

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0117384

(43) 공개일자 2019년10월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01N 31/10 (2006.01) A01C 1/06 (2006.01)

A01G 7/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01N 31/10 (2013.01)

A01C 1/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0039907

(22) 출원일자 2019년04월05일

심사청구일자 2019년04월05일

(30) 우선권주장

1020180040131 2018년04월06일 대한민국(KR)

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

전종록

대전광역시 유성구 송강로42번길 61, 512동 1109호(송강동, 송강청솔아파트)

김외연

경상남도 진주시 내동면 순환로 425-61, 110동 1402호(남강휴먼빌아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

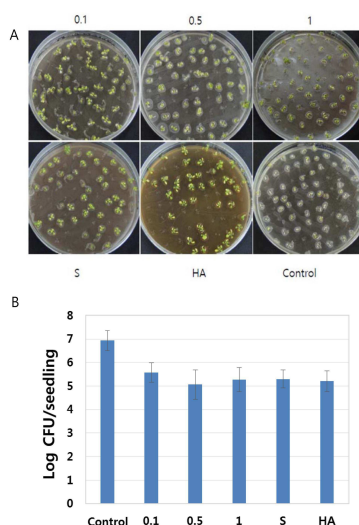
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 리그닌 또는 리그닌 변환체를 유효성분으로 함유하는 식물병 저항성 증진용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 리그닌 또는 리그닌 변환체를 유효성분으로 함유하는 식물병 저항성 증진용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 리그닌 또는 펠톤 산화 반응에 의한 리그닌 변환체는 식물체의 병 저항성 증진 효과가 우수하여 식물 생육 촉진용 조성물, 비료, 토양 개선제 등의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A01G 7/06 (2013.01)

(72) 발명자

김민갑

경상남도 진주시 내동면 순환로 425-61, 110동
1402호(남강휴먼빌아파트)

정해진

부산광역시 영도구 웃서발로 82-5(동삼동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ01319501

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21

연구과제명 식물계 바이오매스 유기 구조 변화 추적 및 다방향족 물질의 휴믹화를 위한 발효법 개발

기 여 율 1/2

주관기관 경상대학교 산학협력단

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017041B10-1819-BA01

부처명 산림청

연구관리전문기관 한국임업진흥원

연구사업명 산림생명자원소재발굴연구

연구과제명 리그닌의 생물학적·비생물학적 산화 처리를 통한 신재생 유기 비료 개발

기 여 율 1/2

주관기관 경상대학교 산학협력단

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

리그닌 또는 리그닌 변환체를 유효성분으로 함유하는 식물병 저항성 증진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 리그닌 변환체는 리그닌의 펜톤 반응 산화물인 것을 특징으로 하는 식물병 저항성 증진용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 식물병은 세균성 식물병인 것을 특징으로 하는 식물병 저항성 증진용 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 식물병 저항성 증진용 조성물을 식물, 식물의 종자 또는 식물 식재 토양에 처리하는 단계를 포함하는 식물의 병 저항성을 증진시키는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 식물병 저항성 증진용 조성물을 유효성분으로 포함하는 비료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 리그닌 또는 리그닌 변환체를 유효성분으로 함유하는 식물병 저항성 증진용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 리그닌(lignin)은 침엽수나 활엽수 등의 목질부 구성 성분 중 지용성 페놀 고분자 성분으로서, 건조 목재의 20~35 중량%를 차지한다. 리그닌은 바이오 매스의 구성 성분 중 셀룰로오스에 이어 가장 풍부하고 쉽게 구할 수 있는 유기 고분자로서, 화석화되지 않은 유기 탄소의 30%를 차지하고 있는 것으로 알려져 있다. 구체적으로 리그닌은 탄소 63.4%, 수소 5.9%, 산소 30%, 회분(ash) 0.7%로 이루어져 있으며, 많은 페닐기를 포함하고 있기 때문에 방향족 화합물을 생산하기 위한 중요한 원료가 될 수 있다.

