을 보호하고 숙주 식물과의 관계를 친밀하게 유지시킴으로써 독성에 영향을 미침. carveol에서 0.4 mM부터 유의미하게 xanthomonadin의 생산을 억제하고 0.7mM부터 거의 생산하지 않는 것으로 나타났음. D-limonene과 L-limonene은 유의미한 생산 변화가 없었음. 각 화합물을 처리한 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 성장 억제 효과와 유사한 결과를 보임
- 단일 화합물을 혼합하여 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 처리한 결과, carveol + D-limonene, 및 carveol + L-limonene의 경우 carveol을 단독으로 처리한 결과와 유사하였음. D-limonene과 L-limonene을 단독으로 각각 처리한 경우에는 효과가 유의미하지 않았으나, 두 화합물을 혼합하여 처리한 결과는 농도 의존적으로 유의미하게 xanthomonadin이 감소한 것을 확인하였음



[각 화합물의 농도별로 처리한 xanthomonadin의 측정]

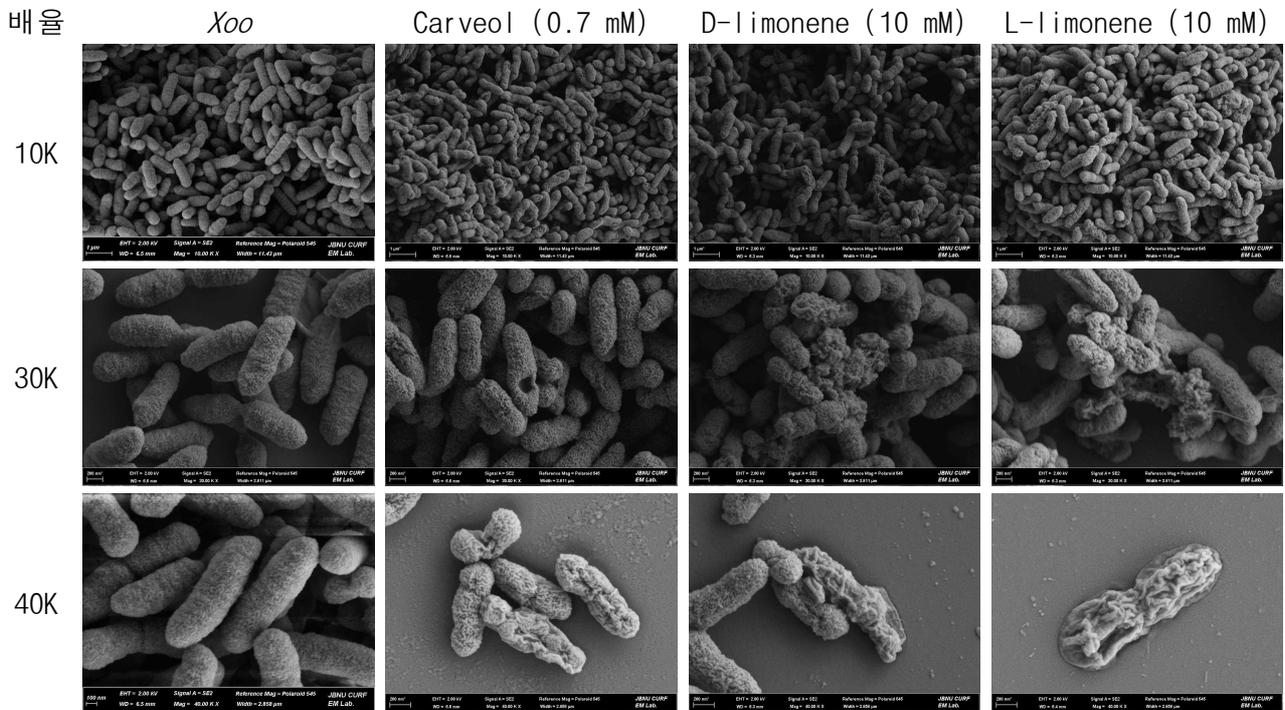
### (11) 후보 물질이 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 형태에 미치는 영향 관찰

#### 가) 실험 목적

- 전계방사형주사전자현미경을 통하여 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 형태 변화를 일으키는 후보 물질 탐색

#### 나) 실험 재료 및 실험 방법

- 생물 시료 전처리
  - 28°C shaking incubator에서 화합물이 있거나 없는 NB 배지에서 24시간 동안 배양된 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 culture를 원심분리하고 0.05M sodium cacodylate 완충액(pH 7.2) 중 2% paraformaldehyde 및 2% glutaraldehyde에 현탁시켰음. 현탁액을 밤새 4°C에서 1차 고정시켰음. 사전 고정된 세포를 0.05M sodium cacodylate 완충액(pH 7.2)으로 세 번 세척하고 1% osmium tetroxide에서 1시간 동안 2차 고정했음. 30%에서 100%까지 ethanol의 각 %에 대해 3분 동안 반응시키는 ethanol 농도 구배가 탈수에 사용되었음. 탈수된 세포에 100% hexamethyldisilazane을 첨가하고 밤새 건조시켰음
- 전계방사형주사전자현미경(Field Emission-Scanning Electron Microscope, FE-SEM) 관찰
  - FE-SEM 분석은 SUPRA-40VP (ZEISS)를 사용하여 관찰되었음



[화합물 처리에 따른 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 형태 변화 관찰]

## (12) *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 병원성 관련 유전자 발현 분석

### 가) 실험 목적

- 후보 물질이 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 병원성 관련 유전자에 영향을 미치는 정도 파악

### 나) 실험 재료 및 실험 방법

- NCBI에서 제공한 유전자 서열을 통해 Primer 3 (version 0.4.0)을 사용하여 독성 유전자의 특정 primer를 설계하고 표에 나열하였음. Biofilm 형성에 관여하는 유전자의 primer도 표에 나열되어 있음

[Real-time PCR을 위한 Primer 목록]

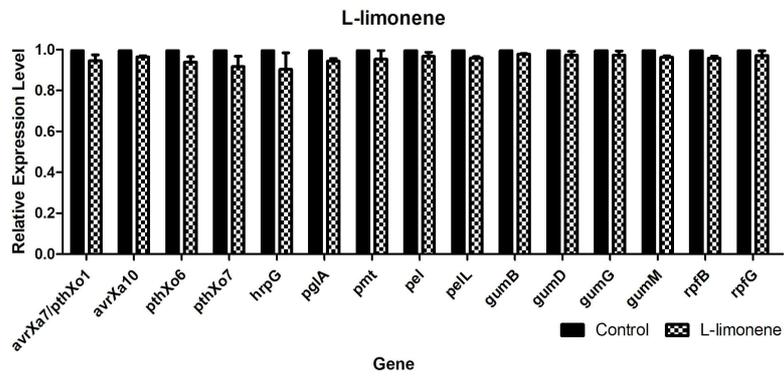
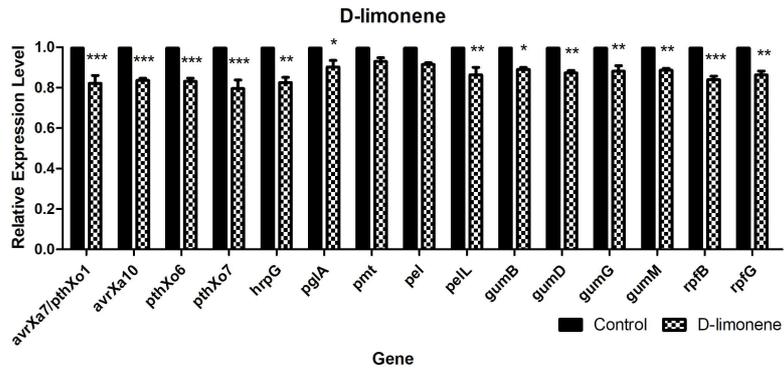
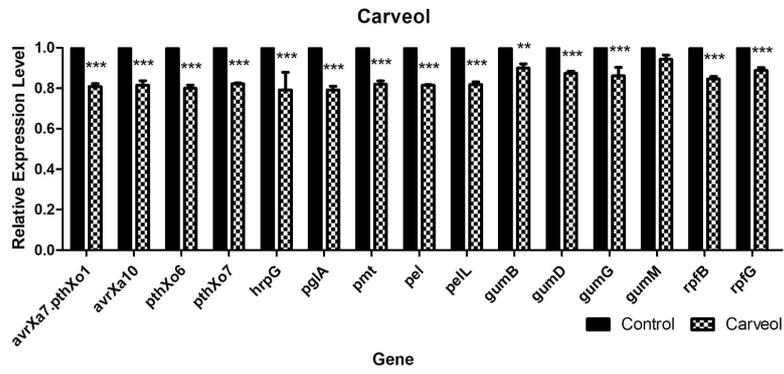
Gene	Primer sequence		Reference		
	Forward	Reverse			
Virulence	<i>avrXa7</i> /	GAGAGCATTGTTGCCAGTT	CGGCGATTGATTCTTCTGAT	This study	
	<i>pthXo1</i>				
	<i>avrXa10</i>	CGTGATGTGGGAACAAGATG	GTGTTGTAGAGGGCGACGAT		
	<i>pthXo6</i>	TCAGCAGCAGCAAGAGAAGA	CAACGCCCTGATTATGTCCT		
	<i>pthXo7</i>	GGCTTGGTACAGCTCTTTCG	GTCTGATCTCCCTCGTGCAT		
	<i>hrpG</i>	ACTCAGCGTTGGTCCATACC	TGCGCAGCTTGTAGATATGC		
	<i>pgIA</i>	TCGCTGGTTCCAAGGCATT	GGCTTTGCGAACGAGACCTTT		Tayi et al, 2016
	<i>pmt</i>	TGTTTCGACAATGCCCTCATCC	GCCACAAAGCGGCTATTGATCG		
	<i>pel</i>	TGCGTTTTCGGTAAGGTGCATCT	ACCGCTGATCTCGAACACATTACG		
	<i>pelL</i>	GCGCATCGAAATGATCAACC	TCGTCCAGGCTGACGAAAT		
Biofilm	<i>gumB</i>	ATCGTGTTCGCATGGTC	ATATCGCCGCCGTAATCTC		
	<i>gumD</i>	GCGTGCGATTGATGTTTC	GCGAGGAAGCTGTGTAAGT		
	<i>gumG</i>	GCCAATGGTTCAGTCTGTA	GCACGCAAGGCAATGTAAG		
	<i>gumM</i>	TGTTGAGACGACGGGAATTG	CTGCCAACGCATGGAATAGA		
	<i>rpfG</i>	GACGAGATGAGCGTGATGAA	GATAACCGGTGCCGTCATAA		
	<i>rpfB</i>	ACGCGGTGAAGCGGGTCTTT	ATCACTGCGCTGCCGCTGTA		

- 유전적 분석을 위한 RNA 추출 및 cDNA 합성
  - 화합물이 있거나 없는 NB 배지에서 배양한 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 culture를 TRI reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, USA)을 사용하여 용해시켰음. RNA를 chloroform으로 분리하고 isopropanol으로 침전시켰음. RNeasy mini kit (QIAGEN, Germantown, USA)를 사용하여 column 기반으로 분리된 RNA를 세척했음. 세척하는 동안 RNase-Free DNase Set (QIAGEN)을 사용하여 genomic DNA를 제거했음. cDNA 합성을 위해 PrimeScript™ IV 1st strand cDNA Synthesis Mix (TaKaRa, Shiga, Japan)를 제조자의 절차에 따라 수행하였음
  
- Real-time PCR 수행
  - Real-time PCR은 제조사의 지시에 따라 2X Real-Time PCR Master Mix (SCINOMICS, Daejeon, Korea)를 사용하여 수행하였음. PCR 주기는 95℃에서 15분, 95℃에서 20초, 58℃에서 30초의 40주기로 구성되었음. 16S rRNA의 발현 수준은 표적 유전자의 상대적인 발현 수준을 결정하는 데 사용되었음
  - 각 유전자의 상대적 발현 수준은 다음과 같이 계산하였음:  

$$\text{Relative Expression Level} = (\text{Target gene expression level of T} / \text{16S rRNA of T}) / (\text{Target gene expression level of C} / \text{16S rRNA of C})$$
 T는 화합물을 첨가한 배지에서 성장한 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*이고 C는 첨가하지 않은 배지에서 성장한 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 값임

다) 실험 결과

- Real-time PCR을 통한 유전적 분석
  - *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 성장을 억제하는 carveol의 최소 억제 농도인 1 mM보다 낮은 0.7 mM를 처리하였으며, D-limonene과 L-limonene은 실험을 진행한 최고 농도인 10 mM을 처리하여 분석하였음. 병원성 관련 유전자의 경우, carveol을 처리한 실험군의 상대적 유전자 발현량 차이는 대조군에 비해 낮았음. D-limonene은 *pmt*, 및 *pel* 유전자를 제외하고 유의미한 발현량의 차이를 보였음. Biofilm 관련 유전자를 분석한 결과, carveol, 및 D-limonene 모두 병원성 관련 유전자에 비해 적은 효과를 나타냈으며, 발현량 수치 또한 유사하였음. L-limonene을 처리한 결과, 병원성, 및 biofilm 형성에 관련이 있는 유전자 모두 처리하지 않은 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*의 유전적 발현량에 비해 유의미한 변화를 발견하지 못했음



[화합물을 처리한 *Xoo*의 virulence 및 biofilm 관련 유전자의 상대적 발현 수준 분석]

라. 공동과제 3

(1) 소재의 특성을 고려한 제형 전략화

① 리모넨 유도체의 선행 제형화 도출 사례 분석

가) 실험 목적

- 선행 사례 조사를 통한 제형화의 방향성 및 초기 제형 모델 설정

나) 실험 재료 및 실험 방법

- 국내 특허 및 작물 보호제, 유기농업자재 대상, 소재의 물성 특성을 고려한 키워드 검색

[특허 분석 범위 및 검색식]

구분	활용 DB	특허 검색 기준
국내특허	키프리스	공개 및 등록 특허 내 청구범위
대분류	검색식	검색결과
작물보호제	(제형 or 살충 or 살균 or 방역 or 친환경) and (작물보호제 or 도열병 or 흰 잎 마름병 or 리모넨 or 유기농업자재)	2,717건
물질의 성상	(오일 or 식물성 or 소수성 or 휘발성 or 유화제 or 계면활성제 or 안정제 or 유제 or 추출물 or 휘발성) and (제형 or 제품화 or 생산) and (작물보호제 or 시트러스오일 or 리모넨 or 리모넨 유도체 or 유기농업자재 or 터펜류)	4,010건
사전 10종 리모넨 유도체	(Limonene or L-carveol, carvone or Limonene oxide or perilly alcohol or terpineol or carvacrol or isopulegol or citrus oil) and (제형 or 작물보호제 or 유기농업자재)	484건 (주로 화장품, 발모제, 약학제)

다) 실험 결과

- 본 소재를 활용, 개발 선순위인 도열병, 흰잎 마름병 유발성 병원균 방제목적 대상의 유사 소재의 적용 사례는 확인 할 수 없으며, 살충제 및 구충제 3건, 작물 보호제 4건, 세정제 13건으로 주로 보조 원료로 활용이 제한됨
- 선행 발굴 소재 및 연구를 기반으로 제품화 시 유효 현장 방제 수준을 달성하기 위해, 현장 희석수 내 유효물질은 20mM 이상의 농도 필요, 100배 희석액으로 기준으로 원제에 유효물질이 3% 이상 함유가 필요함
- 반면 선행사례는 저농도 활용에 제한되나, 본 연구팀의 선행 소재의 함유농도와 상이하여, 제형 도출에 적합한 가이드라인을 살펴볼 순 없음

[선행 조사 대표 사례]

구분	권리자	년도	특허명	제형화 방법
구충제 등	㈜지웰바이오	2020	닭 진드기 살충제 조성물 및 이의 제조 방법	· 유효성분, 침투이행제, 0.1-0.5%(D-limonene oil)
	㈜창조바이오텍	2014	어류의 스퀴티카 치료용 조성물	· 리모넨 300mL, 디메틸설폭사이드 300mL, Tween 80 2.5g, Span 80 6.25g, Sea water 400mL · 리모넨 300mL, 시나믹 알데하이드 100mL, 디메틸설폭사이드 300mL, Tween 80 2.5g, Span 80 6.25g, Sea water 300mL · 리모넨 300mL, 유게놀 100mL, 디메틸설폭사이드 300mL, Tween 80 2.5g, Span 80 6.25g, Sea water 300mL · 리모넨 300mL, 시나믹 알데하이드 100mL, 유게놀 100mL, 디메틸설폭사이드 300mL, Tween80 2.5g, Span 80 6.25g, Sea water 300mL
	한국콜마(주)	2006	무좀 원인균에 대한 항균활성을 갖는 감국 정유와 이를 포함하는 무좀 예방용 화장료 조성물	· Citrus oil 10.0%, 디메치콘코포리올 10.0%, 사이클로메치콘 10.0%, 우레아 20.0%, 글리세린 20.0%, 트레메탄올아민 0.02%, 방부제 적량, 정제수 적량
작물보호제	동방아그로, 코셀	2020	살충제 조성물	· 몰포린 지방산염 70%, 계면활성제 20%, 보조성분 D-limonene 5%
	김채영	2016	살충제 조성물	· Citrus oil 15-35%, 식용유 30-55%, 식초 30-45% + 커피찌꺼기 추출액 30-45%, Citrus oil 10-45%, 고추씨 추출물

	바이오포스	2020	식물 정유를 유효성분으로 포함하는 천연 살충제 조성물	30-45% 혼합 · 안정화제 : Paraffin oil 11.0%, Castor oil 0.08%, Sesame oil 0.06%, Mustard oil 0.3% · 식물정유 : Anise oil 0.3%, Cinnamon oil 0.16%, Citronella oil 0.1%, Clove oil 0.1%, Dill Seed oil 0.08%, Eucalyptus oil 0.08%, Ginger oil 0.2%, Hinoki oil, 0.1%, Lavender oil 0.09%, Neem oil 1.1%, Rosemary oil 0.06%, Tea tree oil 0.1%, Thyme oil, 0.08%, Garlic oil 0.1% · 식물추출물 : Derris extract 15.0% · 부형제 : <u>D-limonene 0.11%</u> , Span 80 30%, Tween 80 30%, IPA 8.7%, Formic acid 0.3%, Tripton-X 100 1.0%
	농림축산식품부	2021	천연 식물 추출물 유래 항생제 대체제인 꿀벌의 미국 부저병 예방 및 치료용 조성물	· 에탄올 10%, 리모넨 5%, propylene glycol 10%, 글리세린 20%, 정제수 55%, 20-25°C 균질 혼합기 반응
세정제 등	㈜엠트	2011	솔잎 추출물을 함유한 스프레이용 조성물, 그 제조방법, 상기 스프레이용 조성물이 충전된 스프레이 장치, 스프레이식 손 소독 세정제 및 스프레이식 구강 청정제	· 솔 잎 추출물 0.1-30%, 정제수 30-75%, 에탄올 10-45%, 리모넨 0.001-3%
	미국(하이드로머 인 코포레이티드) Pct	2017	카르바크롤을 함유하는 항균성 비누 및 그 사용방법	· 정제수 89.9%, 증점제 0.2%, V-100 0.1%, Lecithin ultralec P 0.1%, 카바크롤 1.0%, 레몬 글라스 오일 0.8%, 폴리머 2,000
	㈜다래월드	2004	환경 친화적 기능성 세정제 조성물	· D-리모넨 2-3%, 천연 지방산 아자유 2-3%, 수용성 폴리머 4-5%, 5-크롤로-2-메틸-4-이소티아졸린-3 0.01-0.05%, 메틸 4-이소티아졸린-3 0.005-0.01%, 수용성 폴리아닐린 2-3%, SLES 4-5%, 마그네슘 염 0.05-0.1%, 에틸알코올 2-3%, 정제수 80-85%
	㈜제주클린산업	2019	감귤을 이용한 유아용 세탁세제	· Citrus oil 19-11%, 계면활성제 2.5-5.0%, 소듐카르복시메틸셀로이스 0.1-0.12%, 정제수 77.9-83.4%
	씨앤에스테크(주)	2021	친환경 세정제의 제조방법	· Citrus oil 5%, 락티에씨드 0.15%, 우레아 0.001%, L-멘톨 0.01%, 시리카 5.0%, 에탄올 25.0, 폴리옥시에틸렌화파마자유 0.4%, EDTA 0.05%, 방부제 적량, 정제수 적량
	애경정밀화학(주)	2007	터핀 오일을 포함하는 O/W 타입 마이크로에멀전 세정제 조성물 및 제조방법	· 터핀 오일 0.5-30%, 비이온 계면활성제 0.5-40%, 알콜 0.5-30%, 정제수 50-90%
	㈜영진	2013	염화세틸피리디늄과 오렌지 추출물이 함유된 주방 세제 조성물	· 염화세틸피리디늄 0.01-2%, Citrus oil 0.1-10%, 지방알콜 0.1-15%, 계면활성제 5-40%, 알킬 폴리클로코사이드 1-30%, 정제수 적량
	㈜네오팜	2004	산업용 세정제 조성물 및 그 제조방법	· 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르 17.5%, D-리모넨 65.3%, 정제수 4.4%, 디에틸렌 글리콜 모노부틸 에테르 16.7%
향료 조성물	김형길	2014	감귤향 조성물 및 그 제조방법	· Citrus gell 100%, Citrus oil 2%, 글리세린 20%, 정제수 70%
	한방향노화학연구원	2019	감귤꽃 정유를 유효성분으로 포함하는 뇌파에서 상대적 세타파는 감소시키고 상대적 알파파는 증가시키는 향료 조성물 및 이의 용도	· 감귤꽃 정유 1%, 폴리솔베이트 60 1.5%, 솔비탄세스퀴올레이트 0.5%, PEG60 2.0%, 파라핀오일 10.0%, 스크알란 5.0%, 카프릴릭 5.0%, 글리세린 5.0%, 부틸렌글리콜 6.0%, 정제수 적량
화장품	한국콜마주식회사	2006	감귤 정유를 함유하는 여드름에 유효한 화장품 조성물	· Citrus gell 100%, Citrus oil 2%, 글리세린 20%, 정제수 70%
	엘지생활건강	2020	한방향 유효성분 리모넨(Limonene)을 피부 유효성분으로 함유하는 화장품 조성물	· 천연화장수, 겔, 영양크림, 팩 등 · 대표 사례 : <u>D-limonene 0.1%</u> , 베타-1,3-글루칸 1.0%, 부틸렌글리콜 2.0%, 프로필렌글리콜 2.0%, 카르복시비닐폴리머 0.1%, PEG 12 0.2%, 폴리솔베이트80 0.4%, 에탄올 10.0%, 트리에탄올아민 0.1%, 방부제 0.05%, 색소 0.05%, 향료 0.05%, 정제수 적량

## ② 소재의 최종 제품화를 위한 보조제 DB 구축

### 가) 조사 목적

- 도출 대상 소재의 유기농업자재 등록을 위한 허용 원료 범위 조사

### 나) 실험 재료 및 실험 방법

- 유기농업자재 표준 지침 및 공시 및 품질 인증 기준 내 활용 가능한 물질로 분류되는 EPA List 3, 4 기준(미국 환경 보호국에서 지정하는 농약 제품에 허가된 불활성 성분목록)과 대조하여 계면활성제 DB를 구축함
- 도출소재는 유효물질 및 연속상이 오일류로 예상, 이에 대한 에멀전 제조 또는 분산제 용도로는 비이온 계면활성제가 지배적으로 활용됨

- 이에 선행 및 추가 도출 예상되는 소재간의 성상이 오일류로 예상, 에멀전 및 분산제 용도로 활용, 유효물질의 친유성기를 수용성을 유도하는 비이온성 계면활성제군을 채택함
- 다) 실험 결과
- 비이온성 계면활성제 23종, 점도증가제 15종, 고체 담체 5종, 방부제 5종을 선발함

[유기농업자재 허용 원료 성분 조사]

분류	물질명	EPA List	HLB value
비이온계면활성제	Tween 20	4B	16.7
	Tween 40	4B	15.6
	Tween 60	4B	14.9
	Tween 65	4B	10.5
	Tween 80	4B	15
	Tween 85	4B	11
	Span 20	3	8.6
	Span 40	4B	6.7
	Span 60	4B	4.7
	Span 65	3	2.1
	Span 80	3	4.3
	Span 85	3	1.8
	Ethanol	4B	-
	Acetone	3	-
	Lecithin	4A	7
	Methyl oleate	4B	-
	Triton X-100	3	13.4
	Triethyl citrate	3	-
	cetyl alcohol	4B	15.5
	stearic acid	4A	15.0
Polyoxyethylenemonotetradecylether (Laureth-5)	4B	11.0	
Dimethylsulfoxide	3	-	
Sulfatedcastoroil	4B	-	
점도증가제	Glycerine	4A	-
	Guar gum	4A	-
	Xanthan gum	4A	-
	PEG (400 보유)	4B	-
	Propylene glycol	4B	-
	Gelatin	4B	-
	Pectin	4B	-
	Carrageenan	4A	-
	Carob gum	4A	-
	Gum arabic	4B	-
	Paraffin oils	3	-
	Polyvinyl alcohol	4B	-
	Polyvinyl pyrrolidone	4B	-
	Dextrins	4A	-
	alpha-Cyclodextrin	4B	-
고체담체	Kaolin	4A	-
	Bentonite	4A	-
	Vermiculite	4A	-
	Zeolites	4A	-
	Diatomaceous earth	4A	-
방부제	Potassium sorbic acid	4A	-
	sodium sorbic acid	4B	-
	sodium benzoate	4A	-
	Ethyl p-Hydroxybenzoate	3	-
	Sodium Propionate	4B	-

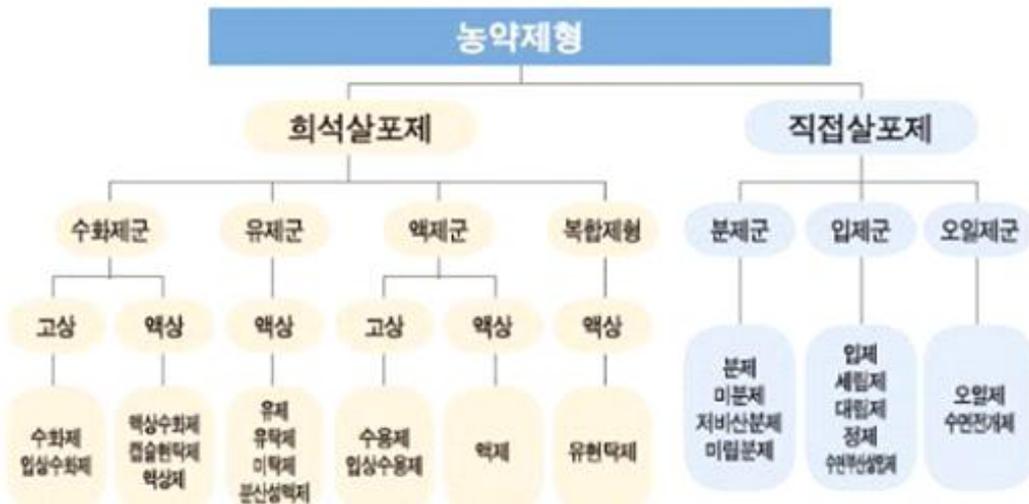
③ 원료의 성상에 기인한 도출 제형의 전략 수립

가) 실험 목적

- 원료 특성 및 제형의 안정성을 고려한 초기 제형 모델 결정

나) 실험 재료 및 실험 방법

- 농약 제형의 분류는 활용방법 측면에서 희석 살포 및 직접 살포 용도로 나뉨

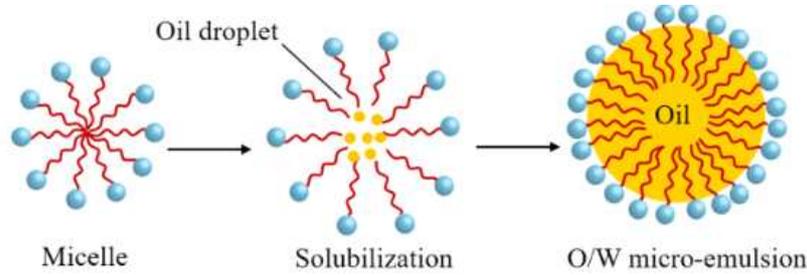


[농약 제형의 분류 체계도]

- 도출 소재의 원료 성상은 오일류, 성분의 함유 요구량이 상대적으로 높은 것으로 예상되었음
- 원료의 성상 및 함유량 기준으로 판단 시 유탁제(Emulsion in water, EW) 혹은 미탁제(Microemulsion, ME)가 적합 판단되었음
- 이에 미탁제의 일반적 처방전을 조사, 이는 살충제 제형별 품질 효력 시험 자료집, 2014 자료를 기본으로 선행 자료를 추가 참조함

다) 실험 결과

- 미탁제형의 일반적 특성
  - 유탁제의 기능을 개선한 것으로, 유기용매의 사용 지양, 투명한 성상을 보임이 특징임
  - 유화입자의 미세화가 특징으로, 물리학적으로 에너지를 가하기 위해 homogenizer 및 고회전의 교반 에너지를 통한 물리적인 에너지를 가하거나, 유화제의 복합 성상 적용 또는 함량을 증가시켜 미세 유화 입자를 얻음
  - 미세 입자는 유제나 유탁제에 비해 전달력 및 침투성 우수, 높은 방제가를 도출 시 유리함
  - 또한 보다 안정화 된 계면을 형성하여 높은 유화 안정성으로 제품 저장 안정성이 우수함
- 제조방법 및 변수 인자 설계
  - 기본 유화 조건 : 원료의 소재가 포함된 오일 담채 유화제를 혼입 → 연속상인 물을 추가로 첨가하며 교반 → 유상에서 수상으로 연속상 전환 O/W 에멀전화를 기본으로 설계, 이를 반전 유화법 또는 agent-in-oil 기법이라 함
  - 유화 조건의 특징 : 통상적으로 가장 많이 활용 되어지는 방법, 수상에 계면활성제를 직접 용해 한 것 대비 미세한 에멀전 입자를 얻을 수 있는 장점이 있음
  - 공정 설계 인자 : 성상의 원료의 특성을 고려하여 유화 안정성을 확보하기 위하여는 1) 친유, 친수성 계면활성제의 복합 처리, 2) 반응온도, 3) 교반력, 4) 수상의 첨가속도 등 미세 입자 및 성상의 안정성이 고려되는 다양한 Paramater 조작성이 요구됨
  - 추가 안정제 : 유화층의 수직 이동성을 억제하고 제형의 안정성을 추가 확보를 위해 비중 조정제 및 점증제를 활용, 현장적용 시 목적부위의 유효성분의 체류성을 증가시킬 수 있는 추가 수단으로 활용함



