

발 간 등 록 번 호
11-1543000-001470-01

곤충 생장조절억제물질 개발을 통한 친환경 해충방제제 개발 최종보고서

2016. 12. 5.

주관연구기관 / 안동대학교
협동연구기관 / 주)YA코리아

농림축산식품자료실



0025089

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “곤충 성장조절억제물질 개발을 통한 친환경 해충 방제제 개발”(개발기간 : 2013. 8.26 ~ 2016. 8. 25)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 12. 5.

주관연구기관명 : 안동대학교 산학협력단 (인)

참여기관명 : (주) YA코리아 (인)

주관연구책임자 : 김용균

참여기관책임자 : 양경형

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호		해 당 단 계 연 구 기 간	3차년도	단 계 구 분	3차년도/총3년
연구사업명	중 사업명	선도기술개발사업			
	세부 사업명	신농약 개발 사업			
연구과제명	대 과제명	-			
	세부 과제명	곤충 성장조절억제물질 개발을 통한 친환경 해충 방제제 개발			
연구책임자	김용균	해당단계 참 여 연구원 수	총: 11명 내부: 4명 외부: 7명	해당단계 연 구 개 발 비	정부: 300,000천원 민간: 100,000천원 계: 400,000천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 11명 내부: 4명 외부: 7명	총 연구개발비	정부: 900,000천원 민간: 300,000천원 계: 1,200,000천원
연구기관명 및 소속부서명	안동대학교 식물외학과			참여기업명	
				YA 코리아	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
1. 화학농약에 의한 농생태계 파괴로 친환경농자재 필요성 대두 2. 곤충병원세균 유래 곤충생리교란 물질 발견 3. 비티플러스의 살충력 제고 개념 4. 네프킬, 콜킬, 디프킬의 3 중 친환경방제제 개발				보고서 면수 227	

요약문

		코드번호	D-01-L			
연구의 목적 및 내용	<p>농생태계의 화학농약 오염을 줄이기 위한 친환경방제 개발이 필요하였다. 곤충병원세균류인 <i>Xenorhabdus</i> 와 <i>Photorhabdus</i>는 곤충 면역을 억제하는 생리교란 물질을 분비한다. 이 세균류의 배양액을 이용하여 3 가지 서로 다른 새로운 친환경해충방제제를 개발하는 데 본 연구의 목적을 둔다.</p>					
연구개발성과	<p>새로운 친환경방제제의 개발 방향은 비티플러스를 기반으로 이뤄졌다. 면역억제를 기반으로 비티 살충제의 살충력을 증가시키는 데 개발 원리를 갖는다. 이에 대한 원천 기술은 바로 면역억제물질의 탐색과 작용기작을 밝혀야 한다. 이후 대상 해충에 적합한 비티를 선발하게 된다. 이후 이들을 합리적으로 혼합하여 새로운 살충제를 개발하게 된다.</p> <p>면역억제제는 두 가지 곤충병원세균에서 유래되었다. 이들 물질은 총 8 가지로 알려졌으며 이들의 합성과 분비가 세균 증식 단계에 따라 순차적으로 일어난다는 것을 밝혀졌다. 이들에 대한 대상곤충의 면역생리 작용점은 아이코사노이드 생합성 단계이다. 본 연구는 4 종류의 프로스타글란딘류(PG류)가 파밤나방에 존재하는 것을 LC-MS/MS로 동정하게 되었다. 또한 이들 PG류를 합성하는 생체 기구를 밝혔다. 이러한 결과 두 종류의 PLA2와 COX 유전자를 동정하게 되었다. 이들 유전자의 발현을 RNA 간섭 기술로 처리한 결과 아이코사노이드 생합성 전구물질의 감소는 물론이고 면역억제를 유발하였다. 따라서 파밤나방을 중심으로 세균 유래 면역억제제들의 작용 기작을 밝힌 결과 두 세균 물질은 특히 PLA2의 효소 활성을 억제하였다.</p> <p>세균 유래 면역억제물질을 비티와 혼합하여 3 종류의 친환경방제제를 개발하였다. 나비목 해충을 대상으로 이들 곤충류에 효과적인 Bt aizawai와 Bt kurstaki에 <i>Xenorhabdus nematophila</i> 세균 배양액을 혼합하여 "듀얼네프킬"을 개발하였다. 딱정벌레 해충을 대상으로 Bt tenebrionis를 선발하였으며, 여기에 <i>Photorhabdus temperata temperata</i> 세균 배양액을 혼합하여 "콜킬"을 개발하였다. 파리목 해충을 대상으로 Bt israelensis를 선발하였으며, 여기에 <i>Xenorhabdus nematophila</i> 세균 배양액을 혼합하여 "디프킬"을 개발하였다.</p>					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>본 연구를 통해 학술적으로 SCI 논문 16건, 비 SCI 11건을 발표하였다. 산업적으로 특허출원 7건, 특허등록 2건, 기술이전 1건 그리고 상업화 제품 등록 3건의 성과를 나타냈다. 현재 이들 약제는 (주) YA코리아를 통해 농가에 시판되고 있다.</p>					
중심어 (5개 이내)	곤충	살충제	면역	비티플러스	아이코사노이드	

< SUMMARY >

		코드번호	D-02			
Purpose & Contents	Eco-friendly pest controls are necessary for reducing chemical pesticide contamination in agroecosystems. Two entomopathogenic bacterial groups of <i>Xenorhabdus</i> and <i>Photorhabdus</i> secrete secondary metabolites suppressing insect immunity. This study aimed to develop three different crop protectants controlling insect pests using these bacterial metabolites.					
Results	<p>Development of new crop protectants used a concept of BtPlus that immunosuppression enhances Bt insecticidal activity. Thus, core technologies of this study include identification of immunosuppressive agents and their mode of actions with respect to insect immunity. Using immunosuppressants, tailor-made fashion was used to specifically control target insect pests by selecting specific Bt strain. By mixing immunosuppressants and specific Bt strain, novel crop protectants have been developed.</p> <p>Immunosuppressants were derived from two entomopathogenic bacteria, <i>Xenorhabdus</i> and <i>Photorhabdus</i>. These included 8 different compounds, which were sequentially synthesized and secreted during bacterial growth. Molecular targets of these bacterial metabolites are in eicosanoid biosynthesis. This study chemically identified 4 different prostaglandins (PGs) in <i>Spodoptera exigua</i> using LC-MS/MS. An effort to analyze PG biosynthetic pathway in <i>S. exigua</i> identified two kinds of biosynthetic enzymes of PLA2 and COX genes. RNA interference of these genes significantly reduced production of eicosanoid precursors and suppressed immune responses. These studies showed that PLA2 is the molecular target of these bacterial metabolites that possessed immunosuppressive activity in <i>S. exigua</i>.</p> <p>Rational approach resulted in three different biopesticides by mixing Bt and immunosuppressants. "Dual Lepkill" was developed against lepidopteran insect pests by mixing two Bts (Bt aizawai and Bt kurstaki) and <i>Xenorhabdus nematophila</i>-cultured broth. "Col-Kill" was developed against coleopteran insect pests by mixing Bt tenebrionis and <i>Photorhabdus temperata temperata</i>-cultured broth. "Dip-Kill" was developed against dipteran insect pests by mixing Bt israelensis and <i>Xenorhabdus nematophila</i>-cultured broth.</p>					
Expected Contribution	Academic outcomes of this study include 16 SCI journal papers and 11 domestic journal papers. Industrial outcomes are 7 patent application, 2 patent issues, 1 technology transfer, and 3 commercial registrations of products. These 3 products are now industrialized by YA Korea Inc. and commercialized for farmers.					
Keywords	Insect	Insecticide	Immune	BtPlus	Eicosanoid	

6. 영문목차

1. Overview of research development	1
2. Current status in domestic and foreign research	2
3. Research direction and outcomes	5
Section 1: Core technologies (12p)	
Chapter 1 PLA2 and Bt insecticidal activity (12p)	
Chapter 2 Enhancement of BtPlus (21p)	
Chapter 3 Synergists development of BtPlus (31p)	
Chapter 4 BtPlus and dsRNA (40p)	
Chapter 5 BtPlus and iPLA2 (53p)	
Chapter 6 Bt Cry toxin and BtPlus (60p)	
Chapter 7 Insecticidal genes for BtPlus (67p)	
Chapter 8 Fatty acid composition of Spodoptera exigua (78p)	
Chapter 9 Prostaglandins of Spodoptera exigua (90p)	
Chapter 10 Deveopment of Dual LepKil S (100p)	
Chapter 11 Development of Colkil (107p)	
Chapter 12 Development of Dipkil (119p)	
Section 2: Industrial research (126p)	
Chapter 1 Field application of BtPlus products (126p)	
Chapter 2 Consumer responses to BtPlus products (160p)	
Chapter 3 Legal registration of BtPlus products (179쪽)	
Section 3: Manual for products (205p)	
4. Achievements and impact to related areas	212
5. R&D and Applications	213
6. Foreign researches during this project	214
7. Safety level of research outcomes	214
8. Research facilities uploaded on NTIS	214
9. Research environment for maintaining high safety	214
10. Representative research outcomes	215
11. Others	216
12. References	216

<Appendix> Self-evaluation form

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	1
2. 국내외 기술개발 현황	2
3. 연구수행 내용 및 결과	5
제1단원 원천기술개발(12쪽)	
제1장 세포성 인지질분해효소 활성화 억제에 따른 비티 살충력 증가 효과(12쪽)	
제2장 Cry 독소단백질 혼합과 면역억제제 첨가를 통한 비티 살충제 적용범위 및 방제력 증진 기술(21쪽)	
제3장 비티플러스 cadherin repeat (CR) 협력제 개발(31쪽)	
제4장 비티플러스 dsRNA 협력제(40쪽)	
제5장 비티플러스 살충 작용점 iPLA2 분자 동정(53쪽)	
제6장 비티 Cry 독소 단백질 변형을 통한 살충력 제고 기술(60쪽)	
제7장 비티 대체 살충유전자 기능성 탐색(67쪽)	
제8장 파밤나방의 지방체 및 소화관에 존재하는 지방산 조성 결정(78쪽)	
제9장 파밤나방의 조직 프로스타글란딘 조성 결정(90쪽)	
제10장 나비목 해충방제제(듀얼네프킬에스) 개발(100쪽)	
제11장 딱정벌레 해충방제제(콜킬) 개발(107쪽)	
제12장 파리목 해충방제제(디프킬) 개발(119쪽)	
제2단원 산업화기술개발(126쪽)	
제1장 후보제품군 탐색 및 포장시험(126쪽)	
제2장 개발된 시제품의 농가 반응 조사 및 분석(160쪽)	
제3장 개발 제품의 상품화를 위한 등록 연구(179쪽)	
제3단원 제품 생산 매뉴얼(205쪽)	
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	212
5. 연구결과의 활용계획 등	213
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	214
7. 연구개발성과의 보안등급	214
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	214
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	214
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	215
11. 기타사항	216
12. 참고문헌	216

<별첨> 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

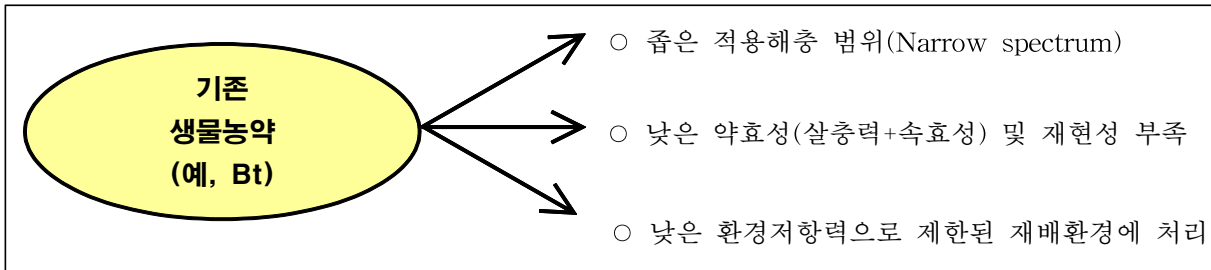
코드번호	D-03
------	------

1-1. 연구개발 목적

- 곤충 생장 조절 기능을 갖는 8종 유용물질과 3종 유용생물체를 이용한 친환경 해충방제제 개발
- 3종의 미생물제제 개발(나방해충 방제제, 딱정벌레해충 방제제, 파리해충 방제제)
- 기술이전 및 산업화

1-2. 연구개발의 필요성

- 해충 밀도의 증가에 따른 안정적 식량공급의 어려움
- 생산량 증가를 위해서는 해충을 효과적으로 방제하는 화학 농약에 대한 의존도 증가
- 화학농약의 남용에 따른 농생태계의 파괴 및 인축에 대한 위협
- 생태계 안전한 친환경 해충 방제 필요성
- 생물방제제는 생태계에 안전한 해충 방제 기술이나 살충효과가 비교적 낮고 효율에서 불안정함



- 이를 극복하기 위한 새로운 방제 개념이 통합생물방제(Integrated Biological Control: IBC)가 대두됨
- IBC는 서로 상이한 작용점을 갖는 생물적 방제제를 이상적으로 혼합 처리하여 방제효과를 극대화하기 위한 방제 개념
- IBC의 첫 사례로서 비티플러스의 방제제 개발 전략이 대두되었음. 이는 비티 처리제를 바탕으로 여기면역억제물질을 첨가하여 방제효과를 극대화하기 위함
- 특별히 비티플러스에서 비티는 선택적으로 대상 해충에 따라 상이한 비티가 포함될 수 있어, 맞춤형 해충 방제로 발전됨.
- 곤충병원세균 유래 다양한 면역억제물질이 *Xenorhabdus nematophila*, *Photorhabdus temperata* 및 *Xenorhabdus hominickii*에서 유래됨
- 이들 곤충병원세균의 작용점은 PLA2 효소로서 아이코사노이드 생합성의 committed step에 관여하게 된다. 따라서 PLA2를 억제하게 되면 전체 아이코사노이드 생합성이 멈추게 된다.
- 아이코사노이드는 산화지방산으로 탄소수가 20개 인 불포화지방산이다. 이들은 곤충의 면역계에 작용하여 세포성 면역 및 체액성 면역에 모두 관여하게 된다.
- 따라서 PLA2의 억제는 이들 물질 전체를 억제하여 다양한 면역반응 전체를 조절하게 된다.

1-3. 연구개발 범위

- 해충별 면역억제 미생물제 선발
- 해충별 벡터 미생물제 선발 및 면역억제 미생물제와 혼합 상승효과 기술 개발
- 액상제제로 제형화 기술 개발
- 대량 생산비 절감 기술 개발
- 인축 및 환경에 대한 독성평가
- 친환경농자재등록

2. 국내외 기술개발 현황

	코드번호	D-04
○ 국내에서는 비티플러스의 개발이 본 연구실을 중심으로 이뤄져 왔다. 이러한 내용은 본 연구집에 포함되고 있다.		
○ 국외적으로 기초 연구 성격으로 비티 저항성 인자 규명 및 면역기작에 대해서 연구력이 모아졌다.		

(1) 국내 연구 현황

본 연구에서 개발하고자하는 기술은 농업 생산에 막대한 경제적 손실을 끼치는 병해충 방제할 수 있는 새로운 작물보호제를 개발하는 데 있다. 기존에 신경계를 겨냥한 신경독 또는 대사작용을 억제하는 물질 또는 단백질 및 핵산 합성을 억제하는 살균제 등이 기본적 화학골격에서 유도체를 형성하면서 개발되어 왔다. 그러나 최근의 환경 및 인축 문제에 따른 장기간 노출 시험 등으로 막대한 개발 비용 및 시간이 투자되어야 했다. 이를 개선하기 위한 방법이 바로 생물기반(Biorational) 개발 방향이다. 즉, 방제하려는 대상 병해충의 생리적 현상을 탐구하고 이를 기반으로 살충 및 살균의 특이적 작용점을 찾게 한다. 또한 이러한 작용점을 공략하는 다양한 천적 미생물류로부터 대사산물을 찾아냄으로써 효과적 작물보호제를 발굴해내는 새로운 작물보호제 개발 방향이 본 연구에서 추구하는 바이다. 즉 본 연구의 핵심기술은 (1) 대상 해충의 작용점인 phospholipase A2 (PLA2)의 생리적 기능 연구 기술과 (2) 이를 공략하는 병원 미생물인 *Xenorhabdus nematophila* 또는 *Photorhabdus temperata temperata*의 PLA2 억제 및 다양한 아이코사노이드 생합성 억제 능력 분석 기술 그리고 (3) 이들 세균의 다양한 항생능력 분석 기술이다. 친환경육성법이 1997년 12월에 발효되었으며, 화학농약(원제기준)의 사용을 1997년 대비하여 2013년까지 40%를 줄이겠다는 목표를 갖게 되었다. 이를 위해서 친환경재배면적을 10,000ha에서 2005년에는 75,000ha까지 증가시키겠다는 실행방안을 제시하기도 하였다.

표. 연도별 전체 농약 중 생물농약 출원비율(특허청, 2003)

구 분	93-94	95-96	97-98	99-00	01-02
생물농약출원(건)	34	40	83	70	106
농약출원(건)	383	416	625	507	588
생물농약 출원비율(%)	8.9	9.6	13.3	13.8	18.0

출원된 생물농약 기술들을 살펴보면, 살충제 개발 방향이 가장 많은 것을 알 수 있다. 이는 앞으로 생물농약 산업화를 위해서 이 분야에 가장 연구 투자를 집중적으로 해야 될 방향성을 보여준다. 또한 기업체와 일반 연구소에서 집중적으로 개발에 노력을 경주하고 있는 것을 알 수 있고, 대학은 기업체와 공동으로 개발하는 것을 알 수 있다. 이를 통해서 불래 추후 생물농약의 개발은 이들 세 분야에서 특정 생물농약 상품화를 놓고 공동으로 연구 개발을 시도하는 것이 개발의 성공률을 높이는 것이라는 것을 짐작하게 한다. 이러한 추세를 살펴보면 앞으로 10년 이내에 현재의 농약시장 규모에서 약 30%까지 생물농약을 중심으로 한 친환경 작물보호제가 차지하고, 이중 대부분이 살충제를 대상으로 시장이 확대될 것으로 기대된다. 이러한 연구 방향은 지난 4년간 아젠다연구과정 동안 많은 진전을 보았다. 특별히 PLA2를 겨냥한 물질 화학동정 및 이를 이용한 신작물보호제 개발이었다.

(2) 국외 연구 현황

- 살충성 미생물로 *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii*, *Paecilomtses spp.*, *Hirsutrlia spp.* 등이 있으며, 국내외적으로 많은 연구가 진행되어왔으나, 그 방제효과가 화학농약에 비해 높지 않고, 제제화하는 데 있어 어려움이 많아 실효성이 낮은 것으로 알려져 있다.
- 현재 곤충병원선충 유래 공생세균을 이용한 기술은 계놈연구, 곤충 병원성 기작 연구 및 응용기술까지 폭넓게 진행되고 있다. 즉, 지금까지 비티(*Bacillus thuringiensis*; Bt) 위주의 미생물농약 판도는 곤충병원세균을 포함한 세균류로 확장되고 있다.
- 최근 중국-영국의 공동연구에서 *X. nematophila*가 세균 자체와 배양물 단독으로 배추 좀나방에 대해서 높은 살충력을 지닐 수 있다고 보고하였다(Nawaz et al., 2004). 이는 그 동안 이 세균의 환경에 대한 높은 감수성을 극복할 수 있는 응용기술이다.
- 앞으로의 전망: 농약은 작물보호의 수단이다. 이에 대한 기술의 변천사를 살펴보면 60년대 이전은 고전적 방제 수단을 중심으로한 원시적 작물보호 기술을 보였다. 이후 DDT, 유기인계, 카바메이트계 및 피레스로이드계의 유기 합성 화학농약이 개발되면서 작물보호의 획기적 전기를 맞게 되며 녹색혁명을 주도하였다. 그러나 화학농약의 인축 및 환경에 대한 문제점은 안전한 농산물을 소비자가 요구하게 되고, 규제 강화에 따른 대안적 작물보호 기술을 요구하게 되었다. 이렇게 해서 등장한 것이 생물농약이고, 이에 대한 약효는 화학농약에 비해서 낮으나 낮은 위해성으로 점차 선호도가 높아지는 실정이다. 그러나 생물농약의 최대 약점이라 할 수 있는 약효는 생명공학기술이 발달되면서 제고되고 있으며, 이를 통한 생물농약 기술의 발달은 지속적으로 기대된다.

표. 작물보호기술의 변천

	~1960	~1980	~2000	2000~
작물보호 방향	고전적 농업	생산성 향상	품질 향상	안전 농산물
보호 기술	비과학적 재래방제	화학농약 (고약효, 고독성)	화학농약 (고약효, 저독성)	화학농약 (고약효, 저독성)
대체 기술			생물농약 (불안정 약효)	생물농약 (안정 약효)

○ 세계적으로 천적 및 미생물을 이용한 생물농약이 차지하는 매출액은 전체농약 300억불 중 1%에 해당하는 3억불에 지나지 않으며, 개발실용화 된 70여종 중 각국에서 많이 사용되고 있는 미생물 살충제인 Bt제를 제외하면 대부분의 생물농약 사용량은 많지 않다. 이로 이용되고 있다. 그러나 이제까지 사용되고 있는 화학농약이 과학기술의 발달에 의해 밝혀지지 않았던 독성의 문제점이 점차 밝혀짐에 따라 저독의 안전한 생물농약의 개발 및 실용화는 더욱 촉진될 것으로 생각된다. 특히 환경 생태에 안전하며 약제저항성 출현이 없고, 농산물의 안전성 및 기존자원을 이용하여 저렴한 개발비 등으로 볼 때 개발은 꼭 필요하다. 국내의 입장으로 볼 때 소비자의 욕구에 따라 무농약 환경친화적 농법이 절실하다. 따라서 외국에서 개발된 것을 도입하는 것보다 국내 자원을 이용한 미생물 및 천적을 이용한 것이 국내 환경에 잘 적응할 뿐만 아니라 기술 축적의 측면에서 육성시킬 분야로 생각되며, 21세기 화학농약의 대체품으로 실용화 촉진은 필수적인 과제이다.

○ 전세계적으로 생물농약의 산업화 사례를 살펴보면, 포식성 천적농약을 제외하고 미생물농약, 생화학농약 및 유용유전자를 통해 개발이 활발히 진행되었다. 특별히 생화학농약의 유용성분과 상품화 개발이 가장 눈에 띄게 나타났다. 현재 미국의 EPA 보고에 따르면 182종의 유효성분을 이용하여 992종의 상품이 개발되었다. 이중 생화학농약은 유효성분이 117종, 상품화가 765종으로 전체에서 각각 64%, 77%를 차지하였다. 특히 식물체 추출물, 페로몬, 식물성장조절제의 개발이 가장 많은 품목

을 차지하였다. 미생물농약의 경우는 세균류를 이용한 생물농약이 가장 많은 수를 차지하였고, 진균과 바이러스를 이용한 생물농약의 개발이 증가하려고 한다.

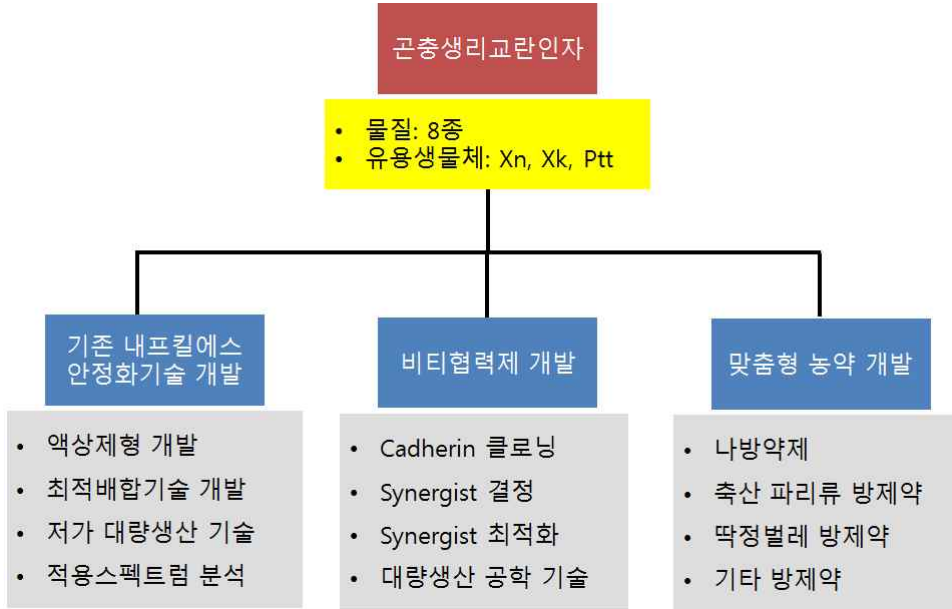
표. 생물농약의 산업화 사례(EPA, 2002)

생물농약종류	유효성분	제품수
미생물농약		
세균	31	171
효모균	1	1
진균	15	29
원생동물류	1	3
바이러스류	6	9
생화학 농약		
식물체 추출물	18	106
식물성장조절제	24	256
페로몬	36	219
기피제	16	94
기타 생화학 농약	23	90
유용 유전자		
유전자 변형세균	5	8
유전자 변형 식물체	6	9
계	182	991

이러한 생물농약의 개발 추이를 살펴보기 위해 연도별 생물농약 출원빈도를 살펴보았다. 전체 농약 출원건수 중에서 약 10%를 차지하였으나, 해마다 전체 농약대비 비중이 높아 약 20%에 이르도록 증가하였다. 이러한 추세는 생물농약의 등록 절차가 분명하여지면서 더욱 늘어날 전망이다.

3. 연구수행 내용 및 결과

○ 연구 전략



[원천기술개발]

- 유용물질 8종의 곤충생리 교란 효과 규명
 - 프로스타글란딘 물질 분석 및 생합성 경로 규명 기술 개발
 - 유용물질 8종의 프로스타글란딘 함량 변화 효과 검정
- 비티협력제 개발로 고효율 비티제 개발
- 맞춤형 살충제 개발
 - Xn, Xk, Ptt 배양액과 Bt의 협력 효과
 - Bt 종류에 따른 대상 해충 특이성 규명
 - 세균배양액의 최적 배합비율 결정

[산업화 전략]

- 처방개선 및 확립을 위해 농약회사 연구소 전문가 활용
- 최적 배양조건 확립을 위한 전문가 확보(경북바이오산업연구원)
- 대량생산을 통한 생산원가 절감 및 시장가격 도출
- 유기농 생산자 연합회를 통한 친환경 실천 농가 확보
- 농업현장에서의 실증시험을 통한 시장성 검증(방문 설문조사)
- 실증시험 농가는 지역 보급망을 활용
- 대학 등의 전문가 활용을 통한 제품 안전성 확보
- 친환경 농자재 등록을 위해 민간인증기관 자문 활용(강원대학교 친환경농산물안전성센터)

[산업화기술개발]

◦ 후보제품군 탐색 및 포장시험

- 나비목, 딱정벌레목, 파리목 해충 방제 약제 탐색 완료 및 배합비 설정

- ① 나비목 해충 방제제(듀얼네프킬에스) : Btk슬러지 4% : Bta슬러지 10% : Xn농축액 3.5% : 증량제 70.5% : 습윤분산제 2% : 보조용제 10%
- ② 딱정벌레목 해충 방제제(콜킬) : Btt슬러지 10 % :Ptt농축액 10% : 증량제 68% : 습윤분산제 2% : 보조용제 10%
- ③ 파리목 해충 방제제(디프킬) : Bti슬러지 10% : Xn배양액 70% : 습윤분산제 5% : 보조용제 15%

- 대량배양 공정 확립 및 물성 검토 완료

- ① 300kg 및 2톤 배양조를 이용한 대량 배양 공정 확립
 - Bt 배양 → Bt 배양액 진동원심막분리 → 저온저장 ⇒ 각 제품별 비율로 배합
 - Xn/Ptt 배양 → 진공농축 (파리목 방제제는 제외)
- ② 생산된 시제품 3종의 물성 확보 (수화성, 침강성)

- 독성예비 검토를 통한 후보제품 안전성 시험 수행

- ① 급성경구 및 경피독성 - 저독성
- ② 어독성 - 3급
- ③ 꿀벌독성 - 없음

- 적용 해충별 포장 약효 시험 진행

- ① 듀얼네프킬에스 : 배추좀나방, 오이목화바둑명나방, 파밤나방
- ② 콜킬 : 콩풍덩이, 벼룩잎벌레
- ③ 디프킬 : 흰줄숲모기, 집파리, 호박꽃과실파리

- 주요 작물에 대한 약해시험

- ① 듀얼네프킬에스 : 고추, 배추, 상추, 오이, 토마토 - 기준량 및 배양에서 약해 없음
- ② 콜킬 : 고추, 배추, 오이, 상추, 참외 - 기준량, 배양에서 약해 없음
- ③ 디프킬 : 고추, 배추, 상추, 오이, 토아토 - 기준량 및 배양에서 약해 없음

- 살충제 및 살균제 각 10종에 대한 농약혼용약해 시험 실시

- ① 3종(듀얼네프킬에스, 콜킬, 디프킬) 시제품 농약 혼용 약해 없음

◦ 대량 배양 및 농가 실증 시험

- 대량배양을 통한 원가 확보

- ① 듀얼네프킬에스 : ₩12,661/kg
- ② 콜킬 : ₩18,949/kg
- ③ 디프킬 : ₩14,020/kg

- 시제품 배포 및 농가설문 조사 수행

- ① 듀얼네프킬에스 : 총 478 농가 배포 후 242 농가 설문 접수
: 설문조사 결과 약효는 보통 이상으로 좋았으나, 최대한 저렴한 약제를 선호하는 경향을 보임
- ② 콜킬 : 총 78 농가 배포 후 57 농가 설문 접수
: 잎벌레류 등 딱정벌레목 해충에 약효가 없는 것으로 판단
- ③ 디프킬 : 총 11 농가 배포 후 5 농가 설문 접수
: 파리류 농업 해충에 약효가 미비한 것으로 판단
: 모기에 우수한 약효를 보이므로, 의약외품으로의 등록이 필요함

▫ 개발 제품의 상품화를 위한 등록 연구

- 유기농업자재 목록공시를 위한 자료 확보

- ① 지표물질 분석 성적서 : 듀얼네프킬에스(Benzylidenacetone 4.67ppm), 콜킬(Benzylidenacetone 2.33ppm), 디프킬 (Benzylidenacetone 0.95ppm)
- ② 유묘기 5종 식물에 대한 약해 시험보고서 : 시제품 3종 약해 없음
- ③ 잔류농약 검사 성적서 : 시제품 3종 잔류농약 검출 없음
- ④ 병원성 미생물 검사 성적서 : 시제품 3종 병원성미생물 검출 없음
- ⑤ 독성시험 결과 보고서 : 급성경구 및 경피독성 시험- 저독성
피부 및 안점막자극성 시험- 자극성 없음
급성어독성 시험 - 어독성 3급
꿀벌접촉독성 시험 - 독성 없음

- 유기농업자재 공시

- ① 듀얼네프킬에스 : 공시-2-5-045호
- ② 콜킬 : 공시-2-5-095호
- ③ 디프킬 : 공시-2-5-139호

○ 연구 성과

① SCI 논문 발표 - 16 건

1. Eom S, Park Y, Kim H, Kim Y. 2014. Development of a high efficient "Dual Bt-Plus" insecticide using a primary form of an entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 507-521.
2. Park J, Kim Y. 2014. Prostaglandin Mediates down-regulation of Phenoloxidase Activation of *Spodoptera exigua* via Plasmacyte-spreading Peptid-Binding Protein. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 85, 234-247
3. Eom S, Park Y, Kim Y. 2014. Sequential immunosuppressive activities of bacterial secondary metabolites from the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila*. 2014. *Journal of Microbiology* 52, 161-168.
4. Stanley D, Kim Y. 2014. Eicosanoid signaling in insects: from discovery to plant protection. *Critical Reviews in Plant Sciences* 33, 20-63.
5. Park Y, Kim Y. 2014. RNA interference of cadherin gene expression in *Spodoptera exigua* reveals its significance as a specific Bt target. *Journal of Invertebrate Pathology* 114, 285-291.
6. Hapat R, Kim Y. 2014. JH modulates a cellular immunity of *Tribolium castaneum* in a Met-independent manner. *Journal of Insect Physiology* 63, 40-70.
7. Park Y, Ahn S, Vogel H, Kim Y. 2014. Integrin β subunit and its RNA interference in immune and developmental processes of the Oriental tobacco budworm, *Helicoverpa assulta*. 2014. *Developmental and Comparative Immunology* 47, 59-67.
8. Park Y, González-Martínez RM, Navarro-Cerrillo G, Chakroun M, Kim Y, Ziarolo P, Blanca J, Cañizares J, Ferré J, Herrero S. 2015. ABCC transporters mediate insect resistance to multiple Bt toxins revealed by bulk segregant analysis. *BMC Biology* 12, 1-15.
9. Park J, David S, Kim Y. 2015. Roles of peroxinectin in PGE2-mediated cellular immunity in *Spodoptera exigua*. *PLOS ONE* 9, 1-11.
10. Shrestha S, Park J, Ahn S, Kim Y. 2015. PGE2 mediates oenocytoid cell lysis via a sodium-potassium-chloride cotransporter. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 89, 218-229.
11. Kim E, Park Y, Kim Y. 2015. A transformed bacterium expressing double-stranded RNA specific to integrin β 1 enhances Bt toxin efficacy against a polyphagous insect pest, *Spodoptera exigua*. *PLOS ONE* 10, 1-15.
12. Kim Y, Stanley D, Zhang L. 2015. Insect anti-viral immunity: roles of prostaglandins and other eicosanoids. *Invertebrate Survival Journal* 12, 166-169.
13. Kim E, Jeoung S, Park Y, Kim K, Kim Y. 2016. A novel formulation of *Bacillus thuringiensis* for the control of brassica leaf beetle, *Phaedon brassicae*. *Journal of Economic Entomology* 108, 2556-2565.
14. Park Y, David S, Kim Y. 2016. Eicosanoids up-regulate production of reactive oxygen species by NADPH-dependent oxidase in *Spodoptera exigua* phagocytic hemocytes. *Journal of Insect Physiology* 79, 63-72.
15. Park Y, Herrero S, Kim Y. 2016. A single type of cadherin is involved in *Bacillus thuringiensis* toxicity in *Plutella xylostella*. 2016. *Insect Molecular Biology* 24, 624-633.
16. Park Y, Jeong J, Kim Y. 2016. A Mixture of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* with *Xenorhabdus nematophila*-cultured broth enhances toxicity against mosquitoes *Aedes albopictus* and *Culex pipiens pallens*. *Journal of Economic Entomology* 109, 1086-1093.

○ 연구 성과

② 비SCI 논문 발표 - 11건

1. 엄성현, 박지영, 김건우, 김용균. 2014. 세포성 인지질분해효소 활성 억제에 따른 비티 살충력 증가 효과. 한국응용곤충학회지 53, 271-280.
2. 김영태, 김은성, 박영진, 김용균. 2014. Inhibitory Effects of a Recombinant Viral Cystatin Protein on Insect Immune and Development. 한국응용곤충학회지 53, 331-338.
3. 김은성, 최봉기, 박영진, 차욱현, 김건우, 이대원, 김용균. 2014. Overwintering Conditions of the Diamondback Moth and Genetic Variation of Overwintering Populations. 한국응용곤충학회지 53, 355-365.
4. 김태형, 수닐 쿠마르, 김용균. 2015. 먹이에 따른 파밤나방 발육과 DNA 메틸화 변이. 한국응용곤충학회지 54, 359-367.
5. 김영태, 김은성, 박영진, 김용균. 폴리드나바이러스 유래 시스타틴 유전자 발현 형질전환 담배 제작. 한국응용곤충학회지 54, 1-9.
6. 박영진, 김민우, 김건우, 김용균. 2015. Xenorhabdus nematophila 세균 배양액 유래 미확인 생리활성 물질의 비티플러스 살충력 상승효과. 한국응용곤충학회지 54, 55-62.
7. 엄성현, 박영진, 김용균. 2015. 혼합 비티 독소 단백질과 아이코사노이드 생합성 억제자를 이용한 약효 증진 기술. 농약과학회지 19, 301-310.
8. 박아름, 김용균. 2015. CpBV-ELP1발현 재조합 벡쿨로바이러스의 대량 증식과 파밤나방 방제 기술. 농약과학회지 19, 279-286.
9. 김은성, 박아름, 박영진, 김주일, 김용균. 2015. 배추좀나방의 계절적 발생과 월동집단의 유전적 분화 감소. 한국응용곤충학회지 54, 303-310.
10. 김용균, 이승희, 김건우, 서승환. 2016. 파밤나방 유충의 조직별 지방산 구성과 세포성 인지질분해효소의 역할. 한국응용곤충학회지 55, 129-138.
11. 김은성, 김용균. 2016. Double-stranded RNA 발현 세균의 동결건조 제형화와 적용 대상 해충 선택성. 한국응용곤충학회지 55, 81-89.

○ 연구 성과

③ 특허출원 7건

1. 김용균. 담배나방 방제용 dsRNA, 이를 포함하는 살충제 조성물 및 방제방법. 10-2014-0068659. 2014-06-05
2. 김용균. 딱정벌레 방제용 살충제 조성물과 방제방법. 10-2015-0056217. 2015-04-21.
3. 김용균. 비티아이와 곤충병원세균 배양액을 포함하는 숲모기속 및 집모기속 모기유충 방제용 조성물. 10-2015-0170613. 2015-12-02
4. 김용균. 배추좀나방과 파밤나방의 동시방제 생물농약 조성물. 10-2013-0105872. 2015-12-27.
5. 김용균. 프루텔고치벌 브라코바이러스 유래 시스타틴 유전자 CpBV-CST1 이 도입되어 해충저항성을 가진 형질전환 식물체 및 이의 제조방법. 10-2016-0024369. 2016-02-29.
6. 김용균. 파밤나방의 인티그린 B1 서브유닛에 특이적인 dsRNA를 발현하는 대장균을 이용한 파밤나방 방제용 조성물 및 파밤나방 방제방법. 10-2016-0024163. 2016-02-29.
7. 김용균. 곤충병원세균 제노랍두스 호미니키아이 ANU1 및 이를 이용한 해충방제제. 10-2016-0072948. 2016-06-13.

④ 특허등록 2건

1. 김용균. 벤질리텐아세톤 유도체를 이용한 식물 병해충 방제 조성물 및 방제 방법. 10-1386329-0000. 2014-04-01
2. 김용균. 고추병해 방제용 조성물 및 이를 이용한 고추병해의 방제방법. 10-1407191-0000. 2014-06-05

○ 연구 성과

⑤ 기술이전 1건

대상기술명: 곤충생장조정 억제물질을 이용한 맞춤형 해충 방제제 개발 (*Bacillus thuringiensis*와 *Xenorhabdus nematophila*를 이용한 친환경 나비목, 딱정벌레목 및 파리목 해충 방제제 개발)

이전업체: (주) YA코리아 기술료: 총 5,000,000원

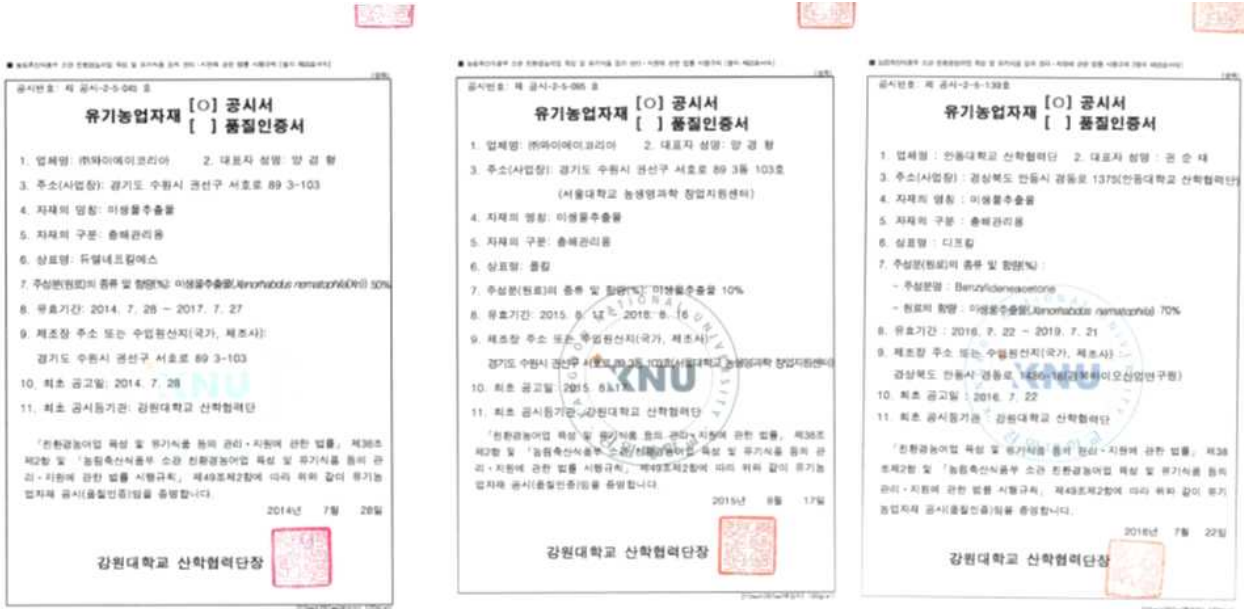
이전내용: 계약기술에 대한 전용실시권

⑥ 상품화 3건

“듀얼네프킬에스®”: 공시-2-5-045 (등록일: 2014. 7. 28)

“콜킬®”: 공시-2-5-095 (등록일: 2015. 8. 17)

“디프킬®”: 공시-2-5-139 (등록일: 2016. 7. 22)



제1단원 원천기술개발

제1장 세포성 인지질분해효소 활성 억제에 따른 비티 살충력 증가 효과

비티(*Bacillus thuringiensis*)는 토양에서 발견되는 그람양성균으로 살충성 결정체 독소단백질(Crystal toxin protein: Cry)을 생성하는 자연계 주요 해충방제인자이다(Roh et al., 2007). Cry 단백질은 세균이 갖는 플라스미드에 암호되어 있고, 이들의 종류에 따라 비티의 살충 스펙트럼이 결정된다(Bravo et al., 2012). 약 700 종류의 Cry 단백질 유전자가 밝혀졌고(Crickmore et al., 2014), 이들의 추정 아미노산 서열의 40% 유사도 기준에 따라 적어도 70 종류의 서로 다른 Cry 부류(Cry1, Cry2... Cry70)로 나뉘고, 다시 70% 유사도 기준으로 세부류(Cry1A, Cry1B 등)로 나뉘고, 다시 70-95%의 유사도 기준에 따라 세 세부류(Cry1Aa, Cry1Ab 등)로 나뉘게 된다(Crickmore et al., 1998). Cry 독소단백질은 크게 두 양상으로 약 130 kDa 크기 대형 단백질과 65-70 kDa 크기의 소형 단백질로 구성되는 원시 독소단백질로 형성되며, 곤충 중장 단백질 분해효소에 의해 N 말단(소형의 경우) 또는 N과 C 말단(대형의 경우)의 가수분해 반응으로 약 60 kDa 크기의 생리활성을 지닌 활성 독소단백질로 가공된다(de Máagd et al., 2001).

활성 독소단백질로 가공된 비티의 살충기작은 중장막의 수용체에 결합으로부터 시작된다. Cry1Ab의 경우 캐드헤린과 같은 높은 결합력(Kd = 1 nM)을 갖는 세포막 단백질에 결합된 Cry는 이 단백질의 domain I의 첫 번째 α 구조 영역이 제거되면서 Cry 올리고 형성이 일어나게 된다. 이후 이들 올리고 독소단백질 복합체는 결합력(Kd)이 약 0.6 nM 정도의 alkaline phosphatase 또는 aminopeptidase N에 결합하고 중장막에 구멍을 뚫게 되고 이에 따라 세포 안팎의 삼투압충격에 의해 중장세포의 치사하게 된다(Bravo et al., 2011). 또 다른 과정으로 캐드헤린에 결합된 Cry 독소단백질은 이 수용체를 통한 세포 내 신호전달과정으로 세포치사를 일으키게 할 수 있다(Zhang et al., 2006). 중장세포치사에 따라 비티 세균이 혈강으로 침입하여 패혈증을 유발하여 궁극적으로 곤충을 치사하게 할 수 있으나 독소단백질만으로도 곤충을 치사시킬 수 있다는 증거는 비티가 패혈증의 원인이라고만 단정 지을 수 없다(Bravo et al., 2005). 이 보다는 중장에 서식하는 여러 다양한 미생물들이 비티 독소단백질에 의해 와해된 중장세포벽을 뚫고 혈강으로 침입하여 패혈증을 일으켰을 것으로 해석된다(Broderick et al., 2006). 이때 곤충 혈림프의 면역 작용은 이들 미생물 침입의 방어 기능을 담당할 수 있다(Grizanova et al., 2014). 따라서 이 대상 곤충의 면역 작용 억제는 비티의 살충력을 증가시킬 수 있는 지렛대 역할을 담당할 수 있다(Rahman et al., 2004; Kwon and Kim, 2007; Broderick et al., 2010).

곤충면역을 억제시키는 미생물 및 화합물이 보고되고 있다. 이 가운데 곤충병원선충에서 유래된 *Xenorhabdus nematophila* (Xn) 세균이 포함된다(Park and Kim, 2000). Xn 세균은 그람음성균으로 선충의 장내에 서식하고 있으며, 기주 선충이 대상 곤충의 혈강으로 침입하면, 선충 장속에서 곤충의 혈강으로 빠져나와 다양한 곤충병원기작을 발휘하게 된다(Akhurst, 1980; Kaya and Gaugler, 1993). 특별히 Xn은 감염 초기에 대상 곤충의 세포성 및 체액성 면역을 모두 억제하게 된다(Park and Kim, 2003; Hwang et al., 2013). 이러한 Xn의 곤충 면역억제 기작은 주로 곤충의 면역 증개물질인 아이코사노이드 생합성을 억제하면서 나타나게 된다(Kim et al., 2005).

아이코사노이드는 탄소수 20개의 다가불포화지방산의 산화물들이다. 이들 물질은 주로 인지질을 기질로 인지질분해효소의 일종인 phospholipase A₂ (PLA₂)의 촉매작용으로 유리된 아라키도닉산(5,8,11,14-eicosatetraenoic acid)이 cyclooxygenase 또는 lipoxygenase의 작용으로 유도된 프로스타글란딘류 및 류코트리엔류가 곤충에서 나타난다(Stanley and Kim, 2014). 따라서 PLA₂는 아이코사노이드 생합성 과정의 첫 반응을 촉매하는 효소로서 Xn의 억제 대상이 된다(Shrestha and Kim, 2009). Xn의 세균배양액에 PLA₂ 억제 물질이 포함되었으며, 이 물질은 유기용매로 추출되었다(Park et al., 2004a,b). 일련의 분획구 분리 방법을 이용하여 이 세균 배양액에 존재하는 PLA₂ 억제 물질을 분리하여 총 8개 화합물의 물질 구조를 동정하였다(Seo et al., 2012).

인지질분해효소의 일종인 PLA₂ (EC 3.1.1.4)는 에스테르 가수분해효소로서 인지질의 sn-2 위치에 작용하여 지방산을 유리시키며, 바이러스, 세균, 식물 및 동물에 이르기까지 모든 생명체에 존재한다 (Burke and Dennis, 2009). 이러한 다양한 PLA₂는 적어도 15 개의 그룹으로 분류되나 일반적으로 세포성 및 칼슘 의존형 cPLA₂ (cellular PLA₂), 세포성 및 칼슘 독립적 iPLA₂ (calcium-independent PLA₂) 및 분비성 sPLA₂ (secretory PLA₂)로 나눌 수 있다 (Schaloske and Dennis, 2006). 이들은 분자 크기 및 이황화결합 수에 있어서 차이를 보이며 생리적 기능 차이를 나타내고 있는 데, 특별히 cPLA₂가 포유동물의 면역 반응에 일종인 염증반응과 밀접하게 관련을 보이고 있다 (Uozumi et al., 1997). 곤충에서는 꿀벌 등의 독샘물질의 성분으로서 sPLA₂를 제외하고 면역작용에 관련 것으로는 거릿쌀도둑거저리 (*Tribolium castaneum*)에서 4 종의 sPLA₂를 최초로 보고하였다 (Shrestha et al., 2010). 그러나 면역 작용에 연관된 cPLA₂에 대한 정보는 곤충에서 알려진 바 없다.

본 연구는 비티 살충제의 살충력 증가시키기 위해 Xn 유래 면역억제물질을 혼합하는 것을 전략으로 세웠다. Xn 물질의 면역 억제를 위해 최근 파밤나방 (*Spodoptera exigua*)에서 클로닝된 cPLA₂ 유전자를 발현시켜 얻은 재조합단백질을 이용하여 Xn 유래 물질들의 cPLA₂ 억제 효과를 분석하였다. 궁극적으로 이 cPLA₂ 억제효과와 비티 살충력 증가의 상관관계를 분석하는 데 목적을 두고 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

곤충 사육

파밤나방 유충을 1994년 파 재배지에서 채집하였고 실내에서 인공사료 (Goh et al., 1990)로 누대 사육하였다. 사육 배양기의 조건은 온도 25±1°C, 광주기 16:8 h (L:D)이며 성충은 10% 설탕물을 먹이로 공급하였다. 배추좀나방은 안동시 송천동에 소재한 배추밭에서 유충을 채집하여 약제 처리하지 않고 실내에서 누대 사육한 것을 실내 약제 노출 실험에 사용하였다. 유충은 온도 25±1°C, 광주기 16:8 h (L:D), 상대 습도 40~60%의 배양기에서 사육했다. 유충은 배추를 먹이로 사육하였으며 성충은 10% 설탕물을 먹이로 하였다. 본 연구의 생물검정에 사용된 발육시기는 파밤나방과 배추좀나방 모두 3령충을 이용하였다.

비티 균주 배양

비티 균주는 (주)고려바이오 (Hwasung, Korea)로부터 지원받았으며 *B. thuringiensis* var. *kurstaki* serotype b (BtK) 그리고 *B. thuringiensis* ssp. *aizawai* NT423 (BtA)을 사용하였다. 두 종류의 비티 균주를 멸균수 1 mL와 혼합하여 현탁액을 만든 후 루프를 이용하여 tryptic soy broth (TSB) 평면 배지에 세균을 도말하고 30°C에서 24 시간 배양하였다. 평판배지에서 배양된 세균에서 단일 콜로니를 얻고 이를 멸균수로 희석하여 TSB 액체배지를 이용하여 28°C에서 48 시간 동안 200 rpm에서 교반배양 후, 다시 48 시간 동안 4°C 저온고에 보관하여 세균의 포자 형성율을 증가시켰다. 포자 형성은 위상차 광학 현미경 (BX-PHD, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 1,000 배 배율에서 확인하였다.

대사 화합물의 조제

Xn 유래 물질인 benzylideneacetone (BZA, (E)-4-phenylbut-3-en-2-one, Sigma-Aldrich Korea, Seoul, Korea), proline-tyrosine (PY, 3-(4-hydroxybenzyl)-hexahydropyrrolo[1,2- α]pyrazine-1,4-dione, Peptron, Daejeon, Korea), acetylated phenylalanine-glycine-valine (Ac-FGV, 2-(2-(2-benzyl-3-oxobutanamido)acetamido)-3-methyl butanoic acid, Peptron), *p*-hydroxyphenyl propionic acid (PHPP, Sigma-Aldrich Korea), 4-hydroxyphenylacetic acid (HPA, Sigma-Aldrich Korea) 그리고 cyclic PY (cPY, 3-(4-hydroxyphenyl)-2-(pyrrolidine-2-carboxamido)propanoic acid)는 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Korea)를 이용하여 1,000 ppm의 농도로 조제하였으며 indole (2,3-benzopyrrole,

Sigma-Aldrich Korea)과 oxindole (2,3-dihydro-1H-indol-2-one, Sigma-Aldrich Korea)은 증류수를 이용하여 1,000 ppm의 농도로 조제하였다.

PLA₂ 활성과 Xn 대사물질의 관계

PLA₂ 효소활성의 측정은 형광물질 pyrene [1-hexadecanoyl-2-(1-pyrenedecanoyl)-sn-glycerol-3-phosphatidyl choline] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)이 부착된 인지질을 기질로 사용하여 형광분석법으로 측정하였다 (Radvanyi et al., 1989). 기질은 99.5% 에탄올을 이용하여 10 mM로 조제하였다. Bovine serum albumin (BSA)은 인산완충용액을 이용하여 10%로 조제하였다. Tris 완충용액(pH 7.0)은 증류수를 이용하여 50 mM로 조제하였다. 염화칼슘은 증류수로 1 M을 조제하였다. Xn 대사물질은 상기의 제조 방법을 따라 1 M의 농도로 조제하였다. 반응용액(150 μ l)은 50 mM의 Tris 완충용액 143.5 μ l, 1 M의 CaCl₂ 1 μ l, 10%의 BSA 1.5 μ l, 1 μ l의 억제자 및 2 μ l의 효소용액으로 구성되었다. 서로 다른 농도의 억제자를 cPLA₂ 효소용액에 첨가한 후 5 분간 25°C에서 반응시켰다. 이후 147 μ l 기질용액을 첨가하고 2 분간 반응시켰다. SpectraMax M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 excitation 345 nm와 emission 398 nm 조건에서 효소 반응을 측정하였다.

대사물질의 단독물질 생물검정

생물검정은 잎침지법으로 실시하였다. 8가지 대사물질을 0에서부터 100 ppm 까지 농도 별로 제조 한 후에 1 분간 침지시킨 배추 잎(3×3 cm)을 여과지가 깔린 용기에 놓아 10 분간 건조시켰다. 이때 1 시간 동안 절식시킨 배추좁나방 3령충과 파밤나방 3령충을 처리 구당 10 마리씩 3 반복으로 처리하였다. 생존 수 확인은 24 시간 주기로 7 일 동안 매일 하루 중 같은 시간에 조사하였다.

비티와 대사물질의 협력효과 생물검정

비티는 28°C에서 48 시간 동안 배양된 것을 사용하였으며, 비티의 내생포자 숫자는 BtK는 3.6×10^{10} /mL, BtA는 2.3×10^{10} /mL를 기록하였다. 비티에 8 가지 대사물질을 각각 혼합하였을 때 각 대사물질의 최종 농도가 0 ~ 100 ppm이 되도록 희석한 후 배추좁나방 3령충과 파밤나방 3령충에 처리하였다. 각 처리는 3 반복하였으며, 각 반복은 10 마리의 공시충으로 구성되었다. 생존수 확인은 24 시간 주기로 7 일 동안 매일 하루 중 같은 시간에 조사하였다.

SecPLA₂ 클로닝 및 분리과정

해당 유전자의 발현을 위해서 파밤나방 혈구시료의 cDNA를 Hwang et al. (2013)의 방법으로 준비 하였다. 이 혈구 cDNA를 대상으로 파밤나방 cPLA (SecPLA₂: GenBank BankIT number 11723770)의 open reading frame (ORF) 영역을 정방향(5'-ATGATGCAACATCAGTACTG-3') 및 역방향(5'-GGCTGCATGGCTTTGGTTGG-3') 프라이머들을 이용하여 94°C에서 45초, 52°C에서 45초, 72°C에서 90초 조건에서 40 회 증폭하였다. 이 증폭물을 6x 히스티딘과 V5 tag가 있는 pBAD-TOPO 발현벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 재조합하였고, 이를 *E. coli* Top 10 균주에 발현시켰다. 형질전환된 대장균을 37°C에서 배양하여 세균 밀도(600 nm 흡수도)가 0.8-0.9 사이가 될 때 까지 증식시킨 후 L-arabinose (Sigma-Aldrich Korea)를 0.02%가 되도록 추가하였다. 이후 30°C에서 4 시간 동안 과발현 시켰다. 수거된 세균은 double detergent buffer (50 mM Tris, pH 7.0, 30 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.02% NaN₃, 0.01% Igepal, 0.005% PMSF, 0.05% protein inhibitor cocktail)로 현탁액을 만든 후 초음파분쇄기 (Bandelin Sonopuls, Berlin, Germany)에서 95%의 강도, 30 초 단위로 15 번을 시행하였으며 이후 10,000 rpm의 속도로 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액을 Ni-NTA 컬럼(Qiagen Korea, Seoul, Korea)을 이용하여 SecPLA₂ 농축 분획구를 얻었고, 이를 다시 Sephadex® G-100 (Sigma-Aldrich Korea)을 이용한 크로마토그래피를 통해 SecPLA₂를 분리하였다. SecPLA₂ 단백질의 전기영동은 10%

SDS-PAGE를 이용하여 분리하였으며 V5 항체(Life Technologies Korea, Seoul, Korea)를 사용하여 Western blotting을 실시하였다.

지방체 유래 인지질 분리

과밤나방 5령 유충의 지방체 시료량 대비 20 배의 *n*-hexane을 가하여 20 분간 초음파 처리(Branson, USA)하면서 2 회 추출하였다. Whatman No. 2 여지로 여과한 후 잔사에 대해 Folch et al. (1957)의 방법에 준하여 동량의 chloroform : methanol (2:1, v/v)로 2회 추출하였다. 중성지질, 당지질 및 인지질의 분리를 위해 chloroform : methanol 추출물에 대한 silica gel column (5.5×40 mm) chromatography를 실시하였으며(Christie, 2003), 활성화시킨 silica gel (70~230 mesh, Merck)을 충전한 후 용매 극성에 따라 chloroform, acetone, methanol을 순차적으로 용출하여 각각 중성지질, 당지질 및 인지질을 차례로 분획하였다. 추출 여액 및 각각의 분획물은 40℃ 이하에서 감압농축하였고 질소로 건조하여 지방산 분석 및 효소처리 실험시까지 -20℃에 보관하였다.

인지질 추출물에 대한 SecPLA₂ 촉매 반응 분석

인지질 분획구를 100% ethanol로 용해시켰다. 이후 100 μ l의 인지질, 100 μ l의 10% BSA, 60 μ l의 1 M CaCl₂, 100 μ l의 PLA₂, 9,640 μ l의 Tris-HCl buffer (pH 7.0)를 섞고 28℃에서 2 시간 동안 반응시켰다. 이후 유리 지방산을 아래의 방법으로 분석하였다.

유리 지방산 분석

Hexane 추출 및 silica gel column chromatography를 통해 획득된 지질을 Metcalfe and Schmitz (1961)의 방법에 준하여 지방산을 methylation 시켰다. 이 시료(0.5 mg - 1.8 mg)를 capped test tube에 취하여 0.5 N NaOH methanol 용액 1.5 mL를 넣고 N₂로 충전한 후 100℃에서 5 분간 증탕하여 비누화 반응을 실시하였다. 이후 분리된 지방산에 메틸기를 첨가하기 위해 14% BF₃-methanol 용액 2 mL을 넣고 질소를 충전하여 100℃에서 30 분간 메틸화 시킨 다음, isooctane 1 mL와 포화 NaCl 용액 5 mL를 가하고 2 회 추출하였다. Isooctane 층을 취하여 무수 Na₂SO₄으로 탈수하고 여과(PTFE 0.2 μ m Hydrophilic, Advantec MFS, Inc., Tokyo, Japan) 후에 GC/MS (HP 6890 GC system/ HP 5973 Mass selective detector, Hewlett Packard, San Diego, USA) 분석시료로 하였다. 효소처리 시료의 경우, *n*-hexane 추출하여 비누화반응 없이 상기와 동일한 방법으로 메틸화하였다. GC/MS 분석을 위한 컬럼은 SP-2560 (100 m × 0.25 mm i.d., 0.2 μ m film thickness, Supelco Inc., Bellefonte, Pennsylvania, USA)을 장착하였으며, 컬럼 오븐 온도는 100℃에서 4 분 동안 유지한 후 240℃까지 분당 3℃씩 증가하여 15 분 동안 유지하였다. 이동상 가스는 헬륨으로 0.8 mL/min, injector 225℃, ion source 200℃, separator 240℃로 설정하였다. 각각의 시료는 1 μ L를 주입하여 분석하였고, split ratio는 20:1의 비율이었다. 분리된 피크는 Supelco사 표준지방산 methyl ester의 머무름 시간과 비교하여 확인하였으며, 피크 면적비로써 지방산 조성 백분율을 구하였다. 또한 GC에 의해 분리된 피크의 mass spectrum을 GC/MS data system인 MS Chemstation (Hewlett Packard)에 설치된 NIST 및 Wiley library와의 검색·비교를 통해 지방산을 동정하였다.

통계처리

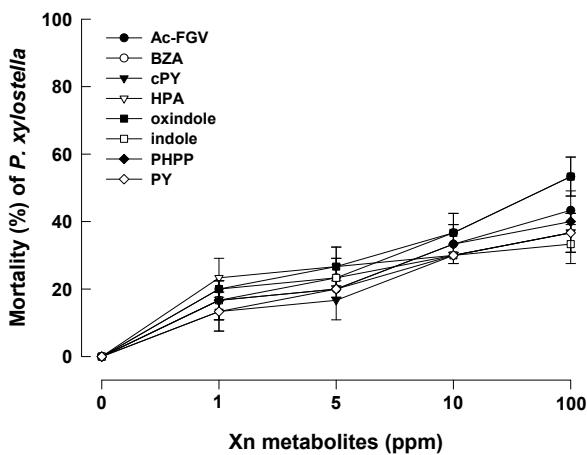
모든 살충효과 시험 결과는 백분율 자료로서 arsine 변환 후 SAS의 PROC GLM (SAS Institute, 1989)을 이용하여 ANOVA 분석을 실시하였다.

결 과

Xn 유래 세균대사물질의 살충력

Xn 세균이 분비하는 8 종류의 대사물질의 살충력을 분석했다(Fig. 1). 이들 물질들의 용해도와 세포 독성을 고려하여 100 ppm 이하의 농도에서 잎침지법으로 배추좀나방과 과밤나방 유충에 대해 독성을 조사하였다. 이때 모든 8 가지 물질은 두 곤충에 대해서 살충력을 나타냈다(배추좀나방: $F = 5.51$; $df = 7, 80$; $P < 0.0001$, 과밤나방: $F = 9.57$; $df = 7, 80$; $P < 0.0001$). 분석된 8 가지 물질 가운데 BZA와 oxindole이 두 곤충에 대해 40% 이상의 살충율을 나타냈다.

(A)



(B)

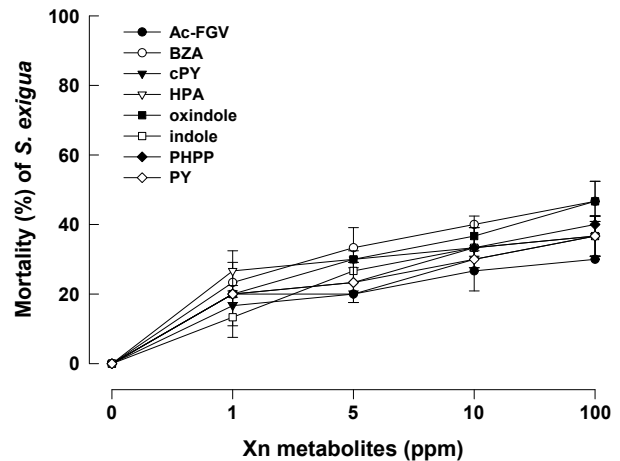


Fig. 1. Toxicities of eight different bacterial metabolites of *Xenorhabdus nematophila* (Xn) against third instar larvae of *Plutella xylostella* and *Spodoptera exigua*. Lead-dipping method was used to assess the toxicities. Each replication used 10 larvae and was replicated three times. Mortality was measured at 7 days after treatment. Error bars indicate standard deviation.

Xn 유래 세균대사물질의 비티 살충력 상승효과

배추좀나방과 과밤나방에 대한 비티의 살충력은 60% 이상을 나타내지 않았다(Eom et al., 2014). 본 연구 결과도 비티 단독 처리는 약 50%의 살충효과를 나타냈다. 이렇게 낮은 비티 살충력을 높이기 위해 Xn 대사물질을 첨가하여 비티의 살충력 상승효과를 분석했다(Fig. 2). 첨가된 세균 대사물질의 농도가 증가함에 따라 비티 살충력을 높였다(배추좀나방: $F = 40.56$; $df = 3, 64$; $P < 0.0001$, 과밤나방: $F = 110.44$; $df = 3, 64$; $P < 0.0001$).

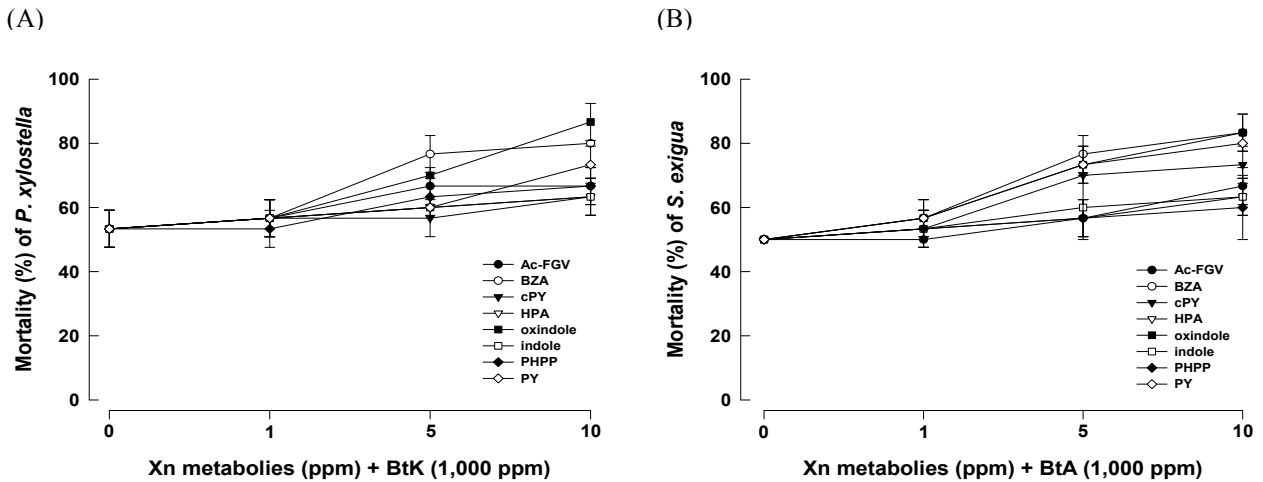
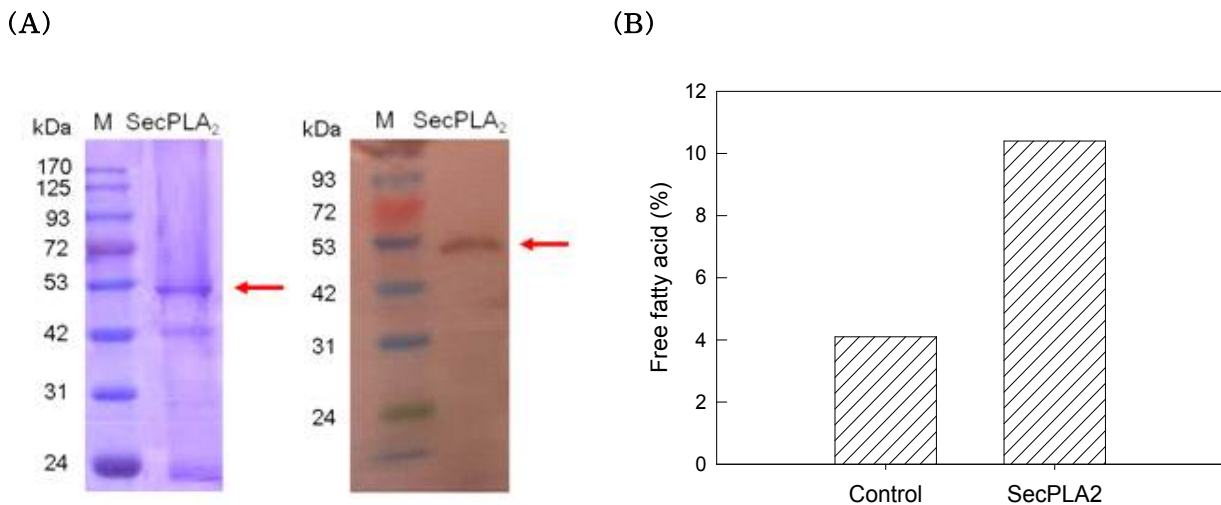


Fig. 2. Synergistic effect of eight different bacterial metabolites of *Xenorhabdus nematophila* (Xn) on 1,00 ppm treatment of *Bacillus thuringiensis kurstaki* (BtK) or *aizawai* (BtA) against third instar larvae of *Plutella xylostella* and *Spodoptera exigua*. Lead-dipping method was used to assess the toxicities. Each replication used 10 larvae and was replicated three times. Mortality was measured at 7 days after treatment. Error bars indicate standard deviation.

제조합 SecPLA₂의 인지질 가수분해 활성

Xn 대사물질은 PLA₂ 활성억제 기능을 갖는다(Seo et al., 2012). 곤충면역작용에 영향을 주는 PLA₂ 가운데 세포내에 존재하는 cPLA₂가 척추동물에서 보듯 면역 관련 아이코사노이드 생성에 중요한 역할을 담당할 것으로 추정된다(Stanley and Kim, 2014). 파밤나방에 존재하는 SecPLA₂ 유전자가 클로닝되었고, 이를 대장균에서 과발현시켜 제조합단백질을 얻었다(Fig. 3A). 예상 크기는 단백질 순수 크기(47,096.79 Da), 6x 히스티딘 tag 크기(1,421.64 Da) 그리고 V5 tag 크기(822.85 Da)를 포함하여 49,341.28 Da으로 그림에서 보듯 유사한 크기의 단백질이 분리되었다. 이 단백질을 지방체 인지질 추출물과 반응시킨 결과 무처리에 비해 약 2.5 배 많은 지방산을 유리시켰다(Fig. 3B). 이들 유리지방산의 조성을 살펴본 결과 대조구에 비해 다가불포화지방산(리놀레익산과 리놀레닉산) 조성이 높았다(Fig. 3C). 그러나 기대한 아라키도닉산은 검출되지 않았다. 추출된 동일한 인지질 시료를 NaOH에서 비누화 반응을 시킨 결과 얻어진 유리지방산을 분석하였지만, 본 연구에서 진행한 GC/MS 시스템으로 아라키도닉산은 검출되지 않았다.



(C)

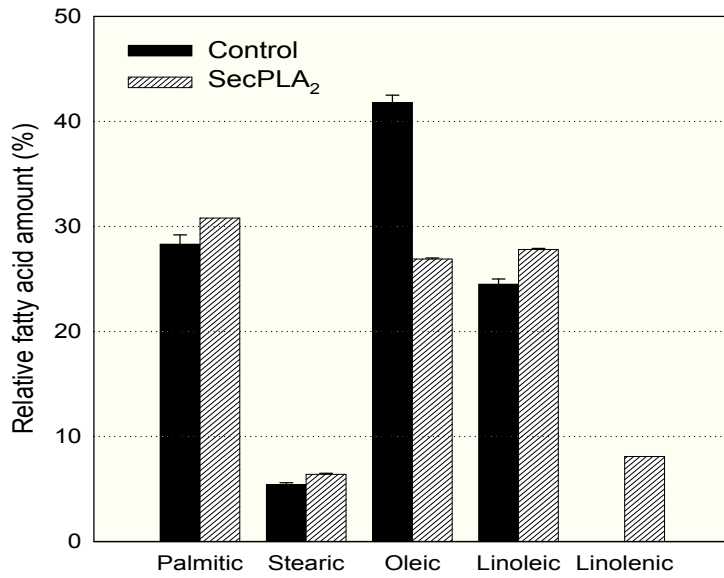
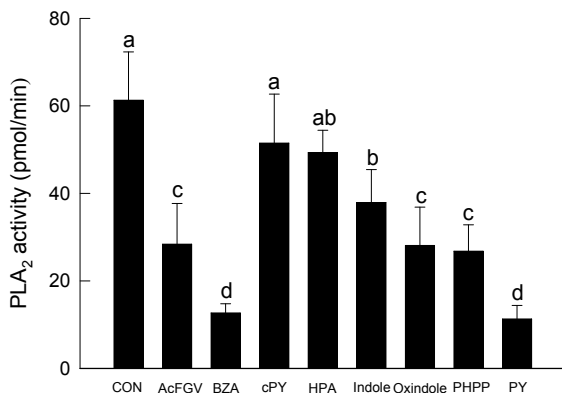


Fig. 3. Purification of SecPLA₂ expressed in hemocytes of *Spodoptera exigua*. (A) 10% SDS-PAGE (left panel) and Western analysis using anti-V5 (right panel). Arrows indicate SecPLA₂. (B) Total amount of free fatty acids released after SecPLA₂ treatment against phospholipid extracted from the fat body of *S. exigua* larvae. Control used a heat-treated SecPLA₂ for 40 min at 70°C. (C) Composition of free fatty acids released after SecPLA₂ treatment. Error bars indicate standard deviation of three measurements.

Xn 유래 세균대사물질의 SecPLA₂ 활성 억제 효과

SecPLA₂ 활성에 대한 8 가지 Xn 대사물질의 억제효과가 비교되었다(Fig. 4). 이들 물질을 모두 6.67 ppm으로 처리하였을 때 cPY와 HPA를 제외하고 SecPLA₂를 억제하였다(Fig. 4A). 이 가운데 BZA와 PY가 가장 높은 억제효과를 보였다. 이 두 물질과 oxindole을 포함한 세 물질에 대하여 농도별 SecPLA₂ 억제효과를 분석하였다(Fig. 4B). 처리 농도가 증가함에 따라 SecPLA₂ 활성 억제가 증가하였다(BZA: $F = 24.40$; $df = 5, 12$; $P < 0.0001$, PY: $F = 25.12$; $df = 5, 12$; $P < 0.0001$, oxindole: $F = 6.45$; $df = 5, 12$; $P = 0.0039$). 이들 세균대사물질들 사이에도 SecPLA₂ 억제 효과에서 차이를 나타냈다($F = 5.57$; $df = 2, 36$; $P = 0.0078$).

(A)



(B)

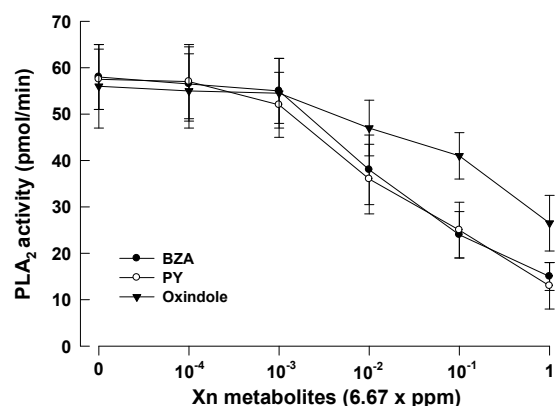


Fig. 4. Inhibitory effects of eight different bacterial metabolites of *Xenorhabdus nematophila* (Xn) against purified SecPLA₂. (A) Comparative analysis of the eight metabolites in the inhibition at the same dose of 6.67 ppm. Each treatment was replication three times. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test). 'CON' represents a solvent DMSO control used for dissolving the metabolites. (B) Dose-response of three selected metabolites in inhibition of SecPLA₂ catalytic activity. Error bars indicate standard deviation of three measurements.

