

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001399-01

**미생물 유래 물질을 이용한 식물병 방제용
작물보호제의 산업화**

(Commercialization of Crop Protection Agent for Control
of Plant Disease using material of originated from
microorganism)

(주) 경농 중앙연구소

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “미생물 유래 물질을 이용한 식물병 방제용 작물보호제의 산업화에 관한 연구”의 보고서로 제출합니다.

2012년 4월 9일

주관연구기관명 : (주)경농
주관연구책임자 : 황 인 천
세부연구책임자 : 황 인 천
연 구 원 : 장 철
연 구 원 : 김 주 경
연 구 원 : 김 형 민
연 구 원 : 신 호 철
연 구 원 : 김 진
연 구 원 : 김 현 재
연 구 원 : 김 중 관
연 구 원 : 김 남 규
연 구 원 : 이 재 군
연 구 원 : 김 정 용

연 구 원 : 박 철 남
연 구 원 : 여 무 일
연 구 원 : 석 창 수
연 구 원 : 허 원
연 구 원 : 유 성 민

협동연구기관명 : 고려대학교

협동연구책임자 : 김 범 석

연 구 원 : 김 민 체
연 구 원 : 이 민 호
연 구 원 : 이 정 민
연 구 원 : 이 동 완
연 구 원 : 김 은 영
연 구 원 : 이 성 남
연 구 원 : 문 보 람
연 구 원 : 최 한

협동연구기관명 : 안전성평가연구원

협동연구책임자 : 문 경 식

연 구 원 : 염 동 혁
연 구 원 : 박 대 훈
연 구 원 : 한 소 리
연 구 원 : 김 지 영
연 구 원 : 윤 홍 길
연 구 원 : 양 병 철
연 구 원 : 이 상 준
연 구 원 : 권 은 미
연 구 원 : 차 경 수
연 구 원 : 장 정 희
연 구 원 : 배 주 현
연 구 원 : 이 갑 수
연 구 원 : 이 보 현

요 약 문

I. 제 목

미생물 유래 물질을 이용한 식물병 방제용 작물보호제의 산업화에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 경제적 중요성

가. 식물바이러스는 감염체의 독특한 생존방식에 의해 아직까지 방제할 수 있는 약제가 전무한 실정이며, 다양한 요인에 의해 바이러스의 변이가 발생하는 등 이로 인한 경제적 피해는 매우 크고 점차 증가하고 있는 추세이다.

나. 식물바이러스는 주로 기계적 접촉, 곤충, 종자, 영양체, 토양, 곰팡이, 선충 등 다양한 방식으로 전염되는데 특히 농작물에 심각한 피해를 끼치는 바이러스는 주로 매개충에 의해 전염되는 특징을 갖고 있어 식물바이러스와 매개충을 같은 범주로 두고 관리해야 한다는 의견이 대두되고 있다.

다. 지구 온난화와 관련하여 한국에서 발생하지 않던 해충이 점차 발생하여 토착화되고, 월동형 해충의 생존율이 급격히 증가하는 등 국내에 없던 식물바이러스가 쉽게 도입, 확산, 정착되고, 예전에는 문제시되지 않던 식물바이러스가 문제시 될 수 있는 다양한 환경적 여건이 조성되고 있어, 외래 식물바이러스가 외래 매개충과 함께 도입, 확산될 경우 막대한 경제적 손실이 야기될 수밖에 없는 처지에 놓여 있다.

라. 식물바이러스병 방제는 전통적으로 저항성품종 육종, 무병종묘·종서 보급 등과 같은 방법이 사용되어지고 있으나, 바이러스의 변이가 쉽게 이루어짐에 따라 계속적으로 품종개량을 해야 하는 등 근본적인 해결책이 전무한 상황이다.

마. 주로 약독바이러스 유전자를 도입한 GMO의 개발, 교차저항성을 이용한 새틀라이트 RNA의 개발과 같은 유전적 방제방식은 외래 유전자의 변이·전파 가능성에 대한 안전성 검증이 되지 않았고, 식물체에서 추출한 항바이러스 물질은 심각한 인축 독성을 나타내는 등 대다수의 기술들이 산업화되지 못했다.

- 바. 최근 토양미생물의 발효추출물을 이용한 식물바이러스 방제제의 개발이 진행되고 있는데, 기존에 보고되어진 물질들과는 다른 항바이러스 기작을 갖는 것으로 알려져 있으며, 현재 산업화를 위한 연구가 진행되고 있다.
- 사. 토양미생물의 발효추출물을 이용한 친환경 식물바이러스 방제제가 개발될 경우 식물바이러스 병해에 대한 새로운 시장을 창출하고 독점적, 차별적 지위를 누릴 수 있을 것이다.
- 아. 친환경 작물보호제(천연식물보호제)의 개발비는 독성이나 잔류 관련 시험 항목이 단계적 허용기준에 따라 대폭 완화될 가능성이 높아 화학농약에 비하여 개발비가 상대적으로 경제적일 수 있다.
- 자. 친환경 작물보호제 제품생산 process를 확립할 경우 기존에 알려진 많은 유용미생물에 적용이 가능하며, 친환경 작물보호제의 경쟁력을 높일 수 있다.

2. 산업적 중요성

- 가. 세계 작물보호제 산업의 규모는 360억불로 추정되고 있으며, 제초제 46%, 살충제 26%, 살균제 23%, 기타 5%를 차지하고 있다. 이러한 작물보호제 시장은 원제의 생산 기술 및 특허를 보유하고 있는 다국적기업(신젠타, 바이엘, 듀폰 등)이 주도하고 있으며, 특허기간이 만료된 copy원제는 인도나 중국과 같은 국가에서 생산하고 있는 실정이다.
- 나. 해외 천연식물보호제 시장의 규모는 2.6억불('06) 수준이었으나, 세계 각국의 화학농약 사용 절감 정책에 따라 약 3.5억불('14) 정도로 점차 확대될 전망이며, 주로 미국이 시장을 주도하고 있다. '05년도 현재 EPA에 등록된 천연식물보호제는 25종(78품목)이며, 약 1.1억불의 매출을 기록하고 있다.
- 다. 국내 작물보호제 시장은 1조 3,867억 원 규모이며, 사용량은 2.4억 톤 수준에 이른다. 하지만 농약원제의 수입의존도는 '95년 시장개방 이후 점차 높아져 국제가격 경쟁력이 매우 취약한 현실이다.
*농약원제의 수입의존도 : ('90) 39.0% → ('00) 70.0 → ('07) 89.0
- 라. 국내 작물보호제의 생산은 주로 수입 원제나 물질특허 기간이 지난 원제의 복제품(copy원제)을 이용하고 있는데, 이는 원제 개발의 투자효율이 현저히 낮고, 중국이나 인도에 비해 복제품(copy원제) 생산단가의 경쟁력이 낮기 때문이다.
- 마. 국내의 신물질 원제 탐색 및 개발에 대한 기술수준은 높은 편이나 원제 개발에 최소 10년 이상의 시간, 1,000억 원 이상의 개발비가 소요되어 당해 업체에서 미온적으로 운영하고 있으며, 더 이상의 R&D 투자 확대를 기대하기 어려운 실정에 있다. 실제로

국내에서 원제를 개발하고도 막대한 등록비용으로 인해 원제를 다국적 기업에 넘겨 제품으로 개발된 사례가 있다.

- 바. 화학농약의 사용 절감 정책과 안전농산물 생산에 대한 사회적 관심이 증대됨에 따라 환경 친화적인 작물보호제에 대한 관심이 증가되어 천연식물보호제에 대한 연구·개발이 더욱 각광받고 있다.
- 사. 국내 천연식물보호제의 기술수준은 분리, 배양, 균주개량, 활용 측면에서 선진국 수준에 근접하나 생물검정, 제제화 기술은 미흡한 실정이다.
- 아. 국내 천연식물보호제의 시장 규모는 화학농약 시장의 0.25%('05) 수준인 24.5억 원이며, 29종('08, 살균제 15, 살충제 14)이 등록되어 판매되고 있다. 민간보다는 정부(농진청) 주도로 연구·개발 진행되고 있으며, 오이흰가루병 방제용 탐시드, 큐펙트 등 2종이 상용화되었다. 하지만, 천연식물보호제의 경우는 전무한 실정이다.
- 자. 작물보호제 원제 개발의 난점과 전 세계적으로 진행되는 화학농약 사용량 절감 정책, 소비자의 경제적·교육적 수준이 높아짐에 따른 안전농산물에 대한 수요 증가 등으로 천연식물보호제 개발에 대한 시대적 요구가 크게 일어나고 있다.

3. 사회·문화적 중요성

- 가. 최근 깨끗한 환경과 삶의 질 향상에 대한 요구가 높아짐에 따라 환경오염이나 인축독성이 거의 없는 친환경 작물보호제에 대한 개발 요구가 매우 높아지고 있다.
- 나. 인체에 무해한 친환경 작물보호제는 쾌적한 약제 살포 여건을 조성하고, 농업인의 농약중독을 없애 주어 건강한 농업환경을 조성할 수 있다.
- 다. 친환경 작물보호제는 화학농약의 오남용으로 인한 생태계 파괴 및 교란을 억제하여 환경 보전형 지속가능농업의 실현을 가속화 할 수 있다.

4. 연구개발의 필요성

- 가. 식물바이러스는 전 세계적으로 22과 작물에 1000여종의 병해를 일으키며 이에 따른 경제적 피해는 매우 큰 실정이다.
- 나. 국내에서는 1997년 수박 CGMMV에 의해 463ha, 500여억 원의 경제적 피해가 발생, 고추에서는 CMV 등에 의해 매년 300여억 원의 피해 발생, 수도작에서는 벼 RSV가 2004년 충청, 경기지방에 4,663ha, 2007년 서해안 지역에서 4,457ha에서 발생하는 등 바이러스 병해로 인한 경제적 피해가 전국적으로 크게 확산되고 있다.
- 다. 식물바이러스 병해를 방제할 수 있는 화학농약은 전무한 실정이며, 기존에 연구되어진 항바이러스 물질들은 대부분 약효가 매우 미미하거나 강한 세포독성으로 산업화된 사

례가 없다.

- 라. 국내에서 분리된 토착미생물을 이용한 식물바이러스 방제제의 개발은 방제 약제가 전무한 식물바이러스 병해 시장에서 독점적 지위를 얻을 것이며, 효과적인 식물바이러스 방제를 통해 고부가 가치의 농산물 생산에도 기여할 것이다.
- 마. 식물바이러스 방제제의 개발을 위한 활성미생물을 (주)경농에서 보유하고 있으며, 다년간의 연구·개발을 통해 기본적인 약효, 스펙트럼, 작용기작에 대한 데이터를 확보하고 있으며, 현재 국내특허출원(제2008-120899호)을 완료하였다.
- 바. 활성물질의 추출 및 분리·동정을 통해 명확한 항바이러스 작용기작을 밝혀 바이러스와 식물체간에 일어나는 생명현상을 해석하는 등 보다 진일보한 학문적 가치를 확보하여, Quality control system을 기반으로 하는 생산 공정 수립 및 제품관리가 가능해질 것으로 판단된다.
- 사. 지난 수십여 년 간 친환경 작물보호제의 탐색에 대한 연구는 활발히 진행되어 왔으나, 화학농약에 비해 낮은 약효, 불균일한 활성으로 인해 산업화되어 시장에서 선도적 지위를 형성한 제품의 수는 매우 적은 것이 현실이다. 이러한 기술적 한계를 극복하기 위하여 전 세계적으로 천연식물보호제의 약효 및 역가 증진에 관한 연구를 하고 있으며, 현재 친환경 작물보호제 연구의 패러다임이 이러한 방향으로 이동 중이라고 판단된다.
- 아. 천연식물보호제과 같은 작물보호제의 경우 활성물질의 생성 과정에 대한 유전학적·생화학적 연구를 통해 약효 증진 또는 수율 향상을 도모할 수 있다.
- 자. 작물보호제의 제형은 활성물질과 작물체의 특성, 재배환경, 식생활 패턴 등에 따라 매우 다양해지며, 제형에 따라 약효의 정도, 지속기간, 부착력 등이 크게 좌우된다는 것은 이미 화학농약 분야에서 크게 입증되어 현업에서의 활용도가 매우 높은 실정이다. 따라서 식물바이러스 방제제도 대상 작물별, 바이러스별 최적 제형 선발에 대한 연구가 필요하며, 현장적용시험을 통해 농업현장에서 최적효과가 나올 수 있는 다양한 방제방법의 확립도 요구된다. (ex. 토양처리제, 경엽 처리제 등)
- 차. 화학농약의 등록에 비해 단계적으로 허용될 수 있는 독성·잔류성 평가 부분은 천연식물보호제의 등록을 위해 반드시 필요한 연구이지만 소요비용이 화학농약에 비해 상대적으로 적을 뿐 연구개발부분에서 매우 큰 비중을 차지하며, 개발비 측면에서 큰 부담이 되는 것이 현실이다.
- 카. 본 과제를 통해 활성 미생물의 대량배양기술, 후처리 공정, 제제화, 균주개량, 작용기작 분석, 적용 스펙트럼 분석 및 적용방법 개발 등의 산업화 연구를 통해 새로운 시장에 진출하는 신상품으로서의 가치와 명확한 약효에 대한 근거 및 방제효과를 극대화

시킬 수 있는 기술을 마련하고자 한다.

다. 이러한 선행기술을 바탕으로 실제 산업화에 필요한 보다 실용적인 연구·개발을 통해 방제 약제가 전무한 식물바이러스에 대한 시장을 창출할 수 있으며, 이 시장에서 독점적, 차별적 지위를 확보할 수 있는 신개념의 천연식물보호제의 개발은 이 시대가 요구하는 바와 크게 일치한다는 점에서 본 연구개발의 필요성은 더욱 부각되어 진다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

가. 연구개발의 최종목표

식물 바이러스병 방제용 천연식물보호제의 원제 및 제품개발

나. 연구개발의 주요내용

- (1) 활성물질의 대량생산 공정개발 및 제형화
- (2) 천연식물보호제 등록을 위한 안전성 데이터 생산
- (3) 유용곤충 및 화학농약에 대한 영향평가
- (4) 활성물질의 순화 및 활성 유전자 탐색
- (5) 균주 개량을 통한 물질생산 최적화 연구
- (6) 활성물질의 작용특성 연구
- (7) 작물별 활성스펙트럼 및 농가적용법 연구
- (8) 곤충매개 바이러스의 특성 및 농가적용법 연구

2. 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

가. 제1세부과제 연구개발의 목표 및 내용

(1) 연구개발의 목표

식물 바이러스병 방제용 작물보호제의 산업화 연구

(2) 연구개발의 내용

(가) 활성물질의 대량생산 공정개발 및 제형화

- ① 산업화 배지 및 배양 최적 조건 선발
- ② 50L ~ 5,000L 발효조를 이용한 대량 생산 공정 확립
- ③ 후처리 공정별 가능 제형선발

- ④ 작물 및 적용 대상별 최적 제형 확립
- ⑤ 산업화 공정을 통한 시제품 생산 및 안정성 검토
- ⑥ 경제성 분석 및 생산 공정 확립
- ⑦ 개량 균주를 이용한 대량생산 및 제형화

(나) 유용곤충 및 화학농약에 대한 영향평가

- ① 꿀벌, 서양뒤영벌, 진디벌, 천적 응애 영향평가 및 재출입 기간 설정
- ② 원예용 살충제, 살균제, 수도용 살충제, 살균제와의 혼용 및 살포시기에 대한 영향평가

나. 제1협동과제 연구개발의 목표 및 내용

(1) 연구개발의 목표

활성물질의 대량 순화 및 작용기전 연구
 작물별 활성스펙트럼 확보 및 농가적용방법

(2) 연구개발의 내용

(가) 활성물질의 순화 및 활성 유전자 탐색

- ① 대량 순화과정의 산업화를 위한 활성검정 기반 추출물 분획 scheme 확립
- ② 생산균주의 genomic DNA library 제작
- ③ Quality Control을 위한 검정법 확립
- ④ 돌연변이체 clone 제작 및 스크리닝법 확립
- ⑤ 대량 배양액의 제품화 process 기법 확립
- ⑥ 해당 유전자의 검정시험 및 cloning과 이형발현체 제작

(나) 균주 개량을 통한 물질생산 최적화 연구

- ① UV mutagenesis 조건 설정
- ② 활성물질 과생산 변이주 확보
- ③ 선발 변이주의 반복 mutation
- ④ 변이주의 배양 조건 확립
- ⑤ 활성물질 과생산 변이주의 산업화 타진
- ⑥ 변이주의 환경적응성 검토
- ⑦ 대량배양 조건 설정

(다) 활성물질의 작용특성 연구

- ① 활성물질의 바이러스 이동 및 복제 억제 기작 분석
- ② 활성물질의 식물체 전신 이동 모니터링
- ③ 활성물질의 작용기작 분석
- ④ 기주방어 및 바이러스 억제 기전 분석

(라) 작물별 활성스펙트럼 및 농가적용법 연구

- ① 작물별 바이러스 발병 빈도조사 (원예, 화훼)
- ② 적용 방법 모델링 및 모델시스템 현장적용 평가
- ③ 적용 방법 최적화
- ④ 방제력 작성

(마) 곤충 매개 바이러스의 특성 및 농가적용법 연구

- ① 식물바이러스와 매개충의 분자 생태적 구명 (애멸구, 진딧물)
- ② 최적 관리 프로그램 구축
- ③ 개발약제의 적용시기 및 적용방법 구축
- ④ 개발 약제의 적용을 포함한 매개충과 바이러스의 최적관리프로그램 제시

다. 제2협동과제 연구개발의 목표 및 내용

(1) 연구개발의 목표

천연식물보호제 등록을 위한 안전성시험성적 생산

(2) 연구개발의 내용

(가) 원제 안전성 GLP data 생산

- ① 인축독성시험
 - ㉠ 급성경구독성시험
 - ㉡ 급성경피독성시험
 - ㉢ 피부자극성시험
 - ㉣ 안점막자극성시험
 - ㉤ 피부감작성시험
 - ㉥ 90일 아급성경구독성시험

② 환경독성시험

- ㉠ 조류(藻類)에 대한 급성독성시험
- ㉡ 담수어류에 대한 영향시험
- ㉢ 담수 무척추동물 영향시험
- ㉣ 적용 외 식물영향시험
- ㉤ 표적 외 곤충영향시험

(나) 제품 안전성 GLP data 생산

① 인축독성시험

- ㉠ 급성경구독성시험
- ㉡ 급성경피독성시험
- ㉢ 안점막자극성시험
- ㉣ 피부감작성시험

② 환경독성시험

- ㉠ 담수어류에 대한 영향시험
- ㉡ 담수 무척추동물 영향시험

3. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

| 구분 | 연도 | 연구개발의 목표 | 연구개발의 내용 |
|----------|------|---|---|
| 1차 년도 | 2009 | ○포장 및 안전성시험용 원제생산 ○산업용 배지 선발 및 배양 최적화 (500L) ○KNF2016 원제의 특성연구 ○KNF2016 원제의 특성연구 | - 원제생산 - 산업용 배지선발 - 배양최적화 (5~500L) - 원제 이화학적 특성분석 - 계면활성제, 보조제 선발 |
| | | ○인축독성시험 (원제) ○환경독성시험 (원제) | - 급성경구독성시험 - 급성경피독성시험 - 피부자극성시험 - 안점막자극성시험 - 피부감작성시험 - 유전독성시험 - 조류에 대한 급성독성시험 - 담수어류에 대한 영향시험 - 담수 무척추동물 영향시험 |
| | | ○꿀벌에 대한 영향평가 ○원예용 살충제와의 혼용성 평가 | - 재출입 기간 설정 - 혼용에 의한 평가 - 살포간격에 따른 평가 |
| | | ○바이러스병 발병조사 ○보독충율과 발병율과의 관계 | - 작물별 발생하는 바이러스병 조사 - 보독충율 및 병발생을 예측할 수 있는 biomarker조사 |
| | | ○대량순화과정의 산업화 ○활성유전자의 탐색 | - 대량순화과정의 산업화를 위한 활성검정기반의 추출물 분획스캠 확립 - 생산균주의 genomic DNA library, 돌연변이체 제작 |
| | | ○활성물질의 바이러스 복제 및 이동 억제 분석 | - 바이러스 복제 및 이동 억제 효과 분석 |
| | | ○UV mutagenesis 조건 설정 및 변이주 확보 ○변이주의 배양조건 확립 | - mutagenesis 조건 설정 - 활성물질 과생산 변이주 확보 - 배지선발 및 최적화 |

| 구분 | 연도 | 연구개발의 목표 | 연구개발의 내용 |
|----------|------|---|--|
| 2차 년도 | 2010 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 5000L 발효 최적화 ○ 후처리 공정 개발 및 최적화 ○ 제제화 연구 ○ 등록시험 진입(1년차) | <ul style="list-style-type: none"> - 배양최적화 (5000L) - 후처리 공정개발 및 최적화 - 작물별 제형선발 - 등록시험 진입 |
| | | <ul style="list-style-type: none"> ○ 인축독성시험 (원제) ○ 환경독성시험 (원제) | <ul style="list-style-type: none"> - 90일 아급성경구독성시험 - 적용 외 식물영향시험 - 표적 외 곤충영향시험 |
| | | <ul style="list-style-type: none"> ○ 뒤영벌에 대한 영향평가 ○ 원예용 살균제와 혼용성 평가 | <ul style="list-style-type: none"> - 재출입 기간 설정 - 혼용에 의한 평가 - 살포간격에 따른 평가 |
| | | <ul style="list-style-type: none"> ○ 매개충의 분자생태 조사 평가 ○ 바이러스 발병조사 평가 | <ul style="list-style-type: none"> - 약제처리에 따른 매개충의 분자생태조사 - 약제처리에 따른 바이러스병의 발병정도 조사 평가 |
| | | <ul style="list-style-type: none"> ○ Q. C. 검정법 확립 ○ 돌연변이체 스크리닝을 통한 관련 유전자 동정 | <ul style="list-style-type: none"> - 단순화된 활성검정법 확립 - 돌연변이체의 생물검정 - 관련 유전자 동정 |
| | | <ul style="list-style-type: none"> ○ 활성물질에 의한 바이러스 억제효과 전신이동모니터링 | <ul style="list-style-type: none"> - 활성물질에 의한 바이러스 억제효과 전신이동 모니터링 분석 |
| | | <ul style="list-style-type: none"> ○ UV mutagenesis를 통한 변이주 확보 ○ 변이주의 배양조건 확립 | <ul style="list-style-type: none"> - 활성물질 과생산 변이주 확보 - 선발 변이주의 반복 mutation |

| 구분 | 연도 | 연구개발의 목표 | 연구개발의 내용 |
|----------|------|--|---|
| 3차 년도 | 2011 | ○ 변이균주 5000L 발효 최적화 ○ 시제품 생산 및 안전성 분석 ○ 등록시험 (2년차) | - 배양최적화 (5000L) - 시제품생산 - 시제품의 안정성 분석 - 산업화 공정 확립 - 원제등록 |
| | | ○ 인축독성시험 (품목) ○ 환경독성시험 (품목) | - 급성경구독성시험 - 급성경피독성시험 - 안점막자극성시험 - 피부감작성시험 - 담수어류에 대한 영향시험 - 담수 무척추동물 영향시험 |
| | | ○ 천적에 대한 영향평가 ○ 수도용 약제에 의한 영향평가 | - 재출입 기간 설정 - 혼용에 의한 평가 - 살포간격에 따른 평가 |
| | | ○ 최적 처리시기 및 처리법 설정 ○ 매개충과 바이러스의 최적관리법 제시 | - 매개충 밀도 및 보독충율의 시공간적 변동 조사 후 작물별 최적 적용시기 및 처리법 제시 - 바이러스병 발병율의 시공간적 변동을 조사하여 최적관리법 제시 |
| | | ○ 제품화 process과정의 최적화 ○ 관련 유전자의 클로닝과 이형 발현체 제작 | - process과정의 최적화 - 유전자 클로닝 - 이형발현체 제작 |
| | | ○ 활성물질 기주방어기전 분석 | - 활성물질의 바이러스억제 작용특성 분석 |
| | | ○ 반복 mutation을 통한 산업화 균주 확보 ○ 대량배양 조건설정 | - 활성물질 과생산 변이주의 산업화 타진 - 변이균주의 환경적응성 검토 |

IV. 연구개발결과

1. 활성물질의 대량생산 공정개발 및 제형화

가. 산업용 배지 최적화 및 배양최적화

Pseudomonas oleovorans KCTC10159BP (이하 KNF2016) 균주의 최적화된 산업용 배지 조성은 Yeast extract 2%, KH_2PO_4 0.5%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.05%로 선발되었으며, 상기 조성의 배지를 이용하여 5L jar fermenter에서부터 5,000L pilot 발효기까지의 scale up 공정을 확립하였으며, 확립된 배양조건을 바탕으로 5,000L pilot 발효기에서 생산된 시료를 Q. C한 결과 500배 희석액에서도 90% 이상의 방제효과가 나타나 산업용 배지 조성 선발 및 배양 최적화 공정의 확립을 이루었다고 판단되었다.

나. 후처리 공정별 가능 제형선발

(1) KNF2016 원제의 특성연구

KNF2016 원제는 60 ~ 100°C 온도에서도 항바이러스 활성을 유지하는 것으로 나타났다으며, 이러한 열안전성은 KNF2016 원제의 경시안전성 시험(54°C)에서도 항바이러스 활성의 변동이 적게 나타내는 역할을 하는 것으로 판단되었다.

(2) 후처리 공정 개발 및 최적화

기 개발된 고상의 원제는 제조공정상 많은 비용과 노동력이 수반되기 때문에 보다 경제성이 확보된 액상제형의 확보를 위해 균주사멸 공정, 배양액 농축공정, 동결건조 공정, 원분과쇄 공정의 효율성과 이를 대체할 수 있는 다양한 공정을 검토 및 도입하여 산업화에 최적화된 원가절감형 후처리 공정을 개발하였으며, 이를 바탕으로 액상제형용 원제 생산 공정을 확립하였다.

(3) 제제화 연구

본 과제에서 수행되는 배양 최적화, 제제화 등의 검토는 담배 반엽법을 통해 이루어지는데, 담배 반엽법은 바이러스 시험법 중 가장 간단하면서도 신뢰할 수 있는 시험법으로 알려져 있음에도 불구하고 변이차가 크기 때문에 부제 선발 혹은 발효 최적화 등과 같은 세밀한 조건을 구분하여 선발하기에는 무리가 있어, 보다 신뢰성이 확보된 시험법을 구축하였으며, 이를 활용하여 KNF2016의 유효기간을 연장시켜줄 수 있는 부제를 선발하였다. 선발된 부제를 이용하여 제제화한 시료의 경우 경시 변화에

도 안정한 것으로 나타나 신뢰성 있는 시험법의 확립을 이루었다.

다. 시제품 생산

(1) 포장 및 안전성 시험용 원제생산

포장 및 안전성 시험용 원제는 선발된 산업용 배지를 이용하여 500L 발효기에서 생산되었으며, 생산된 원제를 액상 제제화 하였을 경우 기존에 만들어진 수화제와 비등한 활성을 보여, 생산된 액상 원제를 이용하여 포장 및 안전성 시험용 시료로써 활용하였다.

(2) 시제품 생산 및 안정성 분석

시제품의 생산은 선발된 산업용 배지를 이용하여 50 L ~ 5,000L 발효기에서 생산되었으며, 새롭게 확립된 생물검정법 (Q. C용)을 적용하여 항바이러스 활성을 분석한 결과 생산된 원제를 500배, 1,000배 희석할 경우에도 각각 94.6%, 90.9%의 방제효과가 나타나 산업용 배지 선발 및 배양최적화가 성공적으로 확립되었다. 상기 조건으로 생산된 원제를 이용하여 액상 제형화에 적합한 처방으로 시제품을 제조한 뒤 경시안정성을 분석한 결과 고온보관 6주 후에도 항바이러스 활성이 안정적으로 유지되었다.

라. 유용곤충에 대한 영향평가

(1) 꿀벌에 대한 영향 평가

KNF2016 원제는 기준량과 배량에서 처리 1시간과 4시간에서 약 10%의 치사율을 나타내었지만, 처리 1일 후부터는 치사개체가 없어 RT_{25} 값이 1일 미만인 것으로 나타났다으며, 이러한 결과를 바탕으로 꿀벌의 방사는 KNF2016 원제 살포 1일 후 부터 가능할 것으로 판단되었다.

(2) 서양뒤영벌에 대한 영향평가

KNF2016 원제는 기준량인 500배에서 처리 1시간에서만 24시간, 48시간 모두 1.6%의 치사율을 나타내었고, 처리후 4시간부터는 치사개체가 없어 RT_{25} 값이 1시간 미만인 것으로 나타났다. 이는 KNF2016 원제가 서양뒤영벌에 별다른 영향을 미치지 않는다는 것을 나타내며, 약제 처리 1시간 후에 서양뒤영벌을 투입하는 것이 안전할 것으로 판단되었다. 또한 약제처리에 따른 일반 중독증상은 나타나지 않았다.

(3) 무당벌레에 대한 영향평가

KNF2016 원제는 기준량, 배량 처리시 모두 RT_{25} 값이 1일 미만으로 나타났다. 이러한 결과는 무당벌레의 경우 KNF2016 원제의 살포와 관계없이 방사가 가능할 것으로 판단되었다.

마. 화학농약에 대한 영향평가

(1) 화학농약과의 혼용성 평가

원예용 살충제 가네마이트 외 28종을 대상으로 고추(풋고추: 부강, 단고추: 수잔), 담배(KF-109, KF-114), 참외(황갈, 금동이), 토마토(대과, 슈퍼도태랑, 방울: 꼬꼬, 주옥), 오이(삼남청장, 백다다기)와 같은 5작물 11품종을 대상으로 기준량, 배량으로 혼용약해를 검토하였다. 원예용 살균제는 미리카트 외 90종을 대상으로 고추(풋고추: 부강, 단고추: 수잔), 담배(KF-109, KF-114), 벼(동진), 오이(삼남청장, 백다다기), 참외(황갈, 금동이), 토마토(대과, 슈퍼도태랑, 방울: 꼬꼬, 주옥), 수박(수박: 태양꿀수박, 복수박: 귀공자), 호박(농우애호박)와 같은 8작물 15품종을 대상으로 기준량, 배량으로 혼용약해를 검토하였다.

(2) 혼용 약효 영향성 평가

KNF2016 원제를 원예용 살충제와 혼용하였을 경우 특정 원제에 따른 활성의 변동양상은 나타나지 않고, case by case에 따라 활성의 변화가 나타나는 것으로 확인되었다. 하지만 대부분의 원예용 살충제에 대해서 항바이러스 활성이 안정적으로 나타났다. 수도용 약제의 경우 원제의 계열별 분석, 같은 원제의 제형별 분석에서도 별다른 항바이러스 활성의 저해가 나타나지 않아 혼용에 따른 약효 저하문제는 없는 것으로 판단되었다.

바. 포장시험 검토

(1) 토마토 황화잎말림병

KNF2016 70% AS (제품)으로 토마토 황화잎말림병(전남 광양)에 7일 간격 6회, 살충제와 혼용 살포한 결과 살충제 관행 살포 농가 대비 우수한 방제효과가 나타났다. 시험 포장내 토마토 황화잎말림병 감염 수가 나타났었지만 주변으로의 확산이 억제되는 효과가 인정되었다.

(2) 수박 얼룩모자이크병

KNF2016 70% AS (제품)으로 수박 얼룩모자이크병(충북 음성)에 10일 간격 4회, 살포한 결과 무처리구 대비 81.5%의 방제효과가 나타났다. 이같은 결과는 주로 토양, 종자, 접촉(즙액) 전염하는 CGMMV의 특성에 맞게 약제 처리시기를 선정하였기 때문인 것으로 판단되었다.

사. 등록시험

(1) 1년차 포장시험

(가) 토마토 황화잎말림병

KNF2016 70% AS (제품)를 이용하여 전남 보성에 위치한 토마토 시설하우스에서 정식 직후 7일 간격 5회 경엽 처리한 결과 무처리 대비 69.2%의 방제효과가 나타났으며, 기준량 및 배량에서 약해를 나타내지 않아 토마토 황화잎말림병 방제약제로써 실용성이 인정되었다.

(나) 수박 얼룩모자이크병

KNF2016 70% AS (제품)를 이용하여 충북 음성에 위치한 수박 시설하우스에서 정식 직후 10일 간격 4회 경엽 처리한 결과 무처리 대비 81.5%의 방제효과가 나타났으며, 기준량 및 배량에서 약해를 나타내지 않아 수박 얼룩모자이크병 방제약제로써 실용성이 인정되었다.

(2) 2년차 포장시험

(가) 토마토 황화잎말림병

KNF2016 70% AS (제품)을 이용하여 전북 나주에 위치한 시설하우스 포장에서 정식 직후 7일 간격 5회 경엽 처리 한 뒤 최종약제처리 7일 후 구당 전체주에 대한 이병주수를 조사한 결과 무처리 대비 60.8%의 방제효과가 나타났다.

(나) 수박 얼룩모자이크병

KNF2016 70% AS (제품)을 이용하여 충북 음성에 위치한 시설하우스 포장에서 정식 직후 10일 간격 4회 경엽 처리 한 뒤 최종약제처리 10일 후 구당 전체주에 대한 이병주수를 조사한 결과 무처리 대비 75.5%의 방제효과가 나타났다.

2. 활성물질의 대량 순화 및 활성유전자 탐색

가. 대량 순화과정의 산업화를 위한 활성검정 기반 추출물 분획 scheme 확립

(1) 항바이러스 물질의 순화

(가) 용해도에 따른 활성물질의 분리

황산암모늄을 이용한 용해도에 따른 항바이러스 활성물질의 분리를 시도한 결과 60% 농도의 황산암모늄 분획에서 항바이러스 활성물질의 대부분이 분리되었다.

(다) Bio-Gel P10을 이용한 분자량에 따른 활성물질의 분리

Bio-Gel P10을 이용하여 분리된 항바이러스 활성물질은 Bio-Gel P10 resin의 분리 범위를 벗어나는 20,000 Da 이상의 물질임이 밝혀졌다.

(라) Bio-Gel P60을 이용한 분자량에 따른 활성물질의 분리

분리 범위가 3,000 ~ 60,000 Da 인 Bio-Gel P60을 이용하여 다시 분리 정제한 결과 62번 fraction에서부터 활성물질이 elution되었으며, 관련 fraction을 SDS-PAGE를 통해서 약 51KDa, 45KDa, 40KDa의 세 가지 단백질이 항바이러스 활성을 나타내는 것으로 추정되어졌다.

나. 항바이러스 물질의 특성분석

(1) 항바이러스 물질의 특성분석

(가) 활성물질의 아미노산 서열 분석

SDS-PAGE에서 밝혀진 단백질 밴드 중 No.2와 No.3 밴드의 N-terminal sequence를 분석한 결과 두 단백질 모두 Asp - Ile - Asn - Gly - Gly (specific protein)로 확인되었다.

(나) 활성물질의 아미노산 조성 분석

항바이러스 물질로 생각되어지는 No.2 단백질의 아미노산 조성을 분석한 결과, Glycine (19.46%), Phenylalanine (16.45%), Threonine (8.53%)의 함량이 높은 것으로 나타났다.

다. 활성물질의 활성유전자 탐색

(1) 항바이러스 활성물질의 유전자 탐색

(가) 특정 protein을 암호화하는 유전자 탐색

아미노산 서열을 바탕으로 degenerated primer 제작한 뒤 nested-PCR을 수행한 결과, 약 700bp정도 길이의 6종류의 specific protein 코딩 gene을 확인할 수 있었다. 확인된 gene은 transposon을 이용하여 point mutation시킨 뒤 항바이러스 활성의 변화 여부를 조사하였으나, 항바이러스 활성이 감소된 돌연변이체는 나타나지 않았다.

(나) Random mutation을 통한 활성유전자 탐색

Random mutagenesis를 이용한 641개의 돌연변이체에 대한 항바이러스 활성의 변화여부를 검정한 결과, 균주의 생육정도가 wild-type 균주에 비해 저하되지 않으면서 항바이러스 활성이 감소된 7개의 돌연변이체 clones(4C1, 4C2, 4F3, 4F5, 4H11, 5B7, 5C7)을 선발하여 knock-out된 유전자의 염기서열을 분석하였다. 그 결과 무작위 돌연변이체의 subcloning에서 확인된 염기서열 상에서는 4C1 mutant의 염기서열이 다른 것들과 연결되지 않는 것으로 나타났으나, 일부 진행된 whole genome sequence의 6.3 kb정도의 contig-1198에서 하나로 연결됨을 확인할 수 있었다.

라. Quality Control을 위한 검정법 확립

(1) 지방산 분석을 이용한 Q. C 법 검토

항바이러스 물질의 생산량이 일정 부분 세포 수의 증가와 비례하는 것으로 나타나 growth에 따라 증가하는 지방산을 GC/MS로 분석하여 지표물질로 이용하고자 하였다. 제제화된 시료에서 제형화에 포함되는 각종 계면활성제를 제외한 나머지 peak 중 Oleic acid peak(C18:1)를 표준물질로 결정하였고, 담배 반엽법으로 활성검정 하였을 경우 제제 1ml당 oleic acid의 함량은 18.7 μ g 으로 나타났다.

(2) SDS-PAGE를 이용한 Q. C 법 검토

항바이러스 활성물질로 추정되는 단백질 band를 SDS-PAGE상에서 확인할 수 있는 방법을 검토한 결과, cell에 포함되어 있는 활성물질은 2-ME와 boiling에 의해 SDS-PAGE상에서 band의 위치가 달라지는 것으로 나타났다. Crude 시료에서는 너무 많은 band가 나타나 분석하고자 하는 band가 명확하게 확인되어지지 않지만, Bio-Gel P10 순화 이후의 시료에서는 명확하게 나타났다. 하지만 본 시험법은 정량적 분석이 어려워 Q. C 법으로는 부적합하다고 판단되었다.

마. 곤충 매개 바이러스의 특성 및 농가적용법 연구

(1) 바이러스 매개충의 보독충율 및 병 발생 모니터링 기술 개발

(가) 매개충의 보독충율 및 병 발생 모니터링

RSV 발병율과 벼 수량 간에는 논둑으로부터 거리에 따라 RSV의 발병율은 감소하고 그에 따라 벼의 수량은 증가하는 부의 상관관계가 있음이 확인되었다. 논둑 인근의 벼에서는 border effect가 존재하였으며 지역의 평균 발병율을 대표하는 값으로는 논둑에서 5 ~ 10번째 줄에서 발병율을 조사하는 것이 가장 바람직한 것으로 확인되었다.

(2) 충매 바이러스의 발병특성에 따른 약효 평가 기술 개발

(가) 병저항성 검정기술을 활용한 항바이러스 약효 검정

시험 약제의 처리 후 경과 일수에 따라 RSV 발병 억제효과는 모든 약제 처리구에서 유의적으로 나타났다. 즉, 이병경율에서 무처리구와 약제 처리구간에 유의적인 차이를 보였다. 특히 모든 약제 처리구에서 처리 후 5일 동안 Disease Index 값 30% 이내의 RSV 저항성을 나타냈다. 즉, 약제 처리 후 5일 간은 RSV에 대해 저항성(약효)이 지속됨이 확인되었다.

(나) 약리반응속도론 모델을 적용한 항바이러스성 약효 검정 기술 개발

매개충에 시험 약제를 분무처리하고 유묘 검정을 수행하여 시간 경과에 따른 RSV 발병율을 조사한 결과, $f(x)=a(1-\exp(-bx))^c$ 의 회귀곡선식이 얻어졌고 RSV에 대한 항바이러스 효과가 정량적인 값으로 산출되었다. 무처리구에서 F value 1(기준 값), $MVIT_{50}$ 이 1시간, MAT(Mean Antiviral Time)는 0인데 대비하여 KNF2016 70% AS (제품)처리구는 F value 0.71, MAT 4.75 (hrs), KNF2016-B 는 F value 0.70, MAT 4.55 (hrs)로, 두 약제 모두 무처리 대비 유의적인 항바이러스 약효를 나타냈다. 그러나 두 약제 간에 유의적인 약효의 차이는 보이지 않았다. 벼 시험 유묘에 시험 약제를 1회 처리하고 애벌레 보독충에는 약제 처리를 하지 않고 집종하였을 때 1회 처리에 따른 약효 지속 기간도 산출이 가능하였는데, KNF2016 70% AS (제품)은 13.4 일로 나타났다.

(3) 활성물질의 적용스펙트럼 확보 및 농가적용법 연구

(가) 시험 약제의 CMV에 대한 항바이러스 약효 검정을 위한 약리반응속도론 모델의 적용

진딧물 개체마다 시험 유묘에 연속 접종시 시간에 따른 일관된 발병을 저하가 관찰되지 않았기 때문에 약리반응속도론으로 약효를 정량화할 수 없었고, 다만 무처리 대비 발병율의 차이로 항바이러스 효과를 추정할 수 있었으나 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다. 따라서 약리반응속도론 모델을 이용한 식물바이러스병에 대한 시험 약제의 항바이러스 약효 평가는 RSV의 경우와 같이 영속성바이러스에 대한 검정에 유효하였으나, 비영속성바이러스에 대해서는 접종 방법 등 향후 추가적인 기술의 개발이 요구된다.

(나) RSV에 대한 시험 약제의 농가적용법 연구

KNF2016 70% AS (제품)에 대한 최적화된 처리 방법을 시험하고자 RSV를 대상으로 서산과 양평의 논에서 포장시험을 수행하였다. 서산에서는 무처리구에서 발병율이 낮아(1.0% 이하) 평가가 곤란하였으나 양평에서는, 이앙 1주일 전 논둑에 약제 처리 시 무처리구 이병주율(8.9%) 대비 KNF2016 70% AS (제품) 처리구 5.6%, KNF2016-B 처리구 4.4%, 대조 화학농약 처리구 5.5%로 낮은 이병주율을 보여 각각 37.5%, 50.2%, 37.8%의 방제율을 나타냈다. 본 시험에서 무처리구 발병율이 낮았기 때문에 약효 평가 등에 적절하지 못하였다. 야외 기상 및 생태 조건에 따라 매년 매개충의 발생 및 발병 조건이 달라지기 때문에 약제 처리구에서 방제율도 낮게 평가되었다. 그럼에도 불구하고 KNF2016 70% AS (제품)은 화학농약처리구와 더불어 유의적인 RSV 발병 억제 효과가 확인됨에 따라 심화 연구가 요구된다.

3. KNF2016의 안전성 평가

가. KNF2016 원제에 대한 안전성평가

(1) SD계 랫드에 대한 급성경구독성시험

KNF2016 원제의 급성경구독성시험을 위하여 농약관리법 농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제2010-29호, 2010년 10월 13일)을 이용하여 투여량을 1,250, 2,500, 5,000mg/kg B.W로 설정하여 투여한 결과 치사개체가 관찰되지 않았고, 투여에 의한 이상증상 관찰 개체가 없었으며, 체중증감 및 부검소견 결과에서도 특이할 만한 이상소견이 관찰되지 않아 KNF2016 원제에 대한 반수치사량(LD₅₀)은 5,000mg/kg B.W. 이상으로 판단된다.

(2) SD계 랫드에 대한 급성경피독성시험

KNF2016 원제의 급성경피독성시험을 위하여 농약관리법 농약의 등록기준(농촌진

홍청 고시 제2010-29호, 2010년 10월 13일)을 이용하여 투여량을 1,000, 2,000, 4,000mg/kg B.W로 설정하여 투여한 결과 치사개체 및 이상소견 관찰 개체가 없었으며 체중증감 및 부검소견 결과에서도 특이할 만한 이상소견이 관찰되지 않아 KNF2016 원제에 대한 반수치사량 (LD₅₀)은 2,000mg/kg B.W. 이상으로 판단된다.

(3) New Zealand White계 토끼에 대한 피부자극성시험

KNF2016 원제의 토끼에 대한 피부자극 정도를 알아보기 위하여 농약관리법 농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제2010-29호, 2010년 10월 13일)을 이용하여 New Zealand White계 토끼에 KNF2016 0.5ml을 노출하여 노출 후 4시간, 24시간, 48시간, 72시간동안 피부자극지수를 관찰한 결과 전 관찰시간에서 피부 발적 및 부종이 관찰되지 않았다. 따라서 KNF2016 원제는 Non irritative material로 판명되었다.

(4) New Zealand White계 토끼에 대한 안점막자극성시험

KNF2016 원제의 토끼에 대한 안점막자극 정도를 알아보기 위하여 농약관리법 농약의 등록기준 (농촌진흥청 고시 제2010-29호, 2010년 10월 13일)을 이용하여 New Zealand White계 토끼에 KNF2016 0.1ml을 노출하여 노출 후 4시간, 24시간, 48시간, 72시간 동안 안점막자극지수를 관찰한 결과 노출 후 72시간까지 결막에 부종, 발적 및 배출물이 관찰되지 않았다. 따라서 KNF2016 원제는 Non irritative material로 판명되었다.

(5) 기니 퓌에 대한 피부감작성시험

KNF2016 원제의 기니 퓌에 대한 피부감작성 정도를 평가하고자 농약관리법 농약의 등록기준 (농촌진흥청 고시 제2010-29호, 2010년 10월 13일)을 이용하여 Hartley계 guinea pig에 피부감작성 시험법 중 Non adjuvant method인 Buehler test를 실시한 결과 시험에 이용한 Hartley계 guinea pig 전 개체에서 감각이 관찰되지 않았다. 따라서 KNF2016 원제는 감각유발물질이 아닌 것으로 판명되었다.

(6) 미생물복귀 돌연변이시험

KNF2016 원제의 미생물복귀 돌연변이 시험을 통한 돌연변이 유발성의 유무를 검색하기 위해 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 균주 TA100, TA1535, TA98 및 TA1537의 4개의 균주와 *Escherichia coli*의 트립토판 요구성 균주인 WP2uvrA를 이용하여 시험한 결과 TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 WP2uvrA의

5 균주를 사용한 직접법 (S9-)과 대사활성화법(S9+) 모두에서 음성 대조군에 비하여 각 농도별 처리군에서의 콜로니 생성 수치는 증가 양상을 나타내지 않았다. 따라서 시험물질 KNF2016 원제는 본 시험 조건하에 사용한 균주들에 대하여 복귀 돌연변이를 유발하지 않는 것(음성)으로 판단된다.

(7) 소핵시험

KNF2016 원제의 유전독성을 평가하기 위하여 ICR계 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 7주령의 ICR계 마우스를 순화시킨 후 시험물질을 0, 500, 1,000 및 2,000mg/kg의 농도로 각각의 농도에 대하여 6마리에 단회 경구 투여하였으며, 투여 후 약 24시간에 골수세포를 수집하여 소핵유발과 세포독성을 평가하였다. 개체당 2,000개의 다염성 적혈구(Polychromatic Erythrocyte, PCE) 중에 나타나는 소핵을 가진 다염성 적혈구 (Micronucleated Polychromatic Erythrocyte, NPCE)의 수를 계수한 결과 시험물질을 투여한 모든 투여군에서 음성 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가는 나타나지 않았으며, 전체 적혈구 중 다염성 적혈구의 비율도 시험물질을 투여한 모든 군에서 음성 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 따라서 시험물질 KNF2016 원제는 ICR계 마우스의 골수세포에서 소핵을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

(8) 염색체이상시험

KNF2016 원제의 염색체이상 유발여부를 평가하기 위하여 Chinese hamster 유래의 Lung Cell(CHL)을 이용하여 직접법(-S9 Mix)과 대사활성화법 (+S9 Mix)의 염색체이상 시험을 실시하였다. 시험물질은 증류수에 희석하는 방식으로 조제하였다. 시험물질의 투여농도는 세포 증식의 약 50% 억제를 기준으로 결정하는 것으로, 시험물질의 최고농도는 직접법과 대사활성화법에 따라 각각의 농도를 설정하였다. 시험물질 KNF2016 원제는 CHL 세포의 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

(9) 반복투여독성시험(rat)

KNF2016 원제의 90-day Dose Range Fin특정 Toxicity Study 및 만성독성시험 투여약량 설정을 위하여 SD계 rat에 대하여 28일 반복투여 독성시험을 수행한 결과 NOEAL(No Observed Adverse Effect Level : 무영향 약량) 1,000mg/kg/day로 산출되었다. 90일 반복투여 독성시험을 수행한 결과 NOEAL(No Observed Adverse Effect Level : 무영향 약량) 1,000mg/kg/day로 산출되었다.

(10) 물벼룩(*Daphnia magna*)에 대한 급성유영저해시험

KNF2016 원제의 물벼룩(*Daphnia magna*)에 대한 급성유영저해 시험을 48시간 동안 지수식으로 실시하여 일반증상 및 치사율을 관찰, 조사하였다. 시험의 결과는 시험물질 노출 후 24시간과 48시간의 반수영향농도(EC₅₀)이 > 100mg/L로 조사되었으며, NOEC는 ≥ 100mg/L로 판단되었다.

(11) 녹조류(*Pseudokirchneriella subcapitata*)에 대한 성장저해시험

KNF2016 원제의 녹조류(*Pseudokirchneriella subcapitata*)에 대한 성장저해 시험을 72시간 동안 실시하여 성장저해율을 관찰, 조사하였다. 시험의 결과는 72시간의 반수영향농도(EC₅₀)가 > 100mg/L로 조사되었으며, NOEC는 ≥100mg/L로 판단되었다.

(12) 잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 급성어독성시험

KNF2016 원제의 잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 급성어독성시험을 96시간 동안 지수식으로 실시하여 일반증상 및 치사율을 관찰, 조사하였다. 시험농도는 100mg/L(nominal concentration)로 하여 본시험을 실시하였다. 시험의 결과는 시험물질 노출 후 48시간과 96시간의 반수영향농도(LC₅₀)이 > 100mg/L로 조사되었으며, NOEC는 ≥ 100mg/L로 판단하였다.

(13) 꿀벌(*Apis mellifera*)에 대한 급성섭식독성시험

KNF2016 원제의 꿀벌(*Apis mellifera*)에 대한 급성섭식독성시험을 48시간 동안 실시하여 일반증상 및 치사율을 관찰, 조사하였다. 시험농도는 100µg a.i./bee(nominal concentration)로 하여 본시험을 실시하였다. 시험의 결과는 시험물질 노출 후 24시간과 48시간의 반수치사량(LD₅₀)이 > 100µg a.i./bee로 조사되었으며, NOEAL는 ≥ 100 µg a.i./bee로 판단되었다.

(14) 꿀벌(*Apis mellifera*)에 대한 급성접촉독성시험

KNF2016 원제의 꿀벌(*Apis mellifera*)에 대한 급성접촉독성시험을 48시간 동안 실시하여 일반증상 및 치사율을 관찰, 조사하였다. 시험농도는 100µg a.i./bee(nominal concentration)로 하여 본시험을 실시하였다. 시험의 결과는 시험물질 노출 후 24시간과 48시간의 반수치사량(LD₅₀)이 > 100µg a.i./bee로 조사되었다.