[대표 제형의 단계별 상거동 특성 및 제형 범위]

## (2) 리모넨 유효성분 조성물의 농가 현장 평가(1차 검증)

### 가) 실험 목적

- 선행 도출 리모넨 유도체를 활용한 예비제형 제조 및 이를 통한 현장단위 흰잎마름병 방제효율평가를 통해 실용화 가능여부를 판단

### 나) 실험 재료

- 병원균 :  $1.0 \times 10^5$  Cfu/mL로 *Xanthomonas campestris* pb. *oryzae*를 조절 감염
- 양성 대조구 : 흰잎마름병 효능효과 공시 유기농업자재(방제가 50%)
- 공시품종 : 보람찬
- 시험구 1 : D-limonene(95% purity, Coseal) 미탁제형
- 시험구 2 : Carvacrol(97% purity, Alfa aesar, 시약급) 미탁제형
- 시험구 3 : Carveol(98% purity, TCI, 시약급) 미탁제형
- 본 시험구의 시료 제조 공정은 단계평가보고서 내 제시, 최종 보고서 내 미수록

[1차 농가 현장 평가 시료의 제조 및 생산 처방전]

구 분	D-limonene	Carveol	Carvacrol
시료의 물성/ 유화입자형태			
HLB value	14.8	16.0	16.2
유화제 종류	S20, T20	S20, T20, TX 100	S20, T80
유화제 함량	15%		
원료의 함량	30%		
안정제 종류 및 함량	Xanthan gum 0.2%		
희석수	Rest		
반응 온도	50℃		
교반 속도	300RPM		
수상첨가속도	2.5%, (Vw / Vt)/sec Vw, 물의 공급량(Volume), Vt, 혼합물의 총량(Volume)		

### ▪ 인위 접종 및 약제 처리 방법(순서)

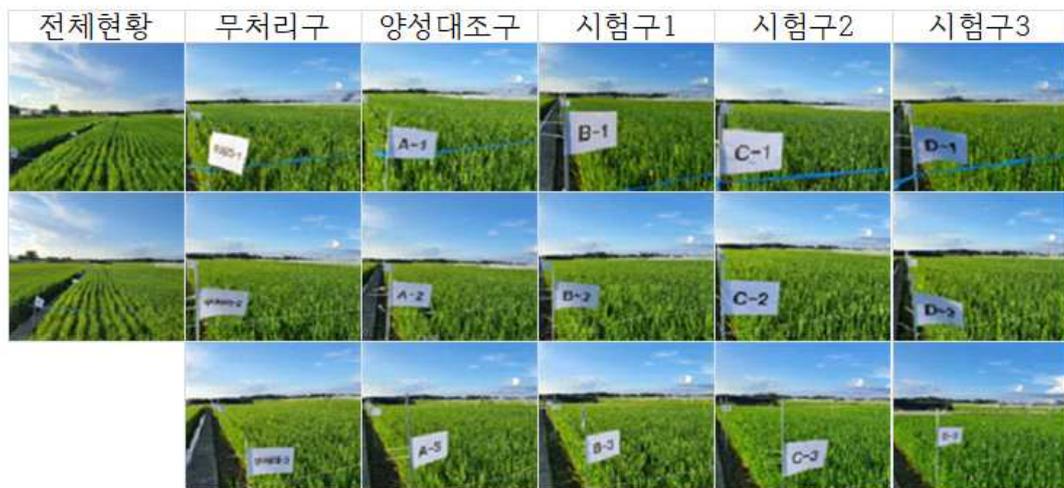
- ① 높이가 동일한 작물의 지·차엽에 대한 가위 절단을 통한 병원균 유입경로 생성함
- ② 약제 처리 : 병원균 감염 이전 침투부(절단부)에 처리약제 분무 도포함
- ③ 인위 감염 : 약제 처리 수시간 경과 후, 침투(절단부)에 *X. campestris* pb. *oryzae* 분무 접종함

다) 현장실험방법

- 병원균 :  $1.0 \times 10^5$  CfU/mL로 *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*를 조절 감염
- 인위 접종 및 약제 처리 방법(순서)
  - ① 높이가 동일한 작물의 지·차엽에 대한 가위 절단을 통한 병원균 유입경로 생성함
  - ② 약제 처리 : 병원균 감염 이전 침투부(절단부)에 처리약제 분무 도포함
  - ③ 인위 감염 : 약제 처리 수시간 경과 후, 침투(절단부)에 *X. campestris* pv. *oryzae* 분무 접종함
- 공시품종 : 보람찬
- 재배 및 처리구 배치
  - 재배이력 : 인위감염(21. 08. 20), 종료(21.09.17)
  - 재배환경 : 국립식량과학원 시험포를 임대활용, 수잉기 이후 환경
  - 처리구 면적 및 배치 : 완전임의배치법(3반복), 각 구획별 44.2m<sup>2</sup>, 800주
  - 처리구 설정 방법

[처리구의 설정 방법]

처리구	시료명	약제 처리량	인위 접종량
무처리	-	멸균수 3L / 44.2m <sup>2</sup> 균일 살포	10 <sup>5</sup> CfU/mL, 3L 배양액/ 4.2m <sup>2</sup> 균일 살포
양성대조구	관행제품	500배 희석액 3L / 44.2m <sup>2</sup> 균일 살포	10 <sup>5</sup> CfU/mL, 3L 배양액/ 4.2m <sup>2</sup> 균일 살포
시험구1	D-limonene	13mM 현탁액 3L / 44.2m <sup>2</sup> 균일 살포	10 <sup>5</sup> CfU/mL, 3L 배양액/ 4.2m <sup>2</sup> 균일 살포
시험구2	Carvacrol	13mM 현탁액 3L / 44.2m <sup>2</sup> 균일 살포	10 <sup>5</sup> CfU/mL, 3L 배양액/ 4.2m <sup>2</sup> 균일 살포
시험구3	Carveol	13mM 현탁액 3L / 44.2m <sup>2</sup> 균일 살포	10 <sup>5</sup> CfU/mL, 3L 배양액/ 4.2m <sup>2</sup> 균일 살포



[시험포 및 시험구역 현황]

- 발병률 측정 방법
  - 측정 기준 : 농약 및 원제의 등록 기준(약효 시험기준과 방법 ; 제 5조 제 1항 제2호)
  - 발병률 조사 : 각 구획별 완전임의배치법(3반복)을 기준, 각 반복 구획별 10주 이상의 대상 조사주에서 대표경의 지엽을 대상으로 무작위의 선발, 대상 잎의 병반 침투 길이를 조사함



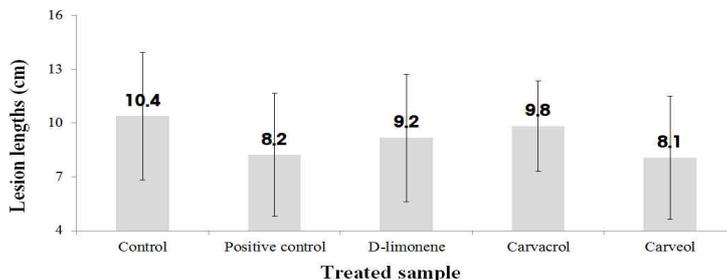
[발병률 측정 방법]

다) 실험 결과

- 현장 육안 달관 관찰
  - 현장에서 병원균을 처리한 모든 시험구역이 병증이 고르게 발생함을 확인됨
  - 세밀한 병반 형성을 평가하기 위해 실험실 내 시료를 이송하여 병반의 침투 길이를 측정함
- 작물 대표경의 병반 침투 현황
  - 무처리의 병반 침투는 평균 10.4cm, 양성대조구 및 전 시험구들 모두 무처리 대비 병반침투가 억제된 결과를 보임
  - 시험구2(Carveol) : 8.1cm > 양성대조구(관행제품) : 8.2cm > 시험구1(D-limonene) : 9.2cm > 시험구3(Carvacrol) 9.8cm
  - 양성 대조구(관행제품) 대비 유사 또는 이상의 억제 결과를 보이는 리모넨 유도체는 Carveol로 상업적 소재의 가용 여부 판단 시, 가장 우수한 소재로 판단됨

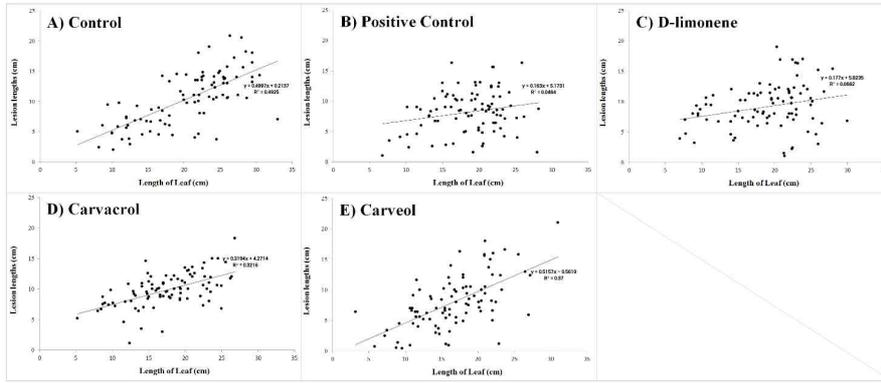
무처리구	양성대조구	시험구 1	시험구 2	시험구 3
평균 10.4±3.554cm	8.2±3.436cm	9.2±9.560cm	9.8±2.516cm	8.1±3.429cm
Average Lesion lengths (12.4cm)	Average Lesion lengths (8.6cm) Control (10.4cm)	Average Lesion lengths (9.7cm) Control (10.4cm)	Average Lesion lengths (11.5cm) Control (10.4cm)	Average Lesion lengths (10.4cm) Control (10.4cm)
Average Lesion lengths (12.1cm)	Average Lesion lengths (7.4cm) Control (10.4cm)	Average Lesion lengths (9.6cm) Control (10.4cm)	Average Lesion lengths (9.7cm) Control (10.4cm)	Average Lesion lengths (9.5cm) Control (10.4cm)
Average Lesion lengths (8.6cm)	Average Lesion lengths (6.6cm) Control (10.4cm)	Average Lesion lengths (8.2cm) Control (10.4cm)	Average Lesion lengths (8.5cm) Control (10.4cm)	Average Lesion lengths (4.5cm) Control (10.4cm)

[구획별 작물 대표경의 침투 현황]



[물질 처리별 평균 병반 침투 결과 비교]

- 농약 및 원제의 등록기준에서 방제가 조사기준 설계
  - 농약 및 원제의 등록 기준(약효 시험기준과 방법 ; 제5조제1항제2호)에서 벼 흰잎마름병은 발병율을 조사, 조사 대상은 조사수에서 대표경의 지차엽 3엽의 이병율을 조사함(10-1-1-5-2-3-1-3항)
  - 현장에서 Random하게 조사주를 채취, 대표경의 지엽을 분리하여, 대상 병반을 확인함



[구획별 작물의 생육과 병반과의 상관성]

- 지엽의 생육 정도에 따라 병원균의 침투정도에 영향을 미칠 수 있을 것으로 예상, 본 영향을 배제하고자 생육도가 동일하다는 가정으로 조사주의 절단부의 수직적 높이가 동일한 지엽을 대상으로 실험을 개시함
- 반면 조사주의 절단부의 수직적 높이가 동일한 지엽을 분리하여 잎의 길이를 측정 하였을 때, 결과는 상당한 차이를 보임
- 채취한 지엽의 길이에 따라 전 시험구들 모두 병반의 침투가 증가되는 관계성을 보였고, 향후 현장에서 시료를 채취할 시 지엽의 길이가 유사한 시험구들을 집단화하여 측정하는 것이 바람직할 것으로 보임
- 금회 현장실증 채취 조사주의 지엽에 대한 길이를 집단화하여 분석결과를 도출하고자 하였으나, 표본량이 미흡, 유의미한 경향을 살펴볼 수 없었음
- 관행 방제가 산출법을 이용한 방제값 산출
  - 농약 및 원제의 등록 기준(약효 시험기준과 방법 ; 제5조제1항제2호 관련)에 준한 벼 흰잎 마름병의 발병률 산출 수식은 이병엽수의 진단에 따르며 대상 옆의 병반 면적에 대비하여, 상위 무, 소, 중, 다, 심으로 나뉘어 진단함
  - 이에 대한 무 발병률을 샘플수로 포함하여, 최종 방제가를 도출함

$$= \frac{(\text{소의합} \times 1) + (\text{중의합} \times 3) + (\text{다의합} \times 5) + (\text{심의합} \times 7)}{\text{조사엽수} \times 7} \times 100$$

0	(무) = 0%	1	(소) = 1 ~ 10%
3	(중) = 10.1 ~ 25%	5	(다) = 25.1 ~ 50%
7	(심) = 50%이상		

[벼 흰잎 마름병 발병률 산출 수식]

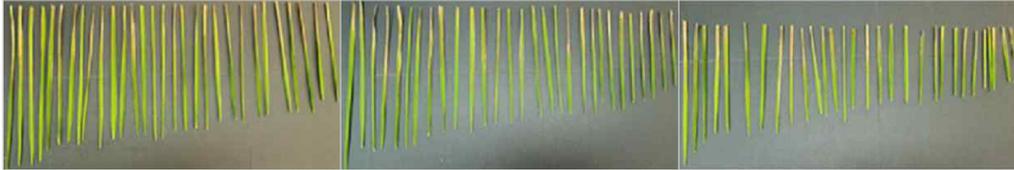
- 예를 들어 관찰자가 10 엽수에 대한 측정 시 상위 병반의 면적을 육안으로 평가, 무, 소, 중, 다, 심으로 엽을 진단함
- 무1, 소1, 중 2, 다3, 심3으로 구분하였다면, 발병률은 아래와 같이 61.4%로 집계되어짐

$$\frac{[(\text{소구분 입수} : 1) \times 1] + [(\text{중구분 입수} : 2) \times 3] + [(\text{다구분 입수} : 3) \times 5] + [(\text{심구분 입수} : 3) \times 7]}{\text{조사엽수}(10) \times 7} \times 100 = 61.4\%$$

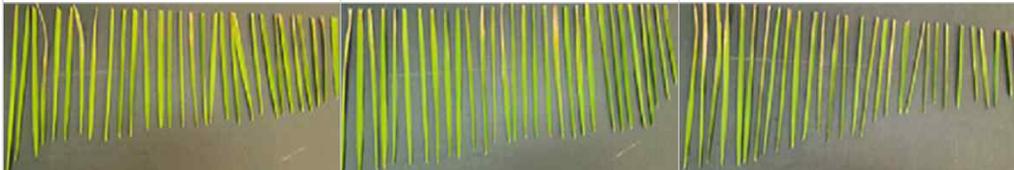
[벼 흰잎 마름병 발병률 산출 예시]

- 유기농업자재 공시 분석 기관 문의 시, 병반의 진단은 정확한 병반의 면적을 정량적으로 산출하는 것이 아니며, 관찰자의 달관성 관찰로 무, 소, 중, 다, 심으로 구분하는 것으로 확인됨

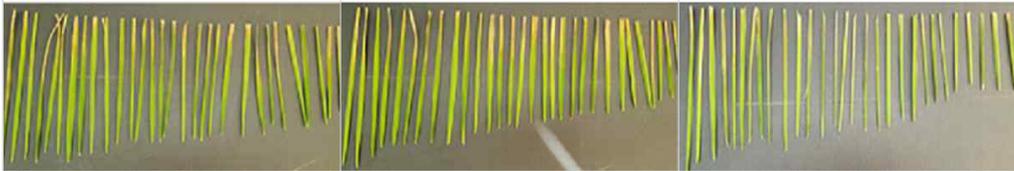
- 이에 현행 방제가 산출방법을 이용한 소재별 처리에 의한 발병률 및 방제가를 아래와 같이 제시함

반복구 1		반복구 2		반복구 3	
					
구분 표본수					전체 표본수
소	중	다	심		
16	28	29	17	90	

[농약 및 원제 등록 기준의 벼 흰잎마름병 발병률 산출 과정(무처리)]

반복구 1		반복구 2		반복구 3	
					
구분 표본수					전체 표본수
소	중	다	심		
30	28	23	9	90	

[농약 및 원제 등록 기준의 벼 흰잎마름병 발병률 산출 과정(시험구 1)]

반복구 1		반복구 2		반복구 3	
					
구분 표본수					전체 표본수
소	중	다	심		
16	35	26	13	90	

[농약 및 원제 등록 기준의 벼 흰잎마름병 발병률 산출 과정(시험구 2)]

반복구 1		반복구 2		반복구 3	
					
구분 표본수					전체 표본수
소	중	다	심		
42	21	18	7	90	

[농약 및 원제 등록 기준의 벼 흰잎마름병 발병률 산출 과정(시험구 3)]

- 무처리구 대비 양성대조구 및 전시험구들 모두 낮은 발병률 및 높은 방제가가 확인됨
- 양성대조구 60% > 시험구3(Carveol) 59.0% > 시험구1(D-limonene) 53.7% > 시험구 2(Cavacrol) 45.7% > 무처리 41.8%
- 시험구 중에서는 Carveol이 59.0%의 방제가로 양성대조구와 유사수준을 보임
- Carvacrol은 무처리와 큰 차이가 없는 수준을 보임
- 본 산출된 방제가는 시료별 시험군간의 병반 침투길이에 의한 상대비교와 대조하여 방제가의 수치는 차이가 있으나, 방제력 순위에서는 유의한 결과를 보임

[농약 및 원제 등록 기준의 발병률 및 방제가 산출 결과]

구분 : 약제	발병률(%)	방제가(%)
무처리 : 물처리	58.2±4.301	41.8±4.301
양성대조구 : 유기농업자재	40.0±1.543	60.0±1.543
시험구 1 : D-limonene	46.3±9.113	53.7±9.113
시험구 2 : Cavacrol	54.3±1.555	45.7±1.555
시험구 3 : Carveol	41.0±4.330	59.0±4.330

■ 결과 고찰

- 선행 소재를 활용한 제형화를 거쳐 현장 적용실험에 의한 관행제품과의 최소 유사 수준의 방제력을 확인함
- 반면 희석액 수준에서 20mM의 높은 함량이 요구(100배 희석기준 원제 30%이상), 시약 급 생산단가는 468,600원/L로 제조 단가 측면에서 실용화 가능성은 낮으므로 산업화 원료등을 고려한 생산단가 절감이 필요함
- 또한 현장적용실험의 연구 체계화 및 노하우를 습득하였음

(3) 상업용 소재를 활용한 제형 최적화

① 상업용 소재의 공급처 확보 및 상업용 소재의 결정

가) 실험 목적

- 유기농업자재 등록을 위한 자연유래생산 및 공급단가가 우수한 상업용 생산 원료의 확보를 위한 공급처 탐색

나) 실험 재료 및 실험 방법

- B2B 해외 무역사이트를 대상으로 공급 여부를 탐색함
  - Alibaba, EC21, ecplaza, Aliexpress, amazon.com, ebay, target.com, doba.com등 Global open market
- 자연 추출공정, 원료의 순도, 원료의 안전성, 공급단가등을 중점으로 공급처를 조사

다) 실험 결과

- 최초 D-limonene을 비롯한 5종의 유도체들이 상업용 소재의 1차 후보였으나, 생산단가 및 공급능력 등 을 고려하여 최종 3종의 상업화 원료가 선발됨
  - 대상 시료의 정보 : D-limonene oil 95%(Florida Chemical, Pure essential oil grade)), Carveol oil 100% (xianluo, Pure essential oil grade)), L-limonene oil 75%(Jiangxi Senhai Natural plant oil , Pure essential oil grade)

[상업화 소재의 목표함량 및 제품의 생산 단가]

Sample	원료의 구매단가	함유목표치(%) <sup>a</sup>	생산비용 <sup>b</sup>	목표판매가 <sup>c</sup>	판매가 내 원재료비 비중 <sup>d</sup>	비고
D-limonene	8,300원/kg	40%	5,320원/L	35,000원/L	≥ 15.2%	선발
Carvacrol	66,938원/kg		28,775원/L		≥ 82.2%	제외
Carveol	23,552원/kg		11,421원/L		≥ 32.6%	선발
Perillyl alcohol	16,114,800원/kg		6,447,920원/L		≥ 18,422.6%	제외
L-limonene	1,884원/kg		2,753원/L		≥ 7.9%	선발

a : 제품 내 원재료(알콜류)의 혼입량(W/W)%, b : 선발 시료를 활용한 제품 예상 생산가, c : 시중에서 형성되는 판매단가, d : 최종 판매가 내 원재료비의 비중, 제조 업 기준상 30% 내외의 범위가 바람직함

## ② 상업용 소재의 HLB 값 도출

### 가) 실험 목적

- 상업용 원료를 이용한 제형개발을 위한 소재 별 최적 HLB 값 도출

### 나) 실험 재료 및 실험 방법

- 대상소재 : D-limonene oil 95%(Florida Chemical, Pure essential oil grade), Carveol oil 100% (xianluo, Pure essential oil grade), L-limonene oil 75%(Jiangxi Senhai Natural plant oil, Pure essential oil grade)
- 대상시료: 선발된 소재 3종 및 이들을 혼합한 원료 3종, 총 6종을 대상으로 함
- 계면활성제 : 실험실 규모에서 선발된 복합계면활성제 상업용 등급(계면활성제 선발 과정은 단계평가보고서 내 제시, 최종 보고서 미수록)
- 유화조건(유화조건 최적화 과정은 단계평가보고서 내 제시, 최종 보고서 미수록)
  - 유화 1단계 : Liquid crystalline Phase가 형성될 때까지 서서히 첨가함
  - 유화 2단계 : White gel Phase가 형성되도록 적량의 연속상을 일시에 첨가함
  - 유화 3단계 : White gel Phase에 나머지 연속상을 서서히 첨가하여 연속상의 첨가가 끝난 후 10분간 50℃ 환경 아래 용해 시킨 후, 50RPM의 교반력을 유지함
  - 최종 72시간 경과 시 유화 안정성을 평가하여 대상 소재의 HLB 값을 도출함

$$\frac{(W_A \times HLB_A) + (W_B \times HLB_B)}{W_A + W_B} = HLB_{complex}$$

$W_A$  Ratio of surfactant A       $W_B$  Ratio of surfactant B  
 $HLB_A$  HLB value of surfactant A     $HLB_B$  HLB value of surfactant B  
 $HLB_{complex}$  HLB value of complex surfactant

[복합 계면활성제의 HLB value 산출 기준 ; HLB system]

[후보 소재 및 HLB 값 산출을 위한 재료 및 조건]

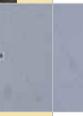
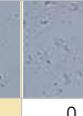
Sample	유효성분의 배합비(W/W)	HLB 산출을 위한 상업용 유화제
D-limonene	1	Span20 Tween 20
L-limonene	1	Span20, Tween 20
Carveol	1	Lecithin, TrionX-100
D-Limonene + L-limonene	1:1	Span20, Tween 20
D-limonene + Carveol	1:1	Span20, Tween 20
L-limonene + Carveol	1:1	Span20, Tween 20
기본 유화 조건		
유화제 함량		20%
반응온도		30℃
교반속도		50RPM
수상첨가속도		2.5%, (Vw / Vt)/sec
<small>Vw, 물의 공급량(Volume), Vt, 혼합물의 총량(Volume)</small>		

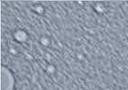
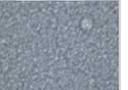
### 다) 실험결과

- D-limonene : HLB 값 산출 결과 1차 14.5-15.5, 2차 14.8-15.2, 이중 15.0 구간이 72시간 경과 후 평균 입자경이 0.17 μm, 0.1 μm미만의 미세입자가 74.1%로 가장 우수한 미세입자 유지력을 보임, 이에 최종 HLB 값을 15.0으로 결정함
- L-limonene : 1차 15.0-15.5, 2차 15.0-15.4, 이중 15.2구간에서 72시간 경과시 평균 입자경이 0.17 μm, 0.1 μm미만의 미세입자가 57.4%로 가장 우수한 입자 유지력을 보임, 이하 HLB 값은 이하 15.2로 반영함

- Carveol : 1차 15.5-16.0, 2차 15.2-16.4, 이 중 16.2구간에서 72시간 경과 시 0.54  $\mu\text{m}$ , 0.1  $\mu\text{m}$ 미만의 미세입자가 45.2%로 가장 우수한 미세입자 유지력을 나타냄, Carveol의 HLB 값은 16.2로 결정함
- D-limonene + L-limonene 혼합 소재 : 1차 15.0-15.5, 2차 14.8-15.6 구간에서 원활한 유화성이 확인되며, 이 중 15.2구간에서 72시간 경과 후 평균입자경이 0.26  $\mu\text{m}$ , 0.1  $\mu\text{m}$ 의 미세입자가 49.8%로 가장 우수한 미세입자 유지력을 보임. 이에 D-limonene+L-limonene 상업 소재의 최적 HLB 값은 15.2로 결정함.
- D-limonene + Carveol 혼합 소재 : 1차 14.0-14.5, 2차 13.8-14.5구간에서 원활한 유화성이 확인되며, 14.2구간에서 72시간 경과 후 평균입자경이 0.79  $\mu\text{m}$ , 1.0  $\mu\text{m}$ 이하의 미세입자가 87.1%로 가장 우수한 미세입자 유지력을 보임에 최종 HLB 값은 14.2로 결정됨
- L-limonene + Carveol 혼합 소재 : 1차 13.0-14.0, 2차 13.2-14.0구간에서 원활한 유화성이 확인, 이 중 13.8 구간에서 72시간 경과 후 평균입자경이 0.67  $\mu\text{m}$ , 1.0  $\mu\text{m}$ 이하의 미세입자가 86.1%로 가장 우수한 미세입자 유지력을 보여, HLB 값을 13.8로 결정함

[후보 소재의 HLB 산출 결과]

성분명		내용				
D-limonene	HLB 구간	14.8	14.9	15.0	15.1	15.2
	유화 형태					
	입자 형태					
	평균입자 크기( $\mu\text{m}$ )	0.350 $\pm 1.596$	0.219 $\pm 1.644$	0.169 $\pm 1.846$	0.207 $\pm 1.664$	0.306 $\pm 1.433$
	미세입자분포(%) < 0.1 $\mu\text{m}$	49.2	67.2	74.1	65.4	51.7
	L-limonene	HLB 구간	15.0	15.1	15.2	15.3
유화 형태						
입자 형태						
평균입자 크기( $\mu\text{m}$ )	0.472 $\pm 1.398$	0.326 $\pm 1.609$	0.251 $\pm 1.567$	0.370 $\pm 1.690$	0.481 $\pm 2.034$	
미세입자분포(%) < 0.1 $\mu\text{m}$	38.2	49.4	57.4	51.2	40.4	
carveol	HLB 구간	15.6	15.8	16.0	16.2	16.4
	유화 형태					
	입자 형태					
	평균입자 크기( $\mu\text{m}$ )	1.771 $\pm 2.669$	1.078 $\pm 1.785$	0.699 $\pm 1.242$	0.541 $\pm 1.269$	0.842 $\pm 1.013$
	미세입자분포(%) < 0.1 $\mu\text{m}$	11.2	17.5	32.1	45.2	30.5
D-limonene +	HLB 구간	14.8	15.0	15.2	15.4	15.6

L-limonenel	유화 형태					
	입자 형태					
	평균입자 크기(μm)	0.480 ±2.514	0.333 ±1.440	0.260 ±1.514	0.327 ±1.432	0.409 ±1.598
	미세입자분포(%)< 0.1μm	22.5	39.4	49.8	38.7	33.5
	HLB 구간	13.8	14.0	14.2	14.4	14.5
D-limonene + Carveol	유화 형태					
	입자 형태					
	평균입자 크기(μm)	1.284 ±4.727	0.941 ±3.250	0.655 ±3.023	1.093 ±4.462	1.251 ±4.448
	미세입자분포(%)< 0.1μm	2.4	4.1	5.2	3.0	2.8
	HLB 구간	13.2	13.4	13.6	13.8	14.0
L-limonene + Carveol	유화 형태					
	입자 형태					
	평균입자 크기(μm)	1.394 ±4.315	1.214 ±3.659	0.807 ±2.813	0.689 ±2.794	0.896 ±2.941
	미세입자분포(%)< 0.1μm	2.1	2.6	3.8	5.6	3.2
	HLB 구간	13.2	13.4	13.6	13.8	14.0

### ③ 미탁제형의 도출 : 유화제 함량 결정 시험

#### 가) 실험 목적

- 선발된 6종 단독 혹은 복합 산업 grade 소재에 대한 침투성 및 안정성이 용의한 미탁제형 처방전 설계

#### 나) 실험 재료 및 실험 방법

- 대상소재 및 시료 : 상위 ② 상업용 소재의 HLB값 도출과 동일함
- 기본생산조건 : 제형 예비실험을 결과를 기본(최적화 기준, 단계평가보고서 제시, 최종 보고서 내 미수록)으로 하였고, 유화제 첨가에 의한 입도분석의 비교 평가로 미탁제형의 완성도를 평가함

#### [미탁제형의 기본 생산 조건]

구분	내용
유화제 함량	15,20,25,30%
반응온도	30℃
교반속도	50RPM
수상첨가속도	2.5%, (Vw / Vt)/sec Vw, 물의 공급량(Volume), Vt, 혼합물의 총량(Volume)
반응수	Rest

- 미탁제형의 최적 선발 방법

- 평균입자크기 =  $\sum n / N$  : 시간별 유화입자의 평균 크기

- 입자증가속도 =  $t \sum n / t_0 \sum n^{(1/t-t_0)}$  : 단위시간당 입자의 증가속도
- 입자유지력지수 =  $\sum n / \sum (t-t)^2 \times n$  : 시간당 입자의 평균크기를 기준으로 작성된 곡선을 정규분포곡선으로 할 때 분산의 역수를 의미, 입자 유지력 지수의 값이 클 수록 입자의 유지력이 큼
- 재혼합지수 =  $(\sum n / N)t / (\sum n / N)t_0$ : 72시간 경과 후 방치된 시료를 손으로 흔들어 혼합, 초기 혼합 직후 대비 유화입자 크기를 대조, 수치가 작을수록 생산 직후와 유사한 유화 안정을 제공함
- 희석수 제조능력 = 희석수와의 반응(100, 250, 500배), 72시간 경과 후 표면상의 층분리 개시 육안평가  
[ n = 입자별 직경합계, N = 입자의 개수, t = 조제 후 관찰시간, t0 = 조제직후 관찰시간]
- 최종 선발 = 각 평가 최우수 그룹의 결과를 기준점을 1로 두었고, 비율적 산정과 증을 통해, 점수화 한 후 합계하여 수치화 정량 비교로 완성도를 평가 선정함

