



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0123030
(43) 공개일자 2016년10월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 63/02 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01N 63/02 (2013.01)
C12N 1/20 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0053022
(22) 출원일자 2015년04월15일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
유용만
대전광역시 서구 청사로 70, 110동 502호 (월평동, 누리아파트)
윤영남
대전광역시 유성구 배울2로 61, 1008동 902호 (관평동, 대덕테크노밸리10단지아파트)
(74) 대리인
최규환

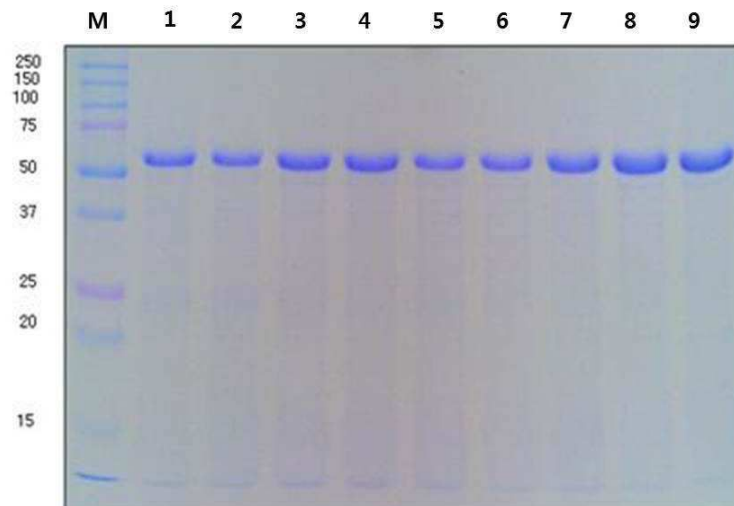
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB100 균주의 유효량에 탄닌산을 첨가하여 제조된 해충 방제용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB100 균주의 유효량에 탄닌산을 첨가하여 제조된 해충 방제용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 본 발명의 KB100 균주의 유효량에 탄닌산을 첨가하여 과밤나방 증장액의 프로테아제로 인한 KB100 균주의 프로톡신의 과분해를 억제함으로써 살충활성을 지속시킬 수 있다는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 해충 방제용 조성물은 과밤나방에 대해 강력한 살충효과를 보이며, 특히 종령기에 접어든 과밤나방에서 바실러스 투린지엔시스(*Bacillus thuringiensis*)의 감수성 저하 문제를 해결할 수 있다. 따라서, 본 발명은 친환경적인 대안으로서 작물에 미치는 영향을 최소화하고 작물에 발생하는 해충을 방제하는데 효과적이므로, 무공해성 해충 방제용 제재의 개발 등에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C12R 1/075 (2013.01)

(72) 발명자

서미자

대전광역시 유성구 배울2로 19, 908동 601호 (관평동, 대덕테크노밸리9단지아파트)

진나영

대전광역시 동구 중심1길 36, 102호 (판암동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ010029

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 국립농업과학원

연구사업명 현장실용화농업기술-친환경안전농산물생산기술-친환경 미생물농자재의현장적용기술개발 ;

지역맞춤형 미래농업인재양성사업단

연구과제명 곤충병원 세균을 이용한 나방류 방제기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2014.01.01 ~ 2016.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

해충에 대해 살충 활성을 갖는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주(KACC91456P)의 유효량에 탄닌산(Tannic acid)을 첨가하여 식물 또는 토양에 살포하는 단계를 포함하는 해충을 방제하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 해충은 나비목인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 해충은 파밤나방인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 탄닌산의 농도는 40mM인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

해충에 대해 살충 활성을 갖는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주(KACC91456P)의 유효량에 탄닌산을 첨가하는 단계를 포함하는 해충 방제용 조성물의 제조 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 해충은 나비목인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 해충은 파밤나방인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 탄닌산의 농도는 40mM인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 해충 방제용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB100 균주의 유효량에 탄닌산을 첨가하여 제조된 해충 방제용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는 해충에 대해 살충 활성을 갖는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB100 균주의 유효량에 탄닌산을 첨가하여 식물 또는 토양에 살포함으로써 해충을 방제하는 방법, 상기 균주의 유효량에 탄닌산을 첨가하는 단계를 포함하는 해충 방제용 조성물의 제조 방법 및 상기 제조 방법에 의해 제조된 해충 방제용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

종래에 사용되고 있는 유기화학적 합성 살충제는 살충효과의 면에서는 우수하나 인축에 유해성 및 환경오염 등의 문제로 인하여 각국에서 그 사용이 제한되고 있다. 특히 세계 농약의 20%를 생물농약으로 대체하자는 리우환경회의 협약 이후 세계적으로 화학농약 사용을 줄이려는 추세가 뚜렷해지고 있으며 화학농약의 사용을 규제하려

는 국제협약들이 강화되고 있다. 따라서, 화학적 합성농약을 대체할 수 있는 생물농약에 대한 관심은 증대되고 있으며 그 중 방제활성이 우수한 미생물을 개발하고 자원화하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0003] 생물농약의 일종인 바실러스 투린지엔시스(*Bacillus thuringiensis*, *Bt*, 비티)는 포자를 형성하는 동안 델타-내독소(δ -endotoxin)라 불리는, 내독소 결정형 단백질(insecticidal crystal proteins, ICPs)을 생산하는 그람 양성 세균이다. 100가지 이상의 *Bt* 크리스탈(ICPs)은 살충 특성 및 분자구조에 근거하여 크게 Cry I, II, III, IV, V의 5 종류로 분류된다. 이들은 나비목(Cry I), 나비목 및 파리목(Cry II), 딱정벌레목(Cry III), 파리목(Cry IV), 나비목 및 딱정벌레목(Cry V)에 대한 살충 활성이 있다. 이 중 나비목에 대한 *Bt* 내독소 결정형 단백질의 경우는 유충 발육단계 동안에 다양한 독성을 지닌다. 대부분의 나비목 해충에 높은 독성을 나타내는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키(*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*) Cry1Ac의 델타-내독소(δ -endotoxin)는 파밤나방에 대해서 초기 어린 유충을 제외하고는 높은 살충효과를 나타내지 않는다.