나. KNF2016 70% AS (제품)에 대한 안전성평가

(1) ICR계 마우스에 대한 급성경구독성시험

KNF2016 70% AS (제품)의 급성경구독성시험을 위하여 농약관리법 농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제2010-29호, 2010년 10월 13일)을 이용하여 투여량을 5,000mg/kg B.W로 설정하여 투여한 결과 치사개체가 관찰되지 않았고, 투여에 의한 이상증상 관찰 개체가 없었으며, 체중증감 및 부검소견 결과에서도 특이할 만한 이상소견이 관찰되지 않아 KNF2016 70% AS에 대한 반수치사량(LD₅₀)은 5,000mg/kg B.W. 이상으로 판단되었다.

(2) SD계 랫드에 대한 급성경피독성시험

KNF2016 70% AS (제품)의 급성경피독성시험을 위하여 농약관리법 농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제2010-29호, 2010년 10월 13일)을 이용하여 투여량을 4,000mg/kg B.W로 설정하여 투여한 결과 치사 및 이상소견 관찰 개체가 없었으며 체중증감 및 부검소견결과에서도 특이할 만한 이상소견이 관찰되지 않아 KNF2016 70% AS에 대한 반수치사량(LD₅₀)은 4,000mg/kg B.W. 이상으로 판단되었다.

(3) New Zealand White계 토끼에 대한 피부자극성시험

KNF2016 70% AS (제품)의 토끼에 대한 피부자극 정도를 알아보하고자 농약관리법 농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제2010-29호, 2010년 10월 13일)을 이용하여 New Zealand White계 토끼에 KNF2016 70% AS 0.5ml을 노출하여 노출 후 4시간, 24시간, 48시간, 72시간 동안 피부자극지수를 관찰한 결과 mild irritative material로 판명되었다.

(4) New Zealand White계 토끼에 대한 안점막자극성시험

KNF2016 70% AS (제품)의 토끼에 대한 안점막자극 정도를 알아보하고자 농약관리법 농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제2010-29호, 2010년 10월 13일)을 이용하여 New Zealand White계 토끼에 KNF2016 70% AS 0.1ml을 노출하여 노출 후 4시간, 24시간, 48시간, 72시간 동안 안점막자극지수를 관찰한 결과 mild irritative material로 판명되었다.

(5) 기니 픽에 대한 피부감작성시험

KNF2016 70% AS (제품)의 기니 픽에 대한 피부감작성 정도를 평가하고자 농약관

리법 농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제2010-29호, 2010년 10월 13일)을 이용하여 Hartley계 guinea pig에 피부감작성시험법 중 Non adjuvant method인 Buehler test를 실시한 결과 시험에 이용한 Hartley계 guinea pig 전개체에서 감작이 관찰되지 않았다. 따라서 KNF2016 70% AS는 감작유발물질이 아닌 것으로 판명되었다.

(6) 잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 급성어독성시험

KNF2016 70% AS (제품)의 잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 급성어독성시험을 96시간 동안 지수식으로 실시하여 일반증상 및 치사율을 관찰, 조사하였다. 시험농도는 10mg/L(nominal concentration)로 하여 본시험을 실시하였다. 시험의 결과는 시험물질 노출 후 48시간과 96시간의 반수영향농도(LC₅₀)이 > 10mg/L로 조사되었으며, NOEC는 ≥ 10mg/L로 판명되었다.

(7) 물벼룩(*Daphnia magna*)에 대한 급성유영저해시험

KNF2016 70% AS (제품)의 물벼룩(*Daphnia magna*)에 대한 급성유영저해 시험을 48시간 동안 지수식으로 실시하여 일반증상 및 치사율을 관찰, 조사하였다. 시험의 결과는 시험물질 노출 후 24시간의 반수영향농도(EC₅₀)는 32.0mg/L로 조사되었으며, 48시간의 반수영향농도(EC₅₀)는 13.6mg/L로 판명되었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 동물바이러스 방제제 개발의 필요성

본 연구 과제는 식물바이러스 방제제의 산업화에 초점이 맞추어져 있고, 그에 맞춰 대부분의 연구들이 식물바이러스에 대해 진행되어있다. 하지만 최근 문제시되고 있으며, 경제적, 산업적으로 큰 반향을 일으키고 있는 것은 구제역과 같은 동물바이러스 분야이다. 바이러스의 구조는 대부분 핵산과 이를 둘러싸고 있는 단백질 외피 혹은 지질 외피로 구성되어 있고, 식물바이러스와 동물바이러스도 구조적으로 큰 차이가 없다. 따라서 식물바이러스에 대해 약효가 인정된 *Pseudomonas oleovorans* KCTC10159BP 배양 추출물을 동물바이러스에 대한 약효 검토가 추가적으로 이루어져야 할 것으로 판단된다.

이를 위해서는 대상 바이러스에 대한 약효 평가시스템의 구비가 필요하며, 이러한 과정을 통해 동물바이러스에서도 효과가 나타난다면, 한번 발생하면 폐농 혹은 축산시스템의 붕괴까지도 이를 수 있는 동물바이러스 분야까지도 시장을 넓힐 수 있는 계기가 될 수 있을 것이라 판단된다.

2. 액상제형화 기술의 기타 제품 적용

본 연구 과제를 수행하면서 확립된 액상제형화 기술을 통해 미생물 발효 배양산물의 산업화에 대한 경제성을 식물바이러스 방제제 뿐만 아니라 기타 친환경자재에도 적용하여 경제성을 확보한다면 보다 저렴하고도 우수한 품질의 제품을 시장에 공급할 수 있을 것으로 판단된다.

3. 천연식물보호제 안전성 평가

본 연구 과제에서 수행된 안전성 평가 시험은 아직까지 이러한 형태의 생화학 농약이 등록된 사례가 없기 때문에 본 연구 과제를 통해 획득한 안전성 평가 시험 데이터 및 분석 기법을 통해 향후 개발될 다른 천연식물보호제에도 적용 가능할 것으로 판단된다.

SUMMARY

Optimized industrial culture compositions for *Pseudomonas oleovorans* KCTC10159BP (referred to below as KNF2016) was selected as follows (Yeast extract 2%, KH₂PO₄ 0.5%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.02%, MnSO₄·5H₂O 0.05%). Mass culture process was established from 5L jar fermenter to 5,000L pilot fermenter. 5,000L pilot sample showed antiviral effect more than 90% at dilution rate 1/500. KNF2016 technical kept stable antiviral activity at temperature range 60 ~ 100°C and aging test(54°C). Post processing for liquid type formulation was established in order to ensure economic feasibility and effectiveness. Adjuvant for extension of shelf life was selected through the establishment of more reliable and accurate bioassay. Control values of liquid type formulation product (KNF2016 70%AS) were 94.6% and 90.9% at dilution rate of 1/500 and 1/1,000, respectively.

RT₂₅ values of KNF2016 technical at standard application were <1 day against honeybee, <1 hour against bumblebee, and <1 day against ladybug.

Compatibilities of KNF2016 technical were evaluated with 29 insecticides for horticulture on 5 crops and 91 fungicides for horticulture on 8 crops.

KNF2016 70% AS showed good efficacy against TYLCV and CGMMV in 2 year field trials for registration. These results suggested KNF2016 70% AS has a practical value for control of TYLCV and CGMMV.

As a result of separation by using techniques based on solubility and molecular weight, active materials showing antiviral activity were confirmed as three different proteins having molecular weight of 51KDa, 45KDa, and 40KDa, respectively. N-terminal sequences of No. 2 and 3 band at SDS-PAGE were identified as Asp - Ile - Asn - Gly - Gly. Amino acid compositions of No. 2 band were Glycine (19.46%), Phenylalanine (16.45%), and Threonine (8.53%).

Through antiviral activity assay against 641 mutants by random mutagenesis, 7 mutant clones (4C1, 4C2, 4F3, 4F5, 4H11, 5B7, 5C7) were selected due to decreased antiviral activity and their knock-out gene sequences were analyzed.

Since production yield of antiviral material was increased in partly proportion to cell number, fatty acids increased by cell growth were analyzed by GC/MS as index

material. Oleic acid (C18:1) was identified as index material and its content was 18.7 μ g/ml. Another approach for quality control was to measure protein band intensity at SDS-PAGE, but this method was not suitable due to difficulty of quantitative analysis.

Rice yield was increased as RSV disease rate was decreased. Suppression effect of test materials against RSV pathogenesis in paddy field was significantly different according to day after treatment. Especially, resistance against RSV was maintained during 5 days after treatment. Antiviral effect against RSV was quantitatively evaluated by using technique of spray application at insect vector and seedling bioassay. Both test materials showed significantly different antiviral efficacies. Residual effect by single application of KNF2016 70% AS was maintained for 13.4 days.

In case of aphid, consistency of pathogenesis rate by inoculation time was not measured and its efficacy could not be evaluated quantitatively by pharmacological reaction kinetics model. therefore, additional technical development is required for evaluation of antiviral effect against non-persistent virus. In order to examine the optimized application method, paddy field trials against RSV were performed in Seo-san and Yang-pyeong. But these trials were not suitable for evaluation of efficacy due to too low pathogenesis rate at untreated plot. Nevertheless, as suppression effect against RSV pathogenesis was observed at KNF2016 70% AS treatment plot, more studies are required. further studies are required for establishment of application method against RSV.

In acute toxicity studies, KNF2016 technical showed low oral and dermal toxicity. KNF2016 technical was also classified as not irritant to skin and eye. It is not a skin sensitizer. Mutagenicity studies did not reveal any signs of toxicity. NOEL(No Observed Adverse Effect Level) in 28-day rat study was 1,000mg/kg/day and 90-day rat study is in progress. In acute toxicity studies to *Daphnia*, algae and fish, all NOEC were \geq 100mg/L. All LD₅₀ in acute oral and contact toxicity studies to honeybees were $>$ 100 μ g a.i./bee at 24H and 48H after application.

In acute toxicity studies, KNF2016 70%AS showed low oral and dermal toxicity. KNF2016 70%AS was also classified as mild irritant to skin and eye. It is not a skin sensitizer. In acute toxicity studies to carp, NOEC was \geq 10mg/L. EC₅₀ of KNF2016 70%AS in acute Immobilisation test to *Daphnia* were 32.0mg/L and 13.6mg/L at 24H and 48H after application, respectively.

CONTENTS

| | | |
|-----------|---|----|
| Chapter 1 | Outline of research development project | 43 |
| Chapter 2 | Current situation of related technology development | 48 |
| Chapter 3 | Result of research development | 50 |
| 1. | Process development for mass production of active materials and formulation | 50 |
| 가. | Optimization of a industrial culture medium and culture conditions | 50 |
| (1) | Officially announced strain | 50 |
| (2) | Change of culture compositions | 50 |
| (3) | Selection of inorganic salts | 50 |
| (4) | Culture optimization of 5L jar fermenter | 50 |
| (5) | Culture optimization of 500L pilot fermenter | 50 |
| (6) | Culture optimization of 5,000L pilot fermenter | 51 |
| (7) | Quality control of 5,000L pilot sample | 51 |
| 나. | Formulation selection suitable for post processing | 51 |
| (1) | Studies for characteristics of KNF2016 technical | 51 |
| (가) | Heat stability test | 51 |
| (나) | Aging test | 51 |
| (다) | Co-formulant selection test | 51 |
| (2) | Post processing development and optimization | 51 |
| (가) | Development of post processing for liquid type formulation | 51 |
| (나) | Process examination for sterilization | 52 |
| (다) | Process examination for concentration of culture medium | 52 |
| (라) | Optimization for post processing | 52 |

| | |
|--|----|
| (3) Formulation studies | 52 |
| (가) Establishment of bioassay | 52 |
| (나) Selection of adjuvant for extension of shelf life | 52 |
| (다) Aging test for selected adjuvant | 53 |
| 다. Production of trial product | 53 |
| (1) Technical production for field trial and stability test | 53 |
| (2) Production of trial product and stability analysis | 53 |
| (가) Culture for trial production | 53 |
| (나) Bioassay of liquid technical for trial production | 53 |
| (다) Formulation recipe for trial production | 53 |
| (라) Aging test for trial product | 53 |
| 라. Risk assessment on beneficial insects | 54 |
| (1) Risk assessment on honeybee | 54 |
| (2) Risk assessment on bumblebee | 54 |
| (3) Risk assessment on ladybug | 54 |
| 마. Evaluation of influence by chemical pesticides | 54 |
| (1) Compatibility test with chemical pesticides | 54 |
| (가) Compatibility test with insecticides for horticulture | 54 |
| (나) Compatibility test with fungicides for horticulture | 54 |
| (2) Evaluation of influence on efficacy with chemical pesticides | 55 |
| 바. Field trials | 55 |
| (1) TYLCV | 55 |
| (2) CGMMV | 55 |
| 사. Registration test | 55 |
| (1) First year field trial | 55 |
| (가) TYLCV | 55 |
| (나) CGMMV | 55 |

| | |
|--|----|
| (2) Second year field trial | 56 |
| (가) TYLCV | 56 |
| (나) CGMMV | 56 |
| 2. Mass purification of active materials and investigation of active genes | 57 |
| 가. Scheme establishment of extract fractionation based on bioassay for commercialization | 57 |
| (1) Culture of antiviral microorganisms | 57 |
| (가) Culture medium | 57 |
| (나) Culture conditions | 57 |
| (2) Purification of antiviral materials | 57 |
| (가) Extraction of antiviral materials | 57 |
| (나) Separation of active materials according to solubility | 57 |
| (다) Separation of active materials according to molecular weight by using Bio-Gel P10 | 58 |
| (라) Separation of active materials according to molecular weight by using Bio-Gel P60 | 58 |
| 나. Characteristics analysis of antiviral materials | 58 |
| (1) Characteristics analysis of antiviral materials | 58 |
| (가) Amino acid sequence of antiviral materials | 58 |
| (나) Amino acid content of antiviral materials | 58 |
| 다. Investigation of active genes for active materials | 59 |
| (1) Construction of genomic DNA library of antiviral active strain | 59 |
| (가) Genomic DNA purification | 59 |
| (나) Construction of Fosmid library | 59 |
| (2) Investigation of genes for antiviral materials | 60 |
| (가) Investigation of genes encoding antiviral protein | 60 |
| (나) Investigation of active genes by using random mutation | 61 |

| | | |
|------|---|----|
| 라. | Establishment of test method for Quality Control | 62 |
| (1) | Examination of quality control method by using fatty acid analysis | 62 |
| (2) | Examination of quality control method by using SDS-PAGE | 63 |
| 마. | Studies for characteristics of virus transmitted by insects and field application method | 63 |
| (1) | Rate of viruliferous insects and monitoring method for disease outbreak | 63 |
| (가) | Rate of viruliferous insects and monitoring method for disease outbreak .. | 63 |
| (2) | Evaluation of efficacy according to pathogenesis of virus transmitted by insects | 63 |
| (가) | Antiviral bioassay by using assay technique based on disease resistance | 64 |
| (나) | Antiviral bioassay by using pharmacological reaction kinetics model | 65 |
| (3) | Application spectrum of active materials and field application method | 66 |
| (가) | Application of pharmacological reaction kinetics model for antiviral bioassay against CMV | 67 |
| (나) | Field application method for control of RSV | 67 |
| 3. | Hazard assessment of KNF2016 | 68 |
| 가. | Hazard assessment of KNF2016 technical | 68 |
| (1) | Acute oral toxicity test | 68 |
| (2) | Acute dermal toxicity test | 68 |
| (3) | Skin irritation test | 68 |
| (4) | Eye irritation test | 69 |
| (5) | Skin sensitization test | 69 |
| (6) | Bacterial reverse mutation assay | 69 |
| (7) | Micronucleus test | 70 |
| (8) | Chromosome aberration test | 70 |
| (9) | 4-week subchronic oral test | 71 |
| (10) | Acute Immobilisation test to <i>Daphnia magna</i> | 72 |
| (11) | Growth inhibition test to alga(<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>) | 72 |
| (12) | Acute fish toxicity test to common carp(<i>Cyprinus carpio</i>) | 72 |
| (13) | Acute oral toxicity test to Honeybees(<i>Apis mellifera</i>) | 72 |

| | |
|---|-----|
| (14) Acute contact toxicity test to Honeybees(<i>Apis mellifera</i>) | 72 |
| 나. Hazard assessment of KNF2016 Product (70% AS) | 73 |
| (1) Acute oral toxicity test | 73 |
| (2) Acute dermal toxicity test | 73 |
| (3) Skin irritation test | 73 |
| (4) Eye irritation test | 73 |
| (5) Skin sensitization test | 73 |
| (6) Acute fish toxicity test to common carp(<i>Cyprinus carpio</i>) | 74 |
| (7) Acute Immobilisation test to <i>Daphnia magna</i> | 74 |
| Chapter 4 Level of achievement for objectives and contribution at related areas | 161 |
| Chapter 5 Accomplishment of research development and plan for utilization | 168 |
| Chapter 6 Collected scientific and technical information from abroad | 169 |
| Chapter 7 References | 172 |

목 차

| | | |
|-------|-------------------------------------|----|
| 제 1 장 | 연구개발과제의 개요 | 43 |
| 제 2 장 | 국내외 기술개발 현황 | 48 |
| 제 3 장 | 연구개발수행 내용 및 결과 | 50 |
| 제 1 절 | 연구개발수행 내용 | 50 |
| 1. | 활성물질의 대량생산 공정개발 및 제형화 | 50 |
| 가. | 산업용 배지 최적화 및 배양최적화 | 50 |
| (1) | 공시균주 | 50 |
| (2) | 배지 조성 변경 | 50 |
| (3) | 무기염 선발 | 50 |
| (4) | 5L jar fermenter 배양 최적화 | 50 |
| (5) | 500L pilot fermenter 배양 최적화 | 50 |
| (6) | 5,000L pilot fermenter 배양 최적화 | 51 |
| (7) | 5,000L pilot 생산시료의 Q. C | 51 |
| 나. | 후처리 공정별 가능 제형선발 | 51 |
| (1) | KNF2016 원제의 특성연구 | 51 |
| (가) | 열안전성 시험 | 51 |
| (나) | 경시안정성 시험 | 51 |
| (다) | 부제 선발 시험 | 51 |
| (2) | 후처리 공정 개발 및 최적화 | 51 |
| (가) | 액상제형용 후처리 공정 개발 | 51 |
| (나) | 균주사멸 공정 검토 | 52 |
| (다) | 배양액 농축 공정 검토 | 52 |
| (라) | 후처리 공정 최적화 | 52 |

| | |
|------------------------------|----|
| (3) 제제화 연구 | 52 |
| (가) 생물검정법 확립 | 52 |
| (나) 유효기간 연장용 부제 선발 | 52 |
| (다) 선발된 부제의 경시안정성 시험 | 53 |
| 다. 시제품 생산 | 53 |
| (1) 포장 및 안전성 시험용 원제생산 | 53 |
| (2) 시제품 생산 및 안정성 분석 | 53 |
| (가) 시제품 생산용 시료의 배양 | 53 |
| (나) 시제품 생산용 액상원제의 생물검정 | 53 |
| (다) 시제품 제조용 처방 | 53 |
| (라) 시제품의 경시안정성 | 54 |
| 라. 유용곤충에 대한 영향평가 | 54 |
| (1) 꿀벌에 대한 영향 평가 | 54 |
| (2) 서양뒤영벌에 대한 영향평가 | 54 |
| (3) 무당벌레에 대한 영향평가 | 54 |
| 마. 화학농약에 대한 영향평가 | 54 |
| (1) 화학농약과의 혼용성 평가 | 54 |
| (가) 원예용 살충제 혼용성 평가 | 54 |
| (나) 원예용 살균제 혼용성 평가 | 55 |
| (2) 혼용 약효 영향성 평가 | 55 |
| 바. 포장시험 검정 | 55 |
| (1) 토마토 황화잎말림병 | 55 |
| (2) 수박 얼룩모자이크병 | 55 |
| 사. 등록시험 | 55 |
| (1) 1년차 포장시험 | 55 |
| (가) 토마토 황화잎말림병 | 55 |
| (나) 수박 얼룩모자이크병 | 56 |

| | |
|--|----|
| (2) 2년차 포장시험 | 56 |
| (가) 토마토 황화잎말림병 | 56 |
| (나) 수박 얼룩모자이크병 | 57 |
| 2. 활성물질의 대량 순화 및 활성유전자 탐색 | 57 |
| 가. 대량 순화과정의 산업화를 위한 활성검정 기반 추출물 분획 scheme 확립 | 57 |
| (1) 항바이러스 미생물의 배양 | 57 |
| (가) 배지 | 57 |
| (나) 배양조건 | 57 |
| (2) 항바이러스 물질의 순화 | 57 |
| (가) 균체의 파쇄 및 항바이러스 물질 추출 | 57 |
| (나) 용해도에 따른 활성물질의 분리 | 58 |
| (다) Bio-Gel P10을 이용한 분자량에 따른 활성물질의 분리 | 58 |
| (라) Bio-Gel P60을 이용한 분자량에 따른 활성물질의 분리 | 58 |
| 나. 항바이러스 물질의 특성분석 | 58 |
| (1) 항바이러스 물질의 특성분석 | 58 |
| (가) 활성물질의 아미노산 서열 분석 | 58 |
| (나) 활성물질의 아미노산 조성 분석 | 59 |
| 다. 활성물질의 활성유전자 탐색 | 59 |
| (1) 항바이러스 활성 균주의 genomic DNA library 제작 | 59 |
| (가) Genomic DNA purification | 59 |
| (나) Fosmid library 제작 | 60 |
| (2) 항바이러스 활성물질의 유전자 탐색 | 60 |
| (가) Specific protein을 암호화하는 유전자 탐색 | 61 |
| (나) Random mutation을 통한 활성유전자 탐색 | 62 |
| 라. Quality Control을 위한 검정법 확립 | 62 |
| (1) 지방산 분석을 이용한 Q. C 법 검토 | 63 |
| (2) SDS-PAGE를 이용한 Q. C 법 검토 | 63 |

| | |
|---|----|
| 다. 곤충 매개 바이러스의 특성 및 농가적용법 연구 | 63 |
| (1) 바이러스 매개충의 보독충율 및 병 발생 모니터링 기술 개발 | 63 |
| (가) 매개충의 보독충율 및 병 발생 모니터링 | 63 |
| (2) 증매 바이러스의 발병특성에 따른 약효 평가 기술 개발 | 64 |
| (가) 병저항성 검정기술을 활용한 항바이러스 약효 검정 | 64 |
| (나) 약리반응속도론 모델을 적용한 항바이러스성 약효 검정 기술 개발 | 65 |
| (3) 활성물질의 적용스펙트럼 확보 및 농가적용법 연구 | 66 |
| (가) CMV에 대한 항바이러스 약효 검정을 위한 약리반응속도론 모델의 적용 | 67 |
| (나) RSV에 대한 농가적용법 연구 | 67 |
| 3. KNF2016의 안전성 평가 | 68 |
| 가. KNF2016 원제에 대한 안전성평가 | 68 |
| (1) SD계 랫드에 대한 급성경구독성시험 | 68 |
| (2) SD계 랫드에 대한 급성경피독성시험 | 68 |
| (3) New Zealand White계 토끼에 대한 피부자극성시험 | 68 |
| (4) New Zealand White계 토끼에 대한 안점막자극성시험 | 69 |
| (5) 기니 픽에 대한 피부감작성시험 | 69 |
| (6) 미생물복귀 돌연변이시험 | 69 |
| (7) 소핵시험 | 70 |
| (8) 염색체이상시험 | 70 |
| (9) 반복투여독성시험(rat) | 71 |
| (10) 물벼룩(<i>Daphnia magna</i>)에 대한 급성유영저해시험 | 72 |
| (11) 녹조류(<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)에 대한 성장저해시험 | 72 |
| (12) 잉어(<i>Cyprinus carpio</i>)에 대한 급성어독성시험 | 72 |
| (13) 꿀벌(<i>Apis mellifera</i>)에 대한 급성섭식독성시험 | 72 |
| (14) 꿀벌(<i>Apis mellifera</i>)에 대한 급성접촉독성시험 | 72 |
| 나. KNF2016 70% AS (제품)에 대한 안전성평가 | 73 |
| (1) ICR계 마우스에 대한 급성경구독성시험 | 73 |
| (2) SD계 랫드에 대한 급성경피독성시험 | 73 |
| (3) New Zealand White계 토끼에 대한 피부자극성시험 | 73 |

| | |
|--|----|
| (4) New Zealand White계 토끼에 대한 안점막자극성시험 | 73 |
| (5) 기니 피에 대한 피부감작성시험 | 73 |
| (6) 잉어(<i>Cyprinus carpio</i>)에 대한 급성어독성시험 | 74 |
| (7) 물벼룩(<i>Daphnia magna</i>)에 대한 급성유영저해시험 | 74 |
| 제 2 절 연구개발 결과 | 75 |
| 1. 활성물질의 대량생산 공정개발 및 제형화 | 75 |
| 가. 산업용 배지 최적화 및 배양최적화 | 75 |
| (1) 배지 조성 변경 | 75 |
| (2) 무기염 선발 | 75 |
| (3) 5L jar fermenter 배양 최적화 | 76 |
| (4) 500L pilot fermenter 배양 최적화 | 78 |
| (5) 5,000L pilot fermenter 배양 최적화 | 79 |
| (6) 5,000L pilot 생산시료의 Q. C | 80 |
| 나. 후처리 공정별 가능 제형선발 | 80 |
| (1) KNF2016 원제의 특성연구 | 80 |
| (가) 열안정성 시험 | 80 |
| (나) 경시안정성 시험 | 81 |
| (다) 부제 선발 시험 | 82 |
| (2) 후처리 공정 개발 및 최적화 | 82 |
| (가) 액상제형용 후처리 공정 개발 | 82 |
| (나) 균주사멸 공정 검토 | 83 |
| (다) 배양액 농축 공정 검토 | 84 |
| (라) 후처리 공정 최적화 | 85 |
| (3) 제제화 연구 | 86 |
| (가) 생물검정법 확립 | 86 |
| (나) 유효기간 연장용 부제 선발 | 88 |
| (다) 선발된 부제의 경시안정성 시험 | 89 |

| | |
|------------------------------|-----|
| 다. 시제품 생산 | 90 |
| (1) 포장 및 안전성 시험용 원제생산 | 90 |
| (2) 시제품 생산 및 안정성 분석 | 91 |
| (가) 시제품 생산용 시료의 배양 | 91 |
| (나) 시제품 생산용 액상원제의 생물검정 | 91 |
| (다) 시제품 제조용 처방 | 92 |
| (라) 시제품의 경시안정성 | 93 |
| 라. 유용곤충에 대한 영향평가 | 94 |
| (1) 꿀벌에 대한 영향 평가 | 94 |
| (2) 서양뒤영벌에 대한 영향평가 | 96 |
| (3) 무당벌레에 대한 영향평가 | 98 |
| 마. 화학농약에 대한 영향평가 | 101 |
| (1) 화학농약과의 혼용성 평가 | 101 |
| (가) 원예용 살충제 혼용성 평가 | 101 |
| (나) 원예용 살균제 혼용성 평가 | 102 |
| (2) 혼용 약효 영향성 평가 | 103 |
| 바. 포장시험 검정 | 106 |
| (1) 토마토 황화잎말림병 | 106 |
| (2) 수박 얼룩모자이크병 | 107 |
| 사. 등록시험 | 108 |
| (1) 1년차 포장시험 | 108 |
| (가) 토마토 황화잎말림병 | 108 |
| (나) 수박 얼룩모자이크병 | 109 |
| (2) 2년차 포장시험 | 110 |
| (가) 토마토 황화잎말림병 | 110 |
| (나) 수박 얼룩모자이크병 | 111 |

| | |
|--|-----|
| 2. 활성물질의 대량 순화 및 활성유전자 탐색 | 113 |
| 가. 대량 순화과정의 산업화를 위한 활성검정 기반 추출물 분획 scheme 확립 | 113 |
| (1) 용해도에 따른 활성물질의 분리 | 113 |
| (2) 분자량에 따른 활성물질의 분리 | 113 |
| 나. 항바이러스 활성물질의 특성분석 | 117 |
| (1) 활성물질의 아미노산 서열 분석 | 117 |
| (2) 활성물질의 아미노산 조성 분석 | 118 |
| 다. 항바이러스 활성물질의 유전자 탐색 | 119 |
| (1) Specific protein을 암호화하는 유전자의 탐색 | 119 |
| (2) Random mutagenesis를 이용한 유전자의 탐색 | 121 |
| 라. Quality Control을 위한 검정법 확립 | 123 |
| (1) 지방산 분석을 이용한 Q. C 법 검토 | 123 |
| (2) SDS-PAGE를 이용한 Q. C 법 검토 | 124 |
| 마. 곤충 매개 바이러스의 특성 및 농가적용법 연구 | 125 |
| (1) 바이러스 매개충의 보독충율 및 병 발생 모니터링 기술 개발 | 125 |
| (가) 매개충의 보독충율 및 병 발생 모니터링 | 125 |
| (2) 충매 바이러스의 발병특성에 따른 약효 평가 기술 개발 | 127 |
| (가) 병저항성 검정기술을 활용한 항바이러스 약효 검정 | 127 |
| (나) 약리반응속도론 모델을 적용한 항바이러스성 약효 검정 기술 개발 | 131 |
| (3) 활성물질의 적용스펙트럼 확보 및 농가적용법 연구 | 134 |
| (가) CMV에 대한 항바이러스 약효 검정을 위한 약리반응속도론 모델의 적용 | 134 |
| (나) RSV에 대한 농가적용법 연구 | 135 |
| 3. KNF2016의 안전성 평가 | 137 |
| 가. KNF2016 원제에 대한 안전성평가 | 137 |
| (1) SD계 랫드에 대한 급성경구독성시험 | 137 |
| (2) SD계 랫드에 대한 급성경피독성시험 | 137 |

| | |
|---|-----|
| (3) New Zealand White계 토끼에 대한 피부자극성시험 | 138 |
| (4) New Zealand White계 토끼에 대한 안점막자극성시험 | 139 |
| (5) 기니 피에 대한 피부감작성시험 | 141 |
| (6) 미생물복귀 돌연변이시험 | 142 |
| (7) 소핵시험 | 146 |
| (8) 염색체이상시험 | 148 |
| (9) 반복투여독성시험(rat) | 149 |
| (10) 물벼룩(<i>Daphnia magna</i>)에 대한 급성유영저해시험 | 154 |
| (11) 녹조류(<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)에 대한 성장저해시험 | 155 |
| (12) 잉어(<i>Cyprinus carpio</i>)에 대한 급성어독성시험 | 155 |
| (13) 꿀벌(<i>Apis mellifera</i>)에 대한 급성섭식독성시험 | 156 |
| (14) 꿀벌(<i>Apis mellifera</i>)에 대한 급성접촉독성시험 | 156 |
| 나. KNF2016 70% AS (제품)에 대한 안전성평가 | 156 |
| (1) ICR계 마우스에 대한 급성경구독성시험 | 156 |
| (2) SD계 랫드에 대한 급성경피독성시험 | 157 |
| (3) New Zealand White계 토끼에 대한 피부자극성시험 | 157 |
| (4) New Zealand White계 토끼에 대한 안점막자극성시험 | 158 |
| (5) 기니 피에 대한 피부감작성시험 | 159 |
| (6) 잉어(<i>Cyprinus carpio</i>)에 대한 급성어독성시험 | 159 |
| (7) 물벼룩(<i>Daphnia magna</i>)에 대한 급성유영저해시험 | 159 |
| 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 | 161 |
| 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 | 168 |
| 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 | 169 |
| 제 7 장 참고문헌 | 172 |

제 1 장 연구개발과제의 개요

식물바이러스는 현재 유기합성농약으로는 방제가 불가능한 미개척 영역으로 알려져 있다. 식물바이러스는 주로 채소류에서 가장 큰 문제가 되고 있으며, 우리나라와 같이 고품질 단일품종의 대규모 시설재배가 이루어지는 작목반 작형 구조에서 더욱더 심각하다. 특히 기후변화에 따른 작물 재배한계선의 북상, 외래 작물 도입 등과 함께 식물바이러스의 50%를 매개하는 해충도 함께 유입되고 있으며, 최근 가계소득 증진에 따른 해외여행 증가, 해외농산물 교역량 증가와 함께 신규 바이러스병의 도입 및 급속한 확산이 이루어지고 있다. 그리고 친환경 농업 육성책과 함께 화학농약 사용량 감소 추세로 인해 매개충 방제가 적기에 이루어지지 않고, 주변국에서의 화학농약 사용 패턴에 따른 약제저항성 매개충의 비래와 함께 복합적인 문제양상을 띠고 있는 게 식물바이러스병의 현실이다.

전통적으로 전염원의 회피·제거, 매개충의 회피·구제, 저항성 품종 재배를 권장하고 있지만 실제 농가에서는 이러한 방법으로는 식물바이러스병을 방제하지 못해 속수무책인 경우가 허다하다. 특히 식물바이러스의 구조적 단순함으로 인해 자연적 변이주의 발생율이 높아 저항성 품종도 그리 오래가지 못하며, 식물바이러스에 대한 기본적 특성에 대한 농민 교육 등도 부족하여 실제 현장에서는 농민이 스스로 바이러스의 매개체가 되는 경우도 많다.

이러한 문제를 해결하고자 많은 연구자들이 오래전부터 다양한 물질들을 이용하여 식물바이러스 방제제를 개발하고자 하였으나 다양한 요인들로 인해 산업화된 사례는 전무한 실정이다. 특히 바이러스가 센트럴 도그마라는 생물체 고유의 유전정보 흐름의 양식을 따라 증식되는 특성을 갖고 있어, 치료할 수 있는 약제를 선별하더라도 위해성평가 분야에서 심각한 문제를 노출하던지, 식물체 추출물의 대량산업화 문제 등을 해결하지 못해 산업화되지 못한 것으로 알려져 있다.

본 연구 과제에서는 방제방법이 전무한 식물바이러스병의 방제를 위해 기 개발되어진 *Pseudomonas oleovorans* KCTC10159BP 균주의 활성물질을 경제성이 확보된 제품으로 개발하기 위한 산업화 공정 개발을 실시함과 동시에 아직까지 명확하게 밝혀져 있지 않은 항바이러스 활성물질의 분리 및 구조 동정을 실시하고, 관련 유전자의 탐색도 진행하였다. 또한 항바이러스 활성물질의 농가 적용을 위한 바이러스 모니터리 시스템 구축과 함께 총매 전염성 바이러스에 대한 약효평가 모델의 구축도 시도하였다. 또한 식물바이러스 방제제의 산업화에 가장 큰 걸림돌이 되고 있는 위해성 평가부분도 GLP 수준에서 검토하여 항바이러스 활성물질을 이용한 생화학 농약의 등록을 위한 자료로도 활용하고자 하였다.

본 연구개발과제의 연구범위는 다음과 같다.

1. 활성물질의 대량생산 공정개발 및 제형화

가. 산업용 배지 최적화 및 배양최적화

- (1) 공시균주
- (2) 배지 조성 변경
- (3) 무기염 선발
- (4) 5L jar fermenter 배양 최적화
- (5) 500L pilot fermenter 배양 최적화
- (6) 5,000L pilot fermenter 배양 최적화
- (7) 5,000L pilot 생산시료의 Q. C

나. 후처리 공정별 가능 제형선발

- (1) KNF2016 원제의 특성연구
 - (가) 열안전성 시험
 - (나) 경시안정성 시험
 - (다) 부제 선발 시험
- (2) 후처리 공정 개발 및 최적화
 - (가) 액상제형용 후처리 공정 개발
 - (나) 균주사멸 공정 검토
 - (다) 배양액 농축 공정 검토
 - (라) 후처리 공정 최적화
- (3) 제제화 연구
 - (가) 생물검정법 확립
 - (나) 유효기간 연장용 부제 선발
 - (다) 선발된 부제의 경시안정성 시험

다. 시제품 생산

- (1) 포장 및 안전성 시험용 원제생산
- (2) 시제품 생산 및 안정성 분석
 - (가) 시제품 생산용 시료의 배양
 - (나) 시제품 생산용 액상원제의 생물검정

- (다) 시제품 제조용 처방
- (라) 시제품의 경시안정성

라. 유용곤충에 대한 영향평가

- (1) 꿀벌에 대한 영향 평가
- (2) 서양뒤영벌에 대한 영향평가
- (3) 무당벌레에 대한 영향평가

마. 화학농약에 대한 영향평가

- (1) 화학농약과의 혼용성 평가
 - (가) 원예용 살충제 혼용성 평가
 - (나) 원예용 살균제 혼용성 평가
- (2) 혼용 약효 영향성 평가

바. 포장시험 검정

- (1) 토마토 황화잎말림병
- (2) 수박 얼룩모자이크병

사. 등록시험

- (1) 1년차 포장시험
 - (가) 토마토 황화잎말림병
 - (나) 수박 얼룩모자이크병
- (2) 2년차 포장시험
 - (가) 토마토 황화잎말림병
 - (나) 수박 얼룩모자이크병

2. 활성물질의 대량 순화 및 활성유전자 탐색

가. 대량 순화과정의 산업화를 위한 활성검정 기반 추출물 분획 scheme 확립

- (1) 항바이러스 미생물의 배양
 - (가) 배지
 - (나) 배양조건
- (2) 항바이러스 물질의 순화

- (가) 균체의 파쇄 및 항바이러스 물질 추출
- (나) 용해도에 따른 활성물질의 분리
- (다) Bio-Gel P10을 이용한 분자량에 따른 활성물질의 분리
- (라) Bio-Gel P60을 이용한 분자량에 따른 활성물질의 분리

나. 항바이러스 물질의 특성분석

- (1) 항바이러스 물질의 특성분석
 - (가) 활성물질의 아미노산 서열 분석
 - (나) 활성물질의 아미노산 조성 분석

다. 활성물질의 활성유전자 탐색

- (1) 항바이러스 활성 균주의 genomic DNA library 제작
 - (가) Genomic DNA purification
 - (나) Fosmid library 제작
- (2) 항바이러스 활성물질의 유전자 탐색
 - (가) Specific protein을 암호화하는 유전자 탐색
 - (나) Random mutation을 통한 활성유전자 탐색

라. Quality Control을 위한 검정법 확립

- (1) 지방산 분석을 이용한 Q. C 법 검토
- (2) SDS-PAGE를 이용한 Q. C 법 검토

마. 곤충 매개 바이러스의 특성 및 농가적용법 연구

- (1) 바이러스 매개충의 보독충율 및 병 발생 모니터링 기술 개발
 - (가) 매개충의 보독충율 및 병 발생 모니터링
- (2) 충매 바이러스의 발병특성에 따른 약효 평가 기술 개발
 - (가) 병저항성 검정기술을 활용한 항바이러스 약효 검정
 - (나) 약리반응속도론 모델을 적용한 항바이러스성 약효 검정 기술 개발
- (3) 활성물질의 적용스펙트럼 확보 및 농가적용법 연구
 - (가) 시험 약제의 CMV에 대한 항바이러스 약효 검정을 위한 약리반응속도론 모델의 적용
 - (나) RSV에 대한 시험 약제의 농가적용법 연구

3. KNF2016의 안전성 평가

가. KNF2016 원제에 대한 안전성평가

- (1) SD계 랫드에 대한 급성경구독성시험
- (2) SD계 랫드에 대한 급성경피독성시험
- (3) New Zealand White계 토끼에 대한 피부자극성시험
- (4) New Zealand White계 토끼에 대한 안점막자극성시험
- (5) 기니 픽에 대한 피부감작성시험
- (6) 미생물복귀 돌연변이시험
- (7) 소핵시험
- (8) 염색체이상시험
- (9) 반복투여독성시험(rat)
- (10) 물벼룩(*Daphnia magna*)에 대한 급성유영저해시험
- (11) 녹조류(*Pseudokirchneriella subcapitata*)에 대한 성장저해시험
- (12) 잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 급성어독성시험
- (13) 꿀벌(*Apis mellifera*)에 대한 급성섭식독성시험
- (14) 꿀벌(*Apis mellifera*)에 대한 급성접촉독성시험

나. KNF2016 70% AS (제품)에 대한 안전성평가

- (1) ICR계 마우스에 대한 급성경구독성시험
- (2) SD계 랫드에 대한 급성경피독성시험
- (3) New Zealand White계 토끼에 대한 피부자극성시험
- (4) New Zealand White계 토끼에 대한 안점막자극성시험
- (5) 기니 픽에 대한 피부감작성시험
- (6) 잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 급성어독성시험
- (7) 물벼룩(*Daphnia magna*)에 대한 급성유영저해시험

제 2 장 국내외 기술개발 현황

본 연구의 개발 대상은 식물바이러스 방제용 천연식물보호제으로서, 현재까지 식물바이러스를 방제할 수 있는 기술로 상업화된 것이 없을 만큼 신규 기술을 바탕으로 하는 고부가가치 제품이라 할 수 있다.

특허를 통해 분석해 본 식물바이러스 연구동향은 다음과 같다. 1977년부터 조사된 PCT를 포함한 3국(미국, 일본, 유럽) 특허는 2004년 12월 현재까지 약 2,200여건의 특허가 검색되었다. 1995년 이후로 급격히 그 수가 증가하고 있는데 특히 출원인이 기초연구기관만큼이나 민간기관(기업)등의 출원이 늘고 있음은 기술동향이 기초연구에서 도입기로 전환되고 있음을 보여주고 있다. 다수의 특허를 출원하고 있는 기관으로 Cornell Research Foundation Inc. Monsanto Company, Japan Tobacco Inc., Mitsubishi Chem Ind Ltd., Seminis Vegetable Seeds Inc., Novartis AG. 등이다. 현재까지 식물 항바이러스(바이러스 방제제 관련) 특허는 약 148건으로 비교적 적을 뿐만 아니라 연구 class도 주로 저항성 유전자, 식물추출물, 저분자 합성화합물질에 국한되고 있다.

국외 기술현황을 살펴보면 BASF (국내특허출원번호 10-2002-7014750)에서 PCT 출원 후 국내에서 공개된 strobilurin 계통의 선도화합물에 대한 바이러스방제제 특허가 있다. 이 특허에서는 식물바이러스병(담배-담배모자이크바이러스)에 대한 약효검정을 Science (Malamy et al., 1990)지에서 제시한 방법으로 평가하였으나 직접적인 약효가 매우 미약했고 약제 처리에 의한 병반 크기 감소로 나타나는 저항성 유도의 효과만을 제시하고 있다. 또한 이 특허에서는 이전에 개발을 검토했던 폴리리신 및 알킬디에틸렌-트리아미노아세트산의 예와 벤조-1,2,3-티아졸 유도체의 효과, 그리고 피리딜티아졸의 유사한 효과에 대해서도 언급하고 있으나 역시 약효부족으로 그 후 상업화 된 기록은 없다. 이 특허를 통해 화학회사가 선도물질을 개발할 때 스크리닝 과정에 꼭 포함되는 것 중 하나가 식물바이러스 약효검증이라는 것을 짐작할 수 있고 실제 바이러스방제 약효가 미약한 물질에 대해서도 특허출원이 된다는 사실에서 향후 개발될 식물바이러스 방제제의 가치를 짐작할 수 있다. 또 다른 국외 메이저 회사로 Monsanto (US patent no. 5,304,730)에서는 감자잎말림바이러스(PLRV)에 저항성 유전자를 갖는 유전자 변형 식물(GMO)을 개발 하였으나 역시 신뢰할만한 생물효과를 얻지 못 했으며 유전자변형 식물이라 상업화에 어려움이 있었다. 일본에서도 식물바이러스병 방제 연구가 활발히 진행 되었는데 그 한 예로 Japan Tobacco Inc.(US patent no. 4,701,522)에서 출원한 특허를 들 수 있다. 이 특허에서는 분꽃에서 분리한 단백질에서 우수한 약효를 확인하였으나 물질규명이 미약하고 대량생산이 되지 않기

때문에 상업화에 어려움이 있었다. 특히 특허가 출원된 1987년 당시의 기술로는 단백질을 정확히 동정하는 것이 어려웠던 관계로 기술적으로는 완성도가 떨어졌다. 미국의 Cornell Research Foundation Inc. (US patent no. 6,649,813)에서도 담배에서 TMV 방제에 획기적인 기술을 특허출원을 했는데 이 기술은 TMV에서 유래한 54kDa sequence를 갖는 유전자 이용해서 TMV replication 억제하는 형질전환식물을 만들게 된다. 이후 다양한 연구 집단에서 담배의 TMV저항성 유전자를 cloning 하여 transgenic plant를 만들었다. 이 기술은 국내 인삼연초연구원(현 KT&G)에서 개발을 성공하여 TMV저항성 담배를 개발했지만 연구초에서는 유전자변형 식물을 사용하지 못하기 때문에 상업화되지는 못 했다. 이런 저항성 유전자에 대한 연구는 최근까지 이어지고 있다. 최근 국내에 공개된 일본 농업생물자원연구소 (국내특허출원번호 10-2003-7008866)의 식물바이러스의 이동단백질에 결합하는 식물 단백질을 이용해서 바이러스 저항성을 부여한 유전자변형 담배에 관한 특허도 유전자 변형 식물의 상용화문제가 제기 될 것으로 생각지만 학문적으로는 높은 가치가 있다고 판단된다.

국내 특허로는 인삼연초연구원(현 KT&G)에서 출원한 2편(KR20010069131, KR20000056350)의 특허가 본 연구와 비슷한 개념을 갖는 다고 할 수 있다. 각각의 특허는 세균과 곰팡이를 이용한 식물바이러스방제제에 관한 특허로 세균유래 물질은 활성물질이 동정되지 않았지만 곰팡이 유래물질은 펩타이볼(peptibol)로 동정된 분자량이 1,913dalton이고 분자식이 C₉₁H₁₄₄N₂₂O₂₃인 아미노산 구성을 밝힌 물질은 특허를 받았다. 농촌진흥청(KR19990080096)의 국내 자생 흰명아주에서 분리한 항바이러스성 단백질에 관한 특허는 유효단백질의 분자량이 30,000dalton이며 단백질구조 동정이 어렵기 때문에 단백질을 코딩하고 있는 cDNA의 염기서열을 밝혀 특허권을 받았다. 또한 국내에서 연구가 활발했던 식물바이러스 방제제 후보물질로 진로 (KR19970074934)에서 출원한 특허가 있다. 섬자리공의 항바이러스성 단백질의 신규 유전자 및 그를 발현하는 재조합 미생물 연구가 진행되었지만 RIPs (ribosome inactivating proteins)의 특성상 다양한 생물체의 라이보솜을 불활성화시킬 수 있는 가능성이 제기되는 등 독성문제 때문에 더 이상의 개발은 중단된 것으로 알려지고 있다. 또한 식물바이러스 연구그룹에서 활발히 진행됐던 satellite RNA를 포함한 약독 바이러스에 대한 연구(Chio et al., 2001 등) 가 진행되고 있지만 불안정한 약효 등의 해결할 과제를 가지고 있다.

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제1절 연구개발 수행 내용

1. 활성물질의 대량생산 공정개발 및 제형화

가. 산업용 배지 최적화 및 배양최적화

(1) 공시균주

본 과제는 농림기술개발과제 “신규 작용기작을 갖는 식물바이러스 방제용 천연식물 보호제” 과제번호 505030-3 (2005~2008)의 계속 진행형 연구테마로써 연구개발에 사용된 공시균주는 상기 과제에서 연구되었던 *Pseudomonas oleovorans* KCTC10159BP의 균주를 이용하였으며, 이하 KNF2016이라는 코드명을 사용하였다.

(2) 배지 조성 변경

과제번호 505030-3에서 확립된 배지 조성의 경우 배양 초기 pH 저하가 발생하며 이때 균주의 초기 생육 저해 현상이 나타나는데 이 부분을 해결하기 위해 기존 배지 조성을 일부 변경하였다.

(3) 무기염 선발

변경된 기본배지를 Basal medium으로 한 뒤 KCl, NaCl, MgCl₂, MnCl₂, CoCl₂, BaCl₂, CaCl₂, MnSO₄, CuSO₄, ZnSO₄, CaCO₃, KNO₃의 12종의 무기염에 대한 균주 생육향상 및 항바이러스 활성의 증감여부를 검토하였다.

(4) 5L jar fermenter 배양 최적화

선발된 무기염을 포함한 산업용 배지조성을 기반으로 5L jar fermenter 배양을 실시하여 균주 생육정도와 항바이러스 활성의 증감여부를 검토하였다.

(5) 500L pilot fermenter 배양 최적화

선발된 산업용 배지조성으로 500L pilot fermenter에서의 균주 생육정도와 항바이러스 활성의 증감여부를 검토하였다.

(6) 5,000L pilot fermenter 배양 최적화

선발된 산업용 배지조성으로 5,000L pilot fermenter에서의 균주 생육정도와 항바이러스 활성의 증감여부를 검토하였다.

(7) 5,000L pilot 생산시료의 Q. C

5,000L pilot 생산시료의 Q. C는 배양액을 250, 500, 1,000배로 희석한 뒤 담배 반엽법을 실시하여 검토하였다.

나. 후처리 공정별 가능 제형선발

(1) KNF2016 원제의 특성연구

(가) 열안정성 시험

KNF2016 원제의 열안정성은 배양액, 배양액을 원심분리하여 얻은 상등액, 배양액을 원심분리하여 얻은 고형물을 60, 80, 100℃ 온도에서 15분간 열처리 한 뒤 담배 반엽법을 이용하여 검토하였다.

(나) 경시안정성 시험

KNF2016 원제의 경시안정성 시험은 배양액을 50℃에서 2주간 보관한 뒤 담배 반엽법을 이용하여 검토하였다.

(다) 부제 선별 시험

KNF2016 원제의 효과적인 제형화를 위한 부제는 식물체의 부착성을 높이는 계면활성제를 처방한 뒤 담배 반엽법을 이용하여 검토하였다.

(2) 후처리 공정 개발 및 최적화

(가) 액상제형용 후처리 공정 개발

기 개발된 고상의 원제는 제조 공정상 많은 비용과 노동력이 소요되어 바이러스 방제제의 산업화에 가장 큰 걸림돌이 되고 있다. 따라서 보다 경제적인 제형 및 후처리 공정의 개발을 위해 액상제형용 후처리 공정 도입을 통해 경제성 문제의 해결을 검토하였다.

(나) 균주사멸 공정 검토

KNF2016 균주의 항바이러스 활성은 항생물질 계열이 아니기 때문에 배양액을 사멸하지 않고 직접 이용할 경우 배양액이 오염되거나 부패될 가능성이 매우 높다. 따라서 이를 해결하기 위해 3가지 타입의 계면활성제를 배양액과 이를 원심 분리한 상등액에 처방하여 임의의 액상제형을 제조한 뒤 배양액과 상등액은 4℃에서, 3가지 타입의 액상제형은 실온에서 2개월간 보관한 뒤 균주의 생존상태와 항바이러스 활성의 변동여부를 검토하였다.

(다) 배양액 농축 공정 검토

선발된 액상제형의 경우 배양액을 그대로 이용하는 것이기 때문에 시판될 제품의 희석배수를 고려할 경우 적정수준의 농축 공정이 필요하다. 따라서 배양액 농축 정도를 결정하기 위해 액상제형의 단계적 희석액을 제조하고 이를 담배 반엽법을 이용하여 검토하였다.

(라) 후처리 공정 최적화

선발된 배양액 사멸과정을 거쳐 후처리 공정 최적화를 검토하였다.

(3) 제제화 연구

(가) 생물검정법 확립

본 과제에서 바이러스 시험에 이용되는 생물검정법인 반엽법은 가장 간단하고도 신뢰할 수 있는 방법으로 알려져 있다. 하지만 검정하는 사람의 기술에 따라 변이차가 크기 때문에 미묘한 차이를 선별해내기 적합하지 않다. 이러한 문제를 해결하기 위해 바이러스 감염 조즙액과 약제를 직접 섞어 반응시킨 뒤 반엽법을 실시하는 방법으로 보다 정밀한 생물검정법을 확립을 검토하였다.

