



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0038048  
(43) 공개일자 2021년04월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A01N 25/00 (2021.01) A01N 43/653 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A01N 25/00 (2013.01)  
A01N 43/653 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2019-0120667  
(22) 출원일자 2019년09월30일  
심사청구일자 2019년09월30일

(71) 출원인  
고려대학교 산학협력단  
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)  
(72) 발명자  
박민영  
서울특별시 강북구 삼각산로24길 7 (수유동)  
김범석  
서울특별시 용산구 회나무로42길 39-17, 303호 (이태원동)  
(74) 대리인  
특허법인 남앤남

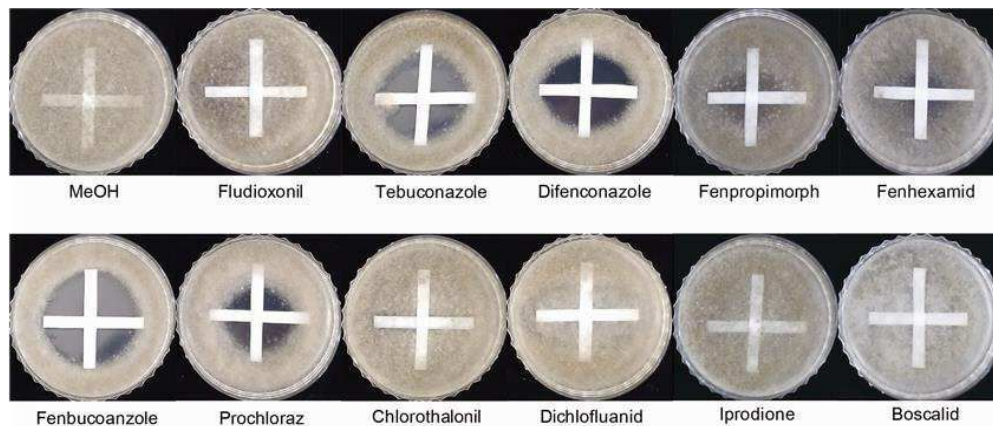
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 스키토스타틴 및 살균제의 상승작용적 효과

(57) 요약

본 발명은 스키토스타틴(Schizostatin)을 유효성분으로 포함하는 살균제 보조용 조성물; 스키토스타틴을 유효성분으로 포함하는 살균제 조성물; 스키토스타틴 및 살균제를 포함하는 식물병 방제용 조성물; 및 상기 식물병 방제용 조성물을 이용한 잣빛곰팡이병 방제방법에 관한 것이다. 본 발명의 스키토스타틴(Schizostatin)은 DMI계 살균제와 혼용하는 경우, 살균제 단독 사용과 대비하여 적은 양의 DMI계 살균제만으로도 우수한 살균·살진균 효과를 갖는다. 따라서 상기와 같은 특징을 갖는 스키토스타틴(Schizostatin)을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은, 병원균의 살균제 내성 문제와 환경에 끼치는 영향에 대한 우려를 갖는 기존 살균제의 사용 약량을 감소시킬 수 있는 보조용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|               |                                                      |
|---------------|------------------------------------------------------|
| 과제고유번호        | 2017R1D1A1B03027996                                  |
| 부처명           | 교육부                                                  |
| 과제관리(전문)기관명   | 한국연구재단                                               |
| 연구사업명         | 이공학 개인기초연구지원사업                                       |
| 연구과제명         | 식물 병원성 세균의 type III secretion을 억제하는 천연물 유래 저해제의 작용 기 |
| 전 및 구조에 관한 연구 |                                                      |
| 기 여 율         | 1/1                                                  |
| 과제수행기관명       | 고려대학교                                                |
| 연구기간          | 2017.06.01 ~ 2020.05.31                              |

---

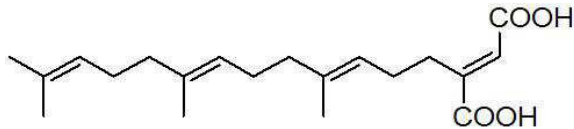
## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기 화학식 1의 스킴조스타틴(Schizostatin)을 유효성분으로 포함하는 살균제 보조용 조성물:

[화학식 1]



#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 살균제는 DMI계 살균제인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 DMI계 살균제는 트리플루미졸, 디페노코나졸, 테부코나졸, 브롬코나졸, 사이프로코나졸, 펜부코나졸, 플루실라졸, 플루트리아폴, 헥사코나졸, 프로피코나졸, 테트라코나졸, 트리아디메폰, 트리아디메놀, 트리플루미졸, 비테르타놀, 이미벤코나졸, 디니코나졸, 디니코나졸-M, 에폭시코나졸, 플루퀸코나졸, 프로클로라즈, 메토코나졸, 이프코나졸, 마이크로부타닐, 펜코나졸, 페나리몰, 페프라조에이트, 피리페녹스, 트리폴린, 디클로부트라졸, 플루오트리마졸, 이마잘릴, 이마잘릴·술페이트, 시메코나졸, 트리티코나졸, 에타코나졸, 누아리몰, 아자코나졸, 플루코나졸, 옥스포코나졸, 부티오베이트, 프로티오코나졸, 나프티펜, 유니코나졸 P, 비니코나졸 및 보리코나졸로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 스킴조스타틴(Schizostatin)은 살균제와 함께 사용되는 경우 살균제의 약효를 상승시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 스킴조스타틴(Schizostatin)은 살균제와 함께 사용되는 경우 살균제의 저항성을 억제시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 6

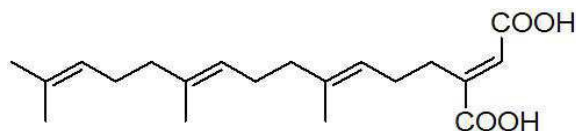
제5항에 있어서,

상기 스킴조스타틴(Schizostatin)은 살균제와 함께 사용되는 경우 살균제의 저항성에 따라 증대되는 스테롤 14-디메틸라아제의 합성을 억제시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 7

하기 화학식 1의 스킴조스타틴(Schizostatin)을 유효성분으로 포함하는 살균제 조성물:

[화학식 1]



#### 청구항 8

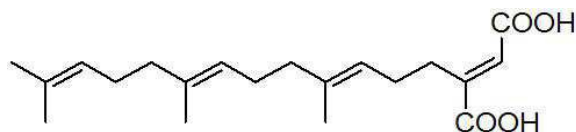
제7항에 있어서,

상기 조성물은 DMI계 살균제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 살균제 조성물.

#### 청구항 9

하기 화학식 1의 스킴조스타틴(Schizostatin) 및 살균제를 유효성분으로 포함하는 식물병 방제용 조성물:

[화학식 1]



#### 청구항 10

제9항에 있어서,

상기 살균제는 DMI계 살균제인 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 조성물.

#### 청구항 11

제10항에 있어서,

상기 DMI계 살균제는 트리플루미졸, 디페노코나졸, 테부코나졸, 브롬코나졸, 사이프로코나졸, 펜부코나졸, 플루실라졸, 플루트리아폴, 헥사코나졸, 프로피코나졸, 테트라코나졸, 트리아디메폰, 트리아디메놀, 트리플루미졸, 비테르타놀, 이미벤코나졸, 디니코나졸, 디니코나졸-M, 에폭시코나졸, 플루퀸코나졸, 프로클로라즈, 메토코나졸, 이프코나졸, 마이크로부타닐, 펜코나졸, 페나리몰, 페프라조에이트, 피리페녹스, 트리폴린, 디클로부트라졸, 플루오트리마졸, 이마잘릴, 이마잘릴·술페이트, 시메코나졸, 트리티코나졸, 에타코나졸, 누아리몰, 아자코나졸, 플루코나졸, 옥스포코나졸, 부티오베이트, 프로티오코나졸, 나프티펜, 유니코나졸 P, 비니코나졸 및 보리코나졸 선택되는 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 조성물.

#### 청구항 12

제9항에 있어서,

상기 조성물은 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 푸자리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinum*), 콜레토트리쿰 오비쿨레어(*Colletotrichum orbiculare*), 콜레토트리쿰 그로에오스포리오이테스(*Colletotrichum gloeosporioides*), 라이조푸스 스톨로니퍼(*Rhizopus stolonifer*) 및 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 식물 병원균에 대해 방제활성을 갖는 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 조성물.

#### 청구항 13

제9항에 있어서,

상기 식물병은 잣빛곰팡이병인 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 조성물.