고 찰

비티의 살충기작은 궁극적으로 대상 곤충의 패혈증을 일으켜 치사하는 전형적 세균병 증상을 갖는다. 본 연구는 이러한 패혈증을 억제하려는 대상곤충의 면역 반응을 억제함으로써 비티의 살충 효과를 증가시키려는 전략을 세웠고, 8종의 Xn 유래 면역억제물질은 비티의 살충효과를 증가시켰다. 비티에 대한 곤충의 방어기작은 중장 내강에 존재하는 단백질 분해효소의 변형(Oppert et al., 1994), 중장의 재생 세포 활동 증가(Martinez-Ramrez et al., 1999), 중장세포막의 비티 수용체 변형(Gahan et al., 2001; Darboux et al., 2002; Park and Kim, 2013) 또한 중장내강에 존재하는 다른 미생물과의 경쟁(Garbutt et al., 2011)을 포함한다. 여기에 대상 곤충의 면역 활동이 포함되어 혈림프 멜라닌 반응 활성을 통해 위식막 또는 중장세포막에 멜라닌 반응증가(Rahman et al., 2004), 혈림프로부터 응고 관련 핵사머린 단백질의 중장내강 분비로 Cry 독소단백질 불활성화(Ma et al., 2005), 세포성 면역반응 증가(Kwon and Kim, 2007; Dubovskiy et al., 2008; Richards and Dani, 2010; Shrestha et al., 2010) 등이 알려졌다. 최근 Grizanova et al. (2014)은 저농도로 비티에 감염되면, 페놀옥시테이즈 및 라이소자임 활성이 높아지는 체액성 면역 반응 증가를 보고하였다. 즉, 비티 감염은 세포성 및 체액성 면역 반응 모두 증가시키는 것으로 나타났다. 따라서 Xn 유래 물질이 아이코사노이드 생합성 억제를 통해 세포성 및 체액성 면역 작용을 모두 억제함으로써 비티의 활성을 증가시켰다는 것을 의미한다. 즉, 비티의 살충작용에 있어서 대상 곤충이 적극적으로 자신의 면역반응을 통해 방어 작용을 발휘한다는 것을 본 연구는 제시하고 있다.

면역작용을 억제하여 비티의 살충효과를 증가시키려는 전략이 일련의 연구에서 진행되어 왔다. Jung and Kim (2006)은 Xn과 비티를 혼합 처리하여 과밤나방의 살충효과를 크게 높이고 살충효과도 빠르게 진행시키는 결과를 보였다. 여기서 살충 효과는 비티에 의한 중장세포벽 붕괴와 관련이 있어 중장세포벽이 와해되는 처리 후 48 시간부터 혈강에서 유리되는 Xn 세균의 존재로부터 추정되었다. Xn은 아이코사노이드 생합성 억제 이외에 살충단백질을 발현하기에(ffrench-Constant et al., 2005) 이 연구가 면역 억제를 통해 비티의 활성 증가로 결론 내리기에는 무리가 있었다. 이후 Xn 배양액에 PLA₂ 억제 효과가 있다는 결과를 토대로(Park et al., 2004a,b), 이 배양액을 멸균 처리한 시료뿐만 아니라 세균 제거용 여과지를 이용하여 순수배양액만을 비티와 혼합 처리하였을 때 또한 비티의 살충력을 상승시키는 결과를 나타냈다(Seo and Kim, 2010). 즉, 이 배양액에 PLA₂ 억제 물질이 포함되었다는 것을 의미했고, 이들 물질을 동정한 결과 본 연구에서 분석된 8 가지 물질의 동정하였다. 이들 물질이 *T. castaneum* 유래 면역관련 sPLA₂에 대한 억제효과가 있다는 것을 밝혔다(Shrestha and Kim, 2009). 그러나 과밤나방 유래 면역 관련 PLA₂에 대한 이들 물질의 영향 분석을 이뤄지지 않았다.

본 연구는 과밤나방 유래 cPLA₂를 대장균을 이용하여 과발현시킨 후 순수 분리하여 이 단백질이 농축된 분획구를 얻었다. 이 단백질은 PLA₂ 활성을 지니고 있었으며 본 연구의 분석 조건에서 인지질의 sn-2 위치에 붙은 pyrene 형광물질을 60 pmol/min의 속도로 촉매하는 활성을 지녔다. 또한 이 재조합단백질을 인지질 추출물과 반응시킨 결과 지방산을 유리시켰으며, 특별히 리놀레익산 또는 리놀레닉산의

다가불포화지방산에 선택성을 보였다. 그러나 기대한 아라키도닉산은 유리되지 않았다. 이러한 결과는 인지질에 붙은 모든 지방산을 유리시키는 방법으로서 NaOH를 이용한 비누화가수분해를 통해서 유리된 지방산에서도 아라키도닉산을 검출하지 못했다. 이러한 이유는 본 연구에서 분석된 GC/MS 검출 한계 아래의 아라키도닉산이 두 방법에서 유리되었다는 것을 의미한다. 일반적으로 곤충은 포유동물에 비해 낮은 함량의 아라키도닉산을 함유하고 있는 것으로 알려지고 있다(Stanley and Kim, 2014). 곤충에서 최초의 아라키도닉산 검출은 모기 유충에서 비롯되었다. Stanley-Samuelson and Dadd (1981)은 아라키도닉산이 포함된 먹이로 모기 유충을 사육했으며, 성장된 모기 성충의 조직 지질 추출물 가운데 인지질에서 아라키도닉산이 검출되었으며, 이러한 아라키도닉산의 존재가 30 종 이상의 다른 곤충에서도 확인되었다(Stanley-Samuelson and Dadd, 1983). 다음은 곤충류에서 아라키도닉산의 생합성 가능성에 대한 질문이 있었다. 비록 대부분의 동물은 이러한 다가불포화지방산을 생리적으로 요구하지만 생합성이 어려워 먹이 중에서 의존하게 된다. 흥미롭게도 여러 곤충류에서 리놀레익산이 올레익산에서 Δ^{12} desaturase의 도움으로 생합성된다(Cripps et al., 1990; Blomquist et al., 1991). 이 리놀레익산은 지방산 사슬 연장 및 desaturase의 도움으로 아라키도닉산으로 생합성되는 데, 직접적으로 이질바퀴(*Periplaneta americana*)와 귀뚜라미류(*Teleogryllus commodus*)와 같은 일부 곤충은 아라키도닉산을 *de novo* 생합성을 진행하는 것으로 밝혀졌다(Jurenka et al., 1987, 1988). 파밤나방의 경우 전체 지방산 추출물에서 약 0.02%가 아라키도닉산이 차지했고, methylarachidonyl fluorophosphate (cPLA₂ 특이적 억제자)에 민감한 PLA₂ 추출물에 의해 유리되는 것으로 나타났다(Park and Kim, 2005). 이 추출물에 본 연구에서 클로닝하여 분리한 cPLA₂가 포함되었을 것으로 추정된다.

이상의 결과는 Xn이 생합성하여 분비하는 대사물질은 cPLA₂를 억제하여 대상 곤충의 면역을 저하시키며, 이렇게 저하된 면역 조건에서 비티의 살충력이 증가되었다는 것을 의미하고 있다. 특별히 cPLA₂ 억제와 비티 살충력 증가의 양의 상관관계는 향후 비티 살충력을 제고시키는 하나의 고효능 제품 개발 방향을 제시하고 있다.

제2장 Cry 독소단백질 혼합과 면역억제제 첨가를 통한 비티 살충제 적용범위 및 방제력 증진 기술

여러 환경에 서식하는 곤충은 다양한 병원 미생물의 공격에 노출된다. 이들을 방어하기 위해 곤충은 다양한 생리작용을 가지고 있지만, 이 가운데 가장 효율적 방어기작이 면역반응이다(Beckage, 2008). 곤충의 면역반응은 척추동물과는 달리 선천성 반응만 지니고 있다. 이 선천성 면역반응은 세포성 면역반응과 체액성 면역반응으로 구분된다. 세포성 면역반응은 식균작용, 소낭형성 및 피낭형성으로 주로 혈구 세포에 의해 수행된다(Gillespie et al., 1997). 체액성 면역반응은 산화효소인 페놀옥시데이즈나 항생단백질에 의해 수행되는 방어용 화합물 반응이다(Park and Lee, 2012). 그러나 면역반응 자체가 많은 에너지를 소모하고 또 자체적으로 해로운 자기면역으로 나타날 수 있기에 엄격한 조절기작 하에 있다(Adamo, 2008).

비티(*Bacillus thuringiensis*) 세균은 그람양성균으로 포자를 형성할 수 있으며 이때 결정형(Crystal: Cry) 독소단백질을 생성한다(Roh et al., 2007). Cry 단백질은 플라스미드에 암호되어 있고, 이들의 종류에 따라 비티의 적용해충범위가 결정된다(Bravo et al., 2012). 약 700 종류의 Cry 단백질 유전자가 밝혀졌고(Crickmore et al., 2014), 이들의 추정 아미노산 서열의 40% 유사도 기준에 따라 적어도 70 종류의 서로 다른 Cry 부류(Cry1, Cry2... Cry70)로 나뉘고, 다시 70% 유사도 기준으로 세부류(Cry1A, Cry1B 등)로 나뉘고, 다시 70-95%의 유사도 기준에 따라 세세부류(Cry1Aa, Cry1Ab 등)로 나뉘게 된다(Crickmore et al., 1998). Cry 독소단백질은 크게 두 양상으로 약 130 kDa 크기 대형 단백질과 65-70 kDa 크기의 소형 단백질로 구성되는 원시 독소단백질로 형성되며, 곤충 중장 단백질 분해효소에 의해 N 말단(소형의 경우) 또는 N과 C 말단(대형의 경우)의 가수분해 반응으로 약 60 kDa 크기의 생리활성을 지닌 활성 독소단백질로 가공된다(de Máagd et al., 2001).

활성화된 독소단백질의 살충기작은 중장막의 수용체에 결합으로부터 시작된다. Cry1Ab의 경우 캐드헤린과 같은 높은 결합력(Kd = 1 nM)을 갖는 세포막 단백질에 결합된 Cry는 이 단백질의 domain I의 첫 번째 α 구조 영역이 제거되면서 Cry 올리고 형성이 일어나게 된다. 이후 이들 올리고 독소단백질 복합체는 결합력(Kd)이 약 0.6 nM 정도의 alkaline phosphatase 또는 aminopeptidase N에 결합하고 중장막에 구멍을 뚫게 되고 이에 따라 세포 안팎의 삼투압충격에 의해 중장세포의 치사하게 된다(Bravo et al., 2011). 또 다른 과정으로 캐드헤린에 결합된 Cry 독소단백질은 이 수용체를 통한 세포내 신호전달과정으로 세포치사를 일으키게 할 수 있다(Zhang et al., 2006). 중장세포치사에 따라 비티 세균이 혈강으로 침입하여 패혈증을 유발하여 궁극적으로 곤충을 치사하게 할 수 있으나 독소단백질만으로도 곤충을 치사시킬 수 있다는 증거는 비티가 패혈증의 원인이라고만 단정 지을 수 없다(Bravo et al., 2005). 이 보다는 중장에 서식하는 여러 다양한 미생물들이 비티 독소단백질에 의해 와해된 중장세포벽을 뚫고 혈강으로 침입하여 패혈증을 일으켰을 것으로 해석된다(Broderick et al., 2006). 이때 곤충 혈림프의 면역작용은 이들 미생물 침입의 방어기능을 담당할 수 있다(Grizanova et al., 2014). 따라서 이 대상 곤충의 면역작용 억제제인 비티의 살충력을 증가시킬 수 있는 연구전략으로 이용되었다(Rahman et al., 2004; Kwon and Kim, 2007; Broderick et al., 2010).

비교적 인축에 안전한 해충방제 인자로 여겨지는 비티 살충제가 형질전환작물체를 제외하고 살포용 약제 면에서 농민들에게 보다 널리 이용되지 않은 이유는 좁은 적용해충범위와 화학농약에 비해 낮은 살충력으로 제기된다(Eom et al., 2014). 본 연구는 이 두 한계를 극복하기 위해 Cry 독소단백질의 혼합과 벡쿨로바이러스 또는 면역억제물질과 혼용의 서로 다른 전략들을 세웠다. Cry 독소단백질의 살충력을 증가시키려는 노력은 또 다른 비티의 살충독소성분인 vegetative insecticidal protein (VIP)을 혼합하여 시도되었다. Cry 독소단백질의 활성부위(N 말단 부위)와 VIP 단백질을 혼합하여 제조한 융합단백질은 각 독소단백질의 단독 살충력 또는 두 독소단백질의 혼합 살충력에 비해 높은 결과를 나타냈다(Dong et al., 2012). 따라서 Cry 독소단백질의 혼합은 서로 다른 중장 수용체 결합을 통해 살충력에 보

완 또는 상승작용을 피할 수 있을 것으로 가정하였다. 또한 비교적 작용점이 다른 벡클로바이러스와의 혼합은 비티의 적용해충범위 및 살충력의 증가를 피할 수 있다는 효과를 기대할 수 있다. 끝으로 면역억제물질의 첨가는 궁극적 비티의 치사작용인 패혈증 유발에 걸림돌인 대상곤충의 면역작용을 억제하는 효과로 살충력을 높일 수 있다는 가설을 세웠다.

재료 및 방법

곤충 사육

본 연구에서는 네 종류의 해충이 사용되었다. 파밤나방(*Spodoptera exigua*)은 1994년 파(*Allium fistulosum*) 재배지에서 채집하였고 실내에서 인공사료(Goh et al., 1991)로 누대 사육을 하였다. 성충은 10% 설탕물을 먹이로 공급하였다. 배추좀나방(*Plutella xylostella*)은 안동시 송천동에 소재한 배추밭에서 유충을 채집하여 약제 처리하지 않고 실내에서 누대 사육한 것을 실내 약제 노출 실험에 사용하였다. 유충은 배추를 먹이로 주었으며 성충은 10% 설탕물을 먹이로 하였으며 배추를 갈아서 만든 배춧물로 산란을 유도하였다. 거저살도둑거저리(*Tribolium castaneum*)는 밀가루, yeast extract (Scharlau, Barcelona, Spain), trypton (BD, NJ, USA) (100:50:50, g/g)을 먹이로 사육하였으며, 최종영기(7령)의 유충(체장 6-7 mm)을 분석에 이용하였다. 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)는 인스턴트 초파리배지(한솔테크, 서울, 한국)를 이용하여 사육을 하였다. 모든 곤충 사육은 온도 25±1℃, 광주기 16:8 h (L:D), 상대습도 40~60%의 조건이었다.

곤충병원세균 균주 배양

곤충병원세균(*Xenorhabdus nematophila*: Xn)은 기주 선충에서 분리된 후 동결보관중인 것을 이용하였다(Jung and Kim, 2006). 이들 균주는 tryptic soy broth (TSB, MCell, Seoul, Korea) 배지를 이용하여 28℃에서 12 시간 동안 배양하여 단일 균총을 채취하였다. 채취된 단일 균총을 TSB 액체배지를 이용하여 28℃에서 16 시간 동안 배양한 후, 글리세롤이 30%가 되도록 첨가하여 보관용 세균 균주를 만들었다. 이 보관 균주는 반복되는 세균 배양의 원시료로 이용되어 계대배양에 따른 세균 변이 가능성을 줄였다.

비티 균주는 네 종류의 비티를 이용하였다. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (BtK)는 슈리사이드® (바이엘 크롭사이언스 주식회사, 서울, 한국) *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* (BtA)는 센타리® (전진산업 주식회사, 대전, 한국), *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (BtI)는 박토섹® (성인제약 주식회사, 서울, 한국), *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (BtT)는 미국 조지아대학교 Mike Adang 교수 연구실에서 분양 받았다. 각각의 균주에 멸균수 1 mL를 혼합하여 현탁액을 만든 후 루프를 이용하여 TSB 평면 배지에 세균을 도말하고 30℃에서 24 시간 배양하였다. 평판배지에서 배양된 세균에서 단일 콜로니를 얻고 이를 멸균수로 희석하여 TSB 액체배지를 이용하여 28℃에서 48 시간 동안 200 rpm에서 교반배양 후, 다시 48 시간 동안 4℃ 저온고에 보관하여 세균의 포자 형성율을 증가시켰다. 포자 형성은 위상차 광학현미경(BX-PHD, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 1,000 배 배율에서 확인하였다.

Cry 독소단백질 분리

분리된 Bt 균주의 단일 균총을 2 mL의 Luria-Bertani (LB) medium에 접종한 후 28℃의 배양기에서 200 rpm으로 48 시간 동안 교반 배양하였다. 이후 2 mL의 세균배양액을 1 L의 peptone glucose salt medium (Brownbridge and Margalit, 1986)에 접종하여 동일한 조건으로 72 시간동안 포자형성과 세포 분해가 진행될 때까지 배양하였다. 배양 후 4,000 rpm에서 포자와 Cry 독소단백질 층을 수거한 후 0.2%의 lysozyme (Sigma, MO, USA)이 포함된 10 mL의 lysis buffer (0.1 M NaCl, 2% Triton X-100, 20 mM Bis-Tris, pH 6.5)에 현탁한 후 28℃의 배양기에서 200 rpm으로 1 시간동안 세포용해 반응을 진행

하였다. 이후 2분간 초음파 파쇄기(Bendelin Sonoplus HD2070, Berlin, Germany)를 이용하여 95%의 출력으로 초음파 처리를 하여 균체로부터 Cry 독소단백질의 분리를 용이하게 하였다. 분리된 Cry 독소단백질과 포자는 4°C에서 10 분간 12,000 rpm으로 원심분리한 후 상등액을 제거하고 멸균 3차증류수로 세척한 후 5 mL의 멸균 3차증류수에서 균일하게 현탁시켰다. 독소단백질 정량분석은 bovine serum albumin (Sigma, MO, USA)을 표준단백질로 10% SDS-PAGE에서 검정선을 얻은 후 비교 정량화하였다.

Xn 세균 배양물질 추출

Xn 세균을 TSB 배지를 이용하여 48 시간 배양하였다. 분획갈때기에 1 L의 세균 배양액 넣고 330 mL의 헥산을 넣고 마개로 막은 다음 30회 흔들어 주었다. 이러한 진탕 반응 동안 매 5 회 진탕 시 코르크를 열어 가스를 배출했다. 이후 거치대에 separate funnel을 2 시간 동안 방치한 후 헥산 추출 상층액을 회수하고, 다시 330 mL의 헥산을 첨가하고 동일한 방법으로 추출했다. 다시 340 mL의 헥산을 첨가하고 동일한 방법으로 추출했다. 수집된 헥산층은 무수황산나트륨을 500 g 넣은 후 탈수시켰다. 이후 2 L의 삼각플라스크 입구에 여과지를 설치하고 탈수시킨 유기용매 추출물들을 부어 무수황산나트륨을 제거시켰다. 이 추출물을 감압농축기를 이용하여 감압농축(40°C, 1 시간)하여 용매층을 제거했다. 유기용매가 사라진 플라스크 벽면에 용출된 대사물질을 5 mL의 메탄올을 첨가하여 용해시켜 회수하였다.

재조합 벡클로바이러스

Cry1Ac와 Cry1Ca 독소단백질이 재조합된 *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrosis virus (AcMNPV)를 서울대학교 제연호 교수 연구실에서 분양받았다. Cry1Ca와 Cry1Ac에 특이적 유전자 프라이머(Cry1Ca: 5'-GCC AGT TGG TCA ACT AAG GGA AG-3'와 5'-CCG TAC CTC TTC CTC GAT ACG TAA A-3', Cry1Ac: 5'-GAT ATC GTT GCT CTG TTC CCG AA-3'와 5'-CAC GTT GTT ATT CTG TGG CGG T-3')를 이용해 98°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초간 PCR 반응을 30회 진행한 후 증폭된 밴드를 통하여 Cry 독소단백질의 차이를 확인하였다.

Cry 독소단백질 생물검정

생물검정은 Cry 독소단백질의 섭식을 통해 이루어졌다. 배추좀나방과 파밤나방을 검정할 경우 대상 곤충당 0.4 μ g의 Cry 독소단백질을 배추 잎(1x1 cm)에 처리하였다. 노랑초파리는 사과껍질(0.5x0.5 cm)에 처리하였다. 거짓쌀도둑거저리는 먹이에 처리를 하였다. 처리하기 전 4 시간 동안 시험곤충들을 절식시키고 이후 처리 먹이를 모두 먹는 것을 확인한 후 무처리 먹이를 공급하였다. 처리구당 10 마리씩 3 반복으로 실시하였으며, 생존 확인은 24 시간 주기로 7 일차 까지 매일 하루 중 같은 시간에 조사하였다.

벡클로바이러스 생물검정

혈강주입은 벡클로바이러스의 budded virus 형태로서 0-10⁶ pfu 농도로 혈강에 주입하였다. 경구 처리는 배추잎에 일정한 농도의 벡클로바이러스를 처리하고 대상 유충에게 섭식시켜 살충율을 분석하였다. Sf9 세포주에서 증식된 다각체형 바이러스(7 x 10⁷ PIB/ml) 10 μ l를 5 x 5 mm의 배추 잎 조각에 처리하였다. 이를 직경 3 cm의 원형 용기에 여과지를 깔고 올려놓았다. 처리된 배추잎 주변으로 10 마리의 3령 유충을 옮겨 놓고 처리된 잎이 모두 섭식되도록 5 시간 방치하였다. 동일한 처리가 3 반복되었다. 이후 3-4 마리씩 나누어 배추좀나방은 배추, 파밤나방은 인공사료로 사육되었다. 처리 후 24 시간 마다 치사된 개체를 조사하였다. 이때 치사 유충은 외부 자극에 대해서 능동적 반응 움직임이 없는 개체로 규정하였다.

혈구 소낭형성분석

세포성 면역반응의 일환으로 세균 침입에 따른 혈구의 소낭형성 반응을 네 종류의 곤충에 대해서 분석했다. 대장균(*E. coli* Top10)을 LB 배지에서 증식시키고 5×10^4 세균 세포수를 대상 곤충의 혈강으로 주입하였다. 혈강 주입은 유리 모세관을 이용하여 초미량펌프가 장착된 미세조정장치(SYS-microcontroller, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)를 이용하여 주입하였다. 유리 모세관은 micropipette puller (PN-30, Narishige, Tokyo, Japan)를 이용하여 제조하였다. 처리 Xn 추출물은 세균 주입하기 1시간 전에 소정의 농도로 주입했다. 세균이 주입된 유충은 곤충 증식 조건(온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 광주기 16:8 h (L:D), 상대습도 40~60%)에서 8 시간 배양시켰다. 이후 4°C 로 옮긴 후 소낭형성 반응을 정지시켰다. 이후 각 처리 곤충을 해부하여 형성된 소낭을 해부현미경 50배 배율에서 관찰했다. 형성된 소낭수는 먼저 소화관 주변 및 기관지에 붙어 있는 것들을 계수하고, 이후 소화관을 적출하고 가려진 몸 부위에 존재했던 소낭을 추가로 계수하여 산출하였다. 각 소낭 분석은 처리 개체를 반복으로 5 마리에 각 처리가 실시되었다.

통계처리

모든 살충효과 시험 결과는 백분율 자료로서 arsine 변환 후 SAS의 PROC GLM (SAS Institute, 1989)을 이용하여 ANOVA 분석 및 처리 평균간 비교를 실시하였다.

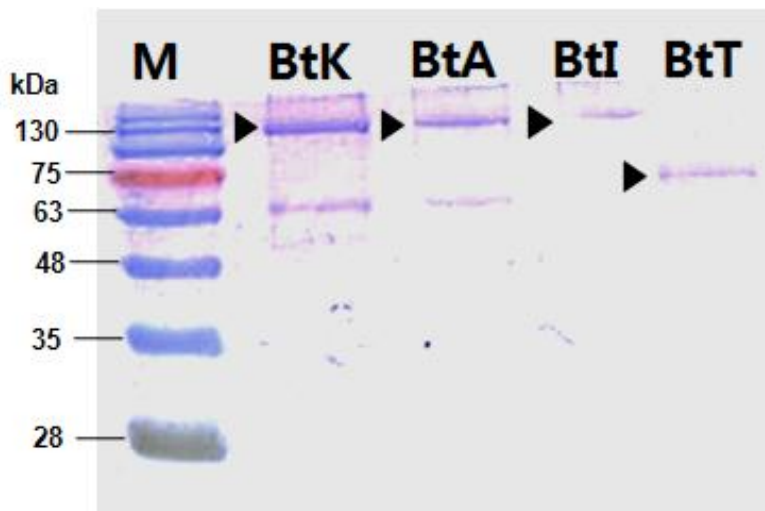
결 과

비티 Cry 독소단백질 분리와 살충효과 특이성

Cry 독소단백질이 네 종류의 비티 균주로부터 각각 분리되었다(Fig. 1A). 이들 분리단백질들을 SDS-PAGE를 이용하여 분석한 결과 BtK, BtA, BtI는 약 130 kDa 그리고 BtT는 약 70 kDa에서 주요 단백질 밴드를 나타냈다. 그러나 모든 분리 시료에서 주 단백질 밴드 외에 다른 단백질이 미량으로 존재했다. 이들 단백질의 본체는 본 연구에서 밝혀지지 않았다.

분리된 Cry 독소단백질들의 서로 다른 해충에 대한 살충력을 비교하였다(Fig. 1B). 조사 대상인 네 종류의 곤충에 대해 이들 네 종류의 Cry 독소단백질은 뚜렷한 살충력을 나타냈다. 그러나 각 Cry 독소단백질은 서로 다른 곤충에 대해서 상이한 살충력을 나타냈다. BtK는 배추좀나방에 대해서 다른 곤충에 비해 높은 살충력을 나타냈다. 유사하게 BtA는 파밤나방, BtT는 거릿쌀도둑거저리 그리고 BtI는 노랑초파리에 대해서 각각 상대적으로 높은 살충력을 나타냈다. 그러나 노랑초파리에 대한 BtI의 살충력을 제외하고 모두는 50%에 미치지 않은 낮은 살충력을 보였다.

(A)



(B)

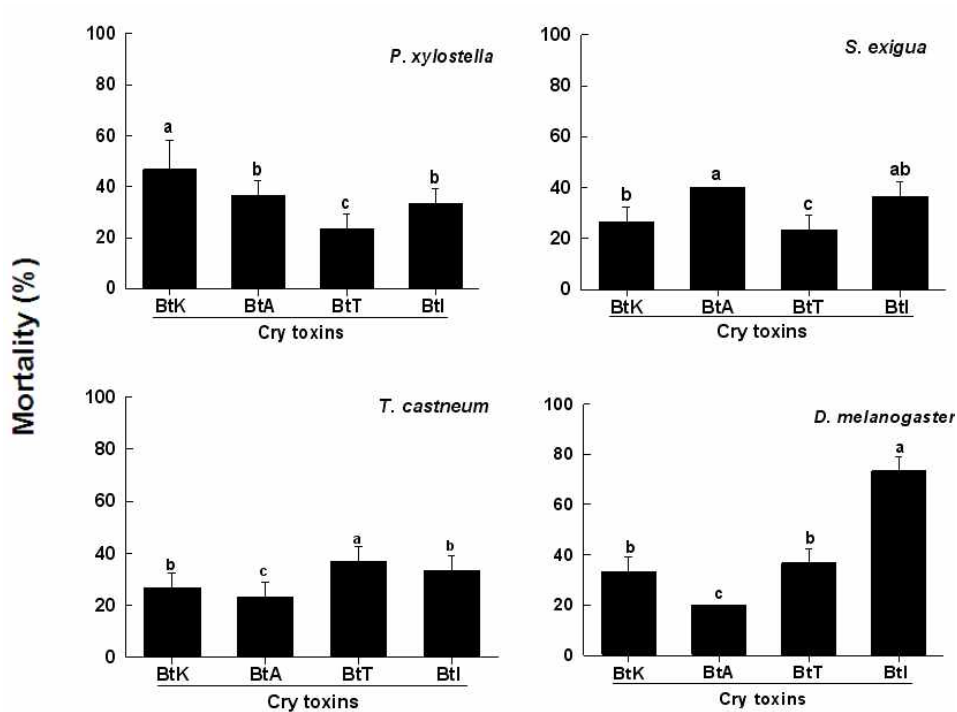


Fig. 1. Specific toxicity of different Cry toxins. (A) Purification of Cry toxins from four different *Bacillus thuringiensis*: *B. thuringiensis kurstaki* ('BtK'), *B. thuringiensis aizawai* ('BtA'), *B. thuringiensis tenebrionis* ('BtT'), and *B. thuringiensis israelensis* ('BtI'). The purified Cry toxins were separated on 10% SDS-PAGE. Each lane contained 10 μg of Cry toxin proteins. Arrow heads indicate main Cry toxin proteins. (B) Insecticidal activities of different Cry toxins against lepidopteran, coleopteran, and dipteran insects. Third instar larvae of *Plutella xylostella*, *Spodoptera exigua*, and *Drosophila melanogaster* were used for bioassay, while seven instar larvae of *Tribolium castaneum* were used. Each larva was fed in a dose of 0.4 μg Cry toxin. Each replication consisted of 10 larvae. Each treatment was replicated three times. Mortality was assessed for 7 days after treatment at 25°C. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

Cry 독소단백질 혼합과 적용해충범위 변화

서로 다른 Cry 독소단백질을 혼합하여 적용해충범위 변화를 분석했다(Fig. 2). 두 종류의 Cry 독소단백질을 혼합한 결과 혼합된 Cry 독소단백질 종류에 따라 적용해충범위가 결정되는 것을 나타냈다(Fig. 2A). 예를 들어, BtK와 BtA 유래 Cry 독소단백질을 혼합하면, 파밤나방과 배추좀나방에 대해서 다른 두 해충에 비해 높은 방제 효과를 가져 주었다. 세 종류의 Cry 독소단백질을 혼합한 결과도 포함된 Cry 독소단백질의 종류에 따라 적용해충의 범위가 변동되었다(Fig. 2B). 예를 들어, BtK, BtA, BtK 유래 Cry 독소단백질을 혼합한 결과 파리류에 유효성분인 BtI의 독소단백질이 누락되어 노랑초파리에 대한 살충력은 낮은 것으로 나타났다. 따라서 4 종류의 Cry 독소단백질을 모두 혼합한 결과 통계적으로 차이가 있지만, 비교적 4 가지 해충에 대해 높은 (> 50%) 살충력을 나타냈다.

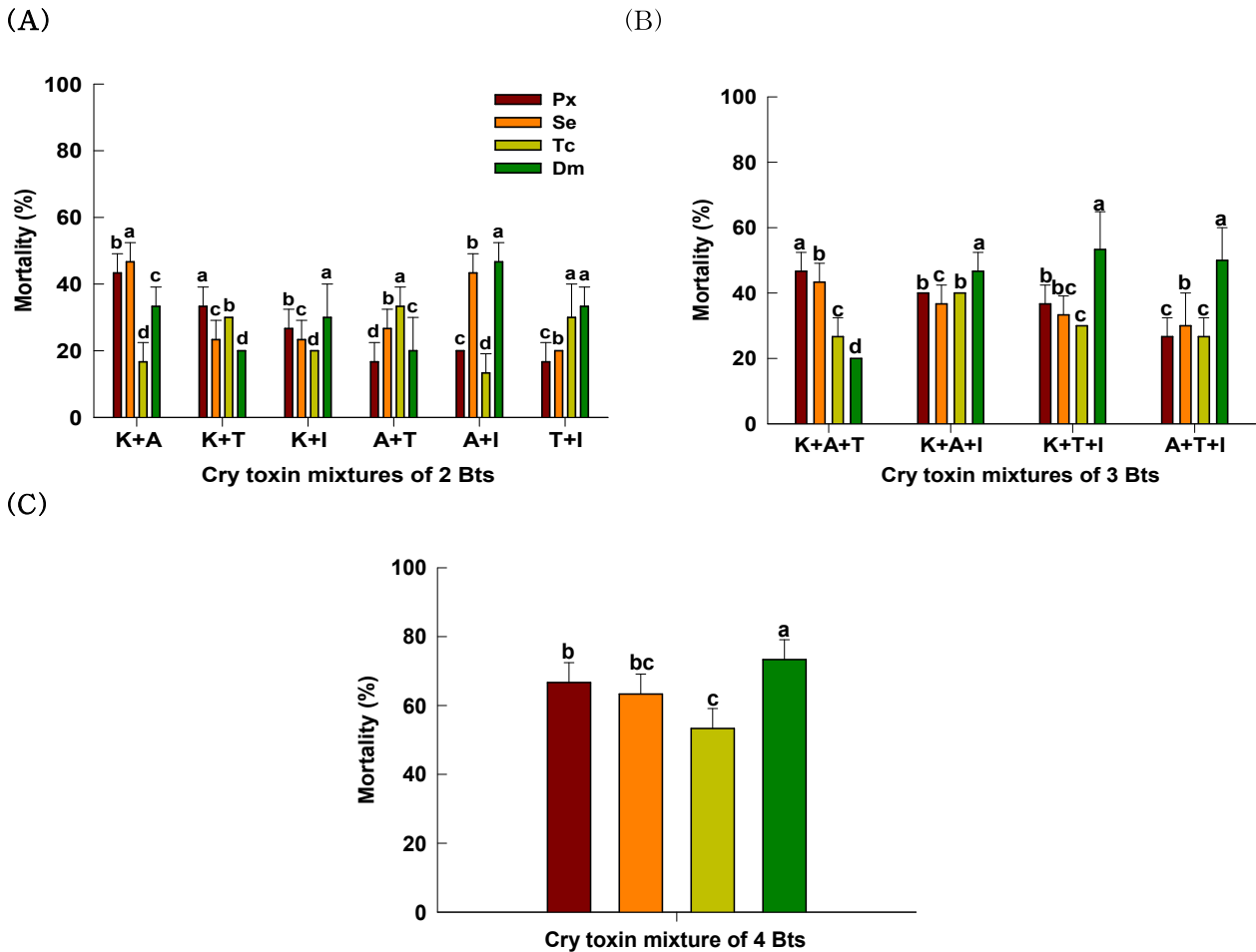
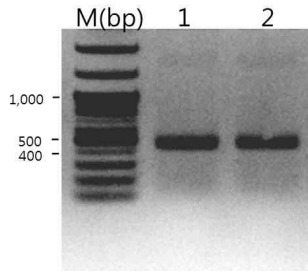


Fig. 2. Effect of Cry toxin mixture on target insect spectrum. (A) Two Cry toxin mixture (B) Three Cry toxin mixture (C) Four Cry toxin mixture. Cry toxins from four different *Bacillus thuringiensis* (Bt): *B. thuringiensis kurstaki* ('K'), *B. thuringiensis aizawai* ('A'), *B. thuringiensis tenebrionis* ('T'), and *B. thuringiensis israelensis* ('I'). Third instar larvae of *Plutella xylostella* ('Px'), *Spodoptera exigua* ('Se'), and *Drosophila melanogaster* ('Dm') were used for bioassay, while seven instar larvae of *Tribolium castaneum* ('Tc') were used. Each larva was fed in a dose of 0.4 μ g Cry toxin mixture. Each replication consisted of 10 larvae. Each treatment was replicated three times. Mortality was assessed for 7 days after treatment at 25°C. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

백콜로바이러스를 이용한 Cry 독소단백질 적용해충범위 변화

Cry 독소단백질의 적용해충범위를 넓히는 데 백콜로바이러스의 효과를 분석하고자, Cry1Ac와 Cry1Ca 독소단백질 유전자를 각각 재조합한 AcMNPV 바이러스를 이용하였다(Fig. 3). 대조구로서 형광단백질('EGFP')을 발현하는 재조합 AcMNPV를 사용하였다. 우선 재조합백콜로바이러스에 Cry1Ac와 Cry1Ca 유전자의 존재를 독소단백질 특이적 프라이머를 이용하여 PCR로 확인하였다(Fig. 3A). 바이러스 단독에 비해 Cry 독소단백질을 발현하는 재조합 백콜로바이러스가 두 해충 모두에서 높은 살충력을 나타냈다(Fig. 3B). 그러나 Cry 독소단백질을 발현하는 재조합백콜로바이러스에서는 Cry 독소단백질에 따라 대상 해충에 미치는 살충력이 상이했다. 즉, BtK에서 유래된 Cry 독소단백질의 주성분인 Cry1Ac와 재조합된 AcMNPV는 배추좀나방에 대해서 높은 살충력을 보인 반면 BtA의 주요 Cry 독소단백질인 Cry1Ca를 발현하는 AcMNPV는 파밤나방에 대해서 높은 살충력을 나타냈다.

(A)



(B)

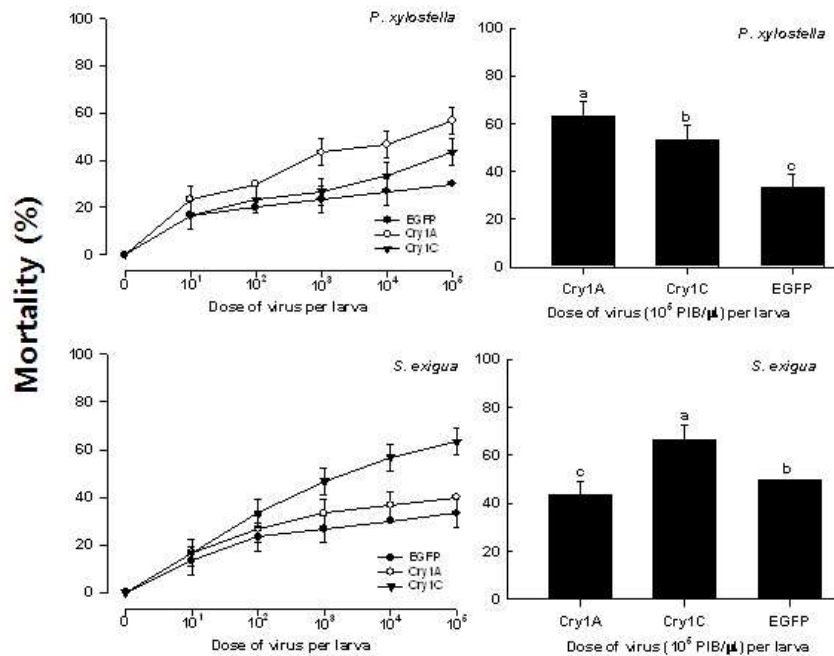


Fig. 3. Effect of baculovirus expressing Cry toxins. (A) Confirmation of baculoviruses expression Cry1Ca (lane 1) and Cry1Ac (lane 2). (B) Insecticidal effects of Cry-expression baculoviruses against two different lepidopteran insects of *Plutella xylostella* and *Spodoptera exigua* by injection (left panels) or feeding (right panels) bioassay. For injection assay, each larva was fed in different doses (pfu) of virus. For feeding assays, each larva was injected with 10^6 PIB of virus. Each replication consisted of 10 larvae. Each treatment was replicated three times. Mortality was assessed for 7 days after treatment at 25°C.

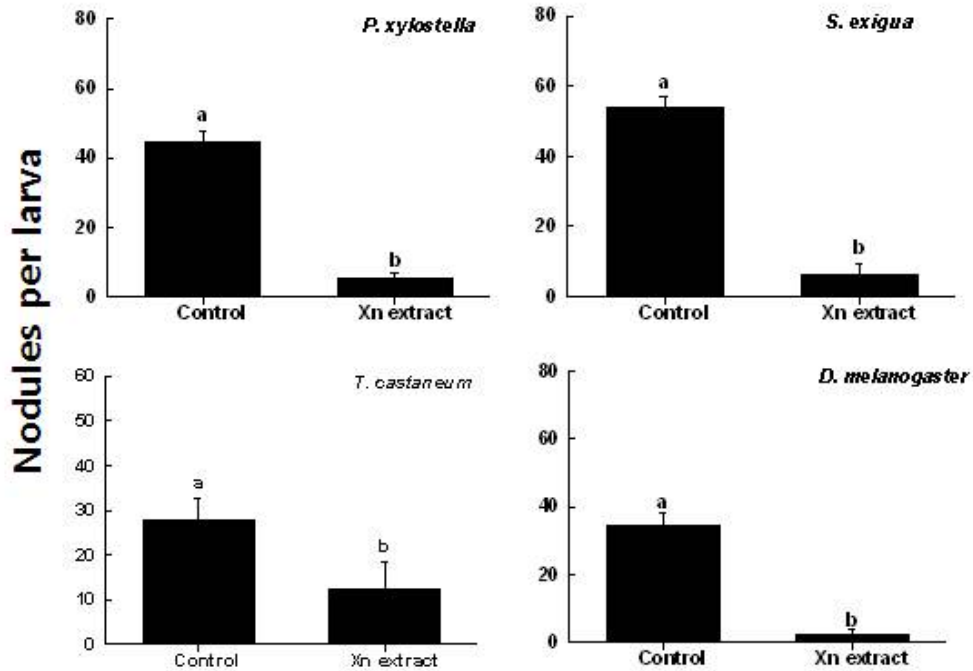
면역억제물질과 Cry 독소단백질의 독성 변화

Xn 세균 배양액 추출물은 곤충면역억제물질을 포함하고 있다(Seo et al., 2012). 이 추출물이 다양한 곤충의 면역억제를 유도할 수 있는 지 세포성 면역반응인 혈구의 소낭형성반응으로 분석하였다(Fig. 4A). 배추좀나방의 경우는 비병원성세균인 대장균 주입에 따라 약 42 개의 소낭을 형성했다. 그러나 Xn 추출물을 함께 주입할 경우 5 개 미만의 소낭을 발현하여 약 88%의 면역억제효과를 나타냈다. 유사하게 Xn 추출물은 파밤나방에게 약 91%, 거저살도둑거저리에게 약 68% 그리고 노랑초파리에게 약 92%의 면역억제효과를 나타냈다.

이 Xn 추출물을 Cry 독소단백질과 혼합하여 살충효과 증대 및 적용범위 확대를 분석하였다(Fig. 4B). BtK 유래 Cry 독소단백질에 Xn 추출물을 혼합한 결과 살충력은 약 75%까지 증가하였다. 네 가지

Cry 독소단백질의 혼합체('BtM')에 Xn 추출물을 혼합한 결과 약 79%까지 방제 효과가 증가했다. 파밤나방의 경우에도 Xn 추출물은 BtA 유래 Cry 독소단백질은 물론이고 초교 독소단백질 혼합체에 방제 효과를 현격하게 증가시켰다. 유사한 결과가 거저살도둑거저리와 노랑초파리에서 나타났다. 즉, Cry 독소단백질 복합체가 Xn 추출물과 혼합된 경우 조사된 모든 해충에 대해서 높은 살충력을 나타냈다.

(A)



(B)

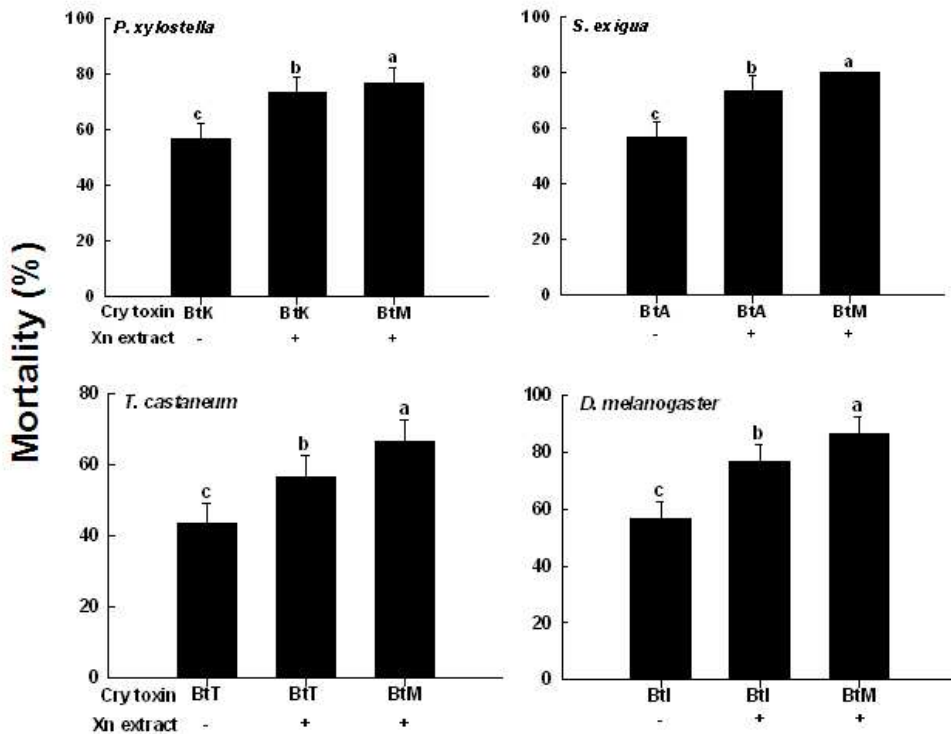


Fig. 4. Immunosuppression and enhancement of Cry toxin toxicity. (A) Nodulation assay to assess the immunosuppressive activity of *Xenorhabdus nematophila* ('Xn') culture broth extract. Xn extract was prepared by organic solvent extracts. Each treatment was replicated five times. (B) Enhancement of Cry toxicity by addition of Xn extract. Cry toxins from four different *Bacillus thuringiensis*: *B. thuringiensis kurstaki* ('BtK'), *B. thuringiensis aizawai* ('BtA'), *B. thuringiensis tenebrionis* ('BtT'), and *B. thuringiensis israelensis* ('BtI'). 'BtM' indicates a mixture of four different species. Third instar larvae of *Plutella xylostella*, *Spodoptera exigua*, and *Drosophila melanogaster* were used for bioassay, while seven instar larvae of *Tribolium castaneum* were used. Each larva was fed in a dose of 0.4 μg Cry toxin. Each replication consisted of 10 larvae. Each treatment was replicated three times. Mortality was assessed for 7 days after treatment at 25°C. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

고 찰

저항성관리의 기본 원리로서 해충의 저항성 발달 속도를 늦추기 위해서는 비티를 고독성의 복합 독소단백질 구성이 필요하다(Park et al., 2005). 이에 입각하여 기존 비티에 *B. sphaericus* 유래의 Bin 독소단백질과 BtA 유래의 Cyt1A 단백질을 복합시킨 결과 이들의 상승효과에 따라 높은 방제 효과를 나타냈다. 또한 비티 감염에 따라 나타나는 곤충의 면역저항성을 억제하는 것이 비티의 효율을 높이는 데 유효하다(Kwon and Kim, 2007). 본 연구는 다양한 비티 균주에서 분리된 Cry 독소단백질을 분리하고 이들의 혼합에 따라 살충력 증가 및 적용해충범위를 넓히려 시도되었다. 또한 백콜로바이러스를 이용하여 Cry 독소단백질의 특이성을 줄이고 적용해충범위를 넓히려 시도하였다. 마지막으로 면역억제물질을 생성하여 분비하는 Xn 세균 배양액을 이용하여 비티의 살충효과 증가 및 적용범위 확대를 꾀하였다.

Cry 독소단백질의 복합체는 적용해충범위를 증가시켰다. 각 Cry 독소단백질은 대상 곤충에 대한 특이적 살충 효과를 나타냈다. 이러한 이유는 Cry 단백질의 작용점인 중장 수용체의 특이성에서 기인된 것으로 사려된다. 즉, Cry 독소단백질의 복합체는 다양한 비티 수용체에 결합할 수 있는 Cry 독소단백질을 제공한 것은 물론이고, 이들 Cry 독소단백질 사이에 상호 작용에 기인된 상승효과도 이러한 적용범위확대에 기인된 것으로 해석된다. 유사한 연구로서 Cry 독소단백질의 살충력을 증가시키려는 노력은 또 다른 비티의 살충독소성분인 vegetative insecticidal protein (VIP)을 혼합하여 시도되었다. Cry 독소단백질의 활성부위(N 말단 부위)와 VIP 단백질을 혼합하여 제조한 융합단백질은 각 독소단백질의 단독 살충력 또는 두 독소단백질의 혼합 살충력에 비해 높은 결과를 나타냈다(Dong et al., 2012). 이는 융합독소단백질의 Cry 독소단백질의 알칼리 조건에서 용해도를 높여 주어 나타난 결과로 해석되었다. 유사한 독소단백질의 혼합 상승효과는 *B. sphaericus*가 영양번식기에 생산하는 모기 독소단백질과 Cry 독소단백질의 혼합처리에서도 증명되었다(Wirth et al., 2007).

백콜로바이러스의 혼합에 따른 Cry 독소단백질의 적용해충범위 증가 효과는 본 연구에서는 관찰되지 않았다. 비록 두 생물제제의 혼합에 따라 각 대상 곤충에 대한 살충력은 증가되었으나 적용해충 증가는 나타나지 않았다. 일반적으로 백콜로바이러스 병원성은 중장을 통한 침입 이후 중장에 붙어 있는 기관지세포로 전이되어 온몸으로 전파되는 것으로 알려지고 있다(Washburn et al., 1995, 2001; Kirkpatrick et al., 1998). 즉, 중장세포가 백콜로바이러스 체내 침입의 주요 관문이 되어, 이들 세포의 항바이러스 기작은 이에 대한 병원성을 낮출 수 있다. 여기서 Cry 독소단백질의 작용으로 상호 상승작용을 기대했지만, 비적용곤충의 경우 이 단백질의 특이적 수용체의 부족으로 백콜로바이러스의 병원력을 증가시

키지 못한 것으로 해석된다. 즉, 벡쿨로바이러스의 작용 속도가 상대적으로 느리기 때문에 Cry 독소단백질의 특이성을 해결하여 주지 못했을 것으로 사려된다.

면역억제물질이 포함된 Xn 추출물은 Cry 독소단백질의 살충력을 크게 증가시켰다. Xn 세균은 그람 음성균으로 선충의 장내에 서식하고 있으며, 기주 선충이 대상 곤충의 혈강으로 침입하면, 선충 장속에서 곤충의 혈강으로 빠져나와 다양한 곤충병원기작을 발휘하게 된다(Akhurst, 1980; Kaya and Gaugler, 1993). 특별히 Xn은 감염 초기에 대상 곤충의 세포성 및 체액성 면역을 모두 억제하게 된다(Park and Kim, 2003; Hwang et al., 2013). 이러한 Xn의 곤충 면역억제 기작은 주로 곤충의 면역 증개물질인 아이코사노이드 생합성을 억제하면서 나타나게 된다(Kim et al., 2005). 아이코사노이드는 탄소수 20개의 다가불포화지방산의 산화물들이다. 이들 물질은 주로 인지질을 기질로 인지질분해효소의 일종인 phospholipase A₂ (PLA₂)의 촉매작용으로 유리된 아라키도닉산(5,8,11,14-eicosatetraenoic acid)이 cyclooxygenase 또는 lipoxygenase의 작용으로 유도된 프로스타글란딘류 및 류코트리엔류가 곤충에서 나타난다(Stanley and Kim, 2014). 따라서 PLA₂는 아이코사노이드 생합성 과정의 첫 반응을 촉매하는 효소로서 Xn의 억제 대상이 된다(Shrestha and Kim, 2009). Xn의 세균배양액에 PLA₂ 억제 물질이 포함되었으며, 이 물질은 유기용매로 추출되었다(Park et al., 2004a,b). 일련의 분획구 분리 방법을 이용하여 이 세균 배양액에 존재하는 PLA₂ 억제 물질을 분리하여 총 8개 화합물의 물질 구조를 동정하였다(Seo et al., 2012). 본 연구에서 Xn 추출물은 나방류는 물론이고 파리류 및 딱정벌레에 까지 면역억제를 나타냈다. 이러한 면역억제효과에 따라 Cry 독소단백질의 살충력 증가 요인은 Cry 독소단백질의 중장 파괴 이후 일어나는 장내 세균의 혈강 침입을 대상 곤충이 효과적으로 방어하지 못해 비교적 용이하게 패혈증이 유발된 것으로 해석된다. 유사한 연구로서 지중해밀가루명나방(*Ephestia kuehniella*)에 대한 비티 살충력이 Xn과 혼합 처리에 의해 증가되었다(BenFarhat et al., 2013). 특별히 Cry 독소단백질 종류에 따라 이러한 상승효과가 상이하었는데, 주된 이유는 Cry 독소단백질이 중장의 수용체에 대한 친화력이 높을수록 Xn의 상승효과는 높아졌다(BenFarhat et al., 2013). 즉, Cry 독소단백질에 의해 중장의 세포붕괴는 Xn으로 하여금 혈강으로 침입할 기회를 제공하여 이 두 세균의 상승효과를 설명한 Jung and Kim (2006)의 결과를 뒷받침하고 있다. 또한 면역억제를 통한 비티의 살충력 증가의 다른 예로서 Cry3Ba를 거깃쌀도둑거저리에 처리된 경우 apolipoprotein III (ApoLpIII) 발현을 2.1 배 증가시켰으며, 이 유전자의 발현을 RNA interference로 억제시킨 경우 이 비티 독소단백질에 대한 감수성이 현격하게 증가되었다(Contreras et al., 2013). 한편, 파밤나방에 Xn을 처리한 경우 ApoLpIII의 발현을 억제시켰다(Hwang et al., 2013). 따라서 본 연구에서 Xn이 거깃쌀도둑거저리에 대해 BtT 유래 Cry 독소단백질의 살충력을 증가시킨 것은 Xn, 대사물질이 ApoLpIII 발현을 억제하여 면역저하를 유도하고 이에 따라 BtT 유래 Cry 독소단백질의 활성을 높인 것으로 해석된다. 본 연구에서 여러 Cry 독소단백질에 대한 Xn 대사물질의 상승효과는 Cry 독소단백질의 대상 곤충의 중장세포층 파괴와 이에 따라 Xn이 갖는 다양한 면역억제물질에 따라 궁극적 패혈증 효과의 증가로 해석된다.

비티의 약효증가 및 저항성 문제를 해결하기 위해 다른 생물농약 살충제와 혼합 처리가 여러 사례에서 찾아 볼 수 있다. 이 가운데 neem 오일의 주성분인 azadirachtin과 혼합효과가 왕담배나방(*Helicoverpa armigera*)에 대해서 분석되었고 뚜렷한 상승효과를 나타냈다(Singh et al., 2007). 또 다른 혼합처리 형태로서 비티 형질전환 작물과 내부기생봉과의 조합이 시도되었다(Vojtech et al., 2005). 특별히 비티는 물론이고 화학농약에 저항성인 배추좀나방에 대해서 프루텔고치벌(*Cotesia plutellae*)은 감수성 개체와 차이 없이 기생 선호성을 보여 이들 혼합 방제의 가능성을 높여 주었다(Kim et al., 2013). 본 연구는 이러한 생물방제제들의 혼합 처리에 의한 비티 살충력 증가는 물론이고 Cry 독소단백질의 혼합에 의한 적용해충범위 증가를 피할 수 있다는 실험적 자료를 제공하고 있다.

제3장 비티플러스 cadherin repeat (CR) 협력제 개발

목적: 비티독소 단백질의 수용체인 cadherin 단백질 가운데 비티와 결합하는 부위인 CR (cadherin repeat domain)을 과발현시켜 비티의 침가제로 사용하여 협력효과 기대

전략: 파밤나방 CR 유전자를 클로닝하여 대장균 발현시스템을 이용하여 CR 단백질 대량 생산 및 분리

재료 및 방법

1. CR 유전자의 클로닝

파밤나방의 CR유전자는 pyrosequencing을 이용해 확보된 transcriptome 데이터 가운데 일부분의 CR contig들과 중국에서 보고된 파밤나방의 CR 유전자 (NCBI GenBank Accession No. HQ647122.2)를 이용한 primer walking 작업을 통해 전체 ORF를 확보하였다. 이렇게 확보된 CR 유전자는 NCBI GenBank에 KC907716.1로 등록하였다. 파밤나방의 CR유전자는 1개의 signal peptide, 11개의 CR 도메인, 1개의 transmembrane domain으로 SMART (<http://www.smart.embl-heidelberg.de/smart/>) 프로그램을 이용한 도메인 분석을 통해 확인하였다. CR 유전자의 클로닝은 파밤나방 5령 유충에서 추출된 전체 RNA를 통해서 cDNA가 RT-Mix Kit (Intron, 서울)를 이용해 합성되었고, 5'에는 NdeI, 3'에는 XhoI의 제한효소 서열이 추가된 프라이머 (Forward primer: GGGAAGTCCATATGCTA TCGGCAACACACTCAGAAG, Reverse primer: CAGGAATGCTACTCGAGCGCGG TTGATATCATGAAGATTGTC)를 통해 PCR을 진행하였다. PCR 산물과 pGEX 3T1 벡터는 NdeI과 XhoI 제한효소로 37°C에서 1시간 동안 처리한 후 PCR clean-up을 진행한 후 T4 DNA ligase를 이용하여 서로 결합되었다. 이 후 *E. coli* Rosetta strain에 heat-shock 방법으로 형질전환되어 엠포실린이 처리된 LB배지에 도말하였으며, 선발된 단일 콜로니는 mini-prep 후 플라스미드 DNA의 sequencing을 통해 도입된 부분의 염기서열을 확인하였다. 확인된 콜로니는 20%의 glycerol stock으로 -70°C에서 보관되었다.

2. SeCR의 과발현 및 분리

단백질 발현은 먼저 -70°C에 보관된 glycerol stock을 2mL의 엠포실린이 처리된 LB배지에 접종하여 37°C 배양기에서 250rpm으로 하루동안 배양되었다. 배양된 2mL의 대장균은 1L의 LB에 접종되어 OD600에서 분광광도계의 흡광도가 0.6이상일 되었을 때 1mM 농도의 IPTG가 처리되었다. IPTG를 통한 SeCR 단백질의 과발현은 이 후 6시간 이상 37°C에서 이루어졌다. 과발현된 SeCR 단백질은 10% SDS-PAGE에서 단백질의 발현이 확인되었다. 이후 대량 배양중인 1L의 대장균은 4,000rpm에서 20분간 원심분리되어 세균만 수거되었으며, 0.2%의 lysozyme (Sigma, MO, USA)이 처리된 10 mL의 lysis buffer (0.1 M NaCl, 2% Triton X-100, 20 mM Bis-Tris, pH6.5)에 현탁한 후 28°C의 배양기에서 200 rpm으로 1시간동안 세포용해 반응을 진행하였다. 이 후 4,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 Crystal Washing Solution I (0.1M NaCl, 2% Triton X-100, 20mM Bis-Tris, pH6.5, 2% Sodium deoxycholate)에서 균질화 시킨 후 초음파 파쇄기 (Bendelin Sonoplus HD2070, Berlin, Germany)를 이용하여 2분간 세포를 파쇄하였다. 이 후 4,000rpm에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 제거하여 Crystal Washing Solution II (1M NaCl)에서 펠렛을 균질화 하였다. 마지막으로 4,000rpm에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 제거하고 멸균증류수에 펠렛을 균질화 하였다. 멸균증류수에 보관된 SeCR 단백질은 10% SDS-PAGE에서 시각화되었으며, 단백질 농도는 Bovine Serum Albumine (BSA, Sigma, MO, USA)를 이용하여 Bradford 방법으로 정량화되었다.

3. Cry 독소단백질에 대한 SeCR 단백질의 살충 상승효과

본 실험에 이용된 Cry1Ac와 Cry1Ca 독소단백질은 스페인의 Salvador Hererro 교수님 (Department of Genetics, Universitat de València)으로부터 제공받아 Cry 독소단백질의 양독실험에 이용되었다. Cry1Ac (0.625, 1.25, 2.5, 5, and 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)와 Cry1Ca (0.062, 0.125, 0.25, 0.5, and 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)는 파밤나방 3령 유충을 대상으로 살충력 검정이 이루어졌다. 살충력 검정은 가로 \times 세로 1cm의 배추잎을 독소단백질에 침지한 후 20분간 실온에서 건조하였으며, 6시간동안 절식된 1령유충에 배추잎을 처리하여 Cry 독소단백질 농도별 살충력을 조사하였다. 처리별 파밤나방 유충 10마리씩 3반복으로 실험이 이루어졌다. 또한 Cry 독소단백질에 대한 SeCR 단백질의 살충 상승효과는 위와 동일한 방법으로 진행되었으며, Cry1Ac (1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)와 Cry1Ca (0.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)의 독소단백질에 대해 각각 1:0, 1:1, 1:10의 비율로 SeCR을 처리하여 살충력을 조사하였다.

결과

1. SeCR 단백질의 구조

파밤나방의 CR 유전자는 NCBI GenBank (KC907716.1)에 등록되었다. 도메인분석에서 CR유전자는 1개의 signal peptide, 11개의 CR 도메인, 1개의 transmembrane domain으로 구성되어 있는 것으로 밝혀졌다 (그림 1).

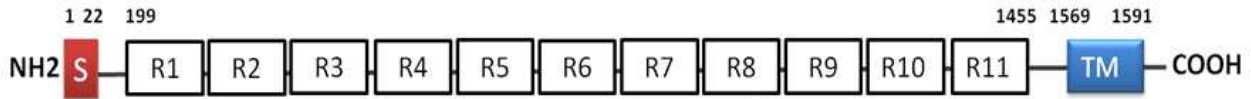


그림 1. 파밤나방의 cadherin 유전자의 전체 ORF

2. SeCR 단백질의 과발현 및 분리

파밤나방의 CR 단백질은 pGEX 벡터에서 GST단백질과 융합되어 대장균 시스템을 통해 발현되었다. 그림 2에서 SDS-PAGE 상에서 2번은 대장균에서 선발된 SeCR/pGEX를 가지고 있는 클론으로, 분리하기 전에 10% SDS-PAGE에 전개된 단백질 샘플이다.

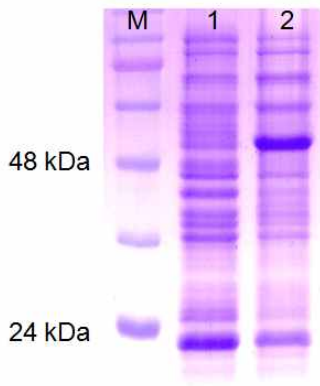


그림 2. pGEX 벡터시스템을 이용하여 발현된 SeCR 단백질의 분리하기 전 사진 (10% SDS-PAGE)

또한, 그림 3에서 1번은 GST 단백질, 2번은 GST-SeCR 융합단백질을 확인할 수 있으며, GST-SeCR 융합단백질은 49 kDa의 크기로 확인되었다. 그림 2와 3을 통해 단백질 분리과정을 통해 대부분의 대장균이 가지고 있는 단백질들이 제거되었음을 확인할 수 있었다.

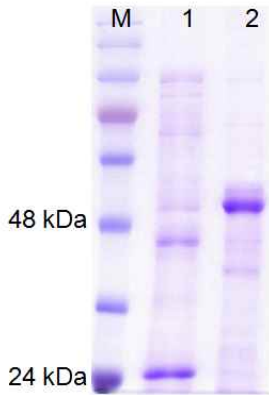


그림 3. pGEX 벡터시스템을 이용하여 발현된 SeCR 단백질의 분리 후 사진 (10% SDS-PAGE)

3. Cry 독소단백질에 대한 SeCR 단백질의 살충 상승효과

파밤나방에 대한 Cry 독소단백질의 살충력 검정에서 Cry1Ac는 1 μ g에서 16%, Cry1Ca는 0.1 μ g에서 18%의 살충력을 나타내었다 (그림 4). 또한 Cry1Ca는 Cry1Ac와 비교하여 파밤나방에서 보다 감수성인 것으로 분석되었다.

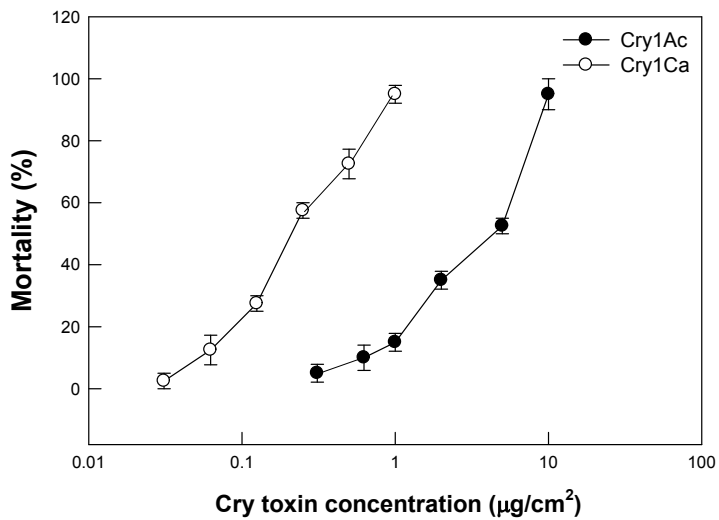


그림 4. Cry1Ac와 Cry1Ca에 대한 파밤나방 3령 유충의 살충력 검정

Cry 독소단백질에 대한 양독실험 결과를 토대로 SeCR 단백질에 대한 상승효과를 수행하였으며, SeCR 단백질은 Cry 독소단백질과 1:10의 비율로 혼합되었을 때 파밤나방 2령 유충에 대한 살충력의 상승효과가 조사되었다 (그림 5).

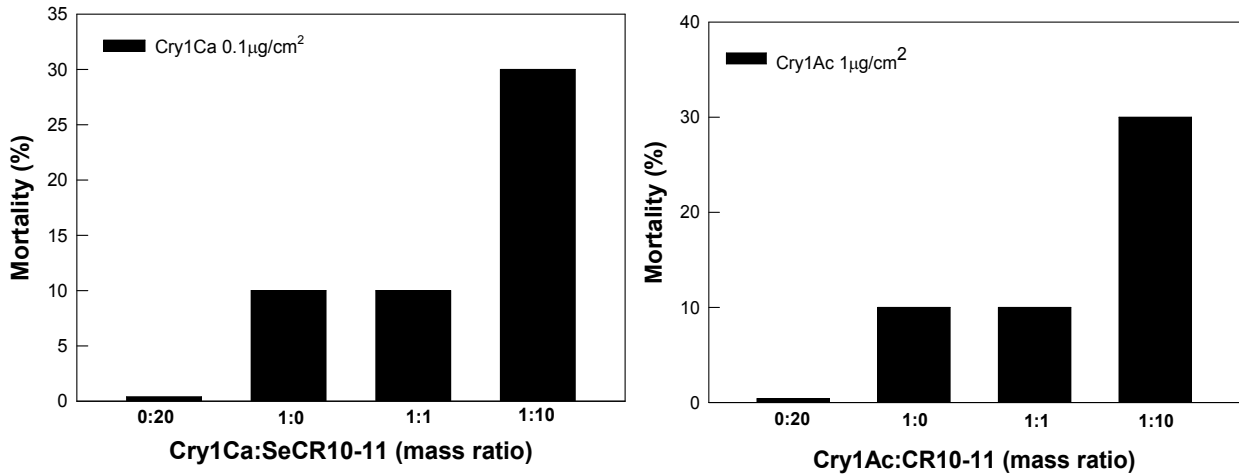


그림 5. Cry1Ac와 Cry1Ca에 대한 SeCR 단백질의 살충 상승효과

비티 내독소 단백질의 수용체인 캐드헤린 (cadherin) 단백질을 이용한 비티 내독소 단백질의 살충력 상승을 피하기 위해 파밤나방의 캐드헤린 재조합 단백질을 형성하고 이를 비티 내독소 단백질과의 결합력 분석을 ELISA 방법을 통해 분석하여 상승 기작을 밝혔다.

재료 및 방법

SeCad1 CR10-11의 과발현 및 분리. 단백질 발현은 먼저 -70°C 에 보관된 glycerol stock을 2mL의 엠피실린이 처리된 LB배지에 접종하여 37°C 배양기에서 250rpm으로 하루동안 배양되었다. 배양된 2mL의 대장균은 1L의 LB에 접종되어 OD600에서 분광광도계의 흡광도가 0.6이상이 되었을 때 1mM 농도의 IPTG가 처리되었다. IPTG를 통한 SeCad1 CR10-11 단백질의 과발현은 이 후 6시간 이상 37°C 에서 이루어졌다. 과발현된 SeCad1 CR10-11 단백질은 10% SDS-PAGE에서 단백질의 발현이 확인되었다. 이 후 대량 배양중인 1L의 대장균은 4,000rpm에서 20분간 원심분리되어 세균만 수거되었으며, 0.2%의 lysozyme (Sigma, MO, USA)이 처리된 10 mL의 lysis buffer (0.1 M NaCl, 2% Triton X-100, 20 mM Bis-Tris, pH6.5)에 현탁한 후 28°C 의 배양기에서 200 rpm으로 1시간동안 세포용해 반응을 진행하였다. 이 후 4,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 Crystal Washing Solution I (0.1M NaCl, 2% Triton X-100, 20mM Bis-Tris, pH6.5, 2% Sodium deoxycholate)에서 균질화 시킨 후 초음파 파쇄기 (Bendelin Sonoplus HD2070, Berlin, Germany)를 이용하여 2분간 세포를 파쇄하였다. 이 후 4,000rpm에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 제거하여 Crystal Washing Solution II (1M NaCl)에서 펠렛을 균질화 하였다. 마지막으로 4,000rpm에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 제거하고 멸균증류수에 펠렛을 균질화 하였다. 멸균증류수에 보관된 SeCad1 CR10-11 단백질은 10% SDS-PAGE에서 시각화되었으며, 단백질 농도는 Bovine Serum Albumine (BSA, Sigma, MO, USA)를 이용하여 분광광도계에서 Bradford 방법으로 정량화되었다.

Cry 독소단백질에 대한 SeCad1 CR10-11 단백질의 살충 상승효과. 본 실험에 이용된 wild type (WT)과 modified (Mod)형의 Cry1Ac와 Cry1Ca 독소단백질은 스페인의 Salvador Hererro 교수님 (Department of Genetics, Universitat de València)으로부터 제공받아 Cry 독소단백질의 양독실험에 이용되었다. Cry1Ac (0, 1, 2, 4, 8, 10, 15, 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)와 Cry1Ca (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)는 파밤나방 3령 유충을 대상으로 살충력 검정이 이루어졌다. 살충력 검정은 가로 \times 세로 1cm의 배추잎을 독소단백질에 침지한 후 20분간 실온에서 건조하였으며, 6시간동안 절식된 1령유충에 배추잎을 처리하여 Cry 독소단백질 농도별 살충력을 조사하였다. 처리별 파밤나방 유충 10마리씩 3반복으로 실험이 이루어졌다. 또한 Cry 독소단백질에 대한 SeCad1 CR10-11 단백질의 살충 상승효과는 위와 동일한 방법으로 진행되었으며, WT과 Mod Cry1Ac (0.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)와 Cry1Ca (4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)의 독소단백질에 대해 각각 1:0, 1:1, 1:10의 비율로 SeCR을 처리하여 살충력을 조사하였다.

ELISA를 이용한 Cry 독소단백질과 SeCad1 CR10-11 단백질의 결합력 조사. Trypsin이 처리된 Cry 독소단백질과 SeCad1 CR10-11 단백질간의 상호작용을 ELISA 기법을 통해 분석한 후 결합친화력 (K_d)을 조사하였다. 활성화된 독소단백질들은 바이오틴 (Pierce, Rockford, IL, USA)으로 표지가 되었다. 독소단백질과 SeCad1 CR10-11 단백질반응용액 (200 mM NaCl, 20mM Na_2CO_3 (pH8.0))에서 2시간동안 실온에서 이루어졌다. 96well 마이크로 플레이트에 SeCad1 CR10-11 단백질 (50 $\mu\text{g}/\text{well}$)로 16시간동안 코팅을 시켰으며, 이 후 0.1 nM에서 300 nM의 바이오틴 표지가 된 내독소단백질을 1,000배 농도의 동일한 비표지 내독소단백질과 1시간동안 실온에서 경합을 시켰다. 이 후 결합하지 않은 비표지 내독소단백질을 반응용액으로 세척하였다. 반응 후 horse radish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)와 표지된 내독소단백질간의 결합반응을 유도하여 HRP 기질 (1-Step Ultra TMB-ELISA, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)로 단백질간의 반응정도를 정량화 하였다. 발색반응은 2M sulfuric acid에 의해 정지되었고 마이크로플레이트 리더 (Biolog MicroStation System, Hayward, CA, USA)에서 405nm의 흡광도에서 흡수도가 측정되었다. 이 후 결합력은 Sigma Plot 프로그램 (SPSS Science, Chicago, IL, USA)을 이용하여 single model fit 방식으로 분석되었다.

결 과

SeCad1 CR10-11 단백질과 내독소단백질. 다양한 비티 내독소단백질과 과밤나방의 SeCad1 CR10-11 단백질은 10% SDS-PAGE에서 전개되었다 (그림 1). Wt와 Mod Cry1Ac와 Cry1Ca 내독소 단백질은 protoxin 형태에서 모두 130 kDa 이상의 동일한 단백질 크기를 나타내었다. 이 후 trypsin 처리가 된 각 내독소 단백질 또한 동일한 65 kDa의 동일한 단백질 크기를 가지고 있었다. 과밤나방에서 분리되어 재조합 단백질로 발현된 캐드헤린 SeCad1 CR10-11은 48 kDa의 크기로 확인되었으며, 본 연구에서는 캐드헤린 도메인 가운데 CR10과 CR11 영역이 발현된 재조합 단백질을 이용하였다 (그림 2).

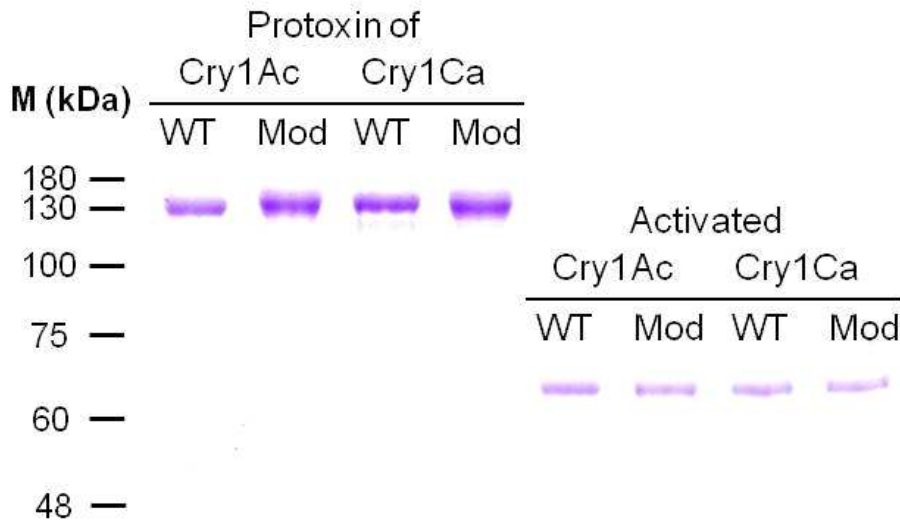


그림 1. 10% SDS-PAGE에서 비활성형과 활성형의 wild type 및 modified 비티내독소 단백질

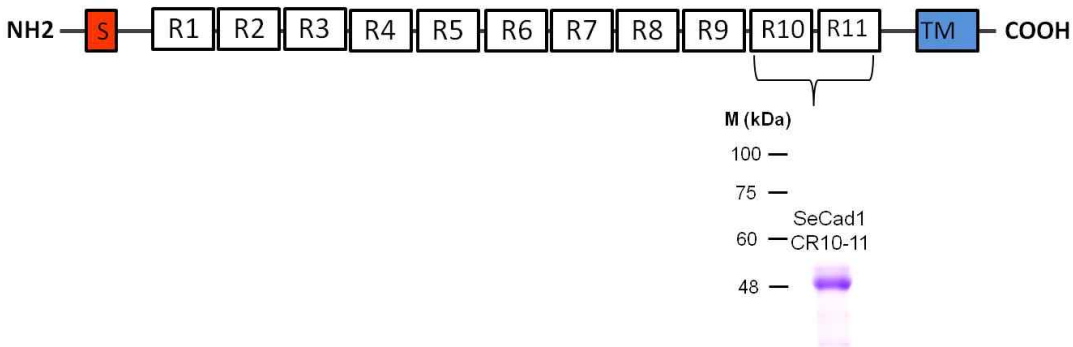


그림 2. 10% SDS-PAGE에서 SeCad1 CR10-11 단백질과 과밤나방의 캐드헤린 단백질의 도메인 구조

Cry 독소단백질에 대한 SeCad1 CR10-11 단백질의 살충 상승효과. 과밤나방 유충에 대한 Cry1Ac 내독소 단백질은 기존의 연구를 통해 감수성이 다소 낮다고 알려졌다. 본 연구에서는 이러한 Cry1Ac 내독소 단백질의 감수성을 높이기 위해 내독소 단백질의 도메인I 영역에서 6번째 α -헬릭스 구조가 결손된 돌연변이 단백질을 이용하여 살충력을 6일동안 조사하였다. 그 결과 Wt의 내독소 단백질과 비교하여

Mod 내독소단백질에서 살충력 상승효과가 일부 확인되었다 (그림 3).

