creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000263923

Pichia anomala 생성 휘발물질을 이용한 생물학적 해충 유인제 개발

Development of the Biological Attractant for harmful insects Using volatile compounds from *Pichia anomala*

2013년 8월 23일

조선대학교 대학원

화 학 공 학 과

심 영 근

Pichia anomala 생성 휘발물질을 이용한 생물학적 해충 유인제 개발

Development of the Biological Attractant for harmful insects Using volatile compounds from *Pichia anomala*

2013년 8월 23일

조선대학교 대학원

화 학 공 학 과

심 영 근

Pichia anomala 생성 휘발물질을 이용한 생물학적 해충 유인제 개발

지도교수 이 중 헌

이 논문을 공학석사학위신청 논문으로 제출함

2013년 4월

조선대학교 대학원

화 학 공 학 과

심 영 근

심영근의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 김 정 규 (인)

위 원 조선대학교 교 수 이 재 욱 (인)

위 원 조선대학교 교 수 이 중 헌 (인)

2013 년 6 월

조선대학교 대학원

목 차

List of Tables ····· i
List of Figures ····· ii
ABSTRACT ····· iii
제 1장 서론 ····· 2
제1절 연구 배경 및 개요 ····· 2
제2절 연구 동향 ····· 3
1. 성 페로몬 ····· 3
2. 식물성 휘발 물질 ····· 4
3. 곤충 유인 및 기피제 ····· 8

제 2 장 실험 재료 및 방법 ····· 11
제1절 균주 및 배지 ····· 11
1. 휘발성 향기물질 생성 균주 확보 ····· 11
2. 배지 제조 ····· 11
제2절 *P. anomala*의 활성 위한 배지조건 최적화 ····· 14
1. 균주 배양특성 ····· 14
2. 탄소원에 따른 최적화 ····· 14
3. 질소원에 따른 최적화 ····· 14
제3절 *P. anomala* 생성 휘발성 향기물질의 분석 ····· 15
1. SPME를 이용한 headspace 유인제 향기성분 분석 ····· 15
제4절 유인제 제조 및 현장 실증 연구 ····· 16
1. 유인제의 제조 ····· 16

2. 유인제의 현장 실증 연구 ····· 16

제 3 장 결과 및 고찰 ····· 19

제1절 휘발성 향기 물질 생성 균주 배양 최적화 ····· 19

1. *Pichia anomala* 배양특성 ····· 19

2. 탄소원에 따른 배양특성 ····· 22

3. 질소원에 따른 배양특성 ····· 25

4. 탄소원 및 질소원 첨가에 따른 *P. anomala* 휘발성 향기물질 생성 특성 · 28

제2절 효모 균주 생성 휘발성 향기 물질 특성 ····· 30

1. SPME를 이용한 headspace 유인제 향기성분 분석 ····· 30

제3절 유인제 제제화 및 유인 특성 검정 ····· 33

1. 유인제의 제조 ····· 33

2. *P. anomala* 배양액 유인제의 나방류 유인 효과 ····· 34

제 4 장 결론 ····· 40

참고문헌 ····· 42

감사의 글 ····· 47

List of Tables

Table 1. Mean number(±SE) of *E. phalonia* moths feeding with different fruit puree in a solidified phytogel ····· 7

Table 2. The synthetic sex pheromone and its composition of moths ····· 10

Table 3. The characteristics of volatile flavor compound producing yeasts ····· 12

Table 4. The composition of culture media of *Pichia anomala* strain ····· 13

Table 5. Cell growth and production of volatile flavor compounds from *P. anomala* by the addition of nutrient sources. ····· 29

Table 6. The volatile flavors produced by *P. anomala* as moth attractants ····· 32

Table 7. The relative frequency of lepidopteran pests caught by the attractant with *P. anomala* ····· 36

Table 8. The results of field test lepidopteran pests caught by the attractant with *P. anomala* ····· 37

List of Figures

Figure 1. Sex pheromone and Attractant of moth insects ····· 6

Figure 2. The Photograph of super absorbent polymer used in this study ····· 17

Figure 3. The photograph of insect trap used in field test ····· 18

Figure 4. Growth curve of *Pichia anomala* in basal and modified GPYA medium for 24 h. ····· 21

Figure 5. Growth curve of *Pichia anomala* according to the concentration of sucrose as carbon sources ····· 23

Figure 6. Growth curve of *Pichia anomala* according to the concentration of fructose as carbon sources ····· 24

Figure 7. Growth curve of *Pichia anomala* according to the concentration of phenylalanine as nitrogen sources ····· 26

Figure 8. Growth curve of *Pichia anomala* according to the concentration of aspartic acid as nitrogen sources ····· 27

Figure 9. Chromatogram of volatile flavor compounds in *P. anomala* cultures by gas chromatography (GC) ····· 31

Figure 10. *P. anomala* cultures and solidified attractant used in this study ····· 33

Figure 11. The farmhouse and insects captured by attractant in this study ····· 38

Figure 12. The representative moth species captured by *P. anomala* attractant ··· 39

심영근의 석사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교 교 수	김 정 규	(인)
위 원	조선대학교 교 수	이 재 욱	(인)
위 원	조선대학교 교 수	이 중 헌	(인)

2013 년 6 월

조선대학교 대학원

ABSTRACT

Development of the Biological Attractant for harmful insects Using volatile compounds from *Pichia anomala*

Shim, Young-Kun
Advisor: Prof. Lee, Jung Heon, Ph.D.
Department of Chemical Engineering
Graduate School of Chosun University

Many moth pheromones and synthetic attractants have been used to monitor or decrease pest populations. However, due to their low economic efficiencies and narrow target specificities these methods are of limited use for trapping pests in large agricultural fields. This study was conducted to attract and control the lepidopteran pest using volatile flavor compounds by *Pichia anomala* KCTC 17625 during fermentation. The yeast *Pichia anomala* was cultured with varying the media composition and incubation time to examine their effects on the production of fruity-floral compounds.

Of the factors affecting the production of volatile flavor compounds by the yeast *Pichia anomala*, the variation of cultivation media such as carbon and nitrogen sources was carried. Fructose and Sucrose, as carbon sources, were found to be good source for the production of flavors based on its nature and intensity.

Phenylalanine was found to be the best nitrogen source in terms of intensity of the volatile flavors.

The volatile flavors by *Pichia anomala* were estimated to be fruity-floral compounds such as ethyl acetate, isopentyl acetate and isoamyl acetate.

A total of 57 taxa were trapped, including 42 species of lepidopteran pests. The most frequently caught lepidopteran pests included *Adoxophyes orana*, *Oraesia excavata* and *Adris tyrannus amurensis*.

Notably, less fruit damage was recorded in the experimental orchard versus a trap-free neighboring control orchard. These results suggest that adult moths might be effectively attracted and mass captured using *P. anomala* fermented oak sawdust media as bait.

제 1 장 서 론

제 1 절 연구배경 및 개요

세계적으로 더욱 높아지는 자국의 환경생태계 보호 열기에 따라 기존 화학합성 농약의 피해사례로 환경오염, 농약 저항성 해충출현, 유용천적생물 감소 등이 보고되고 있으며, 지구환경생태계와 인류 건강에 대한 심각한 수준의 위협을 주는 이러한 문제점을 최소화하기 위해 선진국을 중심으로 환경 친화적 생물농약의 필요성을 중요하게 인식하고 관련 기술 및 제품개발에 많은 노력을 기울이고 있다.

환경과 무역을 연계하는 국제적인 추세에 발맞추어, 최근에 우리 정부도 친환경 농업육성과 관련한 법률을 제정하고 친환경농업육성 5개년계획(2006-2010)을 시행하였으며, 국가농업생명공학육성계획에 의거 농촌진흥청에서 추진 중인 바이오그린21 사업과 같은 정책적 뒷받침을 통하여 연구 지원을 하고 있는 추세이다.

농업 병충해에 대한 개념이 외국은 사후 방제로부터 종합적 예방관리 개념으로 전환되고 있으며, 특히 미국의 경우 병해충 저항성 형질전환작물에 대한 지속적 연구투자로 친환경 병충해관리를 수행하고 있다.

국내의 경우도, 최근 생명산업을 21세기 전략 사업의 하나로 선정하여 정책적인 뒷받침을 촉진하고 있는 상황이며, 화학합성농약과 화학비료 사용량을 2010년까지 50%를 감축해 나갈 계획을 추진하고 있다.

본 연구와 관련하여 국가기술로드맵(NTRM) 특성화기술후보군(#27. 동식물병해충예방기술)에 등재된 기술로 생물농약개발에 대한 기초원천기술을 확보할 수 있는 환경 친화적 생물소재 유인제는 기존의 관행적인 유인포살방법을 개선하고 제제화 연구를 통하여 현대적인 기법을 도입하고자 하였다.

곤충의 생리적 반응 중에서 유인(attracting)은 곤충이 화학물질의 냄새나 맛 등 자극원을 향해 반응을 나타내게 하는 것을 정의하며, 유인제(attractant)는 이와 같은 동물의 주화성을 이용하여 해충방제에 쓰이는 약제를 가리킨다. 유인제는 자극원에 따라 성유인제(sex attractant), 먹이유인제(feeding attractant), 집합유인제(aggregation attractant), 기타 물질(attractant for oviposition) 등으로 구분하기도 한다. 곤충 특히 해충에 대한 유인은 빛깔이나 모양 등의 시각적 매개에 의한 것도 있으나 공기 중에서는 냄새에 의하는 경우가 많고, 물 속에서도 물에 녹아서 물의 흐름에 실려 오는 화학물질에 의한 것이 많으며, 어리여치나 북방여치와 같이 동종 수컷의 울음소리가 암컷을 유인하는 것과 같이 소리에 의한 예도 있으며, 반딧불이의 빛의 명멸도 이성을

유인한다.

이와 같이 곤충의 행동생리화학적 특성을 이용하여 많은 곤충에 대한 유인제로서 당발효액이 많이 알려져 있다(Bestmann, 1997; Landolt, 1995; Utrio, 1977; Eyer and Medler, 1940; Suckling *et al*., 1990). 전통적으로 당발효액은 농업경제적으로 중요한 나방류 해충에 대한 모니터링과 포획에 이용되고 있다(Ditman and Cory, 1933; Götz, 1941). 농업 및 경제수림에 가해하는 나방류 해충은 밤나방과(Noctuidae), 자나방과(Geometridae), 심식나방(Carposinidae)과 및 명나방과(Pyralidae)에 속하는 나방종들이 주류를 이루고 있으며, 이들이 당발효액에 대한 유인성을 나타내고 있다는 보고들이 있다(Bestmann, 1997; Utrio, 1977; Suckling *et al*., 1990).

그러나, 1959년 Butenandt 등이 처음으로 나방의 성페로몬(sex pheromone)을 발견하고, 그 후 2,500 여종의 나방종에 대한 성페로몬 물질의 동정(El-Sayed, 2004)이 이루어지면서 앞서 기술한 나방류 해충에 대한 모니터링과 방제가 성페로몬을 중심으로 수행되어 당발효액의 이용성이 감소되어 왔다. 나방류 해충을 유인하는 데에 있어서 성페로몬과 당발효액의 차이는 성페로몬은 종특이적(species-specific)이며, 단지 수컷 개체만을 유인하는 것과 달리 당발효액은 속(genus) 단위로 영향을 미치고 암수 개체 모두를 유인할 수 있다는 것이다. 이와는 반대로, 당발효액은 나비목 곤충과 먹이 습성이 비슷한 벌목 곤충과 같이 목적하지 않은 곤충을 유인할 수 있어 선택성이 떨어진다는 점과 동종 개체군내에서 성페로몬보다 유인력이 다소 떨어진다는 단점을 가지고 있으나 당발효액이 성페로몬보다 더 넓은 범위의 해충을 유인할 수 있는 장점을 지니고 있다.