#### 청구항 14

제9항에 있어서,

상기 스킴조스타틴(Schizostatin) 및 살균제는 1 : 2~30의 중량비로 조합되는 것을 특징으로 하는 식물병 방제

용 조성물.

## 청구항 15

제9항 내지 제14항 중 어느 한 항의 조성물을 식물체, 종자 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 잣빛곰팡이병 방제방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 스킴조스타틴(Schizostatin)을 유효성분으로 포함하는 살균제 보조용 조성물; 스킴조스타틴을 유효성분으로 포함하는 살균제 조성물; 스킴조스타틴 및 살균제를 포함하는 식물병 방제용 조성물; 및 상기 식물병 방제용 조성물을 이용한 잣빛곰팡이병 방제방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 일반적으로, 잣빛곰팡이병은 딸기, 토마토, 오이 등의 채소류와 사과, 포도 등 200가지 이상의 식물에 병을 일으키는 중요 식물병 중 하나이다.

[0003] 잣빛곰팡이병을 일으키는 병원균인 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea* Pers.:Fr.)는 균핵이나 분생포자의 형태로 토양이나 병든 식물체의 잔재에서 겨울을 지내고 1차 전염원이 되며, 2차 전염은 기주작물의 병반 상에 형성된 분생포자가 비산하여 이루어진다. 20℃ 전, 후의 저온과 다습 조건이 가장 중요한 다 발생 원인이며, 특히 시설재배지에서 피해가 크다. 잎, 줄기, 과실 등 감염된 식물체의 다양한 부위에서 발생하며, 작물의 생육시기에 발생할 뿐 아니라, 수확 후 저장, 운송중인 작물에도 발병하여 큰 피해를 준다.

[0004] 잣빛곰팡이병의 방제는 살균제를 이용한 화학적 방제, 경종적 방제, 저항성 품종의 이용 등 다양하게 이뤄지고 있으며, 주로 화학적 방제에 의존하고 있다. 잣빛곰팡이 방제용 살균제로는 벤지미다졸, 다이카르복사마이드, 아닐리노피리미딘, 스트로빌루린, 하이드록시 아닐리드, 아졸, 페닐피롤 등이 있다. 이 중 아졸계 살균제가 속한 DMI계(demethylation inhibitors) 살균제는 흰가루병, 잣빛 곰팡이병원균 등 넓은 항균활성 스펙트럼을 갖는 살균제이며, 진균의 세포막 형성에 필수적인 에르고스테롤의 생합성 과정에서, 14-알과 디메틸라아제의 작용을 억제하는 작용기작을 갖는다.

[0005] 보트리티스 시네레아는 분생포자를 통한 생식력과 유전적 적응력으로 다양한 살균제 저항성의 위험성이 큰 병원균으로 분류되고 있다. 오랜기간 잣빛곰팡이병 방제 약제로 사용되어 왔던 벤지미다졸 및 다이카르복사마이드 살균제가 약제 저항성균의 출현이 보고되었다(Elad et al., 1988; Faretra et al., 1989). 약제간 교차 저항성과 이중저항성을 나타내기도 한다. 벤지미다졸계 살균제의 저항성 문제를 해결하기 위해 다이카르복사마이드계 살균제(프로시미돈, 빈클로졸린, 이프로디온)가 개발되었으나 토마토, 오이, 딸기 등에서 저항성균의 출현이 보고되었다(Murakoshi and Hosaya, 1982). 다중 저항성균을 방제하기 위해 페닐피롤 및 에르고스테롤 합성 저해제 등이 개발되었으나 계속되는 약제 저항성균의 출현이 문제점으로 대두되고 있다.

[0006] 병원균에 약제 저항성이 나타나는 주요 기작으로는 살균제의 특정 타겟 부위가 돌연변이되거나 타겟 부위의 과발현에 의하여 약제에 대한 감수성이 저하되는 경우가 있다.

[0007] 이러한 저항성의 발생은 단인자 돌연변이에 따라 순간적으로 발생하거나 다인자 돌연변이에 의하여 점진적으로 발생할 수 있다. 또한, 병원균 체내 대사과정을 통해 살균제가 형태로 변형되어 무독성화되는 경우가 있다. 그래서 몇몇 살균제는 활성이 없는 전단계의 살균제로 살포되어 병원균 세포 내에서 유효한 형태가 되어 약효를 나타낸다. 곰팡이에는 ABC transporter나 MFS transporter와 같은 세포외로 물질을 배출하는 시스템이 존재한다. 이들 transporter에 의해 살균제가 체외로 배출되어 병원균의 분리 균주가 감수성이 저하된 경우가 있다. 특정 transporter가 다른 작용기작을 갖는 다수의 살균제를 배출시킬 경우 다중 약물저항성(MDR)이 나타난다. 잣빛곰팡이병원균에서 살균제를 배출 transporter를 갖는 분리 균주가 개체군에서 우세해지는 경향이 보고되었다(Kretschmer et al. 2009).

[0008] 이러한 병원균의 살균제 내성을 막고자 약제 살포 시 계통이 다른 등록약제를 번갈아 살포한다. 또한, 독성물질이 작물과 환경에 미치는 영향을 우려하여 살균제의 절대적인 사용량을 줄이기 위해 기존에 상업적으로 사용하는 살균제를 혼합하여 사용하거나 살균제에 페놀산이나 벤조 유사체를 혼합하여 인체 병원균 혹은 작물의 수확 후 저장병을 방제하는 효과가 증가함이 보고되었다(Kim et al., 2008, 2010; Faria et al., 2011; Kim and

Campbell, 2011).

[0009] 한편, 스킴조스타틴(Schizostatin)은 미생물에 의해 생산되는 생분해성이 높은 환경친화적인 소재로서, 자세하게는 스킴조필럼 커뮴(*Schizophyllum commune*)이 생성하는 대사산물 중 하나로서 스쿠알렌의 생합성 저해제로서 알려져 있다.

[0010] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 천연 항균물질과의 조합으로 병원균의 살균제 내성 문제와 환경에 끼치는 영향에 대한 우려를 갖는 기존 살균제의 사용 약량을 줄이고, 잿빛곰팡이병을 포함한 식물병원성 진균에 대한 항균 활성을 증가시킴으로써 효과적으로 식물병을 방제할 수 있는 소재를 개발하던 중, 스킴조스타틴(Schizostatin)을 DMI계 살균제와 혼용하여 적용하는 경우 적은 양의 DMI계 살균제만으로도 잿빛곰팡이병원균 방제에 효과가 우수함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2018-0008960호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0012] 따라서 본 발명의 목적은 스킴조스타틴(Schizostatin)을 종래 살균제에 혼용하여 사용함으로써 살균제의 효과를 상승시킬 수 있는 보조용 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 스킴조스타틴(Schizostatin)을 유효성분으로 포함하는 살균제 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 스킴조스타틴(Schizostatin) 및 살균제를 유효성분으로 포함함으로써 식물병 방제 효과가 우수한 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 이용하여 잿빛곰팡이병을 효과적으로 방제하는 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0016] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 스킴조스타틴(Schizostatin)을 유효성분으로 포함하는 살균제 보조용 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 살균제는 DMI계 살균제일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 DMI계 살균제는 트리플루미졸, 디페노코나졸, 테부코나졸, 브롬코나졸, 사이프로코나졸, 펜부코나졸, 플루실라졸, 플루트리아폴, 헥사코나졸, 프로피코나졸, 테트라코나졸, 트리아디메폰, 트리아디메놀, 트리플루미졸, 비테르타놀, 이미벤코나졸, 디니코나졸, 디니코나졸-M, 에폭시코나졸, 플루퀸코나졸, 프로클로라즈, 메토코나졸, 이프코나졸, 마이크로부타닐, 펜코나졸, 페나리몰, 페프라조에이트, 피리페녹스, 트리폴린, 디클로부트라졸, 플루오트리마졸, 이마잘릴, 이마잘릴·술페이트, 시메코나졸, 트리티코나졸, 에타코나졸, 누아리몰, 아자코나졸, 플루코나졸, 옥스포코나졸, 부티오베이트, 프로티오코나졸, 나프티펜, 유니코나졸 P, 비니코나졸 및 보리코나졸로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 스킴조스타틴(Schizostatin)은 살균제와 함께 사용되는 경우 살균제의 약효를 두드러지게 상승시킬 수 있다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 스킴조스타틴(Schizostatin)은 살균제와 함께 사용되는 경우 살균제의 저항성을 효과적으로 억제시킬 수 있다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 스킴조스타틴(Schizostatin)은 살균제와 함께 사용되는 경우 살균제의 저항성에 따라 증대되는 스테롤 14-디메틸라아제의 합성을 효과적으로 억제시킬 수 있다.