[0003] 본 발명에서는 리그닌에 고도산화공정 중 하나인 펜톤 산화 반응을 진행하였다. 펜톤 산화 반응은 과산화수소(Hydrogen peroxide)와 2가철(Fe^{2+})의 반응으로 발생하는 OH 라디칼의 강력한 산화작용을 이용한 반응으로, 펜톤 산화 처리에 의해 리그닌 표면에 다양한 친수성 작용기가 도입될 수 있고 방향족 구조가 산화되어 지방족 구조가 도입될 수 있으며 공유성 결합이 깨져 고분자의 분자량이 줄어들 수 있다.

[0004] 한편, 한국공개특허 제2012-0042118호에는 '파로모마이신을 포함하는 식물병 저항성 유도제'가 개시되어 있으며, 한국등록특허 제1285792호에는 '큐산, 키토산 및 부식산을 포함하는 비료 조성물 및 이의 제조방법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 리그닌 또는 리그닌 변환체를 유효성분으로 함유하는 식물병 저항성 증진용 조성물 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 리그닌 또는 리그닌 변환체(리그닌의 펜톤 반응 산화물)이 포함된 MS 배지에서 배양한 애기장대에 슈도모나스 시린개 피브리. 토마토 DC3000(*Pseudomonas*

syringae pv. *tomato* DC3000) 균주 또는 에르위니아 카로토보라 subsp. 카로토보라(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) 균주를 접종한 결과, 리그닌 또는 리그닌 변환체의 무첨가 MS 배지에서 배양한 애기장대는 식물병균 접종에 의해 완전히 사멸한 반면, 리그닌 또는 리그닌 변환체가 포함된 MS 배지에서 배양한 애기장대는 식물병균에 저항성을 보이는 것을 확인하였다. 더욱이, 식물병균에 대한 저항성은 리그닌에 비해 리그닌 변환체가 우수한 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 리그닌 또는 리그닌 변환체를 유효성분으로 함유하는 식물병 저항성 증진용 조성물을 제공한다.
- [0007] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 식물, 식물의 종자 또는 식물 식재 토양에 처리하는 단계를 포함하는 식물의 병 저항성을 증진시키는 방법을 제공한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 비료 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0009] 본 발명의 리그닌 또는 펜톤 산화 반응에 의한 리그닌 변환체는 식물체의 병 저항성 증진 효과가 우수하여 식물 생육 촉진용 조성물, 비료, 토양 개선제 등의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0010] 도 1A는 리그닌 또는 리그닌 변환체(펜톤 산화 반응을 거친 리그닌) 함유 MS 배지에서 배양한 애기장대에 슈도모나스 시린개 피브이. 토마토 DC3000(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000) 균주를 처리하고 7일 후 애기장대 생존 모습을 보여주는 사진이고, 도 1B는 균주가 접종된 애기장대에 리그닌 또는 리그닌 변환체(펜톤 산화 반응을 거친 리그닌)를 처리한 후 애기장대의 잎에 잔존하는 슈도모나스 시린개 피브이. 토마토 DC3000 균주의 수를 측정하여 나타낸 그래프이다. control; 리그닌, HA; 상업 휴믹산, S; 리그닌+산세수, 0.1; 리그닌+황산제일철·7수화물 0.05g, 0.5; 리그닌+황산제일철·7수화물 0.25g, 1; 리그닌+황산제일철·7수화물 0.5g, 리그닌, 상업 휴믹산 및 리그닌 변환체는 모두 MS 배지 기준 1,060mg/ℓ 로 처리됨.
- 도 2는 리그닌 또는 리그닌 변환체(펜톤 산화 반응을 거친 리그닌) 함유 MS 배지에서 배양한 애기장대에 에르위니아 카로토보라 subsp. 카로토보라(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) 균주를 처리하고 3일 후 애기장대 생존 모습을 보여주는 사진이다. MS; 아무것도 처리하지 않은 MS 배지, 0.1; 리그닌+황산제일철·7수화물 0.05g, 0.5; 리그닌+황산제일철·7수화물 0.25g, 1; 리그닌+황산제일철·7수화물 0.5g, control; 리그닌, HA; 상업 휴믹산, S; 리그닌+산세수.
- 도 3은 리그닌 또는 리그닌 변환체(펜톤 산화 반응을 거친 리그닌) 함유 MS 배지에서 배양한 애기장대에 식물병균을 접종한 후, PR1 단백질의 발현량을 웨스턴 블롯으로 확인한 결과이다. MS; 아무것도 처리하지 않은 MS 배지, 0.1; 리그닌+황산제일철·7수화물 0.05g, 0.5; 리그닌+황산제일철·7수화물 0.25g, 1; 리그닌+황산제일철·7수화물 0.5g, control; 리그닌, HA; 상업 휴믹산, S; 리그닌+산세수.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 리그닌 또는 리그닌 변환체를 유효성분으로 함유하는 식물병 저항성 증진용 조성물을 제공한다.
- [0012] 리그닌은 식물의 세포벽의 주요 구성 요소로서 나무 구조를 단단하게 만드는데 중요한 역할을 하는 물질이며, 목재 조성의 셀룰로오스(40-43% 중량) 다음으로 22-29% (중량)을 차지하는 주요 자원이다.
- [0013] 본 발명의 식물병 저항성 증진용 조성물에 있어서, 상기 리그닌은 식물 구조체에 포함되어 있는 리그닌 또는 리그닌의 유도체, 펄프 제조 공정에 있어서 강알칼리 또는 강산 조건에서 처리된 리그닌을 포함할 수 있고, 바람직하게는 크라프트 리그닌일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0014] 또한, 본 발명의 식물병 저항성 증진용 조성물에 있어서, 상기 리그닌 변환체는 바람직하게는 리그닌의 펜톤 반응 산화물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 리그닌 변환체는 휴믹산(humic acid) 유사체일 수 있다. 상기 휴믹산 유사체는 휴믹산의 성질을 갖는 물질을 의미한다.
- [0015] 용어 "휴믹산"은 토양에 포함되는 생물 이외의 유기물 총체, 부식질 중 용제에 제거되지 않고 남아 있는 갈색이

