

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 9월 29일 (29.09.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/153167 A1

(51) 국제특허분류:
C07D 311/40 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2016/000952

(22) 국제출원일: 2016년 1월 28일 (28.01.2016)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2015-0040915 2015년 3월 24일 (24.03.2015) KR

(71) 출원인: 경북대학교 산학협력단 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 14566 대구시 북구 대학로 80, Daegu (KR).

(72) 발명자: 김경민 (KIM, Kyung Min); 42207 대구시 수성구 지산로 32, 105-105, Daegu (KR). 윤병욱 (YUN, Byung Wook); 41563 대구시 북구 경진로 4길 7, 203호, Daegu (KR).

(74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 08380 서울시 구로구 디지털로 31길 20 (구로동) 601호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

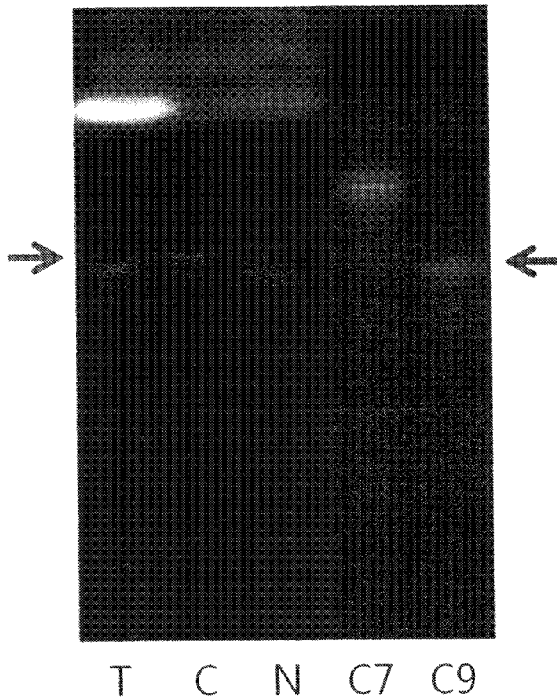
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR ISOLATING CHRYSOERIOL FROM RICE PLANT INOCULATED WITH WHITE-BACKED PLANTHOPPER

(54) 발명의 명칭 : 흰등멸구를 접종한 벼로부터 크리소에리올을 분리하는 방법

[Fig. 6]



(57) Abstract: The present invention relates to an isolation method for chrysoeriol using a planthopper. When using the method for isolating chrysoeriol from a rice plant inoculated with a planthopper according to the present invention, not only it is possible to rapidly produce chrysoeriol but also large quantities of the substance can be produced with high efficiency and costs can be reduced, and thus can be used to advantage in the production of chrysoeriol and in various fields in which the substance is used.

(57) 요약서: 본 발명은 멸구를 이용한 크리소에리올(chrysoeriol)의 분리방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 멸구를 접종한 벼로부터 크리소에리올을 분리하는 방법을 이용할 경우, 크리소에리올을 빠르게 제조할 수 있을 뿐만 아니라, 많은 양의 물질을 높은 효율로 제조 가능하고, 비용의 절감이 가능하므로, 크리소에리올의 제조 및 상기 물질을 이용하는 다양한 분야에서 유용하게 이용할 수 있다.



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, —
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를
접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙
48.2(h))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 흰등멸구를 접종한 벼로부터 크리소에리올을 분리하는 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 멸구를 접종한 벼로부터 크리소에리올(chrysoeriol)을 분리하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 멸구는 멸구과에 속하는 곤충으로 현재 1,800여 종이 알려져 있다. 몸길이는 2~9mm이며 길쭉하고 머리가 짧다. 더듬이는 단순하고 날개는 앞날개가 짧고 날개맥이 퇴화되어 있다. 뒷다리 종아리 마디의 끝에는 움직일 수 있는 가시돌기가 있다. 멸구는 각종 식물에서 생활하며 성충·유충 모두가 벼·보리·옥수수·사탕수수 같은 농작물에 피해를 주는 종류가 많다. 또 성충이나 유충 모두 몸의 배쪽이나 등쪽에서 흰색의 납질물(蠟質物)을 분비하는 것이 많다. 한국의 남부지방과 남해의 도서지방에서는 겨울에도 성충이 활동적으로 생활하고 있는 광경을 볼 수가 있다. 열대지방을 중심으로 세계 각지에 분포하고 있으며 한국에는 벼멸구·흰등멸구·애멸구 등 33종이 분포하고 있다.
- [3] 이 중 흰등멸구는 몸이 검은 갈색이고 암컷이 수컷보다 얇은 빛이며 허리 쪽 가운데에 누런 회색의 긴 무늬가 있다. 벼와 보리에 오갈병을 옮겨 해를 입힌다. 또한 벼멸구와 같이 우리나라에서 월동하지 못하고 매년 중국 남부로부터 비래해 온다. 비래량은 벼멸구에 비해 10배 이상 많으나 피해는 집중발생하지 않고 분산 발생하여 피해가 크지 않다. 흰등멸구는 25°C에서의 1세대 기간이 약 24일이며, 산란전 기간은 4.6일, 난기간은 7.6일, 약충기간은 13일이다. 6월부터 8월 사이의 야외 기온에서는 20~30일 만에 1세대를 경과한다. 성충의 수명은 15.6일이며, 산란 수는 250개 정도이며, 알은 엽초에 무더기로 알을 낳는다.
- [4] 한편, 크리소에리올(chrysoeriol; $C_{16}H_{12}O_6$)은 플라보노이드의 하나로 주로 *Eriodyction glutinosum* Bentham의 잎에 포함된 성분이다. 황색 바늘 모양 결정이며 녹는점 337°C이다. 아세트산에틸, 에탄올에 매우 녹기 어려우나 뜨거운 피리딘에 잘 녹는다. 크리소에리올은 지질농도 저하 활성을 갖는 것으로 알려져 있다.
- [5] 크리소에리올을 분리 또는 분리하는 방법에 대하여 여러 방법이 알려져 있으나, 매우 고가이며 생산 효율이 낮아 새로운 분리방법에 대한 필요성이 대두되었다. 이에 본 발명자들은 크리소에리올을 제조하기 위해 멸구를 접종한 벼를 이용하여 연구한 결과 크리소에리올의 생산 효율이 우수함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명의 목적은 멸구를 접종한 벼로부터 크리소에리올(chrysoeriol)을 분리하는 방법을 제공하는 것이다.
- [7] 또한, 본 발명의 목적은 벼 종자에 멸구를 접종시키는 단계를 포함하는, 벼 추출물 내의 크리소에리올의 함량을 증진시키는 방법 및 벼 추출물로부터 크리소에리올의 분리 효율을 증진시키는 방법을 제공하는 것이다.
- [8] 또한, 본 발명의 목적은 상기 분리방법을 통하여 제조된 크리소에리올을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [9] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은,
- [10] (a) 벼 종자에 멸구를 접종시키는 단계; 및
- [11] (b) 상기 (a) 단계의 벼 종자를 받아 및 생장시킨 후 수득한 벼 추출물로부터 크리소에리올(chrysoeriol)을 분리하는 단계;를 포함하는, 크리소에리올의 분리방법을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 벼 종자에 멸구를 접종시키는 단계를 포함하는, 벼 추출물 내의 크리소에리올의 함량을 증진시키는 방법 및 벼 추출물로부터 크리소에리올의 분리 효율을 증진시키는 방법을 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 상기 분리방법을 통하여 제조된 크리소에리올을 제공한다.

