

(옆면)

(앞면)

115085-2

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개(), 발간등록번호(O)

11-1543000-002220-01

리
그
닉
산

(견고덕31p)

리그닌 전구체를 이용한 인공 휴믹산 합성 및 식물생장조절제 개발 최종보고서

전
합
구
성
체
를
및

2018. 03. 23.

(견고덕15p)

이
식
물
생
장
조
절
제

주관연구기관 / 경상대학교 산학협력단

개
발

(견고덕 15.5p)

최
종
보
고
서

(견고덕
14p)

2018

(견고덕13p)

농
림
산
품
기
술
기
획
평
가
원

농 립 축 산 식 품 부

농림식품기술기획평가원

(견고덕 20p)

(견고덕
17p)

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “리그닌 전구체를 이용한 인공 휴믹산 합성 및 식물생장조절제 개발”(개발기간 : 2015. 12. 18 ~ 2017. 12. 17)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 3. 22.

주관연구기관명 : (대표자) 경상대학교 산학협력단 (인)

주관연구책임자 : 전 종 록

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	115085-2	해 당 단 계 연 구 기 간	2015. 12. 18. ~ 2017. 12. 17.	단 계 구 분	2년차/총 2년
연구사업명	단 위 사 업	(해당 없음)			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	리그닌 전구체를 이용한 인공 휴믹산 합성 및 식물생장조절제 개발			
	세 부 과 제 명	제 1 세부과제: 리그닌 전구체를 이용한 농업에 적용 가능한 식물생장조절제용 인공 휴믹산 합성 및 개발 제 2 세부과제: 천연 및 인공 합성 휴믹산을 이용한 식물 생장 증진 효과 기작 규명 및 작물 대상 효과 검증			
연구책임자	전종록	해당단계 참 여 연구원 수	총: 6명 내부: 6명 외부: 0명	해당단계 연 구 개 발 비	정부:100,000천원 민간: 0천원 계:100,000천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 12명 내부: 12명 외부: 0명	총 연구개발비	정부:200,000천원 민간: 0천원 계:200,000천원
연구기관명 및 소속부서명	경상대학교 산학협력단			참여기업명	(해당 없음)
위탁연구	연구기관명 (해당 없음)			연구책임자	(해당 없음)
<ul style="list-style-type: none"> - 단가가 저렴한 리그닌 전구체 물질 (i.e. Catechol/Vanillic acid/L-dihydroxyphenylalanine/Dihydroxynaphthalene/3-pentadecylphenol) 을 이용해 상업 휴믹산과 비슷한 식물생장 효과를 줄 수 있는 인공 휴믹산을 산화 고분자화 반응을 통해 제조하고 그들의 구조적 유사점 및 차이점을 다양한 분석 기법을 이용하여 확인하였음. - 인공 휴믹 물질의 식물 자극성을 애기장대, 알파과, 이탈리아 라이그라스를 이용해 발아 증진, 바이오 매스 증진, 비생물학적 스트레스 저항성 증가 관점에서 상업 휴믹산과 비교하여 검증 하였음. - Catechol/Vanillic acid/L-dihydroxyphenylalanine 조합으로 합성한 산화 고분자화 산물이 상업 휴믹산 수준의 식물 자극 효과를 보이는 것으로 확인하였음. 				보고서 면수	

