

318082-2

친환경적  
인  
닭진드기  
방제를  
위한  
곤충병원성  
진균을  
이용한  
현장  
적용  
기술  
개발  
최  
종  
보  
고  
서  
2019

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( )발간등록번호( O )  
가축질병대응기술개발사업 2019년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-00  
3180-01

# 친환경적인 닭진드기 방제를 위한 곤충병원성 진균을 이용한 현장 적용 기술 개발

최종보고서

2020.07.17.

주관연구기관 / 배재대학교  
협동연구기관 / 제노바이오

농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원

제출문

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “친환경적인 닭진드기 방제를 위한 곤충병원성 진균을 이용한 현장 적용 기술 개발”(개발기간 : 2018.04. ~ 2019.12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 07. 17.

주관연구기관명 : 배재대학교 산학협력단 (대표자) 채순기

참여기관명 : 제노바이오 (대표자) 박복희

주관연구책임자 : 최 창 원

참여기관책임자 : 구 정 모

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	318082-2	해 당 단 계 연 구 기 간	2018.04.26.~ 2019.12.31	단 계 구 분	2/2
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	가축질병대응기술개발			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세 부 과 제 명	친환경적인 닭진드기 방제를 위한 곤충병원성 진균을 이용한 현장 적용 기술 개발			
연구책임자	최창원	해당단계 참여연구원 수	총: 10명 내부: 5명 외부: 5명	해당단계 연구개발비	정부:120,000천원 민간:40,000천원 계:160,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 20명 내부: 10명 외부: 10명	총 연구개발비	정부:210,000천원 민간:70,000천원 계:280,000천원
연구기관명 및 소속부서명	배재대학교 산학협력단			참여기업명 : 제노바이오	
국제공동연구	상대국명: (해당 없음)			상대국 연구기관명: (해당 없음)	
위탁연구	연구기관명: (해당 없음)			연구책임자: (해당 없음)	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

### 9대 성과 등록·기탁번호

구분	특허
등록·기탁 번호	10-2019-0176336, 10-2019-0176337, 10-2019-0176338, 10-2019-0176339, 10-2019-0176340, 10-2019-0176341, 10-2019-0178962

### 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)	보고서 면수
---	--------

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 닭진드기 방제용 천연 살비제 개발</li> <li>2. 균주개량을 통하여 살비능을 극대화시킨 돌연변이 진균 3속 3종 선발</li> <li>3. 살비능 식물정유와 돌연변이 균주의 분생포자를 혼합한 친환경 천연 살비제 개발</li> <li>4. 친환경 천연 살비제의 계사 내 적용기술 개발</li> <li>5. 현장적용 매뉴얼 개발</li> </ol>				
<p>연구개발성과</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 닭진드기 방제용 진균의 탐색 및 살비능 평가 : 3종 연구 완료</li> <li>2. 닭진드기 방제용 진균 균주 개량 : 1종 완료</li> <li>3. 식물 정유의 살비능 평가 및 기작 검증 : 16종 완료</li> <li>4. 식물 정유 처리 진균 포자 발아율 조사 : 8종 완료</li> <li>5. 살비성 야생형 및 돌연변이 진균 포자와 식물 정유 혼합물의 제조 : 2건 완료</li> <li>6. 혼합제조물의 살비능 평가 : 2건 완료</li> <li>7. 유효 진균 대량 배양 조건 확립 : 1건 완료</li> <li>8. 유효 진균을 이용한 제형화 개발 및 제제화 공정 확립 : 1건 완료</li> <li>9. 최적의 살비제 제형화 확립 : 2건 확립</li> <li>10. 시작품 제작 및 안정성·안전성 평가 : 시작품 제작 2건 완료, 인증 5건 완료</li> <li>11. 살비제 현장 적용 매뉴얼 확립 : 1건 확립</li> <li>12. 고용창출 1건/국내특허출원 7건/학술발표 4건/연구인력양성 2건</li> </ol>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 진균의 액상 배양을 통한 포자 생산과 분상 제형화 개발 및 오일 제형에 대한 적절한 유화제 배합 방법 그리고 o/w 제형 개발 노하우를 확보함에 따라 추후 다양한 제품 개발이 가능함</li> <li>2. 본 연구에서 도출된 진균 제형 및 오일 제형을 동물의약외품으로 등록 추진할 계획임</li> <li>3. 타 연구에 응용(농업 분야 살충관련 연구에 응용 : 유기농업자재 충해관리용 자재 및 토양 개량 및 작물생육용 자재)</li> </ol>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>닭진드기</p>	<p>친환경 살비제</p>	<p>살충성 진균</p>	<p>살비성 식물정유</p>	<p>제형화</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>red mite</p>	<p>eco-friendly acaricide</p>	<p>entomopatho genic fungi</p>	<p>acaricidal plant essential oil</p>	<p>formulation</p>

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	6
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	11
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	68
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	69
붙임. 참고 문헌 .....	75

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

<연구개발 대상 및 기술·제품의 개요>

○ 연구개발 개요 : 균주개량을 통하여 살비능이 증강된 진균의 분생포자와 각 대상 균주의 포자 발아를 촉진하는 식물정유(살비성)를 기반으로 제조한 친환경 천연 살비제

<제품 개념도>

○ 핵심기술(핵심기술의 내용, 용도 등에 대해 세부내용 기술)  
 [주관연구기관]  
 - 살비능 진균 개량  
 • 균주 개량 기술 : 3속 4종의 대상 균주를 자외선, mutagen 및 자외선 + mutagen을 시간 별로 처리하여 배지에 접종한 후 생존률 10% 이하인 돌연변이 균주를 선발  
 • in vitro 활성 측정 기술 : 배양된 돌연변이 및 야생 균주의 chitinase, protease, lipase 활성  
 • 돌연변이 균주의 유전적 변이 분석 기술: RAPD  
 • 닭진드기 표피추출액 분해활성 분석 기술 : 표피추출액을 농도별로 희석 후 배지에 혼합하여 돌연변이 및 야생 균주의 분해능 분석  
 • 살비활성 검증 : laboratory bioassay (포자현탁액 및 cell-free 배양여과액의 살비활성 검증)  
 - 살비능 식물정유 선발 기술


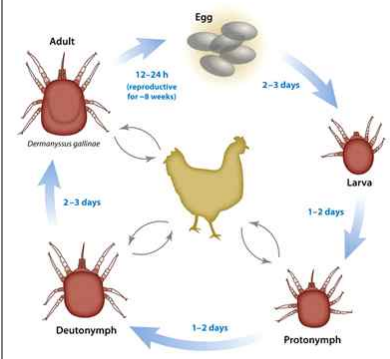



- 농도별 처리 : 0.1%, 0.2%, 0.5%, 1%, 2%, 5% 각각 24 시간 처리하여 치사율 결정
- 살비활성 및 살충활성 기작 검증 : 침지처리, 분무처리, 훈증처리
- 살비능 식물정유의 진균에 대한 독성 측정 : 탁월한 살비능을 가진 식물정유라 하더라도 대상 균주의 포자발아 및 균사체 성장에 독성을 나타낸다면 제외함

[참여기관]

- 유효 진균의 대량배양 기술 : 탄소원, 질소원, 배양온도 및 시간
- 살비능 진균과 식물정유 혼합기술: 역유화(inverted emulsion)
- 제형화 기술 : 부착성, 안정제 및 유화제 시험
- 제형 안정화 기술 : 산화방지제
- 시작품에 대한 살비시험 : laboratory bioassay
- 현장 적용 살비시험 : 닭진드기 트랩을 이용한 치사율 검증

## 1-2. 연구개발의 필요성

<연구개발 기술·제품의 필요성>	
닭진드기	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 학명 : <i>Dermanyssus gallinae</i>, 영명: Red Mite; Chicken Mite; 일본명: ククモ</li> </ul>
분류	<ul style="list-style-type: none"> <li>응애목, 중기문아목, 진드기과</li> </ul>
문제점	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 최근 시스템화 된 계사구조의 도입에 따라 일상관리가 기계화되었고 또한, 계사내부의 온·습도환경은 연간 일정하게 되었음</li> <li>• 이와 같은 배경으로 닭 진드기의 증식이 계절에 상관없이 증식하고 있음</li> <li>• 특히 6월이 되면 계사 내 기온이 상승함에 따라 폭발적으로 증식함</li> <li>• 더욱이 약제에 대한 저항성을 나타내는 닭 진드기의 출현이나 예외적인 사용허가약품에 의해서는 방제가 곤란한 상황임</li> <li>• 흡혈을 안해도 수개월 이상 생존함</li> <li>• 2017년 살충제 계란 파동(2017 Fipronil eggs contamination)은 유럽에서 피프로닐에 오염된 계란과 난제품이 유통된 사건으로서 2017년 8월 대한민국에서 생산된 계란에서도 피프로닐에 오염된 계란이 발견되어 소비자들의 불안감이 증폭하면서 계란 및 난제품들의 매출이 급격히 하락하여 국가적으로 일대 파동이 있었음</li> <li>• 국립축산과학원의 한 연구에 따르면 국내 산란계 농가의 닭진드기 감염률이 94%로 추정함</li> </ul>
숙주범위	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 인수공통 기생충이며 광범위한 숙주범위(가금류, 야생조류, 조류숙주가 없을 경우에는 개, 고양이, 설치류, 말, 인간 등)를 나타냄</li> <li>• 체외기생충(ectoparasite)으로서 가금류의 건강에 심각한 문제를 야기함</li> </ul>
형태 및 life cycle	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 부화 후 어린 진드기는 체장 0.5mm정도이고 다리가 3쌍이며, 성충 진드기는 체장 1mm에 다리는 4쌍임</li> <li>• 평소에는 백·회·흑색으로 보이거나 흡혈 후 몸이 붉은 적색으로 보임</li> <li>• 알에서 성충까지 7~9일 소요되며, 유충은 1~2일에 부화하여 탈바꿈한</li> </ul>

	<p>후 숙주(닭)를 먹이로 하는 애벌레로 변태하고, 애벌레는 2번 탈바꿈한 후 성충이 되어 흡혈·산란을 반복함(수명은 90일)</p>
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>흡혈전                      흡혈후</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><small>Sparagano OAE, et al. 2014. Annu. Rev. Entomol. 59:447-66</small></p> </div> </div>
<p>서식처</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 진드기가 닭에 기생하여 흡혈하는 것은 주로 야간으로, 낮 동안은 그늘진 부분, 계사의 틈새 혹은 이음새, 계분 혹은 급이기통 밑에 몸을 숨기고 있어 발견하기 어렵고, 알아차렸을 때에는 이미 다량으로 발생된 경우가 많음</li> </ul>
<p>흡혈에 의한 산란계 피해</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 한 마리 당 흡혈량은 미량이지만 대량 발생한 농장에서는 닭이 빈혈로 집단 폐사되어 양계농가에 심각한 경제적 손실을 초래함</li> <li>• 산란계의 영양결핍, 발육지연, 수면장애 및 영양흡수장애를 일으켜 탈색란 발생 혹은 산란계에 스트레스를 유발시켜 장기간에 걸쳐 산란율이 저하시킴</li> <li>• 살모넬라, 가금티프스, 가금콜레라, 스피로헤타의 수평감염을 가속화시킬 뿐만 아니라, 백혈병 및 뉴캐슬병 등과 같은 바이러스 질병을 전파하는데 중요한 매개체 및 보균체 역할을 수행함</li> </ul> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;">    </div>



### 1-3. 연구개발 범위

#### <연구개발의 목표 및 개발 범위>

##### 가. 최종목표

목표	내용
1	닭진드기 방제용 천연 살비제 개발
2	균주개량을 통하여 살비능을 극대화시킨 돌연변이 진균 3속 3종 선발
3	살비능을 가진 식물 정유와 돌연변이 균주의 분생포자를 혼합한 친환경 천연 살비제 개발
4	친환경 천연 살비제의 계사 내 적용기술 개발
5	살비제 현장 적용 매뉴얼 확립

##### 나. 세부목표

세부목표	내용
1	닭진드기 방제용 진균의 탐색 및 살비능 평가
2	닭진드기 방제용 진균 균주 개량 : UV, mutagen 및 UV + mutagen 처리
3	식물 정유의 살비능 평가 및 기작 검증
4	식물 정유 처리 진균의 포자 발아율 조사
5	살비성 야생형 및 돌연변이 진균 포자와 식물 정유 혼합물의 제조
6	혼합제조물의 살비능 평가
7	유효 진균 대량 배양 조건 확립
8	유효 진균을 이용한 제형화 개발 및 제제화 공정 확립
9	최적의 살비제 제형화 확립
10	시작품 제작 및 안정성 · 안전성 평가
11	살비제 현장 적용 매뉴얼 확립

##### 다. 연차별 개발목표 및 내용

<1차년도>

- 주관연구기관(배재대학교)

목표	내용
1	닭진드기 방제용 진균의 탐색 및 살비능 평가
2	닭진드기 방제용 진균 균주 개량 : UV, mutagen 및 UV + mutagen 처리
3	식물 정유의 살비능 평가 및 기작 검증
4	식물 정유 처리 진균의 포자 발아율 조사

- 협동연구기관(제노바이오)

목표	내용
1	유효 진균 대량 배양 조건 확립
2	유효 진균을 이용한 제형화 소재 개발 및 제제화 공정 확립

<2차년도>

- 주관연구기관(배재대학교)

목표	내용
1	살비성 돌연변이 진균 포자와 선택된 식물 정유 혼합물의 제조(세부과제 1)
2	혼합제조물의 살비능 평가(세부과제 2)

- 협동연구기관(제노바이오)

목표	내용
1	최적의 살비제 제형화 확립
2	시작품 제작 및 안정성 평가
3	시작품의 포자생존률 및 살비성 분석
4	시작품의 현장 적용 매뉴얼 확립

## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 1절. 대상 균주 선정

#### 1. 균주의 살비활성 검증

##### 가. 균주 분양 및 배양

현재 농업용 진균 살충제로 활용되고 있는 대표적인 진균인 백강균(*Beauveria bassiana*) 및 녹강균(*Metarhizium anisopliae*) 등을 활용하여 닭진드기 살비제의 후보 진균으로 선정하였으며, *Cordyceps militaris* 는 사료첨가할 수 있는 진균으로써 선정하였다. *Beauveria bassiana* KACC40224, *Cordyceps militaris* ATCC26848, *Metarhizium anisopliae* KCTC 327를 농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부에서 분양받았다. 각 진균을 PDA 배지 및 25°C 조건에서 배양하였다.

##### 나. 진균 3종의 닭진드기 살비 테스트

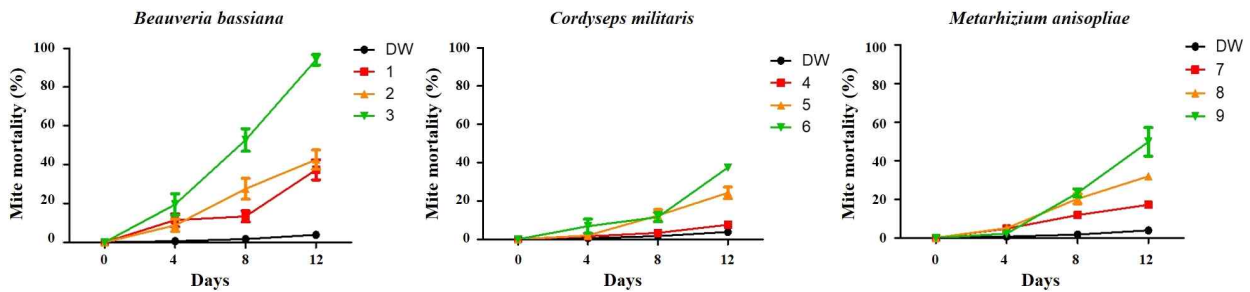
실험에 필요한 닭진드기를 충북 보은군 Y 농장에서 채집하였다. Insect petridish의 바닥에 filter paper를 놓고 채집된 닭진드기 dish당 400~500마리를 분주하였다. 각 진균 3종을 25°C 조건에서 7일간 배양한 후 원심분리를 통해 분리하고 PBS를 이용하여 세척하였다. 그 후, 각 진균 3종을 증류수를 이용하여 표 1에 명시된 포자 수 만큼 희석하여 2 mL씩 분무 살포하였다. 각 표에 기재된 날짜 간격으로 닭진드기 생존율을 확인하였다.

진균 3종을 농도별로 최초 분무 살포하고 12일 후에 닭진드기에 대한 살비효과를 확인한 결과, *B. bassiana* 1 X 10<sup>8</sup>에서 94.13%의 살비효과를 나타낸 반면, *C. militaris*와 *M. anisopliae*에서는 최대 37.58%, 49.76%의 낮은 살비효과가 관찰되었다(그림 1). 따라서 본 연구는 가장 살비효과가 뛰어난 *B. bassiana*를 선택하여 돌연변이 균주 개량 및 제형화를 진행하였다.

곤충병원성 곰팡이는 곤충과의 접촉에 의해 감염이 시작되고 물리 화학적으로 표피를 침투하여 기주 곤충의 면역작용을 차단, 독성물질을 분비하여 곤충을 죽인다. 또한 감염된 곤충병원성 곰팡이는 기주 곤충의 혈강 내에서 대량 번식하여 기주 곤충의 영양분을 고갈시켜 사망에 이르게 하고 기주 곤충의 치사 후에는 죽은 곤충의 표피에서 포자를 형성하여 2차 감염원으로 작용한다.

[표 1] 진균 포자 조성

순번	조성
1	<i>B. bassiana</i> 1 X 10 <sup>6</sup>
2	<i>B. bassiana</i> 1 X 10 <sup>7</sup>
3	<i>B. bassiana</i> 1 X 10 <sup>8</sup>
4	<i>C. militaris</i> 1 X 10 <sup>6</sup>
5	<i>C. militaris</i> 1 X 10 <sup>7</sup>
6	<i>C. militaris</i> 1 X 10 <sup>8</sup>
7	<i>M. anisopliae</i> 1 X 10 <sup>6</sup>
8	<i>M. anisopliae</i> 1 X 10 <sup>7</sup>
9	<i>M. anisopliae</i> 1 X 10 <sup>8</sup>



[그림 1] *Beauveria bassiana*, *Cordyceps militaris*, *Metarhizium anisopliae* 각 진균의 농도에 따른 닭진드기에 대한 살비효과

#### 다. *Beauveria bassiana* 균주 염기서열 분석

후속 연구를 진행하기 앞서 살비효과가 뛰어난 *B. bassiana*를 유전적으로 재검증하기 위해 진균 *B. bassiana*의 18s rRNA 프라이머를 디자인하여 염기서열분석을 수행하였다. 프라이머의 염기서열 정보와 PCR 조건은 아래의 표 2와 같이 수행하였고, HS Prime Taq DNA Polymerase(Genetbio. Korea) 제품을 사용하였다. PCR을 통해 얻어진 유전자를 염기서열분석 서비스를 맡겼고, 염기서열결과를 NCBI blast 프로그램으로 염기서열의 상동성을 비교분석 하였다. 그 결과, 연구에 사용된 진균이 정상적인 *B. bassiana*임을 최종 확인하였다(그림 2).

[표 2] PCR 조성 및 조건

Primer sequence			
Bb 18s rRNA-F	GTA GTC ATA TGC TTG TCT CAA AGA TTA AG		
Bb 18s rRNA-R	TAG GGA TTC CTC GTT GAA GAG CAA T		
GENEBIO HS Prime Taq DNA Polymerase			
Component			Volume
10x Reaction buffer			2 $\mu$ l
10mM dNTPs Mixture			2 $\mu$ l
Primer (50pm/ $\mu$ l)			1 $\mu$ l
HS Prime Taq DNA pol.(2.5 units/ $\mu$ l)			0.4 $\mu$ l
Template DNA			0.1 $\mu$ l
DW			Add up to 20 $\mu$ l
Step	Temp.	Time	Cycles
Initial denaturation	94	5	1
Denaturation	94	1	30
Annealing	56	1	
Extension	72	3	
Final extension	72	8	1

BB-F1 SEQ New: 1254 bp;  
 Composition 328 A; 260 C; 335 G; 331 T; 0 OTHER  
 Percentage: 26.2% A; 20.7% C; 26.7% G; 26.4% T; 0.0% OTHER  
 Molecular Weight (kDa): ssDNA: 388.64 dsDNA: 773.06  
 ORIGIN  
 1 CGCCAAGGGC GTGTTTTTGG ATTTGCAGCA TCCTAGTAT AGCAATTATC AGOGAAACTG  
 61 CGAATGGCTC ATTATATAAG TTATCGTTTA TTGATAGTA CCTACTACT TGGATAACCG  
 121 TGGTAATCT AGASCTAATA CATGCTGAAA ATCCCGACTT CGGAAGGGAG GTATTATTATA  
 181 GATTAAAAAC CAATGCCCTC TGGGCTCCTT GGTGATTCAT AATAACTTTT CGAATCGCAC  
 241 GGCTTSGGCG CGGCGATGAT TCATTCAAAT TTCTTCOUTA TCAACTTTGCG ATGTTTGGGT  
 301 ATTTGGOCAAA CATGTCGCA ACGGGTAACG GAGGGTTAGG GCTCGACCCC GGAGAAGGAG  
 361 CCTGAGAAC GGCTACTACA TCCAAGSAGG GCAGCAGGGG CSCAAATTAC CCAATCCCGA  
 421 TTCGGGGAGG TAGTGACAAT AAATACTGAT ACAGGGCTCT TTTGGGCTT GTAATTGGAA  
 481 TGAATCAAT TTAATCTCTT TAAAGSAGAA CAATTGAGG CCAAGTCTGG TCCAGCAGC  
 541 CGCGTAAT CCAGTCCAA TAGGTATAT TAAAGTTGTT GTGGTAAAA AGCTGTAGT  
 601 TGAACCTTGG GCCTGGCTGG CGGTCCGCC TCACCGCGTG TACTGTCCGG CCGGSCCTT  
 661 TCCTCTGTG GAACTCATG CCTTCACTG GGTGTGGGGG GGAACAGGA CTTTACTTT  
 721 GAATAAATA GATGCTCCA GCGAGGCTA TGCTGAATA CATTAGCATG GAATAATAA  
 781 ATAGACGCG TGGTTCTATT TRGTTGGTT CTAGACCGC CGTAATGATT AATAGGACA  
 841 GTGCGGGCA TCAGTATCA ATTGTCAAG GTGAATCT TAGATTATT GAGACTAAC  
 901 TACTGCGAAA GCATTGCGA AGGATGTTT CATTATCAG GAACGAAAGT TAGGGATCG  
 961 AAGACGATCA GATACCGTCA TAGCTTAA CATAAATCT GCCGACTAGG GATCGGAGA  
 1021 TGTTATTTTT TGACGCTTC GGCACCTTAC GAGAAATCAA AGTGTCTGG CTCACGGGGG  
 1081 AGTATGTCG CAAGGCTGAA ACTTAAAGAA ATTGACGGAA GCGCACCCC AGGGGTGAG  
 1141 OCTGCGGCTT AATTGACTC AACCGSGGA AACTCCCGAG GSCCGAACC AATGGGGATT  
 1201 GAAGAATTGA AAGCCTTTCT TGATTTTGGG GGGGGGGGG CATGCCGCT CTTA

BB-R1 SEQ New: 1235 bp;  
 Composition 333 A; 253 C; 322 G; 327 T; 0 OTHER  
 Percentage: 27.0% A; 20.5% C; 26.1% G; 26.5% T; 0.0% OTHER  
 Molecular Weight (kDa): ssDNA: 382.69 dsDNA: 761.34  
 ORIGIN  
 1 CCCTTTTGG TCCAAGTATA GCATTATACA GCGAAACTGC GAATGGCTCA TTATATAAGT  
 61 TATCGTTAT TTGATAGTAC CTTACTACTT GGATAACCGT GGTAATCTA GAGCTAATAC  
 121 ATGCTGAAA TCCCGACTTC GGAAGGGAGG TATTATTAG ATTAATAACC AATGCCCTCT  
 181 GGGCTCCTTG GTGATTCATA ATAACCTTTC GAATCGCACG GCCTTGGCC GCGATGTT  
 241 CATTCAAAT TTCTCCCTAT CAACTTTCGA TGTITGGGTA TTGGCCAAAC ATGTCGCAA  
 301 CGGGTAACG AGGGTAGGG CTCGACCCCG GAGAAGGAGC CTGAGAAAC GCTACTACAT  
 361 CCAAGSAGG CAGCAGGCC GCAAATTACC CAATCCCGAT TCGGGGAGT AGTGACAATA  
 421 AATACTGATA CAGGGCTCTT TTGGGCTTG TAATTGGAAT GAGTACAATT TAAATCTCT  
 481 AACGAGAAC AATTGGAGG CAAGTCTGTT GCCAGCAGCC CGSGTAATC CAGTCCAAAT  
 541 AGCTATATT AAAGTTGTTG TGTTAAAAA GCTGTAGTT GAACCTGGG CCTGCTGGC  
 601 CGTCCGCTC CACCGGTGT ACTGTCCGG CCGGGCTTTC CCTCTGTGG AACCTCATGC  
 661 CCTTCACTGG GTGTGGGGG GAACAGGAC TTTTACTTTG AAAAATTAG AGTCTCCAG  
 721 GCAGGCTAT GCTCGAATAC ATTAGCATGG AATAATAAAA TAGGACGCTT GGTCTATT  
 781 TGTGTTTC TAGAACGCC GTAATGATTA ATAGGACAG TCGGGGATC CAGTATCAA  
 841 TTGTACAGG TGAATCTT AGATTATTG AAGACTACT ACTCGAAGC CATTTCGCA  
 901 GATGTTTC ATTAATCAGG AACGAAAGT AGGGATCGA AGACACTCAG ATACGCTCG  
 961 AGCTTAACC ATAACTATG CCGACTAGG ATCGACGAT GTTATTTTT GACGCTGTG  
 1021 GCACCTTAC AGAATCAA GTGCTTGGC TCCAGGGGA ATATGGTCC AAGCTCGAA  
 1081 CTTAAAGAAA TTGACGGAAG GGCACCCA GGGTGGAC CTGCGCTTA ATTTACTCA  
 1141 AACGGGAAA CTCACAGGT CCAACCAAT GAGGATGAC AAATTGAAC TCTTCTGAT  
 1201 TTTTGGGGG GGGGCTGGC GTCTATTGG GGGAA

[그림 2] *Beauveria bassiana* 염기서열 분석 결과

## 2. 돌연변이 균주 개량

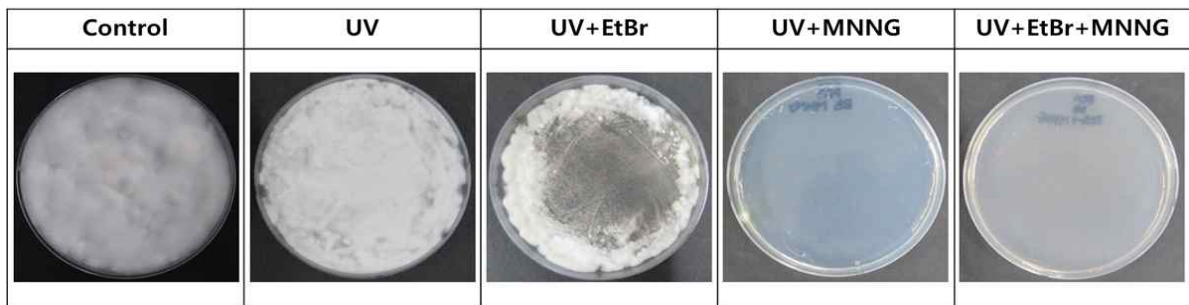
### 가. *Beauveria bassiana* 개량

닭진드기 살비효과가 가장 뛰어난 *B. bassiana*를 단백질, 지질 등의 물질 분해 능력을 증대시켜 wild-type 보다 닭진드기 살비효과 높은 균주를 개량하였다. *Beauveria bassiana* KACC-40224를 4가지 방법으로 돌연변이 유도하였다(표 3).

