



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년06월23일
(11) 등록번호 10-1632806
(24) 등록일자 2016년06월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 63/02 (2006.01) A01N 43/06 (2006.01)
A01N 43/26 (2006.01) A01P 21/00 (2006.01)
A01P 7/04 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01) C12P 1/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7004669
(22) 출원일자(국제) 2012년08월14일
심사청구일자 2014년02월24일
(85) 번역문제출일자 2014년02월24일
(65) 공개번호 10-2014-0043823
(43) 공개일자 2014년04월10일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/050807
(87) 국제공개번호 WO 2013/032693
국제공개일자 2013년03월07일
(30) 우선권주장
61/528,149 2011년08월27일 미국(US)
61/528,153 2011년08월27일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20110207604 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
마론 바이오 이노베이션스, 인코포레이티드
미국 95618 캘리포니아 데이비스 드루 애비뉴
1540
(72) 발명자
아솔카, 라트나카
미국 95618 캘리포니아주 데이비스 코웰 블러바드
4005
코이부넨, 마자
미국 95617 캘리포니아주 데이비스 피오 박스
2277
마론, 파멜라
미국 95616 캘리포니아주 데이비스 빅토리아 플레
이스 3333
(74) 대리인
양영준, 양영환

전체 청구항 수 : 총 2 항

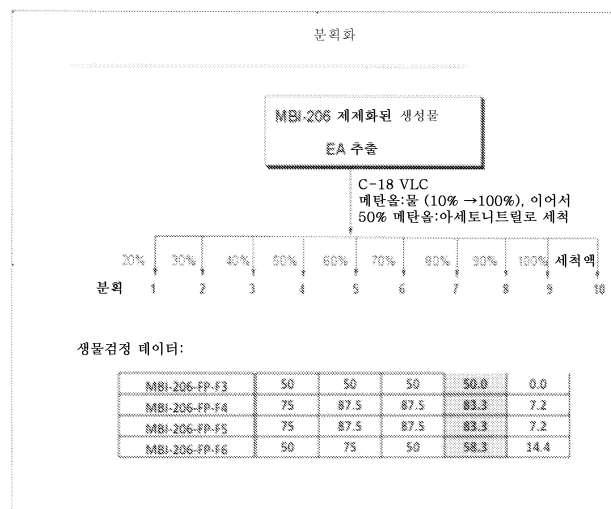
심사관 : 김종호

(54) 발명의 명칭 부르크홀데리아 속의 단리된 박테리아 균주 및 그로부터의 살충 대사물-제제 및 용도

(57) 요약

척추동물에 대해 알려진 병원성은 없으나 살충 활성 (예를 들어, 식물, 조류, 거미류, 곤충류, 진균류, 잡초 및 선충류)이 있는 부르크홀데리아 종의 종 뿐만 아니라 상기 부르크홀데리아의 종을 사용하여 조류를 방제하는 방법이 본원에 제공된다. 또한, 상기 종의 배양물로부터 유래된 천연 생성물 및 상기 천연 생성물을 사용하여 조류 및/또는 거미류를 방제하는 방법이 제공된다.

대표도 - 도2



명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

(A) 부르크홀데리아 종 A396 (NRRL 등록 번호 B-50319)의 단리된 균주를 포함하는 조성물을 제공하는 것;

(B) C2-C17 알콜을 제공하는 것; 및

(C) (A)의 조성물과 (B)의 알콜을 C1-C8 파라벤 생산에 충분한 시간과 온도에서 인큐베이션하는 것을 포함하는, C1-C8 파라벤을 수득하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 C1-C8 파라벤이 부틸 파라벤, 헥실 파라벤 및 옥틸 파라벤으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 척추동물, 예컨대 포유동물, 어류 및 조류에 대해 알려진 병원성은 없으나 식물, 조류, 곤충류, 진균류, 거미류, 예컨대 응애류 및 선충류에 대한 살충 활성이 있는 부르크홀데리아 종, 상기 종을 포함하는 제제 및 조성물이 본원에 제공된다. 또한, 상기 종의 배양물로부터 유래된 천연 생성물, 제제 및 조성물, 및 상기 부르크홀데리아 및/또는 상기 천연 생성물을 사용하여 조류 및 거미류, 예컨대 응애류를 방제하는 방법이 제공된다.

배경 기술

[0002] 천연 생성물은 미생물, 식물 및 다른 유기체에 의해 생산되는 물질이다. 미생물 천연 생성물은 화학적 다양성의 풍부한 공급원을 제공하고, 제약상 목적을 위해 천연 생성물을 활용하는 오랜 역사가 있다. 하나의 이러한 화합물은 크로모박테리움(*Chromobacterium*)으로부터 단리된 FR901228이고, 항박테리아제 및 항종양제로서 유용한 것으로 밝혀졌다 (예를 들어, 미국 특허 번호 7,396,665 (Ueda et al.) 참조).

[0003] 그러나, 미생물에 의해 생산된 2차 대사물이 또한 농업용 적용에서 잡초 및 해충 방제를 위한 용도를 갖는다는 것이 성공적으로 밝혀졌다 (예를 들어, 문헌 [Nakajima et al. 1991; Duke et al., 2000; Lydon & Duke, 1999]; 미국 특허 번호 7,393,812 (Gerwick et al.) 참조). 미생물 천연 생성물은 또한 농업용 살곤충제로 성공적으로 개발되었다 (예를 들어, 문헌 [Salama et al. 1981; Thompson et al., 2000; Krieg et al. 1983] 참조). 때때로, 이러한 천연 생성물은 화학적 살충제와 조합된다 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,808,207 (Gottlieb) 참조).

[0004] 살응애제

[0005] 살응애제는 응애류 (살비제) 및 진드기류 (살진드기제)를 사멸시키는 화합물이다. 이러한 부류의 살충제는 규모가 크고, 항생제, 카르바메이트, 포름아미딘 살응애제, 피레트로이드, 응애 성장 조절제 및 유기포스페이트 살응애제를 포함한다. 화학적 살충제 이외에, 규조토 및 지방산이 응애류를 방제하기 위해 사용될 수 있다. 이들은 전형적으로 각피의 파괴를 통해 응애류를 말려버리는 작업을 한다. 또한, 일부 에센셜 오일, 예컨대 페퍼민트 오일이 응애류를 방제하기 위해 사용된다. 매우 다양한 기지의 살응애제 화합물에도 불구하고, 응애류는 이들이 작물에 유발하는 손상 때문에 농업에서 심각한 문제로 남아 있다. 이들은 한 계절 동안 여러 세대를 생산할 수 있고, 이는 사용된 살응애제 생성물에 대한 내성의 급속한 발생을 촉진한다. 따라서, 새로운 표적 부위를 갖는 새로운 살충제 생성물 및 신규 작용 방식이 절실하게 요구된다.

[0006] 살조제

[0007] 조류는 다수의 형태로 유행한다. 이들은 (1) 미시적 단세포 조류, 모발을 닮은 필라멘트형 조류, 시트에서 성장하는 조류 및 식물처럼 보이는 해조류; (2) 일부 산호, 아네모네, 및 다른 고착 무척추동물의 외부 외피 ("피부") 또는 칼슘 쉼 안에 서식하는 조류 (갈충조로 불림); (3) 또한 조류는 아니지만 그의 매트릭스에서 혼입된

조류를 갖는 구조 또는 방산층 콜로니 (경질 쉼을 갖는 미시적 단세포 동물)인, 때때로 수족관 패널 상에서 성장하는 녹색의 매우 제거하기 어려운 작은 점을 포함한다.

[0008] 유의한 기간에 걸쳐 용기에 남아있는 소량의 물에서의 조류의 성장은 상당할 수 있으며, 이는 매우 바람직하지 않다. 그 결과, 조류는 정수 장치 내의 필터의 막힘, 웅덩이에서의 바람직하지 않은 냄새 및 외관, 용존 산소의 고갈, 어류 및 갑각류의 사멸에 이르는 질식을 유발할 수 있다. 물에 존재하는 것 뿐만 아니라, 조류는 또한 기후 및 광에 노출되는 산업 물질, 예컨대 광물 기재 상의 유기 필름 형성제를 함유하는 코팅, 텍스타일 피니시, 목재 페인트 및 또한 플라스틱으로 만들어진 물질에 존재할 수 있다.

[0009] 조류 방제는 4가지 카테고리: 생물학적, 기계적, 물리적 및 화학적 방제로 분류될 수 있다. 몇 가지 적절한 사실은 조류 방제의 모든 방법에서 유지된다. 예를 들어, 터보(Turbo) 및 아스트레아(Astrea) 달팽이, 일부 베도라치, 일부 갈조류가 다른 것 중에서 우수한 방목자이다. 달팽이는 가장 널리 사용되는 스캐빈저이고, 일반적으로 최상의 선택이다. 국가의 일부는 성게, 드워프 엔젤의 사용을 선호하는 것으로 보인다. 전자는 너무 쉽게 죽고 장식을 이리저리 움직이고, 후자는 고가의 무척추동물을 먹는 문제가 있을 수 있다. 다른 방법은 오존 및 자외선 살균기의 존재 또는 부재 하에 기능적 단백질 스키머를 포함한다. 이러한 물리적 필터는 노출된 조류를 제거 및 파괴하고, 물이 순환할 때 영양소의 산화를 돕는다. 항생제가 또한 사용될 수 있다. 그러나, 이들은 조류 문제의 원인(들)을 다루지 않고 오직 증상만을 처리한다. 요인은 균형을 잃은 수계에 기여할 수 있다. 통상적으로 황산구리 용액 형태의 구리가 살조제로서 뿐만 아니라 일반적인 동물유형성 기생충 방지제로서 사용된다. 이 금속은 처리 및 방역 탱크, 덩 및 어류-단독 배열에 유용하지만, 이는 지속되고, 모든 생물, 특히 비-어류에 독성이다.

[0010] **부르크홀데리아**

[0011] 프로테오박테리아의 β -아문인 부르크홀데리아 속은 다양한 생태학적 환경에서 서식하는 40가지 초과 종을 포함한다 (문헌 [Compant et al., 2008]). 부르크홀데리아 속의 박테리아 종은 토양 및 근권에 매우 흔한 유기체이다 (문헌 [Coenye and Vandamme, 2003; Parke and Gurian-Sherman, 2001]). 전통적으로, 이들은 식물 병원체, 비. 세파시아(*B. cepacia*)로 알려졌으며, 양파에서 질환을 유발하는 병원체로서 처음 발견 및 확인되었다 (문헌 [Burkholder, 1950]). 여러 부르크홀데리아 종은 그의 식물 숙주와의 이로운 상호작용을 발생시켰다 (예를 들어, 문헌 [Caballero-Mellado et al., 2004, Chen et al., 2007] 참조). 일부 부르크홀데리아 종은 또한 기회감염 인간 병원체인 것으로 밝혀졌다 (예를 들어, 문헌 [Cheng and Currie, 2005 및 Nierman et al., 2004] 참조). 추가로, 일부 부르크홀데리아 종은 생물방제 생성물로서 잠재력을 갖는 것으로 밝혀졌다 (예를 들어, 문헌 [Burkhead et al., 1994; Knudsen et al., 1987; Jansiewicz et al., 1988]; 미국 특허 출원 번호 2003/0082147 (Gouge et al.); 미국 특허 번호 6,077,505 (Parke et al.); 미국 특허 번호 6,689,357 (Casida et al.); WO2001055398 (Jeddeloh et al.); 미국 특허 번호 7,141,407 (Zhang et al.) 참조). 이 속의 일부 종은 오염된 토양 또는 지하수의 오염 물질을 제거하기 위한 생물적 환경정화에 효과적이었다 (예를 들어, 문헌 [Leahy et al. 1996] 참조). 추가로, 일부 부르크홀데리아 종은 단백질분해, 지질분해 및 용혈성 활성을 갖는 다양한 세포외 효소 뿐만 아니라 독소, 항생물질 및 시토포어를 분비하는 것으로 밝혀졌다 (예를 들어, 문헌 [Ludovic et al., 2007; Nagamatsu, 2001] 참조).

[0012] PCT/US2011/026016은 척추동물에 대해 알려진 병원성은 없으나 식물, 곤충류, 진균류 및 선충류에 대한 활성을 갖는 부르크홀데리아 종, 특히 부르크홀데리아 A396 및 상기 종으로부터 유래된 화합물을 기재한다.

[0013] **옥사졸, 티아졸 및 인돌**

[0014] 옥사졸, 티아졸 및 인돌은 식물, 조류, 해면류, 및 미생물에서 널리 분포된다. 다수의 천연 생성물은 5-원 옥사졸, 티아졸 및 인돌 핵/잔기 중 하나 이상을 함유한다. 이러한 천연 생성물은 논증할 수 있는 치료 가치의 생물학적 활성의 광범위한 스펙트럼을 나타낸다. 예를 들어, 널리 처방되는 항암 약물인 블레오마이신 A (문헌 [Tomohisa et al.])는 DNA의 산화성 분해를 유발하고, 그의 표적 DNA 서열에 결합하기 위해 비티아졸 모이어티를 사용한다 (문헌 [Vanderwall et al., 1997]). 티아졸린-함유 펩티드 항생제인 바시트라신 (문헌 [Ming et al., 2002])은 C55-박토프레놀피로포스페이트와의 복합체화에 의해 박테리아 세포벽 신규 생합성을 방지한다. 티아안가졸 (문헌 [Kunze et al., 1993])은 1개 옥사졸 및 3개 티아졸린의 일련 어레이를 함유하고, 항바이러스 활성을 나타낸다 (문헌 [Jansen et al., 1992]). 하지만 다른 옥사졸/티아졸-함유 천연 생성물, 예를 들어 티오스트렙톤 (문헌 [Anderson et al., 1970]) 및 GE2270A (문헌 [Selva et al., 1997])는 박테리아 단백질 합성에서 번역 단계를 억제한다. 인돌 골격을 갖는 1000개 초과 알칼로이드가 미생물로부터 보고되었다. 이들 화합물의 3분의 1은 500 Da 초과 질량을 갖는 펩티드이고, 여기서 인돌은 트립토판 유도체였다. 남은 3분의

2의 구조적 다양성은 보다 높으며, 이들의 생물학적 활성은 항균, 항바이러스, 세포독성, 살균증, 항혈전 또는 효소 억제 활성을 포함하는 보다 넓은 범위를 포함하는 것으로 보인다.

발명의 내용

- [0015] 하기 특성을 갖는 비-부르크홀데리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*), 비-부르크홀데리아 플란타리(*Burkholderia plantari*), 비-부르크홀데리아 글라디올리(*Burkholderia gladioli*), 부르크홀데리아 종의 단리된 균주가 본원에 제공된다:
- [0016] (a) 서열 8, 11 및 12에 나타난 서열에 대해 적어도 99.5%의 동일성을 갖는 정방향 서열 및 서열 9, 10, 13-15에 대해 적어도 99.5%의 동일성을 갖는 역방향 서열을 포함하는 16rRNA 유전자 서열을 가짐;
- [0017] (b) 살충, 특히 제초, 살조, 살응애, 살곤충, 살진균 및 살선충 활성을 가짐;
- [0018] (c) 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물 중 적어도 하나를 생산함:
- [0019] (i) 하기 특성을 갖는 화합물: (a) 액체 크로마토그래피/질량 분광분석법 (LC/MS)에 의해 결정시에 약 525-555의 분자량; (b) 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23, 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02의 ¹H NMR 값; (c) 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51의 ¹³C NMR 값을 가짐, 및 (c) 물:아세트니트릴 (CH₃CN) 구배를 이용하는 역상 C-18 HPLC 칼럼 상에서 약 10-15 분의 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC) 체류 시간;
- [0020] (ii) 적어도 1개의 인돌 모이어티, 적어도 1개의 옥사졸 모이어티, 적어도 1개의 치환된 알킬 기 및 적어도 1개의 카르복실산 에스테르 기; 적어도 17개의 탄소 및 적어도 3개의 산소 및 2개의 질소를 포함하는 옥사졸릴-인돌 구조를 갖는 화합물;
- [0021] (iii) 적어도 1개의 벤질 모이어티, 적어도 1개의 옥사졸 모이어티, 적어도 1개의 치환된 알킬 기 및 적어도 1개의 아미드 기; 적어도 15개의 탄소 및 적어도 2개의 산소 및 2개의 질소를 포함하는 옥사졸릴-벤질 구조를 갖는 화합물;
- [0022] (iv) 적어도 1개의 에스테르, 적어도 1개의 아미드, 적어도 3개의 메틸렌 기, 적어도 1개의 테트라히드로피라노스 모이어티 및 적어도 3개의 올레핀계 이중 결합, 적어도 6개의 메틸 기, 적어도 3개의 히드록실 기, 적어도 25개의 탄소 및 적어도 8개의 산소 및 1개의 질소를 갖는 화합물; 및
- [0023] (d) 척추 동물, 예컨대 포유동물, 조류 및 어류에 비-병원성 (비-감염성)임;
- [0024] (e) 카나마이신, 클로람페니콜, 시프로플록사신, 피페라실린, 이미페넴, 및 숄파메톡사졸 및 트리메토프림의 조합에 감수성임; 및
- [0025] (f) 지방산 16:0, 시클로 17:0, 16:0 3-OH, 14:0, 시클로 19:0 ω8c, 18:0을 함유함.
- [0026] 특정한 실시양태에서, 균주는 부르크홀데리아 A396 균주 (NRRL 등록 번호 B-50319)의 식별 특성을 갖는다.
- [0027] 특정한 실시양태에서, 제1 물질은 상청액이다. 또 다른 보다 특정한 실시양태에서, 상청액은 세포-무함유 상청액이다.
- [0028] (a) 임의로 살충제로 사용하기 위한 상기 기재된 부르크홀데리아 균주로부터 유래된 순수 배양물, 세포 분획 또는 상청액 또는 그의 추출물로 이루어진 군으로부터 선택된 제1 물질; 및
- [0029] (b) 임의로 담체, 희석제, 계면활성제, 아주반트, 또는 화학적 또는 생물학적 살충제 (예를 들어, 살조제, 살응애제, 제초제, 살진균제, 살곤충제, 살선충제, 특히 살조제 또는 살응애제 (예를 들어, 살비제)) 중 적어도 하나
- [0030] 를 포함하는 조합물, 특히 조성물 또는 제제가 또한 제공된다. 관련된 측면에서, 상기 조합물 또는 조성물로 코팅된 종자가 본원에 제공된다.
- [0031] 특정한 실시양태에서, 조성물 또는 제제는
- [0032] (a) 임의로 살충제로 사용하기 위한 상기 기재된 부르크홀데리아 균주로부터 유래된 순수 배양물, 세포 분획 또

는 상청액 또는 그의 추출물로 이루어진 군으로부터 선택된 제1 물질;

[0033] (b) 지방산 16:0, 시클로 17:0, 16:0 3-OH, 14:0, 시클로 19:0 ω8c, 18:0, C1-C7 파라벤, C2-C17 알콜 및 세제; 및

[0034] (c) 임의로 살충제 (예를 들어, 살진균제, 살곤충제, 살조제, 살응애제 (예를 들어, 살비제), 제초제, 살선충제)인 또 다른 물질

[0035] 을 포함할 수 있다.

[0036] 특정한 실시양태에서, C1-C7 지방족 파라벤은 약 0.01 - 5%의 양으로 존재하고, C2-C17 알콜은 약 0.00-10%의 양으로 존재하고, 세제는 약 0.001-10%의 양으로 존재한다.

[0037] 또한, 상기 기재된 제제로부터 유래되는 살충 물질, 상기 살충 물질 및 또 다른 화학적 또는 생물학적 살충제를 포함하는 조합물, 및 이러한 살충 물질을 생산하는 방법이 제공된다. 특정한 실시양태에서, 이러한 살충 물질은 하기 특성 중 적어도 하나를 포함한다:

[0038] (a) 살충 특성, 특히 제조, 살곤충, 살선충 및 살진균 특성을 가짐;

[0039] (b) 액체 크로마토그래피/질량 분광분석법 (LC/MS)에 의해 결정시에 약 210-240, 보다 특히 222의 분자량을 가짐;

[0040] (c) δ 7.90, 6.85, 4.28, 1.76, 1.46, 1.38, 1.37, 0.94의 ¹H NMR 값을 가짐;

[0041] (d) δ 166.84, 162.12, 131.34 (2C), 121.04, 114.83 (2C), 64.32, 31.25, 28.43, 25.45, 22.18, 12.93의 ¹³C NMR 값을 가짐;

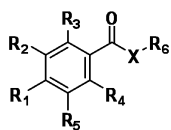
[0042] (e) 0.5 mL/분 유량 및 210 nm의 UV 검출에서 구배 용매 시스템 (0-20 분; 90-0% 수성 CH₃CN, 20-24 분; 100% CH₃CN, 24-27 분; 0 - 90% 수성 CH₃CN, 27-30 분; 90% 수성 CH₃CN)으로 물:아세토니트릴 (CH₃CN)을 사용하는 역상 C-18 HPLC (페노메넥스(Phenomenex), 루나(Luna) 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) 칼럼 상에서 약 15-20 분, 보다 구체적으로 약 17 분, 보다 더 구체적으로 약 17.45 분의 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC) 체류 시간을 가짐;

[0043] (f) 1개의 메틸, 5개의 메틸렌 탄소, 4개의 메틴, 및 3개의 4급 탄소에 기인한 13개의 개별 탄소 신호를 나타내는 ¹³C NMR 스펙트럼;

[0044] (g) ESIMS 및 NMR 데이터 분석의 해석에 의해 결정된 C₁₃H₁₈O₃의 분자식을 가짐;

[0045] (h) 약 210-450 nm 사이, 가장 특히 약 248 nm에서의 UV 흡수대를 가짐.

[0046] 하기 나타낸 구조를 갖는 화합물이 또한 제공된다:

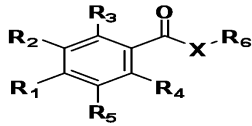


[0047]

[0048] 상기 식에서,

[0049] X는 독립적으로 -O, -NR 또는 -S이고, 여기서 R은 H 또는 C₁-C₁₀ 알킬이고; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ 및 R₆은 각각 독립적으로 H, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, 헤테로시클릭, 치환된 헤테로시클릭, 시클로알킬, 치환된 시클로알킬, 알콕시, 치환된 알콕시, 티오알킬, 치환된 티오알킬, 히드록시, 할로젠, 아미노, 아미도, 카르복실, -C(O)H, 아실, 옥시아실, 카르바메이트, 술폰닐, 술폰아미드 또는 술푸릴이다.

[0050] 특히, 물질은 하기 구조를 가질 수 있다:

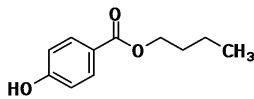


[0051]

[0052] 상기 식에서,

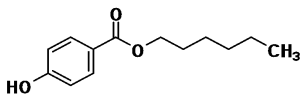
[0053] X는 독립적으로 -O-, -NR 또는 -S이고, 여기서 R은 H 또는 C₁-C₁₀ 알킬이고; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ 및 R₆은 각각 독립적으로 H, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, 헤테로시클릭, 치환된 헤테로시클릭, 시클로알킬, 치환된 시클로알킬, 알콕시, 치환된 알콕시, 티오알킬, 치환된 티오알킬, 히드록시, 할로젠, 아미노, 아미도, 카르복실, -C(O)H, 아실, 옥시아실, 카르바메이트, 술폰일, 술폰아미드 또는 술폰릴이다.

[0054] 보다 특정한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조를 갖는 부틸 파라벤이다:



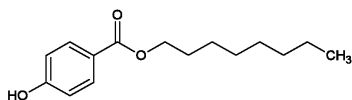
[0055]

[0056] 보다 특정한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조를 갖는 헥실 파라벤이다:



[0057]

[0058] 보다 특정한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조를 갖는 옥틸 파라벤이다:



[0059]

[0060] 상기 기재된 제제로부터 유래되는 살충 물질(들)은

[0061] (a) 상기 기재된 제제를 제공하고;

[0062] (b) 살충 물질(들)을 생산하기에 충분한 시간 (예를 들어, 약 1일 내지 약 6개월) 동안 및 충분한 온도 (예를 들어, 약 3°C 내지 약 50°C)에서 제공된 제제를 인큐베이션 또는 저장하고;

[0063] (c) 살충 물질을 단리함으로써

[0064] 수득할 수 있다.

[0065] 관련된 측면에서, 해충의 증식 및/또는 성장의 조절이 요구되는 장소에 상기 장소에서 상기 해충의 증식 및/또는 성장을 조절하기에 유효한 양의

[0066] (I) (a) 상기 기재된 부르크홀데리아 균주로부터 유래된 실질적으로 순수한 세포 배양물, 세포 분획, 상청액 또는 그의 추출물로 이루어진 균으로부터 선택된 적어도 1종 이상의 물질 및 (b) 임의로 살충제인 또 다른 물질, 또는

[0067] (II) 상기 기재된 조합물, 조성물 또는 제제 또는 상기 제제로부터 유래되는 살충 물질

[0068] 을 적용하는 것을 포함하는, 곤충류, 진균류, 갑충, 선충류, 거미류, 조류, 특히 조류, 거미류 (예를 들어, 응애류, 진드기류)를 포함하나 이에 제한되지는 않는 해충의 증식 및/또는 성장을 조절하는 방법이 개시된다.

[0069] 임의로 부르크홀데리아 종으로부터 수득가능하거나 또는 유래된 단리된 화합물, 또는 대안적으로, 다양한 해충, 특히 예를 들어 곤충류, 선충류, 박테리아, 진균류를 포함하나 이에 제한되지는 않는 식물 병원성 해충을 방제하는데 사용될 수 있는 이들 화합물을 생산할 수 있는 유기체가 본원에 개시된다. 이들 화합물은 또한 제초제, 살웅애제 또는 살조제로서 사용될 수 있다.

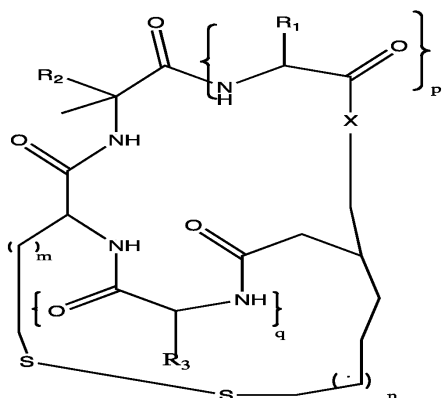
- [0070] 특히, 단리된 살충 화합물은 하기를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다:
- [0071] (A) 하기 특성을 갖는 화합물: (i) 액체 크로마토그래피/질량 분광분석법 (LC/MS)에 의해 결정시에 약 525-555의 분자량; (ii) 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23, 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02의 ^1H NMR 값; (iii) 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51의 ^{13}C NMR 값을 가짐; 및 (iv) 물:아세트니트릴 (CH_3CN) 구배를 이용하는 역상 C-18 HPLC 칼럼 상에서 약 10-15 분의 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC) 체류 시간;
- [0072] (B) 적어도 1개의 인돌 모이어티, 적어도 1개의 옥사졸 모이어티, 적어도 1개의 치환된 알킬 기 및 적어도 1개의 카르복실산 에스테르 기; 적어도 17개의 탄소 및 적어도 3개의 산소 및 2개의 질소를 포함하는 옥사졸릴-인돌 구조를 갖는 화합물;
- [0073] (C) 적어도 1개의 벤질 모이어티, 적어도 1개의 옥사졸 모이어티, 적어도 1개의 치환된 알킬 기 및 적어도 1개의 아마이드 기; 적어도 15개의 탄소 및 적어도 2개의 산소 및 2개의 질소를 포함하는 옥사졸릴-벤질 구조를 갖는 화합물;
- [0074] (D) 적어도 1개의 에스테르, 적어도 1개의 아마이드, 적어도 3개의 메틸렌 기, 적어도 1개의 테트라히드로피라노스 모이어티 및 적어도 3개의 올레핀계 이중 결합, 적어도 6개의 메틸 기, 적어도 3개의 히드록실 기, 적어도 25개의 탄소 및 적어도 8개의 산소 및 1개의 질소를 갖는 화합물; 및
- [0075] (E) 적어도 1개의 에스테르, 적어도 1개의 아마이드, 에폭시드 메틸렌 기, 적어도 1개의 테트라히드로피라노스 모이어티, 적어도 3개의 올레핀계 이중 결합, 적어도 6개의 메틸 기, 적어도 3개의 히드록실 기, 적어도 25개의 탄소, 적어도 8개의 산소 및 적어도 1개의 질소를 갖는 화합물.
- [0076] 특정한 실시양태에서, 단리된 화합물은 하기를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다:
- [0077] (A) 적어도 1개의 인돌 모이어티, 적어도 1개의 옥사졸 모이어티, 적어도 1개의 치환된 알킬 기, 적어도 1개의 카르복실산 에스테르 기, 적어도 17개의 탄소, 적어도 3개의 산소 및 적어도 2개의 질소를 포함하는 옥사졸릴-인돌 구조를 가지며, 하기 중 적어도 하나를 갖는 화합물: (i) 약 275-435의 분자량; (ii) 8.44, 8.74, 8.19, 7.47, 7.31, 3.98, 2.82, 2.33, 1.08에서의 ^1H NMR δ 값; (iii) δ 163.7, 161.2, 154.8, 136.1, 129.4, 125.4, 123.5, 123.3, 121.8, 121.5, 111.8, 104.7, 52.2, 37.3, 28.1, 22.7, 22.7의 ^{13}C NMR 값; (iv) 용매 시스템 및 210 nm의 UV 검출로 물:아세트니트릴 (CH_3CN) 구배를 이용하는 역상 C-18 HPLC 칼럼 상에서 약 10-20 분의 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC) 체류 시간; (v) 약 226, 275, 327 nm에서의 UV 흡수대;
- [0078] (B) 적어도 1개의 벤질 모이어티, 적어도 1개의 옥사졸 모이어티, 적어도 1개의 치환된 알킬 기 및 적어도 1개의 아마이드 기; 적어도 15개의 탄소 및 적어도 2개의 산소, 적어도 2개의 질소를 포함하는 옥사졸릴-벤질 구조; 및 하기 특성 중 적어도 하나를 갖는 화합물: (i) 액체 크로마토그래피/질량 분광분석법 (LC/MS)에 의해 결정시에 약 240-290의 분자량; (ii) 약 7.08, 7.06, 6.75, 3.75, 2.56, 2.15, 0.93, 0.93에서의 ^1H NMR δ 값; (iii) δ 158.2, 156.3, 155.5, 132.6, 129.5, 129.5, 127.3, 121.8, 115.2, 115.2, 41.2, 35.3, 26.7, 21.5, 21.5의 ^{13}C NMR 값; (iv) 물:아세트니트릴 (CH_3CN) 구배를 이용하는 역상 C-18 HPLC 칼럼 상에서 약 6-15 분의 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC) 체류 시간; 및 (v) 약 230, 285, 323 nm에서의 UV 흡수대;
- [0079] (C) 적어도 1개의 에스테르, 적어도 1개의 아마이드, 적어도 3개의 메틸렌 기, 적어도 1개의 테트라히드로피라노스 모이어티 및 적어도 3개의 올레핀계 이중 결합, 적어도 6개의 메틸 기, 적어도 3개의 히드록실 기, 적어도 25개의 탄소, 적어도 8개의 산소 및 1개의 질소, 및 하기 특성 중 적어도 하나를 포함하는 비-에폭시드 화합물: (i) 액체 크로마토그래피/질량 분광분석법 (LC/MS)에 의해 결정시에 약 530-580의 분자량; (ii) δ 6.40, 6.39, 6.00, 5.97, 5.67, 5.54, 4.33, 3.77, 3.73, 3.70, 3.59, 3.47, 3.41, 2.44, 2.35, 2.26, 1.97, 1.81, 1.76, 1.42, 1.37, 1.16, 1.12, 1.04의 ^1H NMR 값; (iii) δ 173.92, 166.06, 145.06, 138.76, 135.71, 129.99, 126.20, 123.35, 99.75, 82.20, 78.22, 76.69, 71.23, 70.79, 70.48, 69.84, 60.98, 48.84, 36.89, 33.09, 30.63, 28.55, 25.88, 20.37, 18.11, 14.90, 12.81, 9.41의 ^{13}C NMR 값; (iv) 구배 용매 시스템 및 210 nm의 UV 검출로 물:아세트니트릴 (CH_3CN)을 사용하는 역상 C-18 HPLC 칼럼 상에서 약 7-12 분의 고압 액체 크로

마토그래피 (HPLC) 체류 시간; (v) ESIMS 및 NMR 데이터 분석의 해석에 의해 결정된 $C_{28}H_{45}NO_{10}$ 의 분자식; (vi) 약 210-450 nm 사이의 UV 흡수대;

[0080] (D) 하기를 포함하는 화합물: (i) 적어도 1개의 에스테르, 적어도 1개의 아미드, 에폭시드 메틸렌 기, 적어도 1개의 테트라히드로피라노스 모이어티 및 적어도 3개의 올레핀계 이중 결합, 적어도 6개의 메틸 기, 적어도 3개의 히드록실 기, 적어도 25개의 탄소, 적어도 8개의 산소 및 적어도 1개의 질소, (ii) δ 174.03, 166.12, 143.63, 137.50, 134.39, 128.70, 126.68, 124.41, 98.09, 80.75, 76.84, 75.23, 69.87, 69.08, 68.69, 68.60, 48.83, 41.07, 35.45, 31.67, 29.19, 27.12, 24.55, 19.20, 18.95, 13.48, 11.39, 8.04의 ^{13}C NMR 값, (iii) $C_{28}H_{43}NO_9$ 의 분자식 및 하기 중 적어도 하나: (a) 약 6.41, 6.40, 6.01, 5.97, 5.67, 5.55, 4.33, 3.77, 3.75, 3.72, 3.64, 3.59, 3.54, 3.52, 2.44, 2.34, 2.25, 1.96, 1.81, 1.76, 1.42, 1.38, 1.17, 1.12, 1.04에서의 1H NMR δ 값; (b) 물:아세트니트릴 (CH_3CN) 구배를 이용하는 역상 C-18 HPLC 칼럼 상에서 약 6-15 분의 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC) 체류 시간; (c) 약 210-450 nm 사이, 가장 특히 약 234 nm에서의 UV 흡수대.