발명의 효과

- [14] 본 발명에 따른 멸구를 접종한 벼로부터 크리소에리올을 분리하는 방법을 이용할 경우, 크리소에리올을 빠르게 제조할 수 있을 뿐만 아니라, 많은 양의 물질을 높은 효율로 제조 가능하고, 비용의 절감이 가능하므로, 크리소에리올의 제조 및 상기 물질을 이용하는 다양한 분야에서 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

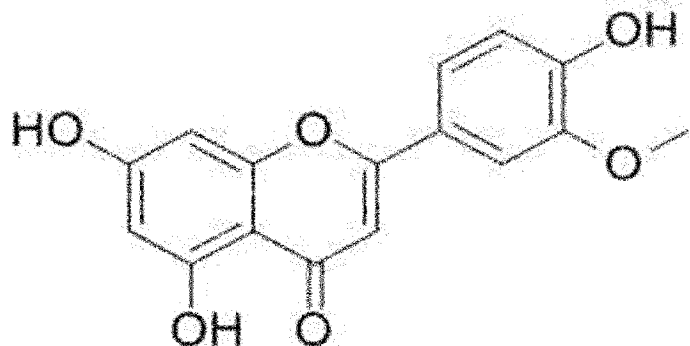
- [15] 도 1은 흰등멸구를 접종하지 않은 벼(A)와 흰등멸구 접종한 벼(B)를 나타낸 도이다.
- [16] [T: TN1, N: 낙동, C: 청청, 1-6: CNDH]
- [17] 도 2는 흰등멸구를 접종한 벼로부터 추출한 추출물을 나타낸 도이다.
- [18] [T: TN1, N: 낙동, C: 청청, 1-3: CNDH]
- [19] 도 3은 흰등멸구를 접종한 벼 추출물의 HPLC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [20] [A: 대조 청청, B: 대조 낙동, C: 처리 청청, D: 처리 낙동, E: 처리 CNDH 115, F: 처리 CNDH 52]
- [21] 도 4는 흰등멸구를 접종한 벼 추출물 내 크리소에리올의 LC/MS 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [22] 도 5는 흰등멸구를 접종한 벼 추출물의 QTLs 분석에 따른 크리소에리올과 연관된 크로모좀 별 유전자 위치를 나타낸 도이다.
- [23] 도 6은 흰등멸구를 접종한 벼 추출물로부터 본 발명의 크리소에리올을 분리하고 TLC를 이용하여 확인한 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [24] 본 발명은 멸구를 접종한 벼로부터 크리소에리올(chrysoeriol)을 분리하는 방법을 제공한다.
- [25] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.
- [26] 본 발명은
- [27] (a) 벼 종자에 멸구를 접종시키는 단계; 및
- [28] (b) 상기 (a) 단계의 벼 종자를 발아 및 생장시킨 후 수득한 벼 추출물로부터 크리소에리올(chrysoeriol)을 분리하는 단계;를 포함하는 크리소에리올의 분리방법을 제공한다.
- [29] 본 발명의 크리소에리올($C_{16}H_{12}O_6$)은 플라보노이드의 일종으로, 하기 화학식 1로 표시되며,
5,7-디히드록시-2-(4-히드록시-3-메톡시페닐)크로멘-4-온(5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)chromen-4-one)이다.

[30] [화학식 1]

[31]



- [32] 상기 (a) 단계는 벼 종자에 멸구를 접종시키는 단계로, 상기 멸구는 멸구과에 속하는 곤충으로 흰등멸구, 벼멸구 또는 애멸구일 수 있으나, 바람직하게는 흰등멸구(whitebacked planthopper; *Sogatella furcifera*)이다.
- [33] 상기 벼 종자는 청청, 낙동, 청청 및 낙동의 반수체 또는 TN1 종자를 배양한 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서는 청청과 낙동을 교배한 뒤 약배양으로 얻어낸 종자를 사용하였다. 청청은 흰등멸구에 저항성을 가지며, 낙동은 밥맛이 좋으며, TN1은 흰등멸구에 민감한 품종으로 알려져 있다.
- [34] 상기 (b) 단계의 발아는 벼 종자를 파종하기 전 싹을 틔우는 단계로, 바람직하게는 26-34 °C에서 5 내지 9일간 수행될 수 있다. 상기 발아는 온실에서 수행될 수 있다.
- [35] 상기 (b) 단계의 생장은 26 내지 28 °C의 온도 및 60-70%의 습도에서 수행될 수 있으며, 24시간 중 11 시간 내지 13시간 동안 일조시간을 유지하는 것이 바람직하다.
- [36] 상기 (b) 단계는 벼 추출물을 추출한 후 추출물로부터 크리소에리올을

분리하는 단계로, 상기 벼 추출물은 벼를 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출하여 수득할 수 있으며, 바람직하게는 메탄올로 추출하여 수득할 수 있다.