[0004] *Bt*가 생산하는 내독소 결정형 단백질(ICPs)은 분자량이 약 130 kDa이며 자체적으로는 살충 활성이 없으나, 상기 전독소 단백질을 곤충이 섭식하였을 때, 알칼리 상태인 곤충의 중장 내에서 단백질 소화효소에 의해서 약 55-70 kDa의 살충성을 나타내는 독소 단백질로 분해된다. 이러한 독소는 중장세포의 수용체에 결합하여 구멍을 뚫으므로써, 중장세포막의 이온교환의 불균형 및 영양분의 흡수가 이루어지지 않게 되며, 이에 따라 패혈증이 유발되어, 곤충은 섭식이 중단되고 결국은 사멸하게 된다.

[0005] 하지만 *Bt*에 내성이 강한 파밤나방의 경우의 내독소 결정형 단백질이 중장효소에 의해 과분해되어 살충성을 나타내는 독소단백질보다 더 작은 분자로 분해되어 결국 살충 활성이 약화된(Christeller *et al.*, 1992, Insect biochemistry and molecular biology 22:735-746). 이렇듯 단백질 분해효소가 *Bt* 독소의 살충력을 결정하는 중요한 요소이다. 따라서 이러한 소화효소의 강한 분해력을 억제시키는 단백질 분해효소 억제자 및 *Bt*를 함께 섭식시켜 독소 단백질이 과분해되지 않도록하여 살충성을 높이는데 초점을 두고 있다. 나비목 유충의 중장 내 소화효소는 세린계 단백질 분해효소(Serine proteases)가 높은 비율을 차지하며, 이는 단백질 가수분해 과정에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0006] 한편, 한국등록특허 제1130782호에는 바실러스 투린지엔시스 세로바 코르메리 KCTC 11451BP 균주의 배양액을 함유하는 나비목 유충에 대한 미생물 살충제에 대해 개시되어 있고, 한국등록특허 제0599414호에는 나비목 해충에 살충효과를 보이는 신규한 내독소 단백질유전자를 보유한 바실러스 투린지엔시스 케이-3 균주 및 이를 이용한 미생물 제제에 대해 개시되어 있다. 하지만 본 발명의 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB100 균주의 유효량에 탄닌산을 첨가하여 제조된 해충 방제용 조성물 및 이의 용도에 대해서는 알려진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 해충에 대해 살충 활성을 갖는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주의 유효량에 탄닌산(Tannin acid)을 첨가하여 식물 또는 토양에 살포함으로써 균주 단독으로 처리할 때보다 해충 방제 효과가 더 우수한 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 해충에 대해 살충 활성을 갖는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주의 유효량에 탄닌산(Tannic acid)을 첨가하여 식물 또는 토양에 살포함으로써 해충을 방제하는 방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주의 유효량에 탄닌산을 첨가하는 단계를 포함하는 해충 방제용 조성물의 제조 방법을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 해충 방제용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB100 균주의 유효량에 탄닌산을 첨가하여 제조된 해충 방제용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 KB100 균주의 유효량에 탄닌산을 첨가하여 파밤나방 중장액의 프로테아제로 인한 KB100 균주의 프로톡신의 과분해를 억제함으로써 살충활성을 지속시킬 수 있다는 것을 확

인하였다. 따라서, 본 발명의 해충 방제용 조성물은 과밤나방에 대해 강력한 살충효과를 보이며, 특히 종령기에 접어든 과밤나방에서 바실러스 투린지엔시스(*Bacillus thuringiensis*)의 감수성 저하 문제를 해결할 수 있다. 따라서, 본 발명은 친환경적인 대안으로서 작물에 미치는 영향을 최소화하고 작물에 발생하는 해충을 방제하는데 효과적이므로, 무공해성 해충 방제용 제제의 개발 등에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 과밤나방 중장액 및 특이적인 기질에 40mM의 탄닌산을 첨가하였을 때 각 기질에 대한 세린(serine), 트립신(trypsin), 키모트립신(chymotrypsin) 및 엘라스타아제(elastase)의 활성 억제정도를 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 과밤나방 중장액, 트립신(trypsin), 키모트립신(chymotrypsin) 및 40mM의 탄닌산(Tannic acid) 첨가에 따른 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주의 프로톡신(protoxin)의 분해 정도를 나타낸 SDS-PAGE 사진이다. A는 과밤나방 중장액, 트립신 및 키모트립신 처리에 따른 KB100 균주의 프로톡신의 분해 정도; M은 단백질 표준 분자량 마커; 레인 1은 KB100 균주의 프로톡신; 2는 중장액; 3은 트립신; 4는 키모트립신; B는 과밤나방 중장액, 트립신 및 탄닌산의 혼합 처리에 따른 KB100 균주의 프로톡신의 분해 정도; 레인 1은 KB100 균주의 프로톡신; 2는 트립신; 3은 트립신 및 탄닌산 혼합 처리이다.
- 도 3은 과밤나방 중장액을 처리한 후 시간경과에 따른 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주의 프로톡신(protoxin)의 분해 정도를 나타낸 SDS-PAGE 사진이다. M은 단백질 표준 분자량 마커; 레인 1은 1분; 2는 5분; 3은 10분; 4는 15분; 5는 30분; 6은 1시간; 7은 2시간; 8은 5시간; 9는 24시간이다.
- 도 4는 과밤나방 중장액 및 40mM의 탄닌산을 혼합처리한 후 시간경과에 따른 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주의 프로톡신(protoxin)의 분해 정도를 나타낸 SDS-PAGE 사진이다. M은 단백질 표준 분자량 마커; 레인 1은 1분; 2는 5분; 3은 10분; 4는 15분; 5는 30분; 6은 1시간; 7은 2시간; 8은 5시간; 9는 24시간이다.
- 도 5는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주에 트립신을 처리한 후 시간경과에 따른 KB100 균주의 프로톡신(protoxin)의 분해 정도를 나타낸 SDS-PAGE 사진이다. M은 단백질 표준 분자량 마커; 레인 1은 1분; 2는 5분; 3은 10분; 4는 15분; 5는 30분; 6은 1시간; 7은 2시간; 8은 5시간; 9는 24시간이다.
- 도 6은 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주에 트립신 및 40mM의 탄닌산을 혼합처리한 후 시간경과에 따른 KB100 균주의 프로톡신(protoxin)의 분해 정도를 나타낸 SDS-PAGE 사진이다. M은 단백질 표준 분자량 마커; 레인 1은 1분; 2는 5분; 3은 10분; 4는 15분; 5는 30분; 6은 1시간; 7은 2시간; 8은 5시간; 9는 24시간이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에서는 해충에 대해 살충 활성을 갖는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주(KACC91456P)의 유효량에 탄닌산(Tannic acid)을 첨가하여 식물 또는 토양에 살포함으로써 해충을 방제하는 방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주는 농업생명공학연구원에 2009년 03월 09일자로 기탁하였다(기탁번호 KACC91456P).
- [0015] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 해충을 살충할 수 있는 방법으로, 해충에 대해 살충 활성을 갖는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주의 유효량에 40mM의 탄닌산을 첨가하여 살포할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0016] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 해충은 나비목일 수 있고, 바람직하게는 과밤나방, 배추좀나방, 작은가시들명나방, 벼애나방 또는 흑명나방일 수 있으며, 더 바람직하게는 과밤나방일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0017] 또한, 본 발명에서는 해충에 대해 살충 활성을 갖는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주(KACC91456P)에 탄닌산을 첨가하는 단계를 포함하는 해충 방제용 조성물의 제조 방법을 제공한다.

