

118103-03

식물바이러스 매개 흡즙 해충 방제용 곤충병원성 진균의 산업화

2021

농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( )발간등록번호( O )  
농축산자재산업화기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003724-01

## 식물바이러스 매개 흡즙 해충 방제용 곤충병원성 진균의 산업화

2021. 11. 25

주관연구개발기관 / (주)경농  
공동연구개발기관 / 전북대학교 산학협력단

농림축산식품부  
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제출문

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "식물바이러스 매개 흡즙 해충 방제용 곤충병원성 진균의 산업화"(개발기간: 2018. 11. 20 ~ 2021. 08. 19)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 11. 25

주관연구개발기관명 : (주) 경농 (대표이사) 이 용 진 (인)

공동연구개발기관명 : 전북대학교 산학협력단 (대표자) 조 기 현 (인)



주관연구책임자 : 박 철 남

공동연구책임자 : 김 재 수

국가연구개발혁신법 시행령 제33조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서				보안등급	
				일반[√], 보안[ ]	
중앙행정기관명		사업명	사업명	농축산자재 산업화기술개발사업	
전문기관명 (해당 시 작성)		내역사업명 (해당 시 작성)		환경부하저감자재	
공고번호		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)	118103-03		
		연구개발과제번호	118103-03		
기술분류	국가과학기술 표준분류	1순위 생물/화학농약	70%	2순위 농업미생물	10%
	농림식품과학기술분류	1순위 소분류 코드명	%	2순위 소분류 코드명	%
				3순위 작물보호 (식물병리/해충방제)	20%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문				
	영문				
연구개발과제명	국문	식물바이러스 매개 흡즙 해충 방제용 곤충병원성 진균의 산업화			
	영문	Industrialization of the entomopathogenic fungi to controlling of piercing and sucking type plant virus vectors			
주관연구개발기관	기관명	㈜경농	사업자등록번호	214-81-08779	
	주소	(우)38175 경북 경주시 숨머리길 34-14	법인등록번호		
연구책임자	성명	박철남	직위	책임연구원	
	연락처	직장전화	휴대전화		
		전자우편	국가연구자번호		
연구개발기간	전체	2018. 11. 20 - 2021. 08. 19 (2년 9개월)			
	단계 (해당 시 작성)	1단계	2018. 11. 20 - 2019. 08. 19 (9개월)		
		2단계	2019. 08. 20 - 2020. 08. 19 (1년)		
		3단계	2020. 08. 20 - 2021. 08. 19 (1년)		
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금	
	현금	현금	현물	현금	현물
총계	205,000	17,940	120,060	222,940	120,060
1단계 1년차	56,000	4,940	33,060	60,940	33,060
2단계 2년차	75,000	6,500	43,500	81,500	43,500
3단계 3년차	74,000	6,500	43,500	80,500	43,500
공동연구개발기관	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편
공동연구개발기관	전북대학교	김재수	부교수		
연구개발담당자 실무담당자	성명	김상원		직위	메니저
	연락처	직장전화		휴대전화	
		전자우편		국가연구자번호	-

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2021 년 10 월 20 일

연구책임자:

박철남

주관연구개발기관의 장:

㈜경농 대표이사 이 용 진 (직인)

공동연구개발기관의 장:

전북대학교 산학협력단 조 기 원 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

## < 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		농축산자재산업화기술개발사업		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		118103-03	
내역사업명 (해당 시 작성)		환경부하저감자재		연구개발과제번호		118103-03	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	1순위 생물/화학농약	70%	2순위 농업미생물	10%	3순위 작물보호 (식물병리/해충방제)	20%
	농림식품과학기술분 류	1순위 소분류 코드명	%	2순위 소분류 코드명	%	3순위 소분류 코드명	%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		식물바이러스 매개 흡즙 해충 방제용 곤충병원성 진균의 산업화					
전체 연구개발기간		2018. 11. 20 - 2021. 08. 19 (2년 9개월)					
총 연구개발비		총 343,000 천원 (정부지원연구개발비: 205,000 천원, 기관부담연구개발비 : 138,000 천원, 지방자치단체: 0 원, 그 외 지원금: 0 원)					
연구개발단계		기초[ ] 응용[ ] 개발[ √ ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준( 3 ) 종료시점 목표( 8 )	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표		식물바이러스 매개 흡즙 해충 방제용 곤충병원성 진균의 산업화				
	전체 내용		흡즙 해충 방제 진균의 효능평가와 대량배양 확립, 제형화 최적화를 통해 최종 제품의 현장 적용성을 평가하였고 병해충 방제유기농업자재로 진입하고자 함.				
	1단계	목표	1) 저항성 흡즙 해충 방제용 미생물 살충제 효능평가 2) 방제 대상 해충(담배가루이, 오이총채벌레)의 생태 특성 분석 3) 흡즙 해충 방제용 균주의 살충효과 평가				
		내용	1-1) 살충평가로 식물바이러스 매개 흡즙 해충인 총채벌레류에 효과적인 진균을 선발하였고 칩입기작을 구명 2-1) 방제 대상 해충의 생활사 분석 3-1) 살충성 미생물에 대한 살충효과 평가 3-2) 적용 방법에 따른 살충효과 비교 평가 3-3) 미생물 처리농도에 따른 살충효과 비교				
	2단계	목표	1) 최적의 처리방법 탐색을 위한 방제 대상 해충 생태 특성분석 2) 살충성 진균의 대량배양 조건확립				
		내용	1-1) 12가지 곡물배지 별 포자생산성 및 열안정성 확인 1-2) 선발한 곡물배지에서 생산된 포자의 살충효과 비교 1-3) 살충성 유전자의 다양성 비교 분석 2-1) 곡물에서 대량 배양 조건 확립과 기질조건 연구를 진행				
3단계	목표	1) 살충성 미생물 제형화 및 현장 적용성 평가 2) 안전성 향상을 위한 기질 조건 연구 및 해충 칩입기작 구명					
	내용	1-1) 포자발아, 큐티클침투, 보관안정성 및 살충활성에 최적화된 제형화 연구를 진행하였고 현장 적용 평가를 완료하여 유기농업자재 등록 진입에 자료를 확보 2-1) 살충성 진균 고체배양체 보관안정성 분석, 제제의 보관안정성 분석, 오이총채벌레/담배가루이에 대한 최종 제형의 살충효과 평가 진행					

연구개발성과	<p>정량적 연구개발성과로 특허출원 1건, 특허등록 1건, SCI논문 2건, 학술발표 6건, 인력양성 1건을 수행하였으며 미달성된 사항인 기술이전 1건 관련하여 '21년 4분기에 완료될 예정임.</p> <p>정성적 연구개발성과로 1년차 연구개발목표인 살충효과 평가, 기초배양 조건 확립, 생태적 적용방법 연구 모두 달성도 100%로 수행하였다. 2년차 연구개발목표인 대량배양 조건 확립, 기초 제형화 연구, 안정성 향상을 위한 기질조건 연구에 달성도 100%로 수행하였고 해충 침입기작 구명 연구도 100% 달성하였다. 3년차 연구개발목표인 제형화 연구 및 현장적용 평가, 보관 안정성 평가에 달성도 100%로 수행하였고 유기농자재 등록 진입은 90% 달성을 하였는데 이는 현재 기술이전 단계에 있으며 '22년 1분기에 100% 달성예정임.</p>											
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<p>1) 활용계획 난방제 해충인 총채벌레에 대한 친환경, 무독성 유기농업자재 개발을 진행하였고 곤충병원성 진균인 <i>B.bassiana</i> JEF-507 균주의 대량배양 생산공정기술, 제형화기술을 확립하여 진균제제 개발 산업화 기술을 구축하였음. 작용기작 연구로 특허 출원 및 제품 홍보(기술자료)에 활용 가능함.</p> <p>2) 기대효과 기존 시장에 판매 중인 <i>B.bassiana</i> 제품과 비교해 약효가 우수한 제품 개발을 하였고 산업계의 수요를 충족할 것으로 예상됨. 이와 함께 화학농약 사용으로 발생하는 작물 및 토양 잔류 문제와 화학농약 사용저감 효과가 기대됨.</p>											
연구개발성과의 비공개여부 및 사유	일반과제에 해당											
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
	2	1	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	곤충병원성 진균		미생물농약		식물바이러스 매개해충		대량배양		제형화			
영문핵심어 (5개 이내)	<i>Beauveria bassiana</i>		Biopesticide		Plant virus-mediated insect		Mass culture		Formulation			

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 .....	8
제 2 장	연구개발 대상의 국내외 현황 .....	10
제 3 장	연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용 .....	18
1.	기초/대량 배양조건 확립 .....	28
가.	배양 조건 확립 .....	28
1)	배양적온 탐색 .....	28
2)	액체배양용 배지선발 .....	31
3)	고체배양 조건선발 .....	31
나.	대량 배양 검토 .....	34
다.	후보 미생물 원제의 기초 활성평가 .....	35
1)	후보 미생물의 살충 스펙트럼-1 .....	35
2)	후보 미생물의 살충 스펙트럼-2 .....	37
3)	미생물 JEF-507 대량배양 원제의 꽃노랑총채벌레에 대한 살충효과 검정 .....	37
4)	미생물 JEF-507 대량배양 원제의 담배가루이에 대한 살충효과 검정 .....	39
2.	살충성 미생물의 제형화 연구 .....	40
가.	후보균주 JEF-462, JEF-507 균주의 액상제형 최적화연구 .....	40
1)	계면활성제 선발 .....	40
2)	액상증량제 선발 .....	41
나.	후보균주 JEF-462, JEF-507 균주의 분상제형 최적화연구 .....	41
1)	1차 증량제 선발 .....	41
2)	계면활성제와 2차 증량제 선발 .....	42
3)	안정제 선발 .....	45
4)	포자발아 개선검토 .....	46
5)	분산성 개선검토 .....	49
다.	JEF-507 균주의 입상제형 최적화연구 .....	52
1)	입상제형 기초검토 .....	52
2)	포자발아 개선검토 .....	53
3)	입상제형 처방의 최적화 .....	54
라.	결과 및 고찰 .....	55
3.	살충성 미생물의 제형화 연구 .....	56
가.	방제 대상 해충의 생태 특성 분석(담배가루이) .....	56
1)	생활사 분석 .....	56
2)	살충성미생물에 대한 살충효과 평가 .....	56
3)	흡즙 해충에 대한 곤충병원성 진균의 살충활성 평가 .....	58
4)	고 병원성 균주의 특성(열안정성, 포자생산성) 비교 .....	63

나. 최적의 적용 방법 도출(담배가루이) .....	66
1) 적용 방법에 따른 살충효과 비교 평가 .....	66
2) 미생물 처리농도에 따른 살충효과 비교 .....	67
다. 방제 대상 해충의 생태 특성 분석(총채벌레) .....	68
1) 생활사 분석 .....	68
2) 살충성미생물에 대한 살충효과 평가 .....	68
3) 흡즙 해충에 대한 곤충병원성 진균의 살충활성 평가 .....	69
4) 고 병원성 균주의 포자생산성 비교 .....	73
라. 최적의 적용 방법 도출(총채벌레) .....	74
1) 적용 방법에 따른 살충효과 비교 평가 .....	74
2) 미생물 처리농도에 따른 살충효과 비교 .....	75
마. 포자생산성, 열안정성 향상 곡물배지 기질 선발 .....	76
1) 곡물 배지 별 포자 생산성과 열안정성(Dish조건) .....	76
바. 살충효과 증진 기질 선발 .....	79
1) 선발 곡물배지에서 생산된 포자의 살충효과 비교 .....	79
사. JEF-507-egfp 형광균주의 담배가루이 침입기작 구명 .....	81
1) egfp 유전자 cloning을 통한 fungal transformation 선발 .....	81
아. <i>B. bassiana</i> 의 주요 유전자의 특이성 규명 .....	83
1) <i>B. bassiana</i> 의 주요 유전자의 다양성 비교 분석 .....	83
자. <i>B. bassiana</i> JEF-507 시제품 Quality check .....	88
1) JEF-507 원제 포자수와 원제 발아율 확인 .....	88
2) JEF-507 수화제(WP), 입제(GR-1,2)의 CFU 확인 .....	89
4. 살충성 미생물의 제형화 연구 .....	90
가. 상업화 후보 분상제형/입상제형 제품의 현장 적용 평가 .....	90
1) 구조토가 처방된 포자 5% 함유 분상제형의 활성검정 .....	90
2) 수용성 Cellulose가 40% 처방된 포자 2.5% 함유 분상제형의 활성검정 .....	91
3) 수용성 Cellulose 1%, 포자 2.5% 함유 분상제형 처방38의 활성검정 .....	95
4) 수용성 Cellulose 1%, 포자 5.0% 함유 입상제형 처방13의 활성검정 .....	97
나. 약해 안정성 평가 .....	97
1) 분상제형 최종제품의 약해 안정성 평가 .....	97
2) 입상제형 최종제품의 약해 안정성 평가 .....	97
5. 선발 살충성 미생물 제품의 보관 안정성 평가 .....	98
가. <i>B. bassiana</i> JEF-507의 보관 안정성 검정 .....	98
나. 2차 <i>B. bassiana</i> JEF-507 Quality check .....	99
다. 2차 <i>B. bassiana</i> JEF-507 WP 시료 1, 5, 6의 안정성 평가 .....	100
라. 2차 <i>B. bassiana</i> JEF-507 WP 시제품을 이용한 병원성 검정 .....	101
1) JEF-507 WP-1,5,6 시료의 오이총채벌레에 대한 살충활성 평가 .....	101
2) JEF-507 WP-1,5,6 시료의 담배가루이에 대한 살충활성 평가 .....	103
3) JEF-507 WP-1,5,6 시료 처리 후 오이총채벌레의 잎 피해를 조사 .....	104
제 4 장 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 .....	107
제 5 장 목표 미달 시 원인분석 .....	113
제 6 장 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여정도 .....	114

제 7 장	연구개발성과의 관리 및 활용 계획 .....	114
제 8 장	별첨 자료 .....	116



## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 1-1. 연구개발의 개요

#### ○ 연구개발의 필요성

- 식물바이러스는 스스로 작물체에 침입할 수 없지만, 한번 발병하게 되면 치료가 매우 어렵고, 병징이 나타나지 않는 잠복기를 통해 부지불식간에 주변으로 전파되면서 농작물의 생산량과 품질을 심각하게 저하시키는 등 농가에서 실질적으로 가장 큰 경제적 손실을 야기하는 병해로 알려져 있다.
- 이러한 식물바이러스는 매개충, 접촉, 종자, 토양, 곰팡이, 선충, 영양번식 등의 다양한 방법으로 매개되는데, 그 중 70% 이상이 매개충에 의해 발생된다고 알려져 있다.
- 다양한 해충들에 의해 식물바이러스가 매개되는데, 특히 진딧물, 총채벌레, 담배가루이와 같은 흡즙성 해충에 의해 많은 식물바이러스가 매개되는 것으로 알려져 있다.
- 국내 농업은 기후 변화에 따른 다양한 작물의 유입과 작부체계의 전환, 특히 원예작물의 재배양식이 노지에서 고수익을 창출할 수 있는 항온, 항습, 고온조건의 시설로 바뀌면서 새로운 바이러스 매개성 흡즙 해충인 총채벌레와 담배가루이의 유입이 증가되었고, 그에 따른 직접적인 충해와 더불어 바이러스 감염과 같은 이차적인 피해도 발생하는 등 농업 현장에서 큰 문제로 부상되고 있다.
- 총채벌레는 먹이 섭식과정에서 다양한 식물 바이러스를 매개할 수 있는데, 꽃노랑총채벌레는 INSV(*Impatiens necrosis spot virus*), CSNV(*Chrysanthemumstem necrosis virus*), TSWV(*Tomato spotted wilt virus*)와 같은 식물바이러스의 주요 매개충으로 알려져 있다. 이 중 TSWV는 작물뿐만 아니라 잡초 등 900여종 이상의 식물에 감염을 일으키는데, 최근 농업 현장에서는 가지과 작물인 고추와 토마토 등에서 대발생하는 등 경제적 피해를 크게 일으키고 있다.
- 담배가루이는 24개 이상의 생태형(biotype)이 알려져 있는데, 이 중 B와 Q biotype이 문제가 되고 있으며, 특히 Q biotype의 경우 토마토황화잎말림병(TYLCCV) 등 100여종 이상의 식물바이러스를 매개할 수 있는 것으로 알려져 있다. 우리나라에서는 2008년도 경남남부 해안지역과 제주지역을 시작으로 현재는 전국 각지에서 토마토황화잎말림병이 발생되고 있으며, 한번 발생하게 되면 폐농해야할 수준으로 막대한 경제적 피해를 야기하고 있다.
- 이러한 주요 식물바이러스 매개 흡즙 해충이 더욱 문제가 되고 있는 것은 장기간의 화학 약제사용에 따른 단일 또는 교차, 복합 저항성 개체가 증가되어 실질적인 방제가 어려워졌기 때문이다.
- 화학약제로 방제가 어려운 식물바이러스 매개 흡즙 해충을 방제하기 위해 천적이거나 병원성 곰팡이 도입 등과 같은 생물적 방제기술의 도입과 식물 정유 혹은 추출물 등과 같은 천연물의 적용이 시도된 바 있지만 실질적인 방제효과는 기대하기 어려운 실정이었다.
- 이에 따라 화학약제로 방제가 어려운 식물바이러스 매개 흡즙 해충에 대한 새로운 작용기작을 가진 생물학적 방제제의 개발과 함께 농업현장에서 안정적인 약효가 발현될 수 있는 제형과 대상 해충의 생태특성에 적합한 사용방법의 개발 및 농가보급도 매우 시급한 실정이다.

○ 연구개발 개요

- 화학약제의 주요 현안인 환경독성과 해충 저항성 극복을 위한 새로운 작물보호제로서의 생물농약, 특히 살충성 진균(곤충병원성 진균)에 대한 정부 지원 연구가 계속적으로 진행되어 왔으나, 주로 up-stream 단계 (균주 발굴 및 효능평가)에서의 연구에만 집중되어 산업화까지 연결된 성과는 매우 저조한 실정이다.
- 본 연구과제는 식물바이러스를 매개하는 주요한 흡즙 해충의 방제를 위해 기존의 화학농약과 다른 다작용점을 갖는 곤충병원성 진균을 이용한 미생물 살충제를 개발하는 것이다. (화학농약: 단일 작용점, 미생물소재: 다작용점 (multi-targeting))
- 본 연구과제의 방제대상 해충은 시설 원예작물에서 식물바이러스를 매개하며 다양한 피해를 일으키는 흡즙해충인 담배가루이와 총채벌레이며, 방제소재는 상기 해충에 뛰어난 효과를 갖고 있는 *Beauveria bassiana* JEF-507 균주이다.
- 본 연구과제에서는 성공적인 산업화를 위하여
  - 1) 기 확보된 우수 곤충병원성 진균의 다양한 환경조건에서의 살충활성 평가
  - 2) 효과적이고 경제적인 곤충병원성 진균의 포자 생산 방법확립
  - 3) 유통기간 중 포자의 안정성 유지와 방제효과의 균일성을 확보할 수 있는 제형화 기술 확립
  - 4) 방제대상 해충의 생태적 특성을 고려한 처리방법의 개발을 목표로 하고 있다.
- 이를 위해, 본 연구팀은 곤충병원성 진균의 산업화 연구에 오랜 경험을 보유한 전북대와 다양한 제형화 연구 및 포장활성 평가 역량을 보유하고 있는 (주)경농으로 구성되어 있으며, 특히 우수 균주 확보 및 대량생산/제형화에 강점을 보유하고 있다.
- 본 연구과제 수행을 통해 확보할 수 있는 핵심기술은 크게 3가지로써 향후 개발될 다양한 곤충병원성 진균 제품에 활용될 예정이다.
  - 1) 살충활성이 높은 우수 생물자원의 선발 기술
  - 2) 상온 안정성이 확보된 곤충병원성 진균의 제형화 기술(기존제품 1년, 본 연구과제 도출 제품 2년 목표)
  - 3) 곤충병원성 진균의 대량배양 기술
  - 4) 방제대상 해충의 생태적 특성 분석 기반의 처리방법 도출 기술

## 제 2 장 연구개발 대상의 국내외 현황

### 가. 국내 기술수준 및 시장현황

#### ○ 기술수준

- 국내의 곤충병원성 진균에 대한 연구는 주로 up-stream 단계 (균주 발굴 및 효능평가)에만 집중되어 있어 (표 1), 산업화와 관련된 대량생산, 제형화, 현장평가 부분의 연구개발은 미흡한 실정이며, 이로 인해 해충 방제에 적용 가능한 제품이 매우 부족한 상황이다.

표 1. 곤충병원성 진균 관련 국가연구과제 수행 현황

년도	과제명 (농진청)	연구 방향
2006	곤충병원성 곰팡이 이용 해충방제제 개발	up-stream
2007	곤충병원성 미생물을 이용한 시설채소 난방제 나방류 해충 방제 기술 개발	up-stream
2009	해충 방제를 위한 곤충병원균 산업화 연구	up-stream
2009	곤충 유래 진균을 이용한 기능성 소재 개발	up-stream
2012	신규 곤충병원성 곰팡이를 이용한 담배가루이 방제용 미생물 살충제 개발	up-stream

#### ○ 시장현황

- 국내 흡즙성 해충에 대한 전체적인 시장규모는 약 1,800억 원('10년)으로 주요 대상 해충은 노린재, 진딧물, 응애, 멸구, 가루이 등이 있다. 노린재, 진딧물 및 응애는 전체 흡즙성 해충 시장의 약 50% 이상을 점유하고 있으며 피해 또한 크고 다양한 작물의 생육 및 품질, 그리고 수확량 감소에 영향을 미치고 있다.
- 그 중 담배가루이와 총채벌레의 시장을 구체적으로 분석해보면, 2017년 12월 기준 전체 고기능성 원예용 살충제 시장(가루이/총채벌레/굴파리)은 540억원으로 추정되는데, 이중 담배가루이는 180억원, 총채벌레는 240억원 규모의 시장을 차지하는 것으로 알려져 있다. (농약월보 분석을 통한 ㈜경농의 자체 시장분석 결과)
- 이러한 식물바이러스 매개 흡즙 해충인 담배가루이와 총채벌레는 노지고추를 제외한 오이, 호박, 멜론, 토마토, 파프리카와 같은 시설재배 작물에 큰 피해를 일으키는 것으로 알려져 있다. 상기 작물의 재배면적에 대한 통계분석(2010~2015)에서도 노지고추의 재배면적은 줄어들고 있지만 시설재배작물의 재배면적은 계속적으로 늘어나고 있어, 본 과제에서 방제하고자 하는 식물바이러스 매개 흡즙 해충의 피해는 지속적으로 늘어날 것으로 판단된다.

표 2. 담배가루이와 총채벌레가 발생하는 주요 작물의 재배면적 동향

(단위: ha)

구분	작물	문제해충	2010	2011	2012	2013	2014	2015
노지	고추	총채벌레	49,976	47,388	50,454	50,211	40,739	34,514
	오이	총채벌레	807	1,062	966	793	862	799
	호박	총채벌레	5,724	5,830	7,582	6,805	6,504	7,249
시설	오이	총채벌레	3,589	3,478	3,201	2,836	3,281	3,338
	호박	총채벌레	3,246	2,990	2,868	2,654	3,155	3,396
	멜론	총채벌레	1,700	1,425	1,470	1,477	1,486	1,550
	토마토	담배가루이	5,270	5,850	6,344	6,054	7,070	6,976
	파프리카	담배가루이	424	429	430	575	598	707
계			70,736	68,452	73,315	71,405	63,695	58,529

시설채소 온실현황 및 채소류 생산실적 (2015, 농림축산식품부), 통계청 농작물생산조사

- 국내에 등록된 미생물농약은 살충제 13개(국내 개발 6개, 수입 7개), 살균제 21개(국내 개발 15개, 수입 6개)와 제초제 1개(수입) 등 총 35개 품목이 등록되어 판매되고 있다 (표 2). 전체 35개 중 33개는 미생물농약이며, 생화학농약의 경우 현재까지 2개의 제품(살충제 아자디락틴 입제, 제초제 펠라르곤산 유제)가 고시되어 있다.

표 3. 국내 생물농약 살충제 현황('15년)

연번	제조/수입	취급분야	품목명	유효성분 함유량
1	제조	미생물	모나크로스포르툼타우마숨케이비시3017 고상제	1.0×10 <sup>4</sup> cfu/g
2	수입	미생물	뷰베리아바시아나지에이치에이 유상현탁제	1.0×10 <sup>8</sup> cfu/ml
3	수입	미생물	뷰베리아바시아나티비아아-1 액상제	1.0×10 <sup>6</sup> cfu/ml
4	수입	미생물	비티아이자와이 액상수화제	8.5BIU/kg
5	수입	미생물	비티아이자와이 입상수화제	35,000DBMU/mg
6	제조	미생물	비티아이자와이엔티423 수화제	1×10 <sup>9</sup> cfu/g
7	제조	미생물	비티아이자와이엔티423 액상수화제	1.0×10 <sup>8</sup> cfu/ml
8	제조	미생물	비티아이자와이엔티413 액상수화제	1×10 <sup>7</sup> cfu/ml
9	제조	미생물	비티쿠르스타키 수화제	16BIU/kg
10	수입	미생물	비티쿠르스타키 액상수화제	10%
11	수입	미생물	비티쿠르스타키 입상수화제	64BIU/kg
12	수입	생화학	아자디락틴 입제	0.15%
13	제조	미생물	패실로마이세스푸모소로세우스디비비-2032 수화제	5.0×10 <sup>7</sup> cfu/g

- 상기와 같이 국내에 등록된 생물농약의 원제 대부분은 수입에 의존하고 있어 높은 원제 공급 비용으로 인하여 고가의 가격 구조를 형성할 수밖에 없고, 국산 원제의 경우 중국이나 인도 등지의 저가 원제와의 경쟁에서 비교 우위를 확보하지 못함으로써 여러 측면에서 어려운 형국에 처해있는 상황이다.

#### ○ 경쟁기관현황

- 기업별로 볼 때 (주)그린바이오텍 8개 품목, (주)팜한농이 7개 품목, (주)농협케미컬이 5개 품목 등 총 18개 회사가 생물농약 연구개발에 투자를 진행하고 있다.
- 국내 시장에서 생물농약 살충제로 등록된 품목으로는 곤충병원성 세균인 Bt(*B. thuringiensis*)가 대부분을 차지하고 있다. 대표적인 제품으로는 (주)팜한농의 토박이 수화제, 토박이 액상수화제 (*Bt. aizawai*)와 (주)그린바이오텍의 솔빛채 액상수화제(*Bt. aizawai*) 있으며, 이들 제품 모두 국내 자생종 균주로 개발된 제품들이다. 수입품목으로는 슈리싸이드 수화제(*Bt. kurstaki*)와 젠타리 입상수화제(*Bt. aizawai*)가 있다.
- 곤충병원성 진균으로는 뷰베리아 바시나아(*B. bassiana*), 페실로마이세스 푸모소로세우스(*Paecilomyces fumosoroseus*), 모노크로스포룸 타우마슘(*Monacrosporium thaumasium*) 등이 있으며, 최근 국내 자생균주 라이브러리가 구축됨에 따라 관련 연구개발에 가속도가 붙고 있다.
- 국내에서는 생물농약도 농약이라는 개념이 확산됨에 따라 농약과의 차별성 부여를 위해 2012년부터 “생물농약”을 “천연식물보호제”라 명칭을 제정하여 사용하고 있으며, 유기농산물 생산 확대를 위해 유기농자재 목록공시제를 도입하여 운영하고 있다. 유기농자재 목록공시제도는 자재의 효과는 검증하지 아니한 채 허용 가능한 물질 여부만을 검토하여 유기농자재로 등록하는 제도로써 이에 대한 다양한 부작용이 발생하여 최근에는 효과검증까지도 고려된 품질인증제가 운영되고 있지만 장기적으로는 볼 때 생물농약 산업의 연구개발 정체와 경제적/산업적 후퇴를 가져오는 결과를 초래하고 있다.
- 천연식물보호제의 등록비용은 품목당 약 2~3억원이 소요되는 데 반해 유기농자재의 경우제품당 0.2~0.3억원으로 상대적으로 저렴한 등록비용이 소요되기 때문에 국내의 다양한 기업들에 유기농자재로 등록하여 판매하고 있는 실정이며, 이에 따라 생물농약 혹은 천연식물보호제의 개념은 점차 희석되어 가고 있다. 이는 외국의 글로벌 초우량 기업들이 생물농약 기업들을 적극적으로 인수합병 또는 협력을 진행하는 것과 상반되는 매우 특이한 현상으로 이해할 수 있다.

#### ○ 지식재산권현황

- 국내에는 농업 해충 방제와 관련된 미생물 특허가 43건 등록되어 있으며, *B. thuringiensis* 23건, *B. bassiana* 10건, *Metarhizium* sp. 6건, *Isaria* sp. 2건이 있다. 이중 상업화된 대부분은 *B. thuringiensis* 이며, *B. bassiana*는 팜한농의 “총채썩”만이 상품화된 실정이다.

#### ○ 표준화현황

- 유기농자재 공시

농촌진흥청에서는 유기농업자재가 허용물질을 사용하여 생산된 자재인지를 확인하여 그 자재의 명칭, 주성분명, 함량 및 사용방법 등에 관한 정보를 공시하고 있으며, 유기농업자재의 개발을 촉진하고 품질을 향상시키기 위하여 효능이 우수한 유기농업자재에 대하여 품질인증을 하고

있다. (친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률」제37조).

유기농업자재 공시를 위해서는 ① 현장기준, ② 원료의 특성 등에 관한 자료, ③ 이화학(미생물 검정) 검사적성서, ④ 식물에 대한 시험성적서, ⑤ 독성에 대한 시험성적서, ⑥ 제조공정, 품질 관리 등에 대한 자료, ⑦ 포장지 표시사항에 관한 자료 등 7가지 인증기준을 준수해야 한다. (규제「친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률」제37조제3항, 규제「농림축산식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙」제47조 제1항 및 별표 13 제1호).

유기농업자재의 품질인증을 위해서는 ① 공통기준, ② 원료의 특성 등에 관한 자료, ③ 이화학(미생물검정) 검사적성서, ④ 식물에 대한 시험성적서 등 4가지 인증기준을 준수해야 한다 (「농림축산식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙」 별표 13 제2호).

#### ○ 기타현황

- 국내에 등록된 생물농약은 살균제 17, 살충제 7, 제초제 1품목이 등록되어 있음(2020년 12월, 농촌진흥청). 미생물을 원료로 하는 총해관리용 유기농업자재는 45종이 등록되어있음(2021. 10. 국립농산물품질관리원)

#### 나. 국외 기술수준 및 시장현황

#### ○ 기술수준

- 생물농약 연구는 미생물농약과 천적류를 중심으로 발전하여 왔으며, 항생물질 또는 식물 추출물질을 활용한 천연물질, 해충의 성교란 또는 유살 등에 이용되는 페로몬 연구가 그 다음을 차지하고 있다. 최근에는 작물보호 기능의 저항성 유전자를 이용하는 연구 또한 진행되고 있다.
- 국외 등록 곤충병원성 곰팡이로는 *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *L. lecanii*, *I. fumosorosea* 등이 대표적인 생물적 방제제로 이용되고 있으며 (BCPC, 2014), *B. bassiana*와 *M. anisopliae*는 나비목과 딱정벌레목을 포함한 다양한 해충군에 살충 활성을 보유하고 있다.
- 최근에는 미생물 농약 단독 사용에 따른 효과를 적용하기 보다는 화학농약과의 체계처리 방법을 통한 종합적인 방제 체계 확립과 작물의 전 생육기 관리가 가능한 종합 방제체계 구축에 대한 연구가 global trend로 진행되고 있다.

#### ○ 시장현황

- 세계 생물농약 시장 규모는 1,796.56 M US\$ (2013년, Expert Interviews and Markets and Markets Analysis, 2013)로 전체 작물보호제 시장의 약 3.5% 규모로 성장하고 있으며, 특히 주목할 부분은 생물농약의 연평균 성장률 (CAGR)이 16.0%로 유기합성농약 (CAGR: 3%) 시장의 약 5배이며(표 3), 2019년 생물농약 시장규모는 약 43억 달러로 추정하고 있다.

표 4. 세계 생물농약 시장(단위: USD)

Type	2008	2009	2014	성장률 (2009-2014)
합성농약	388	412	478	3.0
생물농약	12	16	33	15.6
총계	400	428	511	3.6

- 세계 생물농약 시장에서는 미생물농약의 시장이 26.4%로 가장 높은 시장 점유율을 차지하고 있다. (표 4)

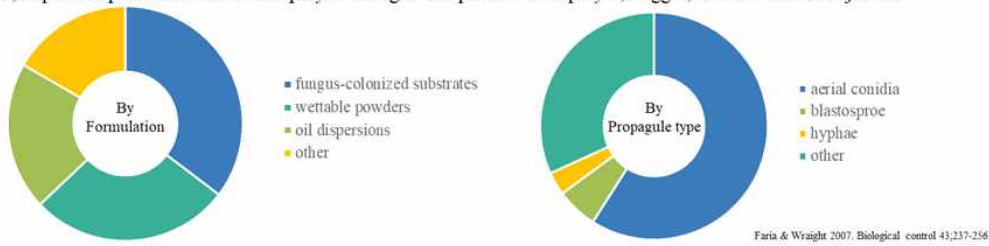
표 5. 세계 생물농약 유형별 시장 점유율

생물농약 유형	판매액 (M US\$)	비율(%)
Macrobials	138	7.6
Microbials	479	26.4
Semiochemicals	48	2.7
Natural products	1148	63.3
전체	1813	100.0

(출처: Philips McDougall AgriServe, '14년)

- 세계 생물농약의 주요 시장은 북미가 40.1%로 가장 크고 유럽 26.7%, 아시아 20.1%, 남미 9.8%의 순으로 알려져 있다. (MarketandMarket, 2016)
- *B. bassiana* 제품군으로는 BotaniGard, Naturalis-L, Mycotal, Beauverin, Boverol 등이 산업화 되어 있으며, *M. anisopliae* 제품군으로는 Bio-Catch-M, Green Muscle, BioGreen 등이 있다. *L. lecanii*는 주로 매미목 해충인 진딧물류에 효과적이며 대표적인 제품으로는 Vertalec 이 많이 알려져 있다. *P. fumosorosea*는 매미목 해충 중에서 온실가루이와 담배가루이에 효과적인 것으로 알려져 있으며, PreFeRal, Priority 등의 제품이 판매되고 있다. (그림 1)

- **Dry formulation** amounts to approximately **68%** of the total biopesticides market because most of the biopesticides are preferred in dry form as they are easy to handle, enable quick application, and are convenient to use. On the other hand, liquid biopesticides are to be sprayed using a compressed air sprayer, fogger, aircraft or soil injector.



- Products based on *Beauveria bassiana* (33.9%), *Metarhizium anisopliae* (33.9%) and *B. brongniartii* (4.1%) are the most common.

Fungus	Brand name	Target pests
<i>Beauveria bassiana</i>	Mycotrol, Naturalis, Conidia, Ostrinol, Biosoft, Biowonder	Whiteflies/Aphids/Thrips/Sucking insects/Coffee berry borer/Corn borer/Helocoverpa & sucking pests/Rice pests
<i>B. brongniartii</i>	Betel, Engerlingspilz, Melocont	Scarab beetle Larvae
<i>Metarhizium anisopliae</i>	BIO 1020, Bio-Blast™, Bio Magic, Multiplex	Black Vine weevil/Termites/Brown plant hopper/Root grubs
<i>M. flavoviride</i>	Green Muscle, BioGreen	Locusts/Grasshoppers/Red-headed cockchafer
<i>Verticillium lecanii</i>	Vertalec Mycotal, Biocatch	Aphids/Whiteflies/Thrips/Whiteflies
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	PFR-97™, Priority	Whiteflies/Thrips/Mites

Ramangjam et al., 2014, Proc Indian Natl Sci Acad 80:455-471

그림 1. 곤충병원성 곰팡이를 이용한 제품 개발현황

(출처: PhD Thesis (SJ Lee, 2018); Biopesticide Manual, (BCPC, 2014))

### ○ 경쟁기관현황

- 외국의 생물농약에 대한 연구개발은 1900년대 초반까지 거슬러 올라가며, 1930년 초반에 이미 Bt 제품이 연구개발 되었고, 1980년부터 본격적으로 산업체, 대학, 정부 출연연에서 연구개발이 시작되었다.
- 살충성 미생물 생물농약은 *B. thuringiensis* HD-1(미국 Valent Science사), *B. bassiana* GHA(미국 Bioworks사), *M. anisopliae* Green Muscle(유럽 연구프로젝트)가 개발되었다. 그 외 Harpin(미생물 추출 단백질, 미국 Eden bioscience사), Serenade(바실러스 미생물, 미국 Agrquest사), Triatum(곰팡이 미생물, 네덜란드 Koppert사)도 생물농약으로 개발되었다.
- 미국의 경우, '14년 EPA에는 137개의 미생물농약과 148개의 생화학농약이 등록되어 있고, 작물에 해를 끼치는 병해충 및 잡초 방제제 외에도 anthraquinone과 같은 조류를 쫓는 물질이라든지 bergamot oil과 같이 개나 고양이를 쫓는 물질도 포함되어 있다.
- 연간 3천만불 이상 매출의 비교적 큰 규모의 미생물농약 회사로는 Verdera OY사(미생물농약 시장의 5%), Certis USA사(미생물농약 시장의 6%), AgraQuest사(미생물농약시장의 6%) 등이 있고, 작지만 성공적인 회사로 평가받고 있는 회사로는 BioWorks사와 E-nema사가 있으며, 혁신적인 기술로서 이제 막 시작하는 회사로는 Pasteuria BioSciences사와 Exosect사 등이 알려져 있다 (참조: The Biopesticide bmarket, Business Communications Co., Inc., 2006).
- 유기합성 농약에 대한 병해충 잡초의 저항성 발현과 환경 생태 독성문제로 인하여, 대안으로서 생물농약에 대한 글로벌 다국적 작물보호제 기업들의 관심이 커지고 있으며, 주요 글로벌 기업인 Syngenta, Bayer, BASF 등은 핵심 기술을 보유한 생물농약 회사들을 인수 합병함으로써 새로운 제품개발에 박차를 가하고 있다(표 5).



표 6. 생물농약 업체 인수합병 및 제휴('10년~)

글로벌 기업	년도	인수합병 및 제휴 기업(비고)
Bayer	2010	AgroGreen ( <i>B. firmus</i> 살선충제 판매 주력회사) (인수가격: '12년 1,280 M US\$)
Syngenta	2012	Pasteuria Bioscience (인수가격: 86 M US\$ + milestone payment)
Novozyme	2012	Natural Industries
Koppert	2012	Itaforte(곤충병원성 곰팡이 제품 다수 보유)
Bayer	2012	AgraQuest(Serenade 주력 제품; 미생물 배양 전문 기업) (인수가격: 424 M US\$ + milestone payments)
BASF	2012	Becker Underwood(종자처리와 곤충병원성 선충 전문 기업) (인수가격: 1020 M US\$)
Andermatt	2012	AbiTep(독일 생물농약 업체 지분 확대)
Isagro	2012	AgraQuest와 지역 제품 판매 계약
Monsanto	2012	US Alynlam Pharmaceuticals(RNAi 기술 도입)
Bioworks	2012	CanHorta, Canadian Horticulture Alliance와 전략적 제휴
Syngenta	2012	Novozyme, Lonza과 생물농약 개발 전략적 제휴
Arysta Lifescience	2012	Laboratoires Goëmar(프랑스)와 전략적 제휴
Bayer	2013	Prophyta(Fungal based biologics 전문 기업)
FMC	2013	CAEB

(출처: AGROW World Crop Protection News, '13년, Philips McDougall AgriService, '14년)

○ 지식재산권현황

- 연도별 특허 출원 추이는 2001년부터 전체적으로 증가하고 있으며 미국 출원 건수가 전체의 43%를 차지하고 있으며 그 다음은 한국으로 32%를 차지하여 미생물을 이용한 기술개발이 활발히 진행되고 있다(그림 2).

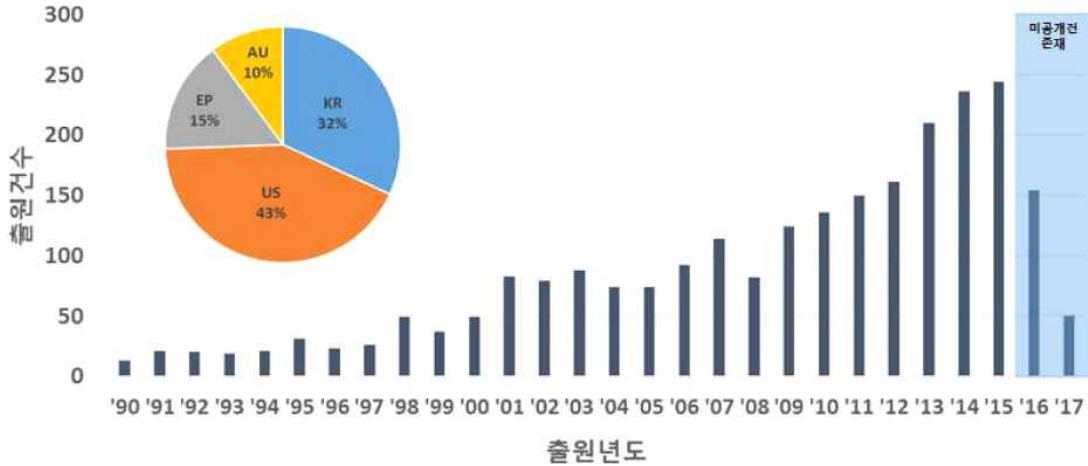


그림 2. 미생물을 이용한 지식재산권 출원 현황, 출처: 한국바이오협회, 2015

○ 표준화현황

- 새로운 기술에 관대한 미국의 경우 화학농약과 상이한 기준으로 신속하고 유연하게 case by case로 등록 심사를 하는 반면 안전성 평가(Risk assessment)를 중요시하는 유럽연합의 경우 화학농약과 동일하게 심사를 하고 있다. 이 결과 미국에 등록된 생물농약 원제(Active ingredient)의 수가 350개를 넘어서지만 유럽연합의 경우 11개의 기본물질(Basic substances)과 5개의 저위해성물질(Low risk substances)로 총 16개의 원제만이 등록되어 있다(Lars Huber, 2016, Biopesticides and the EU regulatory process, Agrow).