[37] 상기 (b) 단계에서, 크리소에리올의 분리 전 벼 추출물의 지방을 제거하고 건조하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[38] 상기 지방의 제거는 지방의 제거는 지방을 용해시킬 수 있는 유기용매를 이용하며, 바람직하게는 에테르(ether), 클로로포름(chloroform), 아세톤(acetone), 벤젠(benzen) 및 헥산(hexane)으로 구성되는 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다.

[39] 상기 분리는 클로로포름(Chloroform), 메탄올(Methanol), 부탄올(Butanol) 및 물로 구성된 용매를 이용하여 수행될 수 있으며, 클로로포름, 메탄올, 부탄올 및 물의 비율은 바람직하게는 4:5:6:4일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[40] 본 발명에 따른 멸구를 접종한 벼로부터 크리소에리올을 분리하는 방법을 이용할 경우, 크리소에리올을 빠르게 제조할 수 있을 뿐만 아니라, 많은 양의 물질을 높은 효율로 제조 가능하고, 비용의 절감이 가능하므로, 크리소에리올의 제조 및 상기 물질을 이용하는 다양한 분야에서 유용하게 이용할 수 있다.

[41]

[42] 따라서, 본 발명은 벼 종자에 멸구를 접종시키는 단계를 포함하는, 벼 추출물 내의 크리소에리올의 함량을 증진시키는 방법 및 벼 추출물로부터 크리소에리올의 분리 효율을 증진시키는 방법을 제공한다.

[43] 또한, 본 발명은 멸구가 접종된, 크리소에리올의 함량이 증진된 벼를 제공한다.

[44] 또한, 본 발명은 상기 분리방법을 통해 제조된 크리소에리올을 제공한다.

[45]

[46] 이상 본 명세서에 기재된 수치 값은 달리 명시되어 있지 않은 한 균등범위까지 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

발명의 실시를 위한 형태

[47] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[48]

[49] 실시예 1. 식물 재료 및 생물학적 검정

[50] 흰등멸구(WBPH)는 아크릴 생육 상자(50×50×40 cm)에서 생육하였다. 생육실은 온도 27^oC, 습도 60-70% 그리고 빛 3,000 lux로 하루에 16시간 명상태를 유지하였으며, 40~50쌍의 흰등멸구를 넣어 교배시켰다. 먹이는 20-25g의 추정 벼로 종자 소독 후 흐르는 물에 깨끗이 씻어내고 29-30^oC에서 7일간 최아 시킨 후 온실로 옮겨서 발아시켰다. 10일간 키운 모를 3~4일마다 새 먹이로 갈아주었다.

- [51] 흰등멸구가 2~3령충이 되었을 때 2012년 경북대학교 농장에서 수확된 120개의 청청(인디카 품종)/낙동(자포니카 품종) 반수체(CNDH), 청청, 낙동 및 TN1 종자에 3주간 접종하였다. 접종 후 각 계통별로 30-35개의 종자를 24시간 소독약에 담근 후 흐르는 물에 씻어내고 6일간 29-30 °C의 암상태로 최아시켰다. 최아시킨 종자를 12줄로 0.8 cm (각 계통별로 3 cm) 간격을 준 뒤 각 줄마다 20개씩 5cm 깊이의 상자(32×23×10 cm)에 심었다. 각 계통별로 2번 반복하였다. 온실에서 3,000 lux의 빛으로 24시간 중 12±1시간 동안 명반응 시키고, 온도는 26-28 °C, 습도는 60-70%로 유지하며 생장시켰으며, 그 결과를 도 1에 나타내었다.
- [52] 도 1에 나타낸 바와 같이, 흰등멸구를 처리하지 않은 경우 모든 품종이 잘 자랐다. 흰등멸구를 처리한 경우, 저항성이 있는 청청은 푸른 잎을 나타냈으나, 저항성이 없는 낙동과 TN1은 잎과 줄기가 말라가는 것을 확인하였다. CNDH 품종 중 일부는 청청과 같이 저항성을 나타냈다.
- [53]
- [54] 실시예 2. 벼 추출물 및 분석
- [55] 상기 실시예 1에서 흰등멸구를 접종한 벼와 접종하지 않은 벼의 상층부를 잘라낸 후 5 g의 잎과 줄기를 액체질소를 이용하여 가루로 만들었다. 상기 가루를 90% 메탄올에 추출하였으며, 이를 도 2에 나타내었다.
- [56] 또한, 상기 메탄올 용액을 50ml의 팔콘 튜브에 넣고 상온에서 3일 동안 암반응 시켰다. 그 후 24±1°C의 소니케이팅에서 20분간 반응시키고, 헥산을 이용하여 지방질을 분리하였다. 그 후 증발기(evaporator)를 이용하여 남은 용액을 증발시켰다. 건조시킨 샘플 1g을 HPLC용 메탄올 1 ml에 녹인 후 0.45 ml 필터에 걸러 HPLC용 샘플을 제조하였다. 그 후 상기에서 제조한 샘플을 역상 HPLC 컬럼(reverse-phase HPLC column; ZORBAX 4.625010 mm, particle size 5 mm Agilent, USA)을 이용하여 아세토니트릴(acetonitrile) (A) 용액과 1% 아세트산 (B) 용액을 1 ml/min씩 50분간 흘려주고 UV 254 nm 검출기(1525 pump, 2487 detector and 717 plus autosampler, waters)를 이용하여 HPLC 분석을 수행하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [57] 도 3에 나타낸 바와 같이, CNDH 계통은 각각 다른 농도 값을 보였으며, 화살표는 크리소에리올을 나타낸다. 이는 흰등멸구를 처리하였을 때와 처리하지 않았을 때 각각 다른 양상을 나타내었다.
- [58] 또한, 상기 크리소에리올의 LC/MS 분석을 위하여, 시료를 1000ppm으로 희석하고 320 °C에서 50 % 메탄올과 0.1 % 포름산을 50 µl/min로 49V 전극을 흘려주었다. 양성 대조군과 음성 대조군의 분자량은 267.33, 341.50, 353.42과 381.50 m/z였다. 상기 LC/MS 분석 결과를 도 4에 나타내었다.
- [59] 도 4에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 화합물인 크리소에리올은 플라보노이드와 퀘논에 글리코시드가 붙어있는 구조임을 확인하였다.