[0081] 보다 특정한 실시양태에서, 하기를 포함하나 이에 제한되지는 않는 화합물이 제공된다:

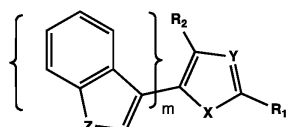
[0082] (A) 하기 구조 ##STR001##을 갖는 화합물 또는 그의 살충용으로 허용되는 염 또는 입체이성질체;



[0083]

[0084] (상기 식에서, M은 1, 2, 3 또는 4이고; n은 0, 1, 2 또는 3이고; p 및 q는 독립적으로 1 또는 2이고; X는 O, NH 또는 NR이고; R_1 , R_2 및 R_3 은 동일하거나 상이하고, 독립적으로 아미노산 측쇄 모이어티 또는 아미노산 측쇄 유도체이고, R은 저급 쇠 알킬, 아릴 또는 아릴알킬 모이어티임)

[0085] (B) 하기 구조 ##STR002##을 갖는 화합물;

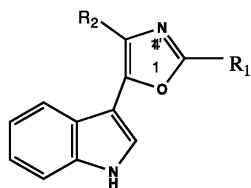


[0086]

[0087] ##STR002##

[0088] (상기 식에서, X, Y 및 Z는 각각 독립적으로 --O, --NR₁ 또는 --S이고, 여기서 R₁은 --H 또는 C₁-C₁₀ 알킬이고; R₁, R₂ 및 m은 각각 독립적으로 --H, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, 헤테로시클릭, 치환된 헤테로시클릭, 시클로알킬, 치환된 시클로알킬, 알콕시, 치환된 알콕시, 티오알킬, 치환된 티오알킬, 히드록시, 할로젠, 아미노, 아마이드, 카르복실, --C(O)H, 아실, 옥시아실, 카르바메이트, 술폰, 술폰아미드 또는 술폰릴이고, "m"은 옥사졸 고리 상의 어느 곳이나 위치할 수 있음)

[0089] (C) 하기 구조 ##STR002a##을 갖는 화합물;

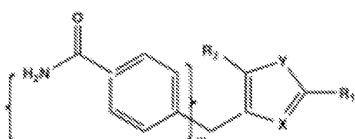


[0090]

[0091] ##STR002a##

[0092] (상기 식에서, R₁은 --H 또는 C₁-C₁₀ 알킬이고; R₂는 알킬 에스테르임)

[0093] (D) 하기 구조 ##STR003##을 갖는 화합물;

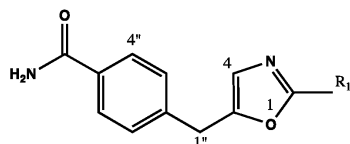


[0094]

[0095] ##STR003##

[0096] (상기 식에서, X 및 Y는 각각 독립적으로 --OH, --NR₁ 또는 --S이고, 여기서 R₁은 --H 또는 C₁-C₁₀ 알킬이고; R₁, R₂ 및 m, 옥사졸 고리 상의 치환기는 각각 독립적으로 --H, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, 헤테로시클릭, 치환된 헤테로시클릭, 시클로알킬, 치환된 시클로알킬, 알콕시, 치환된 알콕시, 티오알킬, 치환된 티오알킬, 히드록시, 할로젠, 아미노, 아미도, 카르복실, --C(O)H, 아실, 옥시아실, 카르바메이트, 술폰, 술폰아미드 또는 술폰릴임)

[0097] (E) 하기 구조 ##STR003a##을 갖는 화합물;

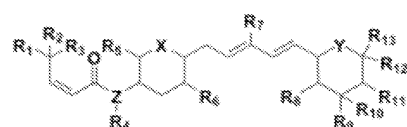


[0098]

[0099] ##STR003a##

[0100] (상기 식에서, R₁은 --H 또는 C₁-C₁₀ 알킬임)

[0101] (F) 하기 구조 ##STR004a##을 갖는 화합물;

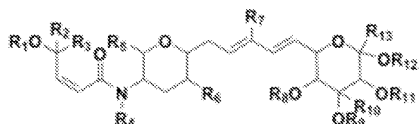


[0102]

[0103] ##STR004a##

[0104] (상기 식에서, X, Y 및 Z는 각각 독립적으로 -O, -NR 또는 -S이고, 여기서 R은 H 또는 C₁-C₁₀ 알킬이고; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂ 및 R₁₃은 각각 독립적으로 H, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, 헤테로시클릭, 치환된 헤테로시클릭, 시클로알킬, 치환된 시클로알킬, 알콕시, 치환된 알콕시, 티오알킬, 치환된 티오알킬, 히드록시, 할로젠, 아미노, 아미도, 카르복실, --C(O)H, 아실, 옥시아실, 카르바메이트, 술폰, 술폰아미드 또는 술폰릴임)

[0105] (G) 하기 구조 ##STR004b##을 갖는 화합물;

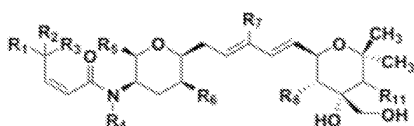


[0106]

[0107] ##STR004b##

[0108] (상기 식에서, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂ 및 R₁₃은 각각 독립적으로 H, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, 헤테로시클릭, 치환된 헤테로시클릭, 시클로알킬, 치환된 시클로알킬, 알콕시, 치환된 알콕시, 티오알킬, 치환된 티오알킬, 히드록시, 할로젠, 아미노, 아미도, 카르복실, -C(O)H, 아실, 옥시아실, 카르바메이트, 술포닐, 술폰아미드 또는 술폰릴임)

[0109] (H) 하기 구조 ##STR004c##을 갖는 화합물;

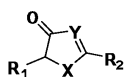


[0110]

[0111] ##STR004c##

[0112] (상기 식에서, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₁₁은 각각 독립적으로 H, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, 헤테로시클릭, 치환된 헤테로시클릭, 시클로알킬, 치환된 시클로알킬, 알콕시, 치환된 알콕시, 티오알킬, 치환된 티오알킬, 히드록시, 할로젠, 아미노, 아미도, 카르복실, -C(O)H, 아실, 옥시아실, 카르바메이트, 술포닐, 술폰아미드 또는 술폰릴임)

[0113] (I) 하기 구조 ##STR005##을 갖는 화합물;

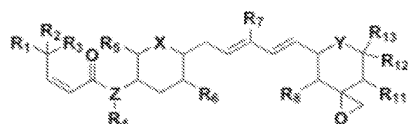


[0114]

[0115] ##STR005##

[0116] (상기 식에서, X 및 Y는 각각 독립적으로 --OH, --NR₁ 또는 --S이고, 여기서 R₁, R₂는 각각 독립적으로 --H, 알킬 (예를 들어, C₁-C₁₀ 알킬), 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, 헤테로시클릭, 치환된 헤테로시클릭, 시클로알킬, 치환된 시클로알킬, 알콕시, 치환된 알콕시, 티오알킬, 치환된 티오알킬, 히드록시, 할로젠, 아미노, 아미도, 카르복실, --C(O)H, 아실, 옥시아실, 카르바메이트, 술포닐, 술폰아미드 또는 술폰릴임)

[0117] (J) 하기 구조 ##STR006a##을 갖는 화합물.



[0118]

[0119] ##STR006a##

[0120] (상기 식에서, X, Y 및 Z는 각각 독립적으로 -O, -NR 또는 -S이고, 여기서 R은 H 또는 C₁-C₁₀ 알킬이고; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₁₁, R₁₂ 및 R₁₃은 각각 독립적으로 H, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, 헤테로시클릭, 치환된 헤테로시클릭, 시클로알킬, 치환된 시클로알킬, 알콕시, 치환된 알콕시, 티오알킬, 치환된 티오알킬, 히드록시, 할로젠, 아미노, 아미도, 카르복실, -C(O)H, 아실, 옥시아실, 카르바메이트, 술포닐, 술폰아미드 또는 술폰릴임)

[0121] 가장 특정한 실시양태에서, 화합물은 하기를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다:

[0122] (i) 템플라졸 A;

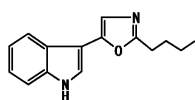
[0123] (ii) 템플라졸 B;

[0124] (iii) 템플라미드 A;

[0125] (iv) 템플라미드 B;

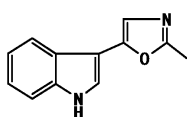
[0126] (v) FR901228;

[0127] (vi)



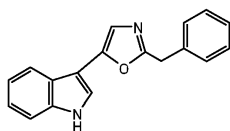
[0128]

[0129] (vii)



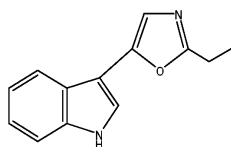
[0130]

[0131] (viii)



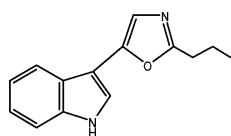
[0132]

[0133] (ix)



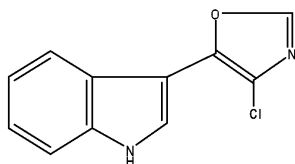
[0134]

[0135] (x)



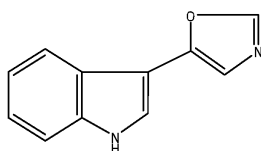
[0136]

[0137] (xi)



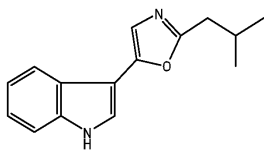
[0138]

[0139] (xii)



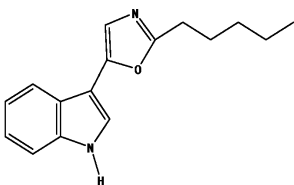
[0140]

[0141] (xiii)



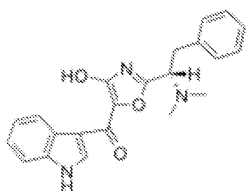
[0142]

[0143] (xiv)



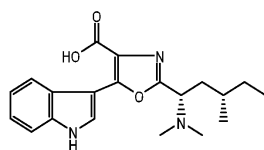
[0144]

[0145] (xv)



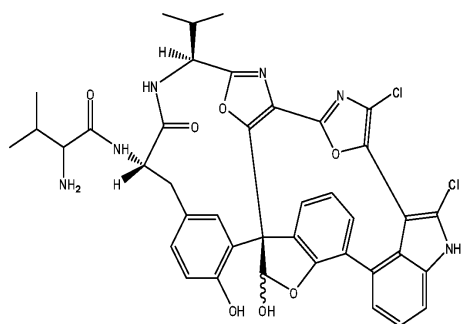
[0146]

[0147] (xvi)



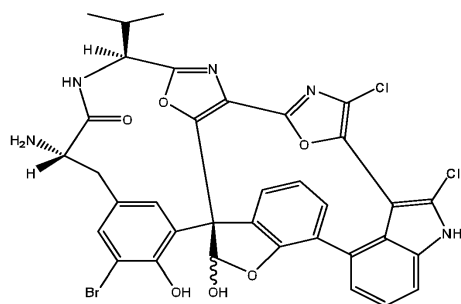
[0148]

[0149] (xvii)



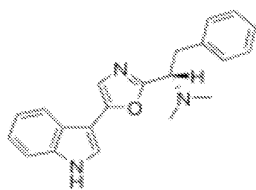
[0150]

[0151] (xviii)



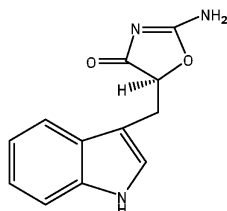
[0152]

[0153] (xix)



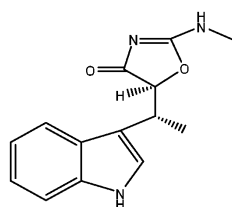
[0154]

[0155] (xx)



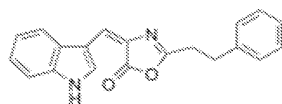
[0156]

[0157] (xxi)



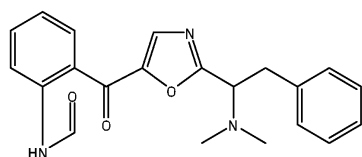
[0158]

[0159] (xxii)

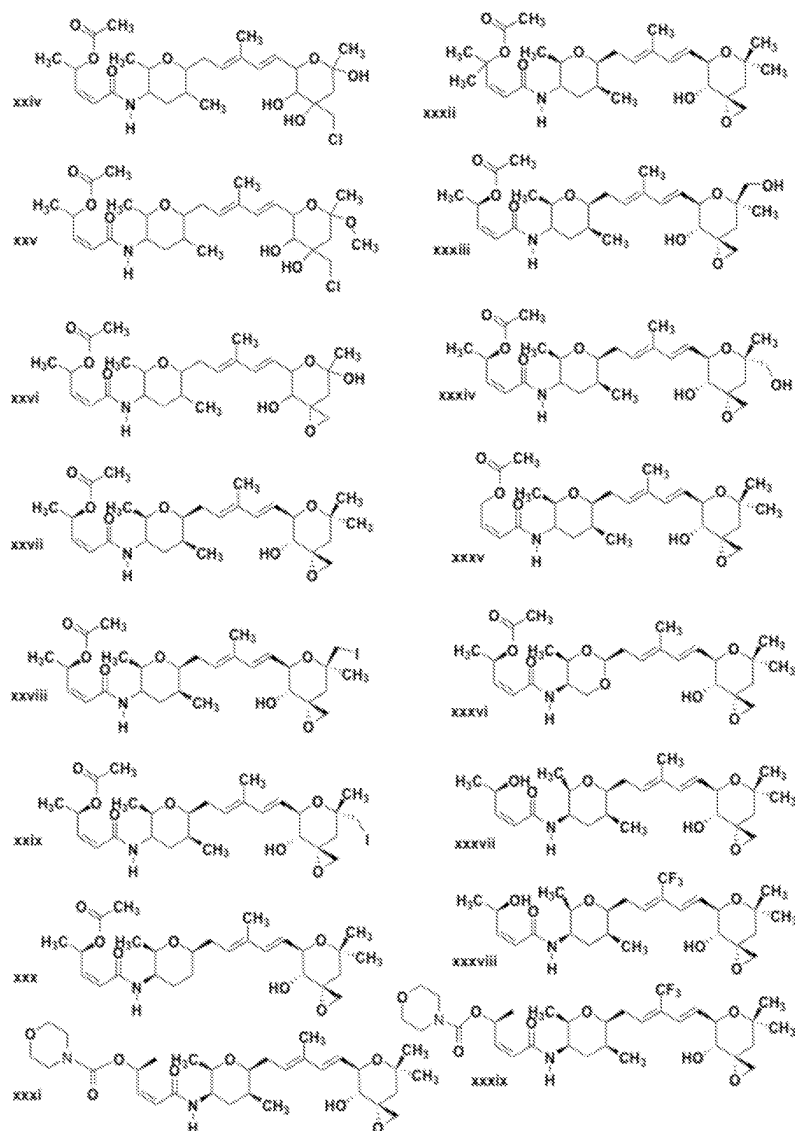


[0160]

[0161] (xxiii)



[0162]



[0163]

[0164]

(x1) FR901465;

[0165]

(x1i) F8H17, 양성 ESI 모드에서 1081.75 (M + H)에서의 분자 이온 피크에 기초하여 1080의 분자량이 할당되고 1079.92에서의 기준 피크를 갖는 음성 ESIMS에 의해 추가로 확인된, 분획 F8로부터의 활성 화합물. 이 화합물은 234 nm에서의 UV 흡수를 보여주었다.

[0166]

관련된 측면에서, 해충 (예를 들어, 조류, 거미류, 선충류, 곤충류, 진균류)의 증식 및/또는 성장의 조절이 요구되는 장소에 상기 장소에서 해충의 증식 및/또는 성장을 조절하기에 유효한 양의

[0167]

(I) (a) 상기 기재된 단리된 화합물 및 (b) 임의로 살조제인 또 다른 물질 또는

[0168]

(II) 상기 기재된 조성물 또는 조합물

[0169]

을 적용하는 것을 포함하는, 해충 (예를 들어, 조류, 거미류, 선충류, 곤충류, 진균류)의 증식 및/또는 성장을 조절하는 방법이 개시된다.

[0170]

또 다른 관련된 측면에서, 조류의 증식 및/또는 성장의 조절 및/또는 거미류의 침입의 조절 및/또는 단자엽, 사초과 또는 쌍자엽 잡초의 출아 및/또는 성장의 조절이 요구되는 장소에 상기 장소에서 상기 조류의 증식 및/또는 성장 및/또는 해충 침입 및/또는 단자엽, 사초과 또는 쌍자엽 잡초의 출아 또는 성장을 조절하기에 유효한 양의

[0171]

(A) 상기 기재된 제제 또는 그로부터 유래된 살충용으로 유효한 물질;

[0172]

(B) 상기 기재된 조합물;

- [0173] (C) 템플라미드 A;
- [0174] (D) 템플라미드 B;
- [0175] (E) FR901465;
- [0176] (F) FR901228
- [0177] 을 적용하는 것을 포함하는, 조류의 증식 및/또는 성장을 조절하고/거나 식물에서 해충 침입을 조절하는 방법 및/또는 단자엽, 사초과 또는 쌍자엽 잡초의 출아 및/또는 성장을 조절하는 방법이 개시된다. 선충류 및/또는 곤충류 침입은 템플라미드 A, 템플라미드 B, FR901465 및/또는 FR901228을 사용하여 조절된다. 보다 특정한 실시양태에서, 곤충류, 특히 온코펠투스(*Oncopeltus*) 종 (예를 들어, 오. 파시아투스(*O. fasciatus*)) 및/또는 리구스(*Lygus*) 종 및/또는 자유 생활 선충류 및/또는 기생 선충류 (예를 들어, 엠. 인코그니타(*M. incognita*))의 침입이 조절된다.

도면의 간단한 설명

- [0178] 도 1은 부르크홀데리아 멀티보란스 ATCC 17616에 대한 부르크홀데리아 A396의 성장 속도의 비교를 보여준다.
- 도 2는 제제화된 MBI-206으로부터 분획을 수득하는데 이용되는 일반적 도식을 보여준다.
- 도 3은 MBI-206 배양물로부터 분획 및 화합물을 수득하는데 이용되는 일반적 도식을 보여준다.
- 도 4는 긴노린재 (온코펠투스 파시아투스)에 대한 시험된 화합물의 살곤충 (흡인) 활성을 보여준다.
- 도 5는 리구스 헤스페루스(*Lygus hesperus*)에 대한 순수 화합물의 살곤충 (섭식) 활성을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0179] 이전의 조성물 및 방법은 다양하게 변형되기 쉽고, 대안적 형태, 예시적인 실시양태가 본원에 상세하게 기재될 것이다. 하지만, 본 발명이 개시된 특정한 형태로 제한되는 것은 아니며, 반대로 본 발명이 첨부된 특허청구범위에 의해 정의된 바와 같은 본 발명의 취지 및 범위를 포함하는 모든 변형, 등가물, 및 대안을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0180] 값의 범위가 제공되는 경우에, 상기 범위의 상한치와 하한치 사이의 각각의 개재 값 (문맥상 달리 명백하게 언급되지 않는 한 하한치 단위의 10분의 1까지) 및 상기 언급된 범위 내의 임의의 다른 언급된 값 또는 개재 값이 그 내에 포함되는 것으로 이해된다. 보다 작은 범위가 또한 포함된다. 이들 보다 작은 범위의 상한치 및 하한치는 또한 언급된 범위 내에서 임의의 구체적으로 배제된 한계치를 제외하고는 그 내에 포함된다.
- [0181] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 전문 과학 용어는 본 발명이 속한 분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 비록 본원에 기재된 것과 유사하거나 또는 등가물인 임의의 방법 및 물질이 또한 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있고, 바람직한 방법 및 물질이 여기에 기재되어 있다.
- [0182] 본원 및 첨부된 특허청구범위에 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥상 명확하게 달리 지시되지 않는 한 복수 대상도 포함한다는 것에 주목해야 한다.
- [0183] 본원에 정의된 "로부터 유래된"은 특정한 공급원으로부터 직접적으로 단리 또는 수득되거나, 대안적으로 특정한 공급원으로부터 단리 또는 수득된 물질 또는 유기체의 특징을 확인하는 것을 의미한다.
- [0184] 본원에 정의된 "단리된 화합물"은 크로마토그래피 방법, 전기 영동 방법을 포함하나 이에 제한되지는 않는 분석 방법에 의해 결정시에, 본질적으로 다른 화합물 또는 물질이 없는, 예를 들어 적어도 약 20% 순수한, 바람직하게는 적어도 약 40% 순수한, 보다 바람직하게는 약 60% 순수한, 보다 더 바람직하게는 약 80% 순수한, 가장 바람직하게는 약 90% 순수한, 보다 가장 바람직하게는 약 95% 순수 화합물이다.
- [0185] 본원에 사용된 용어 "알킬"은 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, tert-부틸 및 n-헥실 등을 비롯한, 1 내지 약 12개의 탄소 원자를 갖는 1가 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소 기를 지칭한다.
- [0186] 본원에 사용된 "치환된 알킬"은 히드록시, 알콕시, 메르캅토, 시클로알킬, 치환된 시클로알킬, 헤테로시클릭, 치환된 헤테로시클릭, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, 아릴옥시, 치환된 아릴옥시, 할로젠, 시아노, 니트로, 아미노, 아미도, -C(O)H, 아실, 옥시아실, 카르복실, 술폰일, 술폰아미드, 술푸릴 등으로부터 선택된 1개 이상의 치환기를 추가로 보유하는 알킬 기를 지칭한다.

- [0187] 본원에 사용된 "알케닐"은 1개 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 가지며 약 2 내지 12개 범위의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 히드로카르빌 기를 지칭하고, "치환된 알케닐"은 상기 기재된 바와 같은 1개 이상의 치환기를 추가로 보유하는 알케닐 기를 지칭한다.
- [0188] 본원에 사용된 "알키닐"은 1개 이상의 탄소-탄소 삼중 결합을 가지며 약 2 내지 12개 범위의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 히드로카르빌 기를 지칭하고, "치환된 알키닐"은 상기 기재된 바와 같은 1개 이상의 치환기를 추가로 보유하는 알키닐 기를 지칭한다.
- [0189] 본원에 사용된 "아릴"은 6 내지 14개 범위의 탄소 원자를 갖는 방향족 기를 지칭하고, "치환된 아릴"은 상기 기재된 바와 같은 1개 이상의 치환기를 추가로 보유하는 아릴 기를 지칭한다.
- [0190] 본원에 사용된 "헤테로아릴"은 고리 구조의 일부로서 1개 이상의 헤테로원자 (예를 들어, N, O, S 등)를 함유하며 3 내지 14개 범위의 탄소 원자를 갖는 방향족 고리를 지칭하고, "치환된 헤테로아릴"은 상기 열거한 바와 같은 1개 이상의 치환기를 추가로 보유하는 헤테로아릴 기를 지칭한다.
- [0191] 본원에 사용된 "알콕시"는 모이어티 --O-알킬-을 지칭하며, 여기서 알킬은 상기 정의된 바와 같고, "치환된 알콕시"는 상기 기재된 바와 같은 1개 이상의 치환기를 추가로 보유하는 알콕실 기를 지칭한다.
- [0192] 본원에 사용된 "티오알킬"은 모이어티 --S-알킬-을 지칭하며, 여기서 알킬은 상기 정의된 바와 같고, "치환된 티오알킬"은 상기 기재된 바와 같은 1개 이상의 치환기를 추가로 보유하는 티오알킬 기를 지칭한다.
- [0193] 본원에 사용된 "시클로알킬"은 약 3 내지 8개 범위의 탄소 원자를 함유하는 고리-함유 알킬 기를 지칭하고, "치환된 시클로알킬"은 상기 기재된 바와 같은 1개 이상의 치환기를 추가로 보유하는 시클로알킬 기를 지칭한다.
- [0194] 본원에 사용된 "헤테로시클릭"은 고리 구조의 일부로서 1개 이상의 헤테로원자 (예를 들어, N, O, S 등)를 함유하며, 3 내지 14개 범위의 탄소 원자를 갖는 시클릭 (즉, 고리-함유) 기를 지칭하고, "치환된 헤테로시클릭"은 상기 기재된 바와 같은 1개 이상의 치환기를 추가로 보유하는 헤테로시클릭 기를 지칭한다.
- [0195] 본원에 사용된 "조류"는 단세포 형태로부터 거대 갈조류까지의 크기 범위를 갖는 임의의 다양한, 주로 수중, 진핵, 광합성 유기체를 지칭한다. 이 용어는 지구 상의 수많은 광합성을 담당하는 광합성 원생생물을 추가로 지칭할 수 있다. 조류는 군으로서 다계통성이다. 따라서, 이 용어는 하기 군으로부터의 조류인 것으로 여겨지는 임의의 원생생물을 지칭할 수 있다: 알베올라테스(alveolates), 클로라라아키노피테스(chloraraachniophytes), 크립토포나즈(cryptomonads), 유글레니즈(euglenids), 글라우코피테스(glaucophytes), 합토피테스(haptophytes), 홍조류, 예컨대 로도피타(Rhodophyta), 스트라메노필레스(stramenopiles) 및 비리다에플란타에(viridaeplantae). 이 용어는 진핵생물에서 녹조류, 황록조류, 갈조류 및 홍조류를 지칭한다. 이 용어는 또한 원핵생물에서 시아노박테리아를 지칭할 수 있다. 이 용어는 또한 녹조류, 청조류 및 홍조류를 지칭한다.
- [0196] 본원에 사용된 "살조제"는 조류증식억제 및/또는 살조 활성을 갖는 하나 이상의 작용제, 화합물 및/또는 조성물을 지칭한다.
- [0197] 본원에 사용된 "살조"는 조류의 사멸을 의미한다.
- [0198] 본원에 사용된 "조류증식억제"는 특정 조건 하에 가역적일 수 있는 조류의 성장 억제를 의미한다.
- [0199] **부르크홀데리아 균주**
- [0200] 본원에 기재된 부르크홀데리아 균주는 비-부르크홀데리아 세파시아 복합체, 비-부르크홀데리아 플란타리, 비-부르크홀데리아 글라디올리, 부르크홀데리아 종이고, 척추동물, 예를 들어 조류, 포유동물 및 어류에 대해 비-병원성이다. 이 균주는 당업계에서 공지되고 문헌 [Lorch et al., 1995]에 기재된 절차를 이용하여 토양 샘플로부터 분리될 수 있다. 부르크홀데리아 균주는 토양 또는 성장 배지의 다수의 상이한 유형으로부터 분리될 수 있다. 이어서, 샘플은 감자 텍스트로스 한천 (PDA) 상에 플레이팅된다. 박테리아는 그람 음성이고, 구형이고, 불투명한 크림색 콜로니가 시간의 경과에 따라 분홍 및 분홍색빛-갈색 색상으로 변하고, 점액성 또는 점착성으로 된다.
- [0201] 콜로니는 감자 텍스트로스 한천 플레이트로부터 분리되고, 하기 실시예에 기재된 본 발명의 부르크홀데리아 균주의 생물학적, 유전적, 생화학적 및/또는 효소적 특징을 갖는 것들에 대해 스크리닝 된다. 특히, 부르크홀데리아 균주는 클러스탈 분석에 의해 결정시에, 서열 8, 11 및 12에 나타난 서열에 적어도 약 99.5%, 보다 바람직하게 약 99.9%, 가장 바람직하게 약 100% 동일한 정방향 서열, 및 서열 9, 10, 13, 14 및 15에 나타난 서열에 적어도 약 99.5%, 보다 바람직하게 약 99.9%, 가장 바람직하게 약 100% 동일한 정방향 서열을 포함하는 16S

rRNA 유전자를 갖는다. 또한, 하기 기재되는 바와 같이, 이 부르크홀데리아 균주는 하기 기재되는 바와 같이 살충 활성, 특히 살바이러스, 제초, 살균, 살진균, 살선충, 살박테리아 및 살곤충, 보다 특히 제초, 살조, 살응애, 살곤충, 살진균 및 살선충 활성을 가질 수 있다. 이는 척추 동물, 예컨대 포유동물, 조류, 및 어류에 대해 병원성이 아니다.

[0202] 추가로, 부르크홀데리아 균주는 적어도 본 개시내용에 기재된 살충 화합물을 생산한다.

[0203] 부르크홀데리아 균주는 카나마이신, 클로람페니콜, 시프로플록사신, 피페라실린, 이미페넴, 및 술포메톡사졸 및 트리메토프림의 조합에 대해 감수성이고, 지방산 16:0, 시클로 17:0, 16:0 3-OH, 14:0, 시클로 19:0, 18:0을 함유한다.

[0204] 이 부르크홀데리아 균주는 감자 텍스트로스 한천 (PDA) 상에서 또는 규정된 탄소 공급원, 예컨대 글루코스, 말토스, 프룩토스, 갈락토스, 및 비규정 질소 공급원, 예컨대 펩톤, 트립톤, 소이톤 및 NZ 아민을 함유하는 발효 배지에서 부르크홀데리아 A396 (NRRL 등록 번호 B-50319)의 식별 특징을 갖는 미생물을 배양하여 수득할 수 있다.

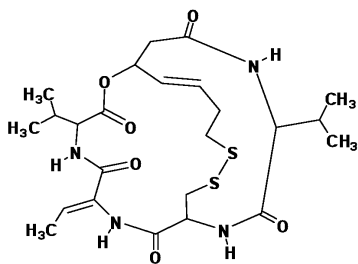
[0205] 살조 및 살응애 화합물

[0206] 본원에 개시된 살조 및 살응애 화합물은 하기 특성을 가질 수 있다: (a) 신규 부르크홀데리아 종, 예를 들어 A396으로부터 수득가능함; (b) 특히 가장 흔한 농업 곤충류 해충에 독성임; (c) 액체 크로마토그래피/질량 분광 분석법 (LC/MS)에 의해 결정시에 약 525-555, 보다 특히 540의 분자량을 가짐; (d) 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23, 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02의 ¹H NMR 값을 가짐; (e) 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51의 ¹³C NMR 값을 가짐; (f) 0.5 mL/분 유량 및 210의 UV 검출에서 구매 용매 시스템 (0-20 분 90-0% 수성 CH₃CN, 20-24 분 100% CH₃CN, 24-27 분, 0-90% 수성 CH₃CN, 27-30 분 90% 수성 CH₃CN)으로 물:아세토니트릴 (CH₃CN)을 사용하는 역상 C-18 HPLC (페노메넥스, 루나 5μ C18 (2) 100A, 100 x 4.60 mm) 칼럼 상에서 약 10-15 분, 보다 구체적으로 약 12 분, 보다 더 구체적으로 약 12.14 분의 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC) 체류 시간을 가짐; (f) ¹H, ¹³C NMR 및 LC/MS 데이터의 해석에 의해 결정된 분자식, C₂₄H₃₆N₄O₆S₂를 가짐; (g) 5개의 메틸, 4개의 메틸렌, 9개의 메틴 및 6개의 4급 탄소를 포함하는 모든 24개의 탄소에 대한 신호를 갖는 ¹³C NMR 스펙트럼; 및 (g) 3개-아미노 양성자 [4.63, 4.31, 3.93] 및 1개의 에스테르 카르비놀 양성자 [5.69]를 나타내는, 전형적인 펩티드 특성을 보여주는 ¹H NMR 스펙트럼. 특정한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조 ##STR001##을 갖거나 또는 그의 살충용으로 허용되는 염 또는 입체이성질체이다:

[0207]

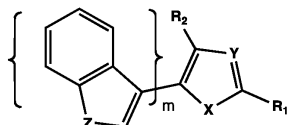
[0208] 상기 식에서, M은 1, 2, 3 또는 4이고; n은 0, 1, 2 또는 3이고; p 및 q는 독립적으로 1 또는 2이고; X는 O, NH 또는 NR이고; R₁, R₂ 및 R₃은 동일하거나 상이하고, 독립적으로 아미노산 측쇄 모이어티 또는 아미노산 측쇄 유도체이고, R은 저급 쇠 알킬, 아릴 또는 아릴알킬 모이어티이다.

