

118048
-03

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

발간등록번호

11-1543000-003507-01

곡류 저장 안전성 향상을 위한 천연 유래 방충
유효 단일 성분 규명 및 대량 생산 방안 탐색

2021. 05. 11

주관연구기관 / (주)하이포스알앤씨
협동연구기관 / 고려대학교 산학협력단

곡류 저장 안전성 향상을 위한 천연 유래 방충
유효 단일 성분 규명 및 대량 생산 방안 탐색

2021

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “곡류 저장 안전성 향상을 위한 천연 유래 방충 유효 단일 성분 규명 및 대량 생산 방안 탐색”(개발기간: 2018. 4. ~ 2020. 12.)과제의 최종 보고서로 제출합니다.

주관연구기관명 : (주)하이포스알앤씨 나자현

협동연구기관명 : 고려대학교 산학협력단 조석주

참여기관명 : (주)하이포스알앤씨 나자현

주관연구책임자 : 나자현

협동연구책임자 : 한계준

참여기관책임자 : 나자현



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

보고서 요약서

과제고유번호	118048-03	해당단계 연구기간	2018. 4. 30 - 2020. 12. 31	단 계 구 분	총단계
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	곡류 저장 안전성 향상을 위한 천연 유래 방충 유효 단일 성분 규명 및 대량 생산 방안 탐색			
연구책임자	나자현	해당단계 참여연구원 수	총: 16 명 내부: 15 명 외부: 1 명	해당단계 연구개발비	정부:187,500천원 민간: 62,500천원 계:250,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 45명 내부: 42명 외부: 3명	총 연구개발비	정부:507,000천원 민간:169,000천원 계:676,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)하이포스알앤씨 고려대학교			참여기업명 (주)하이포스알앤씨	
국제공동연구	상대국명: 해당없음			상대국 연구기관명: 해당없음	
위탁연구	연구기관명: 해당없음			연구책임자: 해당없음	
연구개발성과의 보안등급 및 사유	해당없음				

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호		10-201 9-0136 977, 10-202 0-0166 253, 10-202 0-0154 152									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

- 공시충 대량사육 시스템 구축 및 방충효과, 효율검증 기술 표준화(특허출원)
- 식품공전 등재 식물(19종) 중 방충효과를 갖는 2차 대사물질을 탐색하여 4종의 유효 단일성분 Dillapiole, D-carvone(시라자), *Trans*-cinnamaldehyde(계피), *Trans*-anethole(팔각회향) 확보
- 방충효과 유발 식물 스크리닝 방법, 유효성분 최적 추출법(초음파 에탄올 추출법) 개발 및 유효 단일성분 분획(Hexane, Diethyl ether, Ethyl acetate, DW 용매분획법(Solvent-solvent partition)) 표준방법 개발
- 단일 유효성분 및 조합에 대한 대상해충의 방충효과 검증을 통한 방충 단일 유효성분 최적 조합 물질 개발 및 방충 유효성분 DB 구축
- 방충 단일 유효 물질의 유기합성 시안 도출 및 최적 조합 물질 생산방안 마련
- 최적 조합 물질 방충물질을 이용한 현장 적용 방충 소재 개발(특허출원) 및 시제품의 현장적용, 방충효과 분석을 통한 상용화 가능성 검증

보고서 면수

116

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>본 연구의 목적은 곡류(식품) 저장 시설에서 친환경적이며 효과적인 저곡해충의 관리/방제를 위한 천연 방충성분의 방충효과를 검증하는 기술을 표준화하고 이를 이용하여 천연물에서 방충 유효성분을 분리, 규명, 방충 효과 극대화를 위한 최적 조합비 탐색을 통해 확보한 방충물질을 시제품의 실증화 적용·검증 후 방충물질 생산 시 비용 저감화를 위한 유기합성법 시안 마련하는 것이다.</p> <p>이를 위해 수행한 연구내용은 다음과 같다</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 공시충(화랑곡나방, 거저쌀도둑거저리) 대량사육 시스템 구축 및 방충효과, 효율검증 기술 표준화 ○ 식품공전 등재 식물 중 방충효과를 갖는 2차 대사물질을 탐색 및 방충효과 스크리닝을 통해 후보군을 선정, 유효성분 최적 추출법 개발 및 유효 단일성분 분획 방법 개발 ○ 방충 단일 유효성분 및 조합에 대한 대상해충의 방충효과 검증/유효성분 DB구축 및 방충 단일 유효성분 최적 조합비 탐색 ○ 방충 단일 유효 물질의 유기합성 시안 마련/ 시제품에 대한 방충효과 검증 및 현장 적용 방충 소재 개발/현장적용 가능성 분석 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 공시충 대량사육 시스템 구축 및 방충효과, 효율검증 기술 표준화(특허출원) ○ 식품공전 등재 식물(19종) 중 방충효과를 갖는 2차 대사물질을 탐색하여 4종의 유효 단일성분 Dillapiole, D-carvone(시라자), <i>Trans</i>-cinnamaldehyde(계피), <i>Trans</i>-anethole(팔각회향) 확보 ○ 방충효과 유발 식물 스크리닝 방법, 유효성분 최적 추출법(초음파 에탄올 추출법) 개발 및 유효 단일성분 분획(Hexane, Diethyl ether, Ethyl acetate, DW 용매 분획법(Solvent-solvent partition)) 표준방법 개발 ○ 단일 유효성분 및 조합에 대한 대상해충의 방충효과 검증을 통한 방충 단일 유효성분 최적 조합 물질 개발 및 방충 유효성분 DB 구축 ○ 방충 단일 유효 물질의 유기합성 시안 도출 및 최적 조합 물질 생산방안 마련 ○ 최적 조합 물질 방충물질을 이용한 현장 적용 방충 소재 개발(특허출원) 및 시제품의 현장적용, 방충효과 분석을 통한 상용화 가능성 검증 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○국가기관, 연구기관, 산업체 등에서 방충성분, 물질, 상품개발 시 방충효과 시험 성적자료 제공 사업화 ○식품기업, 곡물/사료 관련기업, 유통/보관 관련기업, 농약회사, 방역회사 등 친환경 방충기능 상품, 성분, 물질이 필요한 산업체에 친환경 방충물질 공급 사업화 ○건축자재 생산기업, 식품기업, 포장재생산기업, 생활용품기업 등 친환경 방충소재 개발, 판매 산업체 친환경 방충소재 판매 및 개발/검증 관련기술 사업화 ○친환경 살충제, 기피제, 방충성능 제품 개발 시 객관적인 효과 검증기술을 제공 함으로 개발비용 절감, 소비자 신뢰성 및 안전성 확보 ○친환경 방충소재를 활용한 다양한 상품개발, 시장확대, 관련 인원의 고용창출 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	저장안전성	천연물질	방충성분	저장곤충	유기합성
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	storage safety	Natural substance	Insect repellent	stored products insect	organic synthesis

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	6
1-1. 연구개발 목적	6
1-2. 연구개발의 필요성	6
1-3. 연구개발 범위	9
가. 주관기관과 협동기관의 년차 별 연구 개발 범위 및 계획	9
나. 1차 년도	9
다. 2차 년도	15
라. 3차 년도	19
2. 연구수행 내용 및 결과	22
2-1. 연차별 연구개발 목표 및 결과	22
2-2. 연차별 연구수행 내용	25
가. 1차 년도 연구수행 내용	25
나. 2차 년도 연구수행 내용	41
다. 3차 년도 연구수행 내용	69
2-3. 연구성과	111
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	114
3-1. 목표	114
3-2. 목표 달성여부	114
3-3. 목표 미달성 시 원인 및 차후대책	114
4. 연구결과의 활용 계획 등	116

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

가. 최종목표

- 곡류(식품) 저장 시설에서 친환경적이며 지속적인 효과를 담보하는 저곡해충의 관리/방제를 위하여 대상 해충에 대한 방충효과 검증 기술 표준화
- 천연물 유래 방충 물질 중 유효성분을 분리, 규명하며 방충 효과 극대화를 위한 최적 조합비 탐색을 통해 곡물(식품)의 저장 안전성을 확보하며 방충물 시제품의 실증화 적용·검증 및 비용 저감화를 위한 유기합성법 시안 마련

나. 세부목표

- 대상해충(화랑곡나방, 거릿쌀도둑거저리)의 대량사육 시스템 구축 및 연령구조 체계 확립
- 대상해충에 대한 방충효과, 효율검증 기술 표준화
- 곡물 저장 안전성 확보를 위한 2차 대사물질 발현 식품공전 등재 식물소재 탐색/추출
- 추출물 내 방충 유효 단일 성분 분획을 위한 분획 방법 마련
- 방충 단일 유효성분 및 조합에 대한 대상해충의 방충효과 검증/방충성능 DB구축
- 식품 품질 유지기술로의 개발을 위한 분획된 방충 단일 유효성분 최적 조합비 탐색
- 방충 단일 유효 물질의 유기합성 시안 마련 및 시제품에 대한 방충효과 검증/방충성능 DB 구축
- 검증된 방충물질의 곡물저장 현장 적용 소재 탐색 및 식품 품질 유지관리 기술로의 적용가능성 분석

1-2. 연구개발의 필요성

가. 식품 유통·보관 중 발생하는 이물에 의한 식품 품질 저하

- 일반적으로 식품은 제조, 유통, 보관의 3단계를 거쳐 소비자에게 전달되나 유통 및 보관 단계에서 일어나는 품질 저하에 의한 소비자 불만이 지속적으로 접수되고 있음.
- 이는 주로 노출되는 환경조건(온도, 습도 등)에 따라 식품으로의 해충 유입과 곰팡이 발에 기인한 것으로 알려져 있음.

표 1. 가공식품에 발생하는 문제 발생 현황 및 시장규모 (단위: US\$ 1,000)

피해유형	제품 종류		국내(수출)	국외(수입)	포장형태
해충에 의한 피해	면류	파스타	92	1,854	복합필름(파우치), 지합
		냉면	4,393	31	복합필름(파우치)
곰팡이 등 유해미생물에 의한 피해	육가공품	소시지	1,070	13,411	복합필름(진공포장)
					복합필름

표 2. 제품 피해 발생 현황

피해 유형	제품 피해 발생 현황
해충에 의한 피해	- 이물 종류별 피해 현황은 해충(2,343건, 49.5%)로 가장 많이 발생 - 소비·유통단계 혼입률(445건, 19.3%)이 제조단계 혼입률(73건, 3.2%)보다 월등히 높음 - 이는 식품 보관 및 취급 과정 중 부주의로 인해 발생한 것으로 분석됨
곰팡이 등 유해미생물에 의한 피해	- 곰팡이는 570건, 12.0%로 해충에 의한 피해에 이어 잦은 빈도로 발생 - 소비·유통단계(85건, 15.2%)나 제조단계의 혼입률(84건, 15.0%)이 비슷한 수준으로 나타남 - 제조 과정 중에는 건조처리 미흡 또는 포장지 밀봉 불량 등으로 발생 - 유통 중에는 주로 용기·포장 파손 또는 뚜껑 등에 외부공기가 유입되어 나타나는 것으로 분석됨

- 본 연구의 대상 해충으로 선정된 거릿쌀도둑거저리와 화랑곡나방은 전 세계적으로 다양한 종류의 저장 곡물과 식품에 막대한 피해를 야기하는 저장 해충의 대표 종으로 시설 내 저장 곡물이나 식품을 갇아먹거나 섭식하여 직접적인 양적 피해를 일으키며 발육 잔재물(실크, 파편, 탈피각 등)이나 배설물 등에 의한 오염으로 더 큰 질적 피해를 유발함.

나. 방제 방식의 변화

- 해충 방제를 위하여 현재까지 주로 화학적 방제, 즉 살충제 등과 같은 농약에 의지 하여 왔으나, 농약의 과다사용과 지속적인 사용으로 인해 환경오염, 독성물질 축적, 식품 안전성 저하 등과 같은 커다란 부작용을 야기하였음. 따라서 현재의 해충방제는 이러한 화학제제 사용을 최대한 억제하면서 부작용을 최소화하는 환경 친화적 방제로 방향을 전환하고 있는 실정임.

다. 화학합성제제의 단점

- 화학 기술에 기초한 방충제는 해충의 저항성 증대와, 토양, 수질, 환경오염 등 많은 환경적 문제를 야기함.

표 3. 화학합성제제의 장·단점

	화학합성방충제
장점	- 효과가 빠르며 약효가 높음 - 가격이 저렴하며 사용 및 보관상 편리함 - 약효가 비교적 오래 지속됨
단점	- 인축 독성을 지니며 잔류성이 높아 잔류 문제가 존재함 - 광범위한 살충/살균 효과에 의해 천적, 유익생물에 피해를 입힘 - 장기간 사용 시 내성을 지닌 해충이 발생할 수 있음 - 화학합성방충제에 대해 소비자는 부정적 인식을 지님

- 이에 따라 우리나라를 포함한 OECD 국가에서는 환경오염 및 합성제의 부작용을 줄이기 위한 대책으로 친환경정책을 추진하고 있음.

라. 화학합성 방충제의 대체제로서 천연물 유래 방충제의 개발 시도

- 천연 유래 방충제는 합성방충제에 비해 인축이나 유용생물 및 생태환경에 대한 안전성이 뛰어나며, 해충이 내성을 가지기 어렵다는 장점이 보고되고 있음.
- 하지만, 천연 유래 방충제는 효과가 서서히 나타나거나 지속성이 짧은 문제가 있어 이를 극복하기 위한 노력이 지속적으로 시도 중임.
- 또한, 천연 유래 방충제의 효과를 향상시키기 위해 대상 해충에 직접적인 효과를 주는 단일 유효 성분 획득을 위한 방법도 제대로 구축되지 않았으며 단일 성분을 획득한다 하여도 가격 경쟁력이 여전히 낮다는 단점이 존재함.

마. 천연 방충 물질 중 방충 단일 유효 성분 획득과 천연 유래 단일 성분 합성을 위한 유기 합성 시도

- 본 연구에서는 인체 안전성이 입증된 천연 유래 방충 물질로부터 방충력이 우수한 단일 유효 성분만을 획득하여 식품 내 대상 해충(거짓쌀도둑거저리, 화랑곡나방) 피해를 위한 천연 방충제 기반 확보하고자 함.
- 또한, 천연물로부터 단일 성분을 효율적으로 분리하기 위한 분획 방법을 고안하여 분획된 단일 성분의 대상 해충에 대한 방충력 검증을 통해 방충 유효 성분 규명과 유효 성분 혼합을 통해 천연 유래 방충제의 기초 물질을 확보하려 함.

바. 본 연구는 저장시설에서 친환경적이고 효과적인 저장 곡류 해충의 관리, 방제를 위하여 대상해충에 대한 방충효과, 효율검증 기술을 표준화 할 계획이며 이를 통해 식품 품질관리 기술의 체계적인 접근법을 제시할 계획임.

사. 또한, 식품공전 상에 등재된 천연식물소재로부터 식물-곤충간의 공진화 과정에서 생성된 2차 대사물질을 추출하여 방충효과를 극대화시킨 물질을 선별하여 이들의 유효성분 및 최적 조합비를 규명할 계획임.

아. 궁극적으로, 저장해충의 침입으로 인해 야기되는 저장 곡류의 손실을 제어할 수 있는 천연 유래 방충 단일 물질의 유기합성법을 통한 대량생산 방안을 시도하고 현장에 적용 가능한 방충소재에 응용함으로써 식품 품질 관리를 통한 유통·저장 신뢰도를 향상시키는데 이바지하려 함.

자. 본 연구의 고유성

- 기존 연구는 천연 물질로부터 유래된 추출액의 방충효과 검증 및 이를 이용한 품질유지 기술을 제시하였으나 본 연구는 천연물을 구성하는 방충 유효 단일 성분만을 분획화한 후, 이의 최적 조합을 통해 식품의 품질 유지 기술을 제안하고자 함.
- 또한, 천연 유래 방충 유효 단일 성분의 유기합성을 통해 대량 생산에 대한 가능성 제시와 향후 품질 관리 및 제조법의 표준화에 대한 기초를 제공하고자 함.

- 본 연구와 기존연구와의 차별성 및 신규성을 통하여 연구 개발되는 연구결과의 권리를 확보하고자 함.

핵심 기술 및 기존 기술과의 차별성 · 신규성

개발 예정 핵심 기술



기존 기술과의 차별성

기존 연구 및 기술

- 천연 유래 방충 활성 성분 추출과 효능만 확인하여 DB 구축화 미흡
- 방충 성분 획득을 위한 높은 비용 투자 및 대량 생산의 어려움
- 실험실 수준에서 진행하여 산업화 및 실용화 한계

본 연구 과제 핵심 기술

- 추출 방법별 추출물의 방충 성능 검증
- 방충 단일 물질 규명 및 DB 구축
- 향후 실용화 및 산업화를 위한 방안으로 유기 합성법 시안 제시
- 유기 합성을 통한 시제품 제작 및 천연 추출 성분과의 비교 · 검증
- 천연추출물의 유기 합성 가능성 제시

1-3. 연구개발 범위

가. 주관기관과 협동기관의 년차 별 연구 개발 범위 및 계획

: 1차 년도 연구기간 동안 대상식물의 탐색, 선정과 1차 후보군의 규명.

: 2, 3차년도 방충효과 연구를 위하여 연령구조가 확립된 공시충을 대량으로 공급할 수 있는 기반을 조성하는 것과 방충효과 유무 및 지속성을 검증.



나. 1차 년도

(1) 연구개발 목표

(가) 주관연구기관 (주)하이포스알앤씨:

: 대상해충(화랑곡나방, 거짓쌀도둑거저리)의 대량사육 시스템 구축 및 탐색식물 추출물에 대한 방충효과 스크리닝

(나) 협동연구기관 (고려대학교):

: 천연물 유래 방충물질의 최적 추출 방법 탐색을 통한 대상 방충 추출물 획득 및 구성 성분 분석

(2) 개발 내용 및 범위

(가) 주관연구기관((주)하이포스알앤씨)

① 대상해충(화랑곡나방, 거짓쌀도둑거저리)의 대량사육 시스템을 통한 연령구조 체계 확립

- 실험 대상해충 감수성 개체군을 확보함.

- 대량 생산을 통해 연령구조가 일정한 공시충을 안정적으로 공급함.

: 실험에 사용될 공시충으로 나비목 저장해충 화랑곡나방과 딱정벌레목 저장해충 거짓쌀도둑거저리를 선정함.

: 감수성 개체군을 선발하고 이들 개체군의 대량사육 시스템을 통해 실험에 사용될 공시충의 연령구조를 균일하게 조절하여 실험에 필요한 대량의 공시충을 연구기간동안 안정적으로 공급하는 체계를 확립함.



그림 1 공시충 대량사육 및 연령구조 조절

② 대상해충에 대한 방충효과 검증 및 효율검증 기술 표준화

- 기존연구에서 수행한 방충효과 검증 실험법을 통합한 신뢰성 극대화 및 방충효과 유무, 방충효과 지속성 검증 기술 표준화를 제시함.



그림 2 Disc를 이용한 여지확산법

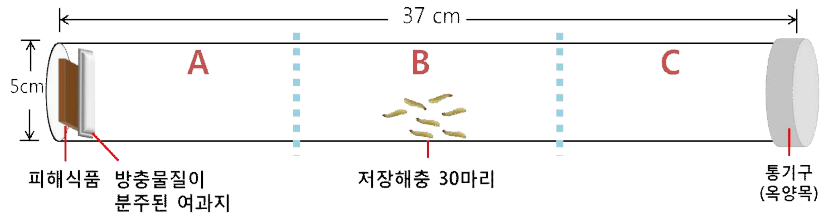


그림 3 기피테스트트랩의 모식도

표 4 주요 성능 지표 개요

< 주요 성능지표 개요 >					
주요 성능지표	단위	최종 개발목표	세계최고수준 (보유기업/보유국)	가중치 (%)	측정기관
1. 방충효과(기피율)	%	90% 통계유의성	-	10	고려대학교
2. 방충지속성	개월	6개월	-	10	고려대학교

③ 곡물 저장 안전성 확보를 위하여 식품공전에 등재된 2차 대사물질 발현 식물 탐색

- 식품 공전에 등재된 식물체를 대상으로 저장 해충에 살충, 기피, 방충 효과를 보이는 2차 대사물질 발현 식물 탐색 및 선발함.



그림 4 식품공전에 등재된 식용, 약용식물 및 공진화 기인 2차 대사물질 탐색

- 식품 공전에 등재되어 저장해충에 살충, 기피, 방충 효과를 보이는 식물체 유래 물질의 종류

식물과 곤충의 공진화 관계를 통해 식물에서 발현되는 2차 대사물질(semiochemical) 함유 여부, 식품공전 등재 식용, 약용식물 여부 조사

번호	학명	속명	과명	비고	번호	속명	과명	비고
1	<i>Artemisia annua</i> DC	국화과	국화과	100	40	우유나무	우유과	100
2	<i>Ligustrum lucidum</i>	진달래과	진달래과	100	41	양귀비	양귀비과	100
3	<i>Salvia japonica</i> Thunberg	박하과	박하과	100	42	박하	박하과	100
4	<i>Helianthus l. Inam</i> Hrad	박하과	박하과	100	43	양귀비	양귀비과	100
5	<i>Chrysanthemum</i>	국화과	국화과	100	44	양귀비	양귀비과	100
6	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	45	양귀비	양귀비과	100
7	<i>Senecio</i>	국화과	국화과	100	46	양귀비	양귀비과	100
8	<i>Chrysanthemum</i>	국화과	국화과	100	47	양귀비	양귀비과	100
9	<i>Chrysanthemum</i>	국화과	국화과	100	48	양귀비	양귀비과	100
10	<i>Senecio</i>	국화과	국화과	100	49	양귀비	양귀비과	100
11	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	50	양귀비	양귀비과	100
12	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	51	양귀비	양귀비과	100
13	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	52	양귀비	양귀비과	100
14	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	53	양귀비	양귀비과	100
15	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	54	양귀비	양귀비과	100
16	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	55	양귀비	양귀비과	100
17	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	56	양귀비	양귀비과	100
18	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	57	양귀비	양귀비과	100
19	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	58	양귀비	양귀비과	100
20	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	59	양귀비	양귀비과	100
21	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	60	양귀비	양귀비과	100
22	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	61	양귀비	양귀비과	100
23	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	62	양귀비	양귀비과	100
24	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	63	양귀비	양귀비과	100
25	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	64	양귀비	양귀비과	100
26	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	65	양귀비	양귀비과	100
27	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	66	양귀비	양귀비과	100
28	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	67	양귀비	양귀비과	100
29	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	68	양귀비	양귀비과	100
30	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	69	양귀비	양귀비과	100
31	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	70	양귀비	양귀비과	100
32	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	71	양귀비	양귀비과	100
33	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	72	양귀비	양귀비과	100
34	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	73	양귀비	양귀비과	100
35	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	74	양귀비	양귀비과	100
36	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	75	양귀비	양귀비과	100
37	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	76	양귀비	양귀비과	100
38	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	77	양귀비	양귀비과	100
39	<i>Salvia</i>	박하과	박하과	100	78	양귀비	양귀비과	100

- 1) 1~7번 (약용식물) : 방충효과를 가짐.
- 2) 8~45번 (약용식물) : 살충, 훈증활성을 가짐. **권역벌레**는 회향, 계피, 대회향, 겨자, 양고추냉이 등은 매우 높은 활성, 창포, 육계, 백조향 역시 높은 활성을 보임. **화랑곡나방 유충**에 대해서는 겨자와 양고추냉이에서 높은 살충활성을 보임. **어리쌀바구미**도 계피, 겨자, 양고추냉이, 육계, 창포, 석창포, 백조향, 회향 등에서 살충활성을 보임. **팥바구미 성충**은 창포, 지초, 계피, 육계, 대회향, 정향, 후추, 백조향, 회향, 마늘 등에서 살충활성을 보임. 애수시렁이 유충은 마늘, 편노, 회향, 대회향 등에서 살충활성을 보임. **저장해충**에는 공통적으로 겨자, 양고추냉이, 육계, 창포, 백조향, 회향, 대회향, 마늘 등이 효과를 보임.
- 3) 46~49번 (약용식물) : 원화(팥꽃나무), 청향, 사군자, 건강(생강) 등은 살충효과를 보이고, **홍충(나팔꽃)**, **창이지(도파리)**, **청주황(원장풀)**은 살비활성을 가짐.
- 4) 50~84번(약용식물) : 전반적으로 저장해충에 기피현상을 보이는 식물

국내외 논문분석을 통한 방충효과를 보이는 허브, 향신료, 농작물 및 정유물질을 탐색

④ 탐색식물 추출물에 대한 방충효과 스크리닝

- 극성/무극성 용매를 이용하여 추출한 후보 추출물에 대한 대상해충의 방충효과를 disc를 이용한 여지확산법으로 스크리닝함.

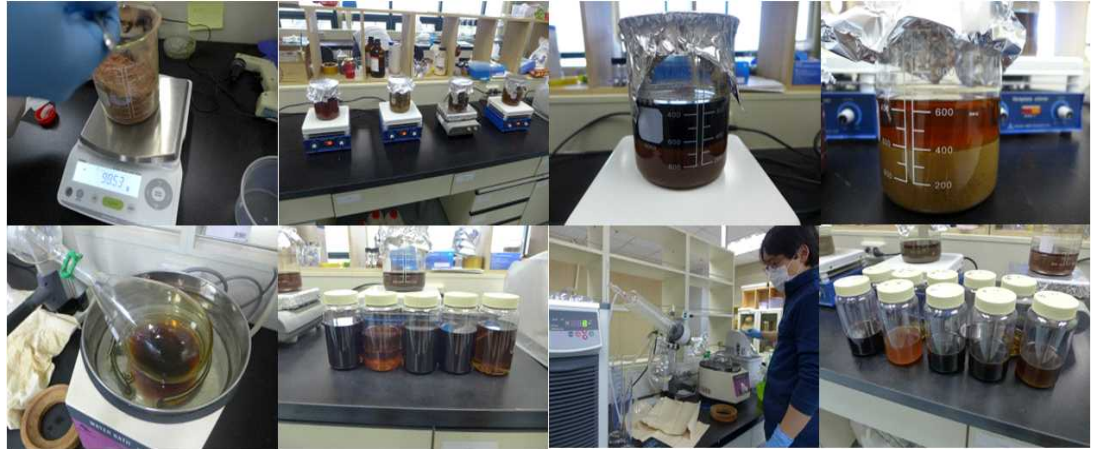


그림 5 해충 기피물질 함유 약용식물 후보군에서의 2차 대사물질 추출

- 방충효과 검증 실험(disc를 이용한 여지확산법)은 물질 처리 후 경과시간(1h, 3h, 6h, 9h, 24h, 48h, 72h)에 따른 방충효과를 검증하여 방충물질의 방충 효과와 지속성을 동시에 조사함.

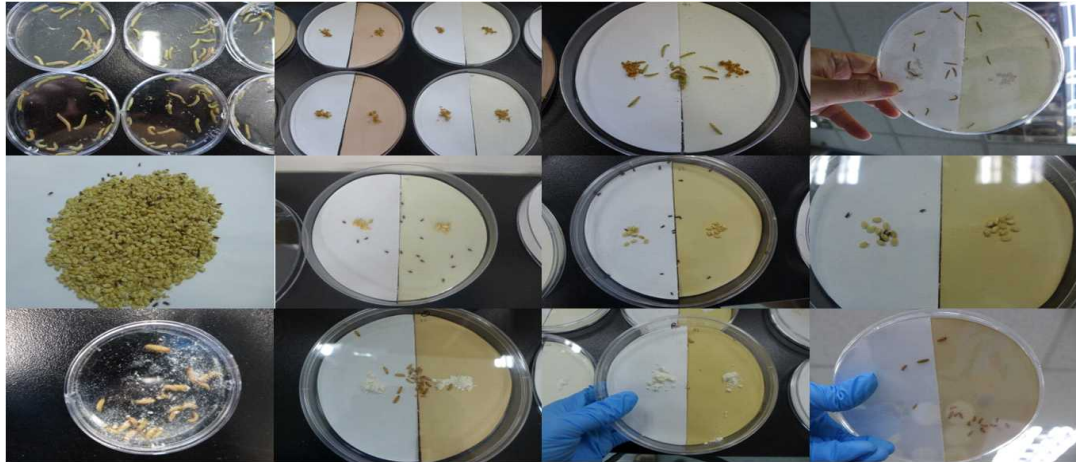


그림 6 약용식물에서 추출한 2차 대사물질의 해충기피효과 검증

(나) 협동연구기관(고려대학교)

① 천연 유래 물질 중 대상 해충 제어를 위한 물질 선정(1협동)

- 선행 연구 결과의 포괄적인 분석을 통해 방충 효과가 우수한 천연 유래 대상 해충 제어 물질 후보군을 제시함.
- 제시된 천연 유래 해충 제어 물질의 방충력 검증을 통해 방충물질을 선정함.

② 선정된 천연 유래 물질의 추출법 최적화

- 천연 유래 물질 추출 수율 향상을 위해 최적 추출법 확립.
- 추출법으로는 열수 추출, 에탄올 추출, 초음파 병합을 통한 추출법이 사용되고 있음.
- 사전 조사를 기반으로 특정 물질을 최적화하기 위한 방법(추출 온도, 시간)을 선정하며 이를 기반으로 초음파 병합을 통한 열수 추출과 에탄올 추출을 진행하도록 함.

㉠ 초음파 병합을 통한 열수 추출법

Ex) 추출 용매: 물, 추출 온도: x °C

: 각 시험 조건에서의 추출물의 수율 비교 후, 열수 추출법 수율이 가장 높은 최적화 조건을 선정함.

㉡ 초음파 병합을 통한 에탄올 추출법

Ex) 추출 용매: 에탄올, 추출 온도: x °C

: 각 시험 조건에서의 추출물의 수율 비교 후, 열수 추출법 수율이 가장 높은 최적화 조건을 선정함.

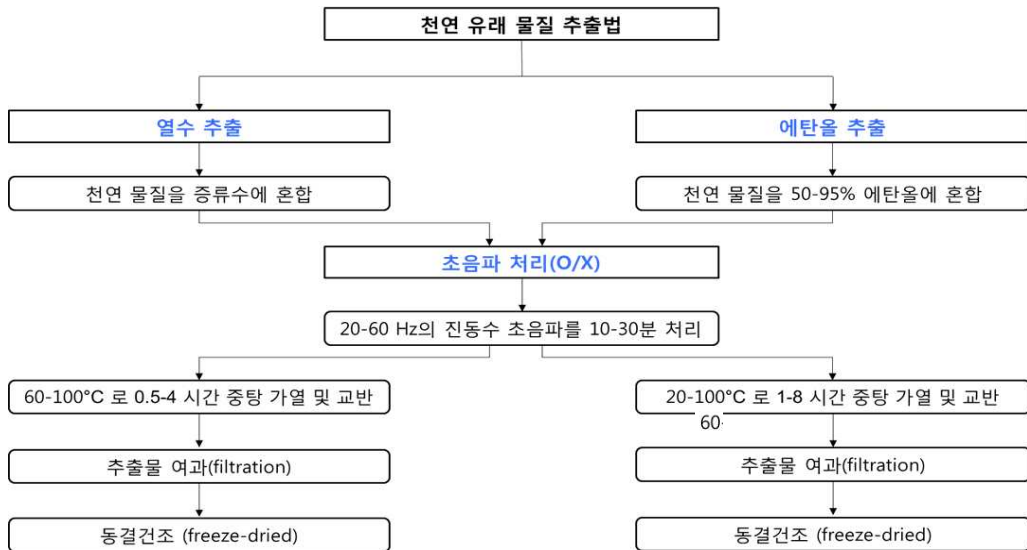


그림 7 천연 유래 물질 추출 예시

③ 추출된 천연 유래 방충 물질 구성성분 분석

- GC-MS 또는 LC-MS를 이용하여 방충 물질의 구성 성분을 확인함.

㉞ GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometer)

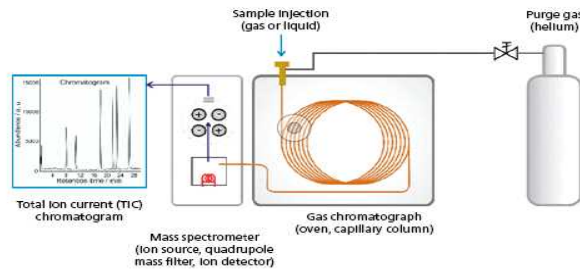


그림 8 GC-MS

: 기상에서 적용 가능한 질량 분석기로서 방충 물질 중에 함유된 화학물질의 정성 분석 가능.

: GC-MS의 가스 농도비, 유량, 온도 조절을 통하여 추출된 천연 유래 방충 물질의 구성 성분 확인 및 각 구성 물질의 함유비 검토.

: 선정된 물질의 사전 문헌 조사를 기반으로 검출된 각 구성 물질의 특성 정보 확인.

㉟ LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometer)

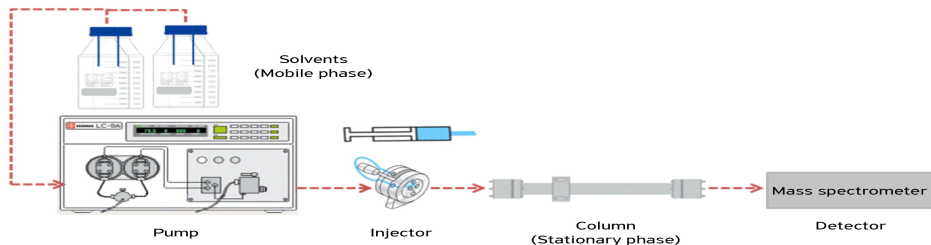


그림 9 LC-MS

: 액상에서 적용 가능한 질량 분석기로서 천연 유래 방충 물질 중에 함유된 화학물질의 정성 분석이 가능함.

: 방출 물질의 특성을 고려한 chromatography 선정 및 이를 응용한 구성 성분 확인 가능.

: 선정된 물질의 사전 문헌 조사를 기반으로 검출된 각 구성 물질의 특성 정보 확인

다. 2차 년도

(1) 연구개발 목표

(가) 주관연구기관((주)하이포스알앤씨)

: 추출 방법별 추출물에 대한 대상해충 방출효과 검증과 단일 유효성분에 대한 대상해충의 방출효과 검증 및 방출성능 DB구축

(나) 협동연구기관(고려대학교)

: 추출된 천연 방출 물질의 분획을 통한 방출 유효 성분 확보 및 물질 규명

(2) 개발 내용 및 범위

(가) 주관연구기관((주)하이포스알앤씨)

① 추출 방법별 추출물에 대한 대상 해충 방출효과 검증

- 협동연구기관에서 다양한 방법으로 추출한 천연식물 추출물을 소재로 하고, 선정된 공시충을 대상으로 1차년도에 표준화한 방출효과 검증 기술(disc를 이용한 여지확산법, olfactometer 등)을 통해 방출효과를 검증함.

- 모든 방출효과 검증 실험(disc를 이용한 여지확산법, Olfactometer 등)은 물질 처리 후 경과시간(1h, 3h, 6h, 9h, 24h, 48h, 72h)에 따른 방출효과를 검증하여 방출물질의 방출효과와 지속성을 동시에 조사함.

② 단일 유효성분에 대한 대상해충의 방출효과 검증 및 방출성능 DB구축

- 대상해충에 방출효과를 보이는 추출물을 대상으로 협동연구기관에서 분석 및 규명한 유효성분에 대하여 방출효과 검증 기술(Disc를 이용한 여지확산법, Olfactometer 등)을 적용하여 방출효과와 지속성을 검증함.

- 방출효과를 기반으로 대상 탐색식물, 추출방법, 유효성분 종류(분자구조, 분자량 등) 및 함유량에 따른 database를 구축함.

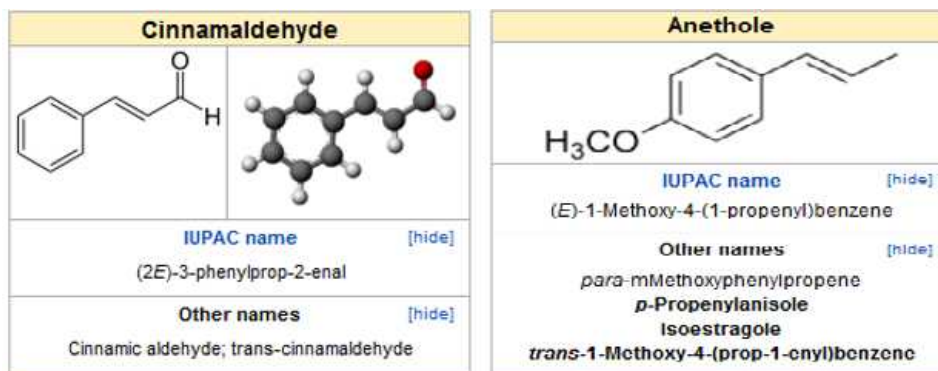


그림 10 식물 2차 대사물질 유효성분 DB

(나) 협동연구기관(고려대학교)

① 추출된 천연 방충 물질의 분획방법 고안 및 분획을 통한 방충 유효 성분 획득

- 천연 방충 물질의 구성성분 구조 및 특성을 고려한 분획방법을 고안함.

㉠ 용매 분획법

: 천연추출물의 분리 과정 중 가장 초기 단계에 활용되기도 하며, 중간 또는 마지막 단계에 전처리 등의 용도로 활용됨.

: 시료에 포함된 물질들의 극성도 차이에 따라 용매 선정 및 분획 시행.

: 분획물의 특성을 고려하여 상반된 용매를 이용, 이를 통해 방충 물질의 분획 진행.

: 각 용매들의 극성도 및 추출 순서는 다음과 같음

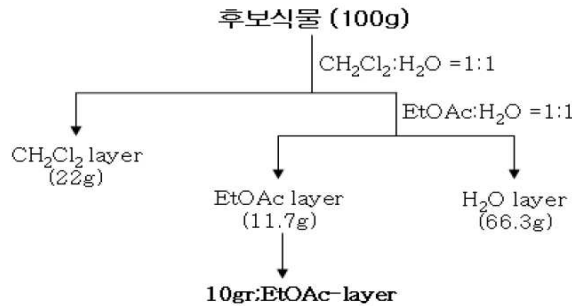
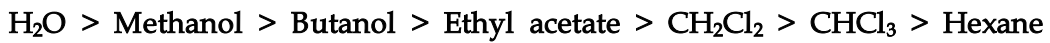


그림 11 천연추출물의 용매분획법 시행 예

㉡ Column chromatography 분획법

: 이동상과 고정상 사이에 일어나는 화합물의 상호작용을 통한 분배를 이용하여 분획법 시행

: 고정상의 종류에 따라 liquid, bonded liquid, solid의 세 가지로 구분되며 분획하고자 하는 물질의 특성을 고려하여 진행

: 고정상 중 liquid 형태는 thin layer chromatography와 HPLC (high performace liquid chromatography)가 자주 사용됨.

: Solid 형태의 chromatography는 ion exchange, size exclusion 등으로 나눌 수 있음.

▶ Silica chromatography

: 추출된 천연 유래 곤충 제어물질의 분획을 위해 silica gel column을 이용하여 각 단일 물질을 분리·획득함

: 분획의 최적화를 위해 silica gel을 다양한 용매를 이용하여 충전함.

Ex) chloroform:acetone:methanol:water (5:3:2:0.5)의 용매 조건으로 하여 분획물 획득 → 분획 효율을 최대화하기 위하여 용매 조건 변경 후 분획물을 재획득함.

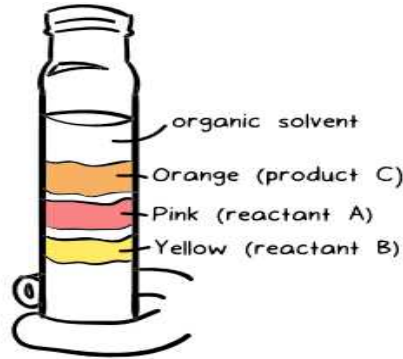


그림 12 Silica chromatography

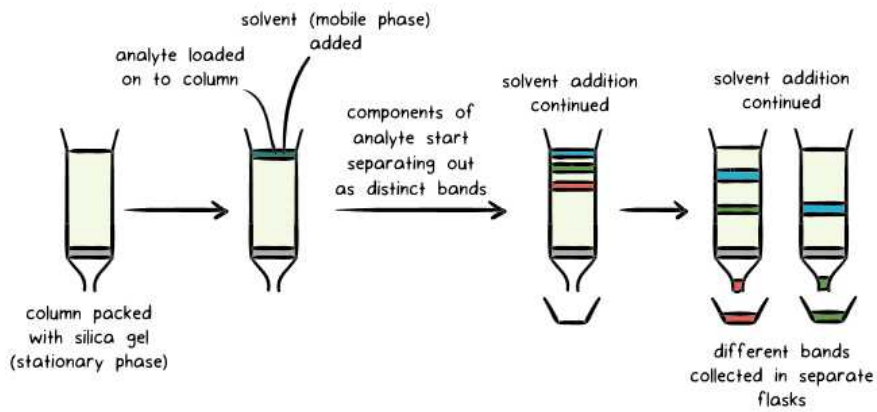


그림 13 Silica chromatography를 이용한 추출 방법의 예

▶ HPLC

: LC를 이용하여 분획 효율 향상 및 분리된 물질의 단일 성분을 획득함.

: 효율적 분획을 위한 최적 방법 선정

- 분획에 적합한 column 종류 변경

Ex) 역상 크로마토그래피(C₁₈): 곤충행동 생태조절 추출물의 비극성 잔류시간을 증대시켜 분리 효율을 높임.



그림 14 Column 종류에 따른 잔류 효과

- 이동상으로 활용 가능한 용매 선정 및 최적 조합 비율 선정

Ex) 메탄올 : 물 = x : y (v/v) 1L 제조

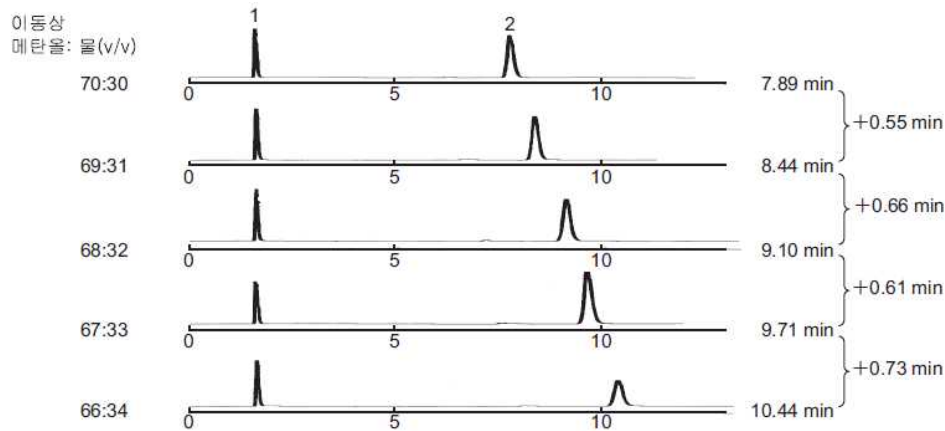


그림 15 용매 혼합비에 따른 특정 단일 물질의 잔류 시간 변화

- 기타 이동상의 유속, inlet 또는 outlet 온도 조절을 통한 단일 성분의 분획 향상 및 단일 성분 획득

② 분획을 통해 획득한 단일 성분의 구조 분석

- 분리된 단일 물질의 구조 및 특성을 확인하기 위해 NMR (ex. ^1H , ^{13}C), UV, MS 등의 다양한 분광학적 방법을 이용함.

㉞ NMR (Nuclear Magnetic Resonance)

: 핵의 자성을 이용한 물질 구조 분석 방법으로 질량수 홀수인 ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F 및 ^{31}P 등을 측정 가능함.

: ^1H , ^{13}C 분석을 통해 미지의 단일 유기물질 구조를 확인함.

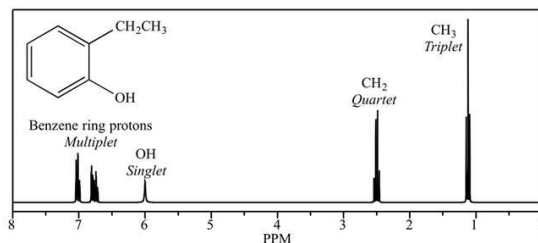


그림 16 NMR 분석 예

㉞ UV-Vis spectroscopy

: 분획된 물질의 구조에 따라 서로 다른 흡광도 피크 결과를 확인함.

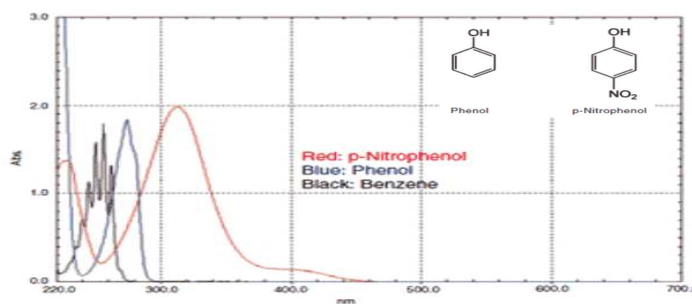


그림 17 단일 물질 구조에 따른 흡광도 피크 변화

㉔ MS (Mass Spectrophotometer)

: MS를 이용하여 분광학적 방법으로 확인된 단일 물질을 재검증함.

③ 해충 제어를 위한 천연물 단일 성분의 방충력 검증을 통한 방충 유효 성분 확인 및 물질 규명(1세부 연계)

- 분획된 단일 성분들 중 대상 해충에 대해 가장 방충력이 우수한 물질을 선정함.
- 다만, 독성이 우려되는 방충 유효 단일 성분은 제외하며 그 외 방충력이 우수한 단일물질을 선정할 예정임.
- 우수한 방충력을 지니는 단일 성분의 물질을 규명함.
- 또한, 방충 유효 성분들의 혼합과 방충력 검증을 통해 해충에 대해 가장 우수한 방충 시너지 효과를 보이는 혼합물을 선정하여 천연 유래 방충제를 위한 기초 물질을 마련함.

라. 3차 년도

(1) 연구개발 목표

(가) 주관연구기관((주)하이포스알앤씨)

: 유효성분 조합 물질 및 대량생산 시제품에 대한 대상해충 방충효과 검증

(나) 협동연구기관(고려대학교)

: 조합된 물질의 유기 합성 실행 시안 마련 및 합성 전/후 물질 간의 방충 효능 비교

(2) 개발 내용 및 범위

(가) 주관연구기관((주)하이포스알앤씨)

① 유효성분 조합에 대한 대상 해충의 방충효과 검증

- 2차 년도에 작성된 방충효과 기반 대상 탐색식물, 추출방법, 유효성분 종류(분자구조, 분자량 등) 및 함유량 database를 활용하여 협동연구기관에서 제조된 유효성분 조합물(조합비율, 농도 별)을 대상으로 방충효과, 지속성을 검증함 (disc를 이용한 여지확산법, Olfactermeter 등 적용).

② 천연 유래 단일 성분의 최적 조합비 기반으로 제조된 방충시제품에 대한 대상

- 유효성분 조합(조합비율, 농도 별)에 대한 대상 해충의 방충효과 검증 결과를 비교 분석하여 최적 조합 물질을 선정함.
- 협동연구기관이 대량생산 기술로 제조한 시제품을 대상으로 방충효과와 지속성을 검증함 (disc를 이용한 여지확산법, Olfactermeter 등 적용).

③ 검증된 방충물질의 곡물저장 현장 적용 소재탐색 및 적용가능성 분석

- 개발된 천연유래 기반 방충물질을 스프레이, 훈증제, 포장소재, 시설, 설비 코팅액, 도료 등과 같은 곡물저장 현장에 직접적으로 적용 가능한 소재 탐색 및 최적 적용방법(제형, 농도,

QC지표 등) 모색



그림 18 곡물저장 현장 적용 소재

(나) 협동연구기관(고려대학교)

① 천연 유래 단일 방충 성분을 이용한 천연 유래 곤충 제어 물질 생산 가능성 확보

- 2 차 년도에 분리한 천연 유래 곡류 해충 제어 단일 성분의 유효성과 사업성을 검토하여 최적 방충 효과를 보이는 단일 성분 간의 최적 조합비를 확립함 (1 협동).
- 곡류 저장 안정성을 위한 방충물 생산을 위해 최적 조합 물질을 이용한 방충물을 제조, 이의 실증화 검증을 1협동과 같이 진행할 예정.

② 천연 유래 곤충 제어 물질 생산을 위한 유기 합성 시안 마련

- 최적 조합 물질의 생산 능력 향상 및 저비용으로 시행 가능한 유기합성법을 제시함.

Ex) 유기합성 과정 및 설계방법

- ㄱ. 합성 대상 물질의 다양한 구조 특성 분석 진행.
(탄소 원자의 결합 형태, 작용기의 종류 및 입체 이성질체의 유무여부)
- ㄴ. 실험실적 수준에서의 합성법의 설계 혹은 유기합성 전문 업체를 통해 유기 합성법 설계
(예: 작용기 도입 및 전환에 있어 효율적인 방법의 탐색탄소-탄소 결합 형성)
- ㄷ. 선형 합성 또는 수렴 합성의 여부 결정, 반응 선택성을 제어할 수 있는 반응 모색
- ㄹ. 대량생산에 적합한 방법 설계를 통한 유기합성법 제시

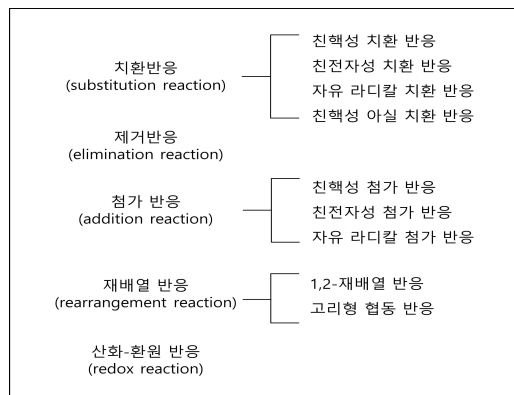


그림 19 생성물의 형태적 변화에 의한 유기합성 반응의 분류

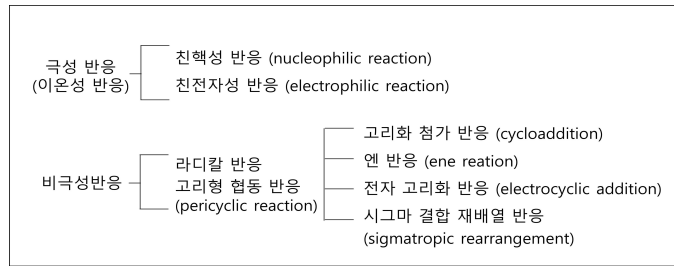


그림 20 반응 기질 및 탄소 반응종의 반응 행태에 의한 유기합성 반응의 분류

Ex) 유기합성 사례

(Ex 1) Recinine의 유기합성 및 살충활성 측정

- Recinine : 피마자 (*Ricinus communis*) 잎중 alkaloid 계통의 활성물질로서, 벼멸구에 대한 살충 활성이 뛰어나며, 구조상 유기합성이 용이함.

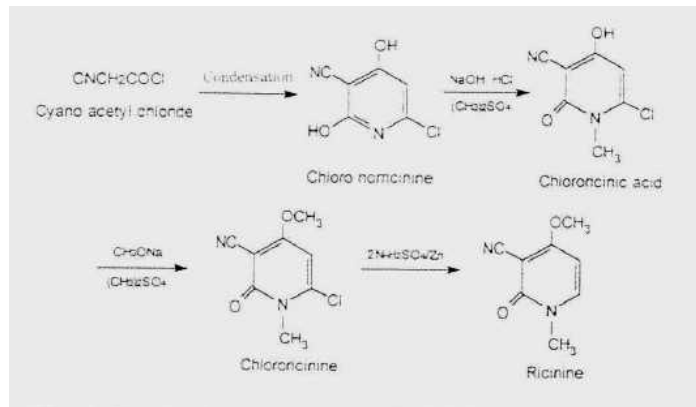


그림 21 Synthesis procedure of ricinine

(Ex 2) β -lactam 의 유기합성

- β -lactam : β -lactam계 화합물은 페니실린과 같은 항생제의 주요 골격을 이룸.

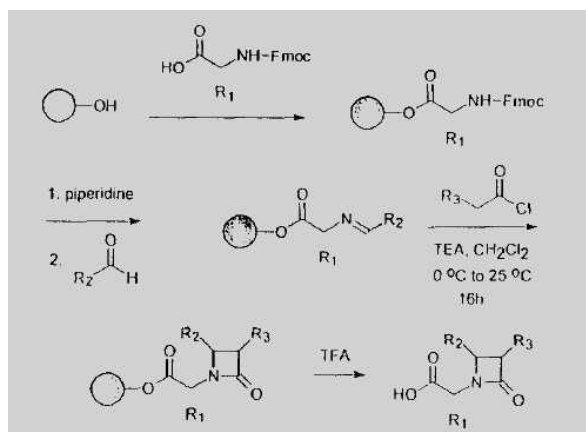


그림 22 Synthesis procedure of β -lactam

(3) 유기합성된 천연 유래 곤충 제어 물질 분석 평가

- 합성된 물질은 다양한 방법을 통해 분석 가능하며 특히, LC-MS와 NMR 등을 이용하여 분석함.

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 연차별 연구개발 목표 및 결과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2018)	곡류 저장 안전성 향상을 위한 천연 유래 방충 유효 단일 성분 규명 및 대량 생산 방안 탐색	대상해충(화랑곡나방, 거릿쌀도둑거저리)의 대량사육 시스템 구축 및 탐색식물 추출물에 대한 방충효과 스크리닝	<ul style="list-style-type: none"> ○ 대상해충(화랑곡나방, 거릿쌀도둑거저리)의 대량사육 시스템 구축을 통한 연령구조 체계 확립 ○ 대상해충에 대한 방충효과 검증 및 효율검증 기술 표준화 ○ 곡물 저장 안전성 확보를 위하여 식품공전에 등재된 2차 대사물질 발현 식물 탐색 ○ 탐색식물 추출물에 대한 방충효과 스크리닝 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 실험 대상해충 감수성 개체군 확보 및 대량 생산을 통해 연령 구조가 일정한 공시충의 안정적 공급 ○ 기존 연구에서 수행한 방충효과 검증 실험법을 통합한 신뢰성 극대화 및 방충효과 유무, 방충효과 지속성 검증 기술 표준화를 제시 ○ 식품 공전에 등재된 식물체 대상으로 저장해충에 살충, 기피, 방충 효과를 보이는 2차 대사물질 발현 식물 탐색 및 선발 ○ 극성/무극성 용매를 이용, 추출한 후보 추출물에 대한 대상해충의 방충효과를 disc를 이용한 여지 확산법으로 스크리닝함.
	천연 유래 방충 유효 단일 성분 규명 및 단일 성분 기반의 방충 조합물 탐색	천연물 유래 방충물질의 최적 추출 방법 탐색을 통한 대상 방충 추출물 획득 및 구성 성분 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ 천연 유래 물질 중 대상해충 제어를 위한 물질 선정 ○ 천연 유래 물질의 추출법 최적화 ○ 추출된 천연 유래 방충물질 구성성분 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 선행 연구 결과의 포괄적인 분석을 통해 방충효과가 우수한 천연 유래 대상해충 제어 물질 후보군을 제시 ○ 국외논문 분석을 통한 방충효과 물질 탐색 ○ 국내외 논문분석을 통해 방충효과를 나타내는 허브, 향신료, 농작물 및 정유물질을 탐색하였고, 이후 유충 assay를 통해 실제 효과 여부를 판단한 후 사전 조사를 기반으로 특정 물질을 최적화하기 위한 방법(추출 온도, 시간)을 선정 ○ LC-MS (Liquid Chromatography - Mass Spectrometer)를 이용한 방충물질 구성성분 분석에 필요한 최적화된 전처리 과정 탐색 및 전처리 과정 중에 있음.

