

발간등록번호

11-1543000-002361-01

핵과류 병해충 관리용 유기농업자재 개발 및 실용화 최종보고서

2018. 11. 12.

주관연구기관 / 효성오앤비(주)

협동연구기관 / 전남대학교, 안동대학교,
(주)팜한농, (주)마이크로자임,
세계김치연구소

농림축산식품부

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “핵과류 병해충 관리용 유기농업자재 개발 및 실용화”(개발기간 : 2015. 08. ~ 2018. 08.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 09. 00.

주관연구기관명 : 효성오앤비(주) (대표자) 박태현

협동연구기관명 : 전남대학교 산학협력단 (대표자) 송진규 (인)

팜한농(주) (대표자) 박진수, 김윤환 (인)

안동대학교 산학협력단 (대표자) 권순태 (인)

쥬마이크로자임 (대표자) 심영근 (인)

세계김치연구소 (대표자) 하재호 (인)

주관연구책임자 : 조성현

협동연구책임자 : 김인선, 김진철, 신태주, 임인택,
심영근, 박해웅

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	315007-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2017.08.14.~ 2018.08.13.	단 계 구 분	3/3
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	첨단생산기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	핵과류 병해충 관리용 유기농업자재 개발 및 실용화			
연구책임자	조성현	해당단계 참여연구원수	총: 41명 내부: 41명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부:400,000천원 민간:140,000천원 계:540,000천원
		총 연구기간 참여연구원수	총: 41명 내부: 41명 외부: 명	총 연구개발비	정부:1,200,000천원 민간: 420,000천원 계:1,620,000천원
연구기관명 및 소속부서명	효성오앤비(주) 친환경농업연구소			참여기업명 전남대학교, 팜한농(주), 안동대학교, (주)마이크로자임, 세계김치연구소	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
----------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시 설·장비	기술요 약 정보	소프트 웨어	화 합 물	생명자원		신품종	
								생 명 정 보	생물자원	정 보	실 물
등록· 기탁 번호		1. 10-1849378 2. 10-1837175 3. 10-1804038 4. 10-1820485 5. 10-1904473							1. KACC 92115P 2. KCTC 13060BP 3. KCTC 12979BP		

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설·장 비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약

본 연구과제는 미생물을 이용하여 핵과류에 발생하는 세균성구멍병, 진딧물 및 복숭아순나방을 방제할 수 있는 기술개발에 관한 것으로 미생물 후보균주 및 합제용 식물추출물을 선별하여 활성물질 분리 및 동정하고 기초제제의 개발과 특성분석 및 생물검정 등을 수행하여 유기농업자재를 개발 및 실용화를 완료하였음.

선발된 미생물 균주(바실러스 균주)는 세균성 구멍병 방제활성 *B. velezensis* G341, 진딧물 살충활성 *B. subtilis* Y9 균주 유래 surfactin 대량생산 공정 개발을 통하여, 각각의 균주들의 형태적, 생리적, 계통적 특성을 분석하고, 식물유래 살충물질 탐색과 효능평가 등을 실시하였음. 또한, 미생물 보베리아 바시아나 ARP14 균주를 이용하여 톱다리개미허리노린재 및 복숭아순나방 방제효과 규명하였으며, 효모균주인 *pichia anolama* 균주를 통한 복숭아순나방의 유인제 활성증진, 보전성 및 안전성 등 핵심기술을 개발하여 시제품 제작 및 특성과 효능을 평가하여 최종 제품 3개를 유기농업자재로 등록함.

보고서 면수

337

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>1. 연구목적 : 핵과류병해충 관리용 유기농업자재 개발 및 실용화 2. 연구내용 1) 복숭아혹진딧물 방제용 유기농업자재 개발 및 등록(제품화) - in vitro 및 in vivo 검정을 통한 균주 선발 및 특성을 규명하고, 활성물질 분리, 구조를 동정하여, 제형 개발, 대량생산공정확립 및 유기농업자재등록. 2) <i>Bacillus</i>를 이용한 세균성구멍병 방제용 유기농업자재 개발 및 등록(제품화) - in vitro 및 in vivo 검정을 통한 균주 선발 및 특성을 규명하고, 활성물질 분리, 구조를 동정하여, 제형 개발, 대량생산공정확립 및 유기농업자재등록. 3) 복숭아순나방 방제용 유기농업자재 개발 및 등록(제품화) - <i>Pichia anomala</i> 효모를 이용한 생물검정, 온실검정을 통하여 특성을 규명하고 약효시험, 독성을 시험을 통하여 유기농업자재개발 및 등록. 4) 핵과류 주요 병해충 방제용 길항미생물의 산업화 생산공정개발 - 세균성구멍병, 복숭아혹진딧물, 복숭아순나방 방제 균주의 배양 물리화학적 조건 확립 및 고농도 배양방법 확립 등 대량배양생산공정 개발.</p>																																
<p>연구개발성과</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>항목</th> <th>목표</th> <th>실적</th> <th>달성도(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>유기농업자재등록</td> <td>3</td> <td>유기농업자재 3건</td> <td>150</td> </tr> <tr> <td>기술이전</td> <td>1</td> <td>기술이전 1건</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>특허출원</td> <td>5</td> <td>특허출원 8건</td> <td>240</td> </tr> <tr> <td>특허등록</td> <td>1</td> <td>특허등록 5건</td> <td></td> </tr> <tr> <td>SCI논문</td> <td>5</td> <td>10건 게재완료</td> <td>140</td> </tr> <tr> <td>비SCI논문</td> <td>3</td> <td>(SCI 7, 비SCI 3)</td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table>					항목	목표	실적	달성도(%)	유기농업자재등록	3	유기농업자재 3건	150	기술이전	1	기술이전 1건	100	특허출원	5	특허출원 8건	240	특허등록	1	특허등록 5건		SCI논문	5	10건 게재완료	140	비SCI논문	3	(SCI 7, 비SCI 3)	100
항목	목표	실적	달성도(%)																														
유기농업자재등록	3	유기농업자재 3건	150																														
기술이전	1	기술이전 1건	100																														
특허출원	5	특허출원 8건	240																														
특허등록	1	특허등록 5건																															
SCI논문	5	10건 게재완료	140																														
비SCI논문	3	(SCI 7, 비SCI 3)	100																														
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>1. 활용계획 - 난방제 핵과류 병해충 방제용 유기농업자재를 개발함으로써 환경과 인축에 안전한 친환경 방제 역할 - 미생물 유래 활성물질과 식물추출물과의 조합을 통한 안정적인 생물농약 개발 2. 기대효과 - 작물에 대한 안전성, 작물 및 토양 잔류 문제가 없어 친환경 및 관행농업에 적용가능 수출 품목으로 육성 가능. - 관행농업에서 화학 살균제와의 교호 살포를 통한 세균성구멍병, 복숭아혹진딧물 및 복숭아순나방에 대한 효율적인 방제가 가능. - 신선과실과 토양 농약잔류에 대한 과실의 안전성 해결 및 농약사용 저감효과.</p>																																
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>세균성구멍병</p>	<p>진딧물</p>	<p>복숭아순나방</p>	<p>유기농업자재</p>	<p>식물추출물</p>																												
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Bacterial shot hole</p>	<p>aphid</p>	<p>oriental fruit moth</p>	<p>agricultural materials</p>	<p>plant extract</p>																												

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
2. 연구수행 내용 및 결과	6
제 1장 복숭아혹진딧물 방제용 유기농업자재 제품화	6
제 2장 세균을 활용한 복숭아혹진딧물 방제용 유기농업자재 개발	55
제 3장 Bacillus 균주를 이용한 세균성구멍병 방제용 유기농업자재 개발	101
제 4장 Bacillus 균주를 이용한 세균성구멍병 방제용 유기농업자재 제품화	159
제 5장 천연생리활성 소재를 이용한 복숭아순나방 방제용 유기농업자재 개발 ..	179
제 6장 미생물을 이용한 복숭아순나방 방제용 유기농업자재 제품화	209
제 7장 핵과류 주요병해충 방제용 길항미생물의 산업화 생산공정 개발	279
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	318
4. 연구결과의 활용 계획 등	322
붙임. 참고 문헌	324
<별첨> 1. 연구개발보고서 초록	
2. 주관연구기관의 자체평가의견서	
3. 연구성과 활용계획서	

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 미생물을 이용하여 핵과류에 발생하는 세균성구멍병, 진딧물 및 복숭아순나방을 효과적으로 방제하는 유기농업자재를 개발하고 실용화하고자 함.

1-2. 연구개발의 필요성

- 핵과류는 과일의 내부 중앙에 단단한 핵처럼 씨가 들어 있는 과일을 일컫는 것으로, 복숭아, 매실, 자두, 살구 등이 이에 속함.
- 국내과수 중 상의 7대 과수의 재배면적은 2015년 162,944ha, 2016년 166,473ha로 전년대비 0.2% 증가하였으며, 매년 재배면적 및 생산량이 증가함.
- 핵과류 작물 중, 복숭아는 평년대비 21%, 자두는 19% 성장하였으며, 앞으로도 핵과류 재배면적 및 생산량이 증가할 전망이다.

표 1. 주요 과실류 생산량(2016년)

(단위: 천톤)

구분		사과	배	복숭아	포도	감귤	감	자두
2016		576	238	287	248	640	353	78
2015		582	260	237	258	672	384	67
평년		504	251	226	262	681	383	63
증감	전년대비	-0.1%	-0.9%	+19.0%	-0.4%	-0.5%	-0.9%	+14.0%
	평년대비	+12.0%	-0.5%	+21.0%	-0.6%	-0.6%	-0.8%	+19.0%

* 출처: KOSIS 국가통계포털

- 매실은 특용작물로 과거 웰빙시대를 맞이하여 각광을 받은 작물이었으나, 현재는 지속적으로 재배면적이 감소하고 있는 추세이며, 이와같은 원인은 온난화현상, 매실가격 등의 원인으로 예상됨 (매실재배면적, 2014년 12,752ha ⇨ 2017년 11,259ha).

□ 세균성구멍병

- 핵과류 세균성구멍병은 *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia nigrifluens* 등 3종의 그람음성균이 발병하는 것으로 알려져 있는데, 이 중 *X. campestris* pv. *pruni*가 가장 병원성이 강함.
- 이 병은 잎뿐 만 아니라 과실에서도 발병하여 피해가 매우 크며, 4월말부터 5월초까지 많은 비가 오면 6월 초순 대부분의 잎과 과실에서 발생함.
- 세균성구멍병의 경우 잎이 자란 후 잎의 전부분에서 발병함. 발병부위가 점차 확대되며 초기 수침형의 병반이 점차 확대되면서 갈변하고 점차 탈락되면서 구멍이 생김.

- 최근 복숭아 등 과수 재배농가에서 복숭아 유과기부터 세균성구멍병이 다발생하여 많은 피해를 나타내고 있음.
- 복숭아 과실의 경우 수침상의 구멍이 확대되면서 갈색으로 변하며 병반이 움푹 파이는 현상이 나타나고 과실의 중·하부에 집중적으로 피해가 발생함.
- 1차 감염 요인은 노린재 발생에 의한 흡즙 부위가 추후 세균성구멍병으로 진전되며 노린재에 의해서 세균성구멍병원균이 감염 확산됨. 이는 4월~5월에 주로 발생하며 노린재의 피해 초기 증상이 세균성구멍병과 혼동되기도 함.
- 노린재의 주요 발생시기인 4월~5월에 집중발생하고 세균성구멍병은 5월에서 8월 까지 집중 발생함. 세균성구멍병은 습도가 높아지고 온도가 높은 시기에 집중 발생하며 바람에 의해 비산하여 감염원이 확산됨으로 주요 방제시기인 5월부터 주요 약제처리가 진행되어야 함.
- 현행 방제 방법
 - 현재 복숭아 세균성구멍병을 방제하기 위하여 사용하는 방법으로 화학농약의 경우 Oxytetracycline, Dithianon, Oxolinic acid, Validamycin, Streptomycin 등이 있음.
 - 이외 발아직전인 3월 경 석회유황합제를, 개화직전인 4월 경 보르도액(6-6식)을, 낙화 직후 디시아논, 마이신류의 화학농약 처리를 행함.
 - 세균성구멍병이 다발생하는 시기에는 마이신류를 약 3회 정도 처리하도록 권장하고 있음.
 - 과실비대기에 마이신류 혹은 6-6식 유산아연석회액을 처리하고 낙엽기인 9월 이후에 보르도액(4-8식, 4-12식)을 병원균 월동 방제를 위하여 1~3회 정도 처리하고 있음.
- 현행 방제 방법의 문제점
 - 현재 복숭아 세균성구멍병을 방제에 이용되는 대표적인 화학농약은 Oxytetracycline(싸이클린), Oxytetracycline + Streptomycin(아그리마이신), Dithianon(델란), Oxolinic acid(일품), Validamycin, Streptomycin 등이 있음.
 - 그러나 이들 화학농약의 경우 현재 경상북도 지역의 복숭아 재배지역에서 세균성구멍병원균들이 일부 농약에 대해 저항성이 발현하여 약효가 낮거나 없는 경우가 발생하고 있음. 현재 저항성이 발생한 지역은 일부이나 점차 지역이 확대 될 것으로 예측됨.
 - 보르도액의 경우 복숭아 재배 지역에서 많이 사용하고 있으나 약해 문제로 사용이 제한되고 있으며, 궁극적인 세균성 방제제로의 사용으로는 어려운 실정임.
 - 유황, 화학농약 6종 및 보르도액을 이용하여 체계처리를 하여 세균성구멍병을 방제하고 있으나 사용횟수의 과다 및 지속적인 사용으로 저항성이 이미 발생하고 있으며 향후 대부분의 재배 지역에서 저항성 문제로 방제에 어려움이 발생할 것으로 예측하고 있음.
 - 기후변화에 따른 온난화로 복숭아 재배지역의 세균성 병해는 지속적으로 증가하고 있으며 핵과류(복숭아를 포함한)에 발생하는 세균성구멍병원균의 피해는 지속적으로 증가할 것임.

표 2. 복숭아 세균성구멍병 방제 방법(관행처리)

살포시기	살포약제명	유의사항
발아직전(3월 중순)	석회유황합제	
개화직전(4월 상순)	6-6식 보르도액	개화가 10% 정도 되기 전까지 살포 가능
낙화직후(5월 상순)	디시아논 혹은 마이신류	발생상황에 따라 선택 살포
신초신장기 (5월중순~하순)	마이신류	내성이 생기므로 연간 3회 이상 살포 금지
과실비대기 (6월상순~7월중순)	마이신류 혹은 6-6식 유산아연석회액	있을 동에 약하므로 황산동 대신 황산아연 사용
낙엽기(9월하~10월중)	4-8식, 4-12식 보르도액	월동밀도 억제(1~3회 살포)

- 본 연구팀에서는 다양한 *Bacillus* 균주를 이용하여 항세균활성 균주를 선발하던 중 *X. campestris* pv. *pruni*에 대하여 매우 우수한 활성을 보이는 *Bacillus* 5종을 선발하였음. 이에 따라 본 연구에서는 이들 *Bacillus* 균주 단독이나 다른 천연물과의 합제 혹은 균주 개량을 통하여 핵과류에서 발생하는 세균성구멍병을 친환경적으로 방제할 수 있는 유기농업자재를 개발하고자 함.

□ 진딧물

- 진딧물은 66과 300여종의 다양하고 넓은 범위의 기주를 가지며 작물의 잎, 줄기, 꽃 등을 직접 가해함으로써 작물의 생산량에 영향을 줌.
- 주로 어린잎이나 신초를 가해하여 잎을 뒤틀리게 말아 기형유발 및 광합성 저해를 유발함. 피해를 받은 가지 끝에서 발생하는 신초의 경우 다음해 결과모지의 확보에 장애를 초래함으로써 과실의 생산량에 막대한 영향을 끼침.
- 진딧물은 작물을 가해하는 동안 다양한 바이러스 병을 식물에 전염시키는 매개체로서 작물생육에 가장 문제되는 해충 중 하나임.
- 핵과류에서 발생하는 주요한 진딧물에는 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*), 검은마디혹진딧물(*Myzus varians*), 복숭아가루진딧물(*Haylopteras pruni*) 등이 있으며, 이 중에서 복숭아혹진딧물이 가장 발생빈도가 높고 큰 피해를 줌.
- 진딧물을 방제를 위해 네오니코티노이드계 살충제(neonicotinoid insecticide)를 주로 사용해 왔으나 지속적인 사용과 과용으로 인해 저항성 진딧물의 출현이 보고되고 있음.
- 진딧물의 친환경적인 방제는 주로 식물추출물 원료를 이용한 방법이 소개되고 있지만, 매우 협소한 소재의 식물추출물만이 반복적으로 활용되고 있어 저항성 해충이 출현되고 있으며 이마저도 전량 해외수입에 의존하고 있는 실정임.
- 미생물을 이용하는 친환경적인 방법은 주로 곤충병원성 곰팡이를 이용하는 방법이 소개되고 있음. 하지만, 곤충병원성 곰팡이의 살충활성은 곰팡이의 생장에 비례하기 때문에 환경에 대한 영향이 매우 크며 노지에서는 사용이 거의 불가능하기 때문에 실효성이 매우 낮음.

- 세균성 미생물 대사물질을 이용하는 방법은 원료의 공급이 원활하고 이들이 생산하는 대사물질에 의해 살충활성을 나타내기 때문에 환경적 제약이 적어 사용이 매우 용이하지만, 합성농약 및 식물추출물 유래 유효성분에 비해 잔효성이 낮아 약제가 해충 표면에 직접 접촉하지 못하면 살충효과가 현저히 떨어지는 단점이 있음.
- 이러한 배경을 감안하여 볼 때 효과적인 진딧물 방제제의 개발을 위해서는 다음과 같은 연구가 필요할 것으로 판단됨.
 1. 원료의 안정적인 공급 및 환경에 영향이 적은 소재 탐색 연구
 2. 기존 합성농약 및 식물추출물과 상이한 작용기작을 갖는 소재 탐색 연구
 3. 접촉성 및 잔효성이 높은 대사물질의 탐색 연구
- 본 연구에서는 배양 및 공급이 용이한 고효성 세균성 미생물과 잔효성이 높은 추출물을 활용하여 각각의 대사물질 및 작용기작을 구명하고 제형화 연구를 통해 효과적인 복숭아혹진딧물 방제용 유기농업자재를 개발하고자 함.

□ 복숭아순나방

- 복숭아순나방(*Grapholita molesta*)은 중국 서북지역에서 유래되어 현재는 전 세계적으로 핵과류에 피해를 주고 있는 나비목 해충임(Roehrich, 1961; Rothschild and Vickers, 1991).
- 복숭아순나방의 기주식물은 복숭아나무, 사과나무, 배나무, 자두나무, 살구나무 등으로, 유충이 신초의 선단부를 가해하여 말라죽게 만들고 과실의 꽃받침 부분으로 침입하여 과심부를 식해하며 피해를 발생시킴.
- 복숭아순나방의 노숙유충은 과수의 조피 사이, 갈라진 틈, 버려진 봉지 등에서 월동 후, 3월 하순~4월 상순경 용화되고, 4~5월 경 성충으로 우화하여 1차 발생최성기, 6월 중하순경 2회 발생최성기, 7월 하순~8월 상순 3회 발생최성기, 8월 하순~9월 상순 4회 발생최성기, 9월 중순경 5회 발생최성기를 보이나 7월 이후는 세대가 중복되어 구분이 어려움.
- 복숭아순나방의 성페로몬 조성이 알려지면서(George, 1965; Cardé 등, 1979), 교미교란을 이용한 방제기술이 제안되었고, 포장에서 현장 실증이 시도됨. 다량의 합성페로몬 처리구에서 암컷의 탐색 능력을 저하시키면서 효과적인 교미교란 및 피해억제 결과를 나타내면서 화학농약 대체가능성을 보여줌. 하지만, 치솟은 생산단가는 농민들의 경제적 측면을 만족시키지 못하고 있음.
- 복숭아순나방 주요 공시약제로는 유기인계 및 합성피레스로이드계 약제 계통이 주를 이루고 있음.
- 다량의 화학약제 살포와 이에 따른 해충의 약제 저항성 및 환경과 식품의 안전성에 우려를 주고 있음(Pree 등, 1998; Borchert 등, 2004).
- 복숭아순나방의 경우, 신초 또는 과실 내부를 가해하므로 직접적인 방제가 어려울 뿐만 아니라 화학농약과 교미교란제 이외의 마땅한 방제제가 개발된 바 없기 때문에 이를 해결하기 위한 고살충성 친환경 방제제 개발이 필요함.
- 따라서 본 연구에서는 단가가 낮은 미생물 유인제와 복숭아순나방에 직접적인 살충효과를 보이는 천연생리활성물질을 활용하여 단가가 낮으면서도 고효율을 보이는 복숭아순나방 방제용 유기농업자재를 개발하고 제품화하고자 함.

1-3. 연구개발 범위

- 세균성구명병 방제용 유기농업자재 후보물 도출
 - 세균성구명병의 방제를 위한 *Bacillus* 균주들의 효능 평가 및 최고 약효 균주 선발
 - UV 등을 이용한 균주 개량
 - 세균성구명병균에 높은 활성을 보이는 식물 추출물 등 천연물 선발
 - *Bacillus*가 생산하는 물질의 분리 및 기기분석을 통한 구조 분석
 - 미생물 배양액과 천연물의 상승효과 여부 조사
- 진딧물 방제용 유기농업자재 후보물 도출
 - 진딧물에 살충활성을 보이는 균주 특성 규명 및 활성물질 규명
 - 진딧물에 고살충 활성을 보이는 식물 추출물 선발과 활성 물질 분리 및 구조 동정
 - 미생물 배양액과 식물추출물의 시너지 효과 조사
- 복숭아순나방 방제용 유기농업자재 후보물 도출
 - 복숭아순나방의 방제를 위한 천연생리활성물질 후보균의 실내 생물검정
 - 고살충성 천연생리활성물질 후보균 선발 및 시너지 효과 조사
 - 선발된 천연생리활성물질을 이용한 온실 내 약효·약해시험
 - 복숭아순나방 방제효율 증진시험(기개발된 유인제 효과시험) 및 방제전략 수립
 - 방제전략 검증을 위한 포장 약효시험 및 선발 후보균의 산업성 평가
- 유기농업자재 등록
 - 소량 및 대량 최적 배양 공정 개발
 - 사업화를 위한 대량 배양 및 생산공정 개발(원제)
 - 최적 약효를 위한 최적 제형 개발(완제품)
 - 포장 약효 및 약해 시험, 이화학분석시험, 독성시험 등을 통한 유기농업자재 등록

2. 연구수행 내용 및 결과

제 1장 복숭아혹진딧물 방제용 미생물 유기농업자재 제품화

제 1절 진딧물 방제제 제형화

1. 미생물자원의 균주특성

가. 미생물의 진딧물방제

(1) 연구목적

- *Bacillus subtilis* Y9의 진딧물 살충 효과 검정

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시식물: 배추
- ② 공시 미생물: *B. subtilis* Y9 (전남대학교)

(나) 시험방법

① 미생물의 진딧물 살충 시험

- 전남대학교로부터 공여받은 미생물배양액을 clean bench에서 멸균수를 이용하여 10배, 100배 및 1,000배로 희석함.
- 준비된 배추를 가로 5 cm, 세로 5 cm의 크기로 자르고 한천배지에 치상함.
- 실험실에서 순치시킨 균일한 크기의 2령 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*) 유충(10마리)을 배추잎에 안치함.
- 농도별로 희석된 미생물배양액을 30 cm의 거리에서 분무처리한 후 포화습도를 유지시킨 상태에서 파라필름으로 밀봉하고, 시험용 곤충 사육실(25℃, 광조건 12시간)에 72시간동안 정치함.
- 72시간 후 진딧물의 생존개체수를 조사하고, 살충율을 조사함.

② 조사내용

- 미생물의 진딧물 살충 효과

$$\text{살충율(\%)} = (1 - \text{처리구의 진딧물 생존 개체수} / \text{무처리구의 진딧물 생존개체수}) \times 100$$

(3) 결과

(가) 미생물 처리 후 진딧물 살충 효과

- 미생물 배양액을 멸균수에 희석하여 10배액, 100배액 및 1,000배액을 진딧물에 처리한 후 살충 효과를 조사한 결과, 각각 82%, 52% 및 15%로 조사됨(그림 1).
- 미생물의 생물농약과 유기농업자재에서 살충능력으로 효과를 나타내기 위해서는 각각 90%와 50%의 살충 효과를 나타내야 하므로 본 미생물(*B. subtilis* Y9)은 유기농업자재용 미생물로 사용이 가능함.

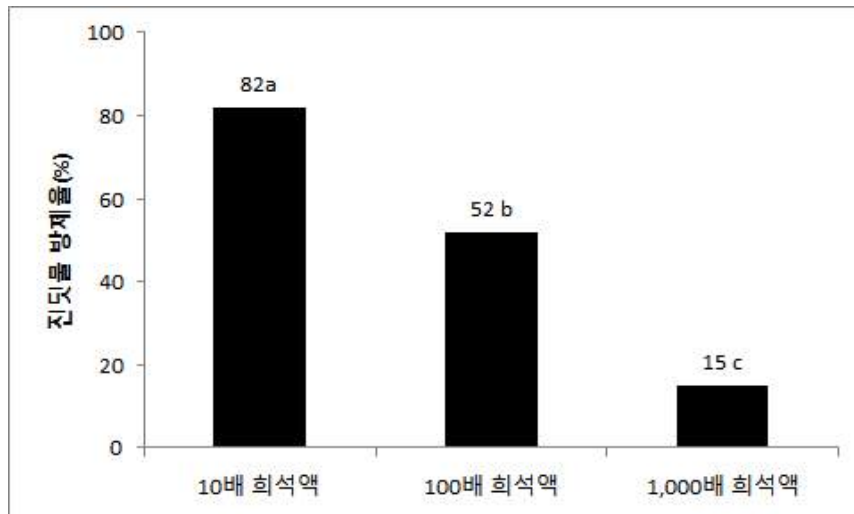


그림 2. 미생물 배양액의 처리에 따른 진딧물 살충 효과.

(4) 결론

- 미생물 배양액을 희석하여 처리할 때, 진딧물의 살충 효과는 10배 희석액과 100배 희석액에서 50% 이상의 살충 효과를 나타냄.

나. 미생물의 항균활성

(1) 연구목적

- *Bacillus subtilis* Y9의 적용확대를 위한 항균활성 검정.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 미생물: *B. subtilis* Y9 (전남대학교)
- ② 공시 병원균: *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*
- ③ 배지 : Potato dextrose agar (PDA)

(나) 시험방법

① 미생물의 항균 활성 시험

- 공시 병원균의 균사 끝 부분에서 6 mm 직경의 cork-borer로 agar plug를 떼어내어 PDA의 한쪽에 접종함.
- 멸균된 paper disk에 배양액 50 μL씩 접종하고 건조한 후, 병원균의 agar plug와 3 cm 거리를 두어 접종한 paper disk를 치상함.
- 25°C로 조절된 배양기에서 생육저지환의 크기를 측정함.

② 조사내용

- 미생물의 생육저지환

$$\text{균사생장억제율(\%)} = (1 - \text{처리구의 병원균 균사생장길이} / \text{무처리구의 병원균 균사생장길이}) \times 100$$

(3) 결과

- *B. subtilis* Y9는 *B. cinerea*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani*에서 항균활성을 나타내었고,
- *B. cinerea*와 *C. gloeosporioides*에서 *B. subtilis* Y9의 항균활성이 높게 나타남(표 1, 그림 2).

표 1. *B. subtilis* Y9의 병원균에 대한 항균활성

병원균	<i>B. cinerea</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>	<i>R. solani</i>	<i>P. capsici</i>
항균활성 ¹⁾	++	++	+	+	+	-

¹⁾ 항균활성: + 30% 이하, ++ 30~60%, +++ 60% 이상.



그림 3. *B. subtilis* Y9의 병원균의 균사억제능력.

(4) 결론

- *B. subtilis* Y9는 *B. cinerea*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani*에서 항균활성을 나타내었고, *B. cinerea*와 *C. gloeosporioides*에서 *B. subtilis* Y9의 항균활성이 높게 나타남.

다. 후보미생물자원의 활용가능성 평가

(1) 연구목적

- 토양에서 분리한 균주를 대상으로 주요작물병원균에 대한 항균활성이 우수한 미생물을 선발하여 추후 병방제용 후보자원을 확보하고자 함.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시미생물: 토양분리 미생물
- ② 공시병원균: *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*
- ③ 배지: Potato dextrose agar (PDA)

(나) 시험방법

① 미생물의 항균 활성 시험

○ 후보미생물의 항균활성검정을 위한 공시병원균에 대해 *Bacillus subtilis* Y9와 동일한 방법으로 생육저지환의 크기를 측정함.

② 조사내용

○ 미생물의 생육저지환에 따른 군사생장억제율(%)은 *Bacillus subtilis* Y9와 동일한 방법으로 계산하였음.

(3) 결과

○ 식물병원균에 대한 항균활성을 검정한 결과, 총 10균주의 활성이 우수하였으며 *B.cinerea*, *S. sclerotiorum*에 대해서는 10개의 균주 모두 강한 항균활성을 보였고, *P.capsici*에 대해서는 KC1-5, KC2-11균주가 높은 항균활성을 나타냄. *F. solani*, *C. gloeosporioides*에 대해서는 모든 균주가 항균활성을 나타냈으며, 그중 KC1-6균주가 높은 활성을 보였음. 이에 따라 추후 병방제용 제품개발을 위한 미생물자원으로 활용할 후보자원을 확보하였음(표 2).

표 2. 후보미생물자원의 병원균에 대한 항균활성

병원균	<i>B.cinerea</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>P. capsici</i>	<i>F. solani</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
KC1-5	++ ¹⁾	++	+++	++	++
KC1-6	++	++	-	+++	+++
KC2-7	++	++	-	++	++
KC2-8	++	++	-	++	++
KC2-10	++	++	-	++	++
KC2-11	++	++	++	++	++
KC2-16	++	++	-	++	++
KC3-1	++	++	-	++	++
KC3-5	++	++	-	++	++
KC4-4	++	++	-	++	++

¹⁾ 항균활성: + 30% 이하, ++ 30~60%, +++ 60% 이상.

라. 미생물의 작물 적용성 평가

(1) 연구목적

- 미생물 배양액을 종자에 처리하여 작물에 대한 안전성평가

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시미생물: *B. subtilis* Y9 (전남대학교)
- ② 공시식물: 무(*Raphanus sativus* subsp., 십자화과), 오이(*Cucumis sativus*, 박과), 청경채(*Brassica rapa* subsp, 십자화과)

(나) 시험방법

① 미생물의 항균 활성 시험

- 미생물 배양액을 준비된 멸균수를 이용하여 10배와 100배로 희석함.
- 준비된 페트리디쉬에 여과지(No. 2)를 고르게 펴고, 희석된 미생물배양액을 5 mL씩 분주한 후 종자를 30개씩 치상함.
- 종자를 치사한 페트리디쉬의 수분이 손실되지 않도록 파라필름으로 밀봉한 후 배양기에서 25℃로 5일간 배양함.
- 배양이 완료된 후 발아율과 뿌리길이를 측정함.

② 조사내용

- 발아지수(Germination index; GI)

$$GR = (\text{발아율}/\text{control 발아율}) \times 100$$

$$RE = (\text{뿌리길이}/\text{control 뿌리길이}) \times 100$$

$$GI = GR \times RE / 100$$

(3) 결과

(가) 발아율

- 3종의 종자에 대해 90~100%의 발아율을 나타내었고, 미생물 배양액 희석에 따른 발아율의 차이를 나타내지 않음(그림 3).
- 무의 발아율은 90~92%, 오이와 청경채의 발아율은 100%를 나타냄.

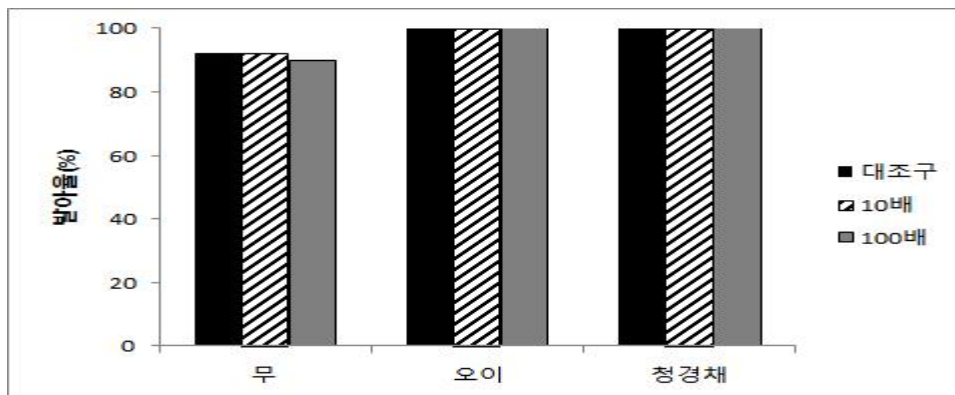


그림 4. *B. subtilis* Y9의 배양액 처리에 따른 종자별 발아율.

(나) 발아지수

- 종자 3종의 발아지수는 65.2~100.3을 나타내었고, 10배 희석액에서는 65.2~84.5, 100배 희석액에서는 70.7~100.3 정도의 발아지수를 나타냄(그림 4).
- 일반적으로 발아지수가 70 이하인 경우 식물에 생리장해를 나타낼 수 있으나, 발아지수가 70 이상의 경우 식물의 생육에 영향을 미치지 않는 것으로 보고되어 배양액을 100배 정도 희석하여 처리하는 경우 작물에서 생리장해는 나타나지 않을 것으로 판단됨.
- 무의 발아지수는 84.5~92.9, 오이의 발아지수는 65.2~100.3, 청경채의 발아지수는 70.5~79.5정도를 나타내어 무와 청경채에서는 10배 희석액에서도 작물생육에 안전한 것으로 나타남.

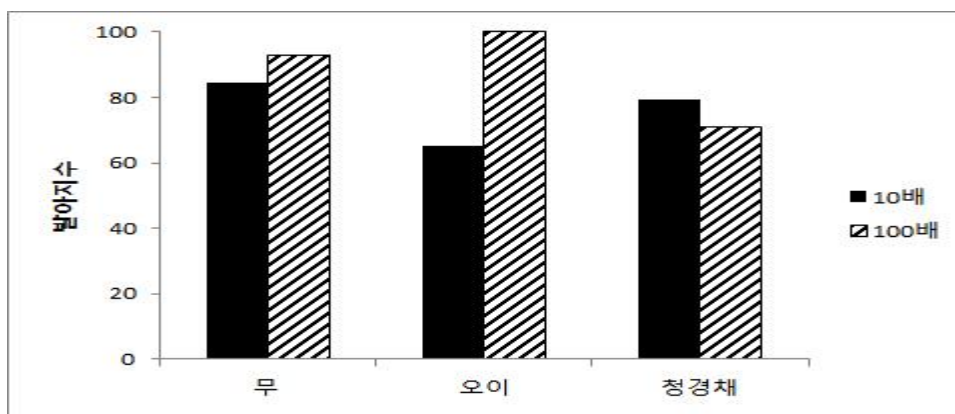


그림 5. *B. subtilis* Y9의 배양액 처리에 따른 종자별 발아지수.

(4) 결론

- *B. subtilis* Y9의 배양액 처리에 따른 종자별 발아율은 90~100%의 범위를 나타내었고, 발아지수는 65.2~100.3의 범위를 보였으며 미생물 배양액을 100배 희석하여 처리하는 경우 작물의 생리장해는 발생하지 않는 것으로 보임.

마. 미생물의 작물재배시험

(1) 연구목적

- *B. subtilis* Y9의 배양액 처리에 따른 작물생육에 미치는 영향 조사.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시미생물: *B. subtilis* Y9
- ② 공시작물: 상추(*Lactuca sativa*, 국화과), 배추(*Brassica rapa*, 십자화과)
- ③ 공시토양: 원예용상토
- ④ 공시비료: 유기질비료(혼합유박비료, 질소-인산-칼리=4-2-1)

(나) 시험방법

- ① 재배이력: 파종(2018. 4.10), 시비(2018. 5. 2), 정식(2018. 5.17), 수확(2018. 6. 21)
- ② 처리구 면적 및 배치: 4 inch 육묘용 포트, 완전임의배치법(3반복)
- ③ 처리구 설정

표 3. 처리구별 시비방법

처리구	유기질비료 시비량(kg/10a)	미생물 배양액 (L/10a)
무처리	-	-
대조구	250	-
미생물 배양액 1,000배	250	1
미생물 배양액 500배	250	2
미생물 배양액 250배	250	4

④ 조사내용 및 통계분석

- 작물 생육 조사 내용: 엽록소, 엽수, 엽폭, 엽장, 생물중, 건물중
- 통계분석: 처리구의 평균비교는 SPSS 12.01.1.을 이용하여 던컨다중검정을 통해 처리구간 유의차를 검정함.

(3) 결과

(가) 상추 생육 시험 결과

- 무처리구와 비교할 때, 대조구와 미생물 배양액 처리구의 엽록소, 엽수, 엽장, 엽폭, 생물중 및 건물중이 증가함(표 4).
- 대조구와 비교할 때, 미생물 배양액 처리구의 엽록소, 엽수, 엽장, 엽폭, 생물중 및 건물중이 대조구와 비슷하거나 감소함.
- 미생물 배양액 처리량 별 상추 생육을 조사한 결과, 미생물 배양액 처리량이나 농도에 따른 생육장애현상은 나타나지 않음(그림 5).
- 상기 결과를 종합할 때, 미생물 배양액의 처리에 따른 상추의 생육 및 생산량의 변화는 나타나지 않아 미생물 배양액의 비료효과는 확인할 수 없었음.

표 4. *B. subtilis* Y9의 배양액 처리에 따른 상추의 생육

처리구	엽록소	엽수	엽장	엽폭	생물중	건물중
	($\mu\text{g}/100\text{cm}^2$)	(ea/plant)	(cm)		(g/plant)	
무처리	1.28b ¹⁾	8.7d	9.9c	4.8b	4.9b	0.80b
대조구	2.27a	26.8ab	19.5ab	13.3a	95.8a	5.39a
미생물 배양액 1,000배	2.38a	24.7c	19.5ab	13.7a	95.2a	5.10a
미생물 배양액 500배	2.35a	25.3bc	21.0a	13.8a	105.8a	5.06a
미생물 배양액 250배	2.37a	27.5a	19.0b	13.6a	102.0a	5.38a

¹⁾ 던컨다중검정($P < 0.05$)



그림 6. *B. subtilis* Y9의 배양액 처리에 따른 상추의 생육. (좌) 정식 후, (우) 수확 전

(나) 배추 생육 시험 결과

- 무처리구와 비교할 때, 대조구와 미생물 배양액 처리구의 엽수, 엽장, 엽폭, 생물중 및 건물중이 증가함(표 5).
- 대조구와 비교할 때, 미생물 배양액 1,000배 처리구에서 엽장이, 미생물 배양액 250배 처리구에서 엽폭이, 미생물 배양액 1,000배 처리구와 미생물 배양액 500배 처리구에서 생물중 및 미생물 배양액 1,000배 처리구와 미생물 배양액 250배 처리구에서 건물중이 대조구보다 증가함.
- 건물중으로 배추의 생육과 생산량을 평가할 때, 미생물 배양액 1,000배 처리구와 미생물 배양액 250배 처리구에서 생산량이 각각 8%와 22%씩 증가함.
- 미생물 배양액 처리량 별 배추 생육을 조사한 결과, 미생물 배양액 처리 농도에 따른 생육장해현상은 나타나지 않음(그림 6).
- 상기 결과를 종합할 때, 미생물 배양액 1,000배 처리구에서 엽장, 생물중 및 건물중이 증가하고, 미생물 배양액 250배 처리구에서 엽폭과 건물중이 증가하여 미생물 배양액의 처리에 따른 약간의 생육 개선효과가 나타남.

표 5. *B. subtilis* Y9의 배양액 처리에 따른 배추의 생육

처리구	엽록소	엽수	엽장	엽폭	생물중	건물중
	($\mu\text{g}/100\text{cm}^2$)	(ea/plant)	(cm)		(g/plant)	
무처리	2.66a ¹⁾	8.5b	6.0c	3.1c	2.9d	0.51d
대조구	2.79a	24.5a	23.3b	11.2b	94.1c	7.80c
미생물 배양액 1,000배	2.94a	24.3a	24.7a	11.6ab	105.0a	8.46b
미생물 배양액 500배	2.73a	24.0a	24.4ab	11.6ab	101.7ab	7.53c
미생물 배양액 250배	2.83a	24.7a	23.9ab	12.0a	96.8bc	9.51a

¹⁾ 던컨다중검정($P < 0.05$)



그림 7. *B. subtilis* Y9의 배양액 처리에 따른 배추의 생육. (좌) 정식 후, (우) 수확 전

(4) 결론

- 미생물 배양액의 처리에 따른 상추와 배추의 생육을 조사한 결과, 국화과 식물인 상추는 미생물 배양액 처리효과를 확인할 수 없었고, 십자화과 식물인 배추는 미생물 배양액 처리 시 생육이 증가하여 작물의 종류에 따라 차이를 나타냄.
- 미생물 배양액 처리 시 미생물 배양액 처리량이나 농도에 따른 상추와 배추의 생육 장해현상은 나타나지 않음.

2. 기초 제형 소재 개발

가. 안정제 선발

(1) 연구목적

- 액제제형의 미생물발효에 의한 변형방지를 위한 안정제 선발.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시미생물: *B. subtilis* Y9
- ② 안정제: Sodium benzoate, Potassium sorbate, Sodium propionate

(나) 시험방법

① 안정제 선발 시험

- 100 mL 삼각플라스크에 80 mL의 미생물 배양액을 넣고, 파라필름으로 밀봉함.
- 30°C로 셋팅된 미생물 배양기에 정치 한 후 7일간 보관함.
- 7일 후 안정제별 가스 발생 여부를 조사함.

② 조사내용

- 파라필름의 부푼 정도에 따른 달관 조사

(3) 결과

- Sodium benzoate, potassium sorbate 및 sodium propionate의 안정제 시험결과, sodium benzoate에서 우수한 결과를 나타냄.
- 다만, sodium benzoate도 3% 이상 사용할 때, 팽창이 나타나지 않아 같은 농도에서 팽창이 없고, 상대적으로 가격이 저렴한 potassium sorbate를 선발함(표 6).

표 6. 안정제 종류별 제형의 팽창에 의한 변형

함량(%)	팽창률 ¹⁾			
	Sodium benzoate	Potassium sorbate	Sodium propionate	Control
0.5	++	++	++	++
1.0	+	++	++	++
3.0	-	-	++	++
5.0	-	-	-	++

¹⁾ 팽창률: 강함(++), 약함(+), 없음(-).

(4) 결론

- 진딧물 방제용 미생물제의 안정제로서 potassium sorbate를 선발함.

나. 동결방지제 선발

(1) 연구목적

- 액제제형의 저온노출에 의한 동결방지용 자재 선발.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시미생물: *B. subtilis* Y9
- ② 동결방지제: Ethylene glycol, propylene glycol

(나) 시험방법

① 동결방지제 선발 시험

- 미생물 배양액과 동결방지제를 1%, 3%, 4%, 5%, 8% 및 10% 씩 각각 혼합함.
- 동결방지제와 혼합한 미생물배양액을 -10℃와 -13℃에 처리.
- 4시간정도 보관 한 후 동결방지제 효과를 조사함.

② 조사내용

- 미생물배양액의 동결여부: 달관조사.

(3) 결과

- Ethylene glycol과 propylene glycol는 -10℃에서 동결방지효과를 나타내는 최소함량은 각각 3%와 8%로 조사됨(표 7).
- 반면에, -13℃에서는 ethylene glycol과 propylene glycol을 10%까지 처리하여도 동결을 방지할 수 없었음.
- 이들 결과를 종합할 때, 두 동결방지제 중 동결방지효과가 우수했던 ethylene glycol를 선발하였고, 적정 사용량은 3%였음.

표 7. 동결방지제 종류 및 온도별 제형의 동결특성

동결방지제	온도(℃)	동결방지제 함량(%) ¹⁾					
		1	3	4	5	8	10
Ethylene glycol	-10	○	×	×	×	×	×
	-13	○	○	○	○	○	○
Propylene glycol	-10	○	○	○	○	×	×
	-13	○	○	○	○	○	○

¹⁾ ○ : 동결, × : 비동결

(4) 결론

- 진딧물 방제용 미생물제(*B. subtilis* Y9)의 동결방지제로서 ethylene glycol를 선발하였고, 적정 사용량은 3%였음.

다. 계면활성제 선발

(1) 연구목적

- 진딧물 방제용 미생물제의 물리화학적 특성을 개선하기 위한 계면활성제의 선발

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 미생물: *B. subtilis* Y9
- ② 계면활성제
 - 1차 시험: SDS, NK-VN, PX-100, MD-425, NX-250, NX-150, NV-410
 - 2차 시험: NK TR-1, NK-SU500, NK-VN, PX-100, MD-425

(나) 시험방법

- ① 농촌진흥청에서 공고한 제2016년 153 농약의 검사방법 및 부정불량 농약 처리요령 중, 농약의 검사항목별 검사방법(물리성 검사방법)에 의하여 실시.
- ② 수화성: 500 mL의 Beaker에 20°C의 물 200 mL를 넣고 여기에 계면활성제 5 g을 수면상 약 10 cm의 위치에서 얇게 퍼지도록 조용히 떨어뜨려 수면에서 물속으로 들어가는 속도를 관찰함. 그리고 초자봉으로 교반하여 현탁의 균일성 여부를 관찰하여, 분말계면활성제를 1차선발.
- ③ pH: 80 mL를 100 mL 공진 flask에 취하여 시료 5%~10%를 가하여 마개로 막고 1분간 진탕시킨 후, 5분간 정치하여 이것을 여과하지 말고 액에 전극을 넣고 수소이온 농도를 측정.

(3) 결과

(가) 계면활성제 별 수화성 및 현탁성 1차 시험

- 계면활성제로서 SDS, NK-VN, PX-100 및 MD-425 등이 수화성과 현탁성이 우수하였고, NK-VN에서 가장 우수한 것으로 조사됨(표 8, 그림 7).

표 8. 계면활성제 종류 별 수화성 및 현탁성 1차 시험

구분	계면활성제						
	SDS	NK-VN	PX-100	MD-425	NX-250	NX150	NV410
수화성	++	+++	++	++	+	-	-
현탁성	++	+++	++	++	+	+	-
특징	비이온성	음이온성					



그림 8 . 계면활성제 종류 별 수화성 및 현탁성 1차 시험.

(나) 계면활성제 별 수화성 및 현탁성 2차 시험

- 1차 선발된 NK-VN과 유사한 특성을 나타내는 계면활성제를 A사로부터 NK TR-1, NK-SU500, NK-VN, PX-100, MD-425 등을 공급받아 수화성 및 현탁성을 조사함(표 9, 그림 8).
- 수화성과 현탁성을 조사한 결과, 대체적으로 NK-VN과 유사한 특성을 나타내나 NK TR-1과 PX-100에서 NK-VN보다 수화성이나 현탁성이 약간 우수한 결과를 나타내었음.
- 이 결과들을 통해 계면활성제는 NK TR-1과 PX-100이 적절한 것으로 판단되며, NK-TR 1은 성상이 액상계면활성제인 점을 고려해 액상제형에 이용할 수 있고, NK-PX100은 분말 계면활성제로서 분말제형에 이용할 수 있을 것으로 판단됨.
- 선발된 계면활성제는 NK-VN의 선행연구에서 약 5%의 경우에 효과적이었음.

표 9. 계면활성제 종류 별 수화성 및 현탁성 2차 시험

구분	계면활성제				
	NK TR-1	NK-SU500	NK-VN	PX-100	MD-425
수화성	++++	+++	+++	++++	+++
현탁성	++++	+++	+++	+++	++
성상	액상			분상	



그림 9. 계면활성제 종류 별 수화성 및 현탁성 2차시험.

(4) 결론

- 진딧물 방제용 미생물제의 계면활성제는 NK TR-1과 PX-100을 선발하였고, NK-TR 1은 액상제형에, NK-PX100은 분말제형에 적합하였음.
- 계면활성제의 적정사용량은 5%로 판단됨.

라. 증량제 선발

(1) 연구목적

- 분말제형 개발을 위한 증량제 선발

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료: 증량제(벤토나이트, 제오라이트, 디아토마이트, 카오린)

(나) 조사내용

- ① 증량제 특성: 비중, 분말도, 석면물질

(3) 결과

(가) 증량제 특성

- 증량제의 비중은 평균 2.3정도를 나타내어 증량제별 차이를 나타내지 않음(표 10).
- 증량제별 분말도 조사에서 디아토마이트의 분말도 범위가 약간 넓게 조사되었고, 벤토나이트와 제오라이트는 125~325 mesh를 카오린은 325 mesh를 나타냄.
- 모든 증량제에서 석면물질은 검출되지 않음.

표 10. 증량제별 특성

증량제 ¹⁾	비중(g/cm ³)	분말도(mesh)	석면물질
벤토나이트	2.0~2.5	125~325	검출안됨
제오라이트	2.0~2.4	125~325	검출안됨
디아토마이트	2.3	125~500	검출안됨
카오린	1.8~2.6	325	검출안됨

¹⁾ 증량제별 자료는 벤토나이트는 3개사, 제오라이트는 2개사, 디아토마이트는 2개사, 카오린은 1개사에서 제공한 자료를 참조함.

(나) 입상제형화 시험

- 미생물제제의 활용성을 향상시키기 위해 고상제형 중 입상제형의 가능성을 평가하기 위해 증량제별 입상제형화 시험을 수행함.
- 입상제형화 시험을 수행한 결과, 카오린과 벤토나이트가 적절한 것으로 조사되었고, 입상제형화에 가장 적합한 증량제는 카오린으로 조사됨(표 11).

표 11. 증량제별 입상제형화 시험결과

증량제	입상제형화 ¹⁾	비고
벤토나이트	○	입자형태가 구형이고, 입상제형의 강도가 우수하지만 입상화에 소요되는 시간이 많음
제오라이트	△	입자크기가 불균일하고, 입상제형의 강도가 약함.
디아토마이트	△	입자크기가 불균일하고, 입상제형의 강도가 우수함.
카오린	○	입자형태가 구형이며, 입상제형의 강도가 우수함.

¹⁾ ○: 제형우수, △: 제형은 되지만 제품화 어려움.

(4) 결론

- 진딧물 방제용 분말제형 개발을 위한 증량제로 벤토나이트, 제오라이트, 디아토마이트 및 카오린의 특성을 분석한 결과, 카오린이 가장 적합하였음.

마. 원료별 진딧물 살충 효과

(1) 연구목적

- 제형소재로 선발된 원료의 진딧물 살충 효과에 대한 영향을 조사하고자 함.

(2) 재료 및 방법

- (가) 공시재료: 안정제(3% potassium sorbate; PS), 동결방지제(4% ethylene glycol; EG), 계면활성제(5% NK TR-1, 5% PX-100), 증량제(카오린; Kao)

(나) 시험방법

- 각 원료는 멸균수에 100배, 250배 및 500배 희석하여 살포함[선행연구를 통해 미생물(*B. subtilis* Y9)을 제형화하는 경우 최대 500배 희석액이 가능한 것으로 조사됨, 이는 미생물이 생성하는 물질에 의한 것으로 보이며, 배양액을 농축하여 제형화하는 경우 최대 500배 까지 희석이 가능한 것으로 조사되었음.
- 원료별 진딧물 살충 효과는 “제 1절 1의 가”시험과 동일하게 수행함.

(3) 결과

(가) 원료별 진딧물 살충 효과

- 안정제인 potassium sorbate (PS)의 진딧물 살충 효과는 14~18% 정도로 진딧물 살충 효과가 거의 나타나지 않음(그림 9).
- 동결방지제인 ethylene glycol (EG)의 진딧물 살충 효과는 23~28% 정도로 진딧물 살충 효과는 미미함.
- 계면활성제 NK TR-1과 PX-100의 진딧물 살충율은 처리농도에 따라 각각 35~64%와 33~59% 정도로 조사되어 미생물제제의 희석배수에 따라 진딧물 살충 효과가 나타나기도 하나 미생물제제의 희석배수가 500배 정도임을 고려한다면 방제 효과는 미미할 것으로 판단됨. → 다만, 미생물과 혼용되었을 때, 상승작용을 나타낼 수도 있음.

- 증량제인 카올린(Kao)의 진딧물 살충율은 15~48%를 나타내었고, 희석배율이 증가할수록 살충 효과가 크게 감소하여 제형화에 따른 제제의 상승작용은 거의 나타나지 않을 것으로 판단됨.

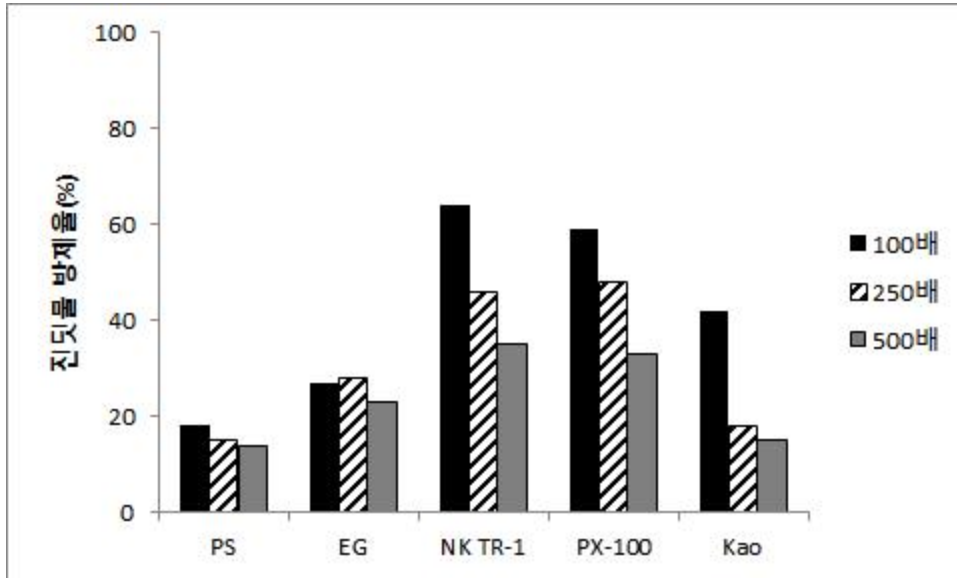


그림 10. 선발된 원료별 진딧물 살충 효과. 안정제(3% potassium sorbate; PS), 동결방지제(4% ethylene glycol: EG), 계면활성제(5% NK TR-1, 5% PX-100), 증량제(카올린; Kao)

(4) 결론

- 안정제, 동결방지제 및 증량제의 진딧물 살충 효과는 미미한 것으로 판단되었고, 계면활성제는 약간의 살충 효과를 나타냄.

3. 제형별 진딧물 살충 효과

가. 제형화 시험

(1) 연구목적

- 선발된 미생물 및 제형원료로 시제품을 생산하여 특성 및 경제성을 평가.

(2) 재료 및 방법

- (가) 공시재료: 미생물 배양액(*B. subtilis* Y9), 안정제(3% potassium sorbate; PS), 동결방지제(4% ethylene glycol: EG), 계면활성제(5% NK TR-1, 5% PX-100), 증량제(카올린; Kao)

(나) 시험방법

① 원료혼합

- 선발된 원료는 표 12와 같이 혼합함.
- 액상제형 및 액상수화제 제형에서는 일반적으로 증점제인 Xanthan gum (0.3%)을 사용하여 본 연구에서도 동일하게 사용함.

표 12. 제형별 배합비율

구분		분말수화제(WP)	액상현탁제(SM)	액상수화제(SC)
<i>B. subtilis</i> Y9		10%	50%	10%
계면활성제	PX-100	5%	-	-
	NK TR-1	-	5%	5%
안정제(potassium sorbate)		3%	3%	3%
동결방지제(ethylene glycol)		-	4%	4%
증점제(Xanthan gum)		-	0.3%	0.3%
증량제	Kaolin	82%	-	61.7%
	물	-	37.7%	20%
합계		100%	100%	100%

② 조사내용

- 특성평가: 비중, 생균수(NB 배지, 30℃, 48시간 배양, 100 μL 배양액 도말)
- 경제성평가: 배합비율별 원가산정



그림 11. 시제품의 제형별 성상.

(3) 결과

(가) 제형별 특성 조사

- 미생물제제의 제형별 비중 조사 결과, 분말수화제, 액상현탁제 및 액상수화제는 각각 0.49 g/cm³, 1.05 g/cm³, 1.12 g/cm³로 조사되어 분말수화제는 비중이 낮았고, 액상현탁제와 액상수화제는 비슷함(표 13).
- 미생물 생균수는 분말수화제, 액상현탁제 및 액상수화제에서 각각 8.7×10⁷ cfu/g, 2.5×10⁶ cfu/g, 7.9×10⁶ cfu/g으로 나타나 미생물제제로 등록이 가능함(*Bacillus subtilis*의 비료등록기준은 10⁶ cfu/g 이상임).

표 13. 제형종류에 따른 비중 및 생균수

제형	비중(g/cm ³)	생균수(cfu/g)
분말수화제(WP)	0.49	8.7×10 ⁷
액상현탁제(SM)	1.05	2.5×10 ⁶
액상수화제(SC)	1.12	7.9×10 ⁶

(나) 제형별 경제성 조사

- 분말수화제, 액상현탁제 및 액상수화제의 생산원가는 각각 1,149 원/kg, 1,205 원/kg, 1,437 원/kg으로 조사되어 분말수화제의 생산원가가 가장 낮고, 액상수화제의 생산원가가 가장 높음.

표 14. 제형별 경제성 분석

구분	단가*	분말수화제(WP)		액상현탁제(SM)		액상수화제(SC)		
		투입 비율	생산 원가 ¹⁾	투입 비율	생산 원가	투입 비율	생산 원가	
<i>B. subtilis</i> Y9	500	10%	50	50%	250	10%	50	
계면활성제	PX-100	4,500	5%	225	-	-	-	
	NK TR-1	4,500	-	-	5%	225	5%	225
안정제(potassium sorbate)	10,000	3%	300	3%	300	3%	300	
동결방지제(ethylene glycol)	10,000	-	-	4%	400	4%	400	
증점제(Xanthan gum)	10,000	-	-	0.3%	30	0.3%	30	
증량제	Kaolin	700	82%	574	-	-	61.7%	432
	물	-	-	-	37.7%	-	20%	-
합계	-	100%	1,149	100%	1,205	100%	1,437	

¹⁾ 생산원가와 원료단가의 단위는 “원/kg”임.

(4) 결론

- 제형별 비중, 생균수 및 생산원가는 각각 0.49~1.12 g/cm³, 2.5×10⁶~8.7×10⁷ cfu/g, 1,149~1,437 원/kg으로 조사됨.

나. 제형별 진딧물 살충 효과

(1) 연구목적

- 시제품 제형별 진딧물 살충 효과 검증

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시작물: 배추
- ② 공시약제: 시제품 3종(분말수화제, 액상현탁제, 액상수화제)
- ③ 배지: 한천배지

(나) 시험방법

- 각 시제품을 증류수에 250배, 500배 및 1,000배로 희석하여 살포함.
- 원료별 진딧물 살충 효과는 “제 1절 1의 가”시험과 동일하게 수행함.

(3) 결과

(가) 제형별 진딧물 살충 효과

- 3종의 시제품의 진딧물 살충율은 분말수화제(WP), 액상현탁제(SM) 및 액상수화제(SC)에서 각각 47~64%, 43~70%, 42~67%로 조사되었고, 시제품의 희석배수가 증가할수록 살충율은 감소함(그림 11).
- 유기농업자재에서는 미생물제제의 진딧물 살충 효과가 50% 이상을 나타낼 때 약효로서 인정받게 되므로 50% 이상의 효과를 나타내는 최소 희석배수는 500배액으로 나타남.

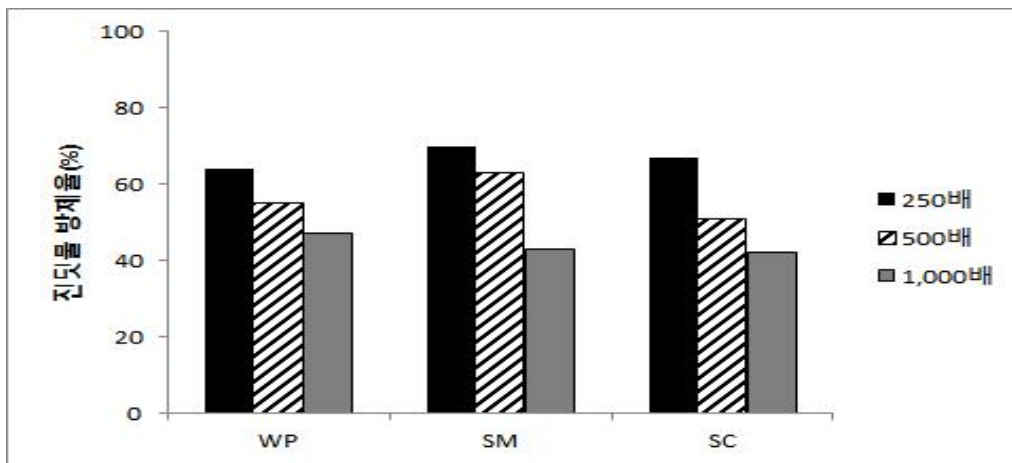


그림 12. 선발된 원료별 진딧물 살충 효과. WP: 분말수화제, SM: 액상현탁제, SC: 액상수화제.

(4) 결론

- *B. subtilis* Y9를 함유하는 미생물제제 제형 중 분말수화제(WP), 액상현탁제(SM) 및 액상수화제(SC)의 진딧물 살충율은 각각 47~64%, 43~70%, 42~67%로 조사되었고, 시제품의 희석배수가 증가할수록 살충율은 감소하였으며, 최적희석배수는 500배액으로 나타남.
- 500배 희석액 처리 시 액상현탁제 처리구에서 가장 높은 살충 효과를 나타냄.

다. 제형별 안정성 평가

(1) 연구목적

- 제품의 가열안정성시험을 통한 약효보증기간을 설정하고자 함.

(2) 재료 및 방법

- (가) 공시재료: 시제품 3종(분말수화제, 액상현탁제, 액상수화제)

(나) 시험방법

- 가열안정성시험의 경우 공시품을 각각의 가열조건하에서 실제 상품화될 포장용기 (특수대포장의 경우는 소포장 가능)의 상태로 완포장하여 보관하여, 온도 54℃에서 약 2주간 방치하여, 생균수를 측정함(그림 12). 초기, 1주, 2주차 측정
 - 약효보증기간 1년 설정약제 54±2℃, 2주 이상 시험한 성적
 - 약효보증기간 2년 설정약제 54±2℃, 4주 이상 시험한 성적
- 생균수 조사: LBA배지를 준비한 후, 희석배율별 10의 8승까지 희석하여 LBA배지에 100 μL를 가하여, 살균된 유리병으로 도말한다. 30℃ 배양기에서 24~48시간 배양 후 총 생균수를 확인.



그림 13. 시제품의 가열안정성 시험.

(3) 결과

- 54℃에서 2주간 보관하여 생균수 측정함.
- 분말수화제 처리구는 1주차에는 2.3×10^8 cfu/mL, 2주차에는 8.7×10^7 cfu/mL였고, 액상수화제 처리구는 1주차에는 1.2×10^7 cfu/mL, 2주차에는 2.3×10^6 cfu/mL였으며, *B. subtilis*의 비료공정규격인 10^6 cfu/mL 이상을 나타내어 안정성에 이상 없었음.
- 반면에 액상현탁제는 1주차에 8.1×10^6 cfu/mL, 2주차에 7.6×10^5 cfu/mL으로 *B. subtilis*의 비료공정규격인 10^6 cfu/mL 이상을 나타내어 안정성이 인정되지 않음.
- 이 결과들을 종합할 때, 분말수화제 처리구와 액상수화제 처리구의 유효미생물은 1년간 보증이 가능하였으나 액상현탁제 처리구의 유효미생물은 1년간 보증이 불가능함(표 15).

표 15. 제형별 생균수 확인

제형	생균수 (cfu/g or cfu/mL)	
	1주차	2주차
분말수화제(WP)	2.3×10^8	8.7×10^7
액상현탁제(SM)	8.1×10^6	7.6×10^5
액상수화제(SC)	1.2×10^7	2.3×10^6

(4) 결론

- 미생물제제를 54°C에서 2주간 보관한 후 분말수화제, 액상현탁제 및 액상수화제의 생균수는 8.7×10^7 cfu/mL, 7.6×10^5 cfu/mL, 2.3×10^6 cfu/mL로 조사됨.
- 분말수화제 처리구와 액상수화제 처리구의 유효미생물은 1년간 보증이 가능하였으나 액상현탁제 처리구의 유효미생물은 1년간 보증이 불가능함.

라. 미생물제제 제형 선정

(1) 연구목적

- 제형별 시험 결과를 분석하여 최적제형을 결정하고자함.

(2) 재료 및 방법

- 미생물제제의 제형별 특성, 경제성, 살충 효과 및 안정성 등을 참조하여 미생물제제 제형을 선정함.

(3) 결과

- 미생물제제의 제형별 특성 비교에서 액상현탁제와 액상수화제의 비중과 생균수는 비슷한 특성을 나타내었고, 수화제는 비중이 약간 낮으나 생균수는 약간 높음.
- 미생물제제의 살균력은 모든 제형에서 비슷한 경향을 나타내며, 500배 희석액을 기준으로 비교할 때 액상현탁제(SM)에서 진딧물 살충 효과가 우수함.
- 안정성 조사결과, 분말수화제는 액상현탁제나 액상수화제에 비해 다소 우수함.
- 1협동과제 결과에 따르면 진딧물에 대한 살충기작을 나타내는 *B. subtilis* Y9는 미생물이 진딧물에 대해 살충성을 나타내는 것이 아니라 *B. subtilis* Y9이 생육과정중 발생하는 미생물 추출물인 surfactin에 의해 살충 효과를 나타내는 것으로 나타남.

(4) 결론

- 미생물제제의 특성, 진딧물 살충 효과, 안정성 및 살충기작 등을 고려할 때, 취급과 생산이 용이한 액상현탁제를 최종 제형으로 선정함.
- 액상현탁제의 배합비율은 *B. subtilis* Y9 배양액 50%, 계면활성제 NK TR-1 5%, potassium sorbate 3%, ethylene glycol 4%, xanthan gum 0.3%, 물 37.7%이며, 생산원가는 1,205 원/kg임.
- 미생물제제의 살충기작은 미생물이 생산하는 surfactin으로 조사됨(1협동과제결과)

마. 최종제품 제작

(1) 연구목적

- 미생물제제의 살충 기작을 분석한 결과 선발미생물의 배양과정에서 생성된 surfactin(1협동과제)으로 조사되어 제품등록을 위한 유효성분을 설정하고 보조제의 특성을 고려하여 최종제품을 제작하고자 함.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시미생물 배양액: 2015년 미생물 배양액(*B. subtilis* Y9; Y9-‘15; 2015년 배양 조건으로 얻어진 미생물 배양액), 2017년 미생물 배양액 (Y9-‘17; 2017년 surfactin 최적 생산 배양 조건으로 얻어진 미생물 배양액)
- ② 미생물제제 보조제: 안정제(3% potassium sorbate; PS), 동결방지제(4% ethylene glycol: EG), 계면활성제(5% NK TR-1; TR)
- ③ 공시 작물: 배추

(나) 시험방법

- ① 미생물 배양액 중 유효성분 분석
 - 미생물 배양액의 살충유효성분인 surfactin은 전남대학교와 강원대학교에 의뢰하여 실시함.
- ② 미생물 배양방법에 따른 진딧물 살충 효과
 - 처리구는 Y9-‘15 처리구(Y9-‘15), Y9-‘17 처리구(Y9-‘17), Y9-‘15+Y9-‘17 처리구(Y9-‘15+Y9-‘17) 및 시제품(액상현탁제, SM) 처리구로 설정함.
 - 미생물 배양액은 시제품에서 권장한 희석배수인 500배로서 평균수로 희석함.
 - 원료별 진딧물 살충 효과는 “제 1절 1의 가”시험과 동일하게 수행함.
- ③ 미생물 배양액과 보조제 혼합에 따른 진딧물 살충 효과
 - 처리구는 Y9-‘17 처리구, 안정제 첨가처리구(Y9-‘15+PS), 동결방지제 첨가처리구(Y9-‘15+EG), 계면활성제 첨가처리구(Y9-‘15+TR), 모든 보조제 혼합처리구(Y9-‘15+All)를 두었음.
 - 미생물 배양액과 보조제 혼합용액은 시제품에서 권장한 희석배수인 500배로서 평균수로 희석함.
 - 원료별 진딧물 살충 효과는 “제 1절 1의 가”시험과 동일하게 수행함.

(3) 결과

- (가) 미생물 배양액 중 유효성분 분석
 - 2015년 배양조건으로 얻어진 미생물 배양액(Y9-‘15)의 surfactin 함량은 215 mg/L로 조사되었고,
 - 2017년 배양조건으로 얻어진 미생물 배양액(Y9-‘17)의 surfactin 함량은 940 mg/L로 조사되어 2017년 배양조건으로 *B. subtilis* Y9를 배양할 때, surfactin 함량이 약 4배정도 증가하는 결과를 나타냄(그림 13).
 - 앞서 언급했던 그림 1에서 미생물 배양액의 희석배수에 따라 진딧물 살충 효과의 차이를 보였고, 이는 surfactin의 농도와 관련이 있는 것으로 판단됨.

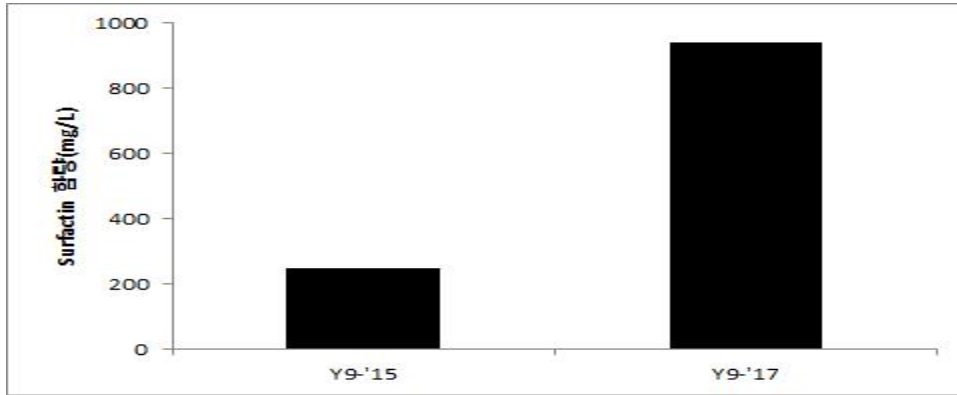


그림 14. 연도별 배양조건에 따른 *B. subtilis* Y9 배양액 중 surfactin 함량.

(나) 미생물 배양방법에 따른 진딧물 살충 효과

- Y9-'15 처리구, Y9-'17 처리구, Y9-'15+Y9-'17 처리구 및 SM 처리구의 진딧물 방제율은 각각 36%, 46%, 73%, 71%를 나타내어 Y9-'17 처리구와 SM 처리구에서 가장 높게 나타남(그림 14).
- Y9-'17 처리구와 SM 처리구의 진딧물 살충 효과는 상호간 통계적 유의차를 나타내지 않음.

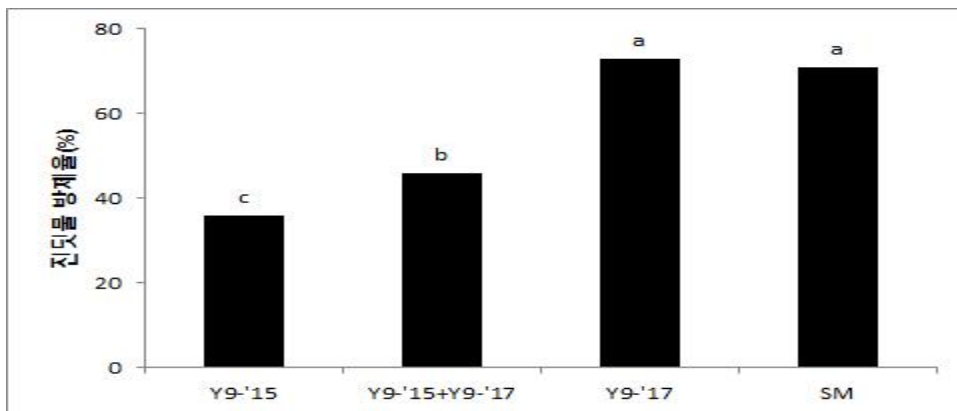


그림 15. 연도별 *B. subtilis* Y9 배양액 및 시제품의 진딧물 살충 효과.

(다) 미생물 배양액과 보조제 혼합에 따른 진딧물 살충 효과

- 미생물 배양액과 보조제 혼합에 따른 진딧물 살충 효과를 확인하기 위해 Y9-'17와 안정제(PS), 동결방지제(EG), 계면활성제(TR), 3종의 보조제(PS+EG+TR)를 혼합한 처리구와 시제품(액상현탁제, SM)의 진딧물 방제율을 조사한 결과, 68~76%의 살충 효과를 나타내었고,
- 보조제의 첨가 여부가 진딧물의 살충 효과에 영향을 미치지 않았고, 모든 처리구에서 통계적 유의차를 나타내지 않음(그림 15).

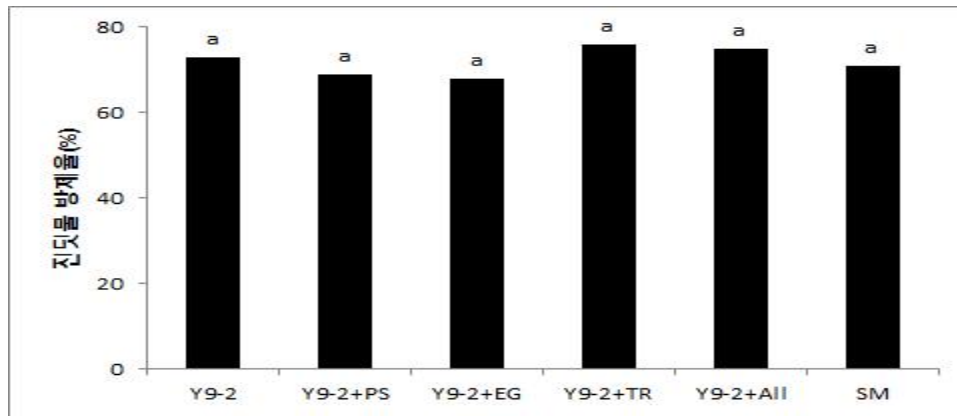


그림 16. 미생물 배양액과 보조제 혼합에 따른 진딧물 살충 효과.

(4) 결론

- 미생물 배양액의 진딧물 살충 유효 성분인 surfactin은 배양방법의 개선으로 2017년 미생물 배양액(Y9-17)은 2015년 미생물 배양액(Y9-15)보다 약 4.3배 정도 증가한 940 mg/L를 나타냄.
- 미생물 배양방법에 따라 얻어진 미생물 배양액의 진딧물 살충 효과를 비교할 때, 진딧물 살충유효성분인 surfactin 함량이 가장 높았던 Y9-17에서 살충효과가 높았고, 시제품(액상현탁제)와 유사한 살충효과를 나타냄.
- Y9-17 배양액과 보조제(안정제, 동결방지제, 계면활성제 등)를 혼합한 후 진딧물의 살충효과를 비교한 결과, 모든 처리구는 통계적 유의차를 보이지 않고 시제품과 유사한 살충효과를 나타냄.
- 상기 결과들을 통해 미생물 배양액의 진딧물 살충 효과는 미생물이 생산하는 surfactin에 의해 결정되는 것으로 판단되며, 개선된 *B. subtilis* Y9 방법으로 얻어진 미생물 배양액(Y9-17)은 기존의 최종 시제품과 유사한 진딧물 살충효과를 나타내고, 보조제의 혼합은 Y9-17의 살충 효과를 개선하지 못하는 것으로 나타남.
- 따라서 이들 결과들을 종합할 때, 진딧물 방제용 최종 제품은 미생물이 아닌 미생물 생산물인 surfactin을 주성분으로 하는 것이 적절하며, 보조제는 살충 개선 효과가 미미하므로 배제하는 것이 적절하다고 판단됨.
- 따라서 최종제품은 미생물배양액 100%로 결정하였으며, 생산원가는 1,205 원/kg에서 500 원/kg으로 약 60% 정도 감소하여 원가절감 효과를 나타냄.

4. 최종 제품 시험

가. 최종 제품의 진딧물 살충 효과

(1) 연구목적

- 최종 제품의 진딧물 살충 효과 검정 및 살충 효과 개선방안 모색

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시작물: 고추

- ② 공시약제: 최종 제품(SM, *B. subtilis* 2.5×10^6 cfu/mL), 추출물(Essential oil, 식물추출물, 님추출물)

(나) 시험방법

- ① 최종 제품의 진딧물 살충 효과 시험
- 최종 제품을 증류수로 250배, 500배 및 1,000배로 희석함.
 - 최종 제품의 진딧물 살충 효과는 “제 1절 1의 가”시험과 동일하게 수행함.

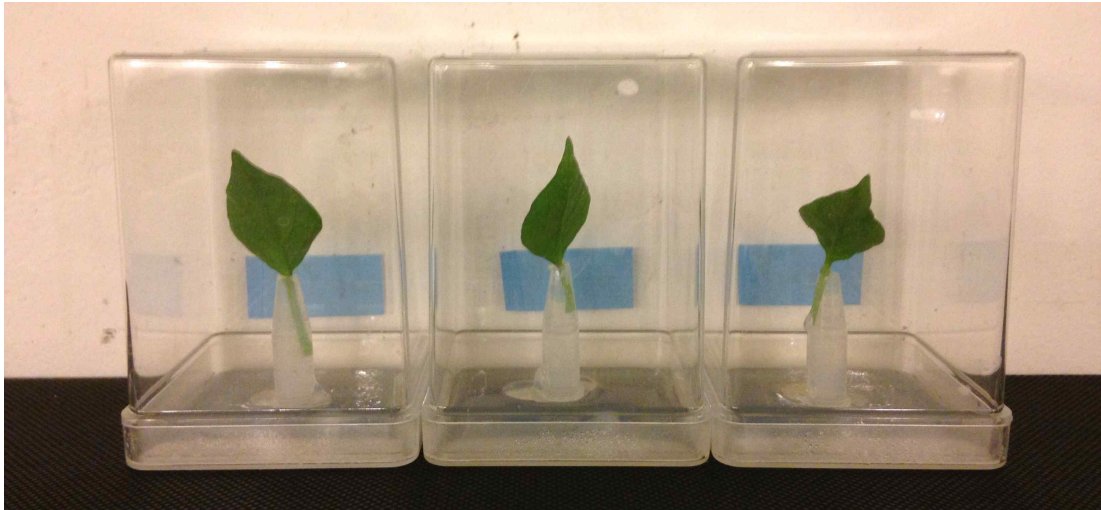


그림 17. 최종 제품의 진딧물 살충 시험(좌측부터 250 배, 500배, 1,000배 처리).

② 최종 제품의 진딧물 살충 효과 개선 시험

- 최종 제품을 추출물이나 기타 계면활성제와 혼용 시 진딧물의 살충 효과를 개선하기 위해 최종 제품에 추출물 및 계면활성제를 첨가 후 혼합하여 살충 효과를 조사함.

(3) 결과

(가) 최종 제품의 진딧물 살충 효과 시험

- 최종 제품의 진딧물 살충 효과는 38~72%의 범위로 나타났고, 유기농업자재의 효과 인정범위인 50% 이상의 살충 효과를 나타내는 희석배수는 500배로 나타남(그림 17).
- 최종 제품의 500배 희석액 처리 시 진딧물 살충 효과는 약 61%로 배추에서의 시험(약 63%)과 유사함(그림 11, 그림 17).

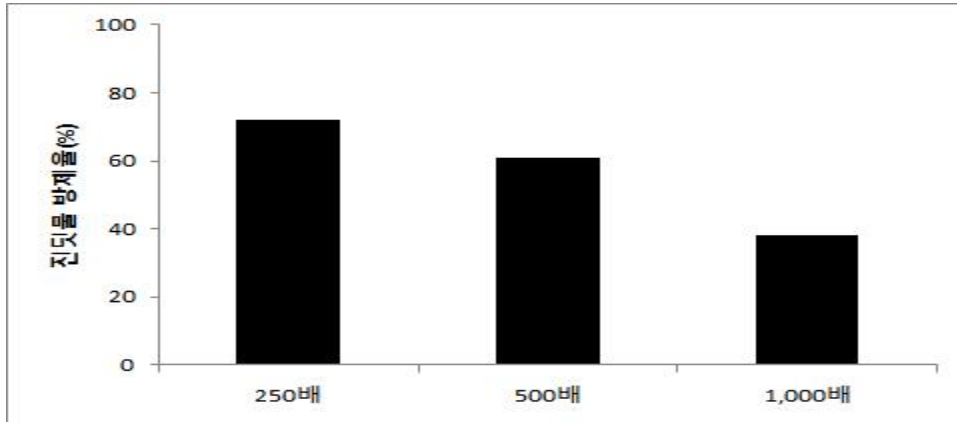


그림 18. 최종 제품의 진딧물 살충 시험.

(나) 최종 제품의 진딧물 살충 효과 개선 시험

- 3종의 추출물과 혼용하여 진딧물의 살충 효과를 조사한 결과, essential oil 처리구, 식물추출물 처리구, 님추출물 처리구에서 각각 40~81%, 42~68%, 35~73%의 범위로 나타남(그림 18).
- 모든 처리구에서 유기농업자재의 살충 효과 기준인 50% 이상의 살충 효과를 나타내는 최소 희석배수는 500배로 나타남.
- 500배 희석액 처리구에서 최종 제품 처리구와 비교할 때, essential oil 처리구의 살충 효과는 약 10% 정도 개선되었고, 식물추출물과 님추출물의 살충 효과는 최종 제품과 비슷하였음.

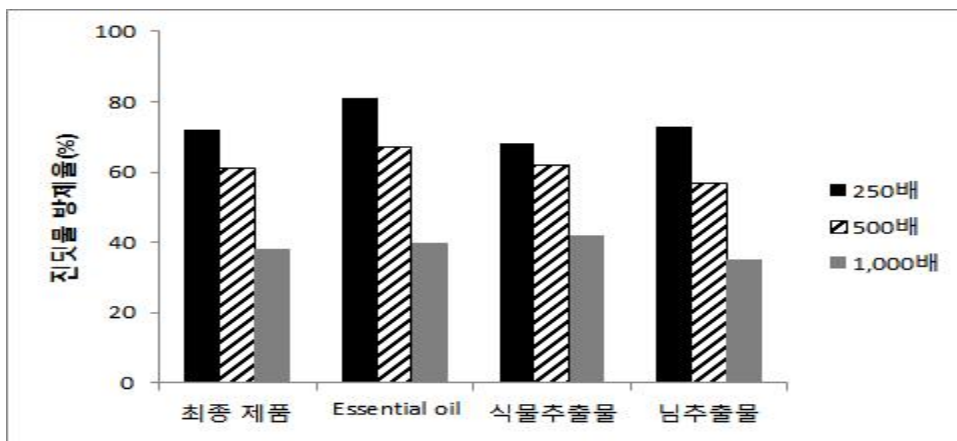


그림 19. 최종 제품의 진딧물 살충 개선 시험.

(4) 결론

- 최종 제품의 진딧물 살충 효과는 38~72%의 범위로 나타났고, 50% 이상의 살충 효과를 나타내는 희석배수는 500배였음.
- 최종 제품과 3종의 추출물을 혼용 처리에 따른 진딧물 살충 효과는 추출물 중 essential oil 처리구에서 개선효과를 나타냄.

나. 최종 제품의 작물 재배 시험

(1) 연구목적

- 최종 제품 처리에 의한 작물의 생육 평가

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 약제: 최종 제품(SM, *B. subtilis* 2.5×10⁶ cfu/mL)
- ② 공시 작물: 상추(*Lactuca sativa*, 국화과), 배추(*Brassica rapa*, 십자화과)
- ③ 공시 토양: 원예용상토
- ④ 공시 비료: 유기질비료(혼합유박비료, 질소-인산-칼리=4-2-1)

(나) 시험방법

- ① 재배이력: 파종(2017. 12. 1), 시비(2018. 12. 29), 정식(2018. 1.12), 수확(2018. 3. 9)
- ② 처리구 면적 및 배치: 4 inch 육묘용 포트, 완전임의배치법(3반복)
- ③ 처리구 설정

표 16. 처리구별 시비방법

처리구	유기질비료 시비량(kg/10a)	미생물 배양액 (L/10a)
무처리	-	-
대조구	250	-
최종 제품 1,000배	250	1
최종 제품 500배	250	2
최종 제품 250배	250	4

④ 조사내용 및 통계분석

- 작물 생육 조사 내용: 엽록소, 엽수, 엽폭, 엽장, 생물중, 건물중
- 통계분석: 처리구의 평균비교는 SPSS 12.01.1.을 이용하여 던컨다중검정을 통해 처리구간 유의차를 검정함.

(3) 결과

(가) 상추 생육 시험 결과

- 무처리구와 비교할 때, 대조구와 최종 제품 처리구는 엽록소, 엽수, 엽장, 엽폭, 생물중은 비슷하였고, 건물중은 대조구와 최종 제품 처리구에서 증가함(표 17).
- 대조구와 최종 제품 처리구를 비교할 때, 최종 제품 1,000배 처리구와 최종 제품 250배 처리구는 대조구와 차이를 나타내지 않았고, 최종 제품 500배 처리구의 엽록소, 엽수, 엽장, 엽폭 및 생물중은 통계적 유의차가 없었고, 건물중은 증가함.
- 최종 제품 처리량 별 상추 생육을 조사한 결과, 처리량이나 농도에 따른 생육장해현상은 나타나지 않음(그림 19).

- 상기 결과를 종합할 때, 최종 제품 처리구의 상추 생육은 대조구와 큰 차이를 보이지 않았으나 최종 제품 500배 처리구에서 건물중이 증가함.

표 17. 최종 제품 처리에 따른 상추의 생육

처리구	엽록소	엽수	엽장	엽폭	생물중	건물중
	($\mu\text{g}/100\text{cm}^2$)	(ea/plant)	(cm)		(g/plant)	
무처리	2.78a ¹⁾	23.0ab	12.6a	9.4a	47.4b	5.30d
대조구	2.79a	23.8ab	13.2a	9.5a	50.8ab	5.60bc
최종 제품 1,000배	2.67a	22.5b	13.1a	9.2a	49.1b	5.46c
최종 제품 500배	2.72a	24.2a	13.2a	9.4a	51.9ab	5.90a
최종 제품 250배	2.74a	24.3a	13.2a	9.9a	54.6a	5.68b

¹⁾ 던컨다중검정($P < 0.05$)



그림 20. 최종 제품 처리에 따른 상추의 생육. (좌) 정식 후, (우) 수확 전

(나) 배추 생육 시험 결과

- 무처리구와 비교할 때, 대조구와 최종 제품 처리구는 엽록소와 엽수에서 통계적 유의차를 나타내지 않았고, 엽장, 엽폭, 생물중 및 건물중에서 대조구와 최종 제품 처리구에서 증가함(표 18).
- 대조구와 최종 제품 처리구를 비교할 때, 최종 제품 처리구는 대조구와 통계적 유의차를 나타내지 않고 비슷함.
- 미생물 배양액 처리량 별 배추 생육을 조사한 결과, 미생물 배양액 처리 농도에 따른 생육장애현상은 나타나지 않음(그림 20).
- 상기 결과를 종합할 때, 배추의 생육에 차이를 보이지 않아 배추의 생육에 영향을 미치지 않는 것으로 판단됨.

표 18. 최종 제품 처리에 따른 배추의 생육

처리구	엽록소	엽수	엽장	엽폭	생물중	건물중
	($\mu\text{g}/100\text{cm}^2$)	(ea/plant)	(cm)		(g/plant)	
무처리	3.27a ¹⁾	26.3a	14.5b	9.1b	53.6b	8.09b
대조구	3.53a	28.0a	16.1a	10.0a	63.9a	9.42a
최종 제품 1,000배	3.39a	28.2a	15.8a	10.0a	62.5ab	9.29a
최종 제품 500배	3.28a	26.7a	15.7a	9.9a	60.3ab	9.12a
최종 제품 250배	3.25a	26.3a	15.8a	9.4ab	59.4ab	9.31a

¹⁾ 토크다중검정($P < 0.05$)



그림 21. 최종 제품 처리에 따른 배추의 생육. (좌) 정식 후, (우) 수확 전

(4) 결론

- 최종 제품을 처리하여 상추와 배추의 생육시험을 통해 특성을 조사한 결과, 처리 후 작물의 생육증대효과는 확인할 수 없었음.
- 최종 제품 처리 시 처리량별 상추와 배추의 생육장애현상은 나타나지 않음.

제 2절 최종 제품의 약효 및 약해 시험

1. 최종 제품의 약효시험

가. 연구목적

- 최종 제품의 처리에 따른 약효 시험 수행(자체시험)

나. 재료 및 방법

(1) 공시재료

(가) 공시식물: 복숭아

(나) 공시약제: 최종 제품(SM, *B. subtilis* 2.5×10⁶ cfu/mL)

(2) 시험방법

(가) 시험기간: 2017년 5~6월

(나) 시험장소

: 세종시 연서면 국촌리 복숭아농가(그림 21)

(다) 처리구면적 및 배치

: 10 m² (3.3 m × 3 m), 난괴법 (3반복)

(라) 처리구 설정



그림 22. 약효시험 지역
(세종시 연서면 국촌리).

표 19. 약효시험 처리구별 약제 처리방법

처리구	약제처리량(L/10a)	약제처리시기	비고
무처리구	-		
대조구(이미다클로프리트)	0.5	5/29, 6/5, 6/12	대조약제
최종 제품 처리구(500배)	2.0		최종 제품

- 약제의 처리는 휴대용 고압 분무기를 이용하여 처리함(그림 22).
- 복숭아의 관리는 일반관리에 준하며, 시험기간에는 살충제를 처리하지 않음.
- 복숭아 반복 당 진딧물은 50~70 마리정도로 시험에 적절하였음.

(마) 조사내용

- 진딧물 발생 및 약효 조사: 처리구별 약제 처리 종료(3회 처리, 주 1회) 후 1주 경과 일에 각 처리구별 진딧물 발생을 조사함.

(바) 약효 시험 기준: 농촌진흥청의 “농약의 등록기준”에 준하여 시험을 진행함.



그림 23. 처리구별 약제 처리.

다. 결과

(1) 약효 시험 결과

- 약제 처리 7일후 진딧물 밀도를 조사하여 진딧물 방제율을 조사함(표 20, 그림 23).
- 약제 1회 처리 후 1차 조사에서 대조구(대조약제처리구, 이미다클리프리트)와 최종 제품 처리구는 각각 90%와 21%의 방제율을 나타내었고,
- 약제 2회 처리 후에는 각각 89%와 25%를, 3회 처리 후에는 92%와 27%의 진딧물 방제효과를 나타냄(그림 23).

표 20. 약제 처리 후 시기별 진딧물 밀도 변화 효과

처리구	약제 처리 전	1주차 (6/5)	2주차 (6/12)	3주차 (6/19)	비고
무처리구	68a	72a	64a	52a	3회처리 5/29, 6/5, 6/12
대조구(이미다클로프리트)	52a	7c	7c	4c	
최종 제품 처리구(500배)	71a	57b	48b	38b	

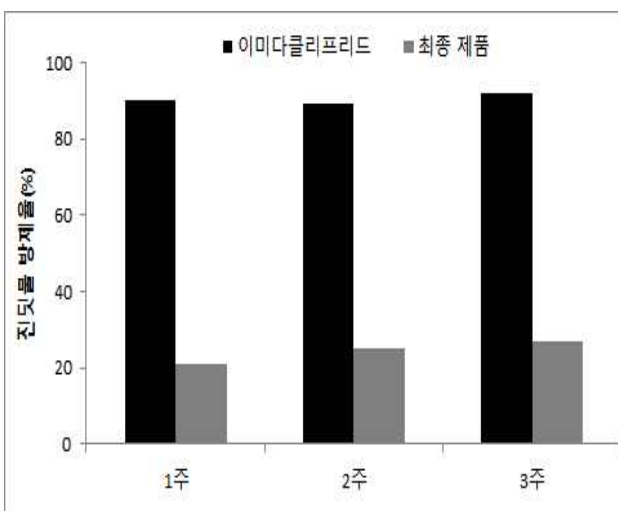


그림 24. 처리시기별 진딧물 방제율 변화.

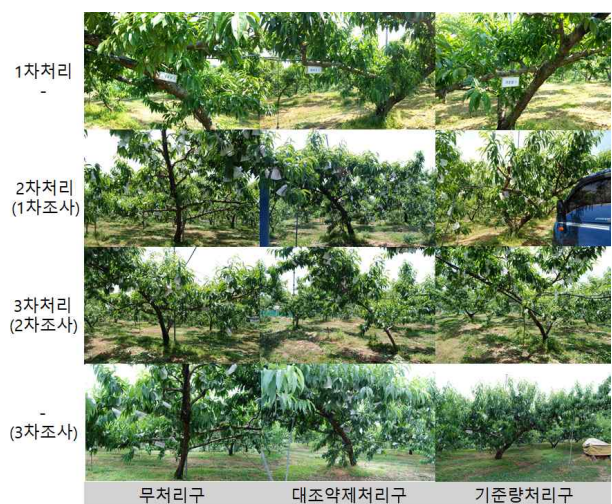


그림 25. 처리시기별 복숭아 나무의 생육.

(2) 최종 제품의 약효 평가

- 최종 제품 처리 후 무처리구에 비해 진딧물 개체수가 감소하였으나 진딧물 방제율은 21~27% 정도로 조사되어 유기농업자재의 약효 인정 기준(50%)에는 도달하지 못함.

라. 결론

- 약제처리 후 대조약제처리구의 방제율은 89~92% 정도로 조사되었고, 최종 제품의 진딧물 방제율은 21~27% 정도로 조사됨.
- 최종 제품의 진딧물 방제율은 유기농업자재의 약효 인정 기준에 도달하지 못함.

2. 최종 제품의 약해시험

가. 연구목적

- 최종 제품의 처리에 따른 약해 시험 수행 (자체시험)

나. 재료 및 방법

(1) 공시재료

- (가) 공시식물: 복숭아
- (나) 공시약제: 최종 제품(SM, *B. subtilis* 2.5×10⁶ cfu/mL)

(2) 시험방법

- (가) 시험기간: 2017년 5~6월
- (나) 시험장소: 세종시 연서면 국촌리 복숭아농가
- (다) 처리구면적 및 배치: 10 m² (3.3 m × 3 m), 난괴법 (3반복)
- (라) 처리구 설정

표 21. 약해시험 처리구별 약제 처리방법

처리구	약제처리량(L/10a)	약제처리시기	비고
무처리구	-		
최종 제품 처리구(500배)	2.0	5/29, 6/5, 6/12	최종 제품
최종 제품 처리구(1,000배)	4.0		

(마) 조사내용

- 약해 조사: 처리구별 약제 처리 종료(3회 처리, 주 1회) 후 1주 경과일에 각 처리구 별 잎의 생리 장애 여부 조사

(바) 약효 시험 기준: 농촌진흥청의 “농약의 등록기준”에 준하여 시험을 진행함.

다. 결과

(1) 약효 시험 결과

- 주별 복숭아 나무의 변화에서 복숭아 나무의 생육에 영향을 주지 않음(그림 28).
- 주별 약제 처리 후 복숭아 잎에서 약해 약해는 발생하지 않음(그림 25, 26, 27).

(2) 최종 제품의 약효 평가

○ 최종 제품 3회 처리 후 시험 복숭아에서 약해가 전혀 발생하지 않아 안전한 것으로 판단됨.



무처리구 기준량처리구 배량처리구

그림 26. 약제 1회 처리 후 복숭아 잎에서 약해 조사.



무처리구 기준량처리구 배량처리구

그림 27. 약제 2회 처리 후 복숭아 잎에서 약해 조사.



무처리구 기준량처리구 배량처리구

그림 28. 약제 3회 처리 후 복숭아 잎에서 약해 조사.

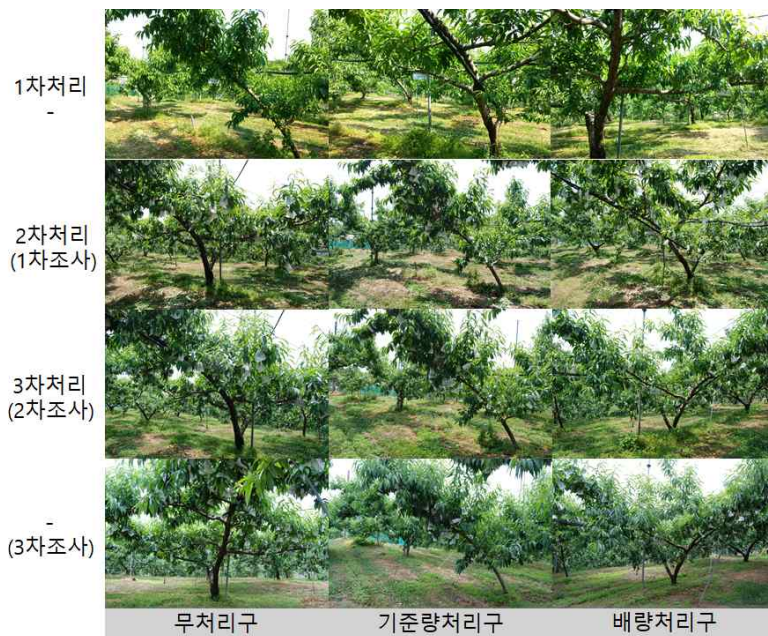


그림 29. 약제 처리 시기별 복숭아 나무의 생육 및 약해 조사.

3. 최종 제품의 약효·약해 등록 시험

가. 연구목적

○ 최종 제품(상품명을 “진자바”라 정함)의 처리에 따른 약효·약해 시험 수행

나. 재료 및 방법

○ 복숭아의 복숭아혹진딧물 약효·약해시험은 “테크노그린부설연구소”에 의뢰하여 수행함.

다. 결과

○ 결과는 테크노그린부설연구소 약효·약해시험 보고서로 제시함.

4. 시험성적

가. 약효실험

○ 복숭아 복숭아혹진딧물에 대한 약제방제 효과(약제처리 후 3일차)

시 험 약 제	약제처리 진밀도 (마리/구)	생충률(%)				유의차 (DMRT)	방제가(%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균		
미생물추출물 액제 (제품명: 진자바)	222.7	94.2	78.8	88.4	87.1	b	21.7
무 처 리	219.3	121.0	101.4	111.1	111.2	a	-

C.V.(%)----- 8.9

○ 복숭아 복숭아혹진딧물에 대한 약제방제 효과(약제처리 후 7일차)

시 험 약 제	약제처리 진밀도 (마리/구)	생충률(%)				유의차 (DMRT)	방제가(%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균		
미생물추출물 액제 (제품명: 진자바)	222.7	122.7	96.7	110.6	110.0	b	22.5
무 처 리	219.3	153.3	131.1	141.5	142.0	a	-

C.V.(%)----- 9.6

복숭아 복숭아혹진딧물
약제방제 효과시험 결과보고서

나. 약해시험

시 험 약 제	시험작물 (품종)	약해정도 (0~5)		약해증상
		기준량	배량	
미생물추출물 액제 (제품명: 진자바)	복숭아 (대필)	0	0	약해없음

(주)테크노그린부설연구소

5.결과요약

가. 약효

○ 시험약제는 무처리와 비교하여 유의성이 있는 방제효과를 나타내었으나, 실제 복숭아 복숭아혹진딧물을 방제하기 위한 유기농업자제로는 실용성이 없는 것으로 판단됨.

나. 약해

○ 시험약제는 기준량, 배량에서 약해 없음.

4. 최종 제품의 유기농업자재 등록용 약해 시험

가. 연구목적

- 최종 제품(상품명 “진자바”라 정함)의 처리에 따른 약해 시험 수행

나. 재료 및 방법

- 유기농업자재 등록용 약해 시험은 “한국생물안전성연구소”에 의뢰하여 수행함.

다. 결과

- 결과는 한국생물안전성연구소 약해시험 보고서로 제시함.

- 고추약해시험



T.N: PT1710-01

4. 시험성적(약제처리 3, 5, 7일 후)

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도(0~5)		비고
		기준량	배량	
진자바	고추 (독야청성)	0	0	약해없음

5. 결과요약

- 진자바의 고추에 대한 약해시험 결과 기준량 및 배량에서 외관상 나타난 약해증상은 없었음.

- 배추약해시험



T.N: PT1710-01

4. 시험성적(약제처리 3, 5, 7일 후)

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도(0~5)		비고
		기준량	배량	
진자바	배추 (CR장담이)	0	0	약해없음

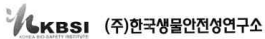
5. 결과요약

- 진자바의 배추에 대한 약해시험 결과 기준량 및 배량에서 외관상 나타난 약해증상은 없었음.

- 상추약해시험

T.N: PT1710-01

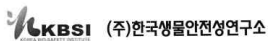
진자바 상추 약해시험
결과보고서



- 오이약해시험

T.N: PT1710-01

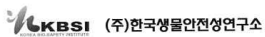
진자바 오이 약해시험
결과보고서



- 콩약해시험

T.N: PT1710-01

진자바 콩 약해시험
결과보고서



T.N: PT1710-01

4. 시험성적(약제처리 3, 5, 7일 후)

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도(0~5)		비고
		기준량	배량	
진자바	상추 (선동2호)	0	0	약해없음

5. 결과요약

진자바의 상추에 대한 약해시험 결과 기준량 및 배량에서 외관상 나타난 약해증상은 없었음.

6. 시험담당자 의견

진자바는 상추에 대하여 기준량 및 배량에서 약해가 없어 유기농업자재도 실용성이 있을 것으로 판단됨.

T.N: PT1710-01

4. 시험성적(약제처리 3, 5, 7일 후)

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도(0~5)		비고
		기준량	배량	
진자바	오이 (태박자)	0	0	약해없음

5. 결과요약

진자바의 오이에 대한 약해시험 결과 기준량 및 배량에서 외관상 나타난 약해증상은 없었음.

6. 시험담당자 의견

진자바는 오이에 대하여 기준량 및 배량에서 약해가 없어 유기농업자재도 실용성이 있을 것으로 판단됨.

T.N: PT1710-01

4. 시험성적(약제처리 3, 5, 7일 후)

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도(0~5)		비고
		기준량	배량	
진자바	콩 (대원콩)	0	0	약해없음

5. 결과요약

진자바의 콩에 대한 약해시험 결과 기준량 및 배량에서 외관상 나타난 약해증상은 없었음.

6. 시험담당자 의견

진자바는 콩에 대하여 기준량 및 배량에서 약해가 없어 유기농업자재도 실용성이 있을 것으로 판단됨.

제 3절 최종 제품의 위해성 평가

1. 최종 제품의 인축독성 평가

가. 피부자극성자극

(1) 연구목적

○ 최종 제품(상품명: “진자바”)의 처리에 따른 피부자극성시험 수행

(2) 재료 및 방법

○ 유기농업자재 등록용 피부자극성시험은 “한국생물안전성연구소”에 의뢰하여 수행함.

(3) 결과


○ 결과는 한국생물안전성연구소 피부자극성시험 보고서로 제시함.

Study No. : ETD-17030 Final Report

최종보고서

New Zealand White계 토끼에 대한 진자바의
피부자극성시험

ETD-17030

 (주) 한국생물안전성연구소

KBSI

KBSI

1 page of 17

Study No. : ETD-17030 Final Report

5. 시험결과 [Results]

5.1. 일반중독증상 및 치사동물 수 (Table 1)

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

5.2. 체중변화 (Table 2)

시험물질 처리직전, 처리 후 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 피부반응평가를 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 진자바는 New Zealand White계 토끼의 피부에 처리 시 자극성이 없는 물질로 구분되었다.

나. 안점막자극성시험

(1) 연구목적

- 최종 제품(상품명: “진자바”)의 처리에 따른 안점막자극성시험 수행

(2) 재료 및 방법

- 유기농업자재 등록용 안점막자극성시험은 “한국생물안전성연구소”에 의뢰하여 수행함.

(3) 결과

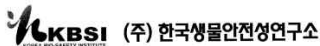
- 결과는 한국생물안전성연구소 안점막자극성시험 보고서로 제시함.

Study No.: ETE-17029 Final Report

최종보고서

New Zealand White계 토끼에 대한 진자바의 안점막자극성시험

ETE-17029



KBSI

KBSI

1 page of 18

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.I는 “0.0”이었다. 이상의 시험결과, New Zealand White계 토끼에 대한 진자바의 안점막자극성시험에서 자극성은 [안점막자극표]에 의거 “없음”으로 구분되었다.

5. 시험결과 [Results]

5.1. 일반중독증상 및 치사동물 수 (Table 1.)

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

5.2. 체중변화 (Table 2.)

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

5.3. 안반응의 평가 (Table 3.)

[표 5. 시험군별 안자극지수]

Time	Animal. No.	Non-treatment			Treatment				
		IOI ^a	M.O.I ^b	A.O.I ^c	IOI ^a	M.O.I ^b	A.O.I ^c		
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		0.0	
	2	0			0				
	3	0			0				
48 hr	1	0	0		0	0.0			0.0
	2	0			0				
	3	0			0				
72 hr	1	0	0	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.

다. 급성경구독성시험

(1) 연구목적

- 최종 제품(상품명: “진자바”)의 처리에 따른 급성경구독성시험 수행

(2) 재료 및 방법

- 유기농업자재 등록용 급성경구독성시험은 “한국생물안전성연구소”에 의뢰하여 수행함.

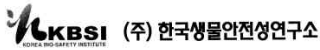
(3) 결과

- 결과는 한국생물안전성연구소 급성경구독성시험 보고서로 제시함.

최종보고서

랫드에 대한 진자바의 급성경구독성시험

ETO-17037



5. 시험결과 [Results]

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

진자바는 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 CO₂ gas로 마취시켜 주요 장기에 대한 육안적 관찰을 실시한 결과 약제투여에 의한 특이한 이상증상은 관찰되지 않았다.

5.4. 반수치사약량 (LD₅₀)

랫드에 대한 진자바의 급성경구독성시험 결과, 농약관리법 시행규칙 [별표 3의5] 농약 등의 독성 및 잔류성정도별 구분에 의거 IV급 (저독성)으로 구분되었다.

라. 급성경피독성시험

(1) 연구목적

○ 최종 제품(상품명: “진자바”)의 처리에 따른 급성경피독성시험 수행

(2) 재료 및 방법

○ 유기농업자재 등록용 급성경피독성시험은 “한국생물안전성연구소”에 의뢰하여 수행함.

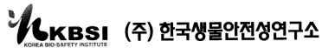
(3) 결과

○ 결과는 한국생물안전성연구소 급성경피독성시험 보고서로 제시함.

최종보고서

랫드에 대한 진자바의 급성경피독성시험

ETP-17032



5. 시험결과 [Results]

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

진자바를 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 (LD50)

랫드에 대한 진자바의 급성경피독성시험 시험 결과, LD50값은 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.

2. 최종 제품의 환경독성평가

가. 꿀벌독성(꿀벌에 대한 급성접촉독성시험) 평가

(1) 연구목적

- 최종 제품(상품명: “진자바”)의 처리에 따른 꿀벌에 대한 급성접촉독성시험 수행

(2) 재료 및 방법

- 유기농업자재 등록용 꿀벌에 대한 급성접촉독성시험은 “한국생물안전성연구소”에 의뢰하여 수행함.

(3) 결과


- 결과는 한국생물안전성연구소 꿀벌에 대한 급성접촉독성시험 보고서로 제시함.

Study No. : ETBC-18001 Final Report

최종보고서

진자바의 꿀벌 (*Apis mellifera*)에 대한 급성접촉독성시험

ETBC-18001

 (주)한국생물안전성연구소

KBSI

1 page of 16

5. 시험결과 [Results]

5.1 시험환경 조건

시험기간 동안 꿀벌실험실의 실내온도는 평균 25.4°C (25.1~26.0°C), 상대습도는 평균 56.8% (51.0~64.0%)로 측정되었다 (Appendix 2).

5.2 치사개체 및 중독증상

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

시험물질 처리군에서는 48시간 관찰 시, 2마리의 치사 개체가 관찰되었고, 이 외에 중독증상을 보인 개체는 관찰되지 않았다 (Table 1, 2).

5.3 급성접촉독성시험 결과

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

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

a: Based on nominal dose of main ingredient input ratio

나. 어독성(담수어류에 대한 급성독성시험) 평가

(1) 연구목적

○ 최종 제품(상품명: “진자바”)의 처리에 따른 담수어류에 대한 급성독성시험 수행

(2) 재료 및 방법

○ 유기농업자재 등록용 담수어류에 대한 급성독성시험은 “한국생물안전성연구소”에 의뢰하여 수행함.

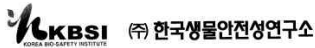
(3) 결과

○ 결과는 한국생물안전성연구소 담수어류에 대한 급성독성시험 보고서로 제시함.

최종보고서

진자바의 담수어류 (잉어, *Cyprinus carpio*)에 대한 급성독성시험

ETF-17068



5. 시험결과 [Results]

5.1 치사개체 및 이상증상

노출기간 96시간동안, 음성대조군 및 시험물질 처리군인 10.0 mg/L 농도군에서 치사 및 어떠한 중독증상도 관찰되지 않았다 (Table 1, 2).

5.2 시험환경조건

시험기간 동안 수온은 평균 21.7°C (21.5~21.9°C), pH는 평균 7.63 (7.33~7.81), 용존산소농도는 포화용존산소량 대비 평균 88.9% (76.9~95.6%)로 측정되었다. 또한, 사용한 시험용수의 경도는 72 mg CaCO₃/L로 측정되었다 (Table 3~6).

5.3 전장 및 체중

노출종료 후 음성대조군과 시험물질 처리군 시험어의 전장 및 체중을 측정한 결과, 전장은 평균 3.90 cm (3.44~4.38 cm), 체중은 평균 0.90 g (0.64~1.22 g)으로 측정되었다 (Table 7, 8).

5.4 급성독성시험결과

진자바의 담수어류 (잉어, *Cyprinus carpio*)에 대한 48, 96시간 반수치사농도 (LC₅₀)는 모두 10.0 mg/L 이상이었고, 무영향농도 (NOEC)는 모두 10.0 mg/L이었다. 이 결과는 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 Ⅲ급^{*)}으로 분류되었다.

- 어류에 대한 독성정도에 따른 농약 등의 구분

구 분	반수를 죽일 수 있는 농도 (mg/L, 48시간)
I급	0.5 미만
II급	0.5 이상 2 미만
III급	2 이상

3. 최종 제품의 병원성평가

(1) 연구목적

○ 최종 제품(상품명: “진자바”)의 처리에 따른 병원성미생물(5종) 시험 수행

(2) 재료 및 방법

○ 유기농업자재 등록용 병원성미생물(5종)의 검사는 “목원대학교 미생물생태자원연구소”에 의뢰하여 수행함.

(3) 결과

○ 결과는 목원대학교 미생물생태자원연구소의 병원성미생물 검사보고서로 제시함.

관리번호 제18-063호



시험성적서				
신청인	성명	박대현	소속기관	효성오앤비㈜
	주소	충청남도 아산시 신동 279-10		
	전화	042-624-7613	FAX	042-624-4068
공시품	명칭	진자바		
	형태	액상		
시험방법	병원성미생물(5종)의 검사			
용도	관공제 추출물			
시험책임자	전인화	서명일자	2018. 04. 27	
병원성미생물 시험결과				
병원성 대장균				불검출
병원성 살모넬라				불검출
황색포도상구균				불검출
리스테리아 모노사이토제네스				불검출
바실러스 세레우스				불검출
2018년 5월 9일				
농촌진흥청지정 비료·유기농업자재 시험연구기관				
목원대학교 미생물생태자원연구소				
<p>※ 본 시험성적서의 내용은 신청인이 의뢰한 시료에 대한 시험 결과로서 용도이외의 목적으로 사용함에 따라 발생되는 모든 사항에 대해서, 당 연구소는 그 어떠한 법적책임을 지지 않습니다.</p>				

제 4절 최종 제품의 생산

1. 최종 제품의 등록 및 사용방법 가. 유기농업자재 신청 및 등록

■ 농림축산검역본부 수산물안전관리과 육상 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 사항규칙 (별지 제49조제1항) 제217, 6, 2조

유기농업자재 공시 신청서

※ 신청서 작성방법 및 신청서 작성 시 유의사항은 별첨 하신다. (별첨 1, 2, 3) 또는 해당사항에 따라 신청서 작성한다.

신청번호: [입력] | 접수일자: [입력] | 처리기간: 3개월

신청인: [입력] | 대표자 성명: [입력] | 연락처: [입력]

주소: [입력] | 신청인 연락처: [입력]

소재지: [입력] | 소재지: [입력]

신청내용: [입력]

신청일: 2018년 08월 08일

공시기관의 장: [인도]

첨부서류: 1. 국내 생산 원재료명 및 함량(%) 2. 국내 생산 원재료명 및 함량(%) 3. 사용 원재료명 및 함량(%)

■ 농림축산검역본부 수산물안전관리과 육상 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 사항규칙 (별지 제49조제1항)

유기농업자재 공시서

공시번호: 제 공시-2018-194 호

1. 업체명: 효성오앤비(주) 2. 대표자 성명: 박태원, 김방석, 박문현

3. 주소(사업장): 충청남도 아산시 온천대로 1785

4. 자재의 명칭: 미생물추출물

5. 자재의 구분: 총해관리용

6. 상표명: 진자바

7. 주성분(원료)의 종류 및 함량(%)
- 주성분의 종류 및 함량: Surfactin
- 원료의 종류 및 함량: 미생물추출물 100%

8. 유효기간: 2018. 08. 08. ~ 2021. 08. 07.

9. 제조장 주소 또는 수입원(산지(국가, 제조사)): 대전광역시 유성구 유성대로1590번길 46

10. 최초 공고일: 2018. 08. 08.

11. 최초 공시기관: 강원대학교 산학협력단

신청인: 박태원, 김방석, 박문현

2018년 08월 08일

강원대학교 산학협력단장

유기농업자재 공시 사항

○ 포장개장 및 직물영역

연월일	제품대상 (직물영역)	사용시기	사용량	처리방법	비표준품 사용	품질보증률 투입비율	비고

○ 병폐종관리

연월일	제품대상 (직물영역)	병폐종	사용시기 (포장)	사용량	처리방법	종자 증식사양	품질보증률 투입비율	비고
2018 08 08	상추	상추파	500g/병	경매처리	-	미생물추출물 100%	-	

※ 직물 영역용, 종자용, 포장 표시 공시공인 경우에만 해당함이다.

나. 최종 제품의 사용방법 및 보관상 주의사항

- 1) 제품보관 중 내용물이 가라앉아도 효과에는 아무 지장이 없으니, 사용 전 제품을 흔들어 사용해 주십시오.
- 2) 살포 시에 약제가 잎의 앞, 뒷면에 골고루 묻도록 살포하십시오.
- 3) 살포 시에는 보안경, 방제복, 마스크, 고무장갑을 착용하고 눈에 들어가지 않도록 주의하여 바람을 등지고 뿌리시되 작업 후에는 입안을 물로 헹구고 손, 발, 얼굴, 등을 비눗물로 깨끗이 씻으십시오.
- 4) 눈에 들어갔을 경우에는 즉시 다량의 물로 씻고 의사의 진료를 받으십시오.
- 5) 제품보관은 서늘하고 건조한 곳에 보관하시는 것이 좋습니다.
- 6) 어린이 손에 닿지 않게 하시고 절대 음용하지 마십시오.

2. 최종 제품의 제품생산공정

가. 미생물의 기술 이전

- 최종 제품 진자바의 유효성분(surfactin)을 생산하는 미생물인 *B. subtilis* Y9의 배양 기술에 대해 전남대학교로부터 기술 이전 받음.

기술이전계약서

■ 계약명: "Bacillus subtilis Y9의 산물인 surfactin 생산을 위한 배양 기술(노하우)"

2018년 2월 1일

계약당사자

기공세종사* 주소: 광주광역시 북구 봉곡로 77 기관: 전남대학교 산학협력단 대표: 단영 송 전 부 사업담당자: 010-802-11942	*실사대상* 주소: 충청남도 아산시 웅천대로 1785 상호: 효호생명과학 대표: 박 제 원 사업담당자: 312-81-03710
기술개발회사: 효호생명과학(주) 농약소재개발부 부서: 김 인 선	당사자: 이태은 대리 연락처: 042-867-8841

제1조(계약의 목적)

① "기공세종사"가 "실사대상"의 산물에 대한 기술 이전을 위한 기술 이전 계약 체결을 목적으로 본 계약을 체결하며, 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다.

제2조(계약의 내용)

본 계약의 내용은 "실사대상"의 산물인 surfactin의 생산을 위한 배양 기술(노하우)을 계약당사자 간에 공유, 개발, 활용하는 데 목적이 있다. 본 계약의 내용은 "실사대상"의 산물인 surfactin의 생산을 위한 배양 기술(노하우)을 계약당사자 간에 공유, 개발, 활용하는 데 목적이 있다. 본 계약의 내용은 "실사대상"의 산물인 surfactin의 생산을 위한 배양 기술(노하우)을 계약당사자 간에 공유, 개발, 활용하는 데 목적이 있다.

제3조(계약의 범위)

"기공세종사"와 "실사대상"은 본 계약의 범위 내에서 기술 이전을 위한 협력을 제공한다. 본 계약의 범위는 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 범위는 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 범위는 본 조항에 기재된 바와 같다.