그 결과, *Beauveria bassiana*는 MNNG가 들어간 조건에서는 생존율 0%를 보였고, Ethidium bromide(EtBr) + Ultra violet를 동시 처리한 조건에서 생존율 20% 미만을 보였다. 따라서 이 조건에서 생존한 균주를 선택하여 3회 계대 배양하였다(그림 4).

[표 3] 진균 돌연변이 조건

	Control	Mutant1	Mutant2	Mutant3	Mutant4
UV	-	+	+	+	+
Ethidium bromide	-	-	+	-	+
1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine	-	-	-	+	+



[그림 3] 돌연변이 조건에서의 *B. bassiana*의 모습

나. Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD) 분석

3회 계대 배양한 *B. bassiana*의 돌연변이를 DNA 수준에서 검증하기 위해 RAPD 분석법을 수행하였다(표 4, 5). RAPD 결과를 Agarose gel에서 확인한 결과, 빨간 칸으로 표시된 프라이머 OPA-02, -09, -12, -17, -19, OPD-04, -20, OPE-01, OPF-02, -08, -10, -12, -14, -16, OPZ-20에서 큰 변화를 보이고, 노란 칸으로 표시된 프라이머 OPA-11, -13, OPB-06, OPD-01, -15, -18, OPE-08, OPF-05, -09, OPH-19, -20, OPZ-07에서 작은 변화를 균주 5개체에서 돌연변이 결과가 관찰되었다(그림 4).

최종적으로 유전적 변이가 관찰된 돌연변이 균주 5개체를 3회 계대 배양하여 후속 연구를 진행하게 되었다(그림 5).

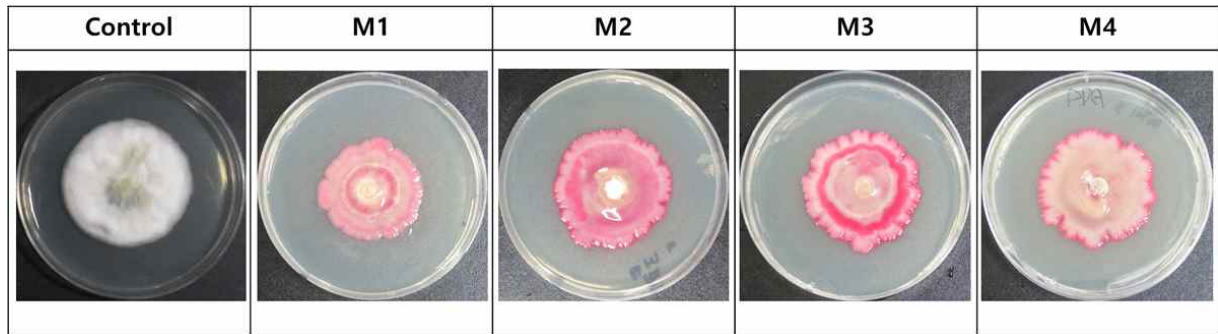
[표 4] 돌연변이 검증용 RAPD primer 36종의 염기서열

OPA-02	TGCCGAGCTG	OPD-04	TCTGGTGAGG	OPF-09	CCAAGCTTCC
OPA-03	AGTCAGCCAC	OPD-15	CATCCGTGCT	OPF-10	GGAAGCTTGG
OPA-09	GGGTAACGCC	OPD-18	GAGAGCCAAC	OPF-12	ACGGTACCAG
OPA-11	CAATCGCCGT	OPD-20	ACCCGGTCAC	OPF-14	TGCTGCAGGT
OPA-12	TCGGCGATAG	OPE-01	CCCAAGGTCC	OPF-16	GGAGTACTGG
OPA-13	CAGCACCCAC	OPE-08	TCACCACGGT	OPH-08	GAAACACCCC
OPA-17	GACCGCTTGT	OPE-09	CTTCACCCGA	OPH-19	CTGACCAGCC
OPA-18	AGGTGACCGT	OPE-11	GAGTCTCAGG	OPH-20	GGGAGACATC
OPA-20	GTTGCGATCC	OPF-02	GAGGATCCCT	OPZ-04	AGGCTGTGCT
OPB-06	TGCTCTGCC	OPF-04	GGTGATCAGG	OPZ-07	CCAGGAGGAC
OPB-10	CTGCTGGGAC	OPF-05	CCGAATTCCC	OPZ-10	CCGACAAACC
OPD-01	ACCGCGAAGG	OPF-08	GGGATATCGG	OPZ-20	ACTTTGGCGG

[표 5] PCR 조건

GENEBIO HS Prime Taq DNA Polymerase			
Component			Volume
10x Reaction buffer			2 $\mu$ l
10mM dNTPs Mixture			2 $\mu$ l
Random Primer (50pm/ $\mu$ l)			1 $\mu$ l
HS Prime Taq DNA pol.(2.5 units/ $\mu$ l)			0.4 $\mu$ l
Template DNA			0.1 $\mu$ l
DW			Add up to 20 $\mu$ l
Step	Temp.	Time	Cycles
Initial denaturation	94	6	1
Denaturation	94	1	30
Annealing	36	2	
Extension	72	2	
Final extension	72	8	1





[그림 5] 진균 3차 계대배양

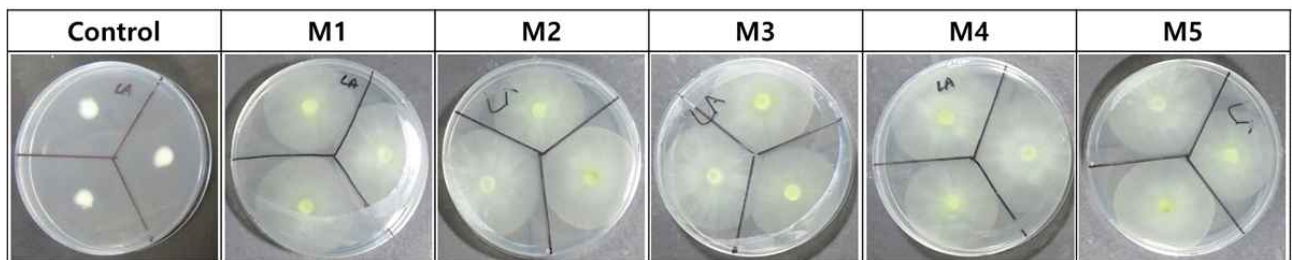
### 3. 돌연변이 균주의 분해활성 검증

곤충병원성 진균이 기주곤충에 감염하는 단계에서 곤충의 외피를 관통하기 위해서는 진균 으로부터 여러 가지 효소가 분비된다. 곤충의 외피는 큐티클층으로 구성되어 있으며, 주성분은 키틴미소섬유, 단백질 및 지질 등으로 구성되어 있다. 진균이 생산하는 큐티클 분해 효소는 키틴분해효소, 단백질분해효소, 지질분해효소 등으로 특히 단백질분해효소가 먼저 큐티클 분해에 관여하여 곤충병원성에 가장 중요한 병원성 인자이다. 곤충병원성 진균의 돌연변이를 유발하여 wild-type 과의 효소활성을 비교하고자 하였다.

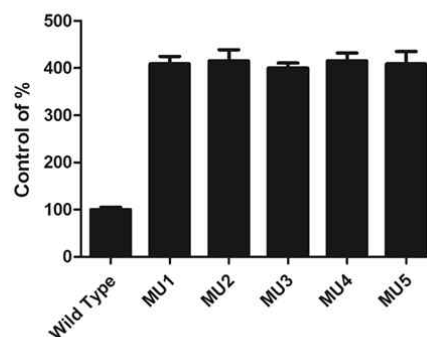
#### 가. 지질 분해활성

개량된 *B. bassiana* 돌연변이 균주의 지질 분해활성을 검증하기 위해 Tween-80이 첨가된 배지에 균주를 접종하고 25°C 에서 2일 배양한 후 결정체의 크기를 확인하였다(그림 6).

그 결과, *B. bassiana*의 wild-type은 자라지 못한 반면, 돌연변이 균주 m1 :  $45.0 \pm 3.0\text{mm}$ , m2 :  $45.7 \pm 4.5\text{mm}$ , m3 :  $44.0 \pm 2.0\text{mm}$ , m4 :  $45.7 \pm 3.2\text{mm}$ , m5 :  $45.0 \pm 5.0\text{mm}$ 으로 각 돌연변이 균주들은 지질을 분해하여 결정체가 형성된 것을 관찰하였다(그림 7).



[그림 6] *B. bassiana*의 wild-type 및 돌연변이 균주의 지질 분해활성 사진



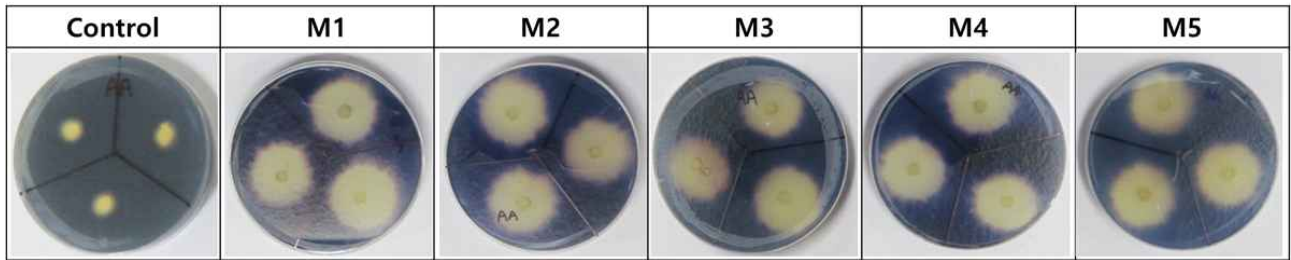
[그림 7] *B. bassiana*의 wild-type 대비 돌연변이균주의 지질 분해활성



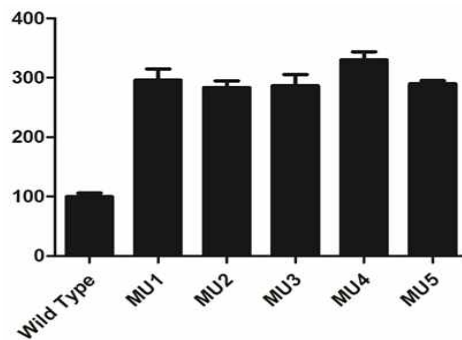
#### 나. 전분 분해활성

개량된 돌연변이 균주의 전분 분해활성을 검증하기 위해 Soluble starch가 첨가된 배지에 균주를 접종하고 25°C에서 2일 배양한 후 투명환(clear zone)의 크기를 확인하였다(그림 8).

그 결과, *B. bassiana*의 wild-type 대비 돌연변이 균주들의 투명환은 m1 : 215.4%, m2 : 206.3%, m3 : 208.6%, m4 : 240.4%, m5 : 210.9% 으로 전분 분해활성이 증대된 것을 관찰하였다(그림 9).



[그림 8] *B. bassiana*의 wild-type 및 돌연변이 균주의 전분 분해활성 사진

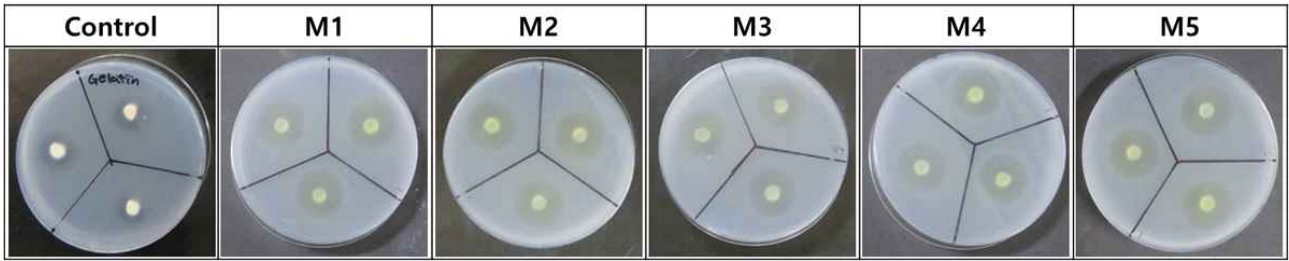


[그림 9] *B. bassiana*의 wild-type 대비 돌연변이균주의 전분 분해활성

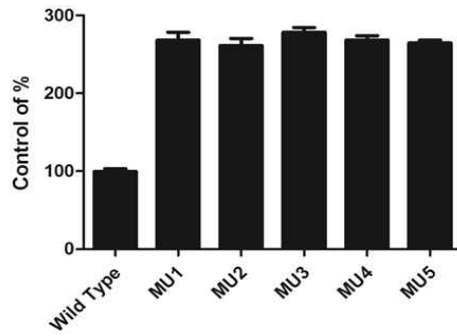
#### 다. 단백질 분해활성

개량된 돌연변이 균주의 단백질 분해활성을 검증하기 위해 Gelatin과 Skim milk가 각각 첨가된 배지에 균주를 접종하고 25°C에서 3일 배양한 후 투명환(clear zone)의 크기를 확인하였다(그림 10, 12).

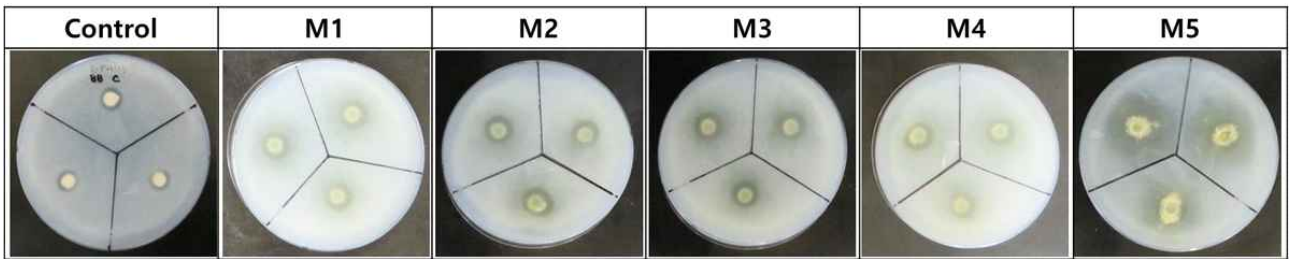
그 결과, *B. bassiana*의 wild-type 대비 돌연변이 균주들의 Gelatin 투명환은 m1 : 268.0%, m2 : 261.2%, m3 : 278.4%, m4 : 268.0%, m5 : 264.6% 으로 분해활성이 증대된 것을 관찰하였고, Skim milk 투명환은 m1 : 146.7%, m2 : 136.7%, m3 : 143.3%, m4 : 130.0%, m5 : 176.7% 으로 분해활성이 증대된 것을 관찰하였다(그림 11, 13).



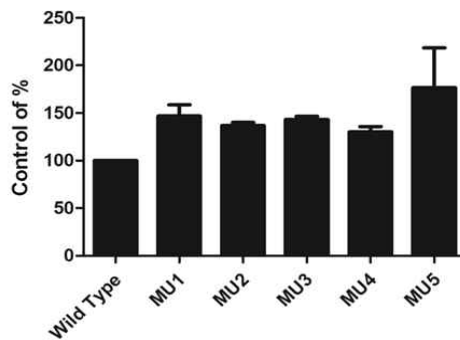
[그림 10] *B. bassiana*의 wild-type 및 돌연변이 균주의 gelatin 분해활성 사진



[그림 11] *B. bassiana*의 wild-type 대비 돌연변이균주의 gelatin 분해활성



[그림 12] *B. bassiana*의 wild-type 및 돌연변이 균주의 skim milk 분해활성 사진



[그림 13] *B. bassiana*의 wild-type 대비 돌연변이균주의 skim milk 분해활성

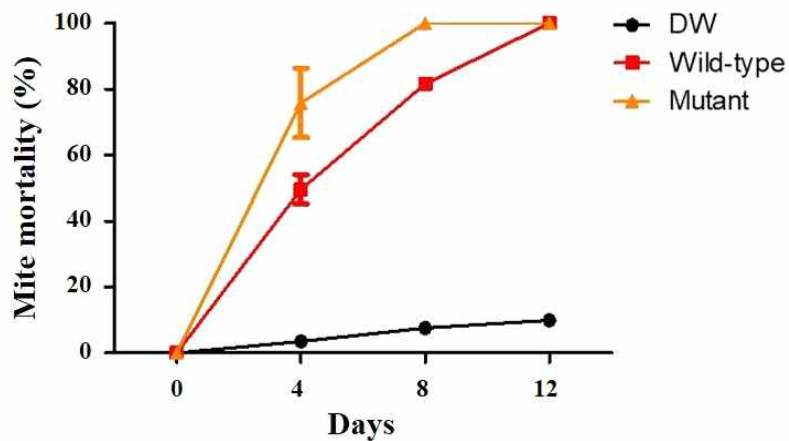
#### 4. 돌연변이 균주의 살비활성 검증

지질, 전분, 단백질 분해활성이 증대된 돌연변이 M1 균주의 닭진드기 살비활성을 검증하기 위해 실험에 필요한 닭진드기를 충북 보은군 Y 농장에서 채집하였다. Insect petridish의 바닥에 Filter paper를 놓고 채집된 닭진드기 dish당 400~500마리를 분주하였다. 각 균주를 25°C 조건에서 7일간 배양한 후 원심분리를 통해 분리하고 PBS를 이용하여 세척하였다. 그 후, 각 진균 3종을 배양액 또는 증류수를 이용하여 표에 명시된 포자 수 만큼 희석하여 2 mL씩 분무 살포

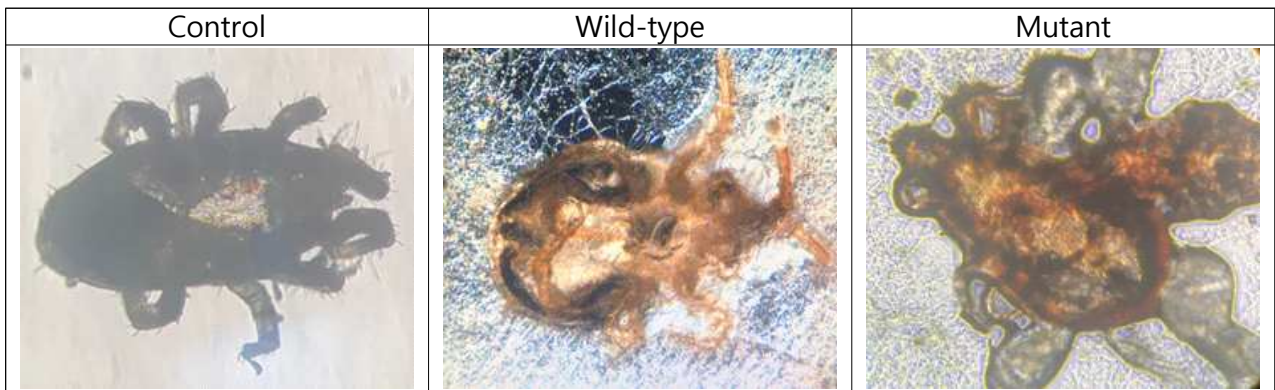
하였다. 각 표에 기재된 날짜 간격으로 닭진드기 생존율을 확인하였다.

그 결과, *B. bassiana*의 돌연변이 M1 균주가 접종 4일 후에 75.86%의 살비효과를 나타내어 wild-type의 약 50%의 더 높은 살비효과를 나타냈고, 접종 8일 후에는 돌연변이 M1 균주의 살비효과는 100%를 보였다. *B. bassiana*의 wild-type 또한 접종 12일 후에 살비효과 100%를 나타내어 돌연변이 M1 균주가 100%에 도달하는 시간을 단축시키는 효과가 있을 뿐 wild-type 또한 높은 살비효과가 관찰되었다(그림 14, 15).

본 연구 결과에 제시하지 않았지만, 돌연변이 균주가 wild-type 보다 성장 속도가 느리기 때문에 산업화 현장에서 돌연변이 균주의 포자를 확보하는데 배양시간대비 포자 회수 효율이 낮아 돌연변이 균주로 제품화하기에 부적합할 것으로 예상되었다.



[그림 14] *B. bassiana*의 wild-type과 돌연변이 균주의 살비활성 비교



[그림 15] *B. bassiana*의 wild-type과 돌연변이 균주의 살비효과 사진

## 2절. 식물 정유 선정

### 1. 식물 정유 선택 및 구입

본 과제의 계획으로는 살비활성을 갖는 10종의 식물 정유를 선별하고 시험하는 것을 목표로 하였다. 기존의 닭진드기 살비 연구 논문을 바탕으로 살비 활성이 밝혀진 16종의 식물 정유를 후보 식물 정유로 선택하였다(표 6).

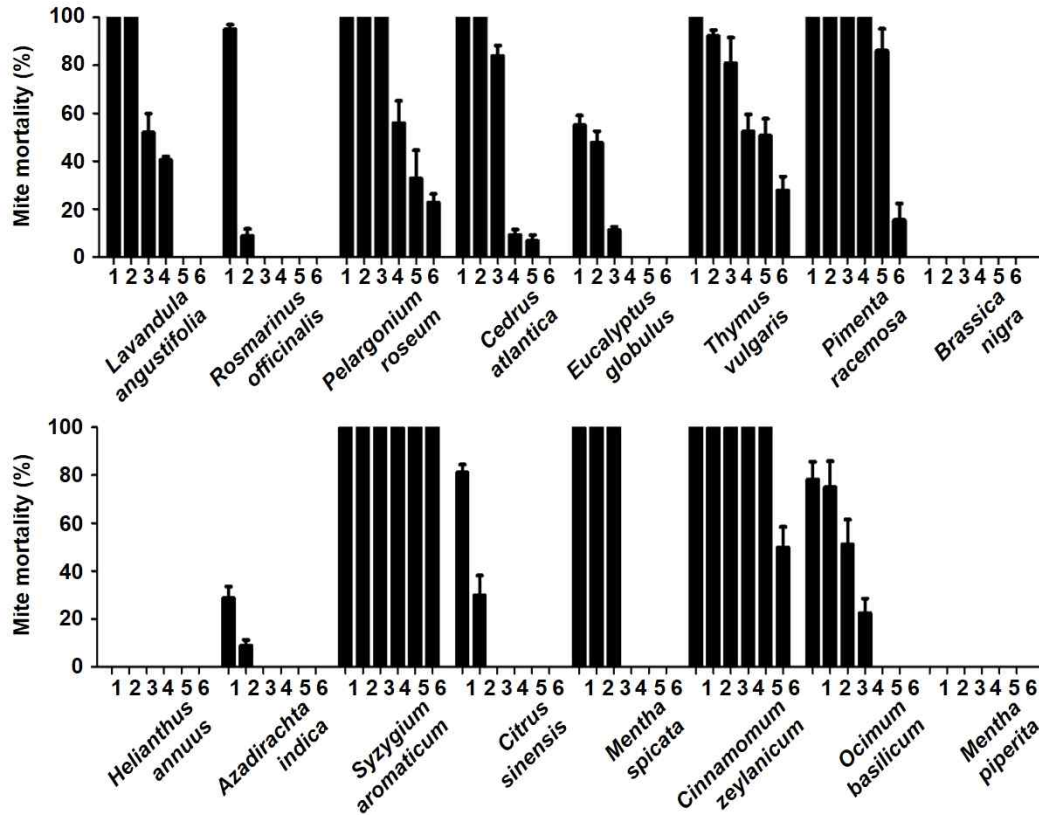
[표 6] 연구에 사용된 식물 정유의 목록 및 구입처

순번	식물 정유 명	구입처
1	라벤더( <i>Lavandula angustifolia</i> )	BUBBLEBANK
2	로즈마리( <i>Rosmarinus officinalis</i> )	BUBBLEBANK
3	로즈제라늄( <i>Pelargonium roseum</i> )	BUBBLEBANK
4	시더우드( <i>Cedrus atlantica</i> )	BUBBLEBANK
5	유칼립투스( <i>Eucalyptus globulus</i> )	BUBBLEBANK
6	타임( <i>Thymus vulgaris</i> )	BUBBLEBANK
7	인디안베이( <i>Pimenta racemosa</i> )	BUBBLEBANK
8	겨자( <i>Brassica nigra</i> )	PURE INDIAN FOODS
9	해바라기유( <i>Helianthus annuus</i> )	FLORA
10	넝오일( <i>Azadirachta indica</i> )	NOW SOLUTIONS
11	정향( <i>Syzygium aromaticum</i> )	BUBBLEBANK
12	스윗오렌지( <i>Citrus sinensis</i> )	BUBBLEBANK
13	스피아민트( <i>Mentha spicata</i> )	BUBBLEBANK
14	시나몬( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> )	BUBBLEBANK
15	바질( <i>Ocimum basilicum</i> )	BUBBLEBANK
16	페퍼민트( <i>Mentha Piperita</i> )	BUBBLEBANK

### 2. 식물 정유의 살비활성 검증

선택된 식물 정유의 닭진드기 살비활성을 검증하기 위해 0.8~0.025%까지 농도를 1/2씩 연속 희석하였다. 유화제인 Tween-80을 10%로 맞춰 각 식물정유와 혼합한 후 60℃ 온도에서 중탕으로 제형하였다. 그런 다음에, Insect breeding petridish에 채집한 닭진드기를 평균 500마리씩 분주하고, 0.8%, 0.4%, 0.2%, 0.1%, 0.05%, 0.025%된 식물 정유를 2 ml씩 31.5 $\mu$ l/cm<sup>2</sup>의 양으로 균일하게 분무 살포하였다. 살포 24시간 후, 움직임이 없는 개체를 죽은 진드기로 간주하였다. 음성 대조군으로는 멸균수를 살포하였고, 모든 살비테스트는 3회 반복 수행하였다.