다) 실험결과

▪ 유화제 함량에 따른 유화 특성

- 전체적인 시험구 모두 유화제의 함량에 따라 미세입자화가 촉진되었고, 혼합 직후 ① D-limonene(0.194-0.129 μm); ② D+L-limonene(0.278-0.185 μm); ③ L-limonene(0.368-0.279 μm), 72시간 경과 시 ① D-limonene(0.527-0.255 μm) ② D+L-limonene(0.617-0.371 μm); ③ L-limonene(0.944-0.595 μm) 순으로 미세화 결과를 보임과 동시에 D-limonene 및 L-limonene 소재에서 미세유화 특성이 상대적으로 우수한 결과, Carveol이 포함된 시료 조건에서는 유화입자의 크기 및 미세 유지력이 감소되는 결과를 보여줌
- 재혼합 시 ① D+L-limonene(0.332-0.177 μm); ② D+L-limonene(0.352-0.252 μm), ③ L-limonene(0.568-0.399 μm)의 결과로 조제 직후보다는 다소 증가, 반면 500배까지의 희석반응에서도 균질한 혼합상태를 확인함
- 유화제의 함량 증가에 따라 유화입자 및 안전성 지표의 개선정도는 확인, 반면 20-25%의 함량 초과 시 개선정도는 감소함

[산업화 소재를 적용한 미탁제형의 유화제 함량 별 유화특성]

유효성분	유화제 함량 (W/W)	유화입자 현황	혼합직후 입자경 (μm)	72시간 입자경 (μm)	재혼합 입자경 (μm)	입자증가속도 (%/hr)	입자 유지력지수	재혼합지수	희석수 제조 능력
D-limonene	15%		0.194 ±4.27	0.527 ±5.44	0.322	1.42	0.183	1.66	≥500time
	20%		0.142 ±3.99	0.297 ±4.27	0.211	1.04	0.191	1.49	≥500time
	25%		0.133 ±3.44	0.277 ±3.89	0.189	1.04	0.191	1.42	≥500time
	30%		0.129 ±3.27	0.255 ±3.14	0.177	0.96	0.193	1.37	≥500time
L-limonene	15%		0.368 ±3.211	0.944 ±3.644	0.568	1.13	1.723	1.27	≥500time
	20%		0.312 ±2.911	0.714 ±3.627	0.499	1.04	1.349	1.35	≥500time
	25%		0.288 ±2.514	0.654 ±4.144	0.436	1.01	1.194	1.35	≥500time
	30%		0.279 ±2.827	0.595 ±3.958	0.399	0.98	1.107	1.36	≥500time

Carveol	15%		0.955 ±7.162	4.566 ±8.111	0.568	2.23	0.167	1.77	≥ 500time
	20%		0.723 ±4.988	2.644 ±9.254	0.499	1.84	0.173	1.55	≥ 500time
	25%		0.629 ±4.274	1.987 ±12.144	0.436	1.63	0.177	1.57	≥ 500time
	30%		0.555 ±5.111	1.776 ±10.199	0.399	1.65	0.176	1.42	≥ 500time
D+L limonene	15%		0.278 ±3.258	0.617 ±4.999	0.352	1.13	1.723	1.27	≥ 500time
	20%		0.221 ±3.277	0.462 ±4.114	0.299	1.04	1.349	1.35	≥ 500time
	25%		0.199 ±4.144	0.405 ±3.888	0.268	1.01	1.194	1.35	≥ 500time
	30%		0.185 ±3.998	0.371 ±3.297	0.252	0.98	1.107	1.36	≥ 500time
D-limonene + Carveol	15%		1.105 ±6.552	5.651 ±9.144	2.052	2.325	0.165	1.86	≥ 500time
	20%		0.897 ±3.958	3.999 ±7.525	1.377	2.128	0.167	1.54	≥ 500time
	25%		0.699 ±5.222	2.955 ±8.552	1.125	2.051	0.169	1.61	≥ 500time
	30%		0.645 ±4.984	2.679 ±6.414	0.999	2.026	0.169	1.55	≥ 500time
L-limonene + Carveol	15%		0.995 ±8.222	4.821 ±13.524	1.544	4.821	0.166	1.55	≥ 500time
	20%		0.764 ±5.177	3.599 ±8.114	1.105	3.599	0.168	1.45	≥ 500time
	25%		0.699 ±4.994	3.154 ±9.622	0.977	3.154	0.169	1.40	≥ 500time
	30%		0.588 ±5.244	2.498 ±10.524	0.787	2.498	0.171	1.34	≥ 500time

■ 제형의 정량적 완성도 대조 평가

- 정량적 수치 비교 시 유화제 첨가 농도 증가에 따라 가장 우수한 제형 정량 지수를 보였으나, 생산 단가를 고려, 최고점수와 최저점수의 중간 그룹으로 결정하여 유화제 첨가 함량을 결정함

[산업화 소재를 적용한 미탁제형의 정량적 완성도 평가(점수화)]

구분	유화제 함량(W/W)			
	15%	20%	25%	30%
D-limonene	5.65	7.26	7.60	8.00
L-limonene	6.44	7.14	7.52	8.00
Carveol	5.33	6.59	7.33	7.98
D+L-limonene	6.48	6.96	7.32	7.57
D-limonene+Carveol	5.69	6.75	7.54	7.99
L-limonene+Carveol	5.72	6.72	7.26	8.00

■ : 정량적 완성도 평가 기준(비율적 산정 과정의 점수화 기준), ■ : 선발결과

■ 최종 제형의 검증 실험

- 선발된 기준을 대상으로 시료를 최종 조제, 72시간 까지 저장 한후 유화안정성 및

생산 재현성을 확인, 희석반응 시 균질한 분산력을 확인함

[설계처방전의 제형 완성도 최종 검증]

구분	총분리 현상			입자경 분석		희석분산현황		
	조제직후	72hr경과	재혼합	혼합직후	72hr 경과	100배	250배	500배
D-limonene								
L-limonene								
Carveol								
D-limonene +L-limonene								
D-limonene +Carveol								
L-limonene +Carveol								

▪ 미탁제형 처방전 결정

- 다양한 리모넨 유도체를 대상으로 한 미탁제형 처방전을 아래와 같이 결정함

[미탁제형 생산 공정]

구분	조건 및 함량(% W/W)
반응온도	50℃ 미만
교반속도	50RPM 이상
수상첨가속도	2.5%, (W / Vt)/sec, W, 물의 공급량(Volume), Vt, 혼합물의 총량(Volume)

[미탁제형 생산 처방전]

구분	원료 함량(% W/W)	
D-limonene	D-limonene(95% purity)	16.8
	Span 20	3.9
	Tween 20	16.1
	Water	Rest
	Total	100.0
L-limonene	L-limonene(75% purity)	16.8
	Span 20	4.3
	Tween 20	20.7

	Water	Rest
	Total	100.0
Carveol	Carveol(100% purity)	16.8
	Lecithin	5.0
	TritonX-100	20.0
	Water	Rest
	Total	100.0
D-limonene + L-limonene	D-limonene(95% purity)	8.4
	L-limonene(75% purity)	8.4
	Span 20	3.4
	Tween 20	16.6
	Water	Rest
	Total	100.0
D-limonene + Carveol	D-limonene(95% purity)	8.4
	Carveol(100% purity)	9.6
	Span 20	7.3
	Tween 20	17.7
	Water	Rest
	Total	100.0
L-limonene + Carveol	L-limonene(95% purity)	8.4
	Carveol(100% purity)	9.6
	Span 20	8.5
	Tween 20	16.5
	Water	Rest
	Total	100.0

#### ④ 유탁제형의 도출 : 유화제 함량 결정 시험

##### 가) 실험 목적

- 1차연도 공동개발기관의 흰잎마름병 유발균인 *X. oryzae*에 대한 유효방제농도는 6mM로 산출됨(Carveol)
- 미탁제형의 경우 제형 내 유효물질의 농도는 1,258.6mM, 500배 희석시 2.52mM, 250배 기준 시 5.04mM의 수준임
- 계면활성제 및 미탁제의 유효물질 미세화를 통해 방제력의 개선 여지가 있을 수 있으나, 소재의 유효물질 함량 증가 필요성에 따라 추가 제형 개발을 실시함

##### 나) 실험 재료 및 실험 방법

- O/W Phase에서 고정상(유효물질)이 과반수 초과시, W/O로 상변환되어 희석반응이 불가해 유효물질의 용출이 우려, 고정상(유효물질) 함량을 부자재의 혼입 고려 최대 40%를 미만으로 결정함
- 유화제의 함량 저감 및 조제 시 충분한 유화성을 제공하기 위해, 전단력을 보충, homogenizer를 이용하여 2,000RPM이상에서 30분이상 교반, 기계적 분산환경을 추가 제공함
- 기본 유화 공정 : 주성분 → 용제 → 유화제 + 연속상 순으로 반응조에 투입
  - ① : 용매인 물에 동결방지제, 비중조정제, 증점제, 소포제등을 첨가하여 혼합(50℃)기열 유지
  - ② : 반응조 내 유화보조제가 용해된 용매를 후 첨가
  - 상 전환이 잘 일어날 수 있도록 연속상을 소량 첨가 시켜가며, 충분한 교반력을 유지, 특히 전상점(Phase transition point) 근처에서는 점도가 매우 높은 관계로 소포제등을 구성하여 교반환경을 유지함
  - ③ : 유화제 및 유화보조제 기본 함량은 살충제 제형별 품질 및 효력 시험 자료집, 2014를 가이드라인으로 참조함

[유탁제형의 기본 생산 조건]

구분	내용
반응온도	50℃
교반속도	2,000RPM 이상
혼합시간	30분 이상
수상첨가속도	Directly
기본 유화 공정	주성분 → 용제 → 유화제 + 용매

- 대상소재 : 상위 ③ 미탁제형의 도출 과정과 동일함
- 대상시료 : 상위 ③ 미탁제형의 도출 과정과 동일함
- 시료의 원료 구성 : 유화제의 함량 저하, 유효물질의 함량 상승으로 인한 유화안정성 저감우려, 유화 안정성 우려, 유화 안정성을 추가 제공할 수 있는 보조원료를 혼입, 적용 유무에 의한 제형 안정성을 평가함
  - 유화제 : EPA list에 준하는 계면활성제 2종 이상 혼합 적용
  - 동결방지제 : Propylene glycol → 제형의 물성 안정성 확보
  - 방부제 : Sodium benzoate → 미생물 등의 추가 증식 억제, 저장성 개선
  - 소포제 : Antifoam → 고속 교반 시 거품 발생 억제
  - 비중조정제 및 유화보조제 : Ethanol, Xanthan gum → 점성증가 및 고점상과 연속상간의 밀도 개선, 유화층의 수직적 이동 억제, 유화안정성 추가 제공
  - 시료에 포함되는 모든 원료는 EPA list에 준하며 유기농업자재 허용물질로써 상업용 Grade로 적용하여 활용

[시료별 원료의 구성]

시료구분	원료명	시료명 및 주요함량(% W/W)			
		A	B(A+부자재)	C(B+비중조정제)	D(C+유화보조제)
D-limonene	D-limonene(95%)	33.6	33.6	33.6	33.6
	Span 20	2.1	2.1	2.1	2.1
	Tween 20	8.7	8.7	8.7	8.7
	Propylene glycol	-	3.1	3.1	3.1
	Sodium benzoate	-	0.1	0.1	0.1
	Antifoam	-	0.5	0.5	0.5
	Ethanol	-	-	5.5	5.5
	Xanthan gum	-	-	-	0.2
	Water	55.6	51.9	46.4	46.2
	Total	100.0	100.0	100.0	100.0
	L-limonene	L-limonene(75%)	33.6	33.6	33.6
Span 20		1.9	1.9	1.9	1.9
Tween 20		9.0	9.0	9.0	9.0
Propylene glycol		-	3.1	3.1	3.1
Sodium benzoate		-	0.1	0.1	0.1
Antifoam		-	0.5	0.5	0.5
Ethanol		-	-	5.5	5.5
Xanthan gum		-	-	-	0.2
Water		55.5	51.8	46.3	46.1
Total		100.0	100.0	100.0	100.0
Carveol		Carveol(100%)	38.3	38.3	38.3
	Lecithin	1.9	1.9	1.9	1.9
	TriptonX-100	9.0	9.0	9.0	9.0
	Propylene glycol	-	3.1	3.1	3.1
	Sodium benzoate	-	0.1	0.1	0.1
	Antifoam	-	0.5	0.5	0.5
	Ethanol	-	-	5.5	5.5
	Xanthan gum	-	-	-	0.2
	Water	Rest	Rest	Rest	Rest
	Total	50.8	47.1	41.6	41.4
	D-Limonene + L-limonene	D-limonene(95%)	16.8	16.8	16.8
L-limonene(75%)		16.8	16.8	16.8	16.8
Span 20		1.9	1.9	1.9	1.9
Tween 20		9.0	9.0	9.0	9.0
Propylene glycol		-	3.1	3.1	3.1
Sodium benzoate		-	0.1	0.1	0.1
Antifoam		-	0.5	0.5	0.5
Ethanol		-	-	5.5	5.5
Xanthan gum		-	-	-	0.2
Water		55.5	51.8	46.3	46.1
Total		100.0	100.0	100.0	100.0
D-Limonene + Carveol	D-limonene(95%)	16.8	16.8	16.8	16.8
	Carveol(100%)	19.2	16.8	16.8	16.8
	Span 20	3.1	3.1	3.1	3.1
	Tween 20	7.6	7.6	7.6	7.6
	Propylene glycol	-	3.1	3.1	3.1
	Sodium benzoate	-	0.1	0.1	0.1
	Antifoam	-	0.5	0.5	0.5
	Ethanol	-	-	5.5	5.5
	Xanthan gum	-	-	-	0.2
	Water	53.3	52.0	46.5	46.3
	Total	100.0	100.0	100.0	100.0
L-Limonene +	L-limonene(75%)	16.8	16.8	16.8	16.8
	Carveol(100%)	19.2	16.8	16.8	16.8

Carveol	Span 20	3.6	3.6	3.6	3.6
	Tween 20	7.1	7.1	7.1	7.1
	Propylene glycol	-	3.1	3.1	3.1
	Sodium benzoate	-	0.1	0.1	0.1
	Antifoam	-	0.5	0.5	0.5
	Ethanol	-	-	5.5	5.5
	Xanthan gum	-	-	-	0.2
	Water	Rest	Rest	Rest	Rest
	Total	100.0	100.0	100.0	100.0

▪ 유타제형의 최적 선발 방법

- ③ 미탁제형의 도출 < 미탁제형의 최적 선발 방법과 동일함

다) 실험결과

▪ 기능성 원료 첨가에 따른 유화 특성

- 전체적인 시험구 모두 유화제의 함량에 따라 미세입자화가 촉진되었고, 혼합 직후 ① D-limonene(3.11~3.32 μm); ② D+L-limonene(3.97~3.22 μm); ③ L-limonene(4.12~4.00 μm), 72시간 경과 시 ① D+L-limonene(8.72~5.22 μm) ② D-limonene(9.52~5.64 μm); ③ L-limonene(8.73~6.60 μm) 순으로 미세화 결과를 보임과 동시에 D-limonene 및 L-limonene 소재의 사용 시료에서 상대적으로 우수한 미세화를 보인 반면, Carveol 혼입 시료조건에서는 미세화 및 유화 유지력이 저하되는 결과를 보임
- 재혼합 시 ① D+L-limonene(3.224~3.112 μm); ② D+L-limonene(4.44~3.36 μm), ③ L-limonene(4.24~3.99 μm)의 결과로 조제 직후보다는 다소 증가, 반면 500배까지의 희석반응에서도 균질한 혼합상태를 확인함
- 전체적인 시험구 모두 유효물질의 함량 증대와 유화제의 혼입량 감소에 의해 미탁제형 대비 평균 입자경은 급격하게 증가, 보조원료의 혼입 시 유화입자의 합일 수준은 점차 완화되는 경향을 나타냄

[산업화 소재를 적용한 유타제형의 기능성 원료 첨가별 유화특성]

유효성분	원료 종류	유화입자 현황	혼합직후 입자경(μm)	72시간 입자경(μm)	재혼합 입자경(μm)	입자증가속도 (%/hr)	입자 유지력지수	재혼합지수	희석수 제조 능력
D-limonene	A		3.114 ±7.5	9.525 ±12.5	3.224	1.59	1.08	0.97	≥500time
	B		3.644 ±4.9	8.997 ±11.7	3.585	1.28	1.13	1.02	≥500time
	C		3.599 ±6.2	6.599 ±9.0	3.477	0.86	1.19	1.04	≥500time
	D		3.321 ±5.9	5.644 ±7.577	3.122	0.75	1.21	1.06	≥500time
L-limonene	A		4.122 ±8.212	8.727 ±13.414	4.244	1.06	1.15	0.97	≥500time
	B		4.309 ±7.943	8.458 ±10.644	4.137	0.95	1.17	1.04	≥500time
	C		4.155 ±6.899	7.634 ±12.114	4.222	0.86	1.19	0.98	≥500time
	D		3.999 ±5.857	6.594 ±9.555	3.985	0.71	1.22	1.00	≥500time
Carveol	A		7.54 ±24.114	17.21 ±30.222	8.55	1.17	1.157	0.88	≥500time
	B		7.64 ±20.445	15.94 ±26.543	8.23	1.04	1.167	0.93	≥500time
	C		7.22 ±18.553	13.62 ±25.221	7.58	0.90	1.183	0.95	≥500time
	D		6.99 ±15.641	12.19 ±20.843	7.13	0.79	1.192	0.98	≥500time

D+L limonene	A		3.97 ±8.887	8.72 ±9.643	4.44	1.12	1.137	0.89	≥500time
	B		3.89 ±7.546	7.59 ±8.882	4.24	0.95	1.170	0.92	≥500time
	C		3.46 ±7.221	6.96 ±7.632	3.62	0.99	1.160	0.95	≥500time
	D		3.22 ±6.995	5.22 ±10.211	3.36	0.68	1.226	0.96	≥500time
D-limonene + Carveol	A		5.54 ±11.119	13.96 ±20.154	7.88	1.31	1.114	0.70	≥500time
	B		5.22 ±10.984	12.54 ±24.566	7.39	1.24	1.119	0.71	≥500time
	C		4.98 ±12.524	10.84 ±22.327	6.99	1.10	1.141	0.71	≥500time
	D		4.33 ±7.880	8.79 ±18.114	5.85	1.00	1.168	0.74	≥500time
L-limonene + Carveol	A		5.23 ±10.243	13.52 ±27.222	6.14	1.31	1.114	0.70	≥500time
	B		5.05 ±9.851	11.54 ±23.152	5.88	1.24	1.119	0.71	≥500time
	C		4.77 ±8.672	9.87 ±19.950	5.58	1.10	1.141	0.71	≥500time
	D		4.52 ±9.140	7.82 ±14.822	5.21	1.00	1.168	0.74	≥500time

A) 유효성분+유화제+물, B) A+부자재, C) B+비중조정제, D) C+유화보조제

■ 제형의 정량적 완성도 대조 평가

- 각 리모넨 유도체 성분별 정량적 수치 비교 시 유화 보조 목적의 각종 보조원료 첨가 시 가장 우수한 제형 정량 지수를 보임

[산업화 소재를 적용한 유타제형의 정량적 완성도 평가(점수화)]

구분	A) 유효성분+유화제+물, B) A+부자재, C) B+비중조정제, D) C+유화보조제			
	A	B	C	D
D-limonene	6.37	6.38	7.40	7.94
L-limonene	6.92	7.20	7.44	7.96
Carveol	6.56	6.85	7.47	8.00
D+L-limonene	6.39	6.74	7.17	8.00
D-limonene+Carveol	6.46	6.75	7.33	8.00
L-limonene+Carveol	6.22	6.59	7.06	8.00

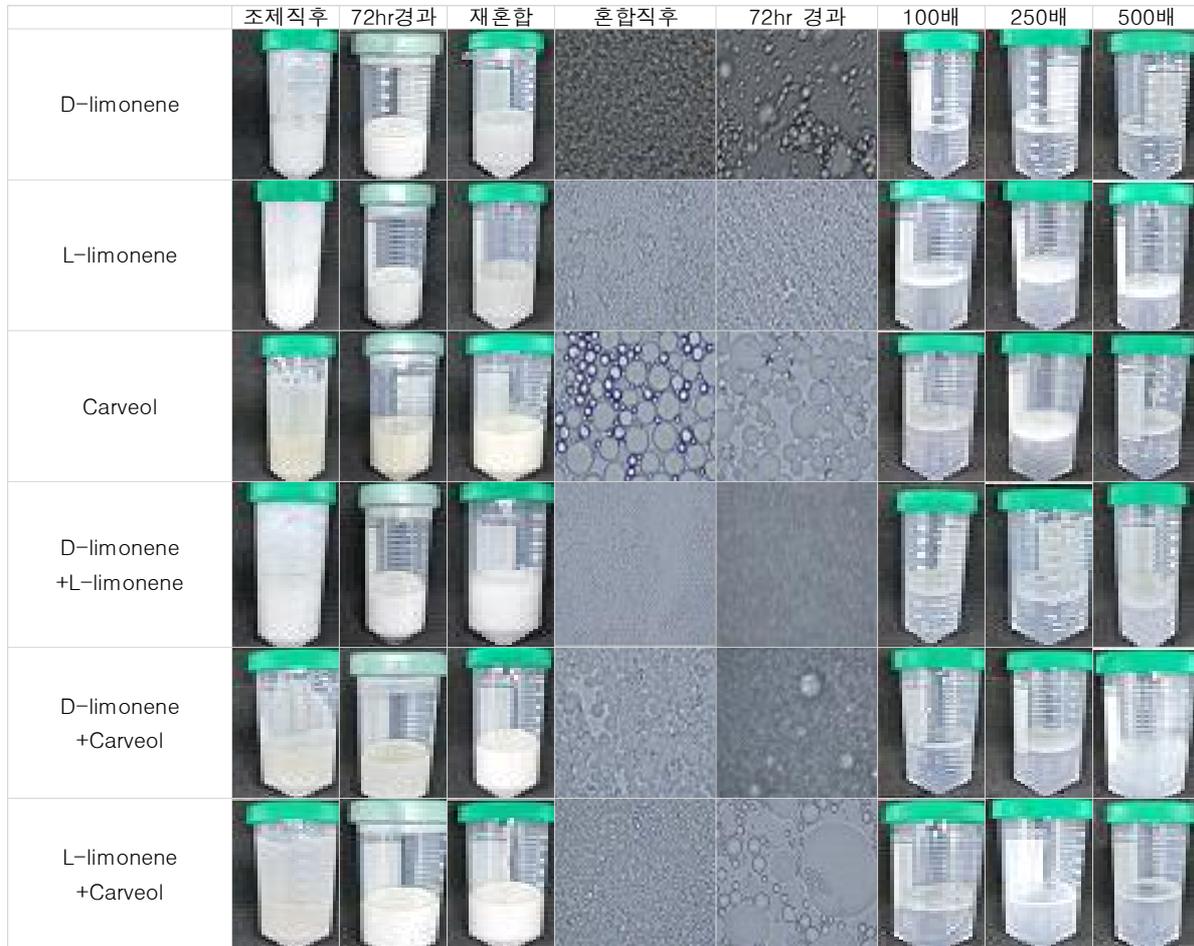
■ : 정량적 완성도 평가 기준(비율적 산정 과정의 점수화 기준) 및 선발결과

■ 최종 제형의 검증 실험

- 선발된 기준을 대상으로 시료를 최종 조제, 72시간까지 저장 한후 유화 안정성 및 생산 재현성을 확인, 희석반응 시 균질한 분산력을 확인함

[설계처방전의 제형 완성도 최종 검증]

구분	충분리 현상	입자경 분석	희석분산현황
----	--------	--------	--------



▪ 유탁제형 처방전 결정

- 다양한 리모넨 유도체를 대상으로 한 유탁제형 처방전을 아래와 같이 결정함

[유탁제형 생산 공정]

구분	조건 및 함량(% , W/W)
반응온도	> 50℃
교반속도	> 2,000RPM
수상첨가속도	Directly
혼합시간	> 30min
기본 유화 공정	주성분 → 용제 → 유화제 + 용매

[유탁제형 생산 처방전]

구분	원료 함량(% , W/W)	
D-limonene	D-limonene(95%)	33.6
	Span 20	2.1
	Tween 20	8.7
	Propylene glycol	3.1
	Sodium benzoate	0.1
	Antifoam	0.5
	Ethanol	5.5
	Xanthan gum	0.2
	Water	46.2
Total	100.0	
L-limonene	L-limonene(75%)	33.6
	Span 20	1.9

	Tween 20	9.0
	Propylene glycol	3.1
	Sodium benzoate	0.1
	Antifoam	0.5
	Ethanol	5.5
	Xanthan gum	0.2
	Water	46.1
	Total	100.0
Carveol	Carveol(100%)	38.3
	Lecithin	1.9
	TriptonX-100	9.0
	Propylene glycol	3.1
	Sodium benzoate	0.1
	Antifoam	0.5
	Ethanol	5.5
	Xanthan gum	0.2
	Water	Rest
	Total	41.4
D-limonene+ L-limonene	D-limonene(95%)	16.8
	L-limonene(75%)	16.8
	Span 20	1.9
	Tween 20	9.0
	Propylene glycol	3.1
	Sodium benzoate	0.1
	Antifoam	0.5
	Ethanol	5.5
	Xanthan gum	0.2
	Water	46.1
	Total	100.0
D-limonene+ Carveol	D-limonene(95%)	16.8
	Carveol(100%)	16.8
	Span 20	3.1
	Tween 20	7.6
	Propylene glycol	3.1
	Sodium benzoate	0.1
	Antifoam	0.5
	Ethanol	5.5
	Xanthan gum	0.2
	Water	46.3
	Total	100.0
L-limonene+ Carveol	L-limonene(75%)	16.8
	Carveol(100%)	16.8
	Span 20	3.6
	Tween 20	7.1
	Propylene glycol	3.1
	Sodium benzoate	0.1
	Antifoam	0.5
	Ethanol	5.5
	Xanthan gum	0.2
	Water	Rest
	Total	100.0

### ⑤ 코팅제의 추가 도출(+ 원예용 제형개발)

#### 가) 실험 목적

- 원예용 세균성 질병은 병원균의 침투에 의해 병증이 전개됨
- 또한 흰잎마름병 등 야외에서는 태풍 등 강우동반에 의한 식물조직의 생채기 발생, 상처부위에 병원균이 침투되어 병원성이 발현됨
- 당초 리모넨 유도체를 활용, 원예용 병원성 원인균에 대한 제품화가 추가 목적, 반면 산업화 가능 범위의 리모넨 유도체에 대한 협력기관의 생물검정 실험 상 원예용 주요 질병 원인균에 대한 항균력은 미흡한 상황임
- 이에 식물체의 상처부에 유효물질과 동반한 코팅력을 제공하여, 병원균의 물리적인 침투억제 및 지속 방제력을 제공하는 예방제 개념의 코팅제형을 추가 개발함
- 코팅원료는 강우 및 태풍 등 현장 내구성을 제공, 왁스 계열의 Paraffin oil로 선정함
- 소재의 유화 불안정 특성과 코팅원료의 추가 혼입등 유화력의 지장 초래 우려, 제형적 안정성이 우수한 미탁제형을 기본으로 하여 코팅제형을 개발함

나) 실험 재료 및 실험 방법

- 기본생산조건 : ③ 미탁제형의 도출 실험을 기본으로 하였고, 코팅원료 및 비중조정제의 단계별 추가 함유에 의한 비교 평가로 코팅 제형의 완성도를 평가함
- 코팅제형의 최적 선발 방법 : ③ 미탁제형의 도출 실험 < 미탁제형의 최적 선발 방법과 동일하게 진행함
- 시료별 원료의 구성
  - 미탁제형을 기본, Paraffin oil 및 비중조정제를 단계별 혼입, 외 유효물질 및 원료는 상위 전술한 미탁제 및 유탁제와 동일함

[시료의 원료별 구성]

시료구분	원료명	시료명 및 주요함량(% , W/W)		
		A	B(A+코팅제)	C(B+비중조정제)
D-limonene	D-limonene(95%)	16.8	16.8	16.8
	Span 20	3.9	3.9	3.9
	Tween 20	16.1	16.1	16.1
	Paraffin oil	-	9.0	9.0
	Ethanol	-	-	3.9
	Water	Rest	Rest	Rest
	Total	100.0	100.0	100.0
L-limonene	L-limonene(75%)	16.8	16.8	16.8
	Span 20	4.3	4.3	4.3
	Tween 20	20.7	20.7	20.7
	Paraffin oil	-	9.0	9.0
	Ethanol	-	-	3.9
	Water	Rest	Rest	Rest
	Total	100.0	100.0	100.0
Carveol	Carveol(100%)	19.2	19.2	19.2
	Lecithin	5.0	5.0	5.0
	TriptonX-100	20.0	20.0	20.0
	Paraffin oil	-	9.0	9.0
	Ethanol	-	-	3.9
	Water	Rest	Rest	Rest
	Total	100.0	100.0	100.0
D-limonene + L-limonene 합제	D-limonene(95%)	8.4	8.4	8.4
	L-limonene(75%)	8.4	8.4	8.4
	Span 20	3.4	3.4	3.4
	Tween 20	16.6	16.6	16.6
	Paraffin oil	-	9.0	9.0
	Ethanol	-	-	3.9
	Water	Rest	Rest	Rest
Total	100.0	100.0	100.0	
D-limonene + Carveol 합제	D-limonene(95%)	8.4	8.4	8.4
	Carveol(75%)	9.6	9.6	9.6
	Span 20	7.3	7.3	7.3
	Tween 20	17.7	17.7	17.7
	Paraffin oil	-	9.0	9.0
	Ethanol	-	-	3.9
	Water	Rest	Rest	Rest
Total	100.0	100.0	100.0	
L-limonene + Carveol 합제	L-limonene(75%)	8.4	8.4	8.4
	Carveol(75%)	9.6	9.6	9.6
	Span 20	8.5	8.5	8.5
	Tween 20	16.5	16.5	16.5
	Paraffin oil	-	9.0	9.0
	Ethanol	-	-	3.9
	Water	Rest	Rest	Rest
Total	100.0	100.0	100.0	