[60]

[61] 실시예 3. QTLs 분석

[62] 상기 실시예 2에서 제조한 벼 추출물의 QTLs 분석을 WinQTLcart2.5 version 프로그램을 이용하여 수행하였다. 상기 프로그램은 크로모솜에 있는 각 마커 사이의 유전자 사이의 거리를 이용하여 유전자 정보와 위치를 밝혀내는 것으로, 복합 인터발 맵핑(Composite interval mapping, CIM)은 WinQTLcart2.5 프로그램에 LOD 2.5로 맞추고 계통별 화합물 피크 A와 B의 농도값을 넣었으며, 그 결과를 표 1에 나타내었다.

[63] 표 1

[Table 1]

QTL	Marker	Chr. ^a	LOD ^b	Variation (%)	Add. ^c
qFla4	RM280-RM6909	4	3.5	30	1.1
qFla7	RM248-RM1134	6	3.0	30	1.2
qFla12	RM1226-RM12	12	2.7	40	1.1

[64] ^a크로모솜, ^b로그가리즘(logarithms), ^c상가적 효과(Additive effect)

[65] 표 1에 나타낸 바와 같이, 21일간 흰등멸구를 처리한 시료의 QTLs 분석 결과 크리스오에리올은 크로모솜 4, 7 과 12에서 잡혔다. qFla4는 크로모솜 4에 위치한 마커 RM280-RM6909 사이에 위치하였으며 30 %의 변이율과 3.5의 LOD값을 가지고, qFla7는 크로모솜 7에 위치한 마커 RM248-RM1134 사이에 있고 변이율은 30 %며 3.0의 LOD값을 가졌고, qFla12는 크로모솜 12에 위치한 RM1226-RM12 마커 사이에 있고 변이율은 30 %이고 LOD값은 2.7이었다.

[66] 또한, QTLs 분석에 따른 크리스오에리올과 연관된 크로모솜 별 유전자 위치를 확인하였으며, 이를 도 5에 나타내었다.

[67] 도 5에 나타낸 바와 같이, qFla4, qFla7 및 qFla12 유전자는 '낙동'에서 유래되었고 감수성에 연관되어 있음을 확인하였다.

[68]

[69] 실시예 4. 화합물 분리

[70] 상기 실시예 1에서 흰등멸구를 접종한 벼와 접종하지 않은 샘플의 상층부를 잘라낸 후 액체질소를 이용하여 가루로 만들었다. 이를 50ml의 팔콘 튜브에 넣고 90 % 메탄올로 추출하였다. 추출한 용액은 헥산을 이용하여 지방성분을 제거한 후 건조하였다. 건조된 추출물은 컬럼관(직경 10×250 mm)에 실리카겔 60F254 (E-merck)과 함께 넣고 클로로포름:메탄올:1-부탄올:물의 비율을 4:5:6:4로 하는 용액을 이용하여 단일 물질로 분리하였다. 분리된 물질은 TLC를 이용하여 확인하였다. 이 때, 전개용매는 클로로포름:메탄올:1-부탄올:물의 비율을 4:5:6:2로 하였으며, 타겟 물질의 농도를 높이기 위해 60 °C에서 증발시켰다. 상기 TLC 결과를 도 6에 나타내었다.

[71] 도 6에 나타낸 바와 같이, 타겟물질인 크리스오에리올을 분리하였으며, 분리된

물질은 갈색병에 담아 20 °C에서 보관하였다. 분리된 화합물은 노란색의 크리소에리올(Chrysoeriol)로 질량값 267.33 m/z, 341.50 m/z, 353.42 m/z, 381.50 m/z, 437.42 m/z 및 469.33 m/z이었다.

[72]

[73] 실시예 5. 화합물 분리 효율

[74] 상기 실시예 4에서 분리된 크리소에리올의 분리 효율을 확인하였으며, 이를 표 2에 나타내었다.

[75] 표 2

[Table 2]

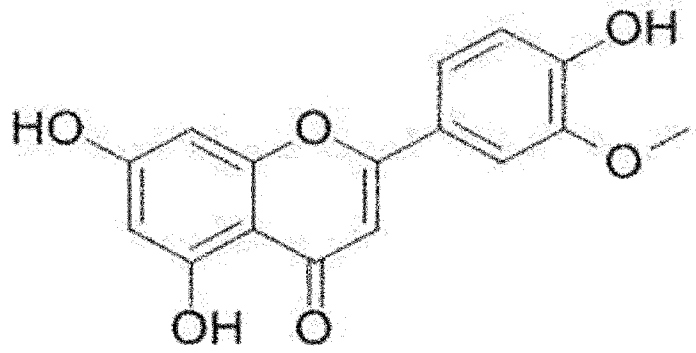
단계	품종	크리소에리올(ng/gram 생체중)	효율(%)
영양생장기	청청	12.26±0.03 ^a	0.0012
	낙동	12.95±0.62	0.0013
	TN1	43.34±1.52	0.0043
생식생장기	청청	4.04±0.79	0.0004
	낙동	3.75±0.51	0.0003

[76] ^ameanSD.