나 흑색의 산성유기물로 pH 2.0 이상의 산도에서만 녹는 휴믹물질이다. 휴믹산은 자연계에 용존 유기물질의 50% 이상을 차지하며, 용해 정도에 따라 많은 토양 내 물질 분포에 영향을 미친다. 휴믹산의 카르복실기, 알코올성, 페놀기 및 에놀기 등의 다양한 작용기들은 소수성, 친수성 물질들의 흡착, 산화 환원 반응 등의 화학적 반응을 한다. 다른 명칭으로 부식산이라고 한다. 휴믹산을 작물 또는 토양에 처리하는 것은, 퇴비나 유기질 비료를 작물이 바로 흡수하거나 토양이 바로 이용할 수 있는 형태로 투여하는 것과 같은 효과를 가진다.

[0016] 펜톤산화법은 펜톤(Fenton) 산화반응을 이용한 것으로, 촉매로 사용되는 2가 철(Fe^{2+})염과 과산화수소(H_2O_2)의 혼합용액(펜톤시약)을 사용하여 반응 중 생성되는 OH 라디칼($\text{OH}\cdot$)의 산화력으로 유기물을 산화처리하는 방법이다. 이와 같이 펜톤 산화법은 흔하게 구할 수 있는 철염과, 취급이 용이하여 현장에서 저장이 가능하고 다양한 유기물과의 반응성이 높으며 독성물질이나 색도물질을 유발하지 않는 비교적 경제성이 있는 산화제인 과산화수소를 이용하므로 비교적 간편한 산화 방법에 속한다.

[0017] 본 발명의 일 구현 예에 따른 조성물에 있어서, 상기 리그닌 변환체는 리그닌을 과산화수소(H_2O_2) 및 촉매에 반응시켜 생성된 것일 수 있고, 바람직하게는 리그닌을 과산화수소 및 철염에 반응시켜 생성된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 철염은 FeSO_4 , FeO , $\text{Fe}(\text{OH})_2$, FeCO_3 , FeCl_2 등의 2가 철염(제1철이온)을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0018] 본 발명의 일 구현 예에 따른 조성물에 있어서, 상기 리그닌 변환체(리그닌의 펜톤 반응 산화물)는 구체적으로,

[0019] 1) 리그닌에 과산화수소를 혼합하여 교반하는 단계;

[0020] 2) 상기 1) 단계의 교반된 혼합물에 철염을 첨가하여 반응시키는 단계; 및

[0021] 3) 상기 2) 단계의 반응물을 원심분리한 후 펠렛을 수득하는 단계;를 포함하여 제조할 수 있으며, 더욱 구체적으로는,

[0022] 1) 0.8~1.2g의 크라프트 리그닌에 30~40%(w/v)의 과산화수소 15~25ml를 혼합하여 교반하는 단계;