본 계약의 기술 내용 및 세부조건

1 기술의 개요 및 세부내용

기술 개요

- 본 기술은 효호생명과학(주)에 대한 효호생명과학(주)의 surfactin을 미생물공학적으로 생산하기 위한 *Bacillus subtilis* Y9의 배양 기술에 관한 내용임.
- 본 기술은 "실사대상"의 산물인 surfactin의 생산을 위한 배양 기술(노하우)을 계약당사자 간에 공유, 개발, 활용하는 데 목적이 있다.
- 본 기술은 효호생명과학(주)에 대한 효호생명과학(주)의 surfactin을 미생물공학적으로 생산하기 위한 배양 기술(노하우)을 계약당사자 간에 공유, 개발, 활용하는 데 목적이 있다.

그림 1. 본 계약의 기술 내용은 surfactin의 생산을 위한 배양 기술(노하우)을 계약당사자 간에 공유, 개발, 활용하는 데 목적이 있다.

본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다.

제4조(계약의 범위)

본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다.

제5조(계약의 범위)

본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다.

제6조(계약의 범위)

본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다.

제7조(계약의 범위)

본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다.

제8조(계약의 범위)

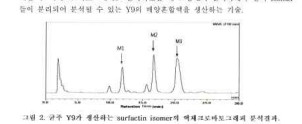
본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다.

제9조(계약의 범위)

본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다.

제10조(계약의 범위)

본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다. 본 계약의 목적은 본 조항에 기재된 바와 같다.



본 계약의 기술 관련 논문

① Yeng, S. Y., Lim, D. J., Nah, M. Y., Kim, J. C., Kim, Y. C., & Kim, I. S. (2017). Characterization of biomarkers from insecticidal metabolites produced by *Bacillus subtilis* Y9. *Entomological Research*, 47(1), 55-56.

기술이전의 범위 및 추진일정

기술이전 범위

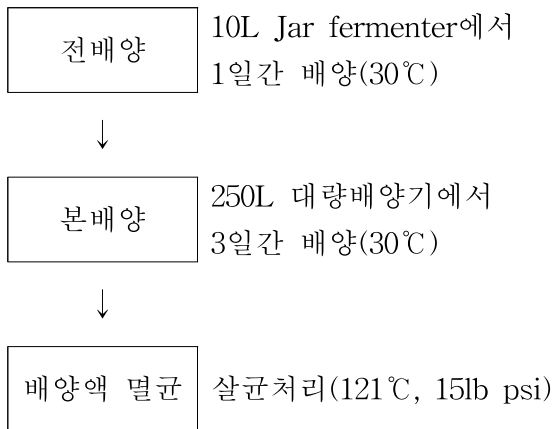
- Bacillus subtilis* Y9의 배양 기술
- Bacillus subtilis* Y9 배양 기술
- Bacillus subtilis* Y9 배양 기술
- Bacillus subtilis* Y9 배양 기술

기술이전 추진일정

- 1~2주: *Bacillus subtilis* Y9 배양 기술
- 3~4주: *Bacillus subtilis* Y9 배양 기술
- 5~7주: *Bacillus subtilis* Y9 배양 기술
- 8~10주: *Bacillus subtilis* Y9 배양 기술

나. 제품의 제조 공정

○ Surfactin 제조공정



○ 배지조성

전배양	Yeast extract	3.0 g	
	Malt extract	3.0 g	
	Peptone	5.0 g	/10L
	Glucose	10.0 g	
	D.W.	1 L	
본배양	Potato starch	30 g	
	Yeast extract	10 g	
	K ₂ HPO ₄	2.5 g	/150L
	NaCl	1.0 g	
	D.W.	1 L	

다. 제품의 품질 관리

(1) 연구목적


○ 최종 제품(상품명: “진자바”)의 유효성분인 Surfactin의 이화학성 분석

(2) 재료 및 방법

○ 유기농업자재 등록용 이화학성분분석을 통한 유효성분 분석은 “강원대학교 친환경농식품안전성센터”에 의뢰하여 수행함.

(3) 결과

○ 강원대학교 친환경농식품안전성센터에서 수행된 이화학적 분석성적서로 제시함.

발급번호 제 EFAF-18-0065-A-1 호						
이화학적 분석성적서						
분석년월일	2018. 02. 26	제조(수입)년월일 (Batch No.)	2018. 02. 03			
시험책임자	소속	의뢰자명		의뢰자명		
분석의뢰자	효성오앤비(주)					
품목명	진자바					
유효성분의 명칭 및 함유량	Surfactin					
분 석 결 과						
분석항목	분석회수	분석치(%)				분석방법
		Surfactin (C13)	Surfactin (C14)	Surfactin (C15)	Surfactin (C13+C14+C15)	
1. 유효성분	1	0.023	0.022	0.048	0.093	LC-MS/MS를 이용한 정량 분석
	2	0.026	0.022	0.047	0.095	
	3	0.022	0.022	0.050	0.094	
	평균치	0.024	0.022	0.048	0.094	
	표준편차	0.002	0.000	0.002	0.001	
2. 물리성	항목	검사결과				
	수화성	- 해당사항 없음 -				
	분말도	- 해당사항 없음 -				
3. 외관	성상	-	색상	-	냄새	-
4. 시험항목 (의뢰자 기재)						
첨부 자료 ○ 성적계산서 및 크로마토그램						
1) 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로써 전체제품에 대한 품질을 보증하지는 않음. 2) 본 성적서의 결과는 광고, 전단, 홍보 및 소송 등의 수단으로 사용하지 않습니다.						
2018년 03월 08일						
(주)친환경농식품안전성센터 						



3. 최종 제품의 시장성평가

가. Biocide의 시장성

- Markets and Markets에서 발간한 생물농약시장 보고서에 의하면 2001년 세계 농약시장의 약 2%인 5.8억 달러에 불과했던 생물농약시장의 가치는 성장률 17.4%를 보이며 지속적인 성장 추세에 있다. 2016년 33억 6000만 달러에 달했고 2022년이면 88억 2000만 달러에 이를 것으로 추산된다. 연구개발 비용이 화학농약에 비해 저렴한 것도 생물농약이 갖는 장점과 함께 기술 개발을 이끄는 주요인이 됨.

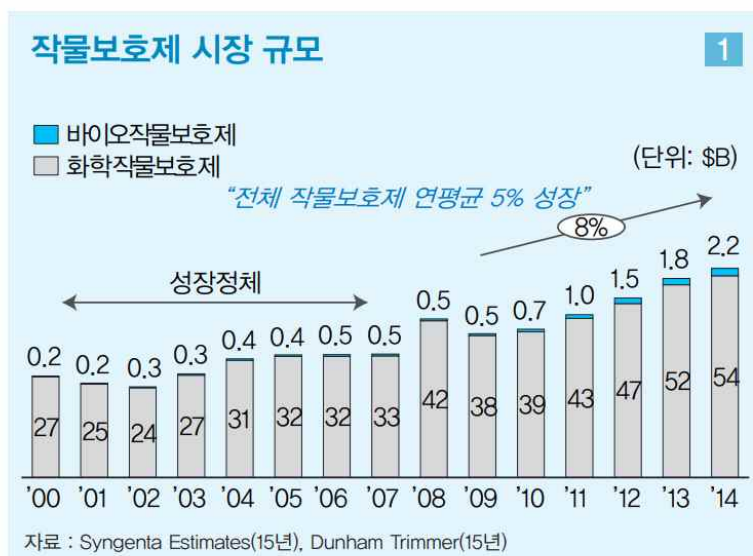


그림 29. 생물농약 세계시장규모.

출처 : LG 경제연구원(글로벌 농화학기업들이 바이오작물보호제에 주목하는 이유.정철웅)

- 생물농약에 대한 연구는 선진국을 중심으로 활발하게 진행 중이다. 농림수산식품교육문화정보원에 따르면 2013년 기준 관련 연구건수는 미국 266건(16%), 인도 136건(8%), 중국 123건(7%)으로 나타났다. 이에 반해 우리나라는 인도와 브라질, 독일, 스페인보다 낮은 54건(3%)의 실적을 보였으며, 증가하는 추세임.
- 미생물농약과 생화학농약 등록규정이 각각 2001년과 2005년에 정해졌으며, 현재까지 생물농약으로 살균제 21개와 살충제 13개 제초제 1개 등 총 35개 품목이 등록되어 시판되고 있음. 21개의 미생물 살균제 중에서 15개의 제품은 국내에서 개발되었고, 6개의 제품은 수입되었으며, 미생물 살충제의 경우에는 6개의 제품이 국내에서 개발되었고, 7개의 제품이 수입된 제품이면 1개의 제품은 생화학농약으로 등록되었음(그림 30)

(2014년 12월말 기준)

연번	용도	제조수입	취급분야	품목명	유효성분 함유량
1	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스디버비1501 수화제	1.0×10 ⁹ cfu/g
2	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스디버비1501 입제	1×10 ⁸ cfu/g
3	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스제이아-9 액상현탁제	1.0×10 ⁷ cfu/ml
4	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스영27 고상제	2×10 ⁸ cfu/g
5	살균	수입	미생물	바실루스서브틸리스영비아아1600 수화제	2×10 ¹¹ cfu/g
6	살균	수입	미생물	바실루스서브틸리스외아1336 수화제	1×10 ⁸ cfu/g
7	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스0더블유42-1 액상현탁제	1.0×10 ⁷ cfu/ml
8	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스제이케이케이238 액상제	5.0×10 ⁷ cfu/ml
9	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스지비365 수화제	3.0×10 ⁷ cfu/g
10	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스지비365 액상수화제	1.0×10 ⁷ cfu/ml
11	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스케이비401 유상현탁제	2.0×10 ⁷ cfu/ml
12	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스케이비사1010 수화제	1×10 ⁸ cfu/g
13	살균	수입	미생물	바실루스서브틸리스큐에스티713 수화제	5×10 ⁹ cfu/g
14	살균	수입	미생물	바실루스서브틸리스큐에스티713 액상수화제	1×10 ⁸ cfu/g
15	살균	제조	미생물	바실루스아밀로리쿠마시엔스케이비사1121 수화제	1×10 ⁸ cfu/g
16	살균	수입	미생물	바실루스푸밀루스큐에스티2808 액상수화제	1×10 ⁸ cfu/g
17	살균	제조	미생물	심플리살리올라펠리콜라비씨피 수화제	5.0×10 ⁷ cfu/g
18	살균	제조	미생물	암펠로미아세스퀴스퀼리에이큐94013 수화제	1.0×10 ⁷ cfu/g
19	살균	수입	미생물	트리코더마아트로버리이드에스케이타-1 수화제	1×10 ⁸ cfu/g
20	살균	제조	미생물	트리코더마하자이눔외이씨459 고상제	1×10 ⁸ cfu/g
21	살균	제조	미생물	패니바실루스폴리믹사메이사-1 액상수화제	5×10 ⁸ cfu/ml
22	살충	제조	미생물	모니크로스모톨타우미송케이비사307 고상제	1.0×10 ¹¹ cfu/g
23	살충	수입	미생물	류베리아비사아나자메이치에이 유상현탁제	1.0×10 ⁸ cfu/ml
24	살충	수입	미생물	류베리아비사아나자메이치아-1 액상제	1.0×10 ⁸ cfu/ml
25	살충	수입	미생물	비타이이지와이 액상수화제	8.5BU/kg
26	살충	수입	미생물	비타이이지와이 입상수화제	35,000DBU/mg
27	살충	제조	미생물	비타이이지와이엔타423 수화제	1×10 ⁹ cfu/g
28	살충	제조	미생물	비타이이지와이엔타423 액상수화제	1×10 ⁸ cfu/ml
29	살충	제조	미생물	비타이이지와이지비413 액상수화제	1×10 ⁷ cfu/ml
30	살충	제조	미생물	비티쿠르스타키 수화제	16BU/kg
31	살충	수입	미생물	비티쿠르스타키 액상수화제	10%
32	살충	수입	미생물	비티쿠르스타키 입상수화제	64BU/kg
33	살충	수입	생화학	아자디락틴 입제	0.15%
34	살충	제조	미생물	패실로미아세스퓨모소르세우스디비사-2032 수화제	5.0×10 ⁷ cfu/g
35	제조	수입	생화학	펠라르곤산 유제	53%

그림 30. 등록생물농약 현황.

출처 : 농촌진흥청(2014.12)

- 북승아혹진딧물의 경우 곤충병원성곰팡이, 천적 및 기주식물을 이용하는 생물적방제 세계 농약시장은 2013년 500억 달러 규모로 이중 살충제 시장은 170억 달러 수준으로 형성되어 있고, 매년 5.1%의 성장률을 보이며 지속적인 성장이 나타날 것으로 예측되며, 북미와 남미에서 빠른 성장세를 보이고 있음(표 22, 23).

표 22. 지역별 세계 농약시장의 규모(금액) 예측

(단위: \$Million)

지역		2011	2012	2013	2018	CAGR%(2013-2018)
금액 (비율)	북미	8,560 (19.2)	9,233.6 (19.5)	9,917.1 (19.7)	13,538.4 (21)	6.4
	남미	10,183.9 (22.8)	11,457.9 (24.2)	12,780 (25.4)	18,791.1 (29.1)	8.0
	아시아-태평양	11,908 (26.7)	12,479.6 (26.3)	13,051.7 (25.9)	15,971.2 (24.8)	1.6
	유럽	12,194.8 (27.3)	12,430.1 (24.2)	12,659.3 (25.2)	13,680.4 (21.2)	6.0
	기타	1,741.3 (3.9)	1,823.8 (3.8)	1,906.9 (3.8)	2,548.9 (3.9)	5.1
합계	합계	44,588 (100)	47,425 (100)	50,315 (100)	64,530 (100)	

출처: Company website, Primary interview, Annual reports, Chemical weekly and Markets and market analysis, Markets and Markets [AGROCHEMICALS MARKET-Global market trends & Forecast to 2018] 2014.

표 23. 세계 농약시장의 규모(금액) 예측

(단위: \$Million)

구분	2011	2012	2013	2018	CAGR%(2013-2018)
유기인산화합물	32,062.3	34,705.2	37,197.7	49,118.9	5.9
피레스로이드	4,217.3	4,435.7	4,631.1	5,477.3	3.4
네오니코티노이드	2,351.6	2,400.3	2,441.8	2,672.6	1.8
생물농약	2,283.5	2,453.6	2,634.9	3,547.8	6.1
기타	3,673.2	3,430.1	3,409.4	3,713.4	1.7
계	44,588	47,425	50,315	64,530	5.1

출처: Company website, Primary interview, Annual reports, Chemical weekly and Markets and market analysis, Markets and Markets [AGROCHEMICALS MARKET-Global market trends & Forecast to 2018] 2014.

나. 제품 홍보 및 판매 전략

- 사업기간 종료 이후 5년간 제품홍보, 판로확보, 판매전략은 아래에 제시한 바와 같이 지속적인 신제품 개발 및 국내외 판매라인 구축에 의한 사업화를 추진할 예정이다.

구분	(2019년) 사업종료 후 1년	(2021년) 사업종료 후 3년	(2023년) 사업종료 후 5년
제품홍보	국내시장의 지속적 홍보의 해외 농자재 진람회 참가 및 수출대상국과 네트워크 구축	수출 대상 국가의 철저한 수요분석에 의한 제품차별성 확보 및 기관 홍보	정부부처와 긴밀한 협조 및 수요처 발굴 및 제품 경쟁력 홍보
판로확보	국내 시장의 제품 적용 대상작물의 구체화에 따른 해외 주요 농산물 생산자와의 교류	수출 판로 확보를 위한 대상국가의 시장조사	신규제품의 개발에 의한 성능개선 및 품질 차별화에 의한 시장 경쟁력 확보
판매전략	국내 판매시스템을 기반으로 해외 영업라인 구축	국내외 해외 판매라인 구축 및 시장현황 분석	주요수출대상국가에 대한 지속적 영업라인 확대

제 2장 세균을 활용한 복숭아혹진딧물방제용 유기농업자재 개발

제 1절 Bacillus 균주 유래 진딧물 살충활성 물질 탐색

1. 미생물 분리 및 동정

가. 미생물 분리 및 동정

(1) 연구목적

- 진딧물 살충효능을 갖는 미생물 분리 및 동정

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 분리원: 된장
- ② 공시 식물: 배추
- ③ 공시 해충: 복숭아혹진딧물
- ④ 배지: 최소무기염류배지 (mineral salt medium, MSM), trypticase soy broth (TSB, Difco), trypticase soy agar (TSA, Difco)
- ⑤ 기기: Du Nouy tensiometer(Model. 3010)

(나) 시험방법

① 미생물 분리

- 된장 1 g을 MSM배지에 현탁한 후 TSB 고체배지에 도말한 다음 30℃에서 4일간 정지배양함.
- 단일 콜로니만을 취하여 TSB 액체 배지 5 mL에 접종한 후 30℃, 150 rpm 조건으로 24 시간 동안 진탕배양함.
- 상기에서 얻은 배양액들의 복숭아혹진딧물에 대한 살충효능을 조사한 후 가장 높은 살충활성을 보인 균주를 선발하여 이의 표면장력을 측정함.

② 미생물의 살충효능 시험

- 진딧물에 대한 미생물 및 식물 추출물 살충효능 시험은 Kim 등(2007)의 방법에 준하여 실시함.
- 수분이 함유된 여과지가 깔린 plate(100 x 90 mm)에 3주 동안 자란 배추 잎(30 x 30mm)을 식재한 다음 진딧물 10마리를 붓을 이용하여 조심스럽게 옮긴 후 12시간 동안 안치함.
- 각각의 실험은 3반복 이상 수행하였으며 살충효율은 진딧물의 생충수를 고려한 Abbott's 식(1925)을 사용하여 조사함.
- 살충율 (%) = $(A - B) / B \times 100$ (A: 대조구 생충수, B: 처리구 생충수)

③ 표면장력 측정

- 표면장력 측정은 Oh 등(2003)의 방법에 준하여 실시함.
- 원심분리(8,000rpm, 4℃, 15min) 한 후 얻어진 상정액의 표면장력을 Du Nouy tensiometer를 이용하여 경시적인 표면장력의 변화를 측정함.

④ 미생물 동정

- 선발한 미생물의 동정은 16S rRNA 염기서열과 탄소이용률 분석을 통해 실시함.
- 염기서열 분석은 Kim 등(2004)의 방법에 준하여 실시하였으며 universal primer는 27F와 1492R 이었음. 계통수는 Neighbor-joining 방법으로 분류하였으며 MEGA 4.0 패키지를 통해 작성하였음.
- 탄소이용률 조사 및 동정은 API 50 CHB test kit(BioMérieux, Inc)를 이용하였으며 제조사의 권장방법에 준하여 실시하였음.

(3) 결과

- 상기 균주의 16S rDNA 염기서열을 표준균주와 비교한 결과 *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* KCTC 13428^T와 99.6%의 유사성을 나타내었음(그림 1).
- 총 18개의 기질을 탄소원으로 이용하였으며 주로 glucose, fructose, mannose와 같은 탄수화물이 주요 기질이었음(표 1).
- 분리 균주의 이용가능한 기질을 API data base 분석한 결과 *Bacillus subtilis*와 98% 유사성을 보였음.
- *Bacillus* sp. 균주의 전형적인 형태인 간균형 모습이 관찰되었음(그림 2).

(4) 결론

- 분리 균주의 계통학적 분류와 생리학·형태학적 특성을 종합하여 볼 때, *Bacillus subtilis*로 동정되었음.
- 기존 1차년도에는 *Bacillus subtilis* MS-1으로 명명하였으나 특허출원 및 논문투고를 용의하기 위해 균주 이름을 *Bacillus subtilis* Y9로 변경함.
- 이에, 살충활성을 갖는 *Bacillus subtilis* Y9로 국립농업과학원에 특허미생물로서 수탁하였음(KACC 92115P) (그림 3).

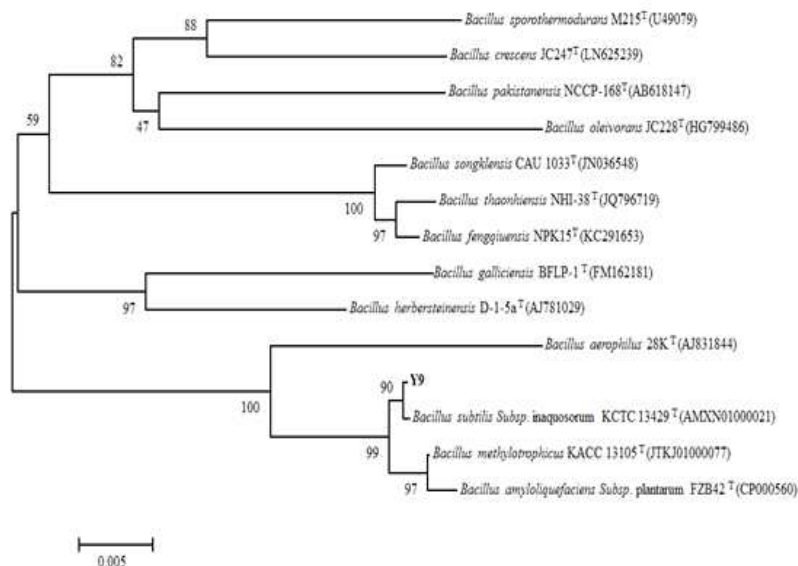


그림 1. 균주의 계통학적 분류표.

표 1. *Bacillus subtilis* Y9의 기질 특이성

Carbon source	Utilization ¹⁾
Glycerol	+
Erythritol	-
D-arabinose	-
L-arabinose	+
D-ribose	+
D-xylose	-
L-xylose	-
D-adonitol	-
Methyl-βD-xylopyranoside	-
D-galactose	-
D-glucose	+
D-fructose	+
D-mannose	+
L-sorbose	-
L-rhamnose	-
Inositol	+
D-mannitol	+
D-sorbitol	+
Methyl-αD-mannopyranoside	-
Methyl-αD-glucopyranoside	-
N-acetylglucosamine	-
Amygdalin	+
Arbutin	+
Esculin ferric citrate	+
Salicin	+
D-cellobiose	+
D-maltose	+
D-lactose	-
D-melibiose	-
D-saccharose (sucrose)	+
Inulin	-
D-melezitose	-
D-raffinose	-
Amidon (starch)	-
Glycogen	-
Xylitol	-
Gentiobiose	+
D-turanose	-
D-lyxose	-
D-tagatose	-
D-fucose	-
L-fucose	-
D-arabitol	-
L-arabitol	-

¹⁾ +: positive, -: negative

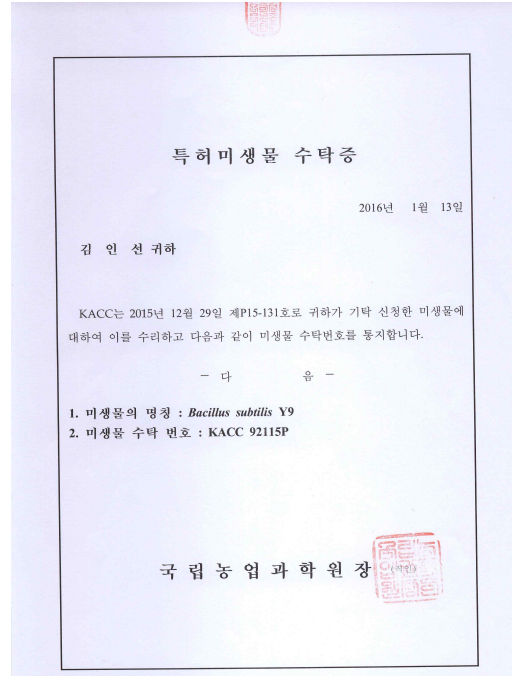
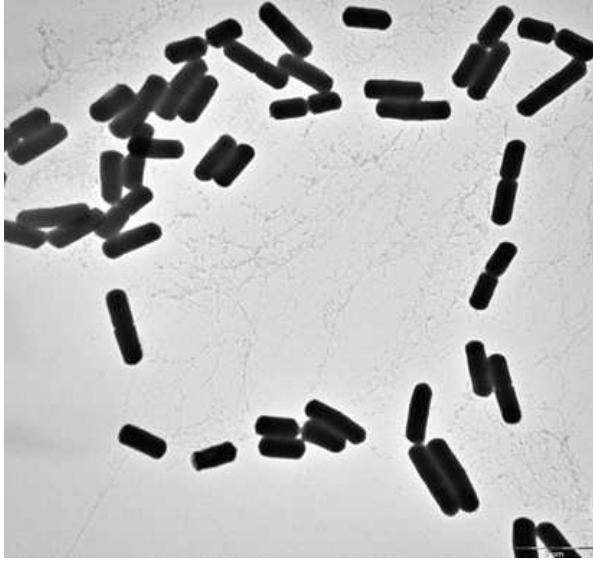


그림 2. *Bacillus subtilis* Y9의 BioTEM분석. 그림 3. *Bacillus subtilis* Y9의 특허미생물 수탁증.

나. 미생물 특성 조사

(1) 연구목적

- 분리한 균주 Y9의 최적 배양시간을 조사하기 위해 생장에 따른 살충효능과 계면활성 능력 조사.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 해충: 복숭아혹진딧물
- ② 공시 식물: 배추
- ③ 공시 미생물: *Bacillus subtilis* Y9

(나) 시험방법

- ① 미생물의 살충효능 시험
 - 상기와 같은 Kim 등(2007)의 방법에 준하여 배양 시간대 별로 실시함.
- ② 미생물의 계면활성능력 조사
 - 상기와 같은 Oh 등(2003)의 방법에 준하여 배양 시간대 별로 실시함.

(3) 결과

- 균주 Y9는 배양 4시간 이후부터 급속도로 성장 (log phase)하였으며 48시간에 이르러 정체기(stationary phase)에 이르는 것으로 관찰되었음.

- 진딧물 살충활성 능력은 8시간 이후부터 90% 이상의 높은 활성을 보였으며 이후 지속적으로 유지된 후 96시간에 이르러 점차적으로 감소하였음(그림 4).
- 균주 Y9는 log phase 단계에 이르렀을 때 surface tension 값이 약 60 mN/m에서 약 30 mN/m 으로 급격히 감소하였음 (그림 5).

(4) 결론

- 균주 Y9의 최적배양시간은 48시간이며, 균주 Y9는 성장하면서 살충활성 물질을 생산한다는 것을 의미함.
- 균주 Y9가 성장하면서 계면활성 물질을 생산하고 계면활성물질이 진딧물 살충활성을 보유하고 있다는 것을 의미함.

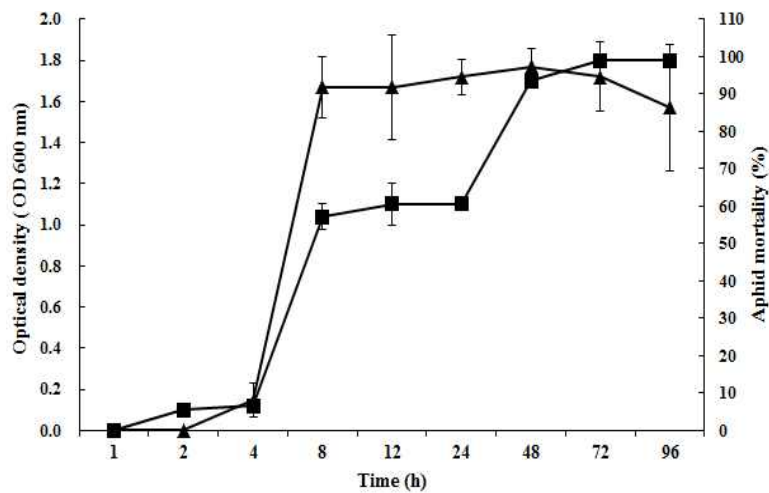


그림 4. *Bacillus subtilis* Y9의 성장(■)에 따른 진딧물 살충활성 능력 (▲).

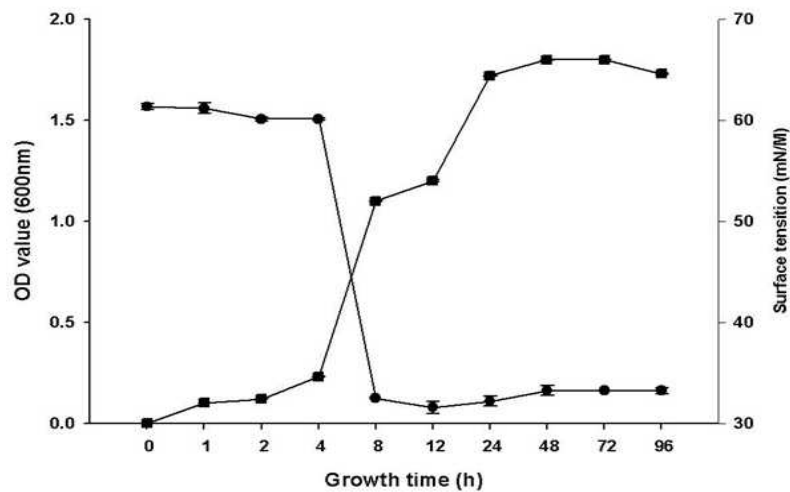


그림 5. *Bacillus subtilis* Y9의 성장 (■)에 따른 surface tension 변화(●).

2. 미생물 유래 살충활성 물질 분리 및 동정

가. 배양액 산 침전물의 살충효능 조사

(1) 연구목적

- 분리한 균주 Y9가 생산하는 계면활성 물질과 진딧물 살충활성간의 연관성을 알아보기 위해 균주 배양액에서 계면활성물질을 추출한 후 진딧물 살충능력을 조사함.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 해충: 복숭아혹진딧물
- ② 공시 식물: 배추
- ③ 공시 미생물: *Bacillus subtilis* Y9

(나) 시험방법

① 산 침전법

- 미생물 배양액을 원심분리하여 얻어진 상징액에 6N 염산 용액을 가하여 pH 2로 보정한 후 4°C에서 24시간 방치함. 이 후 형성된 침전물을 원심분리하여 회수하였으며 methanol(CH₃OH)에 재용해함.

② 살충효능 시험

- 균주의 상징액, 산침전물 제거 상징액, 그리고 산침전물 현탁액을 원액과 5배, 10배 희석액의 진딧물 살충활성을 조사함.

(3) 결과

- 균주의 상징액 원액과 5배 10배 희석액의 진딧물 살충활성은 각각 100, 80 그리고 60% 수준이었음.
- 계면활성 물질이 추출된 상징액(산침전물 제거 상징액)의 살충활성은 상기와 동일한 희석배수에서 40, 15 그리고 10% 수준이었음.
- 한편, 추출된 계면활성물질을 상징액과 동일한 볼륨의 증류수로 현탁한 계면활성물질 함유 현탁액의 진딧물 살충활성은 Y9 균주의 상징액의 살충활성과 유사한 수준이었음.

(4) 결론

- 균주 Y9가 생산하는 진딧물 살충활성 물질은 계면활성능력을 갖는 물질이라는 것을 의미하였음(그림 6).

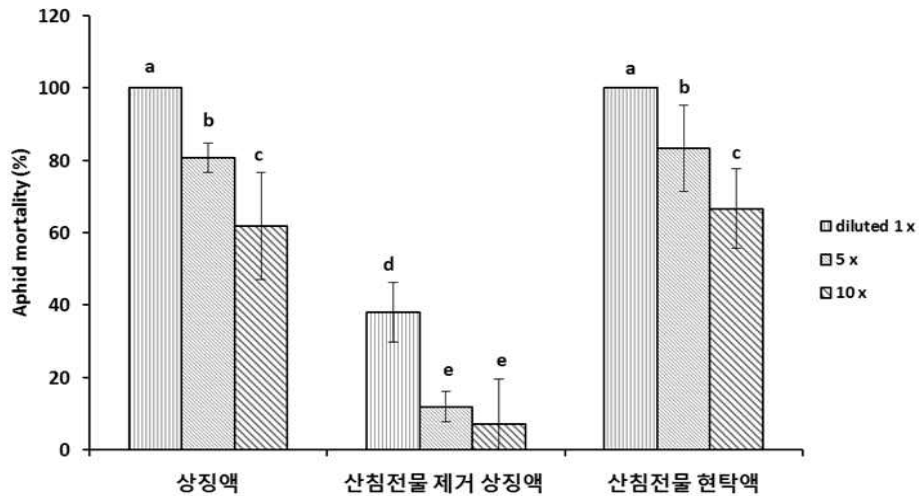


그림 6. 계면활성물질 함유에 따른 진딧물 살충활성 능력.

나. 균주의 살충활성 물질 분리 및 구명

(1) 연구목적

- 분리한 균주 Y9가 생산하는 살충활성 물질을 분리 및 구명하고자함.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 해충: 복숭아혹진딧물
- ② 공시 식물: 배추
- ③ 공시 미생물: *Bacillus subtilis* Y9
- ④ 시약: methanol(CH₃OH), chloroform(CHCl₃), silica gel (Kiesel gel 60, 230-400 mesh, Merck)

(나) 시험방법

① 추출 및 분리

- 미생물이 생산하는 살충물질의 추출 및 분리는 Smith 등(2010)의 방법에 준하여 실시하였으며 그림 7에 도식화함.
- 상기와 같은 산 침전법으로 얻어진 침전물은 methanol에 용해하였으며 silica gel 컬럼 크로마토그래피 정제를 수행하였음.
- 산침전물 (400 mg)을 실리카겔으로 충전한 컬럼에 가한 후 용출용매는 chloroform : methanol 혼합용매계로 methanol 비율을 10%(v/v)씩 증가하면서 용출하였음.

② 기기분석

- 진딧물 살충 활성 물질을 구조 동정하기 위해 단리한 물질은 기기분석용 methanol에 용해하여 질소농축하여 기기 분석을 수행하였음.
- GC-MS분석은 QP2010 (shimazu)을 사용하였으며 분석조건은 electron ionization source로 분석하였음. 컬럼은 DB-5 capillary 컬럼을 사용하였음. 분석조건으로 분석하였으며 초기온도는 100 °C 였으며 280 °C 까지 승온하였음.
- HPLC-MS와 MS/MS분석 그리고 NMR분석은 기초과학지원연구소에 의뢰하여 수

행하였음.

- HPLC 컬럼은 Bondapak C18 stainless column (5 x 10 nm, 5 μm, Waters)을 사용하였으며 이동상은 methanol과 물을 사용하였음. 분석은 Positive ion mode로 수행하였으며 건조온도는 300 °C, capillary 전압과 cone 전압은 각각 3.31 kV와 60 V이었음. 건조가스 유속은 60 L/hr이었으며 scan time은 0.5 sec이었음.
- NMR 분석 시료는 중수소로 치환된 CD₃OD로 용해 시켰으며, 파스텔 피펫을 이용하여 NMR 분석용 tube에 옮겼음. proton, carbon NMR은 fourier transform nuclear magnetic resonance spectrometer (Varian, 600 MHz) 모델을 이용하여 분석하였음. proton, carbon NMR 결과는 MestReNova software를 이용하여 각각의 진동수를 확인하였음.
- 균주 Y9 균주가 생산하는 살충물질의 진딧물에 대한 살충기작을 연구하기 위해 살충활성물질을 처리한 진딧물을 Bio-TEM을 이용하여 관찰함.

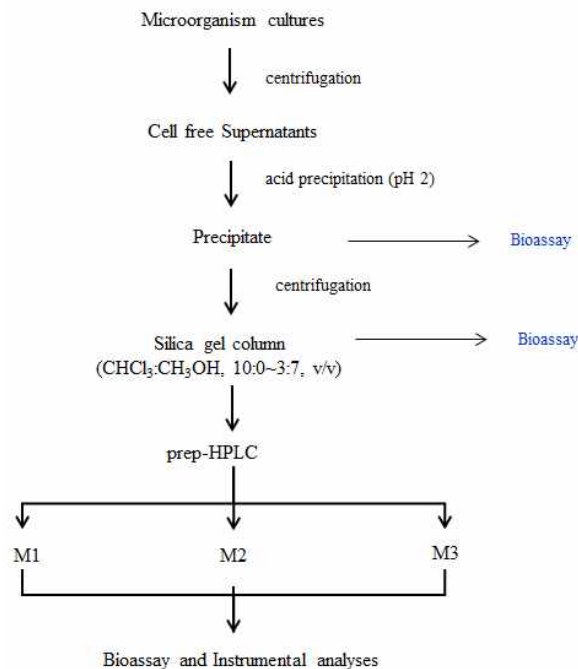


그림 7. 미생물 유래 살충활성 대사물질 추출.

(3) 결과

① 추출 및 분리

- 각각의 용출분획의 진딧물 살충효율을 표 2와 같이 나타남.
- 활성분획을 HPLC 분석한 결과 총 8개의 peak가 관찰되었으며 이를 반복적으로 단리하여 진딧물 살충활성 능력을 측정하였음.
- 최종적으로 머무림시간(retention time)은 11.9, 16.9 그리고 20.3분에서 진딧물 살충활성을 갖는 3개의 peak M1, M2 그리고 M3을 분리하였음(그림 8).
- 각각의 물질을 반복적으로 단리하여 100 μg/mL 농도에서 진딧물 살충효능을 조사한 결과 94.3, 69.8 그리고 96.2%의 살충효능이 관찰됨(표 3).

② 살충활성 물질의 지방산 조성분석

- 지방산을 methylation 시킨 후 GC/MS 분석을 수행하였음 (그림 9). M1과 M2의 지방산은 3-hydroxy tetradecanoic acid methyl ester로 확인되었으며 M3의 경우 3-hydroxy pentadecanoic acid methyl ester로 확인되었음.
- 상기와 같은 결과를 바탕으로 M1과 M2의 지방산은 3-hydroxy tetradecanoic acid 로 구명되었으며 M3의 경우 3-hydroxy pentadecanoic acid로 구명되었음.
- ③ 살충활성 물질의 HPLC-MS분석
 - M1, M2 그리고 M3의 m/z $[M+H]^+$ 값은 각각 1022.5, 1008.3 그리고 1036.6 으로 관찰되었음(그림 10).
 - 이에, 각각의 물질의 모분자 값은 1021, 1007 그리고 1035로 판단되었음.
- ④ 살충활성 물질의 아미노산 조성 및 서열 분석
 - 각각의 물질의 아미노산 조성분석 결과 M1과 M3의 경우 Val, Leu, Asp 그리고 Glu 의 비율이 각각 약 1:4:1:1로 확인되었음. 한편, M2의 경우 Val, Leu, Asp 그리고 Glu가 2:3:1:1로 확인되었음 (표 4.)
 - 각각의 물질의 아미노산 서열을 조사하기 위해 HPLC-MS/MS 분석을 수행하였음 (그림 11).
 - 살충활성 물질 M1과 M3의 경우 동일 순서인 Leu-Leu-Asp-Val-Leu-Leu-Glu 관찰되었으며, M2의 경우 첫 번째 아미노산인 Leu이 Val으로 치환된 Val-Leu-Asp-Val-Leu-Leu-Glu로 조사되었음.
- ⑤ 살충활성 물질의 NMR 분석
 - 각각의 살충활성 물질의 1H NMR 분석 결과 7-9 ppm에서 7개의 amide protone signal과 4-5 ppm에서 7개의 α -H protone signal이 검출되었음 (그림 12, 표 5).
 - ^{13}C NMR 분석결과 170-180 ppm에서 8개의 carbonyl signal과 50-60 ppm에서 7개의 N-C signal이 검출되었음 (그림 13, 표 6).
 - 또한, 1H , ^{13}C NMR의 up-field 부근에서 지방산 유래 peak가 검출되었음.
- ⑥ surfactin 이성질체의 진딧물 살충활성 능력
 - $C_{14}[Lue_7]$ 과 $C_{15}[Leu_7]$ surfactin의 진딧물에 대한 반수치사 농도는 약 20 ppm 수준으로 조사되었으며 $C_{14}[Val_7]$ surfactin은 보다 높은 54 ppm 수준이었음(표 7).
 - 또한, $C_{14}[Lue_7]$ surfactin의 반수치사농도는 $C_{15}[Leu_7]$ surfactin의 반수치사 농도보다 높았음.
- ⑦ surfactin의 진딧물에 대한 살충기작
 - surfactin을 처리한 진딧물의 경우 처리하지 않은 대조구에 비해 cuticle 층이 현저하게 파괴되었으며 세포소기관의 비정상적인 모습이 관찰되었음(그림 14).

(4) 결론

- 상기의 NMR, MS, MS/MS 그리고 아미노산 서열분석 등의 결과를 종합하였을 때 *Bacillus subtilis* Y9가 생산하는 살충활성 물질은 surfactin 으로 구명되었음.
- 분리된 M1-3는 아미노산 조성과 지방산 길이의 서로 다른 surfactin 이성질체로서 각각 $C_{14}[Lue_7]$, $C_{14}[Val_7]$ 그리고 $C_{15}[Leu_7]$ 로 구명되었음 (그림 15).
- surfactin의 아미노산과 지방산 길이에 따라 진딧물 살충활성능력에 차이가 있었음.
- surfactin은 화학구조상 친수성기와 소수성기를 모두 갖는 양친매성물질로 진딧물의

cuticle 층을 쉽게 통과하면서 생체막의 교란을 가져오는 것으로 사료됨.

표 2. Silica gel 컬럼 크로마토그래피 정제 분획 별 진딧물 살충활성 조사

Fraction No.	Solvent system	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Aphid mortality (%) ¹⁾
Fr.1	CHCl ₃ : CH ₃ OH (10:0, v/v)	100	3.12 \pm 19.5
Fr.2	CHCl ₃ : CH ₃ OH (9:1, v/v)	100	93.7 \pm 10.8
Fr.3	CHCl ₃ : CH ₃ OH (8:2, v/v)	100	93.7 \pm 5.4
Fr.4	CHCl ₃ : CH ₃ OH (7:3, v/v)	100	100.0 \pm 0.0
Fr.5	CHCl ₃ : CH ₃ OH (6:4, v/v)	100	96.8 \pm 5.4
Fr.6	CHCl ₃ : CH ₃ OH (5:5, v/v)	100	100.0 \pm 0.0
Fr.7	CHCl ₃ : CH ₃ OH (3:7, v/v)	100	43.7 \pm 18.7

¹⁾ The data are means \pm SD of triplicates.

표 3. HPLC 분석을 통해 분리된 물질의 진딧물 살충활성 조사

Treatment	Concentration (mg /L)	Aphid mortality (%) ¹⁾
Control	-	13.2 \pm 11.7
M1	100	94.3 \pm 5.6
M2	100	69.8 \pm 6.5
M3	100	96.2 \pm 3.2

¹⁾ The data are means \pm SD of triplicates.

표 4. 진딧물 살충활성 물질의 아미노산 조성

Metabolite	Amino acid			
	Val	Leu	Asp	Glu
Molar ratio				
M1	1.0	3.7	1.0	0.9
M2	2.3	3.1	1.0	1.1
M3	1.1	3.8	1.1	1.0

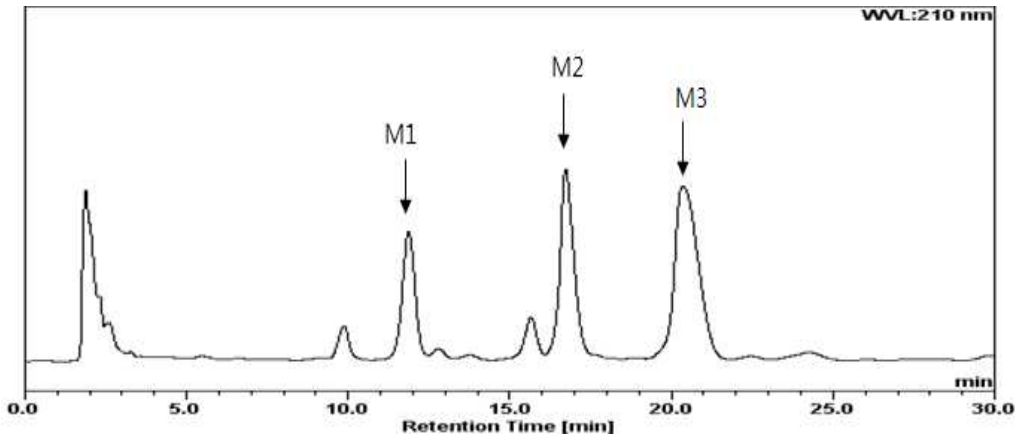


그림 8. *Bacillus subtilis* Y9가 생산하는 진딧물 살충활성 물질의 HPLC chromatogram.

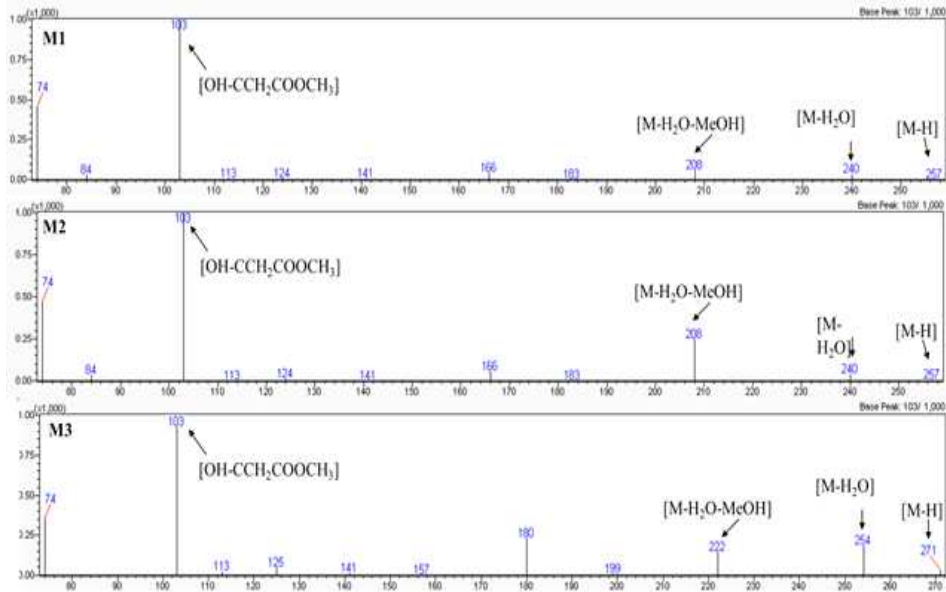


그림 9. 진딧물 살충활성 물질의 GC/MS spectrum.

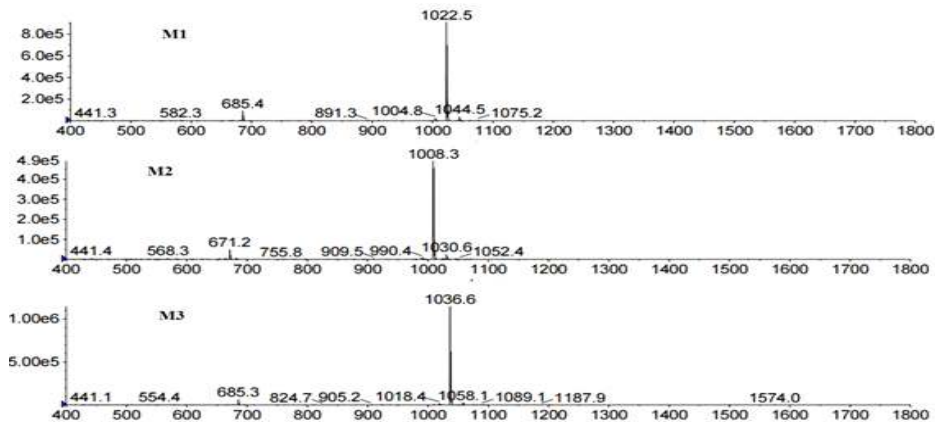


그림 10. 진딧물 살충활성 물질의 HPLC-MS spectrum.

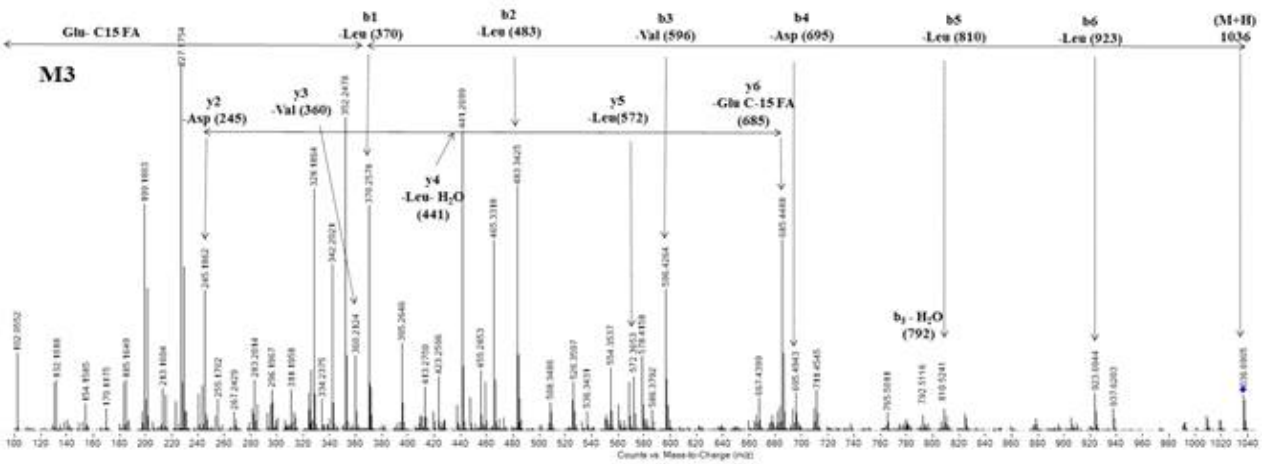
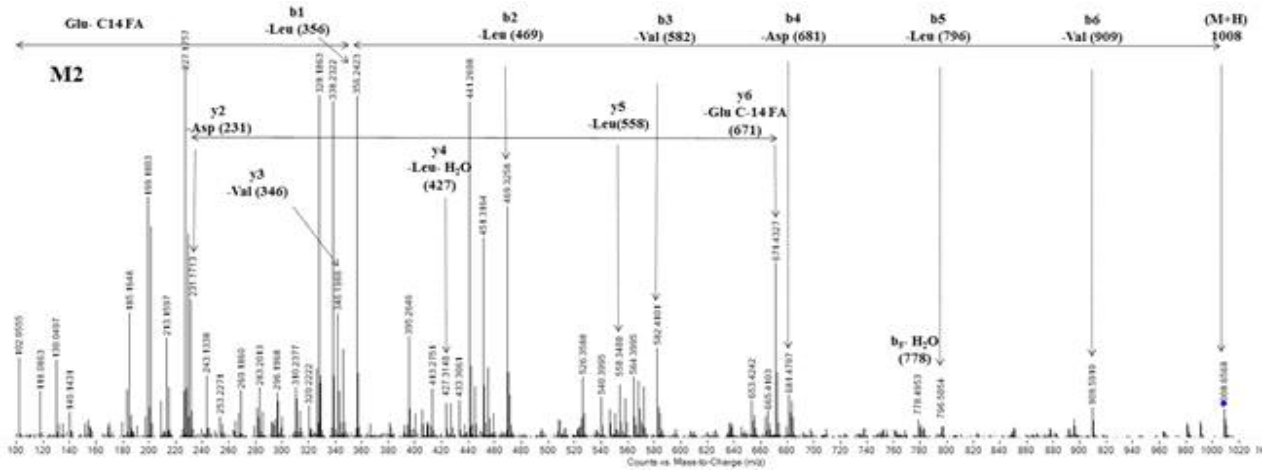
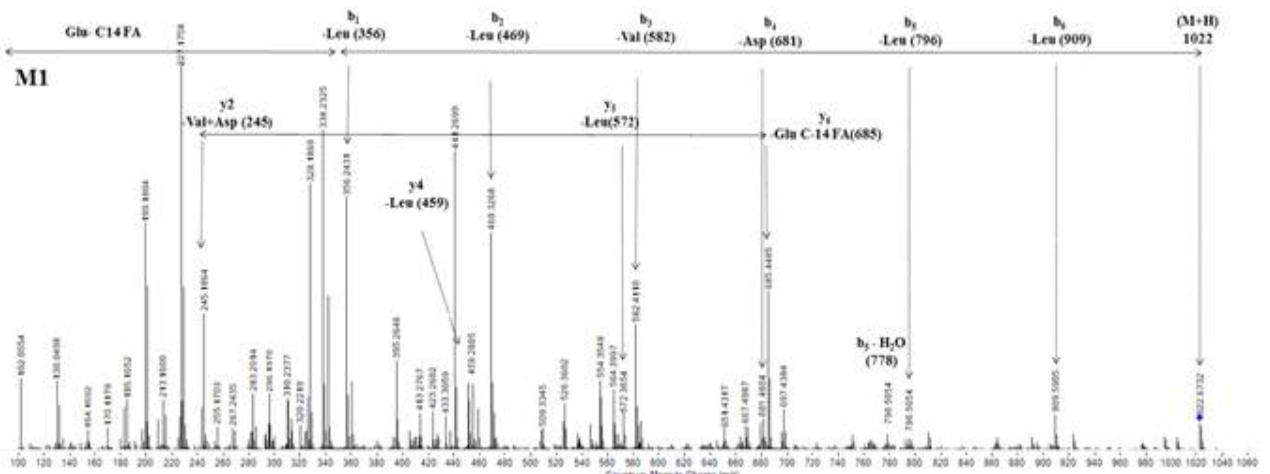
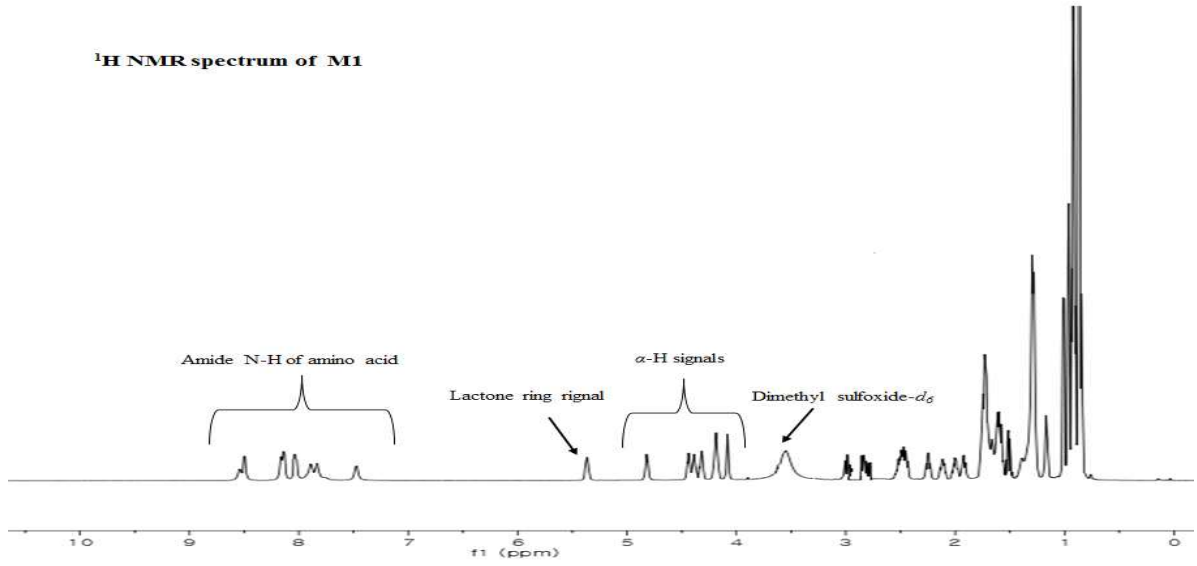
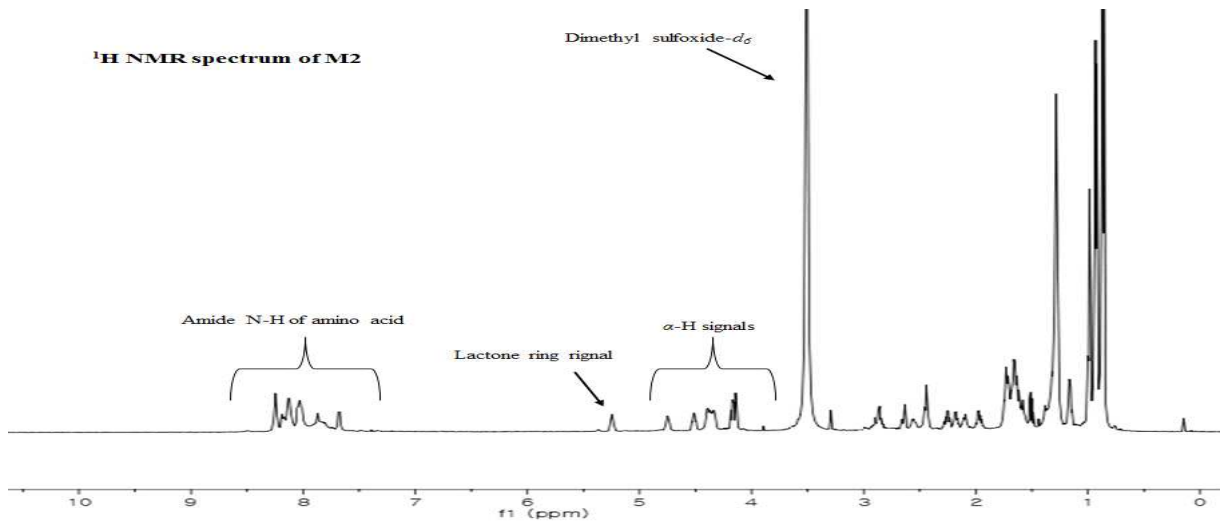


그림 11. 진딧물 살충활성 물질의 MS/MS fragment.

¹H NMR spectrum of M1



¹H NMR spectrum of M2



¹H NMR spectrum of M3

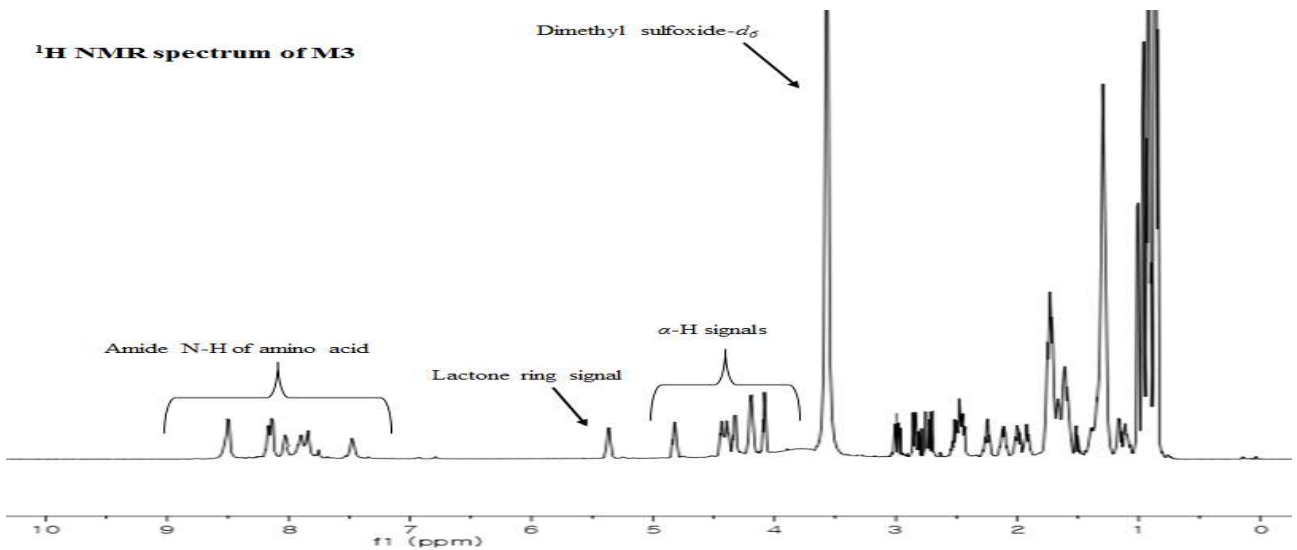


그림 12. 진딧물 살충활성 물질의 ¹H NMR spectrum.

표 5. 진딧물 살충활성 물질의 ^1H NMR

Amino acid	Position	δH of metabolite		
		M1	M2	M3
Glu1	NH	7.89d	7.82d	7.89d
	α -H	4.38m	4.41m	4.39m
	β -H	1.62/1.71m	1.65/1.72m	1.64/1.73m
	γ -H	2.11m	2.18m	2.11m
Leu 2	NH	8.14d	7.87d	8.14md
	α -H	4.31m	4.39m	4.31m
	β -H	1.59m	1.50m	1.59m
	γ -H	1.49m	1.49m	1.49m
Leu 3	δ -H	0.99/0.91m	0.96/0.90m	0.99/0.91m
	NH	8.54d	8.25d	8.54d
	α -H	4.20m	4.39m	4.19m
	β -H	1.59m	1.59m	1.59m
Val 4	γ -H	1.49m	1.58m	1.49m
	δ -H	0.98/0.92m	0.98/0.92m	0.98/0.92m
	NH	7.83d	7.73d	7.83d
	α -H	4.08t	4.16t	4.08t
Asp 5	β -H	2.01m	1.97m	1.99m
	γ -H	0.88/0.84m	0.88/0.84m	0.88/0.84m
	NH	8.16d	8.13d	8.16d
	α -H	4.82m	4.75m	4.82m
Leu 6	β -H	2.63/2.54m	2.63/2.56m	2.62/2.53m
	NH	7.47d	7.66d	7.47d
	α -H	4.42m	4.52m	4.43m
	β -H	1.59m	1.44m	1.59m
Leu 7	γ -H	1.49m	1.43m	1.49m
	δ -H	0.98/0.92m	0.96/0.90m	0.98/0.92m
	NH	8.49d	-	8.49d
	α -H	4.19m	-	4.19m
Val 7	β -H	1.59m	-	1.59m
	γ -H	1.49m	-	1.49m
	δ -H	0.97/0.89m	-	0.97/0.89m
	NH	-	8.18d	-
Val 7	α -H	-	4.13t	-
	β -H	-	2.10m	-
	γ -H	-	0.88/0.84m	-

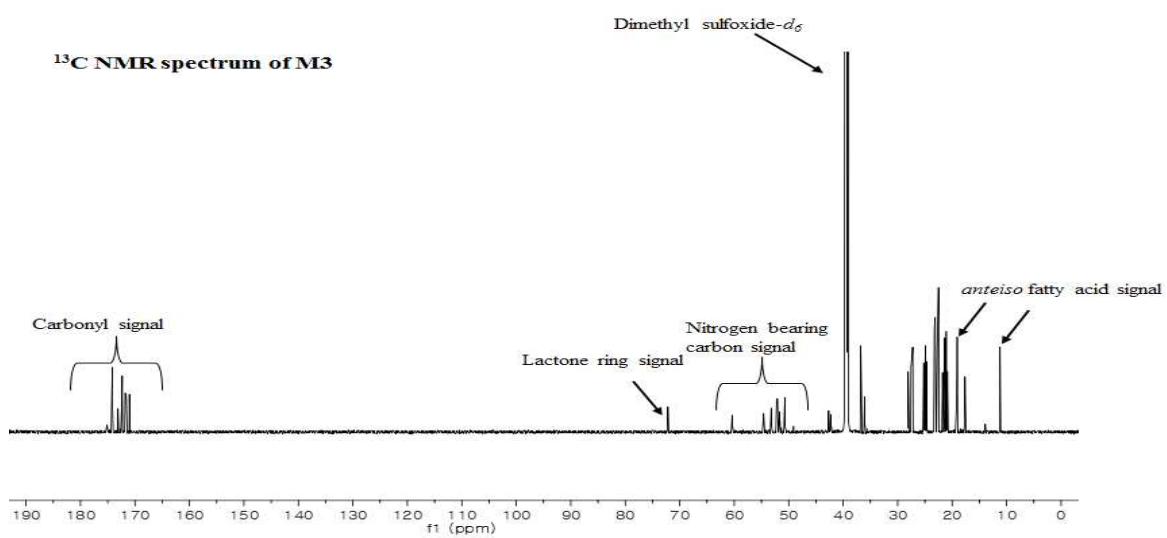
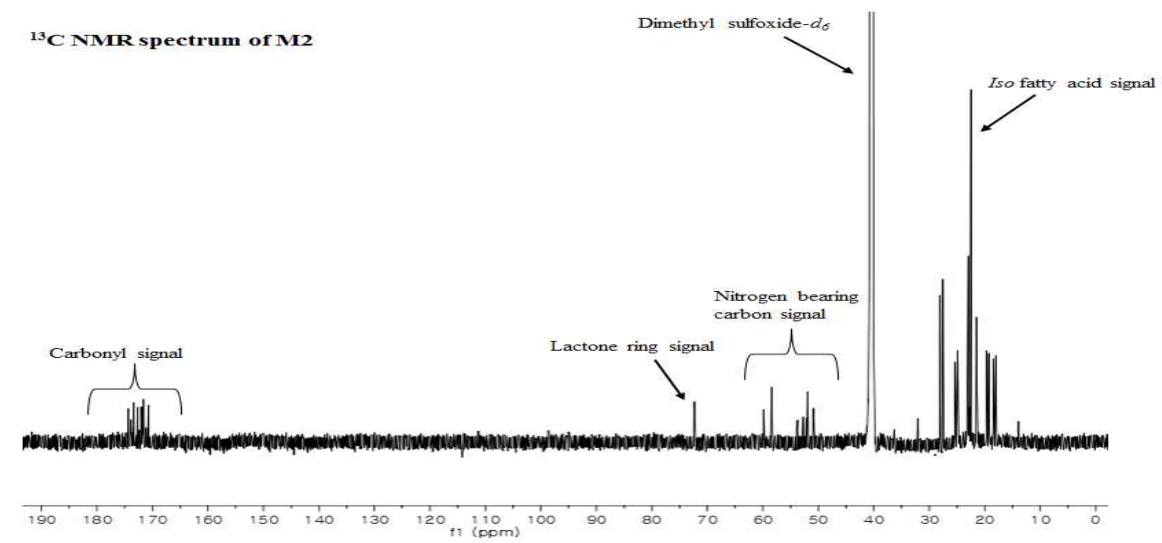
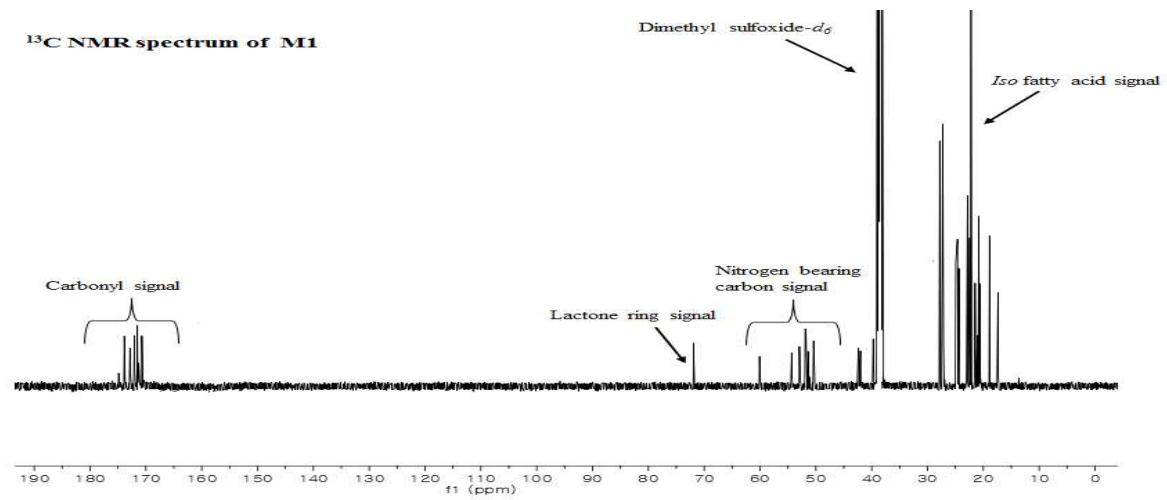


그림 13. 진딧물 살충활성 물질의 ^{13}C NMR spectrum.

표 6. 진딧물 살충활성 물질의 ^{13}C NMR

Amino acid	Position	δC of metabolite		
		M1	M2	M3
Glu1	CO	171.8	172.0	171.8
	α -C	54.6	51.9	54.6
	β -C	24.6	24.7	24.6
	γ -C	28.1	28.0	28.0
	δ -C=O	175.1	174.5	175.1
Leu2	CO	174.1	173.4	174.1
	α -C	53.2	52.2	53.2
	β -C	39.7	39.7	39.7
	γ -C	23.2	23.1	23.3
	δ -C	22.5-20.9	22.5-20.4	22.5-20.8
Leu3	CO	174.2	174.0	174.2
	α -C	52.0	52.7	52.0
	β -C	39.2	39.1	39.2
	γ -C	23.2	22.9	23.2
	δ -C	22.5-20.9	22.5-20.4	22.5-20.8
Val4	CO	171.7	171.7	171.7
	α -C	60.3	59.8	60.3
	β -C	35.4	35.4	35.4
	γ -C	19.1/17.6	19.6/18.4	19.1/17.7
	CO	171.6	171.2	171.6
Asp5	α -C	50.6	50.8	50.7
	β -C	38.8	40.7	38.9
	δ -C=O	172.3	172.3	172.3
	CO	172.4	172.7	172.4
Leu6	α -C	51.6	53.7	51.6
	β -C	42.3	41.5	42.3
	γ -C	23.1	22.7	23.1
	δ -C	22.5-20.9	22.5-20.4	22.5-20.8
Leu7	CO	173.1	-	173.1
	α -C	52.2	-	52.2
	β -C	39.2	-	39.2
	γ -C	22.7	-	22.7
	δ -C	22.5-20.9	-	22.5-20.8
Val7	CO	-	171.6	-
	α -C	-	58.4	-
	β -C	-	36.2	-
	γ -C	-	19.6/18.4	-

표 7. 살충활성 물질의 진딧물에 대한 50, 90 % lethal concentration (LC₅₀, 90)

Metabolites	LC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	95% CL ¹⁾ ($\mu\text{g/mL}$)	LC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	95% CL ¹⁾ ($\mu\text{g/mL}$)
M1, <i>iso</i> -C ₁₄ [Lue ₇]	22.2	19.3 - 25.4	42.7	37.7 - 50.0
M2, <i>iso</i> -C ₁₄ [Val ₇]	54.5	42.2 - 71.4	122.9	98.1 - 174.1
M3, <i>anteiso</i> -C ₁₅ [Leu ₇]	20.4	17.9 - 23.4	37.4	33.0 - 44.3

¹⁾ 95% Confidence limit

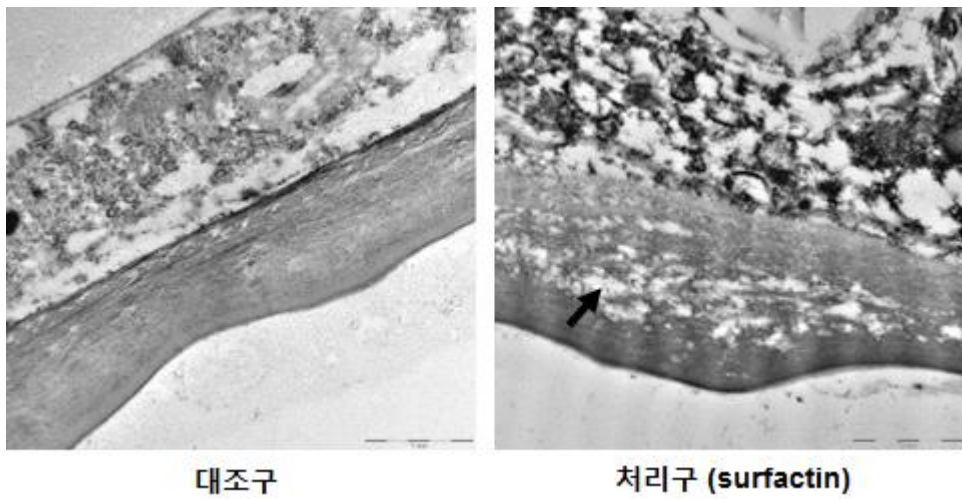


그림 14. Surfactin 처리 전과 후에 진딧물의 주현미경 사진. Cu: cuticle, M: Membrane.

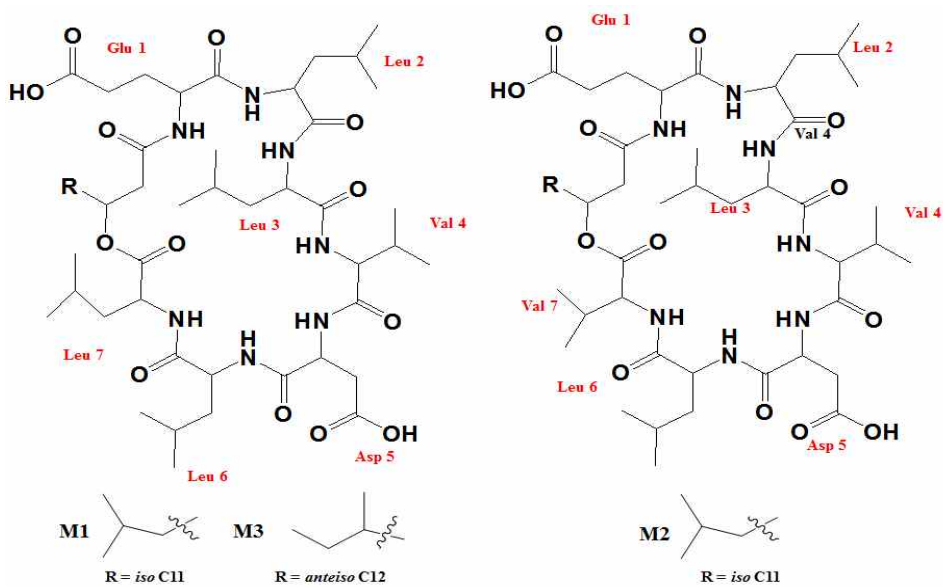


그림 15. *Bacillus subtilis* Y9 균주가 생산하는 진딧물 살충활성 물질.

제 2절 식물유래 살충물질 탐색 및 효능평가

1. 진딧물 살충활성 식물 추출물 탐색 및 선발

가. 식물 추출물 선발

(1) 연구목적

- 복숭아혹진딧물에 대한 우수한 활성을 보이는 식물추출물 탐색.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 식물: 국·내외 자생식물 298종
- ② 공시 해충: 복숭아혹진딧물
- ③ 시약: dimethyl sulfoxide : methanol (4:1,v/v) 혼합액

(나) 시험방법

① 시료 준비

- 식물추출물은 dimethyl sulfoxide : methanol (4:1,v/v) 혼합액에 용해한 다음 증류수로 10배 희석하여 사용함.

② 살충효능 시험

- 진딧물에 대한 미생물 및 식물 추출물의 살충효능 시험은 Kim 등(2007)의 방법에 준하여 실시함.
- 수분이 함유된 여과지가 깔린 plate(100 x 90 mm)에 3주 동안 자란 배추 잎(30 x 30 mm)을 식재한 다음 진딧물 10마리를 붓을 이용하여 조심스럽게 옮긴 후 12시간 동안 안치함.
- 각각의 실험은 3반복 이상 수행하였으며 살충효율은 진딧물의 생충수를 고려한 Abbott's 식(1925)을 사용하여 조사함.
- 살충율 (%) = $(A-B) / B \times 100$ (A: 대조구 생충수, B: 처리구 생충수)

③ 살충효성물질의 추출

- 용매추출은 원시료 1 g을 80% 에탄올(ethanol, v/v) 10 mL 이 함유된 용기에 침지한 후 2일간 방치함. Whatman 여과지(Watman No. 6)를 이용하여 여과한 후 40°C 조건에서 감압농축함.
- 정유추출은 Liu 등(2012)의 방법에 준하여 hydrodistillation 방법을 이용함. 원시료 99 g을 2 L 증류수가 함유되어 있는 cleverger-type의 기구에 침지한 후 300°C 조건에서 6시간 동안 증류함. 포집된 증류액을 2배 부피 헥산(hexane, HEX)을 가하여 추출한 후 상온에서 질소 농축함.

(3) 결과

(가) 식물추출물의 진딧물 살충활성

- 국·내외 자생식물 298종의 식물추출물을 1,000 µg/mL 수준으로 처리하였을 때, 대부분 0.0~30.0% 수준으로서 살충활성이 매우 낮았으나 그 중 녹나무(*Cinnamomum camphora*) 추출물에서 60% 수준의 살충효능이 관찰됨(표 8).

(나) 녹나무 용매추출물과 정유추출물의 진딧물 살충활성

- 용매추출물의 경우 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 60%의 살충활성이 관찰되었으며 이후 지속적으로 감소하여 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 에서 20% 수준으로 감소하였음(그림 16).
- 정유추출물의 경우 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 90% 이상의 살충활성이 관찰되었으며 125 $\mu\text{g/mL}$ 에서 약 50%의 살충활성이 관찰되었음.

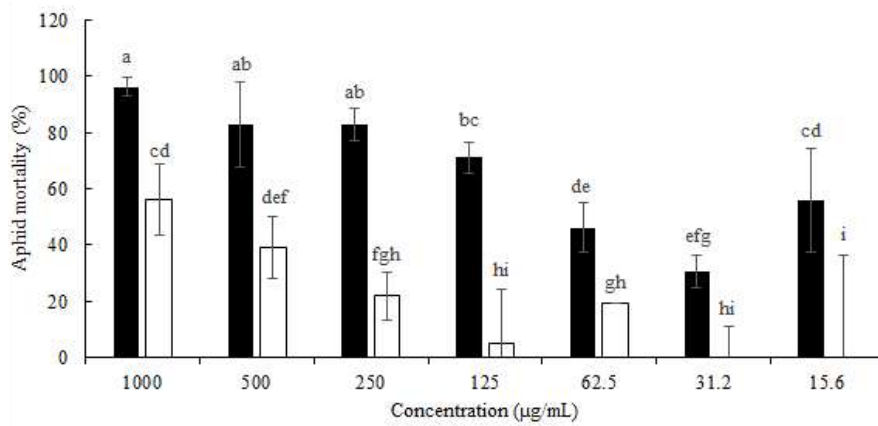


그림 16. 녹나무 용매추출물(□)과 정유추출물(■)의 진딧물 살충활성.

표 8. 식물추출물 탐색

No.	Scientific name	Activity ¹⁾	No.	Scientific name	Activity ¹⁾	No.	Scientific name	Activity ¹⁾
1	<i>Abutilon indicum</i> L.	-	17	<i>Apodytes dimidiata</i>	-	33	<i>Beilschmiedia vidalii</i>	+
2	<i>Acalypha indica</i> L.	-	18	<i>Aporosa ficifolia</i>	-	34	<i>Berrya mollis</i>	-
3	<i>Acer wilsonii</i> var. <i>longicaudatum</i>	-	19	<i>Aporosa villosa</i>	-	35	<i>Bidens pilosa</i> L.	-
4	<i>Adinandra lutescens</i>	-	20	<i>Aporosa yunnanensis</i>	-	36	<i>Breynia officinalis</i>	-
5	<i>Adinandra poilanei</i>	+	21	<i>Aralia foliolosa</i> var. <i>sikkimensis</i>	-	37	<i>Bridelia monoica</i>	-
6	<i>Aganosma acuminata</i>	-	22	<i>Araucaria cunninghamii</i>	-	38	<i>Bridelia stipularis</i>	-
7	<i>Aglaonema simplex</i>	-	23	<i>Archidendron dalatense</i>	-	39	<i>Brucea sumatrana</i>	-
8	<i>Aidia cochinchinensis</i>	-	24	<i>Archidendron pellitum</i>	-	40	<i>Buddleja asiatica</i>	-
9	<i>Aidia henryi</i>	-	25	<i>Ardisia graciliflora</i>	-	41	<i>Buddleja fallowiana</i>	-
10	<i>Amydrium hainanense</i>	+++	26	<i>Ardisia quinquegona</i> var. <i>latifolia</i>	-	42	<i>Callicarpa rubella</i>	-
11	<i>Anacolosia poilanei</i>	-	27	<i>Ardisia stylosa</i>	-	43	<i>Calophyllum calaba</i> var. <i>bracteatum</i>	-
12	<i>Ancistrocladus extensus</i>	-	28	<i>Argyreia monosperma</i>	-	44	<i>Camellia forrestii</i>	-
13	<i>Antidesma</i> <i>cochinchinense</i>	-	29	<i>Baissea acuminata</i>	-	45	<i>Camellia sinensis</i> var. <i>bohea</i> cultivars	-
14	<i>Antidesma henryi</i>	-	30	<i>Barringtonia annamica</i>	-	46	<i>Campylotropis delavayi</i>	-
15	<i>Antidesma velutinosum</i>	-	31	<i>Bauhinia lorantha</i>	-	47	<i>Canarium subulatum</i>	-
16	<i>Antidesma walkeri</i>	-	32	<i>Bauhinia rubrovillosa</i>	-	48	<i>Canthium dicoccum</i> var. <i>rostratum</i>	-

¹⁾ Insecticidal activity: < 20%, - ; 20~40%, +; 40~60%, ++; 60% < +++

표 8. 식물추출물 탐색 (계속)

No.	Scientific name	Activity ¹⁾	No.	Scientific name	Activity ¹⁾	No.	Scientific name	Activity ¹⁾
49	<i>Capparis acutifolia</i>	-	66	<i>Chaenomeles speciosa</i>	-	83	<i>Cratoxylum ligustrinum</i>	-
50	<i>Carallia lucida</i>	-	67	<i>Cinnamomum camphora</i>	++	84	<i>Cryptolepis buchananii</i>	-
51	<i>Cardiospermum halicacabum</i> L.	-	68	<i>Cinnamomum glanduliferum</i>	+	85	<i>Cudrania pubescens</i>	-
52	<i>Careya sphaerica</i>	-	69	<i>Cinnamomum tamala</i>	+	86	<i>Dalbergia cochinchinensis</i>	-
53	<i>Carpinus poilanei</i>	-	70	<i>Cissus assamica</i>	-	87	<i>Dasymaschalon glaucum</i>	+
54	<i>Caryota mitis</i>	-	71	<i>Citrus medica</i> L.	-	88	<i>Dasymaschalon rostratum</i>	-
55	<i>Casearia kurzii</i>	-	72	<i>Clianthus scandens</i>	-	89	<i>Davallia formosana</i>	-
56	<i>Cassia auriculata</i> L.	-	73	<i>Cnestis palala</i>	-	90	<i>Debregeasia edulis</i>	-
57	<i>Cassia mimosoides</i> L.	-	74	<i>Cnestis ramiflora</i>	+	91	<i>Dehaasia cuneata</i> var. <i>longifolia</i>	+
58	<i>Cassia tora</i> L.	-	75	<i>Colocasia gigantea</i>	-	92	<i>Dendrotrophe umbellata</i>	+
59	<i>Castanopsise chidnocarpa</i>	++	76	<i>Combretum deciduum</i>	-	93	<i>Derris caudatilimba</i>	+
60	<i>Casuarina equisetifolia</i> L.	-	77	<i>Connarus paniculatus</i>	-	94	<i>Derris ferruginea</i>	-
61	<i>Catunaregam tomentosa</i>	-	78	<i>Corchorus olitorius</i> L.	-	95	<i>Desmos pedunculatus</i>	-
62	<i>Ceanothus asiaticus</i> L.	-	79	<i>Cordia wallichii</i>	-	96	<i>Dillenia ovata</i>	-
63	<i>Cedrela fissilis</i>	-	80	<i>Craniotome furcata</i>	-	97	<i>Diospyros ehretioides</i>	++
64	<i>Celastrus paniculatus</i>	-	81	<i>Crateva nurvala</i>	-	98	<i>Diospyros hayatae</i>	-
65	<i>Celtis philippinensis</i>	-	82	<i>Cratoxylum formosum</i>	-	99	<i>Diospyros rhodocalyx</i>	-

¹⁾ Insecticidal activity: < 20%, - ; 20~40%, +; 40~60%, ++; 60% < +++

표 8. 식물추출물 탐색 (계속)

No.	Scientific name	Activity ¹⁾	No.	Scientific name	Activity ¹⁾	No.	Scientific name	Activity ¹⁾
100	<i>Diplectria barbata</i>	-	117	<i>Ficus variolosa</i>	-	134	<i>Glochidion sphaerogynum</i>	-
101	<i>Dipterocarpus obtusifolius</i>	-	118	<i>Fortunella polyandra</i>	-	135	<i>Glycosmis parviflora</i>	-
102	<i>Elaeagnus delavayi</i>	-	119	<i>Garcinia hanburyi</i>	+	136	<i>Gomphia serrata</i>	-
103	<i>Elaeocarpus braceanus</i>	-	120	<i>Garcinia multiflora</i>	-	137	<i>Gomphostemma javanicum</i>	+
104	<i>Elaeocarpus floribundus</i>	-	121	<i>Garcinia paucinervis</i>	-	138	<i>Gordonia longicarpa</i>	-
105	<i>Elaeocarpus hainanensis</i>	-	122	<i>Garcinia pedunculata</i>	+	139	<i>Grewia astropetala</i>	-
106	<i>Elaeocarpus sylvestris</i>	-	123	<i>Garcinia subelliptica</i>	-	140	<i>Hedyotis tenelliflora</i>	-
107	<i>Engelhardia serrata</i> var. <i>cambodica</i>	-	124	<i>Gardenia cambodiana</i>	-	141	<i>Helicia formosana</i>	-
108	<i>Eriobotrya bengalensis</i>	-	125	<i>Gardenia philastreii</i>	-	142	<i>Helicia pyrrobotrya</i>	-
109	<i>Erythrina indica</i>	-	126	<i>Gelsemium elegans</i>	-	143	<i>Heteropanax fragrans</i>	-
110	<i>Erythralium scandens</i>	-	127	<i>Getonia floribunda</i>	-	144	<i>Hibiscus congestiflorus</i>	-
111	<i>Euodia leptia</i>	-	128	<i>Getonia floribunda</i> Roxb.	-	145	<i>Hibiscus mesnyi</i>	-
112	<i>Eurya japonica</i> var. <i>harmandii</i>	-	129	<i>Ginkgo biloba</i>	+	146	<i>Holarrhena pubescens</i>	-
113	<i>Fagraea fragrans</i>	-	130	<i>Glochidion balansae</i>	-	147	<i>Homalium hainanense</i>	-
114	<i>Ficus stricta</i>	-	131	<i>Glochidion eriocarpum</i>	-	148	<i>Hopea hainanensis</i>	-
115	<i>Ficus superba</i> var. <i>japonica</i>	-	132	<i>Glochidion falcatilimum</i>	-	149	<i>Hydnocarpus clemensorum</i>	-
116	<i>Ficus tinctoria</i> subsp. <i>gibbosa</i>	-	133	<i>Glochidion lanceolarium</i>	-	150	<i>Hygrophila salicifolia</i>	-

¹⁾ Insecticidal activity: < 20%, - ; 20~40%, +; 40~60%, ++; 60% < +++

표 8. 식물추출물 탐색 (계속)

No.	Scientific name	Activity ¹⁾	No.	Scientific name	Activity ¹⁾	No.	Scientific name	Activity ¹⁾
151	<i>Hymenopyramis brachiata</i>	-	168	<i>Lithocarpus fohaiensis</i>	-	185	<i>Meibomia godefroyana</i>	-
152	<i>Indosinia involucrata</i>	-	169	<i>Lithocarpus gigantophyllus</i>	-	186	<i>Melastoma normale</i>	-
153	<i>Inula helenium</i> L.	++	170	<i>Lithocarpus lepidocarpus</i>	-	187	<i>Melia azedarach</i> L.	-
154	<i>Irvingia malayana</i>	-	171	<i>Lithocarpus polystachyus</i>	-	188	<i>Melodorum hahnii</i>	-
155	<i>Ixora coccinea</i> L.	-	172	<i>Litsea cubeba</i>	-	189	<i>Memecylon chevalieri</i>	-
156	<i>Jasminum pierreanum</i>	+	173	<i>Litsea monopetala</i>	-	190	<i>Memecylon fruticosum</i>	-
157	<i>Keteleeria evelyniana</i>	-	174	<i>Macaranga denticulata</i>	-	191	<i>Mespilus bengalensis</i>	-
158	<i>Knema erratica</i>	-	175	<i>Macaranga kurzii</i>	-	192	<i>Michelia yunnanensis</i>	-
159	<i>Lagerstroemia speciosa</i>	+	176	<i>Macaranga trichocarpa</i>	-	193	<i>Microcos paniculata</i> L.	-
160	<i>Lansium domesticum</i>	-	177	<i>Machilus bombycina</i>	-	194	<i>Micromelum hirsutum</i>	-
161	<i>Lasianthus hoaensis</i>	-	178	<i>Machilus robusta</i>	-	195	<i>Miliusa velutina</i>	-
162	<i>Lasianthus japonicus</i>	-	179	<i>Machilus thunbergii</i> var. <i>condorensis</i>	-	196	<i>Millettia leptobotrya</i>	-
163	<i>Laurocerasus javanica</i>	-	180	<i>Maesa elongata</i>	-	197	<i>Mollugo pentaphylla</i> L.	-
164	<i>Laurocerasus undulata</i> .	-	181	<i>Maesa membranacea</i>	-	198	<i>Momordica subangulata</i>	-
165	<i>Lindera spicata</i>	-	182	<i>Mallotus apelta</i>	-	199	<i>Myxopyrum smilacifolium</i>	-
166	<i>Liquidambar formosana</i>	+	183	<i>Mallotus contubernalis</i>	-	200	<i>Neolitsea elaeocarpa</i>	-
167	<i>Lithocarpus annamensis</i>	-	184	<i>Manilkara zapota</i>	-	201	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	+

¹⁾ Insecticidal activity: < 20%, - ; 20~40%, +; 40~60%, ++; 60% < +++

표 8. 식물추출물 탐색 (계속)

No.	Scientific name	Activity ¹⁾	No.	Scientific name	Activity ¹⁾	No.	Scientific name	Activity ¹⁾
202	<i>Nothaphoebe umbelliflora</i>	-	220	<i>Polygala oligosperma</i>	++	238	<i>Rothmannia wittii</i>	-
203	<i>Ochna integerrima</i>	+	221	<i>Polyosma dolichocarpa</i>	-	239	<i>Rourea minor</i>	-
204	<i>Olax obtusa</i>	-	222	<i>Prunus arborea</i>	-	240	<i>Rubus involucratus</i>	-
205	<i>Oldenlandia capitellata</i>	-	223	<i>Prunus fordiana</i>	-	241	<i>Rubus obcordatus</i>	-
206	<i>Ophiorrhiza japonica</i>	-	224	<i>Prunus zippeliana</i>	-	242	<i>Salacia chinensis</i> L.	-
207	<i>Ormosia pinnata</i>	-	225	<i>Pseudodissochaeta septentrionalis</i>	-	243	<i>Salacia noronhioides</i>	-
208	<i>Paliurus ramosissimus</i>	-	226	<i>Psychotria bonii</i>	-	244	<i>Salacia verrucosa</i>	-
209	<i>Pandanus acaulescens</i>	-	227	<i>Psychotria yunnanensis</i>	-	245	<i>Sansevieria trifasciata</i>	-
210	<i>Parabarium quintaretii</i>	-	228	<i>Pteridrys cnemidaria</i> C.	-	246	<i>Sapium sebiferum</i>	+
211	<i>Parthenocissus pedata</i>	-	229	<i>Pterospermum megalocarpum</i>	-	247	<i>Saprosma verrucosum</i>	-
212	<i>Peltophorum dasyrachis</i>	-	230	<i>Punica granatum</i> L.	-	248	<i>Sarcocephalus cordatus</i>	-
213	<i>Perilla frutescens</i>	-	231	<i>Pyrrosia nummularifolia</i>	-	249	<i>Sauropus macranthus</i>	+
214	<i>Peristrophe baphica</i>	-	232	<i>Rhaphidophora lancifolia</i>	+	250	<i>Schefflera elliptica</i>	-
215	<i>Phoebe tavoyana</i>	+	233	<i>Rhododendron oxyphyllum</i>	-	251	<i>Schima crenata</i>	-
216	<i>Phyllanthus welwitschianus</i>	-	234	<i>Rhododendron spiciferum</i>	-	252	<i>Schima wallichii</i>	-
217	<i>Polyalthia cerasoides</i>	-	235	<i>Rhoeo discolor</i>	-	253	<i>Schismatoglottis cadierei</i>	-
218	<i>Polyalthia oligogyna</i>	+	236	<i>Ricinus communis</i> L.	-	254	<i>Shorea siamensis</i>	-
219	<i>Polyalthia simiarum</i>	-	237	<i>Rinorea longiracemosa</i>	-	255	<i>Shorea vulgaris</i>	+

¹⁾ Insecticidal activity: < 20%, - ; 20~40%, +; 40~60%, ++; 60% < +++

표 8. 식물추출물 탐색 (계속)

No.	Scientific name	Activity ¹⁾	No.	Scientific name	Activity ¹⁾	No.	Scientific name	Activity ¹⁾
256	<i>Sinoadina racemosa</i>	+	271	<i>Syzygium baviense</i>	-	286	<i>Trigonostemon reidioides</i>	-
257	<i>Smilax macrocarpa</i>	-	272	<i>Syzygium chloranthum</i>	-	287	<i>Uncaria macrophylla</i>	-
258	<i>Sphenodesme thorelii</i>	-	273	<i>Syzygium cumini</i>	-	288	<i>Uraria crinita</i>	-
259	<i>Stixis scandens</i>	+	274	<i>Syzygium fastigiatum</i>	-	289	<i>Urobotrya siamensis</i>	-
260	<i>Strobilanthes echinata</i>	-	275	<i>Syzygium mekongense</i>	-	290	<i>Urophyllum chinense</i>	-
261	<i>Strophanthus wallichii</i>	-	276	<i>Syzygium oblatum</i>	-	291	<i>Uvaria rufa</i>	-
262	<i>Styrax rugosus</i>	-	277	<i>Tabernaemontana yunnanensis</i>	-	292	<i>Vaccinium duclouxii</i>	-
263	<i>Styrax suberifolius</i> var. <i>caloneurus</i>	-	278	<i>Tamarix chinensis</i>	-	293	<i>Vaccinium iteophyllum</i>	-
264	<i>Symphorema involucratum</i>	-	279	<i>Terminalia alata</i>	-	294	<i>Vitis planicaulis</i>	-
265	<i>Symplocos glomerata</i>	-	280	<i>Tetrameles nudiflora</i>	-	295	<i>Walsura robusta</i>	-
266	<i>Symplocos glomerata</i> subsp. <i>congesta</i> var. <i>poilanei</i>	-	281	<i>Tetrastigma cruciatum</i>	-	296	<i>Zanthoxylum rhetsa</i>	-
267	<i>Symplocos henschelii</i>	-	282	<i>Tetrastigma erubescens</i>	-	297	<i>Zingiber cochinchinense</i>	+
268	<i>Symplocos longifolia</i>	-	283	<i>Tetrastigma laevigatum</i>	-	298	<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i>	-
269	<i>Symplocos racemosa</i>	-	284	<i>Thevetia peruviana</i>	+			
270	<i>Syzygium albiflorum</i>	-	285	<i>Tinospora crispa</i>	-			

¹⁾ Insecticidal activity: < 20%, - ; 20~40%, +; 40~60%, ++; 60% < +++

나. 녹나무 추출물의 진딧물 살충효능

(1) 연구목적

- 복숭아혹진딧물에 대한 우수한 활성을 보이는 녹나무 추출물의 살충효능 평가

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 식물: 녹나무(*Cinnamomum camphora*)
- ② 공시 해충: 복숭아혹진딧물
- ③ 시약: dimethyl sulfoxide : methanol (4:1,v/v) 혼합액, acetone

(나) 시험방법

① 살충효능 시험

- 접촉독성은 상기와 같은 Kim 등(2007)의 방법에 준하여 실시하였고, 각각의 실험은 3반복 이상 수행, 살충효율은 진딧물의 생충수를 고려한 Abbott's 식(1925)을 사용함.
- 기피효과는 Ikeura 등(2012)의 방법을 변형하여 실시하였으며 식물추출물 시료를 고농도의 아세톤(5% 이하)에 용해한 후 증류수에 적절한 농도(5,000~200 µg/mL)로 희석함. 준비된 시료에 배추 잎(15 x 15 mm)을 5초간 침액한 후 수분이 함유된 여과지가 깔린 plate 끝부분에 배치함. 이 후 진딧물 15 마리를 plate 중앙에 안치 후, 파라필름으로 밀봉하였으며 25 ± 2°C, 광주기 16L : 8D, 상대습도 65 ± 5% 조건에 배치함. 실험은 총 3반복 수행하였음.
- 훈증효과는 2분할 plate 한 면에 수분이 함유된 여과지를 깔고 그 위에 배추 잎을 식재한 후 진딧물 10마리를 안치함. 이 후 원형여과지를 식물 추출물에 5초간 침액한 후 plate의 나머지 한쪽 면에 배치함. 파라필름으로 밀봉하여 25 ± 2°C, 광주기 16L : 8D, 상대습도 65 ± 5% 조건에 배치함. 각각의 실험은 3반복 수행하였으며 살충효율은 진딧물의 생충수를 고려한 Abbott's 식(1925)을 사용함.

② 효능 평가

- 접촉독성 및 훈증효과 평가
살충율 (%) = $(A-B)/B \times 100$ (A: 대조구 생충수, B: 처리구 생충수)
- 기피효과 평가
기피율 (%) = $(A-B)/(A) \times 100$ (A: 대조구 진딧물 수, B: 처리구 진딧물 수)

(3) 결과

(가) 녹나무 정유 추출물의 진딧물 반수치사 농도

- 반수치사 농도는 처리 24, 48시간 후 각각 314.1, 275.1 µg/mL 으로 관찰되었으며, 95% 신뢰한계농도는 각각 231.7~423.0 과 167.4~420.5 수준이었음(표 9).

(나) 녹나무 정유 추출물의 기피 및 훈증독성

- 기피효과는 2,000 µg/mL 수준에서 관찰되지 않음. 5,000 µg/mL 수준에서 4.4%로 매우 저조하였음(표 10). 훈증효과 또한 2,000 µg/mL 수준에서 14.6%로 낮은수준임.

(4) 결론

- 녹나무 정유 추출물의 복숭아혹진딧물에 대한 살충활성은 접촉독성에서 기인한 것으로 판단됨.

표 9. 녹나무 정유추출물의 진딧물 반수치사 농도

처리구	접촉독성			
	24h		48h	
	반수치사 농도	95% 신뢰한계구간	반수치사 농도	95% 신뢰한계구간
녹나무 정유추출물	314.1	231.7 - 423.0	275.1	167.4 - 420.5

표 10. 녹나무 정유추출물의 진딧물 기피 및 혼증효과

처리농도 (µg/mL)	기피 효과(%)	혼증 효과(%)
Control	4.4 ± 3.8	5.3 ± 8.3
100	-	18.6 ± 12.2
200	0.0 ± 0.0	8.0 ± 0.0
500	6.7 ± 6.7	22.6 ± 12.2
1,000	6.7 ± 6.7	20.0 ± 8.0
2,000	-	14.6 ± 9.2
5,000	4.4 ± 7.7	-

다. 녹나무 정유추출물의 성분 분석 및 살충활성

(1) 연구목적

- 선발된 식물 추출물인 녹나무 정유추출물의 구성성분 분석 및 효과 검증.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 식물: 녹나무(*Cinnamomum camphora*)
- ② 공시 해충: 복숭아혹진딧물

(나) 시험방법

① 살충활성물질 추출

- 살충활성을 나타낸 추출물의 활성물질을 분리하기 위해 silica gel 컬럼 크로마토그래피 정제를 수행함. 상기에서 정유추출을 통해 얻은 살충활성을 나타낸 추출물을 헥산에 고농도로 용해 한 후 silica gel(kiesel gel 60, 230-400 mesh, Merck)이 함유된 유리 컬럼에 점적하여 흡착시킴.
- 흡착된 식물정유를 HEX: EtOAc (hexane:ethyl acetate) 혼합용매계를 이용하여 Fr. 1; HEX : EtOAc 10:0(v/v), Fr. 2; HEX : EtOAc 7:3(v/v), Fr. 3; HEX : EtOAc 5:5 (v/v), Fr. 4; HEX : EtOAc 3:7(v/v), Fr. 5; MeOH 10 순으로 용출하였음.

② 살충활성물질 분석

- GC-MS의 재원 및 분석조건은 상기에서 언급한 조건과 동일하였으며 구성성분은 n-alkanes C₆-C₂₆(sigma aldrich) 표준시약과의 Kovats index를 계산하여 규명함.

③ 살충활성물질의 협력작용 시험

- 살충활성 추출물의 주성분과 나머지 구성성분들 간의 살충활성 협력효과는 독립처리와 혼합처리의 따른 진딧물 반수치사 농도를 비교하여 조사함. 각각의 조성물질의 표준품을 이용하여 각각의 물질을 1,000~15.6 µg/mL 수준으로 조제 한 후 진딧물에 국소처리 하였음.
- 혼합처리의 경우 주성분의 농도는 진딧물에 대한 무영향농도(NOEC, no observed effect concentration)로서 500 µg/mL 수준임.

(3) 결과

(가) 녹나무 정유 추출물의 구성성분

- 상기 추출물에 대해 GC-MS 분석을 수행하여 총 11개 성분이 검출되었음(그림 17).
- 각각의 성분에 LRI(linear retention index)값을 Senatore 등(2005)와 Pistelli 등(2013)과 같은 기존 문헌의 LRI 값과 비교한 결과 각각의 성분은 표 11과 같이 규명되었음. 구성성분 중 camphor이 74.79%로 가장 풍부한 성분이었으며 β-caryophyllen(8.93%), caryophyllene oxid(4.29%), α-terpineol(4.08), 4-terpineol(2.24%), borneol(1.53%), humulene(1.46%) 등의 성분이 확인되었음.

(나) 녹나무 정유 추출물의 살충활성 물질 분리 및 효능조사

- 복숭아혹진딧물 살충활성은 hexane 7 : ethyl acetate 3 혼합용매계인 fraction 2에서 90% 이상의 수준으로 관찰됨. 나머지 분획은 40% 미만으로서 관찰됨. crude 추출물의 진딧물 살충활성은 60% 수준으로서 fraction 2의 살충활성 보다 낮았음(표 12).
- 녹나무 정유 추출물 활성분획(fraction no.2)의 조성을 조사하기 위해 GC/MS 분석을 수행하였음 (그림 18, 표 13). 활성분획에서 총 5개의 물질이 검출되었으며, library search 결과, camphor(60.4%), borneol(3.7%), 4-terpineol(6.0%), α-terpineol(15.0%) 그리고 caryophyllene oxide(14.9%) 이었음.
- 활성분획 조성성분의 단독처리 시 24 시간 후 반수치사 농도는 caryophyllene oxide 가 237 µg/mL 로서 가장 우수하였으며 α-terpineol(551 µg/mL), borneol (551 µg/mL), 4-terpineol (915 µg/mL)로 조사되었음. 처리 48 시간 후 반수치사 농도는 caryophyllene oxide가 241 µg/mL 로서 가장 우수하였으며 α-terpineol(484 µg/mL), borneol(498 µg/mL), 4-terpineol(681 µg/mL)로 조사되었음(표 14).

(다) Camphor 혼합처리에 따른 진딧물 반수치사 농도와 협력효과

- Camphor과의 혼합처리에 따른 복숭아혹진딧물의 반수치사 농도는 처리 24시간 후의 단독처리에 비해 혼합처리 하였을 때 모든 처리구에서 상승효과를 보였으며 α-terpineol과 caryophyllene oxide의 경우 1.46배의 반수치사 농도가 낮아졌음. 한편, 처리 48시간후의 상승효과는 caryophyllene oxide를 제외한 처리구에서는 관찰되지 않았으며 caryophyllene oxide의 경우 2.15의 협력효과가 나타났음(표 15).

(4) 결론

- 녹나무 정유 추출물 구성성분 중 가장 높은 비율을 차지하고 있던 camphor의 경우 최고농도 수준인 1,000 µg/mL 수준에서 반수치사농도가 나타나지 않았음. 이는 camphor이 복숭아혹진딧물 살충활성 직접적으로 관여하지 않는 것을 의미함.
- 한편, 녹나무 정유 추출물 구성성분 중 camphor과 caryophyllene oxide간의 협력효과가 있었음.

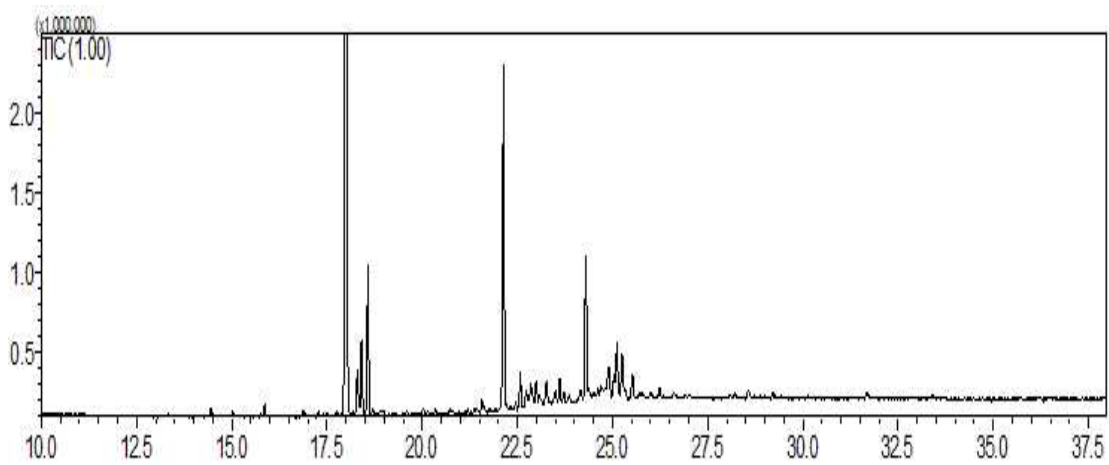


그림 17. 녹나무 정유추출물의 GC-MS 크로마토그램.

표 11. 녹나무 정유추출물의 GC-MS 분석표

LRI ¹⁾	Constituents	Identification ²⁾			Ratio (area %)
940	β-Pinene	RI	MS		0.53
1032	Limonene	RI	MS		0.69
1042	β-Ocimene	RI	MS		0.39
1148	Camphor	RI	MS	Ref	74.97
1169	Borneol	RI	MS	Ref	1.53
1174	4-Terpineol	RI	MS	Ref	2.24
1192	α-Terpineol	RI	MS	Ref	4.08
1418	β-Caryophyllen	RI	MS		8.93
1456	Humulene	RI	MS		1.46
1481	Germacrene D	RI	MS		0.90
1582	Caryophyllene oxide	RI	MS	Ref	4.29

¹⁾ LRI, linear retention indices on DB-5 column.

²⁾ Identification; RI, retention index; MS, mass spectrum; Ref, reference materials, retention time identical to authentic compounds.

표 12. 녹나무 정유 추출물의 silica gel 분획의 진딧물 살충활성

Fractions number	Elution solvent (v/v)	Concentration (mg /L)	Mortality (%) ¹⁾
Control	-	-	- 2.86 ± 8.5
Fr. 1	HEX : EtOAc (10:0)	250	20.0 ± 4.9 e
Fr. 2	HEX : EtOAc (7:3)	250	91.4 ± 8.5 a
Fr. 3	HEX : EtOAc (5:5)	250	22.8 ± 8.5 de
Fr. 4	HEX : EtOAc (3:7)	250	31.4 ± 0.0 cd
Fr. 5	MeOH (10)	250	37.1 ± 4.9 e

¹⁾The data are means ± SD of triplicates.

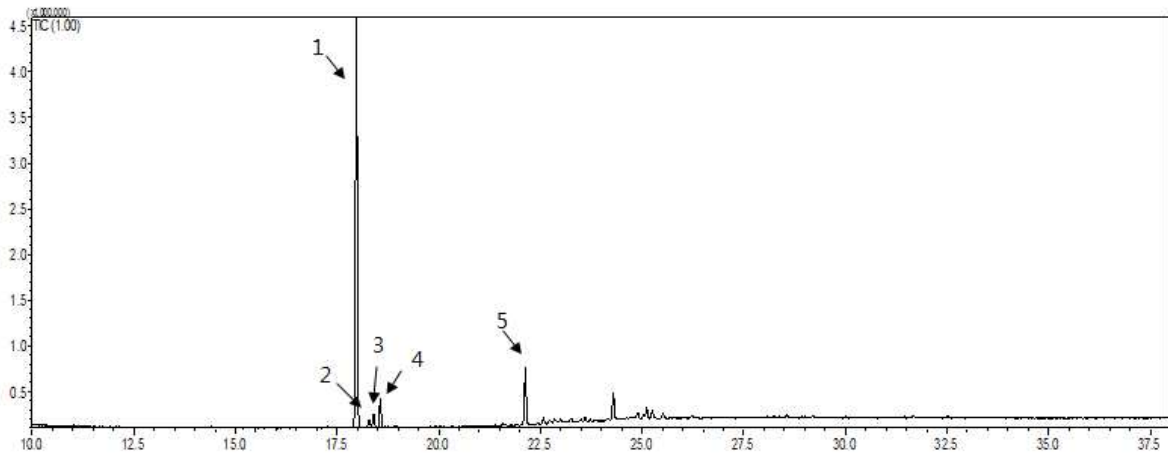


그림 18. 활성분획의 GC-MS chromatogram.

표 13. 활성분획의 GC-MS 분석표

No	LRI ¹⁾	Constituents	Retention time (min)	Ratio (area %)
1	1148	Camphor	17.9	60.4
2	1169	Borneol	18.3	5.7
3	1174	4-Terpineol	18.4	8.0
4	1192	α-Terpineol	18.5	11.0
5	1582	Caryophyllene oxide	24.3	14.9

¹⁾ LRI, linear retention indices on DB-5 column.

표 14. 활성분획 조성물질의 반수치사 농도

Essential components	LC ₅₀ values (µg/mL) ¹⁾			
	24 h		48 h	
	LC ₅₀	95% CL ²⁾	LC ₅₀	95% CL ²⁾
Camphor	> 1,000	-	> 1,000	-
Borneol	551	457 - 686	498	418 - 612
4-Terpineol	915	725 - 1277	681	475 - 1208
α-Terpineol	551	461 - 677	484	393 - 617
Caryophyllene oxide	237	170 - 344	241	171 - 348

¹⁾ The data are means ± SD of triplicates.

²⁾ 95% confidence limit

표 15. 활성분획 조성성분의 camphor 혼합처리에 따른 진딧물 반수치사 농도

Essential components	LC ₅₀ values (µg/mL) ¹⁾			
	24 h		48 h	
	LC ₅₀	Synergism ratio ²⁾	LC ₅₀	Synergism ratio ²⁾
Borneol	440	1.25	556	0.89
4-Terpineol	717	1.27	796	0.85
α-Terpineol	523	1.05	492	0.98
Caryophyllene oxide	162	1.46	112	2.15

¹⁾ The data are means ± SD of triplicates.

²⁾ LC₅₀ of single treatments divided by LC₅₀ of co-treatments with camphor. The LC₅₀ of single treatments were shown in table 7.

다. Camphor 협력효과 기작조사

(1) 연구목적

- 녹나무 정유추출물의 구성성분간의 협력효과 기작조사를 위해 진딧물 체내로 침투한 물질의 양 분석 및 조사.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 식물: 녹나무(*Cinnamomum camphora*)
- ② 공시 해충: 복숭아혹진딧물

(나) 시험방법

① 추출

- 주성분의 처리농도는 진딧물에 대한 무영향농도(500 µg/mL)이었으며, 유효성분의 처리농도는 LC₃₀, LC₂₀(125, 62.5 µg/L) 수준임. 각각의 물질을 진딧물 100 마리에 단독 및 혼합하여 상기와 같이 국소처리 하였음.
- 진딧물 표면에 남아있는 물질을 헥산을 가하여 제거 한 후 진딧물을 헥산 200 µL가 첨가되어 있는 EP-tube(Eppendorf, 1.5 mL)에 옮김. 이 후 tissue homogenizer를 이용하여 진딧물을 균질화 한 후 10분간 음파처리(sonication)함. 불순물을 제거하기 위해 상정액을 원심분리와 필터 한 후 상정액 2 µL를 취하여 GC/MS 분석함.

② 기기 분석

- GC/MS의 재원 및 조건은 상기와 동일하였으며 분석은 SIM(selective ion monitoring) mode를 이용함. 주성분의 선택 이온값은 m/z 152, 유효성분은 m/z 79 이었으며 각각의 물질의 검량곡선을 표준시약을 이용하여 작성하였음.

(3) 결과

(가) Camphor 협력효과 기작조사

- 독립 및 혼합 처리에 따른 진딧물 체내 물질을 GC/MS 분석을 수행함(그림 19).
- 무처리구인 blank와 단독처리 chromatogram 간의 뚜렷한 차이는 관찰되지 않았음. 하지만, CAM 과 CPO 혼합처리시에는 머무름 시간 17.9(CAM)과 24.2(CPO)분에서 표준물질과 동일한 머무름 시간을 갖는 피크가 관찰되었음.
- 표준물질을 이용하여 진딧물 체내의 CAM과 CPO의 정량분석을 수행함(표 16).
- CAM의 단독처리의 경우 진딧물 체내의 CAM은 관찰되지 않은 반면, CPO의 단독 처리의 경우 62.5, 125 µg/mL의 농도 처리구에서 각각 392와 495 ng/adult의 수준으로 검출되었음.
- CAM과 CPO의 혼합처리의 경우 모든 혼합처리 구간에서 독립처리 보다 체내의 두 물질의 양이 현저히 높았음. 즉, 진딧물 체내의 성분이 전혀 검출되지 않았던 CAM 500은 CPO와의 혼합처리결과 체내의 양이 377과 575 ng/adult 수준으로 증가하였음. 또한, CPO 62.5 혼합처리의 경우 체내의 양이 477 ng/adult 수준으로서 두 배 높은 농도로서 125 µg/mL 수준으로 독립처리 한 양인 495 ng/adult과 유사한 수준으로서 검출되었음.

(나) Camphor 협력효과 살충활성

- 그림 20은 상기 두 물질의 독립 및 혼합처리에 따른 진딧물 살충효능을 나타낸 결과로서 진딧물 살충활성은 caryophyllene oxide 125 µg/mL 독립처리구와 caryophyllene oxide 62.5 혼합처리구에서 50% 수준으로 유사하였음. 이는 각각의 처리구에 진딧물 체내에서 검출된 caryophyllene oxide의 양(caryophyllene oxide 125 µg/mL 독립처리구; 495 ng/adult, caryophyllene oxide 62.5 혼합처리구; 477 ng/adult)과 높은 상관성을 보이는 결과임.

(4) 결론

- camphor는 진딧물에 대해 직접적인 살충활성을 보이지 않으며 녹나무 정유 추출물의 주요 살충물질인 caryophyllene oxide의 진딧물 체내로 침투를 도와주는 역할을 하는 것으로 사료됨.

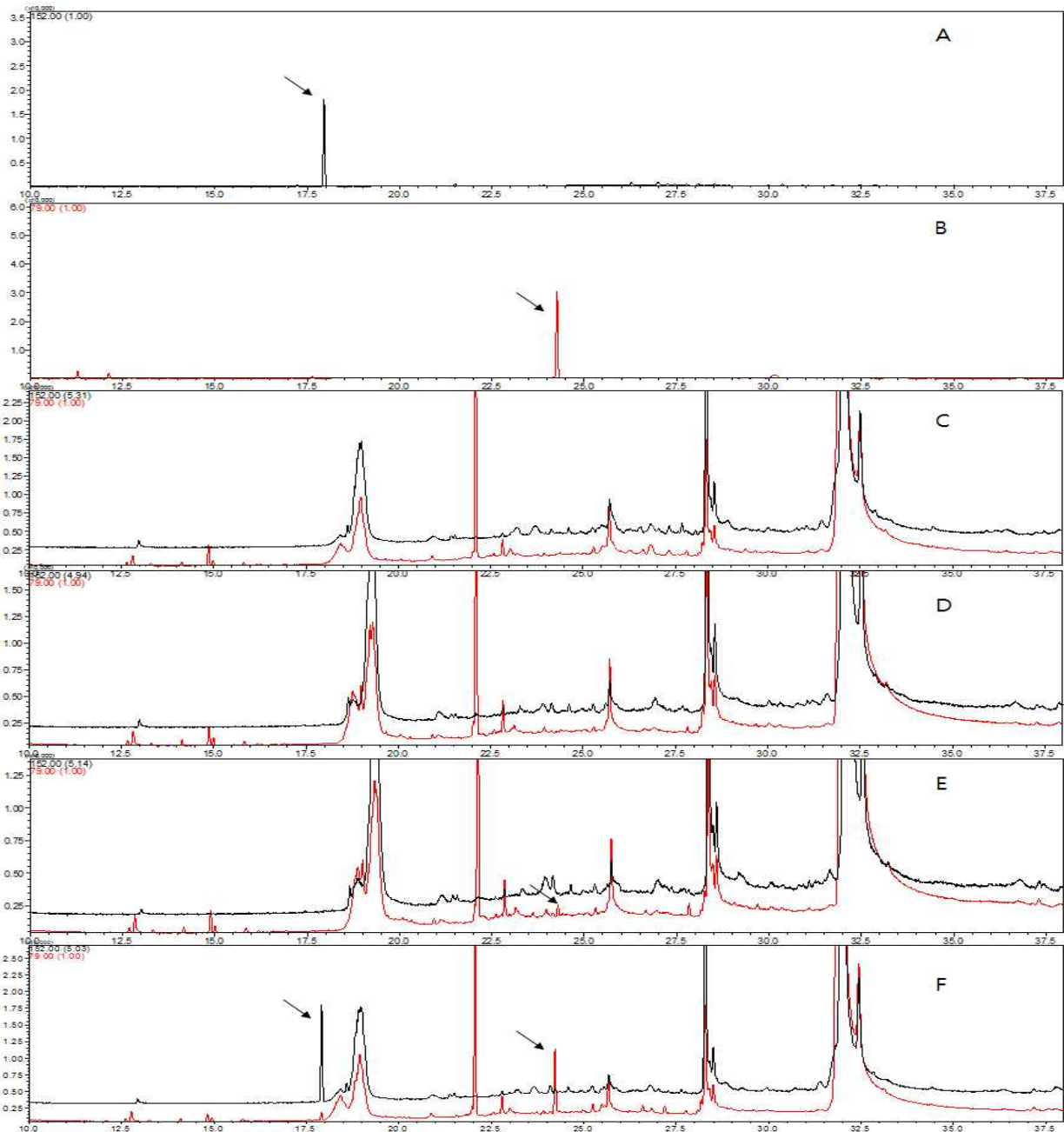


그림 19. CAM과 CPO 독립 및 혼합처리에 따른 진딧물 체내 성분의 GC/MS chromatogram. A. camphor 표준품, B. caryophyllene oxide 표준품, C. 대조구 진딧물 추출물, D. 500 μ g/mL camphor 처리 진딧물 추출물, E. 125 μ g/mL caryophyllene oxide 처리 진딧물 추출물, F. 500 μ g/mL camphor과 125 μ g/mL caryophyllene oxide 혼합처리 진딧물 추출물.

