

발간등록번호

11-1543000-002579-01

신기능 곤충 생장조절 물질을 이용한 친환경 살충제 개발 및 산업화

최종보고서

2019. 3. 25.

주관연구기관 / 서울대학교 산학협력단
참여기업 / 팜한농(주)

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “신기능 곤충 생장조절 물질을 이용한 친환경 살충제 개발 및 산업화”(개발
기간 : 2016. 05. ~ 2018. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 3. 25.

주관연구기관명 : 서울대학교 산학협력단 (대표자) 윤 의 준
참 여 기 관 명 : (주)팍한농 (대표자) 이 유 진



주관연구책임자 : 제 연 호
세부연구책임자 : 박 일 권
참여기관책임자 : 전 희 선

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의
합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	316030-3	해당 단계 연구 기간	2016.05.19. ~ 2018.12.31	단 계 구 분	-
연구사업명	단위사업	농림축산식품 연구개발사업			
	사업명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대과제명	(해당 없음)			
	세부 과제명	신기능 곤충 생장조절 물질을 이용한 친환경 살충제 개발 및 산업화			
연구책임자	제 연 호	해당단계 참여연구원 수	총: 24 명 내부: 14 명 외부: 10 명	해당단계 연구개발비	정부: 800,000천원 민간: 800,000천원 계: 1,600,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 24 명 내부: 14 명 외부: 10 명	총 연구개발비	정부: 800,000천원 민간: 800,000천원 계: 1,600,000천원
연구기관명 및 소속부서명	서울대학교 산학협력단			참여기업명: 팜한농(주)	
국제공동연구 위탁연구	상대국명: 연구기관명:			상대국 연구기관명: 연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정 보	생물자 원	정보	실물
등록·기탁 번호	1420-3049 1420-3049 1748-5967 0022-0493 0048-3575	10-2016-01 52647 10-2018-00 19809 10-2018-01 36813 10-1720427 10-1852462									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

보고서 면수

- 식물체 및 미생물 유래의 신규 IGR 활성물질을 탐색하고 특성을 구명함
 - in vitro high-throughput IGR 스크리닝 시스템을 구축함
 - 식물 및 미생물 추출물과 유래 화합물의 IGR 활성 및 살충활성을 검정함
 - IGR 및 살충 활성이 우수한 식물 및 미생물 추출물로부터 활성 물질을 분리하고 구조를 분석함
 - 식물 및 미생물 추출물 유래 IGR 활성 물질의 다양한 해충에 대한 살충활성을 검정함
 - 미생물 추출물 유래 IGR 활성 물질의 대량생산 체계를 확립하고 안정성을 검정함
 - IGR 활성이 우수한 식물체 정유 및 정유 유래 화합물들의 환경 내에서의 안전성을 평가함
- 식물체 및 미생물 유래의 신규 IGR 활성물질을 이용한 살충제를 개발함
 - IGR 활성이 우수한 식물 및 미생물 추출물을 대상으로 단일농도 및 다중농도 실내 생물검정을 수행함
 - 실내시험을 통하여 선발한 IGR 활성 물질을 대상으로 다중농도에서 온실시험을 수행함
 - 온실시험을 통하여 선발한 IGR 활성 물질을 대상으로 제제화를 수행하고 포장에서의 살충활성을 평가함
 - 온실시험을 통하여 선발한 IGR 활성 물질 및 제제에 대하여 담수어류에 대한 급성독성을 평가함

141

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 새로운 살충기작을 가지는 친환경 IGR 살충제 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 신규 IGR 물질 탐색을 위한 in vitro 스크리닝 시스템 확립 및 최적화 - 10종 이상의 신기능 IGR 물질 확보 - 2종 이상의 유효 IGR 물질 선별 및 제제화 - 선별 IGR 물질의 살충활성 및 환경 영향 평가 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식물체 등 유래 신규 IGR 활성 물질 탐색 및 특성 구명 <ul style="list-style-type: none"> - in vitro IGR 스크리닝 시스템 구축 - 식물 추출물 등 살충활성 검정 및 신규 IGR 화합물 탐색 - 식물 추출물 등 유래 IGR 활성 물질 분리 및 동정 - 유효 후보 화합물 선별 및 특성구명 - 후보 화합물의 해충별 살충활성 평가 및 실내 안전성 평가 - 유효 후보 추출물 선별 및 구조분석 - 후보 추출물의 해충별 살충활성 평가 및 실내 안전성 평가 ○ 신규 IGR 활성물질을 이용한 살충제 개발 <ul style="list-style-type: none"> - IGR 활성 물질의 살충활성 스크리닝 (in vitro) - IGR 활성 물질의 온실시험 - IGR 활성 물질의 제제화 및 포장 시험 - IGR 활성 물질의 안전성 평가 ○ 사업화 성과 <ul style="list-style-type: none"> - 특허 출원 3건 - 특허 등록 2건 - 시작품 2건 제작 ○ 연구기반 성과 <ul style="list-style-type: none"> - SCI급 논문 5건 - 학술발표 18건 - 인력양성 3명 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기존의 IGR 계열의 물질과는 다른 살충 메커니즘을 가지는 JHAN 물질의 다량 확보를 통해 다양한 관련 특허를 출원함. ○ 기존의 살충제에 저항성을 가지는 해충의 방제에 효율적인 살충제 개발이 가능할 것임. ○ high-throughput 스크리닝 시스템을 활용하여 탐색된 신규 JHAN 물질은 다양한 해충 방제에 적용이 가능할 것임. ○ 새로운 IGR 계열의 유효물질인 JHAN의 살충제 시장 진입이 성공 하면, 최소 약 1조원 이상의 시장 규모를 형성할 것으로 기대됨. 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>곤충 생장조절물질</p>	<p>유충호르몬 안타고니스트</p>	<p>식물 추출물</p>	<p>신기능 물질</p>	<p>친환경 살충제</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>insect growth regulator</p>	<p>juvenile hormone antagonist</p>	<p>plant extract</p>	<p>new functional material</p>	<p>eco-friendly insecticide</p>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	6
2. 연구수행 내용 및 결과	9
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	126
4. 연구결과의 활용 계획 등	132
붙임. 참고 문헌	139

<별첨 1> 연구개발보고서 초록

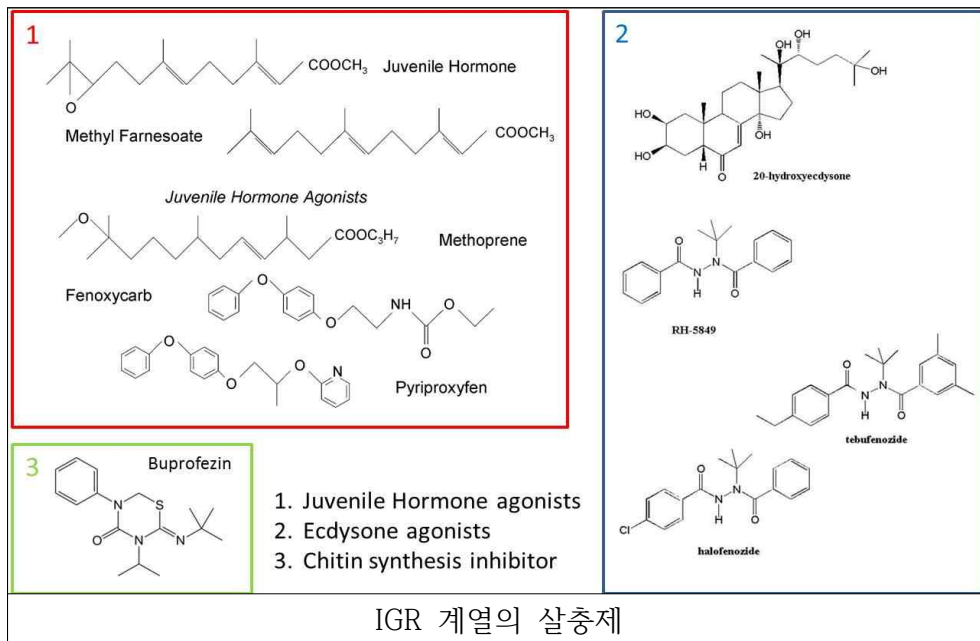
<별첨 2> 자체평가의견서

<별첨 3> 연구성과 활용계획서

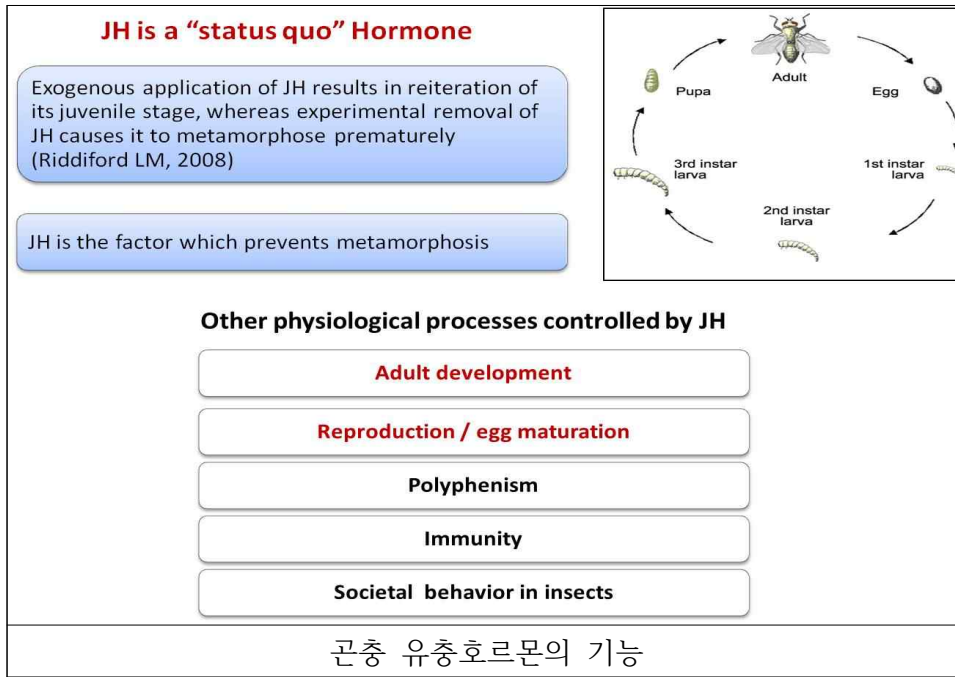
1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 유기합성농약은 넓은 범위에 쉽게 적용 할 수 있을 뿐만 아니라, 효과가 우수하여 기존 해충방제에 매우 큰 공헌을 해왔으나 인축에 대한 독성, 환경오염, 천적의 감소, 잔류 문제 등 많은 부작용을 낳고 있어 이를 대체할 환경 친화적 살충제 개발이 시급함.
- 환경 보전과 안전한 먹거리에 대한 수요가 증가함에 따라, 최근 OECD 회원국을 중심으로 유기합성농약의 사용량을 줄이기 위한 강력한 규제 정책이 실시되고 있음.
- 유기합성농약의 대안으로 주요 거대농약회사들은 천연물에 기반한 친환경 농약 개발, GM 작물 개발 및 무독성 생물농약 개발에 대한 연구를 집중하고 있음.
- 우리나라의 경우 GM작물의 사용을 금하고 있기 때문에 GM 작물의 개발보다는 천연물 기반 농약 개발과 생물농약 개발에 중점을 두어야 할 것으로 판단됨.
- 천연물 기반 제품은 합성 제품 대비 사용량이 적어 생산, 보관 및 유통에서 유리할 뿐만 아니라, 화학제품보다 인축과 환경에 대한 영향이 적기 때문에 안전성평가 비용을 줄일 수 있어 중소기업에서도 투자 가능함.
- 최근 들어 천연물 기반 농약 중 곤충 성장조절제 (insect growth regulator, IGR) 계열의 농약 개발에 관심이 집중되고 있으며, 이러한 추세는 당분간 계속될 것 예측됨.
- 현재까지 사용되는 IGR계열의 유효물질로는 유충호르몬 아고니스트(JHA), 변태호르몬인 엑다이손 아고니스트 (EA) 및 키틴합성 저해물질 (CSI)이 알려져 있고, 세계적으로 약 6.5조원의 시장을 형성하고 있음.



- 이 중 곤충의 유충호르몬 (juvenile hormone, JH)을 타겟으로 하는 JHA는 해충의 변태를 억제시키고, 성충 발달, 생식, 난자성숙 등에 관여하여 매우 안전하며 효과적인 해충방제제로 알려져 있음.



- 그러나, 상용화된 IGR 농약의 반복적인 사용으로 인해, 해충 역시 이에 대한 저항성을 갖기 시작하면서, 보다 신규하고 효과적인 IGR 농약 제제를 개발할 필요가 있음.
- 본 연구에서는 기존의 IGR 계열의 물질과는 전혀 다른 살충기작을 가진 유충호르몬의 안타고니스트 (JHAN)를 이용한 살충제 개발을 목표로 함.

1-2. 연구개발의 필요성

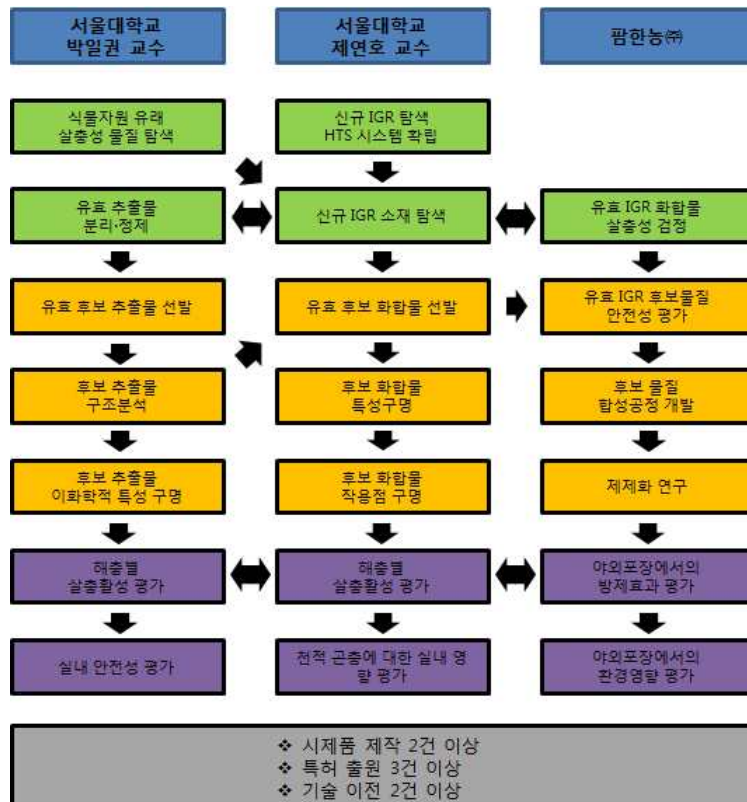
- 차세대 친환경 살충제로서 네오니코티노이드계열과 IGR에 대한 관심과 이용이 증가하고 있음.
- 이 중 네오니코티노이드계열의 살충제는 그 부작용이 보고 (2015. 04. 22. Nature. vol. 521)되면서, IGR계열의 농약 개발에 관심이 더욱 집중되고 있음.
- 그러나, 해충 역시 현재 상용화된 IGR 농약에 대해 저항성을 갖기 시작하면서, 보다 신규하고 효과적인 IGR 농약 제제를 개발 할 필요가 있음.
- 식물은 오랜 세월 동안 해충과 공진화해오면서 이들에 대한 방어물질을 생산해 왔으며, 이들 방어물질들은 다양한 해충에 살충활성 및 기피활성을 나타냄.
- 최근 식물의 다양한 방어물질들을 이용한 새로운 환경친화형 살충제 개발을 위한 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되고 있음.
- 곤충 유충호르몬 안타고니스트 (JHAN)은 세계의 많은 관련 연구자들이 지난 60년간 식물체내에 존재하리라 믿어왔지만 지금까지 발견하지 못했던 물질임.
- 본 연구진은 JHAN을 효율적으로 탐색할 수 있는 분자생물학적 검사법을 최근에 개발하였으며, 세계 최초로 식물 추출물로부터 JHAN 존재 물질을 확인하고, 논문 발표 (PNAS, 2015, 112(6): 1733-1738)와 함께 관련 방법과 물질에 대한 특허(대한민국 특허출원 제 10-20140100066호)를 출원하였음.
- 아울러 최근에는 약 70여종의 식물 추출물 외에도 식물의 Essential oil 등으로부터 다수의 JHA 또는 JHAN 물질을 확인하였으며, 관련 물질의 특성구명과 함께 총채벌레, 담배가루이 및 애멸구 등의 난방제 농업해충에 대한 살충제로서의 이용 가능성을

확인하고 있음.

- 본 연구는 그동안 보고되지 않았던 식물체 유래 천연물의 곤충 성장조절 활성을 탐색함으로써 새로운 개념의 살충제 개발이라는 차별성이 있음.
- 또한, 해외에서 원제를 들여와 이를 제조하여 판매하고 있는 국내 살충제 시장의 경우, 원제 수입국에서 수출국으로 전환이 가능함.
- 한편, 본 연구를 통해 도출된 신규 물질을 선도물질로 하여 구조 변형을 통하여 활성을 더욱 증가시킨 제품 개발에 폭넓게 이용될 수 있음.

1-3. 연구개발 범위

- 곤충 성장조절 물질 탐색 시스템 구축 및 신기능성 화합물 선별
 - IGR 탐색용 HTS 시스템 확립 및 신규 IGR 소재 탐색
 - 유효 IGR 물질 선별 및 특성 구명
 - 선별 IGR 물질의 살충활성 검정 및 실내 안전성 평가
- 국내외산 식물체 추출물로부터 곤충 성장조절 물질 탐색
 - 국내외 식물자원 추출물 확보, 살충 활성 검정 및 활성물질 분석
 - 활성물질 구조 분석 및 살충 활성 검정
 - 활성물질 구조-활성 관계규명 및 안정성 평가
- 신규 곤충 성장조절 물질의 제제화 및 안전성 평가
 - IGR 활성 물질의 살충활성 스크리닝 (in vitro)
 - IGR 활성 물질의 살충 활성 검정 (온실시험)
 - 야외포장 시험 및 제제화



2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 곤충 성장조절 물질 탐색 시스템 구축 및 신기능성 화합물 선발 (제1세부과제)

가. 세부연구수행 내용

(1) 식물체 정유 유래 화합물

식물체 정유의 성분으로 알려져 있는 총 195개의 화합물을 시그마알드리치에서 구매하였다 (Table. 1). 이들 화합물을 DMSO (Dimethyl sulfoxide) 또는 EtOH (Ethanol)에 용해시켜 IGR 활성 검정 및 살충 활성 검정에 이용하였다.

Table 1. 식물체 정유 유래 화합물 목록

No	화합물	No	화합물
1	Acetophenone	99	Phenyl ether
2	Acetyl eugenol	100	Phenylethanol, 2-
3	Acetyl isoeugenol	101	Pinene, (-)- α -
4	Allocymene	102	Pinene, (1R)-(+)- α -
5	Angelic acid isoamyl ester	103	Pinene, (-)- β -
6	Angelic acid isobutyl ester	104	Pinocarveol, (-)-trans
7	Anethole, trans-	105	Piperitone
8	Anisaldehyde, m-	106	Pulegone, (R)(+)-
9	Anisaldehyde, ρ -	107	Pulegone, (S)(-)-
10	Anisaldehyde, σ -	108	Sabinene hydrate
11	Anisole	109	Terpinen-4-ol, (+)-
12	Aromadendrene, (+)-	110	Terpinen-4-ol, (\pm)-
13	Asarone, α -	111	Terpinene, α -
14	Asarone, β -	112	Terpinene, γ -
15	Benzaldehyde Reagent Plus	113	Terpinolene
16	Benzyl benzoate	114	Thujopsene, (-)-
17	Benzyl salicylate	115	Thymol
18	Bisabolol, α -	116	Neral
19	Borneol, contain ca 20% Isoborneol	117	Nerol
20	Bornyl acetate	118	Geranial
21	Butyric acid	119	Geraniol
22	Camphene, (+)-	120	trans-2-Decen-1-ol
23	Camphene, (-)-	121	trans-2-Heptenal
24	Camphor, (\pm)-	122	trans-2-Hexenal
25	Camphor, (1S)-(-)-	123	trans-2-Nonenal
26	Carene, 3-	124	trans-2-Octenal, tech
27	Carvacrol	125	Acetic acid cis-3-hexenyl ester
28	Carveol, (-)- mixture of isomers	126	cis-2-hexen-1-ol
29	Carvone, (R)-(-)-	127	Decanal, minimum
30	Carvone, (S)-(+)-	128	Dodecyl aldehyde
31	Carvone, dihydro-(+)- mixture of isomers	129	Heptanal(=n-Heptaldehyde)
32	Caryophyllene oxide	130	Hexanal
33	Caryophyllene, β -	131	n-Hexyl aldehyde(=n-Capronaldehyde)
34	Cedrene, (-)- α -	132	Nonyl aldehyde
35	Cedrol, (+)-	133	Octyl aldehyde(=Octanal)
36	Cineole, 1,4	134	Tridecanal, tech

37	Cineole, 1,8(=Eucalyptol)	135	Undecyclic aldehyde
38	Cinnamaldehyde, trans-	136	(Z)-3-hexen-1-ol
39	Cinnamyl acetate	137	Allyl benzyl ether
40	Cinnamic acid benzyl ester	138	Allyl methyl sulfide
41	Cinnamyl alcohol	139	Benzyl sulfide
42	trans-Cinnamic acid	140	Benzyl disulfide
43	Citral mixture of ci and trans	141	Benzyl trisulfide
44	Citronellal, (±)-	142	Diallyl disulfide
45	Citronellal, (R)(+)	143	Diallyl sulfide
46	Citronellal, (S)(-)	144	Isopropyl disulfide
47	Citronellol, β-	145	Isopropyl sulfide
48	Copaene, (-)-α-	146	Methyl propyl disulfide
49	Cuparene, (+)-	147	Propyl disulfide
50	Cymene, m-	148	Propyl sulfide
51	Cymene, ρ-	149	Sodium sulfide
52	Dipentene, mixture(±Limonene)	150	Dipropyl trisulphide
53	Dodecyl acetate	151	Methyl propyl sulphide
54	Estragole	152	Methyl propyl trisulphide
55	Eucarvone	153	Hexadecanyl acetate C16-Ac
56	Eugenol	154	butyl isobutanoate
57	Farnesol	155	butyl isovalerate(C4 IV)
58	Farnesyl acetate, trans-	156	butyl 2-methylbutanoate(C4 2MB)
59	Farnesyl acetate	157	butyl 3-methyl-2-butenate(C4 IP)
60	Fenchone, (-)-	158	Cabreuva wood E:H 10%Fr (E)Nerolidol
61	Fenchone, (+)-	159	Citromethyl acetate
62	Geranyl acetate	160	isoamyl anglate
63	Guaiol, (-)-	161	isoamyl tiglate
64	Globulol, (-)-	162	isobutyl isovalerate
65	Hinokitiol	163	isobutyl 2-methylbutanate
66	Humulene, α-	164	isobutyl 3-methyl-2-butenate
67	3-Phenyl-1-propanol	165	methyl cinnamate
68	Isobornyl acetate	166	methyl N-methylantranilate
69	Isoeugenol, mixture of cis and trans	167	myrtenyl acetate
70	Isopulegol, (-)-	168	neryl acetate
71	Isopulegol, (+)-	169	Patchouil E:H 10%Fr (Pat choulol)
72	Isosafrole, mixture of cis and trans	170	pentyl isobutanoate
73	Limonene, (-)-	171	pentyl isovalerate(C5 IV)
74	Limonene, (R)(+)-	172	pentyl 2-methylbutanoate
75	Linalool oxide, mixture of isomers	173	pentyl 3-methyl-2-butenate
76	Linalyl acetate	174	Pinocarvyl acetate
77	Linolenic acid methyl ester	175	1-phenyl-1-ethanol
78	Menthol, (-)-	176	2-methylbutyl angelate
79	Menthone,(-)- contains ca, 5% isomenthone	177	2-methylbutyl isobutyrate
80	Methyl acetate	178	2-methylbutyl isovalerate
81	Methyl eugenol	179	2-methylbutyl 2-methylbutanoate
82	Methyl isoeugenol	180	2-methylbutyl 3-methyl-2-butenate
83	Methyl salicylate	181	2-phenylethyl acetate
84	Myrcene	182	2-phenylethyl benzoate
85	Myristicin	183	3-methylbutyl isobutyrate
86	Myrtenal, (1R)(-)-	184	3-methylbutyl isovalerate
87	Myrtenol, (1R)(-)-	185	3-methylbutyl 2-methylbutanoate
88	Nerolidol, cis-	186	3-methylbutyl 3-methyl-2-butenate
89	Nerolidol, cis amd trans isomers	187	3-methyl-2-butenyl isobutanoate
90	Nonanal	188	3-methyl-2-butenyl isovalerate

91	Nonyl acetate	189	3-methyl-2-butenyl 2-methylbutanoate
92	Nopinone, (1R)-(+)	190	3-methyl-2-butenyl 3-methyl-2-butnoate
93	Ocimene	191	3-phenyl-1-propan-1-ol
94	Octyl acetate	192	Decyl acetate C10-Oac
95	Perillaldehyde, (-)-	193	Nonyl acetate C9-Oac
96	Perillyl alcohol, (S)-(-)-	194	Undecyl acetate C11-Oac
97	Phellandrene, d-	195	Tetradecyl acetate C14-Oac
98	Phellandrene, α -		

(2) 곰팡이 추출물

국내 토양에서 분리한 총 189개의 곤충병원성 곰팡이 균주를 SDB (peptic digest of animal tissue 0.5%, pancreatic digest of casein 0.5%, dextrose 2%) 배지를 이용하여 25°C에서 200 rpm의 조건으로 진탕 배양하였다. 이렇게 배양한 균주를 현미 고체배지에 2차 접종하고, 25°C에서 14일간 정지 배양하였다. 2차 배양 후의 배양체에 동일한 양의 acetone을 혼합하고 24시간 동안 정지하여 추출하였으며, 추출원액에 대하여 멸균한 filter paper (Whatman)를 이용한 여과 및 원심분리를 통하여 추출물을 회수하였다. 회수한 추출물을 회전감압농축기 (EYELA NAJ-160, Tokyo, Japan)를 이용하여 농축하고, 농축된 추출물을 DMSO에 용해시켜 IGR 활성 검정 및 살충활성 검정에 이용하였다 (Fig. 1). 실험에 사용한 곤충병원성 곰팡이 균주의 목록은 표 2와 같다.

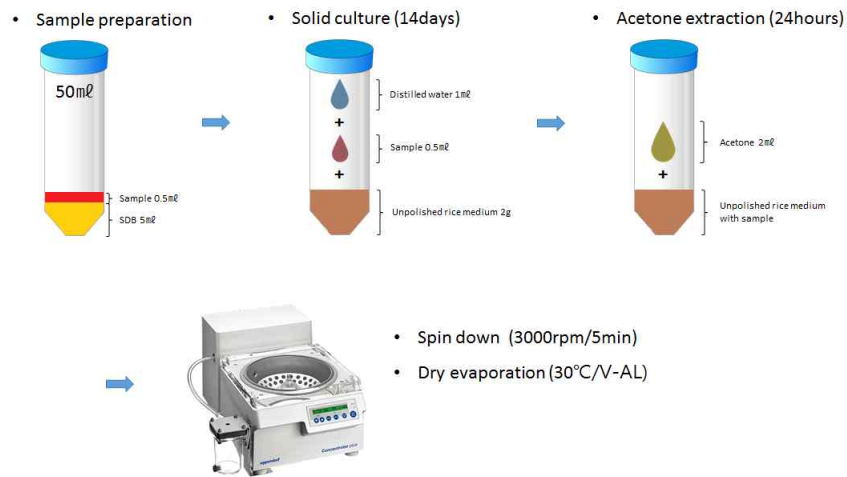


Fig. 1. 곰팡이 균주의 배양체 추출 과정.

Table 2. 곤충병원성 곰팡이 균주 목록

No.	균주명	No.	균주명
F-1	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-96	<i>Metarhizium lepidiotae</i>
F-2	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-98	<i>Bearuveria bassiana brongniartii</i>
F-3	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-99	<i>Bearuveria bassiana bassiana</i>
F-4	<i>Pochonia bulbillosa</i>	F-100	<i>Bearuveria bassiana bassiana</i>
F-5	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-101	<i>Bearuveria bassiana bassiana</i>
F-6	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-102	<i>Bearuveria bassiana bassiana</i>
F-7	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-103	<i>Fusarium oxysporum</i>

F-8	<i>Bearuveria bassiana</i>	F-104	<i>Bearuveria bassiana bassiana</i>
F-9	<i>Bearuveria bassiana</i>	F-105	<i>Aspergillus lentulus</i>
F-10	<i>Metarhizium lepidiotae</i>	F-106	<i>Bearuveria bassiana bassiana</i>
F-11	<i>Metacordyceps taii</i>	F-107	<i>Metarhizium anisopliae flavoviride</i> var. <i>pemphigum</i>
F-12	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-108	<i>Isaria farinosa</i>
F-13	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-109	<i>Bearuveria bassiana bassiana</i>
F-14	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-110	<i>Myrothecium</i> sp.
F-15	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-111	<i>Metarhizium anisopliae anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>
F-16	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-112	<i>Metarhizium anisopliae anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>
F-17	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-113	<i>Bearuveria bassiana bassiana</i>
F-18	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-114	<i>Isaria farinosa</i>
F-19	<i>Metarhizium robertsii</i>	F-115	<i>Bearuveria bassiana brongniartii</i>
F-20	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-116	<i>Bearuveria bassiana bassiana</i>
F-21	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-117	<i>Bearuveria bassiana bassiana</i>
F-22	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-118	<i>Lecanicillium</i> sp.
F-23	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-119	<i>Bearuveria bassiana bassiana</i>
F-24	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-120	<i>Bearuveria bassiana bassiana</i>
F-25	<i>Isaria fumosorosea</i>	F-121	<i>Bearuveria bassiana bassiana</i>
F-26	<i>Bearuveria bassiana</i>	F-122	<i>Isaria farinosa</i>
F-27	<i>Isaria fumosorosea</i>	F-123	<i>Bearuveria bassiana bassiana</i>
F-28	<i>Bearuveria bassiana</i>	F-124	<i>Tolypocladium cylindrosporum</i>
F-29	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-125	<i>Bearuveria bassiana bassiana</i>
F-30	<i>Isaria fumosorosea</i>	F-126	<i>Bearuveria bassiana bassiana</i>
F-31	<i>Isaria fumosorosea</i>	F-127	<i>Tolypocladium cylindrosporum</i>
F-32	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-128	<i>Bearuveria bassiana bassiana</i>
F-33	<i>Bearuveria bassiana</i>	F-129	<i>Acremonium strictum</i>
F-34	<i>Bearuveria bassiana</i>	F-130	<i>Metarhizium anisopliae anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>
F-35	<i>Isaria fumosorosea</i>	F-131	<i>Bearuveria bassiana bassiana</i>
F-36	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-132	<i>Bearuveria bassiana bassiana</i>
F-37	<i>Isaria fumosorosea</i>	F-133	<i>Metarhizium anisopliae anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>
F-38	<i>Paecilomyces catenianulatus</i>	F-134	<i>Isaria fumosorosea</i>
F-39	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-135	<i>Bearuveria bassiana bassiana</i>
F-40	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-136	<i>Bearuveria bassiana bassiana</i>
F-41	<i>Lecanicillium attenuatum</i>	F-136	<i>Bearuveria bassiana bassiana</i>
F-42	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-137	<i>Bearuveria bassiana bassiana</i>
F-43	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-138	<i>Isaria farinosa</i>
F-44	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-139	<i>Metarhizium anisopliae anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>
F-45	<i>Isaria fumosorosea</i>	F-140	<i>Isaria farinosa</i>
F-46	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-141	<i>Metarhizium anisopliae anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>
F-47	<i>Isaria fumosorosea</i>	F-142	<i>Bearuveria bassiana bassiana</i>
F-48	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-143	<i>Aspergillus versicolor</i>
F-49	<i>Metarhizium brunneum</i>	F-144	<i>Bearuveria bassiana bassiana</i>
F-50	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-145	<i>Lecanicillium</i> sp.
F-51	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-146	<i>Mucoromycotina</i> sp.
F-52	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-147	<i>Simplicillium</i> sp.
F-53	<i>Lecanicillium attenuatum</i>	F-148	<i>Tolypocladium cylindrosporum</i>
F-54	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-149	<i>Isaira</i> sp.

F-55	<i>Metarhizium brunneum</i>	F-150	<i>Paraconiothyrium sporulosum</i>
F-56	<i>Gibberella intermedia</i>	F-151	<i>Paecilomyces carneus</i>
F-57	<i>Isaria fumosorosea</i>	F-152	<i>Pochonia sp.</i>
F-58	<i>Pochonia bulbilosa</i>	F-153	<i>Paecilomyces marquandii</i>
F-59	<i>Isaria takamizusanensis</i>	F-154	<i>Isaria fumosorosea</i>
F-60	<i>Bearuveria bassiana</i>	F-155	<i>Isaira sp.</i>
F-61	<i>Paecilomyces fumosorosea</i>	F-156	<i>Bionectria ochroleuca</i>
F-62	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-157	<i>Isaira sp.</i>
F-63	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-158	<i>Pochonia sp.</i>
F-64	<i>Isaria fumosorosea</i>	F-159	<i>Pochonia sp.</i>
F-65	<i>Paecilomyces fumosorosea</i>	F-160	<i>Chaunopycnis sp.</i>
F-66	<i>Isaria fumosorosea</i>	F-161	<i>Paecilomyces carneus</i>
F-67	<i>Isaria fumosorosea</i>	F-162	<i>Myrothecium sp.</i>
F-68	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-163	<i>Myrothecium sp.</i>
F-69	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-164	<i>Isaira sp.</i>
F-70	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-165	<i>Verticillium sp.</i>
F-71	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-166	<i>Lecanicillium sp.</i>
F-72	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-167	<i>Aspergillus lentulus</i>
F-73	<i>Isaria fumosorosea</i>	F-168	<i>Pochonia sp.</i>
F-74	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-169	<i>Aspergillus lentulus</i>
F-75	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-170	<i>Aspergillus lentulus</i>
F-76	<i>Isaria fumosorosea</i>	F-171	<i>Phialocephala sp.</i>
F-77	<i>Bearuveria bassiana</i>	F-172	<i>Chaunopycnis sp.</i>
F-78	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-173	<i>Lecanicillium sp.</i>
F-79	<i>Isaria fumosorosea</i>	F-174	<i>Paecilomyces marquandii</i>
F-80	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-175	<i>Myrothecium sp.</i>
F-81	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-176	<i>Paraconiothyrium sporulosum</i>
F-82	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-177	<i>Bionectria ochroleuca</i>
F-83	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-178	<i>Lecanicillium sp.</i>
F-84	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-179	<i>Isaria farinosa</i>
F-85	<i>Bearuveria bassiana</i>	F-180	<i>Lecanicillium sp.</i>
F-86	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-181	<i>Bearuveria bassiana cf. bassiana</i>
F-87	<i>Bearuveria bassiana</i>	F-182	<i>Lecanicillium sp.</i>
F-88	<i>Bearuveria bassiana</i>	F-183	<i>Bearuveria bassiana cf. bassiana</i>
F-89	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-184	<i>Isaria farinosa</i>
F-90	<i>Bearuveria bassiana</i>	F-185	<i>Aspergillus versicolor</i>
F-91	<i>Bearuveria bassiana</i>	F-186	<i>Paecilomyces lilacinus</i>
F-92	<i>Isaria fumosorosea</i>	F-187	<i>Paecilomyces lilacinus</i>
F-93	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-188	<i>Aspergillus versicolor</i>
F-94	<i>Metarhizium lepidiotae</i>	F-189	<i>Paecilomyces marquandii</i>
F-95	<i>Metarhizium anisopliae</i>		

(3) 선발 곰팡이 균주의 동정

JHAN 활성을 보인 곰팡이 균주 중 배추좀나방에 대하여 높은 살충활성을 가진 것으로 조사된 F-145 균주의 성장상 조사를 위하여 PDA 배지 (Potato Dextrose Agar; potato starch 0.4%, dextrose 2%, agar 2%)에 균주를 접종하고 2주간

25°C에서 배양하였다. 배양 후 포자형성이 유도된 것을 확인하고 위상차 현미경을 이용하여 균사 및 포자를 관찰하였다.

F-145 균주의 형태학적 관찰을 위하여 PDA 배지에서 27°C 암 조건으로 7일 동안 배양하였다. 배양 후 균체 펠렛은 Karnovsky 고정액 (0.05 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2), 2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde)으로 1차 고정한 후, 0.05 M sodium cacodylate buffer로 3회 세척하였다. 1% Osmium tetroxide를 이용하여 4°C에서 2시간 동안 2차 고정하고, 0.05 M sodium cacodylate buffer와 증류수로 각 3회 세척한 후, 에탄올을 이용하여 15분 동안 에탄올 농도를 100%까지 올리면서 탈수시켰다. 이렇게 처리한 시료를 hexamethyldisilazane을 이용하여 완전히 건조시킨 후, SEM 515 scanning electron microscopy (Philips, Amsterdam, Netherlands)를 이용하여 25 kV에서 관찰하였다.

분자생물학적 동정을 위하여 F-145 균주의 균체에 fungal DNA extraction buffer (0.2 M Tris-Cl (pH 7.5), 0.5 M NaCl, 10 mM EDTA (pH 8.0), 1% (w/v) SDS)를 처리한 후, phenol extraction 및 alcohol precipitation 과정을 통하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출한 genomic DNA를 template로 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')과 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primer를 사용하여 internal transcribed spacer (ITS1-5.8S-ITS2) 부분을 PCR 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물의 염기서열을 분석하고, 이를 기 보고된 다른 곰팡이의 염기서열과 비교하였다.

(4) 선발 곰팡이 균주의 배지별 추출물

F-145 균주의 배양 배지별 활성 검정을 위하여 PDB 배지 (Potato Dextrose Broth: potato starch 0.4%, dextrose 2%) 및 현미 고체배지에 접종하여 추출물을 회수하였다.

액체 배양의 경우, PDB 배지를 이용하여 25°C에서 200 rpm의 조건으로 7일간 배양한 후 원심분리를 통하여 균사체와 배양액으로 분리하였다. 균사체는 시료와 동일한 양의 acetone을 혼합하여 잘 섞은 뒤 24시간 동안 정치하여 총 3회 추출하였다. 이 추출액을 filter paper로 여과한 후, 회전감압농축기를 사용하여 40°C에서 농축하였다 (Fig. 2A). 한편, 배양액은 동일한 부피의 ethyl acetate와 혼합하여 3회 추출한 후, 회전농축기를 이용하여 40°C에서 농축하였다.

고체 배양의 경우, PDB 배지를 이용하여 25°C에서 200 rpm의 조건으로 1차 배양한 후, 배양한 균주를 현미 고체배지에 2차 접종하여 25°C에서 14일간 정치 배양하였다. 배양된 균주에 동일한 양의 acetone을 혼합하고 24시간 동안 정치하여 추출하였으며, 추출원액에 대하여 멸균한 filter paper를 이용한 여과 및 원심분리를 통하여 추출물을 회수하였다 (Fig. 2B). 회수한 추출물을 회전감압농축기를 이용하여 농축하였다.

각각의 농축된 추출물을 최종적으로 DMSO에 용해시켜 IGR 활성 검정 및 살충활성 검정에 이용하였다.

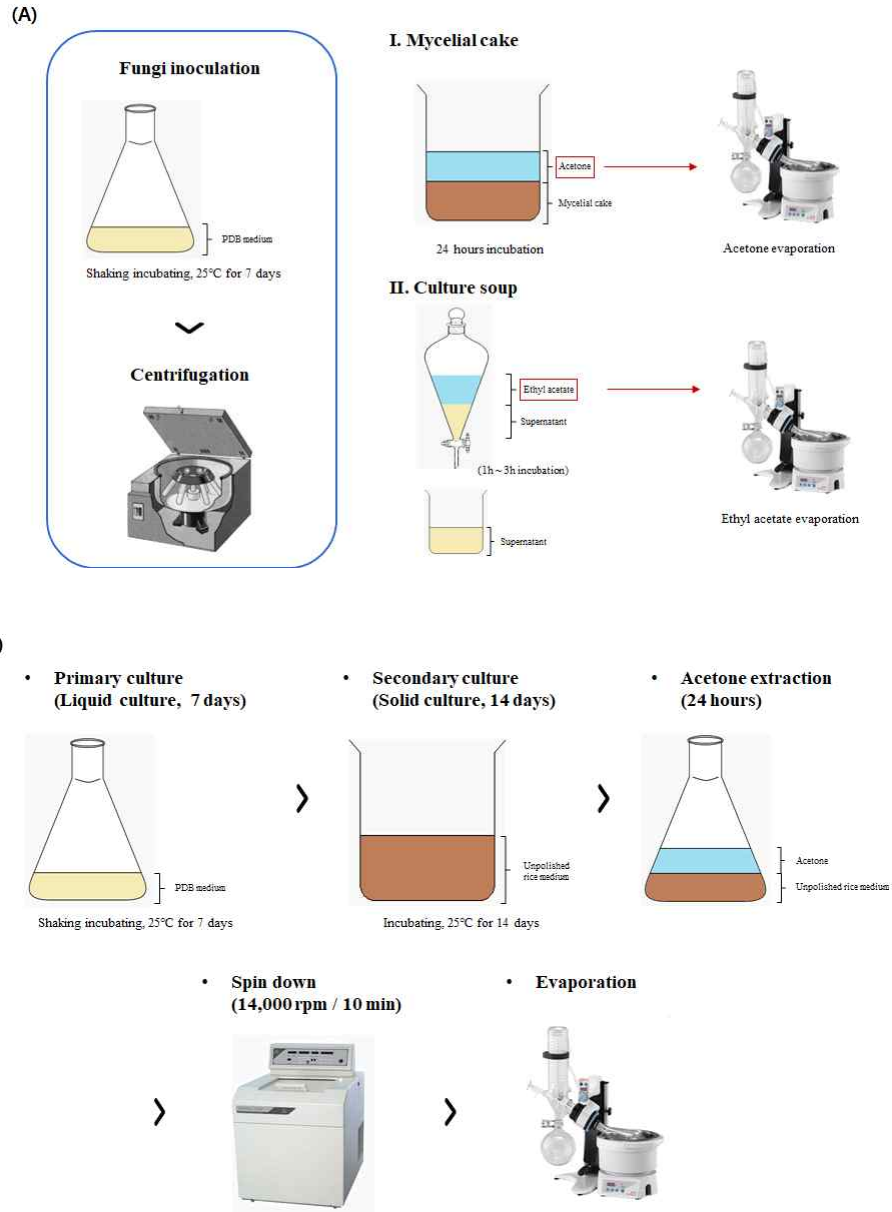


Fig. 2. F-145 곰팡이 균주의 액체 및 고체 배양 추출 과정.

(5) 방선균 추출물

생명공학연구원으로부터 분양받은 총 363개의 방선균 균주를 G.S.S 배지 (soluble starch 1%, glucose 2%, soybean meal 2.5%, beef extract 0.1%, yeast extract 0.4%, NaCl 0.2%, K₂HPO₄ 0.025%, CaCO₃ 0.2%, pH 7.2)를 이용하여 28°C에서 150rpm의 조건으로 3일간 진탕 배양하고, 원심분리를 통하여 균체를 수거하였다. 수거한 균체에 동일한 양의 acetone을 혼합하고 24시간 동안 정치하여 추출하였으며, 추출원액에 대하여 멸균한 filter paper를 이용한 여과 및 원심분리를 통하여 추출물을 회수하였다. 회수한 추출물을 회전감압농축기를 이용하여 농축한 다음, 농축된 시료를 동일한 양의 증류수와 ethyl acetate로 현탁하고, ethyl acetate층을 수거하여 회전감압농축기를 이용해서 다시 농축하였다. 최종적으로 농축된 추출물을 DMSO에 용해시켜 IGR 활성 검정 및 살충활성 검정에 이용하였다.

(6) 선발 방선균 균주의 배양 배지별 추출물

높은 JHAN 및 살충 활성을 보인 S-630 균주에 대한 배양 배지별 활성을 검정하기 위하여, S-630 균주를 G.S.S 배지, F.M 배지 (soluble starch 1%, glucose 2%, soybean meal 1.25%, fish meal 1.25%, beef extract 0.1%, yeast extract 0.4%, NaCl 0.2%, K₂HPO₄ 0.025%, CaCO₃ 0.2%, pH 7.2) 및 현미 배지에 각각 접종하였다. 액체 배지인 G.S.S 및 F.M 배지의 경우 28°C에서 150rpm의 조건으로 진탕 배양하고, 고체 배지인 현미 배지의 경우 28°C에서 14일간 정지 배양하였다. 이렇게 배양된 균주의 균사체에 동일한 양의 acetone을 혼합하여 잘 섞은 뒤 24시간 동안 정지하여 총 3회 추출하였다. 이 추출액을 filter paper로 여과한 후, 회전감압농축기를 사용하여 40°C에서 감압 농축한 추출물을 DMSO에 용해시켜 IGR 활성 검정 및 살충활성 검정에 이용하였다.

(7) 선발 방선균 추출물의 안정성 검정

S-630 방선균 균체 추출물의 온도에 대한 안정성 검정을 위하여 G.S.S 배지에 접종하여 28°C에서 150rpm의 조건으로 진탕 배양한 후, 100°C에서 15분간 열처리하였다. 열처리 후 배양체에 동일한 양의 acetone을 혼합하고 24시간 동안 정지하여 추출하였으며, 회수한 추출물을 회전감압농축기를 이용하여 농축한 다음, 농축된 시료를 동일한 양의 증류수와 ethyl acetate로 현탁하고, ethyl acetate층을 수거하여 회전감압농축기를 이용해서 다시 농축하였다 (Fig. 3A).

pH에 대한 안정성 검정을 위해서는 S-630 방선균 균주를 G.S.S 배지에 접종하여 28°C에서 150rpm의 조건으로 진탕 배양한 후 pH를 각각 4, 7 및 10으로 조정하였다. pH 조정 후 배양체에 동일한 양의 acetone을 혼합하고 24시간 동안 정지하여 추출하였으며, 회수한 추출물을 회전감압농축기를 이용하여 농축한 다음, 농축된 시료를 동일한 양의 증류수와 ethyl acetate로 현탁하고, ethyl acetate층을 수거하여 회전감압농축기를 이용해서 다시 농축하였다 (Fig. 3B).

배양 scale에 따른 안정성의 경우에는 S-630 균주를 1 L의 G.S.S 배지에 접종하여 28°C에서 150rpm의 조건으로 진탕 배양한 후, 배양체에 동일한 양의 acetone을 혼합하고 24시간 동안 정지하여 추출하였으며, 회수한 추출물을 회전감압농축기를 이용하여 농축한 다음, 농축된 시료를 동일한 양의 증류수와 ethyl acetate로 현탁하고, ethyl acetate층을 수거하여 회전감압농축기를 이용해서 다시 농축하였다 (Fig. 3C).

최종적으로 농축된 각각의 추출물을 DMSO에 용해시켜 IGR 활성 검정에 이용하였다.

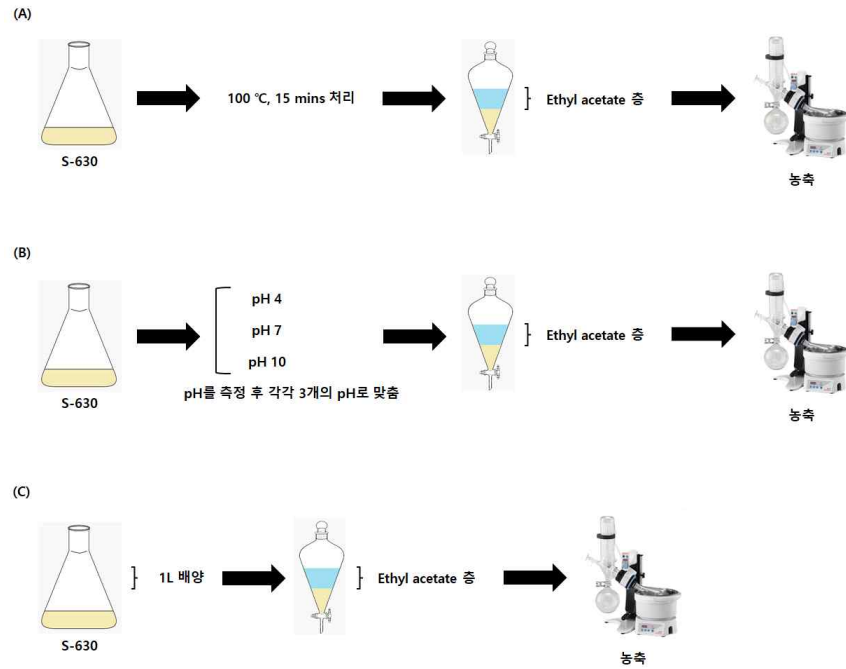


Fig. 3. S-630 방선균 균주 추출물의 온도 (A), pH (B) 및 배양 scale (C)에 따른 안정성 검정.

(8) 선발 방선균 추출물의 익충에 대한 영양성 평가

선발 방선균 추출물의 꿀벌 (*Apis mellifera*)에 대한 안전성을 평가하기 위하여, 부화 후 22일이 지난 외역봉 20마리를 대상으로 살충활성 검정을 수행하였다. 50%의 설탕물 5ml에 S-630 균주의 배양체 추출물을 처리하여 최종 농도 20 ppm으로 희석하였으며, 5 ml의 syringe에 이를 분주하여 플라스틱컵 내의 꿀벌에 공급하였다. 이렇게 처리한 플라스틱컵을 28°C의 암실 조건에서 72시간 동안 관찰하였으며, 72시간 후에 사충수를 조사하였다.



Fig. 4. S-630 방선균 균주 추출물의 꿀벌에 대한 안전성 검정.

(9) 선발 방선균 균주의 동정

S-630 균주의 배양학적 특성을 조사하기 위하여 각종 ISP 배지 (ISP No. 2, ISP No. 3, ISP No. 4, ISP No. 5, ISP No. 6 및 ISP No. 7)에 균주를 접종하고

28°C에서 14일간 배양한 후, 균주의 배양 생리적 특성을 조사하였다.

또한 분리한 균주의 동정을 위해 16s rRNA 유전자 염기서열 분석을 수행하였다. S-630 균주의 16s rRNA 유전자의 염기서열을 얻기 위하여 DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen)을 이용하여 genomic DNA를 분리 하였고 이를 template로 사용하여 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 및 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 정제 후 서열을 분석하였다. 염기서열은 ExTaxon-e server (<http://www.ezbiocloud.net>)와 NCBI의 BLAST을 이용하여 GenBank 데이터베이스의 염기서열과 비교하였다.

(10) 선발 방선균 유래 활성물질의 대량 생산을 위한 배지 조건 확립

S-630 균주 유래 JHAN 및 살충 활성 물질의 대량 생산을 위한 적합배지를 선발하기 위하여 S-630 균주를 GSS, F.M, M3 (soluble starch 2%, glucose 1%, Soytone 1%, CaCO₃ 0.3%, FeSO₄·7H₂O 0.02%, pH 7.2) 및 현미 배지에 각각 접종하였다. 액체 배지인 G.S.S, F.M 및 M3 배지의 경우 28°C에서 150rpm의 조건으로 진탕 배양하고, 고체 배지인 현미 배지의 경우 28°C에서 14일간 정지 배양하여 균사체를 수거하였다. 수거한 균사체에 동일한 양의 acetone을 혼합하고 잘 섞은 뒤 24시간 동안 정지하여 총 3회 추출하였다. 이 추출액을 filter paper로 여과한 후, 회전감압농축기를 사용하여 40°C에서 감압농축하여 균사체 추출물을 확보하였다. 각각의 추출물은 최종적으로 DMSO에 용해시켜 JHAN 활성 검정 및 박층크로마토그래피 분석을 수행하였다.

(11) 선발 방선균 균주의 대량 배양

S-630 균주로부터 활성물질의 대량 생산 및 분리를 위하여 500 L jar fermentor를 이용한 대량 배양 체계를 구축하였다 (Fig. 5). S-630 균주를 3 L의 M3 배지에 접종하고 28°C에서 150rpm의 조건으로 3일 동안 진탕 배양하여 1차 seed를 확보하였다. 1차 seed를 30 L의 M3 배지가 들어있는 50 리터 jar fermentor에 접종하고 3일간 배양하여 2차 seed를 확보하였으며, 최종적으로 2차 seed를 300 L의 M3 배지가 들어있는 500 리터 jar fermentor에 접종하여 28°C에서 6일간 배양하였다. 초기 pH는 6.5로 설정하였고, 통기성 조건은 1 vvm (volume of air added to liquid volume per minute)이었으며, agitation은 120 rpm으로 설정하였다. 배양 완료 후, 대용량 원심분리기를 이용하여 배양액과 균사체를 각각 분리하였다. 분리한 배양액은 대용량 농축기를 이용하여 농축하였으며, 균사체의 경우 필터 프레스를 이용하여 압축한 후 수거하였다.



Fig. 5. S-630 방선균 균주의 대량 배양 공정 과정. 2차 seed 배양 (A), 300L 본배양 (B), 대용량 원심분리기 (C), 대용량 농축기 (D), 필터 프레스 (E).

(12) 선발 방선균 유래 활성물질 분리를 위한 용매 조건 확립

M3 배지를 이용하여 배양한 S-630 균주의 배양액과 균사체를 원심분리를 통하여 각각 분리하였다. 배양액의 경우, 동일한 양의 hexane, ethyl acetate 및 butanol을 순차적으로 혼합하고 각각 추출한 후 분획을 모아 회전감압농축기를 이용하여 40°C에서 농축하였다 (Fig. 6A). 한편, 균사체의 경우에는 동일한 양의 acetone을 혼합하고 잘 섞은 뒤 24시간 동안 정치하여 총 3회 추출하였다. 이 추출액을 filter paper로 여과한 후, 회전감압농축기를 사용하여 40°C에서 농축하였다. 이렇게 농축된 균사체 추출물을 동일한 양의 증류수로 현탁하고 hexane, ethyl acetate, butanol 순으로 분리하여 회전감압농축기를 이용해서 다시 농축하였다 (Fig. 6B). 최종적으로 농축된 각각의 추출물을 DMSO에 용해시켜 IGR 활성 및 살충활성 검정에 이용하였다.

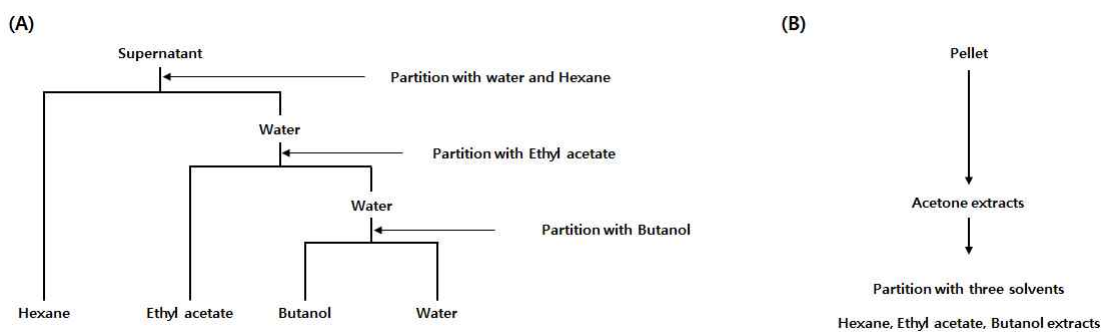


Fig. 6. S-630 방선균 균주의 배양액 (A) 및 균사체 (B)에 대한 추출 용매 선정.

(13) 선발 방선균 유래 활성물질의 분리

S-630 균주의 활성물질 분리 및 동정을 위하여, 배양체 hexane 추출물 3.6 g을 Chloroform/Methanol (100:0→0:100)을 전개 용매로 사용하여 Isolera one 중압액체크로마토그래프 (Biotage, Sweden)을 SNAP Catridge KP-Sil 340 g으로 실시하였다. 각 분획물은 chloroform/Methanol 95:5 (v:v)를 전개용매로 TLC

plate를 사용하여 상승 1차원법으로 전개시킨 후 UV (254 nm 및 365 nm)를 조사하고, 10% H₂SO₄로 발색시켜 나타나는 pattern을 확인하여 동일한 Rf 값을 나타내는 분획물을 합쳤다. 각각의 분획물에 대하여 JHAN 및 생물검정을 수행하였으며, 활성을 나타내는 분획에 대하여 역상 preparative HPLC [Inno C18 column (4.6 × 150 mm, 5 μm 입자크기); 전개용매 MeOH 75% / MeOH 25% isocratic elution over 45 min; flow rate = 1.0 ml/min; UV detection at 220 nm]를 이용하여 물질을 분획하였다. 각각의 분획물은 역상 preparative HPLC [U-VDSpher PUR 100 C18E (2.0 × 50 mm, 1.8 μm 입자크기); 전개용매 acetonitrile (0.1% formic acid) : water (0.1% formic acid) over 40 min; flow rate = 0.3 ml/min; UV detection at 220 nm]를 이용하여 추가적으로 정제하였다.

(14) 선발 방선균 유래 활성물질의 구조 분석

S-630 균주로부터 정제된 활성물질에 대하여 LC/MSMS (Q Exactive, Thermo scientific, USA) 분석을 수행하여 분자량을 확인하였으며, 600 MHz NMR 분광기 (Avance 600, Bruker, Germany)를 이용하여 ¹H 및 ¹³C NMR 스펙트럼을 분석하였다. 또한 2D NMR 기법 (gHMBC, gCOSY, gHSQC)을 사용하여 최종적인 구조를 결정하였다.

(15) JHA 활성 검정

이집트 숲모기 (*Aedes aegypti*)의 유충호르몬 수용복합체인 Met-Fisc가 형질 전환된 yeast Y187 균주를 2.0×10⁶ cells/ml이 될 때까지 DDO (double dropout, SD-Leu/-Trp) 배지를 이용하여 30°C에서 배양하고, 배양한 세포를 수거하여 100 μl씩 96-well plate에 분배하였다. Yeast Y187 균주가 분배된 well에 단일 화합물의 경우 각각 10 ppm 의 농도로 처리하였으며, 추출 혼합물의 경우에는 각각 1/500의 농도로 희석하여 처리하였다. 양성 대조구로는 pyriproxyfen 0.033 ppm을, 음성 대조구로는 EtOH 또는 DMSO를 처리하여 이를 30°C에서 3시간 동안 추가로 배양한 후, Yeast β-galactosidase assay kit (Thermo Scientific)을 사용하여 분석을 수행하였다. 96-well plate에 들어있는 분석 반응 혼합물을 30°C에서 5시간 배양하고, 각각의 OD420값을 iMark™ microplate reader (BIO-RAD)를 이용하여 측정하였다 (Fig. 7). 이렇게 측정된 OD420값을 식 1에 대입하여 각각의 물질에 대한 JHA 활성을 평가하였다.