- [0018] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 해충은 나비목일 수 있고, 바람직하게는 파밤나방, 배추좀나방, 작은가시들명나방, 벼애나방 또는 흑명나방일 수 있으며, 더 바람직하게는 파밤나방일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 탄닌산의 농도는 40mM일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 또한, 본 발명에서는 상기 방법에 의해 제조된 해충 방제용 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 해충 방제용 조성물은 유효성분으로서 본 발명의 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주(KACC91456P)와 탄닌산을 포함하며, 상기 KB100 균주에 탄닌산을 첨가시킴으로써 해충을 방제할 수 있는 것이다. 바람직하게는 상기 KB100 균주에 40mM의 탄닌산을 첨가시켜 해충을 방제할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 이하, 본 발명의 설명에 사용되어지는 용어의 정의는 다음과 같다.
- [0023] "살충성"은 식물 해충의 사망률을 증가시키거나 성장률을 저해하는 물질의 능력을 의미한다.
- [0024] "유효량"은 유익한 또는 원하는 결과를 일으키기에 충분한 양이다. 유효량은 1회 이상으로 투여될 수 있다.
- [0025] "조성물"은 비활성(예를 들어, 검출가능 약품 또는 표지 또는 액체 담체) 또는 활성(예를 들어, 보조제)인, 담체 또는 조성물과 같이 활성제 및 또 다른 화합물의 조합을 의미하도록 의도된다.
- [0026] 본 발명의 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) 균주 KB100은 대한민국 보은군 무밭에서 채집한 토양에서 분리하여 얻은 것으로, 내독소 단백질 유전자를 함유하고 있어, 생장조건이 악화될 경우 이 유전자로부터 내독소 단백질을 생산한다. 이렇게 생산된 내독소 단백질은 이중 피라미드 형태의 결정체를 형성하며, 파밤나방에 대해 우수한 살충 효과를 나타낸다. KB100 균주를 적절한 배지, 예를 들어 GYS 배지(0.1% 글루코스, 0.2% 효모추출물, 0.05% 인산제일칼륨, 0.2% 황산암모늄, 0.002% 황산마그네슘, 0.005% 황산망간, 0.008% 염화칼슘)에서 28 내지 30℃, 바람직하게는 30℃에서 산소분압 30 내지 70%, 바람직하게는 60%하에 160 내지 200rpm으로 3 내지 5일 동안 배양한 후, 이 배양액을 원심분리하여 균체를 수확하고, 이 균체 10 내지 40 중량%, 바람직하게는 20 중량%를 해충 살충제에 통상적으로 사용되는 첨가제 60 내지 90 중량%, 바람직하게는 80 중량%와 혼합하여 해충 살충제를 제조할 수 있으며, 이때 첨가제로는 NT-NX250L, NK-EPB100 등의 계면활성제, 화이트카본, 텍소텍스-25 등의 보조제, 카올린 등의 중량제 등을 사용할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 살충용 조성물을 적용할 수 있는 식물은 특별히 제한되지는 않으며, 배추, 양배추, 오이, 무, 들깨, 고추, 결구상추(양상추), 딸기, 토마토, 파, 담배, 등의 경제작물 이외에도 화훼 또는 특용작물 등의 식물 표면이나 이들 식물이 성장하고 있는 토양에 처리될 수 있으며 또는 재배하여 수송 또는 저장 중인 채소 표면에도 처리될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB100 균주를 함유하는 해충 방제용 조성물, 더욱 바람직하게는 파밤나방 방제에 유용한 조성물은 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB100 균주의 배양액 또는 건조 분말 5 내지 90 중량%에 계면활성제, 무기염류, 보조제, 결합제 및 중량제 등을 혼합하여 해충 방제용 조성물로 제조할 수 있다.
- [0029] 상기 무기염류는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB100 내독소 단백질과 함께 해충의 중장에 들어가서 독소 단백질이 빠르게 활성독소의 형태로 전환되는 것을 도와주거나 중장벽에 물리적인 상처를 주어 독소의 활성을 증진시킬 뿐만 아니라 해충의 체내에서 생리적인 변화를 유도하여 독소의 작용효과를 높일 수 있도록 작용하는 물질로서 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 구입하여 사용할 수 있는 것이다.
- [0030] 상기 계면활성제는 분자 중에 친수성 분자단과 친유성 분자단을 동시에 갖는 양친매성 물질로서, 세정력, 분산력, 유화력, 가용화력, 습윤력, 살균력, 기포력 및 침투력이 우수하다는 특징을 갖는 것으로 이해되는 물질로서, 본 발명에 따른 해충 방제용 조성물 중의 바실러스 투린지엔시스가 효과적으로 약효를 발현하도록 수화, 현탁, 분산시키는 작용을 하는 것으로 이해될 수 있다.
- [0031] 상기 계면활성제로는 알킬벤젠설포네이트, 알킬나프탈렌설포네이트, 디알킬설포석시네이트, 리그닌설포네이트, 알킬나프탈렌설포네이트포르마린축합물, 폴리옥시알킬렌알킬페닐설포네이트와 같은 설포네이트의 나트륨염 또는 칼슘염, 알킬설페이트, 폴리옥시알킬렌알킬설페이트, 폴리옥시알킬렌알킬페닐설페이트와 같은 설페이트의 나트륨염 또는 칼슘염, 나프탈렌설포석시네이트, 폴리옥시알킬렌석시네이트와 같은 석시네이트의 나트륨염 또는 칼

습염 등의 음이온성 계면활성제, 에톡실화 알킬에테르, 폴리옥시알킬렌알킬페닐폴리머, 다중 알코올과 같은 비이온성 계면활성제가 단독으로 또는 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있으며, 이들은 모두 예시적으로 열거한 것들로서 이들 이외의 계면활성제가 사용될 수 있음은 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 용이하게 이해될 수 있을 것이다.

