



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0050160
(43) 공개일자 2016년05월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01N 43/14 (2006.01) A01N 65/44 (2009.01)

A01P 5/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0147504

(22) 출원일자 2014년10월28일

심사청구일자 2014년10월28일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

조만호

경기 용인시 기흥구 금화로82번길 14, 112동 403호 (상갈동, 금화마을대우현대아파트)

이상원

경기 수원시 영통구 삼성로268번길 8, 2동 1209호 (원천동, 원천삼성아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

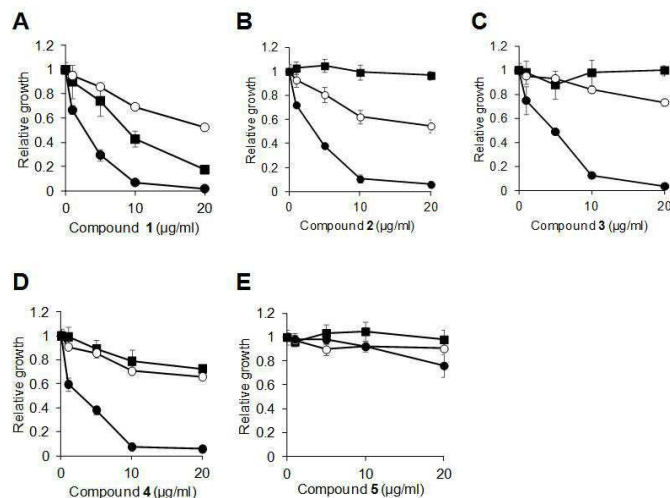
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 사쿠라네틴을 포함하는 식물병 방제용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 사쿠라네틴(sakuranetin)을 포함하는 식물병 방제용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 농약 제제, 비료 및 상기 조성물을 이용한 식물병 병원균의 방제 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

박혜린

울산 남구 문수로369번길 58, 7동 209호 (옥동, 도
성아파트)

유영철

경기 수원시 영통구 청명로 47-1, 201호 (영통동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ00950604

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 기능성 메틸 플라보노이드 생산을 위한 식물 대사 조절 기술 개발

기 여 율 60/100

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2013.02.01 ~ 2014.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A1A2044057

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 병 저항성 벼 개발을 위한 파이토알렉신 생합성 관련 메틸전이 효소 유전자 발굴 및 기능

규명

기 여 율 40/100

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2015.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

사쿠라네틴(sakuranetin)을 포함하는 식물병 방제용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 식물병은 리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 비폴라리스 오리재(*Bipolaris oryzae*), 크산토모나스 오리재 병원형 오리재(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*), 크산토모나스 오리재 병원형 오리지콜라(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*) 및 부르크홀데리아 글루매(*Burkholderia glumae*)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 균에 의해 발병되는 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 식물병은 벼 갈색점무늬병(rice brown spot), 벼 잎집무늬마름병(sheath blight), 벼 흰 잎마름병(bacterial leaf blight of rice), 벼 줄무늬병(stripe disease of rice) 및 벼 세균성 알마름병(bacterial grain rot)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 사쿠라네틴은 자외선을 처리한 벼에서 추출한 것인, 조성물.

청구항 5

제1항의 조성물을 포함하는 농약 제제.

청구항 6

제1항의 조성물을 포함하는 비료.

청구항 7

제1항의 조성물을 리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 비폴라리스 오리재(*Bipolaris oryzae*), 크산토모나스 오리재 병원형 오리재(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*), 크산토모나스 오리재 병원형 오리지콜라(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*) 및 부르크홀데리아 글루매(*Burkholderia glumae*)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 균에 감염된 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 식물병 병원균의 방제 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 사쿠라네틴(sakuranetin)을 포함하는 식물병 방제용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 농약 제제, 비료 및 상기 조성물을 이용한 식물병 병원균의 방제 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 벼는 세계 인구에 중요한 식량 자원이며, 가장 많이 이용되는 곡물 중 하나이다. 따라서, 병원균 감염에 의해 상기 작물에 발생하는 세균병은 대규모의 고사로 연결될 수 있어 심한 경우 재배농가에는 수확량의 급감으로 인한 수입감소를 유발하는 한편, 소비자에게는 수요와 공급의 불균형으로 인한 공급가의 급상승을 초래하여 막대한 경제적 혼동을 유발할 수 있다.
- [0003] 국내에 보고된 바로는 세균성 벼 알마름병(bacterial grain rot), 세균성 잎줄무늬병(bacterial brown streak) 및 세균성 벼 흰잎마름병(bacterial leaf blight)의 주된 3종의 세균병이 있으며, 이들 세균병은 전 세계적으로 아시아는 물론 북남미 및 유럽 등지에서도 발병하는 것으로 보고되고 있다. 이들 세균병은 각각 부르크홀데리아 글루매(*Burkholderia glumae*), 애시도보락스 아바내(*Acidovorax avenae*) 또는 크산토모나스 오리제(*Xanthomonas oryzae*) 등의 감염에 의해 발병하는 것으로 상기 병원균에 의해 감염된 종자는 1차 전염원이 되어 대발생의 원인이 될 수 있다. 또한, 상기 병원균들은 물 예컨대, 관개용수를 통해 전염된다. 따라서, 이러한 감염으로 인한 병해의 효율적인 차단 및 건전 종자 확보를 위해 보다 효과적인 살균제의 개발이 요구되고 있다
- [0004] 또한, 살균제들은 방제 효과를 나타냄에도 불구하고 인축과 생태계에 잠재적으로 위험을 미칠 수 있는바, 친환경적이면서도 부작용이 낮은 살균제를 개발하기 위한 연구가 진행되고 있다. 이와 관련하여, 한국등록특허 제 10-0713857호에서는 여로 추출물 및 이로부터 분리된 베라트라민을 포함하는 친환경 살균제에 대해 개시하고 있고, 한국등록특허 제 10-1230367호에서는 플로레틴 화합물 및 이를 포함하는 사과추출물을 함유하는 식물병 방제용 조성물에 대해 개시하고 있으나, 자외선을 처리한 벼로부터 추출된 화합물의 항균 활성에 대해서는 보고된 바 없다.
- [0005] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 친환경적이면서도 우수한 방제효과를 나타낼 수 있는 살균제를 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 자외선을 처리한 벼에서 빠르게 축적된 화합물들이 높은 항균 활성을 나타냄을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

