

11-1543  
000-002  
167-01

발간등록번호

11-1543000-002167-01

Development of Environment-Friendly  
Pesticide Practice for Export Paprika

잣나무 추출  
피톤치드 기반  
혼합추출물을  
이용한 수출용  
파프리카의  
친환경  
해충방제제  
개발  
최종  
보고  
서

2018

농림축산식품부

잣나무추출 피톤치드 기반  
혼합추출물을 이용한 수출용  
파프리카의 친환경 해충 방제제  
개발  
최종보고서

2018.03.23

주관연구기관 / ㈜피러스  
협동연구기관 / 가천대학교  
경희대학교

농림축산식품부

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “잣나무 추출 피톤치드 기반 혼합추출물을 이용한 수출용 파프리카의 친환경 해충방제제 개발”(개발기간 : 2014.12.19.~2017.12.18.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018 . 02 . 01 .

주관연구기관명 : (주) 피러스	(대표자) 이성희
협동연구기관명 : 가천대학교	(대표자) 이두형
가천대학교	(대표자) 송윤재
위탁기관명 : 경희대학교	(대표자) 강세찬



주관연구책임자 : 김배용  
협동연구책임자 : 제1협동 이두형  
제2협동 송윤재  
참여기관책임자 :

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

### 3. 보고서 요약서

#### 보고서 요약서

과제고유번호	114152-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2014.12.19.~ 2017.12.18	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	수출전략기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	잣나무 추출 피톤치드 기반 혼합추출물을 이용한 수출용 파프리카의 친환경 해충방제제 개발			
연구책임자	김배용	해당단계 참 여 연구원 수	총: 12 명 내부: 12 명 외부: 0명	해당단계 연 구 개 발 비	정부: 220,000 천원 민간: 74,000 천원 계: 294,000 천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 36 명 내부: 36명 외부: 0명	총 연구개발비	정부:660,000 천원 민간:221,000 천원 계:881,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	(주) 피러스			참여기업명 가천대학교	
위탁연구	연구기관명: 경희대학교			연구책임자: 김배용	
천연물 기반의 친환경 농자재 개발을 통한 파프리카 맞춤형 해충 관리시스템 확립 및 해충의 발생소장 및 경제적 피해수준 정량화를 통한 방제 적기 및 빈도 산출 파프리카 상품성 향상				보고서 면수 128	

#### 4. 국문 요약문

		코드번호	D-01
연구의 목적 및 내용		<input type="checkbox"/> 수출용 파프리카의 주요 해충 억제 연구를 통한 친환경 방제 제제 개발 <input type="checkbox"/> 신선농산물 시장에서의 수출 경쟁력 확보 및 국내 소비자 보호를 위한 파프리카 맞춤형 천연물 기반 해충 관리 메뉴얼 개발 <input type="checkbox"/> 수출용 파프리카의 상품성을 저하시키는 해충 발생소장 및 경제적 피해수준의 정량화 <input type="checkbox"/> 수출 대상국의 잔류농약검역 시스템 대응 및 돌파구 창출을 위한 맞춤형 친환경농자재 개발 <input type="checkbox"/> 농약 외 유용생물의 이점을 파프리카 생산단계에서 적극 활용하기 위하여 천적 및 화분매개충에 대한 약제 안전성 평가 <input type="checkbox"/> 신규 친환경농자재의 생산체계 확립하고, 농자재와 관리기법을 수출용 파프리카 생산농가에 보급	
연구개발성과		<input type="checkbox"/> 잣나무 추출물 피톤치드 기반 혼합추출물을 이용한 수출용 파프리카의 친환경 해충방제제 개발 - 신규 혼합추출물에 사용될 식물체 스크리닝 통한 2종 선정 - 신규 혼합추출물의 최적추출공정 개발 및 유효성분 구명/ 지표성분 설정 <input type="checkbox"/> 수출용 파프리카의 주요 해충에 대한 피해양상 조사 및 잣나무 피톤치드 기반 신규 혼합추출물의 방제효과 평가 - 수출용 파프리카의 주요 해충 발생소장 및 경제적 피해수준 산출 - 수출용 파프리카의 주요 해충에 대한 신규 혼합추출물의 방제효과 평가 <input type="checkbox"/> 잣나무 피톤치드 기반 혼합추출물의 수출용 파프리카의 주요 해충에 대한 방제 작용기전 규명 및 독성 평가 - 담배가루이에 효능을 보이는 혼합추출물의 세포 독성 평가 및 유전자 발현 변화를 qRT-PCR 또는 RNA sequencing을 통해 규명 <input type="checkbox"/> 잣나무 피톤치드 기반 혼합추출물의 수출용 파프리카의 주요 해충에 대한 방제 작용기전 규명 -신규 혼합추출물의 담배가루이 유전 발현 분석 시스템 구축 및 담배가루이의 ND-1, ATP-6 mRNA 발현이 저해 되는 것을 확인 <input type="checkbox"/> 수출용 파프리카 주요 해충의 발생소장 파악 및 경제적 피해 수준 산출 - 주요 해충의 발생소장을 조사하고 해충밀도와 과실 피해 간 상관관계 규명 - 주요 해충군의 식물체 내 수직분포를 규명 및 개체군 간 공간 점유양상 파악 - 주요 해충군의 초기 유입 시기 및 확산경로 파악 - 방제 시기 및 빈도별 경제적 피해수준 정립을 위한 기초자료 확보 <input type="checkbox"/> 주요 해충에 대한 신규 혼합추출물의 방제효과 평가 - JS-408 기반 추출물을 농도별로 두 종의 해충에 대한 약효를 평가하고 7종의 신규 혼합추출물을 담배가루이 및 복숭아혹진딧물을 대상으로 생물검정 <input type="checkbox"/> 신규 혼합추출물의 유용 생물에 대한 환경영향 평가 - 화분매개충에 대한 환경영향 평가를 위한 laboratory bioassay법을 개발함 - 서양뒤영벌에 대해 JS-408 기반 추출물의 독성을 3종의 neonicotinoid계 유기 합성 농약과 비교 평가함 <input type="checkbox"/> 신규 혼합추출물의 해충에 대한 방제 작용기전 분석 - 해충 및 유용곤충의 total RNA 추출 및 cDNA 합성, quantitative real-time PCR 등을 이용한 유전자 발현 분석	
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)		<input type="checkbox"/> 활용계획 - 고소득 수출작물인 파프리카의 해충관리를 위한 신규 친환경 농자재의 등록으로 기존의 유기합성 농약의 대체 - 신규 친환경 농자재 및 사용법을 등록하여 농산물에 대한 국가 인증 평가 항목에 활용 - 국가 간 인증을 통하여 수출입 검역단계의 통관절차의 간소화	

	<input type="checkbox"/> 기대효과 - 고부가가치 수출농산물 파프리카의 해충방제 관리 체계 및 매뉴얼 수립 - 파프리카의 신선도 유지 연장과 잔류 농약의 감소로 수출 시장 대변화				
중심어 (5개 이내)	피톤치드	파프리카	수출	친환경	해충방제제

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호	D-02
Purpose& Contents	<input type="checkbox"/> Development of eco-friendly antiseptic formulation through research on pest control of paprika for export <input type="checkbox"/> Development of pesticide management manual based on paprika customized for securing export competitiveness in fresh agricultural products market and protecting domestic consumers Quantification of insect pests and economic damage levels that reduce the commercial value of paprika for export <input type="checkbox"/> Development of tailor-made eco-friendly agricultural products to cope with the pesticide quarantine system of the export destination countries and create a breakthrough To evaluate the benefits of non-pesticide beneficial organisms in paprika production, drug safety assessment of natural and pollinators <input type="checkbox"/> Establish a production system for new eco-friendly farming materials and distribute farming materials and management techniques to farmers producing paprika for export		
Results	<input type="checkbox"/> Development of environment-friendly pest control agent for paprika for export using pine cone extract based on phytoncide-based mixed extract - Selection of two species through plant screening for new mixed extract - Development of Optimum Extraction Process of New Mixed Extract and Establishment of Active Ingredient / Index Component <input type="checkbox"/> Investigation of damage effect on major pests of export paprika and evaluation of control effect of new mixed extracts based on P. vannamei phytoncide - Identification of major insect pests and economic damage level of exported paprika - Evaluation of the Control Effect of New Mixed Extracts on Major Pests of Exported Paprika <input type="checkbox"/> Identification of the control mechanism and toxicity of major pests of paprika for export of mixed extracts based on P. vannamei phononchide - Assessment of cytotoxicity and gene expression changes of the mixed extracts that exhibit efficacy on tobacco roux using qRT-PCR or RNA sequencing <input type="checkbox"/> Identification of the mechanism of action of pine cone-based phytoncide-based mixed extract against major pests of export paprika - Establishment of analysis system of Louis genetic expression of tobacco of		

	<p>new mixed extract and confirmation of inhibition of ND-1, ATP-6 mRNA expression of tobacco rui</p> <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Identification of major insects of paprika for export and calculation of economic damage level <ul style="list-style-type: none"> <li>- Investigation of major insect pests and correlation between pest density and fruit damage</li> <li>- Identification of the vertical distribution of major pest species in the plant and the spatial occupancy pattern among the populations</li> <li>- Identification of the early infestation time and spreading path of major insect groups</li> <li>- Obtain basic data for establishing level of economic damages by control period and frequency</li> </ul> </li> <li><input type="checkbox"/> Evaluation of the effectiveness of new mixed extracts on major pests <p>The extracts were tested for their efficacy against two insect pests by concentration and seven new mixed extracts were tested for tobacco roux and peach aphid</p> </li> <li><input type="checkbox"/> Environmental impact assessment of useful mixed organisms <ul style="list-style-type: none"> <li>- Developed a laboratory bioassay method for pollinators</li> <li>- Toxicity of microbial base extracts against Western obturator species was evaluated by three neonicotinoid organic synthetic pesticides</li> </ul> </li> <li><input type="checkbox"/> Mechanism of action of the new mixed extract on pest control <ul style="list-style-type: none"> <li>- Total RNA extraction and cDNA synthesis of pests and useful insects, and gene expression analysis using quantitative real-time PCR</li> </ul> </li> </ul>				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Utilization plan <ul style="list-style-type: none"> <li>- Registration of new eco-friendly farming materials for pest management of paprika, a high-disinfection export crop, replacing existing organic synthetic pesticides</li> <li>- Registration of new eco-friendly agricultural materials and usage method to be used for national certification evaluation items for agricultural products</li> <li>- Simplification of customs clearance process at the import and export quarantine stage through international certification</li> </ul> </li> <li><input type="checkbox"/> Expected Effect <ul style="list-style-type: none"> <li>- Establishment of management system and manual for pest control of high value-added export agricultural products paprika</li> <li>- Expansion of export market due to extension of paprika freshness retention and reduction of pesticide residue</li> </ul> </li> </ul>				
Keywords	phytoncide	paprika	export	environment	friendly pesticide

## 6. 영문목차

### < 목 차 >

1. Outline of Research and Development Project .....	1
2. Domestic and overseas technology development status .....	20
3. Research Contents and Results .....	26
4. Achievement of goal and contribution to related field .....	230
5. Plan to use research results .....	234
6. Overseas Science and Technology Information .....	234
7. Security level of R & D achievement .....	235
8. Research facilities registered in the National Science and Technology Comprehensive Information System .....	235
9. Implementation of safety measures in laboratories based on R & D tasks .....	235
10. esentative Research Results of R & D Project .....	236
11. Others .....	237
12. References .....	237

<별첨> 자체평가의견서

## 7. 본문목차

### < 목 차 >

1. 연구개발과제의개요 .....	1
2. 국내외 기술개발 현황 .....	20
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	26
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	230
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	234
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	234
7. 연구개발성과의 보안등급 .....	235
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	235
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	235
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	236
11. 기타사항 .....	237
12. 참고문헌 .....	237

<별첨> 자체평가의견서

## 8. 뒷면지

### 주 의

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

# 1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
<p>1-1. 연구개발 목적</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 최근, 생활수준의 향상으로 건강에 대한 관심이 증가함에 따라 채식위주 식습관과 자연 식품을 선호하여, 곡류와 채소를 중심으로 웰빙(well-being)과 관련된 신선 농산물의 소비가 증가하고 있음(yu et al. 2009).</li> <li>• 신선 농산물의 대표 작물인 파프리카는 가지과(solanaceae), 고추속(Capsicum), 고추종(Annum)에 속하는 한해살이 식물로 6개의 아종이 있으며(Hwnag and Jang, 2001), 4가지 품종(annuum,grossum, lycopersiciforme 및 glabriusculum)이 있음(GRIN national genetic resources program; <a href="http://www.ars-grin.gov">http://www.ars-grin.gov</a>). 파프리카는 capsanthin, <math>\beta</math>-cryptoxanthin 및 zeaxanthin 등 카로티노이드계 색소를 함유하고 있으며, 비타민A, B1 및 C가 풍부한 알칼리성 강장식품으로 샐러드, 향신료, 두부, 국수 등 많은 음식에서 이용하고 있고(Firsher and Kocis, 1987; Yu et al., 2006; Jung et al., 2007; Oh et al., 2007; Park et al., 2007; Cho et al., 2008; Park and Jeon, 2008)은 암 예방 효소로 알려진 quinone reductase 활성 유도에 효능이 있는 것으로 보고함.</li> <li>• 국내에서는 1994년 제주도에서 처음 재배하기 시작하여(Jung et al., 2007), 1995년 전북 김제의 참샘농조합법인이 생산 전량을 일본에 수출하면서 본격적으로 재배가 시작되었고, 2000년에는 생산량이 7,500톤에 이르렀음. 그 후 지속적으로 재배면적이 증가하여, 2009년 전국적으로 410ha의 재배면적에서 36,023톤을 생산함. 2009년 파프리카의 지역별 재배 면적은 강원도(30.0%), 경남(27.8%), 전남(15.9%) 순으로 3개 지역이 전국 파프리카 재배면적의 73.7%를 차지하고 있으며, 생산량은 경남(32.8%), 강원(21.9%), 전남(20.2%) 순으로 3개 지역이 전체 생산량의 74.9%를 점유하여 지역집중도가 매우 높음.</li> <li>• 우리나라 신선농산물 수출의 핵심역할을 하고 있는 파프리카는 국제시장에서도 네덜란드 뉴질랜드 및 중국 등과의 경쟁이 치열하게 전개되고 있는 가운데, 일본으로 수출을 시작한지 10여 년 만에 네덜란드를 제치고 시장 점유율 66%를 차지함. 또한 국내 소비량이 40% 이상 증가되고 있고, 일본 이외에 미국, 러시아 및 대만 등 수출시장의 확대를 모색하고 있는 만큼, 파프리카는 우리나라 주요 수출 작물로서 농업에 큰 역할을 하고 있음(Jung et al.,2009).</li> <li>• 이러한 파프리카의 생장, 재배조건, 저장, 품종, 화학성분, 농약을 비롯하여 파프리카를 이용한 음식에 이르기까지 국내·외의 다양한 연구들은 파프리카의 품질향상과 이용에 많은 기여를 함(jung et al, 2006; Cho et al., 2008; Park and Jeon, 2008; Jung at al., 2009; Choi et al., 2001). 그 뿐만 아니라, 생물학적으로 위해요소에 대한 연구에서 대장균(Coliform group), 황색포도상구균(Staphylococcus aureus), 기생충, Salmonella spp. 및 Escherichia coli O157 등 미생물 오염실태를 모니터링하여 수출농산물의 생물학적 안전성을 확인함(Yu, et al., 2009; Yu at al., 2011).</li> </ul>	

- 파프리카는 크게 생리적인 장애와 병해충으로 병이 발생하는데, 생리적 장애는 주로 칼슘과 붕소 흡수가 저해되어 과실의 끝과 옆 부분이 검게 썩는 배꼽썩음병이 많이 발생하며, 그 외에 석과(石果), 변형과, 착색과 및 일소과(日梳果) 현상이 나타남 (Bosland, 1999). 국내외 파프리카 병해충에 대한 연구는 고추에서 발생하는 병해충에 대한 연구(Park et al., 1998; Lee et al., 1999; Lim and Kim, 2003; Kang et al., 2005; Jung et al., 2008)에 비해 아직 많이 부족한 실정임.
- 국내 파프리카 병해충에 관한 연구로는 진딧물, 총채벌레, 담배나방 및 응애류 등의 해충과 흰가루병, 잣빛곰팡이병, Sclerotinia sclerotiorum(Jeon et al., 2006), Fusarium oxysporum(Cha et al., 2007) 및 Botrytis cinerea(Yoon et al., 2008)등 진균병에 대한 보고가 있었으나 병해충 방제제에 대한 획기적인 제품이 개발되지 않았음.

## 1-2. 연구개발의 필요성

### □ 파프리카의 개요

- 파프리카는 중앙아메리카 원산의 가지과(*Solanaceae*), 고추속(*Capsicum*), 고추종(*Annuum*)에 속하는 한해살이 식물로, 단고추(Sweet pepper)라 불림.
- 최근 국민의 생활수준 향상과 식생활패턴의 변화로 건강기능성에 대한 관심이 증대되고 있음.
- 이러한 관심으로 인해, 신선·고품질 농산물에 대한 소비자의 선호도가 급격히 증가되고 있는 실정임.
- 일반적으로 매운맛이 나고 육질이 질긴 것을 피망, 단맛이 많고 아삭하게 씹히는 것을 파프리카가 부르며, 국내에서는 피망과 파프리카의 구분이 정확하지 않아 한국 원예학회(1994)에서 발간한 <원예학용어집>에는 모두 ‘단고추로 분류’.
- 파프리카는 매운맛이 덜하고 단맛이 강한 카로티노이드의 우수급원으로 비타민이 풍부하며, 발암억제 및 면역력 강화 등의 다양한 효과가 있는 것으로 알려져 있음.
- 이러한 이유로 칼로리와 영양소만을 중시하던 예전과 달리 건강지향성과 편의성이 강조되어 파프리카와 같은 웰빙 농산물을 익히지 않고 바로 섭취하는 즉석섭취(ready-to-eat) 농산물의 소비가 증가되고 있음.
- 최근 한국에서도 샐러드용 등으로 많이 사용되어 일 년 내내 생산되고 있으나, 재배에는 고온이 필요하므로 겨울철 재배는 남부 지방이나 가온 장치가 되어있는 재배실에서 가능.

### □ 파프리카 재배 및 유통현황

- 우리나라 파프리카 배재는 ‘94년 재배 한 것이 시초이며, 재배면적과 생산량도 꾸준히 증가하여 ’09년도에는 3262,995ha에 9,888,536톤으로 파프리카의 생산 면적 및 생산량은 증가하였으나 ‘11년도 이후 급속도로 감소하고 있음

<표1> 국내 파프리카 재배면적 및 생산량

(단위: ha, 톤)

구분	'09	'10	'11	'12	'13	'14	'15	'16
면적(ha)	262,995	245,251	260,507	252,229	251,558	246,725	224,959	217,261
생산량(ton)	9,888,536	8,381,479	9,746,701	8,661,831	9,242,708	9,904,137	8,548,644	8,039,788

\*출처: 2016 시설채소 온실현황 및 채소류 생산실적, 농림축산식품부

- 농가별 재배규모는 지역에 따라 시설종류에 따라 다르지만 일반적으로 1,500평~6,000평 내외며, 재배 작형은 여름 작형과 겨울 작형으로 나누어져있음.
- 파프리카는 대부분 수출용으로 이용되고 있으며 특히 일본 파프리카 물량의 66%가 한국산이 차지할 정도로 수출 비중이 높고 수출물량도 증가하고 있으며 점차 국내 소비도 증가하는 추세임.

□ 파프리카 병해충의 발생 현황 및 문제점

- 우리나라 파프리카 재배 시 최근 담배가루이와 흰가루병 발생이 극심하여 이에 미처 대비하지 못한 연유로 미등록 농약사용이나 잔류허용초과 농가의 적발 건수가 27농가에 달해 2006년 대일 수출 파프리카에 대한 농약 전수 검사가 실시되어 파프리카 수출에 지대한 영향을 미침.
- 수출 농산물에 대한 잔류농약의 규제가 강화되어 일본의 Positive list system이나 미국의 Zero tolerance system 도입으로 잔류허용량(MRL)을 근거로 한 안전사용 기준 설정이 엄격히 요구됨.
- Holland에서는 파프리카 재배 시 IPM(병해충종합관리) 기술을 적용하여 소비자에 대한 안전성을 확보하고 있는데, 우리나라도 안전성을 확보하는 것이 필요함.
- 우리나라에서도 파프리카 생산을 위한 농림부 천적사용을 지원하고 있음.

□ 파프리카의 수출 시장 현황 및 문제점

- 파프리카는 여타 수출작물에 비해 그 시장 규모가 월등히 크며, 전년대비('15) 10.1%증가한 93.8백만 불로 꾸준히 증가하고 있으며, 향후 수출 1억불 돌파가 예상되고 있음.
- 봄철 이상고온 등 기상불순에 따른 여름산 조기 출하로 5~6월 겨울산·여름산 작기 중복으로 물량이 증가됨에 따라 수출단가 하락 불구 물량이 확대되며 대 일본 수출증가

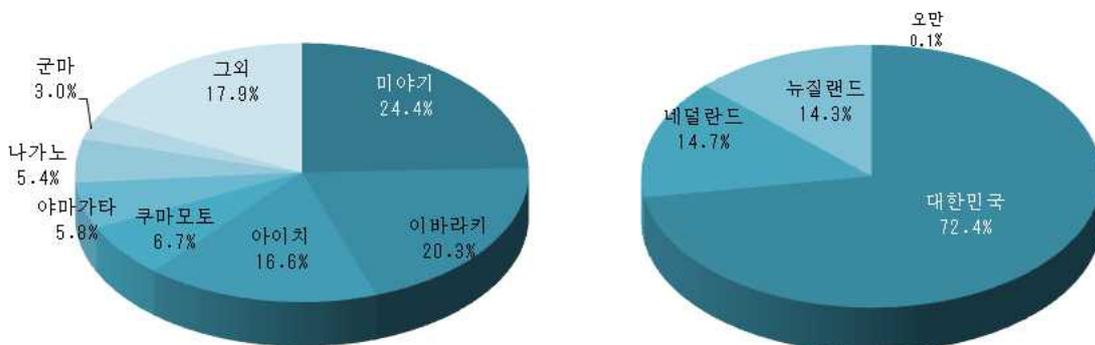
(단위: 톤, 백만원)

주요국	2014			2015			2016		
	물량		금액	물량		금액	물량		금액
		비중(%)			비중(%)			비중(%)	
전체	34,268	100.0	13784	39679	100.0	15853	40488	100.0	15471
대한민국	23,758	69.3	8,860	28,729	72.4	10,427	30,077	74.3	10,537
네덜란드	5,892	17.2	2,761	5,834	14.7	2,918	5,807	14.3	2,566

뉴질랜드	4,599	13.4	2,153	5,111	12.9	2,505	4,598	11.4	2,366
기타	19	0.1	10	4	0.01	2	6	0.0	2

\*출처: 2016 수출입동향 및 통계, 한국농수산물유통공사

- 김치와 인삼류를 제외하고 가장 높은 금액의 수출 실적을 기록하며 국내 농가의 실질적인 수입원이 되고 있음.
- 국내에서 생산되어 해외로 수출되는 파프리카는 다른 나라의 파프리카에 비해 단가는 낮으나 품질 면에서 대등한 수준으로 해외 바이어들이 자국으로의 수입에 적극성을 보이고 있음.
- 중국산 파프리카의 농약안전성 문제로 대만 등 신규시장 수출 증가세를 보이고 있음.
- 매년 3월에 정식하여 6월부터 생산하는 여름재배가 성공을 거두면서 재배면적의 증가로 연중 생산체계가 확립되어 수출경쟁력 우위를 더욱 높이는 계기가 되었으며, 현재 대표적인 수출농산물 중 하나로 일본시장의 60~70%를 차지하는 등 다양한 국가로 수출되고 있음.
- 파프리카는 최근 채소작물 중 최고의 수출 효자품목으로 자리매김 하였으나 안정적인 생산 및 수출의 문제가 지속적으로 제기되고 있음.
- 특히 해충의 피해로 인해 수량 및 상품과 생산비율이 감소하며 연중 안정 수출이 어려운 실정임.
- 이와 같은 한국산 파프리카의 수량 저하의 문제점이 있지만 일본 주요 수입상대국은 한국, 네덜란드, 뉴질랜드 3개국이지만 최근 한·국의 비중이 높아지고 있으며 2015년에는 수입량이 72.4%가 한국산임. 한국산 파프리카는 네덜란드산이나 뉴질랜드산과 비교하여 운송비용이 절약되기 때문에 비교적 저렴한 가격대를 형성하고 있음.
- 따라서 안정적 생산에 적합한 친환경 방제 기법의 개발이 필요한 실정임.



n=輸入量 39,679t <2015年>

\*출처: 농림수산성 홈페이지

- 현재 파프리카는 수출액 \$88.8 millions 중에서 99% 이상을 일본이 차지하고 있는데, 일본은 세계적으로 가장 청결하고 안전한 농산물을 요구하는 시장임.
- 특히, 파프리카는 고급과채류에 속하며, 샐러드 등 날로 먹는 경우가 많아서, 국내외 소비자 모두 파프리카의 안전성에 대해 많은 관심을 갖기 시작함.
- 과채류를 포함한 농산물은 병해충 및 잔류농약 검출 등의 비관세장벽이 두터워, 생산단계에서부터 이를 고려한 철저한 관리가 시행되어야 함.
- 특히, 농식품은 SPS(위생 및 식물위생 조치의 적용에 관한 협정)로 수출 대상국별 기준에 맞는 위험분석 및 통관 절차를 거쳐야 함.
- 최근 2009년도와 2012년도에 파프리카 일본 수출시 통관단계에서의 잔류농약이 검출되어, 통관검사가 강화되고 통관지연, 품질저하 등의 피해발생 하였음.
- 일본 시장 이외에 수출통로의 다변화가 꾸준히 이루어지고 있으나, 각국의 상이한 검역 및 안전성 평가에 대한 요구에 대비한 작물 재배 및 관리방안은 미흡한 실정임.

#### □ 수출용 파프리카의 방제기법 개발 필요성

- 파프리카는 가지과 (Solanaceae) 고추속 (Capsicum)에 속하는 한해살이 식물로 국내에서는 1994년 제주도에서 처음 재배를 시작, 수출작물로 각광을 받으며 재배면적이 전국적으로 확대 및 최근 10년간 비약적으로 증가하였음.
- 온실에서 재배되는 파프리카는 여타 가지과 작물과 마찬가지로 재배기간 연중 병해충에 취약함.
- 파프리카 적정 재배환경이 18-28℃, 상대습도 70-80%로 주요 온실해충이 발생하기에 매우 적합한 기후이며, 국내 수출단지 파프리카 재배 온실에서는 총 15종의 해충이 발견되었으며, 이들 대부분은 경제적 피해를 발생시킴 (김기돈 외, 2013).
- 전국적으로 약 460ha에서 생산되고 있는 파프리카는 9917m<sup>2</sup>(3000평) 유리온실 규모에 농약을 살포할 경우 한 작기 기준 약 1,000만 원 이상의 방제 비용 발생함.
- 파프리카의 수확시기와 주요 온실해충의 밀도증가시기 (3월-7월)가 일치하여, 해충 발생 시 과실에서의 경제적 피해가 크며, 농약잔류 문제 등으로 효과적 방제가 어려움.

시기	7월			8월			9월			10월			11월			12월		
	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하
작업 내용	수확			파종 및 육묘			정식			영양생장 및 착과			수확					
발생 병해충	작기종료			가루이/응애/진딧물/나방류			가루이/진딧물/응애/총채벌레/나방류/뿌리파리						월동 서식처로 이동/온실로 유입 감소 기존 해충 계속 발생					
				바이러스/역병/흰가루병			역병/흰가루병/바이러스			바이러스/흰가루병/역병			잣빛곰팡이병					

시기	1월			2월			3월			4월			5월			6월		
	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하
작업 내용	수확																	
발생 병해충	기존 해충 발생						총채벌레/응애류/가루이/진딧물						진딧물/총채벌레/가루이/응애/나방류/노린재/뿌리파리					
	잣빛곰팡이병/역병/탄저병						잣빛곰팡이병/흰가루병/역병/탄저병						탄저병/역병/반점세균병/흰가루병					

<표 5> 파프리카의 시기별 작업 및 발생병해충((주)산업경영연구원)

- 대일 수출 파프리카는 '03년 Ethoprophos, '06년 Chlorpyrifos가 통관과정 중 잔류기준이 초과 검출되어 상당기간 100% 전수조사를 받음.
- 파프리카는 과실의 외관 (cosmetic value)가 작물가격 형성에 있어 매우 중요하지만, 다음의 주요해충에 의한 피해가 지속적으로 발생.

해충	발생소장
온실가루이 ( <i>Trialeurodes vaporariorum</i> )	연 5세대 이상
담배가루이 ( <i>Bemisia tabaci</i> )	연 5세대 이상
꽃노랑총채벌레 ( <i>Frankliniella occidentalis</i> )	연 10세대 이상
대만총채벌레 ( <i>Frankliniella intonsa</i> )	연 10세대 이상
점박이응애 ( <i>Tetranychus urticae</i> )	연 15세대 이상
차응애 ( <i>Tetranychus kanzawai</i> )	연 15세대 이상

<표 6> 파프리카의 주요 발생 해충

- 현재 pyrethroid 및 neonicotinoid계 합성농약이 주요해충 방제의 근간을 이루고 있지만, 수출에서의 잔류문제 및 국내생태계 교란 부작용을 야기해 왔으며, 반복적 사용으로 해충의 약제저항성이 발달.
- 따라서 주요해충을 대상으로 수출용 파프리카 맞춤형 친환경 방제기법 개발은, 방제 효율, 잔류농약검역, 환경문제 해결의 근간이 될 수 있는 핵심 기술임.

□ 수출용 파프리카의 주요해충

① 온실가루이 (*Trialeurodes vaporariorum*)



<그림 1> (좌)온실가루이의 약충과 성충, (우)온실가루이 감로에 의한 그을음병 피해

- 온실가루이는 국내에 1977년 외국에서 유입된 난대성해충으로, 시설재배 면적의 확대에 의해 전국적으로 분포하는 원예/과채류에 큰 피해를 주는 해충으로 알려져 있음.
- 알에서 성충까지 약 3~4주가 소요되며, 암컷은 1일 평균 8개의 알을 산란하여 총 150~300개의 알을 산란함.
- 고착성인 약충은 중간 잎 또는 아래 잎의 과실근처에 집중적으로 분포하며, 가운데 시설이 있는 온실에서는 연 10회 이상 발생하여 지속적인 피해를 발생시킴.
- 약충과 성충 모두 식물체의 즙액을 빨아먹어 잎과 새순을 직접가해하고, 특히 배설물인 감로(Honeydew)는 과실에 묻어 그을음병(sooty mold)을 발생시켜 과실 수량 및 품질을 저하시키지만, 이에 대한 경제적 피해수준은 알려져 있지 않음.
- 현재 파프리카에서 온실가루이 방제를 위해 코니도, 신기루, 엘로리본, 라노 등 5품목이 등록되어 있음 (과채류공통수출연구사업단).
- 천연물을 기반으로 하는 온실가루이 약제는 3종만이 국내에 등록, 유통되고 있으며, 국내외 선행연구는 주로 essential oil에 관하여 이루어져 왔고, 고농도 처리시에만 유효한 약효를 발휘하는 것으로 알려져 있어 식물에 대한 약해 등이 문제 시되고 있음.

Table 2. Toxicity of test essential oils to *T. vaporariorum* adults using the impregnated filter paper bioassay

Essential oil <sup>a</sup>	Mortality (24 h)(mean ± SEM), %					
	Concentration, μl/ml air					
	n	2.3 × 10 <sup>-3</sup>	n	9.3 × 10 <sup>-4</sup>	n	4.7 × 10 <sup>-4</sup>
Basil	108	92 ± 6.0ab	116	33 ± 4.7def	-	- <sup>b</sup>
Bay	135	100 ± 0.0a	91	20 ± 6.5f	-	-
Cade	111	60 ± 5.0c	74	19 ± 6.5ef	-	-
Caraway seed	78	100 ± 0.0a	70	14 ± 5.5ef	-	-
Cardamom ceylon	129	85 ± 5.2abc	165	32 ± 5.9def	-	-
Caronella java	123	88 ± 5.6abc	116	31 ± 4.9def	-	-
Clary sage	126	76 ± 6.8bc	70	19 ± 2.3ef	-	-
Clove bud	132	90 ± 5.1abc	81	32 ± 2.6def	-	-
Clove leaf	117	90 ± 5.5abc	114	58 ± 5.5bcd	90	17 ± 5.3a
Coriander	102	92 ± 5.2abc	75	19 ± 4.5ef	-	-
Geranium	70	92 ± 6.9abc	72	25 ± 4.3def	-	-
Lavender	122	78 ± 6.9abc	79	9 ± 1.4f	-	-
Lemon eucalyptus	72	100 ± 0.0a	77	12 ± 6.3f	-	-
Lemongrass	75	100 ± 0.0a	73	23 ± 6.5def	-	-
Lime dis 5F	122	90 ± 5.5abc	73	30 ± 6.5def	-	-
Oregano	83	100 ± 0.0a	120	76 ± 5.8abc	75	24 ± 5.1a
Palmarosa	127	100 ± 0.0a	78	19 ± 5.9ef	-	-
Pennyroyal	74	100 ± 0.0a	85	89 ± 4.9a	90	18 ± 5.0a
Peppermint	83	100 ± 0.0a	149	83 ± 4.2ab	86	29 ± 6.2a
Petigrain	118	75 ± 5.7bc	76	12 ± 3.9ef	-	-
Primento berry	75	100 ± 0.0a	115	18 ± 5.0ef	-	-
Rosewood	110	93 ± 5.1abc	117	28 ± 5.5def	-	-
Sage	121	67 ± 6.1bc	78	14 ± 5.5ef	-	-
Spearmint	113	100 ± 0.0a	117	28 ± 4.7def	-	-
Tea tree	107	91 ± 4.6abc	102	28 ± 1.1def	-	-
Thyme red	114	91 ± 4.4abc	77	22 ± 4.5def	-	-
Thyme white	71	100 ± 0.0a	73	43 ± 4.1ede	76	8 ± 4.2a
Wormwood	115	100 ± 0.0a	83	16 ± 4.6ef	-	-

Means within a column followed by the same letter are not significantly different ( $P = 0.05$ , Scheffe test [SAS Institute 1996]).

<sup>a</sup> Essential oils producing <40% mortality are not presented.

<sup>b</sup> Mortality at  $4.7 \times 10^{-4}$  μl/ml air was not evaluated for test oils exhibiting <40% mortality at  $9.3 \times 10^{-4}$  μl/ml.

<표 7> 최원일 외. 2003. Toxicity of plant essential oils to *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). J. Econ. Entomol. 96: 1479-1484

- 본 연구개발 과제에 주관기관인 (주)피러스는 잣나무 송이에서 피톤치드를 추출하여 이를 친환경 농자재로 등록하였으며, 온실가루이 성충을 대상으로 피톤치드의 치사율을 측정 한 결과, 저농도에서 24시간 노출시켰을 때 58% 이상의 치사율을 실험연구에서 달성하였음.

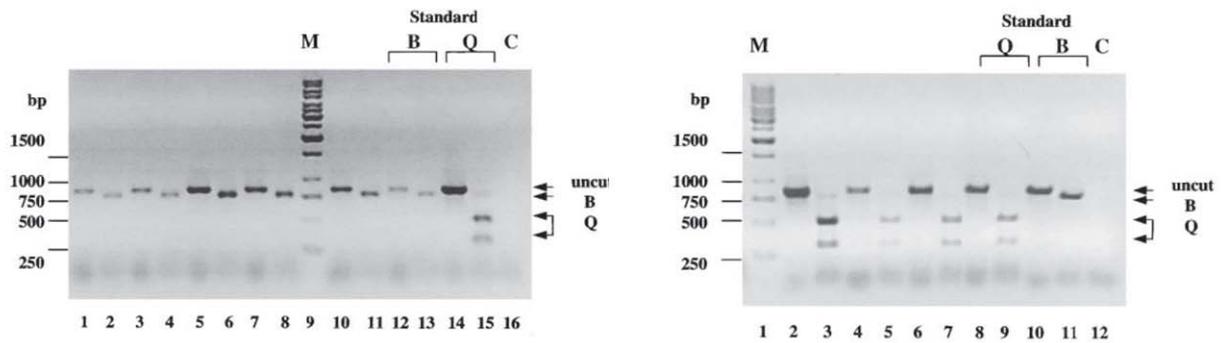
② 담배가루이 (*Bemisia tabaci*)



<그림 2> (좌)담배가루이의 생활사, (가운데, 우)담배가루이 감로에 의한 그늘음병 피해

- 생활사는 온실가루이와 매우 유사하나, 온실가루이가 식물 정단부 외에 주로 산란하는데 비해 담배가루이는 식물 전체 외에 산란하는 경향을 보임.

- 피해증상은 온실가루이와 마찬가지로 식물즙액을 흡즙하고, 감로를 배출하여 그을 음병을 유발하며, 심하면 생리대사에 영향을 주어 작물의 위축을 유발함.
- 현재 등록된 농약은 32품목이 있으며, 화학농약의 살포는 디노테프란 성분 및 갈립소, 아타라, 모스피란 등이 이용되고 있음.
- 2005년 국내 최초 보고된 Q 계통의 담배가루이는 neonicotinoid계 농약에 저항성 유전자를 가지고 있어서 약제 저항성을 쉽게 발달시키고, 후대까지 특징을 유전시킴.



<그림 3> 담배가루이 B 와 Q 계통의 약제저항성 관련 분자생물학적 분석 (출처: Horowitz et al. (2005). Archives of Insect Biochemistry and Physiology 58: 216-225)

- 성충의 이동거리는 약 4-5m로 비교적 짧지만, 바람에 의한 수 km 이상의 장거리 이동이 가능

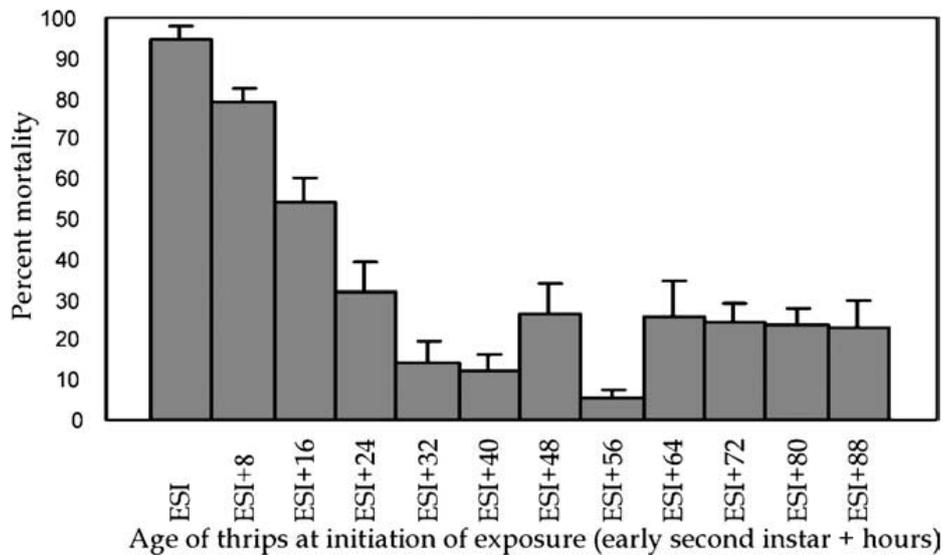
### ③ 꽃노랑총채벌레 (*Frankliniella occidentalis*)



<그림 4> (좌) 꽃노랑총채벌레의 성충, (우)총채벌레 섭식에 의한 과실의 직접피해

- 꽃노랑총채벌레는 외국에서 유입된 해충으로 1993년 9월, 제주도 감귤하우스에서 처음으로 피해가 관찰되었으며, 1995년 말까지 충남북, 전남북, 경남북 등 23개의 시군으로 확산되었고, 현재는 전국적으로 시설원예작물의 주요 해충임.
- 온실내의 환경에서 10회/년 이상 발생이 추정되며, 이러한 온실 환경에서 알로부터 성충까지의 시간은 약 18일이고, 암컷 당 총 산란 수는 약 500개로 번식력이 매우 뛰어남.

- 파프리카를 포함한 각종 과채류의 꽃과 열매를 직접 가해함으로써 큰 피해를 야기 하지만 토양에서 번데기로 지내는 동안에는 방제가 매우 어려움.
- 총 33품목의 농약이 등록되어 있으며, 국내의 파프리카 농가에서 가장 높은 빈도로 총채벌레 방제 농약을 사용하고 있는 것으로 보고됨.
- 초기방제 실패할 경우, 에이팜, 섹큐어, 부메랑, 모스피란, 램페이지 등의 약제를 3-4일 간격으로 2~3회 연속 집중 처리해야 하기 때문에 약해 및 환경독성 부작용 초래
- 꽃노랑총채벌레는 빠른 생식력으로 약제저항성 발달에 유리하며, 실제로 미국 등에서 1990년대부터 약제저항성이 보고되고 있어(Immaraju 외. 1992. Econ. Entomol. 85: 9-14)합성농약의 사용 자제와 천연물기반 약제 개발이 시급함.
- 곤충병원성 진균인 *Beauveria bassiana* 등이 활용되고 있으나, 실험실 환경에서도 치사율이 60~75% 정도로 합성농약에 비해 방제효과가 낮고, 약충이 성장함에 따라 그 효과가 급격히 감소하는 문제점이 발견



<표 8> 약충의 연령에 따른 *Beauveria bassiana* 미생물농약의 총채벌레에 대한 약효 감소 (출처: Ugine et al, (2005) J. Invert. Path. 89: 210-218)

- 본 연구개발 과제의 주관기관인 (주)피러스는 잣나무 송이에서 피톤치드를 추출하여 이를 친환경 농자재로 등록하였으며, 총채벌레 성충을 저농도에서 24시간 노출시켰을 때 75% 이상의 치사율을 선행연구에서 달성하였음.

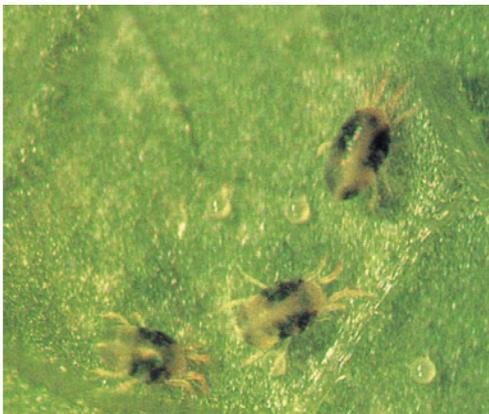
④ 대만총채벌레 (*Frankliniella intonsa*)



<그림 5> (좌) 대만총채벌레 성충, (우) 총채벌레에 의한 꽃 피해

- 파프리카에서는 주로 꽃에서 발견되는데, 일반적으로 꽃노랑총채벌레와 가해양상이 비슷함.
- 성충보다는 유충에 의한 피해가 빈번하며, 집단으로 서식할 경우 과실의 표면을 가해하기 때문에 과실의 표면이 갈색으로 변함.
- 주로 3월 중순경부터 온실의 천장과 측창을 통하여 외부에서 유입되고, 유입 후에는 연중 발생함.
- 농약을 이용한 방제는 꽃노랑총채벌레와 유사한 실정임.

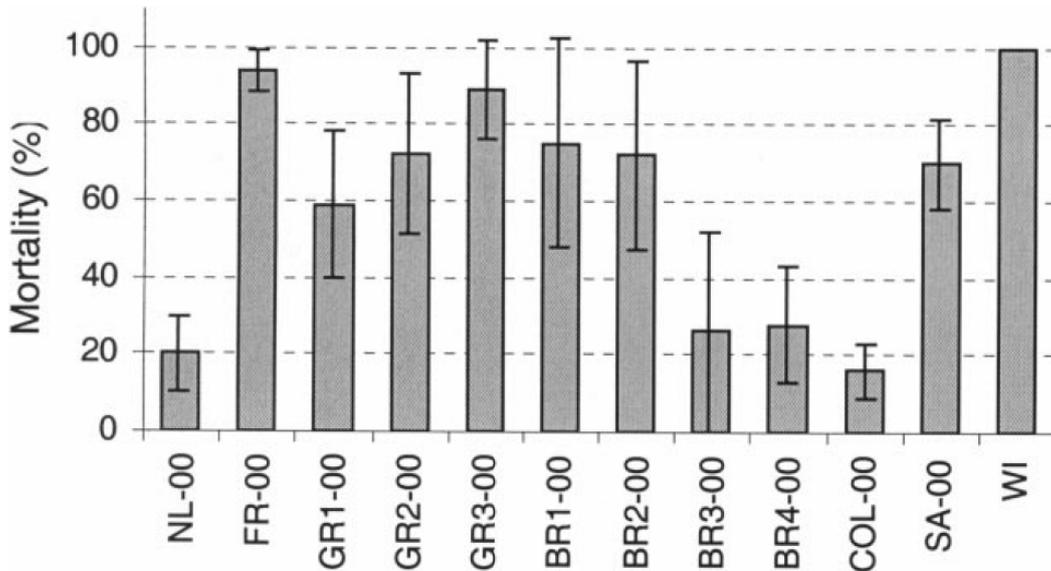
⑤ 점박이용애 (*Tetranychus urticae*)



<그림 6> (좌)점박이용애 성충, (우)점박이용애 가해에 따른 잎의 고사 및 광합성저해 (수박)

- 성충의 체장은 약 0.4mm로 매우 소형이며, 여름형은 대체로 몸통 좌우에 뚜렷한 검정색 무늬가 한 쌍 존재함.
- 온도가 높은 시설재배 작물에서 주로 발생하며, 시설작물에서 가온하고 야간 조명을 할 경우 휴면하지 않고 연중 발생함.
- 성충, 약유충 모두 잎의 표면과 뒷면 양쪽 모두를 가해하나, 주로 잎 뒷면에서 서식함.

- 25℃에서 알에서 성충까지 10일 정도 소요되는데, 온실 환경에서는 급속히 개체수가 증가하는 양상을 보임.
- 잎 뒷면에서 세포 내용물을 빨아 먹으므로 잎 표면에 작은 흰 반점이 무더기로 나타나고, 심하면 잎이 고사함.
- 응애에 국내 등록된 농약은 34품목이나 현재까지 전 세계적으로 92종의 농약에 저항성이 보고되어, 합성농약 사용에 있어 각별한 주의가 필요하며, 천연물기반 생물농약의 개발이 시급함.



<표 9> 점박이응애 계통별 abamectin 농약에 대한 저항성 차이 (출처: Stumpf & Nauen (2002) Pesticide Biochemistry and Physiology 72: 111-121)

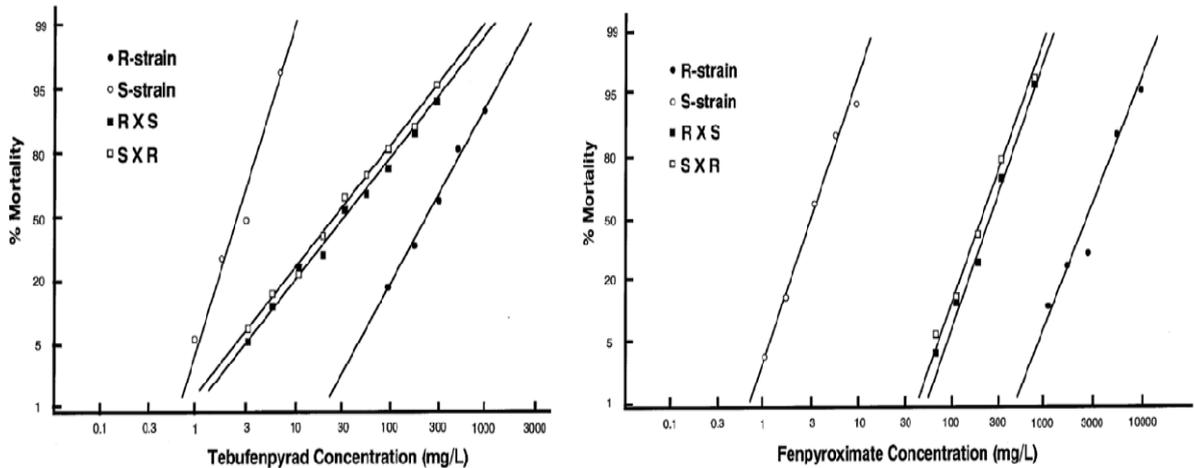
### ⑥ 차응애 (*Tetranychus kanzawai*)



<그림 7> (좌) 차응애 성충, (우)파프리카에서의 응애 피해

- 생활사 및 피해증상이 점박이응애와 매우 유사하며, 점박이응애의 겨울형으로 오인되는 경우가 자주 발생함.

- 6~7월 및 10월에 파프리카에서 발생 최성기를 보이며, 온실 내 연중 수시로 발생함.
- 방제기법은 점박이응애와 동일하지만, 저항성 관리가 매우 중요하며 저항성 계통의 경우 기존의 약제로 방제하기 매우 어려움.



<표 10> 응애의 약제 저항성 과 감수성 계통의 사망률 차이(출처: Goka (1998) Experimental & Applied Acarology 22: 699-708)

#### □ 친환경농자재의 의의

- 친환경농자재란 ‘인축 및 자연에 무해하면서 농작물에 양분 공급, 병해충 억제, 토양개량 및 식물 생육촉진에 사용되는 천연물질로 된 환경 친화적 물질’을 뜻함.
- 친환경농자재는 현재 ①병해충예방, ②비료효과, ③생육촉진, ④토양관리 의 네 개의 종류로 분류되고 있음.
- 일반 농자재와는 달리 친환경농자재는 제품의 종류와 대상 물질이 매우 광범위하고, 이로 인해 각 제품이 가지는 특성과 유효성분이 서로 다르고 불확실한 경우가 많음.
- 친환경농업은 합성화학 비료나 농약사용을 최소화하면서 작물양분종합관리, 병해충 종합관리, 천적이용 등 첨단농업기술을 이용해 농업환경을 지속적으로 보전하는 모든 형태의 농업을 말하며, 과거 녹색혁명에 의한 주곡자급, 백색혁명으로 일컬어지는 비닐하우스시설원예 등은 효율적 농약·비료 사용 및 병해충·잡초 방제로 인해 수량증대는 물론 농산물의 품질향상에 크게 기여하였음.

기존연구	구 분 내 용
이대근(2001)	①토양개량과 시비를 위해 사용할 수 있는 물질, ②병해충관리를 위해 사용할 수 있는 자재, ③유기농산물 가공시 허용물질
윤성희(2004)	①토양, 비료관리 자재, ②병해충, 잡초관리 자재
농업과학기술원(2005) 최두희(2006)	①비료 또는 토양개량에 사용하는 자재: 동식물성 유기물, 부산물과 축분 및 이들을 퇴비화한 것, 광물성 비료자원과 광물성 토양개량제, 산업부산물 등 ②식물 병해충관리용 자재: 동식물성자재, 무기자재, 미생물제, 트랩과 같은 기타 물리적 자재 등
최이해(2005)	①땅심을 높이는 것, ②필요한 영양제 역할을 하는 것, ③병해충에 안걸리도록 예방하거나 병에 걸렸을 때 대처할 수 있는 것
이미경 외(2006)	①병해충예방, ②비료효과, ③생육촉진, ④토양관리

<표 11> 친환경농자재의 분류 (한국농촌경제연구원, 2008)

• 친환경 농자재의 종류

구 분	자재의 종류
농약	목초액, 키토산, 산화전위수, 바이오그린활성수, 현미식초 등
비료성분공급	수용성인산, 그린칼슘, 아미노산, 청초액비 등
농약+ 비료효과	천혜녹즙, 한방영양제, 토착미생물배양제, 유산균 등
생육촉진	미네랄 A, B, C, D, 과일효소, 바로돈, 천연식초 등
토양개량	목탄, 피트모스, 맥반석 등
기타	바닷물, 담배추출물, 발효갯목, 해조류추출물 등

<표 12> 친환경 농업자재의 종류 (한국농촌경제연구원, 2008)

□ 친환경농자재의 필요성

- 21세기 이후 인류생존을 위한 환경보존이 주요 관심사가 되고 있으며, 농업 분야에서도 자연환경을 보존하고 양질의 안전농산물을 생산하기 위해 환경 친화적인 소재개발을 모색해야 한다는 인식이 확산
- 농약사용으로 인한 환경오염, 중독사고 및 식품의 안전성 등 농약의 부작용과 인산염류 및 영양분 유출에 의한 수질오염 등의 비료의 부작용이 문제시됨에 따라 인축건강, 농업환경 및 생태계를 보존하면서 고품질 안전농산물을 안정적으로 생산하는 환경 보존형 농업의 중요성이 부각
- 농약 및 비료의 사용으로 병해충 및 잡초의 방제를 손쉽게 이루었지만 잔류농약, 농약중독 등의 문제점이 확연히 드러남.

□ 친환경농자재를 이용한 병해충 관리의 필요성

- 국내에서 생산되는 파프리카의 90% 이상이 시설재배 생산으로 이루어지고 있어 온

실시절작물에 주로 발생하는 주요 해충에 관한 발생소장 및 관리법 개발이 필요함.

- 현재 Neonicotinoid계 농약과 합성 Pyrethroid계의 무차별 사용은 화분매개충의 감소 및 이차 해충의 돌발양상을 야기해왔지만, 이를 대체할 천연물기반 해충방제 약제는 개발이 미흡한 상태임(Lesky et al. 2012).
- 국내의 경우 2001년과 2005년에 각각 미생물농약과 생화학농약에 대한 등록규정이 마련된 이후 2012년 12월 말까지 국내에 등록된 생물농약은 39종뿐이며, 이중 13종이 살충제로 등록되어 있음(수입 7종, 국내 6종) (농촌진흥청).
- 국내에서 병해충 방제용으로 등록된 친환경농자재는 341종류가 있는데 이중에서 해충 방제용으로는 228종류의 자제가 등록되어 있으며 40.8%를 차지하는 93종류의 제품이 식물추출물을 주성분으로 함.
- 약효의 해충 별 특이성이 잘 알려져 있지는 않지만, 아래 17종의 친환경농자재들이 작물 충해관리용 자재로 등록되어 있음.

자재명 (상표명)	원료명	대상해충*
식물추출물 (응애탕)	고삼뿌리 추출물 90% + 기타	응애 및 진딧물류
넝(Neem)추출물 + 식물추출물(불휘)	넝추출물 60% + 너삼씨앗추출물 40%	뿌리혹선충
식물추출물 (충격파)	회화나무, 멸구슬나무, 양명아주 95% + 계면활성제	?
미생물제제 (땅거미)	미생물( <i>Monacrosporium thaumasium</i> , 1.0×10 <sup>4</sup> cfu/g) 10% + 질석 90%	뿌리혹선충
식물추출물 (대유다이포스)	Cedar oil 16% + 기타	진딧물, 거세미나방, 가루이
미생물제제 (참선충)	<i>Photorhabdus temperata</i> 100%	선충류
식물추출물 + 파라핀유제제 (충돌이)	Matrine 90% + 파라핀유8% + 기타	?
넝추출물 + 목초액 (모두충)	넝추출물 10% + 목초액 30%+ 물 58% + 유화제 2%	?
식물성오일 (다지톨)	피마자오일6%+ 계피오일6%+ 계면활성제5% + 물83%	?
식물추출물 (잘들어)	회화나무, 멸구슬나무, 양명아주 50% + 동결방지제 10% + 계면활성제 10% + 물 30%	?
넝추출물 (클린존)	넝추출물 60% + 발효주정 10% + 유화제 5% + 물 25%	가루이, 진딧물
식물추출물 + 미생물추출물 (네마스타)	너삼씨앗추출물 30% + 미생물추출물 10% + 물 60%	뿌리혹선충
식물추출물 + 넝추출물(모비탄)	식물추출물(고삼) 3% + 넝추출물 7% + 기타 90%	?
식물추출물+넝추출물+미생물추출물(천궁)	너삼씨앗추출물 10% + 넝추출물 8% + 미생물추출물 2% + 제오라이트 80%	뿌리혹선충
식물추출물 (바로깍 입제)	식물추출물(멸구슬나무·양명아주·회화나무) 10% + 기타 90%	토양해충
넝추출물 (웬가드)	넝추출물 8% + 기타 92%	?
식물추출물 (애니킬)	식물추출물(고삼) 60% + 기타 40%	?

<표 13> 작물 층해 관리용 자재(농촌진흥청 농자재 등록정보)

- 대부분의 친환경농자재들은 과실을 직접 보호하기 보다는 토양해충 등을 관리하여 이차적으로 식물의 활력을 증진시키는 것을 주요 작용기작으로 이용함.
- 파프리카와 같은 수출작물의 경우에 살충물질을 사용한 생산단계의 과실 직접적 보호에 대한 기술 개발의 노력이 요구됨.
- 이러한 노력은 작물의 품질향상 및 교역국가 간의 잔류농약 등에 의한 수출입통관에 불필요한 시간 및 절차를 간소화하는데 필수적임.

#### □ 친환경농자재의 현황 및 개발의 중요성

- 친환경농자재 관련 기술은 관행적으로 사용되어 온 화학농약, 비료와는 달리 비교

적 소규모의 생산업자들에 의해 생산되고 있음.

- 따라서 비교적 쉬운 생산과 판매로 인해 시장에서 약효문제와 품질관리 문제를 야기하고 있음.
- 제조회사마다 사용하는 원재료와 부재료, 구성비 등의 차이가 크기 때문에 품질과 가격의 편차가 큼.
- 제품의 표시내용과 효과·효능의 재현성 부족 등으로 인한 낮은 신뢰도 때문에도 화학비료나 농약과 같은 관행 농자재에 비해 소비자들의 불만이 상대적으로 많음.
- 또한, ‘친환경’이라는 용어 사용에 대한 법적 관리 규정이 없기 때문에 정의와 분류를 명확히 규정하는 것을 현재로서는 한계가 있음.
- 이러한 특징으로 인해 현재의 제도로는 적절한 관리가 어렵다는 지적이 제기되고 있음.
- 국내 친환경농자재 개발을 위해서는 원재료 및 부재료의 표준화 기술, 기능성 입증 기술, 품질관리의 기술이 필수적이며, 작용기전의 명확한 구명을 통하여 친환경농자재의 여러 가지 문제점들을 극복해야 함.

### 1-3. 연구개발 범위

□ 현장에서 발생하는 해충을 작기 별로 정확히 진단하고, 그에 따른 경제적 피해수준을 설정하여 최적의 방제 시기 및 빈도를 산출

- 작기 초기의 밀도가 온실 내 해충방제 성공여부를 결정하는 중요 인자이기 때문에, 초기 유입 개체군 밀도와 경로를 결정하는 온실 주변 야생 기주에 대한 포괄적 조사
- 해충별로 유인력을 보이는 물리적, 화학적 자극을 선별하고, 이들을 라이트, 페로몬, 점착 트랩 등으로 개발하여, 해충의 phenology를 정량화
- 해충별로 파프리카 실내 사육실험을 통하여, ‘해충밀도-가해정도-과실편해’ 간의 상관관계를 구명하여, 해충별 파프리카의 경제적 피해수준을 설정하고, 이를 바탕으로 방제 매뉴얼을 작성
- 초기 유입 해충군과 온실 내 누적 세대에 대해 약효 평가를 실시하여, 시기별 효과적인 약제를 선별하고, 빈도를 결정

□ 기존 합성농약 대체를 위해 살충력이 우수한 acyclic monoterpenoids 함량이 높은 식물자원을 선정하고, 기존 합성농약 대비 90% 이상의 방제효과를 달성할 수 있는 유효성분 최적추출공정을 개발

- 장미과, 녹나무, 약모밀, 꿀풀과, 운향과 식물등 유용자원을 채집 및 스크리닝하고, 단일 또는 혼합 추출물로 이용 가능한 식물체를 선별
- 기존의 잣나무 피톤치드 제품과 synergism을 최대화하기 위한 지표성분을 설정하

- 고, 기존제품과의 비율, 온도, 농축 및 formulation을 개발하고, 시험법을 메뉴얼화
- 선별된 약제를 이용하여 주요해충에 대한 독성평가를 실험실 환경 (약제 살포 후 건조한 residue를 이용) 및 파프리카 포장 (식물체 직접 살포) 에서 모두 수행하고, 무처리군, 기존약제, 신규 추출물 처리군를 포함하여 LC<sub>50</sub>와 90% 방제효과 약제농도를 산출함.

□ 신규 식물추출물의 친환경농자재 등록을 위한 포장시험자료 확보, 약해평가 및 유용생물 (예, 천적 및 화분매개충) 및 인체에 미치는 환경독성 평가

- 농촌진흥청 국립원예특작과학원에 민원의뢰시험을 통하여, 신규 식물추출물의 해충에 대한 약효를 방제가 = [(무처리 생충율 - 처리구 생충율)/무처리 생충율] 로 산출하여, 시험자료 확보
- 농촌진흥청 국립원예특작과학원에 민원의뢰시험을 통하여, 파프리카에 대한 약해를 시험약제 처리 후 1, 7, 15일 각각 약해를 달관 조사하여, 시험자료 확보
- 주요해충의 생물적 방제에 이용되고 있는 천적군에 대해 LC<sub>50</sub>값을 산출하고, 해충 방제 유효농도에서의 이동 및 섭식능력의 변화를 EthoVision 영상추적 시스템을 이용하여 실험실에서 평가함.
- 천적들의 아치사 농도에서의 이동 및 섭식능력의 변화를 Harmonic Radar를 이용하여, 실제 포장 환경에서 추적 평가함.