- [0022] 또한, 본 발명은 스킴조스타틴(Schizostatin)을 유효성분으로 포함하는 살균제 조성물을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 DMI계 살균제를 더 포함할 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 스킴조스타틴(Schizostatin) 및 살균제를 포함하는 식물병 방제용 조성물을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 살균제는 DMI계 살균제일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 DMI계 살균제는 트리플루미졸, 디페노코나졸, 테부코나졸, 브롬코나졸, 사이프로코나졸, 펜부코나졸, 플루실라졸, 플루트리아폴, 헥사코나졸, 프로피코나졸, 테트라코나졸, 트리아디메폰, 트리아디메놀, 트리플루미졸, 비테르타놀, 이미벤코나졸, 디니코나졸, 디니코나졸-M, 에폭시코나졸, 플루퀴코나졸, 프로클로라즈, 메토코나졸, 이프코나졸, 마이크로부타닐, 펜코나졸, 페나리몰, 페프라조에이트, 피리페녹스, 트리폴린, 디클로부트라졸, 플루오트리마졸, 이마잘릴, 이마잘릴·술페이트, 시메코나졸, 트리티코나졸, 에타코나졸, 누아리몰, 아자코나졸, 플루코나졸, 옥스포코나졸, 부티오베이트, 프로티오코나졸, 나프티펜, 유니코나졸 P, 비니코나졸 및 보리코나졸로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 푸자리움 옥시스포르뮴(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*), 콜레토틱룸 오비쿨레어(*Colletotrichum orbiculare*), 콜레토틱룸 그로에오스포리오이데스(*Colletotrichum gloeosporioides*), 라이조푸스 스톨로니퍼(*Rhizopus stolonifer*) 및 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 식물 병원균에 대해 방제활성을 가질 수 있다.
- [0028] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식물병은 잣빛곰팡이병일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 스킴조스타틴(Schizostatin) 및 살균제는 1 : 2~30의 중량비로 조합될 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명은 상기 식물병 방제용 조성물을 식물체, 종자 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 잣빛곰팡이병 방제방법을 제공한다.

### 발명의 효과

- [0031] 본 발명의 스킴조스타틴(Schizostatin)은 DMI계 살균제와 혼용하는 경우, 살균제 단독 사용과 대비하여 적은 양의 DMI계 살균제만으로도 우수한 살균·살진균 효과를 갖는다. 따라서 상기과 같은 특징을 갖는 스킴조스타틴(Schizostatin)을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은, 병원균의 살균제 내성 문제와 환경에 끼치는 영향에 대한 우려를 갖는 기존 살균제의 사용 약량을 감소시킬 수 있는 보조용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은 보트리티스 시네레아에 대하여 테부코나졸의 약효를 상승시키는 천연물 유래 라이브러리 스크리닝 과정을 간단하게 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 스킴조필립 커균 균주 KUC9080의 배양 추출액에서 스킴조스타틴을 정제하는 과정을 나타낸 것이다.
- 도 3은 스킴조필립 커균 균주 KUC9080에서 분리·정제한 스킴조스타틴의 화학 구조를 나타낸 것이다.
- 도 4는 스킴조스타틴과 11종 살균제(fludioxonil, tebuconazole, difenoconazole, fenpropimorph, fenhexamid, fenbuconazole, prochloraz, chlorothalonil, dichlofluanid, iprodione, boscalid)의 약효 상승 작용을 조사하기 위하여 스킴조필립 커균 균주 추출물과 상기 11종 각각의 살균제를 필터페이퍼에 분주 후, 보트리티스 시네레아의 포자가 심어진 배지에 교차로 올려놓은 후 2일간 배양, 발아 억제환을 관찰한 결과이다.
- 도 5는 8종의 병원성 진균(*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *Colletotrichum orbiculare*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus oryzae*)에 대한 스킴조스타틴과 살균제 테부코나졸과의 약효 상승 작용을 조사하기 위하여 스킴조스타틴과 테부코나졸을 필터페이퍼에 분주 후, 각 병원균 포자가 심어진 배지에 교차로 올려놓은 후 2일간 배양, 발아 억제환을 관찰한 결과이다.
- 도 6은 온실 조건의 풋트 실험에서 스킴조스타틴과 테부코나졸의 농도별 조합에 따른 토마토 잎의 잣빛곰팡이병

방제 효과를 확인한 결과이다.

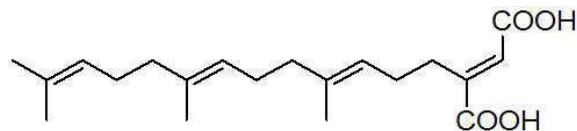
도 7은 잣빛곰팡이 병원균 보트리티스 시네레아에 스키프로스타틴 및 테부코나졸 처리에 따른 sterol 14-demethylase(BC1G\_11853)의 발현량 변화를 PCR을 통해 분석한 결과이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 본 발명은 스키프로스타틴(Schizostatin)을 유효성분으로 포함하는 살균제 보조용 조성물을 제공한다.

[0034] 본 발명에서 ‘스키프로스타틴(Schizostatin)’은 스키프로필럼 커문(*Schizophyllum commune*)이 생성하는 대사산물 중 하나로서 화학식 1의 구조를 갖는다.

[0035] [화학식 1]



[0036]

[0037] 본 발명에 따른 상기 스키프로스타틴(Schizostatin) 화합물은 염, 바람직하게는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하며, 상기 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있다. 상기 유기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산 및 아스파르트산을 포함한다. 또한 상기 무기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 염산, 브롬산, 황산 및 인산을 포함한다.

[0038] 본 발명에 따른 스키프로스타틴(Schizostatin) 화합물은 시중에서 판매되는 것을 사용할 수도 있으며, 또는 천연으로부터 분리되거나 당업계에 공지된 화학적 합성법으로 제조된 것을 사용할 수도 있다.

[0039] 본 발명에서는 상기 스키프로스타틴(Schizostatin)을 살균제와 함께 사용하는 경우 상승작용적 효과(Synergistic effect)가 있는지를 확인하였으며, 그 결과 스키프로스타틴(Schizostatin)을 에르고스테롤 생합성 저해제인 DMI계 살균제와 혼용하는 경우, 살균제 단독 사용과 대비하여 적은 양의 DMI계 살균제만으로도 우수한 살균·살진균 효과를 갖는 것을 실제 실험을 통해 규명하였다.

[0040] 이에, 본 발명은 스키프로스타틴(Schizostatin)의 신규 용도로서, 스키프로스타틴을 유효성분으로 포함하는 살균제 보조용 조성물을 제공한다.

[0041] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 살균제는 스테롤 생합성 저해제일 수 있으며, 바람직하게는 DMI계 살균제일 수 있다.

[0042] 본 발명에서 상기 ‘스테롤 생합성 저해제’는 에르고스테롤 생합성을 저해하는 화합물군으로, 트리플루미졸, 디페노코나졸, 테부코나졸, 브롬코나졸, 사이프로코나졸, 펜부코나졸, 플루실라졸, 플루트리아폴, 헥사코나졸, 프로피코나졸, 테트라코나졸, 트리아디메폰, 트리아디메놀, 트리플루미졸, 비테르타놀, 이미벤코나졸, 디니코나졸, 디니코나졸-M, 에폭시코나졸, 플루퀸코나졸, 프로클로라즈, 메토코나졸, 이프코나졸, 마이크로부타닐, 펜코나졸, 페나리몰, 페프라조에이트, 피리페녹스, 트리폴린, 디클로부트라졸, 플루오트리마졸, 이마잘릴, 이마잘릴·술페이트, 시메코나졸, 트리티코나졸, 에타코나졸, 누아리몰, 아자코나졸, 플루코나졸, 옥스포코나졸, 부티오베이트, 프로티오코나졸, 나프티펜, 유니코나졸 P, 비니코나졸, 보리코나졸, 펜프로피모르프, 펜프로피딘, 트리테모르프, 도테모르프, 알디모르프, 펜프로피딘, 피페탈린, 스피록사민, 펜헥사미드, 피리부티카르브 및 테르비나핀 등을 예시할 수 있다.

[0043] 본 발명에서 상기 ‘DMI계 살균제’는 에르고스테롤 생합성 저해제에 포함되는 대표적인 화합물군으로, 시토크롬 P450의 일종인 14 $\alpha$ -디메틸라아제(CYP51)에 결합하여 스테롤 C14 위치의 탈메틸화를 저해하는 살균제(sterol 14 $\alpha$ -demethylase inhibitor)를 의미한다.