표 16, 단독 및 혼합처리에 따른 진딧물 체내의 CAM과 CPO의 정량분석표

Treatment	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Amount (ng) / adult	
		Camphor	Caryophyllene oxide
Control	-	ND ¹⁾	ND ¹⁾
Camphor	500	ND ¹⁾	-
Caryophyllene oxide	125	-	495 \pm 83
	62.5	-	392 \pm 68
Camphor +	125	575 \pm 38	868 \pm 106
Caryophyllene oxide	62.5	377 \pm 3.6	477 \pm 85

* ND = not detected

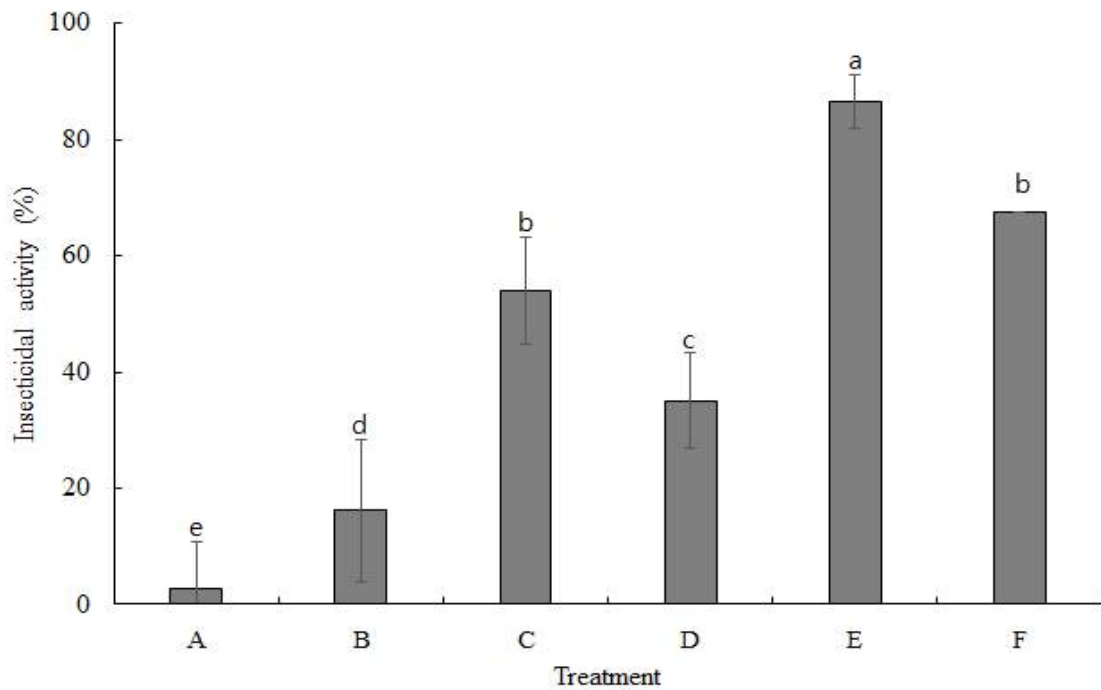


그림 20. camphor (CAM)과 caryophyllene oxid (CPO) 독립 및 혼합 처리에 따른 진딧물 살충 활성. 대조구 (A), camphor 500 $\mu\text{g/mL}$ (B), caryophyllene oxide 125 $\mu\text{g/mL}$ (C), caryophyllene oxide 62.5 $\mu\text{g/mL}$ (D), 125 $\mu\text{g/mL}$ caryophyllene oxide와 500 $\mu\text{g/mL}$ camphor 혼합처리 (E), 62.5 $\mu\text{g/mL}$ caryophyllene oxide와 500 $\mu\text{g/mL}$ camphor 혼합 처리.

제 3절 복숭아혹진딧물 방제용 시제품의 약효 특성 규명

1. 미생물 배양액과 녹나무 정유 추출물의 협력효과

가. 미생물 기반 살충활성 성분과 식물추출물 성분 간의 협력효과

(1) 연구목적

- 균주 Y9 배양액과 녹나무 정유 추출물의 혼합에 따른 협력효과 평가

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 미생물: *Bacillus subtilis* Y9
- ② 공시 식물: 녹나무(*Cinnamomum camphora*)
- ③ 공시 해충: 복숭아혹진딧물

(나) 시험방법

① 살충효능 시험

- 진딧물에 대한 살충효능 시험은 Kim 등(2007)의 방법에 준하여 실시함.
- 각각의 실험은 3반복 이상 수행하였으며 살충효율은 진딧물의 생충수를 고려한 Abbott's 식(1925)을 사용하여 조사함.
- 살충율 (%) = $(A-B) / B \times 100$ (A: 대조구 생충수, B: 처리구 생충수)

(3) 결과

(가) *Bacillus subtilis* Y9 배양액과 식물성 essential oil 혼합액 살충활성

- 녹나무 정유 추출물을 1%와 5% 수준으로 증류수에 첨가한 현탁액의 진딧물 살충효능은 5배와 10배 희석액에서 30% 미만으로서 매우 낮은 수준이었음(표 17).
- 반면, 균주 Y9 배양액에 1% 수준으로 녹나무 정유 추출물을 첨가한 혼합액의 진딧물 살충효능은 10배 희석액에서 100.0% 수준이었으며 40배 희석액에서 63.6% 수준이었음.
- 균주 Y9 배양액에 5% 수준으로 녹나무 정유 추출물을 첨가한 혼합액의 진딧물 살충효능은 20배 희석액에서 100.0%의 살충효능이 관찰되었으며 40배 희석액에서 90.9 % 수준의 살충효능이 관찰되었음.

(나) 미생물 기반 살충활성 성분과 식물추출물 성분간의 협력효과

- 균주 Y9의 유효성분인 surfactin과 녹나무 정유 추출물 주성분인 camphor과의 단독 및 혼합처리에 따른 진딧물 반수치사농도는 표 18과 같음.
- Surfactin의 진딧물 반수치사농도는 처리 24, 48 시간 후 각각 15.6, 15.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 수준이었음. 반면에 surfactin과 camphor을 혼합 처리 할 경우의 진딧물 반수치사농도는 처리 24, 48 시간 후 각각 8.3, 8.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로서 surfactin의 단독처리 반수치사농도와 비교 하였을 때 협력효과는 각각 1.87과 1.84 이었음.

(4) 결론

- 균주 Y9의 배양액을 단독적으로 처리 하였을 때 10배 희석액에서 약 60% 수준의 살충효능을 나타낸 것을 감안 하였을 때 미생물 배양액과 녹나무 정유 추출물은 살충활성 협력효과를 나타내는 것으로 판단되었음. 이는 각각의 유효성분 및 주성분의 협력효과에 기인한 것을 의미하였음.

표 17. *Bacillus subtilis* Y9 배양액과 essential oil의 단독 및 혼합 처리에 따른 복숭아혹진딧물 살충활성.

Dilution Time	Aphid mortality (%) ¹⁾				
	1% essential oil (v/v)	5% essential oil (v/v)	Y9 cultures	Y9 cultures with 1% essential oil (v/v)	Y9 cultures with 5% essential oil (v/v)
5	0.0 ± 0.0	36.3 ± 0.0	78.5 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
10	6.0 ± 5.2	6.0 ± 5.2	60.6 ± 8.2	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
20	-	-	42.4 ± 21.8	84.8 ± 8.25	100.0 ± 0.0
40	-	-	27.2 ± 10.9	63.6 ± 14.3	90.9 ± 4.12
100	-	-	0.0 ± 15.7	0.0 ± 13.8	12.0 ± 13.8

¹⁾ The data are means ± SD of triplicates.

표 18. Surfactin과 camphor 혼합처리에 따른 복숭아혹진딧물 반수치사 농도

Treatment	LC ₅₀ values ¹⁾							
	24 h			48 h				
	LC ₅₀	95% CL ²⁾		Synergism ratio ³⁾	LC ₅₀	95% CL ²⁾		Synergism ratio ³⁾
Surfactin	15.6	8.7	- 31.6	-	15.1	11.1	- 26.3	-
Surfactin + camphor	8.3	6.4	- 11.8	1.87	8.2	6.1	- 12.2	1.84

¹⁾ The data are means ± SD of triplicates.

²⁾ 95% confidence limit

³⁾ LC₅₀ of single treatment of surfactin divided by LC₅₀ of co-treatments with camphor.

2. 혼합제의 기초제제 제조 및 효능평가

가. 계면활성제 첨가에 따른 진딧물 살충효능

(1) 연구목적

- 혼합제의 기초제제를 제조하기 위해 고효성 계면활성제 탐색

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 미생물: *Bacillus subtilis* Y9
- ② 공시 식물: 녹나무(*Cinnamomum camphora*)
- ③ 공시 해충: 복숭아혹진딧물
- ④ 시약: 이온성 계면활성제 6종(CR-SDS, CR-WP110, CR-803, CR-280B, CR-150, CR-250), 비이온성 계면활성제 6종(T-20, T-80, CO25, OP9, TSP-1008, NP10)

(나) 시험방법

① 이온성 계면활성제 함유 기초제제

- 균주 Y9배양액, 3% 상업용 essential oil 그리고 이온성 계면활성제 5%를 혼합함.

② 비이온성 계면활성제 함유 기초제제

- 균주 Y9배양액, 3% 상업용 essential oil 그리고 비이온성 계면활성제 5%를 혼합함.

③ 살충효능 시험

- 진딧물에 대한 살충효능 시험은 Kim 등(2007)의 방법에 준하여 실시함.
- 각각의 실험은 3반복 이상 수행하였으며 살충효율은 진딧물의 생충수를 고려한 Abbott's 식(1925)을 사용하여 조사함.
- 살충율 (%) = $(A-B) / B \times 100$ (A: 대조구 생충수, B: 처리구 생충수)

(3) 결과

(가) 이온성 계면활성제 함유 기초제제

- 이온성 계면활성제의 자체 살충활성은 CR-150을 제외한 5개 품목에서 40% 수준이었으며 CR-150의 자체활성은 100배 희석액에서 70% 수준의 살충활성을 보였음(그림 21).
- 배양액 혼합제와 이온성 계면활성제를 배합하여 처리한 결과 CR-250 배합 처리구에서 살충활성이 자체 활성에 비해 크게 증가하였으며 나머지 처리구의 살충활성은 자체활성 및 배양액 혼합제 처리구와 큰 차이를 보이지 않았음.
- CR-250 배합처리구의 200, 500 배 희석액의 살충활성은 각각 15.3, 10.0% 로 희석 배수에 따른 진딧물 살충활성은 낮은 수준이었음.

(나) 비이온성 계면활성제 함유 기초제제

- 비이온성 계면활성제의 자체 살충활성은 OP9, NP10을 제외한 6개 품목에서 40% 이하 수준이었으며 OP9과 NP10의 자체 살충활성은 100배 희석액 처리구에서 각각 84.6, 100.0% 수준의 살충활성을 보였음(그림 22).

- 배양액 혼합제와 비이온성 계면활성제를 배합하여 처리한 결과 T-80, CO25 배합처리구의 진딧물 살충효능은 100배 희석액에서 60% 이하로서 미생물 혼합제의 살충효능과 유사한 수준이었음.
- T-20과 TSP1008 배합 처리구의 살충효능은 계면활성제 자체 효능 및 미생물 혼합제의 살충효능에 비해 크게 증가하여 200배 희석 처리구에서 각각 67.4, 86.0% 수준의 살충효능을 보였음.
- 계면활성제 자체 살충효능이 높았던 OP9 및 NP10과 미생물 혼합제를 배합처리 한 결과 진딧물 살충효능은 200배 희석처리구에서 각각 90.7, 97.6% 수준이었으며 NP10의 경우 500배 희석처리구에서 74.2%의 높은 살충효능을 보였음.

(4) 결론

- 상기와 같은 결과는 이온성 계면활성제가 배양액 기반 제제에 적합하지 않다는 것을 의미하였으며 비이온성 계면활성제의 희석배수에 따른 진딧물 살충효능과 미생물 혼합제와의 살충효능 상승효과를 고려하였을 때 미생물 혼합제에 적합한 비이온성 계면활성제는 TSP1008, OP9, NP10으로 선정하였음.

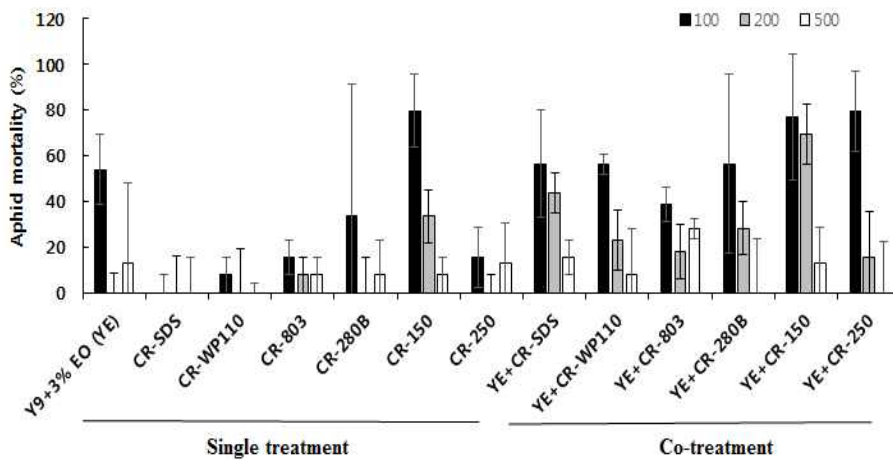


그림 21. 이온성 계면활성제 기반 혼합제의 진딧물 살충활성.

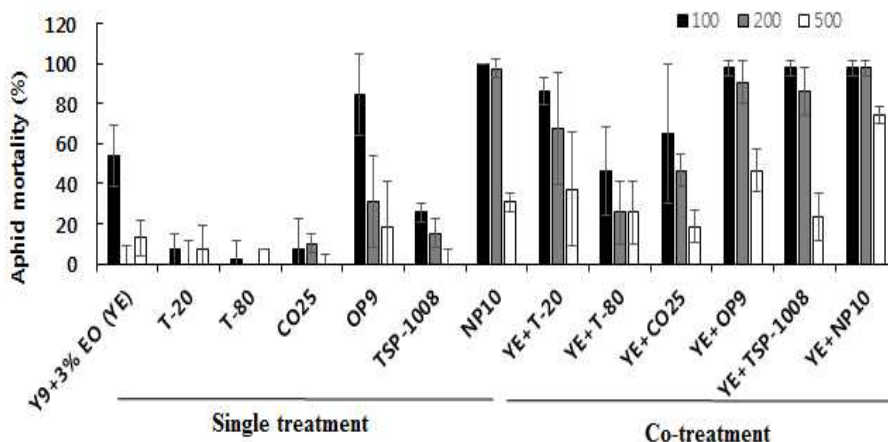


그림 22. 비이온성 계면활성제 기반 혼합제의 진딧물 살충활성.

나. 미생물 기반 기초제제 개발

(1) 연구목적

- 균주 Y9 배양액을 유효성분으로 하여 협력제로 녹나무 정유 추출물 그리고 비이온성 계면활성제가 함유된 제형 개발.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 미생물: *Bacillus subtilis* Y9
- ② 공시 식물: 녹나무(*Cinnamomum camphora*)
- ③ 공시 해충: 복숭아혹진딧물
- ④ 시약: 비이온성 계면활성제 3종(OP9, TSP-1008, NP10)

(나) 시험방법

① 액제형(soluble concentrats, SL) 제제

- 액제형 시제품 1~3은 균주 Y9 배양액 95%(v/v), 녹나무 정유 추출물 3%(v/v) 그리고 계면활성제 2%(v/v)로 구성됨. 각각의 계면활성제는 OP9, TSP1008, NP10이었음. 액제형 시제품 4는 균주 Y9 배양액 90%(v/v), 녹나무 정유 추출물 5%(v/v) 그리고 계면활성제 TSP1008 5%(v/v)로 구성되었음.

② 수화제형(wettable powder, WP) 제제

- 수화제형 시제품 1~3은 균주 Y9 동결건조 분말 90%(w/v), 녹나무 정유 추출물 3%(w/v), 화이트카본 5%(w/v) 그리고 계면활성제 2%(w/v)로 구성됨. 각각의 계면활성제는 OP9, TSP1008, NP10이었음. 수화제형 시제품 4는 균주 Y9 동결건조 분말 70%(w/v), 녹나무 정유 추출물 10%(w/v), 화이트카본 10%(w/v) 그리고 계면활성제 TSP1008 10%(w/v)로 구성되었음. 시제품 5는 균주 Y9 동결건조 분말 10%(w/v), 녹나무 정유 추출물 5%(w/v), 화이트카본 10%(w/v), 카올린 70%(w/v) 그리고 계면활성제 TSP1008 15% (w/v)로 구성되었음.

③ 살충효능 시험

- 진딧물에 대한 살충효능 시험은 Kim 등(2007)의 국소처리법에 준하여 실시함.
- 응애류 및 총체에 대한 살충효능 시험은 분무법을 이용하여 실시함. 수분이 함유된 솜이 깔린 plate(100 x 90 mm)에 해당 해충의 기주식물 잎을 식재한 다음 상기와 같은 방법으로 해충을 안치함. 해충이 안치된 plate를 약제 살포 탑(potter spray tower, Burkard manufacturing Co. Ltd)에 배치한 후 시료 1 mL을 분무함.
- 각각의 실험은 3반복 이상 수행하였으며 살충효율은 진딧물의 생충수를 고려한 Abbott's 식(1925)을 사용하여 조사함.
- 살충율 (%) = $(A-B) / B \times 100$ (A: 대조구 생충수, B: 처리구 생충수)

(3) 결과

(가) 액제형 제제 살충효능 평가

- 상기의 실험결과를 바탕으로 다양하게 조제된 액제형 시제품들의 복숭아혹진딧물 살충효능은 그림 23과 같았음.

- 모든 액제형 시제품들은 100배 희석액에서 90% 이상의 살충효능을 보였음. 액제형 시제품들의 250배 희석액에서 시제품 2와 3의 살충효능은 85.7% 수준이었으며 시제품 1과 4의 살충효능은 65.7% 수준이었음. 500배 희석액에서 복숭아혹진딧물에 대한 살충효능은 시제품 2가 62.8%로서 가장 우수하였으며 시제품 1, 3, 4의 살충효능은 각각 22.8, 31.4 그리고 33.3% 수준이었음.
- 복숭아혹진딧물에 대해 가장 살충효능이 우수하였던 액제형 시제품 2의 적용해충 스펙트럼은 표 19와 같았음.
- 액제형 시제품 2의 목화진딧물에 대한 살충효능은 100, 250, 500 배 희석액에서 각각 100.0, 96.0, 76.0% 수준으로서 복숭아혹진딧물에 대한 살충활성과 유사한 수준이었음. 점박이용애, 꿀 응애에 대한 살충효능은 250배 희석액에서 65.0, 56.0% 수준이었으며 사과 응애에 대한 효능은 낮은 수준이었음. 한편, 오이 총채에 대한 살충효능은 100배 희석액에서 24.0%로서 낮은 살충효능이 관찰되었다.

(나) 수화제형 제제 살충효능 평가

- 상기의 실험결과를 바탕으로 다양하게 조제된 수화제형 시제품들의 복숭아혹진딧물 살충효능은 그림 24와 같았음.
- 시제품 2와 5를 제외한 모든 수화제형 시제품 100배 희석액의 살충효능은 90% 이상으로 조사되었음. 시제품 2의 살충효능은 82.8% 수준이었으며 시제품 5의 살충효능은 46.4% 수준으로서 상대적으로 낮았음. 수화제형 시제품 250배 희석액에서는 시제품 2와 3이 60% 수준의 살충효능을 보였으며 시제품 1과 4의 살충효능은 각각 91.4과 80.9% 수준이었음. 500배 희석액에서 복숭아혹진딧물 살충효능은 시제품 4가 85.7% 수준으로 가장 우수하였으며 시제품 1, 2, 3의 살충효능은 각각 37.1, 31.4 그리고 57.1% 수준이었음.
- 복숭아혹진딧물에 대해 가장 살충효능이 우수하였던 수화제형 시제품 4의 적용해충 스펙트럼은 표 19와 같았음.
- 목화진딧물에 대한 살충효능은 100, 250, 500배 희석액에서 각각 100.0, 92.0, 96.0% 수준으로서 매우 우수하였음. 점박이용애, 꿀 응애에 대한 살충효능은 250배 희석액에서 각각 80.0, 72.0% 수준이었으며 사과 응애에 대한 살충활성은 비교적 낮은 수준이었음. 오이 총채에 대한 살충활성은 액제형 시제품과 동일하게 현저히 낮았음.

(4) 결론

- 수화제형 제제는 유효성분을 함유한 미생물 배양액을 물에 현탁되는 고체에 흡착시킨 고운 가루형태의 제형으로 유효성분이 보다 농축되어 살충효능이 우수함. 반면 제제 제조 시 분말로 변형하는 기술적 공정의 추가는 경제적으로 부담이 됨.
- 상기와 같은 결과에서 살충효능이 우수한 시제품 중 비교적 제조가 용이하고 경제적인 액제형 시제품을 최종 선발하여 소규모 포장 시험을 실시하였음.

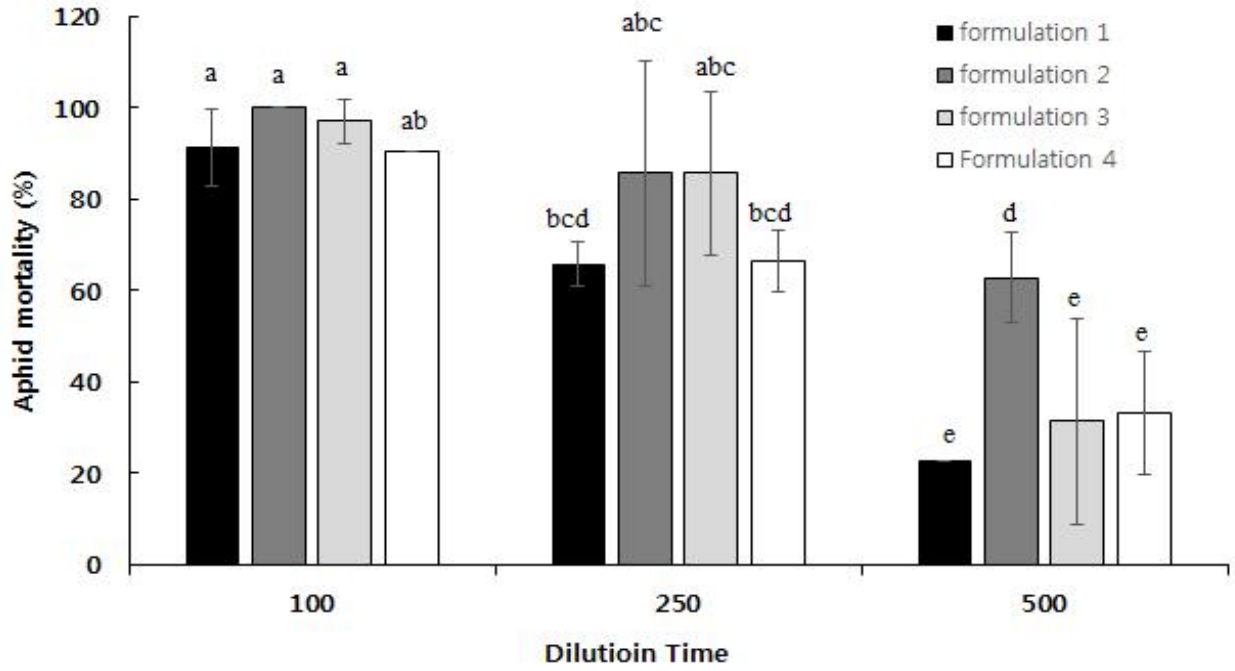


그림 23. 액제형 제제의 복숭아혹진딧물살충활성.

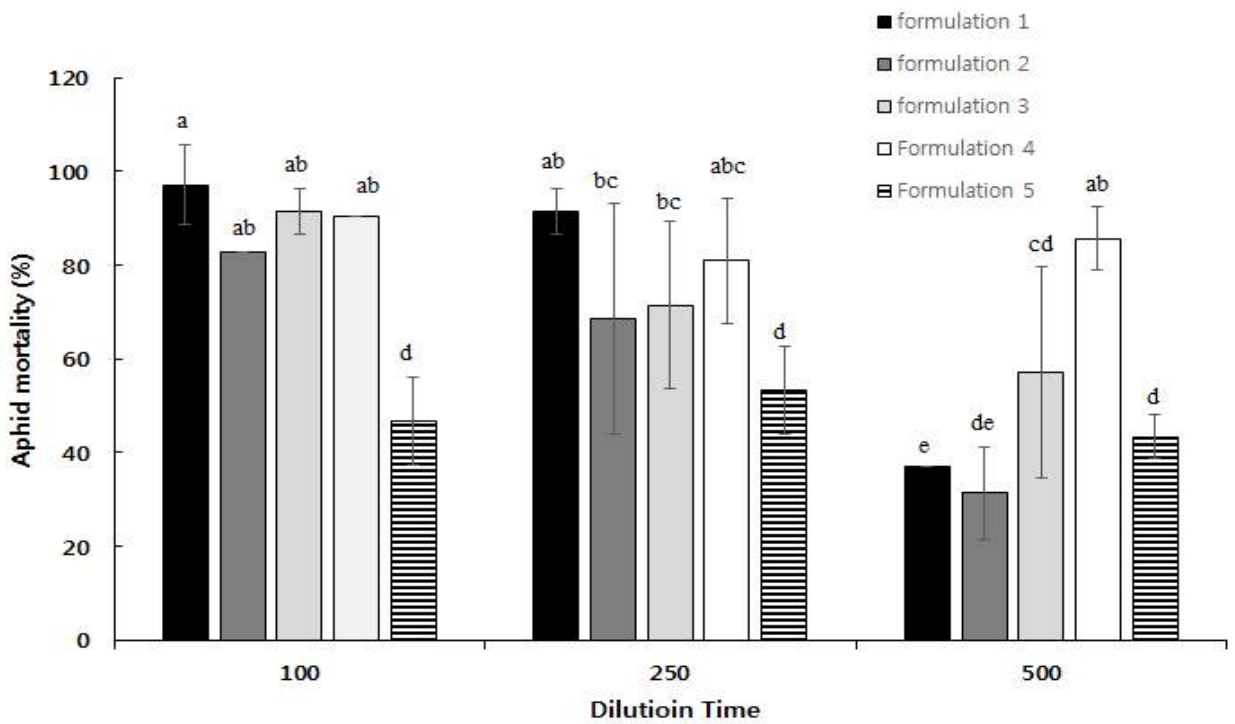


그림 24. 수화제형 제제의 복숭아혹진딧물 살충활성.

표 19. 액제형 및 수화제형의 적용 스펙트럼

Product type	Dilution time	Insecticidal activity (%) ¹⁾				
		Insect pest				
		<i>Aphis gossypii</i> ²⁾	<i>Tetranychusurticae</i> ³⁾	<i>Panonychuscitri</i> ³⁾	<i>Panonychusulmi</i> ³⁾	<i>Thripspalmikarny</i> ³⁾
SL	100	100 ± 0.0 a	70.0 ± 15.0 ab	68.0 ± 13.8 ab	52.0 ± 12.0 a	24.0 ± 6.9 a
	250	96.0 ± 6.9 a	65.0 ± 31.2 ab	56.0 ± 24.9 b	12.0 ± 24.9 b	12.0 ± 27.1 a
	500	76.0 ± 20.7 b	45.0 ± 8.8 b	28.0 ± 12.0 c	8.0 ± 18.3 b	16.0 ± 24.0 a
WP	100	100 ± 0.0 a	70.0 ± 15.0 ab	96.0 ± 6.9 a	48.0 ± 13.8 a	32.0 ± 13.8 a
	250	92.0 ± 6.9 ab	80.0 ± 8.6 a	72.0 ± 18.3 ab	68.0 ± 18.8 a	8.0 ± 18.3 a
	500	96.0 ± 6.9 a	55.0 ± 0.0 ab	68.0 ± 6.9 ab	0.0 ± 18.3 b	0.0 ± 13.8 a

¹⁾ The data are means ± SD of triplicates.

²⁾ Bioassay was topical application.

³⁾ Bioassay method was spray application.

다. 시제품의 약효 특성 평가

(1) 연구목적

- 균주 Y9 시제품의 적용성 시험을 위해 시제품과 시판 농자제와의 혼합처리.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 제제: *Bacillus subtilis* Y9 시제품
- ② 공시 해충: 복숭아혹진딧물
- ③ 합성농약 및 유기농업자재: 코니도(Imidacloprid 10%, (주)팜한농), 참각진(테리스추출물 50%, (주)에코윈), 단디탄(제충국, (주)비아이지)

(나) 시험방법

① 혼합제제

- 복숭아혹진딧물에 살충효능이 미미한 균주 Y9 시제품 100배 희석액을 시판되는 진딧물 방제제와 각각 혼합함.
- 진딧물 방제제는 합성농약 1종과 유기농업자재 2종이며 권장농도 및 권장농도의 1/2배, 1/4배 그리고 1/10배를 사용함.

② 살충효능 시험

- 살충효능 시험은 Kim 등(2007)의 국소처리법에 준하여 실시함.
- 각각의 실험은 3반복 이상 수행하였으며 살충효율은 진딧물의 생충수를 고려한 Abbott's 식(1925)을 사용하여 조사함.
- 살충율 (%) = $(A-B) / B \times 100$ (A: 대조구 생충수, B: 처리구 생충수)

(3) 결과

- 조제된 시제품들의 복숭아혹진딧물 살충효능은 표 20과 같았음.
- 합성농약인 코니도는 단독 및 혼합처리하였을 때 살충효율의 차이는 없었음.
- 균주 Y9 시제품 100배 희석액을 시판 유기농업자재인 참각진의 권장농도 1/4배와 혼합하였을 때 80% 이상의 살충효능이 조사되었음. 이는 참각진을 단독으로 권장농도 1/2배로 처리하였을 때와 유사한 수준임.
- 반면, 제충국이 유효성분인 단디탄은 권장농도 1/2배와 혼합하였을 때 상승효과가 나타났지만 권장농도로 처리하였을 때 대비 효과는 낮았음.

(4) 결론

- 테리스 추출물이 50% 함유된 참각진과 100배 희석된 Y9 시제품을 혼합하여 처리하였을 때 권장농도의 1/4배까지 사용량을 경감할 수 있음.

표 20. 실험실 조건에서 균주 Y9 시제품과 시판 농자재의 살충효능

처리구	희석배수	살충효능 (%)	
코니도	2,000 (권장농도)	88.48 ± 3.94	
	단독사용	4,000 (권장농도 1/2)	79.55 ± 13.64
		8,000 (권장농도 1/4)	63.64 ± 10.41
		20,000 (권장농도 1/10)	54.55 ± 10.41
		2,000 (권장농도)	-
	Y9 시제품 100X 혼합사용	4,000 (권장농도 1/2)	68.18 ± 7.87
		8,000 (권장농도 1/4)	72.73 ± 11.81
		20,000 (권장농도 1/10)	52.27 ± 6.82
참깍진		1,000 (권장농도)	100.00 ± 0.00
	단독사용	2,000 (권장농도 1/2)	95.45 ± 7.87
		4,000 (권장농도 1/4)	43.18 ± 14.19
		10,000 (권장농도 1/10)	40.91 ± 21.92
		1,000 (권장농도)	-
	Y9 시제품 100X 혼합사용	2,000 (권장농도 1/2)	86.36 ± 18.04
		4,000 (권장농도 1/4)	84.09 ± 17.16
		10,000 (권장농도 1/10)	54.55 ± 23.94
단디탄		1,000 (권장농도)	54.55 ± 34.32
	단독사용	2,000 (권장농도 1/2)	25.00 ± 6.82
		4,000 (권장농도 1/4)	6.82 ± 27.56
		10,000 (권장농도 1/10)	-6.82 ± 3.94
		1,000 (권장농도)	-
	Y9 시제품 100X 혼합사용	2,000 (권장농도 1/2)	38.64 ± 13.64
		4,000 (권장농도 1/4)	2.27 ± 57.99
		10,000 (권장농도 1/10)	-15.91 ± 11.81

라. 시제품의 포장 검증 시험

(1) 연구목적

- 시제품의 포장 검증

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 제제: *Bacillus subtilis* Y9 시제품
- ② 공시 해충: 진딧물
- ③ 공시 식물: 고추(만나), 매실
- ④ 포장: 담양
- ⑤ 처리 방법: 분무법(spray)

(나) 시험방법

① 시제품

- 상기와 같이 실험실 조건에서 살충효능이 검증된 시제품을 대상으로 진딧물 방제를 위한 소규모 포장 시험을 실시하였음.

② 분무법

- 진딧물이 발생된 작물의 잎에 제제를 스프레이로 분무한 후 24시간 후 살충효능을 검증함.
- 살충효율은 진딧물의 생충수를 고려한 Abbott's 식(1925)을 사용하여 조사함.
- 살충율 (%) = $(A-B) / B \times 100$ (A: 대조구 생충수, B: 처리구 생충수)

(3) 결과

- 대상작물 고추(만나), 매실나무에 발생된 진딧물을 대상으로 시제품은 200배 희석까지 60% 이상의 살충효능이 평가됨(표 21, 표 22).
- 코니도와 참각진의 권장농도 1/4배와 균주 Y9 시제품 200배 희석액을 단독처리 및 혼합처리하였을 때 단독 처리된 것보다 혼합처리 시 살충효능이 보다 우수하였음.

(4) 결론

- 균주 Y9 활용 미생물 기반 제제는 포장검증을 통해 활성을 확인하였으며 시판되고 있는 합성농약 및 유기농업자재와 혼합하여 사용시 약제의 효능을 상승시킬 수 있을 것이라 판단됨.

표 21. Y9 시제품의 고추 포장 효능시험 결과

처리구		희석배수	살충효능 (%)
		100	80.23
	Y9 시제품	200	66.67
		500	40.28
코니도	단독사용	4000 (권장농도 1/2)	71.03
		8000 (권장농도 1/4)	46.79
	Y9 시제품 200X 혼합사용	4000 (권장농도 1/2)	83.73
		8000 (권장농도 1/4)	71.93
참각진	단독사용	2000 (권장농도 1/2)	57.14
		4000 (권장농도 1/4)	23.68
	Y9 시제품 200X 혼합사용	2000 (권장농도 1/2)	66.82
		4000 (권장농도 1/4)	47.22

표 22. Y9 시제품의 매실 포장 효능시험 결과

처리구		희석배수	살충효능 (%)
	Y9 시제품	200	69.05
코니도	단독사용	8000 (권장농도 1/4)	55.26
	Y9 시제품 200X 혼합사용		73.23
참각진	단독사용	4000 (권장농도 1/4)	40.63
	Y9 시제품 200X 혼합사용		58.06

제 3장 *Bacillus* 균주를 이용한 세균성구멍병 방제용 유기 농업자재 개발

제 1절 세균성구멍병에 대한 고효성 *Bacillus* 균주 및 천연물 선발

1. 기선발한 5개 *Bacillus* 균주의 항세균활성 조사

가. 선행연구를 통하여 선발한 5개 *Bacillus* 균주들의 *in vitro* 항세균활성 검정

(1) 연구목적

- 기선발한 5개 *Bacillus* 속 균주의 agar diffusion 방법을 이용한 항세균활성 비교

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 기선발한 5개 *Bacillus* 속 균주

(나) 시험방법

① 기선발한 5개 균주의 배양여과액 준비

- 20% 글리세롤 용액에 현탁되어 -80℃에 저장된 선발한 5개 *Bacillus* 균주는 멸균된 tryptic soy agar(TSA)에 스트리킹하여 30℃ 조건에 1일 동안 정치배양하였음.
- 1일간 TSA배지에 정치배양한 5개 균주의 각 콜로니를 멸균된 tryptic soy broth (TSB) 5 ml 에 접종하여 30℃, 150 rpm에서 20-24시간 동안 호기적인 조건에서 진탕배양하였음.
- 액체 배양한 5개 균주를 125 ml 삼각플라스크에 멸균된 TSB 15 ml에 각 1%를 접종하여 30℃, 150 rpm에서 70-72시간 동안 호기적인 조건에서 진탕배양하였음.
- 3일간 배양한 배양액을 4000 rpm에서 20분간 원심분리를 하여 약 15 ml 상등액을 0.2 μm 막필터로 제균하여 배양여액을 확보하였음.

② 세균성구멍병균 준비

- 20% 글리세롤 용액에 현탁되어 -80℃에 저장된 복숭아 세균성구멍병 원인균 *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*(Xap)을 멸균된 TSA배지에 스트리킹하여 30℃에서 1일 동안 정치배양하였음.
- 1일간 TSA배지에 정치배양한 Xap 균주 콜로니를 멸균된 tryptic soy broth(TSB) 5 ml 에 접종하여 30℃, 150 rpm에서 20-24시간 동안 호기적인 조건에서 진탕배양하였음. TSB 배양된 Xap 균주는 증류수로 희석하여 UV spectrophotometer 600 nm에서 측정하여 O.D값 0.1로 맞추었음.

③ Agar diffusion방법을 이용한 항세균활성 검정

- 멸균하여 식힌 TSA배지에 O.D 값 0.1 Xap 균주를 1% 접종하여 잘 섞어서 지름이 9 cm 페트리디쉬에 넣어 굳히고, 멸균한 8 mm인 페이퍼디스크 6개를 TSA배지 올리고, 제균된 5개의 *Bacillus* 배양여액 30 μl를 페이퍼디스크에 분주하였음.
- 대조구로 멸균한 물을 30 μl를 분주하였고, 처리 당 2반복을 실시하여 28℃에서 2일

동안 정치배양하였음.

- 5개 *Bacillus* 배양여액의 Xap의 생육이 저해된 클리어존 직경 크기를 측정 한 후, 8 mm의 페이퍼디스크 지름을 제외하고 5개 균주 Xap 성장저해효과를 비교하였음.

(3) 결과

(가) 선발한 5개 *Bacillus* 균주 항세균활성 검정

- 선발한 5개 *Bacillus* 균주(G341, 772, 936, JCK-2001, JCK-2002)의 항세균활성을 agar diffusion 방법을 이용하여 세균성구멍병원인균 *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*(Xap)에 대하여 조사한 결과, JCK-2002가 가장 항세균활성이 뛰어난 것으로 나타났음(그림 1, 2).

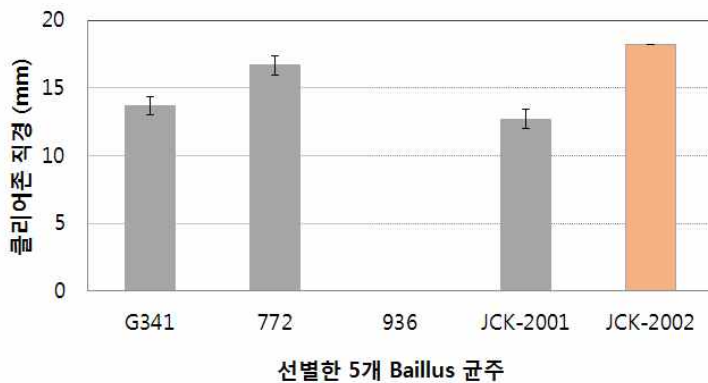


그림 1. 복숭아 세균성구멍병 원인균에 대한 항세균활성 비교 그래프.

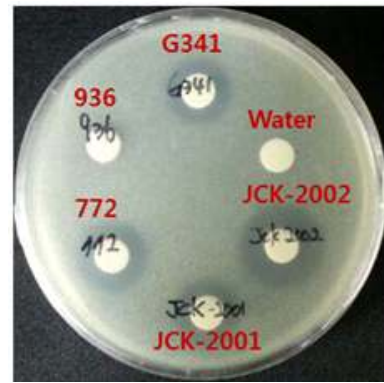


그림 2. *Bacillus* 균주의 배양여액의 복숭아 세균성구멍병 원인균에 대한 성장저해효과 결과.

나. 선발한 균주들의 분류 및 특성 규명

(1) 연구목적

- 선발한 5개의 *Bacillus* 균주의 분자생물학적 동정 및 계통도 분석

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 기선발한 5개 *Bacillus* 속 균주

(나) 시험방법

① 균주의 gDNA 추출

- 선발한 5개 *Bacillus* 균주는 멸균된 TSA배지에 스트리킹하여 30℃, 1일 동안 정치 배양하여 단일 콜로니를 확보하였음.
- 1일간 TSA배지에 정치배양한 5개 균주의 각 콜로니를 멸균된 TSB 5 ml 에 접종 하여 30℃, 150 rpm에서 20-24시간 동안 호기적인 조건에서 진탕배양하였음.
- 균주의 genomic DNA(gDNA)는 ELPIS-Biotech의 DOKDO-prep bacteria genomic DNA purification kit를 이용하여 프로토콜에 따라서 추출하였음.

② PCR을 이용한 3개의 유전자 16s rRNA, *gyrA*, *recA* 증폭

- 추출된 gDNA와 인트론 바이오테크놀로지(iNtRON Biotechnology)의 PCR-프리믹스 (Polymerase chain reaction-premix), 그리고 균주의 16s rRNA, *gyrA*, *recA* 유전자를 증폭할 수 있는 primer set를 혼합한 후 PCR을 통해 5개 *Bacillus* 균주의 세 유전자를 증폭하였음.
- PCR에 사용된 primer set는 16s rRNA의 경우, 9F(5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3')/1512R(5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3')이며, *gyrA*의 경우, *gyrA*-F(5'-CAG TCA GGA AAT GCG TAC GTC CTT-3')/*gyrA*-R(5'-CAA GGT AAT GCT CCA GGC ATT GCT-3'). 그리고 *recA*의 경우, *recA*-F(5'-GAT CGT CAR GCA GSC YTW GAT-3')/*recA*-R(5'-TTW CCR ACC ATA ACS CCR AC-3')가 사용되었음.
- PCR은 95°C 5분을 시작으로 95°C 30초, 55°C 30초, 72°C 1분을 30번 반복한 후, 72°C 7분, 12°C에서 증폭을 끝냈음.

③ 세 개의 유전자 염기서열을 이용한 NCBI Blast N 분석

- 증폭된 세 유전자 PCR 산물은 제노텍(대전, 대한민국)에 염기서열 분석을 의뢰하여 균주의 16s rRNA, *gyrA*, *recA* 유전자의 염기서열을 확보하였고, NCBI의 BlastN 검색을 이용하여 GenBank database의 염기서열을 비교하여 동정하였음.

④ *gyrA*, *recA* 유전자를 이용한 계통도 분석

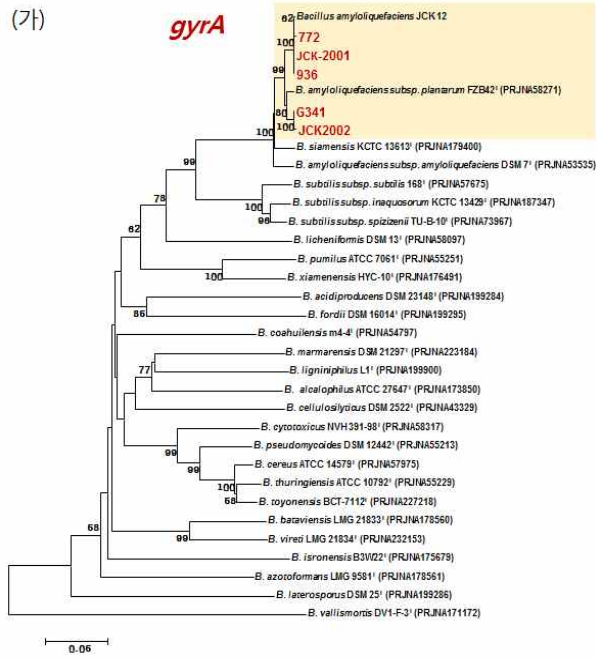
- *gyrA*와 *recA* 유전자 염기서열에 기초하여 BioEdit Sequence Alignment Editor로 염기서열을 정렬하고, Mega 프로그램 버전 6.0을 사용하여 boot-strap trials set 1,000 조건에서 neighbour-joining(NJ) 알고리즘을 바탕으로 분자계통학적으로 분석하였음.

(3) 결과

(가) 선발한 5개 *Bacillus* 균주 분류 및 동정

- 선발한 5개 균주의 16s rRNA와 Gyrase A 유전자(*gyrA*), Rec A protein 유전자(*recA*)의 염기서열의 NCBI BlastN 분석 및 계통분석을 수행한 결과, 5개 균주는 *Bacillus amyloliquefaciens*와 99-100% 유사성을 나타내었고, 계통분석 결과도 *Bacillus* 속에서 *B. amyloliquefaciens* 종에 속하는 것을 확인하였음(그림 3).
- 5개 균주의 세 유전자의 염기서열을 비교분석한 결과, *gyrA* 염기서열은 936과 JCK-2001균주가 100%로 일치하였지만, *recA* 유전자 염기서열 비교분석 결과 서로 다른 균주임이 확인하였음. 즉, 5개 균주 모두 *B. amyloliquefaciens* 종으로 동정되었지만 이들은 서로 다른 strain임을 확인하였음(그림 4).

(가)



(나)

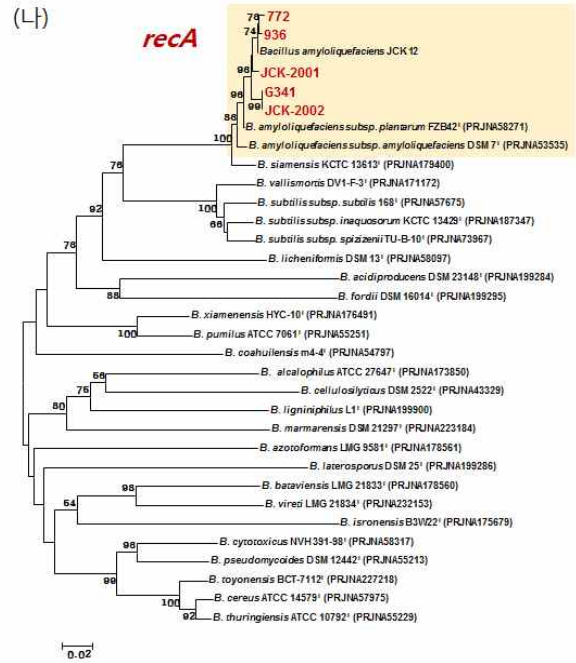


그림 3. 선발한 5개 *Bacillus* 균주의 계통분석 결과. (가) Gyrase A 유전자(*gyrA*)로 분석한 계통도, (나) Rec A protein 유전자(*recA*)로 분석한 계통도.

(가)

<i>gyrA</i> 염기서열 비교분석	G341	772	936	JCK2001	JCK2002
G341	-	98%	98%	98%	99%
772	98%	-	99%	99%	98%
936	98%	99%	-	100%	98%
JCK2001	98%	99%	100%	-	98%
JCK2002	99%	98%	98%	98%	-

(나)

<i>recA</i> 염기서열 비교분석	G341	772	936	JCK2001	JCK2002
G341	-	98%	99%	99%	98%
772	98%	-	99%	99%	98%
936	99%	99%	-	99%	99%
JCK2001	99%	99%	99%	-	99%
JCK2002	99%	98%	99%	99%	-

그림 4. 기선발한 5개 균주의 *gyrA*와 *recA* 염기서열 비교분석 결과. (가) *gyrA* 염기서열 비교분석 결과, (나) *recA* 염기서열 비교분석 결과.

2. 토양시료로부터 항세균활성 *Bacillus* 균주 분리 및 우수 항세균활성 신규균주 선발
가. 토양시료로부터 항세균활성 *Bacillus* 균주 분리

(1) 연구목적

- 토양 시료로부터 세균성구멍병 원인균의 생육을 억제하는 신규 길항미생물 *Bacillus* 균주 검출 및 확보

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시시료 : 토양

(나) 시험방법

① 토양시료 회석

- 다양한 지역에서 토양시료를 채취하여 멸균된 비닐팩에 담아 보관하였음.
- 시험관에 토양시료 1 g을 넣고 멸균된 증류수 9 ml에 넣어 Vortex mixer를 이용하여 토양입자로부터 증류수로 미생물을 분리하였음.
- 멸균된 증류수를 이용해 정치시킨 토양 회석 상등액을 10^{-7} ~ 10^{-5} 까지 회석하였음.

② 세균성구멍병균 준비

- -80°C 에 저장된 복숭아 세균성구멍병 원인균 *X. arboricola* pv. *pruni*(Xap)을 멸균된 TSA배지에 스트리킹하여 30°C 에서 1일 동안 정치배양함.
- 1일간 TSA배지에 정치배양한 Xap 균주 콜로니를 멸균된 TSB 5 ml 에 접종하여 30°C , 150 rpm에서 20-24시간 동안 호기적인 조건에서 진탕배양하였음. TSB 배양된 Xap 균주는 증류수로 회석하여 UV spectrophotometer 600 nm에서 측정하여 O.D값 0.1로 맞추었음.

③ 신규 길항미생물 *Bacillus* 균주 분리

- 멸균하여 식힌 TSA배지에 O.D 값 0.1 Xap 균주를 1% 접종하여 잘 섞어서 지름이 9 cm 페트리디쉬에 넣어 굳히고, 10^{-7} 부터 10^{-5} 까지 회석한 토양 상등액을 100 μl 취해 TSA배지에 분주하고, 화염살균한 도말봉을 이용하여 도말하였음.
- 처리 당 2반복을 실시하여 28°C , 2일 동안 정치배양한 후, 클리어존을 형성하며 자라는 신규 길항미생물 *Bacillus* 균주를 발견하였음.
- 화염멸균한 루프로 신규 *Bacillus* 균주의 콜로니를 묻혀 멸균된 TSA배지에 스트리킹하여 30°C 에서 1일 동안 정치배양 하였음.

④ 신규 길항미생물 *Bacillus* 균주 장기보존 균주 제조

- 1일간 TSA배지에 정치배양한 신규 *Bacillus* 균주 단일 콜로니를 멸균된 TSB 5 ml 에 접종하여 30°C , 150 rpm에서 20-24시간 동안 호기적인 조건에서 진탕배양하였어 얻은 배양액을 멸균된 40% 글리세롤 용액과 일대일 비율로 현탁하고, -80°C 에 저장하였음.

⑤ Agar diffusion법을 이용한 신규 *Bacillus* 균주 항세균활성 검정

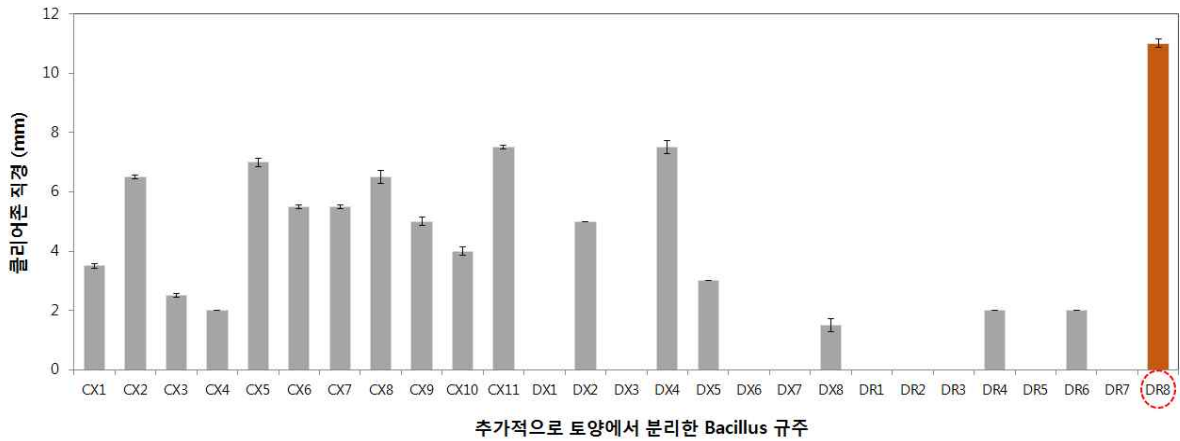
- 5개 *Bacillus* 균주 중 가장 우수항 항세균활성을 갖는 JCK-2002균주와 신규로 토양에서 분리한 균주들 간의 항세균활성을 상기에 수행된 agar diffusion방법을 이용하여 비교하였음.

(3) 결과

(가) 항세균활성 *Bacillus* 균주의 추가 분리 및 선발

- 18개의 채취된 토양샘플에서 세균성구명병 원인균에 대하여 항세균 활성을 갖는 27개의 신규 *Bacillus* 균주 추가적으로 확보하였음.
- 27개 균주의 항세균활성은 세균성구명병 원인균에 대한 클리어존의 직경으로 도식화하였음(그림 5). 그 결과, 신규로 분리한 균주 중에서 DR-08균주가 세균성구명병 원인균에 대한 항세균 활성이 가장 우수하였음.

(가)



(나)

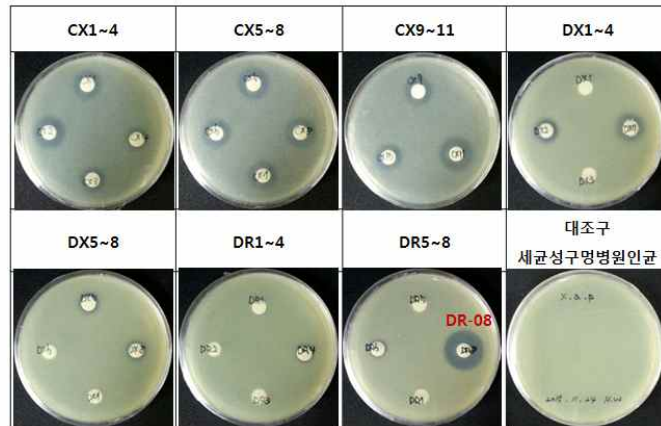


그림 5. 신규로 분리된 27개 균주의 복숭아 세균성구명병 원인균에 대한 *in vitro* 항세균활성 비교 조사. (가) 27개 균주의 클리어존 직경비교. (나) agar diffusion 항세균활성 검정 결과.

- 한편, 기선발한 5개 *Bacillus*속 균주에서 가장 우수한 활성을 보이는 JCK-2002균주와 DR-08균주의 복숭아 세균성구명병균에 대한 활성을 비교한 결과, DR-08균주의 활성이 더 우수하였음. 최종적으로 DR-08균주를 세균성구명병 방제용 유기농업자재 개발 후보물로 최종적으로 선발하였음(표 1).

표 1. Agar diffusion 법을 이용한 JCK-2002와 DR-08균주의 배양여액의 항세균활성 비교

균주	JCK-2002	DR-08
클리어존 직경크기 (mm)	19	19.5

나. 선발한 DR-08 균주가 생산하는 휘발성 물질의 항세균 활성

(1) 연구목적

- 선발한 DR-08 균주 휘발성 물질의 다양한 식물병원균에 대해 항세균활성 검정

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 미생물 : DR-08 균주

(나) 시험방법

① 선발한 DR-08 균주 배양액 준비

- DR-08 균주는 멸균된 TSA배지에 스트리킹한 후 30℃에서 1일 동안 정치배양한 후 단일 콜로니를 멸균된 TSB배지 5 ml 에 접종하여 30℃, 150 rpm에서 20~24시간 동안 호기적인 조건에서 진탕배양하였음.

② 13개 식물병원성세균 준비

- 20% 글리세롤 용액에 현탁하여 -80℃에 저장된 13개 식물병원성세균을 TSA배지에 스트리킹하여 최적조건에서 정치배양하였음. 멸균된 TSB배지 5 ml에 각 식물병원성세균 단일 콜로니를 접종하여, 각 식물병원성세균의 최적생장조건에서 진탕배양하였음
- 13개의 식물병원성세균의 최적생장조건은 표 2로 정리하였음.

표 2. 13개의 식물병원성세균의 최적생장조건

식물병원균	배양 조건		
	배지	온도(℃)	배양일
Gram-negative bacteria			
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>	TSA TSB	30	1
<i>Acidovorax konjaci</i>			
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>			
<i>Burkholderia glumae</i>			
<i>Pectobacterium carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>			
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>			
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>		25	2
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>		30	
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>		28	
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i>			
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>			
<i>Ralstonia solanacearum</i>	30		
Gram-positive bacteria	배지	온도(℃)	배양일
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	TSA TSB	30	2

③ DR-08 균주 휘발성 물질의 항세균활성 검정

- 멸균한 TSA배지를 9 cm 페트리디쉬에 부어서 굳힌 후, 멸균한 칼을 이용해 페트리 디쉬 중앙부 약 1 cm폭 넓이의 TSA배지를 도려내어 페트리디쉬 한 면은 TSB배지에서 진탕배양된 DR-08 균주 배양액 20 μ l를 분주하여 도말하고, 나머지 한 면은 TSB배지에서 진탕배양한 각 식물병원성세균 세균 배양액을 2 μ l씩 5개 스폿으로 접종하고, 무처리구는 식물병원성세균 배양액만을 2 μ l씩 5개 스폿으로 접종하였음. 처리 당 3반복을 실시하였음. 파라필름으로 잘 밀봉하고 접종된 각 식물병원성세균의 최적생장조건에서 정치배양하였음.
- 일정 시간 배양 후 식물병원균의 콜로니를 멸균수로 수확하여 600 nm에서 O.D값을 측정하여 DR-08 균주가 생산하는 휘발성 물질에 의해 식물병원성세균의 성장저해율(%)을 아래와 같이 구하였음.
- 휘발성물질에 의한 성장억제율 (%) = [(무처리구 O.D값 - 처리구 O.D값)/무처리구 O.D 값] * 100

(3) 결과

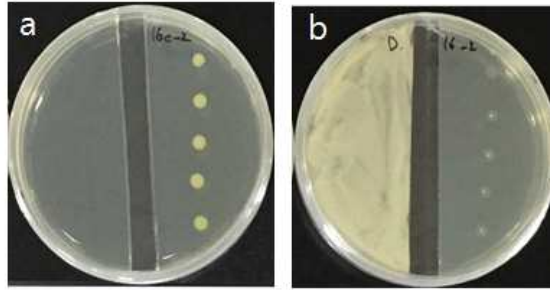
(가) DR-08 균주의 휘발성 물질에 의한 항세균활성 검정

- DR-08균주가 휘발성물질을 생산하고, 이 물질이 항세균활성을 가지는지 확인하기 위하여 I-plate를 이용하여 다양한 식물병원성세균에 대하여 활성을 조사한 결과, 복숭아 세균성구멍병 원인균을 포함하여 11개의 식물병원성 세균에 대하여 항세균활성을 나타내었음(표 3).
- 그림 6은 DR-08균주의 휘발성 물질에 의한 *A. tumefaciens*와 *R. solanacearum*에 대한 성장 저해효과를 조사한 결과임.

표 3. I-plate를 이용한 DR-08균주가 생산하는 휘발성 물질의 의한 다양한 식물병원 세균의 성장 저해

No.	식물병원균	DR-08 휘발성물질에 의한 성장저해율(%)
1	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattlyae</i>	28.6
2	<i>Acidovorax konjaci</i>	-
4	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	40.0
6	<i>Burkholderia glumae</i>	27.6
8	<i>Clavibacte rmichiganensis</i> supsp. <i>michiganensis</i>	33.3
9	<i>Pectobacterium carotovara</i> supsp. <i>carotorova</i>	16.7
10	<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	-
11	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	31.0
12	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	40.0
15	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	33.3
16	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	34.4
16-1	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> 24-20	26.5
22	<i>Xanthomonasoryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	28.6
SL341	<i>Ralstoniasolanacerum</i>	55.6

(가)



(나)

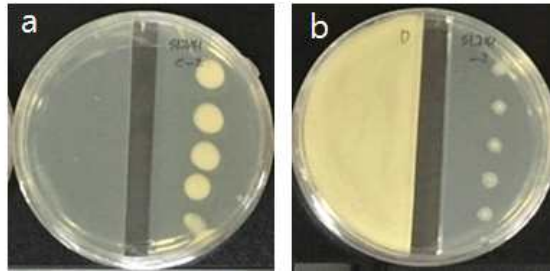


그림 6. I-plate에서의 DR-08균주가 생산하는 휘발성물질에 의한 두 식물병원 세균의 성장저해. (가) *A. tumefaciens*에 대한 결과, (나) *R. solanacearum*에 대한 결과. a; 무처리구, b; DR-08 균주 처리구.

다. 선발한 DR-08 균주가 생산하는 휘발성 물질의 항진균 활성

(1) 연구목적

- 선발한 DR-08 균주의 휘발성 물질의 항진균활성 검정

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 미생물 : DR-08 균주

(나) 시험방법

① 8개 식물병원성 진균 준비

- 식물병원성 진균은 멸균한 PDA배지 또는 V8배지에 접종하여 3-10일 동안 정치배양하였음.

② DR-08 균주 휘발성물질의 항진균활성 검정

- 9 cm I-페트리디쉬 왼쪽은 멸균한 TSA배지, 오른쪽은 멸균한 PDA배지 또는 V8배지를 부어 균혔음. DR-08 균주 배양액 20 μ l를 TSA배지에 분주하여 도말하고, PDA배지 또는 V8배지에 PDA배지에 고체 배양된 식물병원성 진균을 직경 5 mm 균사 조각으로 떼어 접종하고, 파라필름으로 잘 밀봉하였음. 무처리구는 DR-08 균주 배양액을 접종하지 않고, 식물병원성 진균만 접종하였음
- 처리 당 3반복을 실시하였으며 무처리구의 균사가 충분히 자랄 때까지 25°C에서 3~10일간 정치배양 후 식물병원성 진균의 균사 성장을 관찰하였음.

(3) 결과

(가) DR-08 균주의 휘발성물질에 의한 항진균활성 검정

- I-plate를 이용하여 DR-08 균주가 생산하는 휘발성 물질을 10개 식물병원 진균에 대한 항진균활성을 조사한 결과, 시험한 8개 병원균의 균사 생장을 억제하는 것으로 나타났음(표 4, 그림 7).
- 8개 식물병원 진균중에서도 밤나무 줄기마름병균인 *E. parasitica*에 대하여 항진균 활성이 가장 높아 식물병원균이 전혀 성장하지 못했으며, 그 다음으로 참나무 시들음병균인 *Raffaelea quercus-mongolicae*에 대하여 높은 항진균활성을 보였음(표 4, 그림 7).

표 4. DR-08균주가 생산하는 휘발성 물질의 의한 다양한 식물병원 진균의 성장 저해

식물병원성 진균	성장 저해율 (%)
<i>Botrytis cinerea</i>	90.5
<i>Colletotrichumcoccodes</i>	47.9
<i>Endothiaparasitica</i>	100
<i>Fusarium graminearum</i>	0
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	12.7
<i>Fusarium verticillioides</i>	0
<i>Magnaportheoryzae</i>	27.6
<i>Phytophthoracapsici</i>	28.2
<i>Rhizoctoniasolani</i>	47.9
<i>Raffaeleaquercus-mongolicae</i>	87.1

ㄷ

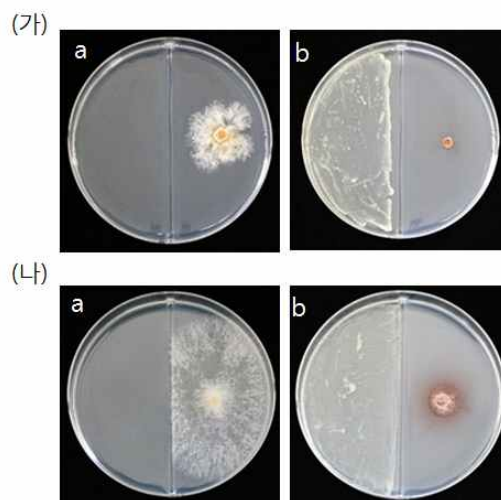


그림 7. I-plate에서의 DR-08균주가 생산하는 휘발성 물질에 의한 식물병원성 진균의 성장 저해. (가) *E. parasitica*에 대한 결과, (나) *R. quercus-mongolicae*에 대한 결과. a; 무처리구, b; DR-08 균주 처리구.

라. 선발한 DR-08 균주의 동정

(1) 연구목적

- 선발한 DR-08 균주의 분자생물학적 동정

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 미생물 : DR-08 균주

(나) 시험방법

① DR-08 균주의 gDNA추출

- 신규 선발한 DR-08 균주는 멸균된 TSA배지에 스트리킹하여 30°C, 1일 동안 정치 배양하여 단일 콜로니를 확보하였음. 1일간 TSA배지에 정치배양한 DR-08 균주는 단일 콜로니를 확보하여, 멸균된 TSB배지 5 ml 에 접종하여 30°C, 150 rpm에서 20-24시간 동안 호기적인 조건에서 진탕배양하였음.
- 균주의 genomic DNA(gDNA)는 ELPIS-Biotech의 DOKDO-prep bacteria genomic DNA purification kit를 이용하여 프로토콜에 따라서 추출하였음.

② PCR을 이용한 3개의 유전자 16s rRNA, *gyrA*, *recA* 증폭

- 추출된 gDNA와 인트론 바이오테크놀로지(iNtRON Biotechnology)의 PCR-프리믹스 (Polymerase chain reaction-premix), 그리고 균주의 16s rRNA, *gyrA*, *recA* 유전자를 증폭할 수 있는 primer set를 혼합한 후 PCR을 통해 세 유전자를 증폭하였음.
- PCR에 사용된 primer set는 16s rRNA의 경우, 9F(5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3')/1512R(5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3')이며, *gyrA*의 경우, *gyrA*-F(5'-CAG TCA GGA AAT GCG TAC GTC CTT-3')/*gyrA*-R(5'-CAA GGT AAT GCT CCA GGC ATT GCT-3'). 그리고 *recA* 의 경우, *recA*-F(5'-GAT CGT CAR GCA GSC YTW GAT-3')/*recA*-R(5'-TTW CCR ACC ATA ACS CCR AC-3')가 사용되었음.
- PCR은 95°C 5분을 시작으로 95°C 30초, 55°C 30초, 72°C 1분을 30번 반복한 후, 72°C 7분, 12°C에서 증폭을 끝냈음.

③ 세 개의 유전자 염기서열을 이용한 NCBI Blast N 분석

- 증폭된 세 유전자 PCR 산물은 제노텍(대전, 대한민국)에 염기서열 분석을 의뢰하여 16s rRNA, *gyrA*, *recA* 유전자의 염기서열을 얻었음.
- 세 유전자의 염기서열은 NCBI의 BlastN 검색을 이용하여 GenBank database의 염기서열을 비교하여 동정하였음.

(3) 결과

(가) DR-08 균주의 분자생물학적 동정

- DR-08 균주의 16s rRNA, Gyrase subunit A(*gyrA*), 그리고 RecA단백질(*recA*) 유전자의 염기서열을 NCBI의 BlastN 검색을 이용하여 GenBank database의 염기서열과 비교한 결과, DR-08 균주는 *Bacillus* sp.로 분류되었으나 16s rRNA와 *gyrA* 유전자의 계통학적 분석을 통해 *Bacillus methylotrophicus*로 확인되었음(표 5, 그림 8).

표 5. DR-08 균주 16s rRNA, Gyrase subunit A (*gyrA*) 및 RecA단백질(*recA*) 유전자의 염기서열 분석을 통해 분자생물학적 동정

유전자	NCBI BlastN 분석결과 (accession no.)	유사성 (%)
16s rRNA	<i>Bacillus</i> sp. Hyhel-1 (KU942606)	100
Gyrase A	<i>Bacillus</i> sp. (KF496216)	100
Rec A protein	<i>Bacillus</i> sp. BH072 (CP009938)	99

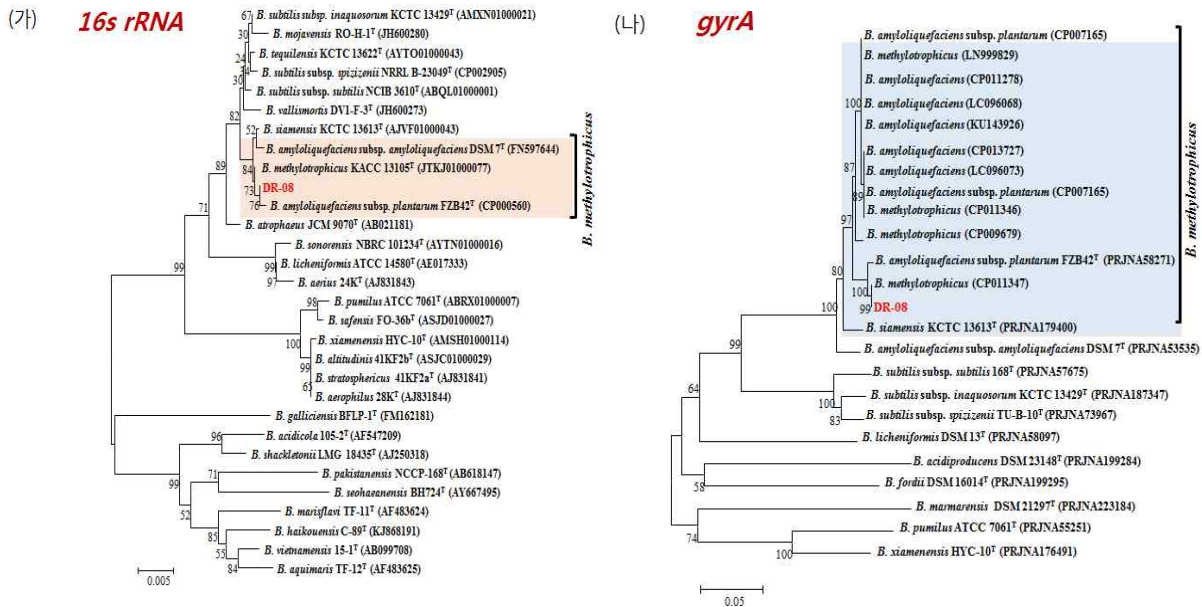


그림 8. 최종 선발한 DR-08균주의 계통분석 결과. (가) 16s rRNA로 분석한 계통도, (나) Gyrase A 유전자(*gyrA*)로 분석한 계통도.

마. 선발한 DR-08 균주가 생산하는 휘발성 물질의 분석

(1) 연구목적

- GC-MS 분석을 통한 DR-08 균주가 생산하는 휘발성물질 동정

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 미생물 : DR-08 균주

(나) 시험방법

- ① 휘발성물질 분석을 위한 시료 준비

○ DR-08 균주는 멸균된 TSA배지에 스트리킹하여 30℃, 1일 동안 정치배양하여 단일 콜로니를 확보하였음. 1일간 TSA배지에 정치배양한 DR-08 균주는 단일 콜로니를 확보하여, 멸균된 TSB배지 5 ml 에 접종하여 30℃, 150 rpm에서 20~24시간 동안 호기적인 조건에서 진탕배양하였음.

- 배양액을 500 ml 삼각플라스크에 멸균된 TSB 50 ml에 각 1%를 접종하여 30℃, 150 rpm에서 3일단 진탕배양하고, DR-08 배양액 5 ml에 증류수로 10 ml를 정용하여 균질화하였고, 대조구는 멸균된 TSB배지를 준비하였음.

② GC-MS 분석 조건

- 컬럼 Rtx-5ms(30 m × 0.25 mm I.D, 0.25 μm film thickness)이 장착되고 헬륨가스가 분당 1 mL씩 운반되는 QP-2010 Ultra(Shimadzu co., Japan) GC-MS 기계를 이용하였음.
- 배양액과 대조구인 멸균 TSB배지를 1/2로 증류수로 희석한 후 60℃에서 30분간 열을 가하여 휘발성 물질을 수득한 후, GC-MS에 주입하였음. 컬럼 온도는 40℃에서 2분 유지한 후, 분당 6℃씩 온도를 높여 최종적으로 250℃에서 13분 유지하는 조건으로 분석하였음. 주입기 온도는 250℃였으며, 인터페이스의 온도는 200℃이었음..

(3) 결과

(가) DR-08 균주가 생산하는 휘발성 물질 분석

- DR-08 균주가 생산하는 휘발성물질을 동정하기 위하여 GC-MS분석을 실시하였음. 대조구와 비교한 결과, DR-08균주가 11개의 휘발성 물질을 생산하였으며, Library search를 통하여 물질을 동정하였음(표 6, 그림 9).

표 6. GC-MS분석을 통하여 동정된 DR-08균주가 생산하는 11개 휘발성물질

Peak	Retention time (min)	Area (%)	Compound
1	3.363	6.31	2,3,4-trimethylpentane
2	3.446	11.85	2,3,3-trimethylpentane
3	3.551	1.45	2,3-dimethylhexane
4	3.679	2.83	3-methyl-1-phenyl-2-butanone
5	3.749	8.02	2-methylpropanoic acid
6	3.969	3.51	2,2,5-trimethylhexane
7	4.65	1.37	2,2,3-trimethylhexane
8	5.12	0.6	4,4-dimethylpent-2-yl ester formic acid
9	5.263	5.85	2,4-dimethyl-1-heptane
10	5.525	35.03	3-methylbutanoic acid
11	5.776	21.98	2-methylbutanoic acid

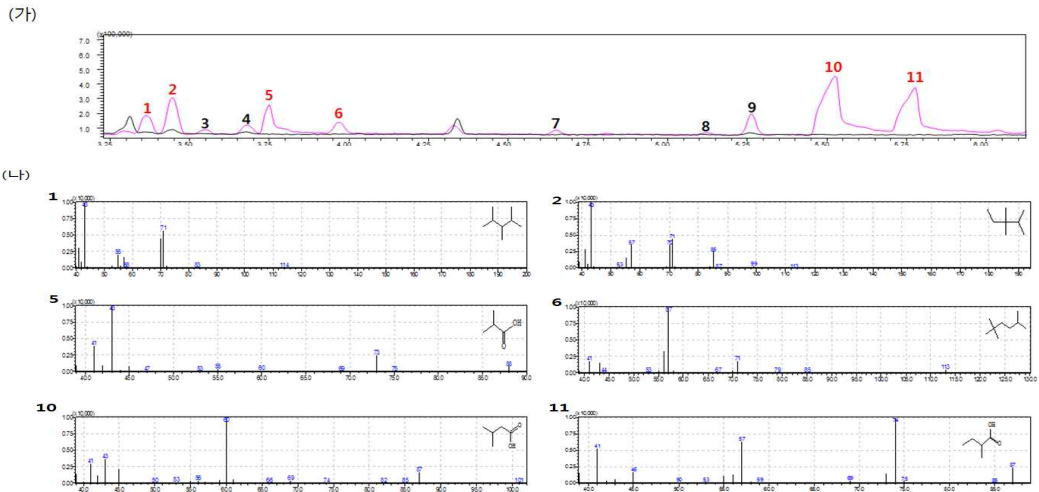


그림 9. DR-08이 생산하는 휘발성 물질의 GC-MS 분석. (가)분홍색: DR-08이 생산하는 휘발성물질시료, 파란색: 대조구인 TSB배지 시료, (나) 주요 peak의 분자량스펙트럼

- 주요 휘발성 물질은 3-methylbutanoic acid(35.03%)와 2-methylbutanoic acid(21.98%)였음. 이들 물질은 *Terminalia catappa* 식물에서 분리된 내생곰팡이 *Oidium* sp.로부터 합성되어 식물병원성 진균에 대한 항진균활성이 있다고 보고되어 있지만, 바실러스속(*Bacillus* sp.)에서 합성되어 항세균과 항진균활성을 동시에 확인한 결과는 현재까지 보고된 바가 없음.
- 2-methylpropanoic acid(8.02%)은 isobutyric acid로 잘 알려져 있으며, 진균에서 합성되며 식물병원성 진균과 인체병원균에 대한 항진균활성이 보고되어있음.
- 2,3,4-trimethylpentane, 2,3,3-trimethylpentane, 2,2,5-trimethylhexane, 그리고 2,2,3-trimethylhexane의 항진균활성은 전혀 보고된 바가 없음.
- 따라서 *Bacillus* sp. DR-08 균주로부터 합성되는 휘발성물질 대부분과 이들의 식물병원성 세균 및 진균에 대한 항진균활성은 본 연구에 의해 처음 발견되었음.

바. 선발한 DR-08 균주의 배양여액 추출물의 항세균활성

(1) 연구목적

- 신규로 선발한 DR-08 균주의 배양여액 추출물 항세균활성 검정

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 미생물 : DR-08 균주

(나) 시험방법

① DR-08 균주의 배양여액 추출 및 항세균 활성 검정

- 3일간 TSB배지에서 액체배양한 DR-08 배양액을 4000 rpm에서 20분간 원심분리를 하여 약 1 L 상등의 배양여액을 획득하였음. 1 L 배양여액에 동량의 에틸아세테이트를 넣어 2회 분획을 실시하여 에틸아세테이트 층을 얻은 후, 700 ml의 부탄올을 물층에 가하여 2회 분배 추출하였음.

- 감압 농축하여 각각 에틸아세테이트 층 물질 24 mg, 부탄올 층 물질 320 mg, 물 층 물질 1 g을 얻었음.
 - 에틸아세테이트 추출물질은 아세톤과 메탄올 각각 1.5 ml을 넣어 용해하였고, 부탄올 추출물질은 메탄올 3 ml에 그리고 물 추출물질은 750 mg을 다른 바이아엘로 취하여 물 4.5 ml에 용해하였음.
 - 에틸아세테이트 추출물은 10 μ l에 아세톤 90 μ l를 넣어 희석하였고, 부탄올 추출물 100 μ l에 메탄올 900 μ l를 넣어 희석하고, 물 추출물은 200 μ l을 800 μ l의 물에 넣어 희석하였음. 각 추출물을 복숭아 세균성구멍병 원인균에 대하여 agar diffusion방법을 이용하여 항세균활성을 조사하였음.
- ② 13개 식물병원성세균에 대한 최소생장저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 조사
- Agar diffusion방법으로 항세균활성을 조사한 결과, 부탄올 추출물만 항세균활성을 나타내어 부탄올 추출물을 96-웰 플레이트 방법으로 항세균 스펙트럼을 조사하였음.
 - 13개 균주를 TSB배지에 접종하여 전배양한 후 UV spectrophotometer를 사용하여 OD값을 0.1로 조절한 후, 멸균하여 식힌 TSB배지에 1% 접종하였음. 한 웰에 준비된 병원균이 혼합된 TSB를 180 μ l와 5,000 μ g/ml의 DR-08 부탄올 추출물 20 μ l를 분주하고 잘 섞어서 500 μ g/ml 처리구를 만들었음. 옆의 웰에 준비된 병원균이 혼합된 TSB를 100 μ l를 분주하고 500 μ g/ml 처리구 웰로부터 100 μ l를 회수하여 분주하고 잘 섞어 250 μ g/ml 처리구를 만들었음.
 - 위와 같이 2배씩 순차적으로 희석하여 500 μ g/ml부터 15.6 μ g/ml까지 96-웰 마이크로플레이트 생물검정법으로 최소생육저해농도(MIC)를 조사하였음.
 - 스트렙토마이신 설페이트(streptomycin sulfate)는 양성 대조군으로 최대 100 μ g/ml부터 2배씩 순차적으로 희석하여 6.25 μ g/ml까지 사용하였음. 처리당 3반복으로 실시하였음.
 - 각 식물병원균의 최적생장조건에서 1~3일 동안 정치배양 한 후, 마이크로플레이트 리더에서 600 nm의 흡광도로 측정하였고, 병원균의 생육을 완전히 저해하는 최소농도를 최소생육저해농도로 결정하였음.

(3) 결과

(가) DR-08 균주 추출물의 항세균활성 검정

- 휘발성 물질 외에도 비휘발성 항균물질 생산여부를 조사하기 위하여 DR-08 균주의 배양여액을 유기용매로 추출한 후 복숭아 세균성구멍병 원인균에 대한 항세균활성을 조사한 결과, 부탄올 추출물이 강한 항세균활성을 보였음(그림 10).

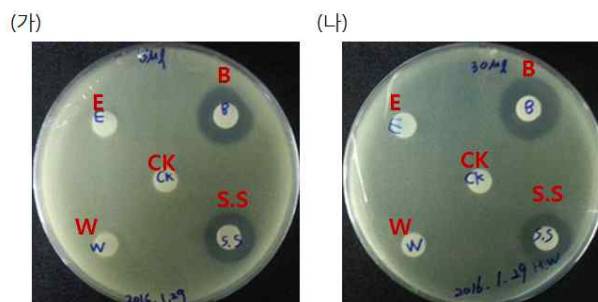


그림 10. 복숭아 세균성구멍병 원인균에 대한 항세균 활성. E: 에틸아세테이트 추출물, B: 부탄올 추출물, W: 물 추출물, S.S: streptomycin sulfate 200 μ g/ml, CK: 메탄올.

- 활성을 보이는 부탄올 추출물을 복숭아 세균성구멍병 원인균을 포함하여 13개 식물병원 세균에 대하여 액체배지에서의 최소생육저해농도를 조사하였음.
- 그 결과, 표 7에서와 같이 8개의 세균에 대하여 250 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 MIC값을 보였음.
- 벼 흰잎마름병원인균 *X. oryzae* pv. *oryzae*의 생육을 가장 효과적으로 저해했으며, 다음으로 세균성구멍병균 *X. arboricola* pv. *pruni*과 세균성점무늬병균 *X. euvesicatoria* 의 생육을 억제하였음.
- 이 외에도 감귤궤양병균을 포함하는 5개의 서로 다른 식물병원성세균에 대해서도 항세균활성을 나타내었음(표 7).

표 7. DR-08균주의 배양여액의 부탄올 추출물의 다양한 식물병원세균에 대한 최소생육저해농도

식물병원균	MIC($\mu\text{g/ml}$)	
	DR-08 BuOH	Streptomycin sulfate
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>	-	-
<i>Acidovorax konjaci</i>	>500	6.25
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	62.5	12.5
<i>Burkholderia glumae</i>	62.5	12.5
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	250	25
<i>Pectobacterium carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	-	6.25
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	-	> 100
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	-	12.5
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	-	12.5
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	31.2	12.5
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	62.5	> 100
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	31.2	12.5
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	15.6	6.25

3. 우수한 항세균활성의 천연물 및 계면활성제 선발

가. 고효성 항세균활성 천연추출물 선발

(1) 연구목적

- 고효성 항세균활성 천연추출물 선발하기 위한 생물검정

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 224개의 식물추출물

(나) 시험방법

① 천연물 확보 및 최소생육저해농도 조사

- 224개의 식물추출물은 한국식물추출물 은행에서 분양받았으며, 생물검정을 위하여 메탄올을 이용하여 50 mg/ml 농도로 용해하였음. 96-웰플레이트 웰에 세균성구명 병원인균을 1.0×10^6 cfu/ml 을 함유한 TSB배지를 분주하고, 추출물을 500 μ g/ml와 250 μ g/ml 농도로 처리하였음.
- 250 μ g/ml에서 세균의 성장을 완전히 억제한 식물 추출물 시료에 대해서는 250 μ g/ml부터 1/2씩 농도를 희석하면서 15.6 μ g/ml까지 처리하여 MIC를 조사하였음.
- 스트렙토마이신 설페이트(streptomycin sulfate)는 양성 대조군으로 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 μ g/ml 수준으로 처리하였고, 음성 대조군으로는 1% 메탄올을 처리하였음. 30°C에서 24시간 동안 정치배양한 후 MIC를 조사하였고, 처리당 3반복으로 실시하였으며, 세균성구명병 원인균의 생육은 마이크로플레이트 리더에서 600 nm의 흡광도로 측정하였음.

(3) 결과

(가) 천연물의 항세균활성 검정

- 한국식물추출물은행에서 분양받은 224개 식물추출물을 세균성구명병 원인균에 대하여 항세균활성을 조사한 결과, 백작약(주초), 백축, 복분자, 복분자(토), 산수유(수), 백작약, 용뇌, 옥리인, 토목향, 해당근, 현호색, 황금(초), 흑축 등의 13개 추출물이 500 내지는 250 μ g/ml의 MIC값을 나타내었음(표 8).
- 13개 추출물에 대하여 다양한 낮은 농도에서 MIC값을 측정한 결과, 흑축 추출물의 MIC 값이 250 μ g/ml으로 가장 항세균활성이 높은 천연물로 선발되었음.

표 8. 224개 식물 추출물 중 활성을 보이는 13개 식물추출물의 복숭아 세균성구명병 원인균에 대한 최소생육저해농도

번호	품명	라틴생약명	MIC 값 ($\mu\text{g/ml}$)
54	백작약(주초)	<i>Paenoniae Radix alba</i>	500
57	백축	<i>Pharbitidis Semen</i>	500
66	복분자	<i>Rubi Fructus</i>	500
67	복분자(토)	<i>Rubi Fructus</i>	500
103	산수유(수)	<i>CrataegiFructus</i>	500
130	백작약	<i>Paenoniae Radix alba</i>	500
136	용뇌	<i>Borneolum</i>	500
137	옥리인	<i>Pruni Nakaii Semen</i>	500
208	토목향	<i>Inulae Radix</i>	500
215	해당근	<i>ChaenomelisLagenariae Radix</i>	500
217	현호색	<i>Corydlais Tuber</i>	500
220	황금(초)	<i>Scutellariae Radix</i>	500
224	흑축	<i>Pharbitidis Semen</i>	250
대조 약제	스트렙토마이신 설페이트 (streptomycin sulfate)		6.25

나. 선발한 흑축 추출물의 항세균활성 검정

(1) 연구목적

- 선발한 흑축 추출물을 이용하여 13개 식물병원성 세균에 대한 항세균 활성 조사

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 선발한 흑축 추출물

(나) 시험방법

① 선발한 흑축 추출물 준비

- 흑축 100 g을 마쇄한 후 메탄올 1 L를 가한 다음 1시간 동안 진탕한 후 여과지로 여과하였음. 잔유물에 다시 메탄올 1 L를 가한 후 1시간 동안 진탕한 후 여과하여 획득한 두 메탄올 추출물을 합하여 감압농축하였음.
- 메탄올 추출물 6.2 g을 획득한 후 700 mg을 남겨두고 나머지 시료에 대하여 에틸아세테이트와 부탄올로 분획하였음.
- 메탄올 추출물에 500 mL의 증류수로 가하여 용해한 후 수용액을 분획여두로 옮기고 나서 다시 에틸아세테이트 500 mL을 메탄올 추출물을 담고 있던 둥근환플라스

크에 가하여 잔유물을 플라스크에 남아 있던 남은 추출물을 용해한 후 수용액이 담긴 분획여두로 옮겼음.

- 수용액과 에틸아세테이트용액이 담긴 분획여두를 1분간 진탕한 후 정치시킨 다음 두 개의 층이 분리될 때 까지 상온에 두었음.
- 에틸아세테이트층을 삼각플라스크에 옮긴 후 무수망초(anhydrous sodium sulfate)로 물을 제거한 후 이 과정을 2회 실시한 후 획득한 에틸아세테이트 용액을 합하여 감압농축하여 1.6 g의 추출물을 획득하였음.
- 수용액층을 다시 부탄올을 이용하여 2회 분획한 후 감압농축하여 부탄올 추출물 2.16 g과 물 추출물 1.7 g을 획득하였음.

② 13개 식물병원세균에 대한 흑측 추출물의 최소생육저해농도(MIC) 조사

- 에틸아세테이트 추출물은 아세톤으로, 부탄올은 메탄올, 그리고 물추출물은 멸균수로 100 mg/ml 수준으로 용해하여, 병원균 현탁액 90 μ l에 본 발명의 흑측 메탄올, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 추출물 용액 10 μ l를 분주하여 1,000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3 μ g/ml 수준으로 처리였고, 대조약제로 스트렙토마이신 설페이트를 멸균수로 용해한 후 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 μ g/ml 수준으로 처리하였음. 무처리는 1 % 메탄올을 처리하였음. 각 식물병원세균 최적 배양 조건에서 정치배양한 후 MIC를 조사하였음.

(3) 결과

(가) 흑측의 다양한 유기용매 추출물의 항세균활성

- 흑측의 메탄올 추출물을 에틸아세테이트, 부탄올과 물로 분획 추출한 후 이들 추출물의 항세균활성을 조사하였음.
- 그 결과, 세 개의 분획 추출물중에서 부탄올 추출물만 활성을 보였으며, MIC값은 125 μ g/ml이었음(표 9).
- 흑측 부탄올 추출물의 다양한 식물병원세균에 대한 항균스펙트럼을 조사하기 위하여 복숭아 세균성구멍병 원인균을 포함한 13개 세균에 대하여 MIC를 조사하였음. 그 결과, 표 10에서와 같이 대상 식물병원세균들 중에서 오직 *Xanthomonas* 속 세균들에 대해서만 항세균활성을 나타내었음.
- 특히, 벼 흰잎마름병을 일으키는 *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. euvesicatoria*, *X. arboricola* pv. *pruni*(Xap)에 대해서는 최소생육저해농도가 125 μ g/ml이었으며, 감귤 궂양병 원인균 *X. axonopodis* pv. *citri*에 대한 최소생육저해농도는 500 μ g/ml이었음(표 10).
- 한편, 흑측의 다양한 추출물을 Xap에 대한 항세균활성을 다양한 농도로 조사한 결과, 그림 11과 같이 부탄올 추출물과 메탄올 추출물이 가장 항세균활성이 높아 부탄올 추출물에서 활성물질분리 분리를 수행하였음.

표 9. 흑축으로부터 획득한 다양한 유기용매 추출물의 복숭아 세균성구멍병균에 대한 최소생육저해농도

시료	MIC($\mu\text{g}/\text{ml}$)
메탄올 추출물	250
에틸아세테이트 추출물	-
부탄올 추출물	125
물 추출물	-
스트렙토마이신 설페이트	6.25

표 10. 흑축 부탄올 추출물의 다양한 식물병원성 세균에 대한 최소생육저해농도

식물병원균	MIC($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	BuOH층	Streptomycin sulfate
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>	-	-
<i>Acidovorax konjaci</i>	-	6.25
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	12.5
<i>Burkholderia glumae</i>	-	12.5
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	-	25
<i>Pectobacterium carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	-	6.25
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	-	> 100
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	-	12.5
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	-	12.5
<i>Ralstonia solanacearum</i>	125	6.25
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	125	12.5
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	125	> 100
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	125	12.5
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	125	6.25

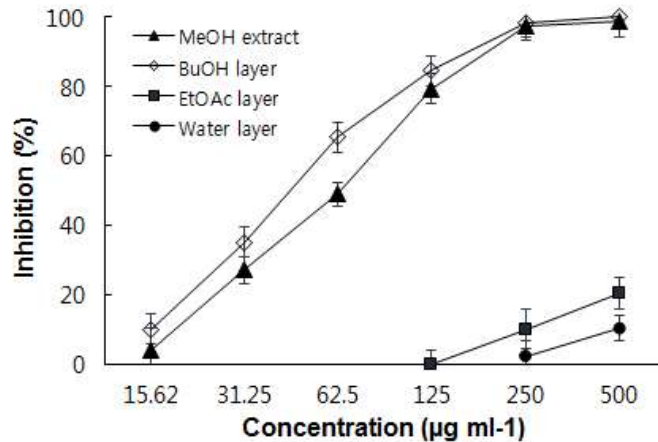


그림 11. 흑측의 메탄올 추출물과 부탄올, 에틸아세테이트 물 분획 추출물의 복숭아 세균성구 멍병균 생육억제율.

다. 흑측 부탄올 추출물로부터 항세균활성 물질 분리

(1) 연구목적

- 흑측 부탄올 추출물로부터 여러 가지 컬럼 크로마토그래피를 이용한 항세균활성 물질 분리

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 흑측 부탄올 추출물

(나) 시험방법

- ① 흑측 부탄올 추출물로부터 항세균활성 물질 분리

- 흑측 부탄올 추출물(2.1 g)을 실리카겔컬럼[3.5 cm(내경) × 60 cm(높이); Kiesel gel 60 70-230 mesh, 150 g]에 가한 다음 클로로포름:메탄올:물(14:6:1)의 유기용매로 용출하여 활성분획 F2(1.47 g)을 얻었음. 활성분획 F2를 세파텍스 LH-20컬럼크로마토그래피[3 cm(내경) × 80 cm(높이), 레진은 50 g]에 가한 다음 100% 메탄올로 용출하였음. 반복적인 세파텍스 LH-20 컬럼크로마토그래피를 통하여 무색의 활성물질 PS1(645 mg)을 순수하게 분리하였음.

- ② PS1 물질의 항세균활성 검정

- 분리한 물질을 아세톤으로 50 mg/ml로 용해한 후 96-웰플레이트를 이용하여 13개 식물병원성 세균에 대하여 최대 500 µg/ml부터 2배씩 순차적으로 희석하여 6.25 µg/ml까지 처리하여 MIC를 조사하였음.

(3) 결과

- 활성을 보이는 흑측 부탄올 추출물로부터 실리카겔컬럼과 세파텍스 LH-20컬럼크로마토그래피를 통하여 무색의 항세균물질 1개를 분리하였고(PS1), 현재 기기분석을 통한 구조 분석을 진행하고 있음.

- 흑축으로부터 분리한 PS1 물질의 다양한 식물병원성 세균에 대한 항세균활성을 조사한 결과, 부탄올 추출물과 마찬가지로 13개의 식물병원성 세균들 중에서 *Xanthomonas* 속에 속하는 4종의 세균에 대해서만 31.3~125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최소생육저해농도 값을 보였음(표 11).

표 11. 흑축으로부터 분리한 항세균활성 물질 PS1의 다양한 식물병원세균에 대한 최소생육저해농도

식물병원균	MIC($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	PS1	Streptomycin sulfate
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>	-	-
<i>Acidovorax konjaci</i>	-	6.25
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	12.5
<i>Burkholderia glumae</i>	-	12.5
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	-	25
<i>Pectobacterium carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	-	6.25
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	-	> 100
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	-	12.5
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	-	12.5
<i>Ralstonia solanacearum</i>	31.25	6.25
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	125	12.5
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	125	> 100
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	62.5	12.5
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	31.25	6.25

라. 계면활성제의 항세균활성 검정

(1) 연구목적

- 기업에서 제공받은 6개 계면활성제(SDS, WP110, 150, 250L, 280B, 803)의 항세균 활성 검정

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 6개 계면활성제(SDS, WP110, 150, 250L, 280B, 803)

(나) 시험방법

- ① 계면활성제 준비

- (주)팜한농으로부터 제공받은 6개 계면활성제(SDS, WP110, 150, 250L, 280B, 803)를 멸균한 증류수로 용해하여 50 mg/ml로 용해하였음.
- 96-웰플레이트 방법을 사용하여 복숭아 세균성구멍병균에 대하여 500 $\mu\text{g/ml}$ 부터 2 배씩 순차적으로 희석하여 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 수준까지 처리하였음. 대조약제로 streptomycin sulfate를 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 $\mu\text{g/ml}$ 수준으로 처리하였으며, 무처리 구로는 1% 멸균수를 처리하였음.
- 30°C에서 24시간 동안 호기적인 조건에서 정치배양한 후, MIC를 조사하였음.

(3) 결과

(가) 계면활성제의 항세균활성 검증

- (주)팜한농에서 제공받은 6개 계면활성제를 500~15.62 $\mu\text{g/ml}$ 까지 세균성구멍병 원 인균에 대하여 항세균활성을 조사한 결과, SDS에서만 항세균활성이 확인되었으며 최소생육저해농도는 250 $\mu\text{g/ml}$ 확인되었음(표 12).

표 12. 계면활성제의 세균성구멍병균에 대한 최소생육저해농도

계면활성제	하기 농도 ($\mu\text{g/ml}$)에서 세균성구멍병원인균에 대한 방제가 (%)					
	500	250	125	62.5	31.25	15.62
SDS	100	100	81.94	33.81	34.16	2.54
WP110	29.35	26.76	33.66	22.02	7.75	-
150	67.05	68.85	26.97	-	-	-
250L	31.66	7.33	-	-	-	-
280B	17.51	-	-	-	-	-
803	9.38	1.95	-	-	-	-
대조약제	하기 농도 ($\mu\text{g/ml}$)에서 세균성구멍병원인균에 대한 방제가 (%)					
	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56
streptomycin sulfate	100	100	99.44	98.9	56.45	36.41

4. 선발한 *Bacillus* 균주와 천연물 및 계면활성제 간의 시너지 효과 조사

가. checkerboard assay 방법을 이용한 시너지 효과 조사

(1) 연구목적

- 선발한 DR-08 균주와 천연물 및 계면활성제 간의 checkerboard assay 방법을 이용한 시너지 효과 조사

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① *B. methylotrophicus* DR-08 균주, 흑축에서 분리한 PS1물질, 계면활성제 SDS

(나) 시험방법

① 시너지 효과를 조사할 물질 준비

- 시너지 효과를 조사할 *Bacillus sp.* DR-08 균주의 부탄올 추출물은 메탄올에 용해하여 최종농도가 6.25 mg/ml이 되도록하고, 천연물 흑축에서 분리한 PS1물질도 메탄올에 용해하여 25 mg/ml, 계면활성제 SDS는 멸균된 증류수에 용해하여 1 mg/ml 스탁 준비하였음.

② 시너지 효과 조사할 물질 A와 B를 선정하여 checkerboard assay 방법 수행

- 세균성구멍병균 O.D값을 0.1로 맞춘 배양액과 TSB배지를 섞어 10^5 으로 준비하고, DR-08 균주 부탄올 추출물과 계면활성제 SDS의 시너지 효과를 조사할 경우, 경우, 물질 A는 하트(DR-08 균주 부탄올 추출물)로, 물질 B는 별(SDS)로 표시하였음.
- DR-08 균주 부탄올 추출물 6.25 mg/ml 농도의 스탁을 준비된 10^5 세균성구멍병균 TSB에 희석하여 MIC x2(하트무늬 32개)인 62.5 $\mu\text{g/ml}$ 로 준비하여, 첫 번째 행의 1~7까지 7 웰에 DR-08 균주 부탄올 추출물 MIC x2(하트무늬 32개) 100 μl 를 분주 두 번째 행부터 여섯 번째 행까지 10^5 세균성구멍병균 TSB 50 μl 에 1/2씩 희석하였음.
- 계면활성제 SDS 1 mg/ml 스탁 MICx4(별무늬 64개)를 준비하여 첫 번째 행부터 여섯 번째 행의 1 웰에 50 μl 를 분주하여 DR-08 균주 부탄올 추출물 (하트무늬)와 잘 섞어, 50 μl 를 회수하고 첫 번째 행부터 여섯 번째 행의 2-7 까지 6 웰로 1/2 씩 희석하였음.
- 흑축의 항세균물질 PS1과 SDS간, DR-08 부탄올 추출물과 PS1 간의 시너지 효과 조사 방법도 checkerboard assay 방법으로 상기와 같음.checkerboard assay 방법의 모식도는 그림 12으로 나타내었음.
- 분할 저해 농도 지수(Fractional Inhibitory Concentration Indexes)는 아래의 수식으로 계산함.
- $FICI = FIC_A + FIC_B = [A]/ MIC_A + [B]/ MIC_B$, [A]: SDS 물질 존재 시, DR-08 부탄올 추출물의 최소생육저해농도이며, [B]: DR-08 부탄올 추출물 존재 시, SDS의 최소생육저해농도.
- FICI 값이 0.5이하: 시너지 효과 있음; FICI 값이 0.5보다 크며 0.75 이하: 부분적 시너지 효과 있음; FICI 값이 0.75보다 크며 1.0 이하: 상승 효과 있음; FICI 값이 1.0보다 크며 4.0 이하: 영향 없음; FICI 값이 4.0보다 큰 경우: 길항작용 효과 있음.













	 MIC X 2	 MIC X 1	 MIC X 1/2	 MIC X 1/4	 MIC X 1/8	 MIC X 1/16
 MIC X 2	+++++ +++++ +++++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	+++++ +++++ +++++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	+++++ +++++ +++++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	++++ ++++ ++++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	++ ++ ++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	+ + + ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥
 MIC X 1	+++++ +++++ +++++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	+++++ +++++ +++++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	+++++ +++++ +++++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	++++ ++++ ++++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	++ ++ ++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	+ + + ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥
 MIC X 1/2	+++++ +++++ +++++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	+++++ +++++ +++++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	+++++ +++++ +++++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	++++ ++++ ++++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	++ ++ ++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	+ + + ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥
 MIC X 1/4	+++++ +++++ +++++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	+++++ +++++ +++++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	+++++ +++++ +++++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	++++ ++++ ++++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	++ ++ ++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	+ + + ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥
 MIC X 1/8	+++++ +++++ +++++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	+++++ +++++ +++++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	+++++ +++++ +++++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	++++ ++++ ++++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	++ ++ ++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	+ + + ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥
 MIC X 1/16	+++++ +++++ +++++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	+++++ +++++ +++++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	+++++ +++++ +++++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	++++ ++++ ++++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	++ ++ ++ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥	+ + + ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥ ♥♥♥♥♥

그림 12. DR-08 균주의 부탄올 추출물과 계면활성제 SDS의 시너지 효과 조사를 위한 checkerboard assay 모식도.

(3) 결과

(가) 선발한 DR-08 균주의 부탄올 추출물과 계면활성제 SDS 간의 시너지 효과 조사

- 선발된 DR-08 균주의 부탄올 추출물과 계면활성제 SDS 간의 시너지 효과를 확인하기 위하여, checkerboard assay를 수행한 결과, 세균성구명병 원인균에 대한 DR-08 균주의 부탄올 추출물의 최소생육저해농도(MIC) 값은 31.25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 SDS에 의한 영향으로 1.95 $\mu\text{g/ml}$ 낮춰졌고, SDS 역시 최소생육저해농도(MIC) 값이 250 $\mu\text{g/ml}$ 에서 DR-08 균주 부탄올 추출물에 의한 영향으로 125 $\mu\text{g/ml}$ 낮춰졌음.
- 분할 저해 농도 지수(FICI)를 확인한 결과, FICI 값은 0.563으로 DR-08 균주의 부탄올 추출물과 계면활성제 SDS간 부분적인 시너지 효과를 확인하였음(표 13).

표 13. DR-08 균주의 부탄올 추출물과 계면활성제 SDS간 시너지 효과에 의한 변화된 최소생육저해농도($\mu\text{g/ml}$), 분할 저해 농도(FIC) 및 분할 저해 농도 지수(FICI) 값

시료	MIC($\mu\text{g/ml}$)	[A] or [B] ($\mu\text{g/ml}$) ¹⁾	FIC	FICI ²⁾
DR-08 BuOH	31.25	1.95	0.063	0.563
SDS	250	125	0.50	

¹⁾ [A]: SDS 존재 시, DR-08 부탄올 추출물의 최소생육저해농도이며 [B]: DR-08 부탄올 추출물 존재 시, SDS의 최소생육저해농도.
²⁾ FICI 값이 0.5이하: 시너지 효과 있음; FICI 값이 0.5보다 크며 0.75 이하: 부분적 시너지 효과 있음; FICI 값이 0.75보다 크며 1.0 이하: 상승 효과 있음; FICI 값이 1.0보다 크며 4.0 이하: 영향 없음; FICI 값이 4.0보다 큰 경우: 길항작용

(나) 항세균물질 PS1과 계면활성제 SDS 간의 시너지 효과 조사

- 선발된 천연물 흑측에서 분리한 항세균물질 PS1과 계면활성제 SDS 간의 시너지 효과를 확인하기 위하여, checkerboard assay를 수행한 결과, 세균성구멍병에 대한 PS1물질의 최소생육저해농도값은 125 $\mu\text{g/ml}$ 에서 SDS에 의한 영향으로 7.81 $\mu\text{g/ml}$ 로 낮춰졌고, SDS 최소생육저해농도(MIC)값 250 $\mu\text{g/ml}$ 은 PS1물질에 의한 영향을 받지 않아 변화가 없었음.
- 분할 저해 농도 지수(Fractional Inhibitory Concentration Indexes)를 확인한 결과, FICI 값은 1.063으로 PS1과 계면활성제 SDS 간의 시너지 효과는 없었음(표 14)

표 14. PS1물질과 계면활성제 SDS간 시너지 효과에 의한 변화된 최소생육저해농도($\mu\text{g/ml}$), 분할 저해 농도(FIC) 및 분할 저해 농도 지수(FICI) 값

시료	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	[A] or [B] ($\mu\text{g/ml}$) ¹⁾	FIC	FICI ²⁾
PS1	125	17.81	0.063	1.063
SDS	250	250	1.00	

¹⁾ [A]: SDS 존재 시, DR-08 부탄올 추출물의 최소생육저해농도이며 [B]: DR-08 부탄올 추출물 존재 시, SDS의 최소생육저해농도.

²⁾ FICI 값이 0.5이하: 시너지 효과 있음; FICI 값이 0.5보다 크며 0.75 이하: 부분적 시너지 효과 있음; FICI 값이 0.75보다 크며 1.0 이하: 상승 효과 있음; FICI 값이 1.0보다 크며 4.0 이하: 영향 없음; FICI 값이 4.0보다 큰 경우: 길항작용

(다) 선발한 DR-08 균주의 부탄올 추출물과 흑측에서 분리한 항세균물질 PS1의 시너지 효과 조사

- DR-08 균주의 부탄올 추출물과 흑측에서 분리한 항세균물질 PS1의 시너지 효과를 확인하기 위하여, checkerboard assay를 수행한 결과, 세균성구멍병 원인균에 대한 DR-08 균주의 부탄올 추출물과 PS1물질의 최소생육저해농도(MIC) 값이 모두 높아졌음.
- 분할 저해 농도 지수(Fractional Inhibitory Concentration Indexes)를 확인한 결과, FICI 값은 4이상으로 DR-08 균주의 부탄올 추출물과 PS1물질 사이 길항작용과 같은 효과를 확인하였음(표 15).

표 15. DR-08 균주의 부탄올 추출물과 흑측에서 분리한 항세균물질 PS1의 시너지 효과에 의한 변화된 최소생육저해농도($\mu\text{g/ml}$), 분할 저해 농도(FIC) 및 분할 저해 농도 지수(FICI) 값

시료	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	[A] or [B] ($\mu\text{g/ml}$)	FIC	FICI
DR-08 BuOH	31.25	62.5	>2	>4
PS1	125	250	>2	

제 2절 흑축과 DR-08로부터 항세균활성물질 탐색

1. 흑축으로부터 분리한 항세균활성 물질의 화학 구조 동정

가. PS1의 가수분해 산물 분리

(1) 연구목적

- PS1의 가수분해를 통한 가수분해 물질 분리

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시재료 : PS1

(나) 시험방법

① PS1화합물의 알칼리성 가수분해 반응을 통한 순수 화합물 분리

- 활성물질 PS1에 1% 수성 포타슘 카보네이트를 30 ml을 넣어 95℃에서 2시간동안 가열하였음. 이 혼합물을 1N 염산으로 pH 4로 조정, 10 ml의 에틸아세테이트로 분획하여 수성층을 60 ℃에서 농축 한 후, 20 ml의 증류수로 용해한 후, 세파덱스 LH-20 컬럼 크로마토그래피를 통하여 물질 분리를 실시하였음.
- 컬럼 크기는 3.5 cm(내경) × 60 cm(높이)였으며, 레진은 100g, 18~111 μm (GE Healthcare, Sweden)상에서 크로마토 그래피하고, 100 % MeOH로 용출하였음
- 얻어진 pharbitic acid는 0.5 mm Merck사의 Prep-TLC plate에 점적하여 클로로폼:메탄올:물:아세트산(55:36:8:1)용매 조건하에서 전개하여, 가수분해 물질 1을 분리하였음.
- 가수분해 물질 1도 PS1과 함께 클로로폼:메탄올:물:아세트산(55:36:8:1)용매 조건하에서 전개하여, 자외선(UV) 254 및 365 nm하에서 관찰하고, TLC 전개판을 p-아니스 알데히드로 분무하여 120℃로 열처리하였음.

(3) 결과

(가) 흑축 부탄올 추출물에서 항세균활성 물질분리 및 화학구조 동정

- PS1의 화학구조를 밝히기 위하여 1H-NMR 분석을 실시한 결과, pharbitin으로 추정되었음. 이에 따라 정확한 구조를 밝히기 위하여 PS1을 알칼리 가수분해를 실시하였음.
- PS1물질에 알칼리 가수분해반응으로 순수한 가수분해화합물 1을 얻었고, p-아니스 알데히드로 분무와 열처리한 후 TLC 분석 결과, PS1은 연한 황색, 순수한 화합물 1은 연한 청색을 나타내었음(그림 13).



그림 13. 분리한 PS1 물질과 가수분해 화합물 1의 TLC 분석 결과.

나. 항세균활성 물질의 구조 동정

(1) 연구목적

- 흑축의 부탄올 추출물에서 분리된 항세균활성 물질의 구조 동정

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 가수분해 화합물 1

(나) 시험방법

① 가수분해 화합물 1의 화학구조 동정

- 가수분해 화합물 1은 핵자기공명(NMR) 분광학 및 고해상도 전기분무이온화 질량분석(HR-ESI-MS)으로 분석되었음. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 500MHz에서 Bruker Avance III HD 500 MHz 장치(Bruker Biospin GmbH, Germany)로 피리딘 d5 (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, MA)에서 측정하였음. 화학적 이동은 테트라 메틸 실란을 내부 표준으로 사용하여 계산하였음.
- HR-ESI-MS는 전기 분사 이온 소스 (Waters, Premier, UK)가 장착 된 Synapt G2 HDMS의 극 비행 시간(QTOF) 질량 분석기로 측정되었음.
- 가수분해 화합물 1의 화학 구조를 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 데이터 및 HR-ESI-MS에 기초하여 분석하였음.

(3) 결과

- 가수분해 화합물 1의 화학구조는 핵자기공명(NMR) 분광학 및 고해상도 전기분무이온화 질량분석 (HR-ESI-MS)분석으로 결정되었음.
- $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼(표 16)과 HR-ESI-MIS 결과(그림 14)에 기초하여 가수분해 화합물 1의 화학구조를 분석한 결과, pharbitic acid C로 확인되었고, 이에 따라 PS1은 Ono 등(2010)이 보고한 pharbitin으로 확인되었음(그림 15).

표 16. 순수한 화합물 1의 1H-NMR 분석 결과

Glc-1	4.87 (d, 7.5)	Rha ² -1	6.26 s
Glc-2	4.32 (dd, 2.5, 5.0)	Rha ² -2	4.75 s
Glc-3	4.55 (dd, 6.5, 5.5)	Rha ² -3	4.81 (d, 2.0, 9.0)
Glc-4	3.89 (dd, 3.0, 5.5)	Rha ² -4	4.39 s
Glc-5	3.90 *	Rha ² -5	5.09 s
Glc-6	3.91 *	Rha ² -6	1.86 (d, 6.0)
	4.54 *		
Glc ¹ -1	5.89 (d, 6.7)	Qui-1	5.21 (d, 7.4)
Glc ¹ -2	4.14 *	Qui-2	3.98 (*)
Glc ¹ -3	4.10 (dd, 9.5, 8.5)	Qui-3	3.98 (*)
Glc ¹ -4	4.02 (dd, 7.5, 7.5)	Qui-4	3.67 (dd, 9.0, 9.0)
Glc ¹ -5	3.82 (dd, 3.5, 5.5)	Qui-5	3.58 (dd, 6.5, 7.5)
Glc ¹ -6	4.19 (dd, 8.0, 9.5)	Qui-6	1.52 (d, 6.0)
	4.39 *		
Rha-1	5.4 (d, 1.5)	Ag-2	2.72 (t, 11.7)
Rha-2	4.53 (*)		2.87 (d, 14.4)
Rha-3	4.50 (*)	Ag-3	4.38 (*)
Rha-4	4.15 (dd, 9.0, 9.0)	Ag-11	3.86 (*)
Rha-5	4.26 (dq, 5.5, 9.0)	Ag-14	0.95 (t, 6.9)
Rha-6	1.63 (d, 6.0)		

* Signals are overlapping. δ in ppm from TMS (coupling constants (J) in Hz are given in parentheses). Spin-coupled pattern are designated as follows:

s = singlet, br s = broad singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet, q = quartet. Abbreviations:

Glc = glucopyranosyl; Rha = rhamnopyranosyl; Qui = quinovopyranosyl; Ag = aglycone = 11-hydroxyhexadecanoyl.

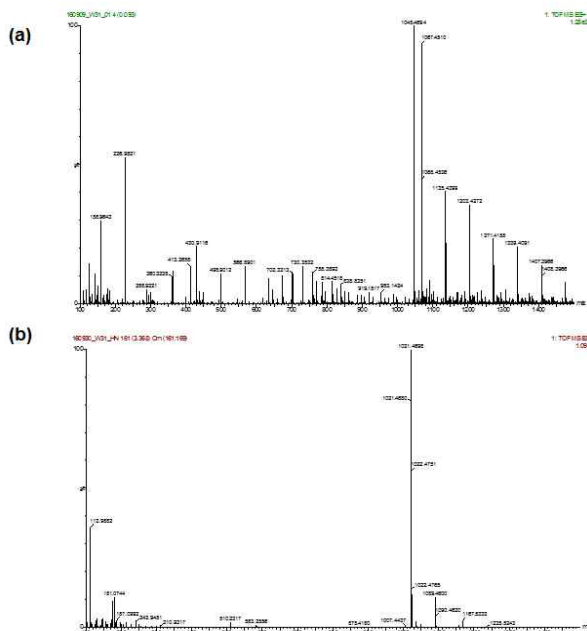


그림 14. 가수분해 화합물 1의 HR-ESI- MIS 결과, (a) 양이온 모드, (b) 음이온 모드.

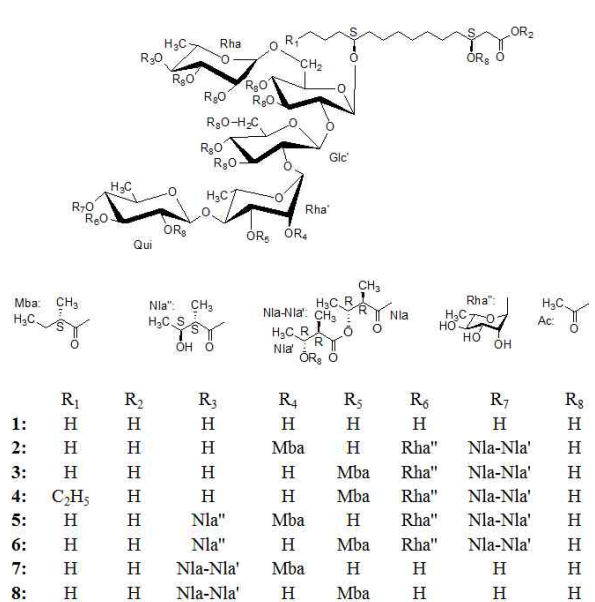


그림 15. 가수분해 화합물 1인 pharbitic acid C와 PS1물질인 pharbitin (2-8)의 화학구조(Ono 등, 2010).

2. 흑축으로부터 분리한 pharbitin의 항세균활성

가. Pharbitin의 복숭아세균성 구멍병에 대한 *in vivo* 조사

(1) 연구목적

- Detached leaf assay 분석을 통한 복숭아 세균성구멍병에 대한 pharbitin (PS1)과 흑축 부탄올 추출물의 항세균활성 검정

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① pharbitin(PS1)과 흑축 부탄올 추출물
- ② 공시 병원균 : *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Xap)
- ③ 공시 식물 : 토마토

(나) 시험방법

- ① Detached leaf assay 분석을 통한 복숭아 세균성구멍병에 대한 pharbitin(PS1)과 흑축 부탄올 추출물의 항세균활성 검정
 - 복숭아 세균성구멍병에 대한 병방제 효과를 조사하기 위해서 복숭아 나무의 어린 가지의 잎(6-9 cm)을 사용하여 detached leaf assay 분석을 수행하였음.
 - 복숭아 어린 잎을 멸균 증류수로 3회 세척한 후, 멸균된 종이 타월에 놓고 건조시키고, pharbitin과 부탄올 추출물을 50, 25, 12.5 mg/ml 농도로 메탄올로 용해한 후, 각각의 용액을 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 Tween-20이 함유된 증류수로 100배 희석하여 500, 250, 125 $\mu\text{g/ml}$ 수준으로 희석하였음. 무처리구는 1% 메탄올을 함유한 Tween-20 (250 $\mu\text{g/ml}$) 용액을 사용하였고, 양성 대조군으로 streptomycin sulfate 200 $\mu\text{g/ml}$ 을 함유하는 Tween-20 (250 $\mu\text{g/ml}$)을 사용했음.
 - 세척한 복숭아 잎을 각각의 용액에 10초 담구었다가 0.5%물 한천 배지 위에 올려두었음.
 - 28°C, 150rpm의 조건에서 36~48시간 TSB배지에서 진탕배양한 복숭아 세균성구멍병 원인균 Xap의 O.D 값을 0.1로 맞추고, 상기에 복숭아 잎에 pharbitin과 부탄올 추출물을 처리 4시간 후, 복숭아 세균성구멍병 원인균이 묻은 포셉을 사용하여 하나의 복숭아 잎에 6개의 상처를 내어 병원균을 접종하였음. 접종 후, 밀봉하여 28°C에서 16시간 빛이 있는 조건에, 8시간은 빛이 없는 조건에 두고, 잎의 변화를 기록함. 위 실험은 처리 당 2 개의 페트리 접시로 2 회 반복하였음.
- ② 조사내용
 - % 병 발생률 (DI) = $100 \times [\text{발병한 상처 수} / \text{모든 상처 수}]$
 - % 병 방제가 = $100 - [100 \times \text{처리구 발병률} / \text{무처리구 발병률}]$

(3) 결과

- Pharbitin과 흑축 부탄올 추출물의 복숭아 세균성구멍병에 대한 방제효능을 평가하기 위하여 복숭아나무의 어린잎을 사용하여 detached leaf assay 분석을 수행하였음.
- 분석 결과, pharbitin과 부탄올 추출물은 복숭아 세균성구멍병 발생율을 농도의존적으로 감소시켰음.
- Pharbitin은 125, 250 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 복숭아 세균성구멍병을 50, 70.8,

87.5% 억제하였음. 부탄올층 역시 125, 250 및 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 29.2, 54.2 및 75.0% 억제하였음(그림 16).