다) 실험결과

■ 유화제 함량에 따른 유화 특성

- 혼합 직후 ① L-limonene+Carveol(2.21-2.00 μm); ② L-limonene+D-limonene(2.21-2.00 μm); ③ D-limonene + L-limonene(2.37-2.23 μm)순으로 L-limonene 및 합제가 가장 미세화된 결과, 72시간 경과 시 ① L-limonene(12.22-6.48 μm) ② D-limonene(8.56-6.45 μm); ③ D-limonene + L-limonene(10.60-7.52 μm) 순으로 미세화 결과를 보임과 동시에 미탁제 및 유탁제 대비 유화 안정성 지표가 상대적으로 불량해짐을 확인할 수 있음
- 재혼합 시 ① L-limonene(3.59-2.59 μm); ② D-limonene(5.54-3.35 μm), ③ D-limonene + Carveol(4.14-3.22 μm)순으로 미세화가 관찰, 전반적으로 시료들 모두 유사한 수준의 입자 크기를 보이며, 조제 직후보다는 입자크기는 다소 증가, 반면 500배까지의 희석반응에서도 균질한 혼합상태를 확인함

[산업화 소재를 적용한 코팅제형의 부자재 첨가별 유화특성]

유효성분	원료 종류	유화입자 현황	혼합직후 입자경 (μm)	72시간 입자경 (μm)	재혼합 입자경 (μm)	입자증가속도 (%/hr)	입자 유지력지수	재혼합지수	희석수 제조 능력
D-limonene	A		0.142 ±2.992	0.267 ±3.476	0.138	0.89	1.195	1.03	≥500time
	B		3.227 ±8.021	8.544 ±15.133	5.544	1.38	1.089	0.58	≥500time
	C		2.994 ±5.881	6.477 ±12.339	3.354	1.09	1.131	0.89	≥500time
L-limonene	A		0.312 ±2.911	0.714 ±3.627	0.327	1.17	1.147	0.95	≥500time
	B		2.214 ±3.625	12.225 ±20.991	3.588	2.44	0.997	0.62	≥500time
	C		1.998 ±4.024	6.477 ±13.662	2.588	1.67	1.072	0.77	≥500time
Carveol	A		0.723 ±4.988	2.644 ±9.254	0.924	1.84	1.033	0.78	≥500time
	B		2.559 ±9.252	15.644 ±25.417	8.114	2.58	0.990	0.32	≥500time
	C		2.487 ±8.321	12.117 ±20.252	5.644	2.26	1.018	0.44	≥500time
D-limonene +L-limonene	A		0.221 ±3.277	0.462 ±4.114	0.255	1.04	1.157	0.87	≥500time
	B		2.372 ±6.114	10.595 ±22.644	4.114	2.13	1.004	0.58	≥500time
	C		2.226 ±4.152	7.524 ±15.644	3.529	1.73	1.057	0.63	≥500time
D-limonene + Carveol	A		0.897 ±3.958	3.999 ±7.525	1.177	2.13	0.995	0.76	≥500time
	B		2.487 ±5.993	13.164 ±28.441	4.144	2.37	1.014	0.60	≥500time
	C		2.105 ±4.886	9.997 ±19.252	3.221	2.22	1.020	0.65	≥500time
L-limonene + Carveol	A		0.764 ±5.177	3.599 ±8.114	1.105	2.21	1.001	0.69	≥500time
	B		2.248 ±10.226	12.167 ±25.338	3.994	2.41	1.010	0.56	≥500time
	C		1.985 ±8.144	9.997 ±17.235	3.305	2.30	1.006	0.60	≥500time

A) 미탁제, B) A+코팅원료, C) B+비중조정제

- 전체적인 시험구 모두 미탁제형과 유사한 유화입자 크기 및 특성을 보이다가, 코팅원

료 첨가 시 입자의 크기 및 유화특성이 상대적으로 불량화 됨. 반면 비중조정제 등의 부자재 첨가시 입자의 미세화 및 유화특성 등 소폭 안정화가 관찰됨

- 제형의 정량적 완성도 대조 평가
  - 각 리모넨 유도체 성분별 코팅원료 첨가 시 제형 안전성은 불량해진 반면, 부자재 첨가에 따라 개선된 제형 정량 지수를 나타냄

[산업화 소재를 적용한 코팅제형의 정량적 완성도 평가(점수화)]

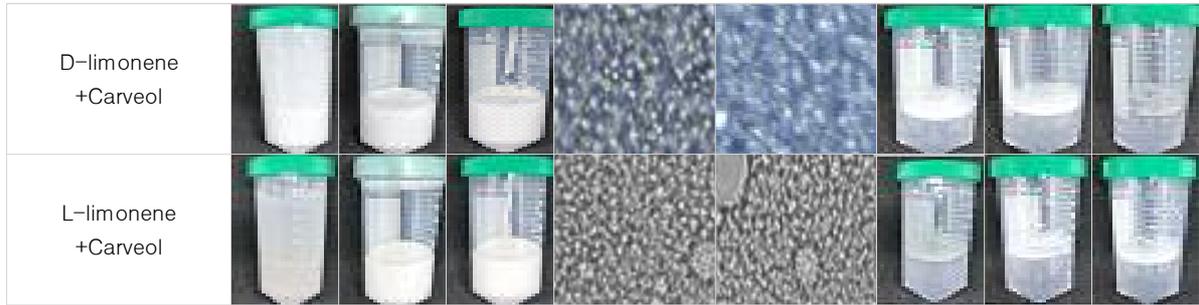
구분	미탁제 포함 비교			코팅원료 첨가 시료별 비교	
	A) 미탁제, B) A+코팅원료, C) B+비중조정제			B	C
	A	B	C		
D-limonene	8.00	3.29	3.84	6.62	8.00
L-limonene	8.00	3.37	3.98	6.14	8.00
Carveol	8.00	3.86	4.28	6.96	8.00
D+L-limonene	8.00	3.29	3.55	7.09	8.00
D-limonene+Carveol	8.0	4.8	5.3	6.9	8.0
L-limonene+Carveol	7.99	4.94	5.31	7.14	8.00

■ : 정량적 완성도 평가 기준(비율적 산정 과정의 점수화 기준), ■ : 선발결과

- 최종 제형의 검증 실험
  - 선발된 기준을 대상으로 시료를 최종 조제, 72시간까지 저장 한 후 유화 안정성 및 생산 재현성을 확인, 희석반응 시 균질한 분산력을 확인함

[설계처방전의 제형 완성도 최종 검증]

구분	충분리 현상			입자경 분석		희석분산현황		
	조제직후	72hr경과	재혼합	혼합직후	72hr 경과	100배	250배	500배
D-limonene								
L-limonene								
Carveol								
D-limonene +L-limonene								



▪ 코팅제형 처방전 결정

- 다양한 리모넨 유도체를 대상으로 한 코팅제형 처방전을 아래와 같이 결정함

[코팅제형 생산 공정]

구분	조건 및 함량(% , W/W)
반응온도	30℃
교반속도	50RPM
수상첨가속도	0.25mL/sec, 2.5%, (Vw / Vt)/sec
반응수	Rest
기본 유화 공정	주성분 + 유화제 → 용제 → 용매

[코팅제형 생산 처방전]

구분	원료 함량(% , W/W)	
D-limonene	D-limonene(95%)	16.8
	Span 20	3.9
	Tween 20	16.1
	Paraffin oil	9.0
	Ethanol	3.9
	Water	Rest
	Total	100.0
L-limonene	L-limonene(75%)	16.8
	Span 20	4.3
	Tween 20	20.7
	Paraffin oil	9.0
	Ethanol	3.9
	Water	Rest
	Total	100.0
Carveol	Carveol(100%)	19.2
	Lecithin	5.0
	TriptonX-100	20.0
	Paraffin oil	9.0
	Ethanol	3.9
	Water	Rest
	Total	100.0
D-limonene+ L-limonene	D-limonene(95%)	8.4
	L-limonene(75%)	8.4
	Span 20	3.4
	Tween 20	16.6
	Paraffin oil	9.0
	Ethanol	3.9
	Water	Rest
Total	100.0	

D-limonene+ Carveol	D-limonene(95%)	8.4
	Carveol(75%)	9.6
	Span 20	7.3
	Tween 20	17.7
	Paraffin oil	9.0
	Ethanol	3.9
	Water	Rest
	Total	100.0
L-limonene+ Carveol	L-limonene(75%)	8.4
	Carveol(75%)	9.6
	Span 20	7.3
	Tween 20	17.7
	Paraffin oil	9.0
	Ethanol	3.9
	Water	Rest
	Total	100.0

#### (4) 현장 적용 실험(2차 검증)

##### ① 현장 환경에서 제형 처리에 의한 유효성분의 잔류성 평가

###### 가) 실험 목적

- 현장단위에서 대표 제형의 처리 후 유효물질 잔류성을 평가, 도출 대상제품의 흰잎마름병 및 원예용 병원균에 대한 예방제의 활용 가치 여부를 확인하고자 함

###### 나) 실험 재료 및 시험 방법

- 대상소재 : D-limonene oil 75%(Florida Chemical, Pure essential oil grade)
- 적용제형 : 미탁제 및 코팅제
- 현장시험방법
  - 처리이력 : 약제처리(22. 08. 17), 종료(22.08.22)
  - 재배환경 : 전남농업기술원 시험포를 임대 활용, 수잉기 이후 환경
  - 처리구의 설정 방법

##### [처리구의 설정방법]

성분명	제형명	약제 처리량
무처리	-	0.3평 물 균일살포
D-limonene	미탁제	100배 희석, 0.3L/평 균일살포
	코팅제	100배 희석, 0.3L/평 균일살포



[현장 환경 및 약제 처리 현황]

###### ▪ 시험분석방법

- 각 구획별 지정 된 조사주에서 처리 일자에 따른 잎을 채취, 실험실 환경으로 이송함
- 대상 시료는 제1세부 기관인 원자력 연구원의 GC-MS 장비(GCMS-7890A/7975C)를 이용하여

잎면의 벼 잎의 유효물질 잔류 분석을 실시함

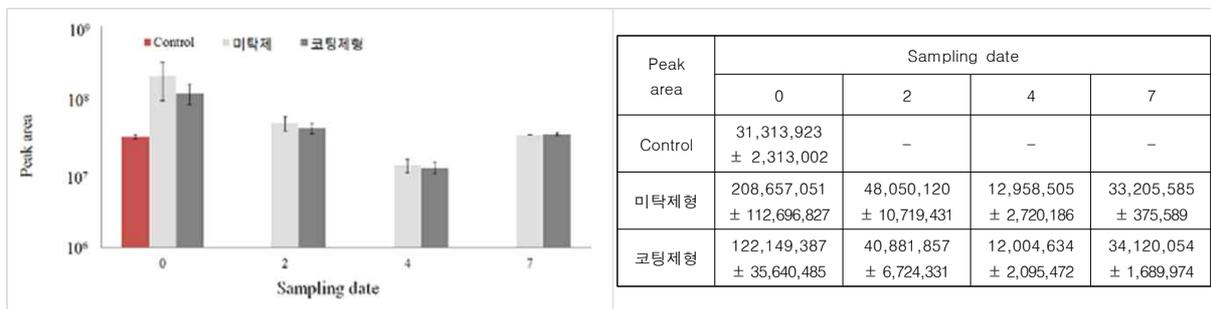
■ 크로마토그램(GC)분석 조건

- column : DB-5MS (0.25mm i.d.×30m length, 0.25 μm film thickness)
- carrier gas : helium
- flow rate : 1 mL/min
- oven temperature : 80° C (3 min hold) → 3° C/min → 100° C → 20° C/min → 180° C → 60° C/min → 300° C (3 min hold)
- injection temperature : 250° C
- transfer line temperature : 280° C

다) 실험 결과

■ 유효물질의 시간의 경과에 따른 잔류성

- 미탁제 및 코팅제는 제형 모두 7일까지 15.9-27.9%의 잔존성이 있음이 확인됨
- 흰잎마름병 감염이 예상되는 태풍 시기 전 처리 시 예방제 차원의 효과를 제공할 수 있을 것으로 사료되며, 최소 7일 내로 사용 시기를 결정하여야 함
- 원예용 병원균에 대한 방제의 경우, 1회 처리 시 7일 내외 물리적인 방제 향상력을 추가 제공할 것으로 사료됨



[대표 소재의 제형의 시간에 따른 벼 잎면 내 성분 잔류성

② 현장 환경에서 병증 발현 후 제형 처리에 의한 병증 전개 완화 평가

가) 실험 목적

- 흰잎마름병 감염균인 *Xanthomonas campestris* pb. *oryzae*는 바람 및 강우를 동반한 벼 잎의 상처부에 친입하여 감염되는 특성이 있음
- 병원균이 식물체내 침투하여 감염될 경우, 관행약제의 방제효율은 급격히 저하되는 문제점이 있음
- 이에 도출 소재 및 제형이 현장 환경에서 흰잎마름병에 대한 병증 발생 후 병반의 전개속도를 억제할 수 있는지 평가하고자 하였음

나) 실험 재료 및 실험 방법

- 대상 소재 : D-limonene oil 95%(Florida Chemical, Pure essential oil grade), L-limonene oil 75%(Jiangxi Senhai Natural plant oil, Pure essential oil grade) Carveol oil 100% (xianluo, Pure essential oil grade)
- 제2공동 전주 소재연구원의 *in-vitro* 및 pot 실험결과에서 방제효과가 뛰어난 소재 3종 선발 및 적용
- 적용 제형 : D-limonene+L-limonene 및 Carveol 유탁제형
- 흰잎마름병 감염 조건

- 11호 태풍 힌남노를 통한 흰잎마름병 자연감염 이후 2주 경과한 자연발생 대발생 환경
- 현장시험방법
  - 처리이력 : 자연감염(9월5일-6일, 태풍 힌남노), 자연발생확인(9월19일), 약제처리(9월19일), 실험종료(10월4일)
  - 실험환경 : 전남농업기술원 시험포를 임대활용, 수잉기 이후 환경
  - 처리구 면적 및 배치 : 자연발생이 확인 된 대표작물을 선정한 후 약제를 직접 분사
- 병반 전개 억제력 측정 방법
  - 최초 감염이 확인된 대표작물의 병반 침투 깊이를 마킹한 후, 2주 경과 후 병반의 추가 침투 깊이를 대조 평가하여, 병반 전개 억제력을 평가함

[처리구의 설정방법]

성분명	제형명	약제 처리 농도	약제 처리량	비고
대조구	-	-	3mL/주	대표작물을 선정 후 직접 처리
D-limonene + L-limonene	유탁제	100배 희석	3mL/주	대표작물을 선정 후 직접 처리
Carveol	유탁제	100배 희석	3mL/주	대표작물을 선정 후 직접 처리



[시험포의 환경 및 약제 처리 시중에 따른 병반 추가 전개 현황]

다) 실험 결과

- 시료 처리에 의한 대표작물의 병증 전개 현황
  - 선정한 대표작물의 시료 처리별 초기 마킹 대비 병증 전개 결과 사진 및 분석 표본을 아래와 같이 제시함



[시료 처리 후 병증 전개 현황]

- 시료 처리에 후 소재별 병증 전개 억제 분석결과
  - 평균 2.75±1.850cm의 병반을 시작으로 무처리구는 2주 경과 후 2.83±2.027cm의 병반 추가 전개가 확인되나, 처리구는 1.76-1.95cm 범위로 병반 전개가 억제되는 경향을 보임
  - D-limonene+L-limonene 유탁제 처리구는 1.95±1.850cm로 무처리구 대비 31.1% 완화된 병반 전개결과를, Carveol 유탁제 처리구는 1.76±1.788cm로 37.85% 완화된 전개 수준을 보임
  - 100배의 고 희석배율을 감안, 치료제 측면으로 활용은 불가할 것으로 판단되어지며,

- 일부 감염된 현장에 대한 병증 완화성 활용으로 사용이 가능할 것으로 사료됨
- 본 소재는 7일 이내 유효물질의 잔류성이 확인되었고, 후처리 시 병증의 전개 완화 측면을 제공함에 따라, 현장 적용 시 감염 시기 전후 처리를 포함한 사용방법을 제공할 수 있을 것으로 사료됨

[각 시료별 병증 전개 억제 결과]

구분	병반깊이(cm)		병반전개억제효율(%) / 2주
	초기 감염 시	처리 후 2주 경과	
무처리	2.75±1.850	2.83±2.027	-
D+L limonene	3.02±2.066	1.95±2.251	31.09
Carveol	2.24±1.140	1.76±1.788	37.85

③ 도출 소재 및 제형의 2차연도 흰잎마름병 현장 평가

가) 실험 목적

- 도출 소재 및 제형을 적용한 흰잎 마름병 방제효율 평가를 통한 실용화 가능 여부 판단

나) 실험 재료 및 방법

- 흰잎마름병 감염 방법
  - 감염조건 : 자연발생이 다수 보고되는 현장포장에 대한 적용 평가함
  - 기후조건 : 11호 태풍 힌남노의 영향으로 흰잎 마름병 자연발생 조건에 부족함이 없었음

[현장 포장의 기상 조건]

월/일	순간 최대 풍속	평균강수량	평균기온
9/5	11.3m/s	50.7mm/d	26.5℃
9/6	13.5m/s	32.8mm/d	24.0℃

태풍 풍속 기준 : 바람등급 6(10.8-13.8), 큰 나뭇가지와 전선이 흔들리고 우산을 들고 있기 힘들다, 바람의 등급과 풍속 기준, 기상청

- 대상 소재 : D-limonene oil 95%(Florida Chemical, Pure essential oil grade), L-limonene oil 75%(Jiangxi Senhai Natural plant oil, Pure essential oil grade) 혼합조성물, Carveol oil 100% (xianluo, Pure essential oil grade), Carveol, 97%(Alfa Aesar, 시약 Grade), 유도체 방사선 조사 처리구 1종
  - 제2공동 전주 소재연구원의 *in-vitro* 및 pot 실험결과에서 방제효과가 뛰어난 소재 혹은 혼합물 2종을 적용함
  - 1차연도에 현장 단위에서 우수한 방제효과를 나타낸 Caveol의 소재와의 비교 평가를 위해, 시약 Grade의 동일소재를 적용하여 시료화 함
  - 추가로 제 1세부에서 도출한 방사선 조사 유도체물 가운데 흰잎마름병에 대한 방제효과가 우수한 성분 1종을 대상으로 확립된 대표 제형성분을 적용하여, 시료화 함.
- 현장 시험방법
  - 재배이력 : 자연감염(9월5일-6일, 태풍 힌남노), 종료(9월19일), 비료 시비등은 관행방법에 준함.
  - 재배환경 : 전남농업기술원 시험포를 임대활용, 수잉기 이후 환경
  - 처리구 면적 및 배치 : 완전임의 배치법(2반복), 각 구획별 10m<sup>2</sup>, 200주
- 적용 시료 및 약제 처리 방법
  - 대상 소재의 예방효과 또는 후처리 후 방제효과를 확인하기 위해, 예방제 목적의 코팅제

및 후처리제 목적의 유탁제를 제조하여 적용함

- 유화제 및 기타 부자재의 추가 방제효과를 확인하기 위해, 유효물질을 배제한 음성대조구를 평가항목으로 구성함
- 외 대상 소재의 관행제품과의 경쟁력 평가목적으로, 흰잎마름병 유기농업자재 공시 제품을 양성대조구로 반영함
- 본 소재를 1L 약제분무기(다잡아)를 활용 실험 구획별 고르게 경엽 처리 하였음

[처리구의 설정방법]

시험구	대상소재	적용제형	희석배수	약제 처리량	유효물질 처리농도(mM)	면적(평)	처리방법
1-1	방사선조사유도체	코팅제	100배 희석	0.3L/평 경엽처리	7.0	6평 100주	전처리
1-2	방사선조사유도체	코팅제	100배 희석	0.3L/평 경엽처리	7.0	6평 100주	전처리
1-3	방사선조사유도체	유탁제	100배 희석	0.3L/평 경엽처리	14.0	6평 100주	후처리
1-4	방사선조사유도체	유탁제	100배 희석	0.3L/평 경엽처리	14.0	6평 100주	후처리
2-1	DHL limonene 조성물	코팅제	100배 희석	0.3L/평 경엽처리	10.49	6평 100주	전처리
2-2	DHL limonene 조성물	코팅제	100배 희석	0.3L/평 경엽처리	10.49	6평 100주	전처리
2-3	DHL limonene 조성물	유탁제	100배 희석	0.3L/평 경엽처리	20.99	6평 100주	후처리
2-4	DHL limonene 조성물	유탁제	100배 희석	0.3L/평 경엽처리	20.99	6평 100주	후처리
3-1	Carveol, 시약 Grade	코팅제	100배 희석	0.3L/평 경엽처리	12.59	6평 100주	전처리
3-2	Carveol, 시약 Grade	코팅제	100배 희석	0.3L/평 경엽처리	12.59	6평 100주	전처리
3-3	Carveol, 시약 Grade	유탁제	100배 희석	0.3L/평 경엽처리	25.17	6평 100주	후처리
3-4	Carveol, 시약 Grade	유탁제	100배 희석	0.3L/평 경엽처리	25.17	6평 100주	후처리
4-1	Carveol	코팅제	100배 희석	0.3L/평 경엽처리	12.59	6평 100주	전처리
4-2	Carveol	코팅제	100배 희석	0.3L/평 경엽처리	12.59	6평 100주	전처리
4-3	Carveol	유탁제	100배 희석	0.3L/평 경엽처리	25.17	6평 100주	후처리
4-4	Carveol	유탁제	100배 희석	0.3L/평 경엽처리	25.17	6평 100주	후처리
양성대조구-1	효능효과 공시제품	-	100배 희석	0.3L/평 경엽처리	황 0.2%	6평 100주	전처리
양성대조구-2	효능효과 공시제품	-	100배 희석	0.3L/평 경엽처리	황 0.2%	6평 100주	전처리
양성대조구-3	효능효과 공시제품	-	100배 희석	0.3L/평 경엽처리	황 0.2%	6평 100주	후처리
양성대조구-4	효능효과 공시제품	-	100배 희석	0.3L/평 경엽처리	황 0.2%	6평 100주	후처리
음성대조구-1	제형 부자재	코팅제	100배 희석	0.3L/평 경엽처리	-	6평 100주	전처리
음성대조구-2	제형 부자재	코팅제	100배 희석	0.3L/평 경엽처리	-	6평 100주	전처리
음성대조구-3	제형 부자재	유탁제	100배 희석	0.3L/평 경엽처리	-	6평 100주	후처리
음성대조구-4	제형 부자재	유탁제	100배 희석	0.3L/평 경엽처리	-	6평 100주	후처리
무처리-1	물	-	-	0.3L/평 경엽처리	-	6평 100주	전처리
무처리-2	물	-	-	0.3L/평 경엽처리	-	6평 100주	전처리
무처리-3	물	-	-	0.3L/평 경엽처리	-	6평 100주	후처리
무처리-4	물	-	-	0.3L/평 경엽처리	-	6평 100주	후처리



[시험포 전체 현황]

▪ 발병률 및 방제가 측정 방법

- 측정 기준 : 농약 및 원제의 등록 기준(약효 시험기준과 방법 ; 제 5조 제 1항 제2호)
- 발병률 조사 : 각 구획별 완전임의배치법을 기준으로, 각 반복 구획별 10주 이상의 대상 조사 주에서 대표경의 지엽을 대상으로 무작위의 선발, 대상 앞의 병반 침투 길이를 조사함
- 방제가 조사 : 지차엽의 생육길이 대비 병반의 침투 길이를 수치화하여, 이를 무처리구와 대조하여 방제가를 1차 산출, 추가로 상위 발병률 조사 방법 내 세분화하는 분류기준을 적용, 생육 길이 대비 병반의 침투 길이의 수치를 적용하여 분류 후 수식에 적용, 이에 대한 상세한 방제가 산출 과정은 1차연도 현장실증 방제가 산출과정과 동일함



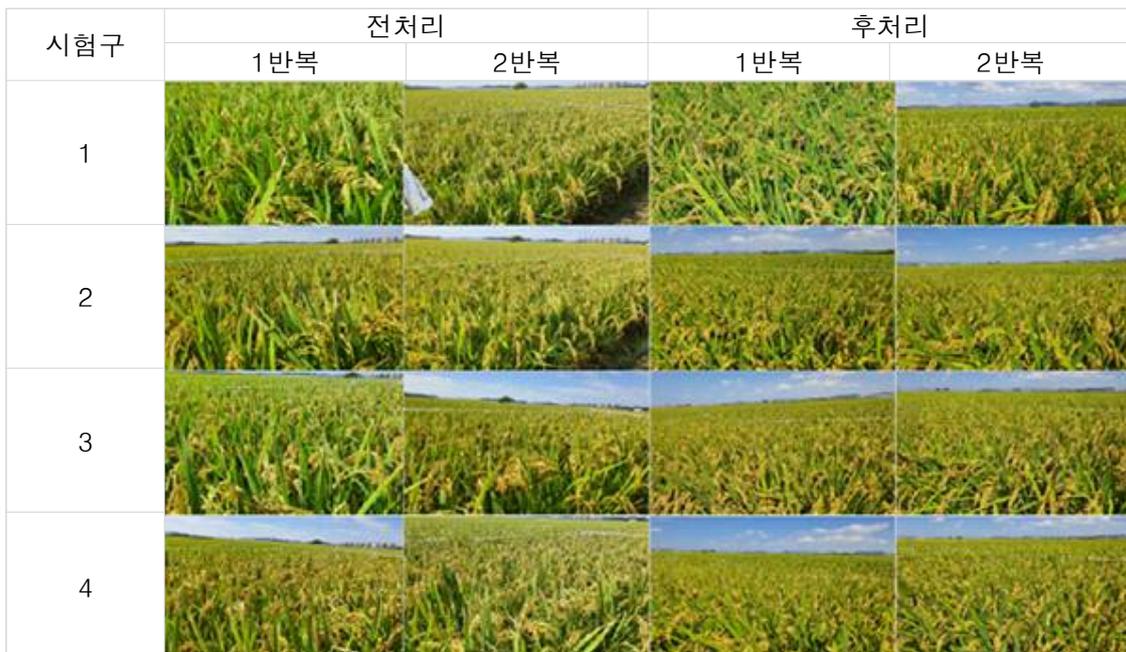
[발병률 측정 방법]

다) 실험 결과

▪ 현장 육안 달관 관찰

- 힌남노 태풍 노출 후 2주 경과 시 모든 시험구역의 병증이 고르게 발생함이 확인됨
- 세밀한 병반 형성을 평가 목적으로 실험실 내 시료를 이송, 병반의 침투 길이를 측정함

[현장 육안 달관 결과]





- 현장 환경의 자연발생에 흰잎마름병 발병 평가
  - 지차엽의 길이가 증가할수록 강우 및 바람에 의한 상처발생 확률이 증가함
  - 1차연도의 현장적용 실험 시 지차엽의 길이가 증가할수록 병반의 침투 깊이가 심화되는 경향이 동일하게 관찰되었음
  - 이에 병반 침투 깊이와 지차엽의 생육길이 간 이변량상관분석(IBM SPSS ver. 1.5)을 통해 각 시험구간의 통계적 유의성을 분석하였음
  - 지차엽의 길이와 병반은 시험구 모두 유의한 양의 상관성을 보여, 본 현장 포장에 대한 흰잎마름병 발병의 통계적 유의성이 있음이 확인됨
  - 이에 전 시험구들은 태풍 힌남노의 노출에 따라 흰잎마름병이 비교적 균일하게 발병되었을 것으로 예상되며, 추가로 지차엽의 생육도를 포함해, 방제가를 산출하여 정확한 방제효과를 대조하고자 하였음
  - 이를 위해 각 시험 구획 별 최소 155, 최대 392개의 지차엽을 회수하였고, 다량의 분석 표본수를 대상으로 분석함

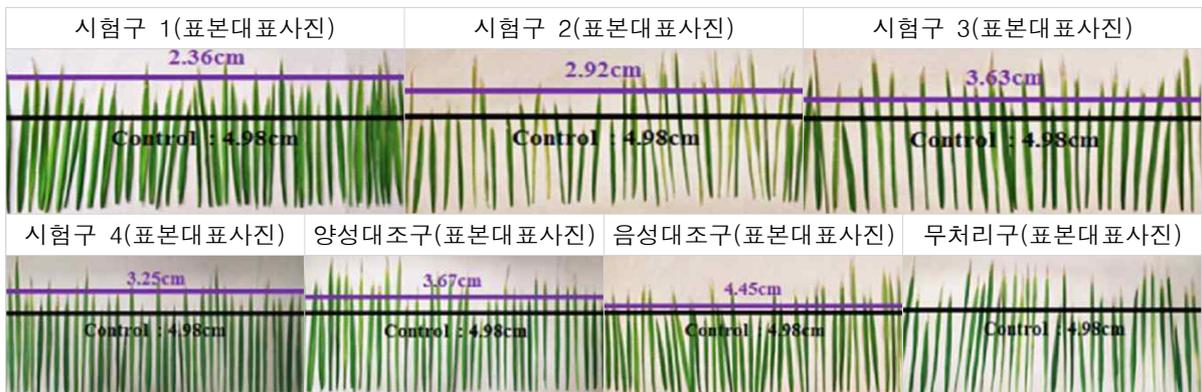
[시험구별 지차엽의 생육도와 병반침투 깊이간의 상관성]

시험구		병반의 침투 깊이		시험구		병반의 침투 깊이	
		Pearson 상관계수	유의확률(양쪽)			Pearson 상관계수	유의확률(양쪽)
1(전처리)	지차엽의 길이	Pearson 상관계수	0.220 <sup>a</sup>	1(후처리)	지차엽의 길이	Pearson 상관계수	0.220 <sup>b</sup>
		유의확률(양쪽)	0.00001			유의확률(양쪽)	0.017
		표본수(N)	392			표본수(N)	155
2(전처리)	지차엽의 길이	Pearson 상관계수	0.317 <sup>a</sup>	2(후처리)	지차엽의 길이	Pearson 상관계수	0.235 <sup>a</sup>
		유의확률(양쪽)	0.0000062			유의확률(양쪽)	0.000005
		표본수(N)	195			표본수(N)	369
3(전처리)	지차엽의 길이	Pearson 상관계수	0.255 <sup>a</sup>	3(후처리)	지차엽의 길이	Pearson 상관계수	0.307 <sup>a</sup>
		유의확률(양쪽)	0.001			유의확률(양쪽)	0.0000001
		표본수(N)	181			표본수(N)	286
4(전처리)	지차엽의 길이	Pearson 상관계수	0.238 <sup>a</sup>	4(후처리)	지차엽의 길이	Pearson 상관계수	0.189 <sup>a</sup>
		유의확률(양쪽)	0.01			유의확률(양쪽)	0.04
		표본수(N)	199			표본수(N)	235
양성대조구 (전처리)	지차엽의 길이	Pearson 상관계수	0.201 <sup>a</sup>	양성대조구 (후처리)	지차엽의 길이	Pearson 상관계수	0.220 <sup>a</sup>
		유의확률(양쪽)	0.06			유의확률(양쪽)	0.0005
		표본수(N)	186			표본수(N)	247
음성대조구 (전처리)	지차엽의 길이	Pearson 상관계수	0.181 <sup>b</sup>	음성대조구 (후처리)	지차엽의 길이	Pearson 상관계수	0.168 <sup>b</sup>
		유의확률(양쪽)	0.29			유의확률(양쪽)	0.021
		표본수(N)	145			표본수(N)	187
무처리 (전처리)	지차엽의 길이	Pearson 상관계수	0.224 <sup>a</sup>	무처리 (후처리)	지차엽의 길이	Pearson 상관계수	0.198 <sup>a</sup>
		유의확률(양쪽)	0.002			유의확률(양쪽)	0.004
		표본수(N)	189			표본수(N)	215

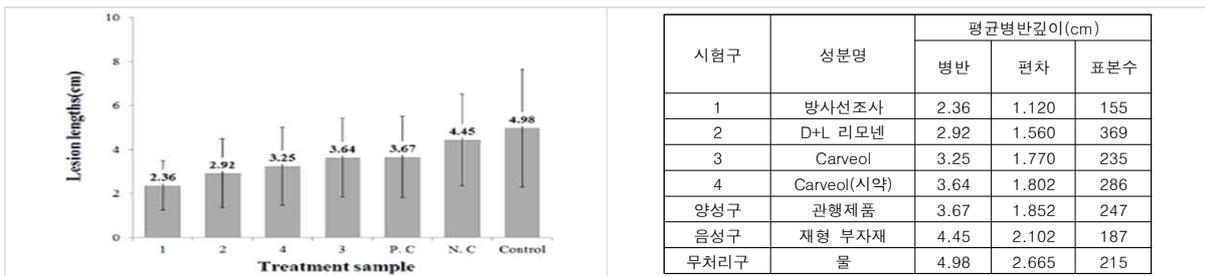
이변량 상관분석 결과 네 a는 유의성 0.01, b는 유의성 0.05를 나타낸다.