[0209] 보다 더 특정한 실시양태에서, 화합물은 FR901228의 구조를 갖는다:



[0210]

[0211] 하기 ##STR002##에 나타난 화합물이 본원에 제공된다:

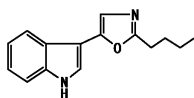


[0212]

[0213] ##STR002##

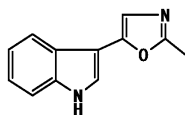
[0214] 상기 식에서, X, Y 및 Z는 각각 독립적으로 --O, --NR₁ 또는 --S이고, 여기서 R₁은 --H 또는 C₁-C₁₀ 알킬이고; R₁, R₂ 및 m은 각각 독립적으로 --H, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, 헤테로시클릭, 치환된 헤테로시클릭, 시클로알킬, 치환된 시클로알킬, 알콕시, 치환된 알콕시, 티오알킬, 치환된 티오알킬, 히드록시, 할로젠, 아미노, 아미도, 카르복실, --C(O)H, 아실, 옥시아실, 카르바메이트, 술포닐, 술포아미드 또는 술푸릴이다.

[0215] 또 다른 특정한 실시양태에서, 패밀리 ##STR002## 화합물은 (vi)-(xix)에 기재된 화합물일 수 있다.



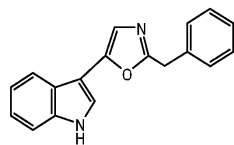
[0216]

[0217] (vii)



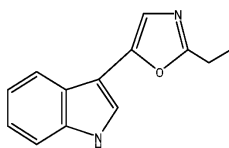
[0218]

[0219] (viii)



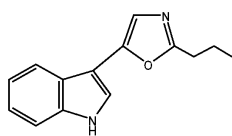
[0220]

[0221] (ix)



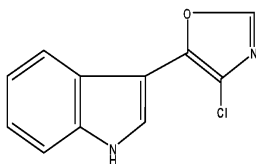
[0222]

[0223] (x)



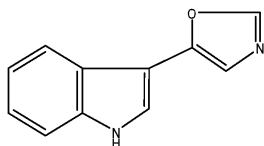
[0224]

[0225] (xi)



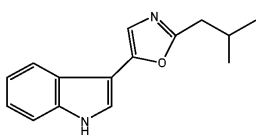
[0226]

[0227] (xii)



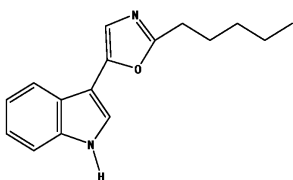
[0228]

[0229] (xiii)



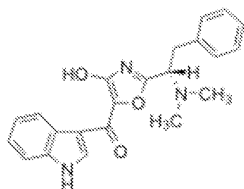
[0230]

[0231] (xiv)



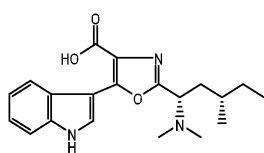
[0232]

[0233] (XV)



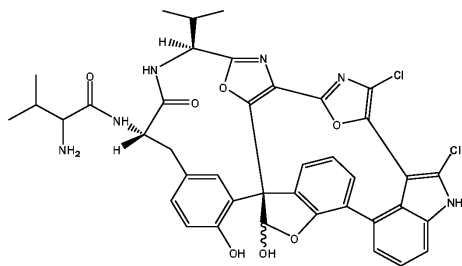
[0234]

[0235] (xvi)



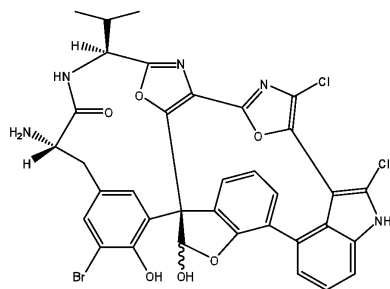
[0236]

[0237] (xvii)



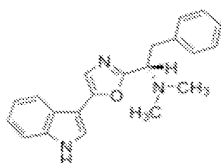
[0238]

[0239] (xviii)



[0240]

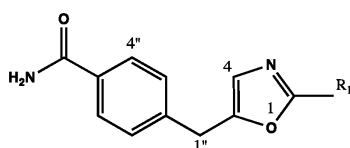
[0241] (xix)



[0242]

[0243] 이들은 천연 물질 또는, 상업적 공급원으로부터 수득되거나 또는 화학적 합성에 의해 수득된 화합물로부터 유래한다. 패밀리 ##STR002## 화합물의 천연 공급원은 미생물, 조류 및 해면류를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 보다 특정한 실시양태에서, 미생물은 패밀리 ##STR002## 화합물을 포함하나 이에 제한되지는 않거나, 또는 대안적으로, 패밀리 ##STR002## 화합물은 중, 예를 들어 스트렙토베르티실리움 바크스마니이 (*Streptoverticillium waksmanii*) (화합물 vi) (문헌 [Umehara, et al., 1984]), 스트렙토미세스 뎀프리카 (*Streptomyces pimprina*) (화합물 vii) (문헌 [Naiket al., 2001]), 스트렙토베르티실리움 올리보레티쿨리 (*Streptoverticillium olivoreticuli*) (화합물 viii, ix, x) (문헌 [Koyama Y., et al., 1981]), 스트렙토미세스 (*Streptomyces*) 중 (화합물 xi, xii) (문헌 [Watabe et al., 1988]), 슈도모나스 시린가에 (*Pseudomonas syringae*) (화합물 xiii, xiv) (문헌 [Pettit et al., 2002])로부터 유래될 수 있다. 패밀리 ##STR002## 화합물은 또한 홍조류 (화합물 xv) (문헌 [N'Diaye, et al., 1996]), 홍조류 마르텐시아 프라길리스 (*Martensia fragilis*) (화합물 xvi) (문헌 [Takahashi S. et al., 1998]), 디아조나 킨시스 (*Diazona chinensis*) (화합물 xvii & xviii) (문헌 [Lindquist N. et al., 1991]), 로도파이코타 하랄디오필룸 (*Rhodophycota haraldiophyllum*) 중 (화합물 xix) (문헌 [Guella et al., 1994])를 포함하나 이에 제한되지는 않는 조류로부터 유래될 수 있다.

[0244] 또한 하기 ##STR003##이 제공된다:

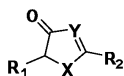


[0245]

[0246] 상기 식에서, X 및 Y는 각각 독립적으로 --OH, --NR₁ 또는 --S이고, 여기서 R₁은 --H 또는 C₁-C₁₀ 알킬이고; R₁, R₂ 및 m, 옥사졸 고리 상의 치환기는 각각 독립적으로 --H, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, 헤테로시클릭, 치환된 헤테로시클릭

릭, 시클로알킬, 치환된 시클로알킬, 알콕시, 치환된 알콕시, 티오알킬, 치환된 티오알킬, 히드록시, 할로젠, 아미노, 아미도, 카르복실, $-C(O)H$, 아실, 옥시아실, 카르바메이트, 술폰일, 술폰아미드 또는 술폰릴이다.

[0247] 하기 ##STR005##이 추가로 제공된다:

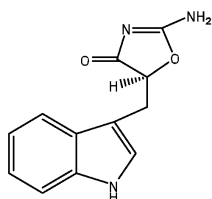


[0248]

[0249] 상기 식에서, X 및 Y는 각각 독립적으로 $-OH$, $-NR_1$ 또는 $-S$ 이고, 여기서 R_1 , R_2 는 각각 독립적으로 $-H$, 알킬 (예를 들어, C_1 - C_{10} 알킬), 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, 헤테로시클릭, 치환된 헤테로시클릭, 시클로알킬, 치환된 시클로알킬, 알콕시, 치환된 알콕시, 티오알킬, 치환된 티오알킬, 히드록시, 할로젠, 아미노, 아미도, 카르복실, $-C(O)H$, 아실, 옥시아실, 카르바메이트, 술폰일, 술폰아미드 또는 술폰릴이다.

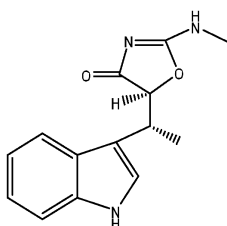
[0250] 특정한 실시양태에서, 패밀리 ##STR005## 화합물, 예컨대 하기 기재된 xx-xxiii로부터의 화합물은 천연 또는 상업적 공급원으로부터 또는 화학적 합성에 의해 유래될 수 있다.

[0251] (xx)



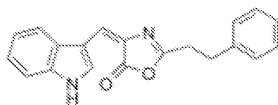
[0252]

[0253] (xxi)



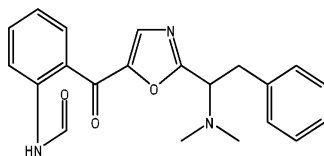
[0254]

[0255] (xxii)



[0256]

[0257] (xxiii)



[0258]

[0259] 패밀리 ##STR005## 화합물의 천연 공급원은 식물, 산호, 미생물 및 해면류를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 미생물은 스트렙토미세스 그리세우스(*Streptomyces griseus*) (화합물 xx) (문헌 [Hirota et al., 1978]), 스트렙토미세스 알부스(*Streptomyces albus*) (화합물 xxi) (문헌 [Werner et al., 1980])를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 패밀리 STR004 화합물은 또한 하랄디오필름 중 (화합물 xxii) (문헌 [Guella et al., 2006]), 및 홍조류 (화합물 xxiii) (문헌 [N'Diaye et al., 1994])를 포함하나 이에 제한되지는 않는 조류로부터 유래될 수 있다.

[0260] 한 실시양태에서, 화합물은 미생물, 특히 부르크홀데리아 종으로부터 유래되거나 또는 수득될 수 있고, 적어도

1개의 에스테르, 적어도 1개의 아마이드, 적어도 3개의 메틸렌 기, 적어도 1개의 테트라히드로피라노스 모이어티 및 적어도 3개의 올레핀계 이중 결합, 적어도 6개의 메틸 기, 적어도 3개의 히드록실 기, 적어도 25개의 탄소 및 적어도 8개의 산소 및 1개의 질소를 포함하는 구조를 갖는 것을 특징으로 할 수 있다. 화합물은 하기 특성 중 적어도 하나를 추가로 포함한다:

- [0261] (a) 살충 특성, 특히 살선충, 살진균, 살곤충, 살응애, 살조 및 제초 특성;
- [0262] (b) 액체 크로마토그래피/질량 분광분석법 (LC/MS)에 의해 결정시에 약 530-580, 보다 특히 555의 분자량;
- [0263] (c) δ 6.40, 6.39, 6.00, 5.97, 5.67, 5.54, 4.33, 3.77, 3.73, 3.70, 3.59, 3.47, 3.41, 2.44, 2.35, 2.26, 1.97, 1.81, 1.76, 1.42, 1.37, 1.16, 1.12, 1.04의 ^1H NMR 값;
- [0264] (d) δ 173.92, 166.06, 145.06, 138.76, 135.71, 129.99, 126.20, 123.35, 99.75, 82.20, 78.22, 76.69, 71.23, 70.79, 70.48, 69.84, 60.98, 48.84, 36.89, 33.09, 30.63, 28.55, 25.88, 20.37, 18.11, 14.90, 12.81, 9.41의 ^{13}C NMR 값;
- [0265] (e) 0.5 mL/분 유량 및 210 nm의 UV 검출에서 구배 용매 시스템 (0-20 분; 90-0% 수성 CH_3CN , 20-24 분; 100% CH_3CN , 24-27 분; 0-90% 수성 CH_3CN , 27-30 분; 90% 수성 CH_3CN)으로 물:아세트니트릴 (CH_3CN)을 사용하는 역상 C-18 HPLC (페노메넥스, 루나 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) 칼럼 상에서 약 7-12 분, 보다 구체적으로 약 10 분, 보다 더 구체적으로 약 10.98 분의 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC) 체류 시간;
- [0266] (f) 6개의 메틸, 4개의 메틸렌 탄소, 및 5개의 sp^2 , 4개의 4급 탄소를 포함하는 13개의 메틴에 기인할 수 있는 28개의 개별 탄소 신호를 나타내는 ^{13}C NMR 스펙트럼;
- [0267] (g) ESIMS 및 NMR 데이터 분석의 해석에 의해 결정된 $\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{NO}_{10}$ 의 분자식;
- [0268] (h) 약 210-450 nm 사이, 가장 특히 약 234 nm에서의 UV 흡수대.
- [0269] 또한 하기 구조 ##STR004a##을 갖는 화합물이 제공된다:

[0270]

[0271] ##STR004a##

[0272] 상기 식에서, X, Y 및 Z는 각각 독립적으로 -O-, -NR 또는 -S이고, 여기서 R은 H 또는 C_1 - C_{10} 알킬이고; R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} , R_{12} 및 R_{13} 은 각각 독립적으로 H, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, 헤테로시클릭, 치환된 헤테로시클릭, 시클로알킬, 치환된 시클로알킬, 알콕시, 치환된 알콕시, 티오알킬, 치환된 티오알킬, 히드록시, 할로젠, 아미노, 아마이드, 카르복실, -C(O)H, 아실, 옥시아실, 카르바메이트, 술폰닐, 술폰아미드 또는 술폰릴이다.

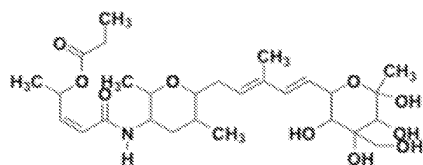
[0273] 특정한 실시양태에서, 화합물은 하기 ##STR004b##에 나타난 구조를 갖는다:

[0274]

[0275] ##STR004b##

[0276] 상기 식에서, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} , R_{12} 및 R_{13} 은 ##STR004a##에 대해 이전에 정의된 바와 같다.

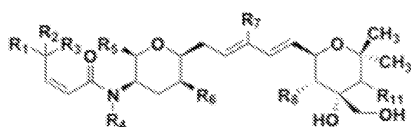
[0277] 보다 특정한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조를 갖는 템플라미드 A이다:



[0278]

[0279] 템플라미드 A

[0280] 또 다른 실시양태에서, 하기 화학식 ##STR004c##을 갖는 화합물이 제공된다:



[0281]

[0282] ##STR004c##

[0283] 상기 식에서, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈ 및 R₁₁은 ##STR004a##에 대해 이전에 정의된 바와 같다.

[0284] 또 다른 실시양태에서, 부르크홀데리아 종으로부터 유래될 수 있으며, 적어도 1개의 에스테르, 적어도 1개의 아미드, 에폭시드 메틸렌 기, 적어도 1개의 테트라히드로피라노스 모이어티 및 적어도 3개의 올레핀계 이중 결합, 적어도 6개의 메틸 기, 적어도 3개의 히드록실 기, 적어도 25개의 탄소 및 적어도 8개의 산소 및 1개의 질소를 포함하는 구조, 및 살충제 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 화합물이 제공된다. 화합물은 하기 특성 중 적어도 하나를 추가로 포함한다:

[0285] (a) 살충 특성, 특히 살곤충, 살진균, 살선충, 살응애, 살조 및 제초 특성;

[0286] (b) 액체 크로마토그래피/질량 분광분석법 (LC/MS)에 의해 결정시에 약 520-560, 특히 537의 분자량;

[0287] (c) 약 6.41, 6.40, 6.01, 5.97, 5.67, 5.55, 4.33, 3.77, 3.75, 3.72, 3.64, 3.59, 3.54, 3.52, 2.44, 2.34, 2.25, 1.96, 1.81, 1.76, 1.42, 1.38, 1.17, 1.12, 1.04에서의 ¹H NMR δ 값;

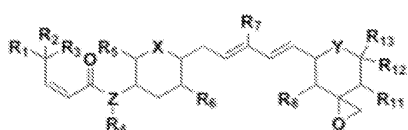
[0288] (d) δ 174.03, 166.12, 143.63, 137.50, 134.39, 128.70, 126.68, 124.41, 98.09, 80.75, 76.84, 75.23, 69.87, 69.08, 68.69, 68.60, 48.83, 41.07, 35.45, 31.67, 29.19, 27.12, 24.55, 19.20, 18.95, 13.48, 11.39, 8.04의 ¹³C NMR 값;

[0289] (e) 물:아세토니트릴 (CH₃CN) 구배를 이용하는 역상 C-18 HPLC 칼럼 상에서 약 6-15 분, 보다 특히 약 8 분의 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC) 체류 시간, 특히 0.5 mL/분 유량 및 210 nm의 UV 검출에서 구배 용매 시스템 (0-20 분; 90-0% 수성 CH₃CN, 20-24 분; 100% CH₃CN, 24-27 분; 0 - 90% 수성 CH₃CN, 27-30 분; 90% 수성 CH₃CN)으로 물:아세토니트릴 (CH₃CN)을 사용하는 역상 C-18 HPLC (페노메덱스, 루나 5μ C18(2) 100 Å, 100 x 4.60 mm) 칼럼 상에서 약 8-15 분, 보다 구체적으로 약 11 분, 보다 더 구체적으로 약 11.73 분의 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC) 체류 시간;

[0290] (f) ESIMS 및 NMR 데이터 분석의 해석에 의해 결정된 C₂₈H₄₃NO₉의 분자식;

[0291] (g) 약 210-450 nm, 가장 특히 약 234 nm에서의 UV 흡수대.

[0292] 특정한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조 ##STR006a##을 갖는다:

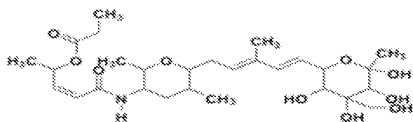


[0293]

[0294] ##STR006a##

[0295] 상기 식에서, X, Y 및 Z는 각각 독립적으로 -O, -NR 또는 -S이고, 여기서 R은 H 또는 C₁-C₁₀ 알킬이고; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₁₁, R₁₂ 및 R₁₃은 각각 독립적으로 H, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알킬닐, 치환된 알킬닐, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, 헤테로시클릭, 치환된 헤테로시클릭, 시클로알킬, 치환된 시클로알킬, 알콕시, 치환된 알콕시, 티오알킬, 치환된 티오알킬, 히드록시, 할로젠, 아미노, 아마이드, 카르복실, -C(O)H, 아실, 옥시아실, 카르바메이트, 술폰닐, 술폰아미드 또는 술푸릴이다.

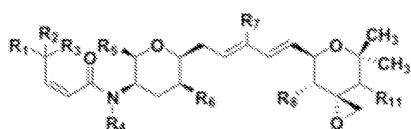
[0296] 특정한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조를 갖는다:



[0297]

[0298] 템플라미드 A

[0299] 또 다른 실시양태에서, 화학식 ##STR006b##을 갖는 화합물이 제공된다:

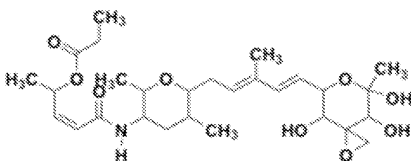


[0300]

[0301] ##STR006b##

[0302] 상기 식에서, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈ 및 R₁₁은 ##STR006a##에 대해 이전에 정의된 바와 같다.

[0303] 보다 특정한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조를 갖는 템플라미드 B이다:



[0304]

[0305] 템플라미드 B

[0306] 또 다른 특정한 실시양태에서, 화합물은 부르크홀데리아 종으로부터 유래될 수 있으며, 적어도 1개의 에스테르, 적어도 1개의 아마이드, 에폭시드 메틸렌 기, 적어도 1개의 테트라히드로피라노스 모이어티 및 적어도 3개의 올레핀계 이중 결합, 적어도 6개의 메틸 기, 적어도 3개의 히드록실 기, 적어도 25개의 탄소 및 적어도 8개의 산소 및 적어도 1개의 질소를 포함하는 구조를 갖는 것을 특징으로 한다. 화합물은 하기 특성 중 적어도 하나를 추가로 포함한다:

[0307] (a) 살충 특성, 특히 살곤충, 살진균, 살응애, 살선충, 살조 및 제초 특성;

[0308] (b) 액체 크로마토그래피/질량 분광분석법 (LC/MS)에 의해 결정시에 약 510-550, 특히 약 523의 분자량;

[0309] (c) 약 6.41, 6.40, 6.01, 5.98, 5.68, 5.56, 4.33, 3.77, 3.75, 3.72, 3.65, 3.59, 3.55, 3.50, 2.44, 2.26, 2.04, 1.96, 1.81, 1.75, 1.37, 1.17, 1.04의 ¹H NMR δ 값;

[0310] (d) δ 172.22, 167.55, 144.98, 138.94, 135.84, 130.14, 125.85, 123.37, 99.54, 82.19, 78.28, 76.69, 71.31, 70.13, 69.68, 48.83, 42.52, 36.89, 33.11, 30.63, 25.99, 21.20, 20.38, 18.14, 14.93, 12.84의 ¹³C NMR 값;

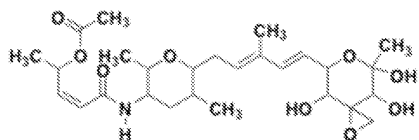
[0311] (e) 물:아세토니트릴 (CH₃CN) 구배를 이용하는 역상 C-18 HPLC 칼럼 상에서 약 6-15 분, 보다 특히 약 8 분의 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC) 체류 시간, 특히 0.5 mL/분 유량 및 210 nm의 UV 검출에서 구배 용매 시스템 (0-20 분; 90 - 0% 수성 CH₃CN, 20-24 분; 100% CH₃CN, 24-27 분; 0 - 90% 수성 CH₃CN, 27-30 분; 90% 수성 CH₃CN)으로 물:아세토니트릴 (CH₃CN)을 사용하는 역상 C-18 HPLC (페노메넥스, 루나 5μ C18(2) 100 Å, 100 x 4.60 mm) 칼럼 상에서 약 8-15 분, 보다 구체적으로 약 10 분, 보다 더 구체적으로 약 10.98 분의 고압 액체 크

로마토그래피 (HPLC) 체류 시간;

(f) ESIMS 및 NMR 데이터 분석의 해석에 의해 결정된 $C_{27}H_{41}NO_9$ 의 분자식;

(g) 약 210-450 nm, 가장 특히 약 234 nm에서의 UV 흡수대.

보다 특정한 실시양태에서, 화합물은 이전에 슈도모나스 종 번호 2663의 박테리아의 배양 브로쓰로부터 단리되고 (문헌 [Nakajima et al. 1996]), 하기 구조로 항암 활성을 갖는 것으로 보고된 기지의 화합물 FR901465이다:



FR901465

또 다른 특정한 실시양태에서, 패밀리 ##STR006a## 화합물은 xxiv 내지 xxxix에 기재된 화합물일 수 있다. 이들은 천연 물질 또는, 상업적 공급원으로부터 획득되거나 또는 화학적 합성에 의해 획득된 화합물로부터 유래된다. 패밀리 ##STR006a## 화합물의 천연 공급원은 미생물, 조류 및 해면류를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 보다 특정한 실시양태에서, 슈도모나스 종 번호 2663과 같은 종으로부터 유래될 수 있는 패밀리 ##STR006a## 화합물 (화합물 xxiv-xxvi)을 포함하는 미생물 (문헌 [Nakajima et al., 1996]), 항암 화합물로서 합성되고 특허 받은 FR901464의 합성 유사체 (xxvii-xxxix) (미국 특허 출원 번호 2008/0096879 A1 (Koide et al.) 참조).

하기 특성 중 적어도 하나를 포함하는 상기 기재된 제제에 의해 생산된 살충 화합물이 또한 제공된다:

(a) 살충 특성, 특히 제초, 살곤충, 살선충, 및 살진균 특성을 가짐;

(b) 액체 크로마토그래피/질량 분광분석법 (LC/MS)에 의해 결정된 약 210-240, 보다 특히 222의 분자량;

(c) δ 7.90, 6.85, 4.28, 1.76, 1.46, 1.38, 1.37, 0.94의 1H NMR 값을 가짐;

(d) δ 166.84, 162.12, 131.34 (2C), 121.04, 114.83 (2C), 64.32, 31.25, 28.43, 25.45, 22.18, 12.93의 ^{13}C NMR 값을 가짐;

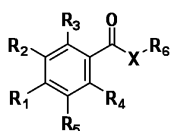
(e) 0.5 mL/분 유량 및 210 nm의 UV 검출에서 구배 용매 시스템 (0-20 분; 90 - 0% 수성 CH_3CN , 20-24 분; 100% CH_3CN , 24-27 분; 0-90% 수성 CH_3CN , 27-30 분; 90% 수성 CH_3CN)으로 물:아세트니트릴 (CH_3CN)을 사용하는 역상 C-18 HPLC (페노메넥스, 루나 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) 칼럼 상에서 약 15-20 분, 보다 구체적으로 약 17 분, 보다 더 구체적으로 약 17.45 분의 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC) 체류 시간을 가짐;

(f) 1개의 메틸, 5개의 메틸렌 탄소, 4개의 메틴, 및 3개의 4급 탄소에 기인한 13개의 개별 탄소 신호를 나타내는 ^{13}C NMR 스펙트럼;

(g) ESIMS 및 NMR 데이터 분석의 해석에 의해 결정된 $C_{13}H_{18}O_3$ 의 분자식;

(h) 약 210-450 nm 사이, 가장 특히 약 248 nm에서의 UV 흡수대.

또한, 하기 나타낸 구조를 갖는 화합물이 제공된다:

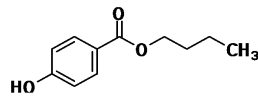


상기 식에서,

X는 독립적으로 -O-, -NR 또는 -S이고, 여기서 R은 H 또는 C_1 - C_{10} 알킬이고; R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 및 R_6 은 각각 독립적으로 H, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, 헤테로시클릭, 치환된 헤테로시클릭, 시클로알킬, 치환된 시클로알킬, 알콕시,

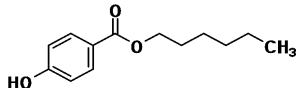
치환된 알콕시, 티오알킬, 치환된 티오알킬, 히드록시, 할로젠, 아미노, 아미도, 카르복실, $-C(O)H$, 아실, 옥시아실, 카르바메이트, 술폰닐, 술폰아미드 또는 술폰릴이다.

[0331] 보다 특정한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조를 갖는 부틸 파라벤이다:



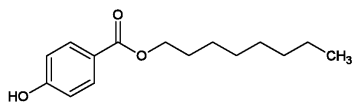
[0332]

[0333] 보다 특정한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조를 갖는 헥실 파라벤이다:



[0334]

[0335] 보다 특정한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조를 갖는 옥틸 파라벤이다:



[0336]

[0337] 또 다른 실시양태에서, 화합물은 약 1080의 분자량을 갖는 F7H18이다.

[0338] **조성물**

[0339] 본원에 개시된 부르크홀데리아 균주에 의해 생산된 실질적으로 순수한 배양물, 세포 분획 또는 상청액 및 화합물 (이들은 모두 대안적으로 "활성 성분(들)"으로 지칭됨)은 살충 조성물 내로 제제화될 수 있다. 특정한 실시양태에서, 상청액은 세포-무함유 상청액일 수 있다.

[0340] 상기 기재된 활성 성분(들)은 임의의 방법으로 제제화될 수 있다. 비제한적 제제의 예는 유화성 농축액 (EC), 습윤성 분말 (WP), 가용성 액체 (SL), 에어로졸, 초미립자 농축물 용액 (ULV), 가용성 분말 (SP), 마이크로캡슐화, 물 분산된 과립, 액상수화제 (FL), 마이크로에멀전 (ME), 나노-에멀전 (NE), 분진, 에멀전, 액체, 플레이크 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본원에 기재된 임의의 제제에서, 활성 성분의 퍼센트는 0.01% 내지 99.99%의 범위 내이다.

[0341] 고체 조성물은 살충 화합물의 용액에 고체 담체를 현탁화시키고, 온화한 조건, 예컨대 실온에서의 증발 또는 65 °C 이하에서의 진공 증발 하에 현탁액을 건조시켜 제조될 수 있다. 대안적으로, 고체 조성물은 분무-건조 또는 동결-건조를 통해 유래될 수 있다.

[0342] 고체 조성물을 지칭하는 경우에, 당업자는 물리적 형태, 예컨대 분진, 비드, 분말, 미립자, 펠릿, 정제, 응집체, 과립, 부유 고체 및 다른 기지의 고체 제제가 포함된다는 것을 이해할 것이다. 당업자는 이들에게 널리 공지된 방법을 이용하여 주어진 적용 동안 특정한 고체 제제를 용이하게 최적화할 수 있을 것이다.

[0343] 조성물은 상기 기재된 부르크홀데리아 균주로부터 유래된 젤-캡슐화 화합물을 포함할 수 있다. 이러한 젤-캡슐화 물질은 젤-형성제 (예를 들어, 젤라틴, 셀룰로스 또는 리그닌)를 살조 화합물의 용액과 혼합하고, 작용제의 젤 형성을 유도함으로써 제조될 수 있다.

[0344] 조성물은 유화, 분산, 습윤, 확산, 통합, 봉해 제어, 활성 성분의 안정화, 및 유동성의 개선 또는 부식 억제 목적을 위해 사용될 계면활성제를 추가로 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 계면활성제는 비-식물독성 비-이온성 계면활성제이고, 이는 바람직하게는 EPA 목록 4B에 속한다. 또 다른 특정한 실시양태에서, 비이온성 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 (20) 모노라우레이트이다. 계면활성제의 농도는 전체 제제의 0.1-35% 범위일 수 있고, 바람직한 범위는 5-25%이다. 분산제 및 유화제, 예컨대 비-이온성, 음이온성, 양쪽성 및 양이온성 분산제 및 유화제의 선택, 및 사용되는 양은 조성물의 특성 및 이들 조성물의 분산을 용이하게 하는 작용제의 능력에 의해 결정된다.

[0345] 분진, 과립, 수분산성 분말, 수성 분산액, 또는 유기 액체 중 에멀전 및 분산액의 형태로 상기 기재된 활성 성분(들)을 함유하는 조성물을 제공하기 위해, 이러한 조성물 중 담체 또는 희석제 작용제는 미분된 고체, 유기 액체, 물, 습윤제, 분산제, 습윤화제 또는 유화제, 또는 이들의 임의의 적합한 조합일 수 있다. 일반적으로, 액체 및 습윤성 분말이 제조되는 경우에, 하나 이상의 표면-활성제 또는 계면활성제를 포함하는 컨디셔닝제는

물 또는 오일에서 분산성인 활성 물질, 미생물을 함유하는 주어진 조성물을 제공하기에 충분한 양으로 존재한다.