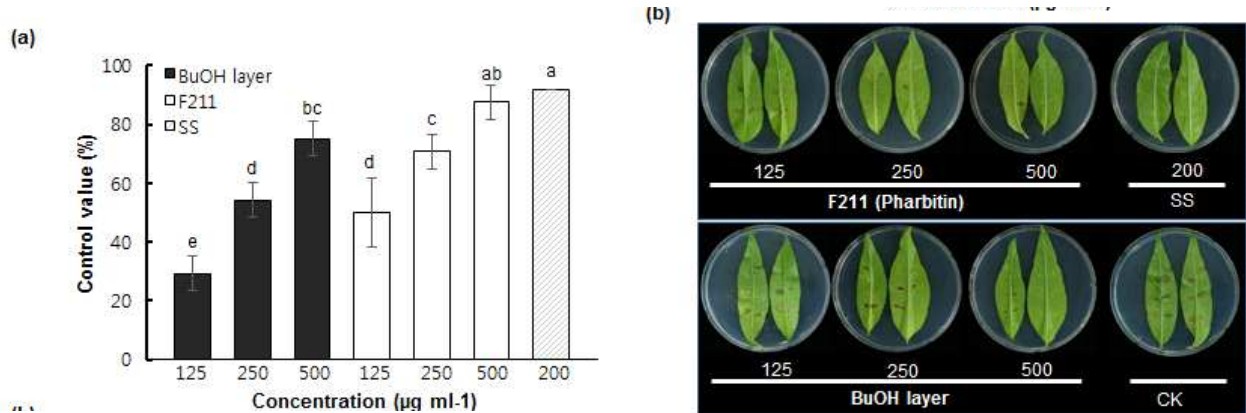


그림 16. PS1(pharbitin)과 흑축 부탄올 추출물의 Detached leaf assay를 통한 복숭아 세균성구멍병 방제 효과 (a) 및 결과 사진 (b).

나. Pharbitin의 토마토 풋마름병에 대한 *in vivo* 조사

(1) 연구목적

- 토마토 묘종을 이용하여 pharbitin(PS1)과 흑축 부탄올 추출물의 토마토 풋마름병 (*R. solanacearum*, Rs)에 대한 방제 효과 조사

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① Pharbitin(PS1)과 흑축 부탄올 추출물
- ② 공시 식물 : 토마토
- ③ 공시 병원균 : *Ralstonia solanacearum*

(나) 시험방법

- ① 토마토 묘종을 이용하여 pharbitin(PS1)과 흑축 부탄올 추출물의 토마토 풋마름병(*R. solanacearum*)에 대한 *in vivo* 항세균활성 검정
 - '서광' (팜한농) 토마토 씨앗을 부농(경주, 대한민국)에서 제조 한 상업용 원예 토양으로 채워진 소주컵에 파종하였음. 파종 24일 후 4-5 잎의 토마토를 음료수 컵(직경 7cm)으로 계대하였음.
 - pharbitin을 50, 25, 12.5 mg/ml 농도로, 부탄올 추출물을 200, 100, 50 mg/ml 농도로 메탄올로 용해한 후, 각각의 원액을 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Tween-20이 함유된 증류수로 pharbitin은 500, 250, 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 부탄올 추출물은 2000, 1000, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 수준으로 희석하였음.
 - 30°C, 150rpm의 조건에서 36~48시간 TSB배지에서 진탕배양한 토마토 풋마름병 원인균 *R. solanacearum*의 O.D 값을 0.1(10^8 CFU/ml)로 맞추고, 계대된지 24시간이 지난 토마토에 준비된 pharbitin과 부탄올 추출물 20 ml을 토양에 고르게 분주함. 6 시간 후 풋마름 병원균 현탁액 20 ml를 토양에 고르게 분주하여 병원균을 접종하였

음. 무처리구는 1% 메탄올을 함유한 Tween-20(250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 용액을 사용하였고, 양성 대조군으로 streptomycin sulfate 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 함유하는 Tween-20(250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 사용했음. 처리구당 5개의 토마토 식물을 사용하여 3번 반복하였음. 토마토 식물은 $30\pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 70~80%에 두고 병발생을 관찰하였음.

② 조사내용

- 토마토 풋마름병의 발병도는 0-5의 척도로 기록하였음(Winstead and Kelman, 1952).
- 0 = 증상 없음, 1 = 잎이 부분적으로 시들음, 2 = 1 ~ 2 잎사귀, 3 = 2 ~ 3 잎사귀, 4 = 4 잎사귀, 5 = 전체 식물 사망 . 풋마름병 방제가는 다음 공식을 사용하여 계산.
- % 방제가 = $100 \times [\text{대조군의 발병도} - \text{처리구의 발병도} / \text{대조구의 발병도}]$

(3) 결과

- 4주 된 토마토 묘종에서 *R. solanacearum*에 의해 발병하는 토마토 풋마름병에 대한 PS1(pharbitin)과 부탄올 추출물의 방제 활성을 조사하였음. 그 결과, 그림 16과 같이 PS1(pharbitin) 125, 250 및 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 7일 후, 처리된 토마토는 대조구 토마토에 비해 각각 79.5, 97.4 및 100%로 풋마름병을 방제하였음.
- 흑측 부탄올 추출물 500, 1000 및 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리 7일 후, 토마토 풋마름병 방제율은 76.9, 100, 100%이었음. 하지만 부탄올 추출물 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리구에서는 2일째부터 잎에 노란색 병변과 같은 식물독성이 유발되었음.
- PS1(pharbitin)과 부탄올 추출물을 처리한 14일 후부터 풋마름병 방제효과가 감소하였음(그림 17).

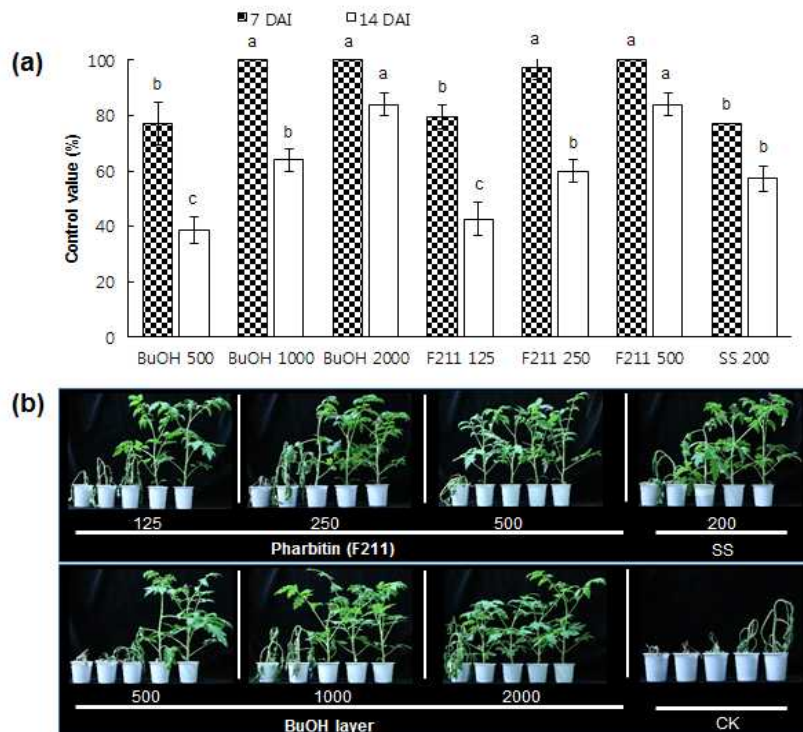


그림 17. 토마토 묘종을 이용한 PS1(pharbitin)과 흑측 부탄올 추출물의 토마토 풋마름병에 대한 방제효과 (a)와 결과 사진 (b).

3. *B. methylotrophicus* DR-08 균주 배양액의 *in vivo* 조사

가. DR-08 균주 배양액의 토마토 풋마름병 방제 효과 조사

(1) 연구목적

- DR-08 균주 배양액의 토마토 풋마름병(*Ralstonia solanacearum*)에 대한 *in vivo* assay를 통한 병방제가 조사

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- *B. methylotrophicus* DR-08 균주 배양액
- 공시 식물 : 토마토
- 공시 병원균 : *Ralstonia solanacearum*

(나) 시험방법

- ① 토마토 묘종을 이용하여 DR-08 균주 배양액의 토마토 풋마름병(*R. solanacearum*)에 대한 *in vivo* 항세균활성 검증
 - '서광' (팜한농) 토마토 씨앗을 부농(경주, 대한민국)에서 제조 한 상업용 원예 토양으로 채워진 소주컵에 파종하였고, 파종 24 일 후 4~5 잎의 토마토를 음료수 컵(직경 7cm)으로 계대하였음. TSB배지에 진탕배양된 DR-08 균주 배양액은 1/2, 1/4농도로 멸균수를 이용하여 희석하였음. 계대 후 5 시간이 지난 토마토에 준비된 DR-08 균주 배양액을 20 ml을 토양에 고르게 분주하였음.
 - TSA배지 30℃에서 72시간 배양한 토마토 풋마름병 원인균 *R. solanacearum*의 O.D 값을 0.1로 맞추고, DR-08 균주 배양액 처리 24 시간 후, 풋마름 병원균 현탁액 20 ml를 토양에 고르게 분주하여 병원균을 접종하였음. 무처리구는 아무것도 처리하지 않았으며, 대조군으로는 생균탄(팜한농, 2014), 부라마이신(한농)을 사용했음. 처리구당 5개의 토마토 식물을 사용하여 3번 반복하였음. 토마토 식물은 30±2℃, 상대습도 70~80%에 두고 병 발생을 관찰하였음.
- ② 조사내용
 - 토마토 풋마름병의 발병도는 0~5의 척도로 기록하였음(Winstead and Kelman, 1952).
 - 0 = 증상 없음, 1 = 잎이 부분적으로 시들음, 2 = 1 ~ 2 잎사귀, 3 = 2 ~ 3 잎사귀, 4 = 4 잎사귀, 5 = 전체 식물 사망 . 풋마름병 방제가는 다음 공식을 사용하여 계산하였음.
 - % 방제가 = $100 \times [\text{대조군의 발병도} - \text{처리구의 발병도} / \text{대조구의 발병도}]$

(3) 결과

(가) DR-08 균주 배양액의 *in vivo* 토마토 풋마름병 방제효과 조사

- DR-08 균주의 부탄을 추출물은 토마토 풋마름병원균인 *R. solanacearum*에 대한 *in vitro* 결과 최소생육억제농도 (MIC) 값이 31.25 $\mu\text{g/ml}$ 로 항세균 활성을 나타내었음 (2015년도 결과). 따라서, DR-08균주의 배양액으로 현재 구축되어있는 토마토 풋마름병에 대한 *in vivo* 조사를 수행하였음. 그 결과, 7일째 DR-08 배양액 1/2희석, 1/4 희석된 것을 처리한 각 처리구에서 94%, 90% 높은 수준으로 토마토 풋마름병을 방제하였음(그림 18).

- 대조구로 사용한 생균탄 250배, 500배, 부라마이신 500배, 1000배 처리구에서는 55%, 35%, 52%, 19% 방제가를 나타내었음(그림 18).

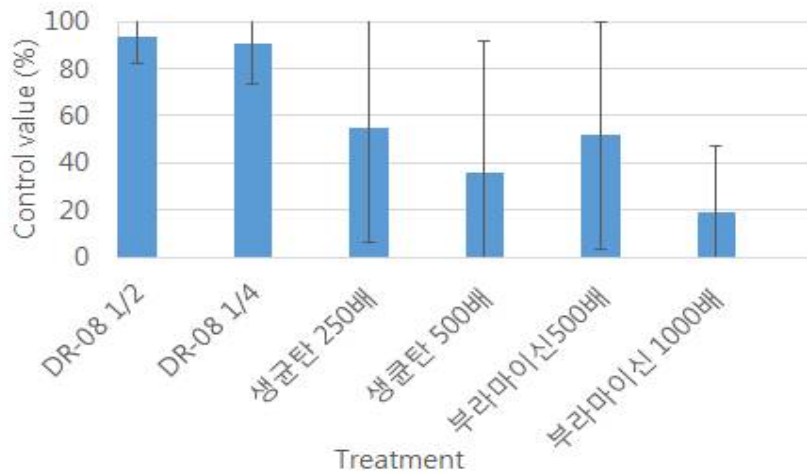


그림 18. DR-08 균주 배양액의 토마토 풋마름병 에 대한 방제효과.

4. *B. methylotrophicus* DR-08 균주로부터 항진균 및 항세균활성 조사 및 물질 탐색 가. DR-08 균주의 부탄올 추출물에서 활성물질 분리

(1) 연구목적

- DR-08 균주 부탄올 추출물로부터 각종 크로마토그래피 기술을 이용한 물질 분리

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① *B. methylotrophicus* DR-08 균주 부탄올 추출물

(나) 시험방법

- ① DR-08 부탄올 추출물 준비

- DR-08 균주를 멸균한 5 ml TSB배지에 접종하여 30℃, 24 시간 진탕 배양하였음. 1 L flask에 멸균한 TSB배지 300 ml에 전 배양액 1%를 접종하여 30℃에서 48 시간 진탕 배양하였음. 배양액을 4,000 rpm, 20분 동안 원심분리 한 후 상층액을 취하여, 상층액에 부탄올을 80% 넣어 분획한 후 얻어진 부탄올층을 회전식 감압 농축기를 이용하여 농축하여 부탄올층 9.53 g 얻었음.

- ② DR-08 부탄올 추출물로부터 항진균 및 항세균 활성 물질 분리

- DR-08 부탄올 추출물중 일부(3.0 g)를 실리카겔컬럼[5 cm(내경) × 60 cm(높이); silica gel 60 60-200 mesh, 400 g]에 가한 다음 클로로포름:메탄올:물(30:9:1)의 유기 용매로 용출하여 활성분획 F4, F5(318.3 mg)을 얻었음.
- 활성분획 F45(318.3 mg)를 세파덱스 LH-20컬럼[3 cm(내경) × 45 cm(높이); 레진 50 g]에 가한 다음 100% 메탄올로 용출하였음.
- 위로부터 얻은 활성 분획 F452(241.7 mg)를 sep-pak C18카트리지 컬럼 크로마토그래피를 통하여 물질 분리를 실시하였음. 카트리지 크기는 35cc, 10 g이며, 100% 물부

터 10, 20, 40, 60, 80, 100% 메탄올로 용출하였음. 활성분획 CF27(26.3 mg)을 Prep-TLC[0.5 mm, 20 cm(가로) × 10 cm(세로), 2플레이트]를 이용하여 물질을 분리하였음. Prep-TLC 분획은 메탄올로 용출하여 활성분획 CF271~CF279를 얻었음.

③ 활성분획물의 잎집무늬마름병균에 대한 최소생육저해농도(MIC) 조사

- 잎집무늬마름병 원인균 *Rhizoctonia solani*를 PDB배지에 접종하여 전배양 한 후 포자를 걸러 믹서기에 갈아 포자 현탁액을 50,000 $\mu\text{g/ml}$ 로 만든 후 멸균하여 식힌 PDB배지에 1% 접종하였음.
- 96웰에 준비된 병원균이 혼합된 PDB배지를 198 μl 와 20,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 각 분획물을 2 μl 를 분주하고 잘 섞어서 200 $\mu\text{g/ml}$ 처리구를 만들었음.
- 옆의 웰에 준비된 병원균이 혼합된 PDB배지를 100 μl 를 분주하고 200 $\mu\text{g/ml}$ 처리구 웰로부터 100 μl 를 회수하여 분주하고 잘 섞어 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리구를 만들었음.
- 위와 같이 2배씩 순차적으로 희석하여 200 $\mu\text{g/ml}$ ~ 3.125 $\mu\text{g/ml}$ 까지 96웰 마이크로플레이트 생물검정법으로 최소생육저해농도(MIC)를 조사하였음.

④ 활성분획물의 복숭아 세균성구멍병균에 대한 최소생육저해농도(MIC) 조사

- 복숭아 세균성구멍병 원인균 *X. arboricola* pv. *pruni* 균주를 TSB배지에 접종하여 진탕배양한 O.D값을 0.1로 맞추고, 멸균하여 식힌 TSB배지에 1% 접종하였음. 최소생육저해농도 조사는 위와 같은 96웰 플레이트 방법을 이용하여 조사하였음.

(3) 결과

- 항세균활성을 나타낸 DR-08 균주 배양여액의 부탄올 추출물 9.5 g 중에서 3.0 g을 사용하여 실리카겔 컬럼과 세파덱스 LH-20 컬럼, sep-pak C₁₈카트리지 컬럼, prep-TLC 크로마토그래피를 통하여 항세균활성 물질을 분리하였음(그림 19).
- 최종적으로 획득한 9개 분획에 대하여 TLC분석을 실시한 결과, CF276분획의 경우 물발색시 흰색을 나타내는 물질이 보임에 따라(그림 20) cyclolipopeptide계 물질을 포함하고 있는 것으로 추정되어, 9개 분획에 대하여 *X. arboricola* pv. *pruni*에 대한 항세균활성과 *Rhizoctonia solani*에 대한 항진균활성을 조사하였음.
- 결과, 표 17에서와 같이 *R. solani*에 대한 항진균활성은 CF276이 최소저해농도가 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 로 가장 강한 활성을 보였고, 그 다음으로 CF277이 강한 활성(50 $\mu\text{g/ml}$) 보였음.
- 한편, 항세균활성은 보다 다양한 분획에서 활성을 보였지만, CF277이 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 최소저해농도를 보임으로써 가장 강한 활성을 보였고, 그 다음으로 CF276, CF275순으로 강한 활성을 보였음.

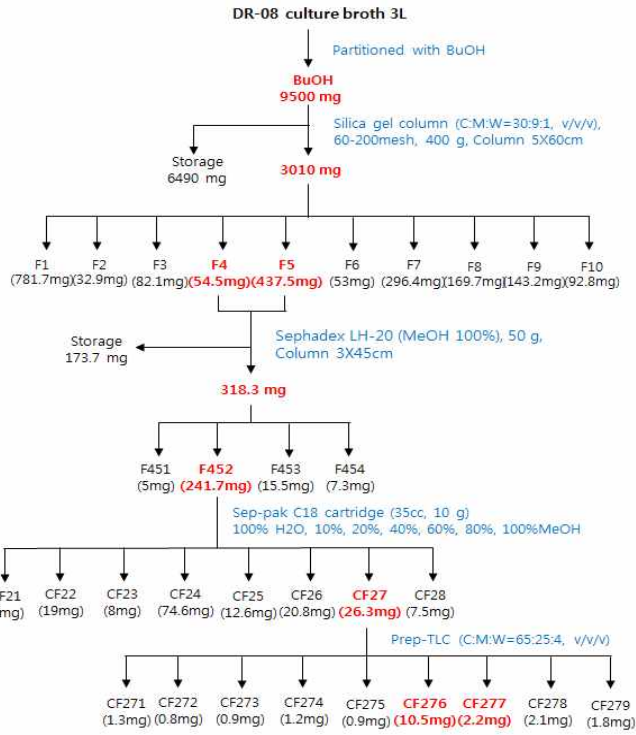


그림 19. DR-08 균주의 배양여액 부탄올 추출물로부터 활성물질을 분리하는 과정 모식도.

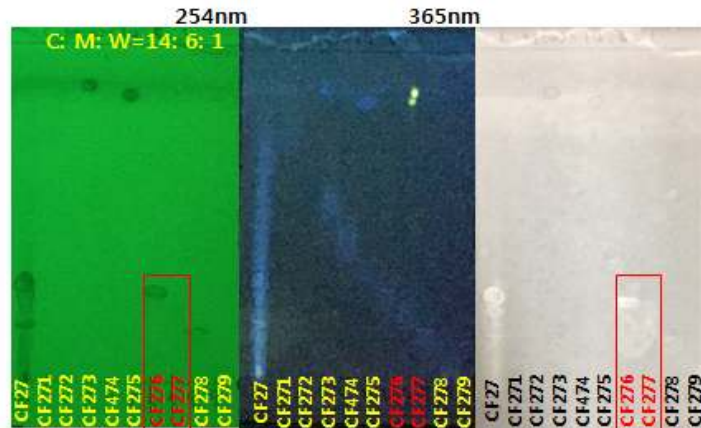


그림 20. DR-08 부탄올 추출물로부터 최종 분리된 9개 분획물의 TLC 분석결과.

표 17. DR-08 부탄올 추출물에서 분리한 9 분획물의 벼 잎집무늬마름병균 (*Rhizoctonia solani*)과 복숭아 세균성구멍병 (*Xanthomonas arboricola* pv *pruni*)에 대한 최소생육 억제농도

Phytopathogen	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)								
	C27-1 1.3mg	C27-2 0.8mg	C27-3 0.9mg	C27-4 1.2mg	C27-5 0.9mg	C27-6 10.5mg	C27-7 2.2mg	C27-8 2.1mg	C27-9 1.8mg
<i>R. solani</i>	-	-	-	-	-	12.5	50	-	-
<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	-	-	-	-	50	25	12.5	100	100

나. 항진균 활성 물질의 HPLC 및 LC-ESI/ MS 분석

(1) 연구목적

- 항진균 활성을 갖는 CF276분획의 HPLC 분석 및 LC-ESI/ MS 분석하여 물질을 동정

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① *B. methylotrophicus* DR-08 균주 부탄올 추출물로부터 분리한 항진균 활성 CF276분획

(나) 시험방법

① 분리된 항진균 활성 물질의 HPLC 분석

- 분리된 활성물질 분획 CF276을 이용하여 용매를 Solvent A 0.1% TFA H₂ O, Solvent B 0.1% TFA ACN를 사용하여 Bamy112BACF100; X bridge R C18 5 μ m (47.6 × 250 mm) 컬럼으로 아래와 같은 분석조건으로 HPLC 분석을 수행함(표 18).
- Iturin A(Sigma)와 활성 분획물을 농도 1 mg/ml의 농도로 메탄올을 이용하여 용해하였음.

표 18. HPLC gradient 분석 조건

	Time	Flow	%A	%B
1		1.00	90.0	10.0
2	80.00	1.00	0.0	100.0
3	90.00	1.00	0.0	100.0
4	92.00	1.00	90.0	10.0
5	99.00	1.00	90.0	10.0

② 항진균 활성 분획의 LC-ESI/MS 분석

- 활성 분획 CF276을 ABSCIEX TripleToF 5600+ mass spectrometer 기기의 이온소스는 ESI (Negative)모드를 이용하여 (Spray voltage : -4500V, Source temperature : 500 degree) MS 스캔 범위 100 ~2000 m/z로 분석하였음.

(3) 결과

(가) 항진균활성을 갖는 CF276분획의 HPLC 분석

- 높은 항진균활성을 갖는 CF276 활성분획을 이용하여 HPLC 크로마토그램분석 결과, retention time (RT) 30분부터 38분 사이에 3개의 주요 피크가 나타났음(그림 21).
- 시그마알드리치로부터 구입한 Ituririn A 물질을 CF266의 분석조건과 같은 조건에서 HPLC 분석한 결과, CF276은 정확히 Iturin A 물질과 동일한 retention time에 3개의 피크를 나타내어 CF276의 항진균활성 물질은 iturin A로 예측되었음.

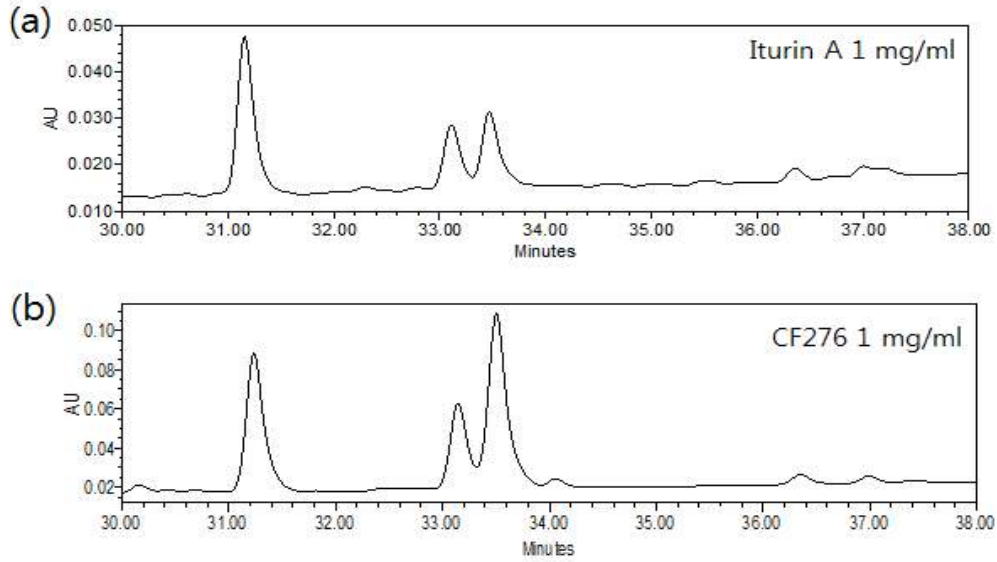


그림 21. DR-08균주로부터 분리한 CF276의 HPLC 분석 결과. (a) CF276분획, (b)시그마알드리치 Iturin A.

(나) 항진균 활성을 갖는 CF276분획의 LC-ESI/ MS 음이온모드 분석

- CF276 활성분획을 이용하여 LC-ESI/MS 음이온모드 분석 결과, 18.863분의 물질에서는 [M-1]- 이온 피크를 1041에서 나타내었고(iturin A2), 19.90분의 피크와 20.241분의 피크는 모두 [M-1]- 이온 피크를 1055에서 나타내었음 (iturin A3, A4 or A5)(그림 22).

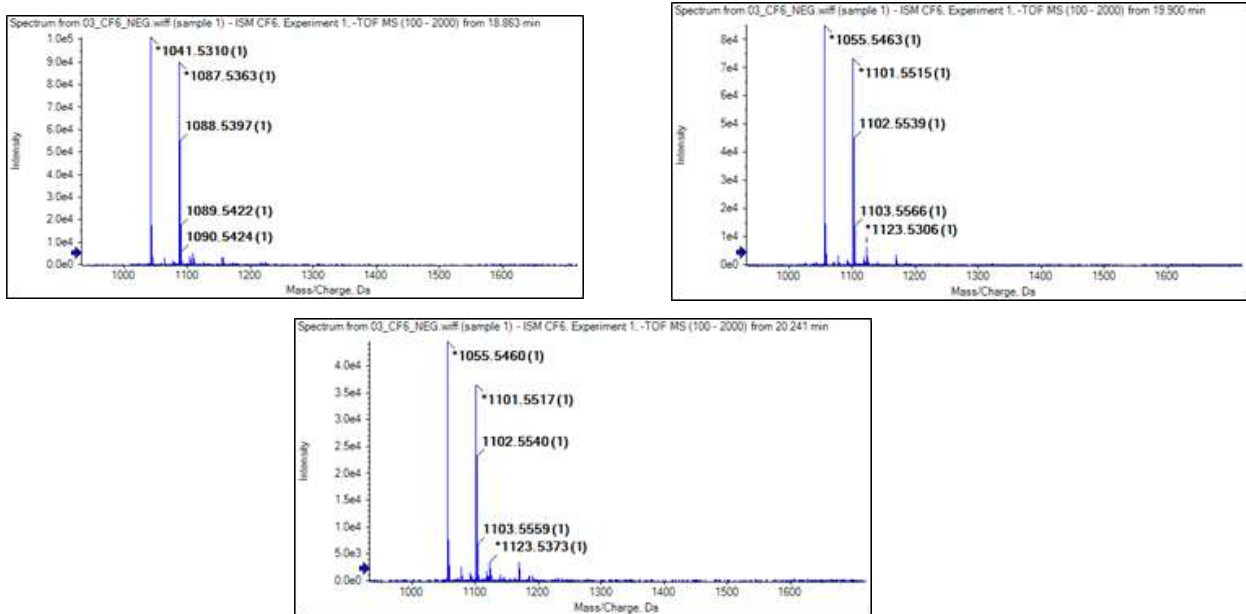


그림 22. 활성물질 CF276의 LC-ESI/MS 음이온모드 분석결과 (m/z 1043).

- 따라서 CF276는 iturin A2와 iturin A3 및 iturin A4(또는 A5)로 구성된 iturin A로 동정되었음(그림 23).

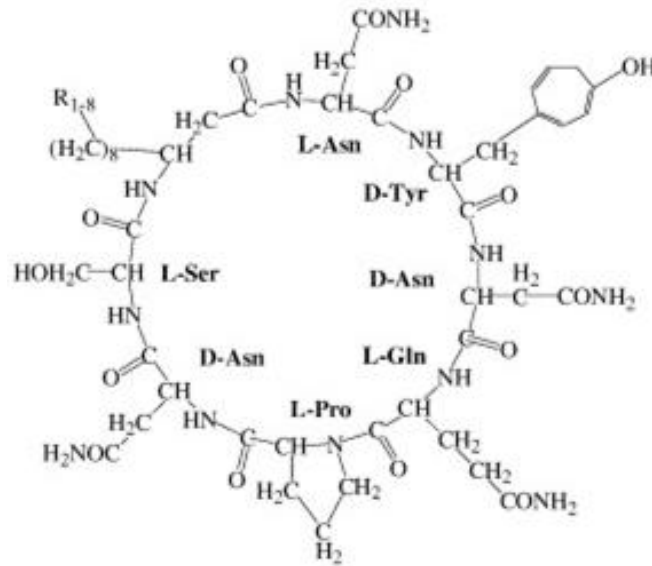


그림 23. 항진균활성 물질 Iturin A의 화학구조.

다. 항세균 활성 물질의 HPLC 및 LC-ESI/ MS 분석

(1) 연구목적

- 항세균 활성을 갖는 CF277분획의 HPLC 및 LC-ESI/ MS 분석하여 물질을 동정

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① *B. methylotrophicus* DR-08 균주 부탄올 추출물로부터 분리한 CF276과 CF277분획

(나) 시험방법

① 분리된 항세균활성 물질의 HPLC 분석

- 항진균 활성 물질의 HPLC 분석방법과 동일(표 18).

② 항세균활성 분획의 LC-ESI/MS 분석

- 활성 분획 CF276과 CF277을 ABSCIEX TripleToF 5600+ mass spectrometer 기기의 이온소스는 ESI(Negative)모드를 이용하여(Spray voltage : -4500V, Source temperature : 500 degree) MS 스캔 범위 100 ~2000 m/z로 분석하였음.

(3) 결과

(가) 항세균활성을 갖는 CF276과 CF277분획의 HPLC 분석

- CF276과 CF277분획을 HPLC분석을 실시한 결과, 이 분획은 여러 개의 물질을 포함하고 있는 것으로 나타났음(그림 24a, b). 이들 물질들의 UV spectrum은 모두 15c와 같이 동일한 것으로 나타나 이들 물질을 서로 유도체이거나 이성질체로 추정되었음.
- UV spectrum은 diffidicin과 oxydiffidicin 과 유사한 것으로 나타났음.

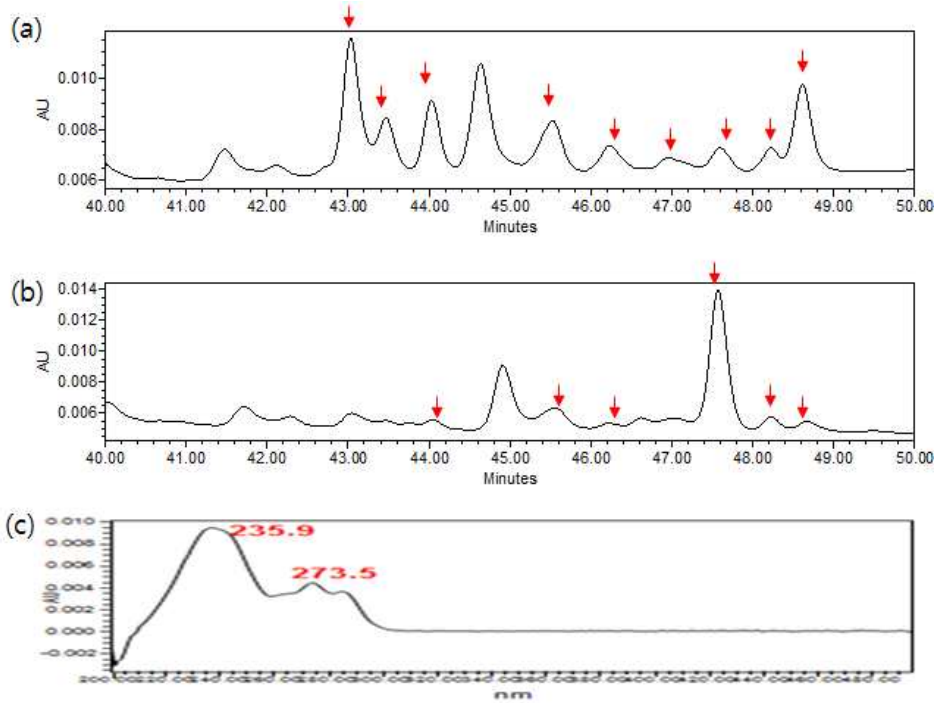


그림 24. CF276과 CF277 분획의 HPLC 크로마토그램(a, b)와 47.5분 피크의 UV spectrum ©.

(나) 항세균 활성을 갖는 CF277분획의 LC-ESI/ MS 음이온모드 분석

- CF276과 CF277분획물을 LC-ESI/MS 음이온 모드 분석을 수행하였음.
- 결과, CF276 분획은 retention time 28분부터 31분 사이에 각각 6개 피크가 확인되었고, 이들의 분자량을 확인한 결과, 559로 항세균활성 물질인 oxydifficidin(분자량 560)으로 확인되었음(그림 25a).
- 그리고, CF277 분획에서 retention time 38분부터 41분 사이 1개의 피크가 나타났고, 분자량은 543으로 항세균활성 물질인 difficidin(분자량 543)임을 확인하였음(그림 25b).
- Oxydifficidin과 difficidin의 화학구조는 그림 26에 나타내었음.

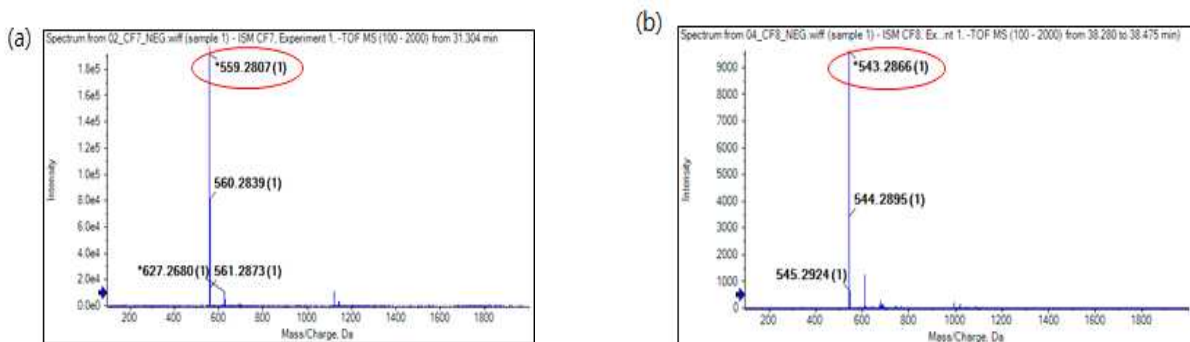


그림 25. DR-08부탄올 추출물로부터 얻은 항세균활성 분획 CF276과 CF277 분획의 LC-ESI/MS 음이온모드 분석 결과. (a) CF276 분획 물질의 질량 스펙트럼, (b) CF277 분획 물질의 질량 스펙트럼.

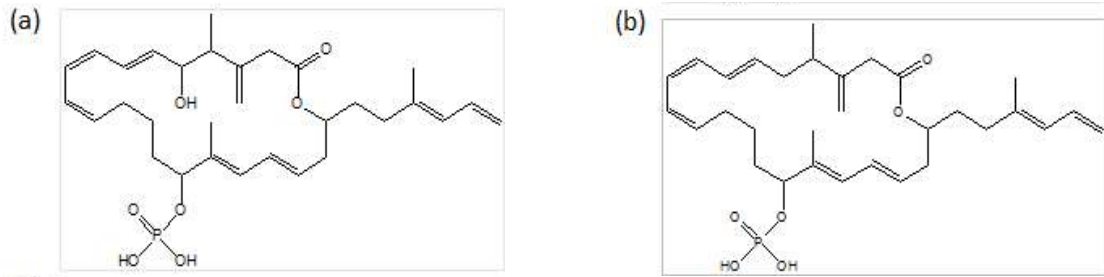


그림 26. DR-08균주로부터 분리한 항세균활성 물질 화학구조. (a) oxydifficidin, (b) difficidin.

- 본 연구결과, DR-08 균주의 부탄을 추출물로부터 항세균활성 물질을 분리하는 과정에서 oxydifficidin과 difficidin 계열의 여러 개의 유도체가 생성되는 것을 확인.
- 문헌조사 결과, 항세균활성 물질인 oxydifficidin 과 difficidin은 pH와 온도변화에 불안정하다는 사실이 보고되어 있음(Kenneth et al.,1987).
- 따라서, DR-08 균주로부터 항세균활성 물질을 분리하는 과정 중에 열에 의한 유도체 생성을 줄이는 새로운 물질 분리 방법을 구축하여 항세균활성 물질을 순수 분리하고자 하였음.

제 3절 항세균활성의 천연물 재선발

1. 재선발한 천연물과 DR-08 균주 부탄을 추출물 간의 시너지 효과 조사

가. 시너지 효과 조사

(1) 연구목적

- DR-08 균주 부탄을 추출물과 2차년도 재선발한 T-추출물의 다양한 식물세균성병에 대한 항세균활성 시너지 효과 조사

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① *B. methylotrophicus* DR-08, 천연물 T-추출물
- ② 14개 식물병원성 세균

(나) 시험방법

① 시너지 효과를 조사할 물질 준비

- 시너지 효과를 조사할 *B. methylotrophicus* DR-08 균주의 부탄을 추출물은 메탄올에 용해하여 50 mg/ml 준비하고, T-추출물은 멸균된 증류수에 용해하여 100 mg/ml 로 만들어 0.2 μ m로 필터하여 스타크 준비.

② 시너지 효과 조사할 물질 A와 B를 선정하여 checkerboard assay 방법 수행

- 상기에 기술된 checkerboard assay 방법으로 수행됨

(3) 결과

- 천연물 T-추출물을 다양한 식물병원성균에 대한 MIC값을 조사한 결과, T-추출물 1000 μ g/ml 농도에서 *A. tumefaciens*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*,

P.carotovora subsp. *carotovora*, *P. chrysanthemi*, *P. syringae* pv. *lachrymans* 병원성세균의 생육을 억제하지 못하였음(표 19).

- T-추출물은 *Xanthomonas* 속의 병원균에 대해서 MIC 값은 125 $\mu\text{g/ml}$ 으로 낮았고, *B. glumae*와 *R. solanacearum*에 대해서 MIC 값은 250 $\mu\text{g/ml}$ 이었음.
- *P. syringae* pv. *actinidiae* 병원균에 대해서 MIC 값은 500 $\mu\text{g/ml}$ 이었음. *X. oryzae* pv. *oryzae*의 경우 DR-08 부탄올 추출물의 MIC 값이 1.562로 매우 낮아 시너지 효과를 조사하지 않았음.
- 따라서, DR-08 균주 부탄올 추출물과 T-추출물을 6개의 식물병원성세균에 대하여 시너지 효과를 조사하였음.
- 그 결과, 토마토 풋마름병원균에서 분할저해농도지수(Fractional Inhibitory Concentration Index)를 확인한 결과, DR-08 부탄올 추출물과 T-추출물의 FICI 값은 0.624로 부분적인 항세균활성 시너지 효과를 나타내었음 (표 20).
- 토마토 풋마름병을 제외 조사된 5가지 식물병원균에서 FICI 값은 1.0과 4.0 사이로 이들 병원균에서 DR-08 부탄올 추출물과 T-추출물간의 항세균활성 시너지 효과를 확인할 수 없었음.

표 19. 다양한식물병원성 세균에 대한 DR-08 균주의 부탄올 추출물과 T-추출물의 최소생육억제농도

Phytopathogenic bacteria	T-ext.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
		Extract ($\mu\text{g/ml}$)	Streptomycin sulfate
		DR-08 BuOH	
<i>Acidovorax avena</i> es ubsp. <i>cattlyae</i>	1000	-	-
<i>Acidovorax konjaci</i>	1000	-	6.25
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	31.25	100
<i>Burkholderia glumae</i>	250	62.5	25
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	-	125	25
<i>Pectobacterium carotovara</i> subsp. <i>carotorova</i>	-	-	12.5
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	500	250	12.5
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	-	500	50
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	125	31.25	12.5
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	125	31.25	12.5
<i>Xanthomonas campetri</i> pv. <i>citri</i> 24-20	125	31.25	6.25
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	125	1.562	3.125
<i>Ralstonia solanacearum</i> SL341	62.5	62.5	3.125>

표 20. DR-08 부탄올 추출물과 T-추출물의 6개의 식물병원성세균에 대한 시너지효과 결과

Phytopathogenic bacteria	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	FIC		FICI ¹⁾	Streptomycin sulfate
	DR-08 BuOH	T-ext.		
<i>Burkholderia glumae</i>	1	0.062	1.062	25
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	1	0.015	1.015	12.5
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	0.031	1	1.031	12.5
<i>Xanthomonas campetris</i> pv. <i>citri</i> 24-20	0.031	1	1.031	6.25
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	0.031	1	1.031	12.5
<i>Ralstonia solanacearum</i> SL341	0.5	0.124	0.624	3.125

¹⁾ FICI \leq 0.5, synergy; 0.5 < FICI \leq 0.75, partial synergy; 0.75 < FICI \leq 1.0, additive effect; 1.0 < FICI \leq 4.0, indifference and FICI > 4, antagonism.

제 4절 UV를 이용한 G341 돌연변이체 제조 및 DR-08 균주의 효능 비교

1. UV를 이용한 G341 균주 돌연변이체 제조

가. UV 조사로 G341 돌연변이 균주 확보

(1) 연구목적

- 이전 연구를 수행하면서 Xap에 대하여 가장 강력한 활성을 보인 균주가 G341이었으며, 이 균주의 경우 이미 최적 발효공정이 진행되어 이 균주의 항세균활성 능력을 제고하고자, UV를 이용하여 고효성을 보이는 돌연변이체를 선별하고자 하였음.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 미생물 : G341

(나) 시험방법

① UV 노출 시간에 따른 G341 균주 생존률 확인

- 마이크로 튜브에 10^7 부터 10^3 까지 적고, 멸균된 증류수 900 μl 씩을 넣고, O.D값이 0.1인 G341균주 현탁액 100 μl 을 10^7 의 마이크로 튜브에 넣고 잘 섞어준 후, 100 μl 를 취해 10^6 의 마이크로 튜브에 넣고 잘 섞어 주었음.
- 10^6 과 10^3 의 마이크로 튜브까지 900 μl 의 멸균수에 희석배수가 낮은 100 μl 를 마이크로 튜브에 넣어 섞어주는 것을 반복하였음.
- 10^5 마이크로 튜브에서 100 μl 를 취해 LBA배지에 분주하고, 화염살균한 유리봉으로 희석배수가 높은 것부터 낮은 것의 순서로 잘 도말하고, 10^5 희석액 100 μl 을 도말한 LBA배지를 플레이트 뚜껑을 열고 클린벤치에서 5초에서 30초까지 UV에 노출시킨 후, 30°C에서 15시간 동안 정치 배양하였음.

- UV에 노출시키지 않은 10^5 100 μ l가 도달된 LBA배지에서 자란 야생형의 G341 균주의 콜로니 수를 계수하고, 5초에서 30초까지 UV에 노출시킨 LBA배지에서 자란 G341 돌연변이 균주의 콜로니 수를 계수하여, 10% 생존률을 보이는 UV 조사시간을 확인하여 돌연변이 균주 확보를 위한 실험방법을 구축하였음.

② G341 돌연변이 균주 라이브러리 구축

- 48웰 플레이트의 각 웰에 멸균된 LBA배지를 500 μ l 분주하여 굳히고, 마지막에서 두 번째 웰에는 LBA배지를 분주하지 않았음. UV 30 초간 조사로 얻은 모든 G341 돌연변이 균주를 멸균한 이쑤시개를 이용하여 단일 콜로니를 문힌 후, 46-웰에 순서대로 접종하였고, 마지막 48번 웰은 G341 야생형을 접종하였음.

(3) 결과

(가) UV 조사로 G341 돌연변이주 확보 및 라이브러리 구축

- 선행 연구를 통해 선발한 유기농업자재 후보물 *B. veleznensis* G341 균주에 다양한 시간동안 UV를 조사하여 10% 생존률을 보이는 돌연변이 형성 조건 UV 조사 조건 확립하였음.
- G341에 30초간 UV 조사로 414개의 돌연변이 균주를 확보하였고, 확보된 돌연변이 균주를 라이브러리로 구축하였음(그림 27).

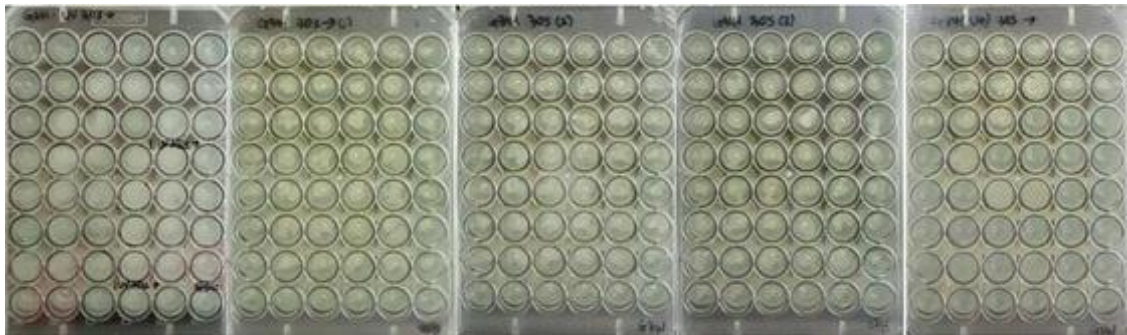


그림 27. 30초간 UV 조사를 통해 얻은 G341 돌연변이 균주 라이브러리.

2. G341, G341 개량 균주 및 선발한 DR-08균주의 항세균 활성 효능 평가

가. 시너지 효과 조사

(1) 연구목적

- 확보된 G341 돌연변이 균주와 G341 야생형 균주 및 선발된 DR-08 균주의 항세균 활성 평가를 통한 가장 우수한 활성을 보이는 균주를 선발하고자 하였음.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① *B. methylotrophicus* DR-08, 야생형 G341, G341돌연변이 균주
- ② 공시 병원균 : *Xanthomonas arboricola* pv *pruni*

(나) 시험방법

① 선발한 DR-08 균주 배양액 준비

- 냉동보관 중인 야생형 G341, 돌연변이 균주 GM1~GM6 및 DR-08 균주의 스타클을 이용하여 멸균된 TSA 배지에 스트리킹한 후 30℃에서 1일 동안 정치 배양하였음.
- 멸균된 이쭈시개로 각 균주의 단일 콜로니를 묻혀 멸균된 TSB 5 ml 배지에 접종하고 30℃, 150 rpm에서 20~24시간 동안 호기적인 조건에서 진탕 배양하였음.
- 100 ml 삼각플라스크에 멸균된 TSB배지 25 ml에 1일간 진탕배양한 배양액 1% 250 ul를 접종하고, 30℃, 150 rpm에서 48시간 동안 호기적인 조건에서 진탕배양하였음. 모든 배양액을 0.2 um 멤브레인 필터로 제균하여 배양여액을 준비하였음.
- 복숭아 세균성구멍병 원인균 Xap를 TSB배지에 접종하여 배양한 후, 배양액을 O.D 값을 0.1로 맞추어 멸균하여 식힌 TSB배지에 1% 접종하였음.
- 최소생육저해농도(MIC)를 조사하기 위하여 96웰플레이트를 이용하여 조사하였음.
- 대조약제로 streptomycin sulfate를 멸균수로 용해한 후 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 수준으로 처리하였음 ○ 30℃에서 24시간 동안 정치배양한 후 MIC를 조사하였음.

(3) 결과

- 복숭아 세균성구멍병 원인균에 대한 G341 야생형 균주, G341 돌연변이 균주(GM1~GM6) 및 선발된 DR-08 균주 배양여액의 최소생육억제농도(MIC)를 비교한 결과, G341은 2.5%, 돌연변이 균주 중 가장 활성이 높은 균주는 GM6으로 1.25%, DR-08 균주는 0.625% 이었음.
- 따라서, DR-08 균주가 G341 야생형과 돌연변이 균주에 비해 가장 항세균활성이 높은 것을 확인하였고, 본 과제의 지속적인 연구를 위한 최종 균주로 *B. methylotrophicus* DR-08 균주를 선발하였음(표 21).

표 21. 복숭아 세균성구멍병균에 대한 G341, G341 개량 균주 및 DR-08 균주 배양여액의 최소생육억제농도(MIC) 결과

세균	MIC value of filtrate (%)							
	DR-08	G341	GM-1	GM-2	GM-3	GM-4	GM-5	GM-6
<i>X. arboricola</i> <i>pv. pruni</i>	0.625	2.5	2.5	-	5	2.5	2.5	1.25

제 5절 시제품의 약효특성 및 적용확대 시험

1. 최적 제제 선발

가. 기업에서 제조한 각종 제제의 *in vitro* 항세균활성 조사

(1) 연구목적

- *Bacillus methylotrophicus* DR-08 균주의 기업에서 제조한 각종 제제를 이용한 *in vitro* 조사

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- *B. methylotrophicus* DR-08 균주의 10%, 20%, 30% suspension concentrate (SC)
- 복숭아 세균성구멍병(*Xanthomonas arboricola* pv *pruni*), 고추세균성점무늬병(*Xanthomonas euvesicatoria*), 배추무름병(*Pectobacterium carotovara* subsp. *carotorova*), 토마토폏마름병(*Ralstonia solanacearum*)

(나) 시험방법

① 시제품의 4가지 식물병원성 세균에 대한 최소생육억제농도(MIC) 조사

- 최소생육저해농도(MIC)를 조사하기 위하여 상기에 설명된 96-웰 플레이트 방법을 이용하여 조사하였음.
- 대조약제로 streptomycin sulfate를 멸균수로 용해한 후 200~3.13 $\mu\text{g/ml}$ 수준으로 처리하였음.
- 30°C에서 24시간 동안 정치배양한 후 MIC를 조사하였음.

(3) 결과

(가) DR-08 균주 SC 제제의 4가지 식물병원성 세균에 대한 *in vitro* 조사

- 30% SC가 복숭아 세균성구멍병과 고추 세균성점무늬병에 대하여 1000배, 2000배에서도 강한 생육억제율을 나타내었음. 또한 토마토 폏마름병에 대하여는 250배 희석액에서에서 활성을 나타내었음(표 22).
- 다양한 제제 중에서 배추무름병(*Pectobacterium carotovara* subsp. *carotorova*)을 제외, 3가지 식물병원성 세균에 대하여 30% SC가 가장 낮은 농도의 희석액에도 항세균활성을 나타내어 최적 제제로 선발하였음..

표 22. DR-08 균주의 10%, 20%, 30% SC 제제의 복숭아 세균성구멍병(*Xanthomonas arboricola* pv *pruni*), 고추세균성점무늬병(*Xanthomonas euvesicatoria*), 배추무름병(*Pectobacterium carotovara* subsp. *carotorova*), 토마토폏마름병(*Ralstonia solanacearum*)에 대한 최소생육억제농도

Phytopathogen	MIC (Dilution)				MIC ($\mu\text{g/ml}$)
	SC10	SC 20	SC 30	WP 50	Ss
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	125	500	1000	250	12.5
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	250	500	2000	500	12.5
<i>Pectobacterium carotovara</i> subsp. <i>carotorova</i>	-	-	-	-	12.5
<i>Ralstonia solanacearum</i>	-	-	250	125	6.25

2. 시제품의 적용확대 시험 및 약효특성 조사

가. DR-08 30% SC의 복숭아 세균성구멍병 방제 효과 조사

(1) 연구목적

- DR-08 30% SC의 복숭아 세균성구멍병(*X. arboricola* pv *pruni*)에 대한 detached leaf bioassay를 통한 병방제 효과 조사

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① *B. methylotrophicus* DR-08 균주의 30% sespention concentrate(SC)
- ② 공시 병원균 : *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*
- ③ 공시 식물 : 복숭아

(나) 시험방법

- ① 복숭아 세균성구멍병에 대한 DR-08 30% SC의 항세균활성 검정은 상기에 설명된 Detached leaf assay 분석 방법으로 수행하였음.
 - 30% SC 제제를 500, 1000배로 희석하였고, 대조군으로는 Streptomycin sulfate 200 ug/ml을 사용함.
- ② 조사내용
 - % 병 발생률(DI) = $100 \times [\text{발병한 상처의 수} / \text{모든 상처의 수}]$
 - % 병 방제가 = $100 - [100 \times \text{처리구의 발병률} / \text{무처리구의 발병률}]$

(3) 결과

- 선별된 최적 제제 30% SC의 detached leaf assay 수행 결과, 접종 12일 후, 대조구 와 비교하였을 때, 30% SC 250, 500, 그리고 1000배 처리구는 각각 92%, 83%, 그리고 88%의 방제 효과를 나타내었음(그림 28).
- 양성 대조군으로 사용된 Streptomycin sulfate 200 ug/ml은 58%의 방제가를 나타냄.

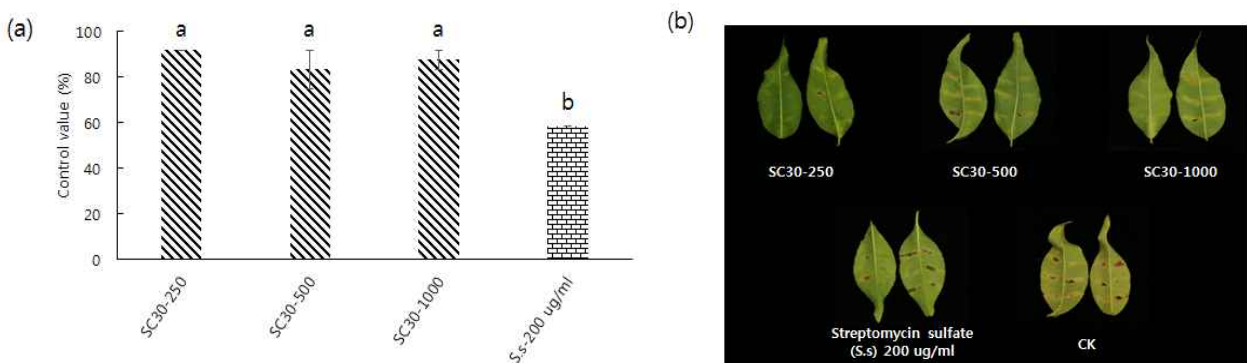


그림 28. DR-08 30% SC의 복숭아 세균성구멍병(*X. arboricola* pv *pruni*)에 대한 방제효과. (a) 접종 12일 후 세균성 구멍병 방제가 (b) 접종 12일 후 세균성 구멍병 증상

나. DR-08 30% SC의 토마토 풋마름병 방제

(1) 연구목적

- DR-08 30% SC의 토마토 풋마름병(*Ralstonia solanacearum*)에 대한 *in vivo* assay를 통한 병방제가 조사

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① *B. methylotrophicus* DR-08 균주의 30% sespention concentrate(SC)
- ② 공시 병원균 : *Ralstonia solanacearum*
- ③ 공시 식물 : 토마토

(나) 시험방법

- ① DR-08 30% SC의 토마토 풋마름병(*R. solanacearum*)에 대한 *in vivo* 항세균활성을 검정하기 위하여 상기에 설명된 토마토 묘종을 이용한 방법으로 수행하였음.
- '서광' (팜한농) 토마토 씨앗을 부농(경주, 대한민국)에서 제조 한 상업용 원예 토양에 파종한 4 주 후 풋마름병 접종 4일 전, 1일 전, 1일 후에 30% SC를 250, 500 그리고 1000배씩 토양에 20 ml씩 처리하였음.
- TSA배지 30℃ 조건에서 72시간 배양한 토마토 풋마름병 원인균 *R. solanacearum*의 O.D 값을 0.1로 맞추고, 풋마름 병원균 현탁액 20 ml를 토양에 고르게 분주하여 병원균을 접종하였음. 무처리구는 아무것도 처리하지 않았으며, 대조군으로는 정보싸이클린 1000배를 처리하였음.
- 토마토 식물은 30±2℃, 상대습도 70~80%에 두고 병 발생을 관찰하였음.

② 조사내용

- 토마토 풋마름병의 발병도는 0~5의 척도로 기록하였음(Winstead and Kelman, 1952).
- 0 = 증상 없음, 1 = 잎이 부분적으로 시들음, 2 = 1~2 잎사귀, 3 = 2~3 잎사귀, 4 = 4 잎사귀, 5 = 전체 식물 사망
- % 병 방제가 = $100 \times [\text{대조군의 발병도} - \text{처리구의 발병도} / \text{대조구의 발병도}]$

(3) 결과

- *In vitro* assay 결과 30% SC가 다른 제제에 비해 풋마름병에 대한 억제 효과가 좋아 30% SC를 이용하여 *in vivo* 조사를 수행하여 방제가를 조사한 결과, 12일째 30% SC는 무처리구 식물에 비해 풋마름병을 크게 방제하였음(그림 29).
- 접종 4 일 전 30% SC 500배 처리 한 결과, 100%의 강한 방제효과를 보였고, 접종 4 일 전에, 250 배 및 1000 배 처리는 각각 87 % 및 68 %의 방제효과를 보였음. 대조구인 정보싸이클린 1000 배 처리는 73 % 방제가를 나타냈음.
- 접종 1 일 전에 30% SC의 250, 500, 1,000 배 처리구는 89%, 73%, 90% 방제가를 나타냈다. 정보싸이클린 1000배는 56 %의 효과를 나타냈음.
- 접종 1 일 후에 250, 500, 1000배의 처리가 각각 67%, 78% 및 76%의 효과를 보임, 처리시기 별로 30 % SC를 처리하였을 때 정보싸이클린보다 풋마름병 방제효과가

높게 나타났고, 30% SC는 치료 효과도 있지만 예방차원에서 효과가 더 좋은 것을 확인하였음.

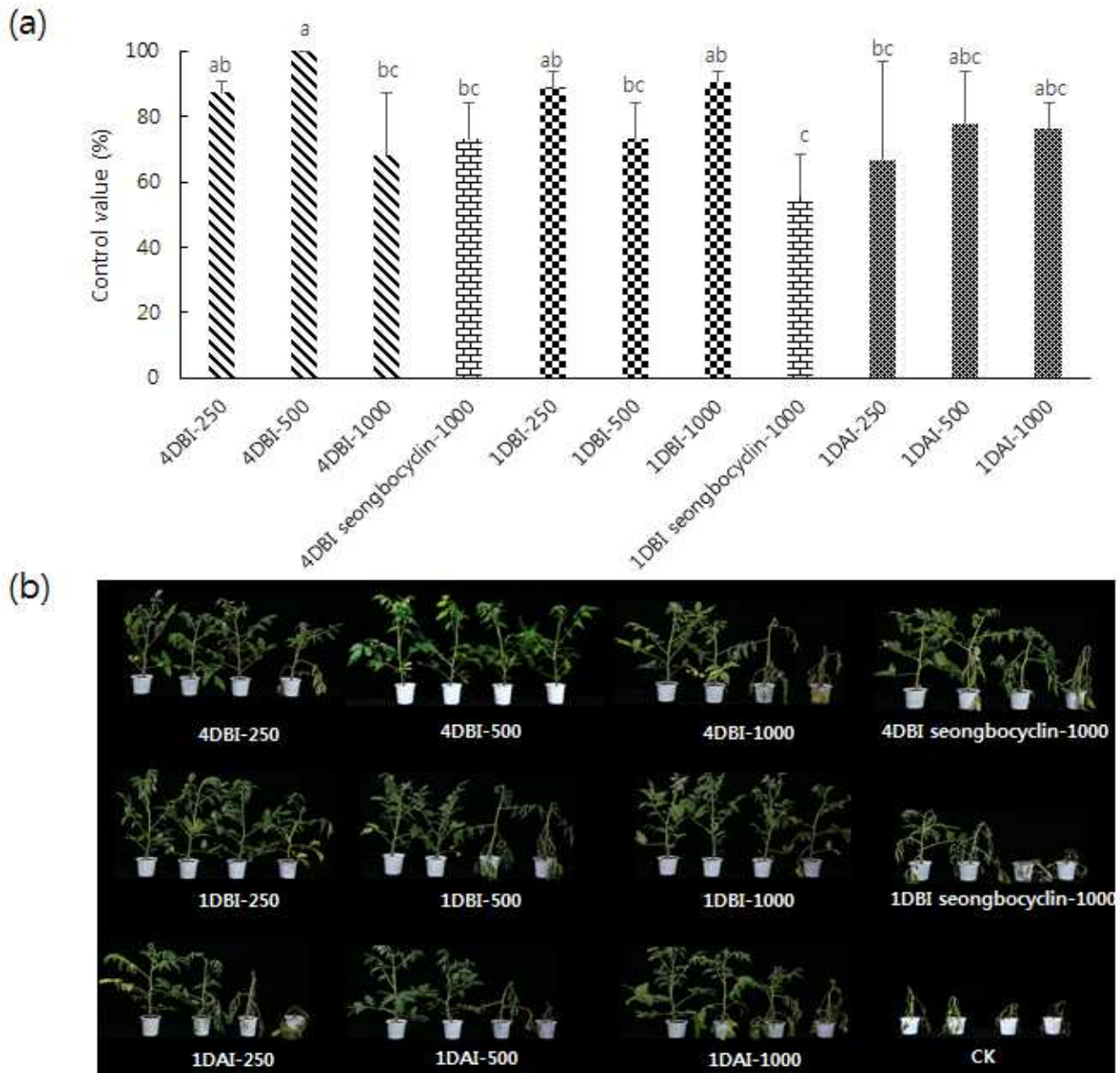


그림 29. DR-08 30% SC의 토마토 풋마름병 (*Ralstonia solanacearum*)에 대한 방제효과. (a) 접종 12일 후 토마토 모종에 대한 풋마름병 방제가 (b) 접종 12일 후 토마토 모종의 풋마름병 증상.

다. DR-08 30% SC의 고추 세균성점무늬병 방제 효과 검정

(1) 연구목적

- DR-08 30% SC의 고추세균성점무늬병(*Xanthomonas euvesicatoria*)에 대한 *in vivo* assay를 통한 병방제가 조사

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① *B. methylotrophicus* DR-08 균주의 30% sespention concentrate(SC)
- ② 공시 병원균 : *Xanthomonas euvesicatoria*
- ③ 공시 식물 : 고추

(나) 시험방법

- ① 고추 묘종을 이용하여 DR-08 30% SC의 고추세균성점무늬병(*Xanthomonas euvesicatoria*)에 대한 *in vivo* 항세균활성 검정하였음.
 - '불탑' (팜한농) 고추 씨앗을 부농(경주, 대한민국)에서 제조 한 상업용 원예 토양에 파종한 5 주 후 세균성점무늬병 접종 1일 전에 30% SC를 250, 500 그리고 1000배씩 5 ml씩 엽면살포 하였음.
 - 30°C에서 24시간 TSA배지에서 배양한 고추세균성점무늬병(*Xanthomonas euvesicatoria*)을 O.D 값으로 맞추고, 세균성점무늬병 병원균 현탁액 5 ml를 고추 잎에 분사하였음.
 - 무처리구는 아무것도 처리하지 않았으며, 대조군으로는 성보싸이클린 1000배를 처리하였음.
 - 고추 식물은 아크릴 커버를 씌워 25±2°C, 상대습도 80~90%에 두고 병 발생을 관찰하였음.
- ② 조사내용
 - 고추 세균성점무늬병 발병도는 0~6의 척도로 기록하였음(Pervaiz et al., 2002).
 - 0 = 증상 없음, 1 = 한 두개의 잎에 몇 개의 반점, 2 = 여러개 잎에 몇 개의 반점, 3 = 한 두 개의 잎에 여러 반점, 4 = 여러개 잎에 여러개의 반점, 5 = 잎이 떨어지거나 반점이 포집됨, 6 = 전체식물사망. 세균성 점무늬병 방제가는 다음 공식을 사용하여 계산하였음.
 - % 병 방제가 = $100 \times [\text{대조군의 발병도} - \text{처리구의 발병도} / \text{대조구의 발병도}]$

(3) 결과

- *In vitro* assay 결과 선발된 30% SC의 고추 세균성점무늬병에 대한 *in vivo* 조사를 수행한 결과, 10 일째, 30% SC 500배와 1000배 처리구는 각각 45% 그리고 65%의 방제가를 나타내었고, 대조구 약제 성보싸이클린 1000배는 68%의 방제가를 나타내었음. 이들 간에는 유의차가 나타나지 않았음(그림 30).
- 30% SC 처리구에 비해 성보싸이클린 처리구에서 잎이 노랗게 변하는 황화현상이 나타났음.

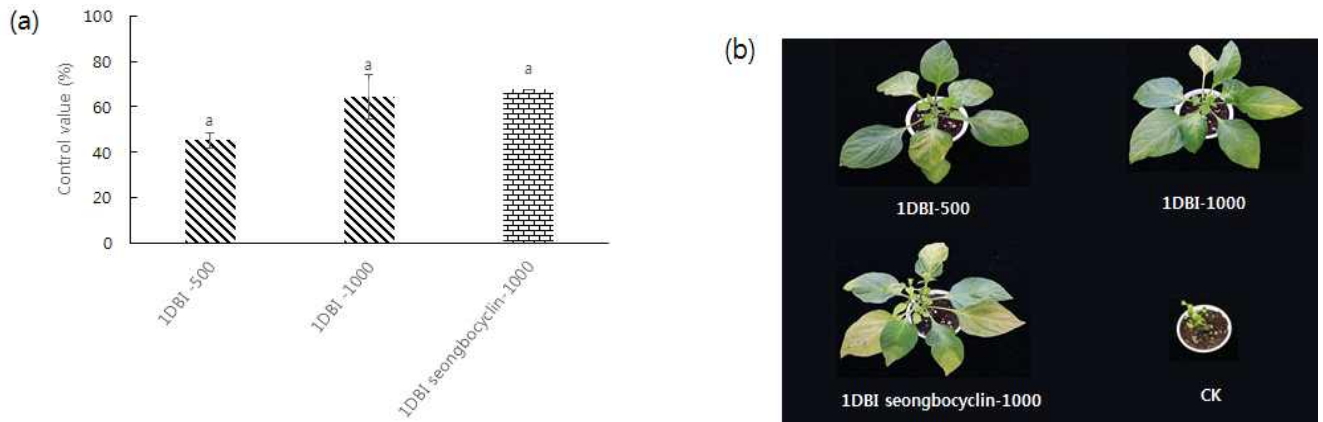


그림 30. DR-08 30% SC의 토마토 풋마름병 (*Ralstonia solanacearum*)에 대한 방제효과. (a) 접종 10일 후 고추 모종의 세균성점무늬병 방제가 (b) 접종 10일 후 고추 모종의 세균성점무늬병 증상.

제 6절 *B. methylotrophicus* DR-08로부터 oxydifficidin과 difficidin의 분리를 위한 최적 크로마토그래피 기술 개발

1. Oxydifficidin과 difficidin의 순수 분리를 위한 최적 크로마토그래피 기술 개발

가. 부탄올 추출물로부터 활성 물질의 분리

(1) 연구목적

- DR-08 균주로부터 항세균활성 물질을 동정하였으나, 불안정한 항세균활성 물질은 다양한 유도체를 만들어내고, 순도가 낮아 oxydifficidin과 difficidin 순수 물질의 항세균활성을 평가하기 어려움이 있었음. 이에 따라 두 항세균활성 물질을 순수하게 분리하는 방법을 구축하고자함.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- *B. methylotrophicus* DR-08 균주 부탄올 추출물
- Sep-pak C18카트리지 컬럼

(나) 시험방법

① DR-08 부탄올 추출물로부터 항세균 활성 물질 분리

- 부탄올 추출물 0.8 g을 이용하여 sep-pak C18카트리지 컬럼 크로마토그래피를 통하여 물질 분리를 실시하였음. 카트리지 크기는 35 cc, 10 g이며, 100% 물부터 10, 20, 40, 60, 80, 100% 메탄올을 50 ml씩 용출하였음.
- 이 중 100% 메탄올에서 용출한 활성 분획 F3을 얻어 두 번째 sep-pak C18카트리지 컬럼 크로마토그래피를 재 수행하였음. 이때, 50, 60, 70, 80, 90 그리고 100% 메탄올을 50 ml씩 용출하였고, 이로부터 활성이 있는 F343과 F352 분획물을 얻었음.

(3) 결과

(가) DR-08 균주의 부탄올 추출물에서 활성물질 분리

- 항세균활성을 나타낸 DR-08 균주 배양여액의 부탄올 추출물 9.5 g 중 0.8 g을 사용하여 sep-pak C18카트리지 컬럼 크로마토그래피를 통하여 항세균활성 물질을 분리하였음(그림 31).
- 부탄올 추출물로부터 단지 2회의 크로마토그래피 단계를 통하여 두 물질oxydifficidin과 difficidin을 순수하게 분리할 수 있었으며, 이와 같이 두 물질 순수분리를 위한 최적의 크로마토그래피 기술을 확보하였음.
- 획득한 2개 분획 F343(2.3 mg)과 F352(3.2 mg)에 대하여 TLC분석을 실시한 결과, 그림 32 같이 나타났고, 이 2개 분획에 대하여 *X. arboricola* pv. *pruni*에 대한 항세균활성을 조사하였음.
- 그 결과, 표 23에서와 같이 *X. arboricola* pv. *pruni* 대한 항세균활성은 1% F343과 F352분획에서 최소저해농도를 확인하였음..

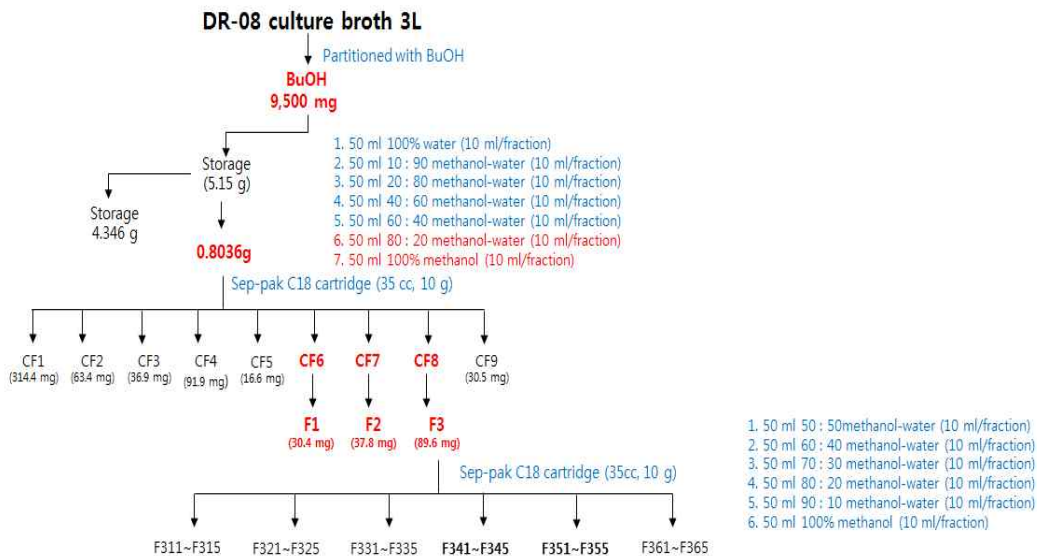


그림 31. DR-08 균주의 배양여액 부탄올 추출물로부터 항세균활성 물질 분리를 위한 최적 분리과정 모식도.



그림 32. DR-08 부탄올 추출물로부터 최종 분리된 2개 분획물의 TLC 분석결과.

- 그 결과, 표 23에서와 같이 *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* 대한 항세균활성은 F343과 F352에 1%의 최소저해농도를 보였다.

표 23. DR-08 부탄을 추출물에서 순수 분리한 2개 분획물의 복숭아 세균성구멍병 원인균에 대한 최소생육억제농도

Phytopathogen	MIC (% or $\mu\text{g/ml}$)		
	F343	F352	Ss
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	1%	1%	12.5 $\mu\text{g/ml}$

2. DR-08 균주로부터 분리한 활성물질의 동정

가. 분리한 물질의 HPLC 분석

(1) 연구목적

- DR-08 균주의 부탄을 추출물로부터 분리한 활성분획을 HPLC분석으로 순도 및 물질 확인

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- *B. methylotrophicus* DR-08 균주 부탄을 추출물로부터 활성분획 F343과 F352

(나) 시험방법

① 분리된 항세균활성 물질의 HPLC 분석

- 분리된 활성물질 분획 F343과 F352를 이용하여 용매를 Solvent A 0.1% TFA H₂O, Solvent B 0.1% TFA ACN를 사용하여 : X bridge R C18 5 μm OBD(4.6×250 mm) 컬럼으로 아래와 같은 분석조건으로 HPLC 분석을 수행하였음(표 24).

표 24. HPLC gradient 분석 조건

	Time	Flow	%A	%B
1		1.00	50.0	50.0
2	25.00	1.00	0.0	100.0
3	30.00	1.00	0.0	100.0
4	31.00	1.00	50.0	50.0
5	39.00	1.00	50.0	50.0

(3) 결과

(가) DR-08 부탄올 추출물로부터 분리한 F343과 F352 분획의 HPLC 분석

- F343과 F352 분획을 HPLC분석을 실시한 결과, F343은 12.124분, 12.508분 2개의 피크로 oxydifficidin으로 확인되었고(그림 33A), F352는 18.236분 1개의 피크로 difficidin으로 확인되었음(그림 33B). 세 피크의 UV spectrum 분석 결과, 모두 동일한 스펙트럼을 나타내었음(그림 33a, b, c).
- 기존 연구결과, 항세균활성 물질인 oxydifficidin과 difficidin은 pH와 온도변화에 불안정하다는 사실이 보고되어 있으며(Kenneth et al.,1987), DR-08 균주의 부탄올 추출물로부터 항세균활성 물질을 분리하는 과정에서 oxydifficidin과 difficidin 계열의 여러 개의 유도체가 생성되는 것을 확인하였음.
- 따라서, 다양한 컬럼크로마토그래피 분석을 수행하지않고 sep-pak C18카트리지를 컬럼 크로마토그래피 분석을 통해 위와같이 oxydifficidin과 difficidin을 순수 분리하였고, 분리방법을 구축하였음.

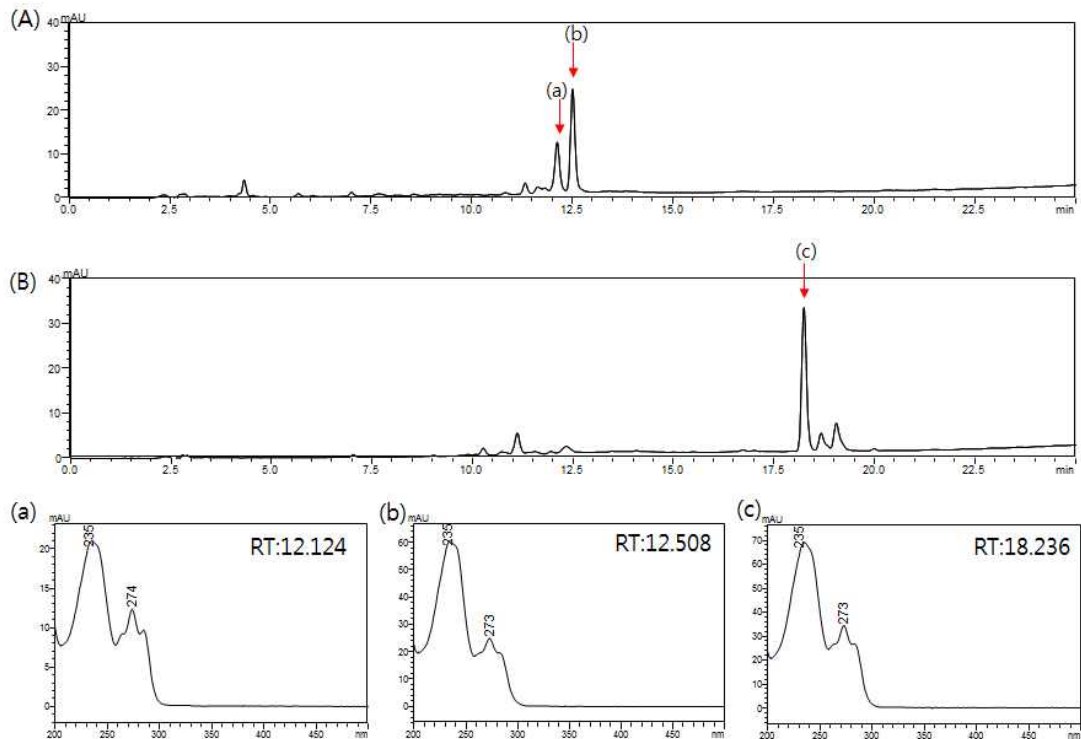


그림 33. HPLC Chromatogram 결과와 UV spectrum 분석 결과. (A) oxydifficidin 물질 F343 분획, (B) difficidin 물질 F352 분획. (a,b) oxydifficidin 피크의 UV spectrum, (c) difficidin 피크의 UV spectrum.

3. DR-08균주로부터 분리한 활성 물질의 *in vitro* 항세균 활성 조사

가. 분리한 물질의 *in vitro* 조사

(1) 연구목적

- DR-08균주 BuOH 추출물로부터 분리한 항세균활성 물질 oxydifficidin과 difficidin 다양한 식물병원성 세균에 대한 *in vitro* 조사

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- *B. methylotrophicus* DR-08 균주 부탄올 추출물로부터 활성 물질 difficidin(F352)과 oxydifficidin (F343)

(나) 시험방법

① DR-08 부탄올 추출물에서 분리된 항세균 활성 물질 difficidin(F352)과 oxydifficidin (F343) 준비

- Difficidin(F352)과 oxydifficidin(F343)을 메탄올로 용해하여 30,000 $\mu\text{g/ml}$ 수준으로 stock solution을 준비하였음.

② 14개 식물병원성세균 준비

- 표 25와 같이 14개 식물병원성세균을 준비하였음.

③ 항세균 활성 물질 difficidin(F352)과 oxydifficidin(F343)의 14가지 식물병원균에 대한 최소생육저해농도(MIC) *in vitro* 조사

- 최소생육저해농도(MIC)를 조사하기 위하여 상기에 설명된 96-웰 플레이트를 이용하여 조사하였음.
- 첫 웰에 준비된 병원균이 혼합된 TSB를 199 μl 에 difficidin과 oxydifficidin 6,000 $\mu\text{g/ml}$ 스탁 1 μl 를 분주하고 잘 섞어서 30 $\mu\text{g/ml}$ 처리구를 만들었음.
- 옆의 웰에 준비된 병원균이 혼합된 TSB를 120 μl 를 분주하고 30 $\mu\text{g/ml}$ 처리구 웰로부터 60 μl 를 회수하여 분주하고 잘 섞어 15 $\mu\text{g/ml}$ 처리구를 만들었음.
- 위와 같이 순차적으로 희석하여 30 $\mu\text{g/ml}$ 부터 1.1 $\mu\text{g/ml}$ 까지 96-웰 마이크로플레이트 생물검정법으로 최소생육저해농도(MIC)를 조사하였음.
- 대조약제로 streptomycin sulfate를 멸균수로 용해한 후 위와 같은 방법으로 100~0.13 $\mu\text{g/ml}$ 수준으로 처리하였음.
- 각 식물병원균의 최적배양 조건에서 배양한 후 MIC를 조사하였음.

(3) 결과

- DR-08 균주에서 분리된 oxydifficidin(F343)과 difficidin(F352)의 *in vitro* 항균 활성을 다양한 식물병원성 세균에 대해 최소생육억제농도를 조사하였음(표 25).
- 항세균활성 물질 oxydifficidin과 difficidin은 기존에 인간병원성 세균에 대해서만 활성이 보고되었음. 본 연구를 통해서 두 물질의 다양한 식물병원성 세균에 대한 항세균활성 비교 조사는 처음 수행되었음.
- *In vitro* 조사 결과, difficidin과 oxydifficidin은 *Acidovorax konjaci* 와 *Pectobacterium chrysanthemi*를 제외한 모든 식물병원성 세균의 생육을 억제하였으며, difficidin은

Aac, Bg, Cmm, Psa, Psl에 대한 항세균활성이 oxydifficidin에 비해 우수하였고, oxydifficidin은 difficidin에 비해 At, Rs, Xap, Xac, Xe, Xoo에 대해서 매우 낮은 농도의 MIC값을 나타내었음. 그리고, oxydifficidin은 *Xanthomonas* 속에 선택적으로 높은 항세균활성을 나타내는 것을 확인하였음.

- 특히, 두 물질은 벼 흰잎마름병을 일으키는 Xoo 에 대해서 매우 낮은 최소생육억제 농도 oxydifficidin 0.12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ difficidin 1.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 나타내었고, Xoo는 difficidin에 의한 항세균활성이 보고되었으나, 본 연구를 통해 oxydifficidin 에 의한 항세균활성이 더 우수한 것을 처음으로 확인하였음.

표 25. DR-08 부탄올 추출물로부터 분리한 difficidin과 oxydifficidin의 복숭아 세균성구멍병 (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*)에 대한 최소생육억제농도

Plant pathogenic bacterium	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	Oxydifficidin	Difficidin	Streptomycin sulfate
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i> (Aaa)	>30	30	> 100
<i>Acidovorax konjaci</i> (Ak)	-	-	3.7
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (At)	3.3	10	100
<i>Burkholderia glumae</i> (Bg)	30	10	11.1
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm)	30	10	11.1
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (Pcc)	>30	>30	11.1
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i> (Pc)	-	-	> 100
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> (Psa)	>30	30	11.1
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> (Psl)	>30	30	11.1
<i>Ralstonia solanacearum</i> (Rs)	3.3	10	3.7
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i> (Xap)	3.3	10	11.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (Xac)	3.3	10	33.3
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> (Xe)	3.3	10	11.1
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (Xoo)	0.12	1.1	3.7

제 7절 *B. methylotrophicus* DR-08 균주의 전체 게놈 분석

1. DR-08 균주의 전체 게놈 분석

가. Whole genome *De novo* sequencing

(1) 연구목적

- DR-08 균주가 갖는 전체 게놈을 분석

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- *B. methylotrophicus* DR-08 균주
- PacBio RSII instrument

(나) 시험방법

- ① DR-08 균주의 full genome sequencing을 마크로젠 회사에 의뢰
 - TSA배지에 정치배양한 DR-08 균주를 마크로젠 회사에 보냈음.
 - PacBio RSII instrument를 사용하여 sequencing을 요청하였음.
 - De novo assembly, annotation을 요청하였음.

(3) 결과

(가) DR-08 균주의 Chromosome

- DR-08 균주의 환형 Chromosome의 전체 염기서열은 3,929,794(bp)이며, GC염기서열은 46.5%를 차지하였음.
- DR-08 균주의 coding sequence (CDS) 3,748개이고, 86개의 tRNA, 27개 rRNA를 암호화하는 유전자를 확인하였음(그림 34).

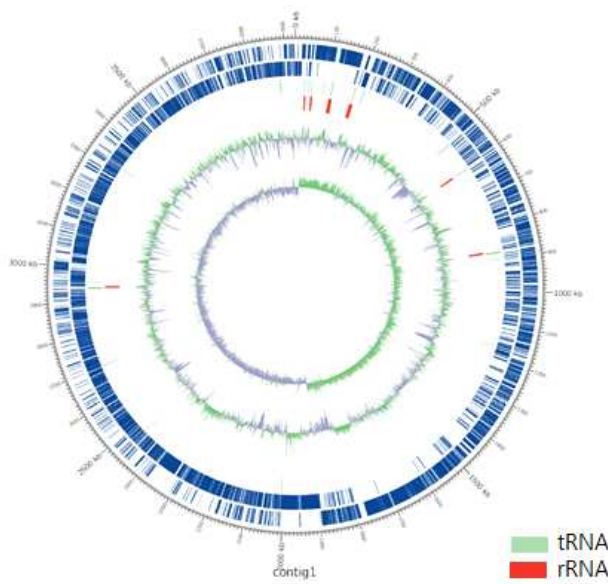


그림 34. DR-08 균주의 환형 chromosome 지도.

2. DR-08 균주가 생합성하는 항균활성 유전자 분석

가. DR-08 균주 항균활성 물질 합성 유전자 분석

(1) 연구목적

- DR-08균주에서 분리한 oxydifficidin과 difficidin, iturin 등 항균활성 유전자 분석

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- *B. methylotrophicus* DR-08 균주의 De novo assembly, annotation
- 보고된 항세균 및 항진균 활성 유전자

(나) 시험방법

① DR-08 균주의 CDS와 보고된 항균활성 유전자 염기서열과 비교분석

- Oxydifficidin과 difficidin, iturin의 생합성 관련 유전자 확보.
- 생합성 관련 유전자 내에서 매우 잘 보존된 염기서열 분석.
- DR-08 균주의 CDS에서 생합성 관련 유전자의 보존된 염기서열 분석.

(3) 결과

(가) DR-08 균주 oxydifficidin과 difficidin, iturin의 확보된 생합성 관련 유전자

- 항세균활성 dfficidin을 생합성하는 *Dfn* polyketide synthase cluster는 chromosome에서 2,304,687bp부터 2,376,664bp까지 약 70kb로 암호화되어 있었음(그림 35).
- 그리고, difficidin은 transcriptional regulator와 antitermination factor를 포함한 17개의 유전자가 cluster되어있었음.
- Oxydifficidin의 polyketide synthase는 따로 보고된 바 없었고 합성된 difficidin이 *Dfn* polyketide synthase cluster 바로 뒤에 위치한 pyrroline-5-carboxylate reductase에 의해 oxydifficidin으로 전환될 것이라 추측하였음.
- DR-08 균주의 항세균활성 iturin을 생합성하는 non-ribosomal peptide synthetase c는 chromosome에서 1,903,719bp부터 1,927,743bp까지 약 24kb로 암호화되어 있었으며, 2개의 iturinA&B계열 합성유전자와 iturinC계열 합성유전자로 되어있었음.

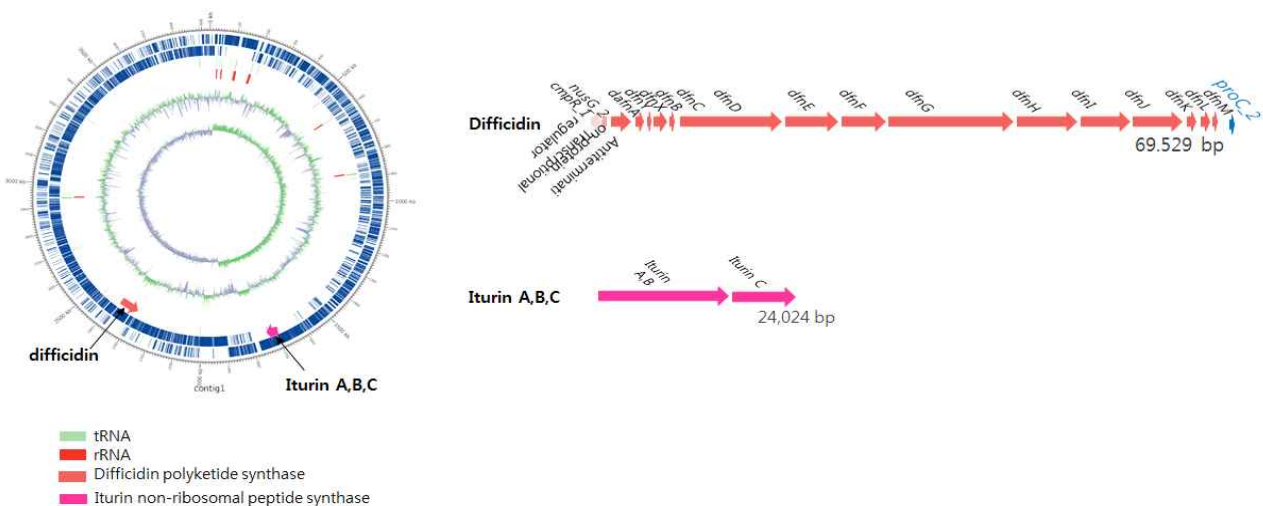


그림 35. DR-08 균주의 환형 chromosome 내 difficidin, pyrroline-5-carboxylate reductase, iturin 유전자의 위치와 difficidin과 iturin 생합성 유전자 cluster.

제 4장 *Bacillus* 균주를 이용한 세균성구멍병 방제용 유기 농업자재 제품화

제 1절 *Bacillus velezensis* G341 균주를 이용한 세균성구멍병 등록자료 생산

1. *B. velezensis* G341의 대량배양 및 대량생산 공정개발(제품화)

가. *B. velezensis* G341의 대량배양 공정개발

(1) 연구목적

- *B. velezensis* G341의 산업화를 위한 대량배양 공정개발

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 미생물: *B. velezensis* G341

(나) 시험방법

① *B. velezensis* G341 배양 조건 최적화

- *B. velezensis* G341 균주의 온도, 시간, pH 등 물리/이화학 조건에 따른 생균수 (spore 수)를 측정하여 최적 조건을 탐색함. 탐색 된 조건으로 탄소원, 질소원, mineral 등 영양요구 조건을 연구하여 최적 배지 조건을 탐색함.

② *B. velezensis* G341의 대량배양(원제화, SD powder)

- *B. velezensis* G341 균주를 TSB broth에서 1차, 2차 seed 배양 후 50L scale의 발효조에서 3차 seed 배양을 함. 3차 seed 배양액을 5 ton scale의 발효조에서 본배양을 하여 품질 분석을 진행 함. 품질 분석 후 후공정(SD, spray dry)을 위해 carrier를 보존제와 혼합함. spray dry 후 포장함.

③ *B. velezensis* G341의 대량생산(제품화, 10% SC)

- 계면활성제를 물에 충분히 분산 시킨 후, 유효성분(원제)을 혼합하여 분쇄함(습식 분쇄부). 부동체에 증점제를 균일하게 분산시킨 다음, 방부제 및 물을 사입한 후 교반함(증점부). 습식분쇄부와 증점부를 적정비율(50:50)로 혼합하여 품질 분석을 진행함. 품질분석 결과 적합하면 규격에 맞게 포장함.

④ *B. velezensis* G341 10% SC의 저장안정성(유통기한)

- 보관온도(54, 40±2℃)에 따라 기간별(6주, 24주) 10% 액상수화제 제품의 생균수 (spore 수)를 측정하여 제품의 저장안정성을 확인함.

(3) 결과

(가) *B. velezensis* G341 배양 조건 최적화

○ *B. velezensis* G341 배양 배지 최적화

- 탄소원 6종, 질소원 5종, basal medium 8종을 검토한 결과 표 1과 같이 탄소원 4종, 질소원 2종, basal medium 3종을 최적 배양 배지로 하여 spore 수를 극대화 하였음.

표 1. 최적 배지 조성표

No.	Content	Composition(g/L)
1	Carbon source A	5.0
2	Carbon source B	5.0
3	Carbon source C	20.0
4	Carbon source D	5.0
5	Nitrogen source A	5.0
6	Nitrogen source B	5.0
7	Mineral A	2.5
8	Mineral B	2.0
9	Mineral C	1.0

○ *B. velezensis* G341 배양 온도 및 시간 최적화

- *B. velezensis* G341 배양 온도 및 시간에 따른 spore 확인 결과 그림 1과 같이 30°C에서 18시간에 sporulation을 시작하여 40시간에 100%로 spore를 형성함.

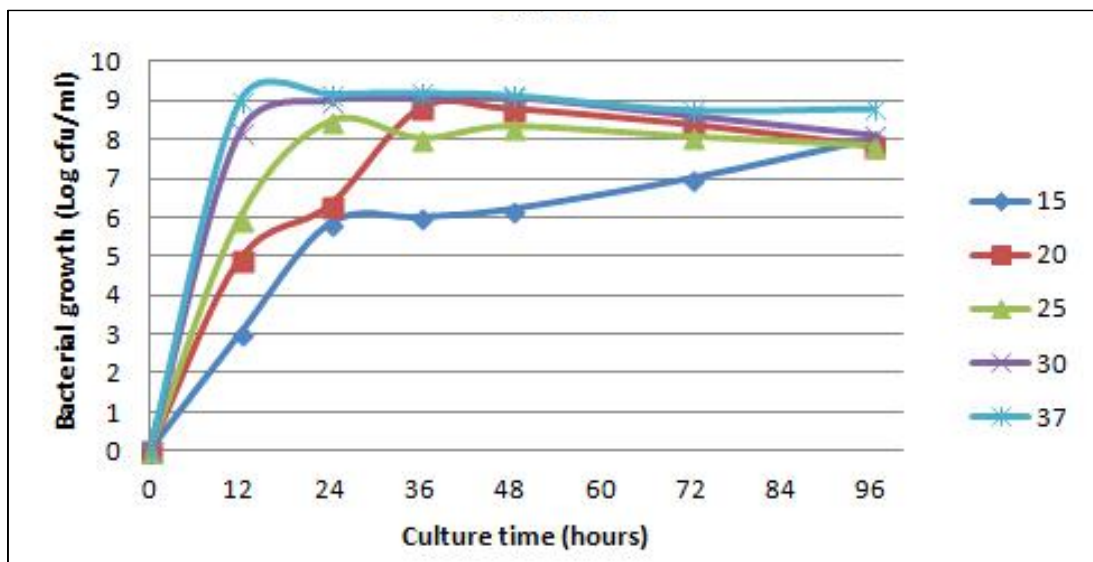


그림 1. *B. velezensis* G341의 배양 온도별 시간에 따른 spore 수 변화.

○ *B. velezensis* G341 배양 pH 최적화

- *B. velezensis* G341의 초기 pH에 따른 spore 수 생성 확인 결과 그림 2와 같이 pH 7.5에서 가장 높은 spore 수를 형성함.

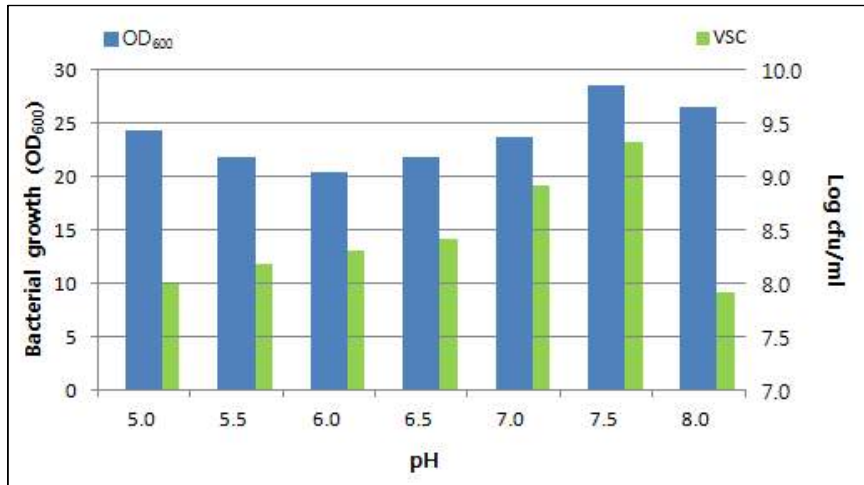


그림 2. *B. velezensis* G341의 초기 pH에 따른 spore 수 변화.

(나) *B. velezensis* G341 대량배양(원제화, SD powder)

- 그림3, 표2 와 같이 *B. velezensis* G341 대량 배양 및 원제 생산 공정의 품질규격을 확보하고 제조공정도를 확정함.

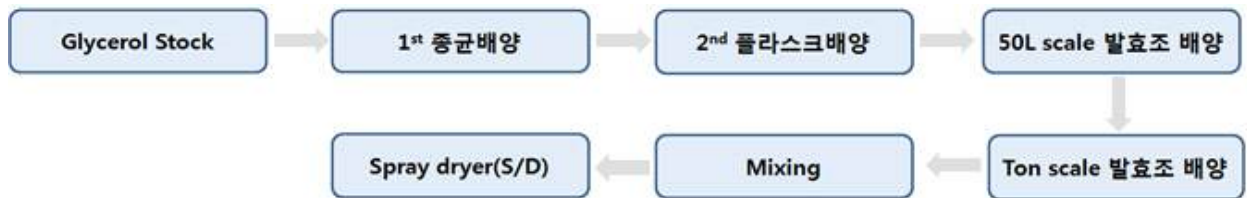


그림 3. *B. velezensis* G341 원제 생산 공정도.

표 2. *B. velezensis* G341 대량배양 및 원제 규격

구분	배양(CFU/ml)	원제(CFU/g)
규격	Min. 1.0 x 10 ⁹	Min. 1.0 x 10 ¹⁰
방법	Viable Cell(spore) Counting Method	

(다) *B. velezensis* G341 대량생산(제품화, 10% SC)

- 표 3, 4와 같이 *B. velezensis* G341 원제를 이용한 10% 액상수화제(SC)의 제조공정도를 확보하고 품질규격을 확정함.

표 3. *B. velezensis* G341 대량생산 제조공정도 및 제품 사진

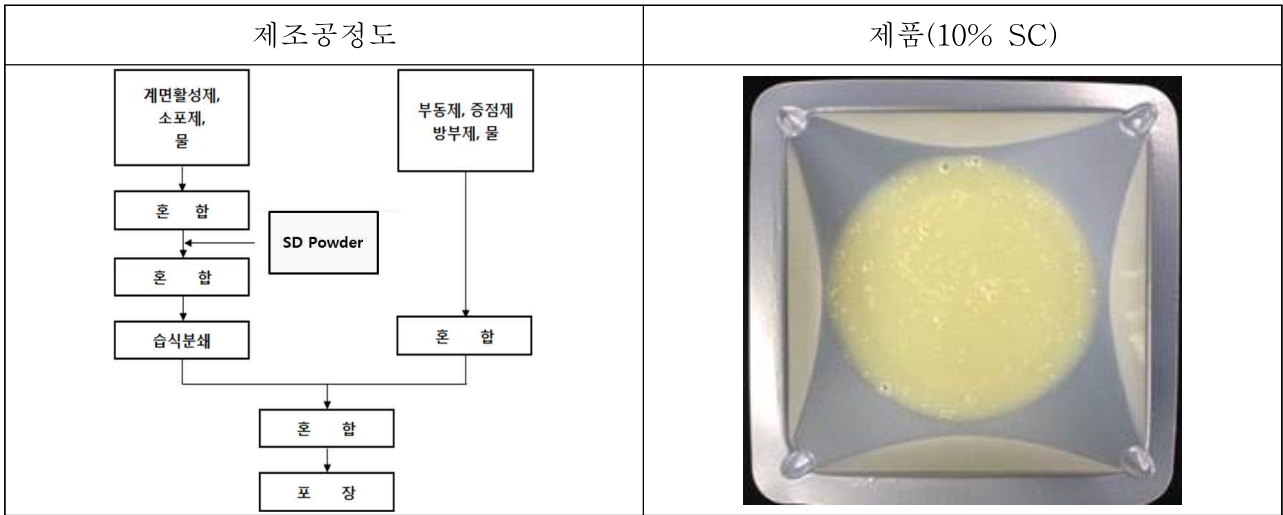


표 4. *B. velezensis* G341 제품 규격

구분	생균수(CFU/ml)
규격	Min. 1.0×10^9
방법	Viable Cell(spore) Counting Method

(라) *B. velezensis* G341 10% SC의 저장안정성(유통기한)

- 표 5, 6와 같이 *B. velezensis* G341 원제를 이용한 10% 액상수화제(SC)의 보관온도 및 기간에 따른 저장안정성을 평가한 결과 유통기한 3년을 확보하였음.

표 5. *B. velezensis* G341 제품의 54±2°C 보관에 따른 생균수 측정 결과

No.	Treatment	생균수(CFU/ml)
1	G341 (RT)	1.1×10^{10}
2	G341 (2 week)	9.7×10^9
3	G341 (4 week)	8.9×10^9
4	G341 (6 week)	5.2×10^9

표 6. *B. velezensis* G341 제품의 40±2°C 보관에 따른 생균수 측정 결과

No.	Treatment	생균수(CFU/ml)
1	G341 (RT)	1.1×10^{10}
2	G341 (4 week)	1.0×10^{10}
3	G341 (8 week)	9.3×10^9
4	G341 (12 week)	8.5×10^9
5	G341 (24 week)	5.6×10^9

(4) 결론

- 세균성 구멍병 방제용 유기농업자재를 개발하기 위해 유효균주인 *B. velezensis* G341의 최적 배양 조건을 확인하고 대량배양 공정을 확립하였으며, 최적 제형 개발을 통해 10% 액상수화제 제품(제품명: 천공탄)의 생산공정을 확립하여 유통기한 3년인 제품을 개발 완료하였음.

나. *B. velezensis* G341 균주를 이용한 세균성구멍병 유기농업자재 등록 자료 생산

(1) 연구목적

- *B. velezensis* G341 균주의 세균성구멍병 유기농업자재로 등록하기 위한 약효/약해 및 안전성 평가 시험 등 자료 생산.

(2) 재료 및 방법



(가) 공시재료

- ① 공시 미생물: 공시 미생물: *B. velezensis* G341
- ② 대조 약제: 부라마이신(streptomycin 20 WP),
- ③ 시험 작물: 복숭아(황도)

(나) 시험방법

- ① 약효 평가 시험
 - 낙화 후 7일간격 3회 처리 후 이병엽을 조사.
 - 약제 처리 시기 및 처리 방법은 표 7과 같음.

표 7. *B. velezensis* G341 제품 약효 시험

약제 처리 시기(낙화 후)	약제 처리 방법
	
낙화 직후 시점부터 처리	앞과 나무가 흠뻑 젖을 수 있게 처리

② 약해 평가 시험

○ 주작물(복숭아)에 대한 약해 평가는 표 8과 같음.

표 8. 주작물 약해 시험 설계 및 시험 방법

시험약제	주성분 함량(%)	처리시기 및 방법	희석배수 및 사용량	
			기준량	배량
<i>B. velezensis</i> G341 제품	10	경엽처리 복숭아(6.4)	2 ml/L	4 ml/L
무처리	-	-	-	-

구분	경엽처리
<i>B. velezensis</i> G341 제품	

작물수	처리수	반복수	작물당 주수	총주수
1	3	3	9	9

조사항목	조사횟수	조사일자		조사방법
약해 유무	3회	복숭아	3일차 (6.7) 5일차 (6.9) 7일차 (6.11)	약제처리 3, 5, 7일 후 신초, 경엽에 대한 기준량, 배량에서 약해정도 달관조사

○ 주변작물(4작물)에 대한 약해 평가는 표 9와 같음.

표 9. 주작물 약해 시험 설계 및 시험 방법

시험작물 (품종)	박과	가지과		십자화과
	오이 (백미백다다기)	고추 (부자)	토마토 (광명)	배추 (흑진주)

시험약제	주성분 함량(%)	처리시기 및 방법	희석배수 및 사용량	
			기준량	배량
<i>B. velezensis</i> G341 제품	10	정식후 경엽처리 오이(8.17), 고추(8.17), 토마토(8.17), 배추(8.17)	500배 (2ml/L)	250배 (4ml/L)
무처리	-	-	-	-

구분	경엽처리
<i>B. velezensis</i> G341 제품	

구분	작물수	처리수	반복수	총구수	구당주수	총소요주수
약해	4	3	3	36	1	36

조사항목	조사횟수	조사일자		조사방법
약해 유무	3회	오이	3일차 (8.20)	외관상 나타나는 약해 달관조사 (0-5)
		고추	5일차 (8.22)	
		토마토	7일차 (8.24)	
		배추		

③ 안전성 평가 시험(독성 평가, 강원대학교 및 한국생물안전성연구소 검사 의뢰)

- Abamectin 외 335 종에 대한 잔류농약 시험을 실시함.
- 꿀벌 독성 외 5종에 대한 독성 시험을 실시함.

(3) 결과

- 약효 평가 시험
 - *B. velezensis* G341 제품의 약효 조사 결과 표 10, 그림 4와 같이 발병율은 63%였으며, 대조약제의 경우 54.5%의 방제가를 보였음. *B. velezensis* G341 제품의 경우 기준량(1000배)에서 62.4%, 배량(500배) 72.5%의 방제가를 보였음.

표 10. *B. velezensis* G341 제품 약효 시험 결과

No.	Treatment Name	Form conc	Form unit	Form type	Rate	Rate unit	비고	방제가 (%)
1	Check	-	-	-	-	-	-	이병율 63.0
2	<i>B. velezensis</i> G341	10	%	SC	2	ml/l	배량	72.5
3	<i>B. velezensis</i> G341	10	%	SC	1	ml/l	기준량	62.4
4	Streptomycin	20	%	WP	1	g/l	부라마이신 (기준량)	54.5





무처리	천공탄 500배 처리
	
<p>이병율: 63%(달관조사 이병율 60%)</p>	<p>- 방제가: 72.5(달관조사 83.3%) - 구멍이 한두개 있는 잎이 많아 달관조사 보다 다소 방제가가 낮게 산출됨. - 달관조사 시 상대적으로 무처리나 대조구 대비 잎이 건강하게 보임</p>
천공탄 1,000배 처리	대조구(부라마이신)
	
<p>- 방제가: 62.4(달관조사 75.0%) - 구멍이 한두개 있는 잎이 많음. - 달관조사 시 상대적으로 무처리나 대조구 대비 잎이 건강하게 보임</p>	<p>- 방제가: 54.5(달관조사 66.7%) - 구멍이 10여개 이상으로 과발병된 잎이 많이 보임</p>

그림 4. *B. velezensis* G341 제품 약효 시험 결과.

○ 약해 평가 시험

- *B. velezensis* G341 제품의 주작물에 대한 약해조사 결과는 표 11, 그림 5와 같음.

표 11. 주작물에 대한 약해시험 결과 (약해 정도 0-5)

시험작물	기준량			배량			비고
	3일차	5일차	7일차	3일차	5일차	7일차	
복숭아(황도)	0			0			시험작물에 대한 약해 증상 없음


시험작물	기준량			배량			비고
	3일차	5일차	7일차	3일차	5일차	7일차	
복숭아(황도)							시험작물에 대한 약해 증상 없음
약해정도(0-5)	0	0	0	0	0	0	-

그림 5. 주작물에 대한 약해시험 결과 (약해 정도 0-5).

- *B. velezensis* G341 제품의 주변작물에 대한 약해조사 결과는 표 12, 그림 6과 같음.

표 12. 주변작물에 대한 약해시험 결과(약해 정도 0-5)

시험작물	3일차		5일차		7일차		비고
	기준량	배량	기준량	배량	기준량	배량	
오이(백미백다다기)	0	0	0	0	0	0	시험작물에 대한 약해 증상 없었음
고추(부자)	0	0	0	0	0	0	
토마토(광명)	0	0	0	0	0	0	
배추(흑진주)	0	0	0	0	0	0	



그림 6. 주변작물에 대한 약해시험 결과(약해 정도 0-5).

○ 안전성 평가 시험(독성 평가)

- 잔류 농약 시험(강원대학교 검사 의뢰) 결과 그림 7과 같이 Abamectin 의 335종의 모든 항목에서 불검출 되었음.

잔류농약 시험(검사)성적서

1. 검사시료

발급번호	제 EFAPSC-2015-42-4 호	발급일	2015. 9. 1.
의뢰인	성명: 동부광한농(주)	생년월일	-
	주소: 서울특별시 강남구 테헤란로 432 동부금융센터 19층		
의뢰내용	대상품목명: 원공단 맥상수취체		
	시험개요: 잔류농약검사 (Abamectin 의 335종)		
	용도: 유기농업자재목적공시용		

2. 검사결과

No.	검출성분명 (Pesticide Name)	검출치 (mg kg ⁻¹)
1	불검출	-

분석을 실시한 Abamectin 의 335종에서 위 성분을 제외한 나머지 성분은 불검출입니다.

* 불검출은 검출한계 미만으로 검출이 되지 않은 것을 뜻함.
 ** 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과이며 전체제품에 대한 품질을 보증하지는 않음.
 *** 본 성적서의 결과는 광고, 판매, 홍보 및 소송 등의 수단으로 사용하진 않음.

강원대학교 친환경농산물안전성센터




그림 7. 잔류 농약 시험 결과.

- 꿀벌 독성 외 5종에 대한 독성 시험(한국생물안전성연구소 검사 의뢰) 결과 그림 8~13 과 같이 모든 시험에서 독성이 검출 되지 않았음.


<p>Study No.: ETBE-15003 Final Report</p> <p style="text-align: center;">최종보고서</p> <p style="text-align: center;">천공탄의 꿀벌 (<i>Apis mellifera</i>)에 대한 영향시험</p> <p style="text-align: center;">ETBE-15003</p> <p style="text-align: center;"> 한국생물안전성연구소</p> <p style="text-align: center;">KBSI 1 page of 18</p>	<p>5. 시험결과 [Results]</p> <p>5.1. 시험환경 조건 (Appendix 1) 관찰기간 동안 꿀벌실험실의 실내온도는 평균 26.3°C (25.6~27.1°C) 그리고 상대습도는 평균 60.6% (50.0~73.0%) 이었다. 실험실 내의 실내온도 및 상대습도가 일부 시간대에서 시험가이드 라인의 범위 (온도: 23.0~27.0°C, 습도 50~70%)로부터 이탈이 발생하였으나, 초과된 범위가 미미하여 시험물질 처리군에 대한 영향은 적은 것으로 판단되었다.</p> <p>5.2. 관찰 및 영향시험결과 (Table 1, 2, 3) 노출 후 7일차 경과 시, 음성대조군의 누적치사율은 26.7% (20/75개체)로 음성대조군의 치사율이 20.0% 초과되어 시험을 종료하였다. 추천사용약량 (500배 희석)의 10, 50, 100배 농도로 시험한 결과, 관찰종료일의 누적치사율은 각각 28.0%, 14.7%, 24.0%로 관찰되었다.</p> <p>관찰기간동안 음성대조군에서 치사개체를 제외한 이상증상을 보인 개체는 관찰되지 않았다. 시험물질 처리군에서는 보행장애 및 무기력한 증상을 보인 일부 개체가 관찰되었다.</p> <p>시험 중 치사한 개체에 한하여 시험물질에 의한 미생물 감염을 조사한 결과, 음성대조군과 시험물질 처리군의 치사개체에서 검출되지 않았다.</p> <p>5.3. 고찰 및 결론 (Appendix 2, 3) 시험물질인 천공탄의 노출 후 7일차까지의 관찰결과를 ANOVA 분석 및 2 sample t-test를 이용하여 통계처리 실시한 결과, 음성대조군의 치사율 대비 추천사용약량 (500배 희석)의 10, 50배 및 100배 높은 농도에서는 통계적으로 유의하지 않아 꿀벌에 대한 영향이 없는 것으로 나타났다.</p> <p>따라서 꿀벌에 대한 최대무영향농도 (NOEC)는 추천사용약량의 100배 높은 농도인 것으로 확인되었다.</p>
---	--

그림 8. 꿀벌 독성 시험 결과.


<p>Study No.: ETD-15018 Final Report</p> <p style="text-align: center;">최종보고서</p> <p style="text-align: center;">New Zealand White계 토끼에 대한 천공탄의 피부자극성시험</p> <p style="text-align: center;">ETD-15018</p> <p style="text-align: center;"> 한국생물안전성연구소</p> <p style="text-align: center;">KBSI 1 page of 17</p>	<p>5. 시험결과 [Results]</p> <p>5.1. 일반중독증상 및 치사 동물수 (Table 1) 모든 시험동물에 있어서 어떠한 일반중상도 관찰되지 않았으며, 치사동물 또한 발견되지 않았다.</p> <p>5.2. 체중변화 (Table 2) 시험물질 처리직전, 처리 후 48시간과 72시간에 개체별 체중을 측정하고, 시간이 경과함에 따라 증가추세를 보였다.</p> <p>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.</p> <p>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 천공탄은 New Zealand White계 토끼의 피부에 처리 시 자극성이 없는 물질로 구분되었다.</p>
---	--

그림 9. New Zealand White계 토끼에 대한 피부자극성시험 결과.

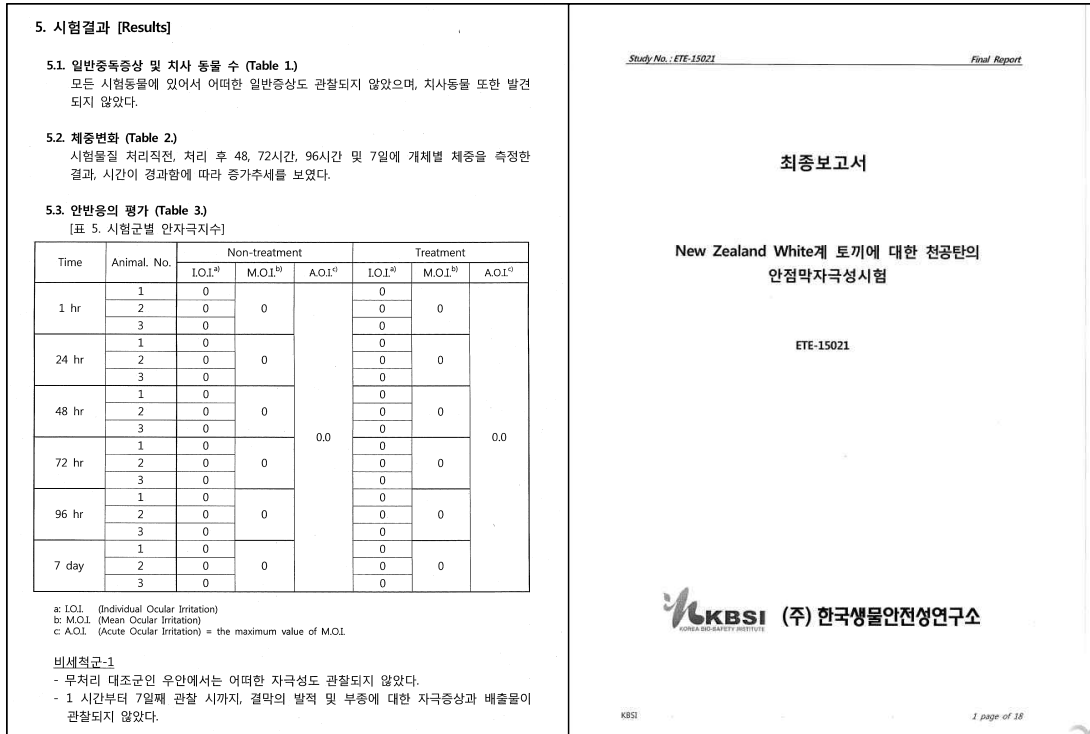


그림 10. New Zealand White계 토끼에 대한 안점막자극성시험 결과.

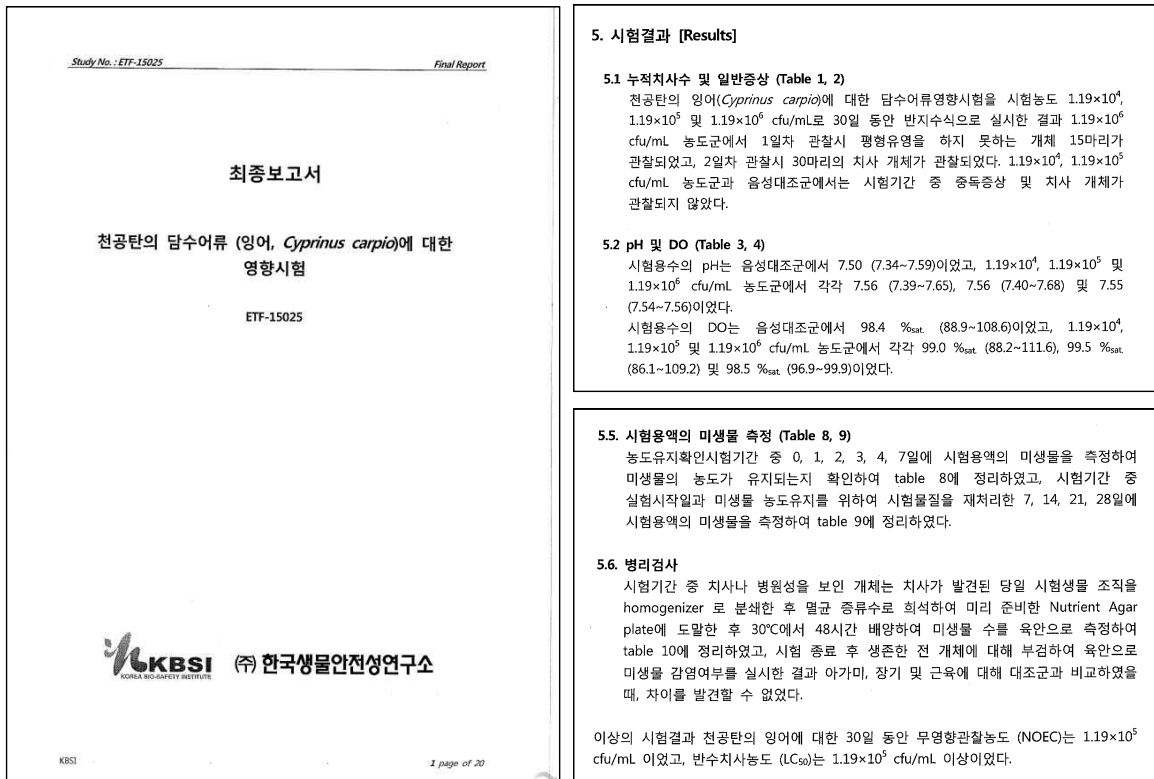


그림 11. 담수어류(잉어, *Cyprinus carpio*)에 대한 영향 시험 결과.