○ 기타현황: 해당 사항 없음

### 제 3 장 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

- 최종목표 : 식물바이러스 매개 흡즙 해충 방제용 곤충병원성 진균의 산업화
- 당해연도 연구개발 목표 및 결과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2018- 2019)	기초배양 조건 확립	후보 미생물의 배양 특성 파악	1) 배양적온 탐색 - 합성배지 - 곡물배지	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 합성배지(SDA)에서 온도에 따른 균사생육을 통한 배양적온을 검토한 결과 후보 균주 모두 25°C에서 최적의 생육을 나타내었음. 32.5°C를 넘을 경우 급격한 생육 저해가 일어나고 35°C 이상에서는 접종한 포자가 사멸됨.</li> <li>- 곡물배지(기장)에서의 포자생성 정도를 통한 배양적온을 검토한 결과 후보균주 모두 25 ~ 27.5°C 수준에서 최적의 포자생산이 이루어지는 것이 확인되었으며, 합성배지와 마찬가지로 32.5°C 부터는 급격한 생육저해와 35°C이상에서는 접종된 포자가 사멸되는 현상이 재현되었음.</li> </ul>
		고체/액체 배양을 위한 배지검토	1) 액체 배양배지 선발 2) 고체 배양조건 선발 - 멸균 함수율 - 물리성 개선 - 다양한 곡물검토	<ul style="list-style-type: none"> <li>1) 액체 배양배지 선발 - 8종의 세균, 방선균, 곰팡이 배양용 합성배지를 이용하여 포자생산량을 측정한 결과 TSB &gt; LB &gt; PDB &gt; MHB &gt; NB &gt; YMB &gt; SDB &gt; CDB 순으로 포자생산량이 높은 것이 확인되었음. 이러한 결과를 바탕으로 액체배양용 배지는 TSB 배지를 선발하였음</li> <li>2) 고체 배양조건 선발 - 10 ~ 100%까지의 멸균 함수율에 따른 물리성과 포자생산량을 측정한 결과 60% 멸균함수율에서 가장 우수한 물리성과 포자생산량이 확인되어 고체배양 조건의 멸균 함수량은 60%를 선발하였음</li> <li>- 고체배양 곡물 멸균시 caking(고결)화되는 현상을 줄이기 위해 식물성 오일을 투입하여 멸균/배양을 검토 한 결과, 오일 투입 처리구에서는 멸균 이후 물리성 개선이 확인되었으나, 접종된 균주의 초기 활착이 확연하게 느려지는 결과가 나타나 곡물배지 멸균시 식물성 오일은 투입하지 않는 것으로 하였음</li> <li>- 다양한 곡물에서의 포자 생산량을 검토</li> </ul>

				<p>한 결과 좁쌀 &gt; 찰보리 = 늘보리 &gt; 수수 &gt; 귀리 &gt; 찰현미 순으로 포자를 생산하는 것으로 나타났음. 좁쌀에서 후보균주 모두 <math>6.0 \sim 6.1 \times 10^9</math> conidia/g 수준의 포자가 생산되는 것이 확인되었음. 이러한 결과는 기장에서 나타난 포자수인 <math>3.0 \sim 3.5 \times 10^9</math> conidia/g 보다 약 2배가량 증가되었음.</p>
<p>살충효과 평가</p>		<p>후보 미생물의 살충 스펙트럼 분석</p>	<p>1) 해충 별 살충 활성 검토</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 살충 활성 검토의 경우 <math>1.0 \times 10^9</math> conidia/ml를 이용하였음.</li> <li>- 꽃노랑총채벌레: 선발균주의 포자현탁액 분무 처리 시, 균주 처리 후 6일차 조사 시 JEF-462, JEF-507 포자현탁액 모두에서 90% 이상의 사충률이 확인되었음.</li> <li>- 배추좀나방: 선발균주의 포자현탁액 분무 처리 시, 균주 처리 후 7일차 JEF-462, JEF-507 포자현탁액 모두에서 0%의 사충률이 확인되었음.</li> <li>- 톱다리개미허리노린재: 선발균주의 포자현탁액 분무 처리 시, 균주 처리 후 7일차 JEF-462, JEF-507 포자현탁액 모두에서 0%의 사충률이 확인되었음.</li> <li>- 복숭아혹진딧물: 선발균주의 포자현탁액 분무 처리 시, 균주 처리 후 7일차 조사 시 JEF-462에서 35.7%, JEF-507에서 28.5%의 사충률이 확인되었음.</li> <li>- 담배가루이: 선발균주의 포자현탁액 분무 처리 시, 균주 처리 후 12일차 조사 시 JEF-462에서 92.9%, JEF-507에서 91.7%의 사충률이 확인되었음.</li> </ul>
		<p>후보 미생물의 살충 활성 수준평가</p>	<p>1) 해충별 살충 활성 검토</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 살충 활성 수준평가는 꽃노랑총채벌레의 경우 <math>1.0 \times 10^{5-9}</math> conidia/ml, 담배가루이의 경우 <math>1.0 \times 10^{7-9}</math> conidia/ml를 이용하였음.</li> <li>- 꽃노랑총채벌레: JEF-462, JEF-507 모두 conidia/ml 분무처리 시, 농도가 높아질 수록 사충률이 높게 확인되었음.</li> <li>- 균주처리 후 7일차 사충률 ① JEF-462 <math>1.0 \times 10^5</math> conidia/ml: 53.3%</li> </ul>

				<p>1.0×10<sup>6</sup> conidia/ml: 53.3%</p> <p>1.0×10<sup>7</sup> conidia/ml: 53.3%</p> <p>1.0×10<sup>8</sup> conidia/ml: 56.7%</p> <p>1.0×10<sup>9</sup> conidia/ml: 100%</p> <p>② JEF-507</p> <p>1.0×10<sup>5</sup> conidia/ml: 3.3%</p> <p>1.0×10<sup>6</sup> conidia/ml: 50.0%</p> <p>1.0×10<sup>7</sup> conidia/ml: 53.3%</p> <p>1.0×10<sup>8</sup> conidia/ml: 100%</p> <p>1.0×10<sup>9</sup> conidia/ml: 100%</p> <p>- 담배가루이: JEF-462, JEF-507 모두 conidia/ml 분무 처리 시, 농도가 높아질수록 사충률이 높게 확인되었음.</p> <p>- 균주처리 후 12일차 사충률.</p> <p>① JEF-462</p> <p>1.0×10<sup>7</sup> conidia/ml: 45.6%</p> <p>1.0×10<sup>8</sup> conidia/ml: 58.7%</p> <p>1.0×10<sup>9</sup> conidia/ml: 89.3%</p> <p>② JEF-507</p> <p>1.0×10<sup>7</sup> conidia/ml: 46.3%</p> <p>1.0×10<sup>8</sup> conidia/ml: 49.5%</p> <p>1.0×10<sup>9</sup> conidia/ml: 86.0%</p>
살충성 미생물의 생태적 적용방법 연구	방제 대상 해충 (담배가루이, 오이총채벌레)의 생태 특성 분석	1) 생활사 분석 2) 살충성미생물에 대한 살충효과 평가	1) 생활사 분석 - 담배가루이: 25°C에서 3주 내에 한세대를 완성하는 것을 확인하였음. 2) 살충성미생물에 대한 살충효과 평가 - 담배가루이: 72개 균주 중 병원성, 열안정성, 포자생산성이 높은 2개 균주(JEF-462, JEF-507)를 선발하였음. - 총채벌레: 46개 균주 중 병원성, 포자생산성이 높은 1개 균주 <i>B.bassiana</i> A-54를 선발하였음.	
	최적의 적용 방법 도출	1) 적용 방법에 따른 살충효과 비교 평가 2) 미생물 처리농도에 따른 살충효과 비교	1)적용 방법에 따른 살충효과 비교 평가 - 담배가루이: JEF-507의 포자현탁액(1.0×10 <sup>7</sup> conidia/ml) 침치 처리 시, 균주 처리 후 5일차 90% 이상의 사충률이 확인되었으며 분무 처리 시, 균주 처리 후 8일차 80% 이상의 사충률이 확인되었음. - 총채벌레: JEF-507의 포자현탁액(1.0×10 <sup>7</sup> conidia/ml) 침치 처리 시, 균주 처리 후 5일차 90% 이상의 사충률이 확인되었으며, 곡물에 배양된 균주의 토양 처리 시, 균주 처리 후 14일차 개체수가 6마리로 감소한 것을 확인하였음 (Non-treated 의 경우 57마리로 증가,	

				<p>초기 10마리 처리).</p> <p>2) JEF-507 처리량에 따른 살충효과 비교</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 담배가루이: <math>1.0 \times 10^{5-7}</math> conidia/ml 침지 처리 시, 농도가 높아질수록 사충률이 높게 확인되었으며, 동일한 농도에서 두 균주 사이의 병원성에 차이를 확인하지 못하였음.</li> <li>- 균주처리 후 5일차 사충률</li> </ul> <p><math>1.0 \times 10^5</math> conidia/ml: 15% 내외  <math>1.0 \times 10^6</math> conidia/ml: 50% 내외  <math>1.0 \times 10^7</math> conidia/ml: 80% 내외</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 오이총채벌레: <math>1.0 \times 10^{5-8}</math> conidia/ml 침지 처리 시, 농도가 높아질수록 사충률이 높게 확인되었음.</li> <li>- 균주처리 후 7일차 사충률</li> </ul> <p><math>1.0 \times 10^5</math> conidia/ml: 79%  <math>1.0 \times 10^6</math> conidia/ml: 97%  <math>1.0 \times 10^7</math> conidia/ml: 100%  <math>1.0 \times 10^8</math> conidia/ml: 100%</p>
--	--	--	--	--



				농도가 처리되어야 활성을 보일 것으로 판단되며, 온실조건은 높은 습도조건에 대한 추가 실험이 필요할 것으로 판단됨.
제형화 연구	후보 균주 제형화 연구	1) 액상제형 최적화 연구		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 17종 계면활성제의 JEF-462, JEF-507에 대한 Spore 안정성을 검정한 결과, Polyoxyethylene dodecyl mono ether계, Polyoxyethylene sorbitan monooleate계, Polyoxyethylene octyl ether계가 비교적 안정적으로 Spore를 유지하지 하는 것으로 확인되었으며, 특히, Polyoxyethylene sorbitan monooleate계가 JEF-507 균주에 대해서 효과가 있는 것으로 확인되었음.</li> <li>- 7종의 증량제 Oil류를 선정하여 균주 JEF-462, JEF-507에 대해 Spore의 안정성을 검정한 결과, <i>B. bassiana</i> 포자의 경우, strain에 관계없이 대부분의 oil에서 안정적인 것으로 확인되었으며, 그 중 Corn oil은 다른 종류의 oil에 비해 포자안정성이 낮은 것으로 확인되었음.</li> <li>- Neem oil는 포자생존 억제효과가 없어 시너지 조합으로 가능하나 점성이 높아 OD제형으로 적용하기에는 부적합하였음.</li> </ul>
		2) 분상제형 최적화 연구		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 분상제형의 증량제 선발을 위해 9종을 선정하여 균주 JEF-462, JEF-507에 대해 Spore의 안정성을 검정한 결과, JEF-462는 원제 대비 증량제 처리구의 많은 조합에서 5~7배 이상의 생존율 하락이 확인되었으나 JEF-507은 비교적 안정적인 생존율을 보였으며, 특히 Zeolite와 Starch는 JEF-462, JEF-507에 모두 안정한 것으로 확인되었음. 다만, 선발된 증량제는 1개월 이후에는 생존율이 떨어지는 경향을 보여 추가적인 검토가 필요하였음.</li> <li>- 수화제 제형의 분산제 및 습윤제로 4종을 선정하였으며, 추가적으로 규조토계통의 증량제를 선정하였음. 이 후 계면활성제중 물에 용해되지 않고, 응집되는 Lignosulfonic acid, sodium salt를 제외한 3종과 조합하여 JEF-507 균주 5%를 첨가하여 균의 생존율을 각각 비교 검토하였음.</li> <li>- 증량제로 검토한 3종은 모두 규조토계통으로 모두 물에 불용으로 매우</li> </ul>



			<p>미세한 입자를 가진 분말형태의 물질이며 계면활성제와 증량제 조합과의 JEF-507균주의 생존율 차이를 확인하기 위하여 아래의 처방으로 상온 및 온도별(30°C, 35°C, 40°C, 54°C) 보관조건에서 비교 확인하였음. 확인 결과, 54°C 보관 조건에서는 균주의 생존이 확인되지 않았으며, 40°C이하에서는 처방의 조합에 따라 차이가 있었으나 생존율이 비교적 안정적인 처방도 확인되었음.</p> <p>- 이러한 결과로부터, <i>B. bassiana</i> JEF-507 균주는 40°C 이하로 보관 관리가 필요하며, 계면활성제와 증량제의 조합에 따라 안정적인 처방의 선발이 가능하였음.</p>
살충성 미생물의 생태적 적용방법 연구	포자생산성, 열안정성 향상 곡물배지 기질 선발	1) 12가지 곡물배지 별 포자생산성 및 열안정성(dish 조건) 확인	<p>- 12가지 곡물에서 포자생산성을 확인한 결과 기장, 쌀에서 높은 포자생산성을 확인할 수 있었음.</p> <p>- 12가지 곡물에서 열안정성 확인한 결과 JEF-462에서는 기장, 수수, 쌀이, JEF-507에서는 귀리와 기장이 높은 열안정성을 확인할 수 있었음.</p> <p>- 기질 평가 결과 두 균주 모두 열안정성과 포자 생산성이 높게 나타난 기장에서 배양하는 것이 가장 적합하다고 판단됨</p>
	살충효과 증진 기질 선발	2) 선발한 곡물배지에서 생산된 포자의 살충효과 비교	<p>- 병원성과 열안정성이 우수한 JEF-507 균주를 이용하여 기장과 베트남쌀에서 고체배지를 확보하였음.</p> <p>- 기장과 쌀에서 배양된 JEF-507을 이용하여 담배가루이에 대한 병원성 검정을 진행한 결과 쌀에서 배양된 JEF-507 처리한 처리구에서 높은 살충활성이 확인되었음.</p>
	형광유전자 발현 system을 통한 침입기작 구명	3) egfp 유전자 cloning 후 AtMT 방법을 통한 fungal transformation 진행. egfp-transformant 분리 및 확인 후 대상 해충 침입 및 환경 정착 확인	<p>- JEF-507 균주에 대한 형광균주 확보를 위한 selection marker(선별마커) 로서 항생제 저항성 확인결과 PPT 처리된 배지에서는 생육이 억제되는 것으로 확인되었음.</p> <p>- pCambia-egfp vector에 pBARKS1에서 확보한 bar expression cassette를 integration을 하였음.</p> <p>- pCambia-egfp-bar vector를 이용하여 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mediated transformation(AtMT)</p>

				방법 세팅완료.
		살충성 유전자의 특이성 구명	살충성 유전자의 다양성 비교 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>B. bassiana</i>의 주요 유전자의 다양성 비교 분석을 위해 아시아, 유럽, 아프리카 등 다양한 지역에서 채집된 곤충병원성 진균 42개의 균주를 선발하였음.</li> <li>- 선발된 균주의 담배가루이에 대한 살충효과와 non-synonymous change를 비교하였음.</li> <li>- 그 결과 <i>LCCL</i>, <i>Volvatoxin</i>, <i>Biotrophy associated protein 2</i>, <i>Lectin-like protein</i>과 같은 유전자들이 관여함을 알 수 있음.</li> </ul>

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
3차년도 (2020 -2021)	살충성 미생물 제형화	분상제형 최적화연구	1) 포자발아 개선검토	- 포자발아 비교시험을 통해 기존 처방 중 규조토가 포자발아를 억제함을 확인, 규조토를 제외하고 수용성 Cellulose를 선발하여 포자발아 개선 완료.
			2) 분산성 개선	- 분산성에 문제가 발생한 수용성 Cellulose 함량을 낮추면서 포자발아 수준은 유지시키는 수용성 당류, 염류를 선발하여 분산성을 개선 완료
			3) 분상제형의 최적화	- 부자재 최적 함량을 결정하고 물성시험을 통해 분상제형의 최적화를 완료
		입상제형 최적화연구	1) 입상제형 기초검토	- 계면활성제인 Polyoxyethylene dodecyl monoether계와 Polyoxyethylene sorbitan monooleate계 2종과 입상제형의 증량제로 사용되는 입상규조토와 입상 Zeolite 2종을 사용하여 처방검토를 진행결과 저조한 포자발아 확인 - 4종 Oil류를 이용하여 입상제형에 처방하였을 경우에도 포자발아를 촉진시키는 Oil은 없었음
			2) 포자발아 개선검토	- 증량제인 Perlite, 입상 Zeolite가 포자발아를 억제시키는 것을 확인하여 개선처방을 통해 포자발아 개선 완료
			3) 입상제형의 최적화	- 수용성 cellulose, Polyoxyethylene sorbitan monooleate계, Polyethylene glycol류를 선발하였고 증량제로 새로운 천연광물질 1종을 선발하여 최적 함량을 결정하고 입상제형의 최적화 완료
	현장 적용성 평가	상업화 후보 분상제형/입상 제형 제품의 현장 적용 평가	1) 분상제형 활성검정	- 총 3가지 분상제형을 가지고 현장 적용 평가를 진행하였고 분상제형 처방38이 최종 상업화 후보 제품으로 선발되었으며 고추포장에서 관주처리 시 꽃노랑총채벌레 대상 방제가 57.4% 확인
			2) 입상제형 활성검정	- 최종 상업화 후보 제품인 입상제형 처방 23을 가지고 현장 적용 평가를 진행하였고 고추포장에서 토양 표면처리 시 꽃노랑총채벌레 대상 방제가 53.5% 확인
		약해 안전성 평가	1) 분상제형 약해 안전성 평가	- 분상제형의 약해 안전성 평가 결과 문제없음을 확인

		2) 입상제형 약해 안전성 평가	- 입상제형의 약해 안전성 평가 결과 문제없음을 확인
선발 살충성 미생물의 보관 안정성 평가	<i>B. bassiana</i> JEF-507의 보관 안정성 검정	포자원제의 온도별 보관 안전성 검정	- 기장에서 생성된 포자를 4°C 에서 보관 시 12개월 동안 90% 이상의 높은 포자 발아율을 확인
	분상제형의 보관 안정성 검정	분상제형 제품의 열안정성 검정	- 분상제형 제품의 열안정성 평가 결과 경쟁제품과 비슷한 안정성 확보
	분상제형의 활성 검정	분상제형 제품의 분무처리 <i>in-vitro</i> 병원성 검정	- 분상제형 제품의 병원성 검정 결과 500배 희석 처리시 100% 치사율 확인 - 분상제형 제품의 병원성 검정 결과 5,000배 희석 처리시 70±2% 치사율 확인

## 1. 기초/대량 배양조건 확립

### 가. 배양 조건 확립

#### 1) 배양적온 탐색

##### - 시험용 균주

시험에 사용된 *Beauveria bassiana* 균주는 협동연구기관(전북대)에서 선발된 JEF-462 (A-67), JEF-507(A-70)을 분양받아 진균 배양에 널리 이용되는 SDA(sabouraud dextrose agar, MB cell) 배지에 접종하고 저온배양기에서 25°C에서 7일간 배양하였음. 이때 발생하는 포자를 멸균 거즈와 멸균수(+0.03% silwet)를 이용하여 회수한 뒤 30% glycerol stock을 제작하고 -80°C 초저온냉동고에 보관하며 본 연구개발에 활용하였음.

##### - 합성배지에서의 배양적온 탐색

SDA 배지의 중앙에 후보 균주의 glycerol stock을 5 $\mu$ l 씩 접종 한 뒤 20~40°C 범위의 온도를 2.5°C 간격으로 나누어 배양하고, 균사의 생육정도를 측정하여 생육적온을 선발하였음. 후보 균주 모두 20~30°C 범위의 온도에서 안정적인 균사 생장이 이루어지는 것이 확인되었으며, 특히 25°C 에서 가장 높은 수준의 균사 생장을 나타내었음. 후보균주 모두 32.5°C부터 급격한 균사 성장저해를 나타내고 있으며, 35°C 이상의 온도에서 7일간 노출될 경우 접종된 포자가 모두 사멸되어 상온으로 옮기더라도 균사 생육을 확인할 수 없었음. 30~32.5°C 구간에서 JEF-507 균주가 JEF-462 보다 근소하게 균사 생육이 우세한 것으로 나타나 후보 균주별 내열성은 JEF-507 이 JEF-462 보다 근소하게 우세한 것으로 판단되었음(그림 1).

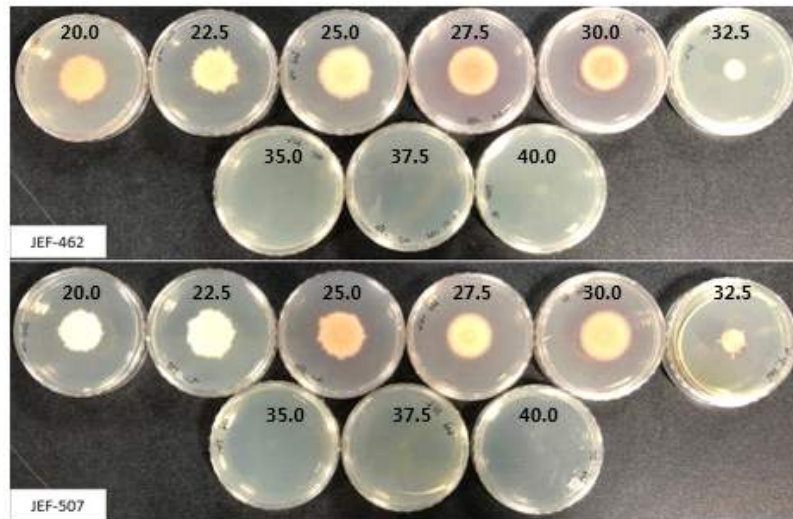
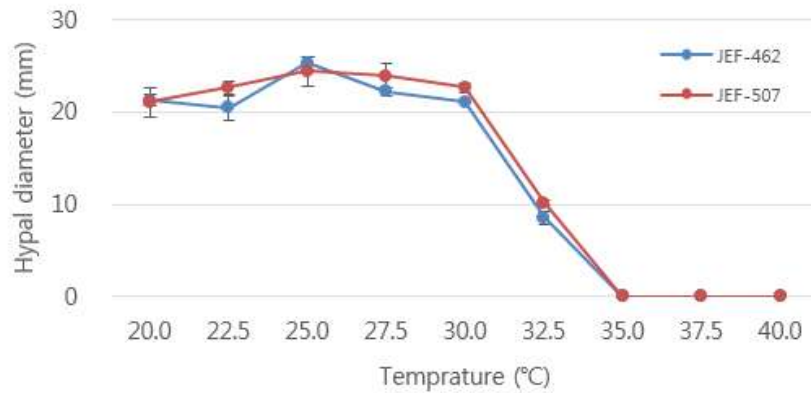


그림 1. SDA배지에서의 배양적온 탐색과 균주별 내열성 차이  
(상: 균사 생육 패턴, 하: SDA plate)

- 곡물배지(기장)에서의 배양적온 탐색

곡물배지 접종에 필요한 seed는 glycerol stock 100 $\mu$ l를 SDB 배지 50ml(250ml flask)에 접종하고 3일간 진탕배양(25°C, 180rpm)하여 준비하였음. 비닐백에 기장 50g을 증류수 20ml을 넣고 121°C에서 50분간 멸균 하여 고체배양용 곡물배지로 준비한 뒤, seed를 1ml 씩 접종하고, 20 ~ 40°C 범위의 온도를 2.5°C 간격으로 나누어 배양하며 육안으로 보이는 포자 발생 정도와 Hemocytometer를 이용하여 포자수를 계수하여 생육적온을 선발하였음. 후보균주 모두 25~30°C 범위의 온도에서 안정적인 포자형성이 관찰되었으며, 특히 27.5°C에서 포자형성이 가장 빠르게 나타나는 것으로 관찰되었음. 후보균주 모두 32.5°C부터 급격한 포자형성 저해가 나타났고, 35°C 이상의 온도에서는 포자발생을 확인할 수 없었음. 곡물배지를 21일간 배양한 뒤 곡물 1g을 덜어 멸균수(+0.3% silwet)를 이용하여 포자를 털어낸 뒤 현미경으로 계수한 결과 27.5°C에서 JEF-507은  $3.5 \times 10^9$  conidia/g, JEF-462는  $3.0 \times 10^9$  conidia/g 수준으로 확인되었음(그림 2).

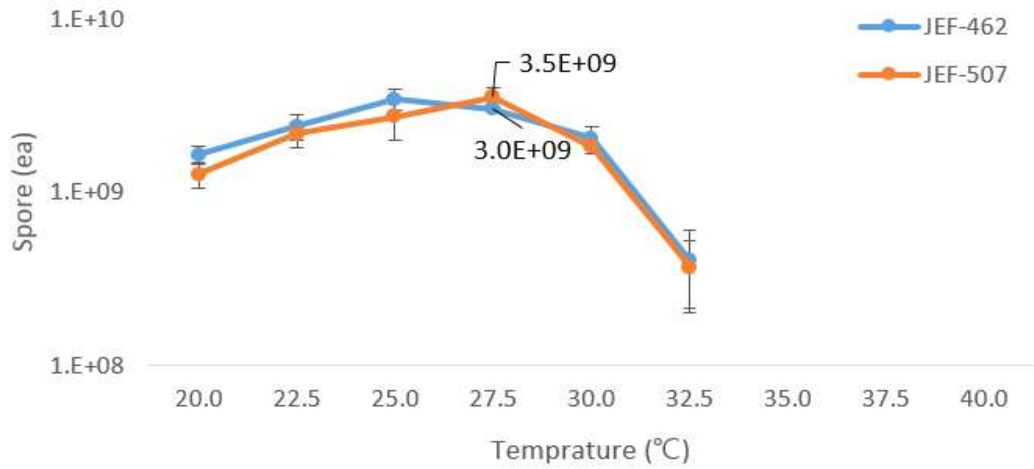


그림 2. 곡물배지에서의 생육적온 탐색  
(상: 곡물배지에서의 포자수, 하: 곡물배지에서의 포자 발생)

## 2) 액체배양용 배지선발

- 접종원으로 이용할 액체배양용 배지의 선발을 위해 PDB(potato dextrose broth, MB cell), TSB(tryptic soy broth, MB cell), SDB(sabouraud dextrose broth, MB cell), LB(luria-bertani broth, MB cell), NB(nutrient broth, MB cell), CDB(czapek-dox broth, MB cell), MHB(meuller hinton broth, MB cell), YMB(yeast malt broth, MB cell)와 같은 8종의 상용 배지에서의 포자 형성율을 측정하였음. 각각의 배지는 제조사의 권장 제조 방법으로 50mL 씩 250mL flask 에 제조한 뒤 멸균하여 준비하고, 접종원은 후보균주의 glycerol stock을 100μL 씩 접종 한 뒤 25°C 진탕 배양기에서 150rpm으로 33시간 배양하였음. 이후 멸균된 거즈를 이용하여 균체를 걸러낸 뒤 수득된 포자를 serial dilution하고 SDA 배지에 도말하여 발생하는 colony를 계수하여 우수한 액체배양용 배지를 선발하였음. 시험결과 TSB > LB > PDB > MHB > NB > YMB > SDB > CDB 의 순으로 포자 발생률이 나타났음. 후보 균주별로 배지에 따라 포자형성율이 일부 다른 것도 있었지만 대략적인 패턴은 상술한 것과 같이 나타났음. 특이하게도 곰팡이 전용 배지보다는 세균이나 방선균 배양 배지에서 높은 포자형성율이 관찰되었고, 이러한 결과를 바탕으로 향후 seed 배양용 액체 배지로 TSB를 선발하였음(그림 3).

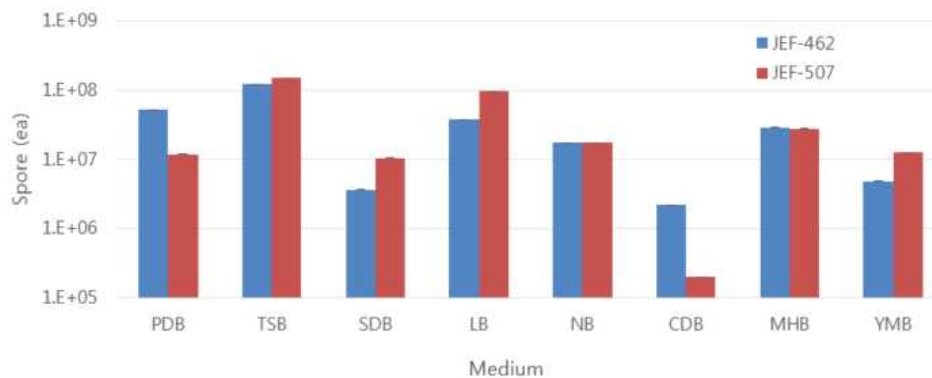


그림 3. 상용배지에서의 포자 형성율 비교

## 3) 고체배양 조건선발

### - 멸균 함수율

곡물을 이용한 고체배양용 배지 제조 시 접종된 균주의 원활한 정착과 안정적인 포자생산을 위한 멸균시 함수율을 측정하기 위해 곡물(기장) 100g을 250mL flask에 넣고 증류수를 중량대비 10~100% 로 투입한 뒤 121°C에서 50분간 멸균하고, 접종원으로는 TSB 배지에서 25°C, 180rpm에서 33시간 진탕 배양된 포자현탁액을 1mL씩 접종 후 flask를 흔들여 균질화 하였음. 접종된 flask는 25°C 배양기에서 배양하면서 균사의 생육과 포자의 발생정도 그리고 곡물배지의 물리성을 함께 관찰하였음. 시험결과 멸균직후 함수율에 따른 곡물배지의 물리성은 10~20% 함수율의 경우 곡물 전체적으로 수분을 머금기에 충분하지 않아 건조된 상태로 보였으며, 30~100% 의 함수율의 경우 수분을 충분히 머금고 멸균된 상태로 확인되었음. 하지만 flask를 흔들었을 때 멸균된 곡물이 떨어져서 충분한 공극을 만드는 정도는 30~60% 의 함수율까지 나타났으나, 70~100 % 함수율의 경우 flask를 흔드는 강도를 높이더라도 곡물이 caking(고결)화 되어 바닥면에서 떨어지지 않고, 전혀 공극을 만들지 못하는 매우 불량한 물리성이 확인되었음. 접종 4일 후 접종된 균주의 정착은 후보균주 모두 30% 함수율에서 가장 빠르게 정착되는 것이 확인되었으며, 30 > 40 > 50%



함수율 순으로 정착율이 높아지는 것으로 나타났음. 70~100% 함수율의 경우 접종된 부분에만 하얗게 균사가 발생할 뿐 주변으로의 확산은 관찰되지 않았음. 접종 22일후 10~20 % 함수율의 경우 수분함량이 절대적으로 부족하여 접종된 균주가 전혀 활착 및 성장하지 못하는 것이 확인되었고, 30 ~ 100 % 함수율에서는 하얗게 균사 및 포자가 형성된 것이 관찰되었으나, flask 밑 부분에서의 균사 생육정도는 30~60 % 함수율이 가장 우수하였고, 그 중 60% 함수율에서는 투입된 곡물 전체적으로 균일하게 포자가 형성된 것이 확인되었음. 70~100% 함수율의 곡물 배지는 caking 현상의 불량한 물리성으로 인해 균사가 하단부까지 원활하게 침투되지 못하는 것이 관찰되었고, 이로 인해 원활한 배양이 어려운 것이 확인되었음. 따라서 곡물을 이용한 고체배양용 배지 제조 시 필요한 멸균 함수량은 60% 수준으로 선발하였음(그림 4).

함수율 (%)		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
멸균직후											
4 DAT	JEF-462										
	JEF-507										
22 DAT	JEF-462										
	JEF-507										
물리성 (22 DAT)	JEF-462										
	JEF-507										



멸균 함수율 (60%)

그림 4. 고체배양용 곡물배지 제조시 멸균 함수량에 따른 물리성과 균주의 생육  
(상: 멸균 함수량에 따른 물리성과 균주의 생육, 하: 멸균 함수량 60%에서의 포자 발생)

- 곡물배지 물리성 개선 검토

고체 배양용 배지 제조 시 식물성 오일을 투입하여 멸균시킬 경우 caking화를 억제하여 통기성 및 물리성을 개선시킬 수 있을 것이라 판단되어 멸균 가능한 비닐백에 곡물(기장) 100g에 현미오일 3g, 6g, 9g을 각각 투입시킨 뒤 증류수를 중량대비 60% 투입한 뒤 121°C에서 50분간 멸균하여 곡물배지를 준비하고, 접종원으로는 TSB 배지에서 25°C, 180rpm에서 33시간 진탕 배양된 포자현탁액을 1mℓ 씩 접종한 뒤 비닐백을 손으로 주물러 균질화 한 뒤 25°C 배양기에서 배양하면서 균사의 생육과 포자의 발생정도 그리고 곡물배지의 물리성을 함께 관찰하였음. 시험결과 곡물배지(기장)에 현미오일을 첨가하여 멸균할 경우 caking화 되는 현상은 현저하게 줄어들어 물리성이 개선되는 것이 확인되었음. 하지만 접종 이후 균주의 활착이 불량해지는 것이 관찰되었으며, 오일 함량이 9g 까지 증가할 경우 균주의 생육 및 포자발생이 현저하게 줄어드는 것이 관찰되었음. 따라서 곡물배지 제조 시 물리성 개선을 위해 식물성 오일을 첨가하는 것은 효과적이지 않다는 것이 확인됨(그림 5). 포자가 형성된 곡물배지를 상온에서 4일간 건조시킬 경우 수분이 증발됨에 따라 중량대비 2배 정도 포자수가 증가하는 것으로 나타났음.

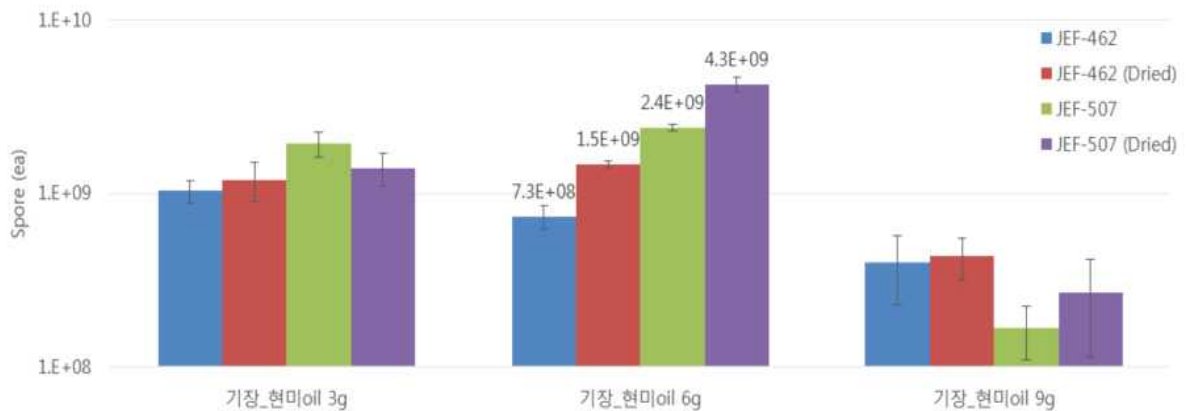


그림 5. 곡물배지 제조시 물리성 개선을 위한 오일첨가 효과

- 다양한 곡물배지 검토

후보균주의 포자생산에 효율적인 고체배양용 곡물배지의 선발을 위해 귀리, 찰보리, 늘보리, 좁쌀, 찰현미, 수수와 같은 곡물 6종에서의 포자 생산량을 검토하였음. 6종의 곡물을 100g 씩 멸균 가능한 비닐백에 넣고, 증류수를 중량대비 60% 투입한 뒤 121°C에서 50분간 멸균하여 곡물배지를 준비하고, 접종원으로는 TSB 배지에서 25°C, 180rpm에서 33시간 진탕 배양된 포자현탁액을 1mℓ 씩 접종한 뒤 비닐백을 손으로 주물러 균질화 한 뒤 25°C 배양기에서 21일간 배양하고 배양직후와 실내에서 4일간 건조 시킨 후 포자 생산량을 측정하였음. 시험결과 건조된 포자를 기준으로 좁쌀 > 찰보리 = 늘보리 > 수수 > 귀리 > 찰현미 순으로 포자가 발생되는 것이 확인되었음. 가장 우수한 포자생산량을 나타낸 좁쌀에서의 포자생산량은 후보균주에 따라 별 차이 없이  $6.0 \sim 6.1 \times 10^9$  conidia/g 수준으로 확인되었음. 이러한 결과는 기장에서 나타난 포자수인  $3.0 \sim 3.5 \times 10^9$  conidia/g 보다 약 2배가량 증가된 것으로 향후 대량배양에 활용 가능할 것으로 판단되었음(그림 6).

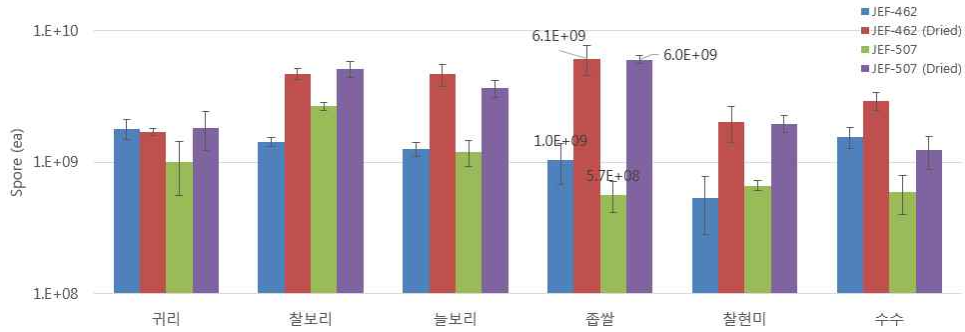


그림 6. 다양한 곡물배지에서의 포자 생산성

나. 대량 배양 검토

- JEF-462 대비 JEF-507 균주의 포자생산성, 열안정성, 약효에서 우수함이 지속 확인되어 대량배양을 위한 검토는 JEF-507에 대하여 수행하였음. 또한 곡물의 경우 자체 6곡물, 협동연구기관(전북대)의 12곡물 시험결과 및 생산단가를 고려하여 최종 곡물은 기장으로 수행하였음. 먼저 -80°C glycerol stock의 균주 해동 후 TSA(tryptic soy agar) 배지에 도말 하여 25°C 조건으로 125시간 배양 하여 1차 접종원을 준비하였음. 이 후 멸균된 기장곡물(50g/250ml flask)에 접종 후 25°C, 125시간 동안 배양하여 2차 접종원을 실시하였음. 대량 배양을 위해 기장 1,800kg을 준비 후 세척 및 증자 후 균 배합을 수행하였음(그림 7). 균 배합 곡물은 입상 후 25°C 조건에서 125시간 동안 배양하였으며, 배양이 완료된 곡물 및 포자는 72시간 동안 송풍건조 수행 후 포자 회수를 진행하였음(그림 8).



그림 7. 원료 처리 및 균 배합



그림 8. 입상, 배양 및 건조 작업

- 최종 고체배양 수행 시 기장 1,800kg의 곡물을 이용하여 입제타입의 곡물 분말을 70~80% 수준으로 회수할 수 있었으며, 2차 포자 회수 시 약 10kg의 순수 포자를 회수 하여 최종 회수율은 약 0.55%로 확인됨(그림 9). 포자 농도 확인을 위해 CFU 검정을 수행하였으며, 0.5% tween 80 용매 희석 후 3반복으로 PDA 배지에 도말 검정 결과  $1.7 \times 10^{11}$ 의 포자 농도를 확인하였음.



그림 9. 대량 배양된 JEF-507 균주의 포자

#### 다. 후보 미생물 원제의 기초 활성평가

##### 1) 후보 미생물의 살충 스펙트럼-1

###### (1) 꽃노랑총채벌레에 대한 살충효과 검정(분무처리, 3반복)

- JEF-462, JEF-507 2개의 균주( $1.0 \times 10^9$  conidia/ml)를 이용하여 꽃노랑총채벌레에 대한 살충효과 검정을 다음과 같은 방법을 이용하여 진행하였음. Insect breeding dish에 filter paper(90mm)를 배치하고 D.W. 1ml을 처리하여  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도  $60 \pm 2\%$ 를 유지시켜 주었으며, 콩(잡두) 떡잎에 (주)경농 살충제 사육실에서 사육하고 있는 (온도:  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도:  $60 \pm 2\%$ ) 꽃노랑총채벌레 성충을 반복 당 10마리씩 접종한 후 균주 현탁액 5ml을 분무 처리하였음. 조사의 경우 24시간 간격으로 사충을 조사하였으며, 그 결과, 균주처리 후 6일차 조사 시 JEF-462 100%, JEF-507 90.0%의 사충률을 확인하였음. 선발된 균주 모두 꽃노랑총채벌레에 활성이 있는 것으로 판단되었음. 차후 농도별 활성평가를 진행을 하였음.