- [0346] 이러한 조성물이 액체 담체를 활용하는 분무기로 적용될 수 있으므로, 매우 다양한 액체 담체, 예컨대 예를 들어, 물, 유기 용매, 데칸, 도데칸, 오일, 식물성 오일, 미네랄 오일, 알콜, 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 처리되는 물 중 병원성 박테리아의 차등 분포를 발생시키는 작용제, 그의 조합 및 당업자에게 공지된 다른 것이 사용될 수 있다는 것이 고려된다.
- [0347] 본 발명의 조성물은 또한 살조제에 통상적으로 사용되는 활성 성분(들), 예컨대 아주반트, 계면활성제, 결합제, 안정화제 등에 해롭지 않은 다른 물질을 단독으로 또는 필요에 따라 조합하여 포함할 수 있다.
- [0348] 당업자는 상기 기재된 활성 성분에 감수성인 해충에 영향을 받기 쉬운 다양한 첨가제 또는 작용제가 그의 살충 작용을 증진시키기 위해 첨가된다는 것을 이해할 것이다. 어구 "활성 성분의 살충 작용을 증진시키는 첨가제"는 상기 첨가제의 부재 하에 활성 성분의 살충 효과와 비교하여 해충, 보다 특히 응애류에 대한 활성 성분의 효과를 증가시키는 임의의 화합물, 용매, 시약, 물질 또는 작용제를 의미한다. 일부 실시양태에서, 이러한 첨가제는 활성 성분에 대한 특정한 해충의 감수성을 증가시킬 것이다. 추가의 첨가제는 감수성 해충의 생물학적 방어를 약화시키는 작용제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이러한 작용제는 염, 예컨대 NaCl 및 CaCl₂를 포함할 수 있다.
- [0349] 조성물은 또 다른 미생물 및/또는 살충제 (예를 들어, 살선충제, 살진균제, 살곤충제, 제초제, 살조제, 살진드기제)를 추가로 포함할 수 있다. 미생물은 바실루스(*Bacillus*) 종, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종, 브레바바실루스(*Brevabacillus*) 종, 레카니실리움(*Lecanicillium*) 종, 비-암펠로미세스(*Ampelomyces*) 종, 슈도지마(*Pseudozyma*) 종, 스트렙토미세스(*Streptomyces*) 종, 부르크홀데리아 종, 트리코더마(*Trichoderma*) 종, 글리오클라디움(*Gliocladium*) 종으로부터 유래된 작용제를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 대안적으로, 작용제는 살진균, 제초, 살진드기, 살조, 살선충 및/또는 살곤충 활성을 갖는 천연 오일 또는 오일-생성물 (예를 들어, 파라핀계 오일, 티트리 오일, 레몬그래스 오일, 클로브 오일, 시나몬 오일, 시트러스 오일, 로즈마리 오일)일 수 있다.
- [0350] 조성물은 특히, 살곤충제를 추가로 포함할 수 있다. 살곤충제는 아베르멕틴, 바실루스 투링기엔시스(*Bacillus thuringiensis*), 니임 오일 및 아자디락틴, 스피노사드, 크로모박테리움 서브츄가에(*Chromobacterium subtsugae*), 유칼립투스 추출물, 곤충병원성 박테리아 또는 진균류, 예를 들어 뷰베리아 바시아나(*Beauveria bassiana*), 및 메타리지움 아니소플리아에(*Metarrhizium anisopliae*), 및 유기염소 화합물, 유기인 화합물, 카르바메이트, 피레트로이드, 및 네오니코티노이드를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는 화학적 살곤충제를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.
- [0351] 조성물은 살선충제를 추가로 포함할 수 있다. 살선충제는 화학적 살선충제, 예컨대 페나미포스, 알디카르브, 옥사밀, 카르보푸란, 천연 생성물 살선충제, 아베르멕틴, 진균류 파에실로미세스 릴라시나스(*Paecilomyces lilacinus*) 및 무스코도르(*Muscodor*) 종, 박테리아 바실루스 피르무스(*Bacillus firmus*) 및 다른 바실루스 종 및 파스퇴리아 페네트란스(*Pasteuria penetrans*)를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.
- [0352] 조성물은 생물살진균제, 예컨대 알. 사칼리넨시스(*R. sachalinensis*) (레갈리아)의 추출물 또는 살진균제를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 살진균제는 단일 부위 항진균제를 포함하나 이에 제한되지는 않고, 이는 벤즈이미다졸, 탈메틸화 억제제 (DMI) (예를 들어, 이미다졸, 피페라진, 피리미딘, 트리아졸), 모르폴린, 히드록시피리미딘, 아닐리노피리미딘, 포스포로티올레이트, 퀴논 외부 억제제, 퀴놀린, 디카르복시이미드, 카르복시이미드, 페닐아미드, 아닐리노피리미딘, 페닐피롤, 방향족 탄화수소, 신남산, 히드록시 아닐리드, 항생제, 폴리아민, 칼라민, 프탈이미드, 벤제노이드 (크실릴알라닌)를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 다른 추가 실시양태에서, 항진균제는 이미다졸 (예를 들어, 트리플루미졸), 피페라진, 피리미딘 및 트리아졸 (예를 들어, 비테트라놀, 미클로부타닐, 펜코나졸, 프로피코나졸, 트리아디메폰, 브로부코나졸, 시프로코나졸, 디니코나졸, 펜부코나졸, 헥사코나졸, 테부코나졸, 테트라코나졸, 프로피코나졸)로 이루어진 군으로부터 선택된 탈메틸화 억제제이다.
- [0353] 항미생물제는 또한 니트릴 (예를 들어, 클로로니트릴 또는 플루디옥소닐), 퀴녹살린, 술파미드, 포스포네이트, 포스포이트, 디티오카르바메이트, 클로르알킬티오스, 페닐피리딘-아민, 시아노-아세트아미드 옥심으로 이루어진 군으로부터 선택된 다중-부위 비-무기, 화학적 살진균제일 수 있다.
- [0354] 조성물은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 적용될 수 있다. 구체적으로는, 이들 조성물은 식물 또는 식물 일

부에 적용될 수 있다. 식물은 본 문맥에서 모든 식물 및 식물 집단, 예컨대 원하는 및 원하지 않는 야생 식물 또는 작물 식물 (자연 발생 작물 식물 포함)을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 작물 식물은 통상의 식물 육종 및 최적화 방법 또는 생물공학 및 유전 공학 방법 또는 이들 방법의 조합에 의해 수득될 수 있는, 트랜스제닉 식물 및 식물 육종가 권리에 의해 보호가능하거나 또는 보호가능하지 않은 식물 재배품종을 비롯한 식물일 수 있다. 식물 부위는 지면 위 및 아래의 식물의 모든 부위 및 기관, 예컨대 순, 잎, 꽃 및 뿌리를 의미하는 것으로 이해되어야 하며, 언급될 수 있는 예는 잎, 침, 대, 줄기, 꽃, 자실체, 과일, 종자, 뿌리, 껍질 및 근경이다. 식물 부위는 또한 수확된 물질, 및 영양 및 생식 번식 재료, 예를 들어 껍질이순, 껍질, 근경, 새순 및 종자를 포함한다.

[0355] 상기 기재된 조성물로의 식물 및 식물 부분의 처리는 직접적으로 수행하거나 또는 예를 들어, 침지, 분무, 증발, 포깅, 산란, 페인팅, 주사에 의해 그의 환경, 서식지 또는 저장 공간 상에 조성물이 작용할 수 있도록 하여 수행될 수 있다. 조성물이 종자에 적용되는 경우에, 조성물은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 하나 이상의 코트를 사용하여 종자를 심기 전에 하나 이상의 코트로서 종자에 대해 적용될 수 있다.

[0356] 상기 언급된 바와 같이, 조성물은 제초 조성물일 수 있다. 조성물은 하나 이상의 제초제를 추가로 포함할 수 있다. 이들은 생물제초제 및/또는 화학 제초제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 생물제초제는 클로브 오일, 시나몬 오일, 레몬그래스 오일, 시트러스 오일, 오렌지색 펄 오일, 텐톡신, 코르넥시스틴, AAL-독소, 마누카 오일, 랩토스페르몬, 탁스토민, 사르멘틴, 모밀락톤 비, 소르골레온, 아스카울락톡신 및 아스카울락톡신 아글리콘으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 화학적 제초제는 디플루벤조피르 및 그의 염, 디캄바 및 그의 염, 토프라메존, 템보트리온, S-메톨라클로르, 아트라진, 메소트리온, 프리미스푸론-메틸, 2,4-디클로로페녹시아세트산, 니코솔푸론, 티펜술푸론-메틸, 아술람, 메트리부진, 디클로포프-메틸, 플루아지포프, 페녹사프로프-p-에틸, 아술람, 옥시플루오르펜, 림술푸론, 메코프로프, 및 퀴클로락, 티오벤카르브, 클로마존, 시할로포프, 프로파닐, 벤술푸론-메틸, 페녹스술람, 트리클로피르, 이마제타피르, 할로술푸론-메틸, 펜디메탈린, 비스피리박-나트륨 카르펜트라존 에틸, 나트륨 벤타존/나트륨 아시플루오르펜, 글리포세이트, 글루포시네이트 및 오르토솔 파무론을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0357] 제초 조성물은 출아전 또는 출아후 제제로서 액체 또는 고체 형태로 적용될 수 있다.

[0358] 출아전 건조 제제의 경우에, 담체의 과립 크기는 전형적으로 1-2 mm (직경)이지만, 과립은 요구되는 토지 피복에 따라 보다 작거나 또는 보다 클 수 있다. 과립은 다공성 또는 비-다공성 입자를 포함할 수 있다.

[0359] 출아후 제제의 경우에, 사용된 제제 성분은 스택타이트 점토, 아타풀자이트 점토 및 유사한 팽윤 점토, 증점제, 예컨대 크산탄 검, 아라비아 검 및 다른 폴리사카라이드 증점제 뿐만 아니라 분산액 안정화제, 예컨대 비이온성 계면활성제 (예컨대 폴리옥시에틸렌 (20) 모노라우레이트)를 함유할 수 있다.

[0360] 특정한 실시양태에서, 조성물은 활성 성분 뿐만 아니라 또 다른 미생물 및/또는 살조제 및/또는 살웅애제를 포함할 수 있다. 미생물은 바실루스 종, 브레비바실루스 종 및 스트렙토미세스 종으로부터 유래된 작용제를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0361] 조성물은 또한 상기에 기재된 바와 같이 다른 살조제, 예컨대 황산구리, 디쿼트 또는 탁스토민 A를 추가로 포함할 수 있는 살조 조성물일 수 있다.

[0362] 조성물은 다른 살웅애제, 예컨대 항생제, 카르바메이트, 포름아미딘 살웅애제, 피레트로이드, 응애 성장 조절제, 유기포스페이트 살웅애제 및 규조토를 추가로 포함할 수 있는 살웅애 조성물일 수 있다.

[0363] 용도

[0364] 본원에 기재된 부르크홀데리아 균주로부터 유래된 조성물 및 살충 화합물은 살충제, 특히 살곤충제, 살선충제, 살진균제, 살조제, 살웅애제 및 제초제로서 사용될 수 있다.

[0365] 구체적으로, 상기 기재된 방법을 이용하여 방제될 수 있는 선충류는 기생성 선충류, 예컨대 뿌리-혹, 고리, 스팅, 랜스, 시스트, 및 뿌리썩이 선충류, 예를 들어 비제한적으로 자유 생활 선충류, 멜로이도기네 (*Meloidogyne*), 헤테로데라(*Heterodera*) 및 글로보데라(*Globodera*) 아종; 특히 멜로이도기네 인코그니타 (*Meloidogyne incognita*) (뿌리혹 선충류) 뿐만 아니라 글로보데라 로스토키엔시스(*Globodera rostochiensis*) 및 글로보데라 파일리다(*globodera pailida*) (감자 시스트 선충류); 헤테로데라 글리시네스(*Heterodera glycines*) (대두 시스트 선충류); 헤테로데라 샤흐티이(*Heterodera schachtii*) (비트 시스트 선충); 올리고니쿠스 프라텐시스(*Oligonychus pratensis*) (뱅크스 그래스 응애); 에리오피에스 시노도니엔시스(*Eriophyes*

cynodonensis) (버뮤다 그래스 응애); 브리오비아 프라에티오사(*Bryobia praetiosa*) (클로버 응애) 및 헤테로테라 아베나에(*Heterodera avenae*) (곡류 시스트 선충류)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0366] 본 발명의 방법에 의해 방제되는 식물병원성 곤충류는 하기 목록으로부터의 곤충류를 포함하나 이에 제한되지는 않는다:

[0367] (a) 나비목, 예를 들어 아클레리스(*Acleris*) 아종, 아독소피에스(*Adoxophyes*) 아종, 아에게리아(*Aegeria*) 아종, 아그로티스(*Agrotis*) 아종, 알라바마 아르길라세아에(*Alabama argillaceae*), 아밀로이스(*Amylois*) 아종, 안티카르시아 겐마탈리스(*Anticarsia gemmatalis*), 아르킵스(*Archips*) 아종, 아르기로타에니아(*Argyrotaenia*) 아종, 아우토그라파(*Autographa*) 아종, 부세올라 푸스카(*Busseola fusca*), 카드라 카우텔라(*Cadra cautella*), 카르포시나 니프포넨시스(*Carpocapsa nipponensis*), 킬로(*Chilo*) 아종, 코리스토네우라(*Choristoneura*) 아종, 클리시아 암비구엘라(*Clysia ambiguella*), 크나팔로크로시스(*Cnaphalocrocis*) 아종, 크네파시아(*Cnephasia*) 아종, 코킬리스(*Cochylis*) 아종, 콜레오포라(*Coleophora*) 아종, 크로시돌로미아 비노탈리스(*Crocidolomia binotalis*), 크립토폴레비아 류코트레타(*Cryptophlebia leucotreta*), 시디아(*Cydia*) 아종, 디아트라에아(*Diatraea*) 아종, 디파로프시스 카스타니아(*Diparopsis castanea*), 에아리아스(*Earias*) 아종, 에페스티아(*Ephesia*) 아종, 유코스마(*Eucosma*) 아종, 유포에실리아 암비구엘라(*Eupoecilia ambiguella*), 유프로크티스(*Euproctis*) 아종, 욱소아(*Euxoa*) 아종, 그라폴리타(*Grapholita*) 아종, 헤디아 누비페라나(*Hedya nubiferana*), 헬리오티스(*Heliothis*) 아종, 헬룰라 운달리스(*Helvula undalis*), 히판트리아 쿠네아(*Hyphantria cunea*), 케이페리아 리코페르시셀라(*Keiferia lycopersicella*), 류코프테라 시텔라(*Leucoptera scitella*), 리토콜레티스(*Lithocolletis*) 아종, 로베시아 보트라나(*Lobesia botrana*), 리만트리아(*Lymantria*) 아종, 리오네티아(*Lyonetia*) 아종, 말라코소마(*Malacosoma*) 아종, 마메스트라 브라시카에(*Mamestra brassicae*), 만두카 섹타(*Manduca sexta*), 오페로프테라(*Operophtera*) 아종, 오스트리니아 누빌리스(*Ostrinia nubilalis*), 팜메네(*Pammene*) 아종, 판데미스(*Pandemis*) 아종, 파놀리스 플람메아(*Panolis flammea*), 펙티노포라 고시피엘라(*Pectinophora gossypiella*), 프토리마에아 오페로클레라(*Phthorimaea operculella*), 피에리스 라파에(*Pieris rapae*), 피에리스(*Pieris*) 아종, 플루텔라 크실로스텔라(*Plutella xylostella*), 프라이스(*Prays*) 아종, 시르포파가(*Scirpophaga*) 아종, 세사미아(*Sesamia*) 아종, 스파르가노티스(*Sparganothis*) 아종, 스포도프테라(*Spodoptera*) 아종, 시난테돈(*Synanthedon*) 아종, 타우메토포에아(*Thaumetopoea*) 아종, 토르트릭스(*Tortrix*) 아종, 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*) 및 위포노메우타(*Yponomeuta*) 아종;

[0368] (b) 딱정벌레목, 예를 들어 아그리오테스(*Agriotes*) 아종, 안토노무스(*Anthonomus*) 아종, 아토마리아 리네아리스(*Atomaria linearis*), 카에톡네마 티비알리스(*Chaetocnema tibialis*), 코스모폴리테스(*Cosmopolites*) 아종, 쿠르쿨리오(*Curculio*) 아종, 데르메스테스(*Dermestes*) 아종, 디아브로티카(*Diabrotica*) 아종, 에필라크나(*Epilachna*) 아종, 에렘누스(*Eremnus*) 아종, 렙티노타르사 데셈리네아타(*Leptinotarsa decemlineata*), 리소로프트루스(*Lissorhoptrus*) 아종, 멜로론타(*Melolontha*) 아종, 오리카에필루스(*Oryzaephilus*) 아종, 오티오르힌쉴스(*Otiorynchus*) 아종, 플릭티누스(*Phlyctinus*) 아종, 포필리아(*Popillia*) 아종, 프실리오데스(*Psylliodes*) 아종, 리조페르타(*Rhizopertha*) 아종, 스카라베이데아(*Scarabaeidae*), 시토폴루스(*Sitophilus*) 아종, 시토포트로가(*Sitotroga*) 아종, 테네브리오(*Tenebrio*) 아종, 트리볼리움(*Tribolium*) 아종 및 트로고더마(*Trogoderma*) 아종; (c) 메뚜기목, 예를 들어 블라타(*Blatta*) 아종, 블라텔라(*Blattella*) 아종, 그릴로탈파(*Gryllotalpa*) 아종, 류코파에아 마데라에(*Leucophaea maderae*), 로쿠스타(*Locusta*) 아종, 페리플라네타(*Periplaneta*) 아종 및 쉬스토세르카(*Schistocerca*) 아종; (d) 흰개미목, 예를 들어 레티쿨리테르메스(*Reticulitermes*) 아종; (e) 다듬이벌레목, 예를 들어 리포셀리스(*Liposcelis*) 아종; (f) 이아목, 예를 들어 헤마토피누스(*Haematopinus*) 아종, 리노그나투스(*Linognathus*) 아종, 페디쿨루스(*Pediculus*) 아종, 펌피구스(*Pemphigus*) 아종 및 필록세라(*Phylloxera*) 아종; (g) 털이목, 예를 들어 다말리네아(*Damalinea*) 아종 및 트리코덱테스(*Trichodectes*) 아종; (h) 총채벌레목, 예를 들어 프란클리니엘라(*Frankliniella*) 아종, 헤르시노트립스(*Hercinotrips*) 아종, 타에니오텍스(*Taeniothrips*) 아종, 트립스 팔미(*Thrips palmi*), 트립스 타바시(*Thrips tabaci*) 및 시르토텍스(*Scirtothrips aurantii*); (i) 노린재목, 예를 들어 시멕스(*Cimex*) 아종, 디스탄티엘라 테오브로마(*Distantiella theobroma*), 디스테르쿠스(*Dysdercus*) 아종, 유키스투스(*Euchistus*) 아종, 유리가스터(*Eurygaster*) 아종, 렙토코리사(*Leptocoris*) 아종, 네자라(*Nezara*) 아종, 피에스마(*Piesma*) 아종, 로드니우스(*Rhodnius*) 아종, 살베르겔라 싱귤라리스(*Sahlbergella singularis*), 스코티노파라(*Scotinophara*) 아종, 온코펠루스(*Oncopeltus*) 아종, 리기스(*Lygys*) 아종 및 트니아토마(*Tniatoma*) 아종; (j) 매미목, 예를 들어 알레우로트릭수스 플로코수스(*Aleurothrixus floccosus*), 알레이로테스 브라시카에(*Aleyrodes brassicae*), 아오니디엘라(*Aonidiella*) 아종, 아피디다에(*Aphididae*) 및 아피스(*Aphis*) 아종, 아스피디오투스(*Aspidiotus*) 아종, 베미시아 타바시(*Bemisia tabaci*), 세로플라스터(*Ceroplaster*) 아종, 크리솜팔루스 아오니디움(*Chrysomphalus*

aonidium), 크리솜팔루스 디티오스페르미(*Chrysomphalus dictyospermi*), 코쿠스 헤스페리디움(*Coccus hesperidum*), 엠포아스카(*Empoasca*) 아종, 에리오소마 라리게룸(*Eriosoma larigerum*), 에리트르네우라(*Erythroneura*) 아종, 가스카르디아(*Gascardia*) 아종, 라오텔팍스(*Laodelphax*) 아종, 레카니움 코르니(*Lecanium corni*), 레피도사페스(*Lepidosaphes*) 아종, 마크로시푸스(*Macrosiphus*) 아종, 미주스(*Myzus*) 아종, 네포테티스(*Nephotettix*) 아종, 닐라파르바타(*Nilaparvata*) 아종, 파라토리아(*Paratoria*) 아종, 펠피구스 아종, 플라노코쿠스(*Planococcus*) 아종, 슈다올라카스피스(*Pseudaulacaspis*) 아종, 슈도코쿠스(*Pseudococcus*) 아종, 프실라(*Psylla*) 아종, 풀비나리아 아에티오피카(*Pulvinaria aethiopica*), 쿼드라스피디오투스(*Quadraspidotus*) 아종, 로팔로시폼(*Rhopalosiphum*) 아종, 사이세티아(*Saissetia*) 아종, 스카포이테우스(*Scaphoideus*) 아종, 쉬자피스(*Schizaphis*) 아종, 시토비온(*Sitobion*) 아종, 트리알레우로데스 바포라리오룸(*Trialeurodes vaporariorum*), 트리오자 에리트레아에(*Trioza erytreae*) 및 우나스피스 시트리(*Unaspis citri*); (k) 막시목, 예를 들어 아크로미르멕스(*Acromyrmex*), 아타(*Atta*) 아종, 세푸스(*Cephus*) 아종, 디프리온(*Diprion*) 아종, 디프리오니다에(*Diprionidae*), 길피니아 폴리토마(*Gilpinia polytoma*), 호플로캄파(*Hoplocampa*) 아종, 라시우스(*Lasius*) 아종, 모노모리움 파라오니스(*Monomorium pharaonis*), 네오디프리온(*Neodiprion*) 아종, 솔레노프시스(*Solenopsis*) 아종 및 베스파(*Vespa*) 아종; (l) 쌍시목, 예를 들어 아에데스(*Aedes*) 아종, 안테리고나 소카타(*Antherigona soccata*), 비비오 호르틀라누스(*Bibio hortulanus*), 칼리포라 에리트르세팔라(*Calliphora erythrocephala*), 세라티티스(*Ceratitis*) 아종, 크리소미아(*Chrysomya*) 아종, 쿨렉스(*Culex*) 아종, 큐테레브라(*Cuterebra*) 아종, 다쿠스(*Dacus*) 아종, 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*), 판니아(*Fannia*) 아종, 가스트로필루스(*Gastrophilus*) 아종, 글로시나(*Glossina*) 아종, 히포더마(*Hypoderma*) 아종, 히포보스카(*Hyppobosca*) 아종, 리리오미자(*Liriomyza*) 아종, 루실리아(*Lucilia*) 아종, 멜라나그로미자(*Melanagromyza*) 아종, 무스카(*Musca*) 아종, 오에스트루스(*Oestrus*) 아종, 오르세올리아(*Orseolia*) 아종, 오시넬라 프리트(*Oscinella frit*), 페고미아 히오시아미(*Pegomya hyoscyami*), 포르비아(*Phorbia*) 아종, 라글레티스 포모넬라(*Rhagoletis pomonella*), 스시아라(*Sciara*) 아종, 스토크시스(*Stomoxys*) 아종, 타바누스(*Tabanus*) 아종, 탄니아(*Tannia*) 아종 및 티풀라(*Tipula*) 아종; (m) 벼룩목, 예를 들어 세라토피루스(*Ceratophyllus*) 아종 및 크세놉실라 케오피스(*Xenopsylla cheopis*) 및 (n) 좀목, 예를 들어 레피스마 사카리나(*Lepisma saccharina*). 본 발명에 따른 활성 성분은 오일 종자 작물, 예컨대 카놀라 (평지), 겨자 종자, 및 그의 잡종, 및 또한 벼 및 옥수수에서의 십자화과 식물 벼룩 딱정벌레 (필로트레타(*Phyllotreta*) 아종), 뿌리 구더기 (텔리아(*Delia*) 아종), 양배추 종실협 바구미 (슈토린쉴스(*Ceutorhynchus*) 아종) 및 진딧물을 방제하기 위해 추가로 사용될 수 있다. 특정한 실시양태에서, 곤충류는 스포도프테라, 보다 특히 스포도프테라 엑시구아(*Spodoptera exigua*), 미주스 페르시카에(*Myzus persicae*), 플루텔라 크실로스텔라(*Plutella xylostella*) 또는 유쉬스투스(*Euschistus*) 종의 구성원일 수 있다.

[0369]

물질 및 조성물은 또한 단자엽 (사초과 및 목초과 포함) 또는 쌍자엽 잡초의 출아전 또는 출아후 제제에서 출아를 조절하기 위해 사용될 수 있다. 특정한 실시양태에서, 잡초는 케노포디움(*Chenopodium*) 종 (예를 들어, 씨. 알뭇(*C. album*)), 아부틸론(*Abutilon*) 종 (예를 들어, 에이. 테오프라스티(*A. theophrasti*)), 헬리안투스(*Helianthus*) 종 (예를 들어, 에이치. 아누우스(*H. annuus*)), 루드위기아(*Ludwigia*) 종 (예를 들어, 엘. 헥사페탈라(*L. hexapetala*)), 암브로시아(*Ambrosia*) 종 (예를 들어, 에이. 아르테메시폴리아(*A. artemesifolia*)), 아마란투스(*Amaranthus*) 종 (예를 들어, 에이. 레트로플렉수스(*A. retroflexus*)), 에이. 팔메리(*A. palmeri*)), 콘볼볼루스(*Convolvulus*) 종 (예를 들어, 씨. 아벤시스(*C. arvensis*)), 이포모에아에(*Ipomoeae*) 종, 브라시카(*Brassica*) 종 (예를 들어, 비. 카베르(*B. kaber*)), 라파누스(*Raphanus*) 종, 타락사쿰(*Taraxacum*) 종 (예를 들어, 티. 오피시날레(*T. officinale*)), 센타우레아(*Centaurea*) 종 (예를 들어, 씨. 솔스티탈리스(*C. solstitialis*)), 코니자(*Conyza*) 종 (예를 들어, 씨. 보나리엔시스(*C. bonariensis*)), 시르시움(*Cirsium*) 종 (예를 들어, 씨. 아르벤세(*C. arvense*)), 레피디움(*Lepidium*) 종, 갈리움(*Gallium*) 종, 솔라눔(*Solanum*) 종 (예를 들어, 에스. 니그룸(*S. nigrum*)), 말바(*Malva*) 종 (예를 들어, 엠. 네글렉타(*M. neglecta*)), 시페루스(*Cyperus*) 종 (예를 들어, 씨. 로툰두스(*C. rotundus*)), 옥살리스(*Oxalis*) 종, 유포르비아(*Euphorbia*) 종, 트리폴리움(*Trifolium*) 종, 메디카고(*Medicago*) 종, 히드릴라(*Hydrilla*) 종, 아졸라(*Azolla*) 종, 디기타리아(*Digitaria*) 종 (예를 들어, 디. 상귀날리스(*D. sanguinalis*)), 세타리아(*Setaria*) 종 (예를 들어, 에스. 루테센스(*S. lutescens*)), 시노돈 닥틸론(*Cynodon dactylon*), 브로무스(*Bromus*) 종 (예를 들어, 비. 텍토룸(*B. tectorum*)), 포아(*Poa*) 종 (예를 들어, 피. 아누아(*P. annua*)), 피. 프라텐시스(*P. pratensis*)), 롤리움(*Lolium*) 종 (예를 들어, 엘. 페렌네(*L. perenne*)), 소르굼(*Sorghum*) 종 (예를 들어, 에스. 할레펜세(*S. halepense*)), 아룬도 도낙스(*Arundo donax*), 페스투카(*Festuca*) 종 (예를 들어, 에프. 아룬디나세아에(*F. arundinaceae*)), 에키노클로아(*Echinochloa*) 종 (예를 들어, 이. 크루스-갈리(*E. crus-galli*)), 이. 필로포곤

(*E. phyllopogon*))을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0370] 상기 기재된 부르크홀데리아 균주, 화합물 및 조성물은 또한 살진균제로서 사용될 수 있다. 표적화된 진균류는 푸사리움(*Fusarium*) 종, 보트리티스(*Botrytis*) 종, 모닐리니아(*Monilinia*) 종, 콜레토티리쿰(*Colletotrichum*) 종, 베르티실리움(*Verticillium*) 종; 마이크로포미나(*Microphomina*) 종, 피토프토라(*Phytophthora*) 종, 뮤코르(*Mucor*) 종, 포도스파에라(*Podosphaera*) 종, 리족토니아(*Rhizoctonia*) 종, 페로노스포라(*Peronospora*) 종, 게오트리쿰(*Geotrichum*) 종, 포마(*Phoma*) 및 페니실리움(*Penicillium*)일 수 있다. 또 다른 대부분의 특정한 실시양태에서, 박테리아는 크산토모나스(*Xanthomonas*)이다.

[0371] 물질 및 조성물은 살조 및 조류증식억제 활성을 통해 단세포, 다세포 및 규조류, 홍조류, 녹조류 및 청록조류, 예컨대 슈도키르크네리엘라 서브카피타타(*Pseudokirchneriella subcapitata*), 리조클로니움(*Rhizoclonium*) 종, 클라도포에라(*Cladophora*) 종, 아나베나(*Anabaena*) 종, 노스톡(*Nostoc*) 종, 히드로딕티온(*Hydrodictyon*) 종, 카라(*Chara*) 종, 마이크로시스티스(*Microcystis*) 및 디다ймо(*Didymo*) 종, 클라미도모나스(*Chlamydomonas*) 종, 세네데스무스(*Scenedesmus*) 종, 오실라토리아(*Oscillatoria*) 종, 볼복스(*Volvox*) 종, 나비쿨라(*Navicula*) 종, 오에도고니움(*Oedogonium*) 종, 스피로자이라(*Spirogyra*) 종, 바트리코스페르뮴(*Batrachospermum*) 종, 로디메니아(*Rhodomenia*) 종, 칼리탐니온(*Callithamnion*) 종, 운다리아(*Undaria*) 종을 포함하나 이에 제한되지는 않는 해양 및 비-해양 미세 및 거대 조류의 성장 및 증식을 방제, 감소 및 또는 제거하기 위해 사용될 수 있다.

[0372] 상기 기재된 활성 성분(들) 및 조성물은 조류를 함유하는 장소에 적용될 수 있다. 이들은 물줄기, 예컨대 연못, 호수, 하천, 강, 수족관, 수 처리 설비, 발전소, 또는 고체 표면, 예컨대 플라스틱, 콘크리트, 목재, 섬유유리, 철 및 폴리비닐 클로라이드로 만든 파이프, 코팅 물질 및/또는 페인트로 덮은 표면을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0373] 상기 언급된 바와 같이, 상기 기재된 활성 성분(들) 및 조성물은 파노니쿠스(*Panonychus*) 종, 예컨대 파노니쿠스 시트리(*Panonychus citri*) (시트러스 적색 응애), 및 파노니쿠스 울미(*Panonychus ulmi*) (적색 잎응애), 테트라니쿠스(*Tetranychus*) 종, 예컨대 테트라니쿠스 칸자위(*Tetranychus kanzawi*) (칸자와 잎응애), 테트라니쿠스 우르티카에(*Tetranychus urticae*) (2 점박이 잎응애), 테트라니쿠스 파시피쿠스(*Tetranychus pacificus*) (태평양 잎응애), 테트라니쿠스 투르케스탄이(*Tetranychus turkestanii*) (딸기 응애) 및 테트라니쿠스 신나바리누스(*Tetranychus cinnabarinus*) (카르민 잎응애), 올리고니쿠스(*Oligonychus*) 종, 예컨대 올리고니쿠스 파니카에(*Oligonychus panicae*) (아보카도 갈색 응애), 올리고니쿠스 페르세아에(*Oligonychus perseae*) (페르세아 응애), 올리고니쿠스 프라텐시스(*Oligonychus pratensis*) (뱅크스 그래스 응애) 및 올리고니쿠스 코페아에(*Oligonychus coffeae*), 아쿨루스(*Aculus*) 종, 예컨대 아쿨루스 코르나투스(*Aculus cornatus*) (복숭아은 응애), 아쿨루스 포케니(*Aculus fockeni*) (자두 러스트 응애) 및 아쿨루스 리코페르시시(*Aculus lycopersici*) (토마토 러셋 응애), 에오테트라니쿠스(*Eotetranychus*) 종, 예컨대 에오테트라니쿠스 윌라메티(*Eotetranychus wilametti*), 에오테트라니쿠스 유멘시스(*Eotetranychus yumensis*) (유마 잎응애) 및 에오테트라니쿠스 섹마쿨라티스(*Eotetranychus sexmaculatis*) (6-점박이 응애), 브리오비아 루브리오클루스(*Bryobia rubrioculus*) (갈색 응애), 에피트리메루스 피리(*Epitrimerus pyri*) (배 러스트 응애), 피토프투스 피리(*Phytoptus pyri*) (배 잎 블리스터 응애), 아칼리티스 에시기(*Acalitis essigi*) (적색 베리 응애), 폴리파고타르소네무스 라투스(*Polyphagotarsonemus latus*) (광범위한 응애), 에리오피에스 셸도니(*Eriophyes sheldoni*) (시트러스 버드 응애), 브레비팔푸스 레위시(*Brevipalpus lewisi*) (시트러스 플랫 응애), 필로코프트루타 올레이보라(*Phyllocoptruta oleivora*) (시트러스 러스트 응애), 페트로비아 라틴스(*Petrobia lateens*) (갈색 밀 응애), 옥시에누스 맥스웰리(*Oxyenus maxwelli*) (올리브 응애), 리조글리푸스(*Rhizoglyphus*) 아종, 티로파구스(*Tyrophagus*) 아종, 디프타쿠스 기강토르헨쿠스(*Diptacus gigantorhyncus*) (대두 자두 응애) 및 펜탈레아 마조르(*Penthalea major*) (겨울 곡물 응애), 아보카도 적색 응애, 플랫 응애, 흑색 및 적색 망고 잎응애, 파파야 잎 에지롤러 응애, 텍사스 시트러스 응애, 유럽 적색 응애, 포도 에리늄 응애 (블리스터 응애), 태평양 잎응애, 윌라멧 잎응애, 분홍색 시트러스 러스트 응애를 포함하나 이에 제한되지는 않는 응애와 같은 거미류를 함유하는 장소에 적용될 수 있다.

[0374] 이러한 장소는 이러한 응애류 또는 다른 거미류 (예를 들어, 진딧물류)가 침입한 작물을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0375] 본 발명은 이제 하기 비제한적 예를 참조하여 보다 상세하게 기재될 것이다.

