



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년02월12일
(11) 등록번호 10-0802494
(24) 등록일자 2008년02월01일

(51) Int. Cl.

A01N 43/38 (2006.01) *A01N 63/00* (2006.01)

A01P 3/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0018386

(22) 출원일자 2006년02월24일

심사청구일자 2006년02월24일

(65) 공개번호 10-2007-0088150

(43) 공개일자 2007년08월29일

(56) 선행기술조사문헌

JP10139612 A

(73) 특허권자

(주)한국바이오케미칼

경남 의령군 의령읍 동동리 1539-6

(72) 발명자

백상훈

경기 성남시 분당구 정자동 7번지 두산 파빌리온
A동 1108호

강훈석

경남 마산시 내서읍 삼계리 숲속마을 611-503호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 박길채

(54) 비올라세인을 함유하는 해충 방제제, 항진균제 및 그의제조방법

(57) 요약

본 발명은 비올라세인(violacein)의 용도 및 그 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 비올라세인은 크로모박테리움 비올라세움(*Chromobacterium violaceum*)의 배양액으로부터 저급 알코올에 의해 추출되며, 해충 방제 및 항진균 활성을 나타내어 고추 탄저병, 잔디 피티움마름병, 상추 균핵병 및 콩나물 잘록병과 같은 식물 곰팡이병과 수박 뿌리혹선충과 같은 식물 기생 선충 방제에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

장인환

경기 평택시 합정동 102번지

이준석

대구 수성구 범어2동 51-18번지

김소영

경남 진주시 하대동 346-25

백점현

경남 창원시 도계동 327-11 일호하이파이 602

강재곤

경남 진해시 여좌동 112-91번지

안진미

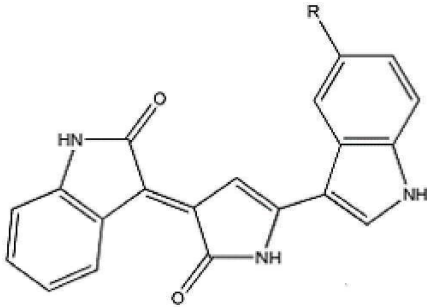
경남 함안군 가야읍 산서리 680-11번지

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1의 비올라세인(violacein) 또는 그의 유도체를 함유하는 식물 기생성 선충 방제용 조성물.

<화학식 1>



(상기 화학식에서, R은 OH 또는 H)

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서, 식물 기생성 선충은 수박 뿌리혹선충인 것을 특징으로 하는 식물 기생성 선충 방제용 조성물.

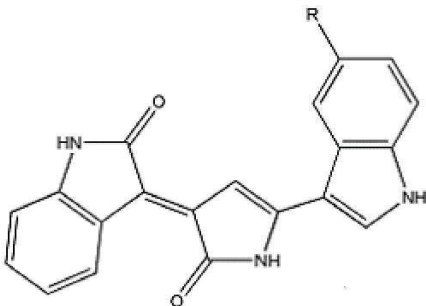
청구항 4

제 1항에 있어서, 비올라세인은 크로모박테리움 비올라세움(*Chromobacterium violaceum*), 알테로모나스 루테오비올라세아(*Alteromonas luteoviolacea*) 또는 잔티노박테리움 리비둠(*Janthinobacterium lividum*)으로부터 유래한 물질임을 특징으로 하는 식물 기생성 선충 방제용 조성물.

청구항 5

하기 화학식 1의 비올라세인(violacein) 또는 그의 유도체를 함유하는 식물 감염성 진균 방제용 조성물.

<화학식 1>



(상기 화학식에서, R은 OH 또는 H)

청구항 6

삭제

청구항 7

제 5항에 있어서, 식물 감염성 진균은 콜레토티리쿰 글로에오스포리오이데스(*Colletotrichum gloeosporioides*), 글로메렐라 신글라타(*Glomerella cingulata*), 포몹시스(*Phomopsis* sp.), 피티움(*Pythium* sp.), 스클레로티니아 스클레로티오럼(*Sclerotinia sclerotiorum*) 및 알타나리아 파낙스(*Alternaria panax*)로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 식물 감염성 진균 방제용 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

제 1항, 제 3항 또는 제 4항에 있어서, 비올라세인 또는 그 유도체는 전체 조성물의 10 내지 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 식물 기생성 선충 방제용 조성물.

청구항 10

제 5항 또는 제 7항에 있어서, 비올라세인 또는 그 유도체는 전체 조성물의 10 내지 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 식물 감염성 진균 방제용 조성물.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <8> 본 발명은 비올라세인(violacein)을 함유하는 해충 방제제, 항진균제 및 그 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 크로모박테리움 비올라세움으로부터 추출한 자색 향균 색소인 비올라세인을 함유하는 해충 방제제 및 항진균제에 관한 것이다.
- <9> 현재까지 농업발전을 위해 많은 합성 화학 농약을 사용하였지만, 환경오염문제와 더불어 농작물의 잔류 독성 규제방침에 따라 그 사용이 점차 제한됨에 따라, 이에 대한 대처방안으로 미생물에서 유래한 천연물 농약 및 생물학적 방제제로서의 미생물 연구개발이 이루어지고 있다.
- <10> 농업용 항생물질의 개발의 예로는 벼도열병 예방 및 치료를 위해 방선균 대사산물에서 카수가마이신(kasugamycin)과 브라스티딘 S(blastidin S)를 분리하여 실용화하였고 이외 폴리옥신(polyoxin), 발리다마이신(validamycin), 사이클로헥사마이드(cyclohexamide) 및 그리세오폴빈(griseofulvin) 등이 실용화되어 독성이 강한 합성 화학 농약의 일부를 대체하고 있다(김현수, 육영민, 여수환. 2003. 한국생물공학회지 18:490-494). 또한 미생물을 이용한 생물학적 방제 개발도 활발히 이루어져, 미생물 살충제 및 살진균제가 기존의 합성 화학

농약을 미생물 농약으로 대체되어 식물 병원균에 대한 예방 및 치료에 적용되고 있다.

<11> 항진균성 항생물질은 곰팡이에서 유래된 질병을 치료하기 위한 의약품 개발 뿐만 아니라 식물 병원균의 방제에 이용되고 있으며, 분해성 물질로 잔류 독성이 적다. 이는 인체나 동물 및 식물에 무독하고 안전한 항생 물질 농약 및 미생물 농약으로 우리나라와 같은 식량 증산을 중시하는 곳에서 그 개발이 크게 요구되고 있다.