■ 코팅제(전처리)의 병증 발생 결과

- 무처리구의 병반침투깊이는  $4.98 \pm 2.655\text{cm}$ 인 반면 제1세부의 방사선 조사 유도체 성분이  $2.36 \pm 1.120\text{cm}$ 으로 가장 우수한 병증 억제력을 보였음
- 차 순위로 D-limonene+L-limonene,  $2.92 \pm 1.560\text{cm}$ 로 우수, Carveol의 실험실 및 산업화 소재는  $3.25\text{--}3.64\text{cm}$ 의 병반 침투 결과를 보임
- 코팅제형의 대표 성분만으로 구성된 음성대조구는  $4.45 \pm 2.102\text{cm}$ 의 결과 값을 나타내, 무처리구의 병반 침투 결과 대비 소폭의 감소 수치를 나타내, 부자재의 병증 억제력은 미비할 것으로 판단됨
- 관형제품은  $3.67 \pm 1.852\text{cm}$ 의 병반 침투 결과를 나타내었고, 리모넨 유도체 소재들 모두 관형제품 대비 이상의 병반 침투 억제력을 나타내었음



[시험구별 코팅제 및 전처리에 의한 병증 발생 결과]

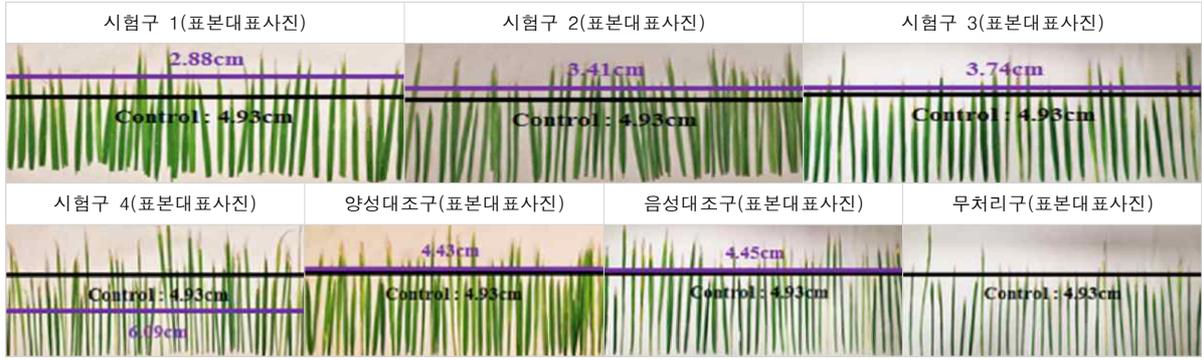


[시험구별 코팅제 및 전처리에 의한 병반침투 깊이 상호 비교]

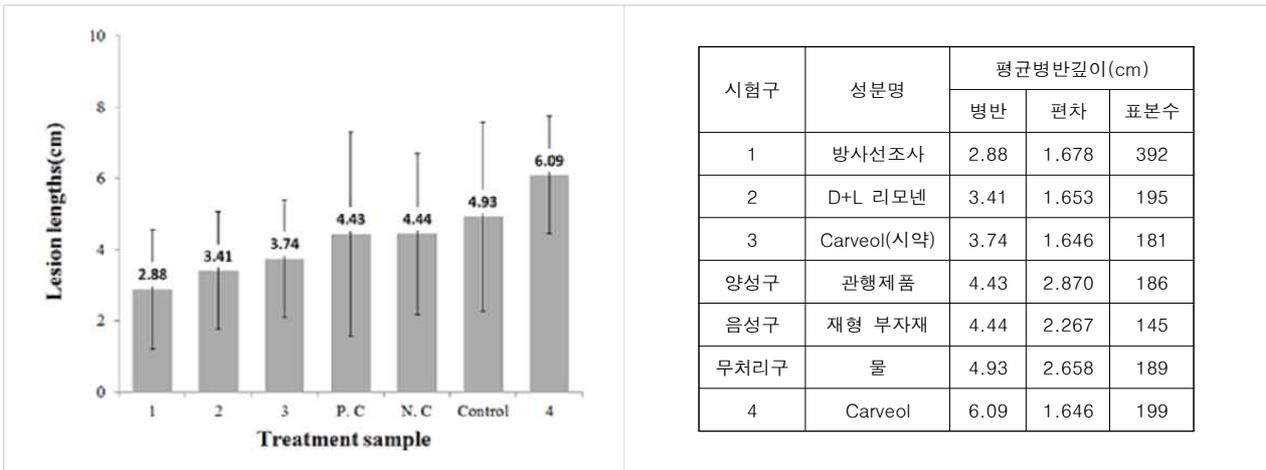
■ 유탁제(후처리)의 병증 발생 결과

- 무처리구는  $4.93 \pm 2.658\text{cm}$ 의 병반 침투 결과를, 외 시험구들은 무처리구 대비 완화된 병반 침투 경향을 보임
- 제1세부가 도출한 방사선 조사 유도체 시료에서  $2.88 \pm 1.678\text{cm}$ 으로 가장 우수, 차 순위로 D-limonene + L-limonene 혼합 조성물이  $3.41 \pm 1.653\text{cm}$ 의 수준으로 우수한 억제력을 나타냄
- 1차연도에 우수하였던 Carveol 소재는  $3.74 \pm 1.646\text{cm}$ 의 결과값을 보였고, 반면 Carveol 대량생산 소재는  $6.09 \pm 1.646\text{cm}$ 의 수치로 무처리구 포함 모든 시험구들 가운데 가장 불량한 결과수준을 나타냈으나, 이는 상위 코팅제의 결과 값으로 볼 때 자연발생에 의한 이벤트 적 결과로 가정함
- 음성대조구는  $4.44 \pm 2.26\text{cm}$ 의 결과 값을 나타내, 무처리구의 병반 침투 결과 대비 소폭의 감소 수치를 나타내, 부자재의 병증 억제력은 미비할 것으로 판단됨
- 관형제품은  $4.43 \pm 2.870\text{cm}$ 의 병반 침투 결과를 나타내었고, 리모넨 유도체 소재들은 일부

시료를 제외하고 관행제품 대비 동등 혹은 이상의 병반 침투 억제력을 나타내었음



[시험구별 유탁제 및 후처리에 의한 병증 발생 결과]



[시험구별 유탁제의 전처리에 의한 병반침투 깊이 상호 비교]

- 최종 대상 시료의 방제가 평가
  - 1차 현장실증 시 지차엽의 생육도 증가 대비 병반의 침투 결과 값이 증가한 경향을 반영하고자 모든 시험구 및 표본에 대해 생육길이 대비 병반의 침투 길이를 수치화하였으며 결과 값을 아래 제시함

[지차엽 생육 길이 대비 병반침투 깊이의 비율 수치화 결과]

코팅제					유탁제				
시험구	성분명	병반침투길이/생육길이			시험구	성분명	병반침투길이/생육길이		
		비율	편차	표본수			비율	편차	표본수
1	방사선조사	7.95	4.266	155	1	방사선조사	9.16	5.504	392
2	D+L 리모넨	9.81	4.846	369	2	D+L 리모넨	11.50	5.179	195
3	Carveol(시약)	11.49	5.251	286	3	Carveol(시약)	12.40	5.401	181
4	Carveol	10.73	5.786	235	4	Carveol	21.69	9.760	199
양성구	관행제품	12.46	6.105	247	양성구	관행제품	14.25	8.578	186
음성구	재형 부자제	15.09	7.340	187	음성구	재형 부자제	14.87	7.163	145
무처리구	물	15.41	7.991	215	무처리구	물	16.52	8.382	189

- 본 수치를 활용하여 1) 대조구 대비 개선결과를 통해 직접적인 흰잎마름병에 대한 방제 값을 산출하였고, 2) 관행산출법을 활용해 발병률을 산출하여 방제값을 도출함
- 대조구 대비 지차엽의 생육길이를 포함한 병반침투 수치비교를 통한 산출 방제값

을 아래와 같이 제시하였고, 전반적으로 전처리 및 코팅원료를 함유한 코팅제형에서 우수한 방제 결과값을 나타냄

- 또한 관행제품인 양성대조구는 전, 후 처리방법에 따라 10.0-13.7%의 방제효과를 나타내었고, 전반적으로 리모넨 유도체가 함유된 시료들 모두 관행제품 대비 동등 혹은 우월한 방제값을 보임
- 제1세부에서 도출한 방사선 조사 시료가 전처리용 코팅제형 및 후처리용 유탁제형 모두에서 44.6-48.4%의 가장 우수한 방제효과를 나타냄
- 차 순위로 D-limonene + L-limonene 혼합 조성물 코팅제형이 36.3%로 우수한 방제효과를 보였고, Carveol 산업소재 코팅제형이 30.4%의 방제효과를 보임
- 코팅제형 및 유탁제형 원료로만 구성된 음성대조구는 2.1-10.0%로 일부 방제효과에 상승력을 제공하고 있음이 확인됨

[소재의 제형 및 처리방법에 따른 대조구 대비 방제개선 결과 : 대조구 대비]

방제력 순위	시험구	성분명	제형	처리방법	병반침투길이/생육길이			방제가(%)
					비율	편차	표본수	
1	1	방사선조사	코팅제	전처리	7.95	4.266	155	48.4
2	1	방사선조사	유탁제	후처리	9.16	5.504	392	44.6
3	2	D+L 리모넨	코팅제	전처리	9.81	4.846	369	36.3
4	4	Carveol	코팅제	전처리	10.73	5.786	235	30.4
5	2	D+L 리모넨	유탁제	후처리	11.50	5.179	195	30.4
6	3	Carveol(시약)	코팅제	전처리	11.49	5.251	286	25.4
7	3	Carveol(시약)	유탁제	후처리	12.40	5.401	181	24.9
8	양성	관행제품	-	전처리	12.46	6.105	247	19.1
9	양성	관행제품	-	후처리	14.25	8.578	186	13.7
10	음성	재형 부자재	유탁제	후처리	14.87	7.163	145	10.0
11	음성	재형 부자재	코팅제	전처리	15.09	7.34	187	2.1
12	4	Carveol	유탁제	후처리	21.69	9.76	199	-31.3

방제가 산출은 대조구의 병반침투길이/지차엽 생육길이 수치 대비 저감된 수치정도를 집계하여 백분을 함  
방사선 조사(■), D+L 리모넨(■), Carveol 시약(■), Carveol(■), 양성 : 관행제품(■), 음성 : 재형 부자재(■)

- 상위 산출한 방제가(%)는 대조구 대비 개선 된 결과로써, 농약 및 유기농업자재 산출기준과는 상의함
- 이에 농약 및 원제의 등록기준(약효 시험기준과 방법; 제5조제1항제2호)에 따른 산출결과를 아래와 같이 제시하며, 자세한 산출 기준은 1차연도 현장실증 방법과 동일함
- 분석 결과 제1세부에서 도출한 방사선 조사 소재가 75.9-78.5%로 가장 우수한 결과를 나타내었고, 후순위로 D-limonene + L-limonene 혼합 조성물 코팅 및 유탁제가 72.7-69.5%의 방제가를 나타내었음
- 외 1차연도에 우수하게 선발된 Caveol 소재의 경우 시약등급의 경우 65.9-68.5%, 산업화 등급의 경우 40.0-72.2%의 방제효과를 나타냄
- 추가로 제형 부자재의 경우 최대 60.3%의 방제효과를 제공하는 것으로 나타나, 소재와의 방제력 추가 상승효과가 있는 것으로 나타남
- 관행제품은 62.7-67.1%의 방제가 수준으로 일부 시료를 제외하고 리모넨 유도체 시료는 관행제품 대비 동등 혹은 우위의 방제효과를 제공하는 것으로 보임

[소재의 제형 및 처리방법에 따른 대조구 대비 방제개선 결과 : 관행 방제가 산출]

방제력 순위	시험구	성분명	제형	처리 방법	관행분류에 의한 분류 표본수					방제가(%)
					소	중	다	심	총 표본수	
1	1	방사선조사	코팅제	전처리	118	35	2	0	155	78.5
2	1	방사선조사	유탁제	후처리	265	123	3	1	392	75.9
3	2	D+L 리모넨	코팅제	전처리	205	161	3	0	369	72.7
4	4	Carveol	코팅제	전처리	134	93	8	0	235	72.2

5	2	D+L 리모넨	유탕제	후처리	87	104	4	0	195	69.5
6	3	Carveol(시약)	코팅제	전처리	125	154	7	0	286	68.5
7	양성	관행제품	-	전처리	99	137	11	0	247	67.1
8	3	Carveol(시약)	유탕제	후처리	60	116	5	0	181	65.9
9	양성	관행제품	-	후처리	61	102	22	1	186	62.7
10	음성	재형 부자제	코팅제	전처리	26	153	7	1	187	60.3
11	음성	재형 부자제	유탕제	후처리	42	88	14	1	145	49.7
12	4	Carveol	유탕제	후처리	8	131	58	2	199	40.0

방사선 조사(■), D+L 리모넨(□), Carveol 시약(●), Carveol(○), 양성 : 관행제품(▲), 음성 : 재형 부자제(▼)

1) 병반 면적(%)은 달관관찰이 아닌, 병반의 침투 깊이/지차엽의 생육도의 백분율값으로 적용함.

2) 각 대상 표본에 대해 소(1) 1-10%, (중) 10.1-25.0%, (다) 25.1-50.0%, (심) 50% 이상으로 진단(농약 및 원제등록 기준)

3) 각 진단 분류에 대해 소(1), 중(3), 다(5), 심(7)의 심화점수 반영(농약 및 원제등록 기준)

4) 최종 각 진단 분류에 대해 (각 표본수 × 심화점수) / 총 표본수 × 7 의 수식을 통해 발병률을 산출

5) 최종 방제가 진단은 100- 발병률(%)로 역산함.

## 라) 결론

### ■ 최종 소재 선발 및 제품의 제형 선정

- 1세부가 도출한 방사선 조사 소재는 희석액 내 유효물질의 농도 7.0-14.0mM 농도 범위로 외 유도체들의 10.49-25.17mM 농도 대비 저함량을 처리함에 불구, 가장 우수한 방제력을 제공함
- 이에 현장단위에서 1세부가 도출한 방사선 조사 신규 유도체는 흰잎마름병에 대한 효과적인 방제소재임이 확인됨
- 반면 본 연구팀의 최종 도출 목적인 ‘유기농업자재’ 내 허용물질의 종류(제3조1항) 내 화학적 처리 또는 자연적 유래 물질만을 활용할 것으로 명시되어 있음.
- 이에 1세부가 도출한 방사선 조사 신규 유도체의 활용은 불가할 것으로 판단, 차 순위로 방제력이 우수한 D-limonene + L-limonene 혼합조성물을 최종 물질로 선발함
- 본 D-limonene 및 L-limonene의 경우 해외에서 생산 및 천연 소재로써 추출과정을 거침을 확인한바, 법적 규제에 준수하며, 사업화 소재의 조달 및 생산단가 측면에서 유리한 소재임
- D-limonene + L-limonene 복합 소재의 경우 유탕제 대비 코팅제의 방제효과가 소폭 우수한 결과를 보이니, 코팅제형의 기본 생산 조건인 미탁제 제조 공정은 대규모 양산 환경에 걸맞지 않은 생산능력을 제공함
- 이에 D-limonene + L-limonene 소재를 선정함과 동시에 최대 69.5%의 방제력을 제공하는 유탕제형을 최종 제형으로 선정하여 후속연구를 진행함

## ④ 도출 소재의 사용매뉴얼 결정

- 본 소재는 7일 이내 유효물질의 잔류성이 확인되며, 현장 환경에서 전처리 시유 및 후처리에도 방제력을 제공함으로써 흰잎마름병 방제 시 감염 예방 전, 후처리로써 활용시기를 제공할 수 있음
- 감염이 경과된 14일 개체에 대한 추가 처리 시 병반의 전개 속도를 저감하였고, 현장 환경에서 후처리 방법에 따른 유효한 방제력이 도출됨에, 감염 이후 후 처리제로써 활용을 포함할 수 있음
- 이와 같은 다양한 현장실증 실험을 기반으로 아래와 같은 사용매뉴얼을 제공하며, 희석배수는 도출제형의 최대 유효성분의 혼입농도를 기준으로 제2공동 전주 소재연구원의 *In-vitro* 항균활성농도를 참고하여 산출함
- 최종 유기농업자재 효능효과 실험을 통해 설정한 사용매뉴얼에 준한 방제효율을 검증함

[D-limonene + L-limonene 유탁제형의 사용매뉴얼]

사용 구분	내용	
희석 농도	300배	
사용 방법	대상 제품을 500배 희석하여 희석수를 조제하고 이를 0.3L/평 단위로 경엽 처리 하시오	
사용 시기	8월말 태풍 전후로 3회 처리 하시오.	
세부 사용 시기	예방목적	8월말(태풍) 노출 이전 3일 이내 1회 처리
	방제목적	8월말(태풍) 노출 직후 1회 처리
	병증완화	감염 2주 이내 1회 처리

(5) 선발 소재의 효과 증진을 위한 추가 제형 연구

① 유효물질 함량 증진 연구

가) 실험 목적

- 최종 선발된 D+L -limonene의 유탁제형은 0/W 성상의 한계로, 35% 미만 농도의 구성 한계를 보임
- 이상 농도를 함유할 경우 0/W 성상에서 W/O 성상으로 전환이 발생, 현장 희석수와 의 반응에서 균질화가 불가함
- 이에 유효물질 함량을 증가 구성 → W/O 제형을 조제 → 이를 0/W 상에 유화하여 최종 W/O/W 제형을 조제하는 멀티플 에멀전화를 시도함
- 최종 선발 소재의 유효물질 함량증진 가능 여부를 평가함

나) 실험방법

- 1단계 : 유탁제의 처방전에서 D+L limonene의 함량을 55.5%, 물을 33.6%로 하여 W/O 처방전을 조제
- 2단계 : 유탁제의 처방전을 기본으로 0/W 처방전을 조제
- 3단계 : 1단계에 조제된 혼합물을 2단계의 제조 혼합물에 혼합하여 분산하여 추가 계면을 형성함(W/O/W)
- 각 조제된 단계별 반응물의 비율을 달리하여 시료를 조제

[시료의 혼합비 및 유효물질 함량]

시료의 혼합비		총 D+L limonene 함량(%)
W/O 구성(%)	O/W 구성(%)	
	100.0	33.6
20	80	37.8
25	75	39.1
30	70	40.2
40	60	42.4

다) 실험재료

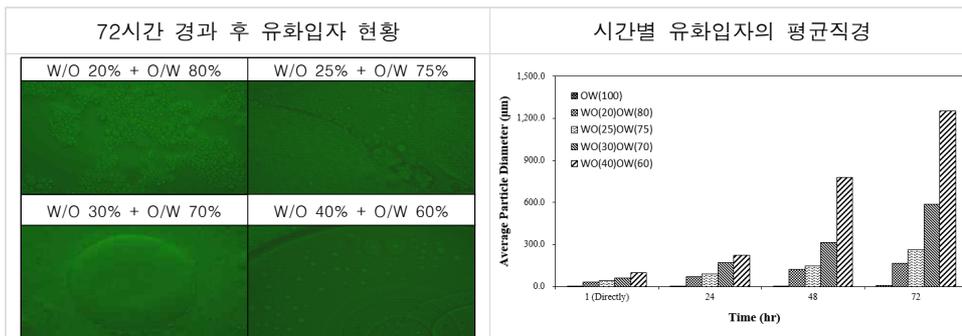
- 대상소재 : D-limonene oil 95%(Florida Chemical, Pure essential oil grade),

L-limonene oil 75%(Jiangxi Senhai Natural plant oil , Pure essential oil grade)

- 유화제 : Span 20, Tween 20 산업용 Grade
- 동결방지제 : Propylenen glycol → 제형의 물성 안정성 확보
- 방부제 : Sodium benzoate → 미생물 등의 추가 증식 억제, 저장성 개선
- 소포제 : Antifoam → 미생물 등의 추가 증식 억제, 저장성 개선
- 비중조정제 및 유화보조제 : Ethanol, Xanthan gum → 점성의 증가 및 유효물질과 용매의 밀도 차이를 개선하는 추가 보조제로 유화입자의 합일 혹은 유화층의 수직적 이동을 억제하여 유화 안정성의 추가 제공 용의
- 시료에 포함되는 모든 원료는 EPA list에 준하며 유기농업자재 허용물질로써 상업용 Grade로 적용하여 활용
- 제형의 평가 방법 : ③ 미탁제형의 도출 실험 < 미탁제형의 최적 선발 방법과 동일 하게 진행함

다) 실험결과

- 평균입자 크기
  - O/W 제형만 100%로 조제한 시료의 평균 입자경은 혼합 직후 3.22 $\mu$ m의 순수한 수준, W/O의 함량이 증가할수록 최소 29.8 $\mu$ m, 최대 100.4 $\mu$ m의 입자경으로 불량해 짐이 확인됨
  - 72시간 경과 후 O/W 100% 조건은 5.22 $\mu$ m의 입자크기를, W/O 20%는 166.1 $\mu$ m, 25%, 260.4 $\mu$ m, 30%는 587.1 $\mu$ m, 40%는 1,254.1 $\mu$ m로 W/O의 함량 구성이 증가할수록 계면의 파괴에 의한 평균입자경이 증가하는 경향을 보임



[혼합비 별 유화 안정성]

- 입자증가속도
  - O/W 100%에서는 0.68%/hr의 범위로 안정된 수준, W/O 혼입함량 증가에 따라 2.45-3.62%/hr로 계면유지력이 저하됨
  - W/O/W의 계면 제조시 초기 입자 크기는 상대적으로 작은 반면, O/W에서 W/O로 전환 Phase에서 형성되는 계면의 유지력은 제품화하기에는 한계성이 보임

- 입자 유지력 지수
  - 0/W 100%는 1.226 범위로 가장 안정된 수준을 보이나, W/O 혼입함량 증가에 따라 0.991-0.885 수준으로 불량해짐이 확인됨
- 재혼합지수
  - 0/W 100%는 제조 직후 3.2 $\mu$ m 재 혼합 후 4.41 $\mu$ m의 평균 입자경으로 준수한 재혼합 지수를 보이나, W/O 함량 증진에 따라 재 혼합 후 입자분포는 255.4-1,688.2 $\mu$ m로 매우 불량한 수준을 보였고, 육안으로도 확인이 가능한 수준임.
  - 다중계면의 특성 상 제조 시 W/O → W/O/W의 순차적인 제조 과정 및 높은 전달력을 요구하나, 재 혼합 시 순차적인 재혼합을 기대할 수 없어, 제품의 장기저장 시 소비자의 간단한 혼합 과정만으로는 유효물질의 재 균질화를 기대할 수 없음
- 희석수 제조능력
  - 0/W 100%는 희석수와의 반응에서 균질화가 비교적 잘된 것으로 관찰, 반면 W/O/W 제형 모두 희석수와의 반응에서 층 분리가 관찰됨

[혼합비 별 유화입자의 특성]

첨가비율(%)	입자증가속도(%/hr)	입자 유지력지수	재혼합 지수	희석수 제조 능력
OW(100)	0.68	1.226	0.73	≥500time
WO(20)OW(80)	2.45	0.991	0.12	≪100time
WO(25)OW(75)	2.69	0.957	0.13	≪100time
WO(30)OW(70)	3.26	0.919	0.07	≪100time
WO(40)OW(80)	3.62	0.885	0.06	≪100time

- 수치적 비교
  - 0/W/O 제형의 도입에 따라 유타제 대비 제형의 안정성 및 현장 희석수와의 반응 한계성을 나타냄
  - 0/W 기존 제형인 유타제 대비 유효물질의 함량을 추가로 개선하는 데는 한계가 있어, 최종 제형은 0/W 제형인 유타제로 결정함

[W/O/W 제형 첨가비율에 따른 정량적 완성도 평가(점수화)]

구분		첨가비율(%)				
		OW(100)	WO(20)OW(80)	WO(25)OW(75)	WO(30)OW(70)	WO(40)OW(80)
입자경	초기	1.00	0.11	0.08	0.05	0.03
	24hr	1.00	0.06	0.05	0.02	0.02
	48hr	1.00	0.04	0.03	0.01	0.01
	72hr	1.00	0.03	0.02	0.01	0.00
입자증가속도		1.00	0.28	0.25	0.21	0.19
입자유지력		1.00	0.81	0.78	0.75	0.72
재혼합지수		1.00	0.16	0.17	0.10	0.08
희석균일도		1.00	0.00	0.00	0.00	0.00
합계		8.00	1.48	1.39	1.16	1.05

② 저비산성 강화에 의한 항공방제용 제형 도출

가) 실험 목적

- 항공방제용 저비산용 분제 개발 목적으로, D+L limonene 유타제를 기본으로 점성을 증가시켜, 비산성을 억제하고자 함

나) 실험방법

- 1차 : D+L limonene 유탁제 처방전에 다양한 증점제 첨가로 시료화
  - 증점제(쟁탄검)를 혼입(0, 0.2, 0.5, 0.7, 1.0%) 시료화
- 2차 : 제조 시료의 점도 및 분무 균일화 평가
  - 점도 측정 : 제조 시료를 디지털 점도계(Visco-895)로 측정 시료의 점도를 측정
  - 분무 균일성 평가 : 시료를 10배 희석, 실험용 분무기로 30cm 이격 1회 분무량을 5mL로 조절 10회 분사한 후, 분무량(처리후 무게-처리전 무게) 및 분무면적(perimeter of equivalent ellipse 계산식)의 균일도를 평가함

[분무면적 산출기준]

$$C = 2\pi \sqrt{(a^2 + b^2) \div 2}$$

*a* 원의 장축      *b* 원의 단축

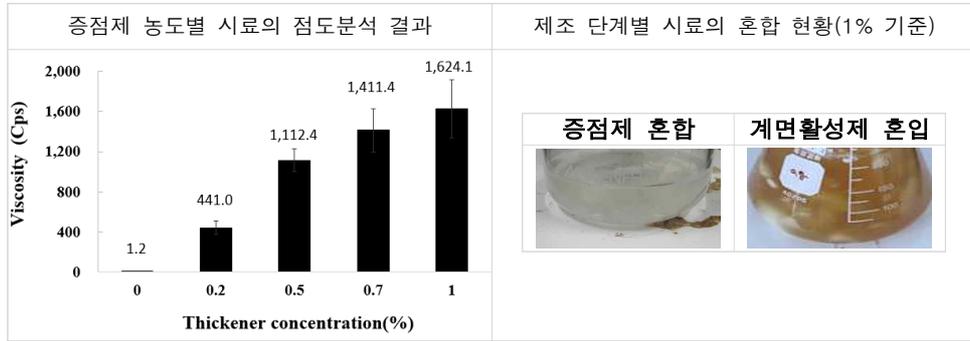
- 3차 : 시료를 10배 희석, 실험용 분무기로 30cm 이격, 대상지점의 평균 분무면적을 기준으로 평가, 최종 분무거리에서 대상지점의 분무면적과의 수치적 상관성으로 비산각도를 추정함
- 4차 : 최종 선발된 비산억제제형 처방전으로 조제된 시료의 유화 안정성을 평가하고 평가기준은 ③ 미탁제형의 도출 실험 < 미탁제형의 최적 선발 방법과 동일하게 진행함

다) 실험재료

- 대상소재 : D-limonene oil 95%(Florida Chemical, Pure essential oil grade), L-limonene oil 75%(Jiangxi Senhai Natural plant oil, Pure essential oil grade)
- 유화제 : Span 20, Tween 20 산업용 Grade
- 동결방지제 : Propylenen glycol → 제형의 물성 안정성 확보
- 방부제 : Sodium benzoate → 미생물 등의 추가 증식 억제, 저장성 개선
- 소포제 : Antifoam → 미생물 등의 추가 증식 억제, 저장성 개선
- 비중조정제 및 점도증가제 : Ethanol, Xanthan gum
- 시료에 포함되는 모든 원료는 EPA list에 준하며 유기농업자재 허용물질로써 상업용 Grade로 적용하여 활용