Fig. 7. Yeast two-hybrid system을 기반으로 한 JHA 활성 물질 탐색.

$$JHA\ activity = \frac{OD_{420}\ Chemical}{OD_{420}\ Pyriproxyfen}$$

식 1. JHA 활성 검정식.

(16) JHAN 활성 검정

이집트 숲모기의 Met-Fisc가 형질 전환된 Y187 균주를 2.0×10^6 cells/ml이 될 때까지 DDO 배지를 이용하여 30°C에서 배양하고, 배양한 세포를 수거하여 100 μ l씩 96-well plate에 분배하였다. 세포가 분배된 well에 pyriproxyfen 0.033 ppm과 스크리닝 물질 (단일 화합물은 10 ppm, 추출 혼합물은 1/500의 희석 농도)을 처리하였다. 양성대조구로는 pyriproxyfen 0.033 ppm과 methoprene acid 10 ppm을, 음성대조구로는 pyriproxyfen 0.033 ppm과 DMSO 또는 EtOH를 처리하여 이를 30°C에서 3시간 동안 추가로 배양한 후, Yeast β -galactosidase assay kit (Thermo Scientific)을 사용하여 β -galactosidase 분석을 수행하였다. 96-well plate에 들어있는 β -galactosidase 분석 반응 혼합물을 30°C에서 5시간 배양하고, 각각의 OD₄₂₀을 iMark™ microplate reader (BIO-RAD)를 이용하여 측정하였다 (Fig. 8). 이렇게 측정된 OD₄₂₀을 식 2에 대입하여 각각의 물질에 대한 JHAN 활성을 평가하였다.



Fig. 8. Yeast two-hybrid system을 기반으로 한 JHAN 활성 물질 탐색.

$$JHAN\ activity = \frac{OD_{420}\ Pyriproxyfen - OD_{420}\ Chemical}{OD_{420}\ Pyriproxyfen}$$

식 2. JHAN 활성 검정식.

(17) 항이스트 (anti-yeast) 활성 검정

이집트 숲모기의 Met-Fisc가 형질전환된 Y187 균주를 2.0×10^6 cells/ml이 될 때까지 DDO 배지를 이용하여 30°C에서 배양하고, 배양한 세포를 수거하여 200 μ l씩 96-well plate에 분배하였다. Y187 균주가 분배된 well에 화합물을 각각 10 ppm 의 농도로 처리하고, 30°C에서 150rpm의 조건으로 진탕 배양하면서 24시간 동안 yeast의 성장률을 OD₆₀₀으로 측정하였다. 대조구로는 pyriproxyfen 0.033 ppm과 DMSO 및 EtOH를 처리하여 동일한 방법으로 OD₆₀₀값을 측정하였다.

(18) 살충활성 검정

모기 유충에 대한 살충 활성을 검정하기 위해서, 흰줄 숲모기 (*Aedes albopictus*) 3령 유충 10마리씩을 한 처리구로 하여, 식물 정유 화합물의 경우 각각의 물질을 10 ppm의 농도로 처리하였고, 방선균 추출물 및 분획물의 경우 다양한 농도로 희석하여 처리하였으며, 곰팡이 추출물의 경우 1,000 ppm의 농도로 처리하였다. 처리 후 24시간 간격으로 3일 동안 사충 수를 조사하였다. 일부 화합물에 대해서 정량 생물 검정을 위하여 흰줄 숲모기 2령, 3령 및 4령 유충 각각 10마리씩을 한 처리구로 하여 2배 농도로 연쇄 희석한 화합물을 각각 처리하고 24시간 간격으로 3일 동안 사충 수를 조사하였다. 모든 실험은 3회 반복 하였으며, IRMA QCal 프로그램을 이용한 직선 회귀를 통해 LC₅₀값을 측정하였다.

모기 성충에 대한 훈증 살충 활성을 검정하기 위해서, 흰줄 숲모기 성충 암컷 3마리 수컷 3마리씩을 한 처리구로 하여 원통형 유리용기(φ 9×10 cm)에 넣고, 식물 정유 화합물을 filter paper (ADVANTEC, φ 0.8 cm)에 처리하여 반대편 유리용기 바닥에 놓았다. 용기 중앙에는 모기 성충이 화합물과 접촉하는 것을 막기 위하여 철망을 놓았고 parafilm으로 밀봉하였다. 처리 72시간 후에 사충 수를 조사하였으며 3반복으로 실험하였다.

배추좀나방 (*Plutella xylostella*)의 경우에는 3령 유충 10마리씩을 한 처리구로 하여 생물검정을 수행하였다. 식물 정유 화합물과 방선균 추출물 및 분획물의 경우에는 direct dipping 방법을 이용하여, 0.005%의 전착제 (PVA)가 포함된 1 ml의 증류수에 식물 정유 화합물은 각각 200 ppm의 농도로, 방선균 추출물 및 분획물은 다양한 농도로 희석하여 현탁한 후 배추좀나방 3령 유충을 침지하였다. 이렇게 처리한 유충에 유채를 먹이로 공급하면서 24시간 간격으로 3일 동안 사충 수를 조사하였고 3반복으로 실험하였다. 곰팡이 추출물의 경우에는 leaf-disc dipping 방법을 이용하여, 0.005%의 전착제 (PVA)가 포함된 1 ml의 증류수에 곰팡이 추출물을 2,000 ppm의 농도로 희석하여 현탁한 후, 무농약 배춧잎 (5×5 cm²) 을 30초간 침지시키고 이를 건조시켜, 3령 유충에 공급하였다. 24시간 간격으로 동일한 방법을 이용하여 곰팡이 추출물을 처리한 배춧잎을 공급하면서 사충수를 조사하였다.

파밤나방 (*Spodoptera exigua*) 및 화랑곡나방 (*Plodia interpunctella*) 유충에 대한 살충 활성을 검정하기 위하여, 2령 유충 10마리씩을 한 처리구로 하여 direct dipping 방법으로 생물 검정을 수행하였다. 0.005%의 전착제 (PVA)가 포함된 1 ml의 증류수에 식물 정유 화합물은 각각 200 ppm의 농도로, 방선균 추출물 및 분획물은 다양한 농도로 희석하여 현탁한 후 파밤나방 및 화랑곡나방 2령 유충을 침지하였다. 이렇게 처리한 유충에 인공사료를 공급하면서 24시간 간격으로 3일 동안 사충 수를 조사하였다. 화랑곡나방의 알에 대한 활성 검정의 경우에는 산란 후 12시간 이내의 알을 검은 종이에 수확하여 아세톤에 희석한 식물 정유 화합물에 10초 동안 침지하고 이어 증류수에 30초 동안 씻어낸 뒤 5일 이후에 부화율을 조사하였으며 3반복으로 실험하였다.

옥수수조명나방 (*Ostrinia furnacalis*)의 경우에는 1령 유충 20마리씩을 한 처리구로 하여, direct dipping 방법으로 생물검정을 수행하였다. 0.005%의 전착제 (PVA)가 포함된 1 ml의 증류수에 곰팡이 추출 혼합물을 2,000 ppm의 농도로 희석하여 현탁한 후 옥수수조명나방 유충을 침지하였다. 이렇게 처리한 유충에

인공사료를 공급하면서 24시간 간격으로 3일 동안 사충 수를 조사하였다.

흡즙 해충인 애멸구 (*Laodelphax striatellus*)의 경우에는, 3령 약충 20마리씩을 한 처리구로 하여, 0.005%의 전착제 (PVA)가 포함된 1 ml의 증류수에 곰팡이 추출 혼합물을 2,000 ppm의 농도로 희석하여 침지 처리하였다. 이렇게 처리한 약충을 벼에 옮겨주고 24시간 간격으로 3일 동안 사충 수를 조사하였다.

소나무재선충 (*Bursaphelenchus xylophilus*)의 경우에는 유충과 성충이 섞인 100마리를 한 처리구로 하여 96well plate의 well에 넣고 식물 정유 화합물을 100 ppm의 농도로 처리하였다. 처리 후 24시간 간격으로 3일 동안 사충 수를 조사하였다.

점박이응애 (*Tetranychus urticae*)의 경우에는 약충 10마리씩을 한 처리구로 하여, 0.005%의 전착제 (PVA)가 포함된 200 μ l의 증류수에 S-630로부터 분리한 compound를 10 ppm의 농도로 희석하여 침지 처리하였다. 처리 후 24시간 간격으로 3일 동안 사충 수를 조사하였다.

꽃노랑총채벌레 (*Frankliniella occidentalis*)의 경우, 성충 암컷 1010마리씩을 한 처리구로 하여, 0.005%의 전착제 (PVA)가 포함된 200 μ l의 증류수에 S-630로부터 분리한 compound를 10 ppm의 농도로 희석하여 침지 처리하였다. 처리 후 24시간 간격으로 3일 동안 사충 수를 조사하였다.

(19) 유전자 발현 분석

우화 후 1시간 이내인 흰줄 숲모기 암컷 성충의 배면에 각 화합물을 0.5 μ g씩 처리하고, 4시간 간격 (4시간, 8시간, 12시간)으로 Qiazol (QIAGEN) 용액을 이용하여 제조사의 방법을 따라 total RNA를 추출하였다. 이렇게 추출한 total RNA를 대상으로 QuantiTect Reverse Transcription 키트 (QIAGEN)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 cDNA를 합성하고, EvaGreen qPCR 키트 (Applied Biological Materials)와 CFX96™ Real-Time 시스템 (BIO-RAD)를 이용하여 Hairy 유전자의 발현 양상을 qPCR 기법으로 조사하였다. qPCR은 95°C에서 10분 간 효소 활성화 단계와 95°C에서 15초, 58°C에서 15초 및 72°C에서 30초의 증폭 단계 40회로 수행하였으며, reference 유전자로는 기존에 알려진 RPS7 유전자를 사용하였다. Hairy 유전자의 증폭을 위해서는 Hairy-Fw (5'-TGACCGTGAAACATTTGGAA-3')와 Hairy-Re (5'-CGGTCTCCAAGGTTTGTTCAT-3') 프라이머를 사용하였다. qPCR 분석은 3반복으로 수행하였으며, SPSS를 통해 통계분석을 실행하였다.

(20) 난소 해부

혈중 유충호르몬의 농도가 높은 우화 직후의 흰줄 숲모기 암컷 성충의 배면에 식물체 정유 화합물을 0.5 μ g씩 처리하고, 우화 후 2일째에 6시간 동안 실험용 흰쥐를 이용하여 흡혈시켰다. 한편, 혈중 유충호르몬의 농도가 낮은 흡혈 직후의 흰줄 숲모기 암컷 성충의 배면에도 식물체 정유 화합물을 0.5 μ g씩 처리하였다. 흡혈 2일 후에 모기를 5-10분 동안 -20°C에 처리하여 기절 시킨 다음, 모기의 배를 생리식염수 용액 안에 위치시키고 해부현미경으로 관찰하면서 배 끝마디를 잡아당기는 방식으로 해부하여 난소를 관찰하였다. Leica 현미경의 active measure 소프트웨어를 이용하여 난소 follicle의 길이를 측정하였고, SPSS를 통해 통계분석을 수행하였다.

나. 세부연구수행 결과

(1) IGR 탐색용 HTS 시스템 확립

(가) in vitro IGR 스크리닝 시스템 구축

신규 유충호르몬 아고니스트 (JHA) 및 안타고니스트 (JHAN) 물질을 탐색할 수 있는 in vitro 스크리닝 시스템을 구축하기 위하여, 이집트숲모기 (*Aedes aegypti*)의 유충호르몬 수용체인 Methoprene-tolerant (Met)과 partner 단백질인 Ftz-F1-interaction steroid receptor coactivator (Fisc)를 합성하고 (Fig. 9), 이들 유전자를 Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 (Clontech, USA)를 이용하여 Y187 yeast 세포에 형질전환 하였다 (Fig. 10).

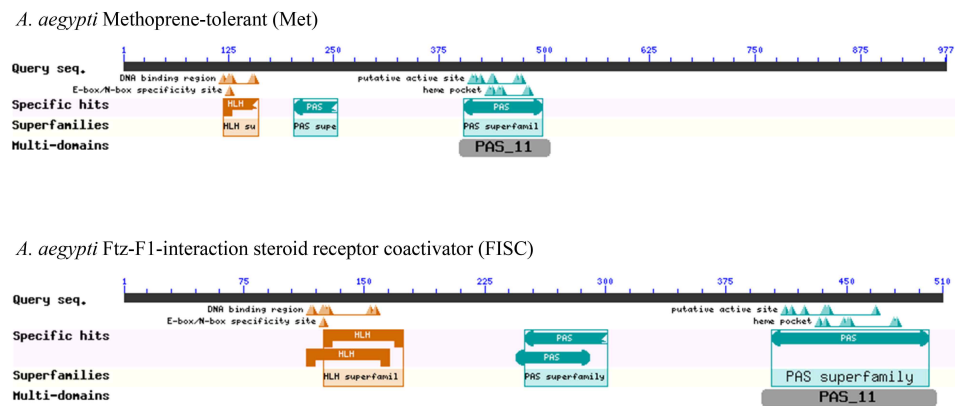


Fig. 9. 이집트 숲모기 (*Aedes aegypti*)의 유충호르몬 수용체 인 Methoprene-tolerant (Met)과 partner 단백질인 Ftz-F1-interaction steroid receptor coactivator (FISC).

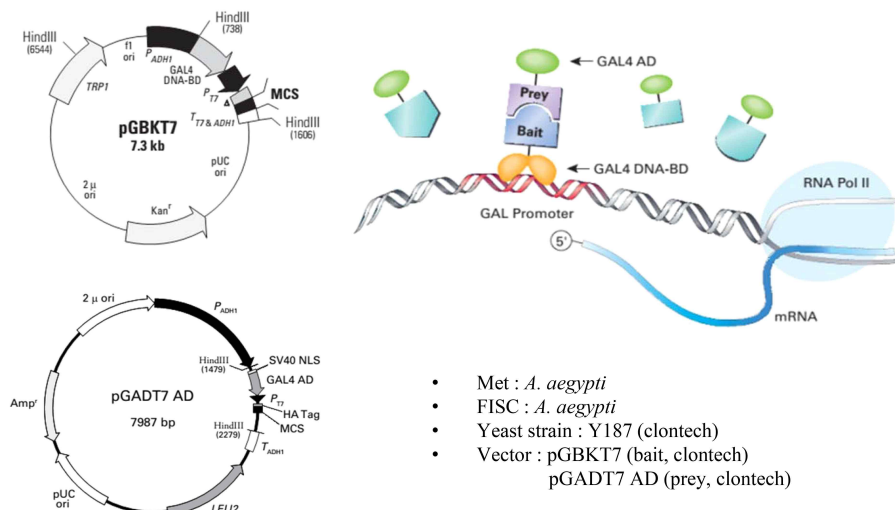


Fig. 10. Yeast two-hybrid system을 이용한 in vitro IGR 스크리닝 시스템.

이렇게 제작된 형질전환체에 스크리닝 물질을 배합하여 배양하였을 때, 스크리닝 물질이 JHA인지 여부에 따라 Met과 Fisc의 결합이 영향을 받을 수 있으며, 이를 통해 유충 호르몬의 아고니스트를 탐색할 수 있다. Fig. 11에서와 같이 Met과 Fisc로 형질전환된 형질전환체를 JHA인 파이리프로キシ펜 존재 하에 배양할 경우, Met과 Fisc가 결합하여 락지 (LacZ)가 전사됨을 확인할 수 있었다. 따라서, 스크리닝 물질의 존재 하에 형질전환체를 배양하였을 때 Met과 Fisc가 결합하여 락지가 전사될 경우 스크리닝 물질은 JHA로 탐색될 수 있다.

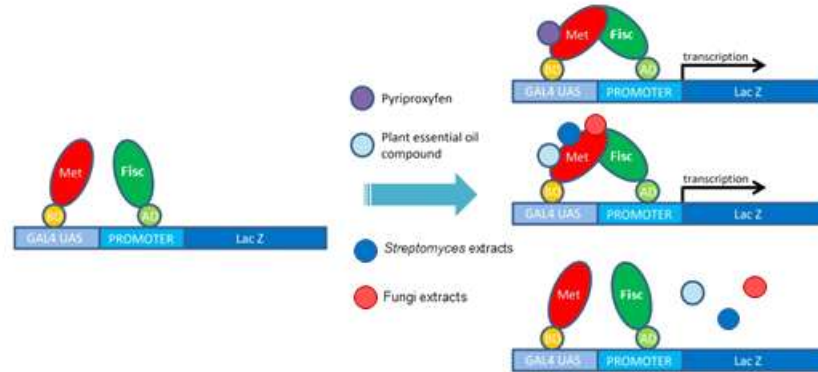


Fig. 11. Yeast two-hybrid system을 기반으로 한 JHA 활성 물질 탐색 모식도.

한편, JH 또는 JHA에 스크리닝 물질을 더 배합하여 위의 형질전환체를 배양하였을 때, 스크리닝 물질이 JHAN인지 여부에 따라 Met와 Fisc의 결합이 영향을 받을 수 있으며, 이를 통해 JHAN을 탐색할 수 있다. Fig. 12에서와 같이 Met과 Fisc로 형질전환된 형질전환체를 JHA인 파이리프로キシ펜과 스크리닝 물질의 존재 하에 배양하였을 때, Met과 Fisc가 결합하지 않아서 락지가 전사되지 않을 경우 스크리닝 물질은 JHAN으로 탐색될 수 있다.

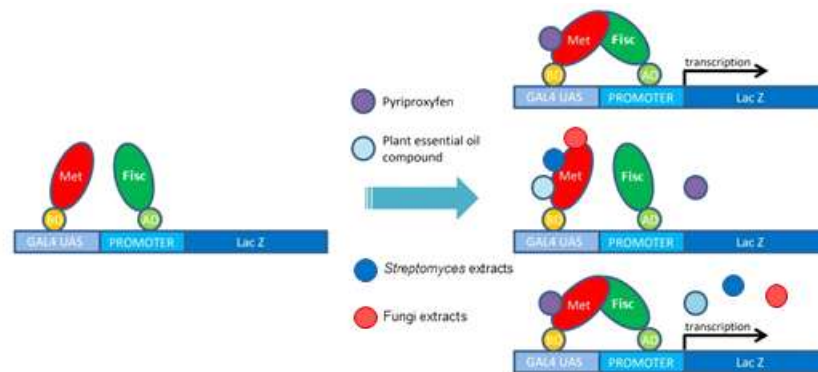


Fig. 12. Yeast two-hybrid system을 기반으로 한 JHAN 활성 물질 탐색 모식도.

(나) in vitro IGR 스크리닝 시스템 최적화

위에서 제작한 in vitro IGR 스크리닝 시스템을 이용하여 스크리닝 물질의 JHAN 활성을 측정함에 있어 Fig. 13에서는 JHA로 파이리프로キシ펜을 적용한 경우를

도시하였으나, JHⅢ 또는 파이리프록시펜 이외의 JHA를 사용한 경우에도 동일하게 적용될 수 있다. 하지만 JHⅢ는 구조적인 안정성이 다른 화합물에 비하여 떨어지는 것으로 알려져 있기 때문에 대량 스크리닝에 이용하기에 적합하지 않았다. 따라서 기존에 알려진 JHA에 대하여 in vitro IGR 스크리닝 시스템을 이용한 JHA 활성을 검정하였다 (Fig. 13). JHⅢ를 포함하여 총 7개의 JHA 물질에 대하여 다양한 농도로 JHA 활성을 검정한 결과, pyriproxyfen과 fenoxycarb의 경우에는 낮은 농도에서도 JHA 활성이 확인되는 반면 JHⅢ, methoprene 및 hydroprene의 경우에는 상대적으로 높은 농도에서 활성을 가지는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로, 10 ppm의 JHⅢ와 동일한 활성을 가지는 0.033 ppm의 pyriproxyfen을 JHA 활성 검정의 양성 대조구 및 JHAN 활성 검정을 위한 JHA로 선발하였다.

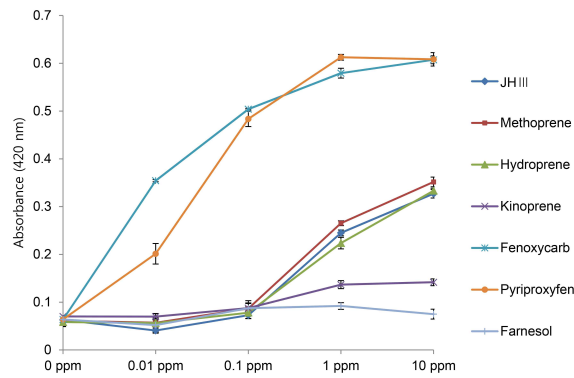


Fig. 13. 기존에 알려진 JHA 물질에 대한 JHA 활성 검정.

또한, 스크리닝 물질에 대한 JHA 및 JHAN 활성 검정을 위하여 다양한 물질에 대해 용해도가 높으며 스크리닝 시스템에 이용하는 yeast 세포의 성장에 영향을 주지 않는 DMSO (Dimethyl sulfoxide) 및 EtOH (Ethanol)을 스크리닝 시스템의 용매로 선정하였다. 본 연구에서는 JHA 및 JHAN 활성을 효율적으로 검정을 위하여 yeast β -galactosidase assay kit (Thermo scientific, USA)를 기반으로 하는 assay 방법 수정하였다 (Fig. 14). 기존에는 실온이나 37°C에서 색이 변하는 시점까지 관찰하는 것을 권장하고 있으나, 본 In vitro IGR 스크리닝 시스템에서는 JHA 및 JHAN 활성을 정량적으로 검정하기 위하여 yeast β -galactosidase assay solution을 처리 후 30°C에서 5시간 동안 정치하고 OD₄₂₀을 측정하였다.

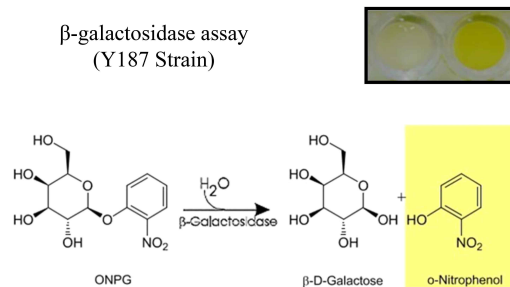


Fig. 14. in vitro IGR 스크리닝 시스템을 이용한 β -galactosidase assay.

(2) 식물 추출물 유래의 신규 IGR 물질 선발 및 특성 구명

(가) 식물 추출물 유래 화합물의 IGR 활성 검정

식물체 유래의 신규 IGR 물질을 탐색하기 위하여, 식물체 정유에서 유래한 180종의 화합물에 대하여 JHA 및 JHAN 활성을 검정하였다. 그 결과, 물질에 따라 다양한 JHA 및 JHAN 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 15). 그 중 JHA 또는 JHAN 활성이 우수한 화합물 17종을 선발할 수 있었으며, 이들은 구조적 유사성에 따라 4개의 그룹으로 분류할 수 있었다 (Fig. 16).

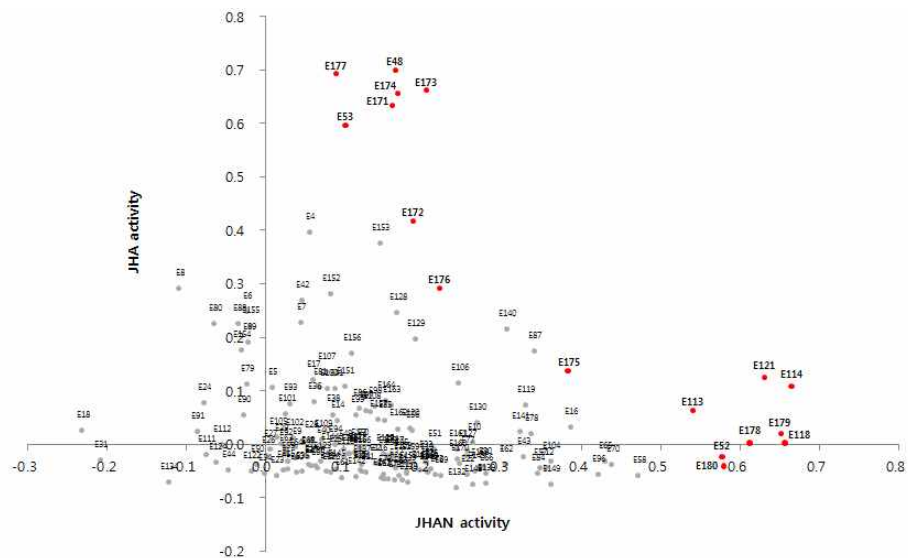


Fig. 15. 식물체 정유 유래 화합물의 JHA 및 JHAN 활성.

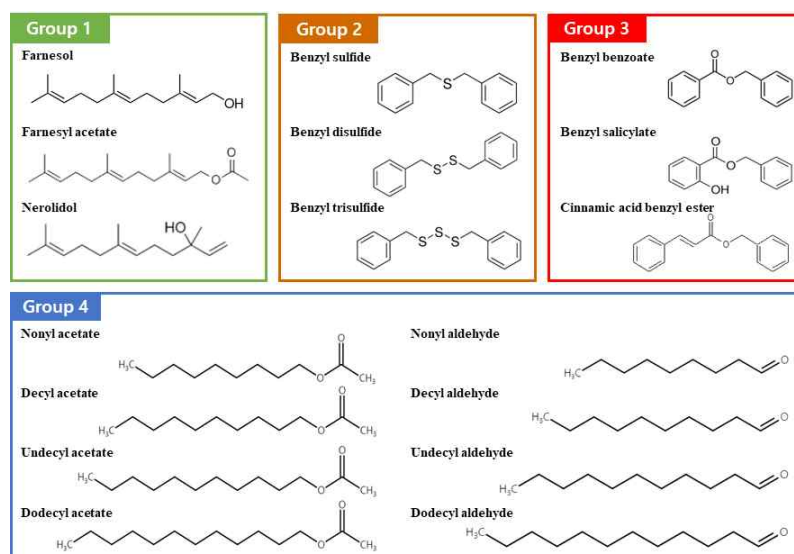


Fig. 16. IGR 활성을 보이는 식물체 정유 유래 화합물의 분류.

이렇게 선별한 17종의 식물체 정유 유래 화합물에 대하여 IGR 활성을 보다 자세히 검증하기 위하여 농도에 따른 JHA 및 JHAN 활성 검정을 수행하였다. 이를 위하여 선별한 화합물을 각각 0.01 ppm, 0.1 ppm, 1 ppm, 10 ppm의 농도로 희석하여 처리하였으며 활성 검정은 앞서와 동일한 방법으로 수행하였다.

그룹 1에 속하는 화합물의 경우 JH와 유사한 sesquiterpenoid계열의 화합물로 farnesol과 farnesyl acetate 및 nerolidol이 포함되었다. 이중 farnesol은 기존에 곤충의 repellent로 알려져 있었지만 본 연구에서는 농도가 증가할수록 높은 JHAN 활성을 가지는 것으로 나타났다 (Fig. 17). 이에 반해 farnesyl acetate는 농도 증가에 따라 JHA 활성이 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 17). Nerolidol의 경우에는 JHA인 pyriproxifen이 존재할 때는 JHAN 활성을 보이는데 반해 pyriproxifen이 없을 때는 JHA 활성을 보이는 것으로 나타났다 (Fig. 17).

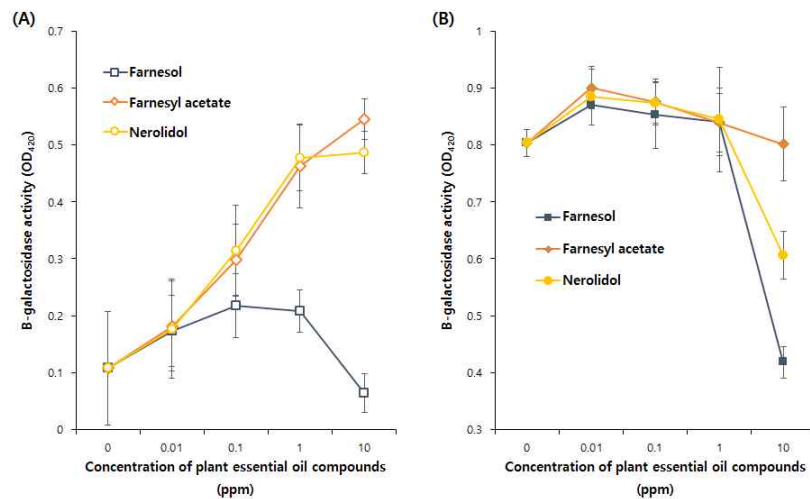


Fig. 17. 그룹 1에 속하는 식물체 정유 유래 화합물의 농도별 JHA (A) 및 JHAN (B) 활성.

그룹 2는 dibenzyl 기를 가지고 있는 화합물들로 benzyl sulfide, benzyl disulfide 및 benzyl trisulfide로 이루어져 있다. 그룹 2에 속하는 화합물들은 두 개의 benzyl 기 사이의 sulfide 개수가 증가함에 따라 JHA 활성이 증가하는 경향을 보였으며, benzyl sulfide만이 높은 농도에서 낮은 수준의 JHAN 활성을 보였다 (Fig. 18).

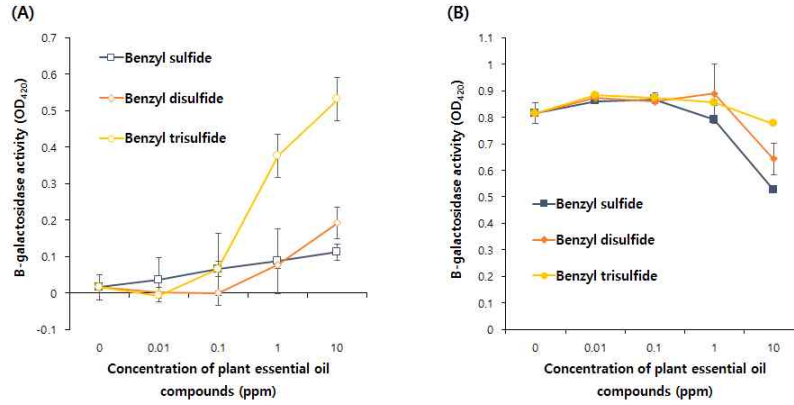


Fig. 18. 그룹 2에 속하는 식물체 정유 유래 화합물의 농도별 JHA (A) 및 JHAN (B) 활성.

그룹 3에 속하는 화합물은 dibenzyl 기를 가지고 있는 benzyl ester 화합물들로 benzyl benzoate, benzyl salicylate 및 cinnamic acid benzyl ester가 포함되었다. 이들 화합물들은 모두 JHA 활성을 보이지 않았으며 10 ppm의 농도에서 높은 JHAN 활성을 보였다. Cinnamic acid benzyl ester의 경우에는 1 ppm의 농도에서도 약간의 JHAN 활성을 보이는 것으로 나타났다 (Fig. 19).

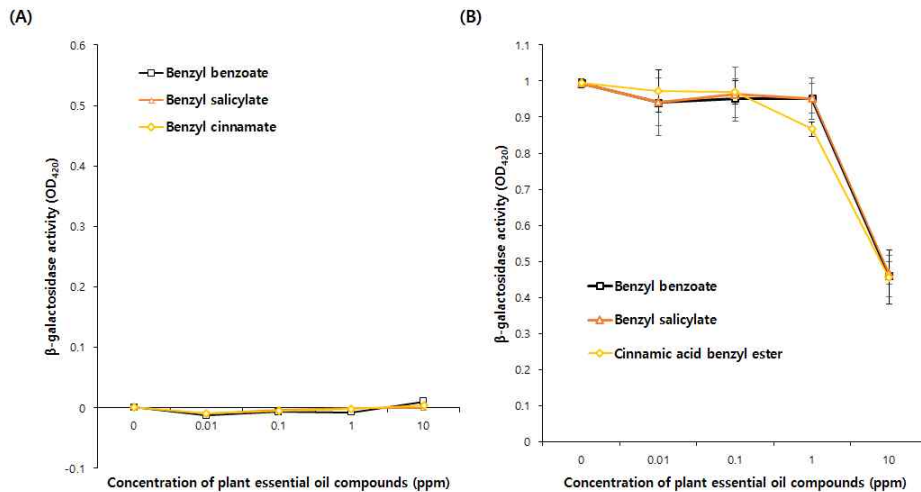


Fig. 19. 그룹 3에 속하는 식물체 정유 유래 화합물의 농도별 JHA (A) 및 JHAN (B) 활성.

그룹 4는 기존에 식물체에서 방향성 물질로 알려져 있는 화합물들로, 9~12개의 carbon으로 이루어진 acyclic alkyl side chain을 가지는 acetate 및 aldehyde로 이루어져 있다. 또한, 그룹 4의 화합물은 다른 그룹의 화합물에 비해 상대적으로 높은 JHA 또는 JHAN 활성을 보여주었다. 이 중 acetate의 경우 sesquiterpenoid 구조가 아니라는 점만 제외하면 JH와 동일한 acetate ester 구조를 가지고 있었으며, 이들은 모두 높은 JHA 활성을 나타내었다. 이에 반해 acetate의 ester 작용기가 aldehyde로 치환된 경우에는 JHA 활성은 사라지고 대신 높은 JHAN 활성을 보이는 것으로 나타났다 (Fig. 20).

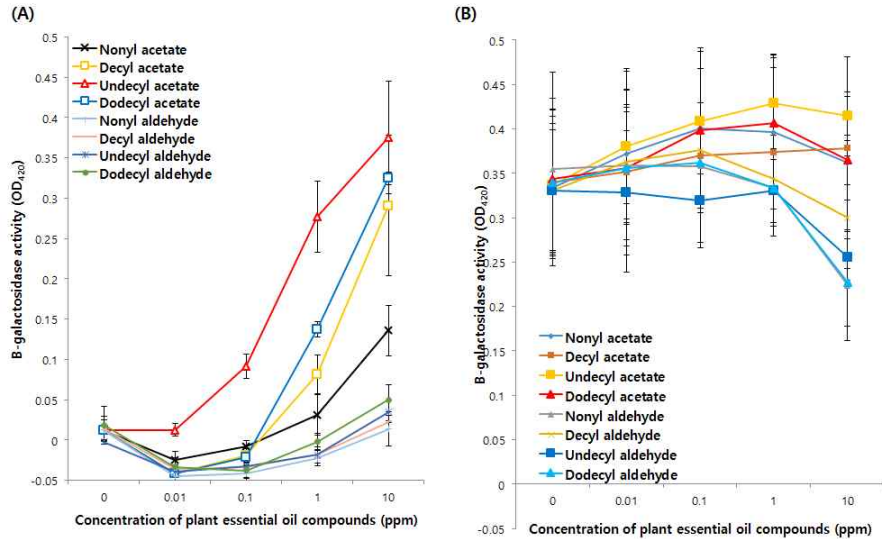


Fig. 20. 그룹 4에 속하는 식물체 정유 유래 화합물의 농도별 JHA (A) 및 JHAN (B) 활성.

식물체 정유 유래 화합물이 yeast에 독성을 가지고 있을 경우, JHAN 활성 측정법으로 측정된 OD₄₂₀ 값이 대상물질의 JHAN 활성에 기인한 것이 아니라 항이스트 활성에 기인한 것일 가능성이 있다. 따라서 선발된 식물체 정유 유래 화합물들을 대상으로 yeast에 대한 성장 저해 효과를 측정함으로써 항이스트 활성 여부를 확인하였다. 그 결과, 그룹 1, 2, 3 및 4에 속하는 화합물들은 항이스트 활성이 없는 것으로 나타났으며, 이를 통하여 IGR 활성 측정에서 나타난 JHAN 활성은 항이스트 활성에 의해 나타난 것이 아니라는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 21).

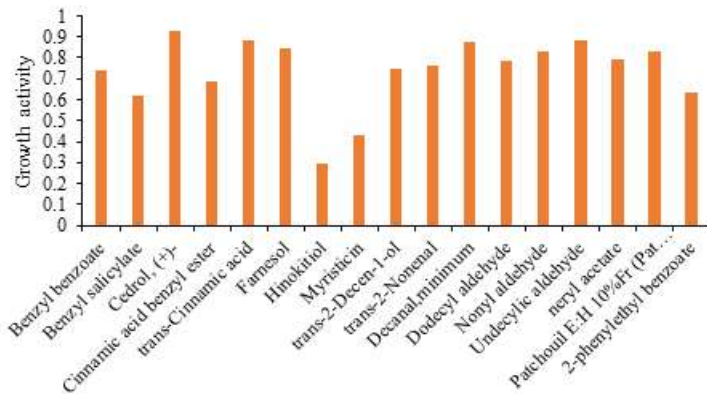


Fig. 21. 식물체 정유 유래 화합물의 항이스트 (anti-yeast) 활성.

(나) 식물 추출물 유래 IGR 화합물의 곤충 생리 활성

이집트 숲모기 암컷 성충의 우화 후 발달과정에서 전사조절자인 Hairy 유전자는 JH에 의해 발현이 조절되며, JHA와 JHAN은 Met과의 상호작용을 통하여 Hairy 유전자의 발현에 영향을 미치고, 이로 인하여 난소의 정상적인 발달을 저해하는 것으로 알려져 있다. JH와 유사한 sesquiterpenoid 계열의 화합물로 이루어진 그룹 1의 화합물 중, JHAN인 farnesol은 대조구로 사용된 acetone 처리구에 비해 Hairy

유전자의 발현을 억제하는 반면, JHA인 farnesyl acetate는 Hairy 유전자의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다 (Fig. 22).

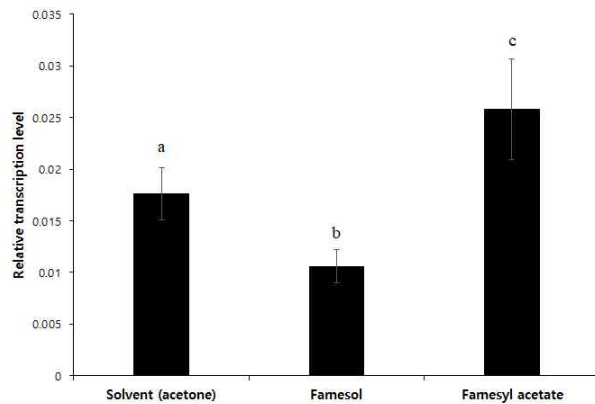


Fig. 22. 그룹 1에 속하는 식물체 정유 유래 화합물의 모기 유전자 발현에 대한 영향.

상대적으로 높은 JHA 또는 JHAN 활성을 보였던 그룹 4 화합물의 경우에도 JHA인 undecyl acetate 및 dodecyl acetate은 대조구인 pyriproxyfen과 마찬가지로 Hairy 유전자의 조기 발현을 유도하였으며, 그 발현량 역시 증가시키는 것으로 나타났다 (Fig. 23). 그에 반해 JHAN 활성을 가지는 undecyl aldehyde 및 dodecyl aldehyde은 Hairy 유전자의 발현을 억제하는 것으로 확인되었다 (Fig. 23).

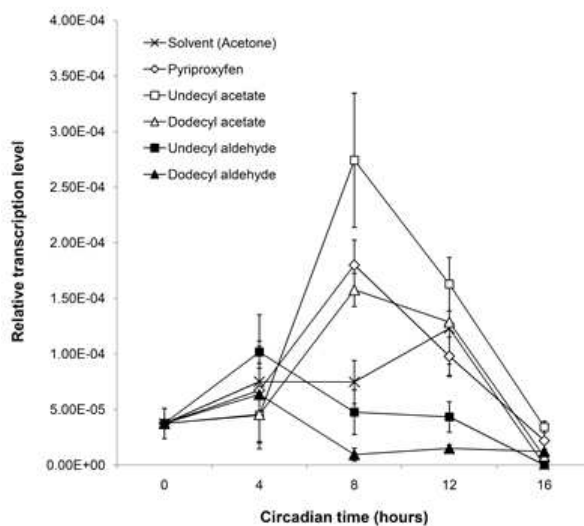


Fig. 23. 그룹 1에 속하는 식물체 정유 유래 화합물의 모기 유전자 발현에 대한 영향.

또한, 이들 물질은 처리 시점에 따라 암컷 성충 모기의 난소 발달을 저해하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 24 and 25). 혈중 유충호르몬의 농도가 높은 우화 직후에는 JHAN인 farnesol, undecyl aldehyde 및 dodecyl aldehyde가, 혈중 유충호르몬의 농도가 낮은 흡혈 직후에는 JHA인 farnesyl acetate, undecyl acetate 및 dodecyl acetate가 각각 난소 발달을 억제하는 것으로 나타났다. 이렇게 식물체 정유 유래

화합물에 의해 난소 발달이 저해된 경우 follicle의 크기도 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 26).

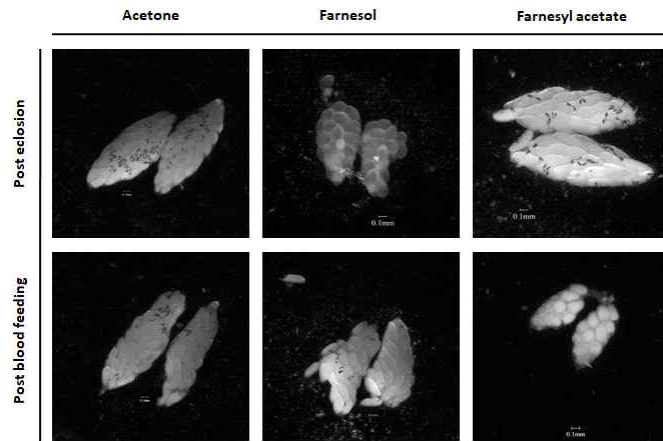


Fig. 24. 그룹 1에 속하는 식물체 정유 유래 화합물 처리에 따른 모기 난소 변화.

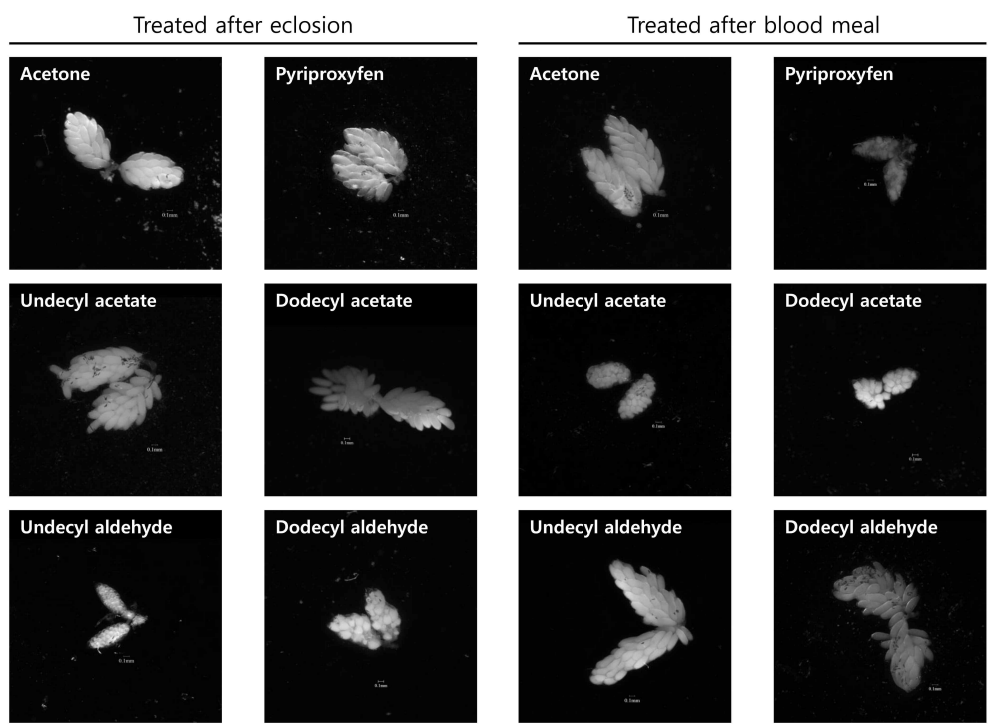


Fig. 25. 그룹 4에 속하는 식물체 정유 유래 화합물 처리에 따른 모기 난소 변화.

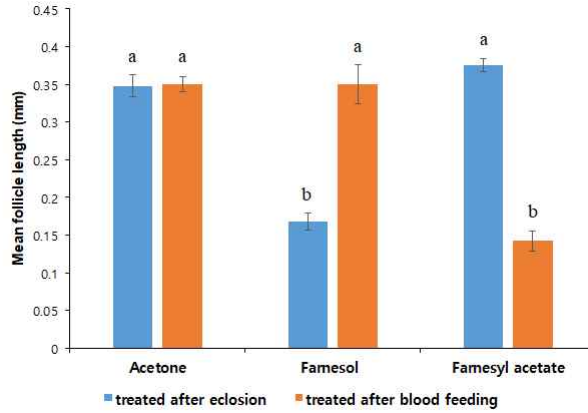


Fig. 26. 그룹 1에 속하는 식물체 정유 유래 화합물 처리에 따른 모기 follicle 크기.

(다) 식물 추출물 유래 IGR 화합물의 살충 활성

JHA 및 JHAN 활성 검정을 통하여 선발한 17종의 식물체 정유 유래 화합물을 대상으로 흰줄 숲모기 3령 유충에 대한 생물 검정을 수행하였다 (Fig. 27). 각 물질을 10 ppm의 농도로 처리하여 24시간 간격으로 3일 동안 살충 활성을 관찰한 결과, 그룹 2, 3 및 4에 속하는 7개의 화합물이 대조구인 pyriproxyfen과 유사하거나 우수한 살충 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 반면에, 그룹 1에 속하는 화합물들은 모기 유충에 대해서 매우 낮은 살충 활성을 보였다.

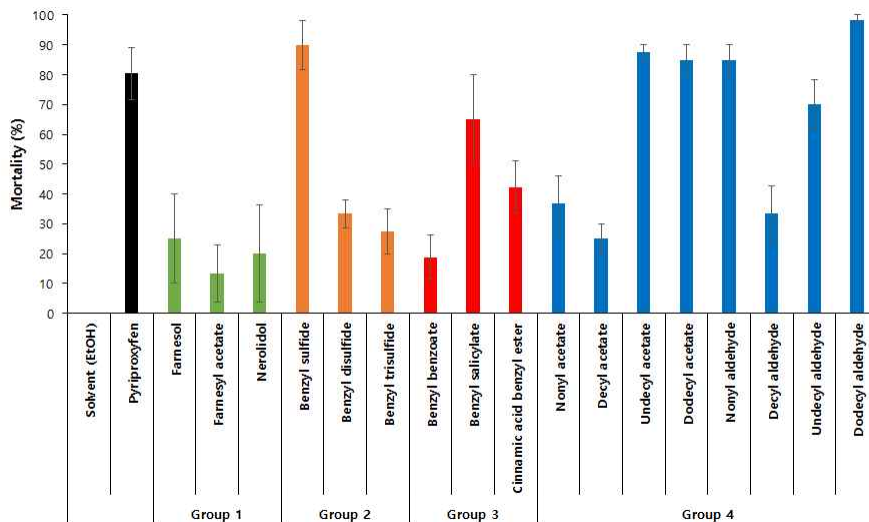


Fig. 27. 식물체 정유 유래 화합물의 흰줄 숲모기 3령 유충에 대한 살충 활성.

선발한 17종의 식물체 정유 유래 화합물 중 상대적으로 높은 JHA 또는 JHAN 활성을 보였던 그룹 4의 화합물에 대해서 모기 유충에 대한 살충 활성을 정량적으로 조사하였다. 그 결과, 4령 유충에 대해서는 JHA인 undecyl acetate 및 dodecyl acetate과 JHAN인 undecyl aldehyde 및 dodecyl aldehyde가 대조구인 pyriproxyfen과 유사한 수준의 살충 활성을 보였으나, 2령 유충에 대해서는 JHA인 undecyl acetate, dodecyl acetate 및 pyriproxyfen에 비하여 JHAN인 undecyl

aldehyde 및 dodecyl aldehyde가 6.6-58.4배 높은 살충 활성을 보이는 것으로 나타났다 (Table 3). 이러한 결과는 JHA보다는 JHAN 활성 물질이 해충의 유충 방제에 더 효과적으로 사용 될 수 있음을 시사하였다.

Table 3. 식물체 정유 유래 화합물의 모기 유충에 대한 정량적 살충 활성.

	2nd instar		4th instar	
	LC ₅₀ (ppm)	95% Fiducial limits	LC ₅₀ (ppm)	95% Fiducial limits
Pyriproxyfen	1.25	0.78-2.01	9.7	6.6-14.2
Undecyl acetate	4.70	1.99-11.02	15.2	11.0-20.9
Dodecyl acetate	7.01	2.46-20.09	24.0	17.3-33.4
Undecyl aldehyde	0.12	0.06-0.21	35.3	21.8-57.4
Dodecyl aldehyde	0.19	0.16-0.23	14.4	10.1-20.5

모기 성충에 대해서는 undecyl acetate와 undecyl aldehyde가 처리 후 72시간에 100%의 살충 활성을 보였으며, 특히 undecyl aldehyde의 경우에는 처리 후 24시간에 60%의 모기 성충이 치사할 정도로 빠른 살충 활성을 보였다 (Fig. 28). 이러한 결과는 본 연구에서 탐색한 신규 IGR 물질이 유충의 방제뿐만 아니라 성충의 방제에도 효과적으로 이용될 수 있음을 시사하였다.

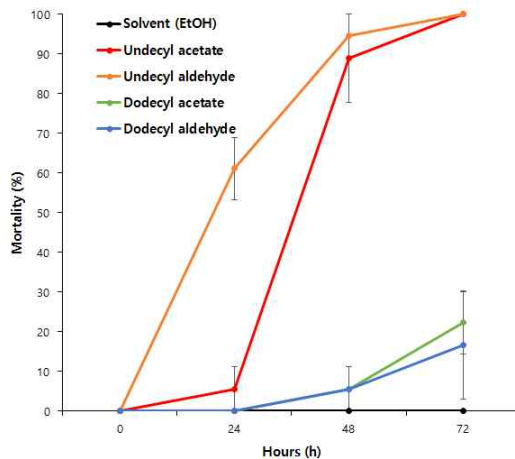


Fig. 28. 식물체 정유 유래 화합물의 흰줄숲모기 성충에 대한 살충 활성.

배추좀나방의 경우, 3령 유충에 각각의 화합물을 200 ppm의 농도로 direct dipping 방법으로 처리하고 24시간 간격으로 3일 동안 유충의 치사율을 확인한 결과, 그룹 4에 속하는 undecyl aldehyde가 90% 이상의 높은 살충 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 29). 그 외에 benzyl sulfide, benzyl salicylate, nonyl acetate, decyl acetate 및 undecyl acetate도 대조구인 pyriproxyfen보다 우수한 살충 활성을 가지는 것으로 나타났다.

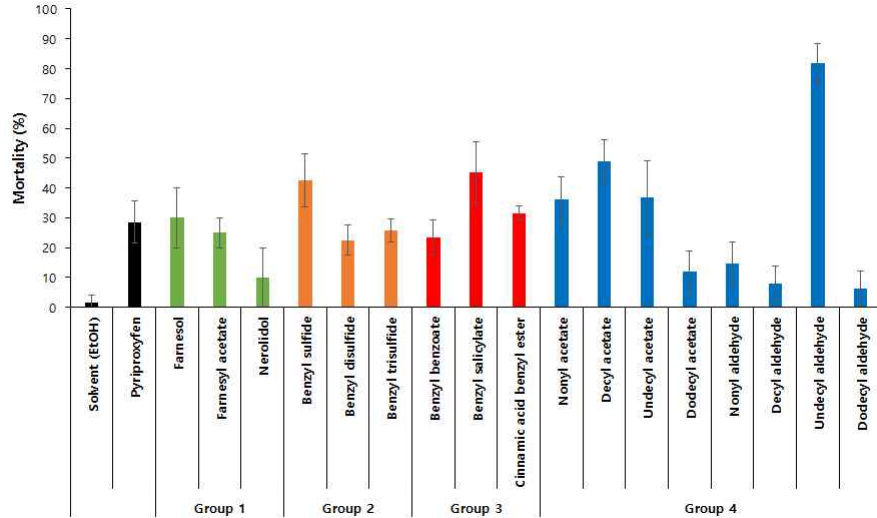


Fig. 29. 식물체 정유 유래 화합물의 배추좀나방 유충에 대한 살충 활성.

화랑곡나방 2령 유충에 각각의 화합물을 200 ppm의 농도로 처리하고 24시간 간격으로 3일 동안 유충의 치사율을 확인한 결과, nerolidol이 약 80%의 높은 살충 활성을 보였다 (Fig. 30). 화랑곡나방 알의 경우에는 대조구인 fenoxycarb과 pyriproxyfen 처리구에서는 0%의 부화율을 보인 반면, 식물체 정유 화합물 중에선 undecyl acetate 처리구에서만 약 20%의 낮은 부화율을 보여주었으며, 나머지 화합물들은 화랑곡나방 알의 부화율에 영향을 거의 미치지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 31).

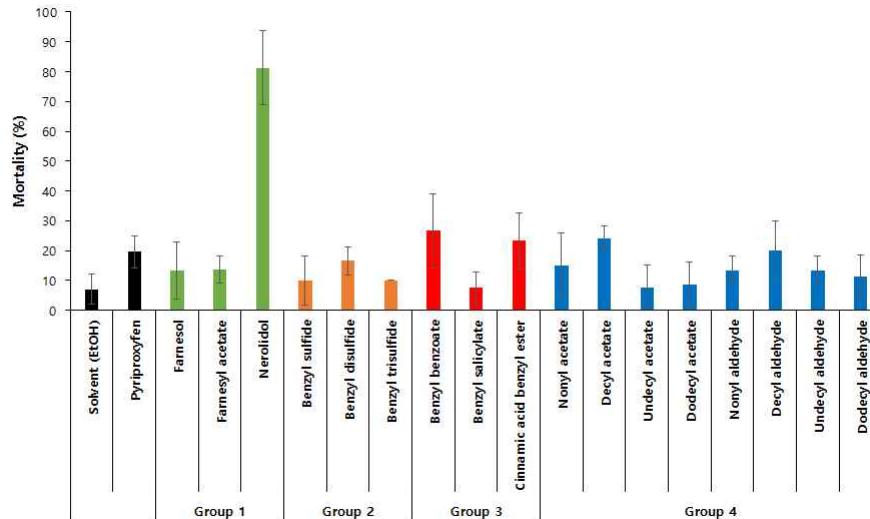


Fig. 30. 식물체 정유 유래 화합물의 화랑곡나방 유충에 대한 살충 활성.

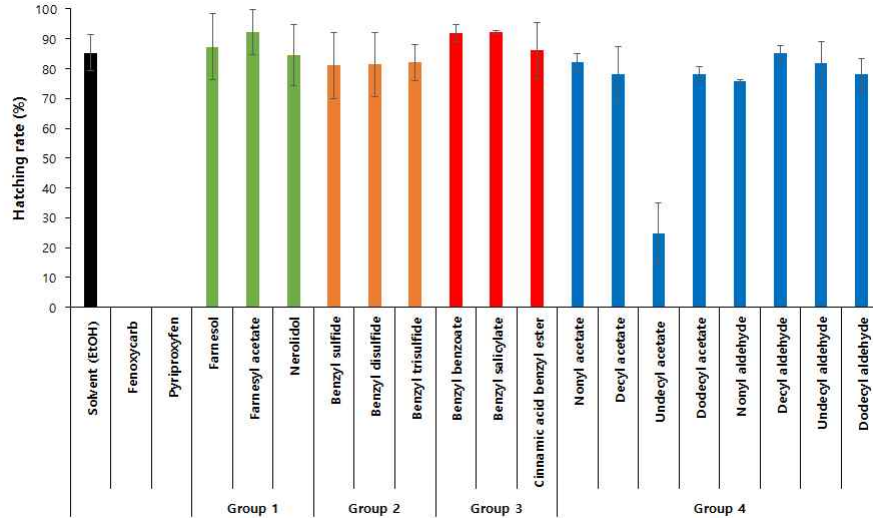


Fig. 31. 식물체 정유 화합물의 화랑곡나방 알의 부화에 대한 영향.

옥수수 조명나방 3령 유충에 각 화합물을 200 ppm의 농도로 처리하고 24시간 간격으로 3일 동안 유충의 치사율을 확인한 결과, 전체적으로 다 낮은 살충성을 보였으며 dodecyl aldehyde가 30%로 가장 높은 살충활성을 보이는 것으로 나타났다 (Fig. 32).

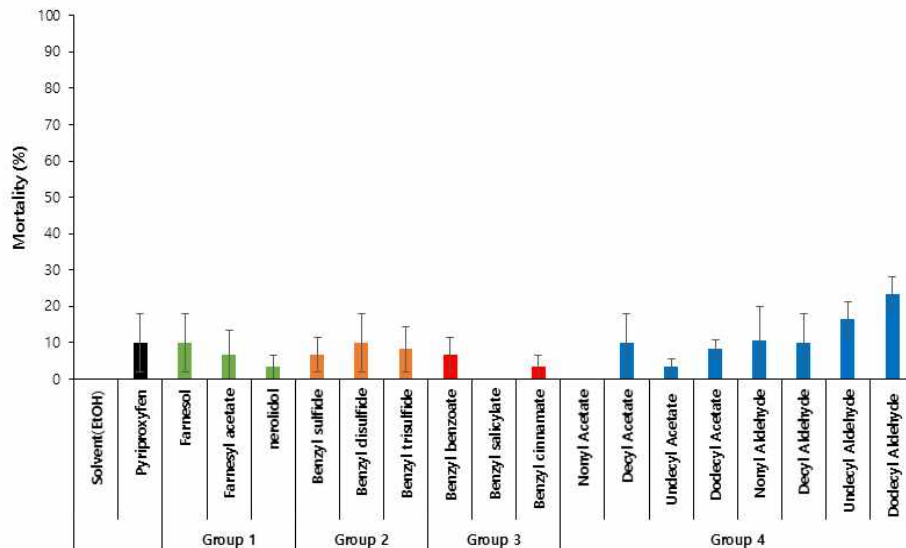


Fig. 32. 식물체 정유 유래 화합물의 옥수수 조명나방 유충에 대한 살충활성.

대표적인 흡습 해충인 애벌구의 경우에는, 3령 약충에 각 화합물을 200 ppm의 농도로 처리하고 24시간 간격으로 3일 동안 유충의 치사율을 확인한 결과, 전체적으로 살충 활성이 낮은 것으로 나타났으며, farnesyl acetate와 decyl acetate가 50% 내외의 살충 활성을 보여주었다 (Fig. 33).