<12> 크로모박테리움(*Chromobacterium*) 속에 속하는 미생물, 특히 크로모박테리움 비올라세움은 여러 종류의 항생활성을 지닌 대사산물을 생산하는데, 에어로시아니딘(aerocyanidin)이나 에어로카빈(aerocavin) 등 산업적으로 유용한 이차 대사산물을 생산하는 것으로 알려져 있다. 상기 물질들은 항생활성이 뛰어난 것으로 알려져 있는데, 예를 들면, 여러 종류의 키틴분해효소(chitinase)를 생산하여 유해곤충, 식물 병원성 곰팡이 및 병원성 선충에 대해 생물학적 방제제로서의 잠재적 가치를 가지고 있다. 또한 시안산염(cyanate)의 가수분해를 촉진하는 효소를 지니 시안화물(cyanide)을 생성하여 근권에서 발생하는 식물 곰팡이병 억제에 이용될 수 있고 제노합두스 보비에니아(*Xenorhabdus bovienii*) 및 포토합두스 루미네스(*Photorhabdus luminescens*)와 유사한 살 선충 및 살충 단백질을 생산한다. 또한 환경 유해물질 해독 작용에 관여하는 산성 탈염소화효소(acid dehalogenase)를 생산하여 생체이물질(xenobiotics)에 대한 해독제로서의 가능성이 있다.

<13> 의학적으로도 크로모박테리움 비올라세움은 잠재력이 큰데, 상기 미생물이 생산하는 폴리케타이드 신타제(polyketide synthase) 등은 항생물질 합성에 이용될 수 있고, 페나진(phenazine) 합성에 이용되는 유전자는 항암제로서의 가능성이 있으며 헤몰리신(hemolysin)의 경우 잠재적인 혈액 항응고제로서 이용될 수 있다. 실제로 크로모박테리움 비올라세움은 세균 유래 바이오플라스틱인 폴리하이드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoate)를 생산하는데, 이는 프로필렌(propylene)과 물리적 성질이 유사하고, 생분해성 플라스틱을 만드는 중요한 재생자원이 될 수 있다. 또한 세균유래 셀룰로스(cellulose)를 합성할 수 있는 ORF(open reading frame)를 가지는데, 식물에 의해 생산되는 셀룰로스와는 삼차원구조, 중합도(degree of polymerization) 및 물리화학적 성상이 다르기 때문에 유용한 상품성을 지닌다(Haselkorn, R. Proceedings of the National Academy of Sciences 100:11660-11665, 2003).

<14> 따라서 크로모박테리움 비올라세움은 항생물질, 효소, 색소, 저해제, 항암물질 등 다양한 2차 대사산물을 생산하는 아주 유용한 미생물로서 신규 항생물질을 비롯한 각종 저해제, 생리활성 물질 등의 분리, 응용에 수많은 연구가 수행 중에 있다.

<15> 비올라세인(violacein)과 디옥시비올라세인(deoxyviolacein)의 경우 소아마비 병원체인 폴리오바이러스와 단순포진 병원체인 헤르페스 바이러스(herpes virus) 감염의 예방 및 치료에 대한 특허가 나와 있다(유럽 특허 03935066DE). 특히 비올라세인은 리슈만편모충증(leishmaniosis)을 일으키는 리슈마니아(*Leishmania* sp.) 등에 대해 항생활성을 나타낸다(Chemother, J. A. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 48:445-458, 2001). 이는 비교약제인 펜타미딘 이소티아네이트(pentamidine isothionate)에 비해 신장 및 간독성이 적은 장점을 지닌다. 또한 자색 색소인 비올라세인을 생산하는 알테로모나스 루테오비올라세아(*Alteromonas luteoviolacea*), 크로모박테리움 비올라세움(*Chromobacterium violaceum*) 혹은 잔티노박테리움 리비둠(*Janthinobacterium lividum*)을 이용하여 섬유 염색제 및 착색첨가제로 사용하는 특허가 등록되어 있다(일본국 특허 00113169A). 그러나 크로모박테리움 비올라세움으로부터 추출한 비올라세인이 식물 병원성 곰팡이 및 식물 기생성 선충에 대한 항생 물질로서 식물 곰팡이병에 대하여 방제효과를 나타낸다는 보고는 전무한 상태이다.

<16> 이에 본 발명자들은 크로모박테리움 비올라세움으로부터 추출한 비올라세인이 식물 병원균 및 식물 기생성 선충에 대해 항생활성을 나타냄을 밝혀, 식물 곰팡이병인 고추 탄저병, 잔디 피티움마름병, 상추 균핵병 및 콩나물 잘록병을 방제하거나 혹은 식물 기생성 선충을 방제하는데 이용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

<17>

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<18> 본 발명은 해충 방제 및 항진균 활성을 나타내는 비올라세인과 그 유도체의 용도 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<19> 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 비올라세인(violacein) 또는 그의 유도체를 함유하는 해충

방지제 및 항진균제를 제공한다.

<20>

또한, 본 발명은

<21>

1) 크로모박테리움 비올라세움을 배양하는 단계;

<22>

2) 단계 1)에서 수득한 미생물 배양액을 유기용매로 추출하는 단계; 및

<23>

3) 단계 2)에서 수득한 추출액을 감압농축 및 동결 건조하는 단계를 포함하는 비올라세인의 제조방법을 제공한다.

<24>

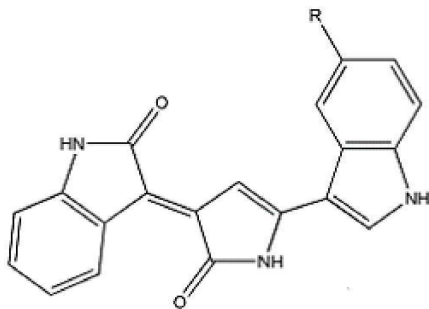
이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<25>

본 발명은 비올라세인(violacein)을 함유하는 해충 방지제 및 항진균제를 제공한다.

<26>

비올라세인 및 그 유도체는 하기의 화학식으로 표시되며 R은 OH 또는 H일 수 있다.



<27>

<28>

<29>

본 발명의 비올라세인은 액체 및 분말을 포함하나 이에 한정되지는 않고 크로모박테리움 비올라세움 (*Chromobacterium violaceum*), 알테로모나스 루테오비올라세아 (*Alteromonas luteoviolacea*) 혹은 잔티노박테리움 리비둠 (*Janthinobacterium lividum*) 으로부터 직접 분리하여 수득할 수 있으나 이에 한정되지는 않는다.