다) 실험결과

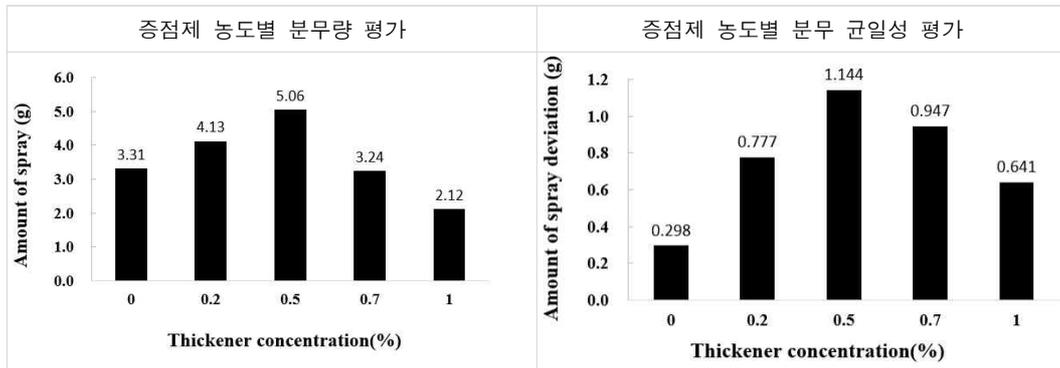
- 점도측정
  - 증점제를 넣지 않은 시료는 물과 유사한 수준의 점성을 보이며, 증점제의 첨가에 따라 441.8±64.1 - 1,624.1±288.7 Cps의 점도 향상을 보임
  - 반면 증점제인 쟁탄검은 0.5% 함유 조건부터 조제 시 높은 수준의 점도로 인해 높은 수준의 교반 및 반응시간의 장기화가 발생하였음



[증점제 첨가에 의한 시료의 점도 및 혼합현황]

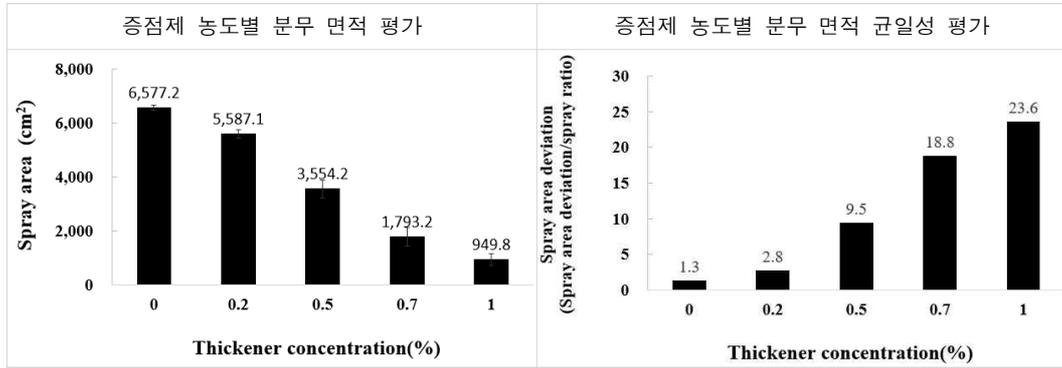
■ 시료의 분무 균일성 평가

- 시료별 항공방제의 희석 권장 범위인 10배 희석 후 점성의 증가에 따른 노즐 막힘 등의 장애 요소 평가목적으로 분무 균일도를 평가함
- 증점제 0.5% 농도까지는 1회 분무시 분무량이 증가하는 경향을 보였고, 0.5%를 초과 할 경우 감소하는 결과를 나타냄. 10회간 반복 분무 시 증점제 0.5% 농도까지는 분무량의 차이가 증가하였던 반면, 이상 농도 혼입 구간에서는 차이가 감소하였음.
- 0.5% 이하 구간에서는 점도의 증가에 따라 1회 분무량이 증가하였으나, 이상의 혼입 구간에서는 급격한 점도 증가에 따라 노즐의 침착으로 분무량이 감소 하였고 이에 분무 편차도 동일하게 감소한 것으로 보임



[증점제 첨가에 의한 분무 균일성 평가]

- 점증제를 처리하지 않은 현탁 제형의 비산면적은  $6,577.2 \pm 88.247 \text{cm}^2$ 인데 반해 증점제의 혼입 농도에 따라  $5587.1 \sim 949.82 \text{cm}^2$ 으로 비산면적의 급격한 감소가 확인됨
- 반면 조제가 힘들고 반응시간의 장기화를 초래한 0.5% 혼입 농도부터 분무 형태가 선형의 유출 등 분무형태가 불규칙적으로 변화함
- 분무편차도(각 분무면적의 표준편차/분무면적  $\times 100$ )를 보면 증점제 혼입 0.2% 구간은 2.8의 값을 보인데 반해 0.5% 이상 혼입구간부터 9.5-23.6의 수준으로 급격히 증가됨을 확인할 수 있음



[증점제 첨가에 의한 분무 패턴 평가]

■ 시료의 비산억제력 평가

- 분무 면적을 기준으로 비산각도를 추정하였고, 증점제의 혼입 농도에 따라 최대 47.0%의 비산각도가 개선되는 결과를 보임

[증점제 첨가에 의한 비산 억제력 평가]

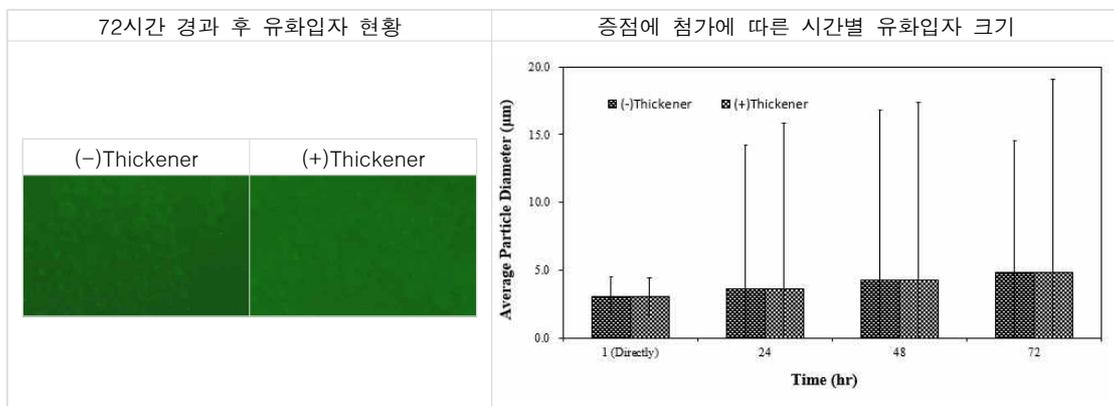
증점제 혼입농도(%)	비산각도 (Degree)	비산 개선 효율(%)
0	1.981	-
2	1.905	3.83
5	1.685	14.94
7	1.345	32.09
10	1.051	46.96

\*비산각도 추정식 :  $\arctan(\text{분무직경 반지름} / \text{분무위치}) \times 2$

- 반면 시료 제조 및 분무 균일성, 노즐의 침착등을 고려할 때 유탁제형에서 비산억제 목적의 증점제의 혼입량은 0.5% 이하로 1차 결정함

■ 제형의 안정성 평가

- DL limonene 유탁제형와 선발된 증점제 0.5%를 혼입한 비산억제 제형간의 대조 평가를 통해 제형의 완성도를 평가함
- 평균입자 크기 : 증점제를 혼입하지 않은 유탁제 시료는 혼합 직후 3.22  $\mu\text{m}$ , 72시간 경과 5.22  $\mu\text{m}$ 의 입자분포를 보였고, 증점제 0.5%를 혼입한 시료는 초기 3.11  $\mu\text{m}$ , 72시간 경과 시 4.88  $\mu\text{m}$ 로 입자크기의 유지력이 소폭 개선됨. 시료의 증가된 점성에 의해 시료의 수층이 추가로 안정되어 입자의 합일 기회를 저감한 결과로 사료됨



[증점제 첨가 유무에 의한 시료의 유화입자 분포]

- 입자증가속도 : 증점제 첨가 전 시료는 0.68%/hr, 증점제 첨가 시료는 0.64%/hr로 소폭 개선이 확인됨
- 입자 유지력 지수 : 증점제 처리 유무와 관계없이 유사한 결과수준을 보임
- 재혼합 지수 : 증점제를 처리하지 않은 시료는 0.73의 값을 보이며, 증점제를 혼입한 시료는 0.55로 24.4%가량 저하됨. 증점제 혼입으로 증가된 시료 점성이 재혼합 시 유화성을 저해한 결과로 보임
- 희석 수 제조 능력 : 전 시료 모두 20배 이하 희석 수준에서 균질한 유화성을 확인함

[증점제 첨가 유무에 의한 시료의 유화특성]

증점제 혼입량(%)	입자증가속도(%/hr)	입자 유지력지수	재혼합 지수	희석수 제조 능력
0	0.68	1.226	0.73	≥20time
0.5	0.64	1.229	0.55	≥20time

- 수치적 비교 : 증점제 첨가는 시료의 재혼합 결과 외 전체적인 평가 지표에서 증점제를 첨가하지 않은 시료 대비 동등 혹은 우위의 결과를 보였음

[증점제 첨가 유무에 의한 제형의 완성도평가(점수화)]

구분		증점제 혼입 농도(%)	
		0	0.5
입자경	초기	0.97	1.00
	24hr	0.90	1.00
	48hr	0.94	1.00
	72hr	0.93	1.00
입자증가속도		0.93	1.00
입자유지력		1.00	1.00
재혼합지수		1.00	0.76
희석균일도		1.00	1.00
합계		7.67	7.76

■ 비산억제제형의 생산 처방전

- 유타제를 기본으로 생산성, 기능성, 안정성 측면을 고려 비산 억제 처방전을 아래 제시함

[D+L limonene 비산 억제제형 생산 처방전]

구분		조건 및 함량(%, W/W)
생산조건	반응온도	> 50℃
	교반속도	> 3,000RPM
	수상첨가속도	Directly
	혼합시간	> 60min
	기본 유화 공정	주성분 → 용제 → 유화제 + 용매
처방전 (원료)	D-limonene(95%)	16.8
	L-limonene(75%)	16.8

	Span 20	1.9
	Tween 20	9.0
	Propylene glycol	3.1
	Sodium benzoate	0.1
	Antifoam	0.5
	Ethanol	5.5
	Xanthan gum	0.5
	Water	46.1
	Total	100.0

## (6) 시제품 제작

### 가) 실험 목적

- 최종 선발된 D-limonene + L-limonene 소재를 활용한 ① 흰잎마름병 방제용 유탁제 형 및 ② 항공방제 제형, ③ 원예용 방제 목적의 코팅제형의 산업화 생산 규모에서의 생산 재현성 평가

### 나) 실험 방법

- 대상소재 : 모든 소재는 산업용 원료 및 유기농업자재에 부합되는 원료로 구성
  - 리모넨 유도체 : D-limonene oil 95%(Florida Chemical, Pure essential oil grade), L-limonene oil 75%(Jiangxi Senhai Natural plant oil, Pure essential oil grade)
  - 유화제 : Span 20, 18kg(Duksan), Tween 20, 20kg(Daemyung Chemical)
  - 동결방지제 : Propylene glycol, 18kg(Daejungchem)
  - 방부제 : Sodium benzoate 20kg(Daejungchem)
  - 소포제 : 폼제로-530F, 20kg(청산캠텍)
  - 비중조정제 : Ethyl alcohol, 18L(Duksan)
  - 점도증가제 : Xanthan gum, 20kg(Jungbunzlauer Austria AG)
- 제품 처방전 : 제품 처방전은 아래와 같음

### [시제품 3종의 생산 처방전]

구분	조건 및 함량(% W/W)			
	유탁제형	항공방제제형	코팅제형	
생산조건	반응온도	> 50℃	> 50℃	> 30℃
	교반속도	> 300 RPM	> 300 RPM	> 50 RPM
	수상첨가속도	Directly	Directly	2.5%, (Vw / Vt)/sec
	혼합시간	> 30min	> 60min	> 30min
	기본 유화 공정	주성분 → 부자재 → 유화제 + 용매	주성분 → 부자재 → 유화제 + 용매	주성분 + 유화제 → 부자재 + 용매
처방전 (원료)	D-limonene(95%)	16.8	16.8	8.4
	L-limonene(75%)	16.8	16.8	8.4
	Span 20	1.9	1.9	3.4
	Tween 20	9.0	9.0	16.6
	Paraffin oil	-	-	9.0
	Propylene glycol	3.1	3.1	3.9
	Sodium benzoate	0.1	0.1	-
	Antifoam	0.5	0.5	-
	Ethanol	5.5	5.5	-
	Xanthan gum	0.2	0.5	-
	Water	46.1	46.1	50.3
	Total		100.0	

▪ 시제품 생산 환경

- 다양한 산업 규모에서 대상소재의 생산 재현성 여부를 확인하고자, 전남 생물산업진흥원, 친환경 농생명 연구센터 시험생산동 내 교반 및 반응기(50L, 500L, 5ton)를 활용하여 실시함

[다양한 산업화 생산시설 현황]

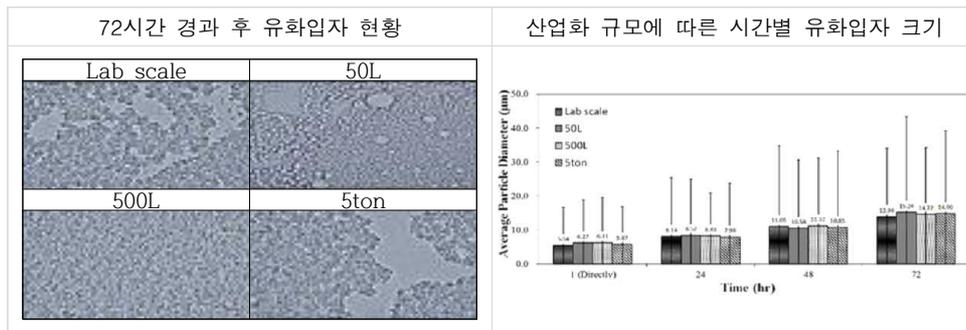


다) 실험 결과

① 흰잎마름병 방제용 유탁제

▪ 평균입자크기

- 실험실 규모 시료는 혼합 직후  $5.54 \pm 11.119 \mu\text{m}$ , 산업화 규모의 시제품은  $5.87\text{--}6.31 \mu\text{m}$ 로 유사수준을 보임
- 72시간 경과 후 당초 시료는  $13.96 \pm 20.154 \mu\text{m}$ , 시제품은  $14.72\text{--}15.24 \mu\text{m}$ 로 생산 재현성을 나타냄



[유탁제형 시제품의 유화입자 분포]

▪ 유화 안정성 및 유화 특성

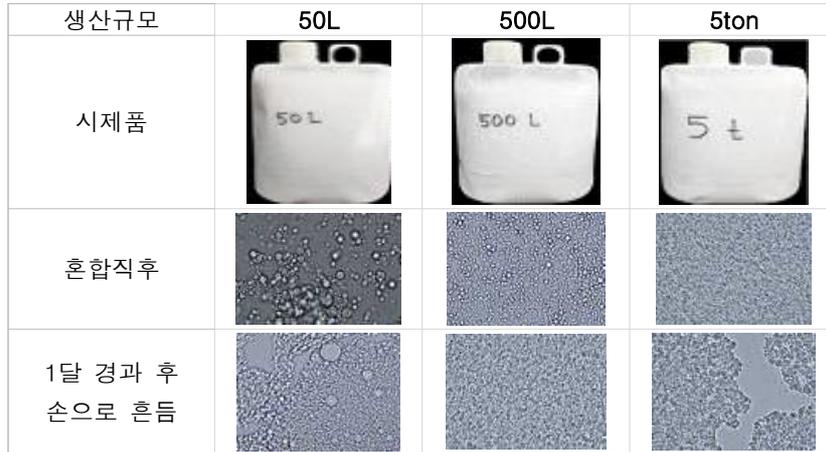
- 입자 증가 속도 : 당초 시료 및 생산 시제품 모두 1.20~1.31%/hr의 입자 증가 속도를 보여 유사 수준을 나타냄
- 입자 유지력 지수 : 실험실 규모는 1.114, 생산 시제품들은 1.106~1.118의 범위 값으로 실험실 규모와 큰 차이점을 나타내지 않음
- 재혼합 지수 : 당초 시료 및 생산 시제품은 0.71~0.77의 범위 값으로 유사한 경향을 보임
- 희석수 제조 능력 : 당초 시료 및 생산 시제품 모두 100~500배 희석 수준에서 균질한 유화성이 확인됨

▪ 시제품의 완성도 평가

- 생산 재현성(수치적 평가) : 단위 시간별 유화 입자의 크기, 입자 증가 속도, 입자 유지력 지수, 재혼합 지수, 희석균일도 등 제형에 대한 다양한 인자의 안정성 평가에 대한 비교 분석 결과 시제품 및 생산 공정은 실험실 환경과 재현성 있는 수준임이 확인됨

[유타제형 시제품의 생산 재현성 평가(점수화)]

구분		산업용 생산 규모			
		Lab scale	50L	500L	5ton
입자경	초기	1.00	0.88	0.88	0.94
	24hr	0.98	0.94	0.96	1.00
	48hr	0.96	1.00	0.93	0.98
	72hr	1.00	0.92	0.95	0.94
입자증가속도		0.92	0.95	1.00	0.91
입자유지력		0.99	0.99	1.00	0.98
재 혼합지수		0.96	0.92	1.00	0.89
희석균일도		1.00	1.00	1.00	1.00
합계		7.81	7.61	7.72	7.64

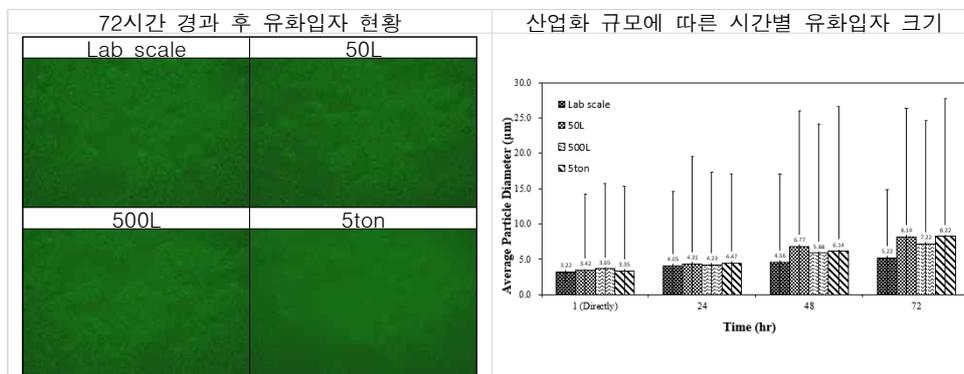


[유타제형 시제품 생산 현황]

② 흰잎마름병 방제용 항공방제제

▪ 평균입자크기

- 당초 시료는 혼합 직후,  $3.22 \pm 1.427$ , 72시간 경과 후  $5.22 \pm 9.643 \mu\text{m}$ 의 입자경을 산업화 규모 시제품은 혼합 직후  $3.35\text{--}3.65 \mu\text{m}$ , 72시간 경과 후  $8.14\text{--}8.22 \mu\text{m}$ 의 입자 분포를 보임
- 대량생산 환경에서 증점제 첨가 및 점성 증가로 유타제와 부자재 사이의 균질화가 저해되어 유타 안정성이 소폭 감소한 것으로 보임



[항공방제 제형 시제품의 유타입자 분포]

▪ 유타 안정성 및 유타 특성

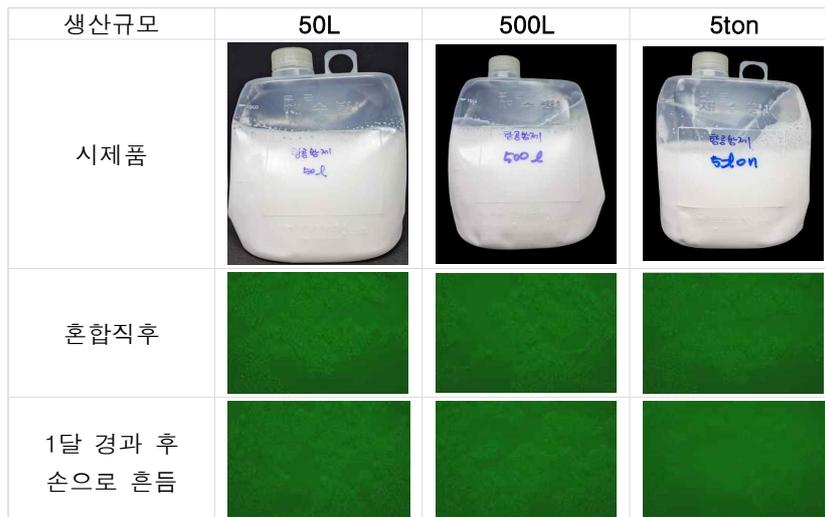
- 입자 증가 속도 : 당초 시료는 0.68%/hr, 생산 시제품은 0.97~1.27%/hr 범위로 다소 증

가된 수준을 보임

- 입자 유지력 지수 : 실험실 환경은 1.226, 생산 시제품은 1.112-1.156의 범위로 다소 감소한 수준을 보임
- 재혼합 지수 : 당초 시료 및 생산 시제품은 0.55-0.63의 범위 값으로 유사한 경향을 보임
- 희석수 제조 능력 : 당초 시료 및 생산 시제품 모두 20배 희석 수준에서 균질한 유평성을 확인함
- 시제품의 완성도 평가
  - 생산 재현성(수치적 평가) : 실험실 환경 대비 유평 입자의 크기 및 유지력 등 일부 감소한 효율을 보이거나, 재혼합 및 희석 반응 시 당초 시료와 유사 수준을 보여 제품 양산에는 큰 지장이 없는 수준임

[항공방제 제형 시제품의 생산 재현성 평가(점수화)]

구분		산업용 생산 규모			
		Lab scale	50L	500L	5ton
입자경	초기	1.00	0.94	0.88	0.96
	24hr	1.00	0.94	0.96	0.91
	48hr	1.00	0.67	0.78	0.74
	72hr	1.00	0.64	0.72	0.64
입자증가속도		1.00	0.56	0.71	0.54
입자유지력		1.00	0.91	0.94	0.91
재혼합지수		0.91	0.87	1.00	0.89
희석균일도		1.00	1.00	1.00	1.00
합계		7.91	6.53	6.99	6.58

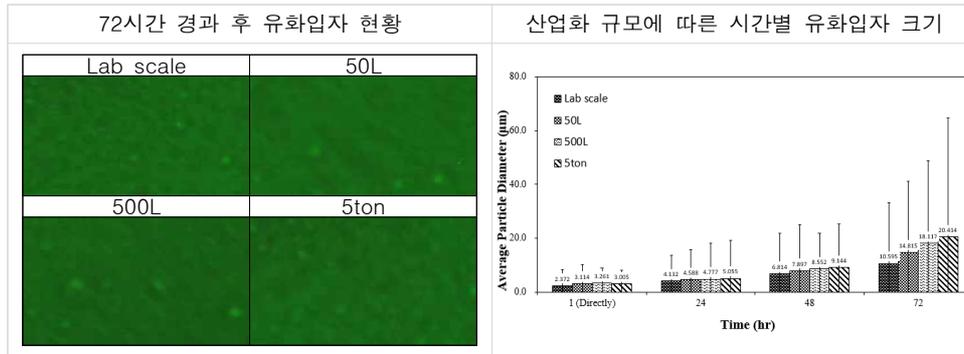


[항공방제 제형 시제품 생산 현황]

### ③ 원예용 병원균 방제용 코팅제

- 평균입자크기
  - 실험실 규모는 혼합직후  $2.37 \pm 6.114 \mu\text{m}$ , 72시간 경과 후  $10.60 \pm 22.644 \mu\text{m}$ 의 크기를 보이지만 산업화 규모 시제품은 혼합직후  $3.005 \sim 3.261 \mu\text{m}$ , 72시간 14.815-20.414  $\mu\text{m}$ 의 입자경을 보였고, 생산 규모의 증가에 따라 입자의 크기가 증가함

- 원예용 코팅제의 기본 제형은 미탁 제형으로써 연속적인 유량조절이 입자 미세화의 주요 요인이나, 대량생산 시 연속적인 유량조절이 쉽지 않아 발생한 것으로 사료됨



[코팅제형 시제품의 유화입자 분포]

- 유화 안정성 및 유화 특성
  - 입자 증가 속도 : 당초 시료는 2.13%/hr, 생산 시제품은 2.22-2.74%/hr 범위로 생산 규모가 증대될수록 증가 속도가 느려짐
  - 입자 유지력 지수 : 당초 시료는 1.004, 반면 생산 시제품은 0.925-0.975 범위로 생산 규모가 증대될수록 느려짐
  - 재혼합 지수 : 당초 시료 및 생산 시제품은 0.55-0.63범위로 유사 수준을 보임
  - 희석수 제조 능력 : 당초 시료 및 생산 시제품 모두 500배 희석 반응까지 균질화된 성상을 보임
- 시제품의 완성도 평가
  - 생산 재현성(수치적 평가) : 산업화 생산 규모에 따라 저장기간에 의한 유화입자의 크기가 증가되는 경향을 보이거나, 제품 구입 시 소비자의 활용 측면을 고려한 재혼합에 의한 분산력, 희석 반응에서 당초 시료와 큰 차이를 보이지 않아 상용화 시 큰 문제점은 없을 것으로 판단됨

[코팅제형 시제품의 생산 재현성 평가(점수화)]

구분	산업용 생산 규모				
	Lab scale	50L	500L	5ton	
입자경	초기	1.00	0.76	0.73	0.79
	24hr	1.00	0.90	0.86	0.82
	48hr	1.00	0.86	0.80	0.75
	72hr	1.00	0.72	0.58	0.52
입자증가속도	1.00	0.96	0.87	0.78	
입자유지력	1.00	0.97	0.94	0.92	
재혼합지수	0.91	0.87	0.87	1.00	
희석균일도	1.00	1.00	1.00	1.00	
합계	7.91	7.04	6.66	6.57	

생산규모	50L	500L	5ton
시제품			
혼합직후			
1달 경과 후 손으로 흔들			

[코팅 제형 시제품 생산 현황]

## (7) 제품등록 실험 및 시제품의 안정/안전성 평가

### ① 시제품 3종의 저장 안정성 평가

#### 가) 실험 목적

- 저장기간 및 저장환경에 따른 시제품의 저장 안전성 평가

#### 나) 실험 재료 및 실험 방법

- 실험 재료
  - : D+L limonene 유타제, 항공방제, 코팅제 3종 시제품
- 방부력
  - 100mL 삼각플라스크에 80mL의 시제품 용액을 넣고, 파라필름으로 밀봉함
  - 30℃로 셋팅된 미생물 배양기에 정치 한 후 7일간 보관함
  - 7일간 파라필름의 부푼 정도에 따른 달관 조사를 시행함
- 이화학적 물성 변화(pH)
  - 100mL 삼각플라스크에 80mL의 시제품 용액을 넣고, 파라필름으로 밀봉함
  - 30℃로 셋팅된 미생물 배양기에 정치 한 후 7일간 보관함
  - 시간의 경과 별 pH를 측정하여 초기 pH 대비 변화 정도를 측정함
  - 층분리에 의한 pH 변화가 야기될 수 있으므로, 측정 시 시제품 용액을 재혼합 함
- 동결 저항 정도
  - 50mL 코니칼 튜브에 35mL 시제품 용액을 넣고, -4℃, -10℃ 환경에 저장함
  - 3시간 시제품 용액을 보관 후 동결 유무에 따른 동결보존 효과를 조사함
- 층분리 여부
  - 50mL 코니칼 튜브에 일정량의 시제품 용액을 넣고, 30℃로 셋팅된 미생물 배양기에 정치 한 후 7일간 보관함.
  - 시제품 용액을 회수 후 손으로 5회 이상 흔들어서 혼합, 5분 후 층 분리 현상을 육안 관찰함

#### 다) 실험결과

- 방부력 및 이화학적 물성변화(pH) 평가
  - 시제품은 3종은 가스 발생 등의 이상 현상을 확인 할수 없었고, 시간의 경과에 의한 pH 변화를 관찰한 결과 특별한 사항은 확인되지 않음

[시제품 3종의 방부력 및 이화학적 안전성 평가]

구분	시제품	측정 일자						
		1일차	2일차	3일차	4일차	5일차	6일차	7일차
팽창률 <sup>1)</sup>	유탕제	-	-	-	-	-	-	-
	항공방제제	-	-	-	-	-	-	-
	코팅제	-	-	-	-	-	-	-
pH	유탕제	5.4	5.4	5.5	5.4	5.4	5.5	5.6
	항공방제제	5.3	5.3	5.4	5.3	5.3	5.3	5.3
	코팅제	5.2	5.2	5.2	5.3	5.2	5.3	5.2

1) 팽창률 : 강함(++), 약함(+), 없음(-)

▪ 동결 저항 정도 평가

- 시제품 3종은 3시간 동안 -10℃ 저장 환경에서 동결이 일어나지 않았음.

