

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0101253 (43) 공개일자 2012년09월13일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A01N 31/08 (2006.01) A01N 27/00 (2006.01) A01N 63/02 (2006.01) A01P 3/00 (2006.01)		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1
(21) 출원번호 10-2011-0019162		(72) 발명자 김기덕 서울특별시 노원구 섬밭로 52, 101동 507호 (공릉동, 대주파크빌) 상미경 서울특별시 관악구 문성로32길 51-4 (신림동)
(22) 출원일자 2011년03월03일 심사청구일자 2011년03월03일		(74) 대리인 김선애

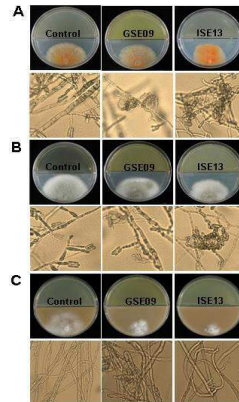
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 근권세균 또는 이에 의해 형성되는 휘발성 화합물 2, 4 - 디 - 터 - 부틸페놀을 유효성분으로 함유하는 식물병 방제용 조성물, 및 식물 생장과 성숙 촉진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 식물 탄저병과 역병에 대해 뛰어난 생물적 방제 효과가 있는 친환경적 생물적 방제균인 플라보박테리움(*Flavobacterium* sp.) 균주 GSE09와 라이조박테리움 엔지모제네시스(*Lysobacterium enzymogenes*) 균주 ISE13 및 이에 의해 형성되는 천연 휘발성 화합물과 이 중 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol)을 포함하는 식물병 방제용 조성물 및 식물의 생장과 성숙 촉진용 조성물에 관한 것이다. 상기한 본 발명에 의하면, 친환경적으로 포장에서도 식물의 탄저병과 역병을 우수하게 방제할 수 있고, 식물의 생장과 성숙을 촉진하는 효과가 있으므로 종래의 농용 살균제와 비료의 문제점을 해결할 수 있는 이점이 있다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

데칸(decane), 도데칸(dodecane), 1,3-디-터-부틸벤젠(1,3-di-*tert*-butylbenzene), 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol), 헥사데칸(hexadecane) 및 테트라데칸(tetradecane)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1 이상의 휘발성 화합물을 포함하는 식물병 방제용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 휘발성 화합물은 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol)인 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 식물병은 식물 탄저병 또는 역병인 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 식물 탄저병은 콜레토티리쿰(*Colletotrichum* spp.)의 병원균에 의해 발생하는 탄저병이고, 상기 역병은 파이토평토라(*Phytophthora* spp.)의 병원균에 의해 발생하는 역병인 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 휘발성 화합물은 플라보박테리움 (*Flavobacterium* sp.) 균주 GSE09 또는 라이조박테리움 엔지모제네시스 (*Lysobacterium enzymogenes*) 균주 ISE13로부터 생산되는 천연 휘발성 화합물인 것을 특징으로 식물병 방제용 조성물.

청구항 6

데칸(decane), 도데칸(dodecane), 1,3-디-터-부틸벤젠(1,3-di-*tert*-butylbenzene), 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol), 헥사데칸(hexadecane) 및 테트라데칸(tetradecane)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1 이상의 휘발성 화합물을 포함하는 식물 성장 및 성숙 촉진용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 휘발성 화합물은 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol)인 것을 특징으로 하는 식물 성장 및 성숙 촉진용 조성물.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 휘발성 화합물은 플라보박테리움 (*Flavobacterium* sp.) 균주 GSE09 또는 라이조박테리움 엔지모제네시스 (*Lysobacterium enzymogenes*) 균주 ISE13로부터 생산되는 천연 휘발성 화합물인 것을 특징으로 식물 성장 및 성숙 촉진용 조성물.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 근권세균 또는 이에 의해 형성되는 휘발성 화합물 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol)을 유효성분으로 함유하는 식물병 방제용 조성물, 및 식물 성장 및 성숙 촉진용 조성물에 관한 것이다. 더욱 상세하게 본 발명은 채소류를 포함한 작물의 포장과 시설재배 시 작물 전체 혹은 경제적으로 중요한 열매에 발생하여 작물 생산에 심각한 피해를 야기하는 탄저병(anthracoise)과 역병 (phytophthora blight)에 대한 생물적 방

제 효과와 고추의 상품성 및 수량에 영향을 주는 고추 열매의 성숙을 촉진하는 효과를 갖는 토양 근권세균인 플라보박터 균주 GSE09와 라이조박테리아 엔지모제네시스 균주 ISE13 또는 이들 근권세균 유래 휘발성 화합물인 2,4-디-터-부틸페놀을 유효성분으로 함유하는 식물병 방제용 조성물, 및 식물 생장 및 성숙 촉진 유도 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 현대 농업에서는 작물을 병으로부터 보호하기 위해 농용 살균제 사용에 의존하고 있는데, 이러한 농용 살균제들은 인간 및 환경에 대한 부정적인 영향이 매우 크다. 그럼에도, 농용 살균제는 안정적인 농업생산을 위해서 현재 계속적인 사용이 불가피한 실정이다.
- [0003] 이러한 이유로 국내외 연구기관들이 새롭고 인간과 환경에 안전한 세균, 진균 등을 이용한 미생물 농약을 개발하기 위해 식물병 방제용 길항미생물 탐색 및 실용화 연구를 하고 있으나 여전히 기초단계의 연구를 수행하고 있으며, 작물재배에서 길항미생물을 이용한 식물병 방제에 대한 연구는 대학교, 농업관련 국가연구소, 정부출연 연구소 등을 중심으로 추진되고 있으나, 아직 국내외 연구 인력 및 기술 축적이 충분하지 않고 재배여건에 적용되어 작물생산에 효과 있는 농용 생물농약과 비료의 사용 및 실용화는 부족한 실정이다.
- [0004] 특히, 실험실의 제한된 조건에서 선발된 길항 능력이 있는 미생물은 실제 포장의 다양한 환경조건에서 생존하지 못하거나 길항 효과를 발휘하지 못하는 경우가 많으며, 이러한 이유로 특정 지역에서 우수한 길항 미생물이 실제 포장 환경에서 효과를 발휘하지 못하는 경우가 적지 않다.
- [0005] 또한, 고추와 같이 고부가가치를 생산하는 작물을 재배할 때 수확량 증가를 위하여 과도한 양의 비료를 사용하며 실제 농가에서는 생장 촉진제와 같은 화학약품을 사용하기도 하므로, 환경오염과 독성의 문제를 야기하여 지속적이고 안전한 고추의 생산에 심각한 문제가 발생할 수 있다.
- [0006] 한편 식물의 탄저병은 콜레토틱리쿰(*Colletotrichum* spp.) 등의 곰팡이에 의해 일어난다. 식탁에 올라오는 대부분의 식물이 그 병원균에 의해 피해를 입는다. 식물 탄저병균은 잎, 줄기, 과일, 꽃 등 부위를 가리지 않고 파괴한다. 동양인의 음식에 빼놓을 수 없는 양념 채소인 고추, 여름철 과일인 수박 등 가지과와 박과 작물에서 특히 심하다.
- [0007] 고추는 대한민국에서 2005년도 기준으로 전체 채소 재배 면적의 약 24%를 차지하며, 조미 채소류 재배 면적에서는 약 49%를 차지하고, 농가 소득기여도가 연간 8,500억 원 이상으로 농가 경제 주요작물 중 하나이다. 특히 동양인의 식생활의 특성상 붉은 고추의 소비가 현저하게 높으며, 이를 이용한 가공품에 대한 시장 규모도 증가하고 있다. 따라서 고추의 성숙을 촉진하기 위한 다양한 방법들이 시도되고 있으나 경제적 또는 유해성 면에서 문제가 많다.
- [0008] 고추 재배에 있어서 고추 탄저병, 역병, 세균성 점무늬병이 심각한 피해를 야기하는데, 특히 고추 열매의 생산과 관련하여 고추 열매에 발생하는 고추 탄저병에 의한 피해가 심각하며, 이를 방제하기 위해 권장 사용량 이상의 과도한 유기 합성 농약 살포에 의존하고 있다. 이러한 유기 합성 농약의 오남용으로 인하여 저항성 균주의 출현, 오존층의 파괴, 토양과 작물 내의 잔류 등의 문제가 야기되고 있으며 이를 대체하기 위하여 길항 미생물을 이용한 생물적 방제 등의 많은 연구들이 진행되어 오고 있지만, 아직까지 공기 전염성 병으로 온난하고 비가 많은 때와 수확기에 접어들면서 자주 발생하는 고추의 병해인 고추 탄저병에 대한 효과적인 길항 미생물을 이용한 생물적 방제가 미미하다. 특히 최근에 환경 보전적 지속 농업과 무농약 고부가가치 산업과 관련하여 식물 탄저병의 생물적 방제 연구가 집중적으로 수행되어야 할 필요가 있지만, 공기 전염성병에 대한 이해가 부족하고 식물의 지상부에 발생하는 병에 대하여 아직까지 포장 조건 아래에서도 기존의 농용 살균제와 비교하여 효과적인 길항 세균 유래 휘발성 물질에 대한 연구가 부족한 상황이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 따라서 본 발명은 고추를 포함한 식물 재배 시 심각한 문제를 야기하는 공기전염성 병인 탄저병을 친환경적이며 효과적으로 방제할 수 있는 근권 토양에서 분리한 내생 근권 세균 플라보박테리움 균주 GSE09를 포함하는 식물

