Korean Journal of Environmental Agriculture

Korean J Environ Agric. 2017;36(1):36-42. Korean
Published online 2017 March 29. https://doi.org/10.5338/KJEA.2017.36.1.05

Online ISSN: 2233-4173
Print ISSN: 1225-3537

Research Article

Open Access

Pseudomonas sp. EP-3에 의한 진딧물 살충성 rhamnolipid 생산을 위한 유자씨앗 부산물의 재활용

임다정[1†], 박태현[2†], 양시영[1], 김진철[1], 김인선[1*]

[1]전남대학교 농화학과, 친환경농업연구소, [2]LG 팜한농(주)

Reuse of Yuza Seed By-product for Production of Aphicidal Rhamnolipid by *Pseudomonas* sp. EP-3

Da Jung Lim[1†], Tae Hyun Park[2†], Si Young Yang[1] Jin Cheol Kim and In Seon Kim[1*] ([1]Department of Agriculture chemistry, Institute of Environmentally Friendly Agriculture, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea, [2]Crop Protection R&D Center, LG Farmhannong, Nonsan 33010, Korea)

Received: 9 February 2017 / Revised: 16 March 2017 / Accepted: 24 March 2017

ORCID
In Seon Kim
http://orcid.org/0000-0003-1061-6848

Abstract

BACKGROUND: Yuza seed by-product has been produced in a large amount from the agricultural farms in the southern area of Korea. It has been mostly abandoned after commercial process for the production of juice, jam and tea. The study on the reuse of the yuza seed by-product has received much attention as a bio-resource material for the production of active compound in agriculture.
METHODS AND RESULTS: Insecticidal rhamnolipid-producing *Pseudomonas* sp. EP-3 was grown in mineral salt media with the yuza seed by-product at 2, 20, 50 and 100 g/L. The growth of EP-3 was accompanied by a increase in insecticidal activity against green peach aphid. The highest insecticidal activity was observed when EP-3 was grown in the medium containing 50 g/L of the seed sample, producing approximately 996 mg/L of rhamnolipid at 96 h. Palmitic acid, stearic acid, oleic acid and linoleic acid were determined as the major fatty acids of the seed sample. The EP-3 cultures grown on the fatty acid mixture extracted from the seed sample showed a aphid mortality similar to that of cultures grown on the seed sample. The EP-3 cultures grown on 50 g/L of the seed sample showed aphid mortality more than 90% under greenhouse conditions.
CONCLUSION: This study suggested that the yuza seed by-product may be used as a renewable material for microbial production of rhamnolipid against green peach aphid.

Key words: Aphid, Biopesticide, Biosurfactant, Rhamnolipid, Yuza

†These authors contributed equally to this work.
*Corresponding author: In Seon Kim
Phone: +82-62-530-2131; Fax: +82-62-530-2139;
E-mail: mindzero@jnu.ac.kr

서 론

유자(*Citrus junos*)는 국내에서 매년 13,000~15,000 M/T 수준으로 생산되어 쥬스, 식초, 향료, 잼 등의 가공식품으로 널리 판매되고 있다. 가공식품으로 제조되는 과정에서 발생하는 유자의 부산물은 전체 생산량의 10% 수준인 것으로 예측되고 있으며(유자 생산 및 유자차 수출동향, 2013) 주요 부산물은 껍질과 씨앗으로서 대부분 폐기물로 버려진다. 유자가공식품공장은 부산물의 처리를 위해 다양한 방법을 강구하고 있지만 특별한 대책이 없어 공장주변에 적재하여 보관하고 있으며 보관기간 동안 발생하는 냄새로 인해 좋지 않은 근무환경이 만들어지고 있다. 따라서 유자의 부산물을 재활용하는 방법을 강구하여 유자가공식품의 생산에 도움을 제공하고 궁

극적으로 순환적인 농가소득을 보전하는 대안이 필요하다.

