



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0054894
(43) 공개일자 2017년05월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01N 43/16 (2006.01) A01N 43/04 (2006.01)

A01N 43/82 (2006.01) A01N 57/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01N 43/16 (2013.01)

A01N 43/04 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0157609

(22) 출원일자 2015년11월10일

심사청구일자 2015년11월10일

(71) 출원인

전남대학교산학협력단

광주광역시 북구 용봉로 77 (용봉동)

대한민국(환경부 국립생물자원관장)

인천 서구 환경로 42, 종합환경연구단지 국립생물
자원관 (경서동)

(72) 발명자

김진철

대전광역시 유성구 가정로 63 , 102동 1505호

장자영

광주광역시 남구 군분로13번길 5-1 (주월동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

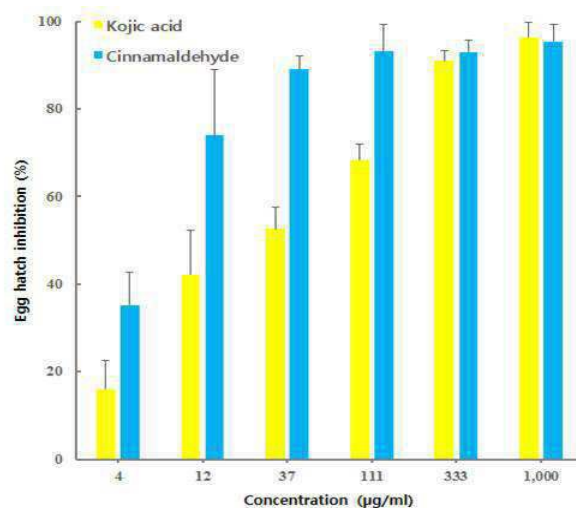
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 코지산을 유효성분으로 함유하는 뿌리혹선충 방제용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 코지산을 유효성분으로 함유하는 뿌리혹선충 방제용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 본 발명은 토양 작물에 기생하는 뿌리혹선충(*Meloidogyne* sp.)에 대해 살선충 효과를 가지는 활성물질을 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*) 균주로부터 분리하였으며, EI-MS 및 ^1H -과 ^{13}C -NMR 분석을 통해 상기 활성물질이 코지산(kojic acid)임을 확인하였다. 따라서 아스퍼질러스 오리제 균주로부터 분리한 코지산이 뿌리혹선충 유충 및 알 부화 억제 효과를 나타내므로, 이를 이용하면 천연물로부터 획득할 수 있다는 이점을 살려 환경친화적인 살선충제로 이용할 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A01N 43/82 (2013.01)

A01N 57/10 (2013.01)

(72) 발명자

김태윤

대구광역시 달서구 구마로36길 20, 208동 203호

이항범

광주광역시 서구 하남대로710번길 20, 501동 803호

전선정

광주광역시 북구 용봉로 77 전남대학교 친환경농업
연구센터 312호

이혜원

광주광역시 북구 용봉로 77 전남대학교 친환경농업
연구센터 312호

김지형

서울특별시 강서구 양천로 731, 302동 1803호 (동
아3차아파트)

배창환

경기도 수원시 영통구 봉영로1517번길 30, 603동
1901호 (영통동, 극동풍림아파트)

여주홍

경기도 수원시 영통구 인계로 165, 523동 1203호
(매탄동, 주공5단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NIBR201512204

부처명 환경부

연구관리전문기관 국립생물자원관

연구사업명 환경부 용역과제

연구과제명 진균 유래 천연 식물보호 활성물질 탐색

기 여 율 1/1

주관기관 전남대학교

연구기간 2015.05.01 ~ 2015.11.30

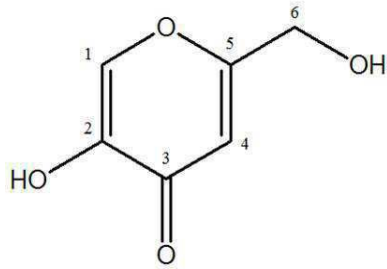
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 코지산(kojic acid) 또는 농업적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 뿌리혹선충 방제용 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서, 살선충활성 물질을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 뿌리혹선충 방제용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 살선충활성 물질은 아버멕틴(ivermectin)계 살선충활성 물질, 모란텔 타르트레이트(morantel tartrate), 메설펜포스(mesulfenfos) 및 레바미솔(levamisole)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 뿌리혹선충 방제용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 아버멕틴(ivermectin)계 살선충활성 물질은 에마멕틴 벤조에이트(emamectin benzoate), 아바멕틴(abamectin), 밀베멕틴(milbemectin) 또는 이버멕틴(ivermectin)인 것을 특징으로 하는 뿌리혹선충 방제용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 뿌리혹선충은 멜로이도기네 인코그니타(*Meloidogyne incognita*)인 것을 특징으로 하는 뿌리혹선충 방제용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 뿌리혹선충의 생육 또는 알 부화를 억제하는 것을 특징으로 하는 뿌리혹선충 방제용 조성물.

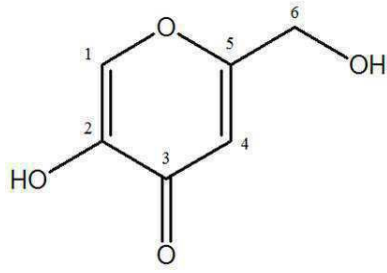
청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 뿌리혹선충 방제용 조성물의 유효량을 식물부위, 토양 또는 종자에 처리하는 단계를 포함하는 뿌리혹선충을 방제하는 방법.

청구항 8

하기 화학식 1로 표시되는 코지산(kojic acid) 또는 농업적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 뿌리혹선충의 감염 예방 또는 치료용 조성물.