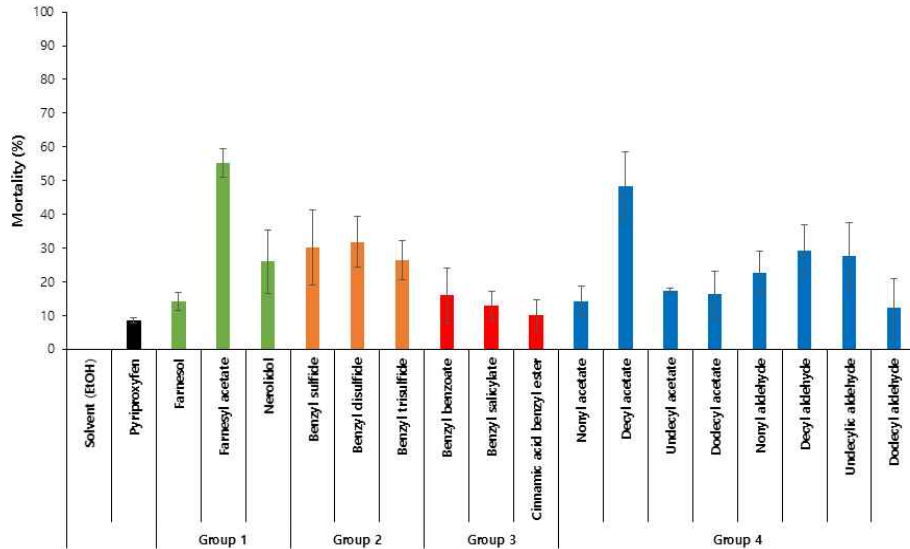


Fig. 33. 식물체 정유 유래 화합물의 애벌레 약충에 대한 살충 활성.

소나무재선충을 대상으로 식물체 정유 화합물의 살선충 활성을 확인한 결과, 그룹 2의 benzyl sulfide, benzyl disulfide 및 benzyl trisulfide가 높은 살선충 활성을 보이는 것을 확인하였고, dodecyl aldehyde도 높은 살선충 활성을 보이는 것으로 나타났다 (Fig. 34).

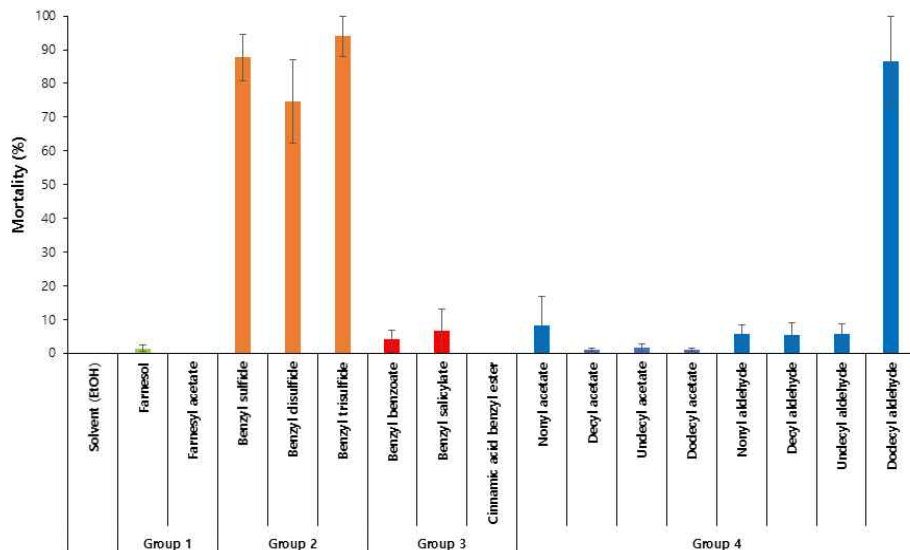


Fig. 34. 식물체 정유 유래 화합물의 소나무재선충에 대한 살선충 활성.

(3) 곰팡이 유래의 신규 IGR 물질 선발 및 특성 구명

(가) 곰팡이 추출물의 IGR 활성

국내 토양에서 채집한 총 189개의 곰팡이 균주의 추출물에 대한 JHA 및 JHAN 활성을 검정한 결과, 189개의 추출물 모두 JHA 활성은 거의 보이지 않는 반면, 총

14개의 균주 추출물에서 높은 수준의 JHAN 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 35). 높은 수준의 JHAN 활성을 보인 14개의 곰팡이 균주는 Table 4와 같으며, 이들은 2000 ppm의 농도에서 0.4 이상의 JHAN 활성을 가지는 것으로 나타났다 (Fig. 36). 또한, 이들 추출물은 모두 항이스트 활성을 보이지 않음으로써, IGR 활성 검정에서 나타난 JHAN 활성은 항이스트 활성에 의해 나타난 것이 아니라는 것을 확인할 수 있었다.

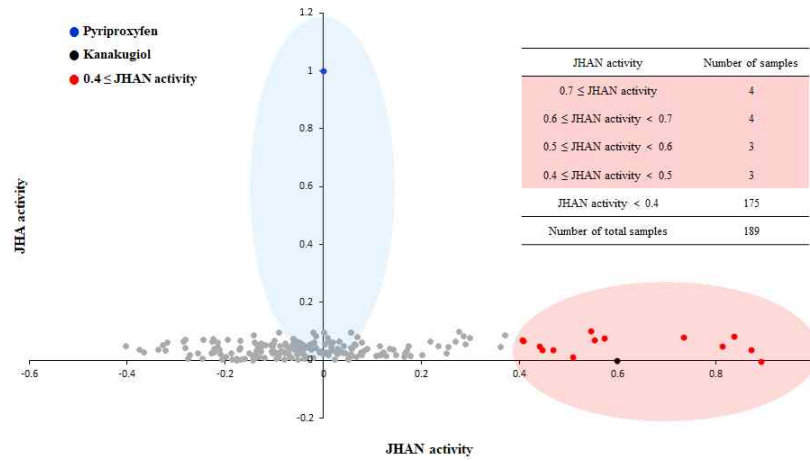


Fig. 35. 곰팡이 추출물의 JHA 및 JHAN 활성 검정.

Table 4. JHAN 활성을 가지는 곰팡이 균주 목록.

No.	균주명	No.	균주명
F-8	<i>Bearuveria bassiana</i>	F-143	<i>Aspergillus versicolor</i>
F-12	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-145	<i>Lecanicillium sp.</i>
F-26	<i>Bearuveria bassiana</i>	F-151	<i>Paecilomyces carneus</i>
F-51	<i>Metarhizium anisopliae</i>	F-169	<i>Aspergillus lentutus</i>
F-58	<i>Pochonia bulbillosa</i>	F-170	<i>Aspergillus lentutus</i>
F-94	<i>Metarhizium lepidiotae</i>	F-175	<i>Myrothecium sp.</i>
F-110	<i>Myrothecium sp.</i>	F-182	<i>Lecanicillium sp.</i>

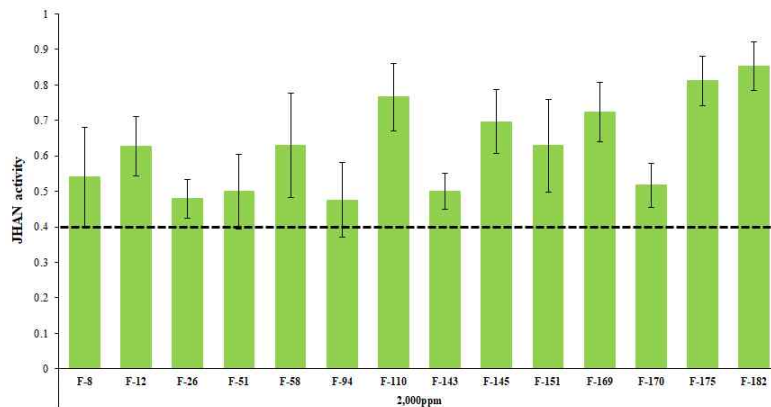


Fig. 36. 곰팡이 추출물의 JHAN 활성.

(나) 곰팡이 추출물의 살충 활성

JHAN 활성 검정을 통하여 선발한 14종의 곰팡이 추출물을 대상으로 흰줄 숲모기 3령 유충에 대한 생물 검정을 수행하였다 (Fig. 37). 각 추출물을 1,000 ppm의 농도로 처리하여 24시간 간격으로 3일 동안 살충 활성을 관찰한 결과, F-94 및 F-145 2개의 균주 추출물이 가장 높은 살충 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

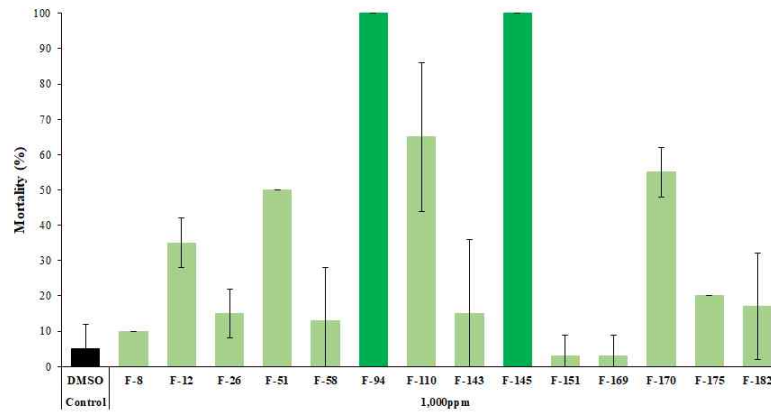


Fig. 37. 곰팡이 추출물의 흰줄 숲모기 유충에 대한 살충 활성.

배추좀나방의 경우, 3령 유충에 2,000 ppm의 곰팡이 추출물을 처리한 잎을 공급하고 24시간 간격으로 3일 동안 유충의 치사율을 확인한 결과, 14개의 곰팡이 추출물 중 F-145 추출물이 약 70%로 가장 높은 살충 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 38).

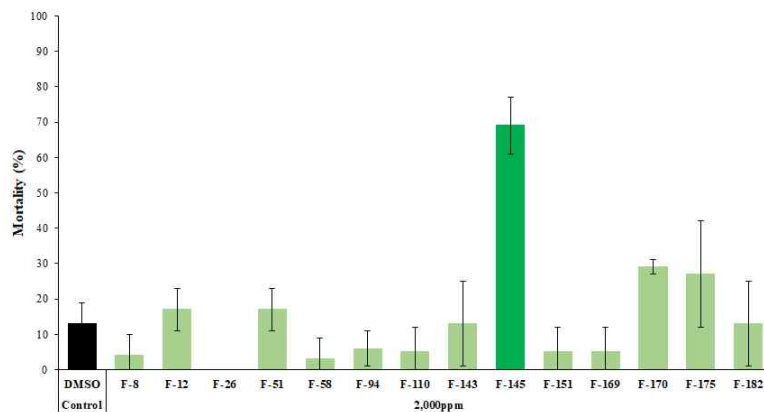


Fig. 38. 곰팡이 추출물의 배추좀나방 유충에 대한 살충 활성.

파밤나방과 화랑곡나방 3령 유충에 대해서는 2,000 ppm의 농도에서 14개의 곰팡이 추출물 모두 살충 활성이 거의 없거나 미미한 것으로 나타났다 (Fig. 39 and 40).

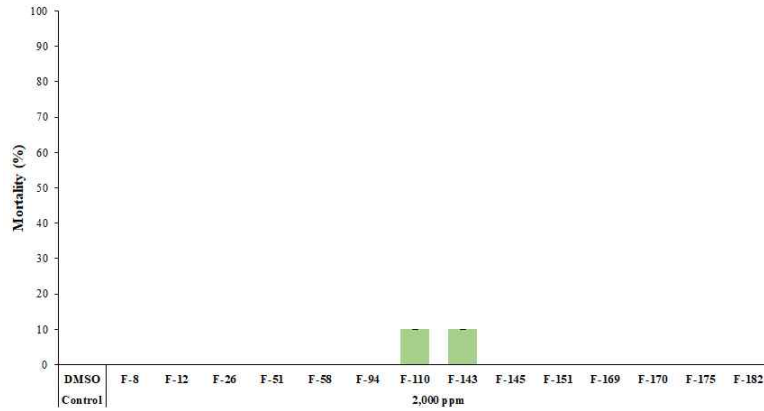


Fig. 39. 곰팡이 추출물의 파밤나방 유충에 대한 살충 활성.

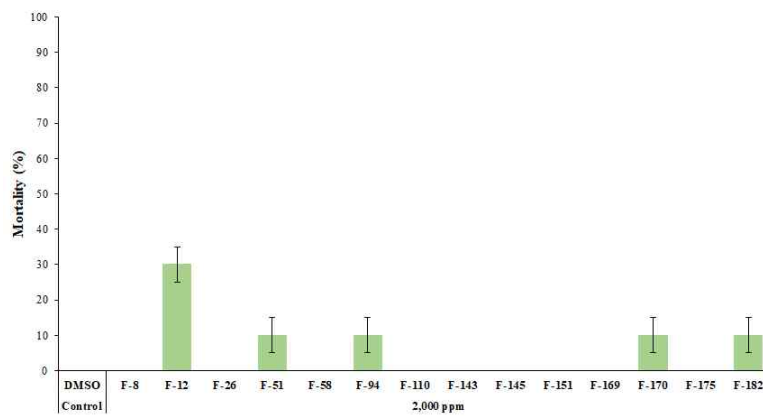


Fig. 40. 곰팡이 추출물의 화랑곡나방 유충에 대한 살충 활성.

옥수수조명나방의 경우, 1령 유충에 2,000 ppm의 곰팡이 추출물을 처리하고 24시간 간격으로 3일 동안 유충의 치사율을 확인한 결과, 14개의 곰팡이 추출물 모두 살충 활성이 40 % 미만으로 미미한 것으로 나타났다 (Fig. 41).

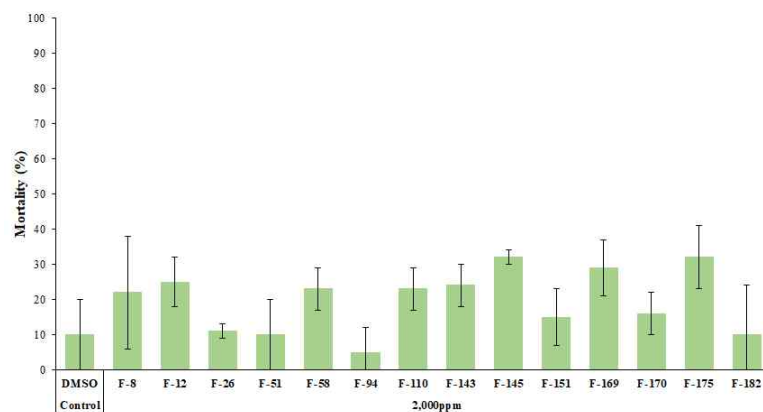


Fig. 41. 곰팡이 추출물의 옥수수조명나방 유충에 대한 살충 활성.

애멸구 약충을 대상으로 곰팡이 추출물의 살충 활성을 확인한 결과, F-58 및

F-182의 2개의 균주 추출물이 50%에 가까운 살충율을 보이는 것으로 나타났다 (Fig. 42).

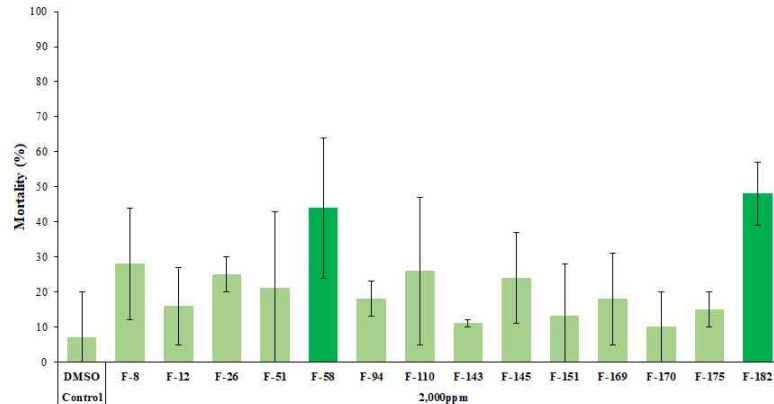


Fig. 42. 곰팡이 추출물의 애벌레 약충에 대한 살충 활성.

(다) 선발 곰팡이 균주의 특성구명

앞서의 결과에서 우수한 JHAN 활성을 가지면서 모기 및 배추좀나방에 대하여 높은 살충 활성을 보인 F-145 곰팡이 균주에 대하여 균주 동정 및 살충활성 평가를 수행하였다.

F-145 균주의 형태학적 동정을 위해 성장상 조사 및 SEM 515 scanning electron microscopy를 수행하였다. 배지 증식상 및 위상차 현미경 관찰을 통해 균총의 색과 spore의 크기 및 형태를 확인하였다 (Fig. 43). 또한, 주사현미경 관찰을 통하여 spore가 균사와 응집한 모양을 하고 있는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 44). 이러한 결과를 기존의 보고와 비교한 결과, F-145 균주는 *Lecanicillium* 속에 속하는 것으로 추정되었다.

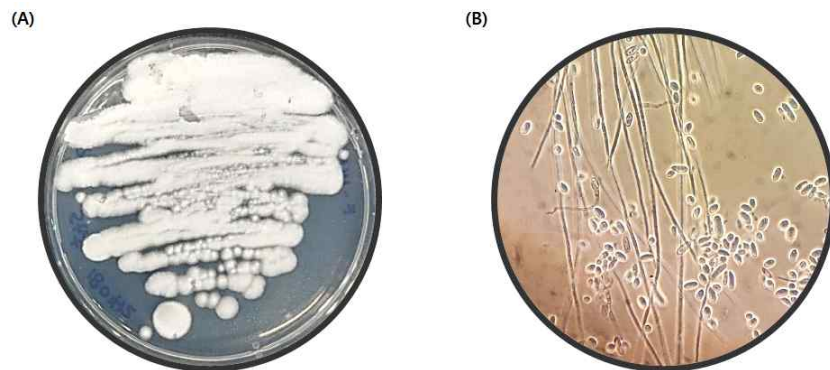


Fig. 43. F-145 곰팡이 균주의 배지 증식상 (A) 및 위상차 현미경 관찰 (B).

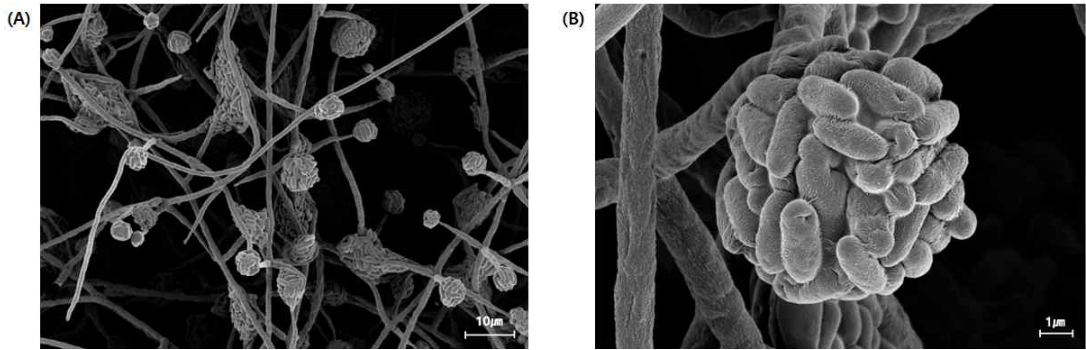


Fig. 44. F-145 곰팡이 균주의 주사현미경 관찰.

또한, ITS1과 ITS4 primer를 이용하여 F-145 균주의 genomic DNA로부터 internal transcribed spacer (ITS1-5.8s-ITS2) 부분을 PCR 증폭하여 염기서열을 분석한 결과, 형태학적 동정 결과와 마찬가지로 F-145 균주는 *Lecanicillium attenuatum*인 것으로 확인되었다 (Fig. 45).

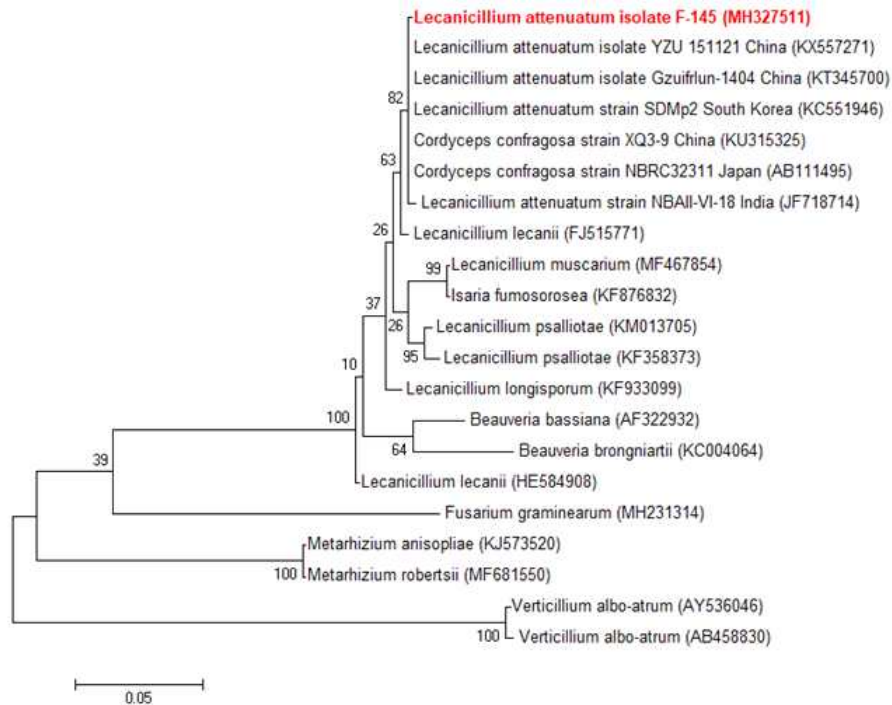


Fig. 45. F-145 곰팡이 균주의 계통분석.

F-145 균주의 흰줄 숲모기 유충에 대한 살충활성을 보다 자세히 알아보기 위하여 유충 령별 살충활성 및 3령 유충에 대한 정량 살충활성을 검정하였다. F-145 균주 추출물을 200 ppm의 농도로 처리하여 24시간 간격으로 3일 동안 살충 활성을 관찰한 결과, 유충의 령기가 높아질수록 살충 활성은 낮아지는 것을 확인하였으며 2령 및 3령의 경우 약 50%로 비슷한 수준의 살충 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 46). 또한, F-145 균주 추출물의 흰줄숲모기 3령 유충에 대한 LC₅₀ 값은 188.09

µg/ml인 것으로 나타났다 (Table 5).

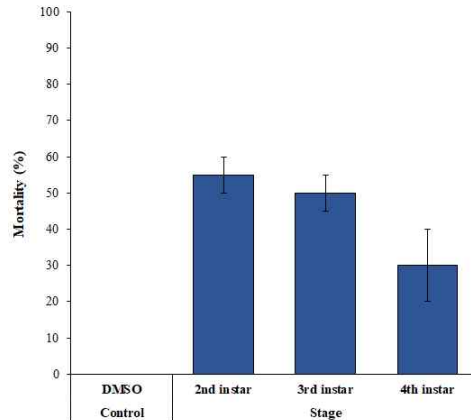


Fig. 46. F-145 균주 추출물의 흰줄 숲모기 유충에 대한 령기별 살충 활성.

Table 5. F-145 균주의 흰줄 숲모기 3령 유충에 대한 정량적 살충 활성.

3th instar		
	LC ₅₀ (µg/ml)	95% Fiducial limits
F-145	188.09	143.95~224.77

(라) 선발 곰팡이 균주의 배지별 IGR 활성 및 살충 활성

F-145 균주의 배양 배지에 따른 추출물의 활성 변화를 확인하기 위하여, 액체 및 고체 배지 조건에서 각각 배양한 F-145 균주의 추출물을 대상으로 JHA 및 JHAN 활성을 검정한 결과, 앞선 결과와 마찬가지로 JHA 활성은 보이지 않는 반면 (Fig. 47A), 2,000 ppm의 농도에서 0.6 이상의 JHAN 활성을 가지는 것으로 나타났다 (Fig. 47B). 또한, 액체 배양의 조건에서 균사체보다는 배양액에서 더 높은 JHAN 활성을 보임으로써 JHAN 활성 물질은 균사체 외부로 방출되는 것으로 추정되었다.

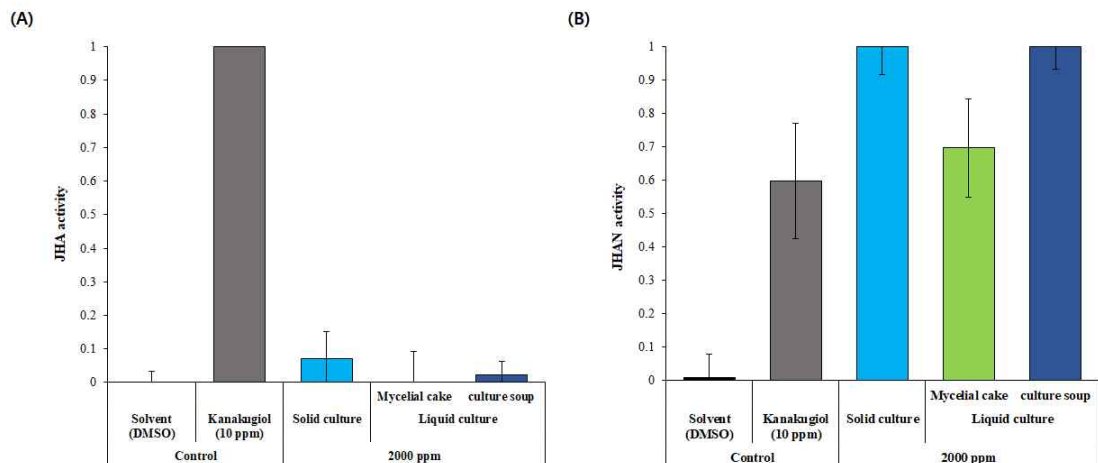


Fig. 47. F-145 균주의 배양 배지별 JHA (A) 및 JHAN 활성 (B).

F-145 균주의 배양 배지별 추출물을 대상으로 흰줄숲모기 및 배추좀나방 유충에 대한 생물 검정을 수행하였다. 흰줄숲모기 3령 유충을 대상으로 각 추출물을 2,000 ppm의 농도로 처리하여 24시간 간격으로 3일 동안 사충율을 조사한 결과, 고체 배양 추출물 및 액체 배양의 배양액 추출물에서 100%의 살충 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 48A). 이러한 결과는 JHAN 활성 검정에서와 마찬가지로 액체 배양의 균사체 추출물보다는 배양액 추출물에 JHAN 및 살충 활성 물질이 존재한다는 것을 시사하였다.

배추좀나방의 경우, 3령 유충에 2,000 ppm의 곰팡이 추출물을 처리한 잎을 공급하고 24시간 간격으로 3일 동안 유충의 치사율을 확인하였다. 그 결과, 현미 고체 배양 조건의 추출물은 약 70%로 높은 수준의 살충 활성을 보이는 반면, 액체 배양 조건의 추출물은 배양액과 균사체 모두 살충 활성이 미미한 것으로 나타났다 (Fig. 48B). 이러한 결과는 F-145 균주는 배양 배지에 따라 다양한 JHAN 및 살충 활성을 가지는 두 개 이상의 물질을 생산하기 때문인 것으로 추정되었다.

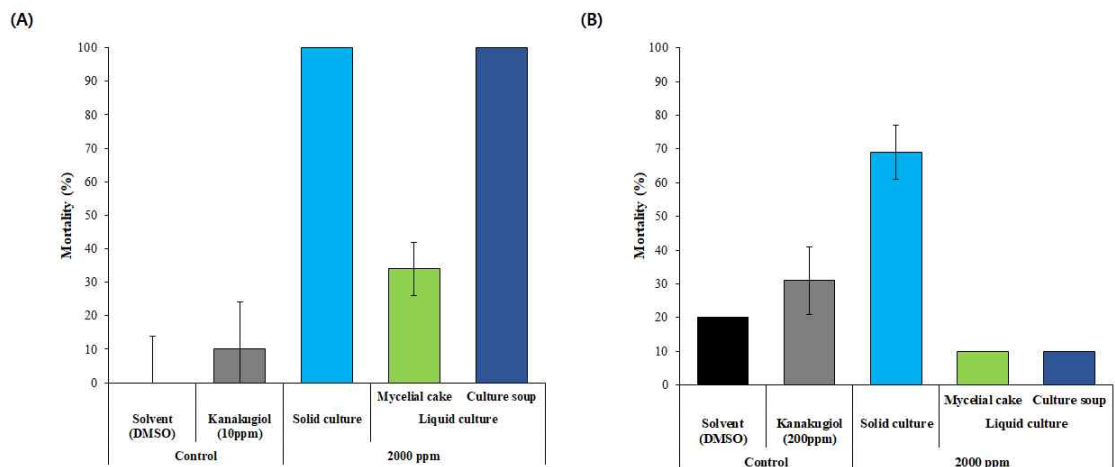


Fig. 48. F-145 균주의 배양 배지별 살충 활성. (A) 흰줄 숲모기, (B) 배추좀나방.

(4) 방선균 유래의 신규 IGR 물질 선발 및 특성 구명

(가) 방선균 유래 추출물의 IGR 활성

방선균 유래의 신규 IGR 물질을 탐색하기 위하여, 총 363개 방선균 균주의 배양체 추출물에 대하여 JHA 및 JHAN 활성을 검정하였다. 그 결과, 363개의 방선균 추출물 모두 JHA 활성은 보이지 않는 반면 (Fig. 49A), 총 9개의 방선균 추출물이 높은 수준의 JHAN 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 49B). 또한, 이들 추출물을 대상으로 항 이스트 활성검정을 확인한 결과 9개의 추출물 모두 항 이스트활성이 나타나지 않아 JHAN 활성이 항 이스트 활성에 의한 것이 아님을 확인하였다. 높은 수준의 JHAN 활성을 보인 9개의 방선균 추출물은 2000 ppm의 농도에서 0.7 이상의 JHAN 활성을 가지는 것으로 나타났다 (Fig. 50).

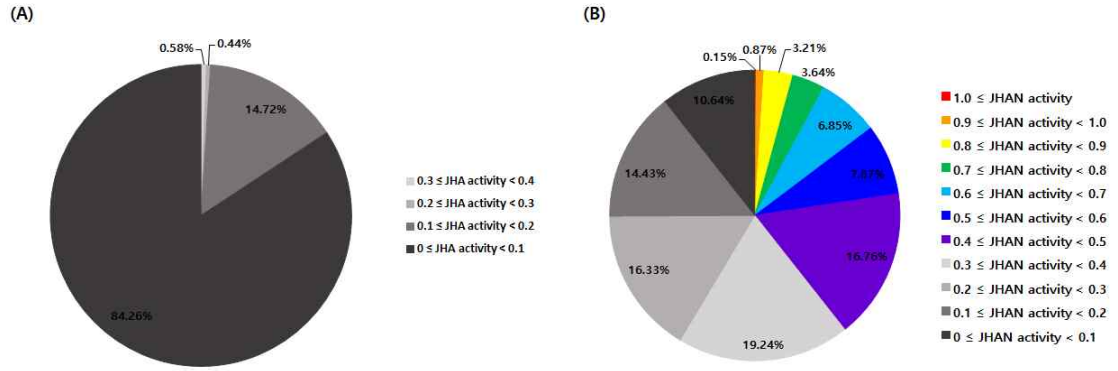


Fig. 49. 방선균 배양체 추출물의 JHA (A) 및 JHAN 활성 (B).

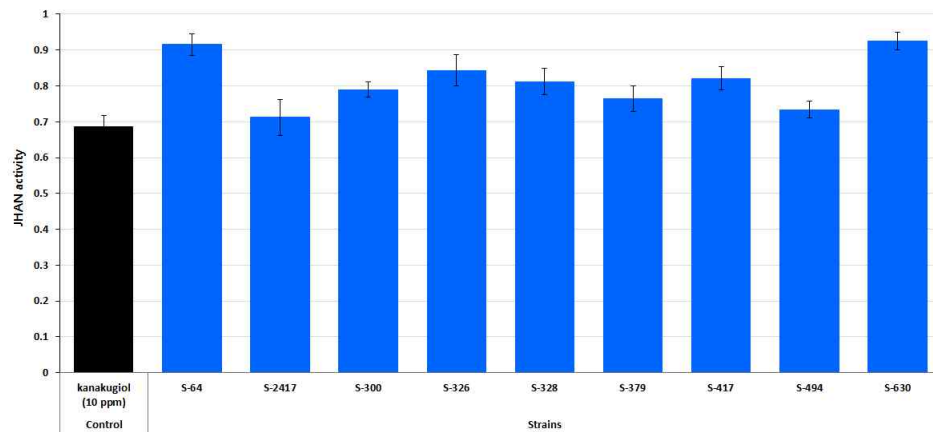


Fig. 50. 방선균 배양체 추출물의 JHAN 활성.

(나) 방선균 유래 추출물의 살충 활성 검정

JHA 및 JHAN 활성 검정을 통하여 선발한 9종의 방선균 배양체 추출물을 대상으로 흰줄숲모기, 배추좀나방 및 애멸구에 대한 생물 검정을 수행하였다. 각각의 방선균 균주 추출물을 흰줄숲모기 3령 유충에 처리하여 24시간 간격으로 3일 동안 살충 활성을 관찰한 결과, S-328, S-379 및 S-630의 총 3개 방선균 배양체 추출물이 70% 이상의 살충율로 우수한 살충 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 51).

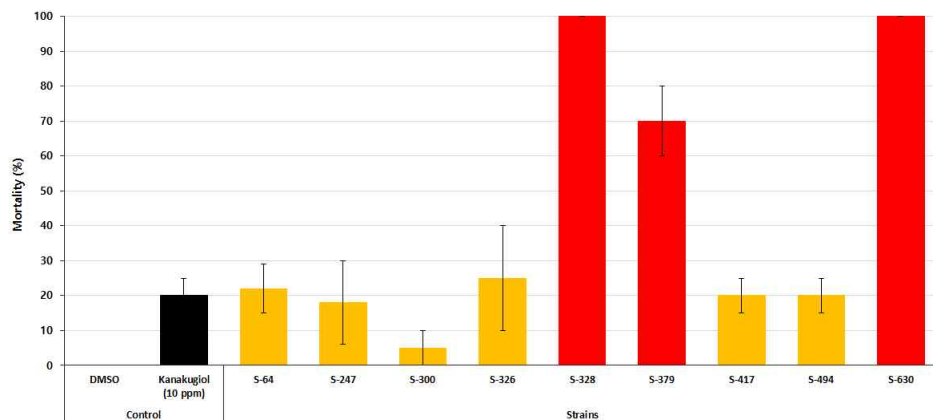


Fig. 51. 방선균 배양체 추출물의 흰줄숲모기 3령에 대한 살충 활성.

배추좀나방의 경우, 3령 유충에 각각의 추출물을 direct dipping 방법으로 처리하고 24시간 간격으로 3일 동안 유충의 치사율을 확인하였다. 그 결과, S-630 균주 배양체 추출물이 100%의 높은 살충 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 52).

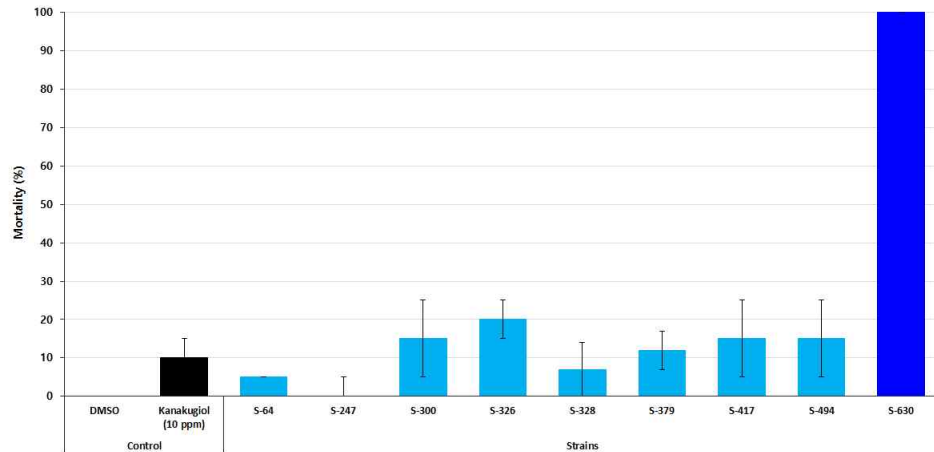


Fig. 52. 방선균 배양체 추출물의 배추좀나방 3령 유충에 대한 살충 활성.

대표적인 흡즙 해충인 애벌구의 경우에는, 3령 약충에 각 추출물을 direct dipping 방법으로 처리하고 24시간 간격으로 3일 동안 유충의 치사율을 확인한 결과, 전체적으로 살충 활성이 낮은 것으로 나타났으나, S-630 균주 배양체 추출물의 경우에는 약 65%로 비교적 높은 살충 활성이 나타나는 것을 확인하였다 (Fig. 53).

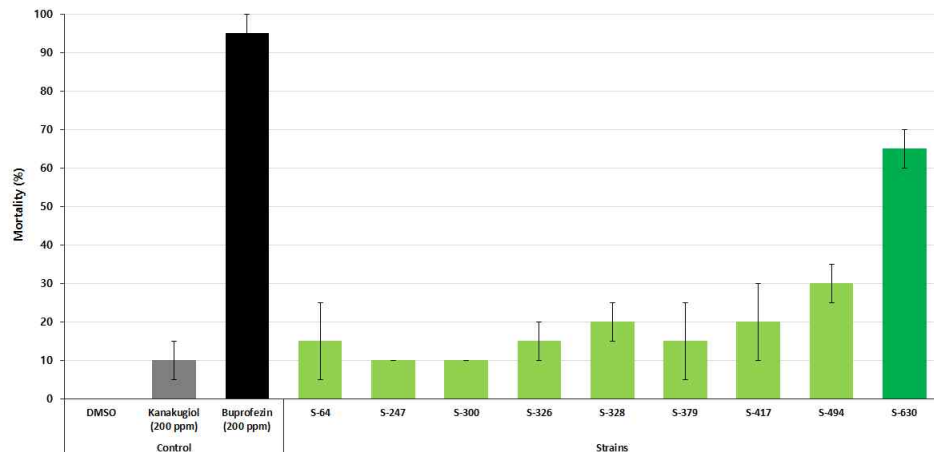


Fig. 53. 방선균 배양체 추출물의 애벌구 약충에 대한 살충 활성.

(다) 선발 방선균 균주의 특성구명

앞서의 결과에서 우수한 JHAN 및 살충 활성을 보인 S-630 방선균 균주에 대하여 배양체 추출물의 안정성을 검정하기 위하여 온도, pH 및 배양 부피에 따른 JHAN 활성 검정을 수행하였다. 그 결과, S-630 균주의 배양체 추출물은 100°C의 고온 및

pH4~10의 조건에서도 JHAN 활성이 유지되는 것을 확인하였다 (Fig. 54). 또한, S-630 균주가 생산하는 JHAN 활성 물질은 배양 scale에 따른 영향이 크게 없는 것으로 나타났다 (Fig. 54).

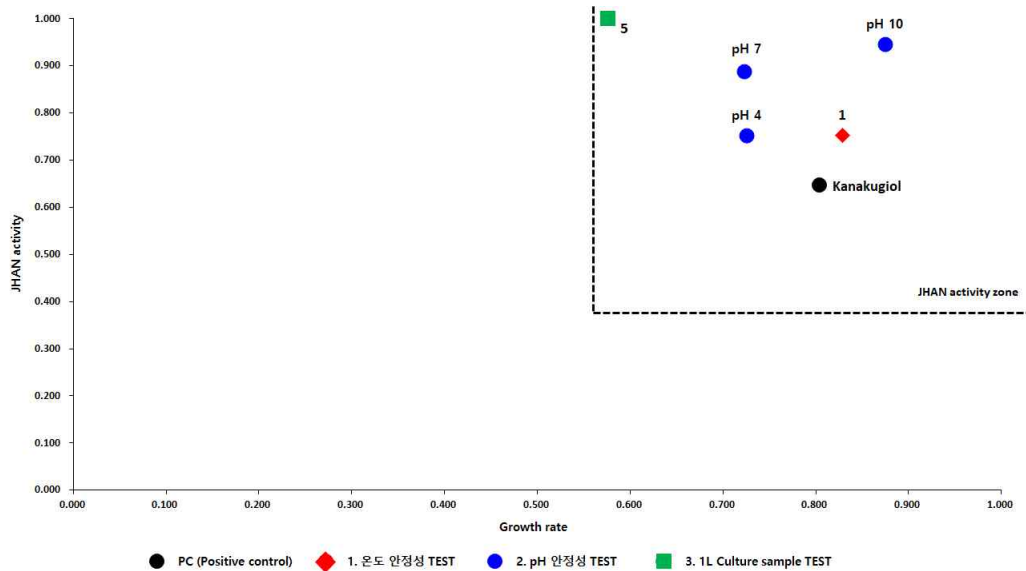


Fig. 54. S-630 방선균 배양체 추출물의 안정성 검정.

S-630 균주는 효모-맥아 한천, 오토밀 한천, 펩톤-효모-철 한천에서는 비교적 양호한 생육 정도를 나타내었고, 무기염-전분 한천, 글리세롤-아스파라긴 한천, 타이로신 한천에서는 보통이었다 (Table 6). 또한, 펩톤-효모-철 한천에서는 분홍빛이 도는 보라색의 수용성 색소를 생산하였고 타이로신 한천에서는 옅은 노랑색 색소를 생산하였다 (Table 6). 한편, S-630 균주의 16s rRNA 유전자 염기서열 분석을 수행한 결과, S-630 균주는 *Streptomyces* 속으로 확인되었으며, *Streptomyces celluloflavus* NRRL B-2493(T)과 99.03%의 유사도를 보였다.

Table 6. S-630 균주의 배양 생리적 특성

배지	성장	기균사색상	기질균사색상	수용성색소
효모 추출물-맥아 추출물 아가 (ISP No. 2)	Good	Whitish gray	Pale yellow	-
오토밀 아가 (ISP No. 3)	Good	Pale yellow	Pale brown	-
무기염-전분 아가 (ISP No. 4)	Moderate	Pale yellow	Whitish gray	-
글리세롤-아스파라긴 아가 (ISP No. 5)	Moderate	Pale yellow	Pale yellow	-
펩톤-효모 추출물-철 아가 (ISP No. 6)	Good	Dark brown	dark grayish brown	+ (pinkish purple)
티로신 아가 (ISP No. 7)	Moderate	yellow	Pale yellow	+ (pale yellow)

S-630 배양체 추출물의 IGR 활성을 보다 자세히 검증하기 위하여 S-630 배양체 추출물을 20 ppm, 50 ppm, 100 ppm 및 200 ppm의 농도로 희석하고 농도에 따른 JHAN 활성 검정을 수행하였다 (Fig. 55). 그 결과, S-630 배양체 추출물은 농도가 증가할수록 JHAN 활성이 높은 것을 확인하였으며, 가장 낮은 농도인 20 ppm에서도 매우 높은 수준의 JHAN 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 또한, S-630 배양체 추출물은 실험한 모든 농도에서 항이스트 활성이 없는 것으로 나타났으며, 이를 통하여 IGR 활성 검정에서 나타난 JHAN 활성은 항이스트 활성에 의해 나타난 것이 아니라는 것을 확인할 수 있었다.

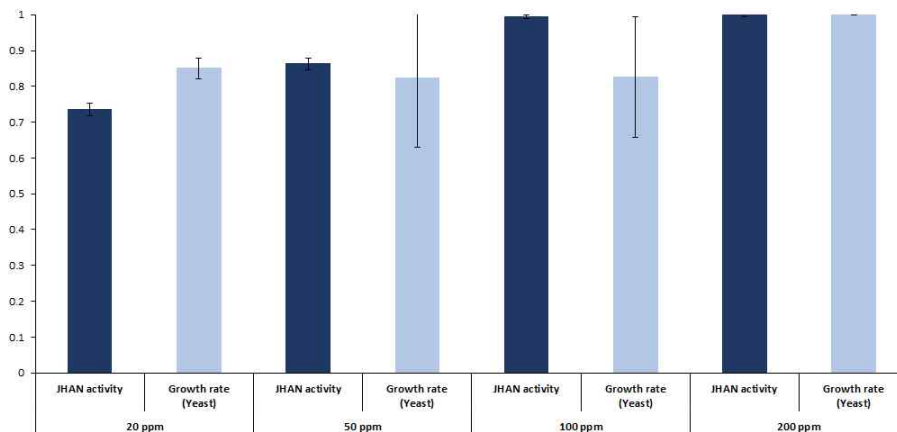


Fig. 55. S-630 배양체 추출물의 농도에 따른 JHAN 및 항이스트 활성.

S-630 배양체 추출물의 흰줄숲모기 3령 유충에 대한 농도별 살충활성을 알아보기 위하여 S-630 배양체 추출물을 20 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm 및 2,000 ppm 농도로 처리하고 24시간 간격으로 3일 동안 유충의 치사율을 확인한 결과, 모든 농도구에서 24시간 이내에 100%의 살충율을 보임으로써 매우 높은 살충 활성을 가지는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 56).

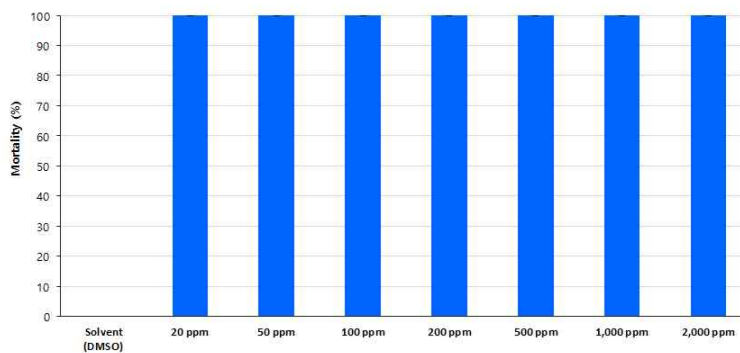


Fig. 56. S-630 배양체 추출물의 흰줄숲모기 유충에 대한 농도별 살충 활성.

배추좀나방 3령 유충에 대해서는 200 ppm 이상의 농도에서는 100%의 살충율을

보였으나, 100 ppm 이하의 농도에서는 살충 활성이 점차 낮아지는 경향을 보여주었다 (Fig. 57). 또한, 흰줄 숲모기 유충과는 달리 시간이 지남에 따라 유충이 순차적으로 치사하는 경향을 보여주었다.

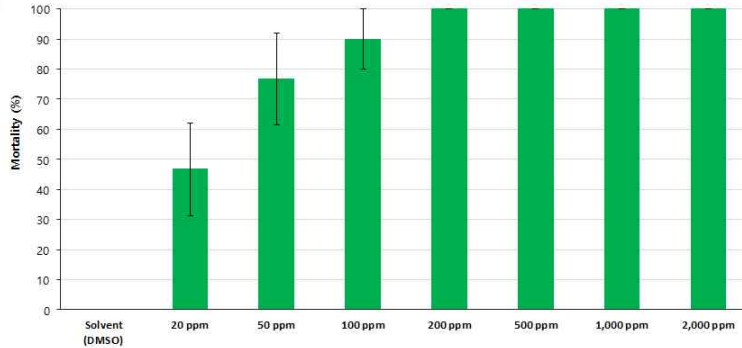


Fig. 57. S-630 배양체 추출물의 배추좀나방 유충에 대한 농도별 살충 활성.

파밤나방 2령 유충의 경우, 2,000 ppm에서 70%로 높은 살충 활성을 보인 반면, 500 ppm 및 1,000 ppm에서는 거의 살충 활성을 보이지 않았다. 또한, 배추좀나방 유충과 마찬가지로 추출물에 노출된 유충은 시간이 지남에 따라 순차적으로 치사하는 경향을 보였다 (Fig. 58).

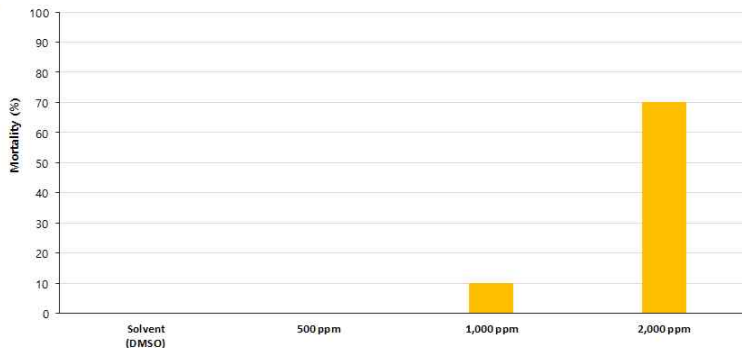


Fig. 58. S-630 배양체 추출물의 파밤나방 유충에 대한 농도별 살충 활성.

(라) 선발 방선균 추출물의 익충에 대한 영향성 평가

JHAN 및 높은 살충활성을 보인 S-630 균주의 배양체 추출물에 대하여 대표적인 익충인 꿀벌 성충에 대한 안전성을 평가하였다. 그 결과, S-630 균주의 배양체 추출물은 꿀벌에 대하여 20 ppm에서 20%의 낮은 살충활성을 가짐으로써 안전성을 가지는 것으로 나타났다 (Fig. 59).

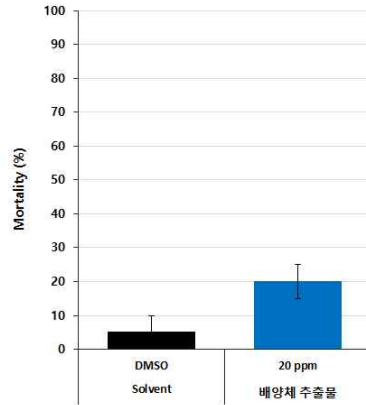


Fig. 59. S-630 배양체 추출물의 꿀벌에 대한 살충 활성.

(라) 선발 방선균 균주의 대량 배양

S-630 균주로부터 IGR 활성 물질의 대량 생산 조건을 확립하기 위하여 배양 배지에 따른 S-630 배양체 추출물의 IGR 및 살충활성을 검정하였다. 이를 위하여 S-630 균주를 G.S.S, F.M, M3 및 현미 배지에 각각 접종하여 배양한 후, 각각의 배양 산물을 배양액과 배양체로 분리하여 추출하였다 (Table. 7).

Table 7. S-630 균주 추출물의 배양 배지에 따른 수율

Medium	Culture volume	Yield of E-A extracts (%)	
		Supernatant	Pellet
G.S.S	1 L	Supernatant	18.9
		Pellet	19.5
F.M	1 L	Supernatant	34.1
		Pellet	4.4
M3	1 L	Supernatant	22.2
		Pellet	5.6
현미	1 Kg	Pellet	110

이렇게 추출된 S-630 균주의 배양 배지별 추출물에 대하여 JHAN 및 살충 활성 평가를 수행한 결과 JHAN 활성 pattern은 배지에 따라 다르게 나타났으나, 배양액보다는 배양체에서 활성이 더 높은 경향을 보여주었다 (Fig. 59). 또한, 배양체 추출물의 JHAN 활성은 모든 배지에서 동일하게 1.0 수준을 가지는 것으로 나타났다 (Fig. 60).

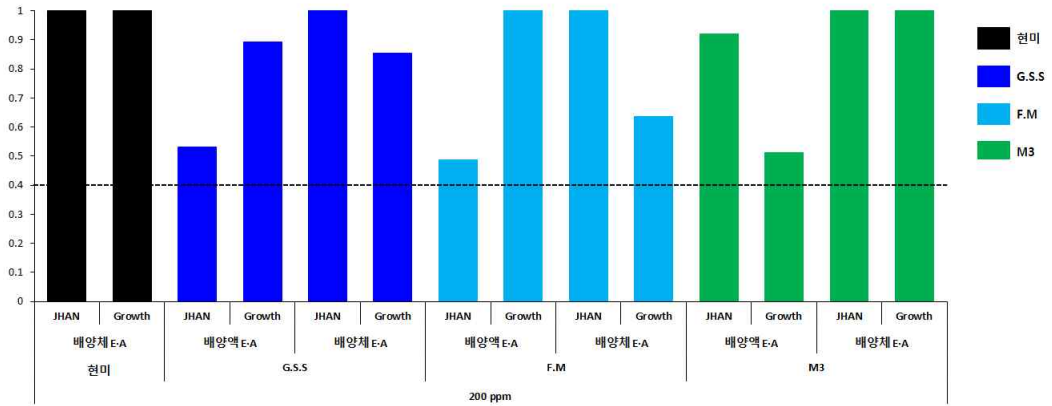


Fig. 60. S-630 균주의 배양 배지별 추출물의 JHAN 및 향이스트 활성.

S-630 균주의 배지별 추출물의 살충활성을 알아보기 위하여 흰줄숲모기 및 배추좀나방에 대한 생물 검정을 수행하였다. 그 결과, 흰줄숲모기 3령 유충에 대해서는 현미 및 M3 배지의 배양체 추출물이 100%의 살충율로 높은 살충활성을 가지는 것으로 나타났다 (Fig. 61A). 한편, 배추좀나방 3령 유충의 경우에는 M3 배지의 배양체 추출물이 가장 높은 살충활성을 보여주었다 (Fig. 61B). 이러한 결과를 통하여 S-630 균주 유래의 IGR 및 살충 활성 물질을 대량 생산하기 위해서는 M3 배지가 가장 효율적이라는 것을 확인할 수 있었다.

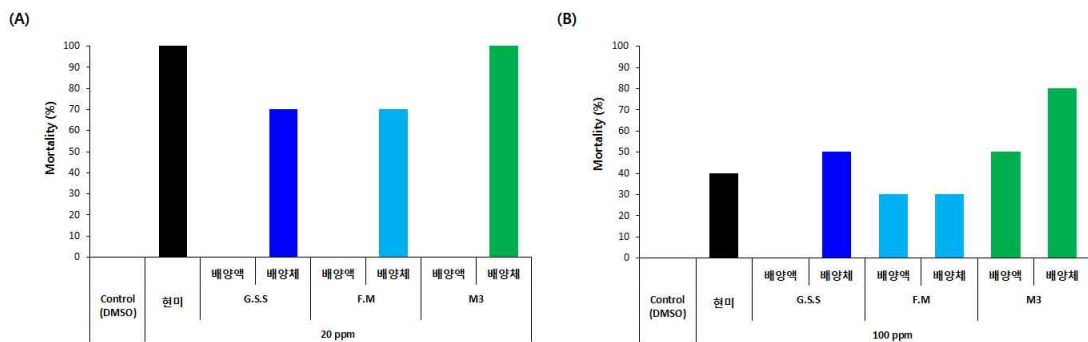


Fig. 61. S-630 균주의 배양 배지별 추출물의 흰줄숲모기 (A) 및 배추좀나방 (B)에 대한 살충 활성.

S-630 균주로부터 IGR 활성 물질을 대량 생산하기 위하여 500 리터 jar fermentor를 이용한 대량 배양 체계를 구축하였다. 대량 생산을 위한 공정은 일반적인 방선균 대량 배양 조건 (28°C, pH6.5, 1 vvm, 120 rpm)으로 설정하였으며, 3단계의 배양 체계로 통제된 조건에서 300 L의 M3 배지를 이용하여 대량 배양을 수행한 결과 총 7.9 kg의 배양체를 확보할 수 있었다. 이러한 대량 배양을 통한 배양체 수율은 26.4 g/L로, 이는 플라스크 배양의 평균 배양체 수율인 11 g/L에 비해 약 2.4배 높은 수율을 보여주었다. 한편, S-630 균주의 대량 배양 과정 중 pH 및 DO가 일정하게 유지되었으며, 균사의 형성 또한 잘 이루어진 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 62). 이러한 결과를 통하여 S-630 균주의 대량 배양이 효율적이며 안정적으로 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

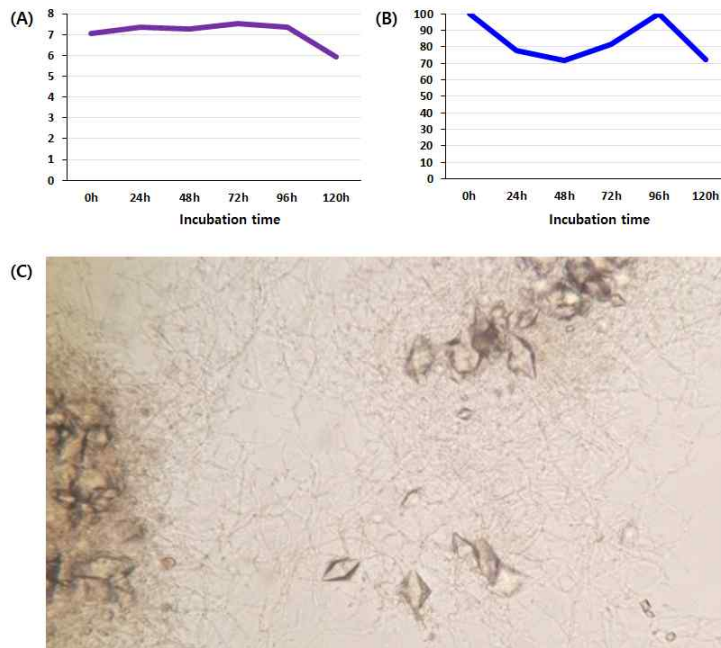


Fig. 62. S-630 균주의 대량 배양. (A) 배양 시 pH 변화, (B) 배양 시 DO 변화, (C) 배양 후 균체의 위상차 현미경 관찰.

(마) 선발 방선균 추출물로부터 IGR 활성 물질 분리

S-630 균주로부터 활성 물질을 분리하기 위하여 3 종류의 용매를 이용하여 극성에 따라 순차적으로 분획하면서 IGR 및 살충 활성을 검정하였다. JHAN 활성의 경우, 배양체 추출물의 hexane 분획에서 약 0.82로 가장 높게 나타나는 반면, ethyl acetate 및 butanol 분획에서는 낮거나 미미한 수준의 JHAN 활성을 보여주었다 (Fig. 63).

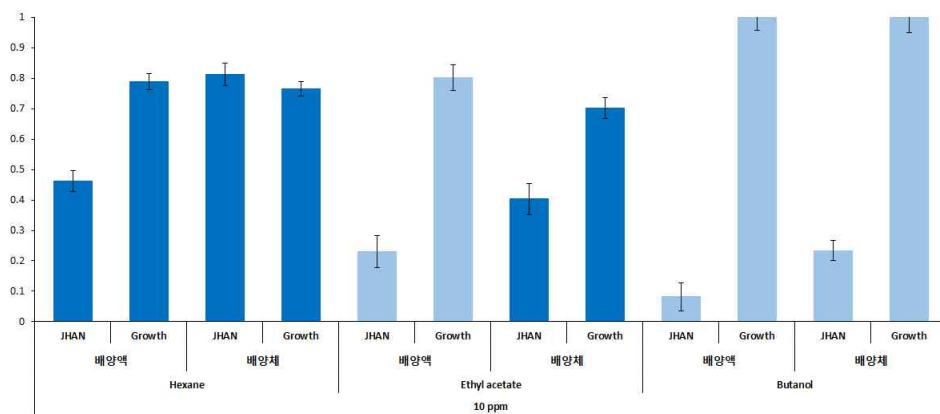


Fig. 63. S-630 균주 추출물의 추출 용매에 따른 JHAN 활성.