유자는 특성상 과피가 두껍고 씨가 많아 다른 과실류에 비해 착즙 후 회수율이 상대적으로 낮아 부산물에 영양성분이 많이 함유되어 있다. 따라서 유자의 부산물에 함유된 영양성분을 미생물의 배양에 이용하여 농업에 필요한 기능성 물질을 생산하는 기술은 유자의 부산물을 재활용하는 경제적인 방안이 될 수 있다. 실제로 미생물의 대사산물을 생산하는데 있어서 배양기질의 경제적인 부담을 줄이기 위해 생물소재 부산물을 이용하는 연구가 진행되고 있다(Grohmann and Baldwin, 1994; Gema *et al.*, 2002). 특히 과일에서 발생하는 부산물은 유기물과 당의 함량이 높아 미생물의 배양에 의한 기능성 물질을 생산하는데 활용될 수 있는 적합한 생물자원으로 인식되고 있다(Bouallagui *et al.*, 2005; George and Jayachadran, 2009; Jeong *et al.*, 2009).

복숭아혹진딧물은 작물의 잎과 줄기를 포함한 전반적인 부위에 기주하면서 영양분을 흡즙함으로서 작물의 생장에 심각한 피해를 일으키는 주요 해충이다(Choi *et al.*, 1984; Seo *et al.*, 2005). 복숭아혹진딧물을 방제하기 위하여 다양한 합성농약들이 개발되어 사용되고 있으나 반복적인 사용으로 약제저항성을 유발할 가능성이 있으며(Silva *et al.*, 2012) 잔류독성으로 인해 농식품의 안전성을 위협할 수 있다는 문제가 제기되고 있다(Wilson and Otsuki, 2004; Carvalho, 2006). 이에 합성농약의 사용을 줄이기 위해서 최근에는 친환경적인 해충방제법이 연구되고 있으며 미생물제제가 그 대표적인 방법이다(Isman, 2005; Goettel *et al.*, 2008). 미생물제제는 대량생산이 가능하고 환경에 노출되었을 경우 인축 및 작물에 대한 부작용을 유발할 가능성이 낮아 효과적이라고 알려져 있다(Nga and Kumar, 2008; Pardo-López *et al.*, 2012). 하지만 농촌진흥청에 등록된 미생물제제 목록을 살펴볼 때 현재까지 개발된 미생물제제는 주로 섭식성 해충을 방제하는 제제가 대부분이며 진딧물 같은 흡즙성 해충을 방제하는 제제는 유효성분을 고려할 때 매우 미비하다. 또한 미생물제제를 개발하는 산업체에 따르면 미생물 배지의 가격에 대한 경제적인 부담으로 인해 제제개발에 어려움을 갖고 있다. 따라서 가격이 저렴한 배양배지를 이용하여 미생물제제를 생산하는 기술개발에 대한 연구가 필요하다.

본 연구에서는 대량으로 폐기되는 유자씨앗 부산물을 재활용하는 방안의 하나로서 미생물에 의한 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*) 방제용 살충물질의 생산에 관한 연구를 수행하고자 살충물질의 생산을 위해 유자씨앗 부산물의 활용성을 조사하고 이의 진딧물에 대한 살충효능을 실내 및 시설재배 조건에서 시험하였다.

재료 및 방법

시약 및 용매

본 연구에 사용된 용매는 HPLC급(Fisher Scientific, MA, USA)을 사용하였다. 시약은 EP급(Juicei Chemical Co., Tokyo, Japan)을 사용하였으며 rhamnolipid 표준품(>95%)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

유자씨앗 부산물

유자씨앗 부산물은 전라남도 고흥에 위치한 유자 가공식품 공장인 두원농협에서 제공받았다. 유자씨앗 부산물은 껍질을 제거한 후 수돗물에서 충분히 세정한 다음 50℃에서 24시간 동안 열풍건조 후 믹서로 분쇄하여 시료로 사용하였다.

공시균주

본 연구에 사용된 공시균주는 복숭아혹진딧물에 대해 살충활성을 갖는 rhamnolipid를 생산한다고 알려져 있는 *Pseudomonas* sp. EP-3 (Kim *et al.*, 2011)로서 2, 20, 50, 100 g/L의 유자씨앗 시료 또는 50 g/L의 glucose를 함유한 최소무기염류배지에서 배양하였다. 최소무기염류배지는 Na_2HPO_4 5.7 g/L, KH_2PO_4 5.4 g/L, $NaNO_3$ 4.0 g/L, 그리고 $CaCl_2$ 1.0 g/L로 구성하였다. EP-3의 생장은 배양시간별로 배양액의 일부를 Luria Broth (LB) 고체배지에 희석하여 평판한 다음 25℃에서 24시간 동안 배양 후 나타난 균체수를 계수하여 조사하였다.