[화학식 1]



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 코지산을 유효성분으로 함유하는 뿌리혹선충 방제용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 코지산(kojic acid) 또는 농업적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 뿌리혹선충 방제용 조성물, 상기 뿌리혹선충 방제용 조성물의 유효량을 식물부위, 토양 또는 종자에 처리하는 단계를 포함하는 뿌리혹선충을 방제하는 방법 및 코지산(kojic acid) 또는 농업적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 뿌리혹선충의 감염 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 편형 동물문(Platyhelminthes)에 속하는 선충은 400~2,000 μ m 정도 크기의 작은 토양 동물로서 사상 및 방추형 모양으로 좌우대칭형이며, 단단한 표피를 가지고 있다. 선충은 일반적으로 토양 중에 약 75만 마리/m²가 서식하고 있으며, 먹이에 따라 세균 포식, 세균 분산, 유기물의 분해 및 생성, 식물 기생성 등으로 나눌 수 있다. 특히, 식물 기생성 선충은 매년 연작지 토양에서 발생하여 심각한 피해를 주고 있다. 이 중, 뿌리혹선충(*Meloidogyne* sp.)은 경제적으로 가장 중요한 식물 기생선충으로서 약 1,700 여종의 식물종이 기주식물로 기록되어 있으며, 기후 적응력이 높아, 전 세계적으로 분포한다. 우리나라의 경우, 고구마뿌리혹선충(*M. incognita*), 자바뿌리혹선충(*M. javanica*), 땅콩뿌리혹선충(*M. arenaria*), 양다래뿌리혹선충(*M. cruciani*), 당근뿌리혹선충(*M. hapla*) 등의 뿌리혹선충에 의한 피해 작물과 피해액이 점차 증가하고 있다.

[0003] 뿌리혹선충의 방제방법으로 담수처리 및 태양열을 이용한 토양소독법, 윤작, 객토, 답전 윤환(paddy-upland rotation)과 같은 물리적 방제방법과 화학적 살선충제를 이용하는 화학적 방제방법이 있다. 하지만 물리적 방제의 경우, 재배시기 조절 및 인력, 시간의 제약 등으로 인해 실질적 사용이 제한되고 있으며, 또한 화학적 방제 방법은 약효가 뛰어나고 사용이 비교적 편리하지만, 잔류문제, 인체 및 자연환경에 대한 유해성 문제로 인해 사용이 제한되고 있는 실정이다. 따라서 이를 대체할 수 있는 보다 환경과 인간에 안전하고 효과적인 살선충제의 개발이 절실히 요구되고 있다. 친환경적으로 식물 기생성 선충을 방제하는 방법으로 미생물을 이용하거나 그들이 생산하는 대사산물을 이용하는 방법이 있다. 곰팡이는 다양한 대사경로를 가져 다양한 대사산물을 합성할 수 있으며 이들은 많은 항생물질과 상업적으로 이용 가능한 다양한 물질을 생산한다고 알려져 있다.

[0004] 한편, 한국등록특허 제1501033호에는 살선충 효과를 가지는 스트렙토마이세스 고양엔시스 BIG11003 균주 및 이의 용도에 대해 개시하고 있으며, 한국등록특허 제1246707호에는 포토랍투스 템프라타 템프라타 균주를 포함하는 뿌리혹선충 방제용 조성물에 대해 개시하고 있다. 하지만 본 발명의 코지산을 유효성분으로 함유하는 뿌리혹선충 방제용 조성물 및 이의 용도에 대해서는 아직 언급된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 토양 작물에 기생하는 뿌리혹선충(*Meloidogyne* sp.)에 대해 살선충활성을 가지는 물질을 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*) 균주로부터 분리하였다. 상기 균주는 흰말채나무(*Cornus alba*) 잎에서 분리하였으며, 상기 균주의 배양여액의 용매 분획별 살선충활성을 확인한 결과, 에틸아세테이트 추출물이 가장 우수하였으며, EI-MS 및 ¹H-과 ¹³C-NMR 분석을 통해 상기 활성물질이 코지산(kojic acid)임을 확인하였다. 따라서 아스퍼질러스 오리제 균주로부터 분리한 코지산이

뿌리혹선충 유충 및 알 부화 억제 효과를 나타내는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 코지산(kojic acid) 또는 농업적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 뿌리혹선충 방제용 조성물을 제공한다.
- [0007] 또한, 본 발명은 상기 뿌리혹선충 방제용 조성물의 유효량을 식물부위, 토양 또는 종자에 처리하는 단계를 포함하는 뿌리혹선충을 방제하는 방법을 제공한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 코지산(kojic acid) 또는 농업적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 뿌리혹선충의 감염 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0009] 본 발명은 토양 작물에 기생하는 뿌리혹선충(*Meloidogyne* sp.)에 대해 살선충 효과를 가지는 활성물질을 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) 균주로부터 분리하였으며, EI-MS 및 ^1H -과 ^{13}C -NMR 분석을 통해 상기 활성물질이 코지산(kojic acid)임을 확인하였다. 따라서 아스퍼질러스 오리재 균주로부터 분리한 코지산이 뿌리혹선충 유충 및 알 부화 억제 효과를 나타내므로, 이를 이용하면 천연물로부터 획득할 수 있다는 이점을 살려 환경 친화적인 살선충제로 이용할 수 있다.