또한, 각각의 추출 분획을 대상으로 흰줄숲모기 및 배추좀나방에 대한 생물 검정을 수행한 결과, JHAN 활성과 마찬가지로 배양체 추출물의 hexane 분획이 100%의 살충율로 가장 높은 살충 활성을 가지는 것으로 확인되었다 (Table. 8). 이러한 결과는 S-630 유래 IGR 활성 물질이 비극성 물질임을 시사하였다.

Table 8. S-630 균주 추출물의 추출 용매 분획에 따른 살충 활성 평가

Target	Concentration	Sample		Mortality (%)
<i>Aedes albopictus</i> (3rd instar)	10 ppm	Control	DMSO	0
		hexane	배양액	80
			배양체	100
		ethyl acetate	배양액	0
			배양체	30
		butanol	배양액	0
배양체	0			
<i>Plutella xylostella</i> (3rd instar)	100 ppm	Control	DMSO	0
		hexane	배양액	70
			배양체	100
		ethyl acetate	배양액	0
			배양체	30
		butanol	배양액	0
배양체	40			

한편, 각각의 추출 분획을 동일 ppm으로 처리하여 TLC의 패턴을 확인한 결과, 배양체 추출물의 hexane 분획에서 IGR 활성 물질로 추정되는 spot (Rf=0.75)은 다른 분획에서는 미미하거나 존재하지 않는 것으로 확인되었다 (Fig. 64).

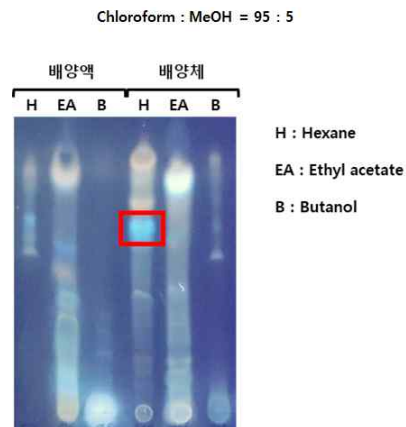


Fig. 64. S-630 균주 추출물의 추출 용매에 따른 TLC 패턴.

S-630 균주의 활성물질 분리 및 동정을 위하여, 배양체 hexane 추출물 3.6 g을 총 1회의 중압액체크로마토그래프 및 1회의 prep-HPLC를 이용하여 물질을 분획하였다. 또한 최종적으로 분리한 물질의 순도를 높이기 위하여 추가적으로 prep-HPLC를 이용하여 정제하였다 (Fig. 65).

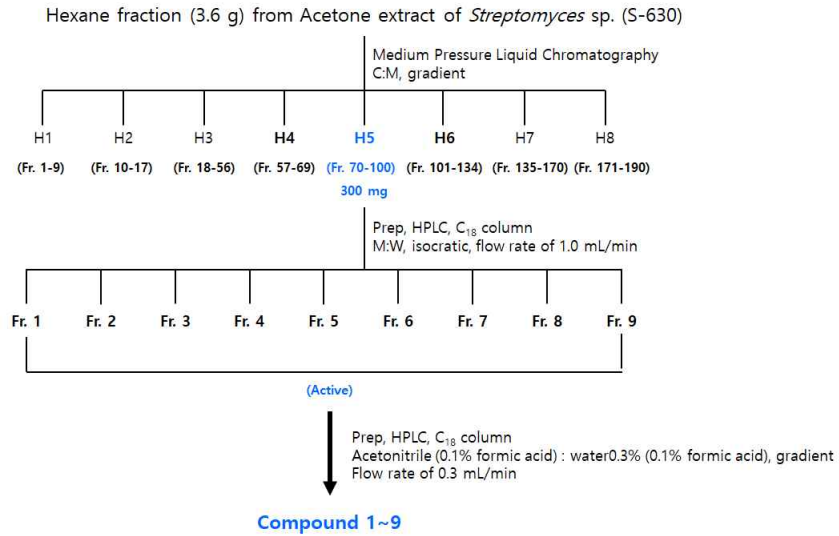


Fig. 65. S-630 추출물로부터의 IGR 활성 물질 분리 모식도.

Hexane 추출물 3.6 g을 이용하여 1차 중압크로마토그래피를 실시하고, 분취한 시료의 Rf 값을 TLC로 확인하여 총 8개의 분획물을 획득하였다. 이 중 Rf 값 0.75의 활성 물질 spot은 H5 분획물에 존재하는 것으로 확인되었다 (Fig. 66).

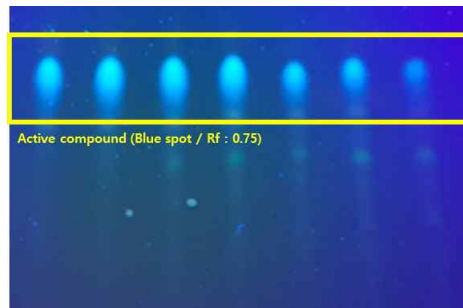


Fig. 66. 중압크로마토그래피를 이용한 S-630 배양체 추출물의 1차 분획.

1차 분리된 H5 분획물의 IGR 활성을 검증하기 위하여 10 ppm의 농도로 JHAN 활성 검정을 수행한 결과, 높은 JHAN 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 67). 또한, H5 분획물은 흰줄숲모기 및 배추좀나방 유충에 대해서 1 ppm 이상의 농도에서 90% 이상의 살충율로 높은 살충 활성을 보여주었다 (Fig. 68).

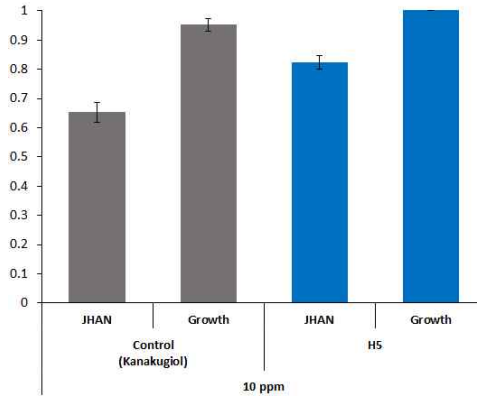


Fig. 67. S-630 배양체 추출물 1차 분획물의 JHAN 및 하이스트 활성.

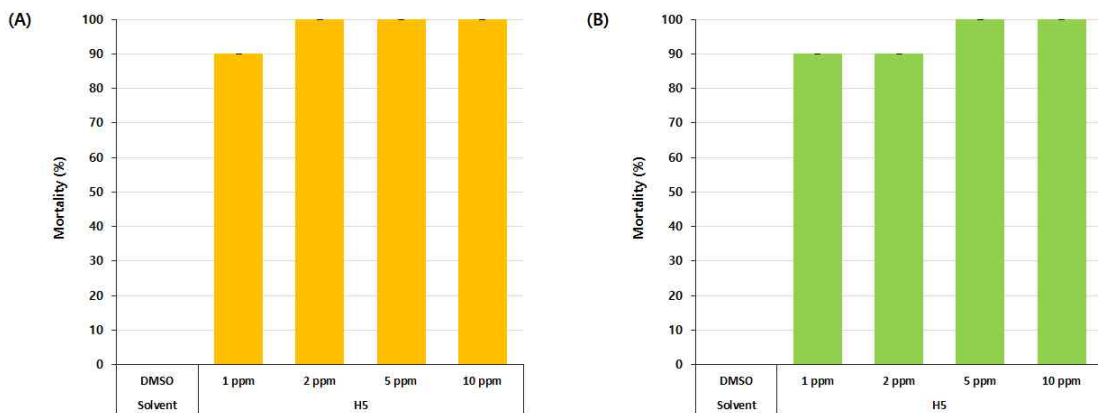


Fig. 68. S-630 배양체 추출물 1차 분획물의 흰줄숲모기 (A) 및 배추좀나방 (B)에 대한 살충 활성.

1차 분획물을 대상으로 preparative HPLC를 실시하여 (Fig. 69), 총 9 가지의 물질을 획득하였다 (Fig. 70).

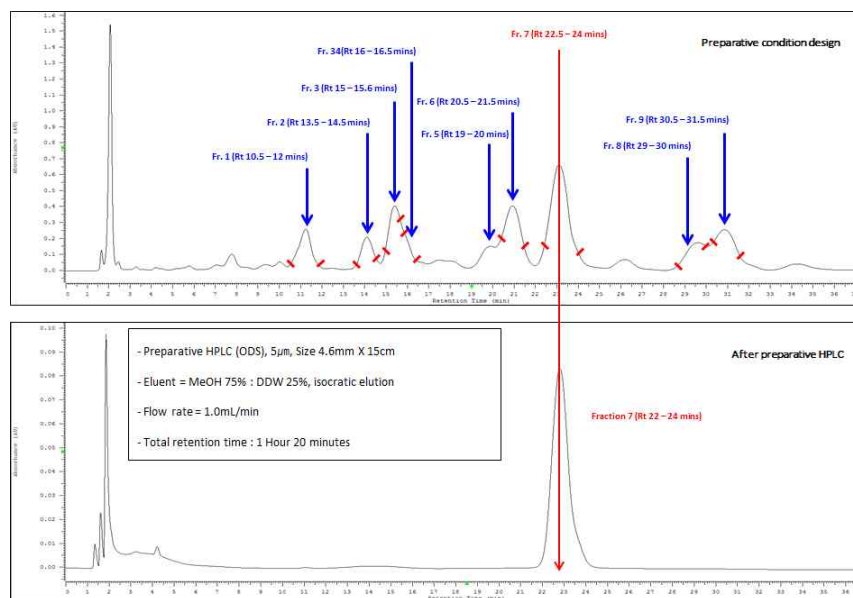


Fig. 69. prep-HPLC를 이용한 S-630 배양체 추출물의 2차 분획.

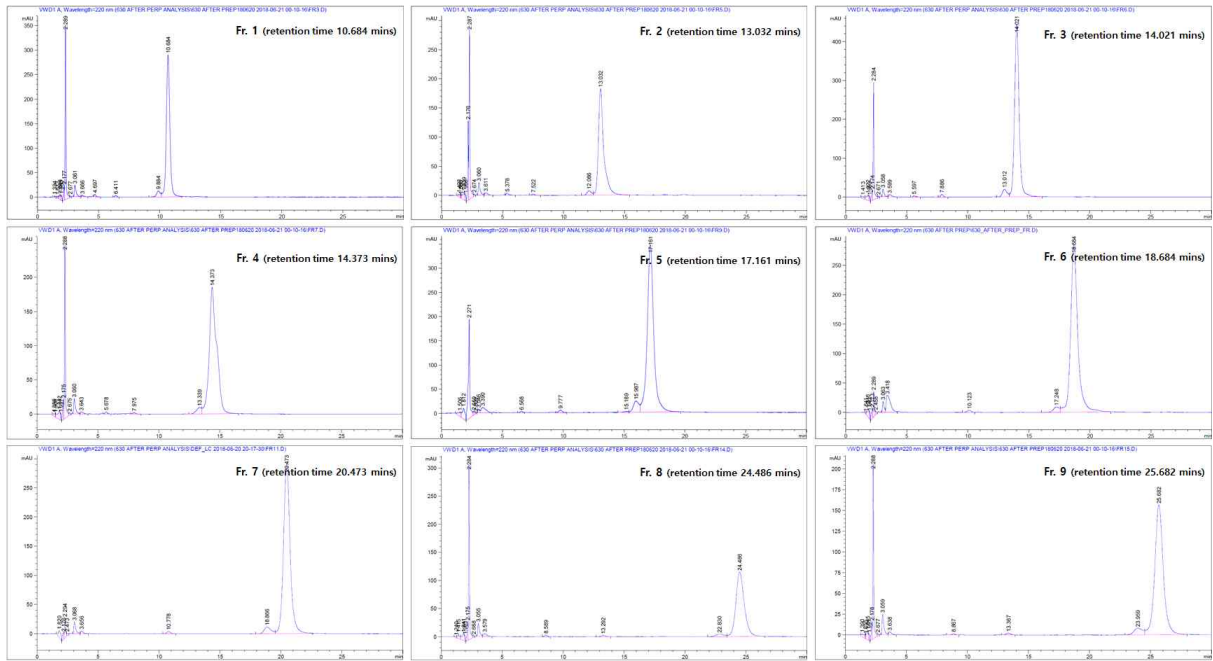


Fig. 70. S-630 배양체 추출물 2차 분획물의 analytic-HPLC.

prep-HPLC를 이용하여 분리된 물질을 대상으로 농도별 JHAN 활성 검정을 수행한 결과, 분리된 물질들은 각각 JHAN 활성이 다르게 나타나는 것을 확인하였다. 9개의 물질 중 1번과 7번 물질이 10 ppm의 농도에서 0.4 이상의 JHAN 활성을 보였으며, 나머지 7개의 물질은 10 ppm 이하에서 JHAN 활성이 낮거나 미미한 것으로 나타났다 (Fig. 71).

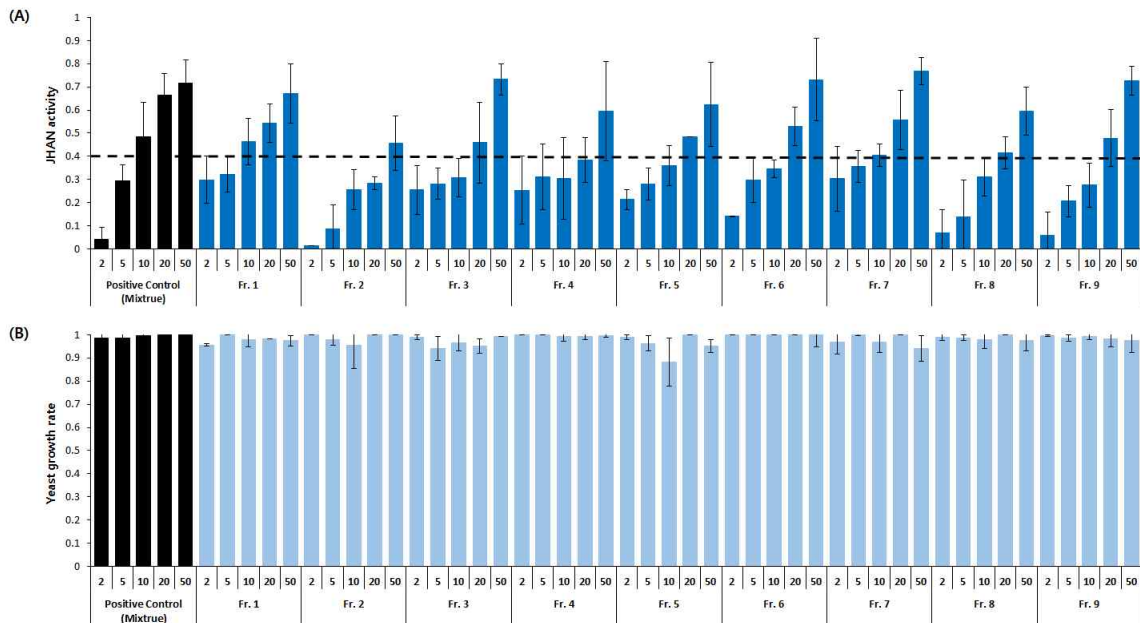


Fig. 71. S-630 배양체 추출물 2차 분획물의 JHAN (A) 및 항이스트 활성 (B).

이들 9개 물질의 배추좀나방 유충에 대한 농도별 생물 검정 결과, 2 ppm에서 1, 3, 5, 7 및 9번 물질이 70% 이상의 높은 살충율을 보여주었으며, 특히 3번 물질은 100%의 살충율로 가장 높은 살충 활성을 가지는 것으로 나타났다 (Fig. 72). 이상의 결과, 2차 분획된 S-630 배양체 유래 9개 물질은 모두 활성 본체라는 것을 확인할 수 있었다.

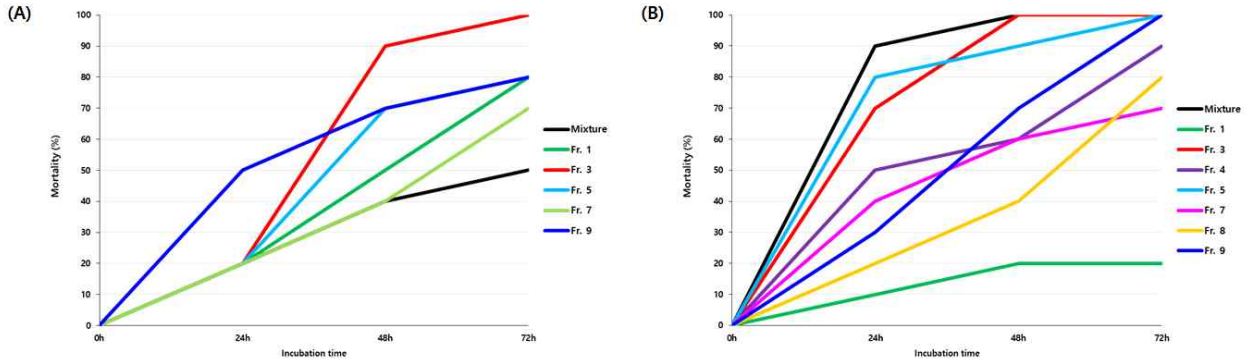


Fig. 72. S-630 배양체 추출물 2차 분획물의 배추좀나방에 대한 살충 활성. (A) 2 ppm, (B) 5 ppm.

또한, 이들 각각의 물질을 direct dipping 방법으로 점박이응애에 처리한 결과 5, 6 및 8번 물질이 70% 이상의 살충율로 높은 수준의 살충 활성을 보여주었다 (Fig. 73A). 이에 반해, 꽃노랑총채벌레의 경우에는 1과 6번 물질이 70%의 살충율로 가장 높은 살충 활성을 보여주었다 (Fig. 73B). 이러한 결과는 S-630에서 유래한 9개의 IGR 활성 물질이 서로 다른 다양한 살충 활성을 가짐을 시사하였다.

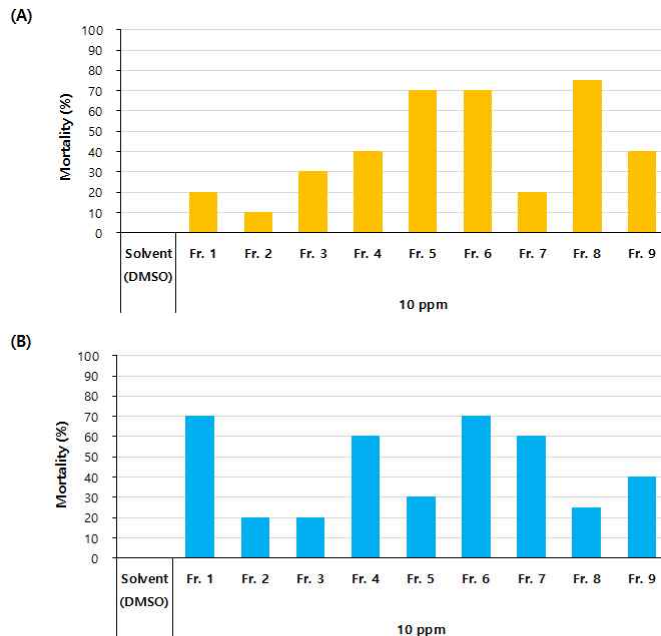


Fig. 73. S-630 배양체 추출물 2차 분획물의 점박이응애 (A) 및 꽃노랑총채벌레 (B)에 대한 살충 활성.

(바) 선발 방선균 유래 IGR 활성 물질의 구조 분석

LC/MSMS 및 NMR 분석을 통하여 S-630 균주로부터 분리된 9개의 활성물질 구조를 분석한 결과, 1번 물질의 경우 하얀색의 무정형 고체로, high resolution LC/MSMS 측정 시 $[M+H]^+$, m/z 493.21 으로 나타났다 (Fig. 74). 또한 1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼을 통하여 총 24개의 carbon이 존재하는 것을 확인하였다 (Fig. 75). 이를 바탕으로 $C_{24}H_{32}N_2O_9$ 의 분자식을 가질 것으로 예상하였다. 더 나아가 평면 구조를 결정하기 위하여 2D NMR 기법 (Fig. 76)을 사용하여 1번 물질의 최종 분자식 및 평면구조를 완성하였다 (Fig. 77). 그 결과, 1번 물질은 Antimycin A5인 것으로 확인되었다.

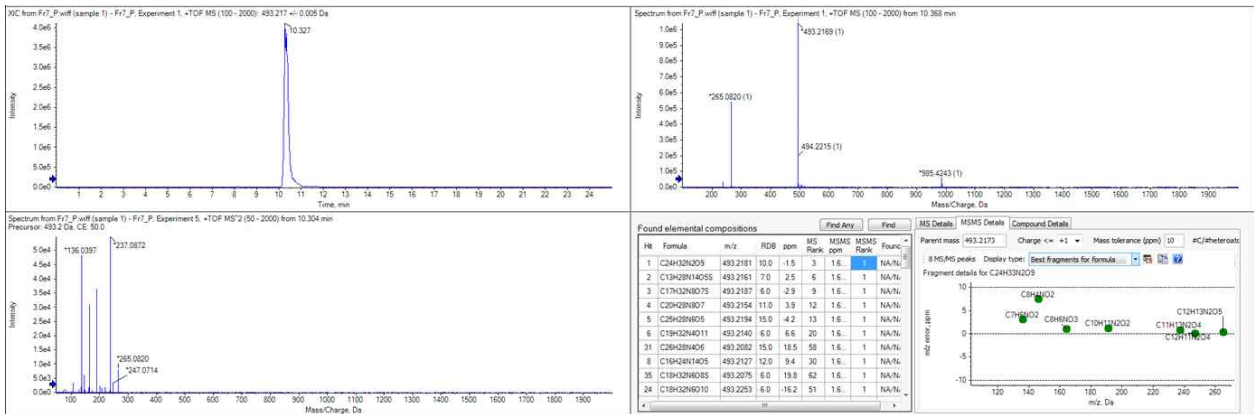


Fig. 74. 1번 물질의 high resolution LC/MSMS 결과.

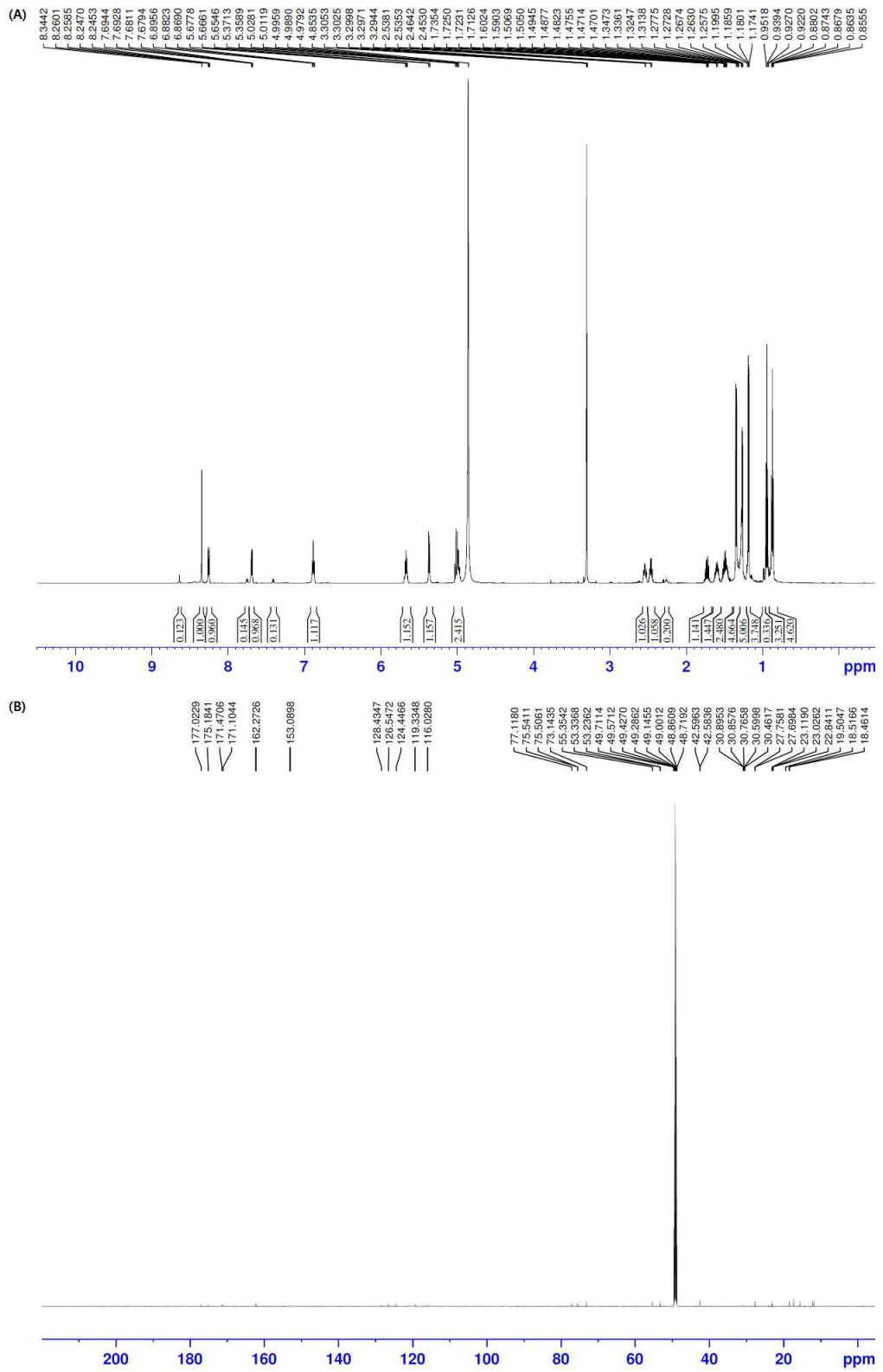


Fig. 75. 1번 물질의 ^1H NMR spectrum (A) 및 ^{13}C NMR (B) spectrum.

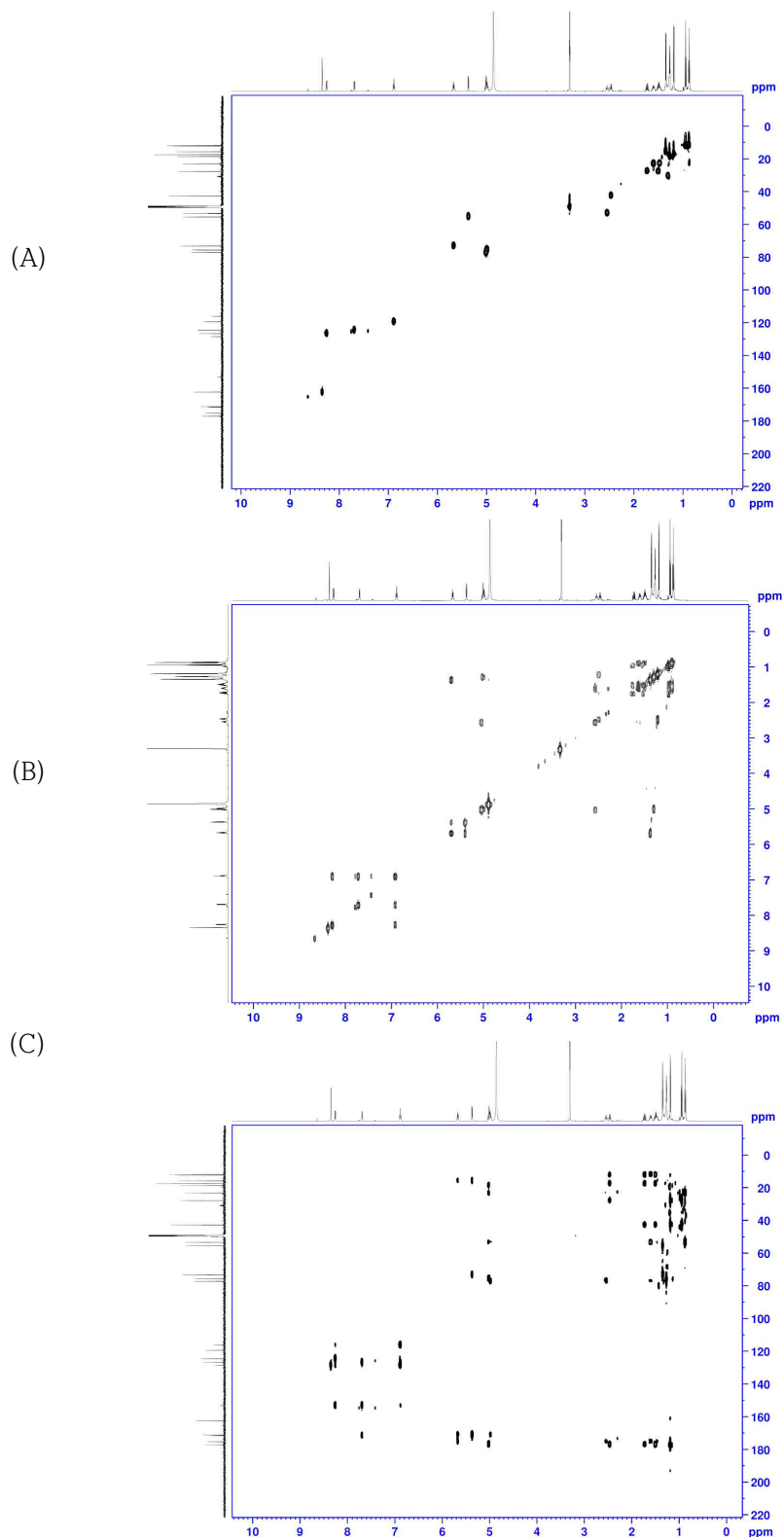
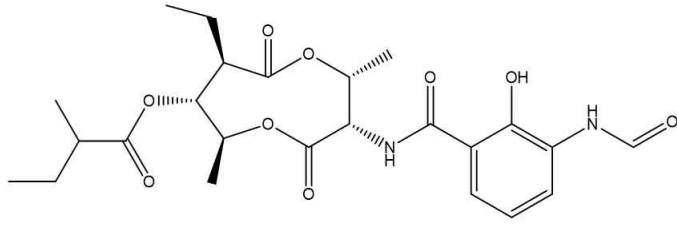


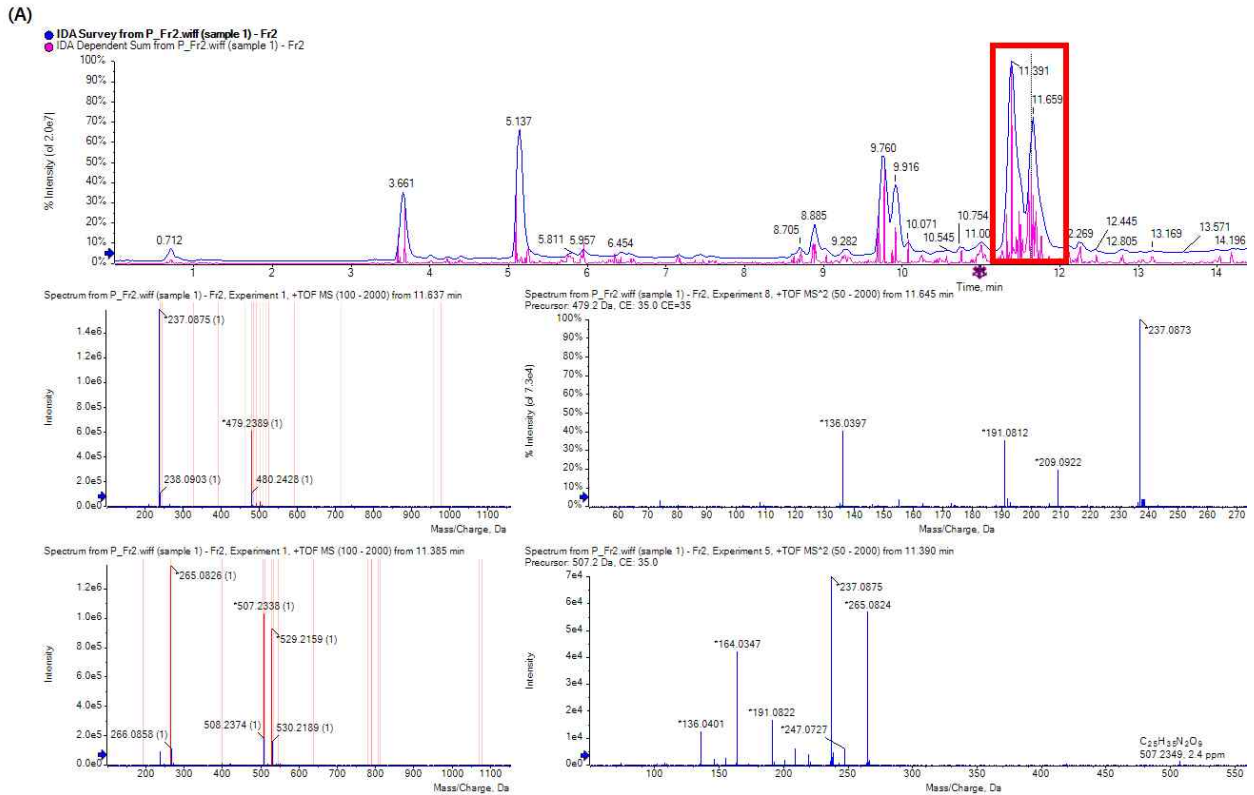
Fig. 76. 1번 물질의 HSQC (A), COSY (B) 및 HMBC (C) spectrum.



(2*R*,3*S*,6*S*,7*R*,8*R*)-8-ethyl-3-(3-formamido-2-hydroxybenzamido)-2,6-dimethyl-4,9-dioxo-1,5-dioxonan-7-yl 3-methylbutanoate
 Chemical Formula: C₂₄H₃₂N₂O₉
 Exact Mass: 492.21
 Molecular Weight: 492.53
 m/z: 492.21 (100.0%), 493.21 (26.0%), 494.22 (2.7%), 494.22 (1.8%)
 Elemental Analysis: C, 58.53; H, 6.55; N, 5.69; O, 29.24

Fig. 77. 1번 물질의 (Antimycin A5)의 평면구조.

2와 3번 물질의 경우에도 하얀색의 무정형 고체로 mixture 상태로 존재하였다. High resolution LC/MSMS 측정 시 [M+H]⁺, m/z 479.20 및 507.23 으로 나타남으로써 2와 3번 물질에는 같은 활성을 가지는 물질 군이 존재한다는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 78). MSMS 및 ¹H 스펙트럼 (Fig. 79) data를 분석한 결과, 1번 물질과 굉장히 유사하다는 것을 확인하였으며 Antimycin A의 유도체 중 하나라 예상할 수 있었다. 이를 바탕으로 하여 참고문헌과의 비교 분석을 통하여 최종 분자식 및 평면구조를 결정한 결과, 2와 3번 물질은 Antimycin A4 및 A6 의 mixture로 확인되었다 (Fig. 80).



(B)

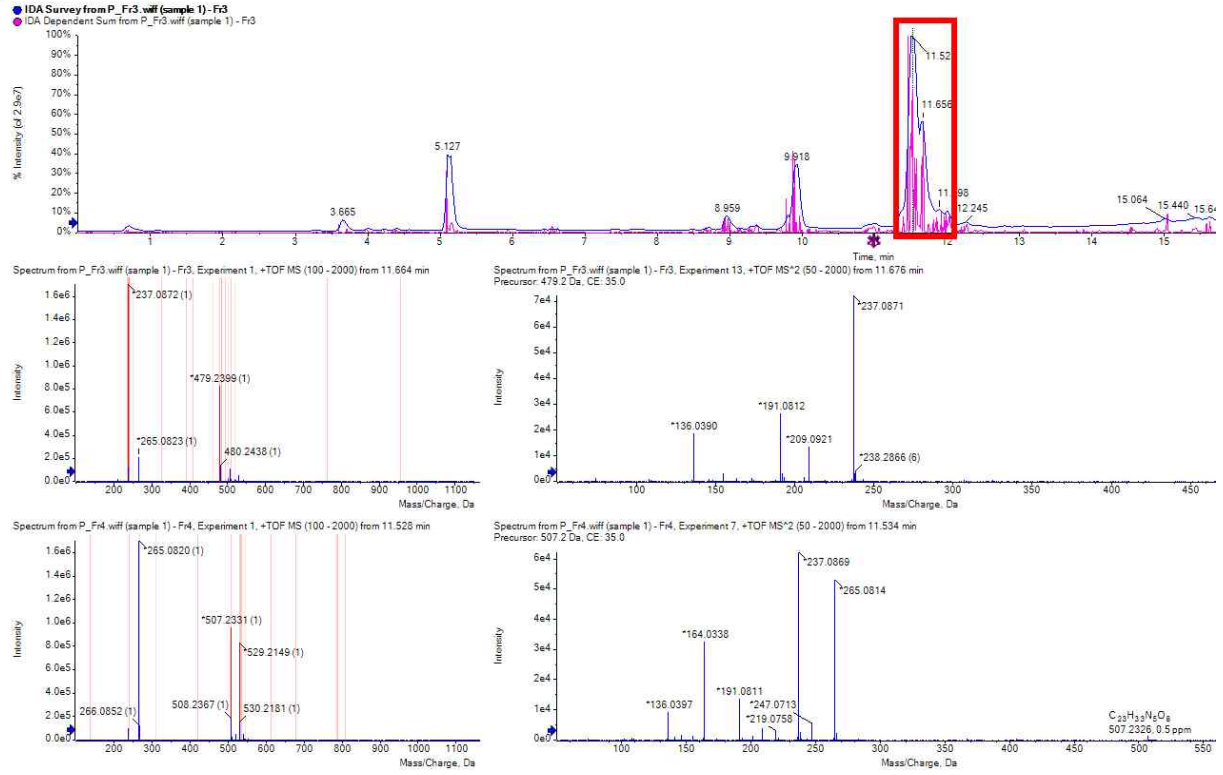
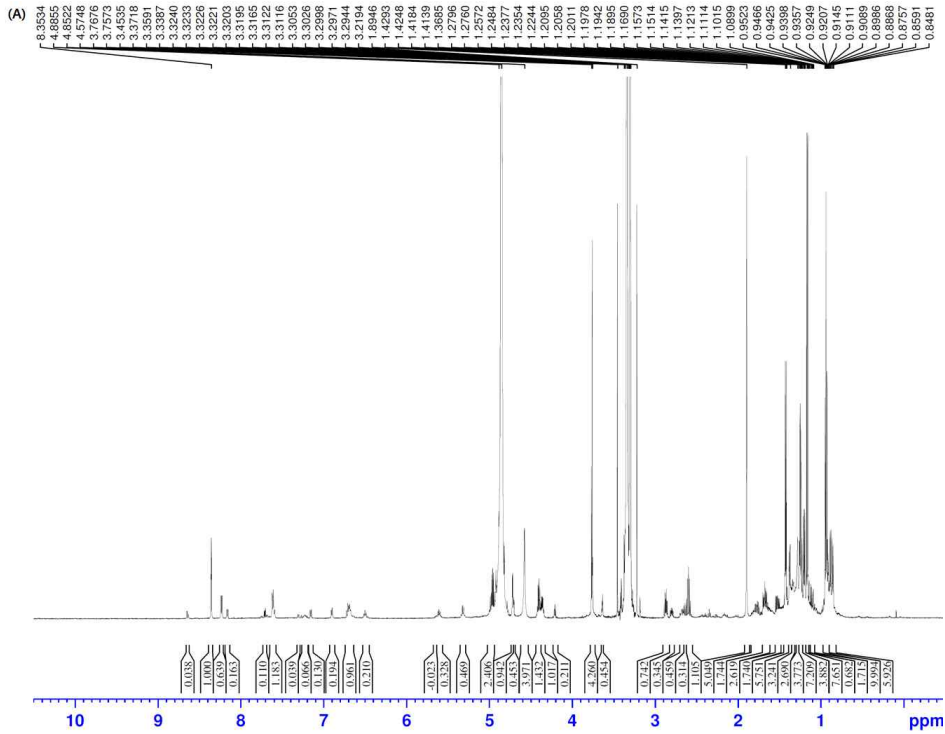


Fig. 78. 2 (A) 및 3 (B)번 물질의 high resolution LC/MSMS 결과.



4번 물질은 high resolution LC/MSMS 측정 시 $[M+H]^+$, m/z 507.23 으로 나타났다 (Fig. 81). MSMS 및 1H 스펙트럼 (Fig. 82) data를 참고문헌과의 비교 분석을 통하여 최종 분자식 및 평면구조를 결정한 결과, Antimycin A4로 확인되었다.

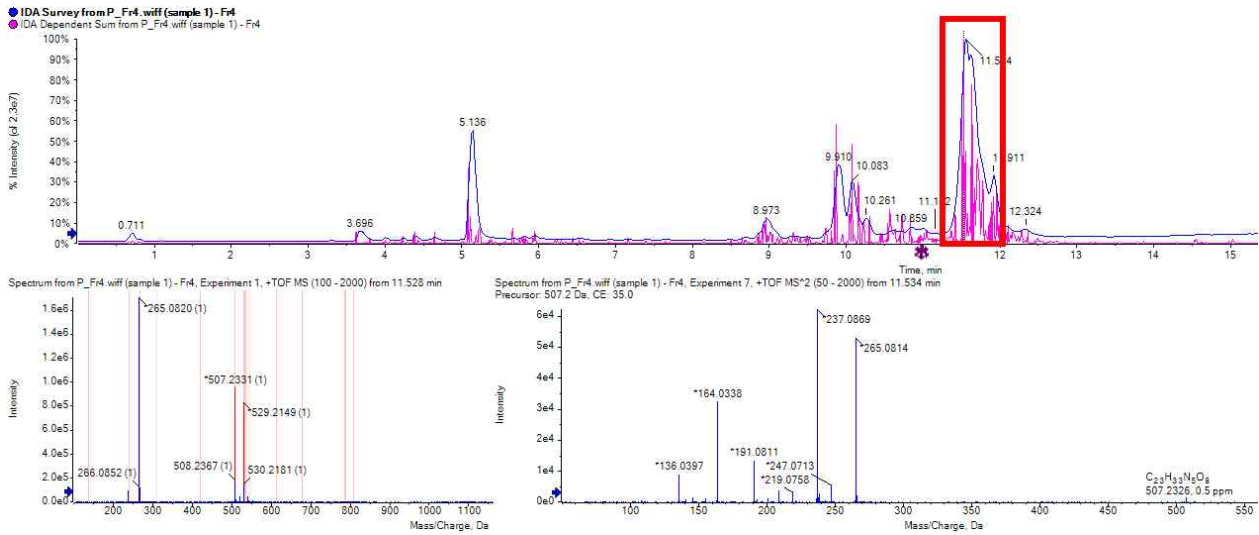


Fig. 81. 4번 물질의 high resolution LC/MSMS 결과.

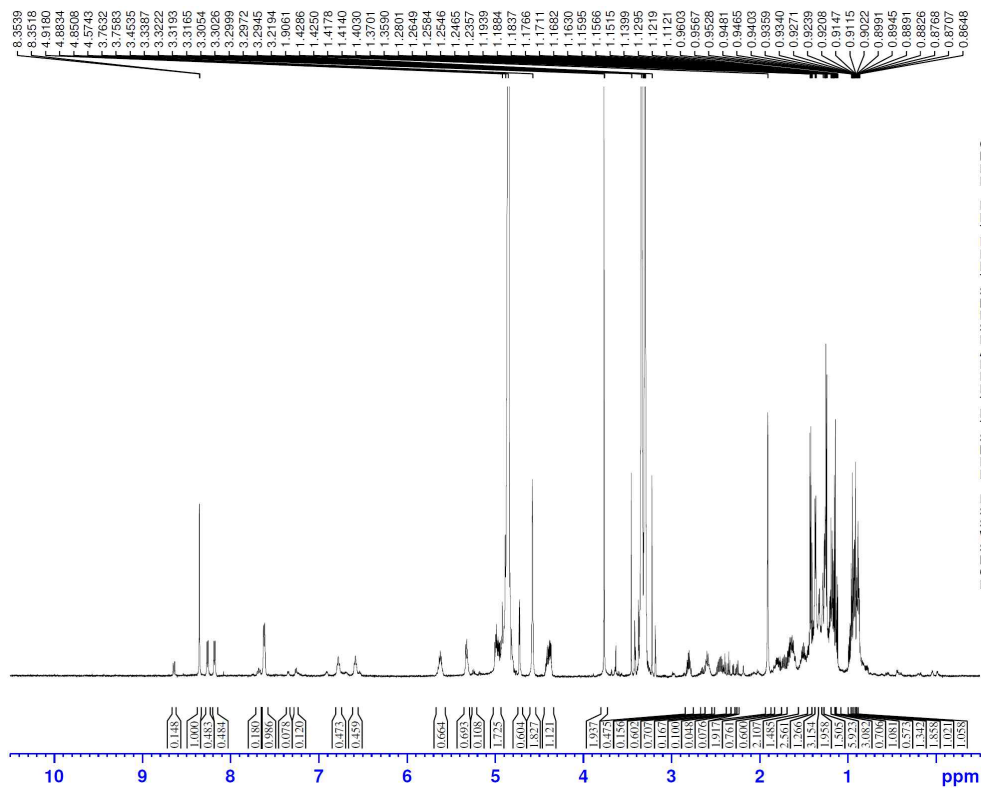


Fig. 82. 4번 물질의 1H NMR spectrum.

5와 6번 물질은 high resolution LC/MSMS 측정 시 $[M+H]^+$, m/z 521.24로

나타났으며 MSMS 스펙트럼 패턴이 동일하게 나타남으로써 같은 물질이라는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 83). MSMS 및 ^1H 스펙트럼 (Fig. 84) data를 분석한 결과를 바탕으로 하여 참고문헌과의 비교 분석을 통하여 최종 분자식 및 평면구조를 결정한 결과, compound 5 및 6은 Antimycin A3으로 확인되었다 (Fig. 85).

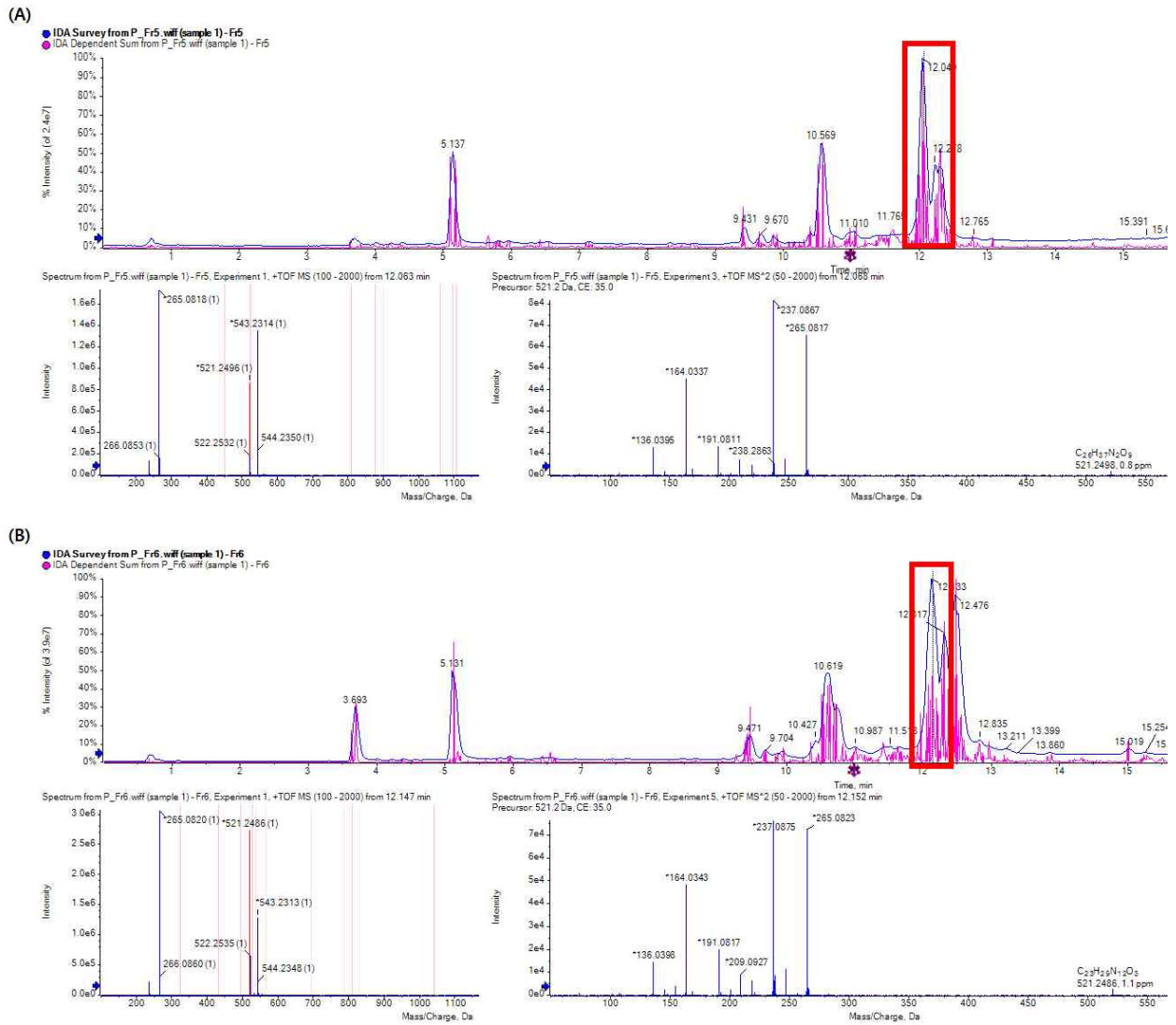


Fig. 83. 5 (A) 및 6 (B)번 물질의 high resolution LC/MSMS 결과.

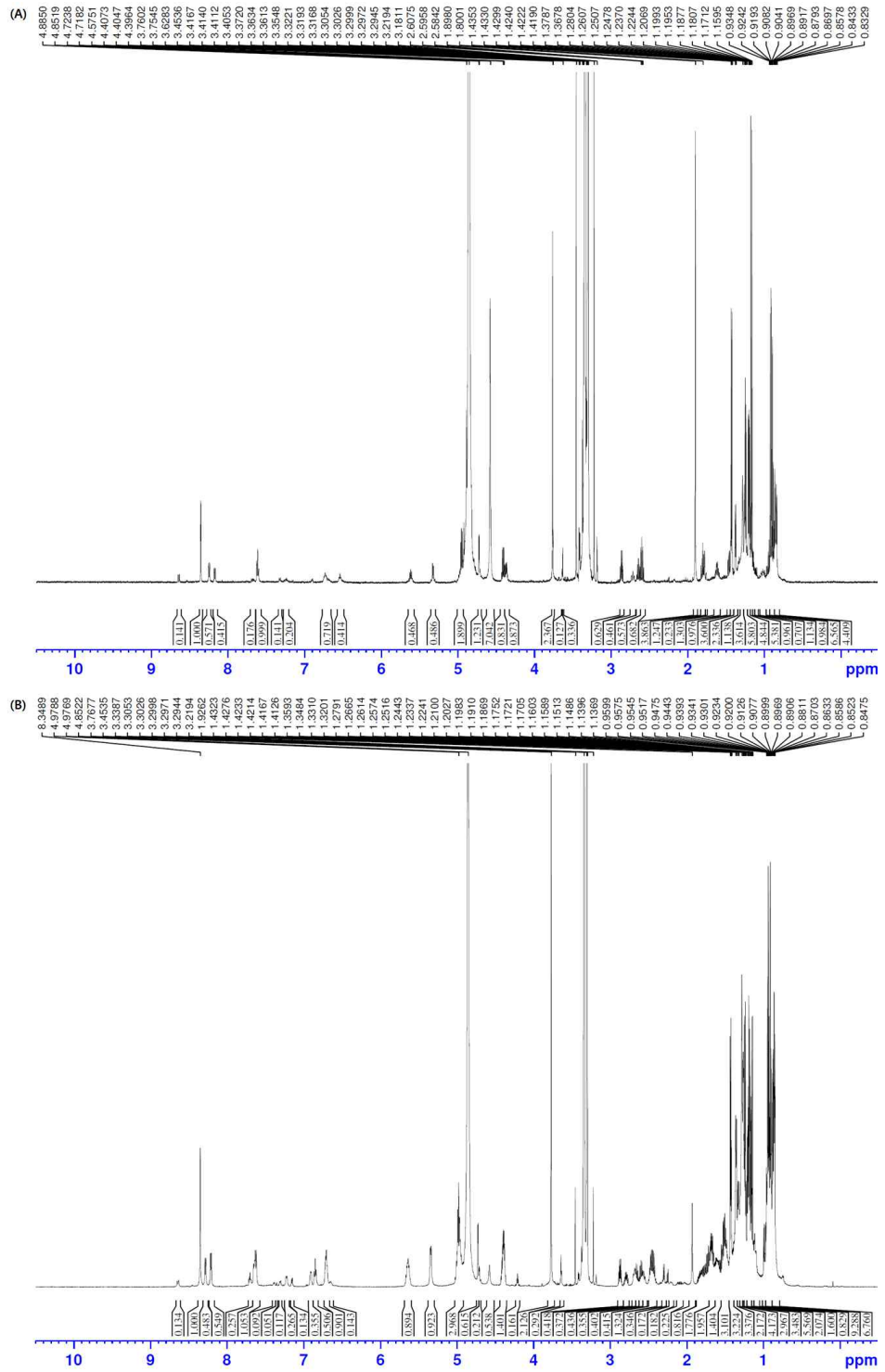
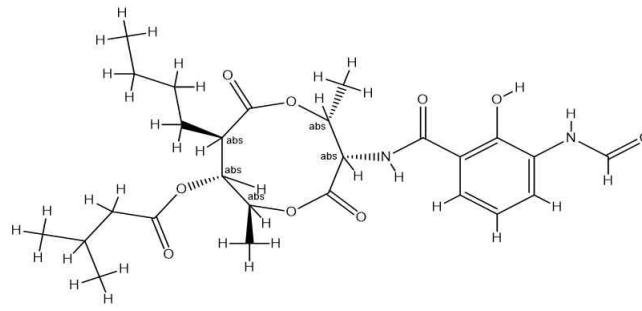


Fig. 84. 5 (A) 및 6 (B)번 물질의 ^1H NMR spectrum.



(2*R*,3*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-8-butyl-3-(3-formamido-2-hydroxybenzamido)-2,6-dimethyl-4,9-dioxo-1,5-dioxonan-7-yl 3-methylbutanoate
 Chemical Formula: C₂₆H₃₆N₂O₉
 Exact Mass: 520.24
 Molecular Weight: 520.58
 m/z: 520.24 (100%), 521.25 (28.1%), 522.25 (3.8%), 522.25 (1.8%)
 Elemental Analysis: C, 59.99; H, 6.97; N, 5.38; O, 27.66

Fig. 85. 5 및 6번 물질 (Antimycin A3)의 평면구조.

7번 물질은 high resolution LC/MSMS 측정 시 [M+H]⁺, m/z 555.23으로 나타났으며 패턴 분석 시 동일하게 Antimycin A의 유도체라는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 86). MSMS 및 ¹H 스펙트럼 (Fig. 87) data를 참고문헌과의 비교 분석을 통하여 최종 분자식 및 평면구조를 결정한 결과, Antimycin A9으로 확인되었다 (Fig. 88).

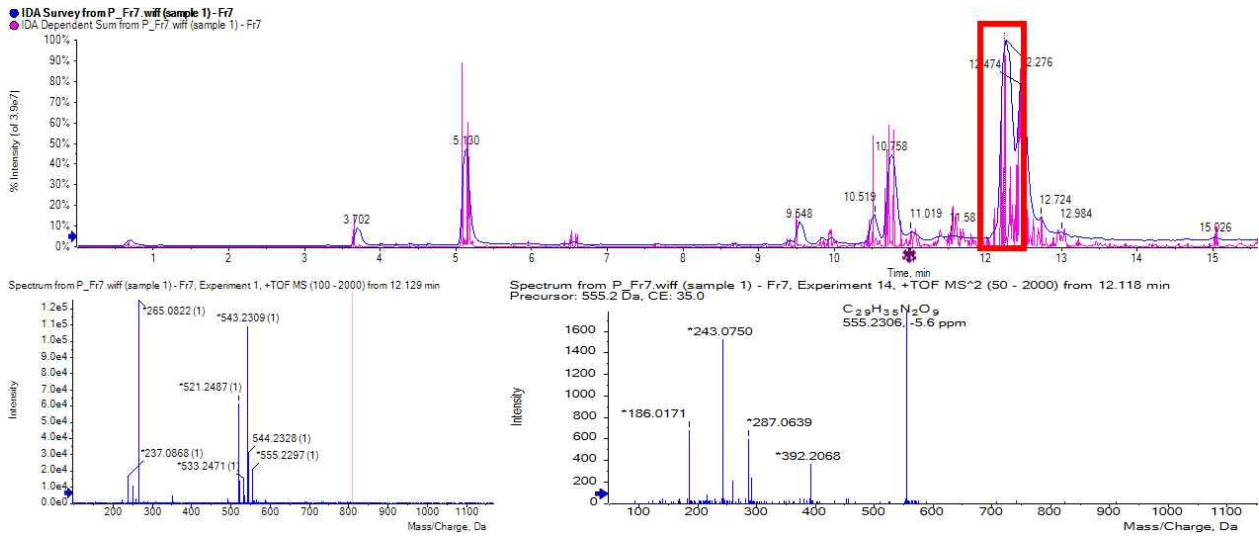


Fig. 86. 7번 물질의 high resolution LC/MSMS 결과.