그 결과, 라벤더 : 0.4 ~ 0.8%, 로즈제라늄 : 0.2 ~ 0.8%, 시더우드 : 0.4 ~ 0.8%, 타임 : 0.8%, 인디안베이 : 0.1 ~ 0.8%, 정향 : 0.025 ~ 0.8%, 스피아민트 : 0.2 ~ 0.8%, 시나몬 : 0.05 ~ 0.8%에서 살비효능 100%를 확인하였다(그림 16). 따라서 16종의 식물오일 중에 100% 살비효능을 보인 라벤더, 로즈제라늄, 시더우드, 타임, 인디안베이, 정향, 스피아민트, 시나몬 등 총 8종을 1차 선별하였다.



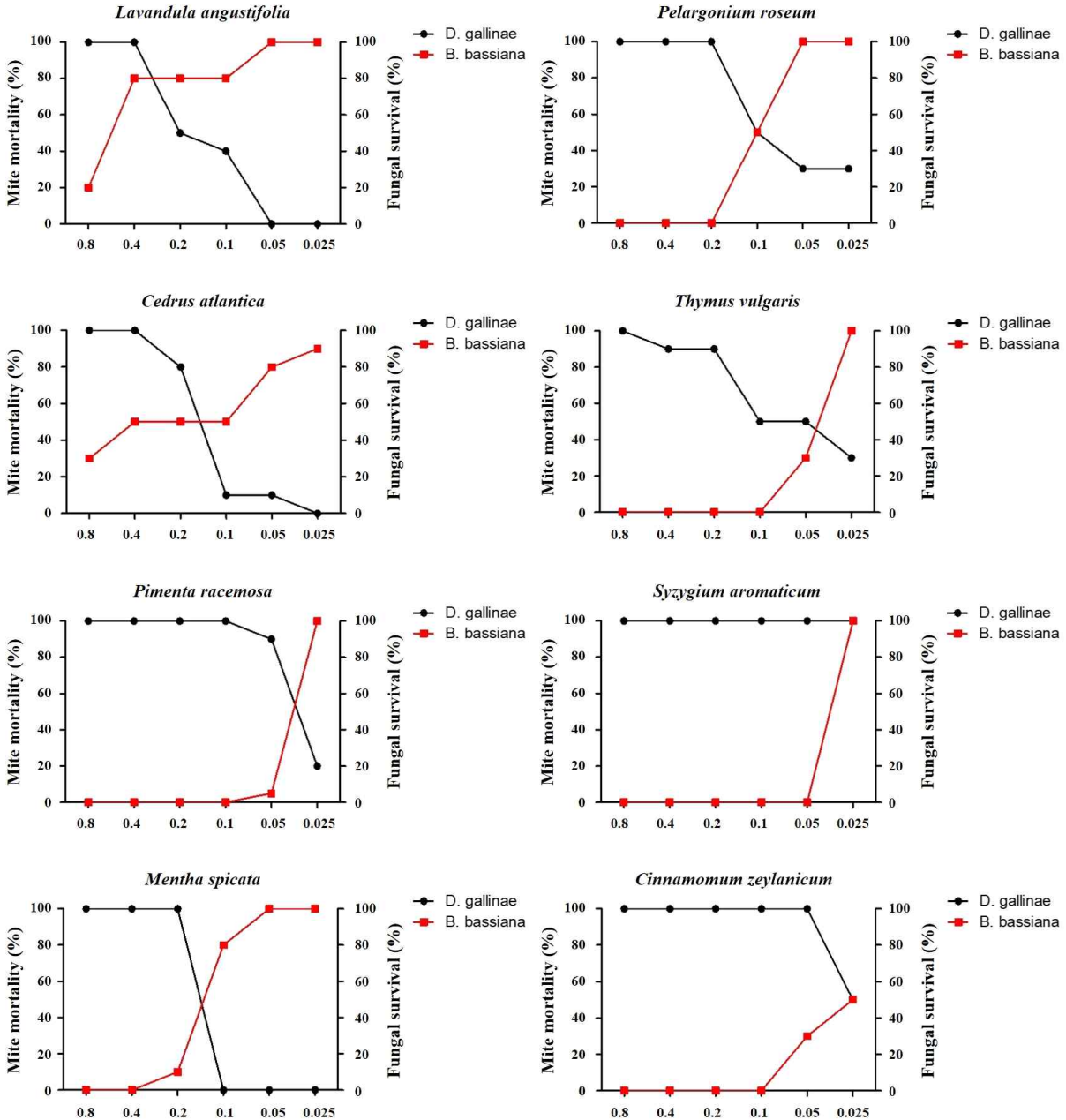
[그림 16] 식물 정유의 단독 살포에 의한 닭진드기 살비효과 비교

### 3. 식물 정유의 살비활성 검증

닭진드기에 대한 살비효과가 있는 식물정유 8종에 대한 진균 생존율을 평가하였다. 본 사업의 최종 목표가 진균과 식물정유의 혼합제형제품이기 때문에 진균에 대한 각 식물정유의 독성을 검증하였다. 각 정유를 농도별 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025% 로 희석 및 5% Tween-80으로 유화시킨 후 식물정유를 PDA배지에 첨가하였다. 그런 다음에 각 배지에 진균 플라크를 접종하고 25℃에서 7일간 배양한 후 성장률 및 발아율 관찰하였다.

그 결과 8종에 대한 식물 정유에 대한 진균의 80% 이상 생존 조건은 라벤더(0.4%), 로즈제라늄(0.05%), 시더우드(0.05%), 타임(0.025%), 인디안베이(0.025%), 정향(0.05%), 스피아민트(0.2%), 시나몬(0.025%)으로 확인되었다. 전체적으로 진균에 대한 식물정유의 독성이 매우 강하여 한 제품으로 제형하기에 어려움이 관찰되었다.

진균에 독성이 낮으며(진균 발아율 80% 이상), 닭진드기 살비효과(80% 이상)를 나타내는 최적 조건은 *B. bassiana*의 라벤더 : 0.4%(125.6 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) 조건이 유일하였다(그림 17).



[그림 17] 닭진드기에 대한 식물 정유의 살비 효과와 식물 정유에 대한 진균의 생존을 비교

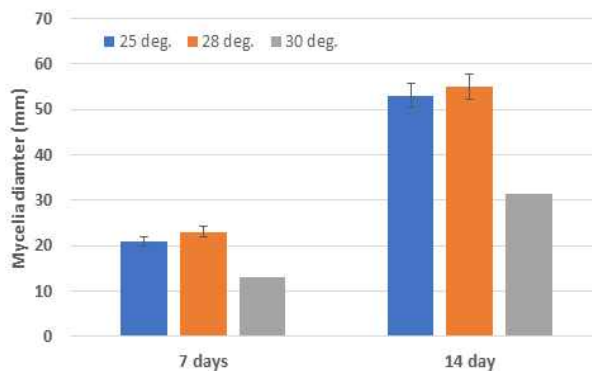
### 3절. 유효 진균 대량 배양 조건 확립

#### 1. *Beauveria bassiana*

##### 가. 배양 온도

PDA 배지에서 배양한 균주를 지름 4mm 정도가 되도록 천공하여 블록으로 만든 후, PDA 배지 정중앙에 상치하였다. 균주 블록이 상치된 PDA 배지를 25°C, 28°C, 30°C에서 각각 7일, 14일 배양하였다. 각각의 배양 일자에 균사체의 지름을 측정하여 최적 배양 온도를 확인하였다.

*Beauveria bassiana* KACC40224 배양의 적합한 온도를 확인하기 위해서 각기 다른 온도에서 7일차 및 14일차 성장한 균사체 지름을 측정하였다(그림 18). 균사체의 성장에 적합온도는 25~28°C가 적합한 것으로 나타났고, 30°C에서는 다른 온도에 비해 전반적으로 약 38~43% 정도 균사체 성장이 저조한 것으로 확인되었다. 이러한 결과로 *B. bassiana* KACC40224의 배양 온도는 28°C 확정하였다.



[그림 18] 배양온도에 따른 균사 성장

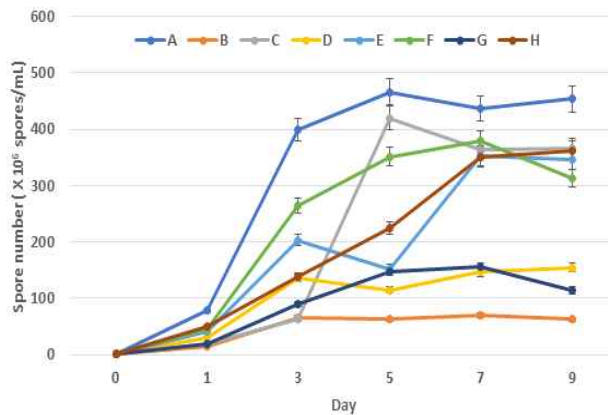
##### 나. 배양배지 조성

PDA에서 배양한 균체를 0.05% Tween 80 용액으로 회수하여 분생포자 현탁액을 제작하였다. 분생포자 현탁액을 액체배지 100mL에 접종하여 28°C ± 1, 150rpm으로 9일간 배양하였다. 액체배지에 접종한 포자의 초기농도는  $2.0 \times 10^6$  spores/mL이 되도록 하였다. 액체배지는 250mL 삼각플라스크에 8종의 각기 다른 조성으로 구성된 배지조성으로 제작하였다(표 7). 배양 1일차, 3일차, 5일차, 7일차, 9일차 배양액을 회수하였고 혈구계수기를 이용하여 포자수를 계수하였다. 또한 포자를 가장 많이 생산한 배지조성을 선택하여 진탕회전속도 및 초기 pH 등의 조건을 검토하였다.

곤충병원성 진균 *B. bassiana* KACC40224의 액체배양에 적합한 배양배지 조성을 검토하기 위해서 8종의 배양배지에 대해서 검토하였다(표 7). 각 배지별로 최대 포자 형성 시기를 확인해보면, 배지 A의 경우 7일차에  $4.6 \times 10^8$  spores/mL, 배지 B의 경우 7일차에  $7.0 \times 10^7$  spores/mL, 배지 C의 경우 5일차에  $4.1 \times 10^8$  spores/mL, 배지 D의 경우 9일차에  $1.5 \times 10^8$  spores/mL, 배지 E의 경우 7일차에  $3.5 \times 10^8$  spores/mL, 배지 F의 경우 7일차에  $3.7 \times 10^8$  spores/mL, 배지 G의 경우 7일차에  $1.5 \times 10^8$  spores/mL, 배지 H의 경우 9일차에  $3.6 \times 10^8$  spores/mL으로 확인되었다(그림 19). 8종의 배양배지 중에서 최대 포자생산량을 최단기간에 형성한 배지 A를 최종 선정하였으며, 다음에 진행된 진탕속도 및 배양 초기 pH 영향 관련 테스트에서 배양 배지로 확정하였다.

[표 7] *Beauveria bassiana* KACC40224의 포자 생산을 위한 배지 조성표

Medium name	Ingredient	Reference
A	Sucrose 47.5g/L, Yeast extract 86.13g/L	[3]
B	Molasses 20g/L, Casein peptone 5g/L, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.5g/L	[1]
C	Glucose 45g/L, Casamino acid 45g/L, Tween 80 2g/L	[4]
D	Glucose 75g/L, Casamino acid 15g/L, Tween 80 2g/L	[4]
E	Glucose 20g/L, CSL 15g/L, Yeast extract 20g/L, Tween 80 4g/L	[5]
F	Glucose 20g/L, CSL 20g/L, KNO <sub>3</sub> 5g/L, CaCl <sub>2</sub> 0.4g/L, MgSO <sub>4</sub> 0.1g/L, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 6.8g/L, Tween 80 4g/L	[5]
G	Glucose 20g./L CSL 9g/L, NaNO <sub>3</sub> 5g/L, MgSO <sub>4</sub> 2g/L, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2g/L, Tween 80 4g/L	[5]
H	Sucrose 50g/L, KNO <sub>3</sub> 10g/L, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5g/L, MgSO <sub>4</sub> 2g/L, Tween 80 2g/L, CaCl <sub>2</sub> 50mg/L, FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O 12mg/L, MnSO <sub>4</sub> 2.5mg/L, CoCl <sub>2</sub> 0.25mg/L, NaMoO <sub>4</sub> 0.2mg/L, ZnSO <sub>4</sub> 2.5mg/L, CuSO <sub>4</sub> 0.5mg/L	[6]



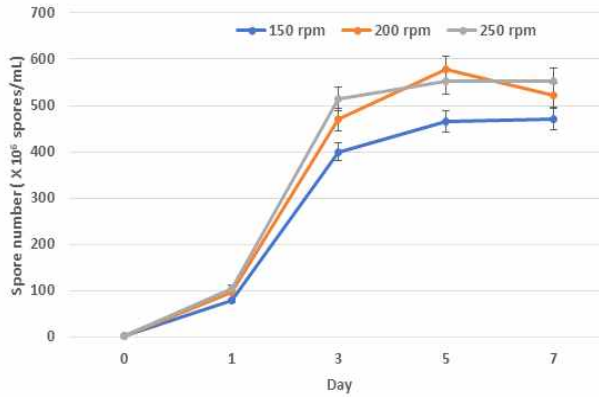
[그림 19] 배지에 따른 포자 생산량

#### 다. 진탕 속도

분생 포자 현탁액을 최적화 액체 배지 100mL에  $1.0 \times 10^6$  spores/mL이 되도록 접종하였다. 배양 온도는 28°C에서 진탕배양기 회전 속도를 150 rpm, 200 rpm, 250 rpm조건으로 7일간 배양하였다. 배양 1일차, 3일차, 5일차, 7일차 배양액을 회수하였고 혈구계수기를 이용하여 포자수를 계수하였다.

포자 생산량을 증가시키기 위해 150 rpm, 200 rpm, 250 rpm에서 진탕속도를 검토하였다(그림 20). 진탕속도 200 rpm 및 250 rpm에서 유사한 결과를 얻었다. 각각의 진탕속도에 따른 최대 포자수는 200 rpm 경우 배양 5일차에  $5.8 \times 10^8$  spores/mL의 포자수를 확인하였고, 250 rpm 경우 배양 7일차  $5.5 \times 10^8$  spores/mL였으며, 150 rpm 경우 배양 7일차  $4.7 \times 10^8$  spores/mL로 확인되었다. 진탕속도는 200 rpm의 최적화하였다.



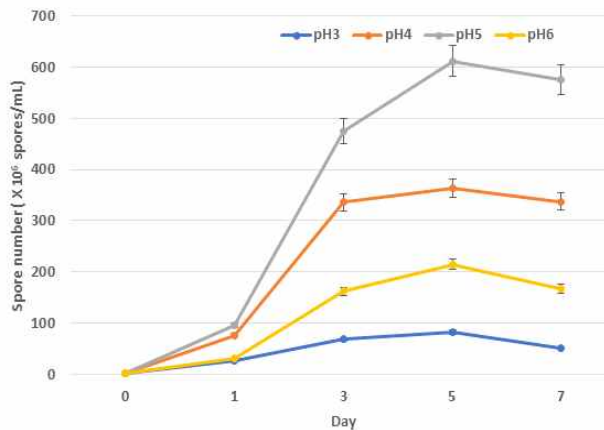


[그림 20] 진탕속도에 따른 포자 생산량

### 라. 초기 pH 영향

배양 초기 pH의 영향을 살펴보기 위해서 액체배지에 2N HCl 및 2N NaOH를 사용하여 pH 3, 4, 5, 6으로 적정하였다. 액체배지 100mL에 초기 접종 농도는  $2.0 \times 10^6$  spores/mL로 배양을 시작하였다. 배양은 28°C에 200 rpm으로 진탕 배양하였고, 배양 1일차, 3일차, 5일차, 7일차 배양액을 회수하여 포자를 계수하였다

포자의 생산량을 증가시키기 위해 배양 초기 배지의 pH 영향을 검토하였다(그림 21). 그 결과 배양 초기 pH 5인 경우 5일차에서  $6.1 \times 10^8$  spores/mL로 가장 높은 포자수가 생산되는 것으로 조사되었다. 초기 pH 3인 경우 5일차에서  $8.2 \times 10^7$  spores/mL, 초기 pH 4인 경우 5일차에서  $3.6 \times 10^8$  spores/mL, 초기 pH 6인 경우 5일차에서  $2.1 \times 10^8$  spores/mL의 포자수를 생산하는 것으로 확인되었다. 배양 초기 pH는 5.0으로 최적화 하였다.



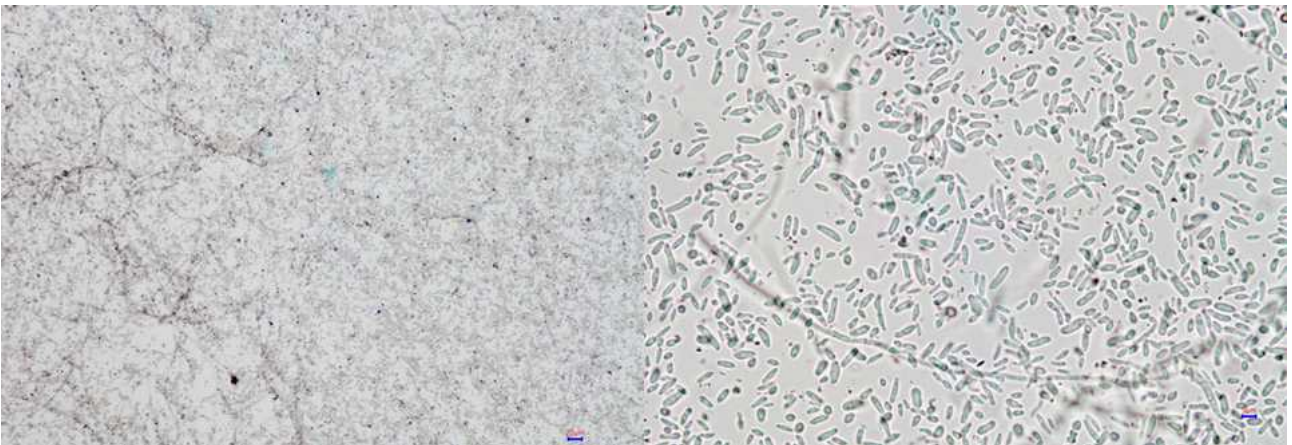
[그림 21] 배양 초기 pH에 따른 포자 생산량

### 마. 대량 배양

위 조건을 바탕으로 500리터 발효조에서 200리터 발효를 수행하였다(그림 22). 초기 접종 농도는  $1.0 \times 10^6$  spores/mL로 하였고, 28°C, 100rpm, 0.5vvm의 조건으로 2일 동안 배양하였다. 종료 후 포자 농도는  $6.75 \times 10^7$  spores/mL로 확인되었다(그림 23).



[그림 22] *B. bassiana* 배양(500리터 발효조)



[그림 23] *B. bassiana* 배양 현미경 사진 (좌 :  $\times 100$ , 우 :  $\times 400$ )

## 4절. 제형화

### 1. 분상제형

#### 가. 동결건조 조건 검토

액상 배양된 진균 *Beauveria bassiana* 배양액을 분상제형으로 전환하기 위해서 동결건조방법을 채용하였다. 동결건조시 보조제로는 Skim milk, Corn starch, Lactose, Maltodextrin, Trehalose, Glycerol 및 Ascorbic acid를 사용하였다(표 8). 동결건조 과정은 진균 배양액과 보조제를 표 8과 같이 혼합한 후 동결 플라스크에 투입하고 예비 동결을  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 진행하였다. 예비동결된 샘플을 동결건조기 장착하여 건조를 수행하였다. 동결건조가 완료된 후에 동결건조물을 회수하고 분쇄하여 분말화 하였다. 분말화된 동결건조물의 온도에 따른 안정성을 확인하기 위해서  $4^{\circ}\text{C}$  및  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 저장하면서 진균 발아율을 검토하였으며, 저장 기간은 98일 동안으로, 14일 간격으로 발아율을 측정하였다.

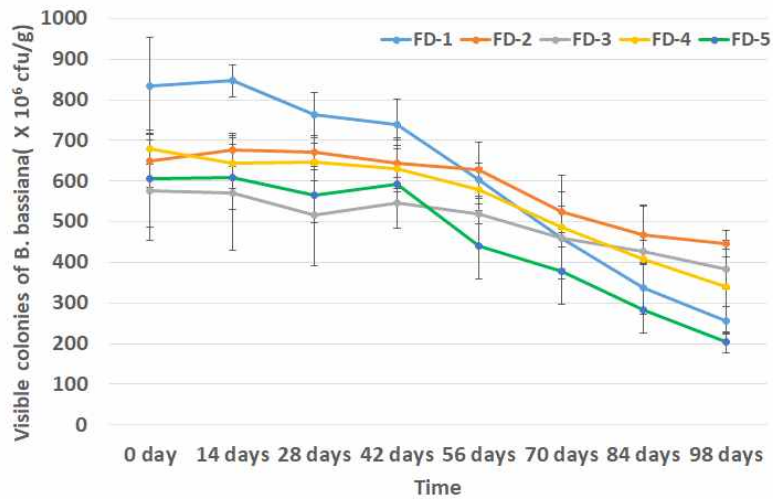
동결건조 보조제로 Ascorbic acid가 미포함된 건조물의 경우,  $4^{\circ}\text{C}$  및  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 저장하면서 진균 발아율을 검토한 결과는 그림 24, 25와 같다. 저장 온도  $4^{\circ}\text{C}$  경우, FD-1은 초기에  $8.3 \times 10^8$  cfu/g 이었으며, 98일에는  $2.5 \times 10^8$  cfu/g을 확인되었다. FD-2는 초기에  $6.5 \times 10^8$  cfu/g 이었으며, 98일에는  $4.4 \times 10^8$  cfu/g을 확인되었다. FD-3은 초기에  $5.7 \times 10^8$  cfu/g 이었으며, 98일에는  $3.8 \times 10^8$  cfu/g을 확인되었다. FD-4는 초기에  $6.8 \times 10^8$  cfu/g 이었으며, 98일에는  $3.4 \times 10^8$  cfu/g을 확인되었다. FD-5는 초기에  $6.0 \times 10^8$  cfu/g 이었으며, 98일에는  $2.0 \times 10^8$  cfu/g을 확인되었다. 저장 온도  $30^{\circ}\text{C}$  경우, FD-1은 초기에  $8.3 \times 10^8$  cfu/g 이었으며, 98일에는  $4.6 \times 10^6$  cfu/g을 확인되었다. FD-2는 초기에  $6.5 \times 10^8$  cfu/g 이었으며, 98일에는  $5.7 \times 10^7$  cfu/g을 확인되었다. FD-3은 초기에  $5.7 \times 10^8$  cfu/g 이었으며, 98일에는  $3.6 \times 10^6$  cfu/g을 확인되었다. FD-4는 초기에  $6.8 \times 10^8$  cfu/g 이었으며, 98일에는  $2.6 \times 10^6$  cfu/g을 확인되었다. FD-5는 초기에  $6.0 \times 10^8$  cfu/g 이었으며, 98일에는  $3.6 \times 10^6$  cfu/g을 확인되었다.

동결건조 보조제로 ascorbic acid가 포함된 건조물의 경우,  $4^{\circ}\text{C}$  및  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 저장하면서 진균 발아율을 검토한 결과는 그림 26, 27과 같다. 저장 온도  $4^{\circ}\text{C}$  경우, FD-1-1은 초기에  $7.6 \times 10^8$  cfu/g 이었으며, 98일에는  $4.8 \times 10^8$  cfu/g을 확인되었다. FD-2-1은 초기에  $7.2 \times 10^8$  cfu/g 이었으며, 98일에는  $5.4 \times 10^8$  cfu/g을 확인되었다. FD-3-1은 초기에  $6.7 \times 10^8$  cfu/g 이었으며, 98일에는  $4.7 \times 10^8$  cfu/g을 확인되었다. FD-4-1은 초기에  $7.3 \times 10^8$  cfu/g 이었으며, 98일에는  $4.4 \times 10^8$  cfu/g을 확인되었다. FD-5-1은 초기에  $7.2 \times 10^8$  cfu/g 이었으며, 98일에는  $4.0 \times 10^8$  cfu/g을 확인되었다. 저장 온도  $30^{\circ}\text{C}$  경우, FD-1-1은 초기에  $7.6 \times 10^8$  cfu/g 이었으며, 98일에는  $7.6 \times 10^7$  cfu/g을 확인되었다. FD-2-1은 초기에  $7.2 \times 10^8$  cfu/g 이었으며, 98일에는  $9.5 \times 10^7$  cfu/g을 확인되었다. FD-3-1은 초기에  $6.7 \times 10^8$  cfu/g 이었으며, 98일에는  $5.5 \times 10^7$  cfu/g을 확인되었다. FD-4-1은 초기에  $7.3 \times 10^8$  cfu/g 이었으며, 98일에는  $4.4 \times 10^7$  cfu/g을 확인되었다. FD-5-1은 초기에  $7.2 \times 10^8$  cfu/g 이었으며, 98일에는  $2.3 \times 10^7$  cfu/g을 확인되었다.