[동결 저항 정도 평가]

구분	시제품	저장온도	측정 시간						
			직후	30분	60분	90분	120분	150분	180분
동결보존력 <sup>1)</sup>	유탕제	-4℃	×	×	×	×	×	×	×
		-10℃	×	×	×	×	×	×	×
	항공방제제	-4℃	×	×	×	×	×	×	×
		-10℃	×	×	×	×	×	×	×
	코팅제	-4℃	×	×	×	×	×	×	×
		-10℃	×	×	×	×	×	×	×

1) 0 : 동결, X : 비동결

▪ 층분리 여부

- 7일간 저장된 시제품 3종을 재혼합하였을 때 균일한 분산성이 확인되었고, 특이점이 확인 안됨

② 제품등록 실험 : 시제품의 유효물질 함량 평가

가) 실험 목적

- 유기농업자재 등록을 위한 제품등록실험 및 유효물질 함량평가

나) 실험 재료 및 실험 방법

- 실험 재료
  - 유탕제형 및 항공방제 제형
- 분석 기관
  - 유기농업자재 공시 분석기관을 통한 공인시험 : 친환경농산물안전성센터
- 분석 방법
  - Limonene에 대한 GC/FID를 이용한 정량 분석

다) 실험 결과

- 유탕 제형 시제품 내 Limonene 함량은 28.22±0.11%로 분석됨

[유탁제형 시제품의 유효물질 함량분석]

분석횟수	1	2	3	평균치	편차값	성적번호
Limonene 함량(%)	28.32	28.14	28.13	28.20	0.11	EFAP-22-1004-A-1

③ 제품등록 실험 : 시제품의 식물 독성 평가(시제품의 식물 약해)

가) 실험 목적

- 유기농업자재 등록을 위한 제품등록실험 및 작물 약해 실험

나) 실험 재료 및 실험 방법

- 실험 재료
  - 유탁 제형 및 항공방제 제형
- 분석 기관
  - 유기농업자재 공시 분석기관을 통한 공인시험 : 친환경농산물안전성센터
- 분석 방법
  - 시험 기준 : 1) 국립농산물품질 관리원 고시 제2020-20호(2020.12.08.) 유기농업자재 공시 기준, 2) 농촌진흥청 고시 제2022-12호(2022.07.06.) 농약 및 원제의 등록 기준
- 시험작물
  - 유탁제형 : 벼 및 주변작물 4종(고추, 들깨, 배추, 오이)
  - 항공방제 제형 : 벼 및 주변작물 6종(고추, 들깨, 배추, 상추, 오이)
- 식물독성평가 기준
  - 유탁 제형 시제품 : 처리일로부터 7일간(3, 5, 7일 후) 총 3회에 걸쳐 외관상 농약 피해 유무를 달관조사
  - 항공방제 제형 시제품 : 처리일로부터 14일간(3, 5, 7, 14일 후) 총 4회 외관상 농약 피해 유무를 달관 조사

[재배 및 처리조건]

시제품	작물명	처리시기	처리구	희석 농도	처리량	시험구 규모
유탁제	벼(오대벼) 2-3엽기 유식물	유식물 4-5주	무처리	-	-	5포트×3반복
			기준량	300배	66.7mL/20L희석, 경엽처리	5포트×3반복
			배량	150배	133.3mL/20L희석, 경엽처리	5포트×3반복
	고추(신와매워) 2-3엽기 유식물	1주 정식 후	무처리	-	-	5포트×3반복
			기준량	300배	66.7mL/20L희석, 경엽처리	5포트×3반복
			배량	150배	133.3mL/20L희석, 경엽처리	5포트×3반복
	들깨(참다복) 2-3엽기 유식물	1주 정식 후	무처리	-	-	5포트×3반복
			기준량	300배	66.7mL/20L희석, 경엽처리	5포트×3반복
			배량	150배	133.3mL/20L희석, 경엽처리	5포트×3반복
	배추(휘모리골드) 2-3엽기 유식물	1주 정식 후	무처리	-	-	5포트×3반복
			기준량	300배	66.7mL/20L희석, 경엽처리	5포트×3반복
			배량	150배	133.3mL/20L희석, 경엽처리	5포트×3반복
오이(신아시아은천) 2-3엽기 유식물	1주 정식 후	무처리	-	-	5포트×3반복	
		기준량	300배	66.7mL/20L희석, 경엽처리	5포트×3반복	
		배량	150배	133.3mL/20L희석, 경엽처리	5포트×3반복	
항공방제	벼(오대벼)	이항 후 3개월 경과	무처리	-	-	10m <sup>2</sup> × 3반복
			기준량	10배	160mL/1.6L희석, 무인항공처리	130m <sup>2</sup> × 2반복
			배량	5배	320mL/1.6L희석, 무인항공처리	130m <sup>2</sup> × 2반복
	고추(신와매워) 2-3엽기 유식물	1주 정식 후	무처리	-	-	5포트×3반복
			기준량	10배	160mL/1.6L희석, 경엽처리	5포트×3반복
			배량	10배	160mL/1.6L희석, 경엽처리	5포트×3반복
	들깨(참다복) 2-3엽기 유식물	1주 정식 후	무처리	-	-	5포트×3반복
			기준량	10배	160mL/1.6L희석, 경엽처리	5포트×3반복
			배량	10배	160mL/1.6L희석, 경엽처리	5포트×3반복
	배추(휘모리골드) 2-3엽기 유식물	1주 정식 후	무처리	-	-	5포트×3반복
			기준량	10배	160mL/1.6L희석, 경엽처리	5포트×3반복
			배량	10배	160mL/1.6L희석, 경엽처리	5포트×3반복
상추(청치마) 2-3엽기 유식물	1주 정식 후	무처리	-	-	5포트×3반복	
		기준량	10배	160mL/1.6L희석, 경엽처리	5포트×3반복	
		배량	10배	160mL/1.6L희석, 경엽처리	5포트×3반복	
오이(신아시아은천)	1주	무처리	-	-	5포트×3반복	
		기준량	10배	160mL/1.6L희석, 경엽처리	5포트×3반복	

	2-3엽기 유식물	정식 후	기준량	10배	160mL/1.6L희석, 경엽처리	5포트×3반복
	콩(선종)	1주	무처리	-	-	5포트×3반복
	2-3엽기 유식물	정식 후	기준량	10배	160mL/1.6L희석, 경엽처리	5포트×3반복

[약해 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

다) 실험 결과

▪ 유탁제형 시제품

- 300배, 150배 희석구간에서 시험작물 모두 식물독성으로 판단될 만한 특이한 증상은 없었음(약해 판정 기준 : 0)

[유탁제형 시제품의 작물 약해 발생 현황]

작물명	희석농도	처리 경과 일자		
		3일	5일	7일
벼	300배			
	150배			
고추	300배			
	150배			
들깨	300배			
	150배			
배추	300배			

				
	150배			
오이	300배			
	150배			

■ 항공방제 제형 시제품

- 5배, 10배 희석구간에서 시험 작물 모두 식물 독성으로 판단될 만한 특이한 증상은 없었음(약해 판정기준 : 0)

[항공방제 제형 시제품의 작물 약해 발생 현황]

작물명	희석농도	처리 경과 일자			
		3일	5일	7일	14일
벼	300배				
	150배				
고추	300배				
들깨	300배				
배추	300배				
상추	300배				
오이	300배				
콩	300배				

④ 제품등록 실험 : 시제품의 생물 독성 평가

가) 실험 목적

- 유기농업자재 등록을 위한 제품등록실험 및 생물 독성 평가

나) 실험 재료 및 실험 방법

- 실험 재료
  - 유탁 제형 시제품
- 분석 기관
  - 유기농업자재 공시 분석기관을 통한 공인시험 : 한국생물안전성연구소
- 분석 항목
  - 피부자극성, 안점막 자극성, 급성 경구독성, 급성 경피독성, 꿀벌 급성 접촉독성, 담수어류 급성독성
- 분석 기준

[생물독성시험 분석기준]

실험 구분	분석기준
피부자극성시험	농약 및 원제의 등록기준[별표 12] 인축독성시험 기준과 방법(농촌진흥청 고시 제 2022-23호)
안점막자극성시험	농약 및 원제의 등록기준[별표 12] 인축독성시험 기준과 방법(농촌진흥청 고시 제 2022-23호)
급성경구독성시험	농약 및 원제의 등록기준[별표 12] 인축독성시험 기준과 방법(농촌진흥청 고시 제 2022-23호)
급성경피독성시험	농약 및 원제의 등록기준[별표 12] 인축독성시험 기준과 방법(농촌진흥청 고시 제 2022-23호)
꿀벌급성접촉독성시험	농약 및 원제의 등록기준[별표 13] 환경생물 독성 시험기준과 방법(농촌진흥청 고시 제 2022-23호)
담수어류급성독성	농약 및 원제의 등록기준[별표 13] 환경생물 독성 시험기준과 방법(농촌진흥청 고시 제 2022-23호)

- 실험 개체 및 시제품 처리량

[실험개체 및 시제품 처리방법]

실험 구분	실험개체	처리방법
피부자극성시험	New zealand white 토끼	시험동물 제모 부위에 시제품 0.5mL량 피부접촉, 4시간 후 제거
안점막자극성시험	New zealand white 토끼	시험동물 결막낭 내 시제품 0.1mL 주입
급성경구독성시험	랫드	시제품 2.0g을 10mL에 희석하여 경구 투여
급성경피독성시험	랫드	시제품 16.0g을 20mL에 희석하여 피부접촉, 24시간 후 제거
꿀벌급성접촉독성시험	꿀벌	꿀벌의 흉부(등위에) 시제품 1μL 처리
담수어류급성독성	제프라 피쉬	시제품 0.1g을 100mL 용해, L 단위 시험수조에 4.0~20.0mL 구간 처리 및 96시간 노출

- 독성판단 기준

[생물독성 판단기준]

실험 구분	생물독성 판단기준
피부자극성시험	1) 일반중독증상 및 치사, 2) 체중측정, 3) 처리부위 관찰, 4) 피부반응의 평가 및 자극성 판정
안점막자극성시험	1) 일반중독증상, 2) 체중측정, 3) 안반응의 평가, 4) 자극성의 평가
급성경구독성시험	1) 일반중독증상 및 치사동물 관찰, 2) 체중측정, 3) 부검, 4) 반수치사약량(LD <sub>50</sub> ) 산출
급성경피독성시험	1) 일반중독증상 및 치사동물 관찰, 2) 체중측정, 3) 부검, 4) 반수치사약량(LD <sub>50</sub> ) 산출
꿀벌급성접촉독성시험	1) 4, 24, 48시간 경과 시 치사 및 이상 증상 개체 관찰, 2) 24, 48시간 반수치사약량(LD <sub>50</sub> ) 산출
담수어류급성독성	1) 형태, 유영, 출현, 중독, 치사 개체 관찰, 2) 수질 측정, 3) 전장 및 체중 측정, 4) 48, 96시간 반수치사 농도(LC <sub>50</sub> ) 산출

다) 실험 결과

- 시제품의 피부 자극성
  - 실험동물은 정상적인 생육 및 중독증상, 치사 개체 등 확인되지 않음

- 국소 자극성 관찰 시 3분, 1시간, 4시간 부종 관찰, 시제품 제거 후 48시간까지 홍반이 관찰, 72시간 모든 증상이 완화되어 정상으로 회복됨
- 이하 피부자극성 시험에서 피부 1차 자극성표에 따라 '없음' 으로 판정됨
- 시제품의 안점막 자극성
  - 시험 기간 중 일반중독증상 및 치사 동물은 관찰되지 않으며, 정상 생육을 확인함
  - 시제품 처리 후 24, 48, 72시간의 각막혼탁, 홍채 반응 평균 점수는 모두 0이었고, 결막의 발적 점수는 0.00-0.33, 부종의 평균 점수는 0.00-0.33이었음
  - 이하 시제품의 안점막 자극성은 안점막 자극 표에 따라 '없음' 으로 판정됨
- 시제품의 급성 경구독성
  - 2회 투여약량 2,000mg/kg 수준에서 14일 동안 일반중독증상 및 치사 개체가 관찰되지 않으며, 정상생육을 확인함
  - 부검 결과 이상 소견은 관찰되지 않으며, 시제품의 LD<sub>50</sub> 값은 2,000mg/kg 초과, 농약관리법 시행규칙[별표 3의5] 농약 등의 독성 및 잔류성 정도별 구분 의거 IV급(저독성)으로 판정됨
- 시제품의 급성 경피독성
  - 투여 최대 수준인 4,000mg/kg에서 치사 개체가 관찰되지 않으며, 정상 생육을 확인함
  - 시제품 처리 후 1일-4(5)일까지 홍반 관찰, 이후 정상으로 회복됨
  - 시제품의 급성 경피독성 시험(LD<sub>50</sub>)값은 4,000mg/kg 초과로 농약관리법 의거 IV급(저독성)으로 판정됨
- 시제품의 꿀벌 급성 접촉독성
  - 개체별 100 µg 노출 후 48시간 동안 관찰한 결과, 모든 개체의 정상 활동이 관찰됨
  - 이에 시제품의 꿀벌에 대한 반수치사약량(LD<sub>50</sub>)은 가장 높은 수준인 100 µg을 초과, 꿀벌 급성 접촉독성에 대해 '안정' 판정을 받음
- 담수어류 급성독성
  - 시제품의 시험 동물에 대한 48, 96시간 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)는 42.170mg/L로, 담수어류 급성독성에 대해 '안정' 판정을 받음

[독성평가 기준표]

피부1차자극표		안점막자극성기준표		급성독성구분표	
구분	분류기준	구분	분류기준	시험동물의 반수를 죽일 수 있는 양 (mg/kg B.W.)	
강도	다음 어느 하나에 해당하는 물질 ① pH 2 이하 또는 pH 11.5 이상인 물질 ② 동물시험 결과 3마리 중 1마리 이상에서 시험 물질 노출 즉시 또는 4시간 노출 중에 피부 순진부식 세포손상 용이 나타나고 관련 증상이 14일까지 지속되는 경우	강도	다음 어느 하나에 해당하는 물질 ① 피부 온도 저하량인 부식성 물질 ② pH 2 이하 또는 pH 11.5 이상인 물질 ③ 염산, 아세트, 황황산에서 각각, 후채 또는 결막에 대한 영향이 회복되지 않을 것이라 예상되거나 일반적으로 관찰기간 21일 내에 완전히 회복되지 않는 경우 ④ 시험동물 3마리 중 최소한 2마리에서 시험물질 투입 후 24, 48 및 72시간에서, 평균 점수에서 계산된 수치가 아래 기준에 어느 하나라도 해당하는 경우 ○ 각막 불투명도 > 3 ○ 혼탁 > 1.5	급성경피	
중도	다음 어느 하나에 해당하는 물질 ① 동물시험(아래) 최대 4시간 노출 조건 결과 2마리 이상 72시간에 대한 개체별 평균값이 적어도 2마리에서 해당 범위에 포함될 경우 (단, 반응이 늦게 발현된 경우에는 피부 반응 발생 후 3일간을 연속평가) 2.3 ≤ 혼탁이 부종 평균값 < 4.0	중도	다음 어느 하나에 해당하는 물질 ① 피부 온도 저하성 물질 ② 동물 시험동물 3마리 중 최소한 2마리에서, 아래 기준에 어느 하나라도 해당되고, 관찰기간 21일 이내에 완전히 회복되는 경우 ○ 각막 불투명도 > 2 ○ 혼탁 평균 > 2 ○ 결막 부종 점수 > 2	IV급 (저독성)	
약도	동물시험(아래) 최대 4시간 노출 조건 결과 24, 48 및 72시간에 대한 개체별 평균값이 적어도, 2마리에서 해당 범위에 포함될 경우 (단, 반응이 늦게 발현된 경우에는 피부 반응 발생 후 3일간을 연속평가) 1.5 ≤ 혼탁 or 부종 평균값 < 2.3	약도	중도 조건에 해당하는 자정성이 7일 이내에 완전히 회복되는 경우	III급 (중독성)	
없음	위도이상 범주기준에 해당하지 않는 경우	없음	약도 이상에 해당하지 않는 경우	II급 (고독성)	
				I급 (중독성)	
				고 체	액 체
				10 미만	40 미만
				10 이상, 100 미만	40 이상, 400 미만
				100 이상, 1000 미만	400 이상, 4000 미만
				1000 이상	4000 이상

⑤ 제품등록 실험 : 시제품의 잔류농약 평가

가) 실험 목적

- 유기농업자재 등록을 위한 제품등록실험 및 잔류농약평가

나) 실험 재료 및 실험 방법

■ 실험 재료

- 유탁 제형 시제품

■ 분석 기관

- 유기농업자재 공시 분석 기관을 통한 공인시험 : 친환경농산물안전성센터

■ 분석 항목

- 유기농업자재 고시 기준 : 2,4,6-trichlorophenol 외 462종의 농약성분
- 분석 방법
  - LC-MS/MS를 통한 잔류농약 정량 분석

다) 실험 재료 및 실험 방법

- 유기농업자재 고시 기준 463종에 대한 잔류농약은 모두 ‘불검출’ 되었음

(8) 시제품의 현장적용실험(최종평가)

① 유탁제형 시제품 : 1회차

가) 실험 목적

- 등록대상 시제품의 공인분석환경에서의 현장단위 흰잎마름병 방제력 평가
- 공인시험결과를 토대로 한 유기농업자재의 효능효과 공시 변경(기술인증)

나) 실험 재료 및 실험 방법

- 실험 재료
  - 유탁제형 시제품
- 분석 기관
  - 유기농업자재 공시 분석기관을 통한 공인시험 : 주식회사 현농(시험번호 : HN23-0-10)
- 현장 시험방법
  - 시험품종 : 벼(남평벼)
  - 시험장소 : 전북 정읍시 태인면 증산리 691
  - 흰잎마름병 감염 방법 : 자연발생, 무처리구에서 자연 발병도가 29.9%로 약효를 조사하기에 충분하였음
  - 재배이력 : 이앙(23.06.23), 시제품 처리 1차(23.08.25), 시제품처리 2차(23.09.01), 종료(23.09.08), 비료 시비 등은 관행 방법에 준하였고, 타 약제를 처리하지 않음
  - 시험구 배치 및 면적 : 난괴법 3 반복

[시험구 배치 및 면적]

처리수	반복수	총 실험구	실험구당 면적	총면적
2	3	6	30m <sup>2</sup>	180m <sup>2</sup>



[시험포 배치 및 약제 처리 현황]

- 시제품 처리 이후 기상 상황 : 약제 처리에 영향을 끼칠 큰 기상변화는 없었음

[시제품 처리 전후 기상 개황]

월/일	강수량(mm)	기온(°C)		
		최고	최저	평균
8/24	19.6	28.4	23.7	24.9
8/25	-	30.6	21.6	25.7
8/26	-	30.7	20.3	24.7
8/31	0.00	27.3	19.3	22.7
9/1	-	30.2	19.5	23.5
9/2	3.1	29.1	19.3	23.6

- 시제품의 처리 방법
  - 약제의 조제 : 시제품 50mL을 물 15L에 희석(300배 희석)
  - 약제의 처리 및 방법 : 0.5L/m<sup>2</sup> 수준으로 경엽처리
  - 처리 시기 : 발병 직전 7일 간격 2회(8월25일, 9월1일)
  - 분무기(살포기) 제원 : Sun 전동분무기/신일종합농기계, 2구 노즐
- 약효시험 조사방법
  - 최종 시제품 처리 7일 후(9월8일) 시험구당 30주에 대한 발병도 조사

다) 실험결과

- 약해판정
  - 시제품을 처리 후 7일간 약해 조사 결과 경엽의 위조, 고사, 반점, 황변, 낙엽 여부 등 약해 증상이 관찰되지 않음
- 약효판정
  - 시제품은 벼 흰잎마름병에 대해 55.2%의 방제 효과를 보였고, 별도의 약해 증상이 발견되지 않아, 흰잎마름병 방제 약제로 사용할 수 있음

[약효시험결과]

구분	발병도(%)				유의차(DMRT)	방제가(%)	대표사진
	1반복	2반복	3반복	평균			
유탁제형 시제품	14.1	13.8	12.2	13.4	b	55.2	
무처리	32.4	28.3	29.2	29.9	a	-	

Cv(%)=6.3

② 유탁제형 시제품 : 2회차

가) 실험 목적

- 등록대상 시제품의 공인분석환경에서의 현장단위 흰잎마름병 방제력 평가
- 공인시험결과를 토대로 한 유기농업자재의 효능효과 공시 변경(기술인증)

나) 실험 재료 및 실험 방법

- 실험 재료
  - 유탁 제형 시제품
- 분석 기관
  - 유기농업자재 공시 분석기관을 통한 공인시험 : 주식회사 현농(시험번호 : HN23-0-11)
- 현장 시험방법
  - 시험품종 : 벼(남평벼)

- 시험장소 : 전남 장성군 삼계면 상도리 434-15
- 흰잎마름병 감염 방법 : 자연발생, 무처리구에서 자연 발병도가 28.4%로 약효를 조사하기에 충분하였음
- 재배이력 : 이앙(23.06.05), 시제품 처리 1차(23.08.25), 시제품 처리 2차(23.09.01), 종료(23.09.08), 비료 시비 등은 관행 방법에 준하였고, 타 약제를 처리하지 않음
- 시험구 배치 및 면적 : 난괴법 3 반복

[시험구 배치 및 면적]

처리수	반복수	총 시험구	시험구당 면적	총면적
2	3	6	30m <sup>2</sup>	180m <sup>2</sup>



[시험포 배치 및 약제 처리 현황]

- 시제품 처리 전후 기상 상황 : 약제 처리에 영향을 끼칠 큰 기상변화는 없었음

[시제품 처리 전후 기상 개황]

월/일	강수량(mm)	기온(°C)		
		최고	최저	평균
8/24	34.9	28.9	23.7	25.2
8/25	-	31.2	23.1	26.2
8/26	-	32.3	20.7	26.0
8/31	0.1	28.9	19.9	23.6
9/1	-	30.1	20.3	24.6
9/2	2.5	27.2	22.0	24.3

- 시제품의 처리 방법
  - 약제의 조제 : 시제품 50mL을 물 15L에 희석(300배 희석)
  - 약제의 처리 및 방법 : 0.5L/m<sup>2</sup> 수준으로 경엽처리
  - 처리 시기 : 발병 직전 7일간격 2회(8월25일, 9월1일)
  - 분무기(살포기) 제원 : Sun 전동분무기/신일종합농기계, 2구 노즐
- 약효시험 조사방법
  - 최종 시제품 처리 7일 후(9월8일) 시험구당 30주에 대한 발병도 조사

다) 실험결과

- 약해판정

- 시제품을 처리 후 7일간 약해 조사 결과 경엽의 위조, 고사, 반점, 황변, 낙엽 여부 등 약해 증상이 관찰되지 않음
- 약효판정
  - 시제품은 벼 흰잎마름병에 대해 59.2%의 방제효과를 보였고, 별도의 약해 증상이 발견되지 않아, 흰잎마름병 방제 약제로 사용할 수 있음

[약효시험결과]

구분	발병도(%)				유의차(DMRT)	방제가(%)	대표사진
	1반복	2반복	3반복	평균			
유탕제형 시제품	10.5	13.0	11.3	11.6	b	59.2	
무처리	27.0	28.3	30.0	28.4	a	-	

Cv(%)=6.1

③ 항공방제 제형 시제품

가) 실험 목적

- 등록 대상 시제품의 공인분석 환경에서의 항공방제 분무 균일성 평가
- 등록 대상 시제품의 공인분석 환경에서의 현장 단위 흰잎마름병 항공 방제력 평가

나) 실험 재료 및 실험 방법

- 실험 재료
  - 항공방제 제형 시제품
- 분석 기관
  - 유기농업자재 공시 분석기관을 통한 공인시험 : 주식회사 현농(시험번호 : HN23-0-01-12)
- 현장 시험방법
  - 시험품종 : 벼(남평벼)
  - 시험장소 : 전남 장성군 삼계면 상도리 434-15
  - 흰잎마름병 감염 방법 : 자연발생, 무처리구에서 자연 발병도가 29.0%로 약효를 조사하기에 충분하였음
  - 재배이력 : 이앙(23.06.05), 시제품 항공방제 처리 1차(23.08.25), 시제품 항공방제 처리 2차(23.09.01), 종료(23.09.08), 비료 시비 등은 관행 방법에 준하였고, 타 약제를 처리하지 않음
  - 시험구 배치 및 면적 : 단구제(3반복 조사)

[시험구 배치 및 면적]

구분	처리수	반복수	총 시험구	시험구당 면적	총면적
항공방제 시제품 처리구	1	1	1	437.5m <sup>2</sup>	437.5m <sup>2</sup>
무처리구	1	3	3	20.0m <sup>2</sup>	60.0m <sup>2</sup>



[시험포 배치 및 약제 처리 현황]

- 시제품 처리 전후 기상 상황 : 약제 처리에 영향을 끼칠 큰 기상변화는 없었음

[시제품 처리 전후 기상 개황]

월/일	강우량(mm)	기온(°C)		
		최고	최저	평균
8/24	34.9	28.9	23.7	25.2
8/25	-	31.2	23.1	26.2
8/26	-	32.3	20.7	26.0
8/31	0.1	28.9	19.9	23.6
9/1	-	30.1	20.3	24.6
9/2	2.5	27.2	22.0	24.3

- 시제품의 항공 처리 방법
  - 약제의 조제 : 시제품 120mL을 물 1,200L에 희석(10배 희석)
  - 처리 시기 : 발병 직전 7일간격 2회(8월25일, 9월1일)
  - 항공방제 처리 방법 : 2.4mL/m<sup>2</sup> 수준으로 항공방제 처리
  - 항공방제 제원 : YAMAHA 산업용 무인헬리콥터 FAZER

[항공방제 비행제원]

사용기종	사용노즐	비행고도(m)	비행속도(km/h)	풍향	풍속(m/s)	항공회사
FAZER	3bar Fine droplet	4	15	남서풍	1.5	무성항공

- 약효시험 조사방법
  - 최종 시제품 처리 7일 후(9월8일) 시험구당 30주에 대한 발병도 조사
- 낙하 분산력조사
  - 살균제 약효·약해시험의 기준과 방법, 낙하분산 조사지표를 기준으로 조사
  - 낙하분산 조사지표 : 각 구획별 낙하분산에 대한 감수지를 설치, 감수지에 대한 분무 입자의 크기 및 분무입자의 낙하밀도 별 분류하여 조사
  - 예를 들어, A단계가 8 판정시, 0.2mm의 약제가 256개 이상 감수지에 낙하하였다고 판단, D단계가 3 판정시, 1.1~1.5mm의 비교적 높은 입경의 약제가 0.2개 감수지에 낙하하였다고 판단, 약제의 낙하 입경 및 고른 분산 정도를 판단할 수 있음(아래 기준표 참조)



\* Flight path : 항공방제 시험 처리구역, Applied plot : 완충지대

[낙하분산 조사를 위한 감수지 설치 구역 및 현황]

낙하분산지수 조사방법		낙하분산 조사지표									
	구분	지수(낙하입수/cm <sup>2</sup> )									
	단계	입경 (mm)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	A	0.2	2	4	8	16	32	64	128	256	512
	B	0.3-0.5	0.8	1.6	3.2	6.4	12.8	25.6	51.2	102.4	204.8
	C	0.6-1.0	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4	12.8	25.6	51.2
D	1.1-1.5	-	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4	12.8	

[낙하분산 조사 기준표]

다) 실험 결과

■ 시제품의 저비산 기능성 평가

- 1회차 정량 살포 시 0.4mm 이하의 입자가 전체의 93.1%로 구성, 배량 희석 살포 시 0.4mm 이하의 입자는 낙하 분포는 91.5%로 나타남
- 1회차 정량 살포 시 낙하 입자는 4,085개, 절반 희석 살포 시 낙하 입자는 5,465개로, 33.8%의 증가 수준을 보임
- 2회차 정량 살포 시 0.4mm 이하의 입자가 전체의 89.8%로 구성, 배량 희석 살포 시 0.4mm 이하의 입자는 낙하 분포는 88.1%로 나타남
- 2회차 정량 살포 시 낙하 입자는 3,576개, 절반 희석 살포 시 낙하 입자는 4,127개로, 15.4%의 증가 수준을 보임
- 0.4mm 이하의 미입자가 89.8-93.1%로 구성되는 낙하분산 기능성을 보이며, 시제품의 부자재인 점도증가제의 기능으로 혼입 농도 증가 시, 낙하입자의 입자경의 소폭 증가는 확인되나, 낙하입자의 수량이 15.4-33.8% 증가 수준을 보임

[시제품의 낙하분산 조사 결과]

		1회차					2회차						
정량	입자크기(mm)	0.2	0.4	0.8	1.3	합계	정량	입자크기(mm)	0.2	0.4	0.8	1.3	합계
	입자수	2,696	1,107	228	54	4,085		입자수	2,116	1,095	291	74	3,576
	입자의 분포(%)	66.0	27.1	5.6	1.3	100.0		입자의 분포(%)	59.2	30.6	8.1	2.1	100.0
배량	입자크기(mm)	0.2	0.4	0.8	1.3	합계	배량	입자크기(mm)	0.2	0.4	0.8	1.3	합계
	입자수	3,274	1,728	377	84	5,465		입자수	2,372	1,255	405	884	4,127
	입자의 분포(%)	59.9	31.6	6.9	1.5	100.0		입자의 분포(%)	57.6	30.5	9.8	2.1	100.0

[시제품의 저비산성 분석 결과]

1회차			2회차		
시험구역	총 낙하입자 수	입자의 낙하 지역분포(%)	시험구역	총 낙하입자 수	입자의 낙하 지역분포(%)
약제처리구	9,550	99.66	약제처리구	7,696	99.74
완충지역	33	0.34	완충지역	20	0.26
총 계	9,583	100.0	총 계	7,716	100.0

- 이하 항공방제 시제품은 미립자로 구성된 저비산 특성이 확인되며, 항공방제 활동 시 약제의 외부 유출은 미흡할 것으로 사료됨

[항공방제 시제품 낙하분산 조사표]

구분	지수	1차 처리(8월25일)				2차 처리(9월1일)			
		A	B	C	D	A	B	C	D
항공방제 시제품 정량 처리구	1	2	3	2	2	2	3	3	4
	2	3	4	2	2	2	3	4	3
	3	3	5	4	3	3	4	3	2
	4	4	5	6	4	2	4	5	4
	5	1	2	3	3	2	4	5	5
	6	2	4	4	3	3	3	3	4
	7	3	2	2	2	2	4	5	3
	8	2	2	2	2	2	1	1	2
	9	3	3	2	2	2	3	3	3
항공방제 시제품 배량 처리구	1	3	4	3	2	2	3	3	3
	2	3	4	3	2	2	3	3	2
	3	3	5	5	3	3	2	4	5
	4	4	6	5	7	4	6	6	6
	5	3	4	4	5	3	4	4	4
	6	4	5	5	6	4	5	5	5
	7	4	5	7	7	3	4	5	3
	8	3	4	3	3	2	2	3	4
	9	3	4	3	2	2	3	4	3
완충지대	1	0	0	0	0	3	5	7	7
	2	1	1	0	0	1	2	2	3
	3	0	0	0	3	0	0	2	2
	4	1	1	2	2	1	2	2	2

- 약해 판정
  - 시제품을 처리 후 7일간 약해 조사 결과 경엽의 위조, 고사, 반점, 황변, 낙엽 여부 등 약해 증상이 관찰되지 않음
- 약효 판정
  - 시제품은 벼 흰잎마름병에 대해 53.4%의 항공방제 효과를 보였고, 별도의 약해 증상이 발견되지 않아, 흰잎마름병 방제 약제로 사용이 가능함

[약효시험결과]

구분	발병도(%)				유의차 (DMRT)	방제가(%)	대표사진
	1반복	2반복	3반복	평균			
항공방제 시제품	13.2	15.7	11.7	13.5	b	53.4	
무처리	28.4	26.2	32.4	29.0	a	-	