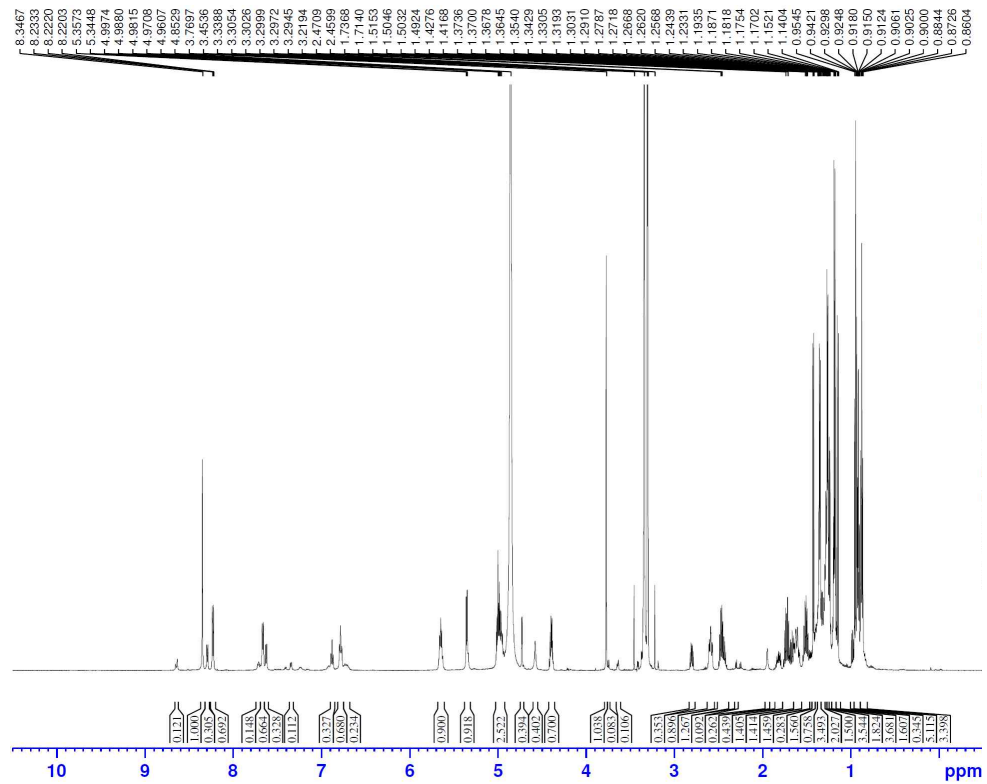


Fig. 87. 7번 물질의 ^1H NMR spectrum.

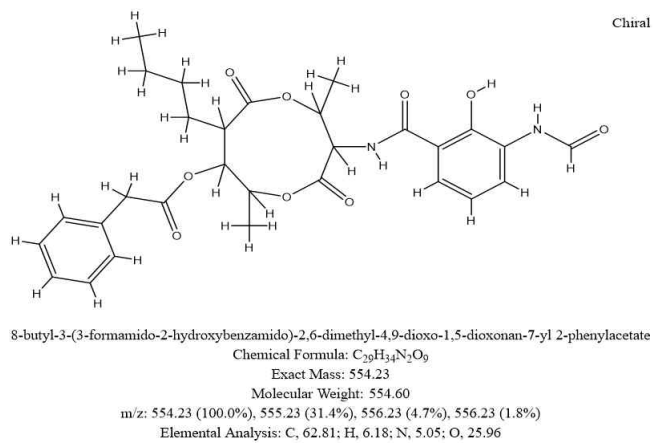


Fig. 88. 7번 물질 (Antimycin A9)의 평면구조.

8번 물질은 high resolution LC/MSMS 측정 시 $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 535.26으로 나타났으며 패턴 분석 시 동일하게 Antimycin A의 유도체라는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 89). MSMS 및 ^1H 스펙트럼 (Fig. 90) data를 참고문헌과의 비교 분석을 통하여 최종 분자식 및 평면구조를 결정한 결과, Antimycin A2로 확인되었다 (Fig. 91).

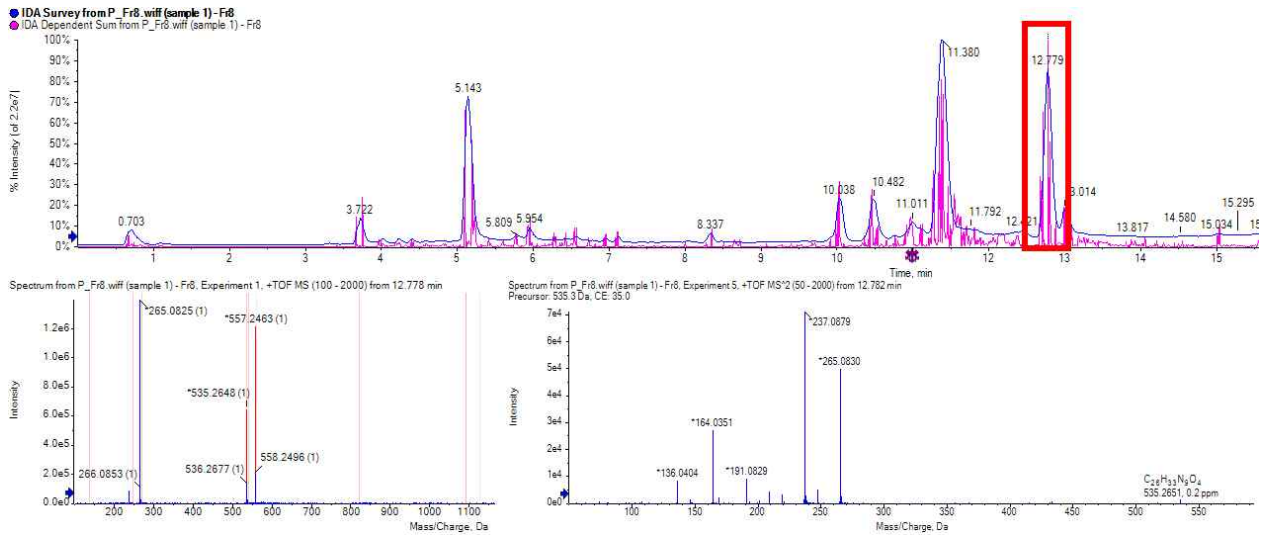


Fig. 89. 8번 물질의 high resolution LC/MSMS 결과.

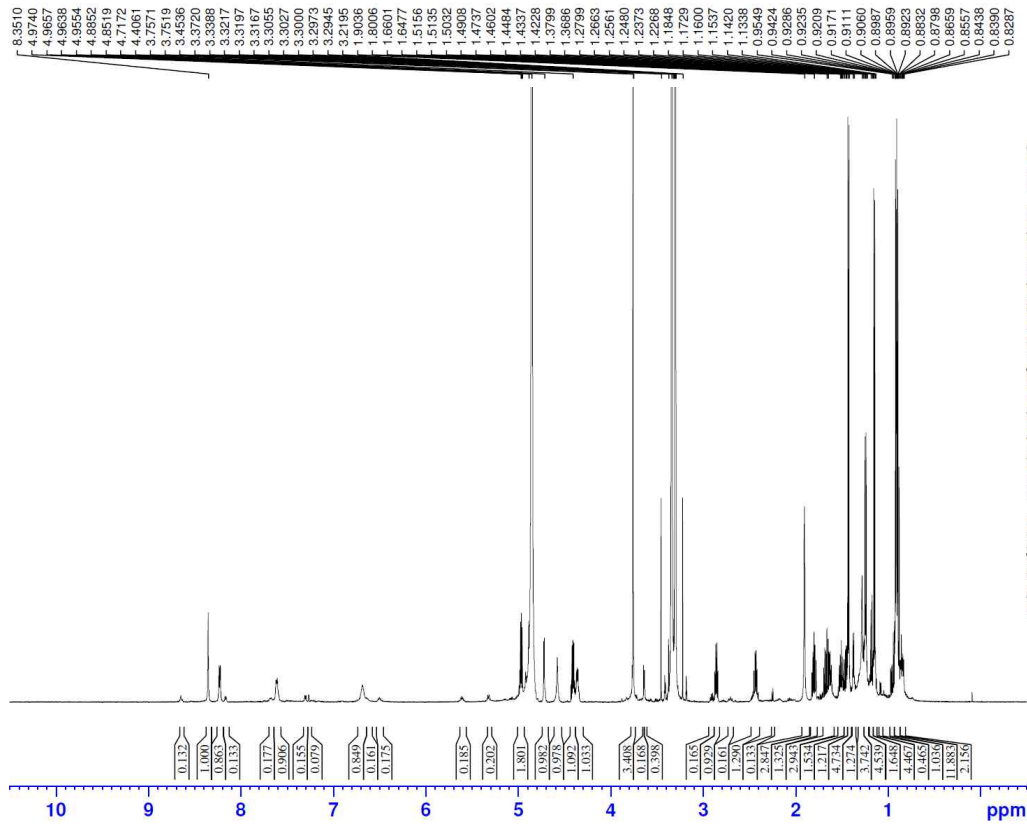


Fig. 90. 8번 물질의 ^1H NMR spectrum.

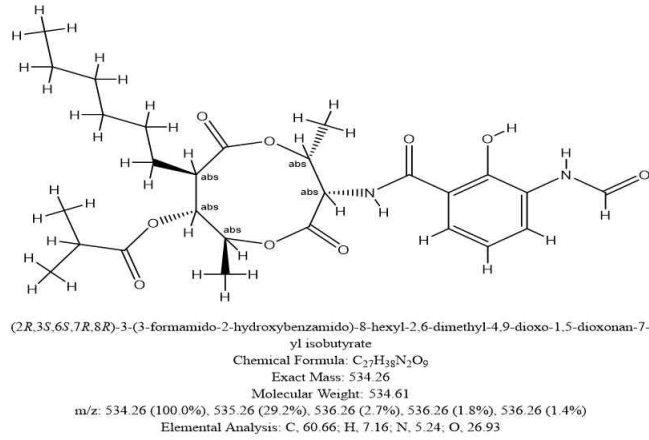


Fig. 91. 8번 물질 (Antimycin A2)의 평면구조.

9번 물질은 high resolution LC/MSMS 측정 시 [M+H]⁺, m/z 549.27로 나타났으며 패턴 분석 시 동일하게 Antimycin A의 유도체라는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 92). MSMS 및 ¹H 스펙트럼 (Fig. 93) data를 참고문헌과의 비교 분석을 통하여 최종 분자식 및 평면구조를 결정한 결과, Antimycin A1으로 확인되었다 (Fig. 94).

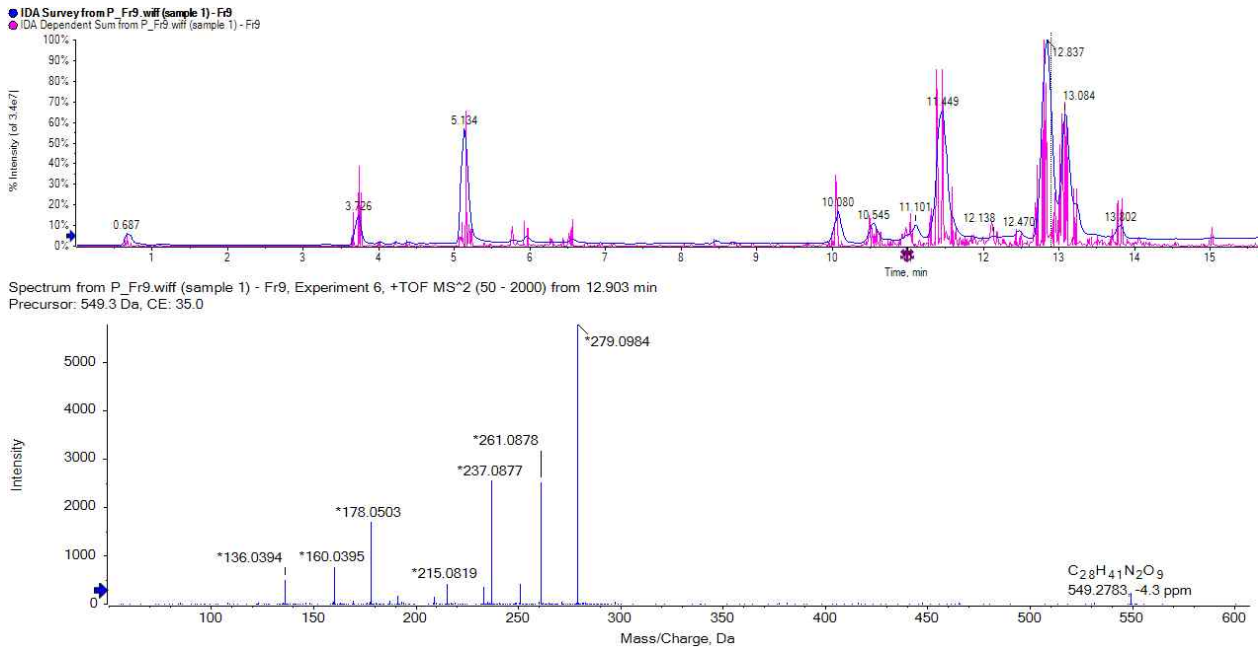


Fig. 92. 9번 물질의 high resolution LC/MSMS 결과.

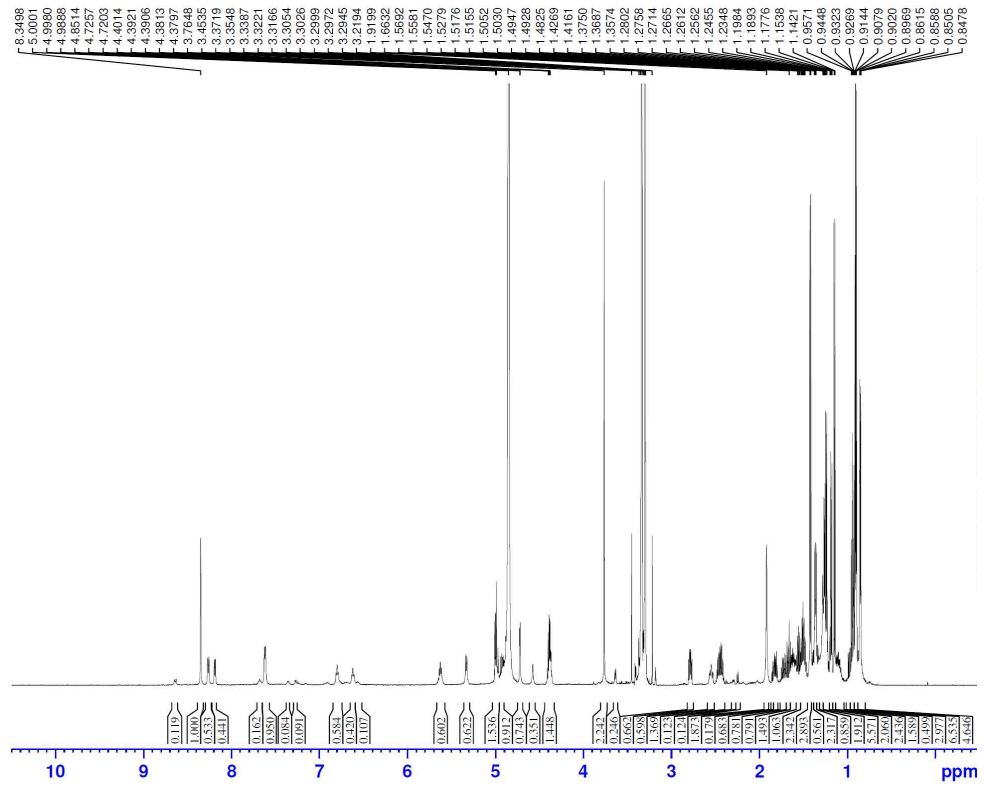


Fig. 93. 9번 물질의 ^1H NMR spectrum.

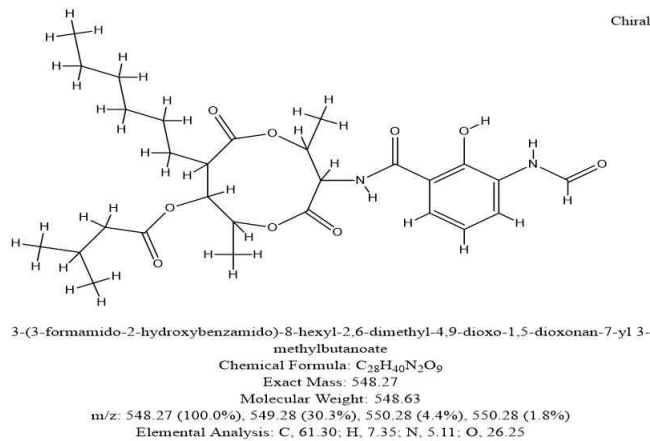
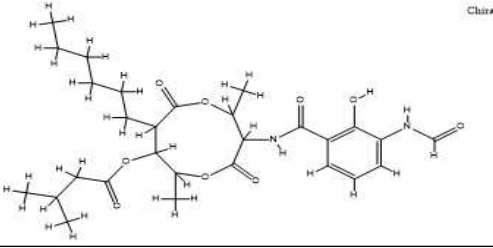
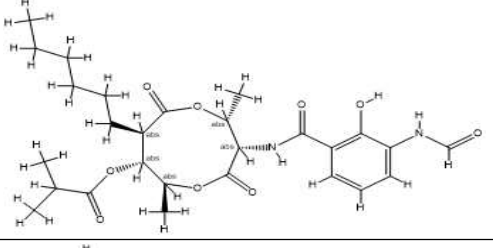
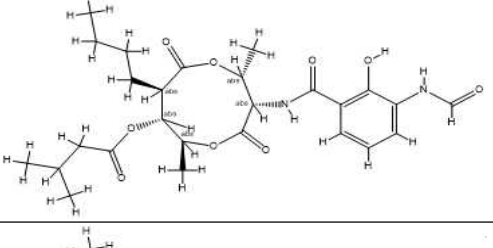
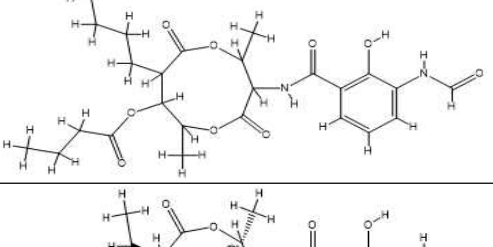
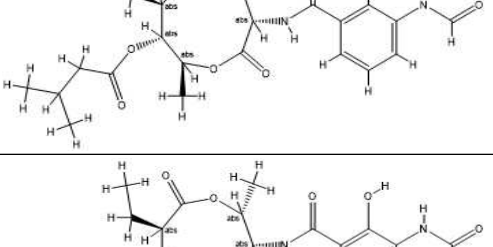
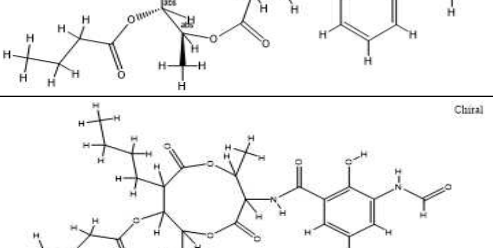
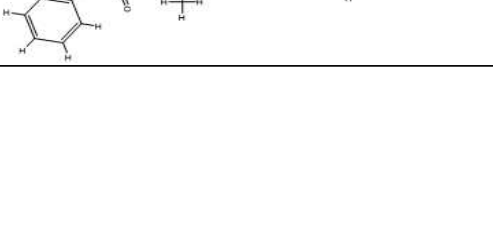


Fig. 94. 9번 물질 (Antimycin A1)의 평면구조.

이와 같이 S-630 방선균 균주로부터 다양한 살충활성을 가지는 7종의 JHAN 활성 물질의 구조를 동정하였다 (Table. 9). Antimycin A는 *Streptomyces* 속의 방선균이 생산하는 것으로 알려져 있는 항진균성 항생물질로 현재까지 곤충 성장조절 활성, 특히 JHAN 활성에 대하여는 알려진 사례가 없다. 연구 결과를 통하여 JHAN 활성과 살충 활성 간에 높은 상관관계를 가진다는 것을 확인하였으며, 이는 추후 구조 변화 및 유도체 합성 등의 전략을 통하여 응용 가능할 것으로 판단된다.

Table 9. S-630 균주 추출물의 IGR 활성 물질 목록

Type	Compound	Molecular weight	Formular	Structure
Antimycin A1	Compound 9	548.27	$C_{28}H_{40}N_2O_9$	
Antimycin A2	Compound 8	535.26	$C_{27}H_{38}N_2O_9$	
Antimycin A3	Compound 5 Compound 6	520.24	$C_{26}H_{36}N_2O_9$	
Antimycin A4	Compound 2 Compound 3 Compound 4	506.23	$C_{25}H_{34}N_2O_9$	
Antimycin A5	Compound 1	492.2	$C_{28}H_{40}N_2O_9$	
Antimycin A6	Compound 2 Compound 3	478.2	$C_{23}H_{30}N_2O_9$	
Antimycin A9	Compound 7	554.2	$C_{29}H_{34}N_2O_9$	

2-2. 국내외산 식물체 추출물로부터 곤충 성장조절 물질 탐색 (제2세부과제)

가. 세부연구수행 내용

(1) 식물체 추출물 시료 확보

본 연구에서 확보된 국내외산 식물체 정유 추출물 목록은 아래와 같다. 식물체 정유는 Oshadhi (Cambridge, UK)와 Jinarome (www.jinarome.com)에서 구입하여 사용하였으며 미나리과 정유 등 총 178종의 시료를 실험에 사용하였다.

Table 1. 식물체 정유 목록

번호	과(Family)	일반명(Common name)	학명(Scientific name)
1	측백나무과	Cade	<i>Juniperus oxycedrus</i>
2		Cypress	<i>Chamaecyparis obtusa</i>
3		Fokienia wood HA	<i>Fokienia hodgensii</i>
4		Cypress	<i>Cupressus sempervirens</i>
5		Fokienia (siam-wood)	<i>Fokienia hodgensii</i>
6		Hinoki	<i>Calitis intratropica</i>
7		Texas-cedar	<i>Juniperus mexicana</i>
8	낙우송과	Japanese Cedar	<i>Cryptomeria japonica</i>
9	소나무과	Fir needle	<i>Abies holophylla</i>
10		Spruce, spruce	<i>Picea mariana</i>
11		Larch HA	<i>Larix europea</i>
12		Fir, silver	<i>Abies alba</i>
13		Atlas-cedar	<i>Cedrus atlantica</i>
14		Zeder, Himalayan Cedar	<i>Cedrus deodora</i>
15	수련과	Golden Lotus abs	<i>Nymphaea mexicana</i>
16	원테라과	Pepper tasmanian	<i>Tasmania lanceolata</i>
17	후추과	Cubeb	<i>Piper cubeba</i>
18	녹나무과	Massoia	<i>Cryptocarya massoia</i>
19		Ho-Oil	<i>Cinnamomum camph. Ho-Sho</i>
20	포포나무과	Ylang ylang	<i>Canagaa odorata</i>
21		Cananga HA	<i>Cananga odorata</i>
22	목련과	Magnolia leaves	<i>Michelia alba</i>
23		Magnolia blossoms	<i>Michelia alba</i>
24	육두구과	Nutmeg	<i>Myristica fragrans</i>
25	창포과	Calmus	<i>Acorus calamus</i>
26	수선화과	Tuberose (in 20% grape alcohol)	<i>Polianthes tuberosa</i>
27	붓꽃과	Iris Absolute	<i>Iris pallida</i>
28	크산토로이아과	Fire-Tree (in dipropylene alcohol)	<i>Xanthorrhoea preissii</i>
29	사초과	Cypriol (Nagarmotha)	<i>Cyperus scariosus</i>
30	벼과	Lemongrass	<i>Cymbopogon citratus</i>
31		Palmarosa	<i>Cymbopogon martini</i>
32		Citronella java	<i>Cymbopogon nardus</i>
33		Vetiver haiti	<i>Vetiveria zizaniodes</i>
34		African Bluegrass	<i>Cymbopogon validus</i>
35		Ahibero	<i>Cymbopogon giganteus</i>
36		Hay Absolute	<i>Hierochlea alpina</i>
37		Vetiver	<i>Vetiveria zizanoides</i>
38		생강과	Cardamone MR
39	Gingerlily (sonna)		<i>Hedychium spicatum</i>
40	미나리아재비과	Nigella	<i>Nigella sativa</i>
41	연꽃과	Lotus pink	<i>Nelumbo nucifera</i>
42	단향과	Sandalwood AGD	<i>Santalum album</i>
43	조록나무과	Styrax, Oriental Sweetgum	<i>Liquidamber orientalis</i>

44	포도과	Yeast	<i>Vitis vinifera</i>
45	쥐손이풀과	Geranium	<i>Pelargonium graveolens</i>
46		Geranium BB JA	<i>Pelargonium graveolens</i>
47		Geranium Zdravets	<i>Geranium macrorrhizum</i>
48	도금양과	Eucalyptus citriodora	<i>Eucalyptus citriodora</i>
49		Eucalyptus dives var.c	<i>Eucalyptus dives var. c</i>
50		Eucalyptus oil	<i>Eucalyptus globulus</i>
51		Eucalyptus polybractea	<i>Eucalyptus polybractea</i>
52		Eucalyptus radiata	<i>Eucalyptus radiata</i>
53		Eucalyptus smithii	<i>Eucalyptus smithii</i>
54		Leptospermum petersonii	<i>Leptospermum petersonii</i>
55		Melaleuca dissitiflora	<i>Melaleuca dissitiflora</i>
56		Melaleuca linariifolia	<i>Melaleuca linariifolia</i>
57		Melaleuca quinquenervia	<i>Melaleuca quinquenervia</i>
58		Melaleuca uncinata	<i>Melaleuca uncinata</i>
59		Bay	<i>Pimenta racemosa</i>
60		Cajeput extra ND	<i>Melaleuca cajuputii</i>
61		Allspice MR	<i>Pimenta dioica</i>
62		Kanuka	<i>Leptospermum ericoides</i>
63		Manuka	<i>Leptospermum scoparium</i>
64		Manuka (Mountain)	<i>Leptospermum scoparium var. alpine</i>
65	Myrtle extra	<i>Myrtus communis</i>	
66	남가새과	Guaiac wood 75% (25% alcohol)	<i>Bulnesia sarmienti</i>
67	물레나물과	St. John's wort	<i>Hypericum perforatum</i>
68	대극과	Cascarilla	<i>Croton niveous</i>
69	버드나무과	Popla Balsam	<i>Populusbalsamiferassp.</i>
70	콩과	Copaiva balm HA	<i>Copaifera reticulata</i>
71		Cabreuva wood HA	<i>Myrocarpus fastigiatus</i>
72		Peru balsam HA	<i>Myroxylon pereira</i>
73		Mimosa Absolute	<i>Acacia dealbata</i>
74		Tonka (in 66% sweet almondoil)	<i>Dipteryx odorata</i>
75		Peru Balm, distilled	<i>Myroxylonbalsamum</i>
76	이우시과	Gurium HA	<i>Dipterocarpus turbinatus</i>
77		Gurjum	<i>Dipterocarpus turbinatus</i>
78	아욱과	Ambrette seed	<i>Abelmoschi seminis</i>
79	웃나무과	Cotinus (Smoke Tree)	<i>Cotinus coggygria</i>
80		Rhus tarantana	<i>Rhus taratana</i>
81	감람과	Frankincense MR	<i>Boswellia carterii</i>
82		Elemi MR	<i>Canarium luzonicum</i>
83		Frankincense	<i>Boswellia carterii</i>
84		Frankincense, ind.	<i>Boswellia serrata</i>
85		Elemi	<i>Canarium luzonicum</i>
86		Myrrh	<i>Commiphora myrrha</i>
87		Opoponax	<i>Commiphora glabrescens</i>
88		Palo Santo (HolyWood)	<i>Bursera graveolens</i>
89	멀구슬나무과	Aglaiia (Chinese Rice Flower) abs	<i>Aglaiia odorata</i>
90	운향과	Bergamot	<i>Citrus bergamia</i>
91		Grape fruit	<i>Citrus paradisi</i>
92		Lime distilled	<i>Citrus aurantifolia</i>
93		Mandarine	<i>Citrus reticulata</i>
94		Orange	<i>Citrus sinensis</i>
95		Tangerine	<i>Citrus × tangerina</i>
96		Amyris MR	<i>Amyris balsamifera</i>
97		Clementine HA	<i>Citrus clementina</i>
98		Prtitgrain MR, Petitgrain	<i>Citrus aurantiums sp.amara</i>
99		Amyris	<i>Amyris balsamifera</i>
100		Cape May	<i>Coleonema album</i>
101		Katafray	<i>Cedrelopsis grevei</i>

102		Mandarine, green extra	<i>Citrus reticulata</i>
103		Petitgrain Mandarine extra	<i>Citrus reticulata</i>
104		Zanthoxylum alatum	<i>Zanthoxylum alatum</i>
105	때죽나무과	Benzoin, abs.	<i>Styrax benzoe</i>
106	진달래과	Rhododendron	<i>Rhododendron anthopogon</i>
107		Wintergreen extra	<i>Gaultheria fragrantissima</i>
108	마편초과	Verbena maroc.	<i>Lippia citriodora</i>
109		Verbenea	<i>Lippia citriodora</i>
110		Verbena (java) (Zimbani)	<i>Lippia javanica</i>
111	물푸레나무과	Jasmine Sambac (China) Absolute	<i>Jasminum sambac</i>
112		Osmantus (in 20% grape alcohol)	<i>Osmanthus fragrans</i>
113	꿀풀과	Basil	<i>Ocimum basilicum</i>
114		Lavender	<i>Lavandula officinalis</i>
115		Majoram	<i>Origanum majorana</i>
116		Penny royal	<i>Mentha pulegium</i>
117		Sage spanish	<i>Salvia officinalis</i>
118		Spearmint	<i>Mentha spicata</i>
119		Thyme red	<i>Thymus vulgaris</i>
120		Thyme white	<i>Thymus vulgaris</i>
121		Hyssop JA	<i>Hyssopus officinalis</i>
122		Hyssop MR	<i>Hyssopus officinalis</i>
123		Lavandin JA	<i>Lavandula hybrida</i>
124		Litesa MR	<i>Litsea cubeba</i>
125		Patchouli MR	<i>Pogostemon patchouli</i>
126		Hyssop	<i>hyssopus officinalis</i>
127		Lavender, Seville	<i>Lavandula luisieri</i>
128		Patchouli	<i>Pogostemon patchouli</i>
129		Salvia stenophylla	<i>Salviastenophylla</i>
130		Summer Savory	<i>Satureja hortensis</i>
131		Thyme, mild (linalol)	<i>Thymus zygis</i>
132	지치과	Black sage	<i>Cordia verbenacea</i>
133	감탕나무과	Mate abs (re-distilled)	<i>Ilex paraguayensis</i>
134	미나리과	Caraway seed	<i>Carum carvi</i>
135		Cumin	<i>Cuminum cyminum</i>
136		Ajowan MR	<i>Trachyspermum ammi</i>
137		Caevi HA	<i>Carum carvi</i>
138		Carrotseed MR	<i>Daucus carota</i>
139		Coriander MR	<i>Coriandrum sativum</i>
140		Dill MR	<i>Anethum graveolens</i>
141		Galbanum MR	<i>Ferula galbaniflua</i>
142		Amми visnaga	<i>Amми visnaga</i>
143		Carrot seed	<i>Daucus carota</i>
144		Celery	<i>Apium graveolens</i>
145		Coriander seed	<i>Coriandrum sativum</i>
146		Coriander, herb (cilantro)	<i>Coriandrum sativum</i>
147		Galbanum	<i>Ferula galbaniflua</i>
148		Parsley	<i>Petroselinum sativum</i>
149		Pastinak	<i>Pastinaca sativa</i>
150	국화과	Wormwood	<i>Artemisia absinthium</i>
151		Artemisia afra HA	<i>Artemisia afra</i>
152		Davana MR	<i>Artemisia pallens</i>
153		Artemisia afra	<i>Artemisia afra</i>
154		Artemisia arborescens	<i>Artemisia arborescens</i>
155		Chamomile, blue	<i>Chamomilla matricaria</i>
156		Chamomile, roman	<i>Anthemis nobilis</i>
157		Chamomile, wild	<i>Ormensis multicaulis</i>
158		Chrysantheme, abs	<i>Chrysanthemum morifolium</i>
159			Costus, root

160		Davana	<i>Artemisia pallens</i>
161		Elecampaneroots	<i>Inula racemosa</i>
162		Erigeron	<i>Coniza canadensis</i>
163		Eriocephalus punctulatus	<i>Eriocephalus punctulatus</i>
164		Feverfew Organic	<i>Tanacetum parthenium</i>
165		Helichrysum	<i>Helichrysum italicum</i>
166		Helichrysum (Immortella)	<i>Helichrysum italicum</i>
167		Helichrysum bracteiferum	<i>Helichrysum bracteiferum</i>
168		Sandalwood African	<i>Brachyleana hutchinsii</i>
169		Santolina	<i>Santolina chamaecyparissus</i>
170		Southern wood Organic	<i>Artemisia abrotanum</i>
171		Tagetes extra-s	<i>Tagetes minuta</i>
172		Tarragon	<i>Artemisia dracunculus</i>
173	마타리과	Spikenard	<i>Nardostachys jatamansi</i>
174		Spikenard, chin	<i>Nardostachys sinensis</i>
175		Valerian	<i>Valeriana officinalis</i>
176		Valerina, ind. (tagar)	<i>Valeriana wallichii</i>
177	뜸부기과	Seaweed Absolute	<i>Fucus vesiculosus</i>
178	석화과	Lichen Absolute	<i>Parmelia nepalensis</i>

(2) 생물검정법 확립

(가) 모기에 대한 살충활성

본 실험에 사용한 흰줄숲모기와 빨간집모기는 국립보건원에서 분양, 계대 사육한 3령기 유충을 사용하였다. 난괴는 수거하여 플라스틱 용기(25×15×7 cm)에 옮겼으며 상업용 물고기 사료로 사육하였다. 성충은 24×35×5 cm 사육망에서 설탕물 10%를 공급해 주었으며 쥐를 넣어 흡혈을 하였다. 사육실은 온도 27±1°C, 습도 60±5 %, 16:8(L:D) 광주기를 유지하였다. 유충에 대한 식물오일과 그 성분의 살충활성을 평가하기 위하여 흰줄숲모기 3령 유충 10마리를 증류수 200 mL가 담긴 270 mL의 종이컵에 옮겼다 (Fig. 1). 식물체 정유와 정유유래 화합물들은 아세톤에 녹인 후 0.1 mg/mL 농도로 4반복 처리하였다. 대조군에는 용매인 아세톤만을 처리하였다. 처리 48시간 경과 후 건드려도 움직이지 않는 것을 죽은 것으로 하여 살충률을 평가하였으며 살충률이 높은 정유 및 정유유래 화합물들은 농도를 점차 낮추어 가며 실험을 계속 진행 하였다. 실험 조건은 25±1°C의 실내조건에서 실시하였다.

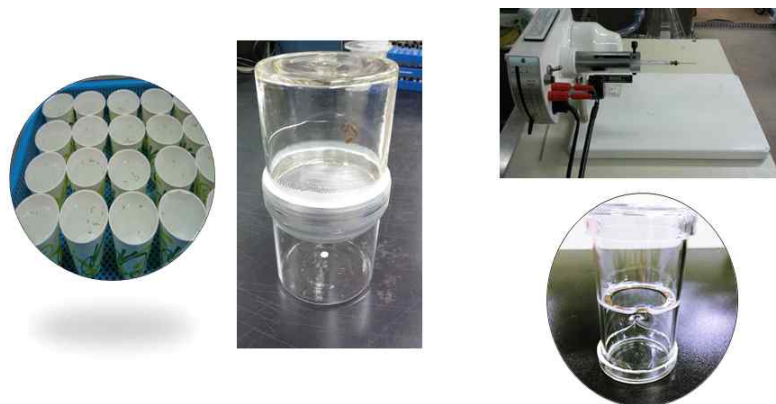


Fig. 1. 모기유충에 대한 침지법, 바퀴 및 쌀바구미 대한 훈증 및 접촉 살충활성 검정법.

(나) 바퀴에 대한 살충활성

실험에 사용된 독일바퀴 (*Blattella germanica* L.)는 실내 사육조건 온도 $27 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 60-70%, 광주기 16L:8D의 조건하에 사육상자(637×437×326 mm)에서 물과 쥐사료 (썬카길애그리퓨리나)를 공급하며 사육하였다. 훈증 독성 실험은 성충 수컷과 암컷을 각각 10마리씩 원통형 유리용기(ϕ 9×10 cm)에 넣고, 정유와 화합물을 filter paper (ADVANTEC, ϕ 0.8 cm)에 처리하여 같은 크기의 또 다른 유리용기 바닥에 놓았다. 두 용기 사이에는 정유와 화합물들의 바퀴와의 접촉을 막기 위해 철망을 놓았고 parafilm (Pechiney Plastic Packaging Company, Chicago, USA)으로 밀봉하였다 (Fig. 1). 처리 48시간 후에 사충수를 조사하였으며 4반복으로 실험하였다. 접촉 독성 실험은 auto microapplicator (Burkard, UK)를 이용하여 성충 수컷과 암컷 각각 10마리를 CO₂로 질식시킨 후, 적정량의 정유와 화합물을 acetone에 녹여 auto microapplicator를 이용해 배 부분에 묻혀주었다 (Fig. 1). 수컷과 암컷을 따로 페트리디쉬 (ϕ 9×1.5 cm)에 넣고 처리 24시간 후에 사충수를 조사하였으며, 5반복으로 실험하였다.

(다) 쌀바구미에 대한 살충활성

실험에 사용한 쌀바구미는 플라스틱케이지에(60×40×40 cm)에 넣고 현미를 먹이로 공급하면서 사육실에서 사육하였다. 사육실은 온도 $27 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $60 \pm 5\%$, 16:8(L:D) 광주기를 유지하였다. 식물체추출의 쌀바구미 성충에 대한 훈증살충활성은 우선 필터페이퍼에(8 mm, Advantec, Tokyo, Japan) 식물체추출물을 유리병(diameter, 5 cm; height, 10 cm) 아래 뚜껑에 처리하였다. 유리병 중간에는 철망이 놓여져 있으며 철망 위에 반복당 10마리씩 쌀바구미를 넣은 후 식물체추출물을 처리한 아래 뚜껑과 윗 뚜껑을 닫은 후 파라필름으로 잘 밀봉하였다. 처리한 유리병은 사육실에 넣었으며 48시간 후에 훈증 살충활성을 조사하였다 (Fig. 1).

(3) 식물체 정유 물질 분석

정유의 분석은 Agilent사의 7890B (Santa Clara, CA, USA)의 GC-FID (Gas chromatography-flame ionization detector)로 분석하였다. Column은 DB-5MS column (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness, Agilent, CA, USA)을 이용하였고, split은 30:1로 oven 온도는 40°C 에서 시작하여 5°C 간 머무름 시간을 갖고 분당 5°C 의 속도로 250°C 까지 온도를 높인 후 다시 5°C 의 기다림 시간을 가졌다. Carrier gas는 질소를(1.5 mL/min) 이용하였다. 더 정확한 분석을 위해 gas chromatography 7890B (Santa Clara, CA, USA)-mass spectrometer 5977B MSD, Agilent, CA, USA)를 사용하였고 오븐 설정시간은 GC-FID와 동일하게 사용하였다. Carrier gas는 helium (1.0 mL/min)을 사용하였고 이온화 조건은 70 eV, 230°C 이고 scan range는 41-400 amu이다. Retention indices (RI)를 측정하기 위해 *n*-alkanes (C₈-C₂₂) homologues series를 사용하였고, NIST MS library를 통해 정유 성분을 확인하였다. 정량분석을 위해서 정유와 표준물질로 C9 (purity 99%, Wako), C12 (purity 99%, Wako), 그리고 C18 (purity 99%, Wako)를 함께

주입하였다.

(4) 파슬리(parsley) 정유로부터 물질 분리 및 구조 동정

JHAN 및 흰줄숲모기에 활성이 우수하였던 파슬리 정유로부터 활성물질을 분리하기 위하여 생물검정유도 활성물질을 분리하였다 (Fig. 2). 먼저 파슬리 정유를 오픈칼럼크로마토그래피에 로딩한 후 hexane과 ether를 이용하여 순차적으로 극성을 높여주면서 용매를 흘려주었다. 처음 컬럼에서 hexane 100%, hexane:ether = 90:10, 그리고 hexane:ether = 0:100 3부분으로 나눈 후 흰줄숲모기에 대한 살충활성을 한 결과 2번째 fraction이 활성이 가장 우수하여 한 번 더 칼럼을 이용하여 활성물질을 분리하였다. 분리된 3종의 화합물들은 Varian UI 500 NMR (500 MHz for ^1H spectra, 125 MHz for ^{13}C spectra)을 이용하여 구조를 분석하였다.

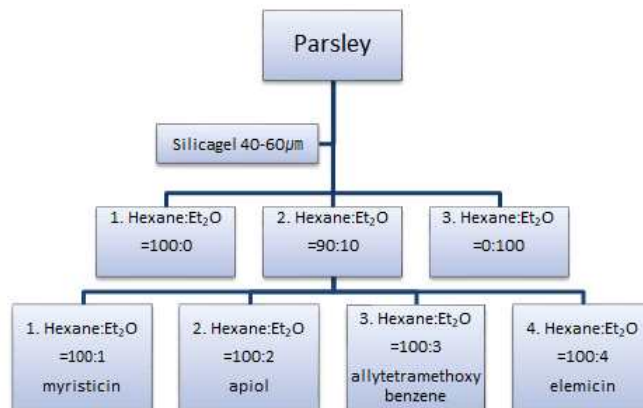


Fig. 2. 파슬리(parsley) 정유로부터 모기 유충에 대한 살충활성 물질 분리.

(5) 식물체정유 성분

JHAN 혹은 JHA 활성이 우수하였던 식물체 정유로부터 분석된 화합물들 중 상업적으로 이용 가능한 화합물들을 구입하여 살충활성을 검정하였다. 본 실험에 사용한 화합물 목록은 표 2에, 구조는 그림 3에 나타내었다. 분리된 화합물인 myristicin, alltetramethoxybenzene 그리고 apiol의 화학구조는 그림 8에 나타내었다.

Table 2. 살충활성 검정에 사용된 IGR 활성 우수 식물체 정유 유래 화합물 목록

번호	화합물명	순도(%)	구입처
1	(-)- α -Pinene	99	Sigma-aldrich
2	(-)-Camphene	80	Sigma-aldrich
3	(+)- β -Pinene	≥ 98.5	Sigma-aldrich
4	Myrcene	75	Sigma-aldrich
5	α -Phellendrene	65	TCI
6	α -Terpinene	85	Fluka
7	ρ -Cymene	99	Sigma-aldrich
8	(-)-Limonene	95	TCI
9	(+)-Limonene	97	Sigma-aldrich
10	1,8-Cineole	99	Sigma-aldrich

11	γ -Terpinene	≥ 97	Fluka
12	Linalool	98	Wako
13	Camphor	96	Sigma-aldrich
14	Borneol	>70	TCI
15	Terpinen-4-ol	>95	TCI
16	Linalyl acetate	>95	TCI
17	β -Citronellol	95	Sigma-aldrich
18	Thymol	≥ 99	Fluka
19	Eugenol	≥ 99	Fluka
20	β -Caryophyllene	>90	TCI
21	α -Humulene	≥ 98	Fluka
22	Myristicin	-	분리
23	Elemicin	-	분리
24	Alltetramethoxybenzene	-	분리
25	Apiol	-	분리

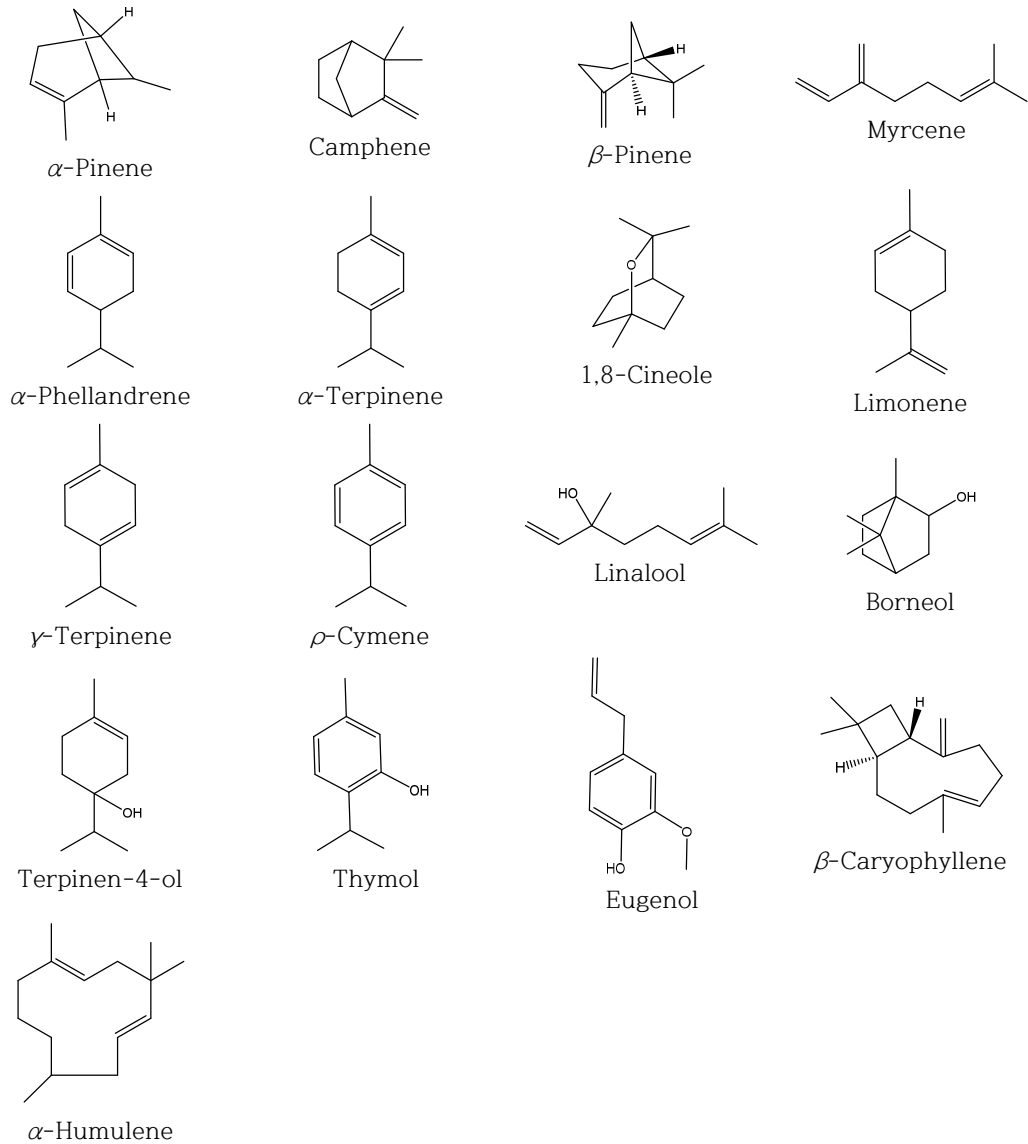


Fig. 3. IGR 활성 우수 식물체 정유 유래 화합물들의 화학구조.

(6) 식물체 정유 잔류량 분석

식물체 정유의 물에서의 잔류량을 확인하기 위하여 아세톤에 녹인 식물체 정유와 정유 성분들을 증류수 200 mL이 담겨있는 유리 비이커에(250 mL) 처리하였다. 식물체 정유와 정유 성분들의 농도는 0.1 mg/mL 이었다. 피펫을 이용하여 1 mL 용액을 처리 2일과 7일후에 비이커로 추출하고 용액을 소량의 NaCl을 이용하여 탈수시킨 후 undecane가 표준시약으로 들어있는 2 mL 헥센으로 추출하였다. Undecane의 농도는 2일차 추출용액에서는 0.01 mg/mL 이었으며 7일차 추출용액에서는 0.001 mg/mL 이었다. 추출한 용액은 가스크로마토그래피를 이용하여 분석하였다. 분석조건은 아래와 같다. 식물체 정유와 정유 성분들의 잔류량은 표준시약의 피크면적과 비교하여 산출하였다. 잔류량 분석은 Agilent사의 7890B (Santa Clara, CA, USA)의 GC-FID (Gas chromatography - flame ionization detector)로 분석하였다. Column은 DB-5MS column (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness, Agilent, CA, USA)을 이용하였고, split은 30:1로 oven 온도는 40°C에서 시작하여 5°C간 머무름 시간을 갖고 분당 5°C의 속도로 250°C까지 온도를 높인 후 다시 5°C의 기다림 시간을 가졌다. Carrier gas는 Nitrogen (1.5 mL/min)을 이용하였다.

(7) 식물체정유 제형 개발

(가) Polyvinyl alcohol을 이용한 식물체 정유 마이크로에멀전(microemulsion) 제형 개발

흰줄숲모기 유충에 활성이 우수하였던 식물체 정유의 현장적용을 위해 polyvinyl alcohol을 이용하여 식물체 정유의 마이크로에멀전 제형을 개발하였다. 식물체 정유의 마이크로에멀전 제형은 식물체정유 100 μl를 PVA (polyvinyl alcohol, 15000 Da, Sigma-Aldrich)가 함유된 탈이온수 900 μl에 첨가하였다. PVA 함유 비율이 각각 2.5%, 5% 그리고 10%인 제형을 제조하였다. 혼합물을 VACX130 (Sonic & Materials, USA)을 이용하여 1분간 65W로 잘 혼합시켰다. 마이크로에멀전 제형은 dark-field microscope (Nikon ECLIPSE LV 100, Nikon Instruments Inc, USA)를 이용하여 잘 혼합이 되었는지 관찰하였다 (Fig. 4). 관찰 결과 평균 마이크로에멀전 방울의 크기는 570 nm였다. 마이크로에멀전 방울의 크기는 일정하게 유지되었으나 7일 경과 후에는 파티클사이즈가 890 nm 정도로 증가되었다. 이는 제형을 보관하는 동안 마이크로에멀전 방울들이 뭉쳐진 결과로 보여지며 다시 VACX130 (Sonic & Materials, USA)을 이용하여 1분간 65W로 혼합시킬 경우 원래 파티클 사이즈로 줄어들었다.

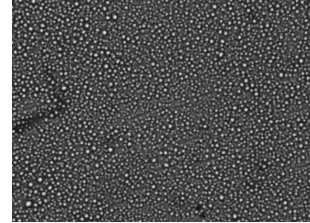
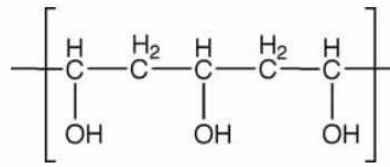


Fig. 4. Polyvinyl alcohol를 이용한 파슬리 식물체 정유의 마이크로에멀전 제형.

(나) Polyurethane을 이용한 식물체정유 제형 개발

Polyurethane을 이용한 제형 실험에는 쌀바구미에 활성이 우수하였던 미나리아재비과인 *Nigella* (*Nigella sativa*)와 운향과인 Mandarin green (*Citrus reticulata*) 등 총 2종의 식물체 정유를 선발하여 사용하였고 제형 훈증 실험에 사용한 화합물은 살충활성이 우수하였던 thymol을 사용하였다. 쌀바구미 훈증제는 폴리우레탄 재질을(30 mm width × 100 mm height × 0.2 mm film thickness) (Sejin Poly, Seoul, Republic of Korea) 사용하여 제작하였다 (Fig. 5). 제형에 대한 살충활성은 아래 그림 5와 같이 플라스틱 통에(5 L) 쌀 200g을 넣은 후 쌀바구미 200마리를 각각 처리구 및 대조구에 넣은 후 30일 후에 쌀의 가해 정도를 무게를 달아 비교하였다.



Fig. 5. Polyurethane 제형의 쌀바구미에 대한 훈증 실험.

나. 세부연구수행 결과

(1) 식물체 정유의 흰줄숲모기 유충에 대한 살충활성

총 178개의 식물체정유의 흰줄숲모기 유충에 대한 살충활성은 표 3에 나타내었다. 이들 정유 중 pepper tasmanian, massoia, manuka, peru balsam, mimosa, palo santo, amyris, cape, mandarine, patchouli, ajowan, carrot seed, parsley, costus 그리고 valerina 정유가 0.1 mg/mL 농도에서 48시간 후에 100%의 살충활성을 나타내었다. 농도 0.05 mg/mL 농도에서는 pepper tasmanian, massoia, manuka, peru balsam, orange, 그리고 mandarine 정유가 >90% 의 높은 살충활성을 나타내었다.

Table 3. 식물체 정유의 흰줄숲모기 유충에 대한 살충활성

일반명(Common name)	살충율(% , 평균±표준편차, N = 4)		
	0.1 ¹	0.05	0.025
Cade	15±12.9	- ²	-
Cypress (Chamaecyparis obtusa)	42.5±18.9	-	-
Fokienia wood HA	7.5±9.6	-	-
Cypress (<i>Cupressus sempervirens</i>)	42.5±37.7	-	-
Fokienia (siam-wood)	77.5±5.0	37.5±9.6	-
Hinoki	12.5±05.0	-	-
Texas-cedar	57.5±12.6	32.5±17.1	-
Japanese Cedar	75±12.9	7.5±9.6	-
Fir needle	60±21.6	17.5±17.1	-
Spruce, spruce	47.5±9.6	-	-
Larch HA	20±8.2	-	-
Fir, silver	97.5±5.0	85±10	12.5±9.6
Atlas-cedar	0	-	-
Zeder,Himalayan Cedar	35±19.1	-	-
Golden Lotus abs	85±10	20±18.3	-
Pepper tasmanian	100	92.5±9.6	20±9.6
Cubeb	20±16.3	-	-
Massoia	100	95±5.8	37.5±9.6
Ho-Oil	7.5±9.6	-	-
Ylang ylang	2.5±5.0	-	-
Cananga HA	2.5±5.0	-	-
Magnolia leaves	0	-	-
Magnolia blossoms	17.5±9.6	-	-
Nutmeg	90±8.2	85±19.1	12.5±5.0
Calmus	100	100	97.5±5.0
Tuberose (in 20% grape alcohol)	70±21.6	10±8.2	-
Iris Absolute	2.5±5.0	-	-
Fire-Tree (in dipropylene alcohol)	0	-	-
Cypriol (Nagarmotha)	30±16.3	-	-
Lemongrass	25±20.8	-	-
Palmarosa	5±10.0	-	-
Citronella java	17.5±15.0	-	-
Vetiver haiti	82.5±15.0	30±14.1	-
African Bluegrass	65±23.8	20±8.2	-
Ahibero	35±5.8	-	-
Hay Absolute	2.5±5.0	-	-
Vetiver	95±5.8	42.5±27.5	15±12.9
Cardamone MR	2.5±5.0	-	-
Gingerlily (sonna)	67.5±5.0	15±12.9	-
Nigella	5±5.8	-	-
Lotus pink	20±16.3	-	-
Sandalwood AGD	60±16.3	40±8.2	-
Styrax, Oriental Sweetgum	40±16.3	-	-
Yeast	22.5±20.6	-	-
Geranium	2.5±5.0	-	-
Geranium BB JA	82.5±17.1	5±5.8	-
Geranium Zdravets	97.5±5.0	52.5±9.6	47.5±32.0
Eucalyptus citriodora	17.5±9.6	-	-
Eucalyptus dives var. c	5±10.0	-	-
Eucalyptus oil	0	-	-

Eucalyptus polybractea	2.5±5.0	-	-
Eucalyptus radiata	0	-	-
Eucalyptus smithii	5±5.8	-	-
Leptospermum petersonii	2.5±5.0	-	-
Melaleuca dissitiflora	12.5±12.6	-	-
Melaleuca linariifolia	2.5±5.0	-	-
Melaleuca quinquenervia	2.5±5.0	-	-
Melaleuca uncinata	2.5±5.0	-	-
Bay	35±10.0	-	-
Cajeput extra ND	10±11.5	-	-
Allspice MR	90±8.2	55±17.3	2.5±5.0
Kanuka	20±23.1	-	-
Manuka	100	100	10±8.2
Manuka (Mountain)	0	-	-
Myrtle extra	2.5±5.0	-	-
Guaiac wood 75% (25% alcohol)	62.5±31.0	15±12.9	-
St. John's wort	80±21.6	15±12.9	-
Cascarilla	2.5±5.0	-	-
Popla Balsam	20±18.3	-	-
Copaiva balm HA	7.5±5.0	-	-
Cabreuva wood HA	55±23.8	10±8.2	-
Peru balsam HA	100	97.5±5.0	80±14.1
Mimosa Absolute	100	0	-
Tonka (in 66% sweet almondoil)	15±5.8	-	-
Peru Balm, distilled	100	100	87.5±5.0
Gurjum HA	2.5±5.0	-	-
Gurjum	5±5.8	-	-
Ambrette seed	22.5±9.6	-	-
Cotinus (Smoke Tree)	70±33.7	35±23.8	-
Rhus tarantana	85±5.8	30±8.2	-
Frankincense MR	0	-	-
Elemi MR	97.5±5.0	62.5±27.5	27.5±9.6
Frankincense	95±10.0	7.5±9.6	-
Frankincense, ind.	77.5±17.1	42.5±26.3	20±8.2
Elemi	85±17.3	70±8.2	10±14.1
Myrrh	100	100	90
Opoponax	25±5.8	-	-
Palo Santo (HolyWood)	100	47.5±17.1	-
Aglaia (Chinese Rice Flower) abs	17.5±5.0	-	-
Bergamot	67.5±17.1	20±8.2	-
Grape fruit	97.5±5.0	80±16.3	0
Lime distilled	65±25.2	37.5±15.0	-
Mandarine	92.5±15.0	72.5±15.0	10±11.5
Orange	97.5±5.0	97.5±5.0	12.5±5.0
Tangerine	97.5±5.0	82.5±15.0	30±14.1
Amyris MR	100	50±7.5	7.5±5.0
Clementine HA	95±5.8	75±19.1	20±14.1
Prtitgrain MR, Petitgrain	100	5±5.8	-
Amyris	80±14.1	65±5.8	5±5.8
Cape May	100	25±5.8	-
Katafray	10±8.2	-	-
Mandarine, green extra	100	90±8.2	42.5±29.9
Petitgrain Mandarine extra	70±24.5	17.5±15.0	-
Zanthoxylum alatum	17.5±15.0	-	-

Benzoin, abs.	92.5±9.6	70±16.3	40±18.3
Rhododendron	62.5±26.3	20±8.2	-
Wintergreen extra	82.5±17.1	67.5±9.6	10±14.1
Verbena maroc.	32.5±5.0	-	-
Verbenea	67.5±17.1	-	-
Verbena (java) (Zimbani)	77.5±20.6	5±5.8	-
Jasmine Sambac (China) Absolute	82.5±12.6	52.5±23.6	-
Osmantus (in 20% grape alcohol)	42.5±9.6	-	-
Basil	10±8.2	-	-
Lavender	0	-	-
Majoram	20±14.1	-	-
Penny royal	52.5±22.2	0	-
Sage spanish	27.5±15.0	-	-
Spearmint	65±12.9	7.5±9.6	-
Thyme red	87.5±5.0	27.5±17.1	-
Thyme white	75±25.2	25±5.8	-
Hyssop JA	32.5±9.6	-	-
Hyssop MR	50±16.3	-	-
Lavandin JA	2.5±5.0	-	-
Litesa MR	92.5±9.6	17.5±5.0	-
Patchouli MR	55±10.0	5±5.8	-
Hyssop	20±16.3	-	-
Lavender, Seville	10±8.2	-	-
Patchouli	100	17.5±5.0	-
Salvia stenophylla	90±8.2	47.5±9.6	-
Summer Savory	100	65±23.8	20±14.1
Thyme, mild (linalol)	15±5.8	-	-
Black sage	12.5±5.0	-	-
Mate abs (re-distilled)	2.5±5.0	-	-
Caraway seed	97.5±5.0	35±5.8	-
Cumin	95±10.0	40±8.2	-
Ajowan MR	100	80±8.2	5±5.8
Caevi HA	97.5±5.0	35±5.8	-
Carrot seed MR	100	37.5±12.6	-
Coriander MR	2.5±5.0	-	-
Dill MR	90±8.2	45±19.1	-
Galbanum MR	42.5±5.0	5±5.8	-
Ammi visnaga	2.5±5.0	-	-
Carrot seed	100	42.5±15.0	2.5±5.0
Celery	97.5±5.0	60±16.3	7.5±5.0
Coriander seed	12.5±9.6	-	-
Coriander, herb (cilantro)	7.5±9.6	-	-
Galbanum	27.5±15.0	-	-
Parsley	100	60±11.5	15±5.8
Pastinak	5±5.8	-	-
Wormwood	5±10.0	-	-
Artemisia afra HA	2.5±5.0	-	-
Davana MR	12.5±15.0	-	-
Artemisia afra	5±10.0	-	-
Artemisia arborescens	0	-	-
Chamomile, blue	27.5±22.2	-	-
Chamomile, roman	15±12.9	-	-
Chamomile, wild	25±17.3	-	-
Chrysantheme, abs	80±21.6	5±5.8	-

Costus, root	100	40±8.2	-
Davana	2.5±5.0	-	-
Elecampane roots	72.5±35.9	15±10.0	-
Erigeron	30±29.4	-	-
Eriocephalus punctulatus	2.5±5.0	-	-
Feverfew Organic	7.5±9.6	-	-
Helichrysum	0	-	-
Helichrysum (Immortella)	20±8.2	-	-
Helichrysum bracteiferum	5±5.8	-	-
Sandal wood African	87.5±12.6	20±8.2	-
Santolina	37.5±22.2	-	-
Southern wood Organic	42.5±15.0	-	-
Tagetes extra-s	57.5±12.6	0	-
Tarragon	37.5±26.3	-	-
Spikenard	37.5±9.6	-	-
Spikenard, chin	65±19.1	-	-
Valerian	20±27.1	-	-
Valerina, ind. (tagar)	100	35±28.9	-
Seaweed Absolute	12.5±9.6	-	-
Lichen Absolute	5±.8	-	-

¹mg/mL. ²Not tested

(2) 식물체 정유의 JHAN 및 JHA 활성

식물체 정유의 곤충 유약호르몬에 대한 agonist 및 antagonist 활성은 주관연구과제인 제연호 교수팀과 같이 진행을 하였다. 식물체추출물들 중 JHA 활성을 보인 식물체추출물은 chrysantheme, aglaia 그리고 pepper tasmanian 정유였다. JHAN 활성이 우수한 식물체추출물은 chamomile. blue, bergamot, clementine HA, mandarin, petitgrainmandarine, celery, parsley, nutmeg nigella, jasmin, osmanthus 그리고 mate 등 총 12종 이었다. 이들에 대한 목록은 표 4에 나타내었으며 활성은 그림 6에 나타내었다.