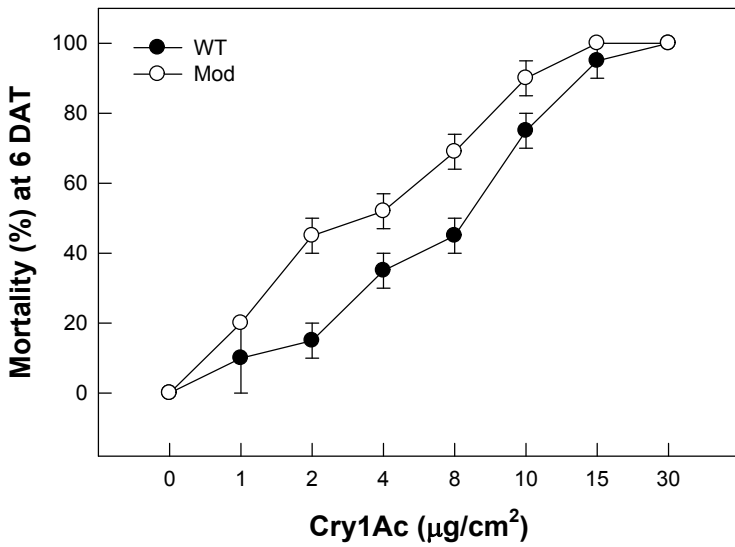


그림 3. Wild type (Wt)와 Modified (Mod) Cry1Ac 내독소단백질에 대한 파밤나방 3령 유충의 살충력 조사

또한, Wt의 Cry1Ca 내독소 단백질에 대한 Mod Cry1Ca 단백질의 살충력을 비교하였다. Cry1Ac 내독소 단백질과 동일한 영역이 결손된 돌연변이 단백질임에도 불구하고 파밤나방 유충에 대한 6일동안 살충력의 상승효과는 확인 되지 않았다 (그림 4).

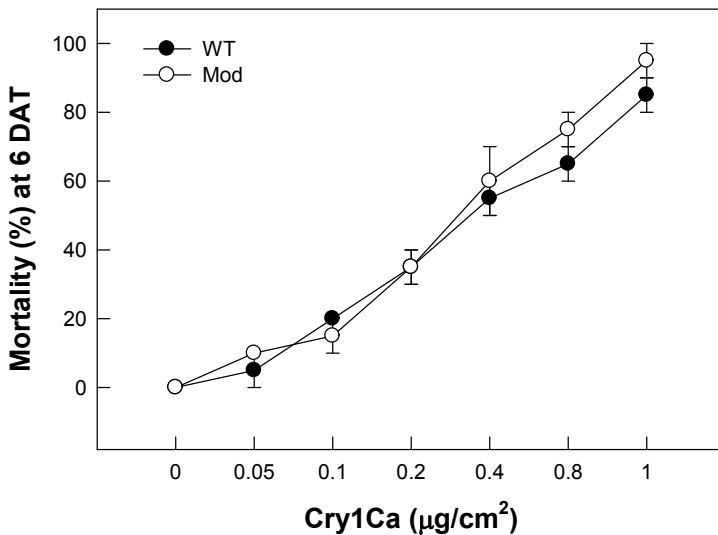


그림 4. Wild type (Wt)와 Modified (Mod) Cry1Ca 내독소단백질에 대한 파밤나방 3령 유충의 살충력 조사

파밤나방에 대한 Cry 내독소단백질과 SeCad1 CR10-11 단백질에 대한 상승효과를 조사하였다. 이를 위해 내독소단백질과 캐드헤린간의 비율은 각각 1:1과 1:10의 비율로 처리하여 Cry1Ac와 Cry1Ca 두 독소

간의 상승효과 및 Wt과 Mod 독소간의 차이를 비교하였다. 먼저 Cry1Ac와 Cry1Ca 독소간에 캐드헤린으로 인한 살충효과의 상승효과가 확인이 되었다 (그림 5와 6).

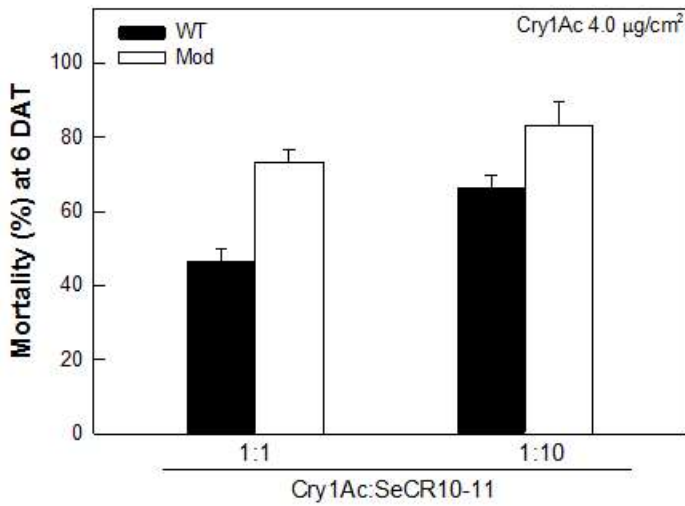


그림 5. Wild type (Wt)와 Modified (Mod) Cry1Ac 내독소단백질과 SeCad1 CR10-11 단백질 대한 파밤나방 3령 유충의 살충력 조사

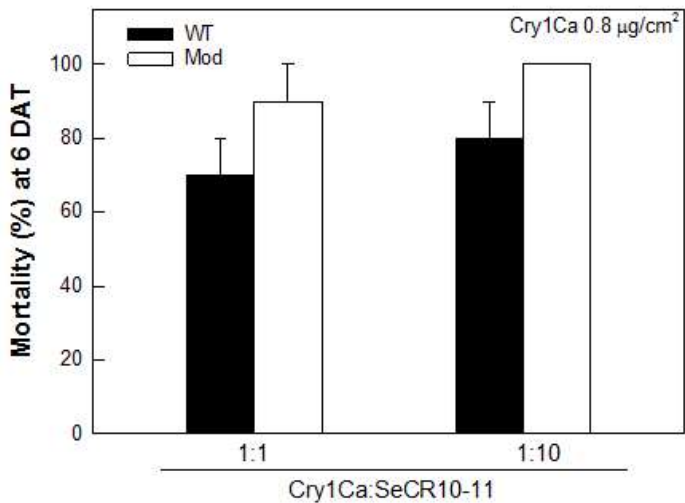


그림 6. Wild type (Wt)와 Modified (Mod) Cry1Ca 내독소단백질과 SeCad1 CR10-11 단백질 대한 파밤나방 3령 유충의 살충력 조사

ELISA를 이용한 Cry 독소단백질과 SeCad1 CR10-11 단백질의 결합력 조사. Wt과 Mod Cry1Ac 내독소단백질과 SeCad1 CR10-11 단백질의 결합력 (Kd)은 각각 57 nM과 29.7 nM로 크게 차이가 있는 것으로 조사되었다 (그림 7). 그러나 Wt과 Mod Cry1Ca 내독소단백질과 SeCad1 CR10-11 단백질의 결합력 (Kd)은 각각 26.5 nM과 20.5 nM로 그 차이가 인정되지 않았다 (그림 8). 따라서 Wt Cry1Ac과 SeCad1 CR10-11 단백질의 결합력을 제외한 나머지 내독소 단백질은 SeCad1 CR10-11 단백질에 대해 모두 동일한 결합력을 나타낸다는 것을 본 연구를 통해 확인할 수 있었다.

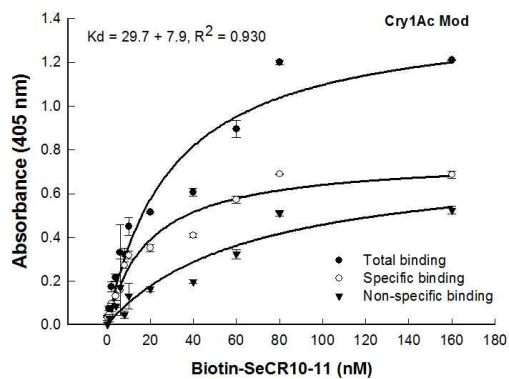
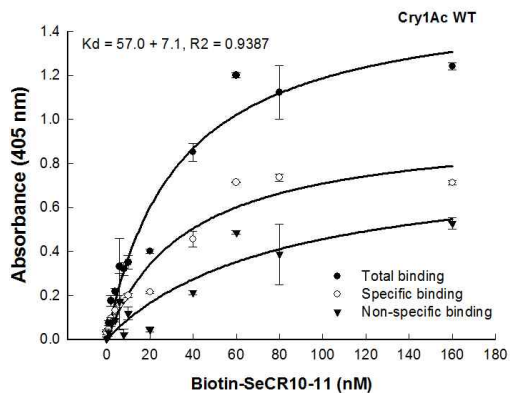


그림 7. Wild type (Wt)와 Modified (Mod) Cry1Ac 내독소단백질과 SeCad1 CR10-11 단백질간의 결합력 조사

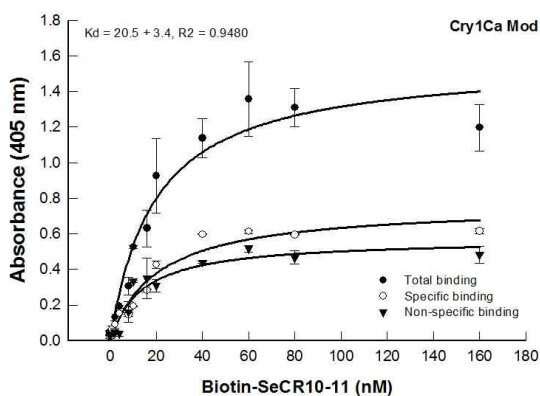
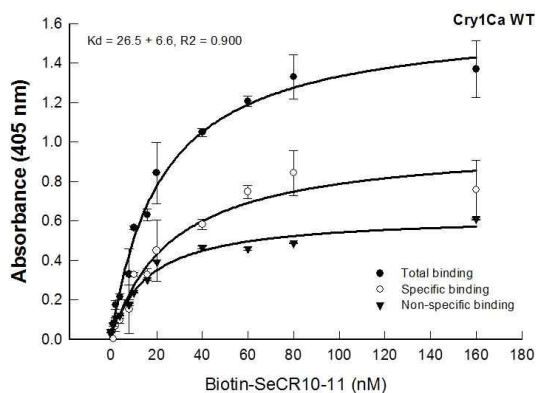


그림 8. Wild type (Wt)와 Modified (Mod) Cry1Ca 내독소단백질과 SeCad1 CR10-11 단백질간의 결합력 조사

제4장 비티플러스 dsRNA 협력제

목적: dsRNA를 이용한 곤충의 생리현상 교란을 이용하여 비티의 살충효과 제고

전략: 곤충세포의 기능을 조절하는 integrin유전자의 발현을 RNA 교란을 이용해 억제시키며, 이를 통한 세포골격의 기능 붕괴로 비티의 작용점에서 pore formation을 유도한다.

재료 및 방법

1. in vitro dsRNA의 합성 및 살충효과

파밤나방 5령 유충에서 추출된 전체 RNA를 통해서 cDNA가 RT-Mix Kit (Intron, 서울)를 이용해 합성되었다. 합성된 cDNA 90ng을 주형으로 5'과 3'에 T7 RNA polymerase promotor 염기서열이 포함된 프라이머 (Forward Primer: TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCAGCTTGCCAGTGTTTGAAG, Reverse Primer: TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCCGTTCCCTTCTGTGCTCTAAT)를 제작하여 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 MEGA Script RNAi kit (Ambion, Austin, TX, USA)를 이용해 dsRNA로 합성되었으며, Metafectene Pro transfection reagent (Biontexas, Planegg, Germany)를 1:1로 처리하여 리포솜 형태로 만들었다. dsRNA의 처리방법은 가로 × 세로 1cm의 배추잎에 6μl의 integrin β subunit 유전자에 특이적인 dsSeITG (0, 25, 50, 100, 200, 400ng)를 피펫을 이용해 처리한 후 실온에서 20분간 건조시켰다. 또한 처리된 dsSeITG에 의한 파밤나방 살충력은 6시간 동안 절식된 1령유충을 대상으로 진행되었으며, 처리 후 5일째에 살충력을 조사하였다. 처리별 파밤나방 유충 10마리씩 3반복으로 실험이 이루어졌다.

2. 세균을 이용한 in vivo dsRNA의 합성 및 살충효과

파밤나방 5령 유충에서 합성된 cDNA를 대상으로 integrin 유전자의 일부분을 PCR 하였다. PCR에 이용된 프라이머는 5'에는 XbaI 3'에는 HindIII 제한효소의 서열을 추가하여 제작 (Forward primer: TCTAGACAGCTTGCCAGTGTTTGAAG, Reverse primer: AAGCTTCCGTTCCCTTCTGTGCTCTAAT) 하였다. PCR 산물과 L4440 벡터는 XbaI과 HindIII 효소로 37°C에서 1시간동안 처리한 후 PCR clean-up을 진행한 후 T4 DNA ligase를 이용하여 서로 결합되었다. 이 후 *E. coli* HT115에 heat-shock 방법으로 형질전환되어 엠포실린이 처리된 LB배지에 도말하였으며, 선발된 단일 콜로니는 mini-prep 후 sequencing을 통해 도입된 부분의 염기서열을 확인하였다. 이렇게 완성된 대장균 발현체계를 이용한 dsSeITG 발현을 통한 곤충에 대한 살충효과는 LB배지에서 하루 동안 37°C의 shaking incubator에서 배양하였으며, 이 후 멸균증류수를 이용하여 4,000 rpm에서 10분간 세 번 원심분리 한 후 배양액을 제거하였으며, 1mL의 멸균증류수안에 세균만 수거하였다. 대장균 발현체계를 이용한 dsSeITG 발현으로 인한 곤충의 살충력을 조사하기 위해 가로 × 세로 1cm의 배추잎을 침지한 후 20분간 실온에서 건조하였으며, 6시간 동안 절식된 1령 유충에 배추잎을 처리하여 농도별 살충력을 처리 후 5일째에 조사하였다. 처리별 파밤나방 유충 10마리씩 3반복으로 실험이 이루어졌다.

3. 대장균 발현체를 이용한 Cry 독소단백질 합성 및 살충효과

pBac8 벡터 안에 도입된 Cry1Ac와 Cry1C를 서울대학교 제연호 교수님 연구실에서 분양받았으며, 이를 *E. coli* BL21으로 heat-shock 방법으로 형질전환 하였다. 본 실험에서는 *E. coli*가 생산하는 Cry 독소단

백질에 대한 곤충의 살충효과를 실험2에서 기술한대로 세균배양 후 배양액을 제거한 후 1mL의 멸균증류수에 세균을 수거하였다. 대장균 발현체계를 이용한 Cry1Ac 생성으로 인한 곤충의 살충력을 조사하기 위해 가로 × 세로 1cm의 배추잎을 침지한 후 20분간 실온에서 건조하였으며, 6시간동안 절식된 1령유충에 배추잎을 처리하여 농도별 살충력을 조사하였다. 처리별 파밤나방 유충 10마리씩 3반복으로 실험이 이루어졌다.

4. Cry 독소단백질과 in vitro dsRNA의 동시 처리에 의한 살충 상승효과

Cry 독소단백질을 생성하는 최고 농도의 세균이 현탁된 1mL의 멸균증류수에 가로 × 세로 1cm의 배추잎을 침지한 후 20분간 실온에서 건조하였으며, 다시 in vitro에서 합성된 dsSeITG (200ng)을 6시간동안 절식된 파밤나방 1령 유충에 섭식 처리하여 살충력을 검정하였다. 처리별 파밤나방 유충 10마리씩 3반복으로 실험이 이루어졌다.

결과

1. in vitro dsRNA의 살충효과

In vitro에서 합성된 SeITG에 특이적인 dsRNA (dsSeITG)는 섭식처리시 200ng 이상의 처리에서 30% 이상의 살충효과를 나타내었다. 또한 dsSeITG 200ng과 400ng 간에는 처리 농도별 살충력의 차이가 나타나지 않았으며, 100ng의 처리는 무처리와 비교하여 살충력의 차이가 인정되지 않았다.

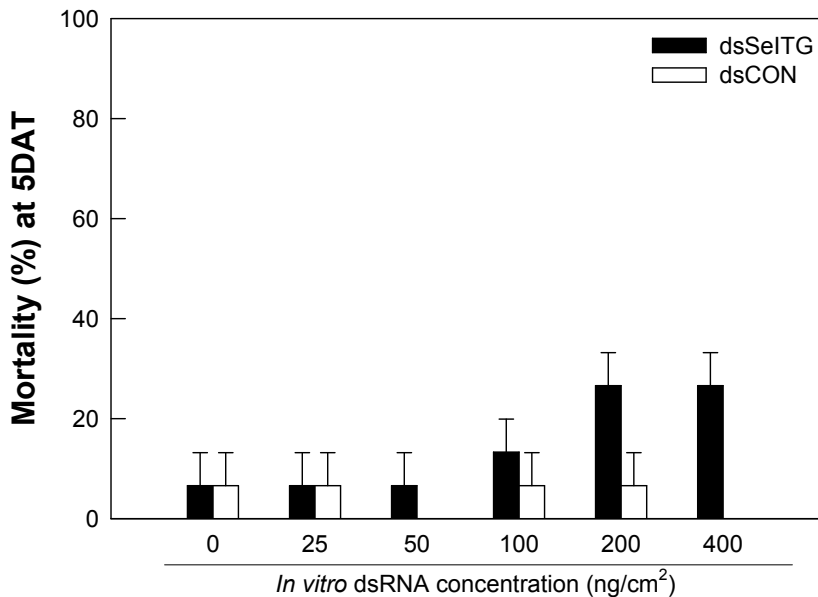


그림 1. In vitro dsRNA의 파밤나방 1령 유충에 대한 살충효과

Cry 독소단백질이 형질전환된 대장균은 파밤나방 1령 유충을 대상으로 살충력을 나타내었다. 10⁸ 세균 농도에서 Cry1Ac와 Cry1C는 각각 가장 높은 48%와 54%의 살충력 나타내었으며, 세균 농도가 증가함에 따라 살충력이 증가하는 dose-dependent 경향을 보였다. 또한 10⁵ 세균농도에서는 두 Cry 독소단백질 모두 살충력에 있어서 무처리와 차이가 나지 않았다.

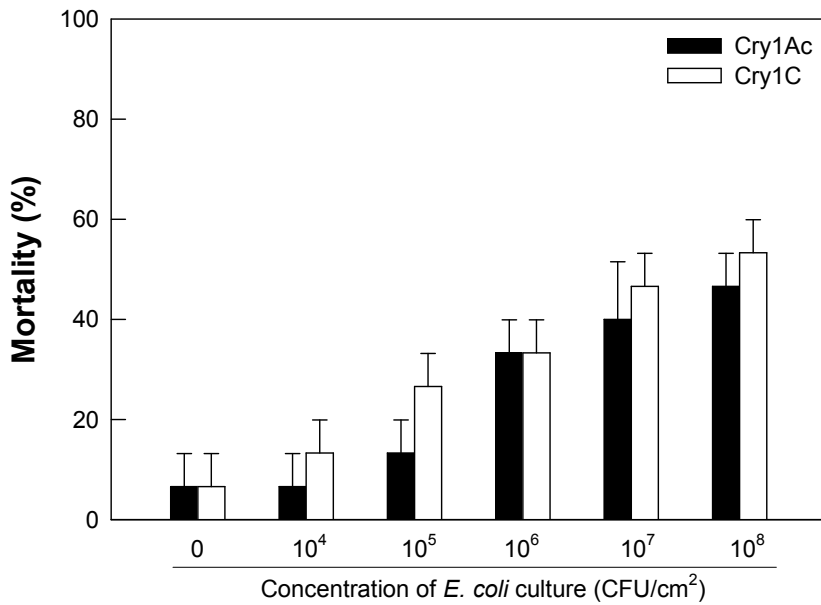


그림 2. 대장균 발현 시스템을 이용해 생성된 Cry 독소단백질의 살충력

대장균을 이용해 생성되는 SeITG에 특이적인 dsRNA (dsSeITG)의 살충효과는 10⁸의 세균농도로 파밤나방 1령 유충에 처리하였을 때 20%정도로 나타났다. 이것은 in vitro에서 합성된 dsSeITG (200ng)의 살충력이 30%인 것과 비교하여 살충력이 다소 낮게 나타났다. 그러나 세균에서 생성된 Cry1Ac와 dsSeITG의 혼합처리시 살충력이 57%로 나타남에 따라 세균에서 생성된 Cry1Ac의 단독처리시 40%와 비교하여 두 단백질간의 혼합처리시 파밤나방 유충에 대한 살충력 상승효과가 있는 것으로 판단된다.

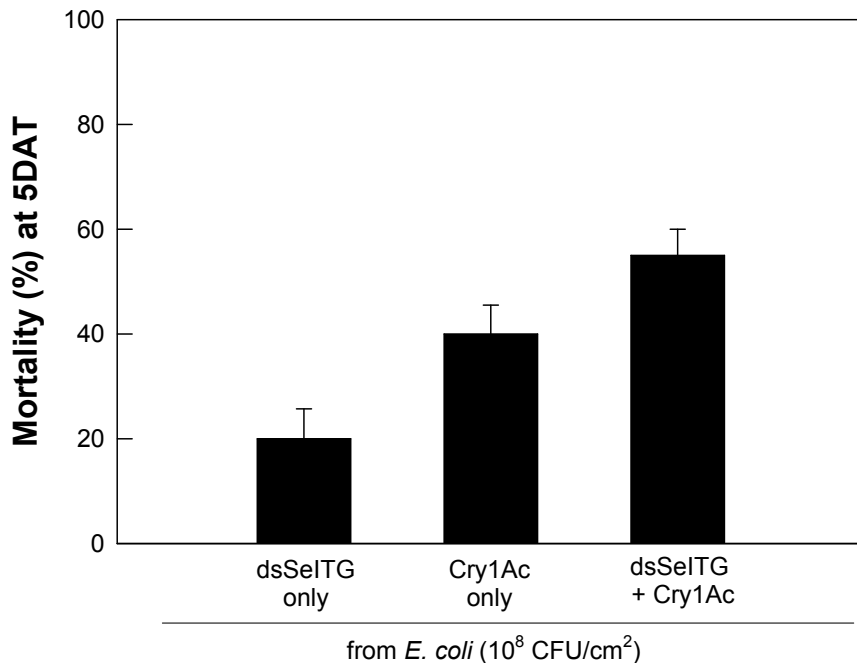


그림 3. 대장균 발현 시스템을 이용해 생성된 Cry 독소단백질과 in vivo dsSeITG의 동시 처리시 파밤나방 1령 유충에 대한 살충력 상승효과

Application of double-stranded RNA (dsRNA) has been focused on controlling specific target insect pests in agriculture [1]. RNA interference (RNAi) induced by exogenous dsRNA leads to loss of a specific function in insect physiological processes and results in a significant threat to survival. Various target genes have been screened to develop an efficient dsRNA insecticide. A V-ATPase gene, which is expressed in the midgut of the corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*, was targeted by its specific dsRNA and gave a significant mortality to the pest [2]. Furthermore, to be specific to insects and other arthropods, a chitin synthase was targeted to develop dsRNA insecticide [3,4]. Targeting ecdysone receptor by dsRNA is another example for the specific control insect pests to avoid any detrimental impact on mammals [5].

Delivery techniques of the efficient dsRNAs to target insects especially into cytoplasm have been investigated. The environmental RNAi is highly efficient by injecting dsRNA directly to the hemocoel of target insects [6]. For its practical purpose, feeding application of dsRNA has been demonstrated in several insects with little information of the route of dsRNA into the target cytoplasm [7-9]. To give a stability of dsRNA in environmental condition, nanoparticle formulation of dsRNA was applied to aquatic condition and proved for its application to control mosquitoes [4]. On the other hand, a formulation of dsRNA in bacteria can give dual benefits in terms of dsRNA synthesis and stability in a kind of bioformulation. A recombinant bacteria expressing dsRNA gave significant RNAi efficacy and resulted in target insect mortality by feeding the bacteria in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* [10]. Furthermore, transgenic plants expressing dsRNA in a hairpin form have been constructed and are effective to give significant RNAi efficacy [11-13].

The beet armyworm, *Spodoptera exigua*, is a serious insect pest on vegetable crops with its wide host range [14,15]. Its development of resistance against various chemical and microbial insecticides needs an alternative control technique [16-18]. Several genes of *S. exigua* are modulated in their expressions by their specific dsRNA treatments and exhibit significant RNAi efficacies [19-24]. Moreover, oral feeding of dsRNA was effective to induce significant RNAi in *S. exigua* [23,25].

Integrin is a heterodimer transmembrane protein and plays a crucial role in cell-cell and cell-extracellular matrix (ECM) interactions [26]. A b subunit of integrin (SeINT) has been identified in *S. exigua* and is associated with cellular immune responses and larval development [27]. Injection or oral treatment of in vitro prepared dsRNA specific to SeINT gave significant mortality to *S. exigua* larvae [27].

This study aimed to develop a dsRNA insecticide against *S. exigua* by constructing a transformed bacterium. To this end, SeINT gene expression was targeted by its specific dsRNA expressed in *Escherichia coli* HT115 lacking in RNase III. To enhance the insecticidal activity, the dsRNA-producing bacteria were mixed with *E. coli* expressing a Cry toxin of *Bacillus thuringiensis* (Bt). This study introduces a novel application of dsRNA synergizing Bt toxicity.

재료 및 방법

Insect rearing. Larvae of *S. exigua* were reared on an artificial diet [41] at 25°C, 16:8 h (L:D) photoperiod and 60 ± 5% relative humidity. Adults were supplied with 10% sucrose solution.

However, insecticidal bioassays used Chinese cabbage for diet to deliver dsRNA in an oral route.

RNA extraction and RT-PCR. Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's instruction. An extraction used 20 young larvae (1st-3rd instar), three 4th instar larvae or one 5th instar larva. The extracted RNA was treated with a RNase-free DNase (Bioneer, Seoul, Korea) to degrade any genomic DNA contamination. RNA extract (1 µg per reaction) was incubated at 70°C for 3 min and then used for synthesis of cDNA using RT-premix (Intron Biotechnology, Seoul, Korea). The synthesized cDNA was used for PCR amplification with SeITG-specific forward primer (5'-TCTAGACAGCTTGCCAGTGTTTGAAG-3') and reverse primer (5'-AAGCTTCCGTTTCCTTCTGTGCTCTAAT-3'). PCR was performed with 35 cycles after an initial denaturation at 94°C for 5 min. Each cycle consisted of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 50°C for 30 s and extension at 72°C for 1 min. The PCR reaction was ended with an extension step at 72°C for 10 min. Quantitative PCR (qPCR) used SYBR Green Realtime PCR master mixture (Toyobo, Osaka, Japan) by 7500 real time PCR system according to the manufacture's instruction. The reaction mixture (20 µL) included 5 pmol of primers used in RT-PCR as described above, and 50 ng of template cDNA. After activation of Hot-start Taq DNA polymerase at 94°C for 15 min, the reaction was amplified with 35 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 50°C, and 1 min at 72°C with a final extension for 5 min at 72°C. Fluorescence values were measured and amplification plots were generated in real time by an Exicycler™ program. Quantitative analysis of amplification was done using the comparative CT method [42].

Cloning of dsRNA specific to SeINT. To construct a recombinant plasmid to express dsRNA corresponding to a fragment (410 bp, Fig. 1A) at the extracellular domain of integrin beta subunit, the amplified DNA (above) was digested with XbaI and HindIII, and inserted into L4440 vector kindly donated from Seung Jae Lee (Pohang University of Science and Technology, Pohang, Korea). The L4440 plasmid has two T7 promoters in an inverted orientation flanking the multiple cloning sites. The recombinant vector L4440-SeINT was transformed into a competent cell of *Escherichia coli* HT115 (donated from SJL) lacking RNase III. This bacterium was designed to be induced to express T7 RNA polymerase in the presence of IPTG.

Preparation of transformed bacteria and over-expression of dsRNA. To produce dsRNA, the bacteria transformed with L4440-SeINT were grown in Luria-Bertani (LB) containing 100 µg/mL ampicillin (LB-AMP) at 37°C for 16 h with 250 rpm shaking rate. The cultured broth (5 mL) was added to 500 mL of LB medium and allowed to grow to OD₆₀₀ = 0.6~0.7. Expression of T7 RNA polymerase gene was induced by an addition of IPTG to 0.1 mM and the bacteria were incubated with shaking for 4 h at 37°C. The expressed dsRNA was extracted using a RNA extraction mini kit (Qiagen Korea, Seoul, Korea). The purity of the synthesized dsRNA was confirmed by electrophoresis on 1% agarose gel. To assess insecticidal activity of the recombinant bacteria expressing dsRNA, IPTG-induced cultures were pelleted by centrifugation and resuspended in the same culture medium, and applied to cabbage leaves for feeding treatment (see below).

Quantification of dsRNA produced by the transformed *E. coli*. Total RNA from *E. coli* cells was isolated as described above. To quantify the extracted dsRNA, the dsRNA sample was separated on 1% agarose gel and visualized with ethidium bromide. A standard curve was generated with the known amounts of purified dsRNA synthesized by in vitro transcription method [43] by comparing them with the gel band intensities estimated by an image analyzer (Bio-Rad Korea, Seoul, Korea). The RNA band intensity was read in pixels by Image Lab software (Bio-Rad Korea).

Pretreatments of the transformed bacteria. The bacteria expressing dsRNA specific to SeINT were cultured at 37°C and over-expressed as described above. Bacterial cells were harvested by centrifugation at 2,720 x g for 30 min at 4°C and resuspended in the fresh culture medium. Two different pretreatments were applied to the bacterial cells. A heat treatment used 100°C for 10 min. A sonication treatment used an ultrasonicator (Bandelin Sonoplus, Berlin, Germany) at 95% intensity with 10 cycle of 10 min burst separated by 2 min gaps. The bacterial viability was assessed by plating 100 µL of the treated bacterial sample on LB+AMP.

Bioassay of the transformed bacteria expressing dsRNA. To assess the insecticidal activity of the bacteria expressing dsRNA specific to SeINT, different instar larvae of *S. exigua* were used in the feeding bioassay. The cabbage was cut into two sizes: the smaller one with 20 mm diameter was used for assessment of 1st and 2nd instar larvae, while the larger one with 30 mm diameter was used for the older instar larvae. Each leaf disc was overlaid with 150 µL suspension of treatment (recombinant vector-containing) or control (non-recombinant vector-containing) bacterial suspension. Each treatment used 10 larvae with three replications. Fresh untreated cabbage was supplied after 24 h feeding of the treated leaf disc. For a long-term exposure experiment, the treated diet was replaced every 24 h. Insect mortality was measured daily for 7 days after treatment. Assessment of RNAi efficiency used qPCR as described above.

Examination of the midgut epithelium. To assess any damage on larval midgut epithelium, each 3rd instar larva was fed with the bacteria (10⁷ cells per larva) expressing dsRNA specific to SeINT. Control larvae were fed with the bacteria transformed with a non-recombinant vector. At 7 days after the transformed bacterial treatment, the larvae were dissected to collect the midgut. After cutting the midgut longitudinally, the midgut content was thoroughly washed with 100 mM phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4). The washed rectangular midgut was soaked into 0.1% trypan blue (Sigma-Aldrich Korea, Seoul, Korea) solution for 10 min and destained three times in PBS for each 10 min. The resulting tissues were observed under a phase contrast microscope (BX41, Olympus, Tokyo, Japan) at 200 x magnification. To assess the ultrastructure of the midgut epithelium, the prepared midgut tissue was fixed for 16 h with Bouin fixative (7.5 mL saturated picric acid, 2.5 mL 40% formalin, 0.5 mL acetic acid glacial) and dehydrated by an ascending ethanol series from 30 to 100%. Then, the tissues were cleared with xylene to be infiltrated with paraffin (58 ± 2°C melting point, Merck Korea, Seoul, Korea). The tissue-embedded paraffin was sectioned with 5 µm width using Buffalo microtome (Nippon Optical Works, Tokyo, Japan). The paraffin section was attached on the slide glass covered with 10% albumin. After deparaffin processes using a descending ethanol series, the tissues were stained with hematoxylin (1 g hematoxylin, 1.5 g ammonium alum, 50 mL ethanol in 100 mL of 50% glycerol) and eosin Y solution (0.1 g eosin and 0.5 mL acetic acid in 100 mL of 70% ethanol). These samples were pictured with a phase contrast microscope (BX41, Olympus) equipped with a color digital camera INFINITY1 (AZ microscope, Cheapside, London, UK).

Preparation of *E. coli* expressing Bt Cry1Ca. A clone containing a Bt Cry toxin (Cry1Ca) was kindly donated from Yeon Ho Jae (Seoul National University, Seoul, Korea). A partial N-terminal Cry toxin (935 residues) was cloned at SmaI and NotI sites of pGEX-4T-1 expression vector (GSL Biotech, Chicago, IL, USA) and expressed under IPTG induction as described above. For a dose-mortality assessment, different cell numbers of the bacteria were prepared and applied on cabbage leaf discs and fed to the 3rd instar larvae. Subsequently, the determined minimal dose

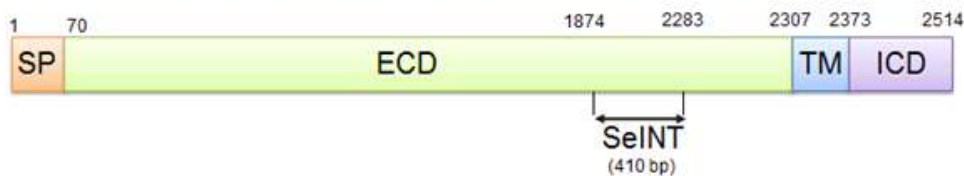
to give a maximal mortality was used to assess a synergistic effect of the *E. coli* bacteria expressing dsRNA specific to SeINT on the Bt toxicity. To determine any sensitive stage to Bt toxin, the Cry1Ca-expressing bacteria were treated at different time points after feeding *E. coli* expressing dsRNA. Each treatment used 10 larvae with three replications. Mortality was measured at 7 days after the dsRNA-expressing bacterial treatment.

Statistical analysis. All bioassays were performed in three independent biological replicates and plotted by mean \pm standard deviation using Sigma plot. Means were compared by least squared difference (LSD) test of ANOVA using PROC GLM of SAS program [44] at Type I error = 0.05.

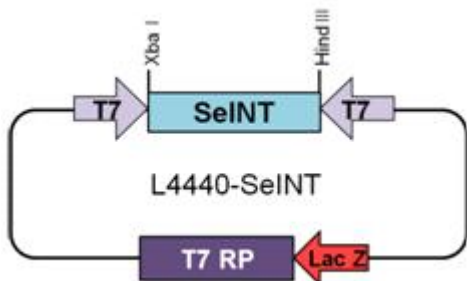
결 과

Transformed bacteria expressing dsRNA specific to integrin β 1 subunit of *S. exigua*. Test bacteria used in this study were prepared with a recombinant vector containing a fragment of *S. exigua* β 1 integrin gene ('SeINT', Fig. 1). A PCR product (Fig. 1A) of an integrin fragment at its extracellular domain was inserted between two T7 RNA polymerase promoters (Fig. 1B). The recombinant vector was used to transform *E. coli* HT115 lacking RNase III. The transformed *E. coli* was induced to overexpress dsRNA under LacZ promoter by adding an isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) inducer (Fig. 1C). The induced bacteria expressed dsRNA specific to the integrin ('dsINT') and the amount of produced dsRNA was linearly related with the bacterial cell number in log scale (dsRNA in ng = 31 x Log (Bacterial cell number) - 199, R2 = 0.9756) (Fig. 1D).

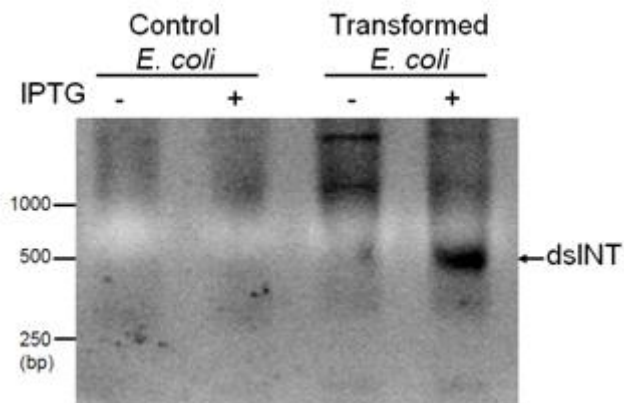
(A)



(B)



(C)



(D)

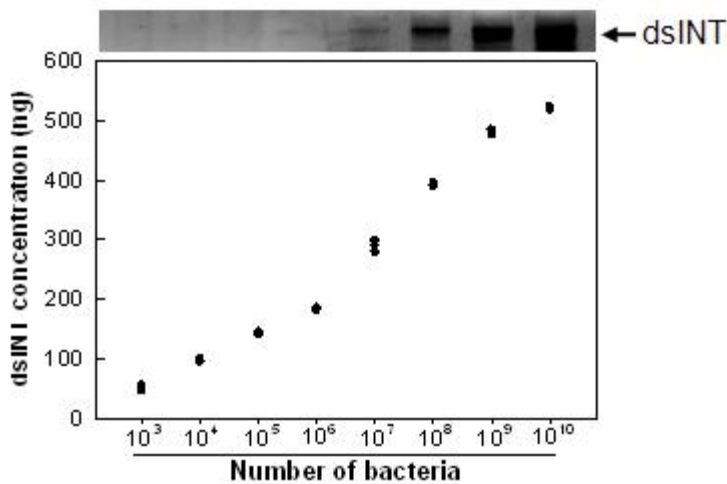


Fig. 1. Construction of a recombinant *E. coli* expressing dsRNA ('dsINT') specific to an integrin $\beta 1$ subunit fragment ('SeINT'). (A) A diagram showing a fragment (410 bp) used for generating dsINT: signal peptide ('SP'), extracellular domain ('ECD'), transmembrane ('TM'), and intracellular domain ('ICD'). (B) Cloning SeINT into an expression vector of L4440. Lactose promoter ('Lac Z') directs the expression of T7 RNA polymerase ('T7 RP'). SeINT is transcribed by both directions according to T7 RNA polymerase promoters ('T7'). (C) Production of dsINT with an inducer, IPTG. Transformed *E. coli* with L4440-SeINT expressed dsINT at the presence of IPTG. (D) Quantification of dsINT according to the transformed bacterial cell numbers. The extracted dsINT was quantified by band intensity based on a standard curved using the known amounts of purified dsINT prepared by in vitro dsRNA construction method. Each measurement was replicated three times.

Insecticidal activity of dsINT-expressing *E. coli* against *S. exigua*. The transformed bacteria were fed to larvae of *S. exigua* (Fig. 2). The insecticidal activity of the transformed bacteria was observed and increased in a bacterial dose-dependent manner (Fig. 2A). The transformed bacterial treatment suppressed the expression of SeINT at high bacterial doses (Fig. 2B). Compared to control bacteria, dsINT-expressing bacteria delayed the larval development when they were fed at young instars (Fig. 2C). Indeed, young instar larvae were more susceptible to the transformed bacterial treatment than old instar larvae (Fig. 2D).

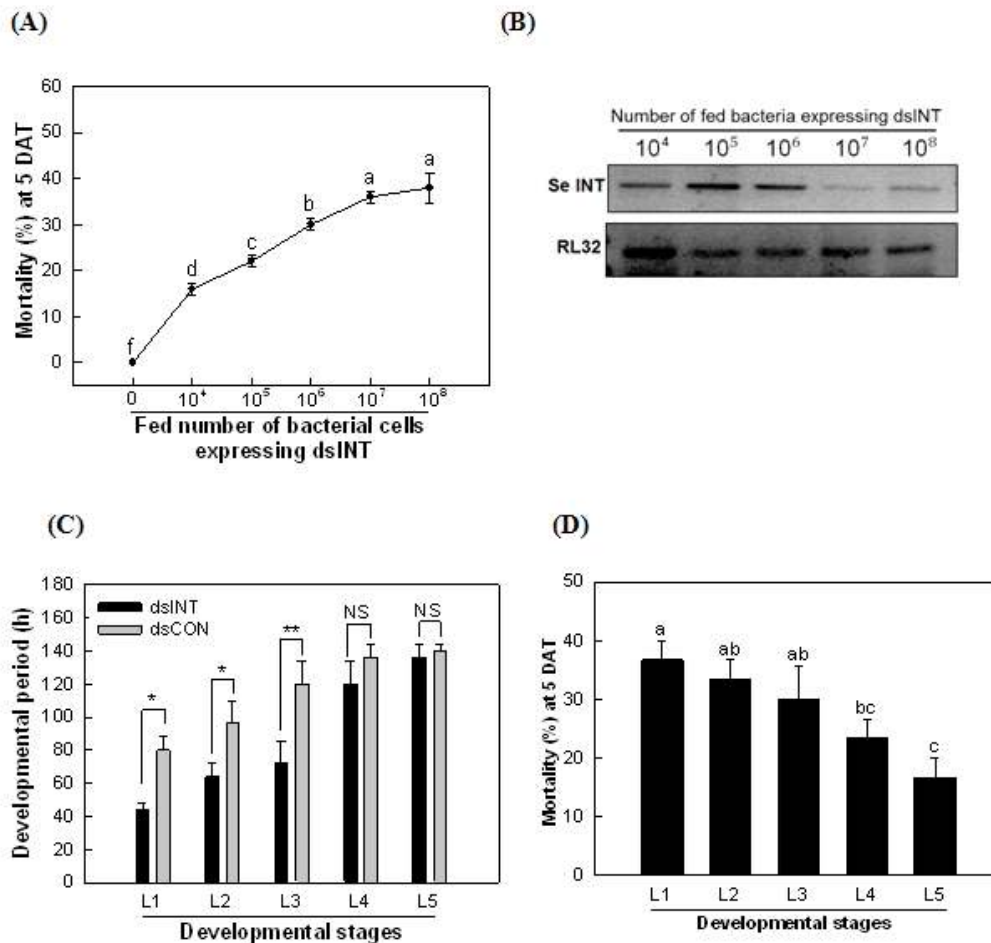
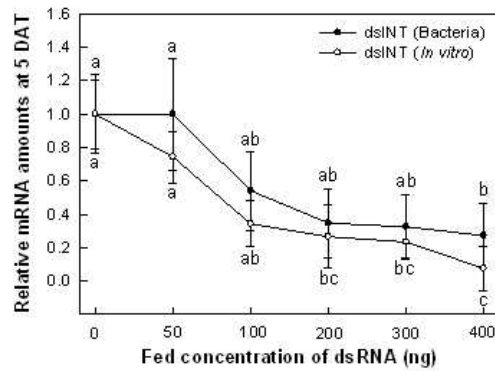


Fig. 2. Insecticidal activity of a transformed *E. coli* expressing dsRNA ('dsINT') specific to an integrin β subunit fragment ('SeINT'). (A) Oral toxicity of the recombinant bacteria (107 cells per larva) to young larvae. Each dose test used 10 larvae with three replications. Mortality was measured after 5 days of treatment ('DAT'). (B) Suppression of SeINT transcript levels measured by RT-PCR in the bacterial treatment. Expression of a ribosomal gene, RL32, was assessed to confirm the cDNA integrity. (C, D) Effects of the recombinant bacteria on developmental rate and toxicity. The recombinant bacteria (107 cells per larva) were independently fed to each instar ('L1-L5') with 10 larvae per replication. Untreated instars were fed with fresh cabbage. Each treatment was replicated three times. The developmental period of each treated instar was measured. Mortality was measured at 5 DAT. Different letters above standard deviation bars indicated significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test). 'NS' represents not significant, but '*' and '**' indicate significant differences among means at Type I error = 0.05 and 0.01, respectively.

Comparison of in vitro prepared dsRNA with the transformed bacteria expressing dsRNA in RNAi efficiency and insecticidal activity. The efficacy of dsRNA produced by the recombinant bacteria was compared with that of in vitro prepared dsRNA (Fig. 3). Both treatments suppressed SeINT transcript levels. However, RNAi efficiency appeared to be greater in the treatment using the in vitro prepared dsRNA especially at a high dose (400 ng per larva) (Fig. 3A). The insecticidal activity was also greater in the treatment using dsRNA prepared by in vitro transcription in most dose treatments (Fig. 3B).

(A)



(B)

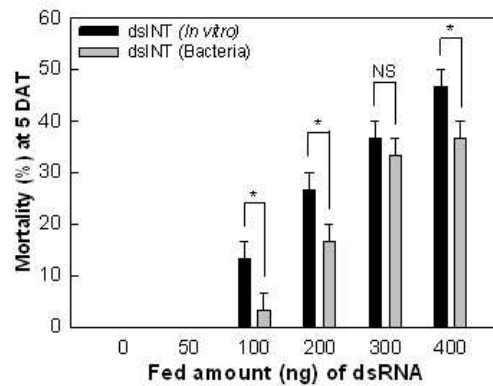


Fig. 3. Comparison of two types of dsRNAs prepared by in vitro transcription or by the recombinant bacteria in RNA interference efficacy. dsRNA of in vitro transcription was orally fed. In dsRNA produced by the bacteria, the recombinant bacteria were orally applied. The number of the bacteria was determined according to the amount of dsRNA produced in the bacteria based on Fig. 1B. (A) Suppression of target gene ('SeINT') expression levels. At 5 days after treatment ('DAT'), total RNA was extracted and assessed in the amount of SeINT transcripts. (B) Toxic effects of in vitro dsRNA and bacterial dsRNA on young larvae of *S. exigua*. Mortality was measured at 5 DAT. Different letters above standard deviation bars indicated significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test). 'NS' represents not significant, but '*' indicates significant differences among means at Type I error = 0.05.

Pretreatment effect of the dsRNA-expressing bacteria on the insecticidal activity. The lower efficiency of the transformed bacteria expressing dsRNA might be caused by a physical hindrance of the bacterial cell wall, which prevented the release of dsRNA into insect gut lumen. To facilitate the release of dsRNA from the bacteria, the bacteria were treated with heat or sonication (Fig. 4A). Heat treatment killed all bacteria, while the sonication gave some significant damage on the bacteria as seen in the reduced number of the bacterial colonies. All transformed bacterial treatments reduced the SeINT expression level (Fig. 4B). Between these two pretreatments, sonication significantly enhanced the insecticidal activity of the dsINT-expressing *E. coli* (Fig. 4C). Heat-killed bacteria did not differ with the live bacteria in their insecticidal activities.

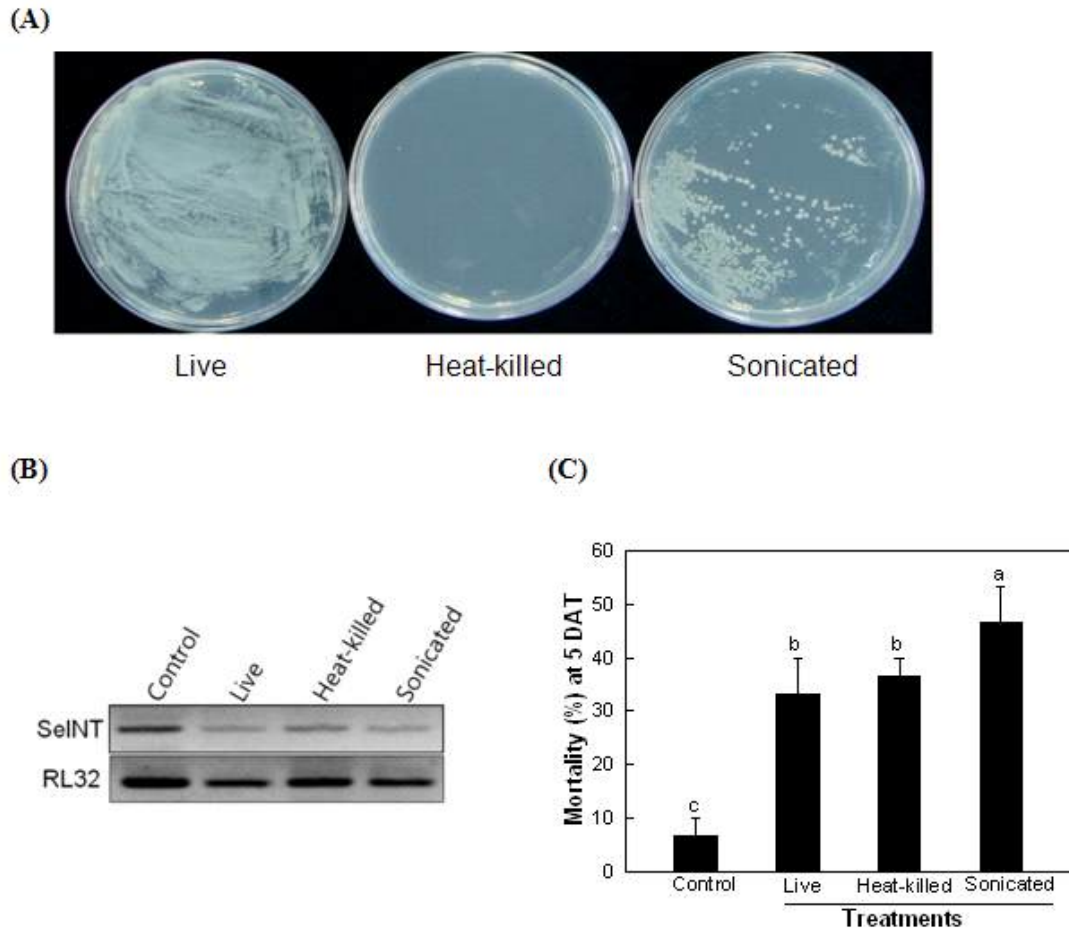


Fig. 4. Pretreatment effect of dsINT-expressing *E. coli* on its insecticidal activity. (A) Two different pretreatments of recombinant bacteria and their survival: heat-killing (100°C for 100 min) and sonication. After pretreatment, the bacterial suspension was plated on LB+AMP plate and cultured for 15 h at 37°C. (B) Suppression of SeINT transcript levels with increase of bacterial doses. The expression was assessed by RT-PCR. Expression of a ribosomal gene, RL32, was assessed to confirm the cDNA integrity. (C) Oral toxicity of the recombinant bacteria against young larvae of *S. exigua*. Each larva was fed 107 bacteria. Mortality was measured after 5 days of treatment ('DAT'). Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

Damage on the midgut epithelium by feeding dsINT-expressing bacteria. The larvae fed with dsINT-expressing bacteria exhibited a delayed development with significantly reduced body size (Fig. 5A). This suggested that dsINT might disrupt the integrity of the midgut epithelium to inhibit nutritional digestion and absorption. When the midgut was isolated from the larvae fed with the recombinant bacteria, it contained more number of dead cells (stained by trypan blue in Fig. 5B) compared to the midgut epithelium isolated from the control larvae. Cell-to-cell connections in the midgut epithelium were analyzed by microsectioning (Fig. 5C). When the guts were cross-sectioned, the midgut size was much different, in which the midgut isolated from the recombinant bacteria-treated larvae appeared to be about 10 times smaller in diameter than the midgut of the control larvae. Furthermore, the midgut epithelium cells were loosely connected in the transformed bacterial treatment, while the midgut cells appeared to be compactly joined in the control.

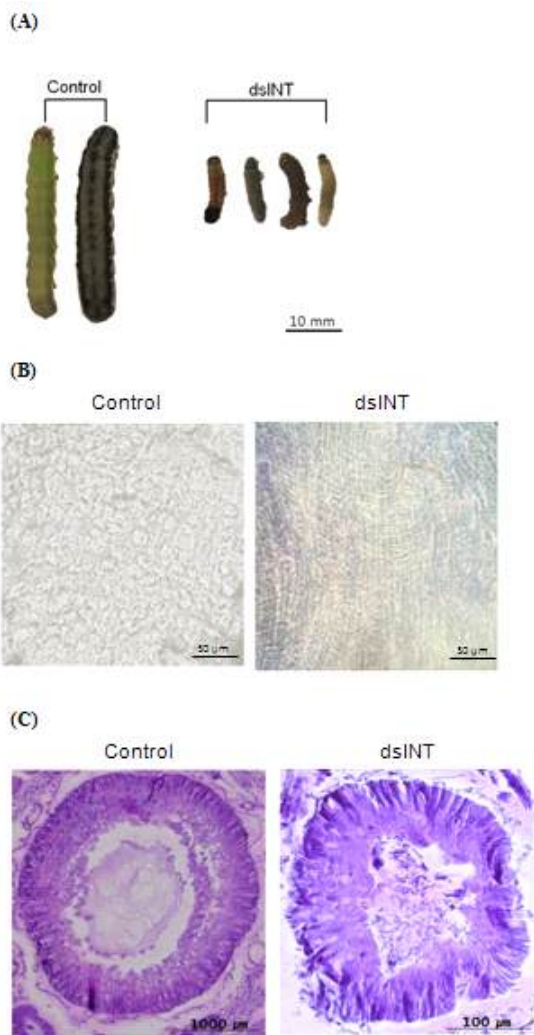
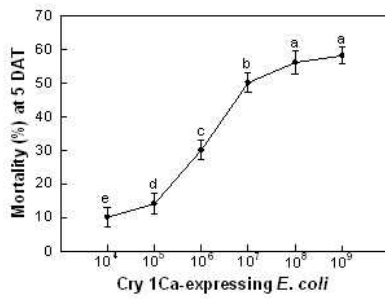


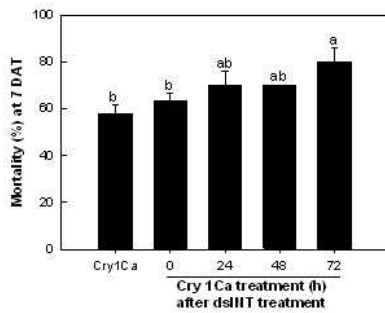
Fig. 5. Effect of dsINT-expressing *E. coli* on development of *S. exigua* and on the midgut epithelium. (A) Effect of the recombinant bacteria on larval development. Control used the bacteria transformed with empty vector. Each larva was fed 107 cells and incubated at 25°C. The pictures were taken at 5 days after treatment. (B) Cytotoxic effect of dsINT expressing bacteria on midgut epithelium. The tissues were stained with 0.1% trypan blue. Stained cells indicate “dead”. (C) Disruption of midgut epithelium in cell-to-cell contacts by oral treatment of dsINT-expressing *E. coli*.

Enhancement of Bt toxin efficacy by dsINT-expressing *E. coli* against *S. exigua*. Despite the sonication pretreatment, the dsINT-expressing *E. coli* gave less than 50% mortality against *S. exigua* larvae. To increase the larval mortality, the dsRNA treatment was coupled with Bt toxin treatment (Fig. 6). Expression of Cry1Ca toxin highly efficient to *S. exigua* [28] was induced in a recombinant *E. coli* and the toxin protein was confirmed from the protein extract of the recombinant bacteria (Fig. S1). *E. coli* expressing Cry1Ca gave a maximal 58% mortality at 108 cells/larva (Fig. 6A). When the dsINT-expressing bacteria were treated with the Cry1Ca-expressing bacteria, the insecticidal efficacy of the Bt toxin was significantly enhanced (Fig. 6B). The enhanced efficacy of the Cry1Ca-expressing bacteria was dependent on the preincubation time after the dsINT-expressing bacterial treatment. The significant enhanced efficacy was observed at 72 h preincubation after the dsINT-expressing bacterial treatment compared to control treatment. However, the enhanced efficacy was not significantly different among pretreatment periods (24–72 h). The enhanced toxicity by the dsINT-expressing bacteria was also observed with a commercial Bt formulation treatment (Fig. 6C).

(A)



(B)



(C)

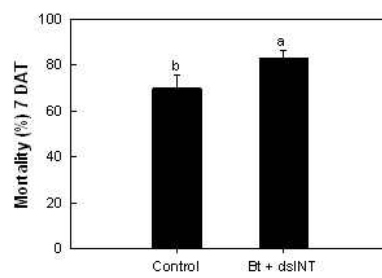


Fig. 6. Enhancement of dsINT-expressing *E. coli* on Bt Cry toxin toxicity against *S. exigua*. (A) Toxicity of Cry1Ca-expressing *E. coli* against young larvae. Each treatment used 10 larvae with three replications. Mortality was measured at 5 days after treatment ('DAT'). (B) Different susceptibilities of dsINT bacteria (10^7 cells per larva)-treated larvae to Cry1Ca-expressing bacteria according to the pretreatment period. Mortality was measured at 7 days after dsINT-bacterial treatment. (C) Effect of dsINT-expressing *E. coli* on toxicity of a commercial Bt (*B. thuringiensis* subsp. *aizawai*, Xentari[®], 1,000 ppm). 'Bt' treatment represents no dsINT treatment. 'Bt+dsINT' represents a mixture treatment of Bt treatment at 48 h after dsINT bacterial treatment. Mortality was measured at 7 days after dsINT-bacterial treatment. Each treatment used 10 larvae with three replications. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

제5장 비티플러스 살충 작용점 iPLA2 분자 동정

비티플러스의 작용기작은 곤충의 면역 증개 역할을 하는 아이코사노이드 생합성을 억제하여 비티에 대한 곤충의 면역 반응을 낮추어 살충력을 증가시키는 데 목적이 있다. 이러한 작용기작을 증명하기 위해서는 아이코사노이드 생합성 과정의 첫 단계인 PLA2의 유전자 확보가 우선시 된다. 이를 위해 파밤나방 iPLA₂ 효소의 특성과 곤충의 발육 및 면역에 관한 기능을 본 연구에서 분석했다. 이 목적을 위해 파밤나방 iPLA₂ 유전자의 클로닝과 iPLA₂에 특이적인 dsRNA를 이용한 RNAi 기법을 이용한 발현조절 및 곤충세포주를 이용한 대상 유전자의 발현을 통해 분리된 단백질을 이용한 효소의 기능 분석이 실시되었다.

재료 및 방법

파밤나방 iPLA₂의 활성 측정. PLA2 활성 분석을 위해 파밤나방 5령 3일의 유충으로부터 지방체 (FB), 혈구세포 (HC), 중장 (MG), 말피기관 (MT), 침샘 (SG), 그리고 표피 (EPD) 조직이 분리되었다. 분리된 각 조직은 50mM Tris-HCl 완충액 (pH7.0)에서 균질화 되었으며, BSA를 이용한 Bradford 방법을 통해 단백질양이 측정되었다. PLA2 반응물은 1.5 μ L의 10% BSA, 1 μ L의 1 M CaCl₂ 그리고 1 μ L의 시약, 1 μ L의 파이렌이 표지된 기질, 100 μ g의 효소 추출물 (3 μ L)과 142.5 μ L의 Tris 완충액으로 이루어졌다. 그리고 형광분광광도계 (SpectraMAX M2, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용해 345 nm와 398 nm의 파장에서 분당 흡광도를 측정하였다. 효소활성 측정은 각 처리는 3반복으로 이루어졌다. 전체 PLA2 효소활성에서 특이적인 iPLA2 효소의 활성을 측정하기 위해 5mM의 ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA)와 1mM의 bromoenol lactone (BEL)를 이용하였다.

파밤나방의 iPLA2 (SeiPLA₂) 유전자의 in silico 분석. 파밤나방과 다른 종의 SeiPLA2-A의 유사도를 분석하기 위해 온라인의 Basic Local Alignment Search Tool program (BLASTX) http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)을 이용하였다. 또한 아미노산 서열을 이용한 단백질의 도메인 분석은 NCBI의 Conserved Domains program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)과 SMART program (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)을 이용하여 수행하였다. 또한 phylogenetic tree는 MEGA 6.0 프로그램의 maximum like hood 방법으로 이루어졌다.

파밤나방의 iPLA2 (SeiPLA₂) 유전자의 발현 패턴 분석. 파밤나방에서 in silico 분석을 통해 예측된 SeiPLA2-A의 발현을 확인하기 위해 다양한 발육시기 (알에서 성충시기)와 5령 유충을 대상으로 분리한 조직 (혈구세포, 지방체, 중장, 말피기관)별 발현패턴을 RT-PCR과 실시간 유전자 증폭기술을 이용하여 분석하였다. 또한, 104 cfu/ml의 농도로 대장균 (*Escherichia coli*)을 혈강내 접종하여 시간대별 (0, 1, 2, 6, 12시간)로 SeiPLA2-A의 발현패턴을 분석하였다. 분석을 위해 이용된 프라이머는 Forward primer (5'-TCCAACATTAGACGTGCTTACA-3')와 Reverse primer (5'-GTACATCTGAGCTTCCCACAG-3')로 구성되어 94°C에서 2분, 55°C에서 1분, 72°C에서 2분간 35

회 동안 증폭과정이 진행되었다.

파밤나방의 iPLA2 (SeiPLA₂) 유전자의 발현 패턴 분석. 곤충 Sf9 세포주를 통해 발현된 SeiPLA₂를 pyrene이 표지된 기질을 대상으로 효소활성을 측정하였다. 효소활성 측정은 위에서 기술한대로 345 nm와 398 nm의 파장에서 분당 흡광도를 측정하였으며, 각 처리는 3반복으로 이루어졌다. 전체 PLA₂ 효소활성에서 특이적인 iPLA₂ 효소의 활성을 측정하기 위해 5mM의 ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA)와 1mM의 bromoenol lactone (BEL)를 이용하였다. 또한, 이러한 SeiPLA₂ (0.5mg)를 대상으로 곤충의 장조직에서 분리된 인지질을 대상으로 arachidonic acid가 유리되는지를 GC 분석을 통해 조사하였다.

결 과

파밤나방의 iPLA2 (SeiPLA₂) 유전자의 in silico 분석. 파밤나방 iPLA₂ 유전자는 총 816개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 이들의 구조는 6개의 ankylin 도메인과 1개의 catalytic 도메인으로 되어있다 (그림 1).

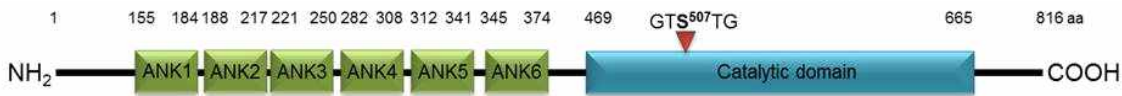


그림 1. 파밤나방 iPLA₂ 유전자의 도메인 구조

파밤나방 iPLA₂ 유전자를 다양한 곤충의 PLA₂ 유전자와 상동성을 MEGA6.0 프로그램을 이용하여 분석하였다. 그 결과 곤충들의 PLA₂ 유전자는 각각 cPLA₂, sPLA₂, 그리고 iPLA₂로 명확하게 분류가 되었고, 본 연구에서 시퀀싱된 SeiPLA₂는 iPLA₂ 그룹으로 분류가 되었다. 따라서 이러한 phylogenetic tree 분석을 통해 확보된 SeiPLA₂가 iPLA₂ 유전자와 유사하다는 것을 알 수 있었다 (그림 2). 이러한 iPLA₂ 유전자군에서는 대표적으로 *Bombyx mori*와 *Tribolium castanum*과 같은 곤충유래의 iPLA₂들이 포함되었다.

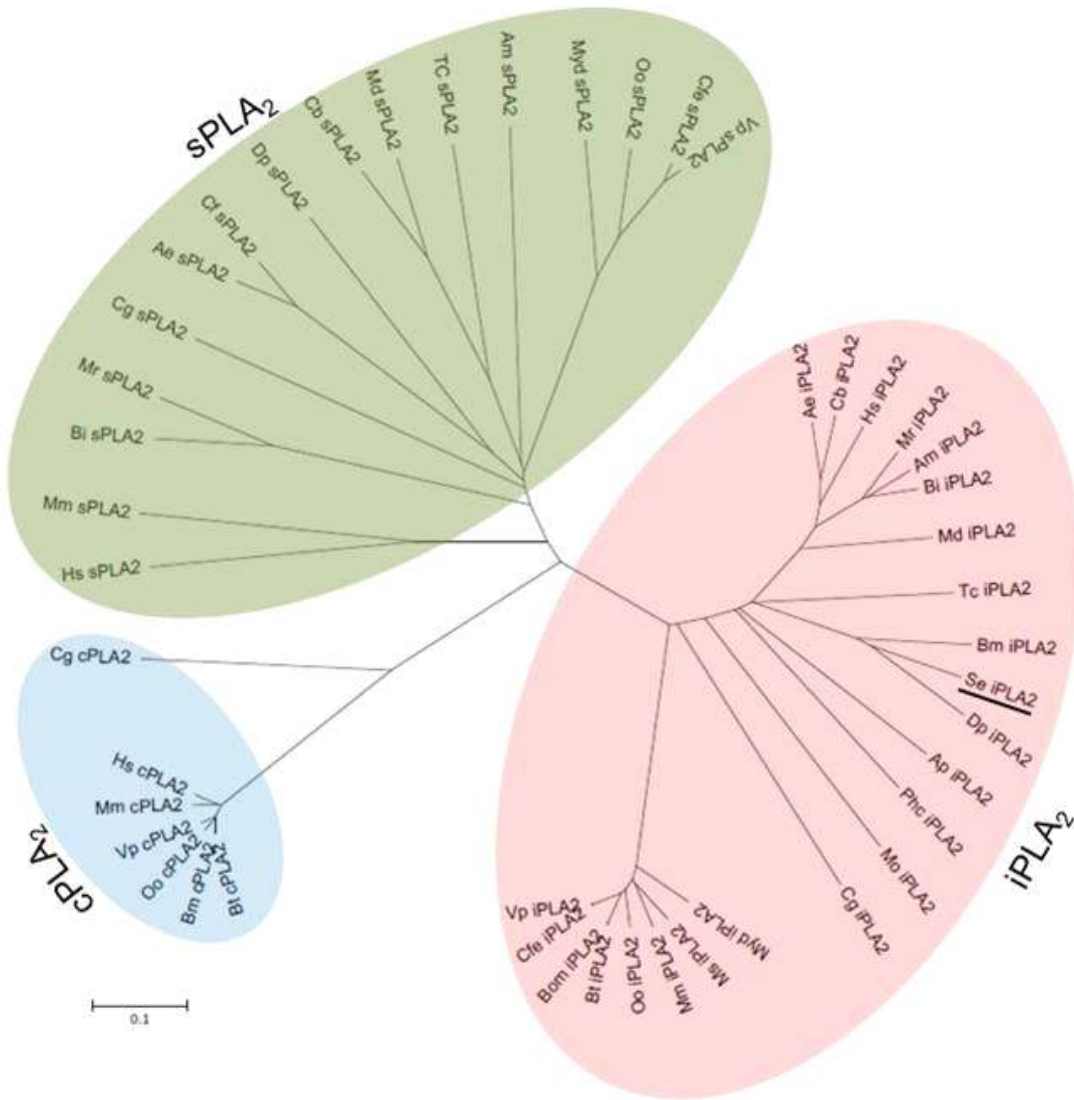


그림 2. 파밤나방 유래의 iPLA₂와 다른 생물종간의 PLA₂ 유전자의 상동성 비교를 통한 유전자 계통도

파밤나방 iPLA₂의 활성 측정. 파밤나방의 각 조직에서 추출된 iPLA₂ 효소샘플은 pyrene 표지가 된 기질을 대상으로 활성을 나타내었다 (그림 3). 특히, 칼슘에 의존해서 활성을 타나내는 sPLA₂와 cPLA₂의 활성을 억제하기 위해 5mM의 EGTA가 처리되었을 때 전체적으로 모든 조직에서 PLA₂의 활성이 낮게 나타나는 것을 확인하였다. 또한 iPLA₂에 특이적인 1mM의 BEL을 처리하였을 때에도 PLA₂의 활성억제 요소를 처리하지 않은 무처리와 비교하여 효소활성이 감소하는 것을 확인하여, iPLA₂의 활성이 BEL에 의해 조절되며 파밤나방의 각 조직추출물에서 iPLA₂가 존재하는 것을 확인하였다. 전체 PLA₂ 활성은 중장에서 가장 높게 나타났으며, 침샘과 표피조직에서 가장 낮게 나타나는 것으로 본 연구결과 확인되었다.

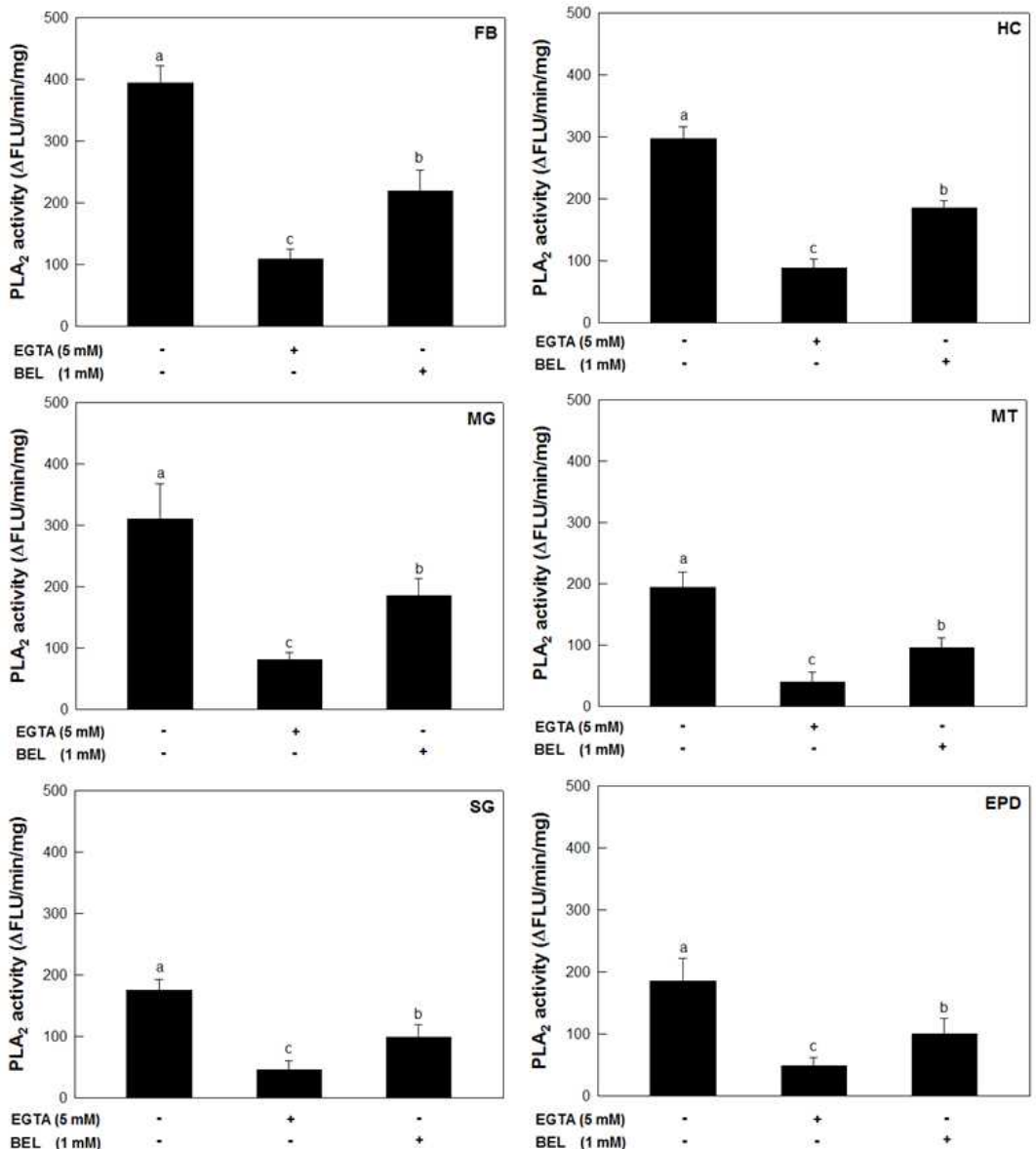


그림 3. 파밤나방 5령 유충에서 분리된 조직별 전체 PLA₂ 효소의 활성화와 iPLA₂의 특이적 효소활성의 측정

파밤나방의 iPLA₂ (SeiPLA₂) 유전자의 발현 패턴 분석. 파밤나방의 발육시기별로 SeiPLA₂ 유전자의 발현을 조사하였을 때 알에서부터 성충까지 SeiPLA₂의 발현이 확인되었다. 그러나 알의 경우 다른 발육시기와 비교하여 다소 발현율이 낮은 것으로 조사되었다 (그림 4). 조직별로 SeiPLA₂ 유전자의 발현을 조사하였을 때에도 모든 조직에서 SeiPLA₂ 유전자의 발현이 균일하게 조사되었다 (그림 5).

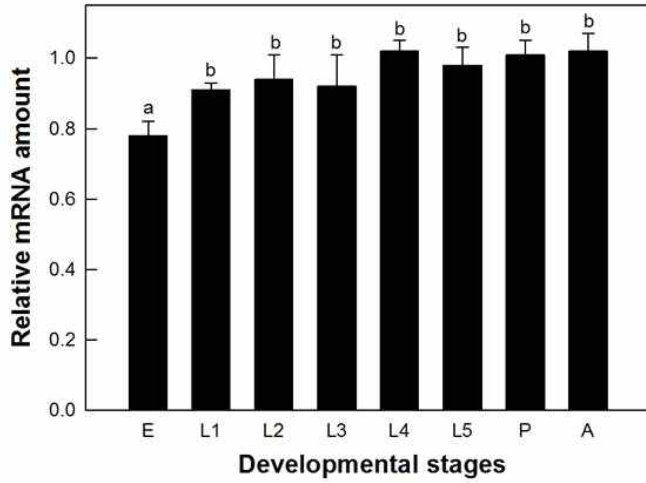
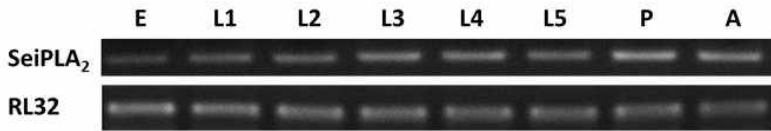


그림 4. 파밤나방의 발육시기별 SeiPLA2 유전자의 발현패턴 분석

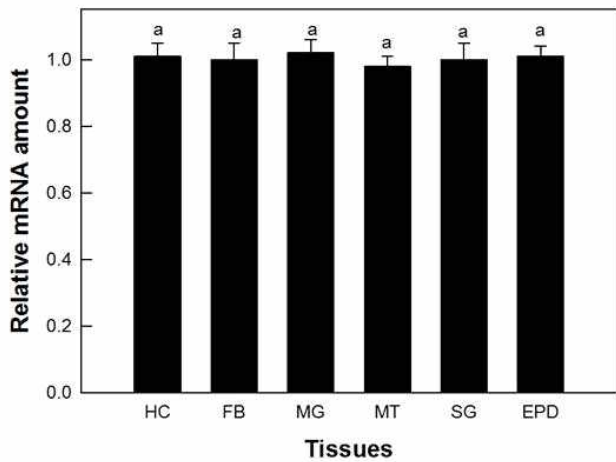
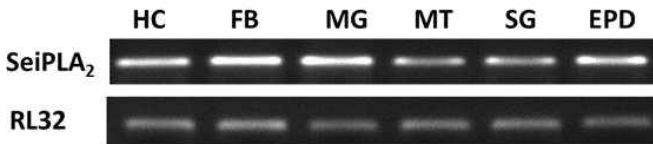


그림 5. 파밤나방의 조직별 SeiPLA2 유전자의 발현패턴 분석

파밤나방의 체내에 대장균을 처리하여 세포성 및 체액성 면역반응을 유도하였을 때 세균 접종 후 2 시간부터 SeiPLA2 유전자의 발현이 높아지기 시작하여 6시간에 가장 높은 발현을 보였으며, 세균 접종 후 12시간에서는 다소 감소하였다 (그림 6). 세균접종에 따른 시간대별 SeiPLA2의 유전자 발현은 통계적으로 유의한 것으로 조사되었다.