살충물질의 추출 및 함량조사

Pseudomonas sp. EP-3 (EP-3)가 생산하는 rhamnolipid의 추출 및 정제는 Kim 등(2011)의 방법에 준하여 수행하였으며 이의 함량은 LC/MS/MS 분석을 통해 조사하였다. 상기에서 얻은 배양액(100 mL)을 8,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 균체를 제거한 다음 상징액에 동일부피의 ethyl acetate를 가하여 2회 추출하였다. 얻어진 유기용매층을 50℃에서 감압농축하여 조추출물을 얻은 다음 silica gel SPE (Phenomenex, CA, USA) column에서 정제하였다. 시료를 50% chloroform이 함유된 6 mL의 ethyl acetate에 용해하여 SPE column에 가한 다음 ethyl acetate의 함량을 10%씩 증가시키면서 6 mL의 혼합용매로 용출하여 세정하였다. 용출액은 모두 제거하고 column에 다시 50% ethyl acetate를 함유한 6 mL의 methanol를 가해 용출한 다음 이를 받아 40 ℃에서 농축하였다. 농축물은 methanol에 재용해하여 HPLC MS/MS 분석을 하였다.

MS/MS는 API 4000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems)이었다. HPLC는 Shimadzu LD 20AD 모델로서 칼럼은 Phenomenex C18 stainless column (100×4.60 mm, 2.6 μm)을 사용하였고 이동상은 0.1% formic acid와 5 mM ammonium formate가 첨가된 증류수와 acetonitrile의 혼합용매 (7:3, v/v)로서 유속은 0.3 mL/min이었다. 시료에 함유된 rhamnolipid의 함량은 MS/MS 분석에서 rhamnolipid의 쪼개짐 이온(daughter ion)인 m/z 315.1$(M+Na)^+$을 갖는 dirhamnose를 표준품 rhamnolipid의 표준검량선에서 정량하여 산출하였다(Pereira *et al.*, 2012). 한편, rhamnolipid를 정성적으로 조사하기 위해 상기에서 얻은 조추출물을 얇은 막 크로마토그래피(TLC,

Silica gel 60 F_{254}, 20×20 cm, Merck)에서 전개하였다. TLC 전개용매는 chloroform : methanol : formic acid (80 : 20 : 0.1, v/v/v) 혼합용매이었으며 전개 후 10% 황산수용액을 분무하여 100℃ 건조기에서 발색시켜 rhamnolipid를 검출하였다.

진딧물 살충효능 시험

진딧물 살충효능 시험은 Kim 등(2007)의 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 실험실에서 순치시킨 균일한 크기의 2령 복숭아혹진딧물 유충(10 마리)을 3주간 생장한 배추잎(3.0×3.0 cm)에 안치한 다음 증류수를 적신 여과지(Whatman No. 6)가 배치된 곤충생육용 플라스틱 용기에 옮겼다. 안치 후 진딧물을 온도 25℃ 및 습도 70% 조건을 갖는 배양실에서 12시간 동안 순치하였다. 순치 후 상기에서 얻은 EP-3 배양액을 마이크로 피펫을 이용해 진딧물에 국소처리하였다. Rhamnolipid를 함유한 조추출물의 살충효능 시험은 10% (v/v) methanol을 함유한 증류수에 용해하여 상기와 같이 수행하였다. 대조구는 최소무기염류배지 또는 10% (v/v) methanol이었으며 예비실험을 통해 살충효능에 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 살충효능은 시료처리 24시간 후 진딧물의 생충수와 사충수를 고려한 Abbott(1925) 방법에 준하여 조사하였으며 모든 실험은 3반복으로 수행하였다.

유자씨앗의 성분 분석

EP-3가 유자씨앗의 어떤 성분을 양분으로 사용하는지 유자씨앗 시료 중 단백질, 지방 및 탄수화물 등의 주요 성분을 분석하였다. 단백질의 함량은 Kjeldahl법을 적용하여 식품 중 질소의 함량을 단백질 함량으로 환산하였으며 지방의 함량은 Soxhlet 추출장치로 추출하여 중량법으로 측정하였고 수분은 105℃ 상압가열 건조법, 그리고 회분의 함량은 600℃ 회화법으로 조사였다. 탄수화물의 함량은 시료 100 g 중 수분, 단백질, 지방 및 회분의 함량을 제외한 차감법으로 산출하였다(2011년 식품공전 시험법).