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
2차 년도 (2019)	곡류 저장 안전성 향상을 위한 천연 유래 방충 유효 단일 성분 규명 및 대량 생산 방안 탐색	추출 방법별 추출물에 대한 대상해충 방충효과 검증과 단일 유효성분에 대한 대상해충의 방충효과 검증 및 방충성능 DB구축	<ul style="list-style-type: none"> ○추출 방법별 추출물에 대한 대상 해충 방충효과 검증 ○단일 유효성분에 대한 대상해충의 방충효과 검증 및 방충성능 DB구축 	<ul style="list-style-type: none"> ○협동연구기관에서 다양한 방법으로 추출한 천연식물 추출물을 소재로 하고, 선정된 공시충을 대상으로 1차년도에 표준화한 방충효과 검증 기술(Disc를 이용한 여지확산법, olfactometer 등)을 통해 방충효과를 검증 ○모든 방충효과 검증 실험(Disc를 이용한 여지확산법, Olfactometer 등)은 물질 처리 후 경과시간에 따른 방충효과를 검증하여 방충물질의 방충효과와 지속성을 동시에 조사 ○대상해충에 방충효과를 보이는 추출물을 대상으로 협동연구기관에서 분석 및 규명한 유효성분에 대하여 방충효과 검증 기술(Disc를 이용한 여지확산법, Olfactometer 등)을 적용하여 방충효과와 지속성을 검증 ○방충효과를 기반으로 대상 탐색식물, 추출방법, 유효성분 종류(분자구조, 분자량 등) 및 함유량에 따른 database를 구축
	천연 유래 방충 유효 단일 성분 규명 및 단일 성분 기반의 방충 조합물 탐색	추출된 천연 방충 물질의 분획을 통한 방충 유효 성분 확보 및 물질 규명	<ul style="list-style-type: none"> ○추출된 천연 방충 물질의 분획방법 고안 및 분획을 통한 방충 유효 성분 획득 ○분획을 통해 획득한 단일 성분의 구조 분석 ○해충 제어를 위한 천연물 단일 성분의 방충력 검증을 통한 방충 유효 성분 확인 및 물질 규명(1세부 연계) 	<ul style="list-style-type: none"> ○천연 방충 물질의 구성성분 구조 및 특성을 고려한 분획방법을 고안 ○분리된 단일 물질의 구조 및 특성을 확인하기 위해 NMR (ex. ¹H, ¹³C), UV, MS 등의 다양한 분광학적 방법을 이용함. ○분획된 단일 성분들 중 대상 해충에 대해 가장 방충력이 우수한 물질을 선정 ○우수한 방충력을 지니는 단일 성분의 물질을 규명

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
3차 년도 (2020)	곡류 저장 안전성 향상을 위한 천연 유래 방충 유효 단일 성분 규명 및 대량 생산 방안 탐색	유효성분 조합물질 및 대량 생산 시제품에 대한 대상해충 방충효과 검증 천연 방충 유효성분에 대한 방충성능 DB구축	<ul style="list-style-type: none"> ○유효성분 조합에 대한 대상 해충의 방충효과 검증 ○천연 유래 단일 성분의 최적 조합비 기반으로 제조된 방충시제품에 대한 대상 해충의 방충효과 검증 ○검증된 방충물질의 곡물저장 현장 적용 소재 	<ul style="list-style-type: none"> ○2차 년도에 작성된 방충효과 기반 대상 탐색식물, 추출방법, 유효성분 종류(분자구조, 분자량 등) 및 함유량 database를 활용하여 협동연구기관에서 제조된 유효성분 조합물(조합비율, 농도 별)을 대상으로 방충효과, 지속성을 검증함 (Olfactometer 등 적용) ○모든 방충효과 검증 실험(Olfactometer 등)은 물질 처리 후 경과시간에 따른 방충효과를 검증하여 방충물질의 방충효과와 지속성을 동시에 조사함

			탐색 및 적용가능성 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○방출효과를 기반으로 유효성분 종류(분자구조, 분자량 등) 및 함유량에 따른 database를 지속적으로 구축함 ○유효성분 조합(조합비율, 농도 별)에 대한 대상 해충의 방출효과 검증 결과를 비교 분석하여 최적 조합 물질을 선정함. ○협동연구기관이 대량생산 기술로 제조한 시제품을 대상으로 방출효과와 지속성을 검증(Olfactormeter 등 적용) ○개발된 천연유래 기반 방출물질을 곡물저장, 식품생산 현장에 직접적으로 적용 가능한 소재 탐색 및 최적 적용방법(제형, 농도, QC지표 등) 모색
천연 유래 방출 유효 단일 성분 규명 및 단일 성분 기반의 방출 합물 탐색	조합된 물질의 유기 합성 실험 시안 마련 및 합성 전/후 물질 간의 방출 효능 비교	<ul style="list-style-type: none"> ○천연 유래 단일 방출 성분을 이용한 천연 유래 곤충 제어 물질 생산 가능성 확보 ○천연 유래 곤충 제어 물질 생산을 위한 유기 합성 시안 마련 ○유기 합성된 천연 유래 곤충 제어 물질 분석 평가 	<ul style="list-style-type: none"> ○2 차 년도에 분리한 천연 유래 곡류 해충 제어 단일 성분의 유효성과 사업성을 검토하여 최적 방출 효과를 보이는 단일 성분 간의 최적 조합비를 확립함. ○곡류 저장 안정성을 위한 방출물 생산을 위해 최적 조합 물질을 이용한 방출물을 제조, 이의 실증화 검증을 주관기관과 같이 진행 ○최적 조합 물질의 생산 능력 향상 및 저비용으로 시행 가능한 유기합성법을 제시함 	

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
3차 년도 (2020)	곡류 저장 안정성을 위한 천연 유래 방출 유효 단일 성분 규명 및 대량 생산 방안 탐색	유효성분 조합 물질 및 대량 생산 시제품에 대한 대상해충 방출효과 검증 천연 방출 유효 성분에 대한 방출성능 DB구축	<ul style="list-style-type: none"> ○유효성분 조합에 대한 대상 해충의 방출효과 검증 ○천연 유래 단일 성분의 최적 조합비 기반으로 제조된 방출시제품에 대한 대상 해충의 방출효과 검증 ○검증된 방출물질의 곡물저장 현장 적용 소재 탐색 및 적용가능성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ○2차 년도에 작성된 방출효과 기반 대상 탐색식물, 추출방법, 유효성분 종류(분자구조, 분자량 등) 및 함유량 database를 활용하여 협동연구기관에서 제조된 유효성분 조합물(조합비율, 농도 별)을 대상으로 방출효과, 지속성을 검증함 (disc를 이용한 여지확산법, Olfactormeter 등 적용) ○모든 방출효과 검증 실험(disc를 이용한 여지확산법, Olfactormeter 등)은 물질 처리 후 경과시간에 따른 방출효과를 검증하여 방출물질의 방출효과와 지속성을 동시에 조사함 ○방출효과를 기반으로 유효성분 종류(분자구조, 분자량 등) 및 함유량에 따른 database를 지속적으로 구축함 ○유효성분 조합(조합비율, 농도 별)에 대한 대상 해충의 방출효과 검증 결과를 비교 분석하여 최적 조합 물질을 선정함. ○협동연구기관이 대량생산 기술로

				제조한 시제품을 대상으로 방충효과와 지속성을 검증함(disc를 이용한 여지확산법, Olfactormeter 등 적용) ○개발된 천연유래 기반 방충물질을 스프레이, 훈증제, 포장소재, 시설, 설비 코팅액, 도료 등과 같은 곡물저장 현장에 직접적으로 적용 가능한 소재 탐색 및 최적 적용방법(제형, 농도, QC지표 등) 모색
천연 유래 방충 유효 단일 성분 규명 및 단일 성분 기반의 방충 조합물 탐색	조합된 물질의 유기 합성 실현 시안 마련 및 합성 전/후 물질 간의 방충 효능 비교	○천연 유래 단일 방충 성분을 이용한 천연 유래 곤충 제어 물질 생산 가능성 확보 ○천연 유래 곤충 제어 물질 생산을 위한 유기 합성 시안 마련 ○유기 합성된 천연 유래 곤충 제어 물질 분석 평가	○2 차 년도에 분리한 천연 유래 곡류 해충 제어 단일 성분의 유효성과 사업성을 검토하여 최적 방충 효과를 보이는 단일 성분 간의 최적 조합비를 확립함. ○곡류 저장 안정성을 위한 방충물 생산을 위해 최적 조합 물질을 이용한 방충물을 제조, 이의 실증화 검증을 주관기관과 같이 진행 ○최적 조합 물질의 생산 능력 향상 및 저비용으로 시행 가능한 유기합성법을 제시함	

2-2. 연차별 연구수행 내용

가. 1차 년도 연구수행 내용

(1) 대상해충(화랑곡나방, 거릿쌀도둑거저리)의 대량사육 시스템을 통한 연령구조 체계 확립

(가) 본 연구의 대상 해충으로 선정된 나비목(Lepidoptera), 명나방과(Pyralidae)의 화랑곡나방(Indian meal moth)은 전 세계적으로 다양한 종류의 곡물과 저장물을 가해하는 저장해충으로 매우 심각한 피해를 야기하는 해충 종이며 저장곡물이나 식품을 갉아먹거나 섭식하여 직접적으로 제품의 수량이나 품질에 피해를 주거나 실크와 같은 분비물로 곡물을 칠하거나 배설물 등에 의하여 제품의 간접적인 피해를 초래한다. 또한, 딱정벌레목(Coleoptera), 거저리과(Tenebrionidae)인 거릿쌀도둑거저리(Red flour beetle)의 경우 쌀뿐만 아니라 옥수수, 밀, 보리 등을 곡물을 주식으로 하는 우리나라를 비롯하여 동남아시아를 포함하여 전 세계적으로 저장 중인 곡물 및 저장시설, 곡류 가공시설 등에 발생하여 심각한 피해를 야기하고 있다. 그림 1과 2에 대상해충인 화랑곡나방과 거릿쌀도둑거저리를 나타냈다.



그림 1. 화랑곡나방 성충, 유충, 알



그림 2. 거릿쌀도둑거저리 성충

(나) 화랑곡나방의 대량사육 및 연령구조 조절

본 연구에 사용된 화랑곡나방(*Plodia interpunctella* H.)은 (주)하이포스알앤씨 기업부설연구소 내 실험실에서 인공사료를 제공하여 누대사육한 계통으로, 다음과 같은 방법으로 연령구조를 조절하였다. 우화 후 48시간 미만의 화랑곡나방을 채집하여, 플라스틱 페트리디쉬 (직경 10cm)에서 24시간 산란 유도 후 알을 확보하였다. 여기에 인공사료를 투입하여 대상해충을 발육시켰다. 인공사료는 다음과 같은 방법으로 제조되었으며 (쌀겨 800g, yeast extract 200g, glycerol 500ml, methyl p-hydroxybenzoate 2g, sorbic acid 2g) 대상해충에게 제공되었다. 사료제공 후 온도 30±0.5℃, 상대습도 60~70%, 항온항습기(JISICO)에서 대량 사육하면서 연구에 필요한 발육단계 별 곤충을 사용하였으며, 위의 방법을 반복하면서 화랑곡나방의 대량사육을 유지하고 연령구조를 조절하였다.



그림 3. 화랑곡나방의 대량사육 및 연령구조 조절

(다) 거릿쌀도둑거저리의 대량사육 및 연령구조 조절

본 연구에 사용된 거릿쌀도둑거저리(*Tribolium castaneum* H.)은 (주)하이포스알앤씨 기업부설연구소 내 실험실에서 밀가루와 밀기울(bran)을 혼합 제공하여 누대사육한 계통으로, 다음과 같은 방법으로 연령구조를 조절하였다. 거릿쌀도둑거저리 사육용기에서 성충을 30마리씩 채집하여 밀가루와 밀기울을 50:50으로 혼합하여 투입한 플라스틱 사육용기(직경 120cm, 높이 80cm)에 접종한 후 48시간 산란을 유도 후 새로운 먹이가 투입된 사육용기로 계속 옮겨주면서 거릿쌀도둑거저리 개체를 대량으로 확보하였으며, 이렇게 처리된 사육용기를 온도 28±0.5℃, 상대습도 60~70%, 항온항습기(JISICO)에서 보관, 대량 사육하면서 연구에 필요한 곤충을 확보하였으며, 위의 방법을 반복하면서 거릿쌀도둑거저리의 대량사육을 유지하고 연령구조를 조절하였다.



그림 4. 거짓쌀도둑거저리의 대량사육 및 연령구조 조절

(라) 본 연구를 위하여 선정된 대상해충인 화랑곡나방과 거짓쌀도둑거저리의 감수성 개체를 지속적인 실험실내 누대사육을 통하여 확보하였으며, 앞에서 언급한 방법으로 대량사육 시스템을 구축하여 연령구조 체계를 조절, 확립하였다. 따라서 대상해충들의 대량사육 시스템의 확립으로 인하여 연구에 필요한 연령구조가 일정한 공시충들의 안정적 공급이 가능하게 되었다.

(2) 대상해충에 대한 방충효과 검증 및 효율검증 기술 표준화

(가) 기존의 연구 등에서 시행된 방충물질에 대한 해충들의 방충효과 및 기피효과 검증에 적용된 실험법을 종합, 분석하여 적용물질의 방충효과의 유무 및 방충효과의 지속성 검증과 신뢰할 수 있는 방충효과의 검증을 위하여 검증기술, 방법의 표준화를 제시하고자 하였다.

(나) 방출물질에 대한 대상해충의 방충 및 기피효과의 효율적인 효과 검증을 위하여 가장 기본적으로 사용되는 종이 Disc를 이용한 여지확산법과 기피테스트 관을 이용하여 기피효과를 검증하는 것이 바람직하다고 판단되었다. 기피효과 검증 방법은 여지확산법과 기피테스트 관 중 대상해충의 발육단계에 따라 선택하는 것이 바람직하다고 판단되었다. 여지확산법의 경우 대상해충의 성충과 유충에 모든 발육단계에 적절하게 적용되어질 수 있으며, 기피테스트 관의 경우는 비교적 운동성이 뛰어난 성충에 효과 검증이 유리한 것으로 생각되었으나 두 기피검증 방법 모두 대상해충 종의 특성을 고려하여 선택하여야 할 것으로 판단되었다.



그림 5. 종이 Disc를 이용한 여지확산법

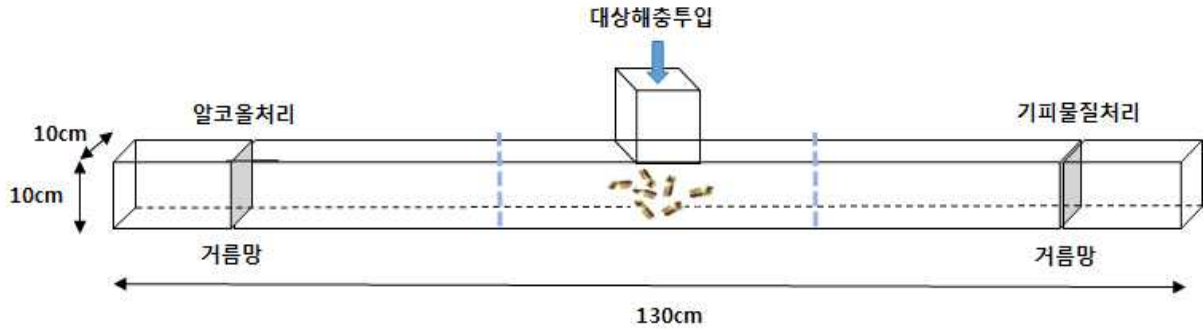


그림 6. 대상해충 기피효과 검증을 위한 기피테스트 관의 모식도

(다) 선발 방충물질의 대상해충에 대한 효과, 성능의 신뢰성을 높이기 위하여 기피율과 방충 효과 지속성에 대한 표준지표를 제시하고자 하였으며 표 1에 나타내었다. 방충물질의 방충, 기피효과의 경우 90%의 통계적 신뢰수준에서 유의성을 갖는 기피율(%)을 지표로 삼으며, 대상해충에 대한 방충 지속성은 6개월 정도가 지속되어야 타당할 것으로 판단되었으며, 방충효과와 지속성 분석은 (주)하이포스알앤씨 기업부설연구소 내 실험실에서 진행되었다.

표 1. 주요 성능 지표 개요

< 주요 성능지표 개요 >					
주요 성능지표	단위	최종 개발목표	세계최고수준 (보유기업/보유국)	가중치 (%)	측정기관
1. 방충효과(기피율)	%	90% 통계유의성	-	10	고려대학교
2. 방충지속성	개월	6개월	-	10	고려대학교

(3) 곡물 저장 안전성 확보를 위하여 식품공전에 등재된 2차 대사물질 발현 식물 탐색

○ 식품 공전에 등재된 식용, 약용 식물을 대상으로 해충에 살충, 기피, 방충, 혼중 효과를 보이는 2차 대사물질을 함유한 식물 84종을 문헌검색을 통해 탐색하고 이 중 저장해충에 방충, 기피효과를 보인다고 보고된 한약재와 선행연구를 통해 효과가 검증된 한약재 중 현재 구입 가능한 계피(*Cinnamomum japonicum*), 고련피(*Melia azedarach*), 금은화(*Lonicera japonica* Thunberg), 모과(*Chaenomeles sinensis*), 산수유(*Cornus officinalis*), 석류피(*Punica granatum*), 시라자(*Anethum graveolense*), 오매(*Prunus mume*), 오배자(*Rhus javanica*), 인진(*Artemisia capillaris*), 행인(*Prunus armeniaca*), 황금(*Scutellaria baicalensis*), 황백(*Phellodendron amurense*) 등 총 13가지 식물을 1차로 선발하여 이들의 추출물에 대한 대상해충의 방충효과를 검증하였다. 선발된 13종의 식물들은 모두 식품 공전에 등록된 것으로 대상해충에는 방충, 기피효과를 나타내는 것으로 알려져 있으나 인축에는 해가 적어 곡물을 저장 할 시 식품 안전성에는 크게 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다.

(4) 탐색식물 추출물에 대한 방충효과 스크리닝

(가) 대상해충에 방충 및 기피효과를 보인다고 알려진 식물체를 선발한 후 이들의 추출물을

이용하여 대상해충인 나비목의 화랑곡나방 유충, 성충과 딱정벌레목에서 전 세계적으로 저곡 및 저곡저장, 가공시설에 커다란 피해를 야기하는 거짓쌀도둑거저리 성충에 대하여 각 식물체 추출물의 기피활성 효과를 시험하였다. 13종의 선정된 식물체들의 추출물은 1000ml 비이커에 증류수 20과 에탄올 80의 비율로 혼합한 용매에 미세하게 제분한 식물체를 넣고 초음파분산기(sonics, 미국)를 이용하여 2시간 혼합한 후 24시간 식물체를 침전시키고, 상등액을 모아 진공회전농축기(EYELA; N-1100)를 이용하여 중량대비 60%의 농도로 물질을 농축시켜 각 식물체에 대한 추출물을 확보하였으며, 이를 3% 농도로 희석하여 사용하였다. 약용, 식용식물로부터 방충효과를 보이는 기피물질 추출 과정과 이들 추출물의 대상해충에 대한 기피효과 극대화를 위한 검증 과정을 그림 7에 보였다.

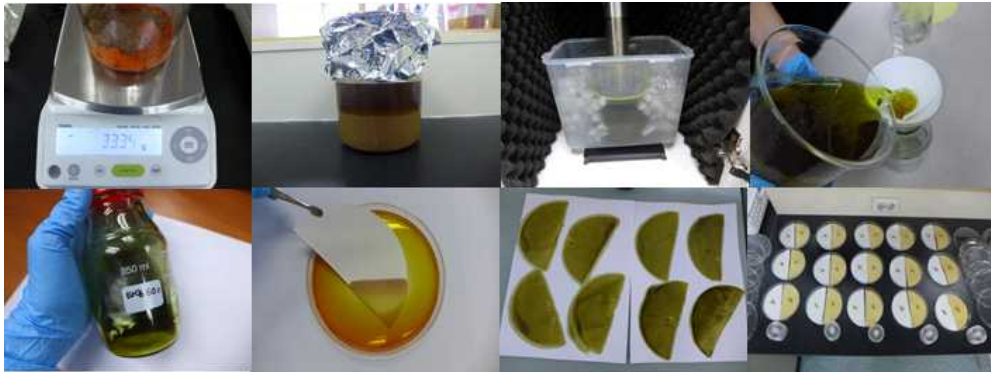


그림 7. 기피물질 추출 및 대상해충에 대한 기피효과 검증 과정

대상해충에 대한 기피물질 후보군 기피활성 효과시험은 여지확산법을 이용하여 검증하였는데, 직경 14cm의 여과지를 반으로 자른 후 각 한약재 추출물을 침지시킨 후 24시간 동안 용매를 휘발시키고 나서 각 추출물이 처리된 여과지와 추출물 무처리 여과지를 함께 직경 14cm의 페트리디쉬에 넣었다. 여과지의 반은 추출물처리, 나머지 반은 추출물 무처리된 여과지가 들어있는 페트리디쉬에 활력이 우수한 화랑곡나방 4령 유충과 우화 후 3주 미만의 거짓쌀도둑거저리 성충 각 10마리를 접종하였다. 접종 후 1, 3, 6, 9, 24, 48시간 간격으로 화랑곡나방 유충과 거짓쌀도둑거저리 성충의 분포 양상 및 개체수를 육안으로 조사하였다.

선정된 식물체 추출물에 대한 기피활성 실험은 각 해충별로 4반복씩 수행되었으며 무처리구와 기피물질 처리구 간 차이의 분석은 Student's t-test를 이용하여 분석하였고 각 선정 기피물질에 대한 화랑곡나방 유충과 거짓쌀도둑거저리 성충의 기피율은 다음의 식으로 계산되었다.

$$\text{기피율(\%)} = (N_c - N_t) / (N_c + N_t) \times 100$$

여기서 N_c 는 무처리구에 있는 개체수, N_t 는 기피물질 처리구에 있는 개체수를 나타낸다. 표 2에 선정된 식물체로부터 추출한 기피물질에 대한 화랑곡나방 유충과 거짓쌀도둑거저리 성충의 기피율(%)을 나타냈다.

표 2. 각 기피물질에 대한 화랑곡나방 유충과 거짓쌀도둑거저리 성충의 기피율

기피물질(3%)	기피율(%)	
	화랑곡나방	거짓쌀도둑거저리
계피	24.17±2.19	0.84±1.96
고련피	19±1.9	26±1.84
금은화	0.83±1.78	-16.67±2.12
모과	31.67±1.5	5.83±1.97
산수유	-4.17±1.22	32.5±1.88
석류피	31.67±1.44	-7.5±2.04
시라자	11.67±1.82	8.33±1.91
오매	20.00	19.17
오배자	25±1.67	31.67±1.91
인진	-5.83±1.71	15±2.19
행인	20.83±1.27	-20±2.25
황금	29.33±1.52	24.17±2.34
황백	35.83±1.47	21.67±1.95

(나) 선정된 13종의 식물체로부터 추출한 방충, 기피물질에 대한 대상해충인 화랑곡나방 유충과 거짓쌀도둑거저리 성충의 기피효과를 검증한 결과, 조사시간 전 시간에 걸친 기피율이 계피(*Cinnamomum japonicum*)에서는 화랑곡나방 유충의 경우 24.17%로 높게 나타났으며, 거짓쌀도둑거저리 성충에서는 기피율이 0.84%로 다소 낮게 조사되었다. 고련피(*Melia azedarach*)의 경우 화랑곡나방 유충에서 19%, 거짓쌀도둑거저리 성충에서 26%로 대상해충 2종에서 모두 비교적 높은 기피율을 나타내어 기피효과가 좋은 것으로 판단되었으며, 금은화(*Lonicera japonica* Thunberg)의 경우는 화랑곡나방 유충에서 0.83%, 거짓쌀도둑거저리 성충에서 -16.67%의 기피율을 나타내 화랑곡나방에서는 다소 낮은 기피효과를 보였으나 거짓쌀도둑거저리 성충에서는 오히려 끌리는 경향을 보여 기피효과가 없는 것으로 나타났다. 모과(*Chaenomeles sinensis*)에서는 화랑곡나방 유충에서 31.67%로 매우 높은 기피율을 나타냈으며, 거짓쌀도둑거저리 성충에서도 5.83%의 기피율을 보여 대상해충 2종 모두에서 기피효과가 있는 것으로 판단되었다. 산수유(*Cornus officinalis*)의 경우 화랑곡나방 유충에서 -4.17%로 기피효과가 없고 오히려 끌리는 현상을 보였으나 거짓쌀도둑거저리 성충에서는 32.50%의 높은 기피율을 보여 기피효과가 있는 것으로 나타났다. 석류피(*Punica granatum*)에서는 화랑곡나방 유충에서 31.67%의 높은 기피율을 보여 기피효과가 있는 것으로 나타났으나 거짓쌀도둑거저리 성충에서는 -7.50%로 오히려 끌리는 현상을 보여 기피효과가 없는 것으로 나타났다. 시라자(*Anethum graveolense*)의 경우 화랑곡나방 유충에서 11.67%의 기피율을 보였으며 거짓쌀도둑거저리 성충에서도 8.33%의 기피율을 보여 대상해충 2종 모두에 대해서 기피효과가 있는 것으로 판단되었다. 오매(*Prunus mume*)의 경우 화랑곡나방 유충에서 20%의 기피율을 보였고 거짓쌀도둑거저리 성충에서도 19.17%로 화랑곡나방의 기피율과 유사한 기피율을 보여 대상해충 2종 모두에서 비교적 기피효과가 좋은 것으로 판단 할 수 있었다. 오배자(*Rhus javanica*)의 경우는 화랑곡나방 유충에서 25%의 기피율, 거짓쌀도둑거저리 성충에서도 31.67%의 기피율을 보여 대상해충 2종 모두에 대해서 비교적 훌륭한 기피효과를 나타낸 것을 알 수 있었다. 또한, 인진(*Artemisia capillaris*)에서는 화랑곡나

방 유충에서는 -5.83%의 기피율로 기피효과가 없는 것으로 나타났으나 거짓쌀도둑거저리 성충에서는 15%의 기피율을 보여 기피효과가 있는 것으로 나타났다. 행인(*Prunus armeniaca*)의 경우 화랑곡나방 유충에서 20.83%의 비교적 높은 기피율을 나타냈으나 거짓쌀도둑거저리 성충에서는 -20%의 기피율로 기피효과가 없는 것으로 나타났다. 황금(*Scutellaria baicalensis*)에서는 화랑곡나방 유충의 경우 23.33%의 기피율, 거짓쌀도둑거저리 성충에서도 24.17%의 기피율로 대상해충 2종 모두에 대해서 비슷한 기피율을 나타내어 기피효과가 비교적 좋은 것으로 판단되었다. 마지막으로 황백(*Phellodendron amurense*)의 경우는 화랑곡나방 유충에서 35.83%의 기피율을 보여 상당히 높은 기피효과를 나타냈으며, 거짓쌀도둑거저리 성충에서도 21.67%의 기피율로 대상해충 2종 모두에 대해서 비교적 높은 기피효과를 기대할 수 있었다.

이러한 결과는 동일종의 식물체 추출물이라 할지라도 대상해충의 종에 따라 기피효과가 크게 달라질 수 있음을 암시하는 것으로 대상해충에 대한 기피물질의 적절한 선택과 적용이 필요한 것으로 판단되어지며 대상해충의 특성을 파악하여 기피물질을 적용하여만 대상해충에 대한 적절한 기피효과를 얻을 수 있다고 판단되었다.

(다) 그림 8~20 등에 실험 용기에 대상해충 투입 후 1, 3, 6, 9, 24, 48시간 경과에 따른 각 식물체 추출물에 대한 대상해충인 화랑곡나방 유충과 거짓쌀도둑거저리 성충의 개체수 변동양상과 무처리구와 기피물질 처리구 간 대상해충의 통합 개체수 비교를 나타내었다.

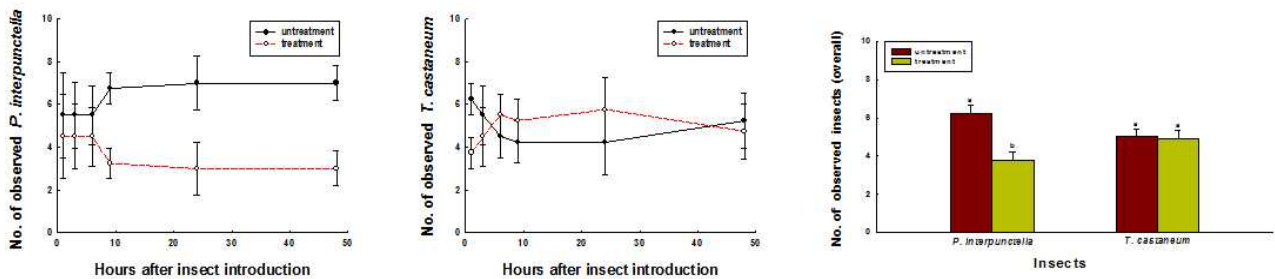


그림 8. 계피 처리 시 화랑곡나방 유충과 거짓쌀도둑거저리 성충의 시간경과에 따른 개체수 변동과 무처리구와 처리구에서의 통합 밀도 비교

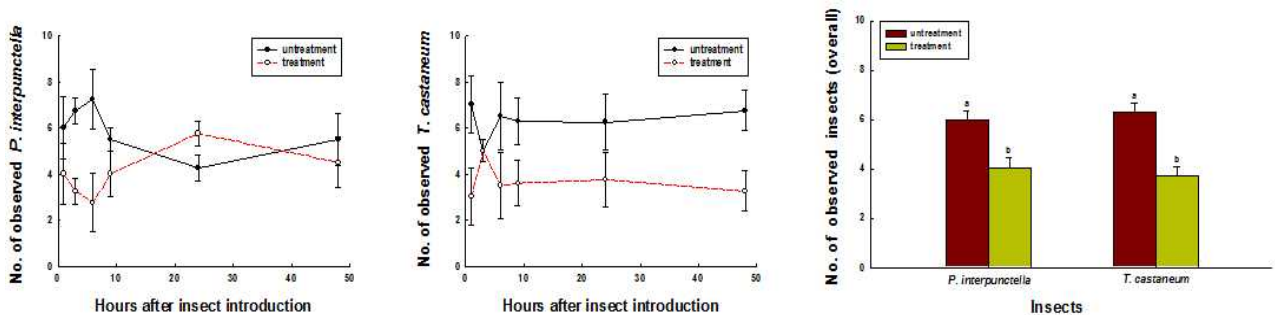


그림 9. 고련피 처리 시 화랑곡나방 유충과 거짓쌀도둑거저리 성충의 시간경과에 따른 개체수 변동과 무처리구와 처리구에서의 통합 밀도 비교

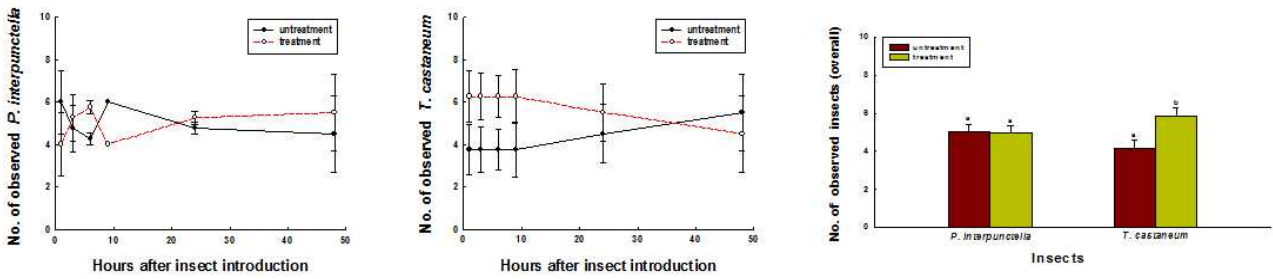


그림 10. 금은화 처리 시 화랑곡나방 유충과 거짓쌀도둑거저리 성충의 시간경과에 따른 개체수 변동과 무처리구와 처리구에서의 통합 밀도 비교

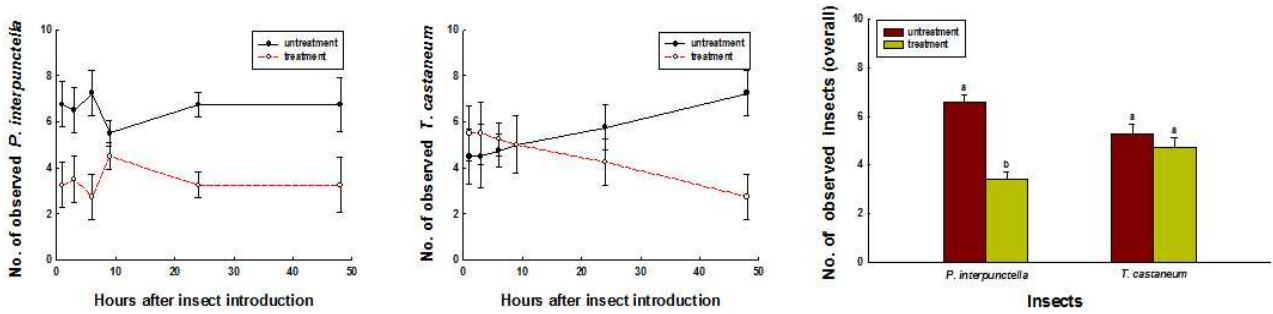


그림 11. 모과 처리 시 화랑곡나방 유충과 거짓쌀도둑거저리 성충의 시간경과에 따른 개체수 변동과 무처리구와 처리구에서의 통합 밀도 비교

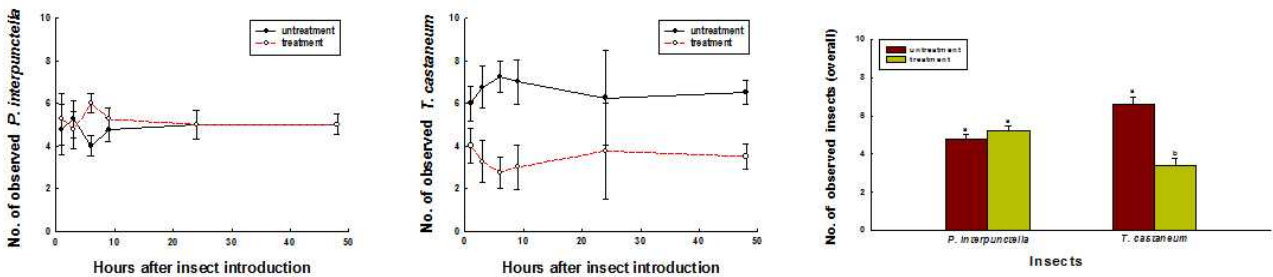


그림 12. 산수유 처리 시 화랑곡나방 유충과 거짓쌀도둑거저리 성충의 시간경과에 따른 개체수 변동과 무처리구와 처리구에서의 통합 밀도 비교

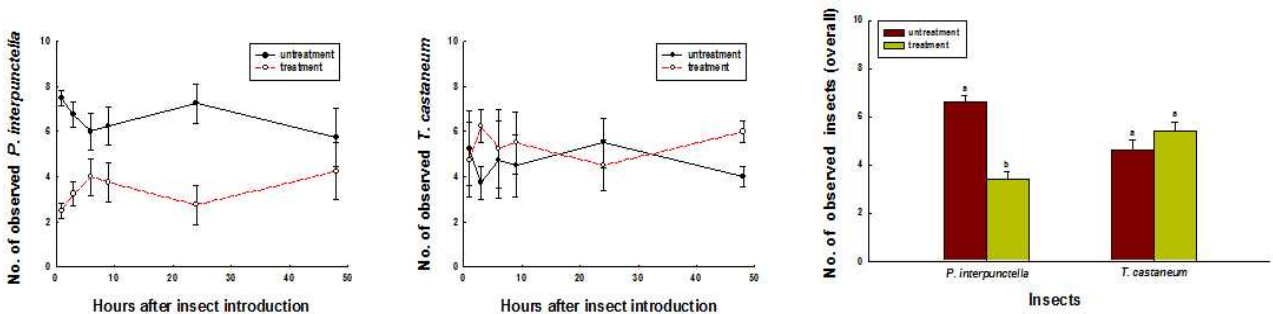


그림 13. 석류피 처리 시 화랑곡나방 유충과 거짓쌀도둑거저리 성충의 시간경과에 따른 개체수 변동과 무처리구와 처리구에서의 통합 밀도 비교

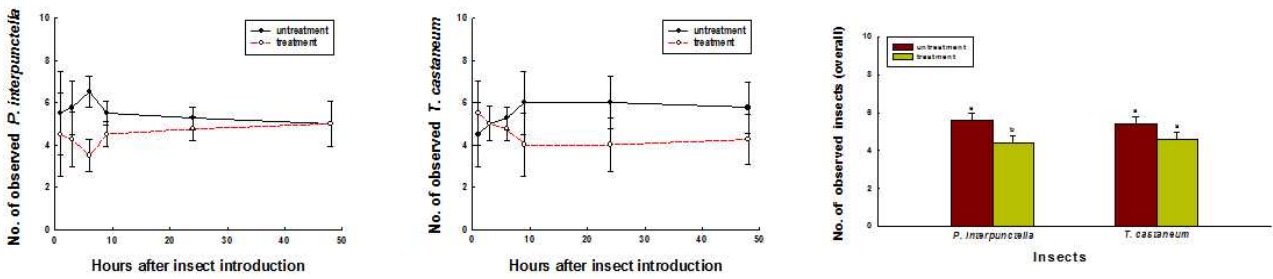


그림 14. 시라자 처리 시 화랑곡나방 유충과 거짓쌀도둑거저리 성충의 시간경과에 따른 개체수 변동과 무처리구와 처리구에서의 통합 밀도 비교

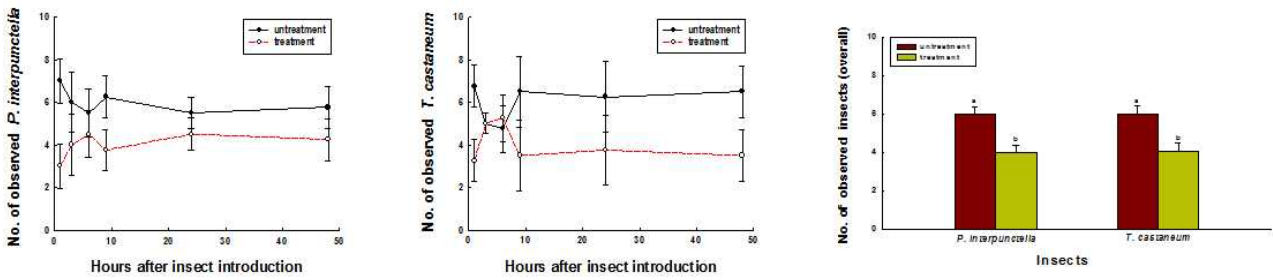


그림 15. 오매 처리 시 화랑곡나방 유충과 거짓쌀도둑거저리 성충의 시간경과에 따른 개체수 변동과 무처리구와 처리구에서의 통합 밀도 비교

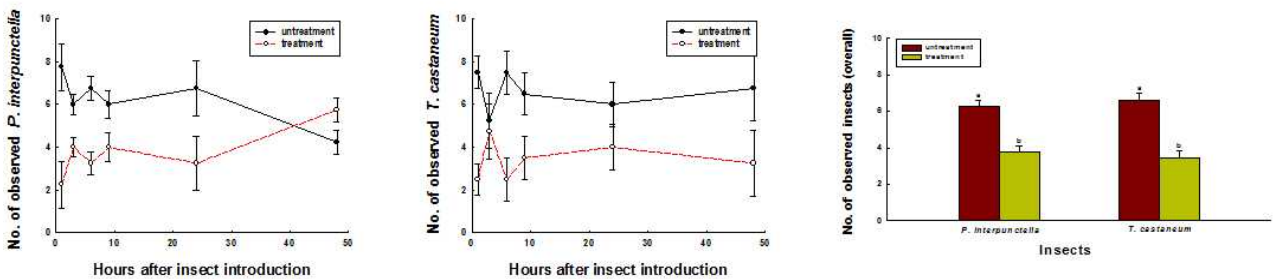


그림 16. 오배자 처리 시 화랑곡나방 유충과 거짓쌀도둑거저리 성충의 시간경과에 따른 개체수 변동과 무처리구와 처리구에서의 통합 밀도 비교

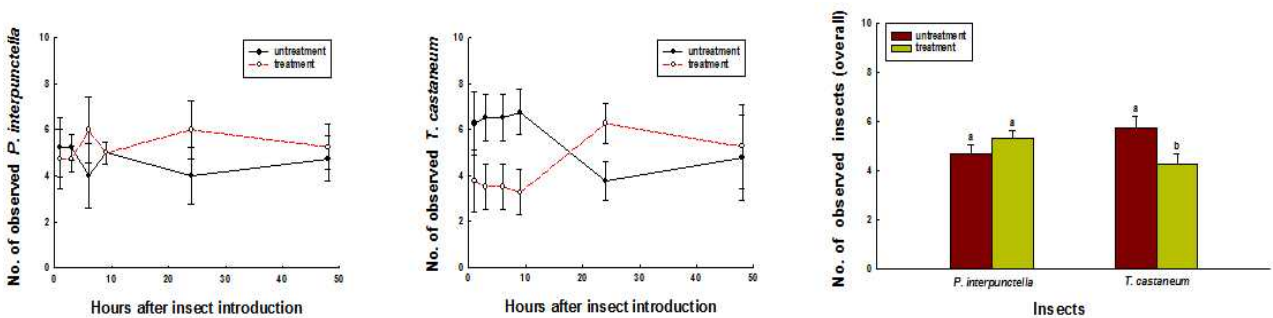


그림 17. 인진 처리 시 화랑곡나방 유충과 거짓쌀도둑거저리 성충의 시간경과에 따른 개체수 변동과 무처리구와 처리구에서의 통합 밀도 비교

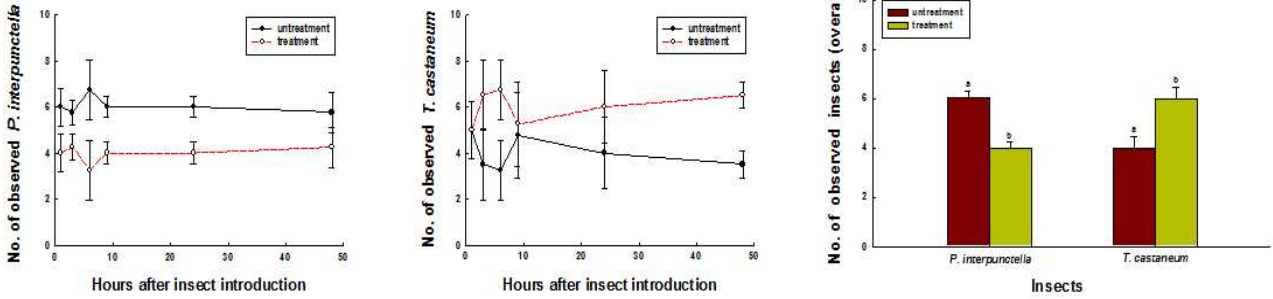


그림 18. 행인 처리 시 화랑곡나방 유충과 거짓쌀도둑거저리 성충의 시간경과에 따른 개체수 변동과 무처리구와 처리구에서의 통합 밀도 비교

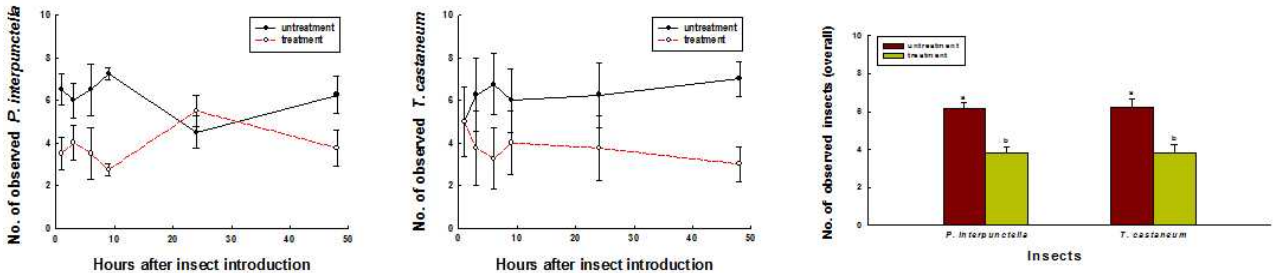


그림 19. 황금 처리 시 화랑곡나방 유충과 거짓쌀도둑거저리 성충의 시간경과에 따른 개체수 변동과 무처리구와 처리구에서의 통합 밀도 비교

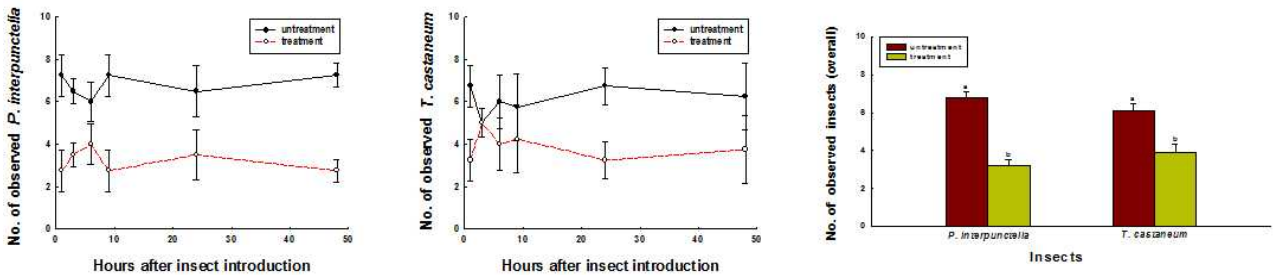


그림 20. 황백 처리 시 화랑곡나방 유충과 거짓쌀도둑거저리 성충의 시간경과에 따른 개체수 변동과 무처리구와 처리구에서의 통합 밀도 비교

선정된 각 식물체 추출물에 대한 화랑곡나방 유충과 거짓쌀도둑거저리 성충의 기피활성 시험 결과 산수유와 인진을 제외한(산수유: $df=46$, $t=-1.19$, $P>0.05$, 인진: $df=46$, $t=-1.18$, $P>0.05$) 대부분 종류의 식물체 추출물의 경우 화랑곡나방 유충에 대해서 기피효과가 있는 것으로 나타났으며(계피: $df=46$, $t=3.83$, $P<0.05$, 고련피: $df=46$, $t=3.15$, $P<0.05$, 금은화: $df=46$, $t=0.16$, $P>0.05$, 모과: $df=46$, $t=7.31$, $P<0.05$, 석류피: $df=46$, $t=7.61$, $P<0.05$, 시라자: $df=46$, $t=2.23$, $P<0.05$, 오매: $df=46$, $t=4.03$, $P<0.05$, 오배자: $df=46$, $t=5.17$, $P<0.05$, 행인: $df=46$, $t=5.69$, $P<0.05$, 황금: $df=46$, $t=5.31$, $P<0.05$, 황백: $df=46$, $t=8.42$, $P<0.05$), 시간경과에 따른 화랑곡나방 유충의 개체수 조사 결과도 식물체 추출물이 처리된 여과지에서 무처리 여과지에서 보다 더 적은 개체가 조사되어 기피효과 분석과 유사한 결과를 나타냈다. 그러나 시간이 경과할수록 기피물질 처리와 무처리 여과지 간에 개체수의 차이가 보이지 않는 현상이 나타났는데, 이러한 현상 즉 시간이 경과함에 따라 무처리구와 처리구 간에 대상해충의 개체수의 차이가 없어지는 이유는 실험장인 페트

리디시 내부의 기피물질 성분의 역치가 올라가 무처리구와 처리구 간에 성분의 차이가 없어졌기 때문이라 생각되어진다. 따라서 실험장이 아닌 실제 시설이나 제품에 적용하는 경우 기피효과가 장기간 지속 될 것이라 생각되었다. 또한, 각 식물체 추출물에서의 시간경과에 따른 거짓쌀도둑거저리 성충의 개체수 변동 양상은 금은화, 석류피, 행인 등을 제외하고(금은화: $df=46$, $t=-2.72$, $P<0.05$, 석류피: $df=46$, $t=-1.27$, $P>0.05$, 행인: $df=46$, $t=-3.09$, $P<0.05$) 대부분의 식물체 추출물에서 처리구 보다 무처리구에서 더 많은 대상해충의 개체수가 조사되어 전반적으로 기피효과가 있는 것으로 나타났으며, 추출물 처리구와 무처리 여과지 간 거짓쌀도둑거저리 성충 개체수에서도 차이를 보여 대부분의 추출물에서 기피효과가 있는 것으로 나타났으며(계피: $df=46$, $t=0.15$, $P>0.05$, 고련피: $df=46$, $t=4.47$, $P<0.05$, 모과: $df=46$, $t=1.03$, $P>0.05$, 산수유: $df=46$, $t=5.98$, $P<0.05$, 시라자: $df=46$, $t=1.51$, $P>0.05$, 오매: $df=46$, $t=3.20$, $P<0.05$, 오매자: $df=46$, $t=5.75$, $P<0.05$, 인진: $df=46$, $t=2.37$, $P<0.05$, 황금: $df=46$, $t=3.58$, $P<0.05$, 황백: $df=46$, $t=3.84$, $P<0.05$) 특히, 산수유와 오매자 추출물에서 기피효과가 큰것으로 나타났다.

(라) 대상해충에 대한 방충효과 검증 및 효율검증 기술의 표준화를 위하여 종이 disk를 이용한 여지확산법 실험 시 화랑곡나방 유충의 벽, 뚜껑으로 이동되어 기피효과 분석이 부정확하게 되는 점을 보완하는 실험법을 고안하기 위해 기피테스트 관을 제작하고 화랑곡나방 유충을 이용하여 disc test로 스크리닝을 추출물 중 효과가 좋은 그룹의 계피와 효과가 중간 그룹인 오매를 대상으로 화랑곡나방 성충을 사용하여 기피효과가 유충과 유사하게 발현되는지를 검증하였으며 곡물 중 독성이 있다고 알려진 조와 메밀, 특유한 향이 강하다고 알려진 감초, 치자 추출물을 활용하여 기피테스트 관의 활용가능성을 조사하였다. 기피물질의 대상해충에 대한 기피효과 검증에 사용된 기피테스트 관의 모식도를 앞의 그림 6에 나타내었다. 아크릴로 제작된 기피테스트 관을 이용한 기피효과 검증은 화랑곡나방 성충에 대하여 진행되었으며, 검증방법은 테스트 관의 양끝단 부위에 거름망을 2겹 덮고 한쪽 거름망에는 스프레이로 알코올(무처리)을 2회 분사하였으며, 다른 한쪽 거름망에는 3%로 희석한 기피물질(처리)을 2회 분사하였다. 기피테스트 관의 중앙 윗부분으로 우화 후 48시간 미만의 화랑곡나방 성충 30마리를 투입하고 덮개를 이용하여 외부와 차단하였다. 화랑곡나방 성충 투입 후 10분 간격으로 60분 동안 무처리구, 중앙, 처리구 부분에 있는 화랑곡나방 성충의 개체수를 육안으로 조사하였다. 기피실험은 기피물질 별로 각 3반복씩 수행하였으며, 기피율은 앞의 여지확산법에서 이용한 공식을 사용하여 산출하였으며 무처리구와 기피물질 처리구 간 차이의 분석은 Student's t-test를 이용하여 분석하였다. 그림 21에 기피테스트 관을 이용한 선발 기피물질에 대한 화랑곡나방 성충의 기피효과 검증과정을 나타냈다.

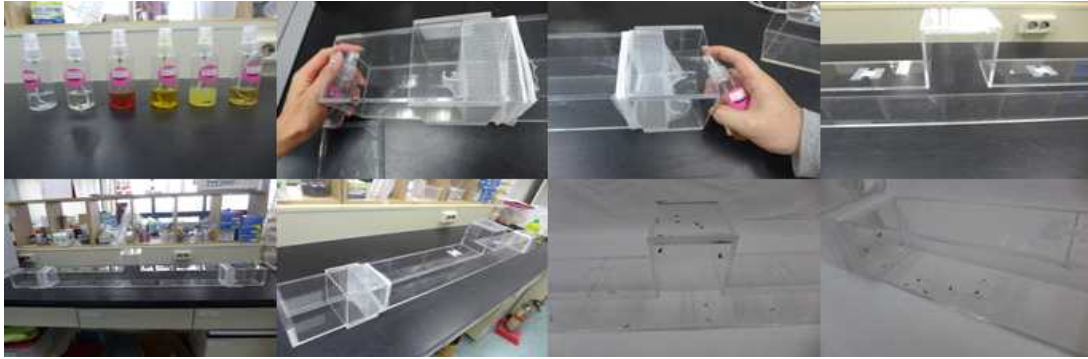


그림 21. 기피테스트 관을 이용한 화랑곡나방 성충의 기피효과 검증

표 3에 기피테스트 관을 이용한 선발 기피물질에 대한 화랑곡나방 성충의 기피율(%)을 나타냈다.

표 3. 기피테스트 관을 이용한 기피물질에 대한 화랑곡나방 성충 기피율

기피물질(3%)	기피율(%)
계피	55.47
조	-29.62
오매	12.42
감초	14.18
치자	17.22
메밀	-15.52

기피테스트 관을 이용하여 선발 기피물질에 대한 화랑곡나방 성충의 기피율은 계피 (*Cinnamomum japonicum*)에서 55.47%로 가장 높게 조사되어 기피효과가 좋은 것으로 나타났으며 계피보다 향이 강하지 않은 오매(*Prunus mume*)의 경우 12.42%, 방충효과는 알려져 있지 않으나 특이한 향이 나는 감초(*Glycyrrhiza uralensis*)와 치자(*Gardenia jasminoides*)에서는 각각 14.18%, 17.22%의 기피율을 나타내어 화랑곡나방 성충은 방충성분 뿐만 아니라 향에 의해서도 기피효과가 유발되며 화랑곡나방 성충을 공시충으로 한약재에 방충성분이 포함되어 있는지 여부를 판단할 때 휘발기피 효과에 대한 판단은 가능하나 접촉기피 효과에 대한 판단은 어려울 것으로 판단되었다. 또한 향이 거의 나지 않는 조(*Setaria italica*)와 메밀(*Fagopyrum esculentum*)의 경우는 각각 -29.62%, -15.52%의 기피율을 보여 오히려 기피물질 처리구 부분으로 끌리는 현상을 나타내어 휘발기피 효과가 없는 것으로 나타났다. 그림 22에 기피테스트 관을 이용한 기피물질 무처리구와 처리구에서의 화랑곡나방 성충 통합 개체수 비교 상황을 나타냈다.

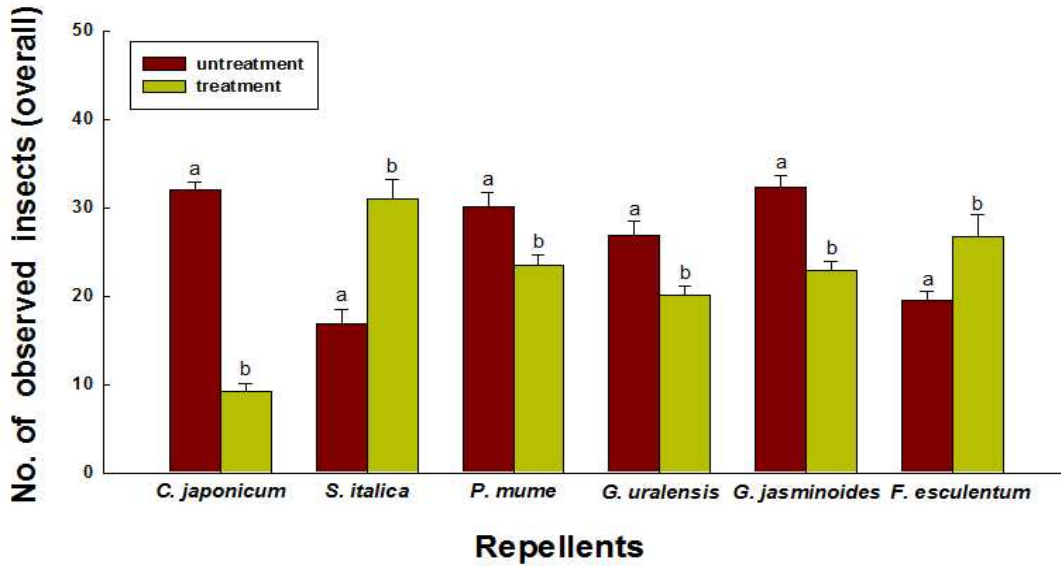


그림 22. 기피물질 무처리구와 처리구에서의 화랑곡나방 성충 통합 밀도 비교

기피테스트 관을 이용한 선발 식물체 추출물에 대한 화랑곡나방 성충의 기피물질 처리구와 무처리구 간 밀도비교의 결과, 계피에서는 기피물질 무처리구에서 화랑곡나방 성충의 개체수가 많이 관측되어 통계적으로 유의하게 기피효과가 있는 것으로 나타났으며(df=10, t=17.21, P<0.05), 조와 메밀의 경우 기피물질 무처리구에서 보다 처리구에서 화랑곡나방 성충 개체수가 유의하게 많이 관측되어(조: df=10, t=-5.02, P<0.05, 메밀: df=10, t=-2.62, P<0.05) 기피효과가 없는 것으로 판단되었으며, 이외에 오매, 감초, 치자의 경우는 기피물질 처리구에서 보다 무처리구에서 대상해충의 개체가 더 많이 관측되어 통계적으로 유의하게 기피효과가 있는 것으로 나타났다(오매: df=10, t=3.39, P<0.05, 감초: df=10, t=3.42, P<0.05, 치자: df=10, t=5.48, P<0.05).