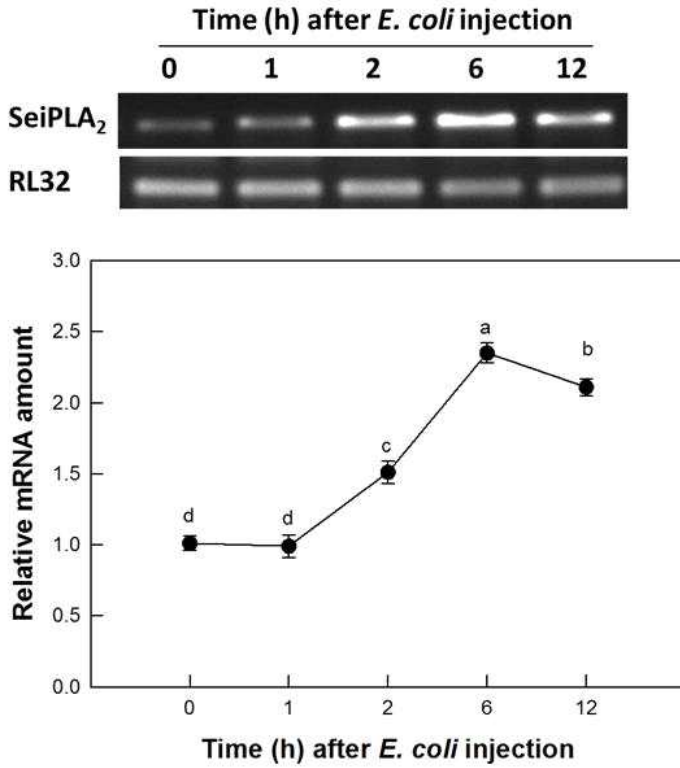


그림 6. 대장균 접종 후 시간대별 파밤나방의 SeiPLA₂ 유전자의 발현패턴 변화

파밤나방의 iPLA₂ (SeiPLA₂) 유전자의 발현 패턴 분석. 곤충 Sf9세포주에서 발현된 SeiPLA₂는 세포질에서 발현되었다 (그림 7). 이렇게 발현된 SeiPLA₂에 대한 효소활성을 pyrene이 표지된 기질을 통해서 측정하였다 (그림 8).

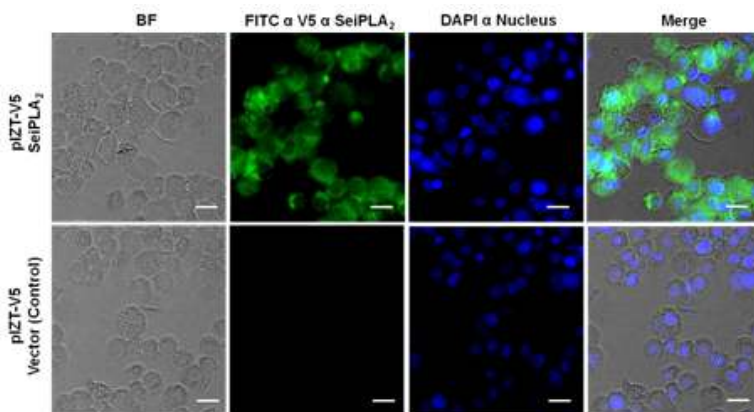


그림 7. 곤충 Sf9세포주에서 발현된 SeiPLA₂

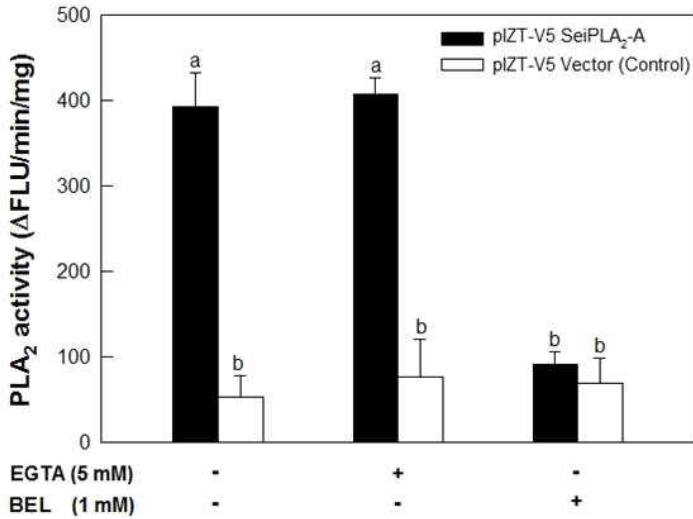


그림 8. 곤충 Sf9세포주에서 발현된 SeiPLA2의 효소 활성

그 결과 5 mM의 EGTA처리는 SeiPLA2 효소의 활성에 영향을 주지 않았다. 그러나 1mM의 BEL이 처리되었을때는 이들의 활성이 감소하여 iPLA2 효소의 특성과 유사함을 확인할 수 있었다. 지방산 분석을 통한 Sf9 세포주에서 분리된 SeiPLA2에 대한 파방나방의 인지질에 대한 가수분해를 통해 arachidonic acid가 유리되는 것을 확인할 수 있었다 (표 1).

표 1. 파방나방 증장과 지방체에서 유래 인지질에 대한 SeiPLA2의 효소 활성

Sample	Compound	R.t	Area %
GUT+ FB control	unknown	34.47	7.33±0.01 ^a
	unknown	39.84	8.23±0.01
	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	42.30	14.42±0.03
	unknown	44.98	3.57±0.00
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	46.69	15.19±0.00
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	47.96	13.37±0.00
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	49.87	27.64±0.01
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	52.06	10.27±0.00
GUT+ FB iPLA2	unknown	39.84	2.33±0.00
	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	42.29	3.58±0.00
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	46.69	4.15±0.00
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	47.69	3.15±0.01
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	49.87	7.09±0.00
	Eicosanoic acid	50.75	7.01±0.01
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	52.06	2.68±0.00

제6장 비티 Cry 독소 단백질 변형을 통한 살충력 제고 기술

연구요약

파밤나방은 비티 Cry 독소단백질의 종류에 따라 차등적 감수성을 나타냈다. 특별히 Cry1Ca에 대해서는 높은 감수성을 보이지만, Cry1Ac에 대해서는 낮은 감수성을 나타냈다. 이러한 원인이 이 독소단백질의 기능적 수용체인 캐드헤린과 이들 독소단백질의 차등적 결합에 의해 기인되는 것으로 기존 연구가 보고하고 있다. 그러나 일반적으로 비티 Cry 독소단백질은 캐드헤린 이외에 다른 수용체와도 결합하기에 이러한 연속적 Cry 독소단백질의 결합 가운데 캐드헤린과의 결합이 갖는 중요성이 독소단백질의 도메인 I에 위치한 $\alpha 1$ 모티프의 제거에 따른 독소단백질 활성화에 기인된다는 것을 밝히기 위해 이 영역을 제거한 재조합 Cry 독소단백질을 이용하여 이러한 가설을 증명하기 위해 본 연구가 수행되었다. 이를 수행하기 위해 Cry1Ac와 Cry1Ca의 원형 단백질과 $\alpha 1$ 모티프가 제거된 Cry1AcMod와 Cry1CaMod를 각각 준비하였다. 파밤나방 중장에 대한 결합력은 Cry1Ca가 Cry1Ac보다 높았다. 그러나 cadherin을 RNA interference로 발현 억제를 이루면 이러한 차등적 결합력이 낮아졌다. 그러나 Cry1AcMod는 Cry1Ac에 비해 월등히 높은 중장막 결합력을 나타내면서 살충력이 증가하였다. 반면에 Cry1CaMod는 Cry1Ca에 비해 중장막 결합력과 살충력에서 차이를 나타내지 못하였다. Cry 독소단백질과 결합하는 캐드헤린 부위(CR10-11)를 재조합단백질로 만들어 이들 Cry 단백질과 결합력을 비교한 결과 Cry1Ca는 Cry1Ac에 비해 월등히 높은 결합력을 보였다. 흥미롭게도 Cry1AcMod는 Cry1Ca와 유사한 결합력을 나타냈다. 이러한 결과는 Cry 독소 단백질의 활성화를 위해서는 캐드헤린이 도메인 I의 $\alpha 1$ 모티프를 제거하는 가설을 뒷받침하며, Cry1Ac의 낮은 살충력도 캐드헤린과의 낮은 결합력에서 기인되는 것을 알 수 있다. 여기에 Cry1AcMod는 Cry1Ac에 비해 월등히 높은 살충력과 중장막 결합력을 보이지만 Cry1Ca 보다 낮은 살충력은 비티 독소단백질과 결합하는 다른 수용체도 이들 독소단백질의 차등적 살충력에 영향을 주는 것으로 나타났다.

재료 및 방법

Insect rearing. The beet armyworm, *S. exigua*, larvae were collected from a field population infesting welsh onion in Andong, Korea. Larvae were reared on artificial diet (Goh et al., 1990) and adults were fed with 10% sucrose at $25 \pm 3^\circ\text{C}$ with $70 \pm 5\%$ RH and a photoperiod of 16L:8D.

Cry toxins. *B. thuringiensis* Cry toxins, Cry1Ac (WT or Mod) and Cry1Ca (WT or Mod), provided by Prof. Salva Herrero (Department of Genetics, Universitat de València, Spain). Lyophilized protoxins form of Cry toxins were used for bioassays. Cry1 toxins were solubilized in solubilization buffer (0.1 M Na_2CO_3 , 0.01 M EDTA, 0.17 M NaCl, pH 10.5) at 37°C for 3 h. Then soluble protoxin was separated from the insoluble fraction by centrifugation. Concentrations of Cry toxins were measured by Bradford method using a commercial reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Korea Seoul, Korea), as standard. The Cry proteins were stored in -80°C until being used for bioassay.

BBMV preparation. Brush border membrane vesicle (BBMV) from *S. exigua* third instar larvae was prepared by the protocol of MacIntosh et al. (1994), suspended in phosphate buffer saline (pH7.0) (PBS), and quantified by a method described above. Specific activity of APN using leucine-p-nitroanilide (Sigma-Aldrich Korea) as the substrate was used as a marker for brush

border enzyme enrichment in the BBMV preparations from dsRNA to- or dsCON-treated insect gut. APN activities in the final BBMV preparation from two treatments were both enriched 5-6 fold when compared to initial midgut homogenates.

Expression and purification of CR10-11. The location of CR10-11 domains in the *S. exigua* (Park and Kim, 2013) cadherin-like protein (GenBank Accession No. KC907716) was predicted using the ISREC ProfileScan server (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>). A DNA fragment encoding amino acids 1,461 to 1,739 (corresponding to the SeCad1 CR10-11 sequence, the three most C-terminal repeats) of the *S. exigua*. The synthetic CR8-10 peptide of 278 amino acid residues has an initiation methionine, a C-terminal six-histidine tag, and a molecular size of 30,913 Da. The synthetic gene was inserted between the NdeI and XhoI restriction enzyme sites of an expression vector, pGEX-4T-3 (Sigma-Aldrich, Seoul, Korea). The coding sequence and clone orientation were confirmed by sequencing (Macrogen, Daejeon, Korea). The pGEX construct was transformed into *E. coli* strain Rosetta-gamiTM 2 (Novagen, Madison, WI), and positive clones were selected on LB plates containing kanamycin. SeCad1 CR10-11 proteins were over expressed in *E. coli* as inclusion bodies. The expression and purification protocol for the truncated cadherin fragment was as described in a previous paper (Park et al., 2009). The inclusion body form was prepared as a suspension in sterile deionized water. The total protein was measured as described above.

Bt toxicity assay. *S. exigua* 3rd instar larvae were used in bioassays with Cry1Ac (WT or Mod) and Cry1Ca (WT or Mod) proteins. For the concentration response bioassays, the concentrations tested for Cry1Ac were 0, 1, 2, 4, 8, 10, 15, and 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, while for Cry1Ca, the concentrations tested were 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, and 1.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Cry1 toxins were serially diluted with sterile deionized water and then overlaid on the piece of cabbage leaf and air-dried for 20 min. Each bioassay was conducted with 10 larvae per replicate and three replicates per concentration. Mortality was scored at 6 days after-treatment (DAT). For dsRNA bioassays, second instar larvae were treated with dsRNA specific to SeCad1 with feeding method as described above. Then, larvae were exposed to 0.8 μg of Cry1Ac (WT or Mod) or 4 μg of Cry1Ca (WT or Mod) protoxins with cadherin proteins for 6 days using same method as before. For the synergistic effect on Cry1 toxins against SeCad1 CR10-11 proteins were added to Cry1 toxins using a 1:0, 1:1, or 1:10 (Cry1:SeCad1 CR10-11) molar ratio. For control, dsRNA specific to a viral gene, CpBV-ORF302, was prepared and fed as described above (Park and Kim, 2010) and did not affect to mortality (data not shown). Each treatment was replicated three times with 10 larvae per replicate.

RNA interference of SeCad1. Template cDNA was amplified with the specific primers (Table 1) including T7 RNA polymerase promoter sequence. Each PCR products was used to prepare dsRNAs using the MEGA Script RNAi kit according to the manufacturer's instruction (Ambion, Austin, TX, USA). The RNAs were synthesized bidirectionally by adding T7 RNA polymerase to the PCR product at 37°C for 4 h and then incubated at 70°C for 5 min to terminate the reaction. For RNAi, the prepared of dsRNA (150 ng) was mixed with Metafectene PRO transfection reagent (Biontix, Plannegg, Germany) in 1:1 volume ratio and incubated for 20 min at 25°C. Dried cabbage (1 × 1 cm) was used for dsRNA feeding assay to 3rd instar larvae as carrier by applying 4 μL of the dsRNA (100 ng) solution on the cabbage fragment. Starved larvae for 6 h were allowed to feed the cabbage treated with dsRNA for 4 h at 25°C. After then, fresh artificial diet was supplied to the larvae to continue development. Knockdown of SeCad1 gene expression was evaluated by RT-PCR at selected periods up to 72 h post injection or feeding. Viral gene, CpBV-ORF302, was used as a

negative RNAi control (Park and Kim, 2010).

RNA extraction and cDNA preparation. To determine expression level of SeCad1 by RNAi, total RNAs were extracted from whole body of the third instar larvae with Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's instructions. One micrograms of RNA from total RNA extract was incubated at 70°C for 3 min and then used for constructing cDNA using an RT-mix kit (Intron, Seoul, Korea).

qPCR. The qRT-PCR was performed on Applied Biosystems 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using SYBR® Green Realtime PCR master mix (Toyobo, Osaka, Japan) according to the manufacturer's instruction with the gene-specific primers. Template cDNAs were constructed as described above. After a hot start at 94°C for 10 min, qRT-PCR was performed with 40 cycles of an array of reactions of 1 min at 94°C, 30 sec at 50°C, and 40 sec at 72°C. Housekeeping gene, RL32 (a ribosomal gene), was used as a control with primers. Each cycle was scanned to quantify the PCR products. Each treatment was independently replicated three times. Quantitative analysis of SeCad1 transcript levels was performed using the comparative CT ($\Delta\Delta CT$) method (Livak and Schmittgen, 2001).

Binding assay of Cry toxin to midgut epithelium using ultra-structure analysis. Midgut was dissected from third instar larvae of *S. exigua* and fixed with 4% formalin solution. The samples were processed through a series of dehydration steps, embedded in paraffin (Merck, Dramstadt, Germany), and longitudinal sectioned at 7 μ m thick by microtome (Nippon Optical Works Co., LTD, Tokyo, Japan). For immunohistochemical analysis, the tissue slides were deparaffinized and an antigen retrieval step was performed (the slides were dipped in 10 mM sodium citrate for 20 min at 95°C). The sample was incubated with rabbit primary polyclonal antibody (CR10-11, Cry1Ac, or Cry1Ca) and then with goat anti-rabbit IgG conjugated to alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich, Seoul, Korea) for 1 h after blocking with 5% BSA in washing buffer for 1 h. To determine binding affinity between Cry1 toxin and midgut epithelium, midgut samples were prepared at 48 h after RNAi and paraffin embedded. One micro gram of Cry1 toxin was incubated with slide sample in PBS for overnight at room temperature after an antigen retrieval step, washed by PBS, and reacted with specific antibody as described above.

Binding assay of Cry toxins to BBMVs. To determine the binding affinity of trypsinized Cry1 toxin to BBMVs from *S. exigua* after RNAi against SeCad1 (dsCad) or control (dsCON), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed as described elsewhere (Park et al., 2009). Activated Cry1 toxins were biotinylated using a 50-fold molar excess of sulfo-NHS (N-hydroxysuccinimide)-photocleavable biotin (Pierce, Rockford, IL, USA) according to the manufacturer's manual. The final reaction was dialyzed against 200 mM NaCl, 20 mM Na₂CO₃ (pH 8.0) and stored in aliquots at 4°C until needed for the binding assays. The microtiter plates were coated with coated with BBMVs (50 μ g/well) for overnight, then biotin labeled toxins (0.1nM to 300nM) were incubated with or without a 1,000-fold molar excess of unlabeled Cry1 toxin. After washing, the plate was incubated with horse radish peroxidase-conjugated streptavidin (Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA), then incubated with HRP chromogenic substrate (1-Step Ultra TMB-ELISA, Thermo Fisher Scientific, Inc., Inc, Rockford, IL, USA) to quantify the bound peptides. Color development was stopped by adding 2M sulfuric acid, and absorbance was measured at 405 nm using a microplate reader (Biolog MicroStation System, Hayward, CA, USA). The binding data of two replicates were analyzed using Sigma Plot software Version 11.0 (SPSS

Science, Chicago, IL, USA) to determine the best site model fit.

Binding assay of Cry toxins to CR10-11. To determine the binding affinity between Cry1 toxin and SeCad1, ELISA was performed as described above. Purified CR10-11 proteins were biotinylated using a 50-fold molar excess of sulfo-NHS-photocleavable biotin. The microtiter plates were coated with activated Cry1 toxin (1.0 $\mu\text{g}/\text{well}$) for overnight, then biotin labeled CR10-11 protein (0.1nM to 160 nM) were incubated with or without a 1,000-fold molar excess of unlabeled CR10-11 to determine total binding. Nonspecific binding was determined by incubating the plates with increasing concentrations of biotinylated CR8-10 protein (0.1 nM to 160 nM) with a 1,000-fold molar excess of nonlabeled CR8-10 protein. After color development was stopped by adding 2M sulfuric acid, absorbance was measured at 405 nm.

Data analysis. All bioassays were performed in three independent replicates. The background mortality was corrected using Abbott's formula (Abbot, 1987). Means and variances of treatments were analyzed in one-way ANOVA by PROC GLM of SAS program (SAS Institute, 1989). The means were compared by least squared difference (LSD) test at Type I error = 0.05.

결과

Differential toxicities of two Cry toxins to *S. exigua*. In this study, wild type and modified Cry1 toxins showed 131-kDa of protoxin and 67-kDa of activated toxin size in 10% SDS-PAGE (Fig. 1A). The larvae fed with Cry1Ca toxin showed higher toxicity compared with the larvae fed with Cry1Ac toxin at 6 days after toxin treatment (Fig. 1B). In Cry1Ca toxin, there is no significant difference on larval mortality between wild type and modified toxin at same concentration. However, modified Cry1Ac toxin has a higher toxicity to larvae compared with wild type toxin from 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ to 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of concentration.

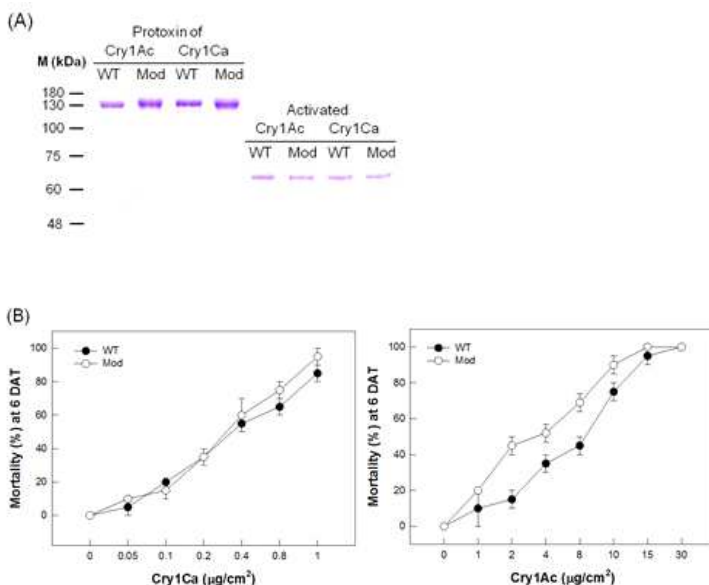


Fig. 1. Differential toxicities of two Cry toxins and change in their toxicities after N terminal cleavage (“activation”). (A) SDS-PAGE of Cry toxins (B) Bioassay of toxins.

RNA interference (RNAi) of SeCad1 in *S. exigua* midgut. Using a specific RNAi against SeCad1, its physiological functions in subsequent developments were assessed. The RNAi used a double-strand RNA specific to SeCad1 (dsSeCad1). When the dsSeCad1 was fed to the fifth instar larvae, SeCad1 expression level was significantly decreased at 48 h post-feeding (Fig. 2A). To test whether RNAi on SeCad1 altered the binding affinity of Cry1Ca toxin in the larval gut epithelium, we treated midgut sections, which were dissected at 48 h after dsSeCad1 or dsCON treated from fifth instar larvae, with polyclonal antibody of wild type Cry1Ca toxin (Fig. 2B). In wild type Cry1Ca toxin, dsSeCad1 treated midgut showed lower level of toxin binding than dsCON treated midgut. However, modified Cry1Ca toxin showed no difference on toxin binding rate between dsSeCad1 and dsCON.

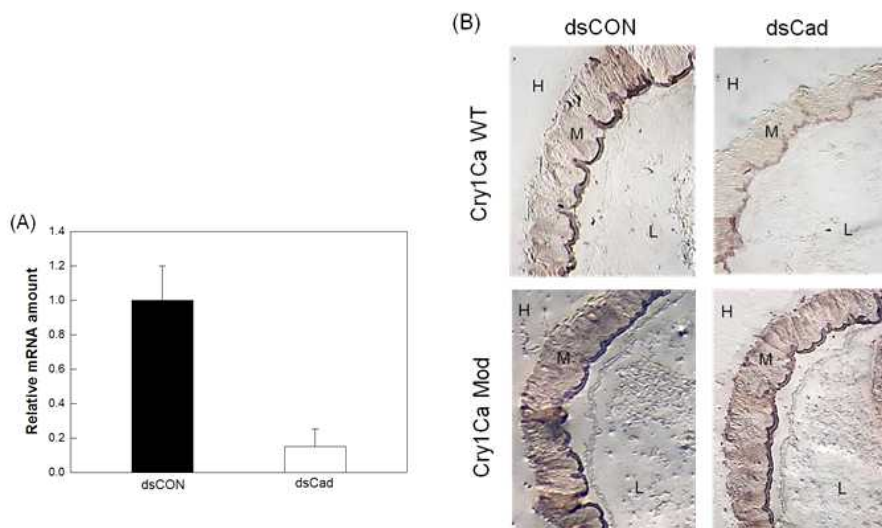


Fig. 2. RNA interference (RNAi) of SeCad1. (A) Suppression in transcript level assessed by qPCR (B) Suppression in Cry toxin binding to the midgut epithelium after RNAi.

Difference in binding affinity of different Cry toxins to BBMVs of *S. exigua*. After knockdown of SeCad1 expression by RNAi, Cry1Ca toxin showed significantly different toxicity to fourth instar larvae between wild type and modified toxins, meanwhile Cry1Ac toxin didn't show difference on toxicity (Fig. 3A). Modified Cry1Ca toxin kept maintaining the toxicity as 80% mortality at 6 days after toxin treatment, but wild type of Cry1Ca lost their toxicity up to 50%. Based on Cry toxicity assay after knockdown of SeCad1, Cry1Ca wild type and modified toxin were measured for binding affinity against BBMVs from *S. exigua* midgut which were treated with dsRNA specific to cadherin (dsCad) or ORF301 (dsCON). In Fig. 3B, biotin-labeled-Cry1Ca wild type had a different binding affinity to BBMVs-dsCad ($K_d = 36.3$ nM) and BBMVs-dsCON ($K_d = 73.18$ nM), meanwhile biotin-labeled-Cry1Ca modified toxin had a similar binding affinity to BBMVs-dsCad ($K_d = 31.87$ nM) and BBMVs-dsCON ($K_d = 30.89$ nM). Therefore, RNAi on SeCad1 results in a decrease of binding affinity of BBMVs to Cry1Ca wild type toxin.

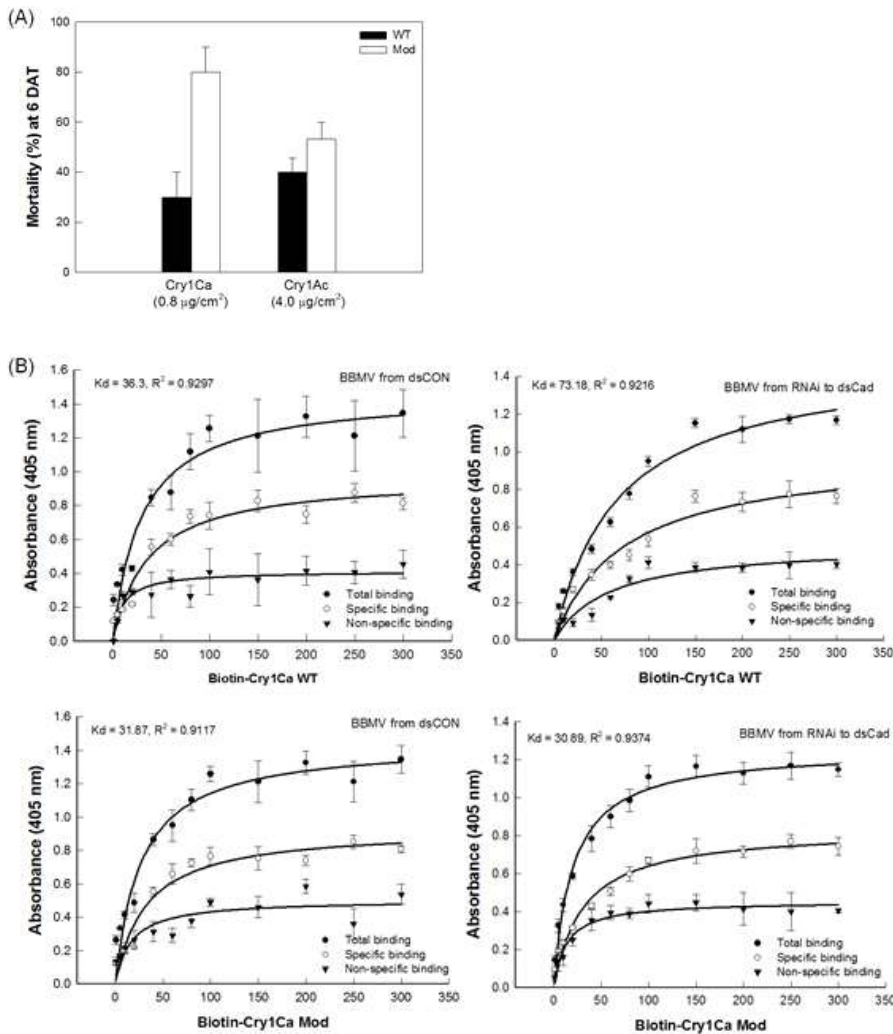


Fig. 3. Difference in binding affinity of different Cry toxins to BBMV of *S. exigua*. (A) Toxicity change of Cry toxins after SeCad1 RNAi (B) Change in their binding affinities to BBMV after SeCad1 RNAi.

Difference in synergistic toxicity of cadherin repeat (CR) addition to different Cry toxins against *S. exigua* under SeCad1 RNAi. The SeCad1 ORF encodes a predicted protein of 1739 amino acids with a calculated molecular mass of 196,317 Da and 4.45 pI value. Hydrophobic regions at the N-terminus and near the C-terminus correspond to a signal peptide (S) and a transmembrane domain (TM), respectively. The extracellular domain consists of eleven cadherin repeats (CR). In this study, the SeCad1 CR10-11 region of the *S. exigua* cadherin was overexpressed in *E. coli* and tested for the ability to bind Cry1 toxins and enhance toxicity to *S. exigua* larvae. The SeCad1 CR10-11 proteins from recombinant *E. coli* were composed of the expected 48-kDa protein (Fig. 4A). In Fig. 4B, the addition of SeCad1 CR10-11 proteins at a 1:1 and 1:10 mass ratio of Cry1 toxin significantly enhanced Cry1 toxicity against *S. exigua* larvae up to 2.6-fold, except of Cry1Ca modified toxin. According to synergistic effect of SeCad1 CR10-11, specific binding affinity of Cry1 toxins were measured with biotin labeled SeCad1 CR10-11. Cry1Ca wild type and modified toxin were measured binding affinity against BBMV from *S. exigua* midgut which were treated with

dsRNA specific to cadherin (dsCad) or ORF301 (dsCON). In fig. 4C, biotin labeled-SeCad1 CR10-11 had a similar binding affinity to Cry1Ca wild type ($K_d = 26.5$ nM) and Cry1Ca modified ($K_d = 20.5$ nM) toxin, meanwhile biotin labeled-SeCad1 CR10-11 had a different binding affinity to Cry1Ac wild type ($K_d = 57.0$ nM) and Cry1Ac modified ($K_d = 29.7$ nM) toxin.

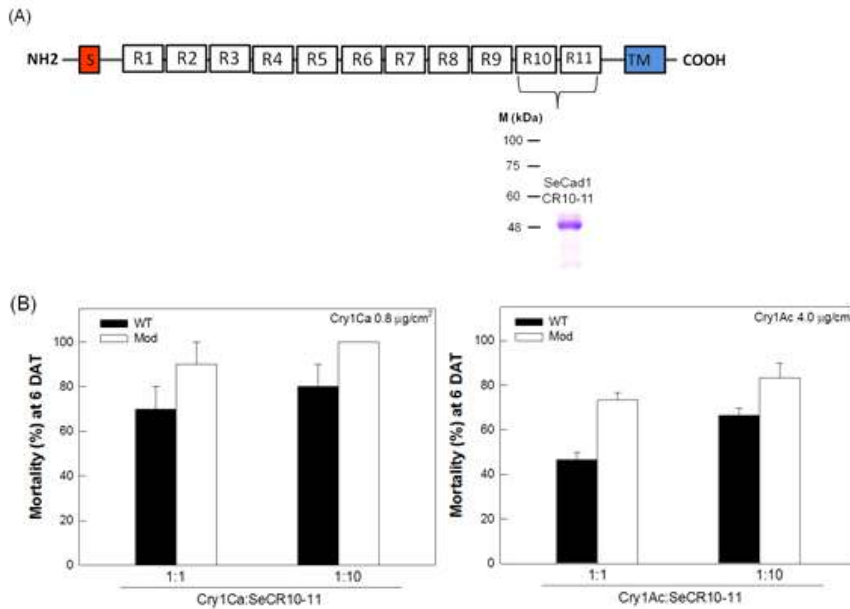


Fig. 4. Difference in synergistic toxicity of cadherin repeat (CR) addition to different Cry toxins against *S. exigua* under SeCad1 RNAi. (A) Expression and purification of SeCR10-11 (B) Toxicity change of Cry toxins after SeCad1 RNAi (C) Variation of their binding affinities to SeCR10-11.

제7장 비티 대체 살충유전자 기능성 탐색

비티 대체 ELP 살충유전자 기능성 탐색

폴리드나바이러스에서 유래된 CpBV-ELP1 유전자는 곤충 세포에 치사를 일으키는 것으로 보고되었다. 이 유전자를 이용하여 궁극적으로 비티 플러스를 개발하려는 목적으로 본 연구가 수행되었다. 기존의 연구 보고는 RNA interference 기술을 이용하여 이 유전자의 기능을 밝힌 것으로 본 연구에서는 이 단백질을 분리하여 살충효과를 나타내는 지를 검증하는 데 목적을 두었다. ELP 유전자를 벡클로바이러스 시스템을 이용하여 재조합 단백질을 형성시켰다. 이 단백질을 분리하여 살충효과를 분석한 결과 경피 및 경구 독성을 일으키면서 해충 방제 이용성을 나타냈다. 이 유전자를 담배에 형질전환시켜 GM 작물에 이용하려 하고 있다.

재료 및 방법

단백질분리. Baculovirus로 재조합 된 후 sf9 cell에 형질전환된 ELP1단백질은 농도 별 ammonium sulfate로 분리 되었다. 이 때 ammonium sulfate는 0-25, 25-50, 50-75, 75-100% 였으며, 분리된 단백질은 막으로 투석하여, 관 크로마토그래피에 이용되었다. 관 크로마토그래피는 G-100을 이용 하였으며, 1m 관에 G-100 슬러지를 채운후 0.01 tryton X를 포함한 PBS용액을 떨어뜨려 주었다. 한 fraction당 2 ml의 용액을 모았으며, 단백질 농도를 측정한 후 SDS-PAGE로 확인 하였다. 관 크로마토그래피로 얻은 용액은 또다시 이온교환 크로마토그래피를 이용하여 순수분리를 하였다. 이온교환 크로마토그래피는 DEAE를 이용하였으며, 10ml의 관 크로마토그래피 추출된 백질을 이용하였다.

살충효과. 파밤나방 5령충에 순수분리된 ELP1 단백질을 농도별로 각각 2 μ L씩 헤밀턴 마이크로 시린지를 이용하여 혈강에 주입하여 혈강독성을 확인했다. 같은 ELP1 단백질을 이용하여 3cm X 3cm로 자른 배추잎에 각 바이러스를 잎침지법을 이용하여 파밤나방 5령충에 섭식 실험을 하였다.

세포 독성. 파밤나방 5령충 3일차에 해당되는 곤충에 순수 분리된 ELP1단백질(1 μ g/1 μ L)을 2 μ L 주입한 후 24시간 25 $^{\circ}$ C에 처리하였다. 그 후 마리당 50-150 μ L의 혈림프를 얻어, hemocytometer에 주입 후 25 $^{\circ}$ C에서 40 분 동안 반응 시켜 혈구 활착을 유도하였다. 이후 총혈구수를 계산하였다. 이때 총혈구수는 2 ml에 존재하는 전체 혈구수로 표기하였다. 또한, ELP1 단백질에 대한 파밤나방 혈구세포 생존 능력을 알아보기 위해 혈림프를 5령충 3일차에 해당되는 파밤나방에서 마리당 50~150 μ L 씩 얻었으며, 얻은 혈림프중 50 μ L는 96well plate에 주입 후, ELP1을 농도별로 처리한 후 20분, 40분, 70분 동안 반응 시켜 혈구 활착을 유도한 후 MTT로 염색하여 혈구세포 생존 능력을 알아보았다. 같은 방법으로 파밤나방에서 추출한 혈림프 10 μ L를 슬라이드글라스에 올린 후, ELP1 1 μ L을 덮어씌웠다. 그 후 40분, 70분, 140분 동안 반응 시킨후, 0.5% Tryptophan blue 용액을 동일한 양으로 섞은 후 혈구세포를 관찰하였다.

항암 효과. 37 $^{\circ}$ C 이산화탄소 배양기에 배양된 대장암 세포(HC116, LOVO, SW480)와, 유방암 세포(MDA-MB 231, MCF-7)를 96well plate에 50 μ L씩 분주 한 후, 37 $^{\circ}$ C 이산화탄소 배양기에 24시간 배양한다. 배양된 세포위에 ELP1을 농도별로 50 μ L씩 분주 한 후, 37 $^{\circ}$ C 이산화탄소 배양기에 다시 24시간 배양한 후, MTT로 염색하여 암세포의 항암효과를 확인 하였다.

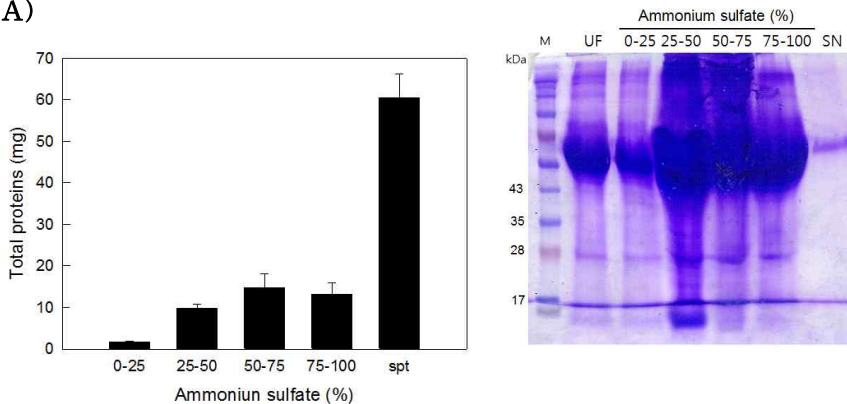
형질전환 식물체. Xba I 인식서열과, Nde I 인식서열이 부가된 프라이머로 증폭된 PCR산물을 pCR 2.1 클로닝 벡터에 subcloning하고 플라스미드를 분리하여 제한효소 Xba I 과 Nde I 으로 절단하였다. 절단된 영역은 식물체 발현용 운반체인 pRI201에 재조합 시키고 대장균이 형질전환 하였다. 대장균에 형질전환된 pRI201-ELP1을 추출하여 아그로박테리움 LBA4404 electro-cell 20 μ L에 운반체 1ng을 혼합하고, 1 mm cuvette에 주입하여, 1.25KV의 전기충격을 가한 후 SOC 배지를 첨가하여 30 $^{\circ}$ C, 200 rpm으로

진탕배양하고 50 μ l/ml kanamycine과 100 μ l/ml streptomycine이 함유된 LB 고체배지에 30 $^{\circ}$ C, 2 일간 배양한 후 ELP1 프라이머로 PCR을 수행하여 ELP1 유전자가 삽입된 균총을 선발하고 식물체 형질전환에 사용하였다. kanamycine과 streptomycine이 든 LB 액체배지에 형질전환된 pRI201-ELP1을 배양 한후 침전물을 수거하여 캘러스 유도 액체배지에 현탁 시켰다. 발아배지에서 성장한 담배 잎을 1cm 크기로 절단한 후 아그로박테리움 현탁액을 넣고 20 분간 진탕 접종한 후 캘러스 유도 고체배지에 치상하여 28 $^{\circ}$ C 암조건에서 2일간 배양하여 캘러스를 유도하였다. 유도된 캘러스는 다시 신초유도배지에 이식하고 2주간격으로 3번 계대 배양하여 신초신장이 양호한 개체들을 발근배지로 이식하여 4주동안 발근을 유도한 후, 원예용 배양토로 옮겨 담아 온실에서 생육 시켰다.

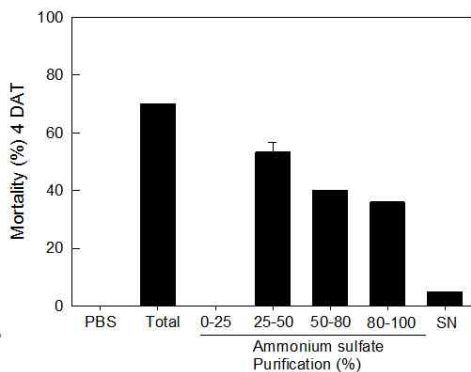
결 과

단백질 분리. 벡쿨로바이러스로 재조합된 ELP1을 Ammonium sulfate을 이용하여 서로 다른 농도로 추출하여 단백질을 분리하였다. 25-100% 농도에서 27kDa의 ELP1 단백질을 확인 하였다. 그 후 25-100%에서 추출된 단백질을 모아 관 크로마토그래피에 이용하였다. 관 크로마토그래피로 나온 31-40 번의 추출 용액을 모아 이온교환 크로마토그래피를 했으며, 이온교환 크로마토그래피에서 나온 28번29 번 추출 용액을 본 실험에 사용했다.

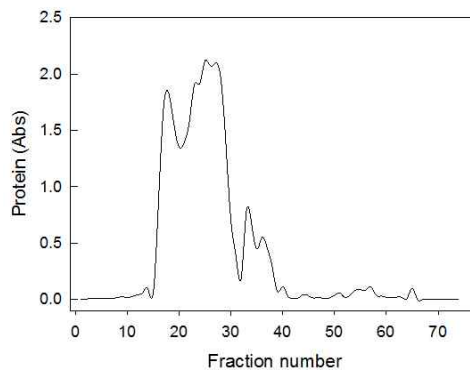
(A)



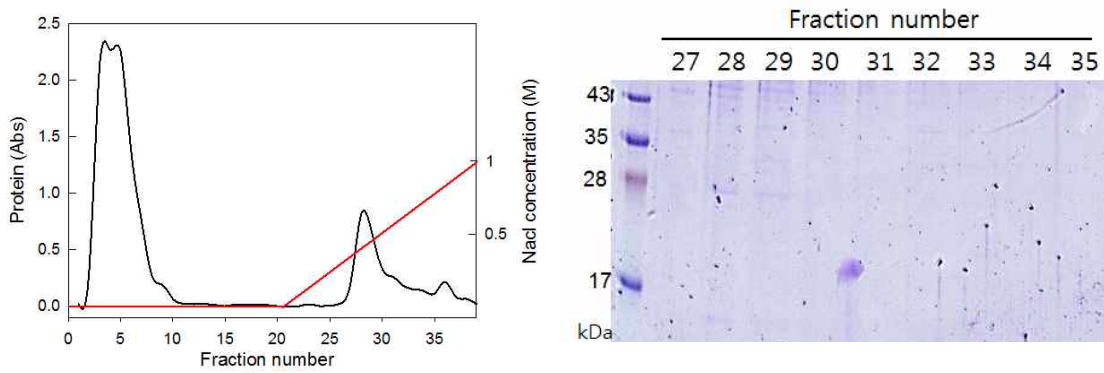
(B)



(C)



(D)



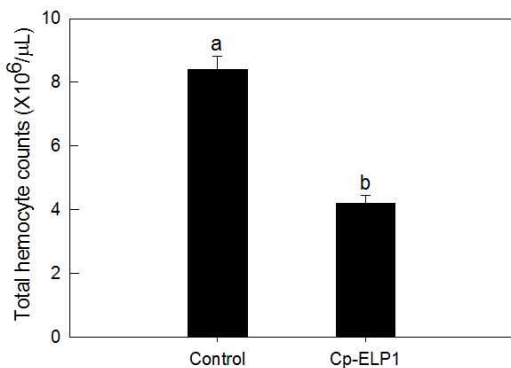
(E)

Purification steps	Volume (mL)	Protein ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Total protein (mg)
CB	100	3.24	324
AS	14	4.17	64.08
G100	20	0.98	19.6
DEAE	20	0.45	9

Fig. 1. Purification of a recombinant CpBV-ELP1 produced from Sf9 cells using a baculovirus expression system.

곤충 세포독성. 파밤나방의 혈구 밀도가 ELP1의 영향에 따라 변동이 일어나는 지를 분석하기 위해 5령 1일차를 대상으로 ELP1을 감염시킨 후 혈구밀도를 분석하였다(Fig. 2A). ELP1의 감염에 따라 파밤나방의 총 혈구수는 급격한 변화를 보였다. ELP1 감염에 따라 총 혈구수는 24시간 만에 거의 두 배에 이르는 감소를 보였다. 파밤나방 5령 3일차의 혈림프에 ELP1을 덮어씌워 처리한 결과, 세포의 생존 능력이 현저히 저하되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2B)

(A)



(B)

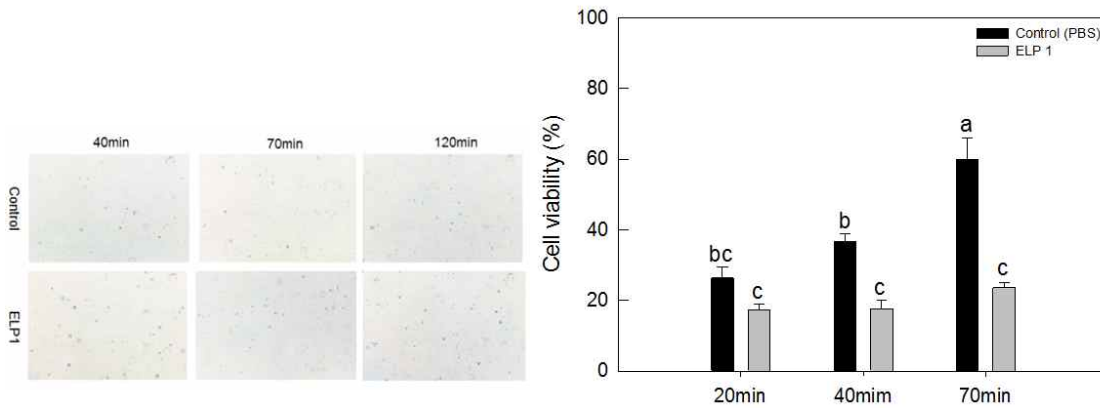
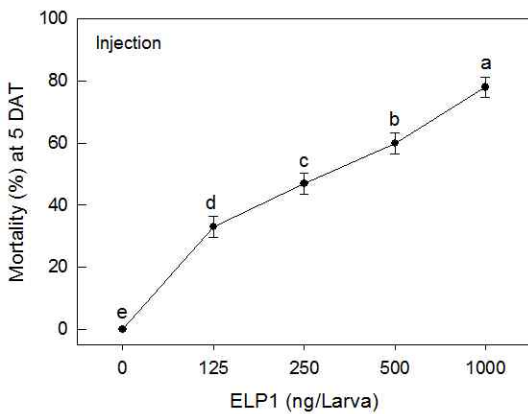


Fig. 2. Cytotoxicity of CpBV-ELP1 against hemocytes of *S. exigua*

살충효과. 순수 분리된 단백질은 100배 농축되어 사용 되었으며, 파밤나방 5령1일차를 대상으로 생물검정이 수행하여 통계적으로 유의한 살충효과를 확인 할 수 있었다(Fig. 3). 생물검정은 혈강 독성과 섭식 독성을 동시에 진행하였으며, ELP1이 혈강에 주입된 후 5일차에 약 80%에 가까운 살충효과를 나타내었으며 (Fig. 3A), ELP1 섭식 후 5일차 조사에서 약 50% 정도의 살충 효과를 나타내었다(Fig. 3B).

(A)



(B)

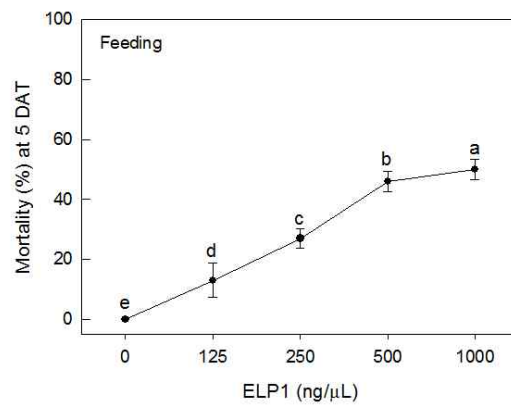


Fig. 3. Insecticidal effects of CpBV-ELP1 by hemocoelic injection or oral feeding against *S. exigua*

항암효과. ELP1의 감염이 파밤나방의 혈구에서 나타나는 밀도 변동이 다른 세포에서도 감염에 따라 밀도 변동이 나타나는 지를 분석하였다(Fig. 4). 이를 위해 대장암세포와 유방암세포를 각각 in vitro 상에서 길러 ELP1을 처리한 후 24 시간 후에 세포 생존 능력을 조사하였다. ELP1의 특히 대장균 HC116, LOVO에서 생존능력 저하를 나타냈다.

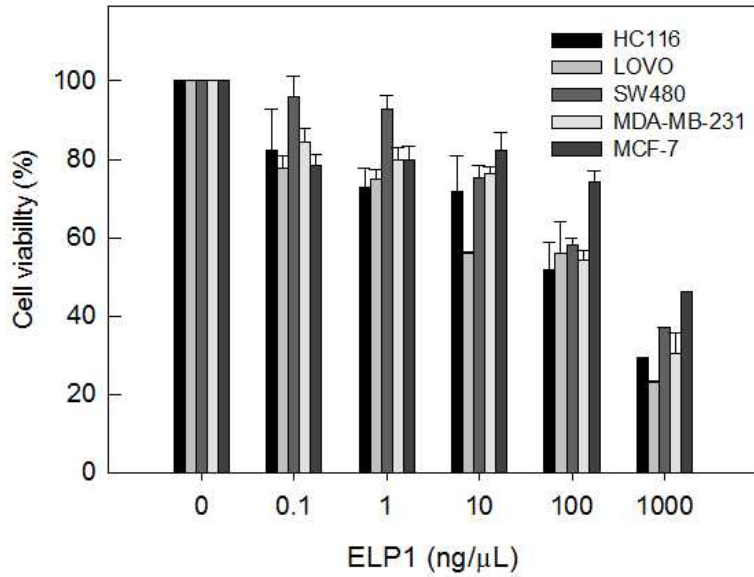


Fig. 5. Anticancer effect of CpBV-ELP1 against five cancer cell lines

GM 작물 개발. ELP1의 살충효과를 비티플러스 개발에 응용하기 이 단백질 유전자를 담배에 형질전환시켰다. 현재 형질전환된 T0 세대의 담배를 얻었다. 향후 이 작물의 살충효과를 분석하고, 궁극적으로 비티플러스의 개발에 이용된다.

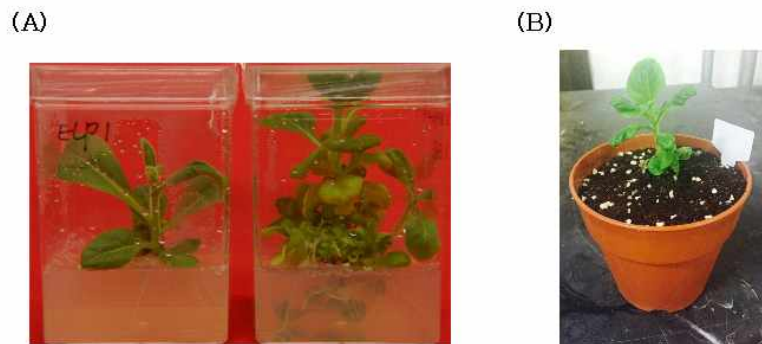


Fig. 6. Transgenic tobacco expressing CpBV-ELP1. (A) Callos formation (B) T0 plant on pot

ELP 살충유전자를 이용한 재조합 벡클로바이러스 제작

공생은 서로 다른 생명체들 사이에 여러 형태의 생활양상을 통칭하는 생명현상이다. 다양한 병원미생물이 기주 곤충의 생존을 위협하는 기생(parasitism)을 보이고 있는 반면에 일부 미생물은 기주 곤충의 부족한 영양원의 보충, 독성물질의 처리 및 타 생명체로부터 보호의 기능을 수행하면서 상리공생(mutualism)을 이루고 있다. 폴리드나바이러스(polydnavirus: PDV)는 숙주 및 기주를 가지고 각각 상리공생 및 기생의 생명현상을 보이고 있다.

PDV는 일부 맵시벌상과(Ichneumonoidea)의 벌목 곤충을 숙주로 생활하며, 이들 숙주의 벡터 역할의 도움을 받아 피기생체 나비목 유충 체내로 침입하게 된다(Webb and Strand, 2005). 이때 PDV는 자신의 유전자를 발현하여 기주 나비목 유충의 생리현상을 교란하며 숙주 기생봉의 생존을 도모하게 된다. PDV의 숙주 곤충은 맵시벌과(Ichneumonidae)와 고치벌과(Braconidae)를 포함하며, 이들에 공생하는 바이러스를 각각 Ichnovirus (IV) 그리고 Bracovirus (BV)의 두 속으로 분류하게 된다(Webb et al., 2000). 두 종류의 바이러스는 바이러스 입자의 모양에서도 차이를 보여 IV는 이중막의 외피 구조를 갖으나 BV는 단일막으로 구성되어 있으며, 서로 상이한 유전자 조성을 지니고 있어 이들이 독립적으로 기원하여 수렴 진화 과정을 통해 발달되어 온 것으로 추정하고 있다(Strand, 2010). BV의 경우 Nudivirus의 조상형을 기원으로 유래된 것으로 밝혀지고 있으나, IV의 경우는 아직 조상형 바이러스 기원을 찾지 못하고 있다(Bezier et al., 2009; Volkoff et al., 2010).

PDV의 계놈은 숙주 곤충의 염색체에 존재하는 프로바이러스 형태로서 곤충 체내 모든 세포에 존재하나, 바이러스 입자를 형성하는 복제과정은 암컷 난소소관 기부의 난소받침 조직에서만 일어나게 된다(Wyler and Lanzrein, 2003). 형성된 바이러스 입자는 산란관 내강에 자리하고 기생봉 숙주가 나비목 유충 기주에 기생할 때 기생봉 알과 함께 기주 혈강으로 옮겨지게 된다. 기주 혈강에 옮겨진 PDV 입자들은 기주 세포에 침입하고, 기주 유전자 발현 시스템을 이용하여 자신의 유전자들을 발현시키게 된다. PDV 유래 다양한 유전자 산물은 기주의 면역을 억제하고, 발육을 지연시켜 숙주 기생봉의 발육을 도모하게 된다(Kim et al., 2007).

프루텔고치벌(*Cotesia plutellae*)은 자신의 공생 PDV인 CpBV (*C. plutellae* bracovirus)를 가지고 기주인 배추좀나방(*Plutella xylostella*) 유충을 기생하게 된다(Bae and Kim, 2004). 기생된 배추좀나방 유충은 면역반응이 억제되고 발육이 지연되며, 이 과정 속에서 숙주 프루텔고치벌 알은 부화 및 유충 발육을 진행하여 형성된 노숙 유충이 기주의 몸 밖으로 빠져나와 용화하게 된다(Kim and Son, 2009; Kwon and Kim, 2010). 이때 피기생체 배추좀나방은 치사하게 되고, 우화된 프루텔고치벌은 다음 기주를 찾게 된다.

복제된 CpBV 바이러스 입자에 존재하는 유전체가 모두 판독되었고 전체 157 개의 유전자를 추정하였다(Chen et al., 2011). 이들 유전자들의 생리적 기능을 결정하기 위해 SERI (segment expression and RNA interference) 기술이 개발되었다(Barandoc and Kim, 2009). 즉, 복제된 바이러스 형태의 CpBV 계놈은 고리모양의 DNA 조각으로 구성되어 있으며, 이들 각각의 고리게놈은 여러 개의 바이러스 유전자를 갖고 있다(Choi et al., 2004). 이들 고리게놈을 각각 클로닝하여 배추좀나방 유충에 삽입하여 일시발현을 일으킨 후 특정 유전자의 RNA 간섭(RNA interference: RNAi)을 일으켜 이 유전자의 기능을 추정하는 과정이 SERI 기술이다. 이 기술을 통해 CpBV 유전자들의 기능을 추정한 결과 대부분 기주 면역을 억제하는 기능을 보였다. 이 가운데 CpBV-ELP1은 *Cotesia* 속에 속한 BV 바이러스들이 공통적으로 가지고 있는 EP1 유전자와 높은 상동성을 가지며, 세포독성을 지니는 것으로 추정되었다(Kwon and Kim, 2008). 모두 7 개의 CpBV-ELP 유전자가 밝혀졌으며, CpBV-ELP2를 제외하고 6 개의 유전자가 피기생체 배추좀나방에서 발현되었으며, 이 가운데 CpBV-ELP1은 대부분 피기생체 발육시기 그리고 조직에서 높게 발현되는 유전자이다(Kwon and Kim, 2008).

CpBV-ELP1을 벡쿨로바이러스에 재조합하여 새로운 살충제 개발로의 연구가 진행되었다(Kim et al., 2008). 총 6 종류의 CpBV 유래 유전자를 이용하여 재조합 벡쿨로바이러스를 제작하였고, 이들의 살충력을 비교한 결과 CpBV-ELP1이 재조합된 벡쿨로바이러스 가운데 가장 높은 살충력을 지니는 것으로 나타났다. 그러나 분석된 벡쿨로바이러스는 Sf9 곤충 세포주를 이용하여 증식되었으나, 실용적으로 해충 방제에 사용하기 위해서는 기주 곤충에서 대량 증식이 필요했고, 이를 통해 얻은 바이러스의 살충력을 재검정할 필요가 있었다. 또한 이 재조합바이러스에 대한 다양한 유충 영기별 감수성 분석이 필요하였다. 이를 수행하기 위해 본 연구는 CpBV-ELP1의 재조합 벡쿨로바이러스를 파밤나방(*Spodoptera exigua*)에서 대량증식하였고, 이를 통해 얻은 재조합 벡쿨로바이러스에 대해서 파밤나방의 영기별 감수성 및 포트 조건에서 바이러스 현탁액을 살포하면서 해충 방제제로 개발 가능성을 분석하였다.

재료 및 방법

곤충 사육. 본 실험에 사용된 파밤나방은 온도 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, 광주조건 16:8 시간 (L:D), 상대습도 $60 \pm 10\%$ 사육실에서 누대 사육하였다. 유충의 경우 인공사료(Goh et al., 1991)를 먹이로 제공하였고, 성충은 10%의 설탕물을 제공하여 사육하였다. 상기의 사육 조건에서 배추좀나방 유충은 배추를 먹이로 제공하였고, 성충은 10% 설탕물을 제공하여 사육하였다.

재조합 벡쿨로바이러스 증식. 벡쿨로바이러스 제작은 Kwon et al. (2008)에 기술하였다. 출아형(budded form) 바이러스를 Sf9 세포주에 접종하고, fetal bovine serum이 포함된 TC-100 배양액에서 5일 동안 배양하여 출아형과 다각체형(polyhedrin inclusion body: PIB)로 증식하였다.

바이러스 혈강주입. 미량주사위(Hamilton micrsyringe, Reno, Nevada, USA)를 이용하여 유충 혈강으로 출아형 재조합바이러스를 주입하였다.

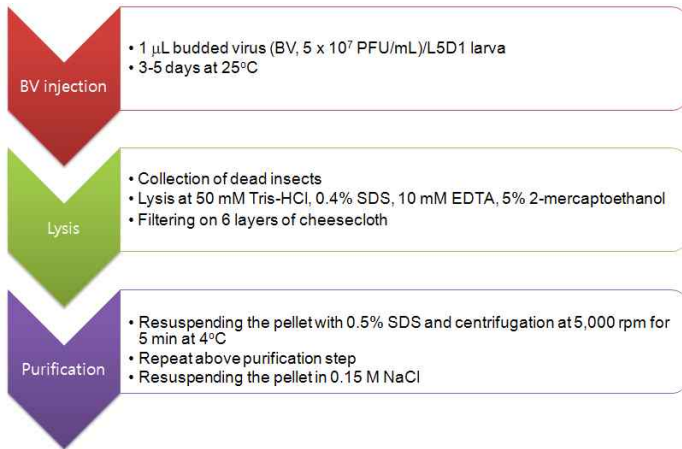
바이러스 섭식처리. Sf9 세포주에서 증식된 다각체형 바이러스를 3 x 3 cm의 배추 잎 조각에 처리하였다. 이를 원형 용기(직경 9 cm)에 여과지를 깔고 올려놓았다. 처리된 배추잎 주변으로 6시간 절식된 유충을 옮겨 놓고 24시간 섭식시켰다. 이후 건전 배추잎을 제공하고 매 24시간 마다 치사된 개체를 조사하였다. 이때 치사 유충은 외부 자극에 대해서 능동적 반응 움직임이 없는 개체로 규정하였다.

통계분석. 모든 살충효과 시험 결과는 백분율 자료로서 arcsine 변환후 SAS의 PROC GLM (SAS Institute, 1989)을 이용하여 ANOVA 분석후 처리평균간 비교를 실시하였다.

결 과

곤충 체내 재조합 벡쿨로바이러스 대량 증식. 곤충 체내에서 재조합 벡쿨로바이러스를 대량 증식하기 위해, Sf9 세포주에서 증식된 출아형 벡쿨로바이러스를 파밤나방 5령 유충 혈강에 주입하였다(Fig. 1). 주입 후 3-5일 경과 후 치사된 개체를 모아서 알칼리 용액으로 용해시킨 후 바이러스 순화를 실시하였다(Fig. 1A) 순화된 바이러스 입자는 전형적인 벡쿨로바이러스 다각체 구조를 보였다(Fig. 1B). 파밤나방 5령 유충 개체당 5×10^{10} PIB가 수거되었다.

(A)



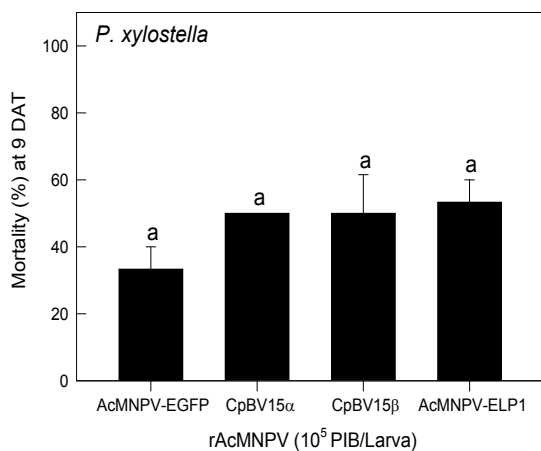
(B)



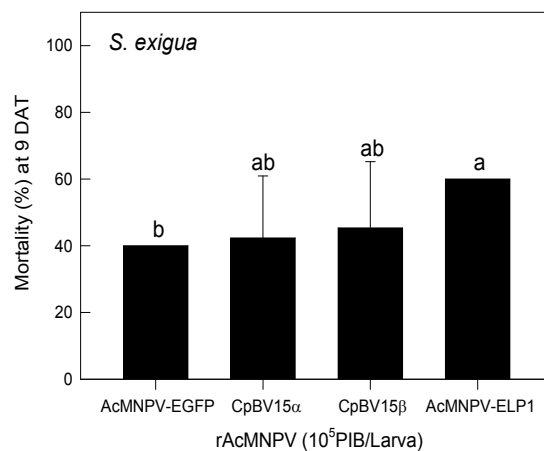
Fig. 1. Mass production of recombinant vaculovirus, AcMNPV-ELP1, in one day old fifth instar larvae ('L5D1') of *S. exigua*. (A) Procedure of the viral infection of budded form (BV), multiplication, and purification. (B) A photo of the produced viral particles.

재조합바이러스의 살충력 스크리닝. 곤충 체내에서 증식된 재조합바이러스들의 파밤나방과 배추좀나방에 대한 살충력이 비교되었다(Fig. 2). 배추 먹이를 이용하여 동일한 양으로 섭식 투여한 결과(Fig. 2A) 모든 재조합 벡쿨로바이러스는 배추좀나방과 파밤나방에 살충력을 나타냈다. 그러나 대상 기주에 따라 이들 살충력을 차이를 보여 파밤나방이 배추좀나방에 비해 높은 감수성을 나타냈다. 특히 파밤나방에서 이들 재조합 유전자에 따라 벡쿨로바이러스의 살충력에 변이를 나타내어, ELP1 유전자가 재조합된 벡쿨로바이러스(AcMNPV-ELP1)가 비교적 우수한 방제력을 나타냈다. 파밤나방에 대한 AcMNPV-ELP1의 높은 감수성은 혈강으로 주입한 출아형 벡쿨로바이러스에서도 유사하게 나타났다(Fig. 2B).

(A)



(B)



(C)

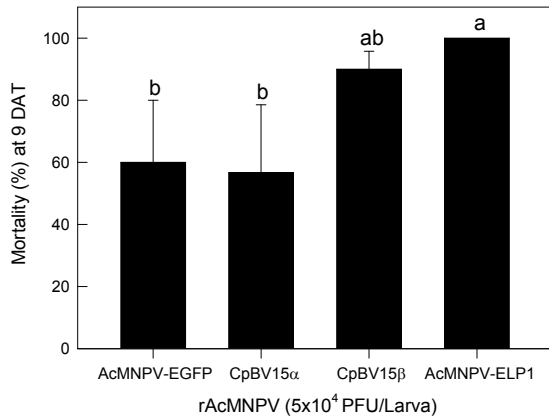


Fig. 2. Toxicity of different recombinant AcMNPV ('rAcMNPV') against two different lepidopteran insects. Oral toxicity against fourth instar larvae of *P. xylostella* (A) and fifth instar larvae of *S. exigua* (B). Each larva was fed 10⁵ polyhedrin inclusion bodies (PIB) on diet cabbage. (C) Hemocoelic injection of the rAcMNPVs to fifth instar larvae of *S. exigua*. Mortality was measured 9 days after treatment ('DAT'). Each treatment used 10 larvae and replicated three times. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

CpBV-ELP1 재조합 벡클로바이러스에 대한 파밤나방 유충 시기별 감수성 변이. 비교적 높은 살충력을 지닌 AcMNPV-ELP1을 농가 현장에 사용하기 위해서는 바이러스 현탁액을 살포하여 방제 효과가 있는 지를 검정해야 한다. 이를 위해 배추 잎을 바이러스 현탁액에 침지하여 파밤나방에 대한 살충력을 검정하였다(Fig. 3). AcMNPV는 대조 바이러스인 AcMNPV-EGFP에 비해 높은 살충력을 나타냈고, 처리 농도가 높아짐에 따라 방제 효과도 높아졌다.

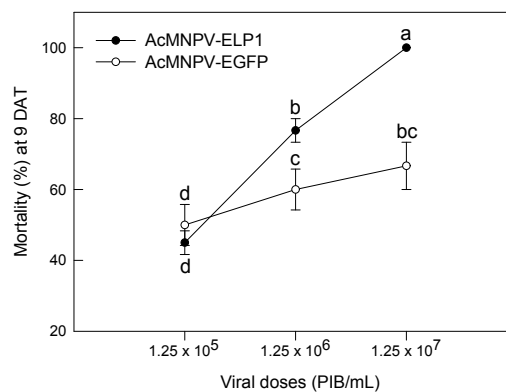


Fig. 3. Leaf-dipping assay of AcMNPV-ELP1 toxicity against fifth instar larvae of *S. exigua*. AcMNPV-EGFP was used as a control viral treatment. Treated leaves were fed for first three days and then replaced with fresh cabbage. Mortality was measured 9 days after treatment ('DAT'). Each treatment used 10 larvae and replicated three times. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

잎침지법에 따라 나타난 AcMNPV-ELP1의 방제 효과를 모든 파밤나방 유충 발육태에 처리하여 살충력을 비교하였다(Fig. 4). 대조구인 AcMNPV-EGFP는 유충 발육태가 증가할수록 방제 효율이 증가하였다. 처리구인 AcMNPV-ELP1도 비교적 높은 방제력이 노숙 유충(4-5령)에서 나타나지만, 대조구와 달리 1령충에 대해서 가장 높은 살충력을 보였다.

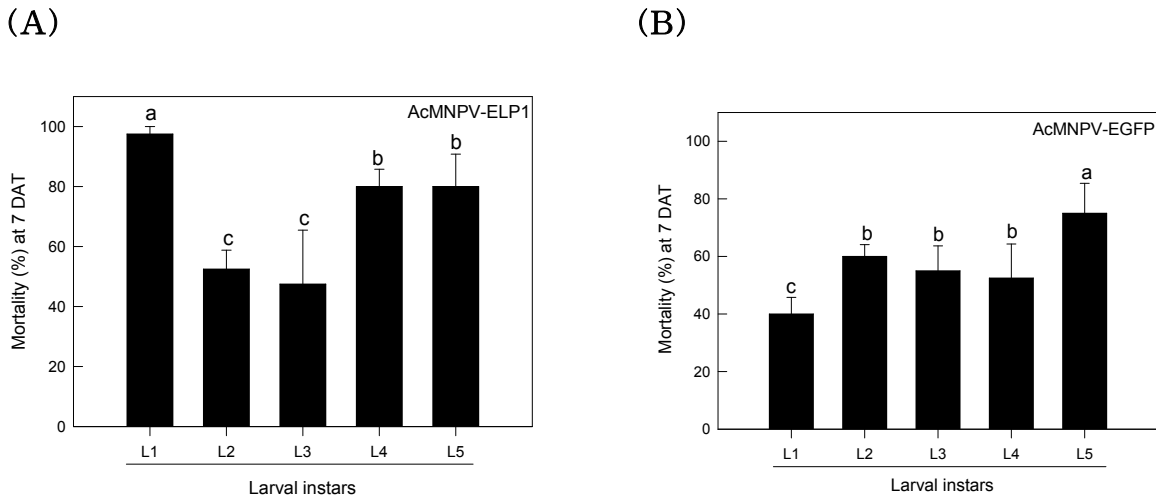


Fig. 4. Variation in control efficacy of AcMNPV-ELP1 against different larval instar of *S. exigua*. Leaf-dipping method was used to test insecticidal activity. As a control recombinant baculovirus, AcMNPV-EGFP, was used. All viral treatments used a dose of 5×10^6 PIB/mL. Each instar used 10 larvae and was replicated three times. Mortality was measured 7 days after treatment (DAT). Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type 1 error= 0.05 (LSD test).

간이 포장 조건에서 CpBV-ELP1 재조합 벡쿨로바이러스의 파밤나방 방제 효과. 곤충 체내에서 증식된 AcMNPV-ELP1의 파밤나방에 대한 방제력 시험은 포트에서 자란 배추를 대상으로 피해를 주는 유충에 대해서 실시되었다(Fig. 5). 대조구로서 AcMNPV-EGFP 처리와 화학 농약인 테부페노자이드를 병행하여 처리하였다. 처리 후 3 일 및 7 일 후에 각각 조사하여 AcMNPV-ELP1의 방제 속도도 분석하였다. 처리 3 일 후에 AcMNPV-ELP1은 대조구인 AcMNPV-EGFP에 비해 높은 방제력을 나타내어 CpBV-ELP1 유전자에 의한 벡쿨로바이러스 살충력 증가를 확인하였으나, 화학약제인 테부페노자이드에 비해서는 낮은 살충력을 나타냈다. 그러나 처리 7 일 후에는 AcMNPV-ELP1의 처리가 대조구 재조합바이러스는 물론이고 화학농약인 테부페노자이드에 비해서도 높은 살충 효율을 나타냈다.

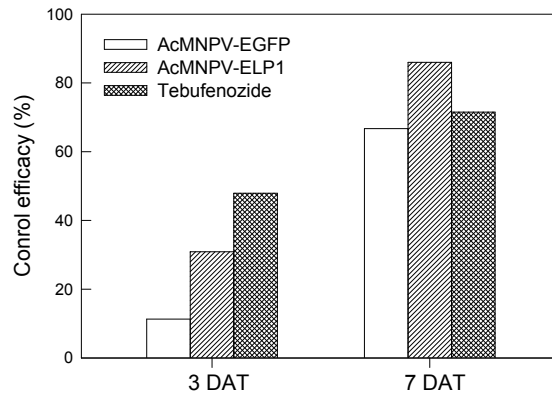


Fig. 5. Pot assay to test the control efficacy of AcMNPV-ELP1 against *S. exigua* infesting Chinese cabbage. As a control recombinant baculovirus, AcMNPV-EGFP, was used. Both viral sprays used a concentration of 5×10^6 PIB/mL. As a chemical insecticide, tebufenozide (8% active ingredient) was sprayed at 1,000 ppm. Initial population was over 20 larvae in each replication. Each treatment was replicated with three pots. Live larvae were counted at 3 and 7 days after treatment ('DAT'). Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type 1 error = 0.05 (LSD test).

요약

프루텔고치벌 브라코바이러스(CpBV)는 배추좀나방(*Plutella xylostella*)의 어린 유충에 기생하는 프루텔고치벌(*Cotesia plutellae*) 공생 폴리드나바이러스이다. 일부 CpBV 유전자들은 피기생체 유충의 면역 반응을 낮추는 데 중요한 역할을 담당한다. 본 연구는 기주의 면역작용을 억제하는 CpBV 유전자를 이용하여 살충력이 높은 재조합 벡큘로바이러스를 개발하는 데 응용할 목적으로 수행되었다. 기보고 자료에 기초하여 CpBV-ELP1를 발현하는 재조합 벡큘로바이러스(AcMNPV-ELP1)를 선발하여 파밤나방(*Spodoptera exigua*) 충체에서 증식시켰다. 충체에서 증식된 재조합바이러스들은 파밤나방 유충 한 마리 당 5×10^{10} polyherin inclusion body (PIB)를 생산하였다. 배양된 AcMNPV-ELP1은 파밤나방 유충에 높은 병원성을 보였다. 특히 파밤나방 1령과 노숙령기에 높은 살충력을 나타냈다. 파밤나방 유충이 가해하는 배추에 재조합 벡큘로바이러스(5×10^6 PIB/mL)를 살포한 결과 처리 7 일 후에 화학 농약인 테부페노자이드 보다 높은 방제효과(약 88%)를 나타냈다. 이 결과는 충체에서 대량배양된 AcMNPV-ELP1이 높은 병원성을 나타내 새로운 미생물방제제로 응용될 수 있음을 제시한다.

제8장 파밤나방의 지방체 및 소화관에 존재하는 지방산 조성 결정

1. 재료 및 방법

가. 파밤나방의 지질 추출 및 지질별 분리

MIDI(microbial identification systems)법에 따라 파밤나방 소화관 및 지방체 시료에 20배량의 *n*-hexane : methyl tertiary-butyl ether(MTBE) 1:1 혼합용매를 가하여 얼음 수조내에서 20분간 초음파 처리(Branson, USA)하면서 2회 추출하였다. Whatman No. 2 여지로 여과한 후 잔사에 대해 Bligh과 Dyer(1959)에 따라 동량의 chloroform : methanol : H₂O (2:2:1.8, v/v)로 2회 추출하였다. 지질 추출물로부터 중성지질, 당지질 및 인지질의 분리를 위해 chloroform : methanol 추출물에 대한 silica gel column(5.5×40mm) chromatography을 실시하였으며(Christie, 2003), 활성화시킨 silica gel (70~230 mesh, Merck)을 충전한 후 용매 극성에 따라 chloroform, acetone, methanol을 순차적으로 용출하여 분획하였다. 추출 여액 및 각각의 분획물은 40℃ 이하에서 감압농축하였고 질소로 건조하여 검화 또는 sControl (대조구, 바이러스의 ORF301 유전자)과 dsSeiPLA2-A (파밤나방 iPLA2-A 유전자의 발현을 억제할 수 있는 dsRNA) 처리를 위한 실험시까지 -20℃에 보관하였다.

나. 지질 검화 및 지방산 에스테르화

Silica gel column chromatography를 통해 분리된 지질 분획들에 대해 MIDI법으로 NaOH 45 g, methanol 150 ml, ddH₂O 150 ml 혼합용액 1 ml에 녹인 후 100℃에서 30분 동안 반응시켜 검화하였다. 검화 또는 dsControl (대조구, 바이러스의 ORF301 유전자)과 dsSeiPLA2-A (파밤나방 iPLA2-A 유전자의 발현을 억제할 수 있는 dsRNA) 처리로 유리된 지방산 시료에 6N HCl 325 ml, Methanol 275 ml 혼합용액을 2 ml 첨가한 후 80℃에서 10분간 반응시키고 수조에 담구어 냉각하였다. 메틸화된 시료에 *n*-hexane 200 ml, MTBE 200 ml 혼합용액을 1.25 ml 첨가한 후 10분 동안 교반하여 분리된 하층액을 pasteur pipet으로 제거하였다. 0.3N NaOH를 3 ml 첨가하여 5분 동안 교반한 다음 포화식염수 100 μ l를 혼합하고 방치하여 분리된 상층액을 pasteur pipet으로 취하여 지방산 분석시료로 하였다(Kaur et al., 2005).

다. 파밤나방(FB, GUT)에 대한 전처리

파밤나방 5령에 dsControl (대조구, 바이러스의 ORF301 유전자)과 dsSeiPLA2-A (파밤나방 iPLA2-A 유전자의 발현을 억제할 수 있는 dsRNA) 200 ng을 미량주사기 (Hamilton microsyringe)를 이용하여 접종하였다. 이 후 48시간 이후에 지방체 (FB)와 중장 (Gut)을 해부하여 층체에서 적출하였다. 무처리 (Normal, 아무런 처리가 되지 않은 상태의 파밤나방)는 dsRNA가 처리되지 않은 파밤나방 5령 유충을 이용하였다.

라. 지방산 분석

시료 용액은 실린지 필터(PTFE 0.2 μ m Hydrophilic, Advantec)로 여과 후에 GC/MS(HP 6890 GC system/ HP 5973 Mass selective detector, Hewlett Packard, USA)에 주입하였다. GC/MS 분석을 위한

column은 SP-2560(100m×0.25mm i.d., 0.2 μ m film thickness, Supelco Inc., USA)을 장착하였으며, column oven 온도는 100℃에서 4분동안 유지한 후 240℃까지 분당 3℃씩 증가하여 15분동안 유지하였다. Carrier gas는 He으로 0.8 mL/min, injector 225℃, ion source 200℃, separator 240℃로 설정하였다. 각각의 시료는 1 μ L를 주입하여 분석하였고, split ratio는 20:1의 비율이었다(표 1). 분리된 peak는 Supelco사 표준지방산 methyl ester의 머무름 시간과 비교하여 확인하였으며, peak 면적비로써 지방산 조성 백분율을 구하였다. 또한 GC에 의해 분리된 peak의 mass spectrum을 GC/MS data system인 MS Chemstation(Hewlett Packard)에 설치된 NIST 및 Wiley library와의 검색·비교를 통해 지방산을 동정하였다.

