

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.

A01N 63/00 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

(11) 공개번호

10-2006-0063833

(43) 공개일자

2006년06월12일

(21) 출원번호 10-2006-0041698(분할)

(22) 출원일자 2006년05월09일

(62) 원출원 특허10-2004-0065272

원출원일자 : 2004년08월19일

심사청구일자

2004년08월19일

(71) 출원인 고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

황병국

서울 강남구 역삼2동 개나리아파트 42동 303호

이지연

전북 전주시 완산구 서신동 롯데아파트 105동 107호

이정엽

경기 고양시 일산동구 마두1동 정발마을 건영빌라 704동 204호

정호원

서울 성북구 돈암동 한신아파트 107동 1903호

(74) 대리인

김선애

심사청구 : 있음

(54) 식물병원균에 항균활성을 가지는 신규 스트렙토마이세스고양엔시스 브이케이-에이60 균주 및 이 균주로부터생산되는 살균제

요약

본 발명은 토양으로부터 분리한 신규의 스트렙토마이세스 고양엔시스 VK-A60(*Streptomyces koyangensis* sp. nov. VK-A60) 균주와 이 균주 배양액으로부터 분리, 추출되는 항생물질인 4-페닐-3-부테노익애시드(4-Phenyl-3-butenic acid)의 제조방법 및 이 항생물질을 유효성분으로 하는 식물병 방제용 살균제에 관한 것이다. 상기한 구성의 본 발명에 의하면, 오이탄저병, 벼도열병 등의 식물병 방제에 사용될 수 있는, 유기합성계 농약 수준의 높은 방제효과를 가지고 있으면서도 저독성이고 환경에 부작용을 일으키지 않는 친환경적 무공해 살균제를 제공할 수 있다.

대표도

도 1

색인어

식물병원균, 스트렙토마이세스, 살균제, 오이탄저병, 벼도열병

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 의한 스트렙토마이세스 고양엔시스 VK-A60 균주의 주사전자현미경 사진.

도 2는 스트렙토마이세스 30여종의 16S rDNA 염기서열을 바탕으로 한 계통도.

도 3은 배양 배지와 배양 시간에 따른 본 발명에 의한 스트렙토마이세스 고양엔시스 VK-A60 균주의 식물병원균에 대한 억제효과를 보인 그래프.

도 4는 본 발명에 의한 스트렙토마이세스 고양엔시스 VK-A60 균주의 배양 여액에서 4-페닐-3-부테노익애시드를 정제하는 과정을 보인 공정도.

도 5는 온실조건의 콧실험에서 본 발명에 의한 항생물질의 벼도열병과 오이탄저병에 대한 방제효과를 상용살균제인 트리사이클라졸(Tricyclazole) 및 클로로탈로닐(Chlorothalonil)과 비교 시험한 결과를 나타내는 그래프.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 식물병원성 진균에 대해 항균활성을 가지는 신규의 스트렙토마이세스 고양엔시스(*Streptomyces koyangensis* sp. nov.) 균주, 및 그로부터 생산되는 항생물질을 이용하는 살균제에 관한 것이다. 보다 상세하게는 오이탄저병균, 벼도열병균 등의 식물병원성 진균에 대해 항균효과를 나타내는 항생물질인 4-페닐-3-부테노익애시드(4-Phenyl-3-butenic acid)를 생성, 분비함으로써 항진균성 활성을 가지는 신규의 스트렙토마이세스 고양엔시스 VK-A60(*Streptomyces koyangensis* sp. nov. VK-A60) 균주, 및 그로부터 생산되는 항생물질 4-페닐-3-부테노익애시드를 이용하는 살균제에 관한 것이다.

일반적으로 오이탄저병균, 벼도열병 등은 우리나라에서 경제적으로 매우 중요한 식물병으로써, 이에 대해 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

박과 채소작물의 탄저병은 온도와 습도가 높을 때 잎, 줄기, 과실 등 식물체의 지상부에 많이 발생하는데, 발생초기에 방제를 하지 못하면 작물의 생육후기에 이르러서는 방제가 매우 어렵고, 수확이 전혀 불가능한 상태로 되어 결국 농사를 망치게 되는 경우가 종종 있다.

상기 탄저병은 고온기에 발생이 많으나 잎에 흠탕물이 묻지 않는 하우스재배에서는 거의 발생하지 않고, 잎, 줄기 및 과실에 발병한다. 잎에는 원형 내지 부정형으로 암갈색의 병반을 만들고 줄기에는 방추형으로 중앙부가 움푹 패인 병반을 형성한다. 병이 더욱 진행되면 병반은 찢어져 구멍이 생긴다. 병반부는 유관속을 제외한 덩굴부분을 따라 길게 나타난다. 후에는 병반부분에 작은 흑점이 많이 붙는다. 과실에 발병한 것은 반점 위에 암흑색의 포자낭이 생기면서 움푹 들어가게 된다.

병원균은 오이 탄저병 균과 같은 균으로 불완전균류에 속하고 분생포자를 형성한다. 분생포자체는 점질물에 피복되어 끈적끈적하게 달라붙어 있기 때문에 노균병균과 달리 바람에 의해서 비산하기 힘들고 주로 물에 의해서 전파된다. 이 때문에 많은 강우시 발생이 많고, 비를 맞지 않는 하우스재배에서는 이 병의 발생이 적다.

본 병원균은 주로 피해 경엽과 함께 균사형태로 생존하여 전염원으로 되므로 연작지에서 발병하기 쉽다. 따라서, 수박뿐만 아니라 오이나 참외 등 본 병이 발생하기 쉬운 박과 작물을 연속 재배하면 위험하다. 토양과 공기가 다습하고 이어짓기가 계속될 때 또는 강우시 흠탕물이 덩굴이나 잎에 부착될 때, 병원균이 피해잎이나 덩굴에 붙어 토양중에서 월동함으로써 다음 해에 발생하게 된다. 또 종자 표면이나 농기구·지주 등에 붙어 감염되는 수도 있다. 병원균의 발육적온은 22~28℃이고 6~30℃의 범위에서 번식한다. 본 병은 피해가 매우 크게 나타나는 병해로 발병이 시작하면 방제하기 어렵기 때문에, 발병되지 않도록 주의가 필요하다.

한편, 벼도열병은 전세계적으로 발생하며 벼에게 가장 중요한 병 중의 하나이다. 특히 관개하거나 강수량이 많은 곳에서 재배하며 다량의 질소비료를 사용하는 곳에서는 가장 중요한 병이다. 지금까지 세계 각지에서 도열병의 대발생이 여러 차

례 있었는데, 어떤 지역에서는 평년작황의 50-90%가 감소되기도 하였다. 도열병은 잎을 침해하는데, 잎에서 방추형 병반의 안쪽은 회백색이며 바깥쪽은 진녹색 내지 진갈색이며 건전부와 경계에는 황색의 둘레무리가 형성된다. 때로 이들 병반은 확대되고 융합하여 잎전체를 고사시킨다. 또한 엽초에 발생하면 엽초 뿐만 아니라 연결된 잎도 고사시키고, 줄기 마디나 마디 사이에 발생하면 출수기에 백수가 나오거나 줄기가 부러지기도 한다.

