(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0153621
(43) 공개일자 2023년11월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 43/12 (2006.01) *A01N 65/08* (2009.01)
A01P 21/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01N 43/12 (2013.01)
A01N 65/08 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0053243
(22) 출원일자 2022년04월29일
심사청구일자 2022년04월29일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
강지은
서울시 중구 황학동 난계로 169, 714호
유나연
서울특별시 영등포구 여의대방로43라길 9 (신길동 삼환아파트) 111동 902호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

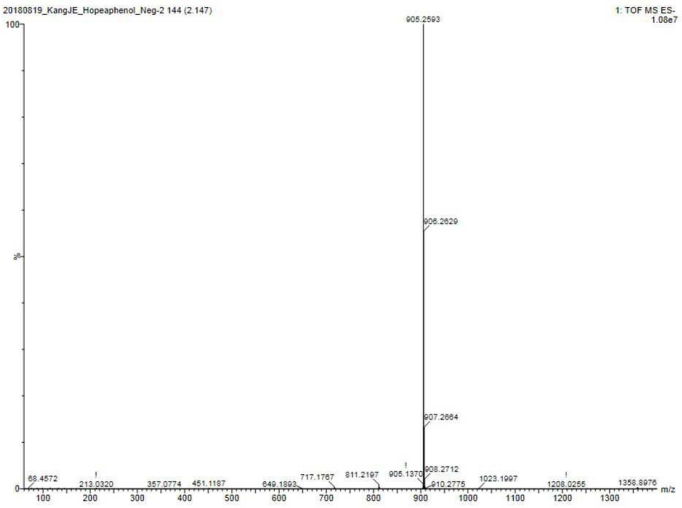
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **호페아페놀을 유효성분으로 포함하는 식물 면역 유도제 및 이를 이용한 식물 면역 유도방법**

(57) 요 약

본 발명은 호페아페놀을 유효성분으로 포함하는 식물 면역 유도제에 관한 것으로, 식물의 1차 면역반응인 PTI(PAMP-triggered immunity)와 2차 면역반응인 ETI(Effector-trigger immunity)를 유도할 수 있다. 본 발명의 식물 면역 유도제는 식물의 선천 면역 시스템을 증진시킬 수 있으며, 기존의 항생제를 대체할 수 있는 친환경적 식물 면역 유도제로 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A01P 21/00 (2021.08)
(72) 발명자
정의환
서울특별시 서초구 방배로19길 67 방배브라운아파트 102동 505호
김범석
서울시 용산구 회나무로42길 39-23

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345341685
과제번호 2021R1A6A3A01086358
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 천연물 대사체의 식물 병원균의 병원성 억제 및 면역 유도 활성 기작 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2021.09.01 ~ 2022.08.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395073460
과제번호 PJ015871032022
부처명 농촌진흥청
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 농축산물생산현장의안전관리기술개발
연구과제명 면역유도 미생물을 활용한 작물 환경 · 생물 스트레스 제어 기술 연구(3공동)
기 여 율 1/2
과제수행기관명 고려대학교(서울)
연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31

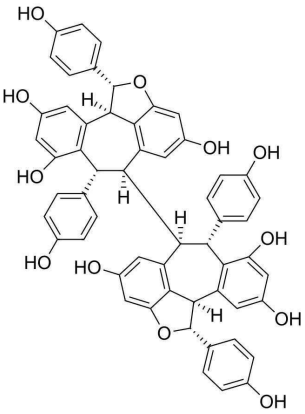
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 이성질체를 포함하는 식물 면역 유도제:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화합물 또는 이의 이성질체는,

식물 잎에서 활성산소를 발생시키는 것인, 식물 면역 유도제.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 화합물 또는 이의 이성질체는,

식물 잎에서 이온을 발생시키는 것인, 식물 면역 유도제.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 화합물 또는 이의 이성질체는,

세균성 반점병에 대한 면역을 유도하는 것인, 식물 면역 유도제.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 화합물 또는 이의 이성질체는,

포도 뿌리로부터 분리된 것인, 식물 면역 유도제.