□ 기존의 친환경농자재(예, 주관기관의 피톤치드 기반 약제)와의 synergism 달성을 위해 신규물질의 작용기작을 규명하고 최적의 혼합 formulation 개발

- Activity-guided fractionation을 통한 유효성분 분리 및 규명
- 천연물 기반 추출물 및 유효성분의 해충 제어 효능 규명
- 선별된 소재가 곤충의 핵산합성, 세포분열, 세포호흡, 단백질합성, 지질합성 및 세포막 유지, 세포벽 합성, 신호전달에 미치는 영향 및 작용기전을 규명

□ 신규 친환경농자재에 대한 병해충의 저항성 발현빈도 예측 및 저항성 관리 매뉴얼 개발

- 각 해충별 LC<sub>50</sub> 농도로 기존약제 와 신규 추출물을 실험실에서 지속적으로 처리, 누대 사육하여, 매 3세대마다 저항성 발현 정도를 모니터링하고, 이를 실제 포장에서의 약제 처리농도 및 횟수에 적용하여, 저항성 관리 매뉴얼을 작성
- 각 해충의 cytochrome P450s gene 발현과 약제저항성간의 상관관계를 이용하여, 지역적 저항성 모니터링 장기 수행

□ 신규 친환경농자재 및 혼합제제 생산체계를 주관기관에 구축하고, 과채류 농업인의 신기술 도입을 장려하기 위한 경제성 분석 및 교육프로그램 개발

- 대량생산공정 확립에 따른 시제품 생산

- 제품 생산을 위한 디자인 및 포장재 개발
- 마케팅 자료 수집 및 마케팅 전략 수립
- 시제품 생산에 따른 제품 판매
- 파프리카 생산 농가에 신규 친환경농자재에 대한 홍보 및 사용 방법 교육
- 수출성과 추적을 통한 경제성 분석 및 시장성 분석

## 2. 국내외 기술개발 현황 (주관기관)

코드번호	D-04
------	------

### □ 국내외 제품 생산 및 시장현황

- 우리나라에서 상표등록이 되어 시중에서 판매되고 있는 생물농약은 총 28종임. 살균제와 살충제가 각각 14개인데, 이 가운데 국내 제조되는 것은 17개이고, 나머지 11개 제품은 수입제품임.
- 생물농약을 생산하는 업체는 총 14개사임, 살균제는 7개 회사에서, 살충제는 11개 회사에서 수입 또는 제조되고 있음.

[표 14] 국내 생물농약 등록 현황

구분	상표명 수			등록업체수		
	수입	제조	계	수입	제조	계
살균제	4	10	14	2	5	7
살충제	7	7	14	6	10	16
계	11	17	28	8	15	23

\*출처: 농촌진흥청 홈페이지

### □ 국외 제품 생산 및 시장현황

- 생물농약의 중요성에 대한 합의가 세계적으로 이뤄지고 있음에도 불구하고 여전히 산업화는 저조함. 전 세계적으로 등록된 생물농약은 188여종이며, 이 중 살충제가 136종, 살균제 29종, 제초제 10종 그리고 생장조절제와 기타 생물농약이 각각 7종임. 이미 실용화된 것은 미생물농약이 약 60종으로 가장 많고, 생화학농약이 45여종, 천적이 40여종임.
- 세계 생물농약시장의 규모는 약 7억 달러임. 이는 전체 농약시장 약 2,800억달러의 2.5%에 불과한 수준임. 그러나 전 세계적인 친환경 농업의 확산에 힘입어 생물농약시장은 비교적 빠르게 성장해오고 있음.
- 선진국에서는 농약의 환경안전성에 대한 인식의 증가로 1980년대로부터 살균, 살충, 제초활성이 높은 천연물을 찾으려는 연구가 진행되었음. 연구결과 식물체내 주요 살충활성 물질은 주로 Phenol, trepenoid, alkaloid 계통의 화합물이 주성분을 이루고 있다는 것을 밝혀내었고, 그 이후 선도화합물을 찾으려는 연구가 활발히 이루어지고 있음

- 식물체의 활성성분으로부터 유래되어 상용화된 농약으로는 제충국 꽃을 이용한 pyrethrin, 인도산 님나무 열매에서 추출한 azadiractin, 콩과식물 데리스의 괴경과 뿌리에서 추출한 rotenone, 백합과 식물 종자를 이용한 sabadilla, 열대성 관목 *Ryania speciosa*의 줄기분말에서 추출한 ryania 등이 있으며 많은 해충의 살충 및 기피효과가 밝혀짐.
- 최근 국내에서도 식물자원으로부터 병해충 활성물질의 탐색 및 유효성분의 분리·동정연구가 이루어졌고(Park 등, 2002; Lee 등, 2000), 홀아비꽃대로부터 벼도열병과 붉은 녹병 방제효과가 높은 shizukanol(박 등, 2004), 할미꽃으로부터 살초물질인 anemonin(최 등, 2003)을 분리·동정함.
- 천연물을 이용한 살균, 살충활성연구가 많은 연구가에 의해 이루어졌음에도 불구하고 균일한 제품 생산을 위한 활성성분의 표준화, 원료확보, 대량생 체계, 경제성 등의 문제로 상업화된 사례는 많지 않은 편임. 특히 국내에서는 잣나무 추출물의 구조분석이나 활성연구에 대한 연구는 전무한 실정임.

## 2. 국내외 기술개발 현황 (제1협동)

코드번호

D-04

### □ 파프리카 방제 관련 기술의 현황

- 여타 온실재배 가지과 작물과 마찬가지로 재배기간 연중 병해충에 취약함.
- 2013년 기준, 국내 수출단지 파프리카 재배온실에서 병원체는 총 21종, 해충은 15종이 보고됨 (김기돈 외 2013).
- 국내 파프리카 병해충에 대한 연구는 고추를 비롯한 다른 가지과 작물에 비해 연구가 많이 미흡한 실정이며, pyrethroid 및 neonocotinoid계 합성화학농약 기반 해충관리가 방제의 근간을 이루고 있음 (유용만 외 2011, 김기돈 외 2013).
- 이러한 합성농약의 사용은 생태계오염, 통관과정에서의 잔류농약문제, 약제저항성 문제를 야기 시키기 때문에, 최근 생물적 방제 및 통합적 방제에 대한 국내외 연구가 빠르게 증가하는 추세임 (Paulitz & Belanger 2001).
- 특히, 과채류 온실재배에서 선도적 기술을 보유한 네덜란드의 경우 파프리카 병해충 관리에 있어서, 2000년대부터 적극적으로 화학적 방제에서 생물학적 방제로 기술전환을 이루고 있는 상태임 (Bakker 2008) (그림8).



<그림 8> 네덜란드 유기농 생산농가에서 파프리카를 포함한 과채류 친환경 생산에 농약사용 저감을 위해 이용되고 있는 천연물 기반 생물학적 방제 기법들

### □ 친환경농자재의 국내 관련기술 현황

- 현재 우리나라 친환경농자재 시장규모는 약 8천억 원 정도로써 4백 50만 톤에 이르고 있음 (표19).
- 친환경농자재 시작은 비료, 농약, 농기계의 3대 농자재에 비해 작은 규모임.
- 하지만 지속적인 수요확대를 가정했을 때 그 시장은 매우 크게 성장할 것이라고 기대됨.

종류	유기질 (유박)	부산물 (퇴비)	천적	미생물 (토양+농약)	천연광물 (키토산 등)	목초액 (목탄)	유기상토	토양개량제 (석회규산)	계
규모 (천톤)	1,614 (364)	3,239 (3,343)	150 (0.40)	125 (0.33)	800 (2)	244 (14,1)	956 (552)	881 (232)	8,009 (4,508)

<표 19> 친환경농자재 생산현황 (단위 : 억원)(한국농촌경제연구원)

- 농과원에서는 식물생육에 관여하는 휘발성 미생물이 생산하는 활성물질에 대한 소재를 개발하려는 단계임.
- 팜한농에서는 식물의 면역 활성을 높여주는 근권 미생물 선발 및 이를 이용한 작물

병 생물학적 방제 효능을 측정하여 생물제제 상용화를 이루고 있음.

- 또한 나노스페이스는 제초제의 나노복합화를 통한 pH 대응형 용출제어 복합소재를 개발하여 현장평가 중에 있으며, 약용 나노복합전달소재는 기술개발을 이미 완료하였다고 발표하였음.
- 국내에서는 은나노의 항균효과가 알려지면서 이를 이용한 감귤저장병 방제 시스템을 개발하고 있으며, 실제로 농가에 은나노를 살포하여 감귤저장병 진전이 억제되었다고 보고하였으나 아직까지 초보적이 단계에 있으며 실용화까지는 많은 연구 및 개발이 필요한 상태임.
- 층산삽입(intercalation) 나노복합체의 담체 역할을 하는 천연점토는 자연으로부터 유래된 환경 및 생태계 친화형 무기담체로써 유용성분의 담지에 사용할 수 있는 최적의 무기소재이며, (주)나노스페이스에서는 제약용, 화장품용 및 정밀화학용 기능성 원료를 천연소재인 층상점토화합물과의 인터칼레이션(intercalation)반응을 이용한 복합화를 통해 활성물질의 안정성(stability), 안전성(safety), 용해도 (solubility), 및 제어방출(controlled releasing)을 조절 할 수 있는 소재를 개발, 다양한 분야에서 응용제품을 개발하고 있음.
- 또한, 제초제인 파라쿼트(paraquat)를 층상점토화합물에 층간 삽입시키고 표면을 pH 대응형 고분자로 코팅함으로써 산성조건에서는 제초제 성분의 용출을 억제하고, 중성 및 염기성 조건에서는 활성성분을 축진 할 수 있는 전달소재를 개발하여 현재 현장 평가진행 중에 있으며, 활성물질의 층간삽입에 의한 나노복합체를 제공함으로써 파라쿼트의 안전성을 획기적으로 개선하면서도 고유의 약리효과를 유지할 수 있는 신개념의 소재를 창출하였음.
- 본 과제에서 수행하고자 하는 국내산 잣나무피톤치드와 천연물을 기반으로 하는 방제물질과의 혼합추출물 상용화 기술은 (주)피러스에서 선발한 휘발성 피톤치드와 식물(herbal plant) 기원 특정 휘발성분으로서 최적화 혼합비율에 따라 기존의 잣나무 피톤치드의 방제효과를 최대화 시킬 수 있는 방제활성을 보유하고 있음.
- 이와 같은 고효성도의 피톤치드 복합체는 아직 개발되지 않은 상태이며, 개발여하에 따라 친환경 농업용 복합제제로서 유기합성농약과는 달리 환경에 대해 부담을 주지 않고 작물에 독성이 잔류하는 등의 부작용 없이 병해충 방제 등의 목적으로 다양하게 사용될 것으로 기대됨.

#### □ 친환경농자재의 국외 관련기술 현황

- Eden bio science는 병저항성을 유도하는 hrp 단백질을 대량생산하여 농작물의 면역기능 증강제를 개발하였으며, 식물생육촉진 및 식물병 방제제로 산업화되고 있음 (표2).
- 또한 온도 반응형 완효성 비료를 개발 상용화 하여 완효성비료(Chisso-Ashai Fertilizer) 시장을 선도하고 있음 (표2)
- 과수에서는 천연물질 및 미생물농약을 사용하여 제한적인 유기농과수를 재배하고

있으며, 미국이 사과 17,272ac, 배 2,789ac로 가장 많고, 유럽이 사과 8,675ac, 배 3,665ac로 각 선진 국가에서는 천연물질에 대한 연구를 활발하게 진행하고 있음.

- 미국 및 유럽의 경우 미생물 기반 *Beauveria bassiana* 및 식물 추출물 Neem-product등이 친환경 농산물 재배에 이용이 확대 중이지만, 비싼 가격과 유기 합성농약 대비 낮은 방제 효율로 현장적용에 어려움이 따름.
- 특히 미국에서는 사과 검은별무늬병 방제를 목적으로 식물추출물을 이용한 연구가 활발하게 수행중에 있으며, 스위스에서는 배 검은별무늬병을 방제하기 위하여 담쟁이덩굴 추출물을 이용하여 연구를 진행하고 있음.
- 미국에서는 *Pseudomonas syringae* ESC-10, -11에 속하는 두개의 균주를 개발하여 Bio-Save<sup>®</sup>로 상품화하였으며, 수확 후 발생하는 부패병에 대한 생물적 방제 수단으로 우수한 효능이 나타내고 있음 (표2).
- 특히, Bio-Save<sup>®</sup>는 생물적 방제가 어려운 실외 포장에서 처리하지 않고 실내에서 처리가 가능하여 월등한 효과 증진을 가져왔으며 냉동건조를 통한 제품화에 성공하여 널리 시판되고 있음.
- 최근 Chlorine와 ClO<sub>2</sub>가 세균인 *Bacillus cereus* 와 *B. thuringiensis* 세포 치사에 효과적이라고 보고되었으며, 이러한 인체에 해가 없는 물질을 이용하여 소비자에 신선한 생과일과 야채를 공급하기 위한 제품 개발이 주를 이루고 있음 (표2).

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
농업과학기술원	- 식물생육에 관여하는 휘발성 미생물 생산 활성물질의 개발 - 식물의 면역 활성을 높여주는 근권 미생물의 선발 및 이를 이용한 작물병 생물학적 방제	- 개발중 - 식물의 면역기능활성화를 일으키는 생물제제의 생산 및 상업화 (동부한농)
Eden bio science	- 병저항성을 유도하는 hrp 단백질을 대량생산하여 농작물의 면역기능 증강제로 개발완료 됨.	- 식물생육촉진 및 식물병 방제제로 산업화됨
(주)나노스페이스	- 제초제의 나노복합화를 통한 pH 대응형 용출제어 복합소재 개발 - 제약용 나노복합전달소재	- 현장평가 진행 중 - 기술개발완료/기술이전 완료
Chisso-Ashai Fertilizer	- 온도 반응형 완효성 비료	- 완효성비료 시장 선도

<표 20> 친환경농자재 주요 관련기술 현황

### 3. 연구수행 내용 및 결과 (주관기관)

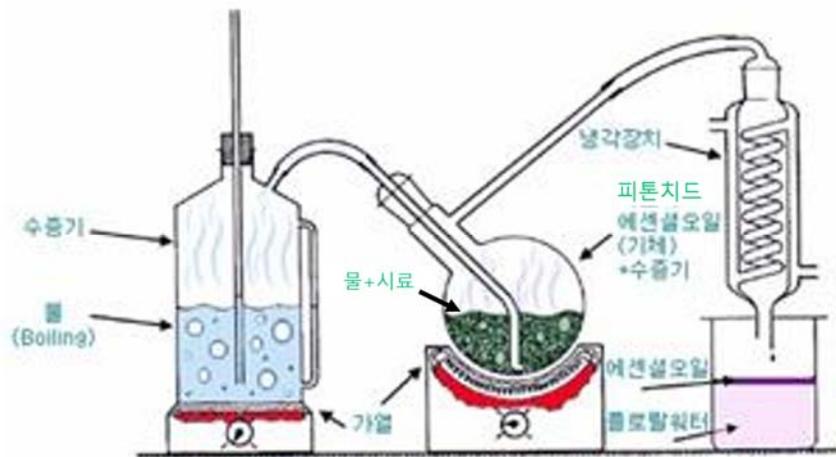
		코드번호		D-05
세부연구목표	구분 (연도)	연구개발 수행내용	연구수행 방법	연구결과
잣나무 추출 피톤치드 기반 혼합추출물을 이용한 수출용 파프리카의 친환경 해충방제제 개발	1년	신규 혼합추출물에 사용될 식물체 스크리닝	스크리닝	문헌조사 등을 통하여 장미과, 녹나무, 약모밀, 꿀풀과, 운향과 식물 중 신규 식물체 선정
		신규 혼합추출물의 최적추출공정 개발 및 유효성분 구명/지표성분 설정	GC-MS Activity-guided fractionation	- Activity-guided fractionation을 통한 유효성분 분리 - 개별 추출물의 유효성분 분석 및 지표성분 설정 - 피톤치드 및 식물추출물의 혼합비율 설정 (1:9~9:1) - 신규 혼합 추출물의 유효 및 지표성분 설정
신규 혼합추출물의 표준화	2년	- 최적추출공정에 따라 생산된 신규 혼합추출물의 지표성분 함량분석 - 지표성분 함량 분석에 따른 신규 혼합추출물의 표준화	GC-MS	-신규 혼합물의 지표 성분 알파피넨, 베타피넨
신규 혼합추출물의 기반으로 하는 시제품 생산		- 유효성 평가 및 안전성 평가를 위한 표준화된 최적추출공법으로 생산된 신규 혼합추출물을 기반으로 하는 시제품 생산	homgenager SEM	-서방성 제형 microcapsulation화
시제품의 안전성 평가		-세포독성시험 - 급성 경구독성시험	세포독성 급성경구	세포독성 시험 급성경구 독성시험
주요 해충에 대한 친환경 해충방제제 개발	3년	신규 혼합추출물을 기반으로 파프리카 방제제 개발		신규 친환경 농자재의 파프리카 방제제 개발
신규 친환경 농자재 생산 체계 구축 및 최적공법 메뉴얼화		신규 혼합추출물 대량생산공정 확립		대량 생산 공정 확립
잣나무 피톤치드 및 천연물 기반 혼합추출물의 안전성 평가		유기농자재 허가등록위한		신규 친환경 유기농자재 허가 등록을 위한 성적서

○신규 혼합 추출물에 적용할 식물체의 스크리닝

- acyclic monoterpenoids 함량이 높은 장미과, 녹나무(후박; 한약재명), 약모밀, 꿀풀과, 운향과 식물 중 방제효과가 뛰어나 피톤치드의 방제효과를 극대화시킬 수 있는 식물체를 선정함.

○ 신규 혼합추출물의 최적추출공정 개발

- 본 연구에서 사용되는 피톤치드는 잣송이에서 잣을 탈각 후 음건하여 2~3cm 크기로 절취한 후 1,000g을 둥근 플라스크에 넣어 증류수 2,000ml 와 1~2분 동안 균질화 시킨 후 증류하였음
- 증류온도는 100±3℃로 유지하면서 정유가 휘발되어 나오지 않을 때까지 30분 동안 증류시켰고, 증류로 얻어진 용액을 비중에 의하여 오일상과 수상이 분리되는데 상등액인 피톤치드 오일을 분리하여 냉장 보관하고 실험에 사용함



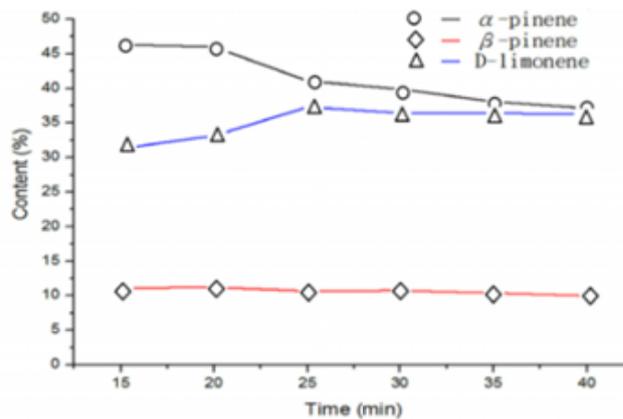
<그림 9> Water-Steam distillation for the extraction of phytoncide component from pine cone waste

- 본 연구에서 사용되는 JS 용액은 JS 잎과 줄기를 음건하여 2~3cm 크기로 절취한 후 1,000g 대비 10L 용량의 60% EtOH로 24시간동안 침지하여 추출하였음
- 추출된 JS 용액은 filtering을 거쳐 불순물을 제거한 후 냉장보관하여 실험에 사용함
- 본 연구에서 사용되는 MS용액은 기존에 국내에 보고되지 않았던 곰팡이 균주를 사용한 배양액으로서 MS 균주는 토양속에서 뿌리혹선충을 사멸시킴으로서 식물의 건전한 생장을 유지하게 도와주는 균주임
- 병원균에 감염된 식물체에서 MS 균주를 분리 → 배지조성 → 1차 종균배양: 500mL 삼각플라스크에 100mL의 배지를 넣고 살균 후 agar plate에 생육시킨 균체를 잘게 잘라 접종하여 30℃, 150rpm에서 3일간 배양 → 2차 종균 배양: 2L 삼각플라스크에 500mL의 배지를 넣고 살균 후 1차 종균 배양액을 접종하여 30℃, 150rpm에서 3일간 배양 →

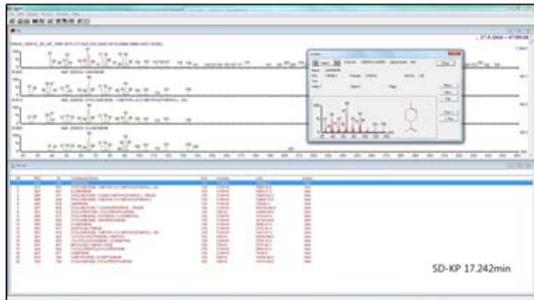
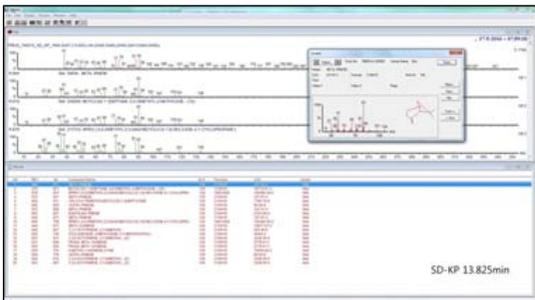
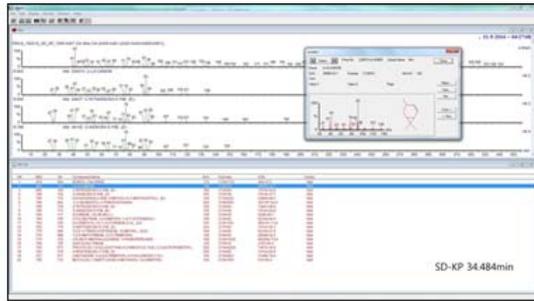
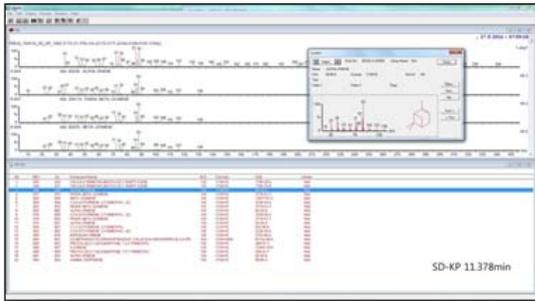
본배양

- 배양액을 filtering을 거쳐 불순물을 제거한 후 냉장보관하여 실험에 사용함
- 본 연구에서 사용되는 GS 용액은 GS의 순을 음건하여 2~3cm 크기로 절취한 후 1,000g 대비 10L 용량의 60% EtOH로 24시간동안 침지하여 추출하였음
- 추출된 MS 용액은 filtering을 거쳐 불순물을 제거한 후 냉장보관하여 실험에 사용함
- 본 연구에서 사용되는 PL용액은 일반적으로 증류되어 사용되는 2차 증류수를 플라즈마처리 하여 filtering을 거쳐 불순물을 제거한 후 냉장보관하여 실험에 사용함
- 본 연구에 사용된 신규혼합추출물 후보물질들(OO-408)은 상기에 표기된 추출방법을 통하여 추출된 피톤치드 오일과 OO용액을 5:5 비율로 혼합하여 방제효과 평가에 사용하였음
- JS408의 경우 우수한 방제효과를 보이나 약해평가에서 약해가 나타나며, 60% EtOH 추출물이므로 에탄올로 인한 약해라고 사료됨
- 최적 추출시간

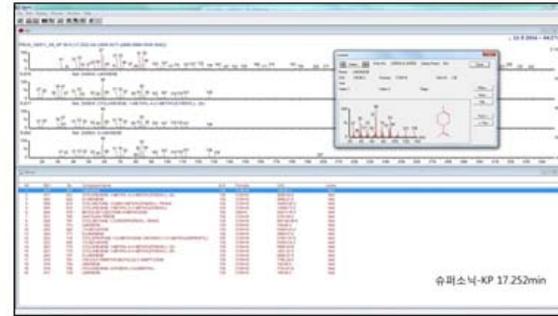
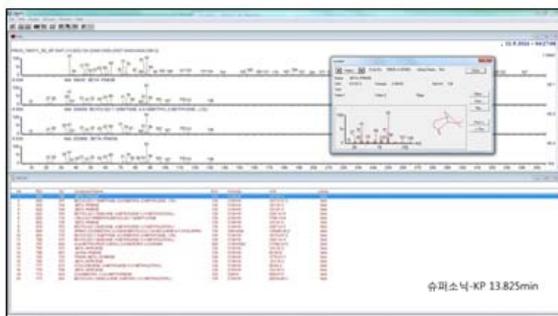
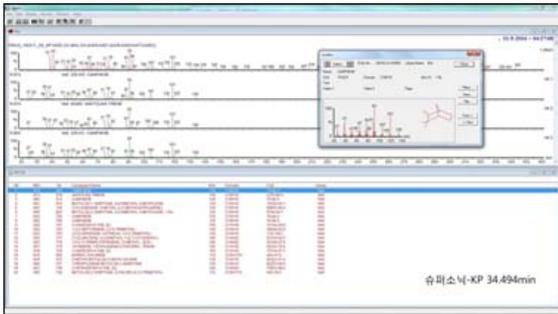
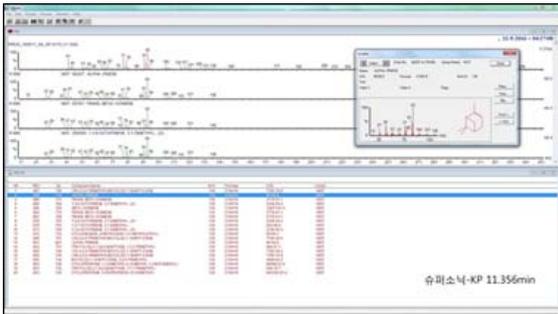
Compounds	15 min (%)	20 min (%)	25 min (%)	30 min (%)	35 min (%)	40 min (%)
$\alpha$ -pinene	46.31	45.98	41.08	39.89	38.08	37.13
camphene	0.87	0.83	0.75	0.76	0.72	0.75
$\beta$ -pinene	11.1	11.23	10.69	10.78	10.41	10.01
$\beta$ -myrcene	3.95	4.14	4.07	4.12	3.97	3.9
3-carene	3.02	3.05	3.02	3.23	3.22	3.19
D-limonene	31.3	33.15	37.3	36.46	36.43	36.24
(+)-4-carene	0.29	0.25	0.29	0.39	0.42	0.42
Bornyl acetate	0.63	0.29	0.62	0.86	1.33	1.59
Tricyclo(5.4.0.0(2,8)undec-9-ene, 2,6,6,9-tetramethyl	0.26	0.12	0.25	0.34	0.5	0.58
$\alpha$ -Cubebene	0.3	0.14	0.25	0.4	0.59	0.71
Seychellene	1.16	0.48	0.97	1.6	2.44	3.02
Caryophyllene	0.8	0.34	0.71	1.17	1.89	2.46
total	99.99	100	100	100	100	100



- 수증기 증류 법을 이용한 추출로 시간대 별 분석치 결과 주요 지표 성분의 함량이 25분 30분 경과 후 함량 변화가 없으므로 시간대 30분 설정이 경제적, 성분 효능 면에서 최적.
- 지표 성분 분석 (SD추출법)



- 지표 성분 분석 (Super sonic추출법)



초음파 추출과 수증기 증류 추출법 결과 지표 성분의 함량 변화가 수증기 추출법이 유효

- 피톤치드유효성분 분리 실험 (지표 성분)

- 식물 중에는 테르펜(Terpenoids)류와 같은 방향성인 화학물질을 분비하는 경우에는 곤충이 식물을 기피하는 효과와 식물을 섭취하여 저해시키는 효과가 있다.

식물들은 왜 이러한 독특한 물질을 분비하는 것일까? 모든 살아있는 생물체들은 저마다의 방식으로

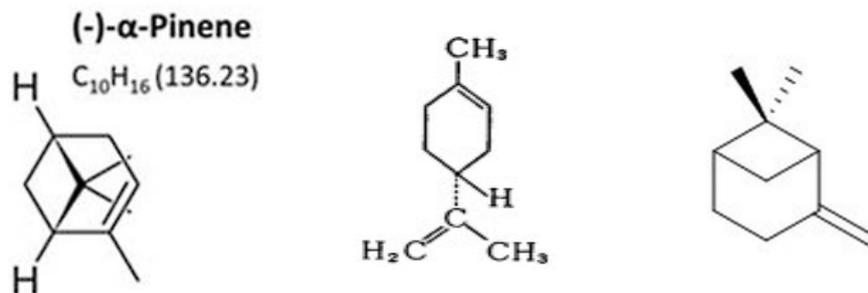
자기 자신을 보호하는 도구와 방법이 있다. 고정된 뿌리만을 땅속깊이 내리고 살아가는 식물인 수목들은 이동할 수 없기 때문에 자신을 보호 및 방어할 수 있는 물질을 만들어 분비하여 살아가고 있다. 곤충이나 작은 동물과 같은 해충방제를 위한 생리활성 물질연구 동향을 관찰하면 살충력을 이용하여 해충을 구제하게 된 것은 기원전으로 거슬러 올라가서 생각하게 된다. 예를 들면 담배분말 제충국(인체에 무해한 천연 살충제) 및 데리스뿌리(친환경 병충해를 위한 살충제) 등이 우수한 천연 살충제로 등장하였다. 오늘날에는 유기합성 농약은 잔류독성 및 환경오염 저항성 해충의 출현 등의 부작용으로 심하게 제한을 받고 있다. 이에 유기합성 농약을 대신할 새로운 물질 개발에 많은 연구가 진행되고 있다.

수목들은 주위의 해충이나 미생물로부터 자기 자신을 방어하기 위하여 공기 중이나 또는 땅속에서 발산하는 향생물질을 총칭하여 피톤치드(Phytoncide)라는 물질을 발산하는데 이것은 항균작용 소취작용 진정작용 스트레스해소작용 등 수많은 기능을 하는 것으로 알려져 있다 특히 피톤치드의 항균살균작용은 아토피 피부염까지 개선하는 효과도 나타나고 있어 각종 공해물질에 노출되어 있는 현대인들에게는 건강을 지켜주는 파수꾼 역할을 해준다고 알려져 있다

삼림욕으로 얻을 수 있는 피톤치드와 테르펜류의 두 종류는 각각 그 기능이 달라 피톤치드는 주로 식물이 미생물에 대항하기 위한 항균작용을 하는 반면 테르펜류는 피톤치드 역할을 하면서 동시에 식물 자신을 위해 각종 곤충을 억제하고 다른 식물의 성장을 방해하는 등의 복합적인 작용을 한다.

연구에 따르면 해충의 경우 식물정유에서는 anise와 caraway oil이 1000 ppm의 농도에서 각각 92.1%, 92.2%로 높은 기피율을 나타내었으며, monoterpenoid에서는 hexanoic acid와 limonene이 1000ppm에서 각각 79.1%와 87.8%의 기피효과를 나타내었다. 한편 fenprothion과 pyridaben저항성 계통에 대해서 hexanoic acid는 각각 77.8%과 83.3%의 기피효과를 나타내었다. 그러나 두저항성계통에 대한 limonene (1,000ppm)의 기피효과는 각각 17.8%와 10.0%로서 감수성계통에 대한 기피효과와 상반된 결과를 나타내었다는 연구결과를 토대로 유효성분을 통한 유해 해충의 살충효과에 대한 자체실험에서도 알파-피넨과 베타-피넨, D-리모넨이 가장 높은 살충효과를 보임을 확인함으로써, 해당 유효성분을 지표성분으로 설정 후 병해충 방제제에 해당 지표성분 함량이 가장 많이 발생하는 추출시간대를 확정함으로써 살충력을 높이고자함.

우리나라에서도 각종 곤충이나 거미와 같은 작은 동물 등의 병충해를 막을 수 있는 유기농약과 같이 친환경적인 테르펜류와 같은 신 물질을 개발할 수 있다면 해결할 수 없는 많은 것이 친환경적으로 해결될 것이다.

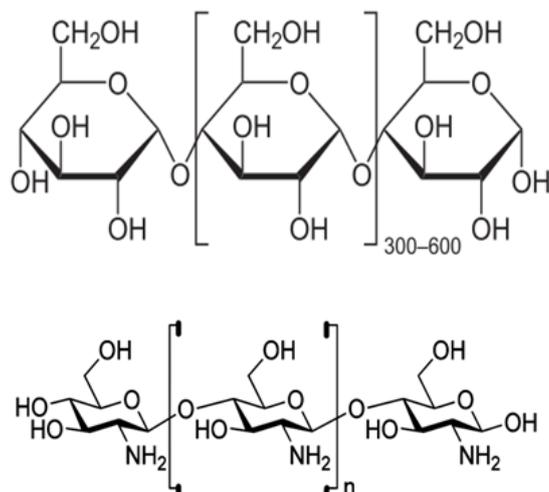


[그림 1] 알파피넨, 리모넨, 베타 피넨 분자구조식

평가항목 (주요성능 spec)	단위	전체항목에 서 차지하는 비율(%)	세계최고수준, 보유국/보유기업 (A사/국가명)	연구개발 전국 내 수준 (B사)	목표치	결과치	달성도 (%)	평가방법
			성능수준	성능수준				
1.캡슐사이즈	μm	20	10이하	50이하	10이하	4.424	100	Zeta Potential
2.캡슐화효율	%	20	30이상	20	35이상	46.9	100	Gas chromatograph
3.완효성	day	20	100	60	100	100	100	UV-spectrophotometer
4.식물병방제율	%	20	60	50	60	80.1	90	
5.병생물검정	%	20	60	50	60	88.6	90	

계면활성제	계면활성제질량(피톤치드 10g기준)	상분리 상태(1개월 후)
Tween 80	0.1g	O
Tween 80	0.5g	X
Tween 80	1g	X

- 캡슐화에서 가교제의 역할은 캡슐의 두께와 물리적 강도 입자 사이즈 서방성 확인 결과 목표치에 도달



가교제	중류수 용해 후 농도	질량	캡슐액 상태
Citric acid	4%	5g	Gel
Citric acid	5%	5g	Gel
Citric acid	6%	5g	Gel
Citric acid	7%	5g	Liquid
Citric acid	8%	5g	Liquid
Citric acid	7%	10g	Liquid
Citric acid	7%	15g	Liquid→Gel

- 분산성:트윈의 최적 유화 비율 설정

유화안정제	양	상 분리 상태	응집 현상
PVA 4%	10g	X	O
PVA 4%	15g	X	O
PVA 4%	20g	X	O
PVA 4%	25g	X	X
PVA 4%	30g	X	X

분산매	양	상 분리 상태	응집 현상
피마자유	1ml	X	X
피마자유	2ml	X	X
피마자유	3ml	X	X

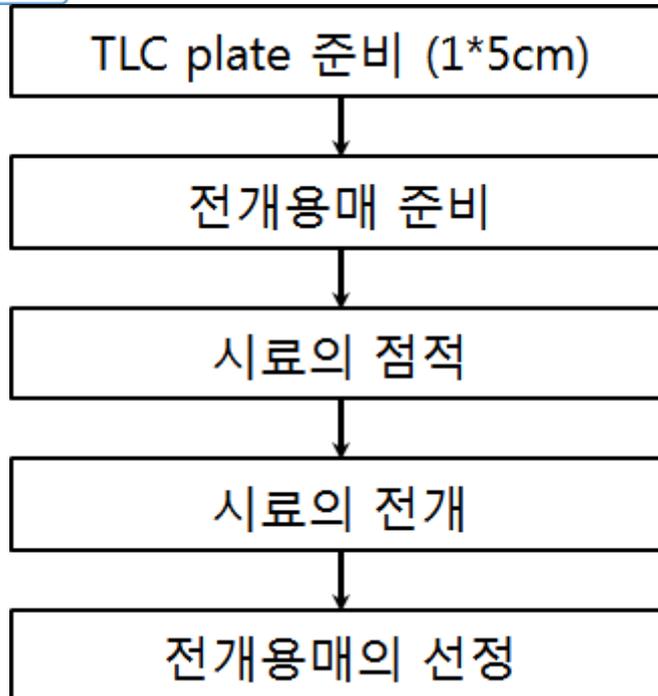
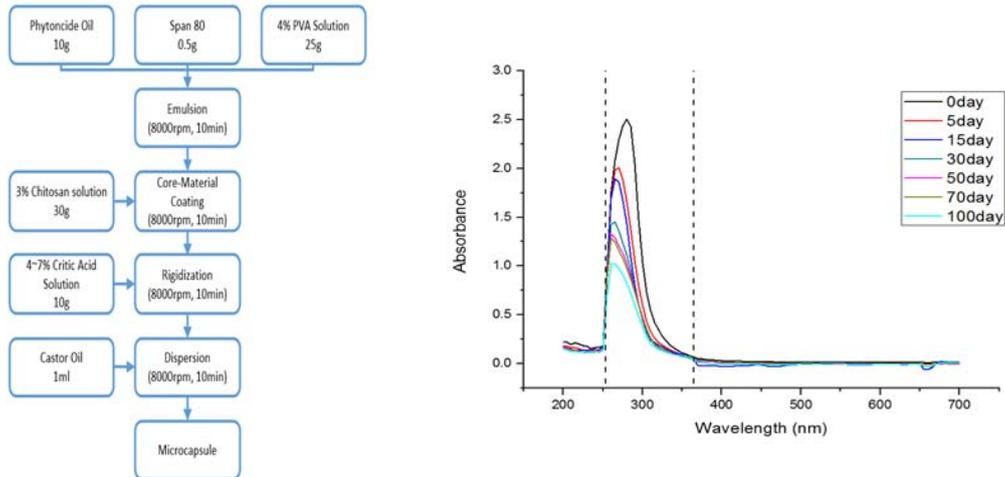
분산매	양	상 분리 상태	응집 현상
피마자유	1ml	X	X
피마자유	2ml	X	X
피마자유	3ml	X	X

- 서방성, 제형화 모식도

- 피톤치드 복합체가 높은 휘발성으로 인해 산업에 적용하기 위해서는 서방성 제어 꼭 필요
- 피톤치드의 방출 제어를 통해 생분해성과 친환경 소재인 PVA와 키토산의 특성을 활용

○ 신규 혼합추출물의 유효성분 구명 및 지표성분 설정

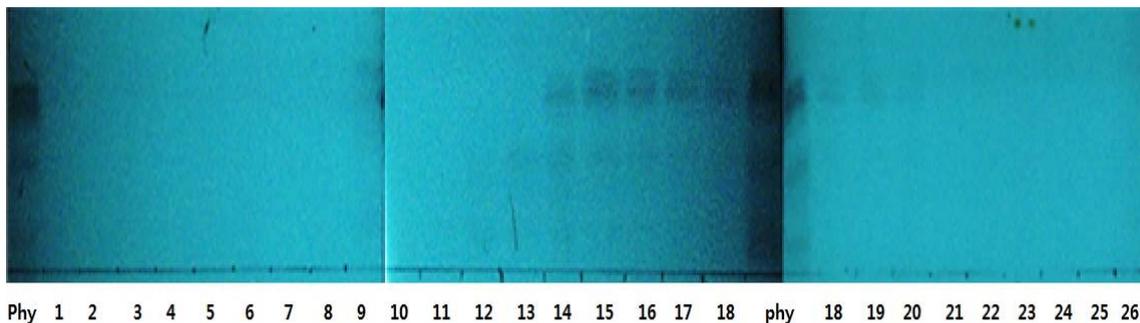
- 잣나무 피톤치드의 활성성분을 분리하기 위하여 Column Chromatography를 실시하였음
- Column packing 물질은 silicagel 60(MERCK, Korea)을 사용하였고, TLC plate는 TLC Silica gel 60 F254(Millipore, Germany)을 사용하였으며, 1차적으로 전개용매의 선정 절차를 아래 그림에 나타내었음



<그림 10> Process of selection of deployment solvent

- 전개용매의 선정을 위한 실험에는 표준 시료로 sigma 사에서 구매한  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene을 사용하였으며, 분리실험에서는 전개용매로는 90% 메탄올(Sigma. USA)을 사용하였음
- 전개용매의 선정실험을 통하여 90% MeOH를 적정 지표 물질 확인을 위한 전개용매 선정되었고, 수증기 증류법으로 30분간 추출한 피톤치드 17mg을 이용하여 Column Chromatography 실험을 아래의 순서로 진행하였음
  - 1) 메스실린더에 솜을 넣고 알코올로 고정 시키기 위해 흘려보낸다.
  - 2) silicagel 60 약 300 g 을 90% 메탄올 500밀리 정도로 활성화 (silica는 시료의 약 15배 사용)시킨 후 추가로 1 L 정도 만들어서 흘려보낸다.
  - 3) 수평을 잡는다.

- 4) 상단부가 건조해지기전 더이상 안내려갈 때
  - 5) 오일을 넣고 상단이 건조하지 않은 상태에서 (하단까지 흘러간 후) 전개용매 메탄올 90%을 2L 넣는다.
  - 6) 8~10분 간격으로 고정 콜렉터 사용하여 시료를 받는다.
- 시간대에 따라 모은 6종의 시료를 순서대로 P1부터 P6으로 명명하였다.
  - 잣나무 오일을 전개용매 90% MeOH로 silica gel column chromatography 하여 6개의 fraction(P1~6) 으로 나누고, 각 fraction의 시료들인 P1은 1~4 lane, P2는 5~8 lane, P3은 9~13 lane, P4는 14~16 lane, P5는 17~19 lane 및 P6은 19~26 lane에 점적하였고, 전개를 진행시키고 UV lamp로 확인하였을 때, 아래의 사진과 같은 결과를 얻을 수 있었음



<그림 11> 분리된 물질의 이동상

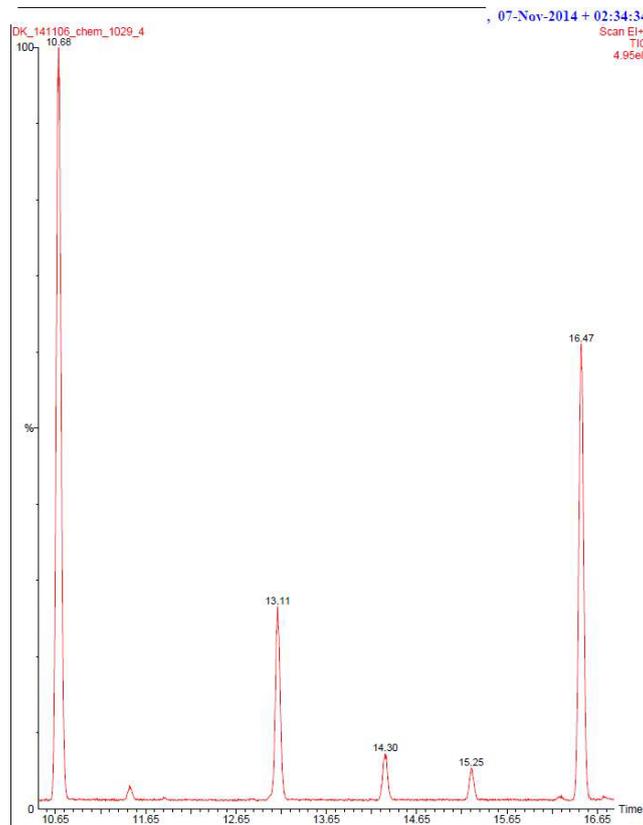
- UV lamp를 통하여 확인하였을 때 P4 의 시료에서 확실한 band가 관찰되었으며, Phy lane(분리되지 않은 total 잣나무 오일)과 비교하여 보았을 때에도 P4가 점적된 14~16 lane 에 Phy lane과 동일한 이동상의 유효 성분을 확인할 수 있었음
- 17~19 lane 에서도 가장 먼 이동상의 밴드가 나타났고, P5 시료에서도 약간의 유효성분이 있음을 확인할 수 있었으며, 따라서 P4, P5 시료에 있는 물질을 지표성분으로 선정하였음
- 분리된 sample P4와 sample P5의 GC/MS 분석을 진행하였으며, P4 시료의 GC peak를 그림 26에, P5 시료의 GC peak를 아래 사진에 나타내었음
- 시료 10 $\mu$ l 와 990 $\mu$ l 에탄올을 용매로 첨가하여 1ml로 용량을 정량한 후 아래 표의 분석 조건에 따라 GC/MS를 이용하여 피톤치드의 조성을 분석하였으며, 조성 분석은 표준용액 및 Wiley 275 Library 의 mass spectrum data 와 표준시약의 retention time 을 비교하여 확인하였음

GC/MS	GC/MS-QP2010, Shimadzu, Japan	
Column	DB-5, 30m length x0.25mm ID x 0.25 $\mu$ m thickness (Agilent)	
Mass range	40 ~ 350 m/z	
Inlet Temp.	250 $^{\circ}$ C	
Ion source Temp.	320 $^{\circ}$ C	
Temp. program	40 $^{\circ}$ C(3min) $\rightarrow$ 2 $^{\circ}$ C/min $\rightarrow$ 150 $^{\circ}$ C $\rightarrow$ 4 $^{\circ}$ C/min $\rightarrow$ 200 $^{\circ}$ C(10min)	
Carrier gas	He gas, 1.5ml/min	
Injection volume	1.0 $\mu$ l	
Spilt ratio		20:1
Ionization	EI(electron impact), 70eV	

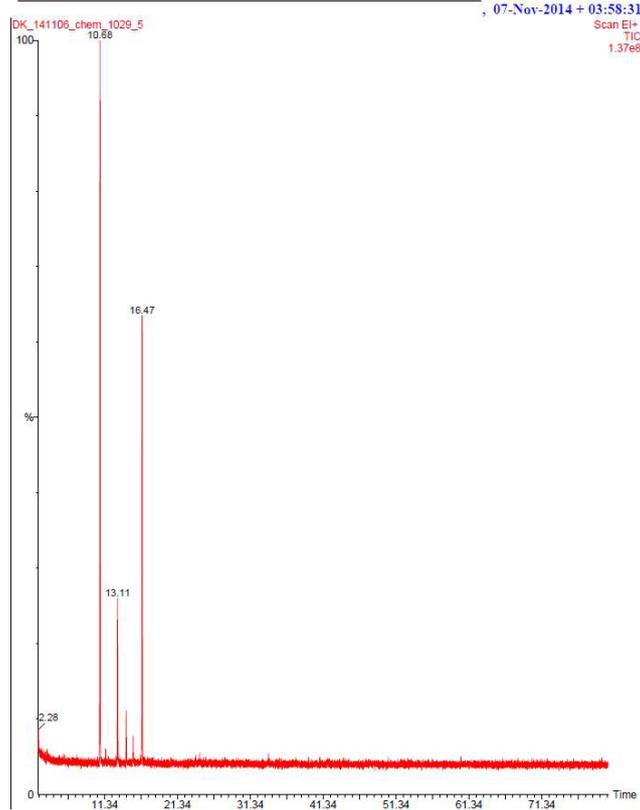
[표 21] Condition of GC/MS for analysis phytoncide by Steam distillation

- 신규 혼합추출물의 표준화
  - 최적혼합비율 설정에 따른 지표성분 함량 분석 (피톤치드 3종, 빈랑 1종, 신규 식물 2종)
  - 피톤치드 복합체의 표준화 확립의 따른 최적추출공정 개발
  - 유효성 평가 및 안전성 평가를 위한 시제품 생산 (액상)
- 신규 혼합추출물의 항균 활성 평가
  - 파프리카에는 바이러스병(담배모자이크, 오이모자이크 등), 시들음병, 역병, 잣빛곰팡이병, 줄기 및 과실 썩음병, 탄저병, 흰가루병, 풋마름병 등이 미생물로 인하여 발생함
  - 따라서 파프리카 작물에 가장 심한 피해를 주는 탄저병 및 잣빛곰팡이 병을 유발하는 *Glomerella cingulata* 와 *Botrytis cinerea* 에 대한 피톤치드 복합체의 항균활성을 Disk diffusion assay와 MIC assay를 통하여 항균 활성을 검정함
- 피톤치드 복합체의 안전성 평가
  - 사람유래 normal cell을 활용한 세포독성 시험
    - $\rightarrow$  NIH/3T3 fibroblast에 대한 세포독성 평가 (MTT assay)
  - 설치류 급성경구독성 및 급성경피독성, 잉어 급성어독성 확인
    - 1) 피톤치드 복합체의 급성경구독성시험
      - 동물종(계통) : SPF mouse (ICR)
      - 기초시험으로 수컷과 암컷 모두 투여량 5000 mg/kg로 설정하여 경구투여
      - 암수 각 5마리씩 10마리를 1개의 군으로 설정
      - 투여 당일 1~4시간까지 매시간, 익일부터는 매일 1회 일반중독증상을 14일간 관찰
      - 투여당일, 투여 후 1일, 7일 14일째 개체별 체중 측정
      - 관찰기간 종료 후 마취를 통한 내부장기의 육안적 이상 유무 관찰
    - 2) 피톤치드 복합체의 급성경피독성시험

- 동물 종(계통) : SPF rat (S.D.계)
- 기초시험으로 수컷과 암컷 모두 투여량 4000 mg/kg로 설정
- 암수 각 5마리씩 10마리를 1개의 군으로 설정
- 4x5cm 크기 면적의 거즈에 조제된 시험물질을 체중 측정치를 기준으로 소정 액량을 산출한 후 균일하게 도포한 후 채모된 부위에 의료용 반창고로 고정/유지 시킴.
- 24시간 후 시험물질의 제거 후 약물처리 당일 10분, 30분, 1시간에서 4시간까지 매시간, 익일부터는 매일 1회 일반중독증상을 14일간 관찰
- 약물처리 당일, 투여 후 1일, 7일 14일째 개체별 체중 측정
- 관찰기간 종료 후 마취를 통한 내부 장기의 육안적 이상 유무 관찰



<그림 12> GC Peak of Sample P4



<그림 13> GC Peak of Sample P5

- 위 그림의 GC peak에 따라 retention time이며, 물질분리를 통하여 얻어진 P4와 P5의 retention time별 GC/MS library 상의 화합물을 아래의 표에 나타내었음

Retention time (min)	Compound Name
10.683	$\alpha$ -pinene
13.109	$\beta$ -pinene
14.299	$\beta$ -myrcene
15.250	3-carene
16.470	D-limonene

<표 22> Compound name with retention time

- 물질분리를 통하여 얻어진 시료 중 UV 분석을 통하여 P4 및 P5에 지표물질이 있는 것을 확인하였고, 이에 따라 P4와 P5의 GC/MS 분석을 통한 조성물질의 구성을 아래의 표에 나타내었음
- 90% 메탄올을 전개용매로 선택하여 분리한 P4 시료의 경우  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene,  $\beta$ -myrcene, 3-carene, D-limonene 이 분리되었고, P5 시료는  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, D-limonene이 분리 된 것을 확인할 수 있었음

Compounds(RT)	P4	P5
$\alpha$ -pinene(10.683)	51.16	54.86
$\beta$ -pinene(13.109)	13.04	12.63
$\beta$ -myrcene(14.299)	3.23	-
3-carene(15.250)	2.14	-
D-limonene(16.470)	30.43	32.51

<표 23> Compound composition with extraction time by water-steam distillation

- 위 결과에 따라서  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, D-limonene을 피톤치드 오일의 지표성분으로 선정함
- JS의 유효성분 분석 및 지표성분 설정
- 신규 혼합추출물의 지표성분 함량분석
- 기존 식물추출물의 경우에는 고삼, 팜 오일 등을 주로 사용하는데 이들은 모두 수입을 해서 사용하고 있으며, 높은 살충력을 갖고 있지만 효능 기간이 길지가 않아 주기적으로 뿌려주어야 하는 번거로움이 있으며, 단기적인 효과로 인해 현장에서는 반기지 않는 실정임. 하지만 이번 연구의 소재는 국내산 잣나무 부산물을 사용하여 친환경 해충방제제를 개발하는 것인데, 국내외 모두 해당 소재를 활용한 사례는 전무함. 더욱이 개발된 병해충방제제는 캡슐레이션 기술을 도입해 살충력을 가진 심물질이 서서히 방출되면서 효능을 유지시켜 나감으로써 병해충방제에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료됨.
- 지표성분 살충실험 보고서

## 지표성분에 대한 살충성(약효)실험

시험일자: 2015년 7월 20일

### ◎ 개요

식물에 존재하는 천연 살충제에 대하여 약효시험을 통해 효능을 확인해 보고자함.

화합물의 배합물에 대한 예상 효과는 다음과 같이 계산된다.(참조: Colby, S.R., "Calculating Synergistic and antagonistic Responses of Herbicide Combinations", Weeds 15, pp. 20-22, 1967)

$$E = X + Y - (X + Y) / 100$$

x는 m ppm 또는 m g/ha의 농도에서 시험 화합물 A의 비처리 대조군에 대한 사충율%로 표시된 효과

Y는 n ppm 또는 n g/ha의 농도에서 시험 화합물B의 비처리 대조군에 대한 사충율%로 표시된 효과

E는 각각 m 및 n ppm 또는 m 및 n g/ha의 농도에서 시험 화합물 A 및 B의 비처리 대조군에 대한 사충율%로 표시된 효과

### ◎ 실험방법 및 결과

**I. 복숭아혹진딧물 살충시험**

**1. 알파-피넨( $\alpha$ -pinene) 살충 분무 시험**

용매: 아세톤 78.0 중량부

디메틸포름아미드 1.5 중량부

유화제: 알킬아릴 폴리글리콜 에테르 0.5 중량부

알파 피넨 1g을 위의 용매 및 유화제와 혼합하고, 농축물을 목적으로 하는 농도가 되도록 유화제를 함유하는 물로 희석하여 활성 화합물을 적합한 제제로 제조함.

모든 영충 단계의 복숭아혹진딧물로 감염시킨 배추 엽면을 목적 농도의 활성 성분 제제로 분무함.

일정한 기간이 경과한 후에, 사충율을 %로 결정함. 100%란 모든 진딧물이 사멸되었음을 의미하고, 0%란 진딧물이 하나도 사멸되지 않았음을 의미함. 결정된 사충율 수치를 사용하여 콜비식에 따라 다시 계산함.

활성성분	농도 (ai 의 ppm)	효과 (6일 후%)	
		obs.*	cal.**
무처리	500	0	0
알파-피넨( $\alpha$ -pinene)	500	90	70

\*obs.=관찰된 살충효과, \*\*cal.=콜비식으로 계산된 효과

∴결과: 본 물질을 복숭아혹진딧물에 적용한 결과 대조군에 비해 살충효과가 높은 것을 확인함.

**2. 베타-피넨( $\beta$ -pinene) 살충 분무 시험**

용매: 아세톤 78.0 중량부

디메틸포름아미드 1.5 중량부

유화제: 알킬아릴 폴리글리콜 에테르 0.5 중량부

베타 피넨 1g을 위의 용매 및 유화제와 혼합하고, 농축물을 목적으로 하는 농도가 되도록 유화제를 함유하는 물로 희석하여 활성 화합물을 적합한 제제로 제조함.

모든 영충 단계의 복숭아혹진딧물로 감염시킨 배추 엽면을 목적 농도의 활성 성분 제제로 분무함.

일정한 기간이 경과한 후에, 사충율을 %로 결정함. 100%란 모든 진딧물이 사멸되었음을 의미하고, 0%란 진딧물이 하나도 사멸되지 않았음을 의미함. 결정된 사충율 수치를 사용하여 콜비식에 따라 다시 계산함.

활성성분	농도 (ai 의 ppm)	효과 (6일 후%)	
		obs.*	cal.**
무처리	500	0	0
베타-피넨( $\beta$ -pinene)	500	85	60

\*obs.=관찰된 살충효과, \*\*cal.=콜비식으로 계산된 효과

∴결과: 본 물질을 복숭아혹진딧물에 적용한 결과 대조군에 비해 살충효과가 높은 것을 확인함.

3. D-리모넨(D-limonene) 살충 분무 시험

용매: 아세톤 78.0 중량부

디메틸포름아미드 1.5 중량부

유화제: 알킬아릴 폴리글리콜 에테르 0.5 중량부

D-리모넨 1g을 위의 용매 및 유화제와 혼합하고, 농축물을 목적으로 하는 농도가 되도록 유화제를 함유하는 물로 희석하여 활성 화합물을 적합한 제제로 제조함.

모든 영충 단계의 복숭아혹진딧물로 감염시킨 배추 엽면을 목적 농도의 활성 성분 제제로 분무함.

일정한 기간이 경과한 후에, 사충율을 %로 결정함. 100%란 모든 진딧물이 사멸되었음을 의미하고, 0%란 진딧물이 하나도 사멸되지 않았음을 의미함. 결정된 사충율 수치를 사용하여 콜비식에 따라 다시 계산함.

활성성분	농도 (ai 의 ppm)	효과 (6일 후%)	
		obs.*	cal.**
무처리	500	0	0
D-리모넨	500	95	70

\*obs.=관찰된 살충효과, \*\*cal.=콜비식으로 계산된 효과

∴ 결과: 본 물질을 복숭아혹진딧물에 적용한 결과 대조군에 비해 살충효과가 높은 것을 확인함.

II. 온실가루이 살충시험

1. 알파-피넨(α-pinene) 살충 분무 시험

용매: 아세톤 78.0 중량부

디메틸포름아미드 1.5 중량부

유화제: 알킬아릴 폴리글리콜 에테르 0.5 중량부

알파 피넨 1g을 위의 용매 및 유화제와 혼합하고, 농축물을 목적으로 하는 농도가 되도록 유화제를 함유하는 물로 희석하여 활성 화합물을 적합한 제제로 제조함.

모든 영충 단계의 온실가루이로 감염시킨 배추 엽면을 목적 농도의 활성 성분 제제로 분무함.

일정한 기간이 경과한 후에, 사충율을 %로 결정함. 100%란 모든 진딧물이 사멸되었음을 의미하고, 0%란 진딧물이 하나도 사멸되지 않았음을 의미함. 결정된 사충율 수치를 사용하여 콜비식에 따라 다시 계산함.

활성성분	농도 (ai 의 ppm)	효과 (6일 후%)	
		obs.*	cal.**
무처리	500	0	0
알파-피넨(α-pinene)	500	80	50

\*obs.=관찰된 살충효과, \*\*cal.=콜비식으로 계산된 효과

∴ 결과: 본 물질을 온실가루이에 적용한 결과 대조군에 비해 살충효과가 높은 것을 확인함.

## 2. 베타-피넨( $\beta$ -pinene) 살충 분무 시험

용매: 아세톤 78.0 중량부

디메틸포름아미드 1.5 중량부

유화제: 알킬아릴 폴리글리콜 에테르 0.5 중량부

베타 피넨 1g을 위의 용매 및 유화제와 혼합하고, 농축물을 목적으로 하는 농도가 되도록 유화제를 함유하는 물로 희석하여 활성 화합물을 적합한 제제로 제조함.

모든 영충 단계의 온실가루이로 감염시킨 배추 엽면을 목적 농도의 활성 성분 제제로 분무함.

일정한 기간이 경과한 후에, 사충율을 %로 결정함. 100%란 모든 진딧물이 사멸되었음을 의미하고, 0%란 진딧물이 하나도 사멸되지 않았음을 의미함. 결정된 사충율 수치를 사용하여 콜비식에 따라 다시 계산함.

활성성분	농도 (ai 의 ppm)	효과 (6일 후%)	
		obs.*	cal.**
무처리	500	0	0
베타-피넨( $\beta$ -pinene)	500	95	80

\*obs.=관찰된 살충효과, \*\*cal.=콜비식으로 계산된 효과

∴ 결과: 본 물질을 온실가루이에 적용한 결과 대조군에 비해 살충효과가 높은 것을 확인함.

## 3. D-리모넨(D-limonene) 살충 분무 시험

용매: 아세톤 78.0 중량부

디메틸포름아미드 1.5 중량부

유화제: 알킬아릴 폴리글리콜 에테르 0.5 중량부

D-리모넨 1g을 위의 용매 및 유화제와 혼합하고, 농축물을 목적으로 하는 농도가 되도록 유화제를 함유하는 물로 희석하여 활성 화합물을 적합한 제제로 제조함.

모든 영충 단계의 온실가루이로 감염시킨 배추 엽면을 목적 농도의 활성 성분 제제로 분무함.

일정한 기간이 경과한 후에, 사충율을 %로 결정함. 100%란 모든 진딧물이 사멸되었음을 의미하고, 0%란 진딧물이 하나도 사멸되지 않았음을 의미함. 결정된 사충율 수치를 사용하여 콜비식에 따라 다시 계산함.

활성성분	농도 (ai 의 ppm)	효과 (6일 후%)	
		obs.*	cal.**
무처리	500	0	0
D-리모넨	500	90	85

\*obs.=관찰된 살충효과, \*\*cal.=콜비식으로 계산된 효과

∴ 결과: 본 물질을 온실가루이에 적용한 결과 대조군에 비해 살충효과가 높은 것을 확인함.