또한 유자씨앗에 함유된 지방산을 분석하기 위해 유자씨앗 시료 5 g을 100 mL의 chloroform : methanol (2 : 1,v/v) 혼합용매에 2시간 동안 침지추출하였다. 추출물은 감압여과하여 잔여물을 제거한 다음 여과액을 200 mL의 chloroform : methanol : 0.9% NaCl (3 : 50 : 47, v/v) 혼합용매로 추출하였다. 추출 후 chloroform 층을 수거한 다음 감압농축하여 지방추출물(50 mg)을 얻었다. 지방추출물은 5 mL의 NaOH : methanol : H_2O (3 : 10 : 10, v/v/v) 혼합용매에 재용해한 다음 80℃ 조건의 중탕에서 25분 동안 비누화반응을 시켰다. 반응액을 상온에서 냉각시킨 후 30% (v/v) 6N HCl 수용액을 함유한 10 mL의 methanol을 가한 다음 80℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 시료를 상온에서 냉각시킨 다음 동일 부피의 hexane : methyl *tert*-butyl ether (1 : 1, v/v) 혼합용매로 추출하였다. 추출 후 hexane 층을 무수황산나트륨에서 탈수시킨 후 질량분석기를 이용하여 지방산을 분석하였다(Kim *et al.*, 2011). 질량분석기는 Shimadzu QP2010 (Tohyo, Japan) 모델로서 분석컬럼은 DB5-MS (30 m×0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness)이었다. 이동상은 헬륨으로서 유속은 1 mL/min 이었으며 시료 주입방법은 split mode로서 비율은 20:1이었다. 컬럼온도는 50℃에서 2분 동안 유지한 후 분당 5℃씩 280℃까지 승온하여 최종온도 280℃에서 10분 동안 유지하였다. 시료의 이온화는 70 eV의 electronic ionization mode에서 수행하였다.

유자씨앗 지방추출물을 이용한 EP-3의 배양

EP-3가 유자씨앗 지방을 기질로 이용하여 rhamnolipid를 생산하는지 조사하기 위해 유자씨앗에서 추출한 지방을 탄소원으로 하여 최소무기염류배지에서 배양하였다. 배양 후 상기와 같이 배양액을 진딧물에 국소처리하여 살충효능을 조사하였으며 TLC 전개를 통해 살충물질을 분석하였다.

시설재배 조건에서 진딧물 살충효능 시험

농가현장에서 EP-3 배양액의 복숭아혹진딧물에 대한 살충효능시험은 농촌진흥청 약효시험기준법에 준하여 전라남도 나주시 남평읍 평산리에 위치한 시설재배 고추농가에서 실시하였다. 자연적으로 발생한 복숭아혹진딧물이 50 마리 이상 서식하고 있는 5 그루의 고추나무에 상기에서 얻은 EP-3 배양액을 고르게 살포하였다. 살충효능은 살포 전 전체 진딧물 생충수 대비 살포 24시간 후 사충수의 비율을 백분율로 환산하여 조사하였다.

통계처리

본 연구에서 시험결과의 통계적 유의성은 IBM SPSS statistics 21.0 software를 이용하여 분석하였다. 모든 값은 평균±표준편차 값으로 나타내었고 각 평균치의 통계적 유의성을 $P<0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

EP-3의 생장과 살충물질 생산

유자씨앗 배지에서 EP-3의 생장율을 경시적인 균체수 변화를 기준으로 조사한 결과 배양 18시간 후부터 가장 많았다(Fig. 1). 균체수는 배지에 첨가한 유자씨앗 시료의 함량에 비례하여 증가하였으며 50 g/L에서 가장 많았다. 한편 glucose 배지의 경우 유자씨앗 배지에 대비하여 낮은 균의 생장을 보였다. 이러한 결과는 유자씨앗 배지가 상업적으로 판매되고 있는 glucose 배지보다 EP-3의 생장에 효율적인 양분으로 사용될 수 있음을 의미하였다. 배지에 첨가된 유자씨앗 시료의 함량을 50 g/L 이상으로 증가하여 균의 생장을 조사한 결과 균의 생장이 점점 낮아졌다. 또한 유자씨앗 시료의 함량을 50 g/L 이상으로 할 경우 균을 적절하게 배양하기 위해 배양기의 진탕속도를 증가시킬 필요가 있었다. 따라서 동일한 조건에서 EP-3의 생장을 위한 유자씨앗 시료의 최적함량은