<30>

본 발명자들은 자색 색소 생산균을 균원시료부터 분리하여 표 1과 같이 균학적 성상을 알아본 결과 크로모박테리움 비올라세움으로 동정하고 크로모박테리움 비올라세움 KBC1001로 명명하였다(실시예 1 참조). 상기 균주는 감 탄저병, 고추 탄저병, 가지 마름병, 뿌리썩음병, 균핵병 및 점무늬병을 유발하는 공시 병원균인 콜레토티리쿰 글로에오스포리오이데스 (*Colletotrichum gloeosporioides*), 글로메렐라 신굴라타 (*Glomerella cingulata*), 포몹시스 (*Phomopsis* sp.), 피티움 (*Pythium* sp.), 스크레로티니아 스크레로티오럼 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 및 알타나리아 파낙스 (*Alternaria panax*)에 대하여 저지대를 형성하여, 식물 병원성 곰팡이의 성장을 저지시키는 것으로 밝혀졌다(도 3 참조).

<31>

또한 본 발명자들은 크로모박테리움 비올라세움 (*Chromobacterium violaceum*) 으로부터 자색 색소를 추출하기 위하여 최적 유기용매를 알아본 결과, 에탄올, 메탄올, 아세톤 혹은 이들의 물 희석액에 의해 색소 침출이 가장 잘 이루어짐을 밝혔다(표 2 참조). 또한 추출한 자색 색소는 흡광도 패턴(도 4)을 분석한 결과 비올라세인임을 확인할 수 있었다.

<32>

또한 본 발명자들은 실시예 2에서와 같이 크로모박테리움 비올라세움에 의한 비올라세인을 추출하기 위해 최적 배양배지에서 배양한 후 이를 메탄올, 에탄올, 아세톤 혹은 이들의 물 희석액으로 추출, 감압농축 및 동결 건조하여 비올라세인을 수득하였다(도 5 참조).

<33>

추출한 비올라세인은 표 3에 나타난 바와 같이 농도에 따라 공시 병원균인 감 탄저균, 고추 탄저균, 가지마름병균, 뿌리썩음병균, 균핵병균 및 점무늬병균에 대하여 군사 생장 억제활성을 나타냄을 확인하였다. 또한 크로모박테리움 비올라세움 혹은 이로부터 추출한 비올라세인의 식물 기생성 선충에 대한 항생활성을 검정한 결과 표 4에 나타난 바와 같이 식물 기생성 선충에 대해 농도 의존적으로 항생활성이 나타남을 확인하였다.

<34>

본 발명자들은 크로모박테리움 비올라세움 으로부터 추출한 비올라세인의 식물 곰팡이병에 대한 방제효과를 측정하기 위하여 실시예 3에서 준비한 크로모박테리움 비올라세움 배양액 혹은 이로부터 추출한 비올라세인을 고추 탄저병, 잔디 피티움마름병, 상추 균핵병 및 콩나물 잘록병과 같은 식물 곰팡이병에 대해 방제시험을 실시하였다. 그 결과 표 5 내지 표 8에서와 같이 약제처리 전에 비하여 식물 곰팡이병에 대해 농도에 의존적으

로 방제효과가 나타났다. 또한 크로모박테리움 비올라세움으로부터 추출한 비올라세인은 수박 뿌리혹선충에 대해 약제처리전에 비하여 뿌리혹 선충에 대해 농도에 의존적으로 방제효과가 나타남을 확인하였다(표 9).

<35> 이와 같이, 비올라세인은 식물 곰팡이와 기생성 선충에 대해 항생활성을 나타내므로 상기 활성 성분 이외에 하나 이상의 다른 농약제나 수화제, 유화 농축제, 수용성 분말, 분제, 과립제, 현탁 농축제 등의 농약에 일반적으로 사용되는 적당한 담체 및 또는 첨가제를 혼합함으로써 방제용 조성물을 제조할 수 있다. 고체 담체로는 키토산, 밀가루 등의 곡분, 규조토, 인회석, 석고, 활석, 벤토나이트, 점토 등의 광물질이 사용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 액체 담체로는 식물성 기름, 광물성 기름, 석유(예: 등유 및 나프타), 크실렌, 시클로 헥산, 시클로 헥사논, 디메틸포름아미드, 디메틸설폭사이드, 트리클로로에틸렌, 메틸이소부틸케톤 및 물이 사용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 필요하다면, 균질 및 안정한 제제를 조성하기 위하여 계면 활성제를 첨가한다.

<36> 본 발명의 방제 조성물중의 상기 크로모박테리움으로부터 추출한 비올라세인의 식물 곰팡이병 혹은 식물 기생성 선충 방제를 위한 유효 농도는 10 µg/ml 내지 1000 µg/ml의 범위이다(표 5 내지 표 9 참조).

<37> 본 발명의 방제 조성물은 들판, 산림, 조림지, 온실, 과수원 또는 포도원의 보호에, 재배작물 또는 삼림수, 예를들면 곡류(예, 옥수수, 밀, 쌀 또는 사탕수수), 목화, 담배, 채소류(예, 오이, 고추, 대두, 상치, 양파, 토마토 또는 후추), 밭농작물(예, 딸기, 감자, 사탕무, 땅콩 또는 콩), 사탕수수, 목초지 또는 마초(예, 옥수수 또는 사탕수수), 재배작물(예, 차, 커피, 코코아, 바나, 팜유, 코코넛, 고무 또는 향료), 과수 또는 작은 나무(예, 감귤류, 키위, 아보카도, 망고, 올리브 또는 호도), 포도원, 장식용 식물, 꽃 또는 채소류 또는 풀밭, 정원 및 공원의 관목 또는 숲의 삼림수(낙엽수 및 상록수), 재배장 또는 양수의 보호에 유용하다.

<38> 또한, 본 발명은

<39> 1) 크로모박테리움 비올라세움을 배양하는 단계;

<40> 2) 단계 1)에서 수득한 미생물 배양액을 유기용매로 추출하는 단계; 및

<41> 3) 단계 2)에서 수득한 추출액을 감압농축 및 동결 건조하는 단계를 포함하는 비올라세인 제조방법을 제공한다.