### III. 점박이응애 살충시험

#### 1. 알파-피넨( $\alpha$ -pinene) 살충 분무 시험

용매: 아세톤 78.0 중량부

디메틸포름아미드 1.5 중량부

유화제: 알킬아릴 폴리글리콜 에테르 0.5 중량부

알파 피넨 1g을 위의 용매 및 유화제와 혼합하고, 농축물을 목적으로 하는 농도가 되도록 유화제를 함유하는 물로 희석하여 활성 화합물을 적합한 제제로 제조함.

모든 영충 단계의 점박이응애로 감염시킨 배추 엽면을 목적 농도의 활성 성분 제제로 분무함.

일정한 기간이 경과한 후에, 사충율을 %로 결정함. 100%란 모든 진딧물이 사멸되었음을 의미하고, 0%란 진딧물이 하나도 사멸되지 않았음을 의미함. 결정된 사충율 수치를 사용하여 콜비식에 따라 다시 계산함.

활성성분	농도 (ai 의 ppm)	효과 (6일 후%)	
		obs.*	cal.**
무처리	500	0	0
알파-피넨( $\alpha$ -pinene)	500	90	80

\*obs.=관찰된 살충효과, \*\*cal.=콜비식으로 계산된 효과

∴ 결과: 본 물질을 점박이응애에 적용한 결과 대조군에 비해 살충효과가 높은 것을 확인함.

#### 2. 베타-피넨( $\beta$ -pinene) 살충 분무 시험

용매: 아세톤 78.0 중량부

디메틸포름아미드 1.5 중량부

유화제: 알킬아릴 폴리글리콜 에테르 0.5 중량부

베타 피넨 1g을 위의 용매 및 유화제와 혼합하고, 농축물을 목적으로 하는 농도가 되도록 유화제를 함유하는 물로 희석하여 점박이응애로 감염시킨 배추 엽면을 목적 농도의 활성 성분 제제로 분무함.

일정한 기간이 경과한 후에, 사충율을 %로 결정함. 100%란 모든 진딧물이 사멸되었음을 의미하고, 0%란 진딧물이 하나도 사멸되지 않았음을 의미함. 결정된 사충율 수치를 사용하여 콜비식에 따라 다시 계산함.

활성성분	농도 (ai 의 ppm)	효과 (6일 후%)	
		obs.*	cal.**
무처리	500	0	0
베타-피넨( $\beta$ -pinene)	500	80	65

\*obs.=관찰된 살충효과, \*\*cal.=콜비식으로 계산된 효과

∴ 결과: 본 물질을 점박이응애에 적용한 결과 대조군에 비해 살충효과가 높은 것을 확인함.

### 3. D-리모넨(D-limonene) 살충 분무 시험

용매: 아세톤 78.0 중량부

디메틸포름아미드 1.5 중량부

유화제: 알킬아릴 폴리글리콜 에테르 0.5 중량부

D-리모넨 1g을 위의 용매 및 유화제와 혼합하고, 농축물을 목적으로 하는 농도가 되도록 유화제를 함유하는 물로 희석하여 활성 화합물을 적합한 제제로 제조함.

모든 영충 단계의 접박이응애로 감염시킨 배추 엽면을 목적 농도의 활성 성분 제제로 분무함.

일정한 기간이 경과한 후에, 사충율을 %로 결정함. 100%란 모든 진딧물이 사멸되었음을 의미하고, 0%란 진딧물이 하나도 사멸되지 않았음을 의미함. 결정된 사충율 수치를 사용하여 콜비식에 따라 다시 계산함.

활성성분	농도 (ai 의 ppm)	효과 (6일 후%)	
		obs.*	cal.**
무처리	500	0	0
D-리모넨	500	94	78

\*obs.=관찰된 살충효과, \*\*cal.=콜비식으로 계산된 효과

∴ 결과: 본 물질을 접박이응애에 적용한 결과 대조군에 비해 살충효과가 높은 것을 확인함.

#### ◎ 결론

- 복숭아혹진딧물 살충시험에서 알파-피넨( $\alpha$ -pinene)에선 90%의 살충력이, 베타-피넨( $\alpha$ -pinene)에선 85%의 살충력이, 리모넨(D-limonene)에선 95%의 살충력이 관찰됨.
- 온실가루이 살충시험에서 알파-피넨( $\alpha$ -pinene)에선 80%의 살충력이, 베타-피넨( $\alpha$ -pinene)에선 95%의 살충력이, 리모넨(D-limonene)에선 90%의 살충력이 관찰됨.
- 접박이응애 살충 시험에서 알파-피넨( $\alpha$ -pinene)에선 90%의 살충력이, 베타-피넨( $\alpha$ -pinene)에선 80%의 살충력이, 리모넨(D-limonene)에선 94%의 살충력이 관찰됨.
- 본 결론을 통합해 볼 때 식물 속에 있는 살충성분들은 병해충에 높은 살충력을 보임으로써 단독으로 사용하거나 다른 물질과 혼합하여 사용하여도 동일 혹은 비슷한 효과를 볼 수 있을 것임.

#### ○ 현장실험 보고서

2017.10. 31

시험명	천연해충방제제 파이토팜의 파프리카에 대한 방제효과 검증		
시험기관	(주)피러스	담당자	유 동 업
시험기간	2017.06.02.~2017.09.30	시험장소	강원도 춘천시 동면 신북읍 발산리 100-10, 신북농장 대표자:유 영 길

#### 1. 시험목적

잣나무 추출 2차대사산물을 주원료로 하여 개발한 친환경 농자재(파이토팜)을 이용한 파프리카의 총채벌레, 응애, 진딧물등의 해충에 대한 방제효과를 검증 하고자 함.

**2. 시험방법**

가.대상작물 : 파프리카

나.대상해충 : 총채벌레, 응애, 진딧물

다.적용방제제 : 잣나무추출 정유를 주원료로 하는 친환경 해충방제제(파이토팜)

라.적용장소: 파프리카 재배농장(소재지:강원도 춘천시 동면 신북읍 발산리 100-10)

마.처리내용 :동일한 처리방법으로 3회 실시

시험약제	작물	약효시험		비고
		희석배수	처리시기 및 방법	
파이토팜	파프리카	500배액,	1.약제처리주기:3주~4주 간격 2.처리방법:옆면시비	

**3.효과파악 방법**

가.파프리카 시설 하우스 한동을 2등분 하여 구분함.

나.2등분한 한쪽은 일반 농약(기존 재배 방식)으로 병해충 관리 하고, 나머지 한쪽은 테스트시험제제인 파이토팜으로 병해충 관리하여 병해충 방제효과 및 약해발생 유무를 비교 확인함.

다. 약제처리주기 및 살포방법은 기존 재배 방식과 동일하게 실시 하였음.

**4.조사방법**

구분	항목	내용	비고
효과파악	조사위치	밀도/엽	총채벌레, 응애,진딧물
	조사회수	2회	
	조사방법	1.약제처리 24시간 경과후 재배현장내에서 임의로 10주를 선정하여 주당 상,중,하엽중 1엽씩 총30엽을 sampling하여 발생 밀도 조사 2.농약처리한 샘플의 밀도와 시험제제(파이토팜)처리한 샘플의 밀도 비교 3.생충율(%)=약제처리후 생충수/사전밀도 x 100	
	조사일자	6월3일, 8월17일	

**5.실험결과**

가. 약제효과

<표. 1> 총채벌레 방제효과(6월3일)

구분	처리 후 생충율(%)	유의차	사전밀도(
----	-------------	-----	-------

	상엽	중엽	하엽	평균		마리/엽)
파이토팜	34.1	32.8	25.8	30.9	b	2.6
기존방법	34.5	29.8	27.2	30.5	a	2.5

<표. 2> 총채벌레 방제효과(8월17일)

구 분	처리 후 생충율(%)				유의차	사전밀도(마리/엽)
	상엽	중엽	하엽	평균		
파이토팜	29.7	31.1	23.9	28.2	b	2.6
기존방법	28.4	30.8	24.1	27.8	a	2.5

<표. 3> 응애 방제효과(6월3일)

구 분	처리 후 생충율(%)				유의차	사전밀도(마리/엽)
	상엽	중엽	하엽	평균		
파이토팜	25.1	21.7	18.8	21.9	b	2.6
기존방법	24.7	22.6	19.5	22.2	a	2.5

<표. 4> 응애 방제효과(8월17일)

구 분	처리 후 생충율(%)				유의차	사전밀도(마리/엽)
	상엽	중엽	하엽	평균		
파이토팜	25.0	21.7	19.4	22.0	b	2.6
기존방법	23.9	20.4	21.2	21.8	a	2.5

<표. 5> 진딧물 방제효과(6월3일)

구 분	처리 후 생충율(%)				유의차	사전밀도(마리/엽)
	상엽	중엽	하엽	평균		
파이토팜	28.5	25.9	23.7	26.0	b	2.6
기존방법	24.3	25.6	23.1	24.3	a	2.5

<표. 6> 진딧물 방제효과(8월17일)

구 분	처리 후 생충율(%)				유의차	사전밀도(마리/엽)
	상엽	중엽	하엽	평균		
파이토팜	27.4	21.9	22.4	23.9	b	2.6
기존방법	26.1	20.9	21.8	22.9	a	2.5

나. 약해 발생 유무

<표. 7> 파프리카에 대한 (파이토팜)의 약해 발생 유무

조사일자	약해발생율(발생엽수/10엽)			평균	약해 유무
	상엽	중엽	하엽		
약제처리후 7일경과	0	0	0	0	무
약제처리후 15일경과	0	0	0	0	무

6. 결과 요약(결론)

◎. 기존재배 방식과 약제처리주기를 동일하게 하여, 약4개월 동안 친환경 해충방제제 파이토팜을 500배 희석하여 관리한 결과, 병해충방제효과(총채벌레, 응애, 진딧물)는 기존 화학 약제 처리한 결과와 비교할 때 전혀 부족한 부분이 발생하지 않음

◎. 해충방제제(파이토팜)를 500배 농도로 약 4개월 동안 3~4주 간격으로 약제처리후 지속적으로 관찰한 결과, 파프리카 잎이나 줄기등에서 약해로 인한 이상증상은 육안으로 전혀 관찰 되지 않았음.

◎. 또한 파프리카의 생산성이나, 품질에 있어서도 기존재배방식과 비교 해서도 차이를 발견할 수 없었음.

◎. 친환경해충방제제(파이토팜)는 해충방제효과가 충분히 있을 뿐만 아니라, 약물로 인한 파프리카 작물에 약해가 전혀 없음을 확인 할 수 있어, 파프리카에 대한 친환경 농자재로 효능이 있음을 확인 하였음.

# 시험결과보고서

과제명: 유기농업자재 공시를 위한 작물비해시험  
(상표명: 파이토팜)

## 시험의뢰자

회 사 명: (주)피러스  
소 재 지: 충청북도 단양군 적성면 쌀미길 18  
대 표 자: 이 성 희

## 발행일

2017년 12월 21일

## 시험기관

(주)한국식물환경연구소

## 시험번호



KPER-17-O-15

Korea Plants Environmental Research Station



(주)한국식물환경연구소의 등록상표임을 증명합니다.



www.kper.or.kr

연구과제명: 유기농업자재 공시를 위한 작물비해시험

본 시험은 국립농산물품질관리원 지정 시험연구기관에서 “농림축산식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙”에 준하여 시험을 실시했음.

1. 용도 : 유기농업자재 공시용(자재종류: 작물생육용자재)

2. 시험기간

시험계획서 승인일: 2017년 10월 10일

시료인수일: 2017년 10월 13일

시험종료일: 2017년 12월 15일

3. 공시자재 보관

본 시험에 사용한 공시제품은 (주)한국식물환경연구소 시료보관실에 보관하였다.

- 시료관리번호:  KP17O15
- 상 표 명: 파이토팜
- 보 존 기 간: 2년

4. 시험자료 보관

본 시험의 시험기초자료 및 시험보고서는 (주)한국식물환경연구소 자료보관실에 보관하였다.

- 시험자료 및 시험보고서 보관: 자료보관실
- 자료 보관 기간: 3년
- 자료 보관 책임자: 김재림

5. 과제참여자 서명(날인):

시험책임자 : 오 세 문 

시험담당자 : 조 용 준 

6. 과제수행 연구기관

- 기관명: (주)한국식물환경연구소 
- 주 소: 경기도 수원시 권선구 오목천로 152번길 40 수원첨단벤처밸리 403호
- 연락처: 031-292-3681 [www.kper.or.kr](http://www.kper.or.kr) [star@kper.or.kr](mailto:star@kper.or.kr)

시험명: 유기농업자재 공시를 위한 작물 비해시험

1. 시험개요

가. 목 적:

공시자재(상표명: 파이토팜)의 시용에 따른 작물(착색단고추) 이식 후 유식물에 미치는 비해를 검정하여 유기농업자재 공시자료로 활용하고자 함.

나. 시험년도: 2017년

다. 시험장소: 경기 수원시 권선구 당수동(시설)

라. 시험담당자: 조용준, 오세문

마. 실험개시일: 12월 6일

바. 실험종료일: 12월 15일

2. 시험방법

가. 시험작물(품종): 착색단고추(후레쉬옐로우)

나. 처리내용

상표명	비 해 시 험		시험 작물명	처리방법 (처리일)	의뢰회사
	기준량	배량			
파이토팜	500배	250배	착색단고추	유묘기 엽면시비 (12/8)	(주)피러스
무처리	-	-	"	-	-

다. 경중개요

- (1) 정식시기: 12월 6일
- (2) 포트규격:  $\phi$  10 cm
- (3) 토성: 양토
- (4) 온도: 하우스 내 평균온도 19.2℃

라. 시험구배치 및 소요면적 : 완전임의배치법 3반복

구 분	작 물 수	처 리 수	반 복 수	총 구 수	구당pot수	총소요pot수
비해시험	5	3	3	9	5포트	225포트

마. 공시자재처리 및 시험구 배치 사진



시험자재계측

시험자재처리

시험구배치

3. 조사방법

구 분	조사항목	작물명	조사횟수	조사일자	조 사 방 법
비해시험	외관상 비해유무	착색단고추	3회	12/11, 12/13, 12/15	정식 후 유묘기 엽면시비하여 3, 5, 7일차 외관상 비해 유무 달관조사

4. 시험성적

○ 비해시험 결과

시험작물 (품종)	처리내용	비해정도(0~4)			최종결과
		처리 후 3일차	처리 후 5일차	처리 후 7일차	
착색단고추 (후레쉬엘로우)	기준량	0	0	0	비해없음
	배량	0	0	0	비해없음

5. 시험 사진

○ 시험 전 작물 유묘 및 정식 후 작물

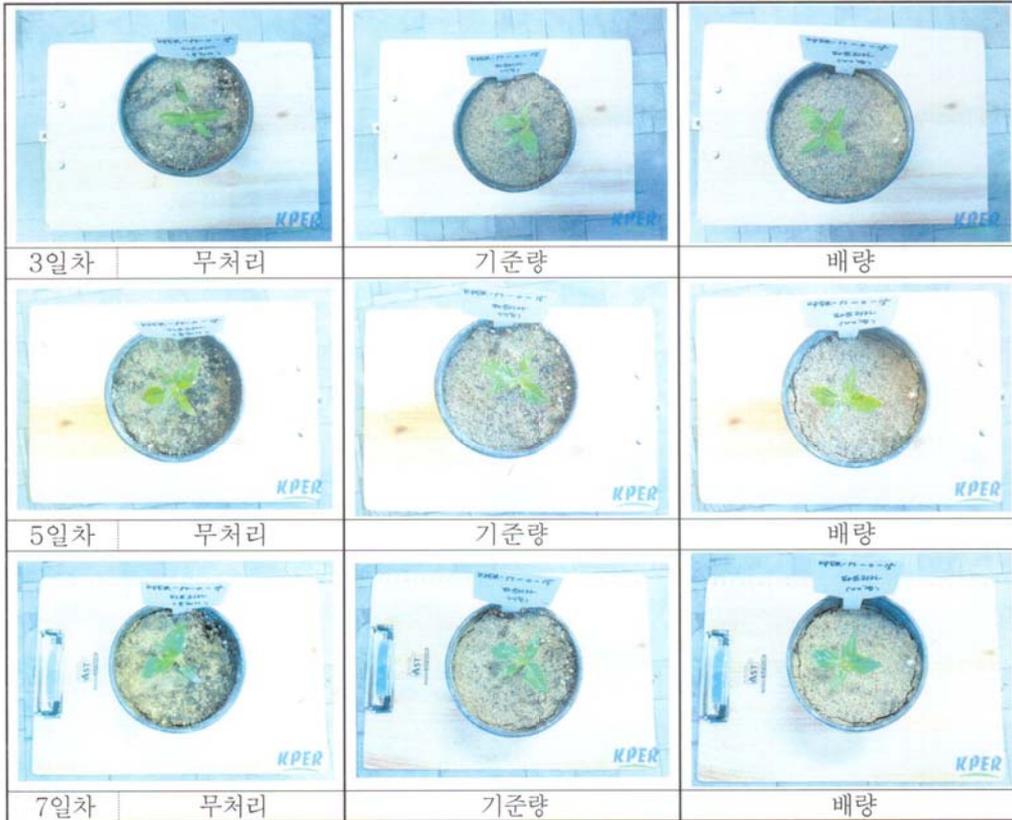


시험작물별 정식 전 유묘 생육상황

정식 후 작물



○ 착색단고추



5. 시험담당자 의견

- 본 시험은 유기농업자재 공시를 위하여 시험의뢰회사((주)피러스)의 요청에 따라 농림축산식품부 소관 친환경농업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙”에 준하여 시험을 실시하였다.
- 공시자재(상표명: 파이토팜)를 시험작물(착색단고추)을 이식하고, 기준량 및 배량을 유묘기 엽면시비 한 후 3, 5, 7일차에 유식물에 나타나는 외관상 비해 유무를 달관 조사한 결과 5종의 시험작물 모두에서 기준량 및 배량에 대하여 비해(비해 판정기준결과: 0)는 나타나지 않았다.
- 따라서 본 시험결과 공시자재(상표명: 파이토팜)는 착색단고추에 대하여 비해가 없어 유기농업자재 공시용으로 적합할 것으로 판단된다.

(주) 한국 식물 환경 연구소 대표이사 (인)

위 결과는 시험의뢰자가 임의로 제출한 시료로 수행한 시험결과로서 소송 및 광고, 기타 구속력이 있는 자료로 사용할 수 없으며 자체보관 및 등록기관 제출용으로만 사용이 가능합니다.

# 시험결과보고서

과제명: 유기농업자재 공시를 위한 작물비해시험  
(상표명: 파이토팜)

## 시험의뢰자

회 사 명: ㈜피러스  
소 재 지: 충청북도 단양군 적성면 쌀미길 18  
대 표 자: 이 성 희

## 발행일

2017년 11월 21일

## 시험기관

(주)한국식물환경연구소

## 시험번호



KPER-17-O-14



www.kper.or.kr



Korea Plants Environmental Research Station

대한식물환경연구소 한국농업기술진흥원 산하 연구기관

시험명: 유기농업자재 공시를 위한 작물 비헤시험

1. 시험개요

가. 목 적:

공시자재(상표명: 파이토팜)의 시용에 따른 작물(오이, 토마토, 상추, 딸기, 고추) 이식 후 유식물에 미치는 피해를 검정하여 유기농업자재 공시자료로 활용하고자 함.

나. 시험년도: 2017년

다. 시험장소: 경기 수원시 권선구 당수동(시설)

라. 시험담당자: 조용준, 오세문

마. 실험개시일: 10월 25일

바. 실험종료일: 11월 3일

2. 시험방법

가. 시험작물(품종): 오이(백봉다다기), 토마토(호용), 상추(선풍골드), 딸기(설향), 고추(녹광)

나. 처리내용

상표명	비 해 시 험		시험 작물명	처리방법 (처리일)	의뢰회사
	기준량	배량			
파이토팜	500배	250배	오이, 토마토, 상추, 딸기, 고추	유묘기 엽면시비 (10/27)	(주)피러스
무처리	-	-	"	-	-

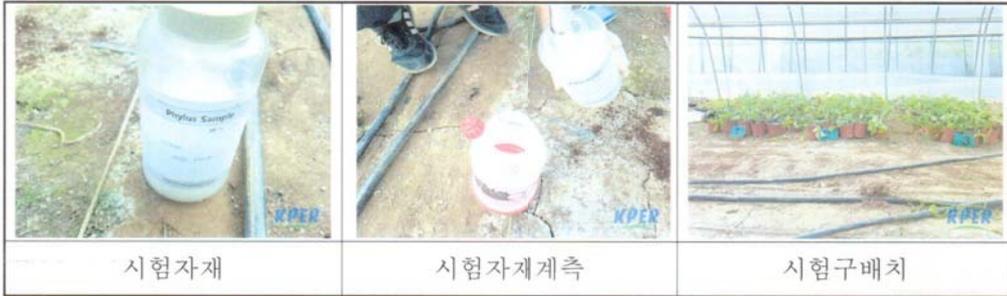
다. 경종개요

- (1) 정식시기: 10월 25일
- (2) 포트규격:  $\phi$  10 cm
- (3) 토성: 양토
- (4) 온도: 하우스 내 평균온도 26.9℃

라. 시험구배치 및 소요면적 : 완전임의배치법 3반복

구 분	작 물 수	처 리 수	반 복 수	총 구 수	구당pot수	총소요pot수
비헤시험	5	3	3	9	5포트	225포트

마. 공시자재처리 및 시험구 배치 사진



3. 조사방법

구 분	조사항목	작물명	조사횟수	조사일자	조 사 방 법
비해시험	외관상 비해유무	오이, 토마토, 상추, 딸기, 고추	3회	10/30, 11/ 1, 11/3	정식 후 유묘기 엽면시비하여 3, 5, 7일차 외관상 비해 유무 달관조사

4. 시험성적

○ 비해시험 결과

시험작물 (품종)	처리내용	비해정도(0~4)			최종결과
		처리 후 3일차	처리 후 5일차	처리 후 7일차	
오이 (백봉다다기)	기준량	0	0	0	비해없음
	배량	0	0	0	비해없음
토마토 (호용)	기준량	0	0	0	비해없음
	배량	0	0	0	비해없음
상추 (선풍골드)	기준량	0	0	0	비해없음
	배량	0	0	0	비해없음
딸기 (설향)	기준량	0	0	0	비해없음
	배량	0	0	0	비해없음
고추 (녹광)	기준량	0	0	0	비해없음
	배량	0	0	0	비해없음

5. 시험 사진

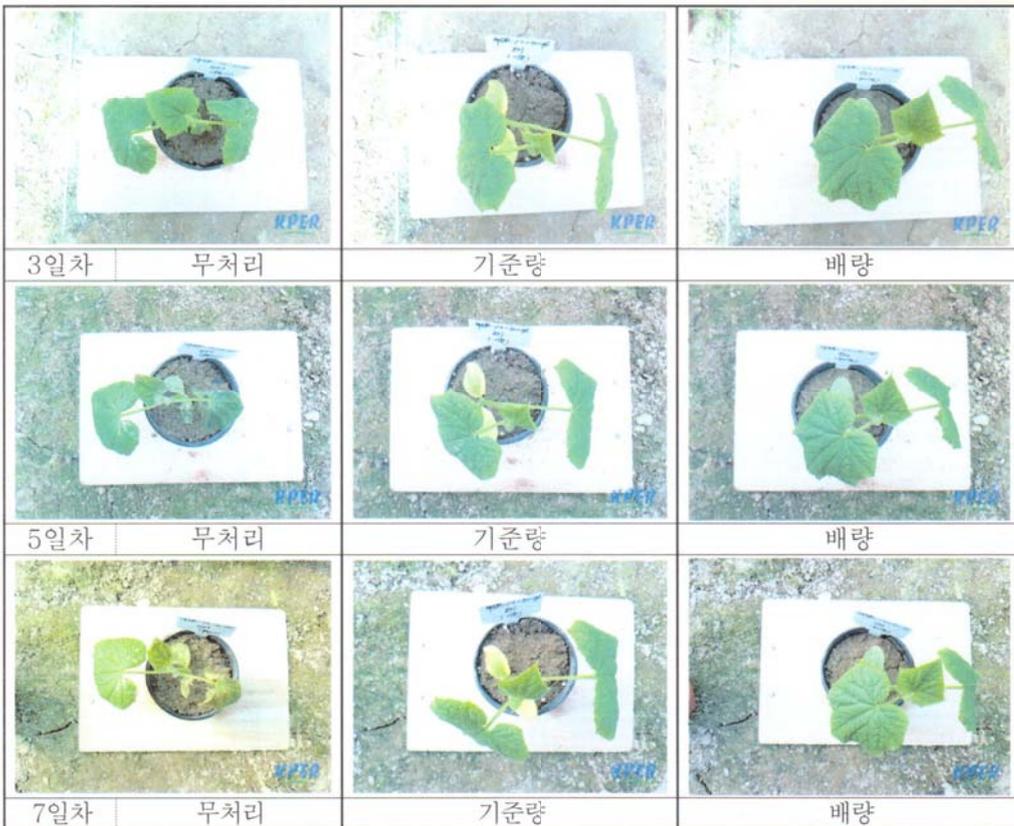
○ 시험 전 작물 유묘



○ 정식 후 작물



○ 오이



○ 토마토

		
3일차 무처리	기준량	배량
		
5일차 무처리	기준량	배량
		
7일차 무처리	기준량	배량

○ 상추

		
3일차 무처리	기준량	배량
		
5일차 무처리	기준량	배량
		
7일차 무처리	기준량	배량

○ 딸기

		
3일차 무처리	기준량	배량
		
5일차 무처리	기준량	배량
		
7일차 무처리	기준량	배량

○ 고추

		
3일차 무처리	기준량	배량
		
5일차 무처리	기준량	배량
		
7일차 무처리	기준량	배량

5. 시험담당자 의견

- 본 시험은 유기농업자재 공시를 위하여 시험의뢰회사((주)피러스)의 요청에 따라 국립농산물품질관리원 고시 '유기농업자재 공시 및 품질인증 기준'에 의거하여 시험을 실시하였다.
- 공시자재(상표명: 파이토팜)를 시험작물(오이, 토마토, 상추, 딸기, 고추)을 이식하고, 기준량 및 배량을 유묘기 엽면시비 한 후 3, 5, 7일차에 유식물에 나타나는 외관상 비해 유무를 달관 조사한 결과 5종의 시험작물 모두에서 기준량 및 배량에 대하여 비해(비해 판정기준결과: 0)는 나타나지 않았다.
- 따라서 본 시험결과 공시자재(상표명: 파이토팜)는 오이, 토마토, 상추, 딸기, 고추에 대하여 비해가 없어 유기농업자재 공시용으로 적합할 것으로 판단된다.

(주) 한국 식물 환경 연구소 대표이사



위 결과는 시험의뢰자가 임의로 제출한 시료로 수행한 시험결과로서 소송 및 광고, 기타 구속력이 있는 자료로 사용할 수 없으며 자체보관 및 등록기관 제출용으로만 사용이 가능합니다.

○ 파프리카 재배 관리 메뉴얼

	파프리카	고추	피망
온실가루이	500배 희석 주 3회 살포	500배 희석 주 2회 살포	500배 희석 주 2회 살포
복숭아혹진딧물			
접박이용애			

I. 파프리카의 정의 및 원산지

○ 학명 : *Capsicum annuum* L

○ 영명 : sweet pepper, bell pepper, paprika

\* paprika는 희람어를 어원으로 갖는 작물로서 유럽에서는 모든 고추를 통칭한다.

1. 생리적 특성

1) 파프리카의 정의 및 특성

파프리카는 가지과, 고추속, 고추종에 속하며 크게 매운고추(hot pepper)와 단고추(sweet pepper)로 대별되는데, 파프리카는 단고추에 속한다. 파프리카는 나라에 따라 sweet pepper, bell pepper, paprika 등으로 불리며 국내에서는 착색단고추로 명명되고 있다. 파프리카의 잎은 보통 파프리카와는 달리 다소 크고 난형이며 엽병의 길이는 0.5~2.5cm 이다. 화관은 8~10mm, 수술은 5~6개, 자방은 2~4개실로 되어 있다. 종자는 황백색으로 납작하며, 신장같이 생겼고, 길이는 3~4mm, 폭은 2~3mm, 두께는 0.5~1mm이다.

파프리카는 목본성 줄기를 갖는 저목형이며 줄기가 비교적 약한 편이므로 과실의 수확기에 도달하였을 때에는 무게에 의하여 중기가 부러지기 쉬운 경향이 있다. 따라서, 작물을 지탱해 줄 수 있는 지지시스템이 필요하다.

처음에 외줄기로 자라지만 곧 두 개의 가지로 분지되며, 분지되는 곳에서 한 개 또는 그 이상의 눈꽃을 만든다. 첫 번째 분지점에서의 눈은 1번화인 버들눈(crown bud)으로 한 개 또는 두 개 이상의 잎을 만든 후에 각각의 가지는 한번 더 분지되고, 각각의 분지점에서 꽃눈을 발육시키는데 이 눈들을 2번화라고 한다. 이러한 형식으로 생육은 계속되며 성장점을 절단하지 않더라도 계속해서 많은 수의 측지가 발생한다.

우리나라에서는 첨단 유리온실을 도입과 함께 1994년 재배기 시작되어 1995년 김제의 참샘농장에서 본격적으로 수출재배가 이루어졌으며, 2015년 600ha로 해마다 증가될 것으로 추정된다.

2) 파프리카의 분류

고추의 식물학적 분류(일본) 고추는 가지과(Solanaceae과) 고추속(Capsicum속) 고추종(Annuum종)으로 분류 고추속속에는 6개의 아종이 있다.

- 칠리고추(chilli pepper, Capsicum annuum L. var.acuminatum)
- 단고추(sweet or bell pepper, Capsicum annuum L. var. grossum)
- 콘고추(cone pepper, Capsicum annuum L. var. conoides)
- 체리고추(cherry pepper, Capsicum annuum L. var. cerasiforme)
- 레드클러스터고추 (red cluster pepper, Capsicum annuum L. var. fasciculatum)
- 긴고추(long pepper, Capsicum annuum L. var. longum)

### 3) 원산지 및 내력

- 원산지: 중앙아메리카
- 이용성: 매운맛이 없고 단맛이 있으며 비타민 A와 C가 풍부하고 다채로운 색을 표현할 수 있어 간식이나 이태리 음식, 샐러드, 고기요리용으로 이용된다.
- 과실의 모양: 다양한 형태의 파프리카가 있으나 대체로 Blocky형이 가장 많이 재배되고 있다.

### 4) 파프리카의 성분

#### 가. 일본의 성분분석

구분	에너지	수분	단백질	지질	탄수화물	비타민A	비타민B
RED	36	90.6	0.9	0.3	7.5	940	150
YELLOW	35	91.1	0.9	0.3	7.1	100	140
ORANGE	31	92	1.2	0.3	5.8	780	200

#### 나. (주)피러스 연구소의 성분분석

구분	파프리카				굴
	RED	YELLOW	ORANGE	GREEN	
에너지	19	17	19	11	47
수분	93.4	93.9	93.9	95.5	86.5
단백질	1.3	1.4	1.1	1.0	0.8
지방	0.3	0.3	0.4	0.1	0.2
당질	3.7	3.2	3.7	2.1	11.8
섬유	0.8	0.8	0.9	0.9	0.3
회분	0.5	0.4	0.5	0.4	0.4
칼슘	10	10	10	12	18
인	24	22	20	19	10
철	1.1	1.0	1.0	1.3	0.2
나트륨	8.5	7.7	9.3	6.4	3
칼륨	321	262	297	255	130
아연	0	0	0	0	-
마그네슘	11.4	12.8	13.2	11.3	-
비타민	654	147	445	41	8
티아민	0.08	0.09	0.09	0.06	0.11
리보플라빈	0.04	0.02	0.03	0.01	0.06

5) 생육단계별 온도 및 습도 적응성

가. 발아단계: 22~25℃(최저 20℃이상)

나. 육묘단계: 낮 25~27℃, 밤 23~24℃, 공중습도 80%, CO<sub>2</sub> 400ppm(본엽 3매 출현 이후)

다. 정식-착과 시: 낮 24~25℃, 밤 21~22℃, CO<sub>2</sub> 600~800ppm

라. 착과 후 : 낮 21~24℃, 밤 18~20℃, 근원온도 18~20, CO<sub>2</sub> 400~500ppm

마. 습도조건: 70~80%

6) 햇빛 요구도

가. 광포화점: 3만 lux(350.7 w/m<sup>2</sup>, 126.2 J/cm<sup>2</sup>/hr)로 다른 작물 보다 낮음

나. 광합성량: 오전 중 60~70%, 오후 중 40~30%

[표 1] 날씨에 따른 광환산(PTC<sup>+</sup>, 2017)

날씨	광량(w/m <sup>2</sup> )	환산예
구름 많은 흐린날	< 25	1,000Lux=24w/m <sup>2</sup> =8.64J/cm <sup>2</sup> /hr
약간 흐린날	25-300	1,000Lux=14w/m <sup>2</sup> =5.04J/cm <sup>2</sup> /hr
맑은날	300-600	1,000Lux=11w/m <sup>2</sup> =3.96J/cm <sup>2</sup> /hr
매우 맑은날	600-1,000	1,000Lux=10w/m <sup>2</sup> =3.60J/cm <sup>2</sup> /hr

[표 2] 광량환산표(PTC<sup>+</sup>, 2017)

Lux	Watt/m <sup>2</sup>	J/cm <sup>2</sup> /hr
1,000	24.0	8.6
2,000	47.0	16.9
3,000	69.0	24.8
4,000	90.1	32.4
	100	36.0
5,000	110.2	39.6
10,000	196.2	70.6
15,000	258.0	92.9
20,000	295.8	106.2
25,000	313.1	112.7
30,000	350.7	126.2
40,000	454.6	163.6
50,000	551.9	198.7
60,000	642.8	213.4
70,000	727.1	261.8
80,000	805.5	289.8
90,000	876.3	315.5

100,000	941.1	338.8
---------	-------	-------

7) 탄산가스 농도

가. 영양생장기: 400~500ppm

나. 착과기: 600~800ppm

[표 3] 탄산가스 자동 공급 장치를 이용한 참고자료

주	340ppm(kg/h/ha)	400ppm(kg/h/ha)	500ppm(kg/h/ha)
period 1(W 1~4)	25	30	38
period 2(W 5~8)	35	40	48
period 3(W 9~12)	50	62	82
period 4(W 13~16)	55	87	140
period 5(W 17~20)	60	99	164
period 6(W 21~24)	60	131	248
period 7(W 25~28)	60	131	248
period 8(W 29~32)	60	131	248
period 9(W 33~36)	55	127	246
period 10(W 37~40)	50	114	220
period 11(W 41~44)	40	90	174
period 12(W 45~48)	25	59	115
period 13(W 49~52)	15	25	41

8) 근권의 EC 농도 및 pH

가. 육묘기 : 2.5-3.0 dS/m, 5.5(fliping 전날에는 3.5dS/m으로 관주 후 flipping)

나. 정식기 : 3.2~3.5 dS/m(배지포수 3.5dS/m 이상, pH 5.5, 맑은 날)

다. 착과기 : 3.5~8.0dS/m, pH 5.2~5.7

라. 착과 후 : 4.0± 0.5 dS/m, pH 5.2~5.7

마. 4월 이후 ~ 7월 관리 : 3.5~4.0 dS/m(맑은 날 →비오거나 흐린 날)

9) 물 요구도

가. 건조와 과습에 약하여 적정 배지습도는 65%이다.

나. 1일 용수량(양액재배) : 1일 광량  $J/m^2 \times 1.4 \sim 2.5cc/m^2$

다. 1일 배액량은 25~30%가 적당하며, 일출 후 4시간에서 4시간 30분경에 첫 배액이 이루어져야 한다.

라. 일중 배지수분 편차는 6~85가 적당하다.

10) 적정 배지용량 및 줄기밀도

가. 배지용량: 9.0 ~12.0  $l/m^2$

나. 줄기밀도: 6.5 8.0  $stem/m^2$ (3.25주 ~4주/ $m^2$ , 2줄기 재배 시)

### 11) 수확량 예측

예상수확량( $kg/m^2$ ) = 착과수/ $m^2$  × 재배면적( $m^2$ ) × 평균과중(0.18 ~ 0.19 $kg$ )

예상수확량( $kg/평$ ) = 착과수/ $m^2$  × 재배면적( $m^2$ ) × 평균과중(0.18 ~ 0.19 $kg$ ) × 3.3025

### 12) 식물구조와 생육습성

가) 작물지지 시스템: 목본성 줄기이나 수확기 과실 무게로 줄기 손상 방지

나) 화아분화 특성

- ① 외줄기로 자라지만 곧 두 개 가지로 분지되며, 분지점에서 1개 이상의 꽃눈 형성
- ② 첫 번째 분지점의 눈은 버들눈(crown bud)이고 1개 또는 2개 이상의 잎을 만든 후 각각의 가지는 한 번 더 분지되고, 각각의 분지점에서 꽃눈(2번화)발육
- ③ 이와 같은 생육 계속, 성장점을 절단하지 않더라도 계속해서 많은 수의 측지 발생하여 식물체를 약하게 하고 생육 장애 발생

다) 식물체 유인

- ① 보통 2~3개의 주지만 남기고 나머지 측지는 모두 제거
- ② 주지는 유인줄로 위로 유인
- ③ 각각의 주지에 발생하는 2개 분지 중 1개는 수직발육 지속 위해 유인줄 고정
- ④ 나머지 한 분지는 1~2매 잎 발생 후 적심 또는 생육 지속 가능
- ⑤ 계속 유인 안하면 착과 시 가지가 부러지기 쉽고, 잘 유인된 경우보다 훨씬 과번무

라) 착과

- ① 꽃눈의 각 분지단계에서 발생하는데, 착화와 과실발육 능력은 수광량, 온도체계, 식물체의 영양 상태와 충실도 등 여러 가지 요인에 의해 영향
- ② 만일 각 분지점에서 제 1번화가 착과부담이나 스트레스를 받으면 이어서 개화하는 제 2번화는 개화나 착과가 되지 않으며, 개화하더라도 황변 낙화
- ③ 성공적으로 착과된 과실은 빠른 신장을 통해 약 6주에 걸쳐 최종 크기에 도달
- ④ 과실의 최종 크기는 종에 따라 다르며, 식물체의 성장력과 과실 하중에 의해 지배

마) 수확

- ① 최종 과실 크기에 도달했을 때 과표면 광택, 이 때를 ‘녹숙(mature green)’ 단계(녹색 수확기, 이 단계에서 수확하지 않으면 나중에 빨강, 노랑, 오렌지 등 변색)
- ② 일반적으로 과색은 불규칙적 변화하기 때문에 반드시 완숙되었을 때 수확
- ③ 착과-성숙 소요기간 : 보통 6~8주(\* 기후 조건, 기타 요인에 의해 영향)
- ④ 상업적 재배 시 완숙까지 기간 : 착과 후 6~8주 정도

## II. 생육진단에 의한 파프리카 상 전환 관리요령

생육조절을 위해 환경관리를 하는 것도 중요하지만 파프리카의 작물 생육 상태를 정확히 진단하여 적절한 성장상을 유지하는 것은 매우 중요하다. 이것은 재배 경험과 지식이 있어야만 가능하므로 전문가의 도움을 받는 것이 좋고 생육 상태를 정확히 판단하는 눈과 이론적 배경을 지녀야 한다. 파프리카의 생육 상태를 진단하는 기준은 아래와 같다.

[표 4] 파프리카의 생육 판단 기준

구분	영양성장	생식성장
머리부분	굵고 강하다 색이 옅다	가늘고, 약하다 색이 진하다
꽃	낮은 부분에 형성된다 꽃대가 하늘을 향한다 꽃이 크고, 기형이 많다	머리부분에 형성된다 꽃대가 땅을 향한다 꽃이 작다
잎	잎이 크고 길다 색이 옅다	잎이 작고 단단하다 색이 진하다
생육	가하다	비교적 약해 보인다

생육진단이 끝나고 생육상전환이 필요 할 때는 아래의 표와 같이 조절할 수 있다.

[표 5] 파프리카 상전환을 위한 환경관리요령

구분	생식성장	영양성장
광	많음	작음
스크린	적게 사용	자주/많이 사용
온도	18<T<23	
24시간 평균온도	높음	매우높은 T>24, 매우낮은 T<18
주야간 온도차	크게	작게
주간시작시간	빨리	늦게
야간시작시간	늦게	빨리
온실의 습도	낮음	높음
CO2	많음(600-800ppm)	작음(400-600ppm)
1일 양액 공급의 량	소량	다량
양액 공급의 횡수	소회	다회
1회 양액공급량	다량(150~180cc)	소량(100-150cc)
양액 공급 시작시간	늦게	빨리
양액 공급 종료 시간	빨리	늦게
온도 하강속도	빨리	늦게
온도 상승 속도	빨리	늦게
줄기의 유인	자주/강하게	천천히/약하게
순치기	빠르게	늦게

공급양식의 EC	높게	낮게
----------	----	----

생식생장중인 작물체의 영양생장으로 유도하기 위한 단편을 설명하면 ①주야간 온도 차이를 줄이고, ② 24시간 평균온도를 낮추며, ③ 상대습도를 올려주어야 한다. 특히 4월경부터 시설내 수분의 급격한 감소가 이루어지는데 이때 지붕스프링클러를 작동시키면 5%의 시설 내 수분 향상 효과와 2~3℃ 온도 하강효과를 볼 수 있다.

지붕 스프링클러의 사용 효과로는 증산량을 줄이고, 습도를 향상시키며, 주간 온도를 낮출 수 있는 장점이 있다. 또한 차광망이나 스크린을 병용하면 효과적이다.

### Ⅲ. 파프리카 병해충 방제

각종 비타민 등 영양분이 풍부해서 국내 소비자뿐만 아니라 수출도 증가하고 있는 파프리카이지만 농가에서는 각종 병해충 때문에 어려움을 겪고 있기에 파프리카에 발생하는 주요 병해충의 증상과 대책은 다음과 같다.

#### 1. 총채벌레

총채벌레는 해충의 크기가 작고 이동 번식속도가 빨라 방제가 쉽지 않으며 잎의 뒷면에서 알과 유충으로 토양속에서 우화기 형태로 생활하기 때문에 약제를 살포해도 약제가 묻지 않아 방제가 어려움이 있습니다. 잎과 열매를 가해하나 특히 유과에 피해가 크며, 어린 유엽에는 작은 반점이 생기며 심하면 잎이 오그라든다. 유과에는 회백색 또는 갈색의 부스럼딱지 같은 반점을 형성하여 상품가치를 떨어뜨리며 과경을 가해하여 신선감을 떨어뜨립니다. 잎이 심하게 피해를 받았을 경우에는 뒷면이 갈변하고 표피가 코르크화 됩니다.

총채벌레가 발생하면 방제가 어려우므로 ‘파이토팜’을 사용하는데, 발생했을 경우 500배로 희석하여 주 2~3회 정도 시비를 해줌으로써 작물 환경을 개선하여 작물이 건강하게 관리해야하며, 예방단계에서는 800배 혹은 1,000배로 희석하여 2주에 1회 정도 시비해주면 총채벌레를 사전에 방지할 수 있습니다. 가장 중요한 것은 벌레가 발생되면 장기간에 걸쳐 가해를 하므로 수회에 걸쳐 방제가 필요하며 농장 내 및 주변의 잡초 방제를 철저히 하여 발생원을 없애는 것이 중요합니다.

#### 2. 복숭아혹진딧물

복숭아혹진딧물은 어린싹이나 잎 뒷면에서 즙액을 빨아 먹기 때문에 잎이 위축되거나 기형이 되고 생육이 정지됩니다. 또한, 진딧물이 배설한 감로가 잎과 열매에 붙으면 그을음병이 발생해서 품질이 떨어집니다. 복숭아혹진딧물은 ‘파이토팜’을 500배 희석해서 주 1~2회 정도 잎의 뒷면에 고루 묻도록 살포하여 방제해줍니다. 예방차원에서 사용할 경우 800배 혹은 1,000배로 희석하여 2주에 1회 살포해주면 복숭아혹진딧물을 사전에 방지할 수 있습니다.

#### 3. 온실가루이

가지과 작물에 주로 발생하며 식물체의 즙액을 빨아먹는 직접적인 피해뿐만 아니라 그을음병과 바이러스병을 유발하여 상품성과 수량을 떨어뜨린다. 이 해충은 초기에 방제해야 효과

적이므로 온실가루이는 ‘과이트팜’을 500배 희석하여 주 1~2회 정도 잎의 뒷면과 앞면을 고루 묻도록 살포하여 방제해주며, 예방의 경우 800배 혹은 1,000배로 희석하여 2주에 1회 살포해주면 온실가루이를 사전에 방지할 수 있습니다.

#### 4. 점박이응애

잎을 누렇게 변하게 하여 말라죽게하는 해충으로써 세대 기간이 짧아 연간 발생횟수가 많고 증식률이 높으며, 모를 통해서 유입되는 것을 막기 위하여 모종을 철저하게 방제함을 물론 방충망을 설치하여 해충 유입을 방지해주는데, 이때 파프리카 농장 주변에도 ‘과이트팜’을 200배 정도 희석해서 주2~3회 정도 살포해주면 밖에서 유입되는 해충을 방제할 수 있으며, 파프리카에 점박이응애가 발생했을 시 ‘과이트팜’을 500배 희석해서 주 1~2회 정도 고루 묻도록 살포하여 방제해주면 된다. 예방의 경우 농장 주변부에 살포, 파프리카에게는 800배 혹은 1,000배로 희석해서 2주에 1회 정도 살포해주면 점박이응애를 사전에 방지할 수 있습니다.

방제종류	병해충 종류	농장주변부	식물체 대상
예방차원	총채벌레	500배희석 / 주 1회 살포 (농장 중심으로 10m이내)	800배 혹은 1,000배 희석 / 2주 1회 살포
	복숭아혹진딧물		
	온실가루이		
	점박이응애		
방제차원	총채벌레	200배 희석/ 주 2~3회 살포 (농장 중심으로 10m이내)	500배 희석 / 주 2~3회 살포
	복숭아혹진딧물		500배 희석 / 주 1~2회 살포
	온실가루이		
	점박이응애		

○ 시제품 제작

① 파이토팜 제품 스티커

**무력균의 특징**

- 마이크로 캡슐 기술로 지속성 강화
- 킬레이트화 하여 침투성 용이
- SD공법으로 추출한 100% 에센셜 오일을 주 원료로하여 생산된 제품입니다.
- 짚나무속 향기가 발산되므로 작업환경에 유익합니다.

**사용방법**

- 적용대상: 모든 작물
- 살포방법: 엽면시비
- 희석배율: 800~1000배 희석
- 사용량: 20~25ml

**대한민국 짚나무 피톤치드**  
우리고유 수종, 짚나무 피톤치드의 자기방어 물질에서 나오는 강력한 효과!

**www.phylus.co.kr** 8 3092 12 168926 **500ml** **피러스 PHYLLUS**

**생산업자 보증표**

- 등록번호: 충북 단양 21-가-10404
- 비료의 종류 및 명칭: 제 4종 복합(엽면)
- 실중량 또는 실용량: 500ml
- 보증성분량: 수용성 인산5.8%, 수용성 칼리5.2%, 수용성 아연0.06%, 수용성 붕소0.06%
- 생산년월일: 별도표기
- 유통기한: 개봉 후 2년
- 제조장의 소재지 및 명칭: (주)피러스
- 본사: 충북 단양군 직성면 빌미길 18 TEL. 070-4116-0330
- 가평공장: 경기도 가평군 북면 화악산로 124번길 3-8

**사용·보관상 주의사항**

- 개봉후에는 빨리 사용하십시오.
- 어린이의 손에 닿지 않는 곳에 보관하십시오.
- 혼용시 약효가 떨어질수 있으니 혼용하지 마십시오.
- 직사광선을 피해 서늘한 곳에 보관하십시오.
- 천연 추출물이므로 보관중 침전 또는 용기의 변형이 생길 수 있으나 효과와는 무관하므로 흔들어서 사용하십시오.

**농림축산식품부 선정 농공상 융합형 기업**  
**산업 통상 자원부 명품 기업 선정**

② 파이토팜 제품 사진



2017. 10. 13.

자유 의견방 < 국민참여 < 국민소통 < 농림축산식품부

자유 의견방

Home > 국민소통 > 국민참여 > 자유 의견방

이 코너에 게재하신 의견에 대해서는 답변되지 않으며, 답변을 원하시는 분의 및 요청 사항과무에는 해당 부서직원으로서 친절하여 이음해 주시기 바랍니다. 본 사이트는 대한민국 저작권법을 준수하며, 본 게시판에 광고성 글, 타인(실명거론)에 관한 비방, 명예훼손에 관한 글, 주민번호나 계좌번호 등 개인정보가 포함된 글 등 홈페이지의 정상적인 운영을 저해하는 내용은 사전 검토 없이 삭제될 수 있음을 알려드립니다.

하단 글쓰기버튼 클릭시 브라우저 화면 상단에 노란바탕 화면 PrivacyScanner Web Component를 설치하라는 메시지를 눌러 ActiveX 컨트롤 설치를 선택해 설치 후 글을 등록해주세요. PrivacyScanner는 개인정보 노출을 막는 프로그램입니다.

타인의 저작물(신문기사, 사진, 동영상) 등을 관리자의 허락 없이 복제 또는 업로드하는 경우, 저작권 침해에 해당합니다. 또한, "공익-홍보-비밀리 목적의 이용", "재일 기관에 대한 신문기사의 이용", "저작물의 일부분의 이용" 등의 경우, 업에서 별도의 면제 규정을 두고 있지 않으므로 허락 없이 이용했다면 저작권 침해에 해당하며, 저작권법에 의하여 처벌 받으실 수 있습니다.

갯나무 부산물을 주원료로 사용한 친환경 배종 방제제

이름	이후정	등록일	2017-10-13
----	-----	-----	------------

친환경농업육성법 제1조의 친환경 병해충 방제제 장치는 농업의 환경모전 기능을 증대, 농업으로 인한 환경오염을 줄이며 친환경 농업을 실천하는 농업인을 육성함으로써 지속가능하고 환경 친화적인 농업을 목적으로 한다는 뜻이지만 현재 친환경 병해충 방제제가 사용되고 있는 친환경 농지재의 경우 병해충 발생억제, 작물 양분공급 및 생육촉진 강화 등 대부분이 기존의 비료나 농약의 효과 또는 비료+농약의 효과를 동시에 발현하는 복합된 효능을 보이고 있지만, 사용목적이 광범위하고 유기성자재로 주성분의 최소량 또는 유해성분의 최대량 등 객관적인 규격 제시가 어려우며, 약효 발현의 주성분과 살충, 살균 효과가 불분명하며, 친환경 농지재에 대한 여러 시각차에 따라 차이와 효과에 대한 전차가 심한 단점이 존재함.

식물추출물은 약제 저항성 발달의 가능성이 적고 특정 해충만을 골라서 방제할 수 있어 환경에 대한 안전성이 높은 장점이 있는 것으로 알려져 있음. 최종 방제효과가 있는 식물유래 물질은 주로 살충제, 기피제, 거식제로서 이용되어 왔으며, 우리나라에서는 제충국, 넝모밀, 고삼, 알구술 등 미 및 가지 식물추출물이 친환경농업에서 많이 사용되고 있어 새로운 살충소재의 개발이 필요한 상황임.

따라서, 국내 것을 참고 낮은 것부산물을 주원료로 사용해 친환경 배종 방제제의 방제효능을 소개하고자 함.

1. 친환경 배종 방제제(무척무척A)의 파프리카에 대한 방제효과 시험기관: 한국유기농업농업농조합

① 시험목적 -갯나무 추출 2차대사산물을 주원료로 하여 개발한 친환경 배종 -친환경 배종 방제제(무척무척A)를 이용한 파프리카의 총채벌레, 향어, 진딧물, 가루이등의 해충에 대한 방제효능 및 약제의 흡수율 등을 하고자 함.

② 시험방법

- 가. 대상작물 : 파프리카
- 나. 대상해충 : 총채벌레, 향어, 가루이
- 다. 적용방제제 : 갯나무추출 정유를 주원료로 하는 친환경 배종방제제(무척무척A)
- 라. 적용장소 : 파프리카 재배 농장
- 마. 처리내용 : 동일한 처리방법으로 3회 실시
  - 시험약제: 무척무척A, 무처리
  - 작물: 파프리카
  - 파프리카 수 및 사용량: 800배씩, 총
  - 처리시기 및 방법 : 1차처리(배종발생초기, 경엽처리), 2차처리(1차처리후 7일 경과), 3차처리 (2차 처리 후 10일 경과)
  - 기준량: 800배씩
  - 배양: 400배씩
  - 바. 조사항목
    - 1) 약효시험
    - 약제처리된 사인밀도를 체크한 후, 약제 3회 처리 후 배종발생밀도 비교조사
    - 2) 약해시험

③ 결과 요약(결론)

- ① 800배 농도로 친환경 배종 방제제 (무척무척A) 3회 처리 후 총채벌레의 방제효과는 84.1%, 향어의 방제효과는 83.1%, 가루이의 방제효과는 83.0%로 확인되었음.
- ② 친환경 배종 방제제 (무척무척A)를 400배 농도로 처리 후 파프리카 잎이나 식물체에 약해로 인한 증상은 육안으로 전혀 관찰 되지 않음.
- ③ 파프리카에 대해서는 방제효과가 검증되었으나, 다능작물에 대한 방제효과를 추가로 시험 확인 할 필요가 있다고 판단됨.
- ④ 국내에서 발생하는 갯나무 부산물을 이용해 친환경 방제제를 개발하여 원산지보호의 더불어 값싸고 질 좋은 신종 방제제를 개발함으로써 농가의 높은 소득과 친환경 농지재 연구 및 활성화를 통해 국제적인 위안을 확대하는 계기가 될 것임.

2. 친환경 배종 방제제(무학무학A)를 이용한 배실 주요 해충 방제효능  
시험기관: 원예특작환경과 해충관리연구실

(가) 시험목적

시험 피피인이 개발한 '갯나무 부산물'을 주원료로 하는 친환경 배종 방제제(무학무학A)를 이용한 배실 주요 해충에 대한 교상 방제효능을 검증코자 함

(나) 시험방법

가. 대상작물 : 배실

나. 대상해충 : 갈색날개매미충, 가루깍지벌레, 꿀검은말미충, 집박이벌레, 목숨아록진딧물

다. 적용 방제제 : 피톤치드를 주원료로 하는 친환경 배종 방제제(무학무학A)

라. 처리내용

(시험1) 대상해충에 대한 검열처리 약효 및 약해 시험

- 시험약제: 친환경 방제제(무학무학A)액제, 무처리

- 작물: 배실

- 피식배수 및 사용량: 500배약 25L(5주/구), 총 25L

- 처리시기 및 방법: 배종발생 초기 검열 혹은 꽃

- 기준량: 500

- 배양: 250

(시험2) 대상해충에 대한 약제 침지 벌트처리 약효 및 약해 시험

- 시험약제: 친환경 배종 방제제(무학무학A)벌트, 무처리

- 작물: 배실

- 피식배수 및 사용량: 500배약 25L 침지 벌트(5주/구), 총 25L 침지 벌트

- 처리시기 및 방법: 배종발생 초기 검열

- 기준량: 500

- 배양: 250

마. 주요 조사항목

1) 약효

- 약제 처리 전 사전검도, 처리 3일 후, 7일 후 해충 발생 밀도 3회 조사

2) 약해

- 피톤치드를 주원료로 하는 친환경 방제제 처리에 의한 배실 피해 유무 (검관조사)

(다) 결과요약

○ 500배 농도로 친환경 방제제(무학무학) 검열 처리 후 3일째 갈색날개매미충 방제효과는 90.8%, 7일째는 97.1%였음. 벌트 처리 후 3일째 방제효과는 39.7%, 7일째는 88.0%였음

○ 500배 농도로 친환경 방제제(무학무학) 검열 처리 후 3일째 가루깍지벌레 방제효과는 75.1%, 7일째는 86.6%였음. 벌트 처리 후 3일째 방제효과는 28.9%, 7일째는 76.8%였음.

○ 친환경 방제제(무학무학A)를 500배 농도로 검열 처리 후 3일째 꿀검은말미충 방제효과는 84.3%, 7일째는 90.6%였음. 벌트 처리 후 3일째 방제효과는 54.4%, 7일째는 84.1%였음

○ 친환경 방제제(무학무학A)를 500배 농도로 검열 처리 후 3일째 집박이벌레 방제효과는 90.7%, 7일째는 97.1%였음. 벌트 처리 후 3일째 방제효과는 68.1%, 7일째는 85.7%였음.

○ 500배 농도로 친환경 방제제(무학무학A) 검열 처리 후 3일째 목숨아록진딧물 방제효과는 90.0%, 7일째는 96.4%였음. 벌트 처리 후 3일째 방제효과는 78.7%, 7일째는 82.2%였음

○ 친환경 방제제(무학무학A)를 500배 농도로 배실에 검열처리와 벌트처리 후 3일과 7일째 식물체 잎에 약해로 인한 증상은 육안으로 관찰되지 않았음.



이전글	복분자씨추출물을 활용한 조류독감의 예방 가능 ...	2017-09-29
다음글	다음글이 없습니다.	

○ 계약서

업무 협약서

(주) 피러스 충북 단양군 적성면 쌀미길 18 (이하 길이라 한다.)에서 생산판매하고 있는 제품을 공급받고자 하는 자, 한국 유기농 인삼영농조합 대전시 동구 대전로 448번길 85-29 (이하 을이라 한다)은 아래와 같이 업무협약 체결을 한다.

제 1 조 ( 목 적 )

1. 본 계약은 "갑"과 "을" 상호간의 업무협약에 관한 전반적인 사항을 규정하며, 쌍방이 성실히 이행 준수함으로써 서로간의 공동이익을 추구하는데 그 목적이 있다.
2. "갑"이 공급한 소재는 홍삼과 융합한 제품 1차(㈜한광면세점, SM면세점 납품용)제조 시 사용한다.

제 2 조 ( 상호 신의 )

양사는 본 사업의 수주 및 수행을 위해서 상대방의 편익을 최우선으로 고려하여 협력한다.

제 3 조 ( 합의 이행 )

1. 양사는 신의성실의 원칙에 입각하여 본 양해각서의 내용을 성실히 이행한다.
2. 양사간 공동협의 과정에서 습득한 모든 사항은 양사 간 사전협의 없이 외부에 유출할 수 없으며, 이를 위반하여 발생하는 모든 책임은 그 위반 당사자가 부담한다.

제 4 조 ( 기타 사항 )

1. 계약조건 및 구체적인 방법에 대해서는 향후 별도의 세부 계약서를 작성, 합의한다.
2. 본 양해각서에 언급하지 아니한 사항에 대해서는 양사간 별도 협의하여 정하기로 한다.
3. 본 양해각서는 양사의 합의 하에 수정되지 않는 한, 1년간 효력을 발휘한다.

본 사업의 성공적인 추진 및 수행을 위하여 양사는 말은 바 최선을 노력을 다하며, 업무협약서가 성립함을 증명하기 위해 2부를 작성하여 양사 기명 날인한 후 1부씩 보관한다.

갑 : ㈜피러스

사업자 번호 : 304-81-15914

주소 : 충북 단양군 적성면 썰미길 18

전화번호 : 043-421-0330

대표: 이 성 희



을 : 한국유기농인삼영농조합

사업자번호 : 418-81-33263

주소 : 대전동구 대전로 448번길 85-29

전화번호 : 042-271-8257

대표: 정 필 윤



2016년 12월 20일

## **Goods Supply Agreement**

This agreement establishes the following contracts between SUNG HUK CO., LTD. (Hereinafter referred to as "A") and PHYLUS (hereinafter referred to as "B") for the supply of goods.

### **Article 1 (Purpose)**

The objective is to establish conditions and methods for supplying goods between "A" and "B" and to ensure smooth transactions by agreeing the terms of compliance of both parties.

### **Article 2 (Object Product)**

1. Items to be supplied to the Employer (hereinafter referred to as "Products") are agricultural equipment such as fruit bags, fruit storage pads, and fruit cleaners.
2. The addition of products shall be agreed upon by both parties.

### **Article 3 (Supply Price and Contract Quantity)**

1. Replace "A" and "B" with quotations submitted to "A" by mutual agreement.
2. Contract quantity shall be 30 million pieces per year.

### **Article 4 (Transaction Terms)**

"A" shall pay 20% of the amount of the order before the production of "B" to the designated account of "B". The balance shall be paid to the designated account of "B" immediately upon notification of the bill of lading do.

### **Article 5 (Returns and Rewards)**

1. In case of defective product or broken product, "B" shall be replaced immediately with "A" by a new product or "A" must be returned.

### **Article 6 (Sales Area)**

1. Prohibit the sale and operation of "B" products without the consent of "A" to the whole Thailand, the supply area of "A".
2. "A" shall not be entrusted with manufacture or production of a product that was developed in cooperation with "B" during the term of the contract from a third party without the consent of "A".

### **Article 7 (Confidentiality)**

"A" shall treat the technical and business facts of "B" recognized through dealings confidentially, and shall be liable to indemnify the other party for damages resulting from such disclosure.

### **Article 8 (Transfer)**

Without a written agreement between the rights and obligations under this Agreement, the parties can not be transferred to third parties.