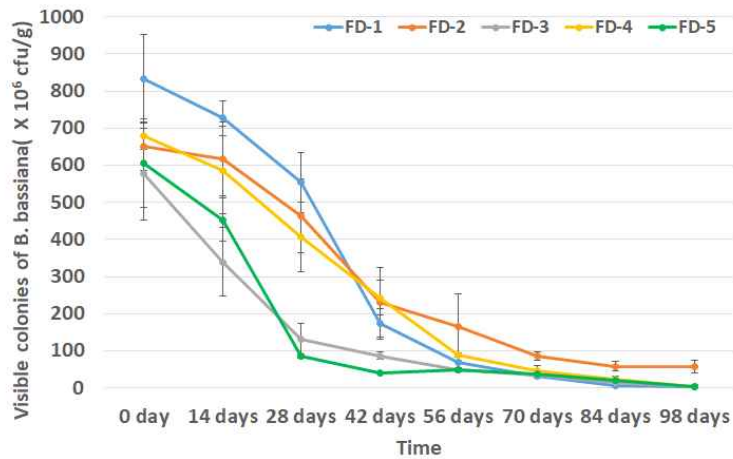
진균 동결건조물 저장시  $30^{\circ}\text{C}$  보다는  $4^{\circ}\text{C}$ 에 저장하는 것이 포자 발아율을 높였으며, 동결건조시 Ascorbic acid를 첨가하는 것이 포자 발아율이 높았음을 확인하였다. 이리써 동결건조시 Ascorbic acid를 첨가하며, 동결건조물을  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하는 것이 효과적인 것으로 나타났다.

[표 8] 동결건조 보조제 조성표

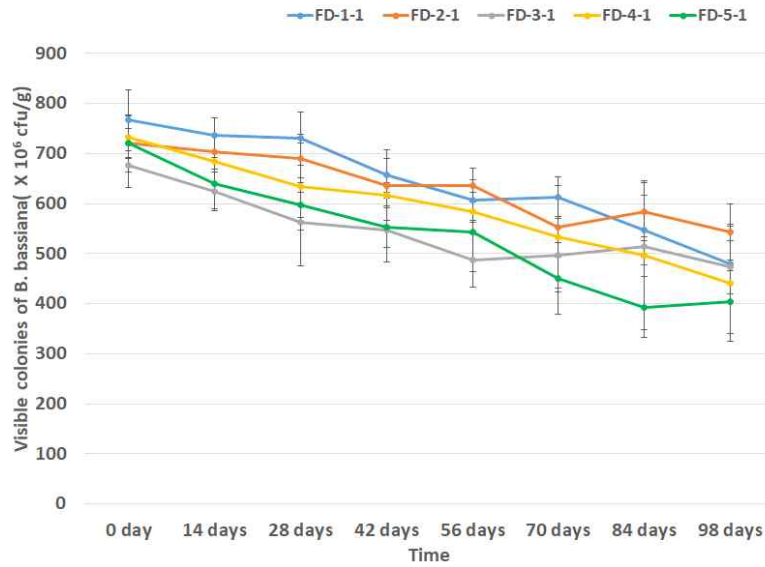
	FD-1	FD-2	FD-3	FD-4	FD-5
Protectant composition (FD-X)	Skim milk 10% Glycerin 0.8%	Skim milk 10% Corn starch 10% Glycerin 0.8%	Skim milk 10% Lactose 10% Glycerin 0.8%	Skim milk 10% Maltodextrin 10% Glycerin 0.8%	Skim milk 10% Trehalose 10% Glycerin 0.8%
Protectant composition (FD-X-1)	+ Ascorbic acid 2.5%	+ Ascorbic acid 2.5%	+ Ascorbic acid 2.5%	+ Ascorbic acid 2.5%	+ Ascorbic acid 2.5%



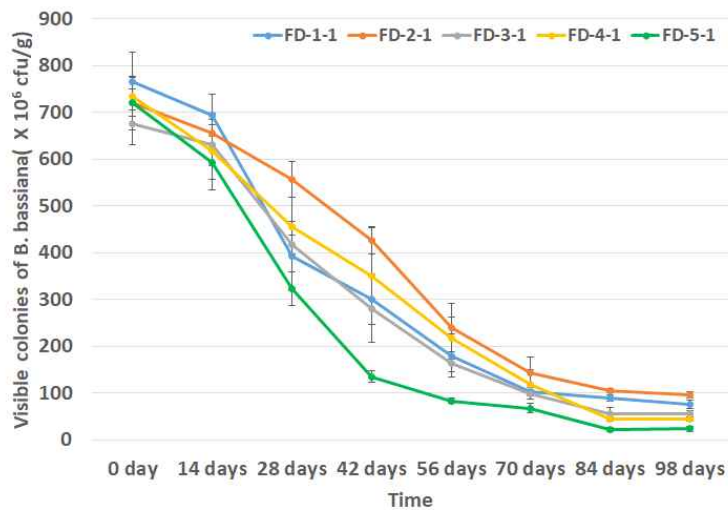
[그림 24] 4°C 저장시 동결건조물의 발아율에 미치는 영향



[그림 25] 30°C 저장시 동결건조물의 발아율에 미치는 영향



[그림 26] 4°C 저장시 동결건조물의 발아율에 미치는 영향



[그림 27] 30°C 저장시 동결건조물의 발아율에 미치는 영향

#### 나. 분상 제형화

분상형 시제품 제형화시 동결 조성은 FD-2-1로 하여 동결건조물을 분상 부형제를 혼합하여 분상 제형화를 실시하였다. 분상 제형의 조성은 표 9와 같으며, 최소 진균의 농도는  $1.0 \times 10^7$  cfu/g가 되도록 하였다(그림 28). 또한 MKB-2에서 파생된 제형으로 진균 동결건조 분말의 함량을 조절하여 MKB-21 과 -22를 각각 제형화하였다. 각각의 분상 제형화에 대한 살비활성을 검토하였고, 최종적으로 MKB-21을 선택하였다.

MKB-21 분상 제형의 *B. bassiana*의 발아율을 그림 29와 같으며, 25°C에 방치하고 30일 간격으로 발아율을 검토하였다. 초기 농도는  $5.6 \times 10^7$  cfu/g이었고, 30일 경과 후  $2.9 \times 10^7$  cfu/g, 60일 경과 후  $1.8 \times 10^7$  cfu/g, 90일 경과 후  $9.9 \times 10^6$  cfu/g로 감소하였다.

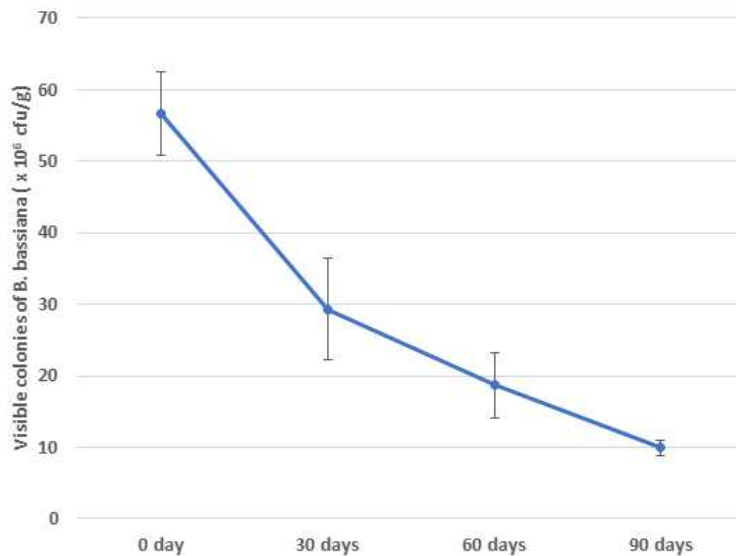
[표 9] 분상 제형 조성

구분	MKB-1(%)	MKB-2(%)	MKB-21 <sup>a</sup> (%)	MKB-22 <sup>b</sup> (%)
진균동결건조분말	40	40	20	10
무수포도당	50	60	80	90
규조토	10	-	-	-
합계	100	100	100	100

a, b : MKB-21 파생 제형



[그림 28] 최종 후보 분상 제형 시제품 (MKB-21)



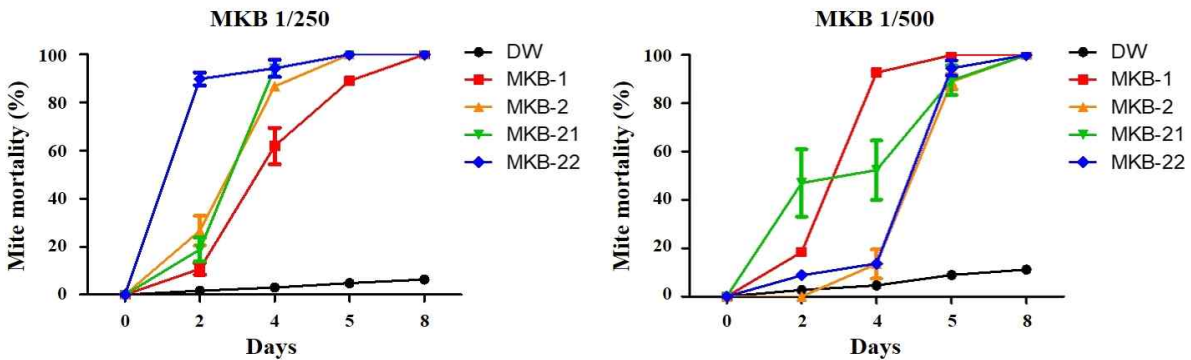
[그림 29] 분상 제형 시제품 발아율

#### 다. 분상 제형의 살비 테스트

액상 배양된 *B. bassiana*를 동결건조하여 제작한 건조물을 활용하여 4종의 분상제형이 제작되었다. 제작된 분상제형에 대한 살비활성을 확인하기 위해서 산란계 농장에서 채집된 닭진드기를 Insect breeding dish에 옮긴 후 3일간 안정을 취하였다. 그 후 제작된 4종의 분상제형을 멸균 증류수 250배 및 500배 희석하여 살포하였다. 각각 dish당 제형 희석액 2mL를 살포하였고, 음성 대조군은 멸균 증류수를 살포하였다. 살포 주기는 4일 간격 3회 살포하였고, 살포 24

시간 후에 움직임 없는 개체는 치사한 닭진드기로 간주하였다.

그 결과 1/250 희석조건에서 MKB-22가 2일차에 89.90%의 신속하고 높은 살비효과를 나타내었으며, MKB-1, -2, -21, -22 모두 접종 8일차에 100%의 살비효과가 관찰되었다. 그리고 1/500 희석조건에서는 MKB-1이 접종 4일차에 92.73%의 신속하고 높은 살비효과를 나타냈으며, 1/250 조건과 동일하게 8일차에 모두 100%의 살비효과가 관찰되었다(그림 30). 전체적으로 1/250 희석조건이 신속한 효과를 보여 현장테스트에서는 1/250 희석조건으로 수행하는게 적합한 것으로 판단되었다.



[그림 30] MKB의 농도별 살비효과

## 2. 액상제형

### 가. o/w 제형

살비활성이 확인된 정향, 계피, 마늘 오일과 진균 배양액을 액상 제형화하기 위해서 유화제 조건을 검토하였다. 계면활성제는 친환경 살충제 및 화장품 등에서 광범위하게 사용되는 Tween-80과 Span-80을 이용하여 유화제 조성을 구성하였다(표 10). 유화제 조성에 따른 o/w 제형을 제작하였고, 사용 오일은 정향오일을 사용하였으며, 24시간 경과 후 층 분리 유무를 확인하였다. 그 결과 80mix-11 23%, 정향오일 10%, 진균 배양액 10%, 물 57% 조성에서 층 분리가 발생하지 않았다(표 11).

o/w 제형은 표 5의 조성을 기준으로 하였으며, 오일은 정향, 계피 및 3oil을 각각 조성하였다. 3oil은 정향, 계피, 마늘을 각각 1:1:1 비율로 혼합된 혼합 오일로 구성하여 사용하였다(표 12).

[표 10] 유화제 조성

구분	Span 80(%)	Tween 80(%)
80mix-9	58	44
80mix-11	35	65
80mix-13	18	82

[표 11] o/w 제형 제작을 위한 조성

유화제	유화제 함량(%)	오일 함량(%)	배양액 함량(%)	물 함량(%)	층분리 유무
80mix-9	23	10	67	-	×
	23	10	10	57	×
	37	16	10	37	×
80mix-11	23	10	67	-	×
	23	10	10	57	○
	37	16	10	37	△
80mix-13	23	10	67	-	×
	23	10	10	57	×
	37	16	10	37	×

층 분리 : ×, 부분적으로 층 분리 : △, 층 분리되지 않음 ; ○

[표 12] o/w 제형 조성

구분	Bbsup-cin(%)	Bbsup-clo(%)	Bbsup-3oil(%)
Bb 배양액	10	10	10
물	57	57	57
오일	10(계피)	10(정향)	10(계피,정향,마늘)
80mix-11	23	23	23
합계	100	100	100

#### 나. 오일 제형

살비 활성이 있는 정향, 라벤더 샘플 오일로 구성된 오일 제형을 조성하였다. 오일 제형은 샘플오일, 유화제, 증량제로 구성되었다(표 13). 유화제는 80mix-11을 사용하였고, 증량제로는 Corn oil을 사용하였다.

[표 13] 오일 제형 조성

구분	10	20	30	40	비고
오일	10%	20%	30%	40%	라벤더, 정향
80mix-11	23%	23%	23%	23%	유화제
Corn oil	67%	57%	47%	37%	증량제
합계	100%	100%	100%	100%	

#### 다. 혼합 제형

살비 활성이 있는 오일과 진균 동결건조분말로 구성된 혼합 제형을 조성하였다. 혼합 제형은 오일, 진균 동결건조분말, 유화제, 증량제, 보조제로 구성되었다(표 14), 유화제는 80mix-11을 사용하였고, 증량제로는 Corn oil을 사용하였다. 살비 활성 진균 *B. bassiana* 동결건조 분말과 살비활성 오일을 혼합한 제형에서 진균의 안정성을 확인하기 위해서 *B. bassiana*의 발아율을 검토하였다. 혼합제형은 25℃ 온도에 보관하였다.

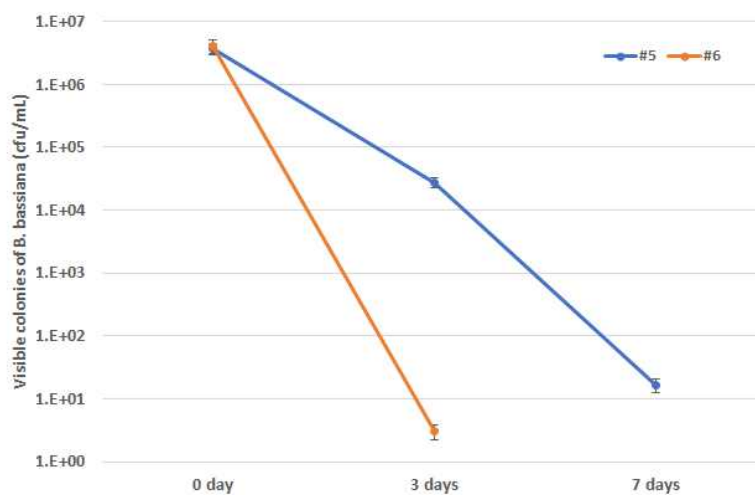
살비활성 오일과 진균 동결건조분말로 구성된 혼합 제형에서의 *B. bassiana* 발아율은 그림 31과 같다. #5제형의 경우 초기 *B. bassiana*의 농도는  $3.7 \times 10^6$  cfu/mL 이었고, 3일차에서는  $2.8 \times 10^4$  cfu/mL, 7일차에서는 거의 사멸하였다. #6제형의 경우 초기 *B. bassiana*의 농도는



4.1 × 10<sup>6</sup> cfu/mL 이었고, 3일차에서는 거의 사멸하였다. 이러한 결과로 미루어 보아, 진균 동결건조분말과 오일을 혼합 제형화하여 제품화하는 것은 부적합한 것으로 판단하였다.

[표 14] 혼합 제형 조성

구분	#5(%)	#6(%)	비고
진균 동결건조 분말	5	5	<i>B. bassiana</i> 동결건조 분말
라벤더	50	-	
정향	-	50	
증량제	20	20	Corn oil
유화제	22.5	22.5	80mix-11
보조제	2.5	2.5	Sodium alginate
합계	100	100	



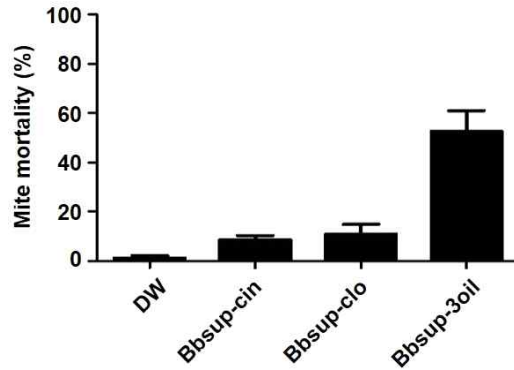
[그림 31] 혼합제형 시제품 발아율

## 라. 액상 제형의 살비 테스트

### (1) o/w 제형 살비테스트

제작된 o/w 제형에 대한 살비활성을 확인하기 위해서 산란계 농장에서 채집된 닭진드기를 insect breeding dish에 옮긴 후 3일간 안정을 취하였다. 그 후 Bbsup-cin, Bbsup-clo, Bbsup-3oil 이상 3종의 제형을 멸균 증류수 250배 희석하여 살포하였다. 각각 dish당 제형 희석액 2mL를 살포하였고, 음성 대조군은 멸균 증류수를 살포하였다. 살포 24시간 후에 움직임 없는 개체는 치사한 닭진드기로 간주하였다. 살비 테스트는 3회 실시하였다.

그 결과 살포 후 24시간에 살비효과로 Bbsup-cin 8.61%, Bbsup-clo 10.96%, Bbsup-3oil 59.25%의 효과가 관찰되었다. 현재 접종 후 24시간에 100%의 살비효과가 목표이기 때문에 3종의 액상제형은 적합하지 않는 것으로 판단되었다(그림 32).

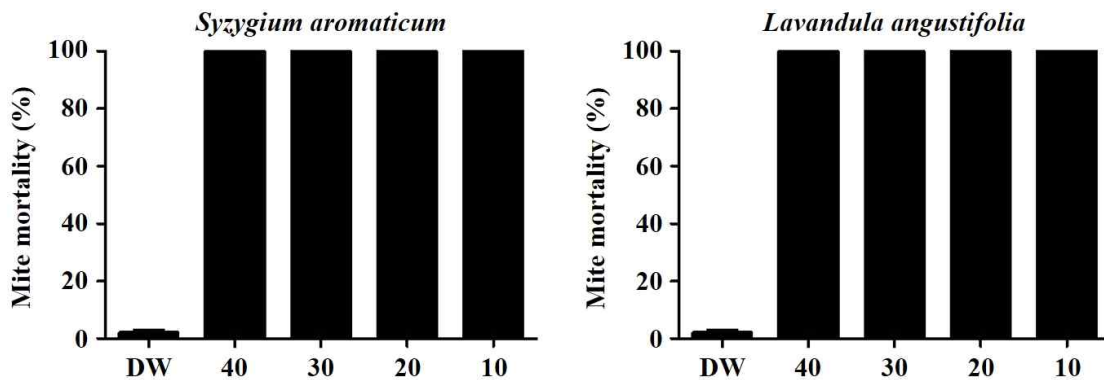


[그림 32] 액상 제형 3종의 살비효과

## (2) 오일제형 살비 테스트

상기 표 13의 구성에 따른 오일제형의 살비 활성을 검토하고자 산란계 농장에서 채집된 닭진드기를 Insect breeding dish로 이주시켜 3일 동안 안정화한 후에 테스트를 수행하였다. 적용 희석 농도는 250배 희석하였으며, 멸균 증류수로 희석하였다. 무처리구는 멸균 증류수를 살포하였다. 각각의 dish당 2mL 제형 희석액을 살포하였고, 4일 간격 3회 살포하였다. 살포 24시간 후에 움직임 없는 개체는 치사한 닭진드기로 간주하였고, 3회 반복 수행하였다.

그 결과 정향(Sa)과 라벤더(La) 오일제형 모두 살포 후 24시간에 100%의 살비효과를 나타내었다. 따라서 최종적으로 두 오일제형을 모두 상품화 가치가 있는 것으로 판단되며, 제품 생산에 필요한 단가를 고려하여 두 제형 중에 하나를 선택할 수 있게 되었다(그림 33).



[그림 33] 라벤더 제형 및 정향 제형의 농도별 살비효과

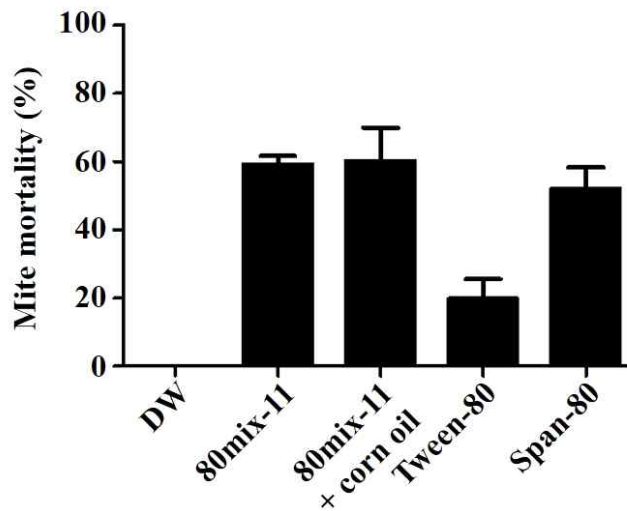
오일 제형시 첨가되는 유화제 및 증량제 오일에 대한 살비활성 유무를 검토하였다. 표 15와 같이 구성하였다. 적용 희석배율을 250배 희석하였으며, 닭진드기 치사 유무는 상기의 방법으로 수행하였다.

그 결과, 80mix-11 단독에서는 59.10%, 80mix-11, Corn oil 혼합에서 60.21%, Tween-80 단독에서 19.78%, Span-80 단독에서 52.05%의 살비효과가 관찰되었다. 전체적인 결과로 제형에 포함된 Span-80 및 Tween-80에서 살비효과가 나타났으며 결론적으로 80mix-11은 두 성분이 함께 60.21%의 살비효과를 나타내는 것이 확인되었다(그림 34). 따라서 식물오일뿐만 아니라 제형을 위한 기타 성분에서 살비효과를 보임으로써 고가의 식물오일을 절약하여 제품단가를 낮

추는 기대효과를 갖게 되었다.

[표 15] 보조제의 살비활성 테스트를 위한 조성

구분	성분명
	세부성분
Composition 1	멸균수
Composition 2	80mix-11
Composition 3	80mix-11 & Corn oil
Composition 4	Tween 80
Composition 5	Span 80

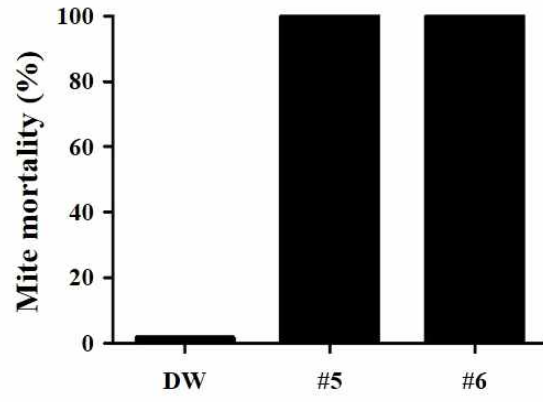


[그림 34] 제형에 포함된 오일 외 기타 성분들의 살비효과

### (3) 혼합제형 살비 테스트

*B. bassiana* 동결건조 분말과 오일을 혼합한 표 14의 제형에 대한 살비 활성을 검토하였다. 살비 활성을 검토하고자 산란계 농장에서 채집된 닭진드기를 Insect breeding dish로 이주시켜 3일 동안 안정화한 후에 테스트를 수행하였다. 적용 희석 농도는 250배 희석하였으며, 멸균 증류수로 희석하였다. 무처리구는 멸균 증류수를 살포하였다. 각각의 dish당 2mL 제형 희석액을 살포하였고, 4일 간격 3회 살포하였다. 살포 24시간 후에 움직임 없는 개체는 치사한 닭진드기로 간주하였고, 3회 반복 수행하였다. 혼합제형은 제작 24시간동안 실온에서 방치한 샘플을 사용하였다.

그 결과, 최종적인 혼합제형 #5, #6 모두에서 살포 후 24시간에 100%의 살비효과가 관찰되었다(그림 35).