Table 4. 곤충 생장조절 활성 우수 식물체 추출물 리스트

활성	식물체정유 번호	일반명	학명
JHA	2-12	Chrysantheme abs	<i>Chrysanthemum morifolium</i>
	25-1	Aglaia	<i>Aglaia odorata</i>
	31-1	Pepper tasmanian	<i>Tasmania lanceolata</i>
JHAN	2-11	Chamomile. blue	<i>Chamomilla matricaria</i>
	12-7	Bergamot	<i>Citrus bergamia</i>
	12-8	Clementine HA	<i>Citrus clementina</i>
	12-11	Mandarine, green extra	<i>Citrus reticulata</i>
	12-12	Petitgrain mandarine extra	<i>Citrus reticulata</i>
	13-3	Celery	<i>Apium graveolens</i>
	13-14	Parsley	<i>Petroselinum sativum</i>
	22-1	Nutmeg	<i>Myristica fragrans</i>
	23-1	Nigella	<i>Nigella sativa</i>
	27-2	Jasmine Sambac	<i>Jasminum sambac</i>
	27-3	Osmanthus	<i>Osmanthus fragrans</i>
	42-1	Mate	<i>Ilex paraguayensis</i>

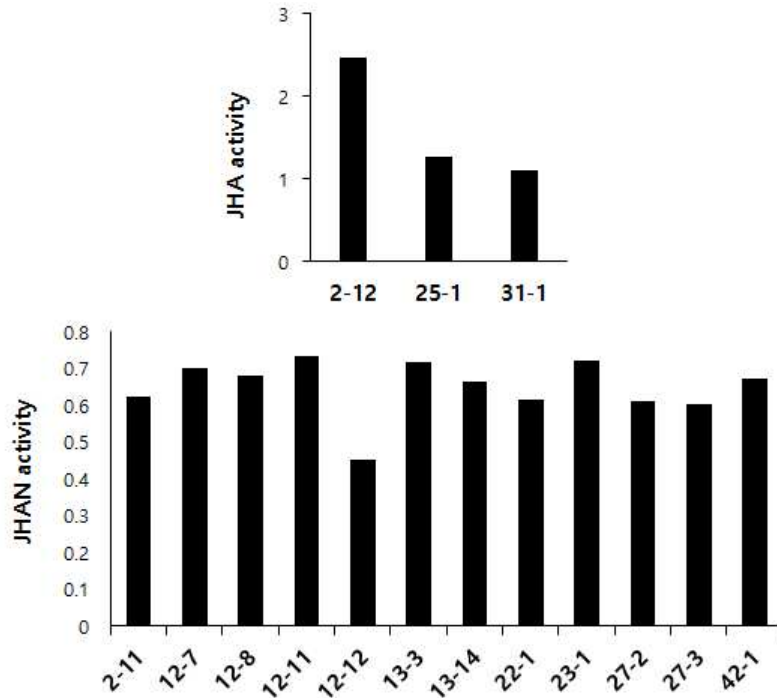
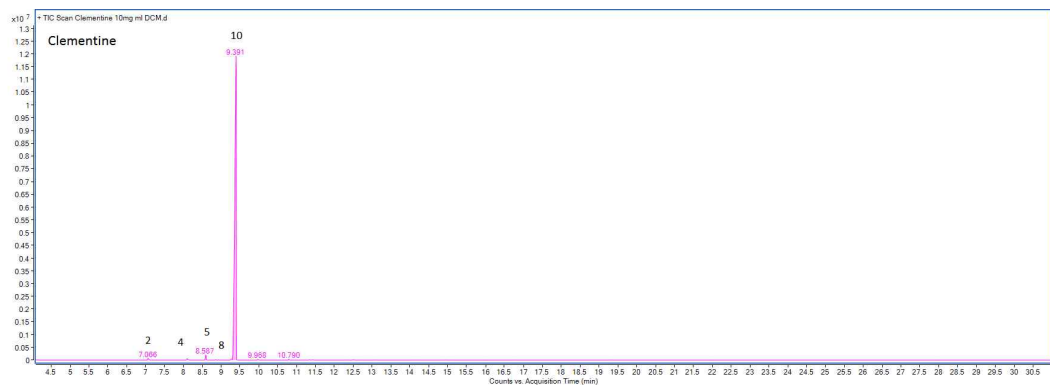
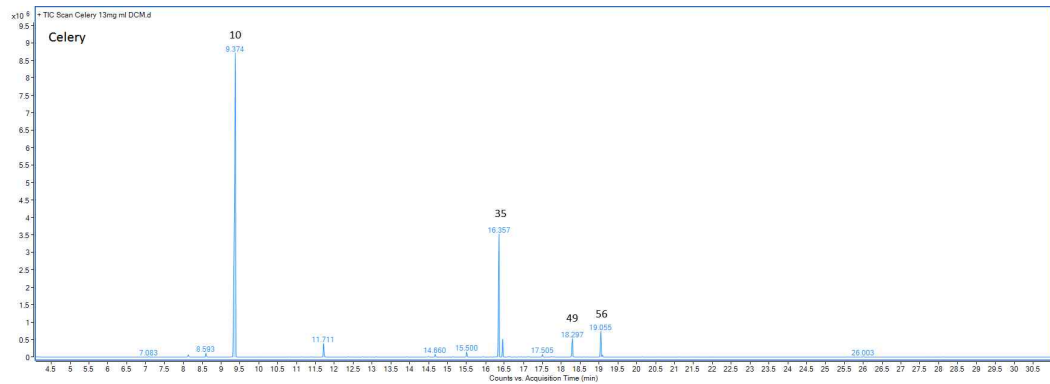
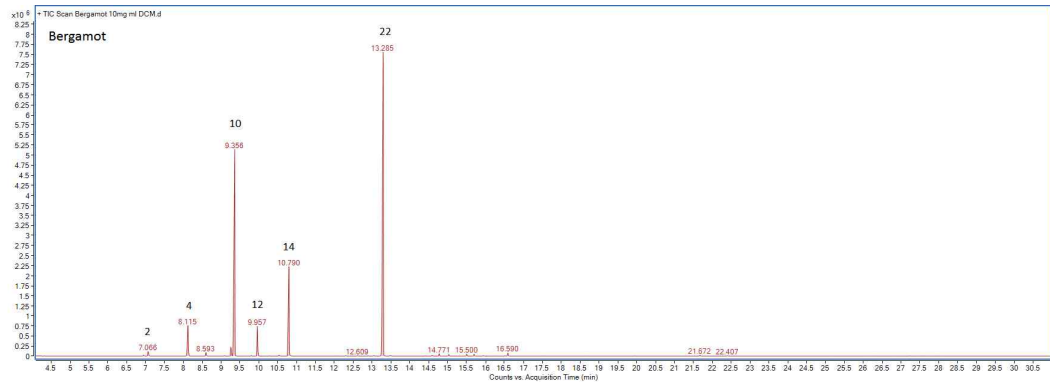
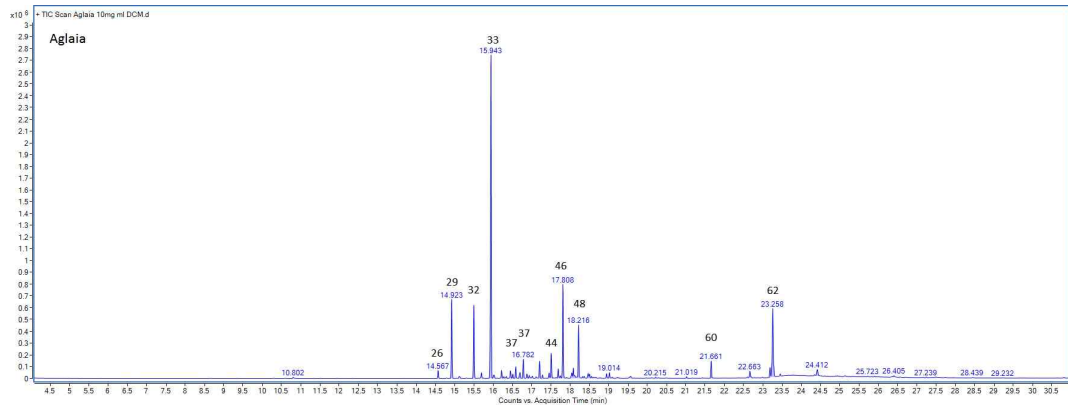
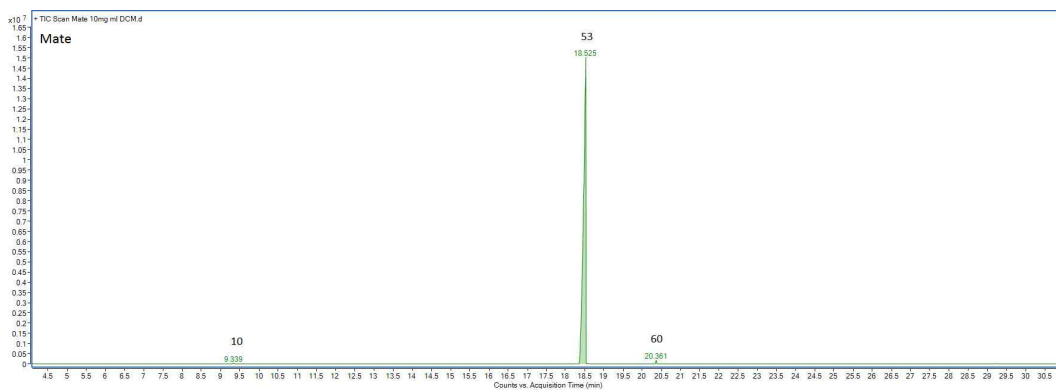
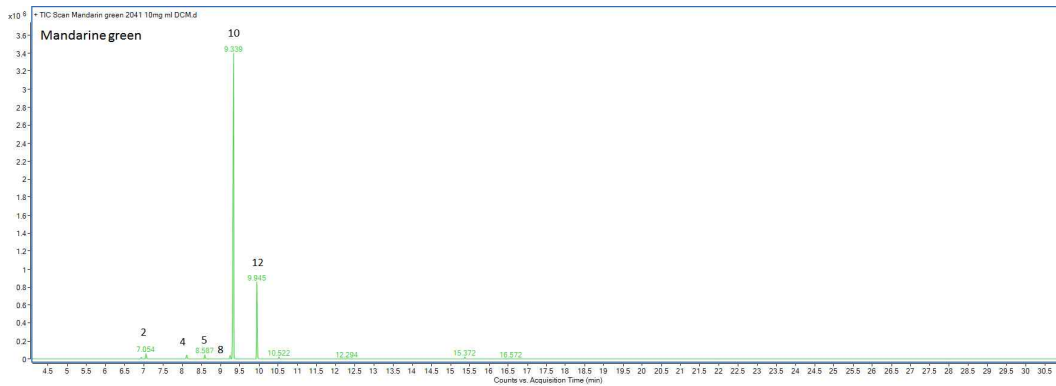
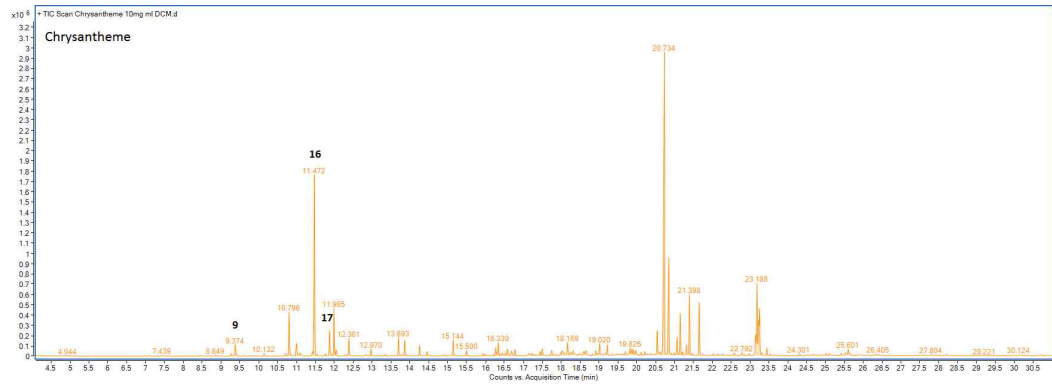
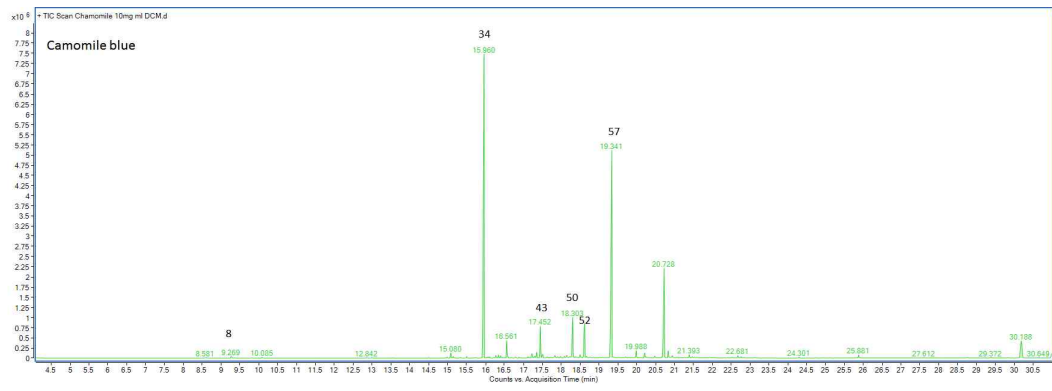


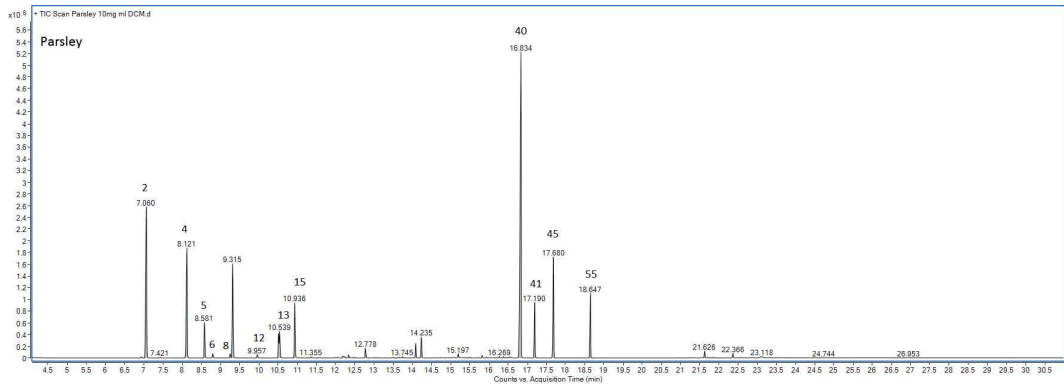
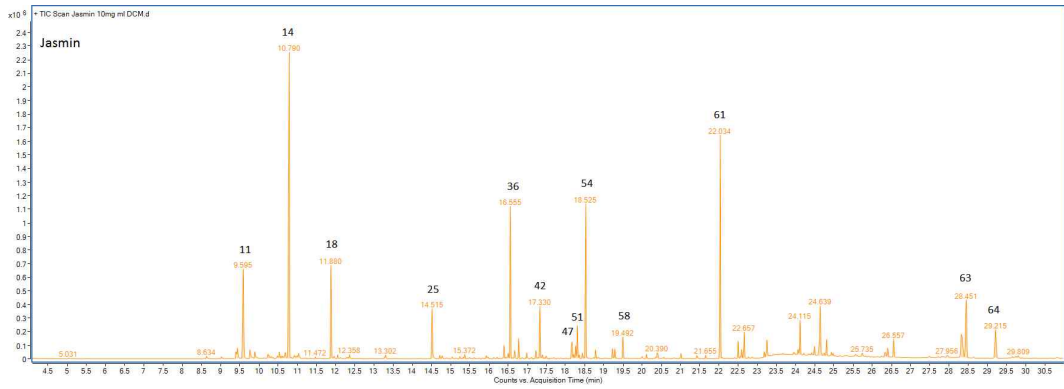
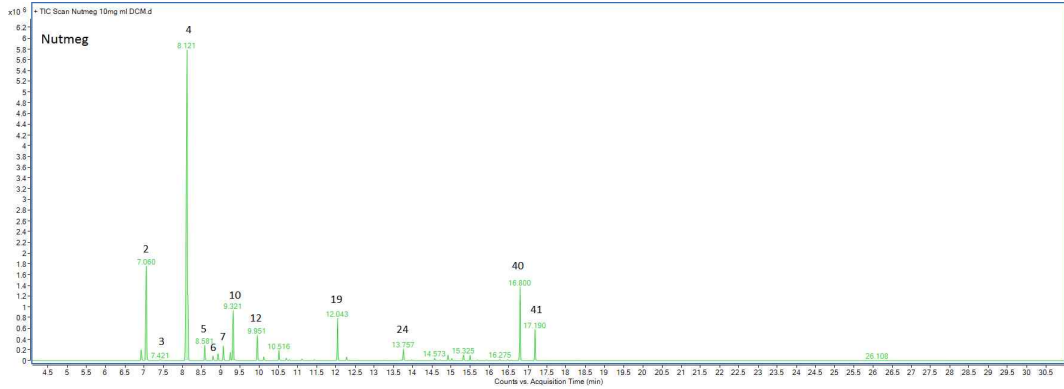
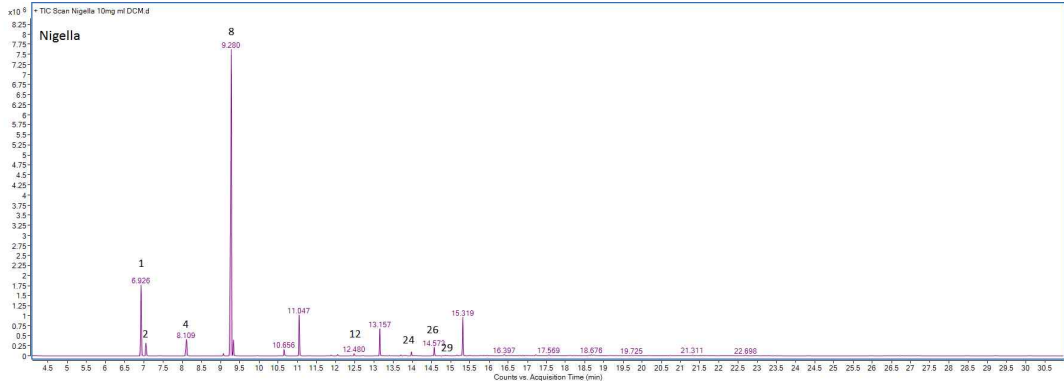
Fig. 6. 곤충 성장조절 활성 우수 식물체들의 IGR 활성.

(3) IGR 활성 우수 식물체 성분 분석

JHAN 및 JHA 활성이 우수하였던 식물체들의 가스크로마토그램은 그림 7 및 표 5에 나타내었다. 활성 우수식물체의 성분들을 분석한 결과 aglaia 정유의 주요 성분은 humulene, humulene epoxide II, methyl jasmonate, copaene, 그리고 ethyl linolenate 등이었다. Bergamot 정유의 주요성분은 limonene, linalool, 그리고 linalyl acetate로 동정되었다. Celery 정유의 주요 성분은 limonene이 67.06%로 가장 높은 비율을 차지했고 selinene 등이 분석되었다. Clementine 정유의 주요성분은 limonene이 97.63%로 대부분을 차지했다. Chamomile blue의 주요성분은 farnesene, spathulenol, 그리고 bisabolol oxide A 등이 동정되었다. Chrysanthemum 정유는 camphor를 많이 함유하고 있었으며, mandarin green의 주요 성분들은 limonene, γ -terpinene 등이 확인되었다. Mate 정유의 주성분은 triethyl citrate (99.43%) 였으며, nigella 정유의 성분들은 cymenene, terpinen-4-ol, 그리고 longifolene 등이었다. Nutmeg 정유의 주요 성분은 β -pinene, α -pinene, limonene, terpinen-4-ol, 그리고 myristicin 등이었다. Jasmin 정유의 주요성분들은 benzyl alcohol, linalool, borneol, farnesene, 그리고 elemicin 등이었다. Parsley 정유의 주요성분들은 α -pinene, β -pinene, myrcene, p-cymene, linalool, myristicin, elemicin, allyltetramethoxybenzene, 그리고 apiol 등으로 동정되었다. Pepper tasmanian과 petitgrain mandarin 정유의 주요성분들은 각각 limonene, γ -terpinene, linalool, eugenol, methyl methanthranilate, 그리고 calamenene 등으로 확인되었다.







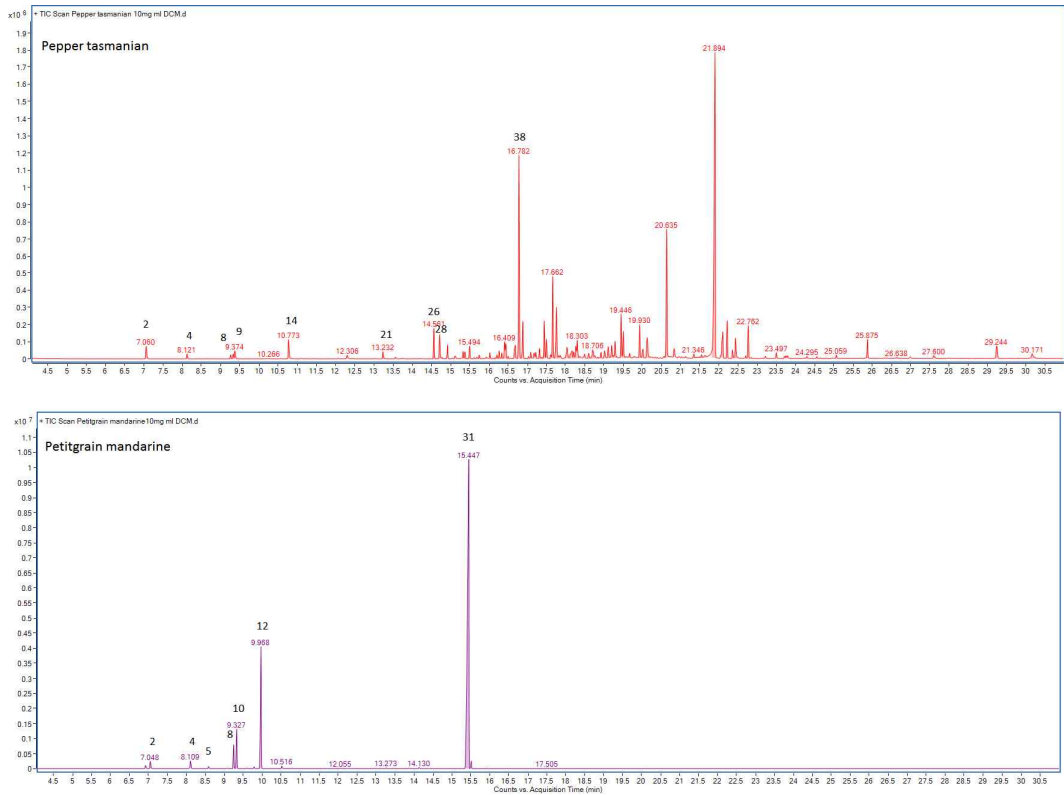


Fig. 7. IGR 활성 우수 식물체 정유들의 가스크로마토그램.

Table 5. IGR 활성 우수 식물체 정유 성분

번호	화합물	식물체정유 내 비율(%)												
		Aglatia	Bergamot	Celery	Clementine	Chamomile blue	Chrysantheme	Mandarine green	Mate	Nigella	Nutmeg	Jasmine	Parsley	Pepper tasmanian
1	Thujene	- ¹	-	-	-	-	-	-	11.67	-	-	-	-	-
2	α -Pinene	-	0.73	-	0.42	-	-	1.51	2.28	12.12	-	14.57	0.84	1.1
3	Camphene	-	-	-	-	-	-	-	-	0.16	-	-	-	-
4	β -Pinene	-	4.72	-	0.38	-	-	1.15	3.51	50.44	-	10.02	0.32	1.17
5	Myrcene	-	-	-	0.92	-	-	1.02	-	1.58	-	2.79	-	0.28
6	α -Phellandrene	-	-	-	-	-	-	-	-	0.54	-	0.39	-	-
7	α -Terpinene	-	-	-	-	-	-	-	-	1.56	-	-	-	-
8	Cymenene	-	-	-	0.29	0.2	-	0.85	-	58.53	-	0.31	0.22	2.87
9	1,8-Cineole	-	-	-	-	-	0.79	-	-	-	-	-	0.52	-
10	Limonene	-	30.35	67.06	97.63	-	-	76.52	0.13	-	6.29	-	-	4.59
11	Benzyl alcohol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.73	-	-	-
12	γ -Terpinene	-	3.5	-	-	-	-	17.16	-	2.63	-	-	-	15.65
13	<i>p</i> -Cymene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.15	-	-
14	Linalool	-	13.03	-	-	-	-	-	-	-	16.58	-	1.13	-
15	1,3,8-p-Menthatriene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.04	-	-
16	Camphor	-	-	-	-	-	11.09	-	-	-	-	-	-	-
17	Borneol	-	-	-	-	-	1.54	-	-	-	-	-	-	-
18	Benzyl acetate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.34	-	-	-
19	Terpinen-4-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	4.08	-	-	-	-
20	Thymoquinone	-	-	-	-	-	-	-	3.64	-	-	-	-	-
21	Carvenone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.42	-
22	Linalyl acetate	-	43.28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

23	Safrole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	Thymol	-	-	-	-	-	-	-	0.57	1.23	-	-	-	-	-
25	Methyl anthranilate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.54	-	-	-	-
26	α -Cubebene	0.75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.53	-
27	Longipinene	-	-	-	-	-	-	-	1.2	-	-	-	-	-	-
28	Eugenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.29	-
29	Copaene	7.63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	Longifolene	-	-	-	-	-	-	-	5.04	-	-	-	-	-	-
31	Methyl methanthranilate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	71.38
32	Caryophyllene	6.94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	Humulene	32.08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	β -Farnesene	-	-	-	-	33.93	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	Selinene	-	-	17.75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	α -Farnesene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.68	-	-	-	-
37	β -Bisabolene	1.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	Calamenene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10.06	-
39	Cadinene	1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	Myristicin	-	-	-	-	-	-	-	-	7.38	-	31.63	-	-	-
41	Elemicin	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3.99	-	-	-
42	3-Hexenyl benzoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.32	-	-	-	-
43	Spathulenol	-	-	-	-	3.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	Caryophyllene oxide	2.41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	Allyltetramethoxybenzene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.62	-	-	-
46	Humulene epoxide II	9.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	Muurolol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.17	-	-	-	-
48	Methyl jasmonate	4.97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	3-n-Butylphthalide	-	-	3.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	Bisabolol oxide B	-	-	-	-	4.17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	Cadinol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.57	-	-	-	-
52	Bisabolone oxide A	-	-	-	-	4.28	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	Triethyl citrate	-	-	-	-	-	-	99.43	-	-	-	-	-	-	-
54	Hexyl salicylate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.87	-	-	-	-
55	Apiol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.44	-	-	-
56	Senkyunolide	-	-	3.86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	Bisabolol oxide A	-	-	-	-	25.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58	Benzyl Benzoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.99	-	-	-	-
59	Caffeine	-	-	-	-	-	-	0.44	-	-	-	-	-	-	-
60	Ethyl palmitate	1.58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61	Nerolidol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9.36	-	-	-	-
62	Ethyl linolenate	8.44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	Benzyl linolenate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.18	-	-	-	-
64	Squalene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.28	-	-	-	-
	total	76.76	94.88	91.68	99.22	70.98	13.42	96.7	100	72.49	78.73	58.15	67.38	15.49	95.94

¹검출 안됨

(4) IGR 활성 우수 식물체 정유의 흰줄숲모기, 쌀바구미 및 바퀴에 대한 살충 활성

곤충 생장조절 활성이 우수한 식물체들의 흰줄숲모기 유충에 대한 살충활성은 표 6에 나타내었다. 흰줄숲모기 3령 유충에 대한 살충활성 결과 parsley, pepper tasmanian 그리고 mandarine green 오일이 0.1 mg/mL 농도에서 100%의 살충활성을 나타내었다. Celery, clementine, 그리고 nutmeg 오일은 0.1 mg/mL 농도에서 >90%의 살충활성을 나타내었으며 나머지 오일들은 90% 미만의 살충활성을 나타내었다. 활성이 우수한 식물체들은 농도를 낮추어 활성을 조사하였으며 0.05 mg/mL 농도에서는 mandarine green, nutmeg, parsley, celery 그리고 pepper

tasmanian 오일들이 >60%의 살충활성을 나타내었다. 농도를 더 낮추어 0.025 mg/mL 농도에서 살충활성을 검정하였을 때는 parsley와 mandarine green 오일이 >40%의 살충활성을 나타내었다.

Table 6. IGR 활성 우수 식물체 정유의 흰줄숲모기 유충에 대한 살충활성

식물체정유	살충율(%) (평균±표준편차, N=4)		
	0.1 ¹	0.05	0.025
Aglaia	17.5±5.0	-	-
Bergamot	67.5±17.1	20±8.2	-
Celery	97.5±5.0	60±16.3	7.5±0.50
Clementine HA	95±5.8	75±19.1	20±14.1
Chamomile blue	27.5±22.2	-	-
Chrysantheme	80±21.6	5±5.8	-
Mandarine green	100	90±8.2	42.5±29.9
Mate	2.5±0.50	-	-
Nigella	5±5.8	-	-
Nutmeg	90±8.2	85±19.1	12.5±5.0
Jasmine Sambac	82.5±12.6	52.5±23.6	-
Osmanthus	42.5±0.96	-	-
Parsley	100	60±11.5	45±5.8
Pepper tasmanian	100	92.5±9.6	20±9.6
Petitgrain mandarine	70±24.5	17.5±15.0	-
대조구	0	0	0

¹mg/mL

쌀바구미에 대한 15종 정유의 훈증 실험결과는 표 7에 나타내었다. 15종의 정유를 각각 5 mg/filter paper로 처리하여 훈증 실험했을 때 nigella 정유 처리 시, 48시간 후에 모두 사멸하여 100%의 훈증 활성을 보였다. Mandarine green은 80%의 훈증활성을 chamomile blue와 jasmin arab은 70%의 훈증 활성을 보였다. Celery와 pepper tasmanian정유에서는 앞에 정유들과는 다르게 조금 낮은 60%이상의 훈증 활성을 나타냈다. Aglaia와 mate, petitgrain mandarine 정유는 각각 58%와 48%, 40%의 훈증 활성을 보였고 나머지 정유 중 bergamot은 24% clementine은 18% nutmeg 16% osmanthus는 32% parsley는 26%로 다른 정유들에 비해 현저히 낮은 훈증 활성을 보였다. 2.5 mg/filter paper로 처리했을 때 nigella정유는 90%의 높은 훈증 활성을 보였고 chamomile blue와 mandarine green은 70%의 활성이 나타났다. Aglaia는 56%의 활성을 jasmin arab은 68%, pepper tasmanian은 54%의 활성을 보였다. 그리고 celery는 34%의 낮은 활성을 보였다. 한 단계 더 낮춰 1.25µl/filter paper로 처리했을 때 nigella는 80%의 훈증 활성이 나타났고 chamomile blue와 mandarine green은 그 뒤로 60%의 활성을 보였다. 마지막 0.625 mg/filter paper로 처리했을 때 15종 정유 중 가장 훈증 효과가 있었던 nigella는 54%의 저조한 활성을 보였고 chamomile blue와 mandarine green은 대조구와 같은 훈증 활성이 없는 결과를 보였다.

Table 7. IGR 활성 우수 식물체 정유의 쌀바구미에 대한 살충활성

식물체정유	살충율(%) (평균±표준편차, N=4)			
	5 ¹	2.5	1.25	0.625
Aglaia	58±9.8	56±8.0	46±4.9	-
Bergamot	24±4.9	-	-	-
Celery	68±4.0	34±4.9	-	-
Clementine HA	18±9.8	-	-	-
Chamomile blue	74±8.0	74±8.0	60±8.9	0
Chrysantheme	34±12.0	-	-	-
Mandarine green	80±8.9	78±7.5	60±6.3	0
Mate	48±14.7	-	-	-
Nigella	100	90±6.3	80±6.3	54±4.9
Nutmeg	16±4.9	-	-	-
Jasmine Sambac	72±17.2	68±11.7	46±4.9	-
Osmanthus	32±13.3	-	-	-
Parsley	26±8.0	-	-	-
Pepper tasmanian	66±4.9	54±4.9	20±6.3	-
Petitgrain mandarine	40±12.6	-	-	-
대조구	0	0	0	0

¹mg/filter paper

독일바퀴 성충에 대한 곤충생장조절 우수 식물체의 훈증 살충활성 및 접촉 살충활성을 조사한 결과, parsley, bergamot, 그리고 clementine 추출물이 높은 훈증 살충활성을 보였다 (Table 8 and 9). Parsley, clementine 그리고 bergamot 추출물의 독일 수컷 바퀴에 대한 훈증 살충활성은 20 mg/filter paper 농도에서 각각 97.5, 87.5 그리고 70%의 살충율을 보였다. 접촉살충활성을 조사한 결과 parsley와 celery 정유가 접촉살충활성이 우수하였다.

Table 8. IGR 활성 우수 식물체 정유의 독일바퀴에 대한 훈증 살충 활성

식물체 정유	훈증 살충활성 (% , 평균±표준편차, N = 4)			
	수컷		암컷	
	20 ¹	10	20	10
Parsely	97.5±2.5	7.5±4.8	15.0±2.9	-
Celery	12.5±4.8	-	2.5±2.5	-
Chamomile blue	2.5±2.5	-	0	-
Chrysantheme abs.	7.5±4.8	-	0	-
Bergamot	70.0±14.1	12.5±15.0	45.0±30.0	5.0±10.0
Clementine	87.5±7.5	7.5±9.6	22.5±5.0	-
Petitgrain mandarine	17.5±9.6	-	0	-

¹mg/filter paper

Table 9. IGR 활성 우수 식물체 정유의 독일바퀴에 대한 접촉 살충 활성

추출물	접촉 살충활성 (% , 평균±표준편차, N = 5)				
	수컷			암컷	
	2 ¹	1	0.5	2	1
Parsely	100	24.0±6.0	-	66.0±2.4	8.0±2.0
Celery	100	74.0±5.1	4.0±2.4	96.0±4.0	22.0±5.8
Chamomile, blue	74±8.0	16±5.1	-	16±4.0	-
Chrysantheme abs.	42±4.9	14±4.0	-	24±10.8	-
Bergamot	46±15.2	24±18.2	-	18±14.8	-
Clementine	76±5.5	16±8.9	-	28±13.0	4±8.9
Petitgrain mandarine	34±16.7	2±4.5	-	14±8.9	-

¹mg/filter paper

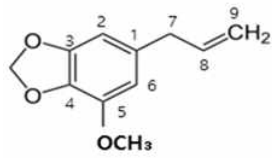
(5) 파슬리(parsley) 정유로부터 모기 유충 활성성분 분리

Parsley 정유 성분 중 myristicin, allyltetramethoxybenzene 및 apiol의 경우 생물검정 유도법을 이용하여 활성물질을 분리하고, NMR을 이용하여 구조를 분석하였으며, 분리된 화합물들의 구조는 그림 8에 NMR 데이터는 그림 9~11에 나타내었다.

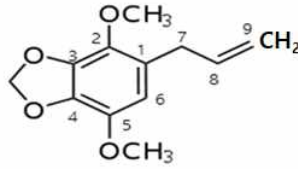
Myristicin: ¹H NMR (500MHz, CDCl₃):δ3.28(7,d,2H,*J* =6.5), 3.88(s, 3H, OMe-5), 5.09(9, br. d, 2H, *J* =2, 8, 12.5), 5.89(8, m, H), 5.92(s, 2H, OCH₂O), 6.34(6,d,H,*J* =1.5, aromatic), 6.38(2, d, H, *J* =1, aromatic). ¹³CNMR (500MHz,CDCl₃): 40.24(C-7), 56.54(OMe-5), 101.24(OCH₂O), 102.68(C-2), 107.68 (C-6), 115.85(C-9),133.49(C-1), 134.63 (C-4), 137.37 (C-8), 143.52(C-5), 148.85(C-3).

Apiol: ¹H NMR (500MHz, CDCl₃):δ3.29(7,d,2H,*J* =6.5), 3.84(s, 3H, OMe-5), 3.87(s, 3H, OMe-2), 5.05(9, br. d, 2H *J* =1.5, 9, 14), 5.89(8, m, H), 5.94(s, 2H, OCH₂O), 6.30(6,s,H,aromatic). ¹³CNMR (500MHz,CDCl₃): 34.10(C-7), 56.90(OMe-5), 60.16(OMe-2), 101.54(OCH₂O), 108.27(C-6), 115.39(C-9), 125.82(C-1), 135.16(C-4), 136.31(C-3), 137.37(C-8), 138.77(C-5), 139.12(C-2).

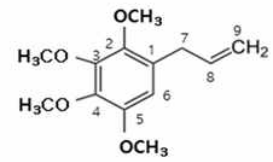
Allyltetramethoxybenzene: ¹H NMR (500MHz, CDCl₃):δ3.35(7,d,2H,*J*=7), 3.79(s, 3H, OMe-2), 3.81 (s, 3H, OMe-4), 3.87(s, 3H, OMe-5), 3.92(s, 3H, OMe-3), 5.09(9, br. d, 2H, *J* = 8), 5.96(8, m, H), 6.44(6, s, H, aromatic). ¹³CNMR(500MHz,CDCl₃):34.07(C-7), 56.19(OMe-5), 61.07(OMe-4), 61.17(OMe-3), 61.18(OMe-2), 107.68(C-6), 115.72(C-9), 127.90(C-1), 137.25(C-8), 141.34(C-3), 145.27(C-4), 147.10(C-2), 149.36(C-5).



myristicin

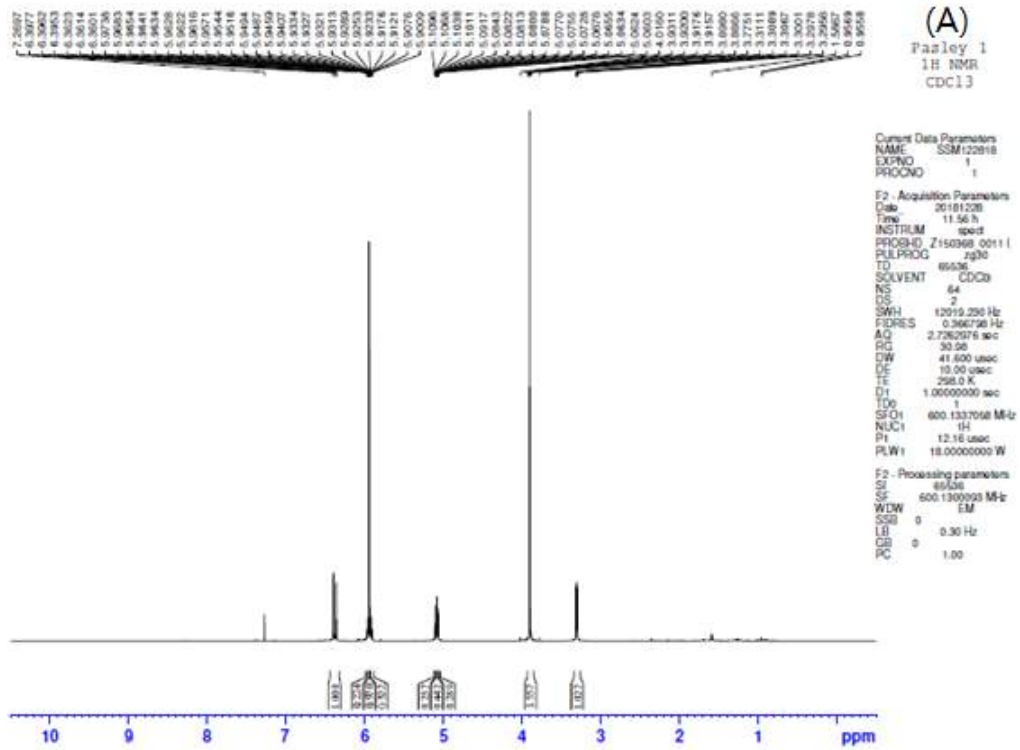


apiol



allyltetramethoxybenzene

Fig. 8. 파슬리 정유로부터 분리된 흰줄숲모기 유충 살충 활성 물질.



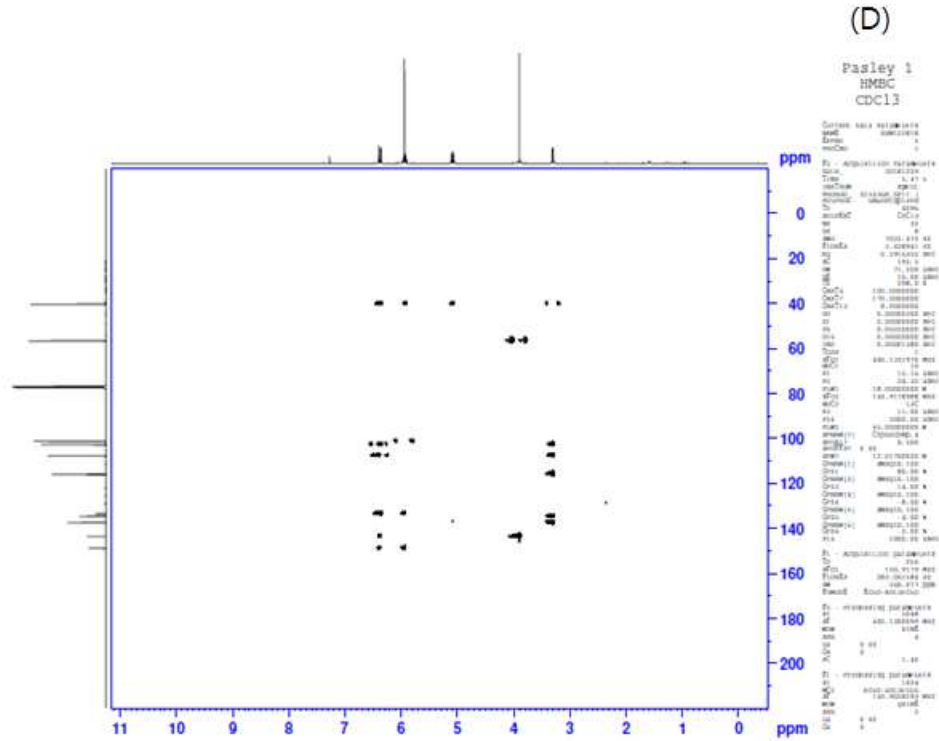
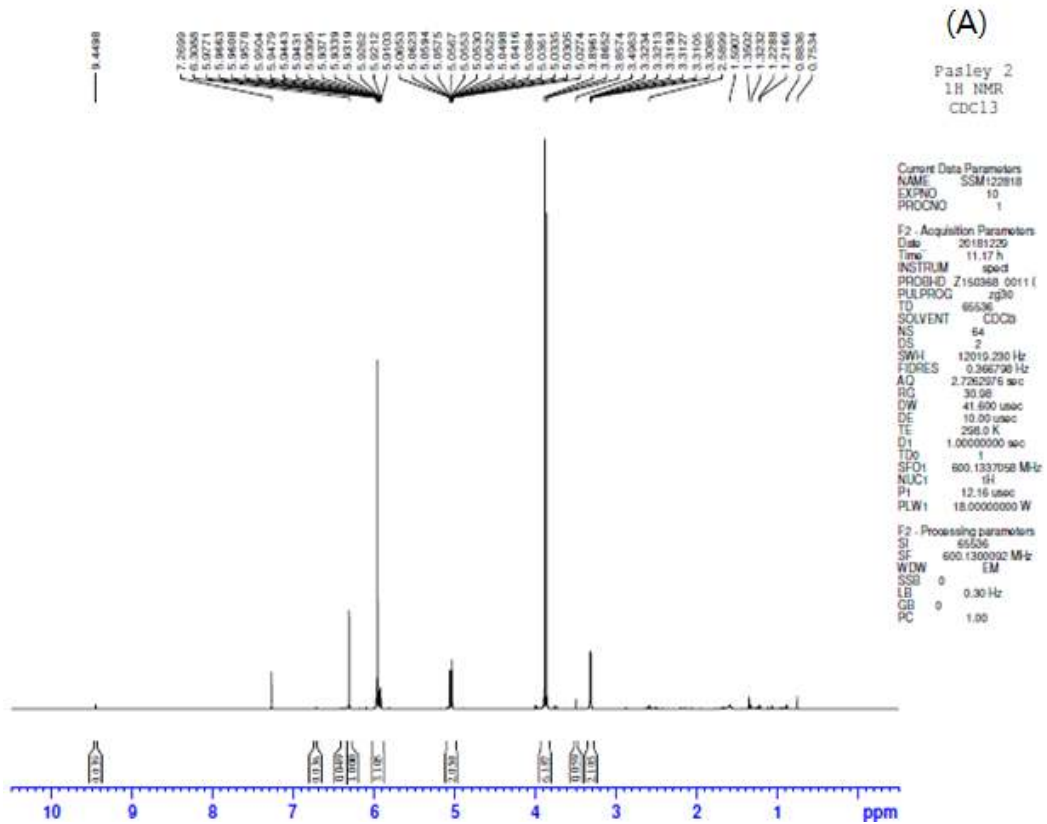
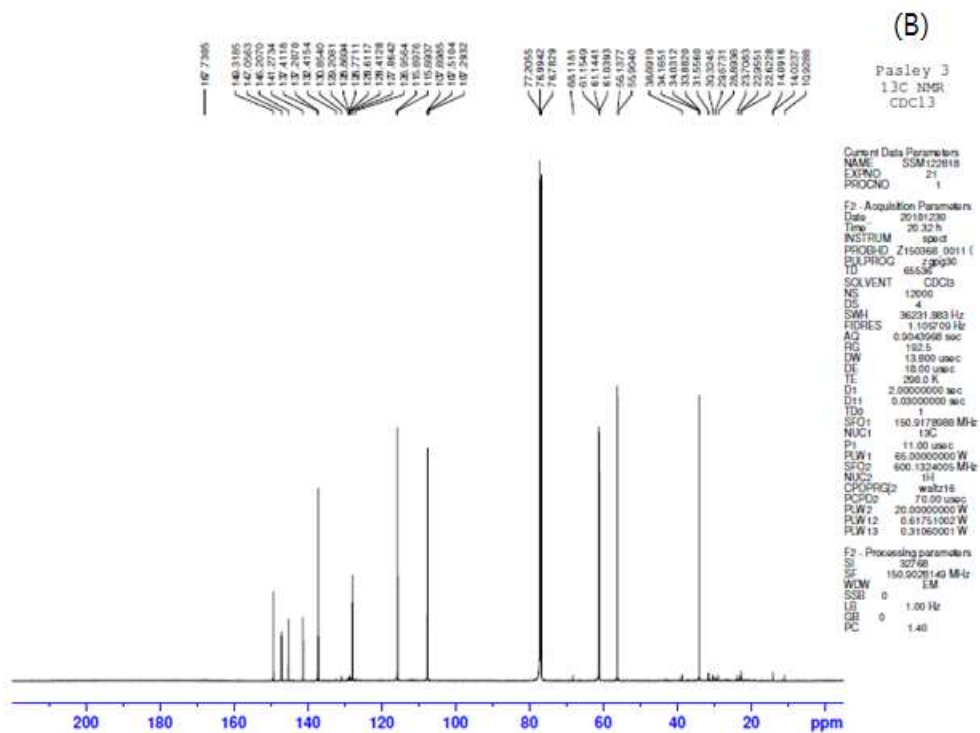
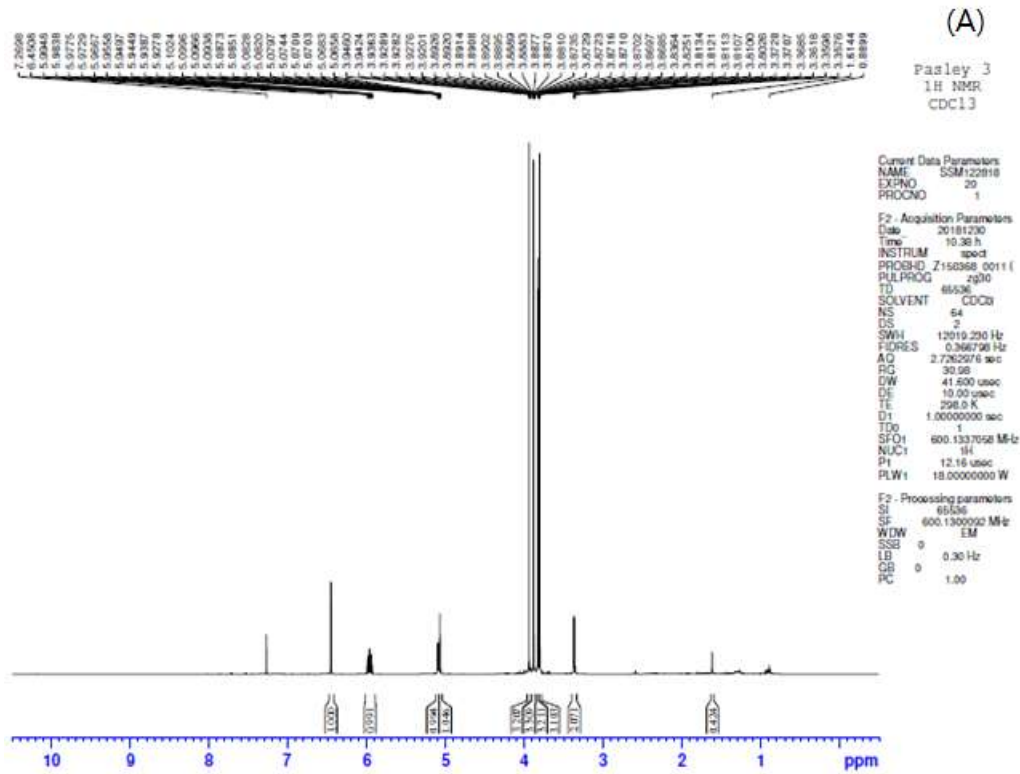


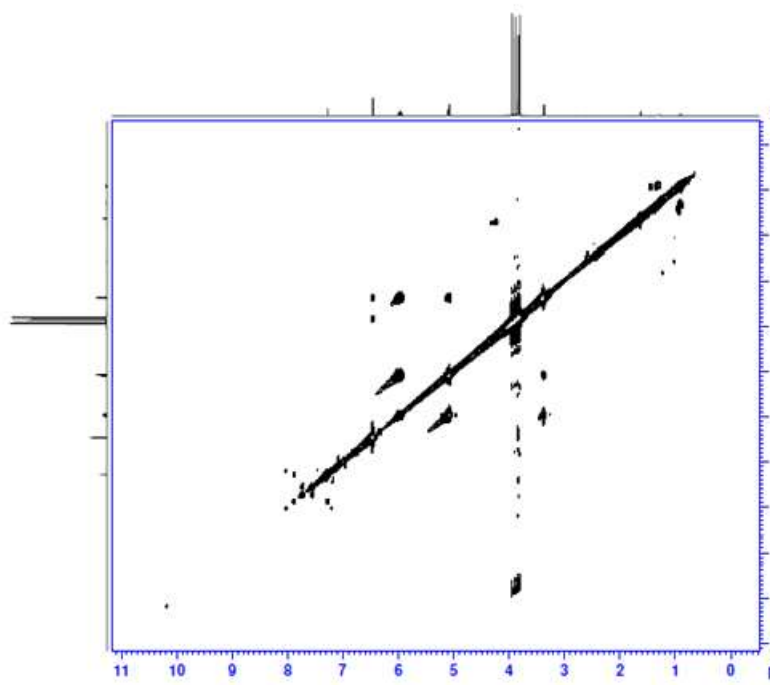
Fig. 9. Myristicin의 ¹H (A), ¹³C (B), Cosy (C) 및 HMBC (D) NMR.