**Article 9 (Jurisdiction)**

"B" and "B" are mutually agreed upon in accordance with common practices, and the court of competent jurisdiction shall be "B" if a lawsuit is filed due to failure to reach a satisfactory agreement at the parties' Shall be the designated court.

**Article 10 (Term of Agreement)**

1. This Agreement is effective for one year from December 11, 2017 and is hereby automatically renewed for one year unless expressly stated otherwise in writing.

For the faithful implementation of the Agreement and prove day right cross section 2 of this Agreement, the parties shall keep each collated 1.

December 11, 2017

A : SUNG HUK CO.,LTD



CEO:

B : PHYLUS CO., LTD

18, Ssalmi-gil, Jeokseong-myeon, Danyang-gun, Chungcheongbuk-do,  
Republic of Korea  
304-81-15914  
CEO Sung Hee Lee



## 계 약 서

본 계약은 을이 갑을 대표해 중국시장에서 상호 윈윈할 수 있도록 긴밀하게 협력하며 신의성실을 준수하기로 갑과 을이 합의한다.

1. 목적  
을이 갑을 대표해 중국시장을 개척하고 판매를 촉진 및 확장하는 역할을 하는데 관련된 각각의 권한과 임무를 확정한다.
2. 임무  
갑: 기술 개발 및 상품화하여 중국시장 진입을 위해 을에게 제공해야 하고 을로부터 소비자 불만을 받으면 품질 개선에 노력한다.  
을: 갑의 제품을 중국시장에 런칭시키기 위해 적극적으로 활동해야 하며 그 결과(제품별 매출액)와 시장 동향을 수시로 갑에게 전달해 사업상황을 공유한다.
3. 범위  
상기 2 항에 해당되는 제품은 피러스 생산 제품 중 농업관련제품과 음료분야에 한정한다. (2017년 7월 17일에 전달한 제품과 자료를 기준으로 한다)  
추가제품은 상호 협의해서 결정한다.
4. 시효기간  
본 계약체결한 후 1년으로 한다.  
상기 1년의 계약기간 중에 거래가 활성화되면 1년씩 자동 연장되며, 갑의 판단 하에 을의 실적이 현저히 낮을 경우 계약을 해지 하고자 할 경우 계약만료 1개월 이전에 상대방에게 통보 하여야한다.
5. 시효만료  
상기 4항 계약기간 중 상기 2항을 달성하지 못하거나 상도의를 준수하지 못하면 이의를 제기하고 협의한다. 단 갑과을이 합의하지 못하면 계약 종료된다.
6. 비밀 준수  
갑은 중국의 영업관련사항을 비밀로 관리한다.  
을은 갑의 제품에 대해 취득한 기술을 비밀로 관리해야 한다.  
비밀 준수 위반으로 피해가 발생하면 귀책사유에 대한 손해 배상을 해야 한다.

본 계약서는 2부 작성해 갑과 을이 각각 1부씩 보관한다.

2017년 8월 25일



갑: (주) 피러스  
충북 단양군 적성면 쌀미길 18번지  
043-421-0330



을: 上海首尔贸易有限公司

上海市黄浦区江西中路 406 号 302 室

021-6360-4587



### 3. 연구수행 내용 및 결과 (제1협동)

		코드번호	D-05
<b>제1협동(가천대) 연구수행 내용 및 결과 요약</b>			
세부연구목표	연구개발 수행내용	연구수행 방법	연구결과
수출용 파프리카의 주요 해충 3종의 발생소장 및 경제적 피해수준 산출	황색점착트랩 및 식물체 내 해충밀도 육안조사를 통한 실험온실 내 주요 해충 발생소장 조사 (2-yr field experiment)	실험온실을 격자 형태로 분할하고 모든 표본조사 위치에서 1-2주 간격으로 파프리카 재배 작기 기간 동안 해충개체군 발생소장을 조사함	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 당초 계획에 포함되었던 점박이응애의 해충발생소장은 미미하였지만, 실험포장 및 상업온실에서 복숭아혹진딧물이 작기 초기부터 심각하게 발생하는 것이 확인됨.</li> <li>2. 해충 3종 (담배가루이, 총채벌레, 복숭아혹진딧물)의 작기 초기 유입 경로 및 확산경로, 해충간 공간상호작용에 관하여 contour map 및 SADIE 분석을 통하여 구명함.</li> <li>3. 집중분포를 보이는 담배가루이와 총채벌레의 고밀도 hotspot의 공간분포가 상호 상관관계를 가지고 있지 않음이 확인됨.</li> <li>4. 황색점착트랩의 경우 해충의 초기 유입 경로 파악에 매우 효과적인 모니터링 기법이지만, 작기가 진행됨에 따라 실제 식물체 내 해충분포와 상관관계가 낮아지는 문제를 가지고 있는 것이 확인됨.</li> </ol>
주요 해충 3종 (담배가루이, 꽃노랑총채벌레, 복숭아혹진딧물)에 대한 신규 혼합추출물의 방제효과 평가	leaf-disc bioassay를 통한 주요 해충군의 신규 혼합추출물에 대한 독성 평가 (3-yr laboratory experiment)	대조구에서 해충의 치사율이 20%이하로 유지될 수 있는 leaf-disc bioassay arena를 이용하여 신규물질의 해충 3종에 대한	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 총 14가지의 신규 혼합추출물이 평가되었으며, 이들 중 8가지가 신규물질이 실험시작 후 3시간 이내 주요 해충군에 대해 90%이상의 방제효과를 나타냄.</li> <li>2. 방제효과를 보인 8가지 물질 중 5가지 물질이 파프리카 식물에 약해를 유발하는 것을 확인함.</li> <li>3. 2가지 물질의 기본 성분은 자소추출액을 확인함.</li> </ol>

	Blind test를 통한 신규 혼합추출물의 식물체 약해 발생여부 평가 (3-yr field experiment)	<p>살충력을 검정함</p> <p>5명의 참가자가 국립농업과 학원 살충제 약해시험 등록기준에 의거하여 blind test를 실시함</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 약해를 유발한 5가지 물질 중 2가지 (JS408, JP503)에 대하여 blind test를 실시함.</li> <li>2. 신규물질 들은 물로 처리한 대조군에 비해 유의한 수준의 약해를 유발하는 경향을 나타냄</li> <li>3. 이러한 약해는 신규물질들을 농약으로 상용화하기 위해 반드시 해결되어야 하는 문제점임</li> <li>4. 현재의 신규물질 조성으로는 파프리카 온실 내에 약재를 살포하는 것은 불가능할 것으로 사료되며, 이러한 이유로 온실외부 주변부 야생기주에 대한 국한된 사용을 대안으로 고려해 볼 수 있음.</li> </ol>
후보 물질의 유용생물(서양뒤영벌)에 대한 환경영향 평가	<p>Bioassay를 통한 유용생물의 후보 물질에 대한 독성 평가 및 아치사 농도에서 행동패턴 분석 (2-yr laboratory experiment)</p>	<p>후보 물질에 의한 유용생물의 치사율을 확인함</p> <p>후보 물질에 대한 유용생물의 아치사농도를 확인함</p> <p>아치사 농도에서 행동변화를</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 기존 3종의 neonicotinoid계 유기 합성농약 (acetamiprid, dinotefuran, imidacloprid)과 JS408의 살충효과를 비교한 결과, JS408이 유의하게 높은 치사율을 유발함 (<math>P &lt; 0.05</math>).</li> <li>2. 따라서, 개발 중인 신규 물질 중 해충살충력이 높은 2가지 후보 물질 모두 높은 수준의 환경독성을 야기하는 문제점을 나타내고 있음.</li> <li>1. JS408의 경우, 농도 의존적 살충효과를 나타내는 것을 확인함. JS408 원액에 비하여 JS408 3.5 배 희석액의 경우, 노출 24시간 후 77%의 치사율을 보임.</li> <li>2. JP503의 경우, 실험시작 후 10시간 때 55%의 치사율을 보였으며, 72시간 후의 치사율은 95%에 도달함을 확인함.</li> <li>1. JP503을 처리하였을 때 유용곤충의 행동변화 패턴을 수치화하기 위해 3가지 parameter (walking</li> </ol>

		<p>확인하기 위해 영상분석프 로그램인 EthoVision 을 이용함.</p>	<p>distance, walking velocity, angular velocity)를 비교함.</p> <p>2. 3가지 parameter 중 1가지 (angular velocity)에서만 유의한 행동차이를 보였으며(<math>P &lt; 0.05</math>), 그 이외의 parameter에서는 대조군과의 차이를 보이지 않음.</p> <p>3. 아치사 농도에서 서양뒤영벌의 이동성은 저하되지 않았지만, 방향감각에 유의한 영향을 미칠 수 있는 가능성이 있으므로 서양뒤영벌 방사를 위해서는 후보 물질 살포 후 잔류 농약이 제거될 수 있는 충분한 시간을 확보하는 것이 필수적임.</p>
--	--	---	---

코드번호	D-05
------	------

### 1. 수출용 파프리카의 주요 해충 3종의 발생소장 및 경제적 피해수준 산출

- 요점1. 황색점착트랩을 이용하여 해충 발생밀도를 조사하였으며 설치 위치는 식물의 최상단으로부터 30cm 상단 지점에 1m 간격으로 설치함. 1~2주 간격으로 트랩을 회수하고 새로운 트랩으로 교체하였으며, 실험실에서 점착된 해충들을 개체수준에서 분류/동정하였음.
- 요점2. 당초 계획에 포함되었던 점박이용애의 해충발생소장은 미미하였지만, 실험포장 및 상업온실에서 복숭아혹진딧물 (*Myzus persicae*)이 작기 초기부터 높은 밀도로 발생하는 것이 확인됨.
- 요점3. 황색점착트랩을 이용하여 해충 3종 (담배가루이, 총채벌레, 복숭아혹진딧물)의 작기 초기 유입경로 및 확산경로, 해충간 공간 상호작용을 contour map 및 SADIE (Spatial Analysis for Distance Indices) 분석을 통하여 파악함.
- 요점4. 집중분포를 보이는 담배가루이와 총채벌레의 고밀도 hotspot의 공간분포가 상호 상관관계를 가지고 있지 않음이 확인됨.
- 요점5. 황색점착트랩의 경우 해충개체군의 초기유입 경로파악에 매우 효과적인 모니터링 기법이지만, 작기가 중반 이후 실제 식물체 내 해충분포와 상관관계가 낮아지는 문제를 가지고 있는 것이 확인됨.

• 1차년도와 2차년도의 실험 포장은 경기도 일산에 위치한 서울시농업기술센터 실험

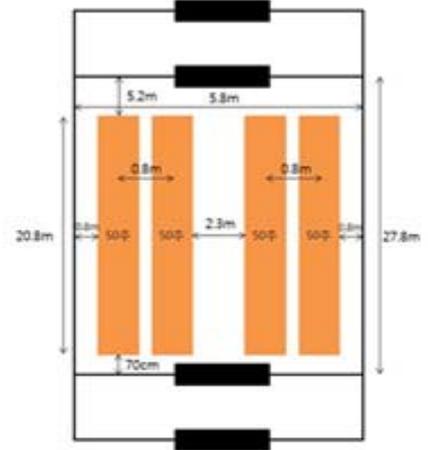
동 (6×28m)에서 5개월간 진행하였으며 (그림14-16), 3차년도 실험 포장은 서울 서초구 신원동에 위치한 서울시농업기술센터 복지형체험농장 실험동에서 3개월간 진행하였음 (그림17). 품종의 경우, 1차년도와 3 차 년도에는 시로코 품종을, 2 차 년도에는 파피레드 품종을 정식함 .



<그림 14> 황색점착트랩 및 육안조사를 통한 해충개체군 발생소장 조사를 실시한 파프리카 실험온실 전경 (1차년도)



<그림 15> 파프리카(시로코)의 작기 기간 중 생육상태 (1차년도, 2015)



2016. 09. 09



2016. 10. 14



2016. 11. 11



2016. 10. 28



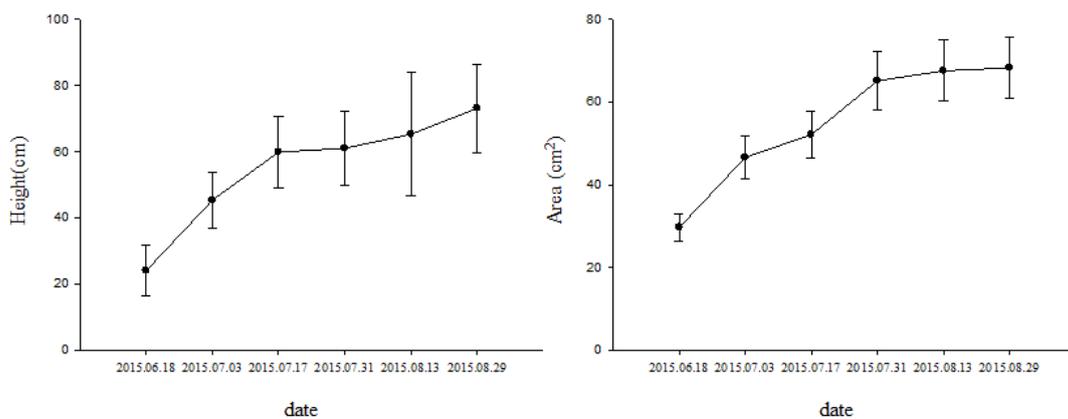
2016. 10. 28

<그림 16> 해충발생 소장 조사가 실시된 실험온실 및 작물(파피레드) 생육 상태 (2차년도)



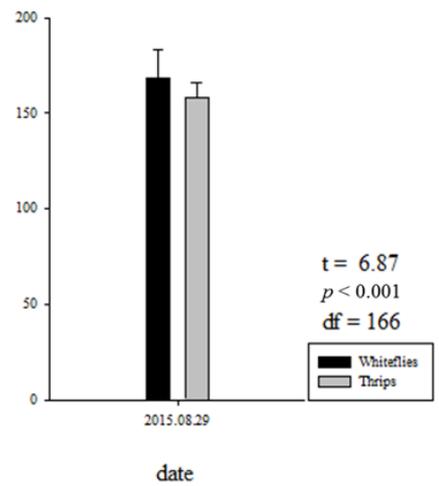
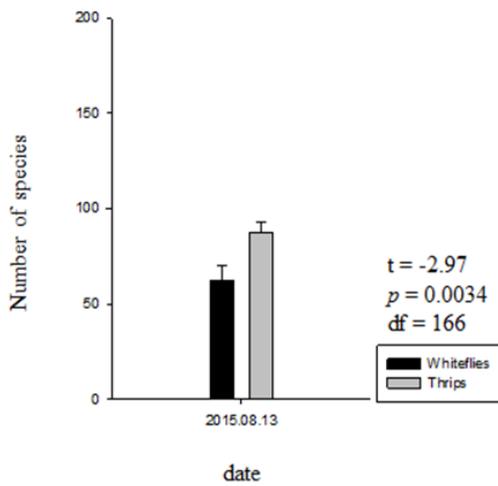
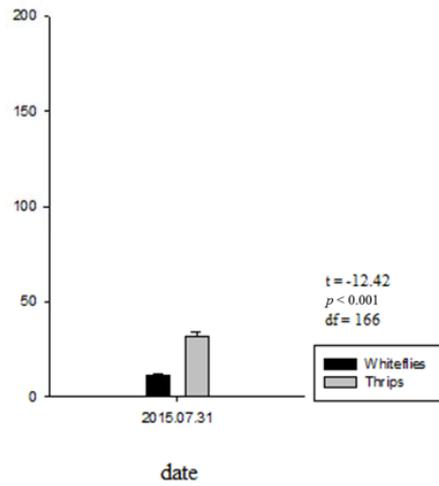
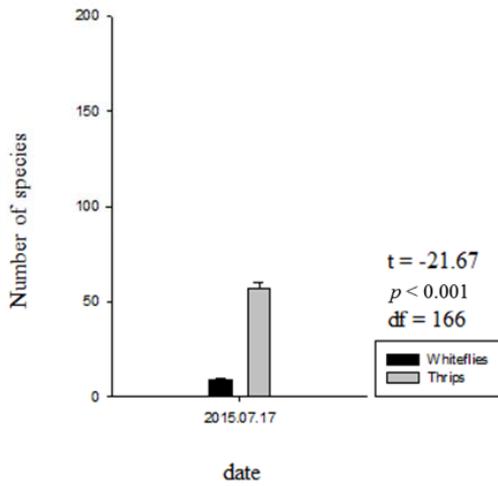
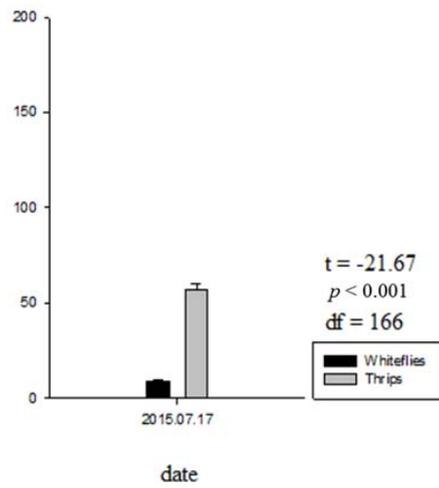
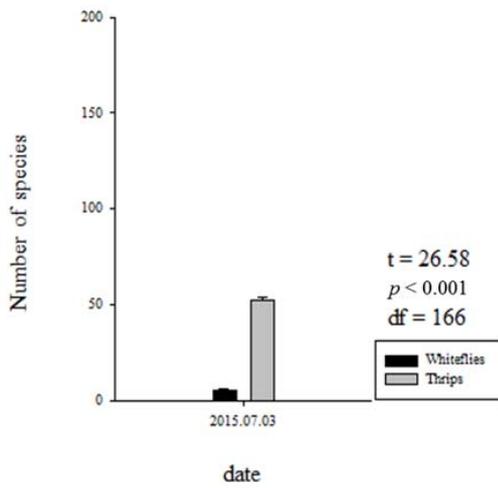
<그림 17> 해충발생 소장 조사가 실시된 실험온실 및 작물(파피레드) 생육 상태 (3차년도)

- 1차년도 실험에서 해충밀도 조사는 2015년 5월29일 (정식)부터 9월4일까지 진행되었으며, 실험 기간 중 파프리카 식물체의 체장과 엽면적은 일반적으로 선형증가 양상을 보였으며, 작기 기간과 식물의 성장간의 상관관계를 나타내는 결정계수는 0.85이상으로 통계적으로 유의한 것으로 확인됨 (그림18).



<그림 18> 작기 기간 중 파프리카 식물 체장과 엽면적의 변화양상

- 황색점착트랩에 유인된 담배가루이의 밀도는 초기에 안정적인 저밀도를 보이다가, 작기가 진행됨에 따라 후반부에는 초기밀도 대비 2,900%로 급격하게 증가하는 양상을 나타냄 (그림19).
- 식물체 내 담배가루이 약충 밀도가 낮은 수준으로 작기 후반까지 지속된 것으로 보아 밀도증가는 대부분 외부유입에 의한 것으로 판단되며, 이는 주변부의 야생기주의 영양이 큰 것으로 사료됨.
- 황색점착트랩에 유인된 총채벌레의 밀도는 담배가루이와 유사하게 초기에 안정적인 저밀도를 보이다가, 작기가 진행됨에 따라 초기밀도 대비 202%로 증가하는 양상을 나타냄 (그림19).
- 담배가루이와 유사하게 식물체 내 총채벌레 유충 및 식흔이 매우 낮은 수준을 감안하면, 밀도증가는 지속적 외부유입에 의한 것으로 판단됨.
- 황색점착트랩에 유인된 담배가루이와 총채벌레의 밀도는 총채벌레의 밀도가 담배가루이에 비해 통계적으로 유의하게 높게 유지되다가, 작기 후반에 가루이의 밀도가 급격히 증가하면서 실험종료 단계에서는 담배가루이의 밀도가 통계적으로 유의하게 높게 나타남 ( $P < 0.05$ ).
- 이러한 발생소장 양상은 해충개체군의 초기유입 방지의 중요성을 의미하며, 작기 기간별에 따라 우점 해충개체군의 변화에 따라 모니터링 및 방제기법의 차등적 적용이 필요함을 시사함.
- 특히, 일반적으로 사용되고 있는 점착트랩 기반 모니터링의 경우 실제 식물체를 가해하는 해충의 밀도와 상관관계가 높지 않을 수 있으므로, 점착트랩 결과에만 의존하여 방제전략을 수립하는 것은 불충분한 것으로 사료됨.



<그림 19> 파프리카가 식대된 실험온실에서 담배가루이와 총채벌레의 황색집착트랩 당 밀도변동 추이 (1차년도)

- 황색점착트랩에 유인된 담배가루이와 총채벌레의 밀도는 일반적으로 유의한 상관관계가 없는 것으로 나타나는데 ( $P > 0.05$ ), 두 종이 모두 유의한 수준에서 집중분포를 보이지만, hotspot의 위치 등은 두 종 간에 유의한 상관관계가 없거나 작기 중반에 낮은 수준에서의 상관관계만 존재하는 것이 확인됨. 따라서 두 종에 대한 밀도 및 분포조사는 각종에 대해서 독립적으로 이루어져야 하며 각 해충종의 고밀도 hotspot을 특정하고 관리하는 것이 필요함 (표24).

Date	Correlation coefficient	P-value
2015.07.03	0.0268	0.1371
2015.07.17	0.1564	0.0002
2015.07.31	0.0630	0.0213
2015.08.13	0.0037	0.5831
2015.08.29	0.0086	0.4018

<표 24> 황색점착트랩에 유인된 담배가루이와 총채벌레 밀도 간 상관관계 (1차년도)

- 식물체에 실제로 존재하는 해충의 밀도를 파악하기 위하여 진행한 잎 육안조사의 경우, 황색점착트랩과 매우 상이한 패턴을 나타내는 흥미로운 결과가 얻어졌음. 주목할 점은 황색점착트랩에 유인된 해충의 밀도가 매우 높은 시기/장소에서도 담배가루이와 총채벌레의 식물체 상의 밀도는 매우 낮은 것으로 확인됨. 이는 황색점착트랩에만 의존한 방제의사결정은 오류의 확률이 매우 높을 수 있음을 보여주는 자료임 (표25).
- 또한 담배가루이와 총채벌레와 달리 진딧물의 식물체내 밀도가 매우 높아 이에 대해 차 년도부터 추가적인 연구가 필요한 실정이며, 이는 상업온실 재배자 및 관련 전문가 집단의 의견수렴에서도 동일한 양상이 나타나는 것이 확인됨 (표25).

2015.06.18	Whitefly	Thrips	Mites	Aphids
Line 1	0	0	0	0
Line 2	0	0	0	0
Line 3	1	0	0	0
Line 4	1	0	0	0
total	2	0	0	0

2015.07.03	Whitefly	Thrips	Mites	Aphids
Line 1	1	0	7	3
Line 2	0	0	0	0
Line 3	0	0	1	1
Line 4	0	0	1	0
total	1	0	9	4

2015.07.17	Whitefly	Thrips	Mites	Aphids
Line 1	0	0	1	1786
Line 2	0	1	6	687
Line 3	0	2	1	161
Line 4	0	0	3	28
total	0	3	11	2662

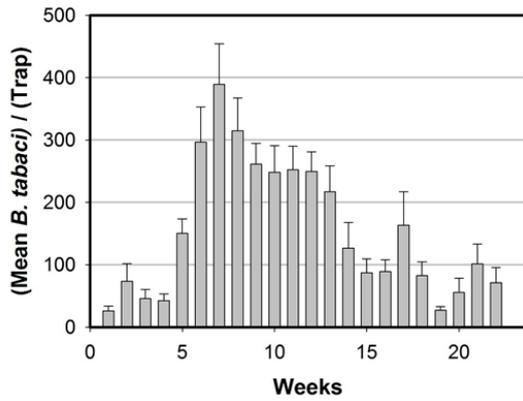
2015.07.31	Whitefly	Thrips	Mites	Aphids
Line 1	0	0	0	2006
Line 2	0	0	5	1482
Line 3	2	5	0	406
Line 4	0	0	1	208
total	2	5	6	4102

2015.08.13	Whitefly	Thrips	Mites	Aphids
Line 1	0	0	15	1069
Line 2	2	1	28	257
Line 3	0	0	4	65
Line 4	0	0	1	10
total	2	1	78	1401

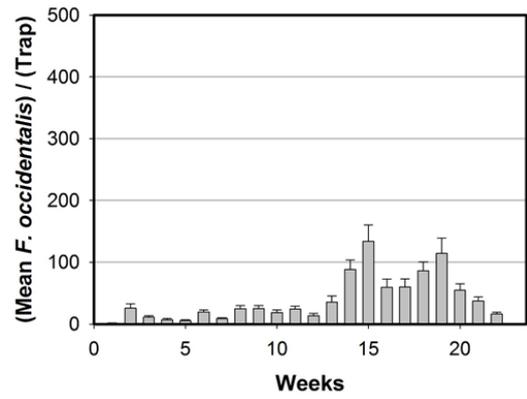
2015.08.29	Whitefly	Thrips	Mites	Aphids
Line 1	0	0	128	1330
Line 2	0	0	61	386
Line 3	0	2	1	474
Line 4	0	0	1	312
total	0	2	191	2502

<표 25> 육안조사를 통하여 확인된 식물 체내 해충의 밀도  
(총 개체수를 표시 / 작물식재 열) (1차년도)

- 2차년도 황색점착트랩을 이용하여 밀도변동을 조사한 결과 전반적으로 담배가루이의 밀도가 높았으며, 특히 작기 초기에 우점 하는 것으로 파악되어 초기 밀도 관리가 중요한 것으로 사료됨. 총채벌레의 경우 작기 후반에 밀도가 상승하는 양상을 나타내어, 이 두 종의 해충관리 전략이 시간적으로 이원화되어 지속적 관리가 필요한 것을 시사함 (그림20).
- 이러한 두 해충 개체군 밀도 변동 양상은 전년도 발생순서가 바뀌었지만, 동일하게 해충우점 양상이 이원화되어 나타나는 일반적 경향을 나타냄.
- 2년간에 걸친 이러한 동일한 결과는 담배가루이와 총채벌레의 방제적기 선정이 개별적으로 이루어져야 하며, 이는 효과적 방제 및 농약사용량 감소에 필수적인 생태정보로 의미 있는 결과임.



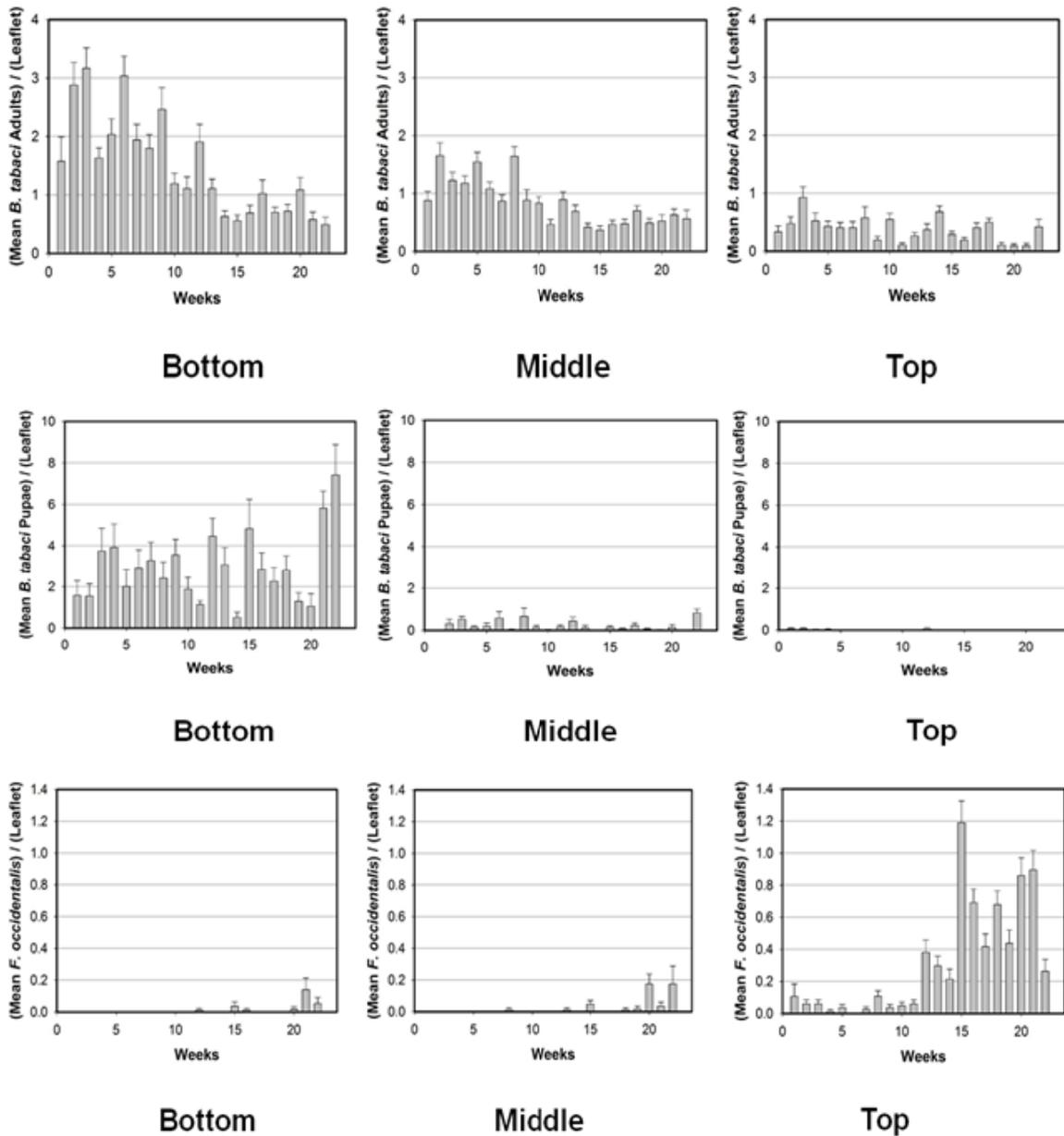
***B. tabaci***



***F. occidentalis***

<그림 20> 담배가루이와 꽃노랑총채벌레의 밀도변동 양상 (2016, 2차년도)

- 본 연구에서는 포장 내 식물체 간 해충공간분포 뿐만 아니라 식물체내 해충개체군의 수직분포를 함께 조사하여, 좀 더 micro site-specific 모니터링 및 방제기법 적용을 위한 기초자료를 확보함.
- 식물체 내 분포의 경우 가루이의 성충과 종령 약충의 밀도는 수직 분포가 유사하며, 식물체 하단부에 집중 분포하는 것으로 나타남. 이와는 상반되게 총채벌레의 경우 식물체 상단에 집중 분포하여, 이 두 종의 해충관리 전략이 식물체 내라는 작은 공간규모에서도 이원화되어 관리가 필요함을 시사함 (그림21).

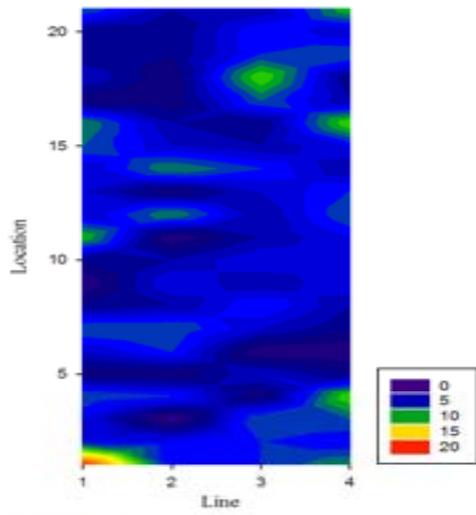


<그림 21> 파프리카 식물체에서 담배가루이 성충, 종령 약충, 및 꽃노랑총채벌레의 식물체 내 수직분포 양상 (2차년도, 2016)

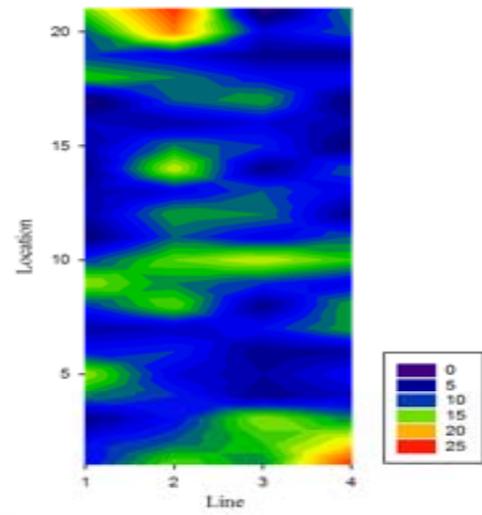
- 두 해충 (담배가루이, 총채벌레)의 유입경로 및 공간 분포변화 양상을 정량적으로 확인하기 위하여 1차년도와 2차년도 황색점착트랩의 결과를 이용하여 contour map 작성 및 SADIE 분석을 실시함.
- 1차년도 실험 결과, 담배가루이와 총채벌레 모두 외부로부터의 지속적인 유입과 운실 내 성충의 이동이 지속적으로 관찰되었지만, 식물체 상의 약충 또는 성충의 밀도는 동일하게 매우 낮아, 두 종 모두 바람 등에 의한 수동적 유입과 비산이 주로 일어나는 것으로 사료됨

- 1차년도 담배가루이의 밀도증가 양상을 보면, 초기 온실 출입구를 통하여 유입되어 온실의 중심부로 확산되었으며, 8월13일 이후 밀도가 급격히 증가하면서, 온실 출입구와 Edge에 집중 분포하는 양상을 나타냄 (그림22).
- 따라서 담배가루이의 효과적인 예찰과 방제를 위해서는 작물생육초기에 온실 출입구에 집중적인 관리가 필요하며, 스크린 등 물리적 장치가 초기 유입을 경감시키는 효과적인 관리방안이 될 것으로 사료됨.
- 총채벌레의 경우 담배가루이와 상이하게 유입초기부터 온실중심부로 확산된 양상을 보이다가, 담배가루이가 유입된 반대쪽 출입구로 추가 유입이 발생하면서, 이곳에 집중분포를 보이는 패턴을 보임 (그림23).
- 이는 총채벌레의 경우 바람 등에 의한 수동적 비산이 주된 분산의 양상이기 때문에, 출입구를 통한 공기흐름을 따라 중앙부로 초기부터 확산된 것으로 사료되며, 이후의 추가 유입 경감을 위해서는 담배가루이와 마찬가지로 스크린 설치 등 물리적 장벽이 필요한 것으로 보임.
- 2차년도 실험 비닐하우스의 담배가루이 성충의 밀도는 작기 초중반에 전반적으로 증가하는 양상을 나타내는데 이는 출입구 부근을 통한 외부로부터 유입임이 contour map 분석 결과 판별이 되었으며, 이러한 유입양상은 전년도 예찰결과와 일치하는 부분으로 작기 초/중기에 외부유입 차단이 가루이 밀도증식 억제에 결정적 요인임을 시사하는 결과임. 전년도 결과와 상이한 점은 포장 중심에 hot spot 이 형성되고 지속적으로 그 곳으로 성충의 유입과 집중이 이루어 짐 (그림24).
- 총채벌레의 유입양상 및 공간분포는 앞서의 담배가루이와 상이한 양상을 나타냄. 작기 초기에 출입구 주변으로의 유입양상은 유사하지만, 유입이 지속적인 근거리 미약하며, 기 유입된 개체군의 hotspot 이 산발적으로 형성되며 주차별로 이동이 잦은 양상을 나타내고 있음. 이는 담배가루이에 비해 성충개체군의 수동적 또는 능동적 포장 내 이동이 활발하며, 이는 site-specific 농약살포의 적용 가능성을 낮추는 주된 요인 중 하나로 사료됨 (그림25).
- 따라서, 황색점착트랩 밀도 조사 및 contour map 분석결과 두 해충개체군의 요방제 밀도 수준은 시기적, 공간적 모두 서로 상이하게 발생하는 것이 확인되며, 이는 효과적인 방제를 위해서는 방제기법의 이원화 및 고도화가 필요함을 시사하는 결과임.

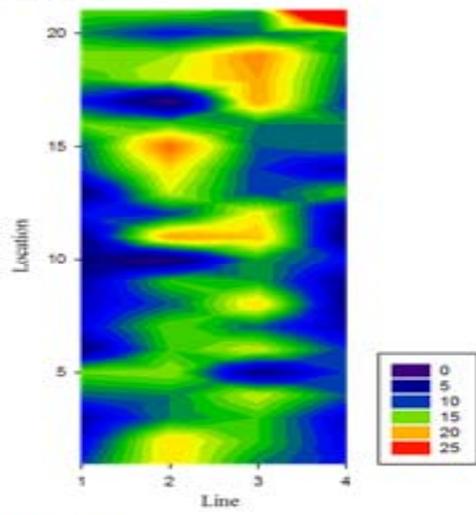
2015.07.03



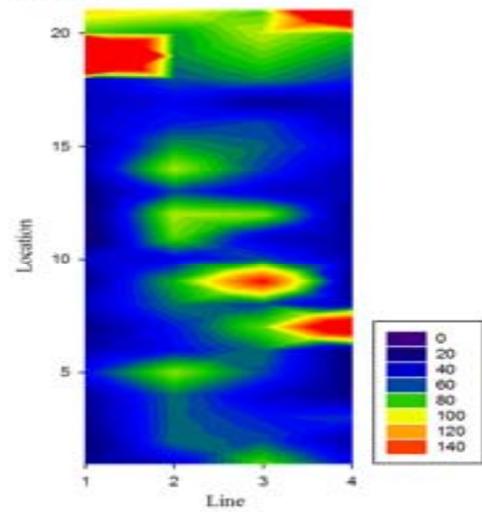
2015.07.17



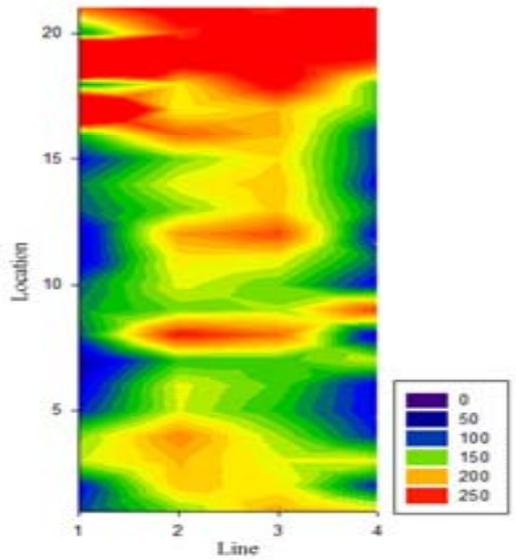
2015.07.31



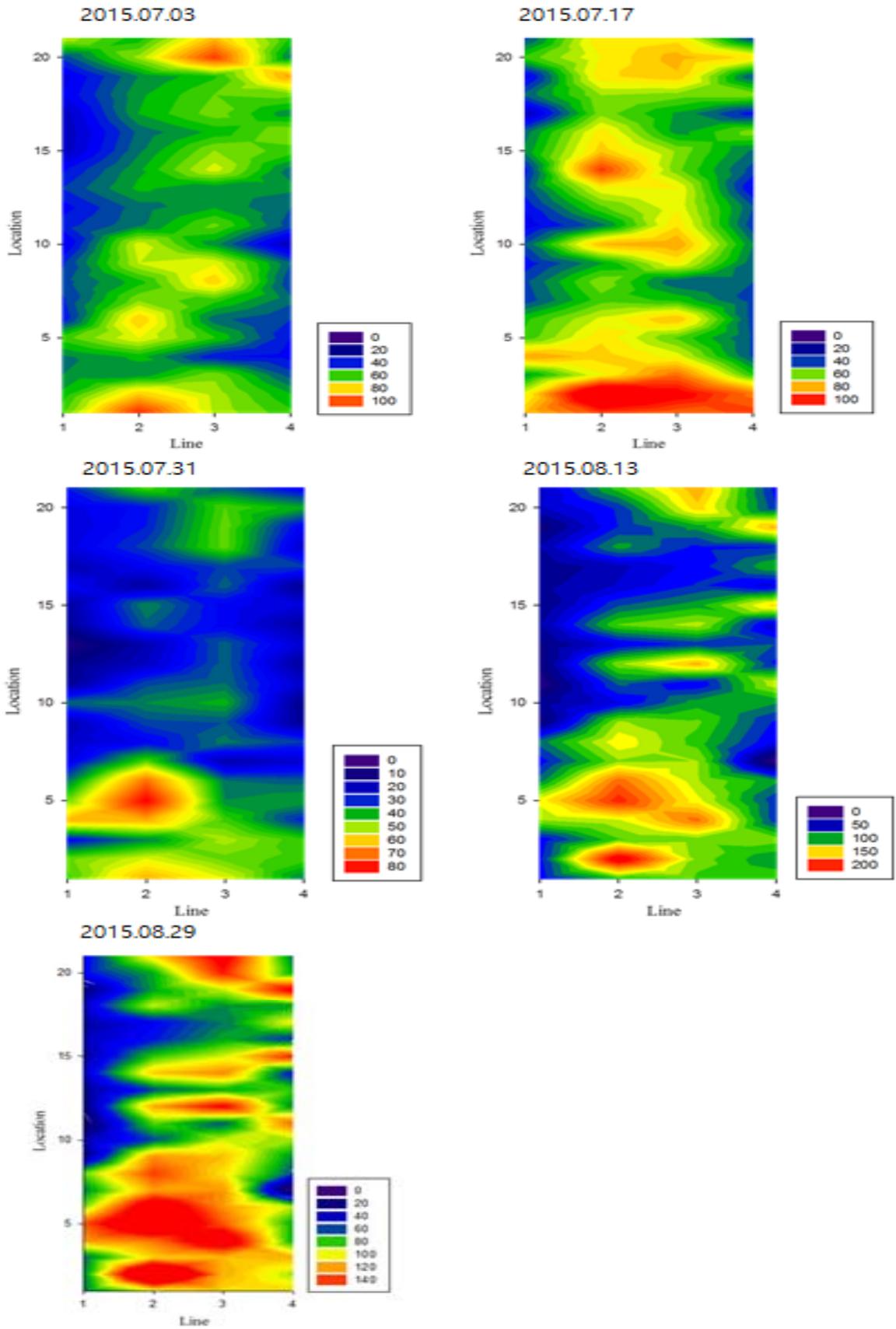
2015.08.13



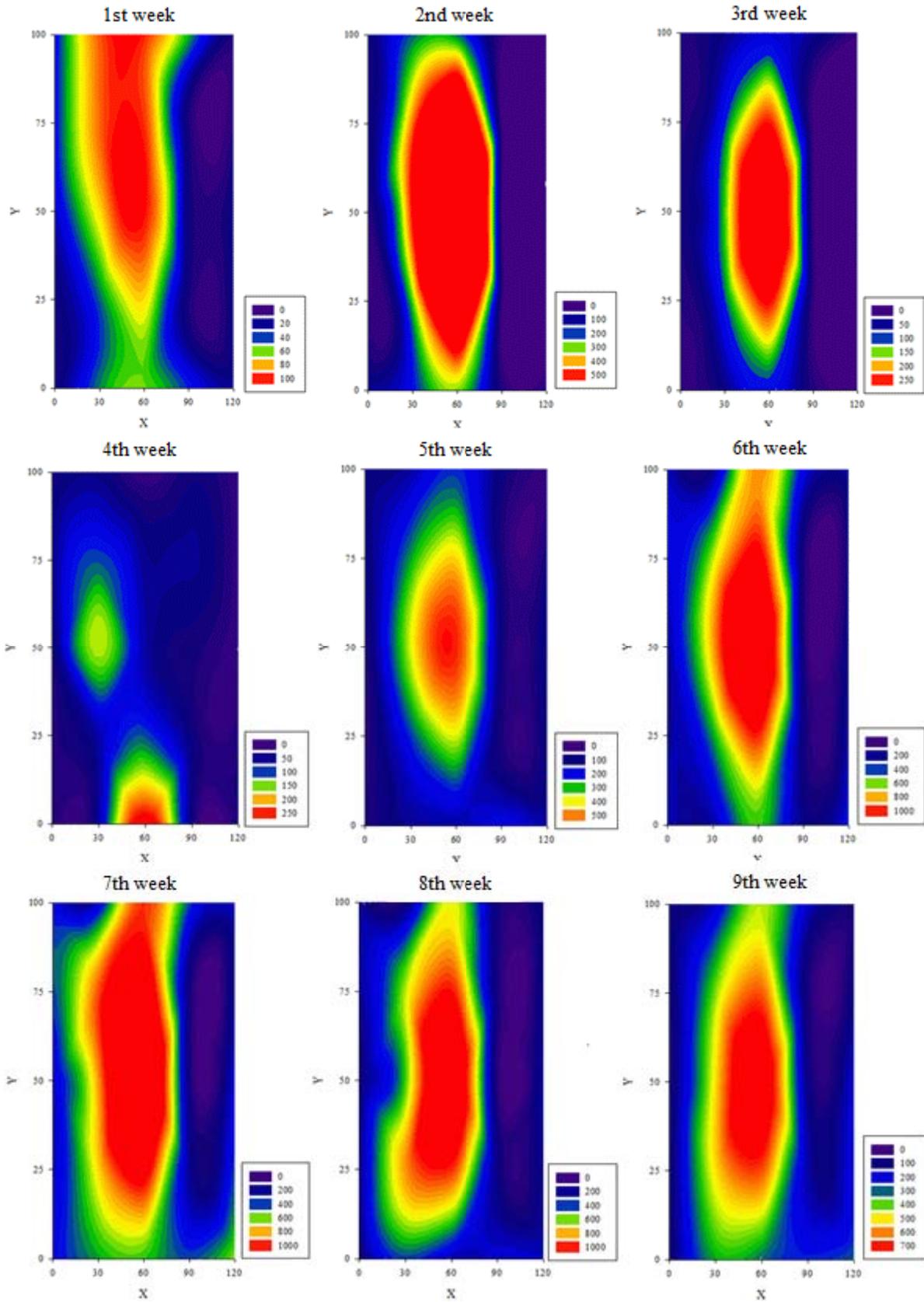
2015.08.29



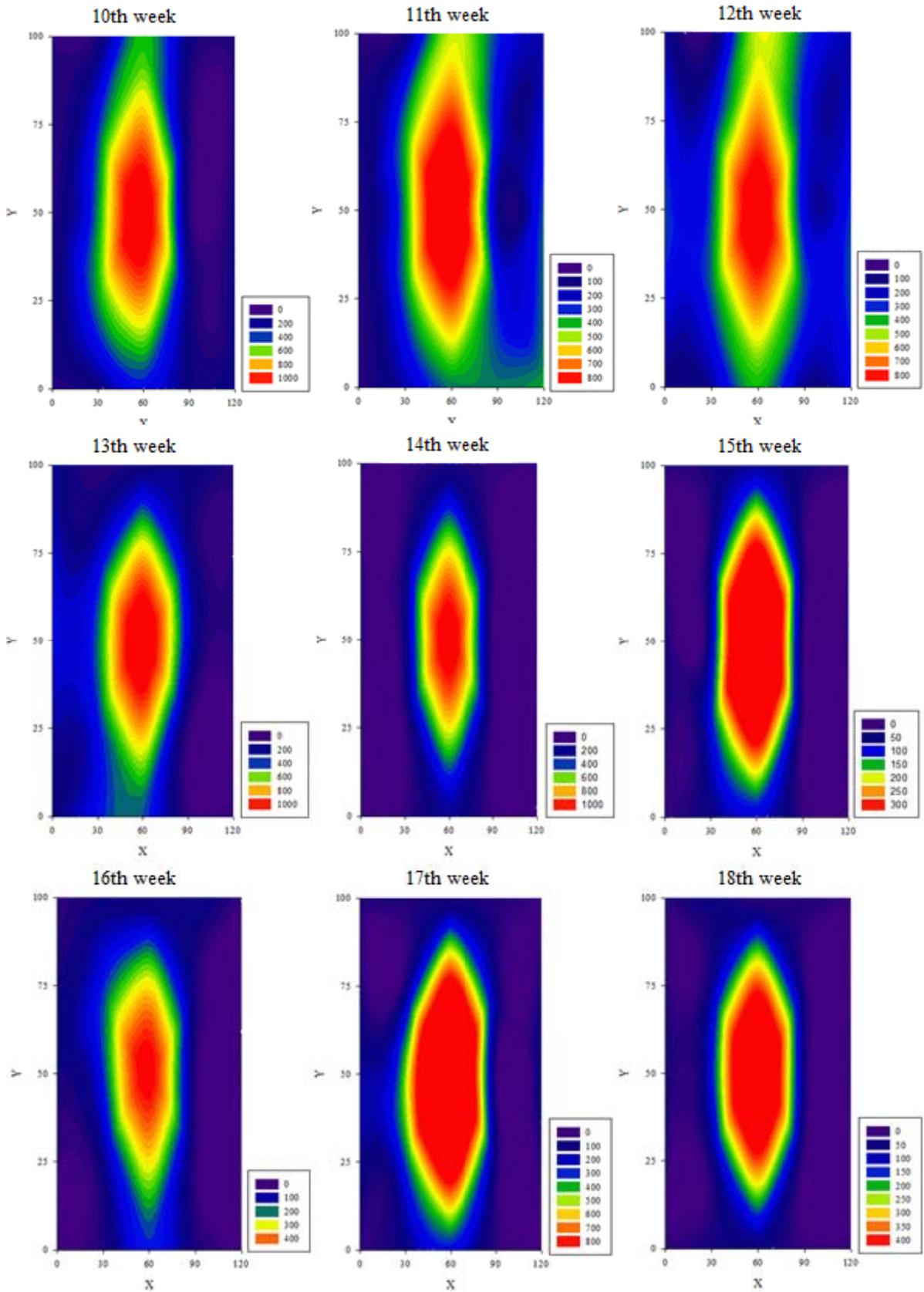
<그림 22> 황색점착트랩에 유인된 담배가루이 밀도의 온실 내 공간분포를 나타내는 Contour map (1차년도)



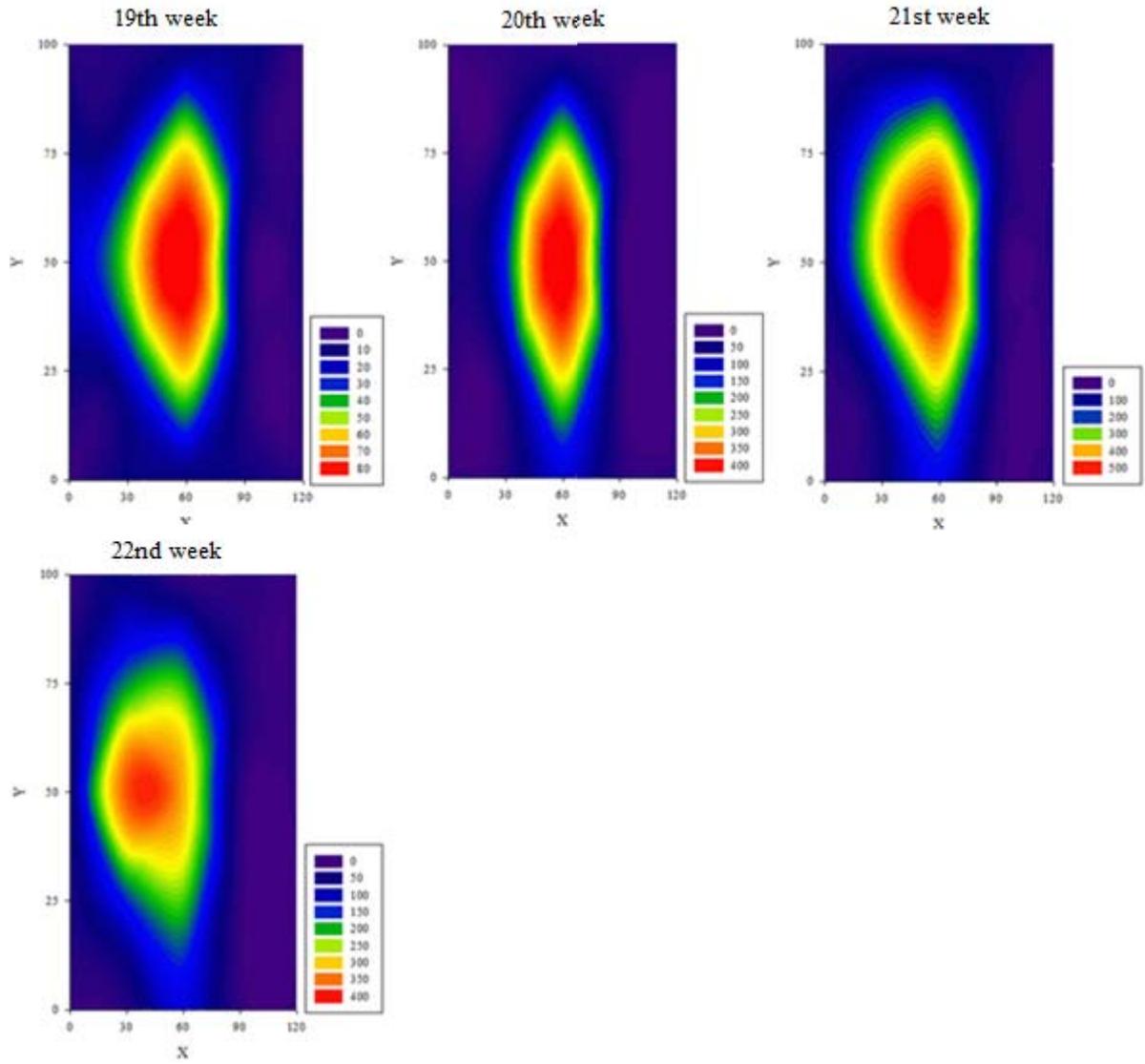
<그림 23> 황색점착트랩에 유인된 총채벌레 밀도의 온실 내 공간분포를 나타내는 Contour map (1차년도)



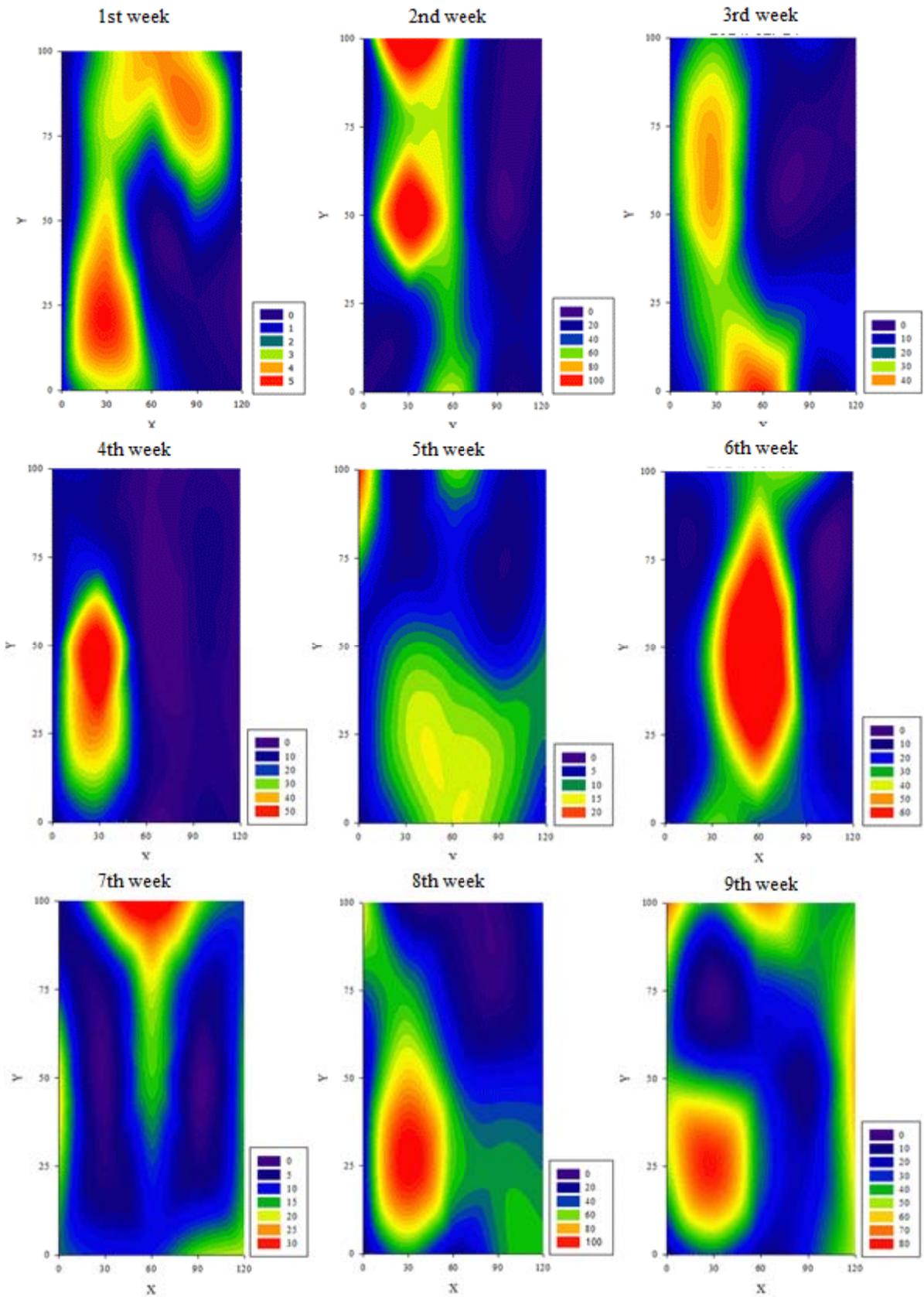
<그림 24> 황색점착트랩에 유인된 담배가루이 밀도의 온실 내 공간분포를 나타내는 Contour map (2차년도)



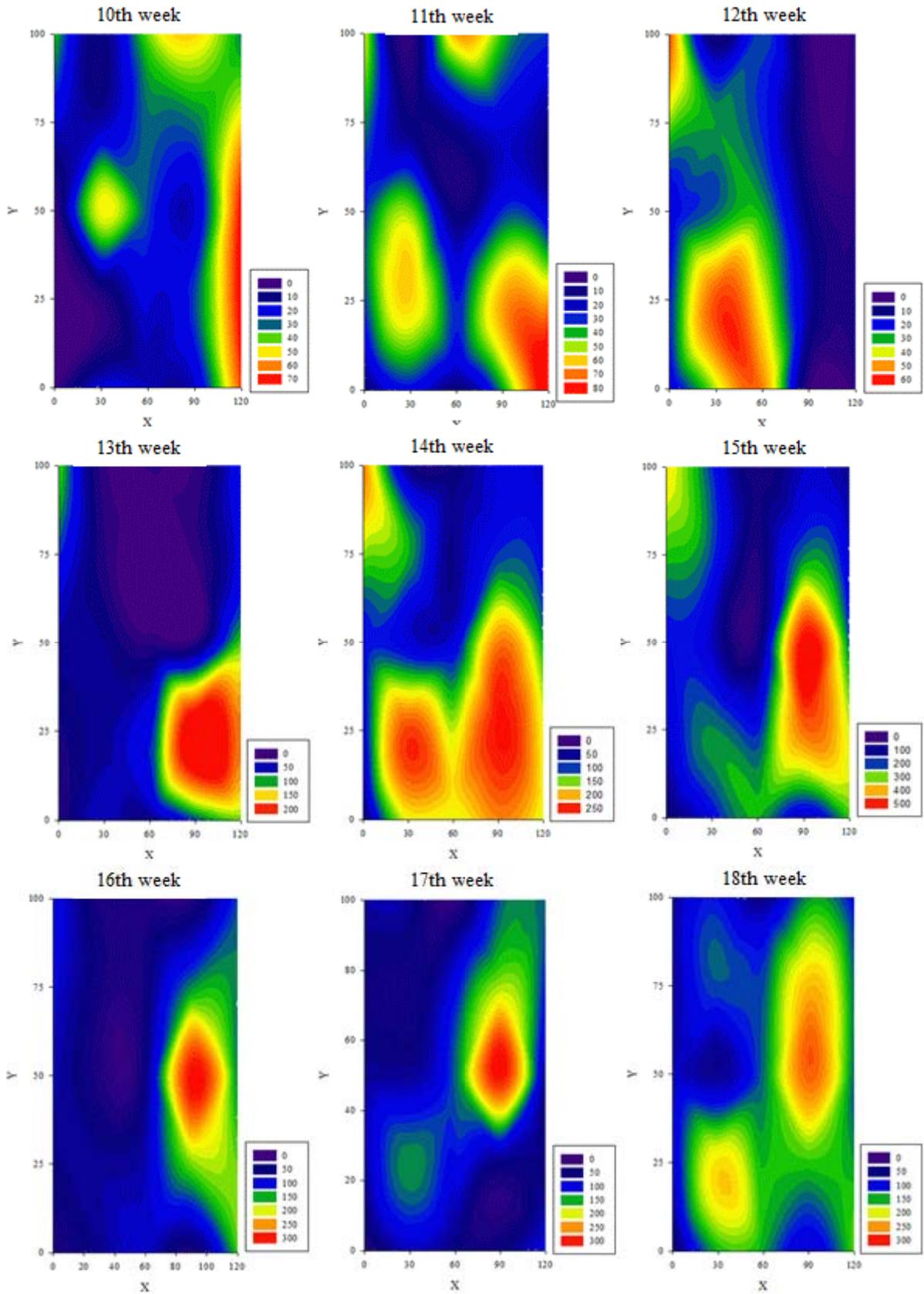
<그림 25> 황색점착트랩에 유인된 담배가루이 밀도의 온실 내 공간분포를 나타내는 Contour map (2차년도)



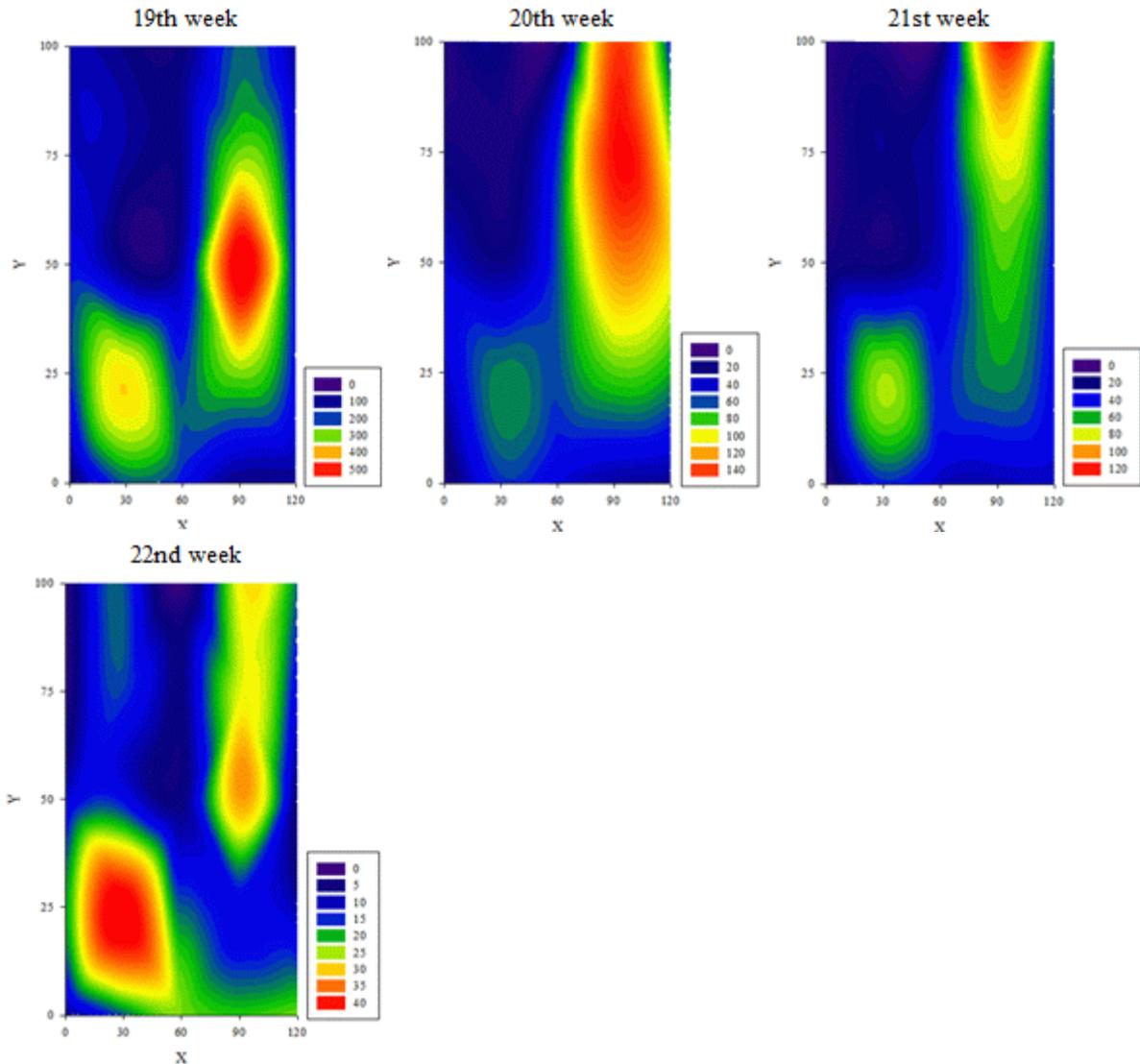
<그림 26> 황색점착트랩에 유인된 담배가루이 밀도의 온실 내 공간분포를 나타내는 Contour map (2차년도)



<그림 27> 황색점착트랩에 유인된 총채벌레 밀도의 온실 내 공간분포를 나타내는 Contour map (2차년도, 2016)



<그림 28> 황색점착트랩에 유인된 총채벌레 밀도의 온실 내 공간분포를 나타내는 Contour map (2차년도)



<그림 29> 황색점착트랩에 유인된 총채벌레 밀도의 온실 내 공간분포를 나타내는 Contour map (2차년도)

- 2차년도 황색점착트랩 결과로 주차별 담배가루이 공간분포와 관련된 SADIE 분석을 실시함. 아래는 분석이 완료된 포장에 대한 SADIE indices를 요약한 표이며, 이를 바탕으로 담배가루이의 site-specific 농약 살포법 개발에 중요한 기초자료로 활용될 것으로 기대됨 (표26-27).
- SADIE 분석결과 담배가루이는 평균이상의 밀도가 이웃하여 집중 분포하는 hotspot이 작기 중반 이후에 형성되어 작기 후반까지 유지되는 것이 확인됨.
- SADIE 분석결과 담배가루이는 앞서의 hotspot이 작기 중반이후에는 온실 내 동일한 지역에서 반복적으로 나타나는 것이 확인되었으며, 이는 방체에 있어서 site-specific 방제기법을 적용하기에 유리한 발생소장으로 해석이 가능함.
- 하지만, 앞서의 SADIE 분석은 황색점착트랩에 기반한 분석결과 및 해석임으로 앞

서 언급한 바와 같이 식물체 내 해충밀도의 육안조사를 통해 방제기법의 효율성을 평가하는 것이 필요함.