[0044] 상기 DMI계 살균제의 예로서, 트리플루미졸, 디페노코나졸, 테부코나졸, 브롬코나졸, 사이프로코나졸, 펜부코나졸, 플루실라졸, 플루트리아폴, 헥사코나졸, 프로피코나졸, 테트라코나졸, 트리아디메폰, 트리아디메놀, 트리플루미졸, 비테르타놀, 이미벤코나졸, 디니코나졸, 디니코나졸-M, 에폭시코나졸, 플루퀸코나졸, 프로클로라즈, 메토코나졸, 이프코나졸, 마이크로부타닐, 펜코나졸, 페나리몰, 페프라조에이트, 피리페녹스, 트리폴린, 디클로부트라졸, 플루오트리마졸, 이마잘릴, 이마잘릴·술페이트, 시메코나졸, 트리티코나졸, 에타코나졸, 누아리몰, 아

자코나졸, 플루코나졸, 옥스포코나졸, 부티오베이트, 프로티오코나졸, 나프티펜, 유니코나졸 P, 비니코나졸 및 보리코나졸 등을 예시할 수 있다.

[0045] 이들 중에서 특히 바람직한 DMI계 살균제로서, 테부코나졸, 디페노코나졸, 펜부코나졸, 페나리몰, 이마잘릴 및 프로클로라즈 예시할 수 있으며, 가장 바람직하게는 테부코나졸을 예시할 수 있다.

[0046] 본 발명의 스킴조스타틴(Schizostatin)은 조성물에 0.1 내지 1,000 µg/ml의 농도로 포함될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0047] 본 발명의 스킴조스타틴(Schizostatin)은 살균제와 함께 사용되는 경우 살균제의 약효를 상승시키며, 살균제의 저항성을 효과적으로 억제시킬 수 있다.

[0048] 본 발명의 하기 실험에서는 토마토 잎에 스킴조스타틴과 살균제의 조합처리시 잣빛곰팡이병 방제 효과 비교한 결과, 살균제를 단독으로 처리한 실험군 대비 살균제와 스킴조스타틴을 조합하여 처리한 실험군에서 저용량의 살균제 사용으로도 두드러지게 우수한 잣빛곰팡이 방제 효과를 확인하였다. 또한 본 발명의 다른 실험에서는 스킴조스타틴(Schizostatin)이 에르고스테롤 생합성 유전자 발현에 끼치는 영향을 살펴본 결과, 스킴조스타틴을 살균제를 함께 처리하였을 때 살균제의 저항성에 따라 증대되는 스테롤 14-디메틸라아제 합성을 효과적으로 억제시키는 것을 확인하였다.

[0049] 그러므로, 상기와 같은 특징을 갖는 스킴조스타틴(Schizostatin)을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 살균제 보조용 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0050] 또한, 본 발명은 스킴조스타틴(Schizostatin)을 유효성분으로 포함하는 살균제 조성물을 제공한다.

[0051] 상기 조성물은 유효성분으로 스킴조스타틴(Schizostatin) 이외에 종래 알려진 DMI계 살균제를 더 포함할 수 있다.

[0052] 본 발명의 살균제 조성물에는, 본 발명의 효과에 영향을 미치지 않는 범위에서 비료, 고체 담체, 증점제, 계면활성제, 전착제, 첨가제, 용제 등이 포함될 수 있다.

[0053] 비료로는, 퇴비, 유박, 어분, 우분, 계분 등 혹은 이들을 가공하여 이루어진 유기 자재; 황산암모늄, 질산암모늄, 질산석회, 우레아 등의 질소 비료; 과인산석회, 인산 제1 암모늄, 용성(熔成) 인비 등의 인산 비료; 염화칼륨, 황산칼륨, 질산칼륨 등의 칼륨 비료; 고토 석회 등의 고토 비료; 소석회 등의 석회 비료; 규산칼륨 등의 규산 비료; 붕산염 등의 붕소 비료; 각종 무기 비료를 함유하여 이루어진 화성 비료; 등을 들 수 있다.

[0054] 고체 담체로는, 대두 입자, 밀가루 등의 식물성 분말; 이산화규소, 규조토, 인회석, 석고, 톨크, 벤토나이트, 파이로필라이트, 클레이, 목토(目土) 등의 광물성 미분말 등을 들 수 있다.

[0055] 첨가제로는, 벤조산 소다, 우레아, 망초 등의 유기 및 무기 화합물 등; 유체씨유, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 소나무 오일, 면실유 및 이들 오일의 유도체나, 이들 오일의 농축물 등을 들 수 있다.

[0056] 용제로는, 케로신, 자일렌; 솔벤트 나프타 등의 석유 유분; 시클로헥산, 시클로헥사논, 디메틸포름아미드, 디메틸설폭사이드, 알콜, 아세톤, 메틸이소부틸케톤, 광물유, 식물유, 물 등을 들 수 있다.

[0057] 계면 활성제로는, 예컨대, 폴리옥시에틸렌이 부가된 알킬페닐에테르, 폴리옥시에틸렌이 부가된 알킬에테르, 폴리옥시에틸렌이 부가된 고급 지방산에스테르, 폴리옥시에틸렌이 부가된 소르비탄 고급 지방산에스테르, 폴리옥시에틸렌이 부가된 트리스티릴페닐에테르 등의 비이온성 계면 활성제, 폴리옥시에틸렌이 부가된 알킬페닐에테르의 황산에스테르염, 알킬벤젠설포산염, 고급 알콜의 황산에스테르염, 알킬나프탈렌설포산염, 폴리카르복실산염, 리그닌설포산염, 알킬나프탈렌설포산염의 포름알데히드 축합물, 이소부틸렌-무수 말레인 공중합체 등을 들 수 있다.

[0058] 본 발명의 살균제 조성물은 본 발명의 효과를 저하시키지 않는 한 다른 살균제나 살충·살진드기제, 공력제의 1종 또는 2종 이상을 더 혼합할 수도 있다.

[0059] 본 발명의 살균제 조성물의 제형은 특별히 제한되지 않고, 통상의 농약이 취할 수 있는 형태, 예컨대, 가루제, 수화제, 수용제, 유제, 플로어블제, 과립제, 입제 등의 형태를 채택할 수 있다.

[0060] 제제화된 본 발명의 살균제 조성물에 있어서의 유효성분의 농도(스킴조스타틴과 DMI계 살균제의 합계 농도)는 특별히 한정되지 않고, 전술한 제제의 형태에 따라 여러 가지 농도를 채택할 수 있다. 예컨대, 수화제에 있어서는 통상 5 ~ 90 중량%, 바람직하게는 10 ~ 85 중량%; 유제에 있어서는 통상 3 ~ 70 중량%, 바람직하게는 5

~ 60 중량%; 입제에 있어서는 통상 0.01 ~ 50 중량%, 바람직하게는 0.05 ~ 40 중량% 로 할 수 있다.