[0023] 2) 상기 1) 단계의 교반된 혼합물에 0.01~1.0%(w/v)의 황산제일철·7수화물(iron II sulfate heptahydrate) 수용액을 첨가하여 총 1~3시간 동안 반응시키는 단계; 및

[0024] 3) 상기 2) 단계의 반응물을 원심분리한 후 펠렛을 수득하는 단계;를 포함하여 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 본 발명의 일 구현 예에 따른 조성물에 있어서, 상기 2) 단계의 철염 촉매인 황산제일철·7수화물 수용액은 제강공정에서 얻어진 부산물인 산세수(pickling acid water)로 대체될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명의 일 구현 예에 따른 조성물에 있어서, 상기 식물병은 토마토반점세균병, 토마토케양병, 토마토폫마름병, 고추 세균성점무늬병, 배추 무름병, 양배추 흑부병 또는 키위 케양병 등의 세균성 식물병일 수 있고, 바람직하게는 슈도모나스 시린게 피브이. 토마토 DC3000(*Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000) 균주에 의한 토마토반점세균병 또는 에르위니아 카로토보라(*Erwinia carotovora*) 균주에 의한 무름병일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0027] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 식물, 식물의 종자 또는 식물 식재 토양에 처리하는 단계를 포함하는 식물의 병저항성을 증진시키는 방법을 제공한다. 상기 식물의 병저항성을 증진시키는 방법으로는 리그닌 또는 리그닌 변환체를 유효성분으로 함유하는 상기 조성물을 식물에 침지하거나 관주, 즉, 분무하여 수행할 수 있다. 침지하는 방법의 경우, 조성물을 식물체 주변의 토양에 붓거나 또는 종자를 조성물에 담가둘 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 본 발명은 또한, 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 비료 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 비료 조성물은, 식물체의 병 저항성을 증진시키는 리그닌 또는 리그닌 변환체를 유효성분으로 포함하고 있어, 식물체의 식물병 저항성 증진 효과 및 생육 증진 효과가 우수하여, 식물영양제, 토양개량제, 염전살포제 또는 관주살포제 등으로 이용될 수 있다.

[0029] 본 발명의 비료 조성물은 농업적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있으며, 상기 허용 가능한 담체는 충전제(fillers), 용매, 부형제, 계면활성제(surfactants), 현탁제(suspending agents), 스프레더(spreaders), 부착제(adhesives), 소포제, 분산제, 습윤제, 드리프트 감소제(drift reducing agents), 보조제(suxiliaries),

보강제(adjuvants) 또는 이의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명의 비료 조성물은 농축물, 용액, 스프레이, 에어로졸, 침수용(immersion baths), 침지(dips), 에멀전(emulsions), 현탁 농축액, 펠, 과립(granules) 등의 타입으로 제제화할 수 있다.

[0031] 본 발명의 비료 조성물은, 상기 비료 조성물 단독 또는 다른 농업용 제제, 예를 들어, 농약(pesticides), 살충제(insecticides), 살균제(acaracides), 살진균제(본 발명의 진균에 무해한 진균제), 살박테리아제, 제초제, 항생제, 항균제, 살선충제(nematocides), 쥐약(rodenticides), 곤충병원체(entomopathogens), 페로몬(pheromones), 유인제(attractants), 식물성장조절제(plant growth regulators), 식물 호르몬(plant hormones), 곤충성장 조절제(insect growth regulators), 화학불임제(chemosterilants), 미생물 작물보호제(microbial pest control agents), 방충제(repellents), 바이러스, 식자극제(phagostimulents), 식물 영양제, 식물비료 및 생물학적 방제제와 함께 배합하거나, 순차적으로 사용될 수 있다. 상기 살충제로는 카르바메이트, 유기 포스페이트, 유기 염소 살충제, 페닐피라졸, 피레트로이드, 네오니코티노이드, 스피노신(spinosin), 아버멕틴(ivermectin), 밀베마이신, 유충 호르몬 유사체, 알킬할라이드, 유기 주석 화합물, 네레이스톡신(nereistoxin) 유사체, 벤조일우레아, 디아실히드라진, METI 살비제(acaricide)류의 살곤충제, 클로로피크린, 피메트로진, 플로니카미드, 클로펜테진, 헥시티아옥스, 에톡사졸, 디아펜티우론, 프로파르지트, 테트라디폰, 클로르페나피르, DNOC, 부프로페진, 시로마진, 아미트라즈, 히드라메틸논, 아세퀴노실, 플루아크리피림, 로테논 또는 이들의 유도체와 같은 살충제가 사용될 수 있다. 상기 식물 영양제로는 통상적으로 사용되는 식물 영양공급용 비료를 사용할 수 있다. 또한 상기 비료로서, 유기질비료, 복합비료, 질소비료, 인산비료, 칼슘비료, 석회비료, 유산질비료, 황산비료, 마그네슘 비료, 미량원소비료, 유기질비료, 분뇨비료 등이 이용될 수 있다. 이때, 상기 농업적 제제의 특정 예는 당업계의 통상의 지식을 가진 사람에게는 자명한 것이다.