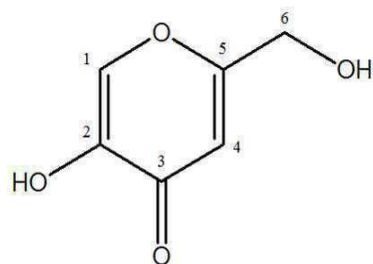
도면의 간단한 설명

- [0010] 도 1은 흰말채나무(*Cornus alba*) 잎에서 분리한 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) NIBRFGC000004108 균주의 형태학적(A) 및 분자계통학적(B) 동정결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) NIBRFGC000004108 균주 배양여액의 뿌리혹선충(*M. incognita*)의 2령 유충에 대한 살선충활성 및 알 부화 억제 활성을 나타낸 것이다.
- 도 3은 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) NIBRFGC000004108 균주의 배양여액에서 추출하여 획득한 3종의 유기용매 분획층의 토마토 뿌리혹선충 2령 유충에 대한 살선충활성을 나타낸 것이다.
- 도 4는 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) NIBRFGC000004108 균주로부터 분리된 살선충활성 물질의 크로마토그램(A) 및 최대흡광도(B)를 나타낸 것이다.
- 도 5는 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) NIBRFGC000004108 균주의 배양여액의 추출물로부터 분리한 코지산(kojic acid)의 토마토 뿌리혹선충(*M. incognita*) 2령 유충에 대한 살선충활성을 나타낸 것이다. 신남알데히드(cinnamaldehyde)는 살선충활성을 나타내는 양성 대조군이다.
- 도 6은 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) NIBRFGC000004108 균주의 배양여액의 추출물로부터 분리한 코지산(kojic acid)의 토마토 뿌리혹선충(*M. incognita*)의 알 부화 억제율을 나타낸 것이다. 신남알데히드(cinnamaldehyde)는 살선충활성을 나타내는 양성 대조군이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 본 발명을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 코지산(kojic acid) 또는 농업적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 뿌리혹선충 방제용 조성물을 제공한다.

화학식 1

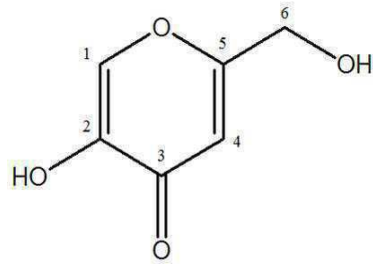


[0012]

- [0013] 본 발명의 뿌리혹선충 방제용 조성물은 코지산(kojic acid) 또는 농업적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하며, 살선충활성 물질을 추가로 함유할 수 있다. 상기 살선충활성 물질은 아버멕틴(ivermectin)계 살선충활성 물질, 모란텔 타르테이트(morantel tartrate), 메설펜포스(mesulfenfos), 레바미솔(levamisol) 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0014] 상기 아버멕틴(ivermectin)계 살선충활성 물질은 에마멕틴 벤조에이트(emamectin benzoate), 아바멕틴(abamectin), 밀베멕틴(milbemectin), 이버멕틴(ivermectin) 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0015] 본 발명에 따른 뿌리혹선충 방제용 조성물에서, 살선충활성은 일반적으로 식물 병원성을 나타내는 뿌리혹선충(*Meloidogyne* sp.); 헤테로테라(*Heterodera* sp.), 글로보테라(*Globodera* sp.) 등과 같은 시스트선충; 뿌리썩이선충(*Pratylenchus*.); 감귤선충(*Tylenchulus semipenetrans*); 감귤뿌리 선충(*Radopholus*); 줄기구근선충(*Ditylenchus*); 밀알선충(*Anguina*); 잎선충(*Aphelenchoides*)에 대한 살선충활성이며, 바람직하게는 뿌리혹선충(*Meloidogyne* sp.)에 대한 살선충활성이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0016] 본 발명에 따른 뿌리혹선충 방제용 조성물에서, 상기 뿌리혹선충은 멜로이도기네 인코그니타(*Meloidogyne incognita*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0017] 본 발명에 따른 뿌리혹선충 방제용 조성물에서, 상기 조성물은 뿌리혹선충의 생육 또는 알 부화를 억제할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명에 따른 뿌리혹선충 방제용 조성물은 예를 들어, 직접 분사가 가능한 용액, 분말 및 현탁액의 형태 또는 고농축 수성, 유성 또는 다른 현탁액, 분산액, 에멀전, 유성 분산액, 페이스트, 분진, 흠뿌림 물질 또는 과립제로 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명의 뿌리혹선충 방제용 조성물은 다양한 형태로 제제화할 수 있다. 상기 제제는 예를 들어 용매 및/또는 담체를 첨가함으로써 제조될 수 있다. 종종, 비활성 첨가제 및 표면-활성 물질, 예를 들어 유화제 또는 분산제를 제제에 혼합한다. 적합한 표면-활성 물질은 방향족 술폰산(예를 들어 리그노술폰산, 페놀-술폰산, 나프탈렌- 및 디부틸나프탈렌술폰산), 지방산, 알킬- 및 알킬아릴술포네이트, 알킬 라우릴 에테르, 지방 알코올 술페이트의 알칼리 금속, 알카라인 토금속, 암모늄염, 술페이트화 핵사-, 헵타- 및 옥타데칸올, 지방 알코올 글리콜 에테르의 염, 술포네이트 나프탈렌 및 이의 유도체, 포름알데히드의 축합물, 나프탈렌 또는 나프탈렌술폰산, 페놀 및 포름알데히드의 축합물, 폴리옥시에틸렌옥틸 페놀 에테르, 에톡실화 이소옥틸-, 옥틸- 또는 노닐페놀, 알킬페닐 또는 트리부틸페닐 폴리글리콜 에테르, 알킬아릴폴리에테르 알코올, 이소트리데실 알코올, 지방 알코올/에틸렌 옥사이드 축합물, 에톡실화 피마자유, 폴리옥시에틸렌 알킬에테르 또는 폴리옥시프로필렌, 라우릴 알코올 폴리글리콜 에테르 아세테이트, 소르비톨 에스테르, 리그닌-술파이트 페액 또는 메틸셀룰로오스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 적합한 고형 담체 물질은 원칙적으로, 모두 다공성이고, 농업적으로 허용가능한 담체, 예를 들어 광물토류(예컨대 실리카, 실리카 겔, 실리카이트, 활석, 고령토, 석회암, 석회, 초크, 보울, 황토, 점토류, 백운석, 규조 토류, 황산칼슘, 황산 마그네슘, 산화마그네슘, 분쇄 합성물질), 비료(예컨대 황산암모늄, 인산암모늄, 질산암모늄, 우레아), 식물성 제품(예컨대 곡물 가루, 나무 껍질 가루, 목분(wood meal) 및 견과 껍질 가루) 또는 셀룰로오스 분말일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 상기 고형 담체는 1종류 또는 2종류 이상을 혼합하여 사용할 수도 있다.
- [0021] 본 발명의 뿌리혹선충 방제용 조성물은 관수용, 엽면 살포용, 종자 소독용 또는 농기구 소독용으로 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 본 발명의 뿌리혹선충 방제용 조성물은 작물체 흡수 및 효과를 증진시키기 위하여 확산제 및 침투제, 또는 계면활성제와도 혼용이 가능하다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 뿌리혹선충 방제용 조성물의 유효량을 식물부위, 토양 또는 종자에 처리하는 단계를 포함하는 뿌리혹선충을 방제하는 방법을 제공한다.
- [0024] 상기 뿌리혹선충을 방제하는 방법으로는 상기 뿌리혹선충 방제용 조성물의 유효량을 이용한 방제용 조성물을 식물부위, 토양 또는 종자에 분무 또는 살포하여 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 코지산(kojic acid) 또는 농업적으로 허용가능한 이의 염을 유효성