탄저병 방제용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 식물의 수량을 증진시키며 성숙을 촉진시킬 수 있는 근권 토양에서 분리한 내생 근권 세균 플라보박테리움 균주 GSE09를 포함하는 수량 증진과 성숙촉진용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 또한, 본 발명은 고추를 포함한 식물 재배 시 심각한 문제를 야기하는 공기전염성 병원 탄저병과 토양병원 역병을 친환경적이며 효과적으로 방제할 수 있는 길항 세균이 형성한 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol)을 포함하는 천연 휘발성 화합물을 함유하는 식물병 방제용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 고추의 성숙을 촉진하는 길항 세균이 형성한 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol)을 포함하는 천연 휘발성 화합물을 함유하는 식물 성장 및 성숙 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 플라보박테리움 (*Flavobacterium* sp.) 균주 GSE09(기탁번호 KACC 91368P) 또는 이 균주로부터 생산되는 대사산물을 함유하는 식물 탄저병 방제용 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 플라보박테리움 (*Flavobacterium* sp.) 균주 GSE09(기탁번호 KACC 91368P) 또는 이 균주로부터 생산되는 대사산물을 함유하는 식물 수량증진용 미생물 비료 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 플라보박테리움 (*Flavobacterium* sp.) 균주 GSE09(기탁번호 KACC 91368P) 또는 이 균주로부터 생산되는 대사산물을 함유하는 식물 성숙촉진용 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 데칸(decane), 도데칸(dodecane), 1,3-디-터-부틸벤젠(1,3-di-*tert*-butylbenzene), 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol), 헥사데칸(hexadecane) 및 테트라데칸(tetradecane)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1 이상의 휘발성 화합물을 포함하는 식물병 방제용 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 데칸(decane), 도데칸(dodecane), 1,3-디-터-부틸벤젠(1,3-di-*tert*-butylbenzene), 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol), 헥사데칸(hexadecane) 및 테트라데칸(tetradecane)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1 이상의 휘발성 화합물을 포함하는 식물 성장 및 성숙 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0019] 이하, 첨부된 도면을 참조하면서 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- [0020] 본 발명은 플라보박테리움 (*Flavobacterium* sp.) 균주 GSE09(기탁번호 KACC 91368P) 또는 이 균주로부터 생산되는 대사산물을 함유하는 식물 탄저병 방제에 사용될 수 있는 무독성이고 친환경적인 탄저병 방제용 조성물을 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 플라보박테리움 (*Flavobacterium* sp.) 균주 GSE09(기탁번호 KACC 91368P) 또는 이 균주로부터 생산되는 대사산물을 함유하는 식물 수량증진 용 미생물 비료 조성물 및 성숙촉진용 조성물을 제공한다.
- [0022] 본 발명자들은 고추 역병에 대한 길항 효과를 가지는 토양 근권세균을 선발하여 확보하기 위하여 다양한 작물의 근권 토양을 수집하여, 그 중 오이 근권 토양 환경에서 분리한 GSE09 균주를 확보하여 16S rRNA 서열 분석, 형태학적 특성 등을 통해 플라보박테리움 (*Flavobacterium* sp.)에 속하는 것으로 동정하였고, 플라보박테리움 균주 GSE09라 명명하고 기탁번호 KACC 91368P로 기탁하였다(대한민국 공개특허 10-2009-0116241 참조).
- [0023] 또한, 본 발명에 의한 근권세균 GSE09 균주는 다양한 처리에 의한 2년 동안의 시설재배 및 포장재배에서도 매우 안정적으로 고추 탄저병을 억제하는 것으로 확인되었다(표 1 및 표 2 참조). 나아가, 본 발명에 의한 GSE09 균주는 다양한 처리에 의한 2년 동안의 시설재배 및 포장재배에서 고추 수량 증진 및 고추 성숙촉진에 효과적인 것으로 확인되었다(표 3 ~ 표 6 참조). 그 결과 상기 GSE09 균주가 고추 탄저병에 대한 생물적 방제 및 식물생