[그림 35] 혼합제형 2종의 살비효과

## 5절. 시제품 독성 및 안전성 테스트

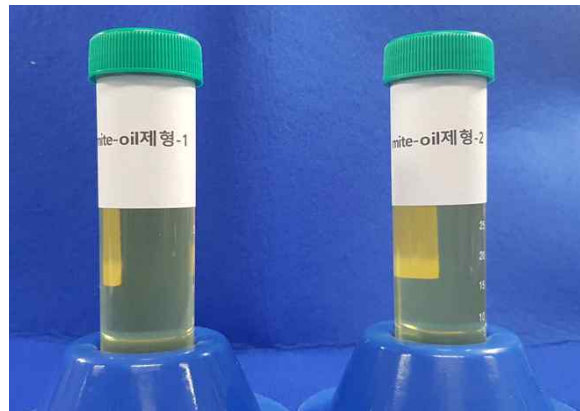
### 1. 오일 제형 시제품의 잔류농약 테스트

오일 제형 시제품에 대한 잔류농약 분석을 수행하였다. 오일 제형 시제품의 조성은 표 16와 같이 조성하였으며 제작하였다(그림 36). 잔류농약시험분석 공인기관에 의뢰하여 국립농산물품질관리원 기준에 준하여 잔류농약을 검사하였다.

mite-oil제형-1은 잔류농약성분 320종 및 Emamectin benzoate, Nitenpyram을 비롯하여 322종을 분석한 결과, 해당 잔류농약 성분이 검출되지 않았다. mite-oil제형-2는 산란계에서 검사하는 잔류농약 성분 329을 검사한 결과, 해당 잔류농약성분이 검출되지 않았다(그림 37).

[표 16] 오일제형 시제품 조성

	mite-oil제형-1	mite-oil제형-2	비고
정향	20%	20%	
계피	20%	20%	
마늘	10%	-	
유화제	23%	23%	80mix-11
증량제	27%	37%	Corn oil
합계	100%	100%	



[그림 36] 오일 제형 시제품

mite-오이제형-1	mite-오이제형-2																																																								
<b>시험 성적서 (Test Certificate)</b> <div style="float: right; font-size: small;">           접수번호 PCAM - 1910 - 0550            페이지 ( 1 ) / ( 총 1 )         </div>	<b>시험 성적서 (Test Certificate)</b> <div style="float: right; font-size: small;">           접수번호 PCAM - 1911 - 0154            페이지 ( 1 ) / ( 총 1 )         </div>																																																								
우 34036 대전광역시 유성구 테크노 11로 12 (탑합동 867) / 전화 (042)823-8680-1 / 전송 (042)823-8682	우 34036 대전광역시 유성구 테크노 11로 12 (탑합동 867) / 전화 (042)823-8680-1 / 전송 (042)823-8682																																																								
<b>1. 시료내용</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; font-size: x-small;"> <tr> <td>기관명</td><td>제노바이오</td><td>의뢰일자</td><td>2019년 10월 15일</td></tr> <tr> <td>시료명</td><td colspan="3">mite-오이제형-1</td></tr> <tr> <td>생산지/주소</td><td colspan="3">대전광역시 대덕구 신일서로18번길 16</td></tr> <tr> <td>의뢰자</td><td>제노바이오</td><td>시험장소</td><td>분석실</td></tr> <tr> <td>시험기간</td><td>2019년 10월 15일 ~ 2019년 10월 21일</td><td>분석장비</td><td>LC-MS/MS, GC-MS/MS, GC-MS, GC</td></tr> <tr> <td>용도</td><td>참고용</td><td>시험환경온도</td><td>(22 ~ 24) °C</td></tr> <tr> <td></td><td></td><td>시험환경습도</td><td>70 % R.H 이하</td></tr> </table>	기관명	제노바이오	의뢰일자	2019년 10월 15일	시료명	mite-오이제형-1			생산지/주소	대전광역시 대덕구 신일서로18번길 16			의뢰자	제노바이오	시험장소	분석실	시험기간	2019년 10월 15일 ~ 2019년 10월 21일	분석장비	LC-MS/MS, GC-MS/MS, GC-MS, GC	용도	참고용	시험환경온도	(22 ~ 24) °C			시험환경습도	70 % R.H 이하	<b>1. 시료내용</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; font-size: x-small;"> <tr> <td>기관명</td><td>제노바이오</td><td>의뢰일자</td><td>2019년 11월 5일</td></tr> <tr> <td>시료명</td><td colspan="3">mite-오이제형-2</td></tr> <tr> <td>생산지/주소</td><td colspan="3">대전광역시 대덕구 신일서로18번길 16</td></tr> <tr> <td>의뢰자</td><td>제노바이오</td><td>시험장소</td><td>분석실</td></tr> <tr> <td>시험기간</td><td>2019년 11월 5일 ~ 2019년 11월 12일</td><td>분석장비</td><td>LC-MS/MS, GC-MS/MS, GC-MS, GC</td></tr> <tr> <td>용도</td><td>참고용</td><td>시험환경온도</td><td>(22 ~ 24) °C</td></tr> <tr> <td></td><td></td><td>시험환경습도</td><td>70 % R.H 이하</td></tr> </table>	기관명	제노바이오	의뢰일자	2019년 11월 5일	시료명	mite-오이제형-2			생산지/주소	대전광역시 대덕구 신일서로18번길 16			의뢰자	제노바이오	시험장소	분석실	시험기간	2019년 11월 5일 ~ 2019년 11월 12일	분석장비	LC-MS/MS, GC-MS/MS, GC-MS, GC	용도	참고용	시험환경온도	(22 ~ 24) °C			시험환경습도	70 % R.H 이하
기관명	제노바이오	의뢰일자	2019년 10월 15일																																																						
시료명	mite-오이제형-1																																																								
생산지/주소	대전광역시 대덕구 신일서로18번길 16																																																								
의뢰자	제노바이오	시험장소	분석실																																																						
시험기간	2019년 10월 15일 ~ 2019년 10월 21일	분석장비	LC-MS/MS, GC-MS/MS, GC-MS, GC																																																						
용도	참고용	시험환경온도	(22 ~ 24) °C																																																						
		시험환경습도	70 % R.H 이하																																																						
기관명	제노바이오	의뢰일자	2019년 11월 5일																																																						
시료명	mite-오이제형-2																																																								
생산지/주소	대전광역시 대덕구 신일서로18번길 16																																																								
의뢰자	제노바이오	시험장소	분석실																																																						
시험기간	2019년 11월 5일 ~ 2019년 11월 12일	분석장비	LC-MS/MS, GC-MS/MS, GC-MS, GC																																																						
용도	참고용	시험환경온도	(22 ~ 24) °C																																																						
		시험환경습도	70 % R.H 이하																																																						
<b>2. 잔류농약검사결과</b> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">           검사항목 322 성분             * 국립농산물품질관리원 비공개성분 320성분            추가성분 : Emamectin benzoate, Nitenpyram         </div> <p style="font-size: x-small;">** 국립농산물품질관리원 지침에의해 농약항목을 미표기함.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; font-size: x-small;"> <tr> <td>결과 (mg/kg)</td><td colspan="2">상기항목 불검출</td></tr> <tr> <td rowspan="2">확인</td> <td>작성자 (시험자)</td><td>승인자 (기술책임자)</td></tr> <tr> <td>성명 : 장지혜 </td><td>성명 : 김현영 </td></tr> </table> <p style="font-size: x-small;">* 본 분석결과를 선진·광고·소송 등 법적요건으로 사용할 수 없습니다.  * 위의 내용은 신청인이 제출한 시료에 대한 결과이며, 시료의 명칭은 신청인이 제시한 것입니다.  * 이 시험성적서는 용도 이외의 사용을 금합니다.</p> <p style="text-align: center;">2019년 10월 21일  <b>주식회사 피켄코리아</b> </p> <p style="font-size: x-small;">서자P-A-210-02 (11-02-21 승안) <span style="float: right;">A4(210x297)</span></p>	결과 (mg/kg)	상기항목 불검출		확인	작성자 (시험자)	승인자 (기술책임자)	성명 : 장지혜	성명 : 김현영	<b>2. 잔류농약검사결과</b> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">           검사항목 329 성분             * 국립농산물품질관리원 비공개성분 320성분            추가 성분 : 9성분         </div> <p style="font-size: x-small;">** 국립농산물품질관리원 지침에의해 농약항목을 미표기함.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; font-size: x-small;"> <tr> <td>결과 (mg/kg)</td><td colspan="2">상기항목 불검출</td></tr> <tr> <td rowspan="2">확인</td> <td>작성자 (시험자)</td><td>승인자 (기술책임자)</td></tr> <tr> <td>성명 : 장지혜 </td><td>성명 : 김현영 </td></tr> </table> <p style="font-size: x-small;">* 본 분석결과를 선진·광고·소송 등 법적요건으로 사용할 수 없습니다.  * 위의 내용은 신청인이 제출한 시료에 대한 결과이며, 시료의 명칭은 신청인이 제시한 것입니다.  * 이 시험성적서는 용도 이외의 사용을 금합니다.</p> <p style="text-align: center;">2019년 11월 12일  <b>주식회사 피켄코리아</b> </p> <p style="font-size: x-small;">서자P-A-210-02 (11-02-21 승안) <span style="float: right;">A4(210x297)</span></p>	결과 (mg/kg)	상기항목 불검출		확인	작성자 (시험자)	승인자 (기술책임자)	성명 : 장지혜	성명 : 김현영																																								
결과 (mg/kg)	상기항목 불검출																																																								
확인	작성자 (시험자)	승인자 (기술책임자)																																																							
	성명 : 장지혜	성명 : 김현영																																																							
결과 (mg/kg)	상기항목 불검출																																																								
확인	작성자 (시험자)	승인자 (기술책임자)																																																							
	성명 : 장지혜	성명 : 김현영																																																							

[그림 37] 잔류농약검사 성적서

## 2. 분상제형 시제품의 독성 테스트

*B. bassiana* 동결건조분말이 주성분인 분상제형 시제품에 대한 독성 테스트는 MKB-21 시제품으로 수행하였다. MKB-21의 *B. bassiana* 농도는  $2.0 \times 10^7$  cfu/g 이며, 적용 농도는 500배 희석하여 테스트를 수행하였다. 독성 검사는 급성경구투여독성시험, 안점막자극성시험 및 피부자극성시험을 수행하였고, 독성 공인시험기관은 (주)한국생물안전성연구소에서 진행하였다.

MKB-21의 독성 테스트 결과는 표 17, 그림 38, 그림 39 및 그림 40과 같으며, 무자극 저독성으로 확인되어 이 제형으로 현장 적용 테스트를 수행하고자 하였다. 추후 동물의약외품을 등록하기 위한 급성독성시험, 아급성독성시험, 만성독성시험, 생식독성시험, 변이원성시험, 암원성시험, 미생물학적 독성시험, 국소독성시험, 면역계 이상 시험에 대한 독성 시험이 요구된다.

[표 17] 독성시험 결과 요약

시험항목	시험결과	실험동물	비고
급성경구투여독성	LD <sub>50</sub> 값: >2000mg/kg bw 급성독성 IV급 (저독성)	SD 랫드	그림 38
안점막자극성	급성안자극지수 (A.O.I) : 0.7 (자극 없음)	토끼 (New Zealand white)	그림 39
피부자극성	피부자극지수 (P.I.I) : 0.0 (자극 없음)	토끼 (New Zealand white)	그림 40

### 최종보고서

### 랫드에 대한 MKB-21의 급성경구독성시험

ETO-19056



(주)한국생물안전성연구소

KBSI

### 제 출 문

시험물질 : MKB-21  
시험제목 : 랫드에 대한 MKB-21의 급성경구독성시험

상기 독성시험을 "농약 및 원제의 등록기준" [별표 1의 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청고시 제2019-26호)에 준하여 실시하고 그 결과를 다음과 같이 제출합니다.

2019년 12월 18일  
㈜한국생물안전성연구소  
시험책임자 **염지영**

KBSI

### 목 차

[Contents]

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

KBSI

5.3. 부검소견	11
5.4. 반수지사약량 (LD <sub>50</sub> )	11
6. 참고문헌 [References]	12
7. Tables [Group summary]	13
Table 1. Mortality and clinical signs	13
Table 2. Mean body weights	13
8. Appendices [Individual data]	14
Appendix 1. Mortality of rats	14
Appendix 2. Clinical signs of rats	15
Appendix 3. Body weights	16
Appendix 4. Macroscopical findings necropsy	17

KBSI

5.3. 부검소견 ..... 11  
 5.4. 반수치사약량 (LD<sub>50</sub>) ..... 11  
 6. 참고문헌 [References] ..... 12  
 7. Tables [Group summary] ..... 13  
 Table 1. Mortality and clinical signs ..... 13  
 Table 2. Mean body weights ..... 13  
 8. Appendices [Individual data] ..... 14  
 Appendix 1. Mortality of rats ..... 14  
 Appendix 2. Clinical signs of rats ..... 15  
 Appendix 3. Body weights ..... 16  
 Appendix 4. Macroscopical findings necropsy ..... 17



2. 시험실시의 개요 [Introduction]

- 2.1. 시험제목  
 랫드에 대한 MKB-21의 급성경구독성시험
- 2.2. 시험물질  
 MKB-21
- 2.3. 시험목적  
 랫드에 대한 MKB-21의 급성경구독성시험을 통하여 시험물질에 대한 기초자료로 활용코자 한다.
- 2.4. 시험방법  
 "농약 및 원제의 등록기준" [별표 12] 연속독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청고시 제2019-26호) 중 12-1-20 급성경구독성시험법 (급성독성등급법에 준하여 실시하였다).
- 2.5. 시험의뢰자  
 명칭 제노바이오  
 소재지 대전광역시 태학구 신일서로 18번길 16
- 2.6. 시험기관  
 명칭 ㈜한국생물안전성연구원  
 소재지 충청북도 음성군 갑곡면 성주로 362-20  
 연락처 Tel : 043-882-0297, Fax : 043-882-0298
- 2.7. 시험장소  
 명칭 ㈜한국생물안전성연구원 동물실험실  
 소재지 충청북도 음성군 갑곡면 성주로 362-20
- 2.8. 시험책임자  
 성명 엄지영  
 소속 ㈜한국생물안전성연구원 독성연구팀

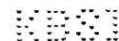


- 2.9. 시험관계자  
 시험물질의 조제 박우근, 박이슬  
 시험물질의 노출 박우근, 박이슬  
 관찰/측정/평가 박우근, 박이슬  
 동물사육관리 박우근, 박이슬
- 2.10. 시험일정  
 동물임수일 2019년 11월 07일 (6 females)  
 검역순화기간 2019년 11월 07일 ~ 2019년 11월 11일 (3 females)  
 2019년 11월 07일 ~ 2019년 11월 14일 (3 females)  
 시험물질 투여일 2019년 11월 12일 (3 females, 2000 mg/kg B.W.)  
 2019년 11월 15일 (3 females, 2000 mg/kg B.W.)  
 일반증상관찰기간 2019년 11월 12일 ~ 2019년 11월 26일 (2000 mg/kg B.W.)  
 2019년 11월 15일 ~ 2019년 11월 29일 (2000 mg/kg B.W.)  
 실험종료 / 부검일 2019년 11월 26일 (3 females, 2000 mg/kg B.W.)  
 2019년 11월 29일 (3 females, 2000 mg/kg B.W.)  
 최종보고서 제출일 2019년 12월 18일
- 2.11. 시험물질의 보관  
 본 시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질 보관고에 보관하였다.  
 시료번호 19-1-077  
 시험물질보관기간 시험종료 후 3년
- 2.12. 시험자료의 보관  
 본 시험의 시험기초자료 및 관계시험성적서는 당 연구소 자료보관실에 보관하였다.  
 시험번호 ETO-19056  
 시험기초자료 자료보관실  
 최종보고서 자료보관실  
 자료하드디스크 자료보관실  
 자료보관기간 시험종료 후 3년  
 자료관리담당자 박선영



3. 시험재료 및 방법 [Materials and Methods]

- 3.1. 시험물질  
 3.1.1. 물질명 MKB-21  
 3.1.2. 입수일 2019년 10월 30일  
 3.1.3. 입수량 100 g  
 3.1.4. 시료번호 19-1-077  
 3.1.5. 성상 및 외관 고상, 연갈색  
 3.1.6. 주원료 Beauveria bassiana, 포도당  
 3.1.7. 주원료 투입비율 100% (Beauveria bassiana 20%+포도당 80%)  
 3.1.8. 균주 Beauveria bassiana 2.0×10<sup>7</sup> cfu/g  
 3.1.9. 보관조건 실온  
 3.1.10. 공급원 제노바이오
- 3.2. 시험동물  
 3.2.1. 시험계 Sprague-Dawley (SD), SPF  
 - Rat  
 3.2.2. 공급원 한림실험동물연구소  
 - 명칭 경기도 화성시 봉담읍 최루백로 313  
 - 소재지 031-227-5955  
 - 연락처
- 3.2.3. 시험계의 선택사유  
 농촌진흥청고시 제 2019-26호 연속독성시험 기준과 방법에 시험동물로 랫드를 추천하고 있으며, 본 계통에 대한 기초자료가 충분해 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다.
- 3.2.4. 주령 및 체중범위  
 [표 1. 시험동물의 주령 및 체중범위]
- | 시험일제 투여 시 | 1단계 (2000 mg/kg B.W.) | 2단계 (2000 mg/kg B.W.) |
|-----------|-----------------------|-----------------------|
| 주령(주)     | 8                     | 8                     |
| 체중(g)     | 195 ~ 207             | 186 ~ 204             |
- 3.2.5. 순화 및 검역  
 시험단계별로 동물을 구입한 후 1단계 및 2단계 시험은 각각 5일, 8일 동안 동물실험실의 환경 하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체를 선별, 본 시험에 사용하였다.





3.3. 사육환경 및 관리

3.3.1. 사육환경

본 시험의 사육환경은 온도 22±3°C, 상대습도 50±20%, 환기시설 (공조기), 조명시간 12시간 (오전8시~오후8시) 및 조도 150~300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

3.3.2. 사육상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육상자 (260×420×180 mm)에 3마리씩 넣어 깔짚을 깔아 사육하였다.

3.3.3. 사료 및 음용수

사료는 방사선 멸균된 사료 (LabDiet)를 자유 급식시켰으며 음용수는 청수필터 통과 및 자외선 살균된 지하수를 자유 섭취시켰다.

3.4. 투여약량수준 설정 및 약제조제

3.4.1. 투여약량수준 설정

시험에 사용된 *Beauveria bassiana* 포도당은 당연구조에서 유기농지체들의 시험한 자료들을 검토하여 1단계 시험에서 최고투여약량인 2000 mg/kg B.W.로 투여하였고, 투여 후 72시간 동안 치사 및 일반중독증상이 관찰되지 않아, 동일한 농도로 투여약량을 설정하여 2단계 시험을 실시하였다.

3.4.2. 실험동물 수 / 개체식별

실험동물 수는 각 단계별 암컷 3마리를 1군으로 하였으며, 개체식별은 유성매직을 사용하여 각 개체의 미부에 표시하고, 사육상자에 개체식별 라벨을 부착하여 식별하였다.

3.4.3. 용매대조군의 설정

중류수를 시험물질을 조제하여 용매대조군은 따로 설정하지 않았다.

3.4.4. 용매의 선택과 시험용액 조제

- 1단계 / 2단계 시험 (2000 mg/kg B.W.)  
시험용액은 1단계 및 2단계 시험에서 투여직전 각각 동일하게 조제하여 시험에 사용하였고, 시험용액 조제 시 용매는 2차 중류수를 사용하였으며 시험물질이 고상으로 막자사발을 이용하여 분쇄하고 표준제(Standard test sieve, 250µm)로 통과시켜 미세한 분말을 만들어 자울로 2.0 g을 정확히 평량하여 5 mL의 volumetric flask에 넣고 2차 중류수를 표시까지 정용한 후 vortex로 충분히 혼합하여 시험용액 (test solution)으로 사용하였다.

3.4.5. 투여역량 (volume) 설정

투여역량은 5 mL/kg B.W.로 설정하였다.

3.5. 시험물질의 투여

3.5.1. 사료의 절식

시험물질 투여개시 하룻밤 전부터, 시험물질 투여 후 3시간 동안은 먹이를



주지 않았다.

3.5.2. 투여경로 및 투여방법

렛드 경구투여용 зонде (Sonde)를 이용하여 투여 전 체중 측정치를 기준으로 소정의 시험물질 투여역량을 산출한 후, 경구투여 경로로 워너 1회에 한하여 강제 투여하였다.

4. 관찰 및 측정 (Observation and Determination)

4.1. 일반중독증상 및 치사동물

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

4.2. 체중측정

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

4.3. 부검

실험종료일에 모든 개체에 대하여 부검을 실시하였다.

4.4. 반수치사약량 (LD50) 산출

급성경구독성 시험을 독성등급법에 의해 실시하여 LD50을 산출하였으며, 농약관리법 시행규칙 [별표 3의5] 농약등의 독성 및 잔류성정도별 구분에 준하여 독성을 구분하였다.

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

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

a : Classification systems of Acute toxicity for pesticides in Korea

b : Globally Harmonized Classification System



5. 시험결과 (Results)

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

MKB-21은 1단계 및 2단계 시험 투여약량 2000 mg/kg B.W.에서 일반중독증상을 보이지거나 지사한 개체가 관찰되지 않았다.

5.2. 체중변화 (Table 2, Appendix 3)

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

5.3. 부검소견 (Appendix 4)

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

5.4. 반수치사약량 (LD<sub>50</sub>)

랫드에 대한 MKB-21의 급성경구독성시험 결과, LD<sub>50</sub>값은 2000 mg/kg B.W. 초과이며 농약관리법 시행규칙 [별표 3의5] 농약등의 독성 및 잔류성정도별 구분에 의거 IV급 (저독성)으로 구분되었다.



6. 참고문헌 (References)

- 농촌진흥청 (2019) 농촌진흥청 고시 제2019-26호 「농약 및 원재의 등록기준」, [별표 1.2] 연속독성시험 기준과 방법 (2019.09.02)
- 국립농산물관질관리원 (2019) 국립농산물관질관리원 고시 제2019-5호 「유기농업자재 공시 기준」, (2019.06.17)
- OECD (2001) OECD. Guideline for testing chemicals. 423. 「Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method」, (2001.12.17)



7. Tables [Group summary]

Table 1. Mortality and clinical signs

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

a : Number of dead animals/Number of tested animals

Table 2. Mean body weights

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Number of animals	Days after administration (g)		
				0	7	14
1	2000	Female	3	199.7 ± 6.4 <sup>a</sup>	219.0 ± 7.0	228.7 ± 6.5
2	2000	Female	3	192.3 ± 10.1	225.3 ± 17.1	235.7 ± 17.5

a : Mean ± standard deviation



8. Appendices [Individual data]

Appendix 1. Mortality of rats

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

a : Number of dead animals



Appendix 2. Clinical signs of rats

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

a : No abnormality detected



Appendix 3. Body weights

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Number of animals	Days after administration (g)					Gain
				0	3	7	14		
1	2000	Female	1	195	205	212	222	27.0	
			2	197	208	219	235	38.0	
			3	207	216	226	229	22.0	
			Mean	199.7	209.7	219.0	228.7	29.0	
			S.D. <sup>a</sup>	6.4	5.7	7.0	6.5	-	
2	2000	Female	1	186	191	214	221	35.0	
			2	187	193	217	231	44.0	
			3	204	209	245	255	51.0	
			Mean	192.3	197.7	225.3	235.7	43.3	
			S.D.	10.1	9.9	17.1	17.5	-	

a : Standard Deviation



Appendix 4. Macroscopical findings necropsy

- Group 1 (2000 mg/kg B.W.)

Animal 1 Planned necropsy (Final necropsy) 26-Nov-2019  
No Findings Noted

Animal 2 Planned necropsy (Final necropsy) 26-Nov-2019  
No Findings Noted

Animal 3 Planned necropsy (Final necropsy) 26-Nov-2019  
No Findings Noted

- Group 2 (2000 mg/kg B.W.)

Animal 1 Planned necropsy (Final necropsy) 29-Nov-2019  
No Findings Noted

Animal 2 Planned necropsy (Final necropsy) 29-Nov-2019  
No Findings Noted

Animal 3 Planned necropsy (Final necropsy) 29-Nov-2019  
No Findings Noted

KBSI

[그림 38] 급성경구투여독성시험 결과보고서

최종보고서

New Zealand White계 토끼에 대한 MKB-21의  
안점막자극성시험

ETE-19054



(주)한국생물안전성연구소



제 출 문

시험물질 : MKB-21

시험제목 : New Zealand White계 토끼에 대한 MKB-21의 안점막자극성시험

상기 독성시험을 "농약 및 원제의 등록기준" [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청고시 제 2019-26호)에 준하여 실시하고 그 결과를 다음과 같이 제출합니다.

2019년 12월 18일

(주)한국생물안전성연구소

시험책임자 엄지영



목 차  
[Contents]

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



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

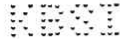


1. 요약 [Summary]

New Zealand White계 토끼에 대한 MKB-21의 안점막자극성시험을 수행하여 일반중독증상, 치사수, 체중변화 및 안점막 자극증상을 관찰조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험물질 0.1 g을 New Zealand White계 토끼에 투여한 결과 시험기간 중 일반중독증상 및 자사동물은 관찰되지 않았다.
○ 체중측정결과 모든 개체에서 체중이 시간이 경과함에 따라 증가하였다.
○ 비세척군의 급성안자극지수 (A.O.I.)는 '0.7'로 산출되었다.

이상의 결과, MKB-21의 안점막자극성시험에서 비세척군의 자극성은 [안점막자극표]에 의거 "없음"으로 구분되었다.



2. 시험실시의 개요 [Introduction]

2.1 시험제목

New Zealand White계 토끼에 대한 MKB-21의 안점막자극성시험

2.2 시험물질

MKB-21

2.3 시험목적

멧드에 대한 MKB-21의 급성경구독성시험을 통하여 시험물질에 대한 기초자료로 활용코자 한다.

2.4 시험방법

"농약 및 원제의 등록기준" (별표 12) 안독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청고시 제2019-26호)에 준하여 실시하였다.