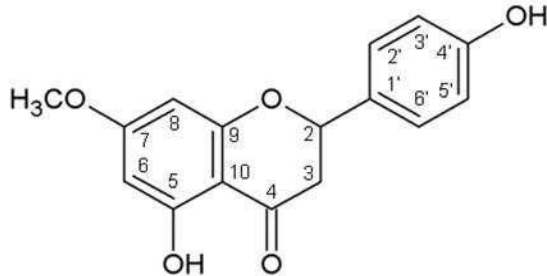
- [0006] 본 발명의 목적은 사쿠라네틴(sakuranetin)을 포함하는 식물병 방제용 조성물을 제공하기 위한 것이다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 농약 제제를 제공하기 위한 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 비료를 제공하기 위한 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 이용한 식물병 병원균의 방제 방법을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 구현예는 사쿠라네틴(sakuranetin)을 포함하는 식물병 방제용 조성물을 제공한다.
- [0011] 본 발명에서, “사쿠라네틴(sakuranetin)”이란, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물로서, 플라보노이드의 일종이다. 플라보노이드류는 일반적으로 피토알렉신으로서 작용하며, 자외선 조사 등의 스트레스로부터 식물을 보호하는 기능을 가지고 있다. 또한 사쿠라네틴은 알러지-예방효과 및 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*)에 대한 살균작용을 하며 지방세포 분화에 작용하는 것으로 보고된 바 있다.
- [0012] 본 발명 일 실시예에서는 자외선을 처리한 벼에서 빠르게 축적되는 화합물 1 내지 5를 확인하고 분리하였으며, NMR 분석을 통해 화합물 1이 사쿠라네틴임을 확인하였다(표 1).

[0013] 또한 본 발명 일 실시예에서는 화학식 1의 사쿠라네틴이 진균성 병원체 및 세균성 병원체 모두에 대해 항균 활성을 나타내는 것을 관찰하였는바(표 6), 광범위한 살균제로서 활용될 수 있음을 확인하였다.

화학식 1



[0014]

[0015] 본 발명에서, “식물병”이란, 식물에 일어나는 질병을 의미하며, 본래의 형태와 생리기능에 이상이 생기는 것을 말한다. 병의 원인은 병원체에 의한 병해, 토양 중의 양분결핍, 기상조건, 유독가스 등에 의한 것일 수 있다. 구체적으로 상기 식물은 벼 일수 있으며, 상기 식물병은 벼에 발생하는 질병 또는 질환일 수 있다. 더욱 구체적으로, 진균성 병원체 또는 세균성 병원체로부터의 감염에 의해 벼에 발병된 것일 수 있다.

[0016] 구체적으로, 상기 식물병은 비폴라리스 오리재(*Bipolaris oryzae*), 크산토모나스 오리재 병원형 오리재(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*), 크산토모나스 오리재 병원형 오리지콜라(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*) 및 부르크홀데리아 글루매(*Burkholderia glumae*)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 균에 의해 발병되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 또한 구체적으로, 상기 식물병은 벼 갈색점무늬병(rice brown spot), 벼 잎집무늬마름병(sheath blight), 벼 흰 잎마름병(bacterial leaf blight of rice), 벼 줄무늬병(stripe disease of rice) 및 벼 세균성 알마름병(bacterial grain rot)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명에서 용어 “벼 갈색점무늬병(rice brown spot)”은, 줄기, 열매 등에 발생하는 진균에 의한 식물병으로, 잎에는 부정원형의 갈색무늬가 생기며, 열매에는 표면에 약간 움푹한 갈색무늬가 나타나고, 줄기에 발생하면 담갈색의 병무늬가 움푹해지는 증상이 나타난다. 갈색점무늬병을 일으키는 병원균은 식물의 종류에 따라 다양하며, 벼의 경우 비폴라리스 오리재(*Bipolaris oryzae*)에 의해 발병될 수 있다.

[0019] 본 발명 일 실시예에서는 자외선을 처리한 벼에서 분리한 화합물 1 및 화합물 4가 비폴라리스 오리재 균주에 대해 억제 효과를 나타내는 것을 확인하였으며, 특히 화합물 1, 사쿠라네틴의 경우 우수한 억제 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다(표 6).

[0020] 본 발명에서 용어 “벼 잎집무늬마름병(sheath blight)”은 벼 등의 농작물에서 발생하는 병해 중 하나로서, 벼과 식물의 잎집과 잎에 발생되는 병으로 전년도 병반에서 형성된 균핵이 눈에 떨어졌다가 이듬해 이앙 후 발병이 시작되는 것으로 알려져있다. 처음에는 잎집에 병반이 나타나는데 물에 데친 것처럼 수침상의 타원형에서 압녹색으로 확대되면서 병반 주위가 연한 갈색으로 변한다. 병반의 크기는 일정하지 않고 7월 하순~8월 상순에 대부분 균핵을 형성하며 벼가 자라면서 병반이 점차 위로 올라가게 되는데 2차 전염은 잎집에 형성된 병반에서 나오는 균사에 의해 옆에 있는 줄기나 포기, 또는 잎에 새로운 병반을 형성한다.