[0032] 상기 증량제는 상기 계면활성제와 함께 사용되어 상기 계면활성제를 흡착, 분상화하고, 이 계면활성제, 약효 증진제, 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB100 균주의 배양액 또는 건조분말과 함께 비티제 조성물의 미립자 표면을 이루는 물질로 작용하며, 전분, 대두박, 밀기울, 입상 섬유질, 유안, 규조토, 제올라이트, 벤토나이트, 탈크, 카올린, 파이로필라이트, 화이트카본 등이 단독 또는 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0033] 상기 결합제는 상기 활성성분인 바실러스 투린지엔시스 균주의 건조분말을 포함하여 약효 증진제, 증량제 등으로서 결합시키는 역할을 하는 것으로서, 수용성 전분, 텍스트린, 카르복시메틸셀룰로오스, 폴리아크릴산나트륨, 폴리비닐알코올, 아라비아검 또는 잔탄검 등이 단독 또는 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0034] 방제 대상인 해충은 레피도프테라(Lepidoptera)이다. 특히 바람직한 양태에서, 해충은 양배추거세미나방[cabbage looper, 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*)], 벨벳빈 카테르필라[velvetbean caterpillar, 안티카르시아 겐마탈리스(*Anticarsia gemmatilis*)], 배추좀나방[diamondback moth, 플루텔라 크실로스텔라(*Plutella xylostella*)], 담배나방[tobacco budworm, 헬리오티스 비레센스(*Heliothis virescens*)], 파밤나방(*Spodoptera exigua*), 흰불나방(*Hyphantria cunea*), 누에(*Bombyx mori*), 담배거세미나방(*Spodoptera litura*), 작은각시들명나방(*Palpita indica*), 벼애나방(*Naranga aenescens*), 흑명나방(*Cnaphalocrocis medinalis*) 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 상기 해충 살충제는 입제, 분제, 액상수화제, 수화제 등의 형태로 제형화 될 수 있는데 이에 한정되지는 않으며, 수화제가 바람직하다.

[0036] 제형화된 살충제는 사용전에 물에 500 내지 2,000배, 바람직하게는 약 1,000배로 희석하여 사용할 수 있다.

[0037] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0038] 재료 및 방법

[0039] 1. 실험곤충

[0040] 본 발명에 사용된 파밤나방(*Spodoptera exigua*)은 안동대학교 곤충 생리학 교실에서 분양받아 충남대학교 생물적 해충제어 실험실에서 인공사료로 누대 사육하면서 실험에 사용하였다. 사육 조건은 온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 및 광조건 16L:8D이며, 성충의 먹이로는 10% 설탕물을 공급하였다.

[0041] 2. 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB100(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB100) 균주

[0042] 국내 토양으로부터 분리한 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*) 중에 탄닌산(Tannic acid)을 첨가하였을 때 살충 상승효과를 나타낸 KB100 균주를 선발하여 실험을 수행하였다. 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*) 균주의 동정은 일본 규슈대학 농학부 M. obha 박사(Institute of Biological Control, Faculty of Agriculture, Kyusu University, Fukuoka, Japan)에 H 혈청형(H serotype)을 의뢰한 결과, 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*)로 동정되었다.

[0043] 3. 파밤나방 중장액

[0044] 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*) 독소 단백질의 분해 활성을 분석하기 위하여 준비한 중장액은 파밤나방의 5령 유충을 -4°C 에 10초간 둔 후, 멸균된 해부용 칼을 이용하여 해부한 후 중장을 떼어내어 얼음에 원심튜브에 넣고 13,000rpm 및 15분간 원심분리하였다. 연한 갈색을 띠는 상층액만 에펜들르프 튜브에 넣어 -20°C 에 보

관하면서 사용하였다.

4. 측포자 소체 결정(Parasporal crystal), 탄닌산(Tannic acid), 트립신(Trypsin) 및 키모트립신(Chymotrypsin)

측포자 소체 결정(Parasporal crystal)은 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*) 균주를 NA배지에 접종하고 27℃에서 5일 동안 배양하여 위상차 현미경으로 자가분해(autolysis)가 일어나는 것을 확인한 후, PBS 버퍼를 사용하여 원심튜브에 15,000rpm으로 4℃에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후, 상층액은 버리고 워싱 버퍼 1(500mM NaCl, 2% Triton X-100)로 3번, 워싱 버퍼2(500mM NaCl)로 2번 세척하였다. 세척된 부아포봉입체(parasporal inclusion)는 멸균수를 첨가한 후 사용될 때까지 -20℃에서 보관하였다.

그 다음으로, 탄닌산(Tannic acid, Sigma사)은 증류수를 이용하여 4단계의 농도(0.4, 4, 40, 및 80mM)로 희석한 후 사용하였고, 단백질분해효소 저해제로서의 탄닌산(Tannic acid)의 역할을 확인할 프로테아제(proteases)로 1mg/ml의 트립신(trypsin, Sigma사) 및 키모트립신(chymotrypsin, Sigma사)을 사용하였다.

