



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2007년10월24일
(11) 등록번호 10-0770139
(24) 등록일자 2007년10월18일

(51) Int. Cl.

A01N 63/00(2006.01) A01N 63/02(2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0109726

(22) 출원일자 2006년11월08일

심사청구일자 2006년11월08일

(56) 선행기술조사문헌

JP11043408 A

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

김범석

서울 성북구 동소문동 한신아파트 106동 703호

박철남

제주 제주시 아라1동 1765-3 번지

이동호

서울 성북구 돈암2동 한진아파트 208동 1802호

(74) 대리인

김선애

전체 청구항 수 : 총 5 항

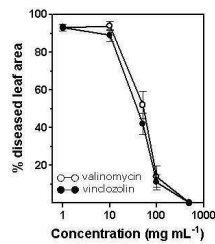
심사관 : 장정숙

(54) 식물병원성 진균에 항균활성을 가지는 발리노마이신을유효성분으로 하는 살균제 조성물

(57) 요약

본 발명은 식물병원성 진균에 항균활성을 가지는 발리노마이신을 유효성분으로 하는 살균제 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 의한 살균제 조성물은 방선균 유래의 천연물질인 항균물질 발리노마이신을 유효성분으로 함유하여 보트리티스 시네리아 (*Botrytis cinerea*)에 의한 잣빛곰팡이병과 같은 식물 진균병에 치유 효과가 있을 뿐만 아니라 자연환경 속에서 다른 미생물에 의해 자연적으로 분해되는 생분해성이 큰 환경친화적 천연 살균제 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

식물병원성 진균에 항균활성을 가지는 발리노마이신(valinomycin)을 유효성분으로 함유함을 특징으로 하는, 식물병 방제용 살균제 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 식물병은 식물병원성 진균인 보트리티스 시네리아(*Botrytis cineria*) 또는 마그나포르세 그리시아(*Magnaporthe grisea*)에 의해 발생하는 식물병임을 특징으로 식물병 방제용 살균제 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 발리노마이신은 방선균 균주 *Streptomyces* spp. M10(미생물기탁번호: KACC 91275P)을 SGGP 아가 배지에서 배양하여 배양여액으로부터 분리 및 정제과정을 거쳐 수득한 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 살균제 조성물.

청구항 4

식물병 방제방법에 있어서, 식물병원성 진균에 항균활성을 가지는 발리노마이신(valinomycin)을 사용함을 특징으로 하는 식물병 방제 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 식물병은 식물병원성 진균인 보트리티스 시네리아(*Botrytis cineria*) 또는 마그나포르세 그리시아(*Magnaporthe grisea*)에 의해 발생하는 식물병임을 특징으로 식물병 방제 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <2> 본 발명은 식물병원성 진균에 항균활성을 가지는 발리노마이신을 유효성분으로 하는 살균제 조성물에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 보트리티스 시네리아 (*Botrytis cinerea*)에 의한 잣빛곰팡이병과 같은 식물 진균병에 치유 효과가 있을 뿐만 아니라 자연환경 속에서 다른 미생물에 의해 자연적으로 분해되는 생분해성이 큰 환경친화적 천연 살균제 조성물에 관한 것이다.
- <3> 현대의 작물 생산에 있어 생산성 향상에 저해요인인 유해생물의 끊임없는 위협으로부터 작물을 보호하기 위한 지속적인 노력을 해오고 있지만, 현대 농업에서 살균제를 제외하고는 식물병의 효율적인 방제는 생각할 수 없을 것이다.
- <4> 더욱이 농업선진국에서의 살균제에 대한 의존도는 아주 높은 실정으로, 전세계 살균제 생산량 중 서구 유럽이 39%, 극동아시아지역이 28%, 미국이 12%를 사용하고 있고 나머지 21%만이 전세계의 나머지 지역에서 사용되고 있다고 보고되고 있다. 1900년대 중반에 많은 수의 유기살균제가 개발되어 다양한 식물병의 방제를 위해 사용되기 시작된 이후로, 현재 113종의 유효성분을 지닌 200여 가지 살균제가 사용되고 있다.
- <5> 일반적으로, 잣빛곰팡이병은 우리나라에서 경제적으로 매우 중요한 것으로 경엽과 꽃, 과실에 회색으로 빌로드상의 곰팡이를 발생하는 병해이다. 단위면적당 소득이 높은 비닐하우스를 이용한 채소 및 과일의 재배면적이 증가하는 가운데 비닐하우스에서 잣빛 곰팡이병의 피해 또한 큰 손실을 입히고 있다. 불완전균류의 일종인 보트리티스 시네리아 (*Botrytis cinerea*)가 병원균이지만, 이 균은 매우 다범성으로 토마토, 가지, 피망, 오이, 호박, 양배추, 양파, 딸기, 양상추, 아스파라거스, 감자, 강낭콩, 완두 등 많은 작물에 잣빛곰팡이병을 일으킨다. 이를 방제하기 위하여 저항성품종의 재배, 재배환경 조절, 경종적 방제, 길항균을 이용한 생물적 방제, 등이 다양하게 행해지고 있으나, 현재까지 가장 효율적인 방제법은 살균제 살포를 통한 화학적 방제인 것으로 알려져 있다.