장촉진 내지 수량증진과 성숙촉진에 효과가 뛰어난 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

- [0024] 본 발명에 따른 조성물에 있어서, 상기 균주 또는 대사산물은 상기 균주의 균체, 상기 균주의 현탁액, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 휘발성 물질의 농축물 및 상기 배양물의 건조물 등의 상태로 이용될 수 있다. 상기 균주의 균체는 균 자체의 몸체 및 포자를 모두 포함하는 의미이며, 상기 현탁액은 상기 균체가 증류수, 생리식염수, 완충액 등에 현탁된 상태를 의미하고, 상기 배양물은 균체 포함 및 균체 비포함 배양물을 모두 포함하며, 상기 농축물 및 건조물은 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 따라서 농축 또는 건조된 것을 의미한다.
- [0025] 바람직하게 상기 균주 대사산물은 휘발성 물질이다.
- [0026] 본 발명에 의한 분리된 플라보박테리움 (*Flavobacterium* sp.) 균주 GSE09 및 이 균주의 대사산물은 모두 천연 유래의 물질로서, 자연 환경에서 미생물에 의해 쉽게 분해될 수 있는 물질이다. 따라서 본 발명에 의한 균주 및 배양여액은 단독 또는 본 발명에 속하는 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 충전제 등을 혼합하여 무공해, 친환경 식물병 방제용 살균제 조성물 및 수량증진과 성숙촉진용 조성물로 제조될 수 있어, 고추를 포함한 식물 탄저병 방제 및 수량증진과 성숙촉진에 매우 유용하게 이용될 수 있다.
- [0027] 따라서 본 발명에 의한 토양 근권세균 GSE09 균주는 고추 등 식물 탄저병에 대한 길항효과를 가지는 생물적 방제 및 식물생장 내지 성숙촉진 세균으로써 활용할 수 있을 것이다.
- [0028] 본 발명에 의한 식물 성숙촉진 조성물은 상기 대사산물이 휘발성 물질이고 이를 고추 식물에 달려 있는 푸른 고추뿐만 아니라 고추 식물에서 분리하여 수확한 푸른 고추에 처리하여도 붉은 고추로 성숙을 촉진할 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0029] 또한, 본 발명은 데칸(decane), 도데칸(dodecane), 1,3-디-터-부틸벤젠(1,3-di-*tert*-butylbenzene), 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol), 헥사데칸(hexadecane) 및 테트라데칸(tetradecane)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1 이상의 휘발성 화합물을 포함하는 식물병 방제용 조성물을 제공한다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 휘발성 화합물은 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol)인 것이 바람직하다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 식물병은 식물 탄저병 또는 역병인 것을 특징으로 한다.
- [0032] 본 발명자들은 탄저병 및 역병에 대한 길항 효과를 가지는 토양 근권세균인 라이조박터 엔지모제네시스 균주 ISE13과 플라보박터 균주 GSE09로부터 GC-MS (가스 크로마토그래피) 분석을 통하여, 휘발성 화합물을 분리 및 동정하였고, 분리된 휘발성 화합물을 이용하여 탄저병원균 및 역병원균의 군사 생장, 포자 형성, 포자의 발아율 및 부착기 형성율을 평가하였으며, 평가한 결과 특히 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol)이 고추 탄저병 및 역병에 대한 생물적 방제효과, 및 식물 생장과 성숙 촉진 효과가 뛰어난 것을 확인하였다.
- [0033] 본 발명에 의한 ISE13균주는 대한민국 공개특허 10-2009-0116244에 기재된 바와 같이 본 발명자들에 의해 오이의 근권 토양에서 분리한 토양 환경에서 수집된 자원으로써, 포장과 시설재배지에서 탄저병원균과 역병에 대한 억제 효과가 있었고, 토착 미생물 (total population)에는 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다.
- [0034] 본 발명에 의한 ISE13균주는 16S rRNA 서열 분석, 형태학적 특성 등을 통해 라이조박터 엔지모제네스 (*Lysobacter enzymogenes*)에 속하는 신균주로 동정되었고, 라이조박터 엔지모제네스 균주 ISE13라 명명되고 기탁번호 KACC 91369P로 기탁되었다.
- [0035] 본 발명에 의한 GSE09균주와 ISE13균주가 형성하는 휘발성 화합물질을 측정하기 위하여, tryptic soy broth(TSB)에 24시간 동안 28℃에서 진탕 배양한 후 배양시 형성된 기체를 500 μ l의 헥산에 녹인 후 GC-MS (가스크로마토그래피)를 사용하여 분석하였다. 그 결과, 공통적으로 17개의 물질을 형성하는 것으로 확인되었으며, 이 중 주된 6개의 peak를 동정한 결과, 데칸(decane), 도데칸(dodecane), 1,3-디-터-부틸벤젠(1,3-di-*tert*-butylbenzene), 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol), 헥사데칸(hexadecane) 및 테트라데칸(tetradecane)을 형성하는 것으로 동정되었고, 이를 GSE09균주와 ISE13균주가 형성한 휘발성 화합물에 각각의 동정된 물질을 0.2ppm 첨가하여 GC-MS 분석을 하여 재확인하였다(도 4 및 도 5 참조).
- [0036] 본 발명에 의해 GSE09균주와 ISE13균주가 형성한 휘발성 화합물 중 탄저병원균과 역병원균에 대하여 방제효과가 있는지 알아보기 위하여, 중앙에 물리적 장벽이 있는 I-plate의 한쪽에 감자한천배지(Potato dextrose agar, PDA)와 V8 배지를 각각 만든 후 탄저병원균과 역병원균을 각각 배양하고, 반대쪽에 위에서 동정된 6개의 물질을

100 µg/ml의 농도로 5ml씩 처리하여 28℃에서 배양한 후 탄저병원균의 군사생장, 포자 형성량, 포자 발아율과 포자의 부착기 형성율을 평가하였으며, 고추 역병균의 군사생장, 포자형성량과 포자 발아율을 평가하였다. 그 결과 위에서 동정된 6개의 휘발성 물질, 특히 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol)이 탄저병원균과 역병균에 대하여 대조구에 비하여 군사생장, 포자형성량과 포자 발아율 및 부착기 형성량을 감소시키는 것으로 나타났다(표 11 참조). 그러므로, 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol)을 포함한 휘발성 화합물은 탄저병원균과 역병균에 대한 억제 및 방제효과가 있는 물질이라고 할 수 있다.

- [0037] 본 발명에 의한 세균 유래 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol)을 포함한 휘발성 화합물은 통상적으로 사용되는 충전제 등을 혼합하여 무공해, 친환경 식물병 방제용 조성물로 제조될 수 있어, 고추를 포함한 식물 탄저병 및 역병의 방제에 매우 유용하게 이용될 수 있다.
- [0038] 특히 본 발명에 의한 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol)은 고추 등 식물 탄저병 및 역병에 대한 높은 길항 효과를 가지는 생물적 방제 효과 물질로써 활용될 수 있을 것이다.
- [0039] 본 발명에 있어서, 상기 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol)을 포함하는 휘발성 화합물은 화학적으로 제조하거나, 식물이나 본 발명에 의한 플라보박테리움(*Flavobacterium* sp.) 균주 GSE09 또는 라이조박테리움 엔지모제네시스(*Lysobacterium enzymogenes*) 균주 ISE13로부터 대사산물로부터 통상의 방법에 의해 분리할 수 있다.
- [0040] 본 발명에 따른 조성물에 있어서, 상기 탄저병은 콜레토티리쿰(*Colletotrichum* sp.)의 병원균에 의해 발생하는 탄저병인 것을 특징으로 한다. 예컨대, 상기 식물 탄저병은 콜레토티리쿰 아쿠타툼(*Colletotrichum acutatum*), 콜레토티리쿰 코코데스(*Colletotrichum coccodes*), 콜레토티리쿰 글로이오스포리오이데스(*Colletotrichum gloeosporioides*), 콜레토티리쿰 데마티움(*Colletotrichum dematium*), 글로메렐라 싱굴라타(*Glomerella cingulata*) 및 콜레토티리쿰 라제나리움(*Colletotrichum lagenarium*)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 병원균에 의해 발생하는 탄저병일 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0041] 또한 본 발명에 따른 조성물에 있어서, 상기 역병은 파이토프토라(*Phytophthora* spp.)의 병원균에 의해 발생하는 역병인 것을 특징으로 한다. 예컨대 상기 식물 역병은 파이토프토라 캡시시(*Phytophthora capsici*), 파이토프토라 인페스턴스(*Phytophthora infestans*), 파이토프토라 각토룸(*Phytophthora cactorum*), 파이토프토라 시나모미(*Phytophthora cinamomi*) 등으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 병원균에 의해 발생하는 역병일 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0042] 본 발명에 따른 조성물에 있어서, 적용 가능한 식물은 특별한 제한은 없으며, 예를 들어 고추, 파프리카, 딸기, 토마토, 수박, 오이 및 사과로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 식물에 적용할 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0043] 본 발명에 따른 조성물에 있어서, 식물병 방제용 또는 수량증진과 성숙촉진용 조성물을 식물에 처리하는 방법에는 특별한 제한은 없으며, 예를 들어 식물을 정식전에 딥퍼처리(root-dipping)하거나 또는 관주 처리하여 이용할 수 있다. 침지하는 방법의 경우, 식물체 주변에 조성물을 붓거나 또는 정식시 유묘를 담가둘 수 있다.
- [0044] 또한, 본 발명은 데칸(decane), 도데칸(dodecane), 1,3-디-터-부틸벤젠(1,3-di-*tert*-butylbenzene), 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol), 헥사데칸(hexadecane) 및 테트라데칸(tetradecane)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1 이상의 휘발성 화합물을 포함하는 식물 생장 및 성숙 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0045] 본 발명에 의해 GSE09균주와 ISE13균주에서 분리한 상기 휘발성 화합물은 특히 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol)은 푸른 고추에서 상품적 가치가 높은 붉은 고추로의 식물 성숙을 촉진시키는 효과를 확인하였다(표 10 참조). 특히, 본 발명에 의한 조성물은 고추 식물에 달려 있는 푸른 고추뿐만 아니라 고추 식물에서 분리하여 수확한 푸른 고추에 처리하여도 붉은 고추로 성숙을 촉진할 수 있는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0046] 상술한 바와 같이, 본 발명에 의한 GSE09균주와 ISE13균주 및 이에 의해 형성되는 근권 토양 세균 유래 휘발성 화합물 특히 2,4-디-터-부틸페놀은 식물 탄저병과 역병에 대하여 뛰어난 병억제 효과를 나타내기 때문에 세균 유래 친환경 휘발성 화합물으로써 새로운 살균제를 제공할 수 있다. 또한, 본 발명에 의하면 기존에 사용하였던