###### (2) 배추좀나방에 대한 살충효과 검정(분무처리, 3반복)

- 배추좀나방에 대한 살충효과 검정을 다음과 같은 방법을 이용하여 진행하였음. 양배추(품종: 다이아) 6cm 크기로 제작한 leaf disk를 Petri dish에 배치한 filter paper(90mm)위에 올려 (주)경농 살충제 사육실에서 사육하고 있는 (온도:  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도:  $60 \pm 2\%$ ) 배추좀나방 3령충을 반복 당 10마리씩 접종한 후 균주 현탁액 5ml을 분무 처리하였음. 온습도 조절의 경우 Filter paper에 D.W. 1ml을 처리하여  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도  $60 \pm 2\%$ 를 유지시켜 주었으며, 24시간 간격으로 사충을 조사하였음. 그 결과, 균주처리 후 7일차 조사 시 까지 JEF-462, JEF-507 균주 모두 유충이 성충으로 우화하였으며, 0.0%의 방제효과를 나타내어 배추좀나방에는 활성이 매우 저조한 것으로 판단되었음.

(3) 톱다리개미허리노린재에 대한 살충효과 검정(분무처리, 3반복)

- 톱다리개미허리노린재에 대한 살충효과 검정을 다음과 같은 방법을 이용하여 진행하였음. 톱다리개미허리노린재의 경우 (주)경농 살충제 사육실에서 사육하고 있는 (온도:  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 상대습도:  $60\pm 2\%$ ) 약충을 반복 당 10마리씩 접종한 후 균주 현탁액 5mL을 분무 처리하였음. Phytohealth에 기주(노란콩)와 D.W.(탈지면 1cm 이용)을 배치하였으며,  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $60\pm 2\%$ 를 유지시켜 주었음. 약효조사의 경우 24시간 간격으로 사충을 조사하였음. 그 결과, 균주처리 후 7일차 조사 시 까지 JEF-462, JEF-507 균주 모두 0.0%의 방제효과를 나타내어 톱다리개미허리노린재에 대해서는 활성이 매우 저조한 것으로 판단되었음.

(4) 복숭아혹진딧물에 대한 살충효과 검정(분무처리, 3반복)

- 복숭아혹진딧물에 대한 살충효과 검정을 다음과 같은 방법을 이용하여 진행하였음. 복숭아혹진딧물의 경우 양배추 6cm 크기로 제작한 leaf disk를 Petri dish에 배치한 Filter paper(55mm)위에 올려 (주)경농 살충제 사육실에서 사육하고 있는 (온도:  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 상대습도:  $60\pm 2\%$ ) 복숭아혹진딧물 성충을 반복 당 10마리씩 접종한 후 균주 현탁액 5mL을 분무 처리하였음. 약효조사의 경우 24시간 간격으로 사충을 조사하였으며, 시간이 지남에 따라 발생하는 산자를 제거하였음. 그 결과, 균주처리 후 7일차 조사 시 JEF-462 35.7%, JEF-507 28.5%의 방제효과를 나타내어 진딧물에 대한 활성은 저조한 것으로 판단되었음.

(5) 담배가루이에 대한 살충효과 검정(분무처리, 3반복)

- 담배가루이에 대한 살충효과 검정을 다음과 같은 방법을 이용하여 진행하였음. 담배가루이의 경우 1일 동안 담배가루이 알을 산란 받은 토마토(품종: 슈퍼도태랑)를 1주일 후 상위 1엽을 제외한 나머지 엽은 제외한 뒤 담배가루이 2령충에 대해 균주 현탁액 5mL을 분무 처리 하여 온도:  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 상대습도:  $60\pm 2\%$ 의 사육실에서 우화율을 조사하였음. 그 결과, 균주처리 후 12일차 조사 시 JEF-462 89.3%, JEF-507 86.0%의 방제효과를 나타내어 담배가루이에 대한 활성은 우수한 것으로 판단되었음. 차후 농도별 활성평가를 진행을 하였음.

표 1. JEF-462, JEF-507 균주에 대한 스펙트럼 검토 결과(O: 활성있음, X: 활성없음)

해충명	JEF-462	JEF-507
꽃노랑총채벌레	O	O
톱다리개미허리노린재	X	X
배추좀나방	X	X
복숭아혹진딧물	X	X
담배가루이	O	O

## 2) 후보 미생물의 살충 활성평가-2

### (1) 꽃노랑총채벌레

- JEF-462, JEF-507 2개의 균주를  $1.0 \times 10^{5-9}$  conidia/ml의 포자농도에서 꽃노랑총채벌레에 대한 살충활성 수준을 평가하기 위해 다음과 같은 방법을 이용하여 진행하였음. Insect breeding dish에 filter paper(90mm)를 배치하고 D.W. 1ml을 처리하여 온도  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도  $60 \pm 2\%$ 를 유지시켜 주었으며, 콩(품종: 잠두) 떡잎에 (주)경농 살충제 사육실에서 사육하고 있는 (온도:  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도:  $60 \pm 2\%$ ) 꽃노랑총채벌레 성충을 반복 당 10마리씩 접종한 후 균주 현탁액 5ml을 분무 처리하였음. 조사의 경우 24시간 간격으로 사충을 조사하였으며, 농도가 높아짐에 따라 높은 방제효과를 보였음(표 2). 약제처리 7일 후 100% 방제효과를 보인 균주는 JEF-462  $1.0 \times 10^9$  conidia/ml과 JEF-507  $1.0 \times 10^{8-9}$  conidia/ml 였으며, 나머지 포자수에 대한 균주의 경우 60% 이하의 방제효과를 나타내었음. 제품화 최종 균주는 JEF-507로 해당 시험 결과로 최소 제품의 상용농도에 함유된 포자농도는  $LC_{50}$  수치인  $2.24 \times 10^6$  conidia/ml 가 필요함을 확인함.

표 2. 꽃노랑총채벌레에 대한 균주 별  $LC_{50}$ ,  $LC_{90}$  value

Strains	N	$LC_{50}$ (conidia/ml DR factor <sup>a</sup> ) (95% CL <sup>b</sup> )	$LC_{90}$ (conidia/ml DR factor <sup>a</sup> ) (95% CL <sup>b</sup> )	Slope
JEF-462	180	$5.43 \times 10^5$	$6.01 \times 10^9$	5.5
JEF-507	180	$2.24 \times 10^6$	$4.72 \times 10^7$	15.6

<sup>a</sup> conidia/ml DL rate factor : Colony Forming Unit Dilution Rate factor

<sup>b</sup> 95% CL : 95% Confidence limits

### (2) 담배가루이

- 최종 선발된 2개의 균주를  $1.0 \times 10^{7-9}$  conidia/ml의 포자농도에서 담배가루이에 대한 살충활성 수준을 평가하기 위해 다음과 같은 방법을 이용하여 진행하였음. 1일 동안 담배가루이 알을 산란 받은 토마토(품종: 슈퍼도태랑)를 1주일 후 상위 1엽을 제외한 나머지 엽은 제외한 뒤 담배가루이 2령충에 대해 균주 현탁액 5ml을 분무 처리 하여 온도:  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도:  $60 \pm 2\%$ 의 사육실에서 우화율을 조사하였음. 그 결과, 약제처리 12일 후 85% 이상의 방제효과를 보인 균주는 JEF-462  $1.0 \times 10^9$  conidia/ml과 JEF-507  $1.0 \times 10^9$  conidia/ml 였으며, 나머지 포자수에 대한 균주의 경우 60% 이하의 방제효과를 나타내었음.

## 3) 미생물 JEF-507 대량배양 원제의 꽃노랑총채벌레에 대한 살충효과 검정

### (1) 시험 곤충

- 시험곤충인 꽃노랑총채벌레(*Frankliniella occidentalis*)는 2020년 3월 충청북도농업기술원으로부터 분양받은 개체를 이용하여 (주)경농 살충제 사육실에서 누대 사육한 개체임. 누대사육 온도는  $24 \pm 5^\circ\text{C}$ , 습도는  $30 \pm 5\%$ , 광주기는 16L:8D로 설정하였음. 누대사육은 Insect breeding dish(Diameter 10cm, Height 4cm)에 filter paper(90mm)를 배치하고 D.W. 1ml을 처리한 후 parafilm을 3cm x 3cm로 잘라 filter paper에 올려주고 콩(품종:



백태)을 파종하여 발아시킨 떡잎을 parafilm 위에 떡잎 3~4장씩 올려 기주로 사용하였음.

## (2) 시험 약제

- 본 과제를 통해 선발된 균주 *B. bassiana* JEF-507 포자를 시험에 사용하였으며, 처리농도는  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  conidia/ml 로 하였으며, 대조물질은 총채벌레류에 활성을 가진 화학약제 플룩사메타마이드 유제 9%(상품명: 캡틴®)로 처리농도는 상용농도인 45ppm으로 하였음.

## (3) 시험 방법

- 꽃노랑총채벌레에 대한 활성평가는 사육 시 사용하는 Insect breeding dish를 이용하여 filter paper를 아래쪽에 배치시키고 D.W. 1ml 처리한 후 parafilm을 3cm x 3cm를 filter paper에 올려 주었음. Parafilm 위에 꽃노랑총채벌레를 접종 후 소형 스프레이를 이용하여 약제가 균일하게 처리되도록 분무처리 하였음. 분무처리가 끝난 뒤 기주인 콩 떡잎을 1장 올려주었으며 약제 처리 후 24시간 간격으로 8일차 까지 생충수를 조사하여 치사율을 산출하였고, 시험은 농도 당 3반복, 반복당 10마리를 접종하였음(그림 10).

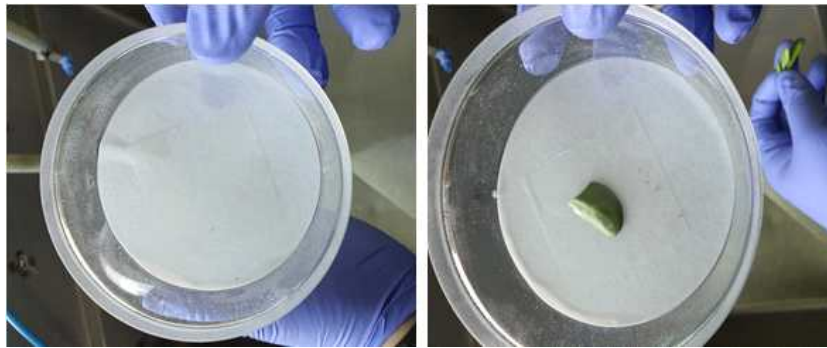


그림 10. 총채벌레 접종 후 약제처리(좌) 및 약제처리 후 콩(떡잎) 입식

## (4) 시험 결과

- *B. bassiana* JEF-507 균주의 농도별 꽃노랑총채벌레에 대한 활성평가 결과는 conidia/ml가 높아짐에 따라 방제효과가 일정하게 상승하는 것을 확인 할 수 있었음(표 3). 활성평가 기간 중 80% 이상 방제가 보인 기간은  $10^6$  conidia/ml에서는 8일차까지 80%에 도달하지 못했으며,  $10^7$  conidia/ml에서는 약제처리 후 8일차,  $10^8$ 과  $10^9$  conidia/ml에서는 약제처리 후 5일차에 80% 이상의 방제가를 나타내었음. 대조약제로 처리된 플룩사메타마이드 유제 45ppm 처리구는 약제처리 24시간부터 100% 방제효과를 나타내었음. 꽃노랑총채벌레에 대한 *B. bassiana* JEF-507의 활성평가 결과 초기치사율(24시간)을 제외하면  $10^7$  conidia/ml 수준에서 방제약제 적용이 가능할 것으로 판단되었으며, 활성평가 기간에 설정된 낮은 습도는 온실포장에서의 습도보다 낮을 것으로 판단되어 습도에 따라 활성의 차이가 분명한 *B. bassiana* 균주의 활성에 영향을 주었을 것으로 판단이 됨. 습도가 낮은 야외 조건에서 *B. bassiana* 처리 농도는 꽃노랑총채벌레의 경우  $10^7$  conidia/ml 수준이 적합할 것으로 판단되며, 총채벌레의 유충과 번데기의 기간을 땅속에서 보내는 것을 가만하여 화학농약의 경우에도 7일 간격 2회 처리를 기본으로 하고 있기 때문에 방제가 2회로 적용이 된다면 보다 낮은 농도에서도 활성을 확인 할 수 있을 것으로 판단됨.

표 3. JEF-507 균주의 꽃노랑총채벌레에 대한 포자 농도별 방제효과

Testing material	방제효과(%)							
	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	8일
JEF-507( $10^6$ )	0.0	0.0	17.8	32.8	32.7	58.2	58.2	58.2
JEF-507( $10^7$ )	20.0	20.0	26.7	26.7	49.1	63.7	78.2	85.5
JEF-507( $10^8$ )	0.0	16.7	27.8	41.1	93.9	93.9	93.9	93.9
JEF-507( $10^9$ )	20.0	33.3	53.3	73.3	85.5	85.5	92.7	100.0
플룩사메타마이드 유제	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

4) 미생물 JEF-507 대량배양 원제의 담배가루이에 대한 살충효과 검증

(1) 시험 곤충

- 시험에 사용된 담배가루이(*Bemisia tabaci*)는 2017년부터 (주)경농 친환경 온실하우스내에서 5m x 3m x 3m의 매쉬망을 이용하여 시설내 격리공간을 만들어 누대 사육한 개체임. 기주는 토마토(품종: 슈퍼도태랑)를 이용하여 산란 및 성장을 유도하도록 하였고, 별도로 환경제어와 stage 관리는 하지 않았음.

(2) 시험 약제

- 본 과제를 통해 선발된 균주 *B. bassiana* JEF-507 포자를 시험에 사용하였으며, 처리농도는  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  conidia/ml로 하였으며, 대조물질은 가루이류에 활성을 가진 스피로테트라멧 액상수화제 22%(상품명: 모벤토<sup>®</sup>)로 처리농도는 상용농도인 110ppm으로 하였음.

(3) 시험 방법

- 담배가루이의 경우 알에서 약 3일, 약충 기간이 약 16일로 시험에는 담배가루이 약충을 이용하여 활성을 평가하고자 하였으며, 토마토 잎이 3~4장 붙어 있는 가지를 증류수를 넣은 5ml 팔콘 튜브에 꽃아 잎이 마르지 않도록 한 다음 24시간 담배가루이 사육 케이지에 넣어 산란을 유도하였음. 산란 받은 토마토를 실험실로 이동하여 사전밀도를 조사하였음 (그림 11). 사전밀도는 해부현미경으로 조사하여 쉽게 확인 할 수 있도록 표식을 하였음. 소형스프레이를 이용하여 약제가 균일하게 처리되도록 3반복 분무처리 하였으며, 약제처리 후 14일차에 생충수를 조사하여 치사율을 산출하였음. 시험 중 온도는  $24 \pm 5^\circ\text{C}$ , 상대습도는  $30 \pm 5\%$ , 광주기는 16L:8D로 설정하였음.





그림 11. 담배가루이 약충 사전밀도 조사 및 약제처리

(4) 시험 결과

- *B. bassiana* JEF-507 균주의 농도별 담배가루이에 대한 활성평가 결과는 약제처리 14일 차에 진행하였으며 conidia/ml 농도에 따라 용량반응을 나타내었음. 담배가루이 약충을 대상으로 14일차 조사는 약충에서 성충으로 변태 전까지 기간을 적용하여 활성을 평가한 결과로 호흡저해 작용기작을 가진 스피로테트라멧 액상수화제의 경우 80.1%의 방제효과를 보였고,  $10^7$ 과  $10^8$  conidia/ml에서 각 67.0, 98.3%의 활성을 보였음. 담배가루이의 경우  $10^6$  conidia/ml와  $10^7$  conidia/ml에서 활성의 차이가 40% 이상으로 나타나기 때문에 낮은 습도의 환경조건에서는  $10^7$  conidia/ml 수준의 농도가 처리되어야 활성을 보일 것으로 판단되며, 온실조건은 높은 습도조건에 대한 추가 실험은 필요할 것으로 판단됨(그림 12).

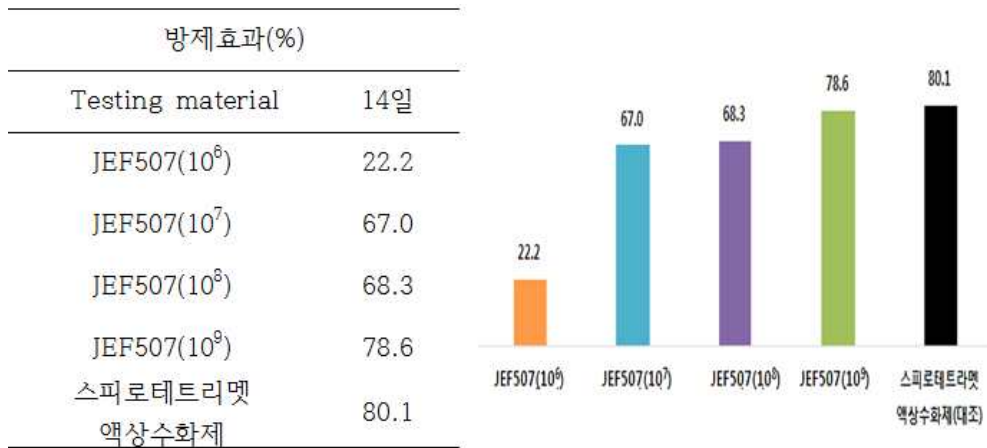


그림 12. JEF-507 균주의 담배가루이에 대한 포자 농도별 방제효과

2. 살충성 미생물의 제형화 연구

가. 후보균주 JEF-462, JEF-507 균주의 액상제형 최적화연구

1) 계면활성제 선발

- 액상제형의 계면활성제 선발을 위해 Polyethylene glycol계, Polyoxyethylene dodecyl mono ether계, Castor oil계, Polyoxyethylene sorbitan monooleate계, Polyoxyethylene octyl ether계, Silicon 계통 등 17종의 물질들을 JEF-462, JEF-507 균주에 대해 포자의 안정성을 검정한 결과, Polyoxyethylene dodecyl mono ether계, Polyoxyethylene sorbitan monooleate계, Polyoxyethylene octyl ether계가 비교적

안정적으로 포자를 유지하지 하는 것으로 확인되었으며, 특히, Polyoxyethylene sorbitan monooleate가 JEF-507 균주에 대해서 효과가 있는 것으로 확인되었음(그림 13).

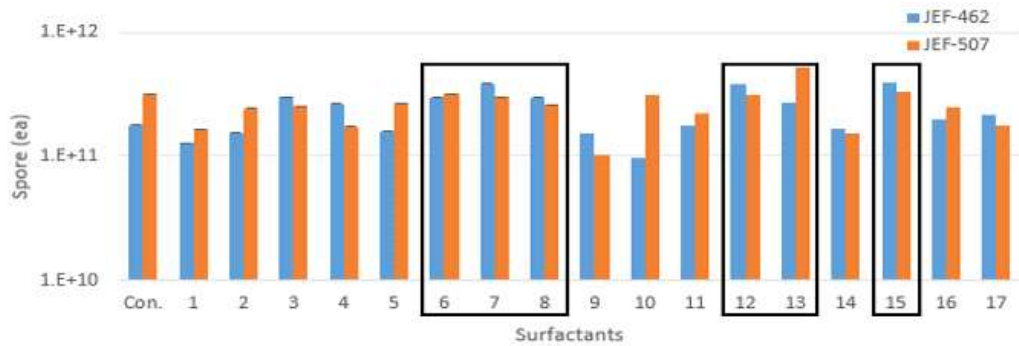


그림 13. JEF-462, JEF-507 균주의 계면활성제에 대한 포자 안정성 검정

## 2) 액상증량제 선발

- 액상제형의 증량제 선발을 위해 7종의 Oil류를 선정하여 JEF-462, JEF-507 균주에 대해 포자의 안정성을 검정한 결과, 균주에 상관없이 대부분의 oil에서 안정적인 것으로 확인되었으며, 그 중 Corn oil은 다른 종류의 oil에 비해 낮은 안정성이 확인되었음. Neem oil는 포자생존 억제효과가 없어 시너지 조합으로 가능하나 점성이 높아 액상제형으로 적용하기에는 다소 부적합하였음(그림 14).

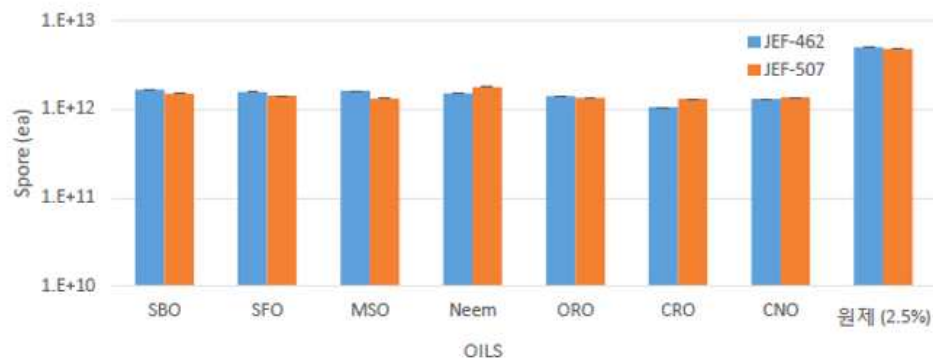


그림 14. JEF-462, JEF-507 균주의 액상증량제에 대한 포자 안정성 검정

## 나. 후보균주 JEF-462, JEF-507 균주의 분상제형 최적화연구

### 1) 1차 증량제 선발

- 분상제형의 증량제 선발을 위해 9종을 선정하여 JEF-462, JEF-507 균주에 대해 포자의 안정성을 검정한 결과, JEF-462는 원제 대비 증량제 처리구의 많은 조합에서 5~7배 이상의 포자생존을 감소가 확인되었으나 JEF-507은 비교적 안정적인 포자생존율을 보였으며, 특히 Zeolite와 Starch는 JEF-462, JEF-507에 모두 안정한 것으로 확인되었음. 다만, 선발된 증량제는 1개월 이후에는 생존율이 떨어지는 경향을 보여 추가적인 검토가 필요하였음(그림 15).

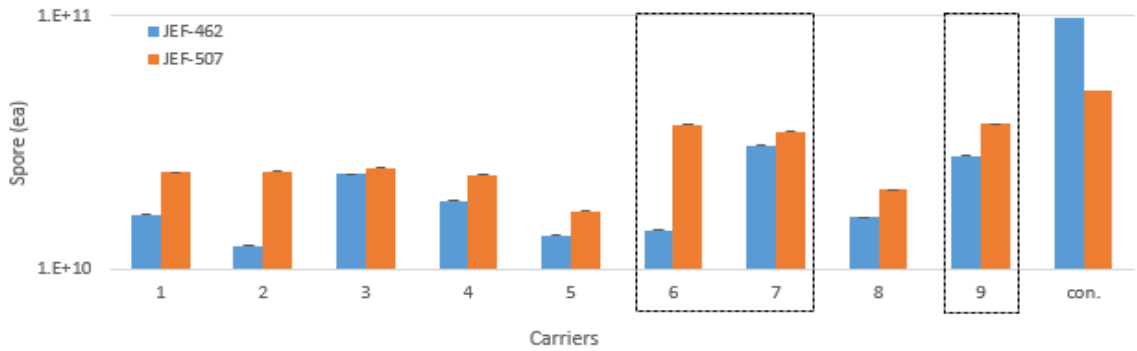


그림 15. JEF-462, JEF-507 균주의 분상제형 증량제에 대한 포자 안정성 검정

## 2) 계면활성제와 2차 증량제 선발

- 시험 중 JEF-462 대비 JEF-507 균주가 생태적 적용방법 연구 결과 기초특성이 더 우수한 것으로 도출되어 2차 선발의 경우는 JEF-507 균주를 중심으로 시험을 진행하였음. 분상제형의 분산제와 습윤제로 4종을 선정하였음(표 4). Lignosulfonic acid, sodium salt를 제외하고 모두 물에 용해되는 특성을 갖고 있으며 분산제형의 분산, 습윤제로 많이 사용되는 물질들임. 그리고 1차 증량제의 선발시험의 결과를 참고하여 추가적으로 구조토계통의 증량제 3종을 선정하였음(표 5).

표 4. 분상제형의 분산제, 습윤제 리스트

화학명	CAS. No	EPA LIST	특성
Dodecylsulfate sodium salt	151-21-3	4B	분말, 물에 용해
Lignosulfonic acid, sodium salt	8061-51-6	4B	분말, 물에 응집
Lignosulfonic acid, calcium salt	8061-52-7	4B	분말, 물에 용해
Sodiumtripolyphosphate	7759-29-4	4B	분말, 물에 용해

표 5. 분상제형 증량제 리스트

물질명	CAS.No	EPA LIST	특성
Diatomaceous earth, soda ash flux-calcined	68855-5-9	-	분말, 물에 불용
Perlite, expanded	93763-70-3	-	분말, 물에 불용
Diatomaceous earth	61790-53-2	4A	분말, 물에 불용

- 이 후 계면활성제 중 물에 용해되지 않고, 응집되는 Lignosulfonic acid, sodium salt를 제외한 3종과 조합하여 고체배지에서 대량 배양된 JEF-507 균주를 5% 첨가하여 균의 생존율을 각 비교 검토하였음(표 6). 증량제로 검토한 3종(Diatomaceous earth, soda ash flux-calcined, Perlite\_expanded, Diatomaceous earth)은 모두 구조토 계통으로 모두 물에 불용으로 매우 미세한 입자를 가진 분말형태의 물질이며 계면활성제와 증량제 조합과의 JEF-507 균주의 생존율 차이를 확인하기 위하여 상온(25°C) 및 온도별(30°C, 35°C, 40°C, 54°C) 보관조건에서 비교 확인하였음. 확인 결과, 54°C 보관 조건에서는 균주의 생존이 확인되지 않았으며, 40°C 이하에서는 처방의 조합에 따라 차이가 있었으나 생존율이 비교적 안정적인 처방도 확인되었음(표 7). 이러한 결과로부터, *B. bassiana* JEF-507 균주

원제를 이용해 처방된 제품들은 40°C 이하로 보관 관리가 필요하며, 계면활성제와 증량제의 조합에 따라 안정적인 처방의 선발이 가능하였음. 추가적으로 고온에서도 균주의 생존율을 지속적으로 유지시킬 수 있는 안정적인 물질에 대한 검토를 지속적으로 진행하여 최적화된 분상 제형의 확립이 필요할 것으로 판단됨.

표 6. 균 생존율 관찰용 분상제형 처방

물질명	함량(%)								
	처방1	처방2	처방3	처방4	처방5	처방6	처방7	처방8	처방9
<i>B. bassiana</i> JEF-507	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Dodecylsulfate sodium salt	5	5	5	-	-	-	-	-	-
Lignosulfonic acid, calcium salt	-	-	-	5	5	5	-	-	-
Sodiumtripolyphosphate	-	-	-	-	-	-	5	5	5
Diatomaceous earth, soda ash flux-calcined	Rest	-	-	Rest	-	-	Rest	-	-
Perlite, expanded	-	Rest	-	-	Rest	-	-	Rest	-
Diatomaceous earth	-	-	Rest	-	-	Rest	-	-	Rest
TOTAL	100	100	100	100	100	100	100	100	100

표 7. 분상제형 처방별 균주 생존율 검정

구분	코드번호	CFU 검정					
		2W	4W	6W	8W	10W	12W
		2/27	3/12	3/26	4/9	4/23	5/7
상온	1-1	4.0.E+09	6.0.E+09	-	1.2.E+09	2.4.E+09	-
	1-2	2.6.E+09	3.8.E+09	-	8.8.E+08	3.8.E+09	-
	1-3	6.8.E+08	3.2.E+09	-	1.1.E+09	2.1.E+09	-
	1-4	3.6.E+08	6.8.E+08	-	1.6.E+09	1.5.E+09	-
	1-5	4.8.E+08	5.6.E+08	-	5.2.E+08	1.6.E+09	-
	1-6	2.0.E+09	1.2.E+09	-	2.0.E+09	1.9.E+09	-
	1-7	9.2.E+08	1.1.E+09	-	4.0.E+08	1.5.E+09	-
	1-8	9.0.E+08	7.8.E+08	-	8.2.E+08	2.5.E+09	-
	1-9	3.0.E+08	1.2.E+09	-	6.4.E+08	1.1.E+09	-
30°C	2-1	1.6.E+09	6.2.E+09	-	5.8.E+08	2.5.E+09	-
	2-2	2.2.E+09	1.4.E+09	-	1.4.E+09	1.9.E+09	-
	2-3	7.4.E+08	3.2.E+09	-	1.1.E+09	2.1.E+09	-
	2-4	9.4.E+08	7.6.E+08	-	2.6.E+08	1.3.E+09	-
	2-5	1.3.E+09	1.0.E+09	-	2.0.E+08	6.8.E+08	-
	2-6	2.0.E+09	9.8.E+08	-	8.0.E+08	1.9.E+09	-
	2-7	6.2.E+08	1.0.E+09	-	8.4.E+08	1.9.E+09	-
	2-8	1.5.E+09	8.4.E+08	-	3.8.E+08	-	-
	2-9	6.0.E+06	0.0.E+00	-	-	-	-
35°C	3-1	2.8.E+08	2.8.E+09	4.4.E+09	6.4.E+08	7.4.E+08	1.5.E+09
	3-2	2.2.E+09	9.6.E+08	2.2.E+09	1.8.E+08	7.6.E+08	1.5.E+09
	3-3	2.8.E+09	4.2.E+08	8.2.E+08	9.4.E+08	1.1.E+08	6.2.E+08
	3-4	3.2.E+09	1.0.E+09	2.6.E+09	1.3.E+09	1.5.E+09	-
	3-5	4.8.E+08	5.8.E+08	3.2.E+09	8.4.E+08	1.5.E+09	4.7.E+09
	3-6	1.1.E+09	5.0.E+08	8.6.E+08	1.2.E+08	4.4.E+07	-
	3-7	3.2.E+07	0.0.E+00	-	-	-	-
	3-8	6.6.E+08	8.2.E+08	8.6.E+08	1.4.E+08	4.8.E+08	2.3.E+08
	3-9	8.0.E+06	0.0.E+00	-	-	-	-
40°C	4-1	8.6.E+08	4.4.E+08	1.6.E+08	1.6.E+07	-	-
	4-2	3.0.E+09	2.8.E+08	8.2.E+07	-	-	-
	4-3	2.0.E+07	0.0.E+00	-	-	-	-
	4-4	7.6.E+08	6.2.E+08	4.0.E+09	9.2.E+08	1.7E+09	2.7.E+09
	4-5	1.4.E+09	6.6.E+08	1.1.E+09	1.4.E+08	2.4E+08	-
	4-6	2.2.E+08	0.0.E+00	-	-	-	-
	4-7	2.0.E+06	0.0.E+00	-	-	-	-
	4-8	2.0.E+06	0.0.E+00	-	-	-	-
	4-9	2.0.E+06	0.0.E+00	-	-	-	-
54°C	5-1	2.0.E+06	-	-	-	-	-
	5-2	2.0.E+06	-	-	-	-	-
	5-3	4.0.E+06	-	-	-	-	-
	5-4	8.0.E+06	-	-	-	-	-
	5-5	6.0.E+06	-	-	-	-	-
	5-6	1.2.E+07	-	-	-	-	-
	5-7	2.0.E+06	-	-	-	-	-
	5-8	2.0.E+06	-	-	-	-	-
	5-9	1.0.E+07	-	-	-	-	-

### 3) 안정제 선발

- 분상제형에 처방될 안정제를 선발하기 위해 아래 표와 같이 물질별 함량을 다르게 처방하여 온도별 안정성 시험을 진행하였음(표 8). 안정성 시험결과, 계면활성제는 Sodiumtripolyphosphate, 증량제는 Perlite, expanded가 가장 안정한 것으로 확인되었으나, 분상제형의 주요 물리성 항목 중 하나인 수화성이 다소 나쁜 것으로 확인되었음. 처방10과 같이 수화성 개선을 위해 Dodecylsulfate sodium salt를 첨가하였을 경우, 수화성이 개선되었으며 추가적으로 보관안정성 향상을 위하여 Glucose, Starch, Sorbitol등의 당류에 대한 40°C 보관 안정성을 검토하였으나 활성유지가 안 되는 것으로 확인되었음. 원료물질인 포자와 처방10과 표 8의 처방에 대하여 균사의 포자발아 시험을 진행하였으며 그 결과, 처방10은 배양후 3일차부터 포자발아가 확인되었음. 다른 처방은 배양후 6일차에 포자발아가 일부 확인되어, 처방10과 비교해서 개선이 되지 않은 것으로 확인되었음. 증량제로 사용한 Perlite는 40°C 보관안정성은 양호하였으나, 포자발아에 나쁜 영향을 주는 것으로 확인되어 다른 수용성 고분자의 선발이 필요하였음.

표 8. 안정제 선발용 분상제형 처방

물질명	함량(%)					
	처방10	처방11	처방12	처방13	처방14	처방15
<i>B. bassiana</i> JEF-507	5	5	5	5	5	5
Sodiumtripolyphosphate	30	25	15	25	15	24
Dodecylsulfate sodium salt	18	14	4	14	4	14
Glucose	-	10	30	-	-	-
Starch	-	-	-	10	30	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	10
Perlite, expanded	Rest	Rest	Rest	Rest	Rest	Rest
TOTAL	100	100	100	100	100	100

- 포자발아를 촉진시키는 물질들을 선발하기 위해 아래 표 9 와 같이 포자발아 촉진용 분상제형 처방을 진행하였음. 그 결과, Potato meal이 처방된 처방19, 처방23이 다른 처방들과 비교해 빠른 포자발아를 보였지만 여전히 포자 원제와 비교해보면 현저히 떨어지는 것을 확인하였음(표 10). 본 결과는 추가적인 검토를 통해 증량제로 사용한 Perlite가 포자발아에 나쁜 영향을 주는 것으로 확인되어 해당 증량제를 제외한 경우 포자발아가 3일차에 관찰되는 결과를 얻었음. 해당 결과로 Perlite가 포자발아를 감소시킨다는 결론을 도출하였음.

표 9. 포자발아 촉진용 분상제형 처방-1

물질명	함량(%)								
	처방16	처방17	처방18	처방19	처방20	처방21	처방22	처방23	처방24
<i>B. bassiana</i> JEF-507	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Sodiumtripolyphosphate	2	3	6	3	3	3	3	30	-
Dodecylsulfate sodium salt	1	2	3	2	2	2	2	18	-
Potato meal	-	-	-	1	-	-	-	1	-
Dextrose	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Starch	-	-	-	-	-	1	-	-	-
Glucose	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Perlite, expanded	Rest	Rest	Rest	Rest	Rest	Rest	Rest	Rest	Rest
TOTAL	100	100	100	100	100	100	100	100	100

표 10. 포자발아 촉진용 분상제형 처방들의 포자발아 비교(포자발아 시험-1)

처방	INFORMATION	2일차	3일차	6일차
16	5% WP, STP 2%, SDS 1%			
17	5% WP, STP 3%, SDS 2%			
18	5% WP, STP 6%, SDS 3%			
19	5% WP, STP 3%, SDS 2%, Potato meal 1%			균사 확인
20	5% WP, STP 3%, SDS 2%, Dextrose 1%			
21	5% WP, STP 3%, SDS 2%, Starch 1%			균사 확인
22	5% WP, STP 3%, SDS 2%, Glucose 1%			균사 확인
23	5% WP, STP 30%, SDS 18%, Potato meal 1%			
원제	Spore_원제초기	균사 확인		
24	JEF-507 5% WP_STP;SDS 미첨가			
25	JEF-507_5% WP		균사 확인	
비교	제품A			균사 확인

#### 4) 포자발아 개선검토

- 원료물질인 *B. bassiana* JEF\_507 포자 원제는 물에서 25°C 배양 시 2일차에서 포자발아가 활발하지만, 검토한 대부분의 처방은 포자발아가 지연되는 경향을 보였으며, 이러한 결과는 증량제로 사용한 Perlite 뿐만 아니라 처방에 사용된 계면활성제가 영향을 주는 것으로 확인되었음. 초기의 포자발아가 약효활성에 중요한 것을 고려하여 포자발아가 원제인 포자에 준하는 수준으로 개선하고자 증량제로 사용한 Perlite 대신에 수용성 고분자 외에 분상제형의 특성을 고려하여 계면활성제도 최소량을 사용하였음.

- 기존에 검토해 왔던 *B. bassiana* JEF-507 포자 5% 함유 분상제형은 가격경쟁력 확보가 어려워 2.5%로 변경하였으며 수용성이면서 유기농자재로 사용가능한 Sodium bicarbonate를 증량제로 하여 여러 종류의 수용성 고분자에 대한 초기 포자발아를 비교 검토하였음. 이외에도 추가적으로 수용성 Cellulose를 함량별 처방하여 포자발아에 대한 시험을 진행하였고(표 11) 이외에도 수용성 당류가 포자발아를 촉진시키는 것으로 확인되어 고려되었음(그림 16).

표 11. 포자발아 촉진용 분상제형 처방-2

물질명	함량(%)				
	처방25	처방26	처방27	처방28	처방29
<i>B. bassiana</i> JEF-507	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Sodiumtripolyphosphate	3	3	3	3	3
Dodecylsulfate sodium salt	1	1	1	1	1
수용성 Cellulose	0	20	40	60	80
Sodium bicarbonate	Rest	Rest	Rest	Rest	Rest
TOTAL	100	100	100	100	100

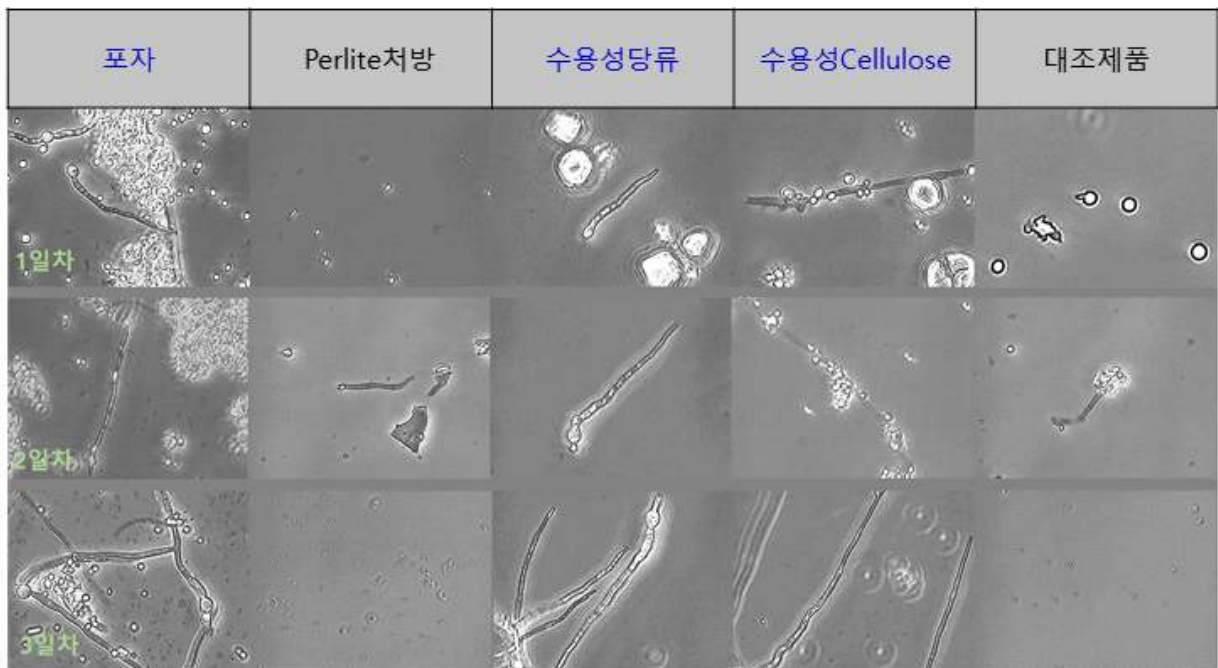


그림 16. Perlite, 수용성 당류 및 수용성 Cellulose 처방 시 포자발아 비교

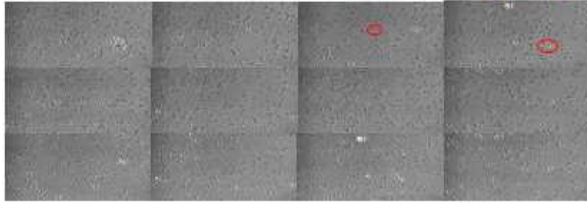
- 포자발아 비교시험으로 선발된 수용성 Cellulose의 0%, 20%, 40%, 60%, 80% 함량별 처방들의 포자발아를 확인한 결과, 함량이 높아질수록 포자발아가 촉진되는 것을 확인하였음(그림 17). 다만 분상제형에서 처방에 사용된 부자재들은 유기농업자재 병해충관리 제품의 경우 총 50%가 넘으면 안 되기 때문에(주성분이 50% 이상 필요) 제품 가능성이 있는 최대 수용성 Cellulose 함유량은 40%로 처방하였음.