농업과 산림해충방제를 위한 유인제의 활용을 고려하고자 할 때, 성페로몬은 거의 대부분이 수컷 개체를 유인할 수 있고, 암컷을 모니터링할 수 있는 성페로몬제제는 상업적으로 보편화되지 못하는 문제가 있다.

최근에는 해외에서 나방이 가해하는 식물로부터 발산되는 휘발성 물질을 이용한 개체군 조절에 관한 연구가 진행되고 있다. 이와 같은 식물들은 대부분 현화식물에 속하는 것으로 대표적인 것은 *Araugia sericofera* (Cantelo and J, 1979), *Abelia grandiflora* (Grant 1971. Haynes 1991), 쟈스민의 일종인 *Cestrum nocturnum* (Heath 1992), 인동덩굴 *Lonicera japonica* (Pair and horvet, 1997)와 *Gaura drummondii* (Teranishi 1991, Lopez 2000) 등이 있다. 식물의 꽃에서 발산되는 휘발물질은 곤충에 의한 수분매개의 기회를 확대하기 위한 수단으로써 나방의 유인과 관련된 화학물질은 phenylacetaldehyde, benzaldehyde, 2-phenylethanol, benzyl alcohol 및 linalool 등이 있는 것으로 알려져 있다(Toby *et al*., 2005).

본 논문에서는 농업과 산림해충 중에서 나비목 해충(lepidopteran pests)인 나방 개체군을 조절하는 방법으로 효모(*Pichia sp.*)발효액의 가능성을 타진하고자 하였다. 이를 위하여 기존에 이용되거나 연구되고 있는 성페로몬, 휘발성 물질 및 당발효액에 대한 나방 유인제의 특성을 비교하여 활용도를 분석하고자 하였다.

제 2 절 연구동향

1. 성 페로몬

곤충은 개체간에 의사전달(통신)을 주로 빛, 소리, 화학물질 등을 이용한다. 이들 중에 냄새로 의사를 전달하는 신호물질을 통신화합물이라고 한다. 통신화합물은 통신 주체에 따라 구분하는데, 같은 종내의 개체간 통신에 이용되는 물질은 페로몬(pheromone), 다른 종간에 작용하는 것을 타감물질(allelochemical)이라 한다.

여기에서는 나방 유인을 위한 페로몬을 같은 종 내의 한 개체가 외부로 방출하는 물질로 다른 개체에 의해 감지되어 특이한 행동반응을 보이게 하는 물질로 정의되며 본 연구에서는 성페로몬만을 다루기로 한다.

성페로몬이 처음 분리 동정된 것은 1959년 누에(*Bombyx mori*)의 성페로몬인 Bombycol로 시작되어, 1992년에 397종에 대한 화합물 분류, 940종에 대한 수컷 유인물질 분리와 74종에 대한 물질 발견으로 총 1411종에 대한 페로몬 성분이 연구되었고, 현재는 2,500여종에 이르고 있는 실정이다. 성페로몬의 장점은 페로몬 물질이 자연적으로 발생한다는 점, 무독하다는 점, 환경 오염이 없다는 점, 어떤 같은 종에만 영향을 미치는 종 특이적이다는 점, 유용 곤충에 안전하다는 점과 해충종합관리에 이상적인 구성요소라는 점이다. 그러나 이러한 장점에도 불구하고 아직도 합성살충제를 대신하지 못하고 있는 것은 첫째, 목적해충의 생물학적, 생태학적 정보가 부족하여 페로몬으로 목적해충의 교미를 교란하는 경우 해충의 모든 행동학적 특성을 생활사 동안 통제가 완전하게 이루어질 수 없다는 점이며, 두 번째로 페로몬제의 합성에 있어 순도가 다소 저하되더라도 효과에는 큰 손실이 없는 합성살충제와는 달리 페로몬은 조성과 순도에 의한 영향이 크기 때문에 고순도 페로몬 생산기술 부족과 목적해충에 대하여 영향을 미치는 페로몬의 적량과 지속성에 대한 기술이 현재까지 정립되지 않은 것으로 판단된다.

나방의 페로몬을 이용한 농업분야에서 해충방제방법은 해충 포획을 목적으로 페로몬트랩으로 대상해충을 유인, 방제하기 위하여 대상해충의 밀도와 발생을 예측하는데 이용한다. 한편, 대상해충의 대량포획으로 그들의 차세대 밀도를 감소시키기 위한 대량유살방법은 암컷을 유인하지 못하는 결점이 있다. 또 다른 방법으로는 페로몬에 의해 대상해충의 교미교란을 통한 개체군 증식을 억제하는 방법과 대상해충의 활력을 조장하여 살충제에 접촉할 수 있는 가능성을 높여, 살충제와 페로몬을 동시 처리하여 양쪽의 약량을 감소시키려는 시도가 있었으나 실효성을 거두지 못하고 있다.

2. 식물성 휘발 물질 (Plant Volatiles)

대부분 초식성 곤충들은 섭식행동과 산란활동을 위하여 숙주가 되는 식물을 매우 선택적으로 탐색한다 (Schoonhoven et al, 1998). 숙주식물을 선택하는 과정은 탐색을 하고 접촉을 시도하면서 최종적으로 수용하거나 거부하는 행동을 나타내게 되는데 (Schoonhoven et al, 1998) 일반적으로 시각과 후각적 단서들을 종합하여 숙주식물로 향하게 된다. 나방과 같은 곤충은 시각보다는 후각에 의한 민감도가 더욱 발달되어 있으며, 후각적 감각에 영향을 미치는 것은 공기의 흐름과 냄새 물질의 구성과 비율이 가장 중요한 인자들이다 (Rojas and Wyatt, 1999).

식물이 발산하는 휘발물질은 테르펜계 물질, 방향성 페놀류, 알콜류와 알데히드류를 포함한 2차 대사산물이 대부분인데, 이러한 물질들은 꽃샘에서 발산되거나, 식물 조직이 해를 입은 경우 외부로 방출된다(Schoonhoven et al, 1998). 식물에서 발산되는 휘발물질은 그 구성이 수백 종이 넘는 화합물로 구성되어 있다 하더라도, 그 고유한 향기는 몇몇 화합물에 의해 결정된다. 각각의 냄새물질은 종 특이적으로 작용하지만, 종내에서도 그 차이가 나타날 수 있다. 이러한 종내 차이를 나타내는 것은 식물의 생리, 발달상태, 유전적 특성에 기인하거나 계절, 빛과 지리적 위치 등과 무생물적 요인들도 작용할 수 있다 (Schoonhoven et al, 1998).

Table 2는 식물이 발산시키는 주요 휘발물질에 따른 나방류의 유인성을 나타내고 있다. 이는 여러 식물들이 발산하는 휘발물질을 포집하여 GC의 headspace analysis를 통하여 화합물을 동정하고, 나방의 촉각 (antennae)에 화학적 자극을 보내 나방의 전기생리학적 특성을 조사한 결과이다. 이와 같은 결과를 토대로 값비싼 페로몬제를 대체하거나 보완할 수 있도록 식물성 휘발물질을 해충 조절에 이용하고자 하는 시도들이 있었는데, 여전히 초보적 수준에 머물러 있는 실정이다. 이는 식물성 휘발물질이 동종 성페로몬에 대한 나방종의 유인성을 상승시킬 수 있으나, 식물의 생리상황과 계절적 요인에 의하여 상쇄시키는 등의 결과를 초래할 수 있다는 결과가 보고되고 있다.

먹이에 의한 유인

과수원에 주로 가해하는 흡즙나방(fruit-piercing moths)은 나비목 밤나방과 (Noctuidae)에 속하는 종들이 대부분을 차지한다. 이들의 대표적인 종으로서, *Eudonia phalonia*를 예로 들면, 세계적으로 태평양 연안, 아프리카, 아시아 및 호주 지역에 분포하는 감귤류 과수 및 채소의 주요 해충이며 (Denton et al., 1999), 과실에 구기 (mouth parts)를 꽂아 과즙을 섭취한다 (Sands and Schotz, 1991). 이들에 대하여 유인제 실험이 이루어졌는데, Fay and Halfpapp (2001)는 *n*-butyl acetate와 methyl

butyrate와 같은 고휘발성 에스테르계열물질과 알데히드와 알콜류 화합물을 설탕이 첨가된 한천으로 제조한 인공먹이가 에스테르물질만으로 구성된 유인제에 비하여 *E. phalonia*를 유인하는데 더욱 효과적인 것을 확인하였다.

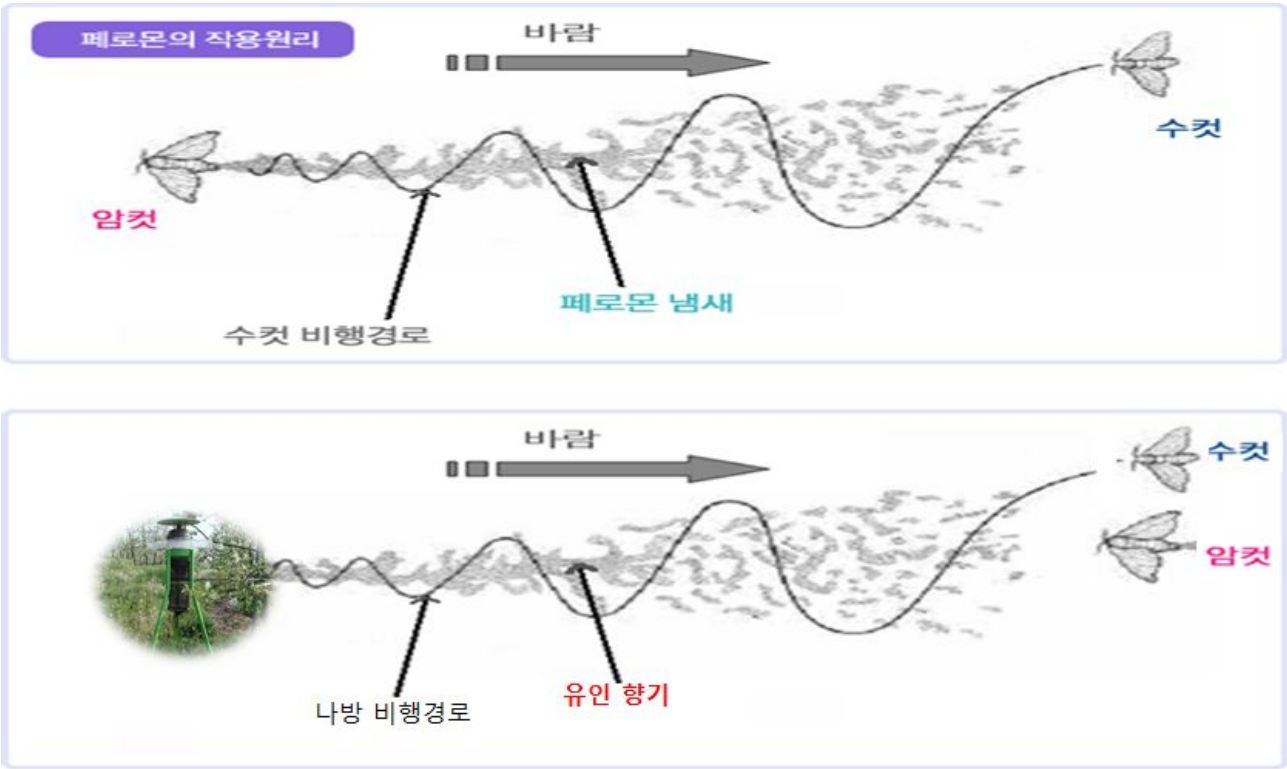


Figure 1. Sex pheromone and Attractant of moth insects

Table 1. Mean number(±SE) of *E. phalonia* moths feeding with different fruit puree in a solidified phytogel (Reddy et al., 2007)