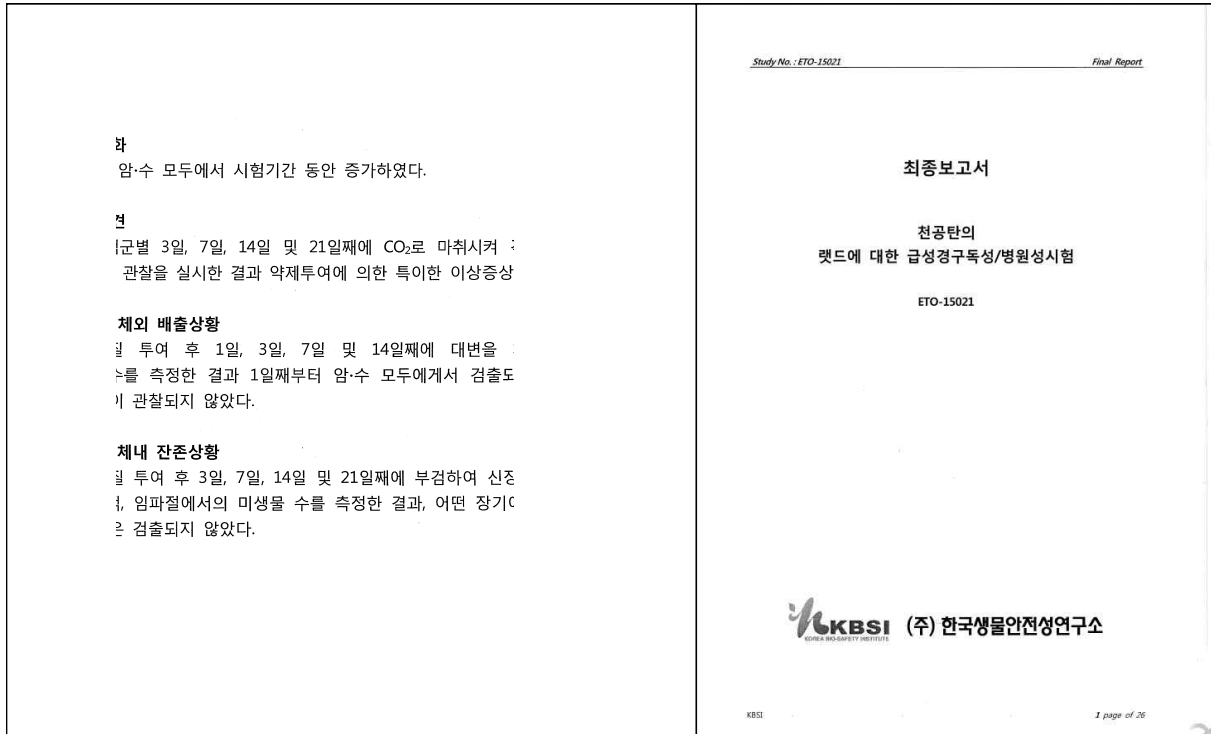


그림 12. 랫드에 대한 급성경구독성/병원성 시험 결과.

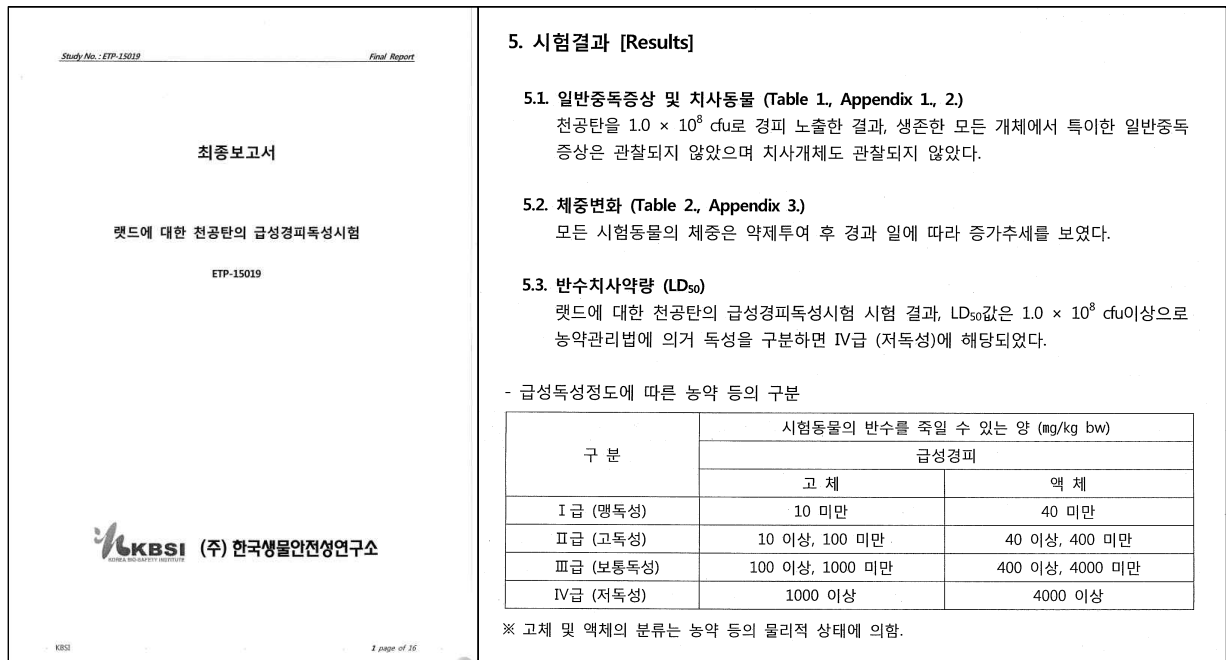


그림 13. 랫드에 대한 급성경구독성 시험 결과.

(4) 결론

- *B. velezensis* G341 균주를 이용한 세균성구멍병 유기농업자재 등록 자료를 생산하기 위해 *B. velezensis* G341 제품(제품명: 천공탄)으로 Field에서 약효 검증을 하였으며 주작물(복숭아) 포함 주변작물의 약해를 평가하였음. 또한 유기농업자재로 등록하기 위한 독성 평가를 모두 수행하여 등록 자료 생산을 완료하였음.

제 2절 복숭아 세균성구멍병 방제용 유기농업자재 등록

1. 복숭아 세균성구멍병 방제용 유기농업자재(제품명: 천공탄) 등록

가. 제품 등록

(1) 연구목적

- 개발한 제품을 유기농업자재로 등록하기 위하여 「친환경 농업육성법 시행규칙」에 따라 다음과 같은 자료를 준비하여 등록을 신청함.
 - 원료의 특성·조성비 및 물질의 유래에 관한 자료
 - 제조공정 및 품질관리에 관한 자료
 - 공인시험연구기관의 유해성분 분석성적서, 효과 시험성적서, 급성경구/경피/어독성 시험성적서, 포장지 표기사항 및 시료

(2) 등록 결과

- 2016년 1월 제품 등록 및 출시하였으며, 그림 14, 15와 같이 제품 기술 자료와 사용방법을 확정함.

천공탄
엑상수회제

세계처리로
복숭아 세균성구멍병 걱정 뚫!

복숭아 세균성구멍병 예방효과 우수

저항성 발현 및 작물 잔류 걱정 뚫

복숭아 세균성구멍병 방제효과

실험구	방제효과 (%)
100% 배양	81.5%
100% 배양	79.4%
100% 배양	79.4%

효과적인 사용방법

사용시기	용량방법	2016년 사용역량
발병전	수확 전 1~2회 후~수확 전	15일 간격 3회 경엽차지
발병후	수확 전 1~2회 후~수확 전	7일 간격, 2회 경엽차지

주의사항

- 1 어린이 손에 닿지 않는 곳에 보관하십시오.
- 2 사용 전에 잘 흔들어서 사용하시고, 잔류를 피해 오전 일찍 또는 오후 늦게 사용하십시오.
- 3 산, 알칼리성 농지에서는 혼용하여 사용하지 마십시오.
- 4 첫사용을 피하고 냉암소에 보관하십시오.

천공탄 엑상수회제

복숭아 세균성구멍병

병원균
학명: *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*
특징: 간상형 세균으로, 17도의 극온을 가지고 있으며, 운동성 호기성 그람 음성균 특성으로, 영양배양액에서 노란색을 띠고, 크기는 0.4~0.7X, 7~1.5um

발생환경

- 병원균은 잎이 떨어진 부분, 가지의 병반부, 표피조직에 침투하여 병반을 형성하여 전파 일어난다.
- 일찍이부터 2월 하순부터 증식하여 병반을 확대하면서 세균이 분출되어 제 1차 전파원이 된다.
- 일찍이 4월 하순경인 일찍이 직후부터 비 바람에 의해 기온으로부터 온습하여 발생되며, 세균에 감염된 병반이 세균을 제 2차 전파원이 되어 잎과 과실로 계속 전염된다.
- 일찍이에서 전파기간은 15°C에서 18일, 20°C에서는 9일이며, 적온인 25°C에서는 4~5일이다.

병징

- 잎, 가지, 과실 등에 피해
- 잎에 작은 구멍이 생기거나 과실 표면에 부정형의 오목한 병반이 생긴다.

그림 14. 제품(천공탄) 기술 자료(Brochure).

“복숭아 세균성구멍병 전문약제”

천공탄 SC 사용방법		
처리시기	● 발생 전, 발생초기	❖ 발생 전 3회 처리(4월말 ~ 6월까지) ❖ 다발생기 2회처리(6월 ~ 8월까지)
처리내용	● 7일 간격 3회 경엽처리(낙화 후) ● 다발생 시기 2회 경엽처리 총 5회 처리	❖ 예방처리: 1,000배 희석(25말/500ml, 병), 4월말 ~ 6월까지 ❖ 다발생기 처리: 500배희석(12.5말/500ml, 병), 6월 ~ 8월까지
사용량	● 1,000배 희석 - 예방처리 ● 500배 희석 - 발생/확산 억제	❖ 1,000배 처리 시 복숭아 세균성구멍병 발생 확률 억제 ❖ 5,000배 처리 시 복숭아 세균성구멍병 확산 억제
농약 혼용성	● 살충제 - 사용가능 ● 살균제 - 사용가능 ● 보르도액 - 사용불가 ● 친환경자재 - 일부 사용 가능	❖ 주의 - 마이신계통의 화학농약과는 혼용 불가함. - 마이신계통 화학농약 처리 시 3~5일간격을 두고 교호살포 - 보르도액 혼용불가 - 5일간격 교호 살포 - 친환경자재의 경우 식물추출물, 강알카리/강산성 자재 혼용불가
특장점	● 수확기 처리 가능 ● 저항성 문제 없음 ● 농약과 혼용 가능 ● 세균성병 전문 약제	❖ 미생물 유래의 효과가 탁월한 제품으로 수확기에 처리 가능함. ❖ 마이신계통의 농약과 달리 저항성 문제 없음. ❖ 살충제, 살균제(마이신계통 제외)와 혼용처리 가능함. ❖ 약효를 극대화 하기 위해서는 혼용처리보다 교호살포 권장함.

그림 15. 제품(천공탄) 사용 방법(Manual).

2. 다양한 농가 포장에서의 효능 평가

가. 글로벌 기업(일본, 글로벌 기업 S사) 평가 시험

(1) 연구목적

- 글로벌 매출 확대를 위해 약효 시험 등 품질 평가를 통해 수출 사업 가능성을 확인하고자 함.

(2) 실험방법

- 시험작물: 복숭아
- 시험방법: 발생 전 7일간격 3회처리
- 시험약제: 천공탄

(3) 결과

- 그림 16과 같이 다발생기나 심발생기 조건하에서 천공탄은 대조약제와 거의 유사한 효과를 보였음.

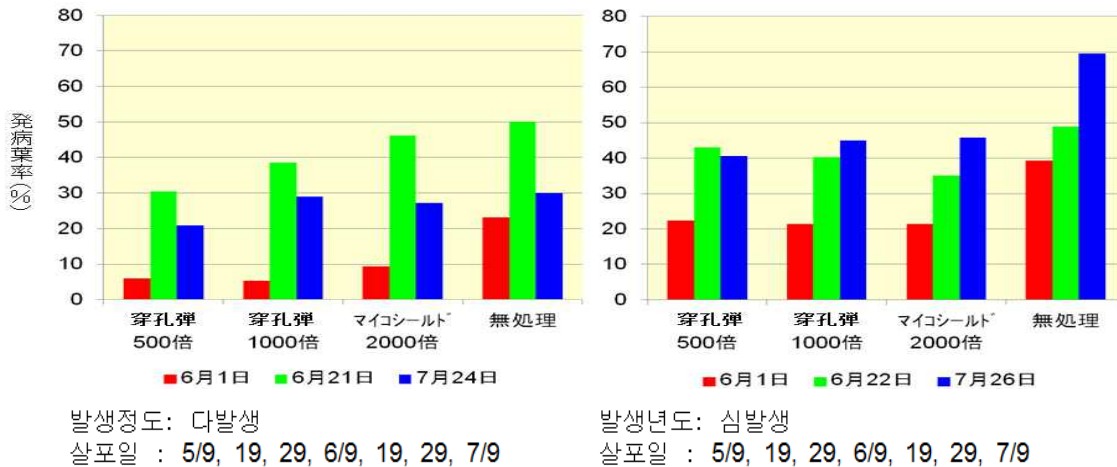


그림 16. 다발생기나 심발생기 조건하에서 천공탄 약효시험 결과.

(4) 결론

- 일본의 경우에도 생육기에 사용 할 수 있는 약제가 한정되어 있어 유기농업자재인 천공탄은 실용성이 뛰어날 것으로 보임.

나. 전문 기관 평가

(1) 연구목적

- 공인기관인 청도 복숭아 시험장의 약효 시험 결과를 통해 제품의 품질을 확인하고자 함.

(2) 재료 및 방법

- 시험작물 : 복숭아
- 대상병해 : 세균구멍병(*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*)
- 시험약제 : 천공탄(*Bacillus velezensis* G341 10% SC)
- 처리내용 : 표 13과 같음

표 13. 천공탄 공인 시험 설계 및 시험 방법

시험약제	주성분함량(%)	처리시기 및 방법	희석배수
천공탄(생균탄)	10	발생초 10일간격 3회 경엽살포 (5.9, 5.20, 5.31)	250배
천공탄(생균탄)	10	"	500배
천공탄(생균탄)	10	"	1,000배
옥시테트라사이클린.스트렙토마이신	20.3	"	1,000배
황산염(대조약제)	(1.5+18.8)		
무처리	-	-	-

구 분	처리수	반복수	구당주수	총주수
약효검정	5	3	5	75

○ 주요 조사항목

- 약효 : 약제처리 10일 후 이병과율, 이병엽률 조사
- 약해 : 약제처리 3일, 5일 7일 외관조사

(3) 결과

○ 약효/약해시험

- 약효 시험 결과 표 14, 15와 같이 복숭아 세균구멍병에 대한 천공탄(생균탄) 처리 결과 500배 처리구에서 앞에서 70.6%의 방제효과로 대조약제와 유사한 결과를 보였음. 또한 과실에서는 무처리 이병률이 3.9%로써 약제간에 효과를 검토하기에 충분하지 않았음.
- 약해 시험 결과 표 16과 같이 모든 처리구에서 발생하지 않았음.

표 14. 복숭아 세균구멍병에 대한 천공탄 처리 효과(잎, 최종약제처리 후 7일차)

시험약제	이병엽률(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평 균		
천공탄 250배	16.3	14.9	14.7	15.3	bc	66.0
천공탄 500배	11.2	13.6	14.9	13.2	c	70.6
천공탄 1,000배	14.7	20.0	17.3	17.3	b	61.5
옥시테트라사이클린.스트렙토 마이신황산염(대조약제)	13.6	12.3	14.1	13.3	c	70.4
무처리	42.7	44.0	48.3	45.0	a	

CV(%) ----- 9.3

표 15. 복숭아 세균구멍병에 대한 천공탄 처리 효과(과실, 최종약제처리 후 7일차)

시험약제	이병과율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평 균		
천공탄 250배	1.3	1.6	2.1	1.7	bc	57.3
천공탄 500배	1.0	2.0	1.3	1.4	bc	63.2
천공탄 1,000배	1.7	2.0	2.3	2.0	b	48.7
옥시테트라사이클린.스트렙토 마이신황산염(대조약제)	1.0	1.3	1.3	1.2	c	69.2
무처리	3.3	4.7	3.7	3.9	a	

CV(%) ----- 17.1

표 16. 천공탄 약해 시험 결과

시험약제	시험작물	약해정도 (0~5)		비 고
		기 준 량	배 량	
천공탄 250배	복숭아	0	0	약해증상 없음
천공탄 500배	"	0	0	"
천공탄 1,000배	"	0	0	"
옥시테트라사이클린.스트렙토 마이신황산염(대조약제)	"	0	0	"

(4) 결론(청도 복숭아 시험장 의견)

- 시험약제는 복숭아 세균구멍병에 대한 방제효과가 인정되고 복숭아에 대한 외관상 나타나는 약해증상이 없어 영농현장에서 실용성이 높을 것으로 판단됨
- 특히 항생제에 대한 저항성이 있는 과원에서 약제연용으로 인한 부작용을 줄일 수 있을 것으로 기대됨

다. 자체 평가(화학농약과의 체계처리)

(1) 연구목적

- 화학농약과 체계처리 가능성을 확인하고 천공탄의 세균성구멍병 방제력을 더 높일 수 있는 방안을 모색하며, 최근 화학농약(마이신류) 저항성 농가에 적용가능한지 확인하고자 함.

(2) 재료 및 방법

- 시험작물: 복숭아(장택백봉)
- 시험약제: 천공탄 10% SC
- 대조약제: Streptomycin 20% WP
- 시험방법: 개화기 7일 간격 3회 처리, 발병 초 7일간격 2회 처리 후 이병엽을 3반복 조사(1반복 최소 200엽)
- 시험시기 및 약제 처리 방법은 표 17과 같음.

표 17. 천공탄 약효 시험 시기 및 약제 처리 방법

약제 처리 시기(개화기)	약제 처리 방법
	
<p>- 개화기 시점부터 3회 약제 처리</p>	<p>- 꽃과 가지가 흠뻑 젖을수 있게 약제처리 - 나무 밑동과 닿아있는 지면까지 약제처리</p>

(3) 결과

- 천공탄의 화학농약과의 체계처리 시험 결과 표 18, 그림 17과 같이 복숭아 세균구멍병에 대한 천공탄을 처리한 결과 기준량, 배량 처리구에서 각각 69.6%, 77.9%의 방제효과로 대조약제(44.0%)보다 높은 약효를 보였음. 특히 달관조사 결과 배량 처리구에서 86.6%로 다른 처리구들 보다 잎이 깨끗하고 건강하게 보였음.

표 18. 약효 조사 결과

Trt No.	Treatment Name	Form Conc	Form Unit	Form Type	Rate	Rate Unit	방제가 (%)
1	Control	-	-	-	-	-	이병율: 58.5
2	천공탄	10	%	SC	1	ml/L	69.6
3	천공탄	10	%	SC	2	ml/L	77.9
4	천공탄	10	%	SC	1	ml/L	67.3
	Streptomycin	20	%	WP	1.25	ml/L	
5	Streptomycin	20	%	WP	1.25	ml/L	44.0

대조구	천공탄 기준량 처리
	
<ul style="list-style-type: none"> - 방제가: 44.0%(달관조사 방제가 56.0%) - 구멍이 밀집되어 과발병되고, 처리구 대비 크기가 크게 관찰 됨 	<ul style="list-style-type: none"> - 방제가: 69.6%(달관조사 방제가 78.3%) - 구멍이 한두개 있는 잎이 부분적으로 관찰 되고, 과실은 모두 건강 함 - 무처리 대비 달관상 엽과 과실이 건강 함
천공탄과 화학농약 체계 처리	천공탄 배량 처리
	
<ul style="list-style-type: none"> - 방제가: 67.3%(달관조사 방제가 77.3%) - 구멍이 한두개 있는 잎이 부분적 관찰 되어 달관 방제가와 차이가 있음 - 무처리 대비 달관상 엽과 과실이 건강 함 	<ul style="list-style-type: none"> - 방제가: 77.9%(달관조사 방제가 86.6%) - 구멍이 한두개 있는 잎이 관찰 되지만, 빈도가 낮음 - 모든 처리구 대비 달관상 엽과 과실이 건강 함

그림 17. 천공탄 체계처리 조사 결과.

(4) 결론

- 화학농약과의 체계 처리 시 단독 처리보다 방제가가 높지 않아 현재 수준에서는 체계처리가 어려울 것으로 사료됨. 하지만 화학농약보다 높은 방제가를 나타냄으로 유기농업자재만으로 방제하는 것을 설득하기 어려운 농가에는 사용이 가능 할 것으로 생각됨.

3. 출시 제품 농가 현장 교육

가. 충북 옥천 복숭아 작목반

- (1) 일시: 2017년 4월 24일
- (2) 장소: 옥천 명품복숭아연구회장 과수원
- (3) 참석인원: 명품복숭아연구회장 박득선의 외 19명
- (4) 세미나 내용 : 천공탄 활용 세균성 구멍병 방제 교육(그림 18), 교육자료(그림 19).



그림 18. 충북 옥천 명품복숭아연구회 교육 사진.

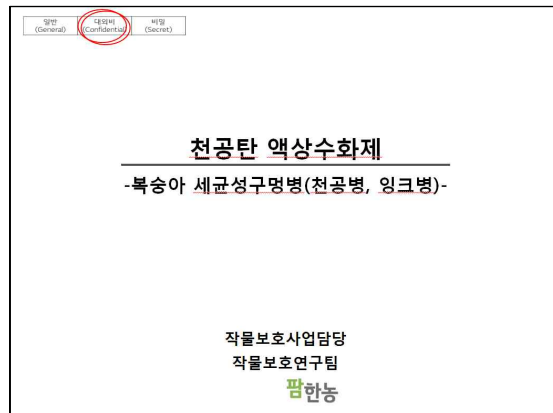


그림 19. 천공탄 교육자료.

나. 충북 옥천 복숭아 작목반

- (1) 일시: 2017년 5월 9일
- (2) 장소: 충주 만복식당
- (3) 참석인원: 복숭아 작목반 장원기 외 16명
- (4) 세미나 내용 : 복숭아 세균성구멍병(천공병)에 대하여 발생 환경, 병징, 및 천공탄의 저항성 발현 작용기전, 효과 등에 대하여 기술 세미나 실시(그림 20).



그림 20. 충북 충주 복숭아작목반 교육 사진.

다. 충북 원예농협 본점 교육

- (1) 일시: 2017년 5월 19일
- (2) 장소: 충주 구옥식당
- (3) 참석인원: 정찬식 상무 외 9명
- (4) 세미나 내용 : 복숭아 세균성구멍병(천공병)에 대하여 발생 환경, 병징, 및 천공탄의 저항성 발현 작용기전, 효과 등에 대하여 기술 세미나 실시(그림 21).



그림 21. 충북 충주 복숭아작목반 교육 사진.

라. 경기 이천 복숭아 연합회

- (1) 일시: 2018년 1월 18일
- (2) 장소: 경기 이천시 동부과수조합 본소
- (3) 참석인원: 이천 동부과수조합회(20명)
- (4) 세미나 내용 : 복숭아 세균성구멍병(천공병)에 대하여 발생 환경, 병징 및 천공탄의 저항성 발현 작용기전, 효과 등에 대하여 기술 세미나 실시(그림 22).



그림 22. 경기 이천 복숭아 연합회 교육 사진.

마. 전남 남원 복숭아 연합회

- (1) 일시: 2018년 4월 27일
- (2) 장소: 남원시 요천로 1465
- (3) 참석인원: 남원 복숭아 연합회(30명)
- (4) 세미나 내용 : 복숭아 세균성구멍병(천공병)에 대하여 발생 환경, 병징, 및 천공탄의 저항성 발현 작용기전, 효과 등에 대하여 기술 세미나 실시(그림 23).

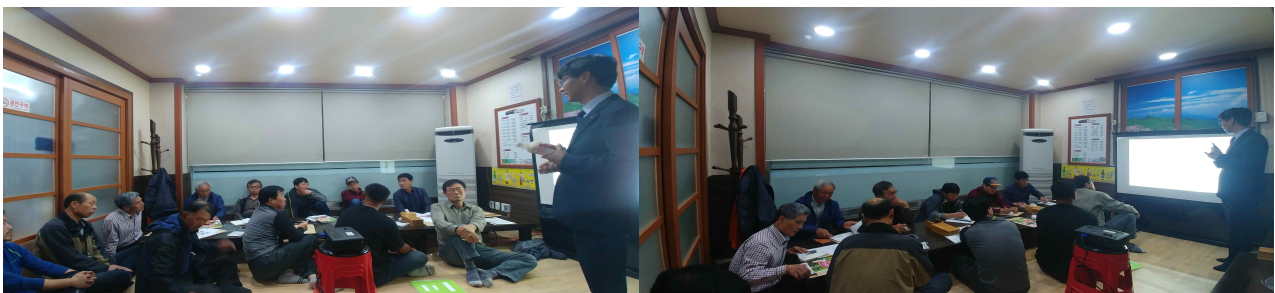


그림 23. 전남 남원 복숭아 연합회 교육 사진.

제 5장 천연생리활성 소재를 이용한 복숭아순나방 방제용 유기농업자재 개발

제 1절 복숭아순나방 대량사육 체계 구축

1. 사과를 이용한 복숭아순나방 대량 사육 체계 구축

가. 연구목적

- 정확한 살충효과 검증에 필요한 안정되고 균일한 곤충 시료확보를 위한 복숭아순나방의 대량사육 체계를 구축

나. 재료 및 방법

- 문헌 조사(Vetter et al 1989)와 전문가 자문(생물이용연구소 대표)을 통해 인공사료로 사육 시 높은 치사율과 활성저하 때문에 생물검정을 위한 시험곤충 확보 어려움을 발견. 저온 저장된 사과를 이용한 사육법을 통해 시험충을 확보하기로 결정
- 2015년 8월 경북 안동시 길안면과 풍산면 사과원에서 심식충 피해과와 정상과를 수집한 후 피해과에서 나온 복숭아순나방을 수집하여 산란을 받은 후 부화한 유충을 정상과를 공급하여 사육함(그림 1).

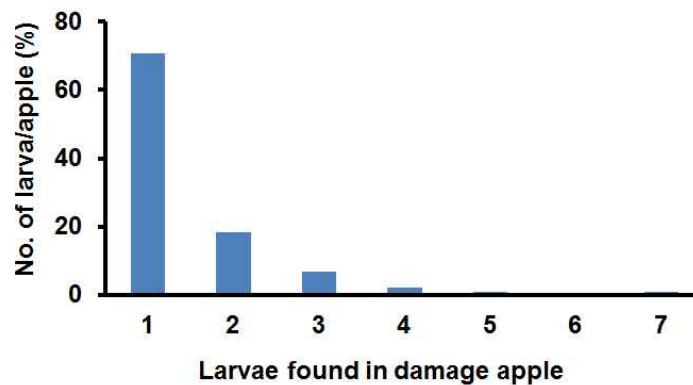


그림 1. Number of *Grapholita molesta* found in a single apple fruits.

- 채란을 위해서 원통형 아크릴케이지(25.5 H cm × 17 D cm, 그림 2) 혹은 배양디시(4 H cm × 10 D cm) 등을 사용하였고 환경 조건은 24~25℃와 86~95% 상대습도, 16L:8D 광주기임. 산란된 알에서 부화한 4~5마리의 1령 유충을 사과에 접종함. 이 때 사과에 침입용 흔적(혹은 구멍)을 미리 만들어서 그 효과를 비교함(그림 3).



그림 2. Rearing apparatus of *Grapholita molesta* Acrylic cage for egg oviposition (left) and growing shelf (right).



그림 3. Larvae of *Grapholita molesta* (arrow) reared on apples.

다. 결과

- 폴리비닐이나 곤충사육용기보다는 아크릴케이지내에서의 산란전 기간이 짧았고 산란수도 많았음(표 1).
- 10~13마리의 암컷과 8~14마리의 수컷을 집단으로 아크릴 케이지에 두어 암컷 한 마리당 30개 이상의 평균 산란 수를 얻었음(표 1). 암컷 한 마리당 평균 산란 수의 최대치는 40개였음.
- 사과에 침입용 흔적을 만들어 준 경우 기존 성적(64%, Vetter et al 1989)에 비해 높은 용화율을 보임(87%, 표 2). 또한 성충의 우화율도 침입용 흔적을 만들어준 사과에서 발육한 개체군에서 더 높았음.

표 1. Number of eggs produced from the different rearing condition of *Grapholita molesta*

♂:♀	n	Cage type	Preoviposition period (Day)	Temperature (°C), Relative humidity (%)	Total number of egg produced per cage	Average fecundity per female
11:14	1	Acrylic cage	3	25.6±0.05, 86.2±0.12	560	40
13:10	1	Acrylic cage	3	25.6±0.05, 86.2±0.12	337	33.7
10:8	1	Acrylic cage	4	24.6±1.15, 86.2±0.12	559	32.4
18:17	1	Acrylic cage	3	25.6±0.05, 86.2±0.12	466	27.4
17:17	1	Acrylic cage	3	25.6±0.05, 86.2±0.12	460	27.1
9:9	5	Acrylic cage	3-5	25.6±0.05, 86.2±0.12	225	25
35:27	1	Acrylic cage	3	24.9±0.11, 94.9±0.77	575	21.3
6:6	1	Acrylic cage	3	25.6±0.05, 86.2±0.12	126	21
1:1	6	Breeding dish	5	25.9±0.11, 93.9±0.77	16.7	16.7
24:20	1	Acrylic cage	4	24.6±1.15, 86.2±0.12	272	13.6
13:17	1	Acrylic cage	5	25.6±0.05, 86.2±0.12	217	12.8
20:20	1	Acrylic cage	5	25.6±0.05, 86.2±0.12	234	11.7
27:18	1	Acrylic cage	3	24.6±1.15, 86.2±0.12	195	10.8
9:9	3	Poly vinyl container	4-5	25.9±0.11, 93.9±0.77	78.3	8.7
3:3	1	Poly vinyl container	6	25.9±0.11, 93.9±0.77	20	6.7
18:18	1	Acrylic cage	3	24.9±0.10, 95.0±0.75	64	3.6

표 2. Comparison of development of *Grapholita molesta* larvae reared on apples punctured or non-punctured

Type	No. of larva	Development time (1st-5th instar)		Pupation rate (%)	Adult emergence rate (%)	Mean weight reduction of apple (gm)
		Min	Max			
With Puncturing	78	9	20	87	68	2.4
Without Puncturing	20	11	19	75	35	1.3

라. 결론

- 피해를 받지 않은 정상과를 이용한 복숭아순나방 사육 방법을 개발함.
- 10-13마리의 암컷과 8~14마리의 수컷을 집단으로 아크릴 케이스에 두어 암컷 한 마리당 30개 이상의 평균 산란 수를 얻었음.
- 특히 사과에 유충의 침입용 흔적(혹은 구멍)을 만들어 주면 생존율이 더욱 향상이 됨.

제 2절 천연생리활성 소재 선발

1. 천연생리활성 소재 확보 및 살충활성 스크리닝

가. 연구목적

- 다양한 천연생리활성 소재 확보 및 살충활성 스크리닝을 통한 우수 소재 선발

나. 재료 및 방법

- 다양한 천연생리활성 소재(미생물 또는 식물추출물)를 확보하고, 각 천연생리활성물질의 특성과 복숭아순나방의 발육상태 등을 고려한 생물검정법을 적용.
- 기존 문헌 조사를 통해 나방류 해충에 활성을 보인 40종의 식물 확인(표 3).
- 이들 중 한국생명공학연구원(KPEB)에서 28종의 시료 확보 및 복숭아순나방에 대해 생물 검정(표 4).
- KPEB에서 구입한 식물 추출물을 메탄올로 희석해서 (2mg/ml) Scintillation Vial 검정법(그림 4)으로 각 30개체의 1영충(부화 후 5시간 이전, 그림 5)에 대해 생물 검정. 보정된 반수 치사시간(LT₅₀)으로 probit 분석 실시.



그림 4. Scintillation vial assay using plant extracts.

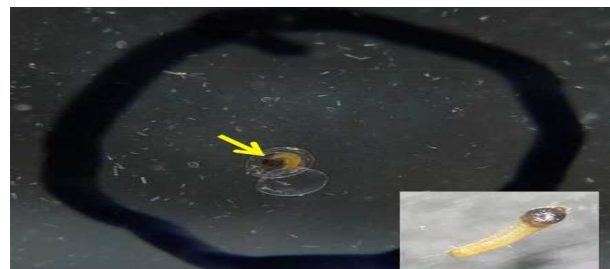


그림 5. The first instar larvae of *Grapholita molesta* (less than 5 hours old) used in the bioassay.

3. The list of plant extracts reported to be effective against lepidopteran insects summarized from the article published between 2000 and 2015

Plant species	Author	Plant parts	Solvent	Lepidopteran insects tested	
				Species	Family
<i>Abrus precatorius</i>	Zaitoun 2007	Seed	Ethanol	<i>Galleria mellonella</i>	Pyralidae
<i>Achillea millefolium</i>	Hashemina 2011	Leaf	Methanol	<i>Pieris rapae</i>	Pieridae
<i>Allium cepa</i>	Ghanim et al. 2014	Fresh onion	Tween 20	<i>Tuta absoluta</i>	Gelechiidae
<i>Allium sativum</i>	Ghanim et al. 2014	Fresh garlic	Tween 20	<i>Tuta absoluta</i>	Gelechiidae
<i>Artemisia annua</i>	Hashemina et al. 2003	Leaf	Methanol	<i>Pieris rapae</i>	Pieridae
<i>Artemisia vulgaris</i>	Karakoc and Ayhan 2013	Whole plant	-	<i>Spodoptera littoralis</i>	Noctuidae
<i>Avicennia marina</i>	Soliman et al. 2012	Aerial part	Hexane	<i>Phthorimaea operculella</i>	Gelechiidae
<i>Bifora radiens</i>	Er et al. 2009	Whole plant	Acetone	<i>Thaumetopoea solitaria</i>	Thaumetopoeidae
<i>Capparis aegyptia</i>	Soliman et al. 2012	Aerial part	Hexane	<i>Phthorimaea operculella</i>	Gelechiidae
<i>Capparis aegyptia</i>	Soliman et al. 2012	Aerial part	Hexane	<i>Phthorimaea operculella</i>	Gelechiidae
<i>Chrysanthemum grandiflorum</i>	Haouas et al. 2010	Aerial part	Metanol	<i>Spodoptera littoralis</i>	Noctuidae
<i>Chrysanthemum macrotum</i>	Haouas et al. 2010	Aerial part	Methanol	<i>Spodoptera littoralis</i>	Noctuidae
<i>Chrysanthemum segetum</i>	Haouas et al. 2010	Aerial part	Methanol	<i>Spodoptera littoralis</i>	Noctuidae
<i>Capsicum annum</i>	Jannet et al. 2001	Leaf	Methyl. chloride	<i>Spodoptera littoralis</i>	Noctuidae
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Beninger et al. 2003	Leaf	Methanol	<i>Trichoplusia ni</i>	Noctuidae
<i>Citrus sinensis</i>	Bouzouina et al. 2012	Leaf	Phenol	<i>Phyllocnistis citrella</i>	Gracillariidae
<i>Cleome deoserifolia</i>	Soliman et al. 2012	Aerial part	Ethanol	<i>Phthorimaea operculella</i>	Gelechiidae
<i>Cyprus rotundus</i>	Dadang et al. 2001	Tuber	Ethanol	<i>Plutella xylostella</i>	Yponomeutidae
<i>Datura metel</i>	Panneerselvam et al. 2013	Leaf	Methanol	<i>Helicoverpa armigera</i>	Noctuidae
<i>Delphinium consolida</i>	Karakoc et al. 2013	-	-	<i>Spodoptera littoralis</i>	Noctuidae
<i>Euphorbia lathyris</i>	Shalaby et al. 2013	Seed	Ethanol	<i>Spodoptera littoralis</i>	Noctuidae
<i>Fumaria officinalis</i>	Er et al. 2009	Whole plant	Acetone	<i>Thaumetopoea solitaria</i>	Thaumetopoeidae
<i>Ginkgo biloba</i>	So et al. 2012	Seed coat	Methanol	<i>Spodoptera exigua</i>	Noctuidae
<i>Glycine max</i>	Binder et al. 1984	Leaf	Isocotane	<i>Heliothis zea</i>	Noctuidae
<i>Hordium sativum</i>	Zaitoun 2007	Seed	Ethanol	<i>Galleria mellonella</i>	Pyralidae
<i>Humulus lupulus</i>	Er et al. 2009	Whole plant	Methanol	<i>Thaumetopoea solitaria</i>	Thaumetopoeidae
<i>Ipomoea pauciflora</i>	Elisa et al. 2010	Seed	Hexane	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Noctuidae
<i>Laurus nobilis</i>	Zaitoun 2007	Seed	Ethanol	<i>Galleria mellonella</i>	Pyralidae
<i>Nicotiana tabacum</i>	Blankson et al. 2013	Leaf	Detergent	<i>Plutella xylostella</i>	Yponomeutidae
<i>Nerium indicum</i>	Dhanapakiam et al. 1995	Leaf	Acetone	<i>Spodoptera litrura</i>	Noctuidae
<i>Petroselinum sativum</i>	Zaitoun 2007	Seed	Ethanol	<i>Galleria mellonella</i>	Pyralidae
<i>Piper amalago</i>	Brito et al. 2015	Leaf	Ethanol	<i>Tuta absoluta</i>	Gelechiidae
<i>Piper mikanianum</i>	Brito et al. 2015	Leaf	Ethanol	<i>Tuta absoluta</i>	Gelechiidae
<i>Plantago psyllium</i>	Zaitoun 2007	Seed	Ethanol	<i>Galleria mellonella</i>	Pyralidae
<i>Pulicaria incisa</i>	Soliman et al. 2012	Aerial part	Chloroform	<i>Phthorimaea operculella</i>	Gelechiidae
<i>Rhododendron micranthum</i>	Zhong et al. 2001	Flower	Ethyl acetate	<i>Pieris rapae</i>	Pieridae
<i>Rhododendron ponticum</i>	Er et al. 2009	Whole plant	Acetone	<i>Thaumetopoea solitaria</i>	Thaumetopoeidae
<i>Ricinus communis</i>	Lopez et al. 2010	Leaf	Hexane	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Noctuidae
<i>Sapindus mukorossi</i>	Eddaya et al. 2013	Fruit	Water	<i>Thysanoplusia orichalcea</i>	Noctuidae
<i>Tagetes erecta</i>	Sanchez et al. 2012	Leaf	Ethanol	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Noctuidae

표 4. The 28 different plant extracts used for the bioassay

Plants	Extracted part	Reference	Korean name
<u>Amaranthaceae</u>			
<i>Gomphrena globosa</i>	Whole plant	Dadang et al. 2001	천일홍
<u>Amaryllidaceae</u>			
<i>Allium cepa</i>	Whole plant	Ghanim et al. 2014	양파
<i>Allium sativum</i>	Whole plant	Ghanim et al. 2014	마늘
<i>Artemisia annua</i>	Leaf	Hashemina et al. 2003	개똥쑥
<u>Apocynaceae</u>			
<i>Nerium indicum</i>	Leaf	Dhanapakiam et al. 1995	협죽도
<u>Asteraceae</u>			
<i>Chrysanthemum boreale</i>	Whole plant	Haouas et al. 2010	산국
<i>Chrysanthemum coronarium</i>	Whole plant	Haouas et al. 2010	쑥갓
<i>Chrysanthemum indicum</i>	Whole plant	Haouas et al. 2010	감국
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Whole plant	Beninger et al. 2003	국화
<i>Tagetes erecta</i>	Whole plant	Sanchez et al. 2012	천수국
<u>Cannabaceae</u>			
<i>Humulus japonicas</i>	Leaf-stem	Er et al. 2009	환삼덩굴
<u>Cleomaceae</u>			
<i>Cleome spinosa</i>	Aerial part	Soliman et al. 2012	풍접초
<u>Cucurbitaceae</u>			
<i>Citrulus vulgaris</i>	Whole plant	Prabakar et al. 2003	수박
<i>Momordica charantia</i>	Whole plant	Alves et al. 2011	여주
<u>Ericaceae</u>			
<i>Rhododendron micranthum</i>	Leaf-stem	Zhong et al. 2001	포리진달래
<u>Euphorbeaceae</u>			
<i>Ricinus communis</i>	Leaf	Lopez et al. 2010	피마자
<u>Ginkgoaceae</u>			
<i>Ginkgo biloba</i>	Leaf-stem	So et al. 2012	은행나무
<u>Piperaceae</u>			
<i>Piper Kadzura</i>	Leaf	Brito et al. 2015	후추등
<u>Plantaginaceae</u>			
<i>Plantago lanceolata</i>	Whole plant	Alves et al. 2011	창질경이
<u>Poaceae</u>			
<i>Cymbopogon tortilis</i>	Whole plant	Komla et al. 2006	개솔새
<u>Ranunculaceae</u>			
<i>Delphinium maackianum</i>	Whole plant	Karakoc et al. 2013	큰제비고깔
<u>Rhamnaceae</u>			
<i>Hovenia dulcis</i>	Stem-bark	Pessoa et al. 2014	헛개나무
<u>Rutaceae</u>			
<i>Citrus unshiu</i>	Leaf-stem	Bouzouina et al. 2012	귤(궁천조생)
<i>Zanthoxylum piperitum</i>	Leaf	Brito et al. 2015	초피나무
<u>Sapindaceae</u>			
<i>Sapindus mukorossi</i>	Leaf-stem	Eddaya et al. 2013	무환자나무
<u>Solanaceae</u>			
<i>Capsicum annum</i>	Leaf-stem	Jarnet et al. 2001	고추
<i>Datura metel</i>	Aerial part	Panneerselvam et al. 2013	흰독말풀
<i>Nicotiana tabacum</i>	Leaf-stem	Blankson et al. 2013	담배

- 6종의 곤충병원성 미생물 확보하고(그림 6) SDA(Sabouraud Dextrose Agar)배지를 이용해서 배양한 다음 복숭아순나방에 대해 생물 검정.
- 포자를 Triton X-100에 희석해서 1×10^8 conidia/ml 현탁액을 Scintillation Vial 검정 방법으로 각 30개체의 1영충(부화 후 5시간 이전)에 대해 생물 검정 실시.

- 약제 처리 후 매 4시간 마다 살충률을 조사하고 사체는 따로 분리하여 포자 형성 유무를 기록. 보정된 반수 치사시간(LT₅₀)으로 probit 분석 실시.



그림 6. The 6 different entomopathogenic fungi used for the bioassay.

다. 결과

- Scintillation Vial 검정법을 이용한 복숭아순나방 1령충에 대한 생물검정 분석 결과 담배(*Nicotiana tabacum*), 마늘(*Allium sativum*), 초피나무(*Zanthoxylum piperitum*), 무환자나무(*Sapindus mukorossi*) 순으로 반수 치사시간(LT₅₀)이 짧았음(표 5, 그림 7).

5. Analysis result of LT_{50} of *G. molesta* larvae by 28 different plant extracts

Treatment	LT_{50}	95% confidence interval	Slope±SE	$\chi^2(df)$
Lamda cyhalothrin	5.32a	4.92-5.72	6.21±0.58	2.35
<i>Nicotiana tabacum</i>	12.92b	11.57-14.14	9.07±1.09	9.99(4)
<i>Zanthoxylum piperitum</i>	16.09bcd	14.07-18.15	8.57±1.40	17.02(4)
<i>Allium sativum</i>	15.57c	15.03-16.09	11.16±0.88	4.02(4)
<i>Sapindus mukorossi</i>	17.48d	16.32-18.62	9.74±0.98	10.04(5)
<i>Cleome spinosa</i>	21.50de	16.50-35.96	12.04±4.16	103.07(5)
<i>Chrysanthemum boreale</i>	23.17de	16.79-32.93	18.71±6.76	94.56(5)
<i>Cymbopogon tortilis</i>	19.07de	17.08-21.21	7.94±1.19	20.49(5)
<i>Tagetes erecta</i>	17.95de	17.29-18.59	8.91±0.64	8.24(5)
<i>Chrysanthemum coronarium</i>	22.25de	17.38-34.55	8.92±2.84	80.31(5)
<i>Gomphrena globosa</i>	19.50de	17.61-21.47	10.14±1.61	23.04(5)
<i>Allium cepa</i>	18.52de	17.94-19.09	11.30±0.83	5.51(5)
<i>Citrus vulgaris</i>	18.70de	18.12-19.26	14.91±1.15	6.52(5)
<i>Ginkgo biloba</i>	19.78de	18.19-21.37	11.59±1.65	18.63(5)
<i>Capsicum annum</i>	19.09de	18.49-19.69	10.87±0.80	8.16(5)
<i>Ricinus communis</i>	19.36de	18.61-20.09	7.50±0.50	8.66(6)
<i>Momordica charantia</i>	20.55e	18.86-22.31	11.76±1.84	20.45(5)
<i>Chrysanthemum indicum</i>	21.87e	19.05-25.61	10.72±2.52	42.42(5)
<i>Piper Kadzura</i>	21.35e	19.87-22.91	13.38±1.98	17.72(5)
<i>Delphinium maackianum</i>	21.69e	20.15-23.28	9.16±1.07	17.54(6)
<i>Datura metel</i>	22.77e	20.29-25.93	13.98±3.27	41.16(5)
<i>Artemisia annua</i>	22.67e	20.31-25.25	9.42±1.64	37.51(6)
<i>Plantago lanceolata</i>	20.90e	20.36-21.44	14.56±1.15	6.25(5)
<i>Citrus unshiu</i>	22.86e	21.39-24.36	12.84±1.72	21.27(6)
<i>Hovenia dulcis</i>	24.02e	22.09-26.08	12.30±2.03	31.59(6)
<i>Humulus japonicus</i>	24.48e	22.91-26.28	27.58±6.45	29.28(5)
<i>Nerium indicum</i>	24.15e	23.61-24.69	16.47±1.28	4.80(6)
<i>Rhododendron micranthum</i>	-	-	-	-
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	-	-	-	-

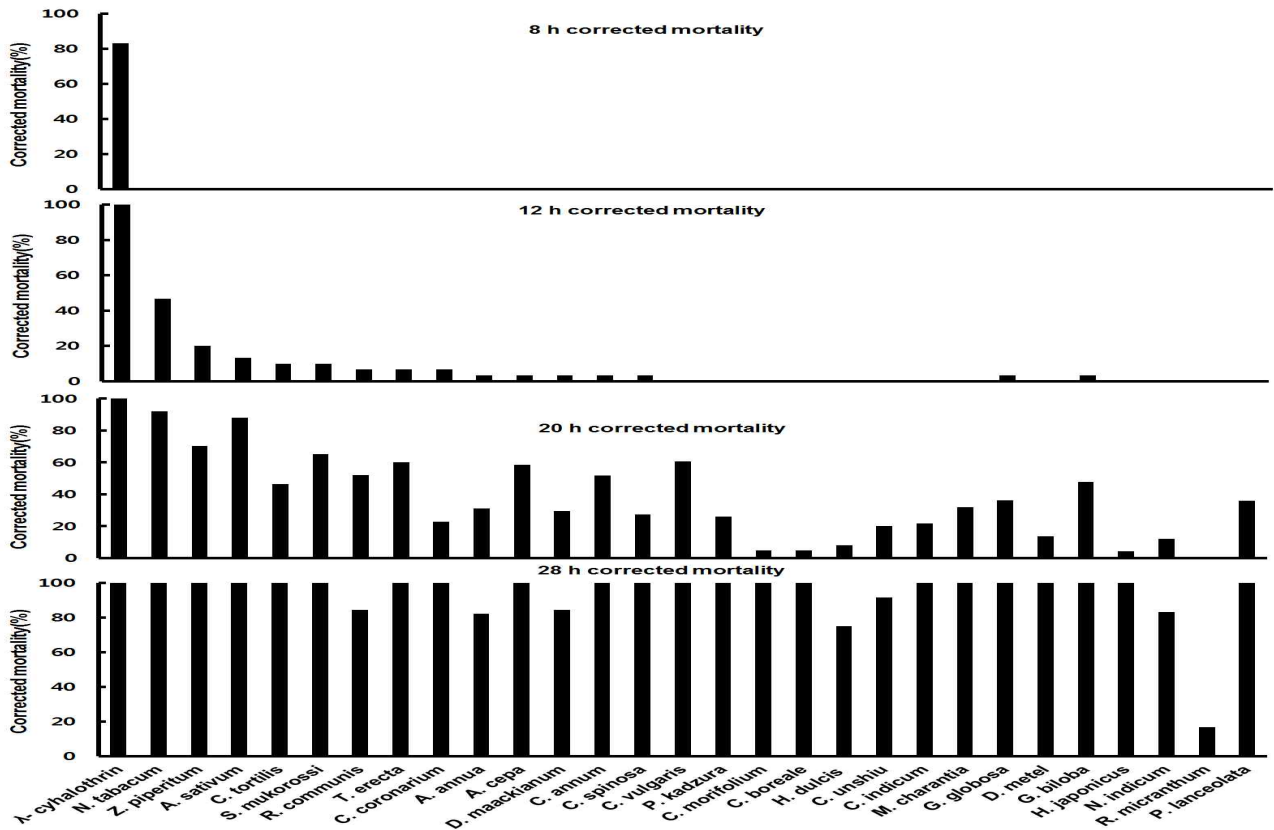


그림 7. Corrected mortality of *G. molesta* larvae by 28 different plant extracts.

- 곤충병원성 미생물에서는 살충력이 가장 빠르게 나타난 *Beauveria bassiana* ARP14 와 감염율이 가장 높게 나타난 *Beauveria bassiana* F2F-133가 복숭아순나방에 대한 방제제로 가능성을 보였음(그림 8, 표 6, 표 7).

표 6. Analysis result of LT_{50} of *G. molesta* larvae by 6 different entomopathogenic fungi

Treatments	LT_{50}	95% confidence interval	Slope±SE	$\chi^2(df)$
<i>Beauveria bassiana</i> ARP14	9.75a	7.63-11.47	7.08±1.10	10.88(3)
<i>Beauveria bassiana</i> GHA	12.70ab	8.67-17.34	6.54±1.53	23.27(3)
<i>Beauveria bassiana</i> F2F-133	12.63ab	9.41-16.09	7.37±1.55	20.12(3)
<i>Metarhizium robertsii</i> F2F-188	13.03ab	10.78-15.35	8.33±1.42	13.24(3)
<i>Metarhizium brunneum</i> F2F-151	-	-	-	-
<i>Isaria farinosa</i> F2F-153	13.71ab	7.86-23.51	7.59±2.12	34.42(3)

표 7. Infection rate of *G. molesta* larvae by 6 different entomopathogenic fungi.

Treatments	Infection rate(%)±SE
<i>Beauveria bassiana</i> ARP14	70.00±4.47B
<i>Beauveria bassiana</i> GHA	66.67±6.67B
<i>Beauveria bassiana</i> F2F-133	90.00±6.83A
<i>Metarhizium robertsii</i> F2F-188	6.67±6.15AB
<i>Metarhizium bruneum</i> F2F-151	In progress
<i>Isaria farinosa</i> F2F-153	In progress

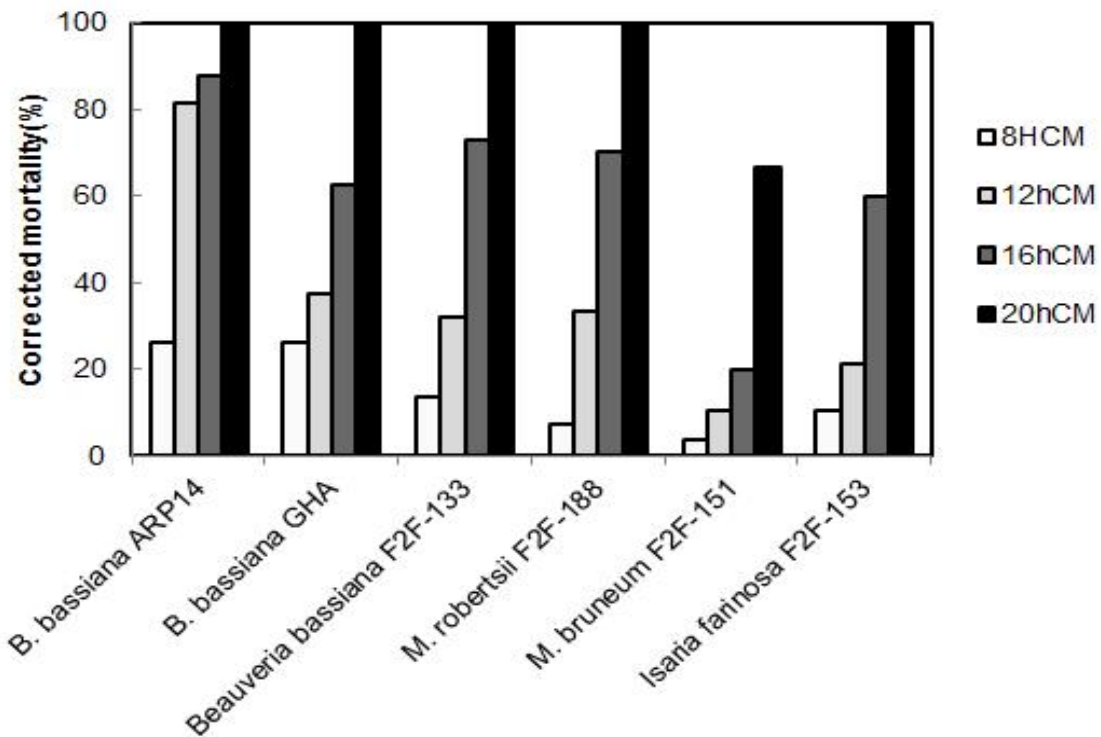


그림 8. Mortality of *G. molesta* larvae by 6 different entomopathogenic fungi.

- 이들 중 *Beauveria bassiana* ARP14를 국제특허용 균주로 한국생명공학연구원에 기탁(KCTC12979BP)하고 국내특허출원(10-2016-0023361)함(그림 9). 2017년 11월 27일 특허등록됨(10-1804038).

라. 결론

- 식물 추출물에서는 담배(*Nicotiana tabacum*), 초피나무(*Zanthoxylum piperitum*), 마늘(*Allium sativum*), 무환자나무(*Sapindus mukorossi*)를 우수 소재로 선발함.
- 곤충병원성 미생물에서는 2종류의 백강균(*Beauveria bassiana* ARP14)를 우수 소재로 선발함.

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1

TO : **Lim, Un Taek**

Andong National University

1375, Gyeongdong-ro, Andong-si, Gyeongsangbuk-do 26729

Republic of Korea

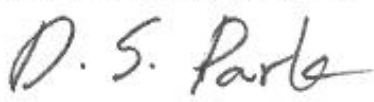
I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Beauveria bassiana</i> ARP14	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCTC 12979BP
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: [<input checked="" type="checkbox"/>] a scientific description [<input type="checkbox"/>] a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on February 18, 2016 .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on _____ and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Korean Collection for Type Cultures Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) 125 Gwahak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-806 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority of authorized official(s):  PARK, Doo Sang, Director Date: February 22 2016

그림 9. Certificate of deposit of *Beauveria bassiana* ARP14 in KRIBB.

제 3절 천연생리활성 소재 후보군을 이용한 온실 내 복숭아순나방 살충성 약효 및 약해 검증

1. 천연생리활성 소재 후보군을 이용한 온실 내 복숭아순나방 살충성 약효 및 약해 검증 가. 연구목적

- 1차 년도에 선발된 담배(*Nicotiana tabacum*), 초피나무(*Zanthoxylum piperitum*), 마늘(*Allium sativum*), 무환자나무(*Sapindus mukorossi*)를 대상으로 하우스에서 복숭아 유목을 이용해서 살충력과 약해 조사

나. 재료 및 방법

- 온실내 포트에 심은 복숭아나무에서 새순 형성 부위에 근접한 잎 뒷면에 알을 설치 후(그림 10, 그림 11) 부화한 유충에 의해 침투당한 새순의 비율 조사. 총 25회 반복 함.



그림 10. Peach trees in greenhouse used for the evaluation of the plant extracts.



그림 11. Greenhouse evaluation of plant extract. Eggs of *Grapholita molesta* were attached bottom of the leaf (left). Twig with penetration mark by the 1st instar larvae hatched from the eggs(right).

다. 결과

- 온실 내 복숭아순나방 1령 충에 대한 시험에서 알의 부화율에서는 처리별 차이가 없었지만 새순을 가해한 비율은 Lamda-cyhalothrin과 담배 추출물 처리구에서 낮았음. 마늘 추출물 처리구에서도 대조구에 비해 통계적으로 유의하게 낮은 가해율을 보였음(표 8).
- 온실 내 약해 검증에서 모든 추출물에 대해 약해를 발견하지 못함.

표 8. Evaluation of plant extract spray on infestation by *Grapholita molesta* in peach twigs in greenhouse

Treatment	Concentration	Hatchability (%)	Infestation rate
λ -cyhalothrin	6.7 ml/20 litre	88.0	0.09 (2/22)d
<i>Nicotiana tabacum</i>	2 mg/ml	88.0	0.27 (6/22)cd
<i>Allium Sativum</i>	2 mg/ml	84.0	0.38 (8/21)bdc
<i>Zanthoxylum piperitum</i>	2 mg/ml	88.0	0.45 (10/22)abcd
<i>Sapindus mukorssi</i>	2 mg/ml	84.0	0.67 (14/21)abc
Control	99% methanol	88.0	0.82 (18/22)a

라. 결론

- 1차 년도 실내 검증에서와 같이 식물추출물에서는 담배가 가장 효과적인 것으로 보임.

2. 1차년에 선발된 후보소재를 복숭아순나방 성충에 대해 추가 실내 검증

가. 연구목적

- 1차년에 복숭아순나방 1령충에 대해서 선발된 식물추출물 중 담배와 마늘 추출물의 복숭아순나방 성충에 대한 살충력을 Scintillation Vial 검정법을 이용하여 시험. 암컷 성충과 수컷 성충 30개체에 대해 시험

나. 재료 및 방법

- 1차년에 복숭아순나방 1령충에 대해서 선발된 곤충병원성곰팡이 중 *Beauveria bassiana* (ARP 14)을 복숭아순나방 성충에 대한 살충력과 감염률을 비교. 암컷 성충과 수컷 성충 30개체에 대해 시험

다. 결과

- 1차년에 선발된 약제 중 담배와 마늘 추출물이 성충에 효과적이었음(그림 12, 그림 13, 표 9, 표 10).
- 1차년에 선발된 곤충병원성곰팡이 중 *Beauveria bassiana* (ARP 14)을 복숭아순나방 성충에 대한 살충력을 비교한 결과 유충에 비해 감염률은 낮았음(그림 14, 표 10).
- *Beauveria bassiana* (ARP 14)의 복숭아순나방 성충에 대한 LT_{50} 는 암컷보다 수컷에서 더 낮았으나 감염률에서는 유의한 차이가 없었음(그림 15, 그림 16).

라. 결론

- 복숭아순나방 성충에 대해서는 담배와 마늘 추출물이 효과적이었으며, 곤충병원성곰팡이 *Beauveria bassiana* (ARP 14)는 성충에 대한 살충력이 유충에 비해 낮았음.

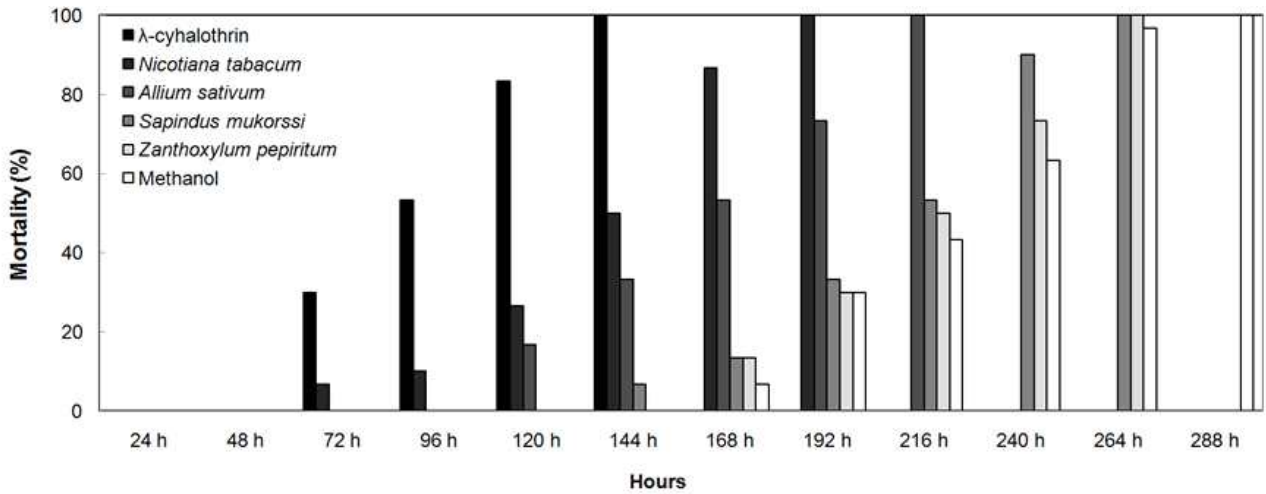


그림 12. Toxicity of plant extracts on adult female *Grapholita molesta*.

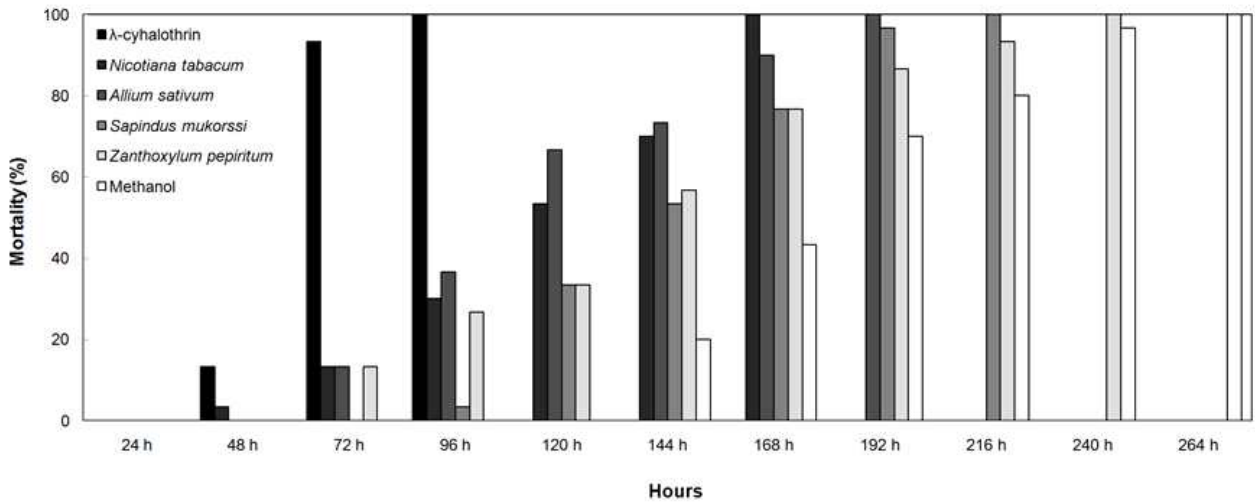


그림 13. Toxicity of plant extracts on adult male *Grapholita molesta*.

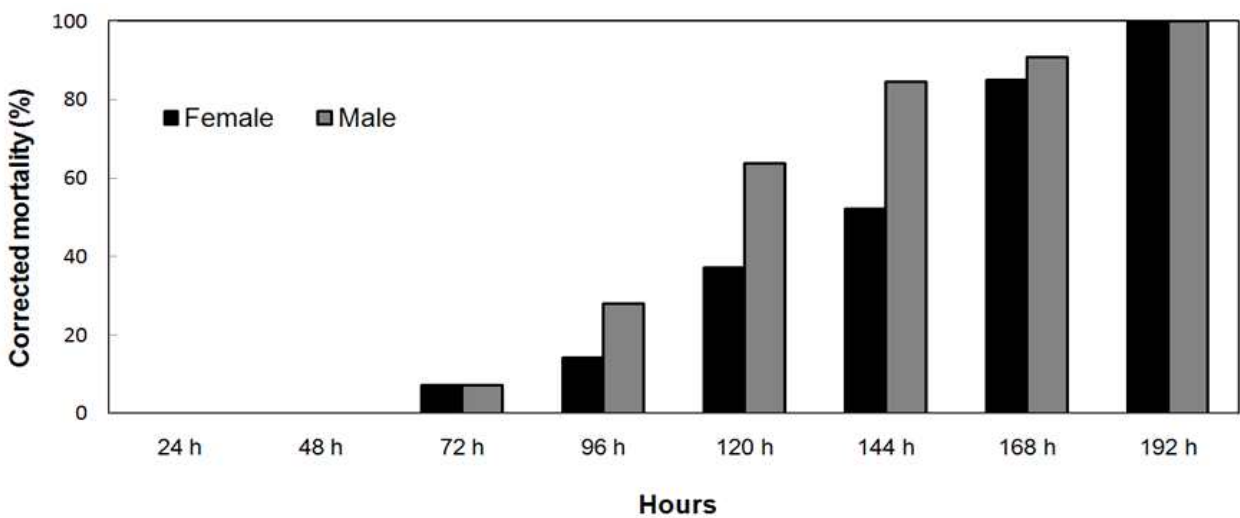


그림 14. Corrected mortality (%) of adult female and male of *Grapholita molesta* by *Beauveria bassiana*(ARP 14).

표 9. Statistical comparison of methanolic plant extracts (2 mg/ml) against the male adult of *Grapholita molesta* by glass scintillation vial assay (n = 30)

Treatment	LT50	95% C.I.	Slope ± SE	χ^2 (df)
Lamda cyhahothrin	57.013a	54.92 - 59.21	14.90 ± 1.39	0.04(2)
<i>Allium sativum</i>	110.35b	99.29 - 121.19	6.38 ± 0.75	19.12(6)
<i>Nicotiana tabacum</i>	114.47b	94.82 - 138.44	6.84 ± 1.45	41.601(5)
<i>Sapindus mukorossi</i>	146.88bc	135.35 - 158.37	10.01 ± 1.43	31.49(7)
<i>Zanthoxylum piperitum</i>	147.55bcd	128.10 - 170.85	4.27 ± 0.64	41.52(8)

CI, Confidence interval; Based on corrected mortality

표 10. Statistical comparison of the toxicity of *Beauveria bassiana* (ARP 14) against the adult female and male of *Grapholita molesta* by glass scintillation vial assay (n =30)

Adult	Concentration	LT ₅₀	95% C.I.	Slope ± SE	χ^2 (df)
Female	1×10 ⁸	128.01 a	115.23 - 141.68	7.95 ± 1.17	28.29 (6)
Male	1×10 ⁸	110.20 b	106.15 - 114.17	8.53 ± 0.06	4.70 (6)

C.I. Confidence interval based on corrected mortality



그림 15. Infection of adult female (left) and male (right) of *Grapholita molesta* by *Beauveria bassiana* (ARP 14) after 14 days of exposure.

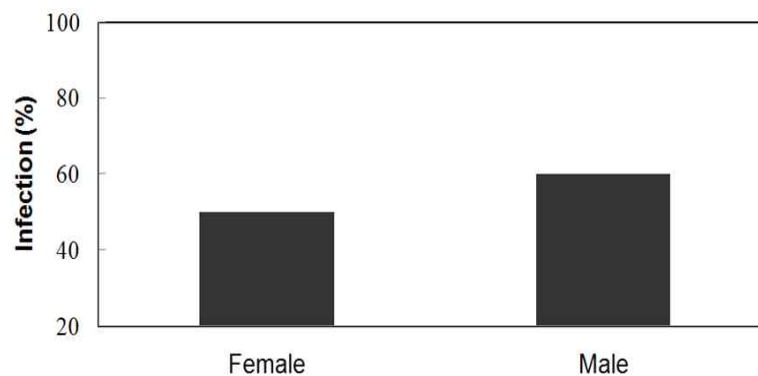


그림 16. Fungal infection rate after 14 days on adult female and male of *Grapholita molesta*.

제 4절 복숭아순나방에 대한 고살충성 소재 선발

1. 선발된 약제들의 조합 검정

가. 연구목적

- 선발된 천연활성물질의 조합에 따른 살충력 증가 효과의 유무 검증

나. 재료 및 방법

- 1차년도에 선발된 담배(*Nicotiana tabacum*), 초피나무(*Zanthoxylum piperitum*), 마늘(*Allium sativum*), 무환자나무(*Sapindus mukorossi*)의 두 가지 약제 조합의 살충력을 검증
- 제 2절에서 기술된 Scintillation Vial 검정법을 이용해 복숭아순나방 1령충(n = 30)과 성충(암 수 각각 n = 30)을 대상으로 검증

다. 결과

- 1차년에 선발된 약제들의 조합 검정결과 담배와 초피나무 혼합추출물이 유충에 가장 효과적이었음(그림 17, 표 11).

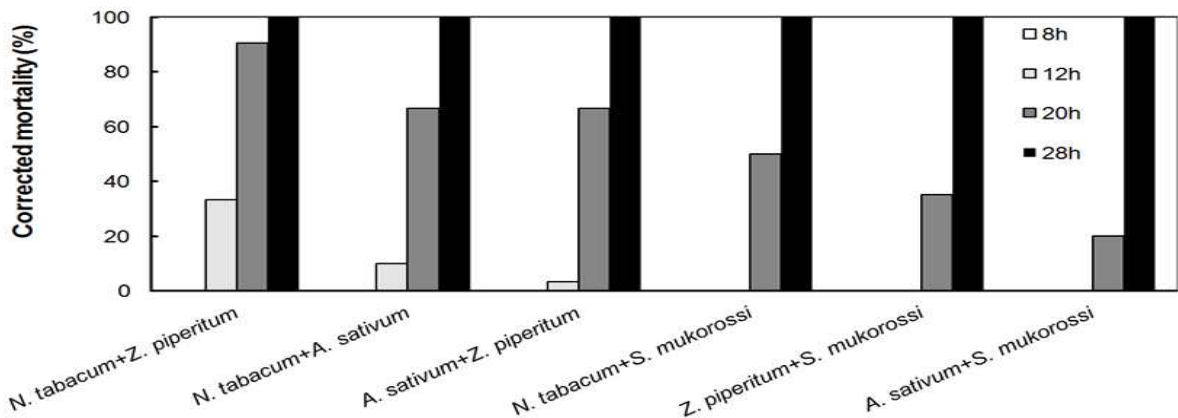


그림 17. Evaluation of different combinations of plant extracts against 1st instar larvae *Grapholita molesta*.

- 1차년에 선발된 약제들의 조합 검정결과 유충과는 달리 담배와 마늘 혼합추출물이 성충 암컷과 수컷 모두에게 가장 효과적이었음(그림 18, 그림 19, 표 12, 표 13).

표 11. Statistical comparison of combinations of methanolic plant extracts against the 1st instar larva of *Grapholita molesta*

Treatment	LT ₅₀	95 % C.I.	χ^2 (df)	Slope \pm SE
<i>N. tabacum</i> + <i>Z. piperitum</i>	14.27 a	12.78–15.65	11.32(4)	9.03 \pm 1.17
<i>N. tabacum</i> + <i>A. sativum</i>	18.20 b	16.52–19.90	16.26(5)	8.31 \pm 1.08
<i>A. sativum</i> + <i>Z. piperitum</i>	18.04 b	17.47–18.60	2.51(5)	11.40 \pm 0.84
<i>N. tabacum</i> + <i>S. mukorossi</i>	18.99 bc	17.83–20.10	11.38(5)	12.44 \pm 1.44
<i>A. sativum</i> + <i>S. mukorossi</i>	21.80 bcd	19.81–24.05	28.37(5)	12.95 \pm 2.45
<i>Z. piperitum</i> + <i>S. mukorossi</i>	21.65 bcd	18.56–25.79	43.92(5)	9.65 \pm 2.34

C.I. Confidence interval based on corrected mortality

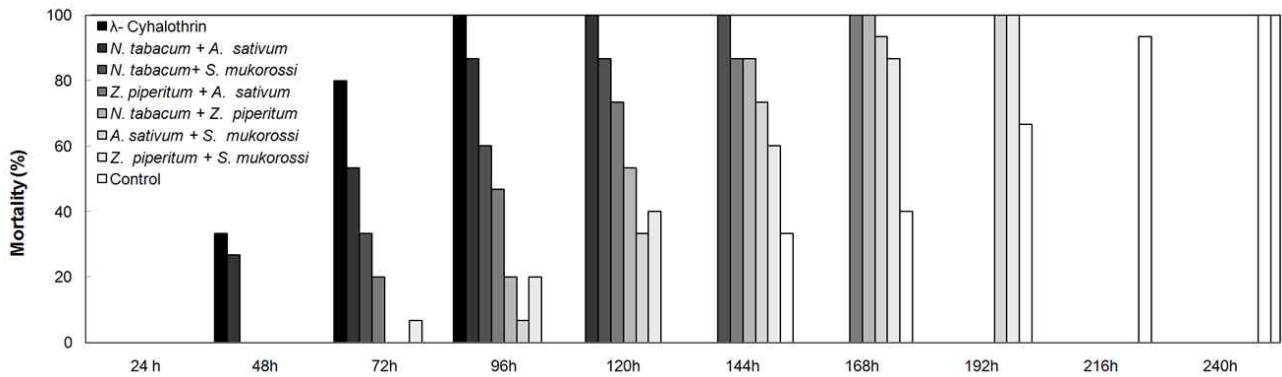


그림 18. Evaluation of different combinations of plant extracts against adult female of *Grapholita molesta*.

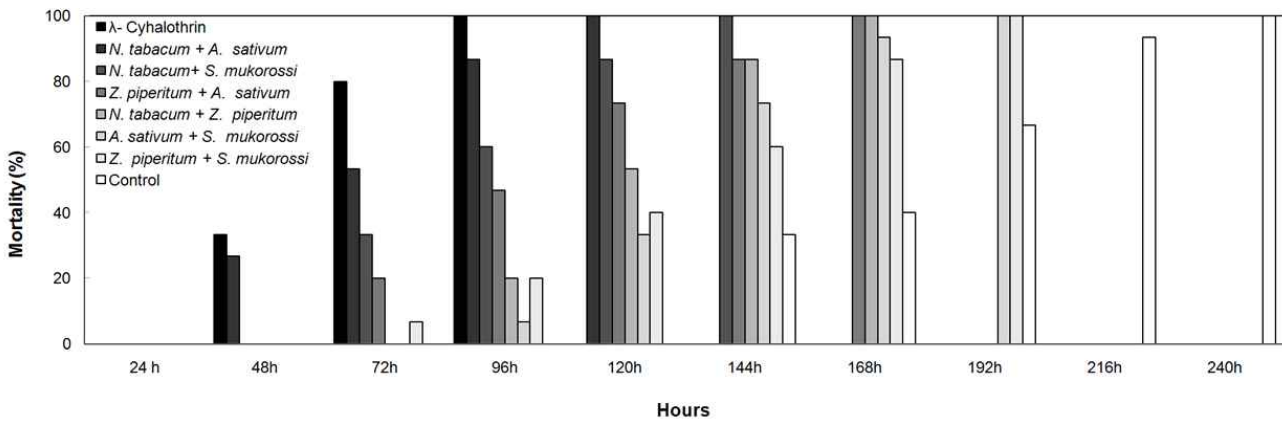


그림 19. Evaluation of different combinations of plant extracts against adult male of *Grapholita molesta*.

표 12. Statistical comparison of combinations of methanolic plant extracts against adult female of *Grapholita molesta*

Treatment	LT ₅₀	95% CI	Slope ± SE	χ ² (df)
λ- Cyhalothrin	88.19 a	78.60-96.94	10.03 ± 2.03	0.70(4)
<i>N. tabacum</i> + <i>A. sativum</i>	103.51 ab	90.76-115.62	6.31 ± 1.06	1.86(6)
<i>N. tabacum</i> + <i>S. mukorossi</i>	129.64 c	119.45-139.37	11.98 ± 2.18	0.77(6)
<i>Z. piperitum</i> + <i>A. sativum</i>	141.54 cd	130.90-151.91	11.49 ± 1.93	1.70(7)
<i>N. tabacum</i> + <i>Z. piperitum</i>	166.31 e	154.68-178.12	10.96 ± 1.80	3.31(8)
<i>A. sativum</i> + <i>S. mukorossi</i>	181.04 ef	168.29-194.32	9.78 ± 1.50	5.88(9)
<i>Z. piperitum</i> + <i>S. mukorossi</i>	233.14 h	221.86-245.41	16.04 ± 2.72	6.21(10)
Control	198.41 fg	186.86-209.40	13.80 ± 2.17	1.20(10)

표 13. Statistical comparison of combinations of methanolic plant extracts against adult male of *Grapholita molesta*

Treatment	LT ₅₀	95% CI	Slope ± SE	χ ² (df)
λ- Cyhalothrin	54.86 a	45.81-62.39	8.62 ± 2.18	0.57(2)
<i>N. tabacum</i> + <i>A. sativum</i>	63.99 ab	53.75-73.33	6.61 ± 1.39	1.60(3)
<i>A. sativum</i> + <i>S. mukorossi</i>	85.86 c	75.77-95.19	8.65 ± 1.71	1.51(4)
<i>N. tabacum</i> + <i>Z. piperitum</i>	97.44 cd	86.25-108.03	7.69 ± 1.39	1.18(5)
<i>N. tabacum</i> + <i>S. mukorossi</i>	115.5 de	106.04-124.55	12.57 ± 2.50	0.81(5)
<i>Z. piperitum</i> + <i>A. sativum</i>	123.74 ef	111.74-136.11	7.90 ± 1.37	2.60(6)
<i>Z. piperitum</i> + <i>S. mukorossi</i>	128.19 efg	118.53-137.44	13.07 ± 2.42	0.30(6)
Control	169.08 h	158.02-179.94	12.64 ± 2.17	4.14(8)

라. 결론

- 1차년에 선발된 약제들의 조합 검정결과 담배와 초피나무 혼합추출물이 유충에 가장 효과적이었고 성충에게는 담배와 마늘 혼합추출물이 가장 효과적임.

2. 임의로 선택된 다른 추출물 추가 스크리닝 및 검정

가. 연구목적

- 기존에 알려지지 않은 식물추출물의 복숭아순나방에 대한 활성을 검증을 통한 신규 소재 개발

나. 재료 및 방법

- 1차년에 선발된 약제들 외 추가적으로 임의로 선택한 4가지 식물추출물(*Alnus japonica* 오리나무, *Arisaema takeshimense* 성인봉천남성/섬남성, *Xylosma congestum* 산유자나무, *Acer takeshimense* 섬단풍나무)에 대한 검증을 실행
- 제 2절에서 기술된 Scintillation Vial 검정법을 이용해서 30개체의 복숭아순나방 1령 충에 대해 실시

다. 결과

- 1차년에 선발된 약제들 외 추가적으로 임의로 선택한 4가지 식물추출물(*Alnus japonica* 오리나무, *Arisaema takeshimense* 성인봉천남성/섬남성, *Xylosma congestum* 산유자나무, *Acer takeshimense* 섬단풍나무)에 대한 검증을 실행한 결과 오리나무 추출물이 가장 효과적이었으나 1년차에 선발된 4종의 추출물에 비해서는 모두 보정 살충력이 낮았다(그림 20, 표 14).

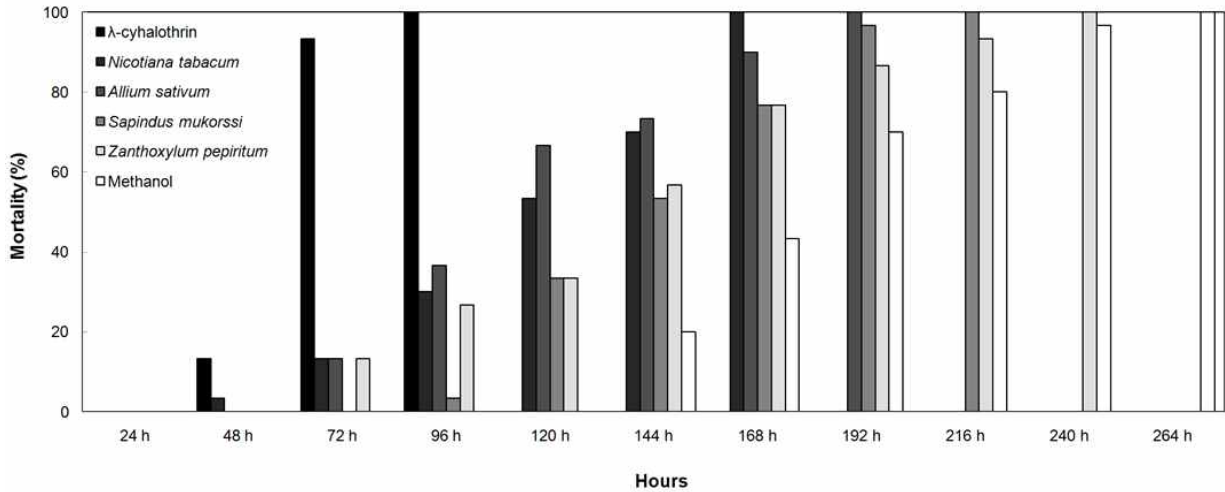


그림 20. Toxicity of randomly selected plant extracts on 1st instar larva of *Grapholita molesta*.

표 14. Statistical comparison of randomly selected methanolic plant extracts against the 1st instar larva of *Grapholita molesta* by glass scintillation vial assay (n = 30)

Treatment	LT ₅₀	95% C.I.	Slope ± SE	χ^2 (df)
<i>Alnus japonica</i> (오리나무)	19.09a	17.53 - 20.71	8.73 ± 1.09	14.41 (5)
<i>Arisaema takeshimense</i> (성인봉천남성/섬남성)	21.51ab	17.56 - 27.97	9.16 ± 2.52	64.14 (5)
<i>Xylosma congestum</i> (산유자나무)	23.09ab	20.87 - 25.61	8.68 ± 1.39	30.74 (6)
<i>Acer takeshimense</i> (섬단풍나무)	25.02ab	23.65 - 26.45	13.93 ± 1.88	18.30 (6)

C.I. Confidence interval based on corrected mortality

라. 결론

- 오리나무 추출물이 가장 효과적이었으나 1년차에 선발된 4종의 추출물에 비해서는 보정 살충력이 낮아 신규소재로 개발될 가능성 적음.

제 5절 선발된 소재의 노린재 살충효과 추가 실내 검증 및 복숭아 순나방 방제전략 수립

1. 선발된 소재의 노린재 살충효과 검증

가. 연구목적

- 1차년도에 선발된 식물추출물 중 담배(*Nicotiana tabacum*), 마늘(*Allium sativum*)을 톱다리개미허리노린재에 대해서 약효 검증

나. 재료 및 방법

- 생물 검증에 사용된 톱다리개미허리노린재의 생활 단계는 2령 약충과 4령 약충, 암컷 성충이었음.
- 실험실에서 Scintillation Vial 검정법을 이용해서 각 생육 단계에 대해 30개체 반복 시험

다. 결과

- 1차 년도에 선발된 식물추출물 중 담배와 마늘이 비교적 살충 효과가 우수했으며, 특히 담배는 4령 약충 톱다리개미허리노린재에 대해서 마늘 추출액 보다 우수하였음(그림 21, 그림 22, 그림 23, 표 15, 표 16, 표 17).
- 하지만, 담배와 마늘의 혼합추출물은 상대적으로 살충효과가 높지 않았음.

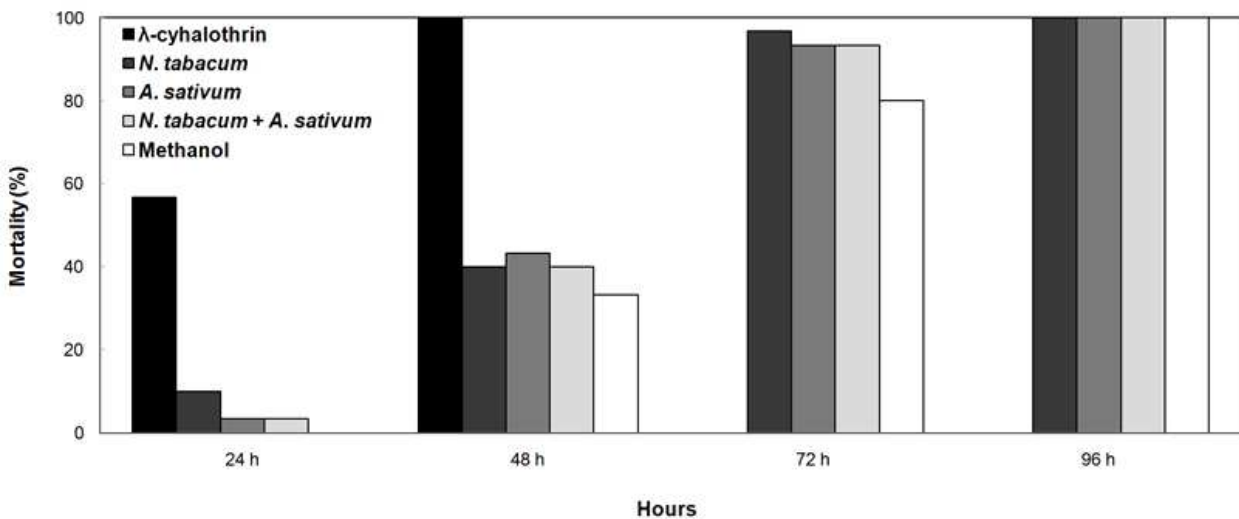


그림 21. Toxicity of plant extracts on 2nd instar nymph of *Riptortus pedestris*.

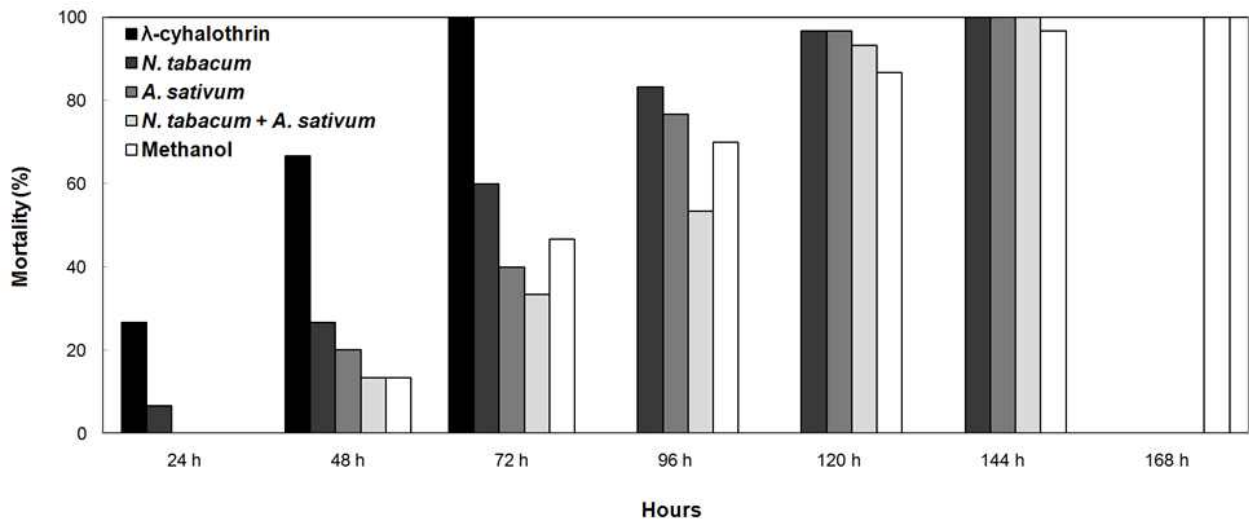


그림 22. Toxicity of plant extracts on 4th instar nymph of *Riptortus pedestris*.

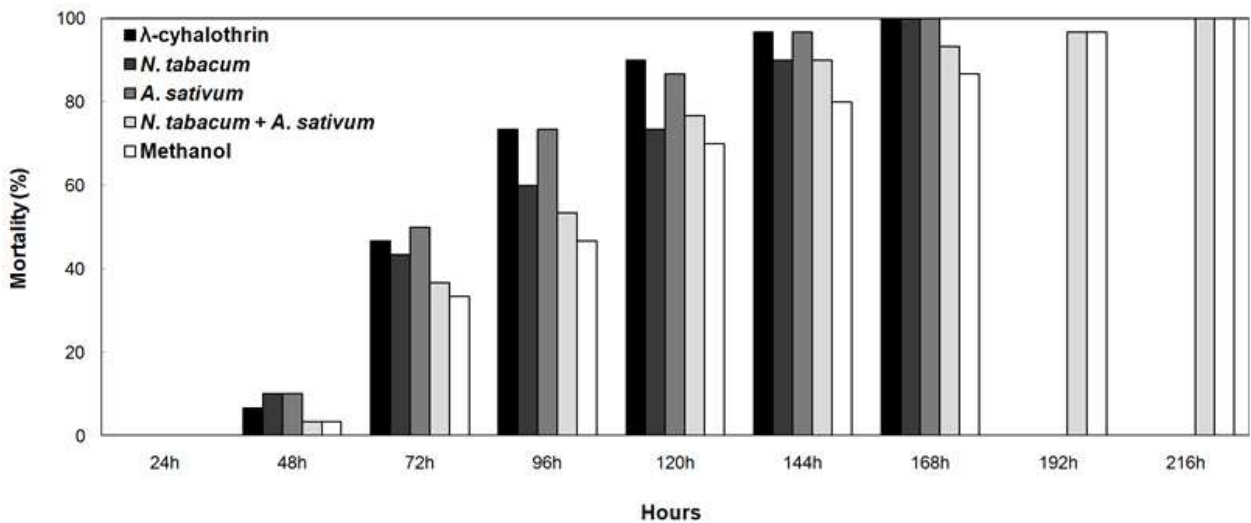


그림 23. Toxicity of plant extracts on adult female of *Riptortus pedestris*.

표 15. Statistical comparison of tested methanolic plant extracts against 2nd instar nymph of *Riptortus pedestris* by glass scintillation vial assay (n = 30)

Treatment	LT ₅₀	95% CI	Slope \pm S.E.	χ^2 (df)
λ -cyhalothrin	19.51 a	17.81 - 21.16	5.10 \pm 0.50	5.31 (9)
<i>N. tabacum</i>	45.81 b	43.40 - 48.34	5.87 \pm 0.47	24.55 (17)
<i>A. sativum</i>	48.40 bc	46.21 - 50.60	7.17 \pm 0.54	11.95 (19)
<i>N. tabacum</i> + <i>A. sativum</i>	48.18 bc	44.95 - 51.50	7.93 \pm 0.90	34.15 (17)
Methanol	56.02 d	53.57 - 58.46	6.87 \pm 0.49	5.51 (22)

표 16. Statistical comparison of tested methanolic plant extracts against 4th instar nymph of *Riptortus pedestris* by glass scintillation vial assay (n = 30)

Treatment	LT 50	95% CI	Slope ± SE	χ^2 (df)
λ -cyhalothrin	36.30 a	34.00 - 38.56	5.25 ± 0.43	11.61 (16)
<i>N. tabacum</i>	59.04 b	55.96 - 62.12	4.67 ± 0.28	19.59 (29)
<i>A. sativum</i>	67.92 c	65.12 - 70.71	6.30 ± 0.39	5.98 (29)
<i>N. tabacum</i> + <i>A. sativum</i>	81.14 de	78.08 - 84.29	6.42 ± 0.40	31.86 (31)
Methanol	75.49 d	72.53 - 78.38	6.25 ± 0.33	9.31 (39)

표 17. Statistical comparison of tested methanolic plant extracts against adult female of *Riptortus pedestris* by glass scintillation vial assay (n = 30)

Treatment	LT50	95% CI	Slope ± SE	χ^2 (df)
λ -cyhalothrin	74.69 a	71.83 - 77.51	6.55 ± 0.36	21.41(35)
<i>N. tabacum</i>	82.83 bc	79.39 - 86.26	5.27 ± 0.29	15.95(38)
<i>A. sativum</i>	77.55 ab	74.58 - 80.45	6.41 ± 0.35	10.04(37)
<i>N. tabacum</i> + <i>A. sativum</i>	91.18 d	87.93 - 94.37	6.24 ± 0.30	10.57(47)
Methanol	98.27 e	94.56 - 101.94	5.33 ± 0.26	17.55(48)

라. 결론

- 톱다리개미허리노린재에 대한 살충활성은 담배와 마늘이 유사하였다, 다만 4령 약충에 대해서는 담배가 마늘 추출액 보다 살충효과가 우수하였음. 담배와 마늘의 혼합 추출물은 상대적으로 살충효과가 높지 않았음.

2. 과원의 복숭아순나방 발생 조사를 통한 방제전략 수립

가. 연구목적

- 복숭아순나방과 천적의 발생 패턴 조사를 통한 복숭아순나방의 방제 적기 규명

나. 재료 및 방법

- 자두과원에서 매월(2016년 5월~10월, 2017년 5월; 그림 24) 복숭아순나방의 발생 및 피해 조사



그림 24. Assessment of occurrence of and its fruit damage in a orchard at Namhoo, Andong.

다. 결과

- 자두과원에서 조사 결과 6월을 제외한 대부분의 달에서 자두나무 순에서 복숭아순나방 발생이 많았음.
- 복숭아순나방붙이는 5월에서만 소수의 수컷 성충이 발견되어 복숭아순나방이 우점하였음.
- 천적에 의한 기생률은 2016년에는 5월 말에 96.4%로 가장 높았고(표 18), 2017년에는 6월 중순경에 78.8%로 가장 높았음(표 19).

표 18. Collection of plum twigs or fruits infested with oriental fruit moth and their parasitoids in 2016 (Gd, 복숭아순나방붙이; Gm 복숭아순나방)

Sampling date	No. of infested twigs collected	No. of infested fruits collected	No. of Pupae collected	No. of adults emerged	No. of male Gd	No. of male Gm	No. of females	No. of parasitized pupae	Parasitism rate (%)
12-May-2016	21	0	14	11	1	4	6	5	26.3
25-May-2016	28	0	0	0	0	0	0	27	96.4
18-Jun-2016	2	159	38	36	6	6	24	0	0.0
07-Jul-2016	24	0	9	7	0	5	2	12	57.1
26-Jul-2016	92	0	23	12	0	5	7	30	56.6
24-Aug-2016	55	0	48	27	0	14	13	5	0.1
28-Sep-2016	162	0	32	21	0	13	8	123	79.4
20-Oct-2016	8	0	2	0	0	0	0	1	50.0

표 19. Collection of plum twigs or fruits infested with oriental fruit moth and their parasitoids in 2017 (Gd, 복숭아순나방붙이; Gm 복숭아순나방)

Sampling date	No. of infested twigs collected	No. of infested fruits collected	No. of Pupae collected	No. of Gm/Gd pupae	No. of adults emerged	No. of male Gd	No. of male Gm	No. of females	No. of parasitized pupae	Parasitism rate (%)
11-May 17	16	0	4	4	3	0	3	0	1	30.0
14 June 17	0	6	3	3	2	0	2	0	0	0.0
11 July 17	24	0	9	2	0	0	0	1	7	78.8
18 Aut 17	44	0	30	11	10	0	6	4	19	63.0
13 Sept 17	55	0	25	19	14	0	9	5	6	24.0
20 Oct 17	3	0	1	1	1	0	1	0	0	0.0

라. 결론

- 자두과원에서 조사 결과 천적 발생과 과일에 침입하기 전인 5월 이전이 복숭아순나방 방제 적기임.

제 6절 천연생리활성 소재의 포장 내 복숭아순나방 살충성 약효 검증

1. 천연생리활성 소재의 실험실 혹은 하우스 내 복숭아순나방 산란기피 효과 검증

가. 연구목적

- 선발한 천연생리활성 소재의 복숭아순나방의 기피 효과 추가 검증

나. 재료 및 방법

- 원통형 실린더(25.50 H × 8.50 D cm, 그림 25)에 복숭아줄기를 물이 든 플라스크에 꽂아 두고 식물추출물 4ml을 살포한 후 건조시킴. 이 후 복숭아순나방 10마리(암컷 5마리와 수컷 5마리)를 방사한 후 실린더 벽과 복숭아잎과 줄기에 산란된 알의 수를 기록하였음.
- 직육면체형 PVC파이프로 구성된 케이지(47.0 L × 47.0 W × 115.0 L cm, 그림 26)에 복숭아화분을 넣고 신초 당 식물추출물 4ml을 살포한 후 건조시킴. 이 후 복숭아순나방 10마리(암컷 5마리와 수컷 5마리)를 방사한 후 복숭아 줄기와 잎에 산란된 알의 수를 기록하였음.



그림 25. Acrylic cylinder cage (25.50 H × 8.50 D cm) used in deterrent experiment in the laboratory.



그림 26. Pipe frame cage (47.0 L × 47.0 W × 115.0 L cm) used in deterrent experiment in greenhouse.

다. 결과

- 복숭아순나방은 대조구인 합성살충제 처리구에서 가장 적은 수의 알(2.2%)을 잎에 놓았으며, 담배추출물 처리 구에서는 그 다음으로 낮은 9.3%으로 나타나 담배추출물의 산란 기피 효과가 우수한 것으로 나타남(표 20).

표 20. Deterrent effect of plant extract (4 ml/twig) on oviposition of *G. molesta* (5 females+5 males) in laboratory

Treatment	No. of eggs on wall (%)	No. of eggs on leaves (%)
λ -cyhalothrin	261 (97.8)a	6 (2.2)a
<i>Nicotiana tabacum</i>	283 (90.7)b	29 (9.3)b
<i>N. tabacum</i> + <i>A. sativum</i>	216 (67.7)c	103 (32.3)c
<i>Allium sativum</i>	245 (65.0)c	132 (35.0)c
Methanol	205 (51.8)d	191 (48.2)d

○ 복숭아순나방은 대조구인 합성살충제 처리구에서는 줄기와 잎 모두에 산란하지 않았으며, 담배추출물 처리 구에서는 줄기의 36%와 잎의 9%에서만 산란된 알을 찾을 수 있었음. 마늘추출물 혹은 담배와 마늘혼합 추출물에 비해 산란 기피효과가 우수한 것으로 나타남(표 21).

표 21. Deterrent effect of plant extract (4 ml/twig) on oviposition of *G. molesta* (5 female+5 male) in greenhouse

Treatment	No. of twigs	No. of leaves	No. of leaves/Twig	Percent of twigs of which leaves with egg	Percent of leaves with egg	Total no. of eggs
λ -cyhalothrin	11	103	9.36	0 (0/11)a	0 (0/103)a	0
<i>Nicotiana tabacum</i>	11	94	8.56	36.4 (4/11)ab	8.5 (8/94)b	18a
<i>Allium sativum</i>	14	95	6.79	57.1 (8/14)b	15.8 (15/95)b	28a
<i>N. tabacum</i> + <i>A. sativum</i>	13	117	9.00	69.2 (9/13)b	19.7 (23/117)bc	42a
Methanol	13	93	7.15	46.2 (6/13)b	29.0 (27/93)c	184b

라. 결론

○ 실내와 하우스 모두에서 담배추출물의 산란기피효과가 가장 우수하였음.

2. 천연생리활성 소재의 실외 복숭아포장에서의 복숭아순나방 살충 효과 검증

가. 연구목적

○ 선발한 천연생리활성 소재의 실외 복숭아포장에서 약효 실증

나. 재료 및 방법

○ 시험방법으로는 7개의 소규모 1년생 복숭아 포장(24.94~104.03 m², 그림 27)을 조성하여 메탄올(50%) 담배 추출액을 처리한 것과 대조구로서 메탄올(50%)만 처리한 것과 비교함.

○ 각 시험구는 절반으로 나누어 임의적으로 받은 처리구로 나머지 절반은 대조구로 두었음. 각 처리구와 대조구는 6~8주의 복숭아 나무가 있었음. 메탄올(50%) 담배

추출액은 2 mg/ml의 농도로 주당 40 ml을 골고루 살포한 후 처리전과 처리 후 밀도를 비교함.

- 처리 효과는 각 시험구에서 임의로 선택된 주당 3~5개의 신초에 대해서 육안으로 산란수와 유충의 침입흔적을 기록하였음(그림 28).
- 시험 기간 동안 고온 현상으로 인해 복숭아순나방 발생이 적어 5월 19일에서 6월 12일까지의 실험 결과 유의한 차이를 볼 수 없어 같은 실험을 7월 23일과 8월 3일에 반복실험 하였음. 다만, 작물의 성장으로 인해 주당 120~140 ml을 살포하였음.



그림 27. The seven experimental peach plots made in the experimental station of Andong National University.



그림 28. An egg of *G. molesta* on the peach leaf.

다. 결과

- 담배 추출액 처리의 복숭아순나방에 대한 산란억제 효과를 2번의 실험에서 모두 찾을 수 없었음(표 22, 표 23). 고온 증상으로 인해 복숭아순나방의 야외 밀도 감소 때문인 것으로 판단됨.

표 22. Egg density (per twig) found after the spray of tobacco extract (trial on May-June)

Plant Extract Spray	Before Spray		After 1st spray on 26 May		After 2nd spray on 2 Jun	
	19 May	25 May	28 May	01 Jun	09 Jun	12 Jun
Yes	0.00(0/186) 0.00(0/30)		0.00(0/40)a	0.00(0/70)a	0.00(0/54)a	0.02(1/48)a
No			0.00(0/40)a	0.00(0/70)a	0.00(0/62)a	0.02(1/48)a

표 23. Egg density (per twig) found after the spray of tobacco extract (trial on July)

Plant Extract Spray	Before Spray		After 1st spray on 24 Jul		After 2nd spray on 31 Jul
	23 Jul		27 Jul	30 Jul	03 Aug
Yes	0.01(1/126)a		0.00(0/190)a	0.00(0/185)a	0.00(0/185)a
No	0.00(0/126)a		0.00(0/180)a	0.00(0/180)a	0.00(0/180)a

- 담배 추출액 처리의 복숭아순나방에 의한 침입률 감소 효과를 2번의 실험에서 모두 찾을 수 없었음(표 24, 표 25). 고온 증상으로 인해 복숭아순나방의 야외 밀도 감소 때문인 것으로 판단됨.

표 24. Infestation rate found after the spray of tobacco extract (trial on May-June)

Plant Extract Spray	Before Spray		After 1st spray on 26 May		After 2nd spray on 2 Jun	
	19 May	25 May	28 May	01 Jun	09 Jun	12 Jun
Yes	0.00(0/186) 0.03(1/30)		0.00(0/40)a	0.00(0/70)a	0.01(1/54)a	0.00(0/48)a
No			0.00(0/40)a	0.04(3/75)a	0.00(0/62)a	0.00(0/48)a

표 25. Infestation rate found after the spray of tobacco extract (trial on July)

Plant Extract Spray	Before Spray		After 1st spray on 24 Jul		After 2nd spray on 31 Jul
	23 Jul		27 Jul	30 Jul	03 Aug
Yes	0.06(7/126)a		0.00(0/190)a	0.00(0/185)a	0.00(0/185)a
No	0.02(3/126)a		0.00(0/180)a	0.01(2/180)a	0.01(2/180)a

라. 결론

- 이상 고온으로 인한 복숭아순나방의 야외 밀도가 낮아 복숭아순나방의 야외 밀도가 낮아 담배 추출액 처리에 의한 복숭아순나방의 산란억제와 침입률 감소 효과를 찾을 수 없었음. 추후 후속 연구가 필요함.

제 7절 방제효율 증진을 위한 유인제와 시너지 효과 조사

1. 천연생리활성 소재와 해충유인트랩의 동시 적용의 복숭아순나방 방제효과 평가

가. 연구목적

- 공동연구기관인 마이크로자임에서 개발한 피치아트랩을 담배 추출액과 동시 적용시의 복숭아순나방 방제 효과 평가

나. 재료 및 방법

- 제 6절에서 조성한 7개의 소규모 1년생 복숭아 포장(24.94~104.03 m², 제 6절 참고)을 이용하여 3개의 포장에는 피치아트랩을 설치하고 나머지 4개의 포장에는 트랩을 설치하지 않았다(그림 29). 다시 각각의 포장에서 임의로 선택한 반은 메탄올(50%) 담배 추출액을 처리하고 나머지 반은 대조구로서 메탄올(50%)만 처리하였음.
- 각 처리구와 대조구는 6~8주의 복숭아 나무가 있었음. 메탄올(50%) 담배 추출액은 2 mg/ml의 농도로 주당 120~140 ml을 골고루 살포한 후 처리전과 처리 후 밀도를 비교함.
- 처리 효과는 각 시험구에서 임의로 선택된 주당 3~5개의 신초에 대해서 육안으로 산란수와 유충의 침입흔적을 기록하였음(제 6절 참고).
- 시험은 8월 6일에서 17일까지의 수행함.



그림 29. Pichia trap installed in the peach fields(left) and inside view of the trap(right).

다. 결과

- 피치아트랩과 담배 추출액의 동시 처리가 복숭아순나방에 대한 산란억제 및 침입률 감소 효과를 찾을 수 없었음(표 26, 표 27). 고온 증상으로 인해 복숭아순나방의 야외 밀도 감소 때문인 것으로 판단됨.

표 26. Egg density (per twig) found after both installing Pichia trap and spraying tobacco extract (trial on Aug)

Trap Installation	Plant Extract Spray	Before Spray	After 1st spray on 07 Aug		After 2nd spray on 14 Aug
		06 Aug	10 Aug	13 Aug	17 Aug
Yes	Yes	0.00(0/90)a	0.00(0/90)a	0.00(0/90)a	0.01(1/90)a
Yes	No	0.00(0/85)a	0.00(0/85)a	0.00(0/85)a	0.00(0/85)a
No	Yes	0.00(0/95)a	0.01(1/110)a	0.00(0/100)a	0.00(0/100)a
No	No	0.00(0/115)a	0.00(0/115)a	0.00(0/115)a	0.00(0/115)a

표 27. Infestation rate found after both installing Pichia trap and spraying tobacco extract (trial on Aug)

Trap Installation	Plant Extract Spray	Before Spray	After 1st spray on 07 Aug		After 2nd spray on 14 Aug
		06 Aug	10 Aug	13 Aug	17 Aug
Yes	Yes	0.01(1/90)a	0.00(0/90)a	0.04(4/90)a	0.00(0/90)a
Yes	No	0.02(2/85)a	0.02(2/85)a	0.02(2/85)a	0.00(0/85)a
No	Yes	0.00(0/95)a	0.00(0/110)a	0.00(0/100)a	0.00(0/100)a
No	No	0.01(1/115)a	0.00(0/115)a	0.00(0/115)a	0.00(0/115)a

○ 피치아트랩에도 복숭아순나방은 포획되지 않았으며(그림 28), 톱다리개미허리노린재와 다른 소수의 나방류가 포획되었음.

라. 결론

○ 이상 고온으로 인한 복숭아순나방의 야외 밀도가 낮아 피치아트랩과 담배 추출액의 동시 처리에 의한 복숭아순나방의 산란억제와 침입률 감소 효과를 찾을 수 없었음. 이에 따라 추후 후속 연구가 필요함.

제 8절 유기농업자재로서의 산업성 평가

1. 유기농업자재로서의 산업성 평가

가. 연구목적

- 식물추출물의 경제성과 실효성에 대한 문헌 조사 및 분석

나. 재료 및 방법

- 건조된 담배잎을 증발농축기를 이용해 활성성분 추출(그림 30)

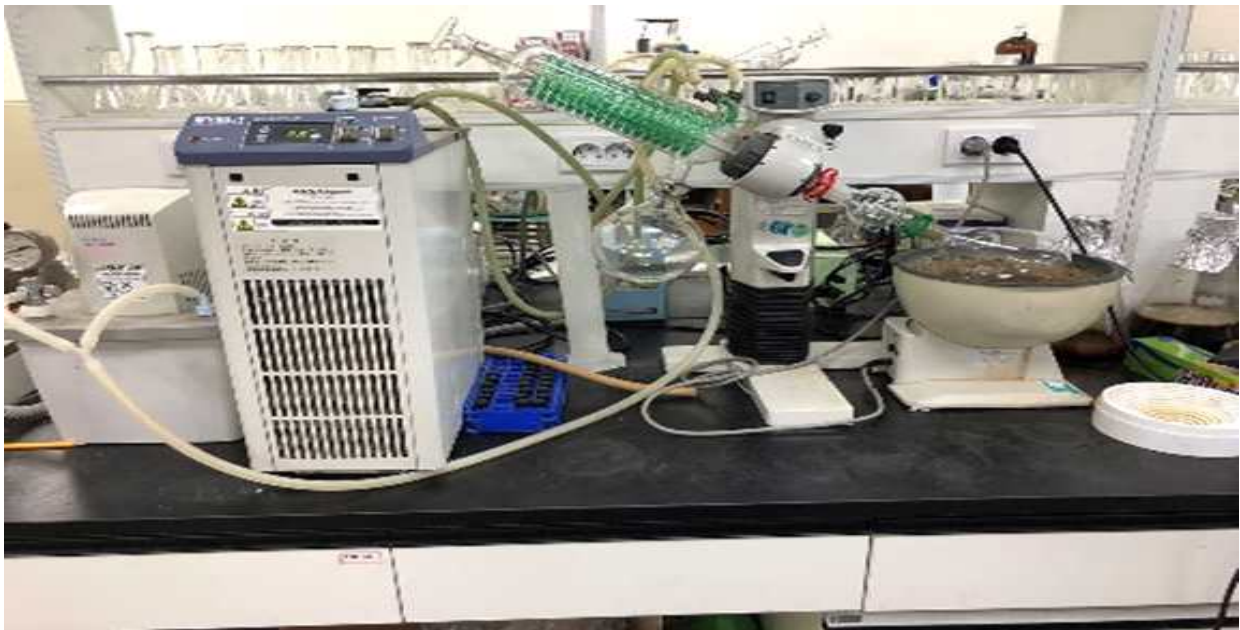


그림 30. Rotary evaporator used for extraction of dried tobacco leaves. Fresh leaves of tobacco plant were washed in running water and then dried in the oven at 60 °C. Oven dried plant materials were pulverized, and a 250 μm sieve was used to obtain fine and uniform dust. Twenty grams of the dust were mixed with 200 ml of methanol. Then the mixture was stirred for 1 hour and left to stand for 24 hours. The mixture was then filtered through filter paper. The filtered materials were then condensed by evaporation of solvent in a rotary evaporator.

- 2017년 엽연초생산협동조합중앙회에서 고시한 잎담배 판매실적표의 잎담배판매 가격에 기초한 담배 추출액의 10당 가격과 현재 판매되고 있는 3가지 유기합성 살충제의 가격을 비교함(그림 31).

2017년도 담배배 조합별 판매실적 (종류)

2017년 12월

구분	종류	2017년 12월				2017년 12월				2017년 12월				2017년 12월			
		수량	단가	금액	비율	수량	단가	금액	비율	수량	단가	금액	비율	수량	단가	금액	비율
합계		1,784	282,720	504,171	8,492,925	1,784	282,720	504,171	8,492,925	1,784	282,720	504,171	8,492,925	1,784	282,720	504,171	8,492,925
담배		1,650	271,800	449,250	7,786,150	1,650	271,800	449,250	7,786,150	1,650	271,800	449,250	7,786,150	1,650	271,800	449,250	7,786,150
종류		1,650	271,800	449,250	7,786,150	1,650	271,800	449,250	7,786,150	1,650	271,800	449,250	7,786,150	1,650	271,800	449,250	7,786,150
합계		1,784	282,720	504,171	8,492,925	1,784	282,720	504,171	8,492,925	1,784	282,720	504,171	8,492,925	1,784	282,720	504,171	8,492,925

상표명	단위	2017년 수량	2017년 평균단가	2017년 가격인상 률	2017년 총액	2017년 평균 단가	2017년 총액	2017년 평균 단가	2017년 총액	2017년 평균 단가	2017년 총액
플레타익상수화제	40G	100	8,000								
플레타익상수화제	500ML	20	30,000								
플레타익상수화제	100ML	50	13,000								
플레타익상수화제	250ML	40	30,000								
피라미드합성수화제	250G	20	20,000		18,000						
피라미드합성수화제	250ML	30	23,000		19,100	19,100	23,000				
피라미드합성수화제	170G	100	15,000								
피라미드합성수화제	70G	100	15,000								
피레스수화제	500ML	20	4,000	1,500							
피레스수화제	500ML	20	4,000		1,990	1,990	4,000				
피레스수화제	500ML	20	4,500		2,500	2,500	4,500				
피레스수화제	500ML	20	4,500		11,300	11,300	4,500				
피레스수화제	200G	100	8,000		5,000	5,000	8,000				
피레스수화제	500G	40	18,500		11,000	11,000	18,500				
피레스수화제	400ML	30	7,500		6,700	6,700	7,500				
피레스수화제	500ML	20	17,000		14,500	14,500	17,000				
피레스수화제	100ML	60	12,000		8,000	8,000	12,000				
필드합성제	3KG	8	18,000		118,500	118,500	18,000				
필드합성제	500ML	20	10,000								
허니제합제	3KG	8	17,000		14,800	14,800	17,000				
허니제합제	100ML	100	10,000								

그림 31. Status of sales of dried tobacco leaves (left) and current price list of pesticide (right) used for the comparison of economic value of the tobacco extract used in this study.

다. 결과

- 현재 사용되고 있는 복숭아순나방 방제용 합성 농약의 사용 단가는 10a당 1,500에서 45,000원으로 분석되었음(표 28).

표 28. 주요 복숭아순나방 방제용 합성 농약의 사용 단가

상표명	제조사	제 제	유효성분	포장단위	가격(원)/포장단위	사용약량 (20 liter 당)	사용량/10a	가격(원)/10a
스튜어드골드	콤파농	액상수화제	인독사카브	200 ml	20,000	20 ml	200 - 450 liter	20,000 - 45,000
명타자	콤파농	유탁제	에토펜프록스	200 ml	6,000	20 ml	200 - 450 liter	6,000 - 12,000
알타코아	콤파농	입상수화제	클로란트라닐리프롤	100 g	15,000	10 g	200 - 450 liter	1,500

- 담배추출액의 경우 사용 단가는 10a당 534에서 1,498원으로 계산되었음(표 29). 따라서 기존 합성 농약과 가격면에서는 경제성이 있는 것으로 판단됨. 물론 이 것은 원자재 가격만 반영되었고 추출과정에 소요되는 제반 비용과 제재화에 필요한 비용, 순수정제 비용, 유통비용, 순이익 비용 등은 포함되지 않았음.

표 29. 담배 추출액의 사용 단가

기준 가격(원, 2017년, 1kg 당)	중량 (건조 담배잎)	가격 (원, 건조 담배잎)	중량 (담배 추출액)	담배 추출액 사용 가격(원, 9당)	추출액 사용량 (주당)	담배 추출액 사용량 (10a 당)*	추출액 사용량 (10a당)	가격(원)/10a
9,515.49	0.58 kg	5,518.98	59 g	93.542	0.238 - 0.286 g	24 - 56	5.712 - 16.016 g	534.31 - 1,498.17

*농촌진흥청. 원클릭농업기술. www.nongsaro.go.kr.

라. 결론

- 담배추출액의 산업성 평가 결과 추가 개발 비용이 소요되었지만 기존 합성 살충제에 비교해서 경제성이 있는 것으로 분석됨.

제 6장 미생물을 이용한 복숭아 순나방 방제용 유기농업자재 제품화

제 1절 *Pichia anomala* 호모의 복숭아순나방 유인효율 검토

1. *Pichia anomala*의 자체 확보

가. *Pichia anomala*의 자체 분리 및 확보

(1) 연구목적

- 유인제 생성 균주 종균 확보

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 재료 : 전남 권역의 전통 막걸리 및 발효식품

(나) 시험방법

① 전통 발효식품을 통한 *Pichia anomala* 분리 및 확보

- 유인제에 활용될 *Pichia anomala*를 비롯한 다수의 유용미생물을 분리하기 위해 전남 지역의 전통 막걸리 및 매주와 발효주등을 확보함.
- 각각의 시료 1g 또는 1ml를 phosphate-buffered saline(PSB, pH 7.2) 9ml에 현탁 시킨 후 연속희석법을 이용하여 1.0×10^{-2} 의 농도로 희석 후, 희석한 각각의 시료 100 μ l를 malt extract agar에 각각 도말함.
- 도말된 고체배지를 37 $^{\circ}$ C에서 2~3일동안 배양하였음.

② 분리 균주의 확보

- 20% glycerol stock에 저장하여 -80 $^{\circ}$ C에서 보관하였으며, 차후 종의 동정 및 *P. anomala*를 비롯한 유용 호모균을 확보하여 유인제 제조 균주로서 활용함.

③ 분리된 유용 미생물 동정

- (주) 솔젠트에 16S rRNA의 염기서열 분석을 수행, 각 분리된 균주의 genomic DNA를 template DNA로 사용하였으며, 16S rRNA primers (F-5' CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3', R-5' TACCAGGGTATCTAATCC-3')를 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 수행하였음.
- PCR 조건은 100ng의 DNA 1 μ l, 10pmol primer 1 μ l, 1% PVP 1 μ l, BSA 1 μ l 및 PCR premix 4 μ l를 혼합하여 최종 반응 부피를 20 μ l로 하였음.
- 95 $^{\circ}$ C에서 7분간 pre-denaturation하고 총 30cycle (denaturation 95 $^{\circ}$ C에서 45초, annealing 58 $^{\circ}$ C에서 45초, extension 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30초)을 반응시킨 후, 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 더 반응시킴. 얻어진 PCR 산물은 pGEM-T-easy vector에 삽입하여 sequence 분석에 사용하였고 분석 MEGA 5.1 program을 이용하여 결정함.