(나) 유효기간 연장용 부제 선발

확립된 생물검정법을 바탕으로 TMV 감염 조즙액 : KNF2016 원제 : 부제의 비율을 달리 하여 부제별 항바이러스 활성을 담배 반엽법을 이용하여 유효기간 연장용 부제 선발에 검토하였다.

(다) 선발된 부제의 경시안정성 시험

유효기간 연장용 부제로 선발된 계면활성제를 이용하여 처방된 액상제제의 경시안정성 분석을 위해 농약 관리법에 고시되어 있는 가혹 실험을 진행하고 각 주차별 시료를 채취하여 담배 반엽법으로 검토하였다.

다. 시제품 생산

(1) 포장 및 안전성 시험용 원제생산

포장시험 및 안전성 시험용 시료의 생산은 선발된 산업용 배지를 이용하여 500L pilot fermenter에서 생산하였으며, 생산된 배양액을 원심분리하여 상등액, 고형물 그리고 배양액을 이용하여 제제화된 액상제제를 담배 반엽법을 이용하여 항바이러스 활성을 검토하였다.

(2) 시제품 생산 및 안정성 분석

(가) 시제품 생산용 시료의 배양

시제품 생산용 시료는 산업용 배지 조성을 이용하여 5,000L pilot fermenter에서 배양하였다.

(나) 시제품 생산용 액상원제의 생물검정

생산된 액상원제는 250배, 500배, 1,000배 희석한 뒤 담배 반엽법을 이용하여 항바이러스 활성을 검토하였다.

(다) 시제품 제조용 처방

시제품 제조용 처방은 유효기간 연장 효과가 있는 부제를 이용하여 5가지 처방으로 제조한 뒤 으로 제조한 뒤 농약관리법상의 검사항목인 분말도를 이용하여 검토하였다.

(라) 시제품의 경시안정성

시제품의 경시안정성은 농약 관리법에 고시되어 있는 가혹 실험을 진행하고 각 주차별 시료를 채취하여 담배 반엽법으로 검토하였다.

라. 유용곤충에 대한 영향평가

(1) 꿀벌에 대한 영향 평가

대전 양봉원에서 꿀벌(*Apis mellifera*)를 분양받은 뒤 농촌진흥청고시 제2009-1호 농약의 독성시험기준과 방법에 따라 시험을 진행하고 꿀벌에 대한 영향을 검토하였다.

(2) 서양뒤영벌에 대한 영향평가

(주)세실에서 서양뒤영벌(*Bombus terrestris*)을 분양받은 뒤 농촌진흥청고시 제2008-4호 농약의 독성시험기준과 방법에 따라 시험을 진행하고 꿀벌에 대한 영향을 검토하였다.

(3) 무당벌레에 대한 영향평가

무당벌레는 2009년 6 ~ 7월 충남대학교 주변에서 번데기와 성충을 채집하여 실험실조건하(25±2°C, Rh70%)에서 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*)과 무데두리진딧물(*Lipaphis erysimi*)을 먹여서 사육하였으며 성충은 채집된 개체에서 얻어진 F1세대를 이용하였고, 유충은 F1세대에서 알을 받아 위와 동일한 조건하에 사육된 F2세대의 2 ~ 3령 유충을 이용하여 무당벌레에 대한 영향을 검토하였다.

마. 화학농약에 대한 영향평가

(1) 화학농약과의 혼용성 평가

(가) 원예용 살충제 혼용성 평가

KNF2016 원제의 원예용 살충제에 대한 혼용성 검토는 가네마이트 외 28종의 약제를 5작물 11품종에 대하여 기준량, 배량 처리하고 3, 5, 7일 후 육안 달관 조사하는 방법으로 검토하였다.

(나) 원예용 살균제 혼용성 평가

KNF2016 원제의 원예용 살균제에 대한 혼용성 검토는 미리카트 액상수화제 외 90종의 약제를 8작물 15품종에 대하여 기준량, 배량 처리하고 3, 5, 7일 후 육안 달관 조사하는 방법으로 검토하였다.

(2) 혼용 약효 영향성 평가

KNF2016 원제를 화학농약과 혼용하였을 때 항바이러스 활성에 대한 영향을 분석하기 위하여 검정 대상용 약제를 실사용 농도로 혼용한 뒤 담배 반엽법을 이용하여 검토하였으며, 원예용 살충제의 경우 약효 영향성을 검토하였고, 수도용 약제의 경우 계통별, 제형별 혼용 약효 영향성까지도 검토하였다.

바. 포장시험 검정

(1) 토마토 황화잎말림병

KNF2016 70% AS (제품)의 항바이러스 활성의 검정을 위한 포장시험은 전남 광양에 위치한 대규모 유리온실에서 토마토 황화잎말림병으로 검토하였다. 총매 바이러스인 토마토 황화잎말림병은 매개충의 방제도 동시에 이루어져야 하기 때문에 담배가루이 Q 타입에 방제효과가 있는 살충제와 혼용하여 정식 초기부터 7일 간격 6회 경엽 처리의 방식으로 약제를 처리하여 포장시험을 검정하였다.

(2) 수박 얼룩모자이크병

KNF2016 70% AS (제품)의 항바이러스 활성의 검정을 위한 포장시험은 충북 음성에 위치한 시설하우스에서 수박 얼룩모자이크병으로 검토하였다. 수박 얼룩모자이크병은 기계적 전염을 일으키는 바이러스로써 오염된 종자로부터 발병이 시작되며 이후 농작업을 통해 포장 전체적으로 퍼져나가는 특징이 있다. 따라서 정식 전 경엽 처리, 정식 직후 관주처리, 정식 후 10일 간격 4회 경엽 처리의 방식으로 약제를 처리하여 포장시험을 검정하였다.

사. 등록시험

(1) 1년차 포장시험

(가) 토마토 황화잎말림병

토마토 황화잎말림병에 대한 등록시험은 전남 보성군에 위치한 시설하우스에서 실시되었으며, 정식 직후 7일 간격 5회 경엽 처리하여 약효를 검토하였다.

(나) 수박 얼룩모자이크병

수박 얼룩모자이크병에 대한 등록시험은 충북 음성군에 위치한 시설하우스에서 실시되었으며, 정식 직후 10일 간격 4회 경엽 처리하여 약효를 검토하였다.

(2) 2년차 포장시험

(가) 토마토 황화잎말림병

토마토 황화잎말림병에 대한 등록시험은 전남 나주시에 위치한 시설하우스에서 실시되었으며, 정식 직후 7일 간격 5회 경엽 처리하여 약효를 검토하였다.

(나) 수박 얼룩모자이크병

수박 얼룩모자이크병에 대한 등록시험은 충북 음성군에 위치한 시설하우스에서 실시되었으며, 정식 직후 10일 간격 4회 경엽 처리하여 약효를 검토하였다.

2. 활성물질의 대량 순화 및 활성유전자 탐색

가. 대량 순화과정의 산업화를 위한 활성검정 기반 추출물 분획 scheme 확립

(1) 항바이러스 미생물의 배양

(가) 배지

① 전배양 (Mueller-Hinton broth)

- Casamino acid 17.5g, Beef extract 3.0g, Soluble starch 1.5g / L당

② 본배양 (Production medium)

- Yeast extract 20g, KH_2PO_4 0.5g, K_2HPO_4 0.1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g,
 $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.02g / L당

(나) 배양조건

24시간 배양시킨 전배양액을 본배양 배지에 약 1%정도 접종한 후, 28°C, 200rpm
에서 24시간 배양한 후, 활성물질 순화에 사용하였다.

(2) 항바이러스 물질의 순화

(가) 균체의 파쇄 및 항바이러스 물질 추출

활성물질 중 열에 안정하여 제형화 하였을 때, 유효물질로 작용하는 항바이러스
물질을 분리하기 위해 원심분리를 통하여 균체를 분리하였다. 모아진 균체는 물로 2
번 세척한 다음 증류수에 현탁 시킨 뒤 초음파 파쇄장치를 이용하여 균체를 파쇄하
고, 원심 분리하여 비과괴세포와 세포단편 및 핵을 침전시켜 분리하였다. 항바이러
스 물질의 분리에는 상등액을 이용하였다.

(나) 용해도에 따른 활성물질의 분리

수용성 항바이러스 물질의 용해도에 따른 분리를 위해 황산암모늄 침전법을 이용
하였다. 황산암모늄은 용해도가 높고, 단백질의 변성이 잘 일어나지 않아 다량의 단
백질을 포함하는 시료로부터 다량의 단백질을 정제하는 일반적인 실험에서 초기 정
제법으로써 널리 이용되는 시험법이다. 황산암모늄의 침전 분획은 20, 40, 60, 80 %
의 염농도 별로 실시하였다. 침전물은 pore size가 6,000 ~ 8,000인 Spectra/Por[®]
Membrane을 이용하여 멸균수로 탈염하였다.

(다) Bio-Gel P10을 이용한 분자량에 따른 활성물질의 분리

용해도에 따른 분리에서 항바이러스 활성이 확인된 분획을 모아 Bio-Rad사의 Bio-Gel[®]P Polyacrylamide Gel중 pore size가 1,500 ~ 20,000 사이를 분리할 수 있는 Bio-Gel P10 resin을 이용하여 크기별 정제를 실시하였다. 100cm × 1.6cm column에 resin을 충전하였고, 증류수 1 drop/17s의 속도로 elution하여 tube당 200drops (약 5ml)씩 분취하였다. 분취된 각 fraction은 동결건조 시킨 뒤 (주)경농 중앙연구소에 의뢰하여 담배 반엽법으로 항바이러스 활성을 검정하였다.

(라) Bio-Gel P60을 이용한 분자량에 따른 활성물질의 분리

Pore size가 3,000 ~ 60,000 사이를 분리할 수 있는 resin인 Bio-Gel P60을 100cm × 1.6cm column에 충전하여 분자량에 따른 분리 정제를 실시하였다. 증류수로 elution하였고, 증류수 1 drop/17s의 속도로 elution하여 tube당 77drops(약 2ml)씩 분취하였다. 분취한 각 fraction은 동결건조 시킨 뒤 (주)경농 중앙연구소에 의뢰하여 담배 반엽법으로 항바이러스 활성을 검정하였다.

나. 항바이러스 물질의 특성분석

(1) 항바이러스 물질의 특성분석

(가) 활성물질의 아미노산 서열 분석

Bio-Gel P60으로 정제된 항바이러스 물질이라 판단되는 단백질의 N-terminal과 internal amino acid sequence를 분석하였다. 활성을 나타내는 fraction의 amino acid sequence 분석을 위하여 10% SDS-PAGE에 전기영동하고, PVDF membrane에 blotting한 후, coomassie brilliant blue R-250로 염색하여 단일 단백질 band를 확인하였다. 확인된 단백질 band는 1956년에 Edman에 의해 개발되어진 PITC법 (phenylisothiocyanate, 화학적 degradation법)을 자동화한 시스템인 Procise cLC492 protein sequencer(Applied Biosystem, Foster City, CA)를 이용하여 분석하였다.

(나) 활성물질의 아미노산 조성 분석

아미노산 조성 분석을 위하여 완전히 건조시킨 활성물질을 가수분해한 뒤, Hewlett Packard 1100 Series HPLC system에 Waters Nova-Pak C18 4μm(3.9×300mm) column을 장착하여 분석하였다.

다. 활성물질의 활성유전자 탐색

(1) 항바이러스 활성 균주의 genomic DNA library 제작

(가) Genomic DNA purification

공시균주를 MH medium 200ml을 이용하여 28°C shaking incubator에서 200rpm, 18시간 배양시킨 뒤, 원심 분리(13,000rpm, 15min, 4°C)하여 cell만 회수한 뒤 genomic DNA purification에 사용하였다. 회수된 cell에 20ml의 buffer {50mM Tris-HCl(pH 7.5), 50mM EDTA(pH 8.0)}를 넣고, vortexing하여 현탁 시킨 후, 20mg/ml Lysozyme 1ml 넣고 잘 섞은 뒤 얼음에서 30분간 반응시켰다. 이후 STEP buffer {500 μ l 10% SDS, 500 μ l 1M Tris-HCl(pH 7.5), 8ml 0.5M EDTA(pH 8.0), 1ml 10mg/ml Protease K}를 최종 10ml이 되도록 첨가하면서 조심스럽게 섞어 준 뒤 50°C에서 30분간 반응시켰다. 균체가 lysis되었으면, 30ml의 Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol (25:24:1)을 넣고 잘 섞어준 뒤 원심분리(10,000rpm, 15min, 4°C)한다. 맑은 상등액을 끝을 자른 micropipette tip을 이용하여 깨끗한 다른 원심분리용 bottle에 옮긴다. 옮겨진 상등액은 다시 Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol (25:24:1)을 이용하여 동일한 방법으로 washing하였다. 최종적으로 얼은 깨끗한 상등액에 최종농도가 0.3M이 되도록 3M sodium acetate를 첨가하고 잘 섞어준 뒤 차가운 100% ethanol을 총량의 2배가 되도록 넣어 genomic DNA가 영기도록 하였다. 이후 멸균된 유리막대를 이용하여 genomic DNA 조심스럽게 spooling하고 70% Ethanol에 잠깐 담가 washing한 후, 5mg/ml RNase가 포함된 TE buffer {10mM Tris-HCl(pH 8.0), 1mM EDTA(pH 8.0)}에 녹여 genomic library 제작과 whole genomic sequencing 등에 사용하였다.

(나) Fosmid library 제작

활성유전자의 탐색을 위하여 CopyControlTM Fosmid Library Production Kit(Epicentre)를 이용하여 genomic library를 제작하였다. 정제된 genomic DNA는 제한효소 *Sau3AI*을 이용하여 partial digestion하여 pCC2FOS vector에 insertion 할 수 있는 35 ~ 40 kb로 shearing하였다. shearing한 genomic DNA 20 μ g을 end-repair enzyme을 이용하여 말단 끝을 blunt-end로 만들어 준 후, chimera를 방지하기 위하여 1% low melting point agarose에 전기영동 하여, 35 ~ 40 kb사이의 DNA를 gel purification하였다. Gel purification한 genomic DNA 0.25 μ g을 CopyControl pCC2FOS Vector 0.5 μ g에 Fast-Link DNA Ligase을 이용하여 ligation 한 후, MaxPlax Lambda Packaging Extracts를 이용하여 *E.coli*

EPI300-T1^R에 도입한 하고, 12.5 μ g/ml chloramphenicol이 포함된 LB agar 배지에 도말하여 genomic DNA library를 제작하였다. Library의 유효성을 확인하기 위하여 random하게 12개의 clones을 선택하여 fosmid DNA를 정제한 후, 제한효소 *Bam*HI 으로 cutting한 결과 vector size 인 8.1kb가 관찰되었고, insert의 평균 size 는 35kb정도로 나타났다. genomic DNA library clones은 96-well에서 각각 배양하였고, 10%의 glycerol을 첨가하여 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다가 screening에 사용하였다.

(2) 항바이러스 활성물질의 유전자 탐색

(가) 특정 protein을 암호화하는 유전자 탐색

항바이러스 활성물질이라고 생각되어지는 특정 protein을 암호화하고 있는 유전자를 찾기 위해 N-terminal amino acid sequence와 internal amino acid sequences를 암호화하고 있는 degenerated primer를 제작하였다(Table 1). 특정-F와 47-R primers를 사용한 1차 PCR 조건은 KNF2016 total nucleic acid를 주형으로 하여 95 $^{\circ}$ C 5min 1cycle, 95 $^{\circ}$ C 1min, 60 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min 30cycles, 72 $^{\circ}$ C 3min 1cycle로 수행하였고, 1% agarose gel을 사용하여 PCR products를 확인하였다(Fig. 1). 두 번째 51-F와 47-R primers를 이용한 두 번째 nested-PCR은 특정-F와 47-R primers를 이용한 증폭산물을 gel purification하여 주형으로 사용하였고, PCR 조건은 동일하게 수행하였다. 최종적으로 얻은 PCR products(Fig. 1)는 sequencing을 통하여 기존에 알려진 특정 protein 암호화 genes과 비교하여 그 연관성을 확인하고, pUTmini-Tn5(Km^R,*Ori*R6K) vector를 이용하여 chromosome에서 특정 protein을 암호화하고 있는 위치에 kanamycin 저항성 gene을 삽입하는 point mutation을 이용한 knock out 실험을 수행하고, mutants는 wild-type 균주와 동일한 방법으로 배양한 뒤 경농 중앙연구소에 의뢰하여 담배 반엽법으로 항바이러스 물질 유전자의 불활성화 여부를 검정하였다.

Table 1. Primers used in the search of specific proteins.

| Name | Amino acid sequence | Nucleic acid sequence |
|------------|---------------------|-------------------------------|
| Specific-F | Specific sequence | 5'-GAY ATM AAY GGY GGT GGT-3' |
| 47-R | FVPLPD | 5'-RTC YGG CAG YGG MAC GAA-3' |
| 51-F | IQVPSV | 5'-ATC CAG GTG CCR TCG GTG-3' |



Fig. 1. Specific protein PCR products

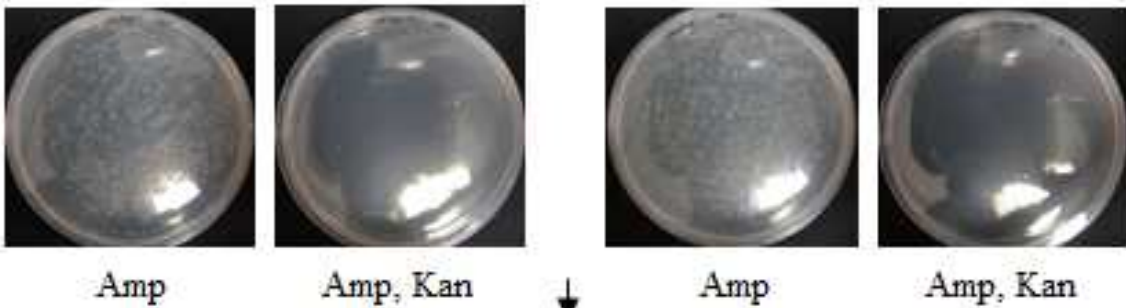
(나) Random mutation을 통한 활성유전자 탐색

항바이러스 물질 발현유전자의 탐색을 위하여 transposon mutagenesis를 통하여 무작위 돌연변이체를 제작하였다. pRL27(Km^R,Orf6K) vector를 사용하여, kanamycin 저항성을 갖는 무작위 돌연변이체 641개의 clones을 제작하였다(Fig. 2). 돌연변이체는 15ml culture tube를 이용하여 2ml production medium에서 200rpm으로 shaking되는 28℃ incubator에서 24시간동안 배양하였다. 돌연변이체간에 growth 차이가 있어 O.D. 600에서 0.95 ~ 0.98사이로 균체 양을 일정하게 조정 한 뒤 (주)경농 중앙연구소에 의뢰하여 담배 반엽법을 통해 항바이러스 활성의 변이 여부를 검정하였다. 생물검정 결과 항바이러스 활성이 감소한 돌연변이체들의 genomic DNA를 정제하여 pUC18 cloning vector에 subcloning하여 삽입된 kanamycin 저항성 유전자가 발현되는 clones을 찾아 sequencing 하는 방법으로 knock-out된 위치의 유전정보를 확인하였다.

**Extraction of genomic DNA
from Tn5 mutants**



**Library construct with pUC18 vector &
Screening of Kanamycin resistant clones**



Sequencing of target gene



Fig. 2. Analysis of sequence to random mutants

라. Quality Control을 위한 검정법 확립

(1) 지방산 분석을 이용한 Q. C 법 검토

지방산의 분석은 공시균주 배양액 4ml에 saponification reagent(NaOH 45g, Methanol 150ml, D.W 150ml) 1ml을 첨가한 뒤 30초간 vortex하여 잘 섞어준다. 이후 100°C에서 30분간 가열하고, methylation reagent(6N HCl 325ml, Methanol 275ml) 2ml을 잘 섞어준 뒤, 80°C에서 10분간 가열하였다. Extraction solvent(Hexane 200ml, Methyl-Tert Butyl Ether 200ml)을 1.25ml 첨가하고, 10분간 상온에서 rotater를 이용하여 잘 섞어주어 상층과 하층을 분리시켰다. 상층만을 분취하여 10.8% NaOH 3ml과 5분간 잘 섞어준 후 깨끗한 상층액 만을 GC/MS 분석용 시료로 사용하였다. 분석용 장비로는 Agilent 6890(GC)/ 5975(MSD)에 HP-5MS capillary column을 장착하고,

He gas를 이동상으로 사용하였다. 분석조건은 120℃에서 injection 하였으며, 120℃에서 300℃까지 분당 8℃씩 gradient를 주면서 분석하였다.

(2) SDS-PAGE를 이용한 Q. C 법 검토

지방산 분석과 다른 Q. C 검정법의 확립을 위해 항바이러스 활성물질로 추정되는 단백질 band를 SDS-PAGE상에서 검정할 수 있는 방법을 검토하였다.

마. 곤충 매개 바이러스의 특성 및 농가적용법 연구

(1) 바이러스 매개충의 보독충율 및 병 발생 모니터링 기술 개발

항바이러스 활성물질을 이용한 생화학 작물보호제의 약효 평가 검정 및 최적 방제 기술을 제시하기 위해서는 식물 바이러스 및 이를 매개하는 매개충의 병역학적 접근이 중요하다. 본 연구에서는 이를 위하여 벼줄무늬잎마름병 바이러스(Rice stripe virus, RSV)를 대상으로 바이러스 매개충인 애멸구(*Laodelphax striatellus*)와의 병역학적 모니터링 기술을 확립하고자 하였다.

(가) 매개충의 보독충율 및 병 발생 모니터링

충남부 지역 총 13개 필지를 대상으로 논둑으로부터 거리에 따라 RSV 발병이 Log phase에 이르는 6월 하순 ~ 7월 초순에 RSV 발병률을 조사하였으며, 9월 수확기에 동일 지점에서 벼 이삭을 수확하여 백립중(g)을 조사하였다. RSV 발병률은 바이러스 입자에 대하여 특이적 결합반응을 보이는 GroEL 단백질을 이용하여 분자적으로 진단하는 Immuno-capture (IC) RT-PCR법으로 검정하였는데, 이를 위하여 i-RSV isolation/detection kit (Intron Biotechnology, Korea)를 사용하였다. 본논 필지 내 바이러스 발병 모니터링 지점은 논둑으로부터 첫 번째, 5번째, 10번째, 20번째 줄 등을 수행하였고, 관행적으로 발병 모니터링을 하는 대각선상의 3지점 조사 방식과 비교하여 논둑으로부터 첫 번째, 5번째 및 10번째 줄에서의 RSV 발병율과 관행적 조사방식에 의한 RSV 발병률을 지역 전체 평균 발병율과의 상관관계를 구하고 직선회귀식을 추정하였다. 이를 통하여 최적화된 RSV 발병 모니터링 방법을 선정하였다.

(2) 충매 바이러스의 발병특성에 따른 약효 평가 기술 개발

KNF2016 70% AS (제품)의 항바이러스 활성은, (주)경농 중앙연구소에 의해 TMV, PMMoV, CGMMV 등 사상형(filamentous) 식물바이러스병에 대해 보고되었으므로, 본 연구에서 대상 바이러스인 RSV도 사상형이라 항바이러스 활성이 기대되었

다. 그러나 본 연구 수행 이전까지 식물바이러스병해에 대한 항바이러스 약효 검정 기술이 전무하였으므로, 일차적으로는 기존에 확립된 병저항성 검정기술을 활용하여 상기 작물보호제의 약효를 저항성 개념으로 대입하여 검정을 수행하였다. 한편, 보다 정량적이면서도 항바이러스성 작용기전을 파악하기 위해 개선된 약효 평가 기술이 개발될 필요가 있었으므로, 본 연구에서는 약리반응속도론(Pharmacokinetics) 모델(Yamaoka, et. al., 1978; Abd El-Aty, et. al., 2004)을 적용하여 상기 약효 검정을 수행하고 식물바이러스병에 대한 항바이러스성 작물보호제의 약효 검정·평가 기술을 개발하였다.

(가) 병저항성 검정기술을 활용한 항바이러스 약효 검정

시험 약제인 KNF2016 70% AS (제품)과 KNF2016-B 를 각각 500배 및 250배 희석농도에서 벼(추청벼, 5엽기)를 시험 작물로 하여 약제처리 후 1일, 3일, 5일 경과 후 애멸구 RSV 보독충을 1일간 접종하여 2주 후 시험 유묘의 RSV 발병률 검정을 수행하였다. RSV 발병률 검정은 1차적으로 육안 조사를 수행하여 RSV의 특이적인 벼줄무늬잎마름 병징을 확인하였으며, 병징이 뚜렷하지 않거나 병징이 나타나지 않은 시험 작물 개체에 대해서는 i-RSV isolation/detection kit (Intron Biotechnology, Korea)를 사용하여 IC-RT-PCR법으로 분자적 진단을 수행하였다. 항바이러스 약효는 발병 억제력(저항성도)과 동일하다는 가정 하에 이병정도에 따른 이병지수(Disease Index)를 산출하고 처리 간에는 다중분산분석법으로 유의차 검정을 수행하였다(LSD test). 검정법의 전반적인 수행 절차는 아래와 같다(Fig. 3).

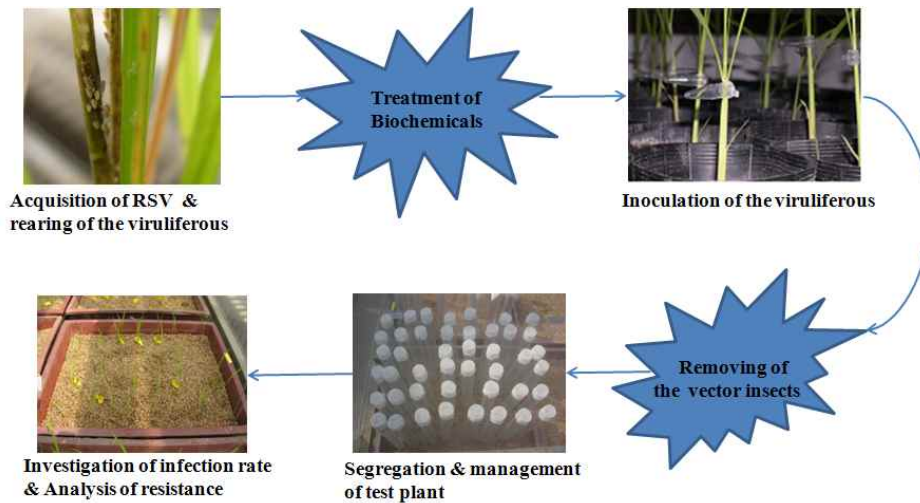


Fig. 3. Bioassay system for antiviral activity of biochemicals in rice seedling against RSV. Antiviral effect was estimated as disease rating index (%) from infection rating 2 weeks after treatment (modified from Washio, et al., 1967; Maeda, et al., 2004; 특정, et al., 2004).

(나) 약리반응속도론 모델을 적용한 항바이러스성 약효 검정 기술 개발

시험 약제인 KNF2016 70% AS (제품) 과 KNF2016-B 를 각각 500배 희석농도로 애멸구 건전충(RSV-비보독충)에 약제를 분무 처리한 후 즉시 RSV 이병벼에 1시간 격리접종을 하였다. 그 후 약제 처리구와 매개충 개체별로 시험 벼 유묘(추청벼, 5엽기)에 1시간씩 접종하였다가 충을 유묘에서 분리하는 방식으로 약제 처리 후 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96시간에 시험 유묘에 충을 접종하였다. 접종 2주 후 시험 유묘의 RSV 발병 여부는 1차적으로 RSV 특이적 병징을 이용하여 육안 조사하였으며, 병징이 나타나지 않은 유묘에 대해서는 i-RSV isolation/detection kit (Intron Biotechnology, Korea)를 사용하여 IC-RT-PCR법으로 확인하였다.

한편, 본 검정 기술을 활용하여 벼 조직 내 항바이러스 활성의 작용점을 탐색하기 위하여 상기 시험 약제를 시험 유묘에 분무 처리하고 자연 건조시킨 다음, 약제 처리하지 않은 RSV 보독충을 주당 3마리씩, 처리당 3주에 접종 처리하고, 1일간 접종시킨 뒤 보독충을 분리, 회수하였다. 약제 처리 1일, 5일, 10일, 15일 경과 후에 시험 유묘의 잎을 채취하였다. 접종 충 샘플 및 시험 유묘 잎 샘플을 i-RSV isolation/detection kit (Intron Biotechnology, Korea)를 사용하여 IC-RT-PCR법으로 RSV 보독 및 감염 여부를 검정하였다.

상기 시험에서 확보된 데이터를 바탕으로 약리반응속도론 모델의 파라미터 값을 산출하였다.

- $MVIT_{50}$: 시험 유묘에 바이러스 전달 후 감염률 50%에 도달하는 시간
- MAT (Mean Antiviral Time) = $|MVIT_{treated} - MVIT_{control}|$
- AUG (Area Under Graph) : 발병률 곡선 그래프 면적(적분 값)
- F value (정량적 항바이러스 약효 값) : $F = AUG_{treated}/AUG_{control}$

애멸구 및 RSV에서 뿐만 아니라 진딧물 및 CMV에 대해서도 약리반응속도론 모델의 적용 가능 여부를 검토하고자 하였다. 이를 위하여 CMV Fny 균주에 이병된 고추에 접종하여 사육중인 복숭아혹진딧물 무시성충을 수거하여 접종에 사용하였다. 상기 시험 약제를 500배 희석 농도로 시험 고추 유묘에 분무 처리한 다음 진딧물을 유묘 당 3마리를 1분씩 접종하는 방식으로 연속적으로 10주의 시험 유묘에 접종하였다. 각 처리 당 3번의 반복 실험을 수행하여 총 30 주 유묘를 검토하였다. CMV 이병 여부는 특징적인 모자이크 병징을 나타내는 지 육안으로 조사하였다.

(3) 활성물질의 적용스펙트럼 확보 및 농가적용법 연구

본 약리반응속도론 모델을 진딧물이 매개하는 오이모자이크바이러스병(CMV)에도 적용해보고자 하였다. 그러나 진딧물이 매개하는 CMV는 비영속적·기계적 전염방식으로 충체 내에 바이러스 전달에 관한 경시적 변화에 따른 시험 약제의 작용, 즉 충체 내에서 바이러스 전달의 억제를 기대하기 어렵다. 따라서 시험 약제를 시험 작물인 고추에 분무처리 후 복숭아혹진딧물 보독충을 접종하여 발병률을 비교함으로써 시험 약제의 적용스펙트럼을 조사하였다.

실내 연구에서에서 시험 약제의 RSV에 대한 항바이러스 약효와 약효지속 기간이 정량적으로 검토되었으므로 야외 논 포장에서 농가적용법에 대해 기초적인 검토를 수행하고자 하였다. 본 시험 약제의 정확한 작용 기작이 구명되지 않은 상태에서 농가적용법을 최적화하는 것은 어렵기 때문에 본 연구에서는 이양 직전에 애멸구 매개충이 서식하는 논둑에 약제를 처리하고 이양 후 발병률을 무처리구와 비교하는 수준에서 조사를 수행하였다. 애멸구 발생 밀도와 보독충률, 그리고 본논에서의 RSV 발병률은 해마다 상이하고 지역적 차이가 크므로 유연관계가 높고 일관된 조사 및 자료산출이 어렵다. 그럼에도 불구하고 본 연구에서는 상기 사전 개발된 RSV 발병 모니터링 기법을 활용하여 농가 포장에서 실제로 시험 약제가 약효를 보여줄 수 있는지 평가를 시도하였다. 애멸구에 의해 벼에 RSV가 전달되거나 발병시킬 수 있는 가능성은 여러 가지 경우를 갖는다. 1) 월동 애멸구가 이듬해 성충이 되어 이양 후 논둑에서 본논으로 직접 유입되는 경우, 2) 월동 애멸구가 이듬해 성충이 되어 보리, 밀 등

에서 밀도 증식 후 해당 논 또는 인근의 논에서 벼 이앙 후 피해를 입히는 경우, 3) 월동 애벌구가 이듬해 성충이 되어 못자리 묘판에 직접 날아오는 경우, 4) 5월 중하순 이후 중국에서 비래하는 애벌구가 논으로 대량 유입되어 피해를 입히는 경우 등 다양한 경우의 수를 나타낸다. 각각의 경우에서도 애벌구 개체군의 밀도와 개체군 내 보독충율에 따라 발병률은 크게 달라질 수 있다. 따라서 본 연구에서는 논둑에서 월동을 마친 애벌구 개체군이 본논에 벼 이앙 후 직접 유입되어 피해를 끼치는 경우를 가정하여 서산과 양평에서 실험을 수행하였다.

(가) CMV에 대한 항바이러스 약효 검정을 위한 약리반응속도론 모델의 적용

오이모자이크바이러스(CMV)는 진딧물이 기계적으로 매개를 하므로 충체 내에 바이러스가 전달되어 혈액 속에서 순환되는 과정이 없으므로 충체 내에 작용 기작이 있을 것으로 기대하기 어렵다(약제가 혈액과 조직을 통과하는 과정에서 약리반응속도론에 의거한 약효 평가에 대한 논문은 Toutain, et. al., 2002 참조). 따라서 RSV-애벌구에서 약리반응속도론 모델 검정을 수행한 것과는 다르게 진딧물 보독충에 약제를 처리하여 약효를 검정하지 않았다. 시험 약제인 KNF2016 70% AS (제품)과 KNF2016-B (비교약제)를 500배 희석농도에서 시험 작물인 고추 유묘 각 10주에 분무처리 후 자연 건조시키고 유묘 당 3마리 CMV Fny 균주 보독충을 1분간 접종한 후 다음 시험 유묘로 보독충을 옮겨 접종하는 방식으로 연속적으로 10개 식물을 접종하였다. 접종이 끝난 고추 유묘는 온실 내 격리 재배상에서 배양하면서 진딧물 발생 등이 없도록 관리하고, 2주 후 병징을 육안으로 관찰하여 발병 유무를 판단하였다.

(나) RSV에 대한 농가적용법 연구

서산과 양평 각 지역별 무농약 벼재배 1개 논 필지(990m²)에서 네 방향의 논둑에 무처리, KNF2016 70% AS (제품) 500배 처리, KNF2016-B 500배 처리, 대조 약제(애벌구 살충제, 추천농도) 처리를 두고 4월 하순부터 5월 하순 벼 이앙 전까지 각 처리별 시험 약제를 2주 간격 3회 분무 처리하였다. 처리된 논둑에서 애벌구 발생 밀도를 조사하였으며, RSV의 발병률은 7월 초순 논둑으로부터 5번째 줄에서 RSV 이병주율을 육안 조사하여 처리구간 차이를 통계적으로 조사하였다.

3. KNF2016의 안전성 평가

(주)경농 중앙연구소에서는 KNF2016 균주의 대량 발효 및 후처리 공정을 통해 확보된 원제 및 제품에 대한 초기 위해성 평가와 개발 의사결정에 관한 자료의 생산을 국내 안전성평가 및 등록자료 생산 전문시험 연구기관인 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소와 (주)경농 중앙연구소에서 인축독성시험 분야 중 9항목과 환경생태독성시험 분야 중 5항목에 대해 GLP 규정에 따라 실시하였다.

가. KNF2016 원제에 대한 안전성평가

(1) SD계 랫드에 대한 급성경구독성시험

KNF2016 원제에 대한 급성경구독성시험을 농약관리법 농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제 2010-29호, 2010년 10월 13일)에 따라 SD계 랫드를 사용하여 시험물질의 투여량을 1,250, 2,500, 5,000mg/kg B.W.의 약량을 투여액량 10ml의 부피로 단회투여한 후 14 일간 임상증상 및 치사개체를 조사하였으며 실험이 종료되는 투여 후 14 일째 부검하여 장기별 이상 유무를 확인하였다. 투여에 이용한 개체의 체중은 투여당일과 투여 후 7 일, 14 일차에 조사하였다.

실험기간 중 환경조건은 온도 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 30 ~ 70%로 유지하였으며, 광주 조건 12 시간, 암조건 12 시간으로 조절하였다. 급이는 투여 전 4 시간 전부터 절식하였으며, 투여 후 실험종료까지 먹이와 음용수를 지속적으로 공급하였다

(2) SD계 랫드에 대한 급성경피독성시험

KNF2016 원제에 대한 급성경피독성시험을 농약관리법 농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제 2010-29호, 2010년 10월 13일)에 따라 SD계 랫드를 사용하여 시험물질의 투여량을 1,000, 2,000, 4,000mg/kg B.W.로 투여액량 4 ml의 부피로 단회투여한 후 24 시간동안 노출하였다. 노출 후 24 시간 경과 시 노출한 실험물질을 제거하였으며, 투여 후 14 일간 임상증상, 치사개체를 조사하였으며 실험이 종료되는 투여 후 14 일째 부검하여 장기별 이상 유무를 확인하였다. 투여에 이용한 개체의 체중은 투여당일과 투여 후 7 일 및 14 일차에 조사하였다.

(3) New Zealand White계 토끼에 대한 피부자극성시험

KNF2016 원제에 대한 피부자극성시험을 농약관리법 농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제 2010-29호, 2010년 10월 13일)에 따라 New Zealand White계 토끼를 사용하여 시험물질의 투여량을 0.5ml로 설정하여 수컷 6마리 각각에 대해 1회 피부 노출 한

후 72시간동안 치사개체 수, 일반증상 및 체중변화를 관찰, 조사하였다.

실험기간 중 환경조건은 온도 $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 30 ~ 70%로 유지하였으며, 광주 조건 12 시간, 암조건 12 시간으로 조절하였다. 급이는 투여기간동안 먹이와 음용수를 지속적으로 공급하였다.

(4) New Zealand White계 토끼에 대한 안점막자극성시험

KNF2016 원제에 대한 안점막자극성시험을 농약관리법 농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제 2010-29호, 2010년 10월 13일)에 따라 New Zealand White계 토끼를 사용하여 시험물질의 투여량을 0.1ml로 설정하여 수컷 6마리 각각에 대해 1회 안구 노출한 후 72시간 동안 치사개체 수, 일반증상 및 체중변화를 관찰, 조사하였다.

실험기간 중 환경조건은 온도 $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 30 ~ 70%로 유지하였으며, 광주 조건 12 시간, 암조건 12 시간으로 조절하였다. 급이는 투여기간동안 먹이와 음용수를 지속적으로 공급하였다.

(5) 기니 픽에 대한 피부감작성시험

KNF2016 원제의 기니 픽에 대한 피부감작성 정도를 알아보기 위하여 농약관리법 농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제 2010-29호, 2010년 10월 13일)을 이용하여 Hartley계 guinea pig에 피부감작성 시험법 중 Non adjuvant method인 Buehler test를 실시하고, 피부감작성 정도를 관찰 조사하였다.

(6) 미생물복귀 돌연변이시험

KNF2016 원제의 미생물복귀 돌연변이 시험을 통한 돌연변이 유발성의 유무를 검색하기 위해 OECD Guidelines for Testing of Chemicals", Section 4, No. 471: "Bacterial Reverse Mutation Test"를 이용하여 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 균주 TA100, TA1535, TA98 및 TA1537의 4개의 균주와 *Escherichia coli*의 트립토판 요구성 균주인 WP2 $uvrA$ 를 이용하여 시험을 실시하였다.

미생물 복귀 돌연변이실험을 통한 돌연변이 유발성의 유무를 검색하기 위해 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성균주 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537의 4 개 균주와 *Escherichia coli*의 트립토판 요구성 균주인 WP2 $uvrA$ 를 이용하여 실험을 실시하였다. 실험 균주들은 각각의 master plate로부터 15 ml의 전배양액 (2.5% Oxoid nutrient broth NO. 2)에 접종해 진탕배양기(37°C, 180 rpm)에서 약 10 시간 배양하여 사용하였다. 최소영양배지는 1.5% Bacto agar (Difco Laboratories,

Detroit, MI, USA)와 Vogel-Bonner medium E 및 2% glucose를 함유한 것을 25ml 씩 분주하여 사용하였다. Top agar는 0.6% agar와 0.5% NaCl로 조제하였으며, 살모넬라 4개 균주용 top agar에는 0.5 mM histidine-biotin, 대장균용 균주에는 0.5mM 트립토판을 각각 100ml당 10ml씩 첨가하였다. 균주의 형질확인을 위해 *S. typhimurium* 균주들의 경우 histidine 요구성 여부, *uvrB* 돌연변이 유지 여부, R-factor 유지 여부, *rfa* 돌연변이의 유지 여부 및 자발적 복귀돌연변이의 수 등을 검사하였고, *E. coli* WP2*uvrA* 균주에 있어서는 트립토판 요구성 여부, *uvrA* 돌연변이 유지 여부 및 자발적 복귀돌연변이의 수 등을 검사하였다.

실험물질은 dimethyl sulfoxide(Sigma-Aldrich Korea, Seoul, Korea)에 용해하여 처리하였으며, 5,000 μ g/plate를 최고 농도로 하여 1,000, 500, 100 및 50 μ g/plate로 단계 희석하여 실시한 농도설정실험을 통해 결정된 농도를 토대로 하여 본 실험에서의 적용농도는 5,000, 2,500, 1,250, 625 및 312.5 μ g/plate로서 음성 및 양성 대조군과 함께 대사활성화법 미적용 (S9-) 및 적용(S9+) 실험을 함께 실시하였다.

결과 판정은 대사활성계 존재 유, 무에 관계없이 최소 1 개 균주에서 plate 당 복귀된 균총 수가 음성대조에 비하여 명확히 두 배 이상이면서, 용량의존성을 가지며, 그 작용에 재현성이 인정될 경우 양성으로 판정하였다.

(7) 소핵시험

KNF2016 원제의 유전독성을 평가하기 위하여 OECD Guideline for Testing of Chemicals, Section 4, No. 474, "Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test"를 이용하여 ICR계 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 투여한 최고농도는 예비시험을 토대로 하여 시험물질의 가능한 높은 용량이라고 설정한 500, 1,000, 2,000mg/kg으로 정하였다. 8주령 ~ 12주령의 랫드를 순화시킨 후 시험물질을 0, 500, 1,000 및 2,000mg/kg의 농도로 각각의 농도에 대하여 6마리에 단회 경구 투여하였으며, 투여 후 약 24 시간에 골수세포를 수집하여 소핵유발과 세포독성을 평가하였다.

(8) 염색체이상시험

KNF2016 원제의 염색체이상 유발여부를 평가하기 위하여 Chinese hamster 유래의 Lung Cell(CHL)을 이용하여 직접법(-S9 Mix)과 대사활성화법 (+S9 Mix)의 염색체 이상 시험을 실시하였다. 시험물질은 증류수에 희석하는 방식으로 조제하였다.

염색체이상 유발여부를 평가하기 위하여 Chinese hamster 유래의 Lung Cell (CHL)을 이용하여 직접법(-S9 Mix)과 대사활성화법(+S9 Mix)의 염색체 이상 실험을

실시하였다. 실험물질은 DMSO에 희석하는 방식으로 조제하였다. 실험물질의 투여농도는 세포 증식의 약 50% 억제를 기준으로 결정하였으며, 실험물질의 최고농도는 직접법에서는 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 대사활성화법의 경우는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 최고농도로 하여 실험하였다. 본 실험에서 최고농도 이하 3단계 실험농도와 음성 및 양성대조실험을 포함하여 총 5군의 실험군에 대해 염색체 이상을 직접법과 대사활성화법에서 관찰 계수하였다. 최고농도를 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 하여 확인실험(24시간 처리군)도 하였다.

직접법은 면적이 25 cm^2 인 플라스크에 4,000cells/ml의 세포를 5ml씩 분주하여 약 3일간 배양하였다. 실험물질을 투여 시 기존 배양액을 제거하고 신선한 배양액(37 $^{\circ}\text{C}$) 4.95ml을 각 플라스크에 분주한 후 실험물질용액 (50 μl)을 분주하여 5ml가 되도록 처리하였다. 실험물질 처리 6 시간 후에 배양액을 제거하고 5ml의 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4, 37 $^{\circ}\text{C}$)으로 세포층을 1~2 회 세척한 후 제거하고 다시 배양액을 5ml를 분주하여 18 시간 동안 추가 배양하였다. 대사활성화법은 면적이 25 cm^2 인 플라스크에 4,000cells/ml의 세포를 5ml씩 분주하여 약 3일간 배양하였다. 실험물질을 6시간 처리하며, 실험물질 투여 시 기존 배양액을 제거하고 신선한 배양액(37 $^{\circ}\text{C}$) 4.45ml을 분주한 후 실험물질용액(50 μl) 및 S9 Mix (500 μl)를 분주하여 5 ml이 되도록 처리하였다. 6 시간 후 배양액을 제거하고 5ml의 PBS로 세포층을 1~2 회 세척한 후 제거하고 다시 배양액을 5ml를 분주하여 18 시간 동안 추가 배양하였다.

결과판정은 CHL세포의 경우 일반적으로 음성대조군의 염색체이상을 가진 세포의 출현율이 3%를 초과하는 일이 거의 없으므로(Ishidate, 1987) 염색체이상을 가진 세포의 출현율이 5% 미만의 경우 음성, 10% 이상의 경우 양성으로 판정하였다. 단, 용량의존성이 확인되지 않는 경우, 용매대조군에서 염색체이상 출현율이 이상적으로 3%를 초과하는 경우에는 재실험을 실시하였다.

시험물질의 투여농도는 세포 증식의 약 50% 억제를 기준으로 결정하는 것으로, 시험물질의 농도는 직접법과 대사활성화법의 농도를 각각 설정하였다. 직접법의 경우 625, 1,250, 2,500, 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 설정하였으며 대사활성법 역시 동일하게 625, 1,250, 2,500, 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 설정하였다

(9) 반복투여독성시험(rat)

KNF2016 원제의 90-day Dose Range Finding Toxicity Study 및 만성독성시험 투여약량 설정을 위하여 SD 랫드를 사용하여 시험물질의 투여량을 100, 300, 1,000mg/kg B.W.로 설정하여 암 수 각각에 대해 28일 반복투여 한 후 치사 수, 일반 증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사하였다. 상기 시험결과를 바탕으로 설정된 약

량으로 90일 반복투여 한 후 치사 수, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사하였다.

(10) 물벼룩(*Daphnia magna*)에 대한 급성유영저해시험

KNF2016 원제의 물벼룩(*Daphnia magna*)에 대한 급성유영저해 시험을 OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 202, “*Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test”에 따라 48시간 동안 지수식으로 실시하여 일반증상 및 치사율을 관찰, 조사하였다.

(11) 녹조류(*Pseudokirchneriella subcapitata*)에 대한 성장저해시험

KNF2016 원제의 녹조류(*Pseudokirchneriella subcapitata*)에 대한 성장저해 시험을 OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, No. 201 “Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test”를 이용하여 72시간 동안 실시하여 성장저해율을 관찰, 조사하였다.

(12) 잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 급성어독성시험

KNF2016 원제의 잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 급성어독성시험을 OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2, No. 203, “Fish, Acute Toxicity Tests”에 따라 96시간 동안 지수식으로 실시하여 일반증상 및 치사율을 관찰 조사하였다. 시험농도는 100mg/L(nominal concentration)로 하여 본시험을 실시하였다.

(13) 꿀벌(*Apis mellifera*)에 대한 급성섭식독성시험

KNF2016 원제의 꿀벌(*Apis mellifera*)에 대한 급성섭식독성을 평가하고자 농약관리법 농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제 2010-29호, 2010년 10월 13일)을 이용하여 48시간 동안 실시하여 일반증상 및 치사율을 관찰, 조사하였다. 시험농도는 100 μ g a.i./bee(nominal concentration)로 하여 본시험을 실시하였다.

(14) 꿀벌(*Apis mellifera*)에 대한 급성접촉독성시험

KNF2016 원제의 꿀벌(*Apis mellifera*)에 대한 급성접촉독성을 평가하고자 농약관리법 농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제 2010-29호, 2010년 10월 13일)을 이용하여 48시간 동안 실시하여 일반증상 및 치사율을 관찰, 조사하였다. 시험농도는 100 μ g a.i./bee(nominal concentration)로 하여 본시험을 실시하였다.

나. KNF2016 70% AS (제품)에 대한 안전성평가

(1) ICR계 마우스에 대한 급성경구독성시험

KNF2016 70% AS (제품)에 대한 급성경구독성시험을 농약관리법 농약의 등록기준 (농촌진흥청 고시 제 2010-29호, 2010년 10월 13일)에 따라 ICR계 마우스를 사용하여 시험물질의 투여량을 5,000mg/kg B.W.로 설정하여 암·수 각각에 대해 1회 경구투여 한 후 치사 수, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰, 조사하였다.

(2) SD계 랫드에 대한 급성경피독성시험

KNF2016 70% AS (제품)에 대한 급성경피독성시험을 농약관리법 농약의 등록기준 (농촌진흥청 고시 제 2010-29호, 2010년 10월 13일)에 따라 SD계 랫드를 사용하여 시험물질의 투여량을 4,000mg/kg B.W.로 설정하여 암·수 각각에 대해 1회 경피 투여 한 후 2주간 치사 수, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰, 조사하였다.

(3) New Zealand White계 토끼에 대한 피부자극성시험

KNF2016 70% AS (제품)에 대한 피부자극성시험을 농약관리법 농약의 등록기준 (농촌진흥청 고시 제 2010-29호, 2010년 10월 13일)에 따라 New Zealand White계 토끼를 사용하여 시험물질의 투여량을 0.5ml로 설정하여 수컷 6마리 각각에 대해 1회 피부 노출 한 후 72시간동안 치사 수, 일반증상 및 체중변화를 관찰, 조사하였다.

(4) New Zealand White계 토끼에 대한 안점막자극성시험

KNF2016 70% AS (제품)에 대한 안점막자극성시험을 농약관리법 농약의 등록기준 (농촌진흥청 고시 제 2010-29호, 2010년 10월 13일)에 따라 New Zealand White계 토끼를 사용하여 시험물질의 투여량을 0.1ml로 설정하여 수컷 6마리 각각에 대해 1회 안구 노출 한 후 72시간 동안 치사 수, 일반증상 및 체중변화를 관찰, 조사하였다.

(5) 기니 픽에 대한 피부감작성시험

KNF2016 70% AS (제품)의 기니 픽에 대한 피부감작성 정도를 평가하고자 농약관리법 농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제 2010-29호, 2010년 10월 13일)을 이용하여 Hartley계 guinea pig에 피부감작성 시험법 중 Non adjuvant method인 Buehler test 를 실시하고, 피부감작성 정도를 관찰, 조사하였다.

(6) 잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 급성어독성시험

KNF2016 70% AS (제품)의 잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 급성어독성 시험을 OECD Guide lines for Testing of Chemicals, Section 2, No. 203, "Fish, Acute Toxicity Tests"에 따라 96시간 동안 지수식으로 실시하여 일반증상 및 치사율을 관찰 조사하였다. 시험농도는 10mg/L(nominal concentration)로 하여 본시험을 실시하였다.