농용살균제의 사용량을 감소시킬 수 있어 환경오염과 저항성 균주의 출현 등의 문제를 해결할 수 있다.

[0047] 나아가, 본 발명에 의한 GSE09균주와 ISE13균주 및 이에 의해 형성되는 2,4-디-터-부틸페놀은 친환경적으로 고추를 포함한 식물의 수확량을 증가시키는 동시에 성숙을 촉진시킬 수 있는 효과를 도모할 수 있다. 특히 본 발명에 의한 조성물은 푸른 고추에서 상품적 가치가 높은 붉은 고추로의 고추 성숙을 촉진시키는 생물 비료로도 이용될 수 있어 화학비료의 문제점을 해결할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 본 발명에 의한 GSE09 균주에 의한 시설재배 시 고추 성숙촉진 현상을 나타내는 사진이다.

도 2는 본 발명에 의한 GSE09균주와 ISE13균주의 휘발성 화합물에 의하여 I-plate에서 식물 탄저병원균인 균주 G4(도 2의 A), R14(도 2의 B)와 역병균(도 2의 C)의 균사생장을 억제하는 것과 각각의 현미경 관찰 결과를 나타내는 도면이다.

도 3은 본 발명에 의한 GSE09균주와 ISE13균주의 휘발성 화합물에 의한 고추 성숙 정도를 0~4 단계로 평가한 것을 나타내는 도면이다 (0=푸른색, 1 = breaking, 2 = < 50%, 3 = 50~89%, 4 = = 90% 붉은색).

도 4는 본 발명에 의한 GSE09균주와 ISE13균주가 형성하는 휘발성 화합물을 GC-MS 분석을 통하여 확인한 결과를 나타내는 도면(도 4의 A 및 B), 본 발명에 의한 GSE09균주와 ISE13균주가 형성하는 휘발성 화합물과 이들 중 식물탄저병원균과 역병균을 억제하는 효과가 있는 2,4-디-터-부틸페놀 화합물을 혼합하여 GC-MS 분석을 하여, 동정한 물질을 재확인한 것을 나타내는 도면이며(도 4의 C 및 D), 배지성분의 기체 부분을 분석한 대조구를 나타내는 도면(도 4의 E)이다.

도 5는 본 발명에 의한 GSE09균주와 ISE13균주에 의하여 형성된 휘발성 화합물과 이들 중 동정된 주된 화합물 중에서 데칸(decane), 도데칸(dodecane), 1,3-디-터-부틸벤젠(1,3-di-tert-butylbenzene), 헥사데칸(hexadecane) 또는 테트라데칸(tetradecane)을 혼합하여 GC-MS 분석을 함으로써 분리한 물질을 재확인한 것을 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[실시예 1] GSE09 균주의 고추 탄저병에 대한 병억제 효과 시설재배 검증

[0051] 길항세균 GSE09 균주가 고추 탄저병에 의한 병발생을 감소시키는 효과가 있는지 2008년과 2009년에 경기도 남양주시 덕소에 위치한 고려대학교 부속 농장의 비닐하우스 시설 재배 시설에서 병억제 효과를 검증하였다.

[0052] 시설재배 검정을 하기 위하여 GSE09 균주를 NA (nutrient agar, Difco, USA) 배지에서 48시간 동안 28℃에서 배양하였고, 단일 균총을 NB (nutrient broth, Difco, USA) 5ml에 24시간 동안 전배양 한 후, 전배양한 GSE09 균주를 500ml의 NB에 접종하여 48시간 동안 28℃에서 160rpm으로 배양하였다. 배양된 GSE09 균주를 5000rpm에서 15분 동안 원심 분리하여, GSE09 균주의 세포를 수확한 후 10mM MgSO₄ 버퍼로 세균현탁액을 만들었다. 세균현탁액은 분광광도계로 흡광도를 측정하여 10mM MgSO₄ 버퍼로 A600에서 O.D=0.5 (약 10⁸ cell/ml)의 농도로 맞추었다.

[0053] 이렇게 만들어진 세균 현탁액을 2008년 4월 19일과 2009년 4월 18일에 고추 유묘에 100ml씩 관주처리하였고, 2008년 4월 22일과 2009년 4월 20일에 시설하우스 재배 시설에 정식하였다. 병 평가는 2008년 8월 2일에 15 식물씩 4 반복으로 수행하였고, 2009년에는 7월 29일에 20 식물씩 4 반복으로 수행되었다. 표 3에 그 결과를 나타내었다. 즉 표 3은 길항세균 GSE09 균주에 의한 고추 탄저병에 대한 병억제 효과를 시설재배에서 검증한 결과를 나타낸다(2008~2009년, 경기도 남양주시 덕소 고려대학교 부속 농장).

표 1

연도와 처리	병발생율 (%)		
	푸른 고추	붉은고추	푸른+붉은 고추
2008			
무처리	1.7 ± 1.2	8.3 ± 1.4	4.1 ± 1.4
GSE09	0.8 ± 0.3	4.3 ± 0.3	2.1 ± 0.3
2009			
무처리	5.5 ± 1.1	8.6 ± 0.7	7.3 ± 0.4
GSE09	2.3 ± 1.0	3.3 ± 1.4	2.8 ± 0.8

표 1에 나타난 바와 같이, GSE09를 처리한 시설재배의 고추에서는 푸른 고추와 붉은 고추에서 2008년과 2009년에 모두 무처리 대조구에 비하여 탄저병의 발생이 통계적으로 유의하게 감소하였다. 2008년에 무처리 대조구가 푸른 고추와 붉은 고추, 푸른+붉은 고추에서 1.7, 8.3과 4.1 % 탄저병이 발생하였을 때 GSE09 처리구에서는 각각 0.8, 4.3과 2.1 % 탄저병이 발생하였다. 2009년에도 2008년과 유사하게 GSE09가 무처리 대조구에 비하여 탄저병을 감소시켰는데, 약 49~62% 정도 병을 감소시켰다.

[실시예 2] GSE09 균주의 고추 탄저병에 대한 병억제 효과 포장재배 검증

길항 세균 GSE09는 시설재배 검증에서와 같이 준비하였으며, 세균 현탁액을 2008년 6월 13일, 2009년 5월 14일에 고추 유묘에 100ml씩 관주처리하여 정식하였으며, 고추 열매는 2008년 9월 2일 수확하여 7 식물씩 4 반복으로 수행하였고, 2009년에는 8월 5일에 수확하여 10 식물씩 4 반복으로 탄저병의 발생을 평가하였다. 표 4에 그 결과를 나타내었다. 즉 표 2는 길항세균 GSE09 균주에 의한 고추 탄저병에 대한 병억제 효과를 포장재배에서 검증한 결과를 나타낸다(2008~2009년, 경기도 남양주시 덕소 고려대학교 부속 농장).