청구항 6

제1항의 식물 면역 유도제를 식물체 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 식물 면역 유도방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 호페아페놀(hopeaphenol)을 유효성분으로 포함하는 식물 면역 유도제 및 이를 이용한 식물 면역 유도 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식물과 병원균의 상호작용을 연구하는 모델식물인 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 면역 시스템은 1차 면역 반응과 이를 억제하는 병원균의 병원성 단백질을 인식할 수 있는 2차 면역 반응으로 분류된다. 1차 면역 반응은 병원균의 보존분자(conserved molecule)인 PAMP(pathogen-associated molecular pattern)을 인식하는 것으로 시작되는데, 식물의 세포 표면에 존재하는 수용체에 PAMP가 인식되고, 일련의 반응을 통해 1차 면역 반응이 활성화 된다. 이를 PTI (PAMP-triggered immunity)라 한다. 2차 면역 반응은 이러한 1차 면역 반응을 무력화시키려는 병원균의 병원성 단백질들을 식물의 2차 선천면역 수용체가 인식하여 이루어진다. ETI (Effector-trigger immunity) 라 불리는 2차 면역 반응은, 병원균이 분비하는 병원성 단백질인 이펙터 단백질을 식물에 존재하는 NLR(nucleotide-binding leucine rich-repeat) 면역 수용체가 직, 간접적으로 인식하면서 활성화된다. 이 두 가지의 면역 반응은 병원균에 감염된 국소적인 부분뿐만 아니라 감염되지 않은 식물 부위까지 면역 반응을 촉진하여 식물체 전반의 병저항성을 유도한다.

[0003] 식물이 외부 자극(미생물, 주변식물, 병원균의 이펙터 단백질, 천연물, 합성물 등)에 노출 시, priming이라는 반응을 통해 이후에 일어나는 생물적 또는 무생물적 스트레스에 대한 면역 능력이 국부적 또는 전신적으로 향상된다. 일반적으로 식물 뿌리에 서식하는 비병원성 세균이 식물체의 병저항성을 향상시키는 것으로 알려져 있으며, 살리실산(salicylic acid) 등의 식물 호르몬도 이러한 유형의 병저항성을 유도하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 식물 면역 유도제는 항생제 저항성 식물 병원균의 출현 문제를 해결할 수 있을 뿐만 아니라, 천연물 유래 대사산물을 기반으로 하는 식물 면역유도제는 친환경적으로 식물을 보호할 수 있는 장점이 있다. 이에, 본 발명은 식물에서 분리한 천연물 대사산물의 식물 면역유도 효과를 확인하였으며, 본 발명에 따른 식물 면역유도제는 유기합성 항생물질을 대체하여, 항생제 저항성 문제뿐만 아니라 환경에 대한 부작용 우려를 대폭 낮출 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) KB 10-2205557 B1

발명의 내용

해결하려는 과제

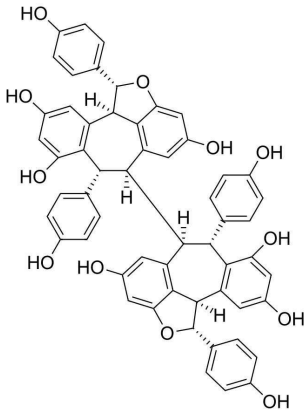
[0006] 본 발명은 식물의 선천 면역을 활성화시켜 식물병 방제제로서의 효과를 가지는 식물 면역 유도제를 제공하고자 한다.

[0007] 또한, 본 발명은 식물병 방제에 일반적으로 사용되는 항생제를 대체할 수 있는 친환경적인 식물 면역 유도제를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 이성질체를 포함하는 식물 면역 유도제를 제공한다.

[0009] [화학식 1]



[0010]

[0011] 본 발명에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 이성질체는, 바람직하게는 식물 잎에서 활성산소를 발생시키는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0012] 본 발명에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 이성질체는, 바람직하게는 식물 잎에서 이온을 발생시키는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0013] 본 발명에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 이성질체는, 바람직하게는 세균성 반점병에 대한 면역을 유도하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0014] 본 발명에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 이성질체는, 바람직하게는 포도 뿌리로부터 분리된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 식물 면역 유도제를 식물체 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 식물 면역 유도방법을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명은 호페아페놀을 유효성분으로 포함함에 따라, 식물의 1차 면역반응인 PTI(PAMP-triggered immunity)와 2차 면역반응인 ETI(Effector-trigger immunity)를 통해 국부적, 전신적 저항성을 유도하는 식물 면역 유도제를 제공할 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명의 식물 면역 유도제는 식물의 선천 면역 시스템을 증진시킬 수 있으며, 기존의 항생제를 대체할 수 있는 친환경적 식물 면역 유도제로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 호페아페놀의 분자량을 확인한 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 호페아페놀의 구조 분석 결과를 보여주는 ^{1}H-NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 호페아페놀 처리에 따른 활성산소 발생량을 확인한 도이다.