2.5 시험의뢰자

명칭: 제노바이오
소재지: 대전광역시 대덕구 신일서로 18번길 16

2.6 시험기관

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

2.7 시험장소

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

2.8 시험책임자

성명: 임지영
소속: ㈜한국생물안전성연구소 독성연구팀



2.9. 시험관계자

시험물질의 조제: 박이슬, 박우근
시험물질의 노출: 박이슬, 박우근
관찰/측정/평가: 박이슬, 박우근
동물사육관리: 박이슬, 박우근

2.10. 시험일정

동물입수일: 2019년 11월 07일
검역숙화기간: 2019년 11월 07일 ~ 2019년 11월 11일
2019년 11월 07일 ~ 2019년 11월 18일
시험물질 처리일: 2019년 11월 12일
2019년 11월 19일
일반증상관찰기간: 2019년 11월 12일 ~ 2019년 11월 15일
2019년 11월 19일 ~ 2019년 11월 22일
실험종료일: 2019년 11월 15일
2019년 11월 22일
최종보고서 제출일: 2019년 12월 18일

2.11. 시험물질의 보관

본시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질보관고에 보관하였다.
시료번호: 19-1-077
시험물질보관기간: 시험종료 후 3년

2.12. 시험자료의 보관

본시험의 시험기초자료 및 관계시험성적서는 당 연구소 자료보관실에 보관하였다.
시험번호: ETE-19054
시험기초자료: 자료보관실
최종보고서: 자료보관실
자료하드디스크: 자료보관실
자료보관기간: 시험종료 후 3년
자료관리담당자: 박선영



3. 시험재료 및 방법 [Materials and methods]

3.1 시험물질

- 3.1.1. 물질명: MKB-21
3.1.2. 입수일: 2019년 10월 30일
3.1.3. 입수량: 100 g
3.1.4. 시료번호: 19-1-077
3.1.5. 성상 및 외관: 고상, 연갈색
3.1.6. 주원료: Beauveria bassiana, 포도당
3.1.7. 주원료 투입비율: 100% (Beauveria bassiana 20%+포도당 80%)
3.1.8. 균주: Beauveria bassiana 2.0x10^7 cfu/g
3.1.9. 보관조건: 실온
3.1.10. 공급원: 제노바이오

3.2. 시험동물

3.2.1. 시험계: New Zealand White계 토끼

3.2.2. 공급원

- 명칭: 한림실험동물연구소
- 소재지: 경기도 화성시 봉담읍 최루백로 313
- 연락처: 031-227-5955

3.2.3. 시험계의 선택사유

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

3.2.4. 재증범위

[표 1. 시험동물의 재증범위]

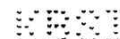
Table with 3 columns: 구분, 입수시 체중 (kg), 처리시 체중 (kg). Rows: 비세척군, 1.8 ~ 2.0, 2.1 ~ 2.2

3.2.5. 순화 및 검역

동물을 구입한 후 초기 및 확인시험 각각 5일, 12일 동안 동물실험실의 환경 하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체를 선별, 시험에 사용하였다.

3.2.6. 군분리

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



3.2.7. 개체식별

사육 상자에 개체식별정보를 부착하여 식별하였다.

3.3. 사육환경 및 관리

3.3.1. 사육환경

본 시험의 사육환경은 온도 20±3°C, 상대습도 50±20%, 환기시설 (공조기계), 조명시간 12시간 (오전8시~오후8시) 및 조도 150~300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

3.3.2. 사육 상자

순화 및 시험기간 중 stainless steel 사육상자 (380×490×345 mm)안에 넣어 사육하였다.

3.3.3. 사료 및 음용수

사료는 토끼용 펠렛사료 [Cargill Agri Purina Korea Inc]를 자유 급식시켰으며 음용수는 정수필터 통과 및 자외선 살균한 지하수를 자유 섭취시켰다.

3.4. 시험물질의 투여

3.4.1. 시험군의 구성

[표 2. 시험군]

군	동물수	최우구분	처리
비제거군	3	라	안
		우	안

3.4.2. 시험물질 조제

시험물질이 고상으로 액자사발을 이용하여 분쇄하고 표준체(Standard test sieve, 250µm)로 통과시켜 미세한 분말로 만들어 시험물질 처리 시 사용하였다.

3.4.3. 투여량 설정

투여량은 투여 개체별로 0.1 g으로 설정하였다.

3.4.4. 투여방법

초기 시험은 1마리의 동물을 사용하였으며 시험동물은 시험개시 전 24시간 이내에 양쪽 눈을 검사하여 눈에 이상이 없는 동물로서 약제처리는 좌안의 하안검을 가볍게 잡아당겨 결막낭 내에 시험물질 0.1 g을 한 번에 넣어 처리하고 시험물질의 손실을 막기 위해 양안검을 느슨하게 맞춰 잡고 약 1초간 유지하였다. 무처리한 우안은 대조부위로 하여 처리부위와 중앙관찰 비교 용도로 활용하였다. 초기 시험에서 심한 눈 손상이 관찰되지 않아 이후 2마리의 동물을 사용하여 확인 시험을 진행하였다.

4. 관찰 및 측정 (Observation and determination)

4.1. 일반중독증상

시험물질 처리 후 72시간까지 일반증상의 변화, 중독증상 및 치사동물의 유무를 관찰하였다.

4.2. 체중 측정

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

4.3. 안반응 (眼反應)의 평가

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

4.4. 자극성의 평가

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

[표 3. 안반응평가표]

1) 각막

(A) 윤탁 : 안구의 노출된 점도(거침 농후한 지점을 관찰함) 평점

- 화농이나 윤탁이 없음 0
- 윤탁이 분산 혹은 밀집되어 있으나(정상적인 투명성이 약간 둔화 된 것과는 다름) 홍채의 말단이 명확히 관찰됨 1
- 반투명한 부분이 쉽게 관찰되면서 홍채의 말단이 약간 불명확함 2
- 건조색깔을 띠면서 홍채의 말단이 관찰되지 않으나 중심이 크기가 가까스로 관찰됨 3
- 각막이 불투명하고 윤탁 때문에 홍채가 관찰안됨 4

(B) 윤탁이 각막의 범위

- 윤탁이 없음 0
- 1/4이하 1
- 1/4이상 1/2미만 2
- 1/2이상 3/4미만 3
- 3/4이상 1개지 4

점수 = A×B×5 최고점 = 80

2) 홍채

(C) 반응치

- 정상 0
- 현저한 주름의 형성, 중첩, 증강 혹은 각막주위에 중첩도의 증진을 보이나

· 홍채가 빛에 대해 반응함	1
· 홍채가 빛에 대한 반응이 없거나 줄임, 또는 대부분이 파괴된 상태	2
점수 = C×5	최고점 = 10

3) 결막

(D) 발적(안검결막, 안구결막에 현출, 홍채 제외)

· 일관 증상	0
· 일부 결막 증진	1
· 일부 흰색물을 띄거나 각막의 혈관이 쉽게 관찰 안됨	2
· 깊은 선홍색	3

(E) 경막부종

· 부풀지 않음	0
· 정상보다 약간 증진(순막 포함)	1
· 안검이 부분적 위전을 동반한 현저한 증진	2
· 눈에 범종 감질 정도의 안검의 증진	3
· 눈에 반 이상 감질 정도의 안검의 증진	4

(F) 배출물

· 배출물 없음	0
· 약간의 배출물(정상동물의 내부 눈코리에서 관찰되는 작은 양은 제외)	1
· 속눈썹과 눈꺼풀을 적실 정도의 배출물	2
· 눈주위의 상당한 부위와 속눈썹 및 눈꺼풀을 적실 정도의 배출물	3
점수 = (D+E+F) × 2	최고점 = 20

[표 4. 안점막자극표]

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

5. 시험결과 (Results)

5.1. 일반중독증상 및 치사동물 수 (Table 1)

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

5.2. 체중변화 (Table 2)

시험물질 처리직전, 처리 후 48 및 72시간에 개체별 체중을 측정하고, 시간이 경과함에 따라 증가추세를 보였다.

5.3. 안반응의 평가 (Table 3)

초기시험 후 심한 눈 손상이 관찰되지 않아 동일한 방법으로 확인시험을 진행하였다. 초기시험 및 확인시험의 안반응 평가 결과는 아래와 같다.

[표 5. 시험군별 연자극지수]

Time	Animal No.	Non treatment			Treatment		
		IOI <sup>a</sup>	MOI <sup>b</sup>	AOI <sup>c</sup>	IOI <sup>a</sup>	MOI <sup>b</sup>	AOI <sup>c</sup>
1 hr	1	0			2		0.7
	2	0	0.0		0	0.7	
	3	0			0		
24 hr	1	0		0.0	0		0.7
	2	0	0.0		0	0.0	
	3	0			0		
48 hr	1	0		0.0	0		0.7
	2	0	0.0		0	0.0	
	3	0			0		
72 hr	1	0		0.0	0		0.7
	2	0	0.0		0	0.0	
	3	0			0		

a. IOI (Individual Ocular Irritation)

b. MOI (Mean Ocular Irritation)

c. AOI (Acute Ocular Irritation) = the maximum value of MOI.

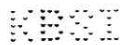
비제거군-1 (초기시험)

- 무처리 대조군인 우안에서는 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다.
- 1 시간째 관찰 시, 시험물질 처리군에서 배출물이 관찰되었다.
- 24 시간째 관찰 시, 시험물질 처리군에서 모든 증상이 소실되어 정상으로 회복되었다.

- 비체적군-2 (확인시험 1)
- 무처리 대조군인 우연에서는 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다.
  - 1 시간째 관찰 시부터 72 시간째 관찰 시까지 시험물질 처리군에서 결막의 발적 및 부종에 대한 자극증상과 배출물이 관찰되지 않았다.
- 비체적군-3 (확인시험 2)
- 무처리 대조군인 우연에서는 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다.
  - 1 시간째 관찰 시부터 72 시간째 관찰 시까지 시험물질 처리군에서 결막의 발적 및 부종에 대한 자극증상과 배출물이 관찰되지 않았다.

5.4. 자극성의 판정 (Table 3)

안반홍 평가표에 의해 평가된 안점막자극정도를 처리하여 급성안자극지수 (A.O.I.)를 산출한 결과, A.O.I.는 "0.7" 이었다. 이상의 시험결과, New Zealand White계 토끼에 대한 MKB-21의 안점막자극성시험에서 자극성은 [안점막자극표]에 의거 "없음"으로 구분되었다.



6. 참고문헌 [References]

- 농촌진흥청 (2019) 농촌진흥청 고시 제2019-26호 「농약 및 원재의 등록기준」 [별표 12] 연속독성시험 기준과 방법 (2019.09.02)
- 국립농산물품질관리원 (2019) 국립농산물품질관리원 고시 제2019-5호 「유기농업자재 공시 기준」 (2019.06.17)



7. Tables

Table 1. Mortality and clinical signs

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

a : Normal  
b : Number of dead animals/Number of tested animals



Table 2. Body weight changes

Group	No. of treatment	Days after application (g)			
		0	2	3	Gain
No eye washed	1	2236	2265	2315	79.0
	2	2733	2254	2268	35.0
	3	2172	2235	2291	119.0
	Mean	2213.7	2251.3	2291.3	77.7
	S.D. <sup>a</sup>	36.1	15.2	23.5	

a : Standard Deviation

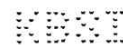


Table 3. No eyes washed evaluation of eye irritation (Non-treatment)

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

a : I.O.I. (Individual Ocular Irritation) = (A × B × 5) + (C × 5) + (D + E + F) × 2  
 b : M.O.I. (Mean Ocular Irritation)  
 c : A.O.I. (Acute Ocular Irritation) = the maximum value of M.O.I.

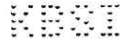
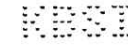


Table 4. No eyes washed evaluation of eye irritation (Treatment)

Time	Animal No.	Cornea		Conjunctiva			I.O.I. <sup>a</sup>	M.O.I. <sup>b</sup>	A.O.I. <sup>c</sup>
		Degree of opacity (A)	Diffuse-ness of Opacity (B)	Iris (C)	Redness (D)	Edema (E)			
1 hr	1	0	0	0	0	0	1	0.7	0.7
	2	0	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0		
24 hr	1	0	0	0	0	0	0	0.0	
	2	0	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0		
48 hr	1	0	0	0	0	0	0	0.0	
	2	0	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0		
72 hr	1	0	0	0	0	0	0	0.0	
	2	0	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0		

a : I.O.I. (Individual Ocular Irritation) = (A × B × 5) + (C × 5) + (D + E + F) × 2  
 b : M.O.I. (Mean Ocular Irritation)  
 c : A.O.I. (Acute Ocular Irritation) = the maximum value of M.O.I.



[그림 39] 안점막자극성시험 결과보고서



최종보고서

New Zealand White계 토끼에 대한 MKB-21의  
피부자극성시험

ETD-19055



(주)한국생물안전성연구소



제 출 문

시험물질 : MKB-21

시험제목 : New Zealand White계 토끼에 대한 MKB-21의 피부자극성시험

상기 독성시험을 "농약 및 원제의 등록기준" [별표 1] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청고시 제 2019-26호)에 준하여 실시하고 그 결과를 다음과 같이 제출합니다.

2019년 12월 18일

(주)한국생물안전성연구소

시험책임자 열 지 명



목 차  
[Contents]

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



6. 참고문헌 [References]	13
7. Tables	14
Table 1. Mortality and clinical signs	14
Table 2. Body weight changes	15
Table 3. Evaluation of skin irritation	16
Table 4. Calculation of P.I.I. value	17



1. 요약 [Summary]

New Zealand White계 토끼에 대한 MKB-21의 피부자극성시험을 수행하여 일반중독증상, 지사수, 체중변화 및 피부자극성을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험기간 중 시험물질의 처리에 기인된 치사개체가 관찰되지 않았다.
○ 일반중상 관찰 시 시험물질의 처리에 기인된 중독증상이 관찰되지 않았다.
○ 개체별 체중결과, 시간이 경과함에 따라 증가추세를 보였다.
○ 시험물질 제거 후 처리부의 국소자극성을 관찰한 결과, 피부자극이 관찰되지 않아 1차 피부자극지수 (P11)는 '0.0'으로 산출되었다.

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



2. 시험실시의 개요 [Introduction]

2.1 시험제목

New Zealand White계 토끼에 대한 MKB-21의 피부자극성시험

2.2 시험물질

MKB-21

2.3 시험목적

넷트에 대한 MKB-21의 급성경구독성시험을 통하여 시험물질에 대한 기초자료로 활용코자 한다.

2.4 시험방법

"농약 및 원재의 등록기준" [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청고시 제2019-26호)에 준하여 실시하였다.

2.5 시험의뢰자

명칭: 제노바이오
소재지: 대전광역시 대덕구 신일서로 18번길 16

2.6 시험기관

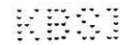
명칭: ㈜한국생물안전성연구소
소재지: 충청북도 음성군 갑곡면 성주로 362-20
연락처: Tel : 043-882-0297, Fax : 043-882-0298

2.7 시험장소

명칭: ㈜한국생물안전성연구소 동물실험실
소재지: 충청북도 음성군 갑곡면 성주로 362-20

2.8 시험책임자

성명: 엄지영
소속: ㈜한국생물안전성연구소 독성연구팀



2.9 시험관계자

시험물질의 조제: 박이순, 박우근
시험물질의 노출: 박이순, 박우근
관찰/측정/평가: 박이순, 박우근
동물사육관리: 박이순, 박우근

2.10 시험일정

동물임수일: 2019년 11월 07일
검역숙화기간: 2019년 11월 07일 ~ 2019년 11월 11일
시험동물 제모일: 2019년 11월 11일
시험물질 처리일: 2019년 11월 12일
일반중상관찰기간: 2019년 11월 12일 ~ 2019년 11월 15일
실험종료일: 2019년 11월 22일
최종보고서 제출일: 2019년 12월 18일

2.11 시험물질의 보관

본시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질보관고에 보관하였다.
시료번호: 19-1-077
시험물질보관기간: 시험종료 후 3년

2.12 시험자료의 보관

본시험의 시험기초자료 및 관계시험성적서는 당 연구소 자료보관실에 보관하였다.
시험번호: ETD-19055
시험기초자료: 자료보관실
최종보고서: 자료보관실
자료하드디스크: 자료보관실
자료보관기간: 시험종료 후 3년
자료관리담당자: 박선영



3. 시험재료 및 방법 [Materials and methods]

3.1 시험물질

- 3.1.1. 물질명: MKB 21
3.1.2. 입수일: 2019년 10월 30일
3.1.3. 입수량: 100 g
3.1.4. 시료번호: 19-1-077
3.1.5. 성분 및 외관: 고상, 연갈색
3.1.6. 주원료: Beauveria bassiana, 포도당
3.1.7. 주원료 투입비율: 100% (Beauveria bassiana 20%+포도당 80%)
3.1.8. 균주: Beauveria bassiana 2.0x10^7 cfu/g
3.1.9. 보관조건: 실온
3.1.10. 공급원: 제노바이오

3.2 시험동물

3.2.1. 시험계: 토끼 (New Zealand White계)
3.2.2. 공급원:
- 명칭: 한림실험동물연구소
- 소재지: 경기도 화성시 봉담읍 좌투백로 313
- 연락처: 031-227-5955

3.2.3. 시험계의 선택사유: 농촌진흥청고시 제 2019-26호 인축독성시험 기준과 방법에 백색토끼를 사용하도록 되어 있으며 New Zealand White계 토끼는 농약의 독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다.

3.2.4. 체중범위

Table with 3 columns: 구분, 염수 시 체중 (kg), 지라 시 체중 (kg). Row 1: 시험동물, 1.8 ~ 2.0, 1.9 ~ 2.3

3.2.5. 순화 및 검역

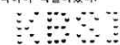
동물은 구입한 후 초기 및 확인시험으로 각각 5일, 12일 동안 동물실험실의 환경 하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체만을 시험에 이용하였다.

3.2.6. 군분리

제모를 실시하여 피부에 이상이 없는 동물만 선택하여 시험하였다.

3.2.7. 개체식별

사육 상자에 개체식별정보를 부착하여 식별하였다.



3.3. 사육환경 및 관리

3.3.1. 사육환경

본 시험의 사육환경은 온도 20±5°C, 상대습도 50±20%, 환기시험 (공조기), 조명시간 12시간 (오전8시-오후8시) 및 조도 150-300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하며 순화 및 시험기간 동안 처리 사육하였다.

3.3.2. 사육상자

순화 및 시험기간 중 stainless steel 사육상자 (380×490×345 mm)안에 넣어 사육하였다.

3.3.3. 사료 및 음용수

사료는 토끼용 펠릿사료 [Cargill Agri Purina Korea Inc.]를 자유 급식시켰으며 음용수는 정수필터 통과 및 자외선 살균한 지하수를 자유 섭취시켰다.

3.4. 시험물질의 처리

3.4.1. 시험군의 구성

실험동물은 건강하고 어린 동물로서 초기시험 1마리, 확인시험 2마리를 사용하였다.

3.4.2. 시험물질 조제

시험물질을 고상이라 막지시발을 이용하여 분쇄하고 표준체(Standard test sieve, 250µm)로 통과시켜 미세한 분말로 만들어 시험물질 처리 시 사용하였다.

3.4.3. 처리량 설정

처리량은 처리 군별 공히 0.5 g으로 설정하였다.

3.4.4. 처리방법

실험동물은 시험물질 처리 24시간 전에 전기면도기를 이용하여 경배부 (등 부위)의 털을 15×15 cm 넓이로 재모한 다음 건강하고 깨끗한 피부를 가진 동물만을 사용하였다. 2×3 cm로 잘게 잘라낸 거즈를 이용하여 0.5 g의 시험물질을 처리부위에 드포하고 소량의 증류수를 이용하여 습윤 처리한 후 시험물질의 유실 및 방출을 방지하기 위해 비자극성테이프 (Tegaderm™, 3M)와 Coban™ (self-adherent wrap, 3M)으로 고정 및 유지시켜 시험물질이 경구 및 인접막 등 타 경로로 유입되지 않게 처리하였다. 대조부위는 증류수로 처리하여 처리부위와 증상관찰 비교 용도로 활용하였다.

3.4.5. 시험물질의 제거

초기시험은 3개의 시험물질 접점을 순차적으로 적용하여 각각 3분, 1시간, 4시간 후 패치를 제거하고 확인시험은 단일 접점을 4시간 노출 후 제거하여 피부에 붙은 잔여물질은 증류수로 세척하여 모두 제거한 후 의약품 탈지면으로 불기를 흡수시킨 다음 케이지에 넣어 두었다.



4. 관찰 및 측정 (Observation and determination)

4.1. 일반중독증상 및 치사

시험물질 처리 후 72시간까지 일반중독상의 변화, 중독증상 및 치사동물의 유무를 관찰하였다.

4.2. 체중 측정

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

4.3. 처리부위 관찰

시험물질 도포 종료 후 1, 24, 48 및 72시간에 중반, 부종 및 가피형성 유무를 관찰하였고, 초기시험은 확인시험 여부를 판정하기 위해 각각 3분, 1시간, 4시간 후 접점을 제거한 뒤 피부 반응을 관찰하였다.

4.4. 피부반응의 평가 및 자극성의 판정

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

- 피부반응 평가표

(1) 홍반과 가피형성	
홍반이 전혀 없음	0
아주 가벼운 홍반 (육안으로 겨우 식별할 정도)	1
명확한 홍반	2
중간정도부터 심한 홍반	3
심한 홍반과 종반을 평가할 수 없을 정도의 가피형성	4
총 가능한 홍반과 가피 점수	4
(2) 부종형성 점령	
부종이 전혀 없음	0
아주 가벼운 부종 (육안으로 겨우 식별할 정도)	1
가벼운 부종 (뚜렷하게 부어올라서 노출부위가 분명히 구별될 정도)	2
중간 정도의 부종 (약 1 mm 정도 부어오른 상태)	3
심한 부종 (1 mm 이상 부어오르고 노출부위 밖까지 확장된 상태)	4
총 가능한 부종 점수	4



- 피부 1차 자극표

자극성 구분	기 준
없 음	1차 피부자극지수 (P1I)가 1.0 이하
경 도	1차 피부자극지수 (P1I)가 1.1 ~ 2.0
중 등	1차 피부자극지수 (P1I)가 2.1 ~ 5.0
경 도	1차 피부자극지수 (P1I)가 5.1 이상



5. 시험결과 (Results)

5.1. 일반중독증상 및 치사동물 수 (Table 1)

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

5.2. 체중변화 (Table 2)

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

5.3. 피부반응의 평가 (Table 3)

초기시험 시 동물에 각각 3분, 1시간, 4시간 후 접점을 제거한 뒤 피부 반응 관찰 시 증상이 관찰되지 않았다. 따라서 4시간 접점을 기준으로 시험물질 노출 종료 후 1, 24, 48 및 72시간에 피부반응평가표를 이용하여 피부반응을 관찰한 결과, 시험물질 처리 후 홍반 및 부종 등의 어떠한 피부반응도 관찰되지 않았다. 이후 동일한 방법으로 확인시험을 진행하였으며 확인시험 또한 시험물질 처리 후 홍반 및 부종 등의 어떠한 피부반응도 관찰되지 않았다.

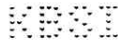
5.4. 자극성의 판정 (Table 4)

초기시험과 확인시험을 피부반응평가표에 의해 1차 피부자극지수 (Primary Irritation Index, P1I)를 산출한 결과, P1I는 "0.0" 이었고 피부 1차 자극표에 의해 자극성을 구분하면 "없음" 이었다. 이상의 결과로부터 MK8-21은 New Zealand White계 토끼의 피부에 처리 시 자극성이 없는 물질로 구분되었다.



6. 참고문헌 [References]

- 농촌진흥청 (2019) 농촌진흥청 고시 제2019-26호 「농약 및 원제의 등록기준」 [별표 12] 연속독성시험 기준과 방법 (2019.09.02)
- 국립농산물품질관리원 (2019) 국립농산물품질관리원 고시 제2019-5호 「유기농업자재 공시 기준」 (2019.06.17)
- Draize, J.H. (1959) Dermal. Assoc. Food and Drug officials, U.S. Appraisal of the Safety of Chemicals in Food, Drugs and Cosmetics. Texas State Dept. of Health, Austin, pp 46-59, Texas.



7. Tables

Table 1. Mortality and clinical signs

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

a : Normal

b : Number of dead animals/Number of tested animals



Table 2. Body weight changes

Number of animals	Days after treatment (g)			
	0	2	3	Gain
1	1987	2138	2207	220.0
2	2284	2310	2362	78.0
3	2338	2391	2417	79.0
Mean	2203.0	2279.7	2328.7	125.7
S.D. <sup>a</sup>	189.0	129.2	108.9	-

a : Standard Deviation



Table 3. Evaluation of skin irritation

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

a : Time after topical treatment



Table 4. Calculation of P.I.I. value

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

a : Time after topical treatment  
 b : Sum of means at 24 and 72hr  
 c : P.I.I. (Primary Irritation Index) = Total/2

MSD

[그림 40] 피부자극성시험 결과보고서

## 6절. 산란계 농장 적용 테스트

### 1. 분상 제형 시제품 테스트

분상 제형 시제품 MKB-21의 살비효과를 검토하기 위해서 충북 보은 소재 Y농장에서 현장 적용 테스트를 수행하였다. 분상 제형 시제품 MKB-21의 유효성분은 곤충병원성 진균인 *Beauveria bassiana*이며, 진균의 농도는  $1.2 \times 10^7$  cfu/g로 확인되었다. 무처리구와 처리구로 구성하였으며, 각각 약 50,000수의 산란계가 사육되고 있는 계사를 선택하였다. 처리구에는 MKB-21을 500배 희석하여 7일 간격으로 4회 살포하였고, 무처리구는 물을 살포하였다. 닭진드기 개체수 조사는 트랩을 사용하였고, 각 계사 당 25개의 설치하였으며 포획 시간은 48시간으로 하였다. 테스트 적용 전 트랩을 설치하여 초기 닭진드기 개체수를 조사하고, 최종 4회 살포 후 트랩을 설치하여 최종 닭진드기 개체수를 조사하였다. 닭진드기 개체수 조사방법은 회수된 트랩을 -20℃ 냉동고에 방치 후 일정시간 지난 후에 트랩을 털어서 방출된 닭진드기 개체수를 조사하였다. 닭진드기 개체수 조사는 충남대학교 농업과학연구소에서 수행하였다.