(C)

Pasley 3
COSY
CDC13



Current Data Parameters
 NAME: SSM122818
 EXPNO: 22
 PROCNO: 1

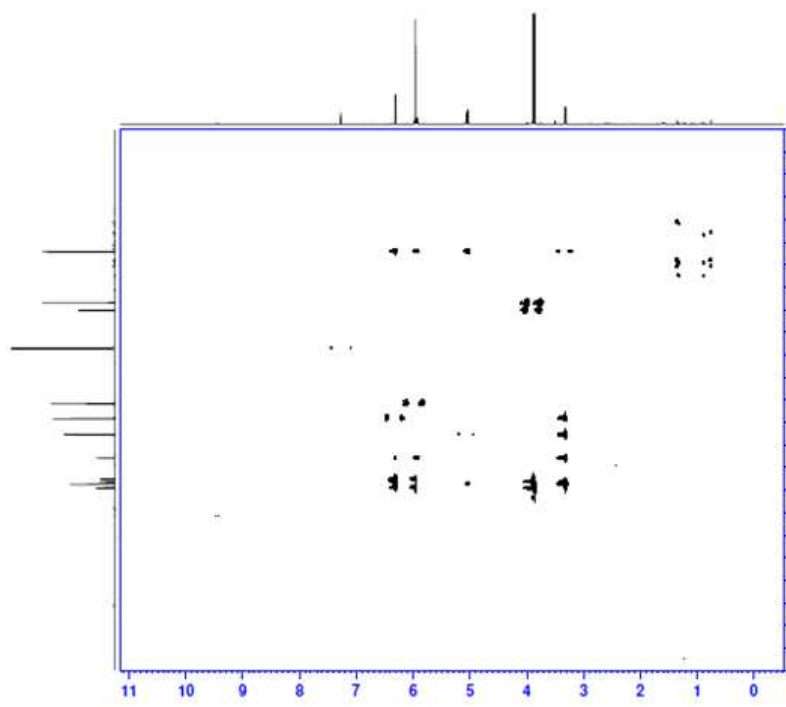
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20101230
 Time: 20:33:18
 INSTRUM: spect
 PULPROG: zgpg30
 ID: zgpg30
 SOLVENT: CDCl3
 NS: 32
 DS: 4
 SWH: 7022.472 Hz
 FIDRES: 0.007882 Hz
 AQ: 0.1458179 sec
 RG: 192
 CW: 71.200 usec
 DE: 10.00 usec
 TE: 298.2 K
 D0: 0.0000000 sec
 D1: 2.0000000 sec
 D11: 0.0300000 sec
 D12: 0.0000000 sec
 D13: 0.0000400 sec
 D16: 0.0000000 sec
 IN0: 0.0001400 sec
 TD: 1
 SFO1: 600.1331070 MHz
 NUC1: 1H
 P1: 12.16 usec
 PL1: 0.0000000 W
 P17: 2500.00 usec
 PLW1: 10.0000000 W
 PLW17: 4.2500000 W
 GPM1: 5MSG10.100
 GP1: 10.00 %
 P18: 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
 TD: 160
 SFO1: 600.1332 MHz
 FIDRES: 0.0332607 Hz
 SW: 11.712 ppm
 FMODE: QF

F2 - Processing parameters
 SI: 3024
 SF: 600.1300000 MHz
 WDW: COSY
 SSB: 0
 LB: 0 Hz
 GB: 0
 PC: 1.40

(D)

Pasley 2
HMBC
CDC13



Current Data Parameters
 NAME: SSM122818
 EXPNO: 22
 PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20101230
 Time: 20:33:18
 INSTRUM: spect
 PULPROG: zgpg30
 ID: zgpg30
 SOLVENT: CDCl3
 NS: 32
 DS: 4
 SWH: 7022.472 Hz
 FIDRES: 0.007882 Hz
 AQ: 0.1458179 sec
 RG: 192
 CW: 71.200 usec
 DE: 10.00 usec
 TE: 298.2 K
 D0: 0.0000000 sec
 D1: 2.0000000 sec
 D11: 0.0300000 sec
 D12: 0.0000000 sec
 D13: 0.0000400 sec
 D16: 0.0000000 sec
 IN0: 0.0001400 sec
 TD: 1
 SFO1: 600.1331070 MHz
 NUC1: 1H
 P1: 12.16 usec
 PL1: 0.0000000 W
 P17: 2500.00 usec
 PLW1: 10.0000000 W
 PLW17: 4.2500000 W
 GPM1: 5MSG10.100
 GP1: 10.00 %
 P18: 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
 TD: 160
 SFO1: 600.1332 MHz
 FIDRES: 0.0332607 Hz
 SW: 11.712 ppm
 FMODE: QF

F2 - Processing parameters
 SI: 3024
 SF: 600.1300000 MHz
 WDW: COSY
 SSB: 0
 LB: 0 Hz
 GB: 0
 PC: 1.40

Table 10. IGR 활성 우수 식물체 정유 화합물들의 흰줄숲모기 유충에 대한 살충 활성

화합물	살충율(% , 평균±표준편차, N=4)		
	0.1 ¹	0.05	0.025
(+) - α -Pinene	0	-	-
Camphene	2.5±5.0	-	-
β -Pinene	47.5±17.1	17.5±9.6	-
Myrcene	42.5±17.1	20±14.1	-
α -Phellandrene	100	57.5±9.6	12.5±5.0
α -Terpinene	100	55±12.9	5±10.0
1,8-Cineole	0	-	-
(-)-Limonene	100	57.5±20.6	27.5±20.6
(+)-Limonene	100	70±18.3	10±8.2
γ -Terpinene	100	87.5±12.6	30
ρ -Cymene	100	32.5±34.0	-
Linalool	0	-	-
Borneol	2.5±5.0	-	-
Terpinen-4-ol	10	-	-
Thymol	100	52.5±5.0	7.5±5.0
Eugenol	97.5±5.0	57.5±18.9	7.5±9.6
β -Caryophyllene	32.5±17.1	-	-
α -Humulene	20±14.1	-	-
Myristicin	100	92.5±5.0	50±8.2
Elemicin	27.5±17.0	-	-
Allyltetramethoxybenzene	52.5±29.8	5.0±5.7	-
Apiol	100	100	35±10.0
대조구	0	0	0

¹mg/mL. ²Not tested**Table 11.** IGR 활성 우수 식물체 정유 화합물들의 빨간집모기 유충에 대한 살충활성

화합물	살충율(% , 평균±표준편차, N=4)			
	0.1 ¹	0.05	0.025	0.0125
(+) - α -Pinene	95±5.8	72.5±9.6	20±11.5	-
Camphene	5±5.7	-	-	-
β -Pinene	100	95±5.8	25±10.0	-
Myrcene	100	100	52.5±5.0	5±5.7
α -Phellandrene	55±5.8	37.5±22.2	-	-
α -Terpinene	65±20.8	30±14.1	-	-
1,8-Cineole	17.5±17.1	-	-	-
(-)-Limonene	100	100	75±10.0	50±14.1
(+)-Limonene	100	92.5±9.6	32.5±9.6	-
γ -Terpinene	100	92.5±9.6	37.5±17.1	-
ρ -Cymene	100	100	85±12.9	17.5±5.0
Linalool	32.5±15.0	-	-	-
Terpinen-4-ol	27.5±17.1	-	-	-
Thymol	100	100	0	-
β -Caryophyllene	57.5±12.6	-	-	-
α -Humulene	97.5±5.0	45±12.9	-	-
대조구	0	0	0	0

¹mg/mL. ²Not tested

(7) IGR 활성 우수 식물체 정유 화합물들의 쌀바구미에 대한 훈증살충 활성

Nigella 및 mandarine green 식물체 정유 성분의 쌀바구미에 대한 살충활성을 검정한 결과는 표 12에 나타내었다. 식물체 정유 성분 중, 10 mg 농도에서는 thymol, α -pinene, β -pinene, camphene 그리고 limonene 등이 90% 이상의 높은 훈증살충활성을 나타내었다. Linalool, γ -terpinene, p-cymene는 80% 이상의 훈증살충활성을 나타내었으며 나머지 성분들은 중간 정도의 훈증살충활성을 나타내었다. 농도를 5 mg로 낮추어 훈증살충활성을 조사한 결과, thymol, α -pinene, β -pinene 그리고 camphene만이 >80% 이상의 높은 살충활성을 나타내었다. 농도를 2.5 mg과 1.25 mg로 낮추어 실험을 하였을 경우, thymol만이 >90% 이상의 훈증살충활성을 나타내었다.

Table 12. IGR 활성 우수 식물체 정유 화합물들의 쌀바구미에 대한 살충활성

화합물	살충율(%) (% , 평균±표준편차, N=4)			
	10 ¹	5	2.5	1.25
(+) - α -Pinene	100	90±12.6	52±9.8	8±7.5
Camphene	100	100	10±6.3	-
β -Pinene	94±8.0	84±20.6	54±10.2	12±11.7
Myrcene	60±8.9	20±6.3	-	-
α -Phellandrene	62±14.7	56±8.0	6±4.9	-
α -Terpinene	52±7.5	- ²	-	-
1,8-Cineole	76±4.9	50±6.3	36±13.6	-
Limonene	96±4.9	78±11.7	50±21.9	38±9.8
γ -Terpinene	84±10.2	58±9.8	24±13.6	-
ρ -Cymene	80±6.3	62±11.7	26±8.0	-
Linalool	84±10.2	78±11.7	66±15.0	38±16.0
Terpinen-4-ol	74±10.2	62±17.2	44±4.9	-
Thymol	100	100	98±4.0	90±6.3
β -Caryophyllene	0	-	-	-
α -Humulene	0	-	-	-
대조구	0	0	0	0

¹mg/mL. ²Not tested

(8) IGR 활성 우수 식물체 정유 화합물들의 바귀에 대한 접촉 및 훈증 살충 활성

JHAN 및 JHA 활성 우수 식물체정유 화합물들의 바귀에 대한 접촉 및 훈증 살충 활성은 표 13~16에 나타내었다. 독일바귀 수컷에 대한 훈증 살충활성 결과 20 mg/filter paper 농도에서 α -phellandrene, α -terpinene, 1,8-cineole, γ -terpinene, ρ -cymene, linalool, borneol, 그리고 terpine-4-ol이 높은 훈증살충 활성을 나타내었다. 농도 10 mg/filter paper에서는 1,8-cineole, γ -terpinene, ρ -cymene, linalool 그리고 terpinen-4-ol이 >90% 이상의 높은 살충활성을 나타내었다. 1,8-Cineole과 terpinen-4-ol은 5 mg/filter paper 농도에서 각각 100%와 80%의 높은 살충활성을 나타내었으나 2.5 mg/filter paper 농도에서는 활성을 보이지 않았다. 독일바귀 암컷에 대한 훈증 살충활성 결과 20 mg/filter paper 농도에서 α -phellandrene, α -terpinene, 1,8-cineole, γ -Terpinene 그리고 ρ -Cymene이 높은 훈증살충 활성을 나타내었다. 농도 10 mg/filter paper에서는

1,8-cineole은 5 mg/filter paper 및 2.5 mg 농도에서도 100% 살충활성을 나타내었으나 1.25 mg/filter paper 농도에서는 0%의 활성을 보였다(표에는 표시하지 않음). 독일바퀴 수컷에 대한 접촉 살충활성 결과 1 mg/♂ 농도에서 α -phellandrene, 1,8-cineole, ρ -cymene, terpine-4-ol, thymol 그리고 eugenol이 >80% 높은 접촉 살충 활성을 나타내었다. 농도 0.5 mg/♂에서는 thymol과 eugenol이 각각 98%와 88%의 높은 접촉 살충활성을 나타내었고 이외의 화합물들은 중간 혹은 약한 접촉 살충활성을 나타내었다. 농도 0.25 mg/♂와 0.125 mg/♂에서는 thymol은 각각 98%와 62%의 접촉 살충활성을 나타낸 반면, eugenol은 각각 68%와 12%의 접촉 살충활성을 나타내었다. 독일바퀴 암컷에 대한 접촉 살충활성 결과 1 mg/♂ 농도에서 α -phellandrene, ρ -cymene, 그리고 thymol만이 >60% 이상의 접촉 살충 활성을 나타내었다. 농도 0.5 mg/♂와 0.25 mg/♂ 농도에서 thymol은 각각 94%와 68%의 접촉 살충활성을 나타내었으나 이외의 화합물들은 30% 미만의 약한 살충활성을 나타내었다.

Table 13. IGR 활성 우수 식물체 정유 화합물들의 바퀴 수컷에 대한 혼증 살충활성

화합물	살충율(%), 평균±표준편차, N=4)			
	20 ¹	10	5	2.5
(+) - α -Pinene	65±2.9	12.5±2.5	-	-
Camphene	7.5±2.5	- ²	-	-
β -Pinene	57.5±4.8	12.5±6.3	-	-
Myrcene	5±2.9	-	-	-
α -Phellandrene	100	57.5±2.5	2.5±2.5	-
α -Terpinene	100	37.5±4.8	7.5±4.8	-
1,8-Cineole	100	100	100	0
Limonene	85±6.5	17.5±7.5	-	-
Camphor	22.5±7.5	-	-	-
γ -Terpinene	100	100	17.5±4.8	-
ρ -Cymene	100	100	12.5±4.8	-
Linalool	97.5±4.3	97.5±4.3	35±11.2	15±15.0
Borneol	100	5±5.0	-	-
Terpinen-4-ol	100	100	80±5.8	-
Eugenol	75±2.9	70±4.1	67.5±4.8	12.5±6.3
β -Caryophyllene	0	-	-	-
α -Humulene	0	-	-	-
대조구	0	0	0	0

¹mg/filter paper. ²Not tested

Table 14. IGR 활성 우수 식물체 정유 화합물들의 바퀴 암컷에 대한 혼증 살충활성

화합물	살충율(%), 평균±표준편차, N=4)			
	20 ¹	10	5	2.5
(+) - α -Pinene	65±2.9	12.5±2.5	-	-
Camphene	7.5±2.5	-	-	-
β -Pinene	57.5±4.8	12.5±6.3	-	-
Myrcene	5±2.9	-	-	-
α -Phellandrene	100	57.5±2.5	2.5±2.5	-
α -Terpinene	100	37.5±4.8	7.5±4.8	-
1,8-Cineole	100	100	100	100
Limonene	85±6.5	17.5±7.5	-	-
Camphor	22.5±7.5	-	-	-
γ -Terpinene	100	100	17.5±4.8	-
ρ -Cymene	100	100	12.5±4.8	-
Linalool	15±8.7	-	-	-
Borneol	100	0	-	-
Terpinen-4-ol	27.5±2.5	-	-	-
Eugenol	5.0±5.0	-	-	-
β -Caryophyllene	0	-	-	-
α -Humulene	0	-	-	-
대조구	0	0	0	0

¹mg/filter paper. ²Not tested**Table 15.** IGR 활성 우수 식물체 정유 화합물들의 바퀴 수컷에 대한 접촉 살충활성

화합물	살충율(%), 평균±표준편차, N=5)			
	1 ¹	0.5	0.25	0.125
(+) - α -Pinene	54±2.4	38±5.8	-	-
Camphene	4±2.4	- ²	-	-
β -Pinene	48±2.0	6±4.0	-	-
Myrcene	42±2.0	18±3.7	-	-
α -Phellandrene	80±4.5	34±2.4	0	-
α -Terpinene	68±5.8	26±5.0	-	-
1,8-Cineole	98±2.0	56±2.4	12±3.7	-
Limonene	40±5.5	20±3.2	-	-
γ -Terpinene	90	14±6.0	-	-
ρ -Cymene	98±0	76±2.4	0	-
Linalool	64±15.0	12±11.7	-	-
Borneol	18±17.2	-	-	-
Terpinen-4-ol	86±2.4	40±5.5	10±5.5	-
Thymol	100	98±2.0	98±2.0	62±2.0
Eugenol	100	88±2.0	68±3.7	14±13.4
β -Caryophyllene	46±15.2	22±8.4	-	-
α -Humulene	66±1.0	64±4.9	2±4.0	-
대조구	0	0	0	0

¹mg/♂. ²Not tested

Table 16. IGR 활성 우수 식물체 정유 화합물들의 바퀴 암컷에 대한 접촉 살충활성

화합물	살충율(%), 평균±표준편차, N=4)		
	0.1 ¹	0.05	0.025
(+) - α -Pinene	46±2.4	10±4.5	-
Camphene	0	-	-
β -Pinene	12±3.7	-	-
Myrcene	34±4.0	-	-
α -Phellandrene	76±2.4	2±2.0	-
α -Terpinene	42±3.7	26±5.0	-
1,8-Cineole	28±4.9	24.0±4.0	-
Limonene	26±5.1	-	-
γ -Terpinene	42±3.7	14±6.0	-
ρ -Cymene	68±2.0	4±2.4	-
Linalool	14±8.0	-	-
Borneol	14±8.0	-	-
Terpine-4-ol	44±5.1	16±5.1	-
Thymol	100	94±4.0	68±3.7
Eugenol	50±3.2	28±8.4	-
β -Caryophyllene	0	-	-
α -Humulene	34±18.5	14±10.2	-
대조구	0	0	0

¹mg/♀. ²Not tested

(9) 파슬리(parsley) 정유 마이크로에멀전 제형의 흰줄숲모기 유충에 대한 살충활성

파슬리 정유를 polyvinyl alcohol을 이용한 마이크로에멀전 제형을 만든 후 이들의 살충활성을 조사한 결과는 표 17에 나타내었다. PVA 2.5%, 5% 그리고 10%가 함유된 parsley 정유 마이크로에멀전 제형의 흰줄숲모기에 대한 살충활성은 PVA가 2.5% 함유되었을 때 24시간 후와 48시간 후 살충율은 각각 70%와 70%를 보였다. PVA가 5% 함유되었을 때 24시간 후와 48시간 후 살충율은 각각 73.3%와 86.7%를 보였다. PVA가 10% 함유되었을 때 24시간 후와 48시간 후 살충율은 각각 93.3%와 96.7%로 PVA 함유량이 높을수록 살충력이 올라갔다. PVA 10% 함유 제형과 parsley 정유를 아세톤에 녹이고 처리한 경우 간에 차이가 없어 PVA 함유량은 10%가 적당하였으며 PVA가 마이크로에멀전 제형을 만드는데 적당한 재료로 판단되었다. PVA는 독성이 거의 없어 산업계에서 광범위하게 쓰이고 있어 환경친화형 제형을 만드는데 좋은 재료임이 확인되었다. 앞으로 마이크로에멀전 제형이 식물체정유 혹은 정유유래 화합물 기반 모기유충 방제제 개발에 활용 될 수 있을 것으로 판단된다.

Table 17. PVA를 이용한 파슬리 정유 마이크로에멀전 제형의 흰줄숲모기 유충에 대한 살충활성

대상 물질	파슬리 정유 농도	살충율 (%), 평균±표준편차 N=3)	
		24 h	48 h
PVA 2.5% 함유 파슬리 정유 제형	0.1 mg/mL	70	70
PVA 5.0% 함유 파슬리 정유 제형	0.1 mg/mL	73.3±3.3	86.7±6.7
PVA 10% 함유 파슬리 정유 제형	0.1 mg/mL	93.3±6.7	96.7±3.3
파슬리 정유	0.1 mg/mL	100	100
대조구 (PVA solution only)	-	0	0

(10) IGR 활성 우수 식물체 정유 및 정유 유래 화합물들의 물에서의 잔류

JHAN 및 JHA 활성 우수 식물체 정유 및 정유 유래 화합물들의 물에서의 잔류 결과는 표 18에 나타내었다. 모기 유충에 활성이 우수하였던 parsley와 celery 정유의 잔류량은 처리 2일 후 각각 12.4%와 13.2%로 거의 대부분의 정유가 휘발되어 사라졌음을 알 수 있었다. 처리 7일후 잔류량을 조사한 결과 parsley 정유는 3.1%로 거의 물에 잔류되지 않았으며 celery 정유는 12.8%가 잔류하여 2일후와 큰 차이를 보이지 않았다. α -Pinene, β -pinene, α -phellandrene, α -terpinene, *p*-cymene, limonene, 그리고 γ -terpinene 등은 2일후 잔류가 2~14% 내외 였으며 7일 후에는 거의 잔류가 되지 않았다. 이에 반해 α -humulene, thymol, myristicin 그리고 apiol 등은 2일후에 60~93%의 잔류를 보였으며 7일후에는 16~72%의 잔류를 보였다. 잔류는 기존 유기합성농약의 부작용 중 하나로 식물체 정유 혹은 정유 유래 화합물들은 대부분 반감기가 매우 짧고 환경에 잔류가 될 가능성이 없다는 것을 보여주었다.

Table 18. IGR 활성 우수 식물체 정유 화합물들의 물에서의 잔류

식물체 정유 및 화합물	잔류율(%), 평균±표준편차, N = 5)	
	2 일후	7 일후
Parsley 정유	12.4±1.5	3.1±1.0
Celery 정유	13.2±2.9	12.8±2.4
α -Pinene	11.7±1.7	0.03±0.02
β -Pinene	10.8±2.9	0
α -Phellandrene	10.3±5.2	0
α -Terpinene	3.5±0.5	0.10±0.02
<i>p</i> -Cymene	6.4±0.7	0.01±0.01
(-)-Limonene	9.5±1.8	0.05±0.02
(+)-Limonene	2.55±0.09	0.09±0.03
γ -Terpinene	2.4±0.23	0
α -Humulene	92.2±4.9	37.6±7.9
Thymol	63.6±2.4	48.9±1.6
Myristicin	64.0±1.7	16.7±0.8
Apiol	92.1±3.9	71.4±4.2

(11) IGR 활성 우수 식물체 정유 및 정유 유래 화합물 polyurethane 제형의 쌀바구미에 대한 섭식 저해 활성

쌀바구미에 활성이 우수하였던 mandarine green과 nigella 정유 그리고 thymol을 polyurethane을 이용하여 제형을 만들었다. 이들 제형의 일일 방출량은 표 19에 나타내었다. Mandarin green과 nigella 정유 그리고 thymol 제형의 방출량은 각각 88.3, 70.5, 그리고 52.9 mg/일 이었다. 이들 제형을 50 L 플라스틱 통에 넣고 쌀바구미 200마리를 넣은 후 1주일간 훈증처리 후 30일후 현미무게 감소율을 조사한 결과는 표 20에 나타내었다. 대조구에 비해 mandarine green과 nigella 정유 그리고 thymol 처리구에서 감소율이 각각 1.55%, 1.37% 그리고 2.90%로 대조구의 6.68%와 차이를 보였다. 이는 식물체정유 혹은 thymol 제형 처리구에서 유충이 제대로 발육을 하지 못해 가해 정도가 적은 것으로 판단되었다.

Table 19. 폴리우레탄 정유 제형의 휘발량

식물체정유 및 화합물	일일 휘발량(mg, 평균±표준편차)
Mandarine green	83.8±9.7
Nigella	70.5±3.2
thymol	52.9±3.2

Table 20. 폴리우레탄 정유 제형의 현미에 대한 쌀바구미 섭식 저해율

식물체정유 및 화합물	현미무게 감소율(% , 평균±표준편차)
Mandarine green	1.55±0.28
Nigella	1.37±0.72
thymol	2.90±0.95
대조구	6.68±0.39

2-3. 신규 곤충 생장조절 물질의 제제화 및 안전성 평가 (참여기업)

가. 세부연구수행 내용

(1) 살충활성 스펙트럼 선정

IGR 계열은 3가지 서로 다른 작용기작을 가지는 제품으로 나눌 수 있는데, 그 중 M/S 70%를 차지하는 키틴 합성 저해제의 경우 Syngenta의 Lufenuron, Basf의 Teflubenzuron이 대표적이며 인시목 등 나방류, 총채벌레, 진딧물류, 응애류 등 넓은 스펙트럼을 가지는 것이 특징이다. 그 외 연 매출 1억 불 이상으로 판매되는 유충호르몬 agonists 약제인 Pyriproxyfen은 가루이, 깍지벌레 등에, 탈피호르몬 수용체 agonists인 Methoxyfenozide는 인시목에만 사용되고 있다.

Table 1. IGR 계열 약제 시장

MOA	Class		main pests	'14 sales, \$m	비고	
Juvenile hormone mimics	Juvenile hormone analogues	Hydroprene	정보없음		거저리과, 저장해충 등	
		Methoprene	정보없음		모기, 이집트숲모기	
		Fenoxycarb	Fenoxycarb	잎말이나방, 응애	<10	Carbamate (nerve)
		Pyriproxyfen	Pyriproxyfen	가루이, 깍지벌레, 바퀴벌레	105	국내 (가루이, 오이총채벌레)
Inhibitors of chitin biosynthesis	Benzoylureas	Bistrifluron	인시목, 가루이, 흰개미	<10		
		Chlofluzuron	A wide range of insects	35		
		Diflubenzuron	A wide range of insects	65		
		Flucyclozuron	정보없음			
		Flufenoxuron	insects, 잎말이나방	<30		
		Hexaflumuron	나방, 진딧물, 딱정벌레	<10		
		Lufenuron	인시목, 총채벌레, 가루이, 진딧물, 응애, 옥수수뿌리벌레 등 다수	170		
		Novaluron	인시목, 가루이, 잎나방 (잎굴파리)	80		
		Noviflumuron	흰개미, 개미, 파리, 벼룩	<10		
		Teflubenzuron	나방, 응애	160		
		Triflumuron	인시목	60		
	Buprofezin	Buprofezin	벼 (흰등멸구, 멸구, 녹색매미충)	120		
Moulting disruptor	Cyromazine	Cyromazine	insects	<30	Nerve	
Ecdysone receptor agonists	Diacylhydrazines	Methoxyfenozide	인시목	135		
		Tebufenozide	A wide range of insects	<30		

본 연구팀이 목적으로 하는 유충호르몬 antagonists 작용기작을 가질 것으로 기대되는 후보물질들에 대한 살충 스펙트럼은 아직 국내외에 제품이 개발된 사례도 없고 문헌 상에서도 보고된 바가 없어 현재 스크리닝하고 있는 대상 물질인 식물추출물, 정유 등에 대한 국내외 논문, 특허 검색을 통해 조사해보기로 하고 응애, 가루이, 총채벌레, 진딧물 등에 활성이 있음을 확인하였다. 또한 유충호르몬 agonists에 대한 제품 검색을 통해 딱정벌레목 거저리과, 바구미과 등 저장해충이 대상 해충인 것으로 조사되었으나 원예 시장에서는 주요한 해충이 아니기 때문에 최종적으로 ① 담배거세미나방, ② 복숭아혹진딧물, ③ 점박이응애, ④ 오이총채벌레로 선정하여 단계별로 살충 활성을 측정하기로 하였다.

Table 2. 정유 성분의 활성 스펙트럼

물질	구분	Order	Family	main pests
정유 성분	국내외	응애목	응애과	점박이응애
	국내	노린재목	가루이과	온실가루이, 담배가루이
		총채벌레목	총채벌레과	꽃노랑총채벌레
	해외	나비목	밤나방과	담배거세미나방
노린재목		진딧물과	복숭아혹진딧물	

Table 3. 유충호르몬 agonists의 활성 스펙트럼

MOA	제품	Order	Family	main pests	기타
JHA (juvenile hormone mimics)	Hydroprene				바퀴벌레, 저장해충
	Methoprene				모기, 이집트숲모기
	Fenoxycarb	나비목	잎말이나방과	복숭아순나방, 사과잎말이나방	
		응애목	응애과	응애	
	Pyriproxyfen	노린재목	가루이과	온실가루이, 담배가루이	
			깍지벌레과	깍지벌레	
바퀴목		바퀴과	바퀴벌레		
JHAN	없음				

(2) IGR 활성물질의 단일농도 살충활성 스크리닝 및 살충활성 스펙트럼 (실내시험)

식물 및 미생물 유래 추출물을 DMSO에 희석하여 100,000 ppm이 되도록 stock을 만들어 냉장 보관하면서 사용하였고, *in vitro* HTS 스크리닝 시스템을 통해 선발된 후보물질이 1차적으로 활성이 있는지 없는지를 확인하기 위해 최종 1,000 ppm이 되도록 Triton X-100 (100 ppm)이 들어있는 10% acetone에 희석하여 실험에 사용하였다.

담배거세미나방 (*Spodoptera litura*)은 2령 유충을 시험에 사용하였고 약제 처리 방법은 leaf dipping method와 body immersion method로 서로 다르게 처리하였다. 시험작물로는 배추(신세대)의 잎을 5 cm가 되게 잘라 잎절편을 만들어 사용하였다. Leaf dipping method는 이렇게 만들어진 배추잎 절편에 약액을 30초간 침지하고 실온에서 1시간 풍건시킨 다음 배추잎 당 10마리의 2령 유충을 접종하였고, body immersion method는 만들어진 약액에 2령 유충을 10초간 담근 다음 건져내어

물질처리가 되지 않은 신선한 배추잎 절편에 접종하였다. 대조약제로는 키틴 생합성 저해제 대표약제인 Lufenuron (25 ppm)과 탈피호르몬 수용체 agonists 대표약제인 Methoxyfenozide (40 ppm)를 사용하였고, 처리 3일 후 사충 수를 조사하였다.

복숭아혹진딧물 (*Myzus persicae*)과 점박이응애 (*Tetranychus urticae*)는 성충을 시험에 사용하였고 진딧물은 배추의 잎, 응애는 강낭콩 잎을 5 cm가 되게 잘라 잎절편을 만든 다음, 잎 당 진딧물은 15마리, 응애는 25마리씩 접종한 후 spray처리 하였다. 대조약제로는 키틴 생합성 저해제 대표약제인 Lufenuron (25 ppm)을 사용하였고, 처리 1일, 4일 후 사충 수를 조사하였다.

오이총채벌레는 (*Thrips palmi*)는 약충을 시험에 사용하였고 강낭콩 잎을 5 cm가 되게 잘라 잎절편을 만든 다음 약액에 30초간 침지하고 실온에서 1시간 동안 풍건한 후 강낭콩 잎 당 20마리의 약충을 접종하였다. 대조약제로는 유충호르몬 agonists인 Pyriproxyfen (50 ppm)을 사용하였고, 처리 5일 후 사충 수를 조사하였다.

(3) IGR 활성물질의 다중농도 살충활성 스크리닝 (실내시험)

실내시험의 단일농도에서 활성이 90% 이상 보이는 물질에 대해서는 200 ppm, 100 ppm으로 spray 처리하여 처리 1일 및 4일 혹은 5일 후에 생충수를 조사하였다. 시험에 사용된 추출물은 DMSO를 사용하여 10,000 ppm의 stock solution으로 만들어 4°C에 보관하면서 사용하였고, 처리농도에 맞추기 위해서는 Triton X-100 (100 ppm)으로 희석하였다. 대조물질로 사용된 lufenuron, flufenoxuron은 원제를 구매하여 acetone에 500 ppm이 되게 녹인 다음, 최종적으로 10% acetone과 Triton X-100, 100 ppm이 되도록 만들어 포장추천농도로 처리하였다.

시험 곤충으로는 점박이응애 성충을 시험에 사용하였고 시험작물은 강낭콩을 사용하였다. 강낭콩 잎은 5 cm가 되게 잘라 잎절편을 만든 다음, 잎 당 성충을 25마리씩 접종한 후 200 ppm으로 spray 처리 (1,500 L/ha) 하였다. 처리구 당 3반복으로 실시하였고 대조물질로는 IGR 계열 약제 중 키틴 생합성 저해 대표약제인 lufenuron (25 ppm)이나 flufenoxuron (50 ppm)을 사용하였다. 처리 1일, 4일, 혹은 1일, 5일 후 사충 수를 조사하였다.

점박이응애의 알부화 억제활성을 평가하기 위하여 강낭콩 잎 절편을 준비한 다음 잎마다 암컷 10마리씩을 접종하고 그 다음날 오전에 암컷을 모두 제거한 다음에 시험물질을 100 ppm (1,500 L/ha)이 되도록 spray 처리하였다. 약제처리 1일부터 관찰을 시작하여 7일까지 부화 유무 및 부화한 약충은 작은 붓 등으로 건드려 생존 여부를 확인하였고 살아있는 개체의 움직임이 정상적인지를 관찰하였다.

(3) IGR 활성물질의 살충활성 스크리닝 (온실시험)

실내시험에서 살충 활성이 확인된 후보물질에 대하여 점박이응애를 대상으로 온실시험을 수행하였다. 강낭콩은 파종 후 7~10일이 지나 초엽이 나오면 그 초엽을 제거하고 본엽 2장이 되도록 준비한 다음 각 잎 당 20마리씩 점박이응애 성충을 접종한 다음 4시간 정도 적응시키고 hand spray를 사용하여 약제를 처리하였다. 처리구 당 3반복으로 준비하여 200 ppm 및 100 ppm으로 1,500 L/ha가 되도록 처리하였고 처리 1일, 4일 후 사충 수를 조사하였다. 다른 해충의 오염과 시험 해충의

탈출을 방지하고자 온실 베드에 망케이지를 설치하였다. 대조물질로는 IGR 계열 약제 중 키틴 생합성 저해 대표약제인 lufenuron (25 ppm)이나 flufenoxuron (50 ppm)을 사용하였다.

기존의 온실시험 방법은 pot에 심어진 강낭콩에 점박이응애 암컷을 40마리씩 접종한 다음 약제를 경엽처리하여 약제처리 1일, 4일 혹은 5일차에 생충수를 조사하는 방법으로 실제 포장 환경과는 다를 수 있다. 그러므로 추가적으로 수행한 온실시험에서는 다양한 stage의 응애가 감염되어 있는 강낭콩 잎 절편을 온실시험용 pot의 강낭콩에 접종하고 1일이 지난 다음 약제를 처리하여 3일, 7일, 10일, 14일, 21일에 생충수를 조사하였다. 또한 약제처리 농도뿐만 아니라 처리 횟수 및 처리간격을 다양하게 하여 포장시험을 위한 최적의 조건을 결정하였다.

(4) S-630 hexane 균체 추출물의 제제화

점박이응애를 대상으로 실시한 실내시험과 온실시험을 통해 선발된 S-630 hexane 균체 추출물 원제는 물에 녹지 않는 특징을 가지고 있어 포장시험을 위한 적당한 제형으로 수화제를 선택하였다.

0.5% WP 제형을 만들기 위해 원제 0.515%, 용제 5%, 분쇄조력제 10%, 계면활성제 10%, 그 외 증량제를 사용하였으며 원제를 용제에 용해시킨 다음 분쇄조력제에 흡착시키고 계면활성제와 증량제를 섞은 다음 건식 분쇄하였다. 최종으로 얻은 회색의 WP 0.5% (Wettable powder, 수화제)가 만들어졌고 포장시험 및 담수어류 급성시험에 사용되었다.

(5) S-630 hexane 균체 추출물에 대한 담수어류 급성시험

점박이응애를 대상으로 실내시험과 온실시험을 통해 선발된 S-630 hexane 균체 추출물 및 이 유효성분을 가지고 포장시험을 위해 만든 S-630 hexane 균체 추출물 (0.5% WP)에 대해 담수어류에 대한 급성독성시험을 실시하였다. 이 독성시험은 농천진흥청고시 제 2018-4호 “환경생물 독성시험기준과 방법 - 담수어류급성독성시험 (2018년 04월 26일)” 및 OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 203 "Fish, Acute Toxicity Test"를 참고하였다.

시험에 사용된 시험종은 잉어 (*Cyprinus carpio*)로 사육온도는 20~24°C, 광조건은 16시간, 암조건 8시간으로 유지하였으며 관상어용 입상 사료를 공급하였다. 사육수의 용존산소량을 포화농도의 60% 이상으로 유지하기 위해 산소공급을 실시하였고 시험에 사용된 수조는 시험어류의 단위체중 당 시험용수의 양이 1 g/L 이상이 되도록 60 L 용량의 직육면체 수조를 사용하였다. 사육 중인 잉어는 시험시작 3일 전에 독성시험에 사용할 물과 같은 수질의 물에서 순화시켰으며 시험개시 24시간부터 절식시켰다.

시험물질의 처리를 위해 원통형의 약 13 L (24x30 cm)가 되는 유리수조를 사용하여 24시간 동안 노출시켰다. 시험농도는 0.01, 0.1, 1, 10 mg/L로 설정하였고 시험생물은 대조군과 처리군 각 10마리를 사용하였다. 음성대조군은 시험용수를 사용하였고 관찰은 시험물질 처리 후 3, 6시간에 실시하여 형태이상, 유영이상, 출혈 등의 중독증상과 치사 개체수를 관찰하여 기록하였으며, 치사판정은 아가미의 움직임이 없거나 꼬리 접촉 시 반응이 없는 경우 치사한 것으로 판단하였다. 치사개체는 기록

즉시 수조에서 제거하였다. 시험 종료 후, 살아있는 어류에 대한 도태는 250 mg/L 이상 TMS (Tricaine methane sulfonate, MS-222) 용액에 10분 이상 방치하여 아가미 운동이 정지하는 방법으로 안락사시켰다.

(6) 점박이응애에 대한 포장시험

점박이응애 온실시험을 통해 선발된 S-630 hexane 균체 추출물에 대하여 딸기 및 장미 포장에서의 살충 활성을 평가하였다. 충청북도 청주에 위치한 딸기 포장을 대상으로 5월에 자연발생한 점박이응애에 대해 S-630 hexane 배양체 추출물 200 ppm (처리약량 2,000 L/ha)을 1회 경엽처리하여 약제처리 3일, 5일, 7일, 14일 후에 생충수를 조사하였다. 대조물질은 제품 카스케이드 (flufenoxuron 5% 분산성액제)를 1000배 희석하여 사용하였고 시험구 당 면적은 10 m², 3반복으로 실시하였다.

10월에 실시한 2차 포장시험은 S-630 hexane 균체 추출물을 수화제 제형(0.5% WP)으로 만들어 충북 서천에 위치한 장미 포장을 대상으로 실시하였다. 점박이응애가 자연적으로 발생되지 않아 당사가 보유한 점박이응애 (*Tetranychus urticae*)를 10월 2일, 11일 2회 접종하여 응애가 기주식물에 정착할 수 있는 조건을 만들어주었다.

장미 잎 당 성충 및 약충이 100마리 내외로 정착된 것이 확인된 10월 19일에 사전밀도를 조사한 다음 시험구 당 10 m²을 잡아 3반복으로 실시하였다. 2차 포장시험에 사용된 대조물질은 제품 카스케이드 (flufenoxuron 5% 분산성액제)이며 1000배로 희석하여 사용하였고, S-630 hexane 균체 추출물 (0.5% WP)은 100 ppm이 되도록 물에 희석하여 3일 간격으로 2회 처리하였다. 대조물질의 경우에도 3일 간격으로 2회 처리하였으며, 처리약량은 1차 포장시험과 동일하게 2,000 L/ha가 되도록 경엽처리 하였다.

나. 세부연구수행 결과

(1) 단일농도 스크리닝 및 살충활성 스펙트럼 (실내시험)

(가) 담배거세미나방

식물추출물 유래 정유 12종 및 미생물 추출물 2종 모두 활성은 저조한 것으로 조사되었다 (Table 4, 5 and 6).

Table 4. 식물체 정유 추출물의 담배거세미나방에 대한 살충 활성 (leaf dipping method)

Compounds	Con. (ppm)	반복당 마리수	반복수	Mortality(%)		비고
				3DAT		
1 무처리	-	10	3	[100]		
2 Nigella				0		
3 Pepper tasmanian				0		
4 Celery				0		
5 Petitgrain Mandarine				7		
6 Mandarine, green				0		
7 Clementine HA	1000	10	3	10		
8 Bergamot				0		
9 Nutmug				0		
10 Jasmin arab				0		
11 Mate				0		
12 Chamomile blue				0		
13 Parsley				0		
14 Lufenuron (STD)	25	10	3	100		Inhibitors of chitin biosynthesis
15 Methoxyfenozide(STD)	40			97		Ecdysone receptor agonists

Table 5. 식물체 정유 추출물의 담배거세미나방에 대한 살충 활성 (body immersion method)

Compounds	Con. (ppm)	반복당 마리수	반복수	Mortality(%)		비고
				3DAT	5DAT	
1 무처리	-	10	3	[100]	[100]	
2 Nigella				0	0	
3 Pepper tasmanian				0	3	
4 Celery				0	0	
5 Petitgrain Mandarine				0	0	
6 Mandarine, green				0	0	
7 Clementine HA	1000	10	3	0	0	
8 Bergamot				0	0	
9 Nutmug				0	3	
10 Jasmin arab				0	0	
11 Mate				0	0	
12 Chamomile blue				0	0	
13 Parsley				0	0	
14 Lufenuron (STD)	25	10	3	97	100	Inhibitors of chitin biosynthesis
15 Methoxyfenozide (STD)	40			93	100	Ecdysone receptor agonists

Table 6. 미생물 추출물 2종의 담배거세미나방에 대한 살충 활성

Compounds	Con. (ppm)	반복당 마리수	반복수	Mortality(%)		비고
				3DAT		
1 무처리	-			[100]		
2 S-630	1000	10	1	20		
3 F-145				0		
4 Lufenuron (STD)	25			100		chitin biosynthesis inhibitors

(나) 복숭아혹진딧물

식물추출물 유래 정유 12종 및 미생물 추출물 2종 모두 활성은 저조한 것으로 조사되었다 (Table 7 and 8). Pepper tasmanian의 경우 후대 약충에 대한 활성은 100%로 대조약제 대비 우수하였으나 성충에 대한 활성은 40% 미만으로 다음 단계 스크리닝을 위한 기준에는 미치지 못하는 것으로 결론지었다.

Table 7. 식물체 정유 추출물의 복숭아혹진딧물에 대한 살충 활성

Compounds	Con. (ppm)	반복당 마리수	반복수	Mortality(%)				비고
				1DAT	3DAT	4DAT	4DAT 후대약충	
1 무처리	-	10	1	[100]	[100]	[80]	[100]	
2 Nigella				22	0	0	34	
3 Pepper tasmanian				0	10	38	100	
4 Celery				10	20	0	48	
5 Petitgrain Mandarine				0	10	0	49	
6 Mandarine, green				20	20	0	62	
7 Clemantine HA	1000	10	1	0	0	0	39	
8 Bergamot				10	20	0	33	
9 Nutmug				0	20	0	46	
10 Jasmin arab				0	0	0	56	
11 Mate				0	0	0	61	
12 Chamomile blue				0	0	0	56	
13 Parsley				0	0	0	52	
14 Lufenuron (STD)	25			10	30	88	89	chitin biosynthesis inhibitors

Table 8. 미생물 추출물 2종의 복숭아혹진딧물에 대한 살충 활성

Compounds	Con. (ppm)	반복당 마리수	반복수	Mortality(%)				비고
				1DAT	3DAT	4DAT	4DAT 후대약충	
1 무처리	-			[100]		[67]	[100]	
2 S-630	1000	15	1	7		100	100	
3 F-145				0		70	100	
4 Lufenuron (STD)	25			0		70	68	chitin biosynthesis inhibitors

(다) 점박이응애

식물추출물 유래 정유 12종 중 Pepper tasmanian, Clementine, Chamomile blue, Parsley는 1,000 ppm 처리에 100%, Nigella 및 Celery는 90% 이상의 활성을 보여 1단계 스크리닝 시험물질로 선발하였고 (Table 9), 미생물 추출물 2종 중 S-630이 100%의 활성을 보여 역시 1단계 스크리닝 시험물질로 선발하였다 (Table 10).

Table 9. 식물체 정유 추출물의 점박이응애에 대한 살충 활성

Compounds	Con. (ppm)	반복당 마리수	반복수	Mortality(%)		비고
				1DAT	4DAT	
1 무처리	-	15	1	[100]	[100]	
2 Nigella				20	90	
3 Pepper tasmanian				100	100	
4 Celery				58	92	
5 Petitgrain Mandarine				17	58	
6 Mandarine, green				33	83	
7 Clemantine HA	1000	15	1	25	100	
8 Bergamot				25	83	
9 Nutmug				45	82	
10 Jasmin arab				83	83	
11 Mate				50	63	
12 Chamomile blue				25	100	
13 Parsley				69	100	
14 Lufenuron (STD)	25			23	100	chitin biosynthesis inhibitors

Table 10. 미생물 추출물 2종의 점박이응애에 대한 살충 활성

	Compounds	Con. (ppm)	반복당 마리수	반복수	Mortality(%)		비고
					1DAT	4DAT	
1	무처리	-			[100]	[85]	
2	S-630	1000	25	1	100	100	
3	F-145				50	55	
4	Lufenuron (STD)	25			17	72	chitin biosynthesis inhibitors

(라) 오이총채벌레

식물추출물 유래 정유 12종 및 미생물 발효 추출물 2종 모두 활성은 저조한 것으로 조사되었다 (Table 11 and 12).

Table 11. 식물체 정유 추출물의 오이총채벌레에 대한 살충 활성

	Compounds	Con. (ppm)	반복당 마리수	반복수	Mortality(%)	비고
					5DAT	
1	무처리	-	20	1	[100]	
2	Nigella				30	
3	Pepper tasmanian				0	
4	Celery				0	
5	Petitgrain Mandarine				0	
6	Mandarine, green				0	
7	Clementine HA	1000	20	1	18	
8	Bergamot				19	
9	Nutmug				0	
10	Jasmin arab				19	
11	Mate				0	
12	Chamomile blue				13	
13	Parsley				7	
14	Pyriproxyfen (STD)	50			100	juvenile hormone mimics

Table 12. 미생물 추출물 2종의 오이총채벌레에 대한 살충 활성

	Compounds	Con. (ppm)	반복당 마리수	반복수	Mortality(%)	비고
					4DAT	
1	무처리	-			[100]	
2	S-630	1000	20	1	15	
3	F-145				10	
4	Pyriproxyfen (STD)	50			90	juvenile hormone mimics

(2) 다중농도 스크리닝 (실내시험)

(가) 식물체 정유 및 방선균 S-630 추출물의 살충활성

3반복 시험으로 수행된 1단계 스크리닝 시험에서 Pepper tasmanian이 6 DAT에 70% 이상의 활성을 보였고 (Table 13), S-630은 500 ppm 처리에서 1 DAT에 100% 가까운 활성을 보여 (data not shown) 추가적으로 200 ppm으로 농도를 낮춰 시험한 결과 역시 90% 이상의 활성을 보여 (Table 14) 온실시험 후보물질로 최종 선발하였다.

Table 13. 식물체 정유 추출물의 점박이응애에 대한 활성 결과 (500 ppm)

	Compounds	Con. (ppm)	반복당 마리수	반복수	Mortality (%)			비고
					1DAT	2DAT	6DAT	
1	무처리	-	15	3	[92]	[87]	[82]	
2	Nigella				4	21	33	
3	Pepper tasmanian				12	66	72	
4	Celery	500	15	3	15	23	24	
5	Clementine HA				8	30	49	
6	Chamomile blue				29	27	46	
7	Parsley				17	20	20	
8	Lufenuron	25			20	29	72	chitin biosynthesis inhibitors

Table 14. S-630 추출물의 점박이응애에 대한 활성 결과 (200 ppm)

	Compounds	Con. (ppm)	반복당 마리수	반복수	Mortality (%)		비고
					1DAT	4DAT	
1	무처리	-			[98]	[64]	
2	S-630	200	25	3	94	91	
3	Lufenuron	25			21	61	chitin biosynthesis inhibitors

1단계 스크리닝 시험에서 우수한 활성을 보인 방선균 S-630에 대해 균체 추출물 3종, 배양액 추출물 2종에 대하여 점박이응애에 대한 활성을 평가하였다 (Table 15). Hexane 추출물은 균체 및 배양액 모두 활성이 1일차부터 우수하였고 4일차에 100%의 사충율을 보였다. 균체 ethyl acetate 추출물의 경우에도 활성이 우수한 것으로 조사되었다.

Table 15. S-630 균체 및 배양액 추출물 (200 ppm)에 대한 점박이응애 실내시험 결과

Compounds	Con. (ppm)	반복당 마리수	반복수	Mortality (%)		비고
				1 DAT	4 DAT	
1 무처리	-	20	3	[93]	[80]	
2 균체-butanol				11	0	
3 균체-ethyl acetate				72	95	
4 균체-hexane	200	20	3	84	100	
5 배양액-ethyl acetate				64	73	
6 배양액-hexane				96	100	
7 Lufenuron	50	20	3	17	52	chitin biosynthesis inhibitors
8 Flufenoxuron	50	20	3	21	43	chitin biosynthesis inhibitors

(나) 방선균 S-627 등 10종에 대한 살충활성

S-630 대비 우수한 활성이 있는지를 확인하기 위해 S-627 등 10종의 방선균 배양액 및 균체의 ethyl acetate 추출물에 대하여 추가적으로 실내시험을 수행하였다. S-628 균체 ethyl acetate 추출물이 처리 4일차에 89%의 사충율을 보여 가장 우수하였다 (Table 16). 배양액 ethyl acetate 추출물 중에서는 S-633과 S-644가 처리 1일차에 70% 이상의 활성을 보였으나 3일차부터 약해가 발생하였다 (Table 17).

Table 16. S-627 등 10종의 방선균에 대한 균체 ethyl acetate 추출물 (200 ppm)의 점박이응애 실내시험 결과

Compounds	Con. (ppm)	반복당 마리수	반복수	Mortality (%)		비고
				1 DAT	4 DAT	
1 무처리	-	25	3	[100]	[92]	
2 S-627				15	49	
3 S-628				71	89	
4 S-629				20	48	
5 S-631				39	72	
6 S-632	200	25	3	33	61	
7 S-633				17	17	
8 S-634				10	13	
9 S-635				17	24	
10 S-636				12	35	
11 S-637				15	35	
12 Lufenuron	50	25	3	11	46	chitin biosynthesis inhibitors

Table 17. S-627 등 10종의 방선균에 대한 배양액 ethyl acetate 추출물 (200 ppm)의 점박이응애 실내시험 결과

Compounds	Con. (ppm)	반복당 마리수	반복수	Mortality (%)			비고	
				1 DAT	3 DAT	5 DAT		
1	무처리	-	25	3	[97]	[90]	[83]	
2	S-627				3	8	34	
3	S-628				23	25	58	
4	S-629				17	23	42	
5	S-631				3	13	76	
6	S-632	200	25	3	32	약해	약해	
7	S-633				70	약해	약해	
8	S-634				71	약해	약해	
9	S-635				55	약해	약해	
10	S-636				22	18	20	
11	S-637				29	37	60	
12	Lufenuron	50	25	3	26	33	63	chitin biosynthesis inhibitors

균체 추출물 중 각각 89%, 72%의 활성을 보인 S-628과 S-631 및 배양액추출물 중 76%의 활성을 보인 S-631에 대해서는 실내 다중농도시험을 실시하였는데, 3물질 모두 100 ppm 처리에 40% 미만의 낮은 활성을 보였다 (Table 18).

Table 18. S-628 추출물 등 3종에 대한 점박이응애 실내 다중농도시험 결과

Compounds	Con. (ppm)	반복당 마리수	반복수	Mortality (%)		비고	
				1 DAT	5 DAT		
1	무처리	-	25	3	[92]	[74]	
2	S-628 균체추출물	200			44	79	
3		100			15	19	
4	S-631 균체추출물	200	20	3	24	40	
5		100			1	2	
6	S-631 배양액추출물	200			19	44	
7		100			30	36	
8	Lufenuron	50	25	3	22	52	chitin biosynthesis inhibitors

(다) 방선균 S-630 hexane 추출물에 대한 알부화 억제활성

방선균 S-630의 균체 및 배양액 hexane 추출물에 대한 점박이응애의 알부화 억제 활성을 평가하였다 (Table 19). 무처리구의 경우 암컷이 제거되고 5일이 지나면 90% 이상이 정상적으로 부화하여 건강한 약충이 되는 것이 확인되었다. 균체 hexane 추출물 100 ppm 처리시의 알부화 유무는 6일이 지나야 현미경 상에서 확인이 가능하였고 알부화 억제 활성은 97%로 매우 우수한 것으로 조사되었다 (Fig. 1). 그러나 배양액 hexane 추출물은 알부화 억제 활성이 매우 저조하였으며 대조물질로 사용된 flufenoxuron은 7일차에 63%로 알부화 억제 효과는 높지 않은 것으로

조사되었다.

Table 19. S-630 균체 및 배양액 hexane 추출물 (100 ppm)에 대한 점박이응애 알부화 억제 활성결과

Compounds	Con. (ppm)	반복수	Hatching inhibition & mortality rate (%)			
			4 DAT	5 DAT	6 DAT	7 DAT
1 무처리	-	3	[73%]	[91%]	[92%]	[91%]
2 균체-hexane	100	3	30	10	97	97
3 배양액-hexane	100		23	5	2	0
4 Flufenoxuron (chitin biosyn. Inhibitors)	50	3	0	10	40	63



Fig. 1. 5DAT에 부화한 약충 사진. (left) 균체 추출물 처리구 (×20), (right) 배양액 추출물 처리구(×20).

(3) 점박이응애에 대한 온실시험

(가) 식물체 정유 및 방선균 S-630 추출물의 온실시험 결과

S-630 및 Pepper tasmanian의 점박이응애에 대한 온실시험에서 두 물질 모두 500 ppm 처리에 100%, 200 ppm 처리에 90% 이상의 우수한 활성을 보였다 (Table 20).

Table 20. S-630 및 Pepper tasmanian의 점박이응애에 대한 살충 활성

Compounds	Con. (ppm)	반복당 마리수	반복수	Mortality (%)		비고
				1DAT	4DAT	
1 무처리	-	40	3	[88]	[80]	
2 S-630	200			8	92	
3 S-630	500	40	3	56	100	
4 Pepper tasmanian	200			30	95	
5 Pepper tasmanian	500			38	100	
6 Flufenoxuron	50	40		8	31	chitin biosynthesis inhibitors

방선균 S-630의 균체 추출물 2종 및 배양액 추출물 1종에 대한 온실 다중농도시험 결과 3물질 모두 활성이 98~100%로 우수한 것으로 조사되었으나 균체 hexane

추출물의 경우 100 ppm의 농도에서도 처리 1일차부터 50%의 활성을 나타내었다 (Table 21). 온실 다중농도시험을 통해 3물질 간의 살충 활성 차이는 볼 수 없었으나 배양액 hexane 추출물은 알부화 억제 활성이 매우 저조한 것으로 평가되어 균체 hexane 추출물이 포장시험을 위한 시험물질로 최종 선발되었다.

Table 21. S-630 균체 및 배양액 추출물 3종에 대한 점박이응애 온실 다중농도시험 결과

Compounds	Con. (ppm)	반복당 마리수	반복수	Mortality (%)		비고
				1DAT	4DAT	
1 무처리	-	40	3	[84]	[93]	
2 ethyl acetate 균체추출물	200			29	98	
3	100			47	98	
4 hexane 균체추출물	200	40	3	37	99	
5	100			50	100	
6 Hexane 배양액추출물	200			0	100	
7	100			24	100	
8 Flufenoxuron	50	40		21	0	chitin biosynthesis inhibitors

(나) 방선균 S-630 균체 hexane 추출물에 대한 온실시험 결과

방선균 S-630의 균체 hexane 추출물에 대하여 처리농도를 200, 100, 50 ppm으로 하여 1회 처리하거나 7일 간격으로 2회 처리한 다음의 살충 활성 효과를 조사하였다. 인위적으로 암컷 성충만 접종하여 수행한 온실 활성 결과보다 성충, 약충 및 알이 다양하게 접종된 온실시험의 살충 활성 결과가 많이 저조한 것으로 조사되었다. 암컷 성충만 인위적으로 접종하여 실시한 온실시험에서는 100 ppm으로 1회 처리 시 4일차에 100% 사충율을 보였으나 (Table 21), 점박이응애의 stage가 다양하게 접종된 온실시험에서는 100 ppm 1회 처리 시에 80% 미만으로 사충률이 감소되는 것을 확인하였고, 조사기간이 길어질수록 사충율이 더욱 낮아지는 것이 관찰되었다 (Table 22).

Table 22. S-630 균체 hexane 추출물 처리농도 및 처리횟수에 따른 점박이응애 온실활성 결과

Compounds	Con. (ppm)	반복수	Mortality (%)						비고
			3 DAT	7 DAT	10 DAT	14 DAT	17 DAT	21 DAT	
1 무처리	-	3	[131]	[221]	[608]	[1221]	[1243]	[1223]	
2 hexane 균체추출물	200		85	80	78	79	77	56	
3 hexane 균체추출물 1회	100	3	73	78	60	76	76	65	
4	50		43	50	47	67	66	31	
5 hexane 균체추출물	200		60	76	약해	-	-	-	
6 hexane 균체추출물 2회 (7일 간격)	100	3	63	55	85	87	86	61	
7	50		52	61	77	89	79	60	
8 카스케이드 2회 (7일 간격)	50	3	12	59	81	94	93	93	chitin biosynthesis inhibitors

방선균 S-630의 균체 hexane 추출물을 7일 간격으로 2회 처리한 경우에도 활성이 높지 않았고 200 ppm으로 2회 처리한 경우 10일차부터 약해가 발생되었다. 또한 7일

간격으로 2회 처리한 100 ppm, 50 ppm의 경우에는 약해는 없었으나 활성이 70% 미만으로 조사되어 처리간격을 줄이거나 처리횟수를 늘이는 시험이 필요할 것으로 판단되었다.

(다) 방선균 S-630 균체 hexane 추출물 (0.5% WP)에 대한 온실시험 결과

S-630 균체 hexane 추출물 0.5% WP에 대한 온실시험을 수행하였다. 점박이응애의 암컷 및 수컷 성충, 약충 및 알이 다양하게 감염되어 있는 강낭콩 포트를 시험에 사용하였고, 기초 제형으로 사용된 WP 0.5%는 강낭콩에 대한 약해가 없는 것으로 조사되었다 (Table 23). S-630 균체 hexane 추출물을 200 ppm으로 2회 처리시 강낭콩에 약해가 발생되었으므로 (Table 22), 처리농도는 100 ppm과 50 ppm으로 3일 간격 2회 및 3회, 5일 간격 2회 및 3회 spray로 처리하여 생충수를 조사하였다.

S-630 균체 hexane 추출물 0.5% WP를 50 ppm으로 처리 시 처리간격 및 처리횟수에 따른 활성 결과는 처리간격이 5일에서 3일로 짧아질수록 활성이 높았으며 2회 처리보다 3회 처리의 활성 결과가 우수하였다. 100 ppm으로 처리한 경우에도 유사한 경향을 보이며 3일 간격으로 2회 처리 이상 시 높은 살충률을 나타내는 것으로 조사되었다.

Table 23. S-630 균체 hexane 추출물 (0.5% WP) 처리농도 (100, 50 ppm) 및 처리횟수, 처리간격에 따른 점박이응애 온실활성 결과

Compounds	Con. (ppm)	반복수	Mortality (%)				
			3 DAT (7/16)	7 DAT (7/20)	10 DAT (7/23)	14 DAT (7/27)	21 DAT (8/3)
1 무처리 (WP 0.5%)	-	3					
2 무처리	-	3	[144]	[403]	[811]	[856]	[489]
3 hexane 균체추출물	100	3	86	97	98	99	95
4 3일 간격, 2회	50		86	97	98	97	74
5 hexane 균체추출물	100	3	86	99	100	100	100
6 3일 간격, 3회	50		78	97	99	98	97
7 hexane 균체추출물	100	3	91	89	95	96	84
8 5일 간격, 2회	50		90	91	95	95	67
9 hexane 균체추출물	100	3	95	87	96	99	97
10 5일 간격, 3회	50		83	85	91	92	55
11 카스케이드 2회	50	3	46	78	91	89	41

(4) S-630 hexane 균체추출물에 대한 담수어류 급성독성시험

S-630 hexane 균체추출물 WP 0.5% 제형의 시험에서는 순화와 절식기간 동안에 치사한 개체는 발견되지 않았으며, 이 기간동안의 건강상태는 양호하였고, 수온은 20.8~20.9°C로 관측되었다. 실험개시일의 수온은 20.9°C로 측정되었고, 시험기간 동안 처리군에서의 포화농도는 60% 이상이 유지됨을 확인하였고 pH cm rwjdruf과 평균 7.74±0.12 (7.61~7.89)로 나타났다. 시험물질을 처리한 시험용액 중 0.1, 1 mg/L에서 육안 관찰이 가능한 수준의 균일한 분산이 관찰되었고 10 mg/L에서는 시험물질로 인하여 심한 탁도가 관찰되었다. 시험물질의 농도 별 치사수 및 일반중독증상을 관찰한

결과는 표 24와 같다.

Table 24. S-630 hexane 균체추출물 (WP 0.5%)의 담수어류 급성독성시험

시험물질 농도 (mg/L)	생물수 (마리)	치사수 (마리)		치사율 (%)	
		3hr	6hr	3hr	6hr
음성대조군	10	0	0	0	0
0.01	10	0	10	0	100
0.1	10	10	10	100	100
1.0	10	10	10	100	100
10.0	10	10	10	100	100

0.1, 1, 10 mg/L 시험용액에서 노출 3시간만에 전 개체의 치사가 관찰되었다. 0.01 mg/L 시험용액에서는 노출 3시간 후 유영저해 및 표면에 떠있는 개체가 각각 5마리씩 관찰되었으나 노출 6시간 후 모든 개체의 치사가 관찰되었다. S-630 hexane 균체추출물 WP 0.5%의 반수치사농도 (LC₅₀)은 0.01 mg/L 미만이 될 것으로 예상된다.

원제인 S-630 hexane 균체추출물에 대해서는 시험농도를 0.01, 0.1 1 mg/L로 설정하여 추가시험을 수행하였다. 시험물질 150 mg을 칭량하여 DMSO 150 ml에 녹여 충분히 혼합하여 1,000 mg/L의 stock 용액을 준비하였다.

(5) 점박이응애에 대한 포장시험

S-630 hexane 추출물 100 ppm에 대한 딸기에서의 점박이응애 포장시험에서 50% 내외의 저조한 활성을 나타내는 것을 조사되었다 (Table 25). 대조물질로 사용한 카스케이드 (flufenoxuron)의 경우에도 처리 7일차에 60% 미만의 저조한 활성을 나타내었다. 처리 후 14일차에 나타는 처리구들의 높은 활성은 무처리구의 개체수가 급격하게 감소한 결과로 실제 활성이 우수한 것으로는 판단하기는 어렵다.

Table 25. S-630 균체 hexane 추출물에 대한 딸기 포장시험 결과

No.	Treatment	Efficacy(%)				
		사전밀도	3 DAT	5 DAT	7 DAT	14 DAT
1	Check	[162.3]	[126.5]	[165.3]	[118.3]	[12.1]
2	S-630 hexane 균체추출물	[124.3]	54	52	29	74
3	카스케이드 (STD)	[190.7]	56	60	54	96

S-630 hexane 추출물 (WP 0.5%) 100 ppm에 대한 장미에서의 점박이응애 포장시험에서 3일 간격으로 2차 처리 후 7 DAT에 100% 활성을 보였다 (Table 26). 대조물질로 사용한 카스케이드 (flufenoxuron)는 3일 간격 2차 처리 시 80% 내외의

활성을 나타내는 것으로 조사되었다.