Plants	Common name	Number of moths feeding
Musa X *paradisiaca* L.	Banana	15.9±0.1
Psidium guajava L.	Guava	9.3±0.3
Citrus spp.	Orange	9.3±0.2
Actinidia deliciosa Chev.	Kiwi	5.3±0.2
Malus pumila P	Apple	4.9±1.0
Ananas comosus (L.)	Pineapple	5.1±0.1
Pyrus communis L.	Pear	5.0±0.2
Carica papaya L	Papaya	5.2±0.1
Mangifera indica L.	Mango	4.3±0.3
Citrus paradisi M.	Grapefruit	2.7±0.2
Vitis vinifera L	Green grapes	2.5±0.1
Control(water)	-	0.0±0.1

3. 곤충 유인 및 기피제

곤충의 종류는 약 100만 종에 이르며 그 반수 이상이 식물을 먹는 식식성 곤충이다. 식식성 곤충은 각기 기주 식물을 가지고 있으며 식성의 범위에 따라 단식성, 협식성, 광식성으로 나눌 수가 있다. 광식성 곤충이란, 여러 종류의 식물을 먹이로 할 수 있는 곤충을 말한다. 그러나 실제로 먹는 식물의 종류는 먹을 수 없는 식물의 수보다도 훨씬 적다. 곤충의 기주 선택 현상이 어떻게 구성되어 있는지에 대해서는 복잡한 생리•생태적 요인이 내재하고 있다. 곤충이 어떻게 기주식물에 유인되고 이에 관여하는 화합물들과 곤충과의 관계를 보다 깊이 이해한다면 이들 화합물들을 이용한 좀더 효과적인 해충방제가 가능할 것이다.

가장 대표적인 유인물질로 밝혀진 화합물들로는 배추좀나방의 유인물질인 십자화과 식물에 널리 분포하는 allylisothiocyanate, 고자리 파리의 유인물질인 양파의 n-propylmercaptan, n-propyldisulfide 등이 있다. 활엽수에 주로 존재하는 휘발성 성분들인 green leaf volatile compounds(GLVs)들은 많은 활엽수를 가해하는 해충들에게 유인물질로 작용하는 것으로 보고되고 있다. 또한 식물체 휘발성 물질들은 이들을 기주로 하지 않는 곤충들에게는 기피 활성을 갖는 물질들이 많다.

최근엔 저장물 해충이나 위생해충에게 기피나 살충 활성을 갖는 식물체정유를 탐색하려는 연구가 많이 이루어지고 있으며 해충기피제로서 제품화된 정유가 많이 있다. 특히 임산물 및 곡류 등의 훈증소독에 널리 사용하는 메틸브로마이드(MB)는 유기합성 농약으로 오존층을 파괴하는 브롬가스를 방출하므로 선진국(OECD 가입국)에서는 2005년부터 사용이 금지되어 각국에서는 대체물질 개발에 많은 노력과 비용을 투자하고 있다. 식물체정유들은 이들 유기합성 훈증제를 대신할 대체제로서 그 가능성이 높아 선진국 등에서는 이들 정유를 이용한 병해충방제 연구에 주력하고 있다. 성페로몬을 나방류 해충의 발생 예찰이나 방제에 응용하기 위한 연구는 '60년대부터 시작되었다. 성페로몬은 목적하는 나방만을 유인하므로 해충의 발생 예찰에 누구나 쉽게 이용할 수 있다는 장점이 있으며, 이런 특성으로 개발초기에는 예찰용으로 사용되다가 유인효과가 좋아지면서 대량유살로 밀도를 감소시키는 방법으로 방제에 이용되었고, 교미를 못하도록 교란시켜 차세대 밀도를 줄이는 방법으로 방제에 이용되고 있다(Kim,1995).

페로몬은 생물들 간의 상호작용 내지는 통신에 이용되는 화학물질들 중의 하나로 같은 종간의 통신에 이용된다. 이중 성페로몬은 암컷이나 수컷이 다른 성의 생물을 부르는데 사용되는 화학물질을 말하는데 이에 대한 연구는 곤충, 특히 나방에서 많이 이루어져 왔다. 농업에의 응용이라는 측면에서 성페로몬은 발생예찰, 대량포획, 교미교란

등을 통해 화학살충제의 사용을 줄이거나 대체하는데 있어 성공적인 가능성을 보여왔다. 또한 순수한 생물학적인 연구에 있어서도 성페로몬은 종 특이적인 화학통신물질의 진화, 화학물질의 감지에 있어서 감각신경계의 역할이나 뇌의 역할, 화학통신물질의 생합성 과정이나 이를 조절하는 신경 또는 호르몬의 역할, 구조 등의 많은 면에서 연구가 이루어져 왔고 이런 생물학적인 현상에 대한 이해의 폭을 넓히는데 큰 도움이 되어왔다. 최근에는 많은 학자들이 감각기나 뇌에서의 통신물질의 인지와 종합, 통신물질의 생합성 과정 및 조절 과정에 대해 많은 관심을 가지고 연구를 해오고 있으며, Table 2는 지금까지 합성되는 페로몬을 정리하였다.

따라서, 본 연구에서는 나방류 해충에 대하여 이들의 기주성 먹이 습성을 이용하여 효모 Pichia anomala로부터 생성되는 휘발성 화합물을 이용한 유인 특성을 파악하고 이에 따른 유인제 제조 특성에 관한 연구를 시도하고자 하였다.

Table 2. The synthetic sex pheromone and its composition of moths

Insect species	Sex pheromones and its composition
Spodopera litura	Z9E11-14AC(90), Z9E12-14AC(10)
Spodoptera exigua	Z9E12-14AC(70), Z9-14OH(30)
Plutalla xylostella	Z11-16Al(49.5), Z11-16Ac(49.5)
Helicoverpa assulta	Z9-16Al(20), Z11-16Al(1)
Helicoverpa amigera	Z11-16AC(97), Z9-16Al(3)
Mamestra brassicae	Z11-16Ac(100), Z7-12Ac(20)
Peridroma saucia	Z9-14Ac(1), Z11-16AC(2)
Pseudaletia unipuncta	Z11-16Ac(9), Z11-16OH
Diaphania indica	E11-16Al(50.4), E11-16OH(1.8)

제 2 장 실험 재료 및 방법

제 1 절 균주 및 배지

1. 휘발성 향기 물질 생성 균주 확보

토양과 과실류에서 서식하는 미생물 중에서 당원 발효에 관여하고 발효과정동안 휘발성 향기물질을 생성하는 미생물 균주를 screening하여 농업 해충의 유인성에 적합한 균주를 선발하여 각각의 미생물 균주에 대한 배양특성을 연구하였다.

본 연구에서는 *Pichia anomala* KCTC 17625를 한국생명공학연구원 미생물자원센터(KCTC, Korea)로부터 분양받아 배양하였다.

2. 배지 제조

각각의 균주에 대하여 배양에 이용한 기본 배지의 조성은 *Pichia anomala*는 GPYA 배지를 사용하였다 (Table 4). 배지의 탄소 및 질소원에 따른 나방류 해충 유인을 위한 방향성 물질 생성 변화를 살펴보기 위하여 dextrose를 비롯한 3종의 탄소원과 phenylalanine을 비롯한 4종의 질소원을 이용하여 각 균주의 생장과 방향성 물질의 특성을 조사하였다. 또한, 방향성 물질을 생성하는 효모 균주 중에서 fructose와 sucrose의 탄소원에 대하여 성장률이 높고 강한 강도의 과일-꽃 향기물질을 생성하는 *Pichia anomala*에 대하여 배양을 수행하였다. 각각의 배지는 110℃에서 15분간 멸균하였다.

Table 3. The characteristics of volatile flavor compound producing yeasts

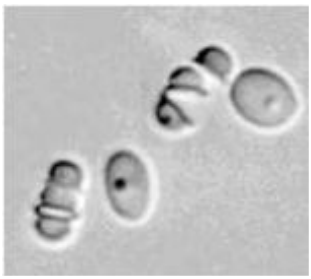
균주	*Pichia anomala*
Shape	
Cell shape	3~4 X 5~6.5 ㎛
Cell size	multilateral budding
Reproduction	Glucose +, Galactose +,
Fermentation	Maltose -
Assimilation to KNO_3	+
Vitamin requirement	-
Acid production	+
Ester formation	+

Table 4. The composition of culture media of *Pichia anomala* strain

Strains	*Pichia anomala*
Composition	GPYA medium Glucose 40.0g Peptone 5.0g Yeast extract 5.0g DW 1.0L (110℃, 0.5 atm, 15min sterilize)
Temperature	30 ℃
pH	5.5

제2절 *Pichia anomala*의 활성을 위한 배지조건 최적화

1. 균주 배양 특성

*Pichia anomala*를 GPYA배지 plate에 평판 도말하여 30℃에서 이틀 배양 후, GPYA 액체 배지에 5 mL에 1 colony를 접종하여 30℃에서 over night (20~24hr) 배양시키고, 4℃에서 3000 RPM으로 15분 동안 원심분리(VS-5500, Vision scientific Co., Ltd., Korea)하여 균체를 회수하고 멸균수로 세척한 다음, 균체 현탁액을 본배양 배지에 1%가 되도록 접종하여 30℃에서 24시간 동안 정치배양시켰다. 배양시키면서 0~24시간 동안 분광광도계 (Microplate spectrophotometer, BioTek)로 흡광도(OD600)를 측정하여 생육곡선을 확인하였고, 멸균수 9mL에 배양액 1mL를 혼합하여 10배씩 연속적으로 희석시킨 다음, GPYA 배지 plate에 0.1 mL 씩 분주·도말 (spread plate method)하여 30℃에서 24시간 동안 배양한 후 생균수를 측정하여 생육 배지를 최적화시키기 위해 생육특성을 비교하였다.

2. 탄소원에 따른 최적화

탄소원으로는 dextrose (Sigma,Germany), fructose (Yakuri,Japan), sucrose (Junsei, Japan), 등 3종을 사용하였다. GPYA 기본 성분에 3종의 탄소원을 각각 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8% 농도별로 배지를 제조하여 *Pichia anomala*의 배양특성과 생성하는 휘발성 향기물질을 확인하였다.

3. 질소원에 따른 최적화

질소원으로는 Glycine (Junsei, Japan), Aspartic acid (Junsei, Japan), Phenylalanine (Junsei, Japan) 3종을 사용하였다. GPYA 기본 성분에 3종의 질소원을 각각 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1% 농도별로 배지를 제조하여 *Pichia anomala*의 배양특성과 생성하는 휘발성 향기물질을 확인하였다.