그 결과는 그림 41과 같으며, 살포 전 초기의 무처리구 닭진드기 총 개체수는 29,437마리였고, 처리구의 총 개체수는 27,091마리였다. 트랩당 평균 닭진드기 개체수는 무처리구는 약 1,177마리였고, 처리구는 1,083마리였다. 4회 최종 살포 후 무처리구의 닭진드기 총 개체수는 26,644마리였고, 처리구의 총 개체수는 7,507마리였다. 트랩당 평균 닭진드기 개체수는 무처리구는 약 1,065마리였고, 처리구는 약 300마리였다. 처리구 경우 분상 제형을 7일 간격으로 4회 살포한 후 초기 닭진드기 개체수에 비해 약 72.2% 감소한 것으로 확인되었다. 또한, 테스트 종료 후, 무처리구 및 처리구의 닭진드기 개체수를 비교하면 무처리구에 비해 약 71.8% 감소한 것으로 확인되었다(Raw data 11 참고). 본 연구 결과로 곤충병원성 진균인 *Beauveria bassiana*을 유효성분으로 하여 제작한 분상 시제품이 닭진드기 개체수를 감소시키는 효과를 확인하였고, 제품화의 가능성을 확인할 수 있었다. 또한 진균의 특성상 산란계에 정착하기 위해 오랜 시간이 요구되기 때문에 장기적인 계획으로 곤충병원성 진균을 유효성분으로 하는 분상제형에 대한 살비효과 검증이 필요하다.

**사양 시험 성적서**

발급번호	19121000	접수번호	19121000
시험명	MKB-21		
의뢰인	업체명 제노바이오		
소재지	대전광역시 대덕구 신일서로18번길 16.공정중 사무동 1층(신일동)		
접수연월일	2019. 12. 17	검사목적	참고용

- 목적**  
곤충병원성 진균(*Beauveria bassiana*)을 제형화한 MKB-21을 산란계 농장에 적용하여 닭진드기 개체수의 변화를 측정하고자 하였음.
- 시험방법**
  - 1) 실험장소 : 충북 보은군 소재 Y농장
  - 2) 공시기간 : 산란계(약 100,000수)
  - 3) 시험기간 : 2019. 11. 27 ~ 12. 26
  - 4) 시험방법  
무처리구 : 농장의 관행 처리, 산란계 약 50,000수  
처리구 : MKB-21을 500배 희석하여 7일 간격으로 4회 살포, 산란계 약 50,000수  
- MKB-21을 살포 전에 트랩을 2일간 설치하였고, 트랩 회수하여 냉동고에 저장하였음.  
- MKB-21을 4회 최종 살포 후 트랩을 설치하였고, 트랩 회수하여 냉동고에 저장하였음.  
- 냉동고에 저장했던 트랩에 포획된 닭진드기 개체수를 확인함.  
- 트랩은 무처리구 및 처리구 각각 25개의 트랩을 설치하였음.
- 테스트 결과**
  - 테스트 초기(0day)에 무처리구의 닭진드기 개체수는 29,437 마리였고, 처리구의 닭진드기 개체수는 27,091 마리였음.
  - 테스트 종료(28 days)에 무처리구의 닭진드기 개체수는 2,644 마리였고, 처리구의 닭진드기 개체수는 7,507 마리였음.

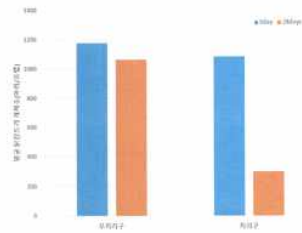
구분	무처리구	처리구	
초기(0day)	총 개체수(마리)	29,437	27,091
중	평균 개체수(마리/트랩)	1177.48	1083.64
종	총 개체수(마리)	26,644	7,507
(28days)	평균 개체수(마리/트랩)	1065.76	300.28



<닭진드기 트랩 설치>



<테스트농장 산란계사 내부>



- 고찰**  
테스트 종료(28 days) 후, 무처리구의 닭진드기는 약 9.49% 감소됨, 반면 처리구의 닭진드기 개체수는 약 72.2% 감소됨
- 참고문헌**
  - 1) D.R. George, R.S. Shiel, W.G.C. Appleby, A. Knox, J.H. Guy, In vitro and in vivo acaricidal activity and residual toxicity of spinosad to the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, *Vet. Parasit.*, Vol. 173(3-4), 2010, pp. 307-316
  - 2) M. Tavassoli, M. Alhymehr, S.H. Pourseyed, A. Ownga, I. Bemousi, K. Mardani, M. Ghorbanzadegan, S. Shokropoor, Field bioassay of *Metatizium anisopliae* stains to control the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*, *Vet. Parasit.*, Vol. 178(3-4), 2011, pp. 374-378

위의 내용은 의뢰자가 제공한 시료에 대한 시험 결과이며, 이 시험 성적서는 용도 이외의 선전, 소송, 기타 법적요건으로 사용할 수 없습니다.

2020년 01월 10일

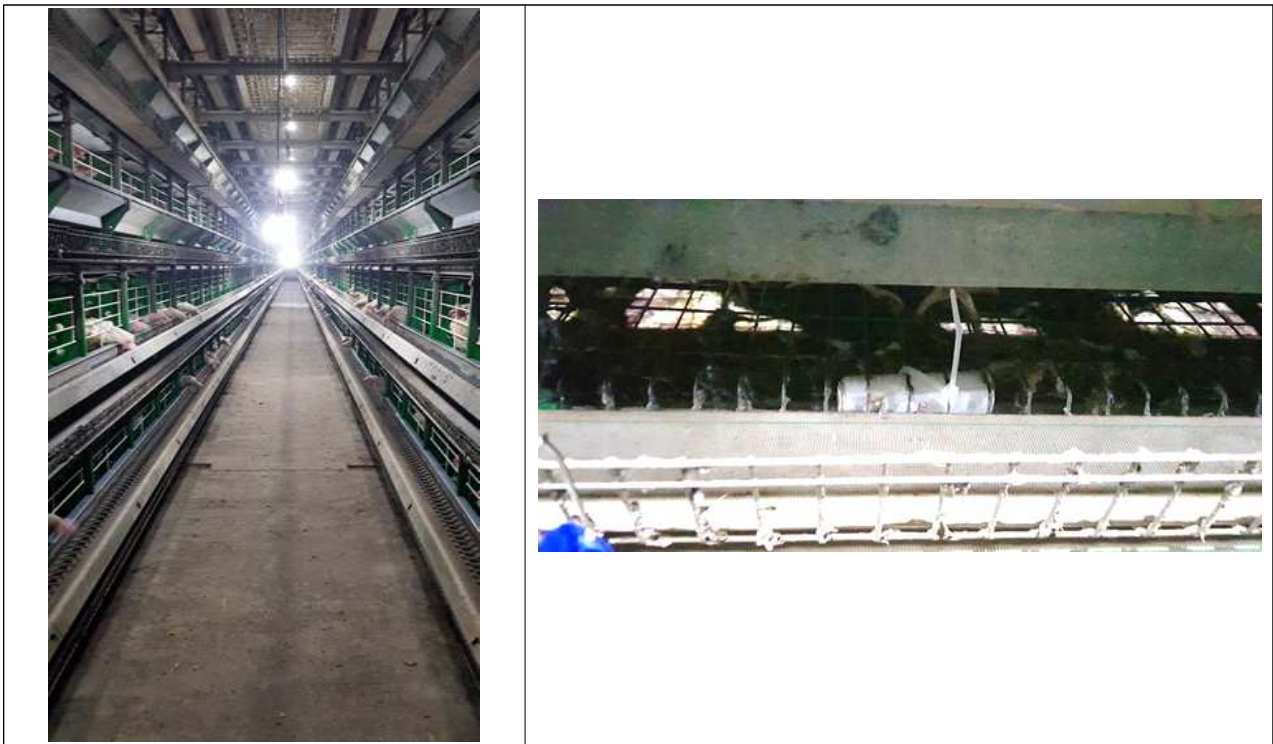
충남대학교 농업과학연구소장

[그림 41] 분상 제형 시제품 MKB-21의 현장 적용 테스트 결과

## 2. 분상 제형 및 오일 제형 시제품 혼용 테스트

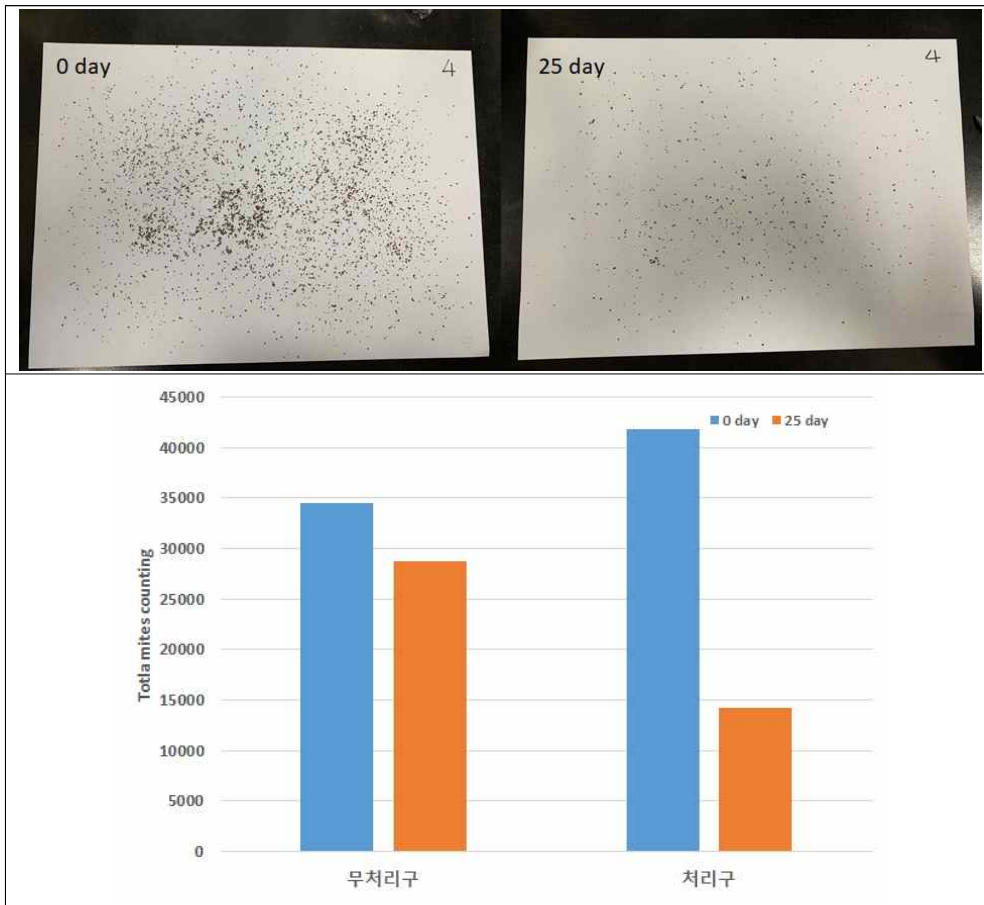
분상 제형 시제품 MKB-21과 오일 제형 시제품(mite-oil제형-2)의 혼용에 대한 살비효과를 검토하기 위해서 충북 진천 소재 O농장에서 현장적용 테스트를 수행하였다. 무처리구와 처리구로 구성하였으며, 각각 약 53,000수의 산란계가 사육되고 있는 계사를 선택하였다. 처리구에는 MKB-21을 1,000배 및 mite-oil제형-2을 1,000배 희석하여 5일 간격으로 4회 살포하였고, 무처리구는 물을 살포하였다. 닭진드기 개체수 조사는 트랩을 사용하였고, 각 계사 당 30개의 설치하였으며 포획 시간은 48시간으로 하였다(그림 42). 테스트 적용 전 트랩을 설치하여 초기 닭진드기 개체수를 조사하고, 최종 4회 살포 후 트랩을 설치하여 최종 닭진드기 개체수를 조사하였다. 닭진드기 개체수 조사방법은 회수된 트랩을 -20℃ 냉동고에 방치 후 일정시간 지난 후에 트랩을 털어서 방출된 닭진드기 개체수를 조사하였다.

그 결과는 그림 43과 같으며, 살포 전 초기의 무처리구 닭진드기 총 개체수는 34,469마리였고, 처리구의 총 개체수는 41,825마리였다. 총 4회 살포 후 무처리구 닭진드기 총 개체수는 28,747마리였고, 처리구의 닭진드기 총 개체수는 14,204마리로 확인되었다. 처리구의 경우 닭진드기의 개체수가 약 66.0% 감소한 것으로 확인되었다(Raw data 12 참고).



[그림 42] 산란계사 내부(좌) 및 트랩 설치(우)





[그림 43] 분상 제형 및 오일 제형 혼합 처리에 의한 살비 효과

## 7절. 현장 적용 매뉴얼

산란계농장 현장에 분상제형 및 오일제형을 닭진드기의 밀도에 맞게 적용할 수 있는 방법을 설정하였다. 또한 분상제형 및 오일제형을 단독 혹은 혼합하여 살포할 수 있도록 하여 닭진드기의 상황에 따라 적용할 수 있도록 하였다. 각 제형의 저장 방법 및 유효 기간을 설정하여 제형의 유효성을 유지할 수 있도록 하였다.

[표 18] 적용 기본 매뉴얼

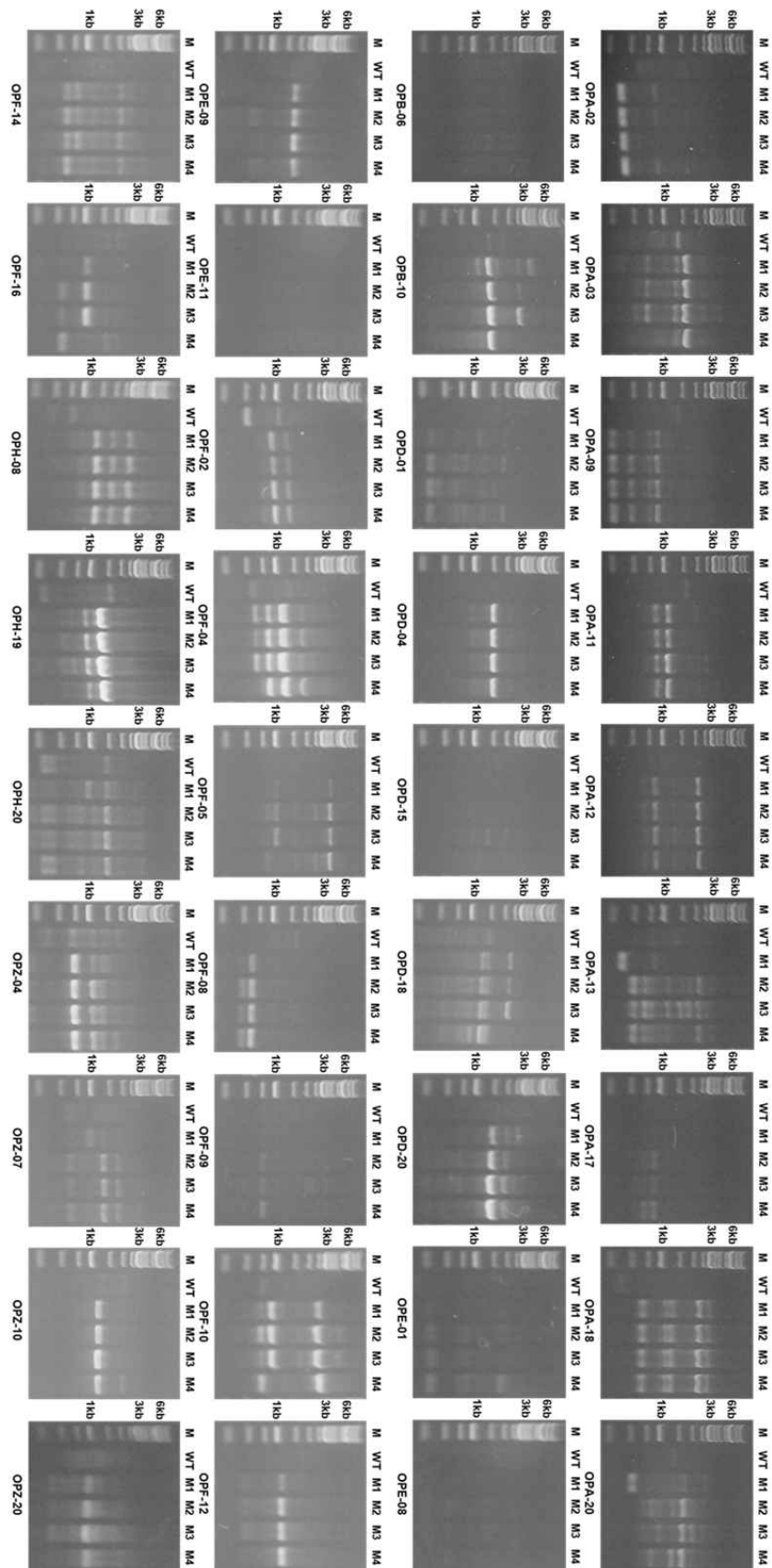
구분	내용
사용 용도	• 닭진드기 개체수 감소용
제품 개요	① 분상제형(충아웃-P; MKB-21) • 곤충병원성 진균인 <i>Beauveria bassiana</i> 가 20% 함유되어 있음 ② 오일제형(충아웃-O; mite-oil제형-2) • 천연오일성분 40%가 함유되어 있음
제품 저장 및 유효 기간	① 분상제형(충아웃-P; MKB-21) • 그늘지고 서늘한 곳에 보관 • 구입 즉시 사용하는 것을 권장함 • 제조일로부터 3개월 ② 오일제형(충아웃-O; mite-oil제형-2) • 그늘지고 서늘한 곳에 보관 • 제조일로부터 6개월
제품 적용 방법	① 1 단계 (트랩당 200마리 미만) - 분상제형(충아웃-P; MKB-21)을 500 ~ 1,000배 희석하여 살포함. - 7일 간격 4회 이상 살포함. ② 2 단계 (트랩당 200마리 미만) - 분상제형(충아웃-P; MKB-21)을 500 ~ 1,000배 희석한 후, 오일제형(충아웃-O; mite-oil제형-2)을 500 ~ 1,000배 희석하여 혼합 살포함. - 5일 간격 4회 살포함.
제품 적용 면적	• 닭 1만수 규모의 계사면적 200m <sup>2</sup> 당 본제 희석액 500L 분부 (2.5L/m <sup>2</sup> )
적용시 주의 사항	• 본 제품의 용법 및 용량 준수함 • 본 제품을 충분히 희석되도록 잘 저어서 사용함 • 닭에게 직접 살포 금지함 • 계란 및 사료에 본 제품이 노출되지 않도록 주의함 • 본 제품 취급시 보호장구를 필히 착용함 • 본 제품이 눈 또는 피부에 노출 시 흐르는 깨끗한 물로 세척하고 이상증상시 의사에게 진료를 받아야 함 • 본 제품이 어린이에 닿지 않는 곳에 보관함 • 본 제품은 음용할 수 없는 제품임

## 8절. Supplemental data

Raw data 1. : [그림 1] *Beauveria bassiana*, *Cordyceps militaris*, *Metarhizium anisopliae* 각 진균의 농도에 따른 닭진드기에 대한 살비효과

1회 분주 후 3일뒤 살비능		
진균	농도	평균 살비율(%) 및 개체수(살비/전체)
DW	-	0.59 (8/1539)
<i>B. bassiana</i>	1 X 10 <sup>6</sup>	11.46 (195/1747)
	1 X 10 <sup>7</sup>	8.78 (117/1425)
	1 X 10 <sup>8</sup>	19.53 (305/1536)
<i>C. militaris</i>	1 X 10 <sup>6</sup>	1.61 (23/1577)
	1 X 10 <sup>7</sup>	2.04 (36/1719)
	1 X 10 <sup>8</sup>	4.86 (68/1331)
<i>M. anisopliae</i>	1 X 10 <sup>6</sup>	2.77 (36/1403)
	1 X 10 <sup>7</sup>	5.04 (72/1409)
	1 X 10 <sup>8</sup>	2.21 (35/1545)
1회 분주 후 7일뒤 살비능		
진균	농도	평균 살비율(%) 및 개체수(살비/전체)
DW	-	1.70 (24/1539)
<i>B. bassiana</i>	1 X 10 <sup>6</sup>	13.41 (230/1747)
	1 X 10 <sup>7</sup>	27.60 (382/1425)
	1 X 10 <sup>8</sup>	52.78 (808/1536)
<i>C. militaris</i>	1 X 10 <sup>6</sup>	3.40 (53/1577)
	1 X 10 <sup>7</sup>	4.21 (72/1719)
	1 X 10 <sup>8</sup>	7.59 (105/1331)
<i>M. anisopliae</i>	1 X 10 <sup>6</sup>	14.28 (198/1403)
	1 X 10 <sup>7</sup>	18.18 (251/1409)
	1 X 10 <sup>8</sup>	9.92 (145/1545)
1회 분주 후 11일뒤 살비능		
진균	농도	평균 살비율(%) 및 개체수(살비/전체)
DW	-	3.88 (60/1539)
<i>B. bassiana</i>	1 X 10 <sup>6</sup>	37.39 (649/1747)
	1 X 10 <sup>7</sup>	42.63 (601/1425)
	1 X 10 <sup>8</sup>	94.13 (1447/1536)
<i>C. militaris</i>	1 X 10 <sup>6</sup>	7.63 (120/1577)
	1 X 10 <sup>7</sup>	7.84 (136/1719)
	1 X 10 <sup>8</sup>	11.55 (157/1331)
<i>M. anisopliae</i>	1 X 10 <sup>6</sup>	16.04 (220/1403)
	1 X 10 <sup>7</sup>	22.54 (311/1409)
	1 X 10 <sup>8</sup>	19.99 (304/1545)

Raw data 2. : [그림 4] RAPD primer 36중에 대한 결과



Raw data 3. : [그림 15] *B. bassiana*의 wild-type과 돌연변이 균주의 살비효과 사진

1회 분주 후 4일뒤 살비능					
진균	농도	1반복	2반복	3반복	평균 살비율(%) 및 개체수(살비/전체)
DW	-	16/523	11/559	25/439	3.57 (52/1521)
<i>B. bassiana</i> wild-type	1 X 10 <sup>8</sup>	263/563	188/429	369/632	49.64 (820/1624)
<i>B. bassiana</i> mutant	1 X 10 <sup>8</sup>	441/478	288/513	331/418	75.86 (1060/1409)
1회 분주 후 8일뒤 살비능					
진균	농도	1반복	2반복	3반복	평균 살비율(%) 및 개체수(살비/전체)
DW	-	35/523	43/559	37/439	7.60 (115/1521)
<i>B. bassiana</i> wild-type	1 X 10 <sup>8</sup>	469/563	344/429	514/632	81.61 (1327/1624)
<i>B. bassiana</i> mutant	1 X 10 <sup>8</sup>	478/478	513/513	418/418	100 (1409/1409)
1회 분주 후 12일뒤 살비능					
진균	농도	1반복	2반복	3반복	평균 살비율(%) 및 개체수(살비/전체)
DW	-	52/523	57/559	43/439	9.98 (152/1521)
<i>B. bassiana</i> wild-type	1 X 10 <sup>8</sup>	563/563	423/423	632/632	100 (1624/1624)
<i>B. bassiana</i> mutant	1 X 10 <sup>8</sup>	478/478	513/513	418/418	100 (1409/1409)

Raw data 4. : [그림 16] 식물 정유의 단독 살포에 의한 닭진드기 살비효과 비교

대조군		살비율(%)			평균 살비율(%) 및 개체수(살비/전체)	
음성 대조군		2/424	15/581	14/470	2.01 (31/1475)	
식물 오일	희석 농도	평균 살비율(%) 및 개체수(살비/전체)		식물 오일	희석 농도	평균 살비율(%) 및 개체수(살비/전체)
라벤더	0.8%	100 (1473/1473)		로즈마리	0.8%	95.16 (1374/1445)
	0.4%	100 (1596/1596)			0.4%	8.79 (135/1571)
	0.2%	51.98 (831/1588)			0.2%	0 (0/1535)
	0.1%	40.53 (618/1518)			0.1%	0 (0/1499)
	0.05%	0 (0/1584)			0.05%	0 (0/1636)
	0.025%	0 (0/1511)			0.025%	0 (0/1466)
로즈 제라늄	0.8%	100 (1452/1452)		시더우드	0.8%	100 (1617/1617)
	0.4%	100 (1617/1617)			0.4%	100 (1441/1441)
	0.2%	100 (1469/1469)			0.2%	84.07 (1432/1705)
	0.1%	55.98 (916/1614)			0.1%	9.30 (151/1586)
	0.05%	32.90 (560/1676)			0.05%	6.73 (97/1371)
	0.025%	22.81 (352/1563)			0.025%	0 (0/1716)
유칼립투스	0.8%	55.08 (836/1535)		타임	0.8%	100 (1646/1646)
	0.4%	47.69 (727/1536)			0.4%	92.30 (1464/1590)
	0.2%	11.31 (168/1489)			0.2%	80.93 (1231/1543)
	0.1%	0 (0/1534)			0.1%	52.46 (764/1482)
	0.05%	0 (0/1652)			0.05%	50.60 (675/1320)
	0.025%	0 (0/1470)			0.025%	27.81 (407/1518)
인디안 베이	0.8%	100 (1439/1439)		겨자	0.8%	0 (0/1582)
	0.4%	100 (1529/1529)			0.4%	0 (0/1630)
	0.2%	100 (1556/1556)			0.2%	0 (0/1466)
	0.1%	100 (1592/1592)			0.1%	0 (0/1383)
	0.05%	86.13 (1297/1496)			0.05%	0 (0/1603)
	0.025%	15.46 (272/1716)			0.025%	0 (0/1597)
해바라기	0.8%	0 (0/1433)		넝오일	0.8%	28.80 (398/1392)
	0.4%	0 (0/1425)			0.4%	8.87 (132/1491)
	0.2%	0 (0/1596)			0.2%	0 (0/1403)
	0.1%	0 (0/1608)			0.1%	0 (0/1661)
	0.05%	0 (0/1449)			0.05%	0 (0/1611)
	0.025%	0 (0/1624)			0.025%	0 (0/1594)
정향	0.8%	100 (1537/1537)		스윗 오렌지	0.8%	81.06 (1227/1514)
	0.4%	100 (1386/1386)			0.4%	29.77 (458/1539)
	0.2%	100 (1600/1600)			0.2%	0 (0/1392)
	0.1%	100 (1444/1444)			0.1%	0 (0/1470)
	0.05%	100 (1467/1467)			0.05%	0 (0/1547)
	0.025%	100 (1706/1511)			0.025%	0 (0/1323)
스피아민트	0.8%	100 (1503/1503)		시나몬	0.8%	100 (1531/1531)
	0.4%	100 (1407/1407)			0.4%	100 (1654/1654)
	0.2%	100 (1479/1479)			0.2%	100 (1412/1412)
	0.1%	0 (0/1460)			0.1%	100 (1576/1576)
	0.05%	0 (0/1462)			0.05%	100 (1444/1444)
	0.025%	0 (0/1514)			0.025%	49.85 (866/1723)