Table 26. S-630 균체 hexane 추출물 (WP 0.5%)에 대한 장미 포장시험 결과

No.	Treatment	Efficacy(%)			
		사전밀도	3 DAT	7 DAT	14 DAT
1	Check	[147.3]	[102.8]	[138.3]	[82.7]
2	S-630 hexane 균체추출물 (WP 0.5%)	[114.7]	91	100	100
3	카스케이드 (STD)	[91.7]	40	79	75

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

구분	내용
최종목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ 새로운 살충기작을 가지는 친환경 IGR 살충제 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 시작품 2건 이상 제작 - 특허 출원 3건 이상 - 기술 이전 2건 이상
세부목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ 신규 IGR 물질 탐색을 위한 in vitro 스크리닝 시스템 확립 및 최적화 ○ 유효 IGR 물질 선발 및 특성 구명 <ul style="list-style-type: none"> - 신기능 물질 10종 이상 확보 - 최적의 살충제 후보물질 2종 이상 선발 ○ 선발 IGR 물질의 대량생산 및 제제화 <ul style="list-style-type: none"> - 선발 물질의 대량 정제 및 인공 합성 공정 확립 - 선발 물질별 최적 제형 연구 ○ 선발 IGR 물질의 살충활성 및 환경 영향 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 해충별 실내 살충활성 평가 - 야외 포장을 이용한 방제효과 평가 - 익충에 대한 안전성 평가 및 야외 포장을 이용한 환경 영향 평가

3-2. 목표 달성도

구분 (연도)	성과목표	자 체 평 가	가중치 (%)	달성도 (%)
1 차 년 도	in vitro IGR 스크리닝 시스템 구축	이집트 숲모기의 Met-Fisc를 yeast에 형질전환하여 yeast two-bybrid system에 기반한 high-throughput IGR 스크리닝 시스템을 제작하고 최적화 하였음	15	100
	식물 추출물 등 유래 신규 IGR 화합물 탐색	195종의 식물체 정유 유래 화합물, 61종의 식물체 정유 추출물, 189종의 곤충병원성 곰팡이 추출물 및 363종의 방선균 추출물의 IGR 활성을 검정하였음	20	100
	식물 추출물 등 살충활성 검정	178종의 식물체 정유 추출물과 IGR 활성이 우수한 17종의 식물체 정유 유래 화합물, 14종의 곤충병원성 곰팡이 추출물 및 9종의 방선균 추출물을 대상으로 대상 해충에 대한 살충 활성을 검정하였음	15	100
	식물 추출물 등 유래 IGR 활성 물질 분리 및 동정	IGR 및 살충활성이 우수한 15종의 식물체 정유의 성분을 분석하였으며, 각 1종의 곤충병원성 곰팡이 방선균 균주를 동정하였음	20	100
	살충활성 스크리닝 방법 확립	대상 해충에 따라 침지, 훈증 및 접촉에 따른 살충 활성 검정법을 확립하였음	15	100
	살충활성 스펙트럼 분석	국내 및 해외 살충제 원예시장 분석을 통해 주요 해충 4가지를 선정하고, IGR 활성 우수 추출물의 이들 해충에 대한 단일농도 스크리닝 및 다중농도 스크리닝 생물검정을 수행하였음	15	100

구분 (연도)	성과목표	자 체 평 가	가중치 (%)	달성도 (%)
2 차 년 도	유효 후보 화합물 선발	IGR 활성이 우수한 17종의 식물체 정유 유래 화합물, 14종의 곤충병원성 곰팡이 추출물과 1종의 방선균 추출물 및 분획물의 IGR 활성을 농도별로 검정하였음	20	100
	유효 IGR 화합물의 특성 구명	IGR 활성이 우수한 17종의 식물체 정유 유래 화합물, 14종의 곤충병원성 곰팡이 추출물과 1종의 방선균 추출물 및 분획물을 대상으로 대상 해충에 대한 살충 활성을 검정하였음	15	100
	유효 후보 추출물 선발 및 구조분석	IGR 활성이 우수한 식물체 15종을 선발하였고, 이들 식물체의 정유로부터 활성물질 분리, 분석 및 구조 동정을 하였음	20	100
	후보 추출물의 이화학적 특성 구명	IGR 활성이 우수한 식물체로부터 분리된 활성물질의 구조적 특성을 분석하고, 이들 식물체 정유 추출물의 살충활성을 평가하였음	15	100
	IGR 활성 물질의 살충활성 실내시험	IGR 후보물질에 대해 주요 해충 4개를 대상으로 pre-test, 1단계 단일농도 스크리닝, 2단계 다중농도 스크리닝의 3단계 실내 생물검정을 수행하였음	15	100
	IGR 활성 물질의 살충활성 온실시험	실내실험을 통하여 선발된 IGR 후보물질에 대해 점박이용애를 대상으로 온실 조건에서 다중농도 스크리닝을 수행하였음	15	100
3 차 년 도	후보 화합물의 해충별 살충활성 평가	IGR 및 살충활성이 우수한 방선균 S-630 균체 추출물 유래 활성물질의 구조 동정을 하였으며, 분리된 활성물질의 IGR 활성과 배추좀나방, 점박이용애 및 꽃노랑총재벌레에 대한 살충 활성을 검정하였음	15	100
	후보 화합물의 대량생산 및 안정성 평가	방선균 S-630 유래 활성물질의 대량 생산 조건을 확립하였으며, 온도와 pH 및 배양 scale에 따른 활성물질의 안정성을 검정하였음	15	100
	후보 추출물의 해충별 살충효과	IGR 활성이 우수한 식물체 정유 화합물들의 흰줄숲모기, 빨간집모기, 쌀바구미 및 독일바퀴에 대한 살충 활성을 검정하였음	15	100
	후보 추출물의 실내 안전성 평가	IGR 활성이 우수한 식물체 정유 및 정유 유래 화합물들의 환경 내에서의 잔류율을 평가하였음	15	100
	IGR 활성 물질의 제제화 및 포장시험	IGR 및 살충활성이 우수한 방선균 S-630 균체 hexane 추출물을 수화제 형태로 제제화하고 점박이용애를 대상으로 포장에서의 살충활성을 평가하였음	20	100
	IGR 활성 물질의 안전성 평가	방선균 S-630 균체 hexane 추출물 원제 및 수화제 제형의 담수어류에 대한 급성독성을 평가하였음	20	100

3-3. 연구개발 성과

가. 정량적 연구 성과

(단위 : 백만원, 건수)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SCI	비 SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
최종목표	3	3		2	320	1	900		1		6			6		3			
1차 년 도	목표	1									1			1					
	실적	1												5					
2차 년 도	목표	2	1								3			3		1			
	실적		1								2		2.861	9		2			
3차 년 도	목표		2		2						2			2		1			
	실적	2	1								3		1.946	4		1			
소 계	목표	3	3		2						6			6		3			
	실적	3	2								5		2.312	18		3			
종료 1차년도																			
종료 2차년도						1	300		1										
종료 3차년도					320		600												
소 계	3	3		2	320	1	900		1		6			6		3			
합 계	3	2		2	320	1	900		1		5			18		3			

나. 연구 성과

(1) 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저 자명	호	국명	발행 기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Larvicidal and Nematicidal Activities of 3-Acylbarbituric Acid Analogues against Asian Tiger Mosquito, <i>Aedes albopictus</i> , and Pine Wood Nematode, <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	Molecules	서선미	22	스위스	MDPI	SCI	2017. 07. 17.	

2	Nematicidal Activity of 3-Acyltetramic Acid Analogues Against PineWood Nematode, <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	Molecules	이효림	22	스위스	MDPI	SCI	2017. 09. 18.	
3	Insect growth regulatory and larvicidal activity of chalcones against <i>Aedes albopictus</i>	Entomological Research	이석희	48(1)	대한민국	Entomological Society of Korea	SCI	2018. 01. 27.	
4	Insecticidal Activity of Lamiaceae Plant Essential Oils and Their Constituents Against <i>Blattella germanica</i> L. Adult	Journal of Economic Entomology	염화정	111(2)	미국	Entomological Society of America	SCI	2018. 04. 02.	
5	Plant-derived compounds regulate formation of the insect juvenile hormone receptor complex	Pesticide biochemistry and physiology	이석희	150	미국	Elsevier	SCI	2018. 08. 01.	

(2) 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2016년도 한국응용곤충학회 추계 학술발표회	박동환	2016. 10. 20	충남 부여 롯데부여리조트	대한민국
2	2016년도 한국응용곤충학회 추계 학술발표회	박민구	2016. 10. 20	충남 부여 롯데부여리조트	대한민국
3	2016년도 한국응용곤충학회 추계 학술발표회	우라미	2016. 10. 20	충남 부여 롯데부여리조트	대한민국
4	2016년도 한국응용곤충학회 추계 학술발표회	서선미	2016. 10. 20	충남 부여 롯데부여리조트	대한민국
5	The 4th Combined Australian and New Zealand Entomological Societies Conference	박동환	2016. 11. 28	Melbourne	Australia
6	2017년도 한국응용곤충학회 정기총회 및 국제심포지움	우라미	2017. 04. 27	경주 현대호텔	대한민국
7	2017년도 한국응용곤충학회 정기총회 및 국제심포지움	김종훈	2017. 04. 27	경주 현대호텔	대한민국
8	2017년도 한국응용곤충학회 정기총회 및 국제심포지움	박동환	2017. 04. 27	경주 현대호텔	대한민국

9	2017 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC	최재영	2017.06 .16	해운대 그랜드호텔	대한민국
10	50th Annual Meeting and Golden Jubilee Celebration of the Society for Invertebrate Pathology	우라미	2017. 08. 16	UC San Diego	USA
11	2017년도 한국응용곤충학회 임시총회 및 국제심포지움	김종훈	2017. 10. 26	횡성 웰리힐리파크	대한민국
12	2017년도 한국응용곤충학회 임시총회 및 국제심포지움	박동환	2017. 10. 26	횡성 웰리힐리파크	대한민국
13	2017년도 한국응용곤충학회 임시총회 및 국제심포지움	우라미	2017. 10. 26	횡성 웰리힐리파크	대한민국
14	2017년도 한국응용곤충학회 임시총회 및 국제심포지움	서선미	2017. 10. 26	횡성 웰리힐리파크	대한민국
15	2018 Spring International Conference of KSAE	우라미	2018. 04. 25	목포 현대호텔	대한민국
16	2018 Spring International Conference of KSAE	김종훈	2018. 04. 25	목포 현대호텔	대한민국
17	2018 Spring International Conference of KSAE	서선미	2018. 04. 25	목포 현대호텔	대한민국
18	2018 International Joint Conference on Plant Protection	서선미	2018. 10. 25	광주 김대중 컨벤션센터	대한민국

(3) 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	식물체 유래의 유충호르몬 아고니스트 또는 안타고니스트를 포함하는 Met 수용체 조절을 통한 해충방제 조성물 및 방법	대한민국	서울대학교 산학협력단	2016. 11. 06.	10-2016-0152647				1
2	식물체 유래의 유충호르몬 아고니스트 또는 안타고니스트를 포함하는 Met 수용체 조절을 통한 해충방제 조성물 및 방법	대한민국				서울대학교 산학협력단	2017. 03. 21.	10-1720427	1
3	유충호르몬 안타고니스트 및 살충 활성을 가지는 스트렙토마이세스속 AN120537 균주 및 이의 용도	대한민국	서울대학교 산학협력단	2018. 03. 21.	10-2018-0019809				1

4	유충호르몬 안타고니스트 및 살충 활성을 가지는 스트렙토마이세스속 AN120537 균주 및 이의 용도	대한민국				서울대학교 산학협력단	2017. 03. 21.	10-1852462	1
5	꿀꿀과 식물 추출물을 포함하는 살충제	대한민국	서울대학교 산학협력단	2018. 11. 08.	10-2018-0136813				1

(4) 전문연구 인력양성

No	분류	기준 년도	현 황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1		2017		2			1	1	2					
2		2018		1				1	1					

3-4. 관련분야 기여도

가. 기술적 측면

- 기존의 IGR 계열의 물질과는 다른 살충 메카니즘을 가지는 JHAN을 이용함으로써 기존의 살충제에 저항성을 가지는 해충의 방제에 효율적인 살충제 개발이 가능할 것임.
- 본 연구를 통해 구축된 high-throughput 스크리닝 시스템을 활용하여 탐색된 JHAN 활성을 가지는 신규 살충 물질들은 다양한 해충 방제에 적용이 가능할 것임.
- 국내외 산림자원으로부터 친환경 살충제 개발에 있어 식물자원의 생리활성기능에 따른 계통체계 확립에 의한 자원관리, 사육법 및 생물검정법, 정밀분석기술을 확립함으로써 친환경 살충제 개발을 위한 국가경쟁력을 강화할 것으로 기대됨.
- 식물유래 천연물의 작용기전 연구를 통해 효과가 우수한 살충제 개발을 위한 기초자료로 활용할 수 있음.

나. 경제적.산업적 측면

- 기존의 IGR 계열의 물질과는 상반된 본 연구개발의 성공으로 새로운 IGR 계열의 유효물질(JHAN)이 살충제 시장에 진입한다면, 향후 최소 1조원 이상의 시장 규모를 형성할 것임.
- 기존의 IGR 계열의 물질과는 다른 살충 메카니즘을 가지는 JHAN에 대하여 지적재산권 선점과 신규 살충제 개발을 통하여 날로 증가하는 친환경 농약 시장의 국제 경쟁력 확보가 가능할 것임.
- 인축에 해가 없는 환경친화형 살충제 개발의 원천기술을 확보함으로써 환경오염 감소 및 국민보건 증대에 기여할 수 있음.
- 저독성 살충제 개발에 관한 노하우 확보 및 국가적인 유경험 연구인력의 원활한 확보 시스템을 구축할 수 있음.

4. 연구결과의 활용 계획 등

4-1 연구개발 결과의 활용방안

- 본 연구에서 찾고자하는 물질은 기존의 IGR 계열의 물질과는 다른 살충 메카니즘을 가지는 JHAN으로, 이들 물질의 대량 확보를 통해 관련 특허를 출원함.
- 본 연구 개발 결과를 유관 기관 및 업체에 기술이전 후 기술이전료를 징수하여 정부 재정에 기여하며, 정부 핵심 과제 중 하나인 친환경 농업 환경 조성에 구체적으로 기여할 수 있음.
- 본 연구를 통해 도출된 JHAN 활성 물질을 선도물질로 이용하여 보다 살충 활성이 향상된 유도체를 제작함으로써 해충 맞춤형 저독성 고효율 살충제 개발의 know-how를 축적하고, 관련 특허 출원 및 상용화를 통해 친환경 농약산업 활성화에 기여할 것으로 사료됨.
- 선행 연구를 통해 확보된 연구 자료는 국내 농약산업 발전 방안 수립에 기여하며, 실제 활용도 높은 식물 자원의 고부가가치화를 통하여 창조경제를 실현하는 신 부가가치 산업으로 홍보함으로써 지속가능한 신 성장 동력을 확보할 수 있음.
- 연구개발 결과의 특허출원 및 해외 저명 학술지 발표를 통해 세계적으로 주목받는 식물 자원의 활용에 있어 대한민국 원천기술의 기반을 마련함.
- 본 연구를 통해 개발된 살충제의 상용화를 통해 국내 농약시장의 비용절감 및 시장 확대에 기여하며, 수출을 통해 시장 확대 및 국내의 발전된 농약 개발 기술을 해외에 홍보하고 수출을 통해 시장을 확대하여 국가 경제에 기여할 것으로 기대됨.

4-2 사업화 계획

가. 생산계획

(유기농업자재로 개발할 경우)

구분		(2020년) 개발 종료 후 2년	(2021년) 개발 종료 후 3년	(2022년) 개발 종료 후 4년
국 내	시장점유율(%)	0.2%	0.4%	0.8%
	판매량(단위: kg)	완제 7,000 kg	14,000	28,000
	판매단가(원)	43,270원/kg(완제)	43,270원/kg	43,270/kg
		100불/kg(원제)	103불/kg	105불/kg
국내매출액(백만원)		300	600	1,200
해 외	시장점유율(%)	-	-	-
	판매량(단위: kg)	-	-	-
	판매단가(\$)	-	-	-
	해외매출액(백만\$)	-	-	-
당사 생산능력1)		100,000	100,000	100,000

(천연물 작물보호제 개발할 경우)

구분		(2023년) 개발 종료 후 5년	(2024년) 개발 종료 후 6년	(2025년) 개발 종료 후 7년
국내	시장점유율(%)	1.4%	2.3%	4.5%
	판매량(단위: kg)	7,000	12,000	24,000
	판매단가(원)	46,600원/kg(완제)	46,600	46,600
	국내매출액(백만원)	2,210	3,780	7,750
해외	시장점유율(%)	0.08%	0.31%	0.81%
	판매량(단위:)	11,000	40,000	103,000
	판매단가(\$)	97	99	100
	해외매출액(백만\$)	1.0	4.0	10.4
당사 생산능력1)		100,000	100,000	100,000

- 1) 당사는 반월에 농약원제를 생산할 수 있는 공장을 1~4공장으로 통상 10만 톤의 원제를 생산.
- 2) 천연물 작물보호제는 개발 후 1차에 국내 시장에 진입하고 이를 바탕으로 글로벌 농약 원제를 개발하여 해외 시장에 론칭이 예정임(안전성평가 기간 감안). 농약 원제의 특성상 론칭+5년에 정상적 매출이 달성되는 특성이 있어 론칭 후+5년차에 시장점유율 2.0% 판매량 248톤/년, 총 매출은 361억 원으로 매출총이익율이 54%를 차지하고 론칭+10년차에는 시장점유율 2.7%, 판매량 335톤, 총 매출은 484억 원이며, 총매출 이익율은 56%로 추정됨.

나. 투자계획

(단위 : 백만원)

항목		(2020년) 개발 종료 후 2년	(2021년) 개발 종료 후 3년	(2022년) 개발 종료 후 4년
매출원가1)		190	280	450
판매관리비		90	190	390
자본적 지출	토지			
	건물/구축물			
	기계장치등			
자본적지출 합계				

항목		(2023년) 개발 종료 후 5년	(2024년) 개발 종료 후 6년	(2025년) 개발 종료 후 7년
매출원가1)		2,950	5,100	9,800
판매관리비		900	2,100	4,600
자본적 지출	토지			
	건물/구축물			
	기계장치등			
자본적지출 합계				

- 1) 기존 생산시설의 여유 Capacity를 활용하기 때문에 별도의 경상투자는 발생하지 않지만, 연구개발시 안전성 평가 등에 투입되는 이연자산은 별도 감안하여 감가상각을 실시하고 매출원가의 제조고정비에 반영하였음.

다. 사업화 전략

구분	구체적인 내용
형태/규모	o 상용화 형태 :

	<ul style="list-style-type: none"> - 개발 후 2년차에 천연물유래 작물보호제 국내 출시 (시험포장 1년간 실시 예정) - 개발 후 5년차에 천연물유래 글로벌 농약원제 출시 (국내는 완제, 수출은 원제 형태) ○ 수요처 : 북미, 유럽, 일본, 남미 등 기타지역, 국내 ○ 예상 단가 : 북미 \$110/kg, 유럽 \$100/kg, 일본 90불/kg, 남미 등 기타 지역 \$95/kg, 국내 100불/kg ○ 개발 투입인력 및 기간 : 1차 2016년~2018년 10명 2차 2019년~2021년 10명
상용화 능력 및 자원보유	<ul style="list-style-type: none"> ○ 당사는 작물보호제를 50년 이상 개발하여 국내외 사업 중이고, 특히 해외의 경우 글로벌 신물질을 개발하여 일부 상업화 단계에 있으며, 해외 글로벌 화학회사와 해외 시장을 공동 개발하고 있음. ○ 국내 생산기반으로는 반월에 원제생산 시설이, 구미, 전주에 완제 생산설비가 완비되어 가동이며, 또한 해외 생산기반으로는 중국 흑룡강성에 중국법인이 운영되어 생산과 영업을 병행하고 있음. ○ 국내외 판매되는 모든 원제와 완제는 논산종합연구소에서 제형시험, 생물활성시험, 독성 및 생태독성 시험, 잔류시험 등 안전성 평가를 거치고, 또한 약 4만평의 연구농장에서의 시험재배 등을 통하여 철저한 사전 성능 검사와 품질관리를 수행함
상용화 계획 및 일정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 시제품 개발 : <ul style="list-style-type: none"> - 천연물 작물보호제 개발: 2018년 - 글로벌 농약원제 개발 및 상업화 연구 : 2023년 ○ 시제품 생산 및 국내외 포장시험 : <ul style="list-style-type: none"> - 2018년~2019년(국내), - 2020년~2022년(해외) ○ 해외 마케팅 및 판매 : 2023년 ~ (일본 2023년, 미국, 유럽 2024년, 기타 지역 2025년 판매)

라. 사업화를 위한 비즈니스 모델

(1) BM 수립 배경

우리가 흔히 사용하는 작물보호제는 대부분 화학기반의 물질로 성능과 효과는 뛰어나지만, 환경 생태적 문제가 상존하는 리스크를 가지고 있어 유럽을 중심으로 저독성, 저농약 사용의 요구가 증대되고 있는 실정임. 또한, 최근 브라질을 중심으로 담배나방의 피해가 극심한 사례에서 보듯이 앞으로 기후변화에 따른 다양한 해충이 식량자원을 위협할 것으로 예상되고 있음.

기존의 화학기반의 작물보호제가 아닌 식물유래 천연물기반 작물보호제를 개발하여 환경 및 생태 독성 문제를 해결하고, 최근 가장 시장이 급성장하는 IGRs 계열의 기존 약제의 저항성 문제를 해결할 수 있는 제품을 개발하여 국내와 일본에 초도 출시하고 가장 큰 규모의 시장인 북미 및 남미 시장을 공략하는 것을 기본 사업의 골격으로 하였음.

(2) BM 목표 및 핵심경쟁요인

(가) BM 목표

단기 목표는 안전하고 친환경적인 작물보호제 원제를 개발하여 IPM program에 포함될 수 있도록 새로운 기전의 물질을 선발하는데 있음. 이는 다른 경쟁사의 약제보다 더욱 안전한 농약이라는 제한된 범위에서 뿐만 아니라 동물약품, 위생방역 등 다양한 영역으로까지 확장 가능한 차별성을 가지고 있음. 따라서 BM의 목표는 식물유래 대사체 구조 최적화를 통해 신규 글로벌 물질 1개 이상 개발하는 것임.

(나) 핵심경쟁요인

식물유래 물질을 기반으로 하는 제품으로 핵심 경쟁 요소는

- 적은 약량으로 ① 높은 활성, ② 친환경 ③ 안전한 물질임.
- 경쟁 제품에 비해 처리량이 적고 독성이 낮아 각 나라별 사용 규제 회피에 적합함.
(현재 많은 기존 제품들이 새로운 규제나 기준에 따라 재등록 절차가 진행 중)
- 기존 제품 대비 해충의 저항성 제가 없음.
- 가격 경쟁력을 확보하는 연구개발이 계속 진행되어 남미시장에서 초기 진입이 용이함.

따라서, 개발의 방향은 신규 기전에 따른 차별화 요소로 높은 활성, 안전성, 낮은 약량으로 가격 경쟁력을 확보하는데 주력할 예정임.

(3) 목표 시장 구조

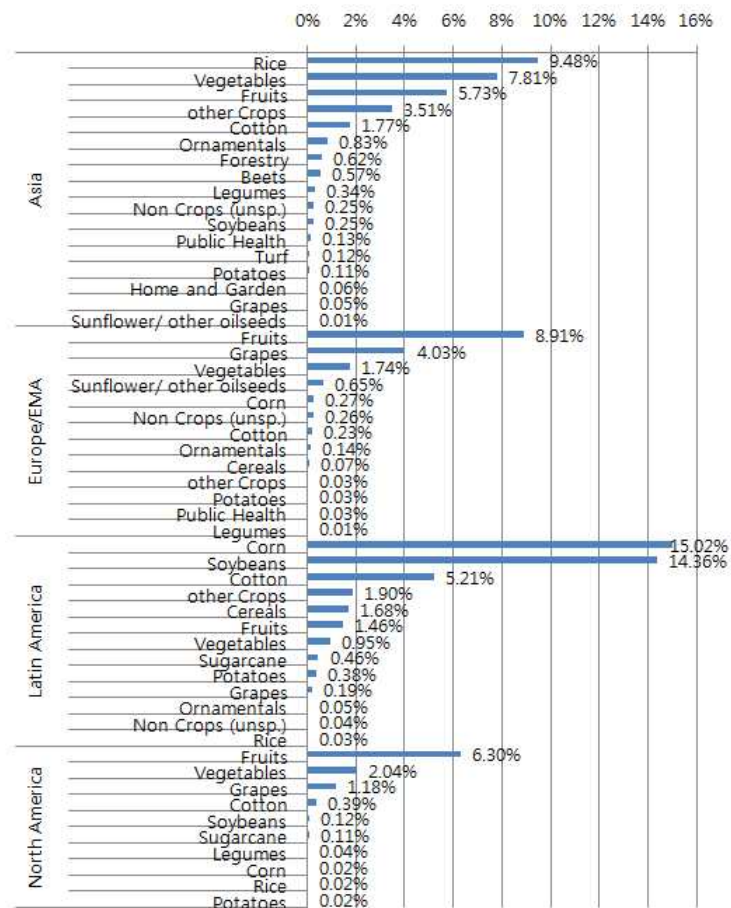
(가) 경쟁기업 현황

살충제 시장에서 IGRs계열의 경쟁사는 신젠타, 다우아그로, 바스트 등 메이저급 글로벌 원제사가 시장점유율 14%~23%를 차지하고 있으며, 이시하라산교, 니폰카야쿠 등 중급 원제사가 0.5%~2.3%를 가지는 경쟁 구도임. 선도기업으로서 신젠타는 단일 품목으로 Lufenuron이 205백만\$(한화 2,365억원)을 판매하여 17%의 시장점유율을 보이고 있으며, 두 번째가 바스프로 Teflubenzuron이 185백만\$(한화 2,135억원)를 차지하고 있음. 최근 출시된 다우아그로의 Noviflumuron이나 Halofenozide의 경우 약 10백만불(한화로 115억원)를 판매하였음. 이들 제품 모두는 화학기반의 작물보호제 원제들로 저항성 문제, 안전성 문제 등의 이슈가 상존하고 있음.

쉐어하는 전략과, 기존에 현지에 진출한 글로벌 원제사와 전략적 제휴를 통하여 당사는 원제 공급을 그리고 파트너사는 현지 비즈니스 네트워크를 통한 마케팅과 판매를 수행하는 전략을 나라별 실정에 맞는 전략을 선택하여 구사할 예정임.

지역별/국가별 IGRs계의 시장이 요구되는 작물 재배 구성은 보면, 남미지역은 옥수수과 대두가 각 15%와 16%로 전체 시장의 30%를 차지하고 있고, 유럽의 과일과 채소 시장이 9%, 아시아 지역의 수도작이 9.5%, 북미지역은 과일과 채소에 6.3%입니다. 따라서 지역별로 전략 시장을 선정하여 접근할 계획임.

지역 Formulator에게는 제조마진의 일정 부분을, 유통채널에도 같은 방법으로 일정 부분을 쉐어하여 전체적으로 원제 판매에 따른 영업이익율은 약 20~35%까지 확보가 가능함(성숙단계 기준).



(나) BM의 사업성 평가

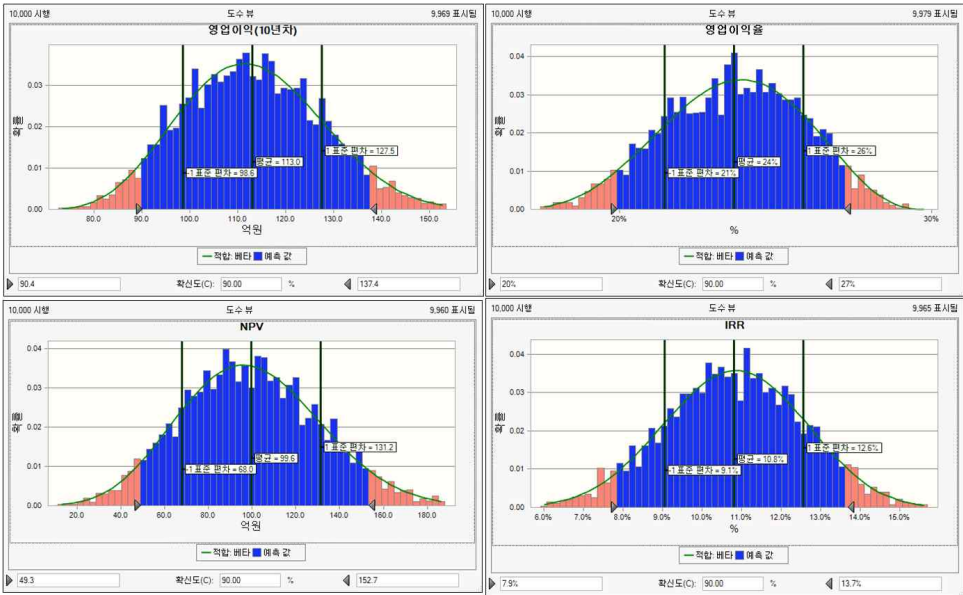
IGRs 계열에서 경쟁력있는 글로벌 농약원제 개발을 가정하여 예비 경제성 평가를 실시함.

전제사항으로

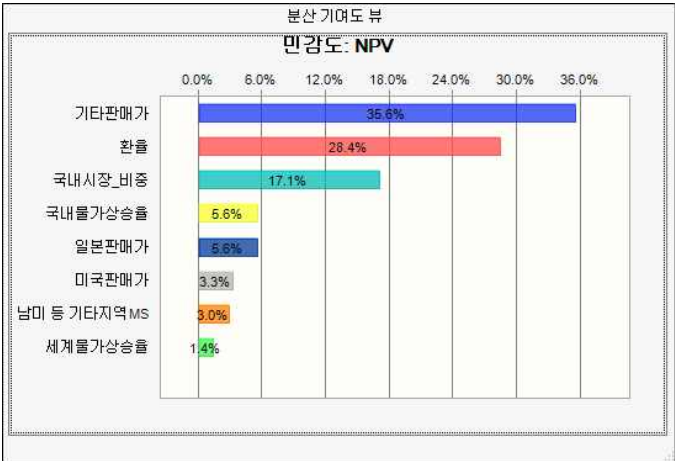
- 원제 판매단가를 \$90~\$110로 지역별 유동 단가를 적용함.
- 시장 점유율 역시 지역별 2.0%~2.8%로 차등 적용하되 정규분포를 적용함.
- 환율은 1,038원~ 1,269원/\$로, 물가 상승율은 1.5%~2.5% 균일분포를 적용함.
- 기타 운전자금, 판매관리비 등을 일정범위에서 최대치와 최저치를 적용한 삼각분포임.

구분	
세후영업이익(A)	TAX (%)
운전자산증감(B)	매출채권 증감
	재고자산 증감
	매입채무 증감

NPV는 253억원, IRR 16%, 투자회수기간은 7년으로 추정되며, 리스크 및 상기 전제사항을 감안하여 시뮬레이션 결과 Worst case일 경우 영업이익이 140억원, NPV 160억원, IRR 11.5%인 반면, Best case의 경우 영업이익이 195억원, NPV 258억원, IRR 16%로 추정됨.



NPV에 대한 각 변수들의 민감도를 분석한 결과 환율, 남미 등 기타지역 판매가격, 일본 판매가격, 국내물가상승률 순임.



붙임. 참고문헌

1. Abdelgaleil, S.A.M., Mohamed, M.I.E., Badawy, M.E.I., El-arami, S.A.A., 2009. Fumigant and contact toxicities of monoterpenes to *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase activity. J. Chem. Ecol. 35, 518-525.
2. Alzogaray, R.A., Lucia, A., Zerba, E.N., Masuh, H.M., 2011. Insecticidal activity of essential oils from eleven *Eucalyptus spp.* And two hybrids: lethal and sublethal effects of their major components on *Blattella germanica*. J. Econ. Entomol. 104, 595-600.
3. Appel, A.G., Gehret, M.J., Tanley, M.J., 2001. Repellency and toxicity of mint oil to American and German cockroaches (Dictyoptera: Blattidae and Blattellidae). J. Agric. Urban Entomol. 18, 149-156.
4. Arasu, M.V., Al-Dhabi, Saritha, V., Duraipandiyar, V., Muthukumar, C., Kim, S.J., 2013. Antifeedant, larvicidal and growth inhibitory bioactivities of novel polyketide metabolite isolated from *Streptomyces* sp. AP-123 against *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. BMC Microbiol. 13, 105.
5. Bonizzoni, M., Gasperi, G., Chen, X., James, A.A., 2013. The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. Trends Parasitol. 29, 460-468.
6. Chang, K.S., Ahn, Y.J., 2001. Fumigant activity of (*E*)-anethole in *Illicium verum* fruit against *Blattella germanica*. Pest Manag. Sci. 58, 161-166.
7. Cheng, S.S., Chang, H.T., Lin, C.Y., Chen, P.S., Huang, C.G., Chen, W.J., Chang, S.T., 2009. Insecticidal activities of leaf and twig essential oils from *Clausena excavate* against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. Pest Manag. Sci. 65, 339-343.
8. Hosseini, S.F., Zandi, M., Rezaei, M., Farahmandghavi, F., 2013. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and *in vitro* release study. Carbohydr. Polym. 95, 50-56.
9. Isman, M.B., 1999. Pesticides based on plant essential oils. Pestic. Outlook 10, 68-72.
10. Isman, M.B., 2000. Plant essential oils for pest and disease management. Crop Prot. 19, 603-608.
11. Kaur, T., Vasudev, A., Sohail, S.K., Manhas, R.K., 2014. Insecticidal and growth inhibitory potential of *Streptomyces hydrogenans* DH16 on major pest of India, *Spodoptera litura* (Fab.). BMC Microbiol. 14, 227.
12. Lee, B.H., Choi, W.S., Lee, S.E., Park, B.S., 2001. Fumigant toxicity of essential oils and their constituents compounds towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). Crop Prot. 20, 317-320.

13. Lee S.H., Oh, H.W., Fang, Y., An, S.B., Park, D.S., Song, H.H., Oh, S.R., Kim, S.Y., Kim, S., Kim, N., Raikhel, A.S., Je, Y.H., Shin, S.W., 2015. Identification of plant compounds that disrupt the insect juvenile hormone receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112(6), 1733-1738.
14. Liu, X.C., Liu, Q., Chen, X.B., Zhou, L., Liu, Z.L., 2015. Larvicidal activity of the essential oil from *Tetradium glabrifolium* fruits and its constituents against *Aedes albopictus*. *Pest Manag. Sci.* 71, 1582-1586.
15. Ogendo, J.O., Kostyukovsky, M., Ravid, U., Matasyoh, J.C., Deng, A.L., Omolo, E.O., Kariuki, S.T., Shaaya, E., 2008. Bioactivity of *Ocimum gratissimum* L. oil and two of its constituents against five insect pests attacking stored food products. *J. Stored Prod. Res.* 44, 328-334.
16. Park, I.K., Lee, S.G., Shin, S.C., Park, J.D., Ahn, Y.J., 2002. Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1866-1870.
17. Park, I.K., Lee, S.G., Choi, D.H., Park, J.D., Ahn, Y.J., 2003. Insecticidal activities of constituents identified in the essential oil from leaves of *Chamaecyparis obtusa* against *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Sitophilus oryzae* (L.). *J. Stored Prod. Res.* 39, 375-384.
18. Pener, M., Dhadialla, T.S., 2012. An overview of insect growth disruptors: applied aspects. eds Dhadialla, T.S. *Advances in Insect Physiology* 43, 1-162.
19. Phillips, A.K., Appel, A.G., Sims, S.R., 2010. Topical toxicity of essential oils to the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 103, 448-459.
20. Rajendran, S., Sriranjini, V., 2008. Plant products as fumigants for stored-produce insect control. *J. Stored Prod. Res.* 44, 126-135.
21. Rozman, V., Kalinovic, I., Korunic, Z., 2007. Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects. *J. Stored Prod. Res.* 43, 349-355.
22. Rundlöf, M., Andersson, G.K.S., Bommarco, R., Fries, I., Hederström, V., Herbertsson, L., Jonsson, O., Klatt, B.K., Pedersen, T.R., Yourstone, J., Smith, H.G., 2014. Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature* 521, 77-80.
23. Rust, M.K., Reiersen, D.A., Ziechner, B.C., 1993. Relationship between insecticide resistance and performance in choice tests of field collected German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 86, 1124-1130.
24. Shaaya, E., Kostjukovsky, M., Eilberg, J., Sukprakarn, C., 1997. Plant oils as fumigants and contact insecticides for the control of stored-product insects. *J. Stored Prod. Res.* 33, 7-15.
25. Sharma, M., 2014. Actinomycetes: source, identification, and their applications. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3(2), 801-832.
26. Yang, F.L., Li, X.G., Zhu, F., Lei, C.L., 2009. Structural characterization of

nanoparticles loaded with garlic essential oil and their insecticidal activity against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). J. Agric. Food Chem. 57, 10156-10162.

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 신기능 곤충 성장조절 물질을 이용한 친환경 살충제 개발 및 산업화					
	(영문) Development and Industrialization of Eco-friendly Insecticides using Insect Growth Regulators with Novel Mechanism					
주 관 연 구 기 관	서울대학교 산학협력단		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 서울대학교		
참 여 기 업	팜한농(주)			(성명) 제 연 호		
총연구개발비 (1,600,000천원)	계	1,600,000천원	총 연 구 기 간	2016. 05. ~ 2018. 12.(2년 8월)		
	정부출연 연구개발비	800,000천원		총 참 여 수 연 구 원	총 인 원	24
	기업부담금	800,000천원			내부인원	14
	연구기관부담금				외부인원	10

○ 연구개발 목표 및 성과

본 연구의 최종목표는 식물체 및 미생물에서 유래한 새로운 살충기작을 가지는 IGR 물질을 발굴하고 이를 이용하여 친환경 살충제를 개발하는 것이다. 이를 위하여 신규 IGR 물질 탐색을 위한 in vitro 스크리닝 시스템을 구축하고, 구축된 스크리닝 시스템을 이용하여 식물체 및 미생물로부터 10종 이상의 신기능 IGR 물질을 확보하며, 생물학적 특성 구명 및 활성 검정을 통한 2종 이상의 유효 IGR 물질을 선발한다. 선발된 신규 IGR 물질에 대하여 제제화를 수행하고, 포장실험을 통하여 제형의 살충활성 및 환경 영향 평가를 수행한다.

○ 연구내용 및 결과

신규 IGR 물질 탐색을 위한 high-throughput screening 시스템을 구축하기 위하여 이집트 숲모기의 Met과 Fisc 단백질 유전자를 yeast에 형질전환하여 Yeast two-hybrid system에 기반한 in vitro IGR 스크리닝 시스템을 제작하였으며, 효율적인 JHAN 활성 검정을 위한 최적 JHA 후보물질을 선발하고, IGR 스크리닝 과정을 표준화하였다.

이렇게 구축한 스크리닝 시스템을 이용하여 신규 IGR 물질을 탐색하기 위하여 195종의 식물체 정유 유래 화합물을 대상으로 IGR 활성을 검정한 결과, JHA 또는 JHAN 활성이 우수한 17종의 화합물을 선발하였다. 이들 IGR 활성 물질의 곤충 생리에 대한 영향을 알아보기 위하여 흰줄숲모기 성충에서의 유전자 발현 조절 및 난소발달에 대한 영향을 분석하였으며, 흰줄숲모기, 배추좀나방, 화랑곡나방, 옥수수조명나방, 애멸구 및 소나무재선충에 대한 살충활성을 검정하였다.

국내 토양에서 채집한 총 189개의 곤충병원성 곰팡이 추출물의 경우 JHA 활성은 거의 보이지 않은 반면, 14개의 곰팡이 추출물이 높은 수준의 JHAN 활성을 보였다. 이들 14개의 추출물의 흰줄숲모기, 배추좀나방, 과밤나방, 화랑곡나방, 옥수수조명나방 및 애멸구에 대한 살충활성 살충활성을 검정한 결과 F-145 균주 추출물이 흰줄숲모기 및 배추좀나방에 대하여 가장 우수한 살충활성을 가지는 것으로 나타났다. 형태학적 및 분자생물학적 동정을 통하여 F-145 균주는 *Lecanicillium attenuatum*인 것으로 확인되었으며, F-145 균주가 생산하는 JHAN 활성물질은 배양과정 중에 균사체의 외부로 방출되는 것으로 나타났다.

방선균 유래의 신규 IGR 물질을 탐색하기 위하여 총 363개 방선균 균주의 배양체 추출물에

대하여 IGR 활성을 검정하였다. 그 결과, 총 9개의 추출물이 높은 수준의 JHAN 활성을 보였다. JHAN 활성을 보인 9개의 방선균 배양체 추출물에 대한 살충활성 검정을 통하여 S-630 균주의 배양체 추출물이 흰줄숲모기, 배추좀나방, 파밤나방 및 애멸구에 대하여 우수한 살충활성을 보임을 확인하였다. *Streptomyces cellulolavus*로 동정된 S-630 균주의 배지에 따른 배양 생리적 특성을 구명하였으며, S-630 균주가 생성하는 JHAN 활성물질의 온도, pH 및 배양 부피에 따른 안정성을 검정하였다. S-630 유래 IGR 활성물질의 대량 생산 조건을 확립하기 위하여 배양 배지에 따른 S-630 배양체 추출물의 IGR 및 살충활성을 검정하고, 500 리터 jar fermentor를 이용한 대량 배양 체계를 구축하였다. MPLC 및 prep-HPLC를 이용하여 S-630 배양체 추출물로부터 9가지의 JHAN 활성물질을 분리하고 그 구조를 분석한 결과, 이들 물질은 antomycin A의 유도체인 것으로 확인되었다.

총 178개의 식물체 정유의 흰줄숲모기 유충에 대한 살충활성 및 IGR 활성검정을 통하여 JHA 또는 JHAN 활성을 보이는 15종의 식물체 정유를 선발하였다. GC를 이용하여 우수한 IGR 활성을 보인 식물체 정유의 성분을 분석하고, 분석된 정유 화합물의 흰줄숲모기, 쌀바구미 및 바퀴에 대한 살충활성을 검정하였다. 한편, IGR 활성 우수 식물체 정유 및 정유 유래 화합물들의 안전성을 평가하기 위하여 물에서의 잔류량을 조사하였다. 쌀바구미에 활성이 우수하였던 mandarine green, nigella 정유 및 thymol에 대하여 polyurethane 제형 제작하고, 제형의 일일 방출량 및 현미에 대한 쌀바구미의 섭식 저해 활성을 평가하였다. 또한, 흰줄숲모기 유충에 대해 높은 살충활성을 보인 parsley 정유로부터 생물검정 유도법을 이용하여 활성물질을 분리하고 그 구조를 분석하였으며, polyvinyl alcohol을 이용한 마이크로에멀전 제형을 만든 후 살충활성을 조사였다.

신규 IGR 살충제를 개발하기 위하여 우수한 IGR 활성 및 살충활성을 보인 12종의 식물체 정유 및 2종의 미생물 추출물을 대상으로 담배거세미나방, 복숭아혹진딧물, 점박이응애 및 오이충채벌레에 대한 단일농도 및 다중농도 실내 스크리닝을 수행하였다. 실내시험에서 점박이응애에 대해 높은 살충활성을 보인 pepper tasmanian 정유와 S-630 추출물에 대한 온실시험을 통하여 S-630 균체 hexane 추출물을 포장시험을 위한 시험물질로 최종 선발하였다. S-630 균체 hexane 추출물을 수화제(WP) 형태로 제제화하고, WP 0.5% 제형의 담수어류에 대한 급성독성을 평가하였으며, 점박이응애에 대한 온실시험 및 포장시험을 수행하였다. 장미에서의 점박이응애 포장시험에서 대조물질인 카스케이드 (flufenoxuron)는 100 ppm의 농도로 3일 간격으로 2회 처리 시 7 DAT에 80% 내외의 활성을 나타낸 반면, S-630 균체 hexane 추출물 (WP 0.5%)은 100% 활성을 보였다.

이상의 결과를 통하여 IGR 활성과 살충활성 간에 높은 상관관계를 가진다는 것을 확인할 수 있었으며, 본 연구를 통하여 발굴된 신규 IGR 물질은 그 자체로써 뿐만 아니라 추후 구조 변화 및 유도체 합성 등의 전략을 통하여 친환경 살충제 개발에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 1) 본 연구에서 선발된 IGR 활성 식물체 정유와 유래 화합물의 특성 및 살충활성 검정에 대한 연구 결과 5편을 국내외 저명 학술지에 게재하였음
- 2) 본 연구에서 선발된 방선균 추출물의 IGR 활성 및 살충활성에 대한 연구 결과를 국외 저명 학술지에 투고할 계획임
- 3) 본 연구에서 선발된 IGR 활성 식물체 정유와 유래 화합물 및 방선균을 이용한 살충제 관련 국내 특허 3건을 출원함
- 4) 본 연구에서 선발된 IGR 활성 식물체 정유 유래 화합물 및 방선균을 이용한 살충제 관련 국내 특허 2건을 등록함
- 5) 식물 및 미생물 유래 신규 IGR 활성물질 탐색 및 살충활성에 관한 연구결과 18건을 국내외 학술발표함

- 6) 친환경 IGR 살충제 개발과 관련된 석사급 전문연구 인력 3인을 양성함
- 7) 기존의 IGR 계열의 물질과는 다른 기작을 가지는 JHAN을 이용함으로써 기존의 살충제에 저항성을 가지는 해충의 방제에 효율적인 살충제 개발이 가능할 것임
- 8) 본 연구를 통해 구축된 high-throughput 스크리닝 시스템을 활용하여 탐색된 JHAN 활성을 가지는 신규 살충 물질들은 다양한 해충 방제에 적용이 가능할 것임
- 9) 국내외 산림자원으로부터 친환경 살충제 개발에 있어 식물자원의 생리활성기능에 따른 계통체계 확립에 의한 자원관리, 사육법 및 생물검정법, 정밀분석기술을 확립함으로써 친환경 살충제 개발을 위한 국가경쟁력을 강화할 것으로 기대됨
- 10) 식물유래 천연물의 작용기전 연구를 통해 효과가 우수한 살충제 개발을 위한 기초자료로 활용할 수 있음

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		316030-3	
사업구분	농림축산식품 연구개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	농생명산업기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	신기능 곤충 성장조절 물질을 이용한 친환경 살충제 개발 및 산업화			과제유형	(개발)
연구기관	서울대학교 산학협력단			연구책임자	제연호
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2016.05.19-2016.12.31	200,000	200,000	400,000
	2차연도	2017.01.01-2017.12.31	300,000	300,000	600,000
	3차연도	2018.01.01-2018.12.31	300,000	300,000	600,000
	4차연도				
	5차연도				
	계	2016.05.19-2018.12.31	800,000	800,000	1,600,000
참여기업	(주)팜한농				
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2019.03.25

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
서울대학교 산학협력단	정교수	제연호

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	제연호
----	-----

I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

- 본 연구의 결과 식물 및 미생물 유래의 다양한 JHAN 활성 물질을 탐색하고 이들의 살충활성을 평가하였음
- JHAN 활성 물질은 본 연구팀이 세계에서 최초로 확인한 신규 살충활성 물질로써, 기존의 IGR 계열의 물질과는 전혀 다른 새로운 살충기작을 가지는 물질임
- 따라서, 본 연구에서 발굴한 JHAN 활성 물질을 이용한 살충제는 기존의 살충제에 저항성을 획득한 해충에도 효과적일 것으로 예상됨

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수)

- 본 연구를 통해 구축된 high-throughput 스크리닝 시스템을 활용하여 탐색된 JHAN 활성을 가지는 신규 살충 물질들은 다양한 해충 방제에 적용이 가능할 것임
- 친환경 살충제 개발에 있어 생리활성기능에 따른 계통체계 확립에 의한 자원관리, 사육법 및 생물검정법, 정밀분석기술을 확립함으로써 친환경 살충제 개발을 위한 국가경쟁력을 강화할 것으로 기대됨

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수)

- 본 연구 개발 결과를 유관 기관 및 업체에 기술이전 함으로써 친환경 농업 환경 조성에 구체적으로 기여할 수 있음
- 본 연구를 통해 도출된 JHAN 활성 물질을 선도물질로 이용하여 보다 살충 활성이 향상된 유도체를 제작함으로써 해충 맞춤형 저독성 고효율 살충제 개발의 know-how를 축적하고, 관련 특허 출원 및 상용화를 통해 친환경 농약산업 활성화에 기여할 것으로 사료됨

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (우수)

- 국내외 식물 및 미생물 자원으로부터 신규 IGR 물질을 탐색함
- 탐색된 IGR 물질의 살충활성을 평가하고 후보 물질을 선별함
- 선별된 IGR 물질의 구조를 분석하고 제제화를 수행함
- IGR 제제에 대한 포장실험 및 환경 안전성을 평가함

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (우수)

- SCI급 국내외 논문 게재 5건
- 국내 특허 출원 3건
- 국내 특허 등록 2건
- 국내외 학술발표 18건

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
신규 IGR 물질 탐색을 위한 <i>in vitro</i> 스크리닝 시스템 확립 및 최적화	20	100	이집트 숲모기의 Met-Fisc를 yeast에 형질전환하여 yeast two-bybrid system에 기반한 high-throughput IGR 스크리닝 시스템을 제작하고 최적화 하였음
유효 IGR 물질 선발 및 특성 구명	30	100	195종의 식물체 정유 유래 화합물, 178종의 식물체 정유 추출물, 189종의 곤충병원성 곰팡이 추출물 및 363종의 방선균 추출물을 대상으로 IGR 및 살충활성 검정을 통하여 후보 물질을 선발하고 그 특성을 구명하였음
선발 IGR 물질의 대량생산 및 제제화	20	100	선발된 IGR 물질의 대량생산 및 분리를 통하여 물질의 구조를 분석하고 적절한 제형으로 제제화를 수행하였음
선발 IGR 물질의 살충활성 및 환경 영향 평가	30	100	선발된 IGR 물질의 원제 및 제제에 대하여 온실 및 포장실험을 통한 살충활성을 검정하였으며, 잔류 및 어독성 등의 환경영향 평가를 수행하였음
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구에서 구축된 *in vitro* high-throughput IGR 스크리닝 시스템은 다양한 자원으로부터 기존의 IGR 살충제와는 다른 작용기작을 가지는 새로운 IGR 물질을 탐색하는데 효과적으로 이용될 수 있을 것이다. IGR 활성이 우수한 식물 및 미생물 추출물을 대상으로 다양한 해충에 대한 살충활성 검정을 통하여 후보 IGR 물질을 선발하고, 이들의 특성구명 및 구조분석을 통하여 IGR 활성과 살충활성 간에

높은 상관관계를 가진다는 것을 확인하였으며, 이러한 결과는 발굴된 신규 IGR 물질이 다양한 난방제 해충의 방제에 유용하게 이용될 수 있음을 시사하였다. 한편, 신규 IGR 살충제 개발을 위하여 선발한 IGR 물질의 제제화를 수행하였으며, 제작된 제제의 야외 살충효과 및 환경 안전성을 평가하였다. 본 연구에서 발굴된 신규 IGR 물질은 그 자체로써 뿐만 아니라 유도체 합성 등의 전략을 통하여 친환경 살충제 개발에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 본 연구를 통해 확보한 신규 JHAN 활성 물질에 대하여 다수의 신규 특허를 출원할 수 있으며, 새로운 트렌드의 친환경 농약시장을 선점할 수 있을 것으로 기대됨
- 기존의 IGR 계열의 물질과는 다른 기작을 가지는 JHAN을 이용함으로써 기존의 살충제에 저항성을 가지는 해충의 방제에 효율적인 살충제 개발이 가능할 것임
- 연구개발 결과의 특허출원 및 해외 저명 학술지 발표를 통해 세계적으로 주목받는 식물 자원의 활용에 있어 대한민국 원천기술의 기반을 마련함
- 본 연구를 통해 개발된 살충제의 상용화를 통해 국내 농약시장의 비용절감 및 시장 확대에 기여하며, 수출을 통해 시장 확대 및 국내의 발전된 농약 개발 기술을 해외에 홍보하고 수출을 통해 시장을 확대하여 국가 경제에 기여할 것으로 기대됨

IV. 보안성 검토

해당사항 없음

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

해당사항 없음

2. 연구기관 자체의 검토결과

해당사항 없음

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	신기능 곤충 성장조절 물질을 이용한 친환경 살충제 개발 및 산업화			
주관연구기관	서울대학교 산학협력단	주관연구책임자	제 연 호	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	800,000천원	800,000천원		1,600,000천원
연구개발기간	2016.05.19. ~ 2018.12.31. (2년 8개월)			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 신규 IGR 물질 탐색을 위한 <i>in vitro</i> 스크리닝 시스템 확립 및 최적화	<ul style="list-style-type: none"> - Yeast two-hybrid system을 이용한 IGR 스크리닝 시스템을 구축함 - 효율적인 JHAN 활성 검정을 위한 최적 JHA 후보물질을 선발함 - IGR 스크리닝 과정을 표준화함
② 유효 IGR 물질 선발 및 특성 구명	<ul style="list-style-type: none"> - 195종의 식물체 정유 유래 화합물의 IGR 활성을 검정함 - 178종의 식물체 정유 추출물의 IGR 활성을 검정함 - 189종의 곤충병원성 곰팡이 추출물의 IGR 활성을 검정함 - 363종의 방선균 추출물의 IGR 활성을 검정함 - IGR 활성이 우수한 추출물 및 유래 화합물의 살충활성을 검정함 - IGR 및 살충활성이 우수한 추출물 및 유래 화합물을 선발하고 그 특성을 구명함
③ 선발 IGR 물질의 대량생산 및 제제화	<ul style="list-style-type: none"> - IGR 및 살충활성이 우수한 방선균 S-630 유래 JHAN 활성 물질의 대량생산 조건을 확립함 - 방선균 S-630 유래 IGR 활성물질을 분리하고 그 구조를 동정함 - 방선균 S-630 hexane 추출물을 대상으로 수화제

	<p>형태로 제제화를 수행함</p> <ul style="list-style-type: none"> - IGR 활성 우수 식물체 정유의 성분을 분석함 - IGR 활성 우수 식물체 정유 및 유래 화합물에 대하여 마이크로에멀전 또는 폴리우레탄 제형으로 제제화를 수행함
④ 선발 IGR 물질의 살충활성 및 환경 영향 평가	<ul style="list-style-type: none"> - S-630 균체 추출물 유래 활성물질의 IGR 활성과 대상 해충에 대한 살충활성을 검정함 - IGR 활성이 우수한 식물체 정유 화합물들의 대상 해충에 대한 살충활성을 검정함 - 방선균 S-630 유래 IGR 활성물질의 온도와 pH 및 배양 scale에 따른 활성물질의 안정성을 검정함 - IGR 활성이 우수한 식물체 정유 및 정유 유래 화합물들의 환경 내에서의 잔류율을 평가함 - 방선균 S-630 균체 hexane 추출물 원제 및 수화제 제형의 담수어류에 대한 급성독성을 평가함 - 방선균 S-630 균체 hexane 추출물 수화제 제형의 온실에서의 살충활성을 평가함 - 방선균 S-630 균체 hexane 추출물 수화제 제형의 야외 포장에서의 살충활성을 평가함

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문 SC I	비 SC I	논문 평균 IF	학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	3	3		2	320	1	900		1			6		6	3					
연구기간내 달성실적	3	2										5		18	3					
달성율(%)	100	66.7		0	0	0	0		0			83.3		2.312	300	100				

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	in vitro high-throughput IGR 스크리닝 시스템
②	식물 및 미생물 추출물의 IGR 활성 및 살충활성 검정
③	IGR 활성 물질의 분리 및 구조 분석
④	IGR 활성 물질의 대량 생산
⑤	IGR 활성 물질의 제제화 및 포장실험

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개발	특허 출원	산업체이전 (상용화)	현장에로 해결	정책 자료	기타
①의 기술	✓					✓				
②의 기술	✓					✓				
③의 기술	✓					✓				
④의 기술	✓					✓	✓			
⑤의 기술	✓					✓	✓			

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	<ul style="list-style-type: none"> - 식물 및 미생물 뿐만 아니라 다양한 생물 자원으로부터 새로운 IGR 물질을 탐색할 수 있으며, 이렇게 탐색된 신규 IGR 물질들은 다양한 해충 방제에 적용이 가능할 것임 - 국내 생물 자원 유래 IGR 물질에 대한 연구 자료는 국내 농약산업 발전 방안 수립에 유용하게 활용될 수 있으며, 활성이 우수한 생물 자원의 고부가가치화를 통하여 지속가능한 신 성장 동력을 확보할 수 있음
②의 기술	<ul style="list-style-type: none"> - 기존의 IGR 물질과는 다른 살충 기작을 가지는 JHAN의 대량 확보 및 관련 특허 출원을 통하여 지적재산권을 선점함 - 기존의 살충제에 저항성을 가지는 해충의 방제에 효율적인 신규 살충제 개발을 통하여 날로 증가하는 친환경 농약 시장의 국제 경쟁력 확보가 가능할 것임 - 친환경 살충제 개발에 있어 생물 자원의 생리활성기능에 따른 계통체계 확립에 의한 자원관리, 실험 곤충 사육법 및 생물검정법, 정밀분석기술을 확립함으로써 친환경 살충제 개발을 위한 국가경쟁력을 강화할 것으로 기대됨
③의 기술	<ul style="list-style-type: none"> - 식물 및 미생물 유래 IGR 물질의 작용기전 연구를 통해 효과가 우수한 살충제 개발을 위한 기초자료로 활용할 수 있음 - 본 연구를 통해 도출된 JHAN 활성 물질을 선도물질로 이용하여 보다 살충 활성이 향상된 유도체를 제작함으로써 해충 맞춤형 저독성 고효율 살충제 개발의 know-how를 축적하고, 관련 특허 출원 및 상용화를 통해 친환경 농약산업 활성화에 기여할 것임

④의 기술	<ul style="list-style-type: none"> - 우수 IGR 활성 물질의 대량생산 관련 기술을 유관 기관 및 업체에 기술이전함으로써 기술이전료를 징수함 - 식물 및 미생물 유래 IGR 물질의 대량 생산을 통하여 친환경 살충제 개발을 위한 원제를 안정적으로 공급함으로써 친환경 농업 환경 조성에 기여할 수 있음
-------	--

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표	정책활용			홍보전시		
												SCI	비SCI						논문평균IF	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명					
가중치																				
최종목표	3	3		2	320	1	900		1		6			6	3					
연구기간내 달성실적	3	2									5			18	3					
연구종료 후 성과창출 계획		1		2	320	1	900		1		1									

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input 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 중점적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

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