제 3 절. *Pichia anomala* 생성 휘발성 향기 물질의 분석

1. SPME를 이용한 headspace 유인제 향기성분 분석

(1) Headspace향기성분의 추출 및 포집

유인제의 휘발성 향기성분은 SPME (solid phasemicroextraction)방법을 이용하여 분석하였다(Penton, 1996). 휘발 향기 성분 포집을 위해서 carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS, 75㎛ thickness)로 코팅된 SPME fiber (Supelco, Bellefonte, PA, USA)를 사용하여 휘발성분을 흡착시켰다. 휘발성 성분을 흡착하기 전 fiber는 GC (gas chromatograph, Agillent GC 6890, Palo Alto, CA, USA)로 250℃에서 5분간 예열시켰으며, SPME 포집은 시료 10 mL을 headspace vial (Supelco, Bellefonte, PA, USA)에 넣어 예열된 SPME fiber를 주입하였다. 시료는 50℃ heating block에서 5분간 예열하였고 SPME fiber는 30분 동안 휘발성분을 포집하였으며, 그 후 GC에 주입하여 2분간 열탈착시켜 GC/MS를 사용하여 분석하였다.

(2) 향기성분의 분리 및 동정

휘발성분 분석을 위하여 MSD (mass selective detector)가 부착된 GC (AgillentGC 6890, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였으며, HP-FFAP capillary column(30m × 0.25mm × 0.25㎛)과 He가 carriergas(1mL/min)로 사용되었다.이 때 oven 온도는 35℃에서 10분 유지되었고 100℃까지는 분 당 5℃로, 210℃까지는 분 당 10℃로 상승시켜 10분 동안 유지하였다. MS system 조건으로서 MS source, MS quadrupole 및 transferline은 각각 230, 150및 280℃이었고, 사용된 library는 Wiley7 Nist 0.5 (Wiley7Nist0.5 Library, mass spectral search program, version 5.0, USA)이었다.

제 4 절. 유인제 제조 및 현장 실증 연구

1. 유인제의 제조

나방 유인 향기물질의 발향과 지속성을 고려한 제제의 형태를 시험하기 위하여 본 연구에서는 *Pichia anomala* 배양액에 참나무 톱밥을 혼합한 액상 유인제와 고흡수성 수지를 이용한 반고형의 유인제를 제조하여 효용성을 비교하였다.
고흡수성수지는 아크릴산과 비닐알코올의 블록혼성중합체로 비드 형태(Kolon, Korea)로 되어 있는 것을 사용하였다 (Figure 2).

고흡수성 수지를 이용한 유인제의 제조는 *P. anomala* 배양액에 총 당도 15 brix(%)가 되도록 sucrose를 첨가하고, 고흡수성 수지와 배양액의 배합비는 고흡수성 수지 : 배양액 = 1 : 200(W/V)으로 하여 24시간 동안 정치한 후 여과하여 비드 타입의 반고형 유인제를 제조하였다.
이와 함께 톱밥을 첨가한 유인제를 제조하였으며, 제조과정은 *P. anomala* 배양액에 총 당도 15 brix(%)가 되도록 sucrose를 첨가하고, 배양액 1ℓ를 기준으로 참나무 톱밥 1.5%(W/V)를 혼합하여 72시간동안 숙성시킨 효모발효유인제를 제조하였으며, 이를 현장에 적용하였다.

2. 유인제의 현장 실증 연구

본 연구에서는 실제 농가에서 적용이 가능한 시제품을 제작하여 영농 현장에서 유인제의 실증 연구를 통해서 나방류 해충 방제용 유인제의 화학합성농약 대체 효과를 평가하고 농업 생산력 증대에 미치는 효용성을 평가하고자 하였다.

유인제를 이용한 해충 유인력 검정은 과수재배농가를 선정하고, 선정된 과원에서 각 개소에 트랩을 5~10 set/ha로 설치하고 설치된 트랩에 대하여 7일~14일 간격으로 1회씩 포획된 해충 샘플을 수거하여 각 종별로 분류하고 개체수를 산정하고 냉동 보관하였다. 포획된 해충의 생태학적 특성을 파악하고, 과원 종류별로 해충 포획율을 산정하고 특정 해충에 대한 포획율을 비교하고자 하였으며, 과원의 피해과율, 생산성 등을 농약 처리지역 등과 비교하였다. 본 연구에서 대상으로 하는 해충은 복숭아명나방, 밤나무재주나방, 밤나무혹나방, 박쥐나방, 으름나방, 밤애기잎말이나방, 주머니나방, 어스랭이나방, 흰불나방 및 흡수나방류를 주요 대상으로 하였으며, 해충 유인 포획에 사용된 트랩은 현재 상용되고 있는 Funnel trap (Damok co., Suncheon, Korea)을 이용하였다 (Figure 3).

Figure 2. The Photograph of super absorbent polymer used in this study

Figure 3. The photograph of insect trap used in field test

제 3 장 결과 및 고찰

제1 절 휘발성 향기 물질 생성 균주의 배양 및 최적화

1. *Pichia anomala* 배양 특성

방향성 휘발물질을 생성하는 효모 균주 *Pichia anomala*를 나방류 해충 방제용 유인제를 개발하는 균주로 선정하였다. 일반적으로 효모는 주로 출아법에 의해 증식을 하고 단세포 세대가 비교적 길며, 진핵세포의 구조를 지닌 진균류에 속하는 미생물군의 형태로 배양조건이나 시기, 세포나이, 영양상태 및 산소의 유무 등 물리화학적 조건에 따라 다르다고 알려져 있다. 효모는 호기성 및 통성 혐기성균으로 당액에 효모를 첨가하여 호기적으로 배양시에는 호흡작용을 통하여 당분은 효모 자신의 증식에 이용하고, 혐기적으로 배양시에는 발효작용을 하게 되는데 당물질은 알코올과 CO_2로 분해된다. 이와 같이 효모를 혐기적으로 배양하면 알코올 생성과정을 통하여 맥주나 와인 등의 양조공업에 이용할 수 있고, 발효 조건을 달리하여 알코올 이외에 글리세롤, 초산 등을 생산할 수 있으며, 발효공정의 중간산물로 방향성 향기 물질이 생성되는 특성이 있다.

*Pichia anomala*의 최적 배양조건을 조사하기 위하여 GPYA 기본 배지에 설탕(sucrose)를 첨가한 배지에서 24시간 동안 배양하여 생육곡선과 생균수를 확인하여 *Pichia anomala*의 최대 배양조건을 결정하였다.

*Pichia anomala*를 GPYA 액체 배지에 5 ㎖에 1 colony를 접종하여 30℃에서 전배양 시키고, 4℃에서 3000 rpm으로 15분 동안 원심 분리하여 멸균수로 세척한 다음, 균체 현탁액을 GPYA 배지와 설탕을 첨가한 변형된 GPYA배지에 1%가 되도록 접종하여 30℃에서 24시간 동안 정치배양 시켰다. 배양시키면서 0~24시간 동안 분광광도계(Bio-Tek)로 흡광도(OD_{600})를 측정하여 생육곡선을 보았고, 30℃에서 24시간 동안 배양한 후 spread plate method로 생균수를 측정하여 생육특성을 비교해 보았다.

*Pichia anomala*의 성장(Figure 4)은 GPYA 기본 배지에서 배양할 경우 2~12시간까지는 변형배지보다 흡광도 값이 더 높게 나타났다. 4~6시간대에 가장 큰 성장을 보였고, 성장 기울기가 점점 완만해지는 것을 볼 수 있었다. 12시간에 정상기에 도달하여 24시간의 흡광도와 유사한 값을 나타내었다. 반면에 설탕을 첨가한 변형된 GPYA 배지에서 배양할 경우 점점 성장 기울기가 커져 10~12시간대에 가장 큰 성장을 보였고, 12시간 이후에도 성장 증가하는 기울기를 보이는 것으로 보아 GPYA 기본 배지에 비해 정상기 도달시간이 늦게 나타났다.그리고 24시간 배양 시 GPYA 기본 배지에 배양했을 때보다 1.1배 정도 OD값을 보였다. 균수는 설탕이 첨가

된 변형 배지에서 5.27 × 10^8 CFU/㎖로 GPYA 기본 배지에서의 균수 3.69 × 10^8 CFU/㎖ 보다 1.42배 정도 증가한 값을 나타내었다.

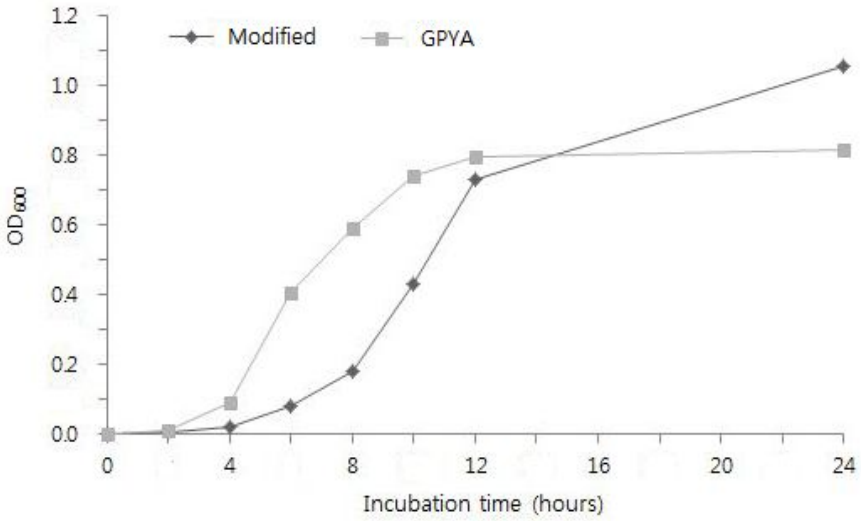


Figure 4. Growth curve of *Pichia anomala* in basal and modified GPYA medium for 24 h.

2. 탄소원에 따른 배양 특성

나방류 유인제의 제조를 위하여 *Pichia anomala* 균체의 휘발성 향기물질 생성에 최적화된 배지를 결정하기 위하여 탄소원의 종류와 농도에 따른 영향을 조사하였다. 미생물이 이용하는 탄소원의 범위는 매우 다양하며, 화합물의 형태나 균의 종류에 따라 다르다. 일반적으로 미생물의 탄소원으로 잘 이용되는 것은 sucrose, fructose 등이 있으며, 본 연구에서는 GPYA 기본 배지에 탄소원의 최적화를 위해 3개의 탄소원 fructose, sucrose, ethanol을 0~8% 농도로 배지에 첨가하여 24시간 동안 *Pichia anomala*의 배양 특성을 비교하였다. 탄소원이 포함되지 않은 대조구 배지에서 *Pichia anomala*은 성장도가 매우 낮았으며, 24시간 후 균수 측정 결과, 다른 탄소원이 첨가된 시험구에 비하여 약 50 % 정도로 낮아 탄소원의 영향이 큰 것으로 나타났다 (Figure 5~6).

24시간 동안 sucrose를 첨가한 배지에서의 성장률은 4~8시간 사이에 성장률이 최대로 증가하고 12시간 이후에는 생장이 더 이상 증가하지 않고 정체되는 패턴을 보였다. 반면 fructose는 성장률이 6~10시간 사이에 가장 큰 기울기를 나타내었고 12시간 이후에도 생장이 계속 증가하는 양상을 보였다.

균수 측정 결과 sucrose는 6%일 때 3.97×10^8 CFU/㎖, fructose는 8%일 때 4.57×10^8 CFU/㎖로 가장 높은 균수를 나타내었다.