분으로 함유하는 뿌리혹선충의 감염 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[화학식 1]



본 발명의 뿌리혹선충의 감염 예방 또는 치료용 조성물은 특히 연작을 수행하는 시설재배지 등의 토양에 고밀도로 서식하며, 작물의 뿌리에 침입하여 작물의 성장을 둔화시키고 수확을 감소시켜 결국에는 작물을 고사하게 만드는 식물 병원성 토양선충 방제에 이용될 수 있기 때문에, 특히 무엇보다도 무공해, 안전농산물에 대한 관심이 높아지고 수요가 늘어나고 있으며 농약사용에 의한 잔류독성, 환경오염에 대한 경각심이 높아지고 있는 시점에서 무공해 안전농산물의 생산에 매우 크게 기여할 수 있다.

본 발명의 뿌리혹선충의 감염 예방 또는 치료용 조성물은, 식물이나 재배 토양에 선충이 나타나기 시작하거나 나타나기 전 예방보호 조치로, 선충의 피해를 받는 곡물(예컨대, 밀, 보리, 호밀, 귀리, 쌀, 사탕수수 및 관련 작물), 사탕무(예컨대, 사탕무 및 사료 사탕무), 오이 식물(예컨대, 오일, 서양호박, 멜론), 야채(예컨대, 시금치, 상추, 아스파라거스, 양배추 및 브라시카, 당근, 양파, 토마토, 감자), 감귤류 과일(예컨대, 오렌지, 레몬, 자몽, 중국종 귤), 과일(예컨대, 사과, 배, 자두, 복숭아, 알몬드, 체리, 딸기, 라즈베리 및 블랙베리), 콩과 식물(예컨대, 알팔파, 강낭콩, 렌즈콩, 완두콩, 대두), 유성식물(예컨대, 평지씨, 겨자씨, 양귀비, 올리브, 해바라기씨, 코코넛, 카스터 오일식물, 코코아씨, 땅콩), 섬유 식물(예컨대, 면화, 아마, 대마, 황마), 라우라세(예컨대, 아보카도, 계피, 캄퍼), 낙엽성 나무와 침엽수(예컨대, 주목나무, 밤나무, 오리나무, 포플라, 자작나무, 전나무, 낙엽송, 소나무) 또는 식물(예컨대, 옥수수, 잔디식물, 담배, 건과, 커피, 사탕 수수, 차나무, 포도나무, 흙, 바나나 및 천연 고무나무) 등(그러나, 이에 제한되지 않는다)에 또는 이들 식물의 재배토양이나 종자에 전달 또는 살포하여 선충에 의한 피해를 억제하거나 줄일 수 있다. 한편, 식물부위, 토양, 종자 등에 선충 감염에 대한 예방 또는 치료가 필요한 경우나 경작전 선충 제거를 통한 토양 정화가 필요한 곳에 본 발명의 살선충활성을 갖는 미생물 및/또는 기타 항선충 활성을 갖는 혼합 미생물과 화학 살충제를 동시에 투여하여 선충에 의한 피해를 억제시킬 수도 있을 것이다.

이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

실시예 1. 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*) NIBRFGC000004108 균주의 형태학적 및 분자계통학적 분류

흰말채나무(*Cornus alba*) 잎으로부터 분리한 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*) NIBRFGC000004108 균주의 형태(균사, 포자, 자실체 등의 미세구조 및 SEM에 의한 초미세구조)를 관찰하여 일차 동정하였다. 이후 종(species) 수준으로 동정하기 위해 분자계통분류를 실시하였다. 분리된 균을 셀로판이 깔린 PDA 배지에 키운 후, 균체로부터 게놈 DNA(gDNA)를 추출하여 증폭체(amplicon)를 얻어 ITS(internal transcribed spacer) rDNA 영역(서열번호 1), CaM(calmodulin, 서열번호 2) 및 BenA(β -tubulin, 서열번호 3) 유전자를 이용하여 PCR을 실시하고, 이를 정제하여 시퀀싱(sequencing)을 실시하였다. ITS rDNA 영역, CaM 및 BenA의 경우, 하기 표 1에 개시된 각각의 프라이머를 사용하였다. 또한 계통도 작성을 위하여, 여러 염기서열을 종합분석하는 복합 데이터 세트 유전자 염기서열에 기초한 분자계통분류학적 분석을 실시하였다. 형태학적 관찰 및 유전자 염기서열에 기초한 분자계통학적 분석을 한 결과, 도 1에 개시된 바와 같이 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*) NIBRFGC000004108 균주는 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)로 동정되었으며, 이에 상기에서 분리한 균주를 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*) NIBRFGC000004108 균주라 명명하였고, 농업생명공학연구원에 2015년 10월 28일자로 기탁하였다(기탁번호:KACC83002BP).