5. SDS-PAGE 분석

바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*)의 부아포봉입체(parasporal inclusion)는 50mM 수산화나트륨(NaOH, pH 12.5)에 용해시킨 후, 부아포봉입체(parasporal inclusion)와 파밤나방 증장액을 7:2 비율로 혼합하여 37℃에서 15분간 반응시켜 사용하였다. 시간대별로 저해현상을 관찰하기 위해 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*)의 부아포봉입체(parasporal inclusion) 7μl와 파밤나방 증장액 2μl를 첨가하여 37℃에서 15분간 반응시킨 후 40mM의 탄닌산(tannic acid) 2μl를 첨가한 후 시간대별(1분, 5분, 10분, 15분, 30분, 1시간, 2시간, 5시간 및 24시간)로 37℃에서 배양하여 실험에 사용하였다. 부아포봉입체(parasporal inclusion)는 트립신(trypsin) 및 키모트립신(chymotrypsin)을 각각 0.1mg/ml의 농도로 10μl와 1μl로 처리한 후, 37℃에서 30분간 반응시켰고, 부아포봉입체(parasporal inclusion), 트립신(trypsin) 및 40mM의 탄닌산(tannic acid)은 각각 10μl, 1μl 및 1μl로 처리하였다. SDS-PAGE는 12% 세퍼레이팅 겔(separating gel)과 5% 스택킹 겔(stack gel)로 수행하였다. 전기영동이 끝난 겔(gel)은 0.5% 쿠마시 브릴리언트 블루(Coomassie brilliant blue)로 염색하였다.

6. 파밤나방의 증장액에 대한 프로테아제(protease) 활성 측정

파밤나방의 증장액에 대한 프로테아제(protease) 활성을 측정하기 위해 브래드퍼드의 방법을 일부 변형하여 실험하였다. 각각의 소화효소 활성을 측정하기 위해 트립신 프로테아제(trypsin protease) 기질로 BApNA(N-Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride) 및 BPVApNA(N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-p-nitroanilide hydrochlorid)를 사용하여 분석하였고, 키모트립신 프로테아제(chymotrypsin protease)의 기질로 BTPNA(N-Benzoyl-L-tyrosine p-nitroanilide) 및 SAAPPpNA(N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide), AAVApNA(Ala-Ala-Val-Ala p-nitroanilide)를 사용하여 분석하였으며, 엘라스타아제 프로테아제(elastase protease) 기질로 SAAApNA(N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide) 및 SAAPLPNA(N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Leu p-nitroanilide)를 사용하여 분석하였다. 파밤나방의 증장액에 대한 탄닌산(Tannic acid)의 억제활성을 확인하기 위해 농도별(10, 20, 40 및 80mM)로 기질인 아조카제인(azocasein)을 사용하여 분석하였다. 증류수로 희석한 파밤나방의 증장액과 탄닌산(Tannic acid)을 1:1의 비율로 혼합한 후 37℃에서 15분간 반응시켰다. 분해된 샘플 100μl에 각각의 기질을 300μl 혼합한 후 37℃에서 15분간 반응시킨 후, 10% TCA를 200μl 첨가하여 반응을 중지시켰다. 샘플을 15,000rpm 및 4℃에서 30분 동안 원심분리한 후 단백질을 응집시키기 위해 상층액에 1M 수산화나트륨(NaOH)과 1:1이 되도록 혼합한 후 흡광도 405nm로 단백질 농도를 측정하였다.

실시에 1. 파밤나방의 증장액에서 과분해되어 살충효과가 떨어지는 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*) KB100 균주의 프로톡신(protoxin)

일반적으로 작물에 발생하는 파밤나방의 알은 난괴 상태로 붙어있어서 생물학적 방제가 어려우며, 유충은 깨어나서 모여 살다가 3령이 넘어서면 분산되기 시작하여 숨기 때문에 관리하기 어려운 조건이 된다. 특히, 성충은

인근 지역으로부터 계속 날아들어 알을 낳아 생활환이 이어지는 이 해충의 생리생태학적 특성 때문에 농장현장에서의 방제는 매우 어려운 해충의 하나이다. 유기농작물에 발생하는 과밤나방의 생물학적 방제에 가장 많이 사용되는 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*)의 경우 균주에 따라서 생물활성의 차이가 심하게 나타난다. 이때, 방제효과를 높이기 위하여 과밤나방의 중장에서 프로톡신(protoxin)과 중장액의 소화효소의 관계에서 일어날 수 있는 작용기작에 대하여 검토하였다. 과밤나방 중장액에 대한 프로테아제 저해제(protease inhibitor)로서 선발한 중장액 소화효소를 저해하는 활성이 가장 높은 5종류의 탄닌산(tannic acid), PMSF(phenylmethanesulfonyl fluoride), EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid), TLCK(N- α -p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone-HCl) 및 SBTI(Soybean trypsin inhibitor)를 조사하였다. 과밤나방 중장액에 대한 5종의 프로테아제 저해제의 활성을 분석한 결과, 탄닌산(tannic acid)이 과밤나방 중장액의 프로테아제 활성을 일정하게 억제하는 것으로 나타났다. 본 실시예 1에서 선발한 탄닌산(tannic acid)과 중장에 있는 프로테아제와의 최적 활성반응조건을 찾기 위하여 탄닌산을 농도별로 측정하였다(표 1).

[0055] 그 결과, 표 1에 개시된 바와 같이 10, 20, 40 및 80mM의 탄닌산(tannic acid) 농도가 높아질수록 과밤나방 중장의 프로테아제 활성은 약 83.1%, 77.6%, 68.0% 및 40.1%로 억제되는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 탄닌산(tannic acid)의 농도가 어느 정도 일정하게 높아질수록 과밤나방 중장 프로테아제 활성을 효과적으로 억제하는 것을 예상할 수 있었다.