(7) 물벼룩(*Daphnia magna*)에 대한 급성유영저해시험

KNF2016 70% AS (제품) 물벼룩(*Daphnia magna*)에 대한 급성유영저해 시험을 OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 202, "*Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test"에 따라 48시간 동안 지수식으로 실시하여 일반증상 및 치사율을 관찰, 조사하였다.

제2절 연구개발 수행 결과

1. 활성물질의 대량생산 공정개발 및 제형화

가. 산업용 배지 최적화 및 배양최적화

(1) 배지 조성 변경

(가) 기존 배지조성 : Yeast extract 1%, Glucose 1%, KH_2PO_4 0.1%, Na_2HPO_4 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%

(나) 변경 배지조성 : Yeast extract 2%, KH_2PO_4 0.5%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%

배양 초기 pH 저하를 막기 위해 Glucose를 제거하였으며, 염 농도를 조절하여 배지내 pH를 멸균 종료 후 pH 6.8 수준으로 조절하였다. 이후 Acetic acid를 pH 조절과 함께 탄소원으로 공급하였다.

(2) 무기염 선발 (Flask 검정)

Basal medium(변경 배지조성) + 12종의 무기염 투입을 통한 cell O.D 향상 여부 시험을 통해 4종(KCl , MnCl_2 , MnSO_4 , CaCO_3)의 무기염이 basal medium 보다 cell O.D가 향상됨을 확인하였으며, 그 중 MnSO_4 0.05%를 투입하였을 때 basal medium에 비해 약 2배 가까운 cell O.D 향상이 나타나 산업용 배지로 선발하였다. 이후 5L jar fermenter 최적화 시험은 선발된 MnSO_4 와 MnCl_2 를 이용하여 검토하였다(Fig. 4).

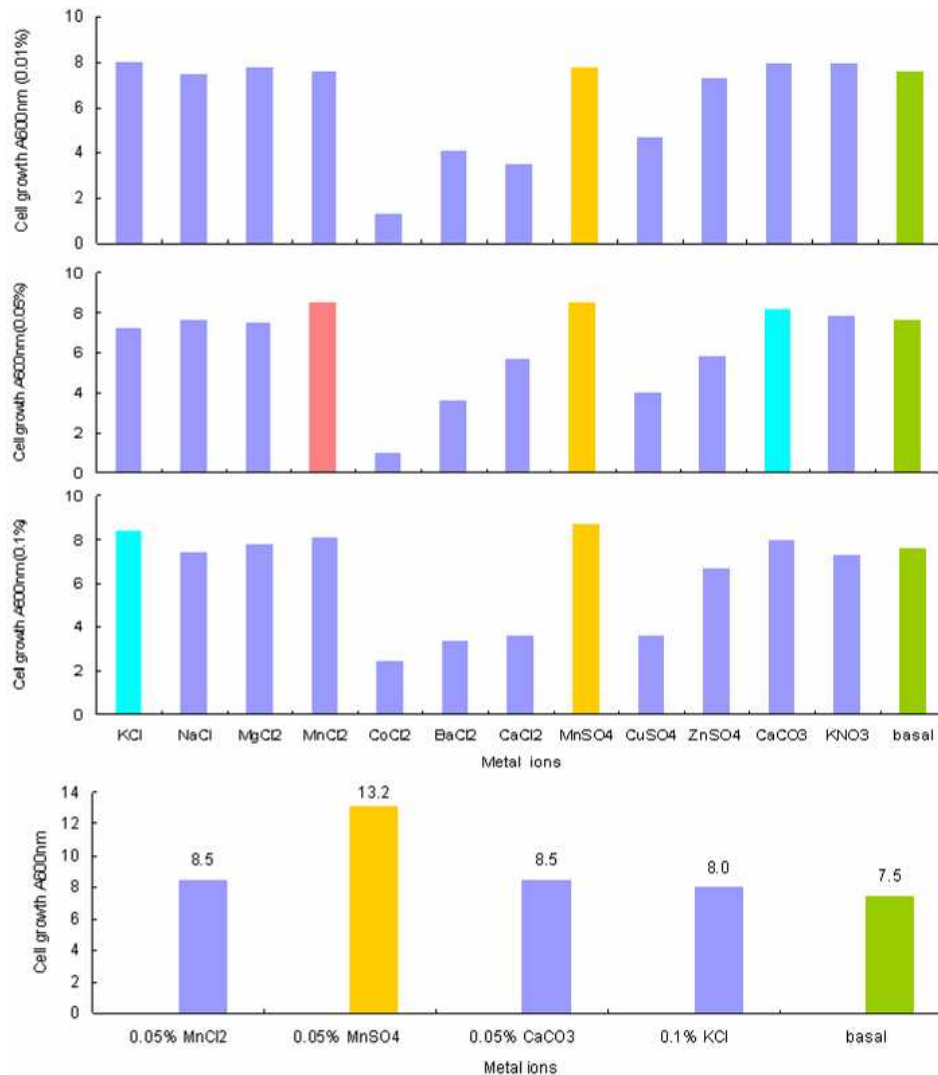


Fig. 4.. Selection of inorganic ion for industrial medium of KNF2016

(3) 5L jar fermenter 배양 최적화

선발된 무기염을 포함한 산업용 배지조건으로 5L jar fermenter 최적화 시험을 실시한 결과 Basal medium의 최대 cell O.D는 48hr에 41.9임에 비해 MnSO₄는 60.8, MnCl₂는 56.2까지 상승한 결과를 얻었다. 이는 배양 초기부터 24hr 이내 cell 생육의 급격한 상승을 통해 높은 수준의 cell O.D가 확보되는 것으로 판단되었다. 이에 따른 생물검정에서도 배양 24hr에 90%에 도달하고, 이후 계속 유지되는 패턴이 나타났다. 이와 같은 결과는 빠른 생육조건 확보를 통해 24hr 배양으로도 활성물질의 생산이 가능하다는 것을 나타내며, cell O.D로는 약 40정도까지만 확보되면 항바이러스 활성에 큰 문제가 없을 것으로 판단되었다(Fig. 5).

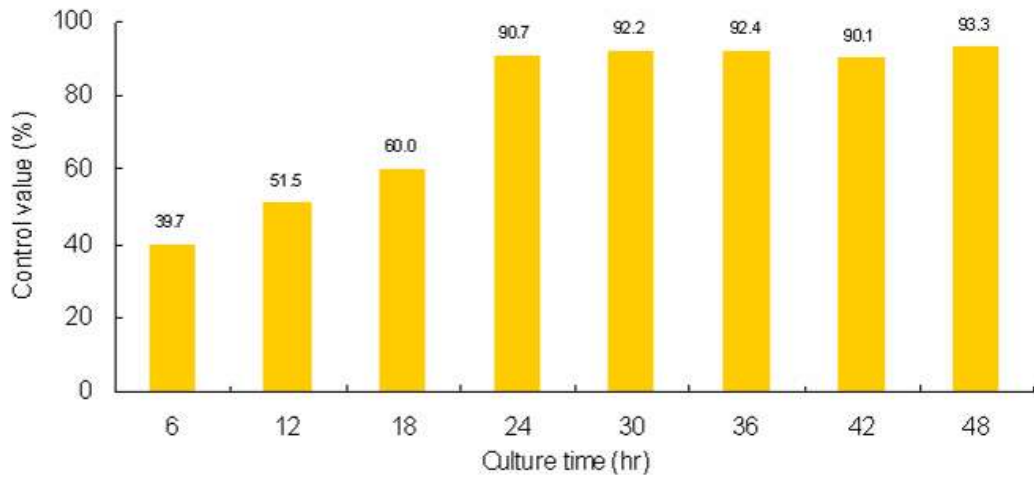
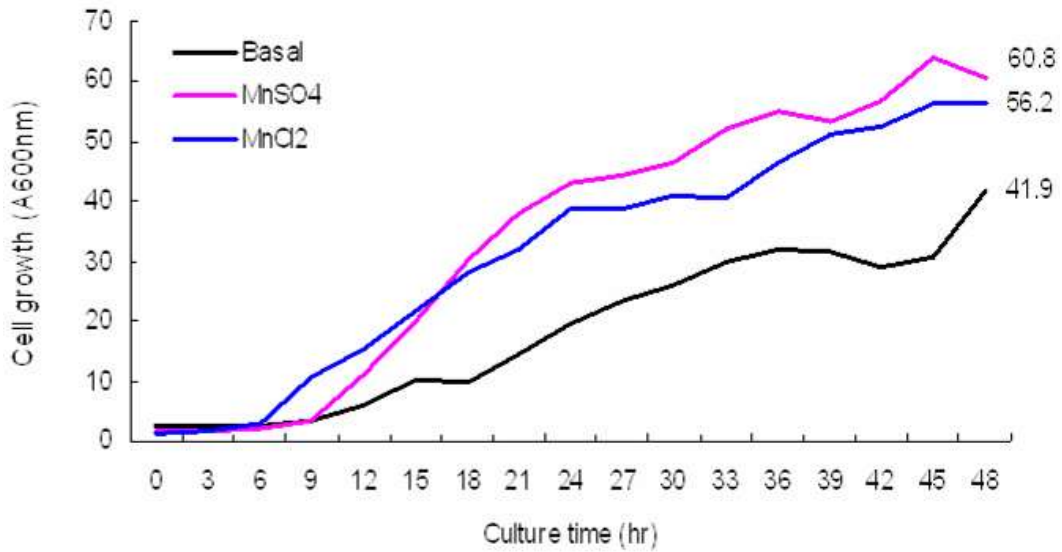


Fig. 5. Optimization of 5L jar fermenter using industrial medium

Cell O.D가 40 이상으로 올라가더라도 CFU와 활성의 증가가 더 이상 이루어지지 않는 것으로 보아 KNF2016의 항바이러스 활성은 CFU와 연동하는 것으로 판단되며, 배양 중에 신속하게 지표로서 활용하기 위해서는 cell O.D를 이용하여 40 이상을 확보하는 것이 필요할 것으로 판단되었다(Fig. 6).

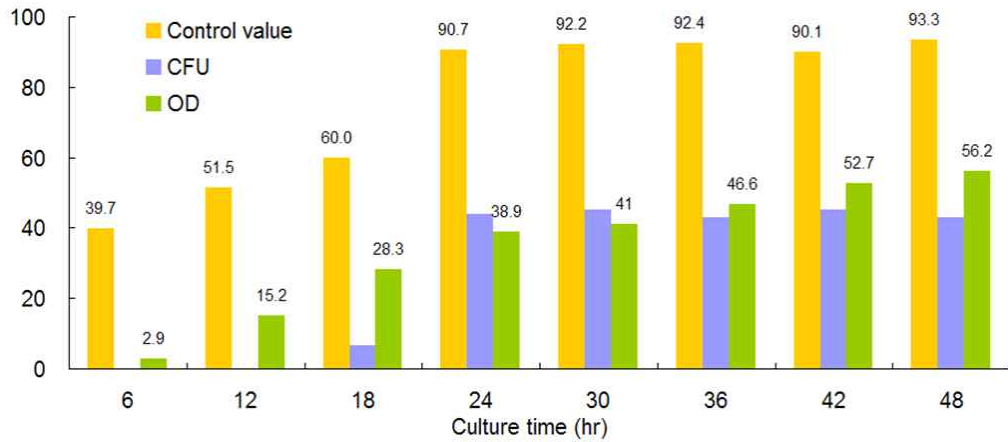


Fig. 6. Effects of $MnSO_4$ to cell O.D (optical density) and antiviral activity

(4) 500L pilot fermenter 배양 최적화

선발된 산업화 배지를 이용하여 500L pilot fermenter에서 최적화 시험을 실시한 결과 5L jar fermenter 와 같은 높은 Cell O.D는 확보하지 못했지만 안정적인 활성이 유지되는 범위인 Cell O.D 40 이상 확보되는 조건을 확립하였다. 배양 종료시간은 5L jar fermenter 보다 8 ~ 10hr 늦은, 총 배양시간은 40hr 이내로 배양이 종료됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 7). 상기와 같이 확립된 조건으로 KNF2016 액상용 원제 300L를 생산하였으며, 이후 원제특성분석 및 안전성검정용 시료로 이용하였고, 일부는 제제화하여 포장 활성검정 및 기타 시험에 이용하였다.

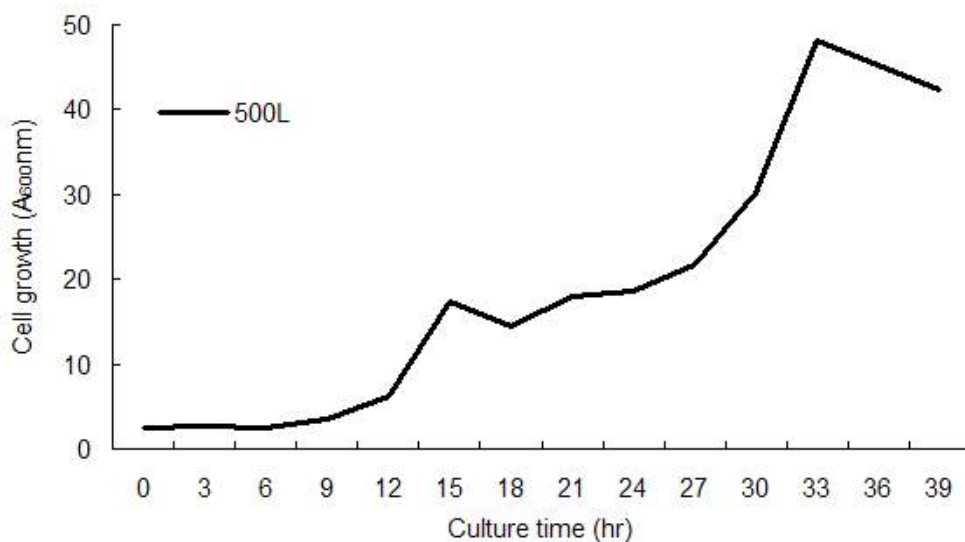


Fig. 7. Optimization of 500L pilot fermenter using industrial medium

(5) 5,000L pilot fermenter 배양 최적화

선발된 산업화 배지를 이용하여 5,000L pilot fermenter에서 최적화 시험을 실시한 결과, Cell O.D 25 정도가 확보되는 조건을 확립하였다. 50L 배양기에서 48시간 배양한 후 O.D 기준 15정도 확보된 상태에서 5000L로 transfer 시켜서 배양하였다. 5,000L에서는 acetic acid를 이용하여 pH 7.5 로 고정하여 배양하다 20 O.D부터 점진적으로 pH를 낮추어 최종 pH 7로 배양하였다. 최종 배양시간은 75시간이었으며, 배양종료시간 산정은 O.D가 감소되는 시점으로 하였다(Fig. 8). 상기와 같은 조건으로 배양하여 재현성 구현여부를 검정한 결과 Fig. 8. 과 유사한 배양 패턴이 나타났다 (Fig. 9).

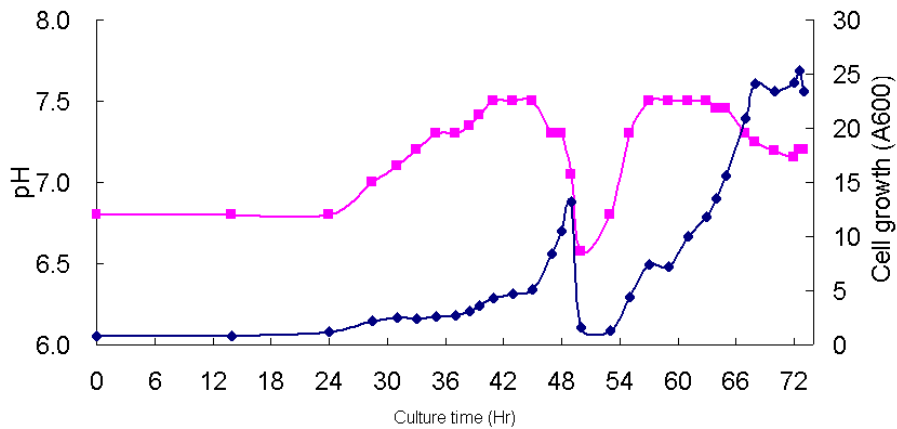


Fig. 8. Optimization of 5,000L pilot fermenter using industrial medium

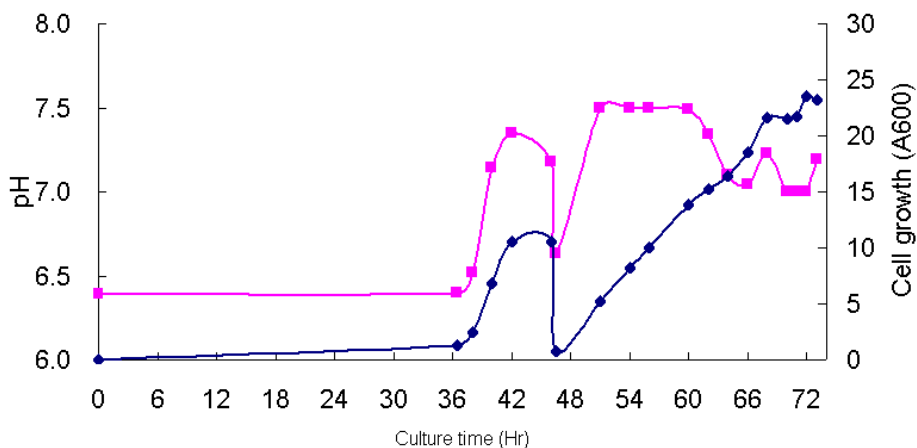


Fig. 9. Optimization of 5,000L pilot fermenter using industrial medium (Reproducibility)

(6) 5,000L pilot 생산시료의 Q. C

5,000L 발효기에서 확립된 배양조건의 적합성 여부의 검토를 위해 생물활성 검정법인 담배 반엽법을 실시하였다. 검정결과 두 번의 배양 모두 기준량인 500배 희석액에서 90% 이상 방제가가 확보되어 안정적으로 배양이 되었음을 확인하였다(Fig. 10). 500L 발효조에서 구현되었던 높은 cell O.D는 확보되지 못하였지만, 생물검정결과 항바이러스 활성이 비교적 높게 유지되는 것으로 보아 5,000L에서의 배양최적화가 완료되었다고 판단하였다.

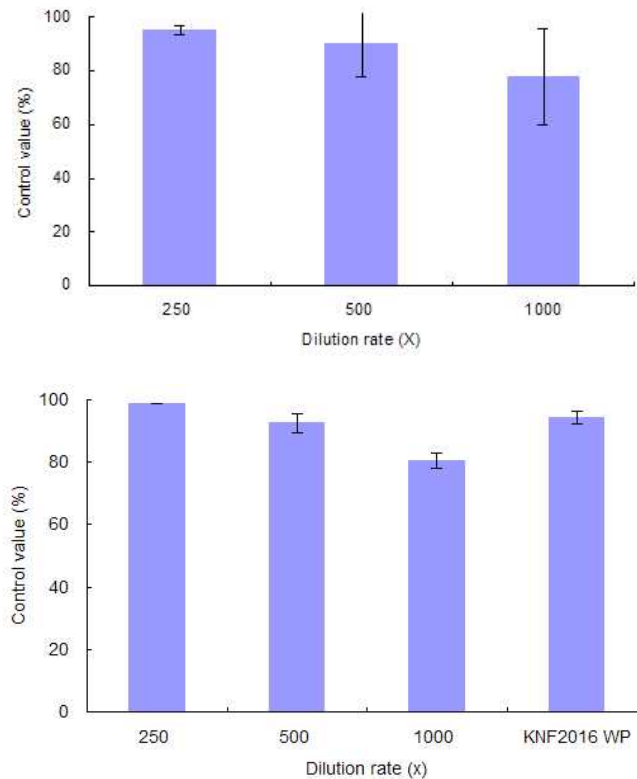


Fig. 10. Antiviral test of 5,000L pilot scale fermentation culture broth (Upper: culture broth of Fig. 8., blow: culture broth of Fig. 9.)

나. 후처리 공정별 가능 제형선발

(1) KNF2016 원제의 특성연구

(가) 열안전성 시험

KNF2016 원제의 열안전성 시험결과 상등액은 온도가 높을수록 활성이 떨어지는데 반해 cell 추출물의 경우 온도에 별다른 영향을 받지 않는 것으로 나타났다(Fig. 11). 이는 KNF2016 균주가 생산하는 항바이러스 활성물질이 단일 물질이 아님을 시사한다.

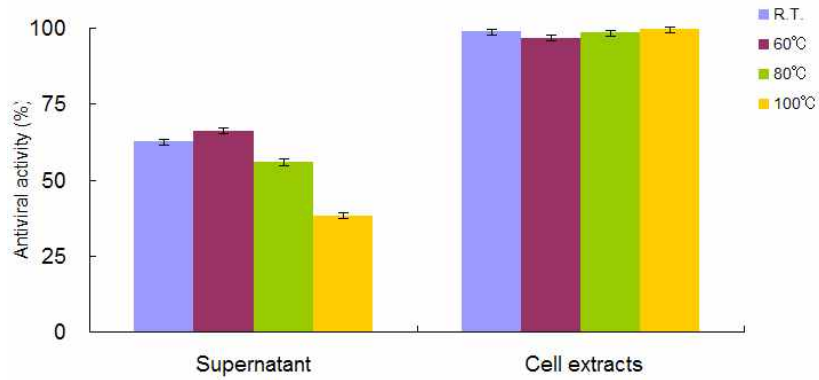


Fig. 11. Thermal stability test of KNF2016 technical

(나) 경시안정성 시험

KNF2016 원제의 경시안정성 시험을 50°C에서 2주간 실시한 결과 활성의 변화 폭이 작게 나타나 생산원제의 유효기간은 농약등록 기준과 방법에 따라 1.5년으로 판단하였다(Fig. 12). 하지만 추후 실온에서 경시안정성 시험과 고온학대 시험기간을 늘린 분석이 필요할 것으로 판단된다.

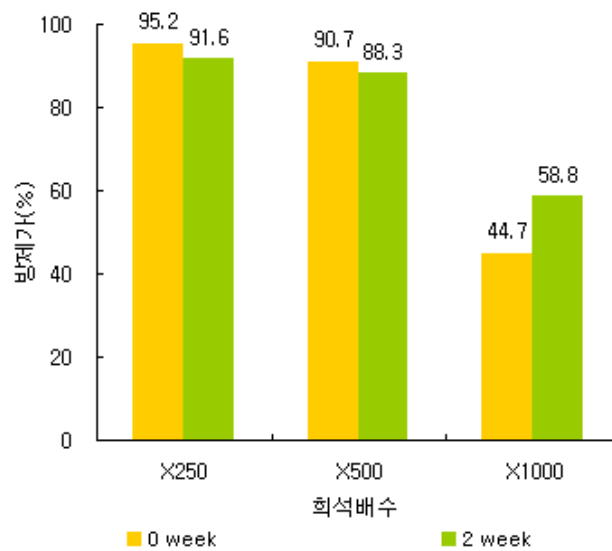


Fig. 12. Aging test of KNF2016 technical

(다) 부제 선발 시험

KNF2016 원제에 별다른 영향을 미치지 않으면서 식물체에 부착이 용이한 계면활성제를 검토한 결과 계면활성제의 종류에 따라 활성의 감소 양상이 다양하게 나타났다(Fig. 13). 이는 활성물질이 계면활성제에 따라 영향을 받을 수 있다고 판단되었다.

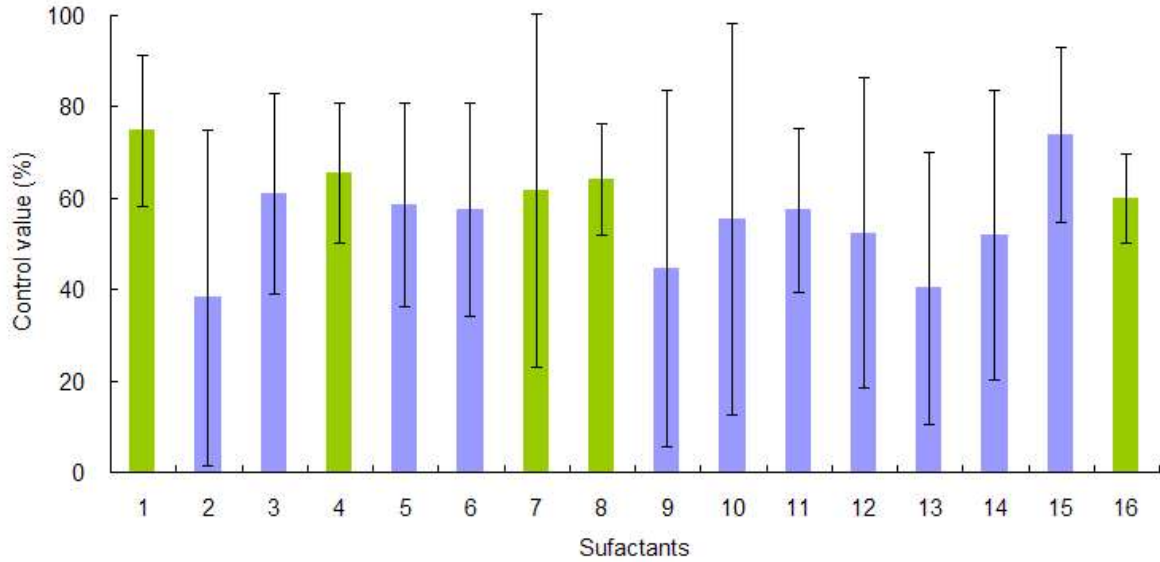


Fig. 13. Stability Testing of surfactants for KNF2016 technical

(2) 후처리 공정 개발 및 최적화

(가) 액상제형용 후처리 공정 개발

기 개발된 고상의 원제는 수화제 제조용으로써 원제의 제조공정상 수분을 제거하는 과정에서 많은 비용과 노동력이 소요된다(Fig. 14). 따라서 보다 산업화에 적합한 후처리 공정의 개발을 위해 고상의 원제 제조과정 중에서 업무량이 높으며, 기간과 비용이 많이 소요되는 항목에 대해 보다 효율적인 산업화 공정으로의 변경을 모색하였다.

공정 변경 대상 항목으로는 ① 균주사멸 process, ② 배양액 농축 process, ③ 동결건조 process, ④ 원분 파쇄 process를 선정하였으며, 다양한 방법으로 산업화에 최적화된 원가절감형 공정을 검토하였다.

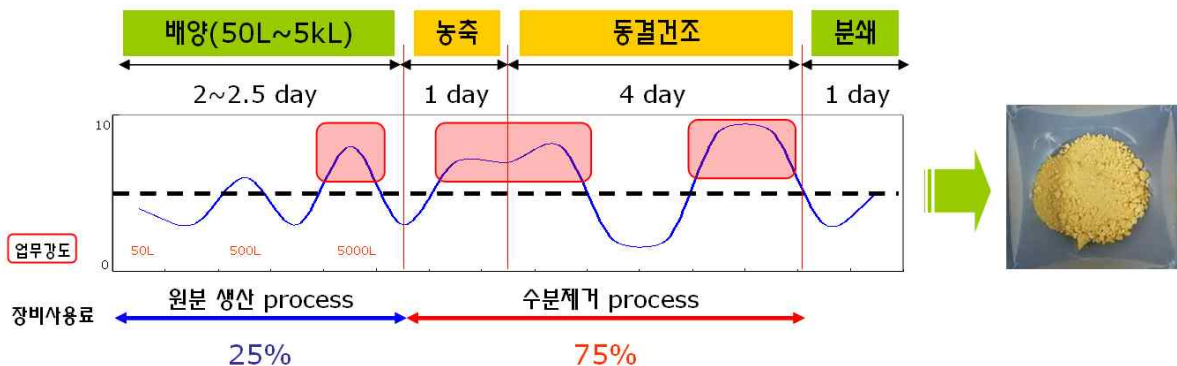


Fig. 14. Manufacturing process of KNF2016 solid technical

(나) 균주사멸 공정 검토

시험결과 균주를 사멸시키지 않은 배양액과 상등액에서는 원균주와 다양한 오염균주가 함께 생존해 있음이 확인되었으며, 약 15% 정도의 활성이 감소되는 것을 알 수 있었다. 그에 반해 액상제형에서는 A, B, C 모두 배양액, 상등액 모두 원균주 및 오염균주가 없음이 확인되었으며, 상등액보다는 배양액으로 제조한 액상제제가 활성이 뛰어난 것을 확인하였다. 3가지 액상제형 타입 중에서는 B타입이 가장 우수하게 나타났다(Fig. 15). 따라서 향후 액상제형 검토에서는 배양액을 이용하고, B타입의 제형으로 진행하였다. 참고로 A타입 같은 경우는 담배에서 약해를 일으켰다(Fig. 16).

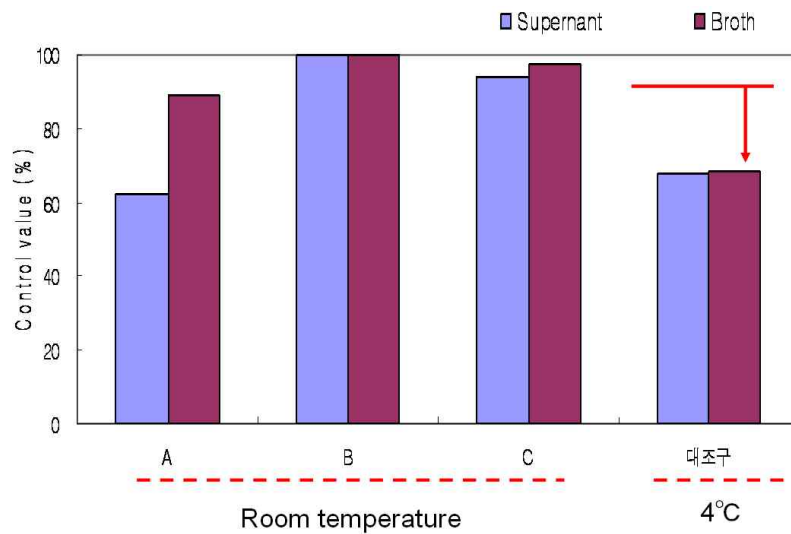


Fig. 15. Review the possibility of deterioration of KNF2016 liquid technical (storage 2 month)



Fig. 16. Appeared phytotoxicity of KNF2016 liquid formulation type A

B 타입의 액상제형이 활성화도 뛰어나고, 균주사멸도 이루어지는 특성이 나타나 성분별 균주 사멸 정도를 측정한 결과 surfactant 3을 처리할 경우 KNF2016균주와 오염균주 모두 발생하지 않는 것으로 나타나 균주 사멸효과가 매우 뛰어난 것으로 나타났다(Fig. 17). 따라서 surfactant 3는 균주사멸 process의 대체가 가능하여 후처리 공정의 1 step 생략을 가능하게 해주었다.



Fig. 17. Bactericidal effects of B type liquid formulation ingredients

(다) 배양액 농축 공정 검토

B 타입 액상제형의 제조를 위해 농축여부를 결정하는 것은 시판될 최종희석 농도에서 활성이 나타나는지 여부에 따라 결정된다. 기존의 수화제형의 제품은 500배 희석했을 때 90% 이상의 방제효과가 나타나(담배 반엽법) 이를 기준으로 액상제형의 농축 여부를 결정하기 위해 serial dilution 담배 반엽법을 실시한 결과 배양액으로 액상제형을 제조할 경우 500배에서 80% 에 가까운 방제효과가 나타나 농축 없이 배양액 자체로 제제화하여도 가능할 정도의 효과가 나타났다(Fig. 18). 따라서 B 타입 액상제형의 경우 배양액 농축 process, 동결건조 process, 원분 파쇄 process의 대체가 가능하여 후처리 공정의 3 step 생략이 가능하게 되어 획기적인 원가절감이 가능하게 되었다.

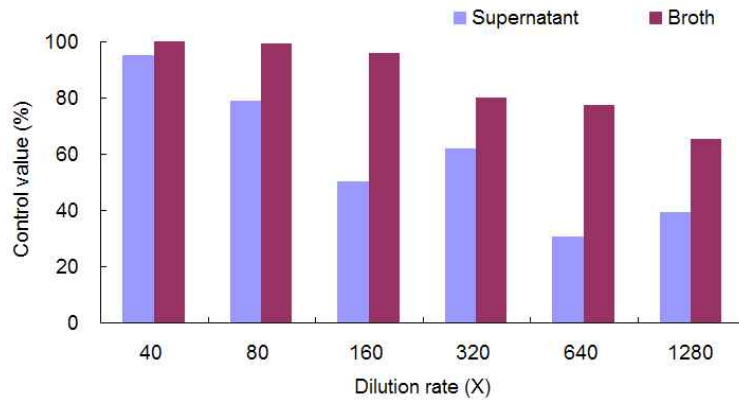


Fig. 18. The degree of antiviral activity of KNF2016 B type liquid formulation

(라) 후처리 공정 최적화

B 타입의 액상제형의 제조를 위한 후처리 공정은 배양이 종료된 KNF2016 배양액에 surfactant 3을 적정의 비율로 투입하여 균주를 사멸시켜 고상의 원제 제조 공정에서 큰 문제점이었던 균주사멸 process, 배양액 농축 process, 동결건조 process, 원분 파쇄 process 부분을 해결하였다(Fig. 19).

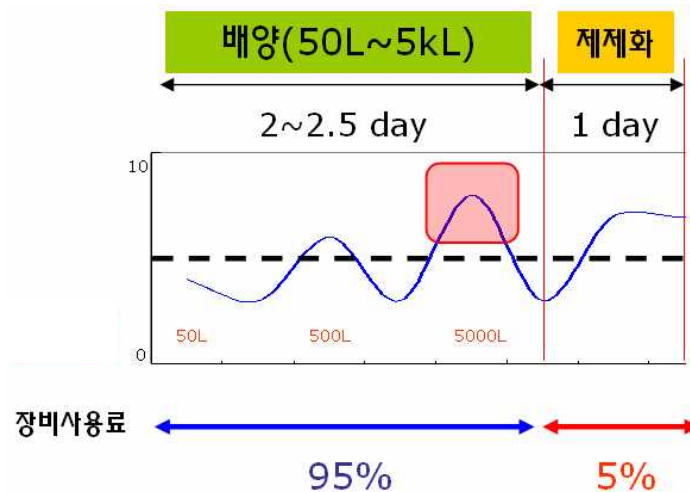


Fig. 19. The down-stream process for liquid b type formulation of KNF2016

(3) 제제화 연구

(가) 생물검정법 확립

바이러스 시험에 이용되는 생물검정법 가운데 반염법(Fig. 20)이 가장 간단하고도 신뢰할 수 있는 방법(생명과학대사전, 강영희 저, 2008)임에도 불구하고 변이차가 크기 때문에 제제화에 적합한 부제의 선발이나 발효최적화 조건선발 등과 같은 미

묘한 차이를 선별해내는 시험에서는 적합하지 않을 수 있다(Fig. 21). 따라서 항바이러스 활성의 유효기간에 영향을 미치는 부제 선별과 같은 시험에는 보다 적합한 시험방법으로의 개선이 반드시 필요하다.



Fig. 20. Bioassay method for evaluation for antiviral effects using tobacco (Half-leaf method)

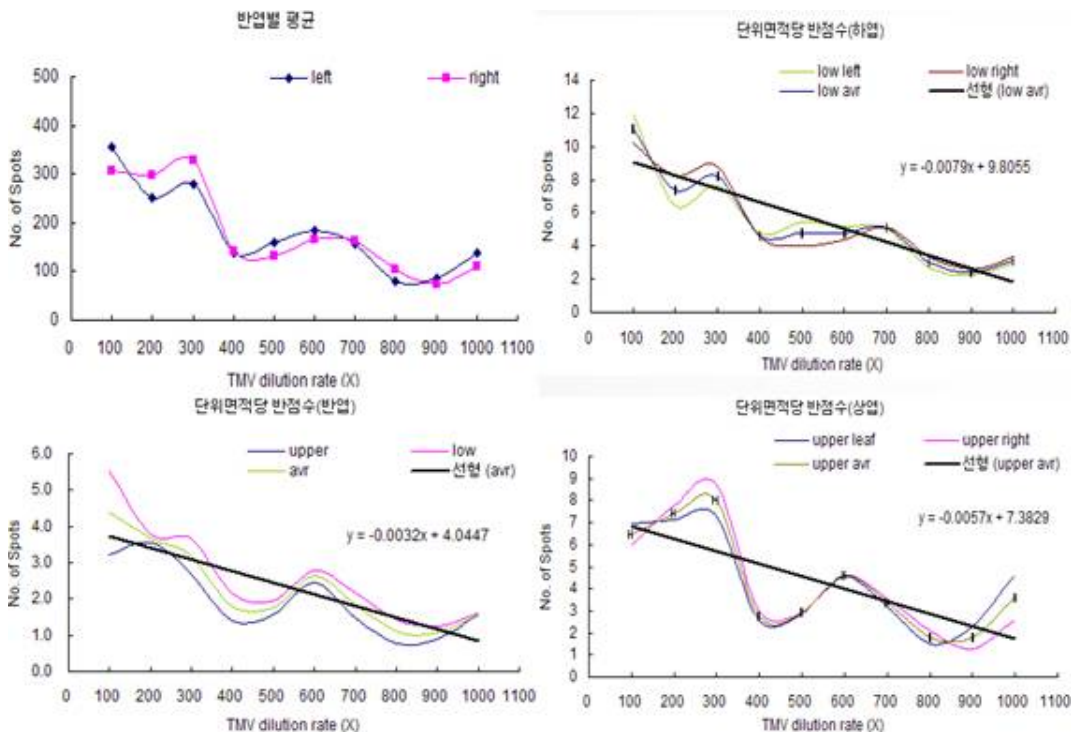


Fig. 21. The pattern of TMV spot number revealed to tobacco half-leaf method

본 시험에서는 (주)경농에서 확보되어있는 TMV 감염 조증액을 base로 하고, KNF2016 원제의 농도를 달리하여 혼합시켜 TMV 바이러스를 불활성화 시키는 방법인 혼합접종법을 이용하여 유효기간 연장에 적합한 부제 선발을 위한 시험법으로 이용하였다. 먼저 부제 선발에 적합한 시험법 선발을 위해서 KNF2016 원제의 농도 선발 시험을 진행한 결과 농도 구배에 따른 TMV 불활성효과가 나타남이 확인되었다(Fig. 22).

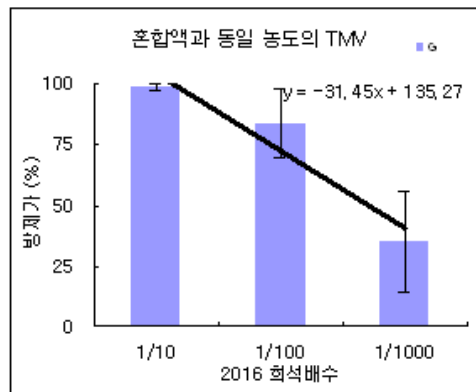


Fig. 22. The pattern of TMV spot number according to degree of density of KNF2016 technical

KNF2016 원제와 TMV 감염 조증액과의 혼합시간에 따른 활성 저해 정도를 측정한 결과 KNF2016 원제의 TMV 불활성화 속도는 매우 빠르게 나타남이 확인되었으며, 혼합의 강도에 따른 영향도 없는 것으로 나타났다. 따라서 이후 시험에서는 혼합 후 vortex로 1min간 혼합하여 시험을 진행하였다(Fig. 23).

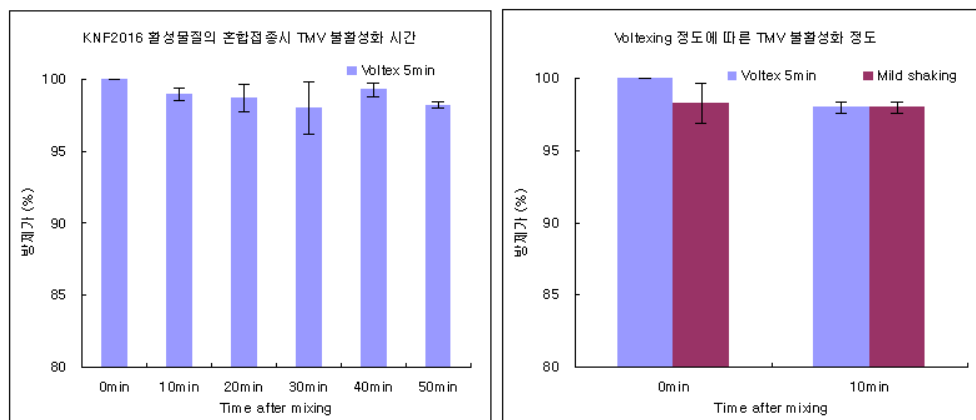


Fig. 23. The antiviral activity pattern according to mixture-inoculation of TMV and KNF2016 technical

(나) 유효기간 연장용 부제 선발

혼합접종의 구체적인 비율 설정을 위해 TMV 감염 조증액의 농도를 고정시킨 뒤 KNF2016 원제의 농도를 달리하여 시험한 결과 TMV 감염 조증액 : KNF2016 원제 : 부제의 비율이 900 : 25 : 75 일 때 활성의 차이가 나타났고 그 이상의 고농도에서는 활성의 차이가 나타나지 않았다(Fig. 24). 따라서 이후 실험에서는 상기의 농도로 시험을 진행하였다.

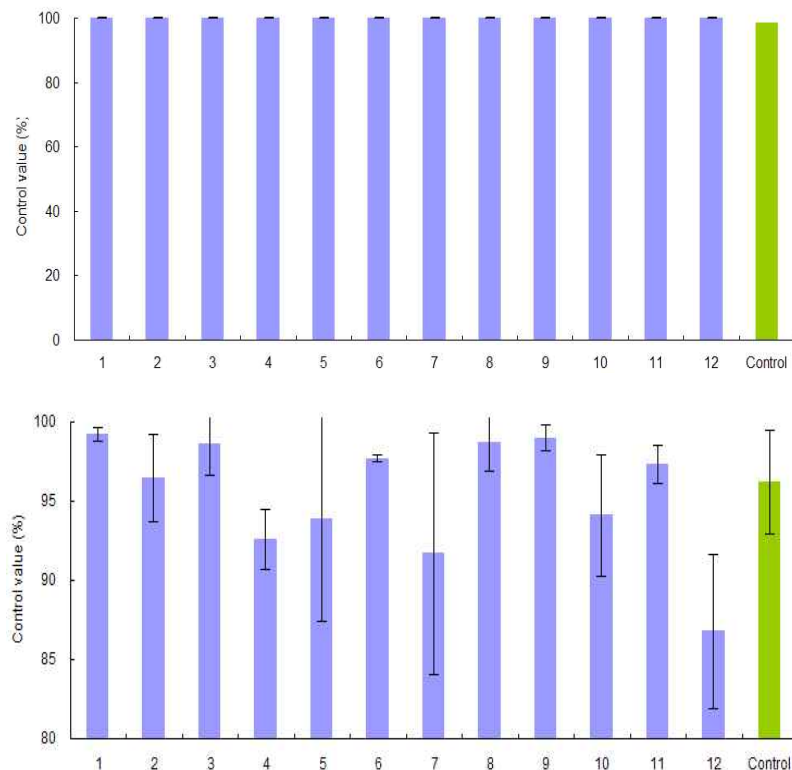


Fig. 24. The mixture-inoculation ratio of selected adjuvants for prolongation of effective duration

(tobacco sap of infected TMV : Technical of KNF2016 : Adjuvant)

Upper: (900 : 25 : 75), below: (900 : 50 : 50)

앞에서 선발된 혼합접종비율로 12가지 부제에 대해 활성저해 여부를 검정한 결과 4, 7, 10, 12의 부제는 KNF2016 원제의 항바이러스 활성을 저해하는 것으로 나타나 (Fig. 24, 상) 이후 시험에서는 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11의 부제로 시험하였다.

(다) 선발된 부제의 경시안정성 시험

농약의 유효기간 연장을 위한 부제 선발 시험은 농약 관리법에 고시되어 있는 가속 시험으로 진행하였다. 54°C incubator에 넣고 가속시험을 하면서 2주, 3주, 4주, 6주째 샘플링 한 뒤 담배 반엽법으로 활성의 변동유무를 측정하였다. 시험결과 대부분의 부제들은 시간이 지남에 따라 활성이 감소하는데 반해 8번 부제는 6주후에도 안정적인 활성이 유지되는 것으로 나타났다(Fig. 25). 따라서 유효기간 연장용 부제로써 8번 부제를 선발하였다.

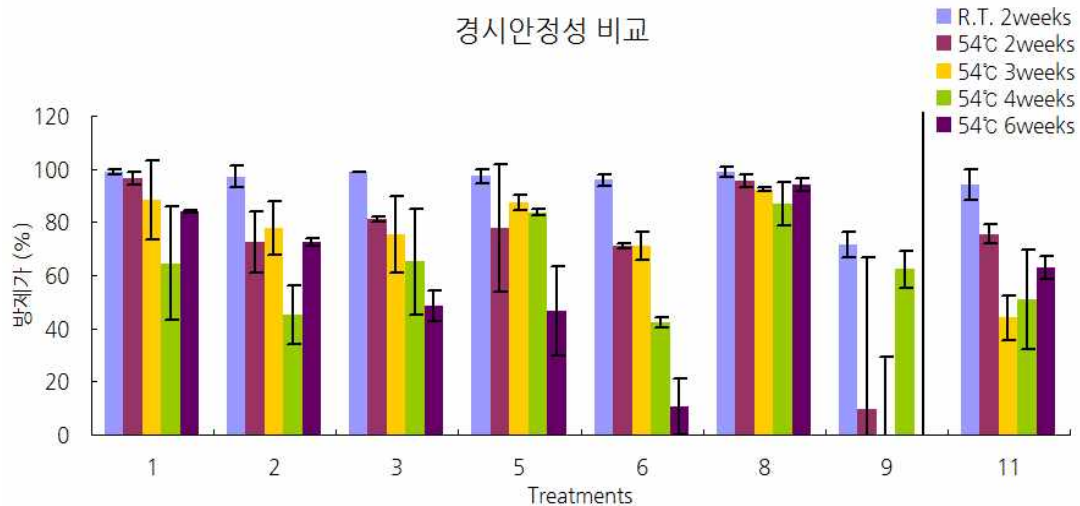


Fig. 25. The selection test of adjuvant for prolongation of KNF2016 effective duration

다. 시제품 생산

(1) 포장 및 안전성 시험용 원제생산

선발된 산업용배지를 이용한 500L pilot fermenter 최적화 조건 시험에서 300L를 생산하였다. 생산된 액상원제는 상등액과 cell, 액상제형 3가지 시료로 제조하여 담배 활성검정을 실시한 결과 상등액보다 cell에 활성물질이 함유 비율이 높았으며, 액상제 제화 하였을 때의 활성이 기존에 선발된 수화제와 비등한 활성이 나타나 생산된 원제의 활성은 매우 우수한 것으로 판단하였으며, 500L pilot fermenter 조건의 확립도 이루어진 것으로 판단하였다(Fig. 26).

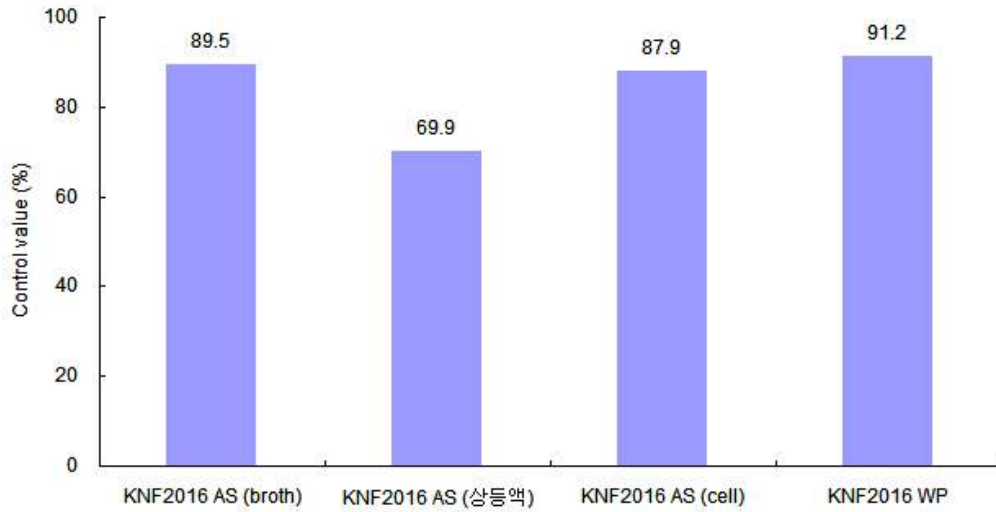


Fig. 26. The antiviral test of production technical for field and hazard assesment

(2) 시제품 생산 및 안정성 분석

(가) 시제품 생산용 시료의 배양

선발된 산업화 배지를 이용하여 5,000L pilot fermenter에서 시제품 생산을 실시하였다. 먼저 48hr 배양한 seed 1.5L를 50L에 접종한 결과 기존에 48시간째 transfer 하던 것에 비해 24시간 만에 transfer를 할 수 있을 정도로 Cell O.D가 확보되었으며, 이후 5,000L에서 48hr에 Cell O.D 25 정도가 확보되었고, 추가적으로 pH를 점진적으로 7까지 하향 조정하여 배양시간을 늘린 결과 최종 Cell O.D가 32까지 확보되었으며 50L에서 5,000L까지의 배양시간은 72시간이 소요되었다(Fig. 27).

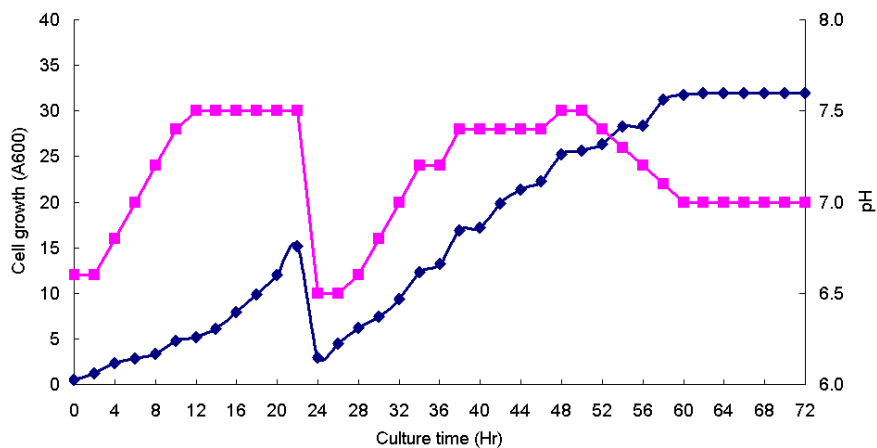


Fig. 27. The graph of 5,000L fermentation about trial production

(나) 시제품 생산용 액상원제의 생물검정

5,000L 발효기에서 생산된 시제품 생산용 액상원제의 적합성 여부를 검토하기 위해 3차 년도에 새롭게 세팅된 생물검정법 (Q. C 용)을 적용하였다. 시험 결과 생산된 액상원제는 500배 희석액에서 방제가 95% 가까이 나타나 시제품 생산용으로 이용하기에 적합하였다(Fig. 28).