표 2

연도와 처리	병발생율(%)		
	푸른 고추	붉은 고추	푸른 + 붉은 고추
2008			
무처리	9.3 ± 1.7	45.3 ± 4.6	15.9 ± 1.5
GSE09	3.3 ± 0.2	10.5 ± 2.7	4.6 ± 0.5
2009			
무처리	8.9 ± 0.6	21.9 ± 3.8	12.8 ± 1.4
GSE09	2.4 ± 0.7	12.2 ± 5.5	5.8 ± 2.1 b

표 2에 나타난 바와 같이, GSE09를 처리한 경우 포장재배의 고추에서는 2008년과 2009년에 모두 무처리 대조구

에 비하여 탄저병의 발생이 통계적으로 유의하게 감소하였다. 2008년에 무처리 대조구에 비하여 푸른 고추에서 65%, 붉은 고추에서 77%, 푸른+붉은 고추에서 71% 탄저병을 감소시켰으며, 2009년에는 무처리 대조구에 비하여 GSE09를 처리한 포장 재배 고추에서 푸른 고추에서 73%, 붉은 고추에서 44%, 푸른+붉은 고추에서 55% 탄저병을 감소시켰다 (표 2).

[실시예 3] GSE09 균주의 시설재배에서 수량 증진 효과

길항 세균 GSE09를 처리한 시설재배의 고추에서 고추 생산이 증진되는지 알아보기 위하여 세균 현탁액을 위에 설명한 것과 동일하게 준비하여 2008년 4월 19일과 2009년 4월 18일에 고추 유묘에 100ml씩 관주처리하였고, 2008년 4월 22일과 2009년 4월 20일에 시설하우스 재배 시설에 정식하였다. 수량 증진 평가는 2008년 8월 2일에 15 식물씩 4 반복으로 수행하였고, 2009년에는 7월 29일에 20 식물씩 4 반복으로 수행되었고, 2회에 걸쳐서 고추의 수와 수확량을 측정하였다 (표 3 및 표 4). 표 4는 길항세균 GSE09 균주에 의한 고추 수 증진 효과를 시설재배에서 검정한 결과를 나타낸 것이고, 표 6은 길항세균 GSE09 균주에 의한 고추 수확량 증진 효과를 시설재배에서 검정한 결과를 나타낸 것이다 (2008~2009, 경기도 남양주시 덕소 고려대학교 부속 농장).

표 3

연도와 처리	고추 수					
	1차 수확			2차 수확		
	푸른 고추	붉은 고추	푸른+붉은 고추	푸른 고추	붉은 고추	푸른+붉은 고추
2008						
무처리	171.0±12.6	302.3±22.3	473.3±28.0	234.5±19.7	223.0±14.2	457.5±32.1
GSE09	218.5±13.7	408.5±35.7	627.0±45.1	310.5±6.7	224.8±2.3	535.3±5.0
2009						
무처리	142.8±11.3	209.8±4.8	352.5±15.6	62.5±9.0 b	88.0±13.9	150.5±20.2
GSE09	182.0±19.0	234.5±16.8	416.5±35.7	112.8±14.1	136.0±5.6	248.8±14.6

표 4

연도와 처리	붉은 고추 무게	
	1차 수확	2차 수확
2008		
무처리	3.4 ± 0.4	4.6 ± 0.5
GSE09	4.0 ± 0.3	5.5 ± 0.2
2009		
무처리	2.9 ± 0.4	1.2 ± 0.1
GSE09	4.8 ± 0.8	2.8 ± 0.5

[0064] 표 3 및 4에 나타난 바와 같이, 2008년과 2009년에는 1차와 2차 수확 동안에 GSE09 균주를 처리할 경우에 무처리 대조구에 비하여 약 10~70% 범위로 고추 수가 증가하였고, 고추 무게는 20~130% 증가하였다. 특히 시설 재배에서 붉은 고추의 생산량이 2008년에는 1~2차 수확에 GSE09균주 처리에 의해서 약 20%의 증가를 가져왔으며, 2009년에는 붉은 고추 생산량이 1차 수확시에는 70%, 2차 수확시에는 130% 증가하였다 (표 4).

[0065] [실시예 4] GSE09 균주의 포장재배에서 수량 증진 효과

[0066] 길항 세균 GSE09를 고추에 처리할 경우에 포장재배할 때 시설재배에서와 유사하게 고추 생산이 증가하는지 알아보기 위하여 생산된 고추의 수와 수확량을 측정하였다 (표 5 및 표 6). 표 5는 길항세균 GSE09 균주에 의한 고추 수 증진 효과를 포장재배에서 검정한 결과를 나타낸 것이고, 표 6은 길항세균 GSE09 균주에 의한 고추 수확량 증진 효과를 포장재배에서 검정한 결과를 나타낸 것이다 (2008~2009, 경기도 남양주시 덕소 고려대학교 부속 농장).

표 5

[0067]

연도와 처리	수확한 고추 수		
	푸른 고추	붉은 고추	푸른+붉은 고추
2008			
무처리	99.3 ± 0.8	21.3 ± 5.3	120.7 ± 5.5
GSE09	114.5 ± 19.1	32.3 ± 3.1	146.8 ± 19.1
2009			
무처리	43.8 ± 7.8	17.3 ± 4.6	61.0 ± 5.5
GSE09	58.0 ± 9.1	27.3 ± 3.0	85.3 ± 11.0

표 6

[0068]

연도와 처리	수확한 고추 무게(kg)		
	푸른 고추	붉은 고추	푸른+붉은 고추
2008			
무처리	0.98 ± 0.01	0.22 ± 0.06	1.20 ± 0.17
GSE09	1.63 ± 0.30	0.44 ± 0.05	2.07 ± 0.30
2009			
무처리	0.60 ± 0.08	0.30 ± 0.10	0.90 ± 0.12
GSE09	1.00 ± 0.21	0.42 ± 0.08	1.42 ± 0.26

[0069] 표 5 및 표 6에 나타난 바와 같이, GSE09 균주 처리에 의한 포장재배 시 고추의 수확은 고추의 수가 2008년과

2009년에는 1차와 2차 수확 시 동안에 무처리 대조구에 비하여 약 20~60% 범위로 증가하였고, 고추 무게는 40~100% 증가하였다. 포장에서 푸른 고추의 수는 2008년에는 GSE09 균주 처리에 의해 대조구보다 20%, 붉은 고추의 수는 50% 증가하였으며, 2009년에는 푸른 고추는 30%, 붉은 고추는 60% 증가하였다 (표 5). 또한 생산된 고추의 무게도 2008년에는 GSE09 균주 처리에 의해 대조구에 비하여 푸른 고추는 70%, 붉은 고추는 100% 수확량이 증가하였으며, 2009년에는 각각 70, 40% 증가하였다 (표 6 및 도 1).

[0070] [실시예 5] 길항 토양 근권세균 GSE09와 ISE13 균주의 휘발성 화합물 형성에 의한 고추 탄저병원균의 생장 및 발달 억제 효과

[0071] 근권세균 유래 휘발성 화합물에 의한 고추 탄저병원균의 생장과 발달의 억제 효과를 연구하기 위하여, 5일 배양한 탄저병원균 (G4와 R14균주)를 중앙에 물리적인 구획이 있는 I-plates의 한쪽부분의 감자한천배지(PDA)에 배양하였다. I-plate의 반대부분의 NA에는 근권세균 GSE09와 ISE13균주를 각각 배양한 현탁액 100 μ l 를 도말하였다. 대조구로는 10mM MgSO₄ buffer를 사용하여 동일량을 도말하였다.