<42> 상기 단계 1에서 상기 비올라세인을 생산하는 크로모박테리움 비올라세움을 배양하는데 쓰이는 영양원으로는 세균의 영양원으로서 공지의 것을 적당히 하여 사용할 수 있다. 예로서, 시판되는 글루코스, 글리세린, 슈크로스, 락토스, 말토스, 전분, 당밀 등의 탄수화물 혹은 지방 등을 탄소원으로 하며, 시판되는 육엑스, 펩톤, 박토 트립톤, 면실가루, 콘스텝리커, 대두분, 대두박, 땅콩가루, 콘글루텐밀, 효모엑스, 어분, 카제인, N-Z 아민, 질산암모늄, 질산 나트륨, 황산암모늄 등의 질소원을 사용할 수 있고, 연산염, 식염, 탄산칼슘, 황산 마그네슘 등을 무기 영양원으로하여 사용할 수 있다. 기타 필요에 따라 미량의 금속염을 첨가할 수 있다. 이들 물질은 비올라세인을 생산하는 크로모박테리움 비올라세에 의해 이용되며, 또 비올라세인의 생산을 방해하지 않는 것이면 된다. 특히 바람직한 배지는 탄소원으로서 글루코스, 카르복시메틸셀룰로스, 셀룰로스, 글리세린, 슈크로스, 갈락토스, 말토스, 등이 있고, 질소원으로서 박토 트립톤, 박토 펩톤, 대두분, 대두박, 효모엑스, 육엑스 등이 있다.

<43> 상기 단계 3에서 유기용매로는 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 이들의 물 희석액이 사용될 수 있다.

<44> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<45> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<46> <실험예 1> 크로모박테리움의 식물 병원균에 대한 방제효과

<47> <1-1> 균주 분리

<48> 본 발명자들은 토양에서 자색 색소 생산균의 하나인 크로모박테리움 비올라세움 KBC1001(*Chromobacterium violaceum* KBC1001)을 분리하였다. 구체적으로, 대한민국 경남 의령군 의령읍 일원에서 채취한 토양을 균원 시료로 사용하여 페트리 접시에 채취한 토양을 층상으로 도포하고 쌀알을 토양 표면에 균등하게 뿌린 후, 토양이 축축해질 때까지 충분한 양의 멸균수를 첨가하였다. 이를 10℃에서 2주 배양한 후 쌀알 표면을 백금으로 긁어 영양배지에서 키운 후 자색을 형성하는 콜로니만을 선별하여 순수분리하였다.

<49>

이후 분리된 균주 중에서 키토산 분해효소의 여부를 통해 크로모박테리움 비올라세움으로 추정되는 미생물을 분리하였다. 즉, 1.2% 콜로이드성 키틴(colloidal chitin)을 포함하는 영양한천배지(nutrient broth agar, Difco사)에 균주를 접종하여 키틴(chitin) 분해환을 형성하는 균주를 키틴분해효소(chitinase) 및 자색 색소 생산성 균주로 선발되었다(도 2).

<50>

상기와 같은 방법으로 분리한 균주의 균학적 성질을 Manual of Microbiological method(Conn, H. J. and M. W. Jennison. 1957. Manual of Microbiological method. Society of American bacteriologist)에 기술된 방법에 준하여 조사해본 결과, 본 발명에서 분리한 균주는 트리할로스에서 산을 생성하며, 키실로스, 아라비노스로부터는 산을 생성하지 않는 점과 카제인을 가수분해하는 점, 특히 키틴을 가수분해하는 점 등으로부터 자색 색소를 생산하는 또 다른 미생물인 알테로모나스 루테오비올라세아나 잔티노박테리움 리비둠과는 명확하게 차별화되었다(표 1). 따라서 상기 균주를 크로모박테리움 비올라세움 KBC1001(*Chromobacterium violaceum* KBC1001)로 명명하였다.

표 1

본 발명에서 분리한 균주의 균학적 성상

현미경적 성상			
형 태	간상(rod)	크 기	0.8-1.0×2.0-4.0μm
포 자	없음	편 모	있음
운동성	있음	그람염색	음성
배양학적 성질 (육즙한천배지)			
형 상	반구형상	표 면	매끄럽고 광택가짐
주 변	평활하고 원형	색 상	자색
내 새	없음	배지색	변화없음
움 기	반구형상으로 융기		
생리학적 성질			
생육온도	10℃-40℃	생육최적온도	30℃ 내외
생육 pH	5-9	생육최적 pH	7
산소요구성	호기성(통성혐기성)	질산염 환원성	질산염에서 아질산염 생성
탈질 반응	양성	MR(Methyl Red)테스트	양성
인돌 형성	음성	황화수소 생성	음성
전분 가수분해	음성	유레아제	음성
옥시다제	양성	카탈라제	양성
카제인 가수분해	양성	VP(Voges-Proskauer)테스트	음성
단수화물로부터의 산 생성(Hugh Leifson 배지 사용)			
D-글루코스	양성	D-솔비톨	음성
D-갈락토스	음성	D-마니톨	음성
D-프룩토스	양성	이노시톨	음성
글리세린	음성	트리할로스	양성
D-만노스	음성	전분	음성
D-키실로스	음성	셀로비오스	음성
L-아라비노스	음성	아도니톨	음성
미놀린	음성	라피노스	음성
멜리비오스	음성	멜레지토스	음성
둘시톨	음성		

<51>

<52>

<1-2> 크로모박테리움 비올라세움의 식물 병원균에 대한 방제효과 측정

<53>

PDA(potato dextrose agar) 배지에서 식물병원균과 상기 균주와의 발육저지 거리를 측정하기 위하여 감탄저병, 고추 탄저병, 가지 마름병, 뿌리썩음병, 균핵병 및 점무늬병을 유발하는 콜레토틱리움 글로에오스포리 오이데스(*Colletotrichum gloeosporioides*, KCTC6160, 한국유전자은행), 글로메렐라 신굴라타(*Glomerella cingulata*, KCTC6475, 한국유전자은행), 포몹시스(*Phomopsis* sp., KACC4033, 한국농업미생물자원센터), 피티움(*Pythium* sp., KACC40581, 한국농업미생물자원센터), 스클레로티니아 스클레로티오럼(*Sclerotinia sclerotiorum*, KACC41065, 한국농업미생물자원센터) 및 알타나리아 파낙스(*Alternaria panax*, ATCC52608, American Type Culture Collection) 등의 공시 병원균 균총을 5mm 크기로 천공하여 PDA 배지에 접종하고 30℃에서 24시간 배양한 후, 30mm 떨어진 곳에 크로모박테리움 비올라세움 KBC1001을 백금으로 선 모양으로 접종하여 30℃에서 계속 배양하였다. 피티움(*Pythium* sp.)은 24시간 배양을 수행하지 않고 바로 크로모박테리움 비올라세움 KBC1001을 백금으로 접종하여 30℃에서 배양하였다. 그 결과, 병원성 곰팡이의 성장이 저지되는

현상이 관찰되었다(도 3).