국문 요약문

		D-01			
연구의 목적 및 내용	<ol style="list-style-type: none"> 1. 단가가 저렴한 리그닌 전구체 물질을 이용해 상업 휴믹산을 산화 고분자화 반응을 통해 제조하고 이들의 구조적 유사성을 규명함. 2. 구조적 유사성을 바탕으로 상업 휴믹산 수준의 식물 자극성이 확보되는지를 규명함. 				
연구개발성과	<ol style="list-style-type: none"> 1. 기존에 보고되지 않은 상업 휴믹산의 식물 자극 능력인 염 저항 능력 향상 기작을 분자 수준에서 규명하고 관련 결과를 학술 저널에 보고하였음. 2. 단가가 저렴한 리그닌 전구체 물질을 이용해 휴믹 유사 구조를 합성하고 애기장대를 활용해 발아 촉진 및 염 저항성 향상 능력이 상업 휴믹산 수준만큼 발현됨을 규명하였음. 관련 기술을 특허 출원하고 학술 저널에 보고하였음. 3. 합성된 휴믹 유사 구조의 구조적 특징을 초고분해능 FT-ICR-MS, IR, EFM, Size distribution, SEM, NMR, Zeta-potential, EPR 등의 고분자 분석법을 동원하여 규명하였음. 상업 휴믹산과 구조적 차이점과 공통점을 규명함. 4. 구조 분석을 바탕으로 리그닌 전구체에 사슬이 긴 알킬 체인과 아민기를 추가 도입하여 2번에서 제시된 물질의 변형체를 제조하고 애기장대를 이용해 발아 및 염 저항성 능력 향상을 규명하고 이를 특허 출원함. 5. 구조 변형을 통해 최종적으로 2가지 휴믹 유사 합성법을 확보하고 염면 시비를 통한 유효과파와 이탈리아인 라이그라스 작물 바이오매스 생장 촉진 능력을 규명하고 관련 시비법 및 바이오매스 촉진 능력을 특허 출원함. 6. 산화 고분자화 합성법을 40 mL 수준에서 0.5 L 반응기 수준으로 Scale-up을 진행하였으며 Scale-up 과정에서 식물 자극성은 크게 변화되지 않는 것으로 확인됨. 7. GS칼텍스 리그닌 구조 변형에 본 기술을 접목하여 리그닌 휴믹화 관련 1차 기술이전을 성사시킴. 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 리그닌 전구체 휴믹화 기술의 Pilot 테스트 및 경제성 평가를 위한 추과 과제 신청 2. GS칼텍스 리그닌 휴믹화 추가 기술이전 3. 국내 비료회사와의 협업을 통해 안공 휴믹산 처리 가능 작물 대상 확대 4. 비해성 평가를 통한 미량 복합 비료화 기술 확보 및 관련 특허 등록 5. 휴믹산을 통해 활성화되는 신규 식물 단백질 발굴 				
중심어 (5개 이내)	휴믹산 (부식산)	리그닌 유래 페놀	산화 고분자화	식물 생장 조절제	비료

영문 요약문
 < SUMMARY >

						D-02
Purpose& Contents	1. To manufacture humic-like plant fertilizers through oxidative polymerization of low-cost lignin-related small phenolics and to identify structural similarity and difference with commercial humic acids. 2. To identify key structural features allowing for plant stimulation that is comparable to commercial humic acids.					
Results	1. We characterized novel molecular mechanism how to improve salt-stress resistance of <i>Arabidopsis thaliana</i> with humic acids. 2. We manufactured some artificial humic-like polymers whose effects on plant germination acceleration and salt-stress resistance that were comparable to commercial humic acids were characterized. 3. Structural elucidation of the artificially synthesized humic materials was performed with HR-FT-ICR-MS, IR, EFM, Size distribution, SEM, NMR, <i>Zeta</i> potential, EPR. Structural similarity and difference between commercial humic acids and the humic mimics were deduced. 4. Additional polymers syntheses by introducing either amine or long alkyl chain were conducted followed by the evaluation of their effects on plant germination acceleration and salt-stress resistance. 5. Significant increase in biomass of alfafa and italian ryegrass was observed through foliar applications of two kinds of humic-like materials we synthesized. 6. Scale-up processes from 0.4 mL to 0.5 L were successfully achieved with the similar plant stimulation activities. 7. Technology transfer related with GS Caltex lignin humification has been achieved with GS Caltex.					
Expected Contribution	1. Pilot test for lignin precursor-based humification and economic evaluation. 2. Additional technology transfer related with GS Caltex lignin humification. 3. Expansion of humic mimic-treatable crops via collaboration with domestic fertilizer companies. 4. Core technology and IP secure for composite fertilizers with humic mimics. 5. Identification of novel plant proteins that are activated with treatment of humic acids.					
Keywords	Humic acid	Lignin-derived phenols	Oxidative polymerization	Plant growth regulator	Fertilizer	