Time		§Mean number of whitefly(±SE)		$I_a$	$P_a$	$\bar{v}_j$	$P\bar{v}_j$	$\bar{v}_i$	$P\bar{v}_i$
July	3 <sup>th</sup>	5.50 ± 0.33		0.901	0.5303	-0.91	0.5244	1.042	0.3297
	17 <sup>th</sup>	9.08 ± 0.50		1.303	0.1412	-1.27	0.1515	1.252	0.1603
	31 <sup>th</sup>	11.19 ± 0.68		1.655	0.0409	-1.492	0.0704	1.581	0.0521
August	13 <sup>th</sup>	61.88 ± 7.29		2.266	0.0051*	-1.942	0.0137*	2.152	0.0038*
	29 <sup>th</sup>	168.51 ± 10.79		2.702	0.0002*	-2.093	0.0065*	2.536	0.0017*

$I_a$ , index of aggregation;  $P_a$ ,  $P$  value of  $I_a$ ;  $\bar{v}_j$ , mean clustering index value over the gap cells;  $P\bar{v}_j$ ,  $P$  value of  $\bar{v}_j$ ;  $\bar{v}_i$ , mean clustering index value over the patch cells;  $P\bar{v}_i$ ,  $P$  value of  $\bar{v}_i$

\* Significant at  $P < 0.025$  § Means were calculated based on the total whitefly counted from each of sticky traps.

<표 26> 담배가루이 SADIE 공간분포 분석 결과 (2016)

Sampling	Index of association ( X )	P
July 3 / July 17	-0.0173	0.5628
July 17 / July 31	0.0566	0.2976
July 31 / August 13	0.3955	0.0124*
August 13 / August 29	0.7756	< 0.0001*

\*Significant at  $P < 0.025$

<표 27> SADIE 분석을 통한 연속된 샘플에서의 담배가루이 밀도변화분석 결과 (2016, 2차년도)

## 2. 주요 해충군 (담배가루이, 꽃노랑총채벌레, 복숭아혹진딧물)에 대한 신규 혼합추출물의 방제효과 평가

### 1) leaf-disc bioassay를 통한 주요 해충군의 신규 혼합추출물에 대한 독성 평가

요점1. 14가지의 신규 혼합추출물이 평가되었으며, 이들 중 8가지의 물질이 실험시작 후 3시간 이내 90% 이상의 치사율을 야기하며 주요 해충군에 대한 방제 효과를 보임.

요점2. 방제효과를 보인 8가지 물질 중 4가지 물질이 파프리카에 잎에 약해를 유발하는 것을 확인함.

요점3. 이들 물질 중 4가지 물질의 기본 원료는 자소 추출액을 확인함.

요점4. 실험 해충에게 에너지와 수분획득이 가능하도록 leaf-disc를 제공해 주고, 생물검정이 필요한 신규 물질을 주관기관에서 제시한 권장농도로 leaf-disc에 dry residue 처리하여 실험함 (그림30).

요점5. leaf-disc bioassay의 방법은 아래와 같다.

- ① 실험군 (신규 혼합추출물)과 대조군 (물)을 설정
- ② 파프리카 또는 강낭콩 잎을 60×15mm petri dish 크기에 맞게 자름
- ③ 실험군과 대조군에 자른 잎을 5초간 침지 후 상온 (25℃±1)에서 2시간 건조
- ④ 젖은 filter paper를 60mm petri dish에 깔고 처리한 잎의 뒷면이 위쪽으로 오도록 놓음
- ⑤ petri dish에 실험곤충 성충을 1마리씩 접종
- ⑥ 25℃ incubator (L:D=12:12)에 놓고 관찰
- ⑦ 접종 후 설정된 관찰시간에 치사율 확인
- ⑧ 30반복 실시



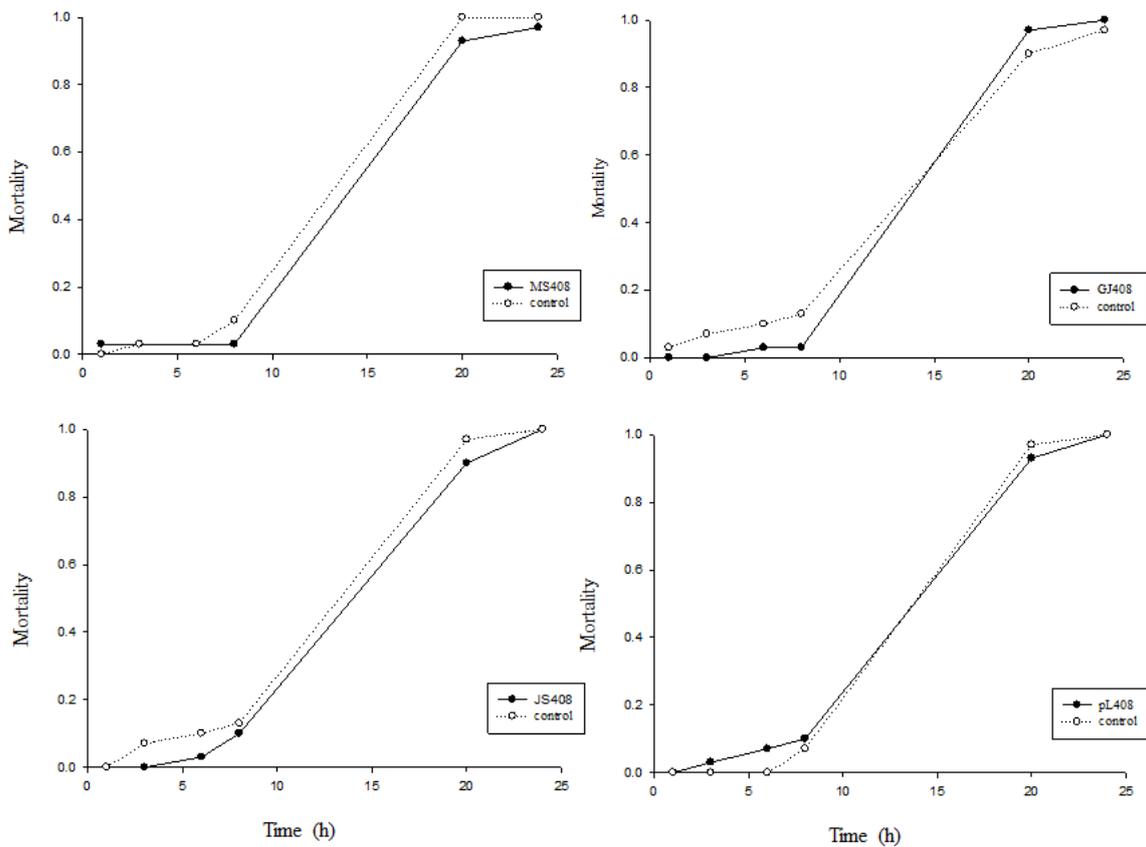
<그림 30> 신규 혼합추출물에 대한 약해실험을 실시한 Leaf-disc bioassay arena (1차년도 2015)

- 1차년도에는 먼저 신규 혼합추출물 (MS408, pL408, JS408)에 대하여 급성 접촉독성 작용여부를 확인하기 위해서, petri dish에 신규 혼합추출물의 residue를 처리하여 섭식이 불가능한 상황에서 담배가루이 성충에 대한 급성 접촉독성 발현여부를 확인함 (그림31).



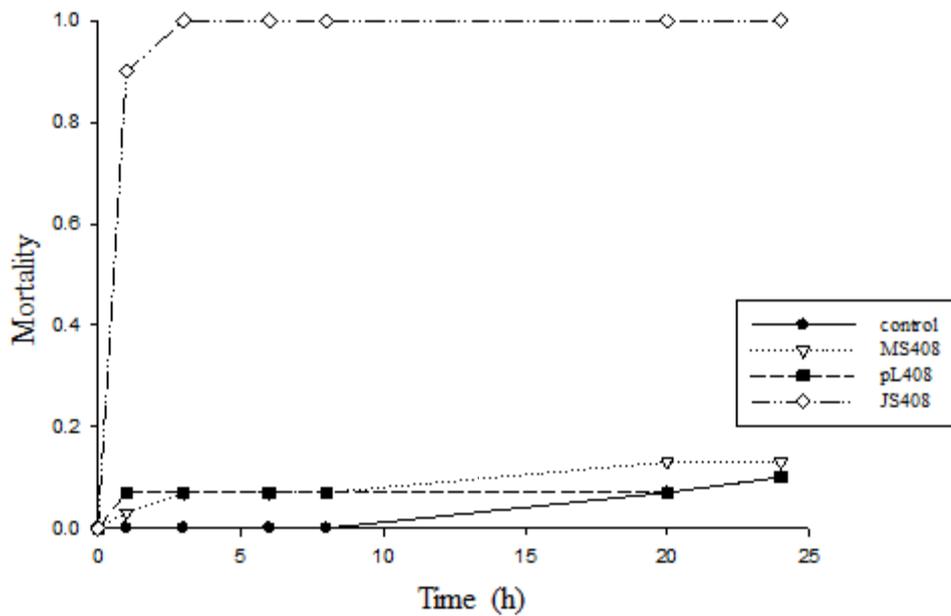
<그림 31> 급성 접촉독성 발현확인을 위한 Petri dish bioassay arena (1차년도)

- 대조구와 신규물질 처리구 모두에서 8시간 이후에 급격한 담배가루이 성충 사망률이 나타났는데, 이는 섭식을 할 수 없는 환경에서, 즉 에너지 및 수분의 획득이 불가능한 상황에서 자연 치사가 유도되었지만, 자연 치사율 이상의 신규 혼합추출물에 의한 접촉독성은 관찰되지 않음. 생존곡선 추이변동에 대한 통계분석 (Kaplan-Meier survival curves) 결과 처리구 모두 대조구에 대비해 유의한 차이가 없으므로 판명됨 ( $P > 0.50$ ) (그림32).



<그림 32> Petri-dish arena에서 신규혼합추출물 처리에 의한 담배가루이 성충의 사망률 변이 추이 (1차년도)

- 이러한, 실험 결과를 바탕으로 담배가루이 성충이 섭식행동을 나타내어 에너지와 수분획득이 가능하도록 Leaf-disc에 신규물질의 residue를 처리하여 실험함.
- 1차년도에는 담배가루이에 대한 3가지 신규 혼합추출물 (MS408, pL408, JS408)의 독성을 평가하였으며, leaf-disc bioassay 방법은 위와 동일하며, 관찰시간은 접종 후 1시간, 3시간, 6시간, 8시간, 20시간, 24시간이었음. 접종 후 24시간 때의 대조구의 치사율이 20%가 넘지 않아, 대부분의 담배가루이 성충이 leaf-disc로부터 섭식을 통하여 생존에 필요한 에너지와 수분을 획득하였음을 나타냄.
- 이러한 환경에서 JS408은 5시간 이내에 100% 치사율을 보이는 급성 섭식독성을 나타내었으며, 이는 대조구에 비해 통계적으로 매우 유의한 차이를 나타냄 (Fisher's exact test,  $P < 0.001$ ). 다른 신규 물질의 경우, 대조구와 유의한 차이를 나타내지 않음 (Fisher's exact test,  $P > 0.90$ ) (그림33).



<그림 33> Leaf-disc arena에서 신규혼합추출물 처리에 의한 담배가루이 성충의 사망률 변이 추이 (1차년도, 2015)

- 2차년도에는 1차년도 독성평가 결과에 근거하여 담배가루이에 대해 우수한 살충 효과를 보인 자소 (*Perilla* sp.) 기반 혼합추출물인 JS408에 대하여 추출물 조성을 gas chromatography-mass spectroscopy 방법을 이용하여 분석하였고, 그 결과 주요 성분을 다음과 같이 규명함 (표 28-29).

Parameter	Condition
Column	DB-5 MS (30 m length x 0.25mm thickness(Agilent))
Mass	40~350 amu
Inlet Temp.	310 °C
Source Temp.	320 °C
Injector Temp.	250 °C
Oven Temp.	40 °C (hold 3 min) – 2 °C/min to 150 °C – 4 °C/min to 200 °C – 200 °C (hold 10 min)
Flow Temp.	He gas, 1.5 mL/min
Spilt ratio	20 : 1
Injection Vol.	1uL
GC/MS analysis time	80.5 minutes

Inlet Temp., the temperature of the portion connecting with GC and Mass detector; Source Temp., the ion source temperature of Mass detector; Injector Temp., the temperature of the portion for injecting sample to the detector part of the GC.

<표 28> 자소 기반 혼합추출물 (JS408) 조성 분석을 위해 이용된 gas chromatography / mass spectroscopy 실험환경

Ingredient	Component (%)
Myristicin	51.18
$\beta$ -Caryophyllene	12.05
Sesquiterpene	11.15
Perilla ketone	5.10
B-Farnesene	1.37
Trans, trans-a-farnesene	1.08
1-Octen-3-ol	1.04
$\alpha$ -Humulene	0.78
Caryophyllene epoxide	0.52
Trans-2-hexenal	0.43
<b>Total</b>	<b>84.70%</b>

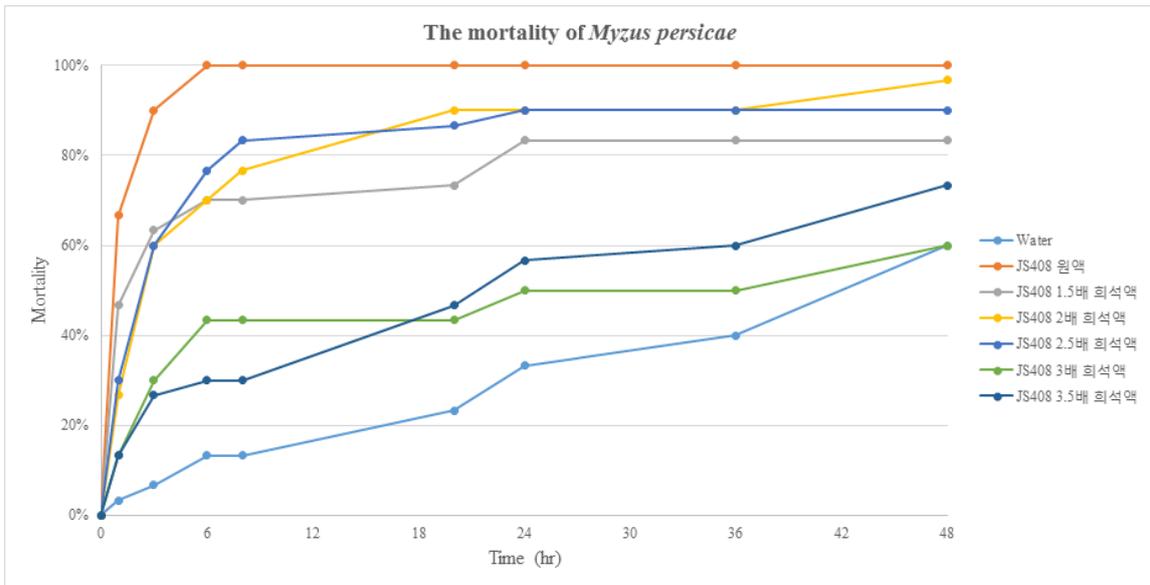
<표 29> 자소 기반 혼합추출물 (JS408) 성분조성 분석 결과

○ 위의 성분들로 구성된 JS408을 이용하여 재배 초기 높은 밀도로 발생하는 복숭아혹진딧물 성충에 대하여 JS408 농도별 dose-response curve 산출을 위한 leaf-disc bioassay를 진행함. 실험 관찰시간은 접종 후 1시간, 3시간, 6시간, 12시간, 24시간에 치사율을 확인함 (그림34).

○ 자소액 농도와 진딧물 치사율간의 유의한 양의 상관관계가 나타났으며 ( $P < 0.05$ ), 특히 원액의 경우 6시간 이내에 치사율 100%를 나타내는 급성 독성을 나타냄. 이러한 결과는 담배가루이 성충에 일으킨 섭식기반 치사양상과 매우 유사함 (그림35, 표 30).



<그림 34> 복숭아혹진딧물 성충에 대하여 JS408 농도별 dose-response curve 산출을 위한 leaf-disc bioassay arena (2차년도)

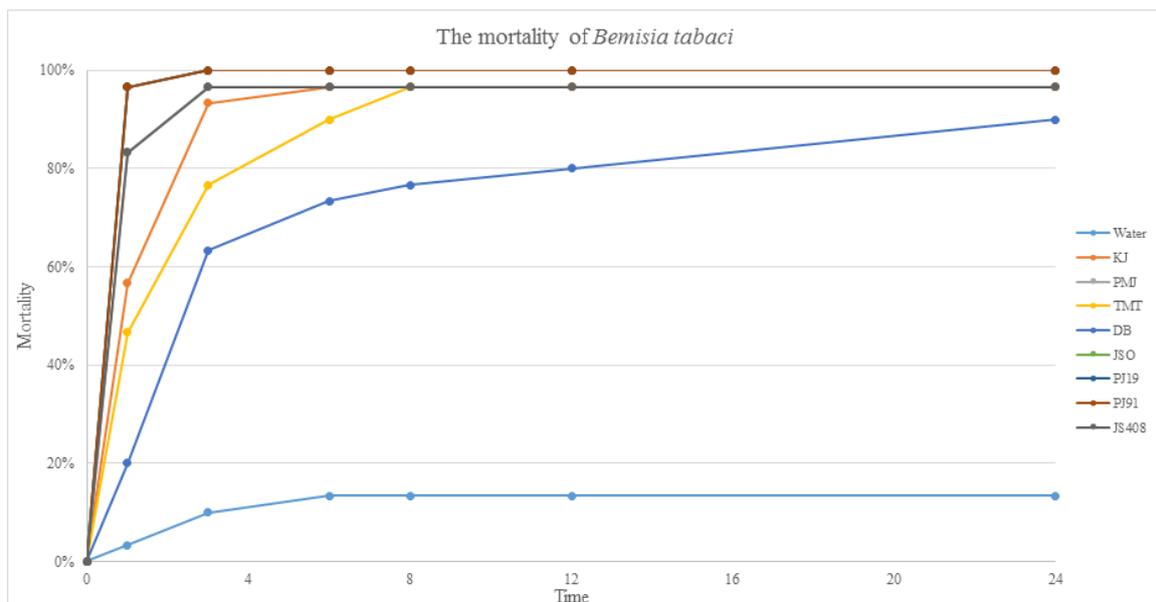


<그림 35> 자소 기반 혼합추출액 (JS408)에 의한 복숭아혹진딧물의 치사율 dose-response 결과 (2차년도)

Time	Water	JS408 원액	JS408 1.5배 희석액	JS408 2배 희석액	JS408 2.5배 희석액	JS408 3배 희석액	JS408 3.5배 희석액
0시간	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
1시간	3%	67%	47%	27%	30%	13%	13%
3시간	7%	90%	63%	60%	60%	30%	27%
6시간	13%	100%	70%	70%	77%	43%	30%
8시간	13%	100%	70%	77%	83%	43%	30%
12시간	23%	100%	73%	90%	87%	43%	47%
24시간	33%	100%	83%	90%	90%	50%	57%
36시간	40%	100%	83%	90%	90%	50%	60%
48시간	60%	100%	83%	97%	90%	60%	73%

<표 30> 자소 기반 혼합추출액 (JS408)에 의한 복숭아혹진딧물의 치사율  
dose-response 결과 (2차년도, 2016)

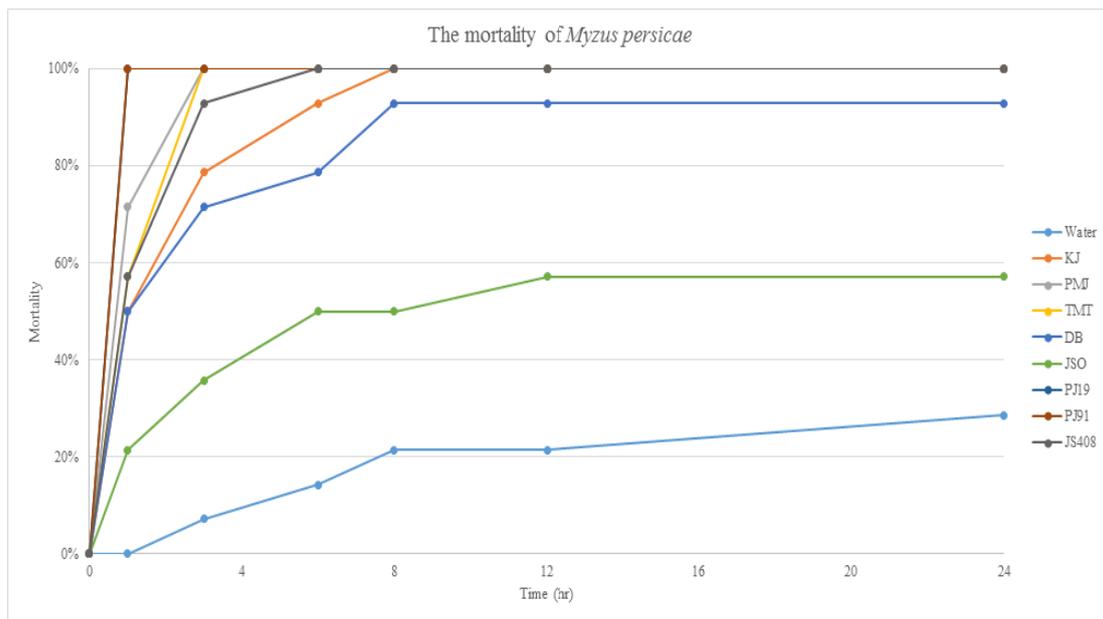
- 담배가루이와 복숭아혹진딧물에 대하여 9종의 신규 혼합추출물 (KJ, PMJ, TOT, DB, JSO, PJ19, PJ91, JS408) 에 대한 독성평가를 진행함. leaf-disc bioassay 실험방법은 위의 방법과 동일하며, 관찰시간은 접종 후 1시간, 3시간, 6시간, 8시간, 20시간, 24시간 이었으며, 이때의 치사율을 확인함.
- 실험결과 담배가루이의 경우, KJ와 DB를 제외하고는 모든 처리구에서 1시간 이내에 90% 이상의 치사율을 유발하였으며, 복숭아혹진딧물의 경우, JSO를 제외한 모든 처리구에서 1시간 이내에 100%의 치사율을 보임. 이와 같이 높은 치사율을 보이는 것은 담배가루이와 복숭아혹진딧물에게 해당 신규 혼합추출물에 대한 감수성이 높음을 의미함 (그림36-37, 표31-32).



<그림 36> 7종의 신규 추출물에 의한 leaf-disc arena에서 담배가루이의 치사율 (2차년도)

Treatment \ Time	Time							
	0시간	1시간	3시간	6시간	8시간	12시간	24시간	
Water	0%	0%	0%	7%	7%	7%	7%	
KJ	0%	53%	93%	100%	100%	100%	100%	
PMJ	0%	93%	100%	100%	100%	100%	100%	
TMT	0%	33%	67%	80%	93%	93%	93%	
DB	0%	7%	60%	80%	80%	87%	100%	
JSO	0%	93%	100%	100%	100%	100%	100%	
PJ19	0%	93%	100%	100%	100%	100%	100%	
PJ91	0%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	
JS408	0%	93%	100%	100%	100%	100%	100%	

<표 31> 9종의 신규 추출물에 의한 leaf-disc arena에서 담배가루이의 치사율 (2차년도, 2016)

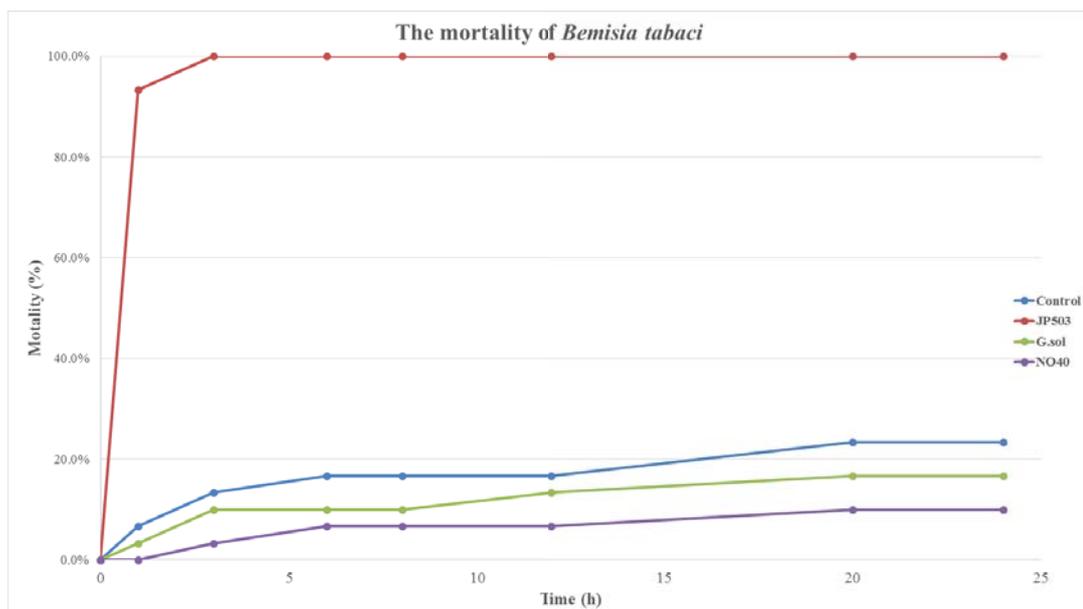


<그림 37> 7종의 신규 추출물에 의한 leaf-disc arena에서 복숭아혹진딧물 치사율 (2차년도)

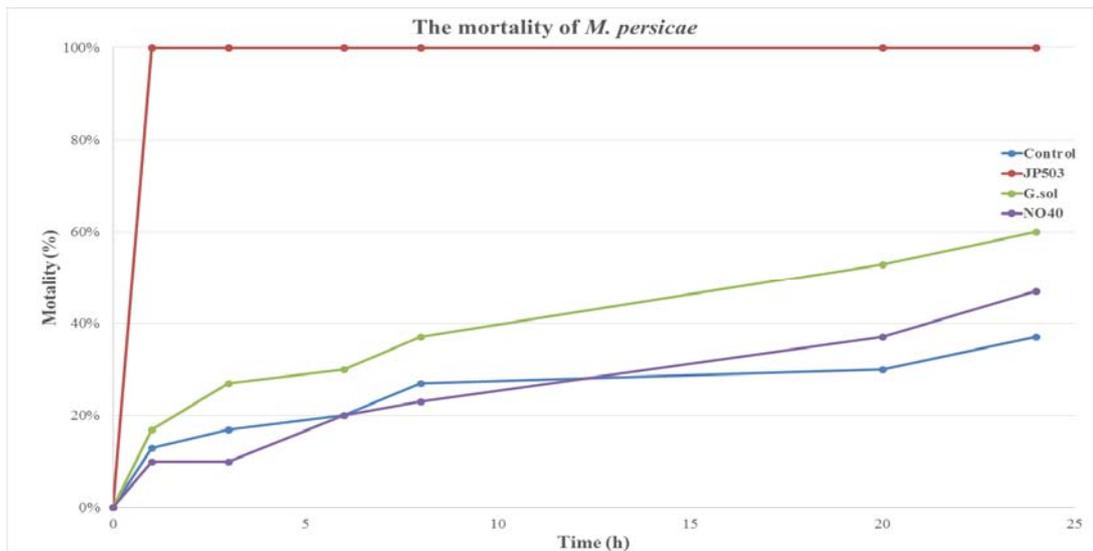
Time Treatment	0시간	1시간	3시간	6시간	8시간	12시간	24시간
Water	0%	0%	14%	29%	29%	29%	43%
KJ	0%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
PMJ	0%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
TMT	0%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
DB	0%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
JSO	0%	14%	29%	43%	43%	57%	57%
PJ19	0%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
PJ91	0%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
JS408	0%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

<표 32> 9종의 신규 추출물에 의한 leaf-disc arena에서 복숭아혹진딧물 치사율 (2차년도)

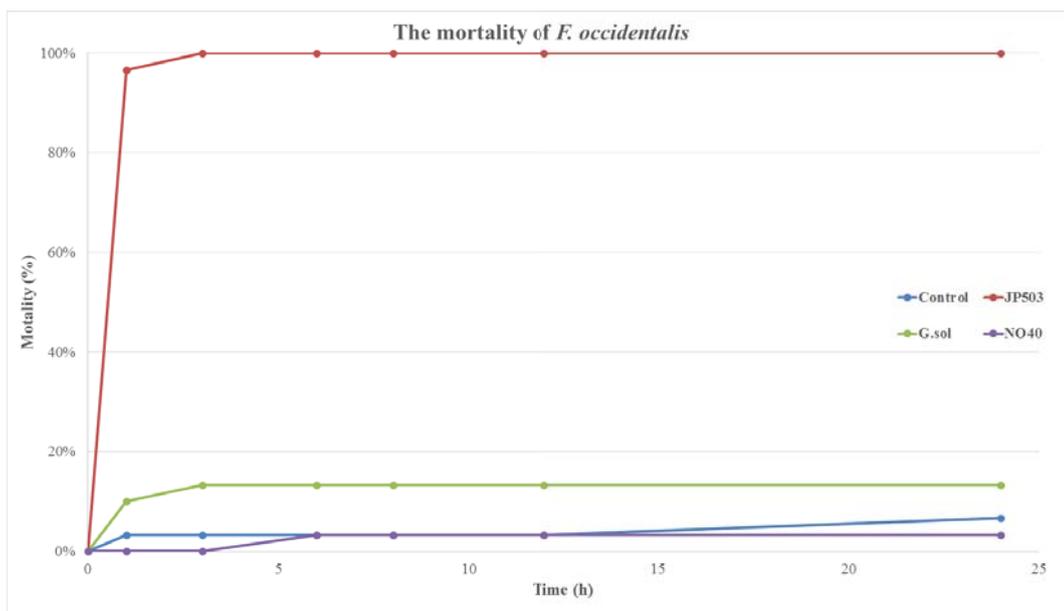
- 3차년도에는 담배가루이, 복숭아혹진딧물, 꽃노랑총채벌레에 대하여 3종의 신규 혼합추출물 (JP503, G.sol®, NO40) 에 대한 독성평가를 진행함. leaf-disc bioassay 실험방법은 위의 방법과 동일하며, 관찰시간은 해충별로 상이함. 담배가루이와 복숭아혹진딧물의 경우, 접종 후 1시간, 3시간, 6시간, 8시간, 12시간, 20시간, 24시간이며 꽃노랑총채벌레의 경우, 접종 후 1시간, 3시간, 6시간, 8시간, 12시간, 24시간 때의 치사율을 확인함.
- JP503은 실험해충 3종 모두 접종 후 3시간 이내의 치사율이 100%임을 확인하였으며, 이는 JP503의 독성이 매우 높다는 것을 의미함 (그림38-40).



<그림 38> 4종의 신규 혼합추출물에 대한 담배가루이 성충의 치사율 (3차년도)



<그림 39> 4종의 신규 혼합추출물에 대한 복숭아혹진딧물 성충의 치사율 (3차년도)



<그림 40> 4종의 신규 혼합추출물에 대한 꽃노랑총채벌레 성충의 치사율 (3차년도)

- 3차년도 3가지 신규 혼합추출물(JP503, G.sol®, NO40)의 조성을 각각 gas chromatography-mass spectroscopy, inductively coupled plasma-atomic emission spectrometer와 ion chromatograph 방법을 이용하여 분석하였고, 그 결과 주요 성분을 다음과 같이 규명함 (표33-37). 가장 살충효과가 뛰어난 JP503 또한 자소 추출액을 기반으로 한 신규물질임.

Parameter <sup>↕</sup>	Condition <sup>↕</sup>
Column <sup>↕</sup>	DB-5 MS (30 m length × 0.25 μm thickness (Agilent)) <sup>↕</sup>
Mass <sup>↕</sup>	40~600 amu <sup>↕</sup>
Inlet Temp. <sup>↕</sup>	310 °C <sup>↕</sup>
Source Temp. <sup>↕</sup>	320 °C <sup>↕</sup>
Injector Temp. <sup>↕</sup>	280 °C <sup>↕</sup>
Oven Temp. <sup>↕</sup>	50 °C (hold 3 min) – 2 °C/min to 150 °C – 2 °C/min to 300 °C (hold 10 min) <sup>↕</sup>
Flow Temp. <sup>↕</sup>	He gas, 1.5 mL/min <sup>↕</sup>
Spilt ratio <sup>↕</sup>	10 : 1 <sup>↕</sup>
Injection Vol. <sup>↕</sup>	1 μL <sup>↕</sup>

Inlet Temp. indicates the temperature of the portion connecting with GC and Mass detector; Source Temp. indicates the ion source temperature of Mass detector; Injector Temp. indicates the temperature of the portion for injecting sample to the detector part of the GC<sup>↕</sup>

<표 33> 자소액 기반 혼합추출물 (JP503) 조성 분석을 위해 이용된  
gas chromatography / mass spectroscopy 실험환경

Parameter <sup>↕</sup>	Condition <sup>↕</sup>
Instrument <sup>↕</sup>	Ion chromatography Metrohm 883 Basic IC Plus <sup>↕</sup>
Column type <sup>↕</sup>	Metrosep A Supp5-150/4.0 <sup>↕</sup>
Eluent composition <sup>↕</sup>	Anion - 3.2 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + 1.0 mM NaHCO <sub>3</sub> <sup>↕</sup>
Channel <sup>↕</sup>	Conductivity <sup>↕</sup>
Injection volume <sup>↕</sup>	100 μl <sup>↕</sup>
Pressure <sup>↕</sup>	9.12 MPa <sup>↕</sup>
Flow rate <sup>↕</sup>	0.700mL/min <sup>↕</sup>
Recording time <sup>↕</sup>	18.0 min <sup>↕</sup>

<표 34> NO40 조성 분석을 위해 이용된 ion chromatograph 실험환경

Parameter <sup>o</sup>	Condition <sup>o</sup>	
Model <sup>o</sup>	Thermo Scientific iCAP 7400 duo Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer(ICP-AES) <sup>o</sup>	+
Frequency <sup>o</sup>	27.12 MHz <sup>o</sup>	+
Power <sup>o</sup>	1350W <sup>o</sup>	+
Plasma gas flows <sup>o</sup>	12 L/min <sup>o</sup>	+
Auxiliary gas flows <sup>o</sup>	0.50L/min <sup>o</sup>	+
Nebulizer gas flows <sup>o</sup>	0.50L/min <sup>o</sup>	+
Sample uptake flows <sup>o</sup>	1.0mL/min <sup>o</sup>	+

<표 35> G.sol® 조성 분석을 위해 이용된 inductively coupled chromatograph-mass spectroscopy 실험환경

Ingredient <sup>o</sup>	Component (%) <sup>o</sup>	
$\alpha$ -pinene <sup>o</sup>	49.38 <sup>o</sup>	·
$\beta$ -pinene <sup>o</sup>	16.23 <sup>o</sup>	·
D-limonene <sup>o</sup>	24.11 <sup>o</sup>	·
3-carene <sup>o</sup>	1.31 <sup>o</sup>	·
Camphene <sup>o</sup>	1.41 <sup>o</sup>	·
$\beta$ -myrcene <sup>o</sup>	3.23 <sup>o</sup>	·
Bicycle [4,1,0] hept-3-ene, 3, 7, 7-trimethyl <sup>o</sup>	3.18 <sup>o</sup>	·
Caryophyllene <sup>o</sup>	0.53 <sup>o</sup>	·
Myristicin <sup>o</sup>	0.27 <sup>o</sup>	·
B-Caryophyllene <sup>o</sup>	0.12 <sup>o</sup>	·
Trans, trans-a-farnesene <sup>o</sup>	0.13 <sup>o</sup>	·
Sesquiterpene <sup>o</sup>	0.09 <sup>o</sup>	·
Total <sup>o</sup>	100.00 <sup>o</sup>	·

<표 36> JP503 성분조성 분석 결과

(A) Control distilled water<sup>1)</sup>

Peak number <sup>2)</sup>	Retention time (min) <sup>3)</sup>	Area <sup>4)</sup> ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) $\times$ min <sup>5)</sup>	Height <sup>6)</sup> ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) <sup>7)</sup>	Concentration (ppm) <sup>8)</sup>	Component name <sup>9)</sup>
1 <sup>1)</sup>	3.240 <sup>2)</sup>	0.1032 <sup>3)</sup>	0.882 <sup>4)</sup>	0.359 <sup>5)</sup>	F <sup>6)</sup>
2 <sup>1)</sup>	3.532 <sup>2)</sup>	0.0302 <sup>3)</sup>	0.160 <sup>4)</sup>	Invalid <sup>5)</sup>	<sup>6)</sup>
3 <sup>1)</sup>	3.832 <sup>2)</sup>	0.0112 <sup>3)</sup>	0.079 <sup>4)</sup>	Invalid <sup>5)</sup>	<sup>6)</sup>
4 <sup>1)</sup>	4.883 <sup>2)</sup>	0.0940 <sup>3)</sup>	0.705 <sup>4)</sup>	0.506 <sup>5)</sup>	Cl <sup>6)</sup>
5 <sup>1)</sup>	8.632 <sup>2)</sup>	0.0301 <sup>3)</sup>	0.120 <sup>4)</sup>	0.288 <sup>5)</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>6)</sup>
6 <sup>1)</sup>	13.297 <sup>2)</sup>	0.0810 <sup>3)</sup>	0.237 <sup>4)</sup>	0.531 <sup>5)</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>6)</sup>

(B) NO40<sup>1)</sup>

Peak number <sup>2)</sup>	Retention time (min) <sup>3)</sup>	Area <sup>4)</sup> ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) $\times$ min <sup>5)</sup>	Height <sup>6)</sup> ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) <sup>7)</sup>	Concentration (ppm) <sup>8)</sup>	Component name <sup>9)</sup>
1 <sup>1)</sup>	3.237 <sup>2)</sup>	0.0046 <sup>3)</sup>	0.038 <sup>4)</sup>	0.058 <sup>5)</sup>	F <sup>6)</sup>
2 <sup>1)</sup>	4.880 <sup>2)</sup>	0.0548 <sup>3)</sup>	0.404 <sup>4)</sup>	0.315 <sup>5)</sup>	Cl <sup>6)</sup>
3 <sup>1)</sup>	8.635 <sup>2)</sup>	0.0112 <sup>3)</sup>	0.045 <sup>4)</sup>	0.107 <sup>5)</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>6)</sup>
4 <sup>1)</sup>	13.292 <sup>2)</sup>	0.0479 <sup>3)</sup>	0.142 <sup>4)</sup>	0.295 <sup>5)</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>6)</sup>

<표 37> NO40 성분조성 분석 결과

2) Blind test를 통한 신규 혼합추출물의 식물체 약해 발생여부 평가

요점1. 야외 실험용 비닐하우스에서 재배한 파프리카 식물체에 주관기관에서 제시한 권장농도로 직접 분사하여 약해시험을 실시함.

요점2. 약해를 유발한 5가지 물질 중 3가지 (JS408, 자소액, JP503)에 대하여 blind test를 실시함.

요점3. 국립농업과학원 살충제 등록시험기준에 의거하여 5명의 평가자가 약해 기준 표에 따라 약해발생여부 및 발생정도를 평가함.

요점4. Blind test의 방법은 아래와 같음.

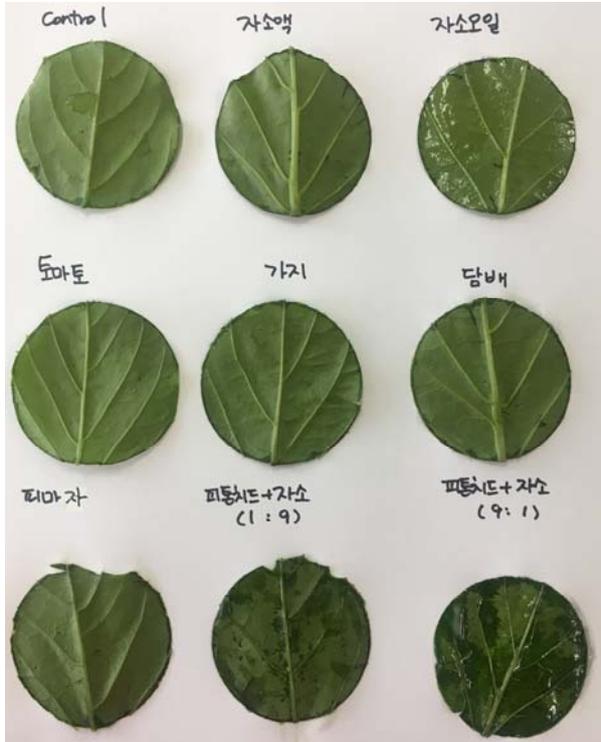
- ① 실험군 (신규 혼합추출물)과 대조군 (물)을 설정
- ② 생육이 고르고 병해충 피해가 적은 파프리카 식물체를 선별함
- ③ 동일 식물체에 실험군 또는 대조군을 분리하여 잎에 처리한 후, 식물체를 온실에서 재배함
- ④ 각 treatment를 알아볼 수 있도록 색깔끈을 이용해 구별함
- ⑤ 분사 후 3일 후 처리한 잎을 수거하여 발생한 약해에 대하여 평가함
- ⑥ 수거해온 잎을 A, B로 표기하고 random하게 실험군과 대조군을 배치함
- ⑦ 평가자들에게 평가기준과 실험방법, 약해 발생한 잎과 그렇지 않은 잎을 먼저 예시로 제시하고 약해에 발생 특징에 대해 사전 설명을 진행함 (그림 41)
- ⑧ 평가자들이 평가기준에 따라 평가함



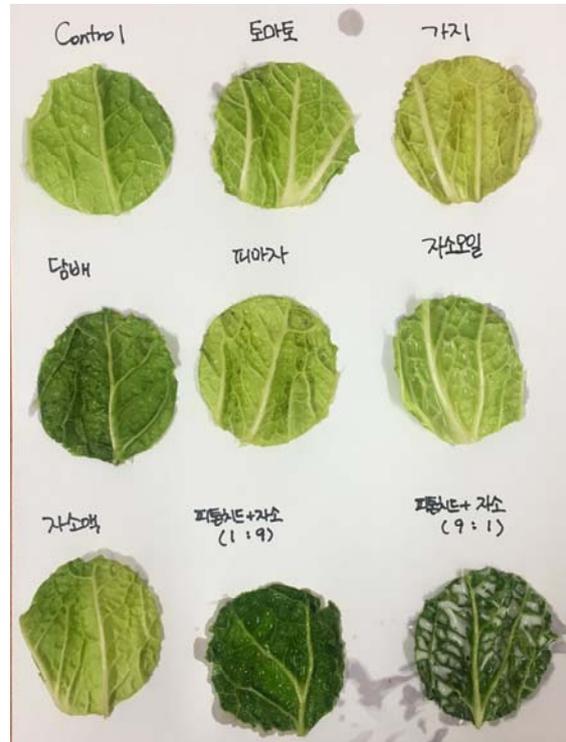
<그림 41> 약해여부를 확인하기 위한 Blind test와 약해를 입은 파프리카 잎의 예 (1차년도, 2015)

요점5. 2가지 물질 (JS408, JP503)을 처리한 실험군이 물로 처리한 대조군에 비해 약해가 심각하다는 것이 확인되었으며, 자소액의 경우 대조군과 크게 차이가 나지 않음을 확인함.

- leaf-disc bioassay를 실시하던 중 잎에 대한 약해가 의심되어 실제 파프리카 식물체에 신규 혼합추출물을 처리하여 약해에 대해 점수를 매기는 blind test를 실시함 (그림42-43).

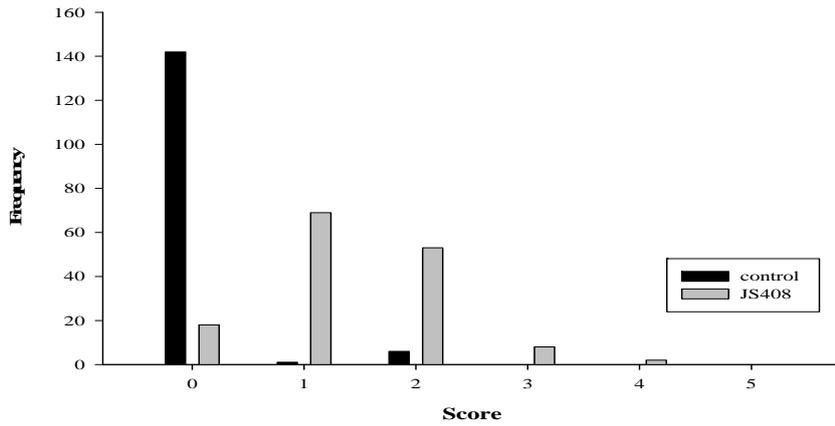


<그림 42> 시약 침지 후 2시간 건조 뒤의 파프리카 잎 상태 (2차년도)



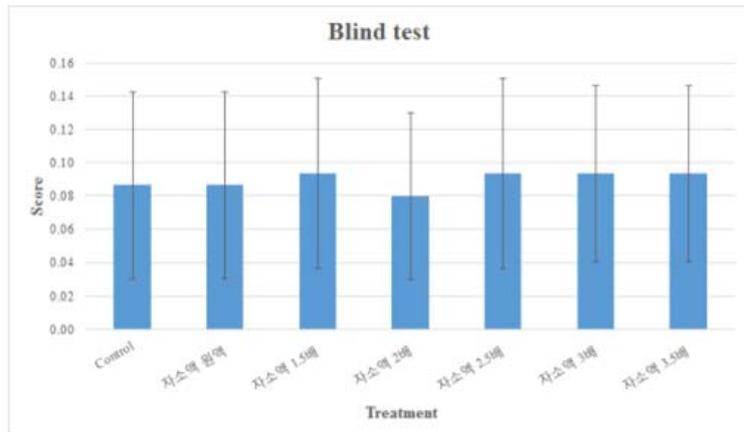
<그림 43> 시약 침지 후 2시간 건조 뒤의 배춧잎 상태 (2차년도)

- 각 연차별로 가장 뛰어난 살충효과를 보인 자소 추출액을 기반으로 한 JS408와 JP503에 대하여 평가함.
- 각 연차별로 실험에 사용된 파프리카는 1차년도와 3차년도에는 시로코 품종을, 2차년도에는 파피레드 품종을 사용함.
- 1차년도의 경우, JS408을 처리한 후 3일 뒤에 수거하여 약해를 평가함. 약해 등급에 대해 실험군과 대조군간의 독립성 검정을 실시한 결과, JS408 처리 잎이 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 약해가 나타난 것으로 판명됨 (Chi-square test,  $P < 0.05$ ) (그림44).



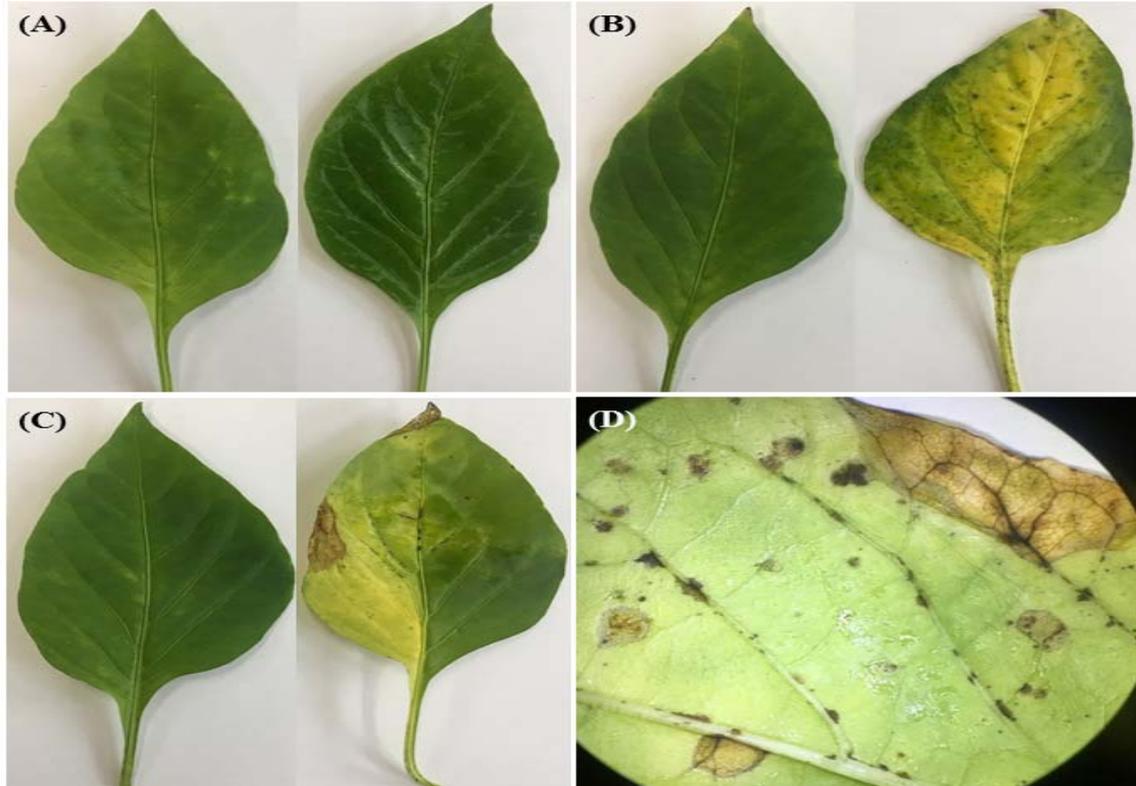
<그림 44> Blind test 결과. 높은 점수일수록 심한 정도의 약해를 의미함.  
(1차년도, 2015)

- 2차년도의 경우, 농도별로 JS408을 처리한 후 3일 뒤에 수거하여 약해를 평가함. 1차년도 시로코 품종에서 약해를 발생시켰던 자소 기반 혼합추출물 (JS408)이 파피레드 품종에서는 영향을 미치지 않음을 확인함. 또한 농도별 처리했을 경우에도 대조군과 큰 차이를 보이지 않음을 확인함 (그림45).

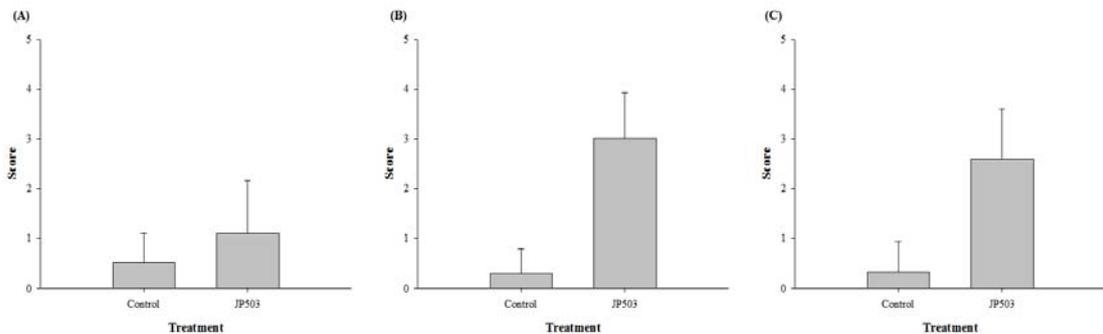


<그림 45> 자소액에 대한 파프리카 ‘파피레드’ 품종에 대한 약해실험 결과

- 하지만, 2차년도에 실험한 경우에도 JS408은 심각한 약해를 유발하였기 때문에 별도의 실험실 환경 약해실험에서 약해유발이 확인되어 작물에 대한 직접적 사용 권장은 매우 신중할 필요가 있음.
- 3차년도의 경우, JP503을 처리한 후 2일, 7일 14일 후에 잎을 수거하여 약해를 평가함 (그림46). JP408 처리 잎이 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 약해가 나타난 것으로 판명됨 ( $P < 0.01$ ) (그림47).



<그림 46> JP503의 약해를 조사하기 위해 실시한 Blind test (왼쪽은 JP503 처리구, 오른쪽은 처리하지 않은 대조구). (A) JP503 처리 후 2일 경과 (B) JP503 처리 후 7일 경과 (C) JP503 처리 후 14일 경과 (3차년도, 2017)



<그림 47> Blind test 결과. (A) JP503 처리 후 2일 경과 (B) JP503 처리 후 7일 경과 (C) JP503 처리 후 14일 경과 (3차년도, 2017)

- 위에서 확인된 유의한 살충력을 가진 모든 물질들이 파프리카에 약해를 발생시킨다는 점은 신규 물질의 친환경 농약등록 단계 전에 반드시 해결되어야하는 문제로 약해발생 원인 물질에 대한 규명 및 조성변경이 필요한 상황임.
- 따라서, 현재 개발 중인 신규 물질들의 경우 파프리카에 직접 살포하는 것은 바람직하지 못하며, 이러한 이유로 현재로서는 온실주변 부의 야생기주에만 살포하는 것이 한 가지 대안점이 될 수 있을 것으로 사료됨.

- 또 다른 대안으로는 가루이의 경우 trap crop에 관한 상당한 연구가 진행되어 있으므로, trap crop에 유인된 해충에 대해 trap crop에만 신규물질을 살포하는 방안을 고려해 볼 수 있지만, 이 경우에도 trap crop이 약해로 인해 가루이의 기주선호도가 낮아지면 해충이 다시 파프리카로 번져나갈 수 있는 back-fire 위험이 있으므로 온실 내에서의 신규 물질 사용은 매우 신중한 검토가 필요함.

### 3. 신규 혼합추출물의 유용생물(서양뒤영벌)에 대한 환경영향 평가

요점1. 파프리카 상업온실에서 화분매개충으로 보편적으로 이용되고 있는 유용생물인 서양뒤영벌을 대상으로 살충력이 우수한 2종의 신규 혼합추출물에 대한 laboratory bioassay를 실시함.

요점2. 해당 bioassay의 방법은 아래와 동일함.

- ① 실험군 (신규 혼합추출물 또는 neonicotinoid계 농약)과 대조군 (물)을 설정
- ② 실험군의 경우, 원액, 희석액 또는 권장희석농도로 희석하여 사용
- ③ filter paper를 각각 실험군과 대조군에 3초간 침지
- ④ 적신 filter paper 무게를 측정하여 양이 일정한지 확인 후 breeding jar에 설치
- ⑤ breeding jar 중앙에 먹이로 설탕물 1ml를 적신 솜을 놓고 서양뒤영벌을 한 마리씩 접종
- ⑥ 접종 후 관찰시간 마다 서양뒤영벌의 치사율을 확인

요점3. 기존 3종의 neonicotinoid계 유기합성농약 (acetamiprid, dinotefuran, imidacloprid)와 JS408의 살충효과를 비교한 결과, JS408이 유의하게 높은 치사율을 유발함 ( $P < 0.05$ ).