[0056] 과밤나방의 중장에 있는 프로테아제는 세린(serine) 계열의 단백질 분해 효소로 트립신(trypsin), 키모트립신(chymotrypsin) 및 엘라스타아제(elastase) 등으로 이루어져 있다. 이러한 곤충의 소화효소의 특성을 밝히기 위해 기질의 높은 특이성을 이용하는 것은 유용하다고 알려져 있다. 따라서, 본 실시예 1에서는 과밤나방 중장에 있는 프로테아제에 특이적인 기질을 반응시킨 후 단백질 분해효소의 활성을 측정하였다. 그 결과, 대조구로서 세린(serine) 계열의 기질인 아조카제인(azocasein)을 사용하여 단백질 분해효소 활성을 측정한 경우 100%의 활성을 나타내었다. 표 2에서 트립신(Trypsin)에 대한 특이적인 기질을 이용하여 측정하였을 때 약 90% 이상의 높은 활성을 나타낸 반면, 키모트립신(chymotrypsin)의 경우 약 55% 정도의 활성으로 트립신보다 약 35% 정도 더 낮았다. 엘라스타아제(Elastase)에 대한 활성은 약 44%로 세 종류의 단백질 분해효소 중 가장 낮은 활성을 나타내었다. 이 결과로 과밤나방 중장 프로테아제 중 트립신이 가장 높은 활성을 나타냈음을 예상할 수 있었다. 따라서 과밤나방의 중장액에서 프로테아제의 활성을 억제하였던 탄닌산(tannic acid)과의 반응을 시도하였다. 프로테아제 활성억제제로 선발된 탄닌산을 4개의 농도(10, 20, 40 및 80mM)로 제조하여 과밤나방 중장액과 혼합처리한 후 기질 반응에 의한 단백질분해 효소 활성의 억제 정도를 측정하였다. 그 결과, 중장액과 트립신 기질인 BApNA 및 BPVApNA를 반응시켰을 때는 각각 91.4 ± 1.8 , 89.4 ± 0.7 의 활성도를 나타냈으나 40mM의 탄닌산과 함께 반응을 했을 때에는 각각 62.2 ± 0.3 및 54.5 ± 1.1 으로 현저한 억제활성 차이를 나타내었다(표 3). 따라서, 과밤나방의 중장액에서 40mM의 탄닌산의 첨가는 프로톡신(protoxin)의 과분해를 억제하였다. 탄닌산의 억제효과가 나타나는 과밤나방 중장액에 포함되어있는 세린 계열의 단백질 분해 효소 중에서 트립신이 가장 높은 활성을 나타냈으나 다른 3종류의 효소는 별다른 차이를 보이지 않았다(도 1). 결과적으로, 과밤나방 중장액에서 기질에 대한 활성은 40mM의 탄닌산을 처리했을 때 약 30~40%의 과밤나방 중장액 프로테아제 활성을 억제하는 것을 확인하였다. 따라서, 탄닌산은 세린 계열의 프로테아제 중에서 트립신의 활성을 효과적으로 억제하는 것으로 조사되었다.

표 1

[0057] 탄닌산 처리에 따른 과밤나방 중장액의 프로테아제 활성 측정

프로테아제 저해제	탄닌산 농도 (mM)	프로테아제 활성 (% control)
탄닌산	10	83.1 ± 2.1
	20	77.6 ± 1.6
	40	68.0 ± 0.4
	80	40.1 ± 2.2

표 2

[0058]

단백질분해 효소의 기질에 대한 파밤나방 중장액의 프로테아제 활성 측정

기질	중장 프로테아제 활성 (% control)	프로테아제
아조카제인(Azocasein)	100±0	세린
BAPNA (N-Benzoyl-DL-arginine4-nitroanilidehydrochloride)	91.4±1.8	트립신
BPVAPNA (N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-p-nitroanilidehydrochlorid)	89.4±0.7	
BTpNA (N-Benzoyl-L-tyrosine p-nitroanilide)	55.4±0.6	키모트립신
SAAPPpNA (N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide)	56.5±3.9	
AAVApNA (Ala-Ala-Val-Ala p-nitroanilide)	52.7±1.5	
SAAApNA (N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide)	48.5±1.6	엘라스타아제
SAAPLpNA (N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Leu p-nitroanilide)	38.7±4.9	

표 3

[0059]

파밤나방 중장액 및 탄닌산의 혼합처리에 따른 기질 반응에 의한 단백질분해 효소의 억제활성 측정

프로테아제 저해제	농도 (mM)	아조카제인	BAPNA	BPVAPNA	BTpNA	SAAPPpNA	SAAApNA
		세린	트립신		키모트립신		엘라스타아제
탄닌산	10	100	86.9±1.2	87.1±.07	88.9±1.2	62.3±1.9	42.5±0.7
	20	100	83.5±0.7	81.2±1.3	86.2±2.5	51.2±2.3	44.2±2.7
	40	100	62.2±0.3	54.5±1.1	61±1.5	51.4±2.5	46.1±1.0
	80	100	61.4±2.1	63.3±0.5	57.3±2.1	46.8±1.2	42.5±0.7

[0060]

실시예 2. 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*) KB100 균주의 프로톡신(protoxin)과 탄닌산(tannic acid)의 혼합 처리시 중장액 프로테아제, 트립신 및 키모트립신의 활성 저해효과

[0061]

일반적으로 나비목 해충에 활성을 나타내는 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*)의 프로톡신(protoxin)은 약 130kDa으로 구성되어 있고 곤충 중장 프로테아제에 의해 60~70kDa의 활성 독성 단백질과 작은 부분의 단백질로 소화된다. 따라서 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*) KB100 균주의 130kDa의 프로톡신(protoxin) 및 일부 소화된 70kDa의 주요 단백질 분자량을 나타내었다(도 2A의 라인 1). 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*) KB100 균주의 프로톡신은 중장 프로테아제 및 트립신으로 활성화시켰을 때 시간적 차이만 보일 뿐 60~70kDa으로 분해되었다. 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*) KB100 균주의 프로톡신이 중장액, 트립신(0.1mg/ml) 및 키모트립신(0.1mg/ml)에 의해 분해되어 활성화되는 것을 비교하였다(도 2A). 중장액에 의해 분해된 프로톡신은 65kDa보다 더 낮은 패턴을 나타내었다(도 2A의 라인 2). 트립신 및 키모트립신에 의한 분해 비율은 중장액보다 미비하였다. 프로톡신이 트립신으로 분해되었을 때, 약 60 및 70kDa의 단백질 밴드 패턴을 나타냈고, 키모트립신은 약 60kDa~90kDa의 몇 가지 단백질 밴드 패턴으로 나타내었다(도 2A 라인의 3 및 4). 상기 실시예 1의 결과를 토대로 트립신이 프로톡신을 분해할 때 함께 처리된 탄닌산이 트립신의 분해활성을 저해하는 지 확인하기 위해 트립신에 40mM의 탄닌산을 혼합한 후 배양하여 분해 패턴을 확인하였다(도 2B). 그 결과, 트립신으로 프로톡신을 분해했을 때보다 40mM 탄닌산을 함께 처리했을 때 트립신의 활성을 억제하는 것을 확인하였다(도 2B 라인의 2 및 3). 이를 통해 트립신에 40mM의 탄닌산을 혼합처리할 때 프로톡신이 분해되는 것을 억제했을 것이라는 예측을 할 수 있었다.