도열병균은 병든 벼짚이나 종자 또는 잡초 기주에서 균사 또는 분생포자로 월동한다. 도열병균은 높은 상대습도가 유지되는 동안 분생포자를 형성하여 비산시킨다. 성숙한 분생포자는 공기전염되는데, 벼에 내려앉은 분생포자는 끝부분에서 분비하는 끈적끈적한 점질물로 딱 들러붙는다. 벼 잎이나 줄기가 습하면, 분생포자는 발아하며, 발아관은 부착기를 형성하고, 부착기를 통해 식물 표면을 뚫고 들어가거나 기공을 통해 들어간다. 유묘 및 어린잎과 줄기는 성식물체 및 성숙한 조종보다 더 감수성이다. 최적온도 조건에서 침입부터 병반 형성까지는 4-5일이 소요된다. 다습한 날씨나 높은 상대습도에서는, 병반이 나타난 몇 시간 이내에 병이 발생한다.

이와 같은 벼도열병 및 오이탄저병은 심할 경우 전체 작물 수확에서 수량을 크게 감소시키는 원인이 되므로, 이의 방제를 위해서 현재 저항성 품종의 재배 등이 행하여지고 있으나, 지금까지 가장 효율적인 방제법은 살균제를 이용한 화학적 방제인 것으로 알려져 있다. 그러나 점차 늘어나는 유기합성농약의 사용으로 환경 및 인축에 대한 부작용이 심각한 수준에 이르러 사회문제를 유발하고 있는 실정이다.

이러한 관점에서 오이탄저병 및 벼도열병 등의 방제에 사용할 수 있는 저독성이고 환경에 부작용을 일으키지 않는 무공해 살균제의 개발이 절실하게 요청되는 상황이라고 할 수 있다. 특히 저독성 무공해 살균제로서 미생물로부터 분비되는 이차대사산물을 활용하는 방안이 제시되고 있으며, 이는 미생물 이차대사산물이 식물병 방제를 위한 살균제로서의 여러 가지 유용한 특성을 가지고 있기 때문이다. 즉, 미생물 유래 항생물질은 자연상태에서 생합성된 물질이므로 자연 환경에서 빠르게 분해되어 토양 잔류 독성에 의한 피해가 적으며, 화학구조와 생물학적 효과가 다양하여 유기합성 농약에 대한 약제 저항성을 가진 병원성 균주의 출현, 토양 내 잔류, 인축에 대한 피해 등을 포함한 부작용을 줄일 수 있는 장점을 가지고 있다.

따라서, 최근 새로운 농약 개발은, 이러한 미생물 이차대사산물의 장점을 살려, 기존 농약과 같이 약효만을 중시하지 않고, 인축에 독성이 낮고, 병해충 및 잡초에 대한 활성이 높은 반면에, 환경 및 자연 생태계에 안전한 고도의 선택성, 저독성 및 환경안정성이 높은 천연물 유래 선도화합물(lead compound) 개발쪽으로 연구가 집중되고 있다.

한편, 이와 같은 미생물유래 항균물질은 그 자체로서 사용되기도 하지만, 보다 강력하고 안전한 새로운 살균제의 개발을 위한 선구물질로도 많이 사용되고 있다. 예를 들어, β -메톡시아크릴레이트 아족시스트로빈(β -methoxyacrylates azoxystrobin)과 크레스옥심-메틸(kresoxim-methyl)은 벤츄리아 이나에쿠알리스(*Venturia inaequalis*), 세르코스포라 아라키디콜라(*Cercospora arachidicola*), 플라스모파라 비티콜라(*Plasmopara viticola*) 그리고 파이토프소라 인페스탕스(*Phytophthora infestans*)를 억제하는 스트로빌루린(strobilurin)으로부터 개발되었고, 옥수수 푸사리움 그라미네아럼(*Fusarium graminearum*)과 밀 걸라키아 시발리스(*Gerlachia civalis*)에 항균 효과가 있는 페니클로닐(fenclonil)과 플루디옥소닐(fludioxonil)은 피롤리트린(pyrrolnitrin)으로부터 개발된 농용 살균제이다.

지난 30년 동안 국내에 시장에 시판된 미생물 유래 살균제는 블라스티시딘 S(blasticidin S), 폴리옥신(polyoxin), 카수가마이신(kasugamycin), 발리다마이신(validamycin), 밀디오마이신(mildiomycin)이 있다. 이중 농용 항생제로서 처음으로 개발된 물질은 블라스티시딘 S로 벼도열병에 대해 뛰어난 방제효과를 나타낸 바 있으며, 폴리옥신 D(polyoxin D)는 과수, 채소, 화훼의 병원성 진균에 사용하고 있고, 라이족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*)가 일으키는 벼잎집무늬마름병 방제를 위해 Zn-salt란 이름으로 판매되고 있으며, 카수가마이신은 벼도열병과 세균성 슈도모나스(*Pseudomonas*) 방제에 이용하고 있고, 밀디오마이신은 여러 작물의 흰가루병 방제에 사용되고 있다.

한편, 기존에 알려진 많은 수의 항생물질이 방선균으로부터 분리되었는데, 그 중에서도 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 속의 방선균은 아미노글리코사이드(aminoglycosides), 안쓰라사이클린(anthracyclines), 글리코펩타이드(glycopeptides), 베타-락탐(β -lactams), 마크로라이드(macrolides), 핵산계(nucleotides), 펩타이드계(peptides), 폴리엔(polyenes) 등의 다양한 종류의 화학구조를 가진 항생물질을 생성하는 것으로 잘 알려져 있어서 집중적으로 탐색이 시도되고 있는 균류이다.

본 발명과 관련된 연구에서는 탐색의 과정에서 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 속 방선균 중 새로운 종인 고양엔시스(*koyangensis* sp. nov.) 종의 방선균을 분리하였으며, 스트렙토마이세스 고양엔시스종이 생성하는 생리활성물질을 분리하여 농용항생제로써의 활성을 평가하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 상기와 같은 종래 기술의 문제점 및 요구를 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 벼도열병과 오이탄저병 등의 식물병 방제에 사용될 수 있는 저독성이고 환경에 부작용을 일으키지 않는 친환경적 살균제를 제공하고자 하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위해 본 발명은, 토양으로부터 분리한 신규의 스트렙토마이세스 고양엔시스 VK-A60 (*Streptomyces koyangensis* sp. nov. VK-A60) 균주와 이 균주 배양액으로부터 분리, 추출되는 항생물질인 4-페닐-3-부테노익애시드(4-Phenyl-3-butenic acid)의 제조방법 및 이 항생물질을 이용하는 식물병 방제용 살균제를 제공하는 것으로 이루어진다.