<실험예 2> 자색 색소의 동정

본 발명은 상기 실험예 1에서 분리한 크로모박테리움 비올라세움 KBC1001로부터 자색 색소 분리를 수행하였다. 구체적으로, 우선 자색 색소를 추출하기 위한 최적 용매를 찾기 위해 메탄올을 비롯한 여러 유기용매를 사용하여 영양배지(nutrient broth, Difco사)에서 5일간 배양한 균주 배양액 1ml을 동량의 유기용매와 섞어 상온에서 10분 동안 교반 추출한 후 직접 백색 광원체에 색소체를 두고 눈으로 관찰하는 달관조사를 실시하여 색상 심도를 통해 색소 침출의 정도를 확인하였다(표 2).

표 2

유기용매에 의한 자색 색소의 추출

Organic solvent	Concentration (%)	Pigment extraction ^o
Methanol	100	+++
Methanol	50	++
Ethanol	100	+++
Ethanol	50	+++
Acetone	100	+++
Acetone	50	++
Ethyl acetate	100	-
Diethyl ether	100	-
Hexane	100	-
Control (water)		-

a) 추출된 용액의 색상 심도(color depth)는 5단계로 구별된다(colorless(-) to dark (++++)).

표 2에서와 같이 메탄올 혹은 에탄올에 의해 색소 침출이 가장 잘 이루어지므로 이후 실험은 메탄올을 이용하여 추출 실험에 이용하였다. 특히 영양 배지(nutrient broth, Difco사)에서 5일간 배양한 후 자색 균체에서 자색 색소를 메탄올로 추출하고 분광광도계(spectrophotometer, DU-650, Dufon사)를 이용하여 가시광선 흡수 측정을 한 결과 최대흡수파장이 587nm로 나타났다(도 4).

이는 DeMoss 등이 밝혀낸 바와 같이 크로모박테리움 비올라세움의 자색 색소인 비올라세인을 생성하며, 또한 DeMoss 등이 밝힌 바와 같은 흡광도 패턴을 나타내는 것을 알 수 있으므로 상기 추출된 자색 색소가 비올라세인(violacein) 및 디옥시비올라세인(deoxyviolacein)임을 확인하였다(DeMoss, R. D. and M. E. Happel. 1958. Nutritional Requirements of *Chromobacterium violaceum*. Journal of Bacteriology 77:137-141). 크로모박테리움 비올라세인의 경우 1. 비올라세인 및 디옥시비올라세인의 물리화학적 성상이 거의 유사하고 2. 항상 혼재되어 있고 3. 분리된 물질은 하이드록시기(-OH) 하나의 차이이며 4. 분광광도계에서 나온 곡선을 통해 이전 논문저자인 DeMoss 등의 실험에서 밝혀진 분광광도계상의 곡선과 동일하므로 이들을 근거로 디옥시비올라세인 및 비올라세인의 혼합물로 판단하였다.

<실험예 3> 비올라세인 추출

크로모박테리움 비올라세움 KBC1001을 비올라세인 생산배지(박토 트립톤 15.0g/L, 글루코스 12.5g/L) 1L에 종 배양액 1.0%(v/v)를 접종하고 20℃, 150rpm에서 5일간 진탕배양한 후 5,000rpm에서 10분간 원심분리하고 그 상등액을 제거한 후 남아있는 균체 및 색소에 에탄올, 메탄올, 아세톤 혹은 이들의 물 희석액 1L를 가하여 환류 추출장치로 상온에서 하루동안 교반한 후 다시, 5,000rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상등액을 수득하고 이를 40℃에서 5시간 동안 감압 농축한 후 동결건조기에서 24시간 저온 건조시킨 후 수득된 분말을 4℃에 보관하고 이를 실험에 사용하였다(도 5). 상기 분말은 실험예 2에서 밝힌 바와 같이 비올라세인 및 그 유도체인 디옥시비올라세인(deoxyviolacein)을 포함한다(도 6 및 7).

<실시예 1> 항생효과 시험

상기에서 수득된 비올라세인이 식물 병원균의 균사 생장 억제활성을 나타내는지 확인하기 위해 페이퍼 디스크 법(paper disk method, Ericsson, H., Hogman, C. & Wickman, K. (1954). A paper disk method for

determination of bacterial sensitivity to chemotherapeutic and antibiotic agents. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation* **6**, Suppl. 11, 21-6.)을 이용하여 감 탄저병, 고추 탄저병, 가지 마름병, 뿌리썩음병, 균핵병 및 점무늬병을 유발하는 공시 병원균인 콜레토틱룸 글로에오스포리오이데스(*Colletotrichum gloeosporioides*), 글로메렐라 신글라타(*Glomerella cingulata*), 포뮬시스(*Phomopsis* sp.), 피티움(*Pythium* sp.), 스크레로티니아 스크레로티오럼(*Sclerotinia sclerotiorum*) 및 알타나리아 파낙스(*Alternaria panax*)에 대하여 다음과 같이 검정하였다.

<64> 상기 <3-2>에서 추출한 비올라세인을 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1mg/ml가 되도록 2배씩 단계적으로 에탄올에 희석하고 멤브레인 필터(0.2μm)를 통과시킨 후 멸균한 PDA(potato dextrose agar) 18ml에 2ml씩 가한 후 혼합하여 페트리 접시(Petri dish) 상에서 균했다. 29℃에서 5 일간 PDA에서 배양시킨 공시병원균 균총을 직경 5mm 크기로 천공하여 배지에 접종하고, 29℃에서 4 일간 둔 후 균사의 생장 척도를 측정하여 항균력을 검정하였다. 그 결과, 표 3에 나타난 바와 같이, 감 탄저병, 고추 탄저병, 가지 마름병, 뿌리썩음병, 균핵병을 유발하는 식물 곰팡이 병원균에 대해 농도에 의존적으로 균사생장 억제활성을 나타냄을 확인하였다.

표 3

비올라세인의 농도에 따른 공시 병원균에 대한 균사생장 억제능

농도(μg/ml)	감 탄저균	고추 탄저균	가지마름병균	뿌리썩음병균	균핵병균	점무늬병균
100	50.1 ^a	49.2	32.1	75.3	45.3	44.9
200	46.8	44.3	26.4	69.2	39.6	38.2
400	39.2	38.4	18.3	64.4	33.2	33.0
800	32.7	33.2	12.1	38.6	27.4	26.8
1,600	27.4	26.5	9.3	32.7	22.3	19.8
대조구	53.2	52.7	36.3	80.6	48.6	47.2

<65>

<66> a) 균사체 직경(mm)

<67> 비올라세인 생산배지(박토 트립톤 15.0g/L, 글루코스 12.5g/L) 1L에서 배양한 크로모박테리움 비올라세움 및 이로부터 추출한 비올라세인의 식물 기생성 선충(*Meloidogyne* sp.)에 대한 항생활성을 검정하기 위해 하기와 같은 실험을 실시하였다.