- <6> 살균제의 예로는 이프로디온, 프로시미돈, 베노밀, 툴릴플루아니드, 디에소펜카브, 빈크로졸린, 다이클로폴루아니드 등이 1960년대 후반부터 개발되어 사용되어오고 있다. 그러나 상기 잣빛곰팡이병의 병방제를 위해 유기합성살균제의 계속적인 살포는 농약으로 인한 환경에 대한 심각한 부작용 및 약제저항성을 보이는 잣빛곰팡이병균이 발생하고 포장에서의 약제 저항성 균의 밀도가 증가하고 있어 살균제의 방제효과는 저하되고 있는 실정이며 상기 잣빛곰팡이병의 방제를 위한 저독성일뿐만 아니라 환경을 파괴하지 않는 친환경적인 새로운 구조를 가진 화합물, 또는 새롭게 약효가 확인된 기존의 화합물을 지속적으로 연구할 필요가 있다.
- <7> 현재 잣빛곰팡이병에 대한 생물농약으로 사용되는 미생물은 세균, 곰팡이 등이 있고, 항균물질을 생성하는 미생물을 이용하는 방제와 트리코더마 속 (*Trichoderma* spp.), 글리오클라디움 속 (*Gliocladium* spp.)과 같이 잣빛곰팡이병균에 기생하는 중복기생균(hyperparasite)을 이용하는 방제 방법 등이 사용되고 있다.
- <8> 한편, 진균성 병원균 마그나포르테 그리시아(*Magnaporthe grisea*)에 의해 발병하는 벼 도열병은 전세계적으로 발생하며 벼에게 가장 중요한 병 중 하나이다. 벼 도열병에 의해 전세계적으로 벼 수확량의 10%가 매년 손실되고 있는 실정이다. 이러한 벼 도열병에도 유기합성농약이 주로 사용되고 있어 약제 저항성 균 발생 및 환경파괴 등의 문제를 유발하고 있는 실정이다.
- <9> 발리노마이신은 펩티드항생물질로 생체 속의 K 이온의 전송에 관계하고 있다고 알려져 있으며, 따라서 막생화학의 연구에 시약으로 많이 연구되어 있고 항세균제와 항효모제로서의 활성이 보고된 바 있다. 그러나 이 항생물질의 식물병원성 진균과 관련한 항균활성에 대해서는 심도있는 연구가 진행된바 없으며, 특히 잣빛곰팡이병에 대해 탁월한 방제효과가 있다는 사실은 알려진바 없다.