본 발명자들은 고려대학교 농생물학과에서 1990년부터 토양미생물로부터 항진균성 항생물질을 개발하기 위한 연구를 수행하던 중, 식물병원진균에 대해 뛰어난 항균활성을 보이는 항진균 항생물질을 생성하는 다수의 길항방선균을 발견한 바 있다.

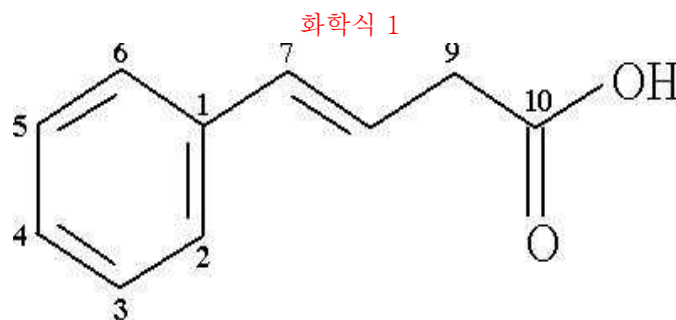
본 발명자들은 한국의 여러 지역의 토양시료로부터 약 1,000여 개의 방선균을 분리하여 한천배지 및 온실조건하의 식물에서 병방제 효과를 검정한 결과, 오이 탄저병과 벼도열병 균을 비롯한 식물병에 대해 항균효과가 뛰어난 신규 방선균 균주 VK-A60 균주를 선발하였다.

본 발명의 방선균 균주 VK-A60는 생리, 생화학적 특성, 그리고 16S rDNA 서열(sequence) 분석을 통해 신종으로 동정하고, 스트렙토마이세스 고양엔시스 VK-A60(*Streptomyces koyangensis* sp. nov. VK-A60(type species VK-A60^T))라 명명한 후 기탁[미생물기탁번호: KCCM 10555]하였다.

이후 계속적인 연구를 통해 상기 스트렙토마이세스 고양엔시스 VK-A60(*Streptomyces koyangensis* sp. nov. VK-A60) 균주의 배양 여액으로부터 항균활성을 가진 항생물질을 분리 정제하여 그 약효를 스크리닝하였다. 그 결과, 그 중 하나가 식물병원진균에 대해 뛰어난 항균활성 효과가 있음을 확인하고, 상기 항생물질에 대한 분자구조를 규명한 결과, 4-페닐-3-부테노익애시드(4-Phenyl-3-butenic acid)임을 확인하고 본 발명을 완성하게 된 것이다.

상기 4-페닐-3-부테노익애시드를 얻는 과정을 좀 더 구체적으로 살펴보면, 상기 스트렙토마이세스 고양엔시스 VK-A60 (*Streptomyces koyangensis* sp. nov. VK-A60) 균주를 글라이세롤텍스트린 배지(GDB)에서 배양하고, 그 배양 여액을 HP-20 레진에 흡착시켜 메탄올로 전개시킨다. 그런 다음, 항균활성 효과를 가진 분획을 에틸아세테이트로 추출하여 농축하여, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Silica gel column chromatography)를 수행한다. 그리고, 항균활성을 나타내는 분획을 모아서 C₁₈ 레진 역상 플래쉬 컬럼 크로마토그래피(C₁₈ resin reversed-phase flash column chromatography)를 행하여, 항균력을 보이는 분획을 수거하여 다시 세파덱스 LH-20 컬럼 크로마토그래피(Sephadex LH-20 column chromatography)로 정제하여, 항균활성 분획 65-189에서 이차대사산물인 본 발명에 의한 4-페닐-3-부테노익애시드를 획득한다.

상기 방법에 의해 본 발명의 방선균주 스트렙토마이세스 고양엔시스 VK-A60 균주로부터 분리 및 정제된 4-페닐-3-부테노익애시드는 하기와 같은 분자구조를 가진다.



현재까지 알려져 있는 바로, 4-페닐-3-부테노익애시드는 1973년 Khristov에 의해서 트리코모나스(Trichomonas)에 대한 항세균작용을 가지는 물질로 첫 보고되었으며, 이후, Trifnov등에 의해 목재부후균에 대한 항균효과가 있는 것이 밝혀

졌다. 이외에도 글루타민산 트랜스펩티다제(glutamic acid transpeptidase)의 조절자로서의 작용과, 펩티다이글라이신 아미데이팅 모노옥시게나제(peptidylglycine amidating monooxygenase)를 저해하는 작용이 있음이 보고되었으나, 식물병 항진균 활성에 대해서는 알려진 바가 없는 물질이다.

이상과 같이 본 발명의 방선균주 스트렙토마이세스 고양엔시스 VK-A60 균주로부터 분리, 정제된 항생물질 4-페닐-3-부테노익애시드는 in vitro 상에서 오이탄저병균(*Colletotrichum orbiculare*), 벼도열병균(*Magnaporthe grisea*)과, 모잘록병균(*Pythium ultimum*) 등에 대해서 특이적인 항균활성을 가지고 있음이 확인되었다(표 1 참조). 또한, 본 발명에 의한 항생물질 4-페닐-3-부테노익애시드는 온실조건 풋트 실험에서 기존의 유기합성 살균제인 대조군과 비교하여 벼도열병과 오이탄저병균에 대해 동등한 수준의 방제효과가 있음이 확인되었다(도 5 참조).

상술한 바와 같이, 본 발명의 스트렙토마이세스 고양엔시스 VK-A60 (*Streptomyces koyangensis* sp. nov. VK-A60) 균주, 이 균주의 배양여액, 및 이 균주로부터 정제된 항균물질 4-페닐-3-부테노익애시드는 모두 천연 유래의 물질로서, 자연 환경에서 미생물에 의해 쉽게 분해될 수 있는 물질이다. 따라서, 본 발명에 의한 균주의 배양여액 및 상기 항균물질은 단독 또는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 충전제 등을 혼합하여 무공해, 친환경 살균제 조성물로 제조될 수 있어, 식물병 방제에 매우 유용하게 이용될 것이 기대된다.

이하 실시예를 이용하여 상기와 같이 구성된 본 발명에 대해 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명한 것이다.