표 1

[0033] 본 발명에 사용된 프라이머

목표 유전자	프라이머 이름	서열번호	염기서열
ITS rDNA	ITS	4	TTA CGT CCC TGC CCT TTG TA
	ITS4	5	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
CaM	Cmd5	6	CCG AGT ACA AGG ARG CCT TC
	Cmd6	7	CCG ATR GAG GTC ATR ACG TGG
BenA	Bt2a	8	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC
	Bt2b	9	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC

[0034] 실시예 2. 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) NIBRFGC000004108 균주 배양여액의 살선충활성 및 알 부화 억제 활성

[0035] 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) NIBRFGC000004108 균주를 PDA(potato dextrose agar) 배지에 25℃에서 7일 동안 배양하였다. 왕성하게 자라고 있는 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) NIBRFGC000004108 균주의 가장자리로부터 지름 8mm의 코르크보드를 이용해 5개의 군사 조각을 떼어내, PDB(potato dextrose broth) 배지에 접종한 후 150rpm 및 25℃에서 14일간 진탕배양하였다. 14일 후, 4겹 거즈를 이용해 균체를 제거한 후 배양여액만 획득하여 살선충활성을 조사하였다. 또한, 뿌리혹선충에 감염된 토마토 뿌리에서 뿌리혹선충 알을 얻기 위해서, 식물의 뿌리를 수돗물로 씻어내 이물질을 제거한 후, 뿌리를 1cm 크기로 잘라 0.5% 차아염소산나트륨(sodium hypochlorite) 용액을 넣은 후 1분 동안 분쇄하였다. 분쇄 후 45 μ m 체 및 25 μ m 체를 2중으로 끼워서 알을 분리하였으며, 분리된 알은 깔대기법(Baermann funnel)을 이용하여 부화된 유충을 분리하여 본 실시예에 사용하였다.

[0036] 뿌리혹선충의 50 마리의 유충과 150개의 알 현탁액을 96-웰 마이크로플레이트의 각 웰에 넣은 다음, 5, 10 및 20%의 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) NIBRFGC000004108 균주 배양여액(이하 '시료'라 함)을 처리하여 웰(well)당 최종 부피가 100 μ l 되도록 하였다. 시료 처리 후 시료가 잘 섞이도록 96-웰 플레이트를 30초간 교반한 후 상대습도가 100%인 플라스틱 통에 넣어 실온 보관하였다. 시료 처리 72시간 후, 광학 도립현미경하에서 살선충율 및 알 부화 억제율을 조사하였다. 살선충율은 곤개 뿔어 움직임이 없는 선충을 죽은 선충으로, 유연한 곡선형으로 움직임이 있는 선충을 살아있는 선충으로 판단하여 하기와 같은 식을 이용하여 살선충율을 조사하였다.

[0037] 살선충율(%) = [(처리구의 치사율-대조구의 치사율)/(100-대조구의 치사율)] $\times$ 100

[0038] 알 부화 억제율(%) = [(대조구의 알 부화율-처리구의 알 부화율)/대조구의 알 부화율] $\times$ 100

[0039] 알 부화율(%) = [유충의 수/(알의 수 + 유충의 수)] $\times$ 100

[0040] 그 결과, 도 2에 개시된 바와 같이 5, 10 및 20%의 배양여액을 처리하였을 때, 각각 2.5, 14.8 및 76.9%의 살선충율과 47.8, 57.7, 80.0%의 알 부화 억제율을 보였으며, 농도의존적인 살선충활성을 나타내었다.

[0041] 실시예 3. 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) NIBRFGC000004108 균주 배양여액의 용매분획별 살선충활성

[0042] 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) NIBRFGC000004108 균주의 배양여액 700ml에 동량의 에틸아세테이트 및 70%(v/v)의 부탄올을 이용하여 순차적으로 2회 분배 추출하였다. 용매분획하여 얻어진 3종의 분획층을 감압 농축하여 에틸아세테이트층은 597mg, 부탄올층은 1,326mg 그리고 물층은 4,283mg을 획득하였으며, 뿌리혹선충의 유충에 대한 살선충활성을 조사하였다. 준비된 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) NIBRFGC000004108 균주의 에틸아세테이트 추출물은 아세톤에, 부탄올 추출물은 메탄올에 그리고 물층은 물에 각각 100배 높은 농도로 용해한 후, 각각을 선충 유충현탁액에 50, 100 및 200 μ g/ml로 처리하였다. 대조구로 1% 아세톤 또는 메탄올을 처리하였으며 잘 섞이도록 96-웰 플레이트를 30초간 교반한 후, 상대습도가 100%인 플라스틱 통에 넣은 후 실온에 보관하였다. 시료 처리 72시간 후 상기 개시된 방법으로 살선충율을 조사하였다.

[0043] 그 결과, 도 3에 개시된 바와 같이 에틸아세테이트층은 100 및 200 μ g/ml에서 65.9%와 74.9%의 높은 살선충활성을 보였으며 부탄올층과 물층은 전혀 활성을 보이지 않았다. 따라서 하기 실시예 4에서 가장 높은 활성을 나타

넨 에틸아세테이트층을 이용하여 살선충활성을 나타내는 물질분리를 수행하였다.

[0044] 실시예 4. 살선충활성 물질 분리

[0045] 살선충활성이 높은 에틸아세테이트 추출물을 클로로포름:메탄올(7:1, v/v) 전개용매를 사용하여 TLC(Kiesel gel 60GF 254, 0.5 mm film thickness, E. Merck) 분석을 통하여 비슷한 패턴을 보이는 분획들을 각각 긁어 모아 Rf 값에 따라 아세톤과 메탄올로 추출하여 최종적으로 7개의 분획(PF1~PF7)을 얻었다. 얻어진 7개 분획에 대하여 살선충활성을 조사한 결과, PF5 분획(Rf value: 0.19)에서 가장 우수한 활성이 있는 것으로 나타났으며, PF5 분획에 존재하는 물질이 순수한 물질인지 조사하기 위해 HPLC 분석을 수행하였다. 컬럼은 C18 역상컬럼 (Atlantis T3, 5 m, 4.6 250 mm, Waters, Co., Ireland)을 사용하였으며, 용매는 0.1%의 아세트산이 들어있는 물과 0.1% 아세트산이 들어있는 메탄올을 이용하여 30분 동안 메탄올 10% 부터 50%로 유기용매의 비중을 높여가며 분석하였다.

[0046] 그 결과, 도 4에 개시된 바와 같이 7분대에 한 개의 크로마토그램이 존재하는 것으로 확인되었으며, 이는 216.0nm 및 268.8nm에서 최대 흡광도를 보였다. 따라서 최종적으로 PF5(7mg) 물질을 순수 분리하였다.