(마) 이러한 결과는 동일한 기피물질을 처리한다 하더라도 대상해충의 발육단계나 검증방법에 따라 공시충에서의 기피율의 차이가 다소 생길 수 있음을 암시하는 것으로 기피, 방충물질의 연구 대상해충에 대한 효과적이고 적절한 기피효과를 검증하기 위해서는 한 가지 기피효과 검증법에 의존하지 말고 여러 연구에서 제안된 여러 가지의 검증법을 조사, 분석한 후 적절한 검증법을 선택, 이용하여 효과를 검증하는 것이 타당하다고 생각되었다.

(5) 천연 유래 물질 중 대상 해충 제어를 위한 물질 선정

(가) 선행 연구 결과의 포괄적인 분석을 통해 방충 효과가 우수한 천연 유래 대상 해충 제어 물질 후보군을 제시하고 국외논문 분석을 통한 방충효과 물질을 탐색하였다.

번호	물질	효능	참고논문	비고
1	Derris elliptica	살충	Effects of root extract from derris (<i>Derris elliptica</i> Benth) on mortality and detoxification enzyme levels in the diamondback moth larvae (<i>Plutella xylostella</i> Linn.)	미얀마·타이·베트남·말레이시아
2	Mundulea	살충	The insecticidal properties of certain species of <i>Annona</i> and of an Indian strain of <i>Mundulea sericea</i> ("Supli")	
3	Tephrosia	살충	Insect antifeedants from <i>Tephrosia elata</i> Deflers	
4	Deguelia utilis	살충	Role of Botanicals in Termite Management	남 아 메

				리카
5	Citrus oil	기피	Repellent Effect of Extracts and Essential Oils of Citrus limon (Rutaceae) and Melissa officinalis (Labiatae) Against Main Malaria Vector, Anopheles stephensi (Diptera: Culicidae)	
6	Chrysanthemum cinerariaefolium	살충	The Production of Pyrethrins by Plant Cell and Tissue Cultures of Chrysanthemum cinerariaefolium and Tagetes Species	케냐
7	Ryania speciosa	살충	Toxicological and pharmacological studies on the powdered stem of Ryania speciosa, a plant insecticide	남 아 메 리카
8	Schoenocaulon officinale	살충	Partial synthesis of 3-O-vanilloylveracevine, an insecticidal alkaloid from Schoenocaulon officinale	
90	basil	기피	Repellent activities of the essential oils of four Sudanese accessions of basil (Ocimum basilicum L.) against Anopheles mosquito	
10	Lavender	기피	Fumigant insecticidal activity and repellent effect of five essential oils and seven monoterpenes on first-instar nymphs of Rhodnius prolixus	
11	Lemongrass	기피	Formulation of an effective mosquito-repellent topical product from lemongrass oil	
12	Lemon thyme	기피	Larvicidal effects of various essential oils against Aedes, Anopheles, and Culex larvae (Diptera, Culicidae)	
13	Rosemary	기피	Repellency of Rosemary Oil Against Myzus persicae in a Laboratory and in a Screenhouse	
14	Bay leaves	기피	Compounds from leaves of bay (Laurus nobilis L.) as repellents for Tribolium castaneum (Herbst) when added to wheat flour	
15	Fennel	기피	Comparison of repellency effect of mosquito repellents for DEET, citronella, and fennel oil	
16	Oregano	기피	Toxic and repellent activity of selected monoterpenoids (thymol, carvacrol and linalool) against the castor bean tick, Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae)	
17	Thyme	기피	Larvicidal effects of various essential oils against Aedes, Anopheles, and Culex larvae (Diptera, Culicidae)	
18	Alliums	기피	Toxicity and repellent effects of crude aqueous extracts of garlic (Allium sativum) on larval and adult Anopheles mosquitoes	
19	Chrysanthemums	기피	Repellent effects of pongam oil on settlement and oviposition of the common greenhouse whitefly Trialeurodes vaporariorum on chrysanthemum	
20	Marigolds	기피	Comparative analysis of larvicidal activity of essential oils of Cymbopogon flexuosus (Lemon grass) and Tagetes erecta (Marigold) against Aedes aegypti larvae	
21	Petunias	기피	The impact of an insecticide on insect flower visitation and pollination in an agricultural landscape	
22	Common lantanas	기피	Isolation of repellent ingredients from Lantana camara (Verbenaceae) flowers and their repellency against Aedes mosquitoes	
23	Corymbia citriodora	기피	Larvicidal effects of various essential oils against Aedes, Anopheles, and Culex larvae (Diptera, Culicidae)	호주
24	Eucalyptus spp.	기피	Repellent activity of essential oils: a review	포 르 투 갈
25	E. camaldulensis	기피	Eucalyptus essential oil as a natural pesticide	에 티 오 피아
26	Eugenia caryophyllus	기피	Efficacy of several essential oils as Culex and Aedes repellents	인도
27	Lippia spp	기피	Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing	케냐, 탄 자니아, 가나
28	L. javanica	기피	Local plants as repellents against Anopheles arabiensis, in	

			Mpumalanga Province, South Africa.	
29	<i>L. uckambensis</i>	기피	Insect-repellent textiles using green and sustainable approaches	
30	<i>L. cheraliera</i>	기피	Plant-based insect repellents	
31	<i>Lantana camara</i>	기피	Repellency of <i>Lantana camara</i> (Verbenaceae) flowers against <i>Aedes</i> mosquitoes.	케냐, 탄자니아
32	<i>O. suave</i>	기피	Evaluation of <i>Ocimum suave</i> (Willd) as a source of repellents, toxicants and protectants in storage against three stored product insect pests	
33	<i>O. basilicum</i>	기피	Larvicidal and repellent potential of <i>Albizzia amara</i> Boivin and <i>Ocimum basilicum</i> Linn against dengue vector, <i>Aedes aegypti</i> (Insecta: Diptera: Culicidae)	
34	<i>O. kilimandscharikum</i>	기피	Plant based products: use and development as repellents against mosquitoes: a review	
35	<i>O. forskolei</i>	기피	Identification of mosquito repellent odours from <i>Ocimum forskolei</i>	
36	<i>M.piperata</i>	기피	Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (<i>Mentha piperita</i>) oil	
37	<i>M. arvensis</i>	기피	esponse of <i>Tribolium castaneum</i> (Coleoptera: Tenebrionidae) and <i>Sitophilus oryzae</i> (Coleoptera: Curculionidae) to potential insecticide derived from essential oil of <i>Mentha arvensis</i> leaves	
38	<i>Pogostemon cablin</i>	기피	Repellent activity of essential oils: a review	인도, 말레이시아
39	<i>C. nardus</i>	기피	Repellent activity of essential oils: a review	
40	<i>C. martini</i>	기피	Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites	케냐
41	<i>C. citratus</i>	기피	Larvicidal, ovicidal and repellent activities of <i>Cymbopogon citratus</i> Stapf (Graminae) essential oil against the filarial mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> (Say) (Diptera : Culicidae)	남미
42	<i>C. winterianus</i>	기피	Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing	
43	<i>Pelargonium reniforme</i>	기피	Local plants as repellents against <i>Anopheles arabiensis</i> , in Mpumalanga Province, South Africa.	
44	<i>C. excavatus</i>	기피	Laboratory evaluation of traditional insect/mosquito repellent plants against <i>Anopheles arabiensis</i> , the predominant malaria vector in Ethiopia	
45	<i>Azadirachta indica</i>	기피	Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, <i>Azadirachta indica</i>	
46	<i>Tagetes minuta</i>	기피	Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina	
47	<i>A. monosperma</i>	기피	Larvicidal and repellent activity of extracts derived from aquatic plant <i>Echinochloa stagninum</i> against <i>Culex pipiens</i>	
48	<i>Daniellia oliveri</i>	기피	Chemical composition, antioxidant and cytotoxicity potential of <i>Daniellia oliveri</i> (Rolfe) Hutch. & Dalz	
49	<i>Glycine max</i>	기피		
50	<i>Zanthoxylum limonella</i>	기피	Microencapsulation of <i>Zanthoxylum limonella</i> oil (ZLO) in glutaraldehyde crosslinked gelatin for mosquito repellent application	태국
51	<i>Citrus hystrix</i>	기피	Insecticidal properties of <i>Citrus hystrix</i> DC leaves essential oil against <i>Spodoptera litura fabricius</i>	인도네시아

표 4. 방충 효과가 우수한 천연 유래 대상 해충 제어 물질 후보군

(6) 천연 유래 물질의 추출법 최적화

(가) 우선 국내외 논문분석을 통해 방충효과를 나타내는 허브, 향신료, 농작물 및 정유물질을

탐색하였고, 이후 유층 assay를 통해 실제 효과 여부를 판단한 후 사전 조사를 기반으로 특정 물질을 최적화하기 위한 방법(추출 온도, 시간)을 선정하며 이를 기반으로 초음파 병합을 통한 열수 추출과 에탄올 추출을 진행할 예정임.

① 초음파 병합을 통한 열수 추출법

논문을 참조하여 추출 온도는 40, 60, 80, 100°C로 추출시간은 2, 4, 6, 8 hr로 선정하였고 시료에 대한 용매비는(g/ml)0.1, 0.2, 0.3로 선정하여 각 조건별로 실험 예정임. 각 시험 조건에서의 추출물의 수율 비교 후, 열수 추출법 수율이 가장 높은 최적화 조건을 선정함.

② 초음파 병합을 통한 에탄올 추출법

논문을 참조하여 에탄올 비율 20, 50, 70, 99%로, 추출시간은 2, 4, 6, 8 hr로 선정하였고 시료에 대한 용매비는(g/ml)0.1, 0.2, 0.3로 선정하여 각 조건별로 실험 예정임. 각 시험 조건에서의 추출물의 수율 비교 후, 열수 추출법 수율이 가장 높은 최적화 조건을 선정함.

(7) 천연 유래 물질의 추출법 최적화

① LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometer) :

-액상에서 적용 가능한 질량 분석기로서 천연 유래 방충 물질 중에 함유된 화학물질의 정성 분석이 가능함.

- 방충 물질의 특성을 고려한 chromatography 선정 및 이를 응용한 구성 성분 확인 가능.

- 선정된 물질의 사전 문헌 조사를 기반으로 검출된 각 구성 물질의 특성 정보 확인

LC-MS를 이용하여 방충 물질의 구성 성분을 확인하기 위한 전처리 과정 중에 있음.

추출물 상에서 기피 효과가 있는 오배자 추출물을 동결건조를 이용하여 분말화 시킴. 극성도에 따라 유기용매를 선정하여 용매분획을 진행. water - ethyl acetate - ether - hexane 으로 용매 분획을 진행하였고, ethyl acetate 층과 물층을 제외한 나머지 용매에는 시료가 거의 녹아 있지 않음을 TLC를 통해 확인하였음.

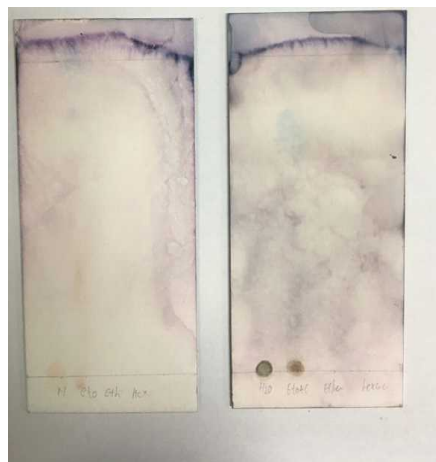


그림 23. LC-MS를 이용하여 방충 물질의 구성 성분을 확인하기 위한 전처리

<오배자 powder 600mg + 20ml 물에 녹이고 에틸아세테이트, 에테르, 헥세인 순으로 각 20ml 씩 용매 분획한 것으로 TLC 전개 진행

분획한 물, 에틸아세테이트, 에테르, 헥세인층 각각 TLC전개(사진의 TLC plate 좌측부터 물, 에틸아세테이트, 에테르, 헥세인층, 좌측plate-전개용매1, 우측plate-전개용매2)

① TLC 전개용매1 - Ethyl acetate 25ml + Diethyl ether 10ml (평균극성 3.94)

② TLC 전개용매2 - Ethyl acetate 20ml + Hexane 15ml (평균극성 2.51) >

이후 기존에 진행한 오배자 powder 600mg + 20ml 물에 녹인 후 에틸아세테이트, 에테르, 헥세인 순으로 각 20ml 씩 용매분획한 것 중 에틸아세테이트층과 물층을 rotary evaporator를 이용하여 농축을 진행(용매분획과정에서 spin down 후 생기는 중간층은 변성된 부분으로 판단, 제거하였음)하였고, freeze dryer를 이용하여 동결건조 함.

- 에틸아세테이트 분획물 동결건조 후 파우더 무게 363.8mg

- 물층 분획물 동결건조 후 파우더 무게 46.1mg

이후에 동결건조한 파우더를 이용하여 column chromatography를 이용하여 다시 분획할 예정이다.

나. 2차년도 연구수행 내용

(1) 천연식물 함유 방충 유효성분 규명을 위한 대규모 방충효과 분석 실험을 위한 공시충(화랑곡나방, 거릿쌀도둑거저리) 대량사육/공급

(가) 본 연구의 공시충은 전 세계적으로 다양한 종류의 곡물과 저장물을 가해하는 저장해충으로 매우 심각한 피해를 야기하는 해충 중인 나비목(Lepidoptera), 명나방과(Pyralidae)의 화랑곡나방(Indian meal moth)과 딱정벌레목(Coleoptera), 거저리과(Tenebrionidae)인 거릿쌀도둑거저리(Red flour beetle)로 1차년도에 구축된 대량사육/공급 시스템을 유지하여 1차년도 연구를 통해 선정된 천연식물 추출물을 다양한 용매로 분획하여 획득한 다종의 유효성분 함유 후보물질군의 대규모 방충효과 분석 실험에 필요한 대량의 동일연령, 감수성 개체를 연구기간동안 지속적으로 공급하였다(화랑곡나방 12,000마리, 거릿쌀도둑거저리 12,000마리).



그림 24. 공시충 대량사육/공급 시스템

(나) 화랑곡나방의 대량사육 및 공급

우화 후 48시간 미만의 화랑곡나방 성충 30마리(암수 성비 6:4)를 플라스틱 페트리디쉬 (직경 10cm)에 투입, 24시간 산란 유도 후 산란된 알을 확보하고 여기에 인공사료(쌀겨 800g, yeast extract 200g, glycerol 500ml, methyl p-hydroxybenzoate 2g, sorbic acid 2g)를 투입 후 온도 30±0.5℃, 상대습도 60~70%, 항온항습기(JISICO)에서 대량 사육하면서 연구에 필요한 발육단계 별 공시충(유충 2~4령)을 연중 지속적으로 공급하였다.

(다) 거짓쌀도둑거저리의 대량사육 및 공급

사육용기에서 거짓쌀도둑거저리 성충을 30마리(암수 성비 6:4)를 플라스틱 사육용기(직경 120cm, 높이 80cm)에 투입 후 밀가루와 밀기울을 50:50으로 혼합한 인공사료를 투입하여 접종한 후 48시간 산란을 유도 후 투입한 성충을 보충하며 새로운 먹이가 투입된 사육용기로 주기적으로 옮겨주면서 온도 28±0.5℃, 상대습도 60~70%, 항온항습기(JISICO)에서 보관, 사육하며 연구에 필요한 발육단계 별 공시충(성충)을 연중 지속적으로 공급하였다.

(2) 천연식물 함유 유효성분의 방충효과분석 기술 개발 및 적용

(가) 식물에서 추출한 방충물질의 방충 및 기피효과 검증을 위하여 가장 기본적으로 사용되는 방법은 대상해충의 성충과 유충에 모든 발육단계에 적절하게 적용되어질 수 있는 장점을 가진 종이 Disc를 이용한 여지확산법이다. 본 과제에서는 1차년도에 방충성분이 함유된 것으로 알려진 13가지 한약재의 추출물을 대상으로 공시충(화랑곡나방 유충, 거짓쌀도둑거저리 성충)에 대한 방충, 기피효과를 여지확산법으로 검증하고 기피테스트 관을 이용하여 화랑곡나방 성충에 대한 방충, 기피효과를 조사하여 후보군을 선정하였다. 그러나 2차년도 연구에서는 단순히 천연식물 후보군을 스크리닝하는 것이 아니라 선정된 후보 식물에서 추출한 물질을 여러 가지 용매로 분획하여 유효성분의 농도와 처리량에 따라 방충, 기피효과를 분석하는 것으로 공시충중 거짓쌀도둑거저리 성충의 경우에는 여지확산법을 사용하더라도 공시충이 유효성분이 도포된 바닥의 Disc에서만 이동하므로 유효성분에 대한 접촉 기피력을 확인할 수 있었으나 화랑곡나방 유충의 경우에는 유효성분이 도포된 바닥의 Disc를 회피하여 용기의 벽면과 뚜껑부분으로 이동하여 유효성분에 대한 접촉 기피력을 정확히 측정하기 어려운 것으로 판단되었다. 또한 여지확산법의 경우 바닥의 Disc에 처리된 유효성분의 농도와 양이 증가하면 용기내부 휘발된 성분이 농축되어 처리시간에 따른 기피율 변화를 측정하기 어려운 경우가 발생된다. 따라서 2차년도 연구에서는 공시충의 특성을 고려하여 거짓쌀도둑거저리 성충의 경우에는 여지확산법으로 화랑곡나방 유충의 경우에는 새로운 기피테스트 관(접촉 독성 및 휘발성 기피력 측정용 기구)을 개발(특허출원)하여 후보물질 처리 후 경과시간에 따른 기피율의 변화는 1, 2, 3 시간까지 조사하는 것 연구방법을 개선하였다(그림 25).

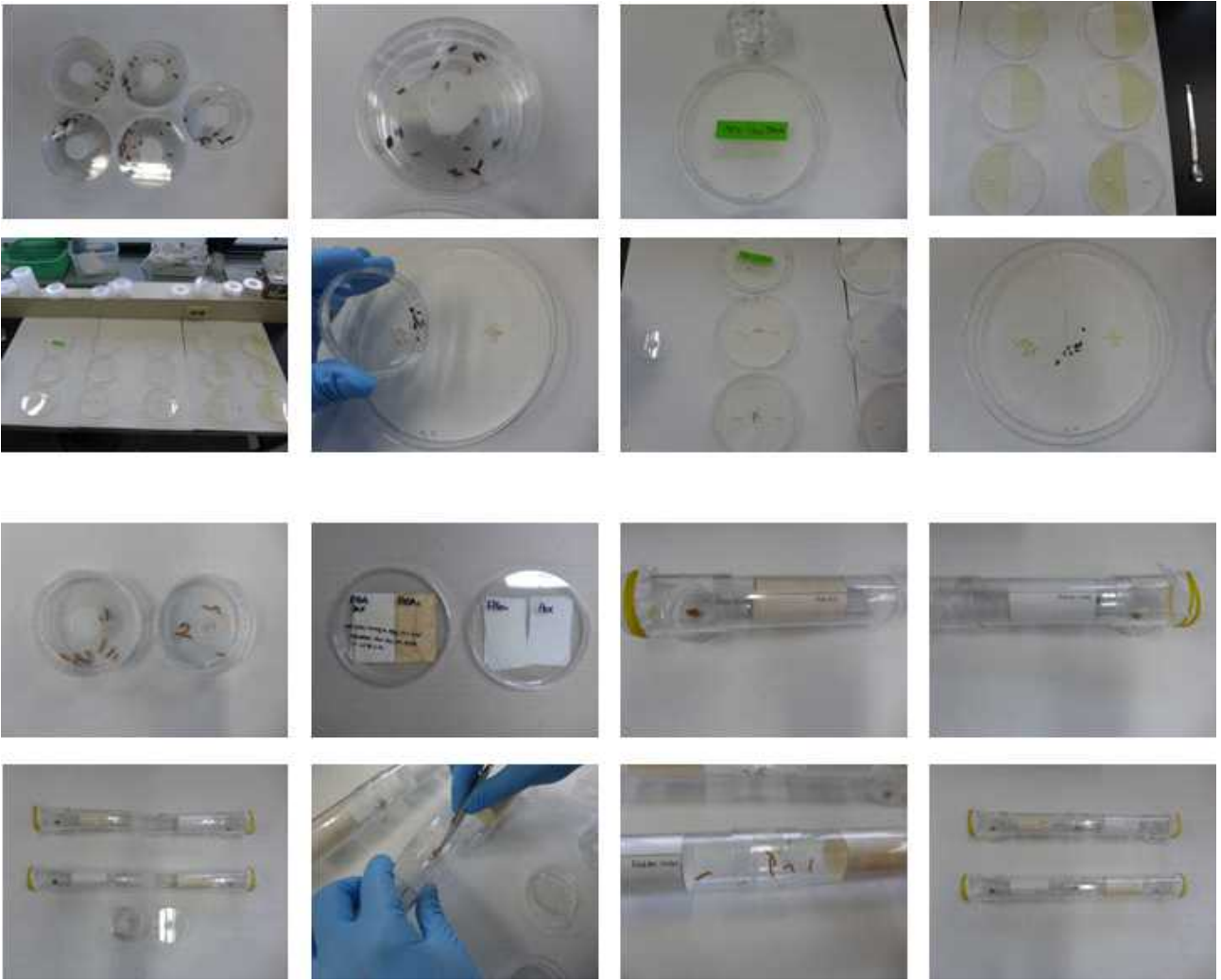


그림 25. 여지확산법 및 기피테스트 관을 이용한 방충효과 검증방법

(3) 접촉 독성 및 휘발성 기피력 측정용 기구 개발

(가) 최근의 해충 방제는 화학 합성 약제 사용을 최대한 억제하면서 인축에 대한 안전성, 환경오염의 부작용을 최소화하는 환경친화적 방제로 방향을 전환하고 있는 실정이다. 이에 따라 합성 물질이 아닌 천연에서 유래하는 에센셜오일과 같은 휘발성 물질이나 피레트린(제충국 추출물)과 같은 접촉 독성을 나타내는 물질을 이용하여 해충을 제어하는 방법이 대두되고 있으며 새로운 천연 방충 성분의 효과를 검증하는데 주로 저농도의 성분을 처리 후 대상해충의 접근 여부를 조사하는 기피법이 사용되고 있다. 그러나 이러한 기피력 측정법의 경우 표준화된 방법이 전혀 제시되어 있지 않다. 기존의 폭넓게 쓰이는 기피력 실험 방법은 페트리디시 바닥 부분에 반원 모양의 여과지 2장을 부착한 후 한쪽은 방충 물질로 적신 후 건조시키고, 나머지 한쪽은 단순히 방충 물질을 녹일 때 사용한 용매만 적셔 건조한 후, 페트리디시 중앙 부분에 대상해충을 다수 적재하고 페트리디시 뚜껑을 닫은 후 좌,우로 이동하는 해충의 수를 측정하는 여지확산법이다. 그러나 해충의 행동학적 특성에 따라(특히 화랑곡나방 유충) 페트리디시의 벽면을 타고 뚜껑으로 이동하거나, 벽면에 붙어있는 경우가 다수 발생하는 종은 이 방법으로 정확한 기피력 측정이 신뢰성이 떨어지며 또한, 에센셜오일과 같은 휘발성이 강한 물질 성분인 경우 페트리디시 내부가 일정시간이 지나면 휘발성 성분으로 포화되어 기피력 측정이 불가능해

진다. 따라서, 본 연구에서는 접촉독성에 의한 기피와 휘발성에 의한 기피 효과 모두 확인할 수 있는 신뢰성 있으며 표준화된 측정 방법을 개발하여 연구를 진행하였다(그림26).

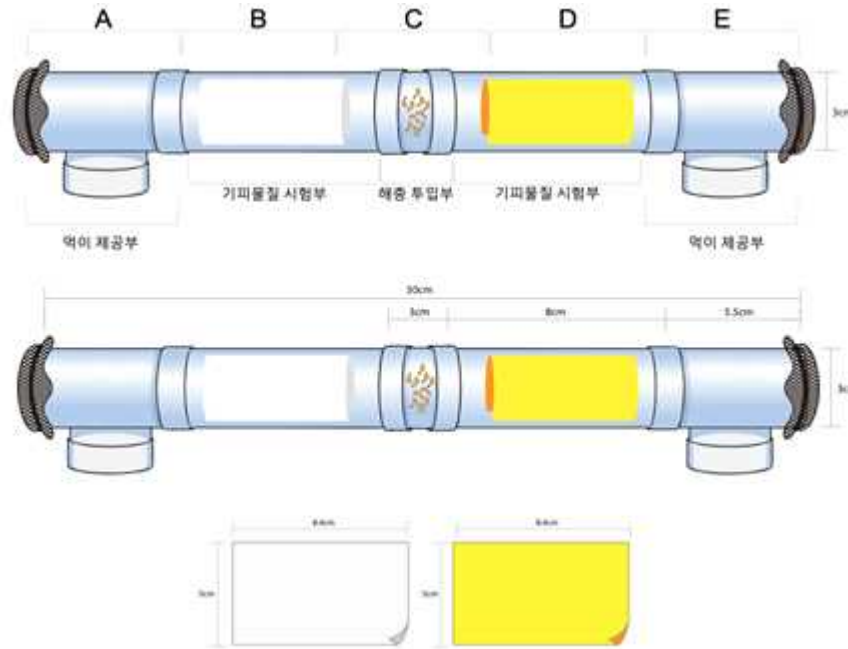


그림 26. 접촉 독성 및 휘발성 기피력 측정용 기구

(나) 본 연구에서 개발된 기피력 측정 방법은 좌측 먹이 제공부 끝부터 우측 먹이제공부 끝까지 6 cm 간격으로 A,B,C,D,E 구역으로 나눈다. 용매만 적시고 건조한 여과지(8.4 cm × 4 cm)와, 용매에 녹인 방충물질을 적시고 건조한 여과지(8.4 cm × 4 cm)를 각각 좌, 우의 방충물질 시험부 내부에 부착한 뒤 대상해충(화랑곡나방 3령 유충 10마리)을 중앙의 공시충 투입부에 투입한 뒤, 파이프 양쪽 말단부에 동일한 양의 먹이를 놓고 암조건에서 투입 후 1시간, 2시간, 3시간째에 각 구역에 위치한 공시충 수를 조사하여 다음의 식으로 기피율을 조사한다.

$$\text{기피율(\%)} = \frac{(Nc - Nt)}{(Nc + Nm + Nt)} \times 100$$

여기서 **Nc**는 무처리구(A, B 구역)에 있는 개체수, **Nt**는 기피물질 처리구(D, E 구역)에 있는 개체수, **Nm**은 중앙(C 구역)에 있는 개체수를 나타낸다.

(다) 본 시험법의 신뢰도를 검증하기 위해 대상해충(화랑곡나방 유충)에 방충, 기피 효과가 있다고 알려진 두 가지 성분(t-cinnamaldehyde, 피레트린)을 사용하여 효과적인 방충, 기피력을 측정할 수 있는지 검증하였다.

t-cinnamaldehyde과 피레트린를 각각 헥산에 녹여 1, 5, 10% 용액을 제조 후, 여과지에 1 ml 씩 뿌리고 화랑곡나방 유충을 공시충을 투입하여 개발된 시험법으로 각 농도별로 기피효과를 측정하였다(각 농도 3반복씩 진행). 시험결과 1, 2, 3시간 모두 A구역에 유충이 대 다수 존재하는 결과를 보여 본 시험법의 기피효과 측정 신뢰도를 확인하였다(그림27).

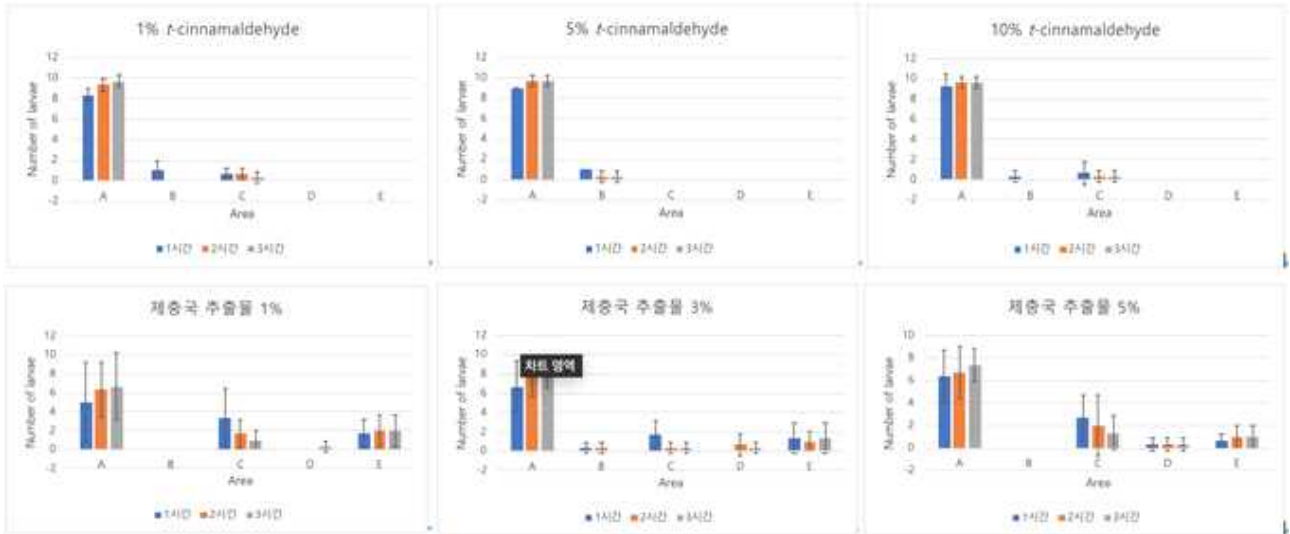


그림 27. 접촉 독성 및 휘발성 기피력 측정 시험법 검증 결과

(4) 방충 유효성분 분획 추출 후보물질 선정

(가) 본 연구에서는 1차년도 연구를 통해 식품 공전에 등재된 식용, 약용 식물로 대상해충에 방충효과를 보인다고 알려진 식물체 13종(계피(*Cinnamomum japonicum*), 고련피(*Melia azedarach*), 금은화(*Lonicera japonica Thunberg*), 모과(*Chaenomeles sinensis*), 산수유(*Cornus officinalis*), 석류피(*Punica granatum*), 시라자(*Anethum graveolense*), 오매(*Prunus mume*), 오배자(*Rhus javanica*), 인진(*Artemisia capillaris*), 행인(*Prunus armeniaca*), 황금(*Scutellaria baicalensis*), 황백(*Phellodendron amurense*)) 중 본 연구에서 선정한 대표적인 저장해충, 딱정벌레목(거짓쌀도둑 거절리)와 나비목(화랑곡나방) 공시충 모두에 기피효과를 보이는 8종을 스크리닝하여 선별하고 스크리닝 실험 시 공시충의 행동학적 특성변화(disc test 시 페트리디시 뚜껑, 벽면으로 회피하는 개체수의 변화)와 추출물의 향, 범용성 등을 고려하여 접촉기피효과와 휘발기피효과가 동시에 발현되는 것으로 판단되는 1차 후보군(계피(*Cinnamomum japonicum*), 시라자(*Anethum graveolense*), 오매(*Prunus mume*), 오배자(*Rhus javanica*), 인진(*Artemisia capillaris*))과 접촉기피효과와 휘발기피효과 중 한 가지 효과가 발휘되는 것으로 판단되는 2차 후보군(고련피(*Melia azedarach*), 모과(*Chaenomeles sinensis*), 황금(*Scutellaria baicalensis*), 황백(*Phellodendron amurense*))으로 구분하여 1차 후보군 추출물을 대상으로 용매 분획을 통해 추출된 유효성분에 대한 공시충의 방충, 기피효과를 조사하였다. 특히 1차 후보군으로 선정된 한약재 중 오매자의 경우 다른 한약재와 다르게 동물성 한약재(불나무에 기생하는 벌레집)로 포함하고 있는 방충 유효성분이 식물성 한약재와 차이가 클 것으로 판단되어 1차 후보군으로 선정하였다.

(5) 방충 유효성분 분획 추출물에 대한 방충효과 스크리닝

(가) 1차년도 연구를 통해 선정된 1차 후보군(계피(*Cinnamomum japonicum*), 시라자(*Anethum graveolense*), 오매(*Prunus mume*), 오배자(*Rhus javanica*), 인진(*Artemisia capillaris*))을 대상으로 초음파 추출기를 이용하여 1차 추출물을 추출하고 1차로 추출된 추출물을 Solvent-solvent partition을 이용하여 Hexane, Diethyl ether, Ethyl acetate, DW를 이용한 각각의 분획을 얻었다. 자세한 방법은 다음과 같다. 음건 세절한 한약재 100 g에 80% ethanol 500ml 를 첨가한

후, 초음파 추출기(Sonics and Materials Inc., Model VC505, Danbury, CT, USA)를 이용하여 500 watt, 20 kHz, 80% amplitude 조건으로 2시간 동안 추출한 후 여과지(Whatman No. 1 filter paper)로 여과하여 추출액을 분리하였다. 고형물이 제거된 추출액을 회전증발농축기를 이용하여 용매(에탄올, 증류수)를 모두 제거하였고 각 한약재별로 무게를 측정하였다. 표 5 은 한약재별 80%에탄올 조건에서의 건조중량, 수율($\frac{\text{추출분말의 무게}(g)}{\text{사용한 시료의 무게}(g)} \times 100$)을 나타낸 것이다.

한약재	에탄올 %(w/w)	용매 전체(g)	한약재(g)	건조중량(g)	수율(%)
시라자	80%	500	100	12.45	12.45
인진	80%	500	100	11.09	11.09
오매	80%	500	100	25.67	25.67
오배자	80%	500	100	76.8	76.8
계피	80%	500	100	11.99	11.99

표 5. 80% 에탄올 추출물에서의 한약재별 성분 건조중량 및 수율

각 한약재에서의 건조중량의 경우 10~25%의 건조중량(수율)을 보이는 것으로 조사되었으나 76.8%의 매우 높은 수율을 보인 오배자와 같은 경우는 식물성 한약재가 아닌 매미목 진딧물과의 오배자면충이 옷나무과의 붉나무(오배자나무)의 잎에 기생하여 만든 벌레 혹은 동물성 한약재이기 때문에 수율이 높은 것으로 추정되었다.

용매가 제거된 각 한약재의 추출물 분말을 증류수 500ml을 넣고 현탁시킨 후, 분액깔때기에 넣고, Hexane(500ml × 3), Diethyl ether(500ml × 3), Ethyl acetate(500ml × 3)를 사용하여 순차적으로 Solvent-solvent partition을 진행하였다(그림 28).

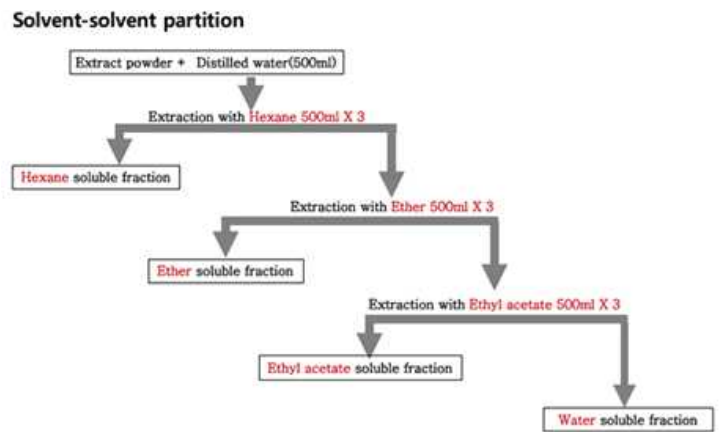


그림 28. 유기용매를 이용한 한약재 추출물 분말에서의 성분 분획

용매가 제거된 각 한약재의 추출물 분말을 증류수 500ml을 넣고 현탁시킨 후 , 분액깔때기에 넣고, Hexane(500ml × 3), Diethyl ether(500ml × 3), Ethyl acetate(500ml × 3)를 사용하여 순차적으로 Solvent-solvent partition을 진행하고 회전증발 농축기를 이용하여 각 용매를 모두 제거하고, 무게를 측정한 결과는 아래의 표 6와 같다.

한약재	Hexane(g)	Ether(g)	EtOAc(g)	DW(g)	분획총 합(g)
시라자	3.66	2.64	0.69	5.1	12.09
인진	1.14	5.94	1.33	2.53	10.94
오매	1.33	1.17	2.83	17.53	22.86
오배자	2.42	6.39	60.96	6.8	76.57
계피	2.38	2.65	1.1	5.67	11.8

표 6. 각 유기용매 분획물에서의 한약재별 성분 건조중량

1차 후보군 한약재(계피(*Cinnamomum japonicum*), 시라자(*Anethum graveolense*), 오매(*Prunus mume*), 오배자(*Rhus javanica*), 인진(*Artemisia capillaris*)) 각 용매별 분획물 내의 유효성분에 대한 기피 효과 시험은 거짓쌀도둑거저리 성충의 경우 여지확산법으로 화랑곡나방 유충의 경우는 기피테스트 판 시험법으로 진행하였다.

거짓쌀도둑거저리에 대한 한약재별 분획 용매에 따른 분획물 유효성분의 기피 효과시험은 여지확산법을 이용하여 검정하였는데, 직경 14cm의 여과지를 반으로 자른 후 각 한약재 용매별 분획물을 분획용매 희석 농도별(1, 5, 10, 50, 100%)로 침지시킨 후 24시간 동안 용매를 휘발시키고 나서 각 분획물이 처리된 여과지와 분획물 무처리 여과지(분획용매)를 함께 직경 14cm의 페트리디쉬에 장착 후 활력이 우수한 우화 후 3주 미만의 거짓쌀도둑거저리 성충 각 10마리를 접종하였다. 접종 후 1, 2, 3시간 간격으로 거짓쌀도둑거저리 성충의 분포 양상 및 개체수를 조사하였다. 각 분획물에 대한 기피 효과시험은 각 시험별로 3~5반복씩 수행되었으며 무처리구와 기피물질 처리구 간 차이의 분석은 Student's t-test를 이용하여 분석하였고 거짓쌀도둑거저리 성충의 기피율은 다음의 식으로 계산되었다.

$$\text{기피율(\%)} = (N_c - N_t) / (N_c + N_t) \times 100$$

여기서 N_c 는 무처리구에 있는 개체수, N_t 는 기피물질 처리구에 있는 개체수를 나타낸다. 그림 29~33은 각 한약재, 분획용매, 처리농도에 따른 처리경과 시간에 따른 거짓쌀도둑거저리 성충의 분포변동 양상이다.

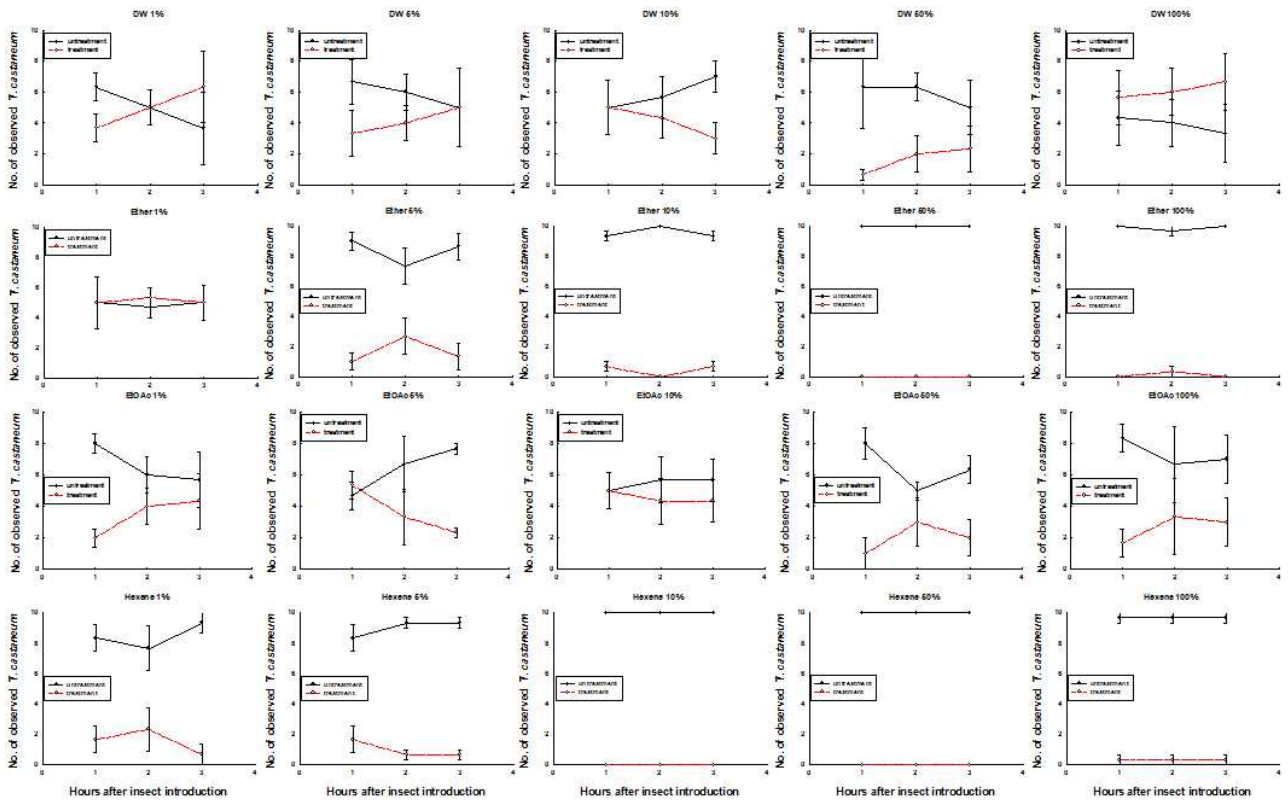


그림 29. 계피 분획물 처리 시간에 따른 거짓쌀도둑거저리 성충의 분포 변화

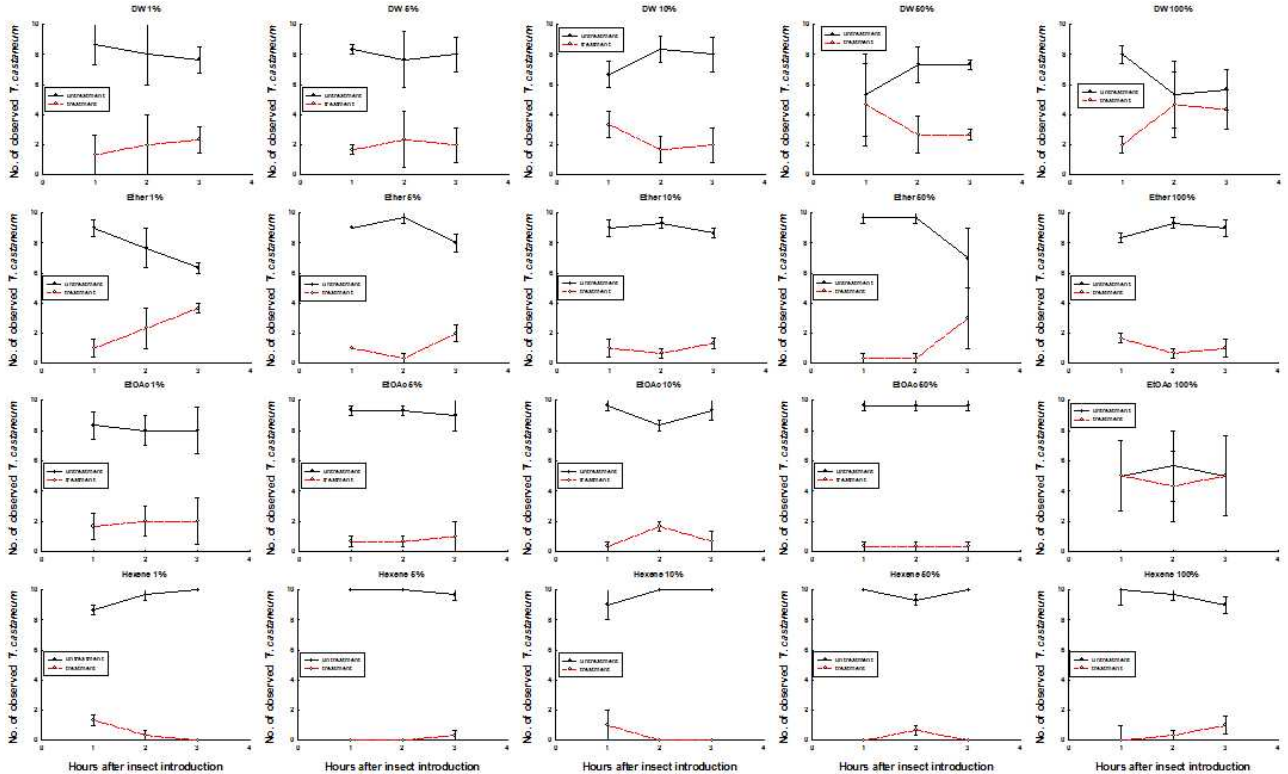


그림 30. 시라자 분획물 처리 시간에 따른 거짓쌀도둑거저리 성충의 분포 변화

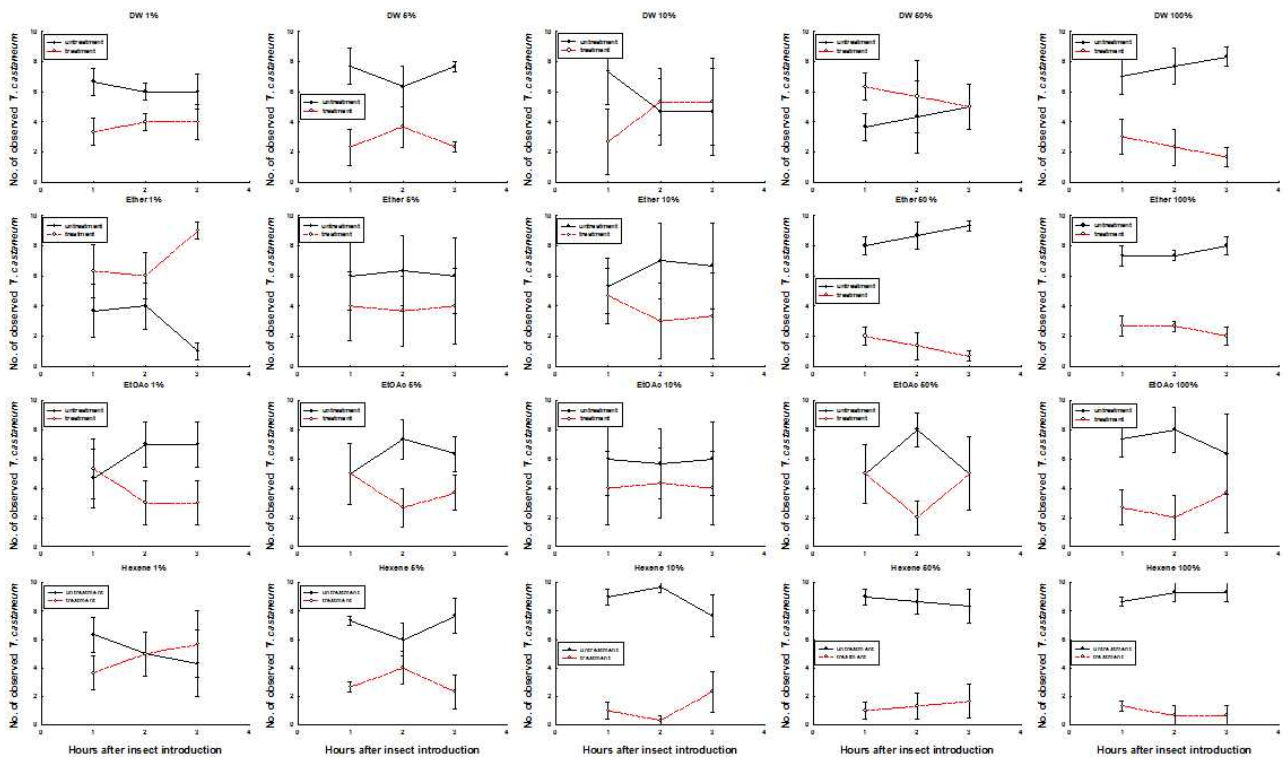


그림 31. 오매 분획물 처리 시간에 따른 거짓쌀도둑거저리 성충의 분포 변화

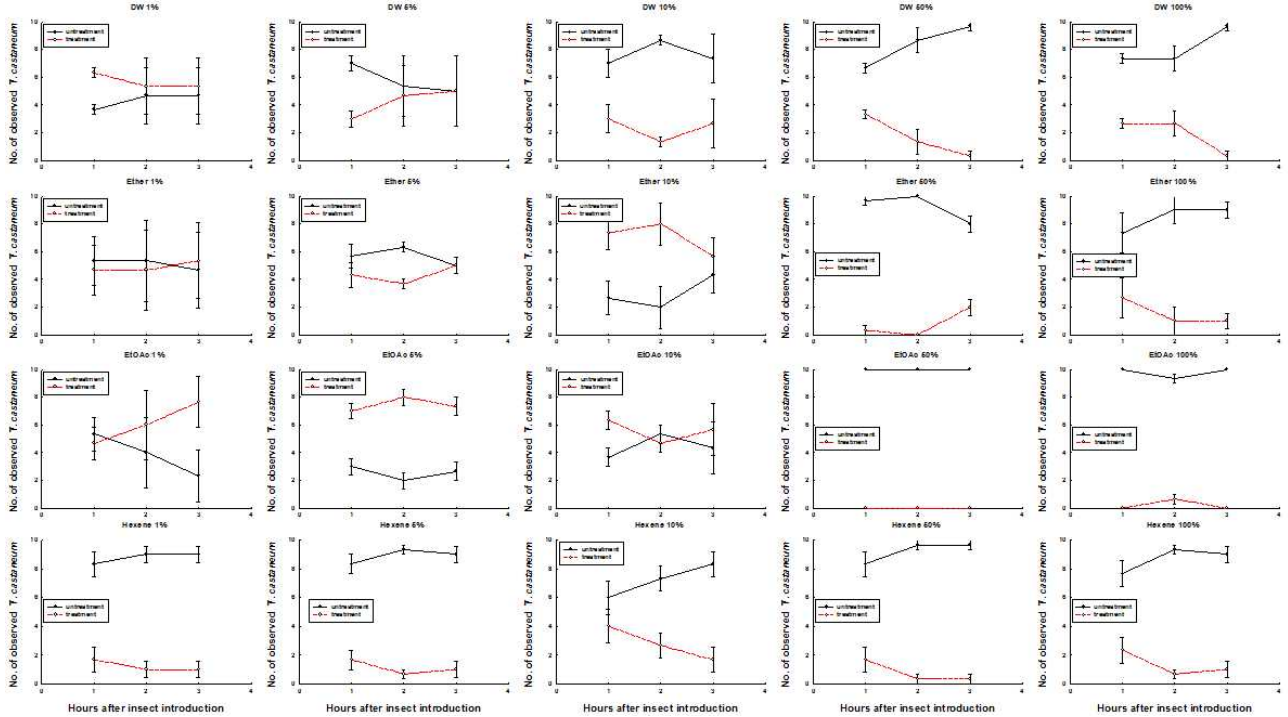


그림 32. 오매자 분획물 처리 시간에 따른 거짓쌀도둑거저리 성충의 분포 변화

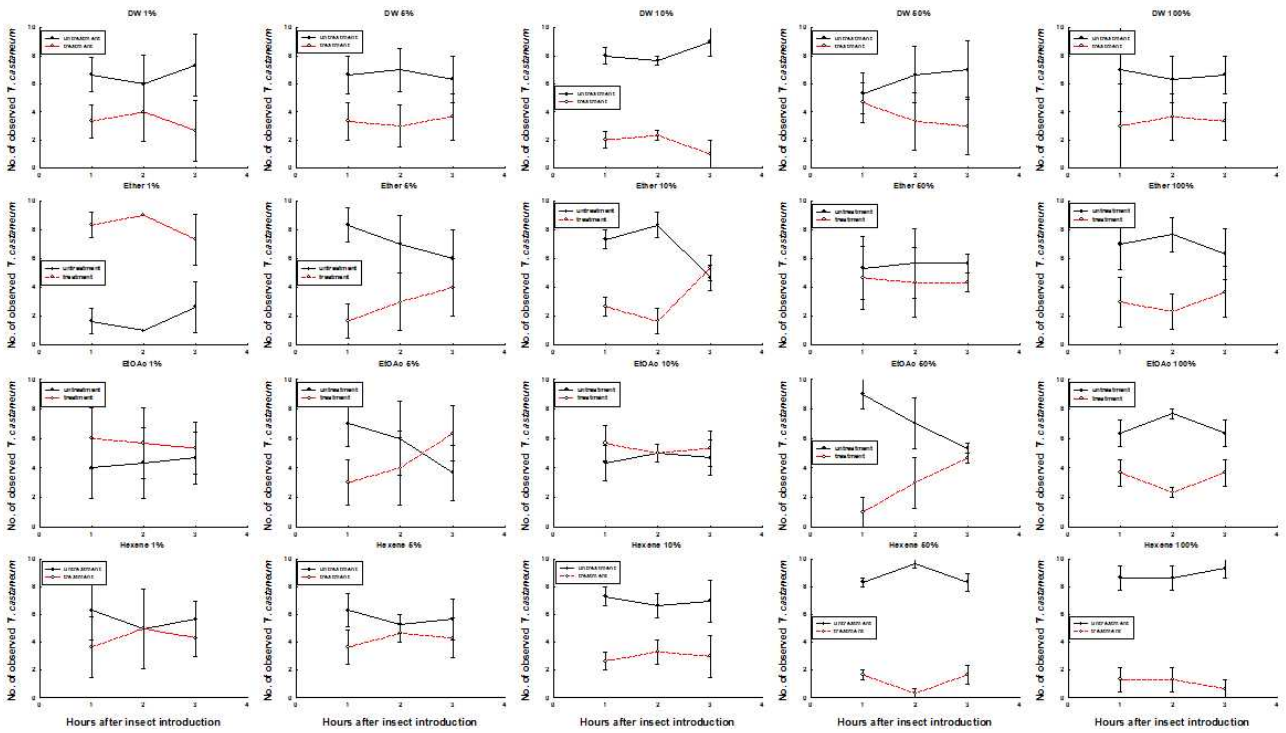


그림 33. 인진 분획물 처리 시간에 따른 거짓쌀도둑거저리 성충의 분포 변화

연구결과 거짓쌀도둑거저리 성충의 경우 1차 후보군인 계피(*Cinnamomum japonicum*), 시라자(*Anethum graveolense*), 오매(*Prunus mume*), 오배자(*Rhus javanica*), 인진(*Artemisia capillaris*)의 Hexane, Diethyl ether, Ethyl acetate, DW 용매 분획물 모두에서 기피효과가 나타나는 것으로 조사되었다. 인진의 경우 Diethyl ether, Ethyl acetate 분획물 낮은 농도(1%)에서, 오매의 경우 Diethyl ether 분획물 낮은 농도(1%)에서, 오배자의 경우 Ethyl acetate(1, 5, 10%), DW(1%) 분획물 낮은 농도에서 기피효과가 미약한 것으로 조사되었으나 계피와 시라자의 경우 모든 분획용매의 모든 농도에서 기피효과가 크게 나타났으며 인진, 오매, 오배자의 경우에서도 위에 언급한 용매, 농도를 제외하고 기피효과가 크게 나타나는 것으로 조사되었다(표 12. 통계처리 결과). 표 7~11은 각 한약재, 분획용매, 처리농도에 따른 거짓쌀도둑거저리 성충의 기피율(%)을 종합하여 분석한 기피율이다.