- [0061] 제제화된 본 발명의 살균제 조성물은, 그대로 혹은 물로 소정 농도로 희석하여, 용해액, 현탁액 혹은 유탁액으로서 식물에 산포하거나, 토양에 관주(灌注), 혼화 또는 산포하거나 함으로써 사용된다. 본 발명의 살균제 조성물을 포장(圃場)에 적용함에 있어서는, 통상 1 헥타르당 유효 성분(스키조스타틴과 DMI계 살균제의 합계량으로) 0.1 g 이상의 적당량이 사용된다.
- [0062] 본 발명의 살균제 조성물의 처리 대상이 되는 유용한 식물로는, 곡물류, 야채류, 근채류, 토란류, 수목류, 목초류, 잔디류 등을 들 수 있다. 여기에 있어서는, 이들 식물류의 각 부위를 대상으로 하여 처리할 수도 있다.
- [0063] 식물류의 각 부위로는, 잎, 줄기, 자루, 꽃, 꽃봉오리, 과실, 종자, 스프라우트, 뿌리, 괴경, 괴근, 묘조, 꺾꽂이 등을 들 수 있다. 또, 이들 식물류의 개량 품종·변종, 재배 품종, 나아가 돌연변이체, 하이브리드체, 유전자 재조합체(GMO)를 대상으로 하여 처리할 수도 있다.
- [0064] 또한, 본 발명은 스키프스타틴(Schizostatin) 및 살균제를 유효성분으로 포함하는 식물병 방제용 조성물을 제공한다.
- [0065] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 살균제는 스테롤 생합성 저해제일 수 있으며, 바람직하게는 DMI계 살균제일 수 있다.
- [0066] 상기 DMI계 살균제는 트리플루미졸, 디페노코나졸, 테부코나졸, 브롬코나졸, 사이프로코나졸, 펜부코나졸, 플루실라졸, 플루트리아폴, 헥사코나졸, 프로피코나졸, 테트라코나졸, 트리아디메폰, 트리아디메놀, 트리플루미졸, 비테르타놀, 이미벤코나졸, 디니코나졸, 디니코나졸-M, 에폭시코나졸, 플루퀸코나졸, 프로클로라즈, 메토코나졸, 이프로코나졸, 마이크로부타닐, 펜코나졸, 페나리몰, 페프라조에이트, 피리페녹스, 트리폴린, 디클로부트라졸, 플루오트리마졸, 이마잘릴, 이마잘릴·술페이트, 시메코나졸, 트리티코나졸, 에타코나졸, 누아리몰, 아자코나졸, 플루코나졸, 옥스포코나졸, 부티오베이트, 프로티오코나졸, 나프티펜, 유니코나졸 P, 비니코나졸 및 보리코나졸 등을 예시할 수 있으며, 이들 중에서 특히 바람직한 DMI계 살균제로서, 테부코나졸, 디페노코나졸, 펜부코나졸, 페나리몰, 이마잘릴 및 프로클로라즈 예시할 수 있으며, 가장 바람직하게는 테부코나졸을 예시할 수 있다.
- [0067] 본 발명의 식물병 방제용 조성물은 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 푸자리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinum*), 콜레토티리쿰 오비쿨레어(*Colletotrichum orbiculare*), 콜레토티리쿰 그로에오스포리오이데스(*Colletotrichum gloeosporioides*), 라이조푸스 스톨로니퍼(*Rhizopus stolonifer*) 및 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 식물 병원균에 대해 방제활성을 가질 수 있으며, 바람직하게는 식물에서 잿빛곰팡이병을 일으키는 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*)에 대한 방제활성이 우수하다.
- [0068] 본 발명에서는 스키프스타틴(Schizostatin) 및 테부코나졸의 혼용 처리에 따른 다양한 식물 병원균에 대한 억제 효과를 평가하였으며, 그 결과 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*) 및 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)에 대한 억제 활성이 우수함을 확인하였다.
- [0069] 또한, 본 발명에서는 온실 조건의 포트 실험에서 스키프스타틴(Schizostatin)과 테부코나졸의 농도별 조합에 따른 토마토 잎의 잿빛곰팡이병 방제 효과를 실험하였으며, 그 결과 스키프스타틴(Schizostatin) 및 살균제를 1 : 2~30의 중량비로 조합하는 경우 잿빛곰팡이병에 대한 방제효과가 두드러지게 우수한 것을 확인하였다.
- [0070] 잿빛곰팡이병은 식물성 병원균인 보트리티스 시네레아에 의해 발생하며, 딸기, 토마토, 오이 등의 채소류와 사과, 포도 등 200가지 이상의 식물에 병을 일으키는 주요 식물병 중 하나이다.
- [0071] 따라서 보트리티스 시네레아에 대한 억제활성이 우수한 본 발명의 조성물은 식물의 잿빛곰팡이병 방제를 위한 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0072] 본 발명의 방제용 조성물은 통상적으로 이용되는 살충제 또는 살균제에 함유되는 물질을 추가로 포함할 수 있으며, 상기 활성성분 이외에 부형제로 약제학적으로 허용 가능한 고체 담체, 액체 담체, 액체 희석제, 액화된 기체 희석제, 고체 희석제, 또는 기타 적당한 보조제, 예를 들면 유화제, 분산제 또는 기포제 등의 계면활성제를 추가로 포함할 수 있다. 활성성분과 상기 부형제를 혼합한 방제용 조성물을 농약분야에 공지된 다양한 제형으로 제제화시켜 사용할 수 있으며, 제제화를 위해서는 농약분야에서 통상적으로 사용되는 제제화 방법을 어느 것이

나 사용할 수 있다.

[0073] 본 발명의 방제용 조성물은 바람직하게는 수화제, 입제, 분제, 유제, 스프레이상, 연막제, 캡셀형 및 젤상의 제형으로 제제화될 수 있고, 제제의 부력을 위해 도넛형과 같은 제형을 통한 접촉제로서 제공되는 것이 바람직하다.

[0074] 본 발명의 방제용 조성물은 식물의 잣빛곰팡이병을 효과적으로 방제하기 위하여 스키토스틴(Schizostatin)은 식물병 방제용 조성물에 0.1 내지 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함하며, DMI계 살균제는 식물병 방제용 조성물에 1 내지 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 포함할 수 있으나, 이는 작물의 종류, 생육 정도, 경작지 환경, 식물병의 발병 정도 등을 고려하여 적절하게 조절할 수 있다.

[0075] 상기와 같이 제형화된 본 발명의 방제용 조성물을 방제가 필요한 식물체 또는 지역에 처리함으로써 식물의 잣빛곰팡이병을 방제할 수 있다. 바람직한 방법은 상기 방제용 조성물을 식물 병원균과 직접 접촉할 수 있도록 적용하여 방제하는 것으로, 토양에 혼화 처리하거나 작물에 직접 분무하는 방법이 가장 바람직하다.

[0076] 또한, 본 발명은 상기와 같은 식물병 방제용 조성물을 식물체, 종자 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 잣빛곰팡이병 방제방법을 제공한다.

[0078] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

#### [0080] <실시예 1>

##### [0081] 살균제 약효 상승 스크리닝

[0082] 탈메틸화억제(Demethylation inhibitors, DMI)계 살균제 테부코나졸의 약효를 상승시키는 천연물 유래 라이브러리를 선별하기 위하여 병원균 보트리티스 시네리아(*Botrytis cinerea*)를 대상으로 실험하였다.

[0083] 자세하게는, 두 개의 96 웰(well) 플레이트 각 웰(well)에 천연물 추출물 1 $\mu\text{L}$ 씩 분주하고 4배 농도의 PDB 배지 25 $\mu\text{L}$ , 1mL당  $4 \times 10^5$ 개 포자 현탁액 25 $\mu\text{L}$ , 멸균수 48 $\mu\text{L}$ 를 넣었다. 한 플레이트에는 천연물 라이브러리 자체의 항균활성을 보기 위해 DMSO 1 $\mu\text{L}$ 를, 다른 한 플레이트에는 준치사농도(0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )의 테부코나졸 1 $\mu\text{L}$ 를 넣었다(도 1 참조). 접종된 마이크로 웰 플레이트는 22 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2일간 배양한 후, 병원균의 성장을 억제하는 웰을 관찰하였다. DMSO를 넣은 웰에서는 병원균이 성장하지만, DMSO 대신 준치사농도의 테부코나졸을 첨가한 웰에서는 병원균의 성장을 억제하는 천연물을 잠재적인 살균제 약효 상승제로 선별하였다. 그 결과, 다수의 스키토필럼 커문(*Schizophyllum commune*) 균주 추출물이 테부코나졸의 항균효과를 상승시키는 것으로 관찰되었다. 참고로, 본 발명에서 사용한 스키토필럼 커문 KUC 9080 균주는 고려대학교 환경생물공학실험실로부터 제공받았으며, 본 발명의 스키토필럼 커문 균주 추출물은 상기 균주를 PDA에 접종하여 28 $^{\circ}\text{C}$ 에서 7일간 배양 후, 배양균체와 배지를 메탄올로 추출한 것이다.

#### [0085] <실시예 2>

##### [0086] 스키조필럼 커문(*Schizophyllum commune*) 균주의 활성물질 분리 및 정제

[0087] 본 실험에서는 테부코나졸과 혼용시 항균활성 상승효과를 갖는 스키토필럼 커문(*Schizophyllum commune*) KUC 9080 균주의 활성물질을 분리, 정제하고, 그 구조를 결정하였다.

[0088] 자세하게는, 스키토필럼 커문(*Schizophyllum commune*) KUC 9080 균주를 PDA에 접종하여 28 $^{\circ}\text{C}$ 에서 7일간 배양 후, 배양균체와 배지를 메탄올로 추출하였다. 조추출물은 감압 농축한 후 Diaion HP-20와 C18 크로마토그래피를 행하였다. 물과 메탄올이 일정비율로 섞인 용매로 용리하였으며, 각 분획은 테부코나졸과 스키토필럼 커문 추출액 분획을 각각 필터페이퍼(35mm\*3mm)에 로딩 후 병원균 보트리티스 시네리아의 포자가 심어진 PDA배지 위에 교차하여 올려놓아 활성 실험하였다. 활성 분획은 건조 후, C18 컬럼을 이용한 역상 HPLC를 통해 테부코나졸과 혼용시 상승효과를 나타내는 활성물질을 분리 정제하였으며, NMR과 질량분석을 통해 스키토스틴(schizostatin)으로 구조를 결정하였다(도2 및 도 3참조).