[0062]

실시예 3. 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*) KB100 균주에서 생산된 프로톡신을 과분해하는 트립신의

활성을 억제하는 탄닌산의 효과

[0063] 소화효소의 종류에 따른 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*) KB100 균주의 프로톡신의 분해정도를 비교하기 위하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*) KB100 균주의 프로톡신을 파밤나방 중장액으로 분해시킨 다음 1분, 5분, 10분, 15분, 30분, 1시간, 2시간, 5시간 및 24시간이 경과한 후에 단백질 패턴을 확인하였다. 단백질이 SDS-PAGE상에 나타나는 현상은 처리 초기부터 5시간 처리한 것까지는 60kDa의 단백질이 보이다가 점점 없어지기 시작하여 24시간 소화된 것은 밴드가 거의 보이지 않았다(도 3의 라인 1-9). 따라서 파밤나방에 높은 활성을 나타내는 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*)라 하여도 해충이 섭식하며 중장 프로테아제의 조건에 의하여 독성이 거의 나타나지 않을 수 있다는 것을 예측할 수 있다.

[0064] 따라서 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*) KB100 균주의 프로톡신을 중장액으로 분해시키면서 탄닌산을 처리하여 시간 경과에 따른 일어나는 변화를 확인하기 위하여 SDS-PAGE로 분석하였다(도 4). 파밤나방의 살충활성 검정에서 가장 높은 상승효과를 나타낸 중장액 + 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*) KB100 + 40mM 탄닌산을 조합한 시료에서는 60kDa의 살충활성 밴드가 없어지지 않고 계속해서 지속됨을 확인하였다(도 4의 라인 1-9).

[0065] 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*) KB100 균주에 트립신을 처리한 후 시간이 지남에 따라 KB100 균주는 점점 분해가 되기 시작하여 24시간이 지나자 60kDa의 살충활성밴드는 희미하게 나타났다(도 5). 반면에 트립신으로 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*) KB100 균주를 활성화시키면서 탄닌산을 첨가하여 시간대별로 관찰한 결과, 24시간까지도 살충활성 밴드가 계속해서 일정하게 유지되는 것으로 나타났다(도 6). 트립신이 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*) KB100 균주의 프로톡신을 분해하는 과정에서 탄닌산이 상기 과정을 억제하는 것으로 SDS-PAGE분석에서 나타났다. 따라서, 탄닌산이 첨가됨에 따라 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*) KB100 균주의 프로톡신 분해속도는 현저히 줄어들었고 살충활성이 지속되는 것으로 나타났다.

[0066] **실시예 4. 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*) KB100(1.02×10^5 cfu/ml) 및 탄닌산(40mM)의 혼합처리를 통한 야외 포장실험**

[0067] 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*) KB100 균주는 1.02×10^8 cfu/ml 농도가 되도록 1000배로 희석하여 사용하였으며 탄닌산(Sigma사)과 혼합처리하였다. 따라서, 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*) KB100 균주 (1.02×10^8 cfu/ml) 및 탄닌산(40mM) 혼합 시 물 1ℓ에 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*) KB100 (1ml/L) 및 40mM의 탄닌산(20.4g/L)을 첨가하여 살포하였다. 방법은 파밤나방 유충 령기가 혼재되어 있는 파 포장에서 완전임의배치법으로 시험구를 설정하였으며 약제처리 전 처리구마다 랜덤으로 45포기를 선택하여 구멍 있는 잎을 피해주로 판정하고 피해주수와 파밤나방 유충수를 조사하였다. 그리고 바실러스 투린지엔시스(*B. thuringiensis*) KB100 (1.02×10^5 cfu/ml) 희석액에 40mM의 탄닌산을 첨가하여 1ℓ를 제조하여 파에 골고루 살포하였으며 약제처리는 1주일 간격으로 3번 하였고 1주일 단위로 사충율 및 피해 감소율을 조사하였다. 그 결과, 수정사충율(corrected mortality)은 표 4에 개시된 바와 같이 40mM의 탄닌산을 첨가하여 83.9%, 89.4% 및 66.8%로서 대조구보다 9 내지 30% 정도의 높은 사충율을 나타내었다.

[0068] 수정사충율(corrected mortality, %)=(X-Y)/(100-Y)×100

[0069] (X = Percentage mortality of treated group, Y = Percentage mortality of untreated group)

표 4

[0070] 파 포장실험에서 바실러스 투린지엔시스 KB100 단독처리와 탄닌산을 혼합 처리하였을 때, 파밤나방 유충의 사충율 비교 결과

처리	농도		처리 후 수정사충율*(%)		
	바실러스 투린지엔시스 (cfu/ml)	탄닌산 (mM)	1주	2주	3주
KB100 균주액	1.02×10^5	0	61.8 ± 9.9^b	80.4 ± 4.9^b	47.3 ± 6.8^b
KB100 균주액+탄닌산	1.02×10^5	40	83.9 ± 3.5^a	89.4 ± 2.5^a	66.8 ± 7.0^a

[0071] * 값은 평균±표준편차를 나타낸다.

수탁번호

[0072]

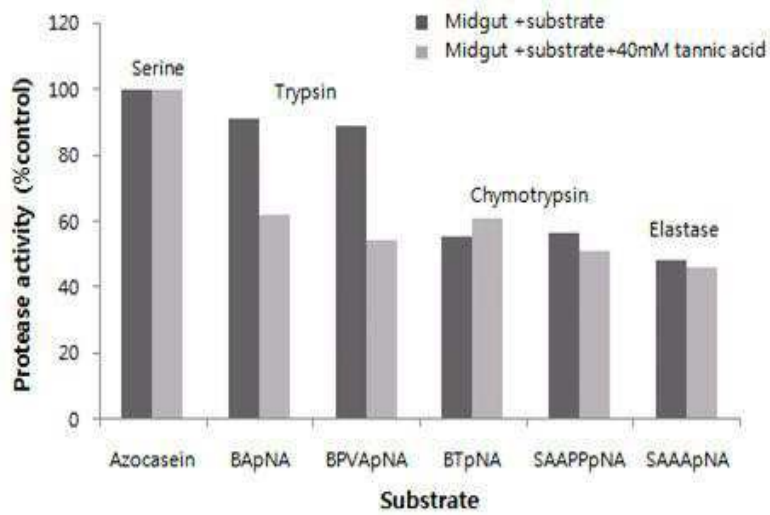
기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC91456P