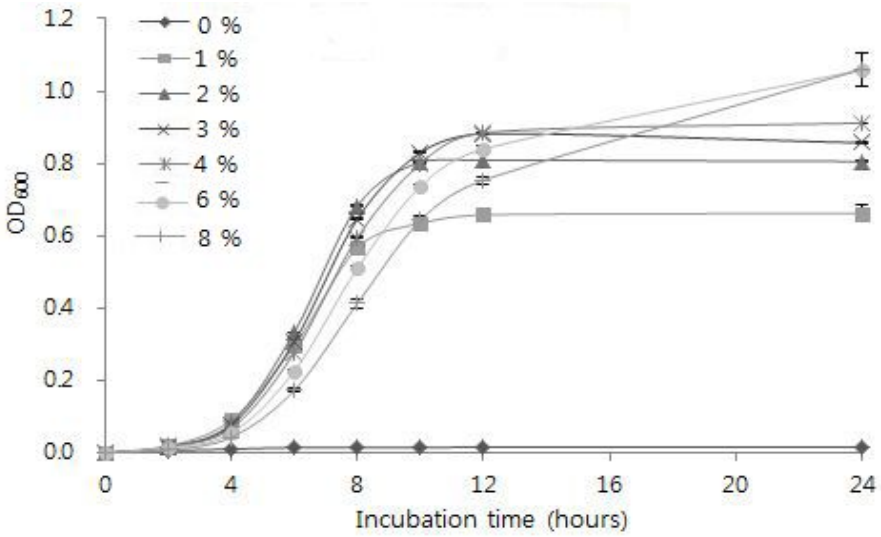


Figure 5. Growth curve of *Pichia anomala* according to the concentration of sucrose as carbon sources

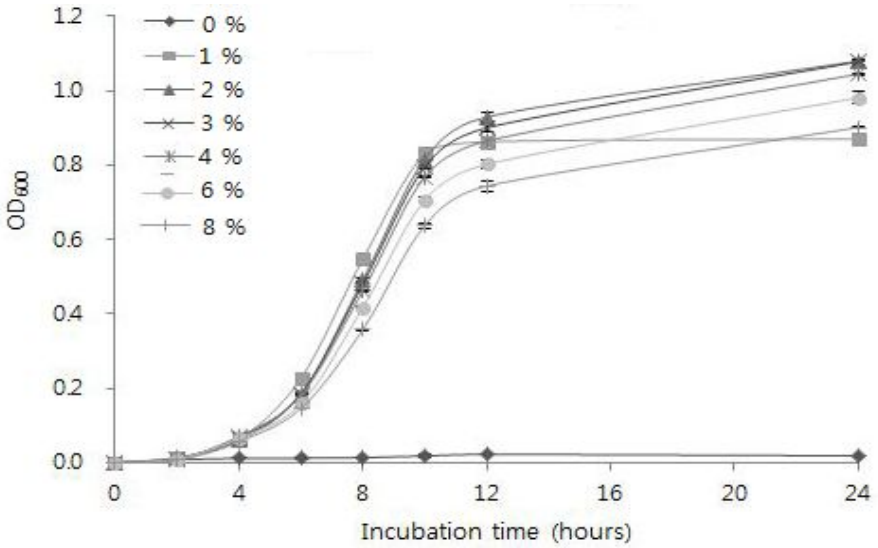


Figure 6. Growth curve of *Pichia anomala* according to the concentration of fructose as carbon sources

3. 질소원에 따른 배양 특성

질소원은 단백질 합성의 기초 물질이 되는 각종 아미노산의 생합성에 필요하며 미생물의 생육에 영향을 주게 된다. 보통 Peptone과 yeast extract 등을 모든 미생물들이 잘 이용하는 것으로 알려져 있으며, 본 연구에서는 glycine, aspartic acid와 phenylalanine을 질소원으로 첨가하였으며, 대체적으로 첨가에 따른 영향은 탄소원보다 크지 않은 것으로 나타났다.
첨가한 질소원 중에서 phenylalanine의 경우 0.75%를 첨가했을 때, 3.02×10^8 CFU/㎖로 최대 생장율을 나타내었고, glycine과 aspartic acid는 동일한 농도에서 각각 2.13×10^8 CFU/㎖, 2.20×10^8 CFU/㎖으로 phenylalanine를 첨가한 경우보다 낮은 균수를 나타내었다 (Figure 7~8).

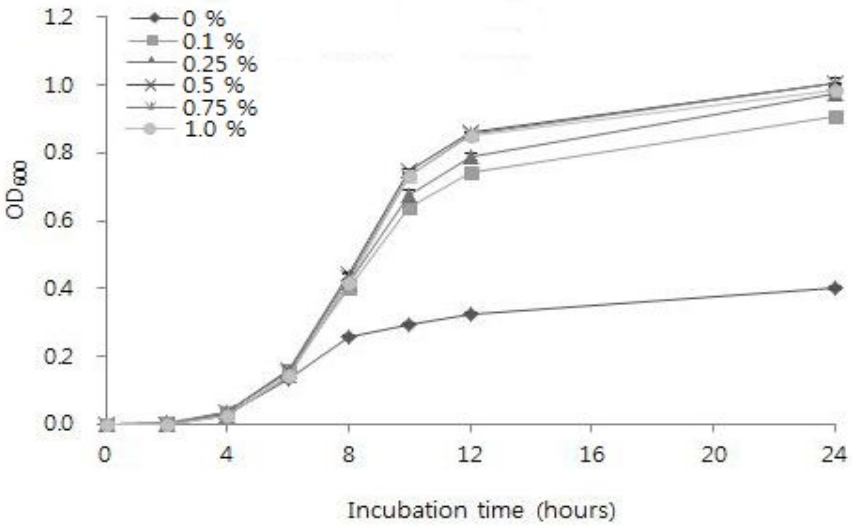


Figure 7. Growth curve of *Pichia anomala* according to the concentration of phenylalanine as nitrogen sources

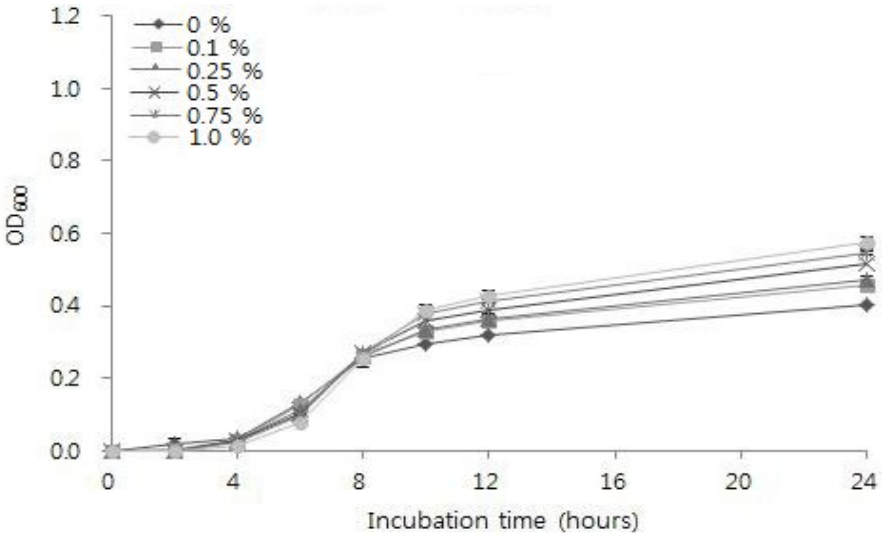


Figure 8. Growth curve of *Pichia anomala* according to the concentration of aspartic acid as nitrogen sources

4. 탄소원 및 질소원 첨가에 따른 *P. anomala* 휘발성 향기물질 생성 특성

본 연구에서 유인제 개발을 위한 효모 균주의 특성은 alcohol acetyltransferase, carboxylic ester hydrolases, lipase와 esterase와 같은 효소 활성으로 방향성 물질을 생성하는 생체 pathway를 거치게 되는데, *P. anomala*의 경우도 phenylalanine을 질소원으로 사용할 때 phenethyl alcochol을 생성하는 것으로 알려져 있다.

각각의 배지에 대하여 배지의 탄소 및 질소원에 따른 나방류 해충 유인을 위한 방향성 물질의 생성 변화를 살펴보기 위하여 fructose를 비롯한 3종의 탄소원과 phenylalanine을 비롯한 3종의 질소원을 이용하여 각 균주의 생장과 방향성 물질의 특성을 조사하였다.

이와 같은 효모 균주의 특성을 활용하여 *Pichia anomala*가 생성하는 방향성 향기물질 생성 특성을 조사하기 위하여 *Pichia anomala*를 기본배지(GPYA)에 접종하여 30℃, 200 rpm으로 24시간 배양하여 균체수 2.0~3.5 × 10^8 CFU/㎖를 확보하였다. 기본 배지 조성에 대하여 탄소원 fructose와 질소원으로써 페닐알라닌을 첨가한 modified 배지에 기배양된 균주 접종하여 30℃에서 150 rpm으로 48시간 배양된 발효액을 분석에 사용하였다.

분석 결과는 *Pichia anomala*가 생성하는 방향성 향기물질은 탄소원을 fructose로 첨가한 경우 균체는 4.57 × 10^8 CFU/㎖, 생성된 방향성 화합물은 ethyl acetate, isoamyl acetate 및 isobutyl acetate가 주요 화합물이었고, 질소원으로 페닐알라닌을 첨가한 경우는 phenylethyl acetate, isoamyl acetate와 propyl acetate 등이 생성되는 것으로 나타났다 (Tabel 5).

Table 5. Cell growth and production of volatile flavor compounds from *P. anomala* by the addition of nutrient sources.

Nutrients		Cell growth	Odor	Strength of odor	Major compounds
Carbon	Sucrose	3.97	fruity-floral	+++	Ethyl, isoamyl, isobutyl acetate
	Fructose	4.57	fruity-floral	+++	Ethyl, isoamyl, isobutyl acetate
	Ethanol	3.20	ethanol-yeast	++	Not detected
Nitrogen	Glycine	2.13	floral	++	Ethyl, isoamyl, isobutyl acetate
	Aspartic acid	2.20	fruity-floral	+++	Ethyl, isoamyl, isobutyl acetate
	Phenylalanine	3.02	fruity-floral	+++	phenylethyl, isoamyl, propyl acetate

제 2 절 효모 균주 생성 휘발성 향기 물질 특성

효모 균주에 의해 생성되는 휘발성 향기 물질을 분석한 결과, 대부분의 화합물은 esters와 alcohols 종류로서, 주요 화합물은 isobutyl acetate, phenethyl alcohol과 phenylethyl acetate 등으로 분석되었다. 이러한 방향성 화합물은 많은 효모 균주로부터 생성되는데, 이와 같은 esters 화합물의 생성은 alcohol acetyltransferase, carboxyl ester hydrolase 및 esterase 등과 같은 효소적 작용에 의해 생성된다고 알려져 있다.

본 연구에서 주요한 화합물로 분석된 phenylethyl alcohol은 mild-warm and rose-honey like 향기를 지니는 화합물이다. Phenylethyl alcohol은 세계적으로 향수산업의 주요한 원료로써 향수 원료의 5~20%를 차지할 정도로 방향성이 강한 화합물이다.

이 화합물은 phenylalanine으로부터 유래하며, 방향성 aromatic neurotransmitter phenylethylamine 유사체로 Phenylethyl alcohol의 방향성과 곤충 특히, 나방류 유인에 대한 유연관계에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

P. anomala 배양액으로부터의 휘발성 향기 성분을 GC-MS로 분석한 결과는 Figure 9와 같다. 총 20종의 휘발성 향기물질이 검출되었으며, 종류별로는 alcohol류 5종, ester류 8종, acid류 3종, 기타 4종이 검출되었다.