[0032] 본 발명의 비료 조성물을 식물체에 시비할 때, 시비량 및 시비 방법은 당 업계에 통상적으로 알려져 있는 범위 내에서 시비할 수 있다.

[0033] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 실시예 1. 크라프트 리그닌의 펜톤 반응 산화물 제조

[0035] 막자와 막자 사발로 분쇄한 크라프트 리그닌(kraft lignin, Sigma, 미국) 분말 1g과 35% 과산화수소(H_2O_2)용액 20ml을 플라스크에 넣어 혼합한 후 130rpm의 속도로 교반하였다. 그리고 황산제일철·7수화물($FeSO_4 \cdot 7H_2O$, iron (II) sulfate heptahydrate; Junsei, 일본) 0.05, 0.25 또는 0.5g을 5ml의 증류수에 각각 넣고 상온에서 교반하여 서로 다른 농도의 철염 용액을 준비하였다. 그 후 크라프트 리그닌과 과산화수소의 혼합액이 들어있는 플라스크에 상기 철염 용액을 각각 10분 간격으로 1ml씩 총 5번 주입하고 2시간 동안 산화반응을 유도하였다. 반응이 끝난 후 3,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 제거하였고, 증류수를 사용하여 동일한 조건으로 2번 더 원심분리하여 각각의 펠렛을 세척하였다. 상기 세척한 펠렛을 동결건조하여 파우더 형태로 제조한 후 1,060 mg/L가 되도록 MS 배지에 각각 희석하여 애기장대 식물 테스트에 사용하였다.

[0036] 상업 휴믹산(Sigma, 미국)은 증류수에 용해시켰고, 펜톤 산화반응을 하지 않은 크라프트 리그닌은 3,000rpm에서 15분 동안 원심분리하고 세척하여 동결건조 과정만 수행하였다. 산세수는 제강공정에서 얻어진 부산물로, 산세수와 증류수를 1:10 비율로 혼합한 후, 상기 크라프트 리그닌과 과산화수소의 혼합액이 들어있는 플라스크에 10분 간격으로 1ml씩 총 5번 주입하여 2시간 동안 반응시킨 다음 상기와 동일한 방법으로 원심분리를 통한 세척 및 동결건조를 수행하였다.

[0037] 실시예 2. 크라프트 리그닌의 펜톤 반응 산화물의 식물병 저항성 증진 효과 분석

[0038] 2-1. 슈도모나스 시린개 피브이. 토마토 DC3000(*Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000)에 대한 저항성 증진 효과 분석

[0039] 애기장대(Co1-0) 종자를 MS 고체배지에 뿌린 후 16시간/8시간(명/암) 광주기 조건의 배양실에서 2주 동안 배양하였다. 상기 배양된 애기장대 유묘를 펜톤 산화 반응을 거친 크라프트 리그닌, 상업 휴믹산(HA), 산세수 처리한 크라프트 리그닌(S) 또는 펜톤 처리하지 않은 크라프트 리그닌(control)이 포함된 MS 배지에 각각 옮겨 심고, 3일간의 적응기간을 거친 후 대표적인 식물병 세균인 슈도모나스 시린개 피브이. 토마토 DC3000(*Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000) 균주를 접종하였다. 슈도모나스 시린개 피브이. 토마토 DC3000 균주는 항생제를 함유한 KB 배지(King's medium B broth)에서 키운 후 10mM 염화마그네슘($MgCl_2$) 버퍼에

재현탁(resuspension)하여 플레이트 당 5×10^4 CFU/cm² 수준으로 희석하여 애기장대에 처리하였다.