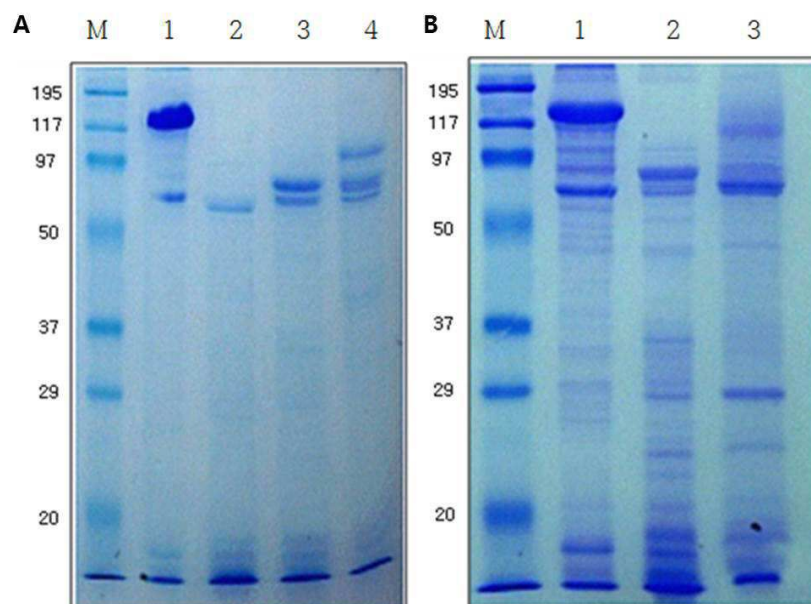
수탁일자 : 20090309

도면

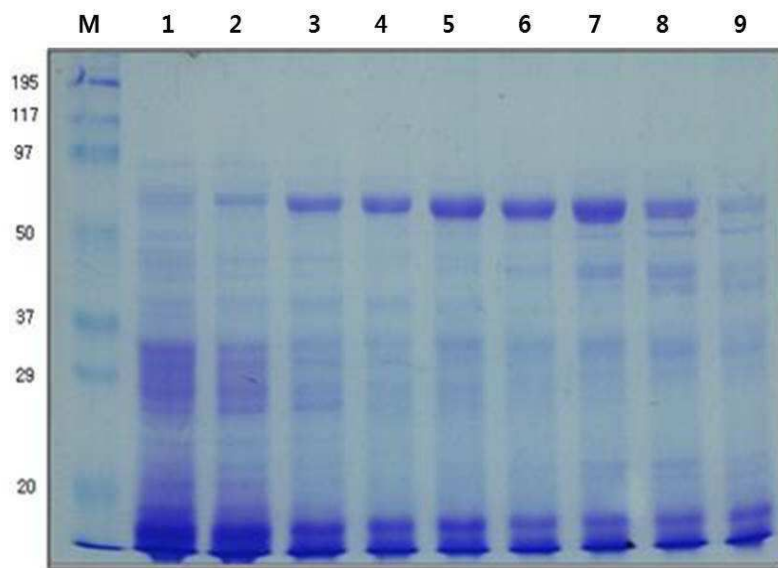
도면1



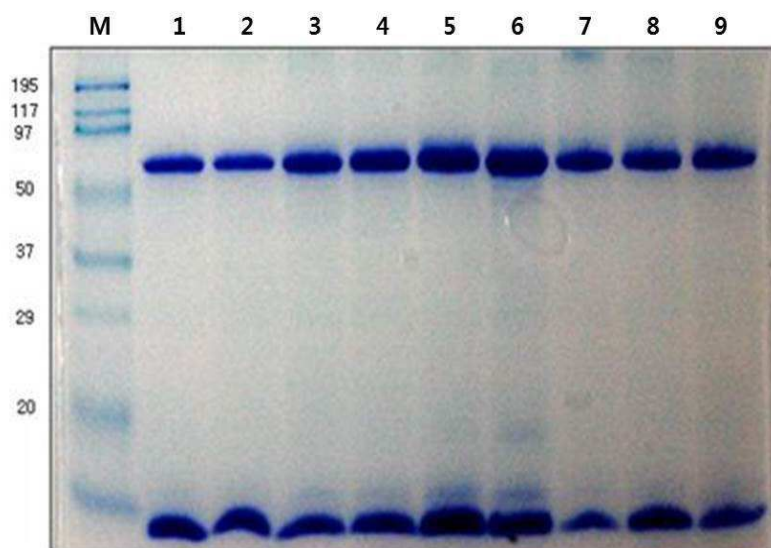
도면2



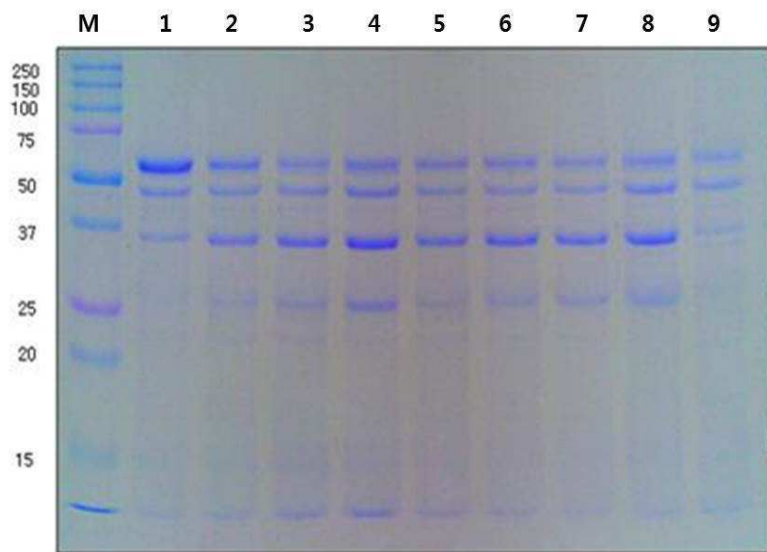
도면3



도면4



도면5



도면6