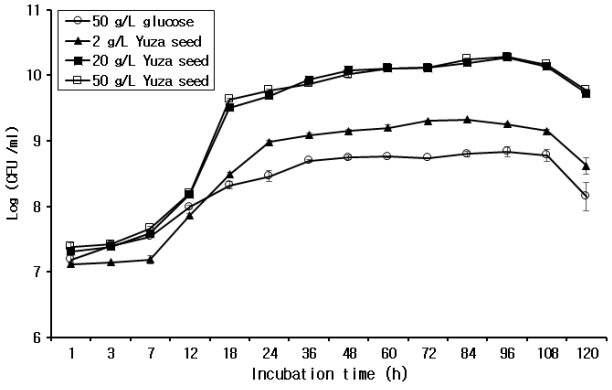

Fig. 1. Growth of *Pseudomonas* sp. EP-3 on the yuza seed by-product or glucose.

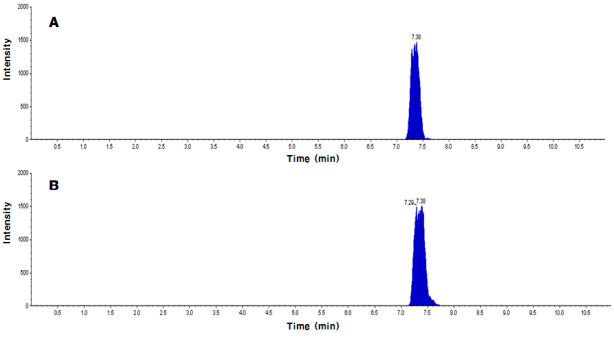

Fig. 2. LC/MS/MS total ion chromatograms of dirhamnose from the extracts of cultures grown on 5% (w/v) glucose (A) and 5% (w/v) yuza seed by-product. The total ion chromatograms were obtained from the fragmented ion at $(M+Na)^+$ *m/z* 315.1 generated from rhamnolipid.

50 g/L 수준으로 정하여 향후 시험을 수행하였다.

EP-3가 생장하면서 생산된 rhamnolipid의 함량을 LC/MS/MS 및 TLC 분석을 통해 정량적 및 정성적으로 조사한 결과를 Fig. 2와 3에 제시한 바와 같았다. 배양 48 시간 후 EP-3를 50 g/L의 유자씨앗 배지에서 배양한 경우 rhamnolipid의 함량이 약 996 mg/L 수준이었으며 이는 동일한 조건에서 glucose 배지에서 배양한 경우의 함량인 약 124 mg/L에 비해 8배 높았다(Table 1). 또한 상기에서 얻은 EP-3의 배양액을 진딧물에 처리하여 살충효능을 조사한 결과 배양액을 10배 희석하였을 경우 유자씨앗 배양액의 살충효능은 13.64~81.82% 수준이었다. 특히 50 g/L의 유자씨앗 배양액의 경우 살충효능이 glucose 배양액에 비해 2.7배 이상 높았다(Table 2). 이러한 결과는 EP-3에 의한 rhamnolipid를 생산하기 위해 유자씨앗 부산물이 활용될 수 있음을 의미하였다.

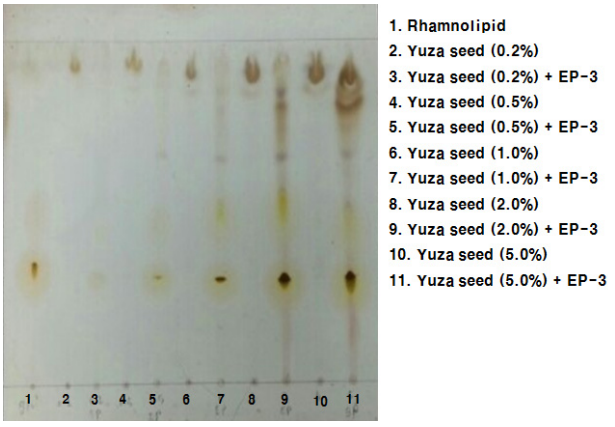

Fig. 3. Thin layer chromatograms of the extracts of yuza seed by-product or cultures grown on yuza seed by-products.