[0040] 균주를 처리하고 7일 동안 배양한 결과, 아무것도 처리하지 않은 MS 배지에서 자란 애기장대는 완전히 사멸한 반면(사진 없음), 펜톤 반응을 거친 크라프트 리그닌, 상업 휴믹산, 산세수 처리 크라프트 리그닌 또는 펜톤 처리하지 않은 크라프트 리그닌이 처리된 MS 배지에서 배양한 애기장대에서는 상당수의 애기장대가 생존한 것을 확인하였다. 특히, 펜톤 산화 반응을 거친 크라프트 리그닌 처리구가 펜톤 산화반응을 하지 않은 리그닌의 처리구 보다 우수한 애기장대 생존율을 보여주었다(도 1A).

[0041] 또한, 배양이 끝난 후 애기장대 위에 잔존하는 슈도모나스 시린개 피브이. 토마토 DC3000 균주의 양을 측정 한 결과, 펜톤 처리하지 않은 크라프트 리그닌(control) 처리구에 비해 펜톤 반응을 거친 크라프트 리그닌, 상업 휴믹산 또는 산세수 처리 크라프트 리그닌 처리구에서 위에 잔존된 균주의 양이 감소하였으며, 특히 펜톤 반응을 거친 크라프트 리그닌 0.5g이 처리된 MS 배지는 펜톤 처리하지 않은 크라프트 리그닌 처리구에 비해 대략 50 배 정도 감소(y축 log 값)한 것을 확인하였다(도 1B).

[0042] 2-2. 에르위니아 카로토보라(*Erwinia carotovora*)에 대한 저항성 증진 효과 분석

[0043] 상기 실시예 2-1에 기술한 것과 동일한 방법으로 배양된 애기장대에 에르위니아 카로토보라 subsp. 카로토보라 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) 균주를 접종하였다. 에르위니아 카로토보라 균주는 항생제를 함유한 KB 배지에서 키운 후 10mM 염화마그네슘(MgCl₂) 버퍼에 재현탁하여 플레이트 당 5×10^4 CFU/cm² 수준으로 희석하여 애기장대에 처리하였다.

[0044] 균주를 처리하고 3일 동안 배양한 결과, 아무것도 처리하지 않은 MS 배지에서 자란 애기장대(MS), 펜톤 처리하지 않은 크라프트 리그닌(control) 및 산세수 처리 크라프트 리그닌(S)에 비해 상업 휴믹산(HA) 및 펜톤 반응을 거친 크라프트 리그닌에서 애기장대가 비교적 건강한 상태를 유지하고 있음을 확인하였다. 특히, 펜톤 반응을 거친 크라프트 리그닌 0.5(리그닌+황산제일철·7수화물 0.25g)에서 애기장대의 생장율이 증가한 것을 확인하였다(도 2).

[0045] 상기 결과를 통해, 펜톤 산화 반응을 거친 크라프트 리그닌이 식물의 병 저항성 증진에 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.

[0046] 실시예 3. 크라프트 리그닌의 펜톤 반응 산화물의 식물병 저항성 단백질 PR1의 발현에 미치는 영향 분석

[0047] 본 발명의 크라프트 리그닌의 펜톤 반응 산화물이 식물의 대표적인 병 저항성 관련 단백질인 PR1 단백질 (pathogenesis related protein 1)의 발현에 미치는 영향을 분석하였다.