[실시예 1] 길항방선균의 선발

길항방선균을 선발하기 위하여 고양 지역의 채소 밭토양에서 표토로부터 10cm 깊이의 토양을 채취하여 시료토양 5g씩을 50mL의 멸균수에 혼합하고, 회전진탕기(150rpm)에서 30분간 진탕하여 토양현탁액을 제조하였다. 제조된 현탁액을 와트만 제1여과지(Watman No. 1 filter paper)를 통과시켜 여과하고, 멸균수로 1:100(v:v) 비율로 희석하였다. 각각의 희석액 1mL를 40℃에서 녹은 휴믹애시드 비타민 한천배지(humic acid vitamin agar: 1.0g humic acid, 0.5g Na₂HPO₄, 1.71g KCl, 0.05g MgSO₄·7H₂O, 0.01g FeSO₄·7H₂O, 0.02g CaCO₃, 0.5mg thiamine-HCl, 0.5mg riboflavin, 0.5mg niacin, 0.5mg pyridoxin-HCl, 0.5mg inositol, 0.5mg Ca-pantothenate, 0.5mg p-aminobenzoic acid, 0.25mg biotin, 50mg cycloheximide, 18g agar, 1 liter H₂O, adjusted to pH 7.2; vitamins and cycloheximide were filter-sterilized)와 0.85% NaCl이 첨가된 말트 추출물 한천배지(malt extract agar: 3g malt extract, 0.5g peptone, 0.5g glucose, 0.85% NaCl, 18g agar, 1 liter H₂O)에 접종하고, 접종된 한천평판배지를 28℃에서 14일간 균총(colony)이 발생될 때까지 배양시켰다.

이렇게 하여 발생한 균총들 가운데 방선균으로 보이는 균총들을 선택하였다. 여기에서, 방선균으로 보이는 균총은 일반 세균과는 달리 기질균사를 형성하여 한천배지 상에서 딱딱한 균총을 형성한 균총을 말한다.

이렇게 선택된 균총들에 대해 오이 탄저병균, 고추역병균, 잣빛곰팡이병균, 사과탄저병균, 벼잎집무늬마름병균 및 벼도열병균에 대한 항균활성을 시험하였다. 구체적으로, 선발된 방선균류를 브이8 주스 한천배지(V8 juice agar, V8A)의 평판 가운데에서 30mm 떨어진 곳에 획선도말(streaking)하고 27℃에서 36시간 동안 배양한 후, 그 배지의 중앙에 증식중인 오이탄저병균 등 식물병원진균의 배양체로부터 떼어낸 균사절편(mycelial disk, 직경 7mm)을 놓고 다시 5일간 배양한 뒤 저지원의 생성을 확인하였다.

저지원의 생성이 확인됨으로써 선발된 길항방선균은 순수배양물을 0.3% TSB배지에서 증식시킨 후에 15%의 글리세롤과 혼합하여 -70℃에서 보관하였으며, 일일사용을 위해서는 뚜껑이 달린 유리시험관(10×28mm)에 담긴 0.3% TSA배지에 접종하여 사용하였다.

[실시예 2] 길항방선균 VK-A60의 생리, 생화학적 특성 및 16S rDNA 서열 분석을 이용한 방선균 종 동정

실시예 1에서 분리, 선발된 본 발명의 균주 VK-A60는 배지상에서 기질 균사를 생성하고, 세포벽의 다이아미노피멜릭애시드(diaminopimelic acid, DAP)가 L-형(L-form)이고, 전자주사현미경으로 포자 모양을 관찰한 결과 렉터플렉서블(rectiflexible) 형이며, 포자 표면이 매끈한 것을 보아 스트렙토마이세스 속임을 확인하였다(도 1 참조).

종 동정을 위한 생리, 생화학적 시험은 매뉴얼 시스템에틱 박테리올로지(Bergey's manual of systematic bacteriology)에 서술되어 있는 방법으로 시행하였다. 상기 스트렙토마이세스 균주 VK-A60는 균동정에 중요한 G+C 함량이 67.8 %로써 다른 방선균과 다른 특이적인 성질을 보였으며, ISP 7배지에서 멜라닌 색소를 형성하였으며, 엘라스틴(Elastin), 알부틴(Arbutin), 전분(Starch), 티로신(Tyrosine), 에스큐린(Aesculin), 잔틴(Xanthine), 카세인(Casein), 젤라틴(Gelatin)을 분해하였으나, 셀룰로오스(Cellulose)를 분해하지는 않았다.

이 균주는 L-아라비노스(Arabinose), D-프룩토오스(D-fructose), 마니톨(Mannitol), 자일로즈(Xylose)를 탄소원으로 이용할 수 있었으나, 아도니톨(Adonitol), 텍스트란(Dextran), meso-이노시톨(meso-inositol), 멜레지토스(Melezitose), D-멜리바이오스(D-Melibiose), 라피노스(Raffinose), 람노스(Rhamnose), 슈크로스(Sucrose), 자일리톨(Xylitol)은 이용할 수 없었다.

질소원으로 L-시스테인(Cystein), L-발린(Valine), L-페닐알라닌(Phenylalanine), L-히스티딘(Histidine)을 사용하였으나, 아미노부티릭애시드(amino-n-butyric acid)과 L-하이드로자일프롤린(Hydroxyproline)은 이용할 수 없었다.

상기 균주의 genomic DNA를 Pospiech와 Neumann의 방법에 따라 추출한 다음, 프라이머 fD1 (AGAGT TTGAT CCTGG CTCAG) 및 rP2 (ACGGC TACCT TGTTA CGACTT)을 이용하여 16S rDNA를 증폭하여 그 염기 서열을 분석하였다.

분석된 서열을 GenBank에서 다른 방선균들의 것과 비교하고, 다른 방선균들과 본 발명에 의한 스트렙토마이세스 속 균주 VK-A60의 16S rDNA를 DNASTAR 프로그램 내에 클러스터링 방법으로 계통도를 그려 도 2에 나타내었다.

이상의 생리, 생화학적인 시험과 16S rDNA 염기 서열 분석을 통하여 본 발명의 방선균 균주는 신종인 스트렙토마이세스 고양엔시스(*Streptomyces koyangensis* sp. nov.)로 동정되었으며, 스트렙토마이세스 고양엔시스 VK-A60 (*Streptomyces koyangensis* sp. nov. VK-A60)라 명명되었다.

[실시예 3] 길항 방선균 VK-A60의 배양 조건

미생물이 분비하는 물질은 배양기의 종류와 배양온도, 산소 공급율 등의 배양 조건에 따라 크게 달라지므로, 본 발명의 길항 방선균 VK-A60 균주가 항생물질을 최적으로 생산할 수 있는 배지 종류와 배양 시간을 알아보기 위해, 하기 4가지 종류의 배지를 선정하여 시험하였다.