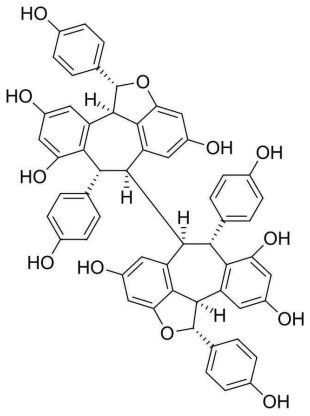
도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 호페아페놀 처리에 따른 이온 전도도를 확인한 도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 호페아페놀 처리에 따라 면역이 유도된 식물 모델에서 병원균의 밀도를 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 이성질체를 포함하는 식물 면역 유도제를 제공한다.

[0020] [화학식 1]



[0021]

[0022] 또한, 본 발명은 상기 식물 면역 유도제를 식물체 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 식물 면역 유도방법을 제공한다.

[0024] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 보다 자세히 설명한다. 다만, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0026] **<실시예 1> 호페아페놀(hopeaphenol) 분리 및 활성물질 분석**

[0027] **1-1. 호페아페놀 분리 및 정제**

[0028] 포도 뿌리를 가루형태로 제분하여, 포도 뿌리 분말 1 g 당 20 mL의 99.5 %(v/v) 메탄올에 침지시킨 후 24시간 동안 실온에서 추출하였으며, Whatman no. 2 여과지를 이용하여 여과하고, 감압농축기를 이용하여 38℃에서 농축하였다. 이후, C18 sep-pak 크로파토그래피를 수행하였다. 각 분획은 물과 메탄올을 일정비율로 혼합하여 전개하였으며, 그 중 활성분획을 모아 감압 농축한 후, 유속 2 mL/min, UV 검출기 254 nm, 용매 0.1% 포름산을 포함한 10~80% 메탄올을 이용하는 분취 조건으로 C18 역상 컬럼을 이용한 HPLC 시스템을 통해 분리 정제하였다.

[0030] **1-2. 분리된 활성물질의 분석**

[0031] 분리된 활성물질의 분자량 및 스펙트럼 분석을 통해 본 발명에서 분리된 물질이 호페아페놀임을 확인하였다.

[0032] HPLC 시스템을 통해 분리된 활성물질의 분자량을 측정하기 위해 고분해능 질량분석법을 사용하였다. 유속 0.4 mL/in, UV 256 nm, 용매 0.1% 포름산을 포함한 20~100% 아세토나이트릴을 이용하는 분취 조건으로 C8 역상 컬럼을 이용한 UPLC-Q/TOF Mass spectrometer를 통해 활성물질의 분자량을 측정하였다.

[0033] 도 1에서 보듯이, 활성물질의 분자량을 negative mode에서 m/z 905.2593임을 확인하였다.

[0034] 활성물질의 구조를 분석하기 위해 핵자기공명법을 사용하였다. HPLC 시스템을 통해 정제한 활성물질을 감압농축기를 이용하여 38℃에서 농축한 후, 10 mg의 활성물질을 600 μL의 아세톤에 용해시키고, 500 MHz의 1H-NMR 분석을 진행하였다.

[0035] 도 2에서 보듯이, 활성물질의 1H-NMR의 chemical shift값이 기존 문헌에 보고된 호페아페놀과 동일한 값을 갖는 것을 확인하였다.

[0037] **<실시예 2> 호페아페놀의 1차 면역 유도 효과 확인**

[0038] 본 실험에서는 식물의 1차 면역 반응을 정량적으로 확인할 수 있는 활성산소 측정법을 수행하여 호페아페놀로부

터 식물의 1차 면역이 유도되는지 확인하였다 (Marcec et al., “Crosstalk between calcium and ROS signaling during flg22-triggered immune response in Arabidopsis leaves”, Plants 11.1 (2021): 14).

[0039] 호페아페놀을 100 μM 농도로 희석한 희석액을 발아 4주 후의 애기장대 잎에 주사기를 이용하여 주입하였다. 대조군으로 물을 주입하였다. 주입 16시간 후, 잎을 일정한 크기로 잘라내어 96 well plate에 각각 넣은 뒤, 활성산소 측정용 용액(*Pseudomonas aeruginosa*에서 분리한 flg22 단백질 100 nM, Luminol 30 μg /mL, Peroxidase 20 μg/mL)을 200 μL씩 분주하여 Luminescence 측정기에서 1시간 동안 2분 간격으로 활성산소 발생량을 측정하였다.

[0040] 도 3에서 보듯이, 호페아페놀을 처리한 경우, 대조군에 비해 활성산소 발생이 증가하여 1차 면역이 유도된 것을 확인하였다.