[0021] 진균성 질병 중 하나로 알려져 있으며, 리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*)에 감염되어 발병될 수 있다.

[0022] 본 발명 일 실시예에서는 자외선을 처리한 벼에서 분리한 화합물 1, 즉 사쿠라네틴이 리족토니아 솔라니에 대해 억제 효과를 나타내는 것을 관찰하여(표 6), 상기 균주 및 벼 잎집무늬마름병에 대한 방제용 조성물로 활용될

수 있음을 확인하였다.

- [0023] 본 발명에서 용어 “벼 흰잎마름병(bacterial leaf blight)”은 크산토모나스 오리재 병원형 오리재(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)의 감염에 의해 발생하는 병으로 알려져 있으며, 세계적으로 광범위하게 발생하며, 한국을 비롯하여 일본, 대만, 필리핀, 인도, 인도네시아 등 동남아의 벼 재배지에서 주로 문제가 되는 병이다.
- [0024] 상기 병원균은 (1 내지 2 μm) $\times$ (0.8 μm) 크기의 간상으로 끝이 둥글고 하나의 편모를 가진다. 그람음성균으로 포자를 갖지 않는다. 균체 표면은 다당류 점질액(캡슐)으로 싸여 있으며, 여럿이 뭉치면 상기 캡슐이 극심한 환경변화에서 세균이 안정적으로 존재할 수 있도록 한다. 영양배지 상에서 노란색을 띠는 둥글고 매끄러운 집락을 형성하며, 보통 5 내지 10 $^{\circ}\text{C}$ 에서 생육가능하나, 최적 온도는 26 내지 30 $^{\circ}\text{C}$ 이다. 사멸온도는 53 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간이나 건조형태의 균은 56 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간으로 다소 길다.
- [0025] 상기 질환은 도관부병으로 주로 잎에 발생한다. 상기 병으로 인한 피해양상은 잎에서의 광합성 기능 상실로 인한 등숙물의 저하로 인하여 쌀의 수량을 감소시키고 미질을 나쁘게 하는 것이다. 물을 통해 전염되며 잎의 기공, 수공이나 상처를 통해 병원균이 침입하여 감염되고 물관 및/또는 체관에서 증식하여 발생하는 것이므로, 침수 및 태풍이 병 발생을 조장하며, 고온 다습한 경우 병원균의 증식이 왕성하여 피해가 커지기도 한다.
- [0026] 본 발명 일 실시예에서는 자외선을 처리한 벼에서 분리한 화합물 1 내지 4가 크산토모나스 오리재 병원형 오리재에 대해 억제 효과를 나타내는 것을 확인하였으며(도 3 및 표 6), 상기 4종의 화합물 중 화합물 1의 사쿠라네틴의 억제 활성이 특히 우수한 것을 알 수 있었다.
- [0027] 본 발명에서 용어 “벼 줄무늬병(stripe disease of rice)”은 증상으로 잎, 줄기 등에 갈색줄무늬의 괴저증상을 나타내며, 크산토모나스 오리재 병원형 오리지콜라(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*) 감염에 의해 발생하는 병으로 알려져 있다. 특히 배수관리가 불량할 때 많이 발생하며, 주로 이병종자 및 주변 잡초를 통하여 전염이 되므로 건전 종자를 사용하고 잡초관리에도 세심한 주의가 필요하다.
- [0028] 본 발명 일 실시예에서는 자외선을 처리한 벼에서 분리한 화합물 1 내지 5 모두 크산토모나스 오리재 병원형 오리지콜라에 대해 억제 효과를 나타내는 것을 확인하였으며(도 3 및 표 6), 특히 화합물 1의 사쿠라네틴의 억제 활성이 우수한 것을 알 수 있었다.
- [0029] 본 발명에서 용어, “벼 세균성 알마름병(bacterial grain rot)”은 부르크홀데리아 글루메(*Burkholderia glumae*)의 감염에 의해 발생하는 병으로, 한국, 일본, 동남아시아를 비롯해 미국 벼 재배지역에서도 중요시되는 병으로 기후변화에 민감한 병이다. 상기 벼 알마름병을 유발하는 병원균은 짧은 간균으로 2 내지 4개의 편모를 가진 (0.5 내지 0.7 μm) $\times$ (1.5 내지 2.5 μm) 크기의 호기성 그람음성세균으로, 상기 세균은 영양배지 상에서 유백색 원형이고 가운데가 볼록한 집락을 형성하며, 최적 생육온도는 30 $^{\circ}\text{C}$ 이며, 수용성 황록색 색소를 형성하는 것으로 알려져있다.
- [0030] 본 발명 일 실시예에서는 자외선을 처리한 벼에서 분리한 화합물 중 화합물 1 및 화합물 4가 부르크홀데리아 글루메에 대해 억제 효과를 나타내는 것을 확인하였으며(도 3 및 표 6), 특히 화합물 1의 사쿠라네틴이 현저히 우수한 억제 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다.
- [0031] 본 발명에서 용어, “방제”란 작물 등의 식물을 병해충의 피해로부터의 예방, 발생한 병원체의 제거 또는 병원체의 파급을 저지시키는 것을 의미한다. 병해충에 독성이 있는 살균제 또는 살충제를 사용하는 화학적 방제 뿐만 아니라 저항성 식물의 재배, 돌려짓기 등을 이용하여 병원체에 대해 부적절한 환경을 조성하는 방법, 식물체를 열처리하거나 토양을 증기처리하여 병원체를 제거하는 방법, 유인물질이나 성페로몬을 이용하여 해충을 유인하여 포살하는 방법 등이 포함된다.
- [0032] 본 발명 일 실시예에서는 자외선을 처리한 벼에서 빠르게 축적된 화합물 1 내지 5가 우수한 항균 활성을 나타내는 것을 확인하였는바(도 3 및 표 6), 상기 화합물을 포함하는 조성물을 식물, 토양 또는 관개수로 등에 사용하여 진균성 또는 세균성 병원체의 성장을 억제시킬 수 있다. 구체적으로, 벼에서의 진균성 또는 세균성 병원체로