Cv(%) - 17.0



[효능효과 결과(기술인증)이 완료된 마름엔의 유기농업자재 공시서]

효능효과 공시변경	효능효과 반영 유기농업자재 공시서(기술인증완료)																		
<p><b>유기농업자재 공시 변경승인 신청서</b></p> <p>신청인: (주)마이크로자임 (대표자: 김성민)</p> <p>소재지: 충청남도 당진군 고서면 원동1길 37-1 (전화번호: 091-383-1907)</p> <p>공시번호: 제 공시-2-4-21호</p> <p>소재지: 충청남도 당진군 고서면 원동1길 37-1 (전화번호: 091-383-1907)</p> <p>공시대상: 원시·고추, 들깨, 배추, 오이</p> <p>변경사항: 원시·고추, 들깨, 배추, 오이</p> <p>승인일자: 2023년 11월 15일</p> <p>강원대학교 산학협력단 (주)마이크로자임 (대표자: 김성민)</p>	<p><b>유기농업자재 공시서</b></p> <p>공시번호: 제 공시-2-4-21호</p> <p>1. 업체명: (주)마이크로자임</p> <p>2. 대표자 성명: 김성민</p> <p>3. 사업장 소재지: 충청남도 당진군 고서면 원동1길 37-1</p> <p>4. 자재의 명칭: 식물성오일</p> <p>5. 자재의 구분: 병해관리용</p> <p>6. 상표명: 마름엔</p> <p>7. 주성분의 종류 및 함량: Limonen 28.2%</p> <p>8. 원료 또는 재료의 종류 및 투입비율: 오렌지오일 30%, 보조제 70%</p> <p>9. 유효기간: 2023. 07. 21. ~ 2026. 07. 20.</p> <p>10. 제조장 주소: 전라북도 장흥시 송덕리하로 241, 사향생산업 및 병치자임 208호</p> <p>11. 최초 공시일: 2023. 07. 21.</p> <p>12. 효능·효과: [✓] 표시제품, [ ] 미표시제품</p> <p>신청농업자재 목적 및 유기농업자재 관리·지침에 관한 법률, 제38조제2항 및 「농업육산식품 소금 잔류농약허용 기준 및 유기농업자재 공시·인용에 관한 법률 시행규칙」 제63조제3항에 따라 유효 기간 유기농업자재 공시·인용을 증명합니다.</p> <p>2023년 12월 21일</p> <p>강원대학교 산학협력단장</p> <p>12. 효능·효과: [✓] 표시제품, [ ] 미표시제품</p>																		
	<p><b>유기농업자재 공시 사항</b></p> <p>○ 자재의 구분: 병해관리용</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>지배대상 작물</th> <th>사용시기 (농사)</th> <th>사용량</th> <th>처리방법</th> <th>농약 등록사항</th> <th>원료·재료 중농약 투입비율</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>배</td> <td>-</td> <td>생육기 (1배/10a)</td> <td>무인 항공방제</td> <td>[후취류] 오렌지오일 30%</td> <td></td> </tr> <tr> <td>배</td> <td>종묘배양</td> <td>생육기 300배 희석</td> <td>경엽처리</td> <td>[보조제] 저분자생제(Powacy ethylene sulfide monocarbonyl) 12%, 유황제(Mucol) 6%</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>○ 효능·효과</p> <p>- 배 병해효과시험: 종묘배양용, 무처리구 대비 55.2% 방제</p> <p>* 표시된 효능과 효과는 공시신청자가 제출한 시험결과에 준하여 표시하였음을 확인합니다.</p> <p>○ 반영 사항</p> <p>1. 2023. 09. 21. 사용일 및 처리방법</p> <p>2. 2023. 12. 21. 효능 효과 (비표시) 확인</p>	지배대상 작물	사용시기 (농사)	사용량	처리방법	농약 등록사항	원료·재료 중농약 투입비율	배	-	생육기 (1배/10a)	무인 항공방제	[후취류] 오렌지오일 30%		배	종묘배양	생육기 300배 희석	경엽처리	[보조제] 저분자생제(Powacy ethylene sulfide monocarbonyl) 12%, 유황제(Mucol) 6%	
지배대상 작물	사용시기 (농사)	사용량	처리방법	농약 등록사항	원료·재료 중농약 투입비율														
배	-	생육기 (1배/10a)	무인 항공방제	[후취류] 오렌지오일 30%															
배	종묘배양	생육기 300배 희석	경엽처리	[보조제] 저분자생제(Powacy ethylene sulfide monocarbonyl) 12%, 유황제(Mucol) 6%															

나) 경엽처리 등록제품의 사용방법

- 적용작물 : 배, 고추, 들깨, 배추, 오이
- 적용병해충 : 흰잎마름병
- 제품등록 기준 사용방법 : 300배 희석 경엽처리

다) 무인항공방제 등록제품의 사용방법

- 적용작물 : 배
- 적용병해충 : 흰잎마름병
- 제품등록 기준 사용방법 : 10배희석(1.6L/10a), 무인항공방제

라) 본 연구팀의 등록제품 실제 사용 매뉴얼

[등록제품의 흰잎마름병 방제 사용매뉴얼]

사용 구분	경엽처리	무인항공방제
희석 농도	300배	10배희석
사용 방법	대상제품을 500배 희석하여 희석수를 조제, 0.3L/평 단위로 경엽 처리	대상제품을 10배 희석하여 희석수를 조제, 1.6L/10a 단위로 무인항공방제
사용 시기	8월말 태풍 전후로 3회 처리	
세부 사용 시기	예방목적	8월말(태풍) 노출 이전 3일 이내 1회 처리
	방제목적	8월말(태풍) 노출 직후 1회 처리
	병증완화	감염 2주 이내 1회 처리

③ 등록 제품의 제품 생산 공정

가) 대상 특허의 기술이전 및 기술실시

- 등록제품인 마름엔의 방제 유효성분인 리모넨 유도체 관련 특허 및 노하우에 대해 주관기관인 한국원자력연구원으로부터 공동기관인 (주)마이크로자임으로 23년 9월1일자로 기술이전을 완료함



(10) 출시제품의 홍보전시

① 기술 및 홍보자료 제작

- 제품 런칭 및 홍보 수단으로 브로셔 및 기술자료를 제작함



[생산제품의 브로셔 및 기술자료 제작]

② 출시 제품의 홍보 전시 활동

가) 2022 국제 바이러스 박테리아 산업 박람회(ViBac 2022)

- 참가 일시 : 2022년 7월18-19일
- 참가 장소 : 서울 코엑스
- 참가 방법 : 제품 전시부스 운영
- 참석 인원 : 미국, 독일, 프랑스 등 10개국, 20개 해외 바이어
- 실시결과 : 도출 예상 제품 포함 수행기관의 제품 전시 및 홍보



[박람회 수행 사진]

나) Green & Agritech Asia

- 참가 일시 : 2023년 8월30일-9월1일
- 참가 장소 : 김대중 컨벤션 센터
- 참가 방법 : 제품 전시부스 운영
- 참석 인원 : 스마트 농업 및 시 자동화 기술 관련 70개사 및 해외 바이어
- 실시결과 : 출시 제품인 마름엔의 홍보



[박람회 수행 사진]

다) MSK 한국 미생물학회 국제 학술대회

- 참가 일시 : 2023년 10월25-27일
- 참가 장소 : 여수 엑스포 컨벤션 센터

- 참가 방법 : 제품 전시부스 운영
- 참석 인원 : 미생물 및 바이오 농약 관련 연구자, 기업
- 실시결과 : 출시 제품인 마름엔의 홍보



[박람회 수행 사진]

### ③ 출시 제품의 Off-line 홍보 활동

#### 가) 화성시 농업기술센터

- 방문 목적 : 대상제품의 사용범위확대(원예작물)을 위한 방문 마케팅 및 시험포 설치 등 보조사업 추진
- 방문 일시 : 2023년 5월 12일
- 방문 장소 : 화성시 농업기술센터



[화성시 농업기술센터 방문 홍보]

#### 나) 고양시 농업기술센터

- 방문 목적 : 대상제품의 사용범위확대(원예작물)을 확대 및 흰잎마름병 방제 분야 마케팅 및 시험포 설치 등 보조사업 추진
- 방문 일시 : 2023년 5월 16일
- 방문 장소 : 고양시 농업기술센터



[고양시 농업기술센터 방문 홍보]

#### 다) 부여군 농업기술센터

- 방문 목적 : 대상제품의 사용범위확대(원예작물)을 확대 및 흰잎마름병 방제 분야 마케팅 및 시험포 설치 등 보조사업 추진
- 방문 일시 : 2023년 5월 18일
- 방문 장소 : 부여군 농업기술센터



[부여군 농업기술센터 방문 홍보]

라) 여수시 농업기술센터

- 방문 목적 : 대상제품의 사용범위확대(원예작물)을 확대 및 흰잎마름병 방제 분야 마케팅 및 시험포 섭외 등 보조사업 추진
- 방문 일시 : 2023년 5월 25일
- 방문 장소 : 여수시 농업기술센터



[여수시 농업기술센터 방문 홍보]

마) 금산군 농업기술센터

- 방문 목적 : 대상제품의 사용범위확대(원예작물)을 확대 및 흰잎마름병 방제 분야 마케팅 및 시험포 섭외 등 보조사업 추진
- 방문 일시 : 2023년 5월 31일
- 방문 장소 : 금산군 농업기술센터



[금산군 농업기술센터 방문 홍보]

바) 전주시 농업기술센터

- 방문 목적 : 대상제품의 사용범위확대(원예작물)을 확대 및 흰잎마름병 방제 분야 마케팅 및 시험포 섭외 등 보조사업 추진
- 방문 일시 : 2023년 6월 26일
- 방문 장소 : 전주시 농업기술센터



[전주시 농업기술센터 방문 홍보]

사) 보령시 농업기술센터

- 방문 목적 : 대상제품의 사용범위확대(원예작물)을 확대 및 흰잎마름병 방제 분야 마케팅 및 시험포 섭외 등 보조사업 추진
- 방문 일시 : 2023년 6월 26일
- 방문 장소 : 보령시 농업기술센터



[보령시 농업기술센터 방문 홍보]

아) 논산시 농업기술센터

- 방문 목적 : 대상제품의 사용범위확대(원예작물)을 확대 및 흰잎마름병 방제 분야 마케팅 및 시험포 섭외 등 보조사업 추진
- 방문 일시 : 2023년 6월 27일
- 방문 장소 : 논산시 농업기술센터



[논산시 농업기술센터 방문 홍보]

자) 함안군 농업기술센터

- 방문 목적 : 대상제품의 사용범위확대(원예작물)을 확대 및 흰잎마름병 방제 분야 마케팅 및 시험포 섭외 등 보조사업 추진
- 방문 일시 : 2023년 7월 4일
- 방문 장소 : 함안군 농업기술센터



[함안군 농업기술센터 방문 홍보]

(11) 출시제품의 판매 내역

가) 대상제품

- 마름엔(경엽처리 및 항공방제)

나) 판매수량

- 2,523병

다) 판매금액

- 50,460,000원

(12) 출시제품의 경제성 분석

- 본 등록 대상 제품을 포함 현시점 흰잎마름병 방제용 효능효과 인정제품은 총 3건으로 아래와 같으며, 이에 대한 원료, 생산비용, 현장방제비용등의 경제성 분석을 대조 평가함



[흰잎마름병 방제용 효능효과 인정제품]

- 원료의 종류 및 함량은 아래와 같음

[효능효과 인정제품의 원료성분비]

황칠황	아트플랜에코	마름엔
규산나트륨 20%	<i>Bacillus subtilis</i> 10 <sup>8</sup> 이상	D-limonene 16%
황 10%	<i>Bacillus Belezensis</i> 10 <sup>8</sup> 이상	L-limonene 13%
황칠추출물 65%		유화제 11%
보조제 5%		보조제 9.4%

- 500mL 환산 기준으로 예상되는 생산원가 대조 내역은 아래와 같으며, 마름엔의 최종 생산 원가는 3,239원으로 매우 저렴한 수준으로 나타남

\*마름엔의 생산원가 및 사용 비용 경제성 분석 결과(보고서 218-219)

황칠황	아트플랜에코	마름엔
1. 500mL 생산원가 : 12,803원 원재료비 : 11,006원 제조경비 : 1,797원 - 장비사용비 : 497원 - 노무비 : 300원 - 기타 : 1,000원	1. 500mL 생산원가 : 63,421원 원재료비 : 3,361원 제조경비 : 60,060원 - 장비사용비 : 59,624원 - 노무비 : 3,500원 - 기타 : 1,000원	1. 500mL 생산원가 : 3,239원 원재료비 : 1,442원 제조경비 : 1,797원 - 장비사용비 : 497원 - 노무비 : 300원 - 기타 : 1,000원
2. 제품 권장 사용배율 : 1,000배	2. 제품 권장 사용배율 : 2,000배	2. 제품 권장 사용배율 : 3,000배
3 <sup>*)</sup> . 사용단가비교 : 25,606원	3. 사용단가비교 : 63,421원	3. 사용단가비교 : 21,593원

주) : 단가비교 : 2,000배 희석배율/권장희석배율 × 총 제조비용

- 상위 결과를 토대로 각 제품의 권장희석배수를 고려한 산출단가 대비 사용비용을 대조하였을 때, 아트플랜에코의 권장희석배율 및 사용면적 대비 65.9% 절감된 21,593원으로 현시점 흰잎마름병 효능효과 인정제품가운데 가장 저렴한 생산 및 현

장 방제비용을 제공할 수 있음이 확인됨

---

(2) 정량적 연구개발성과

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 백만원)

성과지표	1단계		2단계		합계		가중치 (%)
	계획	실적	계획	실적	계획	실적	
특허 출원	2	1	-	3	2	4	10
특허 등록	-	-	1	0	1	0	10
기술이전	-	-	1	1	1	1	5
기술료	-	-	30	9	30	9	10
제품화	1	0	1	2	2	2	15
매출액	-	-	45	50.46	45	50.46	15
고용창출(명)	2	4	-	1	2	5	5
기술인증	1	0	-	1	1	1	5
논문(SCI)	1	0	2	2	3	2	-
논문평균 IF	3	0	6	2.8	4.5	2.8	10
학술발표	5	6	3	5	8	11	5
인력양성	2	4	2	1	4	5	5
홍보전시	1	1	1	2	2	3	5
계							100

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Production of Mono-hydroxylated Derivatives of Terpinen-4-ol by Bacterial CYP102A1 Enzymes	Journal of Microbiology and Biotechnology	김정훈, 박찬미	34 (3)	대한민국	한국미생물·생명공학회	SCIE	2023/12/01	1738-8872	100%
2	Molecular and phenotypic investigation on antibacterial activities of limonene isomers and its oxidation derivative against Xanthomonas oryzae pv. Oryzae	Journal of Microbiology and Biotechnology	김현빈	34 (3)	대한민국	한국미생물·생명공학회	SCIE	2024/01/17	1738-8872	100%

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2021 한국환경생물학회	김미희	2021/10/28	휘닉스 제주 섭지코지	대한민국
2	2021 한국생물공학회	Ngoc Tan Cao	2021/10/07	경주화백컨벤션센터	대한민국
3	2022 한국응용생명화학학회	김미희	2022/06/28	대구 호텔인터불고	대한민국
4	2022 한국미생물학회	김미희	2022/10/30	ICC제주국제컨벤션센터	대한민국
5	2022 한국미생물학회	김현빈	2022/10/30	ICC제주국제컨벤션센터	대한민국
6	2022 한국생물공학회	정해찬	2022/09/29	제주신화월드	대한민국
7	2023 한국생물공학회	김정훈	2023/04/13	제주 ICC	대한민국
8	2023 한국식물병리학회	정문수	2023/04/27	경주 라한셀렉트호텔	대한민국
9	2023 ICCP/JSSX International Joint Meeting in Shizuoka	김정훈	2023/09/27	Shizuoka Convention and Atrs Center	일본
10	2023 한국미생물학회	김미희	2023/10/25	여수엑스포컨벤션센터	대한민국
11	2023 한국미생물학회	김현빈	2023/10/25	여수엑스포컨벤션센터	대한민국

[기술적 성과]

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

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	특허출원	대한민국	한국원자력연구원	2022.09.05.	10-2022-0112264	-	-	-	-	100%	무
2	특허출원	대한민국	한국원자력연구원	2023.01.05.	10-2023-0003646	-	-	-	-	100%	무
3	특허출원	대한민국	전남대학교	2023.04.10.	10-2023-0047016	-	-	-	-	100%	무
4	특허출원	대한민국	전남대학교	2023.04.10.	10-2023-0047015	-	-	-	-	100%	무

□ 기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		
1	유기농업자재 (경엽처리 및 항공방제 제품인증)	강원대학교 산학협력단	유기농업자재	제 공시-2-4-217호	2023.07.21	대한민국
2	원예용 시제품	-	시제품	-	2023.12.15	대한민국
3	유기농업자재 (기술인증)	강원대학교 산학협력단	유기농업자재	제 공시-2-4-217호	2023.12.21	대한민국

[경제적 성과]

□ 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	통상실시	리모넨 유도체를 유효성분으로 함유하는 식물병 방제용 조성물	(주)마이크로자 임	2023.09.20.	9,000,000*	9,000,000

\*기술이전의 특허와 노하우 중 본 과제에 해당하는 노하우(30%)만 측정하여 기술료를 결정함.  
기술료 측정 계산식 : 기술료 30,000,000원 x 30% = 9,000,000원

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 <sup>1)</sup>	사업화 형태 <sup>2)</sup>	지역 <sup>3)</sup>	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	기술이전	신제품 개발	국내	유기농업자 재 판매	수도용 흰잎마름 병 방제	(주)마이크 로자임	12,889		2023	5년

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
유기농업자재 판매(마름엔)	2023	50,460		50,460	기술기여도 100%
합계		50,460		50,460	

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			1단계	2단계	
1	수도용 병해방제용 유기농업자재	(주)마이크로자임	3	1	4
2	수도용 병해방제용 유기농업자재	(재)전주농생명소재 연구원	1		1
합계			4	1	5

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	학위 취득	2021	1				1					1	
2	학위 취득	2022		3			1	2				3	
3	학위 취득	2023	1				1					1	

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	산업박람회 참가	국제바이러스박테리아박람회	전시부스 운영	2022/07/18- 2022/07/19
2	산업박람회 참가	Green&Agritech Asia, 2023	전시부스 운영	2023/08/30- 2023/09/01
3	학술대회 박람회 참가	한국미생물학회	전시부스 운영	2023/10/25- 2023/10/27

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항

□ 베타인마름병원균의 병원성 관련 유전자 발현 분석

- 리모넨 유도체 후보물질 중 병원균의 생장 억제 효과를 보이는 선발물질은 작물시험을 통하여 병방제 효과가 있는 것을 확인하였고 베타인마름병원균의 병원성 관련 유전자의 발현량을 조사하였음
- 병원성 관련 6개 유전자의 발현 정도를 조사하였으며, 무처리 대조군에 비하여 선발물질 처리군의 6개 유전자는 모두 발현이 감소하는 것으로 확인되었음

## 2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
<b>&lt;주관과제&gt;</b>		
○ 리모넨 유도체 생성을 위한 이온화에너지 물질구조변환 기술 최적화 및 유도체 발굴	○ 방사선 선량 및 용매 종류에 따른 이온화에너지 물질구조변환 최적 조건을 확립하였으며, 17종의 방사선 구조변환된 신규 유도체를 발굴하였으며, <공동과제 2>에서 수행한 방사선 조사물의 베타인마름병 방제 결과를 통해 특허 출원 1건을 완료함. 현재 특허 1건 등록을 위해 심사중임	○ 80
○ 시트러스 천연 추출 정유대상 이온화에너지 물질구조변환기술 최적화 및 유도체 발굴	○ 이온화에너지 물질구조변환 최적화를 통해 시트러스 정유의 구조변환된 테르펜 계열의 유도체 2종을 라이브러리 분석을 통해 동정하였으며, <공동과제 2>에서 수행한 방사선 조사물의 베타인마름병 방제 결과를 통해 특허 출원 1건을 완료함	○ 100
○ 이온화에너지/P450 이용 신규 리모넨 유도체 구조 분석	○ <공동과제 1>에서 발굴한 P450 활용 물질구조변환된 신규 대사체 2종을 구조동정 완료하였으며, <공동과제 2>에서 수행한 결과와 함께 논문 게재 1건을 완료함	○ 100
○ 신규 유도체의 분석 표준화	○ 이온화에너지 및 P450 효소를 이용하여 구조변환된 신규 유도체의 분석 표준법을 제시함	○ 100
<b>&lt;공동과제 1&gt;</b>		
○ P450 활용 리모넨 물질구조변환을 통한 신규 후보 유도체 발굴	○ 3종 리모넨 유도체( $\alpha$ -테르피네올, 페릴릴 알콜, 테르피넨-4-올)로부터 P450 활용 물질 구조 변환된 신규 대사체 3종을 발굴함. $\alpha$ -테르피네올과 페릴릴 알콜의 대사체 제조에 대한 특허 출원 2건을 완료함. 테르피넨-4-올 대사체 생산에 관한 논문 1편을 게재 완료 및 1편 투고 예정임(3월 중)	○ 80
○ P450 효소 재설계 및 리모넨 유도체 히드록실화 효소 개발	○ 3종의 신규 대사체의 고효율 생산이 가능한 P450 히드록실화 효소 4종을 개발함	○ 100
○ 리모넨 신규 유도체 제조에 활용할 GRAS 미생물 균주 개발	○ 리모넨 신규 유도체 제조에 활용할 GRAS 미생물 균주( <i>Bacillus subtilis</i> )를 개발함	○ 100
○ 리모넨 신규 유도체 제조 활용 GRAS 미생물 균주를 이용한 생물 전환 시스템 확립	○ 리모넨 신규 유도체 제조 활용 GRAS 미생물 균주를 이용한 생물전환 시스템(재조합 <i>Bacillus subtilis</i> )을 확립함	○ 100
○ 리모넨 물질구조변환을 통한 신규 유도체 고농도 생산	○ 리모넨 물질구조변환을 통한 신규 유도체 고농도 생산 방법을 확립함 [Perillyl alcohol 대사체인 (4-(2-methyloxiran-2-yl)cyclohex-1-en-1-yl)methanol 및 Terpinen-4-ol 대사체인 1,4-dihydroxy-p-menth-2-ene의 2종 대상]	○ 100
<b>&lt;공동과제 2&gt;</b>		
○ 후보물질에 따른 방제 최적 조합 선발 및 처리조건 확립	○ 리모넨과 리모넨 유도체를 활용한 단일 또는 복합 처리에 따른 방제 최적 조합 및 시료 처리 방법에 따른 억제 평가를 완료함	○ 100
○ 신규물질의 주요 세균/곰팡이병 성장 억제 효과 검정	○ 방사선 처리에 의한 신규물질 활성을 확인하기 위하여 세균 및 곰팡이병원균의 성장억제 효과를 검정 완료함	○ 100
○ 수도용 시제품에 대한 병원균 억제 활성 및 유효 처리 농도 산출	○ 후보물질 중 우수한 활성을 보이는 물질을 제형화 후 희석배율에 따른 효과를 검정하여 각각의 유효 처리 농도를 산출 완료함	○ 100
○ 후보물질 이용 원예작물 주요 식물병 억제 효과 검정	○ 리모넨과 리모넨 유도체를 활용하여 단일 및 복합처리에 따른 원예작물 식물병원균 억제 효과를 검정 완료	○ 100

○ 신규 물질 이용 최적 조합 선발 및 유효농도 산출	함 ○ 리모넨 유도체 물질 중 활용한 물질의 상용화를 위하여 제형화된 시제품의 희석 배율별에 따른 억제활성 유효 농도 산출을 완료함	○ 100
○ 선발 물질의 병원균 억제 효과 분석	○ 선발 물질의 제형화 후 온실에서 희석배율에 따른 억제활성 검정 완료함	○ 100
<b>&lt;공동과제 3&gt;</b>		
○ 리모넨 유효성분 조성물의 농가 현장 평가	○ 대상 조성물의 시제품을 적용한 4차례의 현장평가를 실시하였고, 시제품 2종에 대해 공인분석환경에서의 현장평가 2회를 실시함. 반면 원예용 병원균에 대한 대상소재의 효과가 상대적으로 미흡함에 따라 현장 단위 적용은 생략, 수도용 흰잎마름병 중심으로 농가의 현장적용평가를 추가 달성함	○ 100
○ 리모넨 유효성분 조성물의 대량 생산 공정 최적화	○ 최종 선발된 리모넨 유효성분을 이용한 유탁제형, 무인항공방제용 저비산 분제, 코팅제형 3종 복합물을 대상으로 50L, 500L, 5ton scale로 대량생산 조건을 확립함	○ 100
○ 리모넨 유효성분 조성물의 수도용 시제품 1종 인증신청(효능효과 포함)	○ 23년 7월 수도용 흰잎마름병 경엽처리제로 유기농업자재로 최초 등록을 완료함	○ 100
○ 등록된 천연작물보호제의 기술 인증 및 적용범위 확대 등록	○ 23년 9월부터 저비산형 항공방제용 제형의 사용방법을 추가하여 유기농업자재 공시 변경 및 적용범위의 확대 등록을 실시함. 최종 12월부터, 공인분석환경의 현장적용실험결과를 반영하여, 흰잎마름병에 대해 효능 효과 표시제품으로 유기농업자재 공시를 완료함	○ 100
○ 흰잎마름병 방제용 제형의 추가 보완	○ 도출된 복합 리모넨 유도체 기반 무인항공방제용 저비산형 분제, 잔류목적의 코팅제형, 멀티플 에멀전 공정 개발 등 유효물질 함량 증진 및 물성 개선 목적의 다양한 제형의 추가 보완을 실시함	○ 100
○ 원예용 병원균 억제용 시제품 개발	○ 대상소재의 원예용 병원균의 방제력 개선 방향성으로 물리적 방제력 증진범위의 전략 제형인 코팅제형의 개발 심화 및 50L, 500L, 5ton scale의 시제품 개발을 완료함	○ 100
○ 리모넨 유도체 기반 천연작물보호제 출시 및 실용화	○ 수도용 흰잎마름병 방제용 천연작물보호제를 23년 7월 최초 등록, 9월부터 출시를 완료하였고, 사업기간 내 당초 계획한 45백만원을 초과한 50백만원의 매출을 달성함	○ 100

## 4. 목표 미달 시 원인분석

### 1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

---

#### □ 특허 등록(1건) 지연

- 4건의 특허출원이 완료(1건: 22년 중순, 3건: 23년 초순)되었으나, 특허법인 담당자의 교체 및 특허청 내 심사 프로세스의 지연에 기인한 미등록 초래

#### □ 논문 게재(1건) 지연

- Perillyl alcohol을 대상으로 P450 효소에 의해 구조가 변환된 신규 유도체인 (4-(2-methyloxiran-2-yl)cyclohex-1-en-1-yl)methanol을 발굴하였으나 정확한 NMR 분석 결과를 얻기 위한 불순물의 제거와 NMR 분석을 위한 충분한 물질량의 확보에 장시간이 소요됨. 현재 논문투고에 필요한 모든 연구 결과는 확보하였으며, 2024년 5월에 논문투고 완료함
- 

### 2) 자체 보완활동

---

#### □ 원예용 시제품의 현장적용실험

- 본 과제에서 대상으로 선정한 리모넨 유도체의 원예용 병원균에 대한 항균 효과가 상대적으로 미비함에 따라 현장단위 적용은 생략하였으며, 수도용 흰잎마름병에 대한 현장적용실험에 집중하였으며, 대상 소재의 사용전, 사용후, 무인항공방제, 공인분석 환경의 효능효과 실험 등 당초 계획을 초과한 총 6회에 거친 현장적용실험을 완료하였음
- 

### 3) 연구개발 과정의 성실성

---

#### □ 특허 등록(1건) 지연

- 현재 특허 등록을 위해 심사가 4건 진행 중이며, 올해 2024년 상반기에 등록될 것으로 예상함

#### □ 논문 게재(1건) 지연

- 현재 “사이토크롬 P450 효소 이용 신규 리모넨 유도체 발굴”과 관련된 논문을 작성중이며, 학술지 Enzyme and Microbial Technology (IF 3.4)에 3월 중 투고할 예정임.
  - ◆ M601 효소에 의해 생성된 Perillyl alcohol 유도체는 (4-(2-methyloxiran-2-yl)cyclohex-1-en-1-yl)methanol 로 확인되었음

#### □ 수도용 시제품의 현장적용실험 추가 수행

- 원예용 시제품의 현장적용실험의 적용 미흡이 아쉬우나, 차선택으로 수도용 흰잎마름병 분야에 있어 경엽처리, 예방처리, 발병 사후 처리, 무인항공처리 및 공인분석기관의 효능검정 실험 등 다양한 사용방법 및 제형별 현장적용실험을 심화 달성하였음. 이를 통해 관행 수도용 흰잎마름병 제품소재와 차별화되는 사용방법 및 제형별 현장단위 효과구명을 제시하였음
-

## 5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

---

- 식물 유래 테르페노이드를 활용한 식물병 방제제 후보물질 개발 및 적용성 검증을 통한 **작물보호제 분야 신성장** 가능성 제시
  - 이온화에너지를 이용하여 분자구조변환을 유도하면 식물 유래 **파이토케미컬의 기능성을 증대**시킬 수 있으며, 저비용으로 **고기능성 신규 천연물**을 개발할 수 있는 원천기술 확보
  - P450 생촉매 이용 농생물자원 유래 기능성 소재의 대량생산 기술 통한 **원천균주 및 소재 확보**
  - 화학농약을 보완할 수 있는 천연물 식물병 방제제 개발을 통해 **지속가능한 작물 재배 환경 조성** 및 수입 원제에 대한 **대체 효과**가 있을 것으로 기대
-

## 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분		연구개발 종료 후 5년 이내					합계
		종료 1차년도	종료 2차년도	종료 3차년도	종료 4차년도	종료 5차년도	
특허등록	국내	2건	-	-	-	-	2건
	국외	-	-	-	-	-	-
	계	2건	-	-	-	-	2건
인력양성	학사	-	-	-	-	-	-
	석사	1명	-	-	-	-	1명
	박사	-	-	-	-	-	-
	계	1명	-	-	-	-	1명
사업화	매출액	145백만원	300백만원	300백만원	300백만원	300백만원	1,345백만원
	수출액	-	15백만원	30백만원	45백만원	75백만원	165백만원
성과홍보		1건	-	-	-	-	1건

### 주 의

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