[0072] 28℃에서 배양한 후에 대조구의 탄저병원균이 중앙 파티션에 닿을 때 각 처리구에 대한 탄저병원균의 생장을 측정하였으며, 이 후 5ml의 살균증류수를 넣어 탄저병원균의 분생포자를 수확하였다. 수확된 분생포자 현탁액은 거즈로 걸러 균사를 제거한 후 헤모사이토미터(hemocytometer)를 사용하여 균사생장 단위면적당 포자형성량을 측정하였으며, 수확한 분생포자는 슬라이드글라스 위에 20 μ l 씩 놓은 후, 28℃에서 24시간 동안 배양한 후 분생포자의 발아율과 부착기 형성률을 약 100개의 포자를 현미경 관찰을 통하여 평가하였다. 표 7과 도 2의 A 및 B는 실험한 두 근권세균 GSE09와 ISE13균주가 휘발성 화합물을 형성함으로써 대조구에 비하여 통계적으로 유의하게 효과적으로 탄저병원균 G4와 R14균주의 균사 생장, 포자형성량, 발아율 및 부착기 형성률을 억제하는 효과가 있는 것을 나타낸다.

표 7

균주 및 처리	균사생장(mm)	포자형성 (log no. spores/cm ²)	발아율 (%)	부착기형성율 (%)
<i>C. acutatum</i> isolate G4				
Control	23.1 $\pm$ 1.0	5.53 $\pm$ 0.01	86.5 $\pm$ 2.4	83.0 $\pm$ 2.2
GSE09	16.7 $\pm$ 0.9	4.96 $\pm$ 0.04	60.5 $\pm$ 3.5	41.0 $\pm$ 3.3
ISE13	19.6 $\pm$ 1.0	5.20 $\pm$ 0.04	56.0 $\pm$ 4.7	46.3 $\pm$ 2.8
<i>C. acutatum</i> isolate R14				
Control	24.6 $\pm$ 2.1	5.09 $\pm$ 0.03	91.9 $\pm$ 1.7	87.5 $\pm$ 2.4
GSE09	22.8 $\pm$ 2.4	5.02 $\pm$ 0.04	76.6 $\pm$ 2.2	54.3 $\pm$ 8.4
ISE13	21.5 $\pm$ 1.3	5.08 $\pm$ 0.02	68.9 $\pm$ 5.3	61.6 $\pm$ 5.8

[0073]

[0074] [실시예 6] 길항 토양 근권세균 GSE09와 ISE13 균주의 휘발성 화합물 형성에 의한 고추 역병원균의 생장 및 발달 억제 효과

[0075] 근권세균 유래 휘발성 화합물에 의한 고추 역병원균의 생장과 발달의 억제 효과를 연구하기 위하여, 5일 배양한 역병원균 (S197균주)를 중앙에 물리적인 구획이 있는 I-plates의 한쪽 부분의 V8배지(V8)에 배양하였다. I-plate의 반대부분의 NA에는 근권세균 GSE09와 ISE13균주를 각각 배양한 현탁액 100 μ l 를 도말하였다. 대조구로는 10mM MgSO₄ buffer를 사용하여 동일량을 도말하였다.

[0076] 28℃에서 배양한 후에 대조구의 역병원균이 중앙 파티션에 닿을 때 각 처리구에 대한 역병원균의 생장을

측정하였다. 역병균의 유주자 형성량과 발아율을 측정하기 위하여 유주자의 포자를 형성한 후 I-plate의 V8배지에 400 μ l 유주자 현탁액 (10^5 유주자/ml)을 도말하여 3일 동안 28℃에서 배양한 후 각각의 세균현탁액과 대조구인 10mM MgSO₄ buffer를 NA에 100 μ l 씩 도말하여 7일 동안 형광등 아래에서 배양하여 유주자낭의 형성을 유도하였다. 이후에 1ml의 냉각된 살균수를 고추 역병균이 배양된 부분에 첨가한 후 4℃에서 30분, 상온에서 30분 동안 배양한 후 유주자낭으로부터 유주자를 나출시켰다. 형성된 유주자를 피낭화시키기 위하여 30초 동안 vortexing한 후, 유주자의 수를 헤모사이토미터를 사용하여 측정하였으며, 이 포자현탁액을 슬라이드글라스 위에 20 μ l 씩 놓은 후 2~4시간 동안 배양하여 발아율을 측정하였다. 표 8 및 도 2의 C는 실험한 두 근권세균 GSE09와 ISE13균주가 휘발성 화합물을 형성함으로써 대조구에 비하여 통계적으로 유의하게 효과적으로 역병균주의 균사 생장, 포자형성량, 및 발아율 형성을 억제하는 효과가 있는 것을 나타낸다.

표 8

균주 및 처리	균사생장(mm)	포자형성 (log no. spores/cm ²)	발아율 (%)
Control	30.4 ± 0.8	3.97 ± 0.10	83.2 ± 3.9
GSE09	8.6 ± 1.2	3.48 ± 0.07	5.5 ± 1.2
ISE13	19.1 ± 2.8	3.50 ± 0.05	7.9 ± 2.0

[0077]

[0078]

[실시예 7] 길항 토양 근권세균 GSE09와 ISE13 균주의 휘발성 화합물 형성에 의한 고추 열매의 성숙을 촉진하는 효과

[0079]

근권세균 유래 휘발성 화합물에 의한 고추 열매의 성숙을 촉진하는 효과를 확인하기 위하여, 8cm 이상의 푸른 고추 열매를 수확하여 1% NaOCl 용액에 5초 동안 표면살균한 후 살균 증류수로 3회 세척하여 후드 안에서 물기를 제거하였다. 동시에, 100 μ l의 세균 현탁액과 대조구인 10mM MgSO₄ buffer를 각각 지름 6cm의 펠트리디쉬의 NA에 도말하였으며, 약 12cm x 12cm 크기의 사각 펠트리디쉬에 세균 도말한 것과 표면 살균한 고추열매를 넣은 후 파라필름 (Parafilm®

"M", Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA)으로 실링(sealing) 하였다. 이 사각 플레이트를 28℃에 16시간 형광등/8시간 암 상태 아래에 배양한 후 8~10일째에 고추 열매가 푸른색에서 붉은색으로 변한 정도를 평가하였다. 도 3은 고추 성숙 정도를 0~4단계로 평가한 것을 나타내었다 (0=푸른색, 1 = breaking, 2 = < 50%, 3 = 50~89%, 4 = = 90% 붉은색). 표 9는 실험한 두 근권세균 GSE09와 ISE13균주가 휘발성 화합물을 형성함으로써 대조구에 비하여 통계적으로 유의하게 효과적으로 고추의 성숙을 푸른 고추에서 붉은 고추로 촉진시키는 효과가 있는 것을 나타낸다.