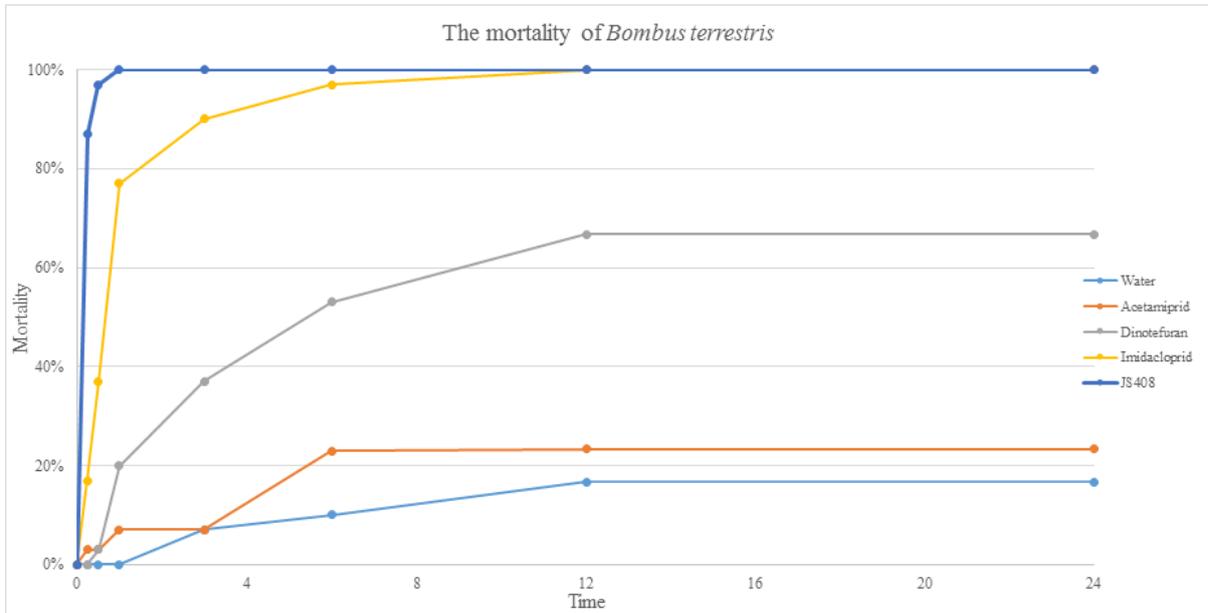
요점4. JS408의 경우, 농도의존적 살충효과를 나타내는 것을 확인함. JS408 원액에 비하여 JS408 3.5배 희석액의 경우, 노출 24시간 후 77%의 치사율을 보임.

요점5. JP503의 경우, 실험시작 후 10시간 때 55%의 치사율을 보였으며, 72시간 후의 치사율은 95%에 도달함을 확인함.

#### 1) Bioassay를 통한 유용생물의 신규 혼합추출물에 대한 독성 평가

- 대표적인 유용생물인 서양뒤영벌을 대상으로 현재 파프리카 재배에 사용되고 있는 neonicotinoid계 농약인 acetamiprid, dinotefuran과 imidacloprid와 자소 기반 혼합추출액 (JS408)과 의한 접촉독성 발현 여부를 laboratory bioassay를 통하여 평가함.

- bioassay 방법은 접종 후 1시간, 3시간, 6시간, 12시간, 24시간, 36시간, 48시간에 치사율을 확인함. neonicotinoid계 농약은 권장희석농도로 희석하고 자소액은 주관기관의 권장농도로 사용함.
- JS408의 경우 3종의 neonicotinoid계 유기합성농약보다 유의하게 높은 서양뒤영벌의 치사율을 유발함 ( $P < 0.05$ , Kaplan-Meier survivorship curve analysis). 특히 접촉 독성에 의해 1시간 이내에 100% 치사를 유발하여 유용곤충에 대한 독성이 매우 높은 것으로 확인됨 (그림48, 표38).



<그림 48> JS408과 3종의 neonicotinoid계 농약에 대한 서양뒤영벌에 대한 접촉독성 결과 (2차년도, 2016)

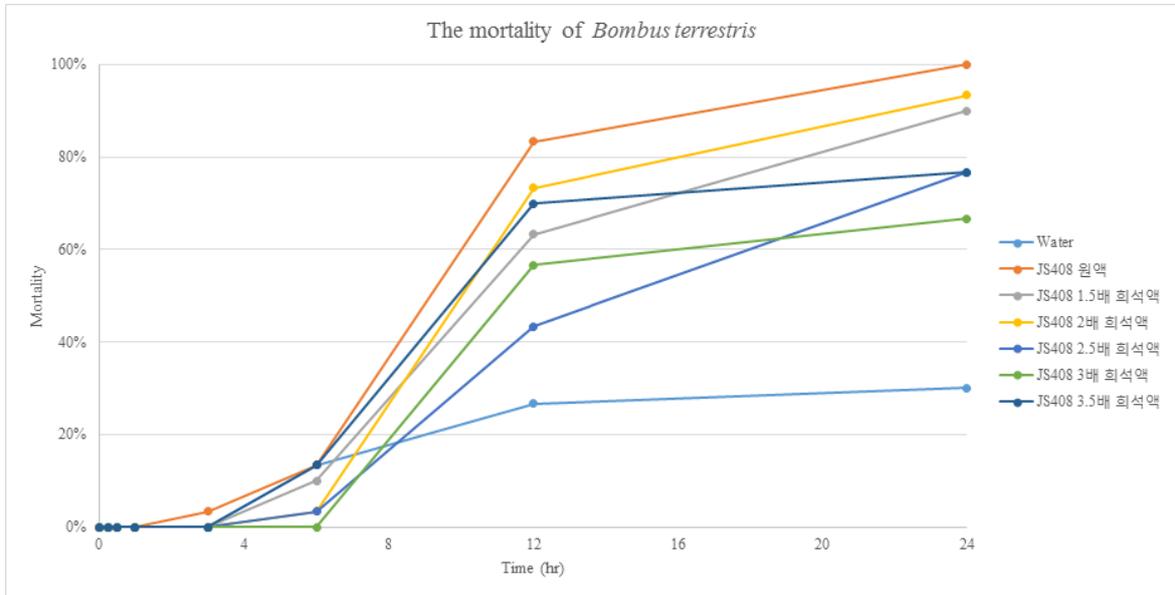
Time	Water	Acetamiprid	Dinotefuran	Imidacloprid	JS408
0시간	0%	0%	0%	0%	0%
15분	0%	3%	0%	17%	87%
30분	0%	3%	3%	37%	97%
1시간	0%	7%	20%	77%	100%
3시간	7%	7%	37%	90%	100%
6시간	10%	23%	53%	97%	100%
12시간	17%	23%	67%	100%	100%
24시간	17%	23%	67%	100%	100%

<표 38> JS408과 3종의 neonicotinoid계 농약에 대한 서양뒤영벌에 대한 접촉독성 결과 (2차년도, 2016)

- 서양뒤영벌에 대한 JS408 원액의 높은 접촉 독성을 확인한 후 JS408과 서양뒤영벌 간의 dose-response 산출을 위하여 JS408 농도별 (원액, 1.5배 희석액, 2배 희석액, 2.5배 희석액, 3배 희석액, 3.5배 희석액)로 laboratory bioassay를 진행

함.

- JS408 원액과 모든 희석액에서 24시간 후 65% 이상의 치사율을 나타내고 있음 (그림49, 표39).



<그림 49> JS408에 의한 서양뒤영벌 치사율 dose-response 결과 (2차년도, 2016)

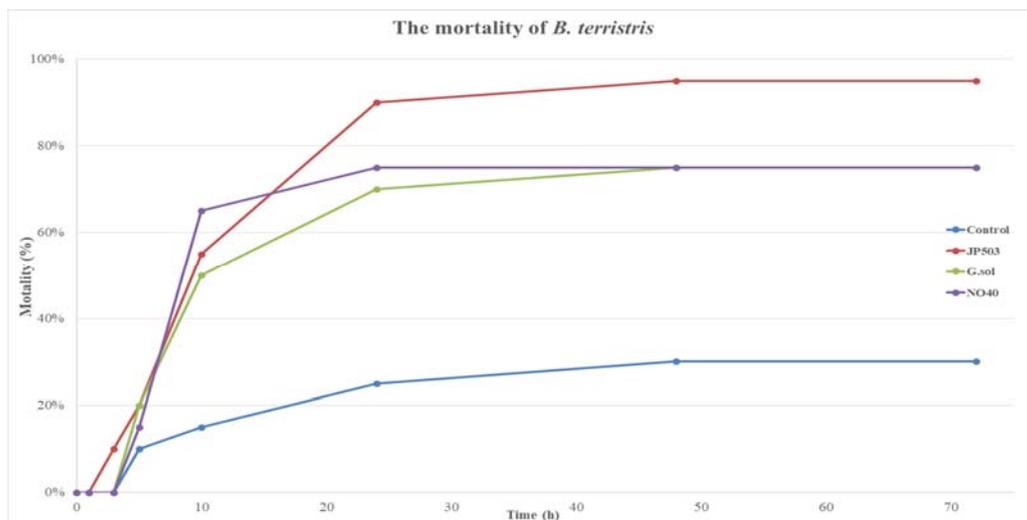
Time	Water	JS408 원액	JS408 1.5배 희석액	JS408 2배 희석액	JS408 2.5배 희석액	JS408 3배 희석액	JS408 3.5배 희석액
0시간	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
15분	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
30분	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
1시간	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
3시간	0%	3%	0%	0%	0%	0%	0%
6시간	13%	13%	10%	3%	3%	0%	13%
12시간	27%	83%	63%	73%	43%	57%	70%
24시간	30%	100%	90%	93%	77%	67%	77%

<표 39> JS408에 의한 서양뒤영벌 치사율 dose-response 결과 (2차년도, 2016)

- 3차년도의 경우, 3가지 신규 혼합추출물 중에 JP503이 실험시작 후 10시간 이내에 55%의 치사율을 보였으며, 72시간 후의 치사율은 95%까지 도달함을 확인함 (그림 50).
- 위의 결과를 종합하여 보면 현재 해충에 대해 급성독성을 야기하는 신규 물질 2종은 모두 동일한 수준에서 유용곤충인 서양뒤영벌에 환경독성을 야기하는 것으로 확인됨. 이러한 환경 독성의 정도는 기존에 등록된 neonicotinoid계 유기합성 농약보

다 유의한 수준에서 높은 것으로 이러한 접촉독성 기반 환경독성은 친환경 농약으로 개발하기 위해서 반드시 저감시켜야하는 문제점이라 할 수 있음.

- 이는 해당 신규 물질의 살포에 있어서 화분매개충으로 온실에서 빈번히 이용되는 서양뒤영벌의 높은 치사를 유발할 수 있음을 시사하며, 따라서 낮은 농도의 신규 물질이라 하더라도 화분매개충의 활동시기와 겹치지 않도록, 그리고 살포 후 잔류 독성이 제거될 수 있는 충분한 시간이 지난 후에 화분매개충을 방사하는 것이 타당해 보임.



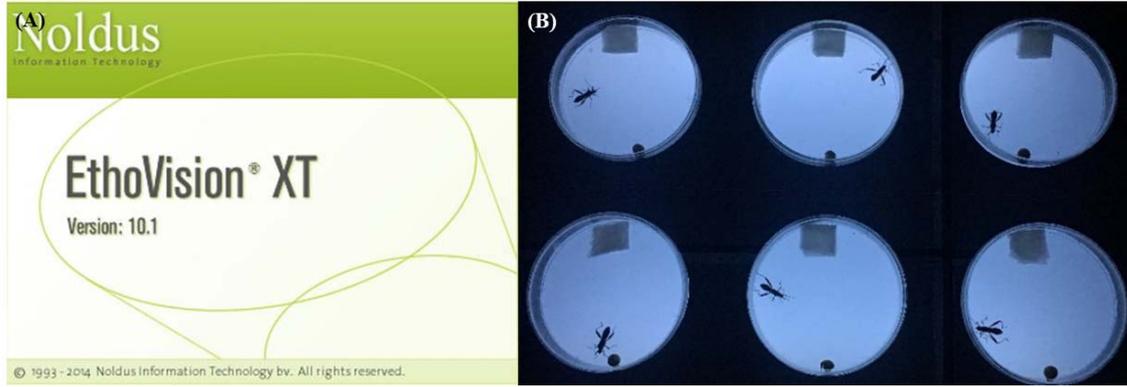
<그림 50> 4종의 신규 혼합추출물에 대한 서양뒤영벌 성충의 치사율 (3차년도, 2017)

Time	Control	JP503	G.sol®	NO40
0시간	0%	0%	0%	0%
1시간	0%	0%	0%	0%
3시간	0%	10%	0%	0%
5시간	10%	20%	20%	15%
10시간	15%	55%	50%	65%
24시간	25%	90%	70%	75%
48시간	30%	95%	75%	75%
72시간	30%	95%	75%	75%

<표 40> 4종의 신규 혼합추출물에 대한 서양뒤영벌 치사율 dose-response 결과 (3차년도, 2017)

## 2) 유용생물의 신규 혼합추출물에 대한 행동패턴 분석

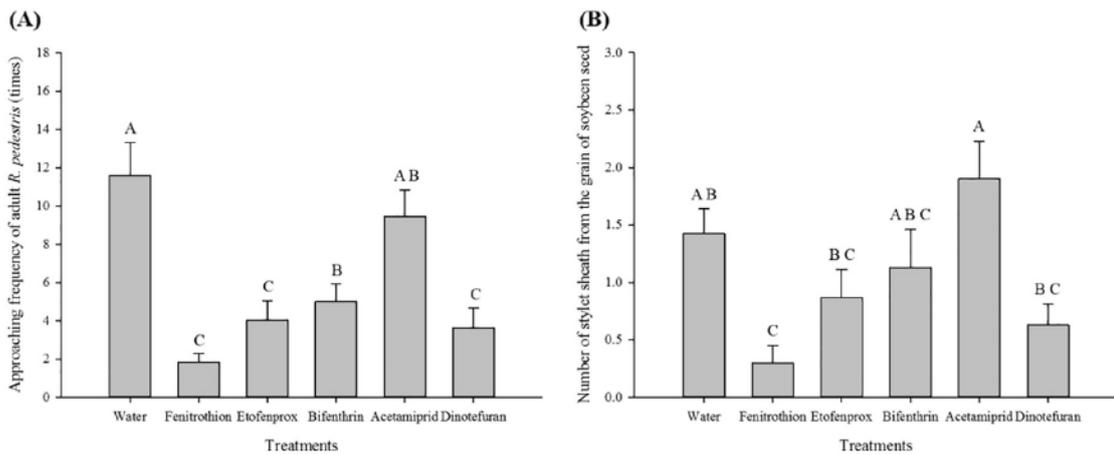
- 아치사농도에서의 서양뒤영벌 행동변화를 분석하기 위해서는 먼저 곤충행동관찰시스템을 구축하고 칼리브레이션할 필요가 있음. 따라서 본 기관에서 이미 예비실험을 진행하고 있던 톱다리개미허리노린재를 활용하여 서양뒤영벌 행동패턴 분석을 위한 EthoVision을 구축하고 평가함.
- 톱다리개미허리노린재의 온실 내 발생은 현재 미미하지만 2000년대 이후 고추를 포함한 농작물에서의 피해가 급격히 증가하고 있는 추세로 파프리카에 대한 잠재해충으로 해충지위를 분류할 수 있음.
- 기존 5종의 해충방제제에 대한 아치사농도에서의 톱다리개미허리노린재 흡즙행동변화 분석실험 순서는 다음과 같음 (Jung et al., 2018).
  - ① 톱다리개미허리노린재 성충 (age + 10±4)을 24시간 동안 물만 제공하고 먹이를 주지 않음 (전처리).
  - ② 실험군(Acetamiprid, Dinotefuran, Etofenprox, Bifenthrin, Fenitrothion)과 대조군(물) 설정
  - ③ 실험군의 경우, 권장희석농도로 희석해서 사용
  - ④ 일정 거리에서 분무기를 이용해 petri dish에 실험군과 대조군 1회 분무 후 실온에서 3시간 건조
  - ⑤ 건조시킨 petri dish에 톱다리개미허리노린재를 4시간 노출시킴
  - ⑥ 노출이 끝난 톱다리개미허리노린재를 깨끗한 petri dish에 옮긴 후 물 묻힌 티슈를 12시 방향으로 넣고 실온에서 1시간 휴식
  - ⑦ 휴식이 끝난 후 6시 방향에 백태를 고정시켜줌
  - ⑧ EthoVision으로 46시간동안 촬영하여 톱다리개미허리노린재가 먹이원 (콩)에 다가간 횟수, 이동거리, 속도 등을 측정 (그림51)
  - ⑨ 30반복 (Female-15반복, Male-15반복) 실시
  - ⑩ 실험이 끝난 후, 실험에 사용한 콩은 수거하여 fuchsiion acid+lactophenol blue solution에 염색시켜 stylet sheths의 개수를 확인함 (그림52)
- 위 실험의 결과, 먹이원인 콩에 접근한 빈도수는 acetamiprid를 제외한 4종의 해충방제제에 영향을 받아 감소하는 것으로 보였으나 실제 흡즙을 한 근거로 볼 수 있는 콩에 남아있는 stylet sheths의 개수는 fenitrothion에서만 감소하는 것을 확인함 (그림53) (Jung et al., 2018).



<그림 51> (A) 곤충의 행동변화를 보기 위한 영상추적장치인 EthoVision. (B) 실제 툽다리개미허리노린재 흡즙행동 변화 관찰실험 arena.



<그림 52> fuchsin acid+ lactophenol blue solution 시약에 염색시킨 콩의 모습



<그림 53> 아치사농도에서의 툽다리개미허리노린재의 흡즙행동변화 분석 결과.

(A) 먹이원 (콩) 접근빈도수(시간) (B) 콩에 있는 stylet sheaths의 개수

- 이와 유사한 방법으로 아치사농도에서의 서양뒤영벌 행동변화를 분석하기 위하여 주요 해충군에 대한 bioassay 방법과 동일하게 진행하였으나 실험군 또는 대조군에 침지한 filter paper를 상온에서 2시간 건조시킨 후 노출시킴으로써 실험방법에

있어 차이를 둔.

- 유용곤충의 행동변화를 분석, 수치화하기 위하여 행동 분석 프로그램인 EthoVision 을 이용하였으며, 3가지 parameter (walking distance, walking velocity, angular velocity)를 기준으로 분석 비교함. 대조군과 비교하였을 때, angular velocity를 제외( $P < 0.05$ )한 다른 2가지 parameter에서는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않음 ( $P > 0.05$ ) (표40).
- 이러한 행동분석 결과는 서양뒤영벌의 경우 신규 물질 살포 후 잔류농약이 있는 상황에서 이동성은 크게 영향 받지 않을 수 있지만, angular velocity가 유의하게 낮게 나온 점은 서양뒤영벌의 방향감각이 신규 물질의 독성에 의해 영향 받을 수 있음을 시사함.

Parameter	Control	JP503	t value	P value
Walking distance ± SE (cm)	68.37 ± 10.39	79.40 ± 8.10	0.8375	0.4076
Walking velocity ± SE (cm/s)	0.28 ± 0.04	0.33 ± 0.03	0.8317	0.4108
Angular velocity ± SE (degree/s)	86.20 ± 5.36	71.47 ± 3.45	-2.3114	0.0270

<표 41> 아치사환경에서의 서양뒤영벌 성충의 movement parameter 결과 (3차년도, 2017년)

- 약효 시험 코딩네임

구분	시료명	코딩네임
1차년도	pLH <sub>2</sub> O	pL408
	마이로세슘	MS408
	감자순	GJ408
2차년도	자소액	JS408
	가지	KJ
	피마자	PMJ
	토마토	TMT
	담배	DB
	자소오일	JSO
	피톤치드+ 자소(1:9)	PJ19
	피톤치드+ 자소(9:1)	PJ91
	3차년도	자소50배 희석 + 3% 피톤치드 오일
산화질소, 1% 미지시료		NO40
지솔, G-sol, 이산화티타늄, 나노화용액		G.sol®

### 총 합

- 과제 수행기간 중 총 14가지의 신규 혼합추출물에 대한 leaf-disc bioassay를 실시, 주요 해충군 3종 (담배가루이, 꽃노랑총채벌레, 복숭아혹진딧물)에 대하여 높은 살충력을 보인 2가지 물질 (JS408, JP503)을 선발하였음.
- 선발한 신규혼합물 2가지 물질 모두 해충군 뿐만 아니라 유용곤충인 서양뒤영벌에도 높은 환경독성을 보임.
- 2가지 신규혼합물의 기본 원료는 모두 자소(*Perilla* sp.) 추출물로 자소 추출물이 살충효과를 가지고 있다는 것을 확인함. 하지만 이 물질들은 파프리카 잎에 심각한 약해를 유발시킨다는 것을 실험실 환경과 실험포장 모두에서 확인함.
- 해충군 발생 소장 조사 결과에 따르면, 담배가루이와 총채벌레는 비닐하우스 출입구를 통해 유입되고 작기가 지남에 따라 밀도가 증가하는 양상을 보이지만, 공간분포 및 작기 중 밀도변동양상이 상관관계를 가지고 있지 않기 때문에 이원화된 모니터링 및 방제기법 적용이 필요함.
- 파프리카 식물체에 직접 분사할 수 있는 친환경 해충방제제를 제품화를 위해서는 선발된 물질들의 유용곤충에 대한 살충 효과를 줄이고 신규 물질의 조성 변화를 통하여 식물체에 대한 약해 유발을 감소시켜야 함.
- 선발된 물질들을 현 상태로 사용할 경우, 해충 유입이 시작될 시기에 온실 주변부에 존재하는 야생 기주에 분사하여 해충과 동시에 야생 기주를 제거할 수 있을 것으로 보임. 하지만, 비닐하우스 내 파프리카 식물체에는 직접 분사를 위해서는 앞서 언급한 문제점들에 대한 해결이 전제되어야 함.

#### 4. 연구개발성과

- 과제수행기간동안 국·내외 학술회의에서 4건의 포스터 발표와 2건의 구두 발표를 수행함 (단독사사).
- SCIE 논문 2편(단독사사)을 게재하고 1편(단독사사)를 SCIE 논문에 투고 완료함.

연구개발성과 (제1협동)						
구분	논문명 / 발표명	논문게재지 / 학회명	Impact Factor	논문게재일 / 발표일	저자명 / 발표자	사사 여부
포스터발표	Development of environment-friendly natural insecticides for <i>Bemisia tabaci</i> (Hemiptera: Aleyrodidae) on greenhouse sweet peppers	2015 한국응용곤충학회 임시총회 및 추계학술발표회	포스터 발표 우수상 수상	2015. 10. 15~16.	김수완 외	단독사사
포스	Population dynamics	2015	·	2015. 10.	김수완	단독

터발표	and spatial distributions of whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) and thrips (Thysanoptera: Thripidae) in sweet pepper greenhouse	한국응용곤충학회 임시총회 및 추계학술발표회		15~16.	외	사사
포스터발표	Development of natural insecticides for <i>Bemisia tabaci</i> (Hemiptera: Aleyrodidae) on greenhouse sweet pepper	International Congress of Entomology 2016, Orlando, Florida, USA	.	2016. 09. 25~30.	김수완 외	단독사사
포스터발표	Development of environment-friendly natural insecticides for <i>Bemisia tabaci</i> (Hemiptera: Aleyrodidae) on greenhouse sweet peppers	제 12차 국제식물보호협약 총회	.	2017. 04. 05~11	김수완 외	단독사사
구두발표	Preference of <i>Riptortus pedestris</i> (Hemiptera: Alydidae) 2nd instar nymph on a gut symbiont, <i>Burkholderia</i> sp., in laboratory conditions	The 12th International congress of Ecology 2017, Beijing	.	2017. 08. 20~25.	김수완 외	단독사사
구두발표	Preference of <i>Riptortus pedestris</i> (Hemiptera: Alydidae) 2nd instar nymph on its gut symbiont, <i>Burkholderia</i> sp. in dual-choice experiments	2017 한국응용곤충학회 추계학술발표회 및 국제심포지엄	.	2017. 10. 26~27.	김수완 외	단독사사
논문	Evaluating the potential of the extract of <i>Perilla</i> sp. as a natural insecticide for <i>Bemisia</i>	Entomological Research, 47(3):	0.573	2017. 05.	김수완 외	단독사사

	<i>tabaci</i> (Hemiptera: Aleyrodidae) on sweet peppers	208-216				
논문	Lethal and sublethal effects of synthetic insecticides on the locomotory and feeding behavior of <i>Riptortus pedestris</i> (Hemiptera: Alydidae) under laboratory conditions	Journal of Asia-Pacific Entomology, 21(1): 179-185	1.046	2018. 03.	정민형 외	단독사사
논문	Evaluating natural compounds as potential insecticides against three economically important pests, <i>Bemisia tabaci</i> (Hemiptera: Aleyrodidae), <i>Frankliniella occidentalis</i> (Thysanoptera: Thripidae), and <i>Myzus persicae</i> (Hemiptera: Aphididae) on greenhouse sweet peppers.	Applied Biological Chemistry 투고 완료	0.750	2018. 예정	김수환 외	단독사사

### 3. 연구수행 내용 및 결과 (제2협동)

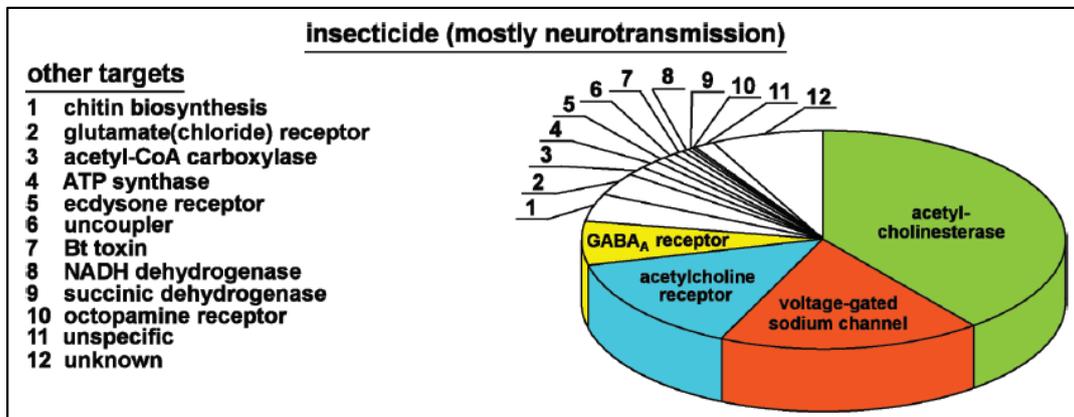
	코드번호	D-05
<input type="checkbox"/> 최종목표 - 잣나무 피톤치드 및 천연물기반 혼합추출물의 파프리카 병해충 방제 작용기전 규		

## 명 및 독성 분석

### □ 연구내용

#### ○ 파프리카 주요 병해충에 대한 방제 작용기전 규명

- 신규 혼합추출물의 파프리카 주요 병해충인 총채벌레, 가루이 및 응애 등에 대한 방제 작용기전을 분석하고자 함
- 대부분의 살충제는 주로 신경신호전달 과정을 억제하는 작용기전을 갖고 있으며 그 외 다른 작용점을 표적하는 기전을 가지는 것으로 알려짐 (그림 54)
- 본 연구에서는 신규 혼합추출물의 파프리카 병해충 방제 기전을 규명하기 위하여 병해충의 신경신호전달과정 억제 효능, 키틴질 생합성 및 여러 대사과정에 대한 신규 혼합추출물의 조절 효능 등을 분석하고자 함



<그림 54>살충제의 작용기전 분석 (Casida JE, *Chem. Res. Toxicol.*, 2009)

#### ○ 유용곤충 및 동물에 대한 독성 평가

- 유용 곤충인 서양뒤영벌 및 동물세포에 대한 신규 혼합추출물의 독성을 분석하고자 함
- 파프리카 주요 병해충에 대한 방제 효능을 갖는 유효 농도의 신규 혼합추출물의 유용곤충 또는 인간 세포에 처리하고 Cell-titer Glo luminescent cell viability assay를 이용하여 독성을 평가함

### □ 연구결과

- 본 연구기관의 주요 연구 수행 내용은 주관 및 협동기관으로부터 제공 받은 시료에 대한 세포 독성 확인 및 유전자 발현 분석이므로 주관 및 협동기관 연구 결과의 보조 데이터로 활용 됨

#### 1) 1차년도

			코드번호	C-03-02
구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2014)	잣나무 피톤치드 기반 혼합추출물 의 수출용 파프리카의 주요 해충에 대한 방제 작용기전 규명 및 독성 평가	주요 해충에 대한 신규 혼합추출물의 방제 작용기전 규명	신규 혼합추출물의 세포독성 분석 및 방제 작용기전 규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 다양한 세포주 (Ra 264.7, MEF, HFF)에 대한 혼합추출물의 세포 독성을 확인하여 추출물 처리조건의 변경이 요구됨</li> <li>• 신규 혼합추출물의 해충 방제 기전 규명 연구를 위한 분석법을 구축함</li> </ul>

○ 신규 혼합추출물의 세포 독성 분석

- 혼합추출물이 murine macrophage cell (Raw 264.7), murine embryonic fibroblast (MEF), human foreskin fibroblast (HFF) 세포에 미치는 영향을 Celltiter-Glo Assay를 통한 세포내 ATP 양을 측정하여 분석함
- 혼합추출물 원액의 0.01, 0.1, 1, 10, 20% 희석물을 세포에 처리한 뒤, 12, 24, 48, 72시간 뒤에 세포독성을 분석함 (표 42)
- 각 세포에서 12, 24, 48, 72시간 뒤 IC50값을 측정함 (표 43)
- 실험 결과, 혼합추출물이 정상 세포에서 독성을 나타내는 것을 확인하여 주관 및 협동기관 연구 수행 시 처리농도 및 시간의 조정이 필요할 것으로 사료 됨

○ 신규 혼합추출물의 주요 병해충에 대한 방제 작용기전 규명

- 주요 해충 1종에 대한 신규 혼합추출물의 방제작용기전 규명에 대한 시험법을 확립함
- 신규 혼합추출물이 담배가루이의 대사 및 생리에 미치는 영향을 평가함
- 담배가루이를 TRI 용액에서 homogenization 시킨 뒤 ZR Tissue & Insect RNA MicroPrep kit (Zymo Research)를 이용하여 RNA를 추출함
- 추출된 RNA를 사용하여 대부분의 살충제가 표적으로 하는 Cytochrome B, Cytochrome C oxidase, ATP synthase, NADH dehydrogenase 유전자 발현 변화를 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)을 통해 분석함

JS408 처리- Raw 264.7						
cell-titer glo	0%	0.01%	0.1%	1%	10%	20%
0hr						
fold	100	100	100	100	100	100
12hr	17385200	4285670	334297	104812	4288.79	4580.9
fold	100	24.65126	1.922883	0.602881	0.024669	0.026349
24hr	6416930	402309	42814.7	9668.02	3728.6	4010.69
fold	100	6.269493	0.667215	0.150664	0.058106	0.062502
48hr	7722130	463888	20550.1	2666.31	1162.06	1892.15
fold	100	6.007254	0.26612	0.034528	0.015048	0.024503
72hr	12666700	1677220	36037.8	3516.53	4945.05	2778.33
fold	100	13.24118	0.284508	0.027762	0.03904	0.021934

JS408 처리- MEF WT						
cell-titer glo	0%	0.01%	0.1%	1%	10%	20%
0hr						
fold	100	100	100	100	100	100
12hr	25380900	24891800	23823900	21270600	32944.6	246361
fold	100	98.07296	93.86547	83.80554	0.129801	0.970655
24hr	22626900	21686200	19984400	11078000	24167.1	62642.3
fold	100	95.84256	88.32142	48.95942	0.106807	0.276849
48hr	15237500	42250.6	5424750	872171	19023.5	41961.6
fold	100	0.27728	35.60131	5.723846	0.124847	0.275384
72hr	29156.5	1909810	2531840	898164	9525.9	23173.1
fold	100	6550.203	8683.621	3080.493	32.67162	79.47833

JS408 처리- HFF						
cell-titer glo	0%	0.01%	0.1%	1%	10%	20%
0hr						
fold	100	100	100	100	100	100
12hr	10603200	10744000	9989940	7772510	10262.5	35363.7
fold	100	101.3279	94.21627	73.30344	0.096787	0.333519
24hr	12293900	11237500	9356470	1765020	5167.15	8491.1
fold	100	91.40712	76.10661	14.35688	0.04203	0.069068
48hr	10106300	9319750	7642680	1408590	2692.31	3052.4
fold	100	92.21723	75.62293	13.93774	0.02664	0.030203
72hr	9183090	9710420	9444920	6020110	1846.15	2776.33
fold	100	105.7424	102.8512	65.55647	0.020104	0.030233

<표 42> 다양한 세포주에서 혼합추출물의 독성 평가

IC 50	12hr	24hr	48hr	72hr
Raw 264.7	0.006636%	0.005334%	0.00532%	0.005763%
MEF WT	4.636077%	0.976198%	0.077641%	
HFF	3.864964%	0.480506%	0.473847%	3.136312%

<표 43> 혼합추출물의 독성 평가 결과를 통한 혼합추출물의 IC50 값

## 2) 2차년도

				코드번호	C-03-02
구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	
2차 년도 (2015)	잣나무 피톤치드 기반 혼합추출물 의 추출용 과프리카의 주요 해충에 대한 방제 작용기전 규명 및 독성 평가	주요 해충에 대한 신규 혼합추출물의 방제 작용기전 규명	신규 혼합추출물의 해충에 대한 작용기전 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>담배가루이 유전자 발현 분석 시스템을 구축함</li> <li>qRT-PCR을 통해 신규 혼합추출물 8종 처리에 따라 담배가루이의 ND-1 및 ATP-6 mRNA 발현이 저해 되는 것을 확인함</li> </ul>	

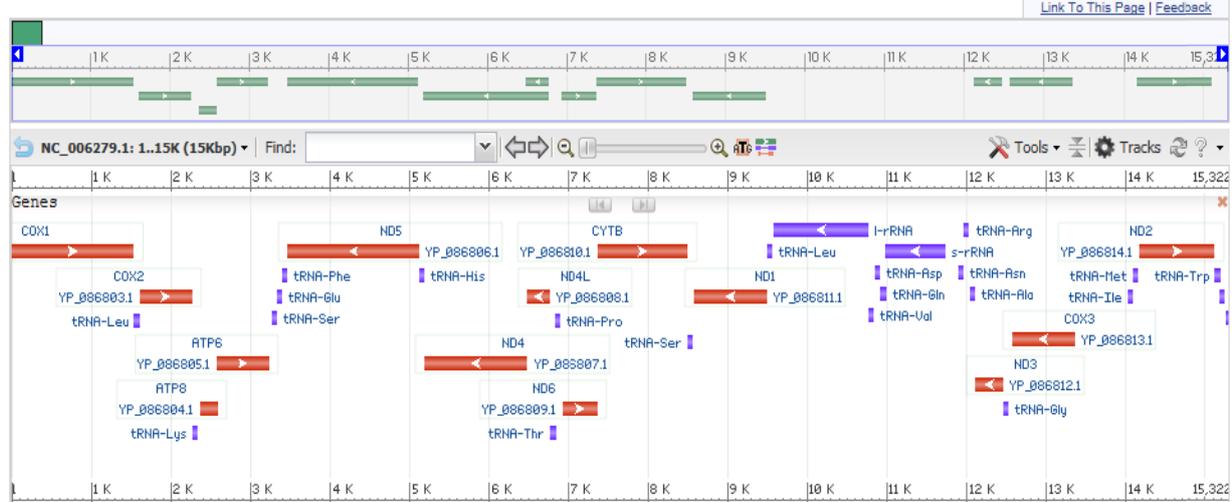
### ○ 신규 혼합추출물의 주요 병해충에 대한 방제 작용기전 규명

- 주요 병해충 담배가루이(*Bemisia tabaci*)에 대한 신규 혼합추출물 8종 자소 원액 (JS-408), 자소 오일 (JSO), 피톤치드+ 자소(1:9) (PJ19), 피톤치드+ 자소(9:1) (PJ91), 가지 (KJ), 토마토 (TMT), 피마자 (PMJ), 담배(DB)의 방제 작용기전을 분석하기 위하여 추출물이 담배가루이 유전자 발현에 미치는 영향을 분석하고자 함
- 담배가루이의 유전체 크기는 약 1020Mbp이며 mitochondrial genome (NCBI Reference Sequence: NC\_006279.1)의 총 13개 유전자 (그림 55) cytochrome c oxidase subunit (COX)-1, COX-2, COX-3, NADH dehydrogenase subunit (ND)-1, ND-2, ND-3, ND-4, ND-4L, ND-5, ND-6, cytochrome b (CYTB), ATP synthase F0 subunit (ATP)-6, ATP-8 중 대부분의 살충제가 표적으로 하는 것으로 알려진 유전자 ND 및 ATP와 COX 유전자의 발현을 비교분석함

## Bemisia tabaci mitochondrion, complete genome

NCBI Reference Sequence: NC\_006279.1

[GenBank](#) [FASTA](#)



<그림 55> 담배가루이 유전 정보

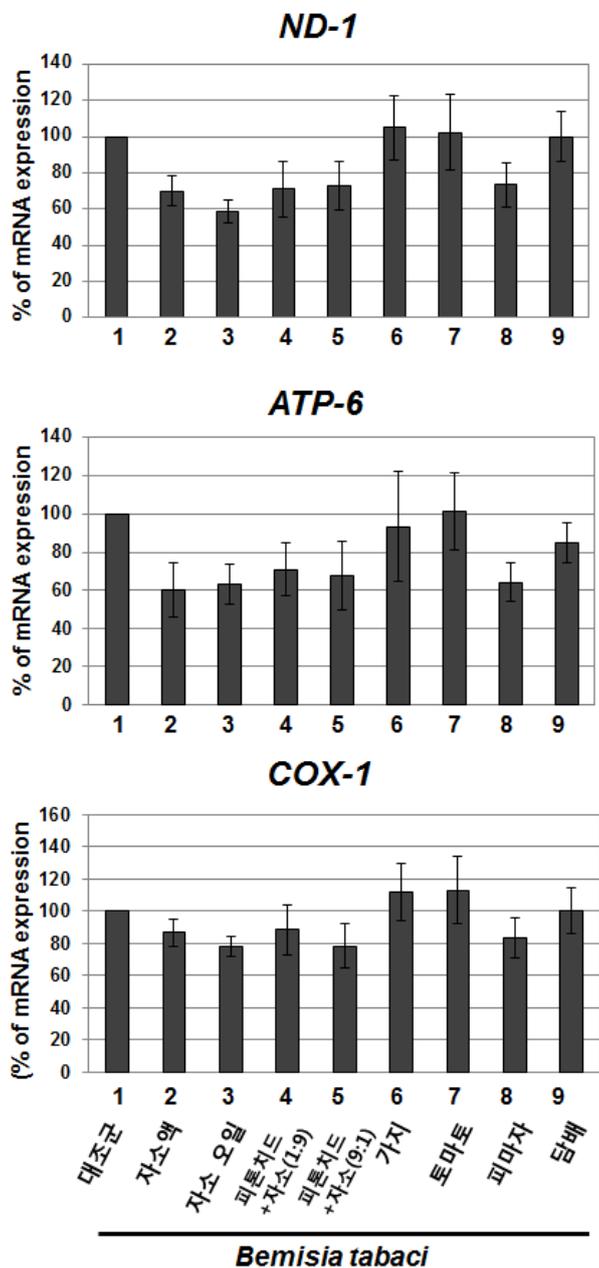
- 신규혼합추출물을 농도별 또는 시간별로 처리한 담배가루이를 액체질소로 급속 냉동시킨 뒤 homogenization 하여 ZR Tissue & Insect RNA MicroPrep kit (Zymo Research) 또는 RNeasy kit (Qiagen)를 이용하여 total RNA를 추출함
- 추출한 total RNA는 Quantitect Reverse Transcriptase (Qiagen)를 이용하여 cDNA 합성한 뒤 담배가루이 유전자 ND-1, ATP-6, COX-1 specific primer (표 44)를 이용해 qRT-PCR하여 유전자 발현을 분석함

Gene	Position	Sequence (5'-3')	length	Tm(°C)	GC(%)	Product size (bp)
COX-1	Forward	TTTCACTTCCCGTCTTGCG	20	59.06	50	227
COX-1	Reverse	ACCCAGGCTACCAAATACTTCT	22	58.81	45.45	
ATP-6	Forward	CTGATTCGGCCTTGGTCTCT	20	59.46	55	157
ATP-6	Reverse	CAAAGGCTTGATAAAACAGACA	23	57.55	39.13	
ND-1	Forward	GTGGTAATGTCGTTCCGGT	20	58.2	50	247
ND-1	Reverse	CTGGCCGAACTAACCGAAC	20	59.21	55	

<표 44> 담배가루이 유전자 발현 분석 Primer 정보

- 담배가루이 유전자 중 밝혀진 house keeping gene 정보가 없어 유전자 발현량을 normalization 할 수 있는 internal control이 없으므로 동일한 크기 및 개체수의 담배가루이를 사용하였고 신규 혼합추출물을 처리하지 않은 대조군 (물)에서의 유전자 발현량을 기준으로 하여 분석함
- 담배가루이에 신규 혼합추출물 8종 (40% 희석액)을 3시간 노출시킨 후 qRT-PCR을 통해 유전자 발현을 분석한 결과, 자소액, 자소 오일, 피톤치드+ 자소(1:9), 피톤치드+ 자소(9:1)

및 피마자 추출물에 의해 담배가루이 ND-1 및 ATP-6의 mRNA 발현이 감소되었으며 COX-1 mRNA 발현에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타남 (그림 56)



<그림 56> 신규 혼합추출물 8종이 담배가루이 유전자 발현에 미치는 영향 분석

- 선행연구에서 신규 혼합추출물이 해충과 유용곤충 모두에 대하여 높은 치사율을 나타내었으므로 담배가루이 유전자 발현 분석뿐만 아니라 유용곤충에서의 유전자 발현 분석을 통해 신규 혼합추출물이 해충인 담배가루이에 특이적인 살충 효과 또는 유전자 발현 변화를 유도한 것인지 분석하고자 하였음
- 유용곤충 2종 서영뒤영벌(*Bombus terrestris*) 및 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*)은 현재 명확하게 밝혀진 유전 정보가 없는 문제로 인하여 같은 무게 또는 개체수의 시료 (대

조균 및 비교균)로부터 total RNA를 추출하여 spectrophotometer로 RNA 양을 측정하거나 RNA gel electrophoresis를 통해 RNA양을 비교하는 방법을 시도해보았으나 큰 차이를 확인할 수 없었음 (표 45)

	서양뒤영벌 total RNA (ng/ul)	복숭아혹진딧물 total RNA (ng/ul)
Control	103.48	28.23
JS	128.52	37.71
JSO	108.44	28.26
PJ19	118.02	26.80
PJ91	98.85	35.54
KJ	115.90	26.11
TMT	108.70	28.70
PMJ	114.38	30.38
DB	111.23	29.04

<표 45>. 유용곤충 2종의 RNA 추출 및 농도 측정

- 신규 혼합추출물들이 유용곤충 및 동물세포에 대한 독성은 최소화하면서 주요 병해충 담배가루이에 대해 특이적인 방제 효과를 나타낼 수 있는 추출물의 농도 및 처리시간을 선정해야하며, 동물(세포)에 대한 안정성 평가 연구가 필수적인 것으로 사료됨

### 3) 3차년도

		코드번호		C-03-02
구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
3차 년도 (2016)	잣나무 피톤치드 기반 혼합추출물 의 수출용 파프리카의 주요 해충에 대한 방제 작용기전 규명 및 독성 평가	주요 해충에 대한 신규 혼합추출물의 방제 작용기전 규명	신규 혼합추출물의 해충에 대한 작용기전 분석 및 세포독성 검사	<ul style="list-style-type: none"> <li>• qRT-PCR을 통해 자소액 처리에 따라 담배가루이의 ND-1, ATP-6와 서양뒤영벌의 NADH, C9, ATP-b, C8 mRNA 발현이 저해 되는 것을 확인함</li> <li>• Celltiter-glo assay를 통해 자소액의 세포독성을 확인함</li> </ul>

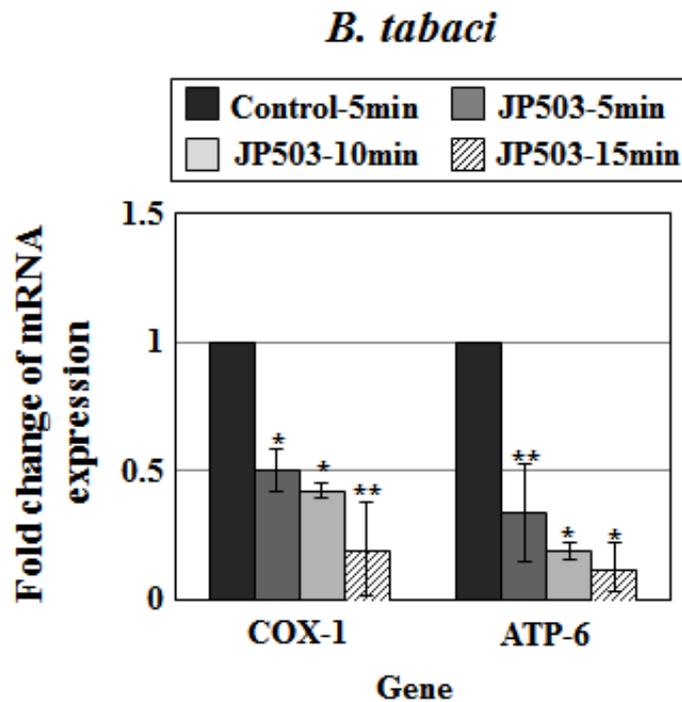
#### ○ 자소액 기반 혼합추출물(JP-503)의 주요 병해충에 대한 작용기전 규명

- 주관기관 및 협동기관의 선행연구를 통해 선정된 JP-503에 의한 주요 병해충 담배가루이(Bemisia tabaci) 방제 작용기전을 분석하기 위하여 추출물이 담배가루이 유전자 발현에 미치는 영향을 분석하고자 함
- 병해충에 대한 방제 작용기전을 분석하기 위해 JP-503를 담배가루이에 시간별로 처리하여 COX-1, ATP-6 유전자 발현에 미치는 영향을 비교분석함

- JP-503을 시간별로 처리한 담배가루이를 액체질소로 급속 냉동시킨 뒤 homogenization 하여 ZR Tissue & Insect RNA MicroPrep kit (Zymo Research) 를 이용하여 total RNA를 추출함
- 추출한 total RNA는 TOPscript™ cDNA Synthesis Kit (Enzymomics)를 이용하여 cDNA 합성한 뒤 담배가루이 유전자 COX-1, ATP-6, specific primer (표 46)를 이용해 qRT-PCR하여 유전자 발현을 분석함

	Gene	Position	Sequence (5'-3')	length	Tm(°C)	GC(%)	Product size (bp)
담배 가루이	COX-1	Forward	TTTCACTTCCCGTTCTTGCG	20	57.3	50	227
		Reverse	ACCCAGGCTACCAAATACTTCT	22	58.4	45.5	
	ATP-6	Forward	CTGATTCGGCCTTGGTCTCT	20	59.4	55	157
		Reverse	CAAAGGCTTGATAAAAACAGACA	23	57.1	39.1	

<표 46>. 담배가루이 유전자 발현 분석 Primer 정보



<그림 57> JP-503이 담배가루이 유전자 발현에 미치는 영향 분석

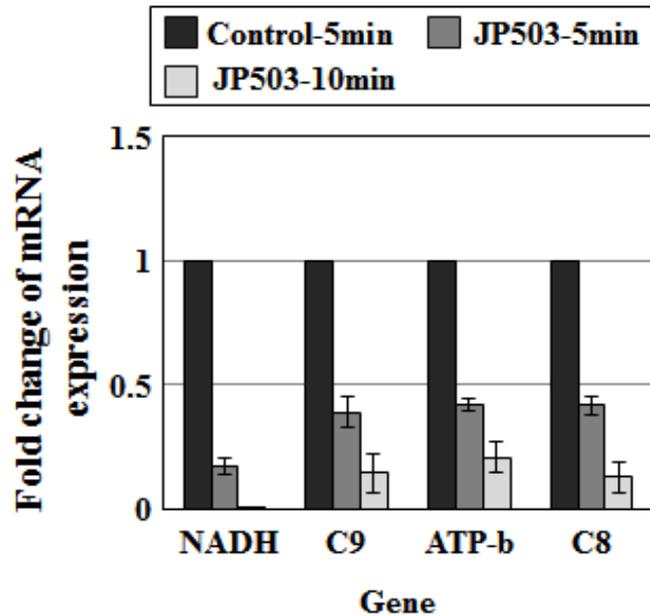
- 담배가루이에 JP-503을 각각 5분, 10분, 15분 노출시킨 후 qRT-PCR을 통해 유전자 발현을 분석한 결과, JP-503 을 처리한 시간에 따라 담배가루이의 COX-1 및 ATP-6의 mRNA 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었음(그림 57)

- 선행연구에서 JP-503 이 해충과 유용곤충 모두에 대하여 높은 치사율을 나타내었으므로 담배가루이 유전자 발현 분석뿐만 아니라 유용곤충에서의 유전자 발현 분석을 통해 JP-503 이 해충인 담배가루이에 특이적인 살충 효과 또는 유전자 발현 변화를 유도한 것인지 분석하고자 하였음
- 주요 유용 곤충 서양뒤영벌(*Bombus terrestris*)에 대한 JP-503의 피해 작용기전을 분석하기 위하여 JP-503이 서양뒤영벌 유전자 발현에 미치는 영향을 분석하고자 함
- 서양뒤영벌의 유전체 크기는 약 18Mbp이며 (NCBI Reference Sequence: NC\_015768.1) mitochondrial genome의 NADH dehydrogenase subunit, cytochrome c oxidase subunit, ATP synthase F0 subunit, cytochrome b 중 대부분의 살충제가 표적으로 하는 것으로 알려진 유전자 NADH dehydrogenase subunit, ATP synthase F0 subunit, cytochrome b subunit의 유전자의 발현을 비교분석함
- JP-503을 시간별로 처리한 서양뒤영벌을 담배가루이와 같은 방법으로 total RNA를 추출하고 같은 방법으로 cDNA 합성한 뒤 NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 12 (NADH), cytochrome b-c1 complex subunit 9-like (C9), ATP synthase subunit b (ATP-b) and cytochrome b-c1 complex subunit 8 (C8) specific primer (표 47)를 이용해 qRT-PCR하여 유전자 발현을 분석함

	Gene	Position	Sequence (5'-3')	length	Tm(°C)	GC(%)	Product size (bp)
서양 뒤영벌	NADH	Forward	GTGGTAATGTCGTTCCGGGTT	20	60.8	55	246
		Reverse	CTGGCCGAAACTAACCGAAC	20	59.1	55	
	C9	Forward	GGCATTCTAGCAGCCACCTT	20	60.4	55	80
		Reverse	CCCTCATTCAGCCTGTCGAA	20	59.8	55	
	ATP-b	Forward	ATGTACCACGTCCAAAGCGT	20	60.0	50	103
		Reverse	CCTGTTGCACCAGTTTTAGGG	21	59.4	52.4	
	C8	Forward	TGGGAGGAAAGAGGTTTGGAG	21	59.3	52.4	101
		Reverse	AGCCTCACGTATTCCAGCAA	20	59.4	50	

<표 47>. 서양뒤영벌 유전자 발현 분석 Primer 정보

*B. terrestris*



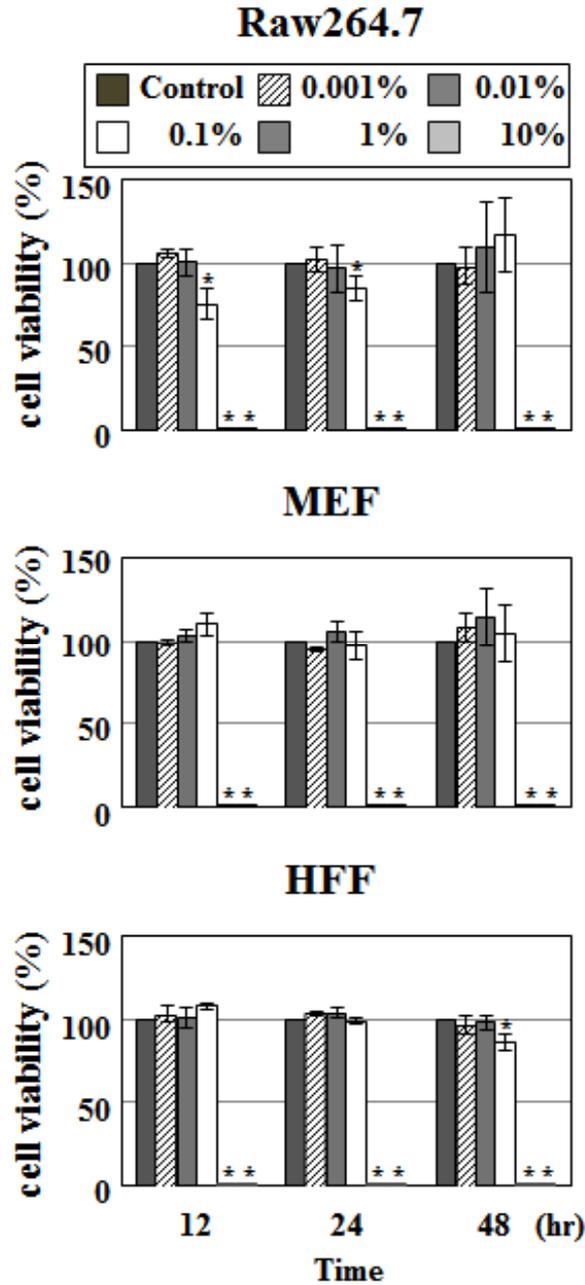
<그림 58> JP-503이 서양뉘영벌 유전자 발현에 미치는 영향 분석

- 서양뉘영벌에 JP-503을 각 5분, 10분 노출시킨 후 qRT-PCR을 통해 유전자 발현을 분석한 결과, JP-503에 의해 서양뉘영벌의 NADH, C9, ATP-b, C8 mRNA 발현이 감소되는 것으로 나타남 (그림 58)
- 담배가루이와 서양뉘영벌 유전자는 밝혀진 house keeping gene 정보가 없어 유전자 발현량을 normalization 할 수 있는 internal control이 없으므로 담배가루이의 경우 동일한 크기 및 동일한 한 숫자를, 서양뉘영벌의 경우 동일한 크기 및 무게를 측정하여 사용하였고 JP-503을 처리하지 않은 대조군(물)에서의 유전자 발현량을 기준으로 하여 분석하였음

○ JP-503의 농도별 처리에 따른 인간 및 동물세포에 대한 세포독성 분석

- 주관기관 및 협동기관의 선행연구를 통해 최종 선정된 JP-503을 다양한 농도 및 시간별로 인간 및 동물세포에 처리하여 Celltiter-Glo luminescent cell viability assay를 통해 세포 독성 분석함 (그림 59)
- 10%, 1%, 0.1%, 0.01%, 0.001% 로 물에 희석된 JP-503을 각각 동일한 조건으로 배양한 인간세포 Human Foreskin Fibroblast (HFF)와 동물세포 murine macrophage cell Raw264.7, Mouse Embryonic Fibroblasts (MEF)에 12시간, 24시간, 48시간 동안 처리하고 Celltiter-Glo luminescent cell viability assay를 통해 세포 독성을 분석한 결과 1% 이상의 농도에서 12시간 이내에 인간 및 동물세포에 대한 강한 세포 독성이 있는 것으로 나타남
- 결론적으로 JP-503은 담배가루이의 COX-1과 ATP-6, 서양뉘영벌의 NADH, C9, ATP-b, C8 유전자 발현량을 유의하게 감소시키며, 뿐만 아니라 동물세포인 Raw264.7,

MEF 그리고 HFF 세포의 생존률을 현저하게 감소시키는 것을 확인함  
 - 따라서 JP-503은 담배가루이 특이적인 억제 효능을 갖기 보다는 비특이적으로 작용하여  
 주요 유전자 발현을 억제하며, 동물 세포에 강한 세포 독성을 갖는 것을 확인하여 보고함



<그림 59> JP-503이 인간 및 동물세포에 미치는 독성 분석

□ 연구성과

- 본 연구를 통해 해당 기관에서는 2건의 논문 게재 성과를 달성함

구분	논문명 / 발표명	논문게재지 / 학회명	Impact Factor	논문게재일 / 발표일	참여저자 (역할)	사사여부
논문	An ethanol extract of <i>Lysimachia mauritiana</i> exhibits inhibitory activity against hepatitis E virus genotype 3 replication	The Journal of Microbiology	1.924	2017.12.07.	진성은 (제1저자) 및 송윤재 (교신저자)	중복사사
논문	Evaluating natural compounds as potential insecticides against three economically important pests, <i>Bemisia tabaci</i> (Hemiptera: Aleyrodidae), <i>Frankliniella occidentalis</i> (Thysanoptera: Thripidae), and <i>Myzus persicae</i> (Hemiptera: Aphididae) on greenhouse sweet peppers.	Applied Biological Chemistry	0.750	2018. 예정	이준규 (공동저자) 및 송윤재 (교신저자)	단독사사

## 시험의뢰서(Study Request Document)

시험의뢰자	회 사 명	경희대학교 산학협력단	대 표 자	홍충선
	주 소	경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 경희대학교 산학협력단		
	의 회 자	2017년 07 월 24 일	강세찬	(서명)
	E-Mail			
	연락처		Fax	-

시험물질명	파이토팜		
시험물질의 종류	<input checked="" type="checkbox"/> 작물보호제, <input type="checkbox"/> 화학물질, <input type="checkbox"/> 기능성물질, <input type="checkbox"/> 의약품, 기타( )		
시험의 구분	<input type="checkbox"/> GLP, <input checked="" type="checkbox"/> vNon-GLP	보고서(안)발급 희망일	2017 년 12 월 25 일
시험의뢰의 목적	<input type="checkbox"/> 농존진홍청, <input type="checkbox"/> 환경부, <input type="checkbox"/> 식약처, <input checked="" type="checkbox"/> 기타(유기목록공시 발급 실용화재단예정 )		
보고서 발급 형식	<input checked="" type="checkbox"/> 보고서: PDF_전자파일, <input type="checkbox"/> 제본 우편발송(기본 1 부 제공)		
	<input type="checkbox"/> 번역본: 영문( 부), 기타( , 부)(번역본 신청 시 비용이 추가)		

<b>독성시험의뢰항목</b>	
1) 일반독성시험	
<input type="checkbox"/> 급성경구독성시험(랫드), <input type="checkbox"/> 급성경구독성시험(마우스), <input type="checkbox"/> 급성경구독성시험 ( )	
<input type="checkbox"/> 급성경피독성시험(랫드), <input type="checkbox"/> 급성경피독성시험(토끼), <input type="checkbox"/> 급성경피독성시험 ( )	
2) 국소독성시험	
<input type="checkbox"/> 피부자극성시험(토끼), <input type="checkbox"/> 안정막자극성시험(토끼)	
3) 피부감작성시험	
<input type="checkbox"/> 피부감작성시험(마우스)	
4) 생태독성시험	
<input checked="" type="checkbox"/> 어류(잉어)급성독성시험, <input type="checkbox"/> 어류(미꾸리)급성독성시험, <input type="checkbox"/> 어류(송사리)급성독성시험	
<input type="checkbox"/> 물벼룩류급성독성시험	
5 유전독성시험	
<input type="checkbox"/> 복귀돌연변이시험, <input type="checkbox"/> 염색체이상시험, <input type="checkbox"/> 소핵시험	

*용역처리항목은 ㈜에이비솔루션에서 기재합니다.							
*시험항목							
*시험번호							
*배포처							
시험항목							
시험번호							
배포처							

\*시험항목에는 경구, 경피 등의 약어로 기록, 제 3 기관 의뢰 경우 시험번호에 외부로 기입

\*배포처 약어(1: 일반독성팀, 2: 생태독성팀, 3: 조제담당자, 4: 표준물질담당자, 5: QAU, 6: 유전독성팀)

시험접수자 확인	(이름, 날짜 및 서명)
운영책임자 확인	(이름, 날짜 및 서명)

## 시 험 의 료 서

### 1. 의뢰기관

(주소는 성적서 수령주소를 적어주십시오)  
(노란색 배경의 공간은 반드시 작성하여 주시기 바랍니다)

기 관 명	경희대학교 산학협력단	의뢰담당자	권 정 은
주 소	경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 경희대학교 생명과학대학 209-1호	연락처(mobile)	
연락처(기관)		e-mail	

### 2. 시험설정

(해당항목에 체크(✓)해 주십시오)

시 험 항 목	특 성	<input checked="" type="checkbox"/> 어류급성독성시험 <span style="float: right;"><input checked="" type="checkbox"/> 잉어 (<i>Cyprinus carpio</i>)</span> <input type="checkbox"/> 담수어류영향시험(미생물) <span style="float: right;"><input type="checkbox"/> 송사리 (<i>Oryzias latipes</i>)</span> <input type="checkbox"/> 미꾸리 ( <i>Misgurnus auguilicaudatus</i> )	
		<input type="checkbox"/> 물벼룩 독성시험( <i>Daphnia magna</i> ) <span style="float: right;"><input type="checkbox"/> 꿀벌급성집축독성시험(<i>Apis mellifera</i>)</span> <input type="checkbox"/> 꿀벌영향시험( <i>Apis mellifera</i> ), 미생물	
		<input type="checkbox"/> 급성경구시험, <input type="checkbox"/> 급성경피시험, <input type="checkbox"/> 피부자극시험, <input type="checkbox"/> 안정막자극시험 <input type="checkbox"/> 미생물체제 ( <input type="checkbox"/> 경구병원성시험, <input type="checkbox"/> 경피시험, <input type="checkbox"/> 피부자극시험, <input type="checkbox"/> 안정막자극시험)	
	생물	<input checked="" type="checkbox"/> 친환경 ( <input type="checkbox"/> 비해, <input type="checkbox"/> 약해) 시험 <span style="float: right;">■ 시험작물: <input type="checkbox"/> 고추, <input type="checkbox"/> 상추, <input type="checkbox"/> 오이, <input type="checkbox"/> 배추, <input type="checkbox"/> 콩</span> <input type="checkbox"/> 기타작물:	
		<input checked="" type="checkbox"/> 친환경효과시험: <input type="checkbox"/> 약효 <span style="float: right;">■ 시험작물:</span> <input type="checkbox"/> 비효 <span style="float: right;">■ 대상병해충:</span>	
의뢰목적		<input type="checkbox"/> 등록시험용( <input type="checkbox"/> 국내 <input type="checkbox"/> 국외) <span style="float: right;"><input checked="" type="checkbox"/> 친환경유기농자재(<input type="checkbox"/> 공시 <input checked="" type="checkbox"/> 품질인증)</span> <input type="checkbox"/> 인/허가제출자료 (제출처: ) <span style="float: right;"><input type="checkbox"/> 독성스크리닝 <input type="checkbox"/> 기타 ( )</span>	
시험의뢰일		2017 년 8 월 17 일	보고서완료희망일 2017 년 10 월 31 일

### 3. 시험물질 정보

제 품 명	파이토팜	색상	불투명한 흰색
주 원 료	잣나무 추출물	유효성분	리모넨
주원료투입비율	2%	유효성분 함량	0.241
사용농도 (희석배수/ 표준사용농도)	1,000배 희석 <span style="float: right;">(예: 1,000배, 30Kg/10a) (독성시험단 의뢰시 각성성확가능)</span>		
사용방법	희석 후 엽면시비한다. <span style="float: right;">(경엽처리, 관주처리, 토양처리, etc.)</span>		
제조회사	(주)피리스	Lot No.	160905
보관조건	상온	유효기간	2년
시험물질 제공량	500ml	잔여량 처리방법	<input type="checkbox"/> 반환 <input checked="" type="checkbox"/> 폐기
첨부자료	v시험성적서 <input type="checkbox"/> MSDS <input type="checkbox"/> 안정성자료 <input type="checkbox"/> 기타		
시험물질 조제 및 사용시 유의사항			
기타사항			
접 수 일	년 월 일		접 수 번 호
시험접수자	(서명)		

## 주) 피 러 스

충북 단양군 적성면 각기리 쌀미길 18 TEL: 043-421-0330 Fax:0303-3440-0330 담당자: 김세은

문서번호 : 2017-08-04

수 신 : 경희대학교 산학협력단

담 당 : 권정은

발 신 : (주) 피러스

제 목 : 독성시험기관 변경 건.