Table 1. Rhamnolipid concentration in *Pseudomonas* sp. EP-3 cultures grown on glucose or the yuza seed by-product

Medium (50 g/L)	Rhamnolipid (mg/L)*
Yuza seed	996.0±40.7
Glucose	123.5±4.3

*The data are means ± SD of triplicate.

유자씨앗 부산물의 화학적 성분과 EP-3의 생장

EP-3의 배양에 이용된 유자씨앗 시료의 주요 성분을 단백질, 지방, 탄수화물 등을 기준으로 조사한 결과 단백질 14.9%, 지방 27.5%, 그리고 탄수화물 52.4%으로서 농수산물유통공사의 연구결과(Lee *et al.*, 1987)와 유사하였다. EP-3 균주를 접종하지 않고 유자씨앗 배지만을 48시간 동안 진탕 후 배지

Table 2. Aphid mortality of *Pseudomonas* sp. EP-3 cultures grown on glucose or the yuza seed by-product

Medium	Aphid mortality (%)*		
	Without cultures	With cultures	
		Not diluted	10X diluted
Yuza seed (2 g/L)	4.6±13.6f	61.4±7.9c	13.6±3.9ef
Yuza seed (20 g/L)	22.7±10.4de	100.0±0.0a	59.2±6.8c
Yuza seed (50 g/L)	13.6±10.4ef	100.0±0.0a	81.8±7.9b
Glucose (50 g/L)	3.6±11.2f	100.0±0.0a	29.6±10.4d

*The data are means±SD of triplicate. Means with different superscripts within the column are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 3. Aphid mortality of *Pseudomonas* sp. EP-3 cultures grown on the yuza seed by-product at 50 g/L or the yuza seed lipid at 1.2 g/L

Fraction of culture	Aphid mortality (%)*	
	Yuza seed	Yuza seed lipid
1/8	100.0±0.0a	93.0±0.0a
1/24	86.1±14.0a	55.8±10.7b
1/72	51.2±7.0b	48.8±21.3bc

*The data are menas±SD of triplicate. Means with different superscripts within a column are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

수용액에 용출된 성분을 분석한 결과 단백질, 지방 및 탄수화물의 함량이 매우 낮았다. 또한 원심분리하여 유자씨앗 시료를 제거한 후 얻은 수용액에 EP-3 균주를 배양하였을 때 균의 생장이 Fig. 1의 결과 대비 현저하게 낮았다. 이러한 결과는 유자씨앗 배지에서 EP-3는 수용액에 용출된 성분보다 유자씨앗 자체에 함유된 성분을 이용하여 생장한다는 것을 의미하였다.

EP-3가 콩기름을 탄소원으로 이용하여 생장하면서 rhamnolipid를 생산하는 능력이 있다는 연구결과(Kim *et al.*, 2011)를 고려할 때 EP-3가 유자씨앗 시료에 함유된 성분 중 지방을 이용하여 생장하였을 것으로 추측되었다. 이에 유자씨앗 시료의 지방을 분석한 결과 주요 지방산은 palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid 등으로 함량비율은 각각 21.2%, 1.9%, 29.3%, 47.6%이었다. EP-3 균주를 50 g/L의 유자씨앗 시료 또는 동일한 양의 유자씨앗 시료에서 추출한 지방을 무기염류배지에 탄소원으로 첨가하여 배양한 후 얻은 배양액의 살충효능을 조사한 결과 Table 3과 같았다. 유자씨앗 시료로 구성된 배지에서 생장한 균주의 배양액을 8배, 24배, 72배 희석하였을 때 살충효능은 각각 약 100%, 86%, 51% 수준이었다. 한편, 동일한 양의 유자씨앗 시료에서 추출한 지방으로 구성된 배지에서 생장한 균주의 배양액을 8배, 24배, 72배 희석하였을 때 살충효능은 각각 약 93%, 55%, 48% 수준으로서 유자씨앗 시료에서 생장한 배양액의 살충효능과 유사하였다. Rhamnolipid는 생물학적 계면활성제로서 소수성 기름성분을 수용액에 유화시키는 능력이 있는 것으로 알려져 있다(Ron and Rosenberg, 2002; Thavasi *et al.*, 2011). 또한 생물학적 계면활성제를 생산하는 미생물은 소수성 기름성분에 부착하여 생장하는 능력이 있는 것으로 알려져 있다(Abouseoud *et al.*, 2008; George and Jayachandran, 2012). 상기와 같은 결과와 배경을 고려할 때 EP-3 균주는 유자씨앗 시료에 함유된 지방(산)을 탄소원으로 이용하여 생장하면서 rhamnolipid를 생산하였을 것으로 예측되었다.