- 또한 비교적 수용성이면서 가격경쟁력이 있는 5종의 Cellulose를 추가 선정하여 특성에 따른 포자발아를 비교 확인하였음(표 12). 유기농업자재 병해충 관리 제품에서 부자재 함량 최대치인 40% 기준으로 Cellulose 종류별 포자발아를 확인한 결과, 기존 선발된 수용성 Cellulose가 가장 우수하였으며, 다른 종류의 Cellulose는 포자발아는 어느 정도 촉진시키지만 수용성 Cellulose에 비해서는 포자발아가 적은 것으로 확인하여(그림 18) 최종적으로 수용성 Cellulose가 선발되었음.



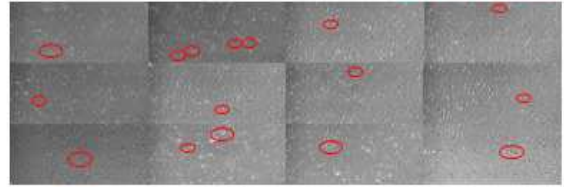
처방25: 수용성Cellulose 0%

포자발아수: 2



처방26: 수용성Cellulose 20%

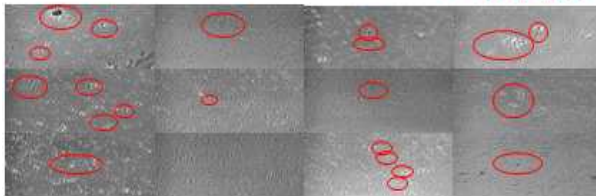
포자발아수: 16



제품A 0

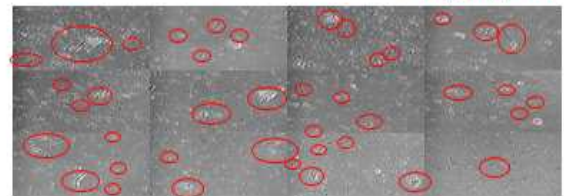
처방27: 수용성Cellulose 40%

포자발아수: 22



처방28: 수용성Cellulose 60%

포자발아수: 45



처방29: 수용성Cellulose 80%

포자발아수: 56

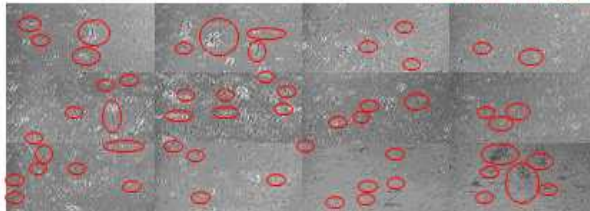
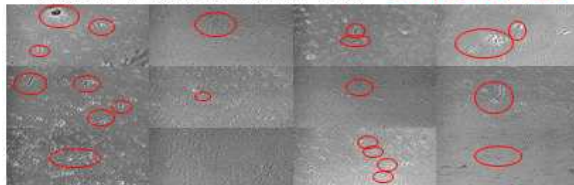


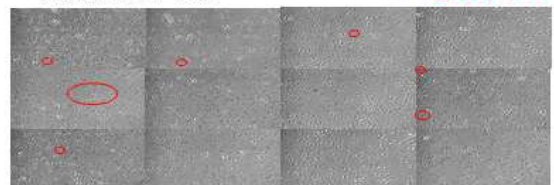
그림 17. 선발된 수용성 Cellulose의 함량별(0%, 20%, 40%, 60%, 80%) 포자발아 비교

처방27: 수용성Cellulose 40% 포자발아수: 22



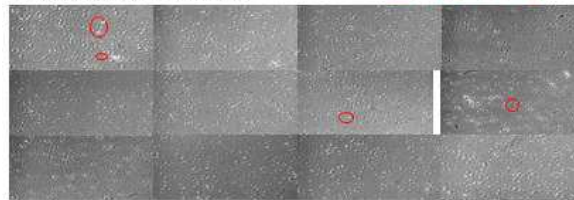
처방30: MC 40%

포자발아수: 7



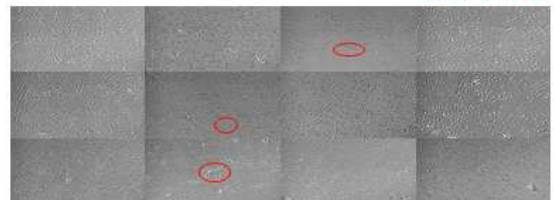
처방31: HDPC 40%

포자발아수: 4



처방32: HPMC 4cps 40%

포자발아수: 3



처방33: HPMC 8cps 40%

포자발아수: 15

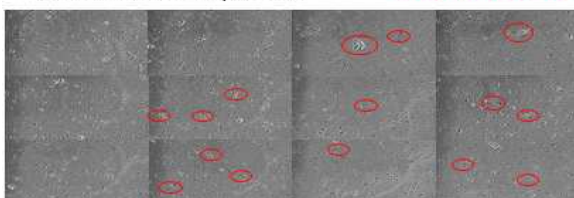


그림 18. 선발된 5종 Cellulose의 포자발아 비교시험결과

MC: Methylcellulose, HDPC: Hydroxypropylcellulose, HPMC: Hydroxypropyl methylcellulose

표 12. 분산제형 포자발아 촉진용 5종 Cellulose 처방

물질명	합량(%)				
	처방27	처방30	처방31	처방32	처방33
<i>B. bassiana</i> JEF-507	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Sodiumtripolyphosphate	3	3	3	3	3
Dodecylsulfate sodium salt	1	1	1	1	1
수용성 Cellulose	40	-	-	-	-
Methylcellulose	-	40	-	-	-
Hydroxypropylcellulose	-	-	40	-	-
Hydroxypropyl methylcellulose (4cps)	-	-	-	40	-
Hydroxypropyl methylcellulose (8cps)	-	-	-	-	40
Sodium bicarbonate	Rest	Rest	Rest	Rest	Rest
TOTAL	100	100	100	100	100

\* Hydroxypropyl methylcellulose 4, 8cps는 점도 차이

#### 5) 분산성 개선검토

- 위 결과로부터 수용성 Cellulose가 포함되어 포자발아가 가장 우수한 처방27을 선발하였으나, 분산제형의 물리성 평가항목인 분산성(수화성)이 상업화 불가 수준으로 확인되어 이 부분에 대한 추가적인 개선검토를 진행하였음(표 13). 수용성 Cellulose가 40% 함유된 처방27의 경우, 1,000배 희석하였을 때 수중에서 입자끼리의 응집이 발생하여 균일하게 분산 및 용해가 잘 되지 않았고, 5분 이상 교반하여야 분산 및 용해가 되어 실용성이 떨어지는 것으로 확인되었음. 수용성 Cellulose 함량을 5%까지 점차적으로 줄여가면서 분산 및 용해성을 확인한 결과, 함량이 낮아질수록 개선되었으나, 처방 제품 사용시 여전히 불편함이 있어 수용성 Cellulose 5% 미만, 분산성 향상 부자재 탐색을 통해 분산성을 보다 더 향상시킬 필요가 있었음(그림 19).

표 13. 분산제형의 분산성 개선용 처방

물질명	합량(%)				
	처방27	처방34	처방35	처방36	처방37
<i>B. bassiana</i> JEF-507	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Sodiumtripolyphosphate	3	3	3	3	3
Dodecylsulfate sodium salt	1	1	1	1	1
수용성 Cellulose	40	30	20	10	5
수용성 당류	-	10	20	30	35
Sodium bicarbonate	Rest	Rest	Rest	Rest	Rest
TOTAL	100	100	100	100	100

처방27: 수용성Cellulose 40%

처방37: 수용성Cellulose 5%

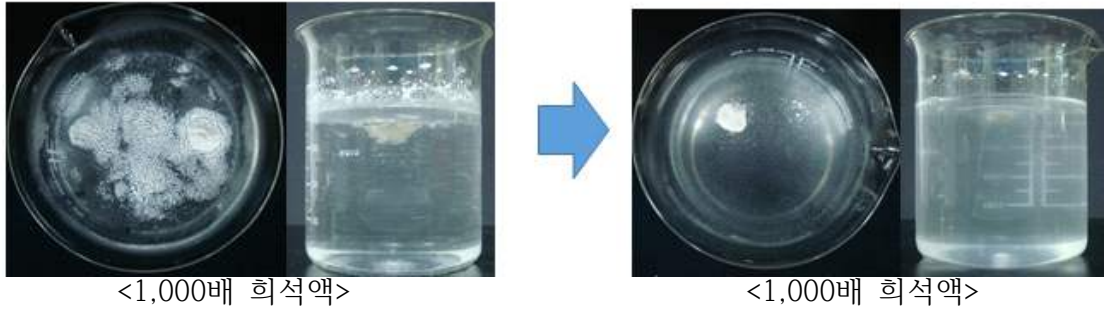


그림 19. 분산성 개선 후 확인한 분산성 비교시험결과

- 일반적으로 사용되는 분산력이 있는 계면활성제는 포자발아에 악 영향을 끼치는 것으로 확인되어 계면활성제 이외에 아래와 같은 6가지 조건에 맞는 물질을 다양하게 검토하였음.

- ① 포자발아에 나쁜 영향을 주지 않을 것
- ② 분산력이 있을 것
- ③ 장기보관에 안정적일 것
- ④ 가격적으로 경쟁력이 있을 것
- ⑤ 대량생산에 적용이 가능한 것
- ⑥ 생물효과에 긍정적인 영향을 줄 것

- 유기농업자재로 사용 가능한 물질 중에 이러한 조건에 맞는 물질은 한정적으로 몇 종류의 물질을 검토한 결과, 계면활성제와 비교해서 분산성이 양호한 수용성 염류를 선발하였으며, 지금까지의 결과로부터 *B. bassiana* JEF-507 분상제형의 효과에 영향을 줄 것으로 예상되는 초기 포자발아와 수화성이 양호한 처방 2종(처방38, 39)을 최종적으로 선발(표 14)하였으며 기초적인 물리성도 확인하였음. 처방38과 처방39는 기존에 검토하여 선발된 처방27에 비해 1,000배 희석한 상태에서 분산성과 용해성이 매우 개선되었으며, 포자발아에도 영향이 없는 것을 확인하였음(그림 20).

표 14. 분산성이 개선된 분상제형 처방2종(처방38, 처방39). 처방27: 분산성 개선 전 처방

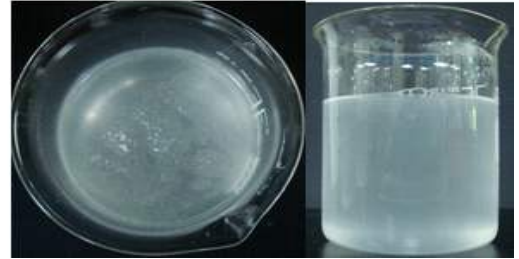
물질명	함량(%)		
	처방27	처방38	처방39
<i>B. bassiana</i> JEF-507	2.5	2.5	2.5
Sodiumtripolyphosphate	3	-	-
Dodecylsulfate sodium salt	1	2	2
수용성 Cellulose	40	1	-
수용성 당류	-	39	40
수용성 염류	-	7.5	7.5
Sodium bicarbonate	Rest	Rest	Rest
TOTAL	100	100	100

처방38: 수용성당류 39%, 수용성염류 7.5%



<1,000배 희석액>

처방39: 수용성당류 40%, 수용성염류 7.5%



<1,000배 희석액>

그림 20. 분산성이 개선된 분산제형 처방2종(처방38, 처방39)의 분산성 비교시험결과

- 처방38과 처방39의 포자발아 비교 결과, 수용성 Cellulose가 1% 함유된 처방38이 처방39에 비해 다소 양호한 것으로 확인되었고 꽃노랑총채벌레 살충 *In-vitro* 시험에서도 처방38이 우수하였기에 최종적으로 처방38을 최종 분산제형 처방으로 결정하였음. 선발된 처방38의 물 50L 대용량에서 1,000배 희석하여 분산성을 확인한 결과, 매우 양호한 분산 및 용해성을 확인하였고 사용상 문제가 없는 것으로 확인되었음(그림 21).

<50L, 1000배 희석초기>




<50L, 1000배 희석 1분후>



그림 21. 최종적으로 선발된 분산제형 처방38의 분산성 시험결과

- 분산제형 처방38의 물성을 검토한 결과는 아래 표 15와 같으며, 고온(40°C) 보관 안정성은 추가로 검토 진행 중이며, 기존에 검토한 원제, 처방(처방10)의 경우 40°C에서 보관 후 16주에서도 안정한 것으로 확인되었고 해당 처방38 경우에도 40°C이하 보관 시에는 안정성이 유지될 것으로 추정하고 있음. 해당 시험은 과제 종료 후에도 계속 관찰하여 최종 확인할 예정임.

표 15. 처방38의 물성시험결과

외관	물리성 검토항목			
	pH(5%)	가비중	수분	수화성
	7.99	0.743	3.5%	균일하게 분산 후 용해됨

다. JEF-507 균주의 입상제형 최적화연구

1) 입상제형 기초검토

- 기초시험을 통해 *B. bassiana* JEF-507 균주에 비교적 안정적인 것으로 확인된 계면활성제인 Polyoxyethylene dodecyl mono ether계와 Polyoxyethylene sorbitan monooleate계 2종과 입상제형의 증량제로 사용되는 입상규조토와 입상 Zeolite 2종을 사용하여 처방검토를 진행하였으며, 40°C 보관안정성과 포자발아 상태를 확인하였음 (표 16). 40°C 보관안정성 검토결과, 8주가 경과한 후에 균 활성이 저조해지는 것으로 확인되었으며, 포자발아도 거의 되지 않는 것으로 확인되어 추가적인 검토가 필요하였음. 4종 Oil류를 각 포함한 처방 10종(처방1~10)을 대상으로 포자발아 비교시험을 하였지만 포자발아를 촉진시키는 처방은 확인할 수 없었음(그림 22).

표 16. 계면활성제, 증량제 선발용 입상제형 처방

물질명	함량(%)									
	처방 1	처방 2	처방 3	처방 4	처방 5	처방 6	처방 7	처방 8	처방 9	처방 10
<i>B. bassiana</i> JEF-507	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Polyoxyethylene dodecyl mono ether계	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polyoxyethylene sorbitan monooleate계	-	18	-	-	-	-	-	-	-	-
Corn oil	-	-	18	-	-	-	5	-	-	-
Caster oil	-	-	-	18	-	-	-	5	-	-
Soybean oil	-	-	-	-	18	-	-	-	5	-
Pine oil	-	-	-	-	-	18	-	-	-	5
Perlite, expanded	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.5	0.5	0.5	0.5
입상규조토	Rest	Rest	Rest	Rest	Rest	Rest	-	-	-	-
입상 Zeolite	-	-	-	-	-	-	Rest	Rest	Rest	Rest
TOTAL	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

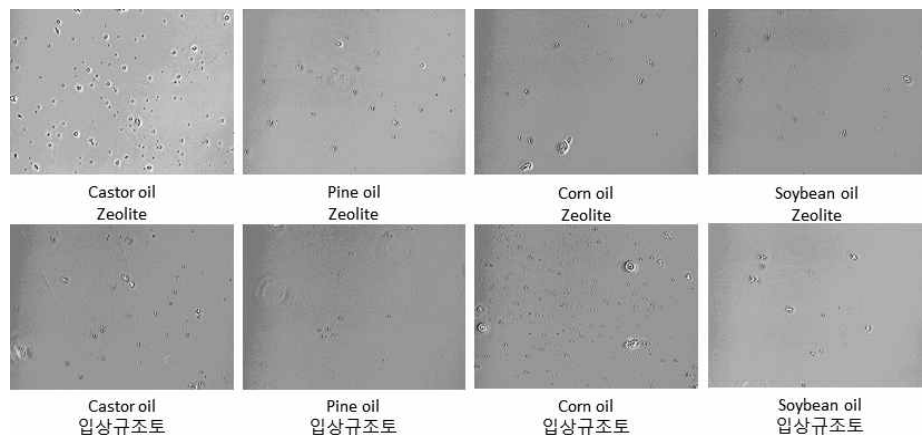


그림 22. 4종 Oil류의 입상제형 처방에 따른 포자발아 비교시험결과

2) 포자발아 개선검토

- 입상제형의 기초시험 결과, 안정성 및 포자발아에 양호한 물질이 선발되지 않아, 분상제형에서 검토된 결과를 참고하여 포자발아를 억제하는 것으로 확인된 Perlite를 제외하고 입상 Zeolite로 대체하였고, 포자발아를 촉진시켰던 수용성 Cellulose의 처방과 입상제형의 균일한 흡착을 위해 비교적 안정성이 양호한 oil을 첨가하여 재검토하였음 (표 17). 처방 12가지(처방11~22)를 대상으로 포자발아 비교시험을 해본 결과 처방 11, 12, 13, 14, 21, 22에서 포자발아가 다른 처방과 비교하여 우수함을 확인하였고 처방 19, 20의 경우 포자발아가 보통이었으며 반면 처방 15, 16, 17, 18의 경우 포자발아가 관찰되지 않았음(그림 23). 해당 결과로 Polyoxyethylene sorbitan monooleate계, Polyethylene glycol류를 선발하여 차후 입상제형 처방의 최적화에 필요하다고 판단함.

표 17. 포자발아 개선을 위한 입상제형 처방

물질명	함량(%)											
	처방 11	처방 12	처방 13	처방 14	처방 15	처방 16	처방 17	처방 18	처방 19	처방 20	처방 21	처방 22
<i>B. bassiana</i> JEF-507	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
수용성 Cellulose	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sodium bicarbonate	-	1	-	-	1	1	-	1	-	1	-	1
Sodium-alginate	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Calcium carbonate	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Polyoxyethylene sorbitan monooleate계	3	3	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-
Polyoxyethylene dodecyl mono ether계	-	-	-	-	3	3	-	-	-	-	-	-
Pine oil	-	-	-	-	-	-	3	3	-	-	-	-
Corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	-	-
Polyethylene glycol류	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3
입상 Zeolite	Rest	Rest	Rest	Rest	Rest	Rest	Rest	Rest	Rest	Rest	Rest	Rest
TOTAL	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100



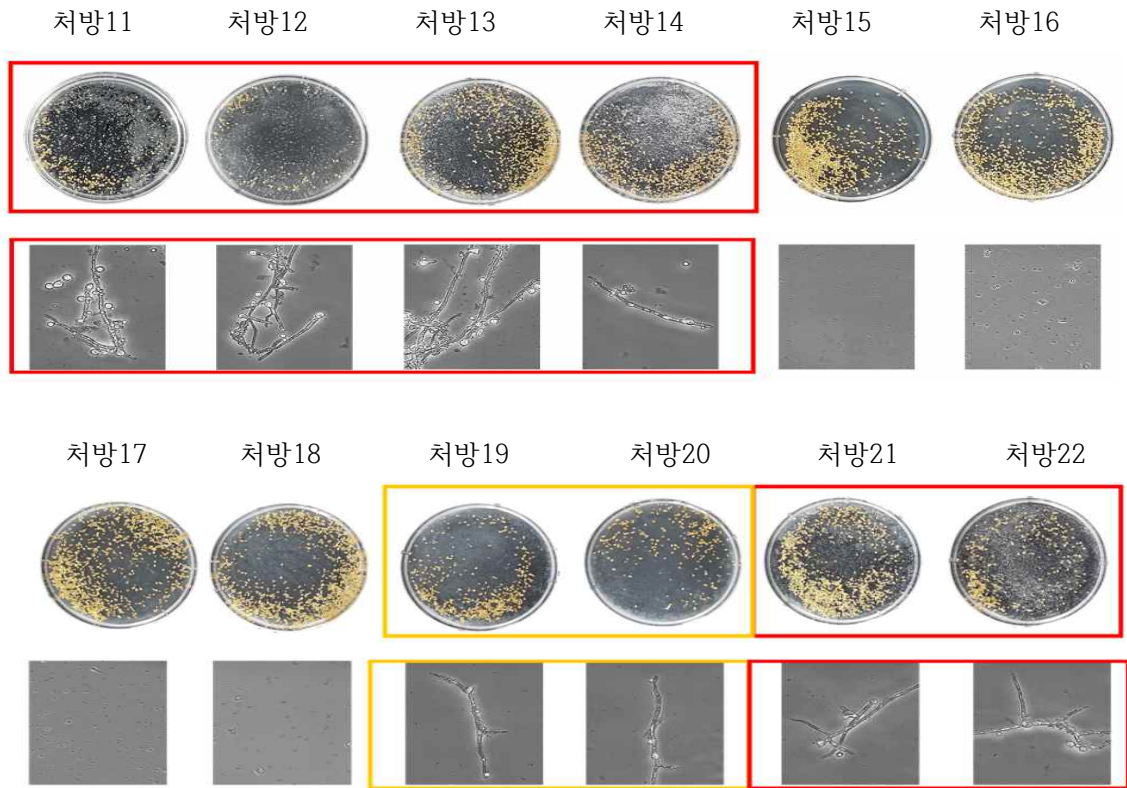


그림 23. 포자발아 개선을 위한 입상제형 처방들의 포자발아 비교시험결과

### 3) 입상제형 처방의 최적화

- 포자발아에 영향을 주는 입상제형 처방에 사용할 수 있는 물질로 수용성 cellulose, Polyoxyethylene sorbitan monooleate계, Polyethylene glycol류를 선발하였으나, 증량제로 사용하는 입상규조토, Zeolite는 포자발아가 잘 되지 않는 경향을 보였음. 입상제형의 안정성과 포자발아 시험은 *B. bassiana* JEF-507 배양분말의 미분을 사용하여 검토하였으나, 상업성을 고려하여 기장으로 배양한 상태 그대로 입상제형 처방의 최적화를 검토하였음. 유기농자재로 사용가능한 증량제는 매우 제한적이어서 품질관리도 가능한 광물질을 조사하여 안정성이 유지되면서 포자발아도 양호한 새로운 천연광물질 1종을 선발하여 최종 입상제형 처방인 처방23을 선발하였음(그림 24, 표 18). 입상제형 처방의 경우, 35°C, 40°C에서의 안정성은 분상제형에 비해 떨어지는 경향을 보이며 4~25°C 이하에서는 안정적인 것으로 확인되어 입상제형에서 고온 안정성을 줄 수 있는 추가적인 검토가 진행되어야 할 것으로 판단됨.

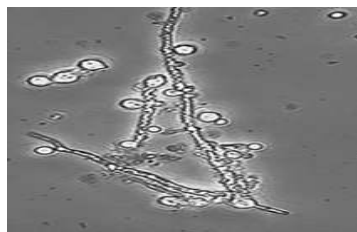


그림 24. 최종 처방된 입상제형의 포자발아(처방23)

표 18. 최종 입상제형 처방(처방23)

물질명	함량(%)	
	기존	처방23
<i>B. bassiana</i> JEF-507	0.5	5
수용성 Cellulose	1	1
Polyoxyethylene sorbitan monooleate계	1	1
Polyethylene glycol류	-	1
Calcium carbonate	1	1
입상 Zeolite	Rest	-
천연광물질	-	Rest
TOTAL	100	100

라. 결과 및 고찰

- 고온안정성, 포자생산성에서 우수한 균주인 *B. bassiana* JEF-507 균주를 대량 배양한 균으로 액상제형(유상제)과 분상제형(수화제), 입상제형(입제) 등의 3가지 제형에 대한 기초시험을 진행하여 안정성, 포자발아 및 상업화 검토를 확인하였음. 유상제는 생산 및 상업성을 고려하여 안정성이 양호한 Oil과 계면활성제를 선별하는 기초적인 시험을 진행하였으나 자사 설비시설 문제로 인한 상업화 불가로 고려되지 않았음. 수화제, 입제 처방에 있어 *B. bassiana* JEF-507 포자에 구조토나 계면활성제가 함유된 대부분의 처방은 초기 포자발아가 잘 되지 않거나 포자발아 자체가 억제되어 실제 *In-vitro* 활성평가, 포장에서 저조한 활성이 확인되었고 이에 따라 포자발아를 촉진시키거나 영향을 미치지 않는 물질을 선별하는 제형화 연구가 많이 진행되었음.
- 수화제 처방의 경우, 계면활성제 및 증량제를 최적화하였으며 또한 포자발아에 효과적인 물질인 수용성 cellulose와 수용성 당류가 포함된 수화제 처방 최적화하였음. 최종적으로 선별한 수화제 처방에 대한 안정성, 포장시험 등 추가적인 검토를 진행하고 있음.
- 입제 처방의 경우, 기초시험결과 계면활성제, Perlite 외에 증량제가 *B. bassiana* JEF-507 균주의 안정성에 가장 큰 영향을 주는 것으로 확인되어 새로운 천연광물질을 선별하여 처방을 최적화하였음. 기존에 검토하였던 입상구조토나 입상 Zeolite는 포자발아가 잘 되지 않았고 안정성도 유지되지 않는 등 문제점이 있었으나, 이 부분을 개선하였음. 하지만 보관안정성은 수화제에 비해 불안정한 경향을 보여, 입제의 보관 온도별로 안정성 확인은 추가적인 검토가 필요함.



### 3. 살충성 미생물의 생태적 적용방법 연구

\* 1차년도에 기입된 A-52, A-54, A-67, A-70 균주는 2차년도부터 JEF-341, JEF-350, JEF-462, JEF-507로 표기

#### 가. 방제 대상 해충의 생태 특성 분석(담배가루이)

##### 1) 생활사 분석

###### - 담배가루이의 생활사 분석

담배가루이는 농촌진흥청에서 분양받은 Q-type 개체를 사용하였으며, 실험에 이용되는 충의 stage를 맞추기 위해 실내 사육조건에서 생활사를 분석하였음. 분석은 토마토 잎에 알을 하루 받고, 성충을 모두 제거 한 뒤 25.2°C±0.0, RH: 56.4±0.3% LD 16:8 조건에서 진행하였음. 관찰 결과, 각 stage의 기간이 알 7일, 1령 유충 3일, 2령과 3령 유충 2일, 4령 유충 6일로 약 21 일 동안 한 세대가 완성되는 것을 확인하였음 (그림 25).

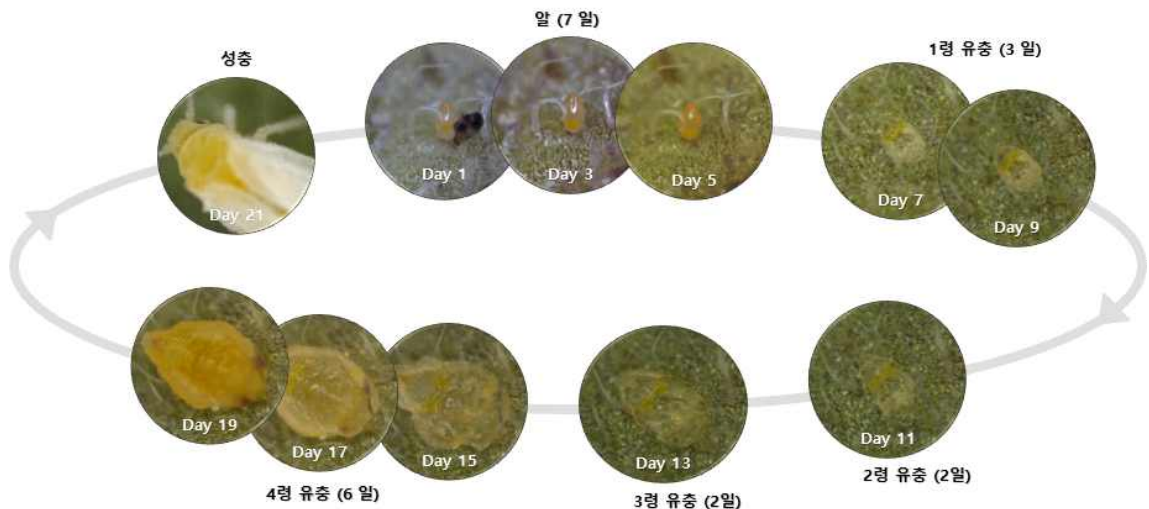


그림 25. 담배가루이의 생활사

##### 2) 살충성미생물에 대한 살충효과 평가

###### - 곤충병원성 진균 선발

담배가루이에 대한 병원성 검정에 이용될 곤충병원성 진균은 전북대학교 곤충미생물공학 연구실에서 확보된 균주 중 임의로 72개 균주를 선발 하여 사용하였음(표 19). 선발된 균주의 채집 및 동정 과정은 다음과 같음.

표 19. 선발된 곤충병원성 진균

No	Code	Identification	
		Genus	Species
1	B-01	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
2	A-03	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
3	B-02	<i>Cordyceps</i>	<i>fumosorosea</i>
4	B-03	<i>Lecanicillium</i>	sp.
5	B-04	<i>Paecilomyces</i>	sp.
6	B-05	<i>Metapochonia</i>	<i>bulbillosa</i>
7	B-06	<i>Metapochonia</i>	<i>bulbillosa</i>
8	B-07	<i>Paecilomyces</i>	sp.
9	B-08	<i>Paecilomyces</i>	sp.
10	B-09	<i>Beauveria</i>	<i>brongniartii</i>
11	B-10	<i>Metapochonia</i>	<i>bulbillosa</i>
12	B-11	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
13	B-12	<i>Purpureocillium</i>	sp.
14	B-13	<i>Cordyceps</i>	<i>farinosa</i>
15	B-14	<i>Cordyceps</i>	<i>confragosa</i>
16	B-15	<i>Purpureocillium</i>	<i>lilacinum</i>
17	B-16	<i>Akanthomyces</i>	<i>attenuatus</i>
18	B-17	<i>Akanthomyces</i>	<i>attenuatus</i>
19	B-18	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
20	B-19	<i>Beauveria</i>	<i>brongniartii</i>
21	B-20	<i>Metarhizium</i>	<i>brunneum</i>
22	A-30	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
23	B-21	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
24	B-22	<i>Metarhizium</i>	<i>lepidiotae</i>
25	B-23	<i>Metarhizium</i>	<i>robertsii</i>
26	B-24	<i>Metarhizium</i>	<i>flavoviride</i>
27	B-25	<i>Metarhizium</i>	<i>brittlebankisoides</i>
28	B-26	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
29	B-27	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
30	B-28	<i>Metarhizium</i>	<i>anisopliae</i>
31	B-29	<i>Isaria</i>	<i>takamizusanensis</i>
32	B-30	<i>Metarhizium</i>	<i>anisopliae</i>
33	B-31	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
34	A-52	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
35	A-53	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
36	A-54	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
37	B-32	<i>Metarhizium</i>	<i>quizhouense</i>
38	B-33	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
39	B-34	<i>Clonostachys</i>	<i>rosea</i>
40	A-67	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
41	B-35	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
42	A-69	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
43	A-70	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
44	B-36	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
45	B-37	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
46	A-72	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>

- 토양 채집 및 균주 동정

국내에 분포하는 곤충병원성 진균을 확보하기 위하여, 산림 및 습지지역의 토양 채집을 진행하였음(그림 26). 채취된 시료는 전북대학교 곤충미생물공학 연구실에 보관하며, 곤충병원성 진균의 분리를 진행하였음. 플라스틱 컵에 채집된 토양시료를 넣어준 뒤 D.W.를 처리하여 고습 조건을 유지해 주었음. 이후 갈색거저리 유충 5 마리를 처리한 뒤

25±2°C 조건에서 약 2주간 감염을 확인하였음(그림 27). 갈색거저리 유충에 감염된 균주를 1/4 Sabouraud dextrose agar (SDA) 배지에서 순수분리 하여 single colony를 확보하였음. 확보된 single colony를 25±2°C 조건에서 7-14일간 배양한 뒤 갈색거저리 유충 5마리를 노출시켰음. 25±2°C 조건에서 10 일간 관찰하며 병원성을 재 검정하였음. 병원성이 확인 된 균주는 25±2°C 조건에서 1/4 SDA 배지에 배양 한 뒤 gDNA extract buffer를 이용하여 extraction 하였음. 이후 ITS1F (5-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3), ITS4R primers (5-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3)를 이용하여 sequencing을 진행하였음. 동정이 완료된 균주는 20% glycerol을 이용하여 -80°C에 보관하였음.



그림 26. 산림 및 습지 지역에서의 토양 채집



그림 27. 채집된 토양에 존재하는 진균에 감염된 갈색거저리 유충

### 3) 흡즙 해충에 대한 곤충병원성 진균의 살충활성 평가

#### - 담배가루이에 대한 병원성 검정 방법 확립(침지처리)

침지처리를 통한 담배가루이에 대해 병원성을 갖는 곤충병원성 진균의 스크리닝 방법을 확립하기 위하여 실험실내 보유중인 고병원성 균주(*B. bassiana*)를 이용하여 적합한 실험 방법을 찾고자 다음의 실험을 진행하였음. 담배가루이 유충이 있는 가지 잎을 포자현탁액( $1.0 \times 10^7$  conidia/ml)에 10초간 침지하였음. Filter paper가 놓인 Petri-dish(90×15 mm)에 D.W. 500 μl를 처리한 뒤, 침지되었던 가지 잎을 옮겨주었음.

실험은  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  조건에서 진행되었으며, 매일 D.W. 100  $\mu\text{l}$ 를 처리하여 습도를 유지시켜주었음. 그 결과 처리 6일 후부터 치사개체가 확인되었음. 처리 6일차에 non-treated(0.03% silwet)  $20\pm 4\%$ , *B. bassiana* isolate  $80\pm 3\%$ 의 사충률을 확인하였음(그림 28). 또한 그림 29과 같이 군주 처리구에서 곤충병원성 진균의 균사가 덮인 담배가루이(mycosis, 진균증)를 확인하였음. 이에 본 방법에 이용된 가지 잎은 assay에 적합하지 않다고 판단하여, 토마토 잎으로 변경하기로 하였음. 또한 물방울에 갇혀 치사되는 충이 발견되어, 침지 처리 후 25분간 건조하는 시간을 실험 방법에 추가하였음. 변경된 방법을 이용하여 담배가루이에 대한 assay가 가능 할 것이라고 판단하였음.

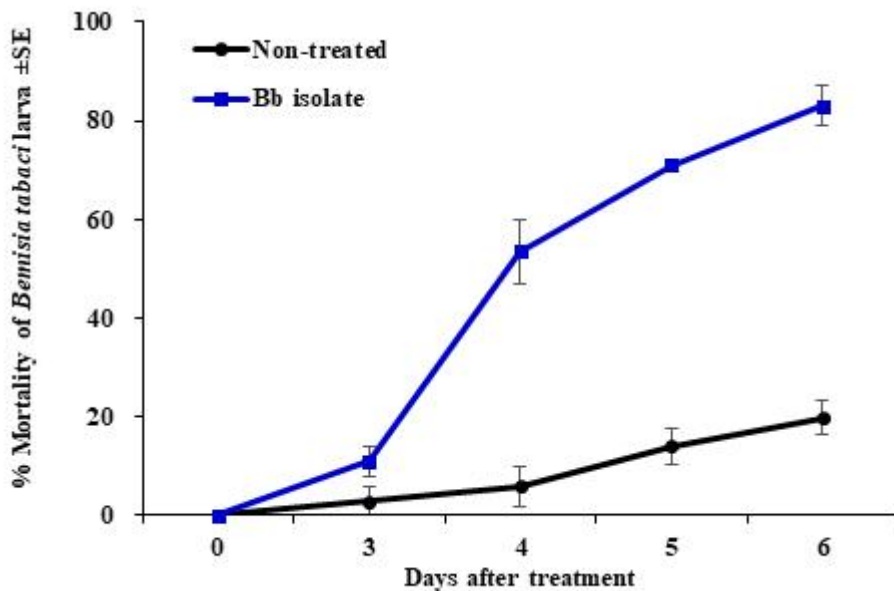


그림 28. 침지처리 시, 담배가루이 유충에 대한 살충효과



그림 29. *Beauveria bassiana* isolate 침지처리 6일 후 mycosis 확인

- 담배가루이에 대한 병원성 검정(침지처리, 단반복)  
앞서 확립된 방법을 이용하여 담배가루이 2령 유충을 군주 현탁액에 침지하였음. 각

처리구 당 20~40 마리씩 단반복으로 실험을 진행하였음. 그 결과, 균주 처리 3일 후 부터 치사개체가 발견되었음. 균주처리 후 5일차 사충률을 기준으로 분류하였을 때 상(80%이상) 10균주, 중(50-79%) 15균주, 하(50%미만) 47균주로 분류되었으며, 80%이상의 사충률을 나타낸 균주는 모두 *B. bassiana* isolate로 확인되었음(표 20). 또한 그림 30과 같이 균주 처리구에서 mycosis를 확인하였음.

표 20. 선발된 곤충병원성 진균의 담배가루이에 대한 병원성 검정

No.	Code	Identification		Virulence against <i>T. palm</i>	Days after treatment (Mortality %)							
		Genus	Species		0	1	2	3	4	5	6	7
1	B-01	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	0	29	77	77	78	100
2	A-03	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	11	30	67	82	82	83	100
3	B-02	<i>Cordyceps</i>	<i>fumosorosea</i>	Low	0	0	9	27	27	32	32	33
4	B-03	<i>Lecanicillium</i>	sp.	Low	0	0	0	0	0	0	0	0
5	B-04	<i>Paecilomyces</i>	sp.	Low	0	10	14	14	17	20	20	30
6	B-05	<i>Metapochonia</i>	<i>bulbillosa</i>	Medium	0	14	20	20	44	44	50	57
7	B-06	<i>Metapochonia</i>	<i>bulbillosa</i>	Low	0	9	9	22	25	22	22	22
8	B-07	<i>Paecilomyces</i>	sp.	Medium	0	0	0	29	33	57	57	57
9	B-08	<i>Paecilomyces</i>	sp.	Low	0	0	20	33	40	44	44	45
10	B-09	<i>beauveria</i>	<i>brongniartii</i>	High	0	0	22	45	56	67	82	100
11	B-10	<i>Metapochonia</i>	<i>bulbillosa</i>	Low	0	0	0	13	14	25	25	29
12	B-11	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	0	44	78	78	78	100
13	B-12	<i>Purpureocillium</i>	sp.	Low	0	9	20	27	27	27	32	33
14	B-13	<i>Cordyceps</i>	<i>farinosa</i>	High	0	0	0	0	56	63	88	100
15	B-14	<i>Cordyceps</i>	<i>confragosa</i>	Low	0	0	22	22	29	22	33	33
16	B-15	<i>Purpureocillium</i>	<i>lilacinum</i>	Low	0	0	0	0	0	0	0	17
17	B-16	<i>Akanthomyces</i>	<i>attenuatus</i>	Medium	0	0	0	0	13	30	50	50
18	B-17	<i>Akanthomyces</i>	<i>attenuatus</i>	Low	0	0	0	8	15	15	17	25
19	B-18	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	20	30	33	57	70	100
20	B-19	<i>Beauveria</i>	<i>brongniartii</i>	High	0	9	22	22	71	86	100	100
21	B-20	<i>Metarhizium</i>	<i>brunneum</i>	Low	0	0	0	0	0	0	0	0
22	A-30	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	0	0	11	29	50	100
23	B-21	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	0	0	30	62	89	100
24	B-22	<i>Metarhizium</i>	<i>lepidiotae</i>	High	0	10	11	11	14	38	75	88
25	B-23	<i>Metarhizium</i>	<i>robertsii</i>	High	0	0	22	22	25	29	75	88
26	B-24	<i>Metarhizium</i>	<i>flavoviride</i>	Low	0	0	10	10	10	10	10	10
27	B-25	<i>Metarhizium</i>	<i>brittlebankisoides</i>	High	0	0	0	0	0	0	100	100
28	B-26	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	0	17	29	67	100	100
29	B-27	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	10	26	27	67	87	100	100
30	B-28	<i>Metarhizium</i>	<i>anisopliae</i>	High	0	0	0	0	11	44	88	100
31	B-29	<i>Isaria</i>	<i>takamizusanensis</i>	Low	0	0	0	0	0	10	12	13
32	B-30	<i>Metarhizium</i>	<i>anisopliae</i>	High	0	10	30	50	100	100	100	100
33	B-31	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	25	50	71	75	82	100
34	A-52	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	9	9	18	25	70	100
35	A-53	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	11	18	18	50	60	62	100
36	A-54	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	10	10	43	50	67	87	100
37	B-32	<i>Metarhizium</i>	<i>quizhouense</i>	High	0	0	0	13	57	57	100	100
38	B-33	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	11	11	25	44	78	100
39	B-34	<i>Clonostachys</i>	<i>rosea</i>	Low	0	0	0	0	12	12	12	13
40	A-67	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	0	0	33	100	100	100
41	B-35	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	0	12	33	62	83	100
42	A-69	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	17	17	43	71	83	100
43	A-70	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	33	67	67	82	98	100	100
44	B-36	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	9	10	33	67	70	70	100
45	B-37	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	8	8	9	40	60	60	100
46	A-72	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	33	50	86	100	100	100
47		Non-treatment (0.03% silwet)		Low	0	0	0	0	0	0	0	0
48		Positive control (Spinetoram)		High	0	75	100	100	100	100	100	100





그림 30. 곤충병원성 진균 현탁액에 침지처리 후 5일차 담배가루이 치사양상

- 담배가루이에 대한 병원성 검정(균주 선발, 침지처리, 3반복)

동일한 방법을 이용하여 병원성이 높게 나타난 (5일차 사충율 80% 이상) 10개 균주에 대해 병원성 검정을 재 진행하였음. 각 처리구 당 30~40 마리씩 3반복으로 실험을 진행하였음. Positive control은 Pyrifroxyfen 액상수화제를 추천약량으로 사용하였음. GHA는 담배가루이를 타겟으로 상용화된 제품(보타니가드)의 유효성분으로 선발 균주의 병원성을 비교하기 위해 추가하였음. 그 결과, 균주 처리 후 5일차 A-70 isolate 의 사충률이 99%로 가장 높게 나타났지만 90% 이상의 사충률을 보인 다른 4개 isolate(A-30, -52, -67, -72)와 유의성이 확인되지 않았음(그림 31). 또한 그림 32와 같이 균주 처리구에서 mycosis를 확인하였음.