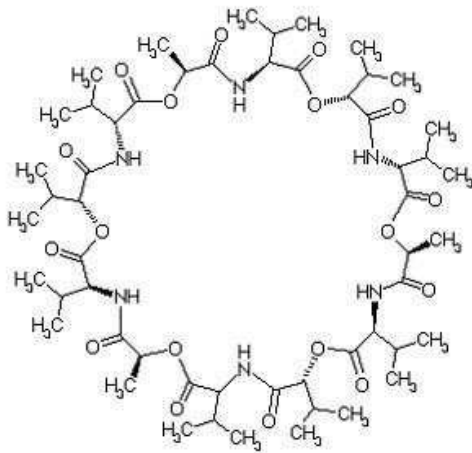
발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <10> 따라서 본 발명의 목적은 상기 종래 기술의 문제점 및 상기 요구를 해결하기 위한 안출된 것으로 항균물질 발리노마이신을 유효성분으로 함유하여 방제효과 뿐만 자연환경 속에서 다른 미생물에 의해 자연적으로 분해되는 생분해성이 큰 환경친화적 천연 식물병 방제용 살균제 조성물을 제공하는 것이다.
- <11> 본 발명의 다른 목적은 본 발명에 의한 발리노마이신을 유효성분으로 하는 살균제 조성물을 이용하여 잣빛곰팡이병균인 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*) 및 벼도열병균인 마그나포르테 그리시아(*Magnaporthe grisea*)를 방제하는 식물병 방제 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <12> 본 발명자들은 고려대학교 식물약학 실험실에서 2005년 제주도의 토양을 채집하여 토양미생물로부터 항진균성 항생물질을 개발하기 위한 연구를 수행하던 중, 잣빛곰팡이병원균에 대해 뛰어난 항진균활성을 보이는 항진균 항생물질을 생성하는 길항방선균 스트렙토마이세스 엠텐 균주(*Streptomyces* sp. M10, 미생물기탁번호: KACC 91275P)를 발견하였다. 상기 길항방선균으로부터 단일성분으로 분리 정제된 항생물질의 약효를 스크리닝한 결과 보트라이티스 시네리야(*Botrytis cinerea*) 및 마그나포르테 그리시아(*Magnaporthe grisea*)에 대해 뛰어난 항균활성 효과가 있음을 확인하고, 상기 항균물질에 대한 분자구조를 규명한 결과, 하기와 같은 구조를 가지는 발리노마이신임을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

화학식 1



<13>

<14> 따라서 본 발명은 식물병원성 진균에 항균활성을 가지는 발리노마이신을 유효성분으로 하는 살균제 조성물을 제공한다.

<15> 본 발명은 상기 발리노마이신을 유효성분으로 하는 살균제 조성물을 이용하여 잣빛곰팡이병균인 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*) 및 벼도열병균인 마그나포르테 그리시아(*Magnaporthe grisea*)를 방제하는 식물병 방제 방법을 제공한다.

<16> 이하, 첨부된 도면을 참조하면서 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다.

<17> 도 1은 온실조건의 풋트 실험에서 본 발명에 의한 항균물질인 발리노마이신의 오이 잣빛곰팡이병에 대한 방제효과를 상용살균제인 빈크로졸린(vinclozolin)과 비교 실험한 결과를 도시한 그래프이다.

<18> 본 발명자들은 화학식 (I)으로 표기되는 항균물질 발리노마이신의 병방제 효과를 확인하기 위하여 식물병원성 진균에 대한 억제 시험을 시행한 결과, 기존의 유기합성 살균제인 대조군과 비교하여 동등한 수준의 방제효과가 있음을 확인하였다(도 1 참조). 특히, 본 발명에서 이용된 항균물질 발리노마이신은 잣빛곰팡이병균 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*)은 물론 벼도열병균인 마그나포르테 그리시아(*Magnaporthe grisea*) 등에 대해서도 특이적인 항균활성과 작용기작을 가지고 있어 식물병 방제에 이용 가능성이 높으리라고 기대된다.

<19> 본 발명의 항생물질은 단독 또는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 충전제 등을 혼합하여 사용될 수 있다. 즉, 본 발명의 항생물질을 유효성분으로 하는 조성물을 제조하여 사용할 수 있다.

<20> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

<21> 실시예 1. 항균물질 발리노마이신의 분리 및 정제

<22> 본 발명자들은 한국의 제주도에 여러 유기농업을 하는 농가의 토양시료로부터 약 400여 개의 미생물을 분리하여 한천배지에서 병 방제 효과를 검정한 결과 잣빛곰팡이병균에 대하여 항균효과가 뛰어난 방선균 균주를 선발하여 항균활성물질 발리노마이신(valinomycin)을 분리, 정제하고, 그 구조를 결정하였다.