시설재배 조건에서 EP-3 배양액의 진딧물 살충효능 시험

EP-3 균주를 50 g/L의 glucose 배지와 50 g/L의 유자씨앗 배지에서 배양한 후 배양액을 고추나무에 발생한 복숭아혹진딧물에 살포한 다음 24시간 후에 살충효능을 조사한 결과 Fig. 4와 같았다. 유자씨앗 배지의 경우 배양액을 8배 희석하였을 때 살충효능이 80% 수준으로서 동일 조건에서 배양한 glucose 배지의 배양액 보다 살충효능이 7배 이상 높았다. Glucose 배지에서 얻어진 배양액의 경우 80%의 살충효능을 달성하기 위해서는 2배까지만 희석해야 하였다. 이러한 결과는 유자씨앗 시료가 EP-3의 진딧물 살충물질을 생산하기 위해 기질로 활용될 수 있다는 것을 의미하였다. 미생물에 의한 rhamnolipid의 생산과 관련하여 배양환경과 공급되는 탄소원 및 질소원에 따라 함량을 현저하게 증가시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다(Chayabutra *et al.*, 2001; Mata-Sanddoval *et al.*, 2001; Deepika *et al.*, 2016). 이러한 배경을 고려할 때 EP-3의 배양공정에 대한 연구가 향후 수행된다면 보다 많은 rhamnolipid의 생산을 통해 높은 살충효능을 갖는 제제의 개발이 가능할 것으로 생각되었다.

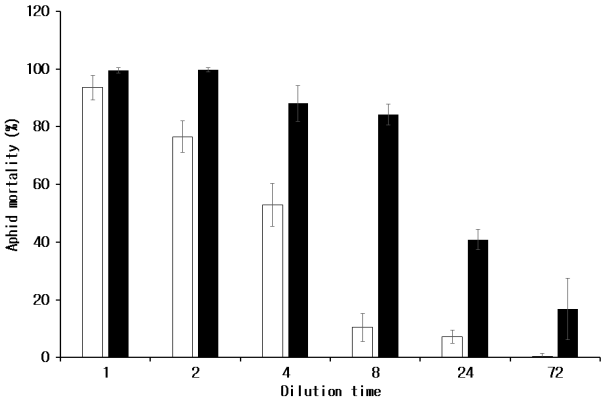

Fig. 4. Aphid mortality under greenhouse conditions of *Pseudomonas* sp. EP-3 cultures grown on glucose (□) or the yuza seed by-product (■) at 50 g/L.

Acknowledgment

This study was supported partially by a grant from the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology (IPET) in the program (0315007031HD020) of Advanced Production Technology Development, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Korea.

References

Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology, 18, 265-267.

Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S., & Nabi, A. (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Desalination, 223, 143-151.

Bouallagui, H., Torrijos, M., Godon, J. J., Moletta, R., Cheikh, R. B., Touhami, Y., Delgenes, J. P., & Hamdi, M. (2004). Two-phases anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes: bioreactors performance. Biochemical Engineering Journal, 21, 193-197.

Carvalho, F. P. (2006). Agriculture, pesticides, food security and food safety. Environmental Science and Policy, 9, 685-692.

Chayabutra, C., Wu, J., & Ju, L. (2001). Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: Effects of limiting nutrients and carbon substrates. Biotechnology and Bioengineering, 72, 25-33.

Choi, H. K., So, I. Y., & Park, K. H. (1984). Studies on the correlation between virus diseases and aphid vectors in radish fields. Korean Journal of Plant Protection, 23, 28-36.

Deepika, K. V., Kalam, S., Sridhar, R. R., Podile, A. R., & Bramhachari, P. V. (2016). Optimization of rhamnolipid biosurfactant production by mangrove sediment bacterium *Pesudomonas aeruginosa* KVD-HR42 using response surface methodology. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 5, 38-47.