[0376] 실시예

- [0377] 상기 기재된 조성물 및 방법은 하기의 비제한적 실시예에서 추가로 설명될 것이다. 실시예는 단지 다양한 실시양태를 예시하기 위한 것이고, 본원에 언급된 물질, 조건, 중량비, 공정 파라미터 등과 관련하여 청구된 본 발명을 제한하지는 않는다.
- [0378] **1. 실시예 1. 미생물의 단리 및 확인**
- [0379] **1.1 미생물의 단리**
- [0380] 린노지 템플(Rinnoji Temple, 일본 니코)에 있는 상록수 아래에서 수집한 토양 샘플로부터 당업계에 공지된 확립된 기술을 이용하여 미생물을 단리하였다. 감자 텍스트로스 한천 (PDA)을 사용하고 문헌 [Lorch et al., 1995]에 상세하게 기재된 절차를 이용하여 단리를 수행하였다. 이 절차에서, 먼저 토양 샘플을 멸균수에 희석한 후, 고체 한천 배지, 예컨대 감자 텍스트로스 한천 (PDA)에 플레이팅하였다. 플레이트를 5일 동안 25℃에서 성장시킨 후에, 개별 미생물 콜로니를 개별 PDA 플레이트 내로 단리하였다. 단리된 박테리아는 그람 음성이며, 일정 기간에 걸쳐 분홍색 및 분홍색빛-갈색 및 점액성 또는 점착성이 되도록 변화하는 둥글고 불투명한 크림색 콜로니를 형성한다.
- [0381] **1.2. 미생물에 대한 확인**
- [0382] 16S rRNA 영역을 증폭시키기 위해 보편적인 박테리아 프라이머를 사용하는 유전자 서열분석에 기초하여 미생물을 확인하였다. 하기 프로토콜이 이용된다: 부르크홀데리아 종 A396을 감자-텍스트로스 한천 플레이트 상에서 배양하였다. 24시간-령 플레이트로부터의 성장물을 멸균 루프로 문지르고, DNA 추출 완충제 중에 재현탁화시켰다. 모바이오 울트라 클린(MoBio Ultra Clean) 미생물 DNA 추출 키트를 사용하여 DNA를 추출하였다. DNA 추출물을 1% 한천로스 겔 상에서 5 µl 영동시켜 품질/양에 대해 검사하였다.
- [0383] PCR 반응을 하기와 같이 설정하였다: 2 µl DNA 추출물, 5 µl PCR 완충제, 1 µl dNTP (각각 10 mM), 1.25 µl 정방향 프라이머 (27F; (서열 1), 1.25 µl 역방향 프라이머 (907R; (서열 2)) 및 0.25 µl Taq 효소. 뉴클레아제-무함유 멸균수를 사용하여 반응 부피를 50 µl로 만들었다. PCR 반응은 95℃에서 10분 동안 초기 변성 단계, 이어서 94℃/30초, 57℃/20초, 72℃/30초의 30 사이클, 및 72℃에서 10분 동안 최종 연장 단계를 포함한다.
- [0384] 생성물의 대략적인 농도 및 크기는 1% 한천로스 겔 상에서 5 µl 부피로 영동시키고 생성물 밴드를 질량 래더와 비교하여 계산하였다.
- [0385] 모바이오 PCR 클린업 키트로 PCR 생성물로부터 잉여량의 프라이머, dNTP 및 효소를 제거하였다. 세정된 PCR 생성물을 그대로 프라이머 27F (상기한 바와 동일함), 530F (서열 3)), 1114F (서열 4)) 및 1525R (서열 5)), 1100R (서열 6)), 519R (서열 7)을 사용하여 서열분석하였다.
- [0386] BLAST를 사용하여 균주 A396의 16S rRNA 유전자 서열을 대표적인 β-프로테오박테리아의 이용가능한 16S rRNA 유전자 서열과 비교하였다. 균주 A396은 부르크홀데리아 세파시아 복합체의 구성원과 밀접하게 관련되며, 이때 부르크홀데리아 멀티보란스, 부르크홀데리아 비에트나멘시스(*Burkholderia vietnamensis*), 및 부르크홀데리아 세파시아의 여러 단리물에 대해 99% 이상의 유사성을 갖는다. 비. 세파시아 복합체를 제외한 BLAST 연구는 비. 플란타리이, 비. 글라디올리 및 부르크홀데리아 종 단리물에 대해 98% 유사성을 나타냈다.
- [0387] 인접한 결합 방법을 이용한 결과의 거리 트리는, A396이 부르크홀데리아 멀티보란스 및 다른 부르크홀데리아 세파시아 복합체 단리물과 관련이 있음을 보여주었다. 부르크홀데리아 플란타리이 및 부르크홀데리아 글루마에(*Burkholderia glumae*)는 트리의 개별 가지로 분류되었다.
- [0388] 단리된 부르크홀데리아 균주는 하기 서열을 함유하는 것으로 밝혀졌다:
- [0389] 정방향 서열, 27F 프라이머, 815개 뉴클레오티드를 갖는 DNA 서열 (서열 8); 역방향 서열, 1453 bp, 프라이머 1525R, 1100R, 519R 사용 (서열 9); 프라이머 907R을 사용한 역방향 서열 824 bp (서열 10); 프라이머 530F를 사용한 정방향 서열 1152 bp (서열 11); 1114F 프라이머를 사용한 정방향 서열 1067 bp (서열 12); 1525R 프라이머를 사용한 역방향 서열 1223 bp (서열 13); 1100R 프라이머를 사용한 역방향 서열 1216 bp (서열 14); 519R 프라이머를 사용한 역방향 서열 1194 bp (서열 15).
- [0390] **1.3. 부르크홀데리아 A396이 부르크홀데리아 세파시아 복합체에 속하지 않는다는 증거**
- [0391] 1.3.1 특이적 PCR 프라이머를 사용한 분자 생물학 작업

- [0392] 부르크홀데리아 멀티보란스로서의 부르크홀데리아 A396의 동정을 확인하기 위해, 하우스키핑 유전자의 추가의 서열분석을 수행하였다. 부르크홀데리아 멀티보란스는 부르크홀데리아 세파시아 복합체의 기지의 구성원이다. 문헌 [Mahenthiralingam et al., 2000]에 기재된 바와 같이, recA 유전자의 PCR에 대해 노력이 집중되었다. 하기 프라이머를 사용하였다: (a) 비. 세파시아 복합체 매치를 확인하기 위한 문헌 [Mahenthiralingam et al., 2000]에 기재된 BCR1 및 BCR2 및 (b) 비. 멀티보란스 매치를 확인하기 위한 문헌 [Mahenthiralingam et al., 2000]에 기재된 BCRBM1 및 BCRBM2. 제1 프라이머 세트에 대한 생성물-생성 PCR 반응은 미생물이 비. 세파시아 복합체에 속한다는 것을 확인할 것이다. 제2 프라이머 세트에 대한 생성물-생성 PCR 반응은 미생물이 실제로 비. 멀티보란스라는 것을 확인할 것이다.
- [0393] 어떤 프라이머 쌍에 대해서도 PCR 생성물이 수득되지 않았다. 부르크홀데리아 멀티보란스 ATCC 17616 (양성 대조군) 및 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) (음성 대조군)를 사용하여 PCR 반응 및 프라이머의 성능을 시험하였다. 양쪽 세트의 프라이머를 사용한 비. 멀티보란스 모두에 대해 강한 밴드가 관찰되었다. 슈도모나스 플루오레센스에 대한 밴드는 관찰되지 않았다. 결과는, A396이 부르크홀데리아이지만, 비. 세파시아 복합체의 구성원이 아니며, 부르크홀데리아 멀티보란스가 아니라는 것을 나타낸다. 이는 또한 A396 및 한 유형의 비. 멀티보란스 배양물 둘 다를 진탕 배양물에서 나란히 성장시키고 600nm에서의 광학 밀도 측정을 이용하여 매일 성장을 모니터링하는 비교 배양 실험에서 입증되었다. 설정 조건 하에, 종 A396은 비. 멀티보란스 유형 균주보다 훨씬 더 빨리 성장하였다 (도 1).
- [0394] 1.3.2 DNA-DNA 혼성화
- [0395] 단리물 A396이 부르크홀데리아의 신규 종임을 확인하기 위해, 부르크홀데리아 멀티보란스 (가장 밀접한 16SrRNA 서열 매치)를 갖는 DNA-DNA 혼성화 실험을 수행하였다. 페른바흐(Fernbach) 플라스크에서 200 rpm/25℃로 48시간에 걸쳐 성장시킨 ISP2 브로쓰에서 A396 및 비. 멀티보란스 둘 다에 대한 바이오매스가 생산되었다. 바이오매스를 원심분리에 의해 무균 수확하였다. 브로쓰를 따라내고, 세포 펠릿을 물:이소프로판올의 1:1 용액 중에 재현탁시켰다. 독일에서 DSMZ (저먼 콜렉션 오브 마이크로오가니즘스 앤 셀 컬처스 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures))에 의해 DNA-DNA 혼성화 실험을 수행하였다. DNA를 프렌치 프레스 셀 (French pressure cell) (써모 스펙트로닉(Thermo Spectronic))을 이용하여 단리하고, 문헌 [Cashion et al., 1977]에 기재된 바와 같이 히드록시아파타이트 상의 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 펠티어(Peltier) 온도 조절 6x6 멀티셀 변형기 및 계내 온도 프로브를 갖는 온도 제어기 (베리안(Varian))가 장착된 모델 캐리(Cary) 100 바이오 UV/VIS-분광광도계를 사용하여 문헌 [Huss et al., 1983]에 기재된 변형을 고려하면서 문헌 [De Ley et al., 1970]에 기재된 바와 같이 DNA-DNA 혼성화를 수행하였다. DSMZ는 A396과 부르크홀데리아 멀티보란스 사이의 % DNA-DNA 유사성을 37.4%로 보고하였다. 그 결과는, 특별 위원회 (문헌 [Wayne et al., 1987])에 의해 박테리아 종의 정의에 대한 70% DNA-DNA 유사성의 역치 값의 추천이 고려되는 경우 부르크홀데리아 종 균주 A396이 부르크홀데리아 멀티보란스 종에 속하지 않음을 나타낸다.
- [0396] **1.4. 바이오로그(Biolog) GN2 플레이트를 사용한 생화학적 프로파일**
- [0397] 탄소 공급원 활용 프로파일의 경우에, 밤새 감자 텍스트로스 한천 (PDA) 상에서 A396을 성장시켰다. 제조업체 (바이오로그, 캘리포니아 헤이워드)에 의해 권장된 바와 같이 바이오로그 실험을 위한 적절한 배양물을 생성하기 위해 배양물을 BUG 한천으로 옮겼다.
- [0398] 바이오로그 GN2 플레이트 상에 접종하고 플레이트를 마이크로로그 4-자동화 마이크로스테이션 시스템을 사용한 24-시간 인큐베이션 후에 판독하여 미생물의 생화학적 프로파일을 결정하였다. 알려지지 않은 박테리아의 동정은 그의 탄소 활용 패턴 및 마이크로로그 4 그람 음성 데이터베이스를 비교하여 시도하였다.
- [0399] 바이오로그 프로파일에 대한 명확한 결정적 매치가 발견되지 않았다. 가장 가까운 매치는 모두 A396과 35% 미만의 유사성을 가졌다: 슈도모나스 스피노사(*Pseudomonas spinosa*) (부르크홀데리아), 부르크홀데리아 세파시아 및 부르크홀데리아 슈도말레이(*Burkholderia pseudomallei*). 결과를 표 1에 나타내었다.

표 1

A369의 생화학적 프로파일

기질	결과	기질	결과
시클로헥스트린	-	L-아라비노스	-
헥스트린	-	D-아라비톨	-
글리코젠	-	D-셀로비오스	-
트윈 40	+	에리트ρί톨	-
트윈 80	+	D-프록토스	-
N-아세틸-D-갈락토스아민	-	L-푸코스	-
N-아세틸-D-글루코사민	-	D-갈락토스	+/-
아도니톨	-	켄터비오스	-
숙신산 Mon-메틸 에스테르	-	D-글루코스	+
아세트산	-	m-이노시톨	-
시스-아코니트산	-	D-락토스	-
시트르산	-	락툴로스	-
포름산	+	말토스	-
D-갈락톤산 락톤	-	D-만니톨	-
D-갈락투론산	-	D-만노스	-
D-글루콘산	-	D-멜리비오스	-
D-글루코사민산	-	β-메틸-D-글루코시드	-
D-글루쿠론산	-	D-프시코스	-
α-히드록시부티르산	-	D-라피노스	-
β-히드록시부티르산	+	L-라모노스	-
γ-히드록시부티르산	-	D-소르비톨	-
p-히드록시페닐아세트산	-	수크로스	-
이타론산	-	D-트레할로스	+
α-케토 부티르산	-	투라노스	-
α-케토 글루타르산	-	크실리톨	-
α-케트 발레르산	-	피루브산 메틸 에스테르	-
D,L-락트산	-	우리딘	-
말론산	-	티미딘	-
프로피온산	+	페닐에틸-아민	-
퀸산	-	푸트레신	-
D-사카르산	-	2-아미노에탄올	-
세바스산	-	2,3-부탄디올	-
숙신산	+	글리세롤	+/-
프로모숙신산	-	D,L-α-글리세롤 포스페이트	+/-
숙신암산	-	α-D-글루코스-1-포스페이트	-
글루쿠론아미드	-	D-글루코스-6-포스페이트	+
L-알라닌아미드	+	γ-아미노 부티르산	+
D-알라닌	-	우로칸산	-
L-알라닌	+	이노신	-
L-알라닐-글리신	-	L-페닐알라닌	+
L-아스파라긴	+	L-프롤린	-
L-아스파르트산	+/-	L-피로글루탐산	-
L-글루탐산	+	D-세린	-
글리실-L-아스파르트산	-	L-세린	-
글리실-L-글루탐산	-	L-트레오닌	-
L-히스티딘	-	D,L-카르니틴	-
히드록시-L-프롤린	+	L-오르니틴	-
L-류신	-	-	-

[0400]

[0401]

1.5. 지방산 조성물

[0402]

28℃에서 24시간 동안 인큐베이션한 후에, 한 집락의 잘-성장한 세포를 수확하고, 지방산 메틸 에스테르를 기재된 바와 같이 (문헌 [Vandamme et al., 1992] 참조) 셜록(Sherlock) 미생물 동정 시스템 (MIDI)을 이용하여 제조, 분리 및 동정하였다. 부르크홀데리아 A396에 존재하는 우세한 지방산은 하기와 같다: 16:0 (24.4%), 시클로 17:0 (7.1%), 16:0 3-OH (4.4%), 14:0 (3.6%), 19:0 ω8c (2.6%) 시클로, 18:0 (1.0%). 합계된 특징 8 (18:1 ω7c 포함) 및 합계된 특징 3 (16:1 ω7c 및 16:1 ω6c 포함)은 각각 전체 피크 면적의 26.2% 및 20.2%에 상응하였다. 합계된 특징 2 (12:0 ALDE, 16:1 이소 I, 및 14:0 3-OH 포함)는 전체 피크 면적의 5.8%에 상응하는 반면 합계된 특징 5 (18:0 ANTE 및 18:2 ω6,9c 포함)은 0.4%에 상응하였다. A396에서 소량으로 검출된 다른 지방산은 하기를 포함하였다: 13:1 12-13 (0.2%), 14:1 ω5c (0.2%), 15:0 3-OH (0.13%), 17:1 ω7c (0.14%), 17:0 (0.15%), 16:0 이소 3-OH (0.2%), 16:0 2-OH (0.8%), 18:1 ω7c 11-메틸 (0.15%), 및 18:1 2-

OH (0.4%).

[0403] MIDI 데이터베이스에서 A396의 지방산 조성물과 기지의 미생물 균주의 지방산 조성물의 비교는 신규 균주 A396에서의 지방산이 부르크홀데리아 세노세파시아(*Burkholderia cenocepacia*)의 지방산과 가장 유사하였음을 시사하였다.

[0404] 1.6 항생제에 대한 내성

[0405] PML 미생물학적 기술 데이터 시트 #535에 기재된 바와 같은 뮐러-힌톤(Muller-Hinton) 배지 상에서 항생제 디스크를 사용하여 부르크홀데리아 A396의 항생제 감수성을 시험하였다. 25℃에서 72-시간 인큐베이션 후에 수득한 결과를 하기 표 2에 제시하였다.

표 2

다양한 항생제에 대한 MBI-206의 감수성. +++ 매우 감수성, ++ 감수성, - 내성

	농축물 (μg)	감수성
테트라시클린	30	-
카나마이신	30	+++
에리트로마이신	15	-
스트렙토마이신	10	-
페니실린	10	-
암피실린	10	-
옥시테트라시클린	30	-
클로람페니콜	30	++
시프로플록사신	5	++
겐타미신	10	-
피페라실린	100	+++
세푸록심	30	-
이미페넴	10	+++
술파메톡사졸-트리메토프림	23.75/ 25	++

[0406]

[0407] 결과는 부르크홀데리아 A396의 항생제 감수성 스펙트럼이 병원성 비. 세파시아 복합체 균주와 꽤 상이하다는 것을 나타낸다. 부르크홀데리아 A396은 카나마이신, 클로람페니콜, 시프로플록사신, 피페라실린, 이미페넴, 및 술파메톡사졸 및 트리메토프림의 조합에 감수성이다. 비교를 위해, 문헌 [Zhou et al., 2007]에서는 양성 섬유증 환자로부터 단리된 비. 세파시아 복합체에서 2,621가지 상이한 균주의 감수성을 시험하였고, 모든 균주 중 단지 7% 및 5%만이 각각 이미페넴 또는 시프로플록사신에 감수성이었다는 것을 발견하였다. 이들은 또한 모든 균주 중 85%가 클로람페니콜에 대해 내성을 갖고 (15% 감수성), 95%가 술파메톡사졸 및 트리메토프림의 조합에 대해 내성을 갖는다는 것 (5% 감수성)을 발견하였다. 문헌 [Zhou et al., 2007]의 결과는 366개의 비. 세파시아 단리물 중에서 항생제 내성을 결정하고, 이들 대부분이 시프로플록사신, 세푸록심, 이미페넴, 클로람페니콜, 테트라시클린 및 술파메톡사졸에 대해 내성이 있다고 보고한 문헌 [Pitt et al., 1996]의 결과와 유사하였다.

[0408] 2. 실시예 2: 부르크홀데리아 제제 및 제제화된 생성물로부터의 분획의 단리

[0409] 하기 절차를 부르크홀데리아 종의 배양물의 진세포 브로쓰를 함유하는 MBI-206의 제제화된 생성물로부터 추출된 화합물의 정제에 이용하였다:

[0410] Hy 대두 성장 배지에서 10-L 발효 부르크홀데리아 (A396)로부터 유래되고, 메틸 0.1% 및 프로필 파라벤, 0.1% 헥산올 0.67% 및 글리코스퍼스 0-20, 0.67%를 사용하여 제제화된 배양 브로쓰를 앰버라이트(Amberlite) XAD-7 수지로 실온에서 2시간 동안 225 rpm에서 수지와 함께 세포 현탁액을 진탕시킴으로써 추출하였다 (문헌 [Asolkar et al., "Weakly cytotoxic polyketides from a marine-derived Actinomycete of the genus *Streptomyces* strain CNQ-085." J. Nat. Prod. 69:1756-1759. 2006]). 수지 및 세포 덩어리를 무명을 통한 여

과에 의해 수집하고, 탈이온수로 세척하여 염을 제거하였다. 이어서, 수지, 세포 덩어리, 및 무명을 아세톤에 2시간 동안 담근 후, 아세톤을 여과하고, 회전 증발기를 이용하여 진공 하에 건조시켜 조 추출물 (MBI-206-FP-CE)을 수득하였다. 이어서, 조 추출물을 역상 C18 진공 액체 크로마토그래피 (H_2O/CH_3OH ; 구배 80:20 → 0:100%)를 이용하여 분획화함으로써 10개의 분획을 수득하였다 (도 1의 개략도 참조). 이어서, 이들 분획을 회전 증발기를 이용하여 농축 건조시키고, 생성된 건조 잔류물을 전식물 제조 검정을 이용하여 생물학적 활성에 대해 스크리닝하였다. 이어서, 활성 분획, 분획 3, 4, 5 및 6 (각각 MBI-206-FP-3, MBI-206-FP-4, MBI-206-FP-5 및 MBI-206-FP-6으로 나타냄)을 역상 HPLC 분리 (스펙트라 시스템(Spectra System) P4000 (써모 사이언티픽(Thermo Scientific))에 반복적으로 적용하여 순수 화합물을 수득한 후에 상기-언급된 생물검정에서 스크리닝하여 활성 화합물을 발견/동정하였다 (도 2 참조).

2.1 제제 분획의 분석

이들 분획을 피니간 서베이어(Finnigan Surveyor) PDA 플러스 검출기, 오토샘플러 플러스, MS 펌프 및 4.6 mm x 100 mm 루나 C18 5 μm 칼럼 (페노메넥스)이 장착된 써모 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 기기 상에서 분석하였다. 용매 시스템은 물 (용매 A) 및 아세토니트릴 (용매 B)로 이루어졌다. 이동상은 10% 용매 B에서 시작하고, 20분에 걸쳐 100% 용매 B로 선형 증가한 후에, 4분 동안 유지되고, 최종적으로 3분에 걸쳐 10% 용매 B로 되돌아가고, 3분 동안 유지된다. 유량은 0.5 mL/분이다. 주입 부피는 10 μL 이고, 샘플은 오토 샘플러에서 실온으로 유지된다.

화합물의 정체성을 발견하기 위해, LC/MS 및 UV와 같은 추가의 분광학적 데이터를 기록하였다. 17.45분의 체류 시간을 갖는, 분획 5에 상응하는 화합물은 어떠한 출발 물질에서도 발견되지 않았고, 이는 화합물이 미생물 발효 브로쓰 내의 천연 생성물 및 제제화 작용제에서 발견된 화합물 중 하나 이상 사이의 화학 반응의 생성물이라는 것을 나타낸다. 구체적으로, 이 분획을 LCQ 데카(DECA) XP^{플러스} 질량 분광계 상의 풀 스캔 모드 (m/z 100-1500 Da)에서 양성 및 음성 이온화 모드 둘 다를 이용하는 써모 피니간 LCQ 데카 XP 플러스 전기분무 (ESI) 기기 (써모 일렉트론 코포레이션(Thermo Electron Corp.), 캘리포니아주 산호세) 상에서 ESI-LCMS를 이용하여 분석하였다. 질량 분광 분석을 하기 조건 하에 수행하였다: 질소 기체의 유량을 시스 및 옥스/스위프 기체 유량에 대해 각각 30 및 15 arb로 고정하였다. 전기분무 이온화를 5000 V로 설정된 분무 전압 및 35.0 V의 모세관 전압으로 수행하였다. 모세관 온도를 400°C로 설정하였다. 엑스칼리버(Xcalibur) 소프트웨어 상에서 데이터를 분석하였다. 분획 5에서 발견된 추가의 신규 화합물은 194 (RT = 14.74분) 및 222 (RT = 17.43분)의 분자량(MW)을 갖는 것으로 밝혀졌다.

2.2 생물검정

2 내지 3개의 본엽을 갖는 건강한 무 식물을 시험을 위해 선택하였다. 무 식물은 처리시에 13일령이었다. 식물을 모든 처리가 있 표면적 및 식물 높이에서 동등하도록 분류하였다. 포트를 처리 횟수 및 반복 횟수로 라벨링하였다. 처리당 3회 반복하여 시험하였다.

MBI-206 제제화된 생성물의 10개의 분획을 시험하였다. 분획은 10 mg/ml의 농도였다. 제제화된 생성물 및 브로쓰의 조 추출물을 또한 시험하였다. 비처리 대조군 (탈이온수로 처리됨) 및 양성 대조군 (겔런당 2.5 유체 온스의 비율의 라운드업 슈퍼(RoundUp Super) 농축물)이 시험에 포함된다.

하기 처리는 표 3에 나타낸 바와 같이 시험하였다:

표 3

시험 설명		
처리	샘플 ID	설명
1	MBI-206-FP-F1	4% 에탄올/물 (0.2% 글리코사퍼스)
2	MBI-206-FP-F2	4% 에탄올/물 (0.2% 글리코사퍼스)
3	MBI-206-FP-F3	4% 에탄올/물 (0.2% 글리코사퍼스)
4	MBI-206-FP-F4	4% 에탄올/물 (0.2% 글리코사퍼스)
5	MBI-206-FP-F5	4% 에탄올/물 (0.2% 글리코사퍼스)
6	MBI-206-FP-F6	4% 에탄올/물 (0.2% 글리코사퍼스)
7	MBI-206-FP-F7	4% 에탄올/물 (0.2% 글리코사퍼스)
8	MBI-206-FP-F8	4% 에탄올/물 (0.2% 글리코사퍼스)
9	MBI-206-FP-F9	4% 에탄올/물 (0.2% 글리코사퍼스)
10	MBI-206-FP-F10	4% 에탄올/물 (0.2% 글리코사퍼스)
11	MBI-206-FP-CE	4% 에탄올/물 (0.2% 글리코사퍼스)
12	MBI-206-CE (브로쓰)	4% 에탄올/물 (0.2% 글리코사퍼스)
13	UTC	UTC (탈이온수)
14	양성 대조군	양성 대조군 (라운드업 @ 2.5 fl oz/gal (AI: 글리포세이트 @ 50.2%))

[0418]

[0419]

모든 생성물 및 처리물은 적용 전에 잘 흔들어준다. 처리물은 2-온스 분무 병으로부터 노즐을 이용하여 적용된다. 개별 분무 노즐이 각각의 처리를 위해 사용된다. 식물 잎은 고르게 및 적당한 부피로 (즉, 가벼운 미스팅도 아니고 넘쳐 흘러내리는 무거운 적용도 아님) 분무된다. 2 밀리리터의 각각의 처리물은 각각의 식물이 대략 0.67 밀리리터의 처리 용액으로 처리되도록 각 처리의 3회 반복물 상에 동시에 분무된다.

[0420]

식물을 공기 건조시킨 후에 보유 트레이에서 무작위화하였다. 각각의 트레이를 실험 명칭 및 처리일로 라벨링하고, 실험실 온실 선반에 놓았다. 실험실 온실은 70-80°F의 온도 및 30-40%의 상대 습도를 유지한다. 생물검정 전반에 걸쳐, 식물 잎은 건조된 채로 유지되도록 적절한 양의 물로 보유 트레이를 채워 아래로부터 식물에게 물을 주었다.

[0421]

결과는 처리후 제3일, 제8일 및 제14일에 수득한다. 증상은 잎 그을음 및 식물 발육 저지를 포함하였다. 표 4에 나타난 하기 평가 척도를 이용하여 효능을 정량화하였다. 평가는 비처리 대조군의 식물과 비교하여 하기 인자를 관찰함으로써 결정된다: 전반적 식물 건강, 평균 식물 높이 및 잎 건강. 침범된 식물의 증상은 탈색된/점이 생긴/그을린/바랜 잎, 비뚤어진/뒤틀린/휘어진 잎, 측면 분지 (손상된 성장점으로 인함), 식물 가지마름, 또는 사멸을 포함할 수 있다.

표 4

평가 척도	
0	- 0% 대조군 증상
0.5	- ≤ 5% 대조군 증상
1	- 10% 대조군 증상
2	- 25% 대조군 증상
3	- 50% 대조군 증상
4	- 75% 대조군 증상
5	- 100% 대조군 증상

[0422]

[0423]

3개 관독값의 평균을 도 2에 나타내었다. 전식물 제조제 시험에서, 분획 4 및 5는 우수한 제조 활성을 나타내었다 (도 2 참조).

[0424]

2.3 제제로부터의 살충 화합물의 분리

[0425]

이 분획을 8 mL/분 유량 및 210 nm의 UV 검출에서 HPLC C-18 칼럼 (페노메넥스, 루나 10u C18(2) 100 Å, 250 x 30), 물:아세트니트릴 구배 용매 시스템 (0-10 분; 80% 수성 CH₃CN, 10-25 분; 80 - 65% 수성 CH₃CN, 25-50 분; 65 - 50% 수성 CH₃CN, 50-60 분; 50 - 70% 수성 CH₃CN, 60-80 분; 70 - 0% 수성 CH₃CN, 80-85 분; 0 - 20% 수성 CH₃CN)을 이용하여 추가로 정제하여 각각 부틸 파라벤, 체류 시간 59.15 분 (MBI206-FP-F5H32) 및 헥실 파라벤,

체류 시간 74.59 분 (MBI206-FP-F5H40)을 수득하였다.

2.3.1 화합물의 NMR 분광 분석

NMR 스펙트럼을 브루커(Bruker) 600 MHz 구배 필드 분광계 상에서 측정하였다. 참조기준은 내부 표준 테트라메틸실란 (TMS, 0.00 ppm) 상에서 설정하였다.

2.3.1.1 핵실 파라벤 (MBI206-FP-F5H40)의 구조 설명

활성 화합물은 248 nm에서 UV 흡수를 갖는 무색 고체로 단리되었다. (-) ESIMS는 222의 분자량에 상응하는 221 (M-H)에서의 분자 이온을 나타내었다. 화합물은 7.90, 6.85, 4.28, 1.76, 1.46, 1.38, 1.37, 0.94에서의 ¹H NMR δ 신호를 나타내었고, 166.84, 162.12, 131.34 (2C), 121.04, 114.83 (2C), 64.32, 31.25, 28.43, 25.45, 22.18. 12.93의 ¹³C NMR 값을 갖는다. C₁₃H₁₈O₃ (5 정도의 불포화)의 분자식이 NMR 및 ESI 질량 분광측정법 데이터의 조합에 의해 할당되었다. ¹H NMR 스펙트럼은 δ 7.90, 2H d, J = 8.5 Hz, 및 6.85, 2H d, J = 8.5 Hz에서 A₂B₂-유형 방향족 신호에 대한 신호를 나타내었다. 또한, ¹H NMR 스펙트럼은 δ 4.28, 2H, t, J = 7.3 Hz; 1.76, 2H, m; 1.46, 2H, m; 1.38, 2H, m; 1.37, 2H, m, 및 0.94, 3H, t, J = 7.3 Hz에서 -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃ 기의 존재를 밝혀내었다. 상기 스펙트럼 데이터의 분석으로부터, 방향족 폴리케티드의 구조는 핵실 파라벤으로 확립되었고, COSY, HMQC 및 HMBC 실험의 상세한 분석에 의해 확인되었다. 문헌 검색은 이 화합물이 합성 화합물로 보고된 적이 있다는 것을 보여주었다.

2.3.1.2 부틸 파라벤 (MBI206-FP-F5H32)의 구조 설명

이 화합물은 248 nm에서 UV 최대값을 갖는 무색 고체로 수득되었다. 음성 모드의 LCMS 분석은 분자식 194에 상응하는 m/z 193에서의 분자 이온을 보여주었다. UV, MS 및 NMR 데이터를 MW 222를 갖는 핵실 파라벤의 것과 비교하여, 이 화합물이 핵실 파라벤의 유사체인 것으로 밝혀졌다. 이들 사이의 유일한 차이는 오직 측쇄에 있었다. 따라서, 부틸 파라벤의 구조는 MW 194를 갖는 이 화합물로 할당되었다. 문헌에서의 검색은 이 화합물이 또한 합성 화합물로서 알려져 있다는 것을 시사하였다.

2.3.2 제초 활성

분획 5로부터 수득한 순수 화합물 (부틸 파라벤 [MBI206-FP-F5H32] 및 핵실 파라벤 [MBI206-FP-F5H40])을 10 mg/ml의 농도에서 시험하였다. 비처리 대조군 (탈이온수로 처리됨), 제제 블랭크 (3% v/v & 10% v/v에서) 및 양성 대조군 (겔린당 2.5 유체 온스의 비율의 라운드업 슈퍼 농축물)이 시험에 포함된다.

하기 처리는 표 5에 나타난 바와 같이 시험하였다:

표 5

처리 요법

시험 설명			
처리	샘플 ID	설명	샘플의 부피 (mL)
1	UTC	UTC (탈이온수)	2
2	부틸 파라벤 (MBI206-FP-5H32)	4% 에탄올/물 (0.2% 글리코사이드)	2
3	핵실 파라벤 (MBI206-FP-5H40)	4% 에탄올/물 (0.2% 글리코사이드)	2
4	블랭크	제제 블랭크 @ 3% v/v	2
5	블랭크	제제 블랭크 @ 10% v/v	2
6	양성 대조군	양성 대조군 (라운드업 @ 2.5 fl oz/gal (AI: 글리포세이트 @ 50.2%))	2

수득된 결과는 표 6에 기재된다.

표 6

생물검정 결과

처리	제-1 일 관독			대조군		제-7 일 관독			대조군	
	1	2	3	AVG	STD DEV	1	2	3	AVG	STD DEV
1	0	0	0	0.0	0.0	0	0	0	0.0	0.0
2	25	5	25	18.3	11.5	25	10	37.5	24.2	13.8
3	75	75	75	75.0	0.0	87.5	87.5	87.5	87.5	0.0
4	0	0	0	0.0	0.0	0	0	0	0.0	0.0
5	0	0	0	0.0	0.0	0	0	0	0.0	0.0
6	0	0	0	0.0	0.0	87.5	87.5	75	83.3	7.2

[0437]

[0438] 상기 표에 제시된 데이터에 기초하여, 핵실 파라벤은 가장 강력한 제초 화합물인 것으로 밝혀졌다.

[0439] 2.3.3 살곤충 활성

[0440] 부틸 파라벤 (MBI206-FP-F5H32) 및 핵실 파라벤 (MBI206-FP-F5H40)의 살곤충 활성을 각 웰에 200 μ l의 고체, 인공 비트 거염벌레 음식물을 갖는 마이크로타이더 플레이트를 사용하여 1령 비트 거염벌레 (스포도프테라 엑시구아) 유충을 갖는 96-웰 음식물 오버레이 검정을 이용하는 실험실 검정에서 시험하였다. 100 마이크로리터의 각각의 시험 샘플 (40 μ g의 샘플 함유)을 음식물의 상부 (각 웰에서 하나의 샘플)에 피펫팅하고, 샘플을 표면이 건조될 때까지 유동 공기 하에 건조시켰다. 각각의 샘플을 6회 반복하여 시험하고, 물 및 상업적 디펠(Dipel) 생성물을 각각 음성 및 양성 대조군으로 사용하였다. 시험 곤충 (비트 거염벌레 - 스포도프테라 엑시구아)의 1령 유충 1마리를 각 웰에 넣고, 플레이트를 통기공이 있는 플라스틱 덮개로 덮었다. 곤충이 있는 플레이트를 26°C에서 6일 동안 인큐베이션하며 매일 사멸률을 평가하였다. 표 7에 제시된 결과에 기초하여, 핵실 파라벤 및 부틸 파라벤은 각각 71% 및 9% 사멸률을 나타내었다.