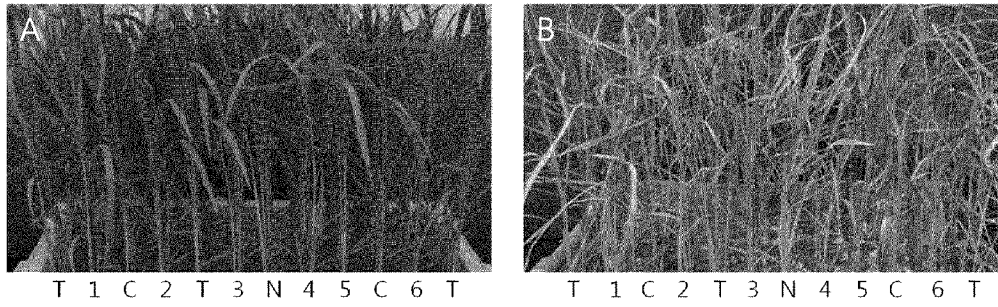
[77] 표 2에 나타난 바와 같이, 흰등멸구를 접종한 벼로부터 분리된 크리소에리올의 분리 효율이 매우 높음을 확인하였다.

청구범위

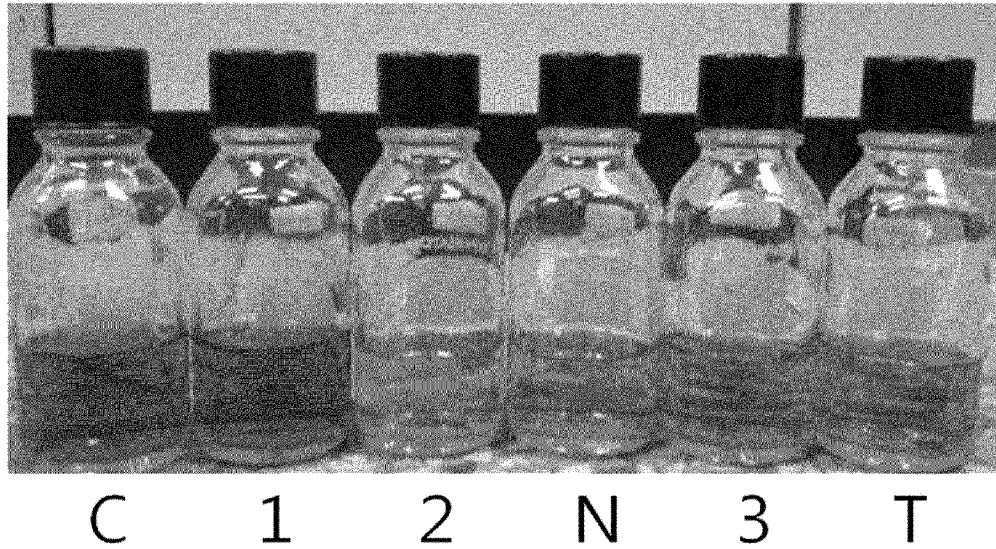
- [청구항 1] (a) 벼 종자에 멸구를 접종시키는 단계; 및
(b) 상기 (a) 단계의 벼 종자를 발아 및 성장시킨 후 수득한 벼 추출물로부터 크리소에리올(chrysoeriol)을 분리하는 단계;를 포함하는, 크리소에리올의 분리방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 멸구는 흰등멸구(whitebacked planthopper; *Sogatella furcifera*)인 것을 특징으로 하는, 크리소에리올의 분리방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 벼 종자는 청청, 낙동, 청청 및 낙동의 반수체 또는 TN1인 것을 특징으로 하는, 크리소에리올의 분리방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 벼 추출물은 벼를 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출하여 수득한 것을 특징으로 하는, 크리소에리올의 분리방법.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 벼 추출물은 벼를 메탄올로 추출하여 수득한 것을 특징으로 하는, 크리소에리올의 분리방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 (b) 단계는 상기 크리소에리올의 분리 전 벼 추출물의 지방을 제거하고 건조하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 크리소에리올의 분리방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 지방의 제거는 에테르(ether), 클로로포름(chloroform), 아세톤(acetone), 벤젠(benzen) 및 헥산(hexane)으로 구성되는 군으로부터 선택된 1종 이상의 유기용매를 이용하는 것을 특징으로 하는, 크리소에리올의 분리방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 분리는 클로로포름(Chloroform), 메탄올(Methanol), 부탄올(Butanol) 및 물로 구성된 용매를 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 크리소에리올의 분리방법.
- [청구항 9] 벼 종자에 멸구를 접종시키는 단계를 포함하는, 벼 추출물 내의 크리소에리올의 함량을 증진시키는 방법.
- [청구항 10] 벼 종자에 멸구를 접종시키는 단계를 포함하는, 벼 추출물로부터 크리소에리올의 분리 효율을 증진시키는 방법.
- [청구항 11] 멸구가 접종된, 크리소에리올의 함량이 증진된 벼.
- [청구항 12] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법을 통하여 제조된, 하기 화학식 1로 표시되는 크리소에리올.
- [화학식 1]



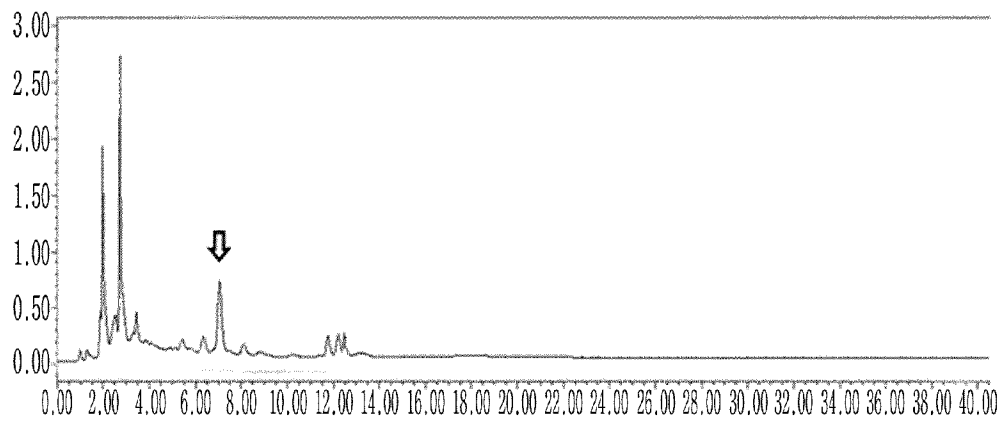
[Fig. 1]