전분카세인 배지(SCB, starch casein broth: 20g soluble starch, 0.6g tryptone peptone, 4g K₂HPO₄, 4g KNO₃, 4g NaCl, 1g MgSO₄·7H₂O, 0.02g FeSO₄·7H₂O, 0.04g CaCO₃ and 1L distilled water)

전분글루코즈 배지(SGB, starch glucose broth: 20g soluble starch, 10g glucose, 5g yeast extract, 5g casamino acid and 1L distilled water)

글라이세롤덱스트린 배지(GDB, glycerol dextrin broth: 20g glycerol, 20g dextrin, 10g soytone, 3g yeast extract, 2g (NH₄)₂SO₄, 4g K₂HPO₄ and 1L distilled water)

글라이세롤펩톤 배지(GPB, glycerol peptone broth : 20g glycerol, 10g polypeptone, 5g beef extract and 1L distilled water)

접종 후 2일부터 14일까지 2일 간격으로 각 배지로부터 배양여액을 회수, 농축하여 페이퍼디스크 방법으로 저지원의 지름(mm)을 측정하여 식물병원균에 대한 항균력을 비교하였다(도 3 참조).

시험 결과, 본 발명에 의한 길항방선균 VK-A60는 글라이세롤덱스트린 배지(GDB)에서 14일을 배양하였을 경우, 시험에 사용된 오이탄저병원균과 벼도열병균에 대한 억제 효과가 가장 큰 것으로 나타났다. 따라서, 상기 배양조건에서 가장 많은 양의 항균성 물질이 생성되고 있음을 알 수 있었다.

[실시예 4] 항생물질 4-페닐-3-부테노익애시드의 분리 및 정제

실시에 1 내지 3에서 동정되고 배양조건이 확립된 본 발명의 길항방선균 스트렙토마이세스 고양엔시스 VK-A60 균주로부터 항균활성을 가지는 이차대사산물을 분리 및 정제하기 위하여, 도 4에 나타난 과정을 수행하였다.

우선, 항균성 물질을 가장 많이 생성하는 글라이세롤 텍스트린 배지(GDB), 28℃에서 본 발명에 의한 균주를 14일간 대량 배양한 후, 원심분리하여 균사체가 제거된 배양여액을 수거한다. 상기 배양여액을 Diaion HP-20 레진에서 메탄올/물 0:100, 20:80, 40:60, 60:40, 80:20, 100:0(V/V) 혼합용매를 용리액(eluent)으로 하여 플래쉬 컬럼 크로마토그래피(flash column chromatography)를 수행하였다.

얻어진 분획(fraction) 중 항균활성 효과를 가진 MeOH 80% 및 100%의 분획을 을 합쳐, 다시 에틸아세테이트(ethyl acetate)로 추출하여 유기용매층에서 항균활성을 확인하고 수거하였다. 그런 다음, 이를 농축하여 다시 메탄올/클로로폼 0:100, 10:90, 80:20, 70:30, 50:50, 30:70, 10:90 (V/V) 혼합용매를 용리액으로 하여 실리카겔 플래쉬 컬럼 크로마토그래피(Silica gel column flash chromatography)를 수행하였다.

항균활성이 관찰된 90% 와 100% 클로로폼 분획(chloroform fraction)을 모아서 C₁₈ 레진 역상 플래쉬 컬럼 크로마토그래피(C₁₈ resin reversed-phase flash column chromatography)를 수행하여 항균력을 보이는 MeOH 60%와 80%의 분획(fraction)을 수거하였다. 이를 다시 세파덱스 LH-20 컬럼 크로마토그래피(Sephadex LH-20 column chromatography)를 이용하여 메탄올로 용리하고 정제하여 항균활성 분획 65-189에서 4-페닐-3-부테노익애시드로 획득하였다.

이를 FAB 질량 분석기(FAB mass spectrum)으로 분석한 결과, 분자량이 162이고 분자식은 C₁₀H₁₀O₂ 이었으며, 핵자기 공명(Nuclear magnetic resonance, NMR) 분석한 결과 4-페닐-3-부테노익애시드(4-Phenyl-3-butenic acid)로 확인되었다.

[실시에 5] 4-페닐-3-부테노익애시드의 식물병원진균에 대한 항균활성

실시에 4에서 얻어진 4-페닐-3-부테노익애시드의 항균활성을 측정하기 위하여 하기와 같은 식물병원진균 억제시험을 수행하였다.

콜레토티리쿰 오비쿨라리에(*Colletotrichum orbiculare*), 마그나포르테 그라이시아(*Manaportha grisea*), 피씨움 울티멈(*Pythium ultimum*), 알터나리아 말리(*Alternaria mali*), 클라도스포리움 쿠쿠메리눔(*Cladosporium cucumerinum*), 보트리티스 시네리아(*Botrytis cinerea*), 실린드로카폰 디스트렉탄스(*Cylindrocarpum destructans*), 푸자리움 옥시스포룸 f.sp. 라이코퍼시시(*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*), 파이토프소라 캡시사이(*Phytophthora capsici*), 라이족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 스크레로티니아 스크레티오룸(*Sclerotinia sclerotiorum*) 등의 식물병원 진균들을 감자 텍스트로스 한천(potato dextrose agar) 배지에서 배양하였다.

4-페닐-3-부테노익애시드를 마이크로 웰 플레이트(micro-well plate)에 1%의 감자한천 액체배지와 섞어 일련의 농도(0.1~100μg/ml)로 담은 후, 각각의 진균포자 또는 유주자 현탁액을 10⁵개 포자/ml의 농도로 맞추어서 각각의 웰(well)에 넣었다.

접종된 웰 플레이트를 28℃에서 2일 내지 4일간 배양한 후, 곰팡이의 균사생장이 일어나지 않은 농도 중 가장 낮은 농도를 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)로 평가하였으며, 그 결과를 하기 표 1(4-페닐-3-부테노익애시드의 여러 식물병원진균에 대한 최소억제농도)에 나타내었다.

[표 1]

식물병원진균	최소억제농도(μg/mL)
알터나리아 말리	30
보트리티스 시네리아	>100
클라도스포리움 쿠쿠메리눔	30
콜레토티리쿰 오비쿨라리에	3
실린드로카폰 디스트렉탄스	30

푸자리움 오기스포룸 f.sp 라이코퍼시시	>100
마그나포르테 그라이시아	10
파이토프소라 캡시사이	30
피씨움 얼티멈	0.5
라이족토니아 솔라니	30
스크레로티니아 스크레티오럼	>100

시험 결과 본 발명의 길항방선균 스트렙토마이세스 고양엔시스 VK-A60 균주로부터 분리된 4-페닐-3-부테노익애시드는 콜렉트트리쿰 오비쿨라리에(*C. orbiculare*), 마그나포르테 그라이시아(*M. grisea*), 피씨움 얼티멈(*P. ultimum*)에서는 10 μ g/ml 이하의 매우 낮은 농도에서 항균활성을 나타내었다. 또한, 알터나리아 말리(*A. mali*), 클라도스포리움 쿠쿠메리눔(*C. cucumerinum*), 보트리티스 시네리아(*B. cinerea*), 실린드로카폰 디스트럭탄스(*C. destructans*), 푸자리움 옥시스포룸 f.sp. 라이코퍼시시(*F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*), 파이토프소라 캡시사이(*P. capsici*), 라이족토니아 솔라니(*R. solani*), 스크레로티니아 스크레티오럼(*S. sclerotiorum*)에 대해서는 100 μ g/ml 이하의 낮은 농도에서 항균활성을 나타내었다.