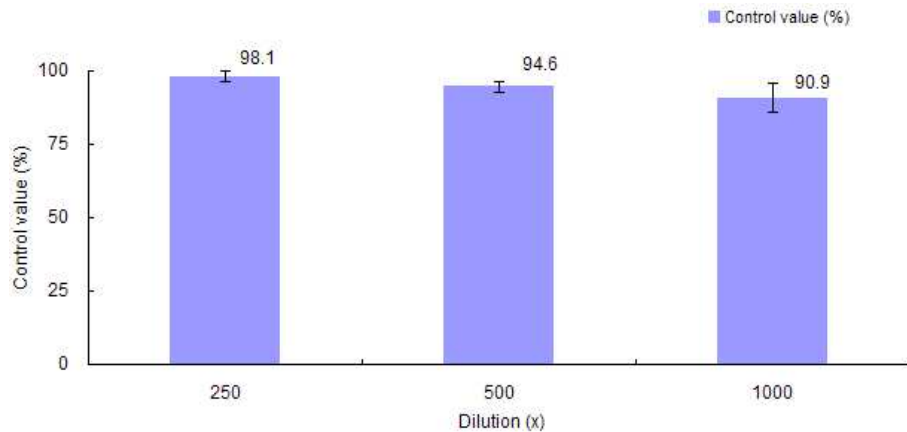


Fig. 28. The antiviral test result of liquid technical for trial production

(다) 시제품 제조용 처방

유효기간 연장을 위한 부제로서 8번 부제가 선발되었다. 천연식물보호제에 있어서 적절한 보조제의 선발은 이번 시험에서 나타난 것처럼 유효성분의 안정성 및 활성에 미치는 영향이 크므로 처방검토에 필수적인 과정이라고 할 수 있다. 선발된 부제 8번은 친환경적으로 사용이 가능한 음이온성 계면활성제로서 습윤 및 분산 기능을 가지는 부제이다. 이를 활용하여 액상제로의 처방 가능성을 경제성 및 기존의 습윤/분산제와의 혼용성을 기준으로 검토한 결과, 기존의 습윤/분산제 2종보다는 1종과 혼용하는 것이 최적인 것으로 판단되었고 경제성을 고려하여 처방5번을 선발하였다(Table 2). 처방 확립된 시료는 농약관리법상의 검사항목인 분말도의 경우 325mesh에서 90% 이상이 통과됨에 따라 액상제로 사용하는데 적합한 것으로 판단되었다. 이에 따라 제조된 액상제 시료는 상품화의 가능성을 검토하고자 경시안정성 시험용 시료로 사용하였다.

Table 2. The results for recipe of KNF2016 using selected adjuvants

1) The results of recipe

| Name | Recipe 1 | Recipe 2 | Recipe 3 | Recipe 4 | Recipe 5 | Note |
|-----------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|------|
| KNF2016 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | |
| Wetting/dispersing agents 1 | 7.5 | 7.5 | - | 7.5 | 5 | SDSS |
| Wetting/dispersing agents 2 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | - | - | PAE |
| Wetting/dispersing agents 3 | - | 2 | 2 | 2 | 2 | SAS |
| Co-formulant 1 | 20 | 18 | 25.5 | 20.5 | 18 | IAA |
| Co-formulant 2 | - | - | - | - | 5 | GAF |
| Total | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | |

2) The results of physical property

| Review list | Recipe 1 | Recipe 2 | Recipe 3 | Recipe 4 | Recipe 5 | Standard of consideration |
|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------------|
| Form of formulation | Aquatic suspension | Aquatic suspension | Aquatic suspension | Aquatic suspension | Aquatic suspension | |
| Appearance | Gray liquid | Layer separation | Layer separation | Gray liquid | Gray liquid | |
| pH | 7.2 | 7.2 | 7.2 | 7.2 | 7.2 | |
| Finess | Good | Good | Good | Good | Good | 44 μ m, 90%up |

(라) 시제품의 경시안정성

새로이 확립된 처방으로 제조된 시료에 대하여 상품화 가능성을 검토하고자 경시 안정성 시험을 실시하였다. 경시 안정성은 유통기한 설정을 위한 시험으로서 유통기한은 제품의 경제성에 미치는 영향이 매우 크므로 상품화 가능성을 평가하기 위해서는 필수적인 검토 항목이라고 할 수 있다. 유통기한 설정을 위해서는 일반적으로 시간 절약을 위하여 실온보다는 고온에서의 경시적인 안정성 시험을 실시하게 되는데, 농약관리법에서는 54°C 고온에 보관하면서 2주 간격으로 시료를 채취하여 안정성을 검토하도록 추천하고 있다. 이에 따라 제조된 시료를 농약관리법에 준하여 고온에서의 경시 안정성 시험을 실시하였다. 그 결과, 새로운 확립된 처방의 시료는 고온보관 6주 이후에도 안정적인 활성이 유지되는 것으로 나타났다(Fig. 29). 이에 따라 새로이 확립된 처방의 경우, 기존 처방보다 유효기간이 연장될 것으로 판단되었다.

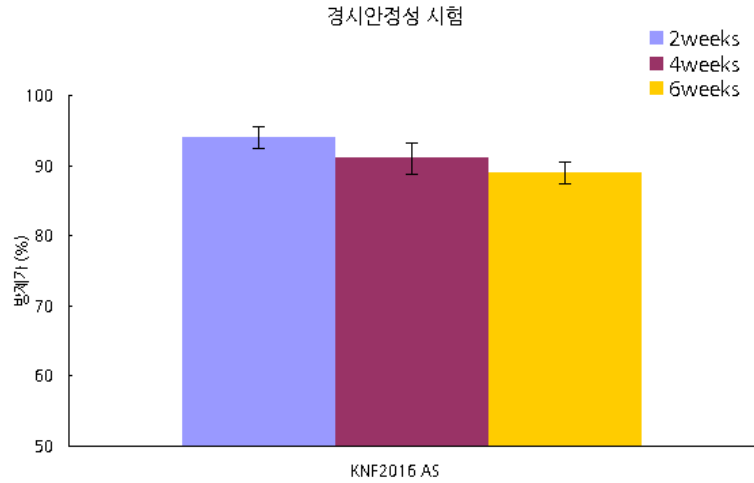


Fig. 29. Aging test of trial product

라. 유용곤충 및 화학농약에 대한 영향평가

(1) 꿀벌에 대한 영향 평가

(가) 시험계

- 시험생물 : 꿀벌(*Apis mellifera*)

- 공급원

명칭 : 대전 양봉원(대전광역시 동구 삼성동 306-8, ☎ 042-636-9896)

- 시험계 입수일 : 2009년 4월 20일

- 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제2009-1호 농약의 독성시험기준과 방법에 꿀벌의 엽상잔류독성시험의 경우 시험 생물은 꿀벌을 사용하도록 되어 있으며, 꿀벌은 농약의 엽상잔류독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험 결과의 해석 및 평가에 용이하여 이용하였다.

- 순화 및 사육

시험생물은 실외에서 사육하였으며, 벌통 안에 꿀이 많이 형성되어 있어서 추가적인 먹이는 공급하지 않았다.

(나) 시험방법

① 시험물질 처리

시험물질처리를 위해 그물망이 설치된 사각pot(500×400×100mm)케이지에 시험물질 처리 30일 전 딸기 유묘 6주를 이식하였다. 시험 당일 오전(9시) 시험 약제(KNF2016 원제)를 기준량, 배량으로 희석하였으며 살포 방법은 500ml/1,000m²의

비율로 경엽살포이프로 딸기 유묘포트 0.2m²에 KNF2016 원제의 기준량과 배량 희석액을 소형분무기를 통해 딸기 잎에 골고루 살포하였다.

② 시험 생물의 처리

시험 당일 오전(10시 ~ 11시)에 시험에 이용할 꿀벌을 벌통으로부터 채집한 후 CO₂ gas를 이용하여 약 2분간 마취 후 시험용기별로 20마리씩 3반복으로 수용하였다. 군 분리시 시험에 이용할 개체의 110%를 군 분리하여 시험물질 처리시 꿀벌 상태를 확인하여서 양호한 개체를 투입하였다. 각각의 시험군은 시험 약제 처리 후 1시간, 4시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일이 경과한 후에 24시간 동안 시험 약제가 처리된 땅으로 둘러싸인 딸기 유묘에 노출되었다. 각 단계별로 24시간 후 치사 개체수를 조사하였고 만약 치사개체가 있는 경우는 기존 꿀벌을 제거한 후 새로운 꿀벌을 각 20마리씩 투입하였고 단계별 꿀벌 치사개체가 없는 경우는 시험을 종료하였다. 대조군은 동일하게 방법으로 처리가 되지 않은 딸기 유묘포트가 있는 케이지에 꿀벌을 투입하고 치사 개체수를 조사하였다.

(다) 관찰 및 조사항목

① 일반 중독증상 및 생사수

시험물질 처리 1시간, 4시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일 후 24시간동안 시험 물질이 처리된 딸기유묘에 노출된 꿀벌의 일반 중독증상 및 생사수를 관찰 조사하였다. 꿀벌의 더듬이, 날개, 다리 등의 움직임이 없는 개체를 치사개체로 판단하였으며 또한 기능장애, 운동실조, 혼수, 빈사, 과민반응 등의 일반중독증상을 보이는 개체 또한 치사개체로 판단하여 조사하였다.

(라) 시험결과

시험에 사용한 KNF2016 원제는 기준량과 배량에서 처리 후 1시간과 4시간에서 약 10%의 치사율을 나타내었지만 처리 후 1일부터는 치사개체가 없어 RT₂₅ 값이 1시간 미만으로 나타났다(Table 3, 4). 이는 KNF2016 원제 살포 1시간 후면 꿀벌에 영향을 미치지 않는다는 것으로 판단된다.

Table 3. According to the duration of exposure to lethal population

| 구 분 | | 반복 | 노출 개체수 (마리) | 약제처리 후 투입 시간대별 치사 개체수 (노출시간: 24hr) | | | | | | | | |
|-------------------|----------------------|----|-------------------|------------------------------------|-----|----|----|----|----|----|----|----|
| 약제명 | 희석배수 (처리 약량) | | | 1시간 | 4시간 | 1일 | 2일 | 3일 | 4일 | 5일 | 6일 | 7일 |
| KNF 2016 원제 | 500배 (0.1ml/50ml) | 1 | 20 | 3 | 2 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| | | 2 | 20 | 2 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| | | 3 | 20 | 1 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| | 250배 (0.2ml/50ml) | 1 | 20 | 2 | 1 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| | | 2 | 20 | 4 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| | | 3 | 20 | 1 | 3 | 0 | - | - | - | - | - | - |

Table 4. According to the duration of exposure to lethal rate (%)

| 구 분 | | 반복 | 노출 개체수 (마리) | 약제처리 후 투입 시간대별 치사율 (%) (노출시간: 24hr) | | | | | | | | |
|-------------------|----------------------|----|-------------------|-------------------------------------|-----|-----|----|----|----|----|----|----|
| 약제명 | 희석배수 (처리 약량) | | | 1시간 | 4시간 | 1일 | 2일 | 3일 | 4일 | 5일 | 6일 | 7일 |
| KNF 2016 원제 | 500배 (0.1ml/50ml) | 1 | 20 | 15 | 10 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| | | 2 | 20 | 10 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| | | 3 | 20 | 5 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| | | 평균 | - | 10.0 | 3.3 | 0.0 | - | - | - | - | - | - |
| | 250배 (0.2ml/50ml) | 1 | 20 | 10 | 5 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| | | 2 | 20 | 20 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| 3 | | 20 | 5 | 15 | 0 | - | - | - | - | - | - | |
| 평균 | | - | 11.7 | 6.7 | 0.0 | - | - | - | - | - | - | |

(2) 서양뒤영벌에 대한 영향평가

(가) 시험계

- 시험생물 : 서양뒤영벌(*Bombus terrestris*)

- 공급원

명칭 : (주)세실(충청남도 논산시 연무읍 동산리 135번지, ☎041-740- 8000)

- 시험계 입수일 : 2009년 5월 12일

- 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제2008-4호 농약의 독성시험기준과 방법에 꿀벌의 염상잔류독성시험의 경우 시험 생물은 꿀벌(*Apis mellifera*)을 사용하도록 되어 있으나, 토

마토 재배지역의 경우 화분매개충으로 서양뒤영벌(*Bombus terrestris*)을 이용하고 있어서 본 시험에서는 시험생물로 서양뒤영벌을 이용하였다.

- 순화 및 사육

시험생물은 반드시 여왕벌이 있는 벌통에 관리하였으며 시험기간 동안 24시간 간격으로 화분가루를 지속적으로 공급하여 주었다.

(나) 시험방법

- 작물재배
- 작물명 : 토마토 (도태랑 슈퍼)
- 공급원 : 산포농협 육묘장
- 파종일 : 2010년 3월 2일
- 정식일 : 2010년 4월 20일
- 재배면적 : 시설하우스 660m² (200평)
- 망사설치

망사는 한 냉사를 이용하였으며 시험구당 토마토가 15주 정도 들어가는 크기인 6미터 길이로 망사를 씌웠다. 망사를 씌우기 직전 시험 약제를 살포하였으며, 재출입 허용기간 설정을 위한 노출시간에 맞춰 서양뒤영벌을 투입하였다.

(다) 시험물질 처리

시험물질은 500배 희석하여 토마토 15주에 3L를 살포하였다. 전기충전식분무기 (한일SP, HP-080)을 이용하여 잎에 골고루 살포하였다.

(라) 시험계 노출

서양뒤영벌은 재출입 허용기간 설정을 위하여 약제 살포 후 1시간, 4시간, 24시간 간격으로 약제살포구 내에 새로운 개체를 노출하였으며, 새로운 개체를 노출할 경우 기 노출한 개체는 제거하여 치사율과 이상 증상을 조사하였다.

(마) 관찰 및 조사항목

① 일반 중독증상 및 생사수

서양뒤영벌 접촉 후 1시간, 4시간, 24시간 경과 후 일반중독증상 및 생사수를 관찰 조사하였다. 조사는 처리 24시간과 48시간 후에 실시하였다. 일반 중독증상은 기능장애, 운동실조, 혼수, 빈사, 과민반응 등을 조사하였다. 치사개체는 서양뒤영

벌의 더듬이, 날개, 다리 등의 움직임이 없는 개체를 치사개체로 판단하였다.

(바) 시험결과

시험에 사용한 KNF2016 원제는 기준량인 500배 처리에서 처리 후 1시간에서만 24시간, 48시간 모두 1.6%의 치사율을 나타내었고 처리후 4시간부터는 치사개체가 없어 RT₂₅ 값이 1시간미만으로 나타났다(Table 5). 이는 KNF2016 원제가 서양뒤영벌에 별다른 영향을 미치지 않는다는 것을 나타내며, 약제 처리 1시간 후에 서양뒤영벌을 투입하는 것이 안전할 것으로 판단되었다. 또한 약제처리에 따른 일반 중독 증상은 나타나지 않았다.

Table 5. According to the duration of exposure to lethal population

| 구 분 | | | 약제살포 후 알판과 채취시간 | 노출 생물수 (마리) | 노출 후 꿀벌 치사수(마리) | | 노출 후 꿀벌 치사율(%) | |
|-------------------|----------|--------|-----------------------|-------------------|--------------------|------|-------------------|------|
| 약제명 | 희석 배수 | 살포약량 | | | 24시간 | 48시간 | 24시간 | 48시간 |
| KNF 2016 원제 | 500배 | 3L/15주 | 처리후 1시간 | 45 | 0.7 | 0.7 | 1.6% | 1.6% |
| | | | 처리후 4시간 | 42 | 0 | 0 | 0.0% | 0.0% |
| | | | 처리후 24시간 | 42 | 0 | 0 | 0.0% | 0.0% |

(3) 무당벌레에 대한 영향평가

(가) 시험계

- 시험생물 : 무당벌레 (*Harmonia axyridis*)
- 채집과 사육

무당벌레는 2009년 6~7월 충남대학교 주변에서 번데기와 성충을 채집하여 실험실조건하(25±2°C, RH70%)에서 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*)과 무테두리진딧물(*Lipaphis erysimi*)을 먹여서 사육하였으며 성충은 채집된 개체에서 얻어진 F1세대를 이용하였고, 유충은 F1세대에서 알을 받아 위와 동일한 조건하에 사육된 F2세대의 2 ~ 3령 유충을 시험에 사용하였다.

(나) 시험방법

① 시험물질 처리

시험물질처리를 위해 그물망이 설치된 사각pot(500×400×100mm)케이지에 시험

물질 처리 30일 전 딸기 유묘 6주를 이식하였다. 시험 당일 오전(9시)에 시험에 사용되는 모든 친환경 농자재는 기준량, 배량으로 희석하였으며 살포 방법은 500ml/1,000m²의 비율로 경엽살포이므로 딸기 유묘포트 0.2m²에 친환경 농자재별 기준량과 배량 희석액을 소형분무기를 통해 딸기 잎에 골고루 살포하였다.

② 시험 생물의 처리

시험 당일 오전(10시 ~ 11시)에 시험에 이용할 무당벌레를 사육하고 있는 케이지에서 채집한 후 CO₂ gas를 이용하여 약 1분간 마취 후 시험용기별로 20마리씩 3반복으로 수용하였다. 군 분리시 시험에 이용할 개체의 110%를 군 분리하여 시험물질 처리시 무당벌레 상태를 확인하여서 양호한 개체를 투입하였다. 각각의 시험군은 시험 약제 처리 후 1시간, 4시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일에 24시간동안 시험 약제가 처리된 땅으로 둘러싸인 딸기유묘케이지에 노출되었다. 각 단계별로 24시간 후 치사 개체수를 조사하였고 만약 치사개체가 있는 경우는 기존 무당벌레를 제거한 후 새로운 무당벌레를 각 20마리씩 투입하였고 단계별 무당벌레 치사개체가 없는 경우는 시험을 종료하였다. 대조군은 동일하게 방법으로 처리되지 않은 딸기 유묘 포트 케이지에 무당벌레를 투입하고 치사 개체수를 조사하였다.

③ 먹이 공급

무당벌레 유충은 먹이가 없을 시에 동종포식현상(cannibalism)이 발생하기 때문에 무당벌레를 케이지에 넣어준 후 복숭아혹진딧물이나 무테두리진딧물을 케이지에 충분히 털어서 넣어주었으며 성충의 경우는 50%설탕용액을 17×120mm Conical Tube(Falcon)의 뚜껑에 1.5ml씩 급이 하였다

(다) 관찰 및 조사방법

① 일반 중독증상 및 생사수

시험물질 처리 1시간, 4시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일 후 24시간동안 시험 물질이 처리된 딸기유묘에 노출된 무당벌레의 일반 중독증상 및 생사수를 관찰 조사하였다. 무당벌레의 날개, 다리 등의 움직임이 없는 개체를 치사개체로 판단하여 조사하였다.

(라) 시험결과

시험에 사용한 KNF2016 원제는 기준량과 배량 모두 RT₂₅ 값이 1일 미만으로 나타났다. 따라서 무당벌레의 경우 KNF2016 원제 살포 직후 방사하여도 별다른 문제가 나타나지 않을 것으로 판단되었다(Table 6, 7).

Table 6. According to the duration of exposure to lethal population

| 구 분 | | | 반복 | 노출 개체 수 (마리) | 약제처리 후 투입 시간대별 치사 개체수 (노출시간: 24hr) | | | | | | | | |
|------------|-------|-------------------|----|--------------|------------------------------------|------|----|----|----|----|----|----|----|
| 약제명 | 생육 단계 | 희석배수 (처리 약량) | | | 1 시간 | 4 시간 | 1일 | 2일 | 3일 | 4일 | 5일 | 6일 | 7일 |
| KNF2016 원제 | 성충 | 500배 (0.1ml/50ml) | 1 | 20 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| | | | 2 | 20 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| | | | 3 | 20 | 0 | 3 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| | | 250배 (0.1ml/50ml) | 1 | 20 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| | | | 2 | 20 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| | | | 3 | 20 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 유충 | 500배 (0.1ml/50ml) | 1 | 20 | 3 | 2 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| | | | 2 | 20 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| | | | 3 | 20 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| | | 250배 (0.1ml/50ml) | 1 | 20 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| | | | 2 | 20 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| | | | 3 | 20 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |

Table 7. According to the duration of exposure to lethal rate (%)

| 구 분 | | | 반복 | 노출 개체 수 (마리) | 약제처리 후 투입 시간대별 치사 개체수 (노출시간: 24hr) | | | | | | | | |
|-------------------|-------|-------------------|-----|--------------|------------------------------------|-----|-----|----|----|----|----|----|----|
| 약제명 | 생육 단계 | 희석배수 (처리 약량) | | | 1시간 | 4시간 | 1일 | 2일 | 3일 | 4일 | 5일 | 6일 | 7일 |
| KNF2016 원제 | 성충 | 500배 (0.1ml/50ml) | 1 | 20 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| | | | 2 | 20 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| | | | 3 | 20 | 0 | 15 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| | | | 평균 | - | 0.0 | 5.0 | 0.0 | - | - | - | - | - | - |
| | | 250배 (0.2ml/50ml) | 1 | 20 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| | | | 2 | 20 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 3 | | 20 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | |
| | 평균 | - | 0.0 | 0.0 | - | - | - | - | - | - | - | | |
| | 유충 | 500배 (0.1ml/50ml) | 1 | 20 | 15 | 10 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| | | | 2 | 20 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| | | | 3 | 20 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| | | | 평균 | - | 5.0 | 3.3 | 0.0 | - | - | - | - | - | - |
| 250배 (0.2ml/50ml) | | 1 | 20 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | 2 | 20 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | |
| | 3 | 20 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | | |
| 평균 | - | 0.0 | 0.0 | - | - | - | - | - | - | - | | | |

마. 화학농약에 대한 영향평가

(1) 화학농약과의 혼용성 평가

(가) 원예용 살충제 혼용성 평가

KNF2016 원제의 원예용 살충제에 대한 혼용약해 검토는 가네마이트, 경농 피레스, 노몰트, 다니톨, 데시스, 디밀린, 라이몬, 모스피란, 바람탄, 보스, 부메랑, 비상탄, 빅카트, 세베로, 수푸라사이드, 시원탄, 싸이헥사틴, 아크라마이트, 아타라, 암메이트, 에이팜, 울스타, 주움, 지존, 코니도, 파단, 팔콘, 한방, 화스탁의 29약제를 대상으로 고추(풋고추: 부강, 단고추: 수잔), 담배(KF-109, KF-114), 참외(황갈, 금동이), 토마토(대과: 슈퍼도태랑, 방울: 꼬꼬, 주욱), 오이(삼남청장, 백다다기)와 같은 5작물 11품종을 대상으로 기준량 배량으로 실시하였다. 시험결과 토마토(대과: 슈퍼도태랑, 방울: 꼬꼬, 주욱)에서 수푸라사이드 약제 배량의 경우 잎괴사가 일어났고, 오이(삼남청장, 백다다기)에서 싸이헥사틴 약제의 기준량, 배량 모두 잎끝괴사, 잎말림 증상이 나타났고, 고추(풋고추: 부강, 단고추: 수잔)에서 보스 약제 배량에서 잎말림 증상이 나타났고, 참외(황갈)에서 팔콘 아타브론, 에이팜 약제의 배량에서 잎말림, 괴사증상이 나타났다(Fig. 27).



Fig. 27. The phytotoxicity symptoms of KNF2016 technical with some horticultural insecticide (plant-fungicide-variety)

(나) 원예용 살균제 혼용성 평가

KNF2016 원제의 원예용 살균제에 대한 혼용약해 검토는 미리카트 액상수화제, 오티바옴티 액상수화제, 델란 액상수화제, 삼진왕 미탁제, 세이브 액상수화제, 다코닐에이스 액상수화제, 미래로 액상수화제, 늘사랑 분산성액제, 올레디 액상수화제, 아칸토 액상수화제, 벨리스플러스 입상수화제, 톱신엠 수화제, 에이플 입상수화제, 리도밀골드플러스 수화제, 포룸만 수화제, 실바코 수화제, 고추탄 수화제, 다코닐 수화제, 비온엠 수화제, 푸른겐 수화제, 리도밀 수화제, 포리옥신비 수화제, 프리엔 액제, 일품 수화제, 아그리마이신 수화제, 산요루 유제, 몬카트 유제, 논사랑 액상수화제, 영그네 유제, 안빌 유제, 경농바리신 액제, 후치왕 유제, 히노산 유제, 솔라자 액상수화제, 명성 액상수화제, 헝가레 유제, 가드너 액상수화제, 아리킬트 유현탁제, 논브라 수화제, 가야빔 수화제, 만풍 수화제, 갈무리 수화제, 논브라 수화제 + 안빌 유제, 논브라 수화제 + 경농바리신 액제, 논브라 수화제 + 몬카트 유제, 논브라 수화제 + 갈무리 수화제, 가야빔 수화제 + 안빌 유제, 가야빔 수화제 + 경농바리신 액제, 가야빔 수화제 + 몬카트 유제, 가야빔 수화제 + 갈무리 수화제, 기타진 유제 + 안빌 유제, 기타진 유제 + 몬카트 유제, 기타진 유제 + 몬세렌 수화제, 오티바 액상수화제, 이카표 액상수화제, 카브리오 유제, 한빛 액상수화제, 힌트 액상수화제, 명작 액상수화제, 파리사드 액상수화제, 타이브랙 액상수화제, 실버스타 유제, 프린트 액상수화제, 푸르겐 유제, 너도사 수화제, 칸투스 입상수화제, 더마니 수용제, 포룸 수화제, 동부훼나리 유제, 비반도 액상수화제, 코리스 액상수화제, 뉴리더 수화제, 카니발 수화제, 누스타 수화제, 트리후민 수화제, 노타치 수화제, 카스텔란 수화제, 푸르른 입상수화제, 포리옥신 수화제, 적토마 수화제, 시스템 수화제, 코사이드 수화제, 깨뜨탄 수화제, 유파렌 수화제, 벨쿠트 수화제, 이카초 수화제, 다이센엠-45 수화제, 안트라콜 수화제, 헥사코나졸 액상수화제, 사과이어 액상수화제, 에머넌트 유탁제의 91약제를 대상으로 고추(풋고추: 부강, 단고추: 수잔), 담배(KF-109, KF-114), 벼(동진), 오이(삼남청장, 백다다기), 참외(황갈, 금동이), 토마토(대과: 슈퍼도태랑, 방울: 꼬꼬, 주옥), 수박(수박: 태양꿀수박, 복수박: 귀공자), 호박(농우애 호박)와 같은 8작물 15품종을 대상으로 기준량, 배량으로 실시하였다. 시험결과 고추(풋고추: 부강, 단고추: 수잔)에서 미래로 액상수화제 배량의 경우 잎말림이 나타났고, 오이(삼남청장, 백다다기)에서 카브리오 유제 배량의 경우 잎끝괴사가 일어났고, 참외(황갈)에서 늘사랑 액상수화제, 미래로 액상수화제, 포리옥신 수화제 배량의 경우 잎말림, 괴사 증상이 나타났고, 수박(태양꿀수박, 귀공자)에서 동부훼나리 유제 배량의 경우 잎말림 증상이 나타났고, 호박(농우 애호박)에서 더마니 수용제에서 황

화 증상이 나타났다(Fig. 28). 그 외 다른 약제의 혼용조합에서는 기준량, 배량 처리 시 아무런 약해증상도 나타나지 않았다.



Fig. 28. The phytotoxicity symptoms of KNF2016 technical with some horticultural fungicide (plant-fungicide-variety)

(2) 혼용 약효 영향성 평가

(가) 원예용 살충제

KNF2016 원제를 원예용 살충제와 혼용하였을 경우 특정원제에 따른 활성의 변동 양상은 나타나지 않고 case by case에 따라 활성의 변화가 나타나는 것으로 확인되었다(Fig. 29). 하지만 대부분의 살충제에 대해서 활성의 변동이 나타나지 않았으며, 일부의 약제만이 활성저하를 나타내는 것으로 나타났다.

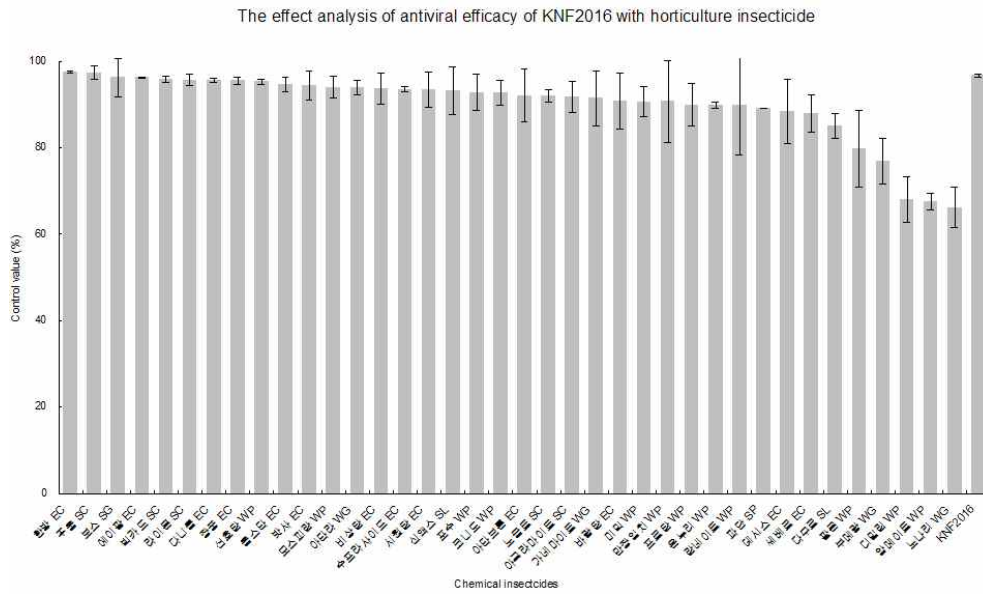


Fig. 29. The effect analysis of antiviral efficacy of KNF2016 with horticultural insecticide

(나) 수도용 약제

KNF2016 원제와 수도용 약제를 실사용 농도의 배배량으로 희석한 뒤 1:1 동량 혼합하여 실사용 농도의 배량 혼합액이 되도록 조제한 뒤 균질혼합기를 이용하여 잘 섞어준다. 이후 TMV 감염 조즙액과 1:1 동량 혼합하여 실사용 농도 바이러스 방제제(500배), 실사용 농도의 화학농약이 되도록 혼합접종액을 만들고, 이를 이용하여 담배 반엽법을 이용하여 항바이러스 활성의 영향성을 분석하였다(Fig. 30).

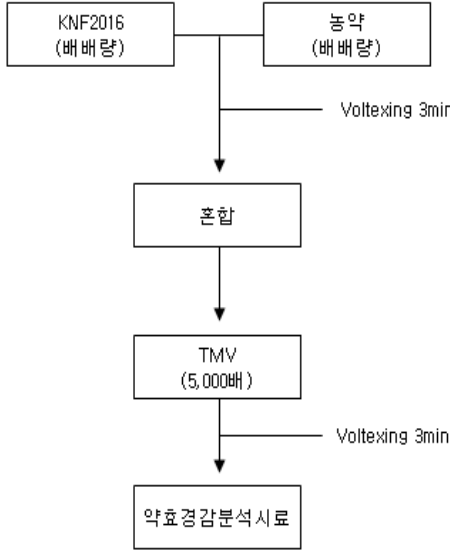


Fig. 30. The scheme of efficacy influence test in mix with KNF2016 and agricultural chemicals

서로 다른 계통의 수도용 살균제 13종과의 혼용 약효 영향성을 분석한 결과 트리azole계(가야빔) 외 10종은 KNF2016 원제 대비 90% 이상의 방제 효과가 나타났으며, 요소계(몬세렌), 아닐라이드계(장타)에서는 90% 이하의 방제 효과가 나타났다(Fig. 2) 미미하지만 약효경감이 일어난 요소계(몬세렌), 아닐라이드계(장타) 약제를 희석 배수별로 검정한 결과, 실 사용농도 (2,000배)에서 각각 95.3%, 93.6%의 방제 효과가 나타나 상기 약제와 혼용하여 살포하여도 항바이러스 활성에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.(Fig. 31) 또한 발리다마이신(항생제)을 이용한 제형별 약효 영향성 분석 결과 한우물 SP 와 경농바리신 SL은 실사용 농도(1,000배)에서 각각 94.4%, 88.4%의 방제가를 나타내어 제형별로도 별다른 영향을 나타내지 않는 것으로 나타났다(Fig. 32)

수도용 살충제 15종 또한 90% 이상의 방제 효과를 나타내어 혼용 살포에 따른 약효 영향성이 없는 것으로 나타났다(Fig. 33)

결론적으로 KNF2016 원제의 수도용 살균제 13종, 살충제 15종에 대한 약효 영향성 분석 결과 대부분의 약제들과 혼용 살포하더라도 항바이러스 활성에 별다른 문제가 없을 것으로 판단된다.

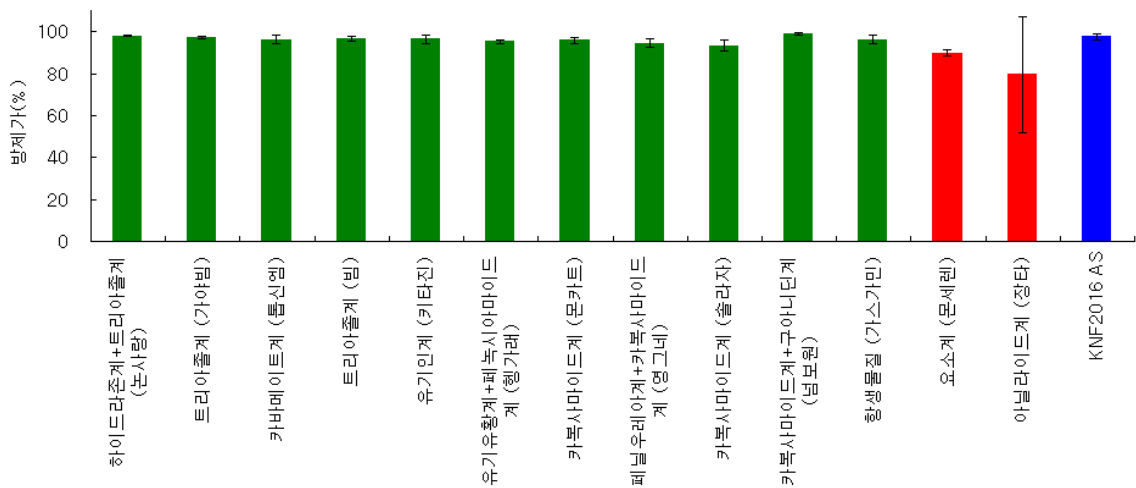


Fig. 31. The effect of efficacy according to mix with KNF2016 and systematically fungicide of paddy rice

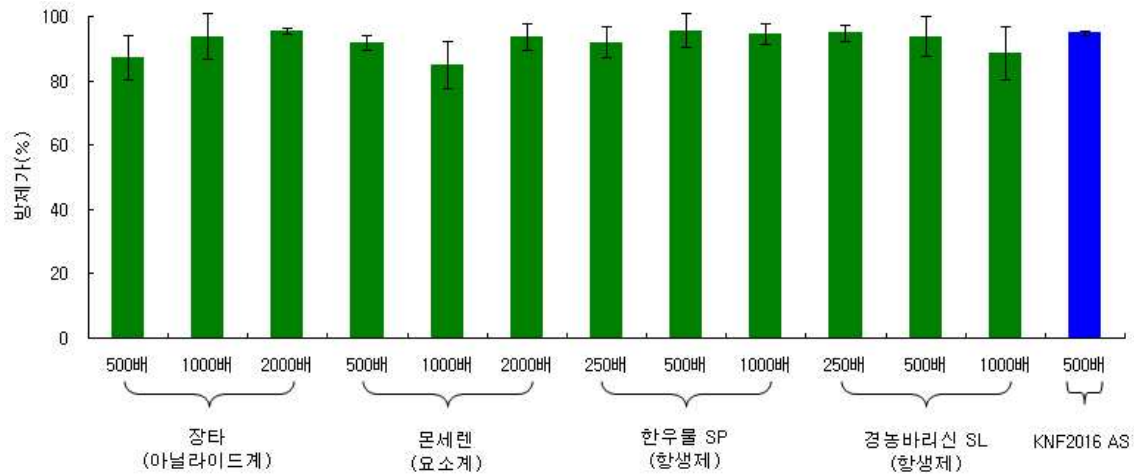


Fig. 32. The effect of efficacy according to grade of density as mix with KNF2016 and systematically fungicide of paddy rice

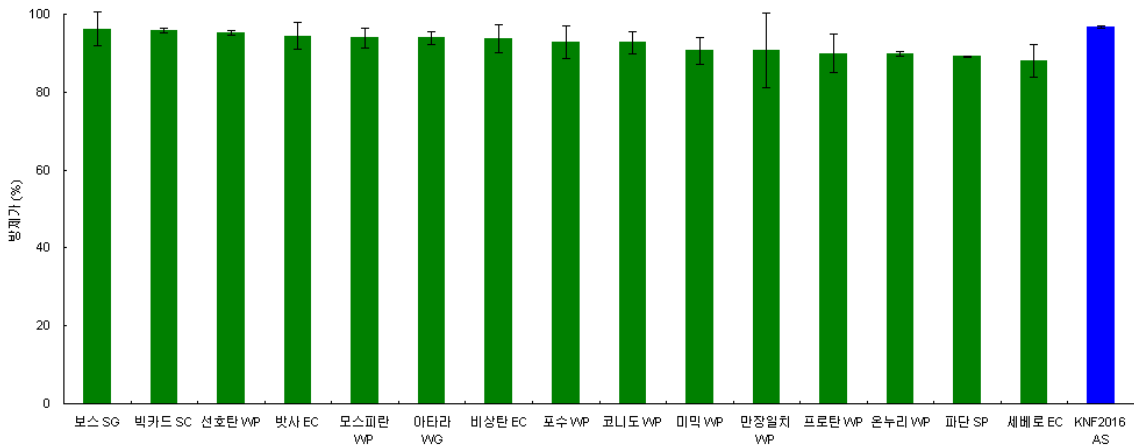


Fig. 33. The effect of efficacy according to mix with KNF2016 and insecticide of paddy rice

바. 포장시험 검정

(1) 토마토 황화잎말림병

KNF2016 원제를 기초상태의 70% 액상제형을 제조한 후 토마토 황화잎말림병에 대한 약효시험을 전남 광양에 위치한 유리온실에서 실시하였다. 포장시험 농가는 2008년도 토마토 황화잎말림병 대발생으로 폐농한 경험이 있는 농가였으며, 정식 초기부터 살충제와 KNF2016 70% AS (제품)를 7일 간격 6회 혼용 처리하였다. 혼용 살포된 살충제로는 펜탐, 오신, 지존, DDVP, 히어로를 이용하였으며 대부분 담배가루이에 효과적인 약제들이었다. 2008년도에 토마토 황화잎말림병으로 폐농했던 경험이 있는 포장이기 때문에 포장내 무처리구를 두지 못하였으며 구당면적 4,000m²의 단구

처리하였다. 무처리는 인근에서 일반 살충제 관행방제를 하는 농가로 선정하였고, 상기 농가도 부메랑, 모스피란, 펜탐, 지존, 에이팜과 같이 담배가루이에 효과적인 약제를 담배가루이 발생정도에 따라 3~7일 간격으로 살포하였다. 시험결과 KNF2016 70% AS (제품) 처리 농가에서는 이병주율이 평균 0.1%인데 반해 무처리 농가의 경우 80.2%로써 폐농하는 결과가 나타났다. 무처리 대비 99.9%의 방제효과가 나타났다. KNF2016 70% AS (제품) 처리 농가에서도 토마토 황화잎말림병의 발생이 이루어지고 있었지만 주변으로의 확산이 되지 않는 현상이 나타났다(Table 8, Fig. 34).

Table 8. The control efficacy of KNF2016 70% AS (commercial product) against *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato

| 시 험 약 제 | 이병주율 (%) | | | | 유의차 (DMRT) | 방제가 (%) |
|------------|----------|-------|--------|------|------------|---------|
| | I 반복 | II 반복 | III 반복 | 평 균 | | |
| KNF2016 AS | 0.2 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | a | 99.9 |
| 무처리 | 77.4 | 74.5 | 88.4 | 80.2 | b | - |

CV(%) ----- 12.9



Fig. 34. The control efficacy of KNF2016 70% AS (commercial product) against *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato (left : only insecticide treatment, right : mix treatment with KNF2016 70% AS and insecticide)

(2) 수박 열록모자이크병

KNF2016 원제를 기초상태로 하여 70% 액상제형을 제조한 후 수박 CGMMV에 대한 약효시험을 충북 음성에 위치한 시설하우스에서 실시하였다. 포장시험 농가는 수년째 수박을 재배한 농가로써 최근 수박 CGMMV로 인해 많은 피해를 보고 있는 농

가였다. 먼저 정식 전 수박 묘상에 KNF2016 70% AS (제품)을 경엽 처리한 뒤 정식 하였으며, 정식 직후 활착을 위해 관수하는 작업에 KNF2016 70% AS (제품) 희석액을 관수하였다. 이후 10일 간격 4회 경엽 처리하였다. 시험결과 KNF2016 70% AS (제품) 처리구는 8.3%의 이병과율이 나타난데 비해 무처리구는 36.9%가 감염되었다. 무처리 대비 77.5%의 방제효과가 나타났다. 이와 같은 결과는 주로 토양, 종자, 접촉(즙액) 전염하는 CGMMV의 특성에 맞게 약제 처리시기를 선정하여 보다 효과적인 방제효과를 얻은 것으로 판단된다(Table 9, Fig. 35).

Table 9. The control efficacy of KNF2016 70% AS (commercial product) against *Cucumber green mottle mosaic virus* in water melon

| 시 험 약 제 | 이병과율 (%) | | | | 유의차 (DMRT) | 방제가 (%) |
|------------|----------|-------|--------|------|------------|---------|
| | I 반복 | II 반복 | III 반복 | 평 균 | | |
| KNF2016 AS | 8.7 | 12.8 | 3.4 | 8.3 | a | 77.5 |
| 무처리 | 44.2 | 38.4 | 28.2 | 36.9 | b | - |

CV(%) ----- 18.6

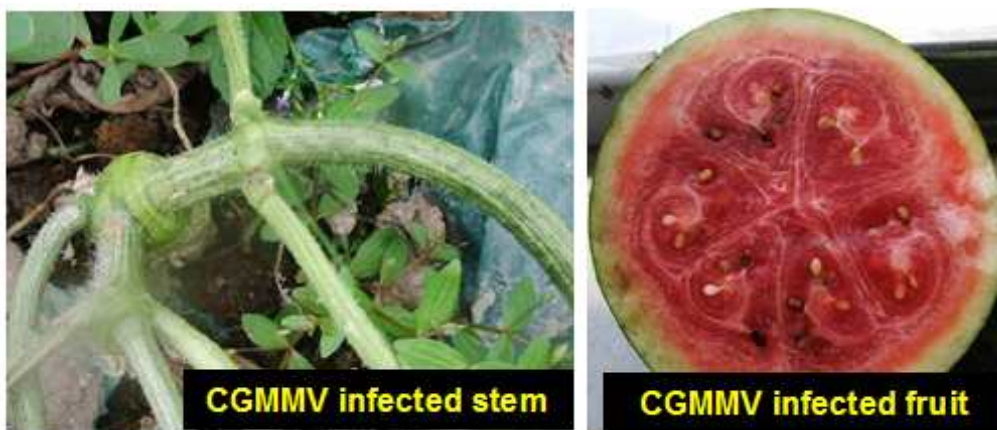


Fig. 35. The CGMMV infected stem and fruit in water melon

사. 등록시험

(1) 1년차 포장시험

(가) 토마토 황화잎말림병

농약 등록을 위한 포장시험은 전남 보성군의 토마토 시설포장에서 시험을 실시하였다. 전남 보성군은 2007년부터 토마토 황화잎말림병에 발생하고 있는 지역이며, 전 작기에도 담배가루이 발생과 함께 토마토 황화잎말림병이 발생하였기 때문에 등록

시험을 진행하기에 적합하였다. 시험작물인 토마토의 품종은 약효: 스마일, 약해: 스마일, 슈퍼도태랑으로 사용하였다. 약제처리는 정식직후 7일 간격 5회 경엽 처리 (5.31, 6.7, 6.14, 6.21, 6.28)하였으며, 약해시험은 기준량, 배량(5.31)을 처리하였다. 조사방법은 최종약제처리 10일 후(7.5) 구당 전체주에 대한 이병주수를 조사하였다. 무처리 발병율은 11.7%로써 약효판정에 충분할 정도로 발생하였으며, KNF2016 70% AS (제품) 처리구의 경우 무처리 대비 69.2%의 방제가를 나타내었다. 또한 약해도 기준량, 배량 모두 나타나지 않았다. 따라서 본 시험에 사용된 약제는 토마토(스마일, 슈퍼도태랑) 품종에 대해 기준량 및 배량에서 약해를 나타내지 않았으며, 토마토 황화잎말림병에 대해 우수한 방제효과를 나타내어 토마토 황화잎말림병 방제약제로 실용성이 있을 것으로 판단되었다(Table 10).

Table 10. The efficacy of KNF2016 70% AS (commercial product) against *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato (upper : control efficacy, below : phytotoxicity)

| 시 험 약 제 | 이병주율 (%) | | | | 유의차 (DMRT) | 방제가 (%) |
|------------|----------|-------|--------|------|------------|---------|
| | I 반복 | II 반복 | III 반복 | 평 균 | | |
| KNF2016 AS | 4.2 | 4.7 | 2.0 | 3.6 | a | 69.2 |
| 무처리 | 14.0 | 10.9 | 10.3 | 11.7 | b | - |

CV(%) ----- 16.6

○ 약제처리 3, 5, 7일 후 조사

| 시 험 약 제 (약제처리 후 3일, 5일, 7일) | 시험작물 (품종) | 약 해 정 도 (0~5) | | 비 고 |
|--------------------------------|------------------------|---------------|-----|-------|
| | | 기 준 량 | 배 량 | |
| KNF2016 AS | 토마토 (스마일, 슈퍼도태랑) | 0 | 0 | 약해 없음 |

(나) 수박 얼룩모자이크병

농약 등록을 위한 포장시험은 충북 음성군의 수박 시설포장에서 시험을 실시하였다. 본 포장은 수년간 수박 얼룩모자이크병 (CGMMV)이 발생하였던 포장으로써 등록 시험을 진행하기에 적합하였다. 시험작물인 수박의 품종은 약효: 금보, 약해: 금보, 귀공자로 사용하였다. 약제처리는 정식직후 10일 간격 4회 경엽 처리 (7.9, 7.19, 7.29,

8.8)하였으며, 약해시험은 기준량, 배량(7.8)을 처리하였다. 조사방법은 최종약제처리 10일 후(8.18) 구당 전체주에 대한 이병과수를 조사하였다. 무처리 발병률은 42.8%로써 약효판정에 충분할 정도로 발생하였으며, KNF2016 70% AS (제품) 처리구의 경우 무처리 대비 81.5%의 방제가를 나타내었다. 또한 약해도 기준량, 배량 모두 나타나지 않았다. 따라서 본 시험에 사용된 약제는 수박(금보, 복수박) 품종에 대해 기준량 및 배량에서 약해를 나타내지 않았으며, 수박 얼룩모자이크병에 대해 우수한 방제효과를 나타내어 수박 얼룩모자이크병 방제약제로 실용성이 있을 것으로 판단되었다 (Table 11).

Table 11. The efficacy of KNF2016 70% AS (commercial product) against *Cucumber green mottle mosaic virus* in water melon (upper : control efficacy, below : phytotoxicity)

| 시 험 약 제 | 이병과율 (%) | | | | 유의차 (DMRT) | 방제가 (%) |
|------------|----------|-------|--------|------|------------|---------|
| | I 반복 | II 반복 | III 반복 | 평 균 | | |
| KNF2016 AS | 4.8 | 10.2 | 8.7 | 7.9 | a | 81.5 |
| 무처리 | 37.4 | 48.7 | 42.2 | 42.8 | b | - |

CV(%) ----- 8.8

○ 약제처리 3, 5, 7일 후 조사

| 시 험 약 제 (약제처리 후 3일, 5일, 7일) | 시험작물 (품종) | 약 해 정 도 (0~5) | | 비 고 |
|--------------------------------|-----------------|---------------|-----|-------|
| | | 기 준 량 | 배 량 | |
| KNF2016 AS | 수박 (금보, 귀공자) | 0 | 0 | 약해 없음 |

(2) 2년차 포장시험

(가) 토마토 황화잎말림병

농약 등록을 위한 2년차 포장시험은 전남 나주시의 토마토 시설포장에서 시험을 실시하였다. 시험작물인 토마토의 품종은 약효: 스마일, 약해: 스마일, 유니콘으로 사용하였다. 약제처리는 정식직후 7일 간격 5회 경엽 처리 (5.2, 5.9, 5.16, 5.23, 5.30)하였으며, 약해시험은 기준량, 배량(5.16)을 처리하였다. 조사방법은 최종약제처리 10일 후(6.7) 구당 전체주에 대한 이병주수를 조사하였다. 무처리 발병률은 10.5%로써 약

효관정에 충분할 정도로 발생하였으며, KNF2016 70% AS (제품) 처리구의 경우 무처리 대비 60.8%의 방제가를 나타내었다. 또한 약해도 기준량, 배량 모두 나타나지 않았다. 따라서 본 시험에 사용된 약제는 토마토(스마일, 유니콘) 품종에 대해 기준량 및 배량에서 약해를 나타내지 않았으며, 토마토 황화잎말림병에 대해 우수한 방제효과를 나타내어 토마토 황화잎말림병 방제약제로 실용성이 있을 것으로 판단되었다 (Table 12).

Table 12. The efficacy of KNF2016 70% AS (commercial product) against *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato (upper : control efficacy, below : phytotoxicity)

| 시 험 약 제 | 이병주율 (%) | | | | 유의차 (DMRT) | 방제가 (%) |
|------------|----------|-------|--------|------|------------|---------|
| | I 반복 | II 반복 | III 반복 | 평 균 | | |
| KNF2016 AS | 3.7 | 3.9 | 4.7 | 4.1 | a | 60.8 |
| 무처리 | 8.9 | 10.8 | 11.8 | 10.5 | b | - |

CV(%) ----- 10.11

○ 약제처리 3, 5, 7일 후 조사

| 시 험 약 제 (약제처리 후 3일, 5일, 7일) | 시험작물 (품종) | 약 해 정 도 (0~5) | | 비 고 |
|--------------------------------|----------------------|---------------|-----|-------|
| | | 기 준 량 | 배 량 | |
| KNF2016 AS | 토마토 (스마일, 유니콘) | 0 | 0 | 약해 없음 |

(나) 수박 얼룩모자이크병

농약 등록을 위한 2년차 포장시험은 충북 음성군의 수박 시설포장에서 시험을 실시하였다. 시험작물인 수박의 품종은 약효: 삼보꿀수박, 약해: 삼보꿀수박, 복수박으로 사용하였다. 약제처리는 정식직후 10일 간격 4회 경엽 처리 (5.23, 6.2., 6.12, 6.21)하였으며, 약해시험은 기준량, 배량(5.23)을 처리하였다. 조사방법은 최종약제처리 10일 후(7.1) 구당 전체주에 대한 이병과수를 조사하였다. 무처리 발병률은 15.5%로써 약효관정에 충분할 정도로 발생하였으며, KNF2016 70% AS (제품) 처리구의 경우 무처리 대비 75.5%의 방제가를 나타내었다. 또한 약해도 기준량, 배량 모두 나타나지 않았다. 따라서 본 시험에 사용된 약제는 수박(삼보꿀수박, 복수박) 품종에 대해 기준량 및 배량에서 약해를 나타내지 않았으며, 수박 얼룩모자이크병에 대해 우수한 방제

효과를 나타내어 수박 얼룩모자이크병 방제약제로 실용성이 있을 것으로 판단되었다 (Table 13).