<68> 뿌리혹 선충에 감염된 토마토에서 발견되는, 토양중에 서식하는 선충란을 채집하기 위해 감염된 토마토 뿌리를 물로 조심스럽게 씻고, 1cm 길이로 자른 후 뿌리 100g을 1% 차아염소산나트륨(sodium hypochlorite) 용액(Sigma사) 500ml이 들어 있는 혼합용 유리병(1.5L)에 넣고, 분쇄 균질기(homogenizer, 대한과학사)로 40초간 균질화한 후, 부서진 뿌리와 선충의 난낭이 섞인 용액은 100메쉬(mesh)체(정밀 표준망체, 대한과학)를 통과시켜 뿌리는 제거하고, 500 메쉬체로 알을 모은 후 실험에 이용하였다. 1.5% 한천배지(water agar)에 선충 난낭을 접종하고 부화시켜 2령 선충을 분리한 다음 살선충 실험에 사용하였다.

<69> 24구 조직배양시험판(24-well tissue culture testplate, 대한과학)에 선충을 1×10^2 마리수준으로 접종하고 상기에서 준비한 크로모박테리움 비올라세움 1×10^3 cfu/ml 내지 1×10^6 cfu/ml 혹은 1μg/ml 내지 1,000 μg/ml의 농도로 준비한 비올라세인 현탁액을 1ml 첨가한 후 25℃로 유지되는 배양기에서 24시간 동안 배양하고, 각각의 웰에 있는 처리액(선충+비올라세인 현탁액)을 페트리 접시에 옮긴 다음 증류수를 가하여 10분간 방치한 후 페트리 접시에 있는 선충의 활동성을 해부 현미경 하에서 관찰하여 살선충 효과를 결정하였다.

<70> 그 결과 표 4에서 나타난 것처럼 무처리구에 비해 비올라세인 현탁액을 처리한 것이 농도 의존적으로 살선충 효과가 나타남을 확인하였다.

표 4

식물 기생성 선충에 대한 크로모박테리움 비올라세움 혹은 비올라세인의 살선 총활성

시험약제	농도	살선총활성도(%)
크로모박테리움 비올라세움 KBC1001	1×10^8 cfu/ml	32.5
	1×10^4 cfu/ml	53.1
	1×10^5 cfu/ml	66.9
	1×10^8 cfu/ml	75.8
비올라세인	1 μ g/ml	38.6
	10 μ g/ml	59.3
	100 μ g/ml	70.5
	1,000 μ g/ml	80.3
무처리	-	3.5

<71>

<72>

<실시예 2> 비올라세인의 방제효과 시험

<73>

크로모박테리움 비올라세움 및 그로부터 분리한 비올라세인의 식물 곰팡이병에 대한 방제효과를 측정하기 위하여 비올라세인 최적 생산 배지(박토 트립톤 15.0g/L, 글루코스 12.5g/L)에서 생산된 크로모박테리움 비올라세움 KBC1001 혹은 이로부터 추출한 비올라세인을 고추 탄저병, 잔디 피티움마름병, 상추 균핵병 및 콩나물 잘록병에 걸린 식물체에 처리하여 방제 실험을 실시하였다.

<74>

구체적으로, 크로모박테리움 비올라세움 KBC1001은 1×10^3 cfu/ml 내지 1×10^6 cfu/ml로 준비하였고, 비올라세인의 경우 1 μ g/ml 내지 1,000 μ g/ml의 농도로 준비하였다. 이때 DMSO(dimethyl sulfoxide, 시그마사) 용액을 가하여 DMSO의 최종 함량이 250 μ g/ml이 되도록 하였다. 대조약제로는 고추 탄저병의 경우, 프로피수화제(유효성분 propineb 70%, 동방아그로사)를 500배 희석하여 유효성분에 대한 포장 상용농도인 1.4mg/mL의 양으로 처리하였고, 잔디 피티움마름병의 경우, 옥사프로수화제(유효성분 oxadixyl 8%+propineb 56%, 상표명:산도판에이, 동부한농사)를 500배 희석하여 유효성분에 대한 포장 상용농도인 1.28mg/mL의 양으로 처리하였으며, 상추 균핵병의 경우, 베노밀수화제(유효성분 benomyl 50%, 상표명:벤레이트, 신젠타사)를 약 1,500배 희석하여 유효성분에 대한 포장 상용농도인 325 μ g/mL의 양으로 처리하였다. 콩나물 잘록병의 경우, 베노람수화제(유효성분 benomyl 20% + thiram 20%, 상표명:벤레이트티, 신젠타사)를 200배 희석하여 유효성분에 대한 상용농도인 2mg/ml의 양에 침지한 후 실험에 사용하였다. 음성 대조군은 증류수로 희석한 농도 250 μ g/ml의 DMSO를 시료로 준비하였다.

<75>

<2-1> 고추

<76>

고추의 경우, 사질양토조건의 노지에서, 왕건 품종((주)코레콘)을 대상으로 하여 난괴법 3반복으로 각 처리당 18주씩 조사주를 설정하여 약제 처리 전 이병과율 대비 처리 10일 후 이병과율을 조사하였다. 약제처리 전 고추 탄저병의 이병과율은 32.1%이었다. 이병과율(%)은 총 조사 과수에 대한 이병과수의 백분비를 산출하였고, 방제가(%)는 [(무처리구의 이병과율 - 처리구의 이병과율) / 무처리구의 이병과율 $\times$ 100]으로 산출하여 나타내었다.

<77>

<78>

<2-2> 잔디

<79>

잔디의 경우, 사질양토조건의 노지에서, 켄터키 블루그래스(Kentucky bluegrass) 품종((주)자연과학)을 대상으로 하여 난괴법 3반복으로 각 처리당 100m²씩 조사면적을 설정하여 약제 처리 전 발병면적을 대비 처리 10일 후 피해면적을 조사하였다. 이때 약효조사표시는 전 시험구중 발병균집 면적을 측정하고 구당 총 면적에 대한 발병 면적의 백분비를 산출하여 발병면적으로 약효를 조사하였고, 방제가(%)는 [(무처리구의 발병면적 - 처리구의 발병면적) / 무처리구의 발병면적 $\times$ 100]으로 산출하여 나타내었다. 이때 약제처리 전 잔디 피티움마름병의 발병면적율은 15.2%이었다.