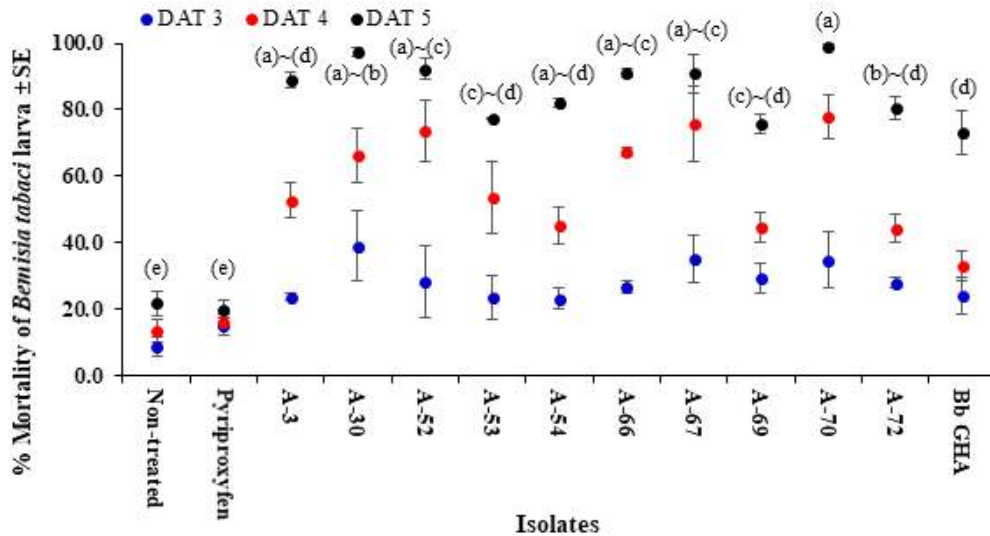


그림 31. 선발된 균주를 이용한 담배가루이에 대한 병원성 검정결과

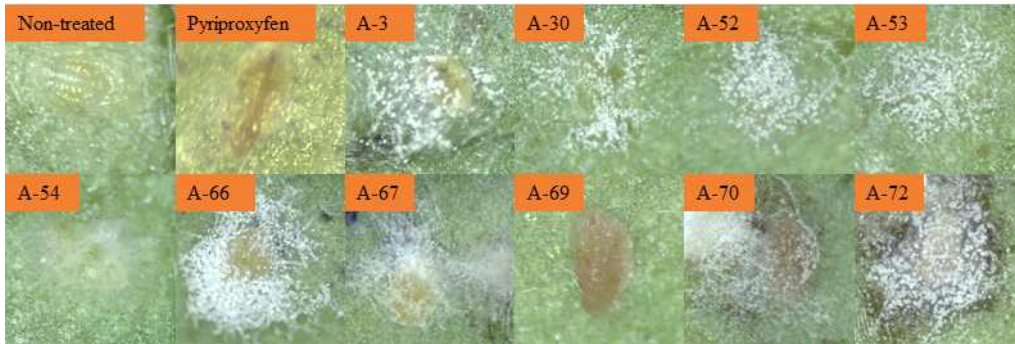


그림 32. 곤충병원성 진균 현탁액에 침지처리 5일 후 mycosis 확인

#### 4) 고 병원성 균주의 특성(열안정성, 포자생산성) 비교

##### - 병원성이 높게 나타난 균주의 열안정성 평가

병원성이 높게 확인된 10개 균주를 대상으로 열안정성을 비교하였음. 1/4 SDA 배지 상에서 25°C 조건으로 7일간 배양된 균주를 이용하여  $1.0 \times 10^7$  conidia/ml 포자현탁액을 제조하였음. 1.5 ml micro-tube에 현탁액 1 ml을 분주한 뒤, 45°C incubator에서 열처리하였음(0, 30, 60, 90, 120분). 열처리가 진행된 포자현탁액을 1/4 SDA 배지에 3  $\mu$ l drop 한 후 25°C 조건에서 18시간 배양한 뒤 발아율을 비교하였음. 균사가 확인된 포자를 발아한 것으로 계수하였으며, 3반복 진행하였음. 그 결과, 열처리하지 않은 경우 모두 95% 이상의 발아율을 나타내어 균주의 생육 능력에는 문제가 없는 것으로 판단되었음. 또한 30분 열처리구에서 A-67 과 GHA의 발아율이 각각 86%, 77%, 60분 열처리구에서 A-67의 발아율이 24%로 확인되어 선발 균주 중 A-67에서 가장 높은 열안정성을 확인 할 수 있었음. 90분 열처리구의 발아율은 모든 처리구에서 10% 미만, 120분 열처리구의 발아율은 0%로 나타났지만, 열처리 이후 25°C 조건에서의 배양시간을 18시간 이상으로 하여 균주가 완전히 사멸된 것인지 발아의 속도가 더딘 것인지 추가적인 검토가 필요한 것으로 판단되었음(그림 33).



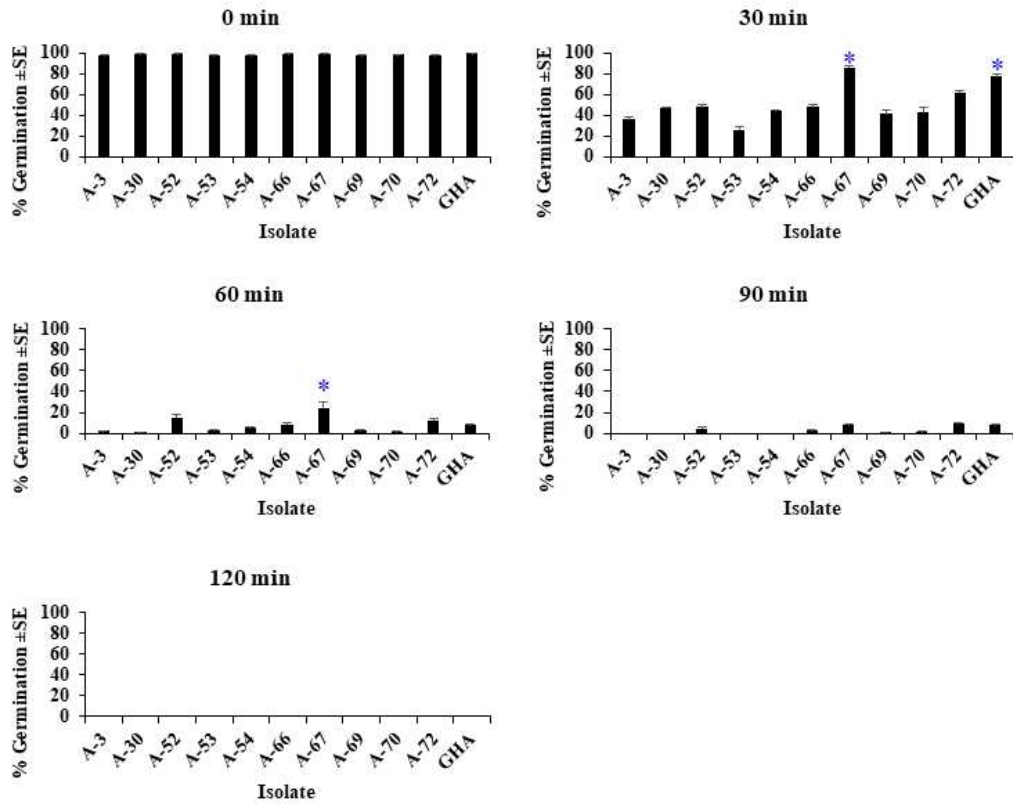


그림 33. 병원성이 높게 확인된 균주의 열안정성 비교

- 병원성이 높게 나타난 균주의 포자생산성 평가

병원성이 높게 확인된 10개 균주를 대상으로 포자생산성을 비교하였음. 1/4 SDA 배지 상에서 25°C 조건으로 7일간 배양된 균주를 이용하여  $1.0 \times 10^7$  conidia/ml 의 포자현탁액을 제조하였음. 1/4 SDA 배지에 현탁액 70  $\mu$ l를 spreading한 뒤, 25°C 조건으로 11일간 배양 후, 중앙부분 disc(0.28  $\text{cm}^2$ )를 0.03% silwet에 현탁하여 포자를 계수하였음. 계수에는 Hemocytometer를 사용하였으며 3반복 진행하였음. 그 결과, A-30에서  $4.0 \times 10^7$  conidia/ml, A-67에서  $3.9 \times 10^7$  conidia/ml의 비교적 높은 포자농도가 확인되었지만 처리구간 유의한 차이는 없었음(그림 34). 최종적으로 병원성이 높게 나타난 A-70 isolate와 병원성과 열안정성 및 포자생산성이 높게 나타난 A-67 균주를 선발하였음.

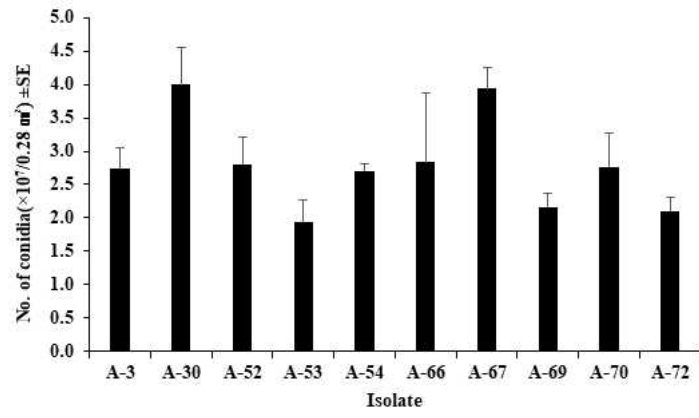


그림 34. 병원성이 높게 확인된 균주의 포자생산성 비교

나. 최적의 적용 방법 도출(담배가루이)

1) 적용 방법에 따른 살충효과 비교 평가

- 담배가루이에 대한 병원성 검정(분무처리, 3반복)

최종 선발된 2개의 균주를 이용하여 담배가루이에 대한 병원성 검정을 다음과 같은 방법을 이용하여 진행하였음. 토마토 잎에 담배가루이 알을 1일간 받은 뒤, 성충을 모두 제거하였음. 10일 후 2령 유충이 있는 토마토에 균주 현탁액( $1.0 \times 10^7$  conidia/ml) 10 ml을 spray 처리하였음. Plastic cage에 D.W. 50 ml을 처리하여  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도  $94 \pm 2\%$ 를 유지시켜 주었으며, cage에 토마토 잎을 넣어준 뒤 2일 간격으로 사충을 조사하였음. Positive control은 dinotefuran 20% 입상수화제와 spinetoram 5% 입상수화제를 추천약량으로 사용하였음. 또한 각 처리구당 30 마리의 유충을 사용하였으며 3반복 진행하였음(그림 35). 그 결과, 균주처리 후 8일차 non-treated  $23 \pm 2\%$ , dinotefuran  $58 \pm 1\%$ , spinetoram  $36 \pm 1\%$ , A-67  $79 \pm 2\%$ , A-70  $100\%$ , GHA  $98 \pm 1.2\%$  의 사충률을 확인하였음(그림 36). 또한 그림 37 와 같이 균주 처리구에서 mycosis를 확인하였음. 실험에 이용된 담배가루이는 dinotefuran과 spinetoram등에 저항성이 있는 것으로 판단되며, 선발된 A-70 균주는 고습조건에서 상용화된 제품의 유효성분인 GHA와 유사한 살충활성을 나타내는 것으로 판단되었음. 따라서 추후 저습 조건에서 분무처리를 통한 병원성 검정이 필요한 것으로 판단되었음.



그림 35. 균주현탁액 분무처리 실험과정

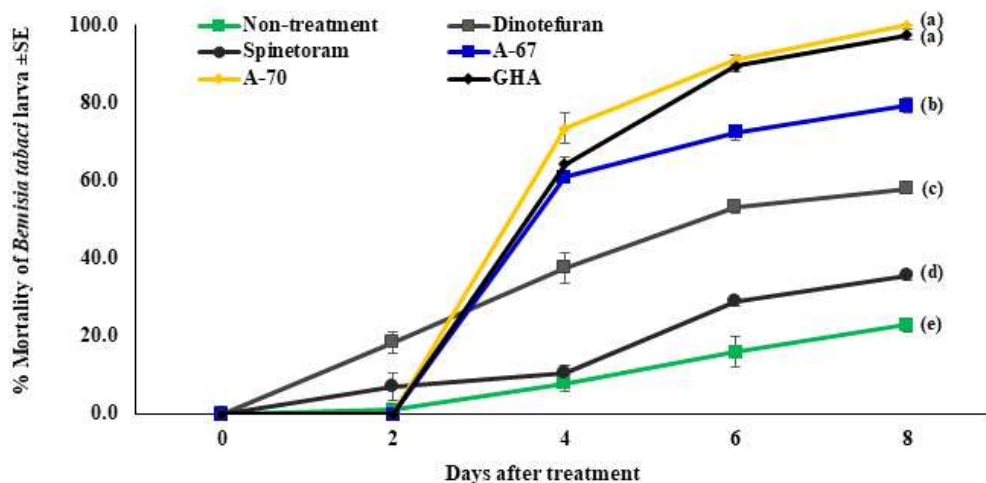


그림 36. 균주현탁액 분무처리를 통한 병원성 검정

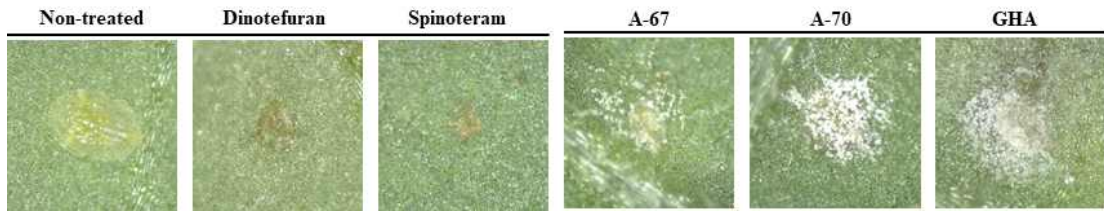


그림 37. 균주현탁액 분무처리 후 8일차 mycosis 확인

2) 미생물 처리농도에 따른 살충효과 비교

- 포자농도에 따른 담배가루이에 대한 병원성 검정(침지처리, 3반복)

병원성 검정이 진행 된  $1.0 \times 10^7$  conidia/ml 의 농도보다 낮은 농도에서의 살충효과를 검정하기 위하여  $1.0 \times 10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  conidia/ml 세 가지의 농도 조건에서 병원성 검정을 진행하였음. 실험은 1차 스크리닝과 동일하게 토마토 잎을 균주 현탁액에 침지하는 방법으로 2령 유충에 대해 진행하였으며, positive control에는 dinotefuran 20% 입상수화제를 추천약량으로 사용하였음. 각 처리구당 20 마리의 충을 사용하였으며, 3반복 진행하였음. 그 결과 세 개의 균주 처리구 모두 농도가 높아짐에 따라 병원성이 높게 확인되었으며, 동일한 농도에서 병원성에 차이는 없는 것으로 확인하였음(그림 38). 또한 그림 39에서와 같이 처리구에서 mycosis를 확인하였음.

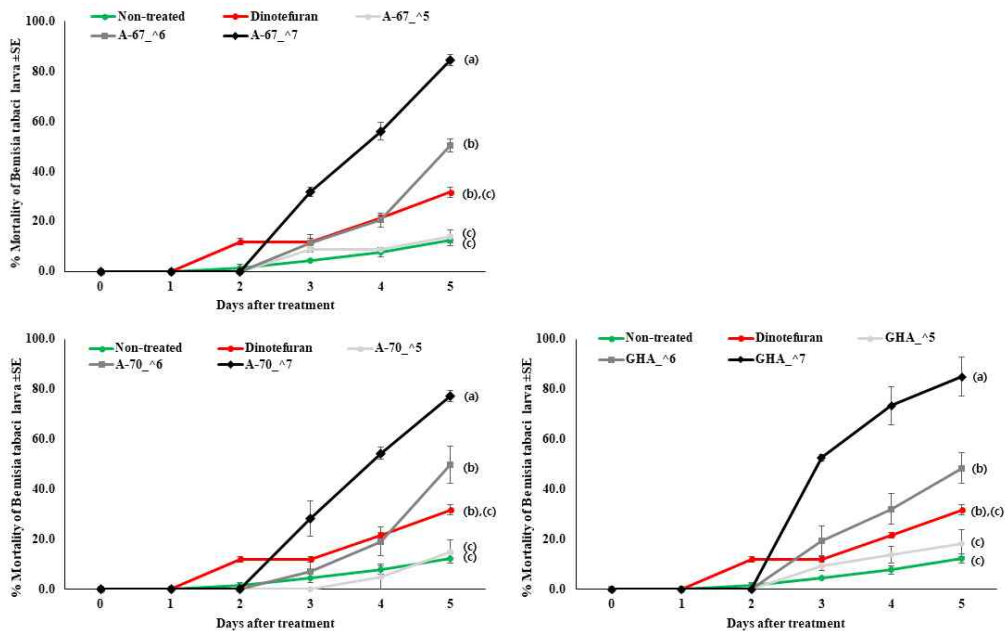


그림 38. 농도에 따른 병원성 검정

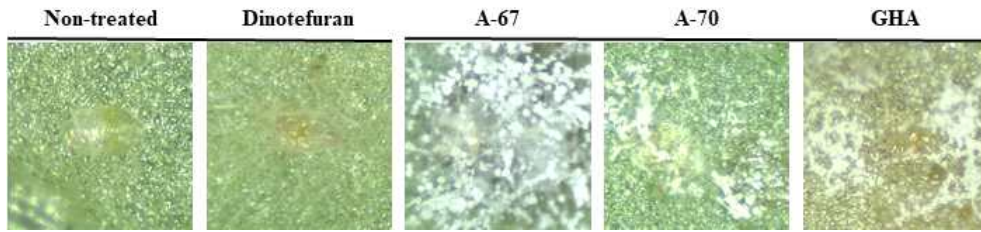


그림 39. 균주현탁액 침지처리 후 5일차 mycosis 확인

다. 방제 대상 해충의 생태 특성 분석(총채벌레)

1) 생활사 분석

- 오이총채벌레의 생활사 분석

실험에 이용되는 총의 Stage를 맞추기 위해 실내 사육조건에서 생활사를 분석하였음. 분석은 다음과 같은 방법을 통해 진행하였음. Filter paper가 놓인 petridish(60×15 mm)에 지름 60 mm 로 자른 오이 잎을 넣어주었음. 오이총채벌레 성충 30마리를 처리하여 알을 하루 받고, 성충을 모두 제거 한 뒤, 25±2.0°C 조건에서 관찰을 진행하였음. 그 결과 알을 받고 3~4일 후 유충이 관찰되기는 하였으나 알을 발견할 수 없었음. 오이총채벌레의 생활사를 관찰한 참고 문헌에서 또한 알의 수를 파악하지 못하였다고 기재되어 있어, 다음 실험에서는 알을 받고 1령 유충이 관찰되기 까지를 알 기간으로 측정하기로 하였음.

2) 살충성미생물에 대한 살충효과 평가

- 곤충병원성 진균 선발

오이총채벌레에 대한 병원성 검정에 이용될 곤충병원성 진균을 전북대학교 곤충미생물공학 연구실에 확보된 균주 중 임의로 46개 균주를 선발하였음(표 21). 선발된 균주의 채집 및 동정 과정은 '1-2-1. 연구개발 수행 내용 및 연구결과 (담배가루이)' 에서 작성된 것과 같은 방법으로 진행하였음.

표 21. 선발된 곤충병원성 진균

No	Code	Identification	
		Genus	Species
1	B-01	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
2	A-03	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
3	B-02	<i>Cordyceps</i>	<i>fumosorosea</i>
4	B-03	<i>Lecanicillium</i>	sp.
5	B-04	<i>Paecilomyces</i>	sp.
6	B-05	<i>Metapochonia</i>	<i>bulbillosa</i>
7	B-06	<i>Metapochonia</i>	<i>bulbillosa</i>
8	B-07	<i>Paecilomyces</i>	sp.
9	B-08	<i>Paecilomyces</i>	sp.
10	B-09	<i>Beauveria</i>	<i>brongniartii</i>
11	B-10	<i>Metapochonia</i>	<i>bulbillosa</i>
12	B-11	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
13	B-12	<i>Purpureocillium</i>	sp.
14	B-13	<i>Cordyceps</i>	<i>farinosa</i>

15	B-14	<i>Cordyceps</i>	<i>confragosa</i>
16	B-15	<i>Purpureocillium</i>	<i>lilacinum</i>
17	B-16	<i>Akanthomyces</i>	<i>attenuatus</i>
18	B-17	<i>Akanthomyces</i>	<i>attenuatus</i>
19	B-18	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
20	B-19	<i>Beauveria</i>	<i>brongniartii</i>
21	B-20	<i>Metarhizium</i>	<i>brunneum</i>
22	A-30	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
23	B-21	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
24	B-22	<i>Metarhizium</i>	<i>lepidotae</i>
25	B-23	<i>Metarhizium</i>	<i>robertsii</i>
26	B-24	<i>Metarhizium</i>	<i>flavoviride</i>
27	B-25	<i>Metarhizium</i>	<i>brittlebankisoides</i>
28	B-26	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
29	B-27	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
30	B-28	<i>Metarhizium</i>	<i>anisopliae</i>
31	B-29	<i>Isaria</i>	<i>takamizusanensis</i>
32	B-30	<i>Metarhizium</i>	<i>anisopliae</i>
33	B-31	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
34	A-52	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
35	A-53	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
36	A-54	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
37	B-32	<i>Metarhizium</i>	<i>quzhouense</i>
38	B-33	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
39	B-34	<i>Clonostachys</i>	<i>rosea</i>
40	A-67	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
41	B-35	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
42	A-69	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
43	A-70	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
44	B-36	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
45	B-37	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>
46	A-72	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>

### 3) 흡즙 해충에 대한 곤충병원성 진균의 살충활성 평가

#### - 오이총채벌레에 대한 병원성 검정 방법 확립 (분무처리, 3반복)

분무처리를 통한 오이총채벌레에 병원성을 갖는 곤충병원성 진균의 스크리닝 방법을 확립하기 위하여 실험실내 보유중인 고병원성 균주 (*B. bassiana*, *M. anisopliae*)를 이용하여 적합한 실험 방법을 찾고자 다음의 실험을 진행하였음.

오이 잎을 지름 60 mm로 절단한 후 포자현탁액( $1.0 \times 10^7$  conidia/ml)을 1 ml 분무처리 및 10분간 상온에 건조하였음. Filter paper가 놓인 petridish(60×15 mm)에 D.W. 200 µl 처리 후, 각 처리구 당 오이총채벌레 성충 10마리를 옮겨주었음. Positive control은 spinetoram 5% 입상수화제를 추천약량으로 사용하였음. 실험은 3반복 진행하였으며, 그 결과 처리 1일 후부터 치사개체가 확인되었음. 처리 후 6일차 non-treated(0.03% silwet) 14±2%, spinetoram 100%, *B. bassiana* isolate 100%, *M. anisopliae* isolate 100%의 사충률을 확인하였음(그림 40). 또한 그림 41과 같이 균주 처리구에서 곤충병원성 진균의 균사가 덮인 오이총채벌레(mycosis, 진균증)를 확인하였음.

이에 본 방법을 이용하여 오이총채벌레에 대한 assay가 가능 할 것이라고 판단되었음.

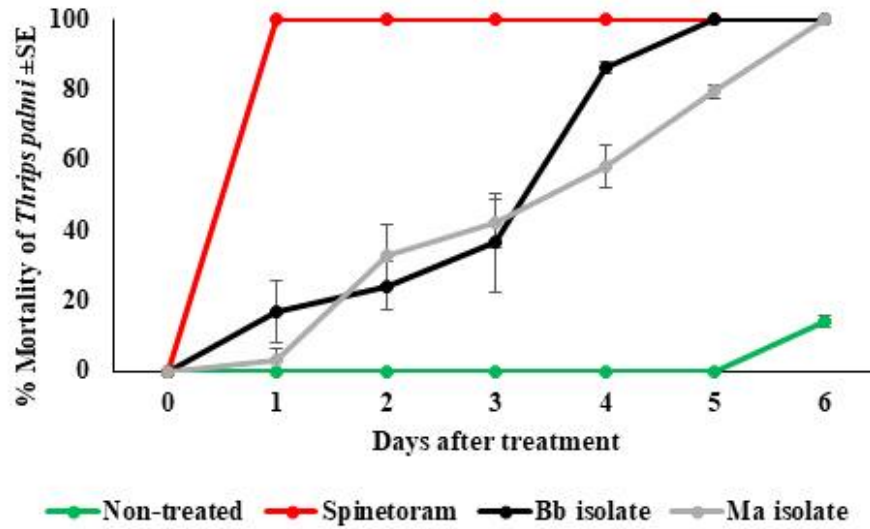


그림 40. 분무처리 후 오이총채벌레 성충에 대한 살충효과



그림 41. 균주포자현탁액 분무처리 6일 후 mycosis 확인

- 오이총채벌레에 대한 병원성 검정(분무처리, 단반복)

앞서 확립된 방법을 이용하여 실험을 진행하였음. 각 처리구당 10마리씩 반복 없이 실험을 진행하였으며 그 결과, 균주 처리 1일 후부터 치사개체가 발견되었음. 균주처리 후 7일차 사충률을 기준으로 분류하였을 때 상(80%이상) 46균주, 중(50-79%) 3균주, 하(50%미만) 균주로 분류되었으며, 80%이상의 사충률을 나타낸 균주는 1개 속을 제외하고 모두 *Beauveria* 또는 *Metarhizum* 속으로 확인되었음(표 22). 또한 그림 42 와 같이 균주 처리구에서 mycosis를 확인하였음.



표 22. 선발된 곤충병원성 진균의 오이총채벌레에 대한 병원성 검정

No.	Code	Identification		Virulence against <i>T. palm</i>	Days after treatment (Mortality %)							
		Genus	Species		0	1	2	3	4	5	6	7
1	B-01	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	0	29	77	77	78	100
2	A-03	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	11	30	67	82	82	83	100
3	B-02	<i>Cordyceps</i>	<i>fumosorosea</i>	Low	0	0	9	27	27	32	32	33
4	B-03	<i>Lecanicillium</i>	sp.	Low	0	0	0	0	0	0	0	0
5	B-04	<i>Paecilomyces</i>	sp.	Low	0	10	14	14	17	20	20	30
6	B-05	<i>Metapochonia</i>	<i>bulbillosa</i>	Medium	0	14	20	20	44	44	50	57
7	B-06	<i>Metapochonia</i>	<i>bulbillosa</i>	Low	0	9	9	22	25	22	22	22
8	B-07	<i>Paecilomyces</i>	sp.	Medium	0	0	0	29	33	57	57	57
9	B-08	<i>Paecilomyces</i>	sp.	Low	0	0	20	33	40	44	44	45
10	B-09	<i>beauveria</i>	<i>brongniartii</i>	High	0	0	22	45	56	67	82	100
11	B-10	<i>Metapochonia</i>	<i>bulbillosa</i>	Low	0	0	0	13	14	25	25	29
12	B-11	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	0	44	78	78	78	100
13	B-12	<i>Purpureocillium</i>	sp.	Low	0	9	20	27	27	27	32	33
14	B-13	<i>Cordyceps</i>	<i>farinosa</i>	High	0	0	0	0	56	63	88	100
15	B-14	<i>Cordyceps</i>	<i>confragosa</i>	Low	0	0	22	22	29	22	33	33
16	B-15	<i>Purpureocillium</i>	<i>lilacinum</i>	Low	0	0	0	0	0	0	0	17
17	B-16	<i>Akanthomyces</i>	<i>attenuatus</i>	Medium	0	0	0	0	13	30	50	50
18	B-17	<i>Akanthomyces</i>	<i>attenuatus</i>	Low	0	0	0	8	15	15	17	25
19	B-18	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	20	30	33	57	70	100
20	B-19	<i>Beauveria</i>	<i>brongniartii</i>	High	0	9	22	22	71	86	100	100
21	B-20	<i>Metarhizium</i>	<i>brunneum</i>	Low	0	0	0	0	0	0	0	0
22	A-30	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	0	0	11	29	50	100
23	B-21	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	0	0	30	62	89	100
24	B-22	<i>Metarhizium</i>	<i>lepidotae</i>	High	0	10	11	11	14	38	75	88
25	B-23	<i>Metarhizium</i>	<i>robertsii</i>	High	0	0	22	22	25	29	75	88
26	B-24	<i>Metarhizium</i>	<i>flavoviride</i>	Low	0	0	10	10	10	10	10	10
27	B-25	<i>Metarhizium</i>	<i>brittlebankisoides</i>	High	0	0	0	0	0	0	100	100
28	B-26	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	0	17	29	67	100	100
29	B-27	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	10	26	27	67	87	100	100
30	B-28	<i>Metarhizium</i>	<i>anisopliae</i>	High	0	0	0	0	11	44	88	100
31	B-29	<i>Isaria</i>	<i>takamizusanensis</i>	Low	0	0	0	0	0	10	12	13
32	B-30	<i>Metarhizium</i>	<i>anisopliae</i>	High	0	10	30	50	100	100	100	100
33	B-31	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	25	50	71	75	82	100
34	A-52	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	9	9	18	25	70	100
35	A-53	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	11	18	18	50	60	62	100
36	A-54	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	10	10	43	50	67	87	100
37	B-32	<i>Metarhizium</i>	<i>quizhouense</i>	High	0	0	0	13	57	57	100	100
38	B-33	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	11	11	25	44	78	100
39	B-34	<i>Clonostachys</i>	<i>rosea</i>	Low	0	0	0	0	12	12	12	13
40	A-67	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	0	0	33	100	100	100
41	B-35	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	0	12	33	62	83	100
42	A-69	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	17	17	43	71	83	100
43	A-70	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	33	67	67	82	98	100	100
44	B-36	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	9	10	33	67	70	70	100
45	B-37	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	8	8	9	40	60	60	100
46	A-72	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	High	0	0	33	50	86	100	100	100
47		Non-treatment (0.03% silwet)		Low	0	0	0	0	0	0	0	0
48		Positive control (Spinetoram)		High	0	75	100	100	100	100	100	100



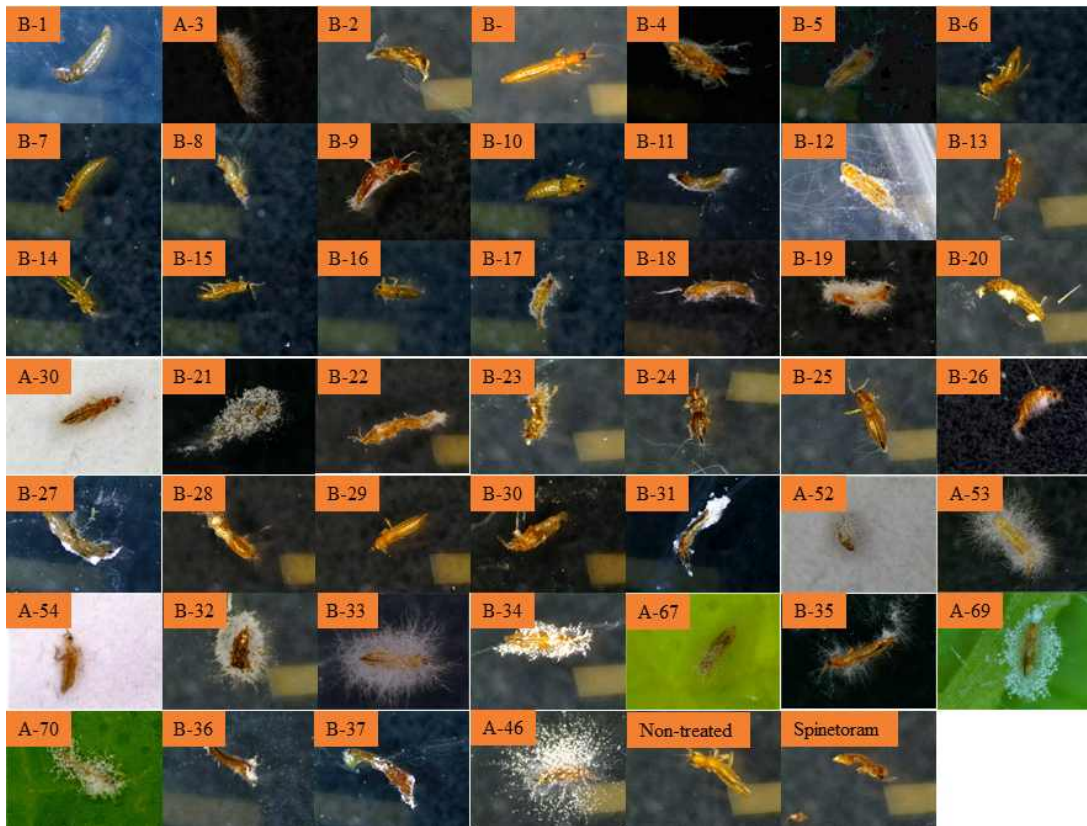


그림 42. 곤충병원성진균 분무처리 7일 후 mycosis 확인

- 총채벌레에 대한 병원성 검정(균주 선발, 침지처리, 3반복)

동일한 방법을 이용하여 병원성이 높게 나타난(5일차 사충율 80% 이상) 46개 균주 중 담배가루이에도 병원성이 높게 나타난 9개 균주에 대해 병원성 검정을 재 진행하였음. 각 처리구당 10 마리씩 3반복으로 실험을 진행하였음. Positive control은 spinetoram 5% 입상수화제를 추천약량으로 사용하였음. 그 결과, 균주 처리 후 5일차 A-52 와 A-54의 사충률이 각각 94%, 95%로 높게 나타났으며 균주처리 8일차 모든 처리구에서 100%의 사충률을 확인하였음(그림 43). 또한 그림 44과 같이 균주 처리구에서 mycosis를 확인하였음. 따라서 다른 균주 처리구의 사충률이 30~60%를 보일 때 90% 이상의 사충률이 확인된 A-52 균주와 A-54 균주를 선발하였음.

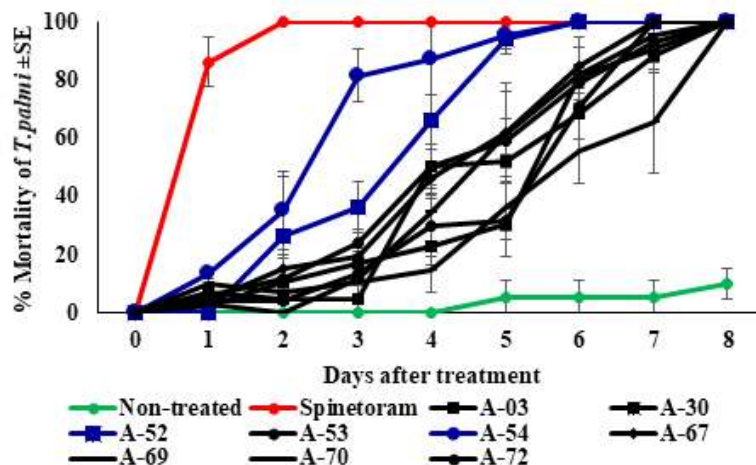


그림 43. 선발된 균주를 이용한 오이총채벌레에 대한 병원성 검정결과

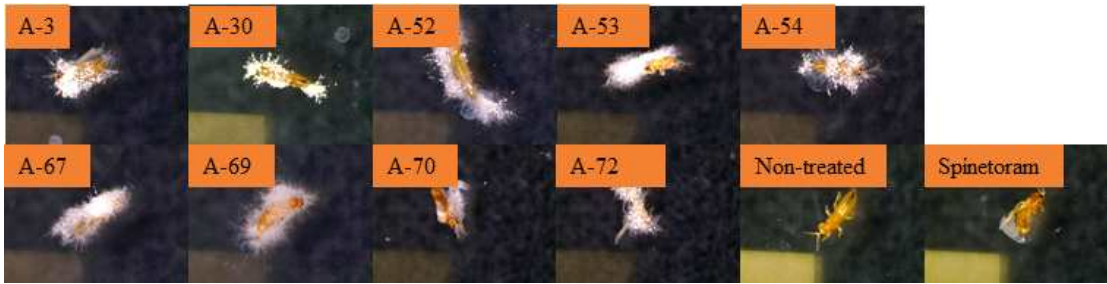


그림 44. 곤충병원성 진균 분무처리 7일 후 mycosis 확인

4) 고 병원성 균주의 포자생산성 비교

- 병원성이 높게 나타난 균주의 포자생산성 평가

열안정성 비교를 진행한 3개 균주를 대상으로 포자생산성을 비교하였음. 1/4 SDA 배지 상에서 25°C 조건으로 7일간 배양된 균주를 이용하여  $1.0 \times 10^7$  conidia/ml 의 포자현탁액을 제조하였음. 1/4 SDA 배지에 현탁액 70  $\mu$ l를 spreading한 뒤, 25°C 조건으로 11일간 배양 후, 중앙부분 disc(0.28  $\text{cm}^2$ )를 0.03% silwet에 현탁하여 포자를 계수하였음. 계수에는 hemocytometer를 사용하였으며 3반복 진행하였음. 그 결과, A-52에서  $0.5 \times 10^7$  conidia/ml, A-54에서  $2.4 \times 10^7$  conidia/ml 그리고 *B.b* isolate에서  $2.1 \times 10^7$  conidia/ml의 포자농도를 확인하여 A-54 균주의 포자생산성이 가장 높은 것을 확인 할 수 있었음(그림 45). 최종적으로 병원성과 포자생산성이 높게 나타난 A-54 균주를 선발하였음.

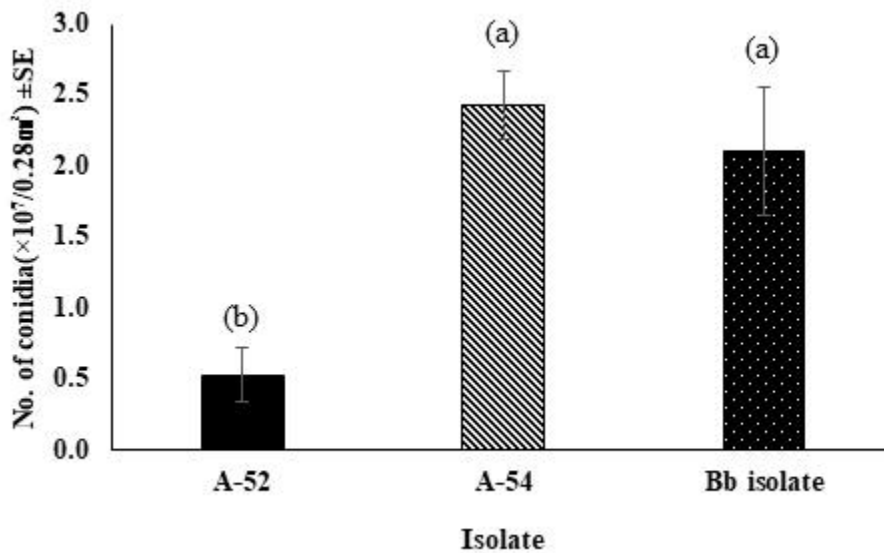


그림 45. 병원성이 높게 확인된 균주의 포자생산성 비교

라. 최적의 적용 방법 도출(총채벌레)

1) 적용 방법에 따른 살충효과 비교 평가

- 오이총채벌레에 대한 병원성 검정(Granule처리, 3반복)

최종 선발된 A-54 균주를 이용하여 오이총채벌레에 대한 병원성 검정을 다음과 같은 방법을 이용하여 진행하였음. A-54 균주를 기장에 배양하여 곡물 배양체를 제조하였음. 제조된 곡물 배양체를 이용하여 처리구당 0.5 g 씩 수박포트에 처리한 뒤 오이총채벌레 10마리를 옮겨주었음. Positive control은 spinetoram 5% 입상수화제를 추천약량으로 사용하였음. 또한 3반복 진행하였으며, 7일 간격으로 생충수를 조사하였음. 그 결과, 균주처리 후 14일차 Non-treated 57개체, A-54 6개체 *B.b* isolate 22개체의 총채벌레가 확인되었으며, 21일차 Non-treated 2개체, A-54 4개체 *B.b* isolate 10 개체의 총채벌레가 확인되었음(그림 46). 14일차의 결과로 보았을 때, A-54 균주의 총채벌레 억제효과가 뛰어나다고 판단되었음. 또한 21일차 기주 식물의 상태를 보았을 때, Non-treated의 개체 수 감소 원인은 기주식물이 유지되지 않았기 때문이라고 판단되었음(그림 47).