[0090] <실시예 3>

[0091] 활성물질 스키토스타틴의 여러 가지 살균제에 대한 활성 상승효과 시험

[0092] 본 실험에서는 활성물질과 혼용시 상승효과가 관찰되는 살균제 스펙트럼을 시험하기 위해 스키토필럼 커문 (*Schizophyllum commune*) KUC9080 균주의 추출물과 테부코나졸을 포함하여 플로디옥소닐, 이프로디온, 클로로탈로닐, 디클로플루아니드, 보스칼리드 등 다양한 작용기작의 살균제를 비교차 검정법으로 활성을 관찰하였다. 상기 <실시예 2>에서 분리한 스키토스타틴과 준치사농도의 각 살균제를 필터페이퍼(35mm\*3mm)에 분주 후, 보트리티스 시네리아의 포자(1mL당  $10^5$  개 포자)가 심어진 배지에 교차로 올려놓은 후 2일간 배양, 발아 억제환을 관찰하였다.

[0093] 그 결과 도 4에서 나타낸 바와 같이, 이중 진균의 에르고스테롤 생합성을 저해하는 살균제와 혼용 시 활성 상승효과를 보였으며, 다른 작용기작의 살균제와는 상승효과를 보이지 않았다.

### 표 1

[0095] 살균제 종류별 작용기작

| 살균제            | 작용기작           |
|----------------|----------------|
| fludioxonil    | 신호전달 저해        |
| tebuconazole   | 에르고스테롤 생합성 저해  |
| difenoconazole | 에르고스테롤 생합성 저해  |
| fenpropimorph  | 에르고스테롤 생합성 저해  |
| fenhexamid     | 에르고스테롤 생합성 저해  |
| fenbuconazole  | 에르고스테롤 생합성 저해  |
| prochloraz     | 에르고스테롤 생합성 저해  |
| chlorothalonil | 다점접촉작용         |
| dichlofyanid   | 다점접촉작용         |
| iprodione      | 신호전달 저해        |
| boscalid       | 호흡 저해(에너지생성저해) |

[0097] 한편, 에르고스테롤 생합성 저해제 중 각각 다른 단계를 저해하는 살균제와 스키토스타틴의 약효 상승 효과를 검정하기 위해 broth microdilution 방법으로 실험하였다. 96 웰 플레이트에 4xPDB 배지 25  $\mu$ L, 멸균수 48  $\mu$ L 을 넣고 각 웰에 스키토스타틴(0.0625-4  $\mu$ g/mL, 직접 분리)과 살균제를 일련의 농도(테부코나졸 0.031-2  $\mu$ g/mL, 디펜코나졸 0.0625-4  $\mu$ g/mL, 펜부코나졸 0.031-2  $\mu$ g/mL, 페나리몰 0.125-8  $\mu$ g/mL, 이마잘릴 0.031-2  $\mu$ g/mL, 프로클로라즈 0.001-0.0625  $\mu$ g/mL, 펜프로피모프 0.125-8  $\mu$ g/mL, 펜헥사미드 0.004-0.25  $\mu$ g/mL)로 첨가한 후 1mL 당  $4 \times 10^5$  개 포자 현탁액 25  $\mu$ L을 분주하였다. 마이크로 웰 플레이트는 22℃에서 2일간 배양한 후, 병원균의 성장을 억제하는 웰을 관찰하였다. FIC index는 혼합한 물질 각각의 혼용시 최소억제농도를 단독 처리시 최소억제농도로 나눈 값의 합으로 계산하였다.  $\Sigma FIC = FIC_A + FIC_B = (C_A/MIC_A) + (C_B/MIC_B)$ . 이 값이 0.5 이하 일 때 두 약제의 상승효과가 있다고 할 수 있다.

[0098] 그 결과, 하기 표 2에서 나타낸 바와 같이 C14 디메틸라아제(demethylase)를 타깃으로 하는 살균제들은 전반적으로 스키토스타틴과 약효 상승효과 관찰되었으며, 하위단계를 타깃으로 하는 펜헥사미드는 약효 상승작용이 관찰되지 않았다.

### 표 2

[0100]

살균제 종류별 스킨조스타틴과 병용 처리에 따른 약효 상승효과

| 살균제     | 타겟 사이트                                                               | FIC index | Interpretation |
|---------|----------------------------------------------------------------------|-----------|----------------|
| 테부코나졸   | C14 demethylase                                                      | 0.1875    | Synergy        |
| 디페노코나졸  |                                                                      | 0.125     | Synergy        |
| 펜부코나졸   |                                                                      | 0.0938    | Synergy        |
| 페나리몰    |                                                                      | 0.1875    | Synergy        |
| 이마잘릴    |                                                                      | 0.375     | Synergy        |
| 프로클로라즈  |                                                                      | 0.1875    | Synergy        |
| 펜프로피모르프 | $\Delta^{14}$ reductase<br>$\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ isomerase | 0.3125    | Synergy        |
| 펜헥사미드   | C3-keto reductase                                                    | >1        | Indifference   |

[0102]

#### <실시예 4>

[0103]

#### 활성물질 스킨조스타틴의 여러 가지 병원성 진균에 대한 억제 시험

[0104]

본 실험에서는 활성물질과 테부코나졸 혼용시 상승효과가 관찰되는 병원균 스펙트럼을 시험하기 위해 스킨조스타틴과 테부코나졸을 스크리닝에 이용했던 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*)를 포함하여, 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 푸자리움 옥시스포럼 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*), 콜레토티리쿰 오비쿨레어(*Colletotrichum orbiculare*), 콜레토티리쿰 그로에 오포리오이데스(*Colletotrichum gloeosporioides*), 라이조푸스 스톨로니퍼(*Rhizopus stolonifer*), 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)를 대상으로 락토자 검정법으로 활성을 관찰하였다. 보트리티스 시네레아는 VTT culture collection(D-07129)에서 수득한 것을 사용하였으며, 콜레토티리쿰 오비쿨레어 및 라이조푸스 스톨로니퍼는 한국농용미생물보존센터에서 분양받은 것(콜레토티리쿰 오비쿨레어 KACC40808, 라이조푸스 스톨로니퍼 KACC44501)을 사용하였다.

[0105]

상기 <실시예 2>에서 분리한 스킨조스타틴(1 µg)과 준치사농도의 테부코나졸(25X MIC stock, 20 µL)을 필터페이퍼(35mm\*3mm)에 분주 후, 각 병원균 포자(1mL당 105개 포자)가 섞여진 배지에 교차로 올려놓은 후 2일간 배양, 발아 억제현을 관찰하였다.

[0106]

실험결과, 도 5에서 나타낸 바와 같이, 보트리티스 시네레아와 아스퍼질러스 오리제 병원균에 대해 테부코나졸과 스킨조스타틴의 약효 상승효과가 관찰되었다.

[0108]

#### <실시예 5>

[0109]

#### 토마토 잎에 스킨조스타틴과 살균제 테부코나졸의 조합처리시 잣빛곰팡이병 방제 효과 비교

[0110]

본 실험에서는 토마토 잎에서의 잣빛곰팡이병에 대한 스킨조스타틴과 살균제 테부코나졸의 약효 상승효과를 비교하기 위하여, 일 당 스킨조스타틴과 테부코나졸을 농도별로 40 µL씩 처리하여 병피해도를 평가하였다. 병피해도는 토마토 잎 면적당 잣빛곰팡이병의 병반 진전된 면적으로 평가하여 비교하였다.

[0111]

보다 구체적으로 살펴보면, 토마토 잎에서 잣빛곰팡이병균의 감염에 대한 스킨조스타틴의 테부코나졸 약효 상승효과는 다음과 같이 평가하였다.

[0112]

먼저, 토마토 종자(품종: 광복)를 바로커 토양이 담긴 32구 플라스틱 포트에 파종하였다. 토마토 유묘에서 약 2.5\*5cm(가로\*세로) 크기의 토마토 잎을 자른 후 물에 적신 거즈를 이용하여 자른 잎병 부위가 마르지 않도록 유지하였다.