[0042] **<실시예 3> 호페아페놀의 2차 면역 유도 효과 확인**

[0043] 본 실험에서는 식물의 2차 면역 반응을 정량적으로 확인할 수 있는 이온 전도도 측정법을 수행하여, 호페아페놀로부터 식물의 2차 면역이 유도되는지 확인하였다(Menna et al., “Elevated temperature differentially influences effector-triggered immunity outputs in Arabidopsis”, Frontiers in plant science 6 (2015): 995).

[0044] 호페아페놀을 100 μM 농도로 희석한 희석액을 4 엽기까지 자란 담배식물 잎에 주사기를 이용하여 주입하였다. 대조군으로 물을 주입하였다. 주입 3시간 후, 동일한 위치에 슈도모나스 시린게 pv. 토마토 DC3000 균주 현탁액(10^6 CFU/mL)을 주입하였다. 주입 40시간 후, 식물의 잎을 일정한 크기로 잘라내어 물 6 mL이 들어있는 테스트 튜브에 넣고 잎에서 유출되는 이온을 2시간 간격으로 12시간 측정하였다.

[0045] 도 4에 호페아페놀 주입 결과를 나타내었다. 도 4에서 보듯이, 호페아페놀을 주입한 잎은 이온 발생량이 증가하였다.

[0047] **<실시예 4> 호페아페놀의 방제 효과 확인**

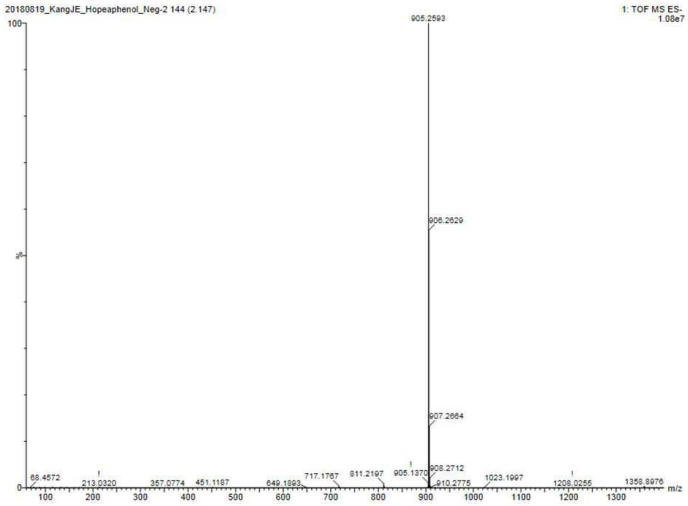
[0048] 본 실험에서는 호페아페놀에 의해 사전에 식물 면역이 활성화된 애기장대 잎의 병저항성을 확인하였다.

[0049] 혼합토양(피트모스, 펄라이트, 버미큘라이트가 4:3:3의 부피비로 혼합된 토양)이 담긴 플라스틱 포트에 애기장대 종자를 파종하고 암처리 4일, 광처리 7일 후에 36-플라스틱 포트에 옮겨심어 3주간 재배하였다. 호페아페놀을 100 μM 농도로 희석한 희석액을 잎에 주입하고 대조군으로는 물을 주입하였다. 16시간 후에 슈도모나스 시린게 pv. 토마토 DC3000 균주 현탁액(10^5 CFU/mL)을 주입하였다. 접종 당일과 3일 후의 애기장대 잎을 일정한 크기로 잘라 2 mm 크기의 비드가 들어있는 튜브에 옮겨담고 잎을 파쇄하였다. 물 1 mL를 넣어 1/10 연속희석법으로 희석하고, 10 μL 씩 King’s B 배지에 점적하였다. 24시간 후, 배지에서 자란 세균의 콜로니 개수를 계산하여 병 피해도를 평가하였다.

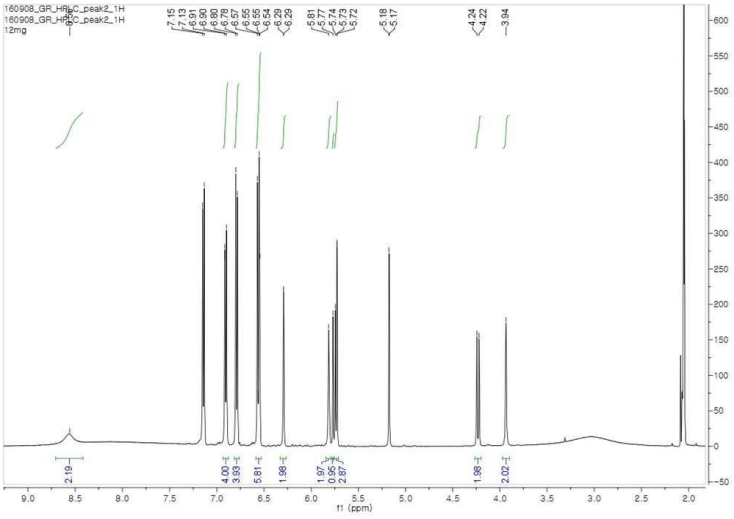
[0050] 도 5에서 보듯이, 호페아페놀을 처리한 애기장대 잎에서의 세균 CFU 값은 면역유도제를 처리하지 않은 대조군에 비해 유의한 수준으로 적었으며, 이에 따라 본 발명의 호페아페놀 처리시 면역이 효과적으로 유도되는 것을 확인하였다.