[0047] 실시예 5. 분리한 물질의 구조 결정

[0048] 획득한 PF5 물질은 EI-MS 및 ^1H -과 ^{13}C -NMR 등을 통해 구조를 동정하였다. EI-MS 분석결과, 살선충활성 물질은 $[\text{M}]^+$ 값으로 m/z 142가 검출되었으며, MS 및 NMR 분석을 통해 $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4$ 분자식을 갖는 것으로 확인되었다. 분리된 활성물질의 ^1H -과 ^{13}C -NMR 데이터는 하기 표 2에 개시한 바와 같다. 살선충 물질은 ^1H -NMR 스펙트럼에서 7.95ppm 및 6.51ppm에서 4-피론(pyron) 구조에 기인하는 메틴 프로톤 신호(methine proton signal)가 관측되었으며, 4.42ppm에서 수산기(hydroxyl)가 붙어 있는 탄소의 메틸렌 프로톤 신호(methylene proton signal)가 관측되었다. ^{13}C -NMR 스펙트럼에서 6개의 카본 신호(carbon signal)가 관측되었으며, 피론(pyron) 그룹에 참여하는 4개의 신호가 110.84, 141.12, 147.71 및 170.46ppm에서 관측되었고, 피론(pyron) 그룹의 카보닐 카본(carbonyl carbon)에 기인하는 신호가 177.16ppm에서 관측되었고, 알코올이 붙어 있는 메틸렌 카본의 신호가 61.33ppm에서 관측되었다. 이와 같은 분광학적 데이터를 통해 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) NIBRFGC000004108 균주가 생산하는 살선충활성 물질은 5-히드록시-2-히드록시메틸-4H-피란-4-원(5-hydroxy-2-hydroxymethyl-4H-pyran-4-one)인 코지산(kojic acid)으로 동정되었다.

표 2

[0049] 분리된 코지산(Kojic acid)의 ^1H -과 ^{13}C -NMR 데이터

Position	코지산	
	δ_{C}	δ_{H} (mult; J, Hz)
1	147.71, CH	7.95, s
2	170.46, C	-
3	177.16, C	-
4	141.12, CH	6.51, s
5	110.84, C	-
6	61.33, CH_2	4.42, s
2C-OH	-	-
6C-OH	-	-

[0050] 실시예 6. 분리한 활성물질인 코지산(kojic acid)의 뿌리혹선충 2령 유충 및 알 부화 억제활성

[0051] 분리된 활성물질인 코지산의 살선충활성 및 알 부화 억제능을 조사하기 위해, 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) NIBRFGC000004108 균주의 배양여액(이하 '시료'라 함)은 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해하였으며, 살선충활성을 가지는 신남알데히드(cinnamaldehyde)는 에탄올에 용해하여 본 실시예의 양성 대조군으로 사용하였다. 모든 시료는 처리농도보다 100배 높은 농도로 제조하였으며, 4, 12, 37, 111, 333 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 수준으

로 살선충활성을 조사하였다. 음성 대조군으로 1% DMSO 및 에탄올을 사용하였으며, 상기 실시예 1에 개시된 방법으로 살선충활성 및 알 부화 억제활성을 조사하였다. 실험은 3회 반복을 수행하였으며, 시료 처리 3일 후 살선충율을 조사하였고, 7일 후 알 부화 억제율을 조사하였다.

[0052]

그 결과, 활성물질인 코지산의 살선충율 및 알 부화 억제율은 농도의존적으로 살선충활성이 증가하였으며, 뿌리혹선충 2령 유충에 대한 살선충활성은 333 μ g/ml에서 68.3%의 치사율을 1,000 μ g/ml에서 90%의 치사율을 보였다(도 5). 이를 LC₅₀ 값으로 나타낸 결과는 하기 표 3에 정리하였다. 또한, 우수한 살선충활성을 나타낸 333 및 1,000 μ g/ml에서 알 부화 억제율은 각각 90.9% 및 96.4%로 양성 대조군인 신남알데히드 처리하였을 때와 비슷한 효과를 보였으며(도 6), 본 발명의 코지산은 살선충활성보다 알 부화 억제활성이 더 우수한 것을 확인할 수 있었다.

표 3

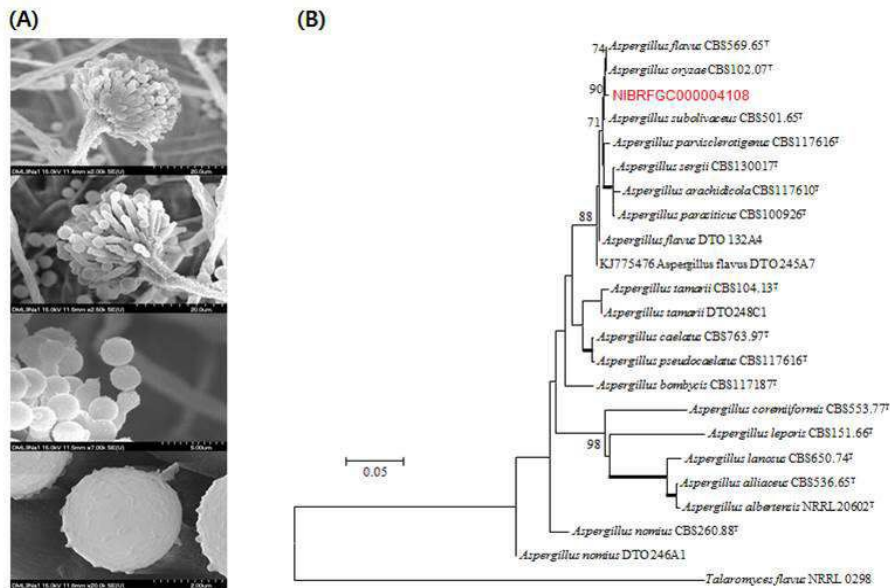
[0053]