[0113]

살균제 테부코나졸 농도 0, 1, 5, 10, 20 µg/mL (0.05% 트윈 20)로 준비하고 잎 하나당 40 µL씩 피펫으로 분주 후 붓으로 고르게 펴발랐다. 한 시간 건조 후, 스킨조스타틴도 0, 0.4, 1, 2.5 µg/mL (0.05% 트윈 20)로 준비하여 잎 하나당 40 µL씩 피펫으로 분주 후 붓으로 고르게 펴발랐다. 처리 당 토마토잎 3장으로 하였으며, 한 시간 건조 후, 물에 적신 거즈를 식물의 절단 부위에 대고 플라스틱 통에 넣어 24시간동안 보관하였다.

[0114]

물질 처리 24시간 후, 잣빛곰팡이병원균 0.05% 트윈 20을 포함한 PDB 배지로 보트리티스 시네레아의 포자를 수

확, 1mL당 10<sup>6</sup> 개 농도로 포자 현탁액을 준비하였다. 토마토잎 하나당 10  $\mu$ L씩 두군에 접종하였다. 병원균 접종 후 높은 습도를 유지하기 위해 플라스틱 통에 물을 부어두고 접종된 잎을 두어 보관하였다.

[0115] 병접종 4일 후, 토마토 잎에서 잿빛곰팡이 병원균의 병진전(disease development)을 관찰한 결과, 하기 표 3 및 도 6에서 나타낸 바와 같이, 스키향스타틴 1  $\mu$ g/mL과 테부코나졸 5, 10  $\mu$ g/mL 조합처리하였을 때, 병진전률이 크게 감소하는 것을 확인하였다. 자세하게는, 스키향스타틴 1  $\mu$ g/mL과 테부코나졸 5  $\mu$ g/mL를 조합처리한 경우 병진전률이 11.67%로 감소하는 것으로 나타났으며, 스키향스타틴 1  $\mu$ g/mL과 테부코나졸 10  $\mu$ g/mL를 조합처리한 경우 병진전률이 9.09%로 감소하는 것으로 나타났다.

### 표 3

[0117] 스키향스타틴과 테부코나졸의 농도별 조합에 따른 토마토 잎에서 잿빛곰팡이 병원균의 병진전률(%) 측정 결과

| 테부코나졸 농도<br>( $\mu$ g/ml) | 스키조스타틴 농도( $\mu$ g/ml) |       |       |       |
|---------------------------|------------------------|-------|-------|-------|
|                           | 0                      | 0.4   | 1     | 2.5   |
| 0                         | 64.01                  | 81.95 | 76.18 | 59.03 |
| 1                         | 73.52                  | 78.12 | 68.90 | 61.47 |
| 5                         | 69.29                  | 57.25 | 11.67 | 29.72 |
| 10                        | 62.83                  | 17.72 | 9.09  | 14.14 |
| 20                        | 25.62                  | -     | -     | -     |

[0119] <실시예 6>

[0120] **활성물질 스키향스타틴의 에르고스테롤 생합성 유전자 발현에 미치는 영향**

[0121] 본 실험에서는 잿빛 곰팡이 병원균 보트리티스 시네레아의 테부코나졸 처리에 따른 유전자 발현 양상을 보기 위해 Gamborg' s B5 배지(Duchefa)에 포자 현탁액 10<sup>5</sup>/mL로 접종 후 22℃에서 2일간 진탕배양한 후, 살균제 테부코나졸을 0.5  $\mu$ g/mL의 농도로 첨가하고 12시간 더 배양하였다. 수확한 균사에서 RNA를 분리하여 DMSO와 테부코나졸 처리시 mRNA의 발현패턴을 비교 분석하였다.

[0122] 그 결과, 살균제 테부코나졸의 타겟 부위이자 스테롤 14-디메틸라아제(sterol 14-demethylase) 기능을 하는 BC1G\_11853 유전자의 발현이 가장 크게 증가하는 것을 확인하였다(결과 미도시). 이와 같은 결과는 살균제인 테부코나졸의 내성(저항성)에 기인하는 것으로, 테부코나졸을 처리하면 스테롤 14-디메틸라아제 관련 유전자들이 발현되지 않아 상대적으로 병원균이 이에 대한 저항반응으로서 스테롤 14-디메틸라아제의 유전자 발현을 더욱 증대시키기 때문이다.

[0123] 참고로, 살균제인 테부코나졸은 에르고스테롤 생합성 경로를 저해하기 때문에 (병원균의 방어기작으로) 에르고스테롤 레벨을 조절에 의한 반응으로 에르고스테롤 생합성에 관련된 유전자들의 발현이 전반적으로 증가한다고 알려져 있다. 즉, 에르고스테롤 생합성을 막게되면 전단계 기질의 축적 또는 에르고스테롤의 부족 등에 대한 피드백컨트롤에 의해 생합성 경로 관여 유전자들의 전사량이 증가하게 된다.

[0124] 한편, 테부코나졸과 스키향스타틴의 조합 처리시 시간별 발현양상을 보기 위해 Gamborg' s B5 배지에서 2일간 배양한 보트리티스 시네레아 균사에 테부코나졸 0.5  $\mu$ g/mL, 스키향스타틴 2.5  $\mu$ g/mL(준치사 농도) 첨가 후 2시간 간격으로 균사를 수확, RNA분리하였다. 각 샘플의 RNA 0.5  $\mu$ g로 cDNA를 합성 (iScript cDNA synthesis kit, Bio-Rad)한 후, realtime PCR을 실험하였다. 보트리티스 시네레아의 액틴(actin)과 유비퀴틴(ubiquitin) 유전자로 보정된 스테롤 14-디메틸라아제(BC1G\_11853) 발현량을 관찰하였다. qRT-PCR에 사용한 기종은 Bio-Rad CFX96 system이었으며, PCR 반응 조건 95℃에서 5분간 denaturation한 후, 95℃ 15초, 58℃ 15초, 72℃ 15초반응하는 사이클을 39회 반복하였다.

### 표 4

[0126]

realtime PCR을 위해 사용된 프라이머 세트

| 유전자        | 프라이머 서열 |                             |
|------------|---------|-----------------------------|
| BC1G_11853 | 포워드     | AGC AAA GGC GCT TCC AGT CC  |
|            | 리버스     | TCG TCG CTC CCA AGC TAC AAC |
| 액틴         | 포워드     | TCT GTC TTG GGT CTT GAG AG  |
|            | 리버스     | GGT GCA AGA GCA GTG ATT TC  |
| 유비퀴틴       | 포워드     | TGG CGC GGA ACC CAT AGA AC  |
|            | 리버스     | GCC GTC GAA GAG GAA GCG AA  |

[0128]

그 결과 도 7에서 나타낸 바와 같이, 12시간까지 테부코나졸에 의해 스테롤 14-디메틸라아제(BC1G\_11853)의 발현이 증가하지만, 스킷조스타틴과 같이 처리하면 발현량이 증가하지 않는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과를 통해, 테부코나졸과 스킷조스타틴을 조합하여 처리하는 경우 테부코나졸 단독 처리에 비해 에르고스테롤 생합성 유전자인 BC1G\_11853의 발현을 더욱 효과적으로 억제시켜, 상기 유전자의 발현 억제가 살균제 항균활성 증진의 메커니즘 중 하나로 가능성을 제시하였다.

[0129]

즉, 테부코나졸과 스킷조스타틴을 함께 처리하는 경우 테부코나졸의 약제 내성(저항성)을 효과적으로 억제할 수 있는 것으로 사료된다.