부터의 감염을 저지하여 상기 병원체로부터의 피해를 예방할 수 있다.

- [0033] 본 발명의 방제용 조성물은 통상적으로 이용되는 살충제 또는 살균제에 함유되는 물질을 더욱 포함할 수 있으며, 상기 활성성분 이외에 부형제로 약제학적으로 허용 가능한 고체 담체, 액체 담체, 액체 희석제, 액화된 기체 희석제, 고체 희석제 또는 기타 보조제 예를 들어 유화제, 분산제 또는 기포제 등의 계면활성제를 더욱 포함할 수 있다. 본 발명의 방제용 조성물은 활성성분과 상기 부형제를 혼합하여 농업용 조성물로 제제화시켜 사용할 수 있고, 농업용 조성물로 제제화하는 방법으로 당분야에서 통상적으로 사용되는 방법은 모두 적용할 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명의 방제용 조성물은 수화제, 입제, 분제, 유제, 스프레이상, 연막제, 캡셀형 및 젤상의 제형으로 제공될 수 있으며, 조성물의 부력을 위해 도넛형과 같은 제형의 접촉제로 제공될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 다른 일 구현에는 상기 조성물을 포함하는 농약 제제를 제공한다.
- [0036] 본 발명에서 용어, “농약”이란, 농작물의 보호와 생장에 사용되는 약제를 의미한다. 구체적으로 농작물의 재배, 저장 중 발생하는 병, 해충, 잡초, 병균, 선충, 응애 등을 방제하기 위해 사용하기 위한 제제 뿐 아니라 농작물의 생리기능을 증진 또는 억제하는데 사용하기 위한 성장조절제, 약효를 증진시키는 보조제를 모두 포함할 수 있다.
- [0037] 본 발명 일 실시예에서는 자외선을 처리한 벼에서 빠르게 축적된 화합물 1 내지 5가 우수한 항균 활성을 나타내어 식물에 대한 병원체의 방제용으로 사용될 수 있음을 관찰하여(도 3 및 표 6), 살균 용도로 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 일 구현에는 상기 조성물을 포함하는 비료를 제공한다.
- [0039] 본 발명에서 용어, “비료”란 거름이라고도 불리며, 토지를 기름지게 하고 초목의 생육을 촉진시키는 영양물질을 의미한다. 본 발명의 조성물을 포함하는 비료는 파종 전 토양과 혼합하여 간편하게 사용할 수 있으며, 농약 등의 살포시 함께 시비할 수 있다.
- [0040] 특히 본 발명의 화합물은 벼에서 추출한 천연 화합물로서 친환경적인 조성물로서 사람이나 가축 및 토양에 무해하므로 화학비료보다 안전하면서도 병해를 방지할 수 있다. 본 발명의 비료를 사용할 수 있는 작물로는 이에 제한되는 것은 아니나, 벼에 사용될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 또 다른 일 구현에는 상기 방제용 조성물을 리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 비폴라리스 오리재(*Bipolaris oryzae*), 크산토모나스 오리재 병원형 오리재(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*), 크산토모나스 오리재 병원형 오리지콜라(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*) 및 부르크홀데리아 글루메(*Burkholderia glumae*)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 균에 감염된 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 식물병 병원균의 방제 방법을 제공한다.
- [0042] 또한, 상기 방제용 조성물을 방제가 필요한 식물체 또는 지역에 처리함으로써 벼 갈색점무늬병(rice brown spot), 벼 잎집무늬마름병(sheath blight), 벼 흰잎마름병(bacterial leaf blight of rice), 벼 줄무늬병(stripe disease of rice) 및 벼 세균성 알마름병(bacterial grain rot)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 식물병을 방제할 수 있다. 구체적으로, 상기 방제용 조성물을 식물 병원균, 즉 리족토니아 솔라니, 비폴라리스 오리재, 크산토모나스 오리재 병원형 오리재, 크산토모나스 오리재 병원형 오리지콜라 및 부르크홀데리아 글루메로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 균과 직접 접촉할 수 있도록 할 수 있으며, 토양에 혼합 처리하거나 또는 작물에 직접 분무하는 방법을 사용할 수 있다.

발명의 효과

- [0043] 본 발명의 화합물은 우수한 항균 활성 및 항진균 활성을 나타내어 식물의 병원균에 대한 방제용 조성물로 사용

될 수 있을 뿐 아니라 자외선을 처리한 벼로부터 추출한 천연 화합물로서 부작용이 없는 천연 살균제 및 이를 포함하는 비료로서 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 자외선 처리에 의해 빠르게 증가되는 화합물 1 내지 5를 검출한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 자외선 처리 후 시간에 따른 화합물 1 내지 5의 벼 잎에서의 축적된 양을 측정한 것으로서, 자외선 처리 후 화합물 1 내지 5가 모두 빠르게 축적된 것을 나타낸 것이다(도 2의 A; 화합물 1, 도 2의 B; 화합물 2, 도 2의 C; 화합물 3, 도 2의 D; 화합물 4, 도 2의 E; 화합물 5).