표 7

1령 비트 거염벌레 (스포도프테라 엑시구아)에 대한 부틸 파라벤 (MBI206-FP-F5H32) 및 핵실 파라벤 (MBI206-FP-F5H40)에 대한 살곤충 생물검정 데이터.

샘플 정보	제 3 일	제 4 일
부틸 파라벤 MBI206-FP-F5H32) @ 40 μ g/웰	8.93	8.9286
핵실 파라벤 (MBI206-FP-F5H40) @ 40 μ g/웰	50.00	70.833
2% 디펠	0.00	0
4% 디펠	25.00	25
8% 디펠	0.00	25
16% 디펠	0.00	0
32% 디펠	0.00	0
64% 디펠	25.00	100
40% EtOH	14.29	14.286
디펠	33.33	100
H ₂ O	0.00	0

[0441]

[0442] 2.3.4 살선충 활성; 부틸 파라벤 (MBI206-FP-F5H32) 및 핵실 파라벤 (MBI206-FP-F5H40)의 시험관내 시험:

[0443] 부틸 파라벤 및 핵실 파라벤의 순수 샘플을 시험관내 96-웰 플라스틱 세포-배양 플레이트 생물검정에 사용하였다. 50 μ l 수용액 중 15-20마리 선충류를 3 μ l의 20 mg/ml 피크 농축물에 24시간 기간 동안 25°C에서 노출시켰다. 인큐베이션 기간에 완료되면, 결과를 화합물로 처리된 각 웰에서 어린 선충류 (J2)의 부동성의 시각적 평가에 기초하여 기록하였고; 각각의 처리물은 4개 웰의 반복에서 시험하였다. 결과를 표 8에 나타내었으며, 이는 화합물의 2개의 상이한 96-웰 플레이트 추출물 생물검정의 결과를 보여준다. 3개의 대조군이 각각의 시험에 포함된다; 1개 양성 (1% 아비드(Avid)) & 2개 음성 (DMSO & 물). 시험 (T1)을 엠. 인코그니타 선충류를 사용하여 수행하고, 시험 (T2)를 엠. 하플라 선충류를 사용하여 수행하고, 샘플을 100% DMSO에 용해시켰다. 핵실 파라벤 (MBI206-FP-F5H40)은 엠. 인코그니타에 대해 81.25% 부동성을 갖는 부틸 파라벤과 비교하여 93.75%의 부동성을 갖는 우수한 방제를 보여주었다.

표 8

엠. 인코그니타 및 엠. 하플라에 대한 헥실 파라벤 및 부틸 파라벤의 효과.

샘플 정보	% 부동성 (시험 # T1)	% 부동성 (시험 # T2)	평균 % 부동성
MBI206-FP-F5H32 (부틸 파라벤)	75	87.5	81.25
MBI206-FP-F5H40 (헥실 파라벤)	87.5	100	93.75
아비트(1%)	75	75	75
DMSO	6.25	0	3.12
물	0	0	0

[0444]

[0445]

2.3.5 생성물의 제제화 동안 파라벤의 형성 연구

[0446]

이들 파라벤의 형성을 이해하기 위해, 제제에서 알코올의 변화의 효과를 고려하였다. 다양한 탄소쇄 알코올을 제제에 사용하였고, 새로운 파라벤의 형성을 LCMS를 이용하여 모니터링하였다.

[0447]

4개의 개별 제제 실험을 부탄올, 헥산올, 옥탄올 및 세틸 알코올을 이용하여 수행하였고, 구매에서 다른 모든 사항은 동일하게 유지하였다. 제제 생성물은 2 일 및 3주의 기간에 걸쳐 추출하였다. 이들 제제로부터 수득된 조 추출물을 LCMS에 의해 분석하였다. 세틸 알코올을 제외한 모든 알코올에서 상응하는 파라벤이 형성되었다. 파라벤의 수율은 1일된 제제 생성물에서 부틸 파라벤이 가장 높고, 그 다음에 헥실 파라벤, 이어서 옥틸 파라벤인 것으로 밝혀졌다. 심지어 3 주 후의 분석 결과는 동일한 순서, 즉 부틸 파라벤 > 헥실 파라벤 > 옥틸 파라벤으로 남아 있었다. 따라서, 이들 파라벤, 예컨대 부틸 파라벤, 헥실 파라벤 & 옥틸 파라벤의 형성의 비율은 제제에 사용된 상응하는 알코올 (부탄올 (C4) > 헥산올 (C6) > 옥탄올 (C8) 등)의 용매 (알코올)의 탄소쇄 (탄소의 수)에 따라 달라지는 것으로 밝혀졌다. 세틸 파라벤의 형성은 3주까지 검출되지 않았다. 이들 파라벤의 수율은 시간 경과에 따라 증가하는 것으로 밝혀졌다.

[0448]

새로운 파라벤 유사체의 형성에서 전세포 브로쓰 (WCB)의 역할을 이해하기 위해 또 다른 세트의 실험을 수행하였다. 4가지 상이한 실험에서, 제제에 하기와 같은 변화를 주어 수행하였다-

[0449]

- Expt-1: 프로필 파라벤 (메틸 파라벤 없음) + WCB + 다른 성분

[0450]

- Expt-2: 메틸 파라벤 (프로필 파라벤 없음) + WCB + 다른 성분

[0451]

- Expt-3: 파라벤 (둘 다) 없음 + WCB + 다른 성분.

[0452]

- Expt-4: 메틸 파라벤 + 프로필 파라벤 + 다른 성분 + WCB 없음.

[0453]

상기 제제를 개별적으로 추출하고, 이어서 수득된 조 추출물을 LCMS를 이용하여 분석하였다. 헥실 파라벤의 형성은 오직 처음 2가지 실험에서만 관찰되었다. 따라서, 이들 실험은 WCB가 이들 파라벤의 형성에서 매우 중요한 역할을 한다는 것을 시사하였다.

[0454]

3. 실시예 3. 템플라줄 A 및 B의 분리

[0455]

방법 및 물질

[0456]

부르크홀데리아 종의 세포 배양물로부터 추출된 템플라줄 A 및 B의 정제를 위해 하기 절차를 이용하였다 (도 3 참조):

[0457]

Hy 대두 성장 배지 중 10-L 발효 부르크홀데리아 (A396)로부터 유래된 배양 브로쓰를 앰버라이트 XAD-7 수지 (문헌 [Asolkar et al., 2006])를 사용하여, 실온에서 2시간 동안 225 rpm으로 세포 현탁액과 수지를 진탕함으로써 추출하였다. 수지 및 세포 덩어리를 무명을 통한 여과에 의해 수집하고, 탈이온수로 세척하여 염을 제거하였다. 이어서, 수지, 세포 덩어리, 및 무명을 아세톤에 2시간 동안 담근 후, 아세톤을 여과하고, 회전 증발기를 이용하여 진공 하에 건조시켜 조 추출물을 수득하였다. 이어서, 조 추출물을 역상 C18 진공 액체 크로마토그래피 (H_2O/CH_3OH ; 구매 90:10 \rightarrow 0:100%)를 이용하여 분획화함으로써 11개의 분획을 수득하였다. 이어서, 이들 분획을 회전 증발기를 이용하여 농축 건조시키고, 생성된 건조 잔류물을 96 웰 플레이트 상추 시딩 검정을 이용하여 생물학적 활성에 대해 스크리닝하였다. 이어서, 활성 분획을 역상 HPLC (스펙트라 시스템 P4000 (써모 사이언티픽))에 제공하여 순수 화합물을 수득한 후에, 이들을 상기 언급된 생물검정에서 스크리닝하여 활성

화합물을 발견/동정하였다. 화합물의 정체성을 확인하기 위해, LC/MS 및 NMR과 같은 추가의 분광학적 데이터를 기록하였다.

[0458] 활성 분획 5를 8 mL/분 유량 및 210 nm의 UV 검출에서 HPLC C-18 칼럼 (페노메넥스, 루나 10u C18(2) 100 Å, 250 x 30), 물:아세트니트릴 구배 용매 시스템 (0-10 분; 80% 수성 CH₃CN, 10-25 분; 80 - 65% 수성 CH₃CN, 25-50 분; 65 - 50% 수성 CH₃CN, 50-60 분; 50-70% CH₃CN, 60-80 분; 70-0% 수성 CH₃CN, 80-85 분; 0 - 20% 수성 CH₃CN)을 사용하여 추가로 정제하여 템플라줄 B, 체류 시간 46.65 분을 획득하였다. 다른 활성 분획 7을 또한 8 mL/분 유량 및 210 nm의 UV 검출에서 HPLC C-18 칼럼 (페노메넥스, 루나 10u C18(2) 100 Å, 250 x 30), 물:아세트니트릴 구배 용매 시스템 (0-10 분; 80% 수성 CH₃CN, 10-25 분; 80 - 60% 수성 CH₃CN, 25-50 분; 60 - 40% 수성 CH₃CN, 50-60 분; 40% CH₃CN, 60-80 분; 40-0% 수성 CH₃CN, 80-85 분; 0-20% 수성 CH₃CN)을 사용하여 정제하여 템플라줄 A, 체류 시간 70.82 분을 획득하였다.

[0459] 순수 화합물의 질량 분광 분석을 LCQ 데카 XP^{플러스} 질량 분광계 상의 풀 스캔 모드 (m/z 100-1500 Da)에서 양성 및 음성 이온화 모드 둘 다를 이용하는 써모 피니간 LCQ 데카 XP 플러스 전기분무 (ESI) 기기 (써모 일렉트론 코포레이션, 캘리포니아주 산호세) 상에서 수행하였다. 피니간 서베이어 PDA 플러스 검출기, 오토샘플러 플러스, MS 펌프 및 4.6 mm x 100 mm 루나 C18 5 μ m 칼럼 (페노메넥스)이 장착된 써모 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 기기를 이용하였다. 용매 시스템은 물 (용매 A) 및 아세트니트릴 (용매 B)로 이루어졌다. 이동상은 10% 용매 B에서 시작하고, 20분에 걸쳐 100% 용매 B로 선형 증가한 후에, 4분 동안 유지되고, 최종적으로 3분에 걸쳐 10% 용매 B로 되돌아가고, 3분 동안 유지된다. 유량은 0.5 mL/분이다. 주입 부피는 10 μ L이고, 샘플은 오토 샘플러에서 실온으로 유지된다. 화합물을 LC 및 역상 크로마토그래피를 활용하는 LC-MS에 의해 분석하였다. 본 발명의 화합물의 질량 분광 분석을 하기 조건 하에 수행하였다: 질소 기체의 유량을 시스 및 옥스/스위프 기체 유량에 대해 각각 30 및 15 arb로 고정하였다. 전기분무 이온화를 5000 V로 설정된 분무 전압 및 35.0 V의 모세관 전압으로 수행하였다. 모세관 온도를 400°C로 설정하였다. 엑스칼리버 소프트웨어 상에서 데이터를 분석하였다. 활성 화합물 템플라줄 A는 298의 분자 질량을 갖고, 음성 이온화 모드에서 297.34에서의 m/z 이온을 나타내었다. 템플라줄 B에 대한 LC-MS 크로마토그램은 258의 분자 질량을 제안하고, 음성 이온화 모드에서 257.74에서의 m/z 이온을 나타내었다.

[0460] ¹H, ¹³C 및 2D NMR 스펙트럼은 브루커 500 MHz & 600 MHz 구배 필터 분광계 상에서 측정하였다. 참조기준은 내부 표준 테트라메틸실란 (TMS, 0.00 ppm) 상에서 설정하였다.

[0461] 템플라줄 A의 구조 설명을 위해, 분자량 298을 갖는 정제된 화합물을 500 MHz NMR 기기를 이용하여 추가로 분석하였고, 이는 8.44, 8.74, 8.19, 7.47, 7.31, 3.98, 2.82, 2.33, 1.08에서의 ¹H NMR δ 값을 갖고, δ 163.7, 161.2, 154.8, 136.1, 129.4, 125.4, 123.5, 123.3, 121.8, 121.5, 111.8, 104.7, 52.2, 37.3, 28.1, 22.7, 22.7의 ¹³C NMR 값을 갖는다. 템플라줄 A는 226, 275, 327 nm에서의 UV 흡수대를 가지며, 이는 인돌 및 옥사졸 고리의 존재를 시사하였다. 분자식, C₁₇H₁₈N₂O₃이 ¹H, ¹³C NMR 및 HRESI MS 데이터 m/z 299.1396 (M+H)⁺ (C₁₇H₁₉N₂O₃에 대한 계산치, 299.1397)의 해석에 의해 결정되었으며, 이는 10개의 이중 결합가에 의해 나타내어지는 높은 정도의 불포화를 수반한다. ¹³C NMR 스펙트럼은 2개의 메틸, 메톡시, 메틸렌 탄소, 지방족 메틴, 에스테르 카르보닐, 및 11개의 방향족 탄소를 포함한 모든 17개의 탄소에 대한 신호를 나타내었다. 3'-치환된 인돌의 존재는 ¹H-¹H COSY 및 HMBC 스펙트럼 데이터로부터 밝혀졌다. ¹H-¹H COSY 및 HMBC는 또한 카르복실산 메틸 에스테르 기 및 -CH₂-CH-(CH₃)₂ 측쇄의 존재를 나타내었다. ¹H-¹H COSY, ¹³C, 및 HMBC 데이터의 상세한 분석으로부터, 화합물이 옥사졸 핵을 함유한다는 것이 유래되었다. 2D 분석으로부터, 이소-부틸 측쇄가 C-2 위치에 부착되고, 카르복실산 메틸 에스테르가 C-4 위치에 부착되고, 인돌 유닛이 C-5 위치에 부착되어 템플라줄 A를 생성한다는 것을 발견하였다.

[0462] 분자량 258을 갖는 제2 제초 활성 화합물, 템플라줄 B를 500 MHz NMR 기기를 이용하여 추가로 분석하였고, 이는 7.08, 7.06, 6.75, 3.75, 2.56, 2.15, 0.93, 0.93에서의 ¹H NMR δ 값 및 δ 158.2, 156.3, 155.5, 132.6, 129.5, 129.5, 127.3, 121.8, 115.2, 115.2, 41.2, 35.3, 26.7, 21.5, 21.5의 ¹³C NMR 값을 갖는다. 분자식은

^1H , ^{13}C NMR 및 질량 데이터의 해석에 의해 결정되어 $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ 로 할당되었다. ^{13}C NMR 스펙트럼은 2개의 메틸, 2개의 메틸렌 탄소, 1개의 지방족 메틴, 1개의 아마이드 카르보닐 및 9개의 방향족 탄소를 포함한 모든 15개의 탄소에 대해 신호를 나타내었다. 구조의 일반적 특성은 파라-치환된 방향족 고리를 나타내는 ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼 [δ 7.08 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.75 (2H, d, J = 8.8 Hz), 및 132.7, 129.5, 115.2, 127.3, 115.2, 129.5]으로부터 추론하였다. ^1H - ^1H COSY 및 HSQC 스펙트럼과 함께 이 구조의 ^1H NMR 스펙트럼은 이소부틸 모이어티에 대한 특징적인 신호를 나타내었다 [δ 0.93 (6H, d, J = 6.9 Hz), 2.15 (1H, sept., J = 6.9 Hz), 2.57 (2H, d, J = 6.9 Hz)]. 또한, 올레핀/방향족 양성자 (δ 7.06, s) 및 카르보닐 탄소군 (δ 158.9)이 또한 ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼에서 발견되었다. HMBC 스펙트럼의 검사시에, 이소부틸 모이어티의 H-1' 신호는 올레핀계 탄소 (C-2, δ 156.3)와 상관관계가 있고, 올레핀계 양성자 H-4는 (C-5, δ 155.5; C-2, 156.3 & C-1", 41.2)와 상관관계가 있다. δ 3.75에서의 메틸렌 신호는 파라-치환된 방향족 모이어티의 C-5, C-4 뿐만 아니라 C-2"와 상관관계가 있다. 이러한 모든 관찰된 상관관계는 이소부틸 사이의 연결성, 및 나타낸 바와 같은 구조의 골격에 대한 파라-치환된 벤질 모이어티를 시사하였다. 또한, 카르복사미드 기는 H-4" & H-6" 위치에서 방향족 양성자로부터의 HMBC 상관관계에 기초하여 벤질 모이어티의 파라 위치에 할당되었다. 따라서, 상기 데이터에 기초하여, 구조를 템플라졸 B로 지정하였다.

[0463] 4. 실시예 4. FR901228의 단리

[0464] 비규정 성장 배지 중 부르크홀데리아 종의 발효물로부터의 전세포 브로쓰를 앰버라이트 XAD-7 수지 (문헌 [Asolkar et al., 2006])를 사용하여, 실온에서 2시간 동안 225 rpm으로 세포 현탁액과 수지를 진탕함으로써 추출하였다. 수지 및 세포 덩어리를 무명을 통한 여과에 의해 수집하고, 탈이온수로 세척하여 염을 제거하였다. 이어서, 수지, 세포 덩어리, 및 무명을 아세톤에 2시간 동안 담근 후, 아세톤을 여과하고, 회전 증발기를 이용하여 진공 하에 건조시켜 조 추출물을 수득하였다. 이어서, 조 추출물을 역상 C18 진공 액체 크로마토그래피 ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$; 구배 90:10 \rightarrow 0:100%)를 이용하여 분획화함으로써 11개의 분획을 수득하였다. 이어서, 이들 분획을 회전 증발기를 이용하여 농축 건조시키고, 생성된 건조 잔류물을 곤충 생물검정 뿐만 아니라 제초 생물검정 둘 다를 이용하여 생물학적 활성에 대해 스크리닝하였다. 이어서, 활성 분획을 역상/정상 HPLC (스펙트라 시스 템 P4000; 써모 사이언티픽)에 적용하여 순수 화합물을 수득한 후에, 이들을 하기 기재되는 제초, 살곤충 및 살선충 생물검정에서 스크리닝하여 활성 화합물을 발견/동정하였다. 화합물의 정체성을 확인하기 위해, LC/MS 및 NMR과 같은 추가의 분광학적 데이터를 기록하였다

[0465] 활성 피크의 질량 분광 분석을 LCQ 데카 XP^{플러스} 질량 분광계 상의 풀 스캔 모드 (m/z 100-1500 Da)에서 양성 및 음성 이온화 모드 둘 다를 이용하는 써모 피니간 LCQ 데카 XP 플러스 전기분무 (ESI) 기기 (써모 일렉트론 코포 레이션, 캘리포니아주 산호세) 상에서 수행하였다. 피니간 서베이어 PDA 플러스 검출기, 오토샘플러 플러스, MS 펌프 및 4.6 mm x 100 mm 루나 C18 5 μm 칼럼 (페노메넥스)이 장착된 써모 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 기기를 이용하였다. 용매 시스템은 물 (용매 A) 및 아세토니트릴 (용매 B)로 이루어졌다. 이동상은 10% 용매 B에서 시작하고, 20분에 걸쳐 100% 용매 B로 선형 증가한 후에, 4분 동안 유지되고, 최종적으로 3분에 걸쳐 10% 용매 B로 되돌아가고, 3분 동안 유지된다. 유량은 0.5 mL/분이다. 주입 부피는 10 μL 이고, 샘플은 오토 샘플러에서 실온으로 유지된다. 화합물을 LC 및 역상 크로마토그래피를 활용하는 LC-MS에 의해 분석하였다. 본 발명의 화합물의 질량 분광 분석을 하기 조건 하에 수행하였다: 질소 기체의 유량을 시스 및 옥스/스위 프 기체 유량에 대해 각각 30 및 15 arb로 고정하였다. 전기분무 이온화를 5000 V로 설정된 분무 전압 및 35.0 V의 모세관 전압으로 수행하였다. 모세관 온도를 400 $^{\circ}\text{C}$ 로 설정하였다. 엑스칼리버 소프트웨어 상에서 데이터를 분석하였다. LC-MS 분석에 기초하여, 분획 6으로부터의 활성 살곤충 화합물은 음성 이온화 모드에서 540의 분자 질량을 갖는다.

[0466] 구조 설명을 위해, 분자량 540을 갖는 분획 6으로부터의 정제된 살곤충 화합물을 500 MHz NMR 기기를 이용하여 추가로 분석하였고, 이는 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23, 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02에서의 ^1H NMR 값을 갖고; 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51의 ^{13}C NMR 값을 갖는다. NMR 데이터는 화합물이 아미노, 에스테르, 카르복실산, 지방족 메틸, 에틸, 메틸렌, 옥시메틸렌, 메틴, 옥시메틴 및 황 기를 함유한다는 것을 나타낸다.

상세한 1D 및 2D NMR 분석은 화합물에 대한 구조를 기지의 화합물로서의 FR901228로 확인하였다.

[0467] **5. 실시예 5. 템플라미드 A, B, FR901465 및 FR901228의 단리**

[0468] **방법 및 물질**

[0469] Hy 대두 성장 배지 중 10-L 발효 부르크홀데리아 (A396)로부터 유래된 배양 브로쓰를 앰버라이트 XAD-7 수지 (문헌 [Asolkar et al., 2006])를 사용하여, 실온에서 2시간 동안 225 rpm으로 세포 현탁액과 수지를 진탕함으로써 추출하였다. 수지 및 세포 덩어리를 무명을 통한 여과에 의해 수집하고, 탈이온수로 세척하여 염을 제거하였다. 이어서, 수지, 세포 덩어리, 및 무명을 아세톤에 2시간 동안 담근 후, 아세톤을 여과하고, 회전 증발기를 이용하여 진공 하에 건조시켜 조 추출물을 수득하였다. 이어서, 조 추출물을 역상 C18 진공 액체 크로마토그래피 (H_2O/CH_3OH ; 구배 90:10 \rightarrow 0:100%)를 이용하여 분획화함으로써 11개의 분획을 수득하였다. 이어서, 이들 분획을 회전 증발기를 이용하여 농축 건조시키고, 생성된 건조 잔류물을 96 웰 플레이트 상추 시딩 (제조제) 및 3령 초기 비트 거염벌레 (살곤충) 검정을 이용하여 생물학적 활성에 대해 스크리닝하였다. 이어서, 활성 분획을 역상 HPLC 분리 (스펙트라 시스템 P4000 (써모 사이언티픽))에 반복적으로 적용하여 순수 화합물을 수득한 후에, 이들을 상기-언급된 생물검정에서 스크리닝하여 활성 화합물을 발견/동정하였다. 화합물의 정체성을 확인하기 위해, LC/MS, HRMS 및 NMR과 같은 추가의 분광학적 데이터를 기록하였다.

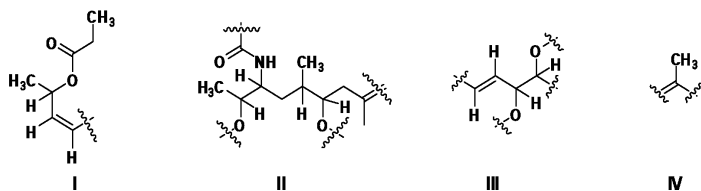
[0470] 활성 분획 6을 8 mL/분 유량 및 210 nm의 UV 검출에서 HPLC C-18 칼럼 (페노메넥스, 루나 10u C18(2) 100 Å, 250 x 30), 물:아세트니트릴 구배 용매 시스템 (0-10 분; 80% 수성 CH_3CN , 10-25 분; 80 - 65% 수성 CH_3CN , 25-50 분; 65 - 50% 수성 CH_3CN , 50-60 분; 50-70% 수성 CH_3CN , 60-80 분; 70 - 0% 수성 CH_3CN , 80-85 분; 0 - 20% 수성 CH_3CN)을 이용하여 추가로 정제하여 각각 템플라미드 A, 체류 시간 55.64 분 및 FR901465, 체류 시간 63.59 분 및 FR90128, 체류 시간 66.65 분을 수득하였다. 다른 활성 분획 6을 또한 8 mL/분 유량 및 210 nm의 UV 검출에서 HPLC C-18 칼럼 (페노메넥스, 루나 10u C18(2) 100 Å, 250 x 30), 물:아세트니트릴 구배 용매 시스템 (0-10 분; 70-60% 수성 CH_3CN , 10-20 분; 60-40% 수성 CH_3CN , 20-50 분; 40 - 15% 수성 CH_3CN , 50-75 분; 15 - 0% CH_3CN , 75-85 분; 0 - 70% 수성 CH_3CN)을 이용하여 정제하여 템플라미드 B, 체류 시간 38.55 분을 수득하였다.

[0471] 순수 화합물의 질량 분광 분석을 LCQ 데카 XP^{플러스} 질량 분광계 상의 풀 스캔 모드 (m/z 100-1500 Da)에서 양성 및 음성 이온화 모드 둘 다를 이용하는 써모 피니간 LCQ 데카 XP 플러스 전기분무 (ESI) 기기 (써모 일렉트론 코포레이션, 캘리포니아주 산호세) 상에서 수행하였다. 피니간 서베이어 PDA 플러스 검출기, 오토샘플러 플러스, MS 펌프 및 4.6 mm x 100 mm 루나 C18 5 μm 칼럼 (페노메넥스)이 장착된 써모 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 기기를 이용하였다. 용매 시스템은 물 (용매 A) 및 아세트니트릴 (용매 B)로 이루어졌다. 이동상은 10% 용매 B에서 시작하고, 20분에 걸쳐 100% 용매 B로 선형 증가한 후에, 4분 동안 유지되고, 최종적으로 3분에 걸쳐 10% 용매 B로 되돌아가고, 3분 동안 유지된다. 유량은 0.5 mL/분이다. 주입 부피는 10 μL 이고, 샘플은 오토 샘플러에서 실온으로 유지된다. 화합물을 LC 및 역상 크로마토그래피를 활용하는 LC-MS에 의해 분석하였다. 본 발명의 화합물의 질량 분광 분석을 하기 조건 하에 수행하였다: 질소 기체의 유량을 시스 및 옥스/스위프 기체 유량에 대해 각각 30 및 15 arb로 고정하였다. 전기분무 이온화를 5000 V로 설정된 분무 전압 및 45.0 V의 모세관 전압으로 수행하였다. 모세관 온도를 300°C로 설정하였다. 엑스칼리버 소프트웨어 상에서 데이터를 분석하였다. 활성 화합물 템플라미드 A는 양성 이온화 모드에서 556.41 $[M + H]^+$ 및 578.34 $[M + Na]^+$ 에서의 m/z 피크에 기초하여 555의 분자 질량을 갖는다. 템플라미드 B에 대한 양성 모드 이온화에서 LC-MS 분석은 538.47 $[M + H]^+$ 및 560.65 $[M + Na]^+$ 에서의 m/z 이온에 기초하여 537의 분자 질량을 제안한다. 화합물 FR901465 및 FR901228에 대한 분자량은 LCMS 분석에 기초하여 각각 523 및 540으로 할당되었다.

[0472] 1H , ^{13}C 및 2D NMR 스펙트럼을 브루커 600 MHz 구배 필드 분광계 상에서 측정하였다. 참조기준은 내부 표준 테트라메틸실란 (TMS, 0.00 ppm) 상에서 설정하였다.

[0473] 템플라미드 A의 구조 설명을 위해, 분자량 555를 갖는 정제된 화합물을 600 MHz NMR 기기를 이용하여 추가로 분석하였고, 이는 6.40, 6.39, 6.00, 5.97, 5.67, 5.54, 4.33, 3.77, 3.73, 3.70, 3.59, 3.47, 3.41, 2.44, 2.35, 2.26, 1.97, 1.81, 1.76, 1.42, 1.37, 1.16, 1.12, 1.04에서의 1H NMR δ 값을 갖고, δ 173.92, 166.06, 145.06, 138.76, 135.71, 129.99, 126.20, 123.35, 99.75, 82.20, 78.22, 76.69, 71.23, 70.79,

70.48, 69.84, 60.98, 48.84, 36.89, 33.09, 30.63, 28.55, 25.88, 20.37, 18.11, 14.90, 12.81, 9.41의 ^{13}C NMR 값을 갖는다. ^{13}C NMR 스펙트럼은 6개의 메틸, 4개의 메틸렌 탄소, 및 5개의 sp^2 , 4개의 4급 탄소를 포함하는 13개의 메틴에 기인한 28개의 개별 탄소 신호를 나타낸다. ^1H , ^{13}C NMR 및 HRESI MS 데이터의 해석에 의해 분자식, $\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{NO}_{10}$ 이 결정되었다. ^1H - ^1H COSY, HMBC 및 HMQC 스펙트럼 데이터의 상세한 분석은 하기 구조 (I - IV) 및 2개의 단리된 메틸렌 & 단일선 메틸 기를 밝혀내었다. 이들 하위구조는 중요한 HMBC 상관관계를 이용하여 나중에 연결되어 아직 문헌에서 보고되지 않은 화합물에 대한 평면 구조를 제공하고, 템플라미드 A로서 지정된다. 이러한 폴리케티드 분자는 2개의 테트라히드로피라노스 고리 및 1개의 공액 아마이드를 함유한다.



[0474]

[0475] 1D & 2D NMR 분광학적 데이터의 분석에 의해 할당된 하위구조 I-IV

[0475]

[0476] 제2 제초 화합물의 (+) ESIMS 분석은 분자량 537에 상응하는 $538.47 [\text{M} + \text{H}]^+$ 및 $560.65 [\text{M} + \text{Na}]^+$ 에서의 m/z 이온을 나타낸다. ESIMS 및 NMR 데이터 분석의 해석에 의해 $\text{C}_{28}\text{H}_{43}\text{NO}_9$ 의 분자식이 결정되었다. 이 화합물의 ^1H 및 ^{13}C NMR은 템플라미드 A에서 커플링되지 않은 메틸렌 기 대신에 새로운 단리된 $-\text{CH}_2-$ 가 나타난다는 것을 제외하고는 템플라미드 A의 경우와 유사하였다. 작은 초기 커플링 상수 4.3 Hz는 에폭시드 메틸렌 기의 존재의 특징이다. 이 에폭시드의 존재는 템플라미드 A에서의 60.98로부터 MW 537을 갖는 화합물에서의 41.07로의 ^{13}C NMR 이동으로부터 추가로 확인되었다. 이들 2종의 화합물 사이의 분자식 차이는 물 분자의 제거 이후 에폭시드의 형성에 의해 합리적으로 설명된다. 따라서, 기반 NMR 및 MS 분석에 기초하여, 새로운 화합물에 대한 구조가 할당되고 템플라미드 B로 지정되었다.

[0477]

구조 설명을 위해, 분자량 523을 갖는 분획 6으로부터의 정제된 화합물을 600 MHz NMR 기기를 이용하여 추가로 분석하였고, 이는 6.41, 6.40, 6.01, 5.98, 5.68, 5.56, 4.33, 3.77, 3.75, 3.72, 3.65, 3.59, 3.55, 3.50, 2.44, 2.26, 2.04, 1.96, 1.81, 1.75, 1.37, 1.17, 1.04에서의 ^1H NMR 값을 갖고; 172.22, 167.55, 144.98, 138.94, 135.84, 130.14, 125.85, 123.37, 99.54, 82.19, 78.28, 76.69, 71.31, 70.13, 69.68, 48.83, 42.52, 36.89, 33.11, 30.63, 25.99, 21.20, 20.38, 18.14, 14.93, 12.84의 ^{13}C NMR 값을 갖는다. 화합물의 상세한 ^1H 및 ^{13}C NMR 분석은 이 화합물이 화합물 템플라미드 B와 매우 유사하고; 유일한 차이는 에스테르 측쇄에 있으며; 그 측쇄에 프로피오네이트 모이어티 대신 아세테이트 모이어티가 존재한다는 것을 시사하였다. 상세한 1D 및 2D NMR 분석은 화합물에 대한 구조를 기지의 화합물로서의 FR901465로 확인하였다.

[0478]

LC-MS 분석에 기초하여, 분획 6으로부터의 다른 화합물은 음성 이온화 모드에서 540의 분자 질량을 갖는다. 구조 설명을 위해, 분자량 540을 갖는 분획 5로부터의 정제된 화합물을 500 MHz NMR 기기를 이용하여 추가로 분석하였고, 이는 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23, 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02에서의 ^1H NMR 값을 갖고; 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51의 ^{13}C NMR 값을 갖는다. NMR 데이터는 화합물이 아미노, 에스테르, 카르복실산, 지방족 메틸, 에틸, 메틸렌, 옥시메틸렌, 메틴, 옥시메틴 및 황 기를 함유한다는 것을 나타낸다. 상세한 1D 및 2D NMR 분석은 화합물에 대한 구조를 기지의 화합물로서의 FR901228로 확인하였다.

[0479]

분획 F8로부터의 다른 활성 화합물 (F8H17)에 대한 분자량은 양성 ESI 모드에서 1081.75 (M + H)에서의 분자 이온 피크에 기초하여 1080으로 할당되었고, 1079.92에서의 기준 피크를 갖는 음성 ESIMS에 의해 추가로 확인하였다. 이 화합물은 234 nm에서의 UV 흡수를 보여주었다.