(3) 결과

(가) 유용 미생물의 종동정 결과

- 분리한 생물자원 중 Isolate 'P'의 16S rRNA의 분석결과 99.83%의 유사성을 보이는 *Pichia anomala*로 분석됨(표 1), (그림 1).

표 1. 분리한 생물자원 내 *Pichia anomala*의 종 동정 결과

Isolates	Identification	Accession no.	Similarity(%)
P	<i>Pichia anomala</i>	EU330185	99.83

```
AACCT'GCGGAAGGAT'CAIT'ATAGT'AIT'CT'AIT'GCGAGCGCT
TAATTGCGCGGGGATAAACCTTACACACATTGTCTAGT'TTT
TTTGAAC'TTTGGT'GGT'GAGCCTGGCTTACTGCCCA
AAGGTCTAAACACATTTTTTAAATGTTAAACCTTTAACCA
ATAGTCATGAAAATTTTTAACAAAATTTAAATCTTCAAAA
CTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTCGCAACGATGAAGAA
CGCAGCGAAATGCGATACGTATTGTGAATTGCAGATTTTCG
TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCCTCTGGTA
TTCCAGAGGGTATGCCTGTTT'GAGCGTCATT'TCTCTCAA
ACCTTCGGGTTTGGTATTGAGTGATACTCTGTCAAGGGTTA
ACTT'GAAATATTGACTTAGCAAGAGTGTACTAATAAGCAGT
CTTTCTGAAATAATGATTAGGTCTTCCAACCTCGTTATAT
CAGCTAGGCAGGTTTAGAAGTATTTAGGCTCGGCTTAACA
ACAATAAACTAAAAGTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTAC
CCGCTGAAC'TTAAGCATATCAATAA
```

그림 1. *Pichia anomala* sample의 sequence.

(4) 결론

- 분석 결과 중 분리된 일부 생물자원에서 *Pichia anomala*로 동정, 이를 활용하여 효과적인 연구개발 진행이 예상된다.

나. 복숭아 순나방을 대상으로 *Pichia anomala* 발효액의 유인효과 검정

(1) 연구목적

- 유인제로 활용될 *Pichia anomala* 대사체의 순나방 유인효율 평가(*in-vitro*)

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 테스트용 유인제: *P.anomala* 대사체
- ② 테스트용 구조물: 자체 제작한 실내용 유인효율 평가 구조물
- ③ 테스트용 해충 : 복숭아 순나방(제4협동에서 제공받음)

(나) 시험방법

① *Pichia anomala* 배양액 제조

- *Pichia anomala*를 배지 plate에 평판 도말하여 30℃에서 이틀 배양 후, 액상 배지 5ml에 1 colony를 접종하여 30℃에서 over night (20-24hr) 배양시킴.
- 4℃에서 3,000RPM으로 15분 동안 원심분리(VS-5,500, Vision scientific Co., Ltd, Korea)하여 균체를 회수하고 균체 현탁액을 배지에 재접종하여 30℃에 5~7일 이상의 정치배양을 실시함.
- 이를 적정량 분취하여 유인제로써 시험에 적용함.

② 실험 개체의 확보

- 제 4협동기관인 안동대학교 사육 test-bed 내 복숭아순나방 고치를 분양의뢰를 실시함.
- 현장에서 공수하여 차량을 통해 운반, 실험 실 내 incubator 내 대상해충의 우화 유도 온인 25~30℃에 보관하여 우화 유도 후 성충을 확보함.

③ 복숭아순나방 유인효과 검증

- *P. anomala* 배양액과 대조구로 활용된 피식원을 각 독립된 공간에 배치, 시간에 따른 복숭아순나방의 이동 분포를 모니터링 함.

- 실험에 활용된 개체는 형태 및 활동성이 양호하며, 최소 10, 최대 10미 이하의 개체를 선별하여 활용하였음.



그림 2. 복숭아순나방 *In-vitro* 유인효과 검정현황.

(3) 실험 결과

(가) 최종 유인효율 시험결과

- 최종(10h) 비 선택구간은 0미로 각 실험 조건에 따라 원활한 이동이 나타내었고, 대조구는 평균 4미 30.04%의 유인율을 보였으며, 실험구는 최종 평균 8미, 유인율 69.96%를 보여 *P. anomala* 배양액은 대조구에 비해 우수한 복숭아 순나방 유인효과를 보이고 있음.

표 2. *Pichia anomala* 배양액의 유인효과 검증 결과

분류	비 선택 구간		대조구		실험구	
	평균	편차	평균	편차	평균	편차
Time(hr)						
최초	15	±3.6	0	±0.0	0	±0.0
2	9	±2.5	1	±1.0	2	±1.5
4	4	±1.0	2	±1.0	6	±2.0
6	2	±0.6	4	±1.5	6	±2.0
8	1	±0.6	4	±1.5	8	±2.5
10	0	±0.0	4	±1.5	8	±2.5
최종 유인률(%)	0	±0.0	30	±7.3	70	±7.3

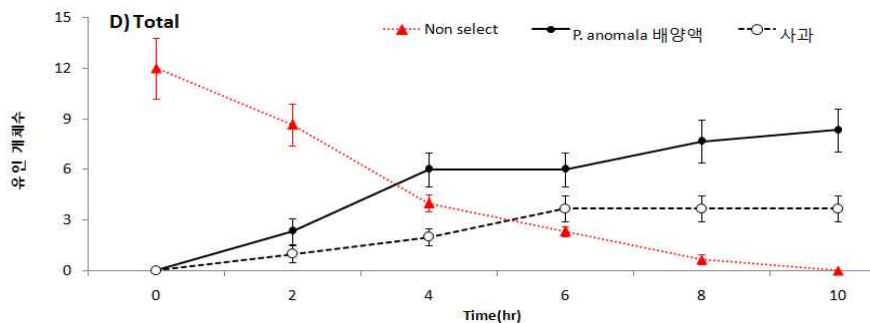


그림 3. 복숭아순나방 *In-vitro* 유인효과 검정결과.

(4) 결론

- *Pichia anomala* 대사체는 복숭아순나방에 대한 유인효과가 있어 유인제로써 개발에 타당성이 있음.

제 2절 유인제의 제형제조

1. 제형화 소재 선발

가. 제형화 목적 및 방향

(1) 제형화 종류

- 유인제의 유인 유효물질의 방출 지속성과 안전성을 고려하고, 자체 대량생산에 용이한 제형화 방안을 고려하였을 때 Cross link를 활용한 미세캡슐 제형이 선발되었음.

(2) 벽제물질의 선발

- Alginate, Gelatin, Chitosan은 친환경 유기농업자재 허용 물질로 분류되는 등 Alginate, CMC, PVA, Gelatin, Chitosan등 친환경적이며, 제조의 간편성을 포함하여 친환경성을 지니는 성분을 대상으로 벽제물질 후보군을 선발함.

2. 제형화 공정 개발

가. 제형화 공정 설계

(1) 연구목적

- 유인제의 휘발 보존 및 안전성을 고려한 제형화 개발

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 유인제 원료 : *Pichia anomala* MZ-02 (마이크로자임)
- ② 공시 재료 : 노즐펌프, 가교제(CaCl₂)

(나) 시험방법

① 유인제 생산

- *Pichia anomala* MZ-02 대사체 생산을 위해 배지에 *Pichia animala* 종균 접종, 60-72시간 배양을 실시함.
- 이후 원심 분리하여 균체를 회수하고, 10⁶ cfu/ml의 수준으로 조정하여 활용함.

② 노즐펌프의 설정

- 노즐펌프를 이용하여 0.4m 상공에서 0.1m/min의 속도로 가교용액에 분출시킴으로써 반응을 실시함.

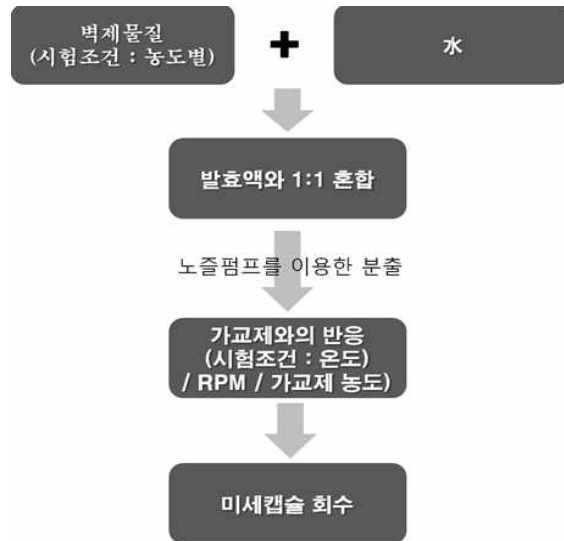


그림 4. 제형 제조 공정도.

나. 미세캡슐 제형화 원료의 선발

(1) 연구목적

- 벽제물질의 미세캡슐 제형화 연구

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 유인제 원료 : *Pichia anomala* MZ-02 (마이크로자임)
- ② 공시 재료 : Alginate, Carboxymethyl cellulose, Polyvinyl alcohol, Gelatin, Chitosan

(나) 시험방법

① 미세캡슐 최적 조건 설계

- 벽제물질 후보군 농도별 가교제의 농도, 온도, 혼합속도를 각 5 grade로 설계하여 반복실험을 실시함.
- 미세캡슐의 제형화 성공률을 평가하기 위해 각 조건별 형성된 미세캡슐을 대상으로 아래와 같은 평가를 실시함.
 - 관 손실률 (%) : (펌프 유입 전 원재료 무게 - 반응조의 최종 무게) × 100
 - 캡슐 형성률 (%) : (펌프 유입 전 원재료 무게 - 캡슐 형성 무게) × 100
 - 구형화 형성률 (%) : 조건별 제형이 완료된 입자의 장경/단경 비율 계산
 - 입자의 균일도 (%) : 제형별 입자를 취한 후 무게를 측정, 캡슐을 입자수와 총무게 간의 상관관계를 통해 입자의 균일도를 파악
 - 입자의 잔존성 : 제형별 입자를 분취, 시간에 따른 무게 변화를 계산
 - 최종 제형 평가 : 각 항목별 점수를 가산, 최종 캡슐화 자동공정 최적화

(3) 결과

(가) 제형화의 최적 생산 조건 확립

① 캡슐화 생성률 (%)

- 각 제제의 벽제물질 별 *pichia anomala* 발효액의 캡슐화 성공률을 분석한 결과 Alginate 조건에서 평균 74.63%로 가장 높은 것으로 나타났으며, 최적 조건에서는 19.13% 개선된 93.76%로 가장 높은 효율을 보였음.

표 3. 제형화 후보군 별 캡슐화 생성률(%)

구분	평균	최적조건 (개선률)	최적 조건	SCORE
Alginate	74.63	93.76 (▲19.13)	벽제농도 : 1.0 가교제 농도 : 20 온도 : 50℃ 반응 RPM : 150	5
Carboxymethyl cellulose,	10.32	53.88 (▲43.56)	벽제농도 : 3.0 가교제 농도 : 1.5 온도 : 50℃ 반응 RPM : 150	3
Polyvinyl alcohol	45.85	78.41 (▲12.55)	벽제농도 : 20.0 가교제 농도 : 15.0 온도 : 60℃ 반응 RPM : 100	4
Gelatin	-	-	-	-
Chitosan	-	-	-	-

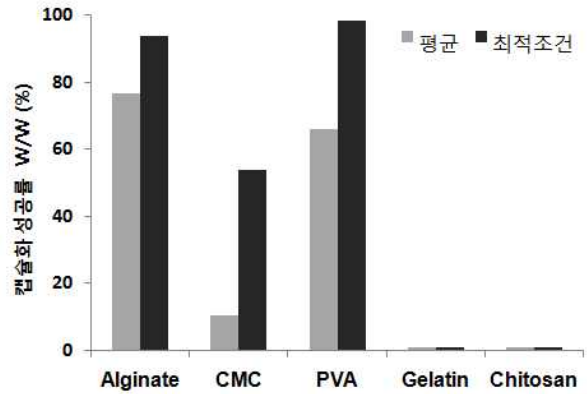


그림 5. 캡슐화 성공률(%).

② 캡슐 구형화 생성률 (%)

- 각 제제의 캡슐의 구형화 형성률을 보면 Alginate 조건이 평균 67.0%로 가장 높은 것으로 나타났고, 최적조건으로 선발된 조건에서는 87.0%로 21.0% 개선된 결과를 보이고 있음.

표 4. 제형화 조건에 따른 구형화 형성률

구분	평균	최적조건 (개선률) %	최적 조건	SCORE
Alginate	67.0	87.0 (▲21.0)	벽제농도 : 1.0 가교제 농도 : 20 온도 : 50℃ 반응 RPM : 150	5
Carboxymethyl cellulose	41.0	53.0 (▲12.0)	벽제농도 : 3.0 가교제 농도 : 1.5 온도 : 50℃ 반응 RPM : 150	3
Polyvinyl alcohol	56.0	76.0 (▲50.0)	벽제농도 : 20.0 가교제 농도 : 15.0 온도 : 60℃ 반응 RPM : 100	4
Gelatin	-	-	-	-
Chitosan	-	-	-	-

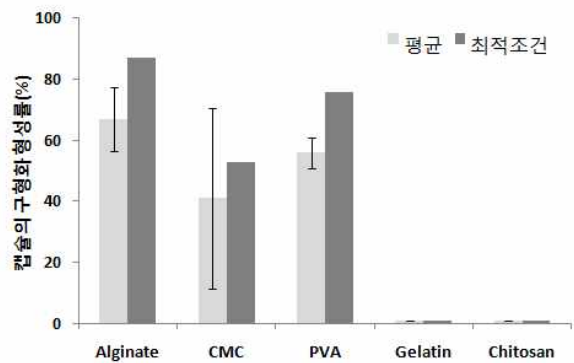


그림 6. 구형화 성공률(%).

③ 제형화 조건별 입자의 균일도

- 각 제제의 조건별 입자의 평균 크기 및 평균 밀도에 비해 최적조건에서는 상대적으로 작고 균일한 수준의 입자를 형성하는 것으로 나타났으며, 균일한 입자가 형성되는 것으로 나타났다. 이는 반응온도 및 혼합의 최적화에 따른 결과로 보임(표 5).
- 이 중 Alginate의 최적 조건에서 입자의 장편과 밀도가 타 벽제물질 및 조건에 비해 가장 균일한 결과를 나타냄.

표 5. 제형화 조건별 입자의 균일도

구분	평균크기 (편차)	최적조건 입자크기 (편차)	평균밀도 (편차)	최적조건밀도 (편차)	SCORE
Alginate	7.03 (±3.67)	4.02 (±0.20)	0.052 (±0.017)	0.026 (±0.012)	5
Carboxymethyl cellulose	6.83 (±4.37)	4.37 (±3.22)	0.011 (±0.005)	0.021 (±0.007)	3
Polyvinyl alcohol	2.01 (±2.70)	1.82 (±0.23)	0.013 (±0.033)	0.012 (±0.021)	4
Gelatin	-	-	-	-	-
Chitosan	-	-	-	-	-

④ 제형화 조건별 잔존성

- 상온에 2주간 방치한 후 각 조건별 무게변화를 보면 Alginate, Carboxymethyl cellulose, Polyvinyl alcohol의 최적 조건이 평균 무게 변화에 비해 전반적으로 증가한 결과를 보이고 있음.
- 최적 조건 및 평균 조건에서 Polyvinyl alcohol가 가장 우수한 잔존력을 보이고 있으며, 최적 조건에서는 50%이상의 우수한 잔존성을 보임.

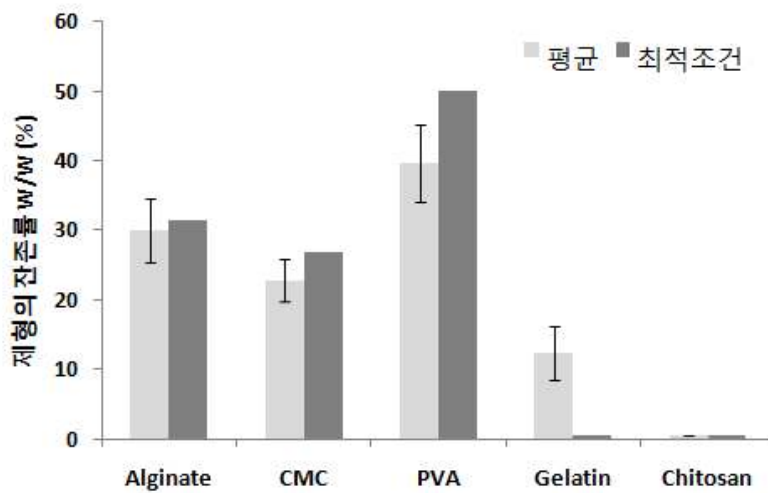


그림 7. 제형의 잔존률(%).

⑤ 최적 제형 공정 및 재료 선발

- 상기의 분석 결과를 전반적으로 고려하여 최적 조건에 따른 미세캡슐의 형성을 평가하고자 하였으며, 평가결과 전반적으로 가장 우수한 결과를 보인 Alginate 조건이 가장 높은 결과 치를 보이고 있음.

표 6. 최적 조건에 따른 미세캡슐의 완성도 평가

구분	A	B	C	D	E	F	Total Score
Alginate	4	5	5	5	4	5	28
Carboxymethyl cellulose	3	3	3	3	3	5	20
Polyvinyl alcohol	5	4	4	4	5	3	25
Gelatin	-	-	-	-	2	4	6
Chitosan	-	-	-	-	-	-	-

주) A : 관 손실률, B : 캡슐화 성공률, C : 구형화 형성률, D : 캡슐 균일도, E : 캡슐 잔존성, F : 향기발생정도, 인위적 측정



그림 8. 제형화 현황.



그림 9. 벽제물질 별 제형화 현황.

(4) 결론

- 미세캡슐 제형화를 위한 벽제물질은 최적조건 아래 캡슐화 형성률 93.8%, 구형화 형성률 87.0%와 입자의 균일도에서 우수한 수준을 보인 Alginate로 선발함.

나. 유인 성분을 포함한 점착성 물질의 제조

(1) 연구목적

- 점착물질을 함유한 stick & Roll type 제품 개발 연구

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 공시 유인제 원료 : *Pichia anomala* MZ-02 (마이크로자임)
- ② 공시 재료 : 천연고무, 폴리부텐, 유화제, DCPD 수점 추지

(나) 시험방법

- 점착제와 접착제의 용해 및 단계적으로 혼합, 최종 유인성분인 효모 발효액을 첨가
- 천연고무 5%, 폴리부텐 55%을 150°C로 가열 혼합하고, 완전히 녹은 후 상온에서 냉각을 실시함.
- 상온에서 액상으로 분포할 수 있도록 유화제를 30%, DCPD 수점 수지를 5% 넣고 혼합하고, 최종 유인액 원료를 5% 순차적으로 혼합함.

(3) 실험 결과

- 유인제가 효과적으로 혼합됨을 확인할 수 있었으며, 공정 종료 시 적절한 발향을 유지함을 확인함.

(4) 실험 결론

- 유인제가 점착물질과 혼합이 이루어짐을 확인 할 수 있었으나, 상기 유인제는 강력한 휘발성 VOCs의 집합체임에 따라, 가온 과정 시 주요 물질의 물성 변화 및 손실량을 무시할 수 없으며, 다량 첨가 시 점착력의 장애를 유발 할 수 있음.
- 따라서 제조 과정에서 다양한 물리·화학적 공정을 동반한 최적화가 필요함.
- 현재 널리 활용되고 있는 Stick & Roll trap의 주요 원료인 점착액과 유인제간의 혼합이 가능함에 따라 적용 시장의 범위를 확대할 수 있을 것으로 사료됨.

다. 제형화에 따른 휘발성 함량 분석

(1) 연구목적

- 유인제의 주요물질 함량 분석, 유인 지표물질 추정
- 각 제형화 후보군들의 유효물질 함량 비교
- 최종 제형화 후보군 선발

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 분석 대상 : 유인액 원제, 미세캡슐 후보군(Alginate, High absorbent resin, Carboxymethyl cellulose, Polyvinyl alcohol), 유인 점착제
- ② 수행 대상 : 장성 나노바이오연구센터에 시험분석 의뢰
- ③ GC-MS 분석 조건
 - 장비명 : Gas chromatography - Mass spectrometer
 - 모델명 : GC-MS-QP2010plus
 - 제작사 및 제조국 : shimadzu, 일본
 - SPME(Solid Phase Micro-extraction) sampling set, Supleco, USA
 - SPME fiber : 50/30 μ m, Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane(DVB/CAR/PDMS)
 - 4ml vial set

(나) 실험방법

- ① 분석 대상 : 유인액 원제, 미세캡슐 후보군(Alginate, High absorbent resin, Carboxymethyl cellulose, Polyvinyl alcohol), 유인 점착제
- ② 수행 대상 : 장성 나노바이오연구센터에 시험분석 의뢰
- ③ GC-MS 분석 조건
 - 유인제 제형 후보군을 5ml SPME 전용 바이알에 약 1.0g으로 취한 후 고체상 미량 추출(Solid Phase Micro-extraction, SPME)를 실시함.
 - 60 $^{\circ}$ C으로 항온된 SPME stand holder에 시험물질을 옮겨 담은 4mL SPME 전용 바이알을 5 min간 방치하여 안정화한 후 SPME fiber를 바이알의 headspace에 위치하

여 30 min 동안 휘발성 유기성분 추출함.

- 휘발성 유기성분이 추출(또는 흡착(adsorption))된 SPME fiber를 미리 설정된 250°C의 GC-MS 시료주입구(injector)에 주입한 후 5 min 동안 탈착(desorption)하여 휘발성 유기성분을 분리·분석함.

(3) 결과

(가) 최적 제형 별 유인 휘발성 물질 함량 분석

① GC-MS분석을 통한 주요 생성물질

- 미생물 발효과정을 통한 생성물질은 휘발성 유기산류, 저급 지방산류, 알데히드 및 케톤류 등 다양한 향기성분이 생성되는 것으로 알려져 있음.
- 분석 결과 5개의 주요 휘발성 물질은 Phenethyl alcohol을 비롯하여 꽃향과 열매향과 유사성분으로 나타나, 이러한 휘발성 향기 성분의 조합이 해충을 유인하는 성분으로 작용하는 것으로 사료됨.

표 7. GC-MS 분석을 통한 주요물질 현황

Peak	R.T(min)	Compound
1	8.18	Ethyl lactate
2	20.97	Ethyl capoate
3	24.33	Ethyl 2-hydroxy-4-methyl valerate
4	27.52	Phenethyl alcohol
5	31.84	Ethyl caprylate

② 각 제형별 지표물질 함량분석

- Polyvinyl alcohol의 각 주요 물질의 area가 상대적으로 낮은 것으로 나타났으며, 실제 관찰 시 캡슐의 가교 강도가 심화된 결과로 보임(그림 10).
- Alginate 및 Carboxymethyl cellulose는 원 발효액과 비교하여 주요 물질인 Phenethyl alcohol이 높은 것으로 나타났으며, Carboxymethyl cellulose에 비해 Capsulation이 유리한 결과를 보인 Alginate를 최종 선발토록 함(표 8).

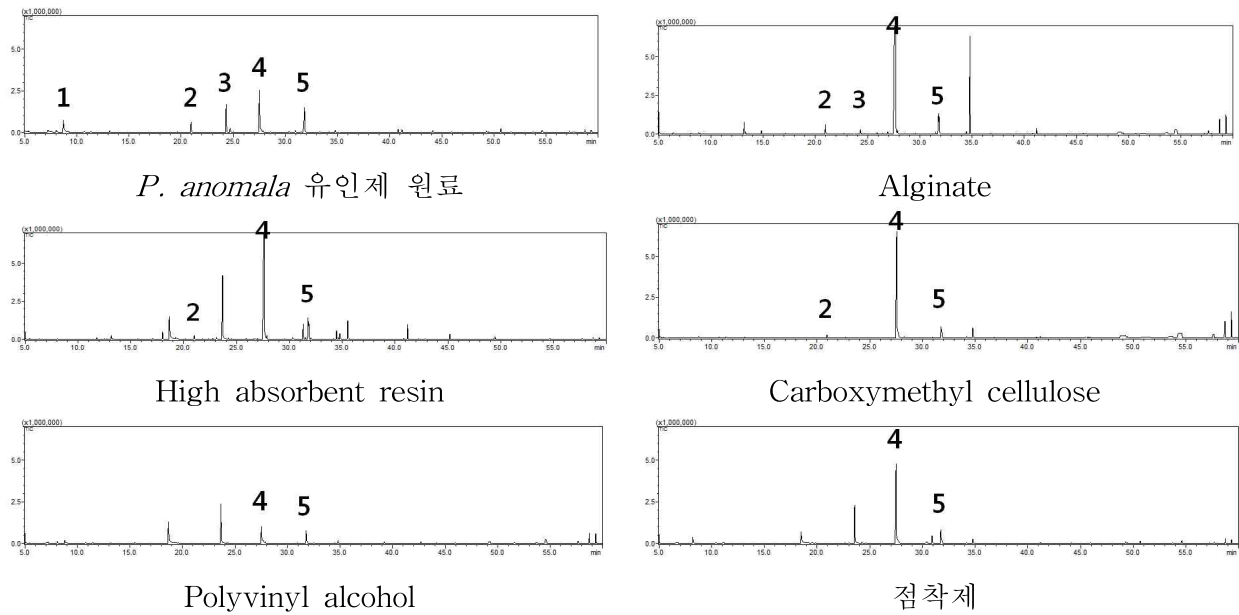


그림 10. 각 제형별 동정된 휘발성 물질 스펙트럼.

표 8. 각 제형별 주요 휘발성 물질 함량

Peak	Major Compound	Area(%)
<i>Pichia anomala</i> broth	Phenethyl alcohol	5.5
Alginate	Phenethyl alcohol	8.0
High absorbent resin	Phenethyl alcohol	9.5
Carboxymethyl cellulose,	Phenethyl alcohol	12.4
Polyvinyl alcohol	Phenethyl alcohol	2.1
점착제	Phenethyl alcohol	6.2

(4) 결론

- 보다 제조 간편성을 판단 할 때, 다양한 시장에서 널리 활용되는 High absorbent resin이 보다 효과적일 수 있음.
- 또한 추가적으로 국내 평판 및 물 트랩에 활용되는 통칭 끈끈이 stick trap 시장 내 활용되는 점착제 내부에 유인물질을 도포한 결과 유효물질이 효과적으로 혼합됨을 확인함에 따라 stick trap 시장 방향도 고려할 수 있음.

제 3절 유인제 트랩의 현장 적용 및 방제매뉴얼 개발

1. 유인제의 현장적용 및 타제품과의 효율 비교

가. 현장적용 시제품 제작

(1) 연구목적

- 복숭아순나방을 포획하는데 용의하고, 장소, 시기, 방법을 고려한 효과적인 현장적용 시제품 제작
- 상용제품과 포획효율 비교, 제품의 성능 분석

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- 공시 유인제 원료 : *Pichia anomala* MZ-02 (마이크로자임)
- 예찰 및 모니터링용 : 유인 점착액을 도포한 Plate
- 대량 포획용 : 접착식 트랩, 포충트랩(상용화된 해충 유인트랩)
- 대조구 : 복숭아순나방 페로몬트랩, 유인제 무첨가 Stick trap

(나) 유인제의 대량배양

- *Pichia anomala* MZ-02를 배지 Plate에 평판 도발하여 30℃에서 이틀 배양 후, 액상 배지 5ml에 1 colony를 접종함.
- 30℃에서 over night(20-24hr) 배양한 후, 4℃에서 3,000 rpm으로 15분간 원심분리 (VS-5,500, Vision scientific Co., Ltd, Korea)하여 균체를 회수하고 균체 현탁액을 배지에 재접종함.
- 30℃에 5-7일 이상의 정지 배양을 실시함.
- 생산된 유인제는 제형화 종류에 따라 입자성 유인제 또는 유인 점착액의 주원료로 활용함.



그림 11. 유인제 제형의 대량생산.

(다) 현장적용 시제품 제작

- 대량 포획용(접착 식 트랩)
 - 강도 높은 하드 보드지를 이용, 끈끈이 부착부는 상단에 홈이 있어, 고정 및 탈착에 용의 하도록 제작함.
 - 활용 끈끈이는 현재 시중에 유통되는 노랑색과 흰색의 해충용 접착 끈끈이를 장착
 - Alginate 및 High absorbent resin을 포획기 내에 부착하여 유인제로써 활용함.

○ 대량 포획용 : 포충 트랩

- 시중에 유통되는 해충 유인용 트랩 내 유인제를 로딩하여 대량포획용 포충트랩으로 활용하였음.



접착 식 트랩



포충 트랩

그림 12. 대량포획용 시제품 트랩.

○ 예찰 및 모니터링용

- 점착제와 점착제의 용해 및 단계적 혼합, 최종 유인성분인 효모 발효액을 첨가함.
- 천연고무 5%, 폴리부텐 55%을 150℃로 가열 혼합하고, 완전히 녹은 후 상온에서 냉각을 실시함.
- 상온에서 액상으로 분포할 수 있도록 유화제를 30%, DCPD 수점 추지를 5% 넣고 혼합하고, 최종 유인액 원료를 5% 순차적으로 혼합함.
- 이 후 정량을 Plate에 도포하여 예찰 및 모니터링용 유인 Plate를 완성함.

○ 대조구 : 시장 상용제품, 복숭아순나방 페로몬트랩, 유인제 무첨가 Stick trap 및 점착액



페로몬트랩 'G'사



Yellow stick trap 'D'사



유인제 미첨가 점착액 'W'사

그림 13. 대조구(타사제품) 현황.

나. 시제품 및 대조구의 현장적용

(1) 연구목적

- 유인제의 현장적용 효율 분석을 통한 제품화 가능성 평가
- 상용제품과 포획효율 비교, 제품의 경쟁력 평가

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- 시험구
 - 예찰 및 모니터링용 : 유인 점착액이 도포된 Plate
 - 대량 포획용 : 접착 식 트랩, 포충 트랩
- 대조구
 - 시장 상용화된 제품 : 페로몬트랩, Yellow stick trap, 유인제 미첨가 점착액

(나) 적용 대상지

- 전년 복숭아순나방 출현이 보고된 화순 권역 복숭아 포장

(다) 평가 방법

- 다양한 시제품 및 대조구별 다양한 설치 조건을 적용하여 현장 설치함.
- 2주경과 후 일괄 수거하여, 실험실로 운송, 포획된 개체 현황을 분석함.



그림 14. 유인제 현장적용 장소 및 제품 분류 현황.

(3) 결과

(가) 나방 및 복숭아순나방 유인효과

- 1세대 현장 적용 결과, 유인제가 활용된 시험구는 9~22마리의 나방이 포획되었으며, 이중 대상해충인 복숭아순나방은 1~2마리가 포획된 것으로 나타났음.
- 대조구인 점착제(접착식 트랩)와 stick trap(끈끈이)는 매우 낮은 나방 포획 수준을 보임.
- 상용제품인 페로몬트랩의 경우 총 22마리의 나방을 포획하였으며, 이 중 6마리의 복숭아순나방을 포획하는 결과를 보여, 나방 중 복숭아순나방이 26.3%의 포획 분포를 보였으며, 이는 복숭아순나방을 특이적으로 유인하는 제품의 특성에 따른 결과로 보임.

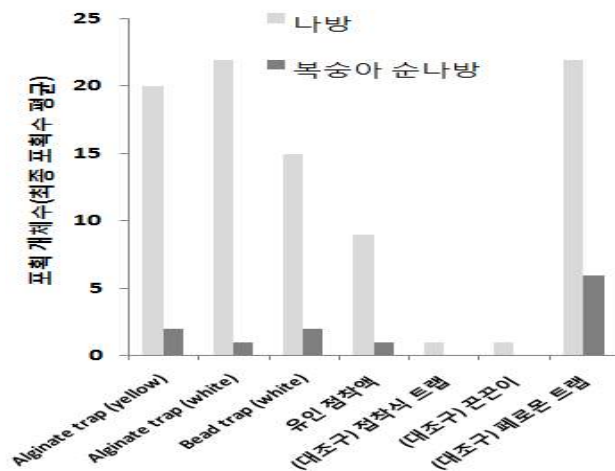


그림 15. 제형별 나방 및 대상해충 포획현황.

(나) 시제품 제형별 나방류 포획 현황

- 대량 포획용 접착식 트랩(yellow)이 77마리의 나방을 포획하여 가장 높은 효율을 나타내었으며, 유인제를 함유한 접착액이 9마리의 복숭아순나방을 유인한 결과를 보임(표 9).
- 나방 포획 현황을 살펴볼 때 *P. anomala* 대사체를 통한 유인제의 성능은 복숭아순나방을 비롯한 전반적인 나방을 비 특이적으로 유인하는 결과를 보이고 있음(표 9).

표 9. 제형 및 현장적용 기술 별 나방 포획 현황

분류	대량포획용 접착트랩(Yellow)	대량포획용 접착트랩(White)	대량포획용 접착트랩(White)	유인 접착액
복숭아 순나방	6	7		9
<i>Stathmopoda masinissa</i>	1	4	5	2
<i>Carposina sasakii</i> Walsingham	1	4	2	3
<i>Acrobasis pyrivorella</i>	1	2	1	2
<i>Scedopla diffusa</i>		2	1	6
<i>Herminia dolosa</i>	4	2		
<i>Synanthedon bicingulata</i>	8		1	
<i>Mamestra brassicae</i>	3	1	2	
<i>Pseudocatharylla simplex</i>		3	2	1
<i>Hipoepa fractali</i>	2	6	3	
<i>Olethreutinae</i>	1	3	1	2
<i>Simplicia niphona</i>	2			1
<i>Ivela auripes</i>	1			2
<i>Mocis annetta</i>	1			1
Total	77	68	33	54



그림 16. 주요 나방 포획류.

(다) 포획 결과 분석

- 대량포획용 접착 트랩(Yellow)이 440미로 가장 높은 포획 효율을 보였으나, 포획 주요 균집을 살펴보면 파리가 88.5%로 가장 많은 비율을 차지하는 것으로 나타남.
- 이는 접착부의 평판의 색감에 따른 유인효과로 보여지며, 복숭아순나방을 비롯한 해충을 유인하기 위해서는 포획부의 다른 선택이 필요 하리라 보여짐.
- 대량포획용 포충트랩에서 나방류가 41.3%로 가장 높은 비율을 차지하였으며, 유인제의 거치 함량의 증가와 더불어 나방의 유인효율이 증가된 것으로 사료됨.

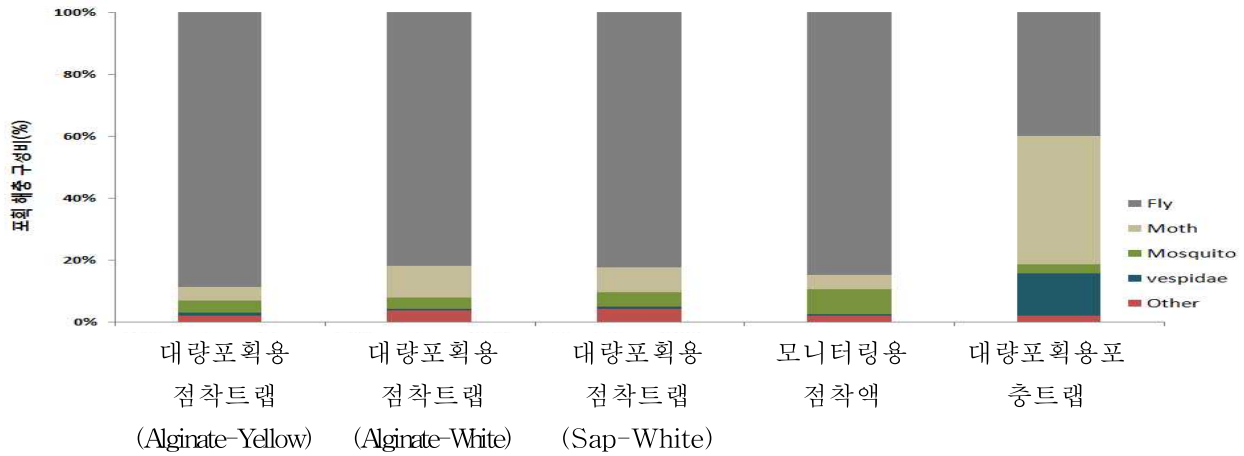


그림 17. 제형 및 현장적용 기술 별 해충 포획 군집 비교.

- 높은 비율로 나방을 포획하는 포충 트랩에 있어 복숭아순나방의 포획은 전무, 이는 복숭아순나방이 소형나방에 분류되며, 이에 따라 포충트랩의 해충 유입부로의 탈출에 따른 결과로 보여짐.
- 따라서 유입 및 유출부의 환경을 작게 개발 하는 것이 대상해충의 이탈을 방지할 수 있겠으나, 유입의 효율 저감이 우려되므로, 유인팬 등의 부수적인 장치를 혼용하는 것이 바람직 할 수 있음.

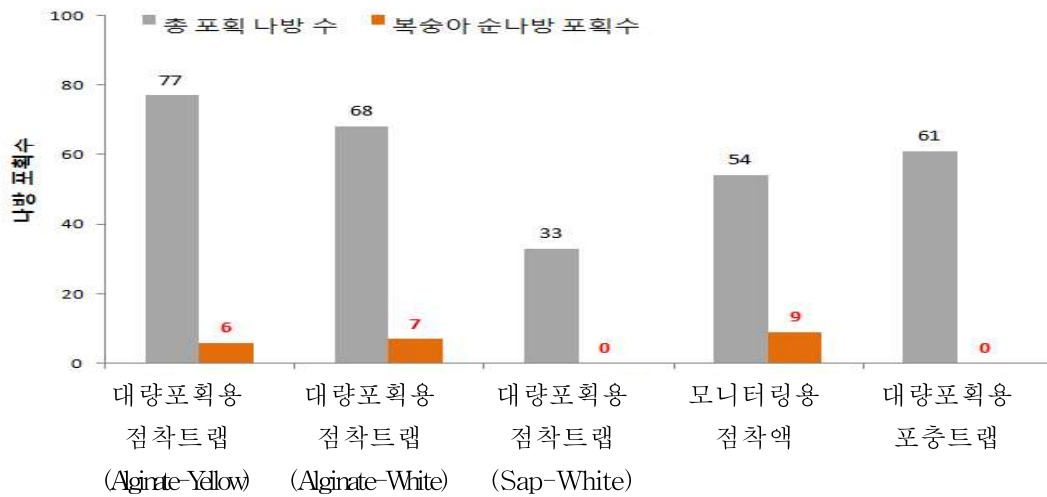


그림 18. 제형 및 현장적용 기술 별 나방 및 복숭아 순나방 포획수.

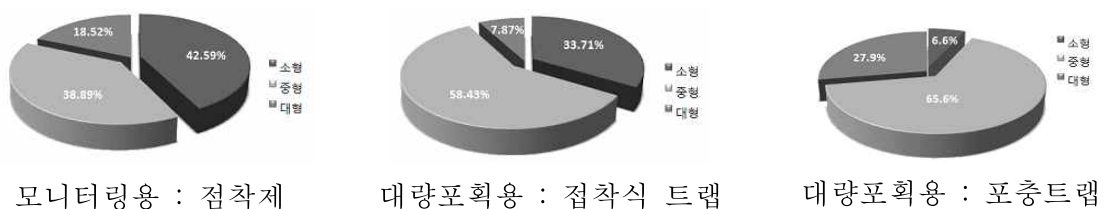


그림 19. 현장적용기술별 포획된 나방 크기 분포.

(4) 결론

- 유인제를 함유한 현장적용기술이 상용제품에 비해 나방 및 복숭아순나방의 포획효율이 증가하는 경향을 보임.
- 그러나 상용제품인 복숭아순나방 페로몬트랩과 대비 복숭아순나방을 선택으로 유인하는 효율이 낮음에 따라, 복숭아순나방의 유인효율을 상승시킬 수 있는 추가적인 연구가 필요함.
- 또한 복숭아순나방은 크기가 작아, 대량 포획용 포충트랩에는 적합하지 않는 결과를 보여, 크기가 작은 복숭아순나방을 효과적으로 포획할 수 있는 현장적용기술의 개발이 필요함.
- 외로 다양한 Stick 및 Roll trap의 주원료인 점착액 내 유인제를 함유한 유인 점착액의 나방 및 복숭아순나방에 대한 포획효율이 관찰되어, 상기 제품의 개발 가능성이 농후함.
- 상기 현장실증 시 복숭아순나방의 출현이 미미하여, 복숭아순나방에 대한 포획효율을 충분히 관찰할 수 없었다는 점에서, 복숭아순나방의 출현이 보고되어지는 다양한 포장에 대한 현장적용이 필요성이 제시됨.

2. 효과적인 현장 사용매뉴얼 개발

가. 설치 방법에 따른 사용매뉴얼 개발

(1) 연구목적

- 효과적인 사용매뉴얼 개발, 기술의 효과적인 현장적용 방안 제시
- 방제기술의 경쟁력 강화

(2) 재료 및 방법

- 다양한 설치 방법(설치 밀도, 높이 등)을 변수로 적용하여 포획효율을 모니터링함.

(3) 수행방법

(가) 현장적용 기술 이격 거리 산출

- 현장 적용 시 다양한 이격거리 별 적용한 기술을 시제품의 포획량을 추적하여 통계학적 분석을 실시, 최적 이격거리를 산출함.

(나) 현장적용 기술 설치 높이 산출

- 현장 적용 시 다양한 거치 높이를 적용한 기술을 시제품의 포획량을 추적하여 통계학적 분석을 실시, 최적 설치 높이를 산출함.

(4) 결과

(가) 설치 간격 제시

- 설치 밀도에 따른 나방 포획현황을 보면 2~10m 의 설치 구간에서 0마리 포획된 실험구가 다수 발생하였으며, 17~18m 구간에서는 3에서 최대 13마리의 포획 개체수를 보이고 있어 최소 10, 최대 18m 내로 유인제를 설치하는 것이 바람직할 것으로 예상됨.

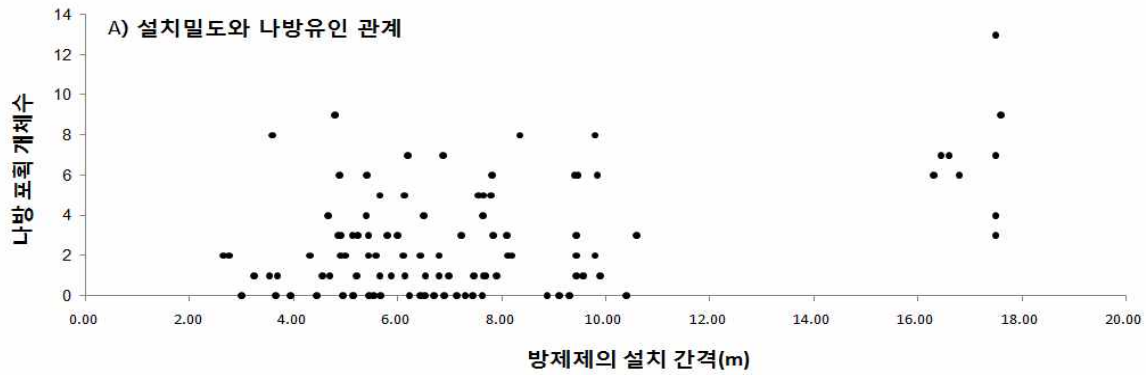


그림 20. 설치 간격에 따른 나방 포획 현황.

(나) 설치 높이 제시

- 1m 이상으로부터 나방 포획 개체수가 증가하는 것을 나타내며, 이는 나방군류의 피식체인 과실의 형성 높이와 유사함을 알 수 있음.
- 따라서 대상 기주식물인 복숭아 외 다양한 작물에 대한 적용 범위를 확대할 경우, 대상 작물의 열매 형성 높이에 거치 하는 것이 바람직 함.

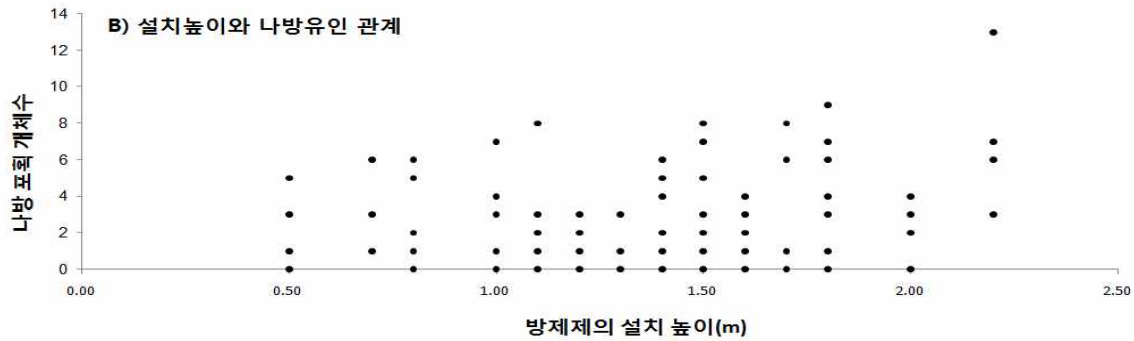


그림 21. 설치 높이에 따른 나방 포획 현황.

(다) 교체 주기

- 그림 22를 살펴보면 대량포획용 점착트랩의 충전재로 활용한 Alginate 미세캡슐이 40일 경과 한 5월16일경 해충 포획 수준은 86미로 약 18% 감소하였고, 모니터링용 점착액은 17미로 약 40% 감소한 결과를 보임.
- 상대적으로 Yellow stick trap의 미미한 감소 결과는 색상에 의한 해충의 유인효과를 유지한 것으로 가정 시, 대량포획용 점착트랩의 유인제는 1회/달로 교체해주는 것이 포획능을 유지하는데 효과적일 것으로 사료됨.

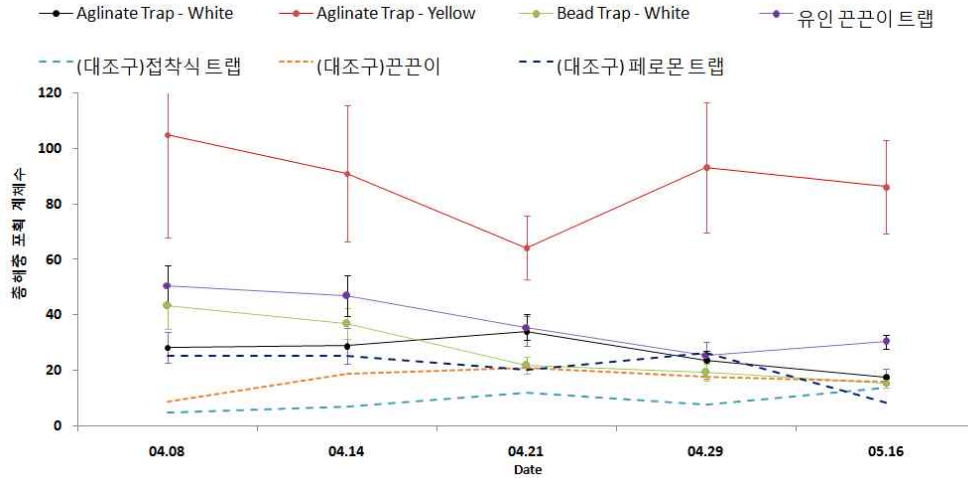


그림 22. 시간에 따른 제형 및 현장적용기술의 해충 포획 결과.

(5) 결론

- 이격거리는 최소 10m~최대 18m, 설치 높이는 과실의 형성부에 동일하게 설치하는 것이 바람직할 것으로 사료되며, 미세캡슐을 활용한 대량포획용 기술의 경우 유인제를 1회/달로 교체해 주는 것이 바람직함.
- 상기와 같은 사용매뉴얼을 제시하였으나, 본 사용매뉴얼은 다양한 현장에 대한 특성 및 세대 구분, 산란기 등의 특성이 적용이 미비함으로, 추가적인 현장적용과 변수에 따른 포획결과의 누적을 통해 보완할 필요성이 있음

제 4절 유인제를 활용한 제품화 방안 연구

1. 유인평판트랩의 개발

가. 유인제 원료의 대량생산

(1) 연구목적

- 유인평판트랩 제작을 위한 유인제 원료의 대량생산
- 유효물질 함량 증진을 위한, 추가적인 장기발효조건 확립

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- 공시 미생물 : *Pichia anomala* MZ-02 (마이크로자임)
- 배지 : yeast extract, peptone, glucose, 상업용 함수결정포도당(대상), soypeptone(hsp349, angel), Yeast extract(FAO₂, angel)
- 생물자원 : 다년생 참나무 줄기

(나) 시험방법

① 유인제의 대량 생산

- *Pichia anomala* MZ-02를 배지 Plate에 평판 도말하여, 30℃에서 이틀 배양 후, 액상 배지 5ml에 1 colony를 접종하여 30℃에서 over night(20-24hr) 배양시키고, 4℃dptj 3,000 rpm으로 15분간 원심분리(VS-5,500, vision scientific Co., Ltd, Korea)하여 균체를 회수하고 균체 현탁액을 배지에 재접종하여 30℃에 5-7일 이상의 정치배양을 실시함.
- 상기 배양액을 seed로 100L 이상 scale-up을 실시하여, 3-5일간 배양을 실시함(표 10).

표 10. Scale-up profile

분류		제조사 및 세부	함유량
배지조성	Glucose	함수결정포도당, 대상	4%
	Peptone	hsp349, soypeptone, tafua	5%
	Yeast extract	FAO2, 엔젤	5%
RPM		100	
Air		28,000	
Temperature ℃		35	
Final volume		70%	
Incubation time		4-5일	

② 유인제의 장기 발효공정

- 유인제의 유효물질 함량 증진을 위해 3개월 이상의 발효공정을 진행하였음.

표 11. 장기발효공정 조건

주요성분	함유율(%)
<i>P. anomala</i> MZ-02 broth	100.0
Brix	50.0
Oak stem	add
Fermentation time	90 day over

나. 개선된 공정에 따른 지표물질 함량 분석

(1) 연구목적

- lab scale / 대량생산용 유인제간의 지표물질 함량분석을 통한 유효물질 함량 증진 여부

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 유인제 : lab scale 기반 유인제, 대량생산 장기발효 유인제
- ② 수행 대상 : 장성 나노바이오연구센터에 시험분석 의뢰

③ GC-MS 분석 조건

- 장비명 : Gas chromatography - Mass spectrometer
- 모델명 : GC-MS-QP2010plus
- 제작사 및 제조국 : shimadzu, 일본
- SPME(Solid Phase Micro-extraction) sampling set, Supleco, USA
- SPME fiber : 50/30 μ m, Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane(DVB/CAR/PDMS)
- 4ml vial set

(나) 실험방법

- ① 유인제 제형 후보군을 5ml SPME 전용 바이알에 약 1.0g으로 취한 후 고체상 미량 추출(Solid Phase Micro-extraction, SPME)를 실시함.
- ② 60 $^{\circ}$ C으로 항온된 SPME stand holder에 시험물질을 옮겨 담은 4mL SPME 전용 바이알을 5 min간 방치하여 안정화한 후 SPME fiber를 바이알의 headspace에 위치하여 30 min 동안 휘발성 유기성분 추출함.
- ③ 휘발성 유기성분이 추출(또는 흡착(adsorption))된 SPME fiber를 미리 설정된 250 $^{\circ}$ C의 GC-MS 시료주입구(injector)에 주입한 후 5 min 동안 탈착(desorption)하여 휘발성 유기성분을 분리·분석함.

(3) 결과

- 유인제의 유효물질로 설정한, Phenyl acetaldehyde, phenethyl alcohol, phenethyl acetate에 대한 분석 결과 대량생산 장기발효 유인제에서 phenethyl alcohol과 phenethyl acetate이 5.59, 17.17 μ g/100mL로 가장 많이 함유되어 있는 것으로 확인됨.

(4) 결론

- 유효물질 함량과 생산단가를 고려할 때 유효물질의 함량이 높은 대량생산 장기발효 유인제가 적합할 것으로 판단됨.

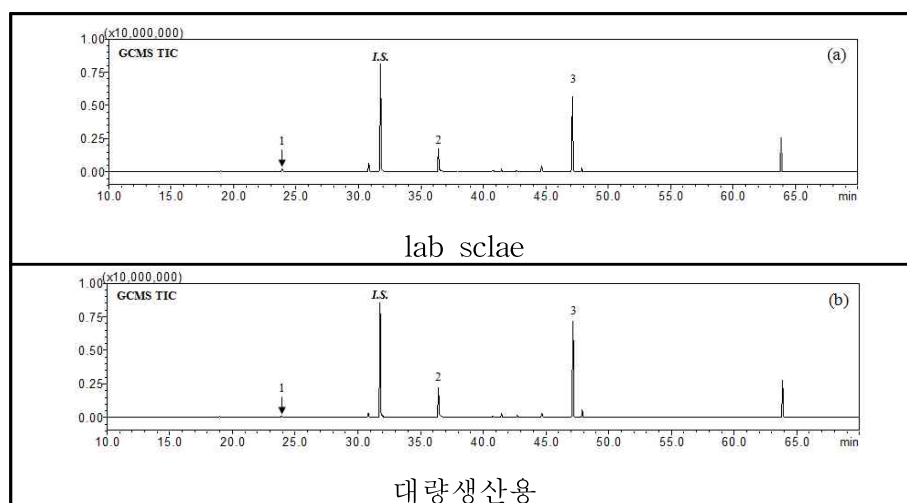


그림 23. 생산조건 별 유인제의 GC/MS Total ion chromatogram(TIC).

표 12. 생산조건별 유인제의 휘발성 향기성분 함량

NO	RT. (min)	RI ¹⁾	Compound	M.F. ²⁾	SI ³⁾	Conc.(%) ⁴⁾		Content (ug/100mL)	
						lab scale	대량생산용	lab scale	대량생산용
1	11.90	772	Lactic acid	C ₃ H ₆ O ₃	99	0.40	0.30	0.12	0.10
2	14.02	804	Isovalericacid	C ₈ H ₁₆ O ₂	92	0.14	0.06	0.04	0.02
3	15.27	823	Furfuryl alcohol	C ₆ H ₆ O ₂	88	0.16	0.15	0.05	0.05
4	16.94	849	Isoamyl acetate	C ₇ H ₁₄ O ₂	94	0.17	0.15	0.05	0.05
5	18.99	880	Furfuryl ether	C ₁₀ H ₁₆ O ₃	85	0.52	0.53	0.16	0.18
6	23.89	948	Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	98	2.63	0.98	0.82	0.34
7	25.58	970	n-Hexanoic acid	C ₆ H ₁₂ O ₂	94	0.42	0.27	0.13	0.09
8	29.58	1023	2-Ethylhexanol	C ₈ H ₁₈ O	98	0.18	0.16	0.06	0.06
9	30.09	1030	Benzyl alcohol	C ₇ H ₈ O	92	0.15	0.12	0.05	0.04
10	30.82	1039	Phenyl acetaldehyde	C ₈ H ₈ O	99	5.70	2.11	1.77	0.73
15	31.77	1052	Butylbenzene(B)						
11	35.57	1102	n-Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	92	0.09	0.16	0.03	0.06
12	36.42	1113	Phenethyl alcohol	C ₈ H ₁₀ O	98	15.33	16.21	4.77	5.59
13	37.96	1134	α-Methylphenethyl alcohol	C ₉ H ₁₂ O	95	0.22	0.32	0.07	0.11
14	40.84	1172	Octanoic acid	C ₈ H ₁₆ O ₂	92	1.83	1.26	0.57	0.44
15	41.46	1181	Diethyl succinate	C ₈ H ₁₄ O ₄	97	1.41	1.96	0.44	0.68
16	42.69	1197	Methyl salicylate	C ₈ H ₈ O ₃	95	1.25	1.20	0.39	0.41
17	44.67	1226	Unknown			3.86	2.65	1.20	0.91
18	47.15	1261	Phenethyl acetate	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	99	44.09	49.78	13.72	17.17
19	47.89	1271	3-Phenylfuran	C ₁₀ H ₈ O	91	2.03	3.51	0.63	1.21
20	53.69	1357	Phenethyl propionate	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	92	0.27	0.26	0.09	0.09
21	54.33	1366	Decanoic acid	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	90	0.34	0.22	0.10	0.08
22	55.12	1378	Butyl butylate	C ₈ H ₁₆ O ₂	95	0.17	0.10	0.05	0.03
23	56.32	1396	Ethyl decanoate	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	89	0.19	0.12	0.06	0.04
24	63.86	1517	2,4-Di-tert-butylphenol	C ₁₄ H ₂₂ O	95	18.37	17.32	5.71	5.97
25	68.93	1602	Butyryl oxide	C ₈ H ₁₄ O ₃	88	0.10	0.07	0.03	0.02
Total						100.00	100.00	31.11	34.48

1) RI : Identification based on retention index at DB-5MS column

2) M.F. : Molecular formula,

3) S.I. : mass spectra library similarity, 4)Conc.(%) : Peak area %

표 13. 유인제의 생산조건 별 유효물질 함량

Peak #	Compound	Content (ug/100mL)		odor characteristics
		Lab scale	대량생산용	
10	Phenyl acetaldehyde	1.77	0.73	honey-like, sweet, rose, green, grassy
12	Phenethyl alcohol	4.77	5.59	sweet, floral, rose
18	Phenethyl acetate	13.72	17.17	raspberry-like taste, rose, honey

다. 복숭아순나방 생물검정 실험

(1) 연구목적

- 개선된 유인제의 복숭아순나방 유인효율 평가

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 유인제 : 대량생산 장기발효 유인제
- ② 수행장비 : 곤충후각감각기
- ③ 수행장소 : 제4협동 실험실 내

(나) 실험방법

- ① 유인제가 침지된 sap 수지 16개를 취하여, 선택부의 종단부에 위치시키고, 다른 한부는 대조구로써 활용함.
- ② 선택부의 시작부에 복숭아순나방을 위치시키고, 종단부로부터 일정량의 바람을 공급하여 유인제의 휘발성 물질이 대상해충으로 전달 되도록 함.
- ③ 10분 내 해충이 선택부에 도달 할 시 'initial response'로 판단하고 해당시간을 기록함.
- ④ 해충이 각 선택구간 중점에서 선택부로 회귀하여 시간 종료 시 최종 'given up'으로 판단하며, 그 시간을 기록함.
- ⑤ 선택구간 중점에서 종점으로 이동 시 최종 'choice to treatment or control'이라 명하며, 이때 처리구에 위치하는 것에 당하여 대상해충에 대해 유인효과가 있다 할 수 있음.
- ⑥ 안동대학교에 복숭아순나방을 공급받아, 1회 실험 시 1개체를 대상으로 실험을 행하고, 반복실험을 실시하였으며, 실험 황용 개체는 반복실험에서 제외함.
- ⑦ 또한 각 실험 후 선택부로 활용되는 Y-tube는 잔류 페로몬의 영향을 배제하기 위해 각기 교체 후 실험을 실시함.



그림 24. 곤충후각감각기 현황.

(3) 결과

- 유인효율 분석결과 유인제에 대해 66.7%의 반응성과 50.0%의 높은 유인성을 나타냄을 확인하였음.

표 14. 복숭아순나방 유인효율 평가 결과

실험 횟수	무반응	최초반응	최초반응 시간(분)	컨트롤 선택	반응 시간(분)	Line cross	Line cross(분)	유인제 선택	컨트롤 선택	도달시간 (분)	포기	결론
1		✓	00:02	✓	00:14	✓	01:05	✓		06:54		유인제 선택
2		✓	00:02		00:13							선택 없음
3		✓	01:47	✓	02:01	✓	02:17	✓		02:17		유인제 선택
4		✓	04:33	✓	04:35	✓	11:27	✓			✓	유인제 선택
5		✓	01:02		01:19						✓	선택 없음
6	✓											무반응

(4) 결론

- 대량생산용 유인제가 복숭아순나방에 대한 유인효과가 있음.

라. 유인평판트랩 최적 공정 개발

(1) 연구목적

- 유인제는 다량의 VOCs로 구성, 점착액과 혼합을 위한 가온 등 공정에 따라 유효 물질의 손실이 우려되어, 최저 가온 조건 아래 점착액과의 혼입조건을 설정이 필요함.
- 유인평판트랩의 점착능력을 유지할 수 있는 혼합비를 산출함.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- 공시 유인제 원료 : *Pichia anomala* MZ-02 (마이크로자임)
- 점착액 원료 : 국내 평판트랩 주 원료인 폴리부텐(Polybutene) 외

(나) 시험방법

① 유인 점착액의 생산

- 점착성 물질은 폴리부텐 50 중량%, 유화제 15 중량%, 수소화탄화수소 수지 20중량%, 방향족계 C9석유수지(HIKOTACK P-90) 4중량%, 공중합체 수지 점착제 4 중량% 및 폴리이소부틸렌 12 중량%의 비율로 혼합함.
- 도포 될 평판은 1세대 현장적용 시 복숭아순나방이 포획효율에서 가장 높은 결과를 보인 노란색으로 결정함.

② 혼합 가온의 최적화

- 상기 ①항에서 온도구배를 변수로 한 혼합 및 점착제의 혼합능을 분석함.
- 혼합능력의 평가는 나쁨, 다소 나쁨, 보통, 좋음, 매우 좋은의 5단계로 평가함.

③ 혼합 속도에 따른 혼합력 평가

- 상기 ①항에서 속도구배를 변수로 한 혼합 및 점착제의 혼합능을 분석함.
- 혼합능력의 평가는 나쁨, 다소 나쁨, 보통, 좋음, 매우 좋은의 5단계로 평가함.

④ 점착능력 평가

- 유인평판트랩을 일정부분 바닥에 위치시키고, 10cm 상공에서 10g의 무게를 지닌 금속을 자유 낙하하여, 평판트랩의 부착능력을 평가함.

(3) 결과

(가) 혼합 가온 및 교반속도에 따른 혼합능력 평가

- 혼합결과 50℃, 200rpm의 교반조건 아래에서 혼합이 관찰되었으며, 80℃ 이상부터는 혼합속도와 관계없이 원활한 혼합 결과를 보임.

표 15. 혼합강도에 따른 점착원료 혼합 능력 평가

Temperature(℃)	Mixing speed (RPM)	Mix result
30	100	-
	200	-
	300	-
40	100	-
	200	-
	300	-
50	100	-
	200	+
	300	++
60	100	++
	200	++
	300	+++
70	100	+++
	200	+++
	300	++++
80	100	++++
	200	++++
	300	++++
90	100	++++
	200	++++
	300	++++
100	100	++++
	200	++++
	300	++++

result) : +++++; 매우 좋음, ++++; 좋음, +++; 보통, ++; 다소 나쁨, +; 나쁨

(나) 유인제 혼입 농도에 따른 점착능력 평가

- 상기 설계된 50.0(±5.0)℃, 300rpm의 조건으로 유인제의 농도 구배를 통해 0.5~7.5% 혼합하였으며, 결과 7.5%까지 점착능의 저하는 없는 것으로 나타남.

표 16. 유인제 혼합농도에 따른 점착능 평가

Mix Concentration(%)	Result
0.5	++++
1.0	++++
1.5	++++
2.0	++++
4.0	++++
5.0	++++
7.5	++++

result) : +++++; 매우 좋음, ++++; 좋음, +++; 보통, ++; 다소 나쁨, +; 나쁨

(4) 결론

- 50℃에서 점착원료의 혼합이 최초 관찰 되었으나, 반응속도가 더디며, 80℃부터 혼합이 원활한 수준으로 관찰되어, 양산 시 최소 가온은 80℃로 설정하는 것이 생산능력 확보에 용의함.
- 또한 유인제가 7.5%까지 함유 시 점착능력의 저하는 관찰되지 아니함에 따라, 7.5% 이상의 유인제가 함유될 수 있는 가능성이 있음을 나타냄.



그림 25. 유인제와 점착액의 혼합 현황.

마. 유인제 혼입농도에 따른 유인평판트랩의 지표물질 함량 평가

(1) 연구목적

- 유인평판트랩 생산 공정 시 일정량의 VOCs가 손실 우려, 유인제 혼입 농도별 유인평판트랩의 지표물질 함량을 분석이 필요함.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 실험 대상 : 혼입농도 1.5, 2.0, 5.0, 7.5%의 유인평판트랩
- ② 수행 대상 : 장성 나노바이오연구센터에 시험분석 의뢰
- ③ GC-MS 분석 조건
 - 장비명 : Gas chromatography - Mass spectrometer
 - 모델명 : GC-MS-QP2010plus
 - 제작사 및 제조국 : shimadzu, 일본
 - SPME(Solid Phase Micro-extraction) sampling set, Supleco, USA
 - SPME fiber : 50/30 μ m, Divinylbenzene/Carboxen/Polymethylsiloxane(DVB/CAR/PDMS)
 - 4ml vial set

(나) 실험방법

- ① 유인평판트랩 도포지에서 점착제를 취하여 SPME 전용 바이알에 약 1.0g으로 취한 후 고체상 미량 추출(Solid Phase Micro-extraction, SPME)를 실시함.
- ② 60℃으로 향온된 SPME stand holder에 시험물질을 옮겨 담은 4mL SPME 전용 바이알을 5 min간 방치하여 안정화한 후 SPME fiber를 바이알의 headspace에 위치하여 30 min 동안 휘발성 유기성분 추출함.
- ③ 휘발성 유기성분이 추출(또는 흡착(adsorption))된 SPME fiber를 미리 설정된 250℃의 GC-MS 시료주입구(injector)에 주입한 후 5 min 동안 탈착(desorption)하여 휘발성 유기성분을 분리·분석함.

(3) 결과

- 분석 시 상당한 휘발성 유기화합물이 검출, 이는 평판 트랩 제작 시 첨가된 점착제에서 유래한 것으로 판단됨.
- 설정 된 3종의 유효(지표)성분 3종 중 Phenethyl alcohol을 제외한 phenyl acetaldehyde와 phenethyl acetate가 동정되어 유인 평판 트랩 내 유인제 함유량에 따라 유의적으로 함유되어 있는 것으로 확인되었음.
- 유인평판트랩 내 유인제의 첨가 비율이 증가할수록 유효물질의 함량은 증가하는 경향을 보이며, 5%의 혼입 조건에서 유효물질의 함량이 가장 높은 결과를 보임.

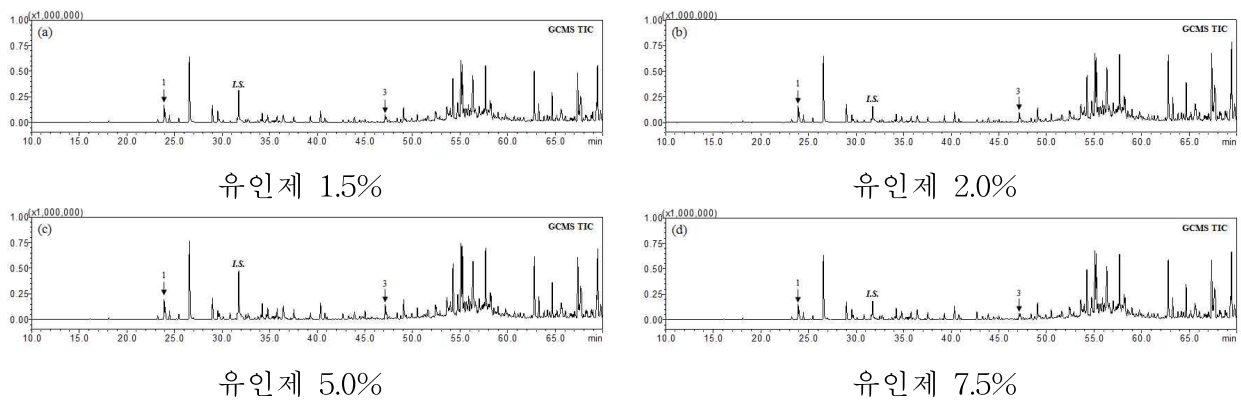


그림 26. 유인제 함량 변화에 따른 유인평판트랩의 GC/MS Total ion chromatogram(TIC).

표 17. 유인제 혼입량에 따른 유인평판트랩의 지표물질 함량 비교

Peak #	Compound			Content (ug/100g)			
	Compound name	M.F.	Structure	p.trap -1.5	p.trap -2.0	p.trap -5.0	p.trap -7.5
1	Phenyl acetaldehyde	C ₈ H ₈ O	<chem>O=Cc1ccccc1</chem>	0.06	0.12	0.29	0.21
2	Phenethyl alcohol	C ₈ H ₁₀ O	<chem>OCCc1ccccc1</chem>	-	-	-	-
3	Phenethyl acetate	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	<chem>CC(=O)OCCc1ccccc1</chem>	0.44	0.60	0.88	0.39

(4) 결론

- Phenethyl alcohol는 강력한 VOCs로 점착제와 유인제 간 혼입과정에 행하여진 가온공정에 의해 손실되었을 것으로 사료되어짐.
- 유인평판트랩 내 유효물질의 함량은 유인제의 혼입 강도에 유의하게 증가하는 경향을 보이고 있으나 7.5%의 조건에서 5.0%와 비교하여 낮은 함유량을 보임.
- 따라서 유인평판트랩의 최적 혼합비는 5.0%로 결정함.

2. 유인평판트랩의 현장적용

가. 유인평판트랩과 유인델타트랩의 현장적용 평가

(1) 연구목적



- 유인델타트랩은 유인제 거치부 + 포획부가 별도로 구성된 형태로 제품 개발을 위해 금형등의 추가적인 개발 공정이 필요함.
- 그와 반면에 유인평판트랩은 기존 시장에 유통되고 있는 평판트랩 내 유인제를 혼합하여 낮은 개발비용 대비 신속한 제품을 개발할 수 있는 장점이 있음.
- 당초 현장 실증 시 복숭아순나방은 소형해충에 분류되어 대량포획용 포충트랩의 포획효율이 미비한 결과를 보임에 따라, 사전 기술인 유인델타트랩 대비 유인평판트랩의 효율을 평가하여 유인평판트랩의 포획효율을 평가하고자 함.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- 시험구 : 유인평판트랩(IPT), 유인델타트랩(IDT)
- 대조구 : 복숭아순나방 페로몬트랩, 평판트랩(PT)

표 18. 현장적용 제품 분류

실 험 구	대 조 구
 <p>유인델타트랩I(IDT) 유인평판트랩(IPT)</p>	 <p>페로몬트랩 평판트랩(PT)</p>

(나) 적용 대상지

- 유기농 포장 7개소, 해충 출현 보고지 2개소
- 전남 화순, 곡성, 구례, 전북 전주, 전북 남원 권역

(다) 시험시기 : 16.06~16.09, 17.04~17.09

- 16년도 : 6월~9월, 17년도 : 7월~9월



그림 27. 현장적용 시험 장소.

(라) 평가 방법

- 일괄 수거 후 -4℃ 냉동보관, 포획된 개체 현황분석
- 도감 : 식물병해충 도감 개정판, 학술편수관 上/下, 원색한국나방도감, 아카데미서적, 나무해충도감, 소담출판사 참조

(3) 결과

(가) 총 해충 포획량

- 시험구인 유인델타트랩(IDT) 내 포획된 총 해충은 평균 129.7마리(표준편차 : 49.137), 유인평판트랩(IPT)은 88.1마리(표준편차 : 28.164)의 포획량을 보였음.

- 대조구인 평판트랩(PT)은 56.7마리(표준편차 : 21.533)의 포획 결과를 보였으며, 페로몬트랩은 포획량이 매우 미미하였음.
- 대조구인 평판트랩(PT)에 비해 유인제가 혼입된 유인평판트랩(IPT)는 31마리, 55.3%의 포획량이 향상됨을 확인할 수 있으며, 유인제 함량이 가장 높은 유인델타트랩(IDT)는 포획량이 가장 높은 129.7마리로 대조구에 비해 73마리, 128.7%의 포획 개선 결과를 보였음.

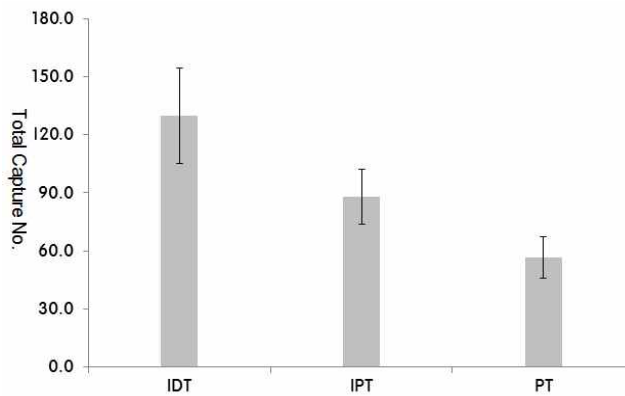


그림 28. 제품 형태 별 해충 총 포획량.

(나) 나방 및 복숭아순나방 포획량

- 나방군의 포획 기여율을 보면 유인델타트랩(IDT)가 7.9%, 유인평판트랩(IPT)가 6.2%, 대조구인 평판트랩(PT)가 2.2%의 포획 기여율을 보임.
- 상기와 같은 결과는 유인성분의 함유량에 따른 IDT>IPT>PT순의 바람직한 포획 결과로 보임.
- 대상 해충인 복숭아순나방은 유인델타트랩이 2.1%, 유인평판트랩이 0.7%, 대조구인 평판트랩이 0.2%의 포획 기여율을 보여, 복숭아순나방 페로몬트랩의 관찰결과 복숭아순나방 발생이 미비하나, 조건에 따른 비교 시 유인제 적용 함량에 따른 복숭아순나방 포획효율이 상승함을 확인함.

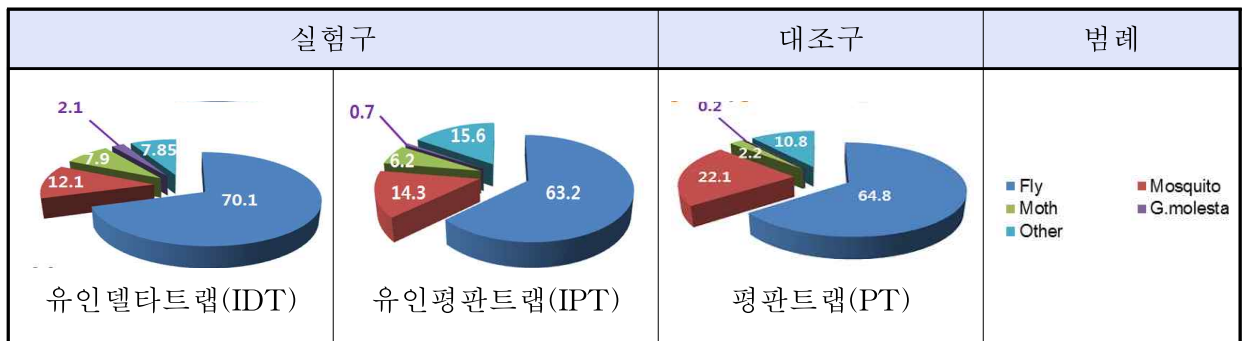


그림 29. 조건별 포획 해충 포획 현황.




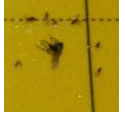


페로몬 트랩			기존 평판트랩		
					
복숭아순나방(<i>G.molesta</i>)			파리 및 초파리	별넓적꽃등에 (<i>M. corollae</i>)	플색노린재 (<i>Nezaratanta</i>)

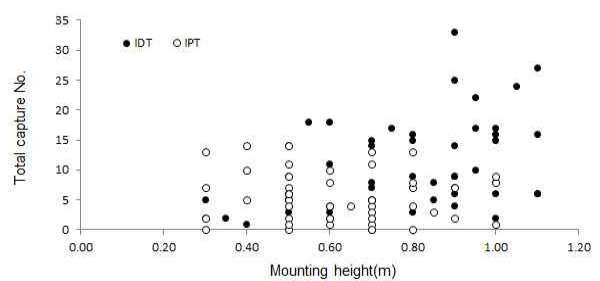
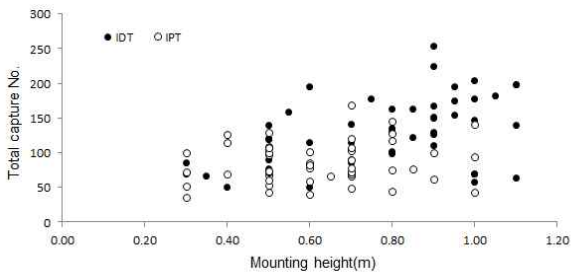
그림 30. 대조구의 주요 포획 해충.



그림 31. 실험구의 유인델타트랩(IDT) & 유인평판트랩(IPT)의 주요 포획 해충.

(다) 최적 사용 매뉴얼 개발

- 유인델타트랩(IDT), 유인평판트랩(IPT)의 설치 높이에 따른 해충 포획 분포를 살펴 보면 0.8~1.0m의 범위에서 높은 포획수준을 보임을 알 수 있음.
- 또한 나방에 대한 경우 해충 포획 분포와 유사하게 0.8~1.0m 범위가 가장 높은 수준을 보이며 비행해충의 비행 고도와 각종 과실이 형성되는 높이가 0.8-1.0m에 인접한 결과로 사료됨.
- 따라서 본 유인평판트랩 및 유인델타트랩은 과실의 형성 높이에 동일하게 거치하는 것이 효과적일 것으로 보임.

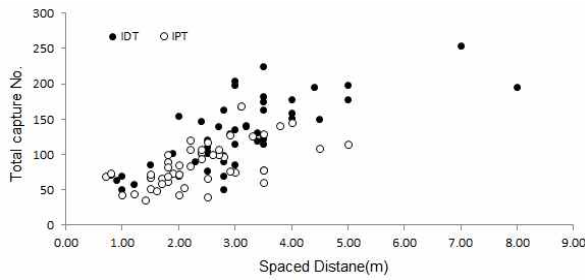


설치높이에 따른 해충 포획 분포

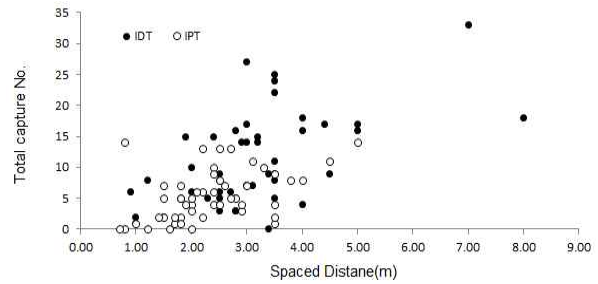
설치높이에 따른 나방 포획 분포

그림 32. 설치높이에 따른 포획 분포.

- 유인델타트랩(IDT), 유인평판트랩(IPT)의 이격거리에 따른 포획분포를 살펴보면 이격거리에 따라 점차 증가하는 포획수준을 보이고 있음.
- 특히 나방의 경우, 이격 거리의 증가에 따라 지속적인 포획 상승을 볼 수 있으며, 3m 초과 시 포획효율의 증가는 완만한 수준을 보임.
- 3m 미만 시 각 시제품 내 함유된 유인제의 확산에 의한 포획 간섭효과로 사료되며, 3m 초과 시 완만한 포획 상승은 일정부분 간섭효과에서 자유로운 것을 볼 수 있음.
- 따라서 설치 간격은 3m를 경계로 두고 설치하는 것이 바람직할 것으로 사료됨.



설치간격에 따른 해충 포획 분포



설치간격에 따른 나방 포획 분포

그림 33. 설치간격에 따른 포획분포.

- 설치 위치에 따른 나방 포획결과를 볼 때 인근 야산 및 그와 인접한 포장 경계부에서 주로 Level 3 - 2(35~25 ; 19~10m)의 높은 포획 결과를 나타냄.
- 이는 방제가 어려운 외부 인근 야산을 비롯한 주요 서식처에 대한 자유로운 입출입에 관한 결과로 보여짐.
- 경계부에 설치 시 1차적으로 포장 진입 이전, 본 시제품을 우선순위로 인식하여 포획된 결과로 보여짐.
- 따라서 본 시제품의 현장 적용 시 인근 야산과 피해대상지 경계부에 설치 시 외부 유출입에 당하는 나방에 대한 유입을 저감하는데 효과적일 것으로 사료됨.



그림 34. 포장 경계부에 따른 나방 포획 효율.

(4) 결론

- 유인제의 함유량에 따라 대상해충인 복숭아순나방 및 다양한 해충의 포획 상승효과를 나타내고 있음.

- 또한 신규로 개발한 유인평판트랩(IPT)의 경우 기 시장 제품인 평판트랩(PT)와 비교하여 포획효율이 상승함을 확인, 유인평판트랩이 제품 경쟁력을 확인함.
- 설치 시 과실의 형성 높이와 유사하게 거치하는 것이 바람직하며, 설치 간격은 3m 이상으로 설치하는 것이 포획효율을 유지하는데 바람직함.
- 또한 포장 내측보다 포장경계부에 설치하는 것이 포획효율 측면에서 바람직함.

제 5절 시제품의 적용 확대 시험

1. 갈색날개매미충에 대한 적용 확대 시험

가. 갈색날개매미충 생물 검정 실험

(1) 연구목적

- 다양한 현장적용 결과 유인평판트랩(IPT) 내 갈색날개매미충이 포획됨을 확인함에 따라 유인제의 유인여부를 검토하여 적용 확대를 검토함.
- 상기 해충은 외래해충으로써 2011년 전남 구례를 시작으로 전국적으로 확산되어 가고 있는 방제대상 해충이며, 발생강도가 점차 과속화 되어 가고 있는 실정임.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- 유인제 : 대량생산 장기발효 유인제
- 수행장비 : 곤충후각감각기
- 수행장소 : 전남농업기술원 친환경 연구소

(나) 실험방법

- 유인조성물이 침지된 고흡수성 수지 일정량을 취하여, 선택부의 종단부에 위치시키고, 다른 한부는 대조구로써 활용함.
- 곤충후각감각기의 구조는 크게 유인성 물질 투여부, 곤충의 방향 선택을 유발하는 Y자관 및 최초 곤충을 투여하는 투여조의 3개소로 구성됨.
- 물질 투여부에서 미세한 바람에 의해 시험 곤충이 위치한 곳으로 서서히 향기가 전달, 이에 이끌린 해충이 유인되는 것을 관찰하는 원리임.
- 전남농업기술원 곤충 사육조에서 갈색날개매미충을 공급받아 20마리씩 총 3회 반복 실험을 실시하였으며, 최종 위치한 곳의 해충의 수를 관찰함.
- 이 때 활용되어지는 Y자관 및 해충은 1회 활용 후 교체하여 반복실험에 영향을 주는 인자들을 배제함.



곤충후각감각기 구성



유인물질 투여부



해충의 방향선택 - Y자관

그림 35. 곤충후각감각기 현황.

(3) 결과

- 분석결과 대상해충은93.3%의 반응성이 있으며, 70.0%의 높은 유인성을 나타냄을 확인함.

표 19. 갈색날개매미충 유인효과 분석

반복	시험충수	유인충수(마리)		
		유인물질	중양(혼합부)	무처리
1	20	16	3	1
2	20	12	7	1
3	20	14	4	2
계	60	42	14	4
비율(%)		70.0	23.3	6.7

(4) 결론

- 대량생산용 유인제가 갈색날개매미충에 대한 유인성이 있음을 확인함.

나. 유인평판트랩의 다양한 포장에 대한 현장적용 실험

(1) 연구목적

- 기존 평판트랩(PT)와 유인제를 혼합한(IPT)간의 갈색날개매미충 포획 효율 평가를 통한 제품 적용 가능성을 평가함.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- 시험구 : 유인평판트랩 (IPT)
- 대조구 : 시장 상용화 평판트랩 (PT)

(나) 적용 대상지

- 전남 : 화순, 곡성, 구례
- 전북 : 전주, 남원
- 충남 : 천안
- 외 : 광주광역시

(다) 평가 방법

- 일괄 수거 후 -4℃ 냉동보관, 포획된 개체 현황을 분석함.

(3) 결과

(가) 전남 남원 밤 및 감 포장 적용 결과

- 전북 남원에 위치한 밤나무 포장에서 대조구 및 시험구를 인접하여 거치한 1차 실험 결과 대조구는 3~21미, 총 36미를 포획하였으며, 유인평판트랩은 11~56미 총 100미를 포획함.
- 2차 시험 결과 대조구는 3~23미, 총 42미를 포획하였고, 유인평판트랩은 14~66미, 총 129미를 포획하였음.
- 유인평판트랩은 대조구 대비 최소 166.7%, 최대 366.7%의 포획 상승효과를 나타내었음.

표 20. 전북 남원의 밤포장의 현장적용 결과

설치기간	반복	유인평판트랩	대조구 평판트랩	포획 개선률(%)
16.09.27 - 10.07	1	11	3	266.7
	2	33	12	175.0
	3	56	21	166.7
	계	100	36	177.8
16.10.08 - 10.18	1	14	3	366.7
	2	49	16	206.3
	3	66	23	187.0
	계	129	42	207.1

- 감포장에 대한 1차 적용 결과 평판트랩은 20~48미, 총 114미를 포획하였으며, 유인평판트랩은 배수 이상 높은 74~92미, 총 236미를 포획하였음.
- 2차 적용 결과 평판트랩은 33~48미, 총 129미를 유인평판트랩은 85~105미, 총 289미를 포획한 결과를 보여, 대조구 대비 최소 52.2%, 최대 270%의 포획 상승 결과를 나타냄.

표 21. 전남 남원의 감포장의 현장적용 결과

설치기간	반복	유인평판트랩	대조구 평판트랩	포획 개선률(%)
16.09.27 - 10.07	1	74	20	270.0
	2	92	48	91.7
	3	70	46	52.2
	계	236	114	107.0
16.10.08 - 10.18	1	105	33	218.2
	2	99	48	106.3
	3	85	48	77.1
	계	289	129	124.0



그림 36. 남원 감나무 포장의 포획 현황.

(나) 전남 구례 산수유 포장 적용 결과

- 유인평판트랩은 총 71미, 대조구인 평판트랩은 20미를 포획하여, 255%의 포획 상승 효과를 나타냄(그림 37).



그림 37. 구례 산수유 포장의 포획현황.

(다) 화순 블루베리포장 적용 결과

- 대조구는 72미를, 유인평판트랩은 동일면적 대비 390미를 포획하였으며, 442%의 포획상승 효과를 나타냄(그림 38).



그림 38. 화순 블루베리포장의 포획현황.

(라) 광주광역시 블루베리포장 적용 결과

- 갈색날개매미충이 다수 포획된 것을 확인할 수 있으며, 약 1,000미 이상이 포획된 것을 확인할 수 있었음(그림 39).

(마) 광주광역시 노지

- 갈색날개매미충이 다수 포획된 것을 확인할 수 있으며, 약 400미 이상이 포획된 것을 확인할 수 있었음(그림 40).

(바) 충남 천안 호두 농장

- 거치 후 1일 경과만에 500미 이상이 포획됨을 확인함(그림 41).

(사) 광주 공원 녹지

○ 거치 후 4일 경과만에 300미 이상이 포획됨을 확인함(그림 42).



그림 39. 광주 블루베리포장의 포획현황.



그림 40. 광주 노지의 포획현황.



그림 41. 천안 호두농장의 포획현황.



그림 42. 광주 공원 녹지의 포획현황.

(아) 전북 전주

○ 출현이 보고되는 전북전주 공원에 대한 적용 결과 평판트랩은 14~31미, 총 138미를 포획하였으며, 유인평판트랩은 배수 이상 높은 27~70미, 총 351미를 포획하여, 대조구 대비 최소 42.1%, 최대 200.0%의 포획 상승 결과를 보임.

표 22. 전북 전주의 포획 현장적용 결과

설치기간	반복	유인평판트랩	대조구 평판트랩	포획 개선률(%)
16.10.1 - 16.10.11	1	55	21	161.9
	2	42	14	200.0
	3	64	22	190.9
	4	70	31	125.8
	5	38	16	137.5
	6	27	19	42.1
	7	55	15	266.7
	계	351	138	154.3



그림 43. 전주 출몰지의 포획현황.

(4) 결론

○ 유인평판트랩이 평판트랩에 비해 높은 갈색날개매미충 포획효율을 보임에 따라, 성

공적인 사업화 가능성이 농후하며, 갈색날개매미충은 넓은 기주식물 스펙트럼에 의해 전국적으로 확산되어 가고 있는 주요 해충임에 따라, 적용범위를 넓히는 것이 성공적인 사업화 측면에서 바람직함.

2. 온실가루이에 대한 적용 확대 실험

(1) 연구목적

- 개발한 유인평판트랩(IPT)는 원예시설에 친환경 방제 목적으로 주로 활용되는 제품으로써, 주요 방제 대상해충 내 온실가루이가 포함되어 있음.
- 따라서 상용 평판트랩과의 포획 개선효율을 평가하여, 원예시설 내 진입여부를 평가하도록 함.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- 시험구 : 유인평판트랩 (IPT)
- 대조구 : 시장 상용화 평판트랩 (PT)

(나) 적용 대상지

- 전남 영암 원예시설 방울토마토

(다) 평가 방법

- 2주간 누적된 온실가루이 포획 개체수 모니터링

(3) 결과

- 유인제 무첨가 군인 평판트랩은 최소 39.8, 최대 129.2미, 총 388.6미의 포획량을 보이고 있으며, 첨가군인 유인평판트랩은 최소 79.2, 최대 236.0미, 총 674.6미의 포획결과를 보임.
- 유인제를 첨가한 유인평판트랩은 대조구인 평판트랩에 비해 최소 54.7%, 최대 99.0%, 총 73.6%의 향상된 포획 결과를 보이고 있음.

표 23. 전남 영암 원예시설의 갈색날개매미충 포획 개선 결과

포획량 산출 기준	반복	유인평판트랩	대조구 평판트랩	포획 개선률(%)
2주간 포획량 / 3cm ³	1	79.2	39.8	99.0
	2	108.6	70.2	54.7
	3	129.8	71.6	81.3
	4	236.0	129.2	82.7
	5	121.0	77.8	55.5
	계	674.6	388.6	73.6

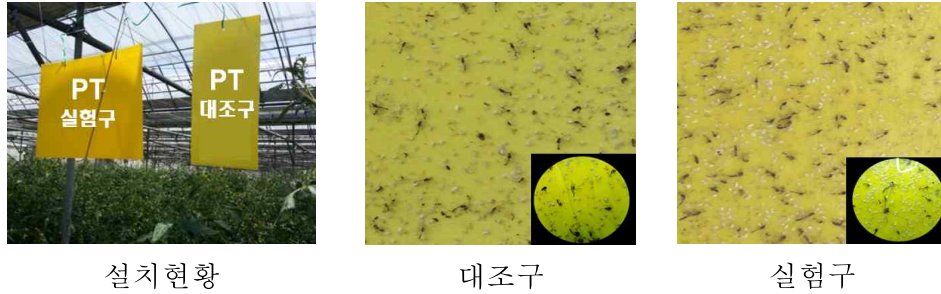


그림 44. 전주 영암의 포획현황.

(4) 결론

- 유인제를 첨가한 유인평판트랩이 대조구인 평판트랩에 비해 향상된 포획효율을 보이고 있어, 업그레이드 된 제품으로써 시장적용 가능성이 농후함.

제 6절 최종 제품의 위해성 및 적합성 평가

1. 최종 유기농업자재 등록을 위한 현장 적용 기술 선발 및 시험 분석 범위 설정

(1) 선발목적

- 당초 최종 개발한 유인평판트랩(IPT)을 대상으로 유기농업자재 공시를 실시하려 하였으나, 유기농업자재 공시 수행기관인 강원대학교 친환경농산물 안전성 센터에서 불가함을 통보함.
- 따라서 유기농업자재 등록을 위해 허용범위 내 유인제의 유기농업자재 등록을 실시함.
- 대량생산의 용의성 및 가격 경쟁력 확보 측면을 고려하여 시중에 시판되는 고흡수성 수지 내 유인제를 침지하여 입자형 유인제로써 유기농업자재 등록을 실시함.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- 유인제 : 대량생산용 유인제
- 발생부 : Super absorbent polymer(고흡수성 수지)
- 발생부인 고흡수성 수지는 유아, 성인, 동물용 기저귀로 많이 쓰이며, 식품 포장재, 농업·원예 보수 및 시트 등으로 사용되며, 또한 각종 방향제의 발생부로 활용됨.

(나) 목록공시 전담기관

- 강원대학교 친환경농산물 안전성 센터

(다) 평가 방법

- 강원대학교 친환경농산물 안전성 센터 심의의원 평가

(3) 결과

(가) 자재의 명칭 및 구분

- 충해관리용 미생물추출물로 등록 범위를 설정함.

(나) 시험 분석 기관

- 강원대학교 친환경농산물 안전성 센터

(다) 실험방법

① 시료 조제

- 이빨립 유인제 제품 1ml(g)을 멸균된 생리 식염수 9ml에 넣고 혼합하여, 1:10 희석액을 만든 후 이를 5mL를 취해 멸균된 생리식염수 5mL를 넣어 1:20 희석액을 제조함.

② 병원성 대장균(*Escherichia coli* O157:H7) 검사

- 선택배지인 Eosin Methylene Blue Agar 배지에 조제된 시료 100μL를 접종한 후 이를 37°C에서 48-72시간 배양한 후 청록색 Colony의 유무를 확인함.

③ 병원성 살모넬라(*Salmonella* spp.) 검사

- 선택배지인 Hektoen Enteric Agar 배지에 조제된 시료 100μL를 접종한 후 이를 37°C에서 48-72시간 배양한 후 검은색 Colony의 유무를 확인함.

④ 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 검사

- 선택배지인 Baird Parker Agar 배지에 조제된 시료 100μL를 접종한 후 이를 37°C에서 24-48시간 배양한 후 검은색 Colony의 유무를 확인함.

⑤ 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria Monocytogenes*) 검사

- 선택배지인 Oxford Agar 배지에 조제된 시료 100μL를 접종한 후 이를 37°C에서 24-48시간 배양한 후 검은색 Colony의 유무를 확인함.

⑥ 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 검사

- 선택배지인 Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar 배지에 조제된 시료 100μL를 접종한 후 이를 37°C에서 24-48시간 배양한 후 연분홍색 Colony의 유무를 확인함.

(3) 결과

① 병원성 대장균(*Escherichia coli* O157:H7) 검사 결과

- 청록색 Colony가 검출되지 않아 병원성 대장균 음성으로 판정됨(그림 46).

② 병원성 살모넬라(*Salmonella* spp.) 검사 결과

- 검은색 Colony가 검출되지 않아 살모넬라 음성으로 판정되었음(그림 47).

③ 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 검사 결과

- 검은색 Colony가 검출되지 않아 황색포도상구균 음성으로 판정되었음(그림 48).

④ 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria Monocytogenes*) 검사 결과

- 검은색 Colony가 검출되지 않아 리스테리아 모노사이토제네스 음성으로 판정되었음(그림 49).

⑤ 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 검사 결과

- 분홍색 Colony가 검출되지 않아 바실러스 세레우스 음성으로 판명되었음(그림 50).



그림 46. 병원성대장균 결과.



그림 47. 병원성 살모넬라 결과.

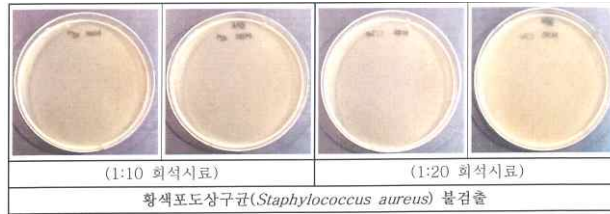


그림 48. 병원성 황색포도상구균 결과.



그림 49. 리스테리아 모노사이토제네스 결과.

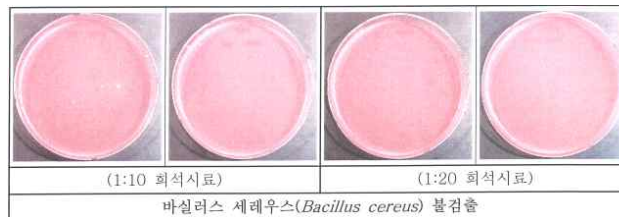


그림 50. 바실러스 세레우스 결과.

(4) 결론

- 병원성 미생물 5종에 대한 불검출 결과를 보여 유기농업자재로써 적합함.

나. 잔류농약분석

(1) 연구목적

○ 유기농자재 고시 및 제품 유해성 평가를 하기 위함.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

○ 유인제 : (주)마이크로자임 해충 유인제 이끌림

(나) 시험 분석 기관

○ 강원대학교 친환경농산물 안전성 센터

(3) 결과

○ 분석 결과 Abamectin B1 등 총 322종에서 불검출임.

(4) 결론

○ 잔류농약 322종에 대한 불검출 결과를 보여 유기농업자재로써 적합함.

잔류농약 시험(검사)성적서

1. 검사시료

발급번호		제 EFAPSC-2017-30-01 호	발급일	2017. 10. 11.
접수번호		17-FP-83	접수일	2017. 09. 18.
의뢰인	성명	(주)마이크로자임	사업자등록번호	409-86-19995
	주소	전라남도 담양군 담양읍 태봉로 97		
의뢰내용	대상품목명	해충유인제 이끌림	Lot. No.	17.09.13
	시험개요	잔류농약검사 (Abamectin B1 등 322종)		
	용도	유기농업자재공시용		

2. 검사결과

No.	검출성분명 (Pesticide Name)	검출치 (mg kg ⁻¹)
1	불검출	-
분석을 실시한 Abamectin B1 등 322종에서 위 성분을 제외한 나머지 성분은 불검출입니다.		

* 불검출은 검출한계 미만으로 검출이 되지 않은 것을 뜻함.

** 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로써 전체제품에 대한 품질을 보증하지는 않음.

*** 본 성적서의 결과는 광고, 전단, 홍보 및 소송 등의 수단으로 사용하지할 수 없음.

그림 51. 잔류농약 분석 결과.

다. 이화학분석

(1) 연구목적

○ 유기농자재 고시 및 제품 유효성분 함량 증빙을 위함.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

○ 유인제 : (주)마이크로자임 해충 유인제 이끌림

(나) 시험 분석 기관

○ 강원대학교 친환경농산물 안전성 센터

(다) 분석대상

○ 유인제의 지표물질로 설정한 Phenethyl alcohol

(라) 실험방법

○ HPLC/UVD를 이용한 정량분석

(3) 결과

○ 최소 6.467, 최고 6.510, 평균 6.158mg/kg의 함량이 분석되었음.

(4) 결론

○ 지표물질이 검출되어, 이를 최소 준수하는 것이 유기농업자재로서 적합함.

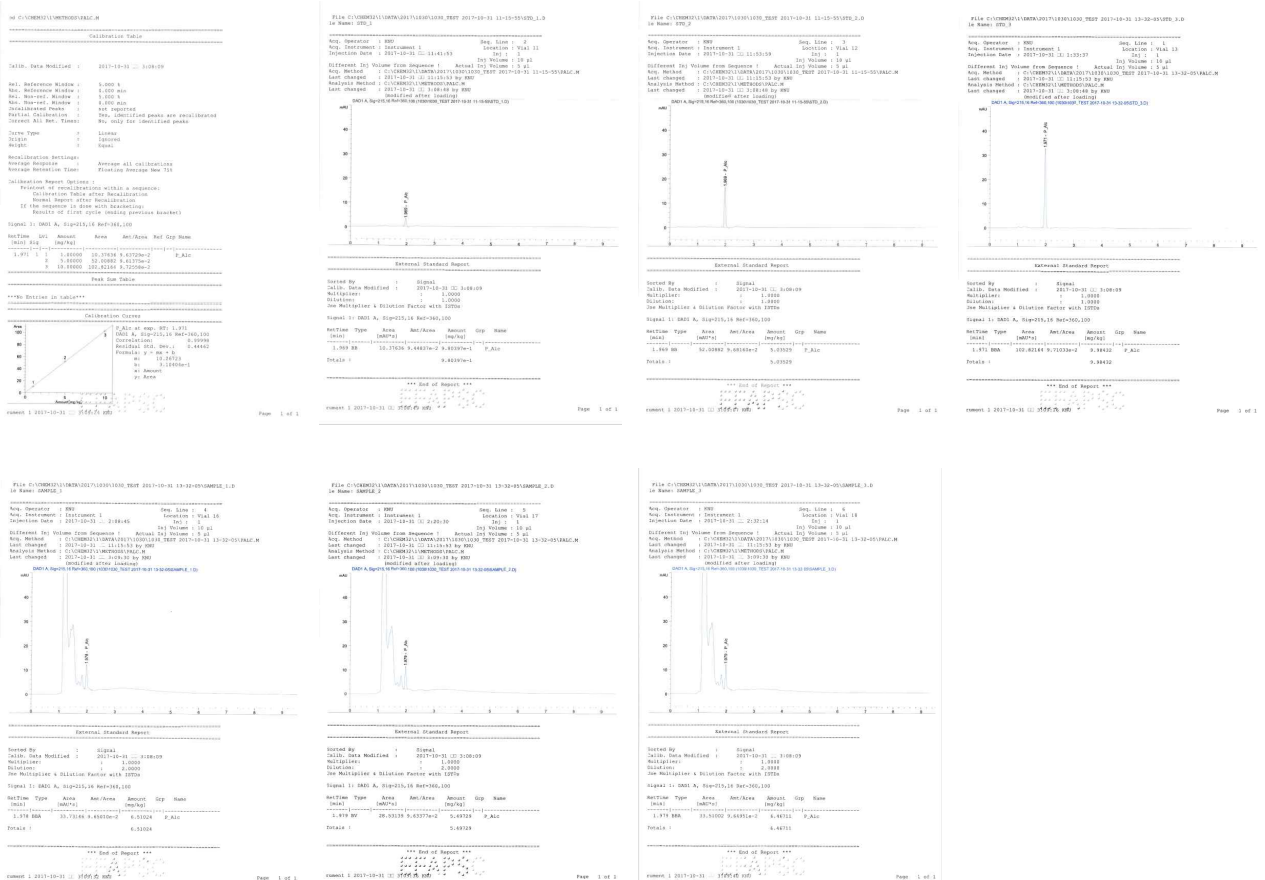


그림 52. 이화학분석결과.

제 7절 최종제품의 생산

1. 최종제품의 등록 및 사용 방법

가. 유기농업자재 신청 및 등록

- 강원대학교 친환경농산물 안전성센터와 협업하여 '18년 1월 24일 총해관리용으로 유기농업자재 목록 공시를 완료함(그림 53).

나. 최종 제품의 사용방법

(가) 유기농업자재 이끌림

① 특장점

- 효모미생물이 생성하는 휘발성 유인향기에 의한 해충 효과
- 노지 과수 작물 및 원예시설 내 해충 유인효과
- 미생물에 의한 제제로 환경 및 인축에 무해
- 액상 및 과립형태 유인제, 기존 해충 범용 포획기 활용 가능

② 대상해충

- 산림 및 노지 : 갈색날개매미충
- 과수원 : 복숭아순나방 및 비행해충(담배 및 밤나방 포함)
- 원예시설 : 온실가루이, 총채벌레 류
- 축사 및 돈사 : 각종 파리 및 모기

③ 사용방법 및 표기사항

- 사용법 : 기존 해충 포획기 내 200g 이상 충전 활용
- 설치밀도 : 20평당 1ea
- 유인 유효 기간 : 30일(교체주기)
- 제조일자 : 별도표기
- 유효기간 : 제조일로부터 1년, 개봉후 30일

(나) 유인평판트랩 이끌림

① 대상해충

- 산림 및 노지 : 갈색날개매미충
- 과수원 : 갈색날개매미충, 복숭아순나방 및 비행해충(담배 및 밤나방 포함)
- 원예시설 : 총채벌레, 온실 및 담배가루이
- 축사 및 돈사 : 파리 및 모기 등 위생 해충

② 사용방법

- 제품별 설치 장소 및 시기

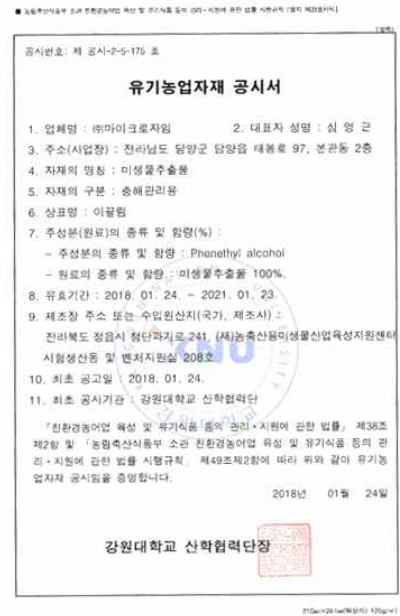


그림 53. 목록공시서.



그림 54. 사용매뉴얼 초안.

표 24. 유인평판 및 롤트랩의 설치 장소 및 방법

제품 종류	활용방법	설치 높이	설치 위치	
평판트랩	유입예상 경계부 집중설치 (내부 살충 약제 처리 혼용 가능) 살충 약제 처리 횟수 저감 + 외부 유입밀도 감소 최종 피해 지역 밀도 저감 효과	피해가 예상되는 신주가지 높이	하우스	포장에 골고루 배치
롤트랩			노지	야산등 해충 유입 경계부 집중배치
	산림		작물 생산지역 경계부 집중 배치	

○ 제품 시기별 설치 밀도

표 25. 제품 시기별 설치 밀도

제품 종류	전용 면적(평)	설치 목적	설치 개수(장)
평판 트랩	300	예찰용	5
	3,000		50
	300	포획 방제용	30
	3,000		300
	300	산란 시	50
	3,000		500
롤 트랩	300	포획 방제용	1개
	3,000		10개
	300	산란 시	2개
	3,000		20개

③ 제품규격 및 표시사항

- 제품 규격 : 평판트랩 - 250 × 400mm, 롤트랩 - 200mm × 100meter
- 제품 포장 : 평판트랩 - 50장, 1pack, 5pack/box, 롤트랩 - 8ea / box
- 제조사 : 마이크로자임, We-chemical
- 보증기간 : 제조일로부터 1년
- 주의사항 : 밀폐유지, 건·냉·암소 보관



그림 55. 이끌림 series 제품 종류.



그림 56. 사용매뉴얼.

2. 최종제품의 제품생산과정

가. 제품의 제조 공정

① 유기농업자재 이끌림

- *Pichia anomala* MZ-02를 배지 Plate에 평판 도말하여, 30°C에서 이틀 배양 후, 액상 배지 5ml에 1 colony를 접종하여 30°C에서 over night(20-24hr) 배양시키고, 4°C 3,000 rpm으로 15분간 원심분리(VS-5,500, vision scientific Co., Ltd, Korea)하여 균체를 회수하고 균체 현탁액을 배지에 재접종하여 30°C에 5-7일이상의 정치배양을 실시함.
- 상기 배양액을 seed로 100L 이상 scale-up을 실시하여, 3-5일간 배양을 실시함
- 유인제의 유효물질 함량 증진을 위해 3개월 이상의 발효공정을 진행하여 유인제 생산을 완료함.
- 발생부인 High absorbent resin(고흡수성 수지)를 유인제에 10%(W/W) 비율로 반응조에 하루동안 침지하며 지정 용기에 포장하여 생산공정을 완료함.



그림 57. 제조공정도.

② 유기평판 및 물트랩 이끌림

- 상기 ①항의 유인제 제조 공정을 실시함.
- 최적 생산 조건을 기반으로 폴리부텐 외 점착물질과 생산 유인제를 5% 함유하여 점착층이 형성되도록 함.
- 점착 물질을 80℃로 2차 가온, 트랩 제조를 위한 평판에 점착물질을 도포함.
- 다양한 크기로 재단하고, 이형지를 부착, 상단부에 천공을 실시하여, 최종 밀봉포장을 통한 제품의 안전성을 확보함.

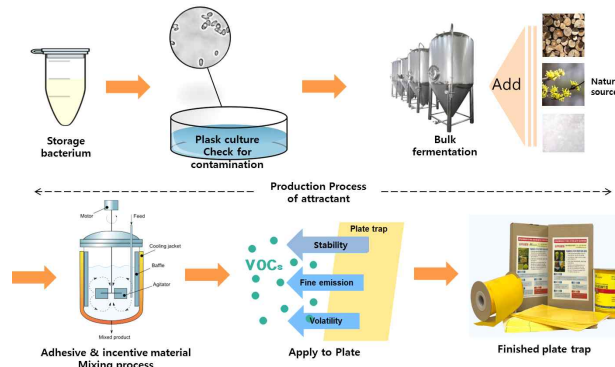


그림 58. 유인평판(물)트랩 제조공정도.

나. 제품의 품질 관리

① 유기농업자재 이끌림

- 유기농업자재의 공시 기준에 따라 제품 품질 기관을 강원대 친환경 농산물 안전성 센터로 지정하여, 품질관리를 수행중임.

② 유인평판트랩 이끌림

- 생산된 제품의 최종 무게를 측정하여, 유인 점착액의 도포의 균일성을 평가함.
- 유인제의 지표물질 phenyl acetaldehyde 및 phenethyl acetate 2종의 함량을 평가하며, 이는 장성 나노바이오연구센터에 생산 분기별 의뢰를 실시하고 있음.

3. 최종제품의 시장성평가

가. 대상해충에 대한 피해 현황

① 갈색날개매미충 피해 형태

- 성충 및 약충이 잎과 어린 가지, 과실에서 수액을 흡즙하고 부생성 그을음병을 유발하며, 신주가지 관부 내 산란 하는 특성으로 줄기고사 및 부러짐의 피해를 유발함.



갈색날개매미충 유충

갈색날개매미충 성충

산란(한국농자재신문)

그을음병(충북농기원)

줄기 과실 흡즙

그림 59. 갈색날개매미충 및 피해 형태.

- 연 1회 발생하나, 국내 기후의 영향으로 약충은 5월 - 8월, 성충은 7월 - 11월에 활동하여 년 중 3분기에 걸쳐 장기간 활동하는 생태학적 특성을 보이며, 년 간 점차 활동기간이 증가하는 경향을 보여, 피해 노출 기간의 증대가 우려됨.
- 게다가 과채 당초 적용대상인 핵과류를 포함하며, 블루베리 및 산수유 등 목본류, 침엽수 및 활엽수, 정원수, 과실수를 호기하는 넓은 범위의 기주식물 스펙트럼을 보임.
- 이와 같은 갈색날개매미충은 농업의 경제적 손실을 비롯하여, 산림의 생태파괴, 공원 및 녹지 등 생활환경에도 피해를 유발하는 방제대상 해충으로 방제필요 최우선 순위라 할 수 있음.



각종 과수

산수유 및 목본류 32종

초본류 19종

산림 관목 및 가로수

그림 60. 기주식물 범위.

② 갈색날개매미충의 전국 확산

- 대상 해충인 복숭아순나방 외 포획이 확인된 갈색날개매미충이 국내 발생분포 및 강도가 가속화되어 지속적으로 피해에 노출되어 가고 있음.
- 갈색날개매미충은 외래해충으로 국내 천적의 분포가 미비하여 자연적 개체수 조절이 불가능한 생태환경임.
- 국내 갈색날개매미충으로써 발생분포는 ('14) 4,800 hectare → ('15) 6,958 hectare → ('16) 11,276 hectare로 59개 시군에 발생, 전년 대비 62%가 증가하였으며, 영호남권역에 주로 발생하여 피해를 주는 것을 시작으로 피해 발생지가 전국적으로 확산되고 있음.

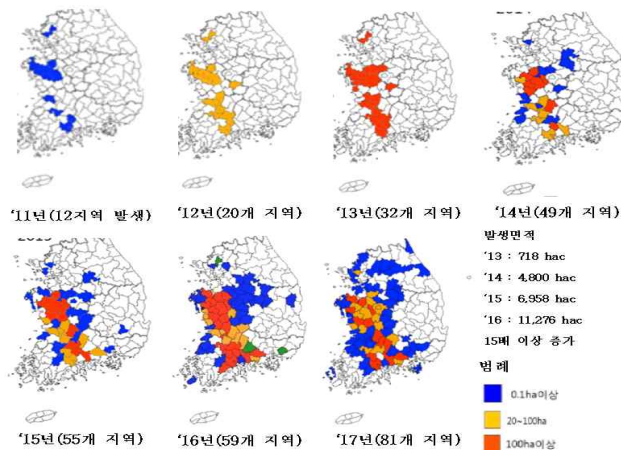


그림 61. 국내 확산 현황.

- 상기 해충의 대표적인 피해 사례로 ('11) 전남 권역의 산수유 마을을 시작으로 ('12) 충남 공주의 밤, 복숭아, 배, 사과 농가 집단적 피해, ('16) 전남 권역 10개 시 20여개의 군·읍·면에서 집단 발생하여 농가에 피해, '16년 59개 시군, '17년 81개 시군에 발

생 피해가 보고되고 있으며, '18년 농진청 월동난 조사 결과 89개 시군에서 발생할 것으로 예측되어 발생 면적의 가속화 및 전국 확산에 속수무책인 실정임.

③ 기 살충약제를 활용한 갈색날개매미충의 방제의 어려움

- 월동 난파는 기주 내 산란하는 습성이 있어, 피식 및 방제작업에서 안전한 조건을 보장, 유충은 흰색의 밀랍 물질을 몸에 두르고 있음.
- 성충은 몸길이가 8 - 9mm인 반해 날개의 크기는 15mm로 날개가 매우 큰 구조이며, 상기 날개부가 보호성 기름을 함유한 체 몸 전체를 감싸고 있음.
- 이와 같은 형태학적 특성은 현재 지배적으로 활용되어 지고 있는 집축 후 사멸하는 살충약제에 기인하는 시장제품의 방제가 저하 결과로 결부되고 있음.
- 게다가 성충의 넓은 이동성 및 기주식물 호기성은 일부 지역에 국한되지 아니하고, 광범위한 발생 및 활동범위를 보임.
- 포장 및 과수원등의 생산지역에서 갈색날개매미충의 방제작업이 이루어지고 있으나, 현재 효과적인 살충약제 기반의 방제기술이 전무하고, 산란시기를 포함해 산림 및 주변 환경에서 유입되는 성충에 대한 유입 차단이 있어 한계가 있어, 각 농민들의 독립 방제에 대한 실효성에 대한 의문이 제시되고 있는 실정이라 할 수 있음.

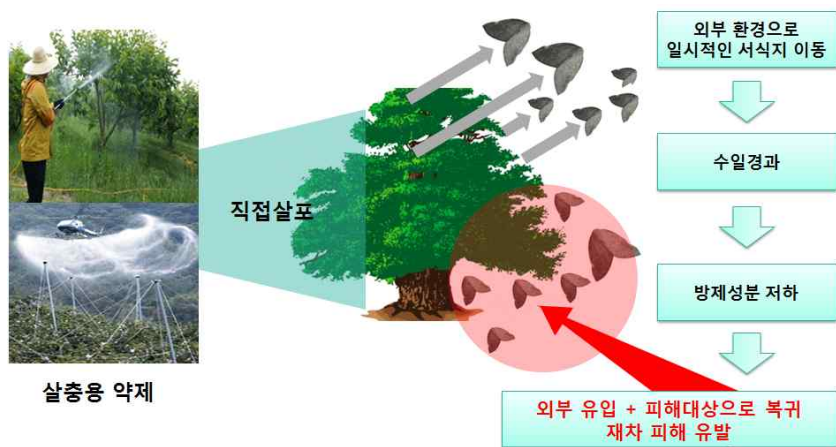


그림 62. 약제 처리 시 대상충의 재유입.

④ 현황총평

- 적용 확대 대상인 갈색날개매미충은 기존 농약 및 유기농업자재 기반의 살포 및 칩 투성 약제에 방제가가 매우 미비함.
- 게다가 날이 갈수록 강화되는 잔류농약 정부 규제는 살포성 약제의 활용 범위의 축소를 유도 하고 있어, 친환경 방제기술의 개발 필요성을 제시하고 있음.
- 이와 같은 흐름 아래 갈색날개매미충의 특성을 고려한 다양한 방제기술이 개발 혹은 상업화되어 가고 있는 초창기임.
- 따라서 당초 대상해충인 복숭아 순나방에 비해 유인효율이 높고 핵과류 외 넓은 범위의 기주식물에 피해를 입히고 있는데 반해 효과적인 방제기술의 시장공급이 미비한 현황임.
- 상기와 같은 현황을 고려할 때 갈색날개매미충의 시장에 대한 진입 용의성 및 파급력은 상당히 매력적인 요소로써 상업적 가치가 있는 것으로 판단됨.

나. 대내외적인 정부정책

① 갈색날개매미충 방제를 위한 정부정책

- 외부 유입을 고려하여 산림 및 노지 및 생활권역인 공원 및 녹지 등 비생산지역과 생산지역에 대한 지자체 중심의 권역 방제를 실시하고 있으나, 상시적으로 실시하기에는 규모나 인력적 측면에서 한계가 있어, 신속한 대응이 어려움.
- 상기와 같은 방제작업에도 불구하고, 발생강도의 과속화를 제어하기에 상당수 애로사항을 나타내고 있으며, 따라서 현재 지자체와 농민간의 긴밀한 협업 아래 갈색날개매미충을 방제할 수 있는 Processing을 구축, 그러나 기동 program인 효과적인 방제기술이 미비한 가운데 그 실효성에 대한 간절한 기대를 요하고 있는 실정임.

② 살충농약 규제 강화

- 안전한 먹거리, 친환경 농산물을 통한 고부가 가치 창출을 위한 정부정책 아래 년차에 걸쳐 점차적으로 농약 활용의 규제가 강화되고 있는 상황으로, 특히 '17년 건과 및 열대과일류를 대상으로 시행된 허용물질목록 관리제도(PLS)는 '19년 1월 이후 모든 농산물을 대상으로 전면 시행될 예정임.
- 이와 같은 시행 아래 살충농약 주요 성분인 프로사이미돈과 다이아지돈, 살균제인 디니코나졸 등 부적합 판정이 총 130건 이상으로 예상되어지고 있어, 법적 규제 강화 대비 활용물질의 제약은 현장 방제의 애로사항으로 발생할 것으로 예측됨.
- 이와 같은 농약잔류기준강화는 기존 살충약제에 대한 규제를 통해 일정부분 시장 축소가 예상되며, 유기농업자재 등 친환경 방제기술이 대체 성장을 이룰것으로 전망됨.
- 본 연구진들이 개발한 이끌림 유인제는 유기농업자재로 상기와 같은 전망에 따라 일정부분 수해가 있을 것으로 사료됨.