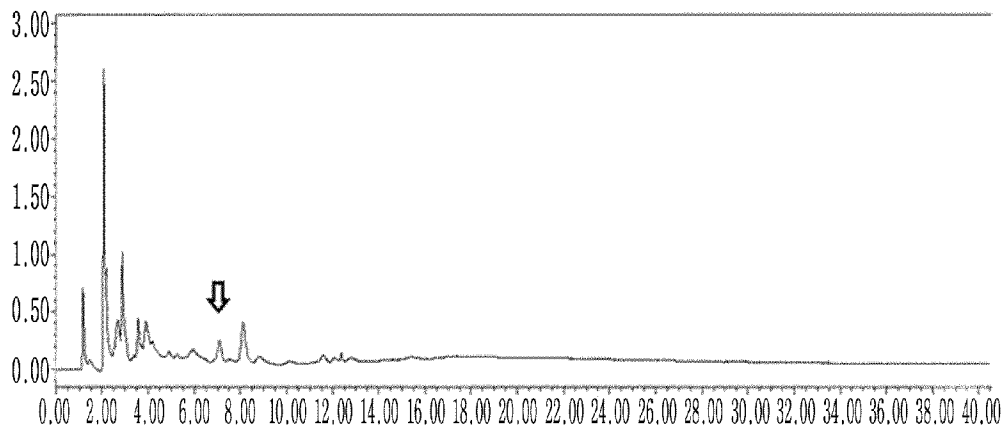
[Fig. 2]



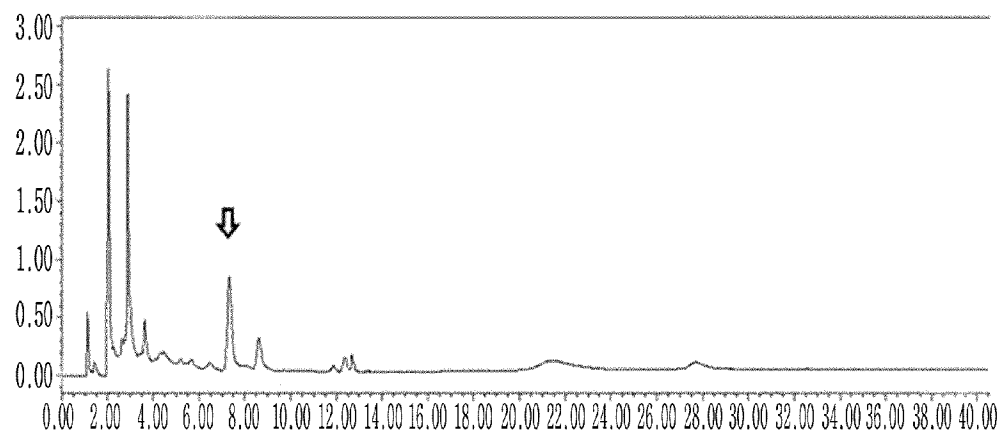
[Fig. 3a]



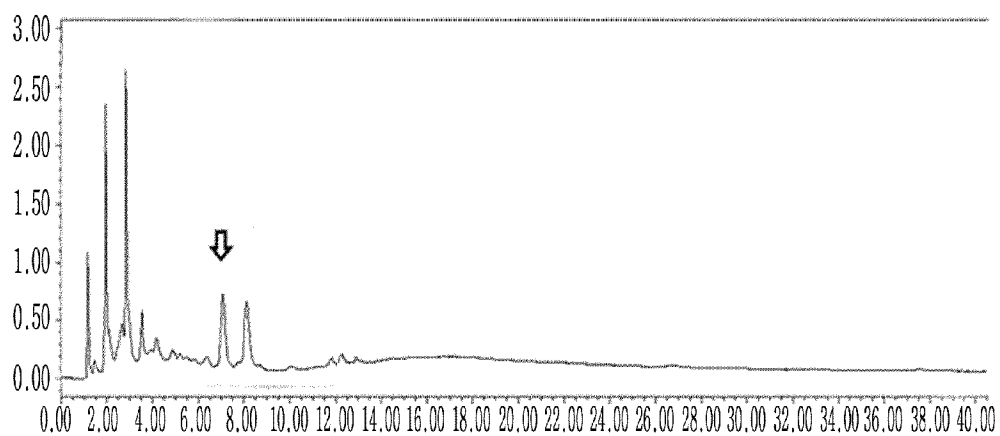
[Fig. 3b]



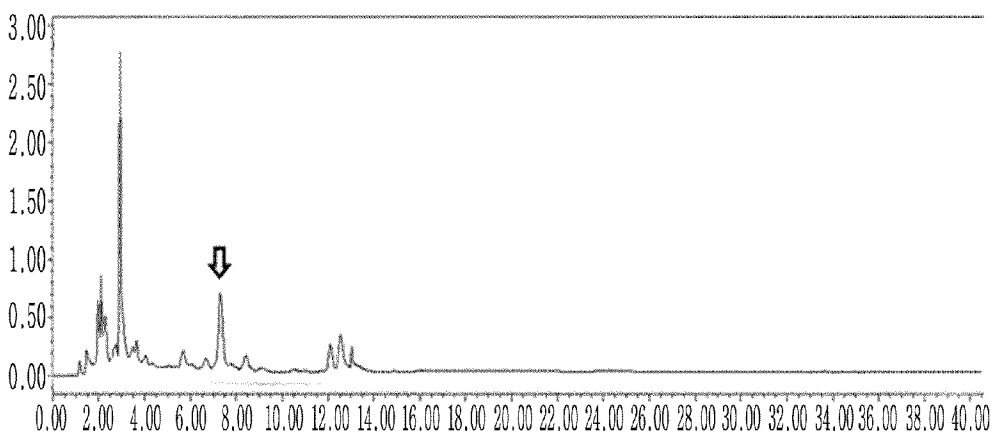
[Fig. 3c]