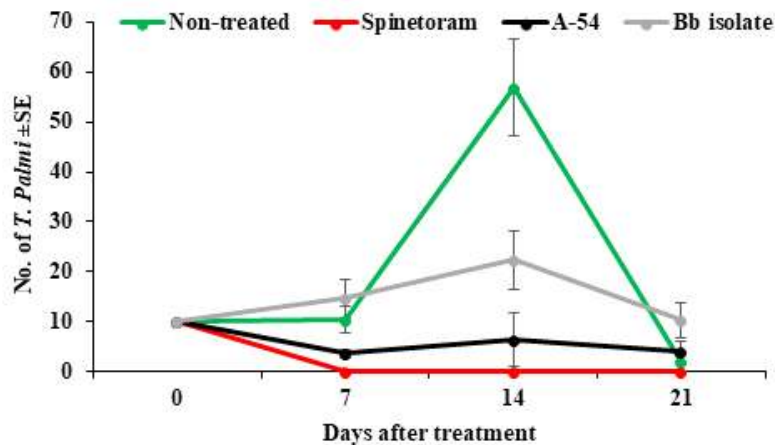


그림 46. Granule처리를 통한 병원성 검정

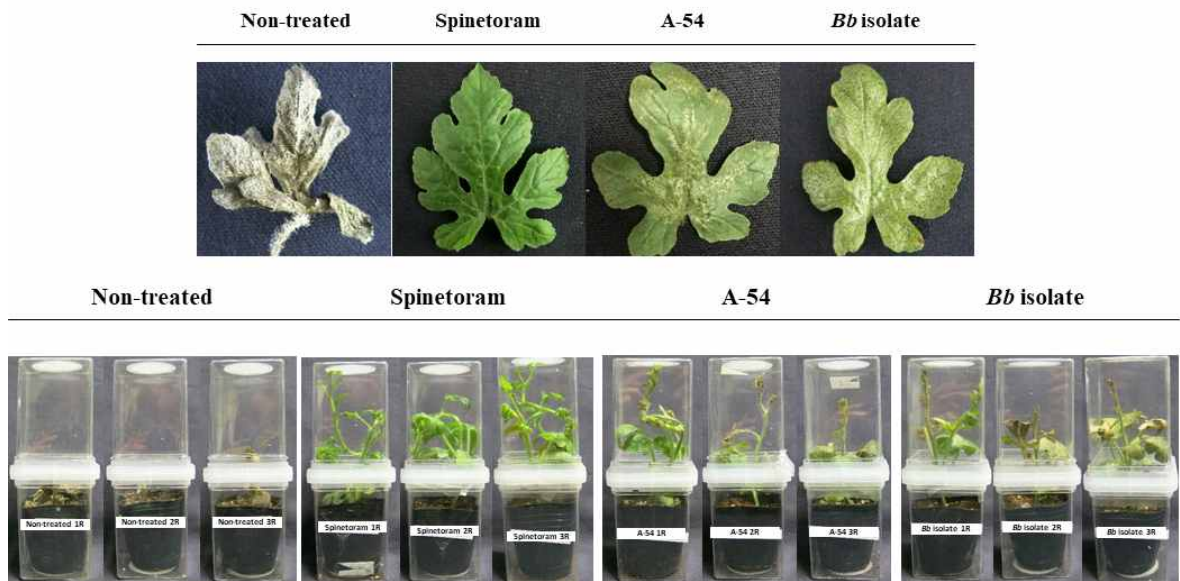


그림 47. Granule처리 14일 후 기주식물

## 2) 미생물 처리농도에 따른 살충효과 비교

- 포자농도에 따른 오이총채벌레에 대한 병원성 검정(분무처리, 3반복)

병원성 검정이 진행 된  $1.0 \times 10^7$  conidia/ml 의 농도보다 높거나 낮은 농도에서의 살충효과를 검정하기 위하여  $1.0 \times 10^5$ ,  $1.0 \times 10^6$ ,  $1.0 \times 10^7$ ,  $1.0 \times 10^8$  conidia/ml 네 가지의 농도 조건에서 병원성 검정을 진행하였음. 실험은 1차 screening 과 동일하게 오이 잎에 균주현탁액을 분무하는 방법으로 성충에 대해 진행하였으며, positive control에는 spinetoram 5% 입상수화제를 추천약량으로 사용하였음. 각 처리구당 10 마리의 충을 사용하였으며, 3반복 진행하였음. 그 결과 균주의 농도가 높아짐에 따라 병원성이 높게 확인되었으며 균주처리 8일차 모든 균주 처리구에서 100%의 사충률을 확인하였음(그림 48). 또한 그림 49에서와 같이 균주 처리구에서 mycosis를 확인하였음.

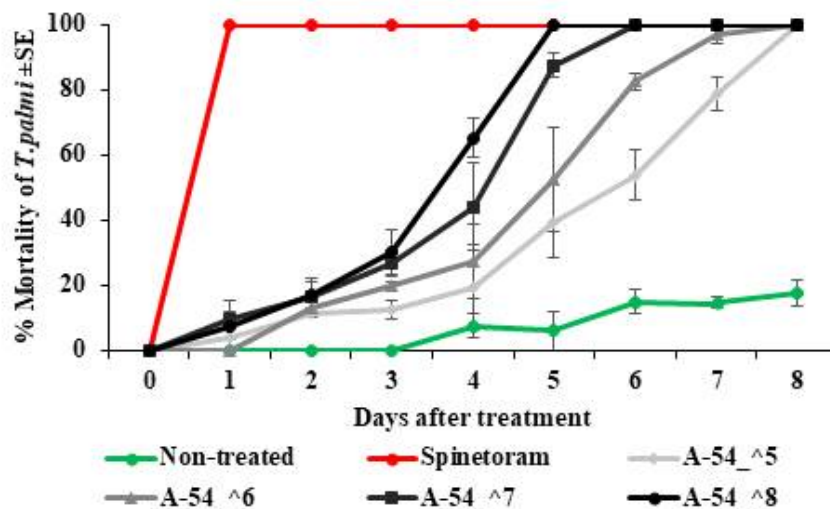


그림 48. 농도에 따른 병원성 검정





그림 49. 균주현탁액 분무 후 8일차 mycosis 확인

마. 포자생산성, 열안정성 향상 곡물배지 기질 선발

1) 곡물 배지 별 포자 생산성과 열안정성(Dish조건)

- 곡물 배지 별 포자 생산성 평가

1차년도 실험 결과 담배가루이에 대해 고병원성을 가진 *B. bassiana* JEF-507 균주와 JEF-462 균주가 선발되었음. JEF-462와 JEF-507 두 균주의 포자 생산성 평가를 위하여 12가지의 곡물배지를 이용하였음(그림 50). 12가지 곡물(결명자, 귀리, 기장, 녹두, 들깨, 메밀, 보리, 수수, 쌀, 조, 참깨, 현미)을 50 g씩 polyethylene bag에 넣어준 후 50% citric acid(160  $\mu$ l/ 100 ml)를 25 ml 처리하였음. 곡물이 들어간 polyethylene bag을 전자레인지에 5 분간 처리하였음. Polyethylene bag 입구를 종이컵과 거즈로 막아준 후 고무줄로 고정시켜 autoclave에서 121°C 15분간 멸균을 진행하였음. 멸균 된 곡물배지를 petridish(60 × 15 mm)에 5 g씩 분배하여 균주 현탁액( $1.0 \times 10^7$  conidia/ml)을 300  $\mu$ l씩 접종시킨 후에 배양하였음(25°C, 15 일). 배양 후 포자의 수분 함량이 10% 될 때까지 건조를 진행하였음. 포자 생산성을 비교하기 위해 고체배양체 0.1 g의 포자량을 hemocytometer를 이용하여 측정하였음.

그 결과 JEF-462에서 결명자( $2.0 \pm 0.3$ ), 기장( $20.3 \pm 2.3$ ), 귀리( $4.0 \pm 0.2$ ), 녹두( $8.5 \pm 2.1$ ), 들깨( $9.9 \pm 2.6$ ), 메밀( $1.2 \pm 0.6$ ), 보리( $14.8 \pm 2.1$ ), 수수( $12.2 \pm 2.3$ ), 쌀( $19.2 \pm 3.2$ ), 조( $18.5 \pm 2.2$ ), 참깨( $6.8 \pm 1.2$ ), 현미( $8.5 \pm 1.5$ ) (단위:  $\times 10^7$  conidia/0.1 g)로 포자생산성을 확인하였고, 그 중 기장, 쌀에서 많은 양의 포자 생산성을 확인할 수 있었음(그림 53).

JEF-507에서 결명자( $6.4 \pm 3.2$ ), 기장( $28.5 \pm 6.4$ ), 귀리( $12.8 \pm 4.9$ ), 녹두( $6.7 \pm 2.5$ ), 들깨( $11.5 \pm 2.2$ ), 메밀( $1.4 \pm 0.4$ ), 보리( $18.3 \pm 3.1$ ), 수수( $13.2 \pm 6.3$ ), 쌀( $24.9 \pm 4.5$ ), 조( $20.9 \pm 9.0$ ), 참깨( $1.6 \pm 0.2$ ), 현미( $4.1 \pm 0.5$ ) ( $\times 10^7$  conidia/0.1 g)로 확인하였고, 그 중 기장, 쌀에서 높은 포자생산성을 확인할 수 있었음(그림 51). 두 균주 모두 기장, 쌀에서 높은 포자생산성을 확인할 수 있었음.



그림 50. 곡물배지 조건에서의 *B. bassiana* JEF-462와 JEF-507의 배양 및 포자 형성 (배지 종류: 12조건)

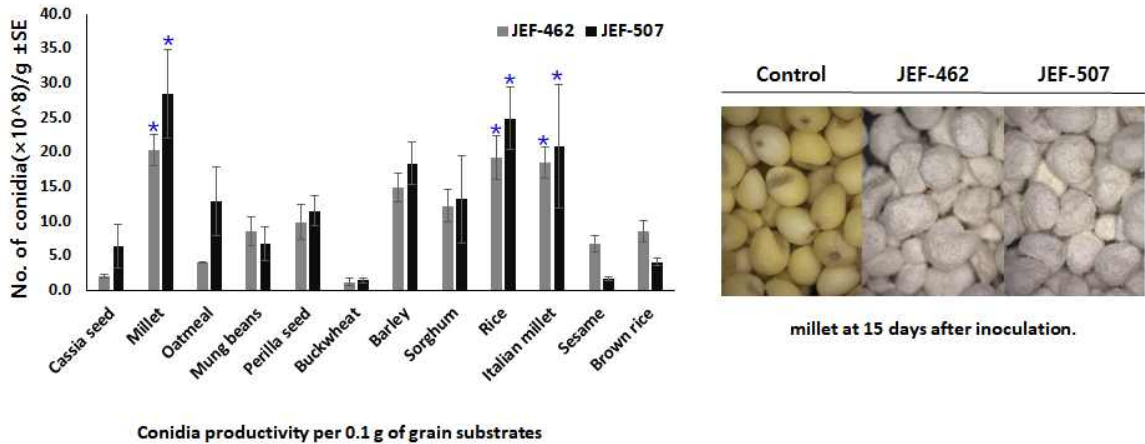


그림 51. 12가지 곡물을 이용한 포자 생산성

- 곡물 배지 별 포자 열안정성 평가

JEF-462, JEF-507의 12가지 곡물(결명자, 귀리, 기장, 녹두, 들깨, 메밀, 보리, 수수, 쌀, 조, 참깨, 현미)에서 생산한 포자의 열안정성을 확인하기 위한 실험을 진행하였음. 각각의 곡물 배양체 0.1 g을 1.5 ml conical tube에 0.03% silwet을 1 ml 과 처리하여 vortexing을 진행하였음. 포자현탁액의 농도를  $1 \times 10^7$  conidia/ml로 조제하여 45°C 에 열처리를 진행하였음(0, 30, 60, 90, 120분). 열처리 후 포자현탁액을 1/4 SDA에 10 µl drop 후 배양하여 발아율을 확인하였음(25°C, 18 시간) (발아율: 발아한 포자/전체 포자 숫자 \* 100 (%))(그림 52).

그 결과 JEF-462의 경우 120분일 때 기장 21.6%, 들깨 19%, 수수 23.2%, 쌀 21.8%, 현미 25.6%로 상대적으로 높은 열안정성이 확인 되었지만, 곡물 간 열안정성에 유의한 차이는 없었음. JEF-507의 경우 120분일 때 귀리 54%, 기장 52%, 녹두 37.2%, 들깨 35% 로 상대적으로 높은 열안정성이 확인됨. 기질 평가 결과를 토대로 두 균주 모두 열안정성과 포자생산성이 높게 나타난 기장에서 배양하는 것이 가장 적합하다고 판단됨.

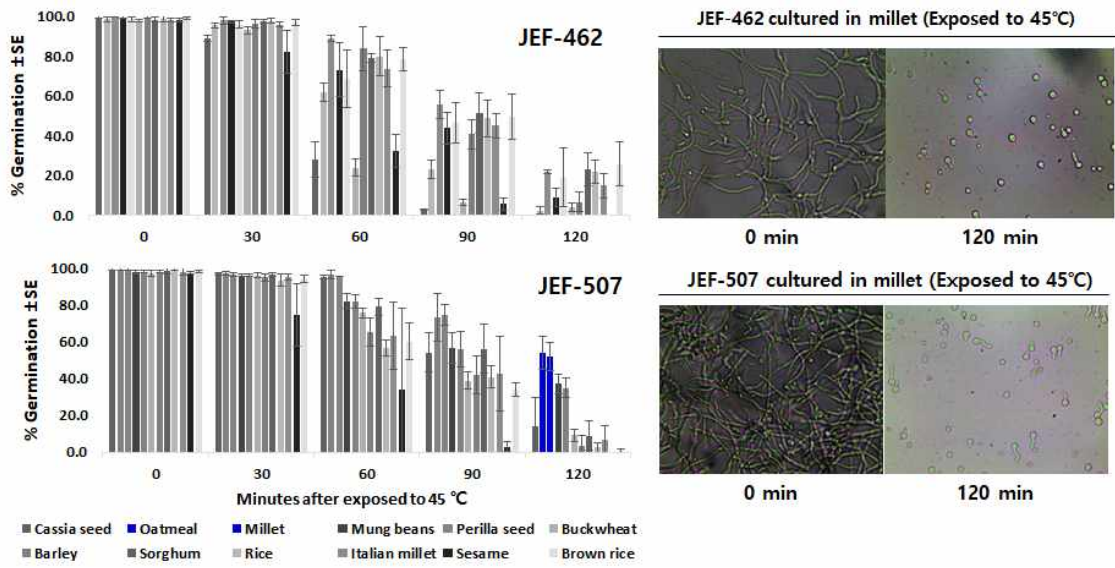


그림 52. 12가지 곡물을 이용한 열안정성

바. 살충효과 증진 기질 선발

1) 선발 곡물배지에서 생산된 포자의 살충효과 비교

- 선발 곡물배지(기장, 베트남 쌀)에 배양된 JEF-507 포자 확보

JEF-462, JEF-507 두 가지 균주 중 병원성과 안정성이 우수한 JEF-507를 선발하여 다음 실험을 진행하였음. 기장, 베트남 쌀 200 g 을 polyethylene bag에 50% citric acid(160  $\mu\text{l}$ / 100 ml)를 100 ml 처리하였음. 곡물이 들어간 polyethylene bag을 전자레인지에 5분간 처리하였음. Polyethylene bag 입구를 종이컵과 거즈로 막아준 후 고무줄로 고정시켜 autoclave에서 121°C 15 분간 멸균을 진행하였음. 멸균 된 곡물배지에 포자 현탁액 1 ml( $1.0 \times 10^7$  conidia/ml)을 접종시킨 후에 배양하였음(25°C, 15 일). 배양 후 포자의 수분 함량이 10% 될 때까지 건조를 진행한 후 포자 생산성을 확인하였음. 그 결과 JEF-507이 배양된 기장에서는  $(15.1 \pm 3.7) \times 10^7$  conidia/0.1 g 쌀에서는  $(22.5 \pm 8.9) \times 10^7$  conidia/0.1 g의 포자생산성이 확인되었음(그림 53).

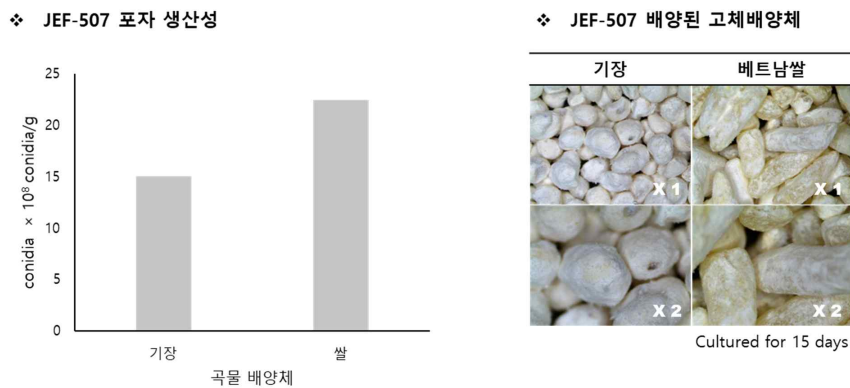


그림 53. 배양된 곡물배양체와 포자생산성



- 온실조건에서 담배가루이에 대한 병원성 검정

선발된 곡물배지에서 생산된 JEF-507 포자의 담배가루이 유충에 대한 살충효과를 온실조건에서 실험을 진행하기 위하여 토마토를 정식하였음(그림 54).

하지만 담배가루이에 대한 활성이 저조한 것으로 확인되어 추가적인 포장시험은 진행하지 않았음.



그림 54. 토마토 정식 및 재배 관리.

(가). 토마토 정식, (나, 다). 토마토 유인, (라). 토마토 지주대 설치

- 선발한 곡물배지에서 생산된 포자의 살충효과 비교

기장과 쌀에 배양된 JEF-507 포자를 이용하여 담배가루이에 대한 병원성 검정을 다음과같은 방법으로 진행하였음. JEF-507 균주를 기장과 쌀에 배양하여 곡물 배양체를 제조하였음. 제조된 포자를 0.03% silwet 에 현탁하여  $1 \times 10^7$  conidia/ml의 포자현탁액을 조제하였음. 담배가루이의 경우 1일 동안 담배가루이 알을 산란 받은 토마토(품종: 슈퍼도태랑)를 1주일 후 상위 1엽을 제외한 나머지 엽은 제외한 뒤 담배가루이 2령충을 확보하여 포자 현탁액에 dipping 처리하였음. Positive control은 spinetoram 5% 입상수화제를 추천약량으로 사용하였음. 처리 후 1일 간격으로 7일까지 생충수를 조사하였음(그림 55). 그 결과 무처리구 (0.03% silwet) 의 생충률( $57.4 \pm 9.3\%$ ) 보다 JEF-507 기장( $29.3 \pm 3.9\%$ ), 쌀( $21.3 \pm 1.9\%$ ) 처리구에서 낮은 생충률이 확인 되었음. 기장과 쌀에서 배양된 JEF-507을 이용하여 담배가루이에 대한 병원성 검정을 진행한 결과 쌀에서 배양된 JEF-507 처리한 처리구에서 높은 살충활성이 확인 되었음.

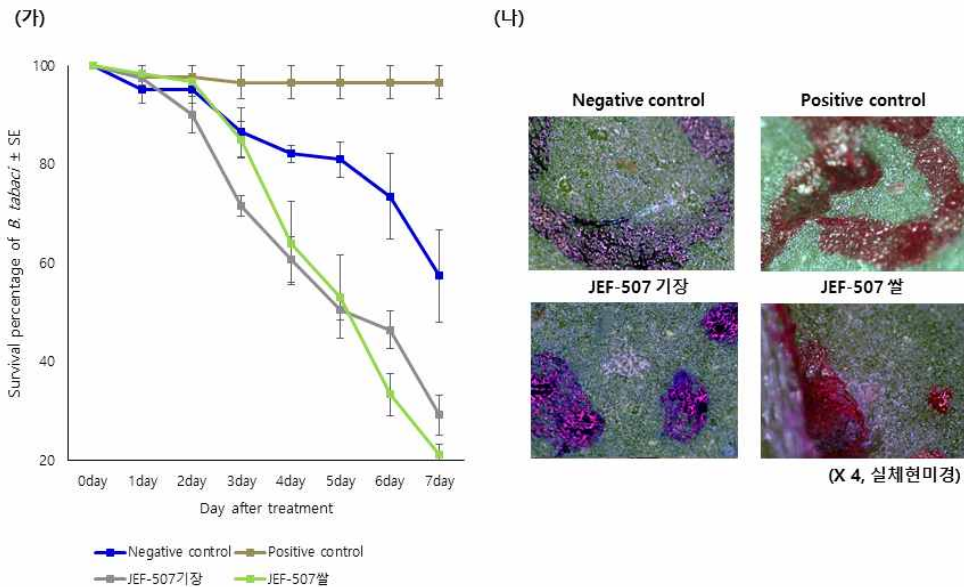


그림 55. 기장과 쌀에서 배양된 JEF-507 포자의 담배가루이에 대한 살충효과 비교 (가), dipping 처리 후 일차별 생충률, (나). 처리구별 담배가루이 치사충

사. JEF-507-egfp 형광균주의 담배가루이 침입기작 구명

#### 1) egfp 유전자 cloning을 통한 fungal transformation 선발

곤충병원성 진균에 의해 치사된 개체 확인 및 mycosis를 관찰하고자, 녹색형광유전자 (egfp, enhanced green fluorescent protein)를 곤충병원성 진균에 도입하여 mutant를 제작하고자 하였음.

- JEF-507 균주에 대한 selection marker(선별마커)로서 항생제 저항성 확인 mutant 제작 시 필요한 selection marker를 선발하기 위해 hygromycin B (hyg. B), phosphinothricin (PPT)를 농도별로 처리한 1/4 SDA 배지를 제작하였음. 제작된 항생제 배지에 JEF-507 균주의 포자현탁액 ( $1 \times 10^7$  conidia/ml) 70 ul을 spreading 하여 1, 3, 5일차 배양양상을 확인하였음. JEF-507 균주의 배양양상을 확인한 결과, control과 hyg. B 처리된 배지에서도 배양양상이 크게 다르지 않았지만, PPT 처리된 배지에서는 생육이 억제되는 것으로 확인되었음(그림 56, 57). 따라서 phosphinothricin (PPT) resistant *bar* gene을 보유하고 있는 plasmid를 이용한 cloning을 진행하고자 하였음.

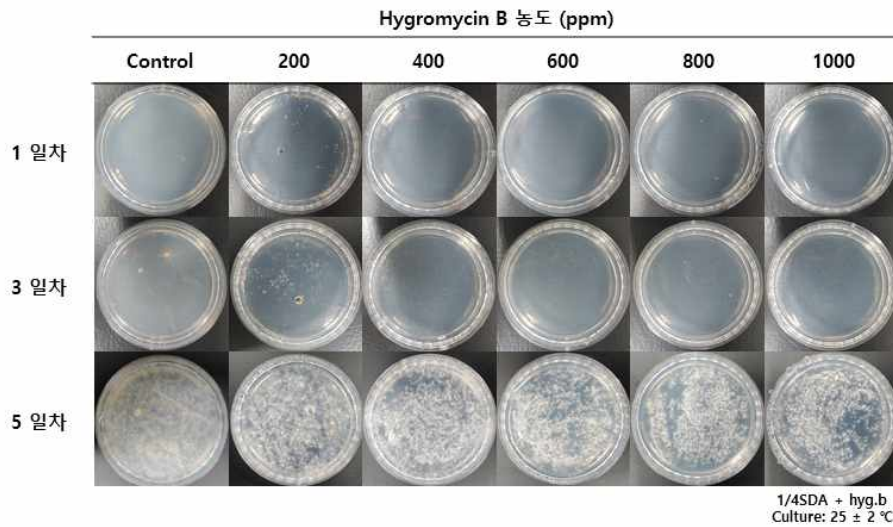


그림 56. 선별배지 선발을 위한 hyg. B 농도에 따른 JEF-507 균주 배양양상

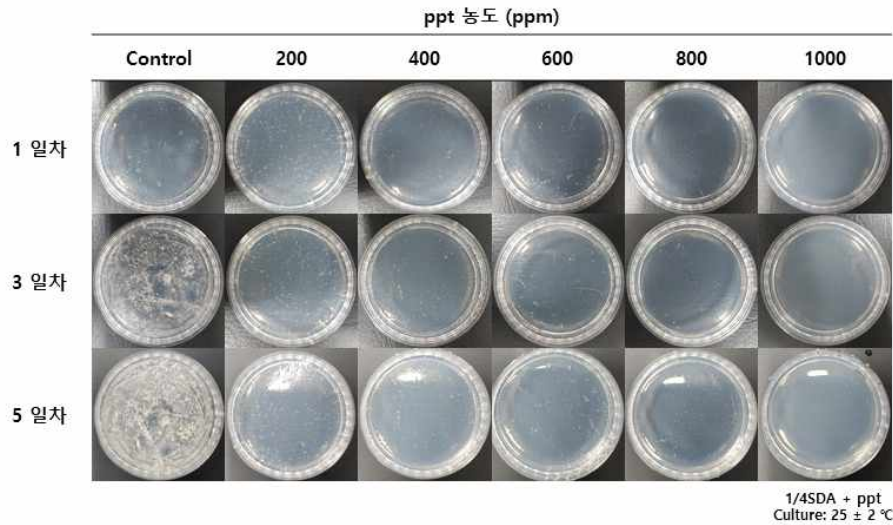


그림 57. 선별배지 선발을 위한 phosphinothricin (PPT) 농도에 따른 JEF-507 균주 배양양상

- pCambia-egfp-bar vector 제작

pBARKS1에서 확보한 bar expression cassette를 pCambia-egfp vector에 cloning 하기 위하여 pCambia egfp vector를 *Xho*I, *Sac*I 제한효소를 이용하여 절단한 뒤, bar expression cassette를 pCambia-egfp vector에 integration 시켰음. 그 결과 pCambia-egfp-bar는 gphA promoter에 의해 발현되는 EGFP gene과 fungal selection marker로 사용되는 phosphinothricin (PPT) resistant *bar* gene이 존재함(그림 58).

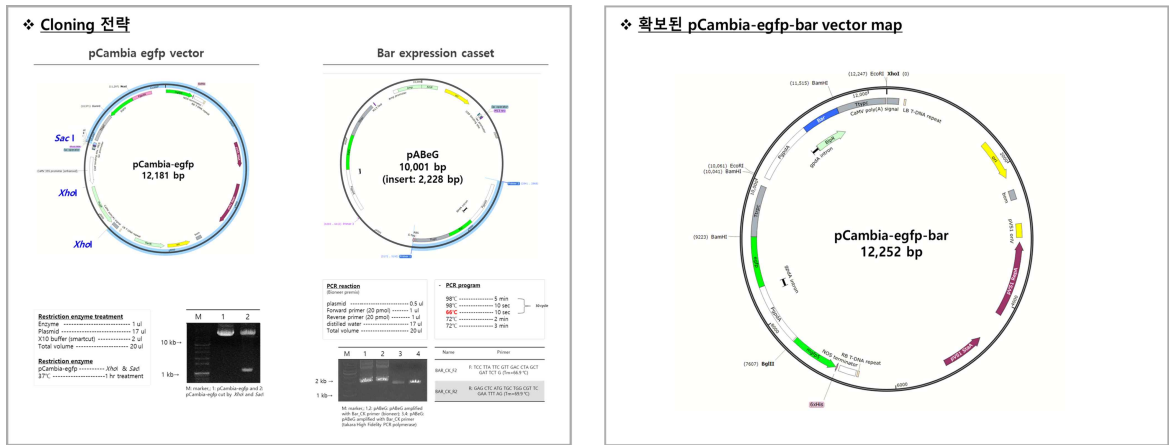


그림 58. pCambia-egfp-bar vector 제작을 위한 cloning 전략 및 pCambia-egfp-bar vector map

- *B. bassiana* transformation을 위한 실험 setting  
*B. bassiana* 균주의 conidia에 앞서 제작된 pCambia-egfp-bar vector를 *Agrobacterium tumefaciencie*에 integration 시킨 뒤 AtMT 방법을 이용하여 transformation을 진행하였음. 그 후 *B. bassiana* EGFP-transformant (*Bb-egfp*)는 600 μl phosphinothricin (PPT)를 포함하는 Czapek 배지에서 배양되었으며, 형광 균주를 확보하기 위한 AtMT를 진행 중.

아. *B. bassiana*의 주요 유전자의 특이성 규명

1) *B. bassiana*의 주요 유전자의 다양성 비교 분석

*B. bassiana* 종간의 형태, 병원성 등의 특성이 유사한 경우 표현형을 통한 구분이 어려움. 이를 해결하기 위한 genotype 수준에서의 비교 방법을 수립하는 것이 필요함. 균주간의 유전적 차이를 확인하여 genotype의 다양성이 균주들의 표현형에 어떤 영향을 미치는지 확인하였음. 먼저 실험실에서 보유하고 있는 균주 중 아시아, 유럽, 아프리카 등 다양한 지역에서 채집된 곤충병원성 진균 42개의 균주를 선발하였음(배양후 gDNA extraction 진행, ITS primer 정보, sequencing). 그 결과 본 균주들을 ITS(Internal transcribed spacer) sequence을 기반으로 계통수 분석을 진행한 결과 크게 2개의 clade로 나뉘는 것이 확인되었음(그림 59). 본 결과를 바탕으로 ITS를 바탕으로 하는 계통수 분석 결과는 지리적 위치와 상관성이 낮으며, 다른 요인들에 의해 분류된다고 판단되었음. genotype의 다양성 분석을 위한 기준 유전자를 선발하였음.



❖ 다양한 지역에서 채집된 *Beauveria bassiana*

❖ ITS 기반 계통수 분석

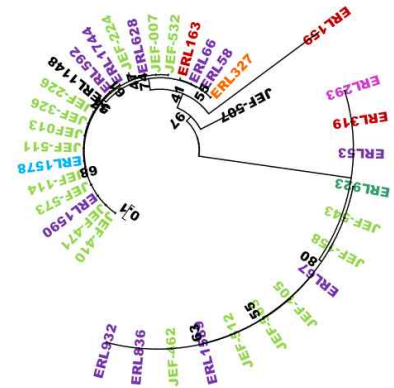
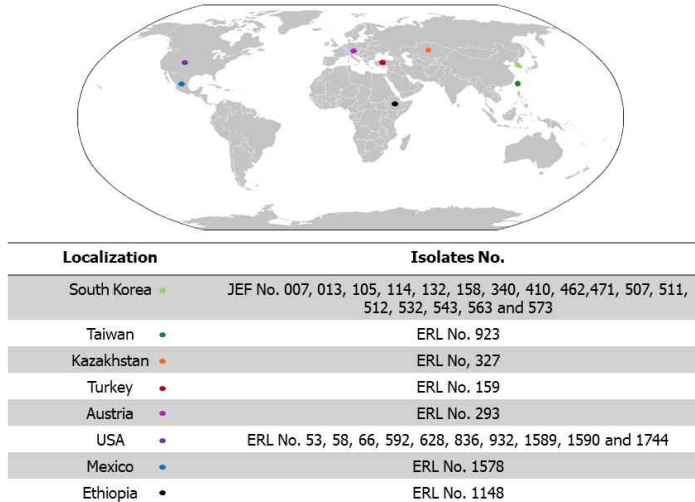


그림 59. 아시아, 유럽, 아프리카 등 채집된 42개 균주와 계통수 분석

- gDNA 확보 및 non-synonymous change을 이용한 상관관계 분석

유전자의 상관관계를 분석하기 위하여 CTAB extraction buffer (Biosesang, Gyeonggi-do, Republic of Korea)를 이용하여 균주의 gDNA를 확보하였음. CTAB extraction buffer 500  $\mu$ l 65°C에 15분간 처리한 뒤 beta-mercaptoethanol (1:100 (v/v))를 첨가하였음. 제조된 용액에 배양된 균주의 균사를 처리한 후 grinding하였음. 400  $\mu$ l의 chloroform: isoamyl alcohol (24:1 (v/v))을 처리한 뒤 centrifuge를 진행하였음 (4°C, 12000 g, 10 분). 상층액 400  $\mu$ l을 옮긴 후 동일한 부피의 isopropanol을 처리한 뒤 centrifuge를 진행하였음 (4°C, 12000 g, 5 분). 상층액을 제거하여 pellet만 확보하였음. 1  $\times$  TE buffer (1  $\times$ ) 600  $\mu$ l과 phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1 (v/v/v)) 300  $\mu$ l을 처리한 후 centrifuge를 진행하였음 (4°C, 12000 g, 5 분). 상층액을 새로운 튜브로 옮긴 뒤 1  $\mu$ l of RNase (10  $\mu$ g/ml)을 처리하여 RNA를 분해하였음. centrifuge 진행 후 pellet을 75% 에탄올로 세척한 뒤 건조를 진행하였음. 최종적으로 확보된 pellet에 DNase free water에 용해하였음.

각 균주별 유전자형과 표현형의 다양성 분석을 위해 non-synonymous change를 분석 팩터로 선정하였음. non-synonymous change란 아미노산 서열을 변화시키는 뉴클레오타이드 변이를 의미함. 이를 위해 선발된 유전자들의 설계된 특정 프라이머로 qPCR을 진행하였음(표 23). qPCR은 Thunderbird Syber<sup>®</sup> qPCR Mix (QPS-201, TOYOBO, Japan)을 이용하여 96-well Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR System (Bio-Rad, USA) 을 이용하여 분석되었음. 확보된 Cts은 Gamma-actin (NCBI accession number: HQ232398.1)을 이용하여 normalize 하였음. 각기 다른 유전자의 copy number 분석에는 *B. bassiana*의 1 copy로 알려진 *Cytochrome P* gene을 reference로 분석을 진행하였음.

표 23. 선발된 단백질과 각 단백질의 primer sequence

Primer	Use	Orientation	Sequence
<i>DNA photolyase</i>	Amplify <i>DNA photolyase</i> contig	Forward	GAACTGTGTCTGCTGGTGGGA
		Reverse	TACGTGGCGATAAAAAGTCCC
<i>Lectin-like gene</i>	Amplify <i>Lectin-like gene</i> contig	Forward	TATACTTACTGCAACATCACT
		Reverse	GCAAGTAAAATATGAATGTTAT
<i>Biotrophy associated gene 2</i>	Amplify <i>Biotrophy associated gene 2</i> contig	Forward	TGGCTTGGGGGCTTCTCGCTG
		Reverse	CGGCCAGGGCAAGCAGTTCAT
<i>LCCL-domain containing gene</i>	Amplify <i>LCCL-domain containing gene</i> contig	Forward	CGCTCTATTTTCGCAACTA
		Reverse	GAGTAGCAAGAGATGGTTCATT
<i>Volvatoxin A2 precursor</i>	Amplify <i>Volvatoxin A2 precursor</i> contig	Forward	CTTTATCCTTTGAGGTAGCA
		Reverse	GTAGAGAACTCCATACAACGA
<i>Thioredoxin-like protein</i>	Amplify <i>Thioredoxin-like protein</i> contig	Forward	GATTCTTCACATGCACGCTT
		Reverse	ATCCTAGATAATGCCAGCT
<i>MSB2</i>	Amplify <i>MSB2</i> contig	Forward	CCGCGCAAAGTCTACTTTGT
		Reverse	CACCCCTCGCTTGTGATGTT
<i>Cyclophilin B</i>	Amplify <i>Cyclophilin B</i> contig	Forward	AAAGGTGTCAAGTGCCTCC
		Reverse	ATGGCAGTGGTGTGAAGAA
<i>Chitinase</i>	Amplify <i>Chitinase</i> contig	Forward	GTGCTAATAGTCTGGAATGCA
		Reverse	GACGCGTACCTATTTTGCC
q- <i>DNA photolyase</i>	Copy number (q-PCR) of <i>DNA photolyase</i>	Forward	ACCGGGTTCCCATCGTTGA
		Reverse	GCCCATGCGCCAGTCTATGA
q- <i>Lectin-like gene</i>	Copy number (q-PCR) of <i>Lectin-like gene</i>	Forward	GAGCAGGGCGTCTGGAAGTA
		Reverse	ACCACTGCCACCCATGGTAA
q- <i>Biotrophy associated gene 2</i>	Copy number (q-PCR) of <i>Biotrophy associated gene 2</i>	Forward	GACTGTGCCTCTGGCTGCT
		Reverse	CGTTGAAGTTGCCACCTTGCT
q- <i>LCCL-domain containing gene</i>	Copy number (q-PCR) of <i>LCCL-domain containing gene</i>	Forward	CTGACACCCTCGACCTGGAC
		Reverse	
q- <i>Volvatoxin A2 precursor</i>	Copy number (q-PCR) of <i>Volvatoxin A2 precursor</i>	Forward	CAAGCAGTCCCTCGACCAGT
		Reverse	GGGTGACGCTAAGCACGTC
q- <i>Thioredoxin-like protein</i>	Copy number (q-PCR) of <i>Thioredoxin-like protein</i>	Forward	CTTCGACGCTCTTGGCATGG
		Reverse	TGCCTCAAGGCTTGGCTCAT
q- <i>MSB2</i>	Copy number (q-PCR) of <i>MSB2</i>	Forward	TGGTCGCTCAGTCTACATCGG
		Reverse	AACAGCCTGGTCTTGTGCG
q- <i>Cyclophilin B</i>	Copy number (q-PCR) of <i>Cyclophilin B</i>	Forward	GGGCTTTGGCTACGAGGGAT
		Reverse	GATGGACTTGCCACCAGTGC
q- <i>Chitinase</i>	Copy number (q-PCR) of <i>Chitinase</i>	Forward	CACTTCATCTCCGCCTCCGT
		Reverse	GGAGCCTTGACACTGTTGG
<i>Gamma-actin</i> (HQ232398.1)	Internal control (q-PCR)	Forward	ATCCACGCCACCACCTTCAA
		Reverse	GTCGGCAAGACCAGGGTACA

- 담배가루이에 대한 병원성의 표현형과 유전자 상관관계 분석

먼저 균주별 담배가루이에 대한 생물검정을 진행하였음. 담배가루이 2령 유충이 있는 토마토 잎을 각 균주의 포자 현탁액에 ( $1.0 \times 10^7$  conidia/ml) 10초간 dipping 하였음. 토마토 잎을 상온에서 25분간 건조 후, filter paper 가 놓인 plate (90 × 15 mm)에 옮겨 주었음. 500 μl D.W 를 처리하였음. 23±2°C 조건에서 매일 생충수를 관찰하였으며, 관찰 시 200 μl D.W 를 처리하였음. 그 결과 각 균주별 치사율을 일차별로 기록하였음(그림 60). 동일한 *B. bassiana* 임에도 불구하고 살충력이 각기 다른 것으로 확인되었음. 균주별 살충률을 균주별로 정리하였음(그림 61). 균주별 살충률과 주요 유전자를 non-synonymous change를 기준으로 분석을 진행하였음. 그 결과 *LCCL*, *Volvatoxin*에서 음의 상관관계가 확인되었음. 본 그래프의 x축은 생물학적특성 y축은 bp당 non-synonymous change를 의미함. Y축의 증가는 염기서열의 변화가 많을수록 병원성이 증가할 경우 양의 상관관계를 가지며, 염기서열의 변화가 적을수록 병원성이 감소하는 경우 음의 상관관계를 가짐을 알 수 있음 (그림 62, 63). *LCCL* 유전자의 경우 말라리아를 일으키는 열대열원충에서 면역경로를 억제한다고 보고되었음. 따라서 숙주의 면역을 손상시켜 병원력을 더 증가시킬 수 있다고 예상됨. *Volvatoxin*, Bt에서 직접적인 독성을 담당하며, *Volvariella volvacea* 에서 세포독성 및 신경독성작용을 한다고 보고되었음. 담배가루이에 높은 병원성을 보이는 JEF-462, JEF-507의 경우 두 유전자에 대해 *LCCL*, *Volvatoxin*에 낮은 non-synonymous change를 보이는 것으로 확인되었음. 따라서 *B. bassiana* 의 *LCCL*, *Volvatoxin*의 non-synonymous change를 통해 담배가루이에 대한 병원성 분석을 진행할 수 있음.