처리농도(%)	1	5	10	50	100
분획용매					
Hexane	68.89±26.94	80.00±11.55	100.00±0.00	100.00±0.00	93.33±11.55
Ether	-2.22±34.21	66.67±30.55	91.11±3.85	100.00±0.00	97.78±3.85
EtOAc	31.11±37.91	26.67±24.04	8.89±19.25	60.00±40.00	46.67±50.33
DW	15.00±4.36	17.67±4.16	17.78±27.76	17.67±8.74	-22.22±53.89

표 7. 계피 분획물에 대한 거짓쌀도둑거저리 성충의 기피율

처리농도(%) 분획용매	1	5	10	50	100
Hexane	88.89±3.85	97.78±3.85	93.33±11.55	95.56±3.85	91.11±7.70
Ether	53.33±24.04	77.78±10.18	80.00±6.67	75.56±20.37	77.78±7.70
EtOAc	62.22±36.72	84.44±16.78	82.22±3.85	93.33±6.67	4.44±83.89
DW	62.22±48.23	60.00±30.55	53.33±17.64	33.33±41.63	26.67±35.28

표 8. 시라자 분획물에 대한 거짓쌀도둑거저리 성충의 기피율

처리농도(%) 분획용매	1	5	10	50	100
Hexane	4.44±53.47	40.00±30.55	75.56±23.41	73.33±30.55	82.22±19.25
Ether	-42.22±33.55	22.22±81.47	26.67±76.88	73.33±20.00	51.11±13.88
EtOAc	24.44±48.23	24.44±16.78	17.78±84.94	20.00±64.29	44.44±61.94
DW	24.22±27.76	44.44±25.24	11.11±77.27	-13.33±37.12	53.33±29.06

표 9. 오매 분획물에 대한 거짓쌀도둑거저리 성충의 기피율

처리농도(%) 분획용매	1	5	10	50	100
Hexane	75.56±10.18	77.78±13.88	44.44±31.51	84.44±13.88	73.33±17.64
Ether	2.22±74.34	13.33±13.33	-40.00±46.67	84.44±7.70	68.89±27.76
EtOAc	-22.22±60.49	-48.89±15.40	-11.11±23.41	100.00±0.00	95.56±3.85
DW	-13.33±40.55	15.56±59.75	53.33±24.04	66.67±13.33	62.22±10.18

표 10. 오배자 분획물에 대한 거짓쌀도둑거저리 성충의 기피율

처리농도(%) 분획용매	1	5	10	50	100
Hexane	13.67±72.11	15.56±15.40	40.00±29.06	75.56±13.88	77.78±26.94
Ether	-64.44±10.18	42.22±53.47	35.56±26.94	11.11±58.25	40.00±53.33
EtOAc	-13.33±70.24	11.11±67.44	-6.67±30.55	42.22±26.94	35.56±13.88
DW	33.33±59.25	33.33±52.07	64.44±16.78	26.67±63.60	33.33±69.28

표 11. 인진 분획물에 대한 거짓쌀도둑거저리 성충의 기피율

분획용매, 처리농도 별 시라자 추출물에 대한 거짓살도독거저리 기피율 통계량

처리농도(%)	1	5	10	50	100
분획용매					
Hexane	df=4; t=-56.57; P<0.0001	df=4; t=-62.23; P<0.0001	df=4; t=-19.80; P<0.0001	df=4; t=-60.81; P<0.0001	df=4; t=-28.99; P<0.0001
Ether	df=4; t=-5.43; P=0.0056	df=4; t=-18.71; P<0.0001	df=4; t=-29.39; P<0.0001	df=4; t=-9.09; P=0.0008	df=4; t=-24.75; P<0.0001
EtOAc	df=4; t=-4.15; P=0.0142	df=4; t=-12.33; P=0.0002	df=4; t=-52.33; P<0.0001	df=4; t=-34.29; P<0.0001	df=4; t=-0.13; P=0.9030
DW	df=4; t=-3.16; P=0.0342	df=4; t=-4.81; P=0.0086	df=4; t=-7.41; P=0.0018	df=4; t=-1.96; P=0.1214	df=4; t=-1.85; P=0.1377

분획용매, 처리농도 별 인진 추출물에 대한 거짓살도독거저리 기피율 통계량

처리농도(%)	1	5	10	50	100
분획용매					
Hexane	df=4; t=-0.45; P=0.6741	df=4; t=-2.47; P=0.0686	df=4; t=-3.37; P=0.0280	df=4; t=-13.34; P=0.0002	df=4; t=-7.07; P=0.0021
Ether	df=4; t=15.50; P=0.0001	df=4; t=-1.93; P=0.1252	df=4; t=-3.23; P=0.0319	df=4; t=-0.47; P=0.6646	df=4; t=-1.84; P=0.1401
EtOAc	df=4; t=0.46; P=0.6661	df=4; t=-0.40; P=0.7072	df=4; t=0.53; P=0.6213	df=4; t=-3.84; P=0.0185	df=4; t=-6.28; P=0.0033
DW	df=4; t=-1.38; P=0.2403	df=4; t=-1.57; P=0.1919	df=4; t=-9.41; P=0.0007	df=4; t=-1.03; P=0.3624	df=4; t=-1.18; P=0.3039

분획용매, 처리농도 별 오매 추출물에 대한 거짓살도독거저리 기피율 통계량

처리농도(%)	1	5	10	50	100
분획용매					
Hexane	df=4; t=-0.20; P=0.8486	df=4; t=-3.21; P=0.0327	df=4; t=-7.90; P=0.0014	df=4; t=-5.88; P=0.0042	df=4; t=-10.47; P=0.0005
Ether	df=4; t=3.08; P=0.0369	df=4; t=-0.67; P=0.5406	df=4; t=-0.85; P=0.4434	df=4; t=-8.98; P=0.0009	df=4; t=-9.02; P=0.0008
EtOAc	df=4; t=-1.24; P=0.2822	df=4; t=-3.57; P=0.0234	df=4; t=-0.51; P=0.6352	df=4; t=-0.76; P=0.4885	df=4; t=-1.76; P=0.1537
DW	df=4; t=-2.16; P=0.0972	df=4; t=-4.31; P=0.0125	df=4; t=-0.35; P=0.7424	df=4; t=0.88; P=0.4286	df=4; t=-4.50; P=0.0109

분획용매, 처리농도 별 오배자 추출물에 대한 거짓살도독거저리 기피율 통계량

처리농도(%)	1	5	10	50	100
분획용매					
Hexane	df=4; t=-18.17; P<0.0001	df=4; t=-13.73; P=0.0002	df=4; t=-3.46; P=0.0259	df=4; t=-14.90; P=0.0001	df=4; t=-10.18; P=0.0005
Ether	df=4; t=-0.07; P=0.9451	df=4; t=-2.45; P=0.0705	df=4; t=2.10; P=0.1037	df=4; t=-26.87; P<0.0001	df=4; t=-6.08; P=0.0037
EtOAc	df=4; t=0.90; P=0.4191	df=4; t=7.78; P=0.0015	df=4; t=1.16; P=0.3097	df=4; t=-infy; P<0.0001	df=4; t=-60.81; P<0.0001
DW	df=4; t=0.81; P=0.4657	df=4; t=-0.64; P=0.5584	df=4; t=-5.43; P=0.0056	df=4; t=-12.25; P=0.0003	df=4; t=-14.97; P=0.0001

분획용매, 처리농도 별 계피 추출물에 대한 거짓살도독거저리 기피율 통계량

처리농도(%)	1	5	10	50	100
분획용매					
Hexane	df=4; t=-6.26; P=0.0033	df=4; t=-16.97; P<0.0001	df=4; t=-infy; P<0.0001	df=4; t=-infy; P<0.0001	df=4; t=-19.80; P<0.0001
Ether	df=4; t=0.16; P=0.8813	df=4; t=-5.35; P=0.0059	df=4; t=-57.98; P<0.0001	df=4; t=-infy; P<0.0001	df=4; t=-62.23; P<0.0001
EtOAc	df=4; t=-2.01; P=0.1148	df=4; t=-2.72; P=0.0531	df=4; t=-1.13; P=0.3211	df=4; t=-3.16; P=0.0341	df=4; t=-2.27; P=0.0856
DW	df=4; t=0.00; P=1.0000	df=4; t=-1.57; P=0.1917	df=4; t=-0.96; P=0.3916	df=4; t=-2.18; P=0.0948	df=4; t=1.01; P=0.3696

표 12. 각 한약재, 분획용매, 처리농도에 따른 거짓살도독거저리 성충의 기피율 통계량

화랑곡나방 유충에 대한 한약재별 분획 용매에 따른 분획물 유효성분의 기피 효과시험은 본 연구에서 새로 개발한 기피테스트 관 시험법을 이용하여 검정하였다. 시험관 좌측 먹이 제공부 끝부터 우측 먹이제공부 끝까지 6 cm 간격으로 A,B,C,D,E 구역으로 나눈 후 분획 용매만 적시고 건조한 여과지(8.4 cm × 4 cm)와, 각 분획용매로 분획되고 농도별로 희석된 분획물 유효성분(1, 5, 10, 50, 100%)을 적시고 건조한 여과지(8.4 cm × 4 cm)를 각각 좌, 우의 방충물질 시험부 내부에 부착한 뒤 화랑곡나방 3령 유충 10마리를 중앙의 공시충 투입부에 투입한 뒤, 파이프 양쪽 말단부에 동일한 양의 먹이를 놓고 암조건에 보관하면서 투입 후 1시간, 2시간, 3시간째에 각 구역에 위치한 화랑곡나방 3령 유충 수를 조사하여 다음의 식으로 기피율을 조사하였다.

$$\text{기피율(\%)} = (N_c - N_t) / (N_c + N_m + N_t) \times 100$$

여기서 N_c 는 무처리구(A, B 구역)에 있는 개체수, N_t 는 기피물질 처리구(D, E 구역)에 있는 개체수, N_m 은 중앙(C 구역)에 있는 개체수를 나타낸다. 각 분획물에 대한 기피 효과시험은 각 시험별로 3~5반복씩 수행되었으며 무처리구와 기피물질 처리구 간 차이의 분석은 Student's t-test를 이용하여 분석하였다. 그림 34~38는 각 한약재, 분획용매, 처리농도에 따른 처리경과 시간에 따른 화랑곡나방 3령 유충의 분포변동 양상이다.

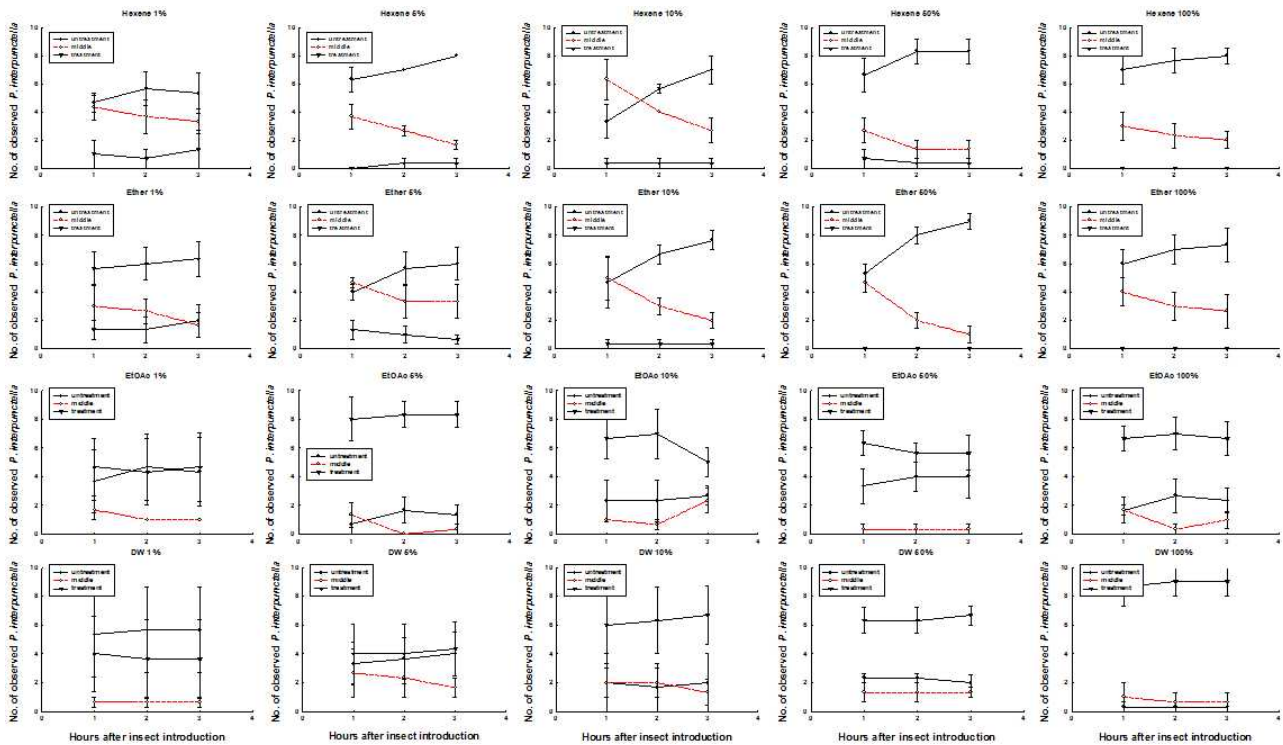


그림 34. 계피 분획물 처리 시간에 따른 화랑곡나방 유충의 분포 변화

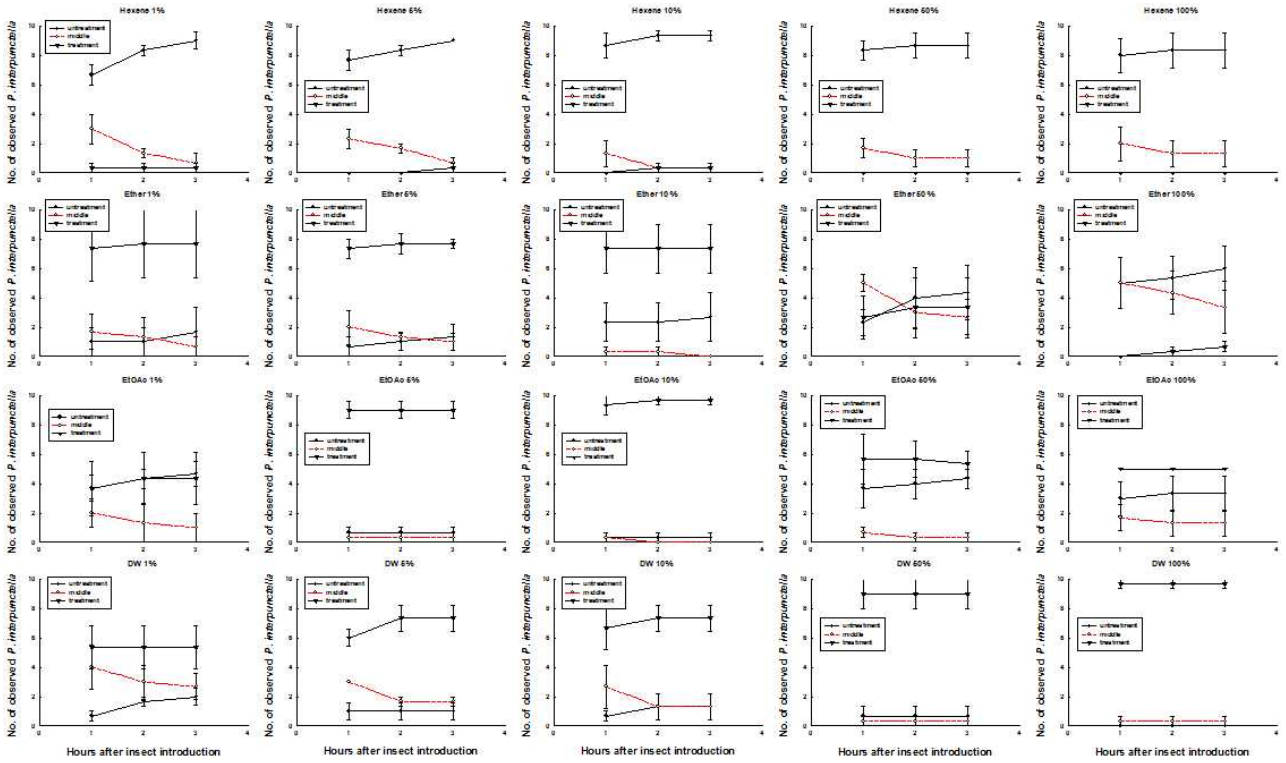


그림 35. 시라자 분획물 처리 시간에 따른 화랑곡나방 유충의 분포 변화

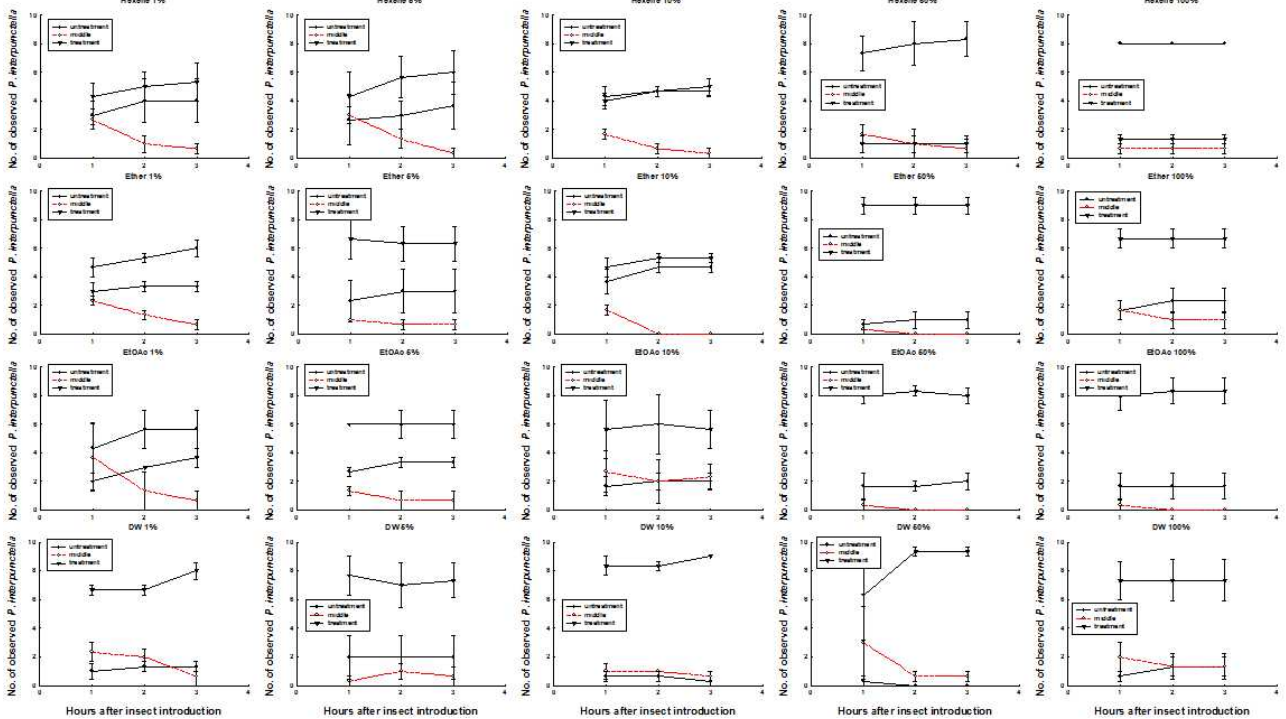


그림 36. 오매 분획물 처리 시간에 따른 화랑곡나방 유충의 분포 변화

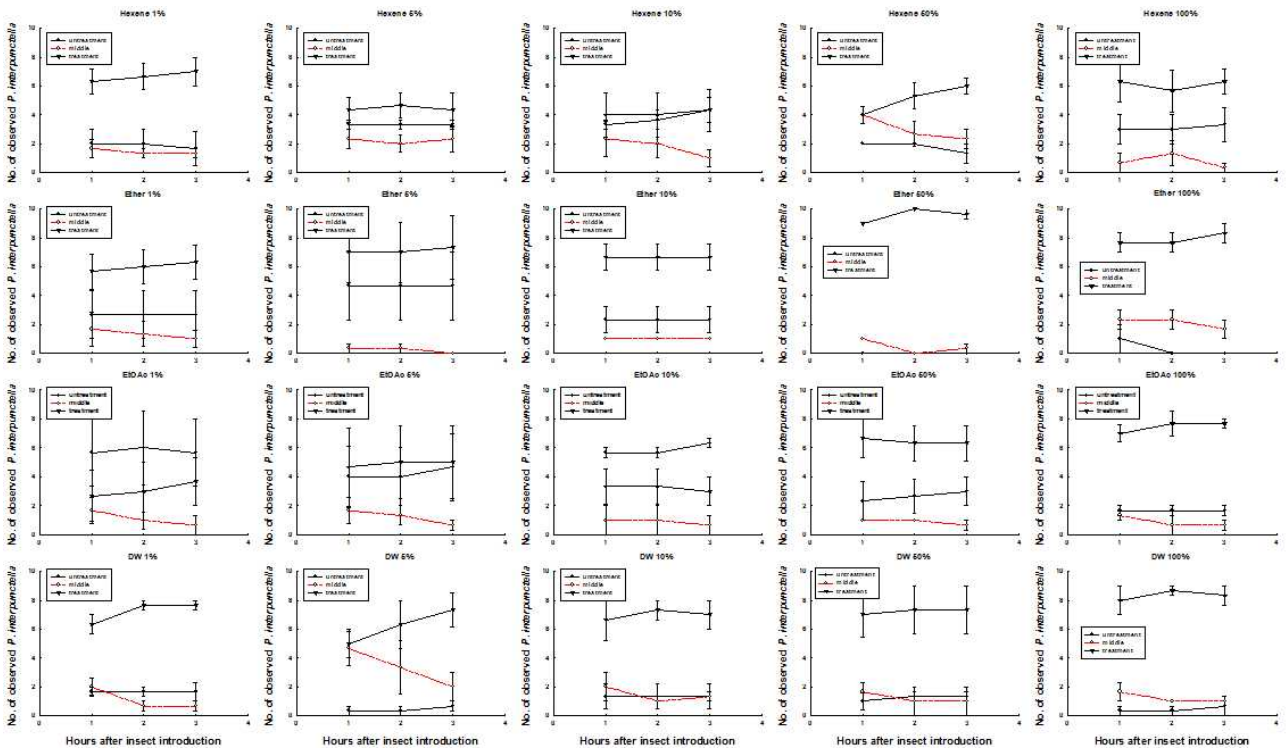


그림 37. 오배자 분획물 처리 시간에 따른 화랑곡나방 유충의 분포 변화

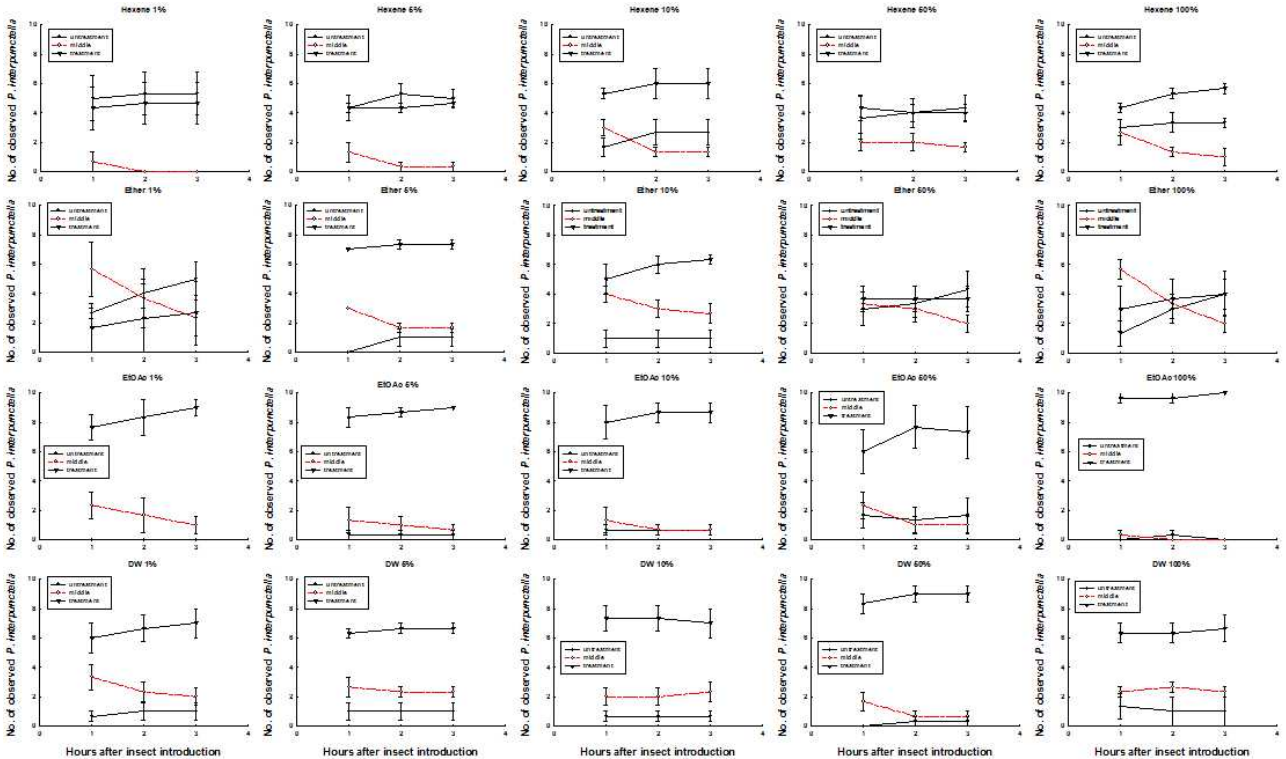


그림 38. 인진 분획물 처리 시간에 따른 화랑곡나방 유충의 분포 변화

연구결과 화랑곡나방 유충의 경우 1차 후보군인 계피(*Cinnamomum japonicum*), 시라자(*Anethum graveolense*), 오매(*Prunus mume*), 오배자(*Rhus javanica*), 인진(*Artemisia capillaris*)의 Hexane, Diethyl ether, Ethyl acetate, DW 용매 분획물 중 계피와 시라자 Hexane 분획물 모든 농도에서 뛰어난 기피 효과가 나타나는 것으로 조사되었으며 Diethyl ether 분획물에서는 계피

의 경우 5% 이상에서, 시라자의 경우 50% 이상의 고농도에서 기피효과가 나타나는 것으로 조사되었으며 오매 Hexane 분획물 10% 이상에서도 기피효과가 나타나는 것으로 조사되었다. 이러한 결과 외에 모든 한약재, 분획용매의 모든 농도에서 화랑곡나방 유충에 대한 기피효과가 크게 나타나지 않는 것으로 조사되었다(표 18. 통계처리 결과). 표 13~17은 각 한약재, 분획용매, 처리농도에 따른 화랑곡나방 유충의 기피율(%)을 종합하여 분석한 기피율이다.

처리농도(%) 분획용매	1	5	10	50	100
Hexane	42.22±31.68	68.89±1.92	50.00±5.77	73.33±23.33	75.56±13.88
Ether	-44.44±29.88	42.22±19.25	60.00±21.86	74.44±9.62	67.78±17.11
EtOAc	-3.33±78.60	-70.00±30.00	-37.78±39.77	-21.11±37.17	-45.56±35.01
DW	17.78±97.54	-4.44±56.80	-44.44±71.83	-42.22±20.09	-85.56±25.02

표 13. 계피 분획물에 대한 화랑곡나방 유충의 기피율

처리농도(%) 분획용매	1	5	10	50	100
Hexane	76.67±5.77	82.22±6.94	88.89±9.62	87.50±11.10	84.09±18.05
Ether	-63.33±60.64	-65.56±16.78	-48.89±53.89	4.35±58.71	51.11±25.89
EtOAc	1.14±45.00	-83.33±15.28	-92.22±13.47	-15.56±38.63	-18.39±22.81
DW	-38.89±30.06	-58.89±23.41	-60.00±26.46	-83.33±28.87	-96.67±5.77

표 14. 시라자 분획물에 대한 화랑곡나방 유충의 기피율

처리농도(%) 분획용매	1	5	10	50	100
Hexane	-12.22±41.68	-22.22±51.03	00.00±14.53	68.89±32.38	66.67±5.77
Ether	21.11±13.47	-36.67±48.07	-7.78±16.44	-81.11±18.36	-45.56±23.41
EtOAc	23.33±26.03	-28.89±16.44	-38.89±41.14	-63.33±18.56	-65.56±30.97
DW	-58.89±9.62	-83.15±21.59	-80.00±8.82	-88.60±55.08	-62.22±35.33

표 15. 오매 분획물에 대한 화랑곡나방 유충의 기피율

처리농도(%) 분획용매	1	5	10	50	100
Hexane	-47.78±33.39	-11.11±22.19	-3.45±35.12	-33.71±14.33	-30.00±39.30
Ether	-33.33±47.26	-20.37±71.11	-43.33±30.55	-95.56±1.92	-73.12±15.01
EtOAc	26.67±72.34	-6.45±80.84	26.67±24.04	-37.78±41.68	-57.78±13.88
DW	-55.56±11.71	-57.78±22.19	-57.95±33.62	-62.07±33.52	-78.89±19.25

표 16. 오배자 분획물에 대한 화랑곡나방 유충의 기피율

처리농도(%) 분획용매	1	5	10	50	100
Hexane	6.67±50.33	4.44±15.40	-34.44±25.89	-1.11±30.06	-18.89±9.62
Ether	16.67±44.10	-65.56±10.18	-47.78±18.36	-1.11±35.01	-7.78±41.41
EtOAc	-83.33±15.28	-83.33±5.77	-77.78±19.53	-54.44±44.01	-96.67±5.77
DW	-56.67±23.33	-55.56±13.88	-65.56±21.43	-85.56±13.88	-53.33±28.87

표 17. 인진 분획물에 대한 화랑곡나방 유충의 기피율

분획용매, 처리농도 별 계피 추출물에 대한 화랑곡나방 기피율 통계량

처리농도(%)	1	5	10	50	100
분획용매					
Hexane	df=2,6; F=4.57; P=0.0623	df=2,6; F=92.62; P<0.0001	df=2,6; F=94.50; P<0.0001	df=2,6; F=26.87; P=0.001	df=2,6; F=34.73; P=0.0005
Ether	df=2,6; F=5.05; P=0.0517	df=2,6; F=7.66; P=0.0223	df=2,6; F=14.58; P=0.005	df=2,6; F=69.54; P<0.001	df=2,6; F=17.68; P=0.0031
EtOAc	df=2,6; F=0.98; P=0.4299	df=2,6; F=31.09; P=0.0007	df=2,6; F=7.32; P=0.0246	df=2,6; F=9.56; P=0.0136	df=2,6; F=13.25; P=0.0063
DW	df=2,6; F=1.15; P=0.3788	df=2,6; F=0.38; P=0.6967	df=2,6; F=2.06; P=0.2085	df=2,6; F=21.07; P=0.0019	df=2,6; F=35.68; P=0.0005

분획용매, 처리농도 별 시라자 추출물에 대한 화랑곡나방 기피율 통계량

처리농도(%)	1	5	10	50	100
분획용매					
Hexane	df=2,6; F=90.60; P<0.0001	df=2,6; F=275.47; P<0.0001	df=2,6; F=138.55; P<0.0001	df=2,6; F=65.04; P<0.0001	df=2,6; F=24.66; P=0.0013
Ether	df=2,6; F=5.13; P=0.0502	df=2,6; F=40.76; P=0.0003	df=2,6; F=8.08; P=0.0198	df=2,6; F=0.03; P=0.9703	df=2,6; F=4.16; P=0.0735
EtOAc	df=2,6; F=1.46; P=0.3039	df=2,6; F=130.20; P<0.0001	df=2,6; F=271.50; P<0.0001	df=2,6; F=7.87; P=0.0210	df=2,6; F=4.44; P=0.0656
DW	df=2,6; F=3.18; P=0.1146	df=2,6; F=29.74; P=0.0008	df=2,6; F=13.48; P=0.0060	df=2,6; F=46.50; P=0.0002	df=2,6; F=406.50; P<0.0001

분획용매, 처리농도 별 인진 추출물에 대한 화랑곡나방 기피율 통계량

처리농도(%)	1	5	10	50	100
분획용매					
Hexane	df=2,6; F=5.15; P=0.0499	df=2,6; F=26.16; P=0.0011	df=2,6; F=10.01; P=0.0123	df=2,6; F=2.61; P=0.1530	df=2,6; F=16.43; P=0.0037
Ether	df=2,6; F=0.38; P=0.6976	df=2,6; F=144.15; P<0.0001	df=2,6; F=18.77; P=0.0026	df=2,6; F=0.29; P=0.7556	df=2,6; F=0.24; P=0.7927
EtOAc	df=2,6; F=37.50; P=0.0040	df=2,6; F=115.80; P<0.0001	df=2,6; F=59.55; P=0.0001	df=2,6; F=7.96; P=0.0205	df=2,6; F=1261.50; P<0.0001
DW	df=2,6; F=15.98; P=0.1146	df=2,6; F=40.38; P=0.0003	df=2,6; F=27.72; P=0.0009	df=2,6; F=123.61; P<0.0001	df=2,6; F=15.22; P=0.0045

분획용매, 처리농도 별 오매 추출물에 대한 화랑곡나방 기피율 통계량

처리농도(%)	1	5	10	50	100
분획용매					
Hexane	df=2,6; F=3.02; P=0.1235	df=2,6; F=2.33; P=0.1808	df=2,6; F=36.30; P=0.0004	df=2,6; F=17.60; P=0.0031	df=2,6; F=222.004; P<0.0001
Ether	df=2,6; F=35.42; P=0.0005	df=2,6; F=6.31; P=0.0334	df=2,6; F=37.97; P=0.0004	df=2,6; F=125.30; P<0.0001	df=2,6; F=17.87; P=0.0030
EtOAc	df=2,6; F=2.12; P=0.2016	df=2,6; F=28.50; P=0.0009	df=2,6; F=2.73; P=0.1439	df=2,6; F=90.19; P<0.0001	df=2,6; F=34.37; P=0.0005
DW	df=2,6; F=49.30; P=0.0002	df=2,6; F=8.47; P=0.0179	df=2,6; F=237.00; P<0.0001	df=2,6; F=54.04; P=0.0013	df=2,6; F=12.10; P=0.0078

분획용매, 처리농도 별 오배자 추출물에 대한 화랑곡나방 기피율 통계량

처리농도(%)	1	5	10	50	100
분획용매					
Hexane	df=2,6; F=12.65; P=0.0070	df=2,6; F=2.46; P=0.1660	df=2,6; F=1.39; P=0.3198	df=2,6; F=14.70; P=0.0049	df=2,6; F=7.33; P=0.0245
Ether	df=2,6; F=3.55; P=0.0963	df=2,6; F=3.68; P=0.0907	df=2,6; F=16.93; P=0.0034	df=2,6; F=3534.00; P<0.0001	df=2,6; F=58.34; P=0.0001
EtOAc	df=2,6; F=1.77; P=0.2489	df=2,6; F=0.99; P=0.4249	df=2,6; F=8.74; P=0.0167	df=2,6; F=8.29; P=0.0188	df=2,6; F=97.41; P<0.0001
DW	df=2,6; F=138.75; P<0.0001	df=2,6; F=7.07; P=0.0265	df=2,6; F=15.94; P=0.0040	df=2,6; F=10.13; P=0.0119	df=2,6; F=82.02; P<0.0001

표 18. 각 한약재, 분획용매, 처리농도에 따른 화랑곡나방 유충의 기피율 통계량

본 연구결과에서 보는 것처럼 계피를 제외하고 거짓쌀도둑거저리 성충에서 조사된 각 한약재 분획물의 기피율과 화랑곡나방 유충에서 보이는 기피율의 차이가 크게 나타나는 것에 대하여 기피 시험에서 처리된 성분의 농도 이외에 처리된 절대량이 화랑곡나방 유충의 기피율에 영향을 줄 수 있을 것으로 판단되어 계피를 제외한 4종의 한약재 분획물 처리양에 따른 화랑곡나방 유충의 기피율을 기피테스트 관 시험법으로 다시 조사하였다.

시험관 좌측 먹이 제공부 끝부터 우측 먹이제공부 끝까지 6 cm 간격으로 A,B,C,D,E 구역으로 나눈 후 분획 용매만 적시고 건조한 여과지(8.4 cm × 4 cm)와, 각 분획용매로 분획된 분획물 유효성분을 여과지 cm²당 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1mg이 도포되도록 처리하여 건조한 여과지(8.4 cm × 4 cm)를 각각 좌, 우의 방충물질 시험부 내부에 부착한 뒤 화랑곡나방 3령 유충 10마리를 중앙의 공시충 투입부에 투입한 뒤, 파이프 양쪽 말단부에 동일한 양의 먹이를 놓고 암조건에 보관하면서 투입 후 1시간, 2시간, 3시간째에 각 구역에 위치한 화랑곡나방 3령 유충 수를 조사하여 다음의 식으로 기피율을 조사하였다.

$$\text{기피율(\%)} = (\text{Nc} - \text{Nt}) / (\text{Nc} + \text{Nm} + \text{Nt}) \times 100$$

여기서 Nc는 무처리구(A, B 구역)에 있는 개체수, Nt는 기피물질 처리구(D, E 구역)에 있는 개체수, Nm은 중앙(C 구역)에 있는 개체수를 나타낸다. 각 분획물에 대한 기피 효과시험은 각 시험별로 5반복씩 수행되었으며 무처리구와 기피물질 처리구 간 차이의 분석은 Student's t-test를 이용하여 분석하였다. 그림 39~42는 각 한약재, 분획용매, 처리농도에 따른 처리경과 시간에 따른 화랑곡나방 3령 유충의 분포변동 양상이다.

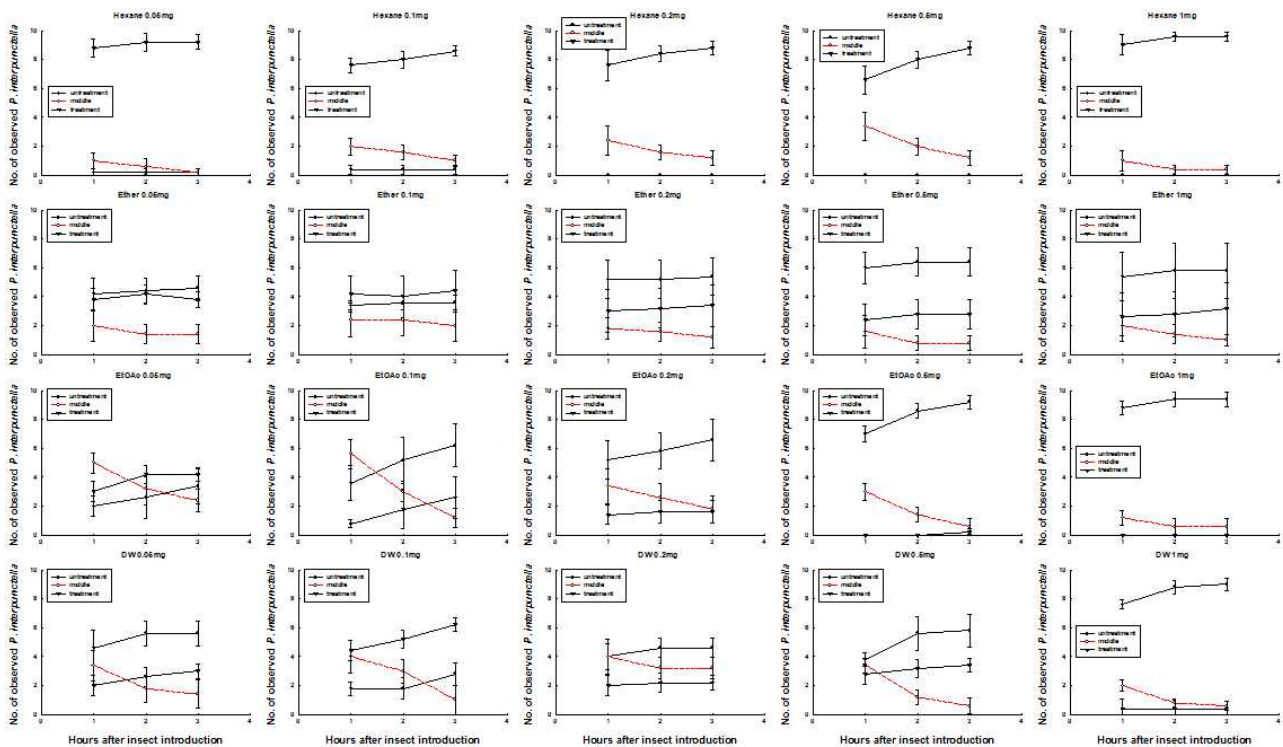


그림 39. 시라자 분획물 처리 시간에 따른 화랑곡나방 유충의 분포 변화

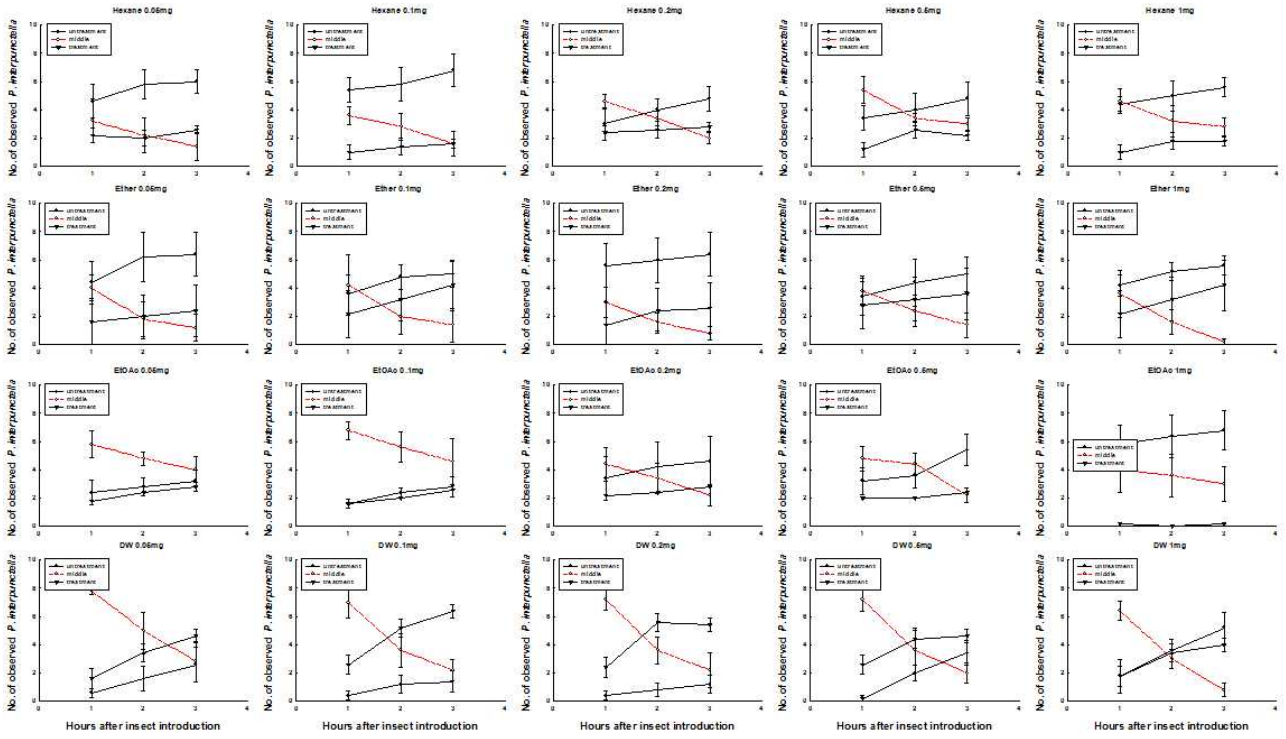


그림 40. 오매 분획물 처리 시간에 따른 화랑곡나방 유충의 분포 변화

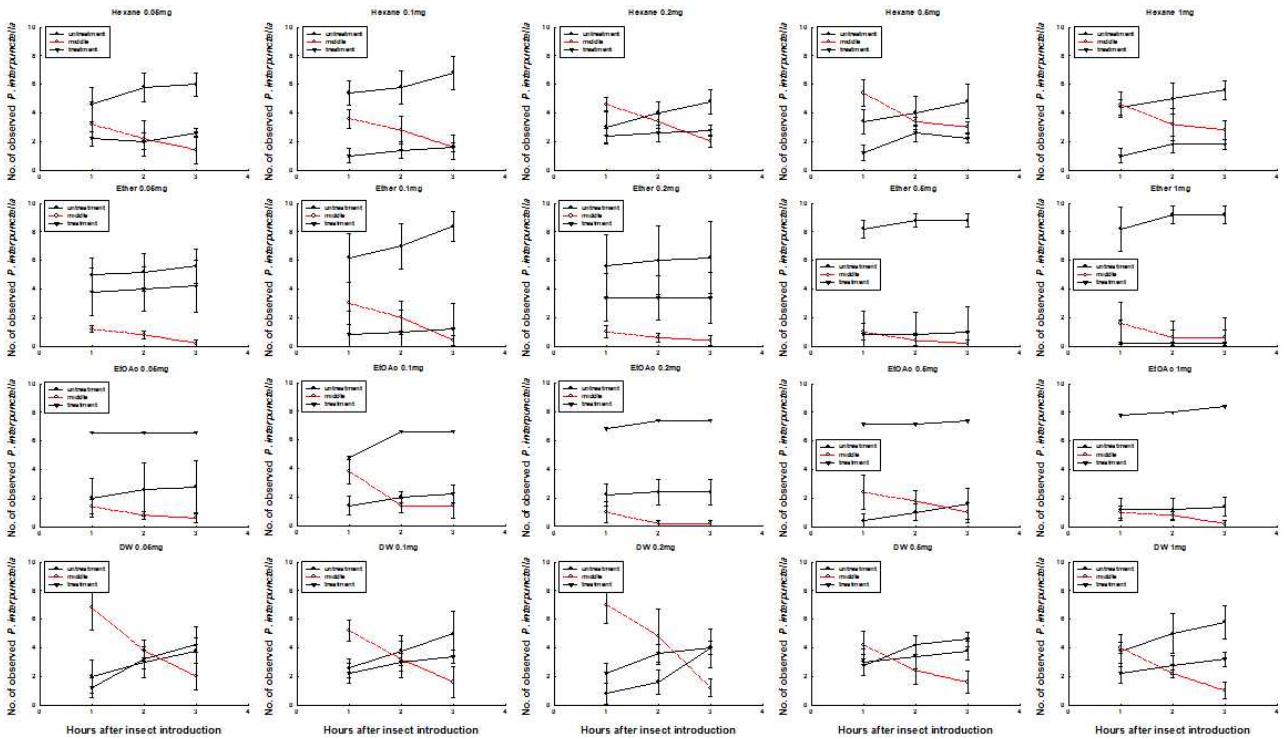


그림 41. 오배자 분획물 처리 시간에 따른 화랑곡나방 유충의 분포 변화

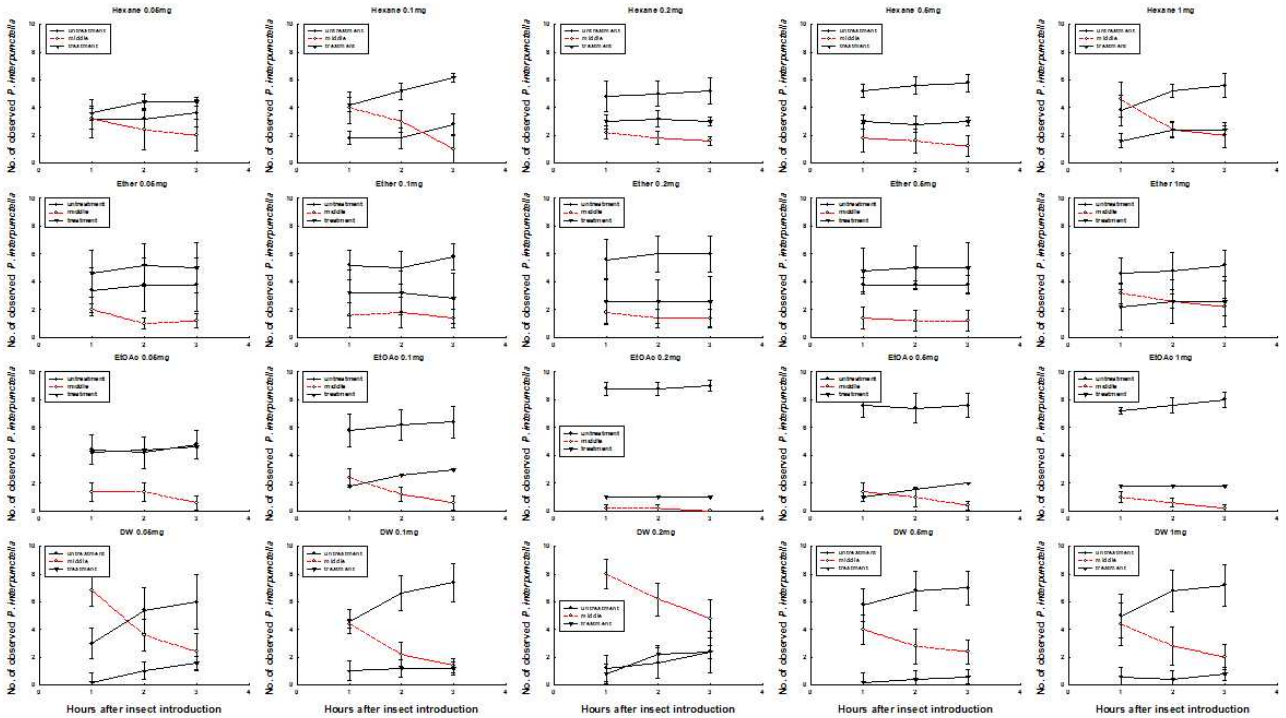


그림 42. 인진 분획물 처리 시간에 따른 화랑곡나방 유충의 분포 변화

연구결과 시라자(*Anethum graveolense*), 오매(*Prunus mume*), 오배자(*Rhus javanica*), 인진(*Artemisia capillaris*)의 Hexane, Diethyl ether, Ethyl acetate, DW 용매 분획물을 여과지 cm²당 균일하게 도포되도록 도포량을 조절한 경우 시라자 Hexane 분획물 모든 처리량과 오매 DW 분획물 모든 처리량, 오배자 Ethyl acetate 분획물 모든 처리량에서 뛰어난 기피 효과가 나타나는 것으로 조사되었다. 그 외에 모든 한약재, 분획용매의 모든 처리량에서 화랑곡나방 유충에 대한 기피효과는 처리농도에 따른 결과와 유사하게 크게 나타나지 않는 것으로 조사되었다(표 23 통계처리 결과). 표 19~22은 각 한약재, 분획용매, 처리량에 따른 화랑곡나방 유충의 기피율(%)을 종합하여 분석한 기피율이다.

처리량(mg/cm ²)	0.05	0.1	0.2	0.5	1
분획용매					
Hexane	90.00±12.47	76.67±9.72	82.67±10.90	78.00±10.17	94.00±7.23
Ether	-4.00±24.20	6.67±28.96	-20.67±45.67	-36.00±33.20	-28.00±59.47
EtOAc	11.33±26.94	-32.67±38.40	-43.33±31.80	-82.00±8.69	-92.00±7.67
DW	-27.33±29.19	31.13±17.68	-22.67±21.13	-19.46±30.95	-80.67±9.83

표 19. 시라자 분획물에 대한 화랑곡나방 유충의 기피율

처리량(mg/cm ²) 분획용매	0.05	0.1	0.2	0.5	1
Hexane	-32.00±16.77	-46.67±23.21	-12.00±31.85	-20.67±29.57	-34.44±19.58
Ether	-36.67±46.84	-12.42±16.85	-37.09±43.67	-10.67±45.91	-18.00±14.64
<u>EtOAc</u>	-4.67±14.26	-2.00±14.06	-14.67±48.63	-19.33±23.86	-62.00±24.34
DW	16.00±21.00	37.33±22.29	40.67±18.62	20.00±19.72	-4.67±33.80

표 20. 오매 분획물에 대한 화랑곡나방 유충의 기피율

처리량(mg/cm ²) 분획용매	0.05	0.1	0.2	0.5	1
Hexane	-63.33±17.95	-44.67±12.61	-62.00±18.94	-33.33±24.83	-47.33±10.38
Ether	-12.67±41.06	-62.00±35.32	-25.33±83.12	-77.33±16.06	-86.67±18.26
<u>EtOAc</u>	41.33±60.26	41.06±18.82	48.67±32.20	67.67±30.68	68.00±22.19
DW	-0.67±32.09	-9.33±43.23	14.00±37.00	4.67±18.65	-21.33±43.24

표 21. 오배자 분획물에 대한 화랑곡나방 유충의 기피율

처리량(mg/cm ²) 분획용매	0.05	0.1	0.2	0.5	1
Hexane	8.00±27.55	30.67±18.17	-18.67±34.53	-26.00±24.77	-27.33±10.65
Ether	12.67±59.60	-22.67±26.39	-32.67±51.93	11.33±21.42	-24.00±41.06
<u>EtOAc</u>	-0.67±45.61	-36.67±35.43	-78.67±14.45	-60.00±26.25	-58.00±14.83
DW	-38.67±35.33	-50.67±36.09	2.00±30.97	-61.33±25.67	-57.33±29.19

표 22. 인진 분획물에 대한 화랑곡나방 유충의 기피율

분획용매, 처리량 별 시라자 추출물에 대한 화랑곡나방 기피율 통계량

처리량(mg/cm ²) 분획용매	0.05	0.1	0.2	0.5	1
Hexane	df=2,12; F=295.78; P<0.0001	df=2,12; F=216.06; P<0.0001	df=2,12; F=119.89; P<0.0001	df=2,12; F=117.39; P<0.0001	df=2,12; F=397.72; P<0.0001
Ether	df=2,12; F=6.02; P=0.0154	df=2,12; F=1.47; P=0.2676	df=2,12; F=4.20; P=0.0413	df=2,12; F=14.10; P=0.0007	df=2,12; F=3.60; P=0.0597
EtOAc	df=2,12; F=0.85; P=0.4506	df=2,12; F=3.99; P=0.0470	df=2,12; F=8.26; P=0.0055	df=2,12; F=205.69; P<0.0001	df=2,12; F=330.79; P<0.0001
DW	df=2,12; F=5.32; P=0.0221	df=2,12; F=8.94; P=0.0054	df=2,12; F=4.14; P=0.0429	df=2,12; F=8.01; P=0.0062	df=2,12; F=559.62; P<0.0001

분획용매, 처리량 별 인진 추출물에 대한 화랑곡나방 기피율 통계량

처리량(mg/cm ²) 분획용매	0.05	0.1	0.2	0.5	1
Hexane	df=2,12; F=0.83; P=0.4580	df=2,12; F=7.96; P=0.0063	df=2,12; F=5.72; P=0.0180	df=2,12; F=9.71; P=0.0031	df=2,12; F=8.61; P=0.0048
Ether	df=2,12; F=2.62; P=0.1141	df=2,12; F=7.65; P=0.0072	df=2,12; F=4.92; P=0.0275	df=2,12; F=11.98; P=0.0014	df=2,12; F=2.70; P=0.1074
EtOAc	df=2,12; F=4.53; P=0.0343	df=2,12; F=12.94; P=0.0010	df=2,12; F=294.85; P<0.0001	df=2,12; F=43.02; P<0.0001	df=2,12; F=161.69; P<0.0001
DW	df=2,12; F=5.40; P=0.0212	df=2,12; F=13.48; P=0.0009	df=2,12; F=9.32; P=0.0036	df=2,12; F=17.56; P=0.0003	df=2,12; F=11.41; P=0.0017

분획용매, 처리량 별 오매 추출물에 대한 화랑곡나방 기피율 통계량

처리량(mg/cm ²) 분획용매	0.05	0.1	0.2	0.5	1
Hexane	df=2,12; F=6.38; P=0.0129	df=2,12; F=18.14; P=0.0002	df=2,12; F=0.98; P=0.4021	df=2,12; F=3.89; P=0.0498	df=2,12; F=9.17; P=0.0038
Ether	df=2,12; F=4.05; P=0.0453	df=2,12; F=1.42; P=0.2786	df=2,12; F=6.91; P=0.0101	df=2,12; F=0.81; P=0.4662	df=2,12; F=8.66; P=0.0047
EtOAc	df=2,12; F=7.64; P=0.0072	df=2,12; F=9.97; P=0.0028	df=2,12; F=0.51; P=0.6130	df=2,12; F=4.32; P=0.0386	df=2,12; F=12.04; P=0.0014
DW	df=2,12; F=8.24; P=0.0056	df=2,12; F=9.40; P=0.0035	df=2,12; F=12.78; P=0.0011	df=2,12; F=4.04; P=0.0457	df=2,12; F=0.14; P=0.8718

분획용매, 처리량 별 오배자 추출물에 대한 화랑곡나방 기피율 통계량

처리량(mg/cm ²) 분획용매	0.05	0.1	0.2	0.5	1
Hexane	df=2,12; F=114.51; P<0.0001	df=2,12; F=130.28; P<0.0001	df=2,12; F=47.13; P<0.0001	df=2,12; F=8.19; P=0.0057	df=2,12; F=183.26; P<0.0001
Ether	df=2,12; F=9.60; P=0.0032	df=2,12; F=16.32; P=0.0004	df=2,12; F=2.98; P=0.0887	df=2,12; F=177.99; P<0.0001	df=2,12; F=71.19; P<0.0001
EtOAc	df=2,12; F=6.90; P=0.0101	df=2,12; F=18.68; P=0.0002	df=2,12; F=30.72; P<0.0001	df=2,12; F=23.00; P<0.0001	df=2,12; F=93.47; P<0.0001
DW	df=2,12; F=0.87; P=0.4427	df=2,12; F=0.24; P=0.7867	df=2,12; F=1.38; P=0.2896	df=2,12; F=1.04; P=0.3839	df=2,12; F=2.84; P=0.0979

표 23. 각 한약재, 분획용매, 처리량 따른 화랑곡나방 유충의 기피율 통계량

본 연구의 결과를 볼 때 계피와 시라자에서는 거짓쌀도둑거저리 성충과 화랑곡나방 유충에서 기피효과를 발현하였으나 나머지 오매, 인진, 오배자의 경우에는 분획용매에 따라 차이가 있으나 거짓쌀도둑거저리 성충에서는 대체로 기피효과를 유도하지만 화랑곡나방 유충에서는 거의 대부분 기피효과를 유도하지 않는 것으로 조사되어 동일한 기피물질(성분)을 처리한다 하더라도 해충 종, 발육단계, 시험방법에 따라 기피율의 차이가 생길 수 있음을 규명하였다. 따라서 특정 기피물질(성분)의 효과를 검증하기 위해서는 대상해충 종, 발육단계, 처리농도, 처리량, 기피효과 시험법 등의 독립변수에 대한 세밀한 조절과 다량의 기피효과 반복실험이 필요하며 본 연구에서와 같이 한 가지 한약재에서 추출한 추출물의 기피효과 검증 시험에서도 함유된 유효성분을 여러 가지 용매로 분획 후 농도별, 처리량별 기피시험을 통해 범위를 축소해나가는 스크리닝 단계가 반복되어야 할 것으로 판단된다. 본 연구에서는 위와 같은 여러 단계의 스크리닝 연구를 통해 거짓쌀도둑거저리 성충과 화랑곡나방 유충 모두에게 효과적으로 기피효과를 유도하는 시라자, 계피의 헥산 분획물을 대상으로 LC-MS를 이용한 유효성분 분석을 진행하고 3차년도 연구에서 유효성분의 유기합성, 효과 극대화를 위한 조합비 선정, 대량생산 방안 및 적용방안에 대한 연구를 지속하고자 한다.