도 3는 화합물 1 내지 5 각각의 병원체에 대한 억제 활성을 관찰한 그래프를 나타낸 것이다(도 3의 A; 화합물 1, 도 3의 B; 화합물 2, 도 3의 C; 화합물 3, 도 3의 D; 화합물 4, 도 3의 E; 화합물 5, X_{oo} (■), X_{oc} (●) 및 $B. glumae$ (○)).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 자외선 처리에 의해 축적된 화합물의 분리

1-1. 자외선 처리

벼(*Oryza sativa* L. spp *japonica* cv. *Dongjin*)를 낮에는 28℃ 및 밤에는 20℃의 조건으로 온실에서 8주 동안 키웠다. 이후 2시간 동안 다섯 개의 20W 살균등(254nm에서 최대 발광, 7.5W UV 출력, 산쿄 덴키사, 일본)이 장착된 생장 챔버에서 8주일 된 벼에 자외선을 처리하였다. 자외선 처리한 벼를 온실로 옮기고 파이토케미칼(phytochemical) 분석을 위하여 자외선 처리 후 1, 24, 48, 72 및 96시간에 잎을 각각 수집하였다.

1-2. 자외선 처리에 의해 증가된 화합물의 분리 및 확인

본 발명자들은 상기 1-1의 자외선 처리에 의해 빠르게 증가되는 화합물들이 존재함을 확인하였다(도 1). 또한, 상기 화합물들이 자외선 처리 후 벼 잎에서 빠르게 축적되는 것을 확인하였다(도 2). 상기 화합물들은 화합물 1 내지 5로 지칭하였으며, 화합물 1 내지 5를 분리하여 확인하였다.

자외선을 처리한 벼 잎을 액체 질소에 담그고 1시간 동안 70% 메탄올(MeOH)-물로 추출하였다. 원심분리 후, 수성 메탄올 추출물을 얻고 진공 상태에서 건조시켰다. 이후 페놀성 화합물을 풍부하게 하기 위해 잔여물을 에틸 아세테이트(EtOAc)-물(1:1) 혼합물로 녹여서 분획하고, 에틸아세테이트 상(phase)을 진공 상태에서 건조시켰다. 잔여물을 메탄올에 녹이고, Park, H. L. et. al., *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 2013, 56, 237-241 「Cytotoxic property of ultraviolet-induced rice phytoalexins to human colon carcinoma HCT-116 cells」에 개시된 용출 조건에 따라 Sunfire C₁₈ 컬럼(워터스, 밀포드, MA)이 장착된 역상 HPLC를 이용하여 분석하였다.

자외선 처리 후 1일 째에 수집한 벼 잎으로부터 얻은 샘플로부터 자외선에 의해 유도된 화합물을 분리하기 위해 실리카 겔 컬럼에 적용하였다. 상기 표본을 헥산-벤젠(1:1), 헥산-벤젠(1:2), 헥산-벤젠(1:3), 벤젠-클로로포름(1:1), 클로로포름-에틸아세테이트(1:1) 및 에틸아세테이트로 연속하여 용출시켰다. 상기 용출된 분획물을 상기 용출 조건에 따라 Sunfire C₁₈ 컬럼(워터스, 밀포드, MA)이 장착된 역상 HPLC로 분석하였다. 이후 자외선으로 유도된 화합물을 함유하는 분획물을 별도로 수집하고 진공 상태에서 건조시켰다. 각각의 자외선으로 유도된 화합물의 분획물을 25분(유속 3ml/min) 동안 3% 아세트산-물에서 25-60% 아세트로나이트릴 선형구배 용출을 통해 프레퍼티브 Sunfire C₁₈ 컬럼(워터스, 밀포드, MA)이 장착된 역상 HPLC로 추가 정제하였다.

[0053] 상기 분리된 화합물은 NMR 분광법 및 양성 전자 분무 이온화 질량 분광 분석(positive electron spray ionization mass spectrometry, ESI MS)을 이용하여 확인하였다. 분리된 화합물의 NMR 스펙트럼은 내부 표준으로서 TMS를 이용하여 Bruker Avance 600 NMR 분석기(독일)로 CD₃OD에서 기록하였다.

[0054] 분리된 화합물 1 내지 5의 ¹H(600MHz) 및 ¹³C(150MHz)의 NMR 화학이동(chemical shift)을 분석한 결과는 각각 하기 표 1 내지 표 5에 나타난 바와 같다.

표 1

No.	1
	¹ H
2	5.37 <i>dd</i>
3	2.73 <i>dd</i>
	3.14 <i>dd</i>
4	
5	
6	6.05 <i>d</i>
7	
7-OCH ₃	3.80 <i>s</i>
8	6.03 <i>d</i>
9	
10	
1'	
2'	7.31 <i>d</i>
3'	6.81 <i>d</i>
4'	
5'	6.81 <i>d</i>
6'	7.31 <i>d</i>

[0055]

[0056] 상기 표 1의 NMR 분석 결과로부터 화합물 1은 사쿠라네틴임을 확인할 수 있었다.