내 용 :

귀 기관의 무궁한 발전을 기원합니다.

1. 수출전략기술개발사업 위탁과제(경희대학교) 독성시험관련 시험기관의 변경을 의뢰하오니 협조 하여 주시기 바랍니다.

### 1) 변경 시험기관명

변경 전	변경 후
에이비솔루션	한국생물안전성

### 2) 변경사유

독성 시험 완료 일정의 지연

3) 변경일시: 8월 말경

끝.

2017년 08월 04일

(주) 피러스

대표이사 이 성 희



## 최종보고서(안)

### 파이토팜의 꿀벌 (*Apis mellifera*)에 대한 급성접촉독성시험

ETBC-17032



(주)한국생물안전성연구소

## 제 출 문

시험물질 : 파이토팜

시험제목 : 파이토팜의 꿀벌 (*Apis mellifera*)에 대한 급성접촉독성시험

상기 독성시험을 “농약 및 원제의 등록기준” [별표 13] 환경생물 독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청고시 제2017-5호)에 준하여 실시하고 그 결과를 다음과 같이 제출합니다.

년 월 일

(주)한국생물안전성연구소

시험책임자 장 희 섭 서명

## 1. 요약 [Summary]

파이토팜의 꿀벌에 대한 급성적 영향을 평가하고, 반수치사약량 ( $LD_{50}$ )을 산출하기 위해 48시간동안 급성접촉독성시험을 수행하였다.

시험은 무처리군과 주원료 투입비율 기준 20,000  $\mu\text{g}/\text{bee}$  (원액 1  $\mu\text{L}/\text{bee}$ )의 한계시험 약량으로 설정하여 진행하였다.

시험생물은 무처리군과 시험물질 처리군 당 10마리씩 3반복으로 노출시켰다.

시험물질 노출 후 48시간동안 관찰한 결과, 무처리군에서 치사 및 중독증상을 보인 개체는 관찰되지 않았고, 시험물질 처리군에서는 24, 48시간 누적 치사 수가 4마리로 동일하였다.

본 시험의 결과는 아래와 같다.

Observation time (hr)	$LD_{50}^a$ ( $\mu\text{g}/\text{bee}$ )
24 & 48	> 20,000

a: Based on nominal dose of main ingredient input ratio

파이토팜의 꿀벌에 대한 24, 48시간 반수치사약량 ( $LD_{50}$ )은 주원료 투입비율 기준으로 모두 20,000  $\mu\text{g}/\text{bee}$  초과이었다.

## 2. 서 론 [Introduction]

### 2.1 시험일반정보

시험제목:	파이토팜의 꿀벌 ( <i>Apis mellifera</i> )에 대한 급성접촉독성시험
시험물질:	파이토팜
시험의뢰자:	㈜피러스 경기도 용인시 수지구 죽전로152 단국대학교 제3공학관 203호
시험기관:	㈜한국생물안전성연구소 충청북도 음성군 감곡면 성주로 362-20 Tel: 043-882-0297, Fax: 043-882-0298
시험장소:	㈜한국생물안전성연구소 GLP 연구동 꿀벌실험실

### 2.2 시험책임자

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

### 2.3 시험관계자

시험물질의 조제/노출:	장희섭, 이상우
관찰/측정/평가:	장희섭
꿀벌사육관리담당자:	김명진, 이상우

### 2.4 시험일정

시험물질 노출일:	2017.09.05
관찰/측정/평가:	2017.09.05 ~ 2017.09.07
관찰 종료일:	2017.09.07
최종보고서 제출일:	

### 2.5 시험목적

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

### 2.6 시험법

농촌진흥청 고시 제 2017-5호 (2017.04.24) "농약 및 원제의 등록기준", [별표 13] "환경생물 독성시험 기준과 방법", "13-1-4. 꿀벌급성독성시험", "13-1-4-1. 꿀벌접촉 독성"에 따라 수행되었다.

**2.7 시험물질의 보관**

본시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질보관고에 보관하였다.

시료번호: 17-1-050

시험물질보관기간: 유기농업자재 공시 후 3년

**2.8 시험자료의 보관**

본시험의 시험기초자료 및 관계시험성적서는 당 연구소 자료보관실에 보관하였다.

시험번호: ETBC-17032

시험기초자료: 자료보관실

최종보고서: 자료보관실

자료하드디스크: 자료보관실

자료보관기간: 유기농업자재 공시 후 3년

자료관리담당자: 박선영

### 3. 재료 및 방법 [Materials and Methods]

#### 3.1 시험물질

물질명:	파이토팜
입수일:	2017.09.05
입수량:	300 mL
시료번호:	17-1-050
로트번호:	160905
외관 및 색상:	액상, 불투명 흰색
주원료:	식물추출물 (잣나무)
주원료 투입비율:	2%
보관조건:	실온
공급원:	㈜피러스

#### 3.2 시험생물

##### 3.2.1 시험생물

시험종:	꿀벌 ( <i>Apis mellifera</i> )
공급원:	㈜한국생물안전성연구소
주소:	충청북도 음성군 감곡면 성주로 362-20
입수일:	2014.07.28

##### 3.2.2 사육

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

##### 3.2.3 시험종의 선정이유

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

### 3.3 시험재료 및 준비

#### 3.3.1 시험용 용기

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

#### 3.3.2 먹이

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

#### 3.3.3 시험물질 노출 전 시험생물 처리

환기구멍이 있는 밀폐통에 한 벌통에서 생산된 건강하고 활동성이 좋은 일벌을 채집하여 CO<sub>2</sub> gas로 마취시킨 후, 어린 개체를 제외하고 한 케이지 당 10마리씩 벌을 넣어 25°C±2의 압조건에서 회복시킨 다음 시험에 사용하였다.

### 3.4 시험방법

#### 3.4.1 시험약량설정

시험물질 파이토팜은 주원료 투입비율이 2%인 제품으로 원액자체를 1 µL/bee 노출 시 시험약량은 20,000 µg/bee (최대 노출약량)가 된다.  
따라서 원액자체의 노출을 한계시험 약량인 20,000 µg/bee로 설정하였다.

#### 3.4.2 노출 생물수

무처리군과 시험물질 처리군 당 10마리씩 3반복으로 수행하였다.

#### 3.4.3 시험용액 조제

시험물질 원액자체를 노출하였으며, 시험용액은 따로 조제하지 않았다.

#### 3.4.4 시험물질 노출

케이지 안에 10마리씩 수용된 꿀벌들을 밀봉팩에 담아 CO<sub>2</sub> gas로 마취시킨 후 여과지 위에 올려놓고, micro applicator를 사용하여 시험물질 원액을 마취된 꿀벌의 흉부 (등부위)에 각각 1 µL씩 처리하여 노출하였다.

#### 3.4.5 대조군 설정

무처리군: 마취 후 어떠한 자극도 주지 않았다.  
음성대조군: 원액자체를 노출하여 따로 설정하지 않았다.  
양성대조군: 가장 최근에 실시한 시험결과로 대치하였다 (Appendix 1).

3.4.6 시험환경

기간:	48시간
광주기:	암조건 (관찰시간 제외)
온도:	23.0~27.0°C
상대습도:	50.0~70.0%
먹이공급:	시험물질이 처리된 벌을 다시 케이지에 옮긴 후, 50% 자당용액이 들어있는 급식관을 공급하였다.

#### 4. 관찰 및 측정 [Observation and Determination]

##### 4.1 관찰

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

##### 4.2 실내온도 및 상대습도

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

##### 4.3 시험결과의 표시 및 통계처리방법

시험결과, 한계시험에서 종료되어 통계프로그램을 이용한 반수치사약량 ( $LD_{50}$ )은 산출하지 않았으며, 주원료 투입비율을 기준으로 설정한 시험약량 초과로 결과를 표기하였다.

## 5. 시험결과 [Results]

### 5.1 시험환경 조건

시험기간 동안 꿀벌실험실의 실내온도는 평균 25.7°C (25.1~26.7°C), 상대습도는 평균 56.9% (53.0~62.0%)로 측정되었다 (Appendix 2).

### 5.2 치사개체 및 중독증상

시험물질 노출 후 48시간동안 관찰한 결과, 무처리군에서 치사 및 중독증상을 보인 개체는 관찰되지 않았다.

시험물질 처리군에서는 시험물질 노출 후 4시간째 관찰 시 무기력 증상 개체 2마리와 치사 개체 2마리가 관찰되었고, 24시간째 관찰 시에 치사 개체 2마리가 추가로 관찰됨에 따라 누적 치사 수 4마리로 관찰되었다. 48시간에는 치사 및 중독증상 개체가 추가로 관찰되지 않았다 (Table 1, 2).

### 5.3 급성접촉독성시험 결과

한계시험 약량인 20,000 µg/bee에서 10% 이상 (13.3%)의 치사가 발생하였으나, 본 시험약량을 초과한 약량의 설정이 불가하므로 본시험을 실시하지 않았다.

이상의 시험 결과, 파이토팜의 꿀벌에 대한 24, 48시간 반수치사약량 (LD<sub>50</sub>)은 주원료 투입비율 기준으로 모두 20,000 µg/bee 초과이었다.

Observation time (hr)	LD <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µg/bee)
24 & 48	> 20,000

a: Based on nominal dose of main ingredient input ratio

## **6. 참고문헌 [References]**

- 1) 농촌진흥청 고시 제 2017-5호 (2017.04.24) "농약 및 원제의 등록기준", [별표 13] "환경생물 독성시험 기준과 방법", "13-1-4. 꿀벌급성독성시험", "13-1-4-1. 꿀벌접촉 독성".
- 2) 국립농산물품질관리원 고시 제 2017-33호 (2017.06.03) "유기농업자재 공시 및 품질 인증 기준".
- 3) OECD guidelines for the testing of chemicals, No. 214 "Honeybees, Acute Contact Toxicity Test (Adopted: September 21, 1998)".

## 7. Tables

**Table 1. Cumulative mortality of honeybees**

Nominal dose <sup>a</sup> (µg/bee)	Exposed honeybees	Cumulative mortality			Mortality (death / total)	
		4 hr	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr
Untreated control	10	0	0	0	0% (0 / 30)	0% (0 / 30)
	10	0	0	0		
	10	0	0	0		
100.000	10	1	1	1	13.3% (4 / 30)	13.3% (4 / 30)
	10	1	2	2		
	10	0	1	1		

a: Based on main ingredient input ratio

**Table 2. Behavioral abnormalities of honeybees**

Nominal dose <sup>a</sup> (µg/bee)	Exposed honeybees	Abnormal response		
		4 hr	24 hr	48 hr
Untreated control	10	N(10 <sup>b</sup> )	N(10)	N(10)
	10	N(10)	N(10)	N(10)
	10	N(10)	N(10)	N(10)
100.000	10	N(9)	N(9)	N(9)
	10	N(8), C(1)	N(8)	N(8)
	10	N(9), C(1)	N(9)	N(9)

a: Based on main ingredient input ratio

b: Number of honeybees

※ Observation key

N: Normal

A: Hyperactivity

B: Mobile but not working or flying normally

C: Alive but unable to walk or fly

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

## 8. Appendices

### Appendix 1. Positive control study

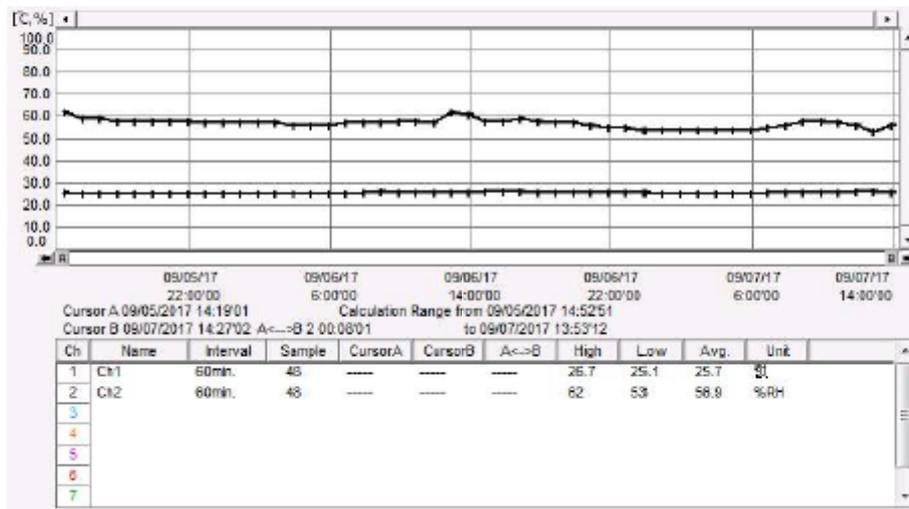
- Recently study data

Study No.	Study period	LD <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µg a.i./bee)	
		24 hr	48 hr
17-KET-PBC002	Aug. 25, 2017 ~ Sep. 08, 2017	0.116	0.113

a: Based on nominal dose of active ingredient

- \* Test substance: Dimethoate
- \* Test species: *Apis mellifera*

Appendix 2. Temperature and relative humidity

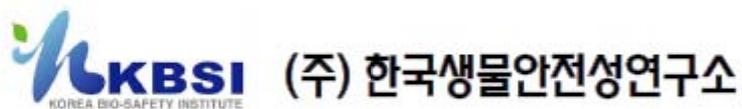


- Recording period: Sep. 05, 2017 ~ Sep. 07, 2017

## 최종보고서(안)

### New Zealand White계 토끼에 대한 파이토팜의 피부자극성시험

ETD-17018



## 제 출 문

시험물질 : 파이토팜

시험제목 : New Zealand White계 토끼에 대한 파이토팜의 피부자극성시험

상기 독성시험을 “농약 및 원제의 등록기준” [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청고시 제 2017-5호)에 준하여 실시하고 그 결과를 다음과 같이 제출합니다.

2017년 월 일

(주)한국생물안전성연구소

시험책임자 엄지영 서명

## 목 차

### [Contents]

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

---

5.4. 자극성의 판정 .....	12
6. 참고문헌 [References] .....	13
7. Tables .....	14
Table 1. Mortality and clinical signs .....	14
Table 2. Body weight changes .....	15
Table 3. Evaluation of skin irritation (1/2) .....	16
Table 4. Evaluation of skin irritation (2/2) .....	17

## **1. 요약 [Summary]**

파이토팜에 대한 피부자극성을 평가하기 위하여 3마리의 New Zealand White계 토끼 등부위에 시험물질을 0.5 mL씩 4시간 동안 처리한 후 72시간 동안의 일반중독증상, 치사수, 체중변화 및 피부자극성을 관찰·조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험기간 중 시험물질의 처리에 기인된 치사개체가 관찰되지 않았다.
- 일반증상 관찰시 시험물질의 처리에 기인된 중독증상이 관찰되지 않았다.
- 개체별 체중결과, 시간이 경과함에 따라 증가추세를 보였다.
- 시험물질 제거 후 처리부의 국소자극성을 관찰한 결과, 피부자극이 관찰되지 않아 1차 피부자극지수 (P.II)는 "0.0"으로 산출되었다.

이상의 결과로부터 New Zealand White계 토끼에 대한 시험물질의 피부 처리는 [피부 1차 자극표]에 의거 자극성 없는 물질인 것으로 구분되었다.



**2.9. 시험관계자**

시험물질의 조제	이상우
시험물질의 노출	이상우, 염지영
관찰/측정/평가	이상우, 염지영
동물관리담당자	김명진

**2.10. 시험일정**

동물입수일	2017년 08월 25일
검역순화기간	2017년 08월 25일 ~ 2017년 08월 28일
시험동물 제모일	2017년 08월 28일
시험물질 처리일	2017년 08월 29일
일반증상관찰기간	2017년 08월 29일 ~ 2017년 09월 01일
실험종료일	2017년 09월 01일
최종보고서 제출일	2017년 월 일

**2.11. 시험물질의 보관**

본시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질보관고에 보관하였다.

시료번호	17-1-050
시험물질보관기간	유기농업자재 공시 후 3 년

**2.12. 시험자료의 보관**

본시험의 시험기초자료 및 관계시험성적서는 당 연구소 자료보관실에 보관하였다.

시험번호	ETD-17018
시험기초자료	자료보관실
최종보고서	자료보관실
자료하드디스크	자료보관실
자료보관기간	유기농업자재 공시 후 3 년
자료관리담당자	박선영

### 3. 시험재료 및 방법 [Materials and methods]

#### 3.1. 시험물질

3.1.1. 물질명	파이토팜
3.1.2. 입수일	2017년 09월 05일
3.1.3. 입수량	300 mL
3.1.4. 시료번호	17-1-050
3.1.5. 외관 및 색상	액상, 불투명 흰색
3.1.6. 주원료	식물추출물 (잣나무)
3.1.7. 주원료 투입비율	2%
3.1.8. 보관조건	실온
3.1.9. 공급원	㈜피러스

#### 3.2. 시험동물

3.2.1. 시험계	토끼 (New Zealand White계)
3.2.2. 공급원	
- 명칭	한림실험동물연구소
- 소재지	경기도 화성시 봉담읍 유리 254-1
- 연락처	031-227-5955

#### 3.2.3. 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제 2017-5호 인축독성 시험기준과 방법에 백색토끼를 사용하도록 되어 있으며 New Zealand White계 토끼는 농약의 독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다.

#### 3.2.4. 체중범위

구 분	입수시 체중 (kg)	처리시 체중 (kg)
시험동물	1.9 ~ 2.0	1.9 ~ 2.0

#### 3.2.5. 순화 및 검역

동물을 구입한 후 4일 동안 동물실험실의 환경 하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체만을 시험에 이용하였다.

#### 3.2.6. 군분리

군분리 시 제모를 실시하여 피부에 이상이 없는 동물만 선택하여 시험하였다.

#### 3.2.7. 개체식별

사육 상자에 개체식별정보를 부착하여 식별하였다.

### 3.3. 사육환경 및 관리

#### 3.3.1. 사육환경

본 시험의 사육환경은 온도  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $50 \pm 10\%$ , 환기시설 (공조기), 조명시간 12시간 (오전7시~오후7시) 및 조도 200 ~ 300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

#### 3.3.2. 사육상자

순화 및 시험기간 중 stainless steel 사육상자 (50 × 38 × 40 cm)안에 넣어 사육하였다.

#### 3.3.3. 사료 및 음용수

사료는 토끼용 펠릿사료 [Cargill Agri Purina Korea Inc.]를 자유 급식시켰으며 음용수는 정수필터를 통과한 지하수를 자유 섭취시켰다.

### 3.4. 시험물질의 처리

#### 3.4.1. 시험군의 구성

실험동물은 건강하고 성숙한 동물 3마리를 사용하여 1군으로 구성하였다.

#### 3.4.2. 시험물질 조제

시험물질이 액상으로 처리부위에 직접 처리함으로 조제하지 않고 처리하였다.

#### 3.4.3. 처리량 설정

처리량은 처리 군별 공히 0.5 mL로 설정하였다.

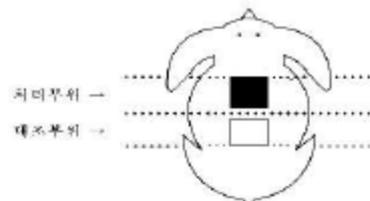
#### 3.4.4. 처리방법

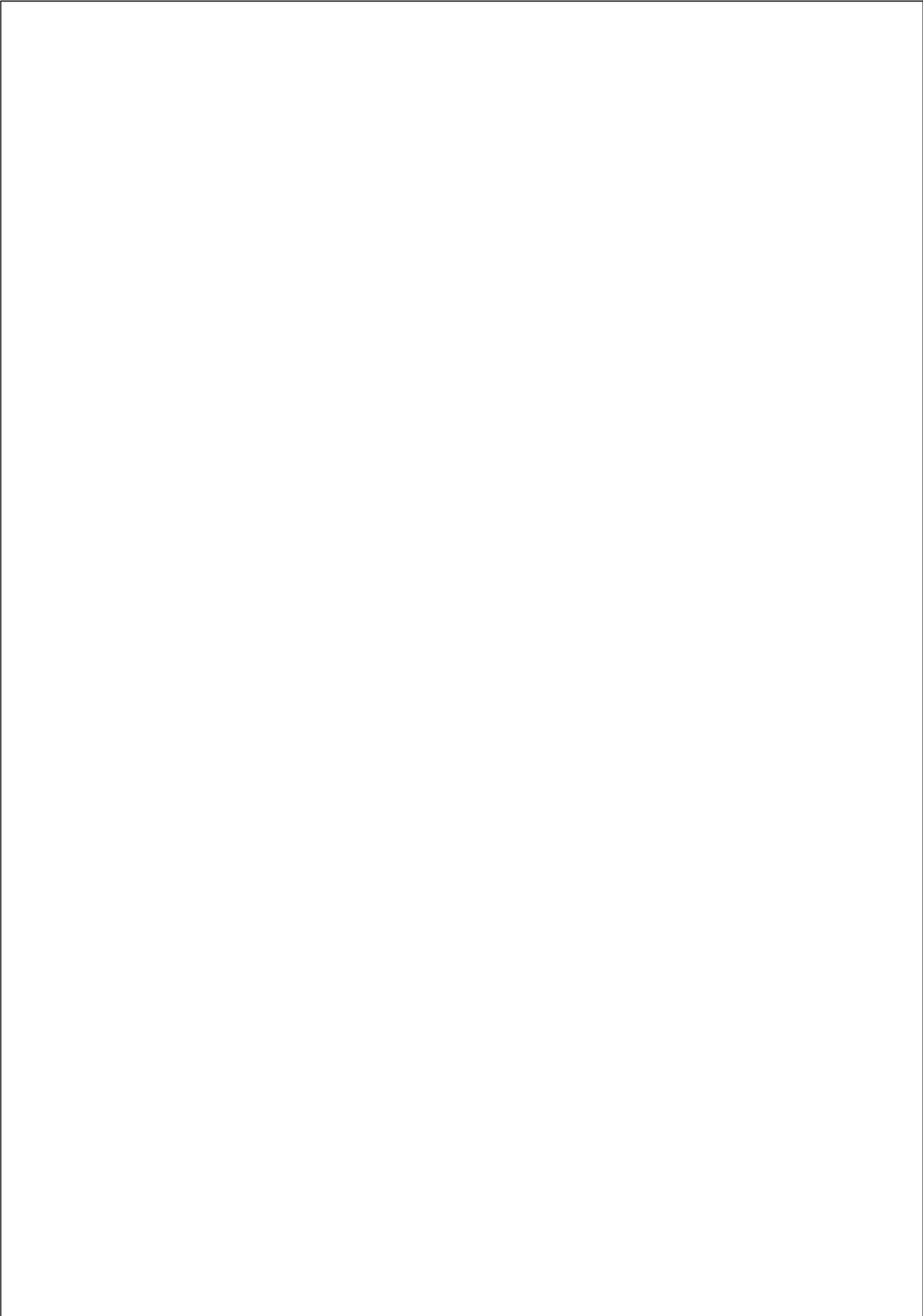
실험동물은 시험물질 처리 24시간 전에 전기면도기를 이용하여 경배부 (등부위)의 털을 15×15 cm 넓이로 제모한 다음 건강하고 깨끗한 피부를 가진 동물만을 사용하였다. 2×3 cm로 절개한 거즈를 이용하여 0.5 mL의 시험물질을 처리부위에 도포한 후 시험물질의 유실 및 방출을 방지하기위해 비자극성테이프 (Tegaderm™, 3M社)와 Coban™ (self-adherent wrap, 3M社)으로 고정 유지시켜 시험물질이 경구 및 안점막 등 타 경로로 유입되지 않게 처리하였다. 대조부위는 증류수로 처리하여 처리부위와 증상관찰 비교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

#### 3.4.5. 시험물질의 제거

시험물질 처리 4시간 후 패치를 제거하고 피부에 묻은 잔여물질은 증류수로 세척하여 모두 제거 한 후 의료용 탈지면으로 물기를 흡수시킨 다음 케이지에 넣어 두었다.

Figure 1. 피부자극성시험 부위별  
처리방법





#### 4. 관찰 및 측정 [Observation and determination]

##### 4.1. 일반중독증상

시험물질 처리 후 72시간까지 일반증상의 변화, 중독증상 및 치사동물의 유·무를 관찰하였다.

##### 4.2. 체중 측정

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

##### 4.3. 처리부위 관찰

시험물질 도포 종료 후 1, 24, 48 및 72시간에 홍반, 부종 및 가피형성 유·무를 관찰하였다.

##### 4.4. 피부반응의 평가 및 자극성의 판정

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

###### - 피부반응 평가표

(1) 홍반과 가피형성		
홍반이 전혀 없음		0
아주 가벼운 홍반 (육안으로 겨우 식별할 정도)		1
분명한 홍반		2
약간 심한 홍반		3
심한 홍반 (홍당무 색의 발적)과 가벼운 정도의 가피형성		4
<b>총 가능한 홍반 점수</b>		<b>4</b>
(2) 부종형성		
부종이 전혀 없음		0
아주 가벼운 부종 (육안으로 겨우 식별할 정도)		1
가벼운 부종 (뚜렷하게 부어 올라서 변연부가 분명히 구별될 경우)		2
보통의 부종 (약 1 mm 정도 부어 올랐을 경우)		3
심한 부종 (1 mm 이상 부어오르고 노출부위 밖까지 확장된 상태)		4
<b>총 가능한 부종 점수</b>		<b>4</b>

- 피부 1차 자극표

자극성 구분	기 준
없 음	1차 피부자극지수 (P.II)가 1.0 이하
경 도	1차 피부자극지수 (P.II)가 1.1 ~ 2.0
중 도	1차 피부자극지수 (P.II)가 2.1 ~ 5.0
강 도	1차 피부자극지수 (P.II)가 5.1 이상

## 5. 시험결과 [Results]

### 5.1. 일반중독증상 및 치사 동물수 (Table 1)

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

### 5.2. 체중변화 (Table 2)

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

### 5.3. 피부반응의 평가 (Table 3.)

시험물질 노출 종료 후 1, 24, 48 및 72시간에 피부반응평가표를 기준으로 피부반응을 관찰한 결과, 시험물질 처리 후 홍반 및 부종 등의 어떠한 피부반응도 관찰되지 않았다.

### 5.4. 자극성의 판정 (Table 4.)

피부반응평가표에 의해 1차 피부자극지수 (Primary Irritation Index, P.II)를 산출한 결과, P.II는 "0.0" 이었고 피부 1차 자극표에 의해 자극성을 구분하면 "없음" 이었다. 이상의 결과로부터 파이토팜은 New Zealand White계 토끼의 피부에 처리 시 자극성이 없는 물질로 구분되었다.

## 6. 참고문헌 [References]

- 농촌진흥청 (2017) 농촌진흥청 고시 제2017-5호 「농약 및 원제의 등록기준」 [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법 (2017.04.24)
- 국립농산물품질관리원 (2017) 국립농산물품질관리원 고시 제2017-33호 「유기농업자재 공시 및 품질 인증기준」 (2017.06.03)
- Draize, J.H. (1959) Dermal. Assoc. Food and Drug officials, U.S. Appraisal of the Safety of Chemicals in Food, Drugs and Cosmetics. Texas State Dept. of Health, Austin, pp 46~59, Texas.

## 7. Tables

**Table 1. Mortality and clinical signs**

Number of animals	Days after treatment				Mortality
	0	1	2	3	
1	NOR <sup>a</sup>	NOR	NOR	NOR	0/3 <sup>b</sup>
2	NOR	NOR	NOR	NOR	
3	NOR	NOR	NOR	NOR	

a : Normal

b : Number of dead animals/Number of tested animals

**Table 2. Body weight changes**

Number of animals	Days after treatment (g)			
	0	2	3	Gain
1	2068.5	2096.5	2140.0	71.5
2	1968.0	2013.5	2066.0	98.0
3	2040.5	2073.0	2097.0	56.5
Mean	2025.7	2061.0	2101.0	75.3
S.D. <sup>a</sup>	51.9	42.8	37.2	-

a : Standard Deviation

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

Phases <sup>a</sup>	Number of animals	Sites	Days after treatment			
			0	1	2	3
Erythema & Eschar	1	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
	2	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
	3	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
Edema	1	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
	2	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
	3	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0

a : Time after topical treatment

Table 4. Evaluation of skin irritation (2/2)

Sites	Control sites				Test sites			
	Erythema & Eschar		Edema		Erythema & Eschar		Edema	
Change	24 hr	72 hr	24 hr	72 hr	24 hr	72 hr	24 hr	72 hr
Phases <sup>a</sup>	24 hr	72 hr	24 hr	72 hr	24 hr	72 hr	24 hr	72 hr
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Sum <sup>b</sup>	0.0				0.0			
PII <sup>c</sup>	<b>0.0</b>				<b>0.0</b>			

a : Time after topical treatment

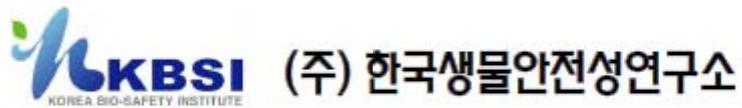
b : Sum of means at 24 and 72hr

c : P.I.I (Primary Irritation Index) = Total/2

## 최종보고서(안)

### New Zealand White계 토끼에 대한 파이토팜의 안점막자극성시험

ETE-17018



## 제 출 문

시험물질 : 파이토팜

시험제목 : New Zealand White계 토끼에 대한 파이토팜의 안점막자극성시험

상기 독성시험을 “농약 및 원제의 등록기준” [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청고시 제 2017-5호)에 준하여 실시하고 그 결과를 다음과 같이 제출합니다.

2017년 월 일  
(주)한국생물안전성연구소  
시험책임자 엄 지 영 서명

## 목 차

### [Contents]

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

5.3. 안반응의 평가 ..... 12  
    [표 5. 시험군별 안자극지수 (비세척군)] ..... 12  
    [표 6. 시험군별 안자극지수 (세척군)] ..... 13  
5.4. 자극성의 판정 ..... 14  
6. 참고문헌 [References] ..... 15  
7. Tables ..... 16  
    Table 1. Mortality and clinical signs ..... 16  
    Table 2. Body weight changes ..... 17  
    Table 3. No eyes washed evaluation of eye irritation (Non-treatment) ..... 18  
    Table 4. No eyes washed evaluation of eye irritation (Treatment) ..... 19

## 1. 요약 [Summary]

New Zealand White계 토끼에 대한 파이토파의 안점막자극성시험을 수행하여 일반중독증상, 치사수, 체중변화 및 안점막 자극증상을 관찰·조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험물질 0.1 mL를 New Zealand White계 토끼에 투여한 결과 시험기간 중 일반중독증상 및 치사동물은 관찰되지 않았다.
- 체중측정결과 모든 개체에서 체중이 시간이 경과함에 따라 증가하였다.
- 비세척군의 급성안자극지수 (A.O.I.)는 "0.0"으로 산출되었다.

이상의 결과 파이토파의 안점막자극성시험에서 비세척군의 자극성은 [안점막자극표]에 의거 "없음"으로 구분되었다.

## 2. 시험실시의 개요 [Introduction]

### 2.1. 시험제목

New Zealand White계 토끼에 대한 파이토팜의 안점막자극성시험

### 2.2. 시험물질

파이토팜

### 2.3. 시험목적

토끼에 대한 안점막자극성시험을 통하여 유기농업자재 목록공시에 관한 기초자료로 활용코자 한다.

### 2.4. 시험방법

"농약 및 원제의 등록기준" [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청고시 제2017-5호)에 준하여 실시하였다.

### 2.5. 시험의뢰자

명칭	㈜피러스
소재지	경기도 용인시 수지구 죽전로152 단국대학교 제3공학관 203호

### 2.6. 시험기관

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

### 2.7. 시험장소

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

### 2.8. 시험책임자

성명	염지영
소속	㈜한국생물안전성연구소 독성연구팀

**2.9. 시험관계자**

시험물질의 노출	이상우
관찰/측정/평가	이상우, 엄지영
동물관리담당자	김명진

**2.10. 시험일정**

동물입수일	2017년 08월 25일
검역순화기간	2017년 08월 25일 ~ 2017년 08월 28일
시험물질 처리일	2017년 08월 29일
일반증상관찰기간	2017년 08월 29일 ~ 2017년 09월 01일
실험종료일	2017년 09월 01일
최종보고서 제출일	2017년 월 일

**2.11. 시험물질의 보관**

본시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질보관고에 보관하였다.

시료번호	17-1-050
시험물질보관기간	유기농업자재 공시 후 3년

**2.12. 시험자료의 보관**

본시험의 시험기초자료 및 관계시험성적서는 당 연구소 자료보관실에 보관하였다.

시험번호	ETE-17018
시험기초자료	자료보관실
최종보고서	자료보관실
자료하드디스크	자료보관실
자료보관기간	유기농업자재 공시 후 3년
자료관리담당자	박선영

### 3. 시험재료 및 방법 [Materials and methods]

#### 3.1. 시험물질

- 3.1.1. 물질명           파이토팜
- 3.1.2. 입수일           2017년 09월 05일
- 3.1.3. 입수량           300 mL
- 3.1.4. 시료번호        17-1-050
- 3.1.5. 외관 및 색상    액상, 불투명 흰색
- 3.1.6. 주원료           식물추출물 (잣나무)
- 3.1.7. 주원료 투입비율 2%
- 3.1.8. 보관조건        실온
- 3.1.9. 공급원         ㈜피러스

#### 3.2. 시험동물

- 3.2.1. 시험계           New Zealand White계 토끼
- 3.2.2. 공급원
  - 명칭                한림실험동물연구소
  - 소재지             경기도 화성시 봉담읍 유리 254-1
  - 연락처            031-227-5955

#### 3.2.3. 시험계의 선택사유

본 시험에 사용된 New Zealand White계 토끼는 안점막자극성시험에 널리 사용되고 있으며 본 계통에 대한 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다.

#### 3.2.4. 체중범위

[표 1. 시험동물의 체중범위]

구 분	입수시 체중 (kg)	처리시 체중 (kg)
비세척군	1.9 ~ 2.0	1.9 ~ 2.0

#### 3.2.5. 순화 및 검역

동물을 구입한 후 각 4일 동안 동물실험실의 환경 하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체를 선별 본 시험에 사용하였다.

#### 3.2.6. 군분리

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

#### 3.2.7. 개체식별

사육 상자에 개체식별정보를 부착하여 식별하였다.

### 3.3. 사육환경 및 관리

#### 3.3.1. 사육환경

본 시험의 사육환경은 온도  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 상대습도  $50 \pm 10\%$ , 환기시설 (공조기계), 조명시간 12시간 (오전7시~오후7시) 및 조도 200 ~ 300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

#### 3.3.2. 사육 상자

순화 및 시험기간 중 stainless steel 사육상자 (50 × 38 × 40 cm)안에 넣어 사육하였다.

#### 3.3.3. 사료 및 음용수

사료는 토끼용 펠릿사료 [Cargill Agri Purina Korea Inc.]를 자유 급식시켰으며 음용수는 정수필터를 통과한 지하수를 자유 섭취시켰다.

### 3.4. 시험물질의 투여

#### 3.4.1. 시험군의 구성

[표 2. 시험군]

군	동물수	좌우구분	처리
비세척군	3	좌 안	시험물질
		우 안	무 처 리

#### 3.4.2. 시험물질 조제

시험물질이 액상으로 처리부위에 직접 투여함으로 조제하지 않고 처리하였다.

#### 3.4.3. 투여량 설정

투여량은 투여 개체별로 0.1 mL로 설정하였다.

#### 3.4.4. 투여방법

시험동물은 시험개시 전 24시간 이내에 양쪽 눈을 검사하여 눈에 이상이 없는 동물을 사용하였다. 약제처리는 좌안의 하안검을 가볍게 잡아당겨 결막낭 내에 시험물질 0.1 mL를 한 번에 넣어 처리하고 시험물질의 손실을 막기 위해 양안검을 느슨하게 맞춰 잡고 약 1초간 유지하였다. 무처리한 우안은 대조부위로 하여 처리부위와 증상관찰 비교 용도로 활용하였다.

**4. 관찰 및 측정 [Observation and determination]**

**4.1. 일반중독증상**

시험물질 처리 후 72시간까지 일반증상의 변화, 중독증상 및 치사동물의 유·무를 관찰하였다.

**4.2. 체중 측정**

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

**4.3. 안반응 (眼反應)의 평가**

안반응의 평가는 "안반응평가표"에 따라 실시하였다. 시험물질 처리 후 1, 24, 48 및 72시간에 각막혼탁, 홍채이상, 결막발적, 부종, 배출물 등 평점을 기록하였다.

**4.4. 자극성의 평가**

안반응평가표에 의해 개체별 안자극 지수 (I.O.I, individual ocular irritation) 및 평균 안자극 지수 (M.O.I, mean ocular irritation)를 산출하여 평균안자극 지수 중 최고치를 급성안자극 지수 (A.O.I, acute ocular irritation)로 하였다. 이 결과로 안점막자극표를 이용하여 자극성의 정도를 구분하였다.

**[표 3. 안반응평가표]**

1) 각막	
(A) 혼탁 : 안구의 농후한 정도(가장 농후한 지점을 관찰함)	평점
◦ 화농이나 혼탁이 없음 .....	0
◦ 혼탁이 분산 혹은 밀집되어 있으나(정상적인 투명성이 약간 둔화 된 것과는 다름)홍채의 말단이 명확히 관찰됨 .....	1
◦ 반투명한 부분이 쉽게 관찰됨, 홍채의 말단이 약간 불명확함 .....	2
◦ 진주색깔을 나타냄, 홍채의 말단이 관찰안됨, 동공의 크기가 가까스로 관측됨 ..	3
◦ 각막이 불투명, 혼탁 때문에 홍채가 관찰안됨 .....	4
(B) 혼탁된 각막의 범위	
◦ 1/4이하(그러나 0은 아니다) .....	1
◦ 1/4이상 1/2미만 .....	2
◦ 1/2이상 3/4미만 .....	3
◦ 3/4이상 1까지 .....	4
A×B×5	최대치 = 80
2) 홍채	
(C) 반응치	
◦ 정상.....	0
◦ 현저한 주름의 형성, 충혈, 종창, 각막주위에 중등도의 충혈, 이상과 같은 단독 혹은 혼합, 홍채는 빛에 대해 반응함(둔한 반응은 양성).....	1
◦ 빛에 대해 반응 없음, 충혈, 대부분 파괴(이상과 같은 증상의 일부 혹은 전부).....	2

C×5	최대치 = 10
3) 결막	
(D) 발적(안검결막, 안구결막에 한함, 홍채 제외)	
◦ 혈관은 정상.....	0
◦ 일부 혈관 충혈.....	1
◦ 얇은 선홍색을 띄거나 각각의 혈관이 쉽게 관찰 안됨.....	2
◦ 짙은 선홍색.....	3
(E) 결막부종	
◦ 부풀지 않음.....	0
◦ 정상보다 약간 중창(순막 포함).....	1
◦ 안검의 부분적 외전을 동반한 현저한 중창.....	2
◦ 눈이 반쯤 잠길 정도의 안검의 중창.....	3
◦ 눈이 반 이상 잠길 정도의 안검의 중창.....	4
(F) 배출물	
◦ 배출물 없음.....	0
◦ 약간의 배출물(정상동물의 내부 눈꼬리에서 관찰되는 작은양 제외).....	1
◦ 속눈썹과 눈꺼풀을 적실 정도의 배출물.....	2
◦ 눈주위의 상당한 부위와 속눈썹 및 눈꺼풀을 적실 정도의 배출물.....	3
점수(D+E+F) × 2	최대치 = 20

[표 4. 안점막자극표]

자극성 구분	기 준
없 음	급성안자극지수 (A.O.I)가 10.0 이하
경 도	급성안자극지수 (A.O.I)가 10.1 ~ 30.0
중 도	급성안자극지수 (A.O.I)가 30.1 ~ 60.0
강 도	급성안자극지수 (A.O.I)가 60.1 이상

**5. 시험결과 [Results]**

**5.1. 일반중독증상 및 치사 동물 수 (Table 1.)**

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

**5.2. 체중변화 (Table 2.)**

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

**5.3. 안반응의 평가 (Table 3.)**

[표 5. 시험군별 안자극지수]

Time	Animal. No.	Non-treatment			Treatment		
		IOI. <sup>a)</sup>	M.O.I. <sup>b)</sup>	A.O.I. <sup>c)</sup>	IOI. <sup>a)</sup>	M.O.I. <sup>b)</sup>	A.O.I. <sup>c)</sup>
1 hr	1	0	0	0.0	0	0.0	0.0
	2	0			0		
	3	0			0		
24 hr	1	0	0		0	0.0	
	2	0			0		
	3	0			0		
48 hr	1	0	0		0	0.0	
	2	0			0		
	3	0			0		
72 hr	1	0	0		0	0.0	
	2	0			0		
	3	0			0		

a: IOI (Individual Ocular Irritation)

b: M.O.I (Mean Ocular Irritation)

c: A.O.I (Acute Ocular Irritation) = the maximum value of M.O.I

**비세척군-1**

- 무처리 대조군인 우안에서는 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다.
- 1 시간부터 72 시간째 관찰 시까지, 시험물질 처리군에서 결막의 발적 및 부종에 대한 자극증상과 배출물이 관찰되지 않았다.

비세척군-2

- 무처리 대조군인 우안에서는 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다.
- 1 시간부터 72 시간째 관찰 시까지, 시험물질 처리군에서 결막의 발적 및 부종에 대한 자극증상과 배출물이 관찰되지 않았다.

비세척군-3

- 무처리 대조군인 우안에서는 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다.
- 1 시간부터 72 시간째 관찰 시까지, 시험물질 처리군에서 결막의 발적 및 부종에 대한 자극증상과 배출물이 관찰되지 않았다.

**5.4. 자극성의 판정 (Table 3.)**

안반응 평가표에 의해 평가된 안점막자극정도를 처리하여 급성안자극지수 (A.O.I.)를 산출한 결과, A.O.I.는 "0.0"이었다. 이상의 시험결과, New Zealand White계 토끼에 대한 피토팜의 안점막자극성시험에서 자극성은 [안점막자극표]에 의거 "없음"으로 구분되었다.

## 6. 참고문헌 [References]

- 농촌진흥청 (2017) 농촌진흥청 고시 제2017-5호 「농약 및 원제의 등록기준」  
[별표 12] 인축독성시험 기준과 방법 (2017.04.24)
- 국립농산물품질관리원 (2017) 국립농산물품질관리원 고시 제2017-33호 「유기농업자재  
공시 및 품질 인증기준」 (2017.06.03)

## 7. Tables

**Table 1. Mortality and clinical signs**

Group	No. of treatment	Days after application				Mortality
		0	1	2	3	
No eye washed	1	NOR <sup>a</sup>	NOR	NOR	NOR	0/3 <sup>b</sup>
	2	NOR	NOR	NOR	NOR	
	3	NOR	NOR	NOR	NOR	

a : Normal

b : Number of dead animals/Number of tested animals

**Table 2. Body weight changes**

Group	No. of treatment	Days after application (g)			
		0	2	3	Gain
No eye washed	1	2101.5	2118.0	2140.5	39.0
	2	1988.5	1998.5	2021.5	33.0
	3	2060.5	2083.5	2115.5	55.0
	Mean	2050.2	2066.7	2092.5	42.3
	S.D. <sup>a</sup>	57.2	61.5	62.7	-

a : Standard Deviation

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

Time	Animal No.	Cornea		Iris (C)	Conjunctiva			I.O.I. <sup>a)</sup>	M.O.I. <sup>b)</sup>	A.O.I. <sup>c)</sup>			
		Degree of opacity (A)	Diffuse-areas of Opacity (B)		Redness (D)	Edema (E)	Lacrima (F)						
1 hr	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0			
	2	0	0	0	0	0	0	0					
	3	0	0	0	0	0	0	0					
24 hr	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0		0.0		
	2	0	0	0	0	0	0	0					
	3	0	0	0	0	0	0	0					
48 hr	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0			0.0	
	2	0	0	0	0	0	0	0					
	3	0	0	0	0	0	0	0					
72 hr	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0				0.0
	2	0	0	0	0	0	0	0					
	3	0	0	0	0	0	0	0					

a : I.O.I. (Individual Ocular Irritation) = (A × B × 5)+(C × 5)+(D + E + F) × 2

b : M.O.I. (Mean Ocular Irritation)

c : A.O.I. (Acute Ocular Irritation) = the maximum value of M.O.I.

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

Time	Animal. No.	Cornea		Iris (C)	Conjunctiva			I.O.I. <sup>a</sup>	M.O.I. <sup>b</sup>	A.O.I. <sup>c</sup>
		Degree of opacity (A)	Diffuse-areas of Opacity (B)		Redness (D)	Chemosis (E)	Lacrima (F)			
1 hr	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0
	2	0	0	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0	0		
24 hr	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0	
	2	0	0	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0	0		
48 hr	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0	
	2	0	0	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0	0		
72 hr	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0	
	2	0	0	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0	0		

a : I.O.I. (Individual Ocular Irritation) = (A × B × 5)+(C × 5)+(D + E + F) × 2

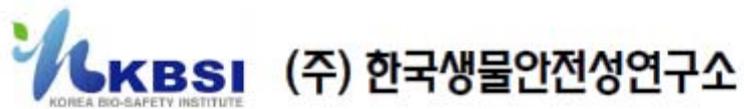
b : M.O.I. (Mean Ocular Irritation)

c : A.O.I. (Acute Ocular Irritation) = the maximum value of M.O.I.

## 최종보고서(안)

랫드에 대한 파이토팜의 급성경구독성시험

ETO-17025



## 제 출 문

시험물질 : 파이토팜

시험제목 : 랫드에 대한 파이토팜의 급성경구독성시험

상기 독성시험을 “농약 및 원제의 등록기준” [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청고시 제2017-5호)에 준하여 실시하고 그 결과를 다음과 같이 제출합니다.

2017년 월 일

(주)한국생물안전성연구소

시험책임자 염 지 영 서명

## 목 차

### [Contents]

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

5.3. 부검소견 ..... 11

5.4. 반수치사약량 (LD<sub>50</sub>) ..... 11

6. 참고문헌 [References] ..... 12

7. Tables [Group summary] ..... 13

    Table 1. Mortality and clinical signs ..... 13

    Table 2. Mean body weights ..... 13

8. Appendices [Individual data] ..... 14

    Appendix 1. Mortality of rats ..... 14

    Appendix 2. Clinical signs of rats ..... 15

    Appendix 3. Body weights ..... 16

    Appendix 4. Macroscopical findings necropsy ..... 17

## 1. 요약 [Summary]

랫드에 대한 파이토팜의 급성경구독성시험 (급성독성등급법)을 2000 mg/kg bw의 투여용량으로 수행하여 치사 수, 일반중독증상 및 체중변화를 관찰. 조사한 결과는 다음과 같다.

- 1단계 투여약량 2000 mg/kg bw에서 14일 동안 치사개체가 관찰되지 않았다.
- 2단계 투여약량 2000 mg/kg bw에서도 14일 동안 치사개체가 관찰되지 않았다.
- 생존한 모든 개체에서 일반중독증상은 관찰되지 않았다.
- 각 개체의 체중은 약제투여 후 경과일수에 따라 증가하였다.
- 부검결과 이상 소견은 관찰되지 않았다.

이상의 시험결과, 랫드에 대한 파이토팜의 급성경구독성시험 결과, GHS 분류기준 category V로 LD<sub>50</sub>값은 > 2000 ~ ≤ 5000 mg/kg bw이었고, 농약관리법 [급성독성정도에 따른 농약의 독성구분]에 의거 IV급 (저독성)으로 구분되었다.



**2.9. 시험관계자**

시험담당자	이상우, 염지영
동물사육관리	김명진

**2.10. 시험일정**

동물입수일	2017년 08월 25일 (6 females)
검역순화기간	2017년 08월 25일 ~ 2017년 08월 28일 (3 females) 2017년 08월 25일 ~ 2017년 08월 31일 (3 females)
시험물질 투여일	2017년 08월 29일 (3 females, 2000 mg/kg bw) 2017년 09월 01일 (3 females, 2000 mg/kg bw)
일반증상관찰기간	2017년 08월 29일 ~ 2017년 09월 12일 (2000 mg/kg bw) 2017년 09월 01일 ~ 2017년 09월 15일 (2000 mg/kg bw)
실험종료 / 부검일	2017년 09월 12일 (3 females, 2000 mg/kg bw) 2017년 09월 15일 (3 females, 2000 mg/kg bw)
최종보고서 제출일	2017년 월 일

**2.11. 시험물질의 보관**

본 시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질 보관고에 보관하였다.

시료번호	17-1-050
시험물질보관기간	유기농업자재 공시 후 3년

**2.12. 시험자료의 보관**

본 시험의 시험기초자료 및 관계시험성적서는 당 연구소 자료보관실에 보관하였다.

시험번호	ETO-17025
시험기초자료	자료보관실
최종보고서	자료보관실
자료하드디스크	자료보관실
자료보관기간	유기농업자재 공시 후 3년
자료관리담당자	박선영

### 3. 시험재료 및 방법 [Materials and Methods]

#### 3.1. 시험물질

3.1.1. 물질명	파이토팜
3.1.2. 입수일	2017년 09월 05일
3.1.3. 입수량	300 mL
3.1.4. 시료번호	17-1-050
3.1.5. 외관 및 색상	액상, 불투명 흰색
3.1.6. 주원료	식물추출물 (잣나무)
3.1.7. 주원료 투입비율	2%
3.1.8. 보관조건	실온
3.1.9. 공급원	㈜피러스

#### 3.2. 시험동물

3.2.1. 시험계	
- Rat	Sprague-Dawley (SD), SPF
3.2.2. 공급원	
- 명칭	한림실험동물연구소
- 소재지	경기도 화성시 봉담읍 유리 254-1
- 연락처	031-227-5955

#### 3.2.3. 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제 2017-5호 인축독성시험 기준과 방법에 시험동물로 랫드를 추천하고 있으며, 본 계통에 대한 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다.

#### 3.2.4. 주령 및 체중범위

[표 1. 시험동물의 주령 및 체중범위]

시험약제 투여시	1단계 (2000 mg/kg bw)	2단계 (2000 mg/kg bw)
주령(주)	8	8
체중(g)	175.0 ~ 187.0	193.5 ~ 203.5

#### 3.2.5. 순화 및 검역

시험단계별로 동물을 구입한 후 1단계 및 2단계 시험은 각각 4일, 7일 동안 동물실험실의 환경하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체를 선별, 본 시험에 사용하였다.

### 3.3. 사육환경 및 관리

#### 3.3.1. 사육환경

본 시험의 사육환경은 온도 23±2°C, 상대습도 50±10%, 환기시설 (공조기), 조명시간 12시간 (오전7시~오후7시) 및 조도 200 ~ 300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

#### 3.3.2. 사육상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육상자 (26 × 42 × 18 cm)에 3마리씩 넣어 깔짚을 깔아 사육하였다.

#### 3.3.3. 사료 및 음용수

사료는 실험동물용 고품사료 [Cargill Agri Purina Korea Inc.]를 자유 급식시켰으며 음용수는 정수필터를 통과한 지하수를 자유 섭취시켰다.

### 3.4. 투여약량수준설정 및 억제조제

#### 3.4.1. 투여약량수준설정

시험에 사용된 식물추출물(잣나무)은 당연구소에서 유기농자재들의 시험한 자료들을 검토한 결과, 독성이 낮은 것으로 평가되어 1단계 시험에서 최고투여약량인 2000 mg/kg bw로 투여하였고, 투여 후 72시간 동안 치사 및 일반중독증상이 관찰 되지 않아, 동일한 농도로 투여약량을 설정하여 2단계 시험을 실시하였다.

#### 3.4.2. 실험동물 수 / 개체식별

실험동물 수는 각 단계별 암컷 3마리를 1군으로 하였으며, 개체식별은 피크린산 용액을 이용하여 피모색소 표시를 하고, 사육상자는 군식별정보를 부착하여 식별하였다.

#### 3.4.3. 용매대조군의 설정

증류수로 시험물질을 조제하여 용매대조군은 따로 설정하지 않았다.

#### 3.4.4. 용매의 선택과 시험용액 조제

- 1단계 / 2단계 시험 (2000 mg/kg bw)

시험용액은 1단계 및 2단계 시험에서 투여직전 각각 동일하게 조제하여 시험에 사용하였고, 시험용액 조제 시 용매는 2차 증류수를 사용하였으며 액상인 시험물질을 저울로 2.0 g 정확히 평량하여 5 mL의 volumetric flask에 넣고 2차 증류수를 표시까지 정용한 후 vortex로 충분히 현탁하여 시험용액 (test solution)으로 사용하였다.

#### 3.4.5. 투여액량 (volume)설정

투여액량은 5.0 mL/kg bw로 설정하였다.

### 3.5. 시험물질의 투여

#### 3.5.1. 사료의 절식

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

## 3.5.2. 투여경로 및 투여방법

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

## 4. 관찰 및 측정 [Observation and Determination]

## 4.1. 일반중독증상 및 치사동물

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

## 4.2. 체중측정

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

## 4.3. 부검

실험종료일에 모든 개체에 대하여 부검을 실시하였다.

4.4. 반수치사약량 (LD<sub>50</sub>) 산출

급성경구독성시험 (급성독성등급법)에 의해 시험을 실시하여 GHS (Globally Harmonized Classification System) 분류기준에 의거 LD<sub>50</sub> 기준치 (mg/kg bw)로 반수치사약량을 산출하였다.

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

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

a : Classification systems of Acute toxicity for pesticides in Korea

b : Globally Harmonized Classification System

## 5. 시험결과 [Results]

### 5.1. 일반중독증상 및 치사동물 (Table 1., Appendix 1., 2.)

파이토팜 1단계 및 2단계 시험 투여약량 2000 mg/kg bw에서 일반중독증상을 보이거나 치사한 개체가 관찰되지 않았다.

### 5.2. 체중변화 (Table 2., Appendix 3.)

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

### 5.3. 부검소견 (Appendix 4.)

관찰종료 후 모든 단계의 시험동물을 CO<sub>2</sub> gas로 마취시켜 주요 장기에 대한 육안적 관찰을 실시한 결과 약제투여에 의한 특이한 이상증상은 관찰되지 않았다.

### 5.4. 반수치사약량 (LD<sub>50</sub>)

랫드에 대한 파이토팜의 급성경구독성시험 결과, GHS 분류 (기준) category V로 LD<sub>50</sub>값은 >2000 ~ ≤5000 mg/kg bw이었고, 농약관리법 [급성독성정도에 따른 농약의 독성구분]에 의거 IV급 (저독성)으로 구분되었다.

## 6. 참고문헌 [References]

- 농촌진흥청 (2017) 농촌진흥청 고시 제2017-5호 「농약 및 원제의 등록기준」 [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법 (2017.04.24)
- 국립농산물품질관리원 (2017) 국립농산물품질관리원 고시 제2017-33호 「유기농업자재 공시 및 품질 인증기준」 (2017.06.03)
- OECD (2002) OECD. Guideline for testing chemicals. 423. 「Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method」 (2001.12.17)

## 7. Tables [Group summary]

**Table 1. Mortality and clinical signs**

Group	Dose (mg/kg bw)	Sex	Number of animals	Clinical signs	Mortality	LD <sub>50</sub>
1	2000	Female	3	No abnormality detected	0/3 <sup>a</sup>	>2000 ~ ≤5000 mg/kg bw
2	2000	Female	3	No abnormality detected	0/3	

a : Number of dead animals/Number of tested animals

**Table 2. Mean body weights**

Group	Dose (mg/kg bw)	Sex	Number of animals	Days after administration (g)		
				0	7	14
1	2000	Female	3	181.7 ± 6.1 <sup>a</sup>	228.0 ± 1.0	256.0 ± 12.3
2	2000	Female	3	198.7 ± 5.0	237.2 ± 7.7	258.0 ± 8.4

a : Mean ± standard deviation

## 8. Appendices [Individual data]

### Appendix 1. Mortality of rats

Group	Dose (mg/kg bw)	Sex	Number of animals	Time / days after administration										
				Time					Days					
				30 min	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	1	2	3	4	5	
1	2000	Female	3	0 <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	2000	Female	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

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

a : Number of dead animals

## Appendix 2. Clinical signs of rats

Group	Dose (mg/kg bw)	Sex	Number of animals	Time / Days after administration										
				Time					Days					
				30min	1hr	2hr	3hr	4hr	1	2	3	4	5	
1	2000	Female	1	NAD <sup>a</sup>	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			2	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			3	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
2	2000	Female	4	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			5	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			6	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD

Group	Dose (mg/kg bw)	Sex	Number of animals	Days after administration										
				6	7	8	9	10	11	12	13	14		
1	2000	Female	1	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			2	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			3	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
2	2000	Female	4	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			5	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			6	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD

a : No abnormality detected

## Appendix 3. Body weights

Group	Dose (mg/kg bw)	Sex	Number of animals	Days after administration (g)				
				0	3	7	14	Gain
1	2000	Female	1	183.0	201.0	227.0	256.5	73.5
			2	187.0	209.5	229.0	268.0	81.0
			3	175.0	193.5	228.0	243.5	68.5
MEAN				181.7	201.3	228.0	256.0	74.3
S.D. <sup>a</sup>				6.1	8.0	1.0	12.3	-
2	2000	Female	4	203.5	216.0	232.0	251.5	48.0
			5	199.0	218.0	233.5	255.0	56.0
			6	193.5	222.5	246.0	267.5	74.0
Mean				198.7	218.8	237.2	258.0	59.3
S.D.				5.0	3.3	7.7	8.4	-

a : Standard Deviation

**Appendix 4. Macroscopical findings necropsy**

**- Group 1 (2000 mg/kg bw)**

Animal 1      Planned necropsy (Final necropsy)      12-Sep-2017

---

No Findings Noted

Animal 2      Planned necropsy (Final necropsy)      12-Sep-2017

---

No Findings Noted

Animal 3      Planned necropsy (Final necropsy)      12-Sep-2017

---

No Findings Noted

**- Group 2 (2000 mg/kg bw)**

Animal 4      Planned necropsy (Final necropsy)      15-Sep-2017

---

No Findings Noted

Animal 5      Planned necropsy (Final necropsy)      15-Sep-2017

---

No Findings Noted

Animal 6      Planned necropsy (Final necropsy)      15-Sep-2017

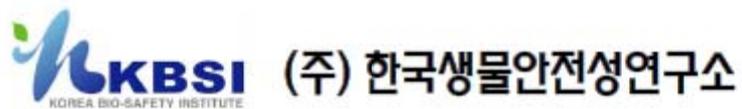
---

No Findings Noted

## 최종보고서(안)

랫드에 대한 파이토팜의 급성경피독성시험

ETP-17021



## 제 출 문

시험물질 : 파이토팜

시험제목 : 랫드에 대한 파이토팜의 급성경피독성시험

상기 독성시험을 “농약 및 원제의 등록기준” [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청고시 제 2017-5호)에 준하여 실시하고 그 결과를 다음과 같이 제출합니다.