[0048] 슈도모나스 시린개 피브이. 토마토 DC3000 균주 처리 후 각각 24시간 및 36시간 후에 채취한 식물의 조직을 액체 질소로 얼린 후 막자사발로 분쇄한 후 조직 100mg을 취하여 100 μ l의 단백질 추출 버퍼(protein extraction buffer)와 혼합하여 완전히 현탁시켰다. 상기 현탁액을 20,000xg, 4℃ 조건에서 원심분리하여 상등액을 취하고, 6X 단백질 로딩 염료(protein loading dye)를 첨가하여 95℃에서 1분간 가열한 후 아크릴아마이드 겔(acrylamide gel)에 로딩하여 전기영동(Bio-Rad, 미국)을 실시하였다. 상기 겔에서 크기별로 분리된 단백질을 멤브레인으로 트랜스퍼시켰으며, 트랜스퍼된 멤브레인을 블로킹 용액(5% skim milk)에 담겨 1시간 동안 천천히 흔들어 블로킹(blocking)하였다. PR1에 대한 1차 항체는 상기 블로킹 용액에 1:2,000 비율로 희석하여 4℃에서 밤새 반응시키거나, 상온에서 2시간 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 멤브레인은 2차 항체(Rabbit 1:5,000)에서 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 TBST(Tris-Buffered Saline with Tween) 버퍼로 10분간 3번 반복하여 세척하였으며, 세척이 끝난 멤브레인에 ECL용액(Thermo Fisher Scientific, 미국)을 5분간 처리하여 발광시킨 후 발현된 단백질의 발현 정도를 시간별로 확인하였다.

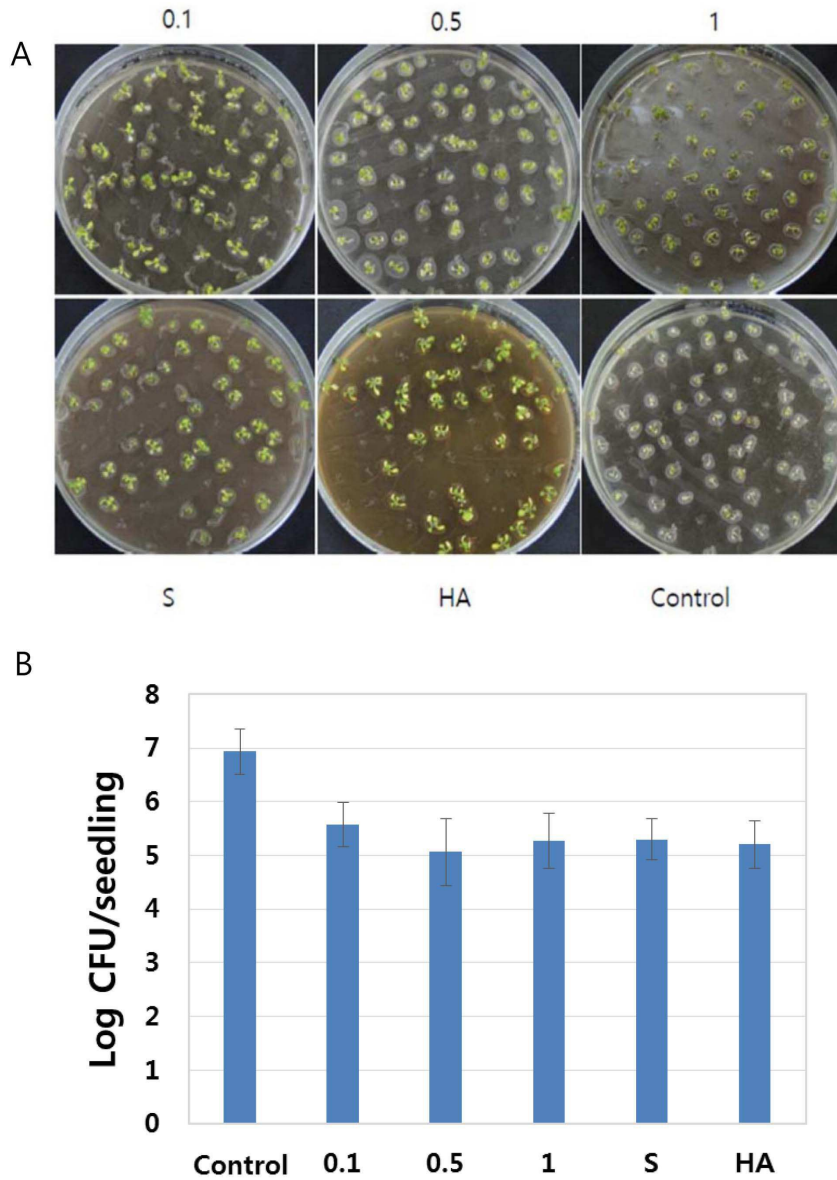
[0049] 식물병균 처리 24시간 후의 시료에서, 크라프트 리그닌의 펜톤 반응 산화물 0.5(:크라프트 리그닌+황산제일철·7수화물 0.25g) 처리구와 산세수 처리구에서 PR1 단백질의 발현이 관찰되었고, 특히 0.5 펜톤 처리한 크라프트 리그닌 처리구는 다른 시험구에 비해 PR1 단백질의 발현이 현저하게 증가된 것을 확인할 수 있었다. 또한, 식물병균 처리 36시간 후의 결과에서는, 크라프트 리그닌의 펜톤 반응 산화물 0.1(:크라프트 리그닌+황산제일철·7수화물 0.05g) 처리구를 제외한 모든 구에서 PR1 단백질의 발현이 관찰되었다(도 3).