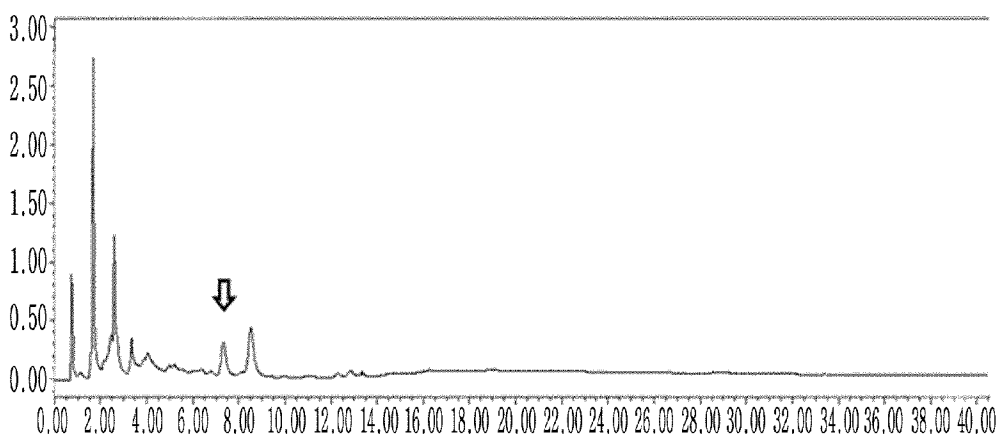
[Fig. 3d]



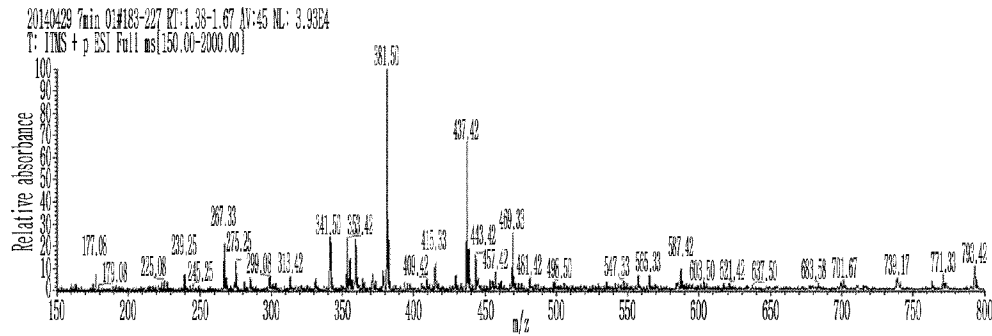
[Fig. 3e]



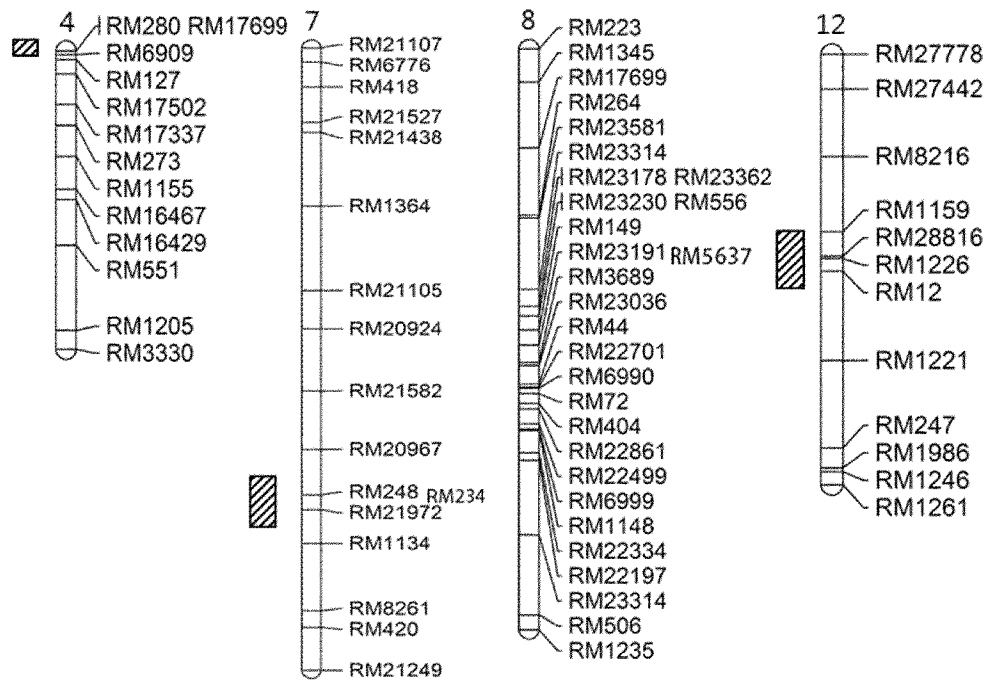
[Fig. 3f]