이 중에서 alcohol류 (Phenethyl alcohol, Acetaldehyde-di-cis-3-hexenylacetal) 2종, ester류 (ethyl acetate, isoamyl acetate, Phenylethyl acetate) 3종 및 기타 (E-2-decenal) 1종 등 총 9종의 향기 성분이 주요한 향기성분으로 검출되었다.

휘발성 향기성분의 상대적 농도는 alcohol류와 ester류가 83.42~92.67%로 대부분을 차지하였고, 그 외 acid류 0.22~0.47%로 나타났다. Alcohol류 중 phenethyl alcohol이 상대적 농도 53.25~61.34%로서 가장 높았으며, ethyl acetate, isoamyl acetate 등의 순으로 나타났다.

Phenylethyl alcohol은 장미향이나 벌꿀향으로서 주요 효모발효액의 주요 향미성분으로 알려져 있으며, 향기성분 중 ester류에서 성숙한 배 과실류의 주요 향기 성분인 isoamyl acetate과 벌꿀향의 phenylethyl acetate및 강한 과실향의 ethyl acetate등이 생성된 것으로 분석되었다. 그 외에 향기성분으로 유기산류 중에서 주류의 발효과정 중 세균과 효모의 발효작용으로 생성되며, 자극취를 나타내는 acetic acid 등이 검출되었다 (Table 6).

이상의 결과로 보아 *P. anomala* 배양액으로부터 생성된 휘발성 향기 물질은 곤충의 섭식과 관련한 꽃과 과실류에서 생성되는 유사한 향기 물질을 생성하는 것으로 파악되고 있으며, 각각의 향기 성분이 곤충 특히 나방류에 대한 유인력에 영향을 미칠 것으로 판단되었다.

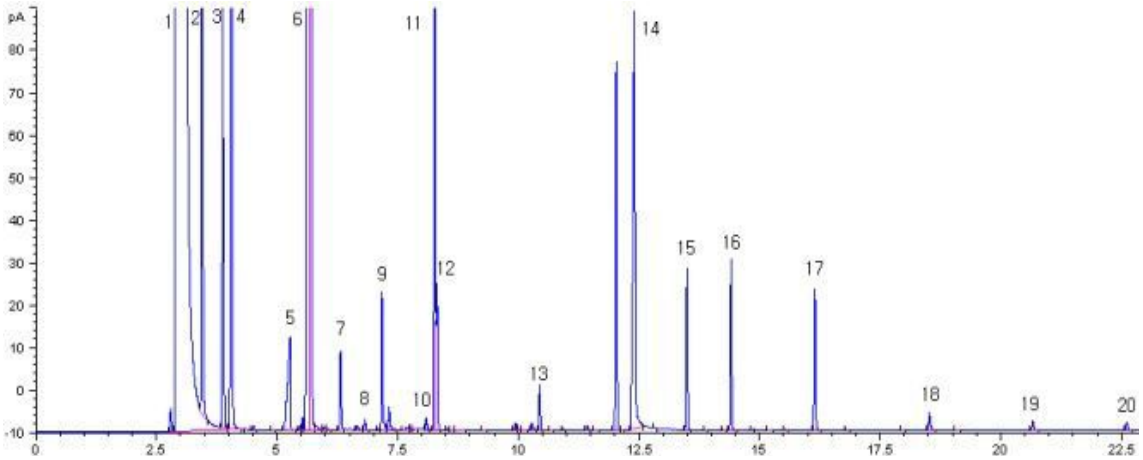


Figure 9. Chromatogram of volatile flavor compounds in *P. anomala* cultures by gas chromatography (GC)

Table 6. The volatile flavors produced by *P. anomala* as moth attractants

No.	Compounds	MW	Characteristics
1	Isobutyl acetate	116	Etheral, fermented odor
2	Phenethyl alcohol	122	Rose-honey-like odor
3	Phenylethyl acetate	164	Very sweet, rose-fruity, honey-like
4	Acetaldehyde-di-cis-3-hexenylacetal	226	Oily-green odor with a sweet taste
5	Hexyl butyrate	172	Fruity, heavy odor
6	1H-indole-3-ethanol	161	Not flavor, auxin precursor
7	Z-2-decenal	154	Waxy-orange-like, sweet-aldehyde
8	E-2-decenal	154	Waxy-orange-like, sweet-aldehyde
9	Allyl propionate	114	Sour-fruity odor

제 3 절 유인제 제제화 및 유인력 검정

1. 유인제의 제조

고흡수성 수지를 이용한 유인제의 제조는 *P. anomala* 배양액에 총 당도 15 brix(%)가 되도록 sucrose를 첨가하고, 고흡수성 수지와 배양액의 배합비는 고흡수성 수지 : 배양액 = 1 : 200(W/V)으로 하여 24시간 동안 정치한 후 여과하여 비드 타입의 반고형 유인제를 제조하였다.
이와 함께 톱밥을 첨가한 유인제를 제조하였으며, 제조과정은 *P. anomala* 배양액에 총 당도 15 brix(%)가 되도록 sucrose를 첨가하고, 배양액 1ℓ를 기준으로 참나무 톱밥 1.5%(W/V)를 혼합하여 72시간동안 숙성시킨 효모발효유인제를 제조하였으며, 이를 현장에 적용하였다 (Figure 10).

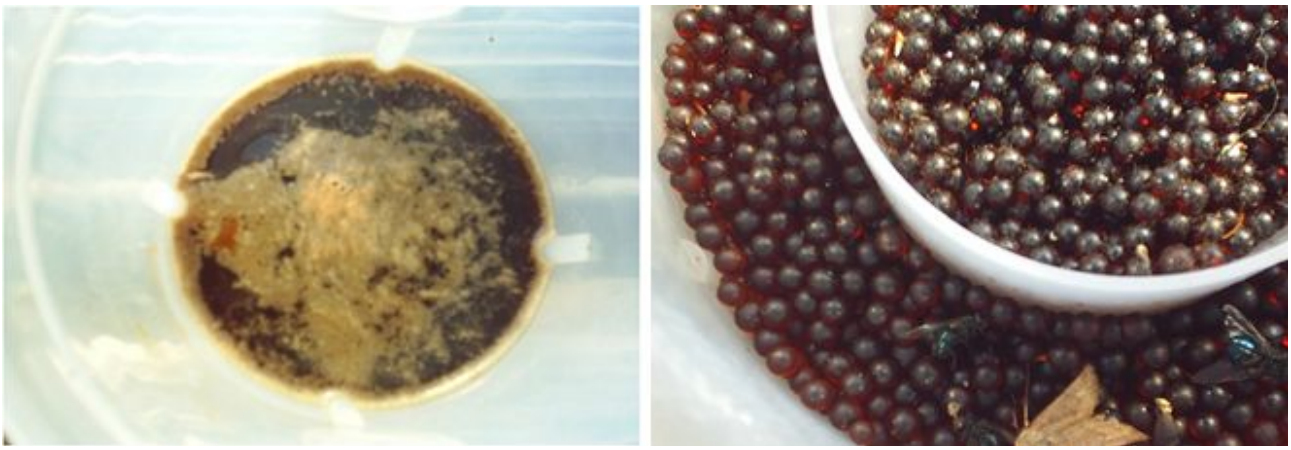


Figure 10. *P. anomala* cultures and solidified attractant used in this study

2. *P. anomala* 배양액 유인제의 나방류 유인 효과

나방류 해충 포획용 유인제 개발을 위한 야외 현장 실증 실험을 통한 유인제제의 해충 유인성 검정 수행내용은 다음과 같다.

조사지역인 전남 담양과 곡성 지역에서 조사 기간동안 유인제에 의해 포획된 나방의 총 개체수는 809개체이며, 일반 농경지에 위치한 과원보다 야산과 인접해 있는 과원에서 많은 개체수가 포획되었다. 조사기간이 7월부터 9월사이의 여름철이었기 때문에 춘추시기보다 다양한 종과 개체수가 포획된 것으로 판단되었다(Table 7). 감나무원의 경우, 조사기간이 수확기를 앞둔 시기이므로, 흡수나방류에 의한 반점 피해가 빈번하게 나타나는 시기이었으나, 유인제에 의한 유인포획으로 예년에 비하여 25~28% 정도 감소한 결과를 보였다.

본 연구에서 제조한 *P. anomala* 배양액으로부터 제조한 유인제를 과원에 설치하여 나방류 해충에 대한 포획실험을 한 결과, 가장 많은 빈도로 유인 포획된 종은 으름밤나방 (*Adris tyrannus amurensis*)과 무궁화밤나방 (*Lagoptera juno*) 2종이다. 이들 종은 각각 32, 43 개체가 포획되어 가장 높은 빈도를 나타내었으며, *P. anomala* 배양액으로부터 제조한 유인제의 유인향기성분에 가장 강한 유인효과를 나타낸 것으로 판단되었다 (Table 8).

이들 종은 성충이 밤에 사과원으로 날아와 과실에 주둥이를 찔러넣고 과즙을 흡즙하므로, 과실의 겉면이 언뜻 보면 잘 표시가 나지 않으나 자세히 살펴보면 바늘로 찌른 것 같은 구멍이 나 있다. 내부의 과육은 변색이 되고 스폰지 같이 되어 있으며 시간이 경과하면 부패하여 낙과되기도 한다. 밤을 제외한 대부분의 과실을 가해하고 특히, 복숭아·포도·배 등에 피해가 많지만, 사과도 지역에 따라서 피해가 적지 않은 종으로 분류되고 있다.

으름밤나방 (*Adris tyrannus amurensis*)과 무궁화밤나방 (*Lagoptera juno*) 등을 흡수나방이라고 부르기도 하는데, 일본에서 과실에 흡수 피해를 주는 나비목으로 14개과 224종이 보고되어 있는데, 밤나방과가 176종으로 가장 많으며 10여종이 피해가 많은 종이다. 우리나라에서는 으름밤나방·무궁화밤나방·우묵밤나방 등이 중요한 흡수나방으로 알려져 있다.

흡수나방에는 건전한 과실에 직접 주둥이를 찔러 가해하는 1차 가해종과 다른 병해충에 의해 상처 피해를 받아서 연화되거나 부패한 과실을 가해하는 2차 가해종이 있다. 그러나, 1차 가해종과 2차 가해종을 명확히 구분하기는 쉽지 않다.

흡수나방은 해가 지면서 어두워지면 이동을 하고 과실을 흡수하며 교미를 하거나 산란 활동을 하고, 해뜨기 전에 다시 활동을 정지하고 주간에는 한 곳에 머물러 있다. 이러한 행동은 어두운 상태가 되면 겹눈이 '암반응'을 하여 촉각과 날개를 움직이게 하는 신경작용에 따라 활동을 하게 되며, 밝은 상태가 되면 겹눈이 '명반응'을 하여 주변의 사물을 구분하지 못하게 됨에 따라 활동을 정지하는 것이다. 대체로 빛의 밝기가 0.3~0.5룩스(보름달인 밤의 밝기는 0.2룩스

임) 이하에서 야간 활동이 유기된다.