[0480]

실시예 6. 살조제로서의 부르크홀데리아 종

[0481] 부르크홀데리아 중 A396을 비규정 무기물 배지에서 5일 (25℃, 200 rpm) 동안 성장시켰다. 세포를 8,000 g에서의 원심분리에 의해 상청액으로부터 분리하고, 세포-무함유 상청액을 사용하여 단세포 조류 중 (피. 서브카피타타) 및 청록 조류 중(아나베나 종)에 대한 살조 활성을 시험하였다. 규정된 증가하는 양의 상청액을 750 마이크로 리터의 고렘(Gorham) 배지에서 성장하고 있는 규정된 조류를 갖는 24-웰 폴리스티렌 플레이트의 웰에 첨가하여 각 조류 유형에 대한 시험 상청액의 용량-반응 곡선을 결정하였다. 각각의 처리를 2회 반복하여 수행하고, 블랭크 성장 배지를 음성 대조군으로 사용하였다. 플레이트의 뚜껑을 닫고, 실온에서 일정한 성장 광 하에 48시간 동안 인큐베이션하였다. 48시간 후에, 각 웰의 현탁액의 형광 (700 nm)을 스펙트라맥스 제미니 (SpectraMax Gemini) XS 플레이트 판독기를 이용하여 측정하고, 비처리 대조군에 비한 형광의 감소를 조류 성장의 방제 퍼센트로 변환시켰다. 하기 표 9에 제시된 결과는 단세포 조류의 탁월한 방제 및 청록 조류에 대한 우수한 방제 또는 조류증식억제 효과를 보여준다.

표 9

700 nm에서의 형광 감소로 측정된 부르크홀데리아 A396 세포-무함유 브로쓰에 의한 2종의 조류 종의 방제.

웰당 브로쓰의 양	% 방제	
	피. 서브카피타타	아나베나 종
0 µL	0	0
10 µL	74.2	0.0
20 µL	84.1	0.0
30 µL	85.5	0.0
40 µL	88.3	0.0
50 µL	90.6	0.0
100 µL	94.6	36.4

[0482]

[0483] 실시예 7: 부르크홀데리아 종의 조 추출물 및 분획에 의한 클라미도모나스 레인하르트티(*Chlamydomonas reinhardtii*)의 방제

[0484] 부르크홀데리아 종의 조 추출물의 분획화로부터 수득된 분획을 클라미도모나스 레인하르트티에 대한 살조 활성에 대해 시험하였다. 증가하는 부피의 분획 (에탄올 중 20 mg/mL의 농도를 가짐)을 750 마이크로 리터의 성장하고 있는 규정된 조류가 있는 투명 48 웰 폴리스티렌 플레이트에 첨가하였다. 각각의 처리를 2회 반복하여 수행하고, 용매 (에탄올)를 음성 대조군으로 사용하였다. 플레이트의 뚜껑을 닫고, 실온에서 일정한 광 하에 72시간 동안 인큐베이션하였다. 72시간 후에, 각 웰의 현탁액의 형광 (680 nm)을 스펙트라맥스 M2 플레이트 판독기를 이용하여 측정하고, 음성 대조군에 비한 형광의 감소를 조류 성장의 방제 퍼센트로 변환시켰다. 각각의 샘플을 음성 대조군과 시각적으로 비교하고; 시각적으로 음성 대조군보다 깨끗한 웰을 활성으로 기록하였다. 하기 표 10에 제시된 결과는 분획 5, 6, 7, 8 및 9에서 규정된 조류의 방제를 보여준다. 시험을 2회 반복하여 진행하고, % 방제를 음성 대조군에 비한 680 nm에서의 형광의 감소로 계산하였다. 각각의 샘플을 음성 대조군과 시각적으로 비교하고; 시각적으로 음성 대조군보다 깨끗한 웰을 활성으로 기록하였다.

표 10

부르크홀데리아 종의 조 추출물 & 분획 (MBI 206)에 의한 클라미도모나스 레인하르티이의 방제.

샘플	조류 750 μL 당 샘플의 μL	% 억제	시각적 결과
용매 블랭크	22.5	0.00	비활성
	11	0.00	비활성
	5	0.00	비활성
조 추출물	22.5	97.10	활성
	11	89.54	활성
	5	90.82	활성
MBI 206F1	22.5	-74.47	비활성
	11	46.47	비활성
	5	46.21	비활성
MBI 206F2	22.5	12.64	비활성
	11	-214.35	비활성
	5	-297.56	비활성
MBI 206F3	22.5	-143.92	비활성
	11	-740.16	비활성
	5	32.68	비활성
MBI 206F4	22.5	-98.80	비활성
	11	-155.41	비활성
	5	58.51	비활성
MBI 206F5	22.5	92.89	활성
	11	79.45	활성
	5	71.60	약한 활성
MBI 206F6	22.5	94.88	활성
	11	96.33	활성
	5	86.45	활성
MBI 206F7	22.5	97.32	활성
	11	98.96	활성
	5	97.89	활성
MBI 206F8	22.5	94.35	활성
	11	32.17	약한 활성
	5	-13.51	비활성
MBI 206F9	22.5	85.35	활성
	11	96.49	활성
	5	97.73	활성
MBI 206F10	22.5	50.30	비활성
	11	48.54	비활성
	5	-108.24	비활성
MBI 206F11	22.5	-121.50	비활성
	11	-16.21	비활성
	5	36.46	비활성

[0485]

[0486]

실시예 8: 부르크홀데리아 종으로부터 수득한 조 추출물 및 다양한 분획의 피. 서브카피타타에 대한 살조 효과.

[0487]

부르크홀데리아 종으로부터 수득한 조 추출물 뿐만 아니라 분획을 단세포 조류 종 (피. 서브카피타타)에 대한 살조 활성에 대해 시험하였다. 각각의 샘플에 상응하는 기지의 양의 물질 (10 mg/mL 농도)을 재용해시켜 유래된 순수 에탄올 용액의 증가하는 부피를 750 마이크로 리터의 고렘 배지에서 성장하고 있는 규정된 조류를 갖는 24-웰 폴리스티렌 플레이트의 웰에 첨가하여 단세포 조류에 대한 샘플 (추출물/분획)의 살조 효과를 결정하였다. 각각의 처리를 3회 반복하여 수행하고, 순수 에탄올을 음성 대조군으로 사용하였다. 혼합 후에, 플레이트의 뚜껑을 닫고, 실온에서 일정한 성장 광 하에 48시간 동안 인큐베이션하였다. 48시간 후에, 각 웰의 현탁액의 형광 (700 nm)을 스펙트라맥스 제미니 XS 플레이트 판독기를 이용하여 측정하고, 비처리 대조군에 비한 형광의 감소를 조류 성장의 방제 퍼센트로 변환시켰다. 하기 표 11에 제시된 결과는 분획 F5, F6 및 F7에서의 단세포 조류의 탁월한 방제를 보여준 반면 다른 샘플에서는 어떠한 실질적인 살조 효과도 수득하지 못하였다.

표 11

부르크홀데리아 종으로부터 수득된 다양한 샘플의 살조 효과. 생물검정은 시험 유기체로 *E. 서브카피타타*를 사용하여 3 회 반복하여 수행하였다.

샘플	샘플 μL	% 방제	결과
MBI206F1	5	0.0	비활성
	10	33.9	비활성
	20	58.2	비활성
MBI206F2	5	35.7	비활성
	10	6.0	비활성
	20	31.8	비활성
MBI206F3	5	40.9	비활성
	10	66.4	비활성
	20	68.5	비활성
MBI206F4	5	46.8	비활성
	10	69.8	약한 활성
	20	84.7	활성
MBI206F5	5	49.9	비활성
	10	71.5	약한 활성
	20	95.4	활성
MBI206F6	5	62.7	비활성
	10	74.7	약한 활성
	20	90.7	활성
MBI206F7	5	40.1	비활성
	10	88.6	활성
	20	93.0	활성
MBI206F8	5	36.8	비활성
	10	50.0	비활성
	20	65.9	비활성
MBI206F9	5	66.3	비활성
	10	40.7	비활성
	20	51.8	비활성
MBI206F10	5	26.8	비활성
	10	27.5	비활성
	20	32.9	비활성
MBI206F11	5	25.9	비활성
	10	32.8	비활성
	20	39.2	비활성
조 추출물	5	45.6	비활성
	10	69.6	약한 활성
	20	70.0	약한 활성
용매 블랭크	5	0.0	비활성
	10	0.0	비활성
	20	0.0	비활성

[0488]

[0489] 실시예 9: 부르크홀데리아 종 발효 브로쓰로부터의 정제된 화합물에 의한 클라미도모나스 레인하르트티이의 방제

[0490] 부르크홀데리아 종 발효 브로쓰로부터의 정제된 화합물을 클라미도모나스 레인하르트티이에 대한 살조 활성에 대해 시험하였다. 증가하는 부피의 정제된 화합물 (에탄올 중 20 mg/mL)을 750 마이크로 리터의 성장하고 있는 규정된 조류가 있는 투명한 48 웰 폴리스티렌 플레이트에 첨가하였다. 각각의 처리를 2회 반복하여 수행하고, 용매를 음성 대조군으로 사용하였다. 플레이트의 뚜껑을 닫고, 실온에서 일정한 광 하에 72시간 동안 인큐베이션하였다. 72시간 후에 각 웰의 현탁액의 형광 (680)을 스펙트라맥스 M2 플레이트 판독기를 이용하여 측정하고, 음성 대조군에 비한 형광의 감소를 조류 성장의 방제 퍼센트로 변환시켰다. 각각의 샘플을 음성 대조군과 시각적으로 비교하고; 시각적으로 음성 대조군보다 깨끗한 웰을 활성으로 기록하였다. 하기 표 12에 제시된 결과는 템플라미드 B (MW 537), FR901228 (MW 540), 템플라졸 A (MW 298) 및 F8H18 (MW 1080)을 함유하는 샘플에서 규정된 조류의 방제를 보여준다. 시험을 2회 반복하여 진행하고, % 방제를 음성 대조군에 비한 680 nm에서의 형광의 감소로 계산하였다. 각각의 샘플을 음성 대조군과 시각적으로 비교하고; 시각적으로 음성 대

조균보다 깨끗한 웰을 활성으로 기록하였다.

표 12

부르크홀데리아 종 발효 브로쓰 (MBI 206)로부터의 정제된 화합물에 의한 클라미도모나스 레인하르티이의 방제.

샘플	조류 750 μ L 당 샘플의 μ L	% 방제	시각적 결과
용매 블랭크	22.5	0	비활성
	11	0	비활성
	5	0	비활성
템플라미드 B (MW 537)	22.5	98.29620264	활성
	11	99.34438783	활성
	5	95.05204335	활성
FR901465 (MW 523)	22.5	-3.887169203	비활성
	11	-33.58351827	비활성
	5	-86.58233289	비활성
템플라미드 A (MW 555)	22.5	-151.6466844	비활성
	11	-21.16166036	비활성
	5	-67.61183948	비활성
FR901228 (MW 540)	22.5	98.71299647	활성
	11	99.35532773	활성
	5	89.48079462	활성
템플라졸 B (MW 258)	22.5	-30.78693813	비활성
	11	52.94712906	비활성
	5	-102.0883867	비활성
템플라졸 A (MW 298)	22.5	98.1523303	활성
	11	98.72823743	활성
	5	99.18429591	활성
템플라졸 A (MW 298)	22.5	95.71173214	활성
	11	98.31330291	활성
	5	98.69251947	활성
F8H18 (MW 1080)	22.5	94.98474386	활성
	11	82.90378804	활성
	5	-21.38764258	비활성

[0491]

[0492]

템플라졸 A는 이 생물검정에서 2회 시험하였다.

[0493]

실시예 10: 열-처리된 부르크홀데리아 종 발효 상청액에 의한 세네데스무스 콰드리카우다(*Scenedesmus quadricauda*)의 방제.

[0494]

부르크홀데리아 종을 이전에 기재된 바와 같이 발효 브로쓰에서 성장시켰다. 브로쓰는 발효가 끝날 때에 열 처리하여 모든 세포를 불활성화시켰다. 세포 무함유 상청액을 세네데스무스 콰드리카우다에 대한 살조제 활성에 대해 시험하였다. 증가하는 부피의 상청액을 750 μ l의 성장하고 있는 규정된 조류가 있는 투명한 48 웰 폴리 스티렌 플레이트에 첨가하였다. 각각의 처리를 2회 반복하여 수행하고, 블랭크 성장 배지를 음성 대조군으로 사용하였다. 플레이트의 뚜껑을 닫고, 실온에서 일정한 광 하에 72시간 동안 인큐베이션하였다. 72시간 후에 각 웰의 현탁액의 형광 (680 nm)을 스펙트라맥스 M2 플레이트 판독기를 이용하여 각 웰에서 측정하고, 비처리 대조군에 비한 형광의 감소를 조류 성장의 방제 퍼센트로 변환시켰다. 하기 표 13에 제시된 결과는 규정된 조류의 방제를 보여준다. 시험을 2회 반복하여 진행하고, % 방제는 비처리 대조군에 비한 680 nm에서의 형광의 감소로 계산하였다.

표 13

열 사멸 부르크홀데리아 종의 상청액 (MBI 206)에 의한 세네테스무스 콰드리카우다의 방제.

물질	부피 (μL)	% 억제
MBI 206 120522ST HK TGAI	0	0
	10	97.21347952
	20	99.36167161
	30	99.42844203
	40	99.50798231
	50	98.90136045
	100	95.9474484

[0495]

[0496]

실시예 11: 열 사멸 부르크홀데리아 종 발효 상청액에 의한 오실라토리아 테니우스(*Oscillatoria tenius*)의 방제

[0497]

부르크홀데리아 종을 이전에 기재된 바와 같이 발효 브로쓰에서 성장시켰다. 브로쓰는 발효가 끝날 때에 열 처리하여 모든 세포를 불활성화시켰다. 세포 무함유 상청액을 오실라토리아 테니우스에 대한 살조제 활성에 대해 시험하였다. 증가하는 부피의 상청액을 750 μl의 성장하고 있는 규정된 조류가 있는 투명한 48 웰 폴리스티렌 플레이트에 첨가하였다. 각각의 처리를 2회 반복하여 수행하고, 블랭크 성장 배지를 음성 대조군으로 사용하였다. 플레이트의 뚜껑을 닫고, 실온에서 일정한 광 하에 72시간 동안 인큐베이션하였다. 72시간 후에, 680 nm에서의 흡광도를 스펙트라맥스 M2 플레이트 판독기를 이용하여 각 웰에서 측정하고, 비처리 대조군에 비한 흡광도의 감소를 조류 성장의 방제 퍼센트로 변환시켰다. 하기 표 14에 제시된 결과는 규정된 조류의 방제를 보여 준다. 시험을 2회 반복하여 진행하고, % 방제는 비처리 대조군에 비한 680 nm에서의 흡광도의 감소로 계산하였다.

표 14

열 사멸 부르크홀데리아 종의 상청액 (MBI 206)에 의한 오실라토리아 테니우스의 방제.

물질	부피(μL)	% 방제
MBI 206 120522ST HK TGAI	0	0
	10	6.177042802
	20	25.12413108
	30	10.56583534
	40	37.70086527
	50	45.47313627
	100	36.96205601

[0498]

[0499]

실시예 13: 마리골드 식물에 침입한 2-점박이 잎응애에 대한 부르크홀데리아 종의 효능

[0500]

숙주 식물 (목화)로부터 추출된 잎을 시험 식물에 놓음으로써 6" 용기에서 성장시킨 마리골드, 타게테스 에렉타 (*Tagetes erecta*)를 2-점박이 잎응애, 테트라니쿠스 우르티카에(*Tetranychus urticae*)로 감염시켰다. 30-40마리 잎응애가 존재하는 대략 10개의 잎을 14일 동안 시험 식물의 다양한 부위에 놓았다. 시험 식물을 침입 후에 개별적으로 케이지에 넣어 잎응애 집단이 구축되도록 하였다. 숙주 잎을 시험 식물로부터 제거하였다. 어떠한 살충제도 연구 적용 전에는 시험 식물에 적용되지 않았다. 분무 적용을 100 gpa로 보정된 Gen3 분무 부스를 이용하여 적용하였다. 각각의 복제물을 적용 직후에 개별적으로 케이지에 넣었다. 케이지 설명; 항바이러스 곤충 스크리닝으로 덮인 와이어 토마토 케이지 30" 높이 x 12" 직경. 시험 식물은 시험 기간 동안 자연 광을 받았다. 시험 식물은 필요에 따라 24시간마다 토양에 물을 주었다. 식물은 적용전 (카운트전), 적용후 제3일, 제5 일 및 제7일에 평가하였다. 4개의 잎을 각각의 복제물로부터 무작위로 선택하여 수확하였으며, 평가된 전체 표면적은 6 cm²으로 동일하였다. 실제 카운트를 살아있는 및 죽은 2-점박이 잎응애 상에서 기록하였다. 부르크홀데리아 종은 TSSM 애벌레 및 성충 둘 다에 대해 약간의 활성을 나타내었다. 이 활성은 TSSM에 대한 생물 살충제 제제에 대한 잠재력을 보여준다. 처리는 또한 샘플 상에서 관찰된 살아있는 응애의 수를 감소시켰다.

이는 MBI206이 TSSM에 대한 생물살충제 제제에 대한 잠재력을 보여준다는 타당한 증거이다.

[0501] 실시예 14: 마리골드 식물에 침입한 2-점박이 잎응애에 대한 부르크홀데리아 종 발효 상청액의 효능

[0502] 숙주 식물 (목화)로부터 추출된 잎을 시험 식물에 놓음으로써 6" 용기에서 성장시킨 마리골드 식물을 2-점박이 잎응애로 감염시켰다. 대략 30-40마리 2-점박이 잎응애가 존재하는 8 내지 10개 (8-10)의 잎을 14일 동안 시험 식물의 다양한 부위에 놓았다. 시험 식물은 침입 후에 개별적으로 케이지에 넣어 잎응애 집단이 구축되도록 하였다. 숙주 잎을 시험 식물로부터 제거하였다. 어떠한 살충제도 연구 적용 전에는 시험 식물에 적용되지 않았다. 식물을 100% 상청액 또는 10% 상청액 (수중)으로 처리하였다. 분무 적용을 일회용 수동-분무기를 이용하여 흘러넘치지 않도록 하면서 전체 적용범위에 적용하였다. 시험 식물을 연구 온실의 와이어-메쉬로 만든 벤치 상에 놓고, 완전한 무작위화된 차단 설계로 배열하였다. 연구 온실을 프로콤(Procom), 마이크로 그로우 그린하우스 시스템(Micro Grow Greenhouse System) 온도 제어 시스템에 의해 모니터링하였다. 환경 조건은 시험일 동안 평균적으로 고온 85°F 내지 저온 72°F였다. 평균 습도 수준은 40% 내지 75% 범위였다. 시험 식물은 시험 기간 동안 자연 광을 받았다. 시험 식물은 필요에 따라 24시간마다 토양에 물을 주었다. 식물은 적용전 (카운트전), 적용후 제3일, 제5일, 제7일 및 제14일에 평가하였다. 평가는 복제물당 6 cm² 총 면적 상에서 수행하였다. 실제 카운트를 살아있는/죽은 2-점박이 잎응애 유충 및 살아있는/죽은 2-점박이 잎응애 성충 상에서 기록하였다.

[0503] 실시예 14: 딸기 - 필드 데이터에서 2 점박이 잎응애 (TSM)의 방제를 위한 부르크홀데리아 종 제제 (MBI 206)의 효능.

[0504] 5개의 전통적 화학-유래 및 MBI 206의 효능을 필드 조건 하에 TSM 방제에 대해 평가하였다. '딸기 축제' 이식물을 플라스틱 뿌리덮개가 덮인 모판, 13인치 높이 및 상부를 가로질러 27인치의 필드에, 4피트 모판 간격으로 놓았다. 두상 관수를 이식 확립의 보조를 위한 설정후 10일 동안 적용하였다. 세류 관수가 실험의 나머지 부분에 이용되었다. 각각의 12.5-피트 플롯은 모판당 2개의 10개-식물 줄에 20개의 식물로 구성된다. 플롯을 식물당 10 내지 20마리의 운동성 TSM이 있는 4개의 세션에서 실험실 콜로니로부터 감염시켰다. 각각의 세션이 실험의 1개의 블록의 침입을 달성하였다. 실험은 다양한 비율 및 스케줄의 살비제 적용의 처리로 이루어지며, 일부는 아주반트 및 비처리 확인과 조합된다. 처리를 RCB 설계에서 4회 반복하였다. 세비(Savey) 및 아크라마이트(Acramite) 처리물을 TSM 밀도가 역치 수준 (6 Jan)에 도달하기 전에 적용하고; 나머지 처리 프로그램은 2주 후에 시작하였다. 처리물을 45-도 코어 및 4번 디스크를 함유하는 노즐이 외부에 장착된 분무 막대를 갖는 휴대용 분무기를 이용하여 적용하였다. 분무기를 CO₂에 의해 40 psi로 가압하고, 보정하여 에이커당 100 gal을 전달하였다. 처리전 샘플을 제1일에 채취하고, 처리물의 마지막 적용 후에 2주에 걸쳐 매주 샘플링을 계속하였다. 샘플은 플롯당 10개의 무작위적으로 선택된 잎으로 이루어지고, 식물의 중앙 3분의 1 층으로부터 수집하였다. 샘플을 시험실로 전달하였으며, 여기서 운동성 및 알 TSM을 잎으로부터 회전 점착성 디스크로 브러싱하고, 디스크 표면의 1/10 상에서 카운팅하여 잎당 평균 수를 추정하였다. 생존 알과 비-생존 알을 구별할 수 없었으므로 전체 알을 기록하였다. 최고 비율 (3 gal/에이커)에서의 MBI 206이 적어도 2개의 화학적 대조군과 대등한 수준에서 알 수의 감소를 보여주었다.

표 15

처리/제제	비율 양/ 에이커	TMS 알 개수/소엽								
		제1일	제9일	제16일	제22일	제30일	제37일	제44일	제52일	제58일
비-처리된 비페나제이트 + 알킬 아릴 폴리옥실란 에테르, 유리 지방산 및 디메틸 폴리실록산의 혼합물	--	15.5	10	27.5	12.3	25.3	122	181.5	587	559
	1 lb.	3.8	6	6	0.8	8.3	20.5	3	28	66.5
비이온성 화합제	16.0 fl. oz.	6.8	15.5	11.8	16.8	31.5	148.3	114	321	525.3
5% 펜코록시메이트 EW	32 fl. oz.	11.3	12.8	35	19.3	11	24.5	17.8	49.8	213
5% 펜코록시메이트 EC	32 fl. oz.	9.3	11.8	12.3	12.5	1	34.5	20.8	28.5	97.3
헥사티아독스	6 oz.	2	8.5	15	17	22	71.5	128.5	281.5	393.5
NBI 206 + 알킬 아릴 폴리옥실란 에테르, 유리 지방산 및 디메틸 폴리실록산의 혼합물	1 gal.	12.3	-	20	12	12.5	65.5	83.3	292	478
NBI 206 + 알킬 아릴 폴리옥실란 에테르, 유리 지방산 및 디메틸 폴리실록산의 혼합물	3 gal.	3.3	-	8.8	13.5	21	54.3	72	158	301.3

TMS 알 생산에 대한 다양한 제제의 효과

[0505]

[0506] 실시예 15: 필드 조건 하에 시트러스 상의 시트러스 러스트 응애 (필로코프트루타 올레이보라(*Phyllocoptruta oleivora*))의 방제

[0507] MBI 206 (부르크홀데리아 종의 제제화된 브로쓰)을 발렌시아 스위트(Valencia Sweet) 오렌지 상에 1, 2 및 3 gal/에이커로 0.25% v/v의 LI-700 (계면활성제)과 조합하여 분무하고, 100 GPA의 부피로 전달하였다. 단일 처리물을 전달하고, 비처리 샘플과 비교하였다. 응애 카운트를 처리전, 이어서 처리후 제1일, 제7일, 제10일 및 제14일에 수행하였다. 응애 카운트는 1개의 샘플링 지점에서 처리당 10개의 과일의 평균이다. MBI 206 처리시에 제시되는 응애 수의 감소는 비처리 대조군 (대략 카운트당 16마리 응애)과 비교한 경우에 1 및 2 gal/에이커 MBI 206으로 처리후 제14일 (카운트당 대략 6-8마리 응애)에 관찰되었다.

[0508] 실시예 16: 긴노린제에 대한 템플라미드, FR901465 및 FR901228의 살곤충 (흡인 접촉) 활성.

[0509] 순수 화합물 템플라미드 B (MBI 206; MW 537), FR 901465 (MBI 206; MW 523) 및 FR901228 (MBI 206; MW 540)의 살곤충 활성을 흡인 접촉 생물검정 시스템을 이용하는 실험실 검정에서 시험하였다. 화합물을 100% 에탄올에 1mg/mL의 농도로 용해시켰다. 개별 4령 긴노린제, 끝에서 두번째 애벌레, 유충을 각각의 통에 2개의 해바라기 종자 및 각각의 통에 1개의 물컵 (목화 심지가 있는 접촉 컵 내의 물)이 있는 5C 러버메이드(Rubbermaid) 용기에 넣었다. 해밀턴 마이크로피펫(Hamilton Micropipette)을 이용하여 1 μ L (1 방울)의 화합물을 각각의 유충의 긴노린제 (MWB)의 복부 상에 적용하였다. 통을 러버메이드 용기에 넣고, 메쉬 뚜껑으로 캡핑하였다. 샘플당 8마리의 유충을 처리하였다. 검정물을 25°C, 12시간 명실/12시간 암실에서 인큐베이션하였다. 유충을 적용 후 제4일 및 제7일에 스코어링하였다. 모든 3개의 화합물이 MWB에 대해 접촉 활성을 나타내었으며, 모든 곤충이 죽은 것은 아니지만 다수가 명백하게 영향을 받았고 이동할 수 없었다. 제7일에 대부분의 MWB가

탈피하였고, 이는 화합물이 탈피를 억제하거나 정상 MWB 발생에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다. 따라서, FR 901465는 FR 901228 (MW 540) 및 템플라미드 B보다 긴노린재의 우수한 (87.5%) 방제를 제공하였다 (도 4).

[0510] 실시예 17: 2령 후기/3령 초기의 리구스 헤스페루스에 대한 순수 화합물의 살곤충 활성

[0511] 부르크홀데리아로부터 단리된 4가지 화합물, 템플라미드 A, 템플라미드 B, FR901465 & FR901228의 살곤충 활성을 처리된 녹색 콩 생물검정 시스템을 갖는 12웰 플레이트를 사용하여 실험실 검정에서 시험하였다. 화합물을 100% 에탄올에 1 mg/mL의 농도로 용해시키고, 이 샘플의 500 μ l를 3.5 mL의 물에 첨가하여 0.25 mg/mL 농도의 화합물을 함유하는 4 mL의 전체 부피가 되도록 하였다. 녹색 콩을 먼저 표백제 용액에서 세척한 후에 물에 넣어 세정하였다. 콩을 사용 전에 건조시킨 후에 12-웰 플레이트의 웰에 맞추어 가위로 절단하였다. 검자의 도움으로 콩을 각각의 처리물을 함유하는 15 mL 플라스틱 팔콘 튜브에 넣은 후에 정확하게 1분 동안 처리물에 침지시켰다. 하나의 콩 부분을 각 웰에 넣은 후에, 개별 2령 후기/3령 초기 리구스 헤스페루스를 브러쉬의 도움으로 웰에 넣었다. 플레이트 실러를 사용하여 트레이를 덮고, 통기를 위해 플레이트 실러에 구멍을 내었다. 리구스/웰의 수를 카운팅하고, 플레이트를 벤치 상단에 두었다. 유충을 적용후 제24시간, 제48시간 및 제120시간에 스코어링하였다. 도 5에 제시된 결과에 기초하여, 화합물 FR 901465가 91.2%의 사멸률로 가장 강력하고, 이어서 템플라미드 B가 69.2%, FR901228이 51.7%로 강력한 것으로 밝혀졌다. 템플라미드 A는 리구스 섭식 생물검정에서 비활성이었다. 이 시험에 사용된 양성 대조군은 13 μ l/10 mL의 비율의 아비드 (아베펙틴)였다.

[0512] 실시예 18: FR901228의 살선충 활성

[0513] FR 901228의 순수 샘플을 시험관내 96-웰 플라스틱 세포-배양 플레이트 생물검정을 이용하여 시험하였다. 50 μ l 수용액 중 15-20마리의 선충류를 25°C에서 24시간 기간 동안 FR 901228의 20 mg/ml 용액 3 μ l에 노출시켰다. 인큐베이션 기간이 완료되면, 결과는 화합물로 처리된 각 웰에서 어린 선충류 (J2)의 부동성의 시각적 등급에 기초하여 기록하고; 각각의 처리는 4 웰의 반복에서 시험하였다. 3개의 대조군이 각각의 시험에 포함된다; 1개의 양성 (1% 아비드) & 2개의 음성 (DMSO & 물). 시험 (T1)을 자유 생활 선충류 (FLN)를 사용하여 수행하고, 시험 (T2)를 엠. 인코그니타 선충류를 사용하여 수행하고, 샘플을 100% DMSO에 용해시켰다. FR 901228 (MW 540)은 75% 부동성을 갖는 엠. 인코그니타와 비교하여 자유 생활 선충류에 대해 75%의 부동성으로 탁월한 방제를 나타내었다.

[0514] 미생물 기탁

[0515] 하기 생물학적 물질은 미국 61604 일리노이주 페오리아 1815 엔. 유니버시티 스트리트의 애그리컬처럴 리서치 컬처 콜렉션(Agricultural Research Culture Collection (NRRL))으로 부다페스트 조약의 조항 하에 기탁되었고, 하기 번호가 주어졌다:

[0516]	<u>기탁물</u>	<u>등록 번호</u>	<u>기탁일</u>
---------------	------------	--------------	------------

[0517]	부르크홀데리아 종 A396	NRRL B-50319	2009년 9월 15일
---------------	----------------	--------------	--------------

[0518] 37 C.F.R. § 1.14 및 35 U.S.C. § 122 하에 자격이 부여된 특허상표청장에 의해 결정된 사람에게 본 특허 출원의 계류 동안 배양물에 대한 접근이 이용가능할 것임을 보장하는 조건 하에 군주가 기탁되었다. 기탁물은 기탁된 군주의 실질적으로 순수한 배양물을 나타낸다. 기탁물은 본 출원의 대응출원 또는 그의 분할출원이 제출된 국가에서 외국 특허법에 의해 요구되는 대로 이용가능하다. 그러나, 기탁물의 이용가능성은 정부 행위에 의해 부여된 특허권을 훼손하는데 본 발명을 실시할 권한을 부여하는 것이 아님을 이해하여야 한다.

[0519] 비록 본 발명이 구체적 실시양태와 관련하여 기재되었을지라도, 당업자가 다양한 등가물, 변화 및 변형을 사용하되, 여전히 본 발명의 범위 내에 있을 수 있다는 것이 명백하기 때문에 그의 세부사항은 제한적으로 해석되지 않아야 한다.

[0520] 다양한 참고문헌이 본 명세서 전반에 걸쳐 인용되고, 이들은 각각 그의 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0521]

인용 문헌:

- Anderson, et al. "The structure of thiostrepton," Nature 225: 233-235. 1970.
- Andra, "Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia (Pseudomonas) plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization." Biol. Chem. 387: 301-310. 2006.
- Arena, et al. "The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans* - correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding and biological activity." J Parasitol. 81: 286-294. 1995.
- Asolkar, et al., "Weakly cytotoxic polyketides from a marine-derived Actinomycete of the genus *Streptomyces* strain CNQ-085." J. Nat. Prod. 69:1756-1759. 2006.
- Burkhead, et al., "Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds of potatoes." Appl. Environ. Microbiol. 60: 2031-2039. 1994.
- Burkholder, W. H. "Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs." Phytopathology 40: 115-117. 1950.
- Caballero-Mellado et al., "*Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1165-1172. 2004.
- Cashion et al. "Rapid method for base ratio determination of bacterial DNA." Anal. Biochem. 81: 461-466. 1977.
- Casida, et al., US Patent No. 6,689,357.
- Chen et al. , "*Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella* " Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 1055-1059. 2007.
- Cheng, A. C. and Currie, B. J. "Meloidosis: epidemiology, pathophysiology, and management." Clin. Microbiol. 18: 383-416. 2005.

[0522]

- Coenye, T. and P. Vandamme, P. "Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches." *Environ. Microbiol.* 5: 719-729. 2003.
- Compant, et al. "Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment." *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 607-626. 2008.
- De Ley et al. "The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates." *Eur. J. Biochem.* 12: 133-142. 1970.
- Duke et al. "Natural products as sources for herbicides: current status and future trends." *Weed Res* 40: 99-111. 2000.
- Gerwick et al., US Patent No. 7,393,812.
- Gottlieb et al., US Patent No. 4,808,207.
- Gouge et al., US Patent Application Pub. No. 2003/0082147.
- Guella et al. "Almazole C, a new indole alkaloid bearing an unusually 2,5-disubstituted oxazole moiety and its putative biogenetic precursors, from a Senegalese Delesseriacean sea weed." *Helv. Chim. Acta* 77: 1999-2006. 1994.
- Guella et al. "Isolation, synthesis and photochemical properties of almazolone, a new indole alkaloid from a red alga of Senegal." *Tetrahedron*. 62: 1165-1170. 2006.
- Henderson, P. J. and Lardy H. A. "Bongkreikic acid. An inhibitor of the adenine nucleotide translocase of mitochondria." *J. Biol. Chem.* 245: 1319-1326. 1970.
- Hirota et al. "Isolation of indolmycin and its derivatives as antagonists of L-tryptophan." *Agri. Biol Chem.* 42: 147-151. 1978.
- Hu, F.-P. and Young, J. M. "Biocidal activity in plant pathogenic *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Ralstonia*, and *Xanthomonas* spp." *J. Appl. Microbiol.* 84: 263-271. 1998.