표 2

No.	2	
	¹ H	¹³ C
1		131.4
2	7.05 <i>d</i>	130.8
3	6.71 <i>d</i>	116.5
4		157.1
5	6.71 <i>d</i>	116.5
6	7.05 <i>d</i>	130.8
7	2.75 <i>t</i>	35.9
8	3.47 <i>t</i>	42.7
1'		136.5
2'	7.53 <i>d</i>	128.9
3'	7.37 <i>m</i>	130.1
4'	7.37 <i>m</i>	130.9
5'	7.37 <i>m</i>	130.1
6'	7.53 <i>d</i>	128.9
7'	7.51 <i>d</i>	141.8
8'	6.56 <i>d</i>	122.1
9'		168.8

[0057]

[0058] 상기 표 2의 NMR 분석 결과로부터 화합물 2는 *N*-트랜스-신나모일타이라민(*N-trans*-cinnamoyltyramine)임을 확인할 수 있었다.

표 3

No.	3	
	¹ H	¹³ C
2	7.09 <i>s</i>	123.6
3		113.7
4		129.0
5	7.60 <i>d</i>	119.5
6	6.98 <i>dd</i>	119.8
7	7.07 <i>dd</i>	122.5
8	7.32 <i>d</i>	112.4
9		138.4
10	3.06 <i>t</i>	26.4
11	3.66 <i>t</i>	42.3
1'		136.1
2'	7.76 <i>d</i>	129.6
3'	7.42 <i>dd</i>	128.4
4'	7.50 <i>d</i>	132.6
5'	7.42 <i>dd</i>	128.4
6'	7.76 <i>d</i>	129.6
7'		170.3

[0059]

[0060] 상기 표 3의 NMR 분석 결과로부터 화합물 3은 *N*-벤조일트립타민(*N*-benzoyltryptamine)임을 확인할 수 있었다.

표 4

No.	4	
	¹ H	¹³ C
2	7.08 <i>s</i>	123.6
3		113.4
4		129.1
5	7.58 <i>d</i>	119.4
6	6.99 <i>dd</i>	119.7
7	7.07 <i>dd</i>	122.5
8	7.32 <i>d</i>	112.4
9		138.4
10	3.01 <i>t</i>	26.5
11	3.60 <i>t</i>	41.8
1'		136.5
2'	7.53 <i>d</i>	129.0
3'	7.37 <i>m</i>	130.1
4'	7.37 <i>m</i>	130.9
5'	7.37 <i>m</i>	130.1
6'	7.53 <i>d</i>	129.0
7'	7.52 <i>d</i>	141.7
8'	6.58 <i>d</i>	122.2
9'		168.8

[0061]

[0062]

상기 표 4의 NMR 분석 결과로부터 화합물 4는 *N*-트랜스-신나모일트립타민(*N-trans-cinnamoyltryptamine*)임을 확인할 수 있었다.

[0063]

또한, 이중핵의 다중 결합 상관관계(heteronuclear multiple bond correlation, HMBC) 스펙트럼에서, δ 3.60 (H-11)의 메틴(methine) 양성자 신호가 δ 168.8 (C-9')의 신나모일 모이어티 내에 카보닐 탄소 신호와 관련되어 관찰되었으며, 이로부터 트립타민 모이어티(moiety)가 아미노 결합을 통해 신나모일 모이어티에 연결되어 있음을 알 수 있었다. 아울러, 양성 ESI MS에서 m/z 291.3 $[M+H]^+$ 의 가짜 분자(pseudomolecular) 이온 피크의 검출을 통해 상기 화합물 4가 *N*-트랜스-신나모일트립타민임을 확인하였다.

표 5

No.	5	
	¹ H	¹³ C
2	7.02 s	124.4
3		112.7
4		129.6
5	6.95 d	103.7
6		151.3
7	6.65 dd	112.8
8	7.15 d	112.5
9		133.3
10	2.92 t	26.6
11	3.56 t	41.6
1'		127.9
2'	7.39 d	130.7
3'	6.78 d	116.9
4'		160.7
5'	6.78 d	116.9
6'	7.39 d	130.7
7'	7.44 d	141.9
8'	6.39 d	118.7
9'		169.4

[0064]

[0065]

상기 표 5의 NMR 분석 결과로부터 화합물 5는 *N-p*-코우마로일세로토닌(*N-p-coumaroylserotonin*)임을 확인할 수 있었다.

[0066]

화합물 5를 확인함에 있어서, ¹H 및 ¹H-¹H 상관관계 스펙트럼을 살펴보았을 때, 화합물 5가 화합물 4와 유사한 구조임을 알 수 있었으며, 다만, 화합물 4와 비교하였을 때, H-6 및 H-4'에 대한 두 개의 양성자 신호가 화합물 5에서는 나타나지 않는 것을 알 수 있었다. 화합물 5에서 C-6 및 C-4'에 대한 탄소 신호는 각각 δ 151.3 및 δ 160.7에서 관찰되었으며, 이로부터 상기 위치에 하이드록실화가 이루어졌음을 알 수 있었다. 따라서, 화합물 5는 세로토닌 및 *p*-코우마로일(coumaroyl) 모이어티로 이루어진 것임을 알 수 있었으며, HMBC 스펙트럼에서 δ 3.56 (H-11)의 세로토닌 모이어티에서 메틴 양성자 신호와 δ 169.4 (C-9')의 *p*-코우마로일 모이어티에서 카보닐 탄소 신호를 통해 세로토닌 및 *p*-코우마로일 모이어티가 아미노 결합을 통해 연결된다는 것을 알 수 있었다.

[0067]

이로부터 상기 화합물 5가 *N-p*-코우마로일세로토닌임을 확인하였다.