(6) 선정된 1차 후보군 추출물 함유 성분 분석을 통한 기피효과 유도 성분 데이터베이스 작성

본 연구에서는 기피효과 유도 성분의 데이터베이스 작성을 위한 1차 단계로 에탄올 초음파 추출법을 통해 추출된 1차 후보군 추출물의 대략적인 함유성분을 GC-MS를 활용하여 조사하였다. 분석법은 1차 후보군(계피(*Cinnamomum japonicum*), 시라자(*Anethum graveolense*), 오매(*Prunus mume*), 오배자(*Rhus javanica*), 인진(*Artemisia capillaris*)) 100 g을 음건 세절후 80% ethanol 500ml 를 첨가, 초음파 추출기(Sonics and Materials Inc., Model VC505, Danbury, CT, USA)를 이용하여 500 watt, 20 kHz, 80% amplitude 조건으로 2시간 동안 추출, 여과한 추출액을 확보하였다. 확보된 각 추출물 0.6 ml과 DW 0.6ml, 분석용매(Solvent A(ethyl acetate: hexane: methylene chloride, 1: 1: 1, v/v/v) 0.2ml를 혼합 후 2분간 혼합(스터링), 13,000rpm에서 5분간 원심분리 후 상등액 4 μ l을 분리하여 GC-MS 분석을 하였다. GC-MS 분석에 사용한 분석용매와 각 1차 후보군 에탄올 추출액에서 분석된 결과는 그림 43과 같다. 분석 결과 모든 추출물에서 사용한 solvent A와 비슷한 compound pattern을 보이며 계피추출물의 경우 주성분으로 보이는 3, 3a, 5a 성분들이 추가로 존재하는 것이 확인 되었으며 시라자 추출물은 가장 많은 1, 2, 3, 5, 6, 8 성분들이 추가로 존재하는 것으로 확인되었다. 또한 인진 추출물의 경우에는 1a, 1b, 6a, 6b, 9b 성분들이 추가로 존재하며 오매와 오배자 추출물의 경우에는 거의 동일한 성분 패턴을 보이며 1, 4b, 7a, 5a, 7b 성분들이 추가로 존재하는 것으로 확인되었다. 그러나 본 GC-MS 분석의 경우 Injection을 덜 정제된 crude한 상태로 했기 때문에 기피효과를 나타내는 유효성분 및 기타 성분을 정확하게 분석하기 위해서는 전처리과정이 필요할 것으로 판단되며 정량 분석을 위해서는 원래 나온 양에서 solvent peak 부분을 제거해 줘야 할 것으로 판단된다. 따라서 본 연구과제에서는 우선적으로 가장 기피효과가 크게 나타나는 시라자, 계피 추출물의 헥산 분획물을 대상으로 TLC상의 band와 HPLC 상의 피크를 확인하며 LC-MS를 통한 성분규명을 진행하였다(LC-MS 성분규명 진행 중 : 현재 2019년 12월 결과 도출).

Solvent A(ethyl acetate: hexane: methylene chloride, 5: 1: 1, v/v/v/v)

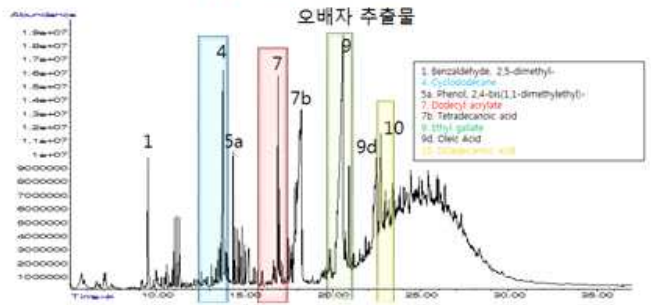
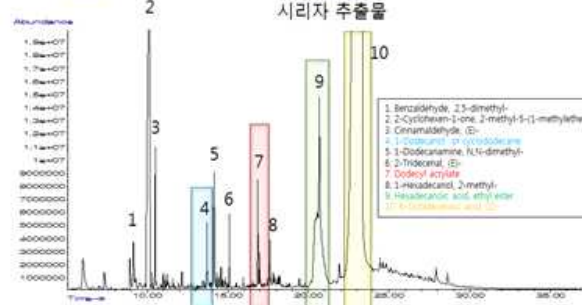
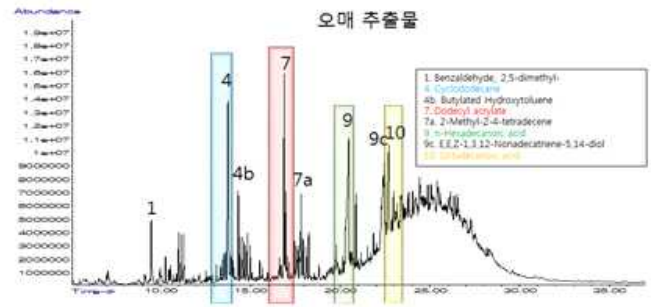
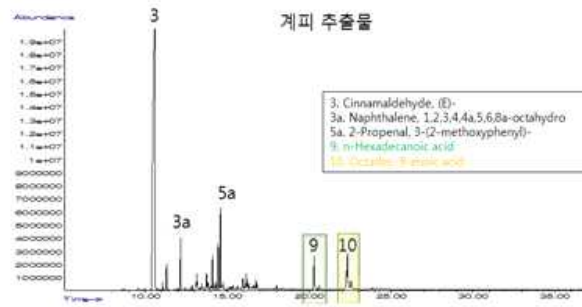
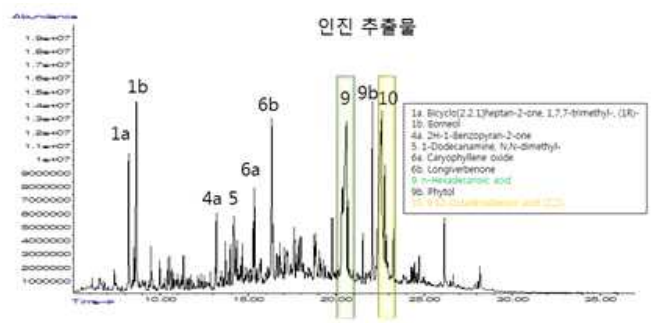
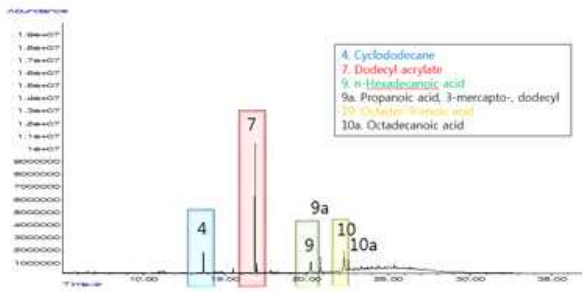
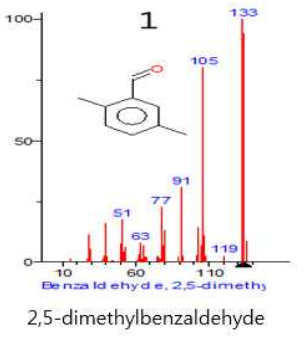
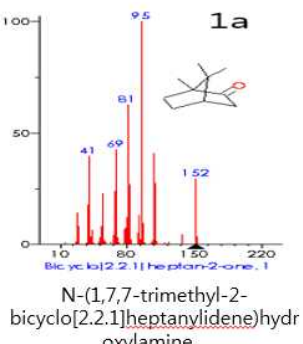
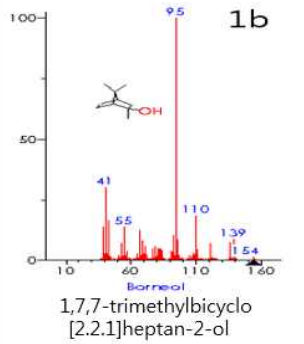
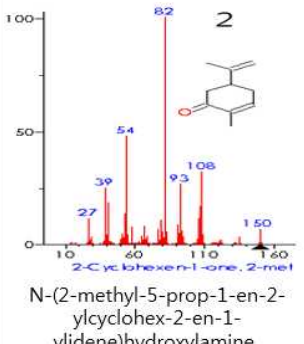
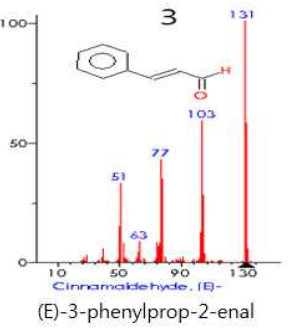
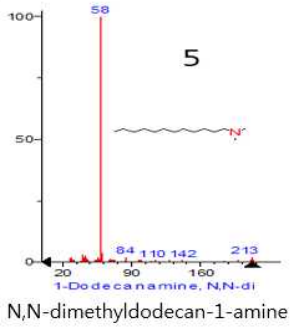
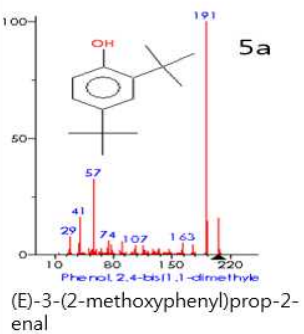
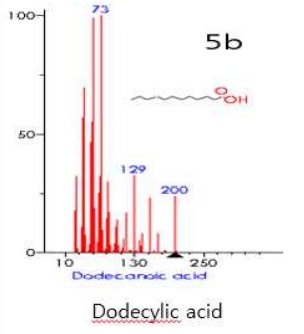
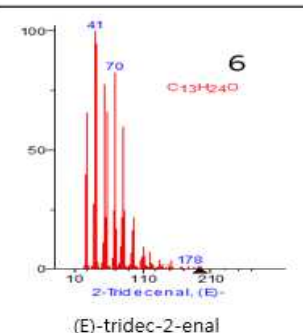
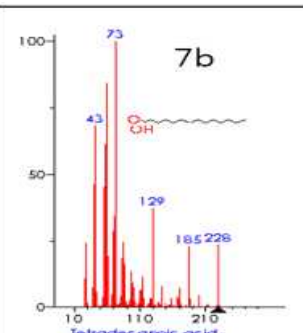
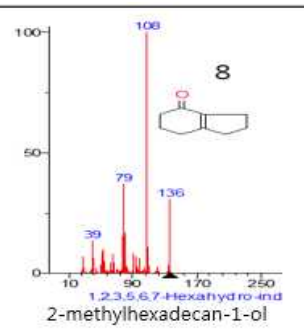
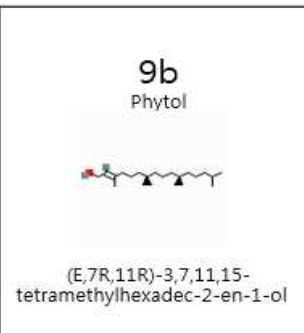
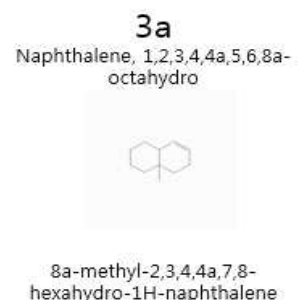
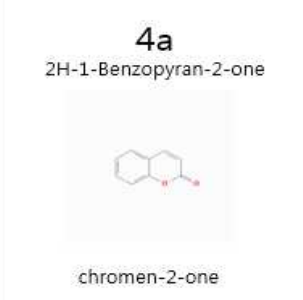
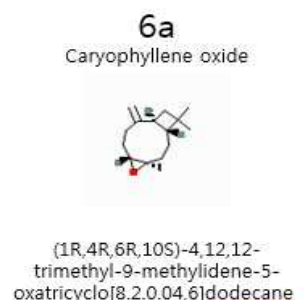
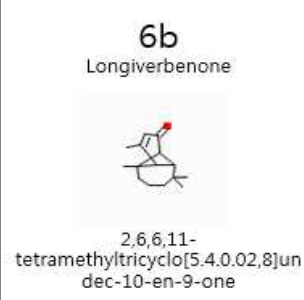


그림 43. 1차 후보 한약재 추출물 함유성분 GC-MS 분석

한약재 추출물에 함유된 기피효과 유도 성분에 대한 데이터베이스 작성은 대상해충에 대해 기피효과를 보이는 1차 한약재 후보군 추출물을 대상으로 GC-MS 분석을 통해 함유성분을 분석하여 대략적인 함유성분 데이터베이스를 작성하고 여러 가지 유기용매로 분획한 분획물 중 가장 기피효과가 크게 나타나는 시라자, 계피, 헥산 분획물을 대상으로 TLC상의 band, HPLC 상의 피크 확인, LC-MS 성분규명, 규명된 성분에 대한 기피효과 시험을 통해 기피효과 유도성분을 분류하여 완성하고자 한다. 그림 44은 1차 한약재 후보군 추출물을 대상으로 GC-MS 분석을 통해 분석한 함유성분을 기반으로 1차로 작성된 기피효과 유도성분 함유 한약재 성분 데이터베이스를 나타낸 것이다.

 <p>1 Benzaldehyde, 2,5-dimethyl</p> <p>2,5-dimethylbenzaldehyde</p>	 <p>1a Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1</p> <p>N-(1,7,7-trimethyl-2-bicyclo[2.2.1]heptan-2-ylidene)hydroxylamine</p>	 <p>1b Bornanol</p> <p>1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol</p>	 <p>2 2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl</p> <p>N-(2-methyl-5-prop-1-en-2-ylcyclohex-2-en-1-ylidene)hydroxylamine</p>
<p>Formula: C₉H₁₀O Molecular weight : 134.17g/mol Origin:</p>	<p>Formula: C₁₀H₁₇NO Molecular weight : 167.25g/mol Origin:</p>	<p>Formula: C₁₀H₁₈O Molecular weight : 154.25g/mol Origin:</p>	<p>Formula: C₁₀H₁₅NO Molecular weight : 165.23g/mol Origin:</p>
 <p>3 Cinnamaldehyde, (E)-</p> <p>(E)-3-phenylprop-2-enal</p>	 <p>5 1-Dodecanamine, N,N-di</p> <p>N,N-dimethyldodecan-1-amine</p>	 <p>5a Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethyl</p> <p>(E)-3-(2-methoxyphenyl)prop-2-enal</p>	 <p>5b Dodecanoic acid</p> <p>Dodecyclic acid</p>
<p>Formula: C₉H₈O Molecular weight : 132.16g/mol Origin:</p>	<p>Formula: C₁₄H₃₁N Molecular weight : 213.4g/mol Origin:</p>	<p>Formula: C₁₀H₁₀O₂ Molecular weight : 162.18g/mol Origin:</p>	<p>Formula: C₁₂H₂₄O₂ Molecular weight : 200.32g/mol Origin:</p>
 <p>6 C₁₃H₂₄O</p> <p>(E)-tridec-2-enal</p>	 <p>7b Tetradeconoic acid</p>	 <p>8 1,2,3,5,6,7-Hexahydro-ind</p> <p>2-methylhexadecan-1-ol</p>	 <p>9b Phytol</p> <p>(E,7R,11R)-3,7,11,15-tetramethylhexadec-2-en-1-ol</p>
<p>Formula: C₁₃H₂₄O Molecular weight : 196.33g/mol Origin:</p>	<p>Formula: Molecular weight : Origin:</p>	<p>Formula: C₁₇H₃₆O Molecular weight : 256.5g/mol Origin:</p>	<p>Formula: C₂₀H₄₀O Molecular weight : 296.5g/mol Origin:</p>
<p>3a Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro</p>  <p>8a-methyl-2,3,4,4a,7,8-hexahydro-1H-naphthalene</p>	<p>4a 2H-1-Benzopyran-2-one</p>  <p>chromen-2-one</p>	<p>6a Caryophyllene oxide</p>  <p>(1R,4R,6R,10S)-4,12,12-trimethyl-9-methylidene-5-oxatricyclo[8.2.0.0.4,6]dodecane</p>	<p>6b Longiverbenone</p>  <p>2,6,6,11-tetramethyltricyclo[5.4.0.0.2,8]undec-10-en-9-one</p>
<p>Formula: C₁₁H₁₈ Molecular weight : 150.26g/mol Origin:</p>	<p>Formula: C₉H₆O₂ Molecular weight : 146.14g/mol Origin:</p>	<p>Formula: C₁₅H₂₄O Molecular weight : 220.35g/mol Origin:</p>	<p>Formula: C₁₅H₂₂O Molecular weight : 218.33g/mol Origin:</p>



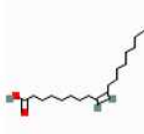
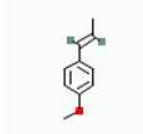
<p>7a 2-Methyl-Z-4-tetradecene</p>  <p>(Z)-2-methyltetradec-4-ene</p>	<p>9c E,E,Z-1,3,12-Nonadecatriene-5,14-diol</p>  <p>(3E,12Z)-nonadeca-1,3,12-triene-5,14-diol</p>	<p>9d Oleic Acid</p>  <p>(Z)-octadec-9-enoic acid</p>	<p>Anethole</p>  <p>1-methoxy-4-[(E)-prop-1-enyl]benzene</p>
<p>Formula:C15H30 Molecular weight :210.4g/mol Origin:</p>	<p>Formula:C19H34O2 Molecular weight :294.5g/mol Origin:</p>	<p>Formula:C18H34O2 Molecular weight : 282.5g/mol Origin:</p>	<p>Formula:C10H12O Molecular weight : 148.2g/mol Origin:</p>

그림 44. 1차 한약재 후보군 추출물 GC-MS 분석 기반 기피효과 유도성분 데이터베이스

(7) 천연 유래 물질의 추출법 최적화 확립

(가) 국내의 논문분석을 결과 방출효과를 나타내는 허브, 향신료, 농작물 및 정유물질에서 유효성분을 추출할 때 대표적으로 사용하는 방법은 열수 추출법과 에탄올 추출법이다. 본 과제에서는 음건 세절한 한약재 100 g에 80% ethanol 500ml 를 첨가한 후, 초음파 추출기(Sonics and Materials Inc., Model VC505, Danbury, CT, USA)를 이용하여 500 watt, 20 kHz, 80% amplitude 조건으로 2시간 동안 추출한 후 여과지(Whatman No. 1 filter paper)로 여과하여 추출액 확보하고 추출액을 회전증발농축기를 이용하여 용매(에탄올, 증류수)를 모두 제거한 후(건조중량, 수율 측정) 증류수 500ml을 넣고 현탁시킨 후, 분액깔때기에 넣고, Hexane(500ml × 3), Diethyl ether(500ml × 3), Ethyl acetate(500ml × 3)를 사용하여 순차적으로 Solvent-solvent partition 을 진행하였다. 이렇게 얻어진 Hexane, Diethyl ether, Ethyl acetate, DW 분획물을 회전증발 농축기를 이용하여 각 용매를 모두 제거하고(중량 측정) 분획 용매에 농도별, 처리량별로 함침 후 대상해충에 대한 기피시험을 실시하였다. 시험 결과 시라자 Hexane 분획물에서 가장 높은 기피율(Percentage repellency)을 나타냈으므로, Hexane 분획의 양을 가장 많이 얻을 수 있는 추출 조건을 탐색하였다. 단순히 추출되는 파우더의 양이 많다고 해서 방출효과가 뛰어난 것은 아니므로 물리적인 수율($\frac{\text{추출분말의무게}(g)}{\text{사용한시료의무게}(g)} \times 100$)에 의한 최적추출법 탐색이 아닌 방출효과를 나타내는 용매 분획의 함량을 기준으로 최적추출법을 탐색하였다(표 24).

한약재	에탄올 %(w/w)	용매 전체(g)	한약재(g)	HEX층
시라자	100%	500	100	3.63
	75%	500	100	3.60
	50%	500	100	0.37
	25%	500	100	0.34

표 24. 에탄올 농도별 시라자 Hexane 분획물 수득량

연구 결과 에탄올 100% 추출 용매에서 Hexane층 분획물 양이 가장 많이 추출되는 것으로 조

사되어 음건 세절한 시라자 200g에 에탄올 100% 용매 1000 ml을 추출용매로 사용하여 초음파 추출기로 추출 후, 수율과 Hexane층 수득량을 조사하여 효과적인 추출법을 확인하였다(표 25).

한약재	에탄올 % (w/w)	용매 전체 (g)	한약재(g)	건조중량(g)	수율(%)	hex층(g)
시라자	100%	1000	200	17.49	8.745	6.50
시라자	100%	1000	200	18.1	9.05	6.76
<u>시라자</u>	100%	1000	200	19.14	9.57	7.03

표 25. 시라자 초음파 에탄올 추출조건 및 추출 결과

(8) 추출된 천연 방충 물질의 방충 유효 성분 확보 및 물질 규명

(가) 추출된 천연 방충 물질의 분획을 통한 방충 유효 성분 획득을 위해 본 연구결과 선정된 초음파 에탄올 추출법으로 추출하고 Hexane으로 분획한 시라자 분획물 5g을 실리카겔 컬럼에서 (3×35cm, pore size 60 Å, 70-230 mesh) Hexane : Ethyl acetate(100:1, 50:1, 25:1, 15:1, 8:1, 4:1, 2:1, 1:1)으로 순차적으로 용출시키고, 최종적으로는 methanol로 용출시켜 9개의 subfraction(1-9)을 확보한 후 회전증발농축기로 감압 농축하여 각 subfraction(1-9)의 무게를 확인하였다(표 26).

Test tube no.	Fraction no.	amount
1~35	X(지방산)	X
36~89	Fraction1	40mg
90~150	Fraction2	60mg
151~222	Fraction3	800mg
223~366	Fraction4	930mg
367~480	Fraction5	750mg
481~558	Fraction6	33mg
559~624	Fraction7	13mg
625~840	Fraction8	850mg
841~1064	Fraction9	600

표 26. 시라자 Hexane 분획물 subfraction 별 중량

시라자 Hexane 분획물을 용출하여 확보한 subfraction에서의 기피효과 유도 성분의 함유여부와 함유 정도(성분 수, 량)를 조사하고 확인된 기피효과 유도 성분의 구조를 분석하기 위해 우선 화랑곡나방 유충을 공시충으로 기피테스트관 시험법을 통해 각 subfraction 물질에서의 기피효과 유도성분의 함유여부를 조사하였다. 화랑곡나방 유충을 공시충으로 한 기피테스트 관 시험은 각 subfraction의 물질을 Hexane에 동일한 농도로 녹인 후(subfraction 중량이 적은 경우 혼합하여 용해, 1+2, 6+7) 여과지에 0.2mg/cm² 양으로 처리하여 위에서 언급한 기피테스트 관 시험을 진행하여 기피율을 도출하였다. 연구결과 처리 후 1, 2, 3시간 경과에 따라 1에서 8

subfraction에서 모두 기피효과가 나타나는 것으로 조사되었으나 실험의 표준 편차가 커 이를 감안 할 때 1+2, 3, 4 subfraction에서 통계적으로 유의한 기피효과가 관찰되는 것으로 조사되었다(표 27).

plant – solvent	fraction	1h	2h	3h
		Exposure concentration (mg/cm ²)	Exposure concentration (mg/cm ²)	Exposure concentration (mg/cm ²)
		0.2	0.2	0.2
시라자 – HEX	1+2	62 ± 18	76 ± 17	89 ± 10
	3	72 ± 24	81 ± 18	89 ± 14
	4	43 ± 32	51 ± 30	60 ± 35
	5	19 ± 41	21 ± 44	26 ± 46
	6+7	25 ± 42	27 ± 48	29 ± 48
	8	3 ± 47	1 ± 50	1 ± 53
	9	-19 ± 28	-22 ± 26	-31 ± 29

표 27. 시라자 Hexane 분획물 subfraction 별 화랑곡나방 유충 기피율

시라자 Hexane 분획물 subfraction 별 화랑곡나방 유충 기피효과 연구 결과를 토대로 기피효과가 검증된 각 subfraction에 함유된 기피효과 유도 성분의 수를 박층크로마토그래피(TLC, Thin Layer Chromatography)를 이용, TLC상의 band로 용출 진행 상황을 확인하며 조사하였으며 이와 병행하여 HPLC 상의 피크를 확인하여 LC-MS를 통한 성분규명 조건을 확립 후 유효성분의 구조를 분석하였다(LC-MS를 통한 유효성분 구조분석을 현재 진행 중이며 결과는 2019년 11월 완료예정). 시라자 Hexane 분획물 subfraction 중 화랑곡나방 유충 기피효과가 검증된 각 subfraction의 HPLC 조건은 다음과 같다. 이동상 용매로 acetonitrile(formic acid 0.1%)과 DW(formic acid 0.1%)을 사용하고, 이동상의 조건은 0.8 mL/min의 유속에서 0min-acetonitrile: 20% DW:80%, 1min-acetonitrile:20% DW:80%, 21min-acetonitrile:100% DW:0%, 31min-acetonitrile:100% DW:0%, 32min-acetonitrile:20% DW:80%, 40min-acetonitrile:20% DW:80%의 gradient 조건에서 40분간 수행하였다. 각 subfraction 시료는 acetonitrile에 녹였고 농도는 100ppm로 하였다. 그림 45는 시라자 Hexane 분획물 subfraction 중 화랑곡나방 유충 기피효과가 검증된 각 subfraction의 TLC상의 band와 HPLC 상의 피크를 나타낸 것이다. 현재 계피 Hexane 분획물에 대해서 동일한 연구가 진행 중에 있다.

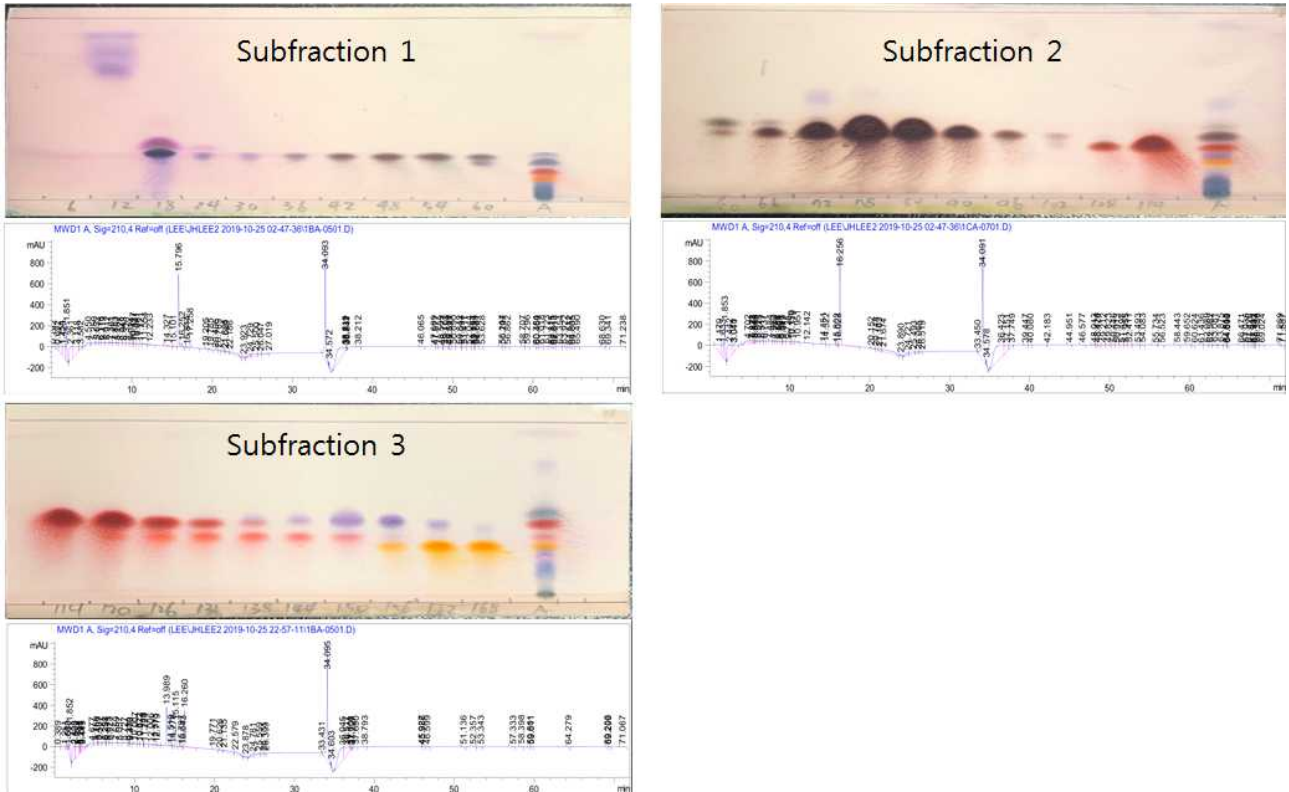


그림 45. 화랑곡나방 유충 기피효과 검증 시라자 Hexane 분획물 subfraction TLC, HPLC 결과

다. 3차 년도 연구수행 내용

(1) 천연식물 함유 방충 유효성분 규명을 위한 대규모 방충효과 분석용 공시충(화랑곡나방) 대량 사육/공급

본 연구에서 사용된 공시충은 전 세계적으로 다양한 종류의 곡물과 저장물을 가해하는 저장해충으로 매우 심각한 피해를 야기하는 해충 종인 나비목(Lepidoptera), 명나방과(Pyralidae)의 화랑곡나방(Indian meal moth)과 딱정벌레목(Coleoptera), 거저리과(Tenebrionidae)인 거저리(Red flour beetle)로 1~2차년도에는 위의 2종의 대량사육/공급 시스템을 유지하여 연구를 진행하였으나 1~2차년도 연구 결과 화랑곡나방 유충이 거저리 성충에 비해 방충성분에 대한 내성이 커 거저리 성충에 효과를 보이는 방충성분에 화랑곡나방 유충에 대해서는 방충효과를 보이지 않는 경우는 발생되나 반대로 화랑곡나방 유충에 방충효과를 보이는 성분은 거저리 성충에게도 방충효과를 보여 3차년도 연구에서는 화랑곡나방 유충을 공시충으로 선정하여 3차년도 연구에 필요한 대량의 동일연령, 감수성 개체를 연구기간동안 지속적으로 공급하였다(화랑곡나방 유충 20,000마리).

(가) 화랑곡나방의 대량사육 및 공급

우화 후 48시간 미만의 화랑곡나방 성충 30마리(암수 성비 6:4)를 플라스틱 페트리디쉬 (직경 10cm)에 투입, 24시간 산란 유도 후 산란된 알을 확보하고 여기에 인공사료(쌀겨 800g, yeast extract 200g, glycerol 500ml, methyl p-hydroxybenzoate 2g, sorbic acid 2g)를 투입 후 온도 $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 상대습도 60~70%, 향온향습기(JISICO)에서 대량 사육하면서 연구에 필요한 발육단계

별 공시충(유충 2~4령)을 연중 지속적으로 공급하였다(그림 46).



그림 46. 공시충 대량사육/공급 시스템

(2) 방충 유효성분 분획 추출 후보 한약재의 분획 추출물에 대한 방충효과 스크리닝

본 연구에서는 1차년도 연구를 통해 식품 공전에 등재된 식용, 약용 식물로 대상해충에 방충효과를 보인다고 알려진 식물체 13종(계피(*Cinnamomum japonicum*), 고련피(*Melia azedarach*), 금은화(*Lonicera japonica Thunberg*), 모과(*Chaenomeles sinensis*), 산수유(*Cornus officinalis*), 석류피(*Punica granatum*), 시라자(*Anethum graveolense*), 오매(*Prunus mume*), 오배자(*Rhus javanica*), 인진(*Artemisia capillaris*), 행인(*Prunus armeniaca*), 황금(*Scutellaria baicalensis*), 황백(*Phellodendron amurense*))과 연구기간 중 추가로 검색된 식물체 6종(창이자(*Xanthium sibiricum*), 백두옹(*Pulsatilla koreana*), 한련초(*Eclipta prostrata*), 위릉채(*Potentilla chinensis*), 고삼(*Sophora flavescens*), 팔각회향(*Illicium verum*)) 중 2차 년도 연구에 사용된 1차 후보군(계피(*Cinnamomum japonicum*), 시라자(*Anethum graveolense*), 오매(*Prunus mume*), 오배자(*Rhus javanica*), 인진(*Artemisia capillaris*)) 이외에 2차 후보군 중 화랑곡나방 유충에 대한 기피효과 스크리닝 결과가 좋은 모과(*Chaenomeles sinensis*), 석류피(*Punica granatum*), 황금(*Scutellaria baicalensis*)과 이와 유사한 향, 효능을 보이는 창이자(*Xanthium sibiricum*), 백두옹(*Pulsatilla koreana*), 한련초(*Eclipta prostrata*), 위릉채(*Potentilla chinensis*), 고삼(*Sophora flavescens*), 시라자(*Anethum graveolense*)와 유사한 향, 효능을 보이는 팔각회향(*Illicium verum*) 등 9종의 한약재를 선정하여 에탄올을 용매로 1차 추출한 추출물을 대상으로 용매 분획을 통해 추출된 유효성분에 대한 공시충의 방충, 기피효과를 조사하였다.

(가) 후보군 한약재 탐색 및 유효 성분 함유 물질 확보

선정된 9종의 한약재를 대상으로 초음파 추출기를 이용하여 1차 추출물을 추출하고 1차 추출물을 극성도에 따른 물질을 추출하기 위해 용매분획법(Solvent-solvent partition)을 이용하여 Hexane, Diethyl ether, Ethyl acetate, DW를 이용한 각각의 분획을 얻었다. 자세한 방법은 다음과 같다. 음건 세절한 한약재 100 g에 80% ethanol 500ml 를 첨가한 후, 초음파 추출기(Sonics and Materials Inc., Model VC505, Danbury, CT, USA)를 이용하여 500 watt, 20 kHz, 80% amplitude 조건으로 2시간 동안 추출한 후 여과지(Whatman No. 1 filter paper)로 여과하여 추출액을 분리하였다. 고형물이 제거된 추출액을 회전증발농축기를 이용하여 용매(에탄올, 증류수)를 모두 제거하였고 각 한약재별로 무게를 측정하였다. 표 28은 한약재별 70%에탄올 조건에서의 건조중량, 수율($\frac{\text{추출분말의 무게}(g)}{\text{사용한 시료의 무게}(g)} \times 100$)을 나타낸 것이다.

한약재	에탄올 %(w/w)	용매 전체 (g)	한약재 (g)	건조 증량 (g)	수율 (%)
창이자	70%	500	100	6.9	6.9
백두옹	70%	500	100	24	24
한련초	70%	500	100	18.9	18.9
위릉채	70%	500	100	9.77	9.77
고삼	70%	500	100	35.08	35.08
활금	70%	500	100	63.13	63.13
석류피	70%	500	100	49.08	49.08
모과	70%	500	100	38.54	38.54
팔각회향	70%	500	100	19.3	19.3

표 28. 70% 에탄올 추출물에서의 한약재별 성분 건조증량 및 수율

용매가 제거된 각 한약재의 추출물 분말을 증류수 500ml을 넣고 현탁시킨 후, 분액깔때기에 넣고, Hexane(500ml × 3), Diethyl ether(500ml × 3), Ethyl acetate(500ml × 3)를 사용하여 순차적으로 Solvent-solvent partition을 진행하였다(그림 47).

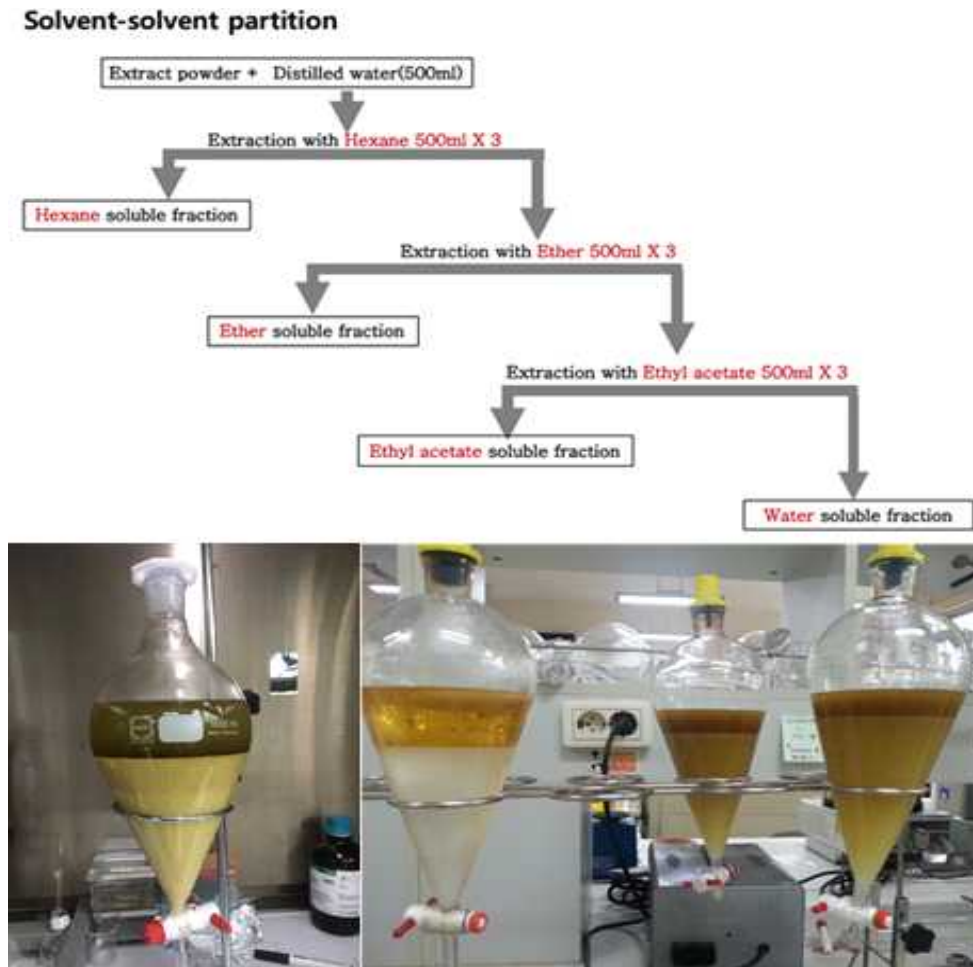


그림 47. 유기용매를 이용한 한약재 추출물 분말에서의 성분 분획

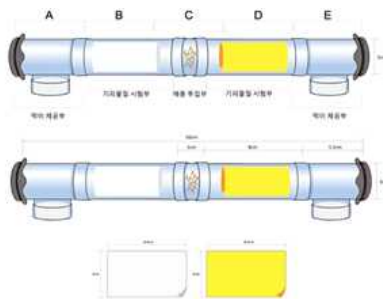
용매가 제거된 각 한약재의 추출물 분말을 증류수 500ml을 넣고 현탁시킨 후, 분액깔때기에 넣고, Hexane(500ml × 3), Diethyl ether(500ml × 3), Ethyl acetate(500ml × 3)를 사용하여 순차적으로

로 Solvent-solvent partition을 진행하고 회전증발 농축기를 이용하여 각 용매를 모두 제거하고, 무게를 측정한 결과는 아래의 표 29와 같다.

한약재	Hexane (g)	Ether (g)	EtOAc (g)	DW (g)	분획층 (g)
창이자	0.27	1.04	0.4	4.5	6.21
백두옹	0.42	2.38	0.95	18	21.75
한련초	0.8	0.1	0.8	10	11.7
위릉채	1.1	2.38	0.43	4.92	8.83
고삼	1.17	9.41	0.39	21.3	32.27
황금	0.57	6.21	0.66	45.75	53.19
석류피	0.62	16.1	2.02	30.05	48.79
모과	0.48	9.46	2.1	18.63	30.67
팔각회향	7.14	1.45	0.89	9.65	19.13

표 29. 각 유기용매 분획물에서의 한약재별 성분 건조중량

선정된 9종의 한약재 각 용매별 분획물 내의 유효성분에 대한 방충(기피) 효과 시험은 화랑곡나방 유충을 대상으로 2차 년도에 개발, 특허출원을 진행한 접촉 독성 및 휘발성 기피력 측정용 기구를 이용한 기피테스트 관 시험법(그림 48)으로 검정하였다.



좌측 먹이제공부 끝부터 우측 먹이제공부 끝까지 6 cm 간격으로 A,B,C,D,E 구역으로 나눔. 용매처리/건조 여과지(8.4 cm × 4 cm)와 용매+방충물질 처리/ 건조 여과지(8.4 cm × 4 cm)를 각각 좌, 우의 시험부 내부에 부착 후 공시충(화랑곡나방 3령 유충 10마리)을 중앙의 공시충 투입부에 투입, 파이프 양쪽 말단에 등 일 양의 먹이 투입, 암조건에서 투입 1시간, 2시간, 3시간 후 각 구역에 위치한 공시충 수를 조사하여 기피율을 조사.

$$\text{기피율}(\%) = \frac{(N_c - N_t)}{(N_c + N_m + N_t)} \times 100$$

Nc는 무처리구(A, B 구역)에 있는 개체수, Nt는 기피물질 처리구(D, E 구역)에 있는 개체수, Nm은 중앙(C 구역)에 있는 개체수를 나타낸다.

그림 48. 접촉 독성 및 휘발성 기피력 측정용 기구를 이용한 기피효과 실험방법

각 분획물(처리농도 100%, 처리량 1mg/cm²)에 대한 기피 효과시험은 각 시험별로 3~5반복(팔각회향의 경우 기피율이 우수하여 5반복 시험) 수행되었으며 무처리구와 기피물질 처리구 간 차이를 분산분석을 이용하여 분석하였다. 표 30은 각 한약재, 분획용매, 처리경과 시간에 따른 화랑곡나방 3령 유충의 기피율을 나타낸 것이며 표 31는 기피율 통계량을 나타낸 것이다.

분획용매 한약재	Hexane	Ether	EtOAc	DW
창이자	-45.96±25.35	-16.67±36.06	-67.78±21.09	-56.67±20.62
백두옹	-47.78±24.39	-54.45±22.98	8.4±32.12	7.78±32.32
한련초	-6.67±20	-14.7±30.14	-51.72±22.35	-8.89±31.8
위릉채	-43.71±33.02	-56.64±15.69	-84.45±16.67	-57.29±10.1
고삼	-70±11.19	-62.23±14.82	-75.56±16.67	26.67±26.46
황금	-86.67±12.25	-64.45±20.07	-48.89±25.23	-76.67±21.8
석류피	-63.34±25	-53.34±25.99	-23.75±29.25	-47.78±13.02
모과	-44.45±60.65	-51.12±7.82	-78.89±7.82	-47.78±28.63
팔각회향	82.67±17.52	-16±15.95	-74.67±29.73	-50.23±40.07

표 30. 각 용매별 한약재 분획물 처리 시간에 따른 화랑곡나방 유충의 기피율

처리량 (mg/cm ²) 분획용매	창이자	한련초	백두옹	위릉채	고삼	황금	석류피	모과
Hexane	df=2,6; F=5.42; P=0.0453	df=2,6; F=1.33; P=0.3336	df=2,6; F=6.75; P=0.0292	df=2,6; F=3.93; P=0.0810	df=2,6; F=30.26; P=0.0007	df=2,6; F=126.00; P<0.0001	df=2,6; F=17.72; P=0.0030	df=2,6; F=1.69; P=0.2617
Ether	df=2,6; F=0.77; P=0.5058	df=2,6; F=0.88; P=0.4633	df=2,6; F=14.78; P=0.0048	df=2,6; F=37.52; P=0.0004	df=2,6; F=25.14; P=0.0012	df=2,6; F=28.04; P=0.0009	df=2,6; F=10.29; P=0.0115	df=2,6; F=123.64; P<0.0001
EtOAc	df=2,6; F=29.66; P=0.0008	df=2,6; F=16.97; P=0.0034	df=2,6; F=1.82; P=0.2408	df=2,6; F=39.97; P=0.0003	df=2,6; F=98.63; P<0.0001	df=2,6; F=7.72; P=0.0219	df=2,6; F=8.95; P=0.0158	df=2,6; F=116.61; P<0.0001
DW	df=2,6; F=23.40; P=0.0015	df=2,6; F=5.42; P=0.0453	df=2,6; F=3.90; P=0.0821	df=2,6; F=55.89; P<0.0001	df=2,6; F=2.41; P=0.1705	df=2,6; F=13.17; P=0.0064	df=2,6; F=32.80; P=0.0006	df=2,6; F=5.41; P=0.0454

표 31. 각 한약재, 분획용매, 처리농도에 따른 화랑곡나방 유충의 기피율 통계량

연구결과 팔각회향 Hexane 분획 용매층에서 화랑곡나방 유충에 대한 기피효과를 발현하였으나 나머지 창이자, 백두옹, 한련초, 위릉채, 고삼, 황금, 석류피, 모과의 경우에는 모든 분획 용매층(Hexane, Ether, EtOAc, DW)에서 기피효과를 유도하지 않는 것으로 조사되었으며 해당 스크리닝 단계에서는 용매층의 원액 (농도 100%)를 처리하였기 때문에 농도의 변화에 따른 기피율의 차이가 나타날 것으로 사료되지 않아 팔각회향에 대해서만 처리농도, 처리량, 등의 독립변수에 대한 세밀한 조절과 다량의 기피효과 반복실험이 필요한 것으로 판단하였다. 따라서 실험결과 화랑곡나방 유충에 높은 기피율을 보이는 것으로 조사된 팔각회향 Hexane 분획물은 2차년도 연구결과 선정된 계피, 시라자 Hexane 분획물과 함께 유효성분 함유 후보군으로 선정하여 다음 단계 연구를 수행하였다(계피 용매별 분획물에 대한 화랑곡나방 유충의 기피효과 2단계 실험을 위해 1단계 실험을 재 수행함). 표 32, 33은 계피와 팔각회향 Hexane 분획물에 대한 화랑곡나방 유충의 처리시간에 따른 기피율을 나타낸 것이다.

분획 용매별 노출 시간	Hexane	Ether	EtOAc	DW
1h	48.00 ± 16.43	-2.44 ± 18.47	-30.00 ± 26.46	-56.00 ± 19.49
2h	86.00 ± 8.94	19.33 ± 23.98	-50.00 ± 10.00	-57.11 ± 19.22
3h	86.00 ± 15.17	20.22 ± 27.29	-54.00 ± 15.17	-60.00 ± 18.71

표 32. 계피 분획물에 대한 화랑곡나방 유충의 기피율

분획 용매별 노출 시간	Hexane	Ether	EtOAc	DW
1h	70.00 ± 23.45	-22.00 ± 8.37	-68.00 ± 36.33	-40.67 ± 40.44
2h	84.00 ± 8.94	-16.00 ± 16.73	-78.00 ± 28.64	-56.00 ± 41.59
3h	94.00 ± 8.94	-10.00 ± 21.21	-78.00 ± 29.50	-54.00 ± 45.61

표 33. 팔각회향 분획물에 대한 화랑곡나방 유충의 기피율

2차년도 분획물의 기피효과 연구 시 분획물의 농도를 변화시켜 여과지를 함침 시킨 후 건조하여 실험한 경우 처리되는 양이 과다하여 기피효과가 나타나는 분획물의 모든 농도에서 기피율이 높게 측정되어 유효성분의 양에 따른 기피효과의 차이를 정확히 조사하기 어려워 농도를 동일하게 한 후 여과지에 처리되는 양을 다르게 하여 유효성분의 양에 따른 기피율을 조사는 실험을 수행하였다. 3차 년도 연구에서는 계피, 팔각회향 용매별 분획물을 대상으로 분획물의 농도를 희석하지 않고 일정 하게한 후 분획물의 처리량을 여과지 cm²당 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1mg으로 처리하여 유효성분의 처리량에 따른 처리 후 경과시간 별 화랑곡나방 3령 유충의 기피효과를 접촉 독성 및 휘발성 기피력 측정용 기구를 이용한 기피효과 실험방법(그림 26)으로 조사하였다.

연구결과 2차 년도 시라자(*Anethum graveolense*) Hexane 용매 분획물 모든 처리농도, 처리 후 경과시간에서 화랑곡나방 유충에 대한 기피효과가 있는 것과는 달리 계피의 경우에는 0.1mg/cm²이상의 Hexane 용매 분획물에서, 팔각회향의 경우에는 0.2 mg/cm² 이상의 Hexane 용매 분획물에서 처리 후 경과시간에서 화랑곡나방 유충에 대한 기피효과가 있는 것으로 분석되었으며 Diethyl ether, Ethyl acetate, DW 용매 분획물에서는 기피효과가 미비하거나 없는 것으로 분석되었다(그림49, 50).

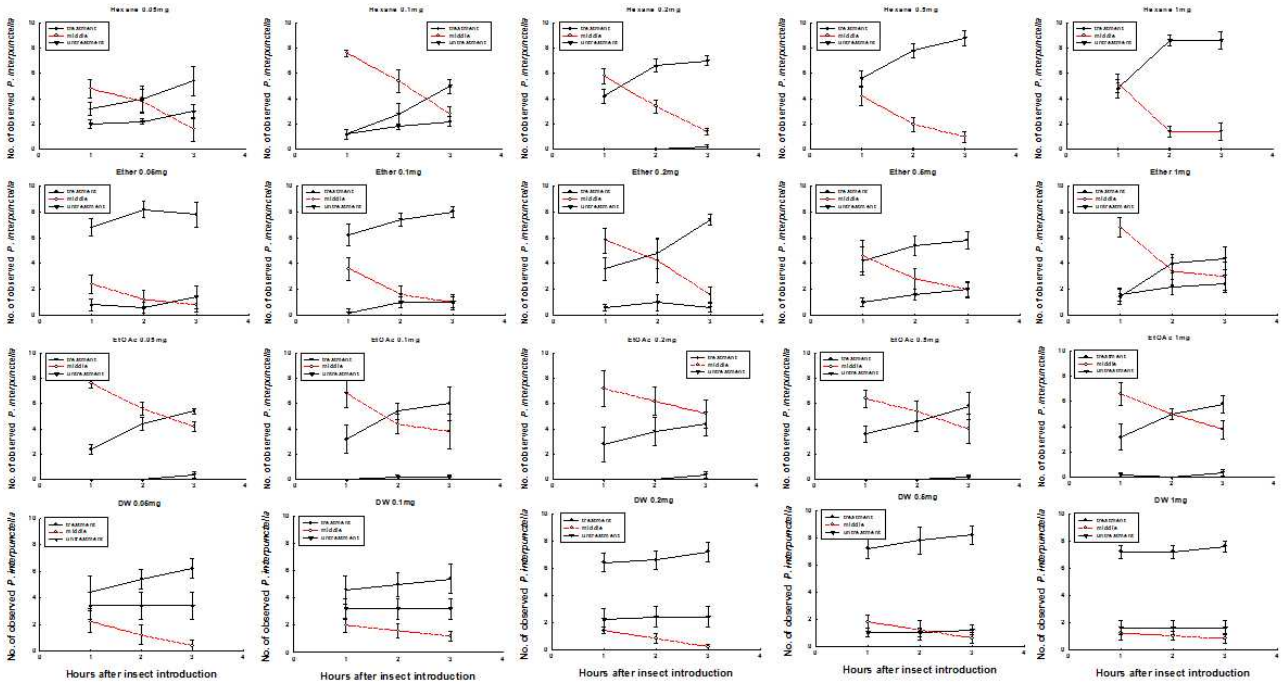


그림 49. 계피 용매별 분획물 처리량에 대한 시간경과 별 화랑곡나방 유충의 분포 변화

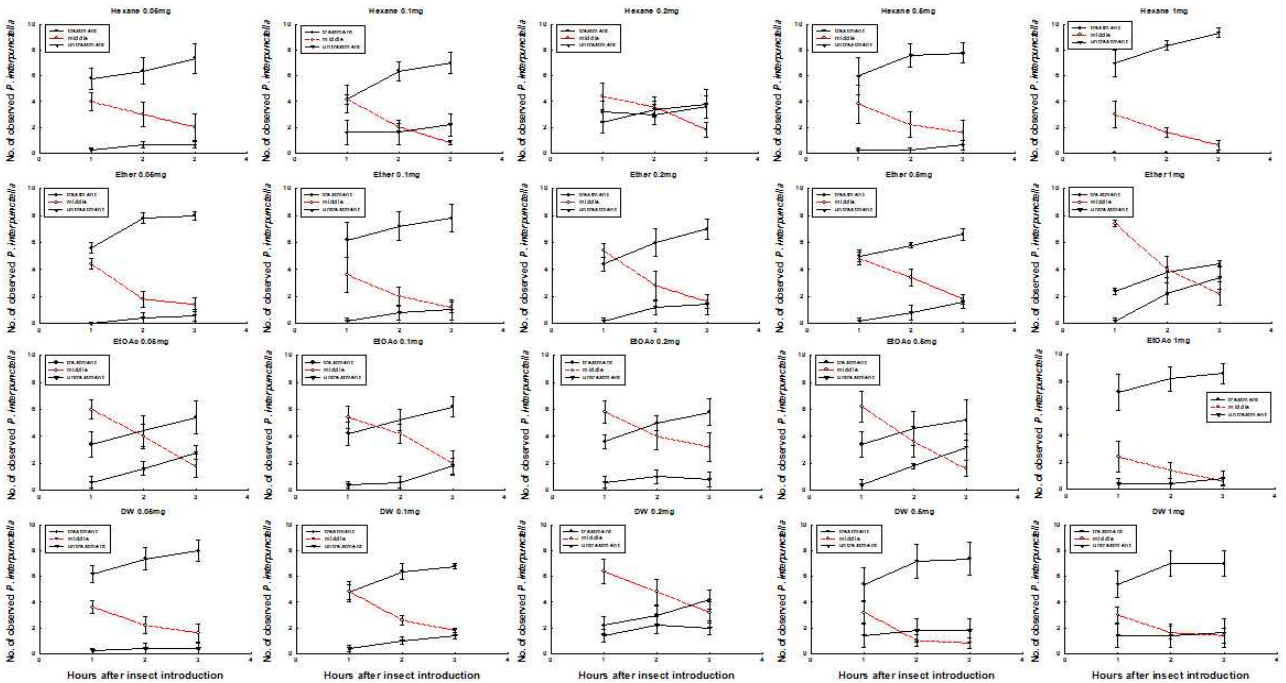


그림 50. 팔각회향 용매별 분획물 처리량에 대한 시간경과 별 화랑곡나방 유충의 분포 변화

2, 3차 년도 연구결과 시라자 Hexane 용매 분획물의 경우에는 0.05 mg/cm^2 의 낮은 처리량에서도 90% 이상의 기피율을 보이는 반면, 계피 Hexane 용매 분획물의 경우, 처리량이 증가할수록 기피율이 증가하여 0.2 mg/cm^2 이상의 농도에서 70% 정도의 기피율을 보이며 팔각회향 Hexane 용매 분획물의 경우, 계피 보다 높은 농도인 0.5 mg/cm^2 이상의 농도에서 70% 이상의 기피율을 보이는 것으로 조사되어 시라자, 계피, 팔각회향 Hexane 용매 분획물에 화랑곡나방 유충의 기피를 유도하는 성분 종류, 함량, 효율 등 차이가 날 것으로 판단되었다 (표 34, 35).