여름철은 오후 7~8시 이후에 활동을 시작하여 과수원에 비래는 밤 12시 전후에 가장 많으며 새벽 4시 이후는 활동을 정지한다. 가을철에는 오후 6~7시에 활동을 시작하고 과수원에 비래는 밤 8시경이 가장 많으며 10시 이후는 급격히 감소되는데, 이는 야간의 온도가 낮기 때문이다.

흡수나방이 방제하기 어려운 이유는 ⅰ)낮에는 주변 산야에 분산되어 은신하고 있고 야간에만 활동하여 과실에 피해를 주므로 소재파악이 곤란하다. ⅱ) 유충기에는 과수나무가 아닌 산야의 잡목림을 가해하여 발육한다. ⅲ) 성충은 예리하고 강한 주둥이를 가지고 있어 봉지도 뚫는다. ⅳ) 성충의 행동반경이 커서 잠복하는 범위가 넓다. ⅴ) 성충은 잡식성이고 수명이 길어서 한 마리가 같은 과수원에 여러번 반복하여 날아오거나, 여러 과수원으로 날아가 가해를 계속하기 때문이다.

따라서, 과원에서 이러한 흡수나방의 방제를 위하여 *P. anomala*와 같은 효모 균주의 배양액을 유인제로 하여 적절한 시기에 사용되어진다면 농약을 대체하면서 효과적인 방제방안을 강구할 수 있을 것으로 판단되었다.

Table 7. The relative frequency of lepidopteran pests caught by the attractant with *P. anomala*

	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov
Helicoverpa sp.	-	-	-	r 1 1	2 1 1	1 r r	-	-	-
Spodoptera sp.	-	-	-	r r 1	r 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	-
Heliothis sp.	-	-	-	r r 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 r r	-
Spodoptera sp.	-	-	-	r r 1	1 1 1	1 2 1	r 2 1	1 1 1	1 r r
Carposina sp.	-	r 1 1	1 r 1	1 r r	1 1 r	1 r 1	-	-	-
Adoxophyes sp.	-	-	r 1 1	r 1 1	1 2 1	1 1 1	1 r r	-	-
Grapholita sp.	r r 1	r 1 1	r 2 1	1 1 1	2 r 1	1 2 1	1 2 r	-	-
Adris sp.	-	-	-	r 1 1	1 1 1	2 r 2	1 1 1	1 r r	-
Lagoptera sp.	-	-	-	-	1 1 1	2 2 2	-	-	-
Mamestra sp.	r r 1	1 1 r	r 1 r	-	1 1 1	1 1 r	-	-	-
Pheosia sp.	-	-	-	r r 1	1 1 1	1 r 1	1 r r	-	-
Lyouetia sp.	-	r 1 1	1 1 1	1 r 1	r 1 r	1 1 1	-	-	-
Dichocrocis sp.	1 1 1	1 1 r	1 r 1	1 1 1	1 r r	1 1 1	r r 1	r 1 r	-

* r : < 3 number of moths/night/trap, 1 : ≤15, 2 : ≥ 25

Table 8. The results of field test lepidopteran pests caught by the attractant with *P. anomala*

Korean name	Scientific name	Farmhouse 1	Farmhouse 2
뒷노랑점가지나방	*Arichanna melanaria*	19	13
점박이불나방	*Agrisius fuliginosus*	13	16
홍줄불나방	*Miltochrista striata*	11	9
끝짤름노랑가지나방	*Pareclipsis gracilis*	11	9
흰독나방	*Euproctis similis*	15	10
세줄무늬수염나방	*Herminia arenosa*	11	9
흰줄푸른자나방	*Geometra valida*	12	9
썩은밤나방	*Axylia putris*	16	12
줄점불나방	*Spilarctia seriatopunctata*	15	13
으름밤나방	*Adris tyrannus amurensis*	22	10
쌍띠밤나방	*Mythimna turca*	13	9
포도들명나방	*Herpetogramma luctuosalis*	11	9
말굽무늬들명나방	*Eurrhyparodes contortalis*	13	9
노랑무늬꼬마밤나방	*Acontia bicolora*	11	10
무궁화밤나방	*Lagoptera juno*	20	23
짤름무늬가지나방	*Proteostrenia falcicula*	11	9
참나무갈고리나방	*Agnidra scabiosa*	13	8
무늬박이푸른자나방	*Comibaena procumbaria*	12	10
밤색갈고리나방	*Drepana curvatula*	13	8
쌍띠밤나방	*Mythimna(Mythimna)turca*	12	8
닥나무들명나방	*Glypodes pryeriButler*	14	13
곧은띠비단명나방	*Orthopygia glaucinalis*	13	8
연노랑들명나방	*Evergestis extimalis*	12	8
노랑다리들명나방	*Charema noctescens*	12	8
담배나방	*Helicoverpa assulta*	15	8
심식나방	*Carposina niponensis*	12	10
검거세미나방	*Rhyacia ypsilon*	13	8
배추좀나방	*Plutella xylostella*	13	17
태극무늬밤나방	*Speiredonia retorta*	11	19
순나방	*Hellula undalis*	17	10
	unidentified	21	19
	damaged	29	12
	total	456	353

Figure 11. The farmhouse and insects captured by attractant in this study

Figure 12. The representative moth species captured by *P. anomala* attractant
left : *Lagoptera juno* , right : *Adris tyrannus amurensis*

제 4 장 결 론

나방과 같은 나비목 곤충을 유인하거나 포획하는 데에 설탕과 같은 당(糖) 물질을 이용하는 것은 주지의 사실이다. 여기에는 직접적으로 당을 이용하거나 과일 또는 알코올류 등이 사용되기도 하였다. 당밀의 경우는 복숭아순나방 *Grapholita molesta*, 코들링나방 *Cydia pomonella*, 토마토 과실나방 *Helicoverpa zea*과 밤나방 *Mocis latipes*에 대하여 유인과 포살에 이용되고 있다.

이와 같은 당물질을 이용한 나방의 유인에서 공통적인 것은 휘발성의 ester와 alcohol류 물질과 깊은 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 나방들의 성페로몬 조성이 규명된 종이 나타나고, 실제 이들 페로몬을 이용한 사전 예찰과 유인 기술이 보급되고 있는 상황에서 이와 같은 당물질을 이용한 나방 유인제의 유용성에 대한 보다 세심한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

본 연구의 목적에서와 같이 나방류 해충에 대한 유인과 관련하여 esters, terpenes와 alcohols 등과 같은 방향성 화합물을 생성하는 미생물 균주에 대한 연구들이 진행되었는데, Kiuchi 등(1975)은 꽃과 과일 향기를 생성할 수 있는 *Saccharomyces spp.*와 *Hansenula spp.*를 토양으로부터 분리하였다. Koizumi 등(1988)은 목재 삼출액으로부터 방향성 화합물을 생성하는 효모 균주를 시험하여 *Geotrichum spp., Candida spp.* 와 *Hansenula spp.* 등을 분리하였다.

그러나 이러한 연구는 방향성 화합물을 생성하는 효모 균주에 대한 기본 특성에 대한 것을 연구하였을 뿐, 이들이 생성하는 물질을 이용하여 해충 유인제에 대한 연구는 거의 전무한 실정이다. 따라서, 본 연구는 향후에 *P. anomala* 등이 생성하는 방향성 화합물과 나방을 비롯한 해충 유인의 관계에 대한 규명 연구가 반드시 필요할 것으로 사료되었다.

본 연구결과, 친환경적인 나방 방제를 위하여 효모와 같은 미생물 균주가 생성하는 휘발성 향기 물질을 이용한 유인제의 개발을 위하여 조사한 *P. anomala*의 배양 특성은 기본 배지에 설탕을 첨가한 변형된 GPYA 배지에서 배양할 경우 점점 성장 기울기가 커져 10~12시간대에 가장 큰 성장을 보였고, 12시간 이후에도 성장 증가하는 기울기를 보이는 것으로 보아 GPYA 기본 배지에 비해 정상기 도달시간이 늦게 나타났다. 그리고 24시간 배양 시 GPYA 기본 배지에 배양했을 때보다 1.1배 정도 OD값을 보였다. 균수는 설탕이 첨가된 변형 배지에서 5.27 × 10^8 CFU/㎖로 GPYA 기본 배지에서의 균수 3.69 × 10^8 CFU/㎖ 보다 1.42배 정도 증가한 값을 나타내었다.

*P. anomala*의 탄소원 첨가에 따른 생장율의 변화는 fructose 첨가구에서 성장률이 6~10시간 사이에 가장 큰 기울기를 나타내었고 12시간 이후에도 생장이 계속 증가하는 양상을 보였다. 균수 측정 결과 sucrose는 6%일 때 3.97 × 10^8 CFU/㎖, fructose는 8%일 때 4.57 ×10^8 CFU/㎖로 가장 높은 균수를 나타내었고, 질소원 첨가의 경우, phenylalanine을 0.75% 첨가했을 때,

3.02 × 10^8 CFU/㎖로 최대 생장율을 나타내었고, glycine과 aspartic acid는 동일한 농도에서 각각 2.13 × 10^8 CFU/㎖, 2.20 × 10^8 CFU/㎖으로 phenylalanine를 첨가한 경우보다 낮은 균수를 나타내었다.

효모 균주에 의해 생성되는 휘발성 향기 물질을 분석한 결과, 대부분의 화합물은 esters와 alcohols 종류로서, 주요 화합물은 isobutyl acetate, phenethyl alcohol과 phenylethyl acetate 등으로 분석되었다. 이러한 방향성 화합물은 많은 효모 균주로부터 생성되는데, 이와 같은 esters화합물의 생성은 alcohol acetyltransferase, carboxyl ester hydrolase 및 esterase 등과 같은 효소적 작용에 의해 생성된다고 알려져 있다.

P. anomala 배양액으로부터의 휘발성 향기 성분은 총 20종의 휘발성 향기물질이 검출되었으며, 종류별로는 alcohol류 5종, ester류 8종, acid류 3종, 기타 4종이 검출되었다.

이 중에서 alcohol류 (Phenethyl alcohol, Acetaldehyde-di-cis-3-hexenylacetal) 2종, ester류 (ethyl acetate, isoamyl acetate, Phenylethyl acetate) 3종 및 기타 (E-2-decenal) 1종 등 총 9종의 향기 성분이 주요한 향기성분으로 검출되었다.

휘발성 향기성분의 상대적 농도는 alcohol류와 ester류가 83.42~92.67%로 대부분을 차지하였고, 그 외 acid류 0.22~0.47%로 나타났다. Alcohol류 중 phenethyl alcohol이 상대적 농도 53.25~61.34%로서 가장 높았으며, ethyl acetate, isoamyl acetate 등의 순으로 나타났다.

본 연구에서 제조한 *P. anomala* 배양액으로부터 제조한 유인제를 과원에 설치하여 나방류 해충에 대한 포획실험을 한 결과, 가장 많은 빈도로 유인 포획된 종은 으름밤나방 (*Adris tyrannus amurensis*)과 무궁화밤나방 (*Lagoptera juno*) 2종이다. 이들 종은 각각 32, 43 개체가 포획되어 가장 높은 빈도를 나타내었으며, *P. anomala* 배양액으로부터 제조한 유인제의 유인 향기성분에 가장 강한 유인효과를 나타낸 것으로 판단되었다.

본 연구에서와 같이 *Pichia sp.* 등과 같이 효모 미생물 발효에 의하여 당 물질의 분해과정을 통하여 ester 화합물이 생성되고 발효단계에 따라서 alcohol과 acetate와 같이 방향성 화합물이 생성되는 특성을 이용하여 개발한 나방 유인제는 최근 농업의 흐름이자 한국 농업의 발전 초석이 되는 친환경농업이라는 명제에 가장 부합되는 기술로서 성장이 가능하리라 판단된다.