아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*) NIBRFGC000004108 균주로부터 분리한 살선충물질인 코지산 및 양성 대조군인 신남알데히드(cinnamaldehyde)의 뿌리혹선충(*M. incognita*)에 대한 LC₅₀ 값

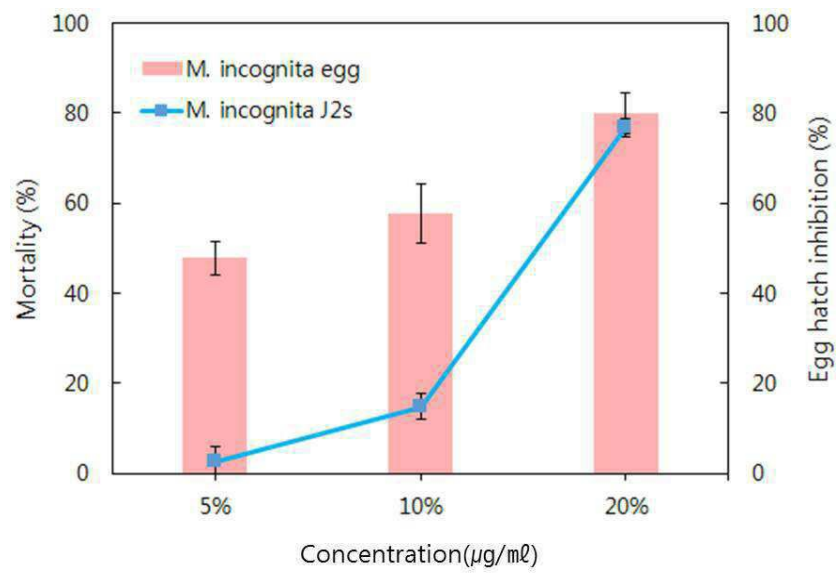
시료	LC ₅₀ (μ g/ml)	
	72 h	R ²
코지산	118.1	0.96
신남알데히드	3.5	0.97