2017년 월 일  
(주)한국생물안전성연구소  
시험책임자 **염 지 영** 서명

**목 차**  
[Contents]

보고서표지 ..... 1  
제출문 ..... 2  
목차 [Contents] ..... 3  
1. 요약 [Summary] ..... 5  
2. 시험실시의 개요 [Introduction] ..... 6  
    2.1. 시험제목 ..... 6  
    2.2. 시험물질 ..... 6  
    2.3. 시험목적 ..... 6  
    2.4. 시험방법 ..... 6  
    2.5. 시험의뢰자 ..... 6  
    2.6. 시험기관 ..... 6  
    2.7. 시험장소 ..... 6  
    2.8. 시험책임자 ..... 6  
    2.9. 시험관계자 ..... 7  
    2.10. 시험일정 ..... 7  
    2.11. 시험물질의 보관 ..... 7  
    2.12. 시험자료의 보관 ..... 7  
3. 시험재료 및 방법 [Materials and methods] ..... 8  
    3.1. 시험물질 ..... 8  
    3.2. 시험동물 ..... 8  
    3.3. 사육환경 및 관리 ..... 9  
    3.4. 투여약량수준설정 및 약제조제 ..... 9  
    3.5. 시험물질의 투여 ..... 9  
4. 관찰 및 측정 [Observation and determination] ..... 10  
    4.1. 일반중독증상 및 치사동물 ..... 10  
    4.2. 체중측정 ..... 10  
    4.3. 부검 ..... 10  
    4.4. 반수치사약량 (LD<sub>50</sub>) 산출 ..... 10  
5. 시험결과 [Results] ..... 11  
    5.1. 일반중독증상 및 치사동물 ..... 11  
    5.2. 체중변화 ..... 11  
    5.3. 반수치사약량 (LD<sub>50</sub>) ..... 11  
6. 참고문헌 [References] ..... 12

---

7. Tables [Group summary] .....	13
Table 1. Mortality and clinical signs .....	13
Table 2. Mean body weights .....	13
8. Appendices [Individual data] .....	14
Appendix 1. Mortality of rats .....	14
Appendix 2. Clinical signs of rats .....	15
Appendix 3. Body weights .....	16

## **1. 요약 [Summary]**

파이토팜에 대한 급성경피독성을 랫드를 사용하여 4000 mg/kg의 약량을 단회 경피투여한 후 14일 동안 치사수, 일반중독증상, 체중 변화를 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- 한계시험의 투여약량수준인 4000 mg/kg에서 치사개체가 관찰되지 않았다.
- 일반중독증상은 관찰되지 않았다.
- 체중변화는 약제투여 후 경과일수에 따라 증가추세를 보였다.

따라서, 랫드에 대한 파이토팜의 급성경피독성시험 LD<sub>50</sub>값은 4000 mg/kg 이상으로 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급 (저독성)에 해당되었다.



**2.9. 시험관계자**

시험담당자	이상우, 엄지영
동물사육관리	김명진

**2.10. 시험일정**

동물입수일	2017년 08월 25일
검역순화기간	2017년 08월 25일 ~ 2017년 08월 28일
시험동물 제모일	2017년 08월 28일
시험물질 투여일	2017년 08월 29일
일반증상관찰기간	2017년 08월 29일 ~ 2017년 09월 12일
실험종료일	2017년 09월 12일
최종보고서 제출일	2017년 월 일

**2.11. 시험물질의 보관**

본시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질보관고에 보관하였다.

시료번호	17-1-050
시험물질보관기간	유기농업자재 공시 후 3년

**2.12. 시험자료의 보관**

본시험의 시험기초자료 및 관계시험성적서는 당 연구소 자료보관실에 보관하였다.

시험번호	ETP-17021
시험기초자료	자료보관실
최종보고서	자료보관실
자료하드디스크	자료보관실
자료보관기간	유기농업자재 공시 후 3년
자료관리담당자	박선영

### 3. 시험재료 및 방법 [Materials and methods]

#### 3.1. 시험물질

3.1.1. 물질명	파이토팜
3.1.2. 입수일	2017년 09월 05일
3.1.3. 입수량	300 mL
3.1.4. 시료번호	17-1-050
3.1.5. 외관 및 색상	액상, 불투명 흰색
3.1.6. 주원료	식물추출물 (잣나무)
3.1.7. 주원료 투입비율	2%
3.1.8. 보관조건	실온
3.1.9. 공급원	㈜피러스

#### 3.2. 시험동물

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

#### 3.2.3. 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제 2017-5호 인축독성시험 기준과 방법에 시험동물로 랫드를 추천하고 있으며, 본 계통에 대한 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가가 용이하기 때문에 선택하였다.

#### 3.2.4. 주령 및 체중범위

시험약제 투여시	Male	Female
주령 (주)	8	8
체중 (g)	223.0 ~ 233.0	155.5 ~ 165.5

#### 3.2.5. 순화 및 검역

동물을 구입한 후 4일 동안 동물실험실의 환경하에서 순화시키면서 일반 건강 상태를 관찰하여 건강한 개체를 선별, 본 시험에 사용하였다.

### 3.3. 사육환경 및 관리

#### 3.3.1. 사육환경

본 시험의 사육환경은 온도  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $50 \pm 10\%$ , 환기시설 (공조기), 조명시간 12시간 (오전7시~오후7시) 및 조도 200 ~ 300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

#### 3.3.2. 사육상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육상자 (26 × 42 × 18 cm)에 5마리씩 넣어 깔짚을 깔아 사육하였다.

#### 3.3.3. 사료 및 음용수

사료는 실험동물용 고품사료 [Cargill Agri Purina Korea Inc.]를 자유 급식시켰으며 음용수는 정수필터를 통과한 지하수를 자유 섭취시켰다.

### 3.4. 투여약량수준설정 및 억제조제

#### 3.4.1. 투여약량수준설정

암수 모두 한계투여약량인 4000 mg/kg bw로 설정하여 시험을 실시하였다.

#### 3.4.2. 실험동물 수 / 개체식별

시험 동물 수는 암수 각각 5마리씩 10마리를 1군으로 하였으며, 개체식별은 피크린산 용액을 이용하여 피모색소 표시를 하고, 사육 상자는 군 식별정보를 부착하여 관리하였다.

#### 3.4.3. 용매대조군의 설정

증류수를 이용하여 시험물질을 조제하였기에 용매대조군은 따로 설정하지 않았다.

#### 3.4.4. 용매의 선택과 시험용액 조제

시험용액 조제 시 용매는 2차 증류수를 사용하였으며 시험물질 16.0 g을 정확히 평량하여 20 mL의 volumetric flask에 넣고 2차 증류수를 표선까지 정용한 후 vortex로 충분히 현탁하여 시험용액 (test solution)으로 사용하였다.

#### 3.4.5. 처리액량 (volume)설정

처리액량은 처리약량수준별 공히 5 mL/kg bw로 설정하였다.

### 3.5. 시험물질의 투여

#### 3.5.1. 억제처리경로 및 처리방법

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

#### 3.5.2. 시험물질의 제거

등부위에 도포시킨 시험물질은 24시간 후 제거하고 피부에 묻은 잔여 물질은 증류수로 잘 닦고 의료용 탈지면으로 물기를 흡수시킨 다음 케이지에 넣어두었다.

#### 4. 관찰 및 측정 [Observation and determination]

##### 4.1. 일반중독증상 및 치사동물

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

##### 4.2. 체중측정

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

##### 4.3. 부검

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

##### 4.4. 반수치사약량(LD<sub>50</sub>) 산출

농촌진흥청고시 제 2017-5호 농약 및 원제의 등록기준에 의해 시험을 실시한 결과, 시험고시의 최고용량에서 모든 시험동물이 생존하여 시험종료 후 통계처리는 생략하였다.

## 5. 시험결과 [Results]

### 5.1. 일반중독증상 및 치사동물 (Table 1., Appendix 1., 2.)

파이토팜을 한계투여약량 4000 mg/kg bw로 경피 노출한 결과, 생존한 모든 개체에서 특이한 일반중독 증상은 관찰되지 않았으며 치사개체도 관찰되지 않았다.

### 5.2. 체중변화 (Table 2., Appendix 3.)

모든 시험동물의 체중은 약제투여 후 경과 일에 따라 증가추세를 보였다.

### 5.3. 반수치사약량 (LD<sub>50</sub>)

랫드에 대한 파이토팜의 급성경피독성시험 시험 결과, LD<sub>50</sub>값은 4000 mg/kg bw 이상으로 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급 (저독성)에 해당되었다.

- 급성독성정도에 따른 농약 등의 구분

구 분	시험동물의 반수를 죽일 수 있는 양 (mg/kg bw)	
	급성경피	
	고 체	액 체
I급 (맹독성)	10 미만	40 미만
II급 (고독성)	10 이상, 100 미만	40 이상, 400 미만
III급 (보통독성)	100 이상, 1000 미만	400 이상, 4000 미만
IV급 (저독성)	1000 이상	4000 이상

※ 고체 및 액체의 분류는 농약 등의 물리적 상태에 의함.

## 6. 참고문헌 [References]

- 농촌진흥청 (2017) 농촌진흥청 고시 제2017-5호 「농약 및 원제의 등록기준」 [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법 (2017.04.24)
- 국립농산물품질관리원 (2017) 국립농산물품질관리원 고시 제2017-33호 「유기농업자재 공시 및 품질 인증기준」 (2017.06.03)

## 7. Tables [Group summary]

**Table 1. Mortality and clinical signs**

Group	Dose (mg/kg bw)	Sex	Number of animals	Clinical signs	Mortality (dead / total)	LD <sub>50</sub>
1	4000	Male	5	No abnormality detected	0% (0 / 5 <sup>a</sup> )	> 4000 mg/kg bw
2	4000	Female	5	No abnormality detected	0% (0 / 5)	

a : Number of Death animals / Number of tested animals

**Table 2. Mean body weights**

Group	Dose (mg/kg bw)	Sex	Number of animals	Days after administration (g)		
				0	7	14
1	4000	Male	5	229.2 ± 4.0 <sup>a</sup>	273.9 ± 9.7	386.4 ± 24.8
2	4000	Female	5	160.6 ± 3.9	201.5 ± 6.1	235.3 ± 5.9

a : Mean ± standard deviation

## 8. Appendices [Individual data]

### Appendix 1. Mortality of rats

Group	Dose (mg/kg bw)	Sex	Number of animals	Time / Days after administration										
				Time					Days					
				30 min	1hr	2hr	3hr	4hr	1	2	3	4	5	
1	4000	Male	5	0 <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	4000	Female	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

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

a : Number of dead animals

## Appendix 2. Clinical signs of rats

Group	Dose (mg/kg bw)	Sex	Number of animals	Time / Days after administration										
				Time					Days					
				30 min	1hr	2hr	3hr	4hr	1	2	3	4	5	
1	4000	Male	1	NAD <sup>a</sup>	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			2	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			3	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			4	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			5	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
2	4000	Female	6	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			7	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			8	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			9	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
			10	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD

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

a : No abnormality detected

b : Scab (가피)

## Appendix 3. Body weights

Group	Dose (mg/kg bw)	Sex	Number of animals	Days after administration (g)				
				0	3	7	14	Gain
1	4000	Male	1	233.0	260.5	278.0	407.0	174.0
			2	227.5	247.5	265.0	364.0	136.5
			3	230.5	262.0	283.0	418.0	187.5
			4	232.0	258.0	281.5	365.0	133.0
			5	223.0	250.0	262.0	378.0	155.0
MEAN				229.2	255.6	273.9	386.4	157.2
S.D. <sup>a</sup>				4.0	6.5	9.7	24.8	-
2	4000	Female	6	159.5	188.5	209.5	242.0	82.5
			7	159.0	179.5	203.0	233.0	74.0
			8	155.5	170.5	192.5	241.0	85.5
			9	163.5	184.5	201.0	228.5	65.0
			10	165.5	187.5	201.5	232.0	66.5
MEAN				160.6	182.1	201.5	235.3	74.7
S.D.				3.9	7.4	6.1	5.9	-

a : Standard deviation

## 6. 참고문헌 [References]

- 농촌진흥청 고시 제2017-5호 「농약 및 원제의 등록기준」 [별표 13] 환경생물 독성시험 기준과 방법 (2017.04.24)
- 국립농산물품질관리원 고시 제 2017-33호 (2017.06.03) "유기농업자재 공시 및 품질 인증 기준".
- OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No. 203 "Fish, Acute Toxicity Test (Adopted : July 17, 1992)"



## 7. Tables

**Table 1. Cumulative mortality of *Cyprinus carpio***

Nominal concentration <sup>a</sup> (mg/L)	Number of fish	Cumulative mortality				
		3 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
Control	10	0	0	0	0	0
2.000	10	0	0	0	0	0
2.990	10	0	0	0	0	0
4.470	10	0	7	7	7	7
6.683	10	0	10	10	10	10
10.000	10	0	10	10	10	10

a: Based on nominal concentration of main ingredient input ratio

**Table 2. Abnormal response of *Cyprinus carpio***

Nominal concentration <sup>a</sup> (mg/L)	Number of fish	Abnormal response				
		3 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
Control	10	NOR(10 <sup>b</sup> )	NOR(10)	NOR(10)	NOR(10)	NOR(10)
2.000	10	NOR(10)	NOR(10)	NOR(10)	NOR(10)	NOR(10)
2.990	10	NOR(10)	NOR(10)	NOR(10)	NOR(10)	NOR(10)
4.470	10	NOR(10)	NOR(3)	NOR(3)	NOR(3)	NOR(3)
6.683	10	NOR(10)	NA	NA	NA	NA
10.000	10	NOR(1) LOE(9)	NA	NA	NA	NA

a: Based on nominal concentration of main ingredient input ratio

b: Number of fish

※ Observation key

LOE : Loss of equilibrium

SUR : Fish mainly at the surface

HEM : Hemorrhage

VDE : Vertebral deformation

BOT : Fish mainly at the bottom

NOR : Normal

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



**Table 3. Temperature**

Nominal concentration <sup>a</sup> (mg/L)	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
Control	23.1 <sup>b</sup>	23.0	22.9	22.8	23.0
2.000	23.1	22.9	22.9	22.9	23.0
2.990	23.1	22.9	22.9	22.9	23.0
4.470	23.1	23.0	23.0	22.9	23.0
6.683	23.1	NA <sup>c</sup>	NA	NA	NA
10.000	23.1	NA	NA	NA	NA

a: Based on nominal concentration of main ingredient input ratio

b: Unit : °C

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

**Table 4. pH-values**

Nominal concentration <sup>a</sup> (mg/L)	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
Control	7.35	6.93	7.76	7.73	7.74
2.000	7.37	6.97	7.72	7.67	7.69
2.990	7.53	6.94	7.73	7.68	7.73
4.470	7.26	6.76	7.75	7.68	7.68
6.683	7.55	NA <sup>b</sup>	NA	NA	NA
10.000	7.60	NA	NA	NA	NA

a: Based on nominal concentration of main ingredient input ratio

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



**Table 5. Dissolved oxygen concentration**

Nominal concentration <sup>a</sup> (mg/L)	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
Control	84.0 <sup>b</sup>	76.1	90.4	81.2	99.8
2.000	82.2	74.4	87.3	82.1	100.6
2.990	85.6	79.3	85.6	85.7	100.0
4.470	85.6	72.6	87.7	82.7	99.8
6.683	85.7	NA <sup>c</sup>	NA	NA	NA
10.000	88.6	NA	NA	NA	NA

a: Based on nominal concentration of main ingredient input ratio

b: Unit : %<sub>sat</sub>

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

**Table 6. Hardness**

Test group	Hardness (mg/L CaCO <sub>3</sub> )
Control	74

**Table 7. Measurement of length for *Cyprinus carpio***

Group	Length (cm)										Mean ±S.D.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Control	3.88	3.85	3.94	3.99	4.24	4.10	3.95	3.70	3.95	3.65	3.97±0.17
Treatment	3.85	4.05	3.81	3.90	3.98	4.26	3.96	3.89	4.13	4.24	

**Table 8. Measurement of body weight for *Cyprinus carpio***

Group	Weight (g)										Mean ±S.D.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Control	0.73	0.77	0.78	0.73	0.97	0.90	0.87	0.63	0.81	0.69	0.83±0.11
Treatment	0.73	0.82	0.77	0.90	0.84	1.09	0.90	0.81	0.86	0.93	



## 8. Appendices

### Appendix 1. Positive control study

Study No.	Study period	LC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (mg/L)	
		48 hr	96 hr
17-KET-PC001	2017.07.14 ~2017.08.07	311.757 <sup>b</sup>	294.849

a: Median lethal concentration

b: Nominal concentration of active ingredient

\* Test substance: Potassium dichromate

\* Test species : *Cyprinus carpio*



Appendix 2. 48 & 96 hr - LC<sub>50</sub> data sheet by probit analysis program

모수 추정값

모수	추정값	표준 오차	Z	유의확률	95% 신뢰구간	
					하한	상한
PROBIT <sup>a</sup> Concentration	1.942	.895	2.169	.030	.187	3.696
절편	-6.138	3.891	-2.091	.036	-12.029	-4.247

a. PROBIT 모형: PROBIT(p) = 절편 + BX

카이제곱검정

	카이제곱검정	자유도 <sup>a</sup>	유의확률
PROBIT Pearson 적합도 검정	.101	4	.999 <sup>b</sup>

a. 각 케이스를 기준으로 하는 통계량은 통합 케이스를 기준으로 하는 통계량과 같습니다.  
 b. 유의수준이 .150보다 크기 때문에 이질성 요인이 신뢰한계 계산에 사용되지 않습니다.

셀 빈도 및 잔차

순자	Concentration	개체의 수	관측응답	기대응답	잔차	확률
PROBIT 1	.000	10	0	.000	.000	.000
2	2.000	10	0	.000	.000	.000
3	2.990	10	0	.098	-.098	.010
4	4.470	10	7	7.058	-.058	.706
5	6.683	10	10	10.000	.000	1.000
6	10.000	10	10	10.000	.000	1.000

신뢰한계

확률	Concentration에 대한 95% 신뢰한계		
	추정값	하한	상한
PROBIT .010	2.993	-9.582	3.691
.020	3.134	-8.111	3.773
.030	3.223	-7.192	3.825
.040	3.290	-6.501	3.866
.050	3.344	-5.940	3.899
.060	3.391	-5.482	3.928
.070	3.431	-5.044	3.953
.080	3.468	-4.670	3.976
.090	3.501	-4.329	3.998
.100	3.531	-4.017	4.018
.150	3.658	-2.726	4.104
.200	3.758	-1.706	4.179
.250	3.844	-.837	4.250
.300	3.921	-.065	4.321
.350	3.993	.639	4.399
.400	4.061	1.292	4.488
.450	4.127	1.900	4.597
.500	4.191	2.461	4.742
.550	4.256	2.962	4.947
.600	4.322	3.378	5.248
.650	4.390	3.694	5.674
.700	4.461	3.920	6.230
.750	4.539	4.063	6.910
.800	4.625	4.212	7.721
.850	4.725	4.325	8.703
.900	4.851	4.438	9.967
.910	4.882	4.462	10.275
.920	4.915	4.488	10.611
.930	4.951	4.515	10.981
.940	4.992	4.545	11.396
.950	5.038	4.577	11.869
.960	5.093	4.614	12.427
.970	5.160	4.658	13.114
.980	5.249	4.715	14.030
.990	5.389	4.801	15.476



#### 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도 (주관기관)

		코드번호	D-06	
세부연구목표	연구개발목표	연구개발 수행내용	연구결과	달성도 (%)
갯나무 추출물 피톤치드 기반 혼합추출물을 이용한 수출용 파프리카의 친환경 해충방제제 개발	신규 혼합추출물에 사용될 식물체 스크리닝	스크리닝을 통한 식물체 2종 선정	문헌 조사 등을 통하여 장미과, 녹나무, 약모밀, 꿀풀과, 운향과 식물 중 신규 식물체 선정	100
	추출 시간대별 함량 분석으로 최적 시간대 확립	추출 시간별 3가지 지표성분 함량 분석	추출 시간대별로 지표성분 함량을 분석하였으며, 지표성분은 알파피넨, 베타피넨 등으로 해충방제제에 가장 효과를 보이는 성분으로 확정. 추출시간대별 지표성분이 가장 많이 함유된 최소15분에서 최대 30분 사이의 시간으로 최적추출조건 확립	100
	신규 혼합추출물의 표준화 및 제형 설정	전자현미경으로 입자 사이즈 및 모양 확인 및 마이크로캡슐 서방성 확인	유화안정제, 분산매 등 함량 조절과 교반속도 등 여러 가지 가설을 통해 최적의 마이크로캡슐레이션 제형 확립 및 uv-vis를 통해 마이크로캡슐의 서방성 확인한 결과 최소 100일 이상의 서방화 유지	100
	혼합추출물의 안전성 평가	급성경구독성시험, 세포독성시험 등 독성 및 안전성 평가	세포독성시험, 급성경구독성시험 등 동물모델을 가지고 시제품 안전성 평가 완료	100
	신규 혼합추출물을 기반으로 하는 시제품 생산	갯나무 추출물 피톤치드 기반 혼합추출물의 마이크로캡슐레이션 시제품 생산	혼합추출물 약효의 지속성을 확보하기 위한 서방성 향상 마이크로캡슐화 시제품을 생산. 현장적용 후 약효가 기대에 미치지 못해 보완하여 약효 높임.	100
	해충 방제 매뉴얼 개발	현장에 사용할 수 있는 해충 방제 매뉴얼 개발	실험실 연구데이터와 현장실험에서의 데이터를 토대로 현장에 맞는 해충방제 매뉴얼 개발 완료	100
	유기농공시 신청	약효 및 약해 안전성 평가	공인인증기관을 통해 약해 및 약효 그리고 안전성에 대한 결과 마쳤으며, 유기농공시 신청 완료함.	100

#### 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도 (제1협동)

		코드번호	D-06	
제1협동 (가천대)				
세부연구목표	연구개발목표	연구개발 수행내용	연구결과	달성도 (%)
수출용 파프리카의 주요해충 3종 (담배가루이, 복숭아혹진딧물, 총채벌레)의 발생소장 및 경제적 피해수준 산출	주요 해충군의 비닐하우스 내 발생소장 조사 (2-yr field experiment)	황색점착트랩을 이용한 비닐하우스 내 해충발생 소장 및 밀도 조사	황색점착트랩의 경우 해충의 초기유입 경로파악에 매우 효과적인 모니터링 기법이지만, 작기가 진행됨에 따라 실제 식물체 내 해충분포와 상관관계가 낮아지는 문제를 가지고 있는 것이 확인됨.	100
		식물체 내 발생 해충밀도 육안조사	담배가루이와 꽃노랑총채벌레의 식물체 내 수직분포 양상을 온실실험을 통하여 확인하고, 두 종간의 공간상관관계를 규명함	90
	주요 해충군의 유입시기 및 확산경로 파악 (2-yr field experiment)	해충 3종의 유입 및 확산경로를 파악하기 위해 contour map 및 SADIE 분석 실시	집중분포를 보이는 담배가루이와 총채벌레의 고밀도 hotspot의 공간분포가 상호 상관관계를 가지고 있지 않음이 확인하였으며, 밀도 최성기가 이원화되어 서로 일치하지 않음을 확인함. 복숭아혹진딧물의 경우 작기 초기부터 고밀도로 유입 및 포장 전반에서 개체군 증가가 확인됨	100
주요 해충 3종에 대한 신규 혼합추출물의 방제효과 평가	주요 해충군의 신규 혼합추출물에 대한 독성 평가 (3-yr laboratory experiment)	leaf-disc bioassay를 통한 신규 혼합추출물 독성을 검정	총 14가지의 신규 혼합추출물이 평가되었으며, 이들 중 8가지가 신규물질이 실험시작 후 3시간 이내 주요 해충군에 대해 90%이상의 방제효과를 나타냄. 후보 물질에 대해 dose-response 관계를 확인함.	100
	신규 혼합추출물의 약해 평가 (3-yr field experiment)	Blind test를 통한 신규 혼합추출물의 약해 발생도 평가	방제효과를 보인 8가지 물질 중 2가지 후보 물질이 파프리카 식물에 약해를 유발하는 것을 확인하였으며, 이 물질들의 기본 성분은 자소 추출액임을 분석 완료함.	100
신규 혼합추출물의 유용생물 (서양뒤영벌)에	기존 유기합성농약과 신규 혼합추출물의 방제효과 비교	신규 혼합추출물의 독성을 기존 3종의 neonicotinoid계 유기합성농약	3종의 유기합성농약과 JS408의 살충효과를 비교한 결과, JS408이 유의하게 높은 치사율을 유발함 ( $P < 0.05$ ).	100

대한 환경영양 평가		(acetamiprid, dinotefuran, imidacloprid)과 비교 평가	개발 중인 신규 물질 중 해충 살충력이 높은 2가지 후보 물질 (JS408, JP503) 모두 높은 수준의 환경독성을 야기하는 문제점을 나타내고 있음.	
	후보 물질 농도 별 신규혼합추출물에 대한 유용곤충의 치사율 조사	후보 물질의 ,dose-response 상관관계 확인을 위해 bioassy를 진행함.	JS408의 경우, 농도의존적 살충효과를 나타내는 것을 확인함. JS408 원액에 비하여 JS408 3.5배 희석액의 경우, 노출 24시간 후 77%의 치사율을 보임. JP503의 경우, 실험시작 후 10시간 때 55%의 치사율을 보였으며, 72시간 후의 치사율은 95%에 도달함을 확인함.	100
	신규 혼합추출물의 유용생물에 대한 행동변화 유발 조사	행동영상분석프로그램인 EthoVision을 이용하여 서양뒤영벌의 행동변화를 분석	JP503을 처리하였을 때 3가지 parameter (walking distance, walking velocity, angular velocity)에 대한 행동변화를 비교함. 3가지 parameter 중 1가지 (angular velocity)에서만 유의한 행동차이를 보였으며 ( $P < 0.05$ ), 그 이외의 parameter에서는 대조군과의 차이를 보이지 않음. 아치사 농도에서 서양뒤영벌의 이동성은 저하되지 않았지만, 방향감각에 유의한 영향을 미칠 수 있는 가능성이 있으므로 서양뒤영벌 방사를 위해서는 후보 물질 살포 후 잔류 농약이 제거될 수 있는 충분한 시간을 확보하는 것이 필수적임.	100

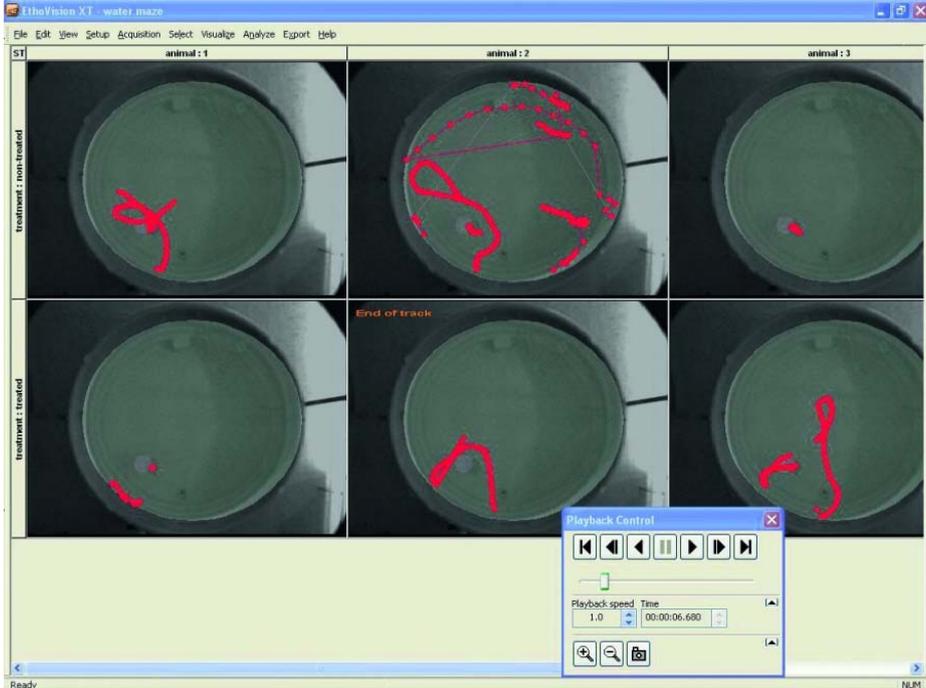
#### 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도(제2협동)

		코드번호	D-06	
제2협동 (가천대)				
연구개발목표	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	달성도 (%)
신규 혼합추출물의 주요 해충에 대한 방제 작용기전 규명	신규 혼합추출물의 방제 전 분석	qRT-PCR을 이용한 혼합추출물의 해충 방제기전 분석 시스템 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>담배가루이 및 서양뒤영벌의 유전자 정보를 확보함</li> <li>곤충 RNA 분리, Reverse transcription, qRT-PCR 분석을 통해 혼합추출물이 유전자 발현에 미치는 영향을 분석 할 수 있는 시스템을 구축함</li> </ul>	100
	신규 혼합추출물의 방제 전 분석	주요 해충에 대한 신규 혼합추출물의 방제기전 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>신규 혼합추출물 8종 처리에 따라 담배가루이의 ND-1 및 ATP-6 mRNA 발현이 저해 되는 것을 확인함</li> <li>자소액 처리에 따라 담배가루이의 ND-1, ATP-6와 서양뒤영벌의 NADH, C9, ATP-b, C8 mRNA 발현이 저해 되는 것을 확인함</li> </ul>	100
신규 혼합추출물의 세포 독성 분석	유용곤충 및 동물세포에 대한 세포독성 분석	Celltiter-Glo assay를 이용한 혼합추출물의 독성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>다양한 세포주 (Ra 264.7, MEF, HFF)에 대한 혼합추출물의 세포 독성을 확인함</li> </ul>	100

## 5. 연구결과의 활용계획

	코드번호	D-07
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <b>제품화 / 산업화 활용방안 : 초기년도 약 50억원/년 이상 매출기대</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 원재료 기준 농가소득 초기 50억/년 (5% 이상 손실 방지 시)</li> </ul> </li> <li>○ 고소득 수출작물의 해충관리를 위한 신규 친환경농자재의 등록으로 기존의 유기합성 농약을 대체</li> <li>○ 신규 친환경농자재를 기존의 약제와 혼합 또는 병행 사용하여 약제 저항성을 관리하고 유기합성 농약 사용량 절감에 이용</li> <li>○ 수출상품인증제도에 신규 친환경농자재 및 사용법을 등록하여, 농산물에 대한 국가인증 평가항목에 활용</li> <li>○ 이러한 국간인증을 통하여, 수출입 검역단계를 국가간에 간소화 전략에 이용하여, 수출작물의 수입국 통관절차를 간소화</li> <li>○ ICT 융합 업체에 병해충 방제 프로그램을 접목하여 스마트 농업의 보편화 도모</li> </ul>		

## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
<p>○ EthoVision System은 곤충의 이동 패턴을 영상 분석하는 장치로 해충 및 유용곤충의 독성평가에 활용. 본 연구 과제에서는 신규 혼합추출물의 독성에 의한 서양뒤영벌 행동이상을 EthoVision을 이용하여 정량화함.</p>		
		
<p>&lt;그림 60&gt; 소형 및 중대형 곤충 모두에 이용 가능한 영상추적장치인 EthoVision의 곤충이동 tracking 실험 장면 (Noldus, Netherlands)</p>		

### 7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○		

### 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

### 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11		
<p>◀ 주관기관</p> <p>○ 실험실 안전 교육 이수 및 안전관리</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 본 연구에 참여하는 모든 과제책임자 및 연구원 대상 기관 내 안전교육 이수 완료 (신입 인력의 경우, 해당 기관에서 시행하는 안전교육 이수)</li> <li>- 매년 정기 안전점검 실시</li> <li>- 정기적인 자체 실험실 안전 점검을 통한 위험요소 제거</li> </ul> <p>○ 세포 및 동물 관리 및 인체 노출 위험요소 제거</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 실험 안전관리 도구(실험복, 마스크, 장갑, 보안경 등)를 적극 활용하여 실험자의 안전성 최우선 확보</li> </ul> <p>○ 추출 등의 연구 조작 시 유해한 용매 사용 등으로 인체 노출 위해 가능성</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 연구실 안전 장비 확보(유기용매침투방지용 보호장갑 등)</li> </ul> <p>○ 연구실 안전관리비 예산 책정 및 마련으로 안전사고에 대한 금전적 손실 방안 기 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 연구실 연구인원 보험가입 완료</li> </ul> <p>◀ 제 1협동</p> <p>○ 과제 수행기간동안 매년마다 안전보건진흥원과 미래연구실안전기술원으로부터 연구실안전진단을 받고 연구원 안전을 위한 실험실 환경으로 개선함 (총 3차례).</p> <p>○ 해당 과제 참여연구원은 매 학기마다 연구 활동 종사자 안전교육 수행 (총 26시간 이수)</p> <p>○ 과제 참여연구원 모두 상해보험에 가입되어있음.</p> <p>◀ 제2협동</p> <p>○ 실험실 안전교육 이수 및 안전관리</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 가천대학교 시행 정기적인 연구실 안전점검 실시</li> <li>- 가천대학교 시행 참여연구원 교육훈련 및 정기 건강검진 실시</li> <li>- 현재 참여연구원 모두 연구실 상해보험 가입 되어 있으며 매년 갱신하고 있음</li> </ul>				

## 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	기타	Development of environment-friendly natural insecticides for <i>Bemisia tabaci</i> (Hemiptera: Aleyrodidae) on greenhouse sweet peppers	가천대학교	포스터 발표	Republic of Korea		2015. 10. 16	단독사사	포스터 발표 우수상 수상
2	논문	Evaluating the potential of the extract of <i>Perilla</i> sp. as a natural insecticide for <i>Bemisia tabaci</i> (Hemiptera: Aleyrodidae) on sweet peppers	가천대학교	제1저자	Entomological Research	0.573	2017.05.29	단독사사	SCIE
3	기타	학술지 편집위원 참여	가천대학교	편집위원	Applied Biological Chemistry	0.750	2017.		Editorial board
4	논문	Lethal and sublethal effects of synthetic insecticides on the locomotory and feeding behavior of <i>Riptortus pedestris</i> (Hemiptera: Alydidae) under laboratory conditions	가천대학교	제1저자	Journal of Asia-Pacific Entomology	1.046	2018.03.	단독사사	SCIE
5	논문	An ethanol extract of <i>Lysimachia mauritiana</i> exhibits inhibitory activity against	가천대학교	교신저자	The Journal of Microbiology	1.924	2017.12.07.	중복사사	SCI

		hepatitis E virus genotype 3 replication							
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

## 11. 기타사항

	코드번호	D-13
○		

## 12. 참고문헌

	코드번호	D-14
1. 김종범(2005) 식물유래 2차 대사산물의 병충해 및 잡초 방제효과, <i>한국응용화학지</i> , <b>48(1)</b> , 1-15.		
2. 김창길, 정학균, 문동현(2009) 최근 국내외 친환경 농산물 생산실태 및 시장전망. 한국 농촌경제연구원 연구보고서.		
3. 농림수산식품부(2008) 2007 채소재배현황.		
4. 박미란, 김혜영, 최경자, 이선우, 장경수, 김진석, 홍경식, 박노중, 조광연, 김진철(2004) 아비꽃대( <i>Chloranthus Japonicus</i> )뿌리로부터 분리한 shizukanol들의 생물활성. <i>농약과학회지</i> <b>8(4)</b> , 338-346.		
5. 이인화,설명수,박종대 (2005)점박이응애,목화진딧물과 복숭아혹진딧물에 대한 은행잎 추출물의 살충 및 기피효과. <i>한국응용생명화학회지</i> . <b>48(2)</b> ,150-154.		
6. 천상욱,김도익,최용수(2003)수종의 국화과식물의 지상부 추출물로부터 살충 및 항균활성 연구. <i>한국잡초학회지</i> <b>23(2)</b> ,81-91.		
7. 최해진,김희연,허장현,허수정,김도순,김성문 (2003)할미꽃( <i>Pulsatilla koreana</i> Nakai)로부터 새로운 살충활성물질, chrysophanic acid의 분리. <i>한국잡초학회지</i> <b>23(4)</b>		
8. Abbott W. S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. <i>J Econ Entomol</i> <b>18</b> ,265-267.		
9. Ahmad, M., Arif, M.I.(2008) Susceptibility of Pakistani populations of cotton aphid <i>Aphis gossypii</i> (Homoptera:Aphididae)to endosulfan, organophosphorus and carbamate insecticides. <i>Crop Prot</i> <b>27</b> ,523-531.		
10. Elliot, M., Janes, N. F., Jeffs, K. A., Needham, P. H. and Sawicki, R. M. (1965)New pyrethrin-like esters with high insecticidal activity. <i>Nature</i> <b>207</b> , 938-940.		
11. Herron, G. A., Powis, K., Rophail, J. (2001) Insecticide resistance in <i>Aphis gossypii</i> Glover (Homoptera: Aphididae), a serious threat to Australian cotton. <i>Aust J Entomol.</i> <b>40</b> , 85-91.		
12. Hoe-Seon Lee,Gyung-ja Choi,Kwang-Yun Cho,Sang-GilLee,Young-Joon Ahn(2000) Fungicidal and insecticidal activites of various grain extracts against five insect pests and six phytopathogenic fungi . <i>The Korean Journal</i>		

- of Pesticide Science* **4(3)**,7-14.
13. Il Kwon Park, Ji Doo Park, Chul Su Kim, Sang Shin, Young Joon Ahn, Seung Chan Park, Sang Gil Lee (2002) Insecticidal and acaricidal activities of domestic plant extracts against five major arthropod pests. *The Korean Journal of Pesticide Science* **6(4)**,271-278.
  14. Jimenez, A., Mata, R., Pereda-Miranda, R., Calderon, J., Isman, M. B., Nicol, R. and Arnason, J. T. (1997) Insecticidal limonoids from *Swietenia humilis* and *Cedrelas alvadorensis*. *J Chem Ecol* **23**,1225-1234.
  15. Jiwajinda, S., Hirai, N., Watanade, K., Santisopasri, V., Chuengsamarnyart, N., Koshimizu, K. and Ohigashi, H. (2001) Occurrence of the insecticidal 16,17-didehydro-16(E)-stemofoline in *Stemona collinsae*. *Phytochemistry* **56**, 693~695
  16. Kaltenecker, E., Brem, B., Mereiter, K., Kalchhauser, H., Khlig, H., Hpfer, O. Vajrodaya, S. and Greger, H. (2003) Insecticidal pyridol[1,2-a]azepine alkaloids and related derivatives from *Stemona* species. *Phytochemistry* **63**, 803-816.
  17. Koul, O., Multani, J. S., Singh, G. and Wahab, S. (2002) Bioefficacy of toosendanin from *Melia dubia* against gram pod-borer, *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Curr Sci India* **83**,1387-1391.
  18. Li, F., Han, Z., 2004. Mutations in acetylcholinesterase associated with insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Insect Biochem Mol Biol* **34**, 397-405.
  19. Linton, Y. M., Nisbet, A. J. and Mordue, A. J. (1997) The effects of azadirachtin on the tests of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.). *J Insect Physiol* **43**, 1077-1084.
  20. Liu, Z. L., Xu, Y. J., Wu, J., Goh, S. H. and Ho, S. H. (2002) Feeding deterrents from *Dictamnus dasycarpus* Turcz against two stored-product insects. *J Agric Food Chem* **50**,1447-1450.
  21. Nunez, M. J., Guadano, A., Jimenez, I. A., Ravelo, A. G., Gonzalez-Coloma, A. and Bazzocchi, I. L. (2004) Insecticidal sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus chiapensis*. *J Nat Prod* **67**,14-18.
  22. Park, I. K., Lee, S. G., Shin, S. C., Park, J. D. and Ahn, Y. J. (2002) Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. *J Agric Food Chem* **50**, 1866-1870.
  23. Reina, M., Gonzalez-Coloma, A., Grutierrez, C., Cabrera, R., Henriquez, J. and Villarreal, L. (1998) Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium megalanthum*. *J Nat Prod* **61**, 1418-1420.
  24. Ruberto, G., Renda, A., Tringali, C., Napoli, E. M. and Simmonds, M. S. (2002) Citrus limonoids and their semisynthetic derivatives as antifeedant agents

against *Spodoptera frugiperda* larvae. A structure-activity relationship study. *J Agric Food Chem* **50**, 6766-6774.

25. 김기돈, 이시원, 강은하, 신용길, 전재용, 허노열, & 이홍식. (2013). 우리나라 파프리카 수출단지 및 선과장의 병해충 조사. *Korean Journal of Agricultural Science*, 40(2), 93-99.
26. 유용만, 윤영남, 최인욱, & 이영하. (2011). 파프리카의 미생물 모니터링 및 보관온도에 따른 세균오염도 분석. *The Korean Society of Food Preservation*, 18(1), 7-12.
27. Paulitz, T. C., & Bélanger, R. R. (2001). Biological control in greenhouse systems. *Annual review of phytopathology*, 39(1), 103-133.
28. Bakker, J. C. (2008). Developments in greenhouse horticultural production systems. *IOBC WPRS BULLETIN*, 32, 5.
29. Jung, M., Kim, S., Kim, H. G., & Lee, D. H. (2018). Lethal and sublethal effects of synthetic insecticides on the locomotory and feeding behavior of *Riptortus pedestris* (Hemiptera: Alydidae) under laboratory conditions. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 21(1), 179-185.
30. Taanman, J. W. 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1410: 103-123.
31. Dhar S. S, Johar K, Wong-Riley, M. T. T. 2013. Bigenomic transcriptional regulation of all thirteen cytochrome c oxidase subunit genes by specificity protein 1. *Open Biology* 3: 120176.

[별첨 1]

## 연구개발보고서 초록

과 제 명	잣나무 추출 피톤치드 기반 혼합추출물을 이용한 수출용 파프리카의 친환경 해충방제제 개발 Development of Environment-Friendly Pesticide Practice for Export Paprika Using Mixed Extracts with Phytoncide from Korean Pine Tree				
주관연구기관	(주) 피러스		주 관 연 구 책 임 자	(주) 피러스	
참 여 기 업				(성명) 김배용	
총연구개발비  (881,000 천원)	계	881,000	총 연 구 기 간	2014.12.19.~2017.12.18.	
	정부출연 연구개발비	660,000	총 연 구 원 수	총 인 원	
	기업부담금	221,000		내부인원	
	연구기관부담금			외부인원	
○ 연구개발 목표 및 성과 ▪ 수출용 파프리카의 주요 해충 억제 연구를 통한 친환경 방제 제재 개발 ▪ 신선 농산물 시장에서의 수출 경쟁력 확보 및 국내 소비자 보호를 위한 파프리카 맞춤형 천연물 기반 해충 관리 매뉴얼 개발 ▪ 수출용 파프리카의 상품성을 저하시키는 해충 발생소장 및 경제적 피해수준의 정량화 ▪ 수출 대상국의 잔류농약검역 시스템 대응 및 돌파구 창출을 위한 맞춤형 친환경농자재 개발 ▪ 농약 외 유용생물의 이점을 파프리카 생산단계에서 적극 활용하기 위하여 천적 및 화분매개체에 대한 약제 안전성 평가 ▪ 신규 친환경농자재의 생산체계 확립하고, 농자재와 관리기법을 수출용 파프리카 생산 농작에 보급 ○ 연구내용 및 결과 ▪ 수출용 파프리카 재배 현장에서 발생하는 해충을 작기 별로 정확히 진단하고, 그에 따른 경제적 피해수준을 정량화하여 최적의 방제 시기 및 빈도를 산출 ▪ 가해양상이 상이한 대표 주요해충군 3종(총채벌레, 가루이, 응애)의 가해 기작 및 영향을 구명 ▪ 기존 합성농약 대체를 위해 살출 효과가 우수한 빈랑 및 acyclic monoterpenoids 함량이 높은 식물자원을 2종 선정하고, 기존 합성농약 대비 90% 이상의 방제효과를 달성할 수 있는 유효성분 구명 ▪ 신규 혼합추출물의 친환경농자재 허가 및 등록을 위한 최적추출공정 개발 및 유효성분, 지표성분 설정, 분석법 개발 ▪ 신규 혼합추출물의 친환경농자재 등록을 위한 포장시험자료 확보, 약해평가 및 유용생물(예, 천적 및 화분매개충) 및 인체에 미치는 환경독성 평가 ▪ 기존 친환경농자재와의 (예, 주관기관의 피톤치드 기반 약제) synergism 달성을 위해 신규 물질의 작용기작을 구명하고 최적의 혼합 formulation 개발 ▪ 신규 친환경농자재에 대한 해충의 저항성 발현빈도 예측 및 저항성 관리 매뉴얼 개발 ▪ 신규 친환경농자재 및 혼합제제의 생산체계를 주관기관에 구축 ▪ 과채류 농업인의 신기술 도입 및 해외 기술이전 ○ 연구성과 활용실적 및 계획					

- 제품화/ 산업화 활용방안: 초기년도 약 50억원/년 이상 매출기대
  - 원재료 기준 농가소득 초기 50억/년 (5% 이상 손실 방지 시)
- 고소득 수출작물의 해충관리를 위한 신규 친환경농자재의 등록으로 기존의 유기합성 농약을 대체
- 신규 친환경농자재의 기존의 약제와 혼합 또는 병행 사용하여 약제 저항성을 관리하고 유기합성 농약 사용량 절감에 이용
- 수출상품인증제도에 신규 친환경농자재 및 사용법을 등록하여, 농산물에 대한 국가인증 평가항목에 활용
- 국가인증을 통하여, 수출입 검역단계를 국가간에 간소화 전략에 이용하여, 수출작물의 수입국 통관 절차를 간소화
- ICT 융합 업체에 병해충 방제 프로그램을 접목하여 스마트 농업의 보편화 도모
- 고부가가치 수출농산물 관리 체계 및 매뉴얼 수립(기술적)
- 동일 또는 유사 유효성분을 ‘생산-유통-수출’ 전 단계에 적용함으로써, 생산비용 절감 및 신기술 경제성 확보(기술적)
- 전 단계에서 식물기반 친환경농자재를 이용함으로써, 국가 간 검역에서 잔류농약안전성 문제를 근본적으로 해결(경제/산업적)
- 수출작물의 신선도 유지 연장과 잔류농약의 감소로 수출통로 다변화(경제/산업적)
- 유기합성 농약의 인체독성, 약제저항성 및 생태계 교란 등의 부작용을 저감(기술적)
- 천연물 사용의 증가로 유용생물 (예, 화분매개충 및 천적)에 대한 보존 및 농가활용이 가능(기술적)
- 90% 이상의 약효를 갖는 고품질 친환경 약제를 개발하여 (허가규정: 기존 대비 50% 이상), 친환경 농자재에 대한 인식 전환 및 시장확대(경제/산업적)
- 현재 침체기에 접어든 생물적 방제 분야로서의 공동연구 및 관련연구의 활성화(기술적)

[별첨 2]

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

			코드번호	D-15	
			과제번호	114152-3	
사업구분	수출전략기술개발사업				
연구분야	잣나무 추출 이용한 수출용 피톤치드 기반 파프리카의 친환경 해충방제제 개발	과제구분		단위	
사업명	수출전략기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	잣나무 추출 이용한 수출용 피톤치드 기반 파프리카의 친환경 해충방제제 개발	과제유형		(개발)	
연구기관	(주) 피러스		연구책임자	김배용	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2014.12.19.- 2015.12.18	146,000	49,000	195,000
	2차년도	2015.12.19.- 2016.12.18	294,000	98,000	392,000
	3차년도	2016. 12. 19 - 2017. 12. 18	220,000	74,000	294,000
	4차년도				
	5차년도				
	계		660,000	221,000	881,000
참여기업					
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2018.01.31

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주) 피러스	연구소장	김배용

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	
-----	---

## I. 연구개발실적

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

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

당 연구는 수출용 파프리카 재배 현장에서 발생하는 해충을 기존 합성농약 대비 90% 이상의 방제효과를 달성하기 위한 제품을 개발하고자함. 기존 합성농약의 경우 미흡한 방제효과를 친환경 천연 추출물을 이용하여 방제효과를 90% 이상 높이는 기술임. 특징적인 것은 살충 효과가 높은 식물자원을 이용하여 선택적으로 해충을 방제하는 독창적인 기술임.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (우수)

당 연구에서 개발된 기술은 파프리카 뿐만 아니라 해충이 발생하는 다른 작물에서도 사용이 가능한 기술임.

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수)

비관세장벽인 병해충 검역 및 농약잔류문제를 생산단계에서부터 철저히 관리하여, 통관 거부 및 지연 등의 피해를 선제적으로 방지함으로써 수출 시장의 안전성 확보가능하며 990% 이상의 약효를 갖는 친환경농자재 개발을 통한 합성농약과 비교우위의 경쟁력을 확보함으로써 친환경 농자재 시장을 확대하고 천연물농약의 성공적 모델 시스템으로 활용 가능.

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

본 연구는 실제 수출용 파프리카 재배 농가에서 사용할 수 있는 해충방제제를 개발하고자 농가 및 협회와도 긴밀하게 협조하여 현장의 need를 최대한 반영한 기술을 개발하고자 노력하였습니다. 현장 실험을 수행하여 상용화에 한층 다가 설려는 노력을 하는 등 성실한 연구를 수행하였습니다.

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수)

3년간 진행된 연구에서 연구개발 성과는 특허출원 2건, 특허등록 1건, SCI급 논문 2건, 비 SCI급 논문 1건, 학술발표 5건, 국내논문 1건임.

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)		비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
신규 혼합추출물에 사용될 식물체 스크리닝		10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>스크리닝을 통한 식물체 2줄 선정</li> </ul>
신규 혼합추출물의 최적추출공정 개발 및 유효성분 구명/ 지표성분 설정		10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>신규 혼합추출물의 피톤치드와 신규 선정 식물체 추출물의 최적 혼합비율 설정</li> <li>신규 혼합추출물의 유효/ 지효성분(피톤치드 3종, 빈랑 1종, 신규 식물체 2종) 설정 및 함량분석</li> </ul>
수출용 파프리카의 주요 해충 발생소장 및 경제적 피해수준 산출	주요 해충의 온실 내 발생소장 조사	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>파프리카 전 재배기간 육안조사와 황색점착트랩 조사를 실시하였으며, 통계분석 완료</li> </ul>
	주요 해충의 수직분포 조사 및 과실피해와의 상관관계 규명		100	<ul style="list-style-type: none"> <li>수직분포 육안조사 및 과실에 대한 해충 피해 조사를 완료함. 실험실 환경에서 해충분포와 과실피해와의 상관관계 규명을 위한 실험완료</li> </ul>
	초기 유입 경로 및 edge effect를 정량화		100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Contour map 작성을 통한 유입 경로 및 hotspot을 판별하였음</li> </ul>
	해충밀도-가해습성-과실피해 상관관계 규명		100	<ul style="list-style-type: none"> <li>육안조사 자료와 과실 피해간 상관관계 파악. 작기 기간 중 식물체내 해충밀도가 경제적 피해수준 이하로 낮아서 이를 보완하기 위한 추가 실험 완료</li> </ul>
	경제적 피해수준 산출을 위한 기초자료 확보		100	<ul style="list-style-type: none"> <li>'해충-약제'별 조합의 방제비용을 산출을 위한 기초자료를 문헌 조사하였으며, 통계분석을 완료</li> </ul>
수출용 파프리카의 주요 해충에 대한 신규 혼합추출물의 방제효과 평가	신규 혼합추출물의 LC50와 90% 방제효과 약제농도를 산출	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>생물검정을 통한 담배가루이 성충에 대한 방제효과 평가완료. 추가 화학정량분석을 통한 LC50 산출</li> </ul>
	신규 혼합추출물의 약해를 평가		100	<ul style="list-style-type: none"> <li>시제품 후보 추출물을 식물에 처리 후 약해여부에 대한 Blind test를 완료. 약해를 경감하기 위하여 다양한 용매에 대한 이용 가능성 완료</li> </ul>
1종의 파프리카 주요 병해충에 대한 신규 혼합추출물의 방제 작용기전 규명	유전자 발현 분석 등을 이용한 혼합추출물의 병해충에 대한 방제 작용점 분석	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>담배가루이 (<i>Bemisia tabaci</i>)에 효능을 보이는 혼합추출물의 세포 독성 평가를 진행하였음</li> <li>혼합추출물에 의한 담배가루이의 유전자 발현 변화를 qRT-PCR</li> </ul>

				또는 RNA sequencing을 통해 규명
신규 혼합추출물의 표준화		10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>최적추출공정에 따라 생산된 신규 혼합추출물의 지표성분 함량분석</li> <li>지표성분 함량 분석에 따른 신규 혼합추출물의 표준화</li> </ul>
신규 혼합추출물의 항균활성평가			100	<ul style="list-style-type: none"> <li>주요 병원균에 대한 신규혼합추출물의 Disk Diffusion Assay</li> <li>주요 병원균에 대한 신규혼합추출물의 MIC Assay</li> </ul>
신규 혼합추출물을 기반으로 하는 시제품 생산			100	<ul style="list-style-type: none"> <li>유효성 평가 및 안전성 평가를 위한 표준화된 최적추출공법으로 생산된 신규혼합추출물을 기반으로 하는 시제품 생산</li> </ul>
시제품의 안전성 평가			100	<ul style="list-style-type: none"> <li>세포독성 시험</li> <li>급성 경구독성시험</li> </ul>
주요 해충의 발생소장 및 경제적 피해수준 산출	주요 해충의 발생소장을 조사하고 해충밀도와 과실 피해 간 상관관계를 규명	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>담배가루이와 꽃노랑총채벌레의 작물 생육 시기별 발생소장을 규명하였으며 과실피해와 상관관계 규명을 위한 온실실험을 진행함</li> </ul>
	주요해충군의 식물체내 수직분포를 규명 및 개체군 간공간 점유양상을 파악		100	<ul style="list-style-type: none"> <li>담배가루이 성충과 약충의 수직분포를 규명하였으며, 이를 기반으로 해충 개체군간 식물체내 상호작용 규명을 위한 SADIE를 활용한 공간통계분석을 진행함</li> </ul>
	주요 해충군의 초기 유입시기 및 확산경로 파악		100	<ul style="list-style-type: none"> <li>초기 유입 경로 및 hot spot 형성 양상을 contour map 작성을 통하여 판별하였으며, 담배가루이와 꽃노랑총채벌레 간 상이한 공간분포양상을 확인하고, 이를 SADIE 분석함</li> </ul>
	방제 시기 및 빈도별 경제적 피해수준 정립을 위한 기초자료 확보		100	<ul style="list-style-type: none"> <li>표본 단위 설정 및 공간분포 분석을 통하여 방제의사 결정을 위한 표본추출 정지선을 산출함</li> </ul>
주요 해충에 대한 신규 혼합추출물의 방제효과 평가	신규 혼합추출물의 반수치사 농도 및 90% 방제효과 약제 농도 산출을 위하여 해충별로 생물검정	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>자소액 기반 추출물을 농도별로 두 종의 해충에 대해 약효를 평가하고 7종의 신규 혼합추출물을 담배가루이 및 복숭아혹진딧물을 대상으로 생물검정함</li> </ul>
신규 혼합추출의 유용생물에 대한 환경영향평가	신규 혼합추출물의 유용생물에 대한	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>서양뒤영벌에 대한 생물검정법 개발 및 접촉독성 자료 확보</li> </ul>

	환경 영향 평가법개발 신규혼합추출물을 기반으로 하는 시제품의 유용생물에 대한 환경영향평가			<ul style="list-style-type: none"> <li>•</li> <li>•</li> </ul>
		100		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 서양뒤영벌에 대해 자소액 기반 추출물의 독성을 3종의 neonicotinoid계 유기 합성 농약과 비교하여 산출함</li> <li>•</li> </ul>
잣나무 피톤치드 기반 혼합추출물의 수출용 파프리카의 주요 해충에 대한 방제 작용기전 규명 및 독성평가	주요 해충에 대한 신규 혼합추출물의 방제 작용기전 규명	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 담배가루이 유전자 발현 분석 시스템을 구축함.</li> <li>• qRT-PCR을 통해 신규 혼합추출물 8종 처리에 따라 담배가루이의 ND-1, ATP-6 mRNA 발현이 저해 되는 것을 확인함.</li> </ul>
합계		100점		

### III. 종합의견

#### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구는 수출용 파프리카 재배 현장에서 발생하는 병해충을 방제하는 친환경 방제제를 개발하는 것을 목표로 하고, 현장과 밀접하게 협력관계를 구축하였으며, 파프리카뿐만 아니라 고추과에 속하는 식물에는 모두 사용할 수 있는 실용연구입니다. 개발된 병해충방제제는 희석하여 사용하였을 경우 노출 24시간 후 77%의 치사율을 보였으며, 72시간 후 치사율은 95%에 도달함을 보이는 등 목표로 했던 방제율보다 높은 수준까지 달성하였습니다.

#### 2. 평가 시 고려할 사항 또는 요구사항

특이사항 없음

#### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

영농조합법인, 농가 등에 보급하여 현장 테스트 및 성능보완을 도모한다. 사용 후 수확된 결실을 주관 기관에서 일괄 통합하여 Business model에 대한 경제성을 검토한다.

[별첨 3]

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야		
연구과제명	잣나무 추출 피톤치드 기반 혼합추출물을 이용한 수출용 파프리카의 친환경 해충방제제 개발				
주관연구기관	(주)피러스			주관연구책임자	김배용
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금		총연구개발비
	660,000,000	221,000,000			881,000,000
연구개발기간	2014.12.19.~2017.12.18.(3년)				
주요활용유형	<input 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 천연물을 이용한 병해충 관리	• 혼합추출물 노출 후 24시간 후 77%의 치사율을 보였으며, 72시간 후 95%의 치사율을 보임
② 유효성분 분리 및 규명	• 신규 혼합물의 지표 성분 알파피넨, 베타피넨
③ 최적추출공정개발	• 추출시간대에 따른 지표성분인 알파피넨, 베타피넨의 함량을 분석하여 최적추출시간인 최소15분에서 최대 30분 사이의 추출시간 확립
④ 작용기전 규명	• qRT-PCR을 통해 자소액 처리에 따라 담배가루이의 ND-1, ATP-6와 서양뒤영벌의 NADH, C9, ATP-b, C8 mRNA 발현이 저해 되는 것을 확인함
⑤ 환경영향성 평가	• 개발 중인 신규 물질 중 해충살충력이 높은 2가지 후보 물질 모두 높은 수준의 환경독성을 야기하는 문제점을 나타내고 있음

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 3. 연구목표 대비 성과

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책활용홍보		기타(타연구)
	특허	특허	품종	건수	기술	제품	매출	수출	고용	투자		논문		학술			정책	홍보	
												SC	비문						

	출원	등록	등록		료	화	액	액	창출	유치		I	SC I	평균 IF	발표		활용	전시	활용 등)
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건
가중치																			
최종목표	3	1		1		3	5			1	3	2		2		4	1	4	
연구기간 내 달성실적 달성율(%)	3	1		0		1	1			1	3	1		6		4	1	3	

#### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	Blind test를 통한 신규 혼합추출물의 식물체 약해 발생여부 평가
②	- 지표성분 함량 분석에 따른 신규 혼합추출물의 표준화
③	신규 혼합추출물의 최적추출공정 개발 및 유효성분 구명/지표성분 설정
④	주요 해충에 대한 신규 혼합추출물의 방제 작용기전 규명
⑤	Bioassay를 통한 유용생물의 후보 물질에 대한 독성 평가 및 아치사 농도에서 행동패턴 분석

#### 5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개발	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술					v			v		
②의 기술					v			v		
③의 기술					v			v		
④의 기술					v			v		
⑤의 기술					v			v		

\* 각 해당란에 v 표시

#### 6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	현재의 신규물질 조성으로는 파프리카 온실 내에 약제를 살포하는 것은 불가능할 것으로 사료되며, 이러한 이유로 온실외부 주변부 야생기주에 대한 국한된 사용을 대안으로 고려해 볼 수 있음
②의 기술	파프리카 작물만 한정하지 않고 다른 작물 혹은 병해충에 적용
③의 기술	파프리카 작물만 한정하지 않고 다른 작물 혹은 다양한 분야에 활용
④의 기술	- 신규 혼합추출물들이 유용곤충 및 동물세포에 대한 독성은 최소화하면서 주요 병해충 담배가루이에 대해 특이적인 방제 효과를 나타낼 수 있는 추출물의 농도 및 처리시간을 선정해야하며, 동물(세포)에 대한 안정성 평가 연구가 필수적인 것으로 사료됨

⑤의 기술	아치사 농도에서 서양뒤영벌의 이동성은 저하되지 않았지만, 방향감각에 유의한 영향을 미칠 수 있는 가능성이 있으므로 서양뒤영벌 방사를 위해서는 후보 물질 살포 후 잔류 농약이 제거될 수 있는 충분한 시간을 확보하는 것이 필수적임
-------	--

### 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	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표	3	1		1		3	5				1	3	2		2		4	1	4
연구기간내 달성실적	3	1		0		1	1				1	3	1		6		4	1	3
연구종료후 성과창출 계획	1					2	4					1	1						3

### 8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>	3		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간		실용화예상시기 <sup>3)</sup>	
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>			

- 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) 기술이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)