처리량(mg/cm ²) 분획용매	시라자				
	0.05	0.1	0.2	0.5	1
Hexane	90.00±12.47	76.67±9.72	82.67±10.90	78.00±10.17	94.00±7.23
Ether	-4.00±24.20	6.67±28.96	-20.67±45.67	-36.00±33.20	-28.00±59.47
EtOAc	11.33±26.94	-32.67±38.40	-43.33±31.80	-82.00±8.69	-92.00±7.67
DW	-27.33±29.19	31.13±17.68	-22.67±21.13	-19.46±30.95	-80.67±9.83
처리량(mg/cm ²) 분획용매	계피				
	0.05	0.1	0.2	0.5	1
Hexane	-18±21.93	12.67±15.53	63.33±7.82	75.51±9.06	73.33±9.43
Ether	-66.67±22.73	-64.67±9.6	-44±13	-36.73±17.91	12.33±19.04
EtOAc	-39.33±6.41	-47.33±22.29	-35.33±24.11	-46±16.06	-44.67±15.02
DW	-19.33±40.51	-18.37±37.23	-44.59±31.23	-66.67±24.27	-57.72±18.98
처리량(mg/cm ²) 분획용매	팔각회향				
	0.05	0.1	0.2	0.5	1
Hexane	-60.67±25.43	-40.67±39.26	2±30.7	68±21.68	82.67±13.21
Ether	-68±6.06	-64±34.19	-48.67±22.06	-49.33±8.63	-16±13.42
EtOAc	-27.33±32.61	-42.67±20.74	-39.33±12.56	-26±33.62	-74.67±30.79
DW	-68.67±22.06	-50.67±14.61	-10.67±17.22	-50±47.55	-50.34±42.37

표 34. 시라자, 계피, 팔각회향 용매별 분획물 처리량에 대한 화랑곡나방 유충의 기피율

처리량(mg/cm ²) 분획용매	시라자				
	0.05	0.1	0.2	0.5	1
Hexane	df=2,12; F=295.78; P<0.0001	df=2,12; F=216.06; P<0.0001	df=2,12; F=119.89; P<0.0001	df=2,12; F=117.39; P<0.0001	df=2,12; F=397.72; P<0.0001
Ether	df=2,12; F=6.02; P=0.0154	df=2,12; F=1.47; P=0.2676	df=2,12; F=4.20; P=0.0413	df=2,12; F=14.10; P=0.0007	df=2,12; F=3.60; P=0.0597
EtOAc	df=2,12; F=0.85; P=0.4506	df=2,12; F=3.99; P=0.0470	df=2,12; F=8.26; P=0.0055	df=2,12; F=205.69; P<0.0001	df=2,12; F=330.79; P<0.0001
DW	df=2,12; F=5.32; P=0.0221	df=2,12; F=8.34; P=0.0054	df=2,12; F=4.14; P=0.0429	df=2,12; F=8.01; P=0.0062	df=2,12; F=559.62; P<0.0001
처리량(mg/cm ²) 분획용매	계피				
	0.05	0.1	0.2	0.5	1
Hexane	Df=2,12; F=1.66; P=0.2312	df=2,12; F=17.03; P=0.0003	df=2,12; F=147.59; P<0.0001	df=2,12; F=124.95; P<0.0001	df=2,12; F=116.25; P<0.0001
Ether	df=2,12; F=41.45; P<0.0001	df=2,12; F=72.53; P<0.0001	df=2,12; F=13.04; P=0.0010	df=2,12; F=6.66; P=0.0113	df=2,12; F=2.87; P=0.0960
EtOAc	df=2,12; F=137.13; P<0.0001	df=2,12; F=12.26; P=0.0013	df=2,12; F=10.22; P=0.0026	df=2,12; F=19.72; P=0.0002	df=2,12; F=30.25; P<0.0001
DW	df=2,12; F=5.74; P=0.0179	df=2,12; F=5.11; P=0.0249	df=2,12; F=26.13; P<0.0001	df=2,12; F=44.36; P<0.0001	df=2,12; F=60.67; P<0.0001
처리량(mg/cm ²) 분획용매	팔각회향				
	0.05	0.1	0.2	0.5	1
Hexane	df=2,12; F=16.26; P=0.0004	df=2,12; F=9.21; P=0.0038	df=2,12; F=0.02; P=0.9774	df=2,12; F=17.94; P=0.0002	df=2,12; F=87.71; P<0.0001
Ether	df=2,12; F=246.27; P<0.0001	df=2,12; F=16.30; P=0.0004	df=2,12; F=15.32; P=0.0005	df=2,12; F=70.81; P<0.0001	df=2,12; F=7.30; P=0.0084
EtOAc	df=2,12; F=3.52; P<0.0625	df=2,12; F=12.18; P=0.0013	df=2,12; F=9.96; P=0.0028	df=2,12; F=2.38; P=0.1351	df=2,12; F=31.87; P<0.0001
DW	df=2,12; F=43.76; P<0.0001	df=2,12; F=50.21; P<0.0001	df=2,12; F=3.95; P=0.0480	df=2,12; F=9.83; P=0.0030	df=2,12; F=9.87; P=0.0029

표 35. 시라자, 계피, 팔각회향 용매별 분획물 처리량에 대한 화랑곡나방 유충의 기피율 통계량

(3) 유효성분 조합에 대한 대상 해충의 방충효과 검증

(가) 천연 방충 유효 성분 확보 및 물질 규명

총 연구기간 동안 스크리닝 된 식용 한약재 19종 중 추출물의 향, 범용성 등을 고려하여 선정된 14종의 한약재를 대상으로 연구결과 정립된 천연 유래 성분 최적 추출법을 통해 추출물을 확보하고 Hexane, Diethyl ether, Ethyl acetate, DW 용매를 이용 Solvent-solvent partition을 진행하여 각 용매별 분획물을 확보, 본 연구에서 개발된 접촉 독성 및 휘발성 기피력 측정용 기구를 통해 농도, 처리량, 처리 후 경과 시간 별 대상해충의 기피율을 측정하여 방충 유효성분 함유 최종 한약재 분획물(계피, 시라자, 팔각회향 Hexane 용매 분획물)을 확보하였다(표 36).

한약재	에탄올 %(w/w)	용매 전체 (g)	한약재 (g)	건조 중량 (g)	수율 (%)	Hexane (g)
시라자	70%	500	100	9.12	9.12	3.60
계피	70%	500	100	18.36	18.36	4.09
팔각회향	70%	500	100	19.3	19.3	7.14

표 36. 방충 유효성분 함유 최종 한약재 Hexane 용매 분획물 건조중량

계피, 시라자, 팔각회향 Hexane 용매 분획물에서의 화랑곡나방 유충의 기피율을 조사한 연구결과를 볼 때 Hexane 용매 분획층에 기피효과를 보이는 유효성분이 다량 함유되어 있는 것으로 분석되어 해당 용매 분획층을 세부적으로 분리, 유효성분을 규명하기 위해 이후 column chromatography와 TLC를 이용하여 Hexane 용매 분획층을 subfraction으로 나누었다. 2차 년도에 시라자 분획물(Hexane층) 5g, 3차 년도에 계피 분획물(Hexane층)과 팔각회향 분획물(Hexane 층) 4g을 각각 실리카겔 컬럼에서(3×35cm, pore size 60 Å, 70-230 mesh) Hexane : Ethyl acetate(100:1, 50:1, 25:1, 15:1, 8:1, 4:1, 2:1, 1:1)으로 순차적으로 용출시키고, 최종적으로는 methanol로 용출시켰다. 연구 수행 결과 계피의 경우, 7개의 subfraction(A1-A7), 팔각회향의 경우, 6개의 subfraction(B1-B6), 시라자의 경우 9개의 subfraction(C1-C9)을 각각 확보한 후 회전증발농축기로 감압 농축하여 각 subfraction의 무게를 확인하였다(표 37).

계피			팔각회향			시라자		
Test tube number	Fraction number	amount (mg)	Test tube number	Fraction number	amount (mg)	Test tube number	Fraction number	amount (mg)
1-144	A1	278.2	1-78	B1	1,274	1-35	X(지방산)	-
145-234	A2	1542.1	79-228	B2	169	36-89	C1	40
235-330	A3	145.5	229-264	B3	164	90-150	C2	60
331-414	A4	407.7	265-432	B4	149	151-222	C3	800
415-468	A5	185.9	415-546	B5	141	223-366	C4	930
469-662	A6	236.5	547-654	B6	229	367-480	C5	750
663-686	A7	413				481-558	C6	33
						559-624	C7	13
						625-840	C8	850
						841-1064	C9	600
Total		3208.9			2,126			4,076

표 37. 계피, 팔각회향, 시라자 Hexane 분획물 subfraction 별 중량

Hexane 분획물을 용출하여 확보한 subfraction에서의 기피효과 유도 성분의 함유여부와 함유 정도(성분 수, 량)를 조사하고 확인된 유효 성분의 구조를 분석하기 위해 우선 화랑곡나방 유충을 공시충으로 접촉 독성 및 휘발성 기피력 측정용 기구를 이용 각 subfraction 물질에서의 유효성분의 함유여부를 조사하였다. 각 subfraction의 물질을 Hexane에 동일한 농도로 녹인 후 계피와 팔각회향의 경우 여과지에 0.5mg/cm² 양으로 처리하여 조사하였으며 시라자의 경우 (subfraction 중량이 적은 경우 혼합하여 용해, 1+2, 6+7) 표 34과 같이 낮은 처리량에서도 높은 기피율을 보여 여과지에 0.2mg/cm² 양으로 처리하여 기피율을 조사하였다(표 38). 계피, 팔각회향 Hexane 분획물 subfraction 별 화랑곡나방 유충 기피율 통계량은 표 39와 같다.

Plant - solvent	Fraction number	기피율 (%)			Plant - solvent	Fraction number	기피율 (%)			Plant - solvent	Fraction number	기피율 (%)		
		1h	2h	3h			1h	2h	3h			1h	2h	3h
계피 - Hexane	A1	-8 ± 13	-4 ± 22	2 ± 16	팔각회향 - Hexane	B1	26 ± 5	58 ± 16	72 ± 8	시라자 - Hexane	C1+2	62 ± 18	76 ± 17	89 ± 10
	A2	58 ± 24	84 ± 18	86 ± 17		B2	60 ± 0	78 ± 13	86 ± 19		C3	72 ± 24	81 ± 18	89 ± 14
	A3	6 ± 5	26 ± 21	50 ± 29		B3	56 ± 9	82 ± 15	90 ± 14		C4	43 ± 32	51 ± 30	60 ± 35
	A4	10 ± 16	42 ± 44	36 ± 15		B4	-12 ± 15	-14 ± 19	-12 ± 29		C5	19 ± 41	21 ± 44	26 ± 46
	A5	-26 ± 25	-16 ± 29	-26 ± 24		B5	-38 ± 23	-52 ± 13	-58 ± 13		C6+7	25 ± 42	27 ± 48	29 ± 48
	A6	-46 ± 23	-40 ± 14	-52 ± 11		B6	16 ± 39	22 ± 49	34 ± 40		C8	3 ± 47	1 ± 50	1 ± 53
	A7	-72 ± 11	-64 ± 23	-70 ± 25							C9	-19 ± 28	-22 ± 26	-31 ± 29

표 38. 계피, 팔각회향, 시라자 Hexane 분획물 subfraction 별 화랑곡나방 유충 기피율

분획용매	Fraction	계피						
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
Hexane		df=2,12; F=22.68; P<0.0001	df=2,12; F=36.78; P<0.0001	df=2,12; F=30.62; P<0.0001	df=2,12; F=51.14; P<0.0001	df=2,12; F=15.67; P=0.0004	df=2,12; F=32.39; P<0.0001	df=2,12; F=80.03; P<0.0001
분획용매	Fraction	팔각회향						
		B1	B2	B3	B4	B5	B6	
Hexane		df=2,12; F=117.75; P<0.0001	df=2,12; F=66.12; P<0.0001	df=2,12; F=117.10; P<0.0001	df=2,12; F=18.57; P=0.0002	df=2,12; F=42.43; P<0.0001	df=2,12; F=7.35; P=0.0083	

표 39. 계피, 팔각회향 Hexane 분획물 subfraction 별 화랑곡나방 유충 기피율 통계량

연구결과 처리 후 1, 2, 3시간 경과에 따라 계피의 경우, 처리 후 1, 2, 3시간 경과에 따라 subfraction A2, A3, A4에서 기피효과가 나타나는 것으로 조사되었으며 팔각회향의 경우 subfraction B1, B2, B3에서 시라자의 경우 C1~C8에서 기피효과가 나타나는 것으로 조사되었으나 실험의 표준 편차와 기피율을 감안 할 때 계피는 subfraction A2, 팔각회향은 subfraction B2~B3, 시라자는 subfraction C1~C3에 유효성분이 많은 것으로 판단되었다(그림 51, 52).

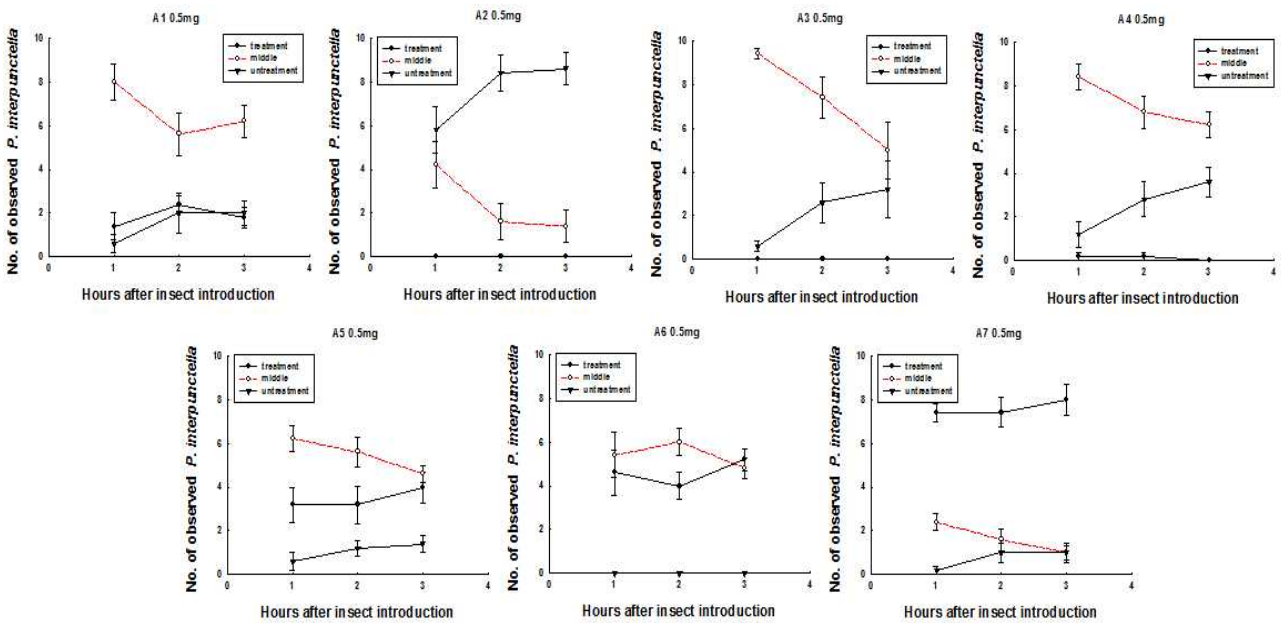


그림 51. 계피 추출물 Hexane 분획물 subfraction에 대한 화랑곡나방 유충의 분포 변화

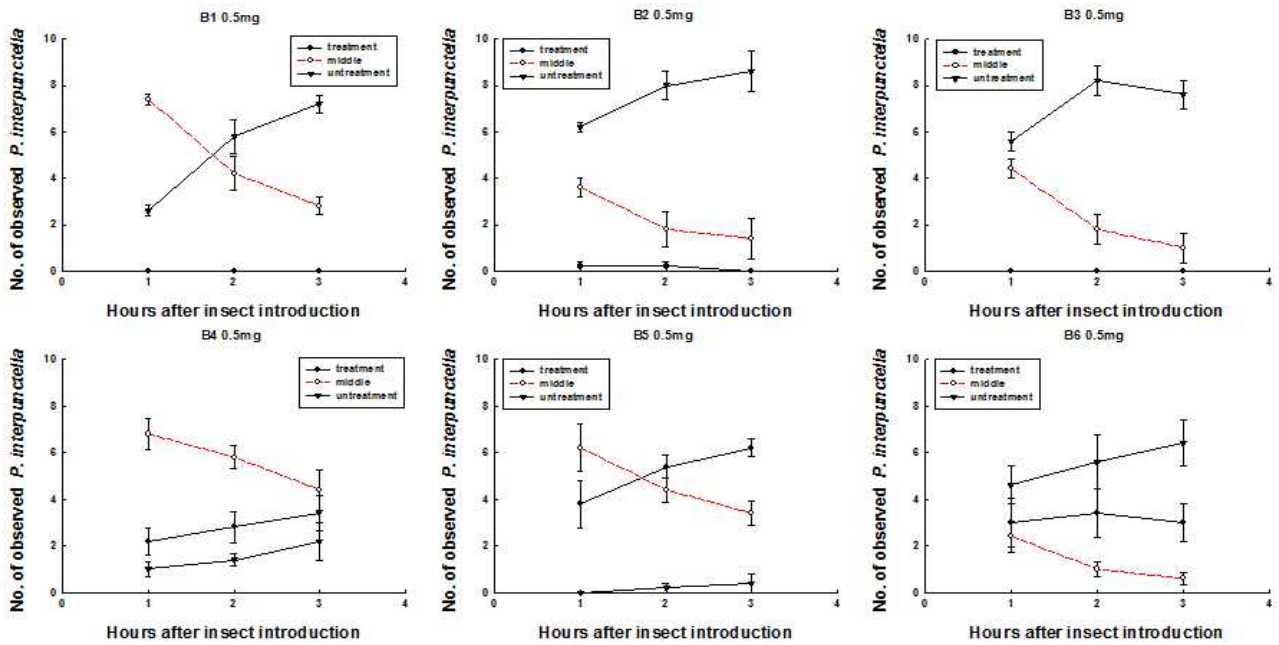


그림 52. 팔각회향 추출물 Hexane 분획물 subfraction에 대한 화랑곡나방 유충의 분포 변화

(나) 방충효과 기반으로 유효성분 종류(분자구조, 분자량 등) 및 함유량에 따른 database 구축.

2차 년도 연구에서 기피효과 유도 성분의 데이터베이스 작성을 위해 1차 단계로 에탄올 초음파 추출법을 통해 추출된 1차 후보군 추출물의 대략적인 함유성분을 GC-MS를 활용하여 조사하였다. 연구결과 각 추출물은 GC-MS 분석에 사용되는 시료(확보된 각 추출물 0.6 ml과 DW 0.6ml, 분석용매(Solvent A(ethyl acetate: hexane: methylene chloride, 1: 1: 1, v/v/v) 0.2ml를 혼합 후 2분간 혼합(스터링), 13,000rpm에서 5분간 원심분리 후 상등액 4 μ l을 분리)가 crude한 상태로 추가로 분석되는 성분이 검출되기는 하나 거의 대부분 solvent A와 비슷한 compound pattern을 보여 유효성분 정확한 정성, 정량 분석을 위해서는 시료의 정제과정과 solvent peak 부분을 제거해 줘야 할 것으로 판단되어 기피효과가 크게 나타나는 한약재 추출물의 분획물을 대상으로 TLC상의 band와 HPLC 상의 피크를 확인하고 LC-MS를 통한 성분규명을 진행하고자 하였다. 그러나 2차 년도 연구에서 시라자 Hexane 분획물 subfraction 중 기피효과가 검증된 각 subfraction에 함유된 기피효과 유도 성분의 수를 박층크로마토그래피(TLC, Thin Layer Chromatography)를 이용, TLC상의 band로 용출 진행 상황을 확인하고 HPLC 분석을 수행하여 각 subfraction의 TLC상의 band와 HPLC 상의 피크를 비교한 결과 TLC상의 band와 HPLC 상의 피크가 유사하게 나타나고 Hexane 분획물 분획과정에서 시료가 정제되고 극성이 감소하고 Hexane 분획물 subfraction 중 초기 subfraction에서 기피효과가 나타나 유효성분의 분자량이 작고 휘발성인 것으로 추정됨에 따라 GC-MS를 이용한 유효성분 분석이 가능할 것으로 판단되었다. 따라서 3차 년도에서는 계피, 팔각회향 Hexane 분획물 subfraction 중 기피효과가 검증된 각 subfraction에 함유된 기피효과 유도 성분의 수를 박층크로마토그래피(TLC, Thin Layer Chromatography)를 이용, 단파장인 254nm, 장파장인 365nm의 UV를 조사하여 TLC상의 band로 용출 진행 상황을 확인한 후(그림 53, 54) 계피, 팔각회향, 시라자 Hexane층과 이 후 세부 subfraction으로 분리 후 가장 기피효과가 뛰어났던 Subfraction의 유효성분을 GC-MS를 통하여

분석하고 최종 database를 구축하였다(표 40~45, 그림 55).

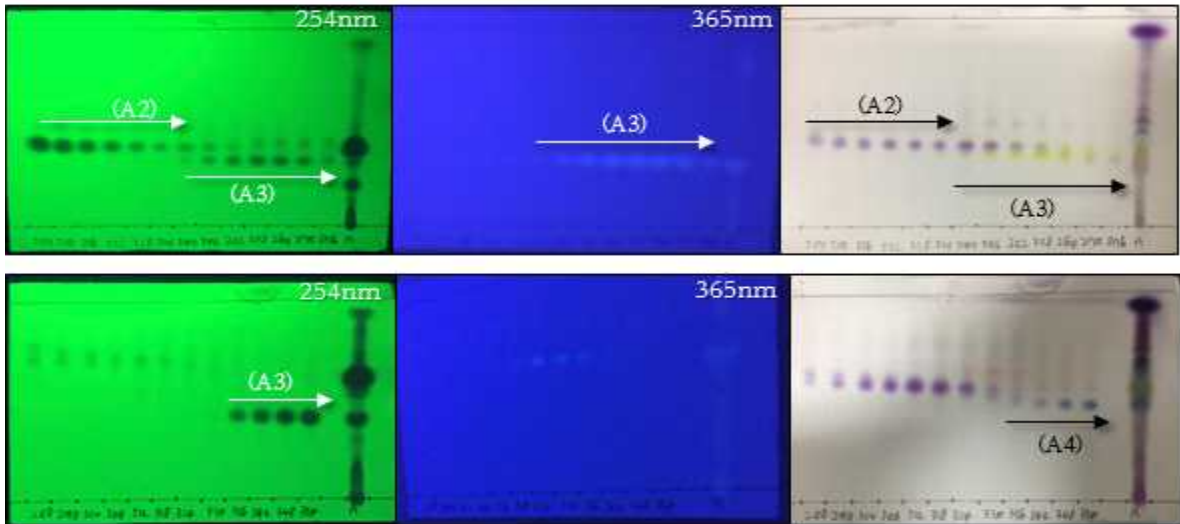


그림 53. 계피 Hexane 분획물 subfraction의 Thin Layer Chromatography. 145~234 (A2) & 235~330 (A3) (위). Fractions 235~330 (A3) & 331~414 (A4) (아래).

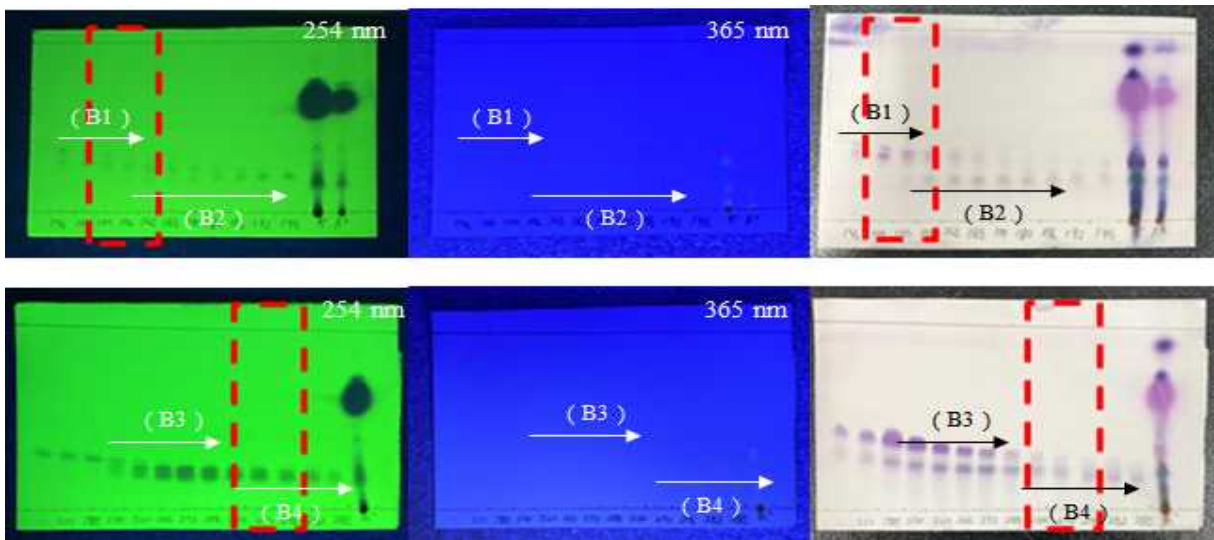


그림 54. 팔각회향 Hexane 분획물 subfraction의 Thin Layer Chromatography. 1~78 (B1) & 79~228 (B2) (위). Fractions 229~264 (B3) & 265~432 (B4) (아래).

*GC-MS 분석 조건

- 주입량 : 1 μ l (마이크로리터), Scan mode : 10-800 m/z, Inlet 온도 : 250 $^{\circ}$ C, Oven 조건: 초기 온도인 80 $^{\circ}$ C 에서 250 $^{\circ}$ C 까지 증가, 승온 속도: 5 $^{\circ}$ C/min, split ratio : 2:1, Gas 및 속도 : Helium, 1.2 mL/min, Column : HP-5MS UI (30 m * 250 μ m, film : 0.25 μ m)

Peak number	Retention time (min)	Compound	Formula	Composition (%)
1	4.498	Hexylaldehyde	C ₆ H ₁₂ O	0.32
2	14.53	<i>Trans</i> -isolimone	C ₁₀ H ₁₆	0.24
3	14.669	(+)-Iso dihydrocarvone	C ₁₀ H ₁₆ O	2.54
4	14.98	(+)-Dihydrocarvone	C ₁₀ H ₁₆ O	0.4
5	15.291	<i>Trans</i> -Carveol	C ₁₀ H ₁₆ O	0.19
6	16.744	D-Carvone	C ₁₀ H ₁₄ O	26.76
7	16.935	<i>p</i> -Anisaldehyde	C ₈ H ₈ O ₂	1.26
8	18.18	Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	6.92
9	18.768	Anethole	C ₁₀ H ₁₂ O	0.12
10	27.485	Myristicin	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	3.12
11	28.627	Elemicin	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	0.33
12	31.792	Dillpiole	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	47.51
13	33.124	Brevifolin	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	0.39
14	34.629	Isodillapiole	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	0.73
15	43.675	Palmitic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1.05
16	48.881	Oleic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	0.24
Total				92.12

표 40. 시라자 Hexane 분획물 GC-MS 분석 결과

Peak number	Retention time (min)	Compound	Formula	Composition (%)
1	16.744	D-Carvone	C ₁₀ H ₁₄ O	7.86
2	18.768	Anethole	C ₁₀ H ₁₂ O	3.76
3	27.485	Myristicin	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	2.12
4	31.792	Dillpiole	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	39.83
5	48.881	Oleic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	38.45
Total				92.02

표 41. 시라자 Hexane Subfraction C3의 GC-MS 분석 결과

Peak number	Retention time (min)	Compound	Formula	Composition (%)
1	7.864	Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	0.05
2	9.78	Benzeneacetaldehyde	C ₈ H ₈ O	1.72
3	14.469	Benzylideneacetaldehyde	C ₆ H ₅ CHO	0.24
4	16.351	<i>Trans</i> -cinnamaldehyde	C ₉ H ₈ O	47.90
5	17.174	4-(1-Hydroxyethyl)benzaldehyde	C ₉ H ₁₀ O ₂	1.18
6	18.704	Alpha-copaene	C ₁₅ H ₂₄	1.32
7	19.947	Ethyl cinnamate	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	1.11
8	20.065	<i>Trans</i> - Cinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₂	1.54
9	20.519	Coumarin	C ₉ H ₆ O ₂	9.96
10	20.737	Alpha - humulene	C ₁₅ H ₂₄	0.54
11	20.939	(+)-epi-bicyclo sesquiphellandrene	C ₁₅ H ₂₄	0.23
12	21.191	γ -Cadinene	C ₁₅ H ₂₄	1.14
13	21.275	Alloaromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	0.48
14	21.762	Alpha muurolene	C ₁₅ H ₂₄	4.36
15	21.998	7-Propylfuro[3,2-b]pyridine	C ₁₀ H ₁₁ NO	0.2
16	22.317	Calamenene	C ₁₅ H ₂₂	4.39
17	22.468	<i>p</i> -methoxycinnamaldehyde	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	3.81
18	22.838	Alpha - Calacorene	C ₁₅ H ₂₀	0.82
19	24.334	Epizonarene	C ₁₅ H ₂₄	0.31
20	24.787	Naphthalene	C ₁₀ H ₈	0.45
21	25.073	1-Naphthalenol	C ₁₀ H ₈ O	0.63
22	25.14	Delta cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	0.38
23	25.426	Alpha cedrene	C ₁₅ H ₂₄	0.37
24	25.813	Cadalene	C ₁₅ H ₁₈	0.38
25	31.342	Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	2.1
26	34.669	Oleic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	4.26
27	35.039	Linoleic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	0.84
28	38.955	(R)-4-Hydroxy-5-methyl-3-tetra decyl-2(5H)-furanone	C ₄ OH ₂ OCH ₃ OH	1.74
29	40.534	Magnolol	C ₁₈ H ₁₈ O ₂	0.56
Total				93.01

표 42. 계피 Hexane 분획물 GC-MS 분석 결과

Peak number	Retention time (min)	Compound	Formula	Composition (%)
1	7.864	Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	2.76
2	9.78	Benzeneacetaldehyde	C ₈ H ₈ O	1.75
3	16.065	<i>Trans</i> -cinnamaldehyde	C ₉ H ₈ O	65.66
4	19.947	Ethyl cinnamate	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	3.32
5	20.25	<i>Trans</i> - cinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₂	10
6	21.998	7-Propylfuro[3,2-b]pyridine	C ₁₀ H ₁₁ NO	7.42
Total				90.91

표 43. 계피 Hexane Subfraction A2의 GC-MS 분석 결과

Peak number	Retention time (min)	Compound	Formula	Composition (%)
1	17.729	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	0.18
2	21.544	Terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.1
3	22.149	Alpha-terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.14
4	22.485	Estragol	C ₁₀ H ₁₂ O	0.29
5	25.443	<i>P</i> -anisaldehyde	C ₈ H ₈ O ₂	5.73
6	27.208	<i>Trans</i> -anethole	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	69.43
7	29.762	Phenol	C ₆ H ₆ O	2.18
8	30.653	Alpha-copaene	C ₁₅ H ₂₄	0.25
9	30.905	Linoleic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	2.57
10	32.569	Beta-caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	0.28
11	33.073	<i>Trans</i> -alpha-bergamotene	C ₁₅ H ₂₄	0.35
12	34.014	<i>Trans</i> -beta-farnesene	C ₁₅ H ₂₄	0.13
13	35.98	Beta-bisabolene	C ₁₅ H ₂₄	0.16
14	38.333	Methoxy-cinnaldehyde	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	0.42
15	41.711	<i>T</i> -muurolo	C ₁₅ H ₂₆ O	0.21
16	42.434	Chavicol	C ₉ H ₁₀ O	1.79
17	51.912	Palmitic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1.35
18	57.441	9,12-octadecadienoic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	1.27
19	57.626	Oleic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	1.28
20	62.433	Bianisal, photoanethole	C ₁₆ H ₁₆ O ₂	1.1
Total				89.21

표 44. 팔각회향 Hexane 분획물 GC-MS 분석 결과

Peak number	Retention time (min)	Compound	Formula	Composition (%)
1	22.603	Estragol	C ₁₀ H ₁₂ O	0.5
2	25.56	<i>P</i> -anisaldehyde	C ₈ H ₈ O ₂	0.27
3	27.493	<i>Trans</i> -anethole	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	94.24
4	30.703	Alpha-copaene	C ₁₅ H ₂₄	0.37
5	32.585	Beta-caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	0.23
6	33.089	<i>Trans</i> -alpha-bergamotene	C ₁₅ H ₂₄	0.57
7	42.45	Chavicol	C ₉ H ₁₀ O	3.03
Total				98.2

표 45. 팔각회향 Hexane subfraction B3 GC-MS 분석 결과













 Benzaldehyde Formula: C ₇ H ₆ O Molecular weight: 106.12 g/mol Origin: 95% Hexane fraction	 Benzoin Formula: C ₁₄ H ₁₂ O Molecular weight: 192.23 g/mol Origin: 95% Hexane fraction	 Benzoin benzoate Formula: C ₂₀ H ₁₆ O ₂ Molecular weight: 280.34 g/mol Origin: 95% Hexane fraction	 Cinnamaldehyde Formula: C ₉ H ₈ O Molecular weight: 132.16 g/mol Origin: 95% Hexane fraction	 Hexanoic acid Formula: C ₆ H ₁₂ O ₂ Molecular weight: 116.15 g/mol Origin: 95% Hexane fraction	 Octanoic acid Formula: C ₈ H ₁₆ O ₂ Molecular weight: 144.20 g/mol Origin: 95% Hexane fraction	 Limonene Formula: C ₁₀ H ₁₆ Molecular weight: 136.24 g/mol Origin: 95% Hexane fraction	 2-Methyl-3-methyl-5-hydroxybutanoic acid Formula: C ₈ H ₁₆ O ₃ Molecular weight: 156.21 g/mol Origin: 95% Hexane fraction	 2-Methyl-3-methyl-5-hydroxybutanoic acid Formula: C ₈ H ₁₆ O ₃ Molecular weight: 156.21 g/mol Origin: 95% Hexane fraction	 2-Methyl-3-methyl-5-hydroxybutanoic acid Formula: C ₈ H ₁₆ O ₃ Molecular weight: 156.21 g/mol Origin: 95% Hexane fraction	 2-Methyl-3-methyl-5-hydroxybutanoic acid Formula: C ₈ H ₁₆ O ₃ Molecular weight: 156.21 g/mol Origin: 95% Hexane fraction	 2-Methyl-3-methyl-5-hydroxybutanoic acid Formula: C ₈ H ₁₆ O ₃ Molecular weight: 156.21 g/mol Origin: 95% Hexane fraction
--	---	---	--	---	---	--	---	--	--	--	--

그림 55. 계피, 시라자, 팔각회향 Hexane 분획 및 주 subfraction의 단일성분 Database

(4) 천연 유래 단일 성분의 최적 조합비 기반으로 제조된 방충시제품에 대한 대상 해충의 방충효과 검증 및 천연 유래 곤충 제어 물질 생산 가능성 확보

(가) 곡류 해충 제어를 위한 천연 유래 방충 유효성분 최적 조합비 규명을 위한 유효성분 검증

3년 동안 수행한 방충성분 함유 후보 한약재의 스크리닝, 1차 추출물과 선정된 계피, 시라자, 팔각회향 Hexane 분획물, 컬럼 fraction의 기피율 실험 및 GC-MS 분석 결과를 토대로 함유량이 많고 방충성을 보일 것으로 판단되는 유효성분을 추정된 결과 5가지 유효성분 Dillapiole, D-carvone (시라자), *Trans*-cinnamaldehyde, *Trans*-cinnamic acid (계피), *Trans*-anethole (팔각회향)을 선정하였다. 본 연구의 최종 목표인 각 유효성분의 최적 조합비를 규명하기 위해 1차로 선정된 5가지 유효성분의 방충효과 발현 여부를 순도 95% 이상의 유기합성 단일물질을 대상으로 검증하였다. 주요 방충 유효성분으로 추정된 5가지 유효성분(Dillapiole, D-carvone, *Trans*-cinnamaldehyde, *Trans*-cinnamic acid, *Trans*-anethole)을 각각 Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 기피테스트에 사용하였다. 유효성분의 방충효과 발현 여부 검증 연구는 2차 년도에 개발된 접촉 독성 및 휘발성 기피력 측정용 기구를 이용하여 선정된 유효성분의 처리량에 따른 처리 후 경과시간 별 화랑곡나방 3령 유충의 기피효과를 조사하였다. 접촉 독성 및 휘발성 기피력 측정용 기구에 처리된 각 유효성분 처리량은 Dillapiole을 제외한 각 단일물질의 경우 Hexane을 이용하여 여과지 단위면적당 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05 mg/cm²이 되도록 희석한 뒤 여과지에 1mL를 분주하여 사용하였다(각 5반복). Dillapiole의 경우, 10mg당 156,400원이라는 높은 가격 때문에 실험의 중간 값에 해당하는 여과지 단위면적당 0.5mg/cm² 처리량에서 기피 테스트를 3반복

진행하였다.

각 유효성분 처리량에 따른 화랑곡나방 3령 유충의 시간 경과별 분포는 그림 56~58와 같다.

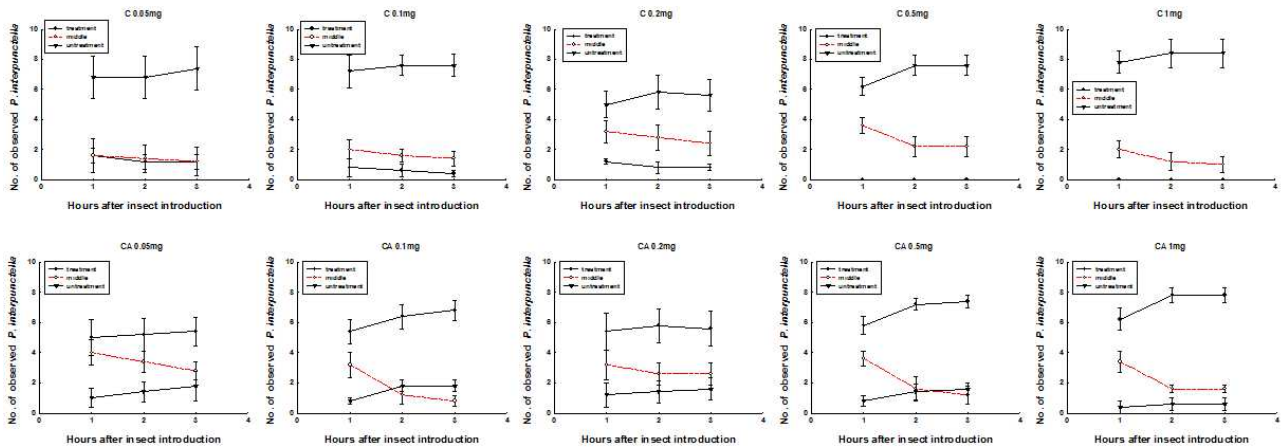


그림 56. 계피 추출물 Hexane 분획 A2 subfraction 주요성분(C: cinnamaldehyde, CA: cinnamic acid) 처리량에 따른 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 분포 변화

계피 추출물 Hexane 분획 A2 subfraction 주요성분인 *Trans*-cinnamaldehyde, *Trans*-cinnamic acid 처리량에 따른 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 분포는 *Trans*-cinnamaldehyde의 경우 모든 처리량, 처리 후 경과 시간에서 화랑곡나방 유충의 기피효과를 유발하며 처리량이 증가할수록 기피효과가 증가하여 0.5mg/cm² 이상에서 처리구에 분포하는 공시충의 개체가 없는 것으로 조사되었으나 *Trans*-cinnamic acid의 경우 모든 처리량, 처리 후 경과 시간에서 화랑곡나방 유충의 기피효과를 유발하지 않고 처리구에 더 많은 개체수가 관찰되어 기피효과를 유발하는 유효성분이 아닌 것으로 판단되었다. 계피 추출물 Hexane 분획 A2 subfraction 주요성분 *Trans*-cinnamaldehyde, *Trans*-cinnamic acid 처리량에 따른 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 기피율은 표 46, 47과 같다.

처리량(mg/cm ²)	1	0.5	0.2	0.1	0.05
노출 시간					
1h	-58.00 ± 21.68	-49.09 ± 18.82	-42.44 ± 41.19	-49.33 ± 20.47	-40.00 ± 38.08
2h	-72.00 ± 19.24	-56.91 ± 10.98	-44.44 ± 38.14	-49.61 ± 26.39	-38.00 ± 37.01
3h	-72.00 ± 19.24	-56.73 ± 11.83	-40.44 ± 39.73	-53.61 ± 21.92	-36.00 ± 40.37

표 46. *Trans*-cinnamic acid 처리량에 따른 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 기피율

처리량(mg/cm ²)	1	0.5	0.2	0.1	0.05
노출 시간					
1h	79.11 ± 14.09	63.11 ± 11.95	39.78 ± 18.06	64.00 ± 35.78	52.00 ± 39.62
2h	86.50 ± 15.77	77.56 ± 14.79	52.44 ± 26.97	70.67 ± 20.87	58.89 ± 42.24
3h	88.28 ± 15.35	77.56 ± 14.79	56.22 ± 28.69	75.43 ± 12.43	62.00 ± 41.47

표 47. *Trans*-cinnamaldehyde 처리량에 따른 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 기피율

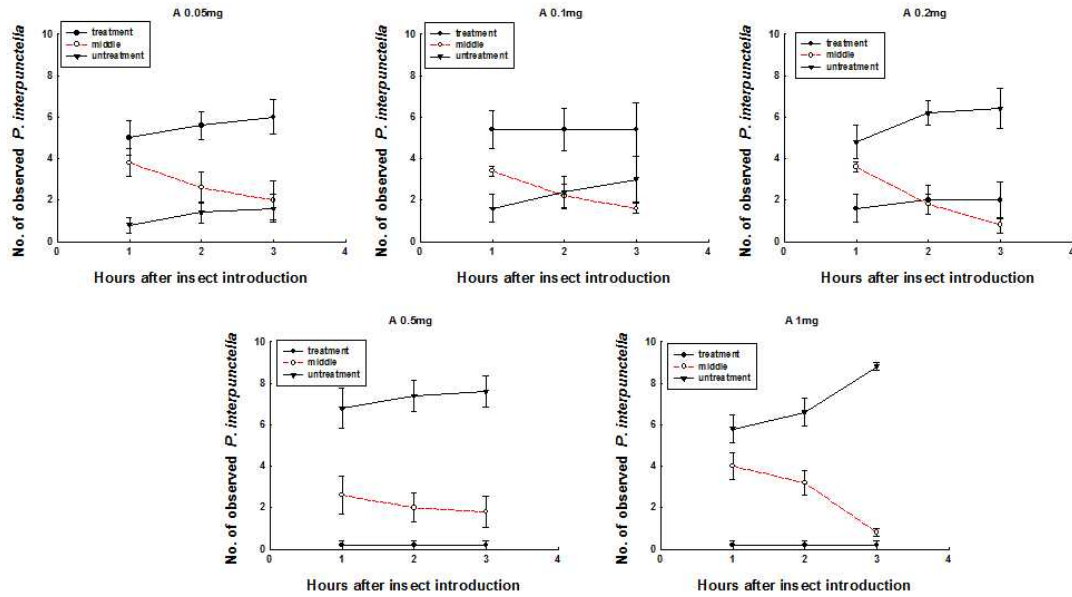


그림 57. 팔각회향 추출물 Hexane 분획 B3 subfraction 주요성분(A: anethole) 처리량에 따른 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 분포 변화

팔각회향 추출물 Hexane 분획 B3 subfraction 주요성분인 *Trans*-anethole 처리량에 따른 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 분포는 0.05, 0.1mg/cm² 처리에서는 모든 처리 후 경과시간에서 처리구에 분포하는 공시충의 개체수가 많아 기피효과가 유발되지 않으나 0.2, 0.1, 0.05 mg/cm² 처리에서는 모든 처리 후 경과시간에서 화랑곡나방 유충의 기피효과를 유발하며 시간이 경과할수록 기피효과가 증가되는 것으로 조사되었다.

팔각회향 추출물 Hexane 분획 B3 subfraction 주요성분 *Trans*-anethole 처리량에 따른 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 기피율은 표 48와 같다.

처리량(mg/cm ²)	1	0.5	0.2	0.1	0.05
노출 시간					
1h	56.00 ± 16.73	68.22 ± 17.67	32.00 ± 32.71	-36.33 ± 33.67	-43.00 ± 16.43
2h	64.00 ± 18.17	74.67 ± 12.85	42.00 ± 26.83	-30.00 ± 38.08	-43.78 ± 16.34
3h	88.00 ± 10.95	76.89 ± 14.39	52.00 ± 40.87	-24.00 ± 53.20	-45.78 ± 21.64

표 48. *Trans*-anethole 처리량에 따른 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 기피율

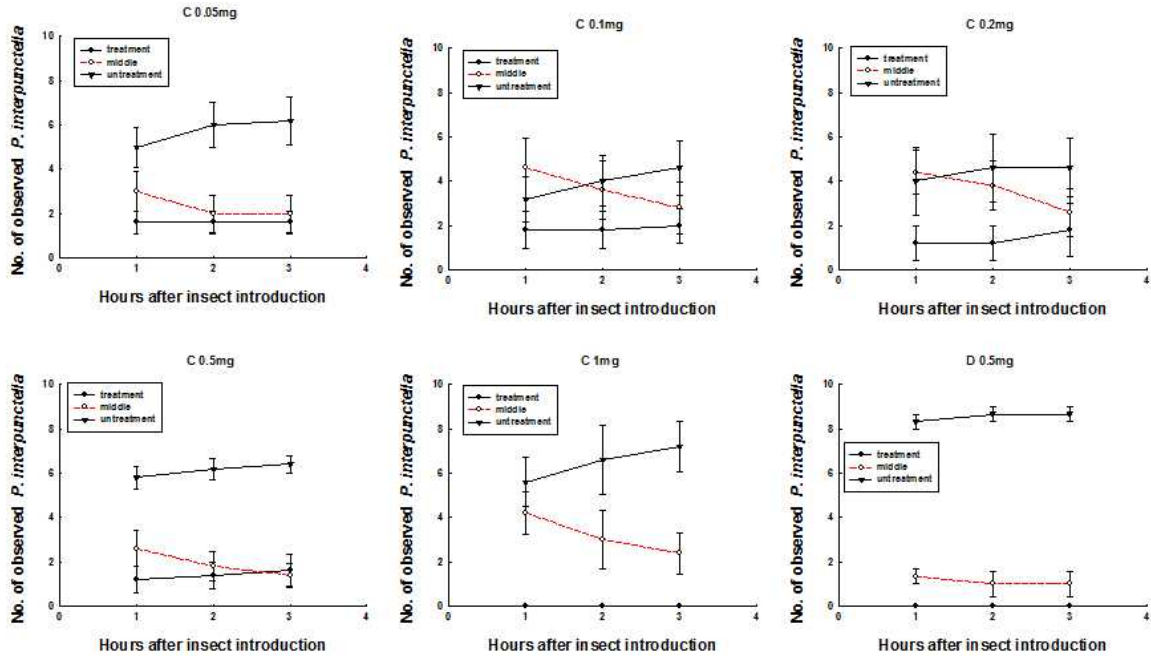


그림 58. 시라자 추출물 Hexane 분획 C3 subfraction 주요성분(C: Carvone, D: Dillapiole) 처리량에 따른 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 분포 변화

시라자 추출물 Hexane 분획 C3 subfraction 주요성분인 Dillapiole, D-carvone 처리량에 따른 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 분포는 D-carvone의 경우 모든 처리량, 처리 후 경과 시간에서 화랑곡나방 유충의 기피효과를 유발하며 처리량, 처리 후 경과시간이 증가할수록 기피효과가 증가하는 것으로 조사되었으며 Dillapiole의 경우 모든 처리 후 경과시간에서 처리구에 분포하는 공시충의 개체가 없는 것으로 조사되어 향후 낮은 처리량에서의 기피효과 검증 실험이 필요할 것으로 판단되었다.

시라자 추출물 Hexane 분획 C3 subfraction 주요성분 Dillapiole, D-carvone 처리량에 따른 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 기피율은 표 49, 50과 같다.

처리량(mg/cm ²) 노출 시간	1	0.5	0.2	0.1	0.05
1h	56.44 ± 24.31	48.44 ± 17.30	28.44 ± 47.56	14.67 ± 25.21	34.89 ± 21.15
2h	67.33 ± 32.79	51.78 ± 20.72	34.67 ± 46.39	23.56 ± 29.88	45.56 ± 29.04
3h	74.22 ± 23.35	52.00 ± 25.79	34.89 ± 49.11	28.00 ± 35.85	46.00 ± 29.66

표 49. D-carvone 처리량에 따른 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 기피율

처리량(mg/cm ²) 노출 시간	0.5
1h	86.30 ± 5.48
2h	90.00 ± 10.00
3h	90.00 ± 10.00

표 50. Dillapiole 처리 후 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 기피율

각 한약재 추출물 Hexane 분획 subfraction 주요성분 처리량에 따른 화랑곡나방 유충의 기피율 통계량은 표 51와 같다.

처리량(mg/cm ²) 분획용매	0.05	0.1	0.2	0.5	1
Cinnaldehyde	df=2,12; F=9.84; P=0.0030	df=2,12; F=40.51; P<0.0001	df=2,12; F=10.24; P=0.0025	df=2,12; F=56.94P<0.0001	df=2,12; F=55.26; P<0.0001
Cinnamic acid	df=2,12; F=5.32; P=0.0222	df=2,12; F=21.79; P<0.0001	df=2,12; F=5.31; P=0.0223	df=2,12; F=37.60; P<0.0001	df=2,12; F=76.16; P<0.0001
Anethole	df=2,12; F=9.88 P=0.0029	df=2,12; F=5.06; P=0.0255	df=2,12; F=14.11; P=0.0007	df=2,12; F=30.62; P<0.0001	df=2,12; F=90.74; P<0.0001
Carvone	df=2,12; F=8.07; P=0.0060	df=2,12; F=1.12; P=0.3574	df=2,12; F=2.01; P=1761	df=2,12; F=21.00 P<0.0001	df=2,12; F=11.85; P=0.0014
Dillapiole				df=2,6; F=202.27; P<0.0001	

표 51. subfraction 주요성분 처리량에 따른 화랑곡나방 유충의 기피율 통계량

(나) 천연 유래 곡류 해충 제어 단일 성분의 유효성 검증

연구결과 효과가 검증된 유효성분 Dillapiole, D-carvone (시라자), *Trans*-cinnamaldehyde, *Trans*-cinnamic acid (계피), *Trans*-anethole (팔각회향)의 기피효과를 유발하는 각 성분 최소 농도를 선정하고 각 유효성분 종류와 최소농도를 다양한 비율로 조합하여 저곡 해충 기피효과 극대화, 단일성분 사용 시의 저곡 해충 저항성 발현 가능성을 최소화하는 최적 조합비를 접촉 독성 및 휘발성 기피력 측정용 기구를 이용, 유효성분 종류, 조합비에 따른 처리 후 경과시간 별 화랑곡나방 3령 유충의 기피효과를 조사하여 확립하였다. 1차적으로 시라자, 계피, 팔각회향 Hexane 분획물로 부터 규명된 방충 유효성분인 Dillapiole, D-carvone (시라자), *Trans*-cinnamaldehyde (계피), *Trans*-anethole (팔각회향)의 최적 조합비를 규명하기 위해 조합 시 투입할 기피효과를 유발하는 각 유효성분의 최소농도를 선정하기 위해 Dillapiole은 시라자 hexane 분획물의 subfraction 중 높은 기피율을 보이는 층을 분리하여, Dillapiole 함유량이 90% 이상이 되는 것을 확인하고 이를 실험에 이용하였다. D-carvone, *Trans*-cinnamaldehyde,

Trans-anethole은 Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, USA)에서 순도 95% 이상의 단일성분을 구입하여 각 단일 유효성분의 몰농도별 기피테스트를 진행하여 기피율을 도출하였고, 이를 분석하여 기피효과(약 50%의 기피율)를 보이는 최저 몰농도를 선정하였다. 실험은 접촉 독성 및 휘발성 기피력 측정용 기구를 이용, 유효성분 종류, 몰농도에 따른 처리 후 경과시간 별 화랑곡나방 3령 유충의 기피효과를 조사하였으며 각 단일 유효성분을 다양한 몰농도별로 Hexane을 이용하여 희석한 뒤 여과지에 몰농도별로 1mL를 분주하여 사용하였다. 연구에 사용된 각 단일 유효성분의 분자량은 표 52와 같다.

Compounds	Molecular weight (g/mol)
Dillapiole	222.240
D-carvone	150.22
<i>Trans</i> -cinnamaldehyde	132.16
<i>Trans</i> -anethole	148.2

표 52 기피효과 극대화를 위한 최적 조합비에 사용된 유효성분의 분자량

각 단일 유효성분 조합 최저농도를 선정하기 위해 접촉 독성 및 휘발성 기피력 측정용 기구를 이용, 각 단일 유효성분 종류, 몰농도에 따른 처리 후 경과시간 별 화랑곡나방 3령 유충의 분포 양상 변화 연구 결과는 다음과 같다(그림 59~62).

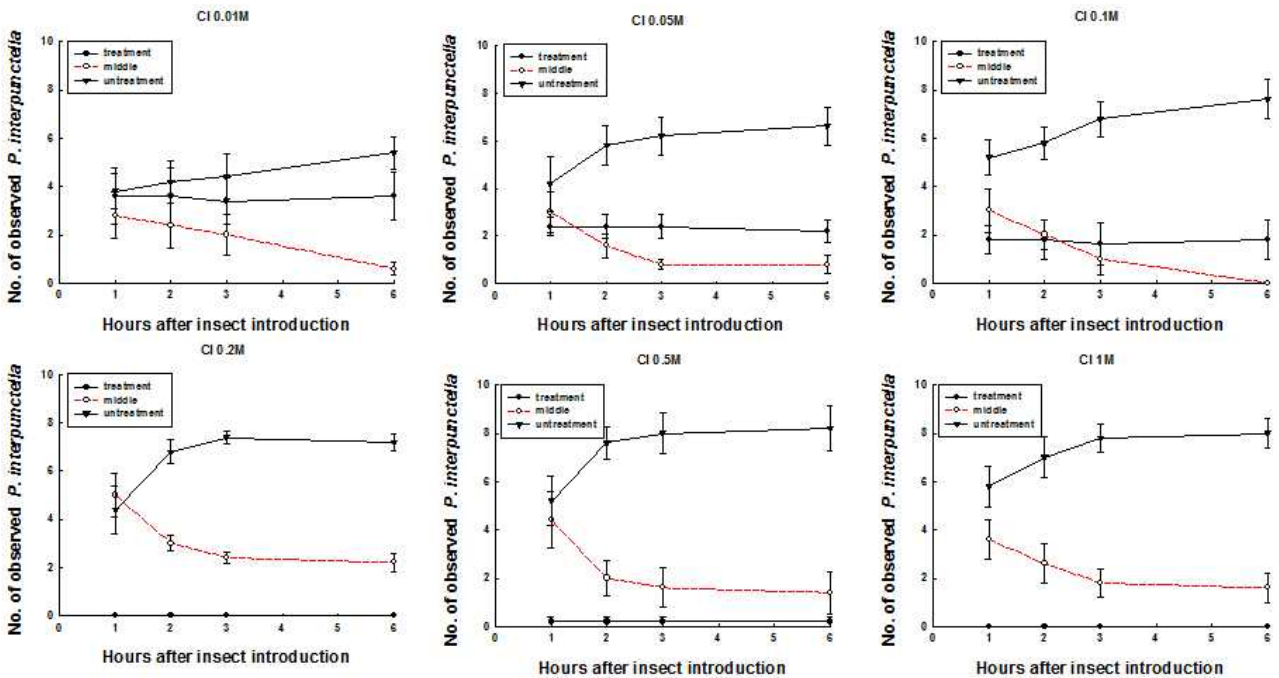


그림 59. 계피유래 유효성분(CI: cinnamaldehyde) 처리농도에 따른 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 분포 변화

계피 추출물 Hexane 분획 A2 subfraction에서 확인된 주요성분인 *Trans*-cinnamaldehyde 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 몰농도 처리 후 경과시간(1, 2, 3, 6 h) 별 화랑곡나방 유충의 분포는 모든 몰농도, 처리 후 경과시간에서 화랑곡나방 유충의 기피효과를 유발하며 처리농도가 증가할수록 기피효과가 증가하는 것으로 조사되었으며 처리 후 6시간 경과 후 기피율 50% 이상을 보이는

최소 몰농도는 0.05 몰농도로 최적 조합비 규명 연구 시 사용할 *Trans*-cinnamaldehyde 기준 농도를 0.05 몰농도로 선정하였다. 계피 추출물 Hexane 분획 A2 subfraction에서 확인된 주요성분인 *Trans*-cinnamaldehyde 처리농도에 따른 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 기피율은 표 53과 같다.