Table 11. The efficacy of KNF2016 70% AS (commercial product) against Cucumber green mottle mosaic virus in water melon (upper : control efficacy, below : phytotoxicity)

| 시 험 약 제 | 이병과율 (%) | | | | 유의차 (DMRT) | 방제가 (%) |
|------------|----------|-------|--------|------|------------|---------|
| | I 반복 | II 반복 | III 반복 | 평 균 | | |
| KNF2016 AS | 2.6 | 5.1 | 3.8 | 3.8 | a | 75.5 |
| 무처리 | 16.9 | 15.4 | 14.1 | 15.5 | b | - |

CV(%) ----- 16.9

○ 약제처리 3, 5, 7일 후 조사

| 시 험 약 제 (약제처리 후 3일, 5일, 7일) | 시험작물 (품종) | 약 해 정 도 (0~5) | | 비 고 |
|--------------------------------|-----------------------|---------------|-----|-------|
| | | 기 준 량 | 배 량 | |
| KNF2016 AS | 수박 (삼보꿀수박, 복수박) | 0 | 0 | 약해 없음 |

2. 활성물질의 대량 순화 및 활성유전자 탐색

가. 대량 순화과정의 산업화를 위한 활성검정 기반 추출물 분획 scheme 확립

(1) 용해도에 따른 활성물질의 분리

담배 반엽법으로 황산암모늄을 이용한 용해도에 따른 항바이러스 활성을 검정한 결과, 본 연구팀에서 찾고자 하는 활성물질이 황산암모늄 60% 농도에서 침전됨을 확인하였다(Table 14).

Table 14. The antiviral activity of fraction according to solubility

| (NH ₄) ₂ SO ₄ contents | DW (μ l) | Diluti on rate | No. Local lesions/Half-leaves | | | | Control value (%) |
|---|------------------|----------------------|-------------------------------|---------|-----------|---------|-------------------------|
| | | | Untreated | Treated | Untreated | Treated | |
| 20% | 500 | | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 |
| 40% | 500 | | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 |
| 60% | 500 | | 150 | 3 | 150 | 12 | 95.0 |
| 80% | 500 | | 200 | 200 | 200 | 200 | 0 |
| KNF2016-B (comparison) | | 1000 | 150 | 0 | 200 | 3 | 99.3 |

(2) 분자량에 따른 활성물질의 분리

Bio-Gel P10으로 분리된 시료는 void volume이 끝나는 11번째 fraction부터 활성물질이 나오는 것으로 확인되었다(Table 15, Fig. 40). Bio-Gel P10 resin의 범위를 벗어나는 20,000 Da 이상 크기의 물질로 예상되어 관련 fraction들을 모아 분리범위가 3,000 ~ 60,000 Da 인 Bio-Gel P60을 이용하여 다시 정제하였다. Bio-Gel P60으로 분리된 시료를 경농 중앙연구소에서 담배 반엽법으로 활성 분획을 확인한 결과(Table 16), 62번부터 활성물질이 elution됨을 알 수 있었다. 담배 반엽법 결과와 SDS-PAGE 상의 단백질 bands를 비교하여 항바이러스 활성물질은 약 51KDa, 45KDa, 40KDa의 세 가지 단백질로 추정되어졌다(Fig. 41).

Table 15. The antiviral activity of fraction according to molecular weight using Bio-Gel P10

| | Fractions | Dilution rate | No. Local lesions/Half-leaves | | | | Control value (%) |
|----|------------|---------------|-------------------------------|---------|-----------|---------|-------------------|
| | | | Untreated | Treated | Untreated | Treated | |
| 1 | Cell crude | 원액 | 0 | 17 | 0 | 15 | 100.0 |
| 2 | P10-10 | " | 45 | 32 | 10 | 5 | -70.3 |
| 3 | P10-11 | " | 0 | 22 | 23 | 64 | 82.0 |
| 4 | P10-12 | " | 0 | 41 | 0 | 41 | 100.0 |
| 5 | P10-13 | " | 0 | 11 | 0 | 8 | 100.0 |
| 6 | P10-14 | " | 0 | 14 | 0 | 3 | 100.0 |
| 7 | P10-15 | " | 17 | 108 | 5 | 42 | 86.2 |
| 8 | P10-16 | " | 45 | 60 | 8 | 11 | 26.1 |
| 9 | P10-17 | " | 91 | 32 | 232 | 81 | -185.4 |
| 10 | P10-18 | " | 101 | 32 | 111 | 108 | -109.2 |
| 11 | P10-19 | " | 132 | 101 | 92 | 48 | -61.2 |
| 12 | P10-20 | " | 82 | 53 | 92 | 32 | -121.1 |
| 13 | P10-25 | " | 101 | 42 | 123 | 82 | -95.2 |
| 14 | P10-26 | " | 92 | 70 | 152 | 163 | -12.3 |
| 15 | P10-27 | " | 62 | 58 | 101 | 92 | -8.3 |
| 16 | P10-28 | " | 72 | 70 | 93 | 80 | -9.6 |
| 17 | P10-29 | " | 105 | 103 | 107 | 101 | -3.9 |
| 18 | P10-30 | " | 101 | 98 | 123 | 111 | -6.9 |
| 19 | P10-31 | " | 92 | 63 | 52 | 41 | -36.4 |
| 20 | P10-32 | " | 159 | 52 | 83 | 73 | -109.7 |
| 21 | P10-33 | " | 132 | 111 | 83 | 61 | -27.5 |
| 22 | KNF2016-B | 1000 | 11 | 141 | 48 | 234 | 85.8 |

KNF2016 cell P10정제 시료 활성비교

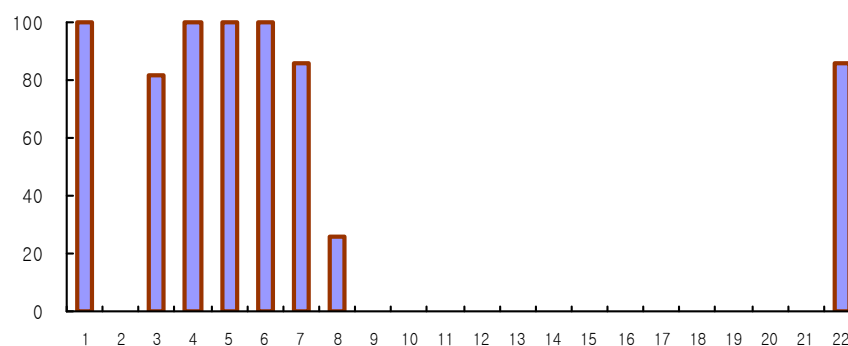
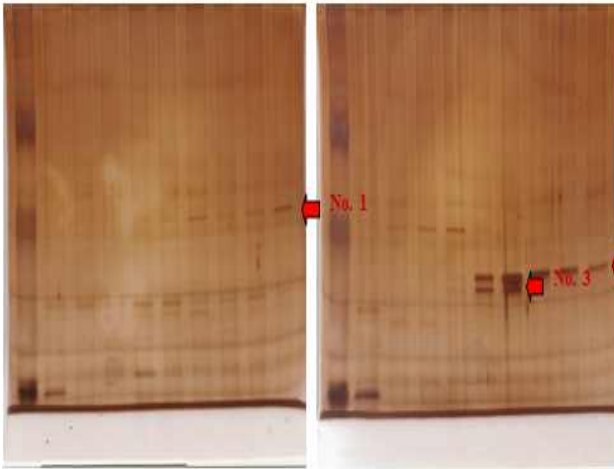


Fig. 40. The antiviral effect of fraction according to molecular weight using Bio-Gel P10

Table 16. The antiviral effect of fraction according to molecular weight using Bio-Gel P10

| Fraction | Dilution rate | No. Local lesions/Half-leaves | | | | Control value (%) |
|----------|---------------|-------------------------------|---------|-----------|---------|-------------------|
| | | Untreated | Treated | Untreated | Treated | |
| 14 | 원액 | 89 | 78 | 120 | 122 | -6.2 |
| 16 | " | 69 | 67 | 73 | 96 | 10.5 |
| 18 | " | 52 | 62 | 58 | 55 | 5.3 |
| 20 | " | 57 | 27 | 83 | 37 | -117.7 |
| 22 | " | 43 | 38 | 53 | 55 | -4.8 |
| 24 | " | 141 | 76 | 56 | 22 | -120.0 |
| 26 | " | 93 | 54 | 61 | 66 | -32.3 |
| 28 | " | 20 | 16 | 21 | 31 | 3.6 |
| 30 | " | 64 | 78 | 102 | 43 | -59.6 |
| 32 | " | 97 | 74 | 186 | 79 | -83.3 |
| 34 | " | 62 | 106 | 206 | 112 | -21.2 |
| 36 | " | 124 | 101 | 134 | 84 | -41.1 |
| 38 | " | 57 | 84 | 43 | 33 | 0.9 |
| 40 | " | 139 | 112 | 62 | 70 | -6.3 |
| 42 | " | 25 | 49 | 26 | 19 | 6.1 |
| 44 | " | 64 | 91 | 43 | 37 | 6.7 |
| 46 | " | 62 | 85 | 53 | 62 | 20.8 |
| 48 | " | 38 | 50 | 50 | 42 | 2.5 |
| 50 | " | 20 | 30 | 81 | 77 | 14.1 |
| 52 | " | 100 | 88 | 153 | 102 | -31.8 |
| 54 | " | 47 | 23 | 15 | 50 | -17.2 |
| 56 | " | 92 | 89 | 100 | 36 | -90.6 |
| 58 | " | 118 | 94 | 153 | 156 | -11.8 |
| 60 | " | 22 | 48 | 77 | 31 | -47.1 |
| 62 | " | 53 | 117 | 59 | 81 | 40.9 |
| 64 | " | 172 | 156 | 178 | 289 | 14.1 |
| 66 | " | 147 | 173 | 41 | 85 | 33.4 |
| 68 | " | 127 | 98 | 82 | 133 | 4.4 |
| 70 | " | 14 | 81 | 38 | 37 | 40.0 |
| 72 | " | 76 | 124 | 26 | 58 | 46.9 |
| 74 | " | 51 | 55 | 93 | 127 | 17.0 |
| 76 | " | 27 | 55 | 27 | 39 | 40.8 |
| 78 | " | 45 | 74 | 42 | 91 | 46.5 |
| 80 | " | 57 | 80 | 41 | 57 | 28.4 |
| 82 | " | 57 | 114 | 125 | 147 | 32.5 |
| 84 | " | 35 | 145 | 31 | 103 | 72.9 |
| 86 | " | 71 | 133 | 53 | 169 | 57.6 |
| 88 | " | 32 | 93 | 32 | 39 | 41.8 |
| 90 | " | 26 | 16 | 26 | 62 | -2.2 |

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 M 10 11 12 13 14 15 16 17 18



M. Prestained SDS-PAGE Standard, low range

- | | |
|--------------------|---------------------|
| 1. Fraction No. 58 | 10. Fraction No. 58 |
| 2. Fraction No. 62 | 11. Fraction No. 78 |
| 3. Fraction No. 64 | 12. Fraction No. 80 |
| 4. Fraction No. 66 | 13. Fraction No. 82 |
| 5. Fraction No. 68 | 14. Fraction No. 84 |
| 6. Fraction No. 70 | 15. Fraction No. 86 |
| 7. Fraction No. 72 | 16. Fraction No. 88 |
| 8. Fraction No. 74 | 17. Fraction No. 90 |
| 9. Fraction No. 76 | 18. Fraction No. 92 |

■ Candidate bands for antiviral compounds

KNF2016 정제 시료 활성비교

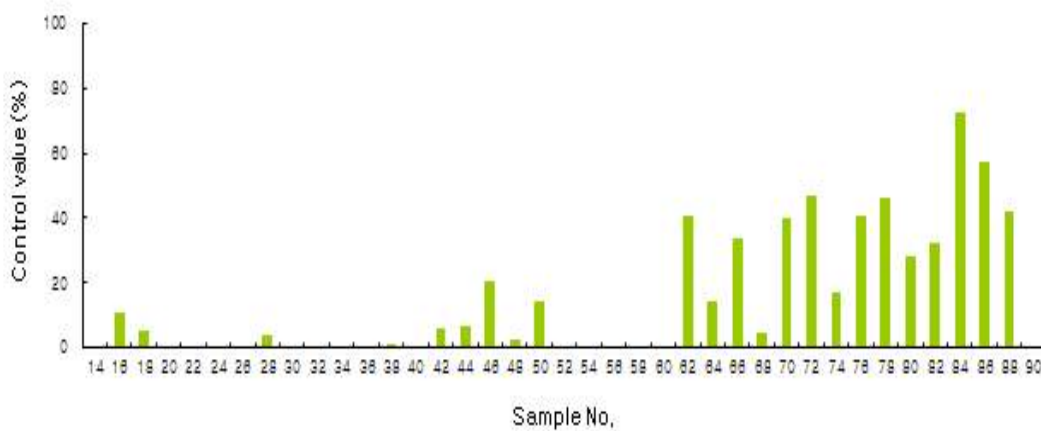


Fig. 41. SDS-PAGE result of purified activity fraction using Bio-Gel P60

Q. C법 확립과 활성 유전자 동정에 필요한 항바이러스 물질의 정제는 전형적인 단백질의 기본 분석법에 의해 이루어졌다. 전체적인 scheme은 아래 그림과 같다(Fig. 42).

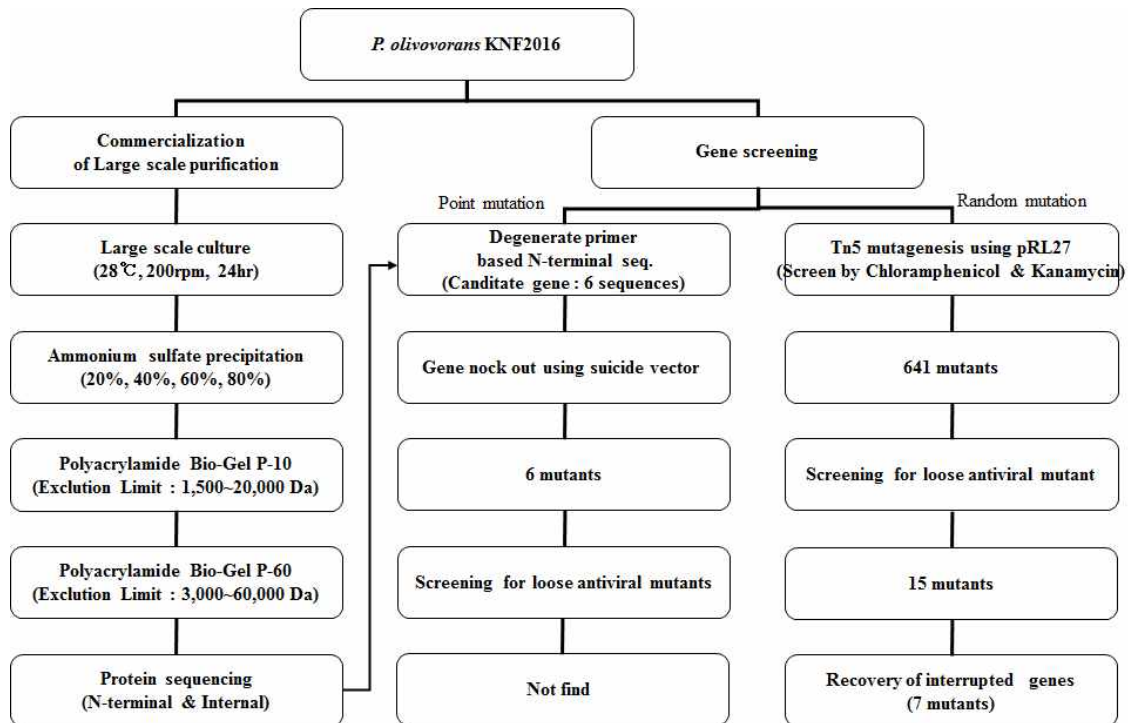


Fig. 42. The hole scheme of purification process in KNF2016 antiviral compound

나. 항바이러스 활성물질의 특성분석

(1) 활성물질의 아미노산 서열 분석

Fig. 41. 에서 보이는 단백질 band들 중 No.2 와 No.3 band의 의 N-terminal sequence를 분석한 결과, 두 단백질 모두 Asp - Ile - Asn - Gly - Gly (Specific protein)로 확인되었고, specific protein의 농도와 항바이러스 활성의 상관관계가 가장 높은 No.2 band의 internal amino acid sequence를 분석한 결과 다음과 같았다(Fig. 43).

- Fraction no. 27 : His - Phe - Gly - Asp - Thr - Asn - Asn - Asp
(HFGDTNN)
- Fraction no. 37 : Ile - Thr - Asp - X - Ser - Gly - Ile - Ser - Gly - Ala - Gly (ITDXSGISGAG)
- Fraction no. 47 : Phe - Val - Pro - Leu - Pro - Asp - Asn - Trp
(FVPLPDNW)
- Fraction no. 51 : Leu - Ile - Gln - Val - Pro - Ser - Val - Ala - Thr - Ser - Val - Ala - Ile - Pro - Phe (LIQVPSVATSV)

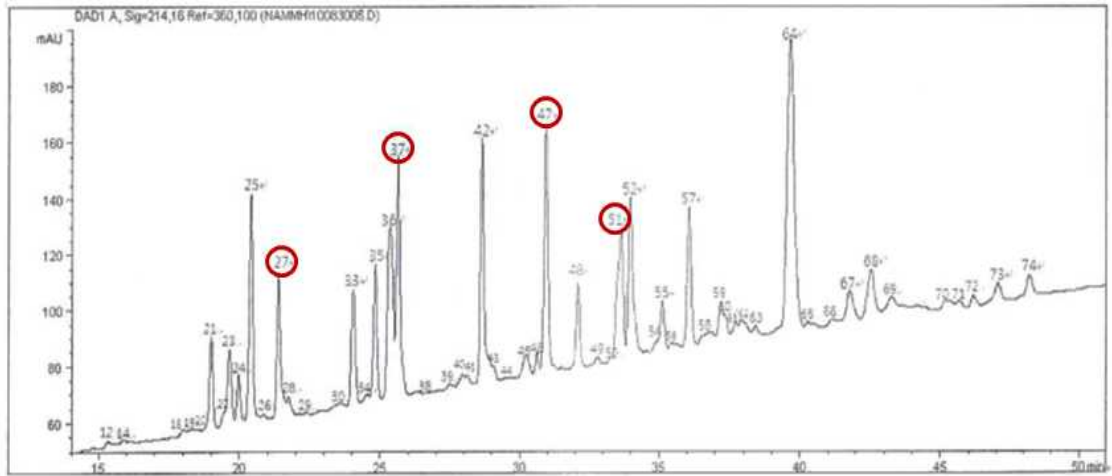
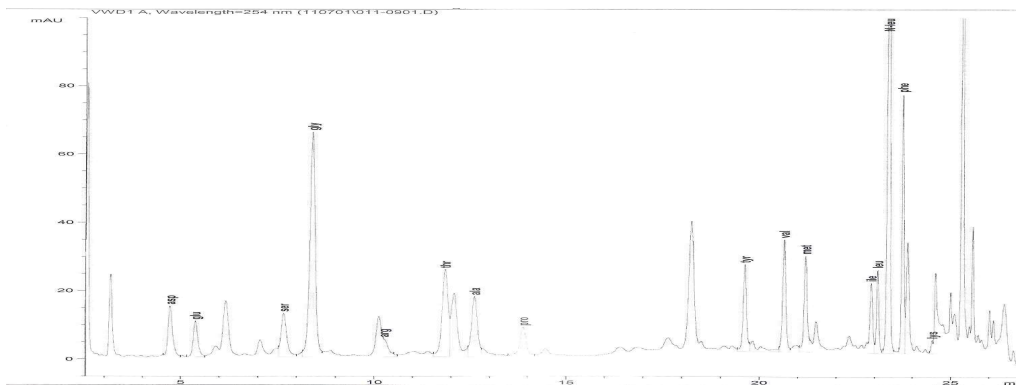


Fig. 43. High-performance liquid chromatography of the protein for internal sequencing

(2) 활성물질의 아미노산 조성 분석

항바이러스 물질로 생각되어지는 No.2 단백질의 아미노산 조성을 분석한 결과, Glycine (19.46%), Phenylalanine (16.45%), Threonine (8.53%)의 함량이 높은 것으로 나타났다(Fig. 44). 이와 같은 결과는 정제된 항바이러스 활성물질의 Q. C.에도 활용 가능할 것으로 판단되었다.



AMINO ACID COMPOSITION TABLE

| Amino acid | Result | MOL% | (ug/mg) ^a | (nmol/mg) ^b |
|--------------|----------------|---------------|----------------------|------------------------|
| CYA* | 259.04 | 6.30 | 6.47 | 34.54 |
| ASX** | 171.33 | 4.16 | 3.04 | 22.84 |
| GLX** | 118.83 | 2.89 | 2.33 | 15.84 |
| SER | 175.01 | 4.25 | 2.45 | 23.33 |
| GLY | 800.51 | 19.46 | 7.69 | 106.73 |
| HIS | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| ARG | 55.05 | 1.34 | 1.28 | 7.34 |
| THR | 350.93 | 8.53 | 5.57 | 46.79 |
| ALA | 250.05 | 6.08 | 2.97 | 33.34 |
| PRO | 137.93 | 3.35 | 2.12 | 18.39 |
| TYR | 191.50 | 4.65 | 4.63 | 25.53 |
| VAL | 252.89 | 6.15 | 3.95 | 33.72 |
| MET | 215.50 | 5.24 | 4.29 | 28.73 |
| ILE | 191.23 | 4.65 | 3.34 | 25.50 |
| LEU | 204.36 | 4.97 | 3.57 | 27.25 |
| PHE | 676.90 | 16.45 | 14.91 | 90.25 |
| TRP | 36.49 | 0.89 | 0.99 | 4.87 |
| LYS | 26.65 | 0.65 | 0.52 | 3.55 |
| TOTAL | 4114.19 | 100.00 | 70.13 | 548.56 |

* Result : HPLC chromatogram의 peak area를 standard(500pmol)에 기준하여 산출한다.

*CYA mean the sum of cysteine & cystine

** ASX, GLX mean the sum of asparagine & aspartic acid and glutamine & glutamic acid, respectively.

*a =(각 아미노산의 분자량*b)/단위전환

*b =(Result1 * (A buffer에 녹인 volume/ injection volume))/(실험에 사용한 단백질농도)

Fig. 44. The contents analysis of antiviral activity amino acid

다. 항바이러스 활성물질의 유전자 탐색

(1) Specific protein을 암호화하는 유전자의 탐색

항바이러스 활성물질이라고 생각되어지는 No.2 단백질의 아미노산 서열을 바탕으로 기존에 알려진 단백질들을 검색한 결과, N-terminal sequence에서 이름을 따온 specific protein과 유사하다는 것이 확인되었다. Specific protein은 생물계 전체에 광

범위하게 존재하지만, 특정한 기능이 밝혀지지는 않았고 다만, ABC transporter 나 periplasmic phosphate-bin특정 protein 등으로써 알려져 있다. 그리고 2007년 Paul B Rainey의 발표에 의하면 *Pseudomonas fluorescens* SBW25가 생산하는 “Psp”라고 명명되어진 specific protein이 식물의 활력에 도움을 준다고 보고된 사례가 있다. 아미노산 서열을 바탕으로 degenerated primer 제작한 뒤 nested-PCR을 수행한 결과, 약 700bp정도 길이의 6종류의 specific protein, specific gene(Table 17)을 확인할 수 있었다. 확인된 specific gene은 transposon을 이용하여 point mutation시킨 뒤, 경농 중앙연구소에서 담배 반엽법으로 항바이러스 활성의 변화 여부를 조사하였으나, 항바이러스 활성이 감소된 돌연변이체는 나타나지 않았다(Table 18). 그 이유는 앞의 항바이러스 활성물질 순화과정에서 나타나듯 KNF2016에는 다양한 종류의 항바이러스 물질이 존재하는 것으로 추정되며 따라서 한 가지 활성 유전자가 knock-out되었을 때 비슷한 경로로 다른 종류의 활성물질이 생합성 되는 보상작용이 일어나 항바이러스 활성이 감소되지 않을 수도 있기 때문이다. 이를 보완하기 random mutagenesis와 whole genome sequencing을 병행하여 수행하였다.

Table 17. Sequence analysis of specific protein

| Name | Identities (%) | Protein | Reference |
|--------------|----------------|---|--|
| Specific 1-2 | 62 | periplasmic tail-specific protease | <i>P. aeruginosa</i> PAb1 |
| Specific 2-1 | 75 | cytochrome c-type biogenesis protein CcmF | <i>P. aeruginosa</i> PA7 |
| Specific 2-2 | 43 | Glucose/galactosetransporter | <i>P. fluorescens</i> Pf-5 |
| Specific 2-3 | 57 | Sensorhistidine kinase | <i>P. syringae</i> |
| Specific 2-4 | 91 | multidrug efflux RND transporter MexF | <i>P. fluorescens</i> Pf-5 |
| Specific 3-1 | 46 | Periplasmic sensor signal transduction histidine kinase | <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1 |

Table 18. Result of antiviral activity in specific protein point mutants

| Sample name | No. Local lesions/Half-leaves | | | | Control value (%) | Standard error |
|--------------|-------------------------------|-----------|---------|-----------|-------------------|----------------|
| | Treated | Untreated | Treated | Untreated | | |
| wild type | 39 | 280 | 12 | 230 | 90.4 | 6.2 |
| Specific 1-2 | 10 | 105 | 7 | 208 | 93.6 | 4.3 |
| Specific 2-1 | 3 | 146 | 15 | 233 | 95.8 | 3.0 |
| Specific 2-2 | 16 | 158 | 8 | 149 | 92.3 | 3.3 |
| Specific 2-3 | 44 | 249 | 32 | 186 | 82.6 | 0.4 |
| Specific 2-4 | 8 | 198 | 23 | 140 | 89.8 | 8.8 |
| Specific 3-1 | 0 | 13 | 40 | 228 | 91.2 | 12.4 |

(2) Random mutagenesis를 이용한 유전자의 탐색

Random mutagenesis를 이용한 641개의 돌연변이체에 대한 항바이러스 활성의 변화여부를 담배 반엽법을 이용하여 검정한 결과, wild-type 균주보다 항바이러스 활성이 감소한 33개의 clones을 선발하였다(Table 19). 그 중 균주의 생육정도가 wild-type 균주에 비해 저하되지 않으면서 항바이러스 활성이 감소된 7개의 돌연변이체 clones(4C1, 4C2, 4F3, 4F5, 4H11, 5B7, 5C7)을 1순위로 하여 knock-out된 유전자의 염기서열을 분석하였다. 그 결과, 아래 Fig. 45와 같이 knock-out 된 것으로 나타났다. 무작위 돌연변이체의 subcloning에서 확인된 염기서열 상에서는 4C1 mutant의 염기서열이 다른 것들과 연결되지 않는 것으로 나타났으나, 일부 진행된 whole genome sequence의 6.3 kb정도의 contig-1198에서 하나로 연결됨을 확인할 수 있었다. 안타깝게도 specific protein이 직접 knock-out된 위치는 찾을 수 없었으나, random mutagenesis에서 항바이러스 활성에 영향을 주었던 돌연변이가 일어난 장소가 클러스터링 되어있는 한 두 유전자에서 집중적으로 나타나는 것으로 보아, 순화를 통해 확인된 항바이러스 단백질의 발현에 영향을 주는 유전자의 발현에 영향을 주는 인자라는 것으로 판단되었다.

Table 19. The comparison of antiviral activity in random mutants

* 스크리닝 결과 *

| Sample | growth | 3차 스크리닝 (KNF2016 Mutant 2배양 처리) | Sequencing 우선 순위 |
|---------------------------|--------|------------------------------------|------------------|
| 1C8 | ○ | × (활성) | 4 |
| 1G10 | ○ | × | 4 |
| 4B3 | △ | ○ (활성 떨어짐) | 2 |
| 4B7 | △ | × | 4 |
| 4C1 | ○ | ○ | 1 |
| 4C2 | ○ | ○ | 1 |
| 4C3 | ○ | × | 4 |
| 4C10 | ○ | × | 4 |
| 4D12 | ○ | ○ | 1 |
| 4F3 - spot 잘 안찍힘 (재시험) | ○ | ○ | 1 |
| 4F5 - spot 잘 안찍힘 (재시험) | ○ | ○ | 1 |
| 4G1 | ○ | × | 4 |
| 4G5 | × | ○ | 3 |
| 4H11 | ○ | ○ | 1 |
| 5A5 | ○ | ○ | 1 |
| 5A6 | ○ | ○ | 1 |
| 5A7 | × | ○ | 3 |
| 5A8 | ○ | ○ | 1 |
| 5B5 | ○ | ○ | 1 |
| 5B7 | ○ | ○ | 1 |
| 5B8 | ○ | ○ | 1 |
| 5C7 | ○ | ○ | 1 |
| 5C8 | ○ | ○ | 1 |
| 5E 4 | × | ○ | 3 |
| 5F7 | ○ | ○ | 1 |
| 5G4 | × | ○ | 3 |
| 5G7 | × | ○ | 3 |
| 5G8 | × | ○ | 3 |
| 5H7 | × | ○ | 3 |
| 5H8 | × | ○ | 3 |
| 6A12 | × | ○ | 3 |
| 6G10 | × | ○ | 3 |
| γC8 - spot 안찍힘 (재시험) | ○ | × | 4 |

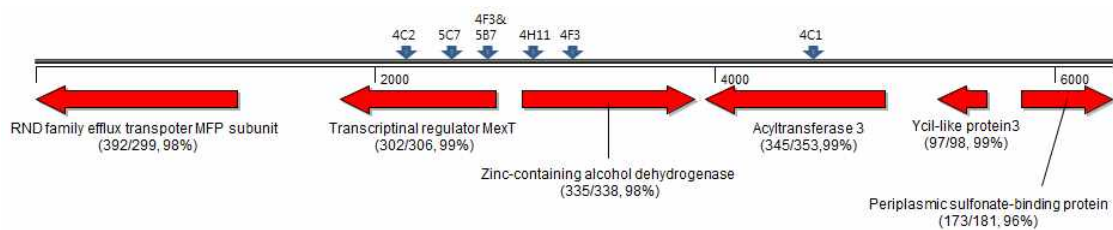


Fig. 45. The location of random mutagenesis arise in genomic DNA sequence contig-1198

라. Quality Control을 위한 검정법 확립

(1) 지방산 분석을 이용한 Q. C 법 검토

항바이러스 물질의 생산량이 일정 부분 세포 수의 증가와 비례하는 것으로 나타나 growth에 따라 증가하는 지방산을 GC/MS로 분석하여 지표물질로 이용하고자 하였다. 제제화된 시료에서 제형화에 포함되는 각종 계면활성제를 제외한 나머지 peak 중 Oleic acid peak(C18:1)를 표준물질로 결정하였고(Fig. 46), 담배 반엽법으로 활성검정 하였을 경우 제제 1ml당 oleic acid의 함량은 18.7 μ g 으로 나타났다(Fig. 47).

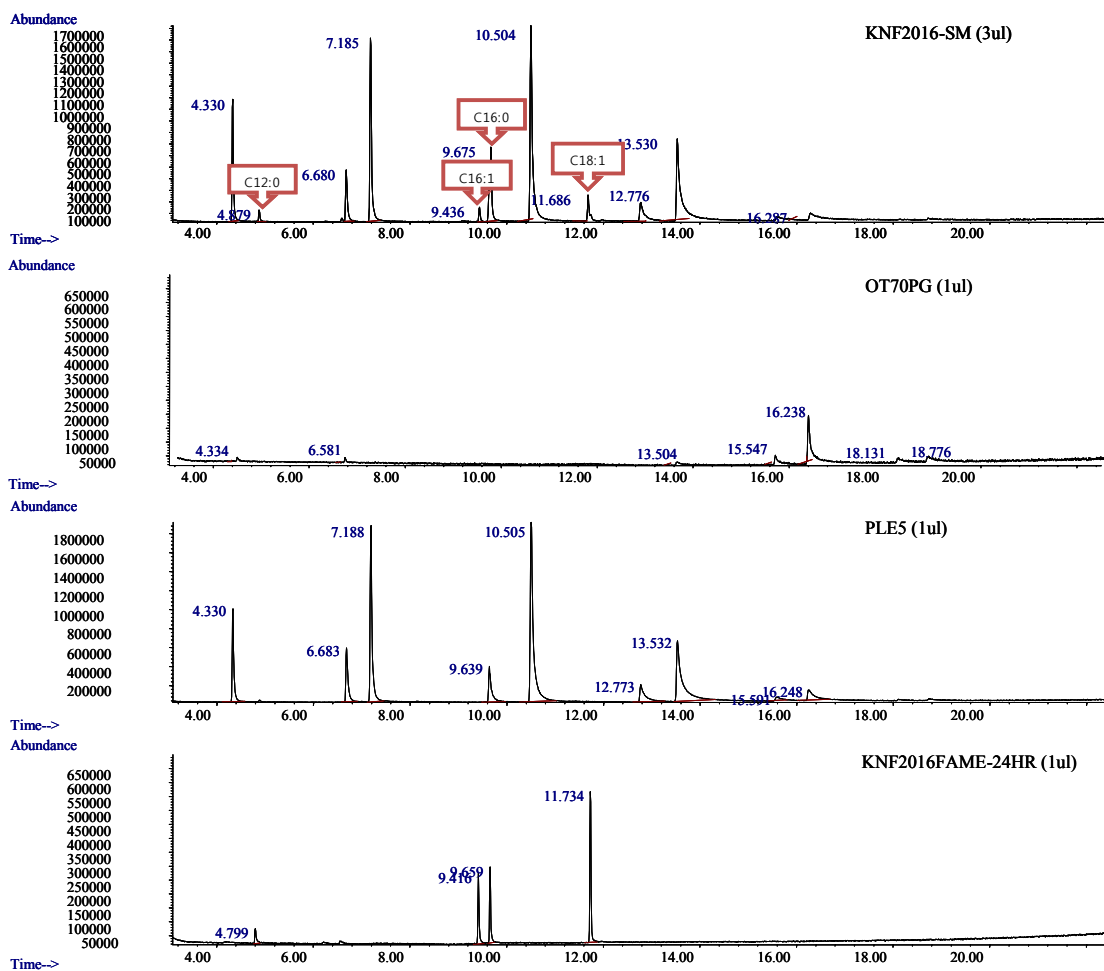


Fig 46. Gas chromatography for determination of standard compounds

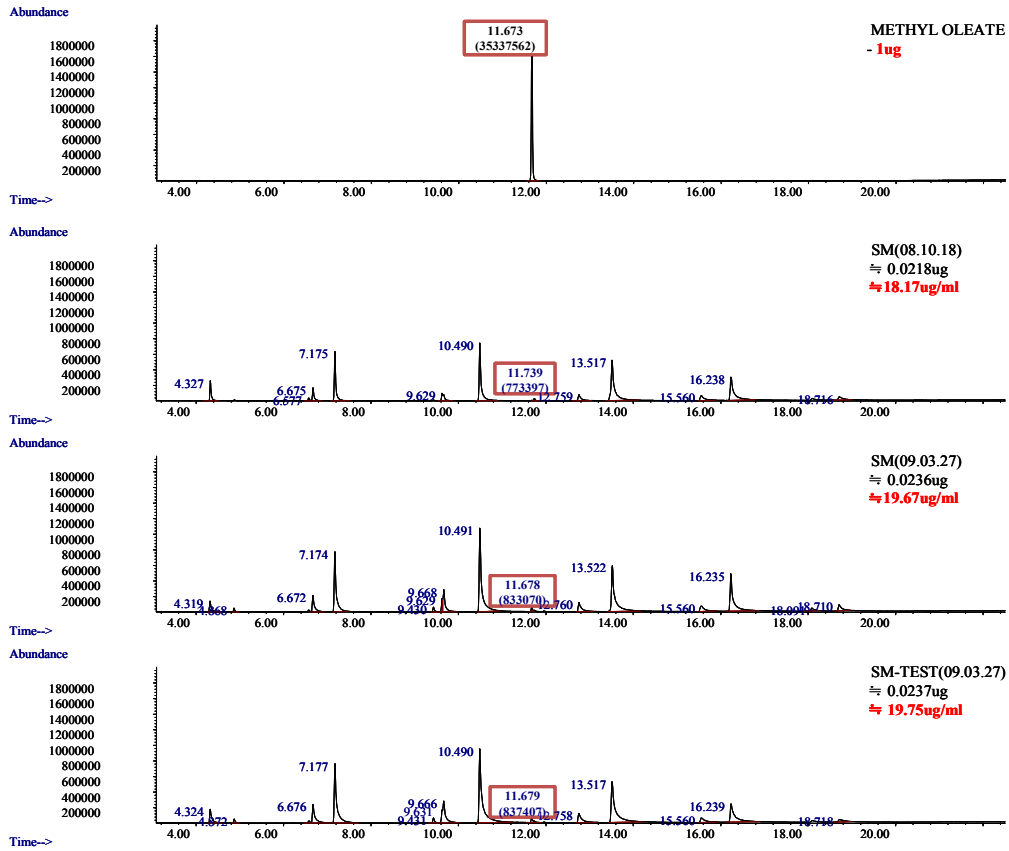


Fig 47. Gas chromatography for quantitative analysis of standard compound (Oleic acid)

(2) SDS-PAGE를 이용한 Q. C 범 검토

지방산 분석과 다른 Q. C 검정법의 확립을 위해 항바이러스 활성물질로 추정되는 단백질 band를 SDS-PAGE상에서 검정할 수 있는 방법을 검토하였다. 그 결과, cell에 포함되어 있는 활성물질은 2-ME와 boiling에 의해 SDS-PAGE상에서 band의 위치가 달라지는 것으로 나타났다. Crude 시료에서는 너무 많은 band가 나타나 분석하고자 하는 band가 명확하게 확인되지 않지만, Bio-Gel P10 순화 이후의 시료에서는 명확하게 나타났다(Fig. 48). 하지만 본 시험법은 정량적 분석이 어렵다고 판단되어 Q. C 범으로는 부적합하였다.

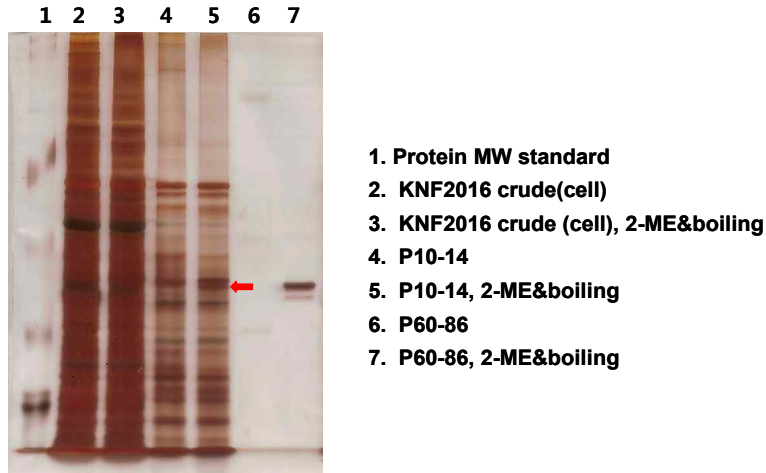


Fig. 48. Consideration of quality control using SDS-PAGE

마. 곤충 매개 바이러스의 특성 및 농가적용법 연구

(1) 바이러스 매개충의 보독충율 및 병 발생 모니터링 기술 개발

(가) 매개충의 보독충율 및 병 발생 모니터링

RSV 발병율과 벼 수량 간에는 부의 관계가 있음을 확인할 수 있었는데, 이 때 논둑으로부터 거리에 따라 RSV의 발병률은 감소하고 그에 따라 벼 수량은 증가하는 양상을 보였다(Fig. 49). 이 결과는 논둑으로부터 매개충인 애멸구가 본논으로 유입되면서 일어나는 border effect로 추정됨에 따라, 이를 증명하고자 논둑으로부터 거리에 따른 RSV 발병율과 지역 내 RSV 평균 발병률간의 상관을 조사하였다. 그 결과 논둑 인근의 벼에서는 border effect가 존재하였으며 지역의 평균 발병률을 대표하는 값으로는 논둑에서 5 ~ 10번째 줄에서 발병률 조사하는 것이 가장 바람직한 것으로 확인되었다(Fig. 50). 우리나라에서 애멸구는 월동하는 곤충이지만 일부 개체군이 매년 중국으로부터 비래하여 국내 서식 개체군과 혼합되므로, RSV의 발병 양상이 해마다 다르게 나타나고 있어서 전국 및 지역적 발병 모니터링이 어려운 병해충으로 알려져 있다. 그럼에도 불구하고 대부분의 지역에서는 애멸구가 인근 논둑에서 월동하고 이듬해 보리, 밀 등의 동계운작 또는 옥수수, 벼 등 조생 기주로 이동하였다가 이앙기 이후 본논으로 침입하는 것으로 조사되었다. 그러나 현재까지 RSV의 발병 모니터링 기법은 관행적으로 세균병해 등의 조사 방법과 유사하게 필지 내 대각선상의 무작위적인 2-3 지점에서 이병주율을 조사하도록 되어있어서, RSV의 매개충인 애멸구의 서식 및 행동 습성을 정확히 반영하지 못한 방식이었다. 따라서 본 연구에서처럼 항바이러스성 생화학 작물보호제의 포장 내 약효 평가에 있어서도 정확한 검

정 평가를 위해서는 일차적으로 RSV 발병 모니터링 기술을 개선할 필요가 있었으며, 개선된 발병 모니터링 방식으로 이후 포장 연구를 효과적으로 수행할 수 있었다.

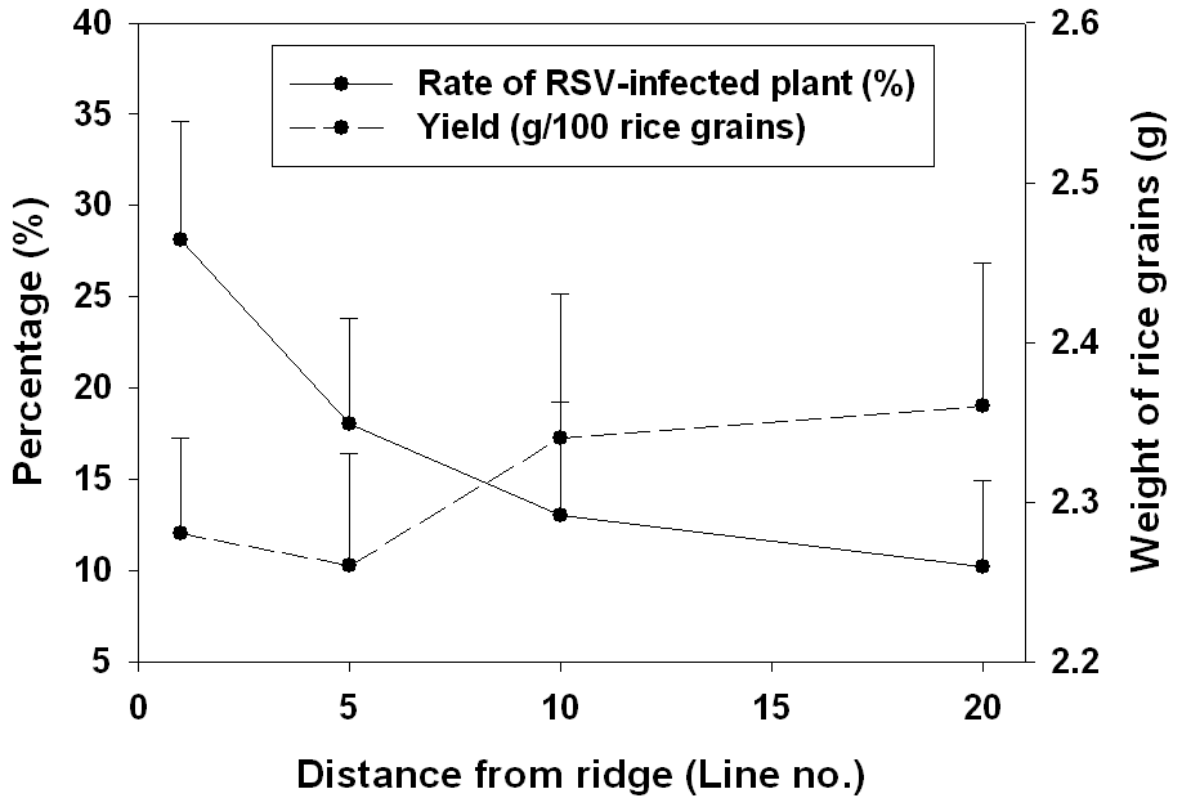


Fig. 49. RSV infection rate (%) and weight (g) of 100 rice grains by distance from ridge (line order of rice plant).

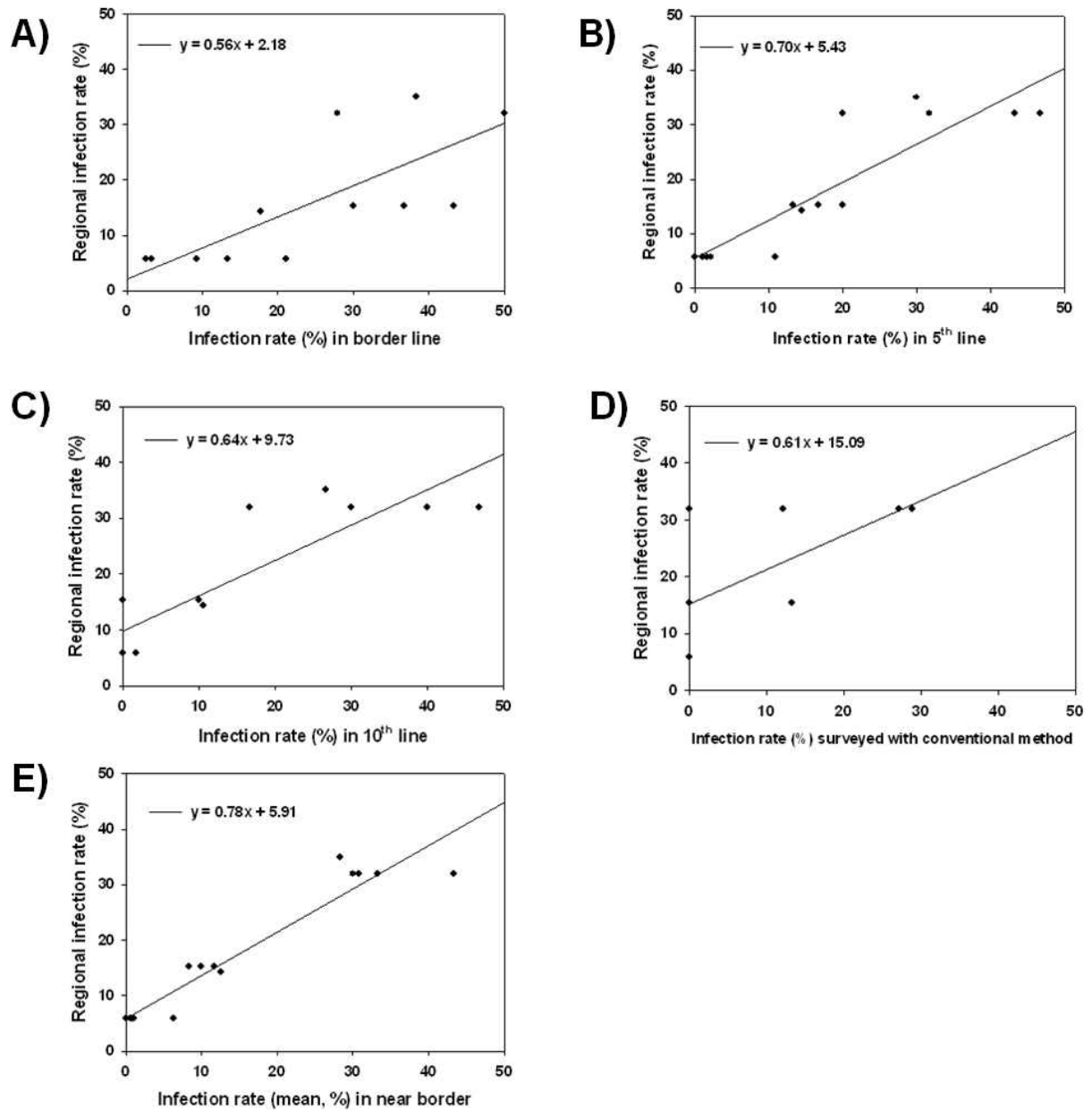


Fig. 50. Scatterplot of regional infection rate (%) of RSV versus infection rate (%) by distance from ridge. A: survey in border line, B, C: 5th and 10th line from ridge, D: conventional method in diagonal middle lines, E: merged data in 5th and 10th lines from ridge (near border).

(2) 증매 바이러스의 발병특성에 따른 약효 평가 기술 개발

(가) 병저항성 검정기술을 활용한 항바이러스 약효 검정

시험 약제의 처리 후 경과 일수에 따라 RSV 발병 억제효과는 모든 약제 처리구에서 유의적으로 나타났다(Table 20, Fig. 51). 즉, 이병경율에서 무처리구와 약제 처리구간에 유의적인 차이를 보였다. 특히 모든 약제 처리구에서 처리 후 5일 동안

Disease Index 값 30% 이내의 RSV 저항성을 나타냈다. 즉, 약제 처리 후 5일간은 RSV에 대해 저항성(약효)이 지속됨을 알 수 있었다.

본 연구에서 사용한 RSV 저항성 검정 방법은, RSV 이병 정도에 따라 시험 작물 품종별로 아래 공식과 같이 이병지수(Disease Index)를 산출하여 저항성도를 평가하는 방법이다.

$$\text{이병지수(\%)} = [\text{피해등급 누계값} / (\text{총 조사 주수} \times 5)] \times 100$$

피해등급은 이병 정도에 따라 0 ~ 5 등급 값으로 분류하는데, 이에 대한 기준은 특정 등(2004)이 제시한 방법을 아래와 같이 분자적 검정기술로 보완하여 개선하였다.

- 0: 생육이 건강하고 병징이 없음,
- 1: 생육은 다소 약하거나 정상. 전형적인 병징이 보이지 않지만 1 ~ 3개의 하엽이 황화되고 분자적 검정 등에서 바이러스 감염이 음성으로 판정(매개충의 흡즙 피해).
- 2: 1등급과 동일하나 분자적 검정 등에서 바이러스 감염이 양성으로 판정.
- 3: 생육이 저조하고 일부 잎에서 줄무늬 또는 잎말림 병징이 나타나고 1 ~ 3개의 하엽이 고사함.
- 4: 생육이 매우 저조하고 전체 잎 또는 신엽을 제외한 모든 잎이 발병함.
- 5: 고사함.

피해등급을 적용하여 산출한 이병지수의 값이 100 ~ 91이면 고도감수성(High Susceptible), 90 ~ 71이면 감수성(Susceptible), 70 ~ 51이면 중도감수성(Moderate Susceptible), 50 ~ 31이면 중도저항성(Moderate Resistance), 30 ~ 11이면 저항성(Resistance), 10 ~ 0이면 고도저항성(High Resistance)으로 구분할 수 있다.