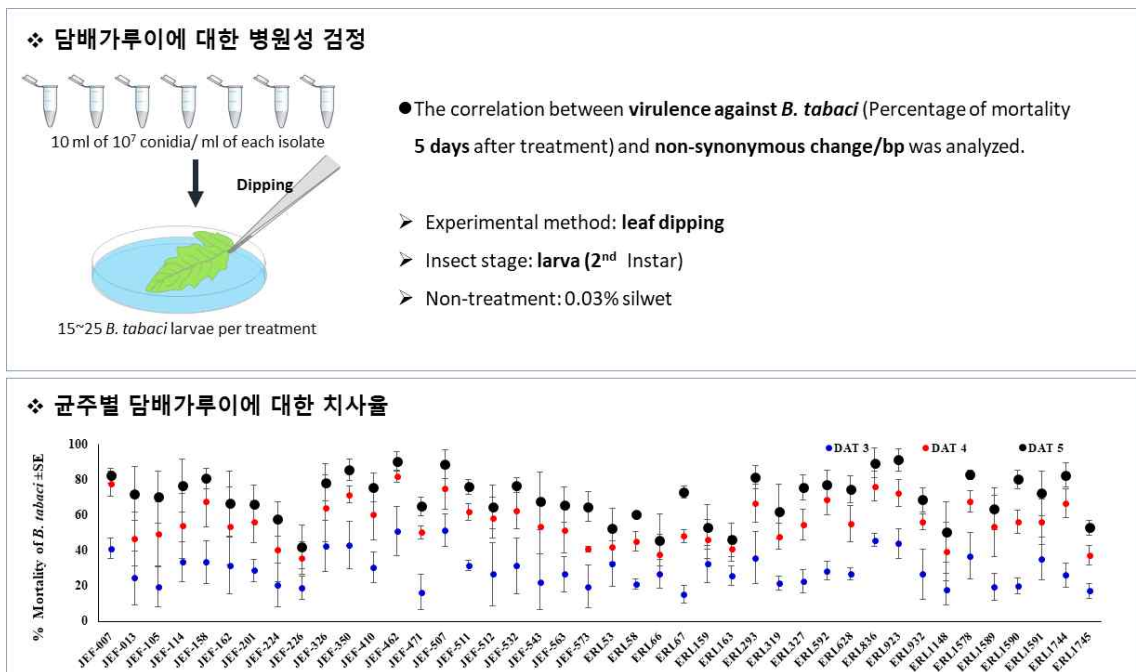


그림 60. 담배가루이에 대한 병원성 검정

❖ 균주별 치사된 담배가루이의 다양한 mycosis 형태



치사 5일차 습실처리

그림 61. 균주별 치사된 담배가루이의 다양한 mycosis 형태

❖ 선발된 주요 유전자별 병원성과 non-synonymous change 분석

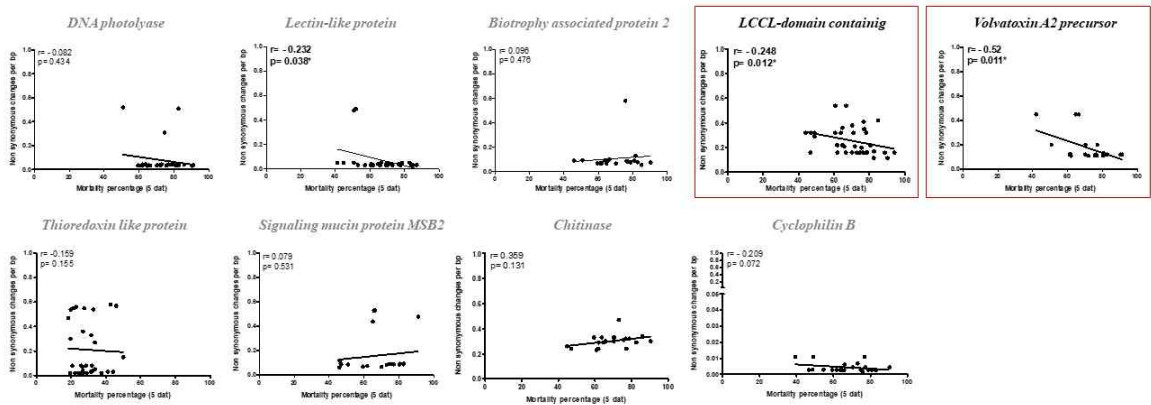


그림 62. *B. bassiana*의 주요 유전자와 병원성과 상관관계 분석

❖ 병원성과 관련된 유전자 기능 분석

	Virulence: <i>B. tabaci</i>	Functions
LCCL-domain containing protein	-	✓ <i>Plasmodium falciparum</i> - Inhibitory activation of immune pathways.
Volvatoxin A2 precursor (delta-endotoxin family of proteins)	-	✓ <i>Bacillus thuringiensis</i> - direct toxicity to insect ✓ <i>Volvariella volvacea</i> - pore forming protein that disrupts target cells' membranes (Cytotoxicity, Neurotoxicity)
Biotrophy associated protein 2		✓ <i>Botrytis cinera</i> - enhance the tolerance to abiotic stressors ✓ <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> - fungus asexual reproduction and penetration
Signaling mucin protein MSB2		✓ Plant-pathogenic fungi - surface recognition and MAP kinase activation ✓ <i>Candida albicans</i> - regulate the thermal stress
Lectin-like protein		✓ Lectin - growth, resistance to abiotic factors interaction with the host immune response

Positive correlation : +; Negative correlation : -

그림 63. *B. bassiana*의 주요 유전자와 병원성과 상관관계 분석 및 기능 분석



자. *B. bassiana* JEF-507 시제품 Quality check

1) JEF-507 원제 포자수와 원제 발아율 확인

- JEF-507 원제의 배양 형태 및 현미경 관찰을 진행하였음(그림 64). JEF-507 원제의 포자수를 확인하기 위하여 포자의 0.1 g을 0.03% silwet 100 mL에 현탁하였음. 현탁액의 포자량은 hemocytometer를 이용하여 측정하였음. 포자량을 확인한 결과  $1.4 \times 10^{11}$  conidia/g으로 확인되었음(그림 65). 포자 발아율을 확인하기 위하여 JEF-507의 원제를 이용하여  $1.0 \times 10^7$  conidia/mL 포자현탁액을 조제하여 1/4 SDA 배지에 배양한 뒤 발아율을 확인하였음 (25°C, 18 시간) (발아율: 발아한 포자/전체 포자 숫자 \* 100 (%)). 발아율을 확인한 결과  $98.7 \pm 0.4\%$  로 확인되었음(그림 65).



그림 64. JEF-507 원제의 배양 형태 및 현미경 관찰

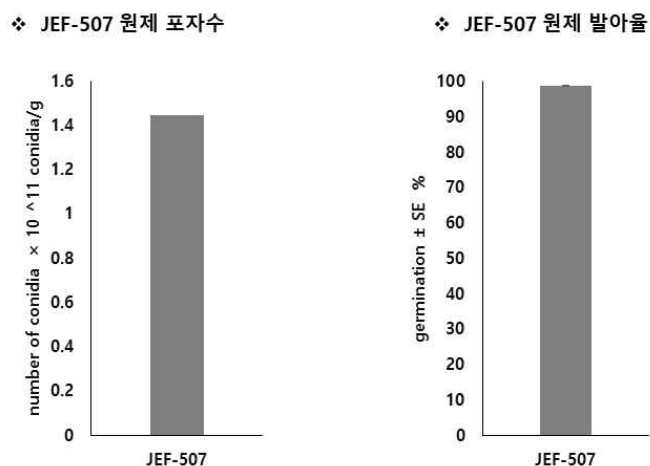


그림 65. JEF-507 원제의 포자량 및 발아율

## 2) JEF-507 수화제(WP), 입제(GR-1,2)의 CFU 확인

- JEF-507(5% WP), JEF-507(0.5% GR-1), JEF-507(0.5% GR-2)의 형태 관찰 및 현미경 관찰을 진행하였음(그림 66). 다음 시료의 CFU를 확인하기 위하여 JEF-507(0.5% GR-1), JEF-507(0.5% GR-2)을 0.1 g 계량하여 1 mL 0.03% silwet에 현탁하였음. 두 시료의 농도를 0.5%로 동일하게 하기 위하여 JEF-507(5% WP)은 0.1 g 계량 후 10 mL에 현탁하였음. 각 시료의 현탁액을  $1/10^4$  으로 희석하여 1/4 SDA 배지에 100  $\mu$ l 도말한 후 3일간 배양하여 colony 수를 확인하였음. 그 결과 확인된 CFU값은 GR-1( $7.1 \times 10^7$  conidia/mL), GR-2( $6.8 \times 10^7$  conidia/mL), WP는 ( $8.8 \times 10^7$  conidia/mL)로 확인되었음(그림 65).

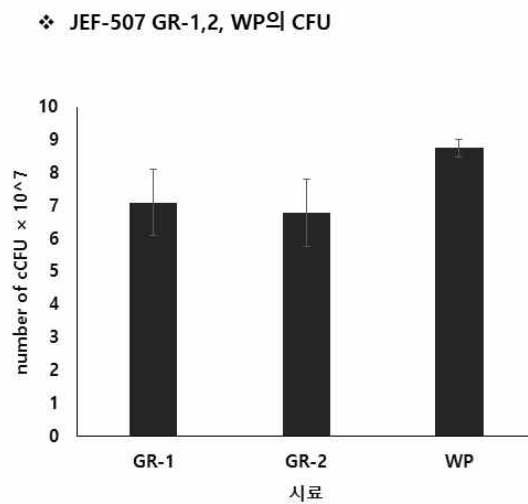


그림 66. JEF-507 수화제(WP), 입제(GR-1, GR-2)의 포자수 함량 분석

#### 4. 상업화 후보 제형의 현장 적용성 평가

##### 가. 상업화 후보 분상제형/입상제형 제품의 현장 적용 평가

상업화 제형을 위해서 먼저 원제인 *B. bassiana* JEF-507 포자에 대한 활성검정이 진행되었음. 본 과제에 2년차에 원제가 총채벌레, 담배가루이에 살충효과가 확인되었으나 담배가루의 경우 포자농도가  $1.0 \times 10^9$  conidia/ml 이상의 고농도의 포자에서 활성이 나타나 상업화 불가 수준으로 판단 이후 활성검정은 총채벌레를 대상으로 이뤄짐.

##### 1) 구조토가 처방된 포자 5% 함유 분상제형의 활성검정(분상제형의 처방1)

- 상업화 후보 제형 중 본 과제 2차년도까지 최종 상업화 후보 제형이었던 분상제형의 처방1의 활성검증을 진행하였음. 처방1의 특징은 구조토가 포함된 제품으로 포자 5% 함유되어 *In-vitro*와 포장시험이 진행되었음. *In-vitro* 시험으로 대두에 꽃노랑총채벌레를 접종 후 약제를 분무처리 하여 1일 간격 7회 생충수를 조사하였음(그림 67). 그 결과, 분상제형 상업화 불가 수준인 50배 희석에서만 약 70%의 방제효과가 나왔으며 500배, 5,000배 희석액에서는 50% 미만의 방제효과가 확인되어 처방개선이 필요함을 확인함. 해당 시험에 사용된 포자 원제와 화학대조 약제인 플룩사메타마이드 유제의 경우 4일차 이후 방제효과가 90%를 넘어 유의미한 대조결과를 얻었음. 반복 시험을 진행하였고 동일한 시험방식으로 진행하였고 1일 간격 8회 생충수를 조사하였음(그림 68). 2차 반복 시험에서 50배 희석에서 100%의 방제효과가 확인되었으나 500배 희석에서는 40%의 방제효과가 확인되어 여전히 처방의 개선이 필요함을 확인함.

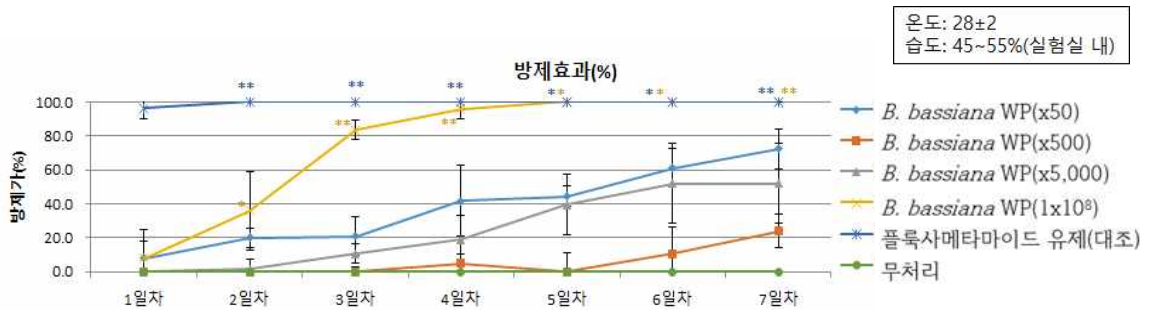


그림 67. 구조토가 처방된 포자 5% 함유 분상제형 *In-vitro* 시험결과-1

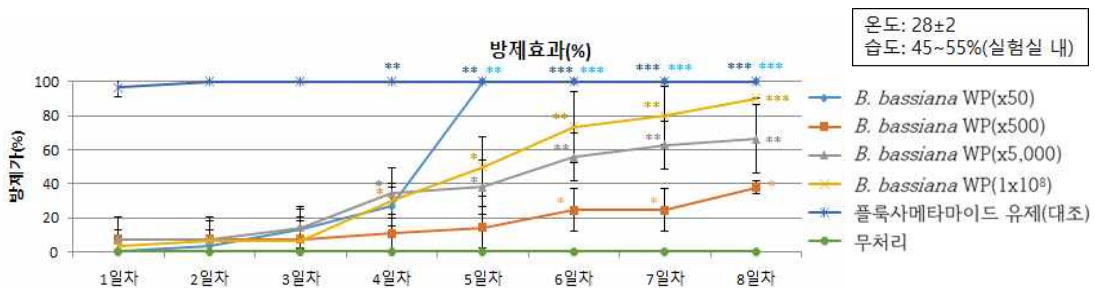


그림 68. 구조토가 처방된 포자 5% 함유 분상제형 *In-vitro* 시험결과-2

- 해당 제형을 대상으로 포장시험을 진행하였으나 *In-vitro* 시험과 동일하게 저조한 방제효과를 확인하였음(그림 69). 50배 희석의 경우에서만 3차 약제처리 7일후 유기농업자재 효능효과표시의 기준인 50%를 넘어 약 70%의 방제가를 달성하였지만 상업화 불가 수준으로 처방 개선을 통해 원제(포자) 활성의 증진이 필요하다고 판단함. 본 포장은 경북 경주시에 위치한 고추포장으로 발생초기 5일 간격 3회 경엽처리 진행되었으며 약제처리 전 및 1차 처리 5일, 2차 처리 5일, 3차 처리 5, 7일 후 생충수를 조사하여 무처리 대비 방제가로 분석하였음.

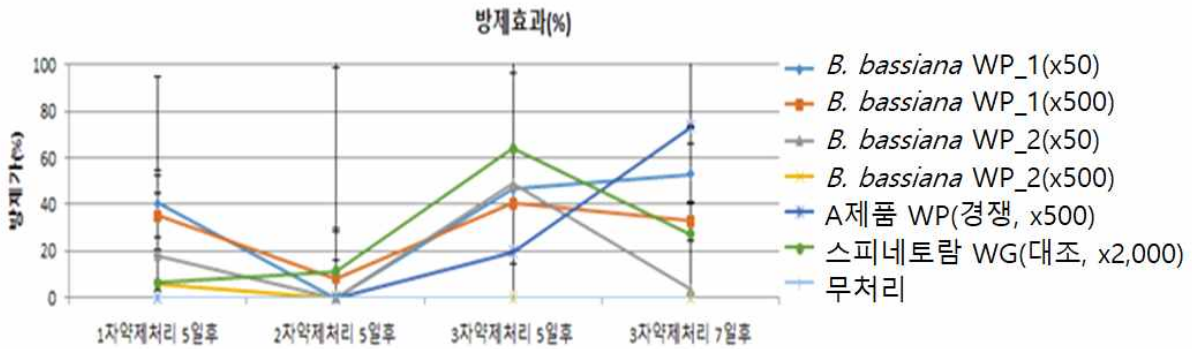
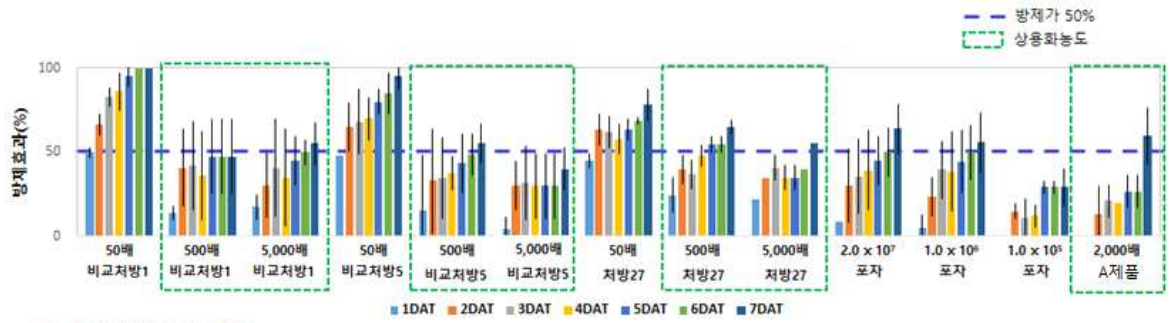


그림 69. 구조토가 처방된 포자 5% 함유 분상제형의 포장 시험결과

2) 수용성 Cellulose가 40% 처방된 포자 2.5% 함유 분상제형의 활성검정(분상제형의 처방27)

- 본 과제 3차년도 성과 중 포자발아를 촉진시키는 수용성 Cellulose가 처방된 상업화 후보 제형인 분상제형 처방27의 활성검정을 진행하였음. 시험방법은 온도 25°C, 습도 80%인 Growth chamber에서 약제처리 1일 간격 7회 생충수 조사를 3반복으로 진행하였음(그림 70). 그 결과, 처방27의 50배 희석의 경우 2일차에 방제가 50%를 넘어 7일차에 방제가 80%가 확인되었으며 상업화 가능 농도인 500배 희석에서는 5일차에 방제가 50%를 넘어 7일차에 60% 방제가가 확인되었으며 5,000배 희석에서는 7일차에 방제가 50% 넘는 것이 확인되었음. 또한 수용성 Cellulose가 처방될 경우 반복간의 방제가의 표준편차가 다른 비교처방에 비해 3.1~7.1 수준으로 약효 안정성 증진도 시키는 것을 확인하였음. 포자 원제와 비교하여도 약효와 약효안정성에서 우수한 것을 확인하였고 수용성 Cellulose의 효과를 확인 가능하였음. Mycosis(진균증) 형성률에서 경쟁A사의 A제품과의 비교를 하였고 분상제형 처방27의 경우 73.3%, 경쟁제품의 경우 50.0%, 포자 원제의 경우 약 70.0% 수준으로 원제수준의 Mycosis 형성률도 확인하였음(그림 71).



2) 처방 및 희석배수별 표준편차

시험시료	희석배수	1DAT	2DAT	3DAT	4DAT	5DAT	6DAT	7DAT	평균
비교처방1	50	3.2	6.4	5.6	11.1	6.4	0.0	0.0	4.7
	500	4.1	22.9	26.5	26.5	22.3	22.3	22.3	21.0
	5,000	7.2	19.1	28.9	28.9	14.4	7.2	12.5	16.9
비교처방5	50	0.0	14.4	19.1	12.5	7.2	12.5	7.2	10.4
	500	33.0	31.1	24.0	9.9	17.1	12.4	11.2	19.8
	5,000	7.2	14.4	21.7	19.1	19.1	19.1	12.5	16.2
신규처방	50	4.1	9.2	9.2	9.2	6.4	2.1	9.3	7.1
	500	10.4	8.4	8.4	6.3	4.8	-4.8	4.2	6.8
	5,000	0.0	0.0	7.2	7.2	7.2	0.0	0.0	3.1

- 비교처방1, 5: 50배 약효우수하나 500배와 5,000배에서 편차가 큼
- 신규처방: 50배, 500배, 5,000배에서 편차 적음 - 희석액에서의 활성편차가 낮은 신규처방

그림 70. 수용성 Cellulose가 40% 처방된 포자 2.5% 함유 분상제형(처방 27)의 *In-vitro* 활성검정결과. 비교처방1: 분상제형 처방1, 비교처방5: 분상제형 처방39, A제품: A사 *B.b* 제품

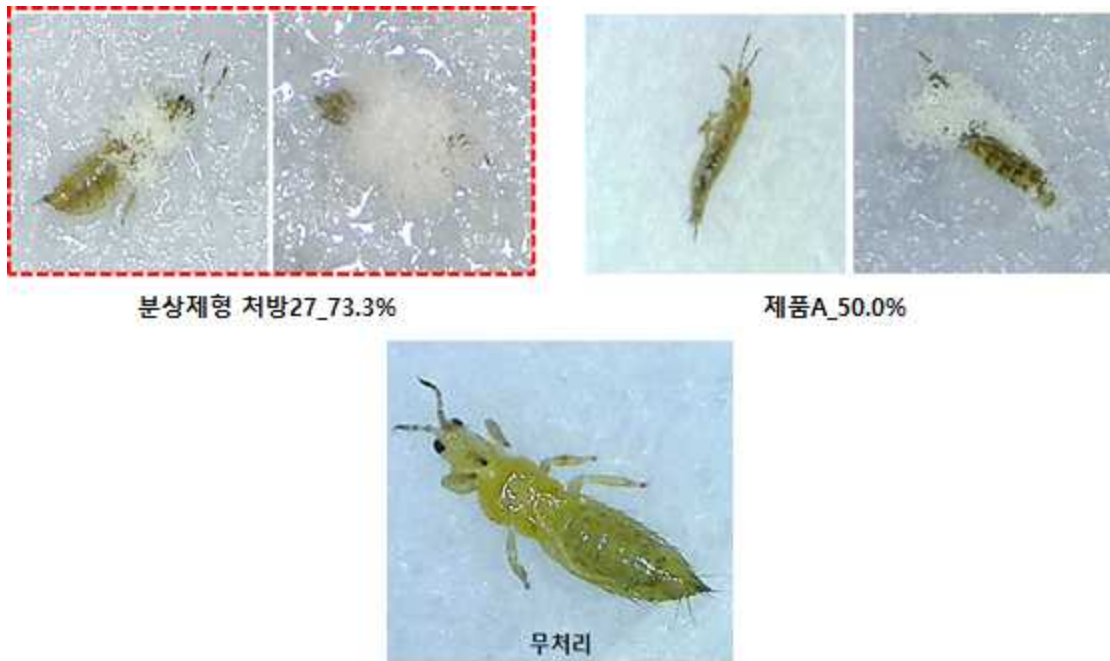


그림 71. 분상제형 처방27의 Mycosis(진균증) 형성률 비교사진



- 분상제형 처방27의 포자발아, 실내활성, 활성편차, Mycosis들을 상대적으로 비교하여 정리해 보았음(그림 72). 포자발아의 경우 여전히 포자 원제에 비해 떨어지는 수준이지만 처방 시 필수적인 계면활성제에 의한 영향으로 최적의 조합을 통해 포자 대비 71-99% 수준의 포자발아능이 확인되었음. 반면 실내활성의 경우 포자 원제 대비 더 우수한 활성이 보였는데 이는 수용성 Cellulose가 가지고 있는 부착능에 의해 살충 대상인 총채벌레의 표피에 더 잘 부착시키는 것으로 확인되었음. 약효안정성으로 볼 수 있는 활성편차와 Mycosis에서 포자와 동등한 수준임을 확인하였음. 참고로 분상제형 처방1은 포자발아를 억제시키는 구조토가 포함된 처방이며 분상제형 처방39는 수용성 당류가 처방된 경우로 부착력 부족에 의해 저조한 실내활성이 확인되었음. 경쟁제품 대비 4가지 평가지표에서 모두 우수한 것을 확인하였음.

	포자발아 <sup>a</sup>	실내활성 <sup>b</sup>	활성편차 <sup>c</sup>	Mycosis <sup>d</sup>
<b>B.b 포자</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>처방1</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>처방39</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>처방27</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>A제품</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>3*~5</b>

\*5x10<sup>5</sup> CFU/ml에서의 mycosis

<sup>a</sup> 각 처방을 동일배수로 희석한 후 28°C Incubator 에서 1~3일동안 포자의 균사발아 (5, *B. bassiana* 포자발아(100%); 4, 포자와 비교해 71-99%; 3, 41-70%; 2, 11-40%; 1, 1-10%; 0, 0%)

<sup>b</sup> 상용화농도 포자 농도에서의 총채벌레 번데기를 대상으로 실내활성(5, 5일차에서 방제가 50%확보; 4, 6일차에서 방제가 50%; 3, 7일차에서 방제가 50%; 2, 8일차에서 방제가 50%; 1, 9일차에서 방제가 50%; 0, 10일차에서도 방제가 50%미만)

<sup>c</sup> 실내활성 검토결과 상용화농도 방제가의 표준편차(5, 표준편차의 평균 0-5%; 4, 5-10%; 3, 10-15%; 2, 15-19%; 1, 20-24%; 0, 25%이상)

<sup>d</sup> 10<sup>7</sup> CFU/mL 포자 농도에서의 총채벌레 번데기대상 실내활성결과 Mycosis 형성률(5, 71-100%; 4, 51-70%; 3, 31-50%; 2, 11-30%; 1, 1-10%; 0, 0%)

그림 72. 분상제형 처방27의 포자발아, 실내활성, 활성편차, Mycosis 비교결과.

B.b 포자: JEF-507 포자원제, 처방1: 분상제형 처방1, 처방39: 분상제형 처방39,

처방27: 분상제형 처방27, A제품: A사 B.b 제품

- 분상제형 처방27의 토양 관주처리에 의한 포장활성을 검토하였고 경북 의성군 고추 하우스 포장에서 정식초기 7일 간격 3회 관주처리를 하여 약제처리 후 7일 간격 4회 조사를 진행함. 상업화 평가 결과 최종적으로 분상제형의 경우 2,000배 희석으로 진행되었음. 그 결과, 3반복 처리구에서 확인된 총 꽃노랑총채벌레 수를 비교한 그래프를 보면 무처리의 경우 최종 조사 시 310마리가 확인된 반면 분상제형인 처방27(가칭: 총채자비WP) 처리구에서는 132마리로 방제가 57.4%가 확인되었음(그림 73, 74). 본 연구로 유기농업자재 효능효과표시 기준인 50%를 넘는 결과를 확보하여 해당 군주의 분상제형을 이용한 토양 관주처리제로의 개발 가능성을 확인하였음(그림 75).



그림 73. 입상제형 처방13, 분상제형 처방27의 토양 관주처리에 의한 포장 활성평가 결과. 3반복 처리구에서 확인된 총 꽃노랑총채벌레 수 비교.

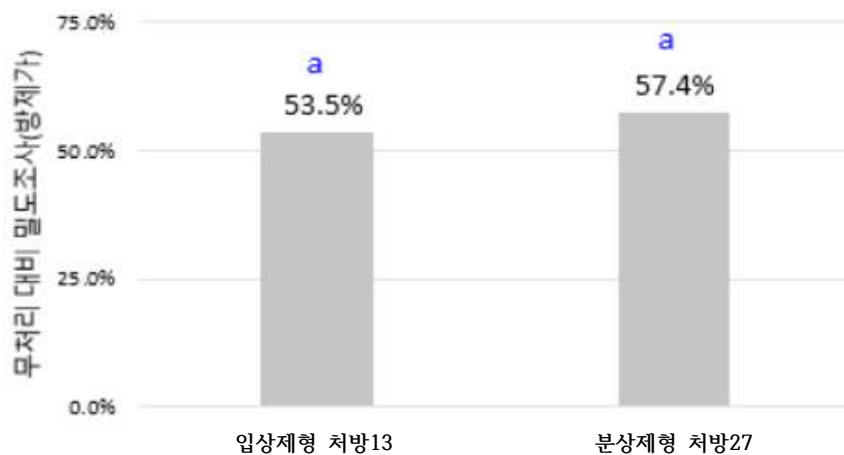


그림 74. 입상제형 처방13, 분상제형 처방27의 토양 관주처리에 의한 포장 활성평가 결과. 무처리 대비 밀도조사를 통해 확인된 방제가.



그림 75. 분상제형 처방27의 토양 관주처리에 의한 고추포장 꽃노랑총채벌레 비교사진. 파란색 화살표: 꽃노랑총채벌레

- 분상제형 처방27의 포장 활성평가에서도 관주처리에 의한 효과가 우수하였으나 수용성 Cellulose 고함량이 원인으로 수화성이 제품화 불가 수준으로 판단되어 수용성 Cellulose 함량은 낮추면서 포자발아 수준은 유지되는 분상제형 처방38으로 활성검정을 재 진행하였음.

### 3) 수용성 Cellulose 1%, 포자 2.5% 함유 분상제형 처방38의 활성검정

- 분상제형 처방27의 수화성 문제를 해결한 처방38의 경우 수용성 Cellulose가 1%로 줄어들어서 먼저 *In-vitro* 시험을 통해 활성의 변화를 관찰하였음(그림 76). 그 결과, 꽃노랑총채벌레 살충 활성은 유지되는 것을 확인하였고 통계적으로 유의함을 확인하였음. 분상제형 처방38의 경엽처리에 의한 포장활성을 검토하였고 경북 예천군 고추하우스 포장에서 꽃노랑총채벌레 발생초기 7일 간격 5회 경엽처리를 하여 약제처리 전, 후 7일 간격 4회 조사, 최종 약제처리 후 5일차에 조사를 진행함. 경엽처리의 경우 약효가 관주처리보다 약효가 낮게 나오는 관계로 1,000배 희석을 포함시켜 2,000배 희석과 함께 진행되었음. 3반복 처리구에서 확인된 총 생충수 비교 그래프를 보면 무처리 대비 생충수 감소 패턴이 보이지 않았음(그림 77). 무처리구의 생충수 대비 방제가를 확인해본 결과 분상제형 처방38의 경우 3T 처리 후 7일차에서 48.1%의 방제가로 유기농업자재 효능효과표시 기준인 50%를 넘지 못하는 결과를 확인함(그림 78). 본 연구로 해당 균주의 분상제형을 이용한 경엽처리제로의 개발은 어려울 것으로 판단하였음.



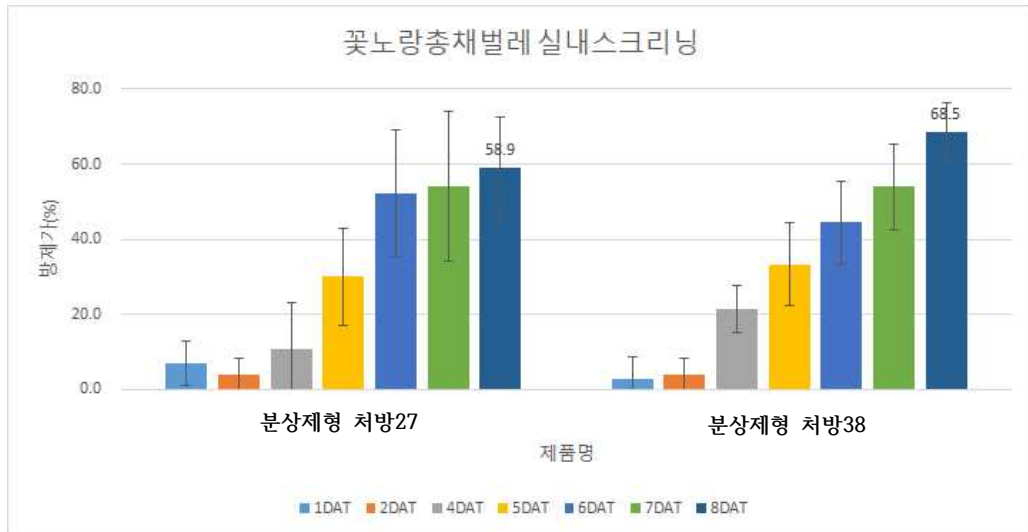


그림 76. 분상제형 처방27, 처방38의 *In-vitro* 활성평가 결과.

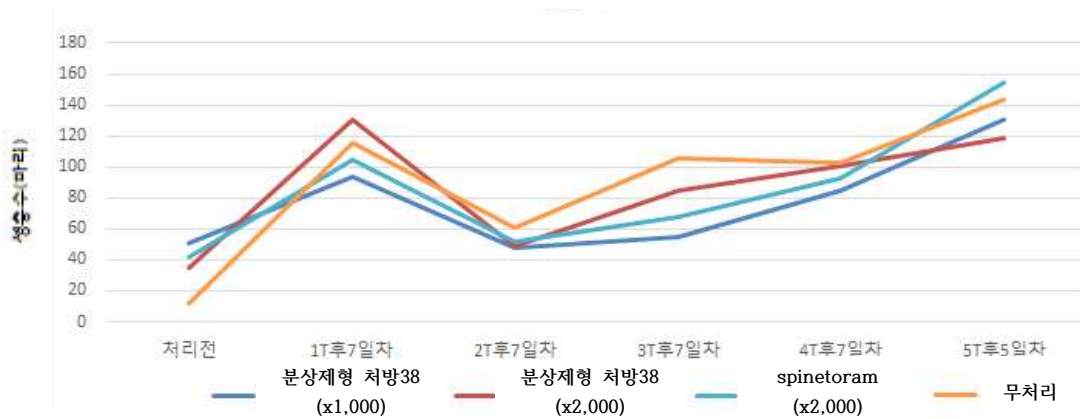


그림 77. 분상제형 처방38의 포장 활성평가 결과1(생충수).

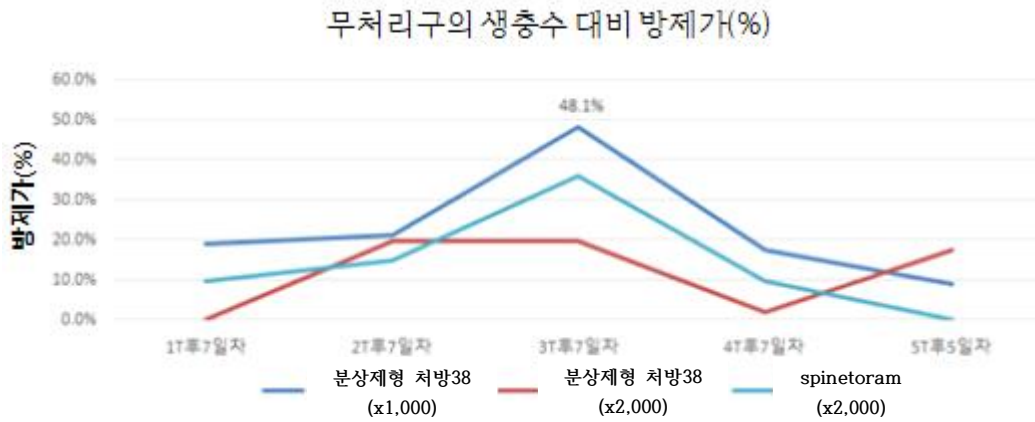


그림 78. 분상제형 처방38의 포장 활성평가 결과2(방제가).

4) 수용성 Cellulose 1%, 포자 5.0% 함유 입상제형 처방13의 활성검정

- 입상제형 처방13의 토양 표면처리에 의한 포장활성을 검토하였고 경북 의성군 고추 하우스 포장에서 정식초기 1회 토양 표면처리를 하여 7일 간격 6회 조사를 진행함. 상업화 평가 결과 최종적으로 입상제형의 경우 10a 당 400g을 사용하였음. 그 결과, 3반복 처리구에서 확인된 총 꽃노랑총채벌레 수를 비교한 그래프를 보면 무처리의 경우 최종 조사 시 310마리가 확인된 반면 입상제형 처방13 처리구에서는 144마리로 방제가 53.5%가 확인되었음(그림 74). 본 연구로 유기농업자재 효능효과표시 기준인 50%를 넘는 결과를 확보하여 해당 균주의 입상제형을 이용한 토양 표면처리제로의 개발 가능성을 확인하였음.

나. 약해 안정성 평가

1) 분상제형 최종제품의 약해 안정성 평가

- 분상제형 상업화 최종 후보제형을 대상으로 고추 포장시험을 2,000배 희석하여 관주처리 방법으로 꽃노랑총채벌레 발생 초기 7일간격 3회 처리로 진행하였고 고추 잎, 열매에 약해가 발생하지 않는 것을 확인하였음.

2) 입상제형 최종제품의 약해 안정성 평가

- 입상제형 상업화 최종 후보제형을 대상으로 고추 포장시험을 토양 표면처리 방법으로 정식전 1회 처리로 진행하였고 고추 잎, 열매에 약해가 발생하지 않는 것을 확인하였음.

## 5. 선발 살충성 미생물 제품의 보관 안정성 평가

### 가. *B. bassiana* JEF-507의 보관 안정성 검정

- 1차년도 실험 결과 담배가루이에 대해 고병원성을 가진 *B. bassiana* JEF-507 균주가 선발되었고, JEF-507 균주의 보관 안정성 평가를 위하여, 열안정성과 포자생산성이 높은 기장에 배양하였음.

① 기장 200 g씩 polyethylene bag에 넣어준 후, 50% citric acid (160  $\mu$ l/ 100 ml)를 100 ml 처리하였음.

② 곡물이 들어간 polyethylene bag을 전자레인지에 5 분간 처리하였음.

③ Polyethylene bag 입구를 종이컵과 거즈로 막아준 후 고무줄로 고정시켜 autoclave에서 121°C, 15 분간 멸균을 진행하였음.

④ 멸균 된 곡물배지에 균주 현탁액( $1.0 \times 10^7$  conidia/ml)을 1 ml 을 접종시킨 후에 배양하였음.

⑤ 25°C에서 1일 간격으로 마사지를 하여 14일간 배양 후, paper bag에 처리하여 수분 함량이 10% 될 수 있도록 건조를 진행하였음.

⑥ 확보된 고체배양체는 약 20 g을 storage bag에 처리하여 4 가지 온도조건 (4, 25, 30, 35°C)으로 설정된 incubator 에 보관하였음.

⑦ 보관은 12개월 동안 진행하였으며, 2 개월 간격으로 보관안정성을 평가하였음.

⑧ 보관 안정성을 평가하기 위해 곡물 배양체 0.1 g을 1.5 ml conical tube에 넣은 후 0.03% silwet 1 ml을 처리하여 vortexing하였음.

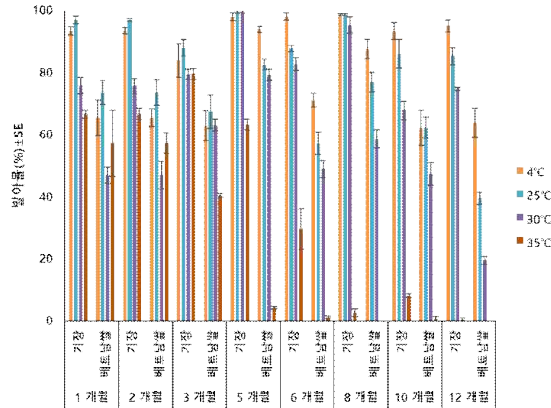
⑨ 포자현탁액의 농도를  $1 \times 10^7$  conidia/ml로 조제하였고, 제조된 포자현탁액을 1/4 SDA 배지에 10  $\mu$ l drop 후 배양하여 발아율을 확인하였음 (25°C, 18 시간).

※ 발아율 : 발아한 포자/전체 포자 숫자 \* 100 (%)

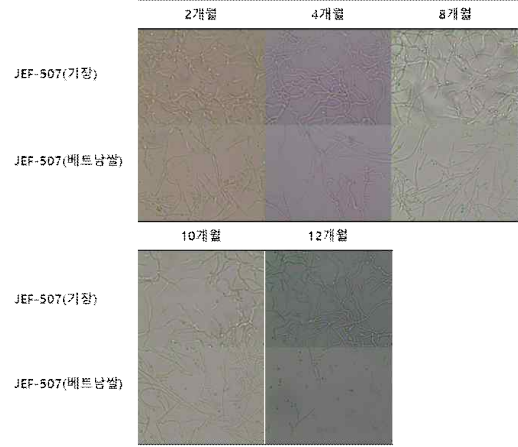
- 곡물 별 포자 발아율을 4개의 보관 온도에서 확인한 결과, 4°C 보관 시 95.1 $\pm$ 2% (기장), 63.9 $\pm$ 4.7% (베트남쌀), 25°C 보관 시 85.4 $\pm$ 2.8% (기장), 39.6 $\pm$ 1.9% (베트남쌀), 30°C 보관 시 74.8 $\pm$ 0.5% (기장), 74.8 $\pm$ 1.2% (베트남쌀), 35°C 보관 시 0.6 $\pm$ 0.6% (기장), 0% (베트남쌀) 로 확인됨(그림 79).

- 기장에서 생산된 포자의 경우, 4°C 보관 시 12개월 동안 90% 이상의 높은 포자 발아율을 확인하였고, 이를 통해 베트남 쌀보다 기장에서 생산된 포자의 보관안정성이 높은 것을 확인할 수 있었음.

(A) JEF-507 보관 기간, 온도 별 발아율



(B) JEF-507 보관 기간, 온도 별 발아형태



25°C 정거보관(정성(40×), 광학현미경)

그림 79. 기장, 베트남쌀에 배양된 JEF-507 포자의 보관 안정성 평가.  
보관온도: 4, 25, 30, 35°C, 보관 기간 : 2개월 간격으로 12개월

나. 2차 *B. bassiana* JEF-507 Quality check

- JEF-507 WP 시료 1, 5, 6의 육안 형태 관찰을 진행하였음(그림 80).

① 시료의 CFU를 확인하기 위하여 JEF-507 WP 시료 1, 5, 6 을 0.1 g 계량하여 1 mL 0.03% silwet에 현탁하였음.

② 현탁액을 10<sup>-1</sup>, -<sup>2</sup>, -<sup>3</sup> 배로 희석하여 1/4SDA배지에 100 µL spreading 하여 25°C에 3-4일간 배양하였음.

- 그 결과 CFU 값은 JEF-507 WP-1(2.55×10<sup>7</sup> conidia/g), JEF-507 WP-5(3.95×10<sup>7</sup> conidia/g), JEF-507 WP-6(4.06×10<sup>7</sup> conidia/g)으로 확인됨(그림 81).