표 1. GC/MS analysis condition

Column	SP-2560 (100m×0.25mm, 0.2 μ m, SUPELCO)
Injector temp	225℃
Column temp	100℃(4min) --- 3℃ /min --- 240℃ (15min)
Carrier gas	Helium
Injection volume	1 μ l
Split ratio	20 : 1
Rater flow	0.7ml/min
Ion source temp.	200℃
GC model	HP 6890 GC system
Mass model	HP 5973 Mass selective detector

2. 연구 결과

가. 파밤나방 조직별 지질 추출량

파밤나방 지방체(fat body) 및 소화관(gastrointestinal tract)으로부터 지질을 추출한 결과, 지방체는 무처리에 비해 전처리한 시료들의 지질 추출량이 다소 많은 경향으로 나타났다. 그러나 인지질 추출량에 있어서는 시료량에 비해 무처리와 처리구간, 지방체와 소화관간에 있어서 크게 차이가 없는 것으로 확인되었다(표 2~4).

표 2. 파밤나방 지방체 및 소화관 유래 지질별 추출량

Sample	Sample F.W. (g)	CHCl ₃ -MeOH-D.W(2 : 2 : 1.8) Fr. (mg)	Lipid (mg)	
dsControl	0.375	14	NL ^b	9.9
			GL	0.6
			PL	2.7
FB ^a Normal	1.097	11	NL	7.1
			GL	1.3
			PL	2.2
dsSdiPL A ₂ -A	0.376	26	NL	17.9
			GL	0.7
			PL	2.9
dsControl	0.572	11	NL	93.5
			GL	1.0
			PL	3.6
GUT Normal	1.076	104	NL	5.7
			GL	0.8
			PL	4.2
dsSdiPL A ₂ -A	0.536	15	NL	17.9
			GL	0.7
			PL	2.9

^aFB: fat body; GUT: gastrointestinal tract

^bNL: neutral lipid; GL: glycolipid; PL: phospholipid.

표 3. 파밤나방 지방체 및 소화관 유래 지질별 추출량

Sample	Sample F.W. (g)	CHCl ₃ -MeOH-D.W(2 : 2 : 1.8) Fr. (mg)	Lipid (mg)	
dsControl	0.850	148	NL ^b	125
			GL	2.2
			PL	3.1
FB ^a Normal	0.918	120	NL	107
			GL	3.8
			PL	5.5
dsSdiPLA ₂ -A	0.876	130	NL	122
			GL	2.8
			PL	3.2
dsControl	1.684	23.5	NL	11.4
			GL	4.0
			PL	4.2
GUT Normal	0.867	30	NL	13.4
			GL	5.3
			PL	6.2
dsSdiPLA ₂ -A	1.890	26.9	NL	11.6
			GL	3.9
			PL	5.8

^aFB: fat body; GUT: gastrointestinal tract

^bNL: neutral lipid; GL: glycolipid; PL: phospholipid.

표 4. 파밤나방 조직별 지질 추출량

Sample	Sample F.W (g)	CHCl ₃ -MeOH-D.W(2 : 2 : 1.8) Fr. (mg)		Lipid (mg)
FB ^a	3.3	25.5	NL ^b	11.0
			GL	1.1
			PL	2.4
			NL	19.8
GUT	3.7	13.9	GL	4.1
			PL	2.3
			NL	46.0
GUT+FB	6.1	48.0	GL	2.6
			PL	1.9

^aFB: fat body; GUT: gastrointestinal tract

^bNL: neutral lipid; GL: glycolipid; PL: phospholipid.

나. 파밤나방 지방체의 지방산 조성

1차 실험으로 파밤나방 지방체 및 소화관으로부터 분리된 중성지질, 당지질, 인지질(표 2)에 대해 dsControl (대조구, 바이러스의 ORF301 유전자)과 dsSeiPLA2-A (파밤나방 iPLA2-A 유전자의 발현을 억제할 수 있는 dsRNA) 처리하여 지방산 조성을 조사하였다. 아라키돈산의 전구체인 linoleic acid의 조성비를 살펴 보면 지방체의 경우 중성지질, 당지질, 인지질 모두에서 처리구 보다 무처리가 크게 나타났다(표 5~7). 한편 소화관에서는 당지질과 인지질 처리구의 linoleic acid의 조성비가 컸으며, 특히 인지질의 처리구는 무처리에 비해 약 2.5~3.3배인 것으로 확인되었다.(표 8~10).

표 5. 파밤나방 지방체 추출 중성지질의 지방산 조성

Sample	Compound	Rt	Area %
FB dsControl	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	38.03	24.97
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.72	30.75
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.67	36.03
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.82	8.25
FB Normal	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	39.03	15.35
	9-Hexadecenoic acid (Palmitoleate acid)	40.58	0.64
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	43.37	3.48
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.71	19.17
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.70	48.55
NL	<i>cis</i> -11-Eicosenoic acid (Gondoic acid)	48.56	0.80
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.83	12.01
FB dsSdiPLA ₂ -A	Tetradecanoic acid (Myristic acid)	34.21	0.50
	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	39.11	35.27
	9-Hexadecenoic acid (Palmitoleate acid)	40.60	1.80
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	43.41	3.73
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.80	44.40
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.74	0.67
	<i>cis</i> -11-Eicosenoic acid (Gondoic acid)	48.57	10.83
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.85	2.79

표 6. 파밤나방 지방체 추출 당지질의 지방산 조성

Sample	Compound	Rt	Area %
FB dsControl	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	38.99	38.88
	Octadecanoic acid(Stearic acid)	43.35	24.22
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.66	11.54
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.62	20.41
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.80	4.94
GL FB Normal	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	39.00	20.19
	Octadecanoic acid(Stearic acid)	43.36	13.99
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.68	15.84
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.64	40.98
	<i>cis</i> -11-Eicosenoic acid (Gondoic acid)	48.56	1.09
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.82	7.92
FB dsSdiPLA ₂ -A	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	39.00	27.68
	Octadecanoic acid(Stearic acid)	43.36	20.09
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.67	13.75
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.63	30.93
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.82	7.55

표 7. 파밤나방 지방체 추출 인지질의 지방산 조성

Sample	Compound	Rt	Area %
FB dsControl	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	39.00	17.22
	Octadecanoic acid(Stearic acid)	43.35	1.08
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.68	19.26
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.64	43.41
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.82	19.03
PL FB Normal	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	39.00	7.55
	Octadecanoic acid(Stearic acid)	43.39	15.20
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.70	15.14
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.67	50.03
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.83	12.08
FB dsSdiPLA ₂ -A	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	38.97	13.83
	Octadecanoic acid(Stearic acid)	43.33	9.42
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.66	15.25
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.62	38.57
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.81	22.94

표 8. 파밤나방 소화관 추출 중성지질의 지방산 조성

Sample	Compound	Rt	Area %
GUT dsControl	Tetradecanoic acid (Myristic acid)	34.20	0.27
	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	39.34	25.22
	9-Hexadecenoic acid (Palmitoleate acid)	40.67	1.67
	Heptadecanoic acid()	41.23	0.08
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	43.69	3.97
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	45.07	35.38
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.94	26.38
	Eicosanoic acid (Arachidinic acid)	47.39	0.08
	<i>cis</i> -11-Eicosenoic acid (Gondoic acid)	48.64	0.58
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.94	6.29
NL	<i>cis</i> -11,14-Eicosadienoic acid	50.42	0.08
GUT Normal	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	39.03	17.42
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	43.35	2.00
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.71	19.50
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.70	48.40
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.83	12.67
GUT dsSdiPLA ₂ -A	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	38.97	15.92
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	43.33	3.26
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.67	18.88
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.65	49.55
	<i>cis</i> -11-Eicosenoic acid (Gondoic acid)	48.54	0.75

표 9 . 파밤나방 소화관 추출 당지질의 지방산 조성

Sample	Compound	Rt	Area %
GUT dsControl	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	38.97	22.61
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	43.32	15.06
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.65	14.85
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.62	40.79
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.81	6.69
GUT Normal	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	38.99	28.05
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	43.34	5.75
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.67	28.14
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.63	29.23
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.82	8.83
GUT dsSdiPLA ₂ -A	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	38.97	26.58
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	43.32	16.36
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.65	13.06
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.61	37.88
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.81	6.12

표 10 . 파밤나방 소화관 추출 인지질의 지방산 조성

Sample	Compound	Rt	Area %
GUT dsControl	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	38.98	8.04
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	43.34	11.30
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.67	14.78
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.66	49.38
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.82	16.50
PL GUT Normal	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	38.98	13.84
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	43.34	7.60
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.67	14.90
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.64	39.10
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.83	24.56
GUT dsSdiPLA ₂ -A	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	38.97	13.83
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	43.34	9.42
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.66	15.25
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.65	38.57
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.82	22.94

2차 반복실험은 1차 실험과 동일하게 처리된 파밤나방 지방체 및 소화관 유래 지질별(표 3) 지방산 분석 결과(표 11~16), 지방체 추출 당지질과 인지질의 linoleic acid의 조성비는 무처리 및 처리구간에 근소한 차이를 나타내었다(표 12~13). 또한 소화관의 지질별 linoleic acid의 조성비(표 14~16)에서도 처리구와 무처리의 차이를 확인할 수 없었다. 한편 파밤나방 지방체 및 소화관 혼합시료로부터 추출한 인지질(표 4)에 대해 NaOH 검화 및 iPLA₂를 처리하여 지방산 조성을 조사하였으나(표 17) 의미있는 결과를 얻지 못하였다. 따라서 상기의 연구 결과들은 추후 반복 실험을 통해 재검토되어야 할 것으로 생각된다.

표 11. 파밤나방 지방체 추출 중성지질의 지방산 조성

Sample	Compound	Rt	Area %
FB dsControl	Tetradecanoic acid (Myristic acid)	34.06	0.49
	Pentadecanoic acid	36.5	0.12
	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	39.57	27.93
	9-Hexadecenoic acid (Palmitoleic acid)	40.72	3.24
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	44.13	3.33
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	45.34	35.90
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	47.12	22.04
	Eicosanoic acid (Arachidic acid)	47.45	0.11
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.95	6.63
	<i>cis</i> -11,14-Eicosadienoic acid	50.37	0.08
	Docosanoic acid (Behenic acid)	50.92	0.03
	13-Docosenoic acid	52.13	0.04
	<i>cis</i> -11,14,17-Eicosatrienoic acid	54.41	0.01
	Tetracosanoic acid	54.52	0.03
NL FB Normal	Tetradecanoic acid (Myristic acid)	34.05	0.35
	Pentadecanoic acid	36.49	0.14
	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	39.69	29.33
	9-Hexadecenoic acid (Palmitoleic acid)	40.79	2.68
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	44.39	3.32
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	45.56	34.35
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	47.26	22.95
	Eicosanoic acid (Arachidic acid)	47.56	0.10
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	49.05	6.61
	<i>cis</i> -11,14-Eicosadienoic acid	50.43	0.08
	Docosanoic acid (Behenic acid)	50.9	0.02
	8,11,14,17-Eicosatetraenoic acid (Arachidonic acid)	51.84	0.04
	Tetracosanoic acid	54.54	0.04
	<i>cis</i> -5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid	55.08	0.01
FB dsSdiPL A ₂ -A	Tetradecanoic acid (Myristic acid)	34.07	0.10
	Pentadecanoic acid	36.51	0.03
	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	39.64	9.96
	9-Hexadecenoic acid (Palmitoleic acid)	40.51	0.08
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	44.23	1.03
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	45.43	12.01
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	47.17	74.50
	Eicosanoic acid (Arachidic acid)	47.49	0.03
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	49.0	2.19
	<i>cis</i> -11,14-Eicosadienoic acid	50.40	0.02
	Docosanoic acid (Behenic acid)	50.94	0.01
	unknown	51.81	0.01
	13-Docosenoic acid	52.14	0.01
	<i>cis</i> -11,14,17-Eicosatrienoic acid	52.44	0.01

표 12. 파밤나방 지방체 추출 당지질의 지방산 조성

Sample	Compound	Rt	Area %
FB dsContr ol	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	38.92	34.54
	9-Hexadecenoic acid (Palmitoleic acid)	40.48	2.63
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	43.24	3.76
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.60	28.20
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.55	24.45
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.72	6.41
GL FB Normal	Tetradecanoic acid (Myristic acid)	34.08	0.46
	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	38.93	32.29
	9-Hexadecenoic acid (Palmitoleic acid)	40.48	2.50
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	43.24	3.71
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.61	30.30
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.55	24.47
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.72	6.27
FB dsSdiP LA ₂ -A	Tetradecanoic acid (Myristic acid)	34.08	0.81
	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	38.91	45.84
	9-Hexadecenoic acid (Palmitoleic acid)	40.47	3.46
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	43.23	5.41
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.59	4.06
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.54	32.85
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.71	7.57

표 13. 파밤나방 지방체 추출 인지질의 지방산 조성

Sample	Compound	Rt	Area %
FB dsContr ol	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	38.86	20.81
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	43.21	11.44
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.55	39.89
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.52	25.68
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.71	2.18
PL FB Normal	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	38.89	18.83
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	43.24	8.18
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.57	16.36
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.55	32.53
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.74	24.10
FB dsSdiP LA ₂ -A	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	38.88	17.66
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	43.24	8.57
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.57	17.46
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.54	35.02
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.73	21.29

표 14. 파밤나방 소화관 추출 중성지질의 지방산 조성

Sample	Compound	Rt	Area %
GUT dsControl	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	38.88	14.67
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	43.22	5.27
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.56	17.32
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.55	51.10
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.72	11.64
GUT Normal	Tetradecanoic acid (Myristic acid)	34.10	0.44
	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	38.96	19.03
	9-Hexadecenoic acid (Palmitoleic acid)	40.50	1.37
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	43.29	2.93
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.65	21.23
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.64	42.99
	unknown	48.04	0.46
	<i>11-Eicosenoic acid</i>	48.48	0.83
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.76	10.70
GUT dsSdiPLA ₂ -A	Tetradecanoic acid (Myristic acid)	34.10	0.40
	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	38.93	16.14
	9-Hexadecenoic acid (Palmitoleic acid)	40.48	0.76
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	43.27	4.81
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.61	16.16
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.61	49.06
	unknown	48.04	0.39
	<i>11-Eicosenoic acid</i>	48.47	10.62
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.75	1.68

표 15. 파밤나방 소화관 추출 당지질의 지방산 조성

Sample	Compound	Rt	Area %
GUT dsControl	-	-	-
GUT Normal	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	38.86	10.64
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	43.21	5.10
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.54	8.11
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.52	23.99
GL	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.69	52.15
GUT dsSdiPLA ₂ -A	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	38.87	31.01
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	43.23	25.81
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.56	23.38
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.54	7.39
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.70	12.41

표 16. 파밤나방 소화관 추출 인지질의 지방산 조성

Sample	Compound	Rt	Area %
GUT dsControl	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	38.75	4.28
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	43.09	49.95
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.42	5.04
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.38	29.06
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.57	11.67
PL GUT Normal	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	38.79	27.40
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	43.14	4.23
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.48	16.17
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.42	48.80
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.62	3.40
GUT dsSdiPLA ₂ -A	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	38.85	89.02
	Octadecanoic acid(Stearic acid)	43.21	0.42
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	44.54	7.13
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	46.50	0.54
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	48.69	2.89

표 17. 파밤나방 지방체 및 소화관 혼합시료 유래 인지질의 지방산 조성

Sample	Compound	Rt	Area %
GUT+ FB control	unknown	34.47	7.33±0.01 ^a
	unknown	39.84	8.23±0.01
	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	42.30	14.42±0.03
	unknown	44.98	3.57±0
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	46.69	15.19±0
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	47.96	13.37±0
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	49.87	27.64±0.01
GUT+ FB iPLA ₂	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	52.06	10.27±0
	unknown	39.84	2.33±0
	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	42.29	3.58±0
	Octadecanoic acid (Stearic acid)	46.69	4.15±0
	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid (Oleic acid)	47.69	3.15±0.01
	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid (Linoleic acid)	49.87	7.09±0
GUT+ FB NaOH	Eicosanoic acid	50.75	77.01±0.01
	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	52.06	2.68±0
	unknown	34.47	22.20±0.04
GUT+ FB NaOH	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	42.30	24.49±0.14
	Octadecanoic acid(Stearic acid)	46.69	53.31±0.10

^aMean±standard error of 3 replicates.

제9장 파밤나방의 조직 프로스타글란딘 조성 결정

1. 재료 및 방법

가. 세균 배양 및 접종

파밤나방(*Spodoptera exigua*) 5령 및 좁은잎가슴벌레(*Phaedon brassicae*) 3령 유충 내의 PG 조성 분석을 위해 대장균 (*Escherichia coli* DH5a)을 이용하였다. 대장균은 안동대학교 식물학과 초저온 냉동고에 글리세롤 보존 액침표본으로 보관되어 있는 것을 사용하였다. NB 평판배지(peptone 5 g, beef extract 3 g, NaCl 5 g, agar powder 15 g, ddH₂O 1 L)에 세균을 도말한 후 24시간 동안 28°C 에서 배양하여 단일 균총을 분리하였다. 분리된 단일 균총은 2 mL의 TSB (MBCell, Seoul, Korea)에서 24 시간 동안 28°C에서 250 rpm으로 교반 배양한 후, 이 가운데 1 mL의 배양액을 곧바로 1 L의 TSB 배지에 접종하여 48 시간 동안 위와 동일한 조건으로 배양하였다. 이 후 대장균을 5,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 상등액인 배지성분을 제거하였으며, 100mL의 살균수에 대장균을 현탁하여 series dilution 방법으로 NA 배지에서 형성되는 단일 균총수를 조사하였으며, 최종적으로 멸균증류수 안에 10⁵ CFU/ μ l (colony forming unit, CFU)로 조사되었다. 위의 농도로 준비된 세균현탁액을 미량주사기 (Hamilton, Reno, Nevada, USA)를 이용해 파밤나방 및 좁은잎가슴벌레 유충에 2 μ l를 접종하였다. 접종 후 4시간에 세균에 감염된 유충의 조직과 혈액을 분리하여 PG 조성 분석을 시도하였다. 분리된 조직별 세균 처리는 Xn (*Xenorhabdus nematophila*) 및 Bt (*Bacillus thuringiensis*)를 이용하였다.

나. PG 분석을 위한 조직 분리

파밤나방은 세균 접종 후 혈림프와 지방체 조직의 분리가 조직 분해를 막기 위해 얼음위에서 이루어져 15mL 튜브에 수거되었다. 지방체는 각 반복실험 당 676~1,096 mg의 시료가 이용되어 homogenizer를 이용해 조직을 파쇄하였으며, 혈림프는 반복 당 1.89~2.38 ml가 수거되었다. 이 후 두 조직 샘플은 모두 ice bath 내에서 5초간 초음파 처리 후 1X PBS 용액에 1N HCl을 사용하여 pH 4.0으로 조정하였다. 좁은잎가슴벌레는 세균 처리 후 조직별 분리없이 PG를 분석하였다. 흰줄숲모기(*Aedes albopictus*)의 경우 세균 처리 없이 전체 유충을 homogenizer를 이용해 조직을 파쇄하였고 723 mg의 시료를 파밤나방과 동일하게 전처리하였다.

다. 프로스타글란딘류 추출

파밤나방, 좁은잎가슴벌레 및 모기에 함유된 프로스타딘류의 추출은 Jurenka et al. (1999)의 방법에 따라 행하였다. 혈림프, 소화관 및 지방체 시료로부터 PG 추출을 위해 분액 여두로 시료 용액과 동량의 ethyl acetate(Junsei Gr. grade)를 사용하여 3회 용매분획하였다. ethyl acetate 분획층을 40°C 이하에서 감압농축하고 N₂ gas로 건조하였다. 소량의 ethyl acetate에 추출물을 용해시킨 후 소형 column(5.5×40mm)에 silica gel (70~230 mesh, Merck)을 충전하여 용매 극성에 따라 ethyl acetate, ethyl acetate : acetonitrile (1:1, v/v, J.T.Baker HPLC grade), acetonitrile, acetonitrile : methanol (1:1, v/v), methanol (J.T.Baker HPLC grade) 순으로 순차적으로 용출하였다. Acetonitrile : methanol (1:1, v/v) 용출 분획을 40°C 이하에서 감압농축하

였고 질소로 건조하여 LC/MS/MS분석시까지 -20℃에 보관하였다. 그림 1에 프로스타글란딘 류 추출 과정을 제시하였다.

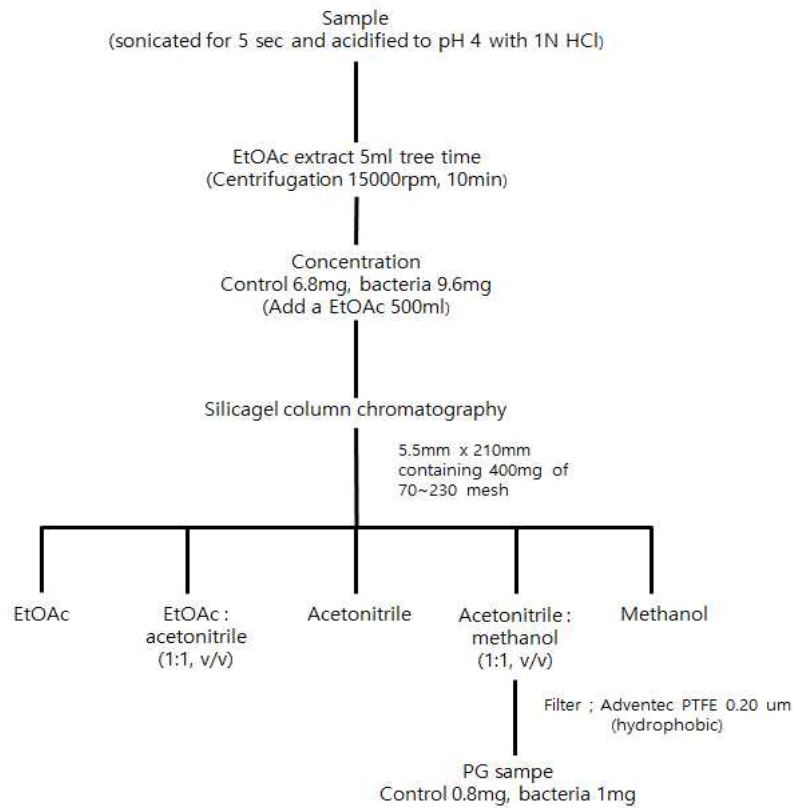


그림 70. 프로스타글란딘 추출 과정.

라. prostaglandin 표준품의 mass library 제작

PG 표준품 5종에 대한 MS Library 제작을 위하여 표준품(표 1)들을 소량의 ethanol(Daejung, 99.9% G.r. grade)을 사용하여 각각 0.5 ppm으로 조제 하여 LC/MS분석을 실시하였다.

표 1. 프로스타글란딘 표준품

prostaglandin B ₂	1 mg	98%	Sigma - Aidrich, USA
prostaglandin D ₂	1 mg	95%	Sigma - Aidrich, USA
prostaglandin E ₂	1 mg	93%	Sigma - Aidrich, USA
prostaglandin F _{2a}	1 mg	99%	Sigma - Aidrich, USA
prostaglandin G ₂	100 μg	95%	Cayman chemical, USA

마. 검량선 작성 및 prostaglandin 분석

검량선은 반복실험 마다 PG 표준품 5종을 혼합 후 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005 ppm의 농도로 조제하여 작성하였다. Silica gel column chromatography를 통해 ACN(acetonitrile) : methanol(1:1, v/v) 용출 분획물을 ethanol 50 μ l에 녹여 실린지 필터(PTFE 0.2 μ m Hydrophilic, Advantec)로 여과 후, LC/MS(API-2000 MS, Applied Biosystems, USA, LC-1200 Series, Ageilent Technologies, USA)에 주입하였다. LC/MS/MS 분석을 위해 column은 XBridge(C18 3.5 μ m 2.1x150mm, Waters, USA)를 장착하였으며, 분석 조건을 표 2에 제시하였다. 시료 중에 함유된 프로스타글란딘류는 아래 산출식에 의거하여 정량하였다.

$$\text{분석치} = \text{검량선 산출 프로스타글란딘 농도}(\mu\text{g/ml}) \times \frac{0.05(\text{ml})}{\text{추출시료부피}(\text{ml})}$$

표 2. Optimized LC/MS/MS conditions

Parameters	Conditions
HPLC model	1200 Series, Ageilent Technologies, USA
Mass model	API-2000, Applied biosystems, USA
Column	XBridge, C ₁₈ 5 μ m 2.1x150mm Waters, USA
Mobile phase	(A) acetonitrile : water : acetic acid 45 : 55 : 0.02 (B) acetonitrile : water : acetic acid 90 : 10 : 0.02
Flow late	150 μ l
Gradient	Time(min) 0 8 8.1 12 12.1 15 15.1 25 B(%) 0 0 50 50 70 70 0 0
Injection volume	5 μ l
Column temperature	40 $^{\circ}$ C
Ionization mode	ESI negative
Curtain Gas	20 psi
Temperature	450 $^{\circ}$ C
Ion Spray Voltage	-4500 V
Ion source Gas 1	40 psi
Ion source Gas 2	60 psi
Collision Gas (CAD)	6

2. 연구결과

가. prostaglandin 표준품의 mass library

PG 표준품에 대한 LC/MS 분석을 수행여 획득된 HPLC chromatogram의 retention time 값과 MS spectrometry의 MRM(multiple reaction monitoring) 값을 표 3에 제시하였다.

표 3. PG 표준품의 retention time 및 multiple reaction monitoring

Compound	Rt(min)	MRM(m/z)	Collision Energy(eV)
F _{2a}	5.32	353.1 / 309.2	-22
E ₂	6.14	351.0 / 315.2	-24
B ₂	13.40	333.1 / 174.7	-18
D ₂	7.02	351.0 / 271.1	-12
G ₂	8.00	367.1 / 235.0	-12

5종의 prostaglandin 표준품 혼합물(그림 2) 및 PG 표준품들 중 PGF_{2a} 의 MS spectrum(그림 3)과 MS/MS spectrum(그림 4)에 예시하였다.

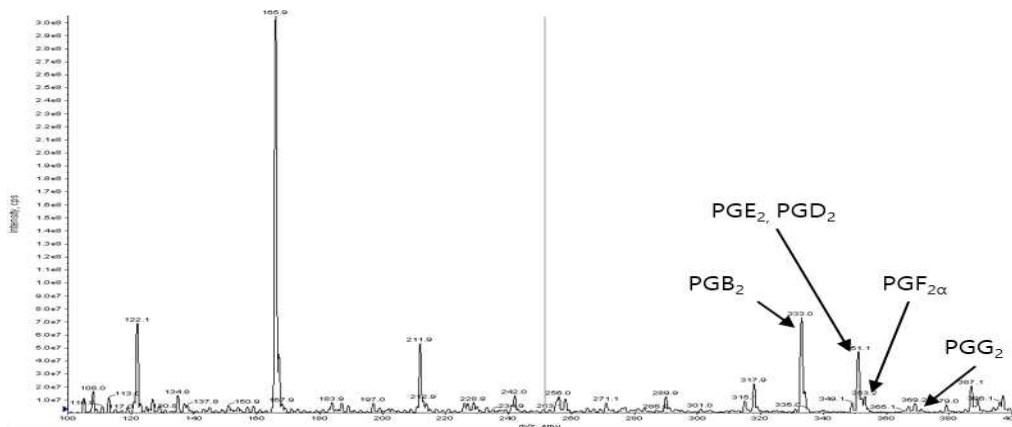


그림 2. Prostaglandin 5종 혼합물의 LC/MS ion product.

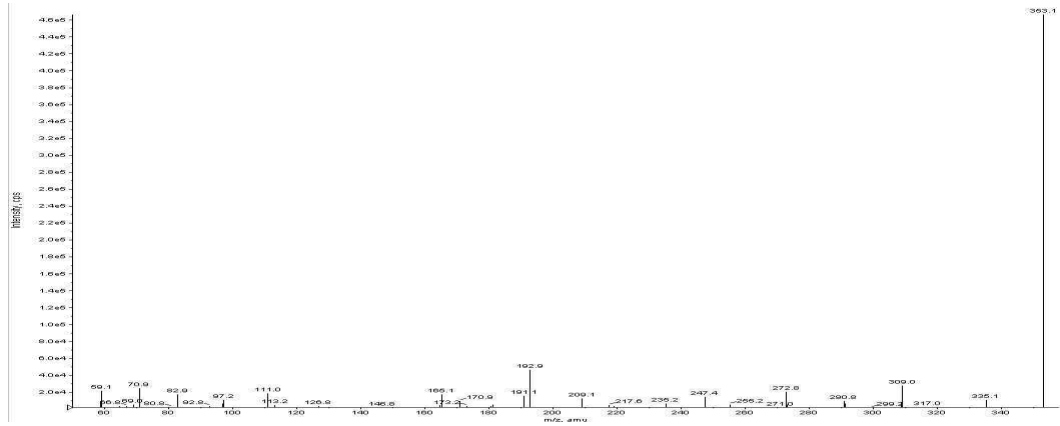


그림 3. PGF_{2α} LC/MS ion product.

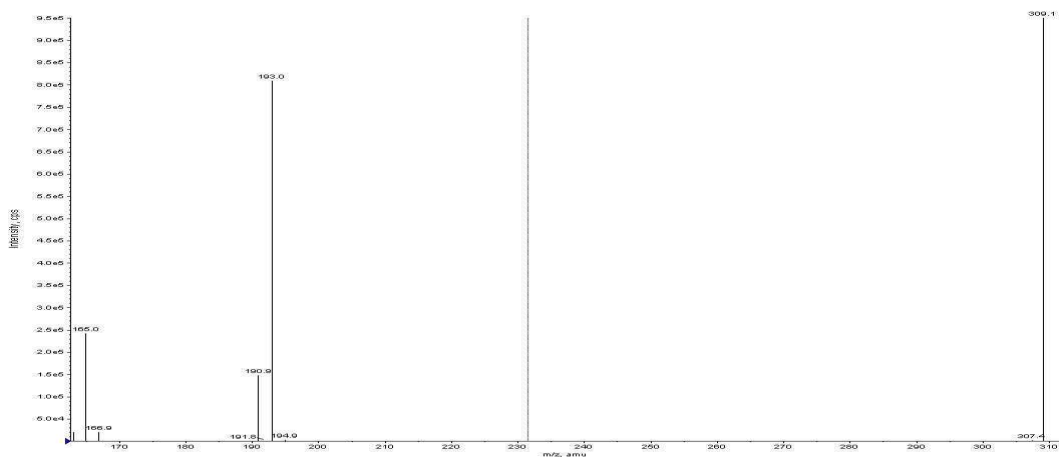


그림 4. PGF_{2α}의 ionization mass spectrum.

나. 프로스타글란딘 LC/MS/MS 분석

시료에 존재하는 프로스타글란딘 함량을 조사하기 위해 각 표준품을 농도별로 조제하여 검량선을 작성하였다. 이들 중 PGF_{2α}의 표준 방정식 및 검량선(그림 5)을 예시하였다.

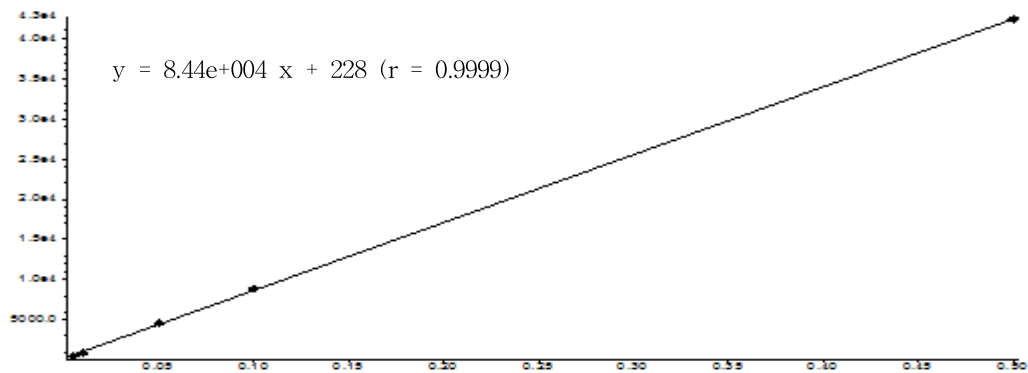


그림 5. PGF_{2α}의 검량선.

PGF_{2a} 의 HPLC chromatogram (그림 6) 및 파밤나방 소화관 무처리구와 세균처리구의 HPLC chromatogram (그림 7~8)을 예시하였다.

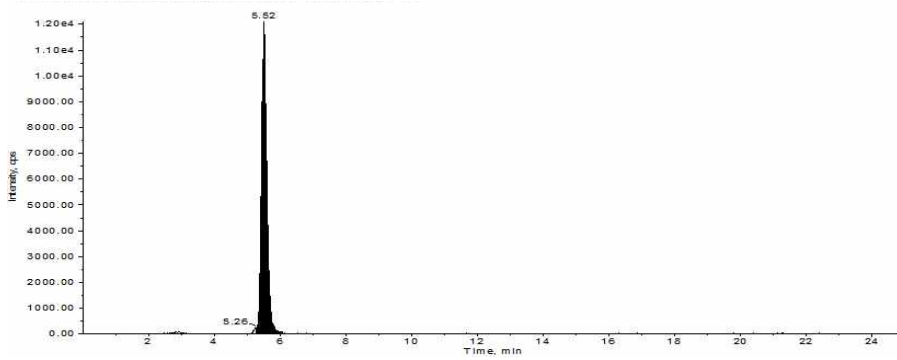


그림 6. Prostaglandin F_{2a}의 HPLC chromatogram.

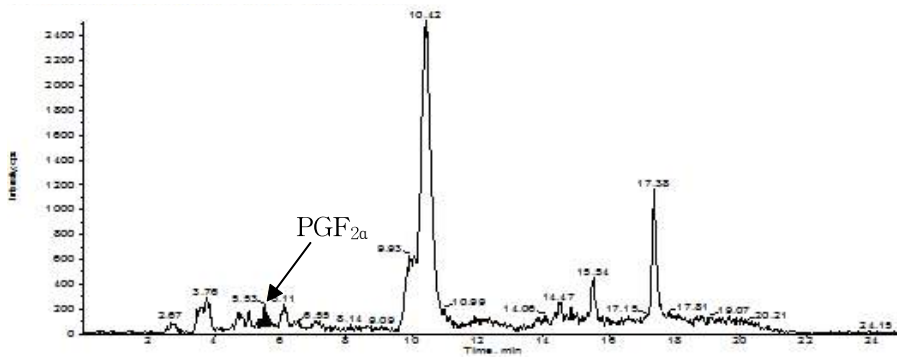


그림 7. GUT 무처리구의 HPLC chromatogram.

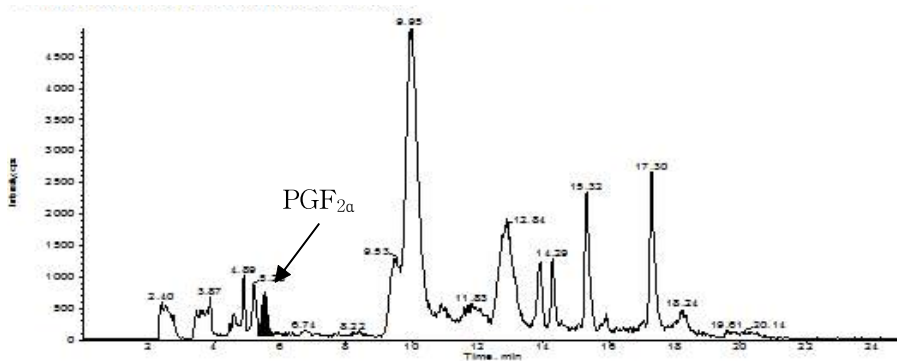


그림 8. GUT 세균처리구의 HPLC chromatogram.

세균처리된 파밤나방의 혈림프, 소화관 및 지방체에 존재하는 프로스타글란딘류를 동정하기 위해 LC/MS/MS 분석 실험을 반복하여 수행한 결과, PGD₂ 는 조직별 무처리에서 모두 검출되었으며, 소화관에서는 세균 처리에서도 존재하는 것으로 나타났다(표 4, 표 6). PGF_{2a} 의 경우 소화관의 무처리와 Bt+Xn 처리 및 지방체+표피 조직의 무처리에서 확인되었으며, 그 함량은 0.00015 ng/ml 내외이었다(표 4~6). PGD₂ 의 함량은 PGF_{2a} 의 약 2배 이상 높게 조사되었다. PGE₂ 는 소화관의 Xn 처리에서 PGF_{2a} 와 비슷한 수준으로 검출되었다(표 5). PGG₂ 는 혈림프 Bt+Xn 처리, 소화관 Bt 처리 및 지방체+표피 조직의 Xn 처리에서 PGF_{2a} 함량의 약 2배인 것으로 나타났다(표 6). 한편 혈림프의 경우 2번의 반복실험에서는 프로스타글란딘류가 검출되지 않았으나(표 4, 표 5), 3번째 반복실험에서 무처리에서 PGD₂ 와 Bt+Xn 처리에서 PGG₂ 가 검출되었다. 또한 파밤나방 무처리와 조직별 세균 처리의 분석치를 검토한 결과 각 반복실험에서 뚜렷한 차이가 인정되지 않았다. 따라서 세균 처리 관련 프로스타글란딘류의 함량 변화 추이에 대한 검토는 추후 재시도하여야 할 것으로 사료된다.

표 4. 세균처리 파밤나방 혈림프, 소화관 및 지방체+표피 조직의 PGD₂ 및 PGF_{2a} 함량

Sample	분석치(ng/ml)		
	PGD ₂	PGF _{2a}	
HL*	무처리	0.000036	-
	Bt처리	0.000050	-
	Xn처리	-	-
	Bt+Xn처리	0.000036	-
GUT	무처리	0.000055	0.000132
	Bt처리	0.000075	-
	Xn처리	0.000057	-
	Bt+Xn처리	0.000056	0.000178
FB+EPD	무처리	0.000051	0.000163
	Bt처리	-	-
	Xn처리	-	-
	Bt+Xn처리	0.000043	-

*HL: hemolymph, EPD; epidermis, FB: fat body.

표 5 세균처리 파밤나방 혈림프, 소화관 및 지방체 + 표피 조직의 PGE₂ 및 PGF_{2α} 함량

Sample	분석치(ng/ml)		
	PGE ₂	PGF _{2α}	
HL*	무처리	-	-
	Bt처리	-	-
	Xn처리	-	-
	Bt + Xn처리	-	-
GUT	무처리	-	0.000174
	Bt처리	-	-
	Xn처리	0.000142	0.000237
	Bt + Xn처리	-	0.000185
FB + EPD	무처리	-	0.000289
	Bt처리	-	-
	Xn처리	-	-
	Bt + Xn처리	-	-

*HL: hemolymph, EPD; epidermis, FB: fat body.

표 6 세균처리 파밤나방 혈림프, 소화관 및 지방체 + 표피 조직의 PGD₂ 및 PGG₂, PGF_{2α} 함량

Sample	분석치(ng/ml)			
	PGD ₂	PGG ₂	PGF _{2α}	
HL*	무처리	0.000076	-	-
	Bt처리	-	-	-
	Xn처리	-	-	-
	Bt + Xn처리	0.000088	0.000241	-
GUT	무처리	0.000092	-	0.000149
	Bt처리	0.000131	0.000369	-
	Xn처리	0.000069	-	-
	Bt + Xn처리	0.000119	-	-
FB + EPD	무처리	0.000147	-	-
	Bt처리	-	-	-
	Xn처리	-	0.00033	-
	Bt + Xn처리	0.000134	-	-

*HL: hemolymph, EPD; epidermis, FB: fat body.

세균 처리된 좁은잎가슴벌레 유충에 존재하는 프로스타글란딘류를 동정하기 위해 LC/MS/MS 분석 실험을 수행한 결과, PGF_{2a}의 함량은 과밤나방에 비해 약 2배이었으며, PGD₂는 유사하였고, PGG₂는 약 1.5~2.5배 수준으로 나타났다(표 7). 이는 조직별 분리 없이 유충 전체에서 추출한 결과와 무관하지 않은 것으로 추정된다. 또한 좁은잎가슴벌레에서도 무처리와 처리구들 사이에 뚜렷한 차이를 보여주지 않았으며, 반복간에도 분석치의 편차가 큰 것으로 나타났다.

표 7. 세균처리 좁은가슴잎벌레 유충의 PGD₂ 및 PGG₂, PGF_{2a} 함량

Sample	분석치(ng/ml)			
	PGD ₂	PGG ₂	PGF _{2a}	
Repli. 1	무처리	0.0001495	-	0.0002150
	Bt처리	-	0.0005329	-
	Xn처리	0.0001184	0.0006315	-
	Bt + Xn처리	0.0001525	0.0008220	0.0003898
Repli. 2	무처리	0.00008522	0.0005511	0.0002614
	Bt처리	0.00008585	-	0.0002323
	Xn처리	-	-	0.0002439
	Bt + Xn처리	-	-	0.0002446
Repli. 3	무처리	0.00008536	-	0.0001829
	Bt처리	0.00007264	0.0004145	0.0001966
	Xn처리	0.00014406	0.0008220	0.0003814
	Bt + Xn처리	0.00009638	0.0005783	0.0002711

세균(*E. coli* DH5a) 처리된 과밤나방 혈림프 및 지방체의 프로스타글란딘류 분석 결과, PGE₂, PGG₂ 및 PGF_{2a}가 동정되었다(표 8). PGF_{2a}는 지방체에서는 무처리 및 세균 처리 모두에서, 혈림프에서는 무처리에서만 검출되었다. 한편 PGE₂와 PGG₂는 각각 혈림프 무처리에서 확인되었다. 또한 흰줄숲모기 유충의 무처리 시료에 대해서는 PGE₂가 확인되었으나, 검량선 하한범위를 벗어나 정량할 수 없었다(자료 미제시).

표 8. 세균처리 과밤나방 혈림프 및 지방체의 PGE₂ 및 PGG₂, PGF_{2α} 함량

Sample	분석치(ng/ml)		
	PGE ₂	PGG ₂	PGF _{2α}
HL*		0.000221429	0.000125
	무처리	0.0000625	0.000115
		0.000171429	-
	세균 처리	-	-
FB			0.000209091
	무처리	-	0.000277778
			0.000264368
	세균 처리	-	0.000335821
흰줄숲모기			0.00022549
무처리	-	-	-

*HL: hemolymph, FB: fat body.

참고문헌

- Grauw Janny C de , Chris HA van de Lest and Paul Rene van Weeren. 2011. A targeted lipidomics approach to the study of eicosanoid release in synovial joints. *Arthritis Research & Therapy*. 13: R123.
- Jurenka R. A., Venkat K. Pedibhotla, and David W Stanley. 1999. Prostaglandin Production in Response to Bacterial Infection in True Armyworm Larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 41: 225-232.
- M Dehnard, S.V. Naidenko and K.Jewgenow. 2014. Comparative metabolism of PGFM(13,14-dihydro-15-keto-PGF_{2α}) in feces of felids. *Theriogenology*. 81: 733-743.
- Masoodi Mojgan and Anna Nicolaou. 2006. lipidomic analysis of twenty-seven prostanoids and isoprostanes by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20: 3023-3029.
- Koda Noriko, Yasutaka Tsutsui, Haruk Niwa, Seiji Ito, David F. Woodward, and Kikuko Watanabe. 2004. Synthesis of prostaglandin F ethanolamide by prostaglandin F synthase and identification of Bimatoprost as a potent inhibitor of the enzyme: new enzyme assay method using LC/ESI/MS. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 424: 128-136.

제10장 나비목 해충방제제(듀얼네프킬에스) 개발

비티 살충제는 토양에 서식하는 그람양성균인 *Bacillus thuringiensis*에서 유래된 미생물농약이다. 이 세균은 포자를 형성할 수 있어 다양한 환경 조건에서 내성을 떨 수 있으며, 포자를 만들 때 피라미드 형태의 독소 단백질을 생성한다(Tanada and Kaya, 1993). 이 독소는 곤충 중장 막에 존재하는 세포막 단백질에 특이적으로 결합하여 중장 세포막을 손상시키는 작용을 가져 궁극적으로 중장세포를 파괴시키는 결과를 초래한다(Gill et al., 1992). 다양한 독소단백질의 구조에 따라 적용 대상 곤충도 상이하여 비티는 나비목뿐만 아니라 딱정벌레목 및 파리목 해충에 이르기까지 넓은 기주 범위를 갖게 되었다(Schnepf et al., 1998).

비티 살충제의 작용 특성은 섭식에 의해 이루어지며 화학농약에 비해 비교적 살충 속도가 느리다. 또한 최근 다양한 해충이 비티 살충제에 대해서 살충제 저항성을 발현하고 있다. 비티 살충제에 대해서 저항성을 발현시키는 대표적 해충은 십자화과 작물을 기주로 하는 배추좀나방(*Plutella xylostella*)이다(Tabashnik et al., 1997). 비티 살충제에 대한 저항성 기작은 내독소 단백질의 단백질 분해 효소의 변형으로 중장 내에서 내독소 단백질의 활성화를 억제하게 하는 기작이며, 또 다른 주요 저항성 기작으로 중장 세포막 단백질인 캐드헤린(cadherin)의 변형에 따른 것으로 내독소 단백질의 결합을 낮추는 것으로 이해되고 있다(Herbert and Goodrich-Blair, 2007). 따라서 비티 살충제의 배추좀나방에 대한 효과적 방제가 어려워 농업 현장에서 선호도가 낮아지고 있다. 비티 살충제는 결정체를 이루는 독소단백질의 살충 적용 대상에 Cry1, Cry2, Cry3, Cry4 등으로 구분하고 있다. 나비목 해충을 대상으로 유효한 살충력은 배로 비티 독소단백질을 Cry1에 속하게 된다. 그러나 Cry1은 다시 분자구조의 다양성에 따라 세분 되어 Cry1A, Cry1B, Cry1C 등으로 구분된다. 배추좀나방(*Plutella xylostella*)과 파밤나방(*Spodoptera exigua*)는 대표적 천적 해충으로 주요 농작물에 대해 경제적 피해를 주고 있다. 이 두 해충은 비티 독소단백질에 대해 상이한 감수성을 보이고 있다. Cry1A는 주요 독소단백질로 *Bt kurstaki*는 배추좀나방에 유효한 살충력을 보이는 반면 Cry1C는 주로 *Spodoptera*에 속하는 해충에 유효한 살충력을 보이게 된다.

비티 생물농약의 살충력을 높이기 위한 연구가 "비티플러스"라는 개념으로 진행되었다(Seo and Kim, 2011). 이는 곤충 면역 억제가 비티의 살충력을 높일 수 있다는 보고에 개발 원리를 두었다(Rahman et al., 2004). 실제로 면역 억제 화합물을 비티 살충제와 혼합하여 처리하면 비티의 살충력을 현저히 증가시켰다(Broderick et al., 2010). 한편, 곤충병원세균인 *Xenorhabdus nematophila* (Xn)는 대상 곤충의 면역을 억제하는 물질을 생성한다고 보고하였다(Park and Kim, 2000).

재료 및 방법

1. 생물검정

생물검정은 옆침지법으로 실시하였다. 각 농도에 5 분간 침지시킨 배추 잎(3×3 cm)을 여과지가 깔린 용기에 놓아 20 분간 건조시켰다. 이때 1 시간 동안 절식시킨 파밤나방 3령충과 배추좀나방 4령충을 처리구당 10 마리씩 3 반복으로 처리하였다. 생존 수 확인은 24 시간 주기로 7 일차 까지 매일 하루 중 같은 시간에 조사하였다. 생존 유무는 뭉툭한 막대로 머리, 가슴, 배

를 각각 1회씩 눌러 자의적 움직임이 없는 개체를 사망체로 인식하였다.

2. 듀얼비티플러스 제조

비티와 Xn 배양액을 서로 다른 비율로 혼합하여 각각 1000 ppm의 희석액으로 준비하였다. 상기에 기술된 생물 검정법으로 서로 다른 혼합 비율별 살충력을 비교하였다. 각각의 혼합 비율은 Bta:Btk:Xn:EtOH = 4:1:4:1 로 제조 하였다. 파밤나방 3령충과 배추좀나방 4령충 10 마리씩 3 반복으로 처리하였다. 대조구는 증류수로 상기와 동일하게 처리하였다. 살충력 판별은 처리 후 7 일차 사망률로 비교하였다.

3. 야외조사

배추좀나방과 파밤나방을 배추 한 포기당 약 50 마리씩 3반복으로 방사한다. 방사 후 3시간이 지난 뒤 배추에 몇 마리가 붙어있는지 조사를 한다. 개체수를 확인한 다음 제조된 듀얼비티플러스를 배추 한 포기당 300ml씩 1,000ppm의 농도로 처리한다. 처리 후 3, 5, 7일 간격으로 배추에 붙어있는 살아있는 해충의 개체수를 세어준다.

4. QC

(1) 듀얼비티플러스를 1 L 씩 총 3 회 수집했다.

(2) 1 L의 separate funnel을 이용하여 1 L의 시료를 넣고 300 ml의 hexane을 넣고 마개로 막고 30회 가량 흔들어 주었다. 이때 5회 마다 코르크를 열어 가스를 배출했다. 이후 거치대에 separate funnel을 2시간 동안 방치했다. 이후 추출 hexane 층을 얻고, 다시 300 ml의 hexane을 첨가하고 동일한 방법으로 추출했다. 다시 400 ml의 hexane을 첨가하고 동일한 방법으로 추출했다. 이러한 1 L의 hexane 추출물은 4°C에 보관했다.

(3) 남은 여액에 hexane 추출과 동일한 방법으로 ethylacetate 추출을 실시했다.

(4) 수집된 hexane층과 ethylacetate 층은 각각 1 L의 삼각플라스크에 무수황산나트륨을 500 g 넣은 후 1 L의 hexane 분획구와 ethylacetate 분획구를 넣어 탈수했다.

(5) 깨끗한 1 L의 삼각플라스크 입구부분에 여과지가 깔린 깔때기를 설치하고, 탈수시킨 유기용매 추출물들을 부었다.

(6) 탈수된 유기용매 추출물들은 1 L 크기의 감압농축기에 플라스크를 이용하여 감압농축(40°C에서 1시간)하여 hexane층과 ethylacetate 층을 제거했다. 유기용매가 사라진 플라스크는 벽면에 대사물질이 묻어 있는 것을 확인할 수 있으며, 벽면에 묻은 물질은 HPLC용 MeOH 5 ml를 첨가하고 sonicator를 이용하여 완전 용해시킨 후 회수했다.

(7) 5ml의 시료를 투과직경이 0.20 μm 의 PTFE syringe filter로 여과한 후 10 μl 의 초자주사기를 이용하여서 HPLC에 5 μl 주입하였다.

(8) HPLC 조건

- 1) HPLC: Waters 996_660 (254 um) 2) Flow rate: 0.5 mL
- 3) Water 60 : MeOH 40 4) Time: 70 min

5. 제조공정

Table 1. 듀얼비티플러스 배지성분

Chemical	Company	Fermenter (500 L)
Glucose	DAESANG, Seoul, Korea	12kg
L-monosodium glutamate	DAESANG, Seoul, Korea	7.2kg
Yeast extract	Duksan, Ansan, Korea	1.5kg
Monopotassium phosphate	Duksan, Ansan, Korea	0.6kg
Calcium chloride	Duksan, Ansan, Korea	0.6kg
Magnesium sulfate	Duksan, Ansan, Korea	0.18kg
copper(II) sulfate	Duksan, Ansan, Korea	0.018kg
Manganese sulfate	Duksan, Ansan, Korea	0.012kg
Iron(II)sulfate	Duksan, Ansan, Korea	0.012kg
Zinc sulfate	Duksan, Ansan, Korea	0.012kg

듀얼비티플러스는 Bta, Btk, Xn 세 가지의 세균이 들어간다. 표에 나와 있는 배지성분을 2시간 동안 고압 멸균한다. 이 때 pH 7.0, 온도는 28℃로 맞춰준다. 멸균이 끝나면 세균을 접종한다. 각각의 세균은 4L씩 미리 배양해 둔 것을 사용한다. 접종 후 약 2시간 간격으로 거품이 발생하는지 확인한다. 거품이 발생하였을 경우 소포제를 소량 투입한다. 48시간 동안 배양한 다음 세균을 원심막분리한다. 약 10배가 농축될 때 까지 막분리를 실시한다. 막분리가 끝나면 Bt는 48시간 동안 4℃에서 저온저장하며 Xn은 20L 말통에 보관한다.

결 과

1. 듀얼비티플러스 유효성분

듀얼비티플러스는 가격면에서 저렴한 산업용 배지로 만들어졌다. 배지의 조성은 (Glucose, L-monosodium glutamate, Yeast extract, Monopotassium phosphate, Calcium chloride, Magnesium sulfate, copper(II) sulfate, Manganese sulfate, Iron(II)sulfate, Zinc sulfate)로 구성되어 있다(Table. 1) (Seo and Kim, 2010). 듀얼비티플러스에 유효물질의 농도는 HPLC를 이용하여서 분석하였다. 초기 1 L 의 듀얼비티플러스를 헥산과 에틸아세테이트로 추출하였다. 추출물을 HPLC를

통해서 8종의 유효물질을 함량 분석하여서 유효물질을 그림으로 나타내었다. 이 8종의 유효물질이 있다는 것을 확인하였으며 각각의 물질별로 농도를 계산하였다. Xn 배양액과 비티플러스와 듀얼비티플러스를 비교하였을 때 듀얼비티플러스가 더 많은 유효물질이 있다는 것을 볼 수 있었다.

Table 2. HPLC analysis of eight bacterial metabolites in 'Dual Bt-Plus' insecticide product. Each measurement was independently replicated three times.

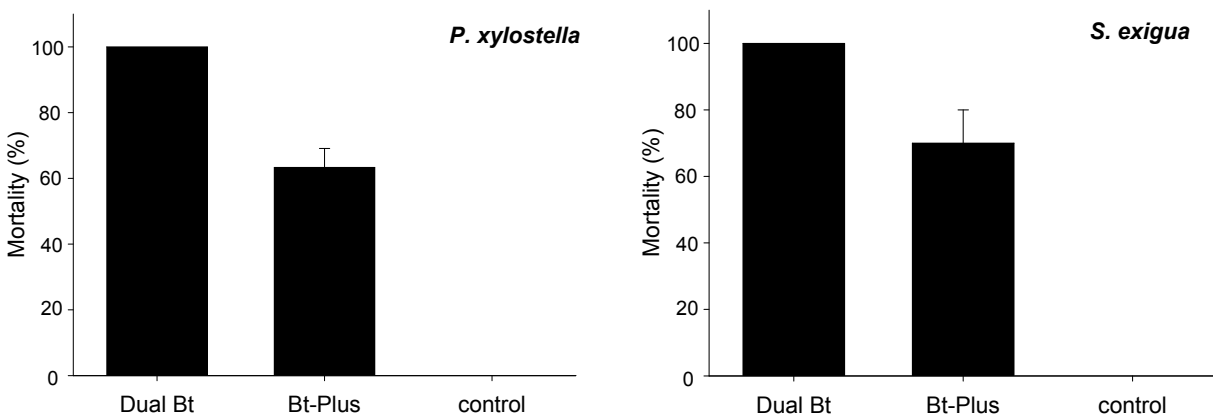
Treatment	Bacterial metabolites ($\mu\text{g}/\text{ml}$)								
	Ac-FGV	BZA	cPY	HPA	indole	oxindole	PHPP	PY	
Xn culture	55.2	88.6	97.3	63.3	46.5	155.1	170.2	216.7	
broth (48 h) ¹	± 11.7	± 10.4	± 21.0	± 19.8	± 18.5	± 49.3	± 61.2	± 50.7	
Bt-Plus	Expected	22.1	35.4	38.9	25.3	13.0	62.0	68.1	86.7
	observed	28.3 ± 5.0	30.7 ± 8.4	51.6 ± 6.0	14.3 ± 5.0	11.9 ± 2.3	79.1 ± 12.8	88.5 ± 23.7	90.9 ± 17.2
Dual Bt-Plus	Expected	220.8	354.4	389.2	253.2	186	620.4	680.8	866.8
	observed	160.1 ± 44.7	187.9 ± 27.4	456.2 ± 63.6	96.8 ± 11.3	130.3 ± 31.1	613.7 ± 89.6	385.4 ± 149.8	413.0 ± 105.8

¹ *Xenorhabdus nematophila* (Xn) was cultured for 48h at LB medium.

2. 약효

(1) 실내약효

기존의 비티플러스와 듀얼비티플러스를 실내에서 약효검정 하였다. 희석배수는 기준 농도인 1,000배 희석배수에서 처리 후 3일차를 그래프로 나타내었다. 기존의 비티플러스는 배추좀나방과 파밤나방에 70%에 미치지 못하는 방제 효과를 보였지만 듀얼비티플러스는 3일차에 100%의 방제 효과를 보였다. 따라서 이러한 결과는 기존의 약제보다 빠른 시간 안에 100%의 방제 효과를 보장할 수 있었음을 보여주었다.



(2) 포장약효

최적의 혼합 비율로 만들어진 듀얼비티플러스를 야외 조건에서 배추좀나방과 파밤나방의 방

제효과를 알아보았다. 듀얼비티플러스는 처리 3일차에 배추좀나방은 86.7%, 파밤나방은 93.0%로 기존의 비티플러스나 상용화된 비티제품, 화학농약보다 약효가 높은 것을 볼 수 있었다. 시간이 지나면서 5일차에는 듀얼비티플러스가 100%의 방제가를 보였다. 이는 다른 제품들보다 현저히 빠른 방제가를 나타내었다. 더불어 듀얼비티플러스(1,000 배 희석)는 기준량에서 약해를 나타내지 않았다.

Table 3. Control efficacy of Dual Bt-Plus against *Plutella xylostella* larvae infesting cabbage leaves in field

Treatment	N	Survival (%)				DMRT ²	Control efficacy
		1	2	3	Mean±SD		
3 DAT ³							
untreated	46	96	93	82	90.3±7.3	c	-
Dual Bt-Plus	47	22	0	18	13.3±11.7	a	86.7
Bt-Plus	45	65	64	70	66.3±3.2	b	34.0
control 1	47	78	63	66	69.0±7.9	b	31.0
control 2	43	79	68	70	72.3±5.9	b	27.7
5 DAT							
untreated	46	96	87	81	88.0±7.5	c	-
Dual Bt-Plus	47	0	0	0	0±0	a	100
Bt-Plus	45	51	41	35	42.3±8.1	b	57.7
control 1	47	42	45	60	49.0±9.6	b	51.0
control 2	43	34	47	44	40.5±9.2	b	59.5
7 DAT							
untreated	46	91	83	81	85.0±5.3	c	-
Dual Bt-Plus	47	0	0	0	0±0	a	100
Bt-Plus	45	44	38	33	38.3±5.5	b	62.7
control 1	47	42	35	43	40.0±4.4	b	59.8
control 2	43	34	45	39	39.3±5.5	b	60.7

¹ 'control 1' represents a chemical insecticidal (Raimon[®]). 'control 2' represents a commercial Bt (Tobaki[®]).

² 'DMRT' represents Duncan's multiple range test at Type 1 error = 0.05.

³ 'DAT' represents days after treatment.

Table 4. Control efficacy of Dual Bt-Plus against *Spodoptera exigua* larvae infesting cabbage leaves in field

Treatment ¹	N	Survival (%)				DMRT ²	Control efficacy
		1	2	3	Mean±SD		
3 DAT							
untreated	55	91	95	98	94.7±3.5	c	-
Dual Bt-Plus	50	6	15	0	7.0±7.5	a	93.0
Bt-Plus	44	91	93	75	86.3±9.9	b	13.7
control 1	46	90	85	85	86.7±2.9	b	13.3
control 2	44	60	73	74	69.0±7.8	b	31.0
5 DAT							
untreated	46	91	89	92	90.7±1.5	d	-
Dual Bt-Plus	47	0	0	0	0±0	a	100
Bt-Plus	45	51	40	30	40.3±10.5	ab	59.7
control 1	47	57	57	47	53.7±5.8	c	46.3
control 2	43	33	29	42	31.0±2.8	b	69.0
7 DAT							
untreated	46	91	83	88	87.3±4.0	c	-
Dual Bt-Plus	47	0	0	0	0±0	a	100
Bt-Plus	45	44	40	30	38.0±7.2	b	62.0
control 1	47	47	44	36	42.3±5.7	b	57.7
control 2	43	29	24	35	29.3±5.5	b	70.7

¹ 'control 1' represents a chemical insecticidal (Raimon[®]). 'control 2' represents a commercial Bt (Tobaki[®]).

² 'DMRT' represents Duncan's multiple range test at Type 1 error = 0.05.

³ 'DAT' represents days after treatment.

3. 약해

시험약제	시험작물	약해정도(0-5)	비고
		기준량	
네프킬에스	배추 (삼보 엇갈이)	0	-
무처리	배추 (삼보 엇갈이)	0	-

결론

비티 생물제제의 곤충 증장을 파괴 시키는 살충기작과 Xn의 곤충 면역억제 기작을 통합하여 상승적 살충력을 전략으로 하는 기존의 비티플러스 약제(Seo and Kim, 2011) 보다 빠른 시간에 효과적이고 동시에 두 해충을 방제하는데 이념을 두었다. 세균배양에 사용하는 배지를 농민의 경제적인 면을 참고하여 제조 공정의 단가를 줄여 저렴하지만 효과는 같은 산업용 배지를 사용하였다(Seo and Kim, 2010). 본 연구에 사용한 비티는 *Bt aizawai*와 *Bt kurstaki*이다. 이 두 종류의 Bt들은 10배 농축을 하여 약 10^9 cfu/mL의 농도를 가졌다. Xn은 배양액에서 8가지의 유효물질이 나온다는 것은 입증되었다. Xn의 유효물질은 Ac-FGV, BZA, cPY, HPA, Indole, oxindole, PHPP, PY 8가지가 생성된다. 각각의 유효물질 중 BZA와 oxindole의 함량에 중점을 두고 Xn을 첨가하였다. BZA와 oxindole은 비티플러스에서 30.7 ± 8.4 $\mu\text{g/mL}$, 79.1 ± 12.8 $\mu\text{g/mL}$ 가 들어있지만 듀얼비티플러스는 BZA가 187.9 ± 27.4 $\mu\text{g/mL}$ oxindole이 613.7 ± 89.6 $\mu\text{g/mL}$ 가 들어있으므로 약 6배 많은 면역억제물질이 첨가되어 있는 것으로 확인되었다. 이는 비티의 병원성을 증가시키는 것을 보여주었다. 실내 약효 검정에서 병원성이 증가되는 것을 증명하였다. 비티플러스와 듀얼비티플러스를 배추좀나방과 파밤나방에 처리하였다. 처리 후 3일안에 듀얼비티플러스는 100%의 방제가를 보였지만, 비티플러스는 70%에도 미치지 못하는 방제가를 보였다. 따라서 듀얼비티플러스의 약효가 뛰어나다는 것을 입증하였다. 야외 포장 실험에서 처리 후 3일 안에 듀얼비티플러스는 배추좀나방 86.7%, 파밤나방 93.0%의 방제가로 비티플러스나 다른 상용화된 농약보다 빠르고 높은 방제가를 보였다. 5일차에는 100%의 방제가를 보여주면서 다른 농약들보다 효과적인 것을 볼 수 있었다.

개발된 비티플러스는 파밤나방과 배추좀나방을 완전방제시키며 약효도 없음으로 우수 약제로 등록 및 상품화 추진하게 한다.

제11장 딱정벌레 해충방제제(콜킬) 개발

화학농약의 무분별한 사용은 해충의 약제 저항성을 유발하였고, 이로 인하여 살충제의 사용량 증가로 농가의 경제적 손실 및 환경과 인축 피해를 주었다. 안전농산물 생산을 위한 인축에 피해가 적고 환경에 안전한 농약의 개발이 생물농약을 중심으로 개발되어 왔다. 나비목 해충을 대상으로 살충력이 높은 비티 살충제가 산업적으로 성공한 사례가 되어 현재까지 사용되고 있다(Bravo et al., 2011).

비티 살충제는 그람양성균인 *Bacillus thuringiensis* 세균을 기반으로 다양한 균주가 이용되었다. 이 세균의 살충 기작은 이 세균이 포자를 형성할 때 포자 주변에 존재하는 독소단백질 결정체(Crystal: Cry)에 의해 기인된다(Crickmore et al., 2014). Cry 단백질은 *B. thuringiensis* 균주에 따라 다양하여, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (BtK)와 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* (BtA)는 나비목해충을 방제하는 데 적합한 Cry 단백질을 발현하는 반면, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (BtI)와 *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (BtT)는 각각 파리목과 딱정벌레목 해충을 대상으로 방제가 효과가 높은 Cry 단백질을 발현하게 된다.

Cry 단백질은 대상 해충의 장내에 들어가면, 나비목 해충의 경우 중장의 알칼리 pH 조건에서 용해되어 소화효소(예, 트립신 유사 효소)의 작용에 의해 활성화된 독소단백질로 전환된다. 활성화된 Cry 단백질은 중장막의 aminopeptidase N (APN) 또는 alkaline phosphatase (ALP)의 도움으로 중장막 주변으로 밀집하게 되며, 이때 캐드헤린 막단백질에 의해 N 말단 영역의 첫번째 α helix 영역이 제거되면서 추가 활성화가 진행된다(Bravo et al., 2012). 이 추가 활성화된 Cry 단백질은 서로 올리고머를 형성하면서 중장막에 구멍을 뚫게 된다. 최근 이 과정에 ABC co-transporter의 기능이 관여하며, 이 단백질이 올리고머를 형성한 Cry 단백질에 대한 궁극적 수용체로 작용하여 중장막에 구멍을 형성하는 데 궁극적으로 도움을 주는 것으로 밝혀지고 있다. 이 구멍 형성 과정에 다시 높은 기질 친화도를 갖는 APN과 ALP가 수용체로 작용할 수 있다(Bravo et al., 2005).

비티 농약의 성공적 상업화와 더불어 농업 현장에서는 이 생물농약에 대한 저항성 사례가 나타나기 시작했다. 더욱이 비티 농약의 살충효과는 60-70% 방제 효과를 넘지 못하고 있다(Kwon and Kim, 2007). 또한 이들 미생물농약의 지효성은 농민들의 요구도를 채우지 못하는 이유가 되고 있다. 이를 극복하고 생물농약을 통한 친환경 방제를 이루기 위해 나타난 개념이 통합생물방제(Integrated Biological Control: IBC)이다(Jung and Kim, 2006). 작용점이 상이한 서로 다른 생물제제를 이상적으로 혼합하여 약효를 높이려는 기술을 담고 있다. IBC의 사례로서는 비티 농약과 곤충면역억제 인자와의 혼합 사용에서 찾을 수 있다.

Photorhabdus temperata subsp. *temperata* (Ptt)는 그람음성세균으로 곤충병원선충인 *Heterorhabditis megidis*의 공생균으로 작용한다(Kaya and Gaugler, 1993; Kang et al., 2005). 이 선충은 대상 곤충의 혈강으로 침입할 수 있고, 이 혈강에서 Ptt 세균을 분비하게 된다. 분비된 세균은 면역억제인자를 곤충 혈강으로 분비하며 자신 과 기주 선충을 곤충의 면역 반응으로 부터 보호받게 하고 자신의 증식을 도모하게 된다. 증식 과정에서 분해된 유기물과 함께 세균을 섭취한 선충은 발육하여 차세대를 형성하여 세균과 선충의 공생관계를 이루게 된다.

최소 네 종류의 면역억제물질이 화학적으로 동정되었다(Seo et al., 2012). 이들 물질의 공통된 특징은 곤충면역중개 물질인 아이코사노이드 생합성을 시작시키는 인지질분해효소인 phospholipase A₂의 활성을 억제하는 것으로 판명되었다(Kim et al, 2005). 이 물질은 세균 배양액에 존재하며, 이 세균 배양액과 비티 농약의 혼합액은 나비목 해충의 방제효과를 크게 향상시켰다. 즉, 비티의 Cry 독소단백질에 의해 대상 곤충이 중장세포층이 허물어지면서 이를 통해 Ptt 면역억제물질이 혈강으로 침입할 수 있게 되어 살충효과를 높인 것으로 해석되었다.

본 발명은 IBC 기술에 입각하여 배추를 가해하는 딱정벌레를 방제할 목적으로 이뤄졌다. 이를 위해 먼저 딱정벌레에 적용이 가능한 *B. thuringiensis* 균주를 선발하였다. 또한 Ptt의 살충효과 및 면역억제

효과를 검증하였다. 최종적으로 두 세균을 혼합한 미생물혼합제를 개발하였고, 이를 실내 및 간이포장 실험을 수행하였다. 본 연구는 이 생물농약을 콜킬('Col-Kill')이라 명명하였다.

재료 및 방법

좁은가슴잎벌레 사육. 본 실험에 사용된 좁은가슴잎벌레(*Phaedon brassicae*)는 온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 광주조건 16:8 (L:D) h, 상대습도 $60 \pm 10\%$ 사육실에서 누대 사육하였다. 유충의 경우 배추를 먹이로 제공하였고, 성충의 경우 10% 설탕물과 배추를 함께 먹이로 제공하여 사육하였다. 생물검정에 사용된 유충은 4-5령 유충(부화 후 7-10일 경과 개체)을 이용하였고, 성충은 우화 10-20일 된 개체를 이용하였다.

곤충병원세균 균주 배양. 곤충병원세균(*Xenorhabdus nematophila* ANU101, *Photorhadus temperata temperata* ANU101)은 기주 선충에서 분리된 후 동결보관중인 것을 이용하였다(Jung and Kim, 2006). 이들 균주는 tryptic soy broth (TSB, MBcell, Seoul, Korea) 배지를 이용하여 28°C 에서 16 시간 배양 후, 글리세롤이 30%가 되도록 첨가하여 보관용 균주를 만들었다. 이 보관 균주는 반복되는 세균 배양의 원시료로 이용되어 계대배양에 따른 세균 변이 가능성을 줄였다. 이 균주를 28°C 에서 48 시간 동안 200 rpm에서 배양하여 균주를 얻었다.

네 종류의 비티 균주(BtK, BtA, BtK, BtT)가 본 발명에 비교 분석되었다. 이들 각 비티 균주를 TSB 평면 배지에 세균을 도말하고 28°C 에서 16 시간 배양하였다. 평면배지에서 배양된 세균에서 단일 콜로니를 얻고 이를 TSB 액체 배지를 이용하여 28°C 에서 48 시간 동안 200 rpm에서 배양한 후, 다시 48시간 동안 4°C 저온고에 보관하여 세균의 포자 형성을 유도하였다.

Ptt 세균 혈장 독성 분석. Ptt와 *X. nematophila* 세균의 혈장 독성을 좁은가슴잎벌레 유충을 대상으로 비교하였다. 각 유충에 서로 다른 세균 밀도($0-10^7$ CFU)로 각각 혈장에 주입했다. 혈장 주입은 모세관 주사기를 이용하여 $1 \mu\text{L}$ 씩 미량주사하였다. 각 세균 농도로 10 마리씩 처리한 후 3일째 사망율을 조사하였다.

Ptt 배양액의 면역억제 활성. 앞에서 기술한 방법대로 Ptt 세균을 48 시간 배양하고, 8,000 rpm에서 30 분 원심분리 한 후 배양액 상등액을 얻었다. 배양액 상등액은 $0.22 \mu\text{m}$ 막여과지를 이용하여 배양액에 존재하는 잉여 세균을 제거하고 순수 배양액만 분리하였다. 이렇게 분리된 배양액을 제조함 대장균과 혼합하여 좁은가슴잎벌레 유충 혈장에 주입하였다. 제조함 대장균은 ampicillin 저항성 유전자를 갖는 pCR2.1 벡터에 형질전환된 것을 이용하였다. 세균의 혈장 주입은 앞에서 기술한 미량주사기법을 이용하였다. 각 유충에 주입된 세균의 농도는 4.8×10^4 CFU 였다. 처리 후 시간별로 혈림프를 수거하여 ampicillin (0.13mM)이 함유된 Luria-Bertani 배지에 도말하고 37°C 에서 15 시간 배양하였다. 이후 형성된 균총수를 계수하여 개체 당 CFU 수로 환산하였다.

콜킬 제조. 미생물 농약 '콜킬'은 Bt (10^{10} 7.28/mL) 25 mL, Ptt 배양액 195 mL, 100% 에탄올 25 mL 그리고 전착제(Koremul-DH-5006, 한농화성, 군산, 한국) 5 mL을 섞어 총 250 mL의 액제로 조제하였다.

Cry toxin 확인. 본 발명에 이용된 4종의 *B. thuringiensis*가 발현하는 특이적 독소 독소를 확인하기 위하여 각 독소(Cry1Ca, Cry1Ac, Cry3, Cry4)별 프라이머를 제작하였다. 네 종류의 Crt 독소단백질 유전자는 NCBI의 GenBank에서 Cry1Ca는 AF362020, Cry1Ac는 EU447666, Cry3는 AJ37900 그리고 Cry4는 FJ770572의 accession number를 이용하여 얻었다. Cry1Ac forward primer는 $5\text{'-GATATCGTTGCTCTGTTCCCGAA-3'}$, reverse primer는

5'-CACGTTGTTATTCTGTGGCGGT-3', Cry1Ca의 forward primer는 5'-GCCAGTTGGTCAACTAAGGGAAG-3', reverse primer는 5'-CCGTACCTCTTCCTCGATACGTAAA-3'이며, Cry3의 forward primer는 5'-CCTTTAGCGGAACTCCAAATC-3', reverse primer는 5'-TGAACTCAATGCACTCACATAATC-3'이며, Cry4의 forward primer는 5'-CCTATGCACAAGCTGCAAATC-3', reverse primer는 5'-CGTTGACATCCCTTCTACAGTC-3'이다. PCR 반응용액은 25 μ l로서 진을 제품(서울, 한국)의 PCR 반응용액을 이용하였다. 각 PCR 반응용액은 1 μ l Bt gDNA, 2.5 μ l 10x 완충용액, 2 μ l dNTP, 1 μ l forward primer, 1 μ l reverse primer 그리고 0.5 μ l의 Taq polymerase로 구성되었다. PCR 기계는 Biorad 회사의 MyCycler™ personal Thermal Cycler 모델을 이용하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분 변성처리 이후 35회 증폭반응이 진행되었다. 각 증폭 반응은 94°C 변성 30초, 52°C 프라이머 결합 30초, 72°C 사슬연장 1분으로 구성되었다. 모든 증폭 반응 후 72°C에서 10분간 잉여 사슬연장 반응을 실시하였다. 이후 4°C에 증폭물을 보관시켰다. PCR 증폭물은 1% 아가로오즈 젤을 이용하여 분리하였다. 전기영동 조건은 1X TAE 완충용액, 150 V 전압으로 25분간 실시되었다. 분리된 PCR 증폭물은 ethidium bromide를 이용하여 염색된 후 관찰하였다.