이와 같은 방법으로 본 시험 약제를 검정한 결과 항바이러스성 약효가 저항성으로 평가될 수 있었다. 시험 유묘 품종은 추청벼로 RSV에 대하여 고도감수성을 나타내는 품종이기 때문에 저항성품종 검정법을 활용하여 항바이러스성 약효 검정이 가능할 수 있었으나 보다 정량적이고 약효의 작용점에 근접하여 항바이러스 효과를 평가하는 데에는 한계가 있는 방법으로 판단되었다. 한편 Immuno-capture

(IC)-RT-PCR 검정법을 사용하여 시험 약제 처리 지속 기간을 조사한 결과, 약제 처리 후 보독충 접종하였을 때 두 약제 모두에서 14일까지 발병되지 않았다(Fig. 52).

Table 20. Disease rating index in rice plant challenged with RSV after treatment

| Treatment | Disease rating index (%) [*] | | | Resistance level |
|--|---------------------------------------|------|------|------------------------------|
| | 1DAT | 3DAT | 5DAT | |
| Control | 58a | 58a | 58a | Moderate Susceptible |
| KNF2016 (x250) | 0d | 6cd | 30b | High Resistance - Resistance |
| KNF2016 (x500) | 6cd | 18c | 16cd | High Resistance |
| KNF2016-B (x250) | 6cd | 6cd | 12cd | High Resistance |
| KNF2016-B (x500) | 12cd | 8cd | 14cd | High Resistance |
| Mock (Non-infection/ DW treated) | 0 | 0 | 0 | - |

Means with the same letter are not significantly different ($P>0.05$).

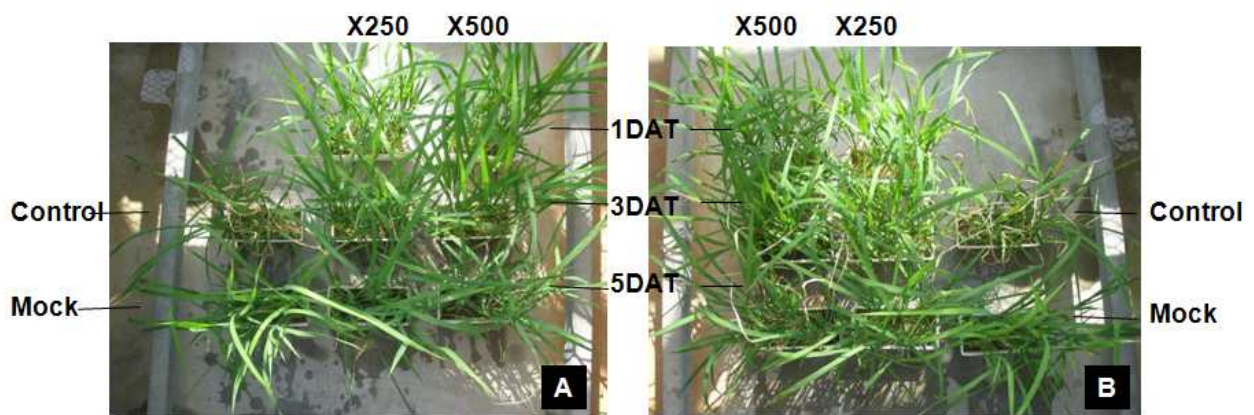


Fig. 51. Resistance in rice to RSV transmitted with the vector infested 1, 3 and 5 days after treatment (A: KNF2016, B: KNF2016-B, x250 & x500: dilution rate).

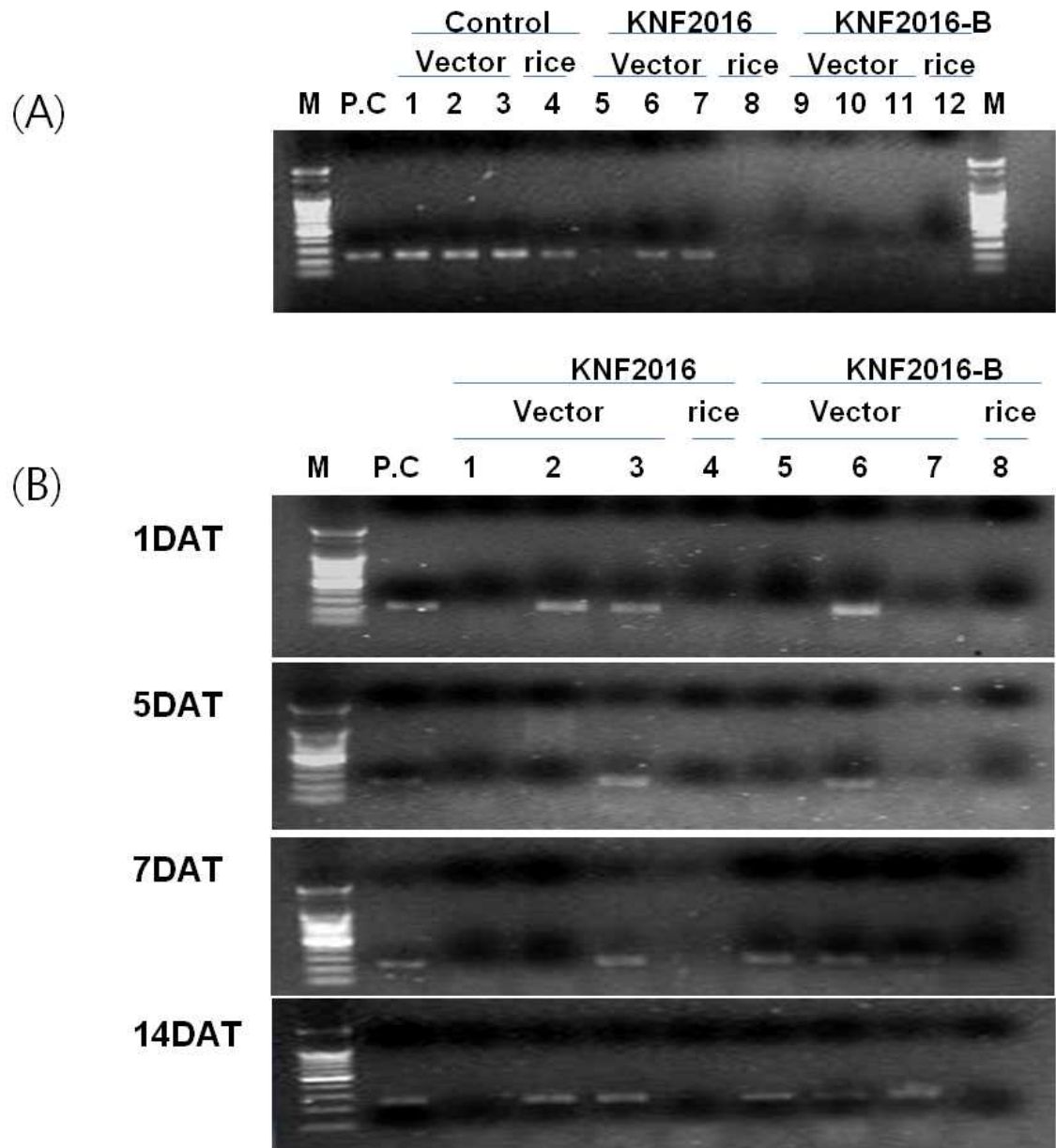


Fig. 52. Immuno-capture (IC)-RT-PCR of RSV using the i-RSV isolation/detection kit in the vector insects and test rice seedlings 1hr (A) or 1-14 days after treatment (B). Vector insects were maintained on the test plants until sampling time after treatment. Any leaf samples of rice treated with the biochemicals was not infected with RSV even if the inoculated insects were detected as the viruliferous.

(나) 약리반응속도론 모델을 적용한 항바이러스성 약효 검정 기술 개발

애멸구에 의해 영속전염하는 RSV의 경우에는, 시험 약제를 식물체(벼 유묘)에 처리하고 매개충을 접종하거나 또는 매개충이 RSV 이병벼를 흡즙한 후 즉, 보독화 직후 약제처리하고 유묘 검정을 수행함으로써 경과 시간에 따라 시험 유묘에서 바이러스의 발병률 무처리와 비교할 수 있다. 약리반응속도론(Pharmacokinetics)은 바이러스의 감염 과정에서 처리된 약물이 바이러스의 이동, 감염, 복제 등에 억제 효과를 나타냄으로, 발병에 따른 일반적인 감염률 곡선과 다르게 낮은 감염률 곡선을 나타낼 것이고 이를 정량적으로 비교함으로써 항바이러스성 약효를 평가할 수 있다는 개념 하에서 본 약효 검정 시험을 수행하였다. 우선 매개충에 시험 약제를 분무처리하고 유묘 검정을 수행하여 시간 경과에 따른 RSV 발병률 조사한 결과, $f(x)=a(1-\exp(-bx))^c$ 의 회귀곡선식이 얻어졌고 RSV에 대한 항바이러스 효과가 정량적인 값으로 산출되었다(Fig. 53). 무처리구에서 F value 1(기준 값), MVIT50이 1시간, MAT(Mean Antiviral Time)는 0인데 대비하여 KNF2016은 F value 0.71, MAT 4.75 (hrs), KNF2016-B는 F value 0.70, MAT 4.55 (hrs)로, 두 약제 모두 무처리 대비 유의적인 항바이러스 약효를 나타냈다(Fig. 52, Table 20). 그러나 두 약제 간에 유의적인 약효의 차이는 보이지 않았다(Table 21). 벼 시험 유묘에 시험 약제를 1회 처리하고 애멸구 보독충에는 약제 처리를 하지 않고 접종하였을 때 1회 처리에 따른 약효 지속 기간도 산출이 가능하였는데, KNF2016은 13.4일, KNF2016-B는 14일 이상으로 검정되었다(Fig. 54).

약리반응속도론 모델을 이용한 항바이러스성 약효 평가 방법은 항바이러스성 유효성분의 작용기전을 탐색하는 기술로도 적용이 가능하였다. Fig. 53에서와 같이 약제 처리된 벼 유묘에 2주간 애멸구 보독충을 흡즙시켰을 때, 이를 분자적으로 검정하여 보독충에서는 RSV가 정상적으로 검출(detection)되었지만 벼 유묘에서는 발병이 일어나지 않은 것으로 확인되었다(Fig. 55). 이는 매개충이 바이러스를 흡즙하는 것과 관련하여 시험 약제가 보독충 체내에서 작용점을 갖지 않는 것을 시사하고 있다. 따라서 본 시험 약제의 항바이러스 효과는 시간에 따라 감소하고 일시적으로 섭식저해 효과를 일으키는 것으로 추정되었다(Fig. 54, Fig. 55).

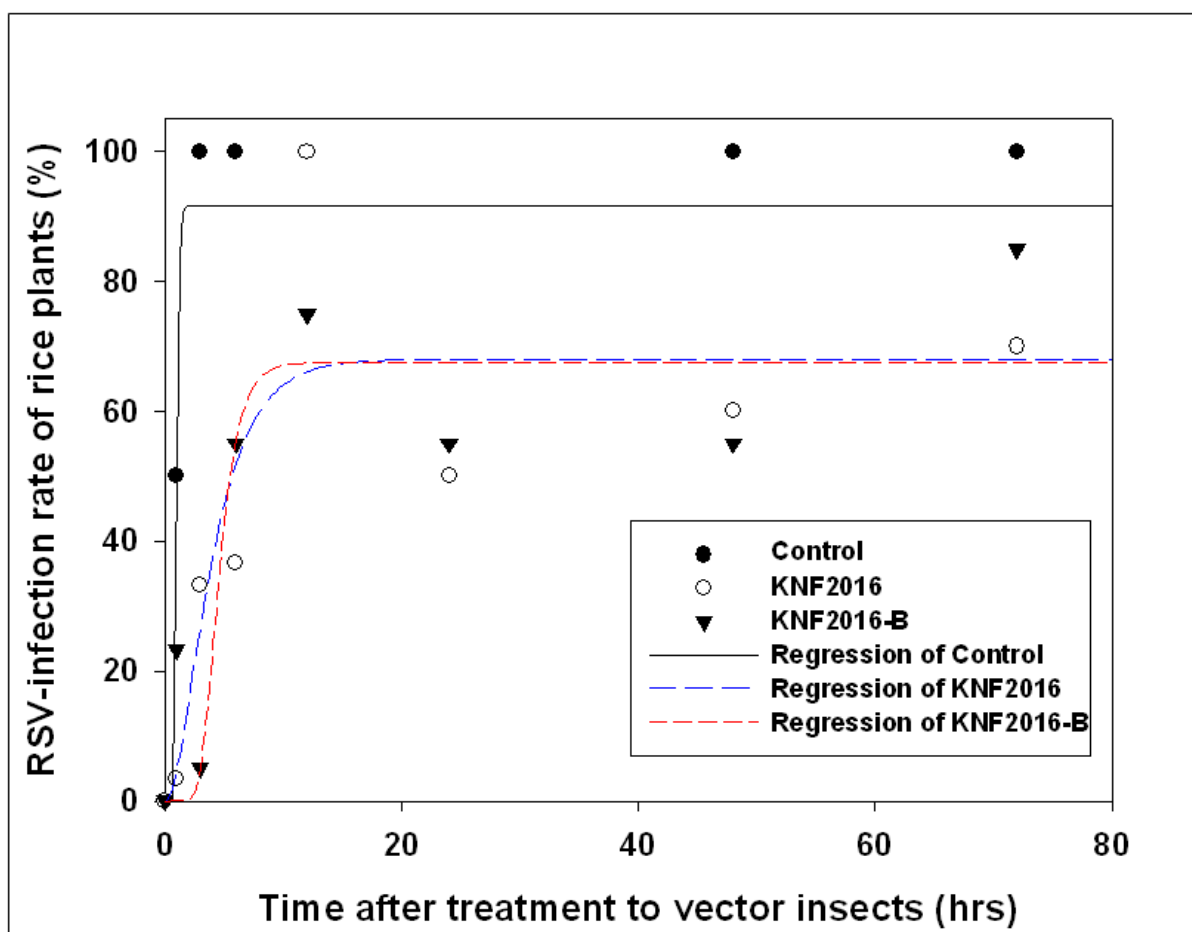


Fig. 53. RSV-infection rate of rice plants after time serial infestation of vector insect treated with the biochemicals, KNF2016 or KNF2016-B.

Table 21. Antiviral effect of KNF2016 and KNF2016-B against RSV*

| Treatment | MVIT50 (hr) | MAT | AUG | F value |
|-----------|-------------|------|---------|---------|
| Control | 1.00 | 0 | 23217.4 | 1.00 |
| KNF2016 | 5.75 | 4.75 | 16484.0 | 0.71 |
| KNF2016-B | 5.55 | 4.55 | 16273.5 | 0.70 |

*Model: $f(x)=a(1-\exp(-bx))c$.

MVIT50: Time at 50% of the infection rate.

MAT (Mean Antiviral Time): $|MVIT_{treated}-MVIT_{control}|$.

AUG: Area under graph.

F value (as antiviral effect)= $AUG_{treated}/AUG_{control}$.

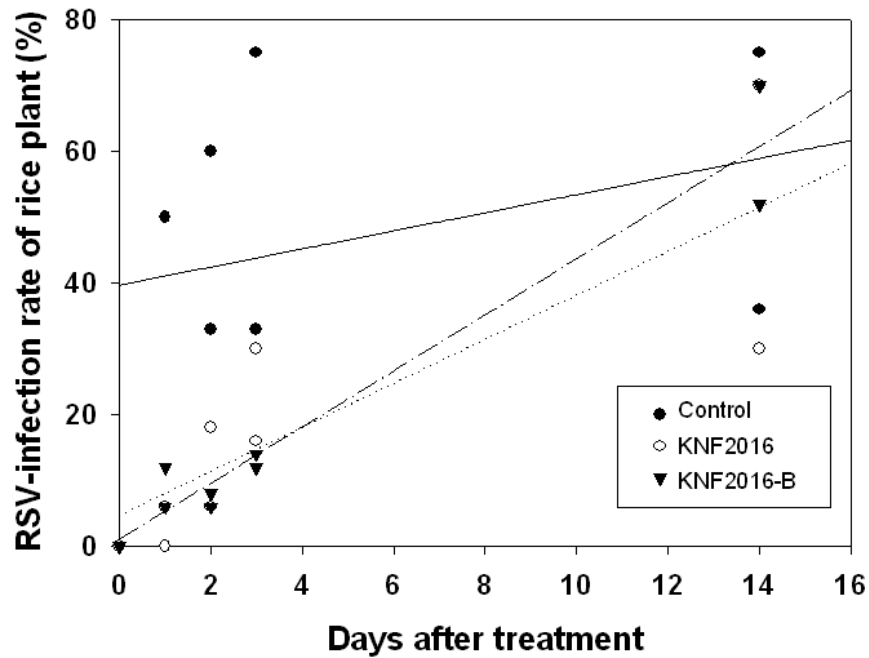


Fig. 54. Duration time of antiviral effect caused by one time treatment of the biochemicals, KNF2016 or KNF2016-B.

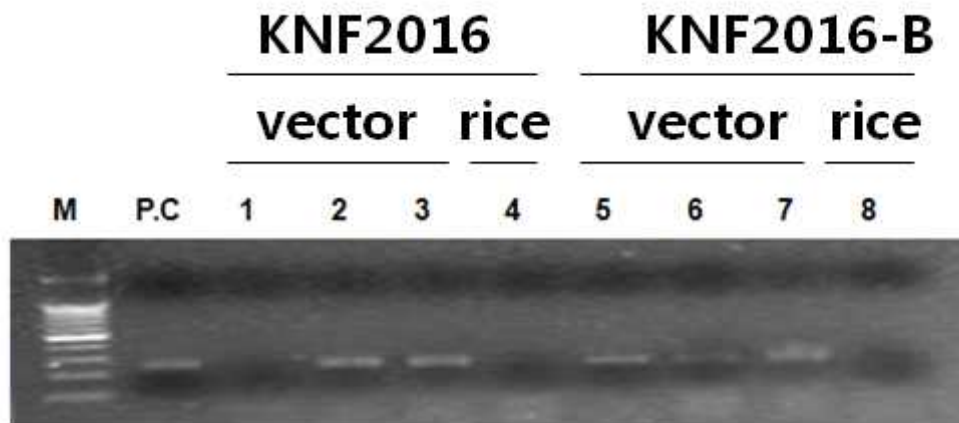


Fig. 55. RSV transmitted in vector insects were not damaged over 2 weeks by fee특정 on the test plants treated with the biochemicals, KNF2016 and KNF2016-B. M: DNA ladder, P.C.: Positive control of RSV, 1-8: RT-PCR products of RSV from samples of vector insects and rice plants.

(3) 활성물질의 적용스펙트럼 확보 및 농가적용법 연구

(가) 시험 약제의 CMV에 대한 항바이러스 약효 검정을 위한 약리반응속도론 모델의 적용

진딧물 개체마다 시험 유묘에 연속 접종시 시간에 따른 일관된 발병률 저하가 관찰되지 않았기 때문에 약리반응속도론으로 약효를 정량화할 수 없었고(Fig. 56), 다만 무처리 대비 발병율의 차이로 항바이러스 효과를 추정할 수 있었으나 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다(Table 22). 따라서 약리반응속도론 모델을 이용한 식물바이러스병에 대한 시험 약제의 항바이러스 약효 평가는 RSV의 경우와 같이 영속성바이러스에 대한 검정에 유효하였으나, 비영속성바이러스에 대해서는 접종 방법 등 향후 추가적인 기술의 개발이 요구된다. 그러나 이로써 본 시험 약제가 CMV에 대한 항바이러스 약효가 없다고 판단하기에는 이르다고 판단된다. 진딧물 매개충에 의한 바이러스 전달 방식을 고려하여 최적화된 약효 검정 기술이 개발된다면 CMV에 대한 항바이러스 약효가 유의적으로 검증될 수도 있기 때문이다. 따라서 신규한 항바이러스 작물보호제의 개발을 위해서는 앞으로도 바이러스 전달과 관련한 실현 가능성이 높은 방식으로 약효 검정 기술의 개발이 필요하다고 본다.

| Treatment | Serial No. | | | | | | | | | | |
|---------------------|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| | of test plant: | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| Control | Test 1 | ● | ● | × | × | × | × | ● | ● | ● | ● |
| | Test 2 | ● | ● | × | ● | × | ● | ● | ● | × | ● |
| | Test 3 | × | ● | ● | ● | × | ● | ● | ● | ● | ● |
| KNF2016 (x500) | Test 1 | ● | ● | × | × | × | ● | ● | ● | ● | ● |
| | Test 2 | ● | × | × | × | × | × | ● | ● | ● | × |
| | Test 3 | ● | ● | ● | × | × | × | × | ● | ● | × |
| KNF2016-B (x500) | Test 1 | ● | × | × | × | × | × | × | ● | ● | ● |
| | Test 2 | ● | × | × | × | × | × | ● | ● | ● | ● |
| | Test 3 | ● | ● | ● | ● | ● | × | ● | ● | ● | ● |

Fig. 56. Infection pattern of CMV transmitted by aphid vector insects (3 individuals/plant) infested serially onto 10 of test pepper plants.

Table 22. Infection rate of CMV in pepper plant after treatment of the biochemicals, KNF2016 or KNF2016-B.

| Treatment | Infection rate (% , Mean±SE) | Control efficacy (%) |
|------------------|------------------------------|----------------------|
| Control | 70.0±5.8a | - |
| KNF2016 (x500) | 53.3±8.8a | 23.9 |
| KNF2016-B (x500) | 63.3±13.3a | 9.58 |

(나) RSV에 대한 시험 약제의 농가적용법 연구

시험 약제에 대한 최적화된 처리 방법을 시험하고자 RSV를 대상으로 서산과 양평의 논에서 포장시험을 수행하였다. 서산에서는 무처리구에서 발병률이 낮아(1.0% 이하) 평가가 곤란하였으나 양평에서는, 이앙 1주일 전 논둑에 약제 처리 시 무처리구 이병주율(8.9%) 대비 KNF2016 처리구 5.6%, KNF2016-B 처리구 4.4%, 대조 화학농약 처리구 5.5%로 낮은 이병주율을 보여 각각 37.5%, 50.2%, 37.8%의 방제 효과를 나타냈다(Table 23). 본 시험에서 무처리구 발병률 낮았기 때문에 약효 평가 등에 적절하지 못하였다. 야외 기상 및 생태 조건에 따라 매년 매개충의 발생 및 발병 조건이 달라지기 때문에 약제 처리구에서 방제율도 낮게 평가되었다. 그럼에도 불구하고 KNF2016-B는 화학농약처리구와 더불어 유의적인 RSV 발병 억제 효과가 확인됨에 따라 심화 연구가 요구된다. 본 시험 약제의 정확한 작용 기작이 구명되지 않은 상태에서 농가적용법을 최적화하는 것은 어렵다. 그렇기 때문에 한번의 농가 포장시험 결과로 약효 검정 및 검증을 평가하는 것은 곤란하므로 향후 작용 기작의 구명과 더불어 최적화된 약제의 야외 포장 검정이 수행될 필요가 있다. 이와 더불어 본 시험 약제의 활용도를 높이기 위해서는 애멸구의 비래, 월동 및 개체군내 보독충을 변동 등과 관련하여 다양한 시나리오에 맞춘 농가 적용 기술의 개발이 연구될 것으로 기대된다.

Table 23. Control efficacy of RSV in rice paddy fields (2011)

| Treatment | Seosan | | Yangpyeong | |
|-----------------------|--------------------------------|-------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| | Infection rate (%, mean±SD) | Control efficacy (%) | Infection rate (%, mean±SD)* | Control efficacy (%) |
| Control | 1.1±1.9 | - | 8.9±1.9a | - |
| KNF2016 | 2.2±3.9 | - | 5.6±2.0ab | 37.5 |
| KNF2016-B | 0.0 | - | 4.4±2.0b | 50.2 |
| Chemical pesticide | 1.1±1.9 | - | 5.5±3.9b | 37.8 |

*LSD-test (P<0.05).

3. KNF2016의 안전성 평가

가. KNF2016 원제의 안전성 평가

(1) SD계 랫드에 대한 급성경구독성시험

KNF2016 원제에 대한 급성경구독성시험을 농약관리법 농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제 2010-29호, 2010년 10월 13일)에 따라 SD계 랫드를 사용하여 시험물질의 투여량을 1,250, 2,500, 5,000mg/kg B.W.로 설정하여 암·수 각각에 대해 1회 경구투여한 후 치사 수, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- (가) 시험기간 중 시험물질 투여에 의한 치사 개체는 관찰되지 않았다.
- (나) 일반증상 관찰시 시험물질 투여와 관련된 이상소견은 관찰되지 않았다.
- (다) 체중측정 결과 대조군과 투여군에서 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다.
- (라) 부검소견 결과 대조군과 투여군에서 특이할만한 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 KNF2016 원제의 투여량을 1,250, 2,500, 5,000mg/kg B.W로 설정하여 투여한 결과 전 투여군에서의 치사 개체는 관찰되지 않았으며, 투여에 따른 이상증상을 나타낸 개체도 없었고, 체중증감 및 부검소견 결과에서도 특이할 만한 이상소견이 관찰되지 않아 KNF2016 원제에 대한 반수치사량(LD50)은 5,000mg/kg B.W. 이상으로 판명되었다.

(2) SD계 랫드에 대한 급성경피독성시험

KNF2016 원제에 대한 급성경피독성시험을 농약관리법 농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제 2010-29호, 2010년 10월 13일)에 따라 SD계 랫드를 사용하여 시험물질의 투여량을 1,000, 2,000, 4,000mg/kg B.W.로 설정하여 암·수 각각에 대해 1회 경피 투여한 후 2주간 치사 수, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- (가) 시험기간 중 시험물질 투여에 의한 치사 개체는 관찰되지 않았다.
- (나) 일반증상 관찰시 시험물질 투여와 관련된 이상소견은 관찰되지 않았다.
- (다) 체중측정 결과 대조군과 투여군에서 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다.
- (라) 부검소견 결과 대조군과 투여군에서 특이할만한 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 KNF2016 원제의 투여량을 1,000, 2,000, 4,000mg/kg B.W로 설정하여 투여한 결과 전 투여군에서의 치사 개체는 관찰되지 않았으며, 투여에 따른 이상증상을 나타낸 개체도 없었고, 체중증감 및 부검소견 결과에서도 특이할 만한 이상소견이 관찰되지 않아 KNF2016 원제에 대한 반수치사량(LD50)은 4,000mg/kg B.W. 이상으로 판명되었다(Table 24).

이상의 단회투여 독성실험 결과 KNF2016 원제의 경우 인축독성실험분야의 급성독성에서 안전한 결과를 나타내었다.

Table 24. Acute toxicity of KNF2016

| Study type | Test animals | Judgement |
|-------------------|--------------|------------------------------------|
| Acute oral test | SPF rat(SD) | LD ₅₀ > 5,000 mg/kg B.W |
| Acute dermal test | SPF rat(SD) | LD ₅₀ > 4,000 mg/kg B.W |

(3) New Zealand White계 토끼에 대한 피부자극성시험

KNF2016 원제에 대한 피부자극성시험을 농약관리법 농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제 2010-29호, 2010년 10월 13일)에 따라 New Zealand White계 토끼를 사용하여 시험물질의 투여량을 0.5ml로 설정하여 수컷 6마리 각각에 대해 1회 피부 노출한 후 72시간동안 치사 수, 일반증상 및 체중변화를 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

(가) 시험기간 중 시험물질 투여에 의한 치사 개체는 관찰되지 않았다.

(나) 일반증상 관찰시 모든 투여동물에서 투여와 관련된 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았다.

(다) 체중측정 결과 대조군과 투여군에서 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다.

(라) 실험기간 중 환경조건은 온도 20 ± 3℃, 상대습도 30 ~ 70%로 유지하였으며, 광조건 12 시간, 암조건 12 시간으로 조절하였다. 급이는 투여기간동안 먹이와 음용수를 지속적으로 공급하였다.

KNF2016 원제의 토끼에 대한 피부자극 정도를 알아보고자 New Zealand White계 토끼에 KNF2016 원제 0.5ml을 노출하여 노출 후 4시간, 24시간, 48시간, 72시간동안 피부자극지수를 관찰한 결과 전 관찰시간에서 피부 발적 및 부종이 관찰되지 않았다 (Table 25). 따라서 KNF2016 원제는 Non irritative material로 판명되었다. 이러한 결과는 미국 EPA 기준에서는 “Category IV“, 유럽기준에는 “not classified with respect to skin corrosion/irritation“에 해당된다.

Table 25. Results of skin reaction

| Skin reaction Phases (Hours) ¹ | Erythema & Eschar | | | | | | | | Edema | | | | | | | |
|---|-------------------|----|----|----|---------|----|----|----|--------|----|----|----|---------|----|----|----|
| | Intact | | | | Abraded | | | | Intact | | | | Abraded | | | |
| | 1 | 24 | 48 | 72 | 1 | 24 | 48 | 72 | 1 | 24 | 48 | 72 | 1 | 24 | 48 | 72 |
| Animal No. 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mean Score | 0.0 | | | | | | | | 0.0 | | | | | | | |
| Σ Mean Score | 0.0 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Total | 0.0 | | | | | | | | | | | | | | | |
| P.I.I. ² | 0 | | | | | | | | | | | | | | | |

¹ Time after topical application

² P.I.I.(Primary Irritation Index) = Total ÷ 8

(4) New Zealand White계 토끼에 대한 안점막자극성시험

KNF2016 원제에 대한 안점막자극성시험을 농약관리법 농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제 2010-29호, 2010년 10월 13일)에 따라 New Zealand White계 토끼를 사용하여 시험물질의 투여량을 0.1ml로 설정하여 수컷 6마리 각각에 대해 1회 안구 노출 한 후 72시간 동안 치사 수, 일반증상 및 체중변화를 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- (가) 시험기간 중 시험물질 투여에 의한 치사 개체는 관찰되지 않았다.
- (나) 일반증상 관찰시 모든 투여동물에서 투여와 관련된 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았다.
- (다) 체중측정 결과 대조군과 투여군에서 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다.

KNF2016 원제의 토끼에 대한 안점막자극 정도를 알아보고자 New Zealand White 계 토끼에 KNF2016 원제 0.1ml을 노출하여 노출 후 4시간, 24시간, 48시간, 72시간 동안 안점막자극지수를 관찰한 결과 노출 후 72시간까지 결막에 부종, 발적 및 배출물이 관찰되지 않았다(Table 26). 따라서 KNF2016 원제는 Non irritative material로 판명되었다. 이러한 결과는 미국 EPA 기준에서는 “Category IV”, 유럽기준에는 “not classified with respect to eye damage/irritation“에 해당된다.

Table 26. Results of eye reaction

| Eye reaction | Hours ¹ | Animal No. | | | | | | |
|---|------------------------------------|------------|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| Cornea | Degree of Opacity (A) | 1H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 24H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 48H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 72H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Diffuse areas of Opacity (B) | 1H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 24H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 48H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 72H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Iris(C) | 1H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 24H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 48H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 72H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Conjunctiva | Redness(D) | 1H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 24H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 48H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 72H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Edema(E) | 1H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 24H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 48H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 72H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| I.O.I.(Individual Ocular Irritation Index) ² | 1H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 24H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 48H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 72H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| M.O.I.(Mean Ocular Irritation Index) | 1H | 0.0 | | | | | | |
| | 24H | 0.0 | | | | | | |
| | 48H | 0.0 | | | | | | |
| | 72H | 0.0 | | | | | | |

¹ Time after topical application

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

(5) 기니 꾀에 대한 피부감작성시험

KNF2016 원제의 기니 꾀에 대한 피부감작성 정도를 알아보고자 농약관리법 농약의 등록기준 (농촌진흥청 고시 제 2010-29호, 2010년 10월 13일)을 이용하여 Hartley계 guinea pig에 피부감작성시험법 중 Non adjuvant method인 Buehler test를 실시한 결과 시험에 이용한 Hartley계 guinea pig 전 개체에서 감각이 관찰되지 않았다(Table 27). 따라서 KNF2016 원제는 감각유발물질이 아닌 것으로 판명되었다.

Table 27. Results of skin sensitization

| Group | No. of animals | Average Sensitization Score ¹ | | Sensitization Rate ² | | Maximization Grade | |
|-----------------|----------------|--|-------|---------------------------------|-------|--------------------|----------------|
| | | 30hrs | 54hrs | 30hrs | 54hrs | Grade | Classification |
| | | G1 ³ | 20 | 0.0 | 0.0 | 0% | 0% |
| G2 ⁴ | 20 | 0.55 | 0.20 | 40% | 20% | III | Moderate |
| G3 ⁵ | 10 | 0.0 | 0.0 | 0% | 0% | I | Non-sensitizer |

¹ Average Sensitization Score = \sum Sensitization Score of each animal \div Number of animals observed

² Sensitization Rate(%) = (Number of animals with positive response \div Number of animals observed) \times 100

³ Group G1 : Sensitized with KNF2016 and challenged with KNF2016

⁴ Group G2 : Sensitized with HCA and challenged with HCA

⁵ Group G3 : Sensitized with Ethyl alcohol and challenged with HCA

(6) 미생물 복귀 돌연변이시험

KNF2016 원제의 미생물 복귀 돌연변이시험을 통한 돌연변이 유발성의 유무를 평가하기 위해 OECD Guidelines for Testing of Chemicals", Section 4, No. 471: "Bacterial Reverse Mutation Test"를 이용하여 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 균주 TA100, TA1535, TA98 및 TA1537의 4개의 균주와 *Escherichia coli*의 트립토판 요구성 균주인 WP2uvrA를 이용하여 시험을 실시한 결과, TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 WP2uvrA의 5균주를 사용한 직접법(S9-)과 대사활성화법(S9+) 모두에서 음성 대조군에 비하여 각 농도별 처리군에서의 콜로니 생성 수치는 증가 양상을 나타내지 않았다(Table 28, 29). 따라서 KNF2016 원제는 본 시험 조건하에 사용한 균주들에 대하여 복귀 돌연변이를 유발하지 않는 것(음성)으로 판명되었다.

Table 28. Result of bacterial reverse mutation assay with KNF2016 – 1st Experiment

| Tester Strain | Chemical Treated | Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | Revertant colonies/plate (Mean) [Factor] ^{a)} | | | |
|---------------------|------------------|-------------------------------------|--|-------|--------------|-------|
| | | | Without S-9 mix | | With S-9 mix | |
| TA100 | Vehicle | 0 | 141 \pm 8 | | 168 \pm 4 | |
| | Test Item | 156.3 | 145 \pm 8 | [1.0] | 182 \pm 5 | [1.1] |
| | | 312.5 | 149 \pm 8 | [1.1] | 174 \pm 11 | [1.0] |
| | | 625 | 154 \pm 8 | [1.1] | 172 \pm 10 | [1.0] |
| | | 1250 | 166 \pm 4 | [1.2] | 173 \pm 16 | [1.0] |
| | | 2500 | 162 \pm 10 | [1.1] | 183 \pm 2 | [1.1] |
| | | 5000 | 161 \pm 4 | [1.1] | 185 \pm 4 | [1.1] |
| TA1535 | Vehicle | 0 | 11 \pm 1 | | 11 \pm 3 | |
| | Test Item | 156.3 | 9 \pm 2 | [0.8] | 10 \pm 3 | [0.9] |
| | | 312.5 | 9 \pm 2 | [0.8] | 11 \pm 2 | [1.0] |
| | | 625 | 10 \pm 3 | [0.9] | 10 \pm 2 | [0.9] |
| | | 1250 | 11 \pm 2 | [1.0] | 12 \pm 2 | [1.1] |
| | | 2500 | 11 \pm 1 | [1.0] | 12 \pm 3 | [1.1] |
| | | 5000 | 10 \pm 1 | [0.9] | 10 \pm 2 | [0.9] |
| TA98 | Vehicle | 0 | 20 \pm 3 | | 31 \pm 3 | |
| | Test Item | 156.3 | 22 \pm 6 | [1.1] | 36 \pm 4 | [1.2] |
| | | 312.5 | 18 \pm 3 | [0.9] | 28 \pm 4 | [0.9] |
| | | 625 | 22 \pm 3 | [1.1] | 33 \pm 3 | [1.1] |
| | | 1250 | 19 \pm 3 | [1.0] | 32 \pm 5 | [1.0] |
| | | 2500 | 18 \pm 4 | [0.9] | 35 \pm 4 | [1.1] |
| | | 5000 | 17 \pm 2 | [0.9] | 29 \pm 4 | [0.9] |
| TA1537 | Vehicle | 0 | 11 \pm 1 | | 15 \pm 2 | |
| | Test Item | 156.3 | 10 \pm 2 | [0.9] | 16 \pm 2 | [1.1] |
| | | 312.5 | 12 \pm 3 | [1.1] | 16 \pm 3 | [1.1] |
| | | 625 | 11 \pm 2 | [1.0] | 18 \pm 2 | [1.2] |
| | | 1250 | 11 \pm 1 | [1.0] | 14 \pm 2 | [0.9] |
| | | 2500 | 14 \pm 1 | [1.3] | 14 \pm 1 | [0.9] |
| | | 5000 | 11 \pm 2 | [1.0] | 16 \pm 2 | [1.1] |
| WP2 ^{uvrA} | Vehicle | 0 | 16 \pm 3 | | 18 \pm 3 | |
| | Test Item | 156.3 | 16 \pm 3 | [1.0] | 22 \pm 3 | [1.2] |
| | | 312.5 | 14 \pm 3 | [0.9] | 19 \pm 5 | [1.1] |
| | | 625 | 16 \pm 5 | [1.0] | 17 \pm 3 | [0.9] |
| | | 1250 | 15 \pm 3 | [0.9] | 17 \pm 3 | [0.9] |
| | | 2500 | 13 \pm 1 | [0.8] | 22 \pm 2 | [1.2] |
| | | 5000 | 18 \pm 2 | [1.1] | 18 \pm 3 | [1.0] |

^{a)} No. of Revertant colonies of treated plate/No. of Revertant colonies of vehicle control plate

Test item: *Pseudomonas oleovorans* extract; Vehicle: Distilled Water (DW)

- Continued -

| Tester Strain | Chemical Treated | Dose (µg/plate) | Revertant colonies/plate (Mean) [Factor] ^{*)} | | | |
|---------------------|------------------|-----------------|--|------|--------------|-----------------|
| | | | Without S-9 mix | | With S-9 mix | |
| Positive Controls | | | | | | |
| TA100 | SA | 0.5 | 430 | ± 34 | [3.0] | |
| TA1535 | SA | 0.5 | 211 | ± 21 | [19.2] | |
| TA98 | 2-NF | 2 | 319 | ± 39 | [16.0] | |
| TA1537 | 9-AA | 50 | 94 | ± 9 | [8.5] | |
| WP2 ^{uvrA} | 4NQO | 0.5 | 44 | ± 7 | [2.8] | |
| TA100 | BP | 2 | | | | 522 ± 26 [3.1] |
| TA1535 | 2-AA | 2 | 10 | ± 1 | [0.9] | 124 ± 15 [11.3] |
| TA98 | BP | 2 | 18 | ± 2 | [0.9] | 279 ± 37 [9.0] |
| TA1537 | BP | 2 | | | | 92 ± 13 [6.1] |
| WP2 ^{uvrA} | 2-AA | 4 | | | | 75 ± 9 [4.2] |

^{*)} No. of Revertant colonies of treated plate/No. of Revertant colonies of vehicle control plate

SA, Sodium azide; 2-NF, 2-Nitrofluorene; 9-AA, 9-Aminoacridine;
4NQO, 4-Nitroquinoline *N*-oxide; 2-AA, 2-Aminoanthracene; BP, Benzo(a)pyrene

Table 29. Result of bacterial reverse mutation assay with KNF2016 – 2nd Experiment

| Tester Strain | Chemical Treated | Dose (µg/plate) | Revertant colonies/plate (Mean) [Factor] ⁴⁾ | | | | | | | |
|---------------------|------------------|-----------------|--|---|----|--------------|-----|---|----|-------|
| | | | Without S-9 mix | | | With S-9 mix | | | | |
| TA100 | Vehicle | 0 | 129 | ± | 7 | 144 | ± | 4 | | |
| | Test Item | 156.3 | 123 | ± | 5 | [1.0] | 138 | ± | 6 | [1.0] |
| | | 312.5 | 132 | ± | 10 | [1.0] | 144 | ± | 10 | [1.0] |
| | | 625 | 119 | ± | 5 | [0.9] | 145 | ± | 12 | [1.0] |
| | | 1250 | 123 | ± | 9 | [1.0] | 136 | ± | 14 | [0.9] |
| | | 2500 | 120 | ± | 15 | [0.9] | 137 | ± | 26 | [1.0] |
| | | 5000 | 124 | ± | 11 | [1.0] | 138 | ± | 22 | [1.0] |
| TA1535 | Vehicle | 0 | 13 | ± | 1 | 10 | ± | 1 | | |
| | Test Item | 156.3 | 11 | ± | 2 | [0.8] | 12 | ± | 1 | [1.2] |
| | | 312.5 | 11 | ± | 1 | [0.8] | 11 | ± | 3 | [1.1] |
| | | 625 | 12 | ± | 2 | [0.9] | 8 | ± | 1 | [0.8] |
| | | 1250 | 14 | ± | 2 | [1.1] | 9 | ± | 2 | [0.9] |
| | | 2500 | 16 | ± | 1 | [1.2] | 12 | ± | 2 | [1.2] |
| | | 5000 | 10 | ± | 2 | [0.8] | 13 | ± | 4 | [1.3] |
| TA98 | Vehicle | 0 | 19 | ± | 1 | 38 | ± | 2 | | |
| | Test Item | 156.3 | 20 | ± | 3 | [1.1] | 38 | ± | 4 | [1.0] |
| | | 312.5 | 21 | ± | 3 | [1.1] | 31 | ± | 5 | [0.8] |
| | | 625 | 19 | ± | 1 | [1.0] | 30 | ± | 5 | [0.8] |
| | | 1250 | 20 | ± | 3 | [1.1] | 32 | ± | 3 | [0.8] |
| | | 2500 | 19 | ± | 1 | [1.0] | 35 | ± | 4 | [0.9] |
| | | 5000 | 19 | ± | 0 | [1.0] | 30 | ± | 3 | [0.8] |
| TA1537 | Vehicle | 0 | 7 | ± | 2 | 13 | ± | 3 | | |
| | Test Item | 156.3 | 7 | ± | 2 | [1.0] | 13 | ± | 1 | [1.0] |
| | | 312.5 | 6 | ± | 2 | [0.9] | 14 | ± | 3 | [1.1] |
| | | 625 | 8 | ± | 2 | [1.1] | 10 | ± | 1 | [0.8] |
| | | 1250 | 7 | ± | 2 | [1.0] | 11 | ± | 2 | [0.8] |
| | | 2500 | 5 | ± | 1 | [0.7] | 11 | ± | 1 | [0.8] |
| | | 5000 | 6 | ± | 2 | [0.9] | 11 | ± | 3 | [0.8] |
| WP2 _{uvrA} | Vehicle | 0 | 20 | ± | 4 | 22 | ± | 3 | | |
| | Test Item | 156.3 | 16 | ± | 1 | [0.8] | 21 | ± | 2 | [1.0] |
| | | 312.5 | 20 | ± | 3 | [1.0] | 21 | ± | 2 | [1.0] |
| | | 625 | 21 | ± | 3 | [1.1] | 21 | ± | 2 | [1.0] |
| | | 1250 | 20 | ± | 4 | [1.0] | 25 | ± | 1 | [1.1] |
| | | 2500 | 19 | ± | 2 | [1.0] | 20 | ± | 1 | [0.9] |
| | | 5000 | 20 | ± | 2 | [1.0] | 24 | ± | 3 | [1.1] |

⁴⁾ No. of Revertant colonies of treated plate/No. of Revertant colonies of vehicle control plate

Test item: *Pseudomonas oleovorans* extract; Vehicle: Distilled Water (DW)

- Continued -

| Tester Strain | Chemical Treated | Dose (µg/plate) | Revertant colonies/plate (Mean) [Factor] ^{a)} | | | |
|-------------------|------------------|-----------------|--|--------|--------------|-------|
| | | | Without S-9 mix | | With S-9 mix | |
| Positive Controls | | | | | | |
| TA100 | SA | 0.5 | 408 ± 24 | [3.2] | | |
| TA1535 | SA | 0.5 | 219 ± 6 | [16.8] | | |
| TA98 | 2-NF | 2 | 300 ± 7 | [15.8] | | |
| TA1537 | 9-AA | 50 | 108 ± 17 | [15.4] | | |
| WP2uvrA | 4NQO | 0.5 | 40 ± 5 | [2.0] | | |
| TA100 | BP | 2 | | | 532 ± 28 | [3.7] |
| TA1535 | 2-AA | 2 | 11 ± 1 | [0.8] | 84 ± 5 | [8.4] |
| TA98 | BP | 2 | 19 ± 2 | [1.0] | 371 ± 37 | [9.8] |
| TA1537 | BP | 2 | | | 101 ± 8 | [7.8] |
| WP2uvrA | 2-AA | 4 | | | 126 ± 10 | [5.7] |

^{a)} No. of Revertant colonies of treated plate/No. of Revertant colonies of vehicle control plate

SA, Sodium azide; 2-NF, 2-Nitrofluorene; 9-AA, 9-Aminoacridine; 4NQO, 4-Nitroquinoline *N*-oxide; 2-AA, 2-Aminoanthracene; BP, Benzo(a)pyrene

(7) 소핵시험

KNF2016 원제의 유전독성을 평가하기 위하여 OECD Guideline for Testing of Chemicals, Section 4, No. 474, “Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test”를 이용하여 ICR계 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 투여한 최고농도는 예비시험을 토대로 하여 시험물질의 가능한 높은 용량이라고 설정한 500, 1,000, 2,000mg/kg으로 정하였다. 8주령 ~ 12주령의 랫드를 순화시킨 후 시험물질을 0, 500, 1,000 및 2,000mg/kg의 농도로 각각의 농도에 대하여 6마리에 단회 경구 투여하였으며, 투여 후 약 24시간에 골수세포를 수집하여 소핵유발과 세포독성을 평가하였다.

개체당 2,000개의 다염성 적혈구(Polychromatic Erythrocyte, PCE) 중에 나타나는 소핵을 가진 다염성 적혈구 (Micronucleated Polychromatic Erythrocyte, NPCE)의 수를 계수한 결과 시험물질을 투여한 모든 투여군에서 음성 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가는 나타나지 않았으며, 전체 적혈구 중 다염성 적혈구의 비율도 시험물질을 투여한 모든 군에서 음성 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다(Table 30, 31). 따라서 KNF2016 원제는 ICR계 마우스의 골수세포에서 소핵을 유발하지 않는 것으로 판명되었다.

Table 30. Micronucleus test of KNF2016 in ICR male mice

| GROUP : | V. CONTROL | T1 | T2 | T3 | P. CONTROL |
|------------------------|------------|------|------|------|-----------------------|
| DOSE : (mg/kg) | 0 | 500 | 1000 | 2000 | 70 |
| MNPCE/2000 PCEs | | | | | |
| MEAN | 0.67 | 0.83 | 0.50 | 1.50 | 73.83 ^{**a)} |
| S. D. | 1.21 | 0.98 | 0.84 | 0.84 | 25.23 |
| PCE/(PCE+NCE) | | | | | |
| MEAN | 0.52 | 0.53 | 0.57 | 0.58 | 0.53 |
| S. D. | 0.07 | 0.06 | 0.10 | 0.09 | 0.05 |
| N | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |

** Significantly different from the control at $P < 0.01$.

^{a)} Mann-Whitney U-test

TEST ITEM: *Pseudomonas oleovorans* extract
V.CONTROL: Water for injection, sterile (DW)
P.CONTROL: CPA

Abbreviations

MNPCE: PCE with one or more micronuclei
PCE: Polychromatic erythrocyte
NCE: Normochromatic erythrocyte
CPA: Cyclophosphamide monohydrate

Table 31. Micronucleus test of KNF2016 in ICR female mice

| GROUP : | V. CONTROL | T1 | T2 | T3 | P. CONTROL |
|------------------------|------------|----------------------|----------------------|------|-----------------------|
| DOSE : (mg/kg) | 0 | 500 | 1000 | 2000 | 70 |
| MNPCE/2000 PCEs | | | | | |
| MEAN | 0.83 | 1.00 | 1.83 | 1.17 | 65.33 ^{**a)} |
| S. D. | 0.75 | 0.89 | 0.75 | 1.94 | 14.90 |
| PCE/(PCE+NCE) | | | | | |
| MEAN | 0.52 | 0.63 ^{**b)} | 0.61 ^{**b)} | 0.53 | 0.44 |
| S. D. | 0.03 | 0.03 | 0.06 | 0.05 | 0.09 |
| N | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |

** Significantly different from the control at $P < 0.01$.

^{a)} Mann-Whitney U-test

^{b)} ANOVA test and Dunnett's test

TEST ITEM: *Pseudomonas oleovorans* extract
V.CONTROL: Water for injection, sterile (DW)
P.CONTROL: CPA

Abbreviations

MNPCE: PCE with one or more micronuclei
PCE: Polychromatic erythrocyte
NCE: Normochromatic erythrocyte
CPA: Cyclophosphamide monohydrate

(8) 염색체이상시험

KNF2016 원제의 염색체이상 유발여부를 평가하기 위하여 Chinese hamster 유래의 Lung Cell(CHL)을 이용하여 직접법(-S9 Mix)과 대사활성화법 (+S9 Mix)의 염색체 이상 시험을 실시하였다. 시험물질은 증류수에 희석하는 방식으로 조제하였다. 시험물질의 투여농도는 세포 증식의 약 50% 억제를 기준으로 결정하는 것으로, 시험물질의 농도는 직접법과 대사활성화법의 농도를 각각 설정하였다. 직접법의 경우 625, 1,250, 2,500, 5,000 μ g/ml로 설정하였으며 대사활성법 역시 동일하게 625, 1,250, 2,500, 5,000 μ g/ml로 설정하였다. 시험물질을 처리한 모든 군에서 염색체이상 빈도는 판정치로 볼 때 모두 5% 미만의 빈도를 나타내었으며, 용량의존성도 관찰되지 않았다 (Table 32). 따라서 시험물질 KNF2016 원제는 CHL 세포의 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판명되었다.