[실시에 6] 살균제 트리싸이클라졸의 벼도열병 방제효과 및 살균제 클로로탈로닐의 오이탄저병 방제효과 각각에 대한 4-페닐-3-부테노익애시드의 방제효과 비교

온실조건의 벼 유묘에서 벼도열병용 상용 살균제인 트리싸이클라졸과 본 발명의 길항방선균 스트렙토마이세스 고양엔시스 VK-A60 균주로부터 생산되는 4-페닐-3-부테노익애시드의 벼도열병 방제효과를 비교 조사하였다. 메탄올과 물에 녹인 두 약제를 각각 0, 1, 10, 50, 100, 500 μ g/ml의 농도로 8엽기의 벼 유묘에 분사하여 처리하였다. 1일 후, 벼도열병균의 포자 현탁액을 벼잎에 분사하여 접종한 후, 24시간 동안 습실처리하였다.

접종 5일 후 벼잎의 병반의 수를 세어 병의 진행상태를 평가하였다. 벼도열병의 전형적인 병반은 접종 4일 이후부터 나타나기 시작하였다. 10 μ g/ml의 4-페닐-3-부테노익애시드와 트리싸이클라졸이 벼잎에서의 병반을 억제하기 시작하였으며, 농도가 증가할수록 벼잎에서의 도열병의 진전은 억제되었다. 4-페닐-3-부테노익애시드가 트리싸이클라졸에 비해 벼도열병 억제 효과는 다소 낮았으나, 500 μ g/ml를 처리했을 때는 트리싸이클라졸과 비등한 억제효과를 나타내었다(도 5의 A 부분 참조).

또한, 온실조건의 3엽기의 오이 식물에서 오이탄저병용 상용 살균제인 클로로탈로닐과 본 발명의 길항방선균 스트렙토마이세스 고양엔시스 VK-A60 균주로부터 생산되는 4-페닐-3-부테노익애시드의 오이탄저병 방제효과를 비교 조사하였다.

0 부터(무처리구) 각각 10, 50, 100, 500 μ g/ml로 희석된 클로로탈로닐과 4-페닐-3-부테노익애시드를 3엽기 오이식물의 잎에 분사하였다. 1일 후, 오이 탄저병균의 포자현탁액을 적정 농도로 희석하여 균일하게 오이식물의 잎에 분사한 후, 하루동안 습실처리하였다. 접종 6일 후 오이 식물의 이차엽의 병반의 수를 세어 탄저병의 진행 상황을 평가하였다.

3엽기에서의 오이식물에 10 μ g/ml의 4-페닐-3-부테노익애시드와 클로로탈로닐을 처리하였을 때, 탄저병은 억제되지 않았으나, 100 μ g/ml의 4-페닐-3-부테노익애시드를 처리하였을 때는 탄저병이 크게 억제되었고, 500 μ g/ml에서는 4-페닐-3-부테노익애시드와 클로로탈로닐 모두 병반이 거의 나타나지 않았다(도 5의 B 부분 참조).

이러한 시험 결과를 볼 때, 본 발명에 이용된 토양 방선균 유래 4-페닐-3-부테노익애시드가 유기합성 살균제 유효성분과 거의 동일한 수준의 병방제 효과를 가지고 있음을 알 수 있다.

이상과 같이 항균활성을 가지는 본 발명의 스트렙토마이세스 고양엔시스 VK-A60 균주가 분리, 동정되고, 그 이차대사산물인 4-페닐-3-부테노익애시드가 분리, 정제됨과 동시에 항균활성이 확인됨으로써, 스트렙토마이세스 고양엔시스 VK-A60(*Streptomyces koyangensis* sp. nov. VK-A60) 균주 또는 이 균주의 배양여액을 사용하는 식물병 방제용 살균제 및 정제된 4-페닐-3-부테노익애시드를 함유하는 식물병 방제용 살균제가 제공될 수 있게 되었다.

또한, 본 발명의 스트렙토마이세스 고양엔시스 VK-A60(*Streptomyces koyangensis* sp. nov. VK-A60) 균주, 이 균주의 배양여액, 및 이 균주로부터 정제된 항균물질 4-페닐-3-부테노익애시드는 모두 천연 유래의 물질로서, 자연 환경에서 미생물에 의해 쉽게 분해될 수 있는 물질이므로, 단독 또는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 충전제 등을 혼합하여 무공해, 친환경 살균제 조성물을 제조하는 데에 사용할 수 있게 되었다고 할 수 있다.

발명의 효과

이상과 같이 본 발명이 완성됨으로써, 토양으로부터 분리한 신규의 스트렙토마이세스 고양엔시스 VK-A60(*Streptomyces koyangensis* sp. nov. VK-A60) 균주와 이 균주 배양액으로부터 분리, 추출되는 항균물질인 4-페닐-3-부테노익애시드(4-Phenyl-3-butenic acid) 및 이 항생물질을 이용하는 식물병 방제용 살균제 등이 제공될 수 있게 되었다.

본 발명이 완성됨으로써, 오이탄저병, 벼도열병 등의 식물병 방제에 사용될 수 있는, 유기합성계 농약 수준의 높은 방제효과를 가지고 있으면서도 저독성이고 환경에 부작용을 일으키지 않는 친환경적 무공해 살균제가 제공될 수 있게 된 것이다.

본 발명에 의하여 제공되는 살균제 조성물은 주요한 식물병원균, 예를 들어, 콜렉토티리쿰 오비쿨라리에(*C. orbiculare*), 마그나포르테 그라이시아(*M. grisea*), 피씨움 얼티멈(*P. ultimum*), 알터나리아 말리(*A. mali*), 클라도스포리움 쿠쿠메리눔(*C. cucumerinum*), 보트리티스 시네리아(*B. cinerea*), 실린드로카폰 디스트럭탄스(*C. destructans*), 푸자리움 옥시스포름 f.sp. 라이코퍼시시(*F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*), 파이토프소라 캡시사이(*P. capsici*), 라이족토니아 솔라니(*R. solani*), 스크레로티니아 스크레티오럼(*S. sclerotiorum*) 등에 의한 식물병의 방제에 이용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

4-페닐-3-부테노익애시드(4-Phenyl-3-butenic acid)를 유효성분으로 하는 식물병 방제용 살균제.

청구항 2.