다. 유사 시장 현황

① 평판트랩 시장

- “김동완 외, 2016. 블루베리에서 갈색날개매미충의 산란특성 및 황색끈끈이트랩의 산란 억제효과. 농약과학회지, 20(4), 281-285.”등과 같이 황색 평판트랩의 색상에 대한 호기성으로 인해 방제효율이 있음이 보고됨.
- 따라서 주요 피해 발생 부인 신주가지에 설치하여 부분적인 방제기술로써 활용되어 지고 있음.



그림 63. 사전 방제 기술 현황.

- 이와 같은 평판트랩 방제 기술은 해충이 호기하는 색상을 적용하여, 유인되는 해충을 포획하는 원리로, 크게 황색, 청색, 흰색 등 색상이 시중에 안정적으로 공급되어 지고 있음.

- 그러나 설치 및 교체의 번거로움으로 인해, 성충이 우화하는 발생 시기 예찰용으로 부분적으로 활용되고 있는 있음.
- 국내 생산기업으로 대길산업, 위캠, 그린아그로텍, 중소기업으로 완화된 진입장벽을 형성하며, 상기 메이저 업체들이 위탁생산을 겸하는 구조, 이들의 공급단가에 따라 평판트랩 시장가가 결정되는 구조임.
- 물량 개런티를 실패한 소규모 업체일 수록 평판트랩의 가격이 증가하는 현상을 보이며, 국내 평판트랩 지분은 외국계 다국적 기업인 Koppert가 50%, 외 대길산업, 위캠, 그린아그로텍 순으로 국내 지분을 차지하고 있으며, Major사의 제품점유율과 각사의 최신 재무제표를 참고하여 시장 규모를 산출하면, 최소 293억원의 시장으로 추이됨.

표 26. 국내 평판트랩 시장 규모

업체명	업체명	현장 점유율	국내 매출액 추이
국내	대길산업	35.0%	9,612백만
	위캠	5.00%	1,600백만
	그린아그로텍	8.75%	3,800백만
	기타	10.25%	1,000백만
국외	Koppert	40.0%	14,000백만
국내 평판트랩 수요시장 규모			29,371백만

② 유인제 및 기피제 시장 현황

- 박하유 및 천연 오일을 기반으로 한 기피제에 대한 연구개발이 시도 되었으나, 상용화 단계의 사례는 전무함.

표 27. 국내 갈색날개매미충 유인 및 기피제 개발 현황

분류	일자	논문 및 기술명	개발 단계
기피제	2016	류태희 외, 2016. 박하유의 갈색날개매미충에 대한 기피효과. 한국응용곤충학회지, 55(3), 223-233	연구
	2015	류태희, 2015. 갈색날개매미충이 기피하는 essential oil의 탐색, 충남대학교	연구
유인제	제5협동 외 전무		

③ 친환경 유기농업자재

- 고삼, 데니스(Derris), 님(Neem), 제충국 추출물 등 단독 혹은 혼합방법을 제시하고 있으나, 갈색날개매미충의 형태학적 구조로 인해 높은 방제가를 기대하기 어려움.

④ 외 추가적인 개발 및 상업화 현황

- 살포형, 침투성 약제에 대한 방제가가 미비함에 따라, 이들의 생태학적 특성을 고려한 방제기술이 개발되고 있는 실정이며, 충남농업기술원에서 개발한 기주식물의 호기성을 고려한 해바라기 내 침투이행성 약제를 주입하여 성충의 우선 흡즙을 통해 방제하는 기술, 전남농업기술원에서 개발한 호기성 LED 파장을 활용한 해충 유인포획장치등을 들 수 있음.

- 그러나 해바라기를 통한 방제는 식재 식물의 재배 및 식종의 애로사항이 동반하며, 호LED포획장치의 경우 주간의 포획기작이 미비함.
- 제 5협동의 유인평판트랩을 포함, 상기 기술들이 결부되어 전라도, 충청도를 중심으로 지차체 갈색날개매미충 방제 시범사업을 추진중에 있음.

나. 제품 홍보 및 판매 전략

① 초기 시장 진입 전략

- 수행기관이 전국 농업기술원 및 농업기술센터를 중심으로 구축한 거래처를 바탕으로 보조 및 협업방제 사업에 참여, 안정적인 판매금 회수방안을 마련하였음.

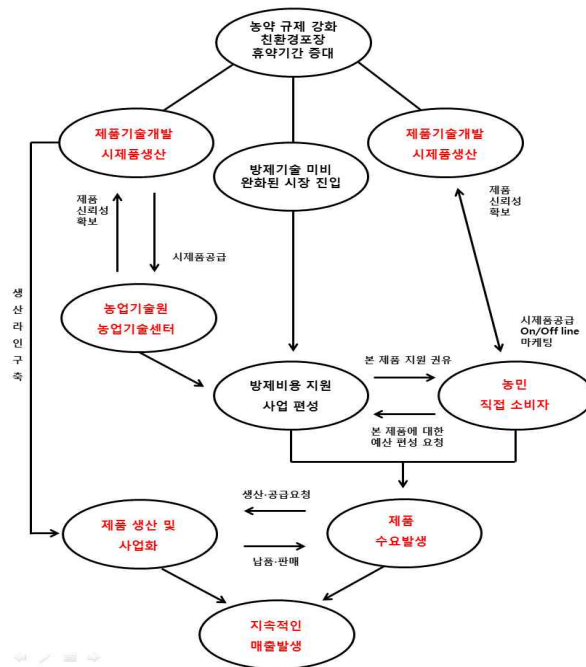


그림 64. 비즈니스 & 수익 모델.

② 중장기 진입 전략

- 대량생산체계, 물량 개런티를 통해 단가 경쟁력 확보함.
- 해충 적용 범위 확대, 시장 점유율을 증대, 기 전국판매망을 활용, 직접 소비자 네트워크 형성함.

표 28. 제5협동의 유인평판(물)트랩 전국판매망

관할 지역	상호명
경기도, 경상남·북도	성진 코퍼레이션
충청남도	에스더종합상사
전라북도	미농바이오텍
전라남도	양지엔텍
원예시설	(주)경농

③ ON/OFF Line 마케팅

- 제품 구입 및 접근 편의성 제공(On-Line), 현장 및 마케팅 전담요원 편성, 제품의 활용방안 컨설팅함.

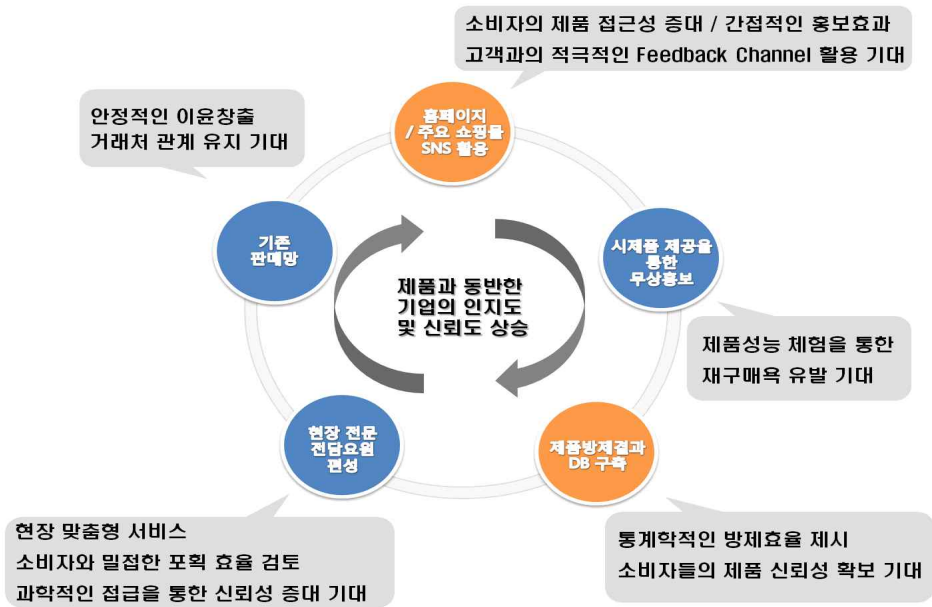


그림 65. On/OFF Line 마케팅 전략.



그림 66. 수행 마케팅 현황.

그림 67. 보조사업 기술 설명회 수행.

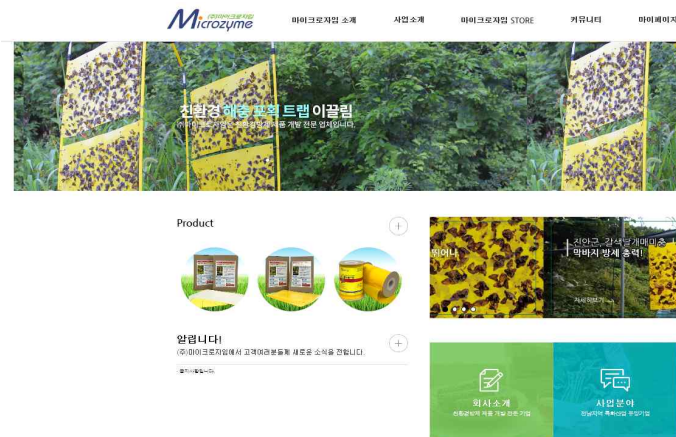


그림 68. 자체 쇼핑몰 구축현황.

다. 사업화 현황

① 보조 및 협업 사업 수행 현황

- 당초 제5협동은 사업기간 내 매출 발생에 대한 정량적 목표가 없었으나, 사업화를 실시함에 따라 이에 대한 수행내역을 제시함.
- 2년차에 함양군 농업기술센터를 시작으로 현재 충남, 전북, 전남권역의 시군을 대상으로 긴급방제 및 보조사업을 실시하고 있으며, 전국적으로 확대되어 가고 있는 상황임.

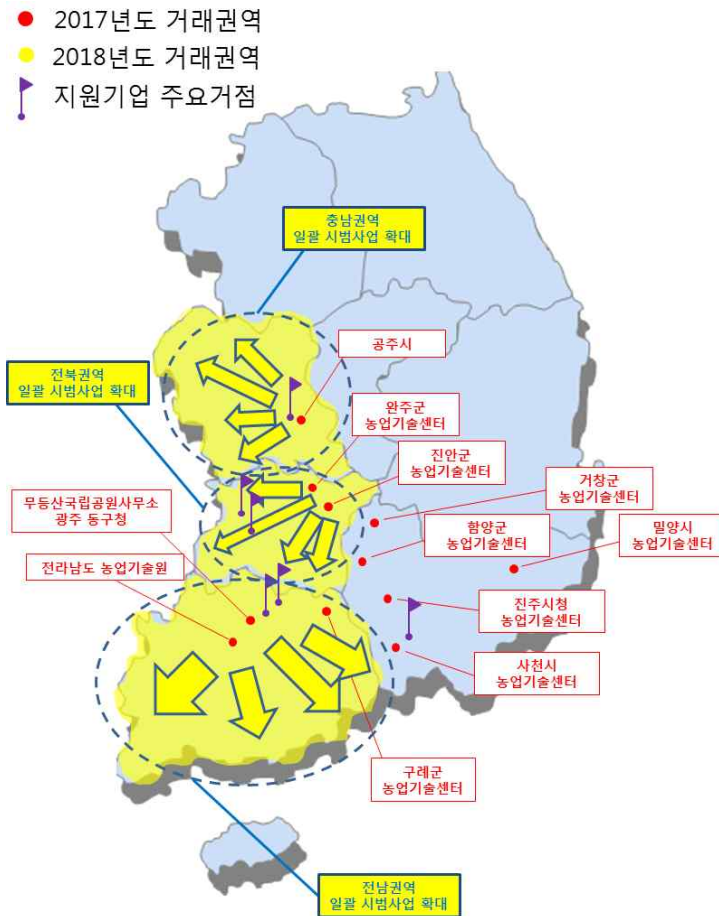


그림 69. 유인평판(폴)트랩의 전국 매출 발생 현황.

② 언론 노출 현황

- 시군 별 유인평판트랩의 방제 사례에 대한 언론 노출된 바 있음(그림 70).

③ 보도 자료 수록

- 농촌진흥청 본원 보도자료, 돌발해충 갈색날개매미충 기본 방제 기술 내 유인용 끈끈이 트랩 기술 항목으로 수록되어 고시되는 등 제품 기술력에 대한 공신력을 확보하였음(그림 71).

진안군, 갈색날개매미충 억제서 방제 총력



진안군, 갈색날개매미충 딱지치 방제 총력, 쿠키뉴스, 17.09.29

과수원 지역 갈색날개매미충 포획장치 개발 관심



과수원 지역 갈색날개매미충 포획장치 개발 관심, 농업신문, 17.08.01

전남 농업기술원, 갈색날개매미충 포획장치 개발 관심, 연합뉴스, 17.08.01

거창군, 갈색날개매미충 방제 유인트랩 공급

거창군 농업기술센터(장관 김재현)는 방제를 위해 방역인삼작기 사자 차제 농가에 직접으로 방제장치를 지원한다고 밝혔다.

일제강점기 산악지방(현곡동)은 동곡동 인삼 주산지. 2003년 인삼재앙 발생으로 인삼 재배가 어려워졌다. 인삼 재배가 어려워진 인삼 농가들은 인삼 재배를 포기하고 사과, 배 등을 재배하고 있다. 인삼 재배를 위해 방제장치를 공급해 농가소득을 증진시키고 인삼 재배를 활성화하는데 인삼 농가들이 인삼 재배를 계속 할수 있도록 지원한다. 인삼 농가들이 인삼 재배를 계속 할수 있도록 지원한다. 인삼 농가들이 인삼 재배를 계속 할수 있도록 지원한다.

거창군, 갈색날개매미충 방제 유인트랩 공급, 경남일보, 17.08.17

막걸리 미생물로 도포... '갈색날개매미충' 유인트랩 뛰어나



막걸리 미생물로 도포... '갈색날개매미충' 유인트랩 뛰어나, 농민신문, 17.08.27

	보도자료 2018년 8월 21일(목)부터 보도될 수 있도록 협조 부탁드립니다.	작성처: 과수보호과 과장: 이상기 담당자: 농약관리과 조경희 연락처: 063-238-3285 세종로 316호 5층 농정기획과
	농촌진흥청 인삼재, 양봉, 동산순매, 과일, 사과, 배, 사과, 배, 사과, 배	농촌진흥청

돌팔매중 갈색날개매미충 기본 방제법 개발

- 산란기 전, 유인 및 포위, 친환경 농치제 활용 기술 등 -

- 농촌진흥청(장관 라승훈)은 동굴기에서부터 하룻길 성충(어른매미)이 이용하는 시기 전반에 걸쳐 갈색날개매미충을 관찰하고 방제할 수 있는 기술을 개발했다.
- 갈색날개매미충은 2010년 중국에서 유입됐다. 식물의 즙을 빨아 먹어 양분을 빼내고, 감도를 빼앗아 그들을 피해를 준다. 1년생 어린 가지에 감을 낚아 가지를 말라죽게 하는데, 과실 수확 시기와 겹쳐 방제에 어려움이 있어 왔다.
- 이번엔 개발된 기술은 스프레이를 가제제거를 통한 월동알 제거, 스프레이 부피를 조절하는 시기에 처리할 수 있는 친환경제 및 약제 스왑-9월 성충이 과원으로 유입될 때 대응 수단 및 대량 포획 등이다.
- 동굴기인 12월에서 3월 초, 사이 갈색날개매미충이 산란된 가지를 관찰하면 월동알 98% 이상을 부파하기 못해 다음 세대의 발생을 대폭 줄일 수 있다.
- 월동알의 부파가 80% 정도 진행되는 봄철(5월 유충순)부터는 친환경추출물 및 상충제를 처리해 방제할 수 있다. 효과가 우수한 친환경제로는 고삼, 남, 피마자유 추출물(500배), 기계유제(50배)

등이 있고, 상충제로는 밀타트린류제, 칼마사이칼로트린계인솔린탄제, 에토펜트록스유제 등이 선별됐다.

○ 성충이 이용하는 하룻길(7~10월)에는 끈기식 포획장치 및 끈곤인트랩을 이용하여 성충을 포획한다. 끈기식 포획장치는 10㎡당 2~3개를 산란과 인삼탄 과수원에 20m 간격으로 설치하면 하루에 700마리 이상 포획할 수 있으며, 교체 없이 방역구적으로 사용할 수 있다.

○ 유인용 끈곤인트랩은 과수원 사이에 설치해 근처의 성충을 포획할 수 있고, 7월에 1,500마리 포획할 수 있다. 끈기를 사용하지 않으면 낮에 주로 포획할 수 있다.

○ 성충이 이용하는 시기인 7월 중순에서 8월 하순 사이 성충 방제를 농치제를 처리하면 효과가 있다. 또한 황색피둑 및 친환경 추출물인 펙트시드를 처리하면 갈색날개매미충의 산란도 억제할 수 있다. 끈기식 포획장치와 끈곤인트랩을 함께 사용하면 갈색날개매미충 발생을 억제할 수 있다. 끈기식 포획장치와 끈곤인트랩을 함께 사용하면 갈색날개매미충 발생을 억제할 수 있다.

□ 농촌진흥청은 이번에 개발한 끈기식 성충 포획장치는 이미 특허출원(10-2017-0160574)을 완료했으며, 영농활용자료로 농업 현장에 보급할 계획이다.

□ 농촌진흥청 국립농업과학원 과수보호과 조경희 농업연구관은 "이번에 개발한 기술은 동굴기 가지치기로 월동알 부파를 억제하고, 약-성충을 대량 유충하는 기술이라 농가 현장에 연중 종합적으로 적용할 수 있는 기술이다."라고 말했다.



그림 70. 언론 노출 현황.

그림 71. 보도자료 수록 현황.

④ 매출 규모

- 사업 기간 내 약 3억원의 사업화를 실시함.

표 29. 사업기간 내 매출액 발생 추이

년도	품명	매출액(천원)
2017	유인평판트랩	99,493
2018	유인평판트랩	211,937
사업기간 내 발생 매출액		311,430

제 8절 복숭아순나방 방제용 살충활성 유기농업자재 후보물 도출

1. 4협동과제에서 제공한 천연생리활성 소재의 작물 적용성 검정

가. 담배추출물 제조

(1) 연구목적

- 제4협동에서 선발한 담뱃잎을 활용한 추출물 제조

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- 공시식물 : 제 4협동에서 공급받은 담뱃잎

(나) 시험방법

- 안동대학교로부터 공급받은 담뱃잎을 파쇄한 후, mesh로 걸러 고른 분말 입자를 제조함.
- 분말상과 Methyl alcohol에 10%(W/W)로 혼합 후 하루 간 균질화 함.
- Filtration을 통해 부유물을 제거하고, 이를 회전 농축기를 통해 농축화하여 추출물 제조를 완료함.

(3) 실험결과

- 원활한 추출물이 제조되었음.

(4) 실험결론

- 추출물의 효과적인 제형이 필요함.

나. 약해시험

(1) 연구목적

- 복숭아순나방 방제용 천연생리활성 소재 선발군인 담뱃잎 추출물의 작물 적용성 검토

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- 분석 시료 : 담뱃잎 추출물 기피제
- 분석 기관 : 전남생물방제연구센터

(나) 시험방법

- 시험작물의 선정 : 배나무
- 약해의 대조 : 무처리구를 대조구로 사용
- 사용농도의 결정 : 신청인 추천구 (1ea/10평)
- 시험반복수 : 배나무 3반복
- 시험기간 : 기피제 설치로 7일간 관찰

- 시험법
 - 시험작물 재배 : 배나무 밭(임차)
 - 약제처리방법 : 10평당 트랩 1개씩 설치
- 약해조사 : 약제처리 후 익일부터 7일간 육안으로 달관 조사
 - 반점 및 반문의 유무
 - 황변 또는 엽소 여부
 - 경엽의 위조 여부
 - 경엽의 고사 여부
 - 기타 발육 생육 상태
- 약해조사 기준

표 30. 약해조사 기준

약해정도	약해증상
0	육안으로 약해가 인정되지 않음
1	아주 가벼운 약해로서 작은 약반이 약간 인정됨
2	처리된 잎이 적은 부분에 약해가 인정됨
3	처리된 잎의 50%정도 약해가 인정됨
4	상당한 피해를 받고 있으나 아직 건전한 부분이 남아있음
5	심한 약해를 받고 고사상태임

(3) 실험결과

- 약제 살포 전후 기상 상황 : 23일 강수가 동반되었으나, 약해판정에 영향을 줄만한 큰 기상변화는 없었음.
- 모든 시험구에서 전혀 약해가 발생하지 아니하였음.

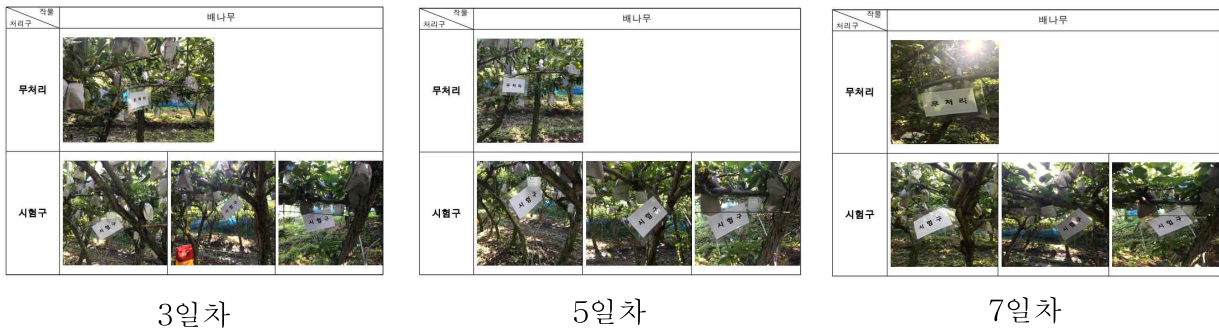


그림 72. 약해평가 현황.

(4) 실험결론

- 본 제품은 작물비접촉 형이며, 공인기관 약해평가 결과 이상이 없으므로 판정됨에 따라, 작물에 대한 적용은 무리가 없을 것으로 사료됨.

2. 현장 적용 기술 개발

가. 담뱃잎 추출물과 유인평판트랩간의 현장 적용

(1) 연구목적

- 담뱃잎 추출물의 장소 시기 방법을 고려한 효과적인 현장 적용기술 확립을 위함.
- 유인평판트랩간 혼용화 적용 가능성 여부 판단을 위함.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- 유인평판트랩 : 250 × 400mm Yellow stick trap(유인제 5% W/W)
- 담배추출물 : 담뱃잎추출물(0.5% W/W)

표 31. 현장적용 제품 분류



(나) 적용 대상지

- 위치 : 전남 곡성 입면로
- 대상작물 : 사과



위치도

현장현황

그림 73. 현장적용대상지 현황.

(다) 시험 시기

- 유인평판트랩 단독 설치 : 18.07.01 - 07.10
- 유인평판트랩 + 담뱃잎추출물 혼용 살포 : 18.07.13 - 18.07.22

(라) 평가 방법

- 일괄 수거 후 -4℃ 냉동보관, 포획된 개체 현황을 분석함.
- 도감 : 식물병해충 도감 개정판, 학술편수관 上/下, 원색한국나방도감, 아카데미서적, 나무해충도감, 소담출판사 참조
- 현장 이격 거리별 무작위 과수 선발, 10개 내의 과실에 대한 달관조사를 통한 상품성 평가

(3) 실험결과

(가) 총 해충 포획량

- 전반적으로 복숭아순나방에 대한 출현이 미비함에 따라 총 해충 포획량에 근거하여 방제효율을 평가하고자 하였음.
- 1차 단독 실험 시, 유인평판트랩은 최소 64미, 최대 211미 평균 122.5미의 포획효율을 보였으나, 2차 혼용 실험 시 포획량은 최소 36미, 최대 166미, 평균 84.3미로 38.3% 저감된 포획효율을 보임.

표 32. 단독 또는 혼용처리에 따른 해충 포획량 대조

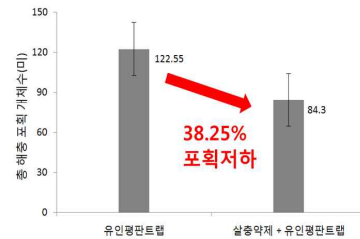
일자	실험 횟수																				평균	편차
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
18.07.01-10	82	102	78	99	86	95	87	99	64	78	211	105	134	218	230	211	190	123	88	71	122.5	22.88
18.07.13-22	54	39	66	65	71	86	71	74	36	44	115	61	114	166	148	154	127	87	48	60	84.3	19.80



유인평판트랩 단독처리



추출물 혼용 처리



포획효율 비교

그림 74. 단독 및 혼용처리 현황 및 포획량 대조.

(나) 과실 달관조사

- 외부로부터 다양한 이격 거리별 과주의 달관조사를 실시한 바, 유인평판트랩은 71.0%의 방제가(과실 손상 無)를 유인평판트랩 + 담배추출물 혼용처리 시 76.5%의 방제효율을 보여, 5.5%의 상승효과를 보임.
- 유인평판트랩 단독 처리의 경우 외부에서 이격될수록 방제효율이 저감됨을 확인할 수 있으며, 특히 10m 전후로 급격한 저감을 살펴볼 수 있음.
- 경계부 설치에 따른 단독 처리로써는 내부로 유입되는 해충을 차단하는데 한계가 있음을 보이고 있으며, 따라서 내부에 일정부분 유인평판트랩을 거치하는 것이 바람직할 것으로 사료됨.
- 혼용조건 시 외부에서 이격될수록 방제가가 상대적으로 저감되는 결과를 보이기는 하였으나, 저감률이 상대적으로 낮았으며, 이는 담배추출물의 혼용처리의 결과로 사료되어짐.
- 그러나 5m 내 방제가는 유인평판트랩 단독 처리군에 비해 낮은 분포를 보여, 담배추출물의 접촉에 따른 유인평판트랩의 기능 상실이 우려됨.



정상상태

상품성 저하

그림 75. 과실 달관조사 현황.

표 33. 단독 및 혼용처리 시 과실 피해 현황

일자	실험횟수(방제가 %)																				평균
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
유인평판트랩	70	80	90	50	70	80	90	80	80	70	70	50	70	70	80	70	50	60	70	70	71.0
유인평판트랩 + 담배추출물	80	90	80	70	70	60	70	80	70	80	70	70	70	80	100	80	70	80	80	80	76.5

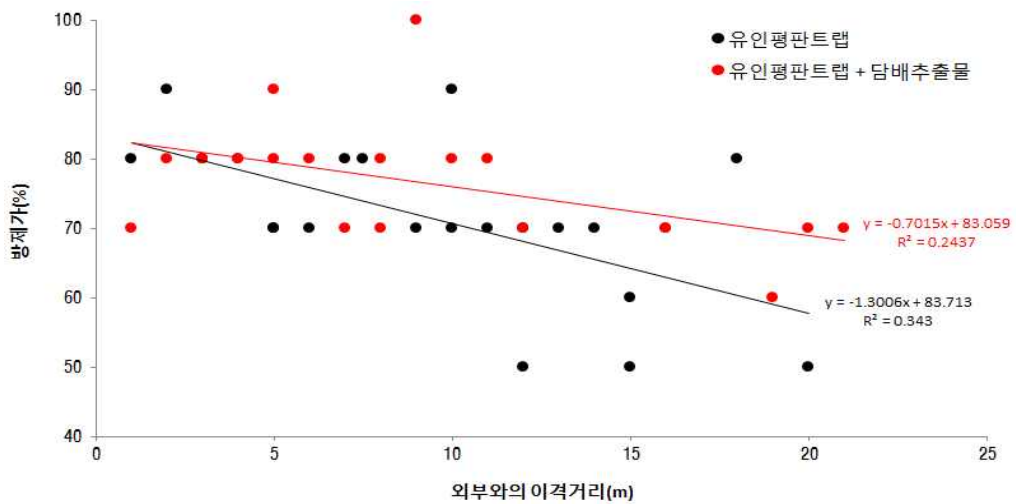


그림 76. 외부와의 이격거리에 따른 방제가.

(4) 실험결론

- 유인평판트랩과 살충활성 소재 간 상승효과를 위해서는 무취 살충활성 소재로 적용하는 것이 바람직할 것으로 사료됨.
- 유인평판트랩 + 담배추출물의 혼용화 방안에도 불구하고 과실에 대한 방제가가 76.5%로 낮은 수준을 보여, 살충활성소재의 효과적인 현장적용기술이 필요할 것으로 사료됨.

3. 살충활성 소재의 제형화

가. 기피제로써의 제형화

(1) 실험목적

- 담뱃잎은 국내 기호식품으로 취급되고 있으나, 중독성이 강하여 원료의 확보 용의성에 장애가 있고, 타 식물소재에 비해 높은 단가로 인한 애로사항이 발생하여, 실제 상용화에 용의할 수 있는 현장적용기술을 탐색하였음.
- 사전 담뱃잎 추출물과 유인평판트랩간의 혼용 적용 결과 시 담뱃잎 추출물의 기피제로써 활용이 용의할 수 있음을 확인하였고, 또한 친환경 병해충 방제 시 담뱃잎 또는 담배나무를 과중 등 담뱃잎의 기피제로써의 활용 사례가 많이 보고되고 있음.
- 따라서 낮은 원료 요구량, 보존성 및 잔존성 측면에서 유리한 기피제로 가능성을 탐색하도록 함.

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- 담배추출물 : 담뱃잎추출물(0.5% W/W)
- 벽제물질 : Alginate, CMC, PVA, Gelatin, Chitosan, Sap, 노즐펌프, 가교제(CaCl₂)

(나) 시험방법

① 담뱃잎추출물의 제조

- 안동대학교로부터 공급받은 담뱃잎을 파쇄한 후, mesh로 걸러 고른 분말 입자를 제조함.
- 분말상과 Methyl alcohol에 10%(W/W)로 혼합 후 하루 간 균질화 함.
- Filtration을 통해 부유물을 제거하고, 이를 회전 농축기를 통해 농축화하여 추출물 제조를 완료함.

② 노즐펌프의 설정

- 노즐펌프를 이용하여 0.4m 상공에서 0.1m/min의 속도로 가교용액에 분출시킴으로써 반응을 실시함.

③ 이화학 반응 조건

- 150rpm, 55℃로 설정하여, 담뱃잎 추출물의 휘발성물질의 손실을 최소화함.

④ 미세캡슐 회수

- 반응 종료 후 미세캡슐을 전량 회수하고 세척하여 상온건조를 실시함.

(3) 실험결과

- Gelatin, Chitosan, CMC를 제외하고 원활한 미세캡슐이 형성되었으며, 이중 Sap 제형이 가장 높은 담뱃잎 추출물을 흡수한 것으로 사료됨.



그림 77. 담배 잎 추출물의 미세캡슐 제형 현황.

(4) 실험결론

- 담배잎추출물의 미세캡슐 제형이 원활하게 수행되었음.
- 최종 휘발성 향기성분 함량 분석을 통해 최종 제형을 결정토록 함.

나. 제형화에 따른 기피제 유효 물질 분석

(1) 연구목적

- 담배잎 추출물 기피제 후보군인 니코틴의 함량 분석
- 외 담배잎 추출물의 VOCs 함량 분석
- 제형화에 따른 주요물질 함량 비교
- 최종 제형 선발

(2) 재료 및 방법

(가) 공시재료

- ① 분석 대상 : 미세캡슐 후보군(Super absorbent polymer, Alginate, Gelatin, CMC)
- ② GC-MS 분석 조건
 - 장비명 : Gas chromatography - Mass spectrometer
 - 모델명 : GC-MS-QP2010plus
 - 제작사 및 제조국 : shimadzu, 일본
 - SPME(Solid Phase Micro-extraction) sampling set, Supleco, USA
 - SPME fiber : 50/40 μ m BVB/CAR/PDMS, Supelco, USA
 - Sampling 4g

(나) 실험방법

- ① 수행 대상 : 장성 나노바이오연구센터에 시험분석 의뢰
- ② GC-MS 분석 조건
 - Column : RTX-5ms, 60m \times 0.25mm, 0.25 μ m, Restek, USA
 - Injection : 250, mode ; split, ratio ; 10:1
 - Carrier gas : He, column flow ; 1ml/min
 - Ionization : Electron impact, 70ev
 - Interface/Ion source : 250 $^{\circ}$ C, 210 $^{\circ}$ C
 - Mass analyzer : Quadrupole
 - Data acquisition : Scan (41 to 400 m/z)

(3) 결과

- 4-Methylbenzaldehyde, Nicotine 등 담배잎 추출물에서 함유된 주요 기피성분이 검출됨을 확인하였으며, 상기 성분은 다수의 해충의 살충 및 기피성분으로 적용된 바 있음.
- 4-Methylbenzaldehyde은 젤라틴의 경우 검출되지 아니하였으며, Alginate>Sap>CMC 순으로 검출되었음.
- Nicotine은 모든 제형에서 검출이 확인되었으며, Alginate>Gelatin>CMC>Sap 순으로 높은 함유량을 보임.

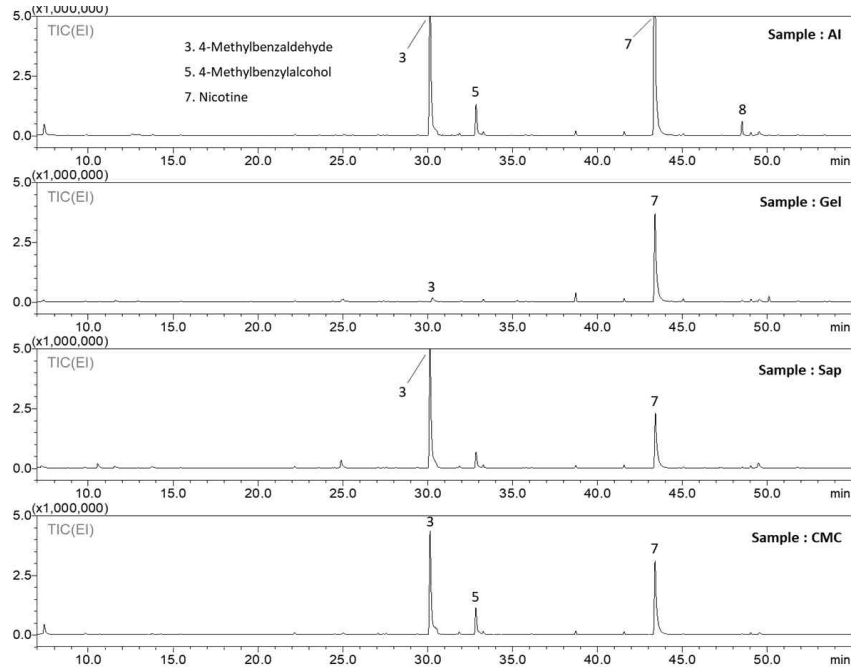


그림 78. 기피제 제형에 따른 GC/MS Total ion chromatogram(TIC).

표 34. 기피제 제형에 따른 주요 물질 함량 비교

N O	R.T. (min)	Compound name	M.F.	M.W. (g/mol)	Area(×10 ⁵)				Area(%)			
					Al	Gel	Sap	CMC	Al	Gel	Sap	CMC
1	7.40	Butanone	C4H8O	72	14.72	0.68	0.50	14.17	3.15	0.59	0.27	6.87
2	12.55	Pyridine	C5H5N	79	2.48	Tr ¹⁾	Tr	Tr	0.53	Tr	Tr	Tr
3	30.14	4-Methylbenzaldehyde	C8H8O	120	124.62	0.00	102.31	81.33	26.70	Tr	54.71	39.44
4	31.88	Phenylethyl alcohol	C8H10O	122	1.37	1.05	1.92	1.87	0.29	0.91	1.03	0.91
5	32.85	4-Methylbenzyl alcohol	C8H10O	122	12.02	Tr	6.71	11.17	2.58	Tr	3.59	5.41
6	38.73	1,3-Ditertiarybutylbenzene	C14H22	190	2.63	5.30	1.63	2.25	0.56	4.57	0.87	1.09
7	43.37	Nicotine	C10H14N2	162	303.25	106.78	69.63	93.56	64.97	92.02	37.23	45.37
8	48.52	2,6-di-tert-Butyl-p-benzoquinone	C14H20O2	220	2.49	0.18	0.15	0.13	0.53	0.15	0.08	0.06
9	49.52	3-Methyl-4-phenylpyrazole	C10H10N2	158	3.21	2.04	4.16	1.76	0.69	1.76	2.22	0.85
Total					467.79	116.04	187.01	206.24	100.00	100.00	100.00	100.00

1) Tr : Trace

(4) 결론

- 벽제물질 후보군인 Alginate가 기피성 물질 함량이 가장 높은 것을 확인하였으며, Gelatin을 제외한 모든 제형화별 기피성 물질 함량이 검출이 확인됨.
- CMC를 제외하고 모든 성분들은 유기농업자재 허용성분에 포함됨에 따라, 본 담뱃잎추출물의 기피제로써 유기농업자재의 활용이 용의할 것으로 판단됨.

4. 기피제와 유인제 간의 시너지 효과 검증

가. 실험목적

- 기피제와 유인제의 현장적용 혼용 방안 검토

나. 재료 및 방법

(1) 공시재료

- 유인평판트랩 : 250 × 400mm Yellow stick trap(유인제 5% W/W)
- 기피제 : 담뱃잎추출물(0.5% W/W)을 침지한 고흡수성 수지

표 35. 현장적용 제품 군류



유인평판트랩(IPT)



기피제(담뱃잎 추출물)



(2) 적용 대상지

- 위치 : 전남 곡성 및 남원 권역 총 11개소
- 대상작물 : 사과, 감, 복숭아
- 유인평판트랩 단독 설치 : 5개소
- 유인평판트랩 + 기피제 혼용 설치 : 6개소

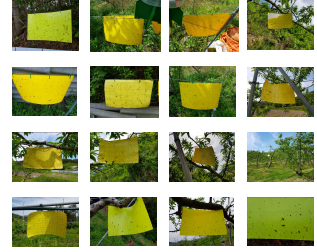


유인평판트랩 단독처리 2개소



혼용처리 3개소

그림 79. 곡성 현장적용대상지 현황.



유인평판트랩 처리

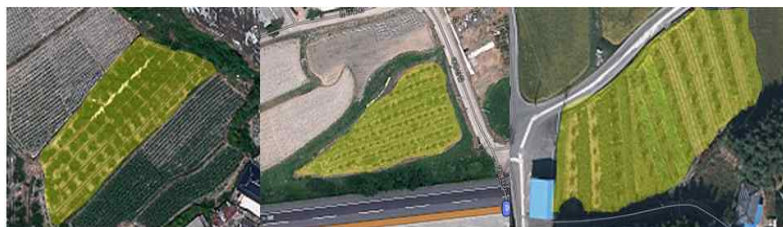


기피제 처리

그림 80. 곡성 현장적용대상지 설치 현황.



유인평판트랩 단독처리 3개소



혼용처리 3개소

그림 81. 남원 현장적용대상지 현황.



유인평판트랩 처리



기피제 처리

그림 82. 남원 현장적용대상지 설치 현황.

(3) 시험 시기

- 18년 8월 1일 - 8월 10일

(4) 평가 방법

- 일괄 수거 후 -4℃ 냉동보관, 포획된 개체 현황을 분석함.
- 도감 : 식물병해충 도감 개정판, 학술편수관 上/下, 원색한국나방도감, 아카데미서적, 나무해충도감, 소담출판사 참조

- 현장 이격 거리별 무작위 과수 선발, 10개 내의 과실에 대한 달관조사를 통한 상품성 평가
- 유인평판트랩과 기피제의 활용을 통한 포획효율 및 방제가의 상관관계를 살펴보기 위해, SPSS v25, IBM을 통한 이변량 상관분석을 실시하였으며, 다수의 변수를 적용하여 통계학적으로 분석하기 위해 지역별 데이터를 일괄 적용하였음.
- 이 때 각 지역별 포획효율 및 방제가가 달라질 수 있으므로, 지역별 최대치를 100으로 놓고 상대적인 수치로 전환하여 활용하였음.

다. 실험결과

(1) 총 해충 포획량

- 곡성의 유인평판트랩 단독 적용지는 평균 48.3 - 58.0의 포획량을 보이며, 혼용처리 3개소는 평균 51.5 - 62.5의 포획 수준을 보이고 있음.
- 남원의 단독 적용지는 30.0 - 49.4의 포획 현황을 보였으며, 혼용지는 48.9 - 67.1의 포획률을 보이고 있음.
- 1차 현장적용 담배잎 추출물의 살충 약제로써 혼용 적용 결과 유인평판트랩이 38.3% 감소한 포획효율을 보여, 혼용 측면에서 회의적인 결과를 보였으나, 금회 적용 결과 유인평판트랩 단독 적용지 대비 감소 측면을 보이지 않아, 혼용의 가능성을 시사함.

표 36. 단독 또는 혼용처리에 따른 해충 포획량 대조

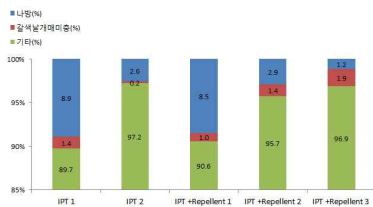
장소	시험조건	횟수	실험횟수										평균	편차
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
곡성	유인평판트랩	1	62	34	23	49	26	105	62	48	43	31	48.3	24.176
		2	88	71	64	52	68	49	38	49	51	50	58.0	14.591
	유인평판트랩 + 기피제	1	68	71	55	49	81	64	71	57	48	61	62.5	10.544
		2	81	68	59	74	61	57	44	32	68	42	58.6	15.349
		3	44	72	64	61	70	28	31	46	51	48	51.5	15.204
남원	유인평판트랩	1	64	71	58	37	44	60	27	41	42	50	49.4	13.648
		2	71	34	64	28	31	36	40	42	44	47	43.7	13.929
		3	64	38	18	20	18	19	22	30	31	40	30.0	14.507
	유인평판트랩 + 기피제	1	80	47	66	50	43	49	52	38	41	23	48.9	15.495
		2	91	88	67	59	48	63	72	64	59	60	67.1	13.354
		3	88	71	49	56	45	61	72	67	44	59	61.2	13.758

(2) 방제 대상 해충 포획량

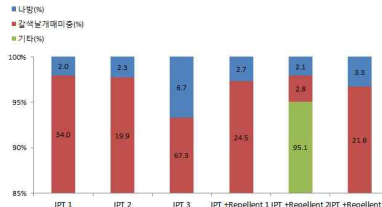
- 곡성 및 남원의 복숭아순나방 포획을 확인해 보고자 하였으나, 출현이 미비하여, 나방에 대한 포획량 비율을 제시하여, 간접적으로 제시토록 함.
- 곡성의 경우 최소 1.2, 최대 8.9%의 나방 포획을 보였으며, 갈색날개매미충은 0.2~1.9%의 포획현황을 보였음.
- 남원은 갈색날개매미충의 포획량이 매우 높음을 확인할 수 있었으며, 최소 2.8, 최대

67.3%에 육박하였음.

- 복숭아순나방은 현장 출현이 미비하여, 성능 확인이 미흡하나, 갈색날개매미충은 *in vitro* 상 93.3%의 반응성과, 현장적용 시 높은 포획효율을 보이고 있어, 본 유인평판트랩은 갈색날개매미충에 대한 효과적인 제제로 활용이 가능함.



곡성 대상지의 대상해충 포획현황



남원 대상지의 대상해충 포획현황



대상해충 포획현황

그림 83. 대상해충의 포획현황.

(3) 과실에 대한 방제가

- 곡성의 유인평판트랩 단독 적용지는 평균 65.5~79.0%의 방제가를 보이며, 혼용 적용지의 경우 65.5~86.5%로 높은 단독 적용지에 비해 높은 방제가를 보이고 있음.
- 남원의 유인평판트랩 단독 적용지의 경우 64.5~81.0%, 총 73.7%의 방제가를 보이나, 혼용지의 경우 67.0~79.0%, 총 71.7%의 방제가를 보여, 방제가의 상승을 확인 할 수 없었음.
- 본 담백잎추출물의 살충활성 및 기피효과는 복숭아순나방에 대해 검증이 완료되었으나, 확대 대상 해충인 갈색날개매미충에 대한 출몰이 높은 결과에 의한 피해의 영향으로 사료됨.

표 37. 단독 또는 혼용처리에 따른 과실 방제가 대조

장소	시험조건	횟수	실험횟수										평균	편차
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
곡성	유인평판트랩	1	85	80	75	90	80	75	65	65	80	75	77.0	7.888
		2	65	70	65	60	60	65	60	70	65	75	65.5	4.972
	유인평판트랩 + 기피제	1	80	75	85	80	85	75	70	80	75	85	79.0	5.164
		2	90	95	90	85	80	85	80	85	85	90	86.5	4.743
		3	70	65	55	60	65	70	75	70	65	60	65.5	5.986
남원	유인평판트랩	1	60	55	65	55	60	65	70	75	60	80	64.5	8.317
		2	70	75	75	80	85	75	75	80	75	65	75.5	5.503
		3	80	85	80	85	75	70	85	90	85	75	81.0	6.146
	유인평판트랩 + 기피제	1	85	80	85	75	70	85	80	85	75	70	79.0	6.146
		2	65	65	70	75	60	65	70	75	75	70	69.0	5.164
		3	70	75	65	60	70	75	70	65	60	60	67.0	5.869

표 38. 과실 달관 조사 현황

사과		감		복숭아	
정상	상품성 저하	정상	상품성 저하	정상	상품성 저하
					
					
					

(4) 유인제와 기피제간 시너지 효과 검토

① 기피제의 적용에 따른 유인평판트랩의 포획 저감

- 기피제의 이격거리에 따라 유인평판트랩의 포획에 대한 상관성이 미미한 것으로 나타나, 기피제가 유인제의 포획효율에 미치는 영향은 매우 미미한 것으로 사료됨.

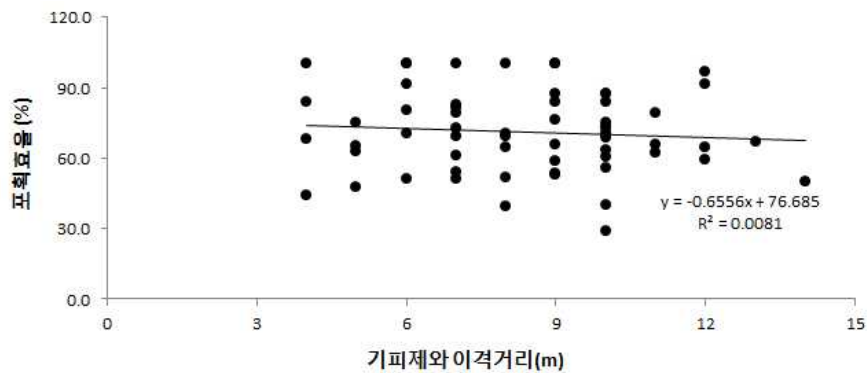


그림 84. 기피제 이격거리에 따른 유인평판트랩 포획효율.

② 기피제와 유인제의 설치 간격에 따른 방제가

- 유인평판트랩 기피제에 비해 설치에 이격될수록 방제가의 저감이 크며, 결정계수 또한 0.2609로 보다 유의성 있는 결과를 보임.
- 따라서 과실에 대한 방제는 기피제에 비해 유인제의 이격거리에 따라 영향을 많이 받는 것을 알 수 있음.

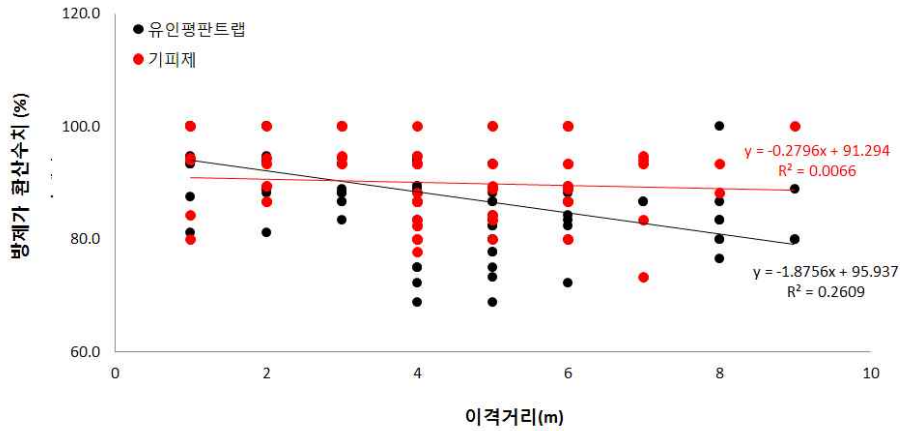


그림 85. 각 제제의 이격거리에 따른 방제가와의 관계.

③ 기피제 및 유인제와 포획효율, 방제가의 상관관계

- 상기 ①항에서 언급한 바와 같이 유인평판트랩의 포획 능력은 기피제의 영향에 유의하지 않는 결과를 보임.
- 과실에 대한 방제가의 경우 유인평판트랩에서 떨어진 과주일수록 높아지는 유의한 음의 상관성을 보이고 있으나, 기피제에 따른 관계는 미미한 것으로 나타났음.
- 추가적으로 기피제와 평판트랩의 설치 간격과 방제가는 유의한 음의 상관성을 보여, 설치간격이 증가될수록 방제가가 저감되었음을 알 수 있음.

표 39. 기피제 및 유인제 적용에 따른 포획효율 및 방제가의 상관관계

구분	방제가		기피제와의 이격거리
유인평판트랩 포획 개체수	-0.07		-0.97
구분	관찰대상과 평판트랩 간 이격거리	관찰대상과 기피제 간 이격거리	기피제와 평판트랩 이격거리
방제가	-0.51 ^b	-0.89	-0.65 ^b

a ; 상관관계가 0.05수준에서 유의합니다(양측)

b ; 상관관계가 0.01수준에서 유의합니다(양측)

다. 실험결론

- 당초 살충활성 소재인 담뱃잎 추출물의 살충 소재로의 활용은 원료의 확보 및 단가 경쟁력 측면과 유인제와의 혼용 측면에서 상승효과가 저해될 것으로 분석되어 기피제로써 전환하여 유기농업자재의 가능성을 검토하여 보았음.
- 실험 결과 기피제의 활용에 따른 유인평판트랩의 포획효율은 영향이 없거나, 매우 미미한 것으로 분석되어 혼용 처리가 용의할 것으로 분석되었음.
- 통계분석 결과, 유인평판트랩에 떨어질수록 과실에 대한 방제가가 저감 됨을 나타내고 있으며, 이는 유인평판트랩의 유인 유효 거리가 5m에 국한된 결과로 사료됨.

- 또한 기피제와 평판트랩간의 이격 거리가 먼 과수일수록 과실에 대한 피해가 높은 경향을 보여, 내부에 대한 평판트랩 혹은 기피제의 활용은 피해 대상지의 방제가를 낮추는데 효과적일 것으로 사료됨.
- 대상 해충인 복숭아순나방의 출현이 미미하여 상기 해충에 대한 충분한 현장적용은 하지 못하였으나, 추가적으로 확대한 대상해충인 갈색날개매미충에 대한 효과적인 포획 효율을 검증하였음.

제 7장 핵과류 주요 병해충 방제용 길항 미생물의 산업화 생산 공정 개발

제 1절 세균성 구멍병 방제활성 *Bacillus velezensis* G341 균주의 대량생산 공정 확립

1. G341 균주 배양의 물리화학적 조건 확립

가. G341 균주 유래 항세균 활성 증진을 위한 배지최적화

(1) 연구목적

○ *Bacillus velezensis* G341 유래 항세균 물질의 발효생산 최적 배지조성 확립

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

① 미생물: *B. velezensis* G341 (전남대학교)

② 배지: 탄소원 14종 (표 1), 질소원 11종 (표 2) 및 산업용 배지 6 종(표 3)

표 1. Reagent-grade carbon sources

C-source media	Manufacturer	Contents (%)
Glucose	Junsei, Japan	
Fructose	Sigma, USA	
Galactose	Sigma, USA	
Sucrose	Sigma, USA	
Maltose	Sigma, USA	
Lactose	Sigma, USA	
Glycerol	Junsei, Japan	
Sorbitol	Sigma, USA	2.0
Xylitol	Sigma, USA	
Mannitol	Sigma, USA	
Soluble starch	Sigma, USA	
Potato starch	Junsei, Japan	
Corn flour	Ingredion Korea, Korea	
Corn steep liquor	Sigma, USA	
TSB (control)	Difco, USA	3.0

표 2. Reagent-grade nitrogen sources

N-source media	Manufacturer	Contents (%)
Yeast extract	Difco, USA	
Beef extract	Difco, USA	
Malt extract	Difco, USA	
Tryptone	Difco, USA	
Soytone	Difco, USA	
Peptone	Difco, USA	0.5
Casamino acid	Difco, USA	
Amminium nitrate	Junsei, Japan	
Sodium nitrate	Junsei, Japan	
Peptone S	Acumedia, USA	
Corn steep liquor	Sigma, USA	
TSB (control)	Difco, USA	3.0

표 3. Industrial grade nitrogen sources

Industrial media	Manufacturer	Contents (%)
Yeast extract	Angest, China	
Casein peptone	Tatua, New zealand	
Soy peptone	Tatua, New zealand	0.5
Sodium caseinate	Tatua, New zealand	
Soybean meal	Gaemi food, Korea	
Corn steep liquor	Samyang, Korea	
TSB (control)	Difco, USA	3.0

(나) 방법

① 균주 및 배지조건

- 세균성 구멍병 방제활성 *B. velezensis* G341 균주 및 항세균 활성을 확인하기 위한 피검균 *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* 균주를 전남대학교로부터 공급받아 사용하였음.
- 단기간 균주보존 배지로는 TSA(Difco, USA) 배지를 사용하였음. TSA 배지에서 30℃, 24시간 동안 자란 G341 균주의 colony를 TSB 배지에 접종하여 전배양을 실시하였음.

② 항세균 활성 검정

- *X. arboricola* pv. *pruni* 균주를 TSB 배지에 48시간 진탕배양한 후 UV 분광광도계 (Shimadzu co., Japan) 600 nm에서 흡광도 0.1이 되도록 멸균수로 희석하였음.
- TSA(Difco, USA)에 희석한 *X. arboricola* pv. *pruni* 균주를 1%(v/v) 접종한 뒤 petri dish에 20 mL씩 분주하여 plate를 제조하였음.
- 멸균된 paper disc(8 × 1.5 mm, Advantec, Japan)를 plate 위에 올리고 배양여액을 각각 60, 30, 15 μ L씩 분주하여 항세균 활성을 확인하였음.

③ 항세균 활성 극대화 최적 탄소원 탐색

- 세균성구멍병 방제활성을 위한 최적 탄소원을 선별하기 위하여 질소원 및 무기염을 0.5% Peptone S(Acumedica, USA), 0.1% KH_2PO_4 (Kanto, Japan) 및 0.05% MgSO_4 (Junsei, Japan)로 고정하고, 14가지 종류의 탄소원 2%를 첨가한 검정배지를 제조하였음 (Table 1).
- *B. velezensis* G341 균주 전배양액 1%(v/v)를 접종하고 진탕배양기(Jeitech, Korea)에서 200 rpm 및 30°C 조건으로 72시간 배양 후 paper disc assay를 실시하였음.

④ 항세균 활성 극대화 최적 질소원 탐색

- 세균성구멍병 방제활성을 위한 최적 질소원을 선별하기 위하여 탄소원 및 무기염을 2% corn flour(Ingredion Korea, Korea), 0.1% KH_2PO_4 (Kanto, Japan) 및 0.05% MgSO_4 (Junsei, Japan)로 고정하고, 11가지 종류의 시약급 및 산업용 질소원 6종 0.5%를 첨가한 검정배지를 제조하였음(표 2 and 3).
- *B. velezensis* G341 균주 전배양액 1%(v/v)를 접종하고 진탕배양기(Jeitech, Korea)에서 200 rpm 및 30°C 조건으로 72시간 배양 후 paper disc assay를 실시하였음.

⑤ C/N ratio 결정 실험

- 세균성 구멍병 방제활성을 위한 최적 탄소원으로 corn flour를 선정하고 질소원으로는 casein peptone 및 yeast extract의 1:1 혼합구를 선정한 후 최적 C/N ratio를 탐색하였음.
- 진탕배양기에서 200 rpm 및 30°C에서 72시간 동안 배양한 후 배양여액 60 μ L를 disc에 분주하여 항세균 활성을 확인하였음.

(3) 결과

(가) 항세균 활성 극대화 탄소원 탐색

- 탄소원 종류에 따른 *B. velezensis* G341 배양액의 항세균 활성은 paper disc 위에 분주되는 상등액 양에 비례해서 증가하였음(그림 1).
- Soluble starch, corn flour 및 corn steep liquor에서 15.2 mm 수준의 항세균 활성을 나타내어 TSB 대비 200% 이상, streptomycin sulfate 200 ppm(6.4 mm) 대비 약 150%의 길항효과를 확인하였음.
- 30 μ L 및 15 μ L 실험구에서 corn flour가 상대적으로 높은 길항효과를 나타내었으므로 향후 항세균 활성 극대화를 위한 탄소원으로 corn flour를 선정함.

(나) 항세균 활성 극대화 최적 질소원 탐색

- Soytone과 peptone S 실험구의 활성이 우수했으며 각각 17.6 mm, 17.5 mm의 clear zone을 나타내었음(그림 2).
- Ammonium nitrate 및 sodium nitrate 등의 chemically defined media에서는 매우 낮은 길항효과가 측정되었음(< 12.1 mm).
- 우수한 효과를 보였던 casamino acid를 산업용으로 대체한 casein peptone 실험구에서 배양 48시간 가장 우수한 균체농도 및 항세균 활성(12.5 mm)을 나타내었으나 배양 72시간 항세균 활성이 감소하여 항세균 활성의 지속성에 의문점을 제기되었음(그림 3).
- Yeast extract 실험구에서 배양 72시간, 12.2 mm의 우수한 길항효과를 나타내었으며 soytone의 산업용 배지인 soy peptone 실험구는 11 mm의 길항효과를 나타내었음.
- 두 가지 질소원을 조합한 실험구에서 casein peptone + yeast extract 조합이 배양 48시간 streptomycin sulfate 200 ppm 대비 110% 수준인 13.9 mm의 길항효과를 나타내었음.
- Yeast extract 단독 실험구에서 항세균 활성은 배양 72시간에 정점이었고, casein peptone 실험구에서는 배양 48시간에 최고점을 나타내고 점차 낮아지는 경향이었음.
- Tryptone, soytone, casamino acid, peptone S는 모두 효소 처리된 질소원이며 단일 아미노산이 배지에 풍부히 존재하는 특징이 있음.
- Casein peptone 실험구는 배양 48시간에 streptomycin sulfate 200 ppm(7.1 mm) 대비 120% 길항효과를 나타내었고 yeast extract 및 soy peptone 실험구는 배양 72시간 streptomycin sulfate 200 ppm(8.3 mm) 대비 각각 97.6% 및 87.9% 효과를 나타내었음.
- Casein peptone 및 yeast extract 조합에서는 두 배지의 장점이 반영되어 배양 48시간에 가장 높은 항세균 활성을 나타내고 배양 72시간까지 항세균 활성이 유지되었음.

(다) C/N ratio 결정 실험

- 탄소원 및 질소원 농도 증가에 따른 길항효과의 차이점은 미미한 경향이었음. C/N ratio에 따른 항세균 활성 역시 차이점을 나타내지 않았음(그림 4).
- C/N ratio 3:2에서 clear zone 직경은 23.5 mm으로 streptomycin sulfate 200 ppm 대비 250% 수준의 우수한 길항효과를 나타내었음. C/N ratio 6:6, 6:5 및 6:4에서 각각 23.4 mm, 21.2 mm 및 21.1 mm의 순으로 streptomycin sulfate 대비 200% 이상의 길항효과를 나타내었음.
- 기존 조성(C/N ratio 4:1)과 비교하여 C/N ratio 3:2 배지에서 항세균 활성이 50% 이상 향상됨.

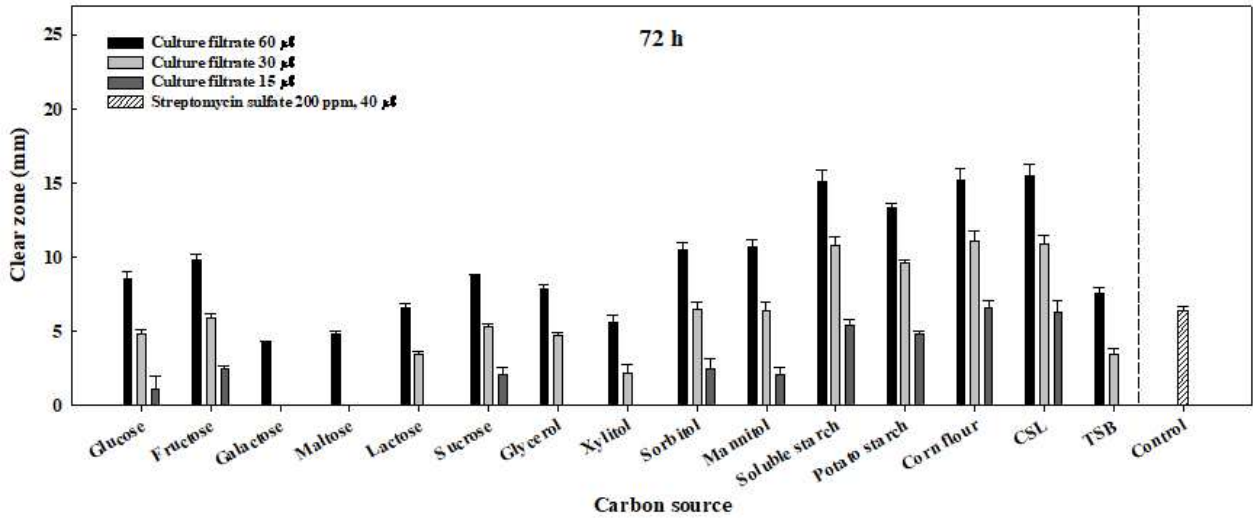


그림 1. Antagonistic effect of culture filtrate on *X. arboricola* pv. *pruni*, depending on various carbon sources. The cultivations were performed at 30°C for 72 h.

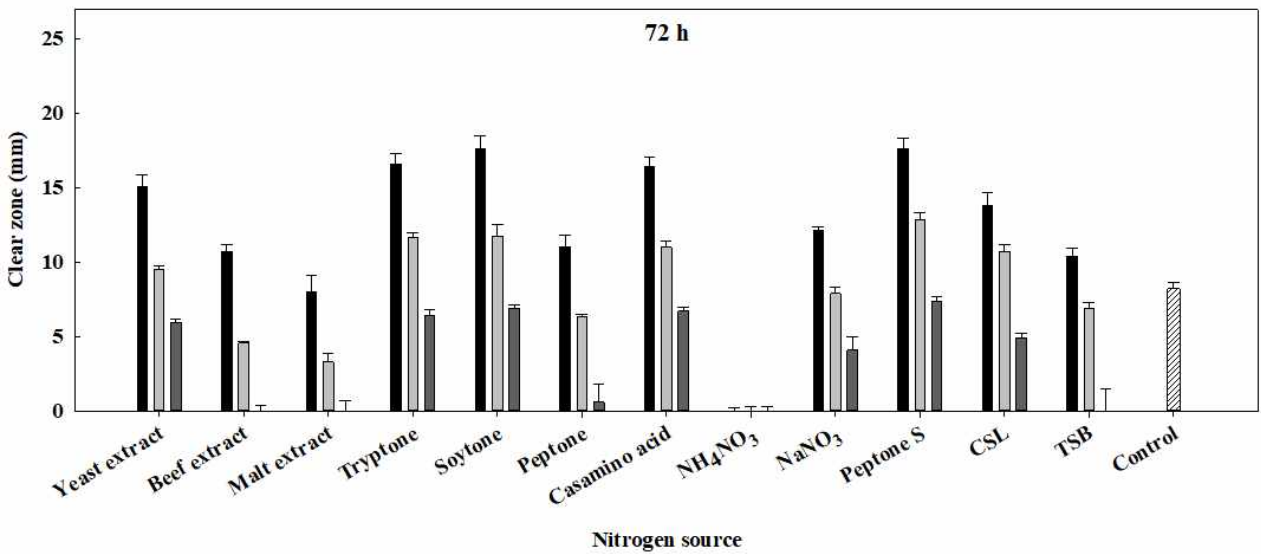


그림 2. Antagonistic effect of culture filtrate with various nitrogen sources on *X. arboricola* pv. *pruni*. The cultivations were performed at 30°C for 72 h.

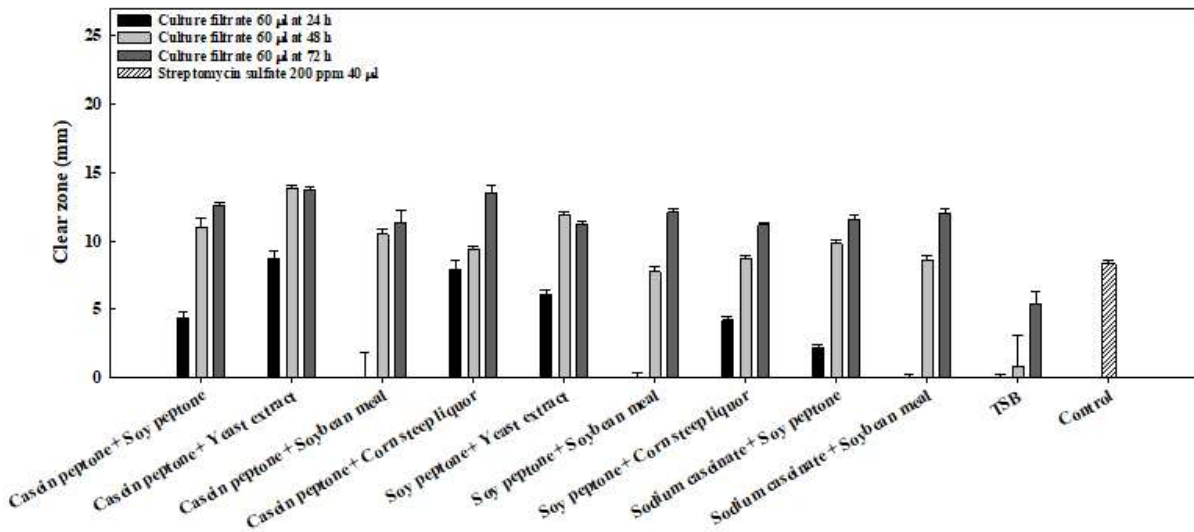
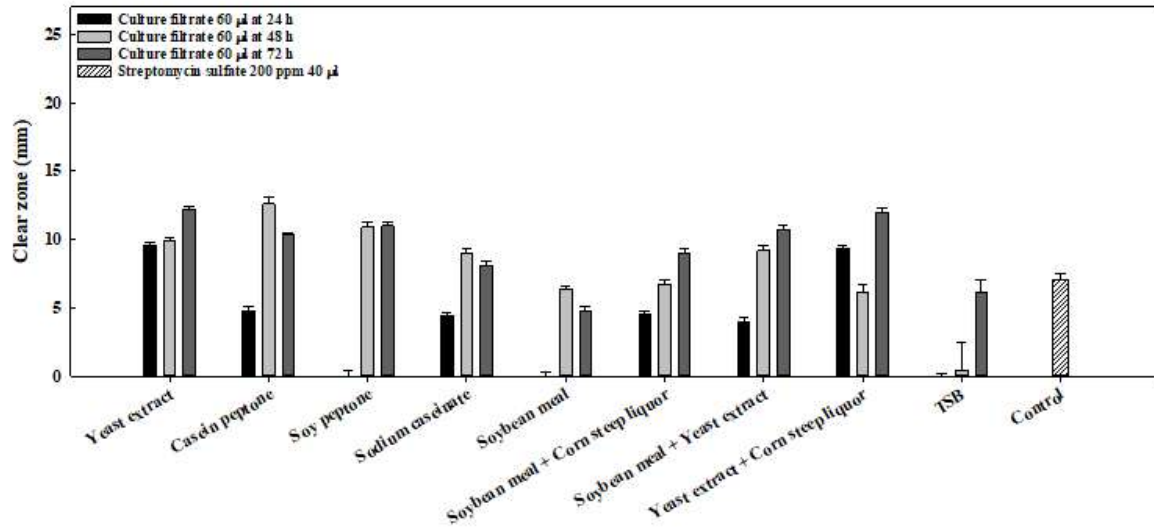


그림 3. Antagonistic effect of culture filtrate of *B. velezensis* G341 with various industrial nitrogen sources on *X. arboricola* pv. *pruni*. The cultivations were performed at 30°C for 72 h.

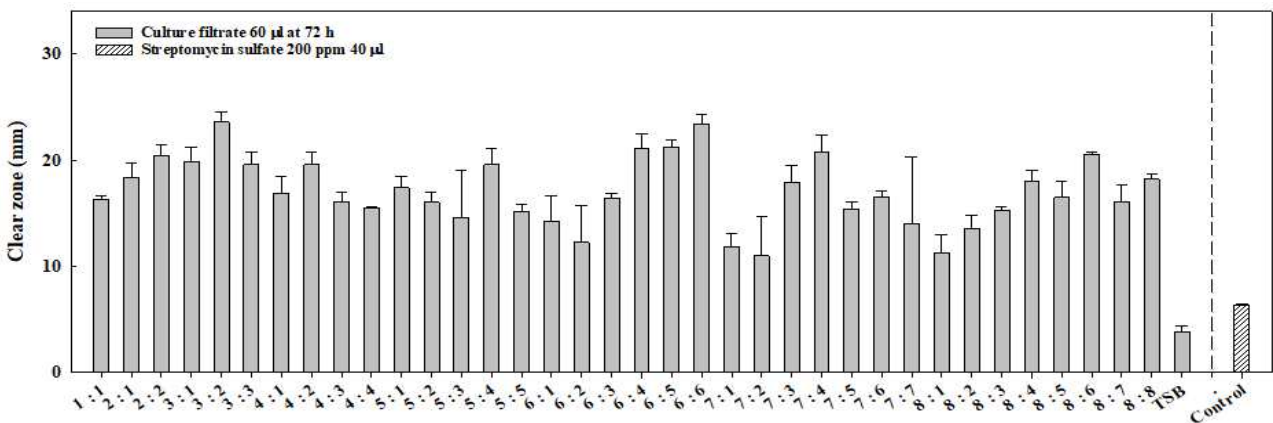


그림 4. Antagonistic effect of culture filtrate of *B. velezensis* G341 on *X. arboricola* pv. *pruni* depending on C/N ratio. The cultivations were performed at 30°C for 72 h.

나. 소포제 첨가에 따른 항세균 효과 경향

(1) 연구목적

○ *B. velezensis* G341의 유효물질 생산에 소포제가 미치는 영향 조사

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

- ① 미생물: *B. velezensis* G341(전남대학교)
- ② 배지: corn flour, casein peptone, yeast extract

(나) 방법

① 소포제 첨가

- 5 L 생물발효기의 배양 중 거품발생을 억제하기 위하여 소포제 및 소포기능이 있는 식물성 기름을 첨가하였음.
- 3% corn flour, 0.5% casein peptone 및 1.5% yeast extract를 기본 배지조성으로 무첨가, 소포제(Antifoam204, Sigma, USA) 0.3% 첨가, vegetable oil(Cooking oil, Haepyo, Korea) 10% 첨가 실험구의 항세균 활성을 비교하였음.

(3) 결과

- 소포제를 0.3% 첨가한 실험구에서 배양 48 및 72시간 항세균 활성은 각각 20 mm 및 19.6 mm 수준의 길항효과를 나타내었음(그림 5).
- Streptomycin sulfate 1000 ppm(14 mm) 대비 소포제 0.3% 실험구의 활성은 140% 수준이었음.
- 소포제 유무에 따른 항세균 활성의 차이는 나타나지 않았음.
- Vegetable oil보다 합성 소포제의 사용이 적합하였음.

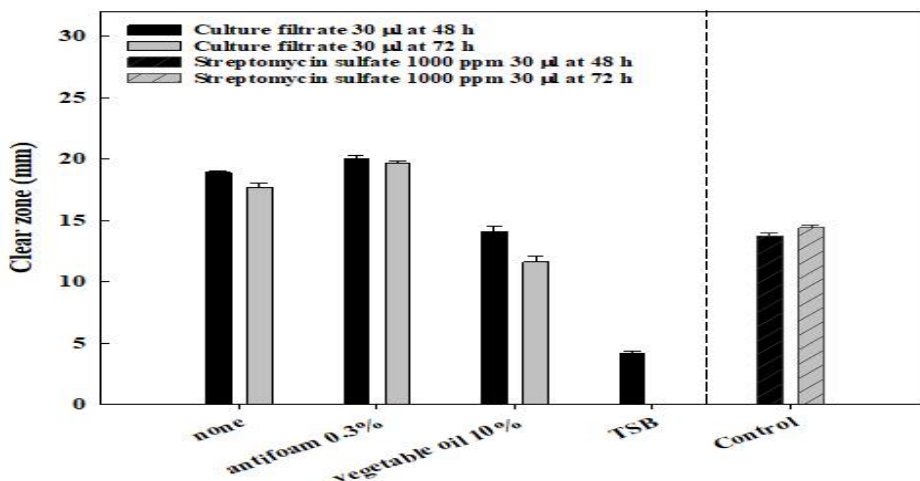


그림 5. Antagonistic effect on *X. arboricola* pv. *pruni* by addition of antifoam and vegetable oil. Cultivations were performed at 30°C and 200 rpm for 72 h.

다. 배양온도에 따른 항세균 효과 경향

(1) 연구목적

○ *B. velezensis* G341의 유효물질 생산을 위한 최적 온도 탐색

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

- ① 미생물: *B. velezensis* G341(전남대학교)
- ② 배지: corn flour, casein peptone, yeast extract

(나) 방법

① 최적 배양 온도 탐색

○ 3% corn flour, 0.5% casein peptone 및 1.5% yeast extract를 기본 배지조성으로 진탕배양기에서 각각 27, 30, 30℃의 온도로 배양 후 항세균 활성을 비교하였음.

(3) 결과

- 배양온도 27, 30, 그리고 33℃에서 배양 상등액을 30 μ L 분주하였을 때, clear zone의 직경은 각각 17.7 mm, 20 mm, 그리고 18.8 mm로 나타내었음(그림. 6).
- 항세균 활성 효과는 30℃에서 가장 우수하다고 판단하였음.

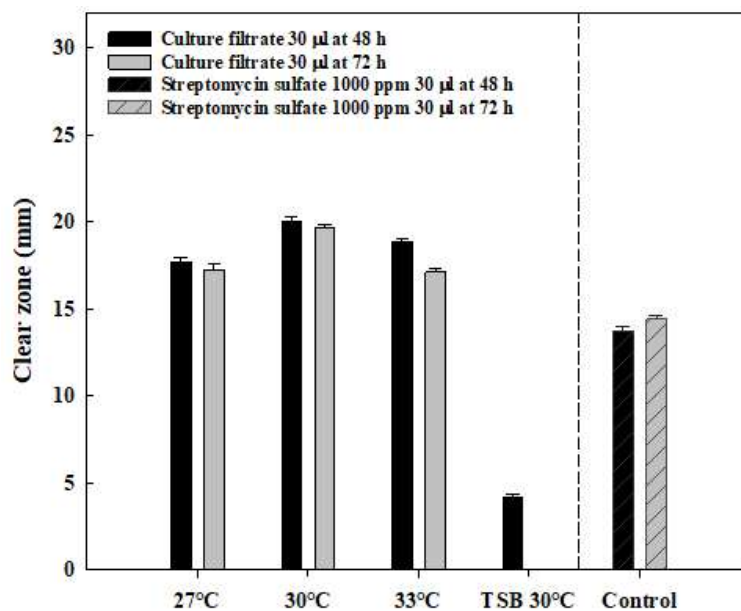


그림 6. Antagonistic effect of culture filtrate of *B. velezensis* G341 with various cultivation temperatures on *X. arboricola* pv. *pruni*. Cultivations were carried out at 200 rpm for 72 h.

2. 생물발효기를 이용한 *B. velezensis* G341 균주 기반 항세균 활성 물질 생산

가. 교반속도 별 항세균 활성 물질 생산 경향 조사

(1) 연구목적

- 교반속도 별 G341 균주의 유효물질 생산 경향 탐색

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

- ① 미생물: *B. velezensis* G341(전남대학교)
- ② 배지: corn flour, casein peptone, yeast extract

(나) 방법

① 교반속도 별 항세균 활성 물질 생산 경향 조사

- 생물발효기(BioCnS Co., Korea)를 이용한 항세균 유효물질 발효생산을 위해 5 L 생물발효기에 3 L의 발효생산배지(3% corn flour, 0.5% casein peptone 및 1.5% yeast extract)를 121°C, 25분간 멸균하고 전배양액 3%(v/v)를 접종한 후 각 실험조건에 따라 수행하였음.
- 생물발효기 교반속도 변화에 따른 항세균 유효물질 생산경향을 분석하였음.

(3) 결과

- 교반속도 300 rpm에서 균체농도는 점진적으로 증가하여 배양 10시간에 최고 1.6×10^9 CFU/mL를 기록하였고 이 후 배양 종료 시점까지 1×10^9 CFU/mL 수준을 유지하였음. 항세균 활성은 배양 10시간부터 발현되기 시작하여 24시간까지 빠른 속도로 증가하는 경향을 확인하였음. 이 후 배양 57시간에 가장 우수한 항세균 효과 (배양 상등액 30 μ L 분주하였을 때 17.2 mm)를 나타내고 점차 감소하였음. 용존산소량은 빠른 속도로 고갈되어 6시간만에 모두 소모되었고 배양이 끝나는 시점까지 0% 수준을 유지하였음(그림 7).
- 교반속도 500 rpm에서 균체증식속도는 300 rpm과 비교하여 상대적으로 느린 수준으로 72시간에 1.4×10^9 CFU/mL까지 천천히 증가하였음. 항세균 활성은 배양초기 300 rpm 조건과 비슷한 패턴이 관찰되었지만, 배양 24시간에 가장 우수한 길항활성(배양 상등액 30 μ L 분주하였을 때 12.5 mm)을 나타낸 이후로 점차 감소하는 경향이었음. 배양 중 다량의 foam을 제어하기 위해 총 120 mL의 소포제가 첨가되었으며 이로 인해 항세균 활성이 영향을 받는지에 관한 확인실험이 필요하다고 판단되었음. 용존산소량은 6시간까지 빠르게 감소하여 6.7%를 기록하였으나 원활한 산소공급으로 10시간에 42.7%, 배양종료 시점에서 94.2% 수준을 기록하였음.
- 교반속도 700 rpm에서 균체농도는 배양 10시간까지 빠르게 증가하고 배양 24시간에 1.5×10^9 CFU/mL 수준의 최고 수율을 기록하였음. 항세균 활성은 교반속도와 상관없이 배양 10시간부터 나타나며 배양 24시간에 13.9 mm의 가장 넓은 clear zone이 관찰되고 72시간에 6.5 mm 정도 수준으로 감소하였음. 용존산소량은 6시간까지 빠르게 감소하여 최저 19.8% 수치를 기록하고 34시간 이 후로 80% 이상의 용존산소량을 유지하였음.

- 교반속도 차이에 의해 이론적으로 기대되는 효과는 단위시간당 산소공급량의 변화임. 일반적으로 교반속도를 높여주면 공기방울의 단면적이 증가하여 수용액상으로 녹아들어가는 용존산소의 양이 비례적으로 증가하였음. 실험 결과에서 교반속도가 300 rpm, 500 rpm, 그리고 700 rpm으로 증가했을 때 용존산소의 농도는 비례적으로 증가하여 각각 0%, 54.3%, 그리고 81.4%로 측정되었지만 항세균 활성의 증가로 이어지지 않았음.
- 교반속도 증가가 더 많은 거품이 발생하여 고농도의 소포제 투입을 유도함. 배양 중 고농도의 소포제와 항세균 활성물질 생산과의 관계를 확인하는 실험이 필요하다고 판단되었음.

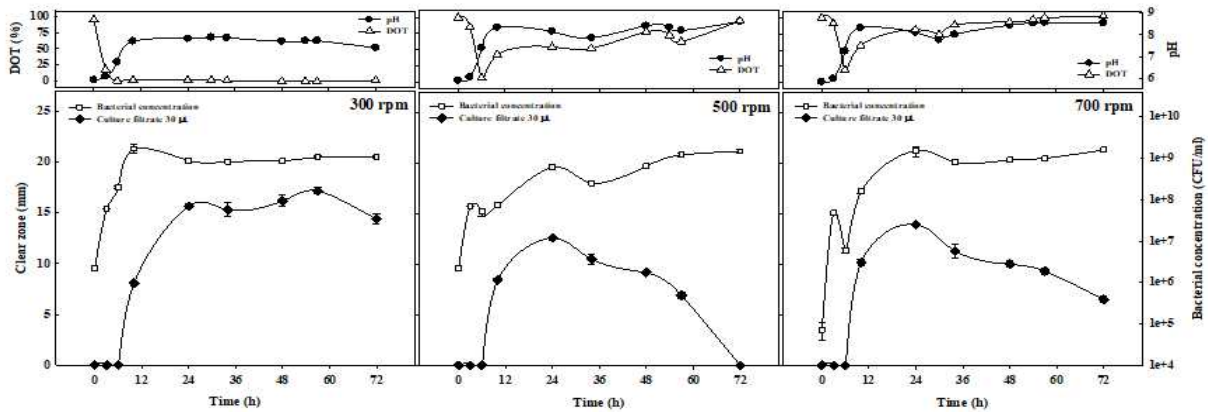


그림 7. Growth profile of *B. velezensis* G341 in a 5 L jar fermenter. The cultivation was performed at 300, 500 and 700 rpm for 72 h.

나. 실험공장 규모(pilot scale) 스케일 업 공정도 확립

(1) 연구목적

- G341 균주의 유효물질 pilot scale 생산
- 실험실 수준에서 도출한 물리화학적 조건을 최대한 동일하게 구현하여 실험실 수준에 근접한 항세균 유효물질 생산성 확보를 시도하였음.

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

- ① 미생물: *B. velezensis* G341(전남대학교)
- ② 배지: corn flour, casein peptone, yeast extract

(나) 방법

① 실험공장 규모 배양

- 실험공장 규모(50 & 500 L pilot)의 발효생산은 각 생물발효기 용량의 60% 수준의 산업용 발효생산배지 (3% corn flour, 0.5% casein peptone 및 1.5% yeast extract)를 자동멸균하고 전배양액 1%(v/v) 접종한 후 수행하였음.
- 실험실 수준 생물발효기에서 도출된 발효인자를 기반으로 실험공장 규모의 스케일 업 공정을 수행하였음. 스케일 업의 주요인자는 통기량, 교반속도, 배양 중 산소전달속도 (OTR, oxygen transfer rate), 균체의 산소소비속도 OUR, Oxygen Uptake Rate), 반응

조의 구조, 선속도, 교반날개의 직경과 형태 등에 따라 결정됨. 스케일 업은 DO, pH, 온도 및 통기량을 조절할 수 있는 시스템으로 구성되어 있는 50 L 및 500 L 생물발효기 (BioCnS Co., Korea)를 이용해서 수행하였음.

- Constant P/V를 스케일 업 인자로 선정하고 50 L 및 500 L 생물발효기의 교반속도를 각각 140 rpm 및 65 rpm으로 얻어 적용하였음.

$$P/V \propto N^3 \cdot Di^2$$

P : Power, N : rotational speed, V : volume

(3) 결과

- 50 L 생물발효기의 균체증식속도는 5 L 생물발효기 때보다 느리게 24시간까지 성장하여 최고 1×10^9 CFU/mL의 수율을 기록 후 감소하여 배양 종료시점까지 9×10^8 CFU/mL을 유지하였음. 항세균 활성은 24시간부터 보이며 36시간에 15 mm의 길항효과를 확인하였음. 배양 종료시점에 14.5 mm로 항세균 활성이 다소 낮았음. 용존산소량은 6시간에 10%, 12시간에 0%를 기록하였고 5 L 수준보다 산소소비속도가 낮았음.
- 500 L 생물발효기는 50 L 결과와 비슷하게 배양 24시간에 최고 균체농도 1×10^9 CFU/mL이 관찰되었으며, 배양 36시간에 14 mm의 항세균 활성을 나타내었음.
- 스케일 업 공정을 거치면서 생물발효기 내부의 환경도 바뀌게 되는데, 50 & 500 L 생물발효기에서 균체증식속도가 느려지고 최고 균체농도와 최초 항세균 활성을 나타내는 시점이 12시간 정도 늦춰지는 경향을 확인하였음. 이는 균주가 적응하는 기간인 유도기가 길어지면서 벌어지는 현상으로 판단되며, 유도기를 줄이고 균체생장을 최대한 앞당기는 실험이 필요하다고 사료되었음.
- 5 L 생물발효기의 항세균 활성 수율 대비 93%를 달성하였음.

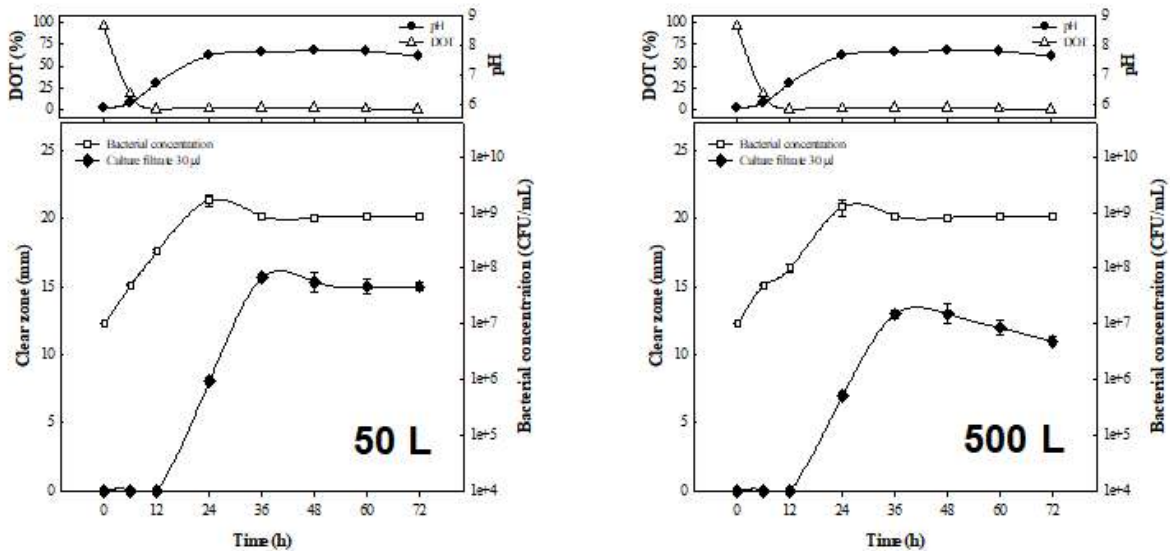


그림 8. Profile of antagonistic effect on *X. arboricola* pv. *pruni* at 140 rpm in a 50 L and 65 rpm in a 500 L fermenter. The cultivation was performed at 30°C for 72 h.

제 2절 진딧물 살충활성 균주의 배양 및 생산 최적화

1. *Bacillus subtilis* Y9 균주 배양의 물리화학적 조건 확립

가. 진딧물 살충활성 물질 생산 극대화 최적 배지 조성 탐색

(1) 연구목적

○ *B. subtilis* Y9 균주의 surfactin 생산 최적 배지 조성 탐색

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

① 미생물: *B. subtilis* Y9(전남대학교)

② 배지: 탄소원 13종(표 4), 산업용 질소원 배지 6종(표 5).

표 4. Carbon sources

C-source media	Manufacturer	Contents(%)
Fructose	Kato, Japan	
Galactose	Sigma, USA	
Glucose	Junsei, Japan	
Lactose	Junsei, Japan	
Maltose	Yakuri, Japan	
Sucrose	Junsei, Japan	
Glycerol	Junsei, Japan	2.0
Mannitol	Sigma, USA	
Sorbitol	Roquette Korea, Korea	
Xylitol	Sigma, USA	
Corn flour	Ingredion Korea, Korea	
Potato starch	Junsei, Japan	
Soluble starch	Deasang, Korea	
TSB (control)	Difco, USA	3.0

표 5. Nitrogen sources

N-source media	Manufacturer	Contents(%)
Casein peptone	Tatua, New zealand	
Corn steep liquor	Samyang, Korea	
Sodium caseinate	Tatua, New zealand	2.0
Soy peptone	Tatua, New zealand	
Soybean meal	Gaemi food, Korea	
Yeast extract	Angest, China	
TSB (control)	Difco, USA	3.0

(나) 방법

① 균주 및 배지조건

- Surfactin 생산 균주인 *B. subtilis* Y9은 전남대학교로부터 공급받아 사용하였음. 전 배양 및 단기간 균주보존 배지로는 TSB(Difco, USA) 배지를 사용하였음.

② Surfactin 정량 분석

- 균주 배양액을 원심 분리하여 상등액을 취한 후 0.2 μm syringe filter(Advantec, Japan)로 여과하였음. 무수부탄올로 배양여액의 물질을 추출하여 surfactin 분석을 위한 샘플을 제조하였음.
- Surfactin 표준물질은 Sigma(USA)에서 구입하여 사용하였고 HPLC를 이용하여 분석하였음(표 6). 이동상으로 trifluoroacetic acid TFA) 3.8 mM이 첨가된 증류수와 acetonitrile (HPLC grade, J.T. Baker, USA)을 20:80의 비율로 제조하여 사용하였으며 컬럼 및 검출기는 Xbridge® RP C18(Waters, 4.6 \times 250 mm, 5 μm)와 Waters 2489 UV/Vis detector를 이용하였음. 표준물질의 분리를 위해 농도별 물질을 10 μl 씩 주입하고 유속은 1.0 mL/min으로 설정하였음.
- 표준물질로 사용한 surfactin에서 농도별로 증가한 각 peak 면적 값을 모두 합한 것을 기준으로 정량곡선을 작성하였음(그림 9).

③ Surfactin 발효생산 최적 탄소원 탐색

- 진딧물 방제활성 물질인 surfactin 생산을 극대화하기 위해 질소원을 2%로 고정하고, Table 4에 표시된 탄소원을 기반으로 발효생산 배지를 제조하였음.

④ 최적 질소원 탐색

- Surfactin 생산성이 우수하게 나타날 수 있는 질소원을 선별하기 위하여 탄소원을 1%로 고정하고 6종류 산업용 질소원 2%를 첨가한 검정배지를 제조하였음 (표 5).

⑤ Surfactin 생산 최적 C/N ratio 탐색

- 탄소원 및 질소원으로 각각 potato starch 및 yeast extract를 선정하고 surfactin 생산성 극대화를 위한 최적 C/N ratio를 탐색하였음.
- 탄소원 함량 1-7%에서 C/N ratio가 7을 넘지 않는 비율로 설정하고 진탕배양기에서 200 rpm 및 30°C에서 60시간 동안 배양한 후 surfactin 생산량을 검정하였음.

표 6. HPLC parameters for surfactin analysis

Parameters	Conditions
Column	Xbridge® RP C18 (Waters, 4.6 \times 250 mm, 5 μm) A : B = 20 : 80
Mobile phase	(A : 3.8mM TFA in water, B : Acetonitrile)
Run time	30 min
Flow rate	1 mL/min
Detector	UV (205 nm)
Injection volume	10 μl

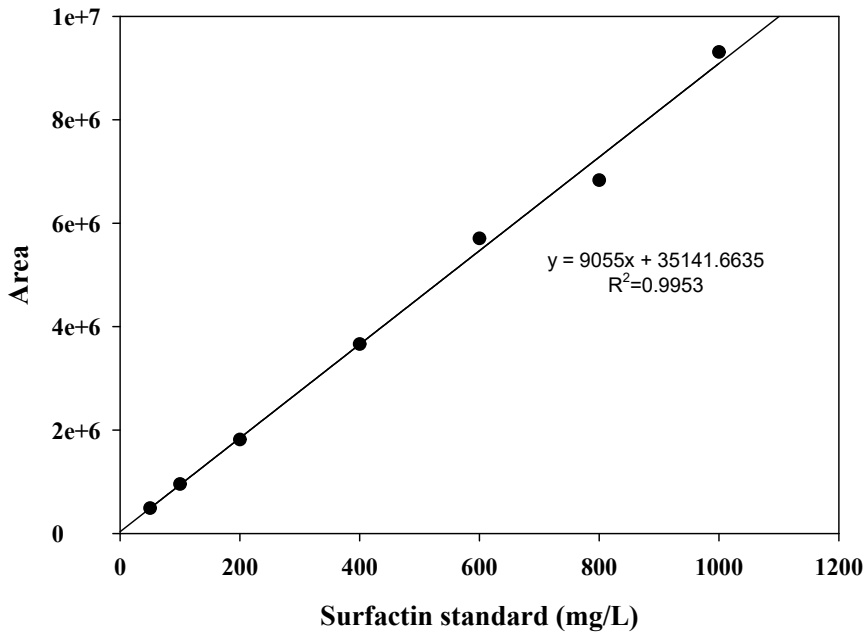


그림 9. Calibration curve of surfactin concentrations.

(3) 결과

(가) Surfactin 발효생산 최적 탄소원 탐색

- 당알콜 및 고분자 탄소원에서 200 mg/L 이상의 생산수율을 기록하였음(그림 10).
- Galactose와 potato starch에서 각각 267, 278 mg/L 수준의 높은 surfactin 수율을 나타내었음.
- 경제성을 고려하여 potato starch(산업용 기준 1,800원/kg)를 surfactin 생산을 위한 탄소원으로 결정하였음.

(나) Surfactin 발효생산 최적 질소원 탐색

- Yeast extract를 질소원으로 사용하였을 때 TSB 실험구 대비 surfactin 생산수율이 277% 증가하여 367 mg/L의 수치를 기록하였음(그림 11).
- Corn steep liquor에서 199 mg/L의 수율을 기록하였고 sodium caseinate의 경우 surfactin이 생산되지 않아 질소원으로 적합하지 않다고 판단하였음.
- TSB(132 mg/L)보다 우수한 surfactin 생산성을 보인 yeast extract를 최적 질소원으로 선별하였음.

(다) Surfactin 생산 최적 C/N ratio 탐색

- 배지 중 탄소원 농도는 3%까지 증가하면서 생산수율이 증가하였지만 4% 부터는 감소하는 경향이었음(그림 12).
- Potato starch와 yeast extract 3:1의 비율에서 대조구(161 mg/L) 대비 343% 증가한 552 mg/L의 최고 수율을 나타내었음.
- Yeast extract는 surfactin 생산을 위한 결정적인 영양원이지만, 농도가 증가할수록 surfactin 생산수율은 감소하였음.

○ 3% potato starch와 1% yeast extract 조성을 surfactin 생산 최적 배지로 선정하였음.

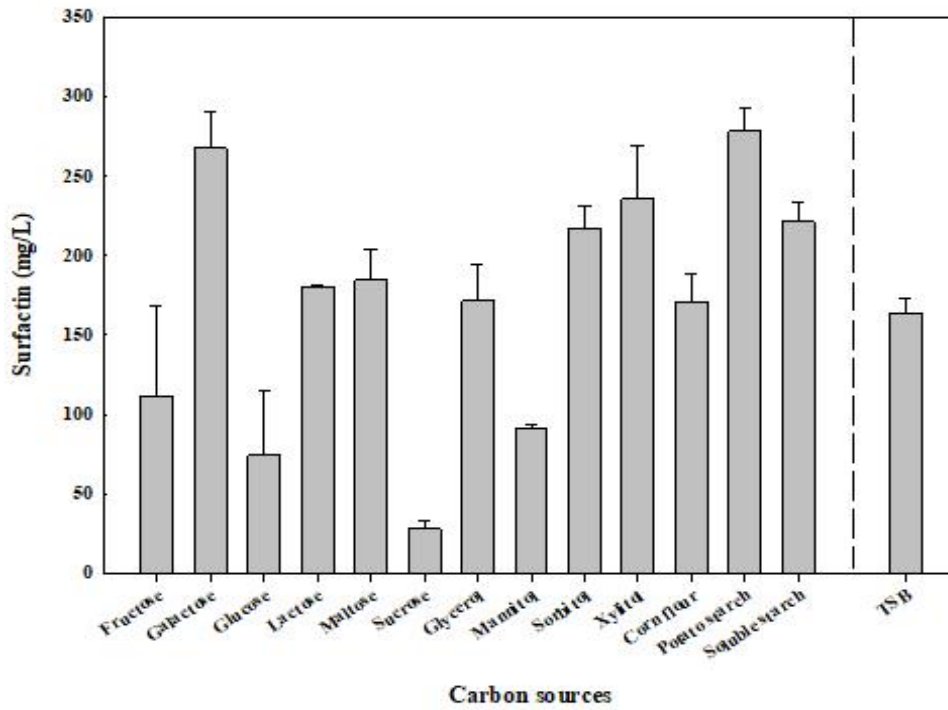


그림 10. Surfactin production depending on various carbon sources in submerged culture of *B. subtilis* Y9. The cultivations were performed in Erlenmeyer flasks at 30°C for 60 h.

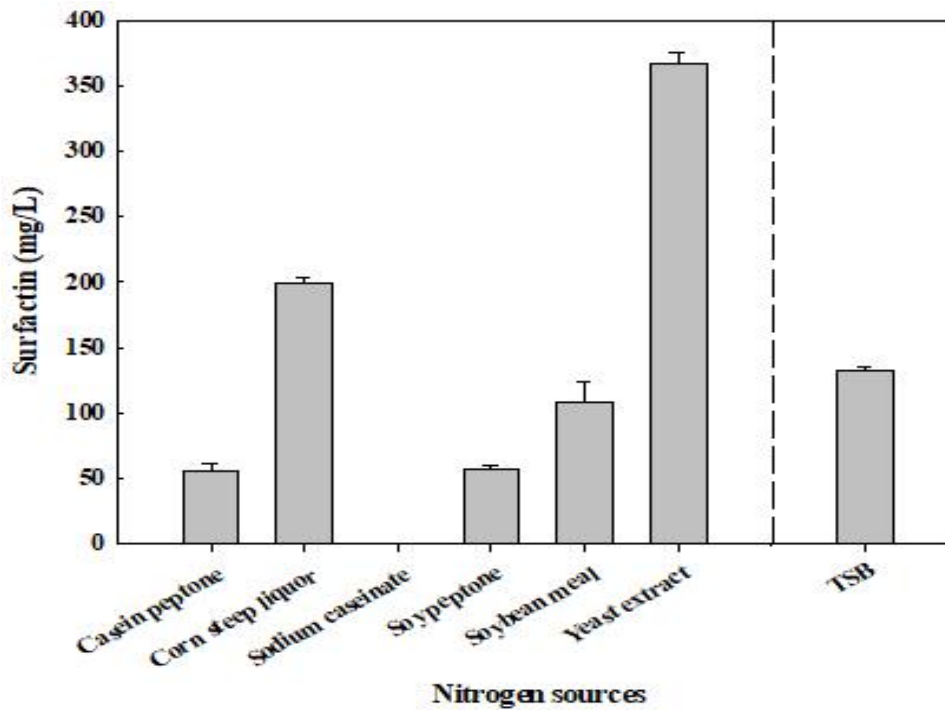


그림 11. Surfactin production depending on various nitrogen sources in submerged culture of *B. subtilis* Y9. The cultivations were performed in Erlenmeyer flasks at 30°C for 60 h.

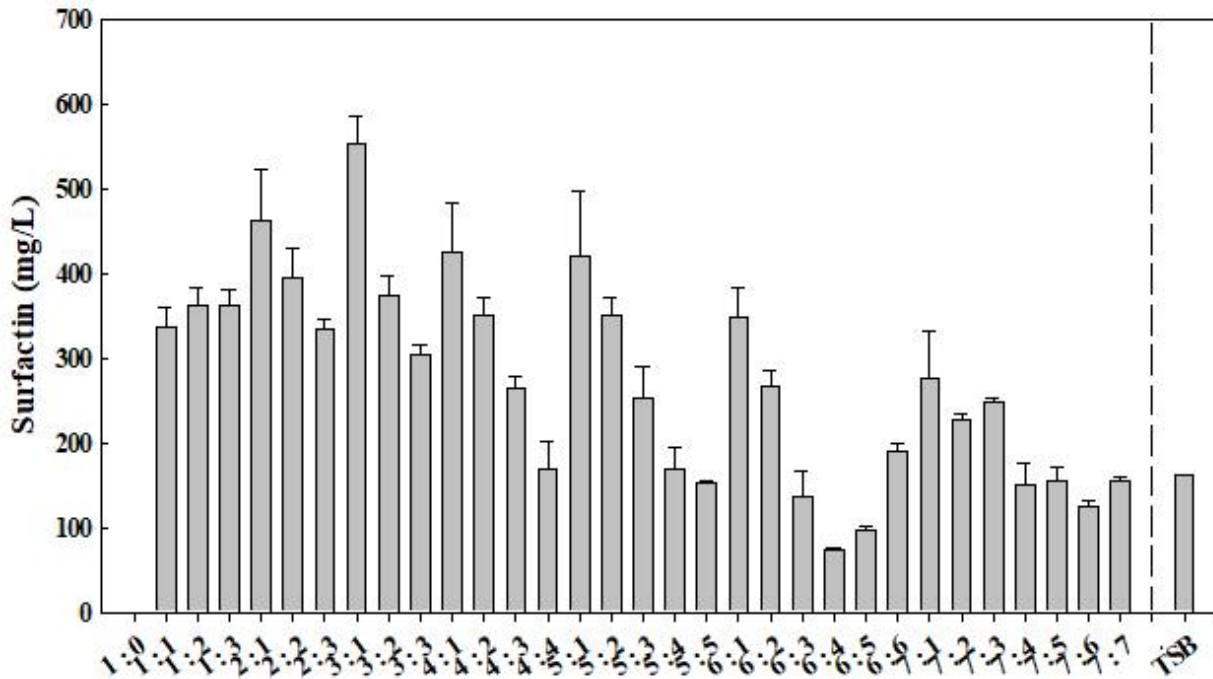


그림 12. Surfactin production depending on various C/N ratios in submerged culture of *B. subtilis* Y9. The cultivations were performed in Erlenmeyer flasks at 30°C for 60 h.

2. 진딧물 살충활성 물질 생산 극대화 전략 수립

가. pH-stat을 이용한 surfactin 생산 경향

(1) 연구목적

- pH 변화에 따른 *B. subtilis* Y9 균주의 surfactin 생산 경향 조사

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

- ① 미생물: *B. subtilis* Y9(전남대학교)
- ② 배지: Potato starch, yeast extract

(나) 방법

① 실험실 수준 생물발효기를 이용한 surfactin 생산

- 5 L 생물발효기(BioCnS Co., Korea)에 3 L의 발효생산배지(3% potato starch, 1% yeast extract, 0.25% K₂HPO₄, 0.1% NaCl)를 121°C, 25분간 멸균함. 전배양액을 1 × 10⁵ CFU/mL 수준으로 접종한 후 pH 변화에 따른 surfactin 생산경향을 분석하였음.

(3) 결과

- 배양 중 5 L 생물발효기의 교반속도를 500 rpm으로 고정하고 pH를 인위적으로 조절하였을 경우 surfactin 생산은 pH가 중성으로 유지될수록 높은 농도로 생산되었음(그림 13).

- pH 5 조건에서 surfactin 생산은 전무하였고, pH 6 이상에서 생산되기 시작하여 pH 7 실험구에서 배양 72시간 531 mg/L의 최고 수율을 나타내었음.
- 기질소비가 이루어지지 않은 pH 5 조건을 제외하고 pH가 높아질수록 기질 소비속도는 감소하는 경향이었음.
- pH 6을 제외하고 배양 10시간 이후 용존산소량은 50% 이상 유지되었음.
- Surfactin의 고농도 발효생산을 위해 pH는 중성일수록 유리하다고 판단하였음.

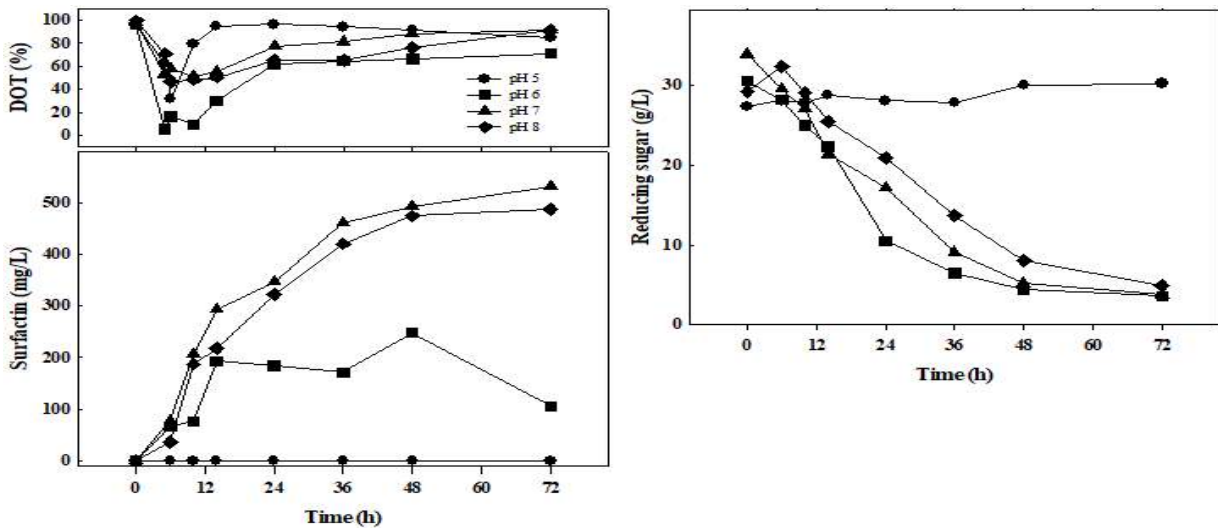


그림 13. Surfactin production with pH control. The cultivations were performed in a 5-L bioreactor at 500 rpm for 72 h.

나. 5 L 생물발효기의 교반속도에 따른 surfactin 생산 경향

(1) 연구목적

- 교반속도 변화에 따른 *B. subtilis* Y9 균주의 surfactin 생산 경향 조사

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

- ① 미생물: *B. subtilis* Y9(전남대학교)
- ② 배지: Potato starch, yeast extract

(나) 방법

① 실험실 수준 생물발효기를 이용한 surfactin 생산

- 5L 생물발효기(BioCnS Co., Korea)에 3 L의 발효생산배지(3% potato starch, 1% yeast extract, 0.25% K_2HPO_4 , 0.1% NaCl)를 121°C, 25분간 멸균함. 전배양액을 1×10^5 CFU/mL 수준으로 접종한 후 교반속도 변화에 따른 surfactin 생산경향을 분석하였음.

(3) 결과

- 교반속도가 증가할수록 surfactin 생산수율은 비례해서 감소하였음(그림 14).
- 교반속도 300 rpm에서 배양 48시간 552 mg/L의 최고수율을 나타내었던 반면, 교반

속도가 600 rpm 실험구에서 surfactin 생산은 141 mg/L로 가장 낮은 수준을 확인하였음.

- 교반속도가 증가할수록 용존산소 농도는 비례적으로 증가하였지만 균체생산이 감소하여 surfactin 생산에 유리하지 않다고 판단하였음.

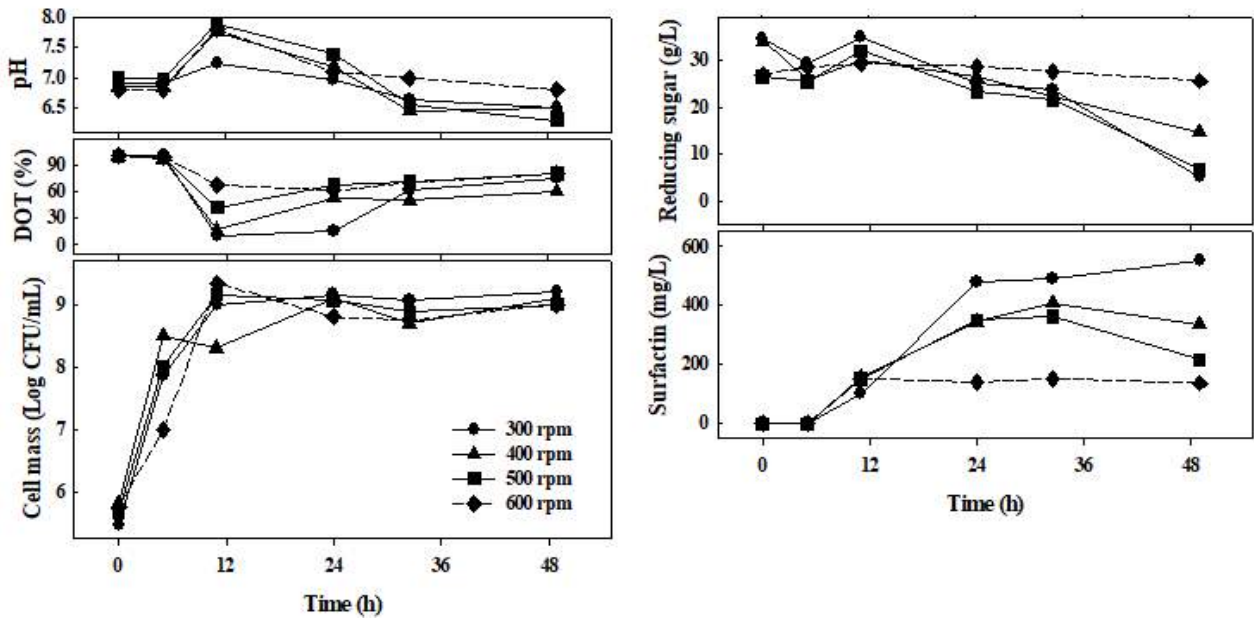


그림 14. Surfactin production depending on various agitation speeds. The cultivations were performed in a 5-L bioreactor at 30°C for 48 h.

다. 5 L 생물발효기 통기량 변화에 의한 surfactin 생산 경향

(1) 연구목적

- 통기량 변화에 따른 *B. subtilis* Y9 균주의 surfactin 생산 경향 조사

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

- ① 미생물: *B. subtilis* Y9(전남대학교)
- ② 배지: Potato starch, yeast extract

(나) 방법

① 실험실 수준 생물발효기를 이용한 surfactin 생산

- 5 L 생물발효기(BioCnS Co., Korea)에 3 L의 발효생산배지(3% potato starch, 1% yeast extract, 0.25% K_2HPO_4 , 0.1% NaCl)를 121°C, 25분간 멸균함. 전배양액을 1×10^5 CFU/mL 수준으로 접종한 후 통기량 변화에 따른 surfactin 생산경향을 분석하였음.

(3) 결과

- 5 L 생물발효기에서 교반속도를 300 rpm으로 고정하고 통기량을 0.5, 1.0 및 2.0 vvm으로 조절하였을 때, 균체농도는 차이를 나타내지 않았음(그림 15).

- 통기량과 상관없이 균체생산에 의한 산소요구도가 증가하여 배양 11시간 용존산소 농도는 0%으로 급격하게 감소하였음.
- 대부분의 실험구에서 배양 중 pH 6-7을 유지하였지만, 통기량 2 vvm에서 배양 11시간 이후 내내 6.9-7.1을 나타내며 중성을 유지하였음.
- 배양 72시간 통기량에 따른 surfactin 생산량은 각각 283 mg/L, 282 mg/L 및 578 mg/L 수준이었음.
- Surfactin은 균체성장과 함께 배양 24시간까지 빠르게 생산되다가 성장곡선이 안정기에 들어감과 동시에 생산속도가 감소하는 growth-associated type의 경향을 나타내었음.

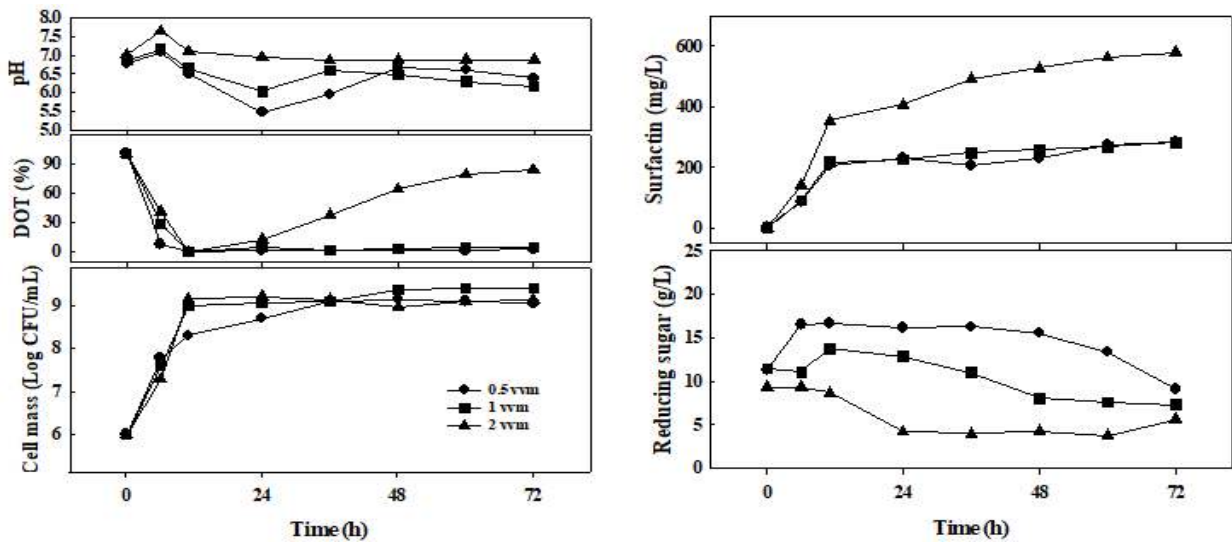


그림 15. Surfactin production depending on various aeration rates. The cultivations were performed in a 5-L bioreactor at 300 rpm for 72 h.

라. 5 L 생물발효기 수준 최적 배양 조건 확립

(1) 연구목적

- *B. subtilis* Y9 균주의 surfactin 최적 생산 조건 조사

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

- ① 미생물: *B. subtilis* Y9(전남대학교)
- ② 배지: Potato starch, yeast extract

(나) 방법

① 실험실 수준 생물발효기를 이용한 surfactin 생산

- 5 L 생물발효기(BioCnS Co., Korea)에 3 L의 발효생산배지(3% potato starch, 1% yeast extract, 0.25% K_2HPO_4 , 0.1% NaCl)를 121°C, 25분간 멸균함. 전배양액을 1×10^5 CFU/mL 수준으로 접종한 후 surfactin 생산경향을 분석하였음.

(3) 결과

- 교반속도를 300 rpm으로 고정하고 배양 중 인위적으로 pH를 조정하였을 때, pH가 증가할수록 생산수율은 증가하였음(그림 16).
- pH와 상관없이 배양초기 산소요구량은 증가하여 36시간까지 용존산소량은 0% 수준이었고, 배양 48시간 이후 pH 7, 8 실험구에서 40% 이상으로 증가하였음.
- pH 8 실험구에서 배양 36시간 이후부터 700 mg/L 이상의 높은 농도로 surfactin을 생산하였고 배양 72시간 811 mg/L의 최고수율을 나타내었음.
- 균체량의 증가와 함께 surfactin 생산량도 비례적으로 증가하였고 배양 24시간에 9.5 log CFU/mL로 pH 7 실험구에 비해 약 두 배 이상 높은 수준이었음.
- 선행연구 결과를 바탕으로 5 L 생물발효기 수준 최적 배양조건을 확립하여 811 mg/L의 surfactin 수율을 확보하였음.

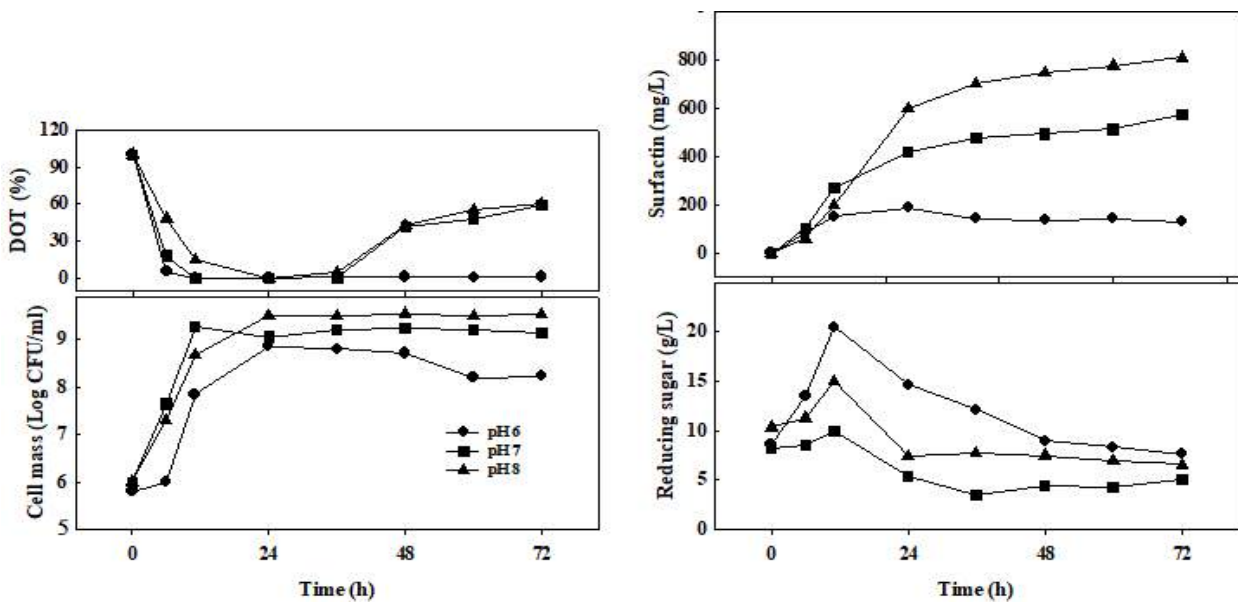


그림 16. Surfactin production with pH-stat. The cultivations were performed in a 5-L bioreactor at 300 rpm for 72 h.