비티 genomic DNA 추출. 비티세균의 게놈 DNA를 추출 하기위해 저온처리 된 각각의 비티를 2ml씩 e-tube에 수거한 뒤 13000rpm에서 5분간 원심분리 후 pellet을 얻었다. 얻은 pellet은 500 μ l의 extraction buffer (10mM Tris (pH 8.0), EDTA (pH 8.0), 20 μ l/ml RNase A, 0.5% SDS)로 녹였다. 그리고 10 μ l의 100 μ g/ml 농도의 proteinase K로 깨진 효소들을 제거했으며, 50°C water bath에 10분간 반응시켰다. 그 다음 225 μ l의 PCI (Phenol:Chloroform:Isopropylalcohol = 25:24:1 (v))를 넣은 후 14000rpm에서 2분간 원심분리 시켰다. 그 후 상등액을 새로운 e-tube에 옮긴 후 500 μ l의 CI (Chloroform:Isopropylalcohol = 24:1 (v))을 넣은 후 당 단백질을 제거하여 주었다. 그 후 다시 1400rpm에서 2분간 원심분리 하여 상등액을 새로운 tube에 담아주었고, 40 μ l의 10M ammonium acetate 와 800 μ l의 100% Ethanol을 넣은 후 얼음에서 10분간 반응시킨 후 14000rpm에서 3분간 원심분리 후 DNA를 수거하였다. 수거한 DNA는 70% Ethanol로 세척 한 후 50 μ l의 증류수로 녹여졌다.

생물검정. 약제처리는 잎침지법으로 2 x 2 cm² (가로 x 세로) 크기의 배추잎을 약제 처리용액에 약 20분간 침지한 후 여과지 위에서 4-5분간 과잉 약액을 제거시켰다. 이를 새로운 여과지가 깔려있는 직경 8.5 cm의 사육용기에 놓고 좁은가슴잎벌레 유충과 성충을 접종하였다. 곤충은 사육용기에 각 10 마리씩 접종하였으며, 사육용기가 실험단위로 3 반복 처리하였다. 이때, 무처리구는 멸균수에 침지한 배추잎을 이용하였고, 대조구는 디노테퓨란·스피네토란 입상수화제(격파, 동부팜한농, 서울, 한국)를 사용하였으며 권장농도를 시험에 사용하였다. 유충과 성충의 살충 유무는 24시간 간격으로 조사되었고, 이때 치사 곤충은 외부 자극에 대해 능동적 반응 움직임이 없는 개체로 규정하였다.

간이포장실험. 배추가 재배된 포트에 좁은가슴잎벌레 유충과 성충을 접종하였다. 각 배추 포기가 반복으로 30 마리 이상의 밀도를 나타냈다. 콜킬은 1,000 배 희석액을 이용하였으며, 대조 약제 디노테퓨란·스피네토란 입상수화제는 추천농도인 1,000 배 희석액을 사용하였다. 무처리는 물만 살포하였다. 생존수는 처리 후 3, 7일에 조사하였다. 방제가는 무처리구 대비 평균생존을 저하로 산출하였다.

약해분석. 어린 배추를 이용하여 콜킬의 약해를 조사하였다. 콜킬을 1,000 배 (기준량)와 500 배(배량)로 희석한 후 배추잎에 살포하였다. 각 처리는 3 반복으로 시행하였다. 약해 조사는 처리 후 3, 5, 7일에 실시되었으며 달관조사로 이뤄졌다. 달관조사는 0-5의 수준으로 평가하였다. 0은 약해가 없는 것이며 숫자가 증가할수록 약해정도가 심한 것으로 나타났다.

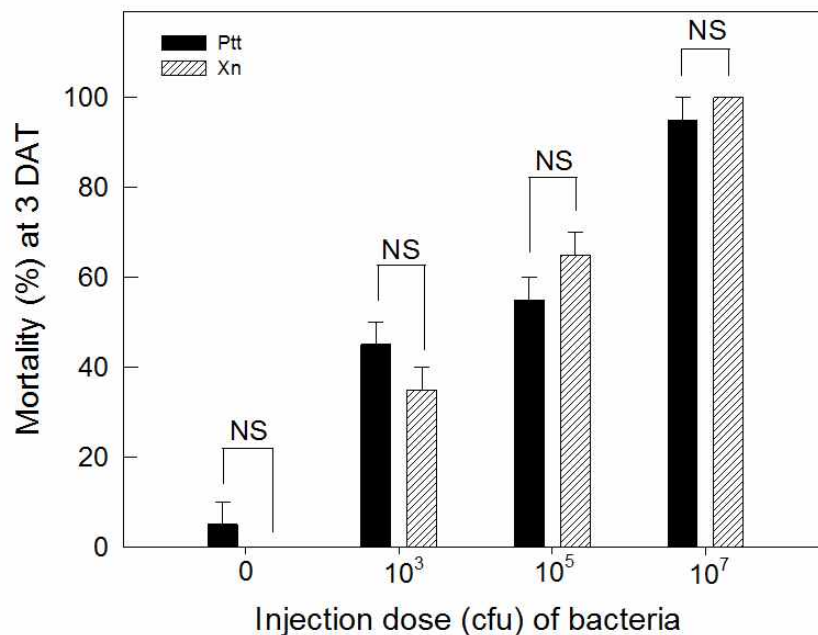
통계처리. 모든 살충효과 시험 결과는 백분율 자료로서 arcsine 변환 후 SAS의 PROC GLM (SAS

Institute, 1989)을 이용하여 ANOVA분석 및 처리 평균간 비교를 실시하였다. 반수치사시간(median lethal time: LT_{50})은 PROBIT 분석법(Raymond, 1985)를 이용하여 산출하였다.

결론

콜킬 제조를 위한 면역억제물질 분비 세균 균주 선발

콜킬의 발명을 위해서는 곤충면역 억제물질 분비를 하는 세균 균주와 다양한 Bt 균주 가운데 딱정벌레 적용 균주를 선발할 필요가 있었다. 먼저 곤충면역억제 균주는 Ptt와 Xn를 비교하여 Ptt 균주를 선발하였다(도 1). 서로 다른 농도의 세균 밀도로 혈강에 주입한 결과 두 세균은 모두 좁은가슴잎벌레 유충에 대해 살충력을 나타냈다. 그러나 농도에 따른 두 세균의 살충력 차이는 나타나지 않아 보였다.



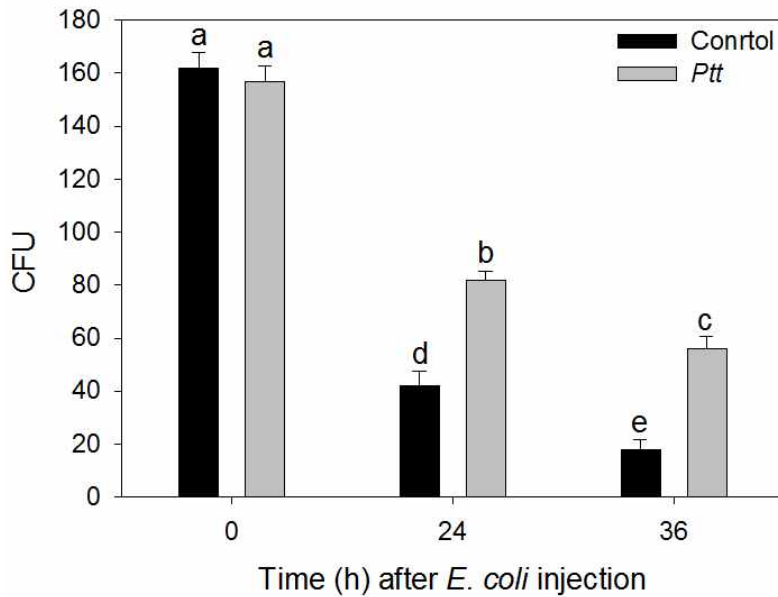
도 1. 좁은가슴잎벌레 유충에 대한 두 곤충면역억제 세균의 살충력 비교. 두 세균은 Ptt (*Photorhabdus temperata* subsp *temperata* ANU101)와 Xn (*Xehornhabdus nematophila* ANU101)를 이용하였다. 각 농도로 유충의 혈강에 주입하였으며 살충효과는 처리후 3일차(days after treatment: DAT)에 조사하였다. 각 처리는 10 마리씩 3반복으로 실시되었다. 'NS'는 0.05 유의수준에서 평균간 차이가 나타나지 않았음을 의미한다.

중앙치사농도는 Ptt 세균이 Xn 세균에 비해 다소 낮은 수치를 보여(표 1) 통계적으로 차이는 인정되지 않으나 Ptt가 Xn에 비해 우세한 살충력을 보인 것으로 판명되어 이 세균을 콜킬 제조에 선발하였다.

표 1. 좁은가슴잎벌레에 대한 두 세균의 증양치사농도

Bacteria	LD ₅₀ (95% confidence interval)	Slope ± SE	χ^2	df	p
Ptt	9.7 x 10 ³ (2.3 x 10 ² - 8.0 x 10 ⁴)	0.4 ± 0.1	0.35	4	0.4469
Xn	1.5 x 10 ⁴ (1.3 x 10 ³ - 8.3 x 10 ⁴)	0.6 ± 0.2	3.94	4	0.9747

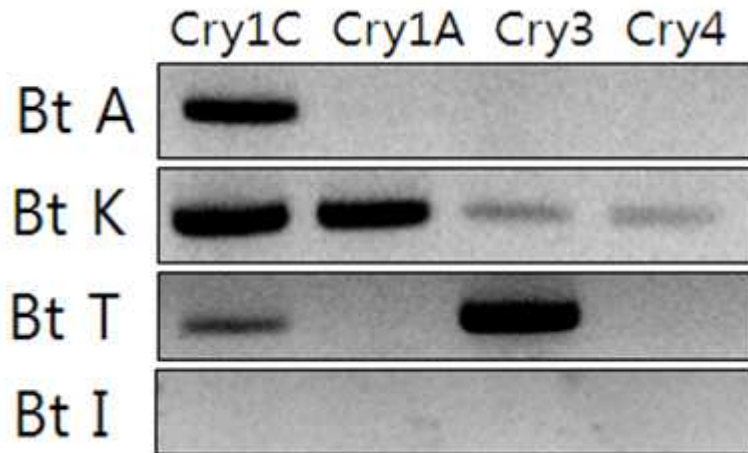
좁은가슴잎벌레에 대한 Ptt 배양액의 면역억제 효과를 규명하였다(도 2). 이를 위해 항생제 ampicillin에 저항성 유전자를 지닌 재조합 대장균을 대상 곤충 혈강에 주입하고, 처리 후 시간별 체내에 존재하는 대장균 밀도 감소를 추적하였다. 대조구의 경우 처리 후 24 시간 이후 주입한 세균 밀도의 뚜렷한 감소를 나타냈다. 이에 반해 Ptt 처리구는 주입된 세균의 밀도 감소가 뚜렷하게 지연되는 효과를 나타냈다. 이는 Ptt 배양액에 좁은가슴잎벌레의 면역을 억제하는 물질이 포함되어 있음을 의미했다.



도 2. 좁은가슴잎벌레에 대한 Ptt 배양액의 면역억제 효과. TSB에서 48 시간 배양된 Ptt 배양액을 원심 분리하여 세균을 제거하고 다시 0.22 μm 여과지를 통해 배양액에 존재하는 잉여 세균을 제거했다. 항생제(ampicillin) 저항성 대장균을 좁은가슴잎벌레 개체 당 150 CFU의 밀도로 주입하였다. Ptt처리구는 3 μl 배양액을 대장균과 함께 주입하였으며, 대조구는 Ptt 배양액 대신에 멸균수를 대장균과 함께 주입하였다. 각 처리는 3반복으로 실시되었다.

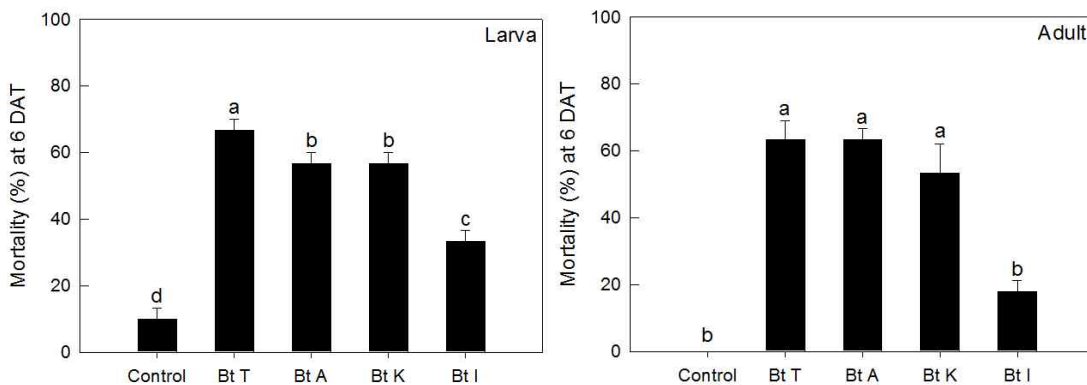
콜킬 제조를 위한 Bt 세균 균주 선발

Bt 선발을 위해 네 종류의 서로 다른 균주를 좁은가슴잎벌레 방제를 위해 비교 선발하였다. 우선 이들 Bt들의 Cry 독소단백질의 다양성을 규명하려 하였다. 각 독소단백질 유전자를 판명하는 특이적 프라이머를 이들 유전자를 비교하여 특이적 유전자 서열을 바탕으로 개발하였다(도 3).



도 4. 네 종류의 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 세균이 함유하는 Cry 단백질 다양성. 분석된 Bt 세균은 *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (BtT), *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* (BtA), *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (BtK) 그리고 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (BtI)를 이용하였다.

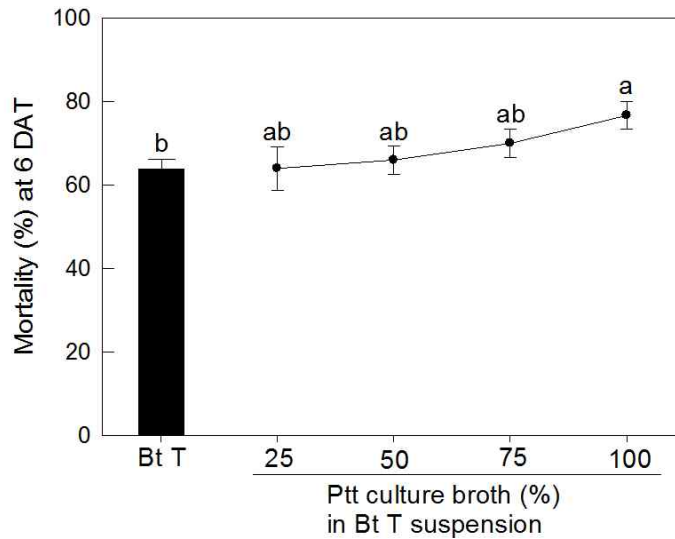
Bt 선발을 위해 네 종류의 서로 다른 균주를 잎침지법으로 유충과 성충에 대해서 살충력을 비교하였다(도 5). 네 Bt 균주는 좁은가슴잎벌레 유충과 성충 모두에게 살충력을 발휘하였다. 그러나 이들 균주들 사이에는 살충력에 차이를 나타냈다. 성충의 경우는 BtI를 제외하고 세 균주 모두 동일한 방제 효과를 나타냈으나, 유충은 이 세균 균주 사이에서도 차이를 나타내, BtT 가장 높은 유충 살충력을 보였다. 이러한 결과는 BtT가 이들 네 Bt 균주 가운데 좁은가슴잎벌레의 섭식 발육시기인 유충과 성충 모두에 대해서 효과적 방제를 위해 가장 살충력이 높은 균주로 판명되었다.



도 5. 좁은가슴잎벌레 유충과 성충에 대한 네 종류 Bt 세균의 살충력 비교. 네 Bt 세균은 *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (BtT), *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* (BtA), *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (BtK) 그리고 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (BtI)를 이용하였다. 생물검정은 잎침지법을 이용하였다. 배추를 이들 세균이 10^6 포자수/mL의 농도로 포함된 처리 약제에 담근 후 말려 유충과 성충에 먹이로 제공하였다. 살충효과는 처리 후 6일차(days after treatment: DAT)에 조사하였다. 각 처리는 10 마리씩 3반복으로 실시되었다. 막대 위에 포기된 서로 다른 영문자는 0.05 유의수준에서 평균간 차이가 있다는 것을 의미한다.

Ptt 배양액 첨가에 따른 BtT 살충력 제고 효과

선발된 BtT는 좁은가슴잎벌레의 방제에 최대 살충력이 약 60%를 나타내면서 방제 효과의 한계를 나타냈다. 이에 면역억제효과를 지닌 Ptt 배양액을 BtT에 추가하여 방제 효율 변화를 분석했다(도 6). Ptt 배양액을 서로 다른 농도로 고정된 BtT 농도에 추가한 결과 Ptt 배양액 농도가 증가할수록 좁은가슴잎벌레에 대한 방제 효율이 증가하여 최대 약 80%의 살충율을 나타냈다.



도 6. Ptt 배양액 첨가에 따른 BtT 방제효과 제고. 모든 처리는 BtT를 10^6 포자수/mL로 고정하였다. 이들 BtT 처리액에는 다양한 Ptt 배양액 농도가 함유되었다. 살충효과는 처리 후 6일차(days after treatment: DAT)에 조사하였다. 각 처리는 10 마리씩 3반복으로 실시되었다. 막대 위에 포기된 서로 다른 영문자는 0.05 유의수준에서 평균간 차이가 있다는 것을 의미한다.

Ptt 배양액 첨가는 방제가 제고는 물론이고 살충 속도를 크게 증가시켰다(표 3). Ptt 배양액 처리 농도별로 중앙치사시간(LT_{50})을 분석한 결과 Ptt 배양액 첨가는 최대 약 38 시간 이상 살충속도를 빠르게 유도하는 것을 확인하였다.

표 3. Ptt 배양액 첨가에 따른 BtT 살충 속도 변화

Treatment	LT_{50} (95%CL)	Slope \pm SE	χ^2	df	P
Bt T	132.6 (108.3-180.8)	5.4 \pm 0.9	2.946	5	0.5995
Bt T + 25% Ptt	129.3 (113.1-160.4)	4.1 \pm 0.8	4.836	5	0.5638
Bt T + 50% Ptt	111.9 (98.7-131.9)	4.0 \pm 0.7	5.326	5	0.7446
Bt T + 75% Ptt	103.7 (89.8-124.7)	3.3 \pm 0.5	3.339	5	0.4973
Bt T + 100% Ptt	94.2 (82.5-109.0)	3.7 \pm 0.6	5.204	5	0.7330

콜킬 제조와 생물검정

이상의 결과는 좁은가슴잎벌레를 방제하는 데 Bt 균주로서 BtT와 면역억제 균주로서 Ptt가 최상의 조합으로 제시하였다. 이에 따라 최대 살충력을 주는 살포액의 최소 농도가 10^6 포자수/mL인 것을 감안하여 Bt 균주의 혼합비율을 결정하였고, 장기보관제인 에타놀을 10% 첨가하고, 전착제를 2%로 제한시킨 조건에서 나머지 78% 액상은 Ptt 배양액을 채우도록 제조하였다(표 4).

표 4. 콜킬(250 mL) 제조 조성

Components	Active ingredients	Volume (mL)	Composition (%)
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i>	10^{10} spores/mL	25	10
<i>Photorhabdus temperata</i> subsp. <i>temperata</i>	48 h culture broth	195	78
Preservative	Ethanol (95%)	25	10
Surfactant	Diocetyl sulfosuccinate	5	2

조제된 콜킬을 1,000 배 희석하여 대조약제들과 함께 좁은가슴잎벌레의 유충과 성충을 대상으로 잎침지법으로 방제효과를 분석하였다(표 5). 이러한 결과 유충과 성충 모두에서 콜킬은 비티 단독 처리에 비해 높은 방제 효율을 나타냈다. 콜킬의 방제 효과는 75-80%의 방제효과를 나타냈다. 그러나 좁은가슴잎벌레 방제를 위해 등록된 상용 화학 살충제의 방제 효율에 비해서는 콜킬의 방제력은 낮았다.

표 5. 좁은가슴잎벌레에 대한 콜킬의 방제효과

Treatment ¹	N	Mortality	Control efficacy (%)
Larvae			
Untreated	30	0.0 ± 0.0	0.0
BtT	30	61.5 ± 5.8	61.5
'Col-kill'	30	80.0 ± 5.8	80.0
DF	30	96.7 ± 3.3	96.7
Adults			
Untreated	30	0.0 ± 0.0	0.0
BtT	30	63.3 ± 3.3	63.3
'Col-kill'	27	75.0 ± 12.6	75.0
DF	30	90.0 ± 5.8	90.0

¹ 'BtT' represents a spray with *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrinis* (10⁶ spores/mL). Preparation of 'Col-kill' was described in Materials and method. 'DF' represents a commercial insecticide of dinotefuran+spinetoram (SG, Dongbu Farm Hannong, Seoul, Korea) and was sprayed as a recommended concentration.

콜킬의 방제효과를 간이 포장 시험에서 진행하였다(표 6). 시험곤충은 좁은가슴잎벌레 유충을 이용하였고, 기주는 배추를 대상으로 하였다. 각 처리는 유충이 30 마리씩 포함되었고, 이를 3 반복하여 방제효과를 산출하였다. 콜킬의 방제효과는 3일차 및 7일차 결과 모두 비티 단독처리에 비해 높았다. 그러나 화학농약은 7일차에서 94.7%의 높은 방제효과를 보인 반면 콜킬은 77.2%의 방제 효과에 그쳤다.

표 6. 좁은가슴잎벌레 유충에 대한 간이포장 조건에서 약제방제 효과

(A) 3 days after treatment

Treatment	Mean number before treatment	Survival (%)				Significance (DMRT)	Control efficacy (%)
		Rep 1	Rep 2	Rep 3	Mean		
BtT	32.3	68.8	78.7	63.3	70.3	a	26.6
'Col-kill'	33.3	66.7	56.3	59.4	59.8	b	37.6
DF	27.7	40.7	58.1	40.0	46.1	c	51.9
Untreated	34.3	97.1	93.6	96.7	95.8	d	-

(B) 7 days after treatment

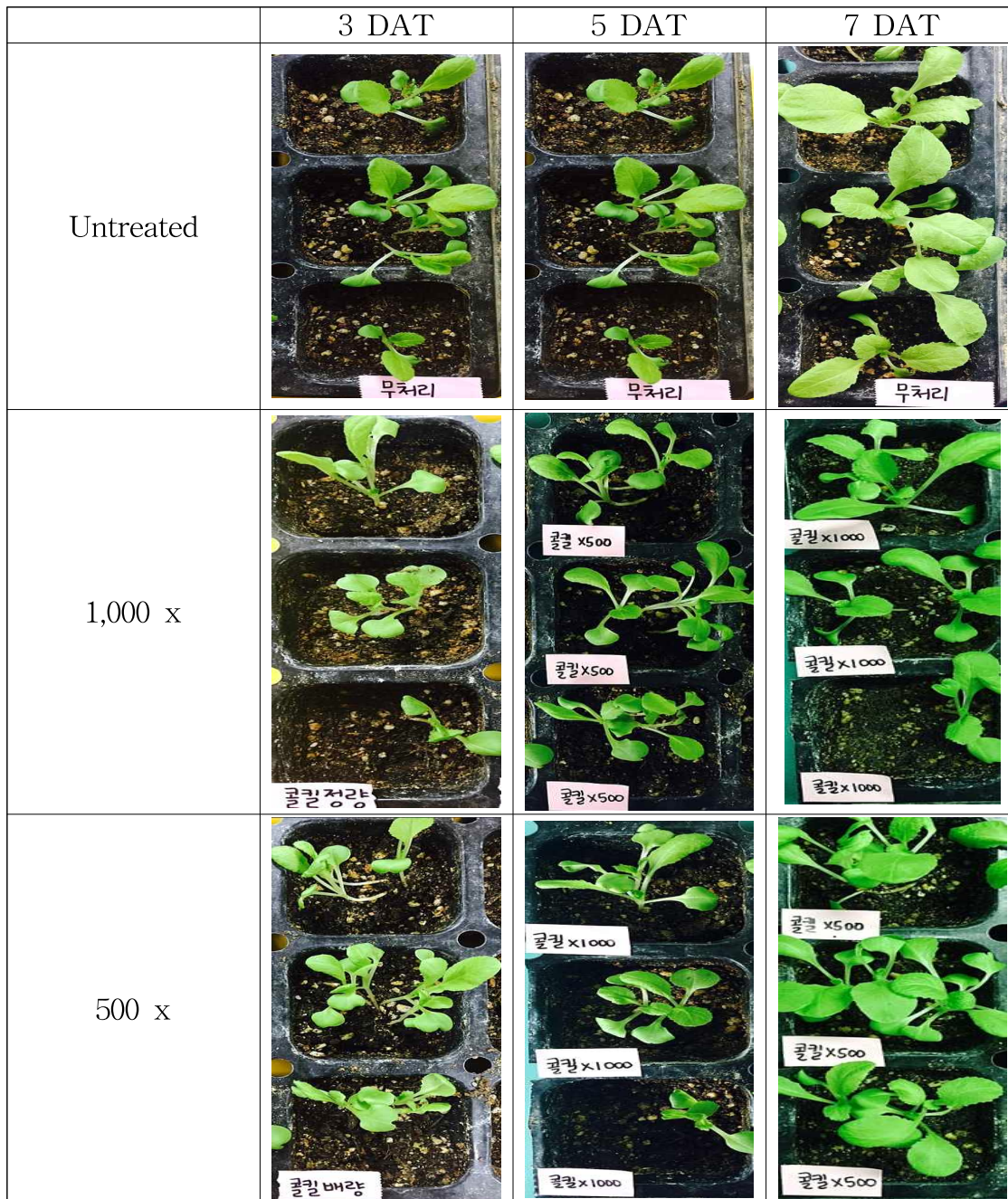
Treatment	Mean number before treatment	Survival (%)				Significance (DMRT)	Control efficacy (%)
		Rep 1	Rep 2	Rep 3	Mean		
BtT	32.3	31.4	32.3	33.3	32.3	a	66.2
'Col-kill'	33.3	21.8	17.1	26.5	21.8	b	77.2
DF	27.7	3.8	8.5	2.8	5.1	c	94.7
Untreated	34.3	97.1	93.6	96.7	95.8	d	-

¹ 'BtT' represents a spray with *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrinis* (10^6 spores/mL). Preparation of 'Col-kill' was described in Materials and method. 'DF' represents a commercial insecticide of dinotefuran+spinetoram (SG, Dongbu Farm Hannong, Seoul, Korea) and was sprayed as a recommended concentration.

배추에 대한 콜킬의 약해가 분석되었다(표 7). 어린 유묘 배추에 대한 콜킬의 기준량(1,000 배) 및 배량(500 배)에 대해서 약해는 나타나지 않았다.

표 7. 유묘 배추에 대한 콜킬의 약효 조사

Test insecticide	Crop	Days after treatment	Phytotoxicity (0-5) at dilution	
			1,000 x	500 x
'Col-Kill'	Cabbage	3	0	0
		5	0	0
		7	0	0



제12장 파리목 해충방제제(디프킬) 개발

연구요약

본 연구는 모기류에 살충력이 높은 새로운 비티플러스 생물농약에 대해서 야외포장 조건에서 약효와 환경생물에 대한 안전성평가에 관해 수행되었다. 모기 유충에 대한 효과적 방제를 위해 두 가지 살포 처리에 따라 비티플러스의 방제 효과를 검증하였다. 비티플러스의 공중살포(3.3 m² 당 100 mL)에 따른 수계에 서식하는 모기 유충의 효과적 방제를 위해서는 최소 50%의 제제화된 약제 농도가 요구되었다. 이에 반해 논생태계와 유사한 조건의 간이모형 조건에서 비티플러스를 수중살포한 경우 모기유충에 대한 비티플러스의 방제효과는 0.1%의 제제화된 약제 농도에서 80% 이상의 살충 효과를 나타냈고, 0.2% 처리에서는 완전 방제 효과를 보여 주었다. 또한 유충에 비해서는 다소 낮지만 10% 설탕물에 포함된 0.1%의 비티플러스는 성충에 대해서도 40% 이상의 살충력을 나타냈다. 환경생물에 대한 안전성평가에서는 잉어(*Cyprinus carpio*), 큰물벼룩(*Daphnia magna*), 꿀벌(*Apis mellifera*)을 대상으로 비티플러스에 대한 독성을 평가한 결과 급성적인 영향은 주지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 논생태계에 서식하는 모기 유충방제에 비티플러스의 수중살포 처리가 유효한 방제 처리라는 것을 제시하고 있다.

연구방법

모기사육. 흰줄숲모기(*A. albopictus*)와 빨간집모기(*C. pipiens pallens*)의 사육조건은 두 모기류 모두 25±1°C, 광주기 16:8h (L:D)이며, 상대습도 40~60%에서 유충과 성충을 사육하였다. 약 200 마리의 유충은 500 mL의 증류수가 담겨 있는 사육용기(가로×세로×높이, 25×10×8 cm)에 1:1로 혼합된 어분(MillepetArtemia, Ansan, Korea)과 건조효모(Samchon Chemical, Damyang, Korea) 10 mg씩 매일 공급하였다. 암수성충에게는 10% 설탕물을 공급하였으며, 흰줄숲모기 암컷은 원교계 마우스(*Mus musculus*)를 이용한 흡혈을 통해 산란을 유도하였다. 흰줄숲모기와 빨간집모기 유충은 각각 서울대학교 농업생명과학대학의 제연호 교수 연구실과 국립보건연구원의 질병매개곤충과에서 분양을 받았다.

BtI 생물농약 비티플러스 제조. 비티플러스 제조를 위한 BtI (*B. thuringiensis* subsp. *israelensis*)가 seed 배양을 위해 2 mL의 TSB (tryptic soy broth, Difco, MD, USA) 배지에서 24 시간동안 28°C에서 180 rpm의 속도로 회전진탕 배양하였다. 이 후 1 L의 TSB 배지에 1 mL가 접종되어 seed 배양과 동일한 조건으로 48 시간 동안 배양되었다. 포자형성을 유도하기 위해 정지기에 도달한 TSB 배지를 4°C에서 48 시간 동안 저온처리를 하였다. BtI 포자 농도는 10¹⁰ spores/mL 이상이 되도록 8,000 rpm에서 30 분간 각 배양액을 원심분리과정을 통하여 상등액인 배지성분을 제거하였으며 멸균증류수에 교반시켜 10 배 농축과정을 완료하였다. 기주 곤충의 면역을 억제하여 BtI의 살충력을 상승시키기 위하여 그람음성의 곤충병원세균인 *Xenorhabdus nematophila* (Xn)도 BtI와 동일한 조건에서 배양되었다. 비티플러스의 제조는 BtI, Xn, 보존제가 전체 양의 10%, 80%, 10%로 각각 구성되었으며, 보존제로는 에탄올 원액을 이용하였다.

비티플러스 공중살포를 통한 모기 유충의 생물검정. 공중살포를 통한 두 종의 모기류에 대한 비티플러스의 유효 살충력을 확인하기 위해 비티플러스 농도는 0.1, 1, 10, 50, 100%를 분석하였다. 비티플러스 처리량은 처리 면적(90 × 90 cm)당 전체 100 mL 부피로 정하였다. 처리면적당 모기 유충은 3 반복으로 이루어졌으며, 각 반복당 10 마리의 유충이 물 100 mL가 담겨있는 종이컵에 처리되었다. 모기 유충의 살충력은 비티플러스 공중살포 후 24 시간제에 조사가 되었으며, 물 표면에 떠오르거나 육안으로 관찰

시 움직임이 없는 개체를 사충으로 인정하였다. 실험환경은 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, 광주기 16:8 h (L:D)이며, 상대습도 40~60% 조건이었다. 무처리는 증류수 100 mL를 살포하였다.

모기 성충에 대한 비티플러스의 방제 효과 검증. 모기 성충에 대한 비티플러스의 살충력을 확인하기 위해 비티플러스를 설탕물에 혼합처리 하여 성충이 설탕물을 흡즙할 때 체내로 전달되도록 하였다. 비티플러스의 처리농도는 각각 500 ppm과 1,000 ppm이었으며, 두 종의 모기류 모두 성충으로 우화한지 5 시간 미만의 성충 개체를 본 실험에 이용하였다. 모기 성충의 살충력은 비티플러스 흡즙 후 24 시간 쯤에 조사가 되었으며, 육안으로 관찰시 움직임이 없는 개체를 사충으로 인정하였다. 각 처리에 30 마리씩 3 반복으로 처리하였다.

간이 수도생태계 모형제작 및 비티플러스 생물검정. 투명 아크릴판을 이용해 간이 논 생태계 모형(100 × 50 × 10 cm)을 제작하였다. 이 모형에 고압살균된 상토를 2 cm의 높이로 복토한 후 10 cm 간격으로 벼 유묘를 이양하였으며, 이곳에 물 8 L를 채워 논과 동일한 환경으로 구성하였다. 비티플러스를 이용한 두 종의 모기류 유충에 대한 생물검정에서는 간이 모형에 채워진 8 L의 물을 기준으로 1,000 ppm과 2,000 ppm의 약제 처리 농도를 평가하였다. 각 농도별 3 반복으로 구성되었으며, 각 반복 당 모기 유충은 30 마리로 이루어졌다. 모기 유충의 살충력은 비티플러스 처리 후 24 시간 쯤에 조사가 되었으며, 생충수를 확인한 후 사충은 육안으로 관찰시 움직임이 없는 개체 또는 조사기간 동안 호흡을 위해 물 표면에 떠오르지 않는 개체로 판별하였다.

비티플러스에 대한 급성독성평가. 비티플러스에 대한 급성독성평가를 잉어(*Cyprinus carpio*), 큰물벼룩(*Daphnia magna*), 꿀벌 (*Apis mellifera*)를 대상으로 (주)경농 중앙연구소 안전성연구팀에서 실험을 수행하였다. 농약 및 원제의 등록기준의 기초시험 농도인 10 mg/L을 기준으로 준비된 시험농도를 시험용수에 처리한 후 시험어류는 치사수 및 유영이상 증상을 96 시간까지 조사하였고, 큰물벼룩은 유영 저해개체 및 유영이상 유무를 48 시간까지 조사하였다. 시험어류는 전장이 3 ~ 5 cm 크기로 선별되었고, 12 L의 유리제품 수조($\phi 24 \times 30$ cm)에 시험용수는 10 L를 사용하였으며, 수온은 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, pH는 7.5 ± 0.2 , DO는 $94.5\pm 0.8\%$, 광주기 16:8 h (L:D)의 수온조건으로 인위적인 산소공급은 시키지 않았으며 실험개시부터 종료시까지 절식을 유지하였다.

큰물벼룩은 태어난 지 24 시간 이내의 개체를 선별하였고, 125 mL 용량의 비이커에 시험용수 100 mL를 사용하였으며, 수질 조건은 수온은 $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, pH는 7.4 ± 0.1 , DO는 평균 94.5%(92.3-96.7), 광주기 16:8 h (L:D)으로 유지하였다. 시험용수는 미국 EPA에서 제시된 방법(U.S. Environmental Protection Agency 1985)에 따라 조제하였으며, 먹이는 *Chlorella vulgaris*를 순수 배양하여 1 일 1 회마다 $1\sim 2.5\times 10^6$ cells/mL씩 제공하였다. 급성 독성평가에서 잉어는 각 처리 당 10 개체, 큰물벼룩은 각 처리 당 30 개체로 구성되었다.

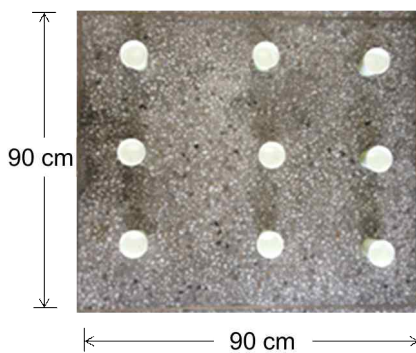
꿀벌(*Apis mellifera*)을 대상으로 비티플러스에 대한 접촉독성 평가를 진행하였다. 시험에 이용된 용기는 길이 15 cm, 직경 5 cm 크기의 원통형 스테인리스 철망으로 제작된 용기를 이용하였고, 시험용기의 입구는 유리 급식관(길이 5 cm, 직경 1 cm)을 끼울 수 있도록 구멍을 뚫은 스펀지 마개로 막아서 이용하였다. 접촉 독성평가에서 꿀벌은 각 처리 당 30 개체로 구성되었다.

통계분석. 모든 살충효과에 대한 생물검정 결과는 백분율 자료로서 arcsine 변환 후 SAS PROC GLM (SAS Institute 1989)을 이용하여 ANOVA 분석 및 처리 평균간 비교를 실시하였다.

결 과

비티플러스 공중살포를 통한 모기 유충의 생물검정. 비티플러스를 이용하여 야외 모기 유충 방제를 구현하기 위해 공중 살포 시 유효 살포량을 분석할 필요가 있었다(Fig. 1). 비티플러스의 공중살포 분석을 위한 공간배치는 90×90 cm의 사각 면적에 종이컵을 설치하였다(Fig. 1A). 각 종이컵에는 100 mL의 물을 붓고 여기에 흰줄숲모기 또는 빨간집모기 유충을 방사하였다. 여기에 서로 다른 농도의 비티플러스 현탁액을 100 mL 공중 살포하였다. 이때 비티플러스의 농도가 증가함에 따라 두 모기류(흰줄숲모기: $F = 109.50$; $df = 5, 12$; $P < 0.0001$, *C. pipiens pallens*: $F=98.67$; $df=5, 12$; $P < 0.0001$)에 대한 살충력도 높아졌다. 제형화된 비티플러스를 기준으로 0.1%를 살포하였을 때 흰줄숲모기는 20%, 빨간집모기는 25%의 살충력을 처리 후 24시간에 나타내었으며, 비티플러스 50% 이상을 살포하였을 때 두 모기류 모두에서 78% 이상의 살충력이 확인되었다. 비티플러스 100% 처리에는 두 모기 유충 중 모두 완전 방제 효과를 나타냈다. 두 모기 종간에 비티플러스에 대한 감수성 차이는 나타나지 않았다($P > 0.05$, Fig. 1B). 따라서 공중 살포로 모기 유충을 방제하기 위해서는 최소한 50% 농도로 제형화된 약제를 살포해야 효과적이라는 결과를 얻었다.

(A)



(B)

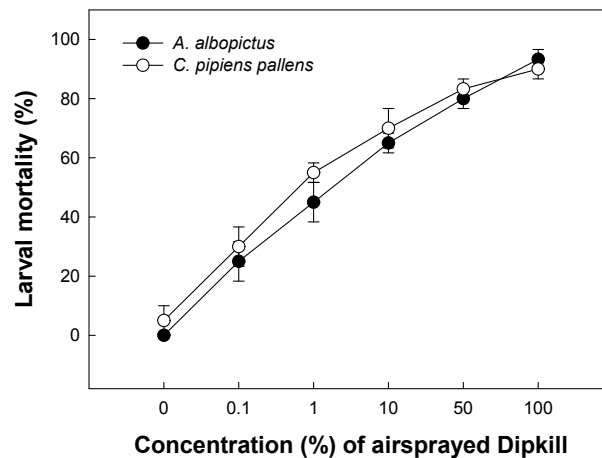
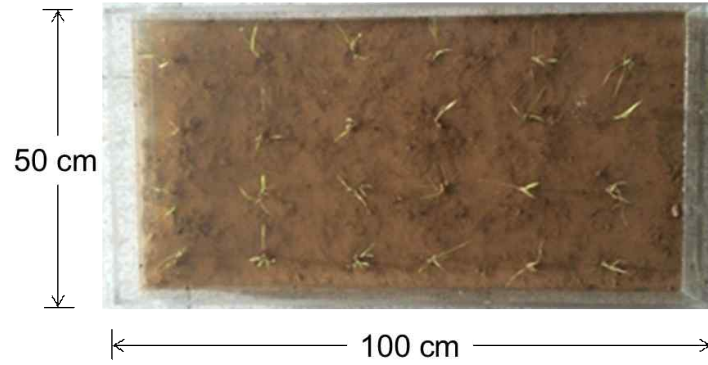


Fig. 1. Effect of Dipkill on mortality against two culicidae mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Culex pipiens pallens*, by spraying in the air. (A) Space arrangement of mosquito larvae in a cup, which has 10 cm of diameter and containing 100 mL of water. (B) Dose-response of Dipkill against two culicidae mosquito larvae. Each replication used 10 fourth instar larvae of larvae and was replicated three times. Mortality was measured at 24 h after treatment. Error bar indicate standard deviation. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

간이 논 생태계 모형에서 비티플러스를 이용한 모기 유충 생물검정. 공중 살포를 통해 모기 유충을 방제하는 것은 현실적으로 비경제적이라는 배경에 논 생태계 수중 처리를 시도하였다(Fig. 2). 8 L의 물량을 수용할 수 있는 논 생태계 모형을 이용하여 비티플러스의 모기 유충 방제 효과를 분석하였다. 간이 논 생태계는 벼의 유모가 이앙되어 실제 논과 유사한 환경에서 실험을 진행하였다(Fig. 2A). 그 결과 두

종류 농도의 비티플러스의 처리에 대한 흰줄숲모기($F = 36.00$; $df = 2, 6$; $P < 0.0005$)와 빨간집모기($F = 58.33$; $df = 2, 6$; $P < 0.0001$)의 약제 감수성이 나타났으며, 두 모기에 대한 비티플러스의 살충력 차이는 확인되지 않았다($P > 0.05$, Fig. 2B). 0.1% (= 1,000 ppm)의 제형화된 비티플러스를 비티플러스 처리한 후 24 시간 경과될 때 흰줄숲모기는 80%, 빨간집모기는 83%의 살충력이 나타났으며, 0.2% (= 2,000 ppm)의 비티플러스 처리에서는 두 종의 모기류 모두 100%의 살충력이 확인되었다.

(A)



(B)

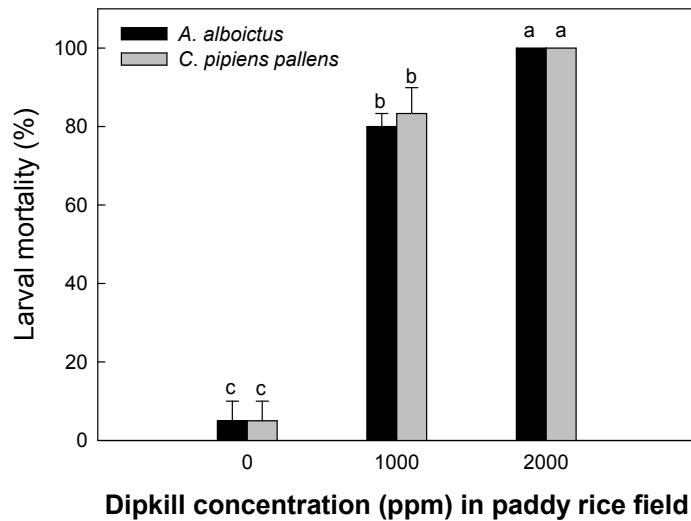


Fig. 2. Effect of Dipkill on mortality against two culicidae mosquito larvae, *Aedes albopictus* and *Culex pipiens pallens*, in Semi-field condition. (A) Designation of semi-field condition for mosquito bioassay. (B) Mosquito larvicidal effect of Dipkill on mortality against two culicidae mosquito larvae. Each replication used 50 fourth instar larvae and was replicated three times. Mortality was measured at 24 h after treatment. Error bar indicate standard deviation. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

비티플러스를 이용한 모기 성충의 생물검정. 모기 성충에 대한 비티플러스 처리는 흰줄숲모기와 빨간집

모기에 대한 통계적으로 유의한 살충력이 확인되었다(Fig. 3). 이들 두 모기류의 살충력은 비티플러스 처리 농도에 의존하여 증가하는 경향을 보여주었다(흰줄숲모기: $F = 318.50$; $df = 2, 6$; $P < 0.0001$, 빨간집모기: $F = 360.50$; $df = 2, 6$; $P < 0.0001$). 제형화된 비티플러스 기준으로 0.05% (= 500 ppm)의 비티플러스 처리 후 72 시간 후에 흰줄숲모기는 25%, 빨간집모기는 30%의 살충력을 나타내었으며, 0.1% (= 1,000 ppm)의 비티플러스 처리 시 흰줄숲모기는 45%, 빨간집모기는 50%의 살충력을 나타내었다. 무처리와 비교하여 비티플러스 1,000 ppm의 경우 모기 성충의 방제효과가 흰줄숲모기와 빨간집모기에서 40%와 45%로 확인되었다.

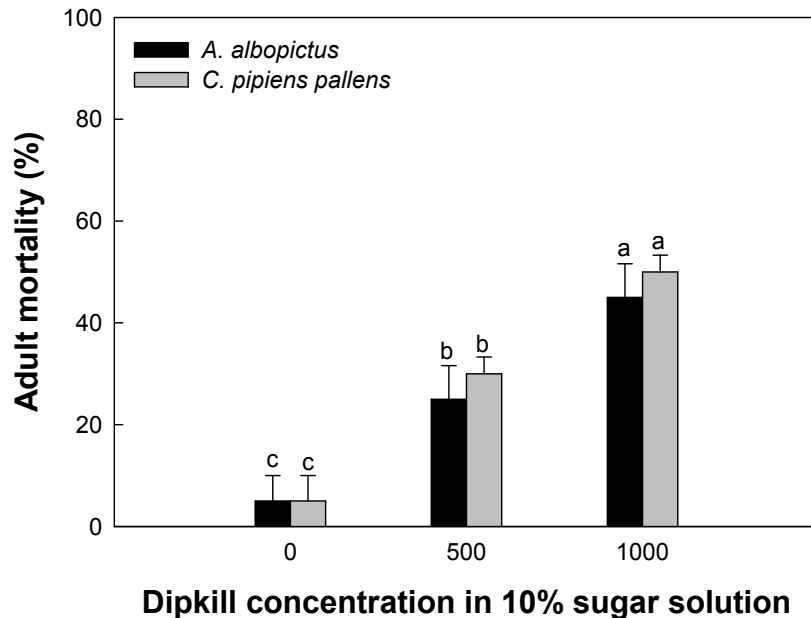


Fig. 3. Effect of Dipkill on mortality against two culicidae mosquito adults, *Aedes albopictus* and *Culex pipiens pallens*. Each replication used 10 adults and was replicated three times. Mortality was measured at 24 h after treatment. Error bar indicate standard deviation. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

비티플러스의 환경생물에 대한 안전성 평가. 잉어와 큰물벼룩을 대상으로 비티플러스 10 mg/L에 대한 급성독성평가를 진행하였다. 잉어를 이용한 급성독성평가에서 비티플러스 처리 후 96 시간까지 치사어 (Table 1)와 일반적인 중독증상으로 보이는 특이한 증상(Table 2)이 나타나지 않았다. 시험에 이용한 잉어의 전장과 체중 평균은 4.6 ± 0.3 cm, 0.9 ± 0.2 g이었다. 큰물벼룩을 이용한 급성독성평가에서도 비티플러스 처리 후 48 시간까지 유영 저해를 보이는 개체(Table 3)와 일반적인 중독증상을 보이는 개체(Table 4)가 관찰되지 않았다. 또한 꿀벌을 이용한 접촉 독성시험 결과 100 μ g a.i./bee 농도에서 48 시간까지 치사개체는 관찰되지 않았다(Table 5).

Table 1. Acute toxicity of BtPlus to common carp, *Cyprinus carpio*

Concentration (mg/L)	Number of fish tested	Cumulative number of dead fish			
		24 h	48 h	72 h	96 h
0	10	0	0	0	0
10.0	10	0	0	0	0

Table 2. Symptoms of BtPlus intoxication with respect to acute toxicity of common carp, *Cyprinus carpio*

Concentration (mg/L)	Symptoms of intoxication ¹			
	24 h	48 h	72 h	96 h
0	N(10) ²	N(10)	N(10)	N(10)
10.0	N(10)	N(10)	N(10)	N(10)

¹ Symptoms were classified into 'N' for normal, 'S' for residing mostly at surface water, 'B' for residing mostly at bottom water, 'L' for loss of equilibrium, 'H' for hemorrhage, 'V' for vertebral deformation, and 'A' for attached to other materials.

² Number in parenthesis indicates individuals diagnosed into each category.

Table 3. Effect of BtPlus on mobility of the water flea, *Daphnia magna*

Concentration (mg/L)	Number of individuals	Cumulative number of immobilized individuals	
		24 h	48 h
0	30	0	0
10.0	30	0	0

Table 4. Symptoms of BtPlus intoxication with respect to swimming behavior of the water flea, *Daphnia magna*

Concentration (mg/L)	Symptoms ¹ of intoxication					
	24 h			48 h		
	N	H	U	N	H	U
0	30	0	0	30	0	0
10.0	30	0	0	30	0	0

¹ Symptoms were classified into 'N' for normal, 'H' for hypersensitive, and 'U' for unstable swimming behaviors.

Table 5. Acute contact toxicity of BtPlus to the honey bee, *Apis mellifera*

Concentration (μg a.i./bee)	Number of honey bee tested	Cumulative number of dead honey bee			
		1 h	4 h	24 h	48 h
0	10	0	0	0	0
10.0	10	0	0	0	0

제2단원 산업화기술개발

제1장 후보제품군 탐색 및 포장시험

I. 나비목 해충 방제제 개발

□ 연구목표 : 나비목 해충의 방제를 위한 후보물질 탐색 및 포장 효과 시험

□ 연구내용

○ 맞춤형 후보 제품의 처방 확립 및 안정화 연구

- 나방류 해충 방제제의 개발을 위하여 Bta배양액, Btk배양액, Xn배양액, 보조용제를 여러 배합비율로 처방하였다. 초기 제품의 처방은 모든 원료의 배양액을 진동원심막분리 후 추출된 슬러지를 사용하여 Bta 40 : Btk 10 : Xn 40 : 보조용제 10의 배합비율로 처방되었으나, 실증실험 결과 포장에서 약효는 저조하였고, 제품 용기에서 누액이 발생하는 등의 단점이 확인되었다.
- 이에 제품의 단점을 보완하기 위하여 새로운 처방을 확립하였다. 제품 내 Bt의 cfu(colony forming unit)는 4.3×10^{10} spores/ml 이상을 확보하였고, Xn의 유효물질인 oxindole의 농도는 202.3ppm 이상이 되도록 처방하였다(표 1).
- Bta와 Btk는 각각 원심막분리 하여 슬러지를 이용하였고, Xn은 순수 배양액을 이용하였다. 보조용제는 IPA(isopropyl alcohol) 등을 실험한 결과 제품 원가 절감과 유기농업자재 허용 부원료의 측면에서 Ethanol(99.9%)을 선택하였다.

표 1. 듀얼네프킬에스 초기 시제품의 배합비율

구분	Bta 슬러지	Btk 슬러지	Xn 배양액	보조용제
함량(%)	6	4	80	10

○ 후보 제품 실사용 농도에서의 물성 검토

- 제품의 추천사용량인 1,000배 희석액에서 액상수화제 규격에 적합한지를 검토하였다.
- Bta 6% : Btk 4% : Xn 80% : 보조용제 10%(w/w)의 비율로 처방된 제품이 모두 수화되는데 걸리는 시간은 1분 이내로 액상수화제의 기준에 적합하였으며, 침강성 분석 결과 30분간 0.1ml 이내로 일반적인 액상수화제 규격에 적합하게 처방이 된 것을 확인할 수 있었다.

○ 후보 제품의 안전성 연구

- 후보 제품의 안전성을 확인하기 위하여 자체적으로 급성경구독성, 급성경피독성, 급성어독성 및 꿀벌접촉독성에 대한 예비실험을 실시하였다. 실험은 농약의 등록 기준(농촌진흥청 고시 제 2013-21호)에 준하여 진행하였으며, 2013년 9월 1차 생산된 시제품과 2014년 4월 2차 생산된 시제품에 대하여 진행하였다.
- 급성경구독성 실험 결과 2가지 시제품 모두 반수치사약량(LD₅₀)은 >5,000mg/kg으로 저독성으로 확인되었다.
- 급성경피독성 역시 2가지 시제품에서 반수치사약량(LD₅₀)은 >4,000mg/kg으로 저독성을 나타내었다.
- 잉어를 이용한 급성어독성 실험 결과 48시간 및 96시간 LC₅₀(mg/L)는 >10.0mg/L로 독성분류상 어독성 III급을 보였다.
- 꿀벌접촉독성 실험 결과 24시간 및 48시간 반수치사약량(LD₅₀, µg a.i/bee)는 >100µg a.i/bee를 보여 꿀벌에도 안전한 것으로 판단되었다.

○ 포장 실험을 위한 시제품 생산

- 포장 실험용 시제품 확보를 위해 2회에 걸쳐 대량 배양 및 제품 생산을 실시하였다. 1차 시제품은 2013년 9월, 2차 시제품은 2014년 4월에 경북바이오산업연구원의 장비를 이용하여 생산하였다.
- 제품 생산에 이용된 Bta, Btk, Xn 균주는 안동대학교에서 보관 중인 것을 이용하였고, 대량배양 시 이용된 배지는 산업용으로 사용되는 공업용 배지를 이용하여 생산 원가 절감을 도모하였다.
- 1차 생산 시 총 65.3kg의 시제품을 생산하였으나, 제품의 약효 미비, 제품 내 가스 발생으로 인한 누액 등으로 상품화하기 부적합 하였다. 또한 제품의 시장가격을 고려하여 원가 절감 차원에서 다음과 같이 처방을 변경하여 2차 대량배양을 실시하였다(표 2).

표 2. 듀얼네프킬에스 시제품 처방 변경

구 분	Bta	Btk	Xn	보조용제
1차 시제품 (2013년 9월 생산)	슬러지 40%	슬러지 10%	슬러지 40%	10%
2차 시제품 (2014년 4월 생산)	슬러지 6%	슬러지 4%	배양액 80%	10%

○ 듀얼네프킬에스의 포장 실증 시험

- 포장시험에 사용된 약제는 앞선 후보제품군 탐색 결과에 의해서 2014년 4월에 생산된 2차 시제품을 사용하였다.

1. 오이 목화바둑명나방에 대한 약효 시험

- 오이 목화바둑명나방 약제방제 효과 시험 결과, 약제 처리 후 3일차에 98.6%, 7일차에 99.6%의 방제가를 보였다(표 3, 4). 이는 살충제 시험기준과 방법 상 공식 대조 약제인 에토펜프록스수화제와 비교할 때, 비등 이상으로 방제 효과가 있는 것으로 판단되었다. 약해시험에서는 기준량(x1,000)과 배량(x500) 모두 약해증상은 나타나지 않은 것으로 미루어 오이 목화바둑명나방에 대한 방제약제로 사용 가능성을 보였다(표 5).

표 3. 오이 목화바둑명나방에 대한 약제방제 효과 (약제 처리 후 3일차)

시험약제	처리 전 밀도 (마리/구)	생충률(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균		
듀얼네프킬에스	62.7	3.1	0.0	1.4	1.5	a	98.6
에토펜프록스 수화제(대조)	66.7	7.3	2.5	4.7	4.8	a	95.6
무처리	69.7	116.9	104.5	104.2	108.5	b	-

C.V.(%) ----- 13.4

표 4. 오이 목화바둑명나방에 대한 약제방제 효과 (약제 처리 후 7일차)

시험약제	처리 전 밀도 (마리/구)	생충률(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균		
듀얼네프킬에스	62.7	0.0	0.0	1.4	0.5	a	99.6
에토펜프록스 수화제(대조)	66.7	3.6	1.2	3.1	2.6	a	97.7
무처리	69.7	122.5	109.1	105.6	112.4	b	-

C.V.(%) ----- 17.0

표 5. 오이에 대한 듀얼네프킬에스 약해시험 결과

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도(0~5)		비고
		기준량	배량	
듀얼네프킬에스	오이 (백미백다다기)	0	0	약해 없음

2. 배추 배추좀나방에 대한 약효 시험

- 배추좀나방 약제방제 효과 시험 결과, 약제 처리 후 3일차에 91.9%, 7일차에 91.3%의 방제가를 보였다. 이는 살충제 시험기준과 방법 상 공식 대조 약제인 디노테푸란입상수화제와 비교할 때, 비등 이상으로 방제 효과가 있는 것으로 판단되었다(표 6, 7). 약해시험에서는 기준량(x1,000)과 배량(x500) 모두 약해증상은 나타나지 않은 것으로 미루어 배추좀나방에 대한 방제약제로 사용 가능성을 보였다(표 8).

표 6. 배추좀나방에 대한 약제방제 효과 (약제처리 3일차)

시험약제	피해엽율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평 균		
듀얼네프킬에스	1.7	2.0	1.3	1.7	a	91.9
디노테푸란 입상수화제(대조)	1.3	1.3	1.0	1.2	a	94.3
무처리	21.3	17.7	24.0	21.0	b	-

C.V.(%) ----- 15.8

표 7. 배추좀나방에 대한 약제방제 효과 (약제처리 7일차)

시험약제	피해엽율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평 균		
듀얼네프킬에스	2.3	2.0	2.0	2.1	a	91.3
디노테푸란 입상수화제(대조)	1.7	1.7	1.3	1.6	a	93.4
무처리	24.0	21.7	27.0	24.2	b	-

C.V.(%) ----- 18.3

표 8. 배추에 대한 듀얼네프킬에스 약해시험 결과

시 험 약 제	시험작물 (품종)	약해정도(0~5)		비 고
		기 준 량	배 량	
듀얼네프킬에스	배추	0	0	약해 없음
디노테푸란 입상수화제 (대조)	(삼보 열갈이)	0	0	약해 없음

○ 듀얼네프킬에스의 농약 혼용 약해 시험

- 시제품(듀얼네프킬에스)과 살충제 10종 및 살균제 10종의 혼용에 따른 유묘기 배추의 생육에 미치는 영향을 조사하였다(표 9).

표 9. 농약혼용약해 시험에 사용된 살충제 및 살균제

번호	살충제	희석배수	적용대상	살균제	희석배수	희석배수
1	알타코아 입상수화제	2,000	과밤나방	일품 수화제	1,000	무름병
2	마진 액상수화제	1,000	벼룩잎벌레	방법대 수화제	2,000	무름병
3	렘페이지 유제	1,000	배추좀나방	부라마이신 수화제	800	무름병
4	벨모스 유제	2,000	배추좀나방	미리카트 액상수화제	2,000	노균병
5	애니충 액상수화제	2,000	배추좀나방	명작 액상수화제	2,000 1,000	뿌리혹병
6	블리암후레쉬 액상수화제	5,000	벼룩잎벌레	세이브 액상수화제	1,000	노균병
7	모스피란 수화제	2,000	진딧물류	메가폰 입상수화제	1,000	노균병
8	코니도 수화제	2,000	진딧물류	리도밀골드 수화제	2,000	노균병
9	보스 입상수용제	250	벼룩잎벌레	포룸 수화제	1,000	노균병
10	에이팜 유제	2,000	배추좀나방	용마루 수용제	1,000	무름병

- 실험결과 듀얼네프킬에스와 농약의 혼용에 따른 배추의 피해는 발견되지 않았다(그림 1).







혼용 농약	조사일 별 사진			약해 증상	
	처리3일 후	처리5일 후	처리7일 후		
알타코아 입상수화제					없음
마진 액상수화제					없음
램페이지 유제					없음
벨모스 유제					없음
애니충 액상수화제					없음
불리암후레쉬 액상수화제					없음
모스피란 수화제					없음

그림 1. 배추 유묘기에 대한 듀얼네프킬에스와 농약의 혼용 약해 시험 결과.





























혼용 농약	조사일 별 사진			약해 증상
	처리3일 후	처리5일 후	처리7일 후	
코니도 수화제 				없음
보스 입상수용제 				없음
에이팜 유제 				없음
일품 수화제 				없음
방범대 수화제 				없음
부라마이신 수화제 				없음
미리카트 액상수화제 				없음

그림 1. 배추 유효기에 대한 듀얼네프킬에스와 농약의 혼용 약해 시험 결과(계속).

혼용 농약	조사일 별 사진			약해 증상	
	처리3일 후	처리5일 후	처리7일 후		
명작 액상수화제					없음
세이브 액상수화제					없음
메가폰 입상수화제					없음
리도밀골드 수화제					없음
포름 수화제					없음
용마루 수용제					없음

그림 1. 배추 유묘기에 대한 듀얼네프킬에스와 농약의 혼용 약해 시험 결과(계속).

□ 듀얼네프킬에스의 최종 처방 확립

- 기 개발된 듀얼네프킬에스의 약효 시험 결과, *Spodoptera* 속의 해충에 대한 약효는 다소 저조함을 보였다. 이를 극복하기 위해, 생산 공정 개선 연구를 통한 최종처방을 확립하고자 하였다.

○ Xn 배양액의 동결건조 및 진공농축

- 시제품의 약효 증진을 위해 Xn을 고농도로 농축하여 생산할 수 있는 공정방법을 모색하였고, 이에 동결건조(freeze dry)와 진공농축(vacuum evaporation) 두 가지 방법으로 연구가 진행되었다.
- Xn 배양액 2.8kg을 동결건조 할 때 26배가 농축되어 약 106.4g의 건조분말이 생산 되었으며, 소요 시간은 72시간이었다.
- Xn 배양액 1.2톤을 진공농축 할 때 21.7배가 농축되어 약 55.3kg의 농축액이 생산 되었으며, 소요 시간은 13시간이었다.
- 이상의 결과, 공정의 난이도와 생산원가 측면에서 진공농축법이 더 효율적임을 확인하였다.

○ 처방개선

- 듀얼네프킬에스 제품 특성 상 작물의 표면에 부착력이 중요하다. 따라서 희석된 제품을 살포하였을 때 작물표면에 부착력을 높여줄 수 있는 전착제의 사용이 필수적이다. 유기농업에 사용 가능한 Sodium bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate와 Polyoxyethylene dodecyl mono ether 등 전착제 2종을 선발하여, 전착효과에 따른 살충력 향상에 대한 실험을 진행하였다(그림 2). 실험은 기존 듀얼네프킬에스에 전체 용량의 2%만큼 각 전착제를 첨가한 후 배추좀나방에 대한 생물검정으로 진행하였는데, 전체 살충률에서는 통계적으로 유의성은 없었으나, Sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate를 사용한 경우의 살충률이 다른 처리구에 비해 높아, 본 제품의 최종처방의 전착제로 선발하였다.

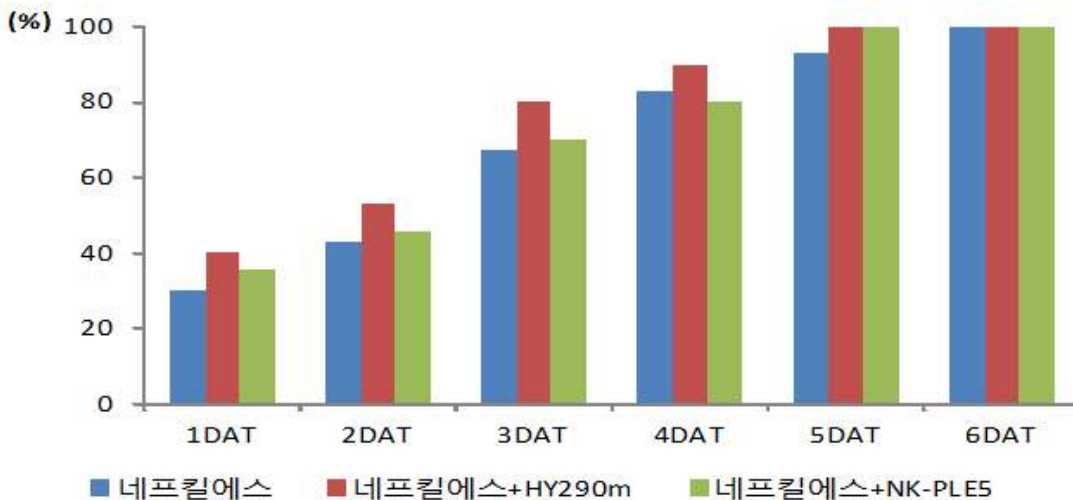


그림 2. 전착제가 처리된 듀얼네프킬에스의 배추좀나방 생물검정

- 따라서 듀얼네프킬에스 최초 처방을 표 10.과 같이 변경하였다. 추가로 위 실험에서 우수한 효과를 보인 습윤분산제 Sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate를 배합하여 제품의 전착성을 높여주었다. 처방 된 두 제품 모두 수화되는데 걸리는 시간은 1분 이내로 액상수화제의 기준에 적합하였으며, 침강성 분석 결과 30분간 0.1ml 이내로 일반적인 액상수화제 규격에 적합하게 처방이 된 것을 확인할 수 있었다.

표 10. 듀얼네프킬에스의 공정 개선 처방

구 분	Btk 슬러지	Bta 슬러지	Xn 동결건조	Xn 농축액	증량제	습윤 분산제	보조용제
듀얼네프킬에스 공정 개선1	4%	10%	3%	-	71%	2%	10%
듀얼네프킬에스 공정 개선2	4%	10%	-	3.5%	70.5%	2%	10%

○ 듀얼네프킬에스 개선 처방 생물검정

- 개선된 듀얼네프킬에스 2종을 이용하여 배추즙나방에 생물검정을 진행하였다. 실험결과 Xn 동결건조물을 이용한 공정 개선1 처방의 살충률이 2일차 93%로 가장 높았고, 농축액을 이용한 공정 개선2 처방의 살충률은 80%였다. 아래의 결과는 기존의 듀얼네프킬에스보다 개선된 처방 2종이 기존의 시제품보다 약효가 우수함을 나타내었다(그림 3).

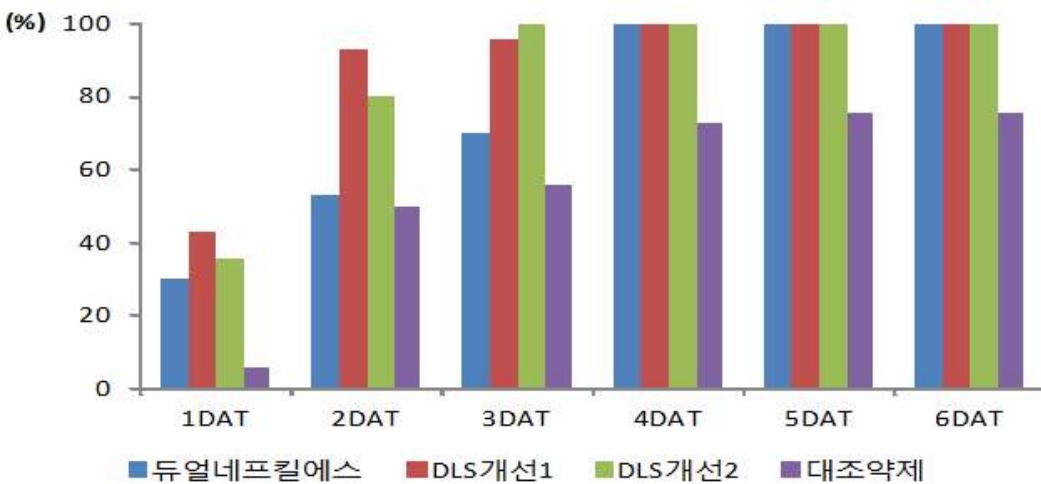


그림 3. 배추즙나방에 대한 듀얼네프킬에스 처방 개선 실험 결과

○ 듀얼네프킬에스 최종 처방 확립

- 위 실험 결과 Xn 동결건조분말을 이용한 처방이 살충효성은 더 높으나, Xn 진공농축액과 큰 차이는 보이지 않았으며, 생산 비용 절감 차원에서도 농축액을 이용한 개선 2 처방이 사업화에 더 적합할 것으로 판단되어, 최종적으로 개선 2를 듀얼네프킬에스 최종 처방으로 선정하였다.

○ 듀얼네프킬에스 개선 처방 실증시험

- 2015년 4월과 6월, 포장 효과 검증을 위해 전남 4개소(장성, 광주, 영암, 해남)와 강원 3개소(정선, 횡성, 평창)에서 53개 배추 포장에서 나방류 해충 발생에 따른 야외 포장 조사를 실시하였다. 하지만 대부분의 배추재배 포장은 계약재배의 형식으로 해충 발생 초기단계에서 화학농약을 대량 살포하여 방제하고 있어 나방류 해충발생은 발견할 수 없었으며, 때문에 개선된 처방의 듀얼네프킬에스에 대한 야외 포장 효과 검증은 수행하지 못하였다.
- 2016년 5월 11일 경기도 남양주시 퇴계원면 소재의 소포장에서 배추에 발생한 파밤나방을 확인하였다. 약제는 개선 전·후의 듀얼네프킬에스 2종과 대조약제인 플루페녹수론 분산성액제를 추천농도로 처리하였으며, 처리 당시 발생율은 처리구 당 평균 64마리로 약효관정에 충분하였다. 각 시험구는 처리별 난괴법 3반복으로, 약제 처리 전 및 약제 처리 3, 7일 후 생충수를 조사하였다.
- 시험 결과 개선 처방에서 처리 후 3일차에 97.4%, 7일차에 100%의 방제가를 보였다. 이는 개선되기 전의 듀얼네프킬에스 보다 월등한 방제가로 보이며, 대조 약제로 사용된 디노테푸란입상수화제 처리 결과인 3일차 93.4%, 7일차 98.5%와 대등하여 파밤나방 방제에 효과가 있는 것으로 판단된다(표 11, 12). 또한 약해시험에서도 기준량과 배량 모두 약해증상은 나타나지 않은 것으로 미루어 파밤나방에 대한 방제약제로 사용 가능성을 보였다(표 13).

표 11. 파밤나방에 대한 약제방제 효과 (약제 처리 후 3일차)

시험약제	처리 전 밀도 (마리/구)	생충률(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평 균		
듀얼네프킬에스 개선	62.5	5.7	2.3	0	2.67	a	97.4
듀얼네프킬에스	69.3	64.1	68.7	57.2	63.3	b	39.1
플루페녹수론 분산성액제(대조)	65.1	3.5	8.3	8.7	6.8	a	93.4
무처리	60.7	112.7	96.5	102.6	103.9	c	-

C.V.(%) ----- 11.1

표 12. 파밤나방에 대한 약제방제 효과 (약제 처리 후 7일차)

시험약제	처리 전 밀도 (마리/구)	생충률(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평 균		
듀얼네프킬에스 개선	62.5	0	0	0	0	a	100
듀얼네프킬에스	69.3	60.3	61.7	52	58	b	46.4
플루페녹수론 분산성액제(대조)	65.1	0	0	4.7	1.57	a	98.5
무처리	60.7	106.3	103.3	115	108.2	c	-

C.V.(%) ----- 8.3

표 13. 배추에 대한 개선된 듀얼네프킬에스 약해시험 결과

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도(0~5)		비고
		기 준 량	배 량	
듀얼네프킬에스 개선	배추 (삼보 얼갈이)	0	0	약해 없음
듀얼네프킬에스		0	0	약해 없음
플루페녹수론 분산성액제(대조)		0	0	약해 없음

II. 딱정벌레목 해충 방제제 개발

□ 연구목표 : 딱정벌레목 해충의 방제를 위한 후보물질 탐색 및 포장 효과 시험

□ 연구내용

○ 맞춤형 후보 제품의 처방 확립 및 안정화 연구

- 딱정벌레목 해충 방제제의 개발을 위하여 Btt 배양액, Ptt 배양액, Xn 배양액, 습윤분산제, 보조용제를 여러 배합비율로 처방 하였다. 초기의 처방은 Btt 슬러지 10 : Ptt 배양액 78 : 습윤분산제 2 : 보조용제 10의 비율이었으나, 제품 생산 원가 절감, 약효 상승, 생산 효율 극대화를 위해 새로운 처방을 시도하였다.
- 이에 진공농축이라는 새로운 공정을 도입하였다. Ptt와 Xn 배양액을 진공농축(54~58℃/760mmHg) 한 결과 약 21.7배 농축되었으며, 이를 이용하여 2가지 시제품을 처방하였다(표 14).
- Btt 10 : 각 농축액(Ptt / Xn) 10 : 증량제 68 : 습윤분산제 2 : 보조용제 10의 비율로 처방하였으나, Xn 농축액이 들어간 시제품은 Ptt 농축액을 이용한 것보다 약효가 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 이에, 제품 처방 2를 최종 시제품화(콜킬)하였다.
- Btt는 진동원심막분리한 슬러지를 이용하여 시제품 내 cfu(colony forming unit)를 1.84×10^{11} spores/ml 이상을 확보하였고, Ptt의 유효물질인 BZA의 농도는 2.3ppm 이상이 되도록 처방하였다. 습윤분산제는 Sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate를 이용하였고, 보조용제는 제품 원가 절감과 유기농업자재 허용 부원료의 측면에서 Ethanol(99.9%)을 선택하였다.

표 14. 시제품 콜킬 배합비율(w/w)

단위 : %

구분	Btt 슬러지	Ptt 농축액	Xn 농축액	증량제	습윤분산제	보조용제
처방 1 (시제품A)	10	-	10	68	2	10
처방 2 (시제품B, 콜킬)	10	10	-	68	2	10

○ 후보 제품 실사용 농도에서의 물성 검토

- 제품의 추천사용량인 1,000배 희석액에서 액상수화제 규격에 적합한지를 검토하였다.
- Btt 슬러지 10% : Ptt 농축액 10% : 증량제 68% : 습윤분산제 2% : 보조용제 10%(w/w)의 비율로 처방된 제품이 모두 수화되는데 걸리는 시간은 1분 이내로 액상수화제의 기준에 적합하였으며, 침강성 분석 결과 30분간 0.1ml 이내로 일반적인 액상수화제 규격에 적합하게 처방이 된 것을 확인할 수 있었다.

○ 후보 제품의 안전성 연구

- 후보 제품의 안전성을 확인하기 위하여 급성경구독성, 급성경피독성, 급성어독성(잉어) 및 꿀벌접촉 독성시험을 수행하였다. 실험은 농약의 등록 기준(농촌진흥청 고시 제 2015-4호 (2015.04.03))에 준하여 진행하였으며, 2015년 04월 01일 생산된 시제품에 대하여 진행하였다.
- 급성경구독성 실험 결과 2가지 시제품 모두 반수치사약량(LD₅₀)은 >5,000mg/kg 으로 저독성으로 확인되었다.
- 급성경피독성 역시 2가지 시제품에서 반수치사약량(LD₅₀)은 >4,000mg/kg 으로 저독성을 나타내었다.
- 잉어를 이용한 급성어독성 실험에서도 2가지 시제품은 모두 48시간 및 96시간 반수치사농도(LC₅₀)이 >10.0mg/L로 독성분류상 어독성 III급을 보였다.
- 꿀벌접촉 독성시험 결과 24시간 및 48시간 반수치사약량(LD₅₀)은 >100µg a.i/bee를 보여 꿀벌에도 안전한 것으로 판단되었다.

○ 포장 실험을 위한 시제품 생산

- 포장 실험용 시제품 생산을 위해 2015년 03월 경북바이오산업연구원의 장비를 활용하였다.
- 제품 생산에 이용된 Btt, Ptt 균주는 안동대학교에서 보관 중인 것을 이용하였고, 대량배양 시 이용된 배지는 산업용으로 사용되는 공업용 배지를 이용하여 생산 원가 절감을 도모하였다.

○ 콜킬의 포장 실증 시험

- 딱정벌레목 해충에 대한 포장 효과를 검증하기 위해 2015년 04월과 06월에 전남과 강원지역의 배추재배단지에서 해충발생소장을 조사하였다.
- 전남 지역에서는 장성 외 3개소(광주, 영암, 해남)에서 18개 배추포장(시설하우스 17개, 노지재배 1개) 조사를 실시하였다. 하지만 대부분의 배추재배 포장은 계약재배의 형식으로 해충 발생 초기

단계에서 화학농약을 대량 살포하여 방제하고 있어 딱정벌레목 해충발생은 발견할 수 없었다. 유일하게 영암지역에서 노지배추를 재배하는 포장에서 좁은가슴잎벌레(*Phaedon brassicae*)의 발생을 확인하였으나, 포기 당 평균 4.5마리의 낮은 밀도를 보여 포장 효과 검증은 수행하지 못하였다.



그림 4. 전남지역 시설 배추



그림 5. 좁은가슴잎벌레 발생(영암, 2015/04/28)

- 강원 지역은 정선 외 2개소(횡성, 평창)에서 35개 배추재배포장을 조사하였다. 전남지역과 달리 전체가 노지 재배를 하고 있었으나, 횡계면 4개 포장을 제외한 모든 포장이 계약재배를 통한 병해충 관리로 해충발생은 발견할 수 없었다. 계약재배를 실시하지 않는 횡계면 소포장에서 벼룩잎벌레(*Phyllotreta striolata*)를 확인할 수 있었으나, 포기 당 평균 7.8마리의 낮은 밀도를 보여 포장 효과 검증은 수행할 수 없었다.