[0068]

실시예 2. 자외선을 처리한 벼로부터 분리된 화합물의 항균 활성 확인

[0069]

상기 실시예 1로부터 자외선이 처리된 벼에서는 사쿠라네틴 뿐 아니라 페닐아마이드 화합물이 모두 증가된 것을 알 수 있었으며, 본 발명자들은 상기 화합물들의 항균 활성을 측정하였다.

[0070]

구체적으로, 자외선 처리한 벼 잎으로부터 분리된 페놀 화합물의 세 종류의 벼 병원성 진균인 마그나포르테 그리시아(*Magnaporthe grisea* P06-6), 리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani* AG-1) 및 비폴라리스 오리재(*Bipolaris oryzae*)에 대한 항진균 활성을 조사하였다. 각각의 화합물을 DMSO에 녹이고 1, 5, 10 및 20 ug/mL의 최종 농도로 감자 텍스트로스 아가 PDA 배지(백틴, 디슨 앤 컴퍼니, 스파크, 메릴랜드, USA)에 각각 첨가하였다. 상기 배지에서 최종 DMSO 농도는 1%(v/v)가 되도록 하였다. PDA 접시에 각 병원체를 이틀간 배양한 것의 가장자리로부터 마이세리알 디스크(myceial disc, 직경 1mm)를 자르고, 그 후 다양한 농도의 각 화합물을 함유하는 PDA 접시에 마이세리알 디스크를 두었다. 병원성 진균을 3일 동안 28℃에 방치하고 자외선 처리에 의해 유

도된 화합물에 의한 성장 억제를 확인하기 위해 각 진균의 마이세리알 반경을 측정하였다. 실험은 세 번 반복하여 수행하였다.

[0071] 또한, 병원성 세균인 크산토모나스 오리재 병원형 오리재(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo)), 크산토모나스 오리재 병원형 오리지콜라 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc)) 및 부르크홀데리아 글루메 (*Burkholderia glumae*)에 대한 항균활성을 조사하였다. 상기 각 균주를 28℃, NB 배지(백톤, 디슨 맨 컴퍼니, 스파크, 메릴랜드, USA)에서 배양하였다. 상기 배양한 균을 각각 1, 5, 10 및 20ug/ml 의 화합물을 함유하는 NB 배지에 접종하였다. 배지에서 최종 DMSO 농도는 1%(v/v)가 되도록 하였다. 각 화합물의 억제 활성을 확인하기 위하여, 세균 성장을 각 세균의 지수기 성장 기간에 OD₆₀₀을 UV/Vis 분광 광도계를 이용하여 측정하였다. 실험은 세 번 반복하여 수행하였다.

[0072] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 3종의 세균성 병원체, 크산토모나스 오리재 병원형 오리재, 크산토모나스 오리재 병원형 오리지콜라 및 부르크홀데리아 글루메에 대하여 화합물 1 내지 5 각각의 화합물은 서로 다른 정도의 항균 활성을 나타내었다. 화합물 1 및 4의 경우 모든 세균성 병원체에 대해 억제 효과를 나타내었으나(도 3의 A 및 D), 화합물 2 및 3의 경우 크산토모나스 오리재 병원형 오리재 및 크산토모나스 오리재 병원형 오리지콜라에 대해 항균 활성을 나타내었다(도 3의 B 및 C). 또한, 화합물 5는 크산토모나스 오리재 병원형 오리지콜라의 성장을 억제하는 것을 알 수 있었다(도 3의 E).

[0073] 또한, 자외선을 처리한 벼의 잎에서 분리한 화합물 1 내지 5의 진균성 또는 세균성 병원체에 대한 억제 활성을 나타내는 IC₅₀(ug/ml)을 측정하였다.

[0074] 하기 표 6에 나타난 바와 같이, 화합물 1 및 화합물 4의 경우 진균성 병원체 및 세균성 병원체 모두에 대해 억제효과를 나타내었다. 특히, 화합물 1의 경우 진균성 병원체인 마그나포르테 그리시아, 리족토니아 솔라니 및 비폴라리스 오리재, 세균성 병원체인 크산토모나스 오리재 병원형 오리재, 크산토모나스 오리재 병원형 오리지콜라 및 부르크홀데리아 글루메 모두에 대해 항균 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

[0075] 마그나포르테 그리시아의 균사 성장(mycelial growth)의 50% 억제를 나타내는 화합물 1의 IC₅₀은 6.44ug/ml이었으며, 또한 54.04 및 19.05ug/ml의 IC₅₀ 값으로 리족토니아 솔라니 및 비폴라리스 오리재에 대해서 항진균 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

[0076] 또한, 대부분의 페닐아마이드 화합물이 진균성 병원체에 대해서는 억제 효과를 나타내지 않았으나, 화합물 4의 경우 비폴라리스 오리재에 대해서 26.92ug/ml 의 IC₅₀ 값으로 항진균 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

[0077] 나아가 세균성 병원체에 대한 항균 활성과 관련하여 화합물 1 및 화합물 4는 각각 각각 2.36 및 2.45ug/ml의 IC₅₀으로 크산토모나스 오리재 병원형 오리지콜라의 성장을 가장 강하게 억제하는 효과를 나타내었다.

[0078] 화합물 4는 화합물 1과 비교하여 크산토모나스 오리재 병원형 오리재의 성장을 유사하게 억제하고 부르크홀데리아 글루메에 상대적으로 약한 항균 활성을 보였다(도 3의 D 및 표 6). 화합물 2 및 3의 경우 화합물 1과 비교하여 다소 약한 활성을 가짐에도 불구하고, 각각 3.18 및 3.72ug/ml의 IC₅₀으로 크산토모나스 오리재 병원형 오리지콜라의 성장을 강하게 억제하였다. 화합물 5의 경우, 54.54ug/ml의 IC₅₀으로 크산토모나스 오리재 병원형 오리지콜라에 대해서만 항균 활성을 나타내었다(표 6).