[0050] 상기 PR1 단백질의 발현을 통해, 크라프트 리그닌의 펜톤 반응 산화물 처리가 식물의 병 저항성을 유도할 수 있음을 알 수 있었고, 상업 휴믹산에 비해 식물병균에 반응하여 단시간에 PR1 단백질의 발현이 유도되는 것으로 보아, 본 발명의 크라프트 리그닌의 펜톤 산화 반응물에 대한 식물병 저항성 증진 효과는 기존에 사용되어온 상

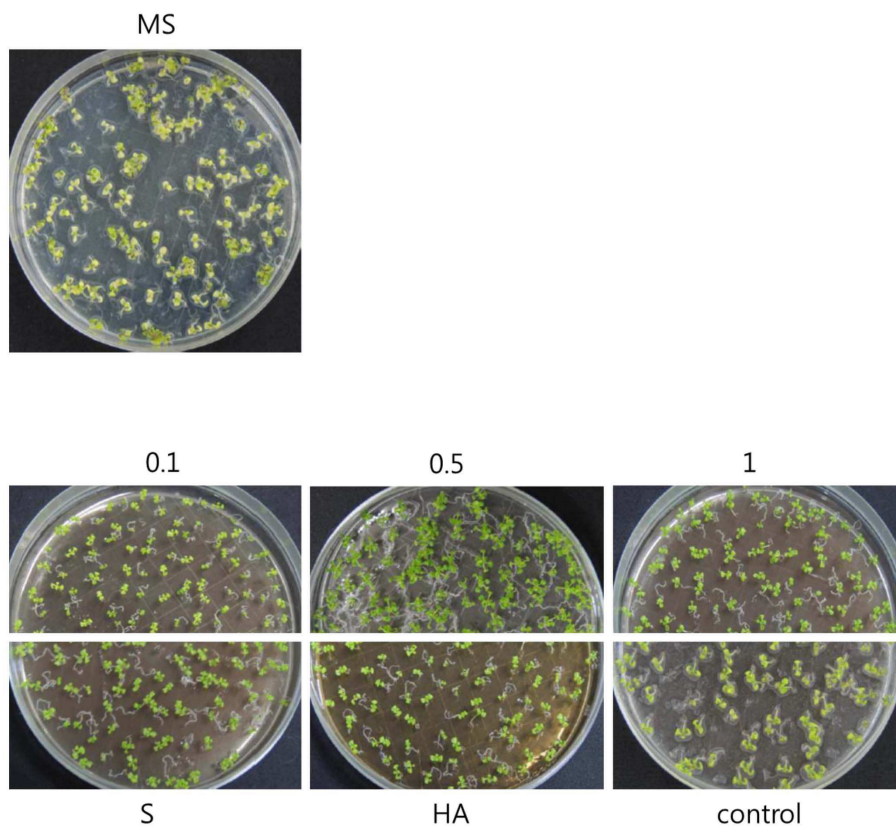
업 휴믹산과 거의 유사함을 알 수 있었다. 또한, 펜톤 산화 반응 전의 크라프트 리그닌보다 펜톤 산화 반응에 의한 크라프트 리그닌의 산화물이 더욱 강한 병 저항성을 유도하는 것으로 판단할 수 있었다.

도면

도면1



도면2



도면3