그림 6. 강원지역 노지 배추



그림 7. 벼룩잎벌레 발생(평창 횡계면, 2015/06/09)

- 시제품(콜킬)에 대한 포장 효과 검증에 다소의 문제점이 발생하였다. 이는 대다수의 농가가 배추 가격의 변동에 대한 손실을 줄이기 위해 계약재배를 실시하고 있었으며, 또한 화학농약을 사용함으로써 해충의 발생을 찾아보기 힘들었다. 계약재배가 아닌 농가는 자가 소비를 위한 소규모 포장이었으며, 유기농업자재로 공시되지 않은 시제품의 사용을 꺼려하는 경향을 보였다.
- 한편, 우리나라의 배추 주산단지인 전남과 강원지역의 53개 재배 농가를 방문 조사하였는바, 유기

농 인증 농가는 없었고 이는 유기농업자재를 사용할 필요와 의무가 없음을 의미하였다. 배추 주산 단지에서의 유기농 인증 농가를 찾아보기 힘든 이유는 매년 배추 가격의 변동 폭이 크기 때문에, 농약에 비해 약효가 다소 떨어지는 유기농업자재를 이용하여 해충을 방제하는 데는 농가의 애로 사항이 있는 것으로 판단된다.

○ 콜킬의 농약 혼용 약해 시험

- 시제품(콜킬)과 살충제 10종 및 살균제 10종의 혼용에 따른 유묘기 배추의 생육에 미치는 영향을 조사하였다(표 15).

표 15. 농약혼용약해 시험에 사용된 살충제 및 살균제

번호	살충제	희석배수	적용대상	살균제	희석배수	희석배수
1	벨모스 유제	2,000	배추좀나방	부라마이신 수화제	800	무름병
2	애니충 액상수화제	2,000	배추좀나방	미리카트 액상수화제	2,000	노균병
3	알타코아 입상수화제	2,000	파밤나방	방법대 수화제	2,000	무름병
4	렘페이지 유제	1,000	배추좀나방	일품 수화제	1,000	무름병
5	마진 액상수화제	1,000	벼룩잎벌레	명작 액상수화제	2,000 1,000	뿌리혹병
6	모스피란 수화제	2,000	진딧물류	리도밀골드 수화제	2,000	노균병
7	모스피란 수화제	2,000	진딧물류	세이브 액상수화제	1,000	노균병
8	블리암후레쉬 액상수화제	5,000	벼룩잎벌레	포룸 수화제	1,000	노균병
9	보스 입상수용제	250	벼룩잎벌레	용마루 수용제	1,000	무름병
10	에이팜 유제	2,000	배추좀나방	메가폰 입상수화제	1,000	노균병

- 실험결과 콜킬과 농약의 혼용에 따른 배추의 피해는 발견되지 않았다(그림 8).





























혼용 농약	조사일 별 사진			약해 증상
	처리3일 후	처리5일 후	처리7일 후	
벨모스 유제 				없음
애니충 액상수화제 				없음
알타코아 입상수화제 				없음
렘페이지 유제 				없음
마진 액상수화제 				없음
모스피란 수화제 				없음
볼리암후레쉬 액상수화제 				없음

그림 8. 배추 유묘기에 대한 콜킬과 농약의 혼용 약해 시험 결과


혼용 농약	조사일 별 사진			약해 증상
	처리3일 후	처리5일 후	처리7일 후	
코니도 수화제 				없음
보스 입상수용제 				없음
에이팜 유제 				없음
부라마이신 수화제 				없음
미리카트 액상수화제 				없음
방범대 수화제 				없음
일품 수화제 				없음

그림 8. 배추 유효기에 대한 콜킬과 농약의 혼용 약해 시험 결과(계속)

























혼용 농약	조사일 별 사진			약해 증상	
	처리3일 후	처리5일 후	처리7일 후		
명작 액상수화제					없음
리도밀골드 수화제					없음
세이브 액상수화제					없음
포름 수화제					없음
용마루 수용제					없음
메가폰 입상수화제					없음

그림 8. 배추 유묘기에 대한 콜킬과 농약의 혼용 약해 시험 결과(계속)

□ 딱정벌레목 해충 방제제 콜킬 실증시험

- 콜킬의 포장효과 검증을 위해 계속적으로 딱정벌레목 해충 발생을 조사한 결과, 2015년 08월 경남 함안과 09월 강원 정선에서 각각 콩풍뎅이와 벼룩잎벌레의 발생을 확인하여 실증시험을 진행하였다.
- 콩 콩풍뎅이(*Popillia mutans*) 포장 실험
 - 경상남도 함안군 군북면 소재의 소포장에서 콩(백태)에 발생한 콩풍뎅이를 확인하였다. 약제 처리는 2015년 8월 13일 콜킬을 500, 1,000배 희석하여 경엽 처리하였으며, 처리 당시 피해엽율은 평균 26.9%로 약효관정에 충분하였다. 각 시험구는 처리별 난괴법 3반복으로, 약제 처리 전 및 약제 처리 3, 7일 후 구당 피해엽수를 조사하였다.
 - 콩에 대한 약해시험은 기준량(1,000배)과 배량(500배)으로 처리된 구간에서 동시에 진행되었으며, 약제 처리 3, 7일 후 외관상으로 나타나는 약해유무를 달관 조사하였다.
 - 콩풍뎅이에 대한 방제 효과를 시험한 결과 콜킬 500배 처리구에서 3, 7일차에 각각 42.8%, 41.7%, 1,000배 처리구에서는 각각 39.7%, 32.2%의 방제율을 보였다(표 16, 17). 본 결과로는 콩풍뎅이에 대한 적절한 방제가 이루어지지 못한 것으로 판단되는데 그 원인으로는 콩 잎에 대한 가해는 대부분 성충에 의해 이루어지고, 성충에 대한 약제방제 효과는 유충보다 떨어지기 때문으로 판단된다. 한편 콩풍뎅이 유충은 생활사 전반을 땅속에서 콩의 뿌리부분을 가해하기 때문에 Bt제를 기반으로 한 콜킬로는 방제가 힘들 것으로도 추정된다. 추후 콩풍뎅이 유충을 방제하기 위한 추가 연구가 필요할 것이라 사료된다.
 - 한편 콩에 대한 약해 시험에서는 기준량과 배량 모두에서 약해는 발생하지 않았다(표 18).

표 16. 콩풍뎅이에 대한 콜킬의 약제방제 효과 (약제 처리 후 3일차)

시험약제	피해엽율 (%)				유의차 (DMRT)	방제율 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균		
콜킬 500배	13.5	18.8	14.5	15.6	a	42.8
콜킬 1,000배	11.6	13.3	19.5	14.8	a	39.7
무처리	23.7	31.4	22.5	25.8	b	-

C.V.(%) ----- 20.9

표 17. 콩풍뎅이에 대한 콜킬의 약제방제 효과 (약제 처리 후 7일차)

시험약제	피해엽율 (%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균		
콜킬 500배	22.5	27.0	29.2	26.2	a	41.7
콜킬 1,000배	25.6	18.4	23.6	22.5	a	32.2
무처리	47.2	36.3	32.5	38.7	b	-

C.V.(%) ----- 16.8

표 18. 콩에 대한 콜킬의 약해시험 결과

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도 (0~5)		비고
		기준량	배량	
콜킬	콩 (백태)	0	0	약해 없음

○ 배추 벼룩잎벌레(*Phyllotreta striolata*) 포장 실험

- 강원도 정선군 임계면 소재의 소포장에서 배추(삼보 얼갈이)에 발생한 벼룩잎벌레를 확인하였다. 약제 처리는 2015년 9월 2일 콜킬을 250, 500, 1,000배 희석하여 경엽 처리하였다. 처리 전 벼룩잎벌레의 발생 밀도는 시험 구당평균 12.5마리로 살충제 시험 기준과 방법에는 부족하지만, 적당한 발생포장을 찾기에는 애로사항이 많아 부득이 시험을 진행하였다. 시험구는 난괴법 3반복으로 약제 처리 전 사전조사와 함께 약제 처리 3, 7일 후 벼룩잎벌레의 생충수를 조사하였다.
- 배추에 대한 약해시험은 기준량(1,000배)과 배량(500배)으로 처리된 구간에서 동시에 진행하였으며, 약제 처리 3, 7일 후 외관상으로 나타나는 약해유무를 달관 조사하였다.
- 벼룩잎벌레에 대한 방제 효과를 시험한 결과 250배 처리구에서는 3일차와 7일차에 각각 68.4%, 62.3%의 방제가를 보였으나, 500배와 1,000배 처리구에서는 50%의 이하의 방제가를 보였다(표 19, 20). 따라서 시제품(콜킬)의 벼룩잎벌레에 대한 방제 효과가 부족하여 실제 농가에서의 사용은 어려울 것으로 판단되었다.
- 배추에 대한 약해시험에서 기준량과 배량 모두에서 약해증상은 관찰되지 않았다(표 21).

표 19. 벼룩잎벌레에 대한 콜킬의 약제방제 효과 (약제 처리 후 3일차)

시험약제	처리 전 밀도 (마리/구)	생충률(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
		I 반복	II 반복	III반복	평 균		
콜킬 250배	8.4	0.6	0.6	1.2	0.8	a	68.4
콜킬 500배	12.1	0.8	1.8	3.6	2.1	b	18.4
콜킬 1,000배	12.0	1.4	3.8	0.4	1.8	b	26.3
무처리	12.5	2.8	2.8	2	2.5	b	-

C.V.(%) ----- 25.7

표 20. 벼룩잎벌레에 대한 콜킬의 약제방제 효과 (약제 처리 후 7일차)

시험약제	처리 전 밀도 (마리/구)	생충률 (%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평 균		
콜킬 액제 250배	8.4	4.2	2.8	1.2	2.7	a	62.4
콜킬 액제 500배	12.1	6	2.4	3	3.8	b	47.7
콜킬 액제 1,000배	12.0	5	3.8	5	4.6	b	36.7
무처리	12.5	10	6.4	5.4	7.2	c	-

C.V.(%) ----- 29.6

표 21. 배추에 대한 콜킬의 약해시험 결과

시험약제	시험작물 (품종)	약 해 정 도 (0~5)		비 고
		기 준 량	배 량	
콜킬	배추 (삼보얼갈이)	0	0	약해 없음

Ⅲ. 파리목 해충 방제제 개발

□ 연구목표 : 파리목 해충의 방제를 위한 후보물질 탐색 및 포장 효과 시험

□ 연구내용

○ 맞춤형 후보 제품의 처방 확립 및 안정화 연구

- 파리목 해충 방제제의 개발을 위하여 Bti 배양액, Xn 배양액, 습윤분산제, 보조용제를 여러 배합 비율로 처방하였다. 제품의 처방은 Bti를 10%로 고정시키고, 처방 1은 Xn 배양액 78 : 습윤분산제 2 : 보조용제 10의 비율로 하였고, 처방 2는 Xn 배양액 70 : 습윤분산제 5 : 보조용제 15의 비율로 처방하였다(표 22).
- 처방 1에 비해 처방 2의 시제품이 속효성을 보여 처방 2를 최종 시제품화(디프킬) 하였다.
- Bti 배양액은 진동 원심 막 분리한 슬러지를 이용하여 제품 내 cfu를 4.1×10^{10} spores/ml 이상 확보하였다. 습윤분산제는 Sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate를 이용하였고, 보조용제는 Ethanol(99.9%)을 선택하였다.

표 22. 시제품 디프킬 배합비율(w/w)

단위 : %

구분	Bti 슬러지	Xn 배양액	습윤분산제	보조용제
처방 1 (시제품A)	10	78	2	10
처방 2 (시제품B, 디프킬)	10	70	5	15

○ 후보 제품 실사용 농도에서의 물성 검토

- 제품의 추천사용량인 1,000배 희석액에서 액상수화제 규격에 적합한지를 검토하였다.
- Bti 슬러지 10% : Xn 배양액 70% : 습윤분산제 5% : 보조용제 15%(w/w)의 비율로 처방된 제품이 모두 수화되는데 걸리는 시간은 1분 이내로 액상수화제의 기준에 적합하였으며, 침강성 분석 결과 30분간 0.1ml 이내로 일반적인 액상수화제 규격에 적합하게 처방이 된 것을 확인할 수 있었다.

○ 후보 제품의 안전성 연구

- 후보 제품의 안전성을 확인하기 위하여 급성경구독성, 급성경피독성, 급성어독성(잉어) 및 꿀벌접촉 독성시험을 수행하였다. 실험은 농약의 등록 기준(농촌진흥청 고시 제 2015-4호 (2015.04.03))에 준하여 진행하였으며, 2015년 12월 01일 생산된 시제품에 대하여 진행하였다.
- 급성경구독성 실험 결과 2가지 시제품 모두 반수치사약량(LD₅₀)은 >5,000mg/kg 으로 저독성으로 확인되었다.
- 급성경피독성 역시 2가지 시제품에서 반수치사약량(LD₅₀)은 >4,000mg/kg 으로 저독성을 나타내었다.
- 잉어를 이용한 급성어독성 실험에서도 2가지 시제품은 모두 48시간 및 96시간 LC₅₀(mg/L)이 >10.0mg/L로 독성분류상 어독성 III급을 보였다.
- 꿀벌접촉 독성시험 결과 24시간 및 48시간 반수치사약량(LD₅₀, µg a.i/bee)는 >100µg a.i/bee를 보여 꿀벌에도 안전한 것으로 판단되었다.

○ 포장 실험을 위한 시제품 생산

- 포장 실험용 시제품 생산을 위해 2015년 12월 경북바이오산업연구원의 장비를 활용하여 시제품을 생산하였다.
- 제품 생산에 이용된 Bti, Xn 균주는 안동대학교에서 보관 중인 것으로, 대량배양 시 이용된 배지는 산업용으로 사용되는 공업용 배지를 이용하여 생산 원가 절감을 도모하였다.

○ 파리목 해충에 대한 실내 약효 검증

- 파리목 해충에 대한 약효 검증을 위해 안동대학교에서 사육중인 중인 호박꽃과실파리(*Bactrocera scutellata*)를 공시하였다.
- 호박꽃과실파리에 대한 약제 처리는 디프킬 100배, 500배, 1,000배, 2,000배 희석 및 무처리 대조구로 각 처리구는 3반복으로 설정하였다. W 10 x D 10 x H 5 mm의 걸피를 제거한 호박과육을 처리구별 희석된 용액에 5분간 침지 후 음건하였다. 처리된 호박과육에 호박꽃과실파리 3령충을 10마리씩 3반복으로 접종 후 7일간 24시간 간격으로 살충률을 관찰하였다.
- 무처리를 포함한 전체 시험구에서 7일차 살충률은 0.6%로 동일하였다(표 23). 이는 시제품(디프킬)이 호박꽃과실파리에 약효가 없는 것으로 판단된다.

표 23. 디프킬 희석배수에 따른 호박꽃과실파리 실내 실험 결과

조사일	살충률(%)				
	100배	500배	1,000배	2,000배	무처리
1일차	0	0	0	0	0
2일차	0	0	0	0	0
3일차	0.3	0.3	0.6	0.3	0.6
4일차	0.6	0.6	0.6	0.3	0.6
5일차	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
6일차	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
7일차	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6

- 농업에 발생하는 파리목 해충에 시제품(디프킬)의 효과는 없는 것으로 판단되어, 이후 위생해충인 흰줄숲모기(*Aedes albopictus*)와 집파리(*Musca domestica*)에 대하여 약효를 검증하였다.
- 흰줄숲모기에 대한 약제 처리는 250ml 1회용 종이컵을 이용하여 디프킬 500배, 1,000배, 2,000배, 4,000배 희석 및 무처리 대조구로 각 처리구는 3반복으로 설정하였으며, 흰줄숲모기 3령충을 처리구당 25마리씩 접종 하여 24시간 후 살충률을 관찰하였다.
- 실험 결과 모든 처리구에서 24시간 이내 100%의 살충률을 보였으며(표 24), 사망한 모기유충의 특징은 중장부분이 검은색으로 변한 채 물위에 떠 있거나 가라앉은 모습을 보였다(그림 9).

표 24. 디프킬 희석배수에 따른 흰줄숲모기유충 실내검증

조사시간	살충률(%)				
	대조구	X 500	X 1,000	X 2,000	X 4,000
24시간	0±0	100±0	100±0	100±0	100±0



대조구의 살아있는 모기유충



약제 처리구의 사망한 모기유충

그림 9. 흰줄숲모기 3령충에 대한 디프킬 약효 검증 결과

- 집파리에 대한 약제 처리는 50ml 플라스틱 용기를 이용하여 디프킬 500배, 1,000배, 2,000배, 4,000 배 희석 및 무처리 대조구로 각 처리구는 3반복으로 설정하였다. 각 실험구 용기에 1g의 돼지 배합사료를 넣고 대조구를 제외한 처리배수 만큼 희석된 디프킬을 1ml씩 넣어 사료를 적셔주었다. 집파리 2령 유충을 처리구당 25마리씩 접종하여 24, 72시간 후 살충률을 관찰하였다.
- 실험 결과 72시간째 500배와 1,000배 처리구에서 33.3%의 살충률을 보였으며, 대조구를 포함한 나머지 처리구에서는 사망한 개체를 관찰 할 수 없었다(표 25). 사망한 집파리 유충의 특징으로는 정상유충에 비해 길게 늘어진 모습과 일부 변색된 형태를 보였다(그림 10).

표 25. 디프킬 희석배수에 따른 집파리유충 실내검증

조사시간	살충률(%)				
	대조구	X 500	X 1,000	X 2,000	X 4,000
24시간	0	0	0	0	0
72시간	0	33.3	33.3	0	0



대조구의 살아있는 집파리 유충과 번데기



1,000배 처리군의 사망한 집파리 유충

그림 10. 집파리 2령충에 대한 디프킬 실내 검증 결과

- 이상의 시험결과 시제품(디프킬)은 파리류 해충에는 약효가 저조하나, 모기 유충에 대한 우수한 약효를 보이므로, 모기 유충 방제 약제로 사용 가능성을 시사하였다. 추후, 본 연구에서 개발된 시제품(디프킬)을 감염병 예방용 살충제(의약외품)로의 개발은 가치가 있을 것으로 판단된다. 현재 우리나라의 모기유충 방제용 Bti는 전량 수입에 의존하고 있으므로, Bti의 국산화를 위한 추가 연구가 필요할 것이다.

○ 디프킬의 농약 혼용 약해 시험

- 시제품(디프킬)과 살충제 10종 및 살균제 10종의 혼용에 따른 유묘기 배추의 생육에 미치는 영향을 조사하였다(표 26).

표 26. 농약혼용약해 시험에 사용된 살충제 및 살균제

번호	살충제	희석배수	적용대상	살균제	희석배수	희석배수
1	레이서 액상수화제	2,000	담배나방	가스가민 액제	1,000	무름병
2	아나콘다 수화제	1,000	진딧물류	알리에테 수화제	500	노균병
3	렘페이지 유제	1,000	배추좀나방	부라마이신 수화제	1,000	무름병
4	벨모스 유제	2,000	배추좀나방	에이스 수화제	2,000	노균병
5	칼립소 액상수화제	2,000	진딧물류	명작 액상수화제	1,000	뿌리혹병
6	타스타 수화제	1,000	파밤나방	세이브 액상수화제	1,000	노균병
7	모스피란 수화제	2,000	진딧물류	메가폰 입상수화제	1,000	노균병
8	코니도 수화제	2,000	진딧물류	리도밀골드 수화제	2,000	노균병
9	보스 입상수용제	250	벼룩잎벌레	포룸 수화제	1,000	노균병
10	에이팜 유제	2,000	배추좀나방	용마루 수용제	1,000	무름병

- 실험결과 디프킬과 농약의 혼용에 따른 배추의 피해는 발견되지 않았다(그림 11).





























혼용 농약	조사일 별 사진			약해 증상	
	처리3일 후	처리5일 후	처리7일 후		
레이서 액상수화제					없음
아나콘다 수화제					없음
램페이지 유제					없음
벨모스 유제					없음
칼림소 액상수화제					없음
타스타 수화제					없음
모스피란 수화제					없음

그림 11. 배추 유묘기에 대한 디프킬과 농약의 혼용 약해 시험 결과

혼용 농약	조사일 별 사진			약해 증상
	처리3일 후	처리5일 후	처리7일 후	
코니도 수화제 				없음
보스 입상수용제 				없음
에이팜 유제 				없음
가스가민 액제 				없음
알리에테 수화제 				없음
부라마이신 수화제 				없음
에이스 수화제 				없음

그림 11. 배추 유묘기에 대한 디프킬과 농약의 혼용 약해 시험 결과(계속)

혼용 농약	조사일 별 사진			약해 증상	
	처리3일 후	처리5일 후	처리7일 후		
명작 액상수화제					없음
세이브 액상수화제					없음
메가폰 입상수화제					없음
리도밀골드 수화제					없음
포름 수화제					없음
용마루 수용제					없음

그림 11. 배추 유묘기에 대한 디프킬과 농약의 혼용 약해 시험 결과(계속)

○ 흰줄숲모기에 대한 시제품(디프킬)의 적용농도

- 흰줄숲모기 유충에 대한 시제품(디프킬)의 반수치사농도(LC₅₀) 및 95%치사농도(LC₉₅)를 확인하였다.
- 시험농도구간을 결정하기 위해 시제품(디프킬)을 1,000배, 10,000배, 100,000배, 1,000,000배 희석하여, 흰줄숲모기 3령충에 구당 25마리씩 접종하였다. 조사시간은 처리 후 3시간, 24시간 이었다.
- 실험 결과 1,000배, 10,000배 처리구간에서 3시간 이내 100%의 살충률을 보였다. 반면 100,000배 처리구에서는 24시간에 96% 살충률을 보였으며, 1,000,000배 처리구에서는 치사 개체가 발생하지 않았다.
- 위 예비 실험을 근거로 본 시험농도는 10,000배, 50,000배, 100,000배, 200,000배, 400,000배, 800,000배로 정하였다. 시험은 처리구 및 대조구 각 3반복으로 설정하였으며, 처리구당 흰줄숲모기 3령충을 25마리씩 접종 하여 3시간, 24시간 후 살충률을 관찰하였다.
- 실험 결과 24시간에 10,000배 처리구의 살충률은 100%였고, 50,000배, 100,000배 처리구의 살충률은 각각 98.7%와 60%로 나타났다(표 27).
- 본 시험 결과를 바탕으로 흰줄숲모기 유충에 대한 반수치사농도(LC₅₀) 및 95% 치사농도(LC₉₅)는 각각 121483.7(110055.1~133923.9), 55744.1(44866.2~65162.5)로 산출되었다. 이를 근거로 야외에서 모기유충을 방제하기 위한 시제품(디프킬)의 처리 농도는 50,000배 이하의 희석이 적절할 것으로 판단된다.

표 27. 디프킬 희석배수에 따른 흰줄숲모기 유충 살충률

조사 시간	살충률(%)						
	1 x 10 ⁻⁴	2 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁵	5 x 10 ⁻⁶	25 x 10 ⁻⁶	1.25x 10 ⁻⁶	무처리
3시간	100	86.7	11.3	0	0	0	0
24시간	100	98.7	60	18.7	0	0	0

○ 흰줄숲모기에 대한 시제품(디프킬)의 간이 포장 시험

- 2016년 08월 경북 안동시 길안면 소재의 산지에서 흰줄숲모기 유충을 채집하였다. 직접적인 야외 포장 시험을 하기에는 현장의 여건이 좋지 않아, 채집된 유충을 이용하여 간이 포장 시험을 수행하였다.
- W 20 x D 20 x H 18cm 의 플라스틱 포트에 물을 2L 채운 후, 시제품(디프킬)을 10,000배, 50,000배, 100,000배 희석되도록 3반복 처리하였다. 처리 된 시험포트에 흰줄숲모기 3령충을 평균 132.8마리씩 접종 하여 3시간, 24시간 후 살충률을 관찰하였다. 모든 처리가 끝난 각 포트는 외부 유입물의 방지를 위해 모기장을 씌운 후 곤충 사육실에서 보관하여, 시험에 영향을 미칠만한 요소를 배제하였다.

- 10,000배 희석 처리구에서는 3시간과 24시간에 각각 98%, 100%의 높은 방제가를 보였으며, 50,000배 희석 처리구도 각각 89.1%, 100%의 방제가를 나타내었다. 100,000배 희석 처리구에서는 처리 3시간 후에는 20.3%의 방제가를 보였지만 24시간에는 85.8%의 비교적 높은 방제가를 보였다 (표 28, 29).

표 28. 흰줄숲모기에 대한 디프킬의 약제방제 효과 (약제 처리 후 3시간)

시험약제	처리 전 밀도 (마리/구)	생충률 (%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평 균		
디프킬 10,000배	137.7	0	0	5.9	1.9	a	98.0
디프킬 50,000배	140.7	12.6	15.7	4.3	10.9	b	89.1
디프킬 100,000배	118.7	66.9	87.6	84.5	79.7	c	20.3
무처리	134.3	100	100	100	100	d	-

C.V.(%) ----- 12.6

표 29. 흰줄숲모기에 대한 디프킬의 약제방제 효과 (약제 처리 후 24시간)

시험약제	처리 전 밀도 (마리/구)	생충률 (%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평 균		
디프킬 10,000배	137.7	0	0	0	0	a	100
디프킬 50,000배	140.7	0	0	0	0	a	100
디프킬 100,000배	118.7	16.0	5.7	20.3	14.0	b	85.8
무처리	134.3	97.9	100	100	99.3	c	-

C.V.(%) ----- 9.8

제2장 개발된 시제품의 농가 반응 조사 및 분석

I. 나비목 해충 방제제 개발

연구목표 : 나비목 해충 방제 제품의 상품화 가능성 타진 및 농가 현장에서의 효과 구명

연구내용

○ 듀얼네프킬에스 시제품의 대량생산

- 제품의 대량배양 시스템을 확립하여 생산수율, 효능증진 및 시장가격을 맞추고, 농가 사용에 편의성을 높이고자 실시하였다.
- 1차 시제품은 2013년 09월, 2차 시제품은 2014년 04월에 경북바이오산업연구원의 장비를 이용하여 생산하였다.
- 1차 시제품은 0.5톤 배양기, 진동원심막분리기를 이용하여 생산하였다. 실험실에서 배양된 Bta, Btk, Xn의 균주를 0.5t 배양기에서 pH7.0 / 28℃로 48시간 동안 배양하였다. 배지조성은 물 0.3t, Glucose 6kg, L-monosodium glutamate 3.6kg, Yeast extract 0.75kg, Monopotassium phosphate 0.3kg, Calcium chloride 0.3kg, Magnesium sulfate 0.09kg, Copper(II) sulfate 0.009kg, Manganese sulfate 0.006kg, Iron(II) sulfate 0.006kg, Zinc sulfate 0.006kg으로 구성되었다. 이후 Bta와 Btk는 포자수를 확보하기 위해 진동원심막분리기를 거쳐 나온 슬러지를 5℃ / 48시간 동안 저온 저장을 하였다. Xn 배양액은 배양액 내의 유효물질을 이용하기 때문에 원심막분리 후 저온 저장은 하지 않았다. 전처리가 끝난 원료들을 Bta 40 : Btk 10 : Xn 40 : 보조용제 10의 비율로 배합하여 총 65.34kg의 시제품을 생산하였다.
- 2차 시제품은 0.3톤 배양기, 2톤 배양기, 원심분리기를 이용하여 생산하였다. 실험실에서 배양된 Bta, Btk, Xn의 균주를 0.3t 배양기에서 pH7.0 / 28℃로 72시간 동안 배양하였다. 배지조성은 물 0.18t, Glucose 3.6kg, L-monosodium glutamate 2.16kg, Yeast extract 0.45kg, Monopotassium phosphate 0.18kg, Calcium chloride 0.18kg, Magnesium sulfate 0.054kg, Copper(II) sulfate 0.0054kg, Manganese sulfate 0.0036kg, Iron(II) sulfate 0.0036kg, Zinc sulfate 0.0036kg으로 구성되었다. 이후 72시간 동안 배양된 원료들을 2t 대량배양조의 seed로 이용하여 동일한 조건으로 72시간 동안 배양하였다. 2t 대량배양조의 배지조성은 물 1.2t, Glucose 24kg, L-monosodium glutamate 14.4kg, Yeast extract 3kg, Monopotassium phosphate 1.2kg, Calcium chloride 1.2kg, Magnesium sulfate 0.36kg, Copper(II) sulfate 0.0036kg, Manganese sulfate 0.024kg, Iron(II) sulfate 0.024kg, Zinc sulfate 0.024kg으로 구성되었다. 이후 2t 배양조에서 생산된 Bta와 Btk 배양액은 진동원심막분리기를 거쳐 나온 슬러지를 5℃ / 48시간 동안 저온 저장하였다. 전처리가 끝난 원료들을 Bta 4 : Btk 6 : Xn 80 : 보조용제 10의 비율로 배합하여 총 1,500kg의 시제품을 생산하였다.
- 배양조건은 1차 시제품의 경우 제품의 약효 미비, 가스 발생으로 인한 누액 등 실증 농가의 설문

에서 여러 차례 불만 사항이 접수되었기 때문에 2차 대량배양의 조건으로 제품 처방을 변경하였다(표 30).

표 30. 시제품 대량 생산 방법

구 분	1차 대량배양	2차 대량배양
Seed	· Bta, Btk, Xn - 안동대학교 보관 균주 이용	· 좌동
배양기	· 0.5t 배양기	· 0.3t 배양기로 seed 생산 후 2톤 배양기 이용
배양조건	· 28℃ 48hr	· 28℃ 72hr
막분리	· Bta, Btk, Xn 3개의 균주 모두 진동원심막분리	· Bta, Btk 2개의 균주 진동원심막분리 · Xn은 배양액 이용
최종배합	· Bta, Btk, Xn + 보조용제 투입 후 전체 배합	· 좌동
생산량	· 65.34kg	· 1,500kg

○ 상품화 가능성 타진을 위한 제품 원가 산출 연구

- 2013년 09월 1차 시제품 65.34kg을 생산 시 사용된 총 비용은 6,414,000원 이었으며(표 31), 병당 가격으로 환산하면 약 25,656원이다. 이는 제품의 시장 가격에 미치지 못하는 가격으로 판단된다. 이는 생산량이 65kg에 불과한 반면, 배양에 이용되는 기기 사용료는 1톤 이상을 생산할 때와 크게 차이가 없기 때문이다.

표 31. 1차 시제품 대량 생산 비용

구 분	품명	사용횟수 (또는 양)	금액(원)
대량배양	0.5톤 배양기	9회	2,350,000
	진동원심막분리기	3회	750,000
	산업용 배지	-	150,000
	보조용제	6.53kg	14,000
	생산인건비	2인 12일	2,400,000
생산 및 포장	포장용기	250개	75,000
	스티커	250개	75,000
	운송비	1회	200,000
	포장인건비	2인 2일	400,000
총 비용			6,414,000

- 변경된 배양방법에 따라 생산량을 늘려 2차 시제품 생산을 하였다. 2차 시제품은 약 1,500kg이 생산되었고 총비용은 18,660,000원 소요되었으며(표 32), 이를 병당 가격으로 환산 했을 때 약 3,455원이다. 이는 다소 미흡한 점은 있으나 시장 가격에 근접하고 있다고 판단되었다.

표 32. 2차 시제품 대량 생산 비용

구 분	품 명	사용횟수 (또는 양)	금액(원)
대량배양	0.3톤 배양기	12회	3,240,000
	2톤 배양기	12회	5,760,000
	진동원심막분리기	2회	500,000
	산업용 배지	-	1,150,000
	보조용제	150kg	910,000
	생산인건비	2인 15일	3,000,000
생산 및 포장	포장용기	6,000개	1,500,000
	스티커	6,000개	1,200,000
	운송비	1회	200,000
	포장인건비	2인 6일	1,200,000
총 비용			18,660,000

○ 듀얼네프킬에스 처방 개선 제품의 공정별 작업시간 및 기기사용료

- 1차년도 개발된 듀얼네프킬에스의 약효 상승 및 원가 절감을 목적으로 동결건조와 진공농축의 2가지 방법으로 시제품을 생산하였다.
- 2014년 10월 경북바이오산업연구원의 장비를 활용하여 Xn 배양액 생산 및 동결건조를 하였다. 처리구당 2.8kg 동결건조 시 약 26배가 농축되어 평균 106.43g의 Xn 건조물을 확보 할 수 있었으며, 소요 시간은 72시간이었다.
- 2015년 02월 경북바이오산업연구원의 장비를 활용하여 Xn 배양액 생산 및 진공농축을 하였다. 장비의 특성상 동결건조처럼 적은 양을 이용할 수 없어 Xn 배양액 1.2톤을 이용하였다. 1.2톤 농축 시 21.7배가 농축되어 약 55.3kg의 Xn 농축액을 확보할 수 있었으며, 소요 시간은 13시간이었다.
- Xn 1.2톤을 배양하기 위해서 공통적으로 0.3톤에서 배양한 후 2톤 배양기를 이용하였으며, 생산 비용은 ₩3,300,000이다(2015년 기기 사용료가 전체적으로 10% 인상되었다).
- 동결건조기를 이용할 경우 1회 건조시간은 4일이며, 최대 건조량은 300L이다. 1.2톤을 동결 건조 하는 경우 총 16일에 걸쳐 ₩7,040,000원이 소요된다.
- 진공농축기를 이용할 경우 1일 최대 농축시간은 8시간이며, 이때 약 600 ~ 700L를 농축할 수 있다. 1.2톤을 진공 농축할 때 총 2일에 걸쳐 ₩347,000원이 소요된다(표 33).

표 33. 듀얼네프킬에스 공정 개선1, 2에 추가되는 생산 비용

구분	품명	사용일수	금액(원)
공정 개선1	동결건조기	16회	7,040,000
공정 개선2	진공농축기	2회	347,000

- 동결건조를 이용한 공정 개선1과 진공농축을 이용한 공정 개선2의 약효차이는 미비하였다. 따라서 생산 비용 절감 차원에서 공정 개선2를 최종 처방으로 확정하였다(표 34).

표 34. 듀얼네프킬에스 최종 처방

Btk 슬러지	Bta 슬러지	Xn 동결건조	Xn 농축액	증량제	습윤분산제	보조용제
4%	10%	-	3.5%	70.5%	2%	10%

- 듀얼네프킬에스를 최종 처방으로 약 1571.4kg을 생산할 때, 총 생산비용은 19,897,000원 이며(표 35), 이를 병당 가격으로 환산하면 약 3,166원이다. 이는 공정 개선 전 병당 가격 3,455원 보다 약 288원 절감되었으며, 저조한 약효를 보여줬던 *Spodoptera* 속 나방 유충에 대한 약효를 보강 할 수 있었다.

표 35. 듀얼네프킬에스 최종 처방 시제품 대량 생산 비용

구분	품명	사용횟수 (또는 양)	금액(원)
대량배양	0.3톤 배양기	12회	3,564,000
	2톤 배양기	12회	6,336,000
	진동원심막분리기	2회	500,000
	진공농축기	2회	347,000
	산업용 배지	-	1,150,000
	보조용제	150kg	900,000
	생산인건비	2인 15일	3,000,000
생산 및 포장	포장용기	6,000개	1,500,000
	스티커	6,000개	1,200,000
	운송비	1회	200,000
	포장인건비	2인 6일	1,200,000
총 비용			19,897,000

○ 시제품(듀얼네프킬에스) 지역별, 작물별, 해충별 현장 실증 시험(개발 1년차)

- 시제품(듀얼네프킬에스)을 사용하여 재배 현장에서의 약효 및 약해, 사용상의 문제점 및 농가 반응 등을 조사하였다.
- 1차 생산된 시제품은 전국 41개 지역의 83개 농가에 배포하였으며(표 36), 2차 생산된 시제품은 전국 73개 지역의 211개 농가에 배포하여(표 37), 농가실증 시험과 설문 및 반응을 조사하였다. 주요 작물은 엽채류, 과채류, 과수 등에서 나방류가 발생하는 배추, 상추, 오이, 수박, 복분자, 딸기, 사과, 단감 등의 다양한 작물을 선정하였으며, 지역별 약제 처리는 각 농가 주체로 관행적인 방법을 따르도록 하였다. 이후 전화나 방문조사를 통해 시제품(듀얼네프킬에스)에 대한 설문을 실시하였다(그림 12).

표 36. 1차 시제품(듀얼네프킬에스) 실증시험 지역

도	시군	지점	도	시군	지점
경상남도	진주시	5	경기도	양평군	2
	창녕군	2		남양주	3
	밀양군	2		수원시	1
	하동군	1	충청북도	옥천군	1
	산청군	1		청원군	1
		창원시	2	충청남도	논산시
경상북도	안동시	2	강원도	철원군	2
	성주시	1	광역시	부산	2
전라북도	전주시	4		대구	2
전라남도	해남군	1		광주	4
	무안군	1	전국 41개 지역		

표 37. 2차 시제품(듀얼네프킬에스) 실증시험 지역

도	시군	지점	도	시군	지점
경상남도	진주시	5	경기도	양평군	2
	창녕군	2		남양주시	2
	사천시	2		이천시	3
	밀양군	2		고양시	2
	하동군	3		하남시	2
	산청군	2		수원시	1
	창원시	2		옥천군	1
경상북도	안동시	2	충청북도	청원군	1
	봉화시	3		제천시	2
	김천시	2		충청남도	논산시
	성주시	1	청양군		3
전라북도	전주시	1	강원도	철원군	2
	정읍시	3		원주시	1
	순창군	5		춘천시	2
전라남도	해남군	1	광역시	부산	2
	보성군	2		대구	2
	순천시	1		광주	4
	무안군	1	전국 73개 지역		

성명 : (전화번호)
 주소 :
 주요작물 :
 인증형태 : (유기, 무농약, 일반)

■ 듀얼네프킬에스 약효평가 설문

1. 나방류 해충 방제를 위해 다른 친환경 자재를 사용해 보신 적이 있으신가요?

- 상표명, 제조사, 가격, 사용량과 사용방법 등

- 특별히 사용하시고 있는 제품이 있다면 그 이유는 무엇입니까?

2. 기 사용해본 친환경 자재의 약효가 어떻다고 생각하십니까?

5	4	3	2	1
매우 좋다	좋은 편이다	보통이다	나쁜 편이다	매우 나쁘다

3. 듀얼네프킬에스의 약효가 어떻다고 생각하십니까?

5	4	3	2	1
매우 좋다	좋은 편이다	보통이다	나쁜 편이다	매우 나쁘다

4. 다른 친환경 자재와 듀얼네프킬에스의 약효를 비교할 때 어떻다고 보십니까?

5	4	3	2	1
매우 좋다	좋은 편이다	같다	나쁜 편이다	매우 나쁘다

5. 듀얼네프킬에스가 출시된다면 구매의사가 있으신가요?

- ① 가격에 구애받지 않고 꼭 구매해서 사용한다
- ② 기존 친환경 자재의 가격수준이라면 꼭 구매해서 사용한다
- ③ 기존 친환경 자재보다 저렴하다면 구매해서 사용할 의사가 있다
- ④ 구매할 의사가 없다

6. 듀얼네프킬에스에 대해 불편사항이나 건의하시고 싶은 말씀이 있다면?

그림 12. 듀얼네프킬에스 설문지.

○ 설문조사 결과 요약

- 1차 시제품에 대하여 총 38개 농가(유기농 3, 무농약 24, 일반농 11)에서 설문에 참여해 주었다. 약제처리 작물은 배추, 토마토, 딸기 등이었으며, 작물별 발생하는 나방의 종류와 발생 시기는 차이가 있었다. 조사 결과, 농가에서 기존 사용하고 있는 유기농업자재와 비교하여 시제품(듀얼네프킬에스)의 약효가 나쁜 편이라는 응답이 87% 이상으로 약효가 미흡한 것으로 판단되었다(그림 13). 또한 제품의 방제효과로 볼 때 시제품이 시장에 출시되었을 경우 제품을 구매할 의사가 전혀 없다는 응답을 나타내었다. 기타 의견으로 제품에 누액이 발생하여 사용 상 불편함을 서술한 응답도 다수 있었다.

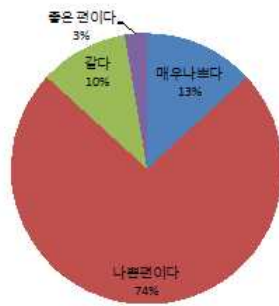


그림 13. 1차 시제품의 약효 비교 설문 결과

- 2차 시제품은 총 106개 농가(유기농 18, 무농약 58, 일반농 30)에서 설문해 주었다. 약제처리 작물은 참외, 오이, 고추, 배추, 토마토, 사과, 파프리카 등으로 다양했으며, 작물별 발생하는 나방의 종류와 발생 시기는 차이가 있었다. 처방이 변경된 2차 시제품의 약효는 “보통이상”이라는 응답이 93% 이상으로 약효 상에 보완은 달성한 것으로 판단되었다(그림 14). 유기농업자재 선택 시 가장 중요한 요소로는 저렴한 가격이라는 응답이 54%를 차지하여 농민들이 약제 선택 시 약효에 버금하여 가격적인 측면도 중요하게 생각하는 것을 알 수 있었다(그림 15). 이 외에 시제품(듀얼네프킬에스)에 대한 건의사항으로 나방류 해충 뿐 아니라 진딧물, 응애 등에 모두 적용되는 종합 살충제 로 개발해 달라는 요청이 있었고, 낮은 가격으로 공급되길 원하는 의견이 있었다.

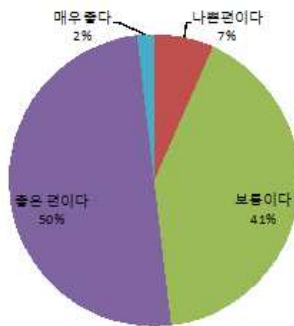


그림 14. 2차 시제품의 약효 설문 결과



그림 15. 듀얼네프킬에스 제품 출시 시 구매의사 설문 결과

○ 설문 분석을 통한 단점 보완 및 피드백

- 종합적으로 2차 시제품은 1차 시제품과 비교할 때 약효와 누액발생 등의 단점을 보완한 긍정적인 반응을 보였다. 반면 가격적인 부분을 고려한다면 생산원가를 더 낮추는 방향의 연구가 추가로 진행되어야 한다는 숙제도 대두되었다.

○ 듀얼네프킬에스 공정 개선 시제품 지역별, 작물별, 해충별 현장 실증 시험(개발 2년차)

- 공정이 개선된 최종 처방의 시제품(듀얼네프킬에스 : Bta 4% + Btk 10% Xn진공농축액 3.5% + 증량제 70.5% + 습윤분산제 2% + 보조용제 10%)을 전국 73개 지역의 98개 농가에 배포하여 재배 현장에서의 약효 및 약해, 사용상의 문제점 및 농가 반응 등을 조사하였다(표 38).
- 조사대상은 주로 2차 시제품(듀얼네프킬에스)를 사용하였던 농가 대상으로 배포하여, 최종 처방된 시제품에 대한 설문 및 반응을 조사하였다. 주요 작물은 엽채류, 수도작, 과채류, 과수 등에서 나방류가 많이 발생하는 배추, 버, 토마토, 오이, 수박, 사과, 배등의 다양한 작물을 선정하였으며, 지역별 약제 처리는 각 농가 주체로 관행적인 방법을 따르도록 하였다. 이후 전화나 방문조사를 통해 시제품에 대한 설문을 실시하였다.

표 38. 최종 처방의 시제품(듀얼네프킬에스) 실증시험 지역(2년차)

도	시군	지점	도	시군	지점
경상남도	진주시	5	경기도	양평군	2
	창녕군	2		남양주시	2
	사천시	2		이천시	3
	밀양시	2		고양시	2
	하동군	3		하남시	2
	산청군	2		수원시	1
	창원시	2		옥천군	1
경상북도	안동시	2	충청북도	청원군	1
	봉화군	3		제천시	2
	김천시	2	충청남도	논산시	1
	성주군	1		청양군	3
전라북도	전주시	1	강원도	철원군	2
	정읍시	3		원주시	1
	순창군	5		춘천시	2
전라남도	해남군	1	광역시	부산	2
	보성군	2		대구	2
	순천시	1		광주	4
	무안군	1	전국 73개 지역		

○ 설문조사 결과 요약

- 공정이 개선된 최종 처방의 시제품에 대하여 총 33개 농가(유기농 3, 무농약 11, 일반농 19)가 설문조사에 참여해 주었다. 1차년에 비해서 매우 적은 응답결과인데, 이는 조사 시점이 작물의 수확이 끝나가는 시기였으며, 실제 농가에서는 나방류 해충의 발생이 저조하여 설문조사에 참여한 농가 수가 적었다. 설문조사 결과를 분석하면 다른 유기농업자재와 비교할 때, 약효가 “보통이상”이라는 응답이 97% 였다(그림 16). 다만 유기농업자재 선택에서 가장 중요한 요소로는 저렴한 가격이라는 응답이 61%로 조사되었는데(그림 17), 이는 농산물 가격 하락으로 인해, 친환경자재 뿐 아니라 모든 농자재의 가격 하락을 바라는 농가의 의견이 반영된 것으로 판단된다.

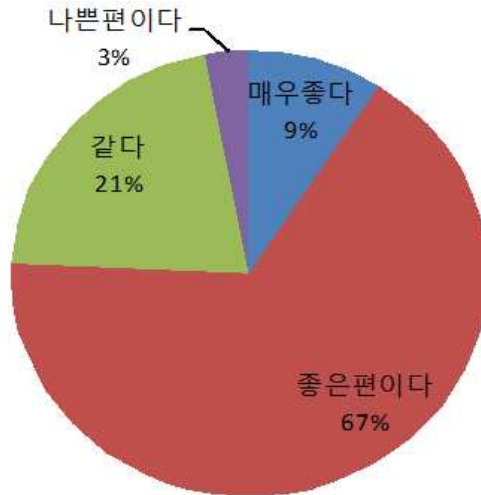


그림 16. 최종 처방 시제품의 약효 비교 설문 결과

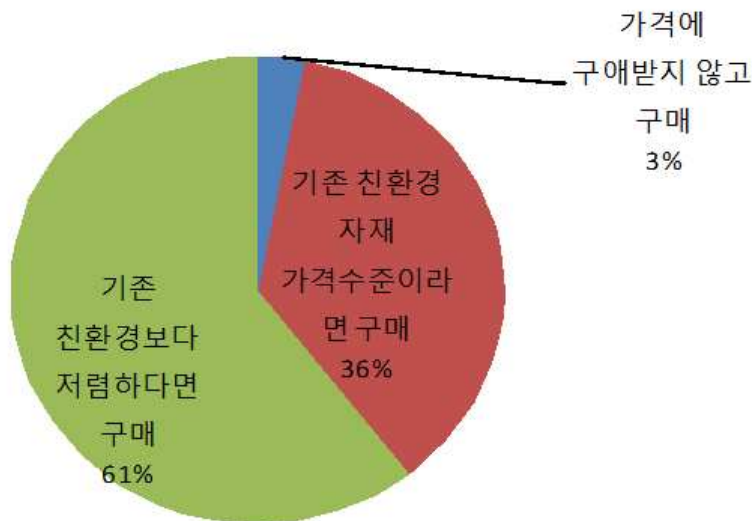


그림 17. 최종 처방 시제품 구매의사 설문 결과

○ 듀얼네프킬에스 공정 개선 시제품 지역별, 작물별, 해충별 현장 실증 시험(개발 3년차)

- 공정이 개선된 최종 처방의 시제품(듀얼네프킬에스 : Bta 4% + Btk 10% Xn진공농축액 3.5% + 증량제 70.5% + 습윤분산제 2% + 보조용제 10%)을 전국 43개 지역의 86개 농가에 배포하여 재배 현장에서의 약효 및 약해, 농가 반응 등을 추가 조사하였다(표 39).
- 조사대상은 개발 2년차에 시제품을 사용하였던 농가를 대상으로 배포하여 약효를 재검증 하였다. 주요 대상은 엽채류, 수도작, 과채류, 과수 등에서 나방류가 많이 발생하는 배추, 상추, 벼, 고추, 오이, 딸기, 사과, 복숭아, 배 등의 다양한 작물을 선정하였으며, 지역별 약제 처리는 각 농가 주체로 관행적인 방법을 따르도록 하였다. 이후 전화나 방문조사를 통해 시제품에 대한 설문을 실시하였다.

표 39. 최종 처방 시제품(듀얼네프킬에스)의 실증 시험 지역(3년차)

도	시군	지점	도	시군	지점
경상남도	진주시	2	경기도	양평군	2
	창녕군	2		남양주시	2
	사천시	2		이천시	2
	하동군	2		고양시	2
	창원시	2		수원시	1
경상북도	안동시	3	충청북도	옥천군	1
	김천시	2		청원군	1
	성주군	1	충청남도	논산시	1
전라북도	전주시	1		청양군	2
	군산시	3	강원도	철원군	2
전라남도	해남군	1		원주시	1
	보성군	2	광역시	광주	2
	순천시	1	전국 43개 지역		

- 공정이 개선된 최종 처방의 시제품에 대하여 총 65개 농가(유기농 7, 무농약 19, 일반농 39)가 설문 에 참여해 주었다. 총 조사농가 대비 응답비율은 75%로 2차년에 비해 늘었는데 이는 시제품에 대한 농가의 인지도가 상승하였다는 것으로 해석된다. 설문 조사 결과를 분석하면 시제품의 약효는 “보통이상”이라는 응답이 전체 99%였다(그림 18). 다만 유기농업자재 선택에서 중요한 요소로는 여전히 저렴한 가격이라는 응답이 57%로 조사되었다(그림 19).

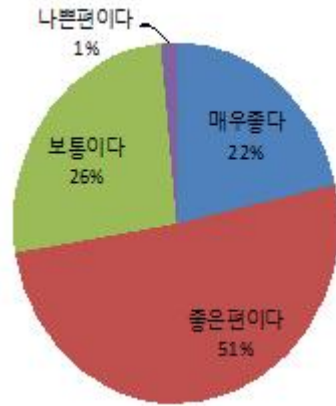


그림 18. 최종 처방 시제품(듀얼네프킬에스)의 약효 설문 결과

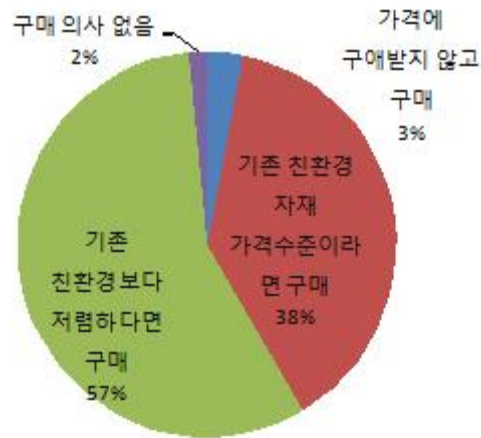


그림 19. 최종 처방 시제품(듀얼네프킬에스)의 구매 의사 설문 결과

II. 딱정벌레목 해충 방제제 개발

□ 연구목표 : 딱정벌레목 해충 방제 제품의 상품화 가능성 타진 및 농가 현장에서의 효과 구명

□ 연구내용

○ 콜킬 시제품의 대량 생산

- 제품의 대량배양 시스템을 확립하여 생산수율, 효능증진 및 시장가격을 맞추고, 농가 사용에 편의성을 높이고자 실시하였다.
- 콜킬 시제품은 2015년 03월 경북바이오산업연구원의 장비(0.3t 배양기, 2t 배양기, 진동원심막분리기, 진공농축기)를 이용하여 생산하였다.
- 실험실에서 배양된 Btt, Ptt의 균주를 0.3t 배양기에서 pH 7.0 / 28℃로 72시간 동안 배양하였다. 배지조성은 물 0.18t, Glucose 3.6kg, L-monosodium glutamate 2.16kg, Yeast extract 0.45kg, Mono-potassium phosphate 0.18kg, Calcium chloride 0.18kg, Magnesium sulfate 0.054kg, Copper(II) sulfate 0.0054kg, Manganese sulfate 0.0036kg, Iron(II) sulfate 0.0036kg, Zinc sulfate 0.0036kg으로 구성되었다. 이후 72시간 동안 배양된 Btt 배양액은 진동원심막분리를 거쳐 나온 슬러지를 5℃ / 48시간 동안 저온 저장을 하였다. Ptt 배양액은 2t 대량배양기에서 pH 7.0 / 28℃로 72시간 동안 배양하였다. 2t 대량배양조의 배지조성은 물 1.2t Glucose 24kg, L-monosodium glutamate 14.4kg, Yeast extract 3kg, Mono-potassium phosphate 1.2kg, Calcium chloride 1.2kg, Magnesium sulfate 0.36kg, Copper(II) sulfate 0.0036kg, Manganese sulfate 0.024kg, Iron(II) sulfate 0.024kg, Zinc sulfate 0.024kg으로 구성되었다. Ptt 배양액은 진공농축기를 이용하여 수분을 증발시킨 후 남은 농축액을 이용하였다. 전처리가 끝난 원료들을 Btt 슬러지 10% : Ptt 농축액 10% : 증량제 68% : 흡윤분산제 2% :보조용제 10%의 비율(w/w)로 배합하여 총 200kg의 시제품을 생산하였다.

○ 상품화 가능성 타진을 위한 제품 원가 산출 연구

- 콜킬 시제품 200kg을 생산 시 사용된 총 비용은 ₩10,145,000이었으며(표 40), 병당 가격으로 환산하면 약 ₩12,680이다.
- 이는 시장 가격과는 상당한 격차가 있는 가격이지만, 시제품을 pilot 생산한 것으로, 추후 scale-up 생산을 추정하면, 1.1톤 생산비용은 ₩20,844,000으로 병당 가격으로 환산 했을 시 약 ₩4,737이다(표 41). 이 역시 다소 미흡한 점은 있으나 시장 가격에 근접하고 있다고 판단할 수 있다.

표 40. 시제품(콜킬) pilot 생산 비용

구 분	품 명	사용횟수 (또는 양)	금액(원)
대량배양	0.3톤 배양기	8회	2,376,000
	2톤 배양기	4회	2,112,000
	진동원심막분리기	1회	250,000
	진공농축기	2회	347,000
	산업용 배지	-	700,000
	보조제	33kg	200,000
	생산인건비	2인 15일	3,000,000
생산 및 포장	포장용기	800개	200,000
	스티커	800개	160,000
	운송비	1회	200,000
	포장인건비	2인 3일	600,000
총 비용			₩10,145,000

표 41. 시제품(콜킬) scale-up 생산 예상 비용

구 분	품 명	사용횟수 (또는 양)	금액(원)
대량배양	0.3톤 배양기	12회	3,564,000
	2톤 배양기	12회	6,336,000
	진동원심막분리기	1회	250,000
	진공농축기	4회	694,000
	산업용 배지	-	1,150,000
	보조제	200kg	1,200,000
	생산인건비	2인 20일	4,000,000
생산 및 포장	포장용기	5,000개	1,250,000
	스티커	5,000개	1,000,000
	운송비	1회	200,000
	포장인건비	2인 6일	1,200,000
총 비용			₩20,844,000

○ 콜킬 시제품 지역별, 작물별, 해충별 현장 실증 시험(개발 1년차)

- 시제품(콜킬)을 사용하여 재배 현장에서의 약효 및 약해, 사용상의 문제점 및 농가 반응을 조사하였다.
- 생산된 시제품은 전국 52개 지역의 70개 농가에 배포하였으나, 조사 당시 배추 등 재배 중인 작물에서 벼룩잎벌레와 좁은가슴잎벌레의 발생이 저조하여 설문에 참여한 농가 수가 적었다.

○ 콜킬 시제품 지역별, 작물별, 해충별 현장 실증 시험(개발 1~2년차)

- 개발 1년차에 배포한 시제품(콜킬)의 설문조사를 계속적으로 수행하였다. 총 54개 지역의 78개 농가에 배포하여 재배 현장에서의 약효 및 약해, 사용상의 문제점 및 농가 반응을 조사하였다(표 42). 주요 작물은 엽채류, 과채류에서 딱정벌레목이 발생하는 배추, 무, 콩, 참외 등의 작물을 선정하였으며, 지역별 약제 처리는 각 농가 주체로 관행적인 방법을 따르도록 하였다. 이후 전화나 방문조사를 통해 시제품에 대한 설문을 실시하였다.

표 42. 시제품(콜킬) 실증시험 지역

도	시군	지점	도	시군	지점
경상남도	진주시	4	경기도	양평군	2
	창녕군	3		남양주시	3
	하동군	3		이천시	1
	산청군	3		하남시	2
봉화군	2	수원시		1	
경상북도	김천시	3	충청북도	청원군	2
	성주군	1		제천시	1
	전라북도	전주시	1	충청남도	논산시
정읍시		2	청양군		1
순창군		2	강원도	평창군	8
전라남도	해남군	1		원주시	1
	영암군	2		춘천시	1
광역시	광주	1	전국 54개 지역		

- 시제품(콜킬)에 대하여 총 57개 농가(유기농 7, 무농약 19, 일반농 31)에서 설문에 참여해 주었다. 시제품의 약효는 "보통이다"라는 응답이 7%로 농가가 인정하는 약효는 매우 저조하였다(그림 20).

- 이는 Btt 균주가 벼룩잎벌레나 좁은가슴잎벌레 등과 같은 현재 국내에서 문제시 되고 있는 딱정벌레목 해충에 낮은 활성을 가지고 있는 것으로 해석할 수 있다. 또한 제품의 배합비에서 Btt의 함량이 10%에 지나지 않아 효과를 보이기에 다소 부족했을 가능성도 배제하지 않을 수 없다. 향후 이런 점에서 착안하여 약효 상승을 위한 처방 개선 등 자체적인 연구를 수행할 계획이다.

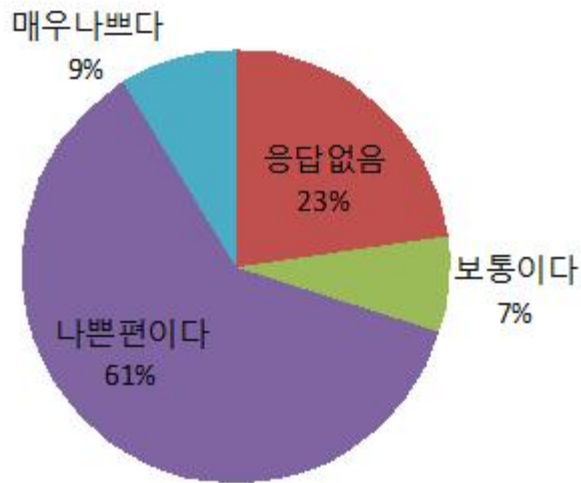


그림 20. 시제품(콜킬)의 약효 설문 결과

Ⅲ. 파리목 해충 방제제 개발

□ 연구목표 : 파리목 해충 방제 제품의 상품화 가능성 타진 및 농가 현장에서의 효과 구명

□ 연구내용

○ 디프킬 시제품의 대량 생산

- 제품의 대량배양 시스템을 확립하여 생산수율, 효능증진 및 시장가격을 맞추고, 농가 사용에 편의성을 높이고자 실시하였다.
- 디프킬 시제품은 2015년 11월 경북바이오산업연구원의 장비(0.3t 배양기, 진동원심막분리기)를 이용하여 생산하였다.
- 실험실에서 배양된 Bti, Xn의 균주를 0.3t 배양기에서 pH 7.0 / 28℃로 48시간 동안 배양하였다. 배지조성은 물 0.18t, Glucose 3.6kg, L-monosodium glutamate 2.16kg, Yeast extract 0.45kg, Mono-potassium phosphate 0.18kg, Calcium chloride 0.18kg, Magnesium sulfate 0.054kg, Copper(II) sulfate 0.0054kg, Manganese sulfate 0.0036kg, Iron(II) sulfate 0.0036kg, Zinc sulfate 0.0036kg으로 구성되었다. 이후 배양된 Bti는 진동원심막분리를 거쳐 나온 슬러지를 5℃ / 48시간 동안 저온 저장을 하였다. Xn은 배양액 원액을 그대로 이용하였다. 준비된 원, 부원료는 Bti 슬러지 10% : Xn 배양액 70% : 습윤분산제 5% :보조용제 15%의 비율(w/w)로 배합하여 총 160kg의 시제품을 생산하였다.

○ 상품화 가능성 타진을 위한 제품 원가 산출 연구

- 디프킬 시제품 160kg을 생산 시 사용된 총 비용은 ₩7,011,000이었으며, 병당 가격으로 환산하면 약 ₩10,954이다(표 43).
- 이는 시장 가격과는 상당한 격차가 있는 가격이지만, 시제품을 pilot 생산한 것으로, 추후 scale-up생산을 추정하면, 생산량 1.2톤에 생산비용은 ₩16,825,000으로 250g 1병당 가격으로 환산했을 시 약 ₩3,365이다(표 44). 이 역시 다소 미흡하나 시장 가격에 근접하고 있다고 판단할 수 있다.

표 43. 시제품(디프킬) pilot 생산 비용

구 분	품 명	사용횟수 (또는 양)	금액(원)
대량배양	0.3톤 배양기	8회	2,376,000
	진동원심막분리기	1회	275,000
	산업용 배지	-	1,100,000
	보조제	33kg	200,000
	생산인건비	2인 10일	2,000,000
생산 및 포장	포장용기	640개	130,000
	스티커	640개	130,000
	운송비	1회	200,000
	포장인건비	2인 3일	600,000
총 비용			7,011,000

표 44. 시제품(디프킬) scale-up 생산 예상 비용

구 분	품 명	사용횟수 (또는 양)	금액(원)
대량배양	0.3톤 배양기	8회	2,376,000
	2톤 배양기	8회	4,224,000
	진동원심막분리기	1회	275,000
	산업용 배지	-	1,150,000
	보조제	150kg	900,000
	생산인건비	2인 20일	4,000,000
생산 및 포장	포장용기	5,000개	1,250,000
	스티커	5,000개	1,250,000
	운송비	1회	200,000
	포장인건비	2인 6일	1,200,000
총 비용			16,825,000

○ 디프킬 시제품 지역별, 작물별, 해충별 현장 실증 시험

- 시제품(디프킬)을 3개 지역의 11개 농가에 배포(표 45)하여 재배 현장에서의 약효 및 약해, 사용상의 문제점 및 농가 반응 등을 조사하였다.
- 현재 국내에서는 호박과실파리와 호박꽃과실파리가 중요해충으로 문제시 되고 있다. 따라서 본 실증시험은 박과류에서 발생하는 상기 2종의 파리류를 대상으로 하고자 하였다. 약제 처리는 각 농가 주체로 관행적인 방법을 따르도록 하였으며 이후 전화나 방문조사를 통해 시제품에 대한 설문을 실시하였다.

표 45. 시제품(디프킬) 실증시험 지역

도	시군	지점	도	시군	지점
전라남도	무안군	1	경상북도	안동시	1
	신안군	1	전국 3개 지역		

- 시제품(디프킬)에 대하여 5개 농가(일반농)에서 설문에 참여해 주었다. 재배 작물은 단호박과 멧돌호박이 위주였는데, 사실상 농가 현장에서 약효는 없는 것으로 확인되었다. 이는 실내 실험 결과와 마찬가지로 시제품은 호박꽃과실파리 등 파리류 농업해충에 적용하기는 어려울 것으로 판단된다.
- 반면 시제품(콜킬)이 위생해충인 모기에 탁월한 효과를 보이는 것은 본 연구의 성과라고 볼 수 있다. 본 성과는 최근 사회적으로 큰 이슈가 되고 있는 지카바이러스 등을 매개하는 숲모기의 방제에 적용 가능하리라 판단된다. 현재 모기유충 방제제는 농약이 아닌 식품의약품안전처의 관리를 받는 의약외품으로 그중에서도 감염병 예방용 살충제로 분류되어 있다. 따라서 제품의 등록(허가)은 식약처의 소관으로 농약이나 유기농업자재의 개발(등록)과정과는 다소 차이점이 존재한다. 향후 시제품(디프킬)을 의약외품으로 개발 및 등록 할 수 있는 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

제3장 개발 제품의 상품화를 위한 등록 연구

I. 나비목 해충 방제제 개발

□ 연구목표 : 나비목 해충 방제 제품의 출시를 위한 제품 등록 및 상품화

□ 연구내용

○ 이화학적 분석 연구

- 듀얼네프킬에스의 Xn 세균 유효물질 분석을 실시하였다. 곤충병원세균인 Xn의 대사물질 내에는 곤충의 면역작용을 억제하는 여러 가지 물질이 존재하는 것으로 알려져 있다. 대표적 물질로는 BZA, PY, Oxindole, Indole, cPY 등이 있다. 이 중 HPLC를 통한 분석 시 가장 높은 농도를 보이는 Oxindole을 지표물질로 선정하였다.
- 분석방법은 시제품(듀얼네프킬에스) 1ml를 채취하여 물 999ml와 혼합하여 separate funnel을 이용하여 hexane 분획구를 추출하였다. 추출방법은 시료와 hexane 300ml를 separate funnel에 넣고 약 30회 흔들어 준다. 이 때 6회마다 코르크 마개를 열어 가스를 배출한다. 2시간 방치 후 수층은 아래로 빼내고 분획층은 위로 빼내서 따로 분리한다. 같은 방법으로 hexane 추가로 300ml, 400ml를 반복해 물질 추출한다. 수집된 hexane 층은 무수황산나트륨을 넣어 탈수하였다. 이 1L의 hexane 추출물을 감압농축(40℃/ 60분)하여 용매를 제거했다. 농축된 추출물은 5ml의 100 % methanol로 수거하였다. 추출 시료를 투과직경이 0.20µm의 PTFE syringe filter로 여과한 후, 고정상으로 C18 역상 칼럼(φ 4.60×250 mm, Gemini C18, Phenomenex, Torrance, CA, USA)이 장착된 HPLC (Waters 600, Waters, Milford, USA)를 이용하여 분석하였다. 초자주사기를 이용하여 시료 10µl를 주사하였으며, HPLC 분석 조건은 이동상으로 methanol : water (40:60, v/v)를 사용하였고, 유속을 분당 0.5ml로 하였으며, 용출된 화합물의 피크들은 UV 254nm 조건에서 photo diode array 검출기로 파장에 대한 흡수특성을 분석하였다. HPLC를 통해 얻은 oxindole peak 면적을 표준방정식에 대입하여 10µl 시료에 포함된 oxindole 양(X)을 산출 하였다: $y = a X + b$.
- 표준방정식 : 피크면적 = 147817 x oxindole (ppm) + 3469014
- 제품 oxindole 함량 (ppm) = oxindole (ppm) x 5 (희석배수)
- 위 방법으로 시제품을 HPLC 분석한 결과 제품 내 Oxindole은 293.6±6.49ppm의 농도를 보였다.

표 46. 2차 시제품(듀얼네프킬에스)의 HPLC 분석 결과

반복	시료채취량 (ml)	Oxindole peak area	추출된 Oxindole 량 (mg)	시제품 중 Oxindole 량 (ppm)
1	1	16,023,545	59.70	298.49
2	1	15,892,535	59.10	295.49
3	1	15,480,620	57.21	289.05

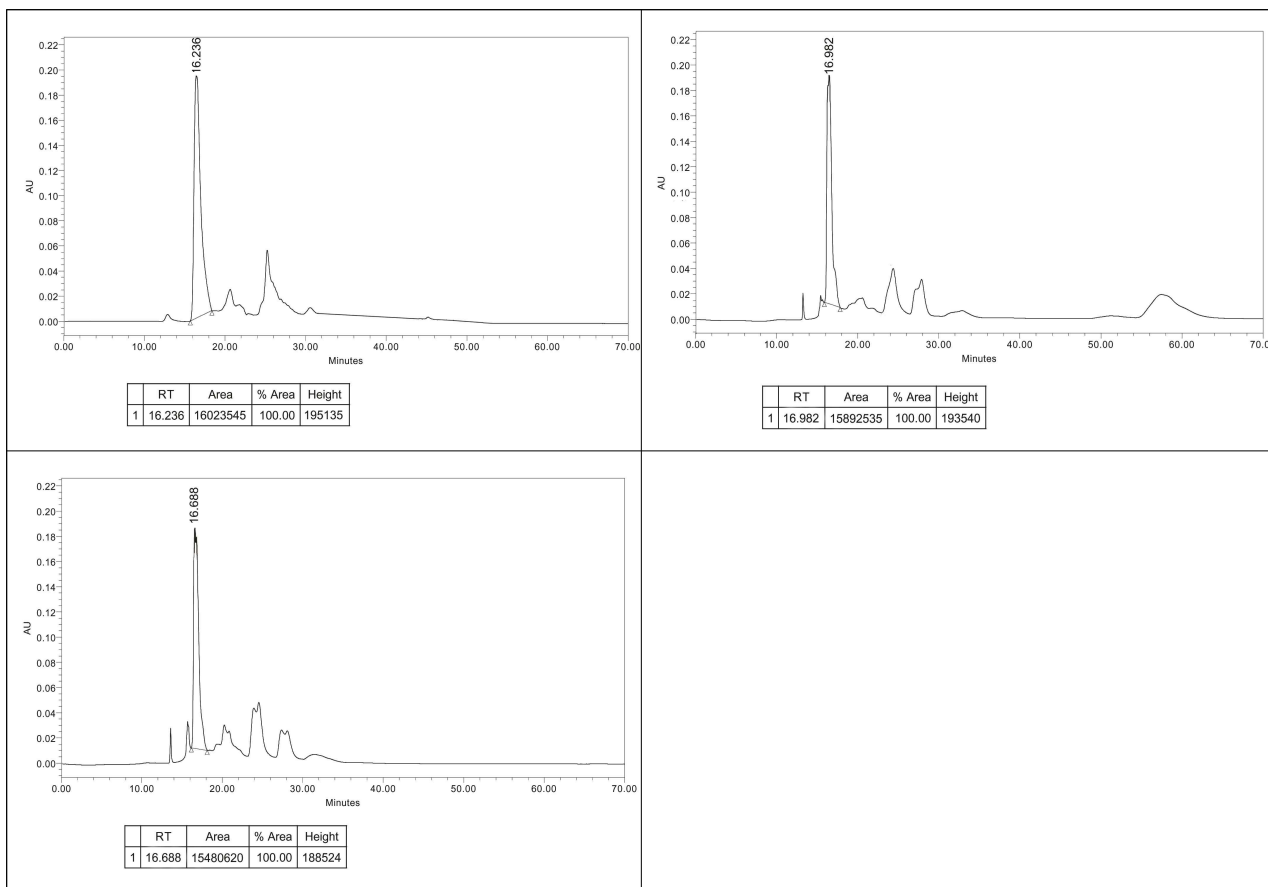


그림 21. 2차 시제품(듀얼네프킬에스)의 HPLC chromatogram(3반복).

○ 미생물 약제의 제형화 연구

- 시제품(듀얼네프킬에스)의 타 유기농업자재와의 혼용 가부에 관한 실험을 수행하였다. 실험에 사용된 유기농업자재는 충해방제용 자재 1종과 균해방제용 자재 1종이었으며, 각각 기준량, 배량의 희석배수에서 침전이나 응집의 발생은 없었다. 따라서 시제품의 해당 유기농업자재와의 혼용이 가능한 것으로 판단된다(표 47).

표 47. 시제품(듀얼네프킬에스)와 기타 유기농업자재와의 혼용 가부

구 분	희석배수	응집/침전 발생	혼용가부
충해용 (타이밍 [®])	기준량 (X1,000)	-	●
	배량 (X500)	-	●
병해용 (광킬러 [®])	기준량 (X1,000)	-	●
	배량 (X500)	-	●

○ 주요 5작물에 대한 약해 시험 자료 확보

- 시제품(듀얼네프킬에스)의 유기농업자재 공시를 위하여 주요 작물 5종(고추, 배추, 상추, 오이, 토마토)에 대한 약해 시험을 하였다(그림 22).
- 약해시험은 각 작물의 유효기에 시제품을 기준량(1,000배)과 배량(500배)으로 엽면 처리하였으며 약해조사는 육안적 달관조사로 처리 후 3, 5, 7일에 걸쳐 외관상 약해 유무를 조사하였다.
- 시험 결과 시제품의 처리에 따른 작물의 피해는 발견되지 않았으며, 무처리구와 비교하여도 약해로 판단될 만한 특이한 증상은 없었다(그림 23).



무처리



기준량



배량

그림 22. 시제품(듀얼네프킬에스)의 주요 5작물에 대한 약해 시험 전경.
















작물명	무처리	기준량	배 량
고 추			
배 추			
상 추			
오 이			
토마토			

그림 23. 시제품(듀얼네프킬에스)의 주요 5작물에 대한 약해 시험 결과(7일차).

○ 유기농업자재 공시를 위한 독성자료 확보

- 시제품(듀얼네프킬에스)의 유기농업자재 공시를 위한 독성자료를 확보하기 위하여 급성경구독성, 급성경피독성, 피부자극성시험, 안점막자극성시험, 급성어독성시험(잉어), 꿀벌접촉독성시험을 실시하였다.
- 급성경구독성시험은 마우스(ICR 계통)에 시제품 5,000mg/kg를 1회 경구 처리한 후 2주간 치사수, 일반중독증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사하였다.
급성경구독성시험 결과 마우스 수컷과 암컷 모두 기초시험 투여약량인 5,000mg/kg에서 전 시험기간 동안 치사 개체는 발견되지 않았으며, 특이한 임상증상은 없었다. 체중의 변화는 음성대조군과 비교하여 시험 전 기간에 걸쳐 유의차 없이 증가하는 경향을 보였으며 약제투여와 관련한 육안적 부검소견에서 내부 장기에 대한 특이한 영향은 없었다. 이상의 결과 반수치사약량(LD₅₀)은 >5,000mg/kg으로 저독성으로 확인되었다.
- 급성경피독성시험은 랫드(SD 계통)를 이용하여 시제품 4,000mg /kg을 1회 경피 처리 한 후 2주간 치사수, 일반중독증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사하였다.
급성경피독성시험 결과 랫드 수컷과 암컷 모두 기초시험 투여약량인 4,000mg/kg에서 전 시험기간 동안 치사 개체는 발견되지 않았으며, 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다. 체중의 변화는 음성대조군과 비교하여 시험 전 기간에 걸쳐 유의차 없이 증가하는 경향을 보였으며 약제투여와 관련한 육안적 부검소견에서 내부 장기에 대한 특이한 영향은 없었다. 이상의 결과 반수치사약량(LD₅₀)은 >4,000mg/kg으로 저독성으로 확인되었다.
- 피부자극성시험은 백색토끼(New Zealand White계)를 사용하여 시제품 0.5ml를 1회 피부 노출시킨 후 72시간 동안 치사수, 일반중독증상, 체중변화 및 피부자극 정도를 관찰 조사하였다.
피부자극성시험 결과 수컷 3마리의 백색토끼 모두 시험기간 중 치사 개체는 발견되지 않았으며, 일반중독증상도 관찰되지 않았다. 약제투여 후 체중은 시간이 경과함에 따라 증가하였으며, 관찰 시간대별 피부자극 역시 관찰되지 않았다. 이상의 결과 피부일차자극지수(Primary Irritation Index)는 0.0으로 자극성이 없음으로 구분되었다.
- 안점막자극성시험은 백색토끼(New Zealand White계)를 사용하여 시제품 0.1ml를 1회 결막낭 내에 투여한 후 72시간 동안 치사수, 일반중독증상, 체중변화 및 안점막 자극 정도를 관찰 조사하였다.
안점막자극성시험 결과 수컷 3마리의 백색토끼 모두 시험기간 중 치사개체는 발견되지 않았으며, 일반중독증상도 관찰되지 않았다. 약제투여 후 체중은 시간이 경과함에 따라 증가하였다. 약제처리 1시간 후 수컷 1마리에서 발적, 부종 및 배출물이 관찰되기 시작하였으나, 24시간째부터 자극이 줄어드는 경향을 보였으며, 72시간째에 자극이 모두 회복되어 정상으로 관찰되었다. 이상의 결과 MOI (Mean Ocular Irritation Index)는 2.0(1시간), 2.0(24시간), 0.7(48시간), 0.0(72시간)으로 나타났다고, AOI(Acute Ocular Irritation Index)는 2.0(1시간, 24시간)으로 자극성이 없음으로 구분되었다.
- 잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 급성독성 시험은 시험물질 400mg을 칭량한 후 증류수로 20ml까지 volume up하면서 강하게 교반하여 stock solution(10,000mg/L)을 조제하여 10ml를 10L 시험용수

에 처리한 후 24, 48, 72, 96시간동안 생사수, 일반 중독증상을 관찰 조사하였다.