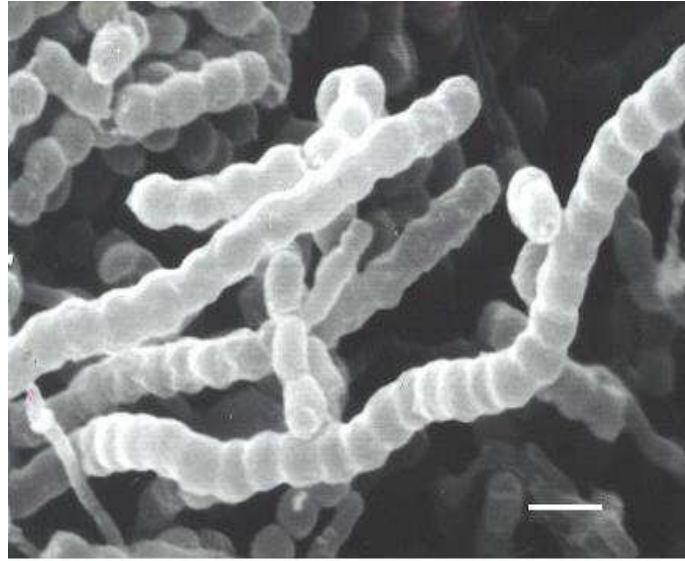
제1항에 있어서, 상기 4-페닐-3-부테노익애시드는 스트렙토마이세스 고양엔시스 VK-A60(*Streptomyces koyangensis* sp. nov. VK-A60) 균주(미생물 기탁번호: KCCM 10555)로부터 생산되는 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 살균제.

청구항 3.

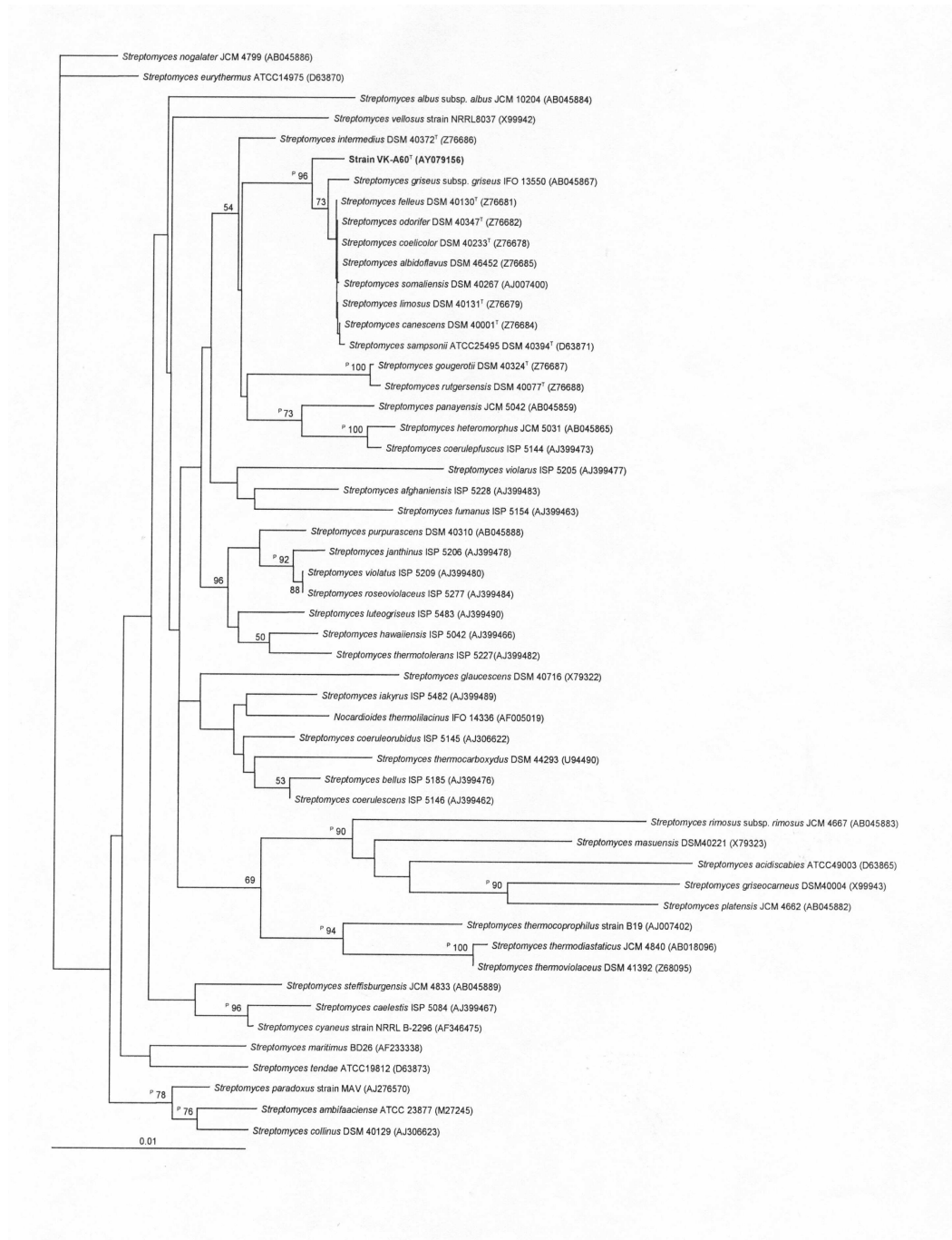
제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 식물병은 식물병원진균인 콜렉토티리쿰 오비쿨라리에(*C. orbiculare*), 마그나포르테 그라이시아(*M. grisea*), 피씨움 얼티멈(*P. ultimum*), 알터나리아 말리(*A. mali*), 클라도스포리움 쿠쿠메리눔(*C. cucumerinum*), 보트리티스 시네리아(*B. cinerea*), 실린드로카폰 디스트럭탄스(*C. destructans*), 푸자리움 옥시스포름 f.sp. 라이코퍼시시(*F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*), 파이토프소라 캡시사이(*P. capsici*), 라이족토니아 솔라니(*R. solani*), 스크레로티니아 스크레티오럼(*S. sclerotiorum*) 중 어느 하나에 의해 발생하는 식물병인 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 살균제.