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	1
2. 국내외 기술개발 현황	3
3. 연구수행 내용 및 결과	31
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	66
5. 연구결과의 활용계획 등	68
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	69
7. 연구개발성과의 보안등급	70
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	71
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	72
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	73
11. 기타사항	75
12. 참고문헌	76

<별첨> 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

가. 연구개발 목적

- (1) 단가가 저렴한 리그닌 전구체 물질을 이용해 휴믹산과 비슷한 식물 성장 효과를 줄 수 있는 인공 휴믹산을 산화 고분자화 반응을 통해 제조하고 이들의 식물 성장 증진 효과를 검증하고 실제 작물에서의 새로운 식물성장조절제 성분으로 개발하고자 함.

나. 연구개발의 필요성

- (1) 휴믹산은 토양 내에 존재하는 유기물로 식물의 유기체가 썩거나 저분자 폐놀계 물질이 생물학적 반응에 의해 중합되어 만들어지는 것으로 추측하고 있음.
- (2) 휴믹산의 식물의 영향은 아주 오래전에 밝혀져 왔고 주로 식물의 성장을 촉진하는 것으로 보고되고 있음.
- (3) 휴믹산의 식물 성장 촉진은 크게 2가지 기작이 작용할 것으로 추측하고 있음. 첫째는 휴믹산의 고분자 구조내에 식물의 옥신 호르몬 구조를 가지고 있어 식물 호르몬 유사 역할을 한다고 알려져 있음. 두 번째는 휴믹산이 식물의 무기물 흡수를 촉진하게 만든다는 기작으로 무기물 관련 흡수 유전자 발현을 증진시키는 것으로 알려져 있음.
- (4) 휴믹산은 기본적으로 구조가 폴리아로마틱 구조로 정형화된 형태를 갖지 않은 고분자 혼합물임. 또한 구조 자체가 리그닌과 매우 유사할 것으로 추정하고 있음.
- (5) 휴믹산의 식물성장촉진 효과에도 불구하고 실제 농업에서 식물성장조절제에 효과적으로 활용하지 못하였음. 이유는 추출과정이 복잡하고 가격적 단가가 높기 때문임. 이를 극복하고자 Coal에서 휴믹산을 뽑아내는 등의 대체 휴믹산이 제시되었지만 역시 추출을 해야 하는 등 과정이 복잡함.
- (6) 휴믹산의 구조가 리그닌과 같은 폴리아로마틱 구조인 것에 착안하여 리그닌의 특정 구조를 갖는 폐놀 물질을 이용해 휴믹산 유사체를 Bottom-up으로 합성할 경우 휴믹산과 같은 매우 비슷한 효과가 날 것으로 예상함. 리그닌의 합성 기작인 산화 고분자화 반응을 이용해 값 싼 단량체를 이용해 합성할 경우 매우 싼 가격으로 휴믹산과 구조적으로 매우 유사한 고분자성 물질을 대량으로 합성할 수 있을 것으로 판단됨. 또한 인공으로 합성할 경우 합성 물질의 구조적 조작성이 가능하기 때문에 천연 휴믹산보다 월등한 식물 영향 효과를 내는 인공 휴믹산 구조를 발굴할 수 있을 것으로 보임.
- (7) 인공 휴믹산을 값싼 방식으로 대량으로 합성이 가능할 경우 새로운 식물성장조절제 성분으로 활용될 수 있고 이를 기반으로 국내 비료 회사에 기술 이전을 통해 국내 농업 산업의 경쟁력 강화에 기여할 수 있음.
- (8) 휴믹산의 식물 성장 증진효과에 대한 기초적인 식물 생리 및 분자생물학적 기작 규명은 향후 목적 작물 선정에 주요한 자료를 제공할 것임.
- (9) 현재까지 휴믹산은 식물 성장 증진 효과에만 집중되어 평가되었으며 부분적인 환경스트레스 적응성 연구가 시작단계에 있기에, 천연 및 인공 휴믹산이 식물 성장 외에 스트레스 또는 개화에 긍정적 영향을 줄 수 있다고 사료되며, 새로운 기능성 식물성장조절 물질의 제조가 가능할 것으로 보임.
- (10) 이러한 천연 휴믹산의 식물 성장 촉진 효과에 기반한 다양한 휴믹계 제품이 산업화되어 있지만 직접적인 근거 및 protocol이 제시되지 않고 있기에, 본 연구진은 천연 및 인공

합성 휴믹산의 생장 및 스트레스 적응성 연구내용 공시를 통해 농가의 맞춤형 작물 선정에 기여하고자 함.