<23> 방선균 균주 *Streptomyces* spp. M10을 28℃에서 2일간 SGGP 아가 배지 (10 g glucose, 4 g peptone, 4 g yeast extract, 4 g casamino acids, 2 g glycine, 0.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 1.3 g K₂HPO₄, 1 L 증류수) 에서 고체 배양한 후, 메탄올을 이용하여 방선균 균체로부터 추출하였다. 분리된 추출액을 감압농축한 후 Diaion[®] H-20 크로마토그래피를 행하였다. 각 분획은 물과 메탄올을 일정비율로 섞어 전개시켰으며, 그 중 활성분획을 모아 실리카 겔(silica gel) 크로마토그래피를 행하였다.

<24> 각 분획은 에틸아세테이트와 메탄올을 일정비율로 섞어 전개시켰고, 그 중 활성분획을 모아 메탄올로 추출한 후 Sephadex-LH-20 resins를 이용, 유속 0.064ml/min으로 겔 필트레이션 크로마토그래피를 행하였다. 겔 필트레이션 크로마토그래피를 통하여 얻어진 분획 중 활성 분획을 모아 유속 2ml/min, UV 검출 210nm, 용매 0.1% 포믹엑시드를 포함한 75%-95% 메탄올을 이용하는 분취 조건으로, HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)를 통하여 항균물질 발리노마이신을 분리 정제하였다.

<25> 실시예 2: 항균물질 발리노마이신의 여러 가지 식물병원 세균 및 진균에 대한 억제시험

<26> 잣빛곰팡이병균인 보트리티스 시네레아 (*Botrytis cinerea*)를 비롯하여 벼도열병균 마그나포르테 그리시아 (*Magnaporthe grisea*), 알터나리아 말리 (*Alternaria mali*), 바실러스 메가테리움 (*Bacillus megaterium*), 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*), 알터나리아 솔라니(*Alternaria solani*), 클라디스포리움 쿠쿠메리눔 (*Cladissporium cucumerinum*), 콜레토티리쿰 그로에오스포리오이데스 (*Colletotrichum gloeosporioides*), 콜레토티리쿰 오비쿨레어(*Colletotrichum orbiculare*), 푸자리움 옥시스포룸 f.sp 쿠쿠메리눔 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *Cucumerinum*), 실린드로카르폰 데스트럭탄스(*Cylindrocarpon destructans*), 다이디멜라 브리오니에 (*Didymella bryoniae*), 푸자리움 모닐리폼(*Fusarium moniliforme*), 푸자리움 옥시스포룸 f.sp 라이코펠시사이 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*), 파이토프소라 캡시사이(*Phytophthora capsici*), 랄스토니아 소라나 세아룸(*Ralstonia solanacearum*), 라이족도니아 솔라니(*Rhizoctoia solani*), 사카로마이세스 세레비시에 (*Saccharomyces cerevisiae*), 스크렐로티니아 스크렐로티오름 (*Sclerotinia Sclerotiorum*), 잔토모나스 캄페스트리스 pv. 베시카토리아 (*Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*) 등의 식물병원 진균들을 텍스트로스 한천 (potato dextrose agar) 배지에서 배양하고 식물병원 세균들을 보통한천배지(Nutrient agar)에서 배양했다.

<27> 상기 실시예 1에서 분리 정제한 발리노마이신을 마이크로 웰 플레이트(micro-well plate)에 1%의 감자배지 및 증류수와 섞어 일련의 농도 (4 ~ 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 로 담은 후, 각각의 진균포자 또는 유주자 또는 세균 현탁액을 10⁶ 개/mL의 농도로 맞추어서 각각의 웰 (well)에 넣었다. 접종된 마이크로 웰 플레이트는 28℃에서 2일 내지 4일간 배양한 후, 곰팡이 및 유주자 또는 세균의 생장이 일어나지 않는 농도 중 가장 낮은 농도를 최소억제농도 (minimum inhibitory concentration; MIC)로 평가하였으며, 그 결과는 하기 표 1에 나타내었다. 상기 발리노마 이신은 보트라이티스 시네리아 (*Botrytis cinerea*), 마그나포르테 그리시아(*Magnaporthe grisea*)에 대해 높은 수준의 항균활성을 보였음을 확인하였다.