도면

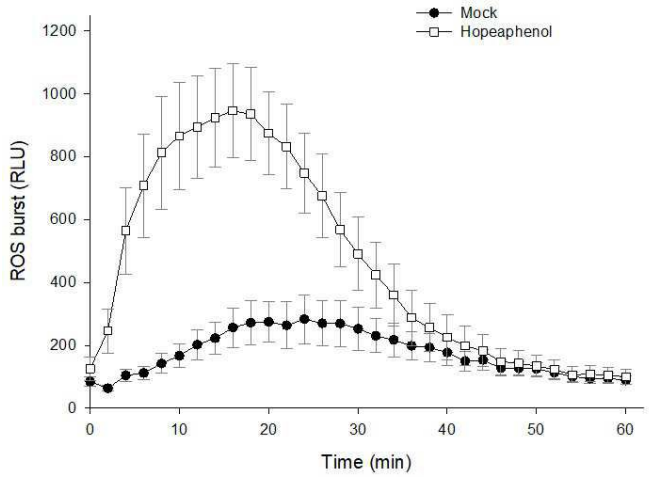
도면1


20180619_KangJE_Hopeaphenol_Neg-2 144 (2.147)
1: TOF MS ES-
1.08e7
905.2593
906.2629
907.2664
908.2712
m/z

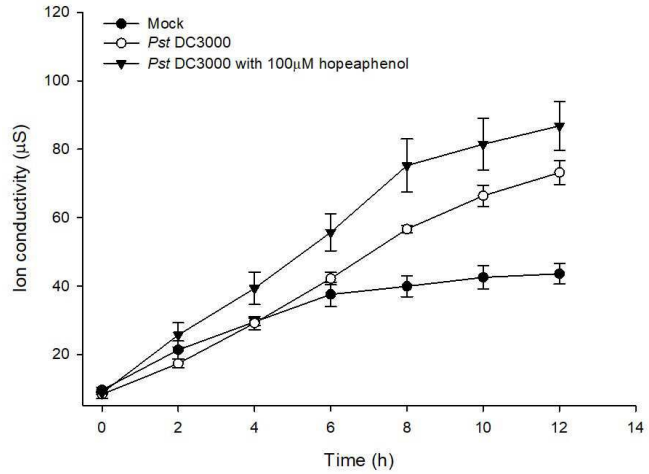
도면2


160908_GR_HRLC_peak2_1H
160908_GR_HRLC_peak2_1H
12mg
f1 (ppm)

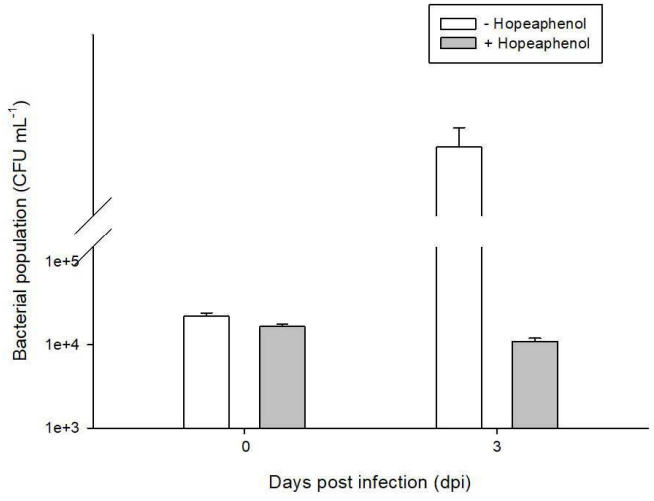
도면3


Mock
Hopeaphenol
ROS burst (RLU)
Time (min)

도면4


Mock
Pst DC3000
Pst DC3000 with 100μM hopeaphenol
Ion conductivity (μS)
Time (h)

도면5


- Hopeaphenol
+ Hopeaphenol
Bacterial population (CFU mL-1)
Days post infection (dpi)