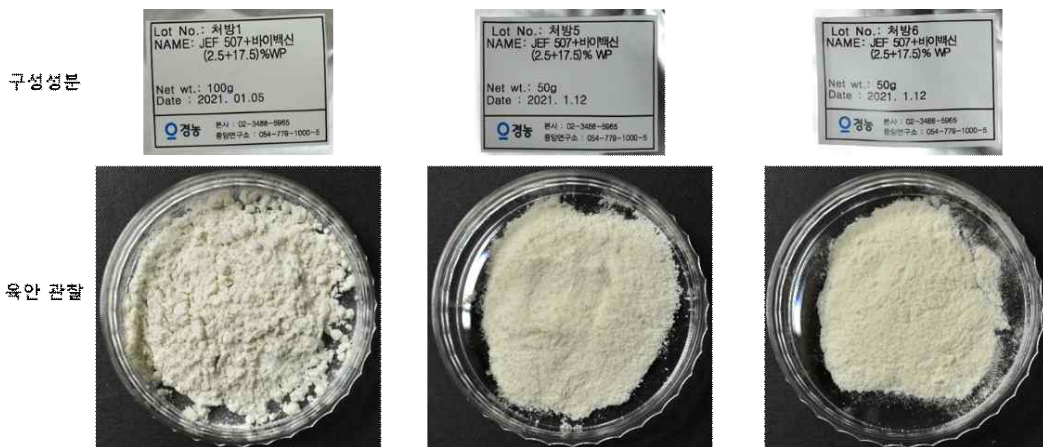


그림 80. JEF-507 WP-1, 5, 6 시료 형태 (육안 관찰)

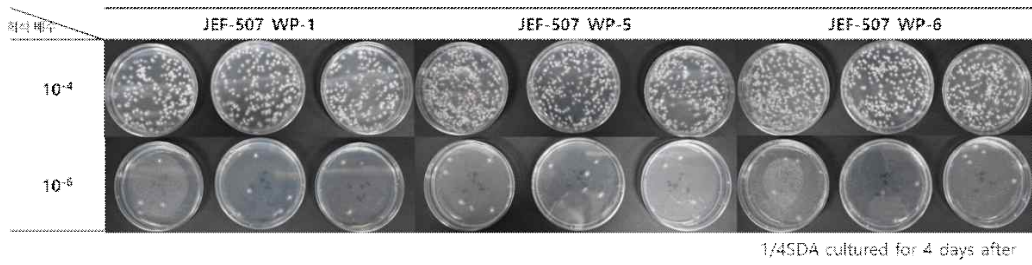


그림 81. JEF-507 WP-1, 5, 6 의 CFU 확인.

다. 2차 *B. bassiana* JEF-507 WP 시료 1, 5, 6의 안정성 평가

- JEF-507 WP 시료 1, 5, 6의 열안정성 평가를 진행하였음.

- ① JEF-507 WP 시료 1, 5, 6과 ERL836 WP의 각 시료를  $10^7$  conidia/ml 로 조제 후, 조제된 시료 현탁액을 45°C incubator에 30, 60, 90, 120 분간 처리하였음.
- ② 열처리된 시료 현탁액 5 ul 을 1/4 SDA 배지에 drop 하였음.
- ③ 20시간 배양한 후 발아율을 확인하였음.

※ 발아율 : 발아한 포자/전체 포자 숫자 \* 100 (%)

- 발아율을 확인한 결과 30분간 열처리 시, JEF-507에서는 59.2±1.0% (WP-1), 67.0±1.0% (WP-5), 65.2±7.0% (WP-6)가, ERL836 WP에서는 64.2±1.0% 의 발아율이 확인됨. 따라서 JEF-507에서는 WP-5에서 가장 높은 안정성을 가지며, 추가적으로 시중에서 판매되는 A사 *B.b* A제품과 비슷한 안정성을 가진다고 판단됨(그림 82).

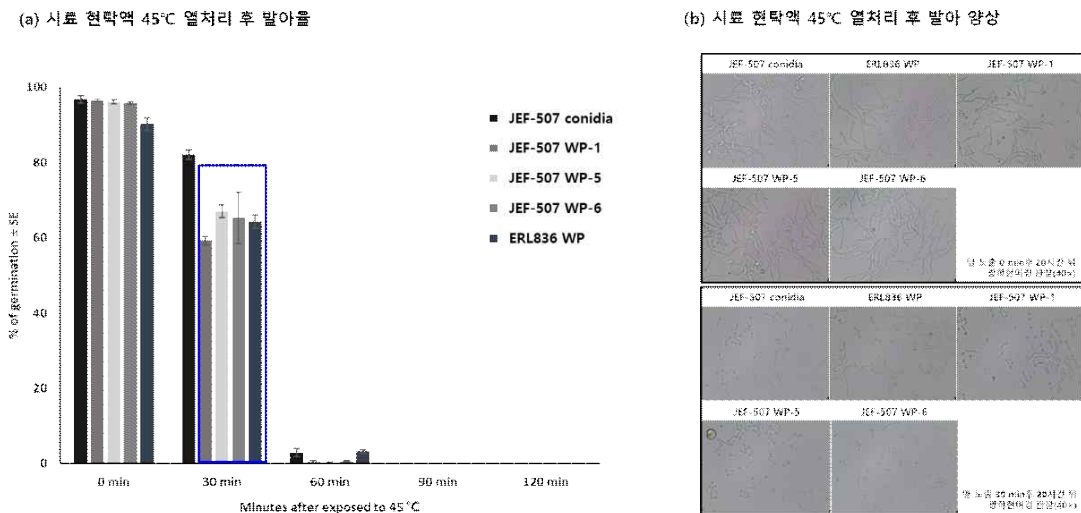


그림 82. JEF-507 WP-1, 5, 6 시료의 열안정성 평가.  
45°C 조건, 30, 60, 90, 120분 열처리 후 발아율 평가

라. 2차 *B. bassiana* JEF-507 WP 시제품을 이용한 병원성 검정

1) Plate 조건에서 JEF-507 WP-1, 5, 6 시료를 이용한 오이총채벌레에 대한 살충활성 평가

- JEF-507 WP 시료 1, 5, 6을 이용한 분무(spray)처리 방법을 통해 오이총채벌레에 대한 살충 효과를 평가하였음(그림 83). 각 시료의 희석배수별(50, 500, 5,000배) 나누어 3반복으로 진행함.



그림 83. JEF-507 WP-1, 5, 6 시료의 분무(spray)처리 방법을 이용한 생물검정법(Bioassay).

㉞ 50배 희석 처리

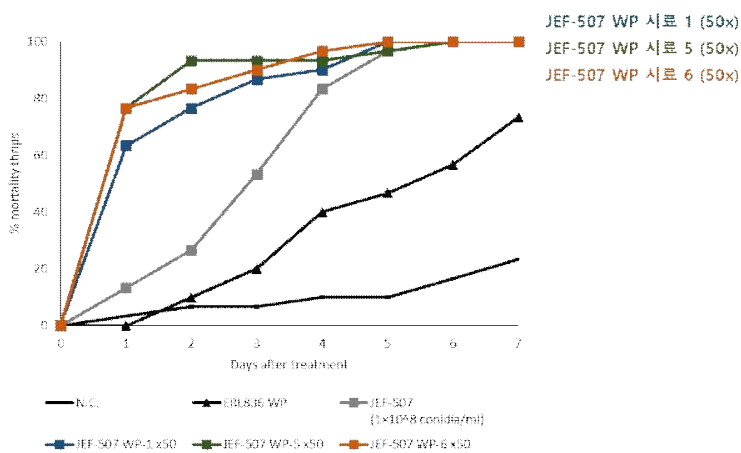
- JEF-507 WP-1, 5, 6 시료를 50배 희석하여 오이 잎 앞, 뒷면에 1 ml 씩 분무처리 후 1일 간격으로 7일까지 생충수를 확인하였음.

※ 음성대조구 (무처리구, N.C.) : 0.03% silwet 처리

양성대조구 (P.C.) : JEF-507 포자현탁액  $1 \times 10^8$  conidia/ml 처리

- 그 결과 무처리구에서 87% 생충율이 확인된 반면, JEF-507 WP-1, 5, 6 시료의 50배 희석 처리구와 양성대조구 (JEF-507  $1 \times 10^8$  conidia/ml 처리구)에서는 100% 치사율이 확인됨(그림 84).

(a) 오이총채벌레 spray 처리 후 생충률 (JEF-507 WP 시료 50배 희석)



(b) 오이총채벌레 치사 양상



그림 84. JEF-507 WP-1, 5, 6 시료 50배 희석 처리 후 오이총채벌레에 대한 살충평가.

Negative control(N.C.): 0.03% silwet, Positive control: JEF-507 포자현탁액  $10^8$  conidia/ml



㉔ 500배 희석 처리

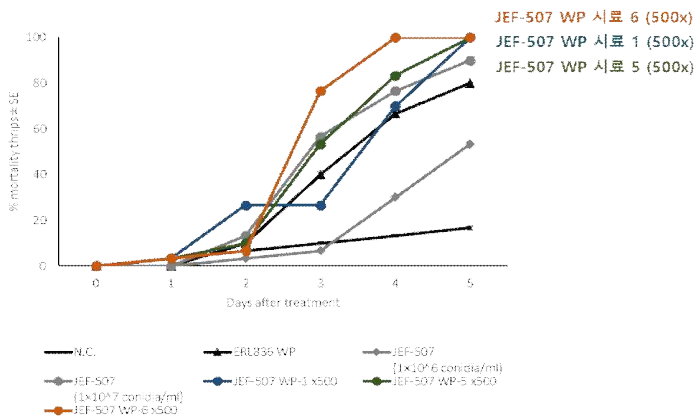
- JEF-507 WP-1, 5, 6 시료를 500배 희석하여 오이 잎 앞, 뒷면에 1 mL 씩 분무처리 후 1일 간격으로 5일까지 생충수를 확인하였음.

※ 음성대조구 (무처리구, N.C.) : 0.03% silwet 처리

양성대조구 (P.C.) : JEF-507 포자현탁액  $1 \times 10^{6,7}$  conidia/mL 처리

- 그 결과 무처리구에서 93%의 생충율이 확인된 반면, JEF-507 WP-1, 5, 6 시료의 500배 희석 처리구에서 100%, 양성대조구의 경우,  $53 \pm 1\%$  (JEF-507  $1 \times 10^6$  conidia/mL 처리구)와  $90 \pm 1\%$  (JEF-507  $1 \times 10^7$  conidia/mL 처리구)의 치사율이 확인됨(그림 85).

(a) 오이총채벌레 spray 처리 후 생충률 (JEF-507 WP 시료 500배 희석)



(b) 오이총채벌레 치사 증상

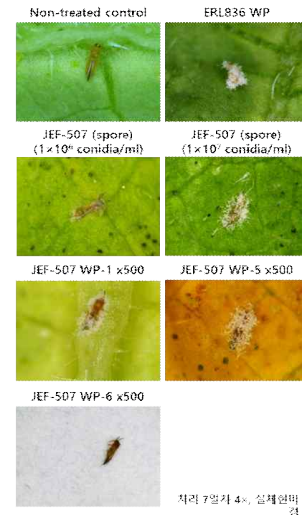


그림 85. JEF-507 WP-1, 5, 6 시료 500배 희석 처리 후 오이총채벌레에 대한 살충평가.  
Negative control(N.C.): 0.03% silwet, Positive control: JEF-507 포자현탁액  $10^{6,7}$  conidia/mL

㉕ 5,000배 희석 처리

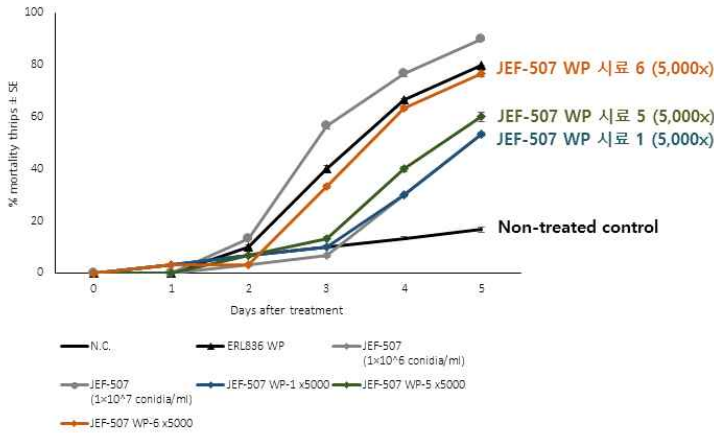
- JEF-507 WP-1, 5, 6 시료를 5,000배 희석하여 오이 잎 앞, 뒷면에 1 mL 씩 분무처리 후 1일 간격으로 5일까지 생충수를 확인하였음.

※ 음성대조구 (무처리구, N.C.) : 0.03% silwet 처리

양성대조구 (P.C.) : JEF-507 포자현탁액  $1 \times 10^{6,7}$  conidia/mL 처리

- 그 결과 무처리구에서 93%의 생충율이 확인된 반면, JEF-507 WP 5,000배 희석 처리구 경우  $53 \pm 1\%$  (WP-1),  $60 \pm 3\%$  (WP-5),  $70 \pm 2\%$  (WP-6)의 치사율이 확인되었고, 양성대조구의 경우  $53 \pm 1\%$  (JEF-507  $1 \times 10^6$  conidia/mL 처리구),  $90 \pm 1\%$  (JEF-507  $1 \times 10^7$  conidia/mL 처리구)의 치사율이 확인됨. 따라서 JEF-507 WP-6에서 가장 높은 살충효과를 보임(그림 86).

(a) 오이총채벌레 spray 처리 후 생충률 (JEF-507 WP 시료 5000배 희석)



(b) 오이총채벌레 치사 양상

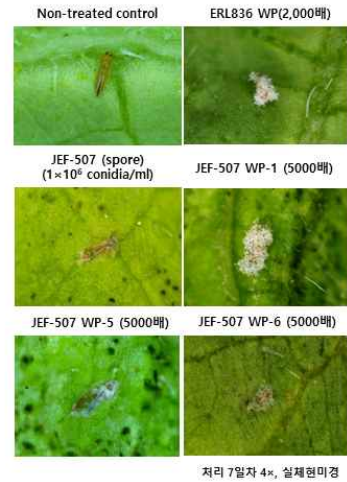


그림 86. JEF-507 WP-1, 5, 6 시료 5,000배 희석 처리 후 오이총채벌레에 대한 살충평가. Negative control: 0.03% silwet, Positive control: JEF-507 포자현탁액 10<sup>6, 7</sup> conidia/ml

2) Plate 조건에서 JEF-507 WP-1, 5, 6 시료를 이용한 담배가루이에 대한 살충활성 평가

- JEF-507 WP-1, 5, 6 시료를 분무처리 방법을 통해 담배가루이에 대한 살충효과를 평가하였음(그림 87).

① 담배가루이 2령 유충이 있는 토마토 잎을 Petridish(90 × 15 mm)에 filter paper와 함께 처리하였음.

② 처리된 토마토 잎에 JEF-507 WP-1, 5, 6 시료를 500배와 5,000배 희석하여 잎의 앞, 뒷면에 1 ml 씩 분무 처리하였음.

※ 음성대조구 (무처리구, N.C.) : 0.03% silwet 처리

양성대조구 (P.C.) : JEF-507 포자현탁액 1×10<sup>6</sup>(5,000배),<sup>7</sup>(500배) conidia/ml 처리

③ 처리 후 1일 간격으로 5일까지 생충수를 확인하였음.

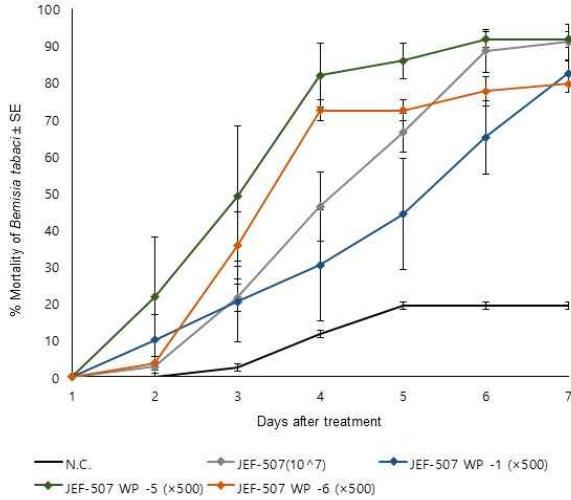
- JEF-507 WP 500배 희석 처리한 경우, 무처리구에서 81±13%의 생충율이 확인된 반면, 처리구의 치사율은 82.4±3.2% (WP-1), 91.7±2.1% (WP-5), 79.5±2.4% (WP-6)가 확인되었고, 양성대조구의 경우 90.9±4.9% (JEF-507 1×10<sup>7</sup> conidia/ml 처리구)의 치사율이 확인되었음.

- JEF-507 WP 5,000배 희석 처리한 경우, 무처리구에서 81±13%의 생충율이 확인된 반면, 처리구에서 치사율은 79±16.6% (WP-1), 76.2±1.2% (WP-5), 80.6±10.8% (WP-6)가 확인되었고, 양성대조구의 경우 69.7±14.1% (JEF-507 1×10<sup>6</sup> conidia/ml 처리구)의 치사율이 확인되었음.

- 따라서 JEF-507 WP-1, 5, 6 시료를 500배와 5,000배로 처리하여 확인한 결과 모든 처리구에서 70% 이상의 치사율을 확인할 수 있었음.



(a) 담배가루이 spray 처리 후 생충률 (JEF-507 WP 시료 500배 희석)



(b) 담배가루이 spray 처리 후 생충률 (JEF-507 WP 시료 5000배 희석)

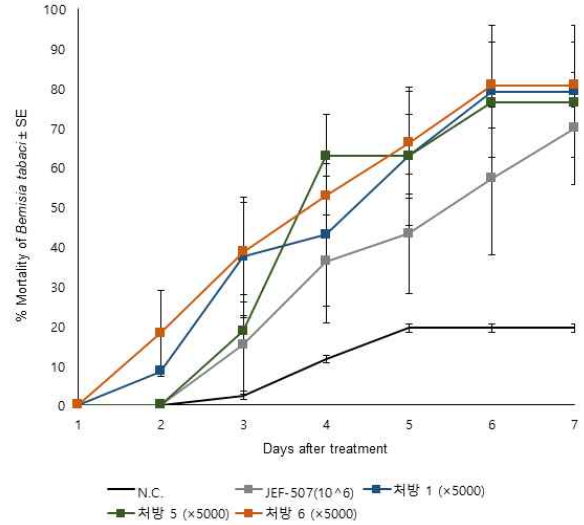


그림 87. JEF-507 WP-1, 5, 6 시료 처리 후 담배가루이에 대한 살충평가.

(a) JEF-507 WP-1, 5, 6 500배 희석처리구; (b) JEF-507 WP-1, 5, 6 5,000배 희석처리구

### 3) Breeding box 조건에서 JEF-507 WP-1,5,6 시료 처리 후 오이총채벌레의 잎 피해율 조사

- JEF-507 WP-1, 5, 6 시료를 관주 처리 방법을 통해 오이총채벌레의 작물에 대한 잎 피해율을 조사하였음.

① 수박 종자를 4엽기까지 재배한 후 3엽만 남긴 후 breeding box(7.2 x 7.2 x 10.0 cm<sup>3</sup>)에 처리하였음.

② 각 수박 pot에 오이총채벌레 성충 10마리를 접종한 후 2일 뒤 오이총채벌레를 모두 제거하였음.

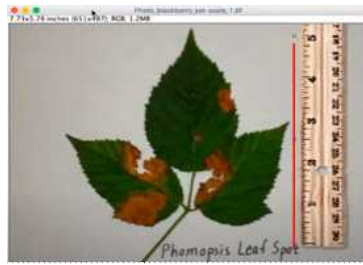
③ JEF-507 WP-1, 5, 6 시료를 500배와 5,000배 희석한 뒤 수박 pot에 7 ml 관주 처리하였음(3반복).

※ 음성대조구 (무처리구, N.C.) : 0.03% silwet 처리

양성대조구 (P.C.) : JEF-507 포자현탁액 1×10<sup>6, 7</sup> conidia/ml,

ERL836 WP 제제 2,000배로 희석 처리

④ 처리 2주 후 수박 잎 앞, 뒷면의 피해양상을 사진을 찍은 후 imageJ 프로그램을 이용하여 정량화함(그림 88).



1. 잎의 사이즈를 규격화하였음.



2. 잎 전체를 검은색으로 설정하였음.



3. 프로그램을 활용해 피해부를 확성하였음

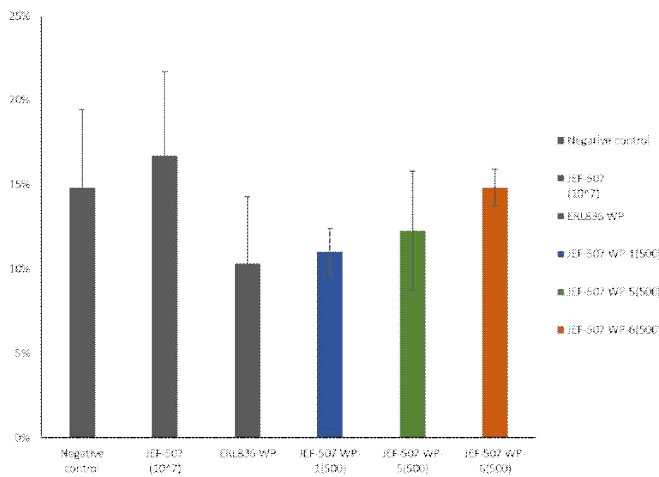


4. 잎의 피해면적을 측정하였음

그림 88. ImageJ 프로그램을 이용한 잎 피해율 측정

- 그 결과 무처리구의 잎 피해율은  $14.8 \pm 4.6\%$ 로 측정되었고, JEF-507 WP 500배 희석 처리구 경우  $11.0 \pm 1.4\%$  (WP-1),  $12.3 \pm 3.5\%$  (WP-5),  $14.8 \pm 1.1\%$  (WP-6)의 피해율이, JEF-507 WP 5,000배 희석 처리구에서는  $7.3 \pm 2.2\%$  (WP-1),  $11.7 \pm 3.5\%$  (WP-5),  $8.7 \pm 2.0\%$  (WP-6)의 잎 피해율이 확인되었음(그림89, 90). JEF-507, WP-1 시료가 500 배와 5,000배 희석하여 관주처리한 경우 오이총채벌레에 번데기에 대한 방제효과가 가장 우수한 것으로 판단됨.

(a) JEF-507 WP 시료 500배 희석 관주처리 후 오이총채벌레에 대한 피해율



(b) 오이총채벌레에 대한 피해양상

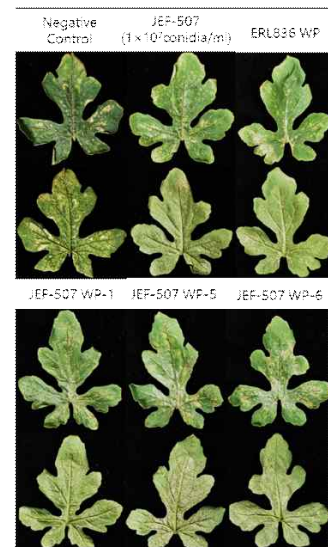
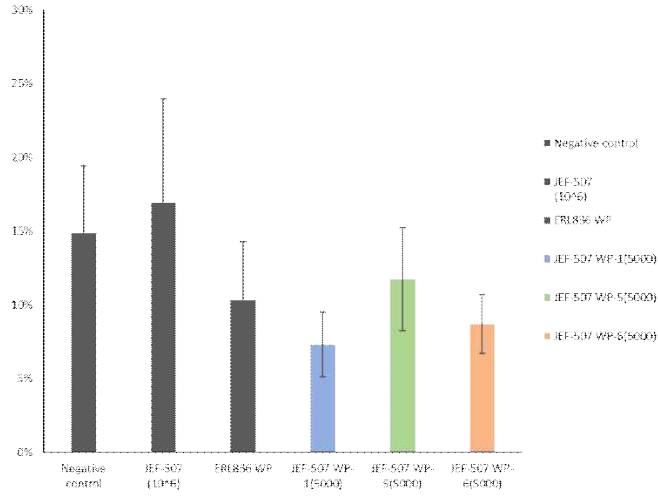


그림 89. JEF-507 WP-1, 5, 6 시료 500배 희석 처리 후 오이총채벌레의 잎 피해 측정(ImageJ).

(a) 수박 잎의 피해율, (b) 수박 잎의 피해양상

(a) JEF-507 WP 시료 5000배 희석 관주처리 후 오이총채벌레에 대한 피해율



(b) 오이총채벌레에 대한 피해양상

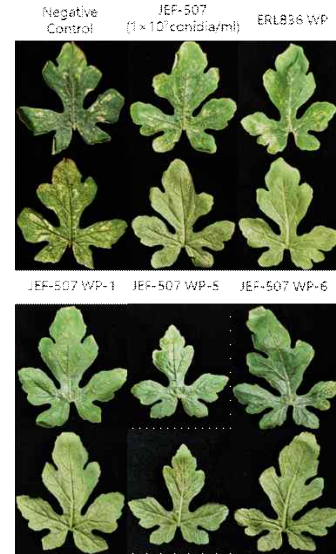


그림 90. JEF-507 WP-1, 5, 6 시료 5,000배 희석 처리 후 오이총채벌레의 잎 피해 측정(Image).  
 (a) 수박 잎의 피해율, (b) 수박 잎의 피해양상

## 제 4 장 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

### 1) 연구수행 결과

#### (1) 정성적 연구개발성과

구분	연구개발목표	가중치	평가착안 및 기준
1 년차	살충효과 평가	30%	- 후보 미생물의 살충 스펙트럼 및 살충활성 수준 평가 → <b>평가기준: 5개 이상 해충에 대한 평가결과 확보 (달성도 100%)</b>
	기초 배양 조건 확립	30%	- 고체/액체 배양을 위한 배지 검토 - 후보 미생물의 배양 특성 파악 → <b>평가기준: 배지 선발 유무 및 기초배양 특성 파악 (달성도 100%)</b>
	생태적 적용방법 연구	40%	- 방제 대상 해충의 생태 특성 분석 - 최적의 적용방법 도출 → <b>평가기준: 최적 적용방법 도출 (달성도 100%)</b>
2 년차	대량배양 조건 확립	30%	- Lab scale 배양 조건 수립 - Pilot scale 배양/생산 조건 수립 → <b>평가기준: Lab &amp; Pilot scale 배양조건 확립 (달성도 100%)</b>
	기초 제형화 연구	20%	- 후보 미생물에 적합한 증량제 선발 - 후보 미생물에 적합한 계면활성제 선발 → <b>평가기준: 미생물 제형화용 증량제 및 계면활성제 선발 (달성도 100%)</b>
	안정성 향상을 위한 기질조건 연구	10%	- 포자생산성, 열안정성 향상 곡물배지 기질 선발 - 살충효과 증진 기질 선발 → <b>평가기준: 최적 곡물배지 선발 (달성도 100%)</b>
	해충 침입기작 구명	40%	- 형광 유전자 발현 system을 통한 침입기작 구명 (AtMT, REMI, 현미경적 관찰) - 살충성 유전자의 특이성 구명 → <b>평가기준: 침입기작을 확인 및 특이 유전자 구명 (달성도 100%)</b>
3 년차	제형화 연구 및 현장적용 평가	40%	- 상업화 제형에 대한 균주안정성 검토 - 제형의 생산 가능성 검토 - 포장 조건에서의 살충활성 평가 → <b>평가기준: 사업화 가능성 평가자료 확보 (달성도 100%)</b>
	유기농자재 등록 진입	30%	- 약효/약해/꿀벌 안전성 평가 - 유기농자재 등록 진입('22년 1분기 예정) → <b>평가기준: 유기농자재 등록 진입 (달성도 90%)</b>
	보관 안정성 평가	30%	- 미생물 원료 및 제제의 안전성 평가 → <b>평가기준: 보관 안정성 데이터 확보 (달성도 100%)</b>

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

(단위 : 건, 천원)

성과지표명			연도	1단계 (2018-2019)	2단계 (2019-2020)	3단계 (2020-2021)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 <sup>1)</sup>	지식재산권	목표(단계별)	-	1	-	-	1	20
		실적(누적)	1	-	-	1	20	
	기술이전	목표(단계별)	-	-	1	1	20	
		실적(누적)	-	-	(1)	-	(20)	
	논문	목표(단계별)	-	1	1	2	-	
		실적(누적)	-	-	2	2	-	
	학술발표	목표(단계별)	2	2	2	6	50	
		실적(누적)	4	1	1	6	50	
연구개발과제 특성 반영 지표 <sup>2)</sup>	인력양성	목표(단계별)	-	-	1	1	10	
		실적(누적)	-	-	1	1	10	
계			목표(단계별)	2	4	5	-	100
			실적(누적)	5	1	(5)	-	(100)

\* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[에스시아이 Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신제품 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.

\* 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 설계 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다 (연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	<i>Beauveria bassiana</i> ERL836 and JEF-007 with similar virulence show different gene expression when infecting western flower thrips, <i>Frankniella occidentalis</i>	BMC Genomics	Sihyeon Kim	21	England	BMC Genomics	SCIE	2020년 11월 27일	1471-2164	100
2	Gene diversity explains variation in biological features of insect killing fungus, <i>Beauveria bassiana</i>	Scientific Reports	Laila Gasmi	11	UK	Nature Publishing Group UK	SCIE	2021년 1월 8일	2045-2322	100

국내 및 국제 학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1.	Society for Invertebrate Pathology	백세현	2019.07.31	발렌시아	스페인
2.	한국응용곤충학회(춘계)	백세현	2019.04.25	청주	한국
3.	한국응용곤충학회(춘계)	이동위	2019.04.25	청주	한국
4.	한국응용곤충학회(추계)	조민성	2019.10.24	평창	한국
5.	한국응용곤충학회(춘계)	김재수	2020.05.25	on-line	한국
6.	한국균학회	박소은	2020.02.19	변산	한국

기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

No	생명자원(생물자원)/화합물명	등록/기탁번호	등록/기탁기관	발생년도
1	<i>Beauveria bassiana</i> JEF-462	KFCC11821P	한국미생물보존센터	2019.02.12
2	<i>Beauveria bassiana</i> JEF-507	KFCC11822P	한국미생물보존센터	2019.02.12

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	담배가루이에 방제효과를 갖는 <i>Beauveria bassiana</i> JEF-462 또는 <i>Beauveria bassiana</i> JEF-507, 이를 포함하는 담배가루이 방제용 조성물 및 이를 이용한 담배가루이 방제 방법	대한민국	김재수	2019년 03월 22일	10-2019-0032711	김재수	2020년 09월 25일	10-2162105	100%

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	학위	2020	1				1					1	

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황

\* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과				
사업화 계획	사업화 소요기간(년)			
	소요예산(천원)			
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후
		단위(%)	현재까지	3년 후
	시장 점유율	국내		
	국외			
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후
	수출			



(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

해당사항없음

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가)
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함)
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

<참고 2> 국가연구개발혁신법 시행령 제33조제4항 및 별표 4에 따른 연구개발성과의 등록·기탁 대상과 범위

구분	대상	등록 및 기탁 범위
등록	논문	국내외 학술단체에서 발간하는 학술(대회)지에 수록된 학술 논문(전자원문 포함)
	특허	국내외에 출원 또는 등록된 특허정보
	보고서원문	연구개발 연차보고서, 단계보고서 및 최종보고서의 원문
	연구시설·장비	국가연구개발사업을 통하여 취득한 3천만 원 이상(부가가치세, 부대비용 포함) 연구시설·장비 또는 공동활용이 가능한 모든 연구시설·장비
	기술요약정보	연차보고, 단계보고 및 최종보고가 완료된 연구개발성과의 기술을 요약한 정보
	생명자원 중 생명정보	서열·발현정보 등 유전체정보, 서열·구조·상호작용 등 단백질체정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
기탁	생명자원 중 생물자원	세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물자원, 인간 또는 동물의 세포·수정란 등 동물자원, 식물세포·종자 등 식물자원, DNA, RNA, 플라스미드 등 유전체자원 및 그 밖의 생물자원
	화합물	합성 또는 천연물에서 추출한 유기화합물 및 관련 정보
	신품종	생물자원 중 국내외에 출원 또는 등록된 농업용 신품종 및 관련 정보

## 2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 살충성 미생물의 효능 평가 및 방제대상 해충의 생태분석	○ 살충성 미생물의 효능평가 결과 담배가루이와 꽃노랑총채벌레에 스펙트럼 확인과 해충의 생태분석을 진행완료	○ 100%
○ 살충성 미생물 대량배양 조건 확립 및 생태적 적용방법 연구	○ 대량 배양조건 확립하여 곡물(기장)에서 포자의 최종 회수율은 약 0.55%, 포자 농도는 $1.7 \times 10^{11}$ conidia/ml로 확인. 생태분석 결과를 바탕으로 적용방법을 연구 결과 침지 처리할 경우 살충활성이 높았으며 포자의 농도가 높아질수록 사충률이 높게 확인되었음	○ 100%
○ 살충성 미생물 제형화 및 현장 적용성 평가	○ 살충성 미생물 제형화 결과 최적의 부자재와 함량을 결정하였고 물성시험을 통해 최적화를 완료. 현장 적용성 평가 결과에서도 고추포장에서 관주처리(수화제), 토양 표면처리(입제)시 꽃노랑총채벌레 대상 무처리 대비 방제가 각 57.4%, 53.5%를 확인하였음	○ 100%
○ 유기농자재 등록 진입	○ 유기농자재 등록 진입을 위한 약효/약해 안전성 평가는 완료하였고 독성 평가를 '21년도에 진행 예정 후 유기농자재 등록 진입예정	○ 90%

## 제 5 장 목표 미달 시 원인분석

### 1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

---

유기농자재 등록 진입을 과제 종료까지 미완료  
유기농자재 효능효과표시를 목표로 포장 약효시험을 2차년도부터 시작하였지만 약효가 확보가 되지 않아 포자발아, 안전성 측면에서 제형 최적화 작업에 시간이 많이 소요되었고 과제 종료 6개월 전에 확립된 처방을 통해 포장 약효시험을 추가로 진행하여 약효/약해 안전성 평가를 완료하였음. 다만 독성 평가에 약 2달의 시간이 소요되며 현재 진행중에 있음. 이후 평가자료를 바탕으로 유기농자재 등록을 '21년 12월에 진행될 예정.

---

### 2) 자체 보완활동

---

자체분석 내용과 동일하게 안전성 평가에 시간이 소요되는바 타임라인에 맞춰 일정을 준수할 예정

---

### 3) 연구개발 과정의 성실성

---

추진 목표였던 살충성 미생물의 효능 평가 및 방제대상 해충의 생태분석, 살충성 미생물 대량배양 조건 확립 및 생태적 적용방법 연구, 살충성 미생물 제형화 및 현장 적용성 평가는 100%로 완료하였으며 최종 제품화 전 단계인 유기농자재 등록 진입은 현재진행형으로 독성 평가 후 유기농자재 등록을 완료하면 해당 연구개발의 모든 목표는 완료될 예정

연구개발 과정의 성실성 측면에서 주관기관인 (주)경농, 전북대학교 김재수 교수 연구진들은 기존 시장에 출시되고 있는 뷰베리아 제품과 비교하여 효능적으로 우수한 제품을 만들기 위해 성실히 연구를 수행하였고 그 결과로 자체평가 결과 기존 시장 제품들 중에서 가장 우수한 효능을 가진 시제품을 개발하였음.

---

## 제 6 장 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

### - 기술적 측면

원예, 화훼 작물에서 난방제 해충인 총채벌레에 대한 친환경, 무독성 방제 유기농업자재 개발을 진행하였고 곤충 병원성 곰팡이인 *B.bassiana* JEF-507 균주의 대량배양 생산공정기술, 제형화기술을 확립하여 곰팡이제제 개발 산업화 기술 구축

### - 산업적 측면

기존 시장에 판매되고 있는 뷰베리아 제품과 비교해 약효가 우수한 총채벌레 방제 친환경 살충제를 출시하여 산업계의 수요를 충족

화학농약 사용으로 발생하는 작물 및 토양 잔류 문제와 화학농약 사용저감 효과 기대

## 제 7 장 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 기존에 형성된 시장에 점유 확대를 위해 본 연구로 개발된 성과를 기반으로 합제를 개발하여 차별화, 시너지 효과를 가지는 제품을 개발하고자 함.
- 확립된 곰팡이제제 대량배양 생산공정기술, 제형화기술을 바탕으로 광범위성 해충 방제용 미생물제제 제품을 개발하고자 함.
- '21년 4분기에 기술이전을 진행하여 '22년 1분기 제품출시 계획임.

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내		
	국외		
	계		
인력양성	학사		
	석사		
	박사		
	계		
사업화	상품출시	1	
	기술이전	1	
제품개발	공정개발		
	시제품개발	2	
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

## <별첨 작성 양식>

[별첨 1]

### 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 식물바이러스 매개 흡즙 해충 방제용 곤충병원성 진균의 산업화					
	(영문) Industrialization of the entomopathogenic fungi to controlling of piercing and sucking type plant virus vectors					
주관연구기관	(주)경농		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 천연소재연구팀		
참 여 기 업	-			(성명) 박철남		
총연구개발비  (천원)	계	343,000	총 연 구 기 간	2018.11.20. - 2021.08.19. (2년 9개월)		
	정부출연 연구개발비	205,000		총 참 연 구 원 수	총 인 원	15
	기업부담금	138,000			내부인원	15
	연구기관부담금	-			외부인원	-
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 연구개발 목표: 식물바이러스 매개 흡즙 해충 방제용 곤충병원성 진균의 산업화</li> <li>- 연구개발 성과: 특허출원 1건, 특허등록 1건, SCI논문 2건, 학술발표 6건, 제품화 1건, 인력양성 1건이 해당 연구개발의 성과이며 '21년 4분기에 기술이전 1건 진행중</li> </ul> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 연구내용: 흡즙 해충 방제 진균의 효능평가와 대량배양 확립, 제형 최적화를 통해 최종 제품의 현장 적용성을 평가하여 우수한 살충활성의 제품화를 완료하였고 '22년 중해관리용 유기농업자재로 등록 예정</li> <li>- 연구결과: 1차년도 기초 살충효과 평가, 기초배양 조건확립, 생태적 적용방법 연구완료 2차년도 대량배양 조건확립, 기초제형화 연구, 안정성향상 기질조건 연구완료 3차년도 제형최적화 및 현장적용 평가, 보관 안정성 평가완료</li> </ul> <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 제형최적화 및 현장적용 평가가 완료된 제품으로 유기농업자재(난방제 해충인 총채벌레에 대한 중해관리용 유기농업자재) 2건 공시를 위해 독성평가, 이화학시험 등을 진행중에 있으며 '22년도 사업화를 통해 목표 매출액 2억을 창출할 계획</li> <li>- 구축된 곤충병원성 진균 <i>B. bassiana</i> JEF-507 균주 대량배양 생산공정기술, 제형화기술을 차후 진균제제 개발에 활용할 계획</li> <li>- 규명된 작용기작 연구는 특허출원 및 제품홍보(기술자료)에 활용할 계획</li> </ul>						

[별첨 1]

## 자체평가의견서

### 1. 과제 현황

		과제번호		118103-03	
사업구분	농축산자재산업화기술개발사업				
연구분야	농업			과제구분	단위
사업명	농축산자재산업화기술개발(R&D)				주관
총괄과제	-			총괄책임자	-
과제명	식물바이러스 매개 흡즙 해충 방제용 곤충병원성 진균의 산업화			과제유형	개발
연구개발기관	(주)경농			연구책임자	박철남
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	'18.11.20~'19.8.19	56,000	38,000	94,000
	2차년도	'19.8.20~'20.8.19	75,000	50,000	125,000
	3차년도	'20.8.20~'21.8.19	74,000	50,000	124,000
	계	'18.11.20~'21.8.19	205,000	138,000	343,000
참여기업	-				
상대국	-	상대국연구개발기관	-		

2. 평가일 : 2021년 10월 27일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)경농	책임연구원	박철남

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약 

# 연구성과 활용계획서

## 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	농업
연구과제명	식물바이러스 매개 흡즙 해충 방제용 곤충병원성 진균의 산업화		
주관연구개발기관	(주)경농	주관연구책임자	박철남
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타
	205,000,000 원	138,000,000 원	-
연구개발기간	2018.11.20. - 2021.08.19. (33개월)		
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(자체사업화) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유: )		

## 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
①저항성 흡즙해충 방제용 미생물 살충제 효능평가	(주)경농: 후보 살충성 미생물 살충효과 평가완료 전북대: 후보 살충성 미생물 해충 침입기작 구명
②살충성 미생물 대량배양 조건확립	(주)경농: 후보 살충성 미생물 고체배양 조건확립 전북대: 후보 살충성 미생물의 안정성 향상을 위한 기질조건 연구완료
③살충성 미생물 제형화 및 현장 적용성 평가	(주)경농: 선발 살충성 미생물의 제형화 및 현장 적용 평가완료 전북대: 선발 살충성 미생물의 보관안정성 평가완료

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능



### 3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인 증	학술성과				교 육 지 도	인력 양 성	정책 활용 홍보		기 타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SCI	비 SC I						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
최종목표	1	1		1		1						2		6	1					
1차 년도	목 표	0												2						
	실 적	1												4						
2차 년도	목 표	1										1		2						
	실 적	0												1						
3차 년도	목 표		1		1	1						1		2	1					
	실 적		1		0	1						2		1	1					
달성율(%)	100	100		0		100						100		100	100					

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	병원성 진균의 우수한 살충효과 최적제형 기술
②	병원성 진균의 대량배양, 생산 공정기술 확보
③	병원성 진균의 최적의 보관안정 제형기술

### 5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소 화·흡 수	외국기술 개 선·개 량	특 허 출 원	산업체이전 (상 품 화)	현 장 애 로 해 결	정 책 자 료	기 타
①의 기술	√					√	√			
②의 기술		√								
③의 기술	√						√			

\* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	제품 적용을 통한 품질향상과 매출 증대
②의 기술	제품 적용을 통한 매출 증대
③의 기술	제품 적용을 통한 품질향상과 매출 증대

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T 평 가 제 도	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논문				학 술 발 표	정 책 활 용	
											SCI		비 SCI	논 문 평 가 I F					
단위	건	건	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	건	건		
가중치								50	50										
최종목표								2	200										
연구기간내 달성실적								0	0										
연구종료후 성과창출 계획								2	200										

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>	기술이전 계약서		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	기업 기밀보안으로 비공개
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간	-	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	22년 2월 제품출시 예상
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	선행조건 없음		

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농축산자재산업화기술개발사업의 식물바이러스 매개 흡즙 해충 방제용 곤충병원성 진균의 산업화 연구개발과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농축산자재산업화기술개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.