도면

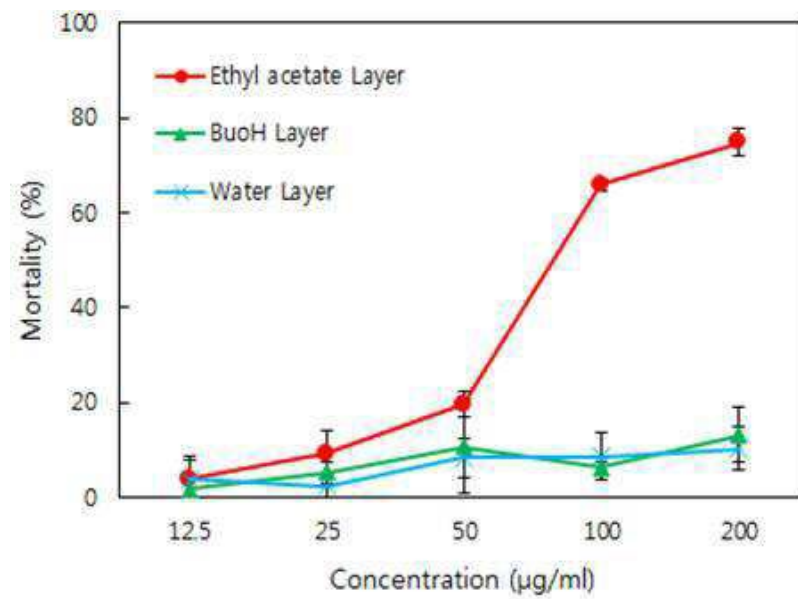
도면1



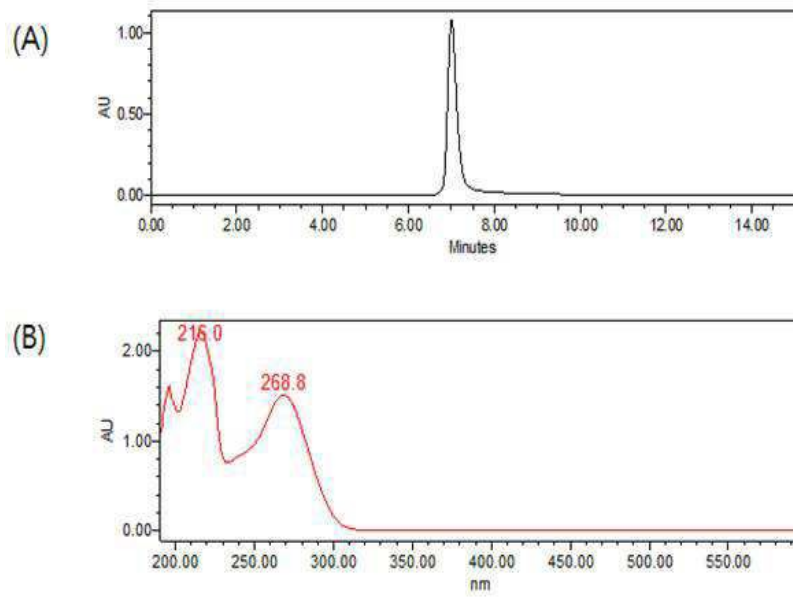
도면2



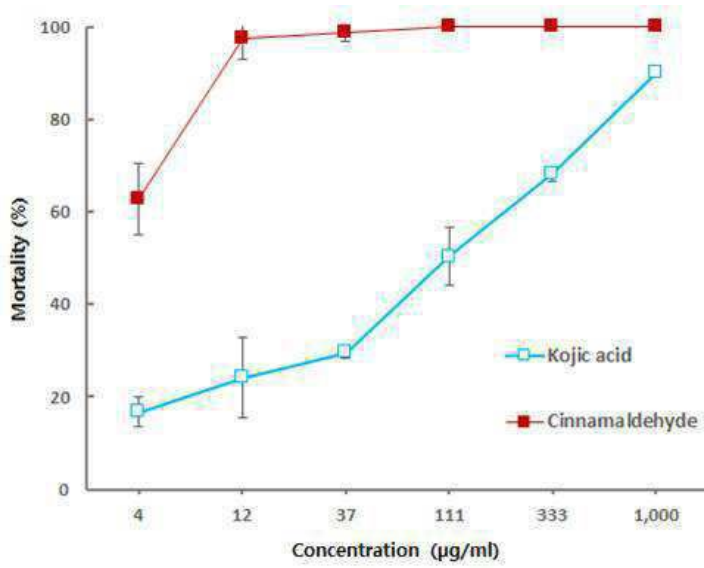
도면3



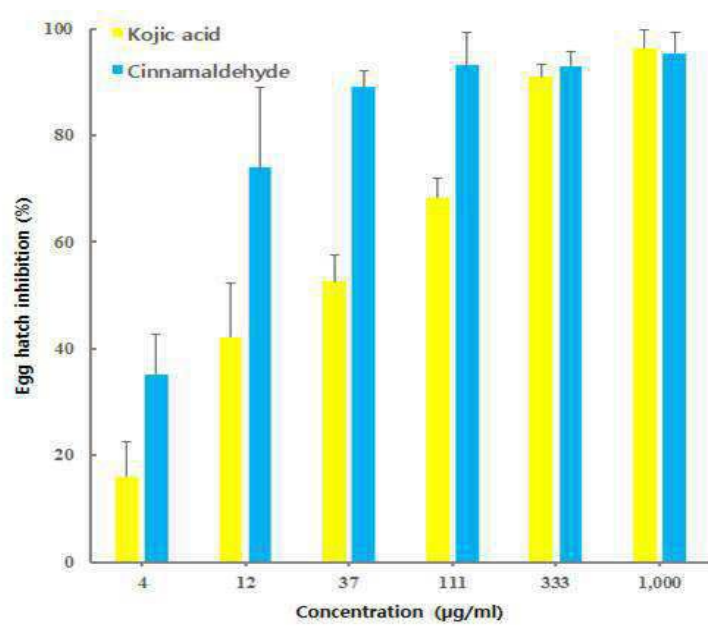
도면4



도면5



도면6



서열 목록

<110> INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY

National Institute of Biological Resources

<120> Composition for controlling root knot nematode comprising kojic acid as effective component and uses thereof

<130> PN15304

<160> 9

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 664

<212> DNA

<213> Aspergillus oryzae

<400> 1

acctaggccg gagggacgca ttcatgcagt cggaggagct attcgtaaag cggaaggatc 60

atatcaataa gcggaggagc atatcaagga gcaggaggat catatcgaga acgcaggacg 120

atcacctcga gaaacaccac gatcactgta tgatctcgtg aattctcagt tgatcgtatc 180

gaaaaccgtt gaatctttcg aagaagcatc tcttggttcc gagcatcgat gaaaaacgca 240

gcgaaatcgc ataactagt tgaattgcag aattccgtga atcatcgagt ctttgaacgc 300

acattgcgcc ccctggtatt ccggggggc tgcctgtccg agcgtcattg ctgcccatca 360

agcacggctt gtgtgttggg tcgtcgtccc ctctccgggg gggacgggcc ccaaaggcag 420
cggcggcacc gcgtccgac ctcgagcgta tggggctttg tcaccgcctc ttagggccc 480
gccggcgctt gccgaacgca aatcaatctt tttccagggt gacctcgat caggtaggga 540

taccgcgtga acttaagcat atcataagcc ggaggaaaca tatctacaga gcggagggct 600
ccttacgtgc ccgcgcccc ttgtttacgg tactaaatgg ggggaaaaaa attgaatttg 660
gaag 664

<210> 2

<211> 582

<212> DNA

<213> Aspergillus oryzae

<400> 2

cattaagctg ctatcgtcgt tcgtgaaatt ggttttgta gtcgtcatga ttgaaacaca 60
agctgacttg gcttttcttg ggtttcctat aggacaagga cggatgatgt tagtacagtt 120
tattttattc attctccctt caaatgcgat caatatgttt tagccgcat aattttatcc 180

agtttctgtt cgatcggctg aagtcttggc attgatgaat tgacttgata tgcaggccag 240
atcaccacca aggagtggg cactgtcatg cgctctctgg gccaaaacc ctctgagtcg 300
gaactccagg acatgattaa cgaggttgac gccgacaaca atggcacat tgacttcct 360
ggtacgagac ggcttccgta cgattcataa atgaaatagc tgttaatgtt caaatagagt 420
tccttacgat gatggcgaga aagatgaagg ataccgactc tgaggaggag atccgggagg 480
ctttcaaggt ttctgaccgc gataacaacg gcttcatctc cgctgccgaa ttgcgccacg 540
tagccccc ccctgggggg aaaggccagg cggggggtga ag 582

<210> 3

<211> 500

<212> DNA

<213> Aspergillus oryzae

<400> 3

ggggggtcta tgcnttcga gttagtatgc ttggacaag gaactctca aaagcatgat 60
ctcgatgtg tctgttata tctgccacat gtttgtaac aactttgcag gcaaaccatc 120
tctggcgagc acggccttga cggctccgt gtgtaagtac agcctgtata cacctcgaac 180
gaacgacgac catatggcat tagaagttgg aatggatctg acggcaagga tagttacaat 240
ggctcctccg atctccagct ggagcgtatg aacgtctact tcaacaggt gcgtacctca 300

aaatttcagc atctatgaaa acgctttgca actcctgacc gcttctccag gccagcggaa 360

acaagtatgt cctcctgtgcc gtcctcgttg atcttgagcc tggtagcatg gacgccgtcc 420

gtgccgggtcc ctccggtcag ctcttcctgc cgcacaactt cgttttcggc cagtcgggtg 480

ctggtaacaa ctgggccaag 500

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

ttacgtccct gccctttgta 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

tcctccgctt attgatatgc 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

ccgagtacaa ggargccttc 20

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

ccgatrgagg tcatracgtg g 21

<210> 8

<211> 24
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 ggtaacaaaa tcggtgctgc ttcc 24
 <210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 9
 accctcagtg tagtgaccct tggc 24