바질	0.8%	78.25 (1152/1456)	페퍼민트	0.8%	0 (0/1505)
	0.4%	75.08 (1153/1518)		0.4%	0 (0/1512)
	0.2%	51.24 (778/1586)		0.2%	0 (0/1562)
	0.1%	22.44 (361/1558)		0.1%	0 (0/1576)
	0.05%	0 (0/1378)		0.05%	0 (0/1485)
	0.025%	0 (0/1484)		0.025%	0 (0/1606)

Raw data 5. : [그림 17] 닭진드기에 대한 식물 정유의 살비 효과와 식물 정유에 대한 진균의 생존율 비교

식물 오일	희석 농도	진균 생존율(%)	식물 오일	희석 농도	진균 생존율(%)
		Bb			Bb
라벤더	0.8%	20	로즈 제라늄	0.8%	0
	0.4%	80		0.4%	0
	0.2%	80		0.2%	0
	0.1%	80		0.1%	50
	0.05%	100		0.05%	100
	0.025%	100		0.025%	100
시더우드	0.8%	30	타임	0.8%	0
	0.4%	50		0.4%	0
	0.2%	50		0.2%	0
	0.1%	50		0.1%	0
	0.05%	80		0.05%	0
	0.025%	90		0.025%	100
인디안 베이	0.8%	0	정향	0.8%	0
	0.4%	0		0.4%	0
	0.2%	0		0.2%	0
	0.1%	0		0.1%	0
	0.05%	0		0.05%	0
	0.025%	100		0.025%	5
스피아 민트	0.8%	0	시나몬	0.8%	0
	0.4%	0		0.4%	0
	0.2%	0		0.2%	0
	0.1%	5		0.1%	0
	0.05%	80		0.05%	0
	0.025%	100		0.025%	0

Raw data 6. : [그림 30] MKB의 농도별 살비효과

대조군		평균 살비율(%) 및 개체수(살비/전체)			
		2 days	4 days	5 days	8 days
음성 대조군		0 (0/1518)	1.71 (27/1518)	3.06 (47/1518)	4.85 (75/1518)
분상 제형	희석 농도	평균 살비율(%) 및 개체수(살비/전체)			
		2 days	4 days	5 days	8 days
MKB-1	1/250	10.82 (135/1284)	61.93 (796/1284)	89.03 (1144/1284)	100 (1284/1284)
MKB-2	1/250	26.69 (392/1506)	86.77 (1309/1506)	100 (1506/1506)	100 (1506/1506)
MKB-21	1/250	18.85 (304/1642)	76.13 (1273/1642)	81.09 (1324/1642)	100 (1642/1642)
MKB-22	1/250	89.90 (1481/1648)	94.25 (1552/1648)	100 (1648/1648)	100 (1648/1648)
MKB-1	1/500	18.48 (307/1664)	92.73 (1543/1664)	100 (1664/1664)	100 (1664/1664)
MKB-2	1/500	0 (0/1570)	13.53 (190/1570)	88.97 (1387/1570)	100 (1570/1570)
MKB-21	1/500	47.07 (684/1535)	52.39 (770/1535)	89.58 (1395/1535)	100 (1535/1535)
MKB-22	1/500	8.82 (133/1500)	13.75 (208/1500)	94.56 (1422/1500)	100 (1500/1500)

Raw data 7. : [그림 32] 액상 제형 3종의 살비효과

대조군		개체수(살비/전체)			평균 살비율(%) 및 개체수(살비/전체)
음성 대조군		2/522	1/642	13/418	1.22 (16/1582)
o/w 제형	희석 농도	개체수(살비/전체)			평균 살비율(%) 및 개체수(살비/전체)
		1반복	2반복	3반복	
Bbsup-cin	1/250	31/518	49/624	71/592	8.61 (151/1734)
Bbsup-clo	1/250	51/467	74/418	23/541	10.96 (148/1426)
Bbsup-3oil	1/250	231/581	322/468	292/422	59.25 (845/1471)



Raw data 8. : [그림 33] 라벤더 제형 및 정향 제형의 농도별 살비효과

대조군	개체수(살비/전체)			평균 살비율 및 개체수(살비/전체)
음성 대조군	2/424	15/581	14/470	2.01 (31/1475)
구분	개체수(살비/전체)			평균 살비율 및 개체수(살비/전체)
	1반복	2반복	3반복	
제형 1 정향40	498/498	589/589	531/531	100 (1618/1618)
제형 2 정향30	611/611	431/431	514/514	100 (1656/1656)
제형 3 정향20	533/533	606/606	527/527	100 (1666/1666)
제형 4 정향10	551/551	425/425	482/482	100 (1458/1458)
구분	개체수(살비/전체)			평균 살비율 및 개체수(살비/전체)
	1반복	2반복	3반복	
제형 1 라벤더40	611/611	457/457	477/477	100 (1545/1545)
제형 2 라벤더30	429/429	480/480	513/513	100 (1422/1422)
제형 3 라벤더20	517/517	553/553	509/509	100 (1579/1579)
제형 4 라벤더10	583/583	521/521	550/550	100 (1654/1654)

Raw data 9. : [그림 34] 제형에 포함된 오일 외 기타 성분들의 살비효과

구분	성분명		첨가비율(V/V, %)		최종농도(%)	평균 살비율 및 개체수(살비/전체)
	층	세부성분	층	세부성분	세부성분	
Composition 1	물층	멸균수	100	100	100	0 (0/1681)
Composition 2	오일층	80mix-11	0.4	23	0.092	59.10(902/1516)
		멸균수		77	0.308	
물층	멸균수	99.6	100	99.6		
Composition 3	오일층	80mix-11	0.4	23	0.092	60.20(951/1578)
		옥수수 오일		77	0.308	
물층	멸균수	99.6	100	99.6		
Composition 4	오일층	Tween 80	0.4	15	0.06	19.78(324/1636)
		멸균수		85	0.34	
물층	멸균수	99.6	100	99.6		
Composition 5	오일층	Span 80	0.4	8	0.032	52.05(842/1614)
		멸균수		92	0.368	
물층	멸균수	99.6	100	99.6		

Raw data 10. : [그림 35] 혼합제형 2종의 살비효과

대조군	개체수(살비/전체)			평균 살비율 및 개체수(살비/전체)
음성 대조군	2/423	16/452	7/587	1.74 (25/1462)
구분	개체수(살비/전체)			평균 살비율 및 개체수(살비/전체)
	1반복	2반복	3반복	
#5	562/562	641/641	528/528	100 (1731/1731)
#6	434/434	478/478	511/511	100 (1423/1423)

Raw data 11. : [그림 41] 분상 제형 의한 살비 효과(충남대 농업과학연구소)

Trap No.	무처리구		처리구	
	0 day	28 day	0 day	28 day
11	522	332	48	9
12	699	736	58	94
13	746	638	647	388
14	882	823	782	162
15	1839	1580	1640	42
21	1580	1088	58	30
22	532	575	433	398
23	852	729	757	182
24	709	838	604	201
25	1023	1095	1413	376
31	541	538	433	6
32	1529	1448	1714	368
33	1943	1731	1574	217
34	1969	2004	1997	587
35	1038	825	957	1146
41	196	104	46	14
42	1873	1629	1680	310
43	2099	1996	2159	290
44	1729	1698	1431	369
45	1495	1395	1565	361
51	109	119	78	0
52	1599	1003	1397	631
53	742	693	2612	523
54	1228	1189	1367	461
55	1963	1838	1641	342
합계	29,437	26,644	27,091	7,507

Raw data 12. : [그림 43] 분상 제형 및 오일 제형 혼합처리에 의한 살비 효과

Trap No.	무처리구		처리구	
	0 day	25 day	0 day	25 day
1	307	513	747	109
2	2395	230	3547	994
3	1230	3105	987	288
4	3141	685	3435	1162
5	1016	453	933	424
6	749	490	1331	309
7	702	327	1462	398
8	603	1285	1854	182
9	305	337	494	201
10	1489	1012	2619	1376
11	360	177	1044	169
12	400	327	1457	368
13	161	1112	1463	217
14	510	594	2463	587
15	263	1300	838	114
16	1722	502	386	147
17	3885	545	624	910
18	2168	1852	1318	290
19	1830	436	2302	1369
20	2221	922	316	361
21	58	227	402	169
22	1189	314	610	731
23	696	446	2813	261
24	1792	1472	374	461
25	1123	278	1084	342
26	234	265	119	58
27	766	1997	558	433
28	1002	3817	2600	757
29	1087	2384	2592	604
30	1065	1343	1053	413
합계	34,469	28,747	41,825	14,204

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표

연구목표	목표	달성	비중(%)	달성도(%)	기여도(%)
1. 닭진드기 방제용 진균의 탐색 및 살비능 평가	3건	3건	5	100	100
2. 닭진드기 방제용 진균 균주 개량	3건	1건	10	33	100
3. 식물 정유의 살비능 평가 및 기작 검증	10건	16건	10	160	100
4. 식물 정유 처리 진균 포자 발아율 조사	8건	8건	5	100	100
5. 살비성 야생형 및 돌연변이 진균 포자와 식물 정유 혼합물의 제조	2건	2건	10	100	100
6. 혼합제조물의 살비능 평가	1건	2건	10	100	100
7. 유효 진균 대량 배양 조건 확립	1건	1건	10	33	100
8. 유효 진균을 이용한 제형화 개발 및 제제화 공정 확립	1건	1건	10	100	100
9. 최적의 살비제 제형화 확립	2건	2건	10	100	100
10. 시작품 제작 및 안정성·안전성 평가	7건	7건	5	100	100
11. 살비제 현장 적용 매뉴얼 확립	1건	1건	5	100	100
12. 국내출원 특허	2건	7건	5	350	100
13. 학술발표 및 논문 게재	5건	4건	5	80	100
14. 고용창출 및 인력양성	0건	2건		0	100

#### 3-2. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

##### 1. 논문 게재 목표 미달성 사유

- 닭진드기 방제용 진균 및 식물 정유를 테스트 및 제형화를 통한 뛰어난 효과를 입증함
- 본 연구를 통해 얻어진 결과물을 특허출원 7건을 진행하였고, 등록까지 대기하고 있음
- 결과물의 권리확보를 위해 특허가 등록된 후에 논문 게재를 수행할 예정임

##### 2. 차후대책

- 아직 특허청으로부터 보완사항을 전달받지 못함
- 따라서 기연구결과 및 기특허 등을 회피전략으로 제시되는 모든 방법을 동원하여 특허등록을 최우선으로 한 후 논문을 게재할 예정임

## 4. 연구결과의 활용 계획 등

### 가. 활용방안

#### (1) 연구결과의 활용 가능성

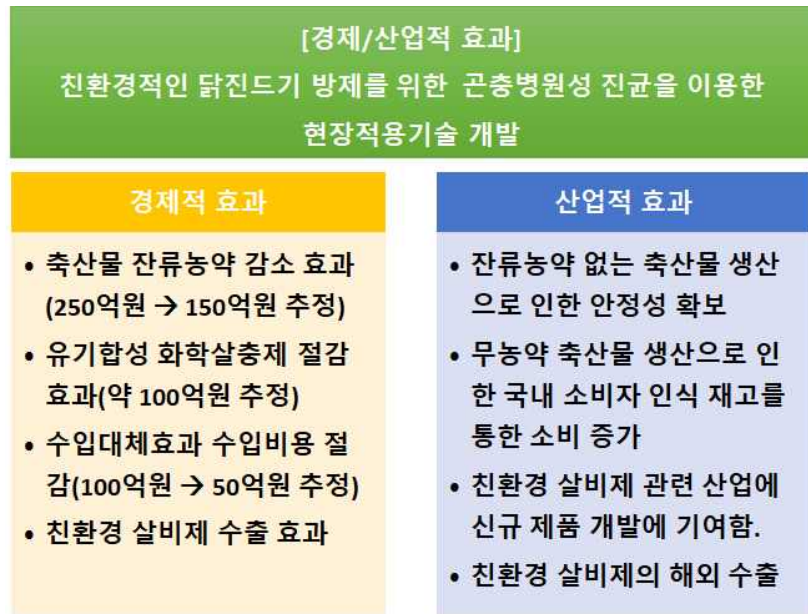
- 곤충병원성 진균의 액상 배양을 통한 포자 생산과 분상 제형화의 개발 노하우를 통한 다양한 진균 분상제형 제품이 개발이 가능함
- 오일 제형에 대한 적절한 유화제 배합 방법 및 o/w 제형 개발 노하우를 확보함에 따른 다양한 o/w 제형 제품 개발이 가능함
- 독성을 비롯한 안전성이 확인되었고, 현장 적용 테스트로 살비활성이 확인되어 친환경 닭진드기 살비제를 제품화할 수 있는 가능성을 제시함
- 농림검역본부에서 제시한 동물의약외품 등록 기준인 안전성 및 임상 테스트를 통한 닭진드기를 방제할 수 있는 친환경적인 곤충병원성 진균 제형 및 오일제형을 동물의약외품으로 등록을 추진할 계획임
- 본 연구결과로 도출된 특허를 사용하고자 하는 동물약품제조사 등에 기술이전으로 기술실시를 추진할 계획임

#### (2) 파급 효과

##### (가) 기술적 효과

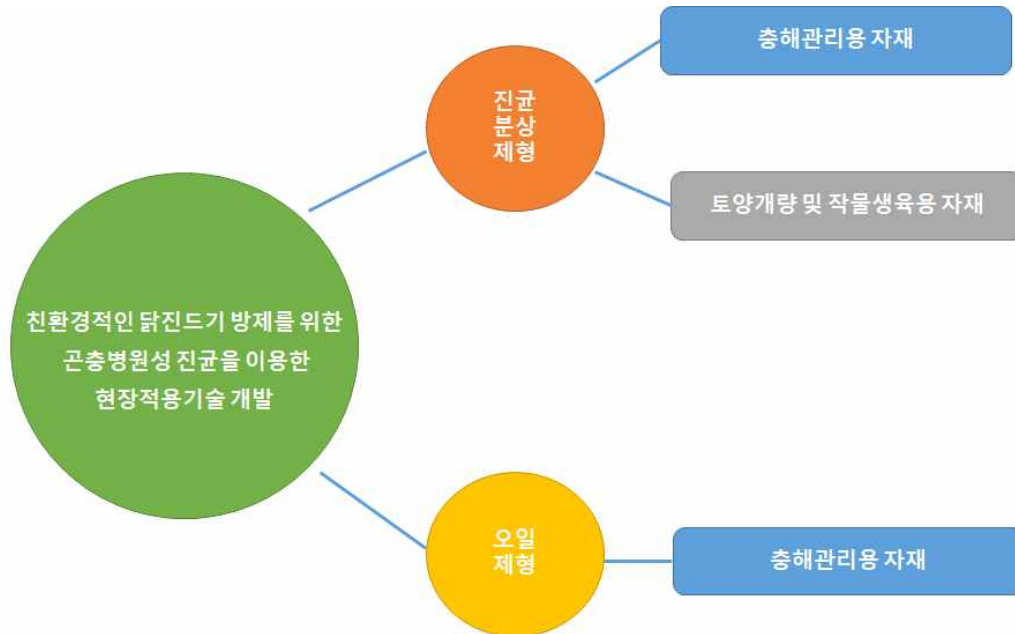


(2) 경제/산업적 효과



나. 타 연구에의 응용

- 농업 분야 살충관련 연구에 응용하고자 함.
- 유기농업자재 충해관리용 자재, 토양개량 및 작물생육용 자재



다. 3국 특허 전략

- 닭진드기 살비제 관련 전통적인 지식재산권 강국인 미국, 유럽 및 일본 특허문헌을 KIPRIS 등을 통해 검토함.
- 현재까지 도출된 연구결과를 바탕으로 3국 특허 문헌에 중복성을 검토함.
- 현재까지 도출된 연구결과중에 3국 특허를 회피가능한 결과를 정리함.
- 3국 특허 회피가 가능한 결과에 대한 추가적인 연구를 통한 연구결과 축적함.
- 회피 가능한 연구결과를 바탕으로 미국, 유럽 및 일본에 특허를 출원함.

다. 사업화 추진방안

(1) 사업화

(가) 사업화 추진 전략

구분	사업화 년도				
년도	2020	2021	2022	2023	2024
사업목표	· 국내 시장 진입	· 국내 시장 점유율 5% · 수출 시장 검토	· 해외시장 진입	· 국내 시장 점유율 15%	· 국내 시장 점유율 20% · 해외시장 확대
사업화 내용	· 보조사료 또는 단미사료로 국내 출시 · 동물 의약품 등록 준비 · 기술이전 검토	· 동물 의약품 등록 · 해외 수출을 위한 바이어 발굴 · 농업용 제품 출시	· 진입 해외 시장에 제품 등록 · 해외 축산관련 전시회 및 박람회 참석 · 생산 시설 확충	· 국내 시장 점유율 확대 · 시장 확대를 위한 친환경 업그레이드	· 개량된 제품을 기반으로 국내 시장 확대 · 해외 시장 확대를 위한 해외 생산 검토

(나) 시장 진입을 위한 단계적 전략



(다) 마케팅 전략 및 계획

① 마케팅 전략

구분	내용
제품의 우수성	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 100% 천연소재 원료 사용함</li> <li>· 살비력 및 지속력이 개선됨</li> <li>· 잔류농약 등 계란에 유기화학성분이 검출되지 않음</li> </ul>
제품의 차별성	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 천연물 소재로서 잔류농약 등 유기합성화학성분이 없음</li> <li>· 닭진드기 방제를 통한 닭진드기 매개 질병 감소함</li> <li>· 타 제품과의 가성비가 우수함 부각시킴</li> </ul>
전략적 포인트	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 축산관련 제품은 지인들의 입소문에 의해서 제품을 구매하는 확률이 높음(입소문 마케팅)</li> <li>· 지역 양계단체 임원 및 사육규모가 큰 농장을 집중공략 할 필요가 있음</li> </ul>

② 마케팅 계획

년도	구분	추진 계획
2020	On/Off 홍보 활동	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 축산관련 신문 및 양계산업 관련 잡지 제품 홍보 기사 및 광고</li> <li>· 기 거래처에 제품 홍보물 배포</li> <li>· 양계산업관련 세미나 및 지역 양계협회 세미나 → 본 과제로 도출된 제품 세미나 및 홍보</li> </ul>
	실증테스트	· 각 지역의 산란계 대농장에서 테스트를 통한 지역 홍보
2021	전시회 참가	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 2021 국제축산박람회(태국 방콕) → 본 과제로 도출된 제품 전시 홍보 및 바이어 발굴</li> <li>· 2021국제축산박람회(대구, EXCO) → 국내 거래처 확보</li> </ul>
	바이어 발굴	· KOTRA를 통한 해외 바이오 발굴
2022	전시회 참가	· 2022 국제축산박람회 → 해외 시장 조사, 해외 바이어 발굴
	On/Off 홍보 활동	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 해외 양계산업 관련 잡지 제품광고</li> <li>· 해외 양계 관련 홈페이지에 제품 광고</li> <li>· 해외 양계 관련 온라인 마켓을 통한 제품 홍보 및 판매 검토</li> </ul>

(라) 생산 계획

- 제품 특성상 재고를 보유하지 않고 제품 발주 시 생산하는 방법을 채택함.
- 아래 표는 최소 생산계획임.
- 진균분상제형(MKB-21; 1kg) : 50,000원/kg
- 오일제형(mite-oil제형-2; 1L, 5L) : 80,000원/L

※ 오일제형의 경우, 고려비엔피 “와구방” 이 현재 600,000원/5L (120,000원/L)으로 유통되고 있기 때문에 본 오일제형은 가격경쟁력이 확보됨. 또한 와구방은 250배가 권장희석배율이지만, 본 오일제형은 500배가 권장희석배율로 경제성이 확보됨.



구분	구분	단위	생산능력	2020	2021	2022	2023	2024	합계
친환경살비제	진균분상제형 (MKB-21)	kg	2톤/월	2,000	3,000	4,000	6,000	8,000	23,000
	오일제형 (mite-oil제형-2)	L	2톤/월	2,000	4,000	5,000	7,000	9,000	27,000
합계				4,000	7,000	9,000	13,000	17,000	50,000

(마) 제품화

분상제형 1kg (가칭: 충-아웃)	오일제형 1L (가칭: 충-아웃)
	

(바) 매출 계획

구분	매출원
국내	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 동물약품 대리점</li> <li>- 산란계 사료 대리점</li> <li>- 동물병원</li> <li>- 지자체 관납사업</li> <li>- 산란계 협회</li> <li>- 산란계 농장</li> </ul>
국외	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 양계관련 제품을 취급하는 온라인 마켓</li> <li>- 축산기자재 무역회사</li> <li>- 산란계관련 동물약품 수입회사</li> </ul>

(2) 사업화성과 및 매출실적

(가) 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	-억원	
			향후 3년간 매출	12.5억원	
		관련제품	개발후 현재까지	-억원	
			향후 3년간 매출	15억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : -% 국외 : - %	
			향후 3년간 매출	국내 : 10% 국외 : -%	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : -% 국외 : -%	
			향후 3년간 매출	국내 : 15% 국외 : -%	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			-위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			20위

(나) 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	3년			
	소요예산(백만원)	150백만원			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		-	9억원	20억원	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	-	10%	20%
		국외	-	-	5%
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		- 친환경 닭진드기 살비제 - 유기농업자재			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	-	15억원	30억원	
	수 출	-	3억원	9억원	

## 붙임. 참고문헌

- 김병혁, 강성우, 윤철석, 성재모, 홍석인, 김승욱, 당밀을 이용한 곤충병원성 곰팡이 *Beauveria bassiana* 726의 포자생산, 한국생물공학회지, 제 14권 3호, pp. 3654-370, 1999년
- C. N. Ogbonna, Production of food colourants by filamentous fungi, Afr. J. Microbiol. Res., vol 10, no. 26, pp. 960-971, 2016
- Emma L. O. L., Antonio B. F., José E. M. A., Mariana H. G., Inajá M. W., Aline M. B. A., Luciano O. Z., Liquid production of entomopathogenic fungi and ultraviolet radiation and temperature effects on produced propagules, Arq. Inst. Biol., vol. 81, no. 4, pp. 342-350, 2014
- F. E. Vega, M. A. Jackson, G. Mercadier, T. J. Poprawski, The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture, World J. Microb. Biotech., vol. 19, pp. 363-368, 2003
- J. Fargues, N. Smits, C. Vidal, A. Vey, F. Vega, G. Mercadier, P. Quimby, Effect of liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity of the hyphomycete, *Metarrhizium flavoviride*, Mycopathologia, vol. 154, pp. 127-138, 2001
- M. Vemmer, M. Schumann, W. B-Heineke, B. W. French, S. Vidal, A. V. Patel, Development of a CO<sub>2</sub>-releasing coformulation based on starch, *Saccharomyces cerevisiae* and *Beauveria bassiana* attractive towards western corn rootworm larvae, Pest Manag. Sci. vol. 72, pp. 2136-2145, 2016
- N. A. Zainol, T. S. Ming, Y. Darwis, Development and characterization of cinnamon leaf oil nanocream for topical application, Indian J. Pharm. Sci., vol. 77(4), pp. 422-433, 2015
- J. S. Kim, H. J. Yeon, M. Skinner, B. L. Parker, An oil-based formulation of *Isaria fumosorosea* blastospore for management of greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae), Pest Manag. Sci., vol. 69, pp. 576-581, 2013
- D.R. George, R.S. Shiel, W.G.C. Appleby, A. Knox, J.H. Guy, In vitro and in vivo acaricidal activity and residual toxicity of spinosad to the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, Vet. Parasi., vol. 173(3-4), pp. 307-316, 2010
- M. Tavassoli, M. Allymehr, S.H. Pourseyed, A. Ownga, I. Bemousi, K. Mardani, M. Ghorbanzadegan, S. Shokrpour, Field bioassay of *Metarrhizium anisopliae* strains to control the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*, Vet. Parasi., Vol. 178(3-4), pp. 374-378, 2011

G. M. Mascarin, M. A. Jackson, R. W. Behle, N. N. Kobori, Í. D. Júnior, Improved shelf life of *Beauveria bassiana* blastospore using convective drying and active packaging processes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100(19), pp. 8359–8370, 2016

주 의

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