표 9

균주 및 처리	Fruit ripening (%)	Ripening Index (0 to 4)	
		중간값	랭크(Rank)
Control	2.5 ± 1.6	0.0	38.6 ± 3.9
GSE09	81.0 ± 5.4	3.0	102.6 ± 2.4
ISE13	40.5 ± 9.8	2.0	70.1 ± 7.8

[0080]

[0081]

[실시예 8] 가스크로마토그래피에 의한 길항 토양 근권세균 GSE09와 ISE13 균주로부터 휘발성 화합물 분리 및

동정

- [0082] 가스크로마토그래피-매스 스펙트로메트리 (GC-MS) 분석을 수행하여 토양 근권세균 GSE09와 ISE13균주가 형성한 휘발성 화합물질을 동정하였다. GSE09와 ISE13균주를 tryptic soy agar(TSA)배지에 2일 동안 배양한 후 단일 콜로니를 tryptic soy broth (TSB)에 전배양한 후 1000ml baffle 플라스크에 100ml TSB배지에 28℃에서 24시간 동안 160rpm으로 진탕 배양하였다. 무접종 TSB를 대조구로 사용하였다. 각각의 세균 배양액이 있는 플라스크의 기체부분을 50ml gastight syringe (Hamilton Co., Reno, NV, USA)으로 추출하여, 수집된 기체 10ml을 500 μ l의 헥산에 농축시켰다. 이 용액 2 μ l을 30m x 0.25mm x 0.25 μ m DB-5MS 컬럼이 장착된 GC-MS 시스템에 주입하였으며, injector, 200℃; detector, 210℃; 컬럼 오븐, 30℃에서 30분 동안, 180℃까지 10℃/min의 속도로 온도를 증가시켰으며, 2분동안 40℃/min의 속도로 200℃까지 온도를 급증시켰다. 캐리어(carrier) 가스는 헬륨으로 1ml/min의 속도로 흘렸다. GC-MS 분석을 통하여 임의적으로 동정된 물질을 확인하기 위하여 상업적으로 판매되는 물질을 구매하여 0.2ppm의 농도로 GSE09와 ISE13균주의 휘발성물질을 추출한 것과 혼합하여 GC-MS 분석을 하였다.
- [0083] 도 4는 이후에 기술될 GC-MS에 의해 동정된 물질 중에서 탄저병과 역병 억제효는 효과가 있으며, 동시에 고추의 성숙을 촉진시키는 효과가 있는 2,4-디-터 부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol) 물질을 세균의 휘발성 화합물과 혼합하여 GC-MS로 측정함으로써 2,4-디-터 부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol)이 세균이 형성한 휘발성 화합물인 것을 재확인한 것을 나타내었다. 도 5는 GC-MS에 의해 동정된 물질 중에서 데칸(decane), 도데칸(dodecane), 1,3-디-터-부틸벤젠(1,3-di-*tert*-butylbenzene), 헥사데칸(hexadecane) 또는 테트라데칸(tetradecane)과 본 발명에 의한 GS09균주와 ISE13균주에 의하여 형성된 휘발성 화합물과 혼합하여 GC-MS 분석을 함으로써 분리한 물질을 재확인한 것을 나타내는 도면이다.
- [0084] [실시예 9] 근권세균 유래 휘발성 화합물 2,4-디-터 부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol)에 의한 고추 탄저병원균, 역병균의 생장 및 발달 억제와 고추 열매의 성숙 촉진 효과
- [0085] 세균의 휘발성 물질의 GC-MS 결과를 토대로 하여, 동정된 화합물과 GSE09와 ISE13균주가 갖는 생물적 효과-탄저병과 역병의 생장과 발달과 고추의 성숙에 주는 영향을 평가하였다. 일차적으로 동정된 6개의 화합물인 데칸(decane), 도데칸(dodecane), 1,3-디-터-부틸벤젠(1,3-di-*tert*-butylbenzene), 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol), 헥사데칸(hexadecane) 및 테트라데칸(tetradecane)을 고추의 성숙과 탄저병원균 R14균주의 생장과 발달억제효과가 있는지 평가하였다.
- [0086] 표 10 및 표 11은 동정된 6개의 화합물이 고추의 성숙과 탄저병원균 R14의 균사생장, 포자형성량, 발아율 및 부작기 형성률에 미치는 영향을 평가한 결과이며, 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol)이 대조구인 용매에 비하여 특히 효과적으로 고추의 성숙을 촉진하고, 탄저병원균 R14균주의 생장과 발달을 억제하는 것을 나타낸다.

표 10

균주 및 처리	Fruit ripening (%)	Ripening Index (0 to 4)	
		중간값	랭크(Rank)
Solvent	5.0 $\pm$ 2.1	0.0	60.8 $\pm$ 5.7
Decane	11.0 $\pm$ 5.1	0.0	63.7 $\pm$ 7.0
Dodecane	9.0 $\pm$ 5.6	0.0	57.9 $\pm$ 6.4
1,3-di- <i>tert</i> -butylbenzene	6.5 $\pm$ 3.3	0.0	58.6 $\pm$ 5.8
Tetradecane	17.0 $\pm$ 5.7	0.0	76.5 $\pm$ 7.9
2,4-di- <i>tert</i> -butylphenol	51.0 $\pm$ 7.8	2.5	109.0 $\pm$ 7.6
Hexadecane	8.5 $\pm$ 3.0	0.0	66.7 $\pm$ 7.1

[0087]

표 11

균주 및 처리	균사생장(mm)	포자형성 (log no. spores/cm ²)	발아율 (%)	부착기형성율 (%)
Solvent	25.6 ± 0.7	4.84 ± 0.03	86.0 ± 1.9	86.4 ± 2.4
Decane	25.3 ± 0.5	4.81 ± 0.04	82.0 ± 1.6	83.2 ± 1.7
Dodecane	25.6 ± 0.4	4.81 ± 0.02	81.7 ± 1.9	83.8 ± 1.3
1,3-di- <i>tert</i> -butylbenzene	25.8 ± 0.3	4.83 ± 0.01	85.1 ± 1.3	85.7 ± 1.9
Tetradecane	24.5 ± 0.6	4.86 ± 0.04	83.2 ± 1.6	83.7 ± 2.1
2,4-di- <i>tert</i> -butylphenol	14.0 ± 0.4	4.72 ± 0.05	43.1 ± 2.9	38.0 ± 2.4
Hexadecane	24.3 ± 0.5	4.86 ± 0.02	83.4 ± 2.0	81.3 ± 2.2

[0088]

[0089]

위의 6개의 휘발성 화합물 중에 일차적인 평가에서 특히 효과가 있는 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol)과 근권 길항 세균 GSE09와 ISE13균주가 분비하는 휘발성 화합물이 가지는 탄저병과 역병 억제 효과와 고추 성숙 촉진 효과를 확인하기 위하여, 동정된 물질 (100 μ g/ml)을 용매(살균증류수, 2%(v/v) dimethyl sulfoxide, 0.001%(v/v) tween20)에 녹인 후 실험하였으며, 10mM MgSO₄ buffer와 용매를 대조구로 사용하여 상기에 설명한 방법과 같이 실험하였다. 이때 GSE09와 ISE13균주는 tryptic soy agar (TSA)에 배양하여 I-plate에서 항균 효과를 평가하였다.

[0090]

표 12 및 표 13은 각각 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol)과 세균 GSE09와 ISE13균주가 고추의 성숙과 탄저병원균 R14와 G4균주의 균사생장, 포자형성량, 발아율 및 부착기 형성률과 고추 역병균의 균사생장, 포자형성량 및 발아율에 미치는 영향을 평가한 결과이며, 2,4-디-터-부틸페놀(2,4-di-*tert*-butylphenol)과 세균 GSE09와 ISE13균주 모두 대조구인 용매와 버퍼(buffer)에 비하여 통계적으로 유의하게 효과적으로 고추의 성숙을 촉진하고, 탄저병원균 R14와 G4균주 및 역병균의 생장과 발달을 억제하는 것을 나타낸다.