처리농도(M) 노출 시간	1	0.5	0.2	0.1	0.05	0.01
1h	61.67 ± 19.51	51.11 ± 20.15	46.44 ± 21.35	34.00 ± 21.91	18.67 ± 32.69	1.82 ± 36.97
2h	73.00 ± 17.89	75.33 ± 11.93	69.21 ± 7.53	42.44 ± 32.08	35.00 ± 25.50	5.82 ± 40.35
3h	81.50 ± 12.70	79.33 ± 16.40	75.56 ± 5.15	56.00 ± 32.79	39.33 ± 28.43	10.97 ± 38.21
6h	83.50 ± 13.18	81.33 ± 18.50	76.67 ± 8.75	62.47 ± 35.01	46.21 ± 26.40	22.61 ± 48.26

표 53. *Trans*-cinnamaldehyde 처리농도에 대한 시간경과 별 화랑곡나방 유충의 기피율

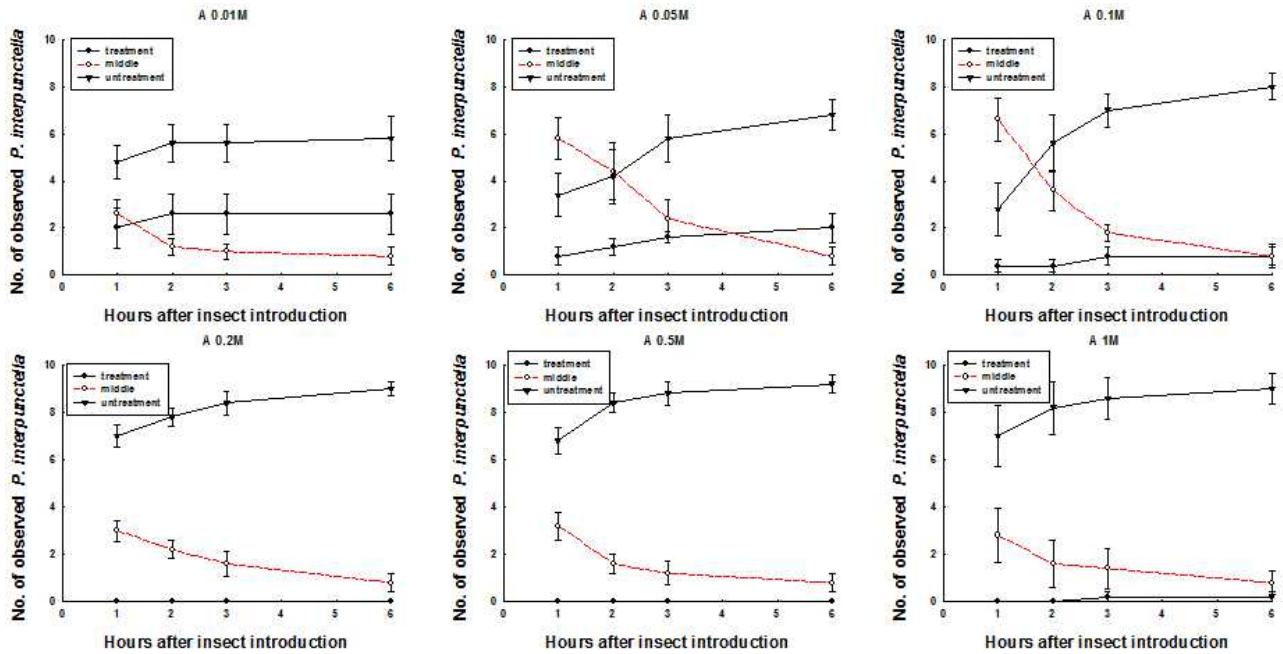


그림 60. 팔각회향유래 유효성분(A: anethole) 처리농도에 따른 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 분포 변화

팔각회향 추출물 Hexane 분획 B3 subfraction에서 확인된 주요성분인 *Trans*-anethole 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 몰농도 처리 후 경과시간(1, 2, 3, 6 h) 별 화랑곡나방 유충의 분포는 모든 몰농도, 처리 후 경과시간에서 화랑곡나방 유충의 기피효과를 유발하며 처리농도가 증가할수록 기피효과가 증가하는 것으로 조사되었으며 처리 후 6시간 경과 후 기피율 50% 이상을 보이는 최소 몰농도는 0.05 몰농도로 최적 조합비 규명 연구 시 사용할 *Trans*-anethole 기준 농도를 0.05 몰농도로 선정하였다. 팔각회향 추출물 Hexane 분획 B3 subfraction에서 확인된 주요성분인 *Trans*-anethole 처리농도에 따른 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 기피율은 표 54과 같다.

처리농도(M) 노출 시간	1	0.5	0.2	0.1	0.05	0.01
1h	70.89 ± 27.15	68.00 ± 13.04	70.00 ± 10.00	24.22 ± 27.79	25.68 ± 25.84	30.33 ± 34.89
2h	83.11 ± 23.18	84.00 ± 8.94	78.00 ± 8.37	53.50 ± 29.13	30.02 ± 20.46	32.78 ± 37.60
3h	83.09 ± 24.73	88.00 ± 10.95	84.00 ± 11.40	64.00 ± 19.49	42.28 ± 21.78	33.49 ± 37.45
6h	88.00 ± 17.89	92.00 ± 8.37	92.00 ± 8.37	75.00 ± 16.58	50.28 ± 25.59	35.71 ± 41.65

표 54. *Trans*-anethole 처리농도에 대한 시간경과 별 화랑곡나방 유충의 기피율

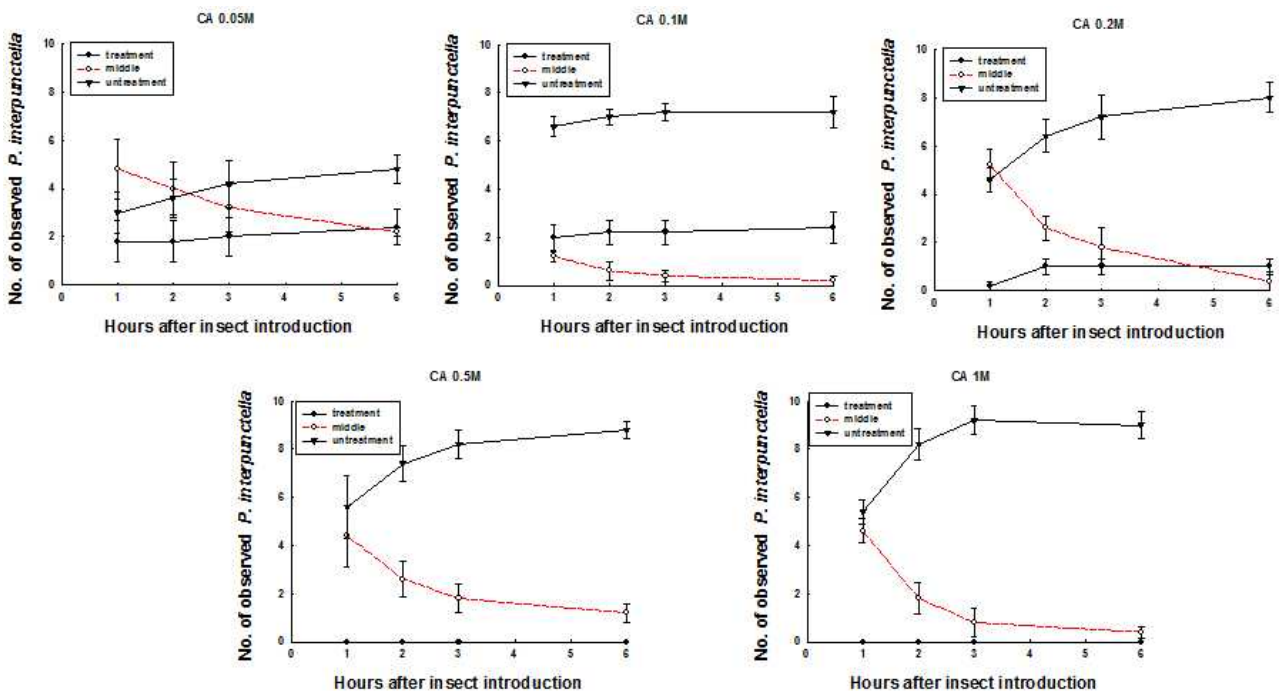


그림 61. 시라자유래 유효성분(CA: Carvone) 처리농도에 따른 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 분포 변화

시라자 추출물 Hexane 분획 C3 subfraction에서 확인된 주요성분인 D-carvone 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 몰농도 처리 후 경과시간(1, 2, 3, 6 h) 별 화랑곡나방 유충의 분포는 모든 몰농도, 처리 후 경과시간에서 화랑곡나방 유충의 기피효과를 유발하며 처리농도가 증가할수록 기피효과가 증가하는 것으로 조사되었으며 처리 후 6시간 경과 후 기피율 50% 이상을 보이는 최소 몰농도는 0.1 몰농도로 최적 조합비 규명 연구 시 사용할 D-carvone 기준 농도를 0.1 몰농도로 선정 하였다. 앞선 *Trans*-cinnamaldehyde, *Trans*-anethole 최소 몰농도 선정 연구결과 0.01 몰농도에 서 처리 후 6h 경과 시 까지 기피율이 50%를 넘지 않아 0.01 몰농도에 대한 실험은 진행하지 않았다. 시라자 추출물 Hexane 분획 C3 subfraction에서 확인된 주요성분인 D-carvone 처리농도에 따른 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 기피율은 표 55와 같다.

처리농도(M) 노출 시간	1	0.5	0.2	0.1	0.05
1h	54.00 ± 11.40	56.00 ± 28.81	44.00 ± 8.94	47.33 ± 22.04	12.67 ± 21.88
2h	82.00 ± 14.83	74.00 ± 16.73	54.00 ± 20.74	49.11 ± 16.78	19.56 ± 24.67
3h	92.00 ± 13.04	82.00 ± 13.04	62.00 ± 24.90	51.11 ± 18.87	24.00 ± 32.33
6h	95.50 ± 6.22	88.00 ± 8.37	73.56 ± 13.20	49.11 ± 29.69	26.22 ± 30.61

표 55. D-carvone 처리농도에 대한 시간경과 별 화랑곡나방 유충의 기피율

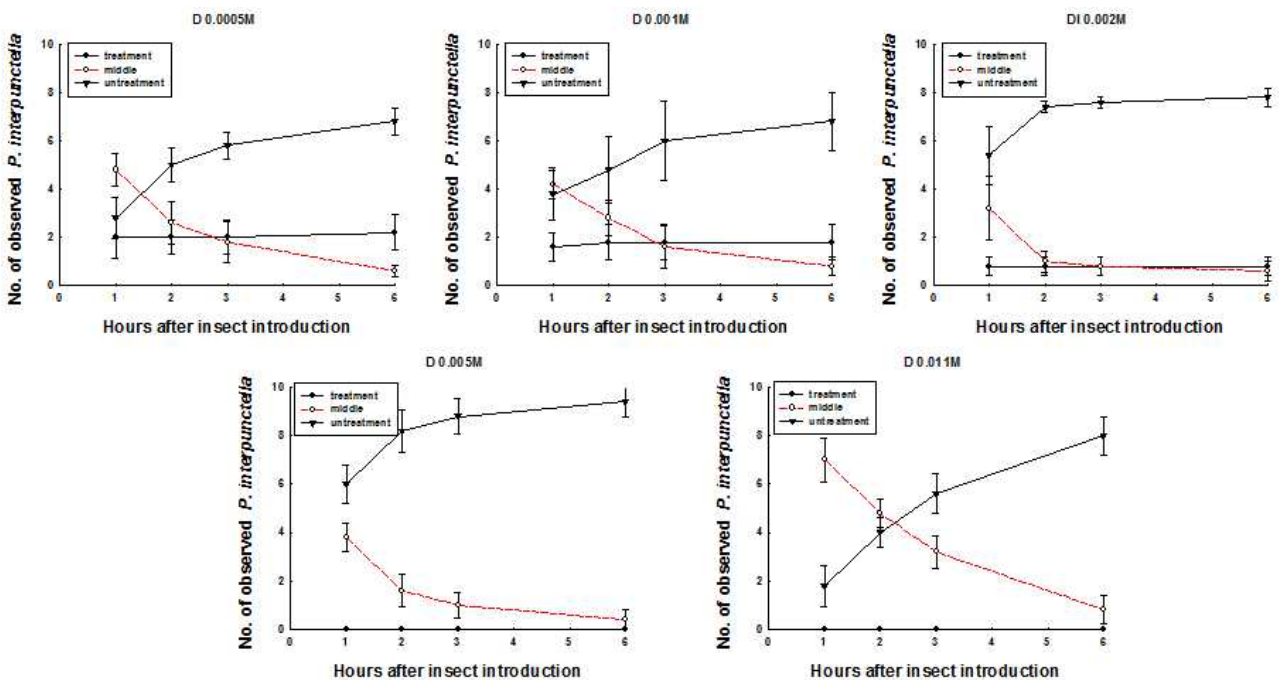


그림 62. 시라자유래 유효성분(D: Dillapiole) 처리량에 따른 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 분포 변화

시라자 추출물 Hexane 분획 C3 subfraction에서 확인된 주요성분인 Dillapiole의 경우 본 실험 수행 전에 진행한 화랑곡나방 유충 반응 시험에서 0.0005 몰농도에서 기피반응을 보여 본 실험에서 처리농도를 0.0005, 0.001, 0.002, 0.005, 0.01 몰농도 선정하였다. 연구결과 Dillapiole 각 몰농도 처리 후 경과시간(1, 2, 3, 6 h) 별 화랑곡나방 유충의 분포는 모든 몰농도, 처리 후 경과시간에서 화랑곡나방 유충의 기피효과를 유발하며 처리농도가 증가할수록 기피효과가 증가하는 것으로 조사되었으며 처리 후 6시간 경과 후 기피율 50% 이상을 보이는 최소 몰농도는 0.001 몰농도로 최적 조합비 규명 연구 시 사용할 Dillapiole 기준 농도를 0.001 몰농도로 선정하였다. 시라자 추출물 Hexane 분획 C3 subfraction에서 확인된 주요성분인 Dillapiole 처리농도에 따른 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 기피율은 표 56와 같다. 단일 유효성분 처리농도에 대한 화랑곡나방 유충의 기피율 통계량은 표 57과 같다.

처리농도(M) 노출 시간	0.01	0.005	0.002	0.001	0.0005
1h	20.56 ± 21.48	60.67 ± 15.88	50.22 ± 33.59	22.22 ± 37.47	8.44 ± 34.41
2h	45.28 ± 15.07	83.11 ± 16.95	72.67 ± 17.56	29.61 ± 46.39	31.33 ± 21.29
3h	63.06 ± 18.73	89.33 ± 13.62	74.67 ± 16.28	42.28 ± 54.25	39.78 ± 18.30
6h	90.28 ± 16.26	95.56 ± 9.94	76.67 ± 16.18	52.00 ± 44.38	48.44 ± 31.14

표 56. Dillapiole 처리농도에 대한 시간경과 별 화랑곡나방 유충의 기피율

분획용매	물농도	0.01	0.05	0.1	0.2	0.5	1
Cinnaldehyde		df=2,12; F=2.26; P=0.1474	df=2,12; F=13.19; P=0.0009	df=2,12; F=19.29; P=0.0002	df=2,12; F=92.47; P<0.0001	df=2,12; F=32.64; P<0.0001	df=2,12; F=45.66; P<0.0001
Anethole		df=2,12; F=9.05; P=0.0040	df=2,12; F=7.64; P=0.0072	df=2,12; F=19.16; P=0.0002	df=2,12; F=257.54; P<0.0001	df=2,12; F=181.64; P<0.0001	df=2,12; F=33.28; P<0.0001
Carvone		-	df=2,12; F=1.78; P=0.2107	df=2,12; F=64.94; P<0.0001	df=2,12; F=47.70; P<0.0001	df=2,12; F=47.30; P<0.0001	df=2,12; F=98.49; P<0.0001
분획용매	물농도	-	0.0005	0.001	0.002	0.005	0.01
Dillapiole		-	df=2,12; F=7.08; P=0.0093	df=2,12; F=4.37; P=0.0374	df=2,12; F=51.24; P<0.0001	df=2,12; F=66.34; P<0.0001	df=2,12; F=46.98; P<0.0001

표 57. 단일 유효성분 처리농도에 대한 화랑곡나방 유충의 기피율 통계량

(다) 최적 방충 효과를 보이는 단일 유효성분 최적 조합비 확립

최적 조합비 연구를 위한 주요 단일 유효성분 최소 물농도 선정 연구 결과 Dillapiole의 경우 0.001M에서 6시간 후 52%의 기피율을 보였으며 D-carvone의 경우 0.1M에서 6시간 후 49%의 기피율을 보였다. *Trans*-cinnamaldehyde의 경우 0.05M에서 6시간 후 46%의 기피율을 보였으며 *Trans*-anethole의 경우 0.05M에서 6시간 후 50%의 기피율을 보였다. 따라서 연구결과를 바탕으로 각 유효성분의 최저농도를 아래의 표 58과 같이 선정하여 최적 조합비 선정을 위한 연구에 적용하였다.

Compounds	최저농도 (M)
Dillapiole	0.001
D-carvone	0.1
<i>Trans</i> -cinnamaldehyde	0.05
<i>Trans</i> -anethole	0.05

표 58. 기피효과 극대화를 위한 최적 조합비에 사용된 유효성분의 최저농도(M)

본 연구에서는 최적 방충 효과를 보이는 단일 유효성분 최적 조합 물질을 개발하기 위해 각 단일 유효성분 최저농도를 비율상 1로 간주하여 조합한 주요 유효성분 조합 방충물질 시제품을 만들어 이에 대한 화랑곡나방 유충의 기피효과 실험을 진행하였다. 예1) Dillapiole : D-carvone (1:1) 의 경우, 0.001M \times 1/2 의 Dillapiole 과 0.1M \times 1/2를 조합, 예2) Dillapiole:D-carvone:*Trans*-cinnamaldehyde:*Trans*-anethole (1:1:1:1) 의 경우, 0.001M \times 1/4 Dillapiole, 0.1M \times 1/4 D-carvone, 0.05M \times 1/4 *Trans*-cinnamaldehyde, 0.05M \times 1/4 *Trans*-anethole를 조합.

1단계 조합은 각 유효성분을 기준으로 다른 유효성분과 동일 비율로 조합한 물질 제조 후 1mL을 처리하여 시간 경과에 따른 기피효과를 조사하였다. 본 연구에서 유효성분 조합비에 대한 표기는 CI:A:CA:D의 순서로 하였다(cinnamaldehyde(CI), anethole(A), carvone(CA), Dillapiole(D)). 각 유효성분을 기준으로 다른 유효성분과 동일 비율로 조합한 물질 처리 후 경과시간 별 화랑곡나방 3령 유충의 분포 양상 변화 연구 결과는 다음과 같다(그림 63, 64).

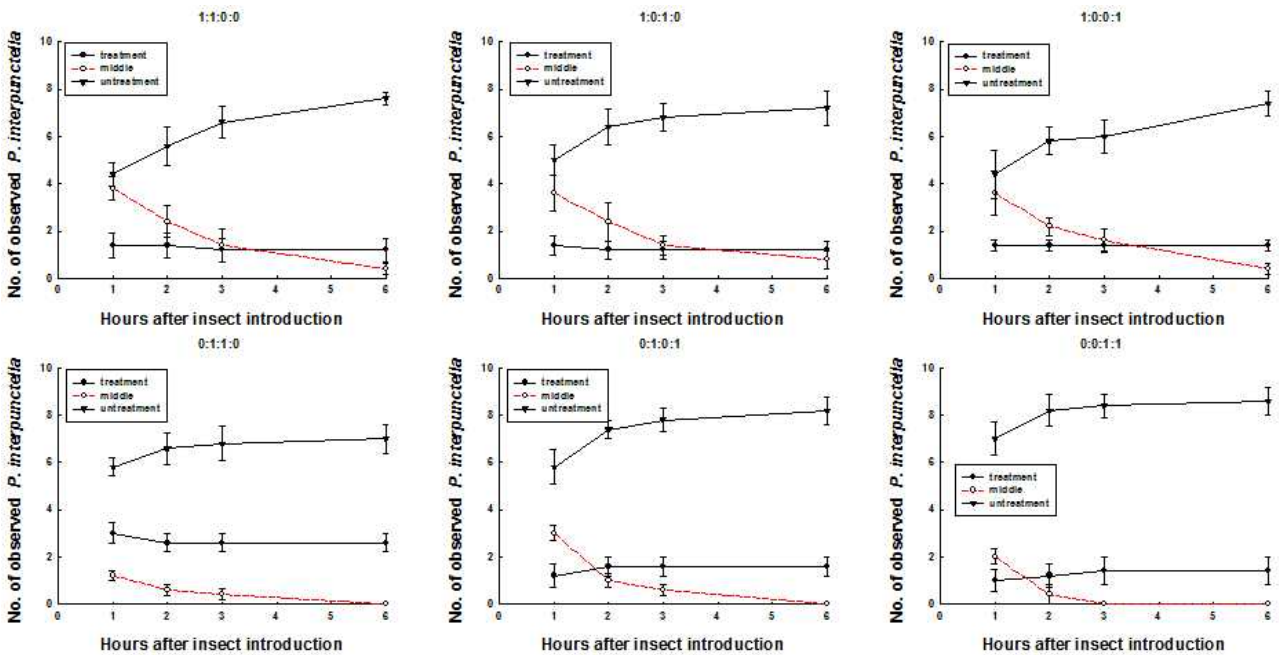


그림 63. 2가지 유효성분 1:1 조합물질 처리 후 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 분포 변화

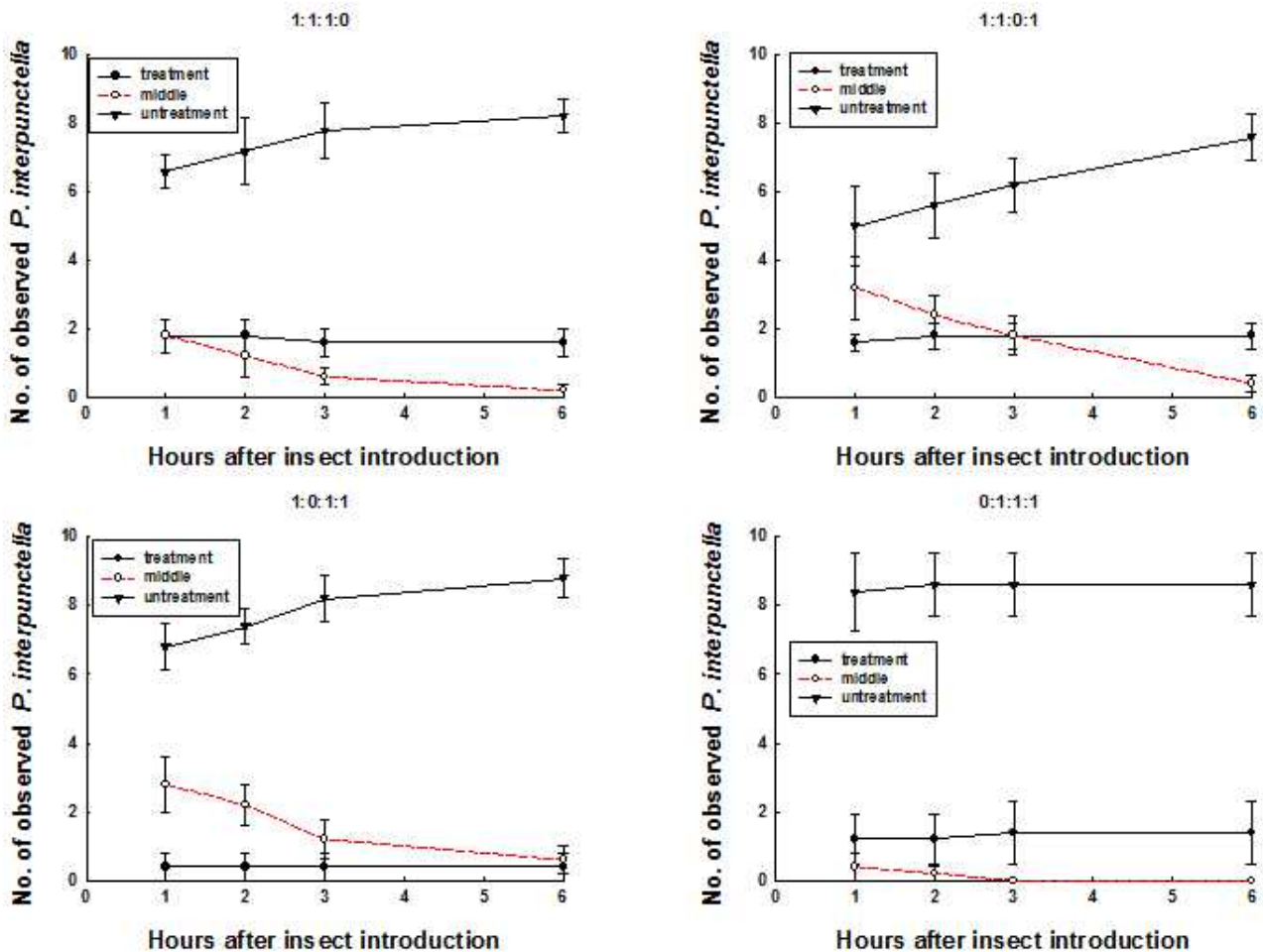


그림 64. 3가지 유효성분 1:1:1 조합물질 처리 후 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 분포 변화 연구결과 모든 조합에서 기피효과가 나타나는 것으로 조사되었으며 처리 후 시간이 경과함에 따라 기피율이 증가하는 것으로 조사되었다. 2가지 유효성분 조합의 경우 carvone(CA)과 Dillapiole(D)의 조합에서 처리 후 2h 경과 후부터 70% 이상의 기피율을 보였으며 cinnamaldehyde(CI)와 anethole(A), cinnamaldehyde(CI)와 Dillapiole(D)의 조합에서 처리 후 6h 경과 후 70% 이상의 기피율을 보이는 것으로 조사되었다. 따라서 2가지 유효성분 조합물 제조 시 CA:D>CI:D>CI:A 순으로 효과가 좋을 것으로 판단되나 Dillapiole의 경우 인공합성이 어려워 시중에 판매되는 단일 유효성분 가격이 비싸며 다른 유효성분보다 비교적 독성이 커서 소량일 경우 큰 문제가 없으나 과도한 양을 함유할 경우 경제성, 안전성문제를 야기 할 수 있어 CI:A의 조합이 안전성과 효과성을 고려할 때 적합한 조합으로 판단되었다. 3가지 유효성분 조합의 경우 cinnamaldehyde(CI), carvone(CA), Dillapiole(D) 조합에서 처리 후 2h 경과 후부터 70% 이상의 기피율을 보이다 6h 경과 후 80%이상의 가장 높은 기피율을 보이는 것으로 조사되었다. 2가지, 3가지 유효성분 조합비 물질 처리 후 경과시간에 따른 화랑곡나방 유충의 기피율은 표 59와 같다.

Trans- cinnamaldehyde 기준 조합비						
Percentage repellency (%)						
Time(h)	combination ratio (CI : A : CA : D)					
	1:1:0:0	1:0:1:0	1:0:0:1	1:1:1:0	1:1:0:1	1:0:1:1
1h	31.11±17.07	36±16.73	12±30.33	46.73±17.55	34.1±26.27	64±16.73
2h	44.22±23.52	52±19.24	30.44±28.1	52.36±28.22	38.1±23.01	70±15.81
3h	59.11±22.53	59.33±16.92	49.27±26.85	61.25±22.97	44.1±16.96	79.33±16.4
6h	70.22±18.63	64.94±21.39	72±27.75	65.66±17.48	58.81±19.54	85.56±16.96

Trans- anethole 기준 조합비						
Percentage repellency (%)						
Time(h)	combination ratio (CI : A : CA : D)					
	1:1:0:0	0:1:1:0	0:1:0:1	1:1:1:0	1:1:0:1	0:1:1:1
1h	31.11±17.07	28±17.89	46±27.02	46.73±17.55	34.1±26.27	72±41.47
2h	44.22±23.52	40.44±22.99	58±16.43	52.36±28.22	38.1±23.01	74±37.15
3h	59.11±22.53	42.44±24.42	62±19.24	61.25±22.97	44.1±16.96	72±41.47
6h	70.22±18.63	45±20.62	66.67±20.55	65.66±17.48	58.81±19.54	72±41.47

D- carvone 기준 조합비						
Percentage repellency (%)						
Time(h)	combination ratio (CI : A : CA : D)					
	1:0:1:0	0:1:1:0	0:0:1:1	1:1:1:0	1:0:1:1	0:1:1:1
1h	36±16.73	28±17.89	60±25.5	46.73±17.55	64±16.73	72±41.47
2h	52±19.24	40.44±22.99	72±26.83	52.36±28.22	70±15.81	74±37.15
3h	59.33±16.92	42.44±24.42	72±26.83	61.25±22.97	79.33±16.4	72±41.47
6h	64.94±21.39	45±20.62	72±26.83	65.66±17.48	85.56±16.96	72±41.47

Dillapiole 기준 조합비						
Percentage repellency (%)						
Time(h)	combination ratio (CI : A : CA : D)					
	1:0:0:1	0:1:0:1	0:0:1:1	1:1:0:1	1:0:1:1	0:1:1:1
1h	12±30.33	46±27.02	60±25.5	34.1±26.27	64±16.73	72±41.47
2h	30.44±28.1	58±16.43	72±26.83	38.1±23.01	70±15.81	74±37.15
3h	49.27±26.85	62±19.24	72±26.83	44.1±16.96	79.33±16.4	72±41.47
6h	72±27.75	66.67±20.55	72±26.83	58.81±19.54	85.56±16.96	72±41.47

표 59. 2, 3가지 유효성분 동일 조합 물질 처리 후 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 기피율

2, 3가지 유효성분 동일비율 처리 조합물에 대한 처리 후 경과시간별 화랑곡나방 유충의 기피율을 볼 때 전반적으로 anethole과 다른 유효성분과의 시너지 효과는 적은 것으로 보이며 특히 anethole(A)과 carvone(CA)을 조합할 경우 가장 낮은 기피효과를 보이는 것으로 조사되었다.

2단계 조합은 각 유효성분을 동일 비율(1:1:1:1)로 조합한 물질 제조 후 1mL을 처리하여 시간 경과에 따른 기피효과를 조사하였으며 이를 기준으로 각 1가지 유효성분의 조합비율을 증가시키면서 동일비율 조합비에서 조사된 화랑곡나방 유충 기피율과 비교하여 기피효과가 가장 큰 조합비를 탐색하였다. 본 연구에서 유효성분 조합비에 대한 표기는 CI:A:CA:D의 순서로 하였다(cinnamaldehyde(CI), anethole(A), carvone(CA), Dillapiole(D)). 각 유효성분을 동일 비율로 조합한 물질과 1가지 유효성분을 증가시킨 조합한 물질 처리 후 경과시간 별 화랑곡나방 3령 유충의 분포 양상 변화 연구 결과는 다음과 같다(그림 65).

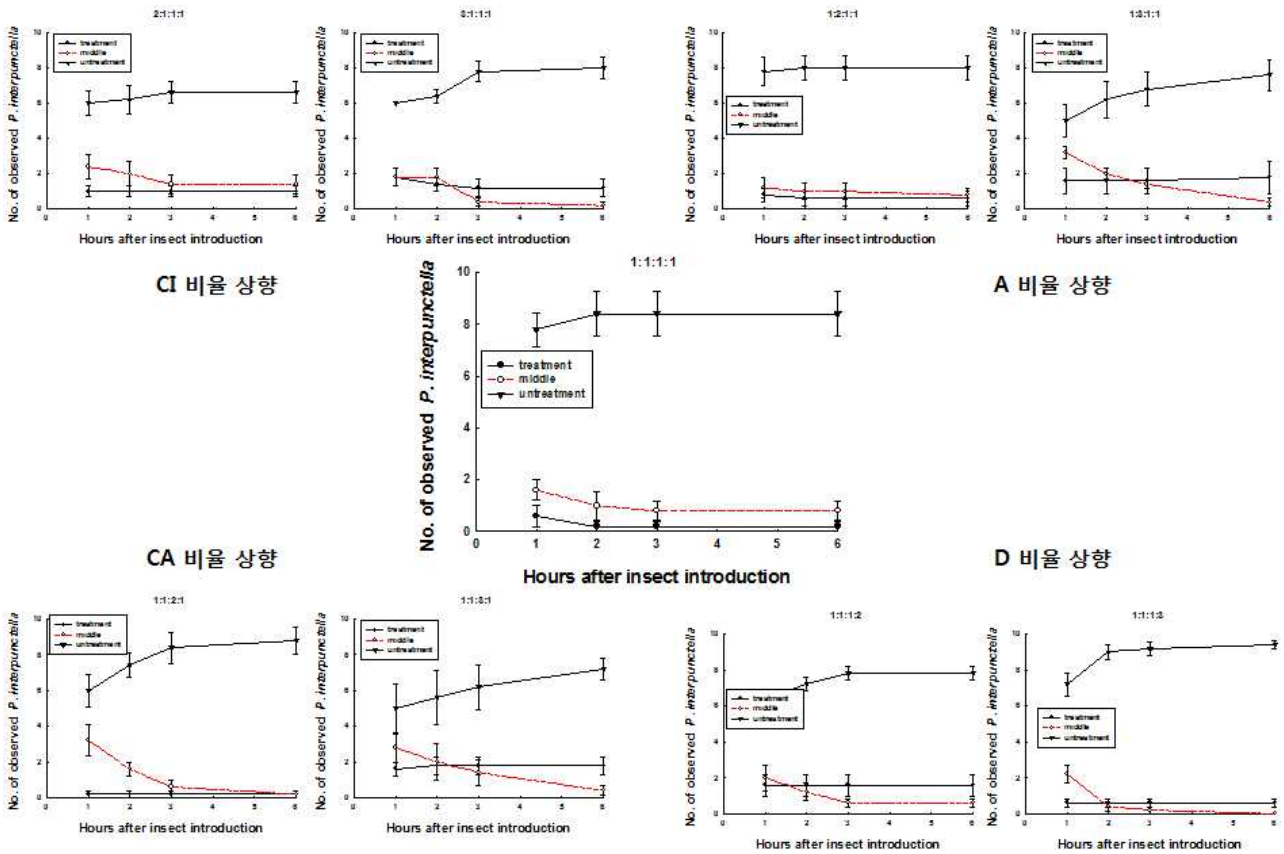


그림 65. 각 유효성분 1:1:1 조합물질 및 각 유효성분 조합비율 증가 조합물질 처리 후 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 분포 변화

연구결과 모든 조합에서 기피효과가 나타나는 것으로 조사되었으며 처리 후 시간이 경과함에 따라 기피율이 증가하는 것으로 조사되었다. 4가지 유효성분 1:1:1:1 조합 시의 경우 처리 후 1h 경과 후부터 70% 이상의 기피율을 보이고 2h 경과 후부터 80% 이상의 기피율을 보였다. 4가지 유효성분 중 1가지 유효성분의 조합비율을 2배로 한 실험 결과에서는 anethole의 비율을 2배로 한 조합에서 처리 후 1h 경과 시부터 지속적으로 70% 이상의 기피율을 보였으며 carvone의 비율을 2배로 한 조합에서 처리 후 3h 경과 후부터 90%에 가까운 기피율을 보였다. 4가지 유효성분 중 1가지 유효성분의 조합비율을 3배로 한 실험 결과에서는 Dillapiole의 비율을 3배로 한 조합에서 처리 후 2h 경과 시부터 지속적으로 80% 이상의 기피율을 보였다. 본 연구결과를 볼 때 4가지 유효성분이 모두 함유된 물질이 2, 3 가지 유효성분이 들어간 물질에 비해 기피효과가 좋은 것으로 보이며 4가지 유효성분의 조합비율을 균일하게 낮은 농도로 조합한 조합물질이 경제성, 안전성, 효과성 측면에서 적합한 물질로 보이나 향이 강하게 나는 유효성분의 조합비율을 증가시킬 경우 본 실험에서 사용한 실험기구 내부 공간 전체에 향이 확산되어 기피효과를 교란 시키는 것으로 판단되어 대규모 공간에서의 기피효과 연구가 추가적으로 진행되어야 할 것으로 판단되었다. 각 유효성분 조합비율 별 물질 처리 후 경과시간에 따른 화랑곡나방 유충의 기피율은 표 60과 같다.

Percentage repellency (%)				
combination ratio CI : A : CA : D	Time (hour)			
	1h	2h	3h	6h
1:1:1:1	72±15	85±17	86±15	86±15
2:1:1:1	53±12	56±14	62±5	62±5
1:2:1:1	71±22	77±23	77±23	79±23
1:1:2:1	62±22	78±10	88±13	93±10
1:1:1:2	48±13	56±19	62±22	62±22
3:1:1:1	45±14	53±15	71±22	73±23
1:3:1:1	34±36	47±40	53±38	59±39
1:1:3:1	34±36	38±38	46±36	57±20
1:1:1:3	66±19	84±15	86±13	88±11

표 60. 4가지 유효성분 조합 물질 처리 후 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 기피율

3단계 조합은 각 유효성분을 동일 비율(1:1:1:1)로 조합한 물질 제조 후 1mL을 처리하여 시간 경과에 따른 기피효과를 조사하였으며 이를 기준으로 각 2, 3가지 유효성분의 조합비율을 증가시키면서 동일비율 조합비에서 조사된 화랑곡나방 유충 기피율과 비교하여 기피효과가 가장 큰 조합비를 탐색하였다. 본 연구에서 유효성분 조합비에 대한 표기는 CI:A:CA:D의 순서로 하였다(cinnamaldehyde(CI), anethole(A), carvone(CA), Dillapiole(D)). 2, 3가지 유효성분을 증가시켜 조합한 물질 처리 후 경과시간 별 화랑곡나방 3령 유충의 분포 양상 변화 연구 결과는 다음과 같다(그림 66, 67).

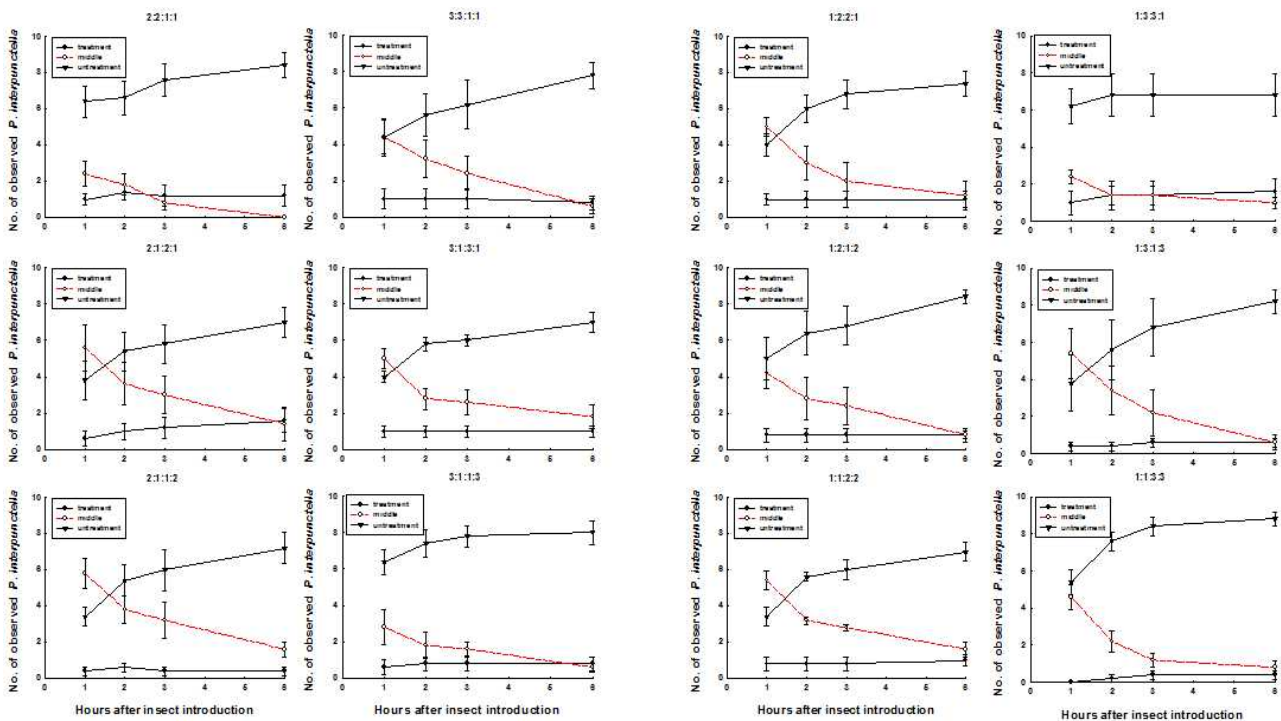


그림 66. 2가지 유효성분 조합비를 증가시켜 조합한 물질 처리 후 경과시간 별 화랑곡나방 3령 유충의 분포

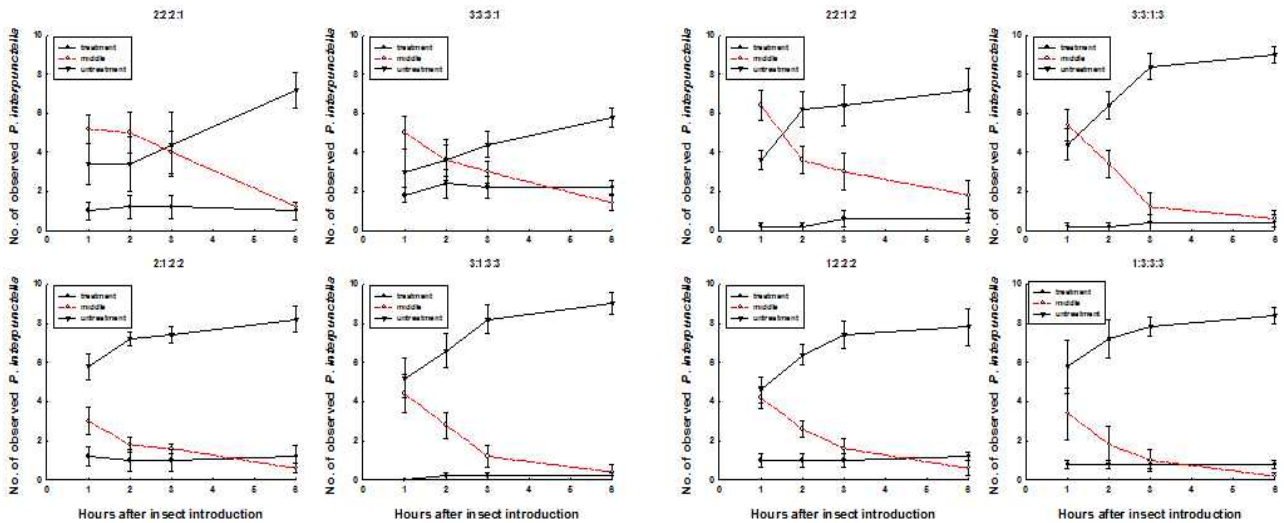


그림 67. 3가지 유효성분 조합비를 증가시켜 조합한 물질 처리 후 경과시간 별 화랑곡나방 3령 유충의 분포

연구결과 모든 조합에서 기피효과가 나타나는 것으로 조사되었으며 처리 후 시간이 경과함에 따라 기피율이 증가하는 것으로 조사되었다. 전반적인 기피율은 조합비율이 변화하더라도 크게 변화하는 경향은 없는 것으로 보이나 anethole과 carvone의 조합비율이 동시에 증가할 경우 기피율이 낮아지는 경향을 보여 anethole과 carvone의 시너지 효과를 크게 기대하기 어려울 것으로 판단되었다. Dillapiole의 경우에는 조합비율이 증가할수록 기피율이 증가하는 경향을 보이며 특히 cinnamaldehyde, Dillapiole, carvone의 조합비율이 동시에 증가할 경우 기피율이 증가하는 경향이 크게 나타나 향후 cinnamaldehyde, Dillapiole, carvone의 다양한 조합비율에 대한 연구가 추가적으로 진행되어야 할 것으로 판단되었다.

각 유효성분 조합비율 별 물질 처리 후 경과시간에 따른 화랑곡나방 유충의 기피율은 표 61과 같다.

Percentage repellency (%)					Percentage repellency (%)				
combination ratio CI : A : CA : D	Time (hour)				combination ratio CI : A : CA : D	Time (hour)			
	1h	2h	3h	6h		1h	2h	3h	6h
2:2:1:1	55±24	53±28	66±29	75±27	2:2:2:1	24±30	22±40	32±47	64±28
2:1:2:1	32±22	44±26	46±30	54±27	2:2:1:2	33±9	59±19	58±21	67±14
2:1:1:2	31±7	49±21	58±22	73±12	2:1:2:2	46±21	62±19	64±21	70±27
1:2:2:1	30±19	50±19	59±12	66±13	1:2:2:2	36±20	54±17	64±21	67±24
1:2:1:2	41±28	55±24	60±24	76±13	3:3:3:1	11±33	12±33	22±23	38±18
1:1:2:2	27±15	50±14	54±19	62±17	3:3:1:3	42±19	62±16	80±19	86±17
3:3:1:1	35±29	47±31	54±35	75±15	3:1:3:3	54±22	66±19	83±13	92±12
3:1:3:1	30±9	50±14	52±11	61±14	1:3:3:3	49±30	65±19	73±6	81±4
3:1:1:3	60±18	66±21	68±15	77±16					
1:3:3:1	55±34	54±41	54±41	53±39					
1:3:1:3	35±37	53±37	64±39	80±16					
1:1:3:3	54±15	74±11	80±16	84±11					

표 61. 4가지 유효성분 조합 물질 처리 후 경과시간 별 화랑곡나방 유충의 기피율

최적 방충 효과를 보이는 단일 유효성분 최적 조합비 확립 연구에 대한 기피율 실험 통계량은

표 62와 같다.

유효성분 조합비 C:A:CA:D	1:1:0:0	1:0:1:0	1:0:0:1	0:1:1:0	0:1:0:1	0:1:1:0	0:0:1:1	1:1:1:0
통계량	df=2,12; F=29.55; P<0.0001	df=2,12; F=26.95; P<0.0001	df=2,12; F=12.67; P=0.0011	df=2,12; F=53.96; P<0.0001	df=2,12; F=78.45; P<0.0001	df=2,12; F=53.96; P<0.0001	df=2,12; F=81.73; P<0.0001	df=2,12; F=57.70; P<0.0001
유효성분 조합비 C:A:CA:D	1:1:0:1	1:0:1:1	0:1:1:1	1:1:1:1	2:1:1:1	1:2:1:1	1:1:2:1	1:1:1:2
통계량	df=2,12; F=18.56; P=0.0002	df=2,12; F=67.87; P<0.0001	df=2,12; F=37.37; P<0.0001	df=2,12; F=64.31; P<0.0001	df=2,12; F=29.61; P<0.0001	df=2,12; F=58.12; P<0.0001	df=2,12; F=72.73; P<0.0001	df=2,12; F=62.17; P<0.0001
유효성분 조합비 C:A:CA:D	2:2:1:1	2:1:2:1	2:1:1:2	1:2:2:1	1:2:1:2	1:1:2:2	2:2:2:1	2:2:1:2
통계량	df=2,12; F=39.95; P<0.0001	df=2,12; F=6.96; P=0.0099	df=2,12; F=17.84; P=0.0003	df=2,12; F=18.97; P=0.0002	df=2,12; F=18.15; P=0.0002	df=2,12; F=50.30; P<0.0001	df=2,12; F=4.69; P=0.0313	df=2,12; F=19.28; P=0.0002
유효성분 조합비 C:A:CA:D	2:1:2:2	1:2:2:2	3:1:1:1	1:3:1:1	1:1:3:1	1:1:1:3	3:3:1:1	3:1:3:1
통계량	df=2,12; F=68.59; P<0.0001	df=2,12; F=56.70; P<0.0001	df=2,12; F=90.13; P<0.0001	df=2,12; F=14.72; P=0.0006	df=2,12; F=9.81; P=0.0030	df=2,12; F=233.55; P<0.0001	df=2,12; F=10.49; P=0.0023	df=2,12; F=37.64; P<0.0001
유효성분 조합비 C:A:CA:D	3:1:1:3	1:3:3:1	1:1:3:3	1:3:1:3	3:3:3:1	3:3:1:3	3:1:3:3	1:3:3:3
통계량	df=2,12; F=48.89; P<0.0001	df=2,12; F=15.01; P=0.0005	df=2,12; F=276.50; P<0.0001	df=2,12; F=8.73; P=0.0046	df=2,12; F=3.37; P=0.0690	df=2,12; F=41.93; P<0.0001	df=2,12; F=62.84; P<0.0001	df=2,12; F=39.57; P<0.0001

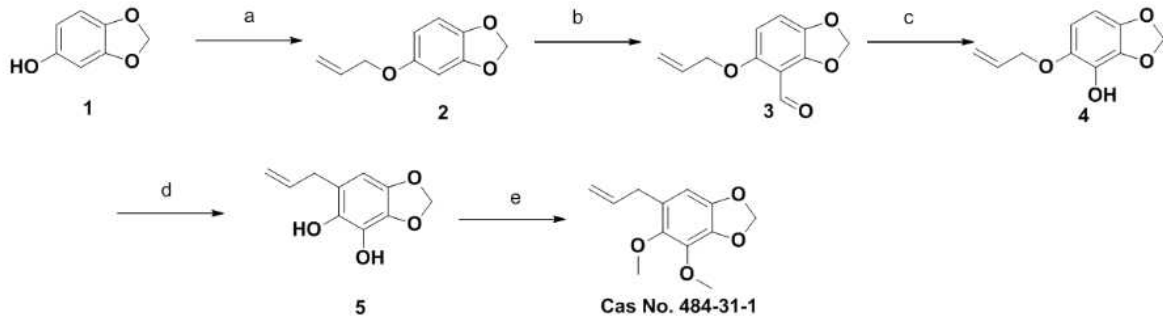
표 62. 단일 유효성분 조합물질에 대한 화랑곡나방 유충의 기피율 통계량

(5) 천연 유래 곤충 제어 물질 생산을 위한 유기 합성 시안 마련

본 연구는 최적 조합 물질의 생산 능력 및 해충 기피효과 향상을 위한 방안을 마련하고자 수행되었으며 경제성과 효과성을 고려한 최적 조합물질 생산방안은 유효성분이 함유된 한약재의 비율을 조절하여 초음파 에탄올 추출법으로 추출물을 얻은 후 감압농축을 통해 1차 물질을 얻은 후 이를 대상으로 유효성분의 함유량을 측정하고 유기합성이나 각 성분이 함유된 한약재를 Hexane 분획하여 얻은 단일 유효성분을 첨가하여 기피효과를 향상시키거나 지속성을 연장시킨 최적 기피물질을 제조하는 생산방안 확립하는 것이다. 본 연구결과 도출된 해충 기피효과 유발 주요 단일 유효성분은 계피에서 *Trans*-cinnamaldehyde, 시라자에서 Dillapiole과 D-carvone, 팔각회향에서 *Trans*-anethole이나 그 외의 한약재 추출물에서도 기피효과 유발 유효성분이 함유된 것으로 조사되어 초음파 에탄올 추출법으로 추출물을 확보하는 1차 단계에서 다양한 한약재의 조합이 가능할 것으로 판단된다. 연구기간 중 수행한 한약재 배합 초음파 에탄올 추출, 농축으로 확보된 1차 물질에서도 실제 사용가능한 정도의 저곡해충의 기피효과가 나타나는 것으로 조사되어 저농도 기피물질을 사용해야하는 상황에서는 1차 물질을 사용해도 충분한 기대효과를 얻을 수 있을 것으로 판단되나 고농도 기피물질을 사용해야하는 상황이나 지속성을 장기간 유지해야 하는 상황에서는 4가지 유효성분의 함유를 증가시킨 2차 물질을 제조하여 사용하는 것이 필요할 것이다. 본 연구결과 도출된 4가지 주요 단일 유효성분 중 D-carvone, *Trans*-cinnamaldehyde, *Trans*-anethole은 저비용 유기합성법으로 합성된 단일 성분이 저렴한 비용으로 판매되고 있어 현재의 유기합성법 보다 저비용, 고수율의 새로운 유기합성법 시안을 도출하는 것이 어려우나 Dillapiole의 경우 저비용 유기합성법이 정립되지 않아 합성된 단일 성분이 비싼 비용으로 판매되고 있어 현재의 유기합성법 보다 저비용, 고수율의 새로운 유기합성법 시안을 도출하는 것이 필요하여 본 연구에서는 기존의 Dillapiole 유기합성법을 개선하여 새로운 유기합성 시안을 마련하였다. 기존의 Dillapiole의 유기합성법과 개선된 유기합성 시안은

그림 68, 69와 같다.

➤ **Reported Scheme**



a. Allyl bromide, K_2CO_3 , Acetone, Reflux, 93 % ; b. *n*-BuLi, THF, $-78^\circ C$, DMF, NH_4Cl , 51% ; c. (i). *m*-CPBA, $CHCl_3$, $0^\circ C$, 2 h (ii). NaOH, THF:H₂O, 1h 48% ; d. Claisen rearrangement in *N,N*-dimethylaniline, 79% ; e. K_2CO_3 , MeI, Acetone, 80 %.

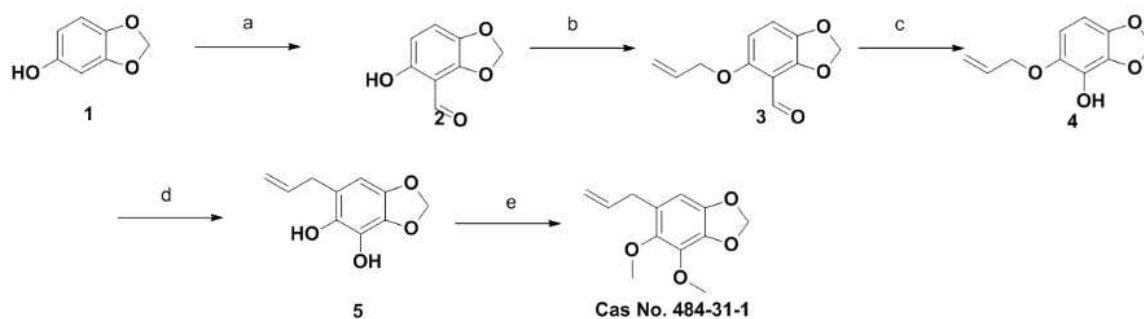
➤ **Over all yield over 5 Steps 14%.**

➤ **For making 5g final , We need to start with minimum 25 g of 1, provided the reported yields obtained in reactions**

그림 68. 기존의 Dillapiole의 유기합성법

기존의 Dillapiole의 유기합성법은 1단계 Allyl bromide, K_2CO_3 , Acetone, Reflux, 93 %, 2단계 *n*-BuLi, THF, $-78^\circ C$, DMF, NH_4Cl , 51%, 3단계 (i). *m*-CPBA, $CHCl_3$, $0^\circ C$, 2h (ii). NaOH, THF:H₂O, 1h 48%, 4단계 Claisen rearrangement in *N,N*-dimethylaniline, 79%; 5단계 K_2CO_3 , MeI, Acetone, 80 %처리의 5단계로 구성되어 있다. 5단계의 유기합성법의 수율은 14% 정도로 수율이 낮아 판매가격이 10mg당 156,400원(Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, USA))으로 고가로 판매되고 있어 기존 판매되고 있는 Dillapiole을 구매하여 2차 물질 제조 시 사용하기에는 경제적으로 불가능할 것으로 판단되었다.

➤ **Modified Route**



a. $MgCl_2$, HCHO, TEA, ACN, $70^\circ C$ (need to Stabilize); b. Allyl bromide, K_2CO_3 , Acetone, Reflux, 93 % ;c. (i). *m*-CPBA, $CHCl_3$, $0^\circ C$, 2 h (ii). NaOH, THF:H₂O, 1h 48% ; d. Claisen rearrangement in *N,N*-dimethylaniline, 79%; e. K_2CO_3 , MeI, Acetone, 80 %.

➤ This route helps to avoid the use of *n*-BuLi and Dry THF etc.