표 1

<28> 발리노마이신의 여러 식물병원진균 및 식물병원진균에 대한 최소억제 농도 (MIC)

미생물(Microorganism)	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)a
--------------------	----------------------------------

<i>Alternaria mali</i>	> 256
<i>Alternaria solani</i>	> 256
<i>Botrytis cinerea</i>	4
<i>Clad sporium cucumerinum</i>	> 256
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	256 (반억제)
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	> 256
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	> 256
<i>Didymella bryoniae</i>	> 256
<i>Fusarium moniliiforme</i>	> 256
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>Cucumerinum</i>	> 256
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	> 256
<i>Fusarium moniliiforme</i>	> 256
<i>Magnaporthe grisea</i>	4
<i>Phytophthora capsici</i>	> 256
<i>Rhizoctonia solani</i>	256(반억제)
<i>Sclerotinia Sclerotiorum</i>	> 256
<i>Bacillus megaterium</i>	> 256
<i>Candida albicans</i>	32
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	>256
<i>Ralstonia solanacearum</i>	> 256
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	> 256
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	> 256

<29> 실시예 3 : 온실조건의 오이 유묘에서 발리노마이신의 잿빛 곰팡이병 방제용 살균제인 빈크로졸린과의 방제효과를 비교

<30> 온실조건하에서 오이유묘에서의 잿빛 곰팡이병에 대한 발리노마이신과 농용살균제인 빈크로졸린과의 방제효과를 비교하기 위하여, 발리노마이신과 빈크로졸린을 잿빛곰팡이병균을 접종하기 1일전에 농도별로 처리하여 각 처리구와 약제를 처리하지 않은 무처리구에서의 병피해도를 평가하였다. 병피해도는 옆면적당 병반면적율을 평가하여 비교하였다.

<31> 실험결과, 잿빛곰팡이병균 접종후 3일째부터 약제를 처리하지 않은 오이식물의 잎에서 흙갈색병반이 나타나기 시작한 반면, 대조약제인 빈크로졸린과 발리노마이신을 처리한 오이식물의 옆면에서는 병징이 관찰되지 않았다. 접종후 4일이 되면서 10 μ g/ml과 100 μ g/ml 농도의 약제를 처리한 오이식물의 옆면에서도 병반이 관찰되기 시작하였다.

<32> 약제를 처리하지 않은 오이식물의 잎에는 접종후 5일 지나면서 옆면 전체면적에 병반이 퍼지며 고사하였으나, 항균물질 발리노마이신 500 μ g/ml이 처리된 오이식물에서는 병반이 거의발생하지 않았다. 500 μ g/ml농도로 빈크로졸린이 처리된 오이식물의 경우에도 병발생이 관찰되지 않았다 (도 1 참조). 이상과 같은 시험결과를 볼 때, 본 발명에 사용되는 발리노마이신은 상용 살균제인 빈크로졸린과 비교하여 잿빛곰팡이병방제효과의 면에서 차이를 보이지 않았다. 따라서 발리노마이신은 잿빛곰팡이병방제용 약제로서 탁월한 효과를 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

<33> 또한 발리노마이신은 펩타이드계 물질로서 자연환경상에서 미생물에 의해 쉽게 분해될 수 있는 구조를 가지고 있으므로, 부가적인 환경에 유해한 토양잔류효과도 기존의 살균제에 비하여 현저히 낮다는 것을 확인할 수 있었다.

발명의 효과

<34> 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명은 방선균 유래의 천연물질인 항균물질 발리노마이신을 유효성분으로 함유함으로써 상용 살균제인 빈크로졸린수준의 방제효과를 가지고 있으면서도 자연환경에서의 미생물에 의한 생분해성이 큰 환경친화적 살균제 조성물을 제공하는 효과가 있고, 보트라이티스 시네리아 (*Botrytis cinerea*), 마그

나포르세 그리시아(*Magnaporthe grisea*)등의 식물병원 진균에 의한 식물병 방제에 효과가 있어 식물병 방제산업 상 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 온실조건의 풋트 실험에서 본 발명에 의한 항균물질인 발리노마이신의 오이 잿빛곰팡이병에 대한 방제효과를 상용살균제인 빈크로졸린(vinclozolin)과 비교 실험한 결과를 도시한 그래프이다.

도면

도면1