[0131]

이상과 같은 시험결과를 볼 때, 본 발명에 사용되는 스킷조스타틴과 조합처리했을 때, 테부코나졸 단독으로 사용했을 때보다 높은 방제 효과가 관찰되었다. 따라서, 스킷조스타틴은 살균제 테부코나졸의 약효 상승효과(시너지 효과)를 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

[0133]

이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

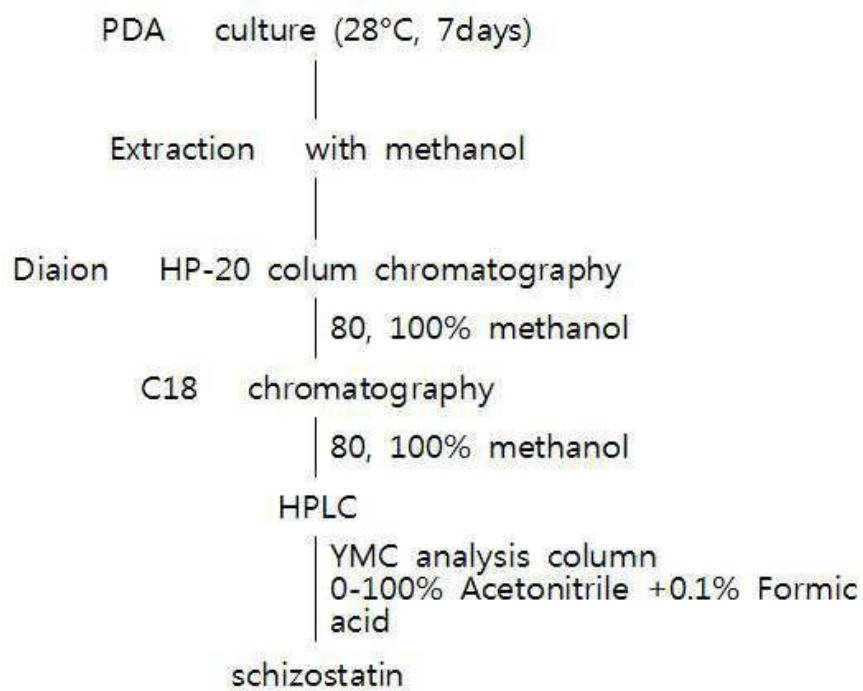
# 도면

## 도면1

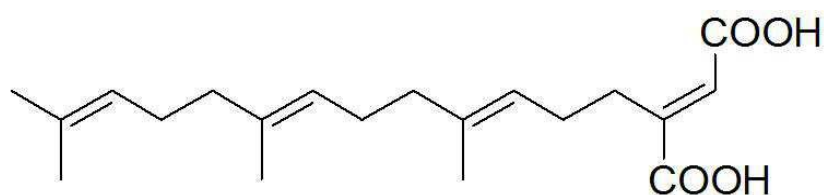
|                            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|----------------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| A                          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| B                          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| C                          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| D                          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| E                          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| F                          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| G                          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| H                          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| A                          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| B                          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| C                          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| D                          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| E                          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| F                          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| G                          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| H                          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

|                                                       |                         |       |
|-------------------------------------------------------|-------------------------|-------|
| 4X PDA                                                |                         | 25ul  |
| 4X 10 <sup>5</sup> conidia of <i>Botrytis cinerea</i> |                         | 25ul  |
| Sterilized D.W                                        |                         | 48ul  |
| Chemical libraries                                    |                         | 1ul   |
| DMSO(control)                                         | Tebuconazole (0.2ug/ml) | 1ul   |
| Total                                                 |                         | 100ul |

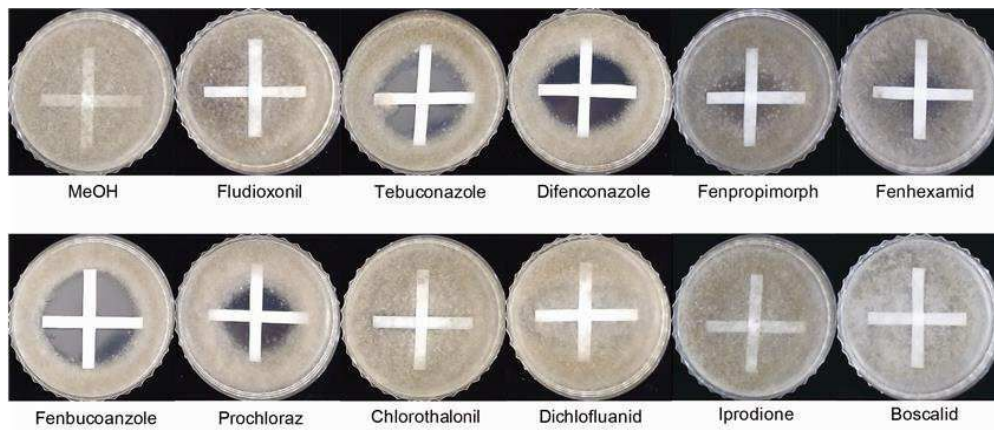
## 도면2



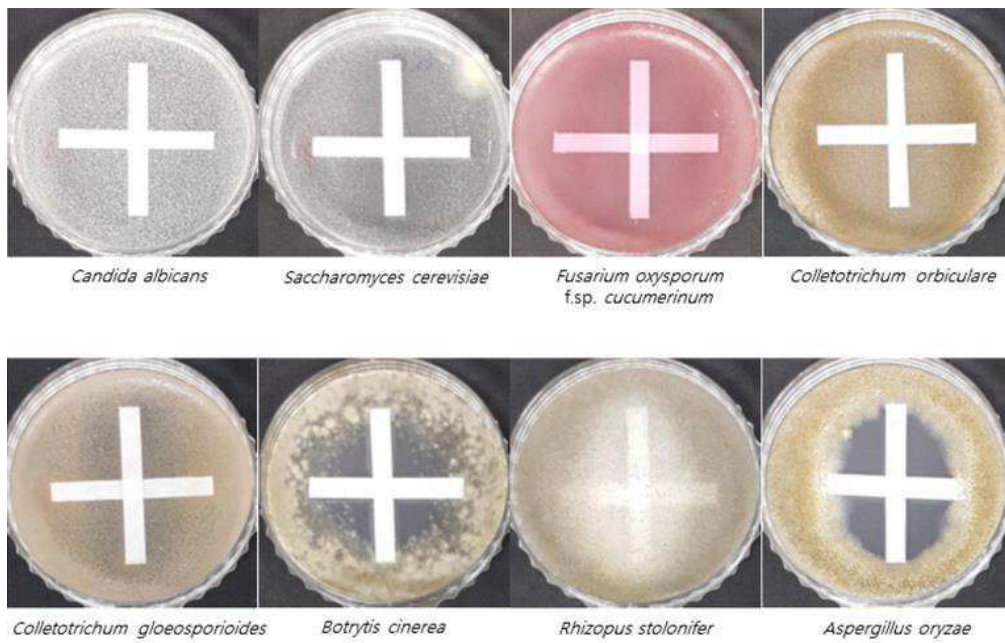
## 도면3



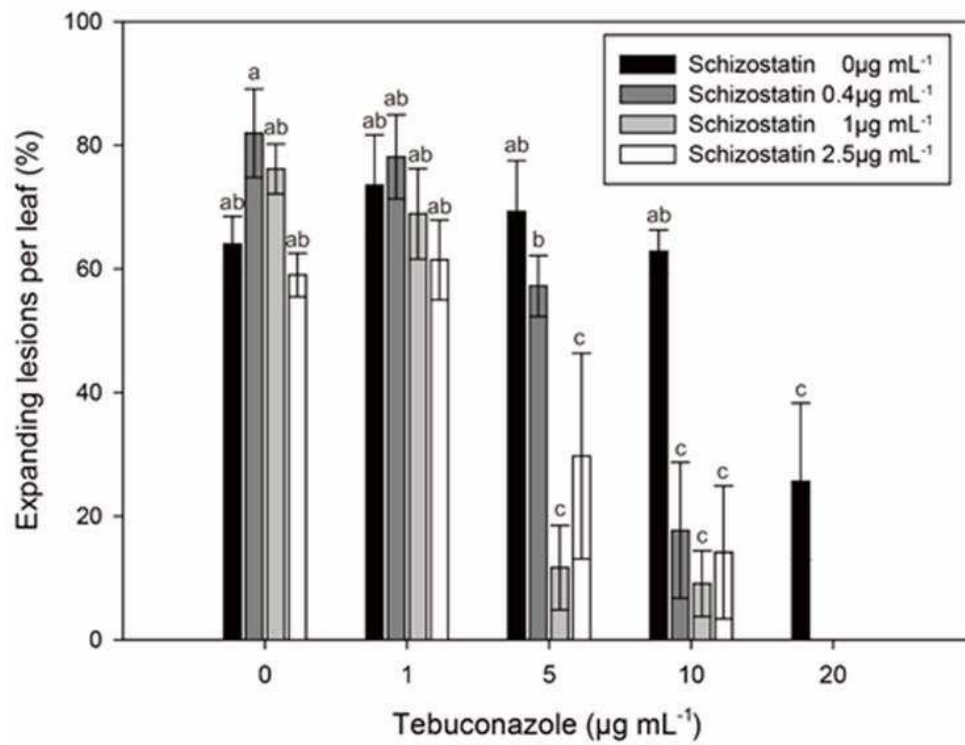
도면4



도면5



도면6



도면7

BC1G\_11853