➤ The logic for this scheme is shown below

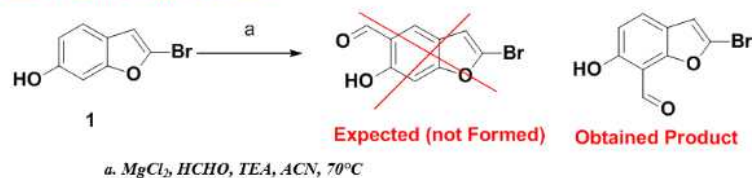


그림 69. 새로운 Dillapiole의 유기합성 시안

본 연구에서 도출된 Dillapiole의 유기합성 시안은 1단계 $MgCl_2$, HCHO, TEA, ACN, $70^\circ C$, 2단계 Allyl bromide, K_2CO_3 , Acetone, Reflux, 93 %, 3단계 (i). *m*-CPBA, $CHCl_3$, $0^\circ C$, 2h (ii). NaOH, THF:H₂O, 1h 48%, 4단계 Claisen rearrangement in *N,N*-dimethylaniline, 79%, 5단계 K_2CO_3 , MeI, Acetone, 80 % 처리의 5단계로 구성되어 있다. 새로운 유기합성 시안은 합성초기 단계에서 나오는 부산물의 생성을 억제하여 최종 물질 생성 수율을 2배 이상 높여 Dillapiole을 첨가한 2차 물질 제조 생산 시 경제성을 높일 것으로 판단되었다. 그러나 유기합성을 기반으로 하는 단일성분 화합물을 대량으로 확보하여 이를 이용한 방충기능 물질, 제품을 제조 시 기존의 화학물질 기반의 방충물질, 제품과의 차별성을 감소시킬 수 있어 해당 물질의 함유량을 높이는 추출방법, 해당물질을 활용한 현장적용 제품 제조 시 사용 목적에 맞는 유효성분 함량 조절 등 경제성을 확보하는 방안에 대한 검토가 필요하다.

(6) 검증된 방충물질의 현장 적용 소재탐색 및 적용가능성 분석

본 연구에서는 연구결과 도출된 천연유래 기반 방충물질을 현장에 직접적으로 적용 가능한 건축자재(도료, 실란트)에 첨가하여 화랑곡나방의 기피효과를 조사하여 상용화방안을 분석하였다. 본 연구에 사용한 천연유래 기반 방충물질은 *Trans*-cinnamaldehyde이 함유된 계피와 Dillapiole, D-carvone이 함유된 시라자를 7:3 비율로 혼합하여 초음파 에탄올 추출법으로 추출, 농축시킨 1차 물질을 곡물저장 및 식품제조 현장에 많이 사용되는 수성도료, 실란트에 농도별로 첨가한 처리구를 물질을 첨가하지 않은 대조구와 함께 설치하여 화랑곡나방 유충을 투입 후 $25\sim 32^\circ C$, 60~70% Rh 조건에서 4주간 화랑곡나방 유충의 분포 양상 변화를 조사하였다. 실험은 6반복을 수행하고 ANOVA 분산분석으로 통계처리 후 농도증가에

다른 기피효과 변화를 회귀분석(Regression Analysis)을 통해 분석하였다.

(가) 천연유래 기반 기피물질을 적용한 방충도료 개발

Trans-cinnamaldehyde이 함유된 계피와 Dillapiole, D-carvone이 함유된 시라자를 7:3 비율로 혼합하여 초음파 에탄올 추출법으로 추출, 농축시킨 1차 물질을 수성도료에 각 첨가비율 별(중량대비 1, 3, 5%)로 혼합 후 도포한 처리 판과 기존 수성도료를 도포한 미처리 판을 단독(각 농도 별 4개-2반복: 총 32개), 혼합(각 농도 4개-2반복: 총 8개)하여 실험 용기에 장착 후 화랑곡나방 유충 2~3 령을 먹이와 같이 각 판의 중앙에 30마리 투입(용기별 4개의 판에 각각 투입 : 총 120마리(단독, 혼합)하여 실온(25~32° C) 60~70% Rh 조건에서 실험용기를 4주간 보관하며 화랑곡나방 유충이 도료가 도포된 판에 남아있는 수를 조사하여 기피효과를 분석하였다(그림 70)



그림 70. 천연유래 기반 방충물질을 적용한 방충도료 개발 연구방법

본 연구는 화랑곡나방 2~3령 유충의 경우 발육을 위해 먹이가 반드시 필요하므로 도료가 처리된 판 중앙에 먹이와 같이 30마리의 유충을 투입하여 먹이가 반드시 필요한 상황에서 기피물질로 인한 회피가 일어나는 가를 조사한 것으로 연구결과는 표 63과 같다.

구분		처리농도	0%	1%	3%	5%
단독	평균		27 A	20.875 B	16.75 BC	14.625 C
	표준편차		4.5987	2.5319	3.5355	2.7223
혼합	평균		33.1667 A	24.8333 B	19.1667 BC	15.1667 C
	표준편차		4.8339	4.0702	2.9269	2.9269

표 63. 기피물질 혼합 비율 별 도료에서의 화랑곡나방 유충 개체수 분포변화 양상

연구결과 단독, 혼합 실험 모두 각 농도별 기피물질을 수성도료에 각 첨가비율별로 처리한 판에서 발견되는 공시충 개체수는 미처리판에서 발견되는 공시충 개체수에 비해 적은 것으로

조사되어 도료에 혼합하여 사용할 경우에도 기피효과가 유발되며 장기간 지속성이 유지될 것으로 판단되었다. 또한 각 첨가비율별 기피물질을 수성도료에 각 농도별로 처리한 판에서 발견되는 공시충 개체수를 조사하여 처리농도에 따른 기피효과를 회귀분석 분석한 결과 단독투입 실험에서 $y=25.01-2.31x$ 의 회귀직선 방정식이 통계적으로 유의하게 도출되었으며 ($R^2=0.8831$), 혼합투입 실험에서 $y=30.65-3.36x$ 의 회귀직선 방정식이 통계적으로 유의하게 도출되어($R^2=0.9121$) 기피물질의 첨가비율이 증가할수록 기피효과가 증가하는 것으로 조사되었다(그림 71)

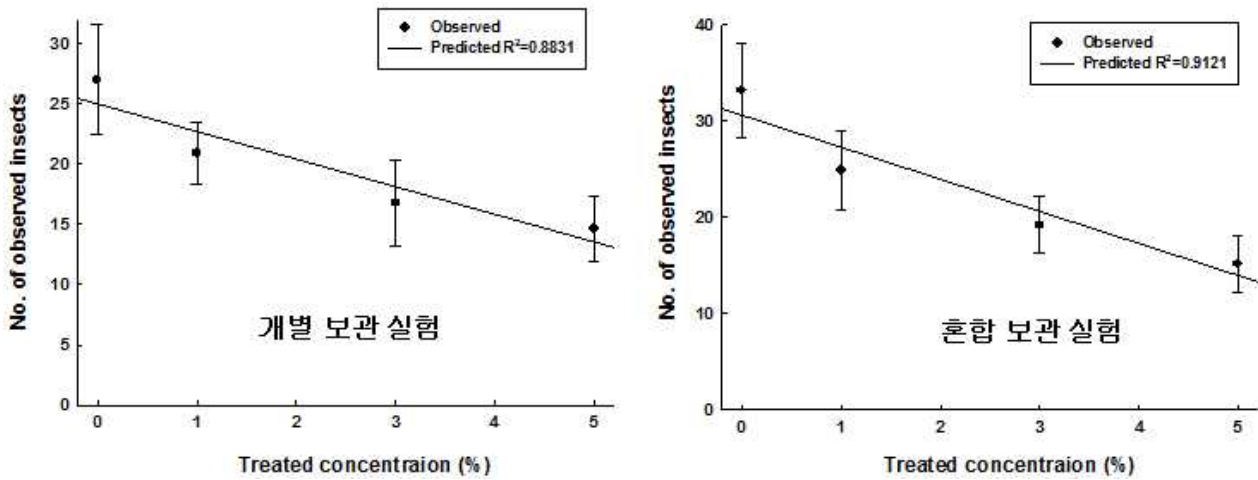


그림 71. 도료에 혼합한 기피물질 첨가 비율 증가에 따른 화랑곡나방 유충 기피효과 변화양상

마지막 단계로 연구결과 검증된 기피물질을 수성도료에 중량대비 5%를 혼합하여 실제 현장에 적용하여 적용 시 문제점과 현장 적용 시 해충 기피효과를 분석하였다. 현장 적용 시 사용되는 도료의 양이 많은 경우 기피물질을 중량 대비 3~5%를 투입하여 도료와 혼합해야하는 과정이 필요하며 기피물질의 균일한 분산을 위해 5분 이상 분산시키는 스테어링 과정이 필요한 것으로 조사되었다. 본 연구에서 적용된 현장은 연간 1~2회 권연벌레, 화랑곡나방의 발생이 모니터링 되는 식품 생산현장으로 기피물질 처리 후 권연벌레, 화랑곡나방의 발생이 모니터링 되지 않는 것으로 조사되었다(그림 72)



그림 72. 기피물질 첨가 방충도료 현장 적용

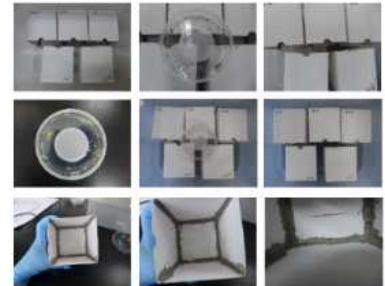
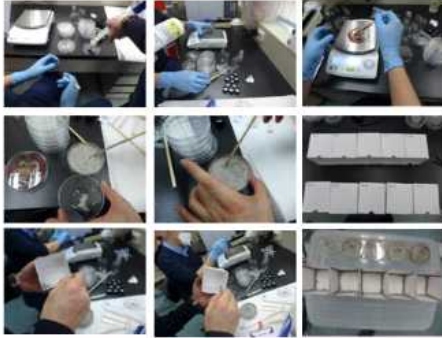
(나) 천연유래 기반 기피물질을 적용한 방충 실란트 개발

Trans-cinnamaldehyde이 함유된 계피와 Dillapiole, D-carvone이 함유된 시라자를 7:3 비율로 혼합하여 초음파 에탄올 추출법으로 추출, 농축시킨 1차 물질을 실란트에 각 농도별(중량대비 5, 10, 15, 20%)로 혼합 후 기피물질과 실란트의 혼화도, 혼합성, 경화속도 등 물성변화를 조사하고 각 농도의 기피물질을 혼합한 실란트를 소형박스(9 x 9 x 10cm) 내부 모서리에 도포한 후 각 농도별 박스를 혼합하여 실험용기에 장착하고 본 연구의 공시충인 화랑곡나방 유충과 실란트와 같이 향이 강한 건축자재에 유인되어 발견되는 대표해충인 권연벌레 각 50마리를 투입(각 공시충별 3반복)하여 28°C, RH 60% 조건의 실험실에 24시간 보관한 후 박스외부, 박스내부에서 발견되는 각 공시충의 개체수를 측정, T-TEST, ANOVA TEST 통계분석을 통해 기피효과를 분석하였다(그림 73).

1. 실험 샘플 제작
 -실란트에 천연방충물질을 농도 별로 혼합한 방충 실란트 제작(중량 대비 0, 5, 10, 15, 20%)
 -소박스 내부 모서리 부분에 방충 실란트 그레이팅: 방충 실란트 적용 소박스

2. 적정 혼합농도 선정 실험
 최종 적용 적정 농도 선정을 위한 실험 진행
 실란트에 천연방충물질을 농도 별로 혼합한 방충 실란트 제작(중량대비 0, 5, 10, 15, 20%)-> 물성변화 분석

3. 방충 실란트 방충 효과 실험
 대상해충 별 소박스 실험 (각 3반복) 농도 별 물질 처리구와 대조구 혼합적재 비교



천연방충물질을 농도 별로 혼합한 실란트를 그레이팅 시공한 소박스(9 x 9 x 10cm)를 실험용기(33 x 26 x 18cm)에 무작위 투입

1. 대조구와 5, 10, 15, 20% 처리구를 각 1개 씩(총 5개) 투입
2. 소박스의 위치를 바꿔 3반복 실험(권연벌레 성충 3반복, 화랑곡나방 유충 3반복)
3. 권연벌레 성충, 화랑곡나방 3~4령 유충 50마리를 투입하여 28°C, RH 60% 조건의 실험실에 24시간 보관한 후 박스외부, 박스내부, 에서 발견되는 개체수를 측정-> 유의수준 95, 99% T-TEST, ANOVA TEST 통계분석

그림 73. 천연유래 기반 기피물질을 적용한 방충 실란트 개발 연구방법

*Trans-cinnamaldehyde*이 함유된 계피와 *Dillapiole*, *D-carvone*이 함유된 시라자를 7:3 비율로 혼합하여 초음파 에탄올 추출법으로 추출, 농축시킨 1차 물질을 실란트에 각 첨가비율별(중량대비 5, 10, 15, 20%)로 혼합 후 기피물질과 실란트의 혼화도, 혼합성, 경화속도 등 물성변화를 조사한 결과 모든 첨가비율의 기피물질 혼합 실란트에서 혼화도, 혼합성은 양호한 것으로 조사되었으나 첨가비율이 10% 이상부터 비율이 증가할수록 실란트의 점도가 감소하고 경화속도가 증가하는 경향을 보여 실란트에 기피물질을 첨가하여 방충실란트를 제조, 사용 시 적정 첨가비율은 5~10%가 적정한 것으로 판단되었다(표 64)

구분 (중량대비 혼합비율)	혼화도	점도	경화속도	비고
0%	-	정상(100)	24h 이내	
5%	양호 (사용 추천)	정상(100)	24h 이내	
10%	양호 (사용 추천)	감소(90~100)	24~36h	
15%	양호	감소(70~80)	36~48h	
20%	양호	감소(60)	48~72h	

표 64. 천연유래 기반 기피물질 첨가 비율 별 실란트 물성변화 양상

Trans-cinnamaldehyde이 함유된 계피와 Dillapiole, D-carvone이 함유된 시라자를 7:3 비율로 혼합하여 초음파 에탄올 추출법으로 추출, 농축시킨 1차 물질을 실란트에 각 첨가비율별(중량대비 5, 10, 15, 20%)로 혼합, 소형박스 내부에 도포 후 각 처리 박스를 혼합하여 각 공시충을 투입, 실란트에 첨가한 기피물질의 비율별 박스 내부, 외부에서 관찰되는 공시충을 조사하여 기피효과를 분석한 결과는 그림 74, 75와 같다.

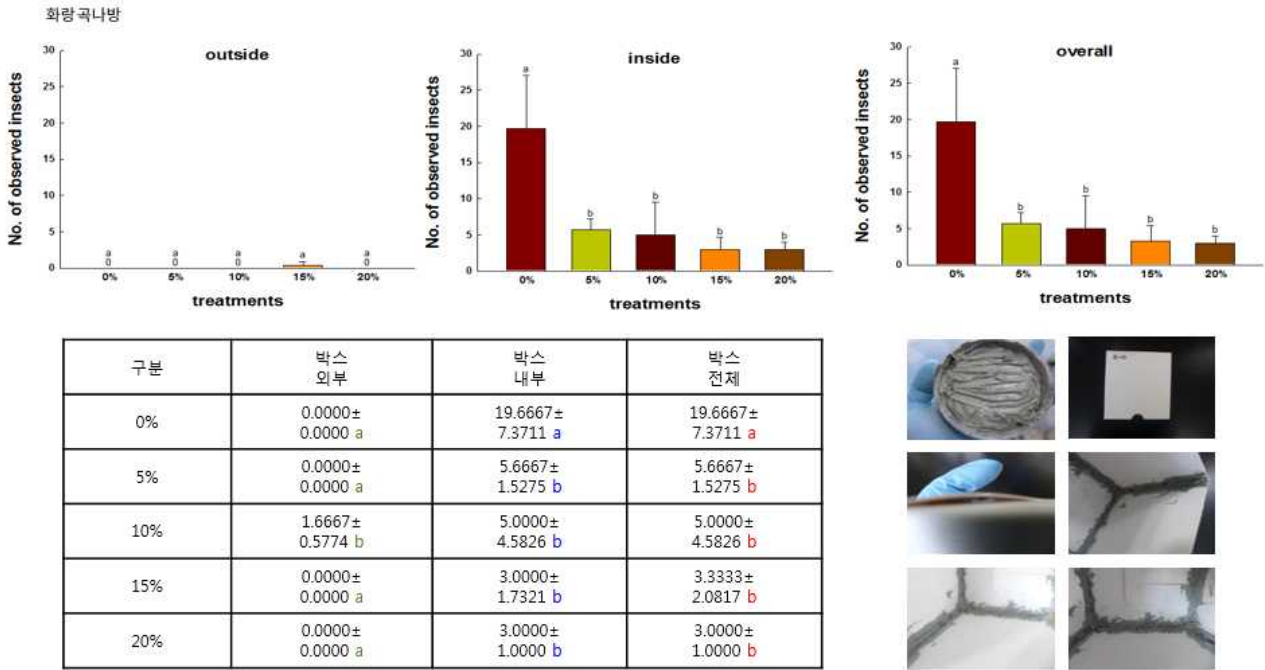
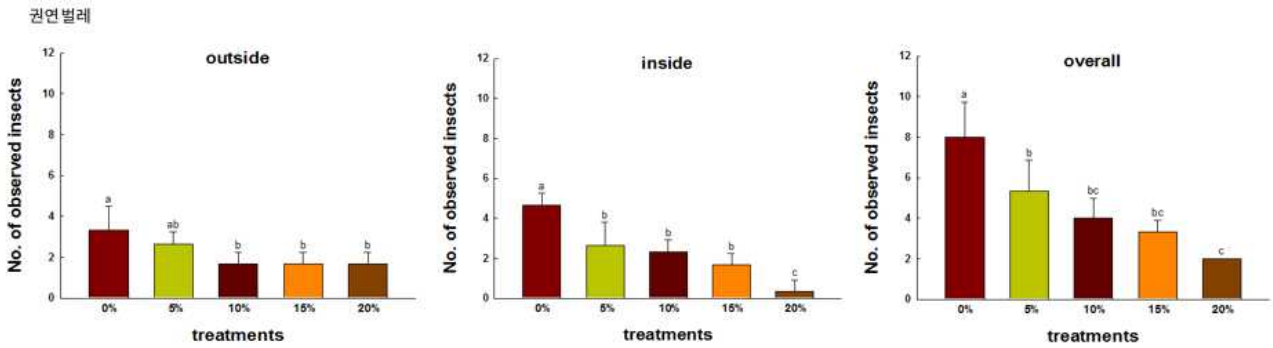


그림 74. 기피물질 혼합 비율 별 실란트 처리 박스에서의 화랑곡나방 유충 분포변화 양상

기피물질 비율별 혼합 실란트 처리 박스에서의 발견되는 화랑곡나방 유충 개체수는 모든 기피물질 비율별 혼합 실란트 처리 박스에서 기피물질을 혼합하지 않은 박스에 비해 통계적으로 유의하게 발견되는 개체수가 적은 것으로 조사되었으며(df=4,14 F=9.09, P=0.0023) 실란트에 기피물질 처리비율이 증가할수록 기피효과가 증가되는 경향을 보였다(df=4,14 F=8.82, P=0.0026).



구분	박스 외부	박스 내부	박스 전체
0%	3.3333 ± 1.1547 a	4.6667 ± 0.5774 a	8.0000 ± 1.7321 a
5%	2.6667 ± 0.5774 ab	2.6667 ± 1.1547 b	5.3333 ± 1.5275 b
10%	1.6667 ± 0.5774 b	2.3333 ± 0.5774 b	4.0000 ± 1.0000 bc
15%	1.6667 ± 0.5774 b	1.6667 ± 0.5774 b	3.3333 ± 0.5774 bc
20%	1.6667 ± 0.5774 b	0.3333 ± 0.5774 c	2.0000 ± 0.0000 c



그림 75. 기피물질 혼합 비율 별 실란트 처리 박스에서의 권연벌레 성충 분포변화 양상

기피물질 비율별 혼합 실란트 처리 박스에서의 발견되는 권연벌레 성충 개체수는 모든 기피물질 비율별 혼합 실란트 처리 박스에서 기피물질을 혼합하지 않은 박스에 비해 통계적으로 유의하게 발견되는 개체수가 적은 것으로 조사되었으며($df=4,14$ $F=14.06$, $P=0.0004$) 실란트에 기피물질 처리비율이 증가할수록 기피효과가 증가되는 경향을 보였다($df=4,14$ $F=11.70$, $P=0.0009$).

마지막 단계로 연구결과 검증된 기피물질을 실란트에 중량대비 5%를 혼합하여 실제 식품 생산 현장 포장실의 유리벽 마감재로 적용하여 적용 시 문제점과 현장 적용 시 해충 기피효과를 분석하였다. 현장 적용 시 사용되는 실란트는 1액형, 2액형 2 종류로 1액형 실란트의 경우 기피물질을 혼합하여도 시공 후 경화 부분에 문제가 없으나 2액형의 경우 경화제의 NOC기와 기피물질 용매의 OH기가 반응하여 주제의 OH기와 경화제의 NOC기가 반응하지 않아 경화가 되지 않는 문제가 발생되었다. 따라서 기피물질을 혼합하여 방충실란트를 제조 시 1액형 실란트가 사용되어야 할 것으로 판단되며 향후 2액형 실란트에 첨가할 수 있는 기피물질 제형 연구가 필요할 것으로 판단되었다. 기피물질을 혼합한 도료의 현장 적용과 마찬가지로 실란트에서도 사용하는 양이 많은 경우 기피물질을 중량 대비 5%를 투입하여 실란트와 혼합해야하는 과정이 필요하며 기피물질의 균일한 분산을 위해 5분 이상 분산시키는 스테어링 과정이 필요하다(그림 76).



그림 76. 기피물질 첨가 방충 실란트 현장 적용

(7) 유기 합성된 천연 유래 곤충 제어 물질 분석 평가

본 연구를 통해, 시라자에서는 Dillapiole과 D-carvone, 계피에서는 *Trans*-cinnamaldehyde, 팔각회향에서는 *Trans*-anethole이 주요 방충 유효성분으로 규명되었으며 이를 GC-MS 등으로 분석한 결과는 그림 77와 같다.

Compound	Dillapiole	D-carvone	<i>Trans</i> -cinnamaldehyde	<i>Trans</i> -anethole
CAS NO.	484-31-1	6485-40-1	14371-10-9	4180-23-8
구조식				
분자식	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	C ₁₀ H ₁₄ O	C ₉ H ₈ O	C ₁₀ H ₁₂ O
분자량	222.24g/mol	150.22g/mol	132.16g/mol	148.2g/mol
기타특징	끓는점: 285 °C 밀도: 1.16g/cm ³	끓는점: 231 °C 밀도: 1.16g/cm ³	끓는점: 248 °C 밀도: 1.05g/cm ³	끓는점: 234 °C 밀도: 998kg/m ³

그림 77. 주요 방충 유효성분 분석결과

본 연구에서는 최종적으로 각 한약재의 유효기피성분을 초음파 에탄올 추출, Hexane 분획 및 subfraction 분리 과정으로 확보한 천연유래 유효성분과 유기합성으로 제조된 방충유효성분의 화랑곡나방 유충 기피효과를 비교하였다(표 65). 모든 물질은 0.5mg/cm²의 농도에서 진행하였으며 유기합성으로 제조된 Dillapiole, D-carvone, *Trans*-cinnamaldehyde, *Trans*-anethole은 Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

<i>Trans</i> -cinnamaldehyde	천연유래	유기합성	Dillapiole	천연유래	유기합성
1h	58 ± 24	63 ± 12	1h	76 ± 13	86 ± 5
2h	84 ± 18	78 ± 15	2h	94 ± 8	90 ± 10
3h	86 ± 17	78 ± 15	3h	94 ± 8	90 ± 10
<i>Trans</i> -anethole	천연유래	유기합성	D-carvone	천연유래	유기합성
1h	56 ± 9	68 ± 18	1h	43 ± 22	48 ± 17
2h	82 ± 15	75 ± 13	2h	63 ± 17	52 ± 21
3h	90 ± 14	77 ± 14	3h	66 ± 12	52 ± 26

표 65. 천연유래 vs 유기합성 방충유효성분 기피효과 비교

나. 사업화				
번호	사업화명	제품명	업체명	사업화 형태
1	방충 실란트 제조용 기피물질	방충 실란트 제조용 기피물질	하이포스알앤씨	기술보유자의 직접사업화- 기존업체-상품화

다. 산업재산권(발명특허, 실용신안, 의장, 규격 등), 신품종, 프로그램개발					
번호	출원등록명	출원등록자명	구분	산업재산권 종류	출원등록일
1	접촉 독성 및 휘발성 기피력 측정용 기구	고려대학교 산학협력단	특허출원	특허	2019-10-30
2	방충 효능을 갖는 실란트	(주) 하이포스알앤씨	특허출원	특허	2020-12-02
3	팔각회향 오일을 유효성분으로 포함하는 방충 필름용 조성물 및 이를 이용한 복합 기능성 다층 필름	고려대학교 산학협력단	특허출원	특허	2020-11-18

라. 논문(국내외 전문학술지) 게재					
번호	논문명	학술지명	주저자명	학술지게재일	SCI구분
1	Prolonged Insecticidal Activity of Clove oil-Loaded Halloysite Nanotubes on Plodia interpunctella Infestation and Application in Industrial-Scale Food Packaging	Journal of food science : an official publication of the Institute of Food Technologists	Jungheon Kim	2019-09-13	SCI
2	Characterization and Preservation Performance of Multilayer Film with Insect Repellent and Antimicrobial Activities for Sliced Wheat Bread Packaging	Journal of food science : an official publication of the Institute of Food Technologists	Jung-Soo Lee, Min A. Park	2019-11-07	SCI
3	Development of insect-proof starch adhesive containing encapsulated cinnamon oil for paper box adhesion to inhibit Plodia interpunctella larvae infestation	Journal of Food Science	Chan Suk Yoon, Jungheon Kim	2020-10-12	SCI
4	Insect-repellent activity of PET-based film with star anise essential oil and its pilot-scale production for food packaging	FOOD PACKAGING AND SHELF LIFE	Jung-Soo Lee	2020-07-02	SCI

마. 국내 및 국제 학술회의 발표				
번호	발표자	발표제목	발표일시	장소, 국명 출원등록일
1	이준혁, 이보영, 신동찬, 한재준	Isolation and Identification of Anti-insect Ingredients from Natural Plant Resources to Enhance Safety of Grain Storage	2019-06-26	Songdo ConvensiA, Incheon, KOREA
2	방민석, 천용식, 나자현, 조기중	Effects of Food and Humidity on Developmental Period of Trogoderma variabile B.	2019-04-24	Grand Plaza Cheongju Hotel
3	이준혁, 이보영, 신동찬, 한재준	Screening, Isolating and Identifying Five Botanical Extracts for Insect Repellent Compounds to Enhance Safety of Grain Storage	2019-11-07	제주 부영호텔 & 리조트
4	Seungyeon Kim	Insecticidal activity of 13 herbal extracts against Plodia interpunctella and identification of anti-insect agents for food packaging application	2020-07-01	Kimdaejung Convention Center, Gwangju, Korea
5	Yunhee Baek	Identifying Repellent Compounds from Herb Extracts against Indian meal moth larvae and Determining Optimal Ratio of Compounds to Secure the Safety for	2020-07-01	Kimdaejung Convention Center, Gwangju, Korea

바. 연구인력 활용/양성 성과			
번호	인력양성명	인력양성년도 인력양성년도	인력양성 대상수 출원등록일
1	박민아	2019	1
2	이준혁	2020	1

사. 기타 홍보실적(수상실적)			
번호	일자	홍보명칭 구분	주요내용 출원등록일
1	2019-11-08	제56회 한국포장학회 학술대회 및 정기총회 포스터발표 우수상	상장번호 : 표창 2019-19호 부문 : 포스터발표 성명 이준혁 소속 고려대학교 식품공학과 제 56회 한국포장학회 학술대회 및 정기총회 포스터발표에서 우수한 연구 결과를 발표하였기에 상장을 수여함.
2	2020-07-03	2020 한국식품과학회 국제학술대회 포스터 발표 우수포스터	상장번호 : 제 20-47호 부문 : 포스터발표 성명 : Seungyeon Kim1*, Wootae Hong1, Inyoung Choi1, Jaejoon Han1,2 소속 : 1Department of Biotechnology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea. University, Korea, 2Department of Food biosciences and Technology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea. University, Korea 2020 한국식품과학회 국제학술대회의 포스터발표에서 창의력과 신선함이 돋보이는 우수한 연구 결과를 발표하였기에 상장을 수여합니다.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

본 연구의 목적은 곡류(식품) 저장 시설에서 친환경적이며 효과적인 저곡해충의 관리/방제를 위한 천연 방충성분의 방충효과를 검증하는 기술을 표준화하고 이를 이용하여 천연물에서 방충 유효성분을 분리, 규명, 방충 효과 극대화를 위한 최적 조합비 탐색을 통해 확보한 방충물질을 시제품의 실증화 적용·검증 후 방충물질 생산 시 비용 저감화를 위한 유기합성법 시안 마련하는 것이다.

3-2. 목표 달성여부

- 공시충 대량사육 시스템 구축 및 방충효과, 효율검증 기술 표준화(특허출원)
- 식품공전 등재 식물(19종) 중 방충효과를 갖는 2차 대사물질을 탐색하여 4종의 유효 단일성분 Dillapiole, D-carvone(시라자), *Trans*-cinnamaldehyde(계피), *Trans*-anethole(팔각회향) 확보
- 방충효과 유발 식물 스크리닝 방법, 유효성분 최적 추출법(초음파 에탄올 추출법) 개발 및 유효 단일성분 분획(Hexane, Diethyl ether, Ethyl acetate, DW 용매분획법(Solvent-solvent partition)) 표준방법 개발
- 단일 유효성분 및 조합에 대한 대상해충의 방충효과 검증을 통한 방충 단일 유효성분 최적 조합 물질 개발 및 방충 유효성분 DB 구축
- 방충 단일 유효 물질의 유기합성 시안 도출 및 최적 조합 물질 생산방안 마련
- 최적 조합 물질 방충물질을 이용한 현장 적용 방충 소재 개발(특허출원) 및 시제품의 현장 적용, 방충효과 분석을 통한 상용화 가능성 검증

3-3. 목표 미달성 시 원인 및 차후대책

본 연구는 계획했던 모든 목표를 3년간의 연구기간에 걸쳐 모두 달성하였으나 계획했던 정량적 목표 중 일부분을 달성하지 못했다. 첫 번째로 비 SCI 논문은 연구기간 중 1편을 등재해야 했으나 연구성과가 비 SCI 논문에 등재하기에는 아까워 SCI 논문으로 작성하여 등재함으로 당초 계획했던 연구기간 중 SCI 논문 2편 등재를 초과하여 4편을 등재하게 되었다. 두 번째는 특허 부분으로 연구기간 중 특허출원 2편 특허 등록 1편을 당초 목표로 했으나 2차년도 연구기간 중 특허 출원한 접촉 독성 및 휘발성 기피력 측적용 기구의 특허출원이 특허 등록 까지 1년 정도 예상되어 우선 심사 청구를 하지 않았으나 이 기간 중 특허청에 접수된 우선 심사 청구 건수가 증가하여 특허등록까지의 기간이 1년 6개월로 지연됨에 따라 특허등록이 연구기간 종료 후에도 가능한 것으로 확인되어 연구기간 중 특허등록이 진행되지 않았다. 그러나 연구기간 종료 1년 후까지는 특허등록이 될 것으로 판단된다. 세 번째는 기술이전 부분으로 본 연구 수행 중 3년차에 두 번째로 특허출원한 방충효능을 갖는 실란트에 관련한 특허를 본 과제의 주관 기관인 (주)하이포스알앤씨에 사용하는 기술이전이 진행되어 당초 계획했던 기술이전 1건의 목표는 달성하였으나 기술이전 비용이 연구수행 기업사용 시 기술료 감면을 받고 일시납으로 인한 추가 감면을 받아 계획하였던 500만원이 아닌 331만 2,400원의 기술료를 납부하게 됨에 따라 계획 보다 적은 기술료 성과가 도출되었다. 네 번째는 매출액 부분으로 3차년도 연구

기간 중 연구가 진행된 방충 유효성분 최적조합 물질을 도료, 실란트에 적용하여 현장에 적용하는 연구를 통해 효능을 검증한 후 연구를 수행한 식품기업의 나머지 생산현장에 정상적으로 방충 유효성분 최적조합 물질을 납품하여 적용하려 하였으나 코로나-19의 상황으로 생산현장 적용계획이 2021년으로 연기됨에 따라 당초 계획했던 연구기간 중 1,000원에 대한 매출성과를 달성하지 못하였다. 그러나 현재까지 확인 바 2021년에 적용할 계획으로 연구 종료 1년 후의 매출액 계획에 추가되어 매출액을 달성할 것으로 판단된다. 본 연구는 계획했던 목표를 달성하였으나 연구 수행 중 본 연구의 성과를 사업화하기 위해서는 다음과 같은 추가 연구 및 사업화 진행 지원이 필요할 것으로 판단된다. 첫 번째로는 방충 유효성분 최적조합비를 규명하는 연구가 추가적으로 진행되어야 할 것으로 판단되며 방충유효성분의 유기합성시안을 적용한 대량생산 시설구축지원 및 생산기술 향상 연구가 필요할 것으로 판단된다. 또한 방충 유효성분을 갖는 천연물의 지속적인 탐색과 저장해충 뿐만 아닌 모기, 바퀴, 파리 등 위생해충과 경작지 해충에 대한 방충 효과 검증 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다. 마지막으로 방충기능을 요구하는 다양한 상품적용, 개발 연구가 추가적으로 이루어져야할 것으로 판단된다.

4. 연구결과의 활용 계획 등

- 국가기관, 연구기관, 산업체 등에서 방충성분, 방충물질, 방충기능 상품개발 시 천연 유래 방충성분의 탐색, 검증, 적용에 관련한 연구용역 및 정부에서 진행 중인 살생물질 관리 정책, PLS법, 모기 기피제 가이드라인 등과 같이 살충, 기피물질과 적용제품의 방충효과 증빙 시험성적 및 자료 작성 등의 인증업체 등록, 사업화에 활용.
- 해충에 의한 직간접피해 및 곤충이물 오염 등으로 직간접적 피해를 받는 식품기업, 곡물/사료 관련기업, 유통/보관 관련기업과 친환경 해충방제 수단을 개발하는 농약회사, 해충방제 활동을 수행하는 방역회사, 친환경 방충 유효성분과 관련된 제약, 시약업체 등 친환경 방충기능 성분, 물질, 상품이 필요한 산업체에 친환경 방충물질 개발연구용역 및 친환경 방충물질 공급 사업화에 활용
- 방충기능이 필요한 건축물에 적용할 건축자재 생산기업, 건설사업, 식품기업, 포장재생산기업, 생활용품기업 등에 친환경 방충소재 개발, 적용 연구용역 및 방충소재 판매, 방충효과 검증 관련기술 사업화에 활용
- 스마트팜, 시설원예, 가축사육시설, 주거시설, 숙박시설, 음식제조 판매 시설, 대중시설, 체육시설, 공원 등 해충관리가 필요한 장소에 사용할 수 있는 안전한 친환경 방충물질 관련 사업화에 활용
- 천연유래 방충성분 뿐만 아니라 천연유래 향균, 향진균, 항바이러스 성분의 탐색, 검증, 조합 물질 개발, 상용화 연구에 연구수행 체계 구성의 기초자료로 활용

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 곡류 저장 안전성 향상을 위한 천연 유래 방충 유효 단일 성분 규명 및 대량 생산 방안 탐색				
	(영문) Isolation and identification of anti-insect ingredients from natural plant resources to enhance safety of grain storage				
주관연구기관	(주)하이포스알앤씨		주 관 연 구 책 임 자	(소속)(주)하이포스알앤씨	
참 여 기 업	(주)하이포스알앤씨			(성명)나 자 현	
총연구개발비 (676,000천원)	계	676,000	총 연구 기간	2018. 04. 30 - 2020. 12. 31(2년 9월)	
	정부출연 연구개발비	507,000	총 참 연 구 원 수	총 인 원	45
	기업부담금	169,000		내부인원	42
	연구기관부담금			외부인원	3

○ 연구개발 목표 및 성과

목표: 곡류(식품) 저장 시설에서 친환경적이며 효과적인 저곡해충의 관리/방제를 위한 천연 방충성분의 방충효과를 검증하는 기술을 표준화하고 이를 이용하여 천연물에서 방충 유효성분을 분리, 규명, 방충 효과 극대화를 위한 최적 조합비 탐색을 통해 확보한 방충물질을 시제품의 실증화 적용·검증 후 방충물질 생산 시 비용 저감화를 위한 유기합성법 시안 마련

성과 : 방충효과검증 기술 표준화, 4종의 천연유래 방충 유효성분 규명, 방충 유효성분 DB 구축, 천연 식물 스크리닝, 유효성분 최적 추출, 유효 단일성분 분획 방법 개발, 단일 유효성분 및 조합에 대한 대상해충의 방충효과 검증, 방충 유효성분 최적 조합 물질 개발 및 방충 유효성분 유기합성 시안 도출, 최적 조합 방충물질 제조 및 현장 적용 방충소재 개발, 시제품의 현장적용, 검증을 통한 상용화

○ 연구내용 및 결과

공시층 대량사육 시스템을 구축하고 방충효과 검증기술을 표준화하고 최적의 유발 식물 스크리닝, 유효성분 최적 추출, 유효성분 분획법을 통해 19종의 한약재에서 4종의 방충 유효성분을 규명하고 다양한 유효성분 DB를 구축함. 규명된 유효성분 및 조합물에 대한 방충효과 검증을 통해 최적 조합방충물질을 제조하고 제조에 필요한 유효성분의 유기합성 시안, 최적 조합 물질 생산방안을 제시함. 제조된 최적 조합 방충물질을 이용하여 방충기능이 필요한 현장 적용 방충 소재를 개발하고 시제품의 현장적용, 방충효과 분석을 통한 상용화 가능성을 검증함.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

-방충성분, 물질, 방충기능 상품 개발 시 천연 방충성분의 탐색, 검증, 적용 관련한 연구용역 및 정부의 살생물질 관리 정책, PLS법, 모기 기피제 가이드라인 등 살충, 기피물질, 적용제품의 방충효과 검증 시험성적 및 사업화.

- 해충에 의한 직간접피해를 받는 산업체와 친환경 해충방제 수단 개발 농약회사, 해충방제 활동 수행 방역회사, 친환경 방충 유효성분 관련 제약, 시약업체 등 친환경 방충기능 성분, 물질, 상품이 필요한 산업체에 친환경 방충 물질 개발연구용역 및 친환경 방충물질 공급 사업화

- 방충기능 요구 건축물 적용 건축자재 생산기업, 건설사업, 식품기업, 포장재생산기업, 생활용품기업 등에 친환경 방충소재 개발, 적용 연구용역 및 방충소재 판매, 방충효과 검증 관련기술 사업화

- 스마트팜, 시설원예, 가축사육시설, 주거시설, 숙박시설, 음식제조 판매 시설, 대중시설, 체육시설, 공원 등 해충 관리가 필요한 장소에 사용할 수 있는 안전한 친환경 방충물질 관련 사업화

- 천연유래 방충성분 뿐만 아니라 천연유래 항균, 항진균, 항바이러스 성분의 탐색, 검증, 조합 물질 개발, 상용화 연구에 연구수행 체계 구성의 기초자료로 활용

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	118048-03		
사업구분	고부가가치식품기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	고부가가치식품기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	곡류 저장 안전성 향상을 위한 천연 유래 방출 유효 단일 성분 규명 및 대량 생산 방안 탐색			과제유형	응용
연구기관	㈜하이포스알앤씨			연구책임자	나자현
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2018. 04. 30 - 2018. 12. 31	132,000	44,000	176,000
	2차연도	2019. 01. 01.- 2019. 12. 31	187,500	62,500	250,000
	3차연도	2020. 01. 01.- 2020. 12. 31	187,500	62,500	250,000
	4차연도				
	5차연도				
	계	2018. 04. 30 - 2020. 12. 31	507,000	169,000	676,000
참여기업	㈜하이포스알앤씨				
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2020년 12월 31일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
㈜하이포스알앤씨	대표이사	나자현

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약



I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구는 천연식물에서 방충효과를 보이는 유효성분을 규명하는 것에만 국한되지 않고 이를 효과적으로 추출, 분획하는 방법과 해충의 생태, 행동학적 특성을 기반으로 접촉 독성 및 휘발성 기피력 측정 기구를 개발하여 방충효과를 검증 독창적인 방법을 표준화하였으며 천연유래 방충 유효성분 4종을 규명하고 단일성분으로 이루어진 살충제, 기피제의 단점인 저항성유발로 인한 방충효과 감소를 극복하고 방충효과가 극대화될 수 있도록 최적조합비로 배합한 방충물질 생산방안 기술 개발 및 생산 시 경제성 확보를 위한 유효성분 유기합성시안을 도출하여 천연유래 성분 최적조합 방충물질을 개발하였다. 또한 개발된 최적조합 방충물질을 이용하여 곡물저장, 식품생산현장에서 해충관리 비용, 노동력을 최소로 하면서 효과적인 해충관리가 가능한 적용소재를 개발, 검증하여 독창적인 상용화 방안을 도출한 점이 매우 우수하다고 판단된다.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구결과 규명된 천연유래 방충 유효성분 4종과 최적조합 물질은 일반 유기 화학적 방법으로 합성된 방충물질의 인축 안전성 우려, 저항성 발생으로 인한 효과감소의 단점으로 인해 사용이 제한되고 있는 다양한 방충기능이 요구되는 장소, 제품 등에 활용 가능할 것으로 판단되며 해충의 생태, 행동학적 특성을 기반으로 한 접촉 독성 및 휘발성 기피력 측정 기구를 이용한 방충효과 검증 방법은 방충성분 및 이를 이용한 제품 등의 연구개발, 평가, 시험성적, 인증 시 반드시 필요한 방충효과 검증을 정확성, 신뢰성 있게 규명할 수 있어 연구개발의 노력, 비용 절감 및 성공가능성 증가와 시험성적, 인증의 신뢰성을 높이는 파급효과를 가져 올 것으로 판단된다.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구의 성과물의 활용가능성은

1. 방충성분, 물질, 방충기능 상품 개발 시 천연 방충성분의 탐색, 검증, 적용 관련한 연구용역 및 정부의 살생물질 관리 정책, PLS법, 모기 기피제 가이드라인 등 살충, 기피물질, 적용제품의 방충효과 검증 시험성적 등에 활용
2. 해충관리가 필요한 정부기관 및 산업체, 연구기관, 농약회사, 방역회사, 제약, 시약회사 등 친환경 방충기능 성분, 물질, 상품이 필요한 산업체에서의 연구개발에 활용
3. 방충기능 요구 건축물 적용 건축자재 생산기업, 건설사업, 식품기업, 포장재생산기업, 생활용품기업 등에 친환경 방충소재 개발, 적용 연구에 활용
4. 스마트팜, 시설원예, 가축사육시설, 주거시설, 숙박시설, 음식제조 판매 시설, 대중시설, 체육시설, 공원 등 안전성 요구 해충관리가 필요한 장소에 활용
5. 천연유래 방충성분 뿐만 아니라 천연유래 향균, 향진균, 항바이러스 성분의 탐색, 검증, 조합 물질 개발, 상용화 연구에 연구수행 체계 구성의 기초자료로 활용

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구는 100여종 이상의 천연유래 방충성분이 함유된 식물체를 탐색하고 이 중 19종의 식물체를 대상으로 방충효과 스크리닝, 추출, 분획물에서의 방충효과 검증, 분획물의 2차 분획물에서의 방충효과 검증, 단일유효성분 및 조합물의 방충효과 검증, 최적조합물 및 유기합성 성분에 대한 방충효과검증, 방충소재 개발 및 상용화를 위한 연구 등 매우 넓은 범위의 연구를 연구기간 중 성실하게 수행하여 연구성과를 도출하였다. 특히 연구기간동안 50만 마리 이상의 공시충을 지속적으로 공급하기 위해 연중 지속적으로 대량사육 시스템을 유지하여 500만 마리 이상의 공시충을 사육하였으며 1만 번 이상의 방충효과 검증 실험을 수행하고 분석하는 연구를 성실하게 수행하였다고 판단된다.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구의 연구성과는 연구기간 중 연차별로 SCI 논문 4편과 학술발표 5편 특허출원 2편을 공개발표하였으며 석사급 인력 4명 양성, 기술이전 1건을 완료 하였으며 상용화를 위한 방충소재 시제품 제작하였다. 그러나 비 SCI 논문을 SCI 논문으로 작성하여 등재함으로 계획했던 비 SCI 논문 발표가 미흡하였으며 2차년도 연구기간 중 특허 출원한 접촉 독성 및 휘발성 기피력 측적용 기구의 특허 등록 까지 기간이 1년 6개월로 지연됨에 따라 특허등록 성과가 미흡하나 연구기간 종료 1년 후 까지는 특허등록을 완료 할 것이다. 또한 연구기간 중 방충 유효성분 최적조합 물질을 도료, 실란트에 적용하여 검증한 후 연구를 수행한 식품기업의 나머지 생산현장에 개발된 방충물질을 판매하여 방충 도료, 실란트를 시공할 계획이었으나 코로나-19로 생산현장 적용계획이 2021년으로 연기됨에 따라 매출성과가 미달성되었으나 2021년에 적용할 계획으로 연구 종료 1년 후 매출성과를 달성할 수 있을 것이다.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
대상해충(화랑곡나방, 거릿쌀도둑거저리)의 대량사육 시스템 구축을 통한 연령구조 체계 확립	10	100	연구기간 내 사용될 공시충의 대량사육시스템을 구축하여 연구기간 동안 50만 마리 이상의 공시충 공급함
대상해충에 대한 방충효과, 효율검증 기술 표준화	20	100	접촉 독성 및 기피효과 검증 기구를 개발하여 연구기간 사용하고 특허출원함
곡물 저장 안전성 확보를 위한 2차 대사물질 발현 식품공전 등재 식물소재 탐색/추출	10	100	식품공전 등재 식물(19종) 중 방충효과를 갖는 2차 대사물질을 탐색하여 4종의 유효 단일성분 Dillapiol, D-carvone(시라자), <i>Trans</i> -cinnamaldehyde(계피), <i>Trans</i> -anethole(팔각회향)을 확보함
추출물 내 방충 유효 단일 성분 분획을 위한 분획 방법 마련	10	100	방충효과 유발 식물 스크리닝 방법, 유효성분 최적 추출법(초음파 에탄올 추출법) 개발 및 유효 단일성분 분획(Hexane, Diethyl ether, Ethyl acetate, DW 용매분획법(Solvent-solvent partition)) 표준방법 개발함
방충 단일 유효성분 및 조합에 대한 대상해충의 방충효과 검증/방충성능 DB구축	20	100	단일 유효성분 및 조합에 대한 대상해충의 방충효과를 검증하고 방충 유효성분 DB를 구축함
식품 품질 유지기술로의 개발을 위한 분획된 방충 단일 유효성분 최적 조합비 탐색	10	100	단일 유효성분 및 조합에 대한 대상해충의 방충효과 검증을 통한 방충 단일 유효성분 최적 조합 물질을 개발함
방충 단일 유효 물질의 유기합성 시안 마련 및 시제품에 대한 방충효과 검증/방충성능 DB 구축	10	100	방충 단일 유효 물질의 유기합성 시안 도출 및 최적 조합 물질 생산방안 마련함
검증된 방충물질의 곡물저장 현장 적용 소재 탐색 및 식품 품질 유지관리 기술로의 적용가능성 분석	10	100	최적 조합 물질 방충물질을 이용한 현장 적용 방충 소재 개발(특허출원) 및 시제품의 현장적용, 방충효과 분석을 통한 상용화 가능성을 검증함
합계	100점	100	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구는 곡류(식품) 저장 시설에서 친환경적이며 효과적인 저곡해충의 관리/방제를 위한 천연 방충성분의 방충효과를 검증하는 기술을 표준화하고 이를 이용하여 천연물에서 방충 유효성분을 분리, 규명, 방충 효과 극대화를 위한 최적 조합비 탐색을 통해 확보한 방충물질을 시제품의 실증화 적용·검증 후 방충물질 생산 시 비용 저감화를 위한 유기합성법 시안 마련하는 것으로 계획했던 목표를 달성하였으나 연구 수행 중 본 연구의 성과를 사업화하기 위해서는 다음과 같은 추가 연구 및 사업화 진행 지원이 필요할 것으로 판단된다. 첫 번째로는 방충 유효성분 최적조합비를 규명하는 연구가 추가적으로 진행되어야 할 것으로 판단되며 방충유효성분의 유기합성시안을 적용한 대량생산 시설구축지원 및 생산 기술 향상 연구가 필요할 것으로 판단된다. 또한 방충 유효성분을 갖는 천연물의 지속적인 탐색과 저장해충 뿐만 아닌 모기, 바퀴, 파리 등 위생해충과 경작지 해충에 대한 방충 효과 검증 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다. 마지막으로 방충기능을 요구하는 다양한 상품적용, 개발 연구가 추가적으로 이루어져야 할 것으로 판단된다.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

비 SCI 논문은 연구기간 중 1편을 등재해야했으나 SCI 논문으로 작성하여 등재함으로 당초 계획했던 연구기간 중 SCI 논문 2편 등재를 초과하여 4편을 등재. 연구기간 중 특허출원 2편 특허 등록 1편을 당초 목표로 했으나 2차년도 연구기간 중 특허 출원한 접촉 독성 및 휘발성 기피력 측적용 기구의 특허 등록 까지 기간이 1년 6개월로 지연됨에 따라 특허등록 미달성. 연구기간 종료 1년 후까지는 특허등록이 가능. 특허출원 방충효능을 갖는 실란트에 관련한 특허를 본 과제의 주관 기관에서 사용하는 기술이전으로 진행되어 연구수행 기업사용 시 기술료 감면을 받고 일시납으로 인한 추가 감면을 받아 계획하였던 500만원이 아닌 331만 2,400원의 기술료를 납부하게 됨. 연구기간 중 방충 유효성분 최적조합 물질을 도료, 실란트에 적용하여 검증한 후 연구를 수행한 식품기업의 나머지 생산현장에 방충 도료, 실란트를 시공할 계획이었으나 코로나-19로 생산현장 적용계획이 2021년으로 연기됨에 따라 매출성과 미달성. 2021년에 적용할 계획으로 연구 종료 1년 후 매출성과 달성 가능.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구의 결과는 향후 1. 방충성분, 물질, 방충기능 상품 개발 시 천연 방충성분의 탐색, 검증, 적용 관련한 연구용역 및 정부의 살생물질 관리 정책, PLS법, 모기 기피제 가이드라인 등 살충, 기피물질, 적용제품의 방충효과 검증 시험성적 및 사업화. 2. 해충에 의한 직간접피해를 받는 산업체와 친환경 해충방제 수단 개발 농약회사, 해충방제 활동 수행 방역회사, 친환경 방충 유효성분 관련 제약, 시약업체 등 친환경 방충기능 성분, 물질, 상품이 필요한 산업체에 친환경 방충물질 개발연구용역 및 친환경 방충물질 공급 사업화. 3. 방충기능 요구 건축물 적용 건축자재 생산기업, 건설사업, 식품기업, 포장재생산기업, 생활용품기업 등에 친환경 방충소재 개발, 적용 연구용역 및 방충소재 판매, 방충효과 검증 관련기술 사업화. 4. 스마트팜, 시설원예, 가축사육시설, 주거시설, 숙박시설, 음식제조 판매 시설, 대중시설, 체육시설, 공원 등 해충관리가 필요한 장소에 사용할 수 있는 안전한 친환경 방충물질 관련 사업화. 5 천연유래 방충성분 뿐만 아니라 천연유래 항균, 항진균, 항바이러스 성분의 탐색, 검증, 조합 물질 개발, 상용화 연구에 연구수행 체계 구성의 기초자료로 활용할 계획이다.

IV. 보안성 검토

해당없음

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구기관 자체의 검토결과

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	곡류 저장 안전성 향상을 위한 천연 유래 방충 유효 단일 성분 규명 및 대량 생산 방안 탐색			
주관연구기관	(주)하이포스알앤씨	주관연구책임자	나 자 현	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	507,000천원	169,000천원		676,000천원
연구개발기간	2018. 04. 30 - 2020. 12. 31 (33개월)			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
대상해충(화랑곡나방, 거릿쌀도둑거저리)의 대량사육 시스템 구축을 통한 연령구조 체계 확립	연구기간 내 사용될 공시충의 대량사육시스템을 구축하여 연구기간 동안 50만 마리 이상의 공시충 공급함
대상해충에 대한 방충효과, 효율검증 기술 표준화	접촉 독성 및 기피효과 검증 기구를 개발하여 연구기간 사용하고 특허출원함
곡물 저장 안전성 확보를 위한 2차 대사물질 발현 식품공전 등재 식물소재 탐색/추출	식품공전 등재 식물(19종) 중 방충효과를 갖는 2차 대사물질을 탐색하여 4종의 유효 단일성분 Dillapiole, D-carvone(시라자), <i>Trans</i> - cinnamaldehyde(계피), <i>Trans</i> -anethole(팔각회향)을 확보함
추출물 내 방충 유효 단일 성분 분획을 위한 분획 방법 마련	방충효과 유발 식물 스크리닝 방법, 유효성분 최적 추출법(초음파 에탄올 추출법) 개발 및 유효 단일 성분 분획(용매분획법(Solvent-solvent partition)) 표준방법 개발함
방충 단일 유효성분 및 조합에 대한 대상해충의 방충효과 검증/방충성능 DB구축	단일 유효성분 및 조합에 대한 대상해충의 방충효과를 검증하고 방충 유효성분 DB를 구축함
식품 품질 유지기술로의 개발을 위한 분획된 방충 단일 유효성분 최적 조합비 탐색	단일 유효성분 및 조합에 대한 대상해충의 방충효과 검증을 통한 방충 단일 유효성분 최적 조합 물질을 개발함
방충 단일 유효 물질의 유기합성 시안 마련 및 시제품에 대한 방충효과 검증/방충성능 DB 구축	방충 단일 유효 물질의 유기합성 시안 도출 및 최적 조합 물질 생산방안 마련함
검증된 방충물질의 곡물저장 현장 적용 소재 탐색 및 식품 품질 유지관리 기술로의 적용가능성 분석	최적 조합 물질 방충물질을 이용한 현장 적용 방충소재 개발(특허출원) 및 시제품의 현장적용, 방충효과 분석을 통한 상용화 가능성을 검증함

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I							
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	25	15	0	0	5	0	10	0	0	0	0	0	25	10	0	10	0	0	0	
최종목표	2	1	0	1	5	1	10	0	0	0	0	2	1	2	5	0	2	0	0	0
연구기간내 달성실적	2	0	-	1	3.31	1	0	-	0	-	-	4	0	10	5	-	2	-	-	-
달성율(%)	100	0	-	100	66.2	100	0	-	0	-	-	200	0	500	100	-	100	-	-	-

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	공시층 대량사육 시스템 구축 및 방충효과, 효율검증 기술
②	단일 유효성분 및 조합에 대한 대상해충의 방충효과 검증을 통한 방충 단일 유효성분 최적 조합 물질 생산 기술
③	최적 조합 물질 방충물질 이용 현장 적용 방충 소재 개발, 검증 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장으로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술	v	v				v		v		v
②의 기술		v					v	v		v
③의 기술		v				v	v	v		v

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	국가기관, 연구기관, 산업체 등에서 방충성분, 물질, 상품개발 시 방충효과 시험성적 자료 제공 사업화 친환경 살충제, 기피제, 방충성능 제품 개발 시 객관적인 효과 검증기술을 제공함으로써 개발비용 절감, 소비자 신뢰성 및 안전성 확보
②의 기술	식품기업, 곡물/사료 관련기업, 유통/보관 관련기업, 농약회사, 방역회사 등 친환경 방충기능 상품, 성분, 물질이 필요한 산업체에 친환경 방충 물질 공급 사업화
③의 기술	건축자재 생산기업, 식품기업, 포장재생산기업, 생활용품기업 등 친환경 방충소재 개발, 판매 산업체 친환경 방충소재 판매 및 개발/검증 관련기술 사업화 친환경 방충소재를 활용한 다양한 상품개발, 시장확대, 관련 인원의 고용창출

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표	정책활용			홍보전시		
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명						
가중치	25	15	0	0	5	0	10	0	0	0	0	0	25	10	0	10	0	0	0	
최종목표	3	2	0	1	5	1	100	0	1	0	0	3	2	2	6	0	4	0	0	0
연구기간내 달성실적	2	0	0	1	3.31	1	0	0	0	0	0	4	0	10	5	-	2	0	0	0
연구종료후 성과창출 계획	1	2	0	0	0	0	100	0	1	0	0	1	1	1	1	0	2	0	0	0

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	방충 실란트 제조용 기피물질		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	3,312.4천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(과제 참여기업 기술사용)		
이전소요기간	즉시	실용화예상시기 ³⁾	2021년
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	자체실시로 제조설비 및 장비 구축 완료		

1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성

- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.