잉어에 대한 급성독성 시험 결과 일반 중독증상은 관찰되지 않았으며, pH는 평균 7.3, 용존산소량(DO)는 평균 74.1%, 수온은 평균 21.7°C였다. 이상의 시험 결과 48시간 및 96시간 LC₅₀(mg/L)는 10.0mg/L로 독성분류상 어독성 III급이었다.

- 꿀벌(*apis mellifera*)에 대한 급성접촉독성시험은 시험물질 2,000mg을 칭량하여 Triton®-X100 0.05%로 10ml volume up하여 stock solution(100,000mg/L)을 조제하여 1 μ l(100.0 μ g a.i/bee)씩 꿀벌 흉부에 처리한 후, 1, 4, 24, 48시간동안 생사수, 일반 중독증상을 관찰 조사하였다.

꿀벌에 대한 급성접촉독성 시험 결과 일반중독증상은 관찰되지 않았으며, 시험기간 중 평균온도는 24°C, 습도는 최저 54~56%였다. 이상의 결과 꿀벌에 대한 24시간 및 48시간 반수치사약량(LD₅₀, μ g a.i/bee)는 >100 μ g a.i/bee로 나타났다.

○ 지표물질 변경(Oxindole 293.65ppm => Benzylidenacetone 4.670ppm)

- 최종 처방된 듀얼네프킬에스의 지표물질을 변경하였다. 농축된 Xn 배양액은 기존 HPLC로 분석할 경우 유효물질인 Oxindole의 검출량 변화가 심하여, 안정적인 검출량을 보이는 Benzylidenacetone(BZA)으로 변경하였다.
- 분석을 위한 시료추출 방법은 최종 처방 시제품(듀얼네프킬에스) 시료 1g을 칭량하여 ball-flask(vol. 100ml)에 넣고 메탄올 50ml를 넣어 1시간 진탕 후, 약 30회 흔들어 주었다. 이후 0.2µm의 PTFE syringe filter로 여과한 후, 고정상으로 C18 역상 칼럼(Phenomenex Gemini NX 3µm C18 110A 150*4.6mm)이 장착된 HPLC(Agilent HPLC 1200 series)를 이용하여 분석하였다. 초자주사기를 이용하여 시료 10µl를 주사하였으며, HPLC 분석 조건은 이동상으로 H₂O: Acetonitrile Gradient mode (20:80, v/v)를 사용하였고, 유속을 분당 1.0ml/min로 하였으며, 용출된 화합물의 피크들은 DAD 280nm 조건에서 photo diode array 검출기로 파장에 대한 흡수특성을 분석하였다.
- 위 방법으로 듀얼네프킬에스를 HPLC 분석한 결과 제품 내 BZA는 4.670±0.137ppm의 농도를 보였다.

표 48. 최종 처방 시제품(듀얼네프킬에스) BZA 분석 결과

반복	Ret. Time	BZA peak area	분석된 BZA 함량(ppm)
1	8.071	45.14046	4.828
2	8.068	42.97193	4.598
3	8.069	42.84277	4.584

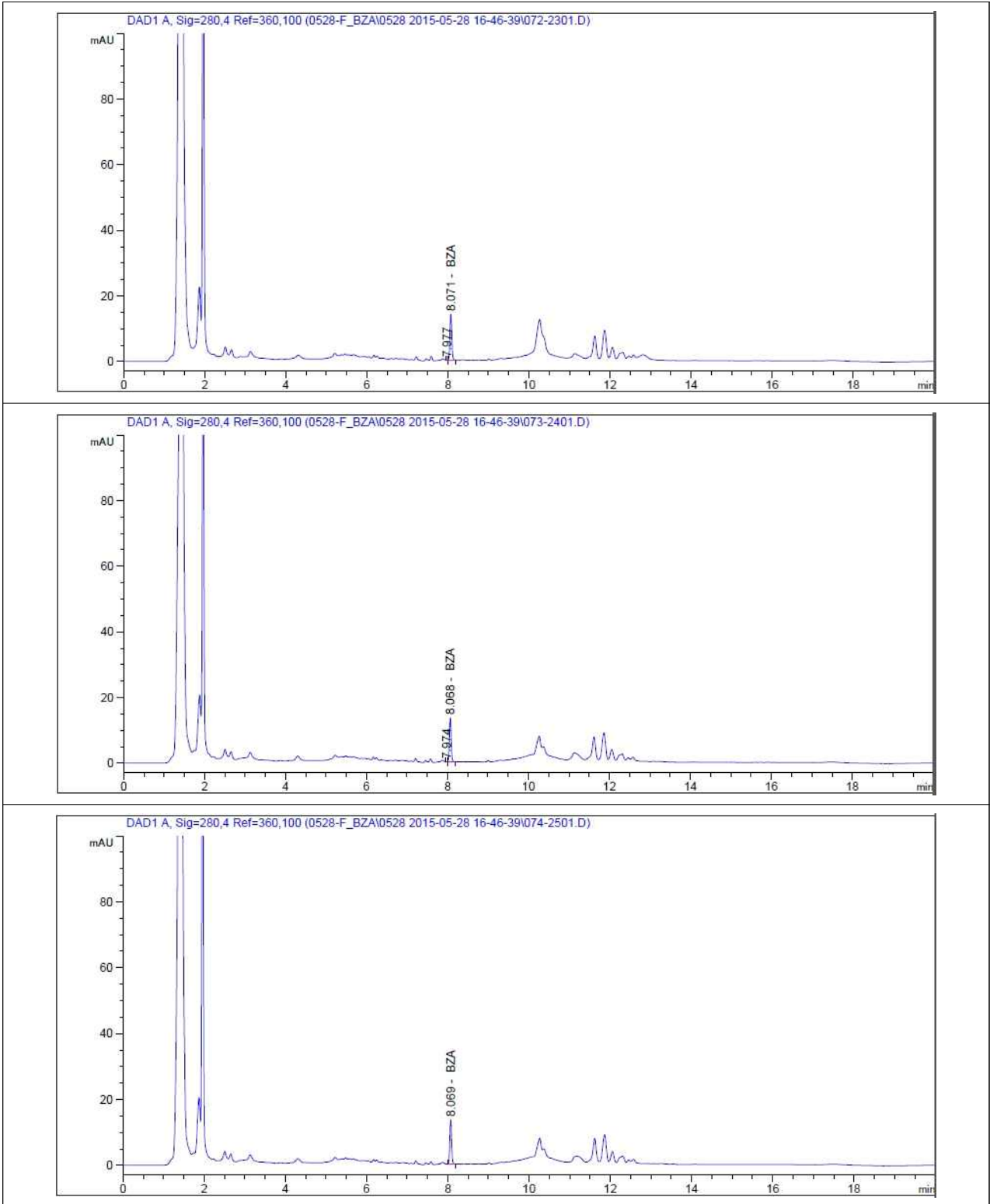


그림 24. 최종 처방 시제품(듀얼네프킬에스)의 HPLC chromatogram(3반복).

○ 시제품(듀얼네프킬에스) 사업화 실적

- 2016년 04월과 05월 춘천과 안동지역에 듀얼네프킬에스를 판매하였다(표 49). 시제품 사용 후 약효에 만족하였던 농가들의 요청에 의한 구매였으며, 점차 수요가 늘어날 것으로 전망한다.

표 49. 듀얼네프킬에스 사업화 실적

지역	재배작물	대상해충	수량
춘천시	토마토, 오이	목화바둑명나방, 담배거세미나방	500ea
안동시	배추, 사과	배추좀나방, 담배거세미나방	950ea
총 계			1,480ea

II. 딱정벌레목 해충 방제제 개발

□ 연구목표 : 딱정벌레목 해충 방제 제품의 출시를 위한 제품 등록 및 상품화

□ 연구내용

○ 이화학적 분석 연구

- 콜킬의 Ptt 세균 유효물질 분석을 실시하였다. 곤충병원세균인 Ptt의 대사물질 내에는 곤충의 면역작용을 억제하는 여러 가지 물질이 존재하는 것으로 알려져 있다. 대표적 물질로는 BZA, PY, Oxindole, Indole, cPY 등이 있다. 이 중 HPLC를 통한 분석이 가장 용이한 BZA를 지표물질로 선정하였다.
- 분석을 위한 시료추출 방법은 콜킬 시료 1g을 칭량하여 ball-flask(vol. 100ml)에 넣고 메탄올 50ml를 넣어 1시간 진탕 후, 약 30회 흔들어 주었다. 이후 0.2 μ m의 PTFE syringe filter로 여과한 후, 고정상으로 C18 역상 칼럼(Phenomenex Gemini NX 3 μ m C18 110A 150*4.6mm)이 장착된 HPLC(Agilent HPLC 1200 series)를 이용하여 분석하였다. 초자주사기를 이용하여 시료 10 μ l를 주사하였으며, HPLC 분석 조건은 이동상으로 H₂O: Acetonitrile Gradient mode (20:80, v/v)를 사용하였고, 유속을 분당 1.0ml/min로 하였으며, 용출된 화합물의 피크들은 DAD 280nm 조건에서 photo diode array 검출기로 파장에 대한 흡수특성을 분석하였다.
- 위 방법으로 콜킬을 HPLC 분석한 결과 제품 내 BZA는 2.33 \pm 0.02ppm의 농도를 보였다.

표 56. 콜킬 BZA 분석 결과

반복	Ret. Time	BZA peak area	분석된 BZA 함량(ppm)
1	8.074	21.53605	2.31927
2	8.073	21.93828	2.36203
3	8.072	21.44093	2.30916

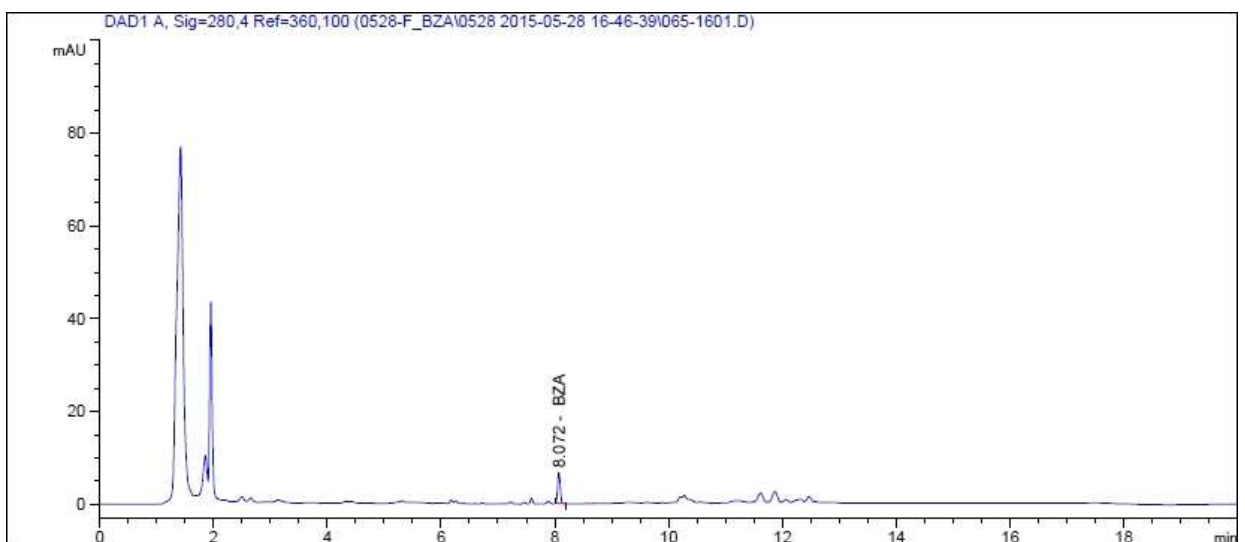
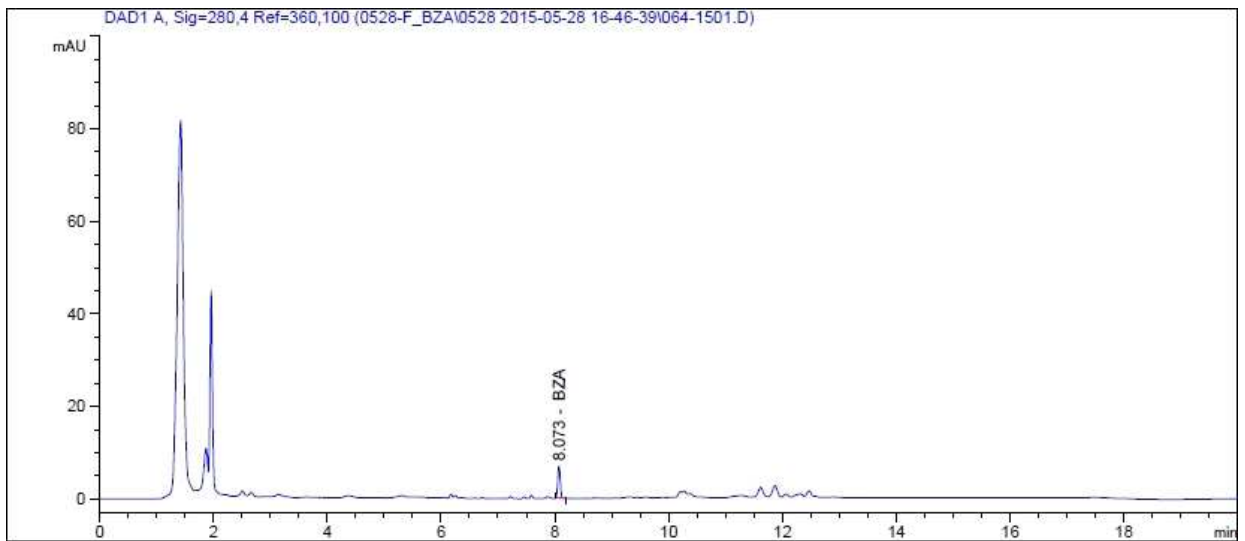
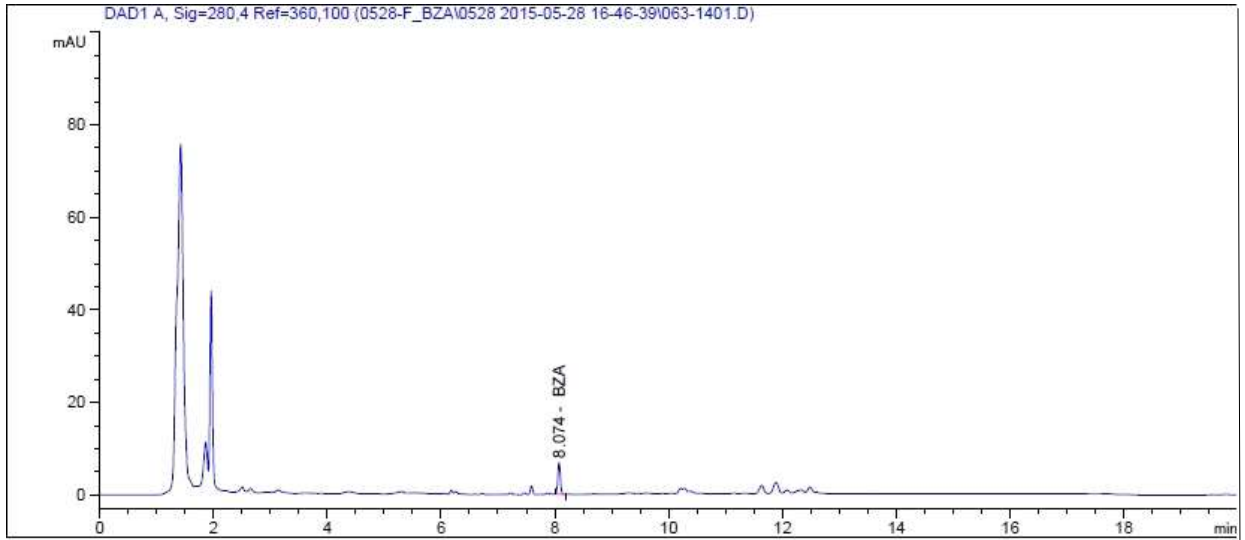


그림 37. 시제품(콜킬)의 HPLC chromatogram(3반복).

○ 미생물 약제의 제형화 연구

- 시제품(콜킬)의 타 유기농업자재와의 혼용 가부에 관한 실험을 수행하였다. 실험에 사용된 유기농업자재는 (주)와이에이코리아에서 개발, 시판 중인 제품으로 충해방제용 자재 2종(1종은 본 과제의 1년차 성과물인 듀얼네프킬에스)과 병해방제용 자재 1종이었으며, 각각 기준량, 배량의 희석배수에서 침전이나 응집의 발생은 없었다. 따라서 시제품의 해당 유기농업자재와의 혼용이 가능한 것으로 판단된다(표 51).

표 51. 시제품(콜킬)과 기타 유기농업자재와의 혼용 가부

구분	희석배수	응집/침전 발생	혼용가부
충해용 (타이밍 [®])	기준량 (X1,000)	-	●
	배량 (X500)	-	●
충해용 (듀얼네프킬에스 [®])	기준량 (X1,000)	-	●
	배량 (X500)	-	●
병해용 (광킬러 [®])	기준량 (X1,000)	-	●
	배량 (X500)	-	●

○ 주요 5작물에 대한 약해 시험 자료 확보

- 시제품(콜킬)의 유기농업자재 공시를 위하여 주요 작물 5종(고추, 배추, 오이, 상추, 참외)에 대한 약해 시험을 하였다(그림 28).
- 약해시험은 각 작물의 유묘기에 시제품을 기준량(1,000배)과 배량(500배)으로 엽면 처리하였으며 약해조사는 육안적 달관조사로 처리 후 3, 5, 7일에 걸쳐 외관상 약해 유무를 조사하였다.
- 시험 결과 시제품의 처리에 따른 작물의 피해는 발견되지 않았으며, 무처리구와 비교하여도 약해로 판단될 만한 특이한 증상은 없었다(그림 29).



무처리



기준량



배량

그림 28. 시제품(콜킬)의 주요 5작물에 대한 약해 시험 전경.
















작물명	무처리	기준량	배 량
고 추			
배 추			
오 이			
상 추			
참 외			

그림 29. 시제품(콜킬)의 주요 5작물에 대한 약해 시험 결과(7일차).

○ 안전성 확보를 위한 독성자료 확보

- 시제품(콜킬)의 유기농업자재 공시를 위한 독성자료를 확보하기 위하여 급성경구독성, 급성경피독성, 피부자극성시험, 안점막자극성시험, 급성어독성시험(잉어), 꿀벌접촉독성시험을 실시하였다.
- 급성경구독성시험은 마우스(ICR 계통)에 시제품 5,000mg/kg를 1회 경구 처리한 후 14일간 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사하였다.
급성경구독성시험 결과 마우스 수컷과 암컷 모두 기초시험 투여약량인 5,000mg/kg 에서 전 시험기간 동안 치사 개체는 발견되지 않았으며, 관찰기간 동안 특이한 임상증상은 없었다. 체중측정 결과 시험물질 투여군과 대조구간 통계적 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았으며, 부검 시 주요장기에 대한 육안적 관찰을 실시한 결과 시험물질 투여와 관련된 이상소견이 관찰된 개체는 없었다. 이상의 결과 시제품의 반수치사약량(LD₅₀)은 5,000mg/kg 이상으로 저독성으로 확인되었다.
- 급성경피독성시험은 랫드(SD 계통)를 이용하여 시제품 4,000mg/kg을 1회 경피 처리 한 후 14일간 치사수, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사하였다.
급성경피독성시험 결과 랫드 수컷과 암컷 모두 기초시험 투여약량인 4,000mg/kg에서 전 시험기간 동안 치사 개체는 발견되지 않았으며, 관찰기간 동안 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다. 체중측정 결과 시험물질 투여군과 대조구간 통계적 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았으며, 부검 시 주요장기에 대한 육안적 관찰을 실시한 결과 시험물질 투여와 관련된 이상소견이 관찰된 개체는 없었다. 이상의 결과 반수치사약량(LD₅₀)은 4,000mg/kg 이상으로 저독성으로 확인되었다.
- 피부자극성시험은 백색토끼(New Zealand White계)를 사용하여 시제품 0.5ml를 1회 피부 노출시킨 후 72시간 동안 치사수, 일반증상, 체중변화 및 피부자극 정도를 관찰 조사하였다.
피부자극성시험 결과 암컷 3마리의 백색토끼 모두 시험기간 중 치사 개체는 발견되지 않았으며, 일반증상도 관찰되지 않았다. 약제투여 후 체중은 시간이 경과함에 따라 증가하였으며, 관찰시간 대별 피부반응 역시 관찰되지 않았다. 이상의 결과 피부일차자극지수(Primary Irritation Index)는 0.0으로 자극성 없음으로 구분되었다.
- 안점막자극성시험은 백색토끼(New Zealand White계)를 사용하여 시제품 0.1ml를 1회 결막낭 내에 투여한 후 72시간 동안 치사수, 일반증상, 체중변화 및 안점막 자극 정도를 관찰 조사하였다.
안점막자극성시험 결과 암컷 3마리의 백색토끼 모두 시험기간 중 치사개체는 발견되지 않았으며, 일반증상도 관찰되지 않았다. 약제투여 후 체중은 시간이 경과함에 따라 증가하였으며, 관찰시간 대별 안점막 자극성 역시 관찰되지 않았다. 이상의 결과 MOI (Mean Ocular Irritation Index)는 0.0(1시간), 0.0(24시간), 0.0(48시간), 0.0(72시간)으로 나타나 자극성 없음으로 구분되었다.
- 잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 급성독성 시험은 시험물질을 유효성분(A.I.) 기준으로 1.0g을 칭량하여 100mL 용량의 volumetric flask에 넣고 시험용수를 이용하여 최종 volume을 100mL로 맞추어 1,000mg/L의 stock solution을 조제하였다. 준비된 stock solution 100ml를 13L 시험용 수조에 넣고, 시험용수 9.9L를 넣어 최종 volume을 10L로 맞추었다. 이 방법으로 10.0mg/L 농도의 시험용액을 준비하여 24, 48, 72, 96시간동안 치사수, 일반증상을 관찰 조사하였다.
잉어에 대한 급성독성 시험 결과 일반증상은 관찰되지 않았으며, pH는 평균 7.5, 용존산소량(DO)는 평균 82.5%, 수온은 평균 20.4℃였다. 이상의 시험 결과 48시간 및 96시간 LC₅₀(mg/L)는

10.0mg/L 이상으로 독성분류상 어독성 III급이었다.

- 꿀벌(*Apis mellifera*)에 대한 급성접촉독성시험은 시험물질 10,000mg을 칭량하여 Triton®-X100 0.05%로 10ml volume up하여 stock solution(100,000mg/L)을 조제하여 1 μ l(100.0 μ g a.i/bee)씩 꿀벌 흉부에 처리한 후, 1, 4, 24, 48시간동안 생사수, 일반 중독증상을 관찰 조사하였다. 꿀벌에 대한 급성접촉독성 시험 결과 일반중독증상은 관찰되지 않았으며, 시험기간 중 온도는 24~26℃, 습도는 55~64%였다. 이상의 결과 꿀벌에 대한 24시간 및 48시간 반수치사약량(LD₅₀, μ g a.i/bee)는 100 μ g a.i/bee 이상으로 나타났다.

○ 유기농업자재 공시

- 제품명 : 콜킬
- 공시번호 : 공시-2-5-095호
- 공고일 : 2015년 8월 17일
- 유효기간 : 2015년 8월 17일 ~ 2018년 8월 16일

(일쪽)

■ 농림축산식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙 [별지 제23호서식]

공시번호: 제 공시-2-5-095 호


유기농업자재 [○] 공시서
[] 품질인증서

1. 업체명: (주)와이에이코리아 2. 대표자 성명: 양 경 형
3. 주소(사업장): 경기도 수원시 권선구 서호로 89 3동 103호
(서울대학교 농생명과학 창업지원센터)
4. 자재의 명칭: 미생물추출물
5. 자재의 구분: 총해관리용
6. 상표명: 콜킬
7. 주성분(원료)의 종류 및 함량(%): 미생물추출물 10%
8. 유효기간: 2015. 8. 17 ~ 2018. 8. 16
9. 제조장 주소 또는 수입원산지(국가, 제조사):
경기도 수원시 권선구 서호로 89 3동 103호(서울대학교 농생명과학 창업지원센터)
10. 최초 공고일: 2015. 8. 17
11. 최초 공시등기관: 강원대학교 산학협력단

「친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률」 제38조 제2항 및 「농림축산식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙」 제49조제2항에 따라 위와 같이 유기농업자재 공시(품질인증)임을 증명합니다.

2015년 8월 17일

강원대학교 산학협력단장



210mm×297mm(백상지) 120g/m²

그림 30. 콜킬 유기농업자재 목록공시서

Ⅲ. 파리목 해충 방제제 개발

□ 연구목표 : 파리목 해충 방제 제품의 출시를 위한 제품 등록 및 상품화

□ 연구내용

○ 이화학적 분석 연구

- 디프킬의 Xn 세균에서의 유효물질 분석을 실시하였다. 곤충병원세균인 Xn의 대사물질 내에는 곤충의 면역작용을 억제하는 여러 가지 물질이 존재하는 것으로 알려져 있다. 대표적 물질로는 BZA, PY, Oxindole, Indole, cPY 등이 있다. 이 중 HPLC를 통한 분석이 가장 용이한 BZA를 지표물질로 선정하였다.
- 분석을 위한 시료추출 방법은 시제품(디프킬) 시료 1g을 칭량하여 ball-flask(vol. 100ml)에 넣고 메탄올 50ml를 넣어 1시간 진탕 후, 약 30회 흔들어 주었다. 이후 0.2 μ m의 PTFE syringe filter로 여과한 후, 고정상으로 C18 역상 칼럼(Phenomenex Gemini NX 3 μ m C18 110A 150*4.6mm)이 장착된 HPLC(Agilent HPLC 1200 series)를 이용하여 분석하였다. 초자주사기를 이용하여 시료 10 μ l를 주사하였으며, HPLC 분석 조건은 이동상으로 H₂O: Acetonitrile Gradient mode (20:80, v/v)를 사용하였고, 유속을 분당 1.0ml/min로 하였으며, 용출된 화합물의 피크들은 DAD 280nm 조건에서 photo diode array 검출기로 파장에 대한 흡수특성을 분석하였다.
- 위 방법으로 시제품을 HPLC 분석한 결과 제품 내 BZA 평균함량은 0.959 \pm 0.001ppm의 농도를 보였다(표 52).

표 52. 시제품(디프킬)디프킬 BZA 분석 결과

반복	Ret. Time	BZA peak area	분석된 BZA 함량(ppm)
1	8.530	101.23070	0.959
2	8.530	101.27171	0.959
3	8.530	101.33457	0.960

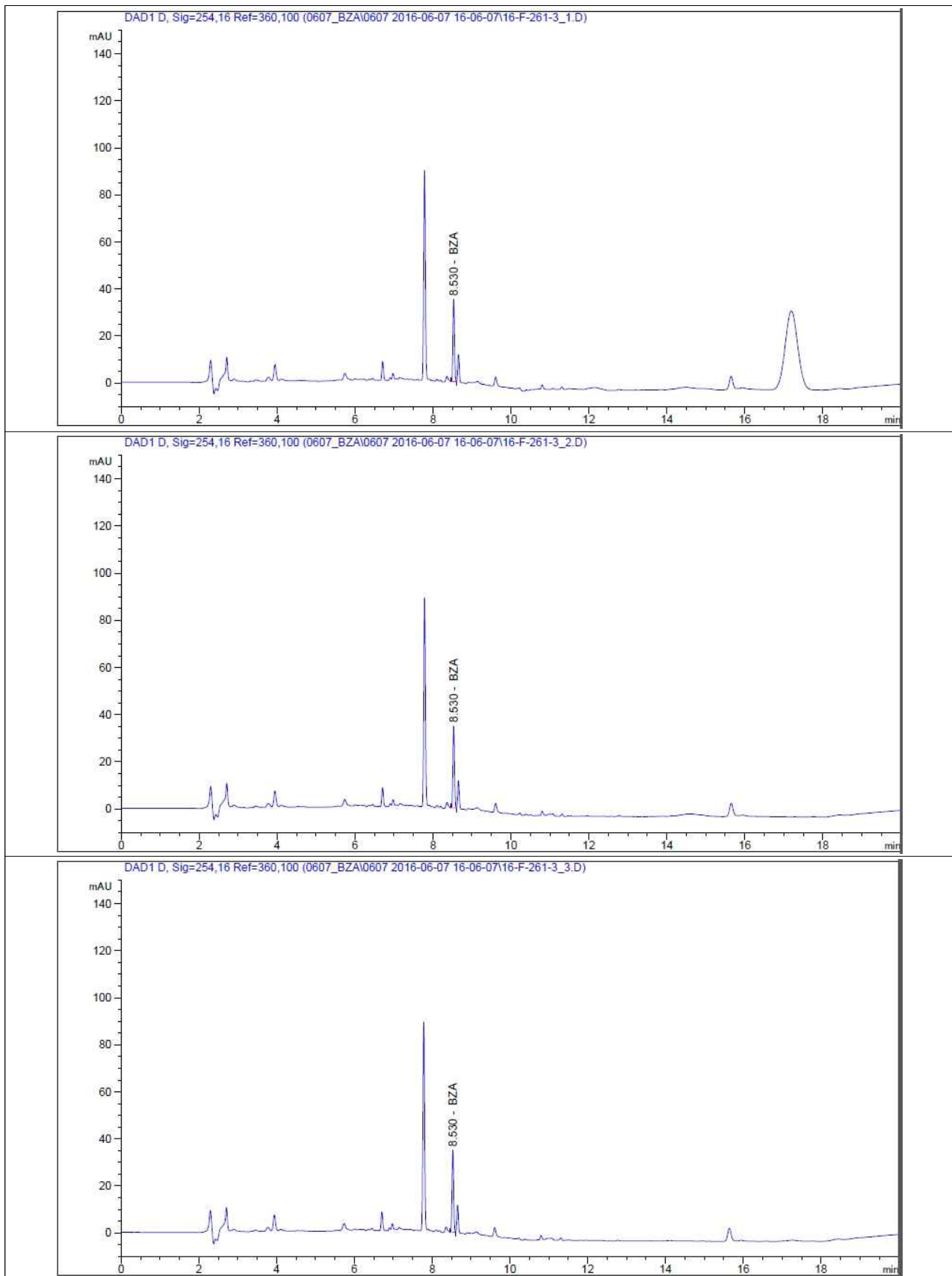


그림 31. 디프킬 시료의 HPLC chromatogram(3반복).

○ 미생물 약제의 제형화 연구

- 시제품(디프킬)의 타 유기농업자재와의 혼용 가부에 관한 실험을 수행하였다. 실험에 사용된 유기농업자재는 (주)와이에이코리아에서 개발, 시판 중인 제품으로 충해방제용 자재 3종(2종은 본 과제의 성과물인 듀얼네프킬에스, 콜킬)과 병해방제용 자재 1종이었으며, 각각 기준량, 배량의 희석배수에서 침전이나 응집의 발생은 없었다. 따라서 시제품의 해당 유기농업자재와의 혼용이 가능한 것으로 판단된다(표 53).

표 53. 디프킬과 기타 유기농업자재와의 혼용 가부

구 분	희석배수	응집/침전 발생	혼용가부
충해용 (타이밍 [®])	기준량 (X1,000)	-	●
	배량 (X500)	-	●
충해용 (콜킬 [®])	기준량 (X1,000)	-	●
	배량 (X500)	-	●
충해용 (듀얼네프킬에스 [®])	기준량 (X1,000)	-	●
	배량 (X500)	-	●
병해용 (팡킬러 [®])	기준량 (X1,000)	-	●
	배량 (X500)	-	●

○ 주요 5작물에 대한 약해 시험 자료 확보

- 시제품(디프킬)의 유기농자재 공시를 위하여 주요 작물 5종(고추, 배추, 상추, 오이, 토마토)에 대한 약해 시험을 하였다(그림 32).
- 약해시험은 각 작물의 유묘기에 시제품을 기준량(1,000배)과 배량(500배)으로 엽면 처리하였으며 약해조사는 육안적 달관조사로 처리 후 3, 5, 7일에 걸쳐 외관상 약해 유무를 조사하였다.
- 시험 결과 시제품의 처리에 따른 작물의 피해는 발견되지 않았으며, 무처리구와 비교하여도 약해로 판단될 만한 특이한 증상은 없었다(그림 33).



그림 32. 시제품(디프킬)의 주요 5작물에 대한 약해 시험 전경.
















작물명	무처리	기준량	배 량
고 추			
배 추			
상 추			
오 이			
토마토			

그림 33. 시제품(디프킬)의 주요 5작물에 대한 약해 시험 결과(7일차).

○ 안전성 확보를 위한 독성자료 확보

- 시제품(디프킬)의 유기농업자재 공시를 위한 독성자료를 확보하기 위하여 급성경구독성, 급성경피독성, 피부자극성시험, 안점막자극성시험, 급성어독성시험(잉어), 꿀벌접촉독성시험을 실시하였다.
- 급성경구독성시험은 암컷 랫드(SD 계통)에 시제품 300mg/kg(1단계 및 2단계)와 2,000 mg/kg(3단계 및 4단계)으로 설정하여 군당 3마리씩 투여한 후 14일간 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사하였다. 급성경구독성시험 결과 랫드 암컷에서 투여약량인 300mg/kg와 2,000mg/kg에서 전 시험기간 동안 치사 개체는 발견되지 않았으며, 관찰기간 동안 특이한 임상증상은 없었다. 체중측정 결과 시험물질 투여군과 대조구간 통계적 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았으며, 부검 시 주요장기에 대한 육안적 관찰을 실시한 결과 시험물질 투여와 관련된 이상소견이 관찰된 개체는 없었다. 이상의 결과 디프킬의 반수치사약량(LD₅₀)은 2,000mg/kg을 상회(저독성)하는 것으로 확인되었다.
- 급성경피독성시험은 랫드(SD 계통)를 이용하여 시제품 4,000mg/kg 을 1회 경피 처리 한 후 14일간 치사수, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사하였다. 급성경피독성시험 결과 랫드 수컷과 암컷 모두 기초시험 투여약량인 4,000mg/kg에서 전 시험기간 동안 치사 개체는 발견되지 않았으며, 관찰기간 동안 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다. 체중측정 결과 시험물질 투여군과 대조구간 통계적 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았으며, 부검 시 주요장기에 대한 육안적 관찰을 실시한 결과 시험물질 투여와 관련된 이상소견이 관찰된 개체는 없었다. 이상의 결과 반수치사약량(LD₅₀)은 4,000mg/kg 이상으로 확인되었다.
- 피부자극성시험은 백색토끼(New Zealand White계)를 사용하여 시제품 0.5ml를 1회 피부 노출시킨 후 72시간 동안 치사수, 일반증상, 체중변화 및 피부자극 정도를 관찰 조사하였다. 피부자극성시험 결과 암컷 3마리의 백색토끼 모두 시험기간 중 치사 개체는 발견되지 않았으며, 일반증상도 관찰되지 않았다. 약제투여 후 체중은 시간이 경과함에 따라 증가하였으며, 관찰시간대별 피부반응 역시 관찰되지 않았다. 이상의 결과 피부일차자극지수(Primary Irritation Index)는 0.0으로 자극성 없음으로 구분되었다.
- 안점막자극성시험은 백색토끼(New Zealand White계)를 사용하여 시제품 0.1ml를 1회 결막낭 내에 투여한 후 72시간 동안 치사수, 일반증상, 체중변화 및 안점막 자극 정도를 관찰 조사하였다. 안점막자극성시험 결과 암컷 3마리의 백색토끼 모두 시험기간 중 치사개체는 발견되지 않았으며, 일반증상도 관찰되지 않았다. 약제투여 후 체중은 시간이 경과함에 따라 증가하였으며, 관찰시간대별 안점막 자극성 역시 관찰되지 않았다. 이상의 결과 MOI (Mean Ocular Irritation Index)는 3.3(1시간), 0.0(24시간), 0.0(48시간), 0.0(72시간)으로 나타났으며, AOI(Acute Ocular Irritation Index)는 3.3으로 산출되어 자극성 없음으로 구분되었다.
- 잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 급성독성 시험은 시험물질을 유효성분(A.I.) 기준으로 0.1429g을 칭량하여 100mL 용량의 volumetric flask에 넣고 시험용수를 이용하여 최종 volume을 100mL로 맞추어 1,000mg/L의 stock solution을 조제하였다. 준비된 stock solution 100ml를 13L 시험용 수조에 넣고, 시험용수 9.9L를 넣어 최종 volume을 10L로 맞추었다. 이 방법으로 10.0mg/L 농도의 시험용액을 준비하여 24, 48, 72, 96시간동안 치사수, 일반증상을 관찰 조사하였다. 잉어에 대한

급성독성 시험 결과 일반증상은 관찰되지 않았으며, pH는 평균 7.4, 용존산소량(DO)는 평균 83.7%, 수온은 평균 20.3℃였다. 이상의 시험 결과 48시간 및 96시간 LC₅₀(mg/L)는 10.0mg/L 이상으로 독성분류상 어독성 III급이었다.

- 꿀벌(*Apis mellifera*)에 대한 급성접촉독성시험은 시험물질 1,482.6mg을 칭량하여 Triton®-X100 0.05%로 10ml volume up하여 stock solution(100,000mg/L)을 조제하여 1μl(100.0μg a.i/bee)씩 꿀벌 흉부에 처리한 후, 1, 4, 24, 48시간동안 생사수, 일반 중독증상을 관찰 조사하였다. 꿀벌에 대한 급성접촉독성 시험 결과 일반중독증상은 관찰되지 않았으며, 시험기간 중 온도는 24.5~25.5℃, 습도는 61~66%였다. 이상의 결과 꿀벌에 대한 24시간 및 48시간 반수치사약량(LD₅₀, μg a.i/bee)는 100μg a.i/bee 이상으로 나타났다.

○ 유기농업자재 공시

- 제품명 : 디프킬
- 공시번호 : 공시-2-5-139호
- 공고일 : 2015년 8월 17일
- 유효기간 : 2015년 8월 17일 ~ 2018년 8월 16일



■ 농림축산식품부 소관 친환경농업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙 [별지 제23호서식] (양쪽)

공시번호: 제 공시-2-5-139호

유기농업자재 [○] 공시서
[] 품질인증서

1. 업체명 : 안동대학교 산학협력단 2. 대표자 성명 : 권 순 태

3. 주소(사업장) : 경상북도 안동시 경동로 1375(안동대학교 산학협력단)

4. 자재의 명칭 : 미생물추출물

5. 자재의 구분 : 총해관리용

6. 상표명 : 디프킬

7. 주성분(원료)의 종류 및 함량(%) :

- 주성분명 : Benzylideneacetone
- 원료의 함량 : 미생물추출물(*Xenorhabdus nematophila*) 70%

8. 유효기간 : 2016. 7. 22 ~ 2019. 7. 21

9. 제조장 주소 또는 수입원산지(국가, 제조사) :
경상북도 안동시 경동로 1486-18(경북바이오산업연구원)

10. 최초 공고일 : 2016. 7. 22

11. 최초 공시등기관 : 강원대학교 산학협력단

「친환경농업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률」 제38조제2항 및 「농림축산식품부 소관 친환경농업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙」 제49조제2항에 따라 위와 같이 유기농업자재 공시(품질인증)임을 증명합니다.

2016년 7월 22일

강원대학교 산학협력단장

(210mm×297mm(백상지) 120g/㎡)

그림 34. 디프킬 유기농업자재 목록공시서와 제품

제3단원 제품 생산 매뉴얼

1. BtPlus 제조법

1.1. BtPlus 종류와 조성

BtPlus는 그람 양성인 *Bacillus thuringiensis* (비티, Bt)가 생성하는 내독소단백질과 그람 음성의 곤충병원세균인 *Xenorhabdus nematophila* (Xn) 또는 *Photorhabdus temperata temperata* (Ptt)가 생성하는 기능성 2차 대사물질들이 혼합되어 있다. 내독소단백질이 주로 살충효과를 나타내며, 기주곤충의 면역생리를 억제하는 기능성 2차 대사물질들에 의해 살충효과가 보다 상승되게 된다. 이러한 BtPlus는 대상 해충의 목(genus)에 따라서 해충 특이적인 살충력을 발휘하는 네프킬(나비목), 콜킬(딱정벌레목), 디프킬(파리목)로 크게 세 개의 생물농약으로 나뉜다.

표 1. BtPlus 종류 및 조성

종 류	조 성 (%)			
	Bt (subsp.)	곤충병원 세균	전착제	보존제
네프킬	20 (aizawai)	58 (Xn)	2	10
	10 (kurstaki)			
콜 킬	10 (tenebrionis)	78 (Ptt)	2	10
디프킬	10 (israelensis)	80 (Xn)	0	10



그림 1. 비티플러스의 구성

1.2. BtPlus 제조법

BtPlus는 대상해충에 주요한 Bt균주와 곤충병원성세균을 혼합하여 그림 1과 같이 제제화되며 제조과정은 그림 2에 간략히 기술된다.

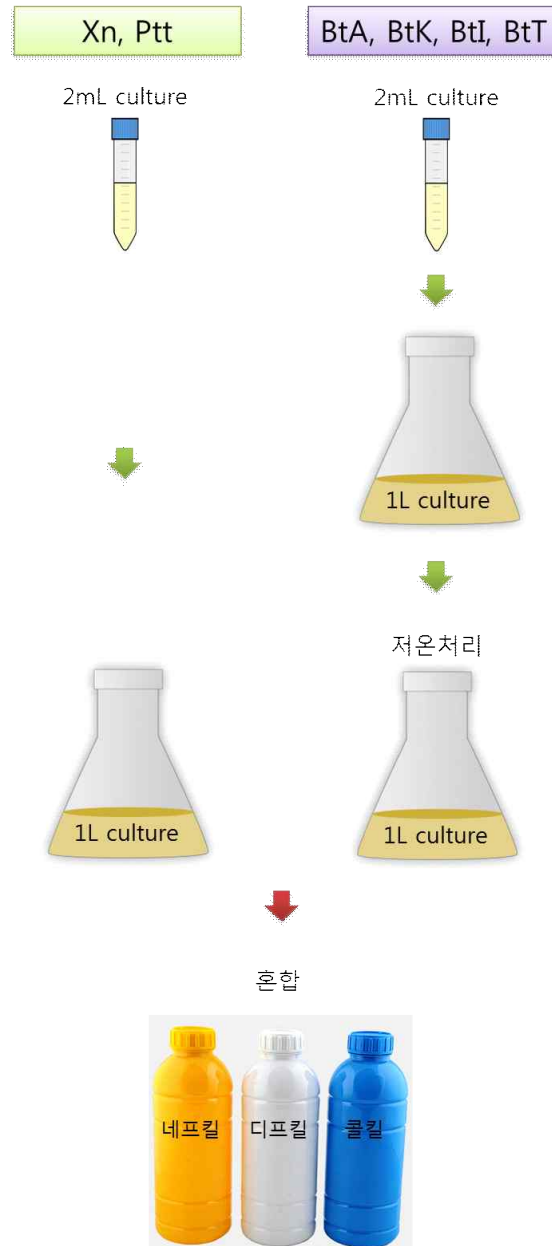


그림 2. 비티플러스의 제조 과정

1.2.1. Bt 배양과 포자형성 유도

Bt 균주들은 안동대학교 식물의학과내 농업유전자원실의 -80°C 에 냉동고에 보관중인 균주를 사용

하였다. 주요한 살충효과를 나타내는 Bt 균주는 네프킬 제조를 위한 BtA (*B. thuringiensis* subsp. *aizawai*)와 BtK (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*), 콜킬 제조를 위한 BtT (*B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*), 그리고 디프킬 제조를 위한 BtI (*B. thuringiensis* subsp. *israelensis*)가 seed 배양을 위해 2mL의 TSB (tryptic soy broth, Difco, MD, USA) 배지에서 24시간동안 28°C에서 180 rpm의 속도로 회전진탕배양 하였다. 이 후 1L의 TSB 배지에 1mL가 접종되어 seed 배양과 동일한 조건으로 48시간동안 배양되었다. 포자형성을 유도하기 위해 정지기에 도달한 TSB 배지를 4°C에서 48시간동안 저온처리를 하였다. BtK, BtT, 그리고 BtI 포자 농도가 각각 10^{10} spores/mL 및 BtA 포자 농도가 10^9 spores/mL 이상이 되도록 8,000 rpm에서 30분간 각 배양액을 원심분리과정을 통하여 상등액 제거하였으며, 침전물을 멸균증류수에 교반시켜 10배 농축과정을 완료하였다. 이 후 농축된 각 Bt의 포자 및 세균은 광학현미경하에서 혈구계산판을 이용하여 그림 3과 같이 최종 포자수가 확인되었다.

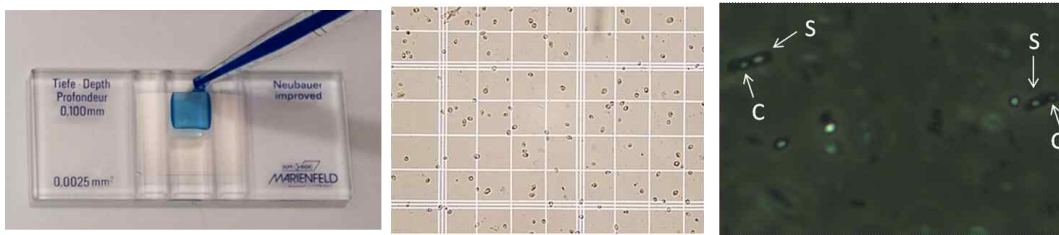


그림 3. 혈구계산판과 BtI의 포자 및 크리스탈

1.2.2. Xn/Ptt 배양

곤충병원세균 균주들은 안동대학교 식물학과내 농업유전자원실의 -80°C에 냉동고에 보관중인 균주를 사용하였다. 살충효과의 상승을 위해서 Xn 또는 Ptt는 앞서 기술한 Bt 균주와 동일한 과정과 조건에서 48시간동안 배양이 되었다.

1.2.3. BtPlus 액상제형화

배양과정이 완료된 Bt와 Xn 또는 Ptt 배양액은 표1에서 기술된 조성 비율에 따라 각각 디프킬, 콜킬, 네프킬로 액상제형화가 이루어졌다. 전착제는 동부 팜 한농의 dinotefuran spinetoran (서울, 한국)을 이용하였으며, 보존제는 100% 에탄올 (Merck, MA, USA)을 이용하였다. 각각의 BtPlus 액상제형은 250 mL를 기준으로 제작되었다.

1.3. BtPlus의 대량생산

실험실 조건의 소량 생산을 기반으로 대형배양조를 이용한 BtPlus의 대량 생산이 경북바이오산업연구원에서 이루어졌다. 이를 위한 seed culture는 안동대학교 식물학과의 곤충생리실에서 이루어 졌으며, 이를 이용하여 5톤 배양조를 위한 300L의 seed culture를 시도하였다 (그림 4). 이 후 실험실과 동일한 조건으로 배양을 시도하였다.



Seed culture를 위한 300ml 배양조

대량생산을 위한 5톤 배양조

그림 4. 경북바이오산업연구원 내의 대량 배양조

2. BtPlus 제품관리

BtPlus의 제품관리는 HPLC 분석을 이용한 곤충병원세균의 배양액내에 존재하는 유효성분의 확인 (그림 5)과 BtPlus의 잎침지법 (그림 7)을 이용한 생물검정을 통해 진행되었다.

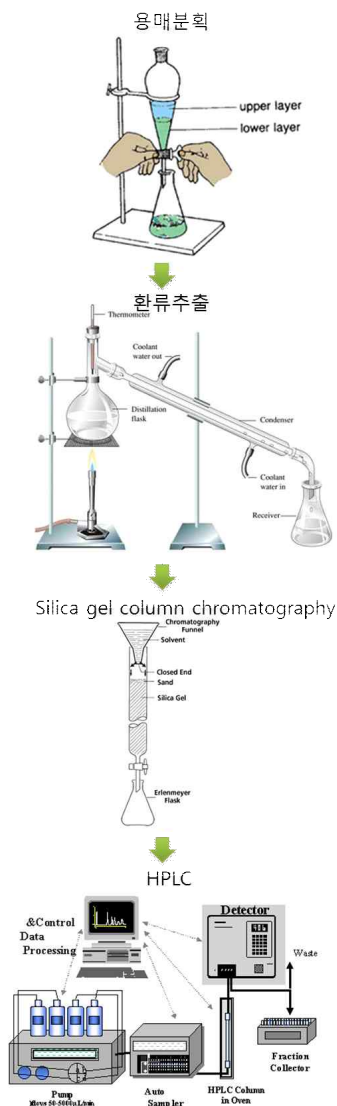


그림 5. Xn과 Ptt 배양액의 생리활성 물질 확인 과정

2.1. Xn과 Ptt 배양액의 유효성분

2.1.1. 용매 분획

sample의 용량과 동량의 용매 Hexane을 함께 separate funnel에 넣고 격렬히 흔들어 섞어 30분 방치 후 추출하였다. 이 과정을 3번 반복 후 추출된 용액을 감압 건조하여 무게를 측정하였다. 1차 Xn배양액은 330ml 동결건조한 후 증류수 330ml에 용해하여 실험 사용하였고, 2차 Xn배양액은 동결건조된 6.85g을 증류수 245ml에 용해하여 실험 사용하였다.

2.1.2. 환류 추출

동결건조 하여 얻은 건물을 1L 라운드플라스크에 동량의 Hexane과 함께 넣고 환류추출기로 5시간 추출하였다. 추출액은 filter paper로 여과한 후 여액은 40℃ 하의 감압농축기로 건조하여, 무게를 측정하였다. 실험 조건에 따라 잔사에 대해 ethyl acetate, methanol을 극성순으로 상기와 동일한 방법으로 추출하였다.

2.1.3. Silica gel column chromatography

Silica gel (70~230 mesh, MERCK) 활성화를 위해 120℃ 전기 회화로에서 1시간 강열한 후 데시케이터에서 식혔다. 충전제 조제를 위해 silica gel 10g에 초순수(J.T.Bker. HPLC grade) 500 μ l를 넣고 섞은 다음 데시케이터에서 24시간 보관 후 사용하였다. 충전제를 전개용매 hexane(Junsei, Gr. grade)에 현탁시켜 5.5×90mm 컬럼에 충전하였고 hexane으로 5ml 씩 3회 반복 세척하였다. 시료를 hexane으로 녹여 column에 흡착시킨 다음 hexane, ethyl acetate(Junsei, Gr. grade), methanol(J.T.Bker. HPLC grade) 순으로 각각 5ml 씩 용출하였다. 들어 섞어 30분 방치 후 추출하였다. 이 과정을 3번 반복 후 추출된 용액을 감압 건조하여 무게를 측정하였다. 1차 Xn배양액은 330ml 동결건조한 후 증류수 330ml에 용해하여 실험 사용하였고, 2차 Xn배양액은 동결건조된 6.85g을 증류수 245ml에 용해하여 실험 사용하였다.

2.1.4. 검량선 작성 및 HPLC 분석

표준품으로 oxindole(97%, Sigma Aldridh), indole(Sigma Aldridh), BZA(99%, Sigma Aldridh)를 사용하였으며, 검량선 작성은 0.25, 0.5, 1, 2, 5 ppm의 농도로 조제하였다. HPLC 분석용 시료 용액을 소량의 methanol을 사용하여 10,000 ppm으로 조제하여 syringe filter(0.20 μ m Hydrophilic, Advantec)로 여과한 후, Nova-Pak C₁₈ 4 μ l 4.6×250mm Cartridge column이 장착된 HPLC(Waters 2487 Dector, 1525 pump)을 사용하였고, 이동상 조건은 methanol:H₂O (40:60, v/v)를 유속 0.5 ml/min 로 하였고 검출 파장은 254 nm로 Injection volume은 10 μ l로 하였다. HPLC 분석 조건은 아래의 표 2와 같다.

표 2. HPLC 분석조건

HPLC system	Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector, Waters, USA Waters 1525 Binary HPLC Pump, Waters, USA
Column	Nova-pack C18 $4\mu\ell$ (4.6×250 mm), Waters, USA
Mobile phase	MeOH : H ₂ O = 2 : 3
Flow rate	0.5 ml/min
Wave length	254nm
Injection volume	$10\mu\ell$

또한 물질의 동정을 위해 매 분석시 마다 표준품을 시료 용액에 첨가하여 peak 면적의 증가를 확인하였으며(그림 6), 곤충병원세균의 배양액에서 검출된 기능성 대사물질의 농도는 표 3에 기술되었다.

표 3. Hexane 환류추출을 통한 Xn배양액과 Ptt배양액의 oxindole, indole, BZA 성분 함량 비교

세균배양액	Oxindole(ppb)	Indole(ppb)	BZA(ppb)
Xn	0.808 ± 0.455^a	1.389 ± 0.421	1.519 ± 0.343
Ptt	0.254 ± 0.189	0.967 ± 0.759	-

^aMean \pm standard error of 3 replicates.

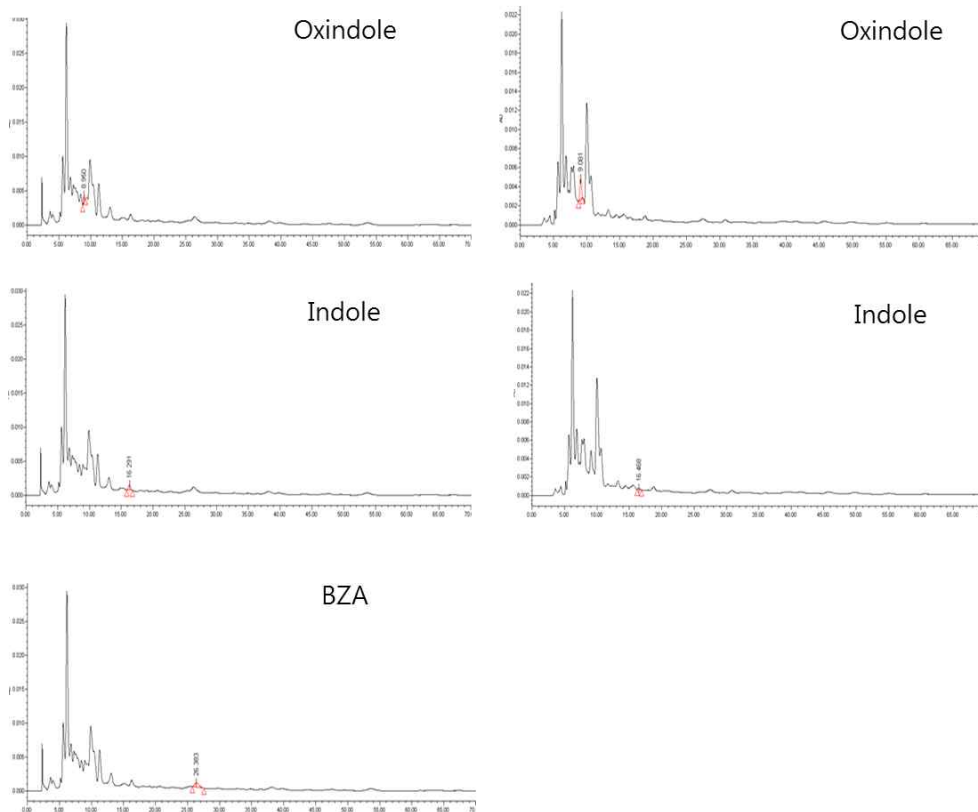


그림 6. Xn(좌)과 Ptt(우) 배양액에서 검출된 oxindole, indole, BZA

2.2. 비티플러스의 생물검정

비티플러스의 활성은 잎침지법을 이용하여 대상해충에 대한 생물검정을 수행함으로써 처리 후 6일째에 살충력을 조사하였다. 비티플러스 1,000배 희석액을 1cm×1cm (가로×세로)로 준비한 신선한 배추잎을 100ml 비이커에서 침지시킨 후 20분간 공기중에서 건조시킨 후 직경 10cm의 페트리 디쉬에 약제가 처리된 배추잎을 두었다. 이 후 6시간 절식된 대상해충은 10마리씩 3반복으로 구성되어 처리 후 6일째까지 살충력을 조사하였다. 파밤나방은 2개의 페트리디쉬에 각각 5마리씩 처리하였으며, 배추좀나방과 좁은가슴잎벌레는 1개의 페트리디쉬에 10마리씩 처리하였다.

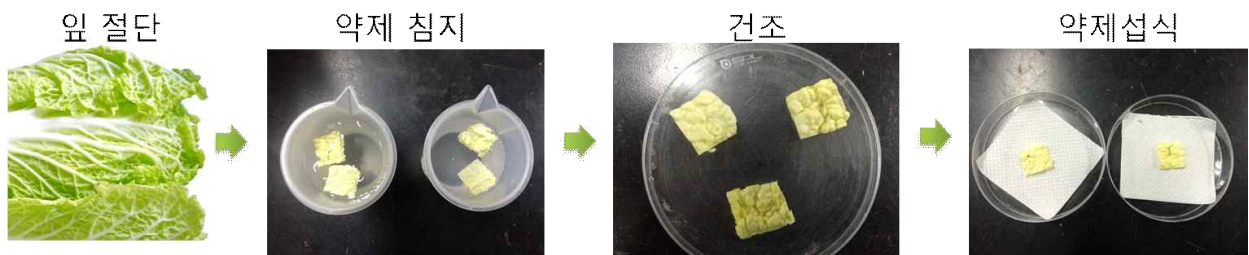


그림 6. 배추잎을 이용한 BtPlus의 생물검정

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
------	------

4-1. 목표달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
10건의 SCI 논문	20	100	16건의 SCI 발표
10건의 비 SCI 논문	20	100	11건의 비 SCI 발표
3건의 특허출원	10	100	7건 특허 출원
1건의 특허등록	10	100	2건 특허 등록
1건의 기술이전	20	100	1건의 기술이전
3건의 상업화	20	100	3건의 제품 등록 및 상업화
합계	100점	100	

4-2. 관련분야 기여도

- 국내 학계: 국내 주요 해충인 파밤나방을 대상으로 곤충생리 작용을 분석하여 밝힌 연구 내용임. 특별히 국내에서는 생소한 곤충의 아이코사노이드 호르몬의 생리 기능을 밝혔다. 이는 11편의 국내 논문 발표로 학계에 알리게 되었다.
- 국제 학계: 곤충의 아이코사노이드는 척추동물에서의 중요성에 비하여 매우 관심이 적은 분야인데 본 연구를 통해 이 물질의 생합성 경로가 밝혀져 새로운 부각의 대상이 될 수 있게 하였다. 이러한 노력은 본 연구를 통해 두 편의 Review 논문을 발간하게 하였다.
- 산업계: 3 가지 새로운 친환경 작물보호제의 개발은 이들의 살충효과의 우수성으로 비취불 때 해충 방제제의 판도를 바꿀 수 있다고 예견된다. 특히 기존의 화학농약 의존도에서 본 연구를 통해 얻은 친환경 작물보호제의 보급이 확대될 것으로 기대된다.

5. 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

본 연구는 3 가지의 상품화를 이룩하였다. 이들의 향후 시장 전망과 후속 보완 사항을 기술한다.

○ 듀얼네프킬에스

- 유기농업자재 공시완료(공시-2-5-045)
- 현장 적용 및 사업화 추진(현재까지 출고가 기준 약 1천만원 매출)
- 지속적인 처방 개선을 통한 원가절감 및 매출증대 시도

○ 콜킬

- 유기농업자재 공시완료(공시-2-5-095)
- 현장 적용 결과 약효미비 및 딱정벌레 해충의 발생이 저조
- 사업화 가능성 불투명

○ 디프킬

- 유기농업자재 공시완료(공시-2-5-139)
- 파리목 농업해충에 대한 약효 미비
- 모기류에 대한 탁월한 방제효과 발현(24시간 100%)
- 감염병 예방용 의약외품(제3호)의 등록(허가)를 위한 추가 연구 필요

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
<p>○ 아이코사노이드 관련 곤충 면역 생리</p> <p>미국의 University of California, Davis의 Bruce Hammock 연구실에서 모기류를 대상으로 유약호르몬의 epoxide를 가수분해할 수 있는 epoxide hydrolase를 연구하는 과정에서 이 효소가 가장 선호하는 기질이 14,15-EET라는 것을 밝혔다(Xu et al., 2014). 또한 이 효소의 활성이 포유동물의 분비성 EH와 유사하면 특히 이 효소에 특이적 억제제인 AUDA [12-(3-adamantan-1-yl-ureido) dodecanoic acid]에 선택적으로 억제되는 것을 확인하였다. 더욱이 생쥐(<i>Mus musculus</i>)의 분비성 EH에 대한 항체가 포유동물은 물론이고 이 곤충의 EH에 상호반응을 보여주었다. 이러한 사실은 곤충에서도 EET가 생리적으로 중요한 반응을 증개할 수 있다는 것을 시사하고 있다. 이러한 결과는 본 연구에서 추진하는 PLA2 유전자의 생리적 중요성을 더욱 부각시켜주고 있다. 즉, PLA2의 작용기작을 통해 생성되는 arachidonic acid에 대해서 epoxidase의 작용을 EET의 생합성이 이뤄지고, 이 물질에 의해 곤충의 다양한 생리적 작용에 관여할 것으로 추정된다.</p> <p>○ 비티 살충제의 새로운 작용기작</p> <p>다양한 비티 독소단백질 수용체가 밝혀졌다. 이들은 cadherin, alkaline phosphatase, aminopeptidase N, ABCC2 등을 포함하게 된다. 최근의 연구는 이들 유전자들의 발현을 조절하는 MAK4K4 유전자의 발현에 의해 이들 유전자의 발현이 조절하게 된다는 것을 밝혀지게 되었다(Guo et al., 2015). 따라서 비티 독소단백질 수용체의 염기서열 변화 없이도 발현량의 변화를 주어 저항성 개체의 출현이 가능하게 하였다.</p>		

7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 해당사항 없음		

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					코드번호	D-10			
구입 기관	연구시설/연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호	
해당사항 없음									

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
<p>○ 독극물 처리에 따른 안전 조치 숙지</p> <p>○ 참여 연구원 연구실 안전보험 가입</p> <p>○ 질소, 헬륨 가스 등 안전시험 정기 점검 실시</p>		

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Eicosanoid Signaling in Insects: from Discovery to Plant Protection	안동대	공동	Critical Reviews in Plant Sciences, 33:20 - 63,	5.442	2014.01.30	중복사사	SCI
2	논문	ABCC transporters mediate insect resistance to multiple Bt toxins revealed by bulk segregant analysis	안동대	책임	B M C biology	7.984	2014.06.02	중복사사	SCI
3	논문	Roles of Peroxinectin in PGE2-Mediated Cellular Immunity in Spodoptera exigua.	안동대	책임	PLOS ONE	3.234	2014.09.01	단독사사	SCI
4	논문	Eicosanoids up-regulate production of reactive oxygen species by NADPH-dependent oxidase in Spodoptera exigua phagocytic hemocytes.	안동대	책임	Journal of Insect Physiology	2.267	2015.08.01	단독사사	SCI
5	논문	A single type of cadherin is involved in Bacillus thuringiensis toxicity in Plutella xylostella.	안동대	책임	INSECT MOLECULAR BIOLOGY	2.866	2016.08.11	단독사사	SCI

11. 기타사항

	코드번호	D-13
○ 해당 사항 없음		

12. 참고문헌

	코드번호	D-14		
<p>Bligh, E. G. and Dyer, W. J. 1959. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. <i>Can. J. Biochem. Physiol.</i> 37: 911-917.</p> <p>Christie, W. W. 2003. Lipid analysis. In <i>Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids</i>, Christie, W. W. (ed.), pp. 373-387. The Oily Press, Bridgewater, England.</p> <p>Kaur Amrit, A. Chaudhary, Amarjeet Kaur, R. Choudhary and R. Kaushik. 2005. Phospholipid fatty acid - A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. <i>Curr. Sci.</i>, 89(7): 1103-1112.</p> <p>고영림 외 4인. 2010. LC/MS/MS 를 이용한 산화성 스트레스 지표로써 소변 중 8-iso-PGF₂α 분석. <i>한국환경보건학회지</i>. No. 1, pp44~51.</p> <p>Grauw Janny C de , Chris HA van de Lest and Paul Rene van Weeren. 2011. A targeted lipidomics approach to the study of eicosanoid release in synovial joints. <i>Arthritis Research & Therapy</i>. 13: R123.</p> <p>Guo Z, Kang S, Chen D, Wu Q, Wang S, Xie W, Zhu X, Baxter SW, Zhou X, Jurat-Fuentes JL, Zhang Y. 2015. MAPK signaling pathway alters expression of midgut ALP and ABCC genes and causes resistance to <i>Bacillus thuringiensis</i> Cry1Ac toxin in diamondback moth. <i>PLoS Genet</i>. 11, e1005124.</p> <p>Jurenka R. A., Venkat K. Pedibhotla, and David W Stanley. 1999. Prostaglandin Production in Response to Bacterial Infection in True Armyworm Larvae. <i>Archives of Insect Biochemistry and Physiology</i> 41: 225-232.</p> <p>Dehnhard M, Naidenko SV, Jewgenow K. 2014. Comparative metabolism of PGFM (13,14-dihydro-15-keto-PGF₂α) in feces of felids. <i>Theriogenology</i> 81, 733-743.</p> <p>Masoodi Mojgan and Anna Nicolaou. 2006. lipidomic analysis of twenty-seven prostanoids and isoprostanes by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. <i>Rapid Commun. Mass Spectrom.</i> 20: 3023-3029.</p> <p>Koda Noriko, Yasutaka Tsutsui, Haruk Niwa, Seiji Ito, David F. Woodward, and Kikuko Watanabe. 2004. Synthesis of prostaglandin F ethanolamide by prostaglandin F synthase and identification of Bimatoprost as a potent inhibitor of the enzyme: new enzyme assay method using LC/ESI/MS. <i>Archives of Biochemistry and Biophysics</i>. 424: 128-136.</p> <p>Xu J, Morisseau C, Hammock BD. 2014. Expression and characterization of an epoxide hydrolase from <i>Anopheles gambiae</i> with high activity on epoxy fatty acids. <i>Insect Biochem. Mol. Biol.</i> 54, 42-52.</p>				

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 곤충 성장조절억제물질 개발을 통한 친환경 해충 방제제 개발						
	(영문) Development of Target-specific Insecticides Using Insect Growth Regulating Agents						
주 관 연 구 기 관	안동대학교		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 안동대학교			
참 여 기 업	(주) YA코리아		총 연 구 기 간	(성명) 김용균			
총연구개발비 (1,200,000 천원)	계	1,200,000	총 연 구 기 간	2013. 8. 26 ~ 2016. 8. 25(3년)			
	정부출연 연구개발비	900,000		총 인 원	11		
	기업부담금	300,000		총 참 여 수	내부인원	4	
	연구기관부담금	0		외부인원	7		
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>농생태계의 화학농약 오염을 줄이기 위한 친환경방제 개발이 필요하였다. 곤충병원세균류인 <i>Xenorhabdus</i> 와 <i>Photorhabdus</i>는 곤충 면역을 억제하는 생리교란 물질을 분비한다. 이 세균류의 배양액을 이용하여 3 가지 서로 다른 새로운 친환경 해충방제제를 개발하는 데 본 연구의 목적을 둔다.</p> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <p>새로운 친환경방제제의 개발 방향은 비티플러스를 기반으로 이뤄졌다. 즉, 면역억제를 기반으로 비티 살충제의 살충력을 증가시키는 데 개발 원리를 갖는다. 면역억제제는 두 가지 곤충병원세균에서 유래되었다. 이들 물질은 총 8 가지로 알려졌으며 이들의 합성과 분비가 세균 증식 단계에 따라 순차적으로 일어난다는 것을 밝혀졌다. 이들에 대한 대상곤충의 면역생리 작용점은 아이코사노이드 생합성 단계이다. 본 연구는 4 종류의 프로스타글란딘류(PG류)가 파밤나방에 존재하는 것을 LC-MS/MS로 동정하게 되었다. 또한 이들 PG류를 합성하는 생체 기구를 밝혔다. 이러한 결과 두 종류의 PLA2와 COX 유전자를 동정하게 되었다. 이들 유전자의 발현을 RNA 간섭 기술로 처리한 결과 아이코사노이드 생합성 전구물질의 감소는 물론이고 면역억제를 유발하였다. 따라서 파밤나방을 중심으로 세균 유래 면역억제제의 작용 기작을 밝힌 결과 두 세균 물질은 특히 PLA2의 효소 활성을 억제하였다. 세균 유래 면역억제물질을 비티와 혼합하여 3 종류의 친환경방제제를 개발하였다. 나비목 해충을 대상으로 이들 곤충류에 효과적인 <i>Bt aizawai</i>와 <i>Bt kurstaki</i>에 <i>Xenorhabdus nematophila</i> 세균 배양액을 혼합하여 "듀얼 네프킬"을 개발하였다. 딱정벌레 해충을 대상으로 <i>Bt tenebrionis</i>를 선발하였으며, 여기에 <i>Photorhabdus temperata temperata</i> 세균 배양액을 혼합하여 "콜킬"을 개발하였다. 파리목 해충을 대상으로 <i>Bt israelensis</i>를 선발하였으며, 여기에 <i>Xenorhabdus nematophila</i> 세균 배양액을 혼합하여 "디프킬"을 개발하였다.</p> <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <p>본 연구를 통해 학술적으로 SCI 논문 16건, 비 SCI 11건을 발표하였다. 산업적으로 특허출원 7건, 특허등록 2건, 기술이전 1건 그리고 상업화 제품 등록 3건의 성과를 나타냈다. 현재 이들 약제는 (주) YA코리아를 통해 농가에 시판되고 있다.</p>							

자체평가의견서

1. 과제현황

			코드번호	D-15	
			과제번호		
사업구분	000000사업				
연구분야			과제구분	단위	
사업명	생명산업기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	곤충 성장조절억제물질 개발을 통한 친환경 해충 방제제 개발		과제유형	개발	
연구기관	안동대학교		연구책임자	김용균	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2013.8.26.- 2014.8.25	300,000	100,000	400,000
	2차년도	2014.8.26.- 2015.8.25	300,000	100,000	400,000
	3차년도	2015.8.26.- 2016.8.25	300,000	100,000	400,000
	계		900,000	300,000	1,200,000
참여기업	(주) YA코리아				
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 :

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
안동대학교	교수	김용균

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	김용균
-----	-----

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

학술적(SCI 16건, 비 SCI 11건) 및 산업적(특허출원 7건, 등록 2건, 기술이전 1건 및 상품화 3건) 성과에 비추어 우수한 과제로 볼 수 있다.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

3 종류의 상품화를 이루어 현재 농가에 시판되고 있다.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

듀얼네프킬에스는 현재 농가에 보급되었고, 콜킬과 디프킬은 향후 시장이 열릴 것으로 전망된다.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

매년 3-4회의 연구팀 회의를 거치면서 성실하게 당해연도 목표를 수행하였다.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지식소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

학술적(SCI 16건, 비 SCI 11건) 및 산업적(특허출원 7건, 등록 2건, 기술이전 1건 및 상품화 3건) 성과에 비추어 우수한 과제로 볼 수 있다.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
10건의 SCI 논문	20	100	16건의 SCI 발표
10건의 비 SCI 논문	20	100	11건의 비 SCI 발표
3건의 특허출원	10	100	7건 특허 출원
1건의 특허등록	10	100	2건 특허 등록
1건의 기술이전	20	100	1건의 기술이전
3건의 상업화	20	100	3건의 제품 등록 및 상업화
합계	100점	100	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구 개발 사업은 기존에 통합생물방제(Integrated Biological Control: IBC)의 개념에서 파생된 비티플러스라는 새로운 해충 방제제 개발 개념을 토대로 이뤄졌다. 본 연구 사업 전에 국내 생태계에서 발견한 유용 생명체를 기반으로 면역억제제를 동정하였고, 이를 대상 곤충에 맞춤형으로 제작되는 생물방제제를 개발하는 방식으로 하여 3건의 상품화 등록에 성공하였다.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

연구결과에 대한 IPET의 평가 기준은 상업화에 초점을 맞추게 된다. 본 연구는 산업체 기술이전 1건과 제품 등록 3건을 통해 이에 대한 목표를 달성하였다. 그러나 무엇보다 중요한 부분이 이 기술이 과학적 기반에 의해 이뤄진다는 점이 16건의 SCI 논문 및 11건의 비 SCI 논문 발표에서 찾아 볼 수 있다.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구를 통해 개발된 3건의 방제제는 (주) YA코리아에 기술이전을 통해 상업화로 이어졌으며, 현재 이들 제품은 국내 농가를 대상으로 시판되고 있다. 추후 시장에서 겪게 될 제품력의 안정화 부분은 회사 자체에서 해결해야 될 과제로 남게 된다.

IV. 보안성 검토

해당 사항 없음

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구기관 자체의 검토결과

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	곤충 성장조절억제물질 개발을 통한 친환경 해충 방제제 개발			
주관연구기관	안동대학교		주관연구책임자	김용균
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	900,000,000원	300,000,000원	0원	1,200,000,000원
연구개발기간	2013. 8. 26 - 2016. 8. 25			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 곤충 성장 조절 기능을 갖는 8종의 유용물질과 3종의 유용생물체를 이용한 친환경 해충방제제 개발	8종의 유용물질이 <i>Xenorhabdus nematophila</i> 에서 생합성되고 상이한 곤충의 면역작용을 억제하는 것을 밝힘. 또한 <i>Photorhabdus temperata temperata</i> 와 더불어 <i>Xenorhabdus hominickii</i> 를 새롭게 동정하여 3 가지 유용생물체를 확보함. 이들의 유용성은 대상 해충의 면역억제의 중심인 아이코사노이드 생합성 과정을 밝히고, 작용점 유전자 및 단백질을 확보하여 물질 동정 및 효능 분석의 전체 분석 시스템을 완비하게 함.
② 3종의 미생물제제 개발(나방해충 방제제, 딱정벌레해충 방제제, 파리해충 방제제)	나비목 해충에 대한 “듀얼네프킬”, 딱정벌레 해충에 대한 “콜킬”, 파리목 해충에 대한 “디프킬”을 개발함
③ 기술이전 및 산업화	(주) YA코리아에 개발된 제품의 전용실시권을 허용하는 기술이전을 실시함. 또한 3 종류의 해충방제제를 친환경자제로 목록공시하여 상품화를 실시함

3. 연구목표 대비 성과

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인 증	학술성과			교육 지 도	인 력 양 성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
											SC I	비 SC I							
최종목표	3	1		1		3						10	10	10					
연구기간내 달성실적	7	2		1		3						16	11	10					
달성율(%)	100	100		100		100						100	100	100					

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	곤충 아이코사노이드 면역 생리: 세포성 및 체액성 면역 조절 증추
②	곤충 PLA2 억제 물질: 아이코사노이드 생합성 과정
③	비티플러스 기술: IBC 기반의 신개념 해충 방제 전략

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소 화·흡수	외국기술 개 선·개 량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술					●	●	●			
②의 기술	●					●	●			
③의 기술	●					●	●			

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	곤충 아이코사노이드 조절을 통한 생리교란 해충 방제제 개발
②의 기술	현재 3 종의 PLA2를 가지고 있으며, 신 물질 탐색의 종말점으로 사용
③의 기술	비티플러스를 이용한 맞춤형 해충 방제제 개발

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표							
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과		교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문				학술발표	정책 활용	
											SC I	비 SC I						
최종목표	3	1		1		3						10	10	10				
연구기간내 달성실적	7	2		1		3						16	11	10				
연구종료 후 성과창출 계획							1							1				

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	곤충생장조정 억제물질을 이용한 맞춤형 해충방제제 개발		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	5,000 천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	10년	실용화예상시기 ³⁾	2016. 6. 9
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	특허 기술에 대한 “계약기술” 이전 형태임		

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
 통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.