<80>

<2-3> 상추

<81> 상추의 경우, 사질양토조건의 하우스에서, 청치마 품종(권농종묘)을 대상으로 하여 난괴법 3반복으로 각 처리당 40주씩 조사주를 설정하여 약제 처리 전 이병주율 대비 처리 10일 후 이병주율을 조사하였다. 약제 처리 전 상추 균핵병의 이병주율은 17.5%이었다. 이때 총 조사주수에 대한 이병주수의 백분비를 산출하여 이병주율을 조사하였고, 방제가(%)는 [(무처리구의 이병주율 - 처리구의 이병주율) / 무처리구의 이병주율×100]으로 산출하여 나타내었다.

<82>

<83> <2-4> 콩나물

<84> 콩나물의 경우 은하콩 품종(농협)을 대상으로 하여 잘록병의 원인균인 피티움(*Pythium* sp.)의 포자懸탁액(1×10^3 conidia/ml)을 분무 접종하고, 1×10^3 cfu/ml 내지 1×10^6 cfu/ml의 크로모박테리움 비올라세움 KBC1001 또는 $1 \mu\text{g/ml}$ 내지 $1,000 \mu\text{g/ml}$ 의 비올라세인에 12시간 침지한 후 재배하였다. 각 처리된 콩의 양은 300g이었으며, 처리 후 12시간 간격으로 1일 2회 관수하였으며, 1회 관수량은 300ml씩 이었다. 재배온도는 22℃ 이고, 처리 7일 후의 콩나물의 뿌리잘록병 유무를 통해 이병주율을 조사하였다. 이때 각 처리 당 3반복으로 하여 반복당 50주씩 조사하였고, 방제가(%)는 [(무처리구의 이병주율 - 처리구의 이병주율) / 무처리구의 이병주율×100]으로 산출하여 나타내었다.

<85> 그 결과, 크로모박테리움 비올라세움 KBC1001 혹은 이로부터 추출한 비올라세인은 표 5 내지 표 8에 나타난 것과 같이 고추 탄저병, 잔디 피티움마름병 및 상추 균핵병에 대해 우수한 방제효과를 나타냄을 확인하였다.

표 5

시험약제의 고추 탄저병에 대한 방제효과

시험약제	농도	방제가(%)
크로모박테리움 비올라세움 KBC1001	1×10^6 cfu/ml	9.4
	1×10^4 cfu/ml	48.2
	1×10^5 cfu/ml	61.4
	1×10^8 cfu/ml	75.9
비올라세인	$1 \mu\text{g/ml}$	11.4
	$10 \mu\text{g/ml}$	51.9
	$100 \mu\text{g/ml}$	64.5
	$1,000 \mu\text{g/ml}$	79.1
프로피수환제	1.4mg/ml	82.3

<86>

표 6

시험약제의 잔디 피티움마름병에 대한 방제효과

시험약제	농도	방제가(%)
크로모박테리움 비올라세움 KBC1001	1×10^6 cfu/ml	10.7
	1×10^4 cfu/ml	52.3
	1×10^5 cfu/ml	64.9
	1×10^8 cfu/ml	77.4
비올라세인	1 μ g/ml	9.4
	10 μ g/ml	49.1
	100 μ g/ml	63.4
	1,000 μ g/ml	78.2
옥사프로수화제	1.28mg/ml	81.9

<87>

표 7

시험약제의 상추 균핵병에 대한 방제효과

시험약제	농도	방제가(%)
크로모박테리움 비올라세움 KBC1001	1×10^6 cfu/ml	21.1
	1×10^4 cfu/ml	49.4
	1×10^5 cfu/ml	62.1
	1×10^8 cfu/ml	75.4
비올라세인	1 μ g/ml	10.3
	10 μ g/ml	48.2
	100 μ g/ml	68.1
	1,000 μ g/ml	79.4
베노밀수화제	325 μ g/ml	83.5

<88>

표 8

시험약제의 콩나물 갈록병에 대한 방제효과

시험약제	농도	방제가(%)
크로모박테리움 비올라세움 KBC1001	1×10^6 cfu/ml	20.1
	1×10^4 cfu/ml	55.2
	1×10^5 cfu/ml	67.3
	1×10^8 cfu/ml	77.9
비올라세인	1 μ g/ml	30.2
	10 μ g/ml	63.8
	100 μ g/ml	72.0
	1,000 μ g/ml	80.1
베노람수화제	325 μ g/ml	85.0

<89>

<90>

<실시예 3> 크로모박테리움 비올라세움 및 비올라세인의 선충 방제효과 시험

<91>

크로모박테리움 비올라세움 및 비올라세인의 식물 기생성 선충에 대한 방제효과를 측정하기 위하여 비

올라세인 최적 생산 배지(박토 트립톤 15.0g/L, 글루코스 12.5g/L)에서 생산된 크로모박테리움 비올라세움 KBC1001 혹은 이로부터 추출한 비올라세인으로 수박 뿌리혹선충에 대한 방제 실험을 실시하였다.

<92> 구체적으로, 크로모박테리움 비올라세움 KBC1001은 1×10^3 cfu/ml 내지 1×10^6 cfu/ml로 준비하였고, 비올라세인의 경우 1 µg/ml 내지 1,000 µg/ml의 농도로 준비하였다. 이때 트윈20(Tween 20, 시그마사) 용액을 가하여 트윈 20의 최종 함량이 250 µg/ml이 되도록 하였다. 준비된 약제는 정식 2주전 토양혼화처리를 하였다. 대조약제로는 카보입제(유효성분 carbofuran 3%, 동방아그로사)를 1,000m²당 3kg의 사용량으로 정식 2주전 토양 혼화처리하였다. 음성 대조군은 증류수로 희석한 농도 250 µg/ml의 트윈 20을 시료로 준비하였다.

<93> 수박은 사질양토조건의 하우스에서 삼복 꿀수박 품종(입수처를 기재하여 주시기 바랍니다)을 대상으로 하여 난괴법 3반복으로 각 처리당 20주씩 조사주를 설정하여 약제 처리 후 30일에 선충수 및 난낭수를 조사하였다. 약제처리전 뿌리혹선충에 감염된 포장에서 흙을 채집하여 사전 밀도 조사결과 토양 300g당 213 마리로서 약효조사에 충분한 밀도였다. 이때 방제율(%)은 [(무처리구의 선충수 혹은 난낭수 - 처리구의 선충수 혹은 난낭수) / 무처리구의 선충수 혹은 난낭수 × 100]으로 산출하여 나타내었다.