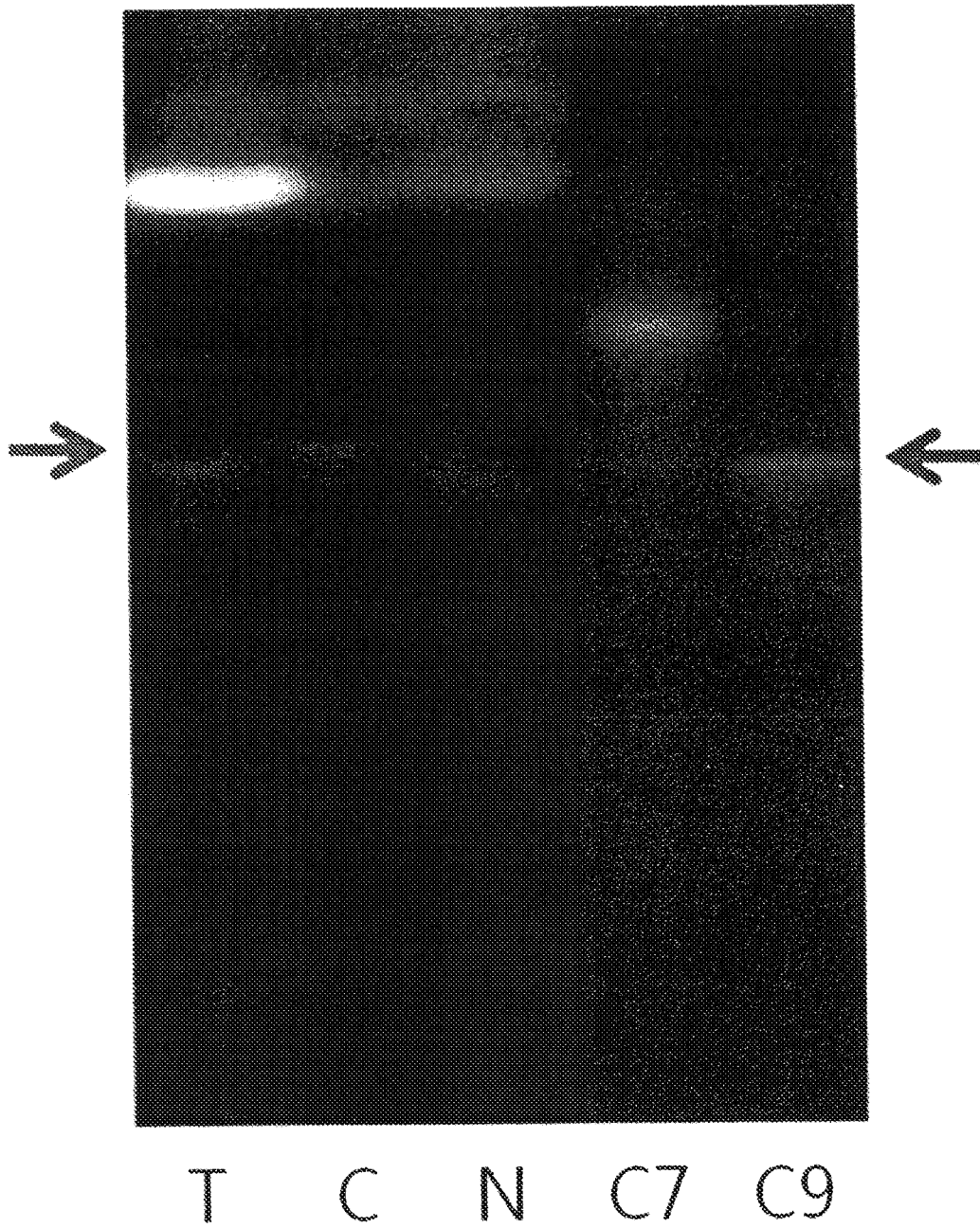
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/000952

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 311/40(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D 311/40; A61K 31/35

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Oryza sativa, Sogatella furcifera, chrysoeriol, separation, extraction

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PARK, Seul Gi et al., "Analysis of QTL Associated with WBPH and Identification of WBPH Mediated Compounds in Rice (Oryza Sativa L.)," Korean Journal of Breeding Science, vol. 46, Supplement No. 1, 2014, page 132 See abstract.	1-12
X	PARK, Seul Gi, "Analysis of QTL Associated with WBPH and Identification of WBPH Mediated Compounds in Rice (Oryza Sativa L.)," The Graduate School of Kyungpook National University, Department of Agriculture, 2014, Abstract of Master's Thesis See abstract.	1-12
A	MIYAGAWA, H. et al., "Phytotoxins Produced by the Plant Pathogenic Fungus Bipolaris Bicolor El-1", Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1994, vol. 58, no. 6, pages 1143-1145 See abstract.	1-12
A	JP 07-149637 A (MITSUBISHI CHEM. CORP.) 13 June 1995 See abstract.	1-12
A	OGO, Y. et al., "Transgenic Rice Seed Synthesizing Diverse Flavonoids at High Levels: a New Platform for Flavonoid Production with Associated Health Benefits.", Plant Biotechnology Journal, 2013, vol. 11, no. 6, pages 734-746 See abstract.	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 JULY 2016 (27.07.2016)

Date of mailing of the international search report

27 JULY 2016 (27.07.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/000952

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 07-149637 A	13/06/1995	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07D 311/40(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07D 311/40; A61K 31/35

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 벼, 흰등멸구, 크리스에리올, 분리, 추출

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	박슬기 등, "Analysis of QTL Associated with WBPH and Identification of WBPH Mediated Compounds in Rice (Oryza sativa L.)," 한국육종학회지, 46권, 별책 1호, 2014, 페이지 132 초록 참조.	1-12
X	박슬기, "Analysis of QTL Associated with WBPH and Identification of WBPH Mediated Compounds in Rice (Oryza sativa L.)," 경북대학교 대학원, 농학과, 2014, 학위논문의 초록본 초록 참조.	1-12
A	MIYAGAWA, H. 등, "Phytotoxins Produced by the Plant Pathogenic Fungus Bipolaris bicolor El-1", Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1994, 58권, 6호, 페이지 1143-1145 초록 참조.	1-12
A	JP 07-149637 A (MITSUBISHI CHEM. CORP.) 1995.06.13 요약 참조.	1-12
A	OGO, Y. 등, "Transgenic rice seed synthesizing diverse flavonoids at high levels: a new platform for flavonoid production with associated health benefits," Plant Biotechnology Journal, 2013, 11권, 6호, 페이지 734-746 초록 참조.	1-12

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 07월 27일 (27.07.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 07월 27일 (27.07.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

조한솔

전화번호 +82-42-481-5580



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 07-149637 A	1995/06/13	없음	