표 12

균주 및 처리	Fruit ripening (%)	Ripening Index (0 to 4)	
		중간값	랭크(Rank)
Solvent	4.5 ± 2.3	0.0	26.3 ± 3.0
MgSO ₄ buffer	7.5 ± 3.2	0.0	29.8 ± 3.9
2,4-di- <i>tert</i> -butylphenol	47.9 ± 7.8	2.0	63.6 ± 3.8
GSE09	61.5 ± 8.4	3.0	69.2 ± 5.5
ISE13	52.0 ± 9.6	2.5	61.8 ± 6.5

[0091]

표 13

균주 및 처리	균사생장 (mm)	포자형성 (log no. spores/cm ²)	발아율 (%)	부착기형성율 (%)
<i>C. acutatum</i> isolate G4				
Solvent	25.8 ± 0.3	5.81 ± 0.03	88.6 ± 0.7	86.5 ± 1.2
MgSO ₄ buffer	24.9 ± 0.3	5.83 ± 0.02	90.0 ± 0.6	90.0 ± 0.8
2,4-di- <i>tert</i> -butylphenol	17.8 ± 0.3	4.99 ± 0.04	65.5 ± 1.9	9.1 ± 0.9
GSE09	16.6 ± 0.9	5.24 ± 0.05	59.9 ± 1.7	8.3 ± 1.5
ISE13	15.8 ± 0.9	5.12 ± 0.04	63.3 ± 1.9	13.0 ± 1.6
<i>C. acutatum</i> isolate R14				
Solvent	24.8 ± 0.4	4.72 ± 0.01	88.8 ± 0.6	87.7 ± 0.9
MgSO ₄ buffer	24.4 ± 0.4	4.69 ± 0.02	89.5 ± 0.9	90.9 ± 0.9
2,4-di- <i>tert</i> -butylphenol	18.1 ± 0.6	4.29 ± 0.01	29.9 ± 2.9	28.7 ± 2.6
GSE09	16.9 ± 0.5	4.36 ± 0.05	16.1 ± 1.0	11.9 ± 1.0
ISE13	19.6 ± 0.9	4.39 ± 0.04	28.0 ± 1.4	21.7 ± 1.7
<i>P. capsici</i> isolate S197				
Solvent	24.3 ± 0.4	3.99 ± 0.04	86.9 ± 1.0	-
MgSO ₄ buffer	23.8 ± 0.3	4.08 ± 0.02	89.0 ± 0.9	-
2,4-di- <i>tert</i> -butylphenol	17.0 ± 0.4	3.56 ± 0.09	22.7 ± 1.0	-
GSE09	18.4 ± 0.4	3.34 ± 0.05	11.2 ± 1.3	-
ISE13	17.1 ± 0.5	3.45 ± 0.06	10.5 ± 1.4	-

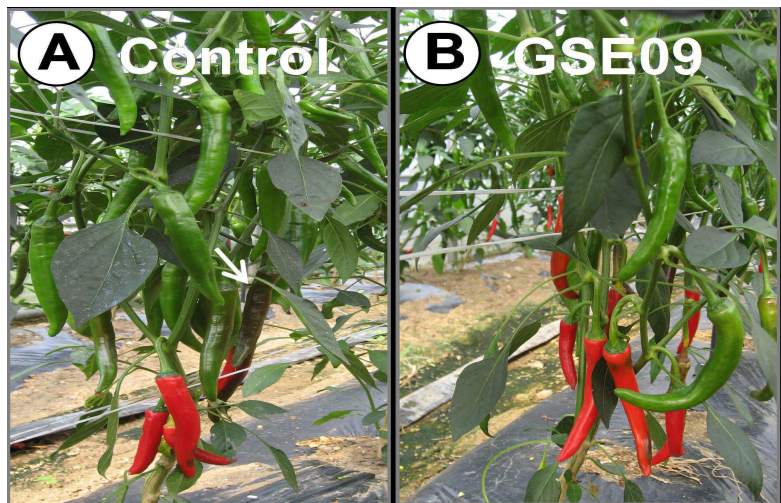
[0092]

[0093]

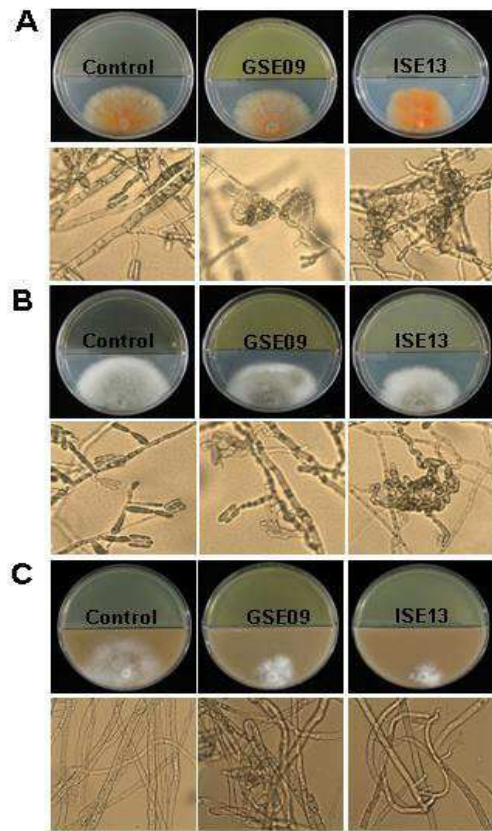
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

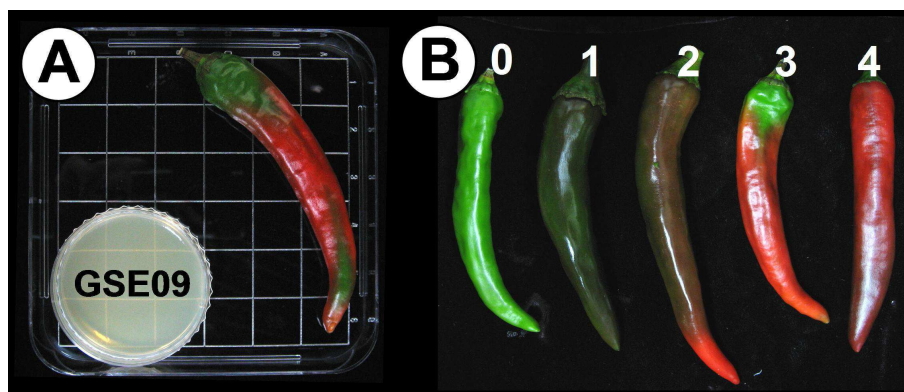
도면1



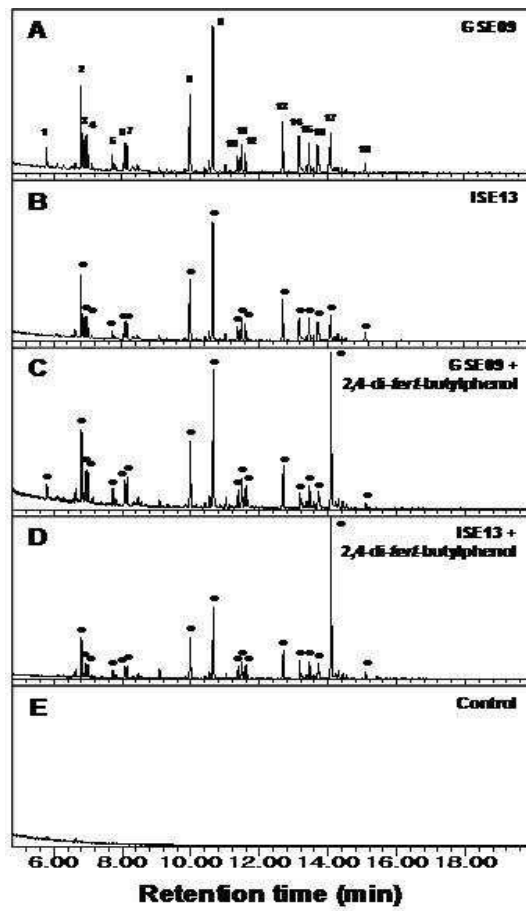
도면2



도면3



도면4



도면5