Gema, H., Kavadia, A., Dimou, D., Tsagou, V., Komaitis, M., & Aggelis, G. (2002). Production of ɣ-linolenic acid by *Cunninghamella echinulata* cultivated on glucose and orange peel. Applied Microbiology and Biotechnology, 58, 303-307.

George, S., & Jayachandran, K. (2009). Analysis of rhamnolipid biosurfactant produced through submerged fermentation using orange fruit peelings as sole carbon source. Applied Biochemistry and Biotechnology, 158, 694-705.

George, S., & Jayachandran, K. (2012). Production and characterization of rhamnolipid biosurfactant from waste frying coconut oil using a novel *Pseudomonas aeruginosa* D. Journal of Applied Microbiology, 114, 373-383.

Goettel, M. S., Koike, M., Kim, J. J., Aiuchi, D., Shinya, R., & Brodeur, J. (2008). Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. Journal of Invertebrate Pathology, 98, 256-261.

Grohmann, K., & Baldwin, E. A. (1994). Fermentation of Galacturonic acid and other sugars in orange peel hydrolysates by the ethanologenic strain of *Escherichia coli*. Biotechnology Letters, 16(3), 281-286.

Isman, M. B. (2005). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annual Review of Entomology, 51, 45-66.

Jeong, T. Y., Lee, J. H., Chung, H. K., Cha, H. J., & Choi, S. S. (2009). Mathane production using peel-type fruit wastes and sewage sludge in batch anaerobic digestion process. Journal of Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry, 20, 542-546.

Kim, S. K., Kim, Y. C., Lee, S., Kim, J. C., Yun, M. Y., & Kim, I. S. (2011). Insecticidal activity of rhamnolipid isolated from *Pseudomonas* sp. EP-3 against green peach Aphid (*Myzus persicae*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 934-938.

Kim, S. K., Kim, S. R., Choi, M. S., Park, C. E., Kim, Y. C., Kim, K. Y., Whang, K. S., Oh, K. T., & Kim, I. S. (2007). Soybean oil-degrading bacterial cultures as a potential for control of green peach aphid (*Myzus persicae*). Journal of Microbiology and Biotechnology, 17, 1700-1703.

Lee, H., Kim, Y., Shin, D., & Sun, B. (1987) Aroma components in korean citron (*Citrus medica*). Korean Journal of Food Science and Technology, 19, 361-365.

Mata-Sanddoval, J. C., Karns, J., & Torrents, A. (2001) Effects of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2. Microbiological Research, 155, 249-256.

Nga, L. T., & Kumar, P. (2008). Contributions of parasitosis and *Bacillus thuringiensis* to the management of Diamondback Moth in highland crucifer production in Da Lat, Vietnam. Journal of Asia-Pacific Entomology, 11, 59-64.

Pardo-López, L., Soberón, M., & Bravo, A. (2013). *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. FEMS Microbiology Reviews, 37, 3-22.

Pereira, J. F. B., Gundina, E. J., Dória, M. L., Domingues, M. R., Rodrigues, L. R., Teixeira, J. A., & Coutinho, J. A. P. (2012) Characterization by electrospray ionization and tandem mass spectrometry of rhamnolipids produced by two *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from Brazilian crude oil. European Journal of Mass Spectrometry, 18, 399-406.

Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. Current Opinions in Biotechnology, 13, 249-252.

Seo, M. J., Jang, J. K., Kang, E. J., Kang, M. K., Kim, N. S., Yu, Y. M., & Youn, Y. N. (2005). Feeding Behavior in the plant tissues with green peach aphid (*Myzus persicae*, Aphididae; Homoptera) using EPG thchnique.

Korean Journal of Applied Entomology, 44, 271-276.

Silva, A. X., Bacigalupe, L. D., Luna-Rudloff, M., & Figueroa, C. C. (2012). Insecticide resistance mechanisms in the green peach aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) Ⅱ: Costs and benefits. Journal of the Plos One, 7, e36810.

Thavasi, R., Jayalakshi, S., & Banat, I. M. (2011). Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. Bioresource Technology, 102, 3366-3372.

Wilson, J. S., & Otsuki, T (2004). To spray or not to spray: pesticides, banana exports, and food safety. Food Policy, 29, 131-146.