표 6

화합물	진균성 병원체			세균성 병원체		
	<i>M. grisea</i>	<i>R. solani</i>	<i>B. oryzae</i>	<i>Xoo</i>	<i>Xoc</i>	<i>B. glumae</i>
1	6.44 ± 1.35	54.04 ± 22.61	19.05 ± 9.83	19.95 ± 6.20	2.36 ± 0.35	8.22 ± 1.49
2	-	-	-	21.96 ± 7.00	3.18 ± 0.44	-
3	-	-	-	34.76 ± 10.98	3.72 ± 0.20	-
4	-	-	26.92 ± 4.74	24.34 ± 5.60	2.45 ± 0.48	41.09 ± 5.96
5	-	-	-	-	54.54 ± 20.84	-

[0079]

[0080]

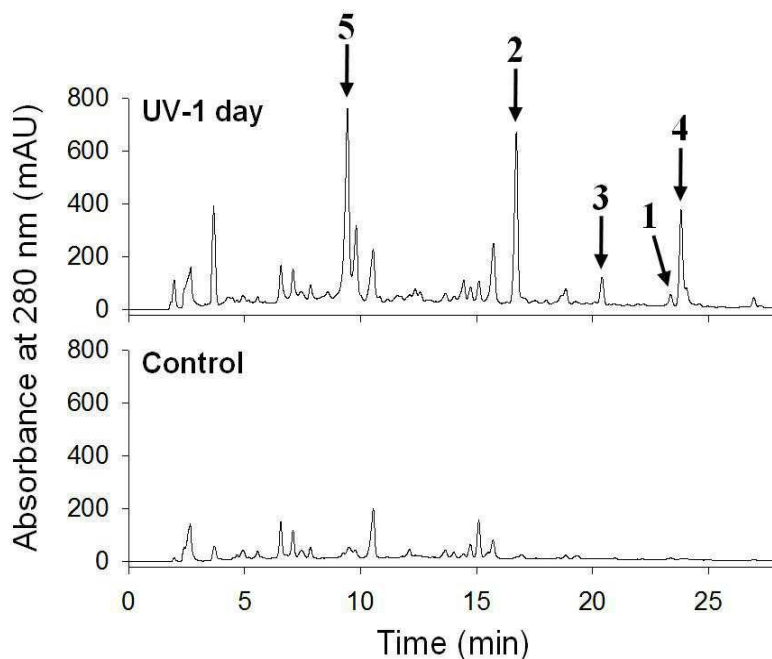
상기 결과로부터 자외선을 처리한 벼에서 빠르게 축적된 화합물 1 내지 5가 우수한 항균 활성을 나타내어 식물에 대한 병원체의 방제용으로 사용될 수 있음을 알 수 있었으며, 특히 벼에서 추출한 천연 화합물로서 부작용 없이 친환경적인 살균 용도로 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0081]

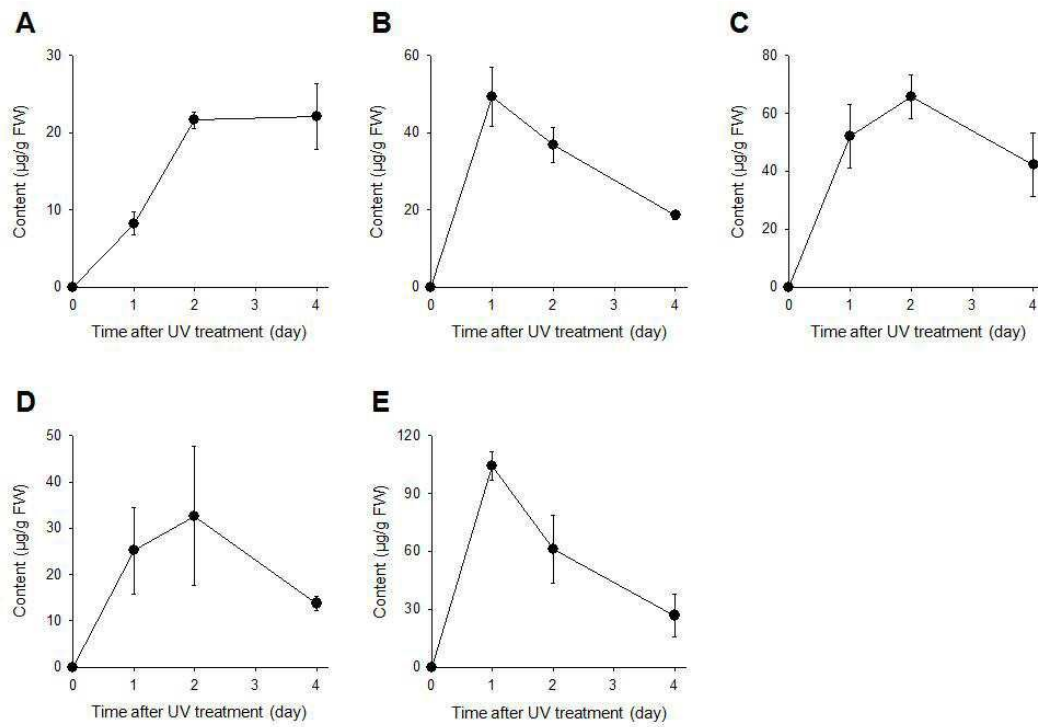
이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1



도면2



도면3