Table 32. Result of Chromosome aberration test and relative cell count

| Nominal conc. of Test item (μ g/mL) | S9 mix | Time ^{b)} (hours) | Mean Aberrant Metaphases | Mean Total Aberrations | Mean of PP + ER | Relative Cell Counts (%) |
|--|--------|----------------------------|----------------------------|------------------------|-----------------|--------------------------|
| 6 h treatment (+S9) | | | | | | |
| 0 | + | 6-18 | 0.5/0.5 ^{c)} | 0.5/0.5 | 1.5 + 0.0 | 100 |
| 625 | + | 6-18 | | Not Counted | | 97 |
| 1250 | + | 6-18 | 0.0/0.0 | 0.0/0.0 | 1.0 + 0.0 | 93 |
| 2500 | + | 6-18 | 0.5/0.5 | 0.5/0.5 | 1.5 + 0.0 | 90 |
| 5000 | + | 6-18 | 0.0/0.0 | 0.0/0.0 | 0.5 + 0.0 | 89 |
| CPA 6 | + | 6-18 | 15.5/15.5 ^{** d)} | 21.5/21.5 | 0.0 + 0.0 | 83 |
| 6 h treatment (-S9) | | | | | | |
| 0 | - | 6-18 | 0.5/0.0 | 0.5/0.0 | 0.0 + 0.0 | 100 |
| 625 | - | 6-18 | | Not Counted | | 104 |
| 1250 | - | 6-18 | 0.0/0.0 | 0.0/0.0 | 0.0 + 0.0 | 106 |
| 2500 | - | 6-18 | 0.0/0.0 | 0.0/0.0 | 1.0 + 0.0 | 108 |
| 5000 § | - | 6-18 | 0.5/0.5 | 0.5/0.5 | 0.5 + 0.0 | 106 |
| EMS 800 | - | 6-18 | 20.0/20.0 ^{** d)} | 30.5/30.5 | 1.0 + 0.0 | 92 |
| 22 h treatment (-S9) | | | | | | |
| 0 | - | 22-2 | 0.0/0.0 | 0.0/0.0 | 0.5 + 0.0 | 100 |
| 625 | - | 22-2 | | Not Counted | | 99 |
| 1250 | - | 22-2 | 0.0/0.0 | 0.0/0.0 | 0.0 + 0.0 | 112 |
| 2500 | - | 22-2 | 0.0/0.0 | 0.0/0.0 | 2.5 + 0.0 | 102 |
| 5000 § | - | 22-2 | 0.0/0.0 | 0.0/0.0 | 0.5 + 0.0 | 96 |
| EMS 600 | - | 22-2 | 32.5/32.5 ^{** d)} | 47.0/47.0 | 1.0 + 0.0 | 92 |

- Continued -

§ Visible turbidity was observed at the beginning and at the end of the treatment.

** Significantly different from the control at $P < 0.01$.

Test item: *Pseudomonas oleovorans* extract

Vehicle control: Water, sterile-filtered, cell culture tested (DW)

^{a)} See Appendix 1, 2, 3 & 4 for individual data

^{b)} Treatment time-recovery time

^{c)} Gaps included/excluded, means of duplicate cultures; 100 metaphases were examined per culture.

^{d)} The vehicle and positive control groups: Fisher's exact test

Abbreviation:

PP, Polyploid; ER, Endoreduplication;

CPA, Cyclophosphamide monohydrate; EMS, Ethyl methanesulfonate

(9) 반복투여독성시험(rat)

KNF2016 원제의 90-day Dose Range Finding Toxicity Study 및 만성독성시험 투여약량 설정을 위하여 SD계 랫드에 대하여 28일 반복투여 독성시험을 수행한 결과 NOEAL(No Observed Adverse Effect Level : 무영향약량) 1000mg/kg/day로 산출되었고, 90일 반복투여 독성시험에서도 NOEAL(No Observed Adverse Effect Level : 무영향 약량) 1,000mg/kg/day로 산출되었다.

SD 랫드를 사용하여 시험물질의 투여량을 100, 300, 1,000mg/kg B.W.로 설정하여 암·수 각각에 대해 28일, 90일 반복투여 한 후 치사 수, 일반증상, 체중변화 및 부검 소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

(가) 시험기간 중 시험물질 투여에 의한 치사 개체는 관찰되지 않았다.

(나) 일반증상 관찰시 시험물질 투여와 관련된 이상소견은 관찰되지 않았다.

(다) 체중측정 결과 대조군과 투여군에서 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다.

(라) 부검소견 결과 대조군과 투여군에서 특이할만한 이상소견은 관찰되지 않았다.

(마) 사료섭취량 결과 대조군과 투여군에서 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다.

(바) 장기 무게 측정결과 대조군과 투여군에서 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다.

(사) 혈액학적 분석결과 대조군과 투여군에서 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다.

이상의 결과로부터 KNF2016 원제의 투여량을 100, 300, 1,000mg/kg B.W로 설정하여 투여한 결과 치사 및 이상소견 관찰 개체는 없었으며 체중증감 및 부검소견 결과에서도 특이할 만한 이상소견이 관찰되지 않아 KNF2016 원제에 대한 NOEAL값은 1,000mg/kg/day로 판명되었다(Fig. 57, 58, Table 33, 34)

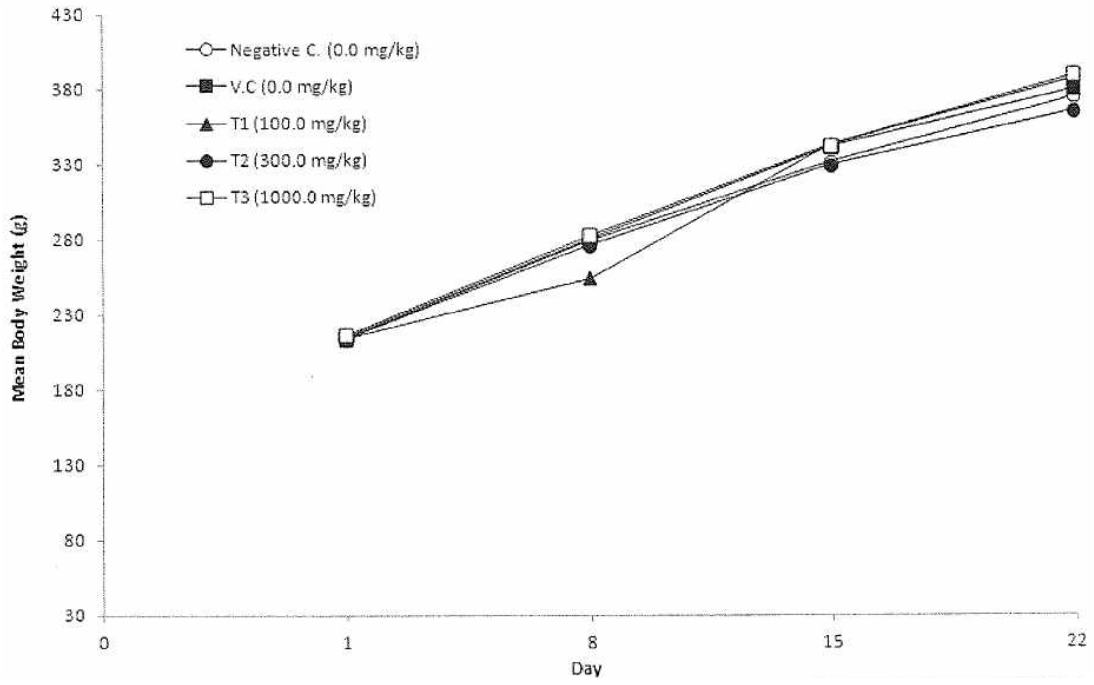


Fig. 57. Mean body weight of male

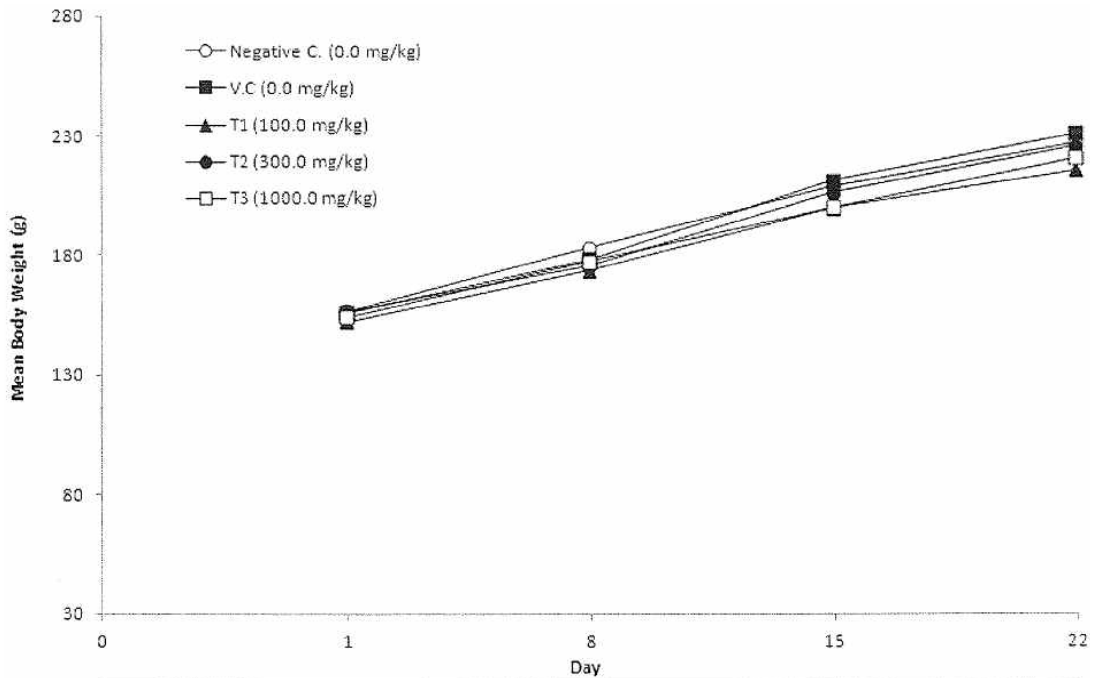


Fig. 58. Mean body weight of female

Table 33. Change in normalized organ weight¹ under treatments of KNF2016 for 4-week subchronic oral test in male rats

| STUDY : G11091 | | SEX : MALE | | | | |
|-----------------|-------------|------------|--------|--------|--------|--|
| GROUP: | Negative C. | V.C | T1 | T2 | T3 | |
| DOSE : (mg/kg) | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 300.0 | 1000.0 | |
| BRAIN | | | | | | |
| MEAN (g) | 1.979 | 2.063 | 2.100 | 1.947 | 1.978 | |
| SD | 0.0718 | 0.0599 | 0.0841 | 0.0430 | 0.1316 | |
| N | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | |
| PITUITARY GLAND | | | | | | |
| MEAN (g) | 0.013 | 0.012 | 0.013 | 0.011 | 0.013 | |
| SD | 0.0009 | 0.0015 | 0.0039 | 0.0012 | 0.0024 | |
| N | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | |
| LIVER | | | | | | |
| MEAN (g) | 11.501 | 12.427 | 12.507 | 11.709 | 12.920 | |
| SD | 1.2337 | 0.7688 | 0.6149 | 0.8032 | 0.9205 | |
| N | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | |
| SPLEEN | | | | | | |
| MEAN (g) | 0.694 | 0.712 | 0.760 | 0.787 | 0.804 | |
| SD | 0.0490 | 0.0853 | 0.0830 | 0.1706 | 0.1120 | |
| N | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | |
| HEART | | | | | | |
| MEAN (g) | 1.304 | 1.337 | 1.253 | 1.281 | 1.272 | |
| SD | 0.1249 | 0.0336 | 0.0659 | 0.1309 | 0.0692 | |
| N | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | |
| THYMUS | | | | | | |
| MEAN (g) | 0.605 | 0.569 | 0.658 | 0.573 | 0.577 | |
| SD | 0.0831 | 0.0708 | 0.1044 | 0.0738 | 0.0876 | |
| N | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | |
| SALIVARY GLANDS | | | | | | |
| MEAN (g) | 0.680 | 0.687 | 0.668 | 0.661 | 0.718 | |
| SD | 0.0887 | 0.0873 | 0.0696 | 0.0885 | 0.0928 | |
| N | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | |
| SEMINAL VESICLE | | | | | | |
| MEAN (g) | 1.449 | 1.336 | 1.120 | 1.294 | 1.273 | |
| SD | 0.1981 | 0.2423 | 0.1348 | 0.2658 | 0.2984 | |
| N | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | |
| PROSTATE | | | | | | |
| MEAN (g) | 0.481 | 0.525 | 0.375 | 0.491 | 0.457 | |
| SD | 0.1276 | 0.1153 | 0.0930 | 0.1087 | 0.0861 | |
| N | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | |

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

- Continued -

| STUDY : G11091 | | SEX : MALE | | | | |
|------------------|-------------|------------|--------|--------|--------|--|
| GROUP: | Negative C. | V.C | T1 | T2 | T3 | |
| DOSE : (mg/kg) | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 300.0 | 1000.0 | |
| KIDNEYS | | | | | | |
| MEAN (g) | 3.212 | 3.293 | 3.182 | 3.065 | 3.360 | |
| SD | 0.1905 | 0.1572 | 0.1066 | 0.2524 | 0.3605 | |
| N | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | |
| ADRENAL GLANDS | | | | | | |
| MEAN (g) | 0.069 | 0.064 | 0.064 | 0.060 | 0.063 | |
| SD | 0.0094 | 0.0096 | 0.0061 | 0.0059 | 0.0145 | |
| N | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | |
| TESTES | | | | | | |
| MEAN (g) | 3.179 | 3.297 | 3.292 | 3.262 | 3.173 | |
| SD | 0.2984 | 0.1684 | 0.2465 | 0.3206 | 0.3340 | |
| N | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | |
| EPIDIDYMIDES | | | | | | |
| MEAN (g) | 1.017 | 1.021 | 1.081 | 1.036 | 1.050 | |
| SD | 0.0617 | 0.0591 | 0.0529 | 0.0358 | 0.0907 | |
| N | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | |
| LUNG | | | | | | |
| MEAN (g) | 1.439 | 1.471 | 1.484 | 1.370 | 1.483 | |
| SD | 0.0843 | 0.1077 | 0.0309 | 0.0718 | 0.1224 | |
| N | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | |
| THYROID/PARATHY. | | | | | | |
| MEAN (g) | 0.021 | 0.021 | 0.021 | 0.021 | 0.021 | |
| SD | 0.0030 | 0.0040 | 0.0029 | 0.0060 | 0.0028 | |
| N | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | |

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

Table 34. Change in normalized organ weight¹ under treatments of KNF2016 for 4-week subchronic oral test in female rats

| STUDY : G11091 | | SEX : FEMALE | | | | |
|------------------------|-------------|--------------|--------|--------|--------|--|
| GROUP: | Negative C. | V.C | T1 | T2 | T3 | |
| DOSE : (mg/kg) | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 300.0 | 1000.0 | |
| BRAIN | | | | | | |
| MEAN (g) | 1.867 | 1.882 | 1.843 | 1.862 | 1.831 | |
| SD | 0.0929 | 0.0916 | 0.0389 | 0.0416 | 0.0581 | |
| N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | |
| PITUITARY GLAND | | | | | | |
| MEAN (g) | 0.012 | 0.013 | 0.014 | 0.015 | 0.013 | |
| SD | 0.0015 | 0.0011 | 0.0026 | 0.0027 | 0.0021 | |
| N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | |
| LIVER | | | | | | |
| MEAN (g) | 6.935 | 7.622 | 6.623 | 7.017 | 7.122 | |
| SD | 0.8419 | 0.4031 | 0.9242 | 0.1976 | 0.5810 | |
| N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | |
| SPLEEN | | | | | | |
| MEAN (g) | 0.527 | 0.501 | 0.480 | 0.484 | 0.484 | |
| SD | 0.0682 | 0.0452 | 0.0419 | 0.0437 | 0.0399 | |
| N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | |
| HEART | | | | | | |
| MEAN (g) | 0.839 | 0.934 | 0.768 | 0.898 | 0.830 | |
| SD | 0.0695 | 0.0531 | 0.0880 | 0.0694 | 0.0458 | |
| N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | |
| THYMUS | | | | | | |
| MEAN (g) | 0.486 | 0.507 | 0.494 | 0.501 | 0.432 | |
| SD | 0.1047 | 0.0966 | 0.1157 | 0.0747 | 0.0493 | |
| N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | |
| SALIVARY GLANDS | | | | | | |
| MEAN (g) | 0.439 | 0.445 | 0.441 | 0.432 | 0.439 | |
| SD | 0.0355 | 0.0520 | 0.0694 | 0.0438 | 0.0393 | |
| N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | |
| KIDNEYS | | | | | | |
| MEAN (g) | 1.935 | 2.008 | 1.935 | 1.956 | 1.939 | |
| SD | 0.2258 | 0.1475 | 0.2193 | 0.1224 | 0.0410 | |
| N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | |
| ADRENAL GLANDS | | | | | | |
| MEAN (g) | 0.069 | 0.070 | 0.075 | 0.077 | 0.070 | |
| SD | 0.0059 | 0.0052 | 0.0109 | 0.0109 | 0.0099 | |
| N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | |

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed
b Bart;NSg-05/Anova;Sig-05/Dunnett's

- Continued -

| STUDY : G11091 | | SEX : FEMALE | | | | |
|------------------|-------------|--------------|--------|--------|--------|--|
| GROUP: : | Negative C. | V.C | T1 | T2 | T3 | |
| DOSE : (mg/kg) | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 300.0 | 1000.0 | |
| OVARIES | | | | | | |
| MEAN (g) | 0.093 | 0.102 | 0.090 | 0.104 | 0.093 | |
| SD | 0.0115 | 0.0169 | 0.0036 | 0.0068 | 0.0101 | |
| N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | |
| LUNG | | | | | | |
| MEAN (g) | 1.111 | 1.147 | 1.183 | 1.226 | 1.188 | |
| SD | 0.0941 | 0.0742 | 0.2439 | 0.2392 | 0.2004 | |
| N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | |
| THYROID/PARATHY. | | | | | | |
| MEAN (g) | 0.017 | 0.017 | 0.017 | 0.016 | 0.017 | |
| SD | 0.0016 | 0.0022 | 0.0032 | 0.0036 | 0.0024 | |
| N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | |
| UTERUS/CERVIX | | | | | | |
| MEAN (g) | 0.752 | 0.652 | 0.638 | 0.569 | 0.533 | |
| SD | 0.1844 | 0.2395 | 0.2594 | 0.2163 | 0.1335 | |
| N | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | |

a Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

(10) 물벼룩(*Daphnia magna*)에 대한 급성유영저해시험

KNF2016 원제의 물벼룩(*Daphnia magna*)에 대한 급성유영저해 시험을 OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 202, “*Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test”에 따라 48시간 동안 지수식으로 실시하여 일반증상 및 치사율을 관찰, 조사하였다. 시험의 결과는 아래와 같으며, 측정 농도에 의해 표기하였다(Table 35).

Table 35. Results of skin sensitization

| Observation time | EC ₅₀ (mg/L) ¹ | 95% C.I(mg/L) | NOEC(mg/L) ² |
|------------------|--------------------------------------|-----------------|-------------------------|
| 24hours | > 100 | NA ³ | ≥ 100 |
| 48hours | > 100 | NA | ≥ 100 |

¹ nominal test concentration

² No observed effect concentration

³ NA : Not available

(11) 녹조류(*Pseudokirchneriella subcapitata*)에 대한 성장저해시험

KNF2016 원제의 녹조류(*Pseudokirchneriella subcapitata*)에 대한 성장저해 시험을 OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, No. 201 “Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test”를 이용하여 72시간 동안 실시하여 성장저해율을 관찰 조사한 결과는 아래와 같으며, nominal concentration(unit : mg/L)에 의해 표기하였다(Table 36).

Table 36. Results of skin sensitization

| Estimates of toxicity | Calculation method | |
|--|-----------------------------|---------------|
| | Average growth rate | Yield |
| 72hr EC ₁₀ (95% confidence limits, mg/L) | > 100 (NA ¹) | > 100 (NA) |
| 72hr EC ₂₀ (95% confidence limits, mg/L) | > 100 (NA) | > 100 (NA) |
| 72hr EC ₅₀ (95% confidence limits, mg/L) | > 100 (NA) | > 100 (NA) |
| NOEC(mg/L) | ≥ 100 | ≥ 100 |

¹ NA : Not available

(12) 잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 급성어독성시험

KNF2016 원제의 잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 급성어독성시험을 OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2, No. 203, “Fish, Acute Toxicity Tests”에 따라 96시간 동안 지수식으로 실시하여 일반증상 및 치사율을 관찰 조사하였다. 시험 농도는 100mg/L(nominal concentration)로 하여 본시험을 실시한 결과는 아래와 같으며, 측정 농도에 의해 표기하였다(Table 37).

Table 37. Results of skin sensitization

| Exposure time | 24hours | 48hours | 72hours | 96hours |
|-------------------------------|-----------------|---------|---------|---------|
| LC ₅₀ (mg/L) | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 |
| (95% confidence limits, mg/L) | NA ¹ | NA | NA | NA |
| NOEC(mg/L) | ≥ 100 | ≥ 100 | ≥ 100 | ≥ 100 |

¹ NA : Not available

(13) 꿀벌(*Apis mellifera*)에 대한 급성섭식독성시험

KNF2016 원제의 꿀벌(*Apis mellifera*)에 대한 급성섭식독성을 평가하고자 농약관리법 농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제 2010-29호, 2010년 10월 13일)을 이용하여 48시간 동안 실시하여 일반증상 및 치사율을 관찰, 조사하였다. 시험농도는 100 μ g a.i./bee(nominal concentration)로 하여 본시험을 실시한 결과 시험물질 노출 후 24시간과 48시간의 반수치사량(LD50)이 > 100 μ g a.i./bee로 조사되었으며, NOEAL는 \geq 100 μ g a.i./bee로 판명되었다.

(14) 꿀벌(*Apis mellifera*)에 대한 급성접촉독성시험

KNF2016 원제의 꿀벌(*Apis mellifera*)에 대한 급성접촉독성을 평가하고자 농약관리법 농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제 2010-29호, 2010년 10월 13일)을 이용하여 48시간 동안 실시하여 일반증상 및 치사율을 관찰, 조사하였다. 시험농도는 100 μ g a.i./bee(nominal concentration)로 하여 본시험을 실시한 결과 시험물질 노출 후 24시간과 48시간의 반수치사량(LD50)이 > 100 μ g a.i./bee로 판명되었다.

나. KNF2016 70% AS (제품)에 대한 안전성평가

(1) ICR계 마우스에 대한 급성경구독성시험

KNF2016 70% AS (제품)에 대한 급성경구독성시험을 농약관리법 농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제 2010-29호, 2010년 10월 13일)에 따라 ICR계 마우스를 사용하여 시험물질의 투여량을 5,000mg/kg B.W.로 설정하여 암·수 각각에 대해 1회 경구투여한 후 치사 수, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- (가) 시험기간 중 시험물질 투여에 의한 치사 개체는 관찰되지 않았다.
- (나) 일반증상 관찰시 시험물질 투여와 관련된 이상소견은 관찰되지 않았다.
- (다) 체중측정 결과 대조군과 투여군에서 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다.
- (라) 부검소견 결과 대조군과 투여군에서 특이할 만한 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 KNF2016 70% AS (제품)의 투여량을 5,000mg/kg B.W로 설정하여 투여한 결과 전 투여군에서 치사 개체는 관찰되지 않았고, 투여에 의한 이상증상 관찰 개체도 없었으며, 체중증감 및 부검소견 결과에서도 특이할 만한 이상소견이 관찰되지 않아 KNF2016 70% AS (제품)에 대한 반수치사량(LD50)은 5,000mg/kg B.W. 이상으로 판명되었다.

(2) SD계 랫드에 대한 급성경피독성시험

KNF2016 70% AS (제품)에 대한 급성경피독성시험을 농약관리법 농약의 등록기준 (농촌진흥청 고시 제 2010-29호, 2010년 10월 13일)에 따라 SD계 랫드를 사용하여 시험물질의 투여량을 4,000mg/kg B.W로 설정하여 암·수 각각에 대해 1회 경피 투여한 후 2주간 치사 수, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- (가) 시험기간 중 시험물질 투여에 의한 치사 개체는 관찰되지 않았다.
- (나) 일반증상 관찰시 시험물질 투여와 관련된 이상소견은 관찰되지 않았다.
- (다) 체중측정 결과 대조군과 투여군에서 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다.
- (라) 부검소견 결과 대조군과 투여군에서 특이할 만한 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 KNF2016 70% AS (제품)의 투여량을 4,000mg/kg B.W로 설정하여 투여한 결과 치사 개체 및 이상소견 관찰 개체는 없었으며 체중증감 및 부검소견 결과에서도 특이할 만한 이상소견이 관찰되지 않아 KNF2016 70% AS (제품)에 대한 반수치사량(LD50)은 4,000mg/kg B.W. 이상으로 판명되었다.

(3) New Zealand White계 토끼에 대한 피부자극성시험

KNF2016 70% AS (제품)에 대한 피부자극성시험을 농약관리법 농약의 등록기준 (농촌진흥청 고시 제 2010-29호, 2010년 10월 13일)에 따라 New Zealand White계 토끼를 사용하여 시험물질의 투여량을 0.5ml로 설정하여 수컷 6마리 각각에 대해 1

회 피부 노출 한 후 72시간동안 치사 수, 일반증상 및 체중변화를 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

(가) 시험기간 중 시험물질 투여에 의한 치사 개체는 관찰되지 않았다.

(나) 일반증상 관찰시 모든 투여동물에서 투여와 관련된 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았다.

(다) 체중측정 결과 대조군과 투여군에서 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다.

KNF2016 70% AS (제품)의 토끼에 대한 피부자극 정도를 평가하고자 New Zealand White계 토끼에 KNF2016 70% AS 0.5ml을 노출하여 노출 후 4시간, 24시간, 48시간, 72시간동안 피부자극지수를 관찰한 결과 mild irritative material로 판명되었다.

(4) New Zealand White계 토끼에 대한 안점막자극성시험

KNF2016 70% AS (제품)에 대한 안점막자극성시험을 농약관리법 농약의 등록기준 (농촌진흥청 고시 제 2010-29호, 2010년 10월 13일)에 따라 New Zealand White계 토끼를 사용하여 시험물질의 투여량을 0.1ml로 설정하여 수컷 6마리 각각에 대해 1회 안구 노출 한 후 72시간 동안 치사 수, 일반증상 및 체중변화를 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

(가) 시험기간 중 시험물질 투여에 의한 치사 개체는 관찰되지 않았다.

(나) 일반증상 관찰시 모든 투여동물에서 투여와 관련된 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았다.

(다) 체중측정 결과 대조군과 투여군에서 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다.

KNF2016 70% AS (제품)의 토끼에 대한 안점막자극 정도를 평가하고자 New Zealand White계 토끼에 KNF2016 70% AS 0.1ml을 노출하여 노출 후 4시간, 24시간, 48시간, 72시간 동안 안점막자극지수를 관찰한 결과 mild irritative material로 판명되었다.

(5) 기니 퓌에 대한 피부감작성시험

KNF2016 70% AS (제품)의 기니 퓌에 대한 피부감작성 정도를 평가하고자 농약관리법 농약의 등록기준(농촌진흥청 고시 제 2010-29호, 2010년 10월 13일)을 이용하여 Hartley계 guinea pig에 피부감작성 시험법 중 Non adjuvant method인 Buehler test를 실시한 결과 시험에 이용한 Hartley계 guinea pig 전 개체에서 감각이 관찰되지 않았다. 따라서 KNF2016 70% AS (제품)은 감각유발물질이 아닌 것으로 판명되었다.

(6) 잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 급성어독성시험

KNF2016 70% AS (제품)의 잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 급성어독성 시험을 OECD Guide lines for Testing of Chemicals, Section 2, No. 203, "Fish, Acute Toxicity Tests"에 따라 96시간 동안 지수식으로 실시하여 일반증상 및 치사율을 관찰 조사하였다. 시험농도는 10mg/L(nominal concentration)로 하여 본시험을 실시한 결과 시험물질 노출 후 48시간과 96시간의 반수영향농도(LC50)이 > 10mg/L로 조사되었으며, NOEC는 \geq 10mg/L로 판명되었다.

(7) 물벼룩(*Daphnia magna*)에 대한 급성유영저해시험

KNF2016 70% AS (제품) 물벼룩(*Daphnia magna*)에 대한 급성유영저해 시험을 OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 202, "Daphniasp., AcuteImmobilisation Test"에 따라 48시간 동안 지수식으로 실시하여 일반증상 및 치사율을 관찰 조사한 결과 시험물질 노출 후 24시간의 반수영향농도(EC50)는 32.0mg/L로 조사되었으며, 48시간의 반수영향농도(EC50)는 13.6mg/L로 판명되었다.

이상의 KNF2016에 대한 인축독성시험분야와 환경생태독성시험 분야 안전성 평가 결과 KNF2016 원제의 위해성은 안전한 것으로 판단되며, KNF2016 원제를 이용한 식물바이러스 방제용 KNF2016 70% AS (제품)의 제품독성 또한 안전한 것으로 판단된다.

식물 바이러스 병해 시장은 방제약제가 전무하였던 까닭에 시장 규모에 대한 보고가 전혀 이루어진 바 없으나, 최근 지구 온난화 현상에 따른 외래 병해충유입과 소비자 기호에 맞는 고품질 감수성 품종의 대면적 재배가 이루지고 있어, 식물 바이러스에 의한 병해 발생 빈도 및 피해가 급증하고 있는 실정과 국내에서는 1997년 수박 CGMMV에 의해 463ha, 500여억 원의 경제적 피해가 발생, 고추에서는 CMV 등에

의해 매년 300여억 원의 피해 발생, 수도권에서는 벼 RSV가 2004년 충청, 경기지방에 4,663ha, 2007년 서해안 지역에서 4,457ha, 200여억 원의 경제적 피해가 발생하는 등 전국적으로 식물 바이러스로 인한 경제적 피해가 크게 확산되고 있는 실정이다. 이러한 식물 바이러스 병해 방제를 위하여 개발된 KNF2016 원제의 안전성과 KNF2016 원제를 이용한 제품의 안전성으로 볼 때 식물바이러스 방제를 위한 제품 개발이 가능하리라 판단된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표 달성도

연차별 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 목표 달성도를 아래와 같이 나타냈다. 연차별 연구개발 목표들은 대체적으로 연구 계획서의 진도와 일치하게 달성되었으며, 연구의 최종 목표 달성도 역시 계획서의 최종 목표를 충분히 달성하였다고 판단된다.

1. 제1차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

| 연구개발목표 | 평 가 | | 목 표 달성도 (%) | 참조부문 (제 3 장) |
|----------------------------|--|-----------|-------------|--|
| | 평가의 착안점 | 평가의 척도(%) | | |
| 1. 바이러스병 방제용 작물보호제의 산업화 | 1) 포장 및 안전성시험용 원제생산 2) 산업용 배지 선발 및 배양 최적화 (500L) 3) KNF2016 원제의 특성연구 4) 꿀벌에 대한 영향평가 5) 원예용 살충제와 혼용성 평가 | 40 | 100 | 1. 다. (1) 1. 가. 1. 나. (1) 1. 라. (1) 1. 마. (1) (가) |
| 2. 활성물질의 대량순화 및 작용기전 분석 | 1) 대량순화과정의 산업화 2) 활성유전자의 탐색 3) 곤충매개바이러스의 특성 및 농가 적용법 연구 4) 활성물질의 바이러스 복제 및 이동 억제 분석 | 30 | 100 | 2. 가. 2. 다. (1) 2. 마 특허미출원 비공개 |
| 3. 천연식물보호제 원제 및 제품의 안전성 평가 | 1) 원제의 인축독성시험 2) 원제의 환경독성시험 | 30 | 100 | 3. 가. 3. 가. |

2. 제2차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

| 연구개발목표 | 평 가 | | 목 표 달성도 (%) | 참조부문 (제 3 장) |
|----------------------------------|---|-----------|-------------|---|
| | 평가의 착안점 | 평가의 척도(%) | | |
| 1. 바이러스병 방제용 작물보호제의 산업화 | 1) 배양최적화 (5000L) 2) 후처리 공정 개발 및 최적화 3) 제제화 연구 4) 등록시험 1년차 진입 5) 서양뒤영벌에 대한 영향평가 6) 원예용 살균제와 혼용성평가 | 40 | 100 | 1. 가. 1. 나. (2) 1. 나. (3) 1. 사. (1) 1. 라. (2) 1. 마. (1) (나) |
| 2. 활성물질의 대량순화 및 작용기전 분석 | 1) Q. C 검정법 확립 2) 돌연변이체 스크리닝을 통한 관련유전자 동정 3) 약제처리에 따른 매개충 분자생태 및 바이러스 발병 조사 평가 | 30 | 100 | 2. 라. 2. 다. (2) 2. 마. (1) |
| 3. 천연식물보호제 원제 및 제품의 안전성 평가 | 1) 원제의 인축독성시험 2) 원제의 환경독성시험 | 30 | 100 | 3. 가. 3. 가. |

3. 제3차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

| 연구개발목표 | 평 가 | | 목 표 달성도 (%) | 참조부문 (제 3 장) |
|----------------------------|--|-----------|-------------|--|
| | 평가의 착안점 | 평가의 척도(%) | | |
| 1. 바이러스병 방제용 작물보호제의 산업화 | 1) 시제품 생산 및 안정성 분석 2) 등록시험 (2년차) 3) 제제화 연구 4) 천적에 대한 영향평가 5) 수도용 약제에 의한 영향평가 | 40 | 100 | 1. 다. (2) 1. 사. (2) 1. 나. (3) 1. 라. (3) 1. 마. (2) |
| 2. 활성물질의 대량순화 및 작용기전 분석 | 1) 제품화 process과정의 최적화 2) 관련 유전자의 클로닝과 이형 발현체 제작 3) 매개충의 분자생태 조사 평가 4) 바이러스 발병조사 평가 5) 활성물질 기주방어기전 분석 6) 반복 mutation을 통한 산업화 균주 확보 7) 대량배양 조건설정 | 30 | 90 | 1. 나. (2) 2. 다. (1) 2. 마. (2) 2. 마. (1) 2. 마. (2) 2. 다. (2) 1. 가 |
| 3. 천연식물보호제 원제 및 제품의 안전성 평가 | 1) 품목의 인축독성시험 2) 품목의 환경독성시험 | 30 | 100 | 3. 나. 3. 나. |

4. 최종 평가의 착안점 및 목표 달성도

| 평 가 | | 목 표 달성도 (%) | 참조부문 (제 3 장) |
|----------------------------|-----------|-------------|--------------|
| 평가의 착안점 | 평가의 적도(%) | | |
| 1. 바이러스병 방제용 작물보호제의 산업화 | 40 | 100 | 1 |
| 2. 활성물질의 대량순화 및 작용기전 분석 | 30 | 90 | 2 |
| 3. 천연식물보호제 원제 및 제품의 안전성 평가 | 30 | 100 | 3 |

제 2 절 관련 분야에의 기여도

유기합성 농약의 개발과 함께 농산물 생산에 걸림돌이 되었던 각종 병, 해충은 어느 정도 사람의 힘으로 조절이 가능하게 되었다. 이로 인해 농산물 생산량은 폭발적으로 늘어났고, 먹거리 문제를 해결한 인류는 또 다른 발전을 위해 다양한 분야에 많은 투자를 할 수 있게 되어, 현재의 고도로 발달한 문명사회를 건설할 수 있었다. 또 앞으로도 다양한 분야에서 문명의 진화를 더욱더 가속화 시킬 수 있는 근원적 힘을 얻은 것이라고도 할 수 있을 정도로 유기합성농약의 개발의 인류사적으로도 가장 큰 이벤트라 할 수 있다.

대부분의 병해충이 유기합성농약으로 방제가 가능하지만 식물바이러스는 이러한 것들로 방제가 되지 않는, 아직까지도 방제할 수 있는 수단이 거의 없는 미지의 영역으로 알려져 있다. 식물바이러스의 발병이 점차 늘어나고 이로 인한 사회적 이슈가 크게 되고 있는 것은 몇 가지 커다란 이유가 있다. 먼저 기후변화에 따른 작목의 전환을 들 수 있다. 기온이 올라감에 따라 전에는 재배가 안 되던 작목이나 국내에 없었던 작물의 유입이 이루어지고 이에 따른 신규 병해충도 함께 유입되고 있다. 이때 식물바이러스의 50% 이상을 매개하는 해충들이 바이러스를 보독한 채 유입되고 이로 인해 수년 내 급속히 전파되어 농가에 심각한 타격을 주고 있다. 이러한 현상은 기후변화에만 국한되는 것이 아니라 가계 수입이 늘어난 시민들의 해외여행 선호도 증가, 외국산 농산물 교역량 증가도 한몫을 하고 있다. 또한 우리 내 농가의 작목 재배 양상도 큰 역할을 하고 있다. 대부분 작목반 위주로 농산물을 생산함에 따라 고품질 단일품종의 대규모 재배가 이루어지고 있다 보니 신규 병해충에 취약할 수밖에 없다. 그리고 최근 친환경농산물에 대한 정책적 지원에 따라 화학농약의 규

제가 이루어지고 있어 매개충의 적기 방제시기를 놓칠 수 있는 요인도 있다. 그리고 그간 누적된 화학약제 살포에 따른 혹은 주변 국가들의 화학농약 살포 경향에 따른 계통별 약제 저항성 해충들이 유입 혹은 정착되고 있어 이러한 문제들이 복합적으로 얽혀져 식물바이러스병의 대규모 발생은 현재도 진행 중에 있고, 앞으로도 더욱더 이루어질 수밖에 없다.

이렇듯 유기합성농약으로도 방제가 되지 않는 식물바이러스라는 미지의 영역을 해결하기 위해 많은 학자들이 식물 추출물, 항생제 등 많은 물질들을 이용하여 방제하려고 많은 노력을 기울였지만, 센트럴 도그마를 이용하여 증식하는 바이러스의 특성 상 대상 작물 혹은 대상 가축 등에 많은 약해를 일으키거나 약효가 있더라도 채산성이 낮은 등 아직까지 전문적으로 산업화된 사례는 거의 없는 실정이다.

본 과제에서는 *Pseudomonas oleovorans* KCTC10159BP 라는 항바이러스 활성을 가진 미생물이 생산해 내는 항바이러스 활성물질의 산업화를 통해 경제성 있는 항바이러스 활성의 작물 보호제를 개발하고자 당면해 있는 다양한 문제들을 해결하였다. 먼저 활성물질의 대량생산을 위한 산업화 배지 선별 및 Pilot scale 발효조 배양최적화를 이루었으며, 경제성 있는 제품 생산을 위한 후처리 공정 개발, 또 이를 활용한 액상제형의 제품을 개발하였다. 액상제형은 기존에 개발된 수화제형 대비 생산비용이 대폭 절감되는 성과를 이루었다. 이렇게 생산된 원제와 이를 제제화한 제품을 이용한 인축독성 시험, 환경독성 시험에서 대부분의 항목에서 위해성이 나타나지 않는 것으로 판명되었다. 바이러스 방제제의 개발사에 등장했다 사라진 많은 물질들이 위해성 부분의 문제를 해결하지 못했다는 점에서 매우 큰 성과라고 할 수 있다. 또한 활성물질의 분리 정제를 통해 특정 protein 관련 물질임이 확인되었으며, 관련 유전자 knock-out, 또는 random mutant 검정을 통해 활성 유전자 부위를 어느 정도 찾는 데 성공하였다. 활성물질을 만들어 내는 유전자가 단일 유전자가 아님에 따라 추가적인 연구 개발이 필요할 것으로 판단된다. 벼줄무늬잎마름병을 대상으로 바이러스 발병특성을 분석하고 이를 활용하여 약효평가시스템을 개발한 것은 평가기준이 없는 바이러스병 분야에 약제를 개발하고 이를 평가할 수 있는 시스템을 확립하고 또 적용하였다는 점에서 큰 성과를 얻었다고 할 수 있다. 그리고 본 과제를 통해 얻어진 많은 시험데이터를 바탕으로 현재 원제 등록 자료로써 활용하여 원제 등록에 진입하고 있고, 동시에 농약등록 시험 분야에 없었던 식물바이러스 시험을 유관기관과 협의하여 항목을 신설하고 평가할 수 있는 검정법을 등록하여 1, 2년차 포장 활성 검정과 실내시험을 수행하였다.

1. 기술적 측면에서의 기여도

본 연구 과제를 통해 개발된 식물바이러스 방제제 KNF2016 70% AS (제품)은 기존에 개발되어진 수화제에 비해 제조 공정상 가장 많은 비용과 노동력이 소요되는 후처리 공정

4단계를 제거함으로써 경제성과 노동력 절감을 이루었다. 또한 항바이러스 활성 물질 탐색 연구를 통해 관련 유전자 군의 대략적인 위치까지 도출되었다. 현재까지 항바이러스 활성을 나타내는 물질 혹은 유전자에 대한 보고가 아직까지 이루어지지 않는 상황에서 큰 성과라 할 수 있다. 또한 식물바이러스 방제제의 산업화계 가장 큰 문제가 될 수 있는 위해성 평가 부분에서도 안정성이 확보되어 환경에 안전하고, 인축에도 무해한 제품의 개발이라는 측면에서 큰 성과를 이루었다.

2. 학문 발전에의 기여도

본 연구 과제를 통해 식물바이러스 방제제의 개발에 필요한 다양한 정보가 제공되었다. 특히 생물 검정 시스템의 개비는 편차가 심한 생물 검정법의 개선 및 조정을 통해 미세한 차이까지도 평가하여 각 단계별 물질 혹은 조건을 선별할 수 있게 되어 이후 식물바이러스 방제제와 같은 식물바이러스 분야 연구에도 활용이 가능하리라 판단된다. 또한 본 연구 과제에서 수행되었던 결과는 다음과 같이 학술지나 학술대회에 발표되었다.

가. 학술발표

- 1) In Cheon Hwang, Hyeong Min Kim, Nam Gyu Kim, Beom Seok Kim, Ki Hyun Ryu, Cheol Jang and Jang Kyung Choi. 2009. Development of Bio-Pesticide for Controlling Plant Virus Diseases, 한국식물병리학회 추계학술발표 초록집
- 2) Min ho LEE, Yu rim Jeong, Nam Gyu Kim, Cheol Nam Park, Jong Gwan Kim, In Cheon Hwang, Tae Yu Yun, Beom Seok Kim, Ki Hyun Ryu, and Mun Il Ryoo, 2009, Antiviral Activity of *Pseudomonas oleovorans* and *Acinetobacter antiviralis* sp. Nov. against Vector Transmission of Rice Stripe Virus. 한국식물병리학회 추계학술발표 초록집
- 3) In Cheon Hwang, 2010, Current states of Eco-friendly Biocontrol Agents and Application of new Bio-pesticide for Controlling Plant Virus, 식물바이러스병 연구회 추계학술발표 초록집
- 4) 황인천, 류기현, 이민호, 박진우, 김범석, 2011, 미생물 유래물질을 이용한 식물병 방제용 작물보호제의 산업화, 범부처 녹색기술 포럼
- 5) Min ho LEE, Nam Gyu Kim, Jong Gwan Kim, Cheol Jang, In Cheon Hwang, Beom Seok Kim, Ki Hyun Ryu, and Mun Il Ryoo, 2011, Pharmacokinetic Assessment of Antiviral Effect of the Biochemicals against Plant Virus, 응용곤충학회 춘계학술발표 초록집

- 6) Min ho LEE, Nam Gyu Kim, Jong Gwan Kim, Cheol Jang, In Cheon Hwang, Beom Seok Kim, Ki Hyun Ryu, and Mun Il Ryoo, 2011, Pharmacokinetic Assessment of Antiviral Effect of the Biochemicals against Plant Virus, IUMS 초록집

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

본 연구 과제의 결과를 바탕으로 *Pseudomonas oleovorans* KCTC10159BP (KNF2016) 추출물을 원제 등록과 함께 KNF2016 70% AS (제품)을 등록하고자 한다. 현재 등록시험 1, 2년차가 수행 완료되었으며, 원제 등록을 위한 원제 초록을 작성하고 있다. 위해성 평가 부분에서 국내 GLP 기관에서 수행 불가능한 항목인 조류(鳥類) 독성시험의 경우 외국 CRO 시험 기관을 통해 위탁 시험 수행을 추진 중에 있고, 원제 이화학 시험데이터도 같은 방법으로 국외 CRO 시험 기관을 통해 수행될 예정에 있다.

본 연구결과를 바탕으로 한국, 미국, 캐나다, 멕시코, 브라질, 일본, 중국, 인도네시아, 이집트, 유럽 10여 개국에 PCT/KR2009/007098 "식물 바이러스병 방제 효과를 갖는 슈도모나스 올레오보란스 균주" 출원하였고, 2012년 2월 현재 멕시코는 특허 허여가 완료된 상태이다.

이러한 연구결과를 통해 KNF2016을 국내에서 먼저 천연식물보호제용 원제로 등록시키고 이후 세계 시장으로의 진출을 도모하고자 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해외 특허

US patent no. 5,304,730

“Virus resistant plants and method therefore”

US patent no. 4,701,522

“Novel protein and plant-virus disease preventive agents”

US patent no. 6,649,813

“Induction of resistance to virus diseases by transformation of plants with a plant virus replicase gene”

US patent no. 4,105,784

“Plant viral disease inhibitor”

US patent no. 4,166,846

“Chemicals for controlling plant virus diseases and control method”

UK patent no. 2020553 A

“Control of virus diseases in plants”

US patent no. 42,294

“Method for controlling viral diseases in plants”

US patent no. 4,228,275

“Nitrogen containing polysaccharide and process for preparing same”

US patent no. 4,226,855

“Plant viral disease preventive alginate containing compositions”

US patent no. 4,269,857

“Control of plant-virus diseases”

US patent no. 4,243,662

“Plant-virus controlling agent”

EU patent no. 0 396 750 B1

“Plant virus controlling agent and process for its preparation”

EU patent no. EP 0 389 521 B1

“2',5'-Phosphorothioate oligoadenylates and antiviral uses thereof”

EU patent no. EP 0 744 896 B1

"Antiviral or antifungal compound and method"

US patent no. 6,770,303 B1

"Nobel use of antifungal and/or antibacterial and/or antiviral compounds"

EU patent no. EP 0 502 473 B1

"Microbicidal benzo-1,2,3-thiadiazole derivatives"

EU patent no. EP 1 016 661 A1

"2,6-Dichloro-4-pyridinemethanol derivatives as agricultural chemicals"

PCT WO 03/053170 A1

"Antimicrobial composition for and method of eradicating and/or controlling pathogens"

Patentschrift DE 11 2004 002 508 B4

"The new KTGB202 Bacillus amyloliquefaciens and procedures to control fungal plant pathogens using selfsame"

US patent no. 7,531,716 B2

"Materials and methods for producing tomato yellow leaf curl virus resistance in plants"

US patent no. US 2012/0027846 A1

"Anti-viral azide containing compounds"

US patent no. US 2012/0003197 A1

"Bacillus isolates and methods of their use to protect against plant pathogens and virus transmission"

일본 특허

JP11251015A

식물바이러스 방제제로서 유용한 칸디다파마타가 생산하는 다당류

JP2009550445A

신규 마이코우일스, 식물 병해 진균 약독균주, 식물 병해 방제제, 마이코우일스 생산 방법, 식물 병해 진균 약독화 방법, 및 식물 병해 방제 방법

JP2006531627A

신규 Paenibacillus 속균 및 그러한 버섯 혹은 그러한 버섯의 배양물성질을 이용한 식물 병해 방제

JP2008315559A

신규 슈우도모나스속 세균

JP2006145984A

항바이러스 및 항균제

JP2007225760A

유해생물방제제

JP2006036245A

식물 바이러스 병의 방제제 및 방제 방법

JP2006008783A

식물바이러스 병해의 방제제

JP2005246567A

바칠루스속 세균의 영양 세포를 유효 성분이라고 하는 식물 병해의 방제 방법 및 방제제

JP2006005738A

바칠루스속 세균을 이용한 식물 병해의 방제 방법 및 방제제

JP2003178489A

식물 바이러스를 방제하는 미생물 및 해당 미생물로 되는 식물 바이러스 방제제 및 해당 미생물을 이용한 식물 바이러스의 방제 방법

JP08326208A

식물바이러스 병해의 예방 또는 방제법

JP08029089A

유용 식물의 생육 방법 및 토양 전염성 바이러스 병해 방제용 토양 처리제

제 7 장 참고문헌

Berger, P. H. and Shiel, P. J. 1998. Potyvirus isolation and RNA extraction. In : Plant Virology Protocols. ed. by G. D. Foster and S. C. Taylor, pp. 151-160. Humana Press, Totowa, USA.

최장경, 정옥화. 1984. 비름과식물 즙액에 의한 담배 모자이크 바이러스의 감염억제효과. 한국식물보호학회지 23: 137-141.

Choi, J. K., Kim H. J., Hong, J. S., Kim, D. W. and Lee, S. Y. 1998. Identification and differentiation of cucumber mosaic virus isolates in Korea. Korean J. Plant Pathol. 14: 7-12.

Clark, M. F. and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475-483.

Gibbs, A. and Harrison, B. 1976. The effects of inactivators on virus particles. In: Plant Virology, The Principles. ed. A. Gibbs and B. Harrison, pp. 129-136, Edward Arnold, London.

Kalo, F. and Taniguchi, T. 1987. Properties of a virus inhibitor from spinach leaves and mode of action. Ann. Phytopath. Soc. Japan 53: 159-167.

Kim, M. S., Kim, Y. S., Jang, C., Hwang, I. C., Ryu, M. H. and Choi, J. K. 2005. Effect of individual and multiple infections with three viruses on disease progress and growth of pepper plants. Plant Pathol. J. 21: 427.

Kim, Y. S., Hwang, E. I., O, J. H., Kim, K. S., Ryu, M. H. and Yeo, W. H. 2004. Inhibitory effects of *Acinetobacter* sp. KTB3 on infection of Tobacco mosaic virus in tobacco plants. Plant Pathol. J. 20: 293-269.

Leberman, R. 1966. The isolation of plant viruses by means of "simple" coacervates. *Virology* 30:341-347.

Moghal, S. M. and Francki, R. I. B. 1976. Towards a system for the identification and classification of potyviruses. I. Serology and amino acid composition of six distinct viruses. *Virology* 73:350-362.

Mossop, D. W., Francki, R. I. B. and Grivell, C. J. 1976. Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses. V. Purification and properties of a cucumber mosaic virus inducing severe chlorosis. *Virology* 74: 544-546.

Takagi, Y. and Ogawa, K. 1978. Inhibitory effect of nonionic surface active agents on tobacco mosaic virus infection. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 44: 282-287.

Takagi, Y. and Shimada, K. 1977. Inhibitory effect of aqueous extracts from the saw dust-rice bran media grown mycelia of *Hymenomyces* on tobacco mosaic virus infection. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 43: 211-214.

Takanami, Y. 1981. A striking change in symptoms on cucumber mosaic virus-infected tobacco plants induced by a satellite RNA. *Virology* 109: 120-126.

여운형, 김영호, 박은경, 김상석. 1997. 방선균 B25균주가 생산하는 항생물질 ASA의 물리, 화학적 특성 및 항바이러스 활성. *한국식물병리학회지* 13: 63-68.

Yoon, J. Y. 2003. Molecular characterization of symptom attenuation of pepper mild mottle virus. Doctoral Thesis, Seoul Women's Univ., Seoul, 166 pp.

Schagger, H. and von Jagow, G., : *Anal. Biochem.*, 166:368-369, 1987

M. Levitt : *Biochemistry*, 17:4277-4285, 1978

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J., : Proc. Natl. Acad. Sci. USA.
76:4350-4354

Edman, P., : Acta Chem. Scand., 10:761-768, 1956

Scott, K. and Wu, L., : Biochim. Biophys. Acta, 1744:234-244, 2005

Zhang, X. X., Scott, K., Meffin, R. and Rainey, P. B., : BMC Microbiol., 7:114, 2007

Berna, A., Scott, K., Chabriere, E. and Bernier, F., : BioEssays 31:570-580, 2009

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.