<94> 그 결과, 크로모박테리움 비올라세움 KBC1001 혹은 이로부터 추출한 비올라세인은 표 9에 나타낸 것과 같이 식물 기생성 선충에 대해 농도에 의존적으로 방제효과를 나타냄을 확인하였다.

표 9

시험약제의 수박 뿌리혹선충에 대한 방제효과

시험약제	농도	선충수에 대한 방제율(%)	난낭수에 대한 방제율(%)
크로모박테리움 비올라세움 KBC1001	1×10^6 cfu/ml	8.2	6.5
	1×10^4 cfu/ml	34.8	33.6
	1×10^5 cfu/ml	53.2	51.9
	1×10^6 cfu/ml	73.4	70.8
비올라세인	1 µg/ml	12.3	10.9
	10 µg/ml	46.2	44.2
	100 µg/ml	59.9	57.3
	1,000 µg/ml	75.2	74.3
카보입제	325 µg/ml	77.4	76.3

<95>

발명의 효과

<96> 본 발명은 식물 곰팡이병 및 식물 기생성 선충에 대해 방제활성을 갖는 크로모박테리움 비올라세움으로부터 추출한 비올라세인의 제조 방법에 관한 것으로 본 발명의 크로모박테리움 비올라세움(*Chromobacterium violaceum*)으로부터 추출한 비올라세인(violacein)이 식물 병원성 곰팡이 및 식물 기생성 선충의 생육을 억제하는 활성물질이며 비올라세인은 고추 탄저병, 잔디 피티옴마름병, 상추 균핵병 및 콩나물 잘록병 등의 식물 곰팡이병 혹은 식물 기생성 선충의 방제에 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- <1> 도 1은 균원시료로부터 분리한 자색 색소 형성 균주(*Chromobacterium* sp.)를 나타낸 그림이고,
- <2> 도 2는 콜로이드성 키틴(colloidal chitin) 배지에서 자색 색소 형성 균주의 키틴 분해환을 나타낸 그림이고,
- <3> 도 3은 크로모박테리움 비올라세움이 식물 병원성 곰팡이에 대해 저지대를 형성한 결과를 나타낸 그림이고,
- <4> 도 4는 크로모박테리움 비올라세움으로부터 메탄올로 추출한 자색 색소의 흡광도 스펙트럼이고,
- <5> 도 5는 크로모박테리움 비올라세움으로부터 추출한 비올라세인 및 그 유도체의 시료 제조 기술을 나타

낸 개략도이고,

<6> 도 6은 비올라세인과 그 유도체인 디옥시비올라세인(deoxyviolacein)의 일반식이고,

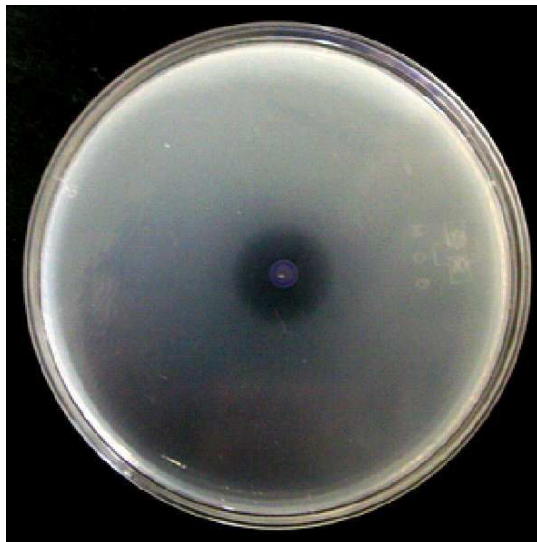
<7> 도 7은 크로모박테리움 비올라세움으로부터 추출한 비올라세인 분말을 나타낸 그림이다.

도면

도면1



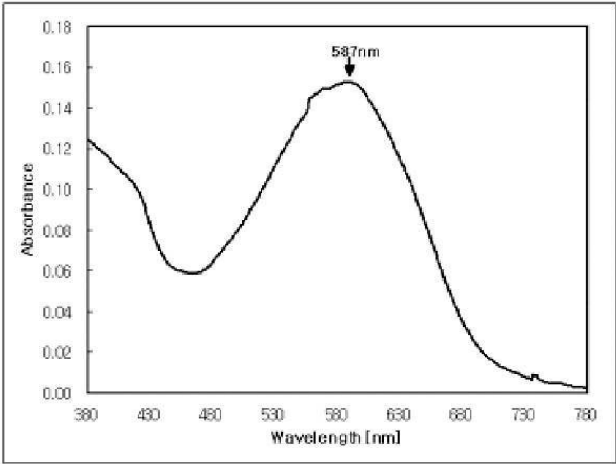
도면2



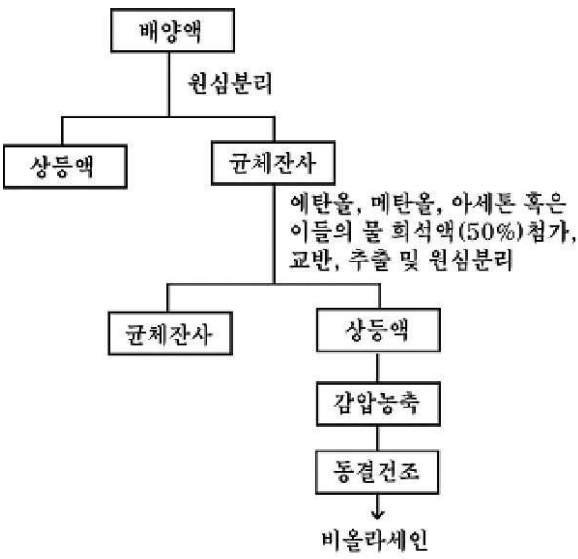
도면3



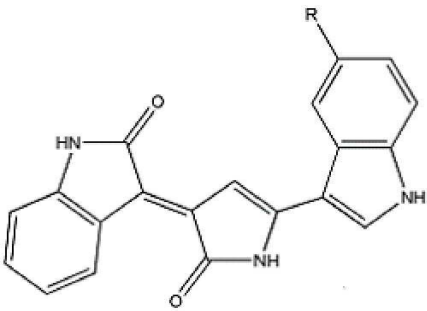
도면4



도면5



도면6



도면7