제 3절 진딧물 살충활성 균주의 대량생산 공정 확립

1. 발효인자 분석을 위한 배양 전략 수립

가. 대체 탄소원 및 C/N ratio 탐색

(1) 연구목적

- 탄소원으로 potato starch를 사용했을 때 완전히 용해되지 않는 문제점이 존재
- 발효인자 분석을 위한 potato starch의 대체 탄소원인 galactose의 최적 C/N ratio 탐색

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

- ① 미생물: *B. subtilis* Y9(전남대학교)
- ② 배지: Galactose, yeast extract

(나) 방법

① Surfactin 정량분석

- Surfactin 생산량을 확인하기 위해 배양여액으로 HPLC(Waters Alliance e2695 system, Waters, USA) 분석을 수행하였음.
- 진탕배양기에서 200 rpm 및 30°C에서 60시간 동안 배양한 후 surfactin 생산량을 검정하였음.

(3) 결과

- C/N ratio 3:4에서 421 mg/L, C/N ratio 4:4에서 454 mg/L의 surfactin을 생산하였음(그림 17).
- Yeast extract 비율이 높아질수록 surfactin 생산성이 비례적으로 증가하였음.
- C/N ratio 4:4에서 가장 높은 surfactin이 생산되었으나 배양 종료시점까지 기질소비가 이뤄지지 않아(data not shown), 기질소비가 완전히 이루어지는 3:4 조건에서 발효인자 분석을 위한 실험을 진행하였음.

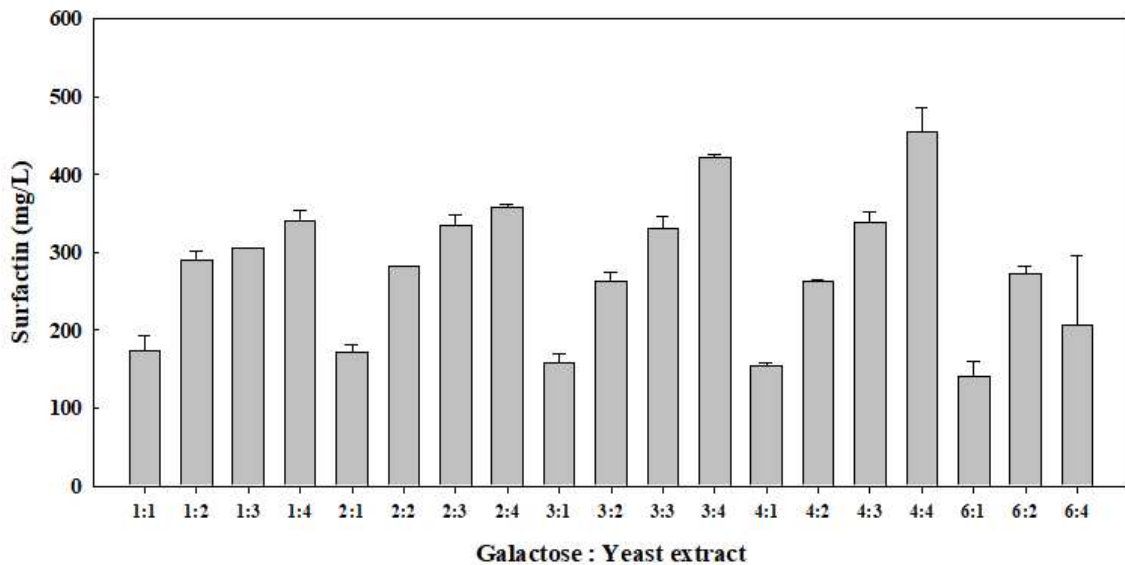


그림 17. Surfactin production depending on various C/N ratios in submerged culture of *B. subtilis* Y9. The cultivations were performed in Erlenmeyer flasks at 30°C for 60 h.

나. 대체 탄소원 기반 5 L 생물발효기 배양

(1) 연구목적

- Galactose를 이용한 5 L 생물발효기 배양 및 교반속도 변화에 따른 surfactin 생산 경향 조사

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

- ① 미생물: *B. subtilis* Y9(전남대학교)
- ② 배지: Galactose, yeast extract

(나) 방법

① 5 L 생물발효기 배양

- pH 및 DO 전극이 장착된 5 L scale 생물발효기 (BioCNS Co., Korea)에 3% galactose, 4% yeast extract, 0.25% K_2HPO_4 , 0.1% NaCl이 포함된 3 L의 발효생산 배지를 담고 121°C, 25분간 멸균한 뒤 전배양액 2%를 접종하였음.
- 교반속도 변화에 따른 surfactin 생산경향을 분석하기 위해 48시간 동안 30도에서 배양을 실시하였음.

(3) 결과

- 교반속도가 증가하였음에 따라 DOT 수준도 증가하였고 surfactin 생산경향에 직접적인 영향을 주었음(Fig. 18).
- 300-500 rpm 조건에서 배양 초기 DOT 수준은 빠르게 감소하며 배양 12시간에 5% 미만으로 낮았음.

- 500 rpm에서 DOT가 배양 28시간 이후 50% 이상 회복되었으나 surfactin 생산량은 증가하지 않았음.
- 400 rpm에서 배양 종료시점 734 mg/L의 surfactin을 생산하였음.
- 300, 400, 500 rpm에서 각각 435, 734, 619 mg/L의 surfactin을 생산하였으며 교반속도에 따른 surfactin 생산경향은 직접적으로 확인할 수 없었음.

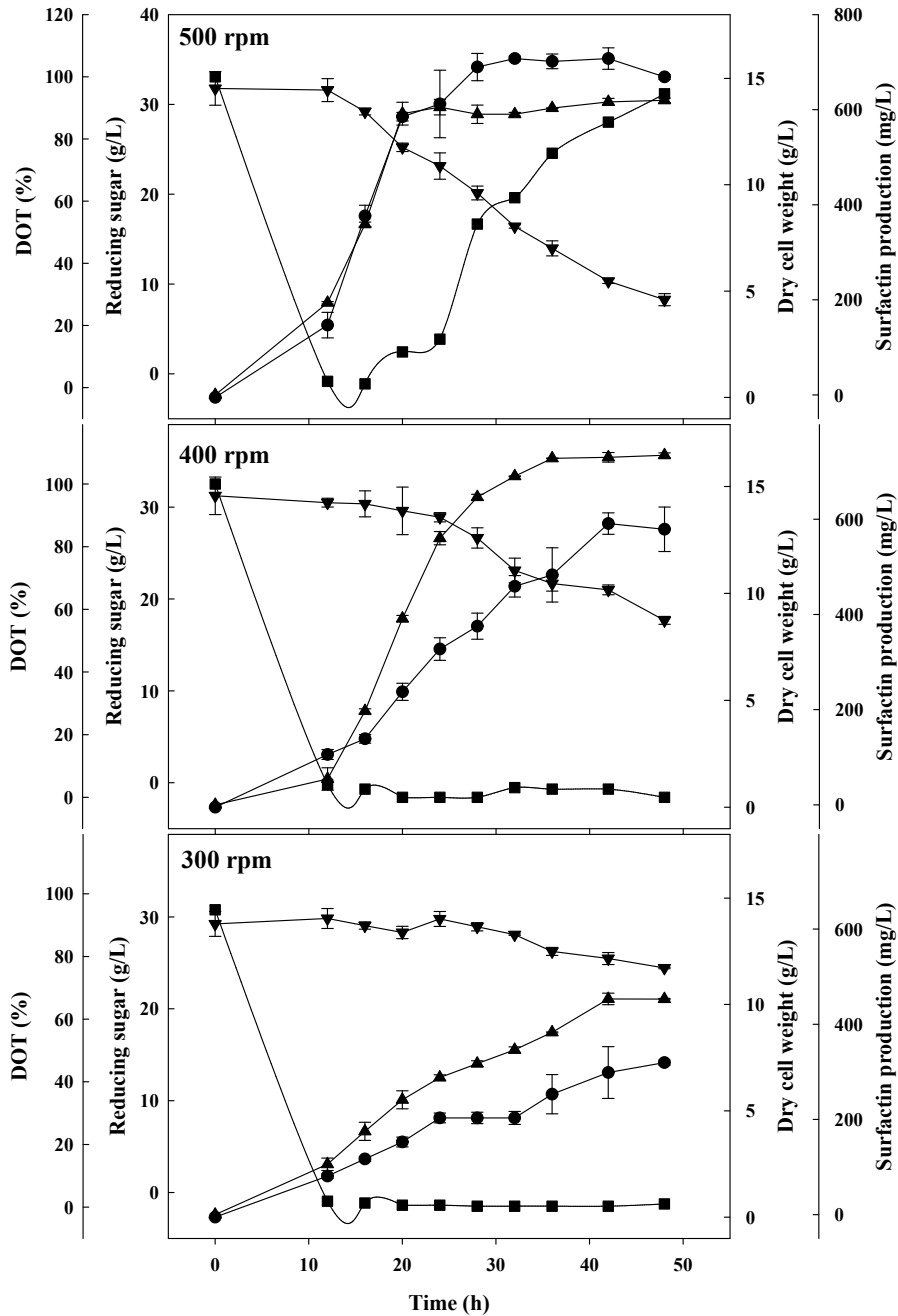


그림 18. Surfactin production depends on agitation speed. Cultivations were carried out in 5-L jar fermenters for 48 h. ▲, surfactin; ●, dry cell weight; ▼, reducing sugar; ■, DOT

다. 발효인자 분석

(1) 연구목적

- *B. subtilis* Y9 균주의 surfactin 생산 발효인자 분석

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

- ① 미생물: *B. subtilis* Y9(전남대학교)
- ② 배지: Galactose, yeast extract

(나) 방법

① 발효인자 분석

- 교반속도 변화에 따른 surfactin 생산경향을 분석하기 위해 48시간 동안 30도에서 배양을 실시하고 발효인자 분석을 수행하였음.

② 포자 염색

- Schaeffer-Fulton 염색 방법을 이용해 포자를 염색하고 교반속도에 따른 포자비율 변화를 측정하였음.
- Y9 배양액을 희석한 다음 slide glass에 열고정하고 0.5% malachite green (Kanto, Japan) 염색 용액으로 충분히 적신 뒤 5분 동안 스팀 가열하여 증류수로 씻어주었음.
- Slide glass를 0.25% safranin O(Sigma, USA) 용액으로 30초 동안 대조 염색한 뒤 증류수로 씻어내었음.
- 포자는 밝은 녹색으로, vegetable cell은 빨간색으로 구분이 가능하였고 형광현미경 (IX73; Olympus, Japan)을 이용해 관측하였음.

(3) 결과

- 산소소비속도인 OUR과 단위부피당 생산성 간에 상관관계를 분석하였음. OUR이 0에서 250 s^{-1} 로 증가할 때 단위부피당 생산성은 $45\text{ mg/L}\cdot\text{h}$ 까지 증가하면서 밀접한 상관관계를 나타내었지만 OUR이 255 s^{-1} 이상 증가하게 되면 단위부피당 생산성은 더 이상 증가하지 않았음 (그림 19).
- 교반속도가 증가할수록 K_{La} 값은 비례적으로 증가하였음(그림 20).
- 교반속도가 300-500 rpm으로 증가하였음에 따라 각각 0.0140 s^{-1} , 0.185 s^{-1} , 그리고 0.0233 s^{-1} 로 측정되었음.
- *Bacillus* 종의 특징인 내생포자가 배양 중 어느 시점에 생기는지 염색을 통해 현미경으로 관찰하여 단위부피당 생산성과 비교하였음(그림 21).
- 전체적으로 단위부피당 생산성은 배양 12-24시간 구간에 $16\text{ mg/L}\cdot\text{h}$ 이상 유지되었고, 24시간 이후에는 $10\text{ mg/L}\cdot\text{h}$ 이하로 감소하였음.
- 300-400 rpm에서 포자는 형성되지 않았고 500 rpm에서 배양 24시간에 포자가 형성됨. 500 rpm에서 포자가 형성된 뒤로 단위부피당 생산성은 $24\text{ mg/L}\cdot\text{h}$ 에서 급감하였고 배양 종료시점까지 $5\text{ mg/L}\cdot\text{h}$ 보다 낮은 상태로 유지되었음.

- 300-400 rpm(각각 44, 36시간)에서 500 rpm(24시간)보다 단위부피당 생산성이 긴 시간 동안 유지되었음.
- 배양초기 OUR과 단위부피당 생산성은 밀접한 관계에 있음을 확인하였음. 증가된 교반속도는 K_{La} 를 향상시켜 배지 내 산소공급을 원활하게 하지만 단위부피당 생산성의 증가로 이어지지 않았음.
- 교반속도가 빨라지면 포자형성 시점도 빨라지는 것을 확인하였음. 내생포자가 형성될 때 단위부피당 생산성이 감소하는 결과를 고려해보면 Y9에서 포자형성은 surfactin 생산에 부정적으로 작용하는 것으로 판단하였음.

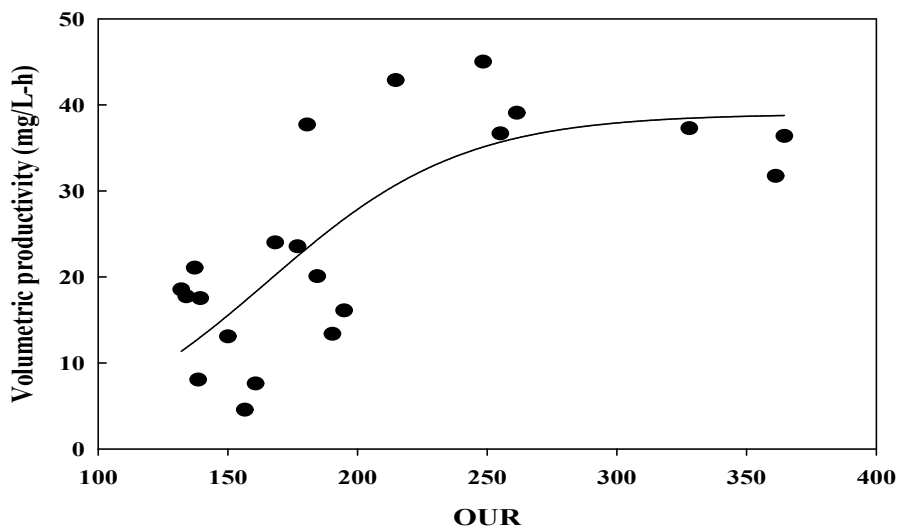


그림 19. Relationship between OUR and volumetric surfactin productivity.

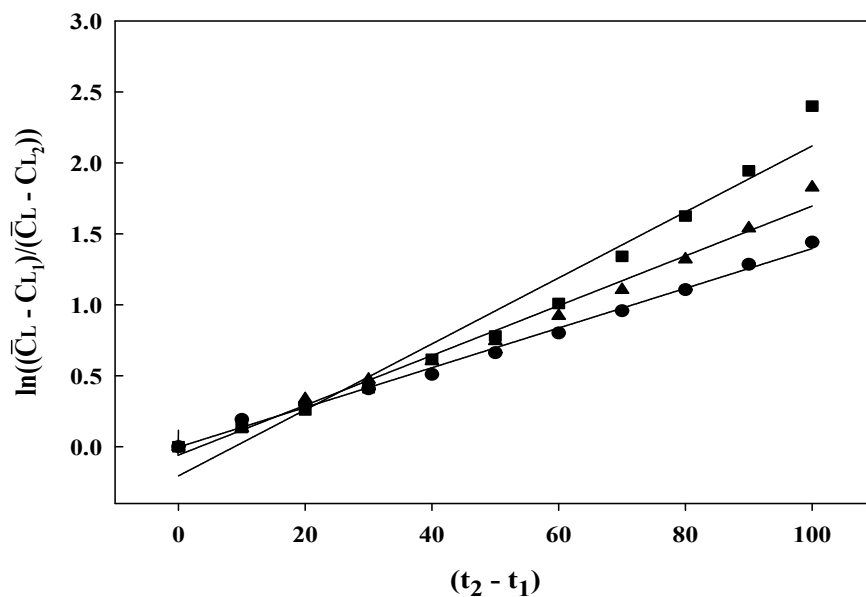


그림 20. The volumetric mass transfer coefficient, K_{La} , depends on agitation speed. ●, 300 rpm; ▲, 400 rpm; ■, 500 rpm

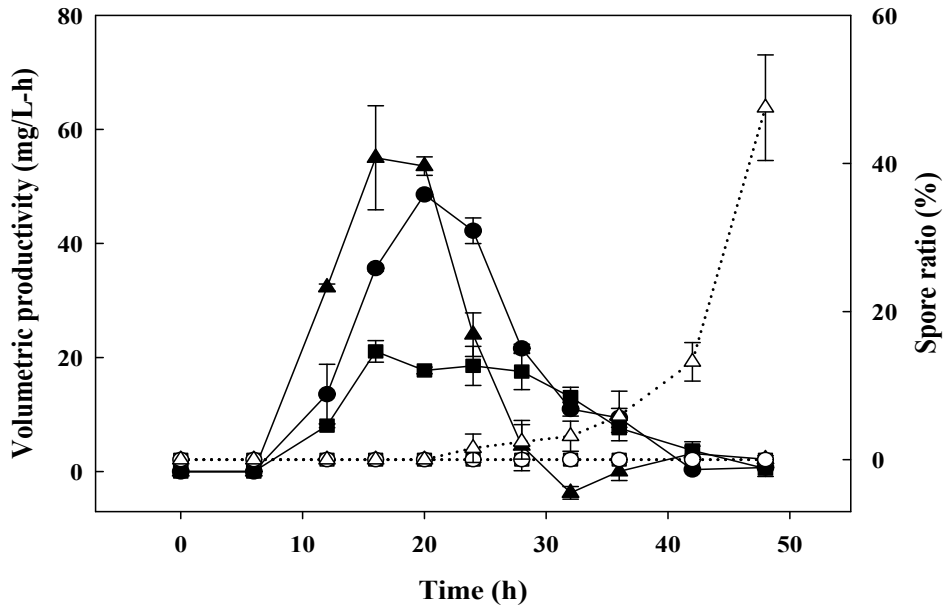


그림 21. Profiles of volumetric surfactin productivity and spore ratio. Closed and open symbols indicate volumetric productivity and spore ratio, respectively. Agitation speed: 300 rpm (□, ■); 400 rpm (○, ●); 500 rpm (△, ▲)

라. Mesh-type sparger를 이용한 5 L 생물발효기 배양

(1) 연구목적

○ 산소 전달 속도 변화에 따른 surfactin 생산경향 분석

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

① 미생물: *B. subtilis* Y9(전남대학교)

② 배지: Galactose, yeast extract

(나) 방법

① Mesh-type sparger 장착

○ 기존 5 L 생물발효기의 original sparger를 탈착 후 mesh-type sparger를 장착하여 3% galactose, 4% yeast extract, 0.25% K_2HPO_4 , 0.1% NaCl 배지 조성에서 배양을 실시하였음(그림 22).

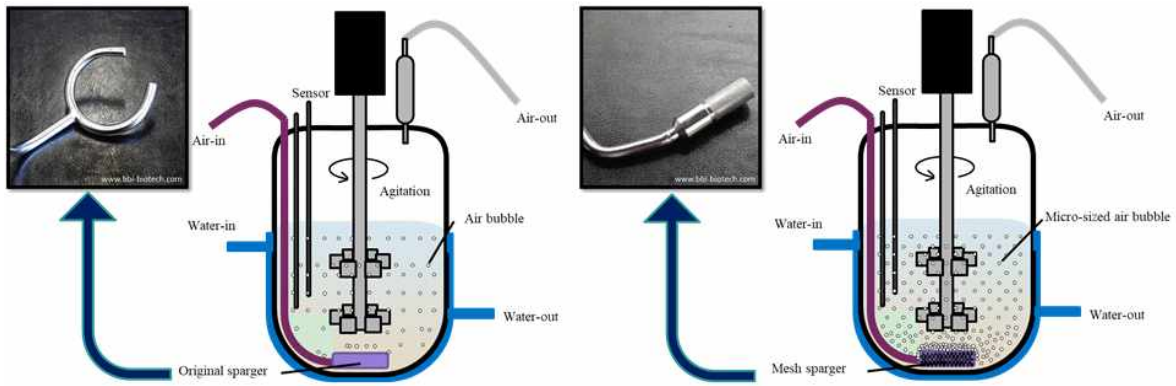


그림 22. Diagram of mesh-type sparger and 5 L jar fermenter.

(3) 결과

- Mesh-type sparger 장착 후 배양하였을 때 875 mg/L의 surfactin이 생산되었음(그림 23).
- DOT는 24시간부터 점차 상승하여 배양 종료시점 50% 수준을 회복하였음.
- 균체농도가 증가하였음에 따라 surfactin 생산도 증가하며 기질소비가 이루어짐.
- 교반속도를 이용하여 K_{La} 를 증가시키는 대신 mesh-type sparger를 장착하여 배지 내 미세공기방울을 공급하였고 교반속도의 증가 없이 K_{La} 가 향상됨(그림 24). Mesh type sparger를 장착한 400 rpm의 K_{La} 는 0.0253 s^{-1} 이었고 original sparger 500 rpm 보다 더 높은 수치를 기록하였음.
- 배양 12-24시간 사이의 단위부피당 생산성은 $42.3 \text{ mg/L}\cdot\text{h}$ 로, original sparger의 400-500 rpm 조건(각각 33.9 및 $40.7 \text{ mg/L}\cdot\text{h}$ 과 비교했을 때 더 높은 값을 기록하였음(그림 25)..
- 포자는 배양 36시간에 형성되었으며 이 후 단위부피당 생산성이 $3 \text{ mg/L}\cdot\text{h}$ 까지 급격하게 감소하였음.
- 배양 중 미세공기방울을 공급하여 기체-액체 간 단면적이 커지게 만드는 효과로 K_{La} 가 증가하였고 875 mg/L의 surfactin을 생산하였음.
- Mesh-type sparger는 교반속도 증가 없이 K_{La} 를 향상시키며 배양 초중기 단위부피당 생산성을 증가시키는 영향을 준다고 판단하였음.

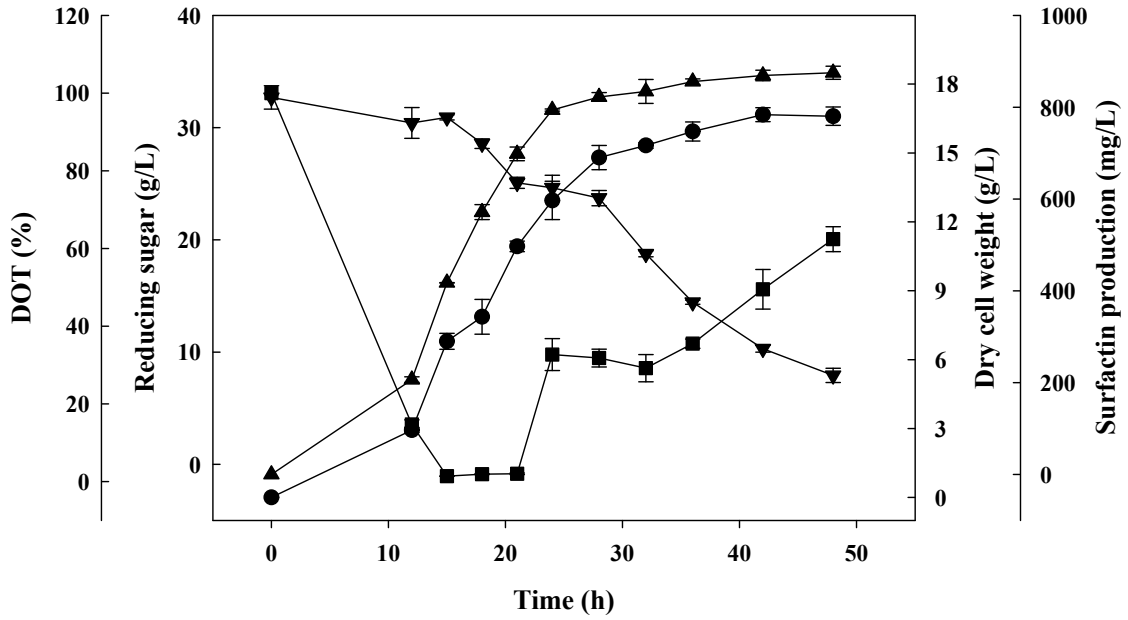


그림 23. Surfactin production when a mesh-type sparger is used. Cultivations were carried out in 5-L jar fermenters for 48 h. ▲, surfactin; ●, dry cell weight; ▼, reducing sugar; ■, DOT

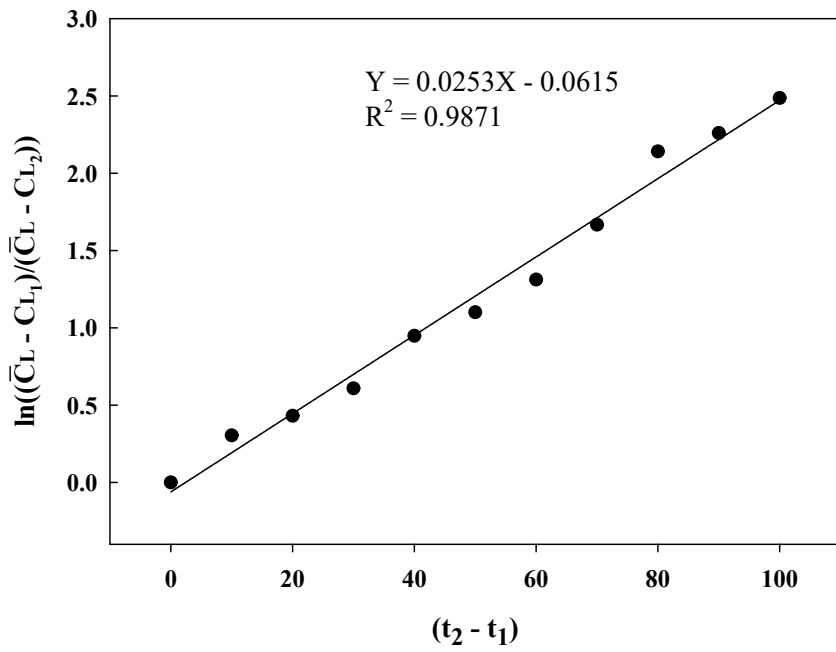


그림 24. Volumetric mass transfer coefficient, K_{La} , when a mesh-type sparger is used.

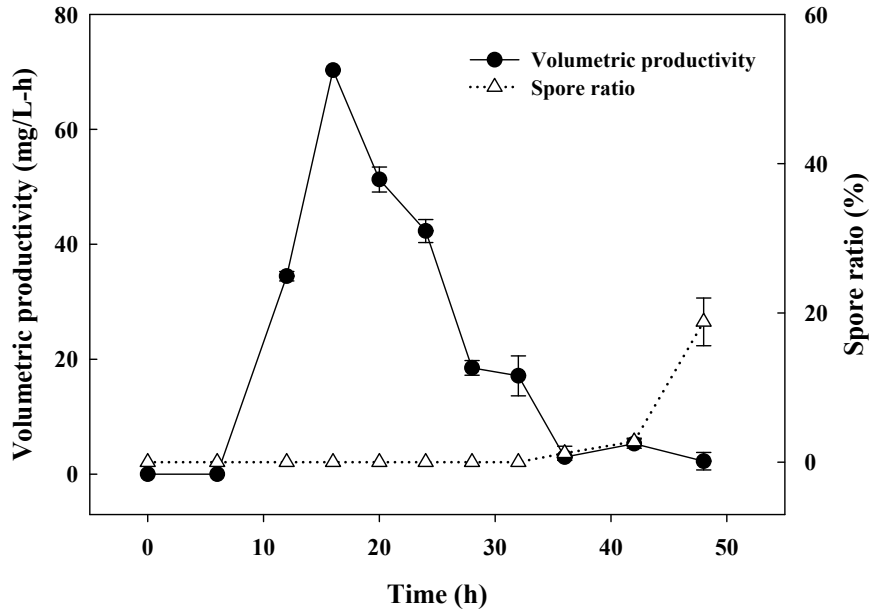


그림 25. Profiles of volumetric surfactin productivity and spore ratio when a mesh-type sparger is used.

2. 실험공장 규모(pilot scale) 스케일 업 공정도 확립

가. 50 L 생물발효기 배양

(1) 연구목적

- *B. subtilis* Y9 균주의 pilot scale surfactin 발효생산

(2) 재료 및 방법

(가) 재료

- ① 미생물: *B. subtilis* Y9(전남대학교)
- ② 배지: Galactose, yeast extract

(나) 방법

① 50 L pilot fermentation

- Pilot scale(50 L, BioCNS Co., Korea)의 발효생산은 생물발효기 용량의 65% 수준의 산업용 발효생산배지(3% galactose, 4% yeast extract, 0.25% K_2HPO_4 , 0.1% NaCl)를 자동멸균(121°C, 25분)하고 전배양액 3%(v/v) 접종하여 수행하였음. 실험실 수준에서 도출한 물리화학적 조건을 동일하게 구현하여 배양에 적용하였음.
- 48시간 동안 30도에서 배양하였으며 교반속도 120 rpm, 통기량 0.8 vvm, 압력 0.2 bar 조건에서 운용하였음.

(3) 결과

- Mesh sparger를 장착하여 50 L scale-up 공정을 수행하였음(그림 26).
- 균체농도는 배양 12시간부터 점진적으로 증가하여 배양 48시간 15.9 g/L를 기록하였음.

- 배양 24시간에 DOT가 급격히 감소하며 surfactin이 생산되기 시작함. 배양 36시간에 839.7 mg/L의 생산량을 확인하였음.
- 5 L 대비 95% surfactin 생산수율을 확보하여 성공적인 scale-up 공정을 수행하였다고 판단되었음.

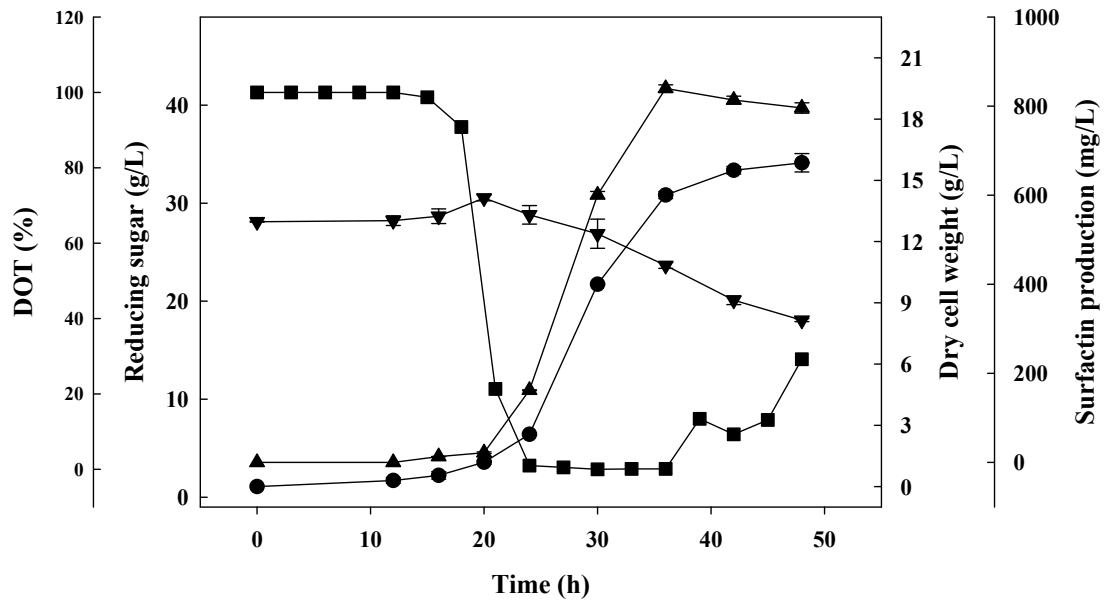


그림 26. Scale-up of surfactin production when a mesh-type sparger is used. Cultivations were carried out in 50-L pilot scale fermenters for 48 h. ▲, surfactin; ●, dry cell weight; ▼, reducing sugar; ■, DOT

○ 연구개발 성과

- 논문성과

No	계제 연도	논문명	저자명	학술지명	호	국내외	SCI여부 (SCI/비SCI)
1	2016	Characterization of biosurfactants as insecticidal metabolites produced by bacillus subtilis Y9	Si young Yang	Entomological research	47,55-59	국내	SCIE
2	2017	Pseudomonas sp. EP-3에 의한 진딧물 살충성 rhamnolipid 생산을 위한 유자씨앗 부산물의 재활용	임다정	Korean journal of environmental agriculture	36, 36-42	국내	비SCI
3	2018	복숭아혹진딧물 방제용 식물추출물 탐색 및 살충성분 구명	양시영	Korean journal of environmental agriculture	37, 125-134	국내	비SCI
4	2017	Development of a biofungicide using a mycoparasitic fungus <i>Simplicillium lamellicola</i> BCP and its control efficacy against gray mold diseases of tomato and ginseng	Teak Soo Shin	The Plant Pathology Journal	33(3)	국내	SCI
5	2017	Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic <i>Bacillus velezensis</i> G341 against various phytopathogenic fungi	Seong Mi Lim	The Plant Pathology Journal	33(5)	국내	SCI
6	2017	Antibacterial activity of pharbitin isolated from the Seeds of <i>Pharbitis nil</i> against various plant pathogenic bacteria	Hoa Thi Nguyen	Journal of Microbiology and Biotechnology	27(10)	국내	SCI
7	2017	Plant-derived antibacterial metabolites suppressing tomato bacterial wilt caused by <i>Ralstonia solanacearum</i>	Thuy Thu Vu	Research in Plant Disease	23(2)	국내	비SCI

8	2017	Synergism of <i>Beauveria bassiana</i> and <i>Phytoseiulus persimilis</i> in control of <i>Tetranychus urticae</i> on bean plants	Mohammad S. Ullah	Systematic and Applied Acarology	22(11): 1924-1935	국외	SCI
9	2017	Laboratory evaluation of the effect of <i>Beauveria bassiana</i> on the predatory mite <i>Phytoseiulus persimilis</i> (Acari: Phytoseiidae)	Mohammad S. Ullah	Journal of Invertebrate Pathology	148: 102 - 109	국외	SCI
10	2018	Extracts of <i>Nicotiana tabacum</i> as a potential control agent of <i>Grapholita molesta</i> (Lepidoptera: Tortricidae)	Souvic Sarker	Plos One		국외	SCIE

- 특허성과

No	특허명	출원국	출원			등록		
			연도	출원인	출원번호	연도	등록인	등록번호
1	바실러스 서브틸리스 Y9 균주 및 이를 이용한 해충 방제용 조성물	대한민국	2016	전남대 산학협력단	10-2016-0141225	2018	전남대 산학협력단	10-1849378
2	흑측 추출물을 유효성분으로 함유하는 식물병 방제용 조성물 및 이의 용도	대한민국	2016	전남대 산학협력단	10-2016-0045992	-	-	-
3	천연 휘발성 화합물을 생산하고, 항균 활성을 가지는 바실러스 속 DR-08 균주 및 이의 용도	대한민국	2016	전남대 산학협력단	10-2016-0095886	2018	전남대 산학협력단	10-1837175
4	흑측으로부터 분리된 파르비틴을 유효성분으로 함유하는 식물병 방제용 조성물 및 이를 이용한 식물병 방제방법	대한민국	2017	전남대 산학협력단	10-2017-0091838	-	-	-
5	천연 휘발성 화합물을 생산하고, 항균 활성을 가지는 바실러스 메틸로트로피쿠스 DR-08 균주 및 이의 용도	대한민국	2017	전남대 산학협력단	10-2017-0094073 10-2016-0095886 특허의 우선권 주장 특허]	-	-	-
6	천연 휘발성 화합물을 생산하고, 항균 활성을 가지는 바실러스 메틸로트로피쿠스 DR-08 균주 및 이의 용도	해외 PCT	2017	전남대 산학협력단	PCT/KR2017/007997	-	-	-

7	신규 미생물 보베리아 바시아나 ARP14 균주 및 이를 이용한 톱다리개미허리노린재와 복숭아순나방 방제용 미생물제제	대한민국	2016	안동대산학 협력단	10-2016-0023361	2017	안동대산학 협력단	10-1804038
8	비행해충 포획용 유인 조성물 및 이를 포함하는 유인평판트랩 제조 방법	대한민국	2017	(주)마이크로 자임	10-2017-0065847	2018	(주)마이크로 자임	10-1820485

○ 연구결과

- 기술적 성과

<복숭아혹진딧물 방제기술 등>

- ① 핵과류에서 발생하는 주요 해충인 진딧물을 방제하기 위해 사용될 수 있는 국내외 최초 미생물제제로서 미생물 살충물질, 천연식물 협력제, 기타 보조제 등으로 제형을 구성하고 있으며 실내 및 포장에서 살충효능이 입증되었음. 또한, 진딧물 외에 다른 해충에 적용할 수 있는 것으로 확인되었음.
- ② 특히, 미생물제제에 함유된 살충물질은 국내외 선행연구에서 식물병에 대한 살균효능과 더불어 식물병에 대한 저항성을 유도하는 능력이 있다고 보고되고 있어 향후 다목적용 미생물제제로서 그 가치가 높을 것으로 사료됨.
- ③ 현재 국내에 상용되고 있는 진딧물 방제용 제제는 대부분 해외에서 수입한 천연식물 추출물을 원료로 하는 제품이라는 점을 고려할 때, 향후 미생물 살충물질의 함량을 산업적으로 증가시키는 노력이 뒷받침될 경우 국내외 제품 및 가격 경쟁력이 높을 것으로 기대됨.
- ④ 현재 선진국에서 개발되어 상용되는 진딧물 방제용 미생물 제제는 곤충병원성 곰팡이제제 이외에 전무한 실정으로 세균을 활용한 미생물제제는 없음.
- ⑤ 곤충병원성 곰팡이 제제의 경우 적절한 온도와 습도를 구비한 시설재배 환경조건에서 적용이 가능하며 핵과류 작물이 재배되는 노지현장에서는 적용이 불가능함.
- ⑥ 본 연구에서 개발한 미생물제제는 살충물질을 생산하는 세균성 미생물을 활용하는 제제로서 시설 및 노지재배 현장에서 적용할 수 있어 제품의 구체적 특성을 고려할 때 경쟁력이 높을 것으로 기대됨.
- ⑦ 본 기술은 국산화하는 있어서 산업적 및 기술적 공정 측면에서 문제가 없음.

<세균성구멍병 방제기술 등>

- ① 세계 최초로 흑축추출물에서 분리한 물질 pharbitin을 식물병원성 세균에 대한 항세균활성 효과를 보고함. 이에 대하여 2건의 특허를 출원하였으며(10-2016-0045992, 10-2017-0091838), 이 중 2016년에 출원한 특허는 등록되었음(10-1837175). 또한 본 연구결과는 2017년 J. Microbiol. Biotechnol.에 출간되었음.
- ② *B. methyilotrophicus* DR-08 균주에서 항진균 및 항세균활성을 갖는 주요 휘발성 물질 3-methylbutanoic acid(35.03%)와 2-methylbutanoic acid(21.98%)을 *Bacillus* 속에서 최초로 보고함.
- ③ *B. methyilotrophicus* DR-08 균주에서 항세균활성 물질 difficidin과 oxydifficidin을 분리하는 최적 기술을 개발함.
- ④ 세계 최초로 *B. methyilotrophicus* DR-08 균주에서 분리한 difficidin과 oxydifficidin을

다양한 식물병원성 세균에 대하여 항세균활성을 조사하였음.

- ⑤ 세계 최초로 *B. methylophilicus* DR-08 균주의 30% suspension concentrate (SC)의 토마토 풋마름병, 고추 세균성점무늬병, 복숭아 세균성구멍병에 대한 *in vivo* 항세균활성 효과를 검정하였음.
- ⑥ DR-08균주에 대하여 국내 출원(10-2017-0094073: 국내우선권 주장) 및 해외 특허 출원(PCT/KR2017/007997)을 실시하였으며, 현재 기업에서 기술이전을 위한 상요화가가능성 검토중에 있음. 또한 두 편의 SCI논문들을 작성하고 있으며, 2018년에 모두 투고할 예정이다.
- ⑦ *Bacillus velezensis* G341의 대량배양 조건 적용과 scale-up 및 제형 최적화를 통해 우수한 형태의 제품 생산 공정을 확보할 수 있었음
- ⑧ 유기농업자재로 등록된 천공탄 SC는 복숭아 세균구멍병 방제를 위해 사용되는 부라마이신 (Streptomycin 20% WP) 대비 우수한 방제효과를 보임 (천공탄: 69.6%, 부라마이신 44.0%)
- ⑨ 단독 처리와 화학농약과의 체계처리에서도 유사한 효과를 확인할 수 있었으며, 농민 선호에 따른 다양한 처리방법을 제시할 수 있었음.
- ⑩ 국내에서 개발된 균주, 대량생산법 및 제형기술을 통해 완제품 개발하여 선진국 기술 대비 비등이상의 기술수준을 확보하였음

<복숭아순나방 방제기술 등>

- ① 세계 최초로 담배추출물의 복숭아순나방에 대한 살충 효과 검정.
- ② 세계 최초로 복숭아순나방 방제용 신규 미생물 보베리아 바시아나 ARP14 균주 개발.
- ③ 대상해충인 복숭아순나방 외 대상해충 범위를 확대, 돌발해충인 갈색날개매미충, 원예시설 주요 해충인 온실가루이 등 적용 대상 범위를 확대하였으며, 생물검정 실험 결과 66.7 - 93.3%의 높은 반응성을 검증함.
- ④ 유인제의 성분분석을 통해 주요 휘발성물질을 분석하였으며, 이 중 대상해충에 후각수용체에 밀접한 영향을 미칠것으로 보이는 3종을 선발하여, 생산의 재현성 기준을 설계함.
- ⑤ 유인제의 주요 원료인 생물자원의 대량배양체계를 구축하여, 주요 원료인 유인제의 대량생산능력을 확보하였음.
- ⑥ 유인제의 보존성 및 안전성을 고려한 제형화와 이를 기반으로 예찰용, 대량포획용 현제품기술 4종을 개발하여, 장소, 시기, 방법을 고려한 사용매뉴얼 제시와 현장적용제품의 실용화에 성공함.
- ⑦ 제4협동의 살충활성 소재인 담뱃잎 추출물의 원료 수급, 단가 경쟁력을 고려한 기피제로써 제조 기술과 적용을 포함한 효과적인 현장 방제 매뉴얼을 제시함.

<미생물 생산(배양)공정 기술 등>

- ① 핵과류 주요 병해충 방제용 길항 미생물의 생산 공정은 국내에서 산업적으로 유일한 액체배양 공정임. 특히, 세균성 구멍병 방제활성 *B. velezensis* G341 배양공정은 기존 2개 미생물의 혼합배양에 기반한 공정보다 간단하고 생산수율이 높은 공정으로, 향후 원인물질의 fine chemical이 확보된다면 더 세심한 공정의 설계가 가능할 것으로 기대됨.
- ② 진딧물 방제활성 *B. subtilis* Y9 균주 배양의 발효인자인 포자생성율은 내생포자 생성 균을 이용한 green chemical 생산에 필요한 발효전략을 세우는데 중요한 지표가 될 것으로 예상됨.

- 경제적성과

(2협동/전남대)

○ 관련 산업 기여도

- *Bacillus* 속 균주를 이용한 미생물 살균제는 *B. subtilis* QST713 균주로 개발된 Serenade 제품이 있으나 이 제품은 식물병원성 진균 방제에 우수한 효과를 보이거나 복숭아 세균성 구멍병 등 세균병에 대한 방제효과는 매우 낮은 실정임.
- 본 연구를 통하여 선발한 *B. methylotrophicus* DR-08 균주의 경우, oxydifficidin과 difficidin을 활성물질로 생산하면서 복숭아 세균성구멍병균 뿐만 아니라 다양한 식물병원 세균에 대하여 매우 높은 효과를 보였음.
- 이에 따라 *B. methylotrophicus* DR-08 균주에 대하여 국내뿐만 아니라 PCT특허도 출원하였음.
- 따라서 본 과제의 타겟 식물병원 복숭아 세균성구멍병을 포함하여 다양한 세균병을 효과적으로 방제하는 글로벌 생물농약 제품이 개발될 가능성이 매우 높다고 판단됨.

(3협동/팜한농)

○ 시장 점유율 및 수입대체효과

- 본 과제의 연구결과를 바탕으로 2016년 천공탄을 출시하였으며, 개발 후 현재까지 8%의 국내 점유율을 달성하였으며, 향후 20%의 국내 점유율을 기대하고 있음

○ 매출액 증대

- 천공탄 제품을 통해 개발후 현재까지 3억원의 매출을 달성하였으며, 향후 3년간 17.4억원의 매출을 달성할 수 있을 것으로 기대하고 있음

○ 관련 산업 기여도

- 세균에 의한 병해에 대해 기존 사용되고 있는 항생제류에 대한 내성이 증가하고 있는 반면 신규 화학 작물보호제의 진입이 미비한 상황에서 항생제류에 대비해 우수한 효과를 갖는 친환경 천연식물보호제를 제품화하였다는 것에 가치가 있음

(5협동/마이크로자임)

○ 개발기술, 제품개발을 통한 생산성 향상

- 주요 원료인 유인제 대량생산화를 통해 1회 생산능력을 900%향상하였으며, 상업용 배지의 적용을 통해 생산단가를 93.4% 저감하여, 최종 제품의 가격경쟁력을 확보하였음.

○ 시장 점유율 및 수입대체효과

- 2017~2018년 갈색날개매미충 긴급방제사업 및 보조사업 내 유인평판트랩으로 예산이 편성된 사례에 대해 100%의 시장 점유율을 보였음.
- 원예시설 평판트랩에 대해 현재 koppert가 40.0%의 지분을 가지고 있으나, 상용제품 대비 우수한 포획효율 및 가격경쟁력을 가지고 있는 제5협동의 유인평판트랩을 대상으로 국내 원예시설 평판(롤)트랩으로 대체하고자 하며 현재 이를 위해 국내 major 기업인 (주)경농과의 거래를 체결하여 수행중에 있음.

○ 매출액 증대

- 2차년도에 함양군 농업기술센터를 시작으로 현재 충남, 전북, 전남권역의 시군을 대상으로 긴급방제 및 보조사업을 실시하고 있으며, 전국적으로 확대되어 가고 있는 상황으로, 2차년도에 약 1억원, 최종년도에 약 2억원으로 사업기간 내 총 3억원의 사업화를 실시하였음.

○ 고용창출

- 유인제를 활용한 부대 제품에 대한 효과적인 사업화를 위해 2차년도에 남성인력을 신규채용하여 유지하고 있음.

○ 관련 산업 기여도

- 현재 대상해충인 복숭아순나방 외, 갈색날개매미충 및 온실가루이에 대한 국내외 유인제의 상용화가 미비한 가운데, 유인제를 활용한 다양한 현장적용기술의 실용화는 친환경 농산물 및 PLS등 강화되는 농약 규제에 따른 휴약기에 대상해충을 효과적으로 방제할 수 있는 친환경 방제기술의 제시했음에 가치가 있음.

○ 총괄과제가 있는 경우 세부과제별 결과를 종합 분석하고 고찰한 결론을 기술

(1세부/효성오앤비)

- 연구목표는 복숭아혹진딧물 방제용 유기농업자재 제품화를 목표로 연구를 수행하였으며, 결과로 미생물배양기술에 대한 기술이전 및 유기농업자재 등록 및 제품화 목표를 달성할 수 있었음.
- 기술이전으로 인하여 *Bacillus subtilis* Y9를 이용한 복숭아혹진딧물뿐만아니라 각종 진딧물, 응애류 제품개발 활용 가능함.
- 과제를 수행함에 있어서 후보 미생물균주로부터 병방제용 제품개발을 위한 미생물 자원 확보함으로 제품개발 활용 가능함.

(1협동/전남대)

- 복숭아혹진딧물에 대해 살충효능을 지닌 세균성 미생물을 분리 및 스크리닝하여 실내조건에서 살충효능이 80% 이상으로 우수한 *B. subtilis* Y9 (Y9)를 선발하였고, Y9가 생산하는 살충물질의 구조를 구명하였으며, Y9 배양액 기반 기초제제를 개발하여 이의 살충효능을 실내 및 포장 조건에서 입증하였음.
- 개발한 기초제제에 중심으로 미생물제제를 산업적으로 생산하기 위해서는 살충물질의 함량을 높일 수 있는 미생물 배양공정에 대한 노력이 향후 필요할 것으로 사료되며 이를 통해 가격 경쟁력을 높일 수 있을 것으로 기대됨.

(2협동/전남대)

- 본 과제를 통하여 선발한 *B. methylotrophicus* DR-08 균주의 경우 다양한 식물병원 세균에 대하여 매우 강한 *in vitro* 항세균활성을 보일 뿐만 아니라, 이 균주의 배양체를 이용하여 제조한 액상수화제 SC30의 경우 복숭아 세균성구멍병 뿐만 아니라 토마토 풋마름병과 고추 세균성점무늬병에도 매우 우수한 방제효과를 보여 기업에 기술이전되어 제품화될 가능성이 매우 높다고 판단됨. 또한 본 균주의 경우 국제 특허권을 보유하고 있으므로 이후 글로벌 제품 개발도 가능할 것이라 판단됨. 또한 당초 계획한 정량적 및 정성적 연구 성과를 충분히 달성하였기 때문에 아주 우수하다고 판단됨.

(3협동/팜한농)

- 복숭아 세균구멍병에 대한 천연식물보호제로서 천공탄 10% SC를 개발하였고, 화학 작물보호제로 사용되고 있는 부라마이신 대비 우수한 효과를 확인하였음
- 또한, 본 과제를 통해 확보된 DR08 균주의 경우 천공탄 10% SC 대비 비등하거나 다소 미흡한 활성을 갖고 있으나, 추가의 배양 최적화를 통해 활성을 증대하는 경우 천공탄 10% SC에 이은 후속제품 개발이 가능할 것으로 사료됨.

(4협동/안동대)

- 복숭아순나방에 대해 살충력이 우수한 후보물질로 담배 추출물과 곤충병원성곰팡이 선발 및 평가되었고 복숭아순나방의 효과적인 친환경 방제제로 사용될 수 있을 것으로 생각됨. 다만, 추후 후속 연구 및 지원을 통한 가격 경쟁력이 있는 제품화가 필요함.

(5협동/마이크로자임)

- 다양한 현장 적용 결과를 기반으로 한 효과적인 현장적용기술 4종과 유인제의 대량생산 기술의 개발을 통한 단가경쟁력의 확보를 거쳐 실용화 측면에서 경쟁력을 확보하였음.
- 비록 대상해충인 복숭아순나방의 현장적용이 미비하여 충분한 검증을 실시하진 못하였으나, 추가적인 해충 적용 탐색을 통해 상업화를 추진함.
- 적합한 절차에 의거하여 유기농업자재를 고시하였고, 유인평판트랩의 경우 타사 제품 대비 54.7 - 442.0%의 포획개선효율을 보이고 있어 실용화 측면에서 전망이 밝음.
- 이를 기반으로 제5협동은 사업화 모델의 다각화를 통해 시장 범위를 전국 확대 하고 있으며, 과제 2차년도부터 실용화단계에 착수하여 원활한 사업화를 추진중임.

(6협동/김치연)

- 세균성 구명병 방제활성 *B. velezensis* G341의 배양은 본 균주의 대사산물 생산에 집중하여 기존 2개 균주의 혼합배양 공정보다 50% 이상의 생산성이 향상되었음. 본 공정이 적용된다면 제품의 생산단가가 낮아질 것으로 기대됨.

○ 사업화성과 및 매출실적

(3협동/팜한농)

- 사업화 성과 : 2016년 천공탄 출시

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	3.0억원
			향후 3년간 매출	17.4억원
		관련제품	개발후 현재까지	-
			향후 3년간 매출	-
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 8% 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : 20% 국외 : %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		- 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		- 위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	당사 대외비로 공개하지 못함			
	소요예산(백만원)	당사 대외비로 공개하지 못함			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		3.0	17.4	-	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	8	20	-
국외		-	-	-	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	당사 대외비로 공개하지 못함			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	-	-	-	
	수 출	-	-	-	

(5협동/마이크로자임)

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	3억원
			향후 3년간 매출	20억원
		관련제품	개발후 현재까지	억원
			향후 3년간 매출	20억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 1.2% 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : 8.4% 국외 : %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : 5% 국외 : %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		1위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		1위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	유인제를 함유한 유인평판트랩 사업기간 내 (3년)			
	소요예산(백만원)	100			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		3	20	30	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	1.2	8.4	12.0
국외					
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	현재 유기농업자재로 등록된 입자형 제제를 로딩하여 효과적으로 포획할 수 있는 포충부가 미비함에 따라 포충부를 개발 대량포획용 포충트랩을 개발하고자 함.			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0.5	10	15	
	수 출		0.3	0.5	

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

(1세부/효성오앤비)

- 복숭아혹진딧물방제용 미생물 유기농업자재 제품화
 - 진딧물방제용 후보균주의 적용성 검토 및 제형개발
 - 시제품생산 및 효능평가
 - 복숭아 혹진딧물 방제용 유기농업자재 등록

(1협동/전남대)

- 세균을 활용한 복숭아 혹진딧물 방제용 유기농업자재 개발
 - *Bacillus* 균주 유래 진딧물 살충활성물질 탐색 및 식물추출물 선별
 - 식물유래 살충물질 탐색 및 혼합제 효능평가
 - 복숭아혹진딧물 방제용 시제품의 약효 특성 구명

(2협동/전남대)

- *Bacillus* 균주를 이용한 세균성구멍병 방제용 유기농업자재 개발
 - 세균성구멍병에 대한 고효성 *Bacillus* 균주 및 천연물 선별
 - 신규로 선별한 *Bacillus* 균주로부터 항세균활성 물질 탐색
 - 세균성구멍병 방제용 유기농업자재 개발

(3협동/팜한농)

- *Bacillus* 균주를 이용한 세균성 구멍병 방제용 유기농업자재 제품화
 - *Bacillus velezensis* G341균주를 이용한 세균성구멍병 등록 자료 생산
 - 복숭아 세균성구멍병 방제용 유기농업자재 등록
 - 세균성구멍병 방제용 신규 유기농업자재 후보물도출 (포장약효 >70%)

(4협동/안동대)

- 천연생리활성 소재를 이용한 복숭아순나방 방제용 유기농업자재 개발
 - 복숭아순나방 방제용 천연생리활성 소재 확보 및 스크리닝
 - 복숭아순나방 방제용 천연생리활성 소재후보균의 온실 내 약효 및 약해검증
 - 복숭아순나방 살충활성 유기농업자재 개발

(5협동/마이크로자임)

- 미생물을 이용한 복숭아순나방 방제용 유기농업자재 제품화
 - *Pichia anomala* 효모를 이용한 복숭아순나방 유인제 개발
 - *Pichia anomala* 효모를 이용한 복숭아순나방 유인제 유기농업자재 등록
 - 복숭아순나방 방제용 살충활성 유기농업자재 후보물 도출

(6협동)

- 핵과류 주요 병해충 방제용 길항 미생물의 산업화 생산 공정 개발
 - 세균성구멍병 방제활성 G341 균주의 대량생산 공정확립
 - 진딧물방제활성 균주의 배양 및 생산 최적화
 - 진딧물 살충활성 균주의 대량생산 공정 확립

3-2. 목표 달성여부

(1세부/효성오앤비)

- *Bacillus subtilis* Y9 균주 확보 및 Y9균주의 작물 적용성 시험을 통하여 검정 완료, 기초 제형별 소재특성 및 평가, 제조하여 기초제형들의 특성 및 효능평가를 하였음. 선발된 기초제제들을 이용하여 각각의 제형별(수화제, 수용제, 액제) 제조하여 살충능을 테스트하여 선발함. 선발된 제제의 사용방법, 제제안정성시험 특성 및 효능평가로 최종제품을 선발함.
- 선발된 최종제품을 이용하여 약효 및 약해시험, 이화학성분석, 병원성미생물시험, 독성시험을 통한 유기농업자재 등록을 할 수 있었음.
- 이를 통해 본 과제의 개발목표를 100% 달성하였음.

(1협동/진남대)

- 세균을 활용한 복숭아혹진딧물 방제용 유기농업자재 개발
 - *Bacillus* 균주 유래 진딧물 살충활성물질 탐색 및 식물추출물 선발내용으로 다양한 접근법을 통한 미생물을 동정하였음. 진딧물 살충물질 3종을 구명함. 구명된 3종의 진딧물 반수치사농도는 50 mg/L 이하로서 살충효과가 우수하였음.
 - 식물유래 살충물질 탐색 및 혼합제 효능평가는 국·내외 자생식물 298종을 대상으로 복숭아혹진딧물에 대한 살충활성을 조사하여 가장 우수한 녹나무 추출물의 유효성분을 탐색하였으며 미생물 유효성분과 식물체 구성성분을 혼합하여 시너지 효과를 보이는 것을 규명하였음. 또한 혼합제의 기초제제를 제조하여 효능평가를 하였음.
 - 복숭아혹진딧물 방제용 시제품의 약효 특성 구명으로 시제품의 적용성 확대 시험을 통해 복숭아혹진딧물 이외에 목화진딧물 및 2종의 응애에 대한 활용가능성을 확인하였으며 균주 Y9 시제품과 시판되는 유기농업자재와 합성농약과의 혼합 사용시 약제의 사용량을 줄일 수 있었음. 이를 통해 본 과제의 개발목표를 100% 달성하였음.

(2협동/진남대)

- *Bacillus* 균주를 이용한 세균성구멍병 방제용 유기농업자재 개발
 - 선행연구를 통하여 선발하였고, 본 과제를 통하여 기업에서 제품화한 G341균주보다 활성이 우수한 *Bacillus methylotrophicus* DR-08 균주를 선발하였음. 기선발한 G341 균주의 경우 외국에 대한 특허권이 없어 국내 판매만 가능한데 비하여 DR-08의 경우 해외 특허출원도 함으로서 해외수출이 가능함. 본 과제를 통하여 선발한 DR-08 균주의 경우 시제품을 이용하여 복숭아 세균성구멍병 뿐만 아니라 다른 세균병에 대하여 시험한 결과, 복숭아 세균성구멍병 뿐만 아니라 고추 세균성점무늬병과 토마토 풋마름병에 대해서도 높은 방제효과를 나타내 글로벌 제품으로서 가능성이 매우 높다고 판단됨. 또한 이 균주가 생산하는 항세균활성 물질을 분리하고 구조를 동정함으로서 이후 최적발효공정 개발 및 QC가 매우 효율적으로 진행될 것이라 판단됨. 해외특허권도 보유한 DR-08 균주를 활용할 경우 다양한 세균성 식물병 방제를 위한 글로벌 제품 개발 가능성이 매우 높다고 판단되어 최종 성과목표를 훌륭히 달성하였다고 판단됨. 이를 통해 본 과제의 개발목표를 100% 달성하였음.

(3협동/팜한농)

- 1차년도 목표 달성을 위해 G341 균주의 제형을 개발하여 1건 (SC제형)을 선발하였으며, 제제 안전성 시험 1건 및 약효 약해 평가시험 각 2건씩을 진행하였음. 시제품에 대한 안전성 평가 시험 (잔류농약 시험 1건, 독성시험 6건)과 대량배양 공정 및 생산 공정 개발을 진행하였음.
- 2차년도 목표 달성을 위해 제품 생산공정을 확정하고, 현장평가를 통해 복숭아 세균구멍병에 대해 60% 이상의 방제가를 확인하였으며, 1개 품목에 대한 목록공시를 완료함 (제품명: 천공탄)
- 신규 후보물 발굴을 위해 DR08 균주에 대한 제형을 선발하고 천공탄 SC와 효능을 비교하였음. DR08 30% SC의 경우 복숭아 세균구멍병에 대해 77.8% 방제가를 보여 천공탄과 유사한 활성을 보였으나, 10% SC의 경우 61.1%의 방제가를 보여 상대적으로 미흡하였음.
- 이를 통해 본 과제의 개발목표를 100% 달성하였음.

(4협동/안동대)

- 천연생리활성 소재를 이용한 복숭아순나방 방제용 유기농업자재 개발
 - 복숭아순나방 살충력이 우수한 후보물질로 담배 추출물과 곤충병원성곰팡이 선발 완료
 - 선발된 식물추출물과 곤충병원성곰팡이를 복숭아순나방에 대한 약효 및 약해 검증 완료
 - 선발된 담배추출물의 실내외 검증 및 경제성 분석 완료
- 이를 통해 본 과제의 개발목표를 100% 달성하였음.

(5협동/마이크로자임)

- 미생물을 이용한 복숭아순나방 방제용 유기농업자재 제품화
 - ① *pichia anomala* 효모를 이용한 복숭아순나방 유인제 개발
 - 미세캡슐, 유인평판(롤)트랩의 제형 및 현장적용기술 4종을 개발 및 매뉴얼 제시
 - 무침가 평판트랩, 페로몬트랩과 비교하여 포획효율을 현장에서 검증함.
 - ② *pichia anomala* 효모를 이용한 복숭아순나방 유인제 유기농업자재 등록
 - 최종 제품은 작물 비접촉형 분석 대상 면제, 병원성 미생물 및 잔류농약분석을 추가로 실시하여 적합하게 수행함.
 - 돌발해충인 갈색날개매미충, 원예시설 주요 해충인 온실가루이에 대한 생물검정실험, 현장 적용실험 진행.
 - ③ 복숭아순나방 방제용 살충활성 유기농업자재 후보물 도출
 - 제형화에 따른 지표물질의 함량과 효능을 GC-MS 분석을 통해 평가하였음.
 - 유인제와 살충활성 제제의 혼용 적용 시 네거티브효과가 발현되어, 살충활성제제의 기피제로써 적용을 실시결과, 과실에 대한 방제가에 대한 상승효과를 거두었음.
- 이를 통해 본 과제의 개발목표를 100% 달성하였음.

(6협동/김치연)

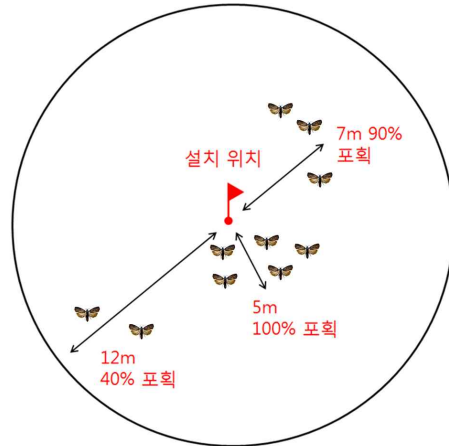
- 세균성 구멍병 방제활성 *B. velezensis* G341 균주의 대량생산 공정 확립
 - ① G341 균주 배양의 물리화학적 조건 확립
 - 산업용 배지최적화: 탄소원, 질소원 및 C/N ratio 설정완료 및 배양온도 설정 완료
 - 생육 및 길항물질 생산 최적 소포제 선발
 - TSB 대비 250%이상 수율 증가
 - ② 항세균 유효성분의 생산 극대화 배양전략 수립

- 교반속도에 따른 산소공급속도 및 항세균 활성 상관관계 분석
- 유효성분 정량분석을 위한 fine chemical 확보 요망
- ③ 실험공장 규모(pilot scale) 스케일 업 공정도 확립
 - 스케일 업 인자 발굴: constant P/V
 - 5 L 생물발효기 대비 93% 생산수율 확보
- 진딧물 살충활성 균주의 대량생산 공정 확립
 - ① 진딧물 방제활성 균주의 물리화학적 조건 확립
 - 산업용 배지최적화: 탄소원, 질소원 및 C/N ratio 설정
 - TSB 대비 580%이상 수율 증가
 - ② 진딧물 살충활성물질 생산 극대화 배양전략 수립
 - 인위적인 pH 조절, 교반속도, 통기량 조절을 통한 surfactin 생산경향 분석
 - 발효인자로서 포자생성을 발굴
 - 산소공급방법에 따른 발효인자 변화 분석
 - ③ 실험공장 규모(pilot scale) 스케일 업 공정도 확립
 - 스케일 업 인자 발굴: constant KLa
 - 5 L 생물발효기 대비 95% 생산수율 확보
- 이를 통해 본 과제의 개발목표를 100% 달성하였음.

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

(5협동/마이크로자임)

- 현장 적용 시 복숭아순나방의 출현 미비
 - 다양한 현장 적용 시험을 실시하였으나, 방제 대상 해충인 복숭아순나방 포장의 발생이 미흡하여 충분한 검증을 실시하지 못하였음.
 - 복숭아순나방은 살충약제 및 농약 등 기존 방제수단이 매우 많아, 다양한 포장에서 기 방제작업을 실시하고 있어, 별도의 포장을 갖고 있지 아니하고선, 높은 발생 밀도를 기대하기 어려운 부분이 있음.
 - 따라서 본 유인제는 과실 및 과주의 유사향의 복합체와 같은 섭식 유인제로써 복숭아순나방 외 다양한 해충이 유인되는 특성을 갖고 있어, 이에 따라 총 해충 및 나방군류의 유인효율을 놓고 복숭아순나방의 유인효율을 간접적으로 제시함.
 - 대상 해충이 현장에 미흡할 시 복숭아순나방에 대한 유인효율을 평가하기 위해서 다음과 같은 실험 방안을 설계함.
 - 공급받은 성충을 대상으로 이격거리별 방생하여, 포획되는 해충의 밀도를 검증, 포획목표치를 설정하고 이격거리에 따라 회수되는 해충의 밀도를 파악하여 유인효율을 검증함.



이격거리별 복숭아순나방 포획비율

○ 복숭아순나방 유인효율 강화

- 생물검정 실험 시 갈색날개매미충의 93.3%의 반응성을 보이는데 반해, 복숭아순나방은 66.6%로 낮은 수준을 보이며, 이는 갈색날개매미충의 기주식물자원을 혼입한 대량생산용 유인제 제조 기술을 통해 갈색날개매미충의 유인효율을 상승 결과로 보임.
- 상대적으로 낮은 유인효율을 보이는 복숭아순나방의 유인 선택성을 강화하기 위해, 복숭아순나방이 호기하는 피식체를 기반으로 추가적인 유인제 생산공정을 확립해야 할 필요성이 있음.

○ 대량포획용 포충트랩의 실용화

- 대량포획용 포충트랩의 장점은 1회 거치 시 유인제의 꾸준한 충진을 통해 반영구적으로 사용할 수 있다는 장점이 있음.
- 그러나, 입자성 유인제를 거치하여 포획할 수 있는 포충부에 대한 연구는 금형등의 부대비용과 시간이 필요함.
- 따라서 유인제를 효과적으로 거치하고 대상해충을 포획할 수 있는 포획 거치부의 개발이 필요하며, 이를 통해 대량포획용 포충트랩의 실용화가 가능할 것임.

4. 연구결과의 활용 계획 등

(1세부/효성오앤비)

- 1협동과 기술이전(*Bacillus subtilis* Y9의 살충물질 surfactin 생산을 위한 배양기술)을 통하여, 추가로 친환경생물농약 제품을 개발할 수 있으며, 핵과류 뿐 만 아니라 다양한 과수 또는 채소류에 발생하는 진딧물, 응애류 등 방제 제품화가 이루어질 수 있도록 수행할 예정이다.

(1협동/전남대)

- Surfactin isomers를 생산하는 *Bacillus subtilis* Y9 균주는 복숭아혹진딧물에 대해 우수한 살충활성을 보여 국내 특허출원 및 등록하였고 이를 활용한 난방제 핵과류 복숭아혹진딧물 방제용 유기농업자재를 개발함으로써 생물농약 분야에서 글로벌 경쟁력 확보하였으며 복숭아혹진딧물 이외에 목화진딧물 및 2종의 응애에 대한 활용가능성을 확인하였음.
- 관행농업에서 화학농약과의 교호 살포를 통하여 관행농가에서도 복숭아혹진딧물에 대한

효율적인 방제가 가능하고, 이에 따라 약제의 사용량을 줄일 수 있어 PLC 대비 활용가치가 있으며 안전한 과일 생산 및 잔류농약 우려 해결될 것으로 사료됨.

- 진딧물과 같이 방제가 어려운 해충을 제어함으로써 친환경농업을 실천하는 농가의 소득증대 및 기술이전을 통한 농산업체의 소득 향상 효과가 기대됨.

(2협동/전남대)

- Oxydifficidin과 difficidin을 생산하면서 다양한 식물병원 세균에 대하여 매우 우수한 활성을 보이는 *B. methylotrophicus* DR-08 균주는 해외 특허권이 확보되었고, 또한 복숭아 세균성구멍병 뿐만 아니라 다양한 세균병에 대하여도 높은 방제효과를 보이므로, 기술이전되어 글로벌 생물농약 제품으로 개발하고자 함.
- Oxydifficidin과 difficidin의 분리를 위한 매우 간단한 방법이 개발되었고, 또한 HPLC분석 방법이 확립되었으므로 DR-08균주의 최적 발효공정 개발 및 QC가 매우 효율적으로 수행될 수 있음.
- DR-08 균주의 full genome sequencing으로 다양한 항세균 및 항진균활성 물질 생합성관련 polyketide synthase와 non-ribosomal peptide synthase 유전자를 파악하여 DR-08 균주의 균주 개량에 대한 연구를 효과적으로 수행할 수 있음.

(3협동/팜한농)

- 본 과제를 통해 개발된 천공탄은 복숭아 세균성구멍병 방제용 유기농업자재로 사업화 완료하였으며 향후 추가 연구를 통해 타 작물 및 기타 병해에 대한 적용확대를 검토하고 있음.

(4협동/안동대)

- 복숭아순나방에 대한 친환경 방제법으로 이용
- 담배추출물의 경제성 분석을 통한 산업화 가속화

(5협동)

- 기술이전을 통한 대량포획용 포충트랩의 개발
 - 제5협동은 다양한 비행해충에 대해 적용성을 가진 “교차형 유인조립체를 갖는 포충트랩”을 농업기술실용화재단을 통해 18년 4월 2일 기술이전을 실시함.
 - 이를 통해 부분적인 금형수정과 Light source를 결합하여, 입자형 유인제를 활용한 대량포획용 포충트랩을 개발하고자 진행중에 있음.

(6협동)

- 산업용 배지를 사용하여 개발한 *B. velezensis* G341의 항세균 활성 물질의 생산공정은 대량기업으로 기술 적용을 추진하여 제품의 생산단가를 낮출 수 있을 것으로 기대됨.
- 진딧물 살충 활성이 있는 *B. subtilis* Y9 균주의 유효 물질인 surfactin 생산성을 극대화시키는 산소공급전략을 수립하였음. 향후 더 큰 규모에서 동일한 스케일 업 인자를 적용한다면 대량생산으로 인한 경제성이 확보될 것으로 기대됨.

붙임. 참고문헌

- Abbasi, P. A., Soltani, N., Cuppels, D. A., and Lazarovits, G, Reduction of bacterial spot disease severity on tomato and pepper plants with foliar applications of ammonium lignosulfonate and potassium phosphate. *Plant Dis.* 86:1232-1236 (2002).
- Abbott, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of economic entomology*, 18, 265-267 (1925).
- Amoabeng BW, Gurr GM, Gitau CW, Nicol HI, Munyakazi L, et al. Tri-trophic insecticidal effects of African plants against cabbage pests. *PloS One.* 8: e78651 (2013) .
- Baskaran V, Narayanasamy P. *Traditional Pest Control.* Caterpillar Publications. Mariyappa Nagar, Tamilnadu, India. p.91 (1995).
- Carrero J. *Luchaintegrada contra las plagasagr?colas y forestales.* Mundi Prensa, Madrid. (1996).
- Cloyd R. Natural instincts: Are natural insecticides safer and better than conventional insecticides *Am. Nurseryman.* ; 200: 41 (2004).
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C and Barka EA, Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol*; 71:4951-4959 (2005).
- Cox PD. Potential for using semiochemicals to protect stored products from insect infestation. *J Stored Prod Res.* 40: 1-25 (2004).
- Du J, Li G, Xu X, Wu J. Development and fecundity performance of oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) reared on shoots and fruits of peach and pear in different seasons. *Environ Entomol.* 44: 1522-1530 (2015).
- Eldefrawi ME, Eldefrawi AT. Nervous-system-based insecticides, pp. 155-207. In E. Hodgson & R. J. Kuhr (Eds.), *Safer Insecticides: Development and Use*, Marcel Dekker, New York. (1990).
- Frikha-Gargouri O, Abdallah DB, Ghorbel I, Charfeddine I, Jlaiel L, Triki MA and Tounsi S, Lipopeptides from a novel *Bacillus methylotrophicus* 39b strain suppress *Agrobacterium* crown gall tumours on tomato plants. *Pest Manag Sci*; 73:568-574 (2017).
- Han KS, Jung JK, Choi KH, Lee SW, Boo KS. Sex pheromone composition and male trapping of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) in Korea. *J Asia-Pac Entomol.* 1: 31-35 (2001).
- Haouas D, Flamini G, Halima-Kamel MB, Hamouda MHB. Feeding perturbation and toxic activity of five *Chrysanthemum* species crude extracts against *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera; Noctuidae). *Crop Protect.* 29:992-997 (2010).
- Hasheminia SM, Sendi JJ, Jahromi KT, Moharramipour S. The effects of *Artemisia annua* L. and *Achillea millefolium* L. crude leaf extracts on the toxicity, development, feeding efficiency and chemical activities of small cabbage *Pieris rapae* L.

- (Lepidoptera: Pieridae). *Pest Biochem Physiol.* 99:244–249 (2010).
- Ikeura, H., Kobayashi, F., & Hayata, Y.. Repellent effects of volatile extracts from herb plants against larvae of *Pieris rapae*, *crucivora* Boisduval. *Journal of Agricultural Science*, 4, 145 (2012).
- Isman MB. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protect.* 19:603–608 (2000).
- Kanga LHB, Pree DJ, van Lier JL, Walker GM. Management of insecticide resistance in Oriental fruit moth (*Grapholita molesta*, Lepidoptera: Tortricidae) populations from Ontario. *Pest Manag Sci.* 59: 921–927 (2003).
- Kawaguchi A, Inoue K, Inoue Y, Biological control of bacterial spot on peach by nonpathogenic *Xanthomonas campestris* strains AZ98101 and AZ98106. *J. Gen. Plant Pathol.* 80: 158–163 (2014).
- Kim, I. S., Ryu, J. Y., Hur, H. G., Gu, M. B., Kim, S. D., & Shim, J. H. *Sphingomonas* sp. strain SB5 degrades carbofuran to a new metabolite by hydrolysis at the furanyl ring. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 2309–2314 (2004).
- Kim, S. K., Kim, S. R., Choi, M. S., Park, C. E., Kim, Y. C., Kim, K. Y., & Kim, I. S. Soybean oil-degrading bacterial cultures as a potential for control of green peach aphids (*Myzus persicae*). *Journal of microbiology and biotechnology*, 17, 1700–1703 (2007).
- Kloepper JW, Kabana RR, Zehnder GW and Murphy JF, Plant root–bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Aust Plant Pathol*; 28:21–26 (1999).
- Kraiss H, Cullen EM. Insect growth regulator effects of azadirachtin and neem oil on survivorship, development and fecundity of *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphididae) and its predator, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Pest Manag Sci.* 64: 660–668 (2008).
- Kubo I. New concept to search for alternate insect control agents from plants. In: Rai and Carpinella, editors. *Naturally Occurring Bioactive Compounds*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier. 61–80 (2006).
- Liu, P., Liu, X. C., Dong, H. W., Liu, Z. L., Du, S. S., & Deng, Z. W. Chemical composition and insecticidal activity of the essential oil of *Illicium pachyphyllum* fruits against two grain storage insects. *Molecules*, 17, 14870–14881 (2012).
- Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer SV, Machado MA, Toth I, Salmond G and Foster GD, Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*; 13: 614–629 (2012).
- Najar-Rodriguez A, Bellutti N, Dorn S. Larval performance of the oriental fruit moth across fruits from primary and secondary hosts. *Physiol. Entomol.* 38: 63–70 (2013).
- Natale D, Mattiacci L, Hern A, Pasqualini E, Dorn S. Response of female *Cydia molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) to plant derived volatiles. *Bull Entomol Res.* 93: 335–342.04 (2003).

- Nguyen HT, Yu NH, Park AR, Park HW, Kim IS and Kim J-C, Antibacterial Activity of Phorbactin, Isolated from the Seeds of *Pharbitis nil*, against Various Plant Pathogenic Bacteria. *J Microbio Biotechnol*; 27: 1763-1772 (2017).
- Oh, K. T., Chung, S. Y., Kang, C. M., & Kubo, M. Cultural Characteristics of a Biosurfactant-Producing Microorganism *Pseudomonas aeruginosa* F722. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, 171-176 (2003).
- Pistelli, L., Noccioli, C., D'Angiolillo, F., & Pistelli, L. Composition of volatile in micropropagated and field grown aromatic plants from Tuscany Islands. *Acta Biochimica Polonica*, 60, 43-50 (2013).
- Pree DJ, Whitty KJ, Van Driel L, Walker GM. Resistance to insecticides in Oriental fruit moth populations (*Grapholita molesta*) from the Niagara peninsula of Ontario. *Can Entomol*. 130: 245-256 (1998).
- Reegan AD, Gandhi MR, Paulraj MG, Ignacimuthu S. Ovicidal and oviposition deterrent activities of medicinal plant extracts against *Aedes aegypti* L. and *Culex quinquefasciatus* Say mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Osong Public Health Res Perspect*. 6: 64-69 (2015).
- Regnault-Roger C, Staff V, Philog?ne B, Terr?n P, Vincent C. *Biopesticidas de origen vegetal*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid (2004).
- Rice RE, Doyle J, Jones RA. Pear as a host of the oriental fruit moth in California. *J Econ Entomol*. 65: 1212-1213.03 (1972).
- Rosenberg MS, Garrett KA, Su Z, Bowden RL, Meta-analysis in plant pathology: synthesizing research results. *Phytopathology* 94:1013-1017 (2004).
- Rothschild GHL, Vickers RA. Biology, ecology and control of the oriental fruit moth, pp. 389-412. In L. P. S. van der Geest, and H. H. Evenhuis (eds.), *Tortricid pests: Their biology, natural enemies and control*. Elsevier Publishers, New York, NY. 1991.
- Senatore, F., Napolitano, F., Apostolides Arnold, N., Bruno, M., & Herz, W. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea falcata* L.(Asteraceae). *Flavour and fragrance journal*, 20, 291-294 (2005)..
- Smyth, T. J. P., Perfumo, A., McClean, S., Marchant, R., & Banat, I. M. Isolation and analysis of lipopeptides and high molecular weight biosurfactants. In *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology* (pp.3687-3704). Springer Berlin Heidelberg. (2010).
- Socquet-Juglard D, Patocchi A, Pothier JF, Christen D, Duffy B, Evaluation of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* inoculation techniques to screen for bacterial spot resistance in peach and apricot. *J. Plant Pathol*. 94: S1.91-S1.96 (2012).
- Sun YP, Johnson ER. Analysis of joint action of insecticides against house flies. *J Econ Entomol*. 53: 887-892 (1960).
- Tambwekar KR, Kakariya RB, Garg S. A validated high performance liquid chromatographic method for analysis of nicotine in pure form and from formulations. *J Pharm Biomed Anal*. 32: 441-450 (2003).
- Valds RA, Castillo FDH, Cabello JCA, Fuentes YMO, Morales GG, Cant DJ and Aguilar

- CN, Review of antibacterial activity of plant extracts and growth-promoting microorganism (GPM) against phytopathogenic bacterial tomato crop. *European Journal of Biotechnology and Genetic Engineering*; 4:11-36 (2017).
- Vandenborre G, Groten K, Smaghe G, Lannool N, Baldwin IT, Damme EJMV. *Nicotiana tabacum* agglutinin is active against lepidopteran pest insects. *J Exp Biol.* 61:1003-1014 (2010).
- Wilson KE, J. E. Flor, R. E. Schwartz, H. Joshua, Smith JL, Pelak BA, Liesch JM and Hensens OD, Difficidin and oxydifficidin: novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. II. Isolation and physico-chemical characterization. *J Antibiot (Tokyo)*; 40:1682-1691 (1987).
- Wu, L.M. Wu, H.J. Chen, L. Yu, X.F. Borriss, R. Gao, X.W, Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens, *Sci. Rep.-U*, 5:12975 (2015).
- Yang CY, Han KS, Boo KS. Occurrence of and damage by the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) in pear orchards. *Kor J Appl Entomol.* 40: 117-123 (2001).
- Zhang ZX, Cheng MD, Hu H, Xu HH. It is unreasonable to use co-toxicity coefficient to evaluate the synergism of pesticides. *Plant Prot.* 34: 34-36 (2008).
- Zimmerman SB, Schwartz CD, Monaghan RL, Pelak BA, Weissberger B, Gilfillan EC, Mochales S, Hernandez S, Currie SA, Tejera E and Stapley EO, Difficidin and Oxydifficidin: Novel Broad Spectrum Antibacterial Actibiotics Produced by *Bacillus subtilis*.. *The journal of antibiotics*; 40:1677-1681 (1986).

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 핵과류 병해충 관리용 유기농업자재 개발 및 실용화				
	(영문) Development and commercialization of organic agricultural materials for the management of pests occurring on pome fruits				
주관연구기관	효성오앤비(주)		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 효성오앤비(주)	
참 여 기 업	전남대학교, (주)팜한농, 안동대학교, (주)마이크로자임, 세계김치연구소		총 연 구 기 간	2015. 08. ~ 2018. 08.(3년)	
총연구개발비 (1,620,000 천원)	계	1,620,000,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	41
	정부출연 연구개발비	1,200,000,000		내부인원	41
	기업부담금	420,000,000		외부인원	-
	연구기관부담금				
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>▶ 핵과류에 발생하는 세균성구멍병, 진딧물 및 복숭아순나방을 효과적으로 방제하는 유기농업자재를 개발하고 실용화 하고자 하여, 본 과제를 수행하였으며 이에 따라 아래와 같이 유기농업자재 등록 및 성과과 발생하여 등록함.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 유기농업자재 등록 : 유기농업자재 2건 중 3건이 발생하여 달성율 150% 초과달성. - 기술이전 : <i>Bacillus subtilis</i> Y9의 살충물질 surfactin 생산을 위한 배양기술 1건 발생(100%) - 특허출원 : 특허출원 5건 중 12건(출원 8건, 등록 4건)이 발생하여 240%달성하였음. - SCI논문 5건 중 7건(140%), 비SCI논문 3건 중 3건 성과(100%) - 국내외 학술발표 25건, 우수 학술대회 발표 수상 2건, 균주기탁 3건 <p>○ 연구내용 및 결과</p> <p>- 미생물을 이용한 세균성구멍병, 진딧물, 복숭아순나방 방제기술개발로 생물검정을 통하여 미생물 후보균주 및 식물추출물을 선발하여 활성물질 분리 및 동정을 통한 기초제제를 개발하여 유기농업자재 개발 및 실용화하고자 함. 이에 선발된 미생물 균주(바실러스 균주)는 세균성 구멍병 방제 활성 <i>B. velezensis</i> G341, 진딧물 살충활성 <i>B. subtilis</i> Y9 균주 유래 surfactin 대량생산 공정 개발을 통하여, 각각의 균주들의 형태적, 생리적, 계통적 특성을 분석하고, 식물유래 살충물질 탐색과 효능평가 등을 실시하였음. 또한, 미생물 보베리아 바시아나 ARP14균주를 이용하여 톱다리개미허리노린재 및 복숭아순나방 방제효과 규명하였으며, 효모균주인 <i>pichia anolama</i> 균주를 통한 복숭아순나방의 유인제 활성증진, 보전성 및 안전성 등 핵심기술을 개발하여 시제품 제작 및 특성과 효능을 평가하여 최종 제품 3개를 유기농업자재로 등록함.</p> <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> - 난방제 핵과류 세균성구멍병, 진딧물 및 복숭아순나방 방제용 유기농업자재 상품화 - 다양한 소재를 활용한 지속적인 유기농업자재 개발 및 상품의 다양화 - 고품질 친환경 핵과류 농산물생산 및 농민소득제고 - 연구성과 PCT 출원 [천연 휘발성 화합물을 생산하고, 항균 활성을 가지는 바실러스 속 DR-08 균주 및 이의 용도]을 통해 DR-08 균주를 기업에 이전하여 세균성구멍병 뿐만 아니라 다양한 세균병을 효과적으로 방제할 수 있는 글로벌 제품 개발을 개발하고자 함 - 고효효 유기농업자재 개발을 위한 발효공정기술 및 제형기술 축적 					

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	315007-3		
사업구분	첨단생산기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	첨단생산기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	핵과류병해충 관리용 유기농업자재 개발 및 실용화			과제유형	(개발)
연구기관	2015. 08. 14. ~ 2018. 08. 13. (3년)			연구책임자	조성현
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2015.08~2016.08	400,000	140,000	540,000
	2차연도	2016.08~2017.08	400,000	140,000	540,000
	3차연도	2017.08~2018.08	400,000	140,000	540,000
	4차연도				
	5차연도				
	계		1,200,000	420,000	1,620,000
참여기업	전남대학교, 팜한농(주), 안동대학교, (주)마이크로자임, 세계김치연구소				
상대국	상대국연구기관				

* 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2018. 07. 17.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
효성오앤비(주)	연구소장	조성현

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.

확약	
----	---

I. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 아주우수

(1세부/효성오앤비)

- *Bacillus subtilis* Y9 균주의 작물검정 시험을 통하여 효능평가 완료, 제형소재특성 및 평가를 통한 기초제형들의 특성 및 효능평가.
- 각 제형별 제조 및 사용방법, 제제안정성시험 특성 및 효능평가.
- 실내 및 포장에서의 약효 및 약해시험, 이화학성분석, 독성시험을 통한 유기농업자재 등록.

(1협동/전남대)

- 핵과류 작물에 발생하는 진딧물을 방제하는 미생물제제를 개발하는 것으로서 진딧물 살충성 미생물 분리, 살충성 대사물질 구명, 미생물 기반 기초제제 개발 및 살충효능 검증 등을 주요 내용으로 하고 있음.
- 본 연구를 통해 학술논문 게재, 특허 출원 및 등록, 산업체 기술이전을 달성하였으며 산업체에서는 연구결과를 기반으로 유기농자재를 등록하였음.

(2협동/전남대)

- 신규로 분리, 동정한 높은 항세균 활성을 갖는 *Bacillus* 균주 DR-08의 연구개발결과를 토대로 1건의 특허 출원[10-2017-0094073]과 1건의 PCT를 출원하였음[PCT/KR2017/007997].
- 높은 항세균 활성을 갖는 식물추출물 스크리닝을 통해 선별한 흑측 추출물과 이로부터 항세균 활성 물질 파르비틴 분리 및 동정 결과, 2건의 특허를 출원[10-2016-0045992, 10-2017-0091838], 1건의 특허를 등록하였음[10-1837175].

(3협동/팜한농)

- *Bacillus velezensis* G341 균주를 이용한 세균성구멍병 유기농업자재 개발 및 실용화.
 - *Bacillus velezensis* G341 균주 대량 배양 및 대량 생산 공정 확립
 - *Bacillus velezensis* G341 균주 최적 제형 개발(액상수화제, SC)
 - *Bacillus velezensis* G341 균주를 이용한 제품의 약효 검증(방제가 60% 이상)
 - 유기농업자재 등록(제품명: 천공탄, 2016년)

(4협동/안동대)

- 복숭아순나방 살충력이 우수한 후보물질 선별 및 평가를 하였으며, 선별된 담배추출물은 복숭아순나방의 살충력과 산란 기피성이 우수한 것으로 밝혀짐. 또한 곤충병원성곰팡이도 개발하였으며 복숭아순나방에 대해 살충력이 우수한 것으로 밝히고 특허등록 완료함.

(5협동/마이크로자임)

- 기 페로몬 대비 대량생산에 용의하고 친환경 생물자원에 대한 유인제 대량생산기술과 이를 활용한 현장적용기술은 저비용 고효율의 포획기술로서 활용할 수 있을 것임.

(6협동/김치연)

- 기 선별된 성과 균주 유래 대사산물의 고농도 발효방법이 개발되었음. G341 균주는 대조구인 화학농약 대비 250% 활성이 증가하였으며, Y9 균주는 대조구 TSB 대비 583% 수율이 증가하여 산업적 경쟁력을 극대화시킴.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수, 아주우수

(1세부/효성오앤비)

- 미생물을 이용하여 복숭아혹진딧물의 친환경적인 방제를 위한 유기농업자재 개발을 위한 생물학적 방제기술로 친환경농자재 생산 기술의 적용확대가 기대됨.
- 후보 미생물균주로부터 병 방제용 제품개발을 위한 미생물 자원으로 활용이 가능함.

(1협동/전남대)

- 현재 국내에 사용되고 있는 진딧물방제용 유기농자재는 해외수입 3~4가지 식물추출물로 구성되어 있으며 이들 자재는 오랫동안 사용됨에 따라 저항성유발 우려가 있고 가격이 높아 농가에 부담이 되고 있음. 따라서 다양한 유효성분으로 구성된 품목을 개발하는 연구가 필요한 실정임.
- 본 연구에서 도출된 결과는 기존 해충방제용 자재와 더불어 친환경농업에서 효과적으로 활용될 수 있을 것이며 농산업적 파급성이 클 것으로 기대됨.

(2협동/전남대)

- *Bacillus* 속 균주를 이용한 미생물 살균제는 *B. subtilis* QST713 균주로 개발된 Serenade 제품이 있으나 이 제품은 식물병원성 진균 방제에 우수한 효과를 보이거나 복숭아 세균성구멍병 방제에 대한 약효는 농가에서 낮음. 따라서, 본 연구개발결과 핵과류 세균성구멍병에 매우 높은 방제효과를 확인한 *B. methylotrophicus* DR-08 균주를 활용하여 유기농업자재를 개발할 경우, 국내 뿐 아니라 글로벌 제품으로 수출될 파급효과가 아주우수하다고 판단됨.

(3협동/팜한농)

- 연구개발 결과로 16년 출시한 핵과류 세균성구멍병 방제 제품(제품명: 천공탄)의 성공적인 런칭으로 매년 매출 달성(현재까지 매출액: 약 3억).

(4협동/안동대)

- 구 결과물로 국외학술지에 3건의 논문게재를 하였으며, 국내외 학술대회에 7건을 발표하였고 그 중 1건에 대해서는 발표 우수상을 수상하여 연구결과의 파급효과가 큼.

(5협동/마이크로자임)

- 복숭아순나방, 갈색날개매미충, 온실가루이등 주요 해충에 대한 친환경 방제기술의 제공은 휴약기의 방제기술의 제공과 친환경 포장에 대한 효과적인 방제기술로써 국내 농업 시장의 경쟁력 강화에 이바지 할 수 있을 것임.

(6협동/김치연)

- 식물병원성 진균에 효과적인 생물농약은 기존에 공급되고 있으나 세균성 구멍병 방제에 대한 효과는 낮음. 본 연구개발결과로 세균성 구멍병 병원균에 대한 항세균 활성이 증가된 공정 전략을 수립하였으므로, 관련 제품이 개발될 경우 뛰어난 약효로 인한 파급효과가 클 것으로 예상됨.
- 진딧물 살충활성을 가진 Y9 균주의 surfactin 고농도 발효생산 공정이 개발되었으며, *Bacillus* 속이 식물의 유도저항성을 증진시키는 사례가 많으므로 제품 개발 시 시너지 효과가 클 것으로 예상됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수, 아주우수

<p>(1세부/효성오앤비)</p> <ul style="list-style-type: none">○ 본 과제를 통하여 핵과류 복숭아혹진딧물 유기농업자재 개발하여 등록하였으며, 1협동과 기술이전 (<i>Bacillus subtilis</i> Y9의 살충물질 surfactin 생산을 위한 배양기술)을 통하여, 추가로 친환경생물농약 제품을 개발할 수 있으며, 핵과류 뿐만 아니라 다양한 과수 또는 채소류에 발생하는 진딧물, 응애류 등 방제 제품화가 이루어질 수 있을 것으로 봄. <p>(1협동/전남대)</p> <ul style="list-style-type: none">○ 본 연구에서 개발된 기술은 surfactin을 생산하는 미생물을 기반으로 하는 진딧물방제용 제제로서 surfactin은 국내외 연구결과를 통해 식물병에 대한 살균효능과 작물에 병저항성을 유도하는 능력이 있다고 보고되고 있음. 따라서 본 연구결과는 향후 진딧물방제용 제제로서 뿐만 아니라 작물에 발생하는 식물병 방제와 병저항성을 유도하는 제제로서 활용될 수 있을 것으로 기대됨. <p>(2협동/전남대)</p> <ul style="list-style-type: none">○ <i>B. methylotrophicus</i> DR-08 균주의 우수한 항세균활성 연구개발결과와 DR-08 균주에서 분리, 동정한 항세균활성 물질 oxydifficidin과 difficidin 결과는 DR-08 균주를 친환경생물농약에 관심이 있는 기업체에 기술이전 할 수 있음. 국제특허권도 보유하고 있으므로 DR-08 균주를 활용하여 다양한 세균병을 방제할 수 있는 글로벌 제품을 개발할 수 있음. <p>(3협동/팜한농)</p> <ul style="list-style-type: none">○ <i>Bacillus velezensis</i> G341 균주를 이용하여 핵과류 세균성구멍병 유기농업자재 개발하여 실용화하였음. 또한 미생물 단독 제품으로 친환경 농업뿐만 아니라 기존 관행 농가 및 화학농약인 마이신류 저항성 농가에도 제품을 적용하여 유기농업자재의 실용화를 극대화하였음. <p>(4협동/안동대)</p> <ul style="list-style-type: none">○ 복숭아순나방 살충력이 우수한 후보물질 담배추출물을 선별하고 그 효과 검증 및 경제성 분석을 완료하여 산업화를 위한 기반을 구축했지만, 실제 농가에서 활용하기 위해서는 제재화 및 제품화가 이루어져야 함. <p>(5협동/마이크로자임)</p> <ul style="list-style-type: none">○ 장소, 시기, 방법을 고려한 예찰, 포획, 대량포획용 다양한 현장적용기술의 제공은 다양한 피해대상의 상황에 맞게 적용할 수 있는 선택권을 제시하고 있음.○ 포획대상 해충의 유인제 기술이 전무한 가운데, 현장 및 국내 전문가들로부터 검증이 완료된 유인제 제품군류는 성공적인 실용화 단계에 도입되었음. <p>(6협동/김치연)</p> <ul style="list-style-type: none">○ 산업용 배지를 사용하여 개발한 <i>B. velezensis</i> G341의 항세균 활성 물질의 생산 공정은 대상기업으로 기술 적용을 추진하여 제품의 생산단가를 낮출 수 있을 것으로 기대됨.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 아주우수

<ul style="list-style-type: none">○ 연구개발계획서에 계획된 연구내용을 모두 성실히 수행하였으며, 연구성과 또한 목표대비 추가 달성하여 모두 충실히 수행하였다고 판단됨.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 아주우수

○ 본 과제 of 정량적 목표로서, 유기농업자재 2건, 기술이전 1건, 특허출원 5건, SCI논문 5건, 비SCI논문 3건으로 계획되었음.
○ 연구 수행 결과물로는 유기농업자재 등록 3건, 기술이전 1건, 특허출원 8건 및 등록 4건, SCI논문 7건, 비SCI논문 3건, 국내외 학술발표 25건, 인력양성 9명, 우수발표상 2건으로 연구개발 성과가 우수함. 또한 현재 SCI급 논문 3건이 심사중에 있어 과제 종료 후 실적달성이 예상됨.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
(1세부/효성오앤비) 복숭아혹진딧물방제용 미생물 유기농업자재 제품화	30	100	- <i>Bacillus subtilis</i> Y9균주 확보 및 작물적 용성검토 및 제형별 특성 규명 - 후보균주의 적용성검토 및 균주확보
1. 진딧물방제용 후보균주의 적용성 검토 및 제형개발	35	100	- 시제품 및 최종제품 생산합과 각 제형별 효과를 평가하여, 사용방법 및 안정성 조사.
2. 시제품생산 및 효능평가	35	100	- 최종제품의 약효 및 약해, 이화학적, 병원성, 독성시험 등을 통한 유기농업자재등록
3. 복숭아혹진딧물 방제용 유기농업자재 등록			- 최종제품 균주 제조공정 확립
(1협동/전남대) 세균을 활용한 복숭아혹진딧물 방제용 유기농업자재 개발	35	100	- 다양한 접근법을 통한 미생물 동정 및 진딧물 살충물질 3종을 구명 및 진딧물 살충효과가 우수함.
1. <i>Bacillus</i> 균주 유래 진딧물 살충활성물질 탐색	35	100	- 국·내외 자생식물 298종을 대상으로 복숭아혹진딧물에 대한 살충활성 조사, 녹나무추출물 유효성분 탐색과 미생물 유효성분과 혼합, 시너지 효과 규명
2. 식물유래 살충물질 탐색 및 혼합제 효능평가	30	100	- 시제품 적용성 확대 시험 수행하여 복숭아혹진딧물 이외에 목화진딧물 및 2종의 응애에 대한 활용가능성 확인.
3. 복숭아혹진딧물 방제용 시제품의 약효 특성 규명			- 균주 Y9 시제품과 시판되는 유기농업자재와 합성농약과의 혼합 사용시 약제의 사용량 절감.
(2협동/전남대) <i>Bacillus</i> 균주를 이용한 세균성구멍병 방제용 유기농업자재 개발	35	100	- 항세균활성 우수한 균주 JCK-2002 및 식물추출물 추출 선발하여 항세균활성 검정 - UV 를 통한 돌연변이 균주 개량방법 구축 및 균주 확보
1. 세균성구멍병에 대한 고효성 <i>bacillus</i> 균주 및 천연물선발	30	100	- 토양에서 분리한 균주 중 항세균활성이 가장 우수한 DR-08 균주 선발, 기선발한 JCK2002 균주와 비교할 때 DR-08균주가 우수하여, 항진균 및 항세균물질 분석 및 동정
2. 신규로 선발한 <i>bacillus</i> 균주로부터 항세균활성물질 탐색			- 야생형 G341 균주와 G341 개량균주 GM1~GM6, 신규 선발된 DR-08 균주들에 대하여 활성을 비교한 결과, DR-08 균주가 가장 활성이 우수한 것으로 나타났음.
3. 세균성구멍병 방제용 유기농업자재 개발			

	35	100	- 제형별 DR-08 30% SC30 제제가 복숭아 세균성구멍병 88% 방제, 고추 세균성점무늬병 65%, 토마토 꽃마름병 90% 방제가 조사됨
(3협동/팜한농) <i>Bacillus</i> 균주를 이용한 세균성 구멍병 방제용 유기농업자재 제품화	40	100	- <i>Bacillus velezensis</i> G341 균주를 이용한 배양 최적화, 제형 최적화, 생산 공정 수립 및 독성검사 등 수행 및 등록자료 구축.
1. <i>Bacillus velezensis</i> G341 균주를 이용한 세균성구멍병 등록 자료 생산	40	100	- 복숭아 세균성구멍병 방제용 유기농업자재를 등록 완료(제품명: 천공탄, 포장약효: >70%)
2. 복숭아 세균성구멍병 방제용 유기농업자재 등록(포장약효: >60%)			
3. 세균성구멍병 방제용 신규 유기농업자재 후보물 도출 (포장약효: >70%)	20	100	- 전남대에서 신규 분리한 균주(DR08)와 기존 천공탄의 세균성구멍병검증(포장약효: >70%)
(4협동/안동대) 천연생리활성 소재를 이용한 복숭아순나방 방제용 유기농업자재 개발	35	100	- 복숭아순나방 살충력이 우수한 후보물질로 담배 추출물과 곤충병원성곰팡이 선발
1. 복숭아순나방 방제용 천연생리활성 소재 확보 및 스크리닝	35	100	- 선발된 식물추출물과 곤충병원성곰팡이를 복숭아순나방에 대한 약효 및 약해 검증 완료
2. 복숭아순나방 방제용 천연생리활성 소재후보균의 온실정			
3. 복숭아순나방에 살충활성 유기농업자재 개발	30	100	- 후보균의 포장 약효시험 및 산업성 평가를 하였으며, 선발된 담배추출물의 실내외 검증 및 경제성 분석 완료
(5협동/마이크로자임) 미생물을 이용한 복숭아순나방 방제용 유기농업자재 제품화	25	100	- 미세캡슐, 유인평판(몰)트랩의 제형 및 현장적용기술 4종을 개발 및 매뉴얼 제시 - 무침가 평판트랩, 페로몬트랩과 비교하여 포획효율을 현장에서 검증함.
1. <i>pichia anomala</i> 효모를 이용한 복숭아순나방 유인제 개발	60	100	- 최종 제품은 작물 비접촉형 분석 대상 면제, 병원성 미생물 및 잔류농약분석을 추가로 실시하여 적합하게 수행함. - 돌발해충인 갈색날개매미충, 원예시설 주요 해충인 온실가루이에 대한 생물검정실험, 현장적용실험 진행.
2. <i>pichia anomala</i> 효모를 이용한 복숭아순나방 유인제 유기농업자재 등록			
3. 복숭아순나방 방제용 살충활성 유기농업자재 후보물 도출	15	100	- 제형화에 따른 지표물질의 함량과 효능을 GC-MS 분석을 통해 평가하였음. - 유인제와 살충활성 제제의 혼용 적용 시 네거티브효과가 발생되어, 살충활성제제의 기피제로써 적용을 실시결과, 과실에 대한 방제가에 대한 상승효과를 거두었음.
(6협동/김치연) 핵과류 병해충 방제용 길항 미생물의 산업화 생산공정 개발]	40	100	- G341 및 Y9 균주 배양의 물리화학적 조건을 확립하여 생산성을 극대화하였음
1. 시험균주 배양 물리화학적 조건 확립	30	100	- 5 L 생물발효기 수준에서 선발균주의 고농도 발효법 확립 및 스케일 업 인자를 도출하였음
2. 선발균주의 고농도 배양방법 확립			
3. 선발균주의 실험공장규모 수준 대량 배양생산공정 개발	30	100	- 스케일 업 인자를 적용하여 실험공장 수준에서 5 L 대비 90% 이상 수율을 달성하였음
합계	100점		

Ⅲ. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

(1세부/효성오앤비)

- 본과제의 연구목표는 복숭아혹진딧물 방제용 유기농업자재 제품화를 목표로 연구를 수행하였으며, 결과로 미생물배양기술에 대한 기술이전으로 유기농업자재 등록 및 제품화 목표를 달성할 수 있었음.
- 또한, 기술이전으로 인하여 *Bacillus subtilis* Y9를 이용한 복숭아혹진딧물 뿐아니라 각종 진딧물, 응애류 제품개발 활용 가능함.
- 과제를 수행함에 있어서 후보 미생물균주로부터 병 방제용 제품개발을 위한 미생물 자원 확보함으로써 제품개발 활용 가능함.

(1협동/전남대)

- 본 연구는 핵과류 작물에 발생하는 진딧물을 방제하는 미생물제제를 개발하는 것으로서, 연구목표로 설정한 진딧물 살충성 미생물 분리, 살충성 대사물질 구명, 미생물 기반 기초제제 개발 및 살충효능 검증 등을 달성하였으며, 이는 surfactin을 활용한 진딧물 방제제로서 국내외 최초의 성과로서 그 우수성이 인정됨.
- 아울러 surfactin 함유 미생물제제는 식물병 방제 및 식물병 저항성 유도 제제로서 활용될 수 있을 것으로 기대되어 그 가치가 높다고 사료됨. 또한, 달성된 연구결과를 기반으로 학술논문 게재, 특허출원 및 등록, 산업체 기술이전 등의 성과를 도출하였으므로 연구수행의 성실도 높고 관련 연구결과를 기반으로 산업체에서 유기농자재를 등록하였으므로 친환경농업에 파급효과가 높을 것으로 기대됨.

(2협동/전남대)

- 본 과제를 통하여 선발한 *B. methylotrophicus* DR-08 균주의 경우 다양한 식물병원 세균에 대하여 매우 강한 *in vitro* 항세균활성을 보일 뿐만 아니라, 이 균주의 배양체를 이용하여 제조한 액상수화제 SC30의 경우 복숭아 세균성구멍병 뿐만 아니라 토마토 꽃마름병과 고추 세균성점무늬병에도 매우 우수한 방제효과를 보여 기업에 기술이전되어 제품화될 가능성이 매우 높다고 판단됨. 또한 본 균주의 경우 국제 특허권을 보유하고 있으므로 이후 글로벌 제품 개발도 가능할 것이라 판단됨. 또한 당초 계획한 정량적 및 정성적 연구성과를 충분히 달성하였기 때문에 아주 우수하다고 판단됨.

(3협동/팜한농)

- 연구개발 목표인 *Bacillus velezensis* G341 균주를 이용한 세균성구멍병 유기농업자재 개발 및 실용화를 성공적으로 수행하였음(제품명: 천공탄).
- 특히 본 연구는 친환경 농업뿐만 아니라 기존 관행 농가 및 화학농약인 마이신류 저항성 농가에도 제품을 적용하여 유기농업자재의 실용화를 극대화하였음.

(4협동/안동대)

- 복숭아순나방의 친환경적 방제를 위한 우수한 생리활성 소재 2건을 개발하였음.

(5협동/마이크로자임)

- 복숭아순나방 방제를 위한 선행균주인 *P. anomala* MZ-02를 이용한 유기농업자재 개발 및 실용화를 성공적으로 수행하였음(제품명 : 이끌립)
- 특히 추가적으로 돌발해충인 갈색날개매미충, 원예시설 온실가루이등 적용 대상을 확대하여 실용화 단계에 도달하였음.
- 또한 제 4협동의 살충활성소재의 기피제로써 적용을 통한 유기농업자재 후보균을 도출하였음.

(6협동/김치연)

- 핵과류 병해충 길항미생물인 G341 및 Y9 균주 유래 유효물질의 고농도 발효 생산법 및 산업적 생산 공정을 구축하였음

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

(1세부/효성오앤비)

- 본 과제 목적은 선발된 미생물 *Bacillus subtilis* Y9 균주를 이용하여 복숭아혹진딧물방제용 유기농업자재를 개발하고 제품화하는 것이 최종목표로, *Bacillus subtilis* Y9의 대량배양공정확립, 최종제형최적화, 생산공정 수립, 최종제품 독성시험, 약효 및 약해시험 등 수행하였으며, 최종목표인 유기농업자재등록(제품명:진자마)을 완료함.

(1협동/전남대)

- 본 연구는 핵과류 작물에 발생하는 진딧물을 방제하는 미생물제제를 개발하는 것으로서 진딧물 살충성 미생물 분리, 살충성 대사물질 구명, 미생물 기반 기초제제 개발 및 살충효능 검증 등을 연구목표로 하고 있으며 설정한 연구목표를 모두 성공적으로 달성하였음. 이러한 연구결과는 미생물이 생산하는 surfactin을 활용하여 개발된 진딧물 방제제로서 국내외 최초의 성과임.
- 본 연구를 통해 도출된 결과를 학술대회에서 발표하였으며 학술논문과, 특허 출원 및 등록, 그리고 기술이전 등의 성과를 달성하였음. 기존에 설정된 연구목표 중 특허출원이 2건이었으나 연구결과를 통해 달성된 성과는 특허출원 1건과 특허등록 1건을 달성하였음. 지적재산권은 특허출원보다 특허등록에 그 가치성이 높다고 사료되오니 연구결과의 성과 측면에서 가치를 고려하여 평가해주시기를 바랍.

(2협동/전남대)

- 흑측 추출물과 이 추출물에서 분리한 항세균활성 물질 pharbitin의 식물병원성 세균에 대한 항세균활성은 본 연구를 통해 처음 보고됨.
- *Bacillus* 균주에서 휘발성물질이 항세균활성을 갖는 것은 보고된 바 있지만, 본 연구를 통해서 *B. methylotrophicus* DR-08 균주가 *Bacillus* 균주에 보고된 바 없는 휘발성물질을 생산함을 발견.
- *B. methylotrophicus* DR-08 균주의 배양액과 제제를 복숭아 세균성구멍병 뿐만 아니라 다른 세균병, 즉 토마토 풋마름병, 고추 세균성점무늬병에 대해서도 *in vivo* 를 수행하여 효과를 확인함.
- Oxydifficidin과 difficidin 분리 과정이 매우 복잡하여, 본 과제에서 매우 간단한 과정을 통하여 분리할 수 있는 방법을 개발.
- Oxydifficidin과 difficidin은 인간병원성 세균에 대한 항세균활성은 보고되었지만, 두 물질 모두 다양한 식물병원성 세균에 대한 *in vitro* 활성은 처음으로 조사한 것임.

(3협동/팜한농)

- 본 과제의 가장 큰 목적은 기존 선별된 *Bacillus velezensis* G341 균주를 이용하여 세균성구멍병 유기농업자재를 개발하고 실용화하는 것으로써 배양최적화, 제형최적화, 생산공정 수립, 안전성평가 등 성공적으로 연구를 수행하여 목표인 제품 등록(제품명: 천공탄)을 달성하였음.

(4협동/안동대)

- 복숭아순나방의 사육의 어려운 점을 극복하고 생물검정 시험을 모두 완료한 점과 심사자의 노린재에 대한 독성 추가 연구를 완료한 점, 정량적인 성과 목표를 초과 달성한 점을 고려해주기를 희망함

(5협동/마이크로자임)

- 복숭아순나방은 살충약제 및 농약 등 기존 방제수단이 매우 많아, 다양한 포장에서 기 방제작업을

실시하고 있어, 별도의 포장을 갖고 있지 아니하고선, 높은 발생 밀도를 기대하기 어려운 부분이 있었음.

- 따라서 본 유인제는 과실 및 과주의 유사향의 복합체와 같은 섭식 유인제로써 복숭아순나방 외 다양한 해충이 유인되는 특성을 갖고 있어, 이에 따라 총 해충 및 나방군류의 유인효율을 높고 복숭아순나방의 유인효율을 간접적으로 제시함.
- 외 대상 해충 확대한 갈색날개매미충 및 온실가루이에 대해 효과적인 현장적용결과를 수행하였으며, 상용제품대비 포획효율 상승을 나타내었음.
- 또한 상기 적용범위 확대 대상의 해충에 대한 효과적인 실용화를 진행 중에 있으니 고려를 바랍.

(6협동/김치연)

- G341/Y9 균주의 발효인자 분석 및 대량생산공정 개발 여부

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

(1세부/효성오앤비)

- 1협동과 기술이전(*Bacillus subtilis* Y9의 살충물질 surfactin 생산을 위한 배양기술)을 통하여, 추가로 친환경생물농약 제품을 개발할 수 있으며, 핵과류뿐만 아니라 다양한 과수 또는 채소류에 발생하는 진딧물, 응애류 등 방제 제품화가 이루어질 수 있을 것으로 봄. 다만, 본 제품의 효과는 미비하기 때문에 식물추출물 등 추가 혼합하여 제품기술을 높여할 것으로 판단됨.

(1협동/전남대)

- 본 연구에서 개발된 미생물제제는 진딧물 외에 식물병원균 방제용 제제 혹은 식물병 저항성을 유도하는 제제로서 활용의 가치가 있다고 사료되어 이에 대한 연구를 위해 향후 추가적인 연구비의 지원이 필요함.

(2협동/전남대)

- *B. methylotrophicus* DR-08 균주를 이용한 시제품 액상수화제가 핵과류 세균성구멍병 뿐만 아니라 토마토 풋마름병과 고추 세균성점무늬병에 대한 방제효과도 매우 우수하고, 또한 국제 특허권도 확보하고 있으므로, 기업에 이전되어 글로벌 제품으로 개발될 가능성이 매우 높다고 판단됨.
- 글로벌 제품개발로 성공하기 위해서는 최적 발효공정 개발 및 균주 개량, 다양한 포장시험 등이 필요하며, 이에 대한 지속적인 연구비 지원이 필요함.

(3협동/팜한농)

- 복숭아 세균성구멍병 방제제에 대한 산업계의 수요를 충족시킬수 있었으며, 글로벌 경쟁력을 갖춘 작물보호제 원천기술을 확보하여 글로벌 시장에 진출할 수 있는 기반을 마련하였음.

(4협동/안동대)

- 담배추출물과 곤충병원성곰팡이는 복숭아순나방의 효과적인 친환경 방제제로 사용될 수 있을 것으로 생각됨. 다만 추후 후속 연구지원을 통한 제품화가 절실히 필요함

(5협동/마이크로자임)

- 현재 실용화 되고 있는 제품군류는 영호남지역에 치우쳐 있어, 기존에 설립한 대리점 및 (주)경농과 같은 사업 파트너와 전국으로 사업화를 확대하고자 함.
- 유인평판(롤)트랩이 일정부분 실용화에 성공하였으나, 교체 및 설치의 노동력에 따른 애로사항이 보고되고 있음.
- 입자성 유인제의 경우 포획부분의 개발에 한계가 있어, 사업기간 내 개발하지 못하였으나, 현재 포

획부로 활용한 트랩을 기술이전 받아 대량포획용 포충트랩을 개발하기 위해 후속 연구개발에 진행 중임.

(6협동/김치연)

- 대상기업으로 기술 적용을 추진하여 제품의 생산단가를 낮출 수 있을 것으로 기대됨

IV. 보안성 검토

1. 연구책임자의 의견

없음

2. 연구기관 자체의 검토결과

없음

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="checked" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	
연구 과 제 명	핵과류병해충 관리용 유기농업자재 개발 및 실용화		
주관연구기관	효성오앤비(주)	주관연구책임자	조성현
연구 개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금 총연구개발비
	1,200,000,000	420,000,000	1,620,000,000
연구개발기간	2015. 08. 14. ~ 2018. 08. 13.		
주요활용유형	<input checked="checked" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)		

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 비료등록 : 유기농업자재 등록 2건 이상	유기농업자재 등록 3건
② 기술이전 : 1건 이상	기술이전 등록 1건
③ 특허출원 : 5건 이상	특허출원 8건, 등록 5건 (종료 후 1건)
④ SCI 논문 : 5건 이상	7건 완료
⑤ 비SCI 논문 : 3건 이상	3건 완료
⑥ 학술발표	25건
⑦ 인력양성	9명
⑧ 우수발표상	2건
⑨ 균주기탁	3건

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술 인정	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용홍보		기타 (타 연구 활용)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI 논문	비SCI 논문	평균 IF			학술발표	정책 활용	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건		명	건	건	
가중치																			
최종목표	5	0		1		2	1		-			5	3		6	4	-	-	
연구기간내 달성실적	8	4		1	20	3	620		1			7	3		25	9	4	4	
달성율(%)	160	400		100		150			100			140	100		417	225	400	400	

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	바실러스 서브틸리스 Y9 균주 및 이를 이용한 해충 방제용 조성물
②	흑축 추출물을 유효성분으로 함유하는 식물병 방제용 조성물 및 이의 용도.
③	천연 휘발성 화합물을 생산하고, 항균 활성을 가지는 바실러스 속 DR-08 균주 및 이의 용도
④	흑축으로부터 분리된 파르비틴을 유효성분으로 함유하는 식물병 방제용 조성물 및 이를 이용한 식물병 방제방법
⑤	천연 휘발성 화합물을 생산하고, 항균 활성을 가지는 바실러스 메틸로트로피쿠스 DR-08 균주 및 이의 용도
⑥	천연 휘발성 화합물을 생산하고, 항균 활성을 가지는 바실러스 속 DR-08 균주 및 이의 용도
⑦	바실러스 벨레젠시스 G341 최적 배양 및 생산 공정
⑧	담배추출물의 복숭아순나방에 대한 살충 효과 검증
⑨	복숭아순나방 방제용 신규 미생물 보베리아 바시아나 ARP14 균주 개발
⑩	비행해충 포획용 유인조성물 및 이를 포함하는 유인평판트랩 제조방법

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		v				v		v		
②의 기술	v	v				v				
③의 기술	v	v				v				
④의 기술	v	v				v				
⑤의 기술	v	v				v				
⑥의 기술	v	v				v				
⑦의 기술	v	v					v			
⑧의 기술	v									v
⑨의 기술	v					v				
⑩의 기술	v	v		v		v	v	v	v	

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	- 유기농업자재 개발
⑤의 기술	- 천연 휘발성 화합물을 생산하고, 향균 활성을 가지는 바실러스 메틸로트로피쿠스 DR-08 균주 및 이의 용도 기술을 활용하여 핵과류 세균성구멍병뿐만 아니라 토마토 풋마름병, 고추 세균성점무늬병 등 다양한 세균에 의한 식물병방제를 위한 유기농업자재 개발을 위해 기업체에 기술이전 계획.
⑥의 기술	- 세균원인성 식물병을 방제할 수 있는 친환경유기농업자재 제품화는 국내뿐만아니라 국제적으로, 친환경 농가뿐만아니라 관행 농가에서도 사용이 가능할 것으로 기대됨. - 핵과류 세균성구멍병 외에도 가로수에 식재된 벚나무에 문제시되는 구멍병에도 사용이 가능할 것이며 인간 주변생활환경 문제 개선에도 큰 도움이 될 것으로 기대함.
⑦의 기술	- 바실러스 벨레젠시스 G341 최적 배양 및 생산 공정 확립을 통해 안전성과 안정성을 가진 제품(제품명: 천공탄)을 등록하였으며, 성공적인 매출(현재까지 매출 약 3억원)을 발생시켰음.
⑧의 기술	- 농업인 교육을 통한 방제 기술 확산과 관련 산업체를 통한 제품화 추진
⑨의 기술	- 관련 산업체와 산업화 추진
⑩의 기술	- 이끌림 평판(롤)트랩은 현재 영호남권역의 긴급방제 및 보조사업에 일괄 참여하고 있으며, 기 개설한 대리점 및 사업 파트너를 활용하여 원예시장 및 전국 시장으로 적용 범위를 확대할 예정

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
	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	5	0		1		2	1		-			5	3		6		4	-	-
연구기간내 달성실적	8	4		1	20	3	620		1			7	3		25		9	4	4
연구종료후 성과창출 계획		1							1			4							

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	<i>Bacillus subtilis</i> Y9의 살출물질 surfactin 생산을 위한 배양 기술(노하우)		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	20,000 천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성

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