본 연구에서와 같이 과실 수확기에 주로 피해를 입히는 흡수나방류는 주간에 활동하지 않고 야간에만 과원으로 비래하기 때문에 사실상 합성 농약에 의한 방제도 현장에서는 쉽지 않은 해충류이다.

이처럼 수확이 가까운 과실에 유기합성농약을 사용하지 않고 곤충의 잘 발달한 후각을 이용한 미생물 발효 유인제 설치와 빛에 잘 유인되는 주광성을 이용한 유살등 설치방법으로 흡즙해충에 의한 반점피해를 최소화하는 저공해 농산물 생산뿐만 아니라 우리가 생활하는 환경을 훼손하지 않는다는 데에 더 큰 의의가 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Bestmann, 1. Landolt, P. J.; Mitchell, E. R. Attraction of tobacco budworm moths (Lepidoptera: Noctuidae) to Jaggery, a palm sugar extract. Florida Entomol. 1997, 80, 402-407.

2. Landolt, P. J. Attraction of Mocis latipes (Lepidoptera: Noctuidae) to sweet baits in traps. Florida Entomol. 1995, 78, 523-530.

3. Utrio, P.; Eriksson, K. Volatile fermentation products as attractants for Macrolepidoptera. Ann. Zool. Fenn. 1977, 14, 98-104.

4. Eyer, J. R.; Medler, J. T. Attractiveness to codling moth of substances related to those elaborated by heterofermentative bacteria in baits. J. Econ. Entomol. 1940, 33, 933-940.

5. Suckling, D. M.; Thomas, W. P.; Burnip, G. M.; Robson, A. Monitoring lepidopterous pests at two Canterbury orchards. Proc. 43rd N. Z. Weed Pest Control Conf. 1990, 322-327.

6. Ditman, L. P.; Cory, E. N. The response of corn earworm moths to various sugar solutions. J. Econ. Entomol. 1933, 26, 109-115.

7. Götz, B. Der sexualduftstoff als bekämpfungsmittel gegen die traubenwickler im Freiland. Weinrebe. 1941, 4, 75-89.

8. Butenandt, von A.; Beckmann, R.; Stamm, D.; Hecker, E. Über den sexual-lockstoff des seidenspinners Bombyx mori. Reindarstellung und konstitution. Z. Naturforsch. 1959, 14b, 283-284.

9. El-Sayed, A. M. The Pherobase: Database of insect pheromones and semiochemicals. http://www.pherobase.com, 2004.

10. Patel, S.; Shibamoto, T. Effect of different strains of Saccaromyces cerevisiae on production of volatiles in Napa Gamay wine and Petite Sirah wine. J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 5649-5653.

11. Fu, S.-G.; Yoon, Y.; Bazemore, R. Aroma-active components in fermented Bamboo shoots. J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 549-554.

12. Nonato, E. A.; Carazza, F.; Silva, F. C.; Carvalho, C. R.; de Cardeal, Z. A headspace solid-phase microextraction method for the determination of some secondary compounds of Brazilian sugar cane spirits by gas chromatography. J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 3533-3539.

13. DeMilo, A. B.; Lee, C.-J.; Moreno, D. S.; Martinez, A. J. Identification of volatiles derived from Citrobacter freundii fermentation of a Trypticase Soy broth. J. Agric. Food Chem. 1996, 44, 607-612.

14. Lee, C.-J.; DeMilo, A. B.; Moreno, D. S.; Mangan, R. L. Identification of the volatile components of E802 Mazoferm steepwater, a condensed fermented corn extractive highly attractive to the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae). J. Agric. Food Chem. 1997, 45, 2327-2331.

15. SAS Institute Inc. Statview; SAS Institute Inc.: Cary, NC, 1998.

16. Zar, J. H. Biostatistical Analysis, 3rd ed.; Prentice Hall: New Jersey, 1996.

17. Carneiro, I.; Nobrega, C. The analysis of volatile compounds from Brazilian sugar cane spirit by dynamic headspace concentration and gas chromatography-mass spectrometry. Cienc. Tecnol. Aliment. 2003, 23, 210-216.

18. Landolt, P. J.; Higbee, B. S. Both sexes of the true armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) trapped with the feeding attractant composed of acetic acid and

3-methyl-1-butanol. Florida Entomol. 2002, 85, 182-185.

19. Landolt, P. J.; Alfaro, J. F. Trapping Lacanobia subjuncta, Xestia c-nigrum, and Mamestra configurata (Lepidoptera: Noctuidae) with acetic acid and 3-methyl-1-butanol in controlled release dispensers. Environ. Entomol. 2001, 30, 656-662.

20. Landolt, P. J. New chemical attractants for trapping Lacanobia subjuncta, Mamestra configurata, and Xestia c-nigrum, (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 2000, 93, 101-106.

21. Landolt, P. J.; Hammond, P. C. Species composition of moths captured in traps baited with acetic acid and 3-methyl-1-butanol. J. Lepidop. Soc. 2001, 55, 53-58.

22. Jang, E. B.; Light, D. M.; Binder, R. G.; Flath, R. A.; Carvalho, L. A. Attraction of female Mediterranean fruit flies to the five major components of male-produced pheromone in a laboratory flight tunnel. J. Chem. Ecol. 1994, 20, 9-20.

23. Brossut, R.; Dubois, P.; Rigaud, J. Aggregation in Blaberus craniifer: Isolation and identification of the pheromone. J. Insect Physiol. 1974, 20, 529-543.

24. Bestmann, H. J.; Vostrowsky, O.; Platz, H. Pheromone XII. Male sex pheromones of noctuids. (in Germany). Experientia 1977, 33, 874-875.

25. Turker, L.; Togan, I.; Ergezen, S.; Ozer, M. Novel attractants of Galleria mellonella L (Lepidoptera Pyralidae Galleriinae). Apidologie 1993, 24, 425-430.

26. Chermenskaya, T. D.; Burov, V. N.; Maniar, S. P.; Pow, E. M.; Roditakis, N.; Selytskaya, O. G.; Shamshev, I. V.; Wadhams, L. J.; Woodcock, C. M. Behavioral responses of western flower thrips, Frankliniella occidentalis (Pergande), to volatiles from three aromatic plants. Insect Sci. Appl. 2001, 21, 67-72.

27. Brossut, R. Allomonal secretions in cockroaches. J. Chem. Ecol. 1983, 9, 143-158.

28. Frérot, B.; Foster, S. P. Sex pheromone evidence for two distinct taxa within Graphania mutans (Walker). J. Chem. Ecol. 1991, 17, 2077-2093.

29. Robards, K.; Haddad, P. R.; Jackson, P. E. Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods; Academic Press: New York, 1994.

30. Capenter J. E. et al. 1984. Trapping of different noctuid moth species by one trap baited with two lures. J. Georgia Entomol. Soc. 19 (1) : 120-124.

31. Cheng E. Y. 1996. The application of insect sex pheromone for crop pest management in Taiwan. proc. inter. symp. insect pest control with pheromone.

32. Kim, K. C. 1995. Seasonal occurrence of Spodoptera exigua in Chonnam province and a possibility of their control in vinyl house with pheromone traps. Korean J. appl. entomol. 34(2) : 106-111.

33. Nakamura kazuo. 1984. Male catches of spodoptera litura(F.) in pheromone traps under fluctuating wind velocity : validity of the active space model. Appl. Ent. zool. 19(2) : 192-201.

34. Penton Z. 1996. Flavor volatile sinafruit beverage with automated SPME. *Food Test Anal* 2:16-18.

저작물 이용 허락서

학과	화학공학과	학번	20057100	과정	석사
성명	한글 : 심 영 근 한문 : 沈 永 根 영문 : Shim, Young-Kun				
주소	광주광역시 북구 우산동 4-1 우미프라자 1506호				
연락처	e-mail : shim092@hanmail.net				
논문제목	한글 : *Pichia anomala* 생성 휘발물질을 이용한 생물학적 해충 유인제 개발				
	영문 : Development of the Biological Attractant for harmful insects Using volatile compounds from *Pichia anomala*				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB 구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치의 저장, 전송 등을 허락함.
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경을 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(○) 반대( )

2013년 8월

저작자 : 심 영 근 (인)

조선대학교 총장 귀하

감사의 글

인생의 전환점에서 삶을 돌아보니 제게 있어 학위과정의 길은 학문의 질 보다는 어쩌면 인생공부의 수양과정에 더 가깝지 않았나 싶습니다. 이제 비로소 모든 과정을 마치고 논문의 마지막 마무리를 글로 남기려 하니 옛일이 스쳐 지나가면서 베풀지 못하고 받기만 한 삶을 반성하게 됩니다. 저를 도와 주신 분이 이렇게도 많았음에도 불구하고 일일이 찾아 뵙고 감사드리지 못한는 점은 너그럽게 이해해 주시리라 생각됩니다.

2005년 석사 학위를 시작하여 현재 2013년 2학기가 되어 졸업하게 되어 가장 먼저 오랜 시간 학업에 대한 끈을 놓지 않게 해 주신 이중헌 교수님께 머리 숙여 감사의 말씀을 전하고 싶습니다. 일평생을 공부라는 끈을 놓지 않아야 하는 것이 삶이라지만 때에 맞는 공부가 있다는 것을 이번 논문을 준비하며, 많이 깨달았던 시간인 것 같습니다.

2012년 10월 출생하여 아직 까지 아픈 곳 없이 잘 지내고 있는 절 닮았지만 잘 생긴 우리 아들 재현이와 항상 옆에서 힘이 되어준 저의 아내이자 재현이의 어머니 김안란씨에게 감사드리며, 재현이와 저의 아내를 항상 걱정하고 맛있는 음식으로 활력을 넣어 주신 장모님께도 많은 감사를 드립니다.

부족한 회사에서 많은 도움을 주신 저희 회사 연구소장 최환석 박사님과 저의 옆을 보좌해주는 심흥선대리 그리고 우리 회사 살림을 맞고 있는 이경숙과장에게도 감사드립니다.

저의 논문이 잘 마무리 될 수 있도록 끝까지 따뜻한 충고와 격려의 말씀을 아끼지 않으셨던 김정규교수님, 바쁜 시간에도 많은 배려를 해 주신 이재욱교수님, 신현재교수님께도 진심어린 감사의 말씀을 전하고 싶습니다.

학부에서 유전공학을 전공했던 저에게 많은 힘이 되어 준 김의진 박사과정 학생과 이번에 같이 졸업을 앞두고 있는 김현우박사에게도 감사의 인사를 드리고 싶습니다.

마지막으로 현재 투병 중에 계시지만 둘째아들을 항상 걱정해 주시는 저의 인생의 모델인 아버지와 어머니께 감사의 말씀을 전하고 싶습니다.

"앞으로 20년이 지나면 당신은 당신이 한 일보다는 하지 않은 일들 때문에 더 후회할 것이다. 그러니 닻을 올려 안전한 포구를 떠나라. 당신의 돛에 무역풍을 가득 안고 출발하여 탐험하라, 꿈꾸라, 그리고 발견하라."

마크 트웨인의 이 글처럼 가족/회사의 시구들과 함께 인생을 탐험하며 꿈꾸고 발견하는 새로운 항해를 다시 시작하고자 합니다. 하늘만을 바라보며 꿈을 꾸고 희망을 노래하고자 합니다.

감사합니다.