도면

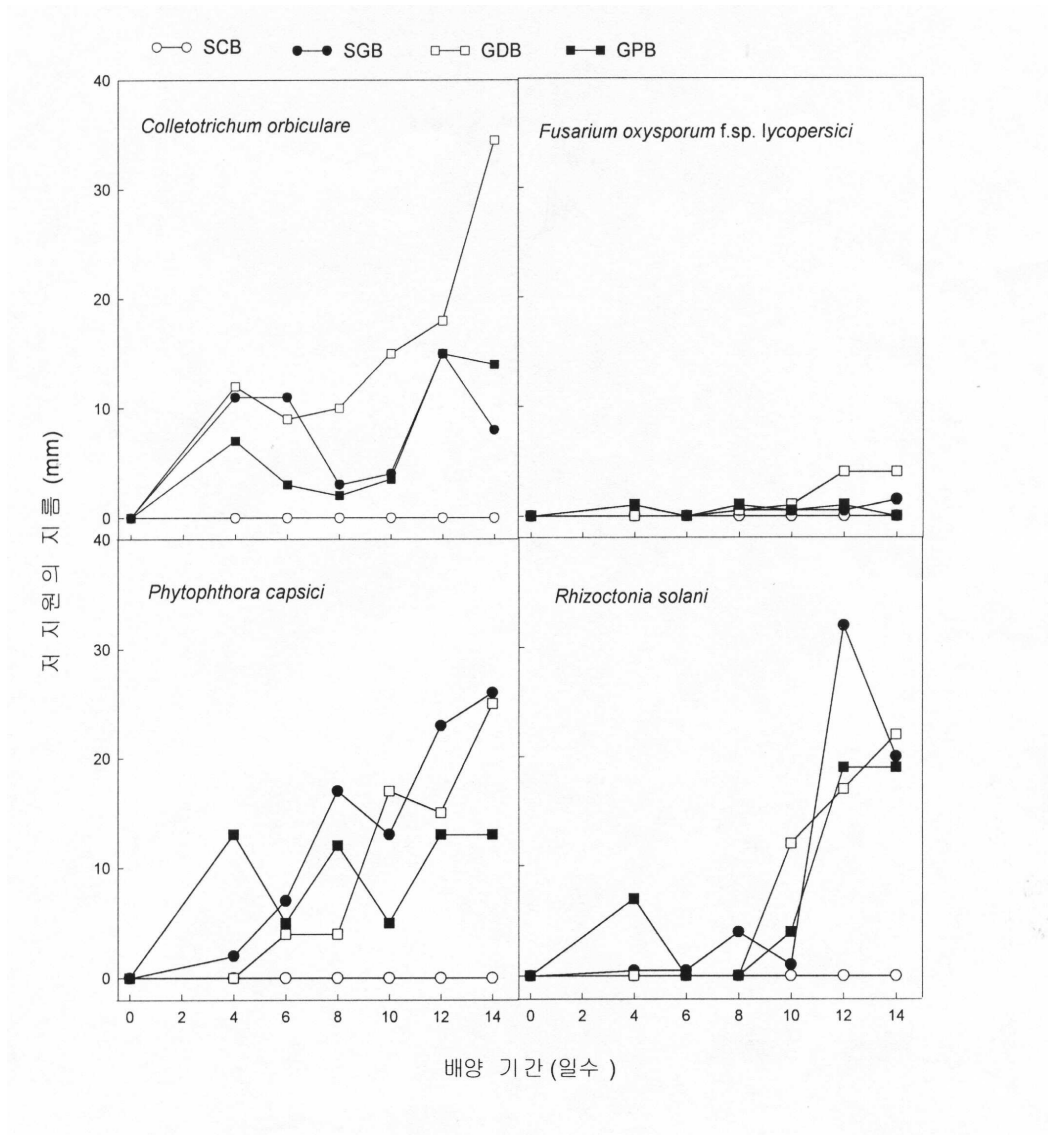
도면1



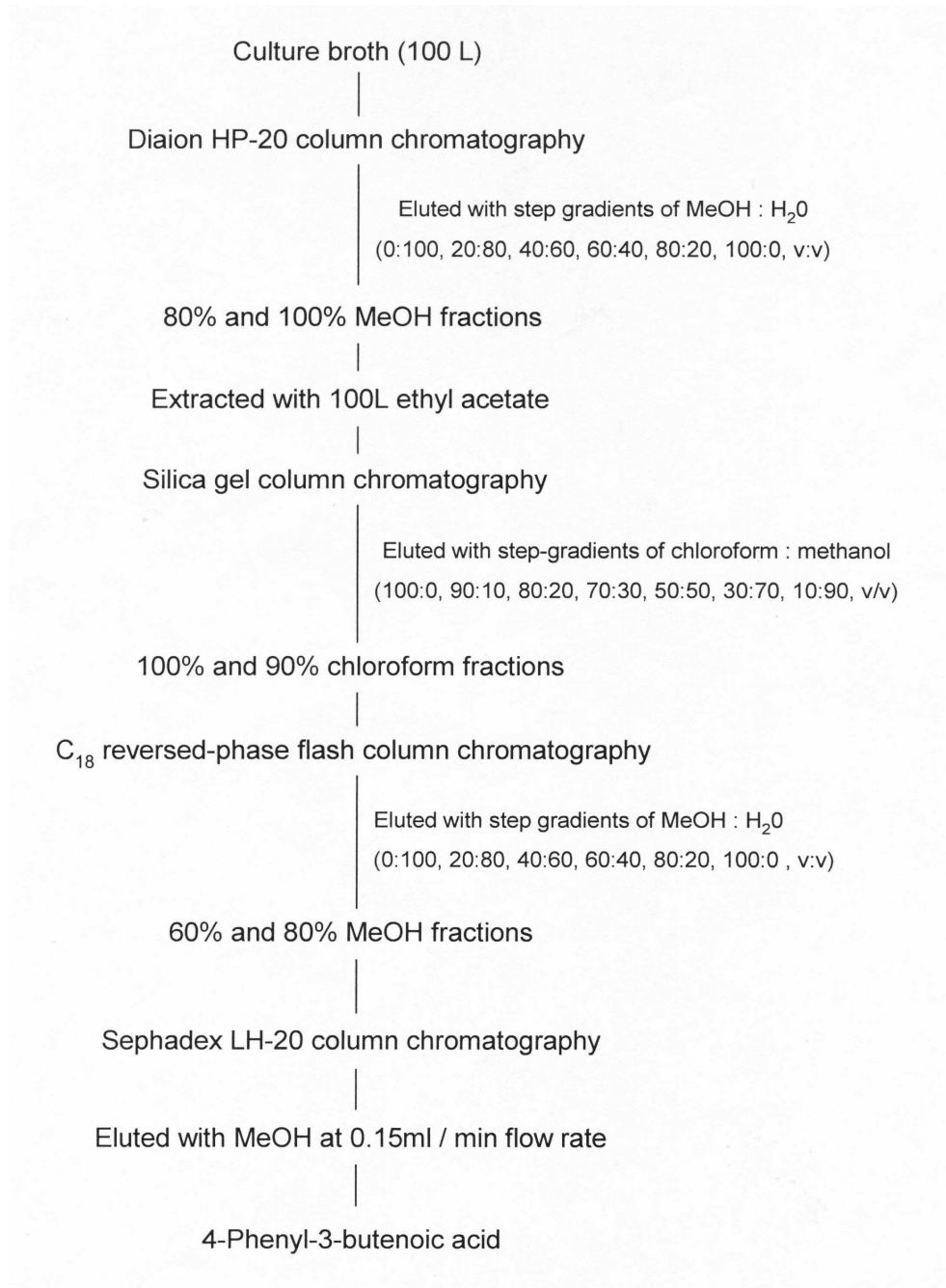
도면2



도면3



도면4



도면5