[0523]

- Huss et al. "Studies of the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates." System. Appl. Microbiol. 4: 184-192. 1983.
- Jansiewicz, W. J. and Roitman J. "Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*." Phytopathology 78: 1697-1700. 1988.
- Jeddeloh et al., WO2001/055398.
- Jansen et al. "Thiangazole: a novel inhibitor of HIV-1 from *Polyangium* Spec." Liebigs Ann. Chem. 4: 357-3359. 1992.
- Jeong et al. "Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops." Plant Disease 87: 890-895. 2003.
- Knudsen, G. R. and Spurr, J. "Field persistence and efficacy of five bacterial preparations for control of peanut leaf spot." Plant Disease 71: 442-445. 1987.
- Koga-Ban et al. "cDNA sequences of three kinds of beta-tubulins from rice." DNA Research 2: 21-26. 1995.
- Koide et al. US Patent Application Pub. No. 2008/0096879.
- Koyama et al. "Isolation, characterization, and synthesis of pimprinine, pimrinrthine, and pimprinaphine, metabolites of *Streptoverticillium olivoreticuli*." Agri. Biol. Chem. 45: 1285-1287. 1981.
- Krieg et al. "*Bacillus thuringiensis* var. tenebrionis: Ein neuer, gegenuber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp." Z. Angew. Entomol. 96:500-508. 1983.
- Kunze et al. "Thiangazole, a new thiazoline antibiotic from *Polyangium* sp (Myxobacteria Production, antimicrobial activity and mechanism of action." J. Antibiot., 46: 1752-1755. 1993.
- Leahy et al. "Comparison of factors influencing trichloroethylene degradation by toluene-oxidizing bacteria." Appl. Environ. Microbiol. 62: 825-833. 1996.

[0524]

Lessie et al. "Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*." FEMS Microbiol. Lett, 144: 117-128. 1996.

Lindquist, N. et al. "Isolation and structure determination of diazonamides A and B, unusual cytotoxic metabolites from the marine ascidian *Diazona chinensis*." J. Am Chem. Soc. 113: 2303-2304. 1991.

Lorch, H et al. "Basic methods for counting microorganisms in soil and water. In Methods in applied soil microbiology and biochemistry. K. Alef and P. Nannipieri. Eds. San Diego, CA, Academic Press: pp. 146-161. 1995.

Ludovic et al. "Burkholderia diveristy and versatility: An inventory of the extracellular products." J. Microbiol. Biotechnol. 17: 1407-1429. 2007.

Lydon, J. and Duke, S. "Inhibitors of glutamine biosynthesis." in Plant amino acids: Biochemistry and Biotechnology. B. Singh., Ed. New York, USA, Marcel Decker. pp. 445-464. 1999.

Mahenthiralingam et al. "DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III." J.Clin. Microbiol. 38: 3165-3173. 2000.

Ming, L.-J. and Epperson. "Metal binding and structure-activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin." Biochemistry 91: 46-58. 2002.

Morita et al. "Biological activity of tropolone." Biol. Pharm. Bull. 26: 1487-1490. 2003.

Nagamatsu, T. "Syntheses, transformation, and biological activities of 7-azapteridine antibiotics: toxoflavin, fervenulin, reumycin, and their analogs". Recent Res. Devel. Org. Bioorg. Chem. 4: 97 -121. 2001.

Naik et al., "Pimprine, an extracellular alkaloid produced by *Streptomyces* CDRIL-312: fermentation, isolation and pharmacological activity." J. Biotech. 88: 1-10. 2001.

Nakajima et al., "Antitumor Substances, FR901463, FR901464 and FR901465. I. Taxonomy,

[0525]

Fermentation, Isolation, Physico-chemical Properties and Biological Activities." J. Antibiot. 49: 1196-1203. 1996.

Nakajima et al. US Patent No. 5,545,542.

Nakajima et al., "Hydantocidin: a new compound with herbicidal activity." J Antibiot. 44: 293-300. 1991.

N'Diaye, I. et al., "Almazole A and amazole B, unusual marine alkaloids of an unidentified red seaweed of the family *Delesseriaceae* from the coasts of Senegal." Tet Lett. 35: 4827-4830. 1994.

N'Diaye, I. et al., "Almazole D, a new type of antibacterial 2,5-disubstituted oxazolic dipeptide from a red alga of the coast of Senegal." Tet Lett. 37: 3049-3050. 1996.

Nierman et al., "Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 14246-14251. 2004.

Okazaki et al., "Rhizobial strategies to enhance symbiotic interaction: Rhizobitoxine and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase." Microbes Environ. 19: 99-111. 2004.

Parke, J. L. and D. Gurian-Sherman, D. 2001. "Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains." Annual Reviews in Phytopathology 39: 225-258. 2001.

Parke, et al. US Patent No. 6,077,505.

Pettit, G. et al. "Isolation of Labradorins 1 and 2 from *Pseudomonas syringae*." J. Nat. Prod. 65: 1793-1797. 2002.

Pitt, et al., "Type characterization and antibiotic susceptibility of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis in the United Kingdom and the Republic of Ireland." J. Med. Microbiol. 44: 203-210. 1996.

[0526]

- Ramette et al., "Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment." Appl. Environ. Microbiol. 71: 1193-1201. 2005.
- Resi et al., "Burkholderia tropica sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 2155-2162. 2004.
- Salama et al. "Potency of spore-gamma-endotoxin complexes of *Bacillus thuringiensis* against some cotton pests." Z. Angew. Entomol. 91: 388-398. 1981.
- Selva et al., "Targeted screening for elongation factor Tu binding antibiotics." J. Antibiot. 50: 22-26. 1997.
- Takahashi, S. et al. "Martefragin A, a novel indole alkaloid isolated from a red alga, inhibits lipid peroxidation." Chem Pharm. Bull. 46: 1527-1529. 1998.
- Thompson et al. "Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme." Pest Management Science 56: 696-702. 2000.
- Takita et al., "Chemistry of Bleomycin. XIX Revised structures of bleomycin and phleomycin." J. Antibiot. 31: 801-804. 1978.
- Tran Van et al., "Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield component in low fertility sulphate acid soils of Vietnam." Plant and Soil 218: 273-284. 2000.
- Tsuruo et al., "Rhizoxin, a macrocyclic lactone antibiotic, as a new antitumor agent against human and murine tumor cells and their vincristine-resistant sublines." Cancer Res. 46: 381-385. 1986.
- Ueda et al., US Patent No. 7,396,665.
- Umehara, K. et al. "Studies of new antiplatelet agents WS-30581 A and B." J. Antibiot. 37: 1153-1160. 1984.

[0527]

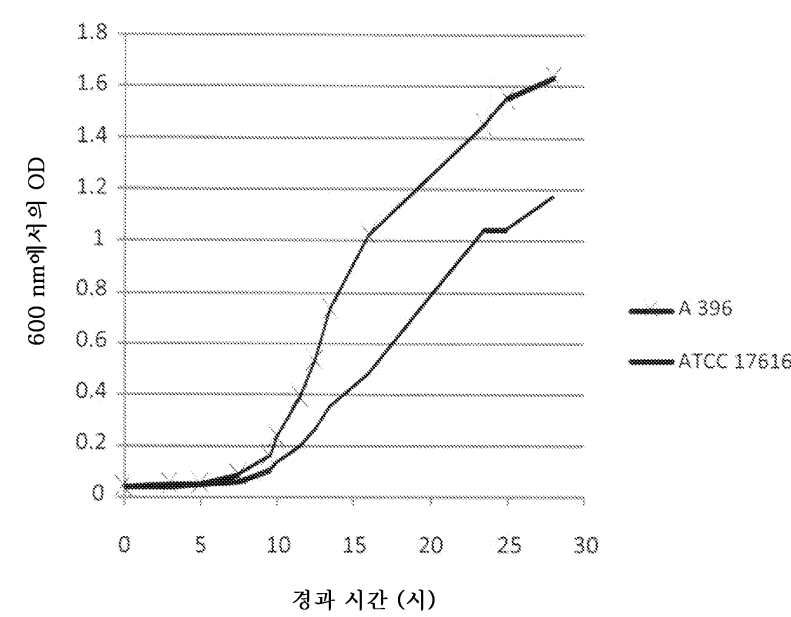
- Vandamme et al. Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens." Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 344-356. 1992.
- Vanderwall et al., "A model of the structure of HOO-Co•bleomycin bound to d(CCAGTACTGG): recognition at the d(GpT)site and implications for double-stranded DNA cleavage, Chem. Biol. 4: 373-387. 1997.
- Vermis K., et al. "Evaluation of species-specific recA-based PCR tests for genomovar level identification within the *Burkholderia cepacia* complex." J. Med. Microbiol 51: 937-940. 2002.
- Watanabe, H. et al. "A new antibiotic SF2583A, 4-chloro-5-(3'indoly)oxazole, produced by *Streptomyces*." Meiji Seika Kenkyu Nenpo 27: 55-62. 1988.
- Wayne et al., "Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 37: 463-464. 1987.
- Werner et al., "Uptake of indolmycin in gram-positive bacteria." Antimicrob Agents Chemotherapy 18: 858-862. 1980.
- Wilson et al. "Toxicity of rhizonin A, isolated from *Rhizopus microsporus*, in laboratory animals." Food Chem. Toxicol. 22: 275-281. 1984.
- Zeck W.M. "Ein Bonitierungsschema zur Feldauswertung von Wurzelgallenbefall. Pflanzenschutznachrichten." Bayer 24,1: 144-147. 1971.
- Zhang et al., US Patent No. 7,141,407.
- Zhou et al., "Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *Burkholderia cepacia* complex isolated from patients with cystic fibrosis." Antimicrobial Agents and Chemotherapy 51: 1085-1088. 2007.

수탁번호

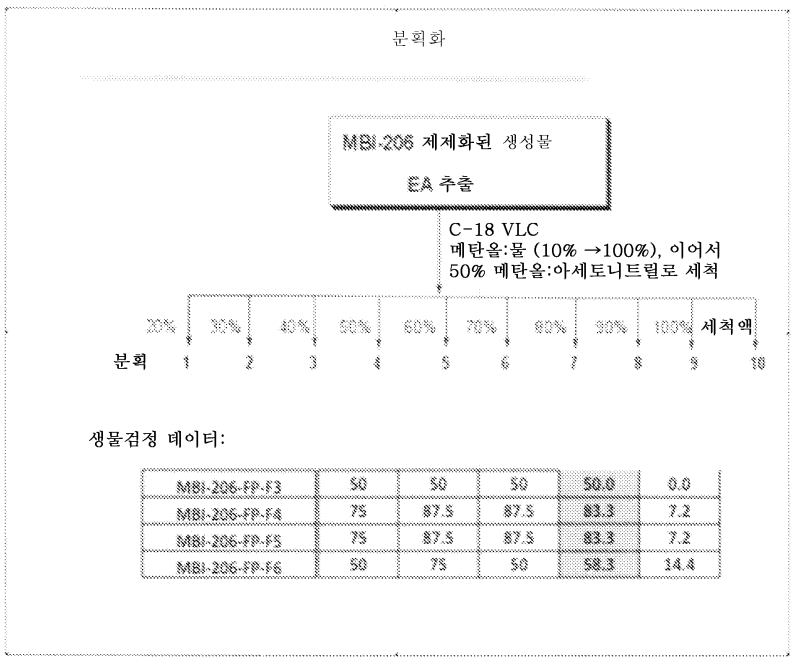
기탁기관명 : 애그리컬처럴 리서치 컬처 컬렉션
 수탁번호 : NRRLB-50319
 수탁일자 : 20090915

도면

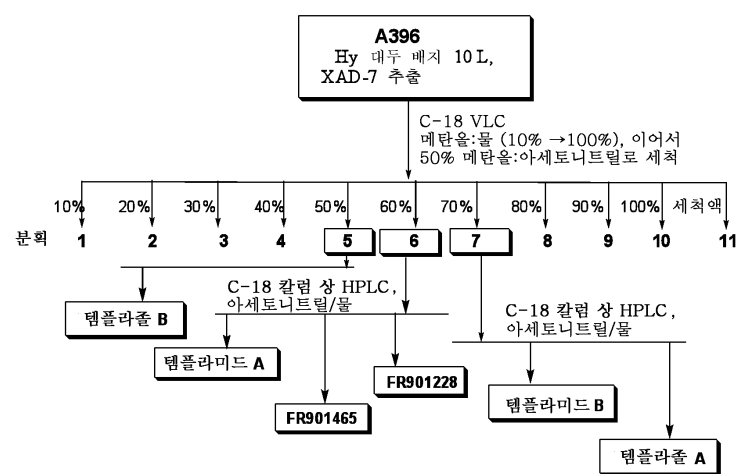
도면1



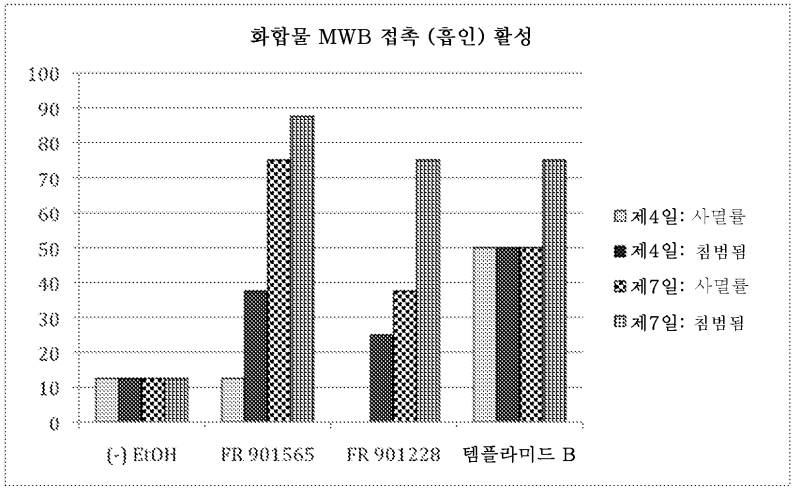
도면2



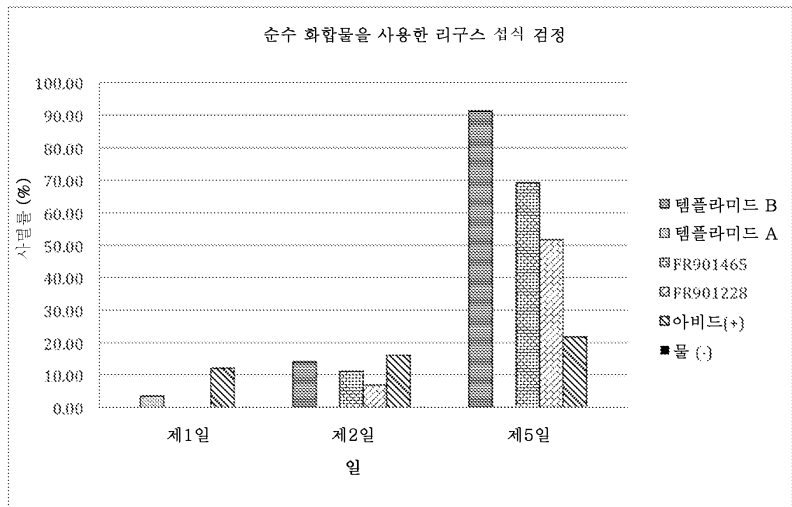
도면3



도면4



도면5



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Marrone Bio Innovations, Inc.

<120> ISOLATED BACTERIAL STRAIN OF THE GENUS BURKHOLDERIA
AND PESTICIDAL METABOLITES THEREFROM-FORMULATIONS AND USES

<130> MOI-42023-25-PCT

<150> 61528153

<151> 2011-08-27

<150> 61528149

<151> 2011-08-27

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Primer

<400> 1

agagtttgat cctggctcag 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Primer

<400> 2

ccgtcaattc ctttgagttt 20

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Primer

<400> 3

gtgccagccg ccgcgg 16

<210> 4

<211> 16

<212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 4
 gcaacgagcg caaccc 16

<210> 5
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 5
 aaggaggtgw tccarcc 17

<210> 6
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 6
 gggttgcgct cgttg 15

<210> 7
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 7
 gwattaccgc ggckgctg 18

<210> 8
 <211> 871
 <212> DNA
 <213> Burkholderia
 <220><223> strain A396
 <400> 8
 tgcagtcgaa cgcgagcacg ggtgcttgca cctggtggcg agtggcgaac gggtagtaaa 60

tacatcgga catgtcctgt agtgggggat agcccgcgga aagccggatt aataccgcat 120
acgatctacg gatgaaagcg ggggatcttc ggacctcgcg ctatagggtt ggccgatggc 180
tgattagcta gttggtgggg taaaggccta ccaaggcgac gatcagtagc tggctctgaga 240
ggacgatcag ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacgggag gcagcagtgg 300
ggaatttttg acaatggggg aaacctgat ccagcaatgc cgcgtgtgtg aagaaggcct 360

tcgggttgta aagcactttt gtccggaaag aaatcctttg ggctaatacc ccggggggat 420
gacggtaccg gaagaataag caccggctaa ctacgtgcca gcagccgagg taatacgtag 480
ggtgagcgcg ttaatcgga ttactgggcg taaagcgtgc gcaggcggtt tgttaagaca 540
gatgtgaaat ccccgggctt aacctgggaa ctgcatttgt gactggcaag ctagagtatg 600
gcagaggggg gtagaattcc acgtgtagca gtgaaatgcg tagagatgtg gaggaatacc 660
gatggcgaag gcagccccct gggccaatac tgacgtcat gcacgaaagc gtggggagca 720
aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cctaaacgat gtcaactagt tgttggggat 780

tcatttcctt agtaacgtag ctacgcgtga agttgaccgc ctggggagta cggtcgcaag 840
attaaatmga gggtkgkktg kkggggggaa a 871

<210> 9
<211> 1453
<212> DNA
<213> Burkholderia
<220><223> strain A396
<400> 9

gtcatgaatc ctaccgtgtg gaccgtctc cttgcggtta gactagccac ttcttgtaaa 60
accactccc atggtgtgac gggcgggtgtg tacaagacc gggaacgtat tcaccgcggc 120
atgctgatcc gcgattacta gcgattccag ctcatgcac tcgagttgca gagtgcgaatc 180
cggactacga tcggttttct gggattagct cccctcgcg ggttggcaac cctctgttcc 240

gaccattgta tgacgtgtga agccctacc ataaggcca tgaggacttg acgtcatccc 300
caccttctc cggtttgtca ccggcagtct ccttagagtg ctcttgcgta gcaactaagg 360
acaagggttg cgctcgttc gggacttaac ccaacatctc acgacacgag ctgacgacag 420
ccatgcagca cctgtgtatc ggttctcttt cgagcactcc cgaatctctt caggattccg 480
accatgtcaa gggtaggtaa ggtttttcgc gttgcatcga attaatccac atcatccacc 540
gcttgtgcgg gtccccgtca attcctttga gttttaatct tgcgaccgta ctccccaggc 600
ggtcaacttc acgcgttagc tacgttacta aggaaatgaa tccccacaa ctagttgaca 660

tcgttttaggg cgiggactac cagggtatct aatcctgttt gctccccacg ctttcgtgca 720
 tgagcgtcag tattggccca gggggctgcc ttcccatcg gtattcctcc acatctctac 780
 gcatttcaact gctacacgtg gaattctacc cccctctgcc atactctagc ttgccagtca 840
 caaatgcagt tcccaggta agcccgggga ttccacatct gtcttaacaa accgcctgcg 900
 cagcctttac gcccagtaat tccgattaac gctcgacccc tacgtattac cgcggctgct 960
 ggcacgtagt tagccggtgc ttattcttcc ggtaccgtca tcccccgagg gtattagccc 1020
 aaaggatttc tticcggaca aaagtgcctt acaaccgaa ggccttcttc acacacgcgg 1080

cattgctgga tcagggtttc cccattgtc caaaattccc cactgctgcc tcccgtagga 1140
 gtctgggccc tgctcagtc ccagtgtggc tgatcgtcct ctacagaccag ctactgatcg 1200
 tcgccttggc aggcctttac cccaccaact agctaactcag ccatcgcca accctatagc 1260
 gcgaggtccg aagatcccc gctttcatcc gtagatcgta tgcggtatta atccggcttt 1320
 cgccgggcta tccccacta caggacatgt tccgatgtat tactcacccg ttgcgacctc 1380
 gccaccaggt gcaagacccc gtgctgccgt tcgacttgca tgtgtaaggc atgccgccag 1440
 cgttcaatct gag 1453

<210> 10

<211> 860

<212> DNA

<213> Burkholderia

<220><223> strain A396

<400> 10

ccaggcggc acttcacgcg ttagctacgt tactaaggaa atgaatcccc aacaactagt 60
 tgacatcggt tagggcgtgg actaccaggg tatctaatec tgtttgtcc ccacgctttc 120
 gtgcatgagc gtcagtattg gcccaggggg ctgccttcgc catcggtatt cctccacatc 180
 tctacgatt tactgctac acgtggaatt ctacccccct ctgccatact ctagcttgcc 240
 agtcacaaat gcagttccca ggttaagccc ggggatttca catctgtctt aacaaaccgc 300
 ctgcgcacgc ttacgcccga gtaattccga ttaacgctcg caccctacgt attaccgcgg 360

ctgctggcac gtagttagcc ggtgcttatt ctccggtagc cgtcateccc ccgggggtatt 420
 agcccaaagg atttctttcc ggacaaaagt gctttacaac ccgaaggcct tcttcacaca 480
 cgcggcattg ctggatcagg gtttcccca ttgtcaaaa tccccactg ctgcctcccc 540
 taggagtctg ggccgtgtct cagtccaggt gtggctgac gtctctcag accagctact 600
 gatcgtcgcc ttggtagccc ttatccccc caactagcta atcagccatc ggccaaccct 660
 atagcgcgag gtccgaagat cccccgttt catccgtaga tcgtatgcgg tattaatccg 720

gctttcgccg ggctatcccc cactacagga catgttccga tgtattactc acccgttcgc 780

cactcgccac cagggtgcaag caccctgtct gccgttcgac ttgcatgtgt aaggcatgcc 840

gccagcgttc aatctgagtg 860

<210> 11

<211> 1152

<212> DNA

<213> Burkholderia

<220><223> strain A396

<400> 11

tccgattact gggcgtaagc gtgcgcaggc ggtttgtaa gacagatgtg aaatccccgg 60

gcttaacctg ggaactgcat ttgtgactgg caagctagag tatggcagag gggggtagaa 120

ttccacgtgt agcagtgaat tgcgtagaga tgtggaggaa taccgatggc gaaggagacc 180

ccctgggcct atactgacct tcatgctcga aagcgtgagg acccaaccgg attagatgcc 240

ctgataggcc atgccccaca ccatgccatg ttttaggggc ccatttcctt agggaggcag 300

ctatggggaa ttttgacaa tgtgggaaac cctgatccaa caatgccgcg tgtgtgaata 360

aggccttcgg gttgtaaagc acttttatcc ggatagattc cttttgggct aaacctccgt 420

aggggatgac ggtaccggaa gaataaccac cgggtaacta cgtgccagca gccgcggtaa 480

tacgtagggt gcgagcgtaa atcggaatta ctgggcgtaa agcgtgcgca ggcggtttgt 540

taagacagat gtgaaatccc cgggcctaac ctgggaactg catttgtgac tggcaagcta 600

gagtatggca gacgggggta gaattccacg ttagcagtg aaatgcgtag agatgtggag 660

gaataccgat gggcgaagca gctcctgggg caatactgac gctcatgcac aagatcgtgc 720

gaaacaaaca ggataaaacc cctgtattcc acgccccaaa cgatgtccac caagttgttg 780

gcgatccttt ccttcgtatc gtagctacgc gggaatttga cccctgggg actaggccgc 840

atataaaact caagggaatt ccgggggacct ccagagctgt gtatgatgtg attattccga 900

tgcgcggaaa accttcctta tctttgaatg gcgggtactc tgaaaattgc ggagtgtctg 960

aaaacaccga acccgggtct ttctgcgtgt cctccctcgt gtgggatatg ctggatatcc 1020

cgcagacgca tctttgactt agtgcctcca aaactgagag ctgggaggac tcgagagggg 1080

atccctgcct ccccggttg ggtgctcccc ttatggggga aacaggatca cggggggatc 1140

atccatacc ta 1152

<210> 12

<211> 1067

<212> DNA

<213> Burkholderia

<220><223> strain A396

<400> 12

tctaaggaga ctgccggtga caaacccgag gaaggtgggg atgacgtcaa gtcctcatgg	60
cccttatggg tagggcttca cacgtcatac aatggtcgga acagagggtt gccaacccgc	120
gagggggagc taatcccaga aaaccgatcg tagtccggat tgcactctgc aactcgagtg	180
catgaagctg gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg	240
tcttgtacac accgcccgtc acaccatggg agtgggtttt accagaagtg gctagtctaa	300
ccgcaaggag gacggtcacc acggtaggat tcatgactgg ggtgaagtgc taacaaggta	360
gccgtatcgg aaggtgcggc tggatcacct ccttaaacc tttggcctaa taaccccggg	420
ggaataagta ccgaaaaaaaa aaaaaactgg ataacttccg tgccacaacc cgcgaaaaa	480
tctagggggg gggagcttaa atggaaattt acggggccgt aaagcgtgcg caggcggttt	540
gtaaacacag atgtgaaatc cccgggctta acctgggaac tgcatttgtg actggcaagc	600
tagagtatgg cacagggggg tagaattcca cgtgtagcat tgaatgcata gagatgagag	660
gataccgatg gagaaggcg cccccgggga caatatgacg cctatgccac aaagctgtgg	720
cacaataggt taaatacctg tgttgtcccc gcctaaacag attacacttg ttgtgggtat	780
tttctcataa aatactacac acgggagaat aactggggg gcttcgtcaa ttatcacaac	840
aatgattgcg ggcacccacg ggggtagatg ggtaataaat cgacggcaac tatctactta	900
cttgggatgat cgcacagatt gggcgggaga gaagagaaca gcgtgtgtgt gtcctccgc	960
gagtgatagg taatcggaca atactttgac aggacttaac tgggtagcgg gatcgagtgg	1020
attcccgctg gatggcctcc gcaggtacgg cagctgggga ttacatc	1067

<210> 13

<211> 1223

<212> DNA

<213> Burkholderia

<220><223> strain A396

<400> 13

ttgcttacga cttcacccca gtcataatc ctaccgtggg gaccgtcttc cttgcggtta	60
gactagccac ttttggtaaa acccactccc atggtgtgac gggcgggtgtg tacaagacc	120
gggaacgtat tcaccgcggc atgctgatcc gcgattacta gcgattccag cttcatgcac	180
tcgagttgca gagtgaatc cggactacga tcggttttct gggattagct cccctcgcg	240

ggttggcaac ccctgttcc gaccattgia tgacgtgtga agccctaccc ataaggcca 300
 tgaggacttg acgtcatccc caccctctc cggtttgtca ccggcagtct ccttagagtg 360

ctcttgcgta gcaactaagg acaagggttg cgtcgttgc gggacttaac ccaacatctc 420
 acgacacgag ctgacgacag ccatgcagca cctgtgtatc ggttctcttt cgagcactcc 480
 cgaatctctt caggattccg accatgtcaa gggtaggtaa ggtttttcgc gttgcatcga 540
 attaatccac atcateccacc gcttgtgcgg gtccccgtca attcctttga gttttaatct 600
 tgcgaccgta ctccccaggc ggtcaacttc acgcgttagc tacgttacta aggaaatgaa 660
 tccccaaaca ctagttgaca tcgtttaggg cgtggactac cagggtatct aatcctgttt 720
 gctccccacg ctttctgca tgagcgtcag tattggccca gggggctgcc ttcgcatcg 780

gtattctctc acatctctac gcatttact gctacacgtg gaattctacc cccctctgcc 840
 atactctagc ttgccagta caaatgcagt tcccaggtta agcccgggga ttacacatct 900
 gctttaacaa accgcctgcg cacgctttac gccagtaat tccgattaac gctcgacccc 960
 tacgtattac cgcggctgct ggcacgtagt tagccgtgc ttattctgcg gtaccgtcat 1020
 cccccgggta tagcccaaag gattctttcg acaaagtgtt ttacaccga tgtctctcac 1080
 acacgcgcat gcgatcagg ttccccatg tcaaagtcca ctgctgctcg taggtctgga 1140
 cgggttcagt tcaatgtgac tgatcgtctt tcgacaacta ctgaacgtcc ctgtagctta 1200

cccaccaact agctatagca tgc 1223

<210> 14
 <211> 1216
 <212> DNA
 <213> Burkholderia
 <220><223> strain A396
 <400> 14

ccgagctgac gacagccatg cagcacctgt gtatcggttc tctttcgagc actcccgaat 60
 ctcttcagga ttccgacat gtcaagggtta ggtaagggtt ttcgcgttgc atcgaattaa 120
 tccacatcat ccaccgcttg tgcgggtccc cgtcaattcc tttgagtttt aatcttgca 180
 ccgtactccc caggcggtca acttcacgcg ttagctacgt tactaaggaa atgaatcccc 240
 aacaactagt tgacatcgtt tagggcgtgg actaccaggg tatctaacc tgtttgtccc 300

ccacgctttc gtgcatgagc gtcagtattg gccagggggg ctgccttcgc catcggtatt 360
 cctccacatc tctacgcatt tcaatgctac acgtggaatt ctacccccct ctgccatact 420
 ctactgtgcc agtcacaaat gcagttccca ggtaagccc ggggatttca catctgtctt 480

aacaaaccgc ctgcgcacgc tttagcccca gtaattccga ttaacgctcg caccctacgt 540
attaccgcgg ctgctggcac gtagttagcc ggtgcttatt cttccggtac cgtcatcccc 600
ccgggggtatt agcccaaagg atttctttcc ggacaaaagt gctttacaac ccgaaggcct 660
tcctcacaca cgcggcattg ctggatcagg gtttcccca ttgtccaaaa tccccactg 720

ctgcctcccg taggagtctg ggccgtgtct cagtcccagt gtggctgac gtctctcag 780
accagctact gatcgtcgcc ttggtaggcc ttacccac caactagcta atcagccatc 840
ggccaacct atagcgcgag gtccgaagat cccccgttt catccgtaga tcgtatgcgg 900
tattaatccg gctttcgccg ggctatcccc cactacagga catgttccga tgtattactc 960
accggttcgc cactcgcccc aggtgcaagc acccgtgctg ccgttcgact tgcattgtga 1020
gcatgcgcag cgtcatctac taaataaaca actctaagaa tttttgccg agggcctcta 1080
aacactcggg gcgtcgagag agactacgga ttaggagcat cctctgtct ctaggtatgt 1140

gttgtgcct ctctcacaga ggaggggacg cacgacggag ccatcgggga cgacaacatg 1200
tacgatatac tatcta 1216
<210> 15
<211> 1194
<212> DNA
<213> Burkholderia
<220><223> strain A396
<400> 15
ttcttcggta ccgtcatccc cccggggtat tagcccaaag gatttcttc cggacaaaag 60
tgctttacaa ccgaaggcc ttcttcacac acgcggcatt gctggatcag ggtttcccc 120
attgtccaaa attccccact gctgcctccc gtaggagtct gggccgtgtc tcagtcccag 180
tgtggctgat cgtcctctca gaccagctac tgatcgtcgc cttggtaggc ctttacccca 240

ccaactagct aatcagccat cggccaaccc tatagcgcga ggtccgaaga tccccgctt 300
tcacccgtag atcgtatgag gtattaatcc ggttttcgcc gggtatccc cactacagg 360
acatgttcg atgtattact caccgttcg cactcgcca ccaggtgcaa gcaccgtgc 420
tgccgttcga cttgcatgtg taaggcatgc cggcagcgtt caatctgagc catgatcaaa 480
ctctgagggg gggggccttc aacggaacga ctgggcaaaa agcgtgcca ggcgttttgt 540
taagacagat gtgaaacccc ggggcttaac ctggaactg catttgtgac tggaaagcta 600
gagtatggca gaggggggta gaattccacg ttagcattg aaatgcgtag aaatggagag 660

gaataccgat gggagagggc agccccgtg ggcaaatact ggcgcttatg aacaaagtgt 720

gggcgcgcgcg ccgggatatg ttccctctggg atatccccc cctaaactgc ttacaaatat	780
tgtgtgggaa actttttctc taaaaaatag aacacaacgg gagatcac ccccgggggg	840
ccaccgccag attaaacccc caaaaagtat ttggcgggca ccccccggg gggtgagatg	900
gggtaaaata aatccgtgcg acgagcaaac cctcccaca cctgggatgg tcgcgaccac	960
agatgagatg cgggcggaga gaacgatacc caagcgtggt tgtttgcctg catccctcc	1020
gtcgggagtg gatatagtag agtaattacg gcacgactgc atttttttt cttcagtaca	1080
ccttatcaca ctgttggatg caccgcgaga aatccggagg tgtgagtact cccccctct	1140
cctcgggatg tgtcggcgct cccttctccc gttcaggggt gggtagcac cgcg	1194