다. 연구개발 범위

(1) 제 1 세부과제 : 리그닌 전구체를 이용한 농업에 적용 가능한 식물생장조절제용 인공 휴믹산 합성 및 개발

(가) 리그닌 전구체 페놀 물질을 이용한 산화 고분자화 반응 유도

- ① 리그닌 전구체 페놀 물질을 이용해 산화 고분자화 반응을 유도하고 이를 통해 다양한 폴리아로마틱 구조를 갖는 라이브리리를 확보
- ② 반응의 온도, 단량체 농도, 단량체 종류, 산화촉매의 양 등을 변수로 하여 다양한 분자량 및 PDI 값을 갖는 폴리아로마틱 구조를 합성함. 이를 통해 최적의 식물 생장 및 스트레스 내성 효과를 갖는 구조적 특징을 평가
- ㉔ 리그닌 전구체를 이용한 산화 고분자화 : 단가가 싼 리그닌 유래 페놀 물질을 활용
- ㉕ 산화 고분자화 후 고분자 특성 평가 : 분자량 및 PDI 값 변화도 측정

(나) 천연 휴믹산과 구조적 특징 비교 분석

- ① 다양한 표면분석, 크로마토그래피, 그리고 질량 분석 기술을 활용해 합성된 휴믹산이 천연 휴믹산과 비슷한 화학적 구조 및 핵심 작용기를 공유하는지 확인
- ㉔ 중합체의 표면 분석 : FT-IR, Water contact angle, phenol reagent, sorption, XPS
- ㉕ 중합체의 질량 분석 : GC/MS, LC/MS/MS, ESI-FTICR, MALDI-TOF/TOF

(다) 합성 scale-up 실험

- ① Lab scale (50 ml ~500 ml) 단위에서 식물 생장 효과를 관찰한 후 5 L에서 50 L 규모로 반응의 규모를 확대하여 합성 반응의 scale-up이 가능한 지를 관찰함. 이를 통하여 대량 생산 가능성을 확인
- ㉔ 중합 반응의 scale-up : 반응기를 사용하여 산소 주입량, pH를 조절하면서 반응 product 생성 정도를 모니터링

(라) 인공 휴믹산의 생분해성 평가

- ① 토양 또는 Composting 환경에서 인공 휴믹산의 아로마틱 구조가 제거되는지를 확인 예정
- ㉔ IR 분석을 통해 아로마틱 구조 변화 관찰
- ㉕ 백색 부후균과 같은 리그닌 분해 미생물을 이용해 생분해가 일어나는지 관찰

(2) 제 2 세부 과제 : 천연 및 인공 합성 휴믹산을 이용한 식물 생장 증진 효과 기작 규명 및 작물 대상 효과 검증

(가) 천연 휴믹산 및 합성 휴믹산의 식물 생장 증진 효과 검증

- ① 천연 및 인공 합성 리그닌 전구체 중합 물질을 애기장대에 처리해 식물의 생장 증진 효과를 형태학적 변화를 통해 모니터링 하고자 하며, 이를 통한 비료로서의 역할을 할 수 있는 합성 휴믹산의 중합체 구조 및 반응 조건을 규정

- ㉔ 중합체에 따른 식물 성장 표현형의 변화 모니터링 : 발아, 성장, 개화 관찰
- ㉕ 휴믹산의 식물호르몬 유사 기능 규명 : 돌연변이체 이용, 유전자 발현 관찰

(나) 천연 및 합성 휴믹산 처리에 의한 식물 환경스트레스 저항성 부여

- ① 본 연구진이 보유한 다양한 스트레스 관련 돌연변이종과 분자생물학적 기법을 이용해 인공 휴믹산에 반응하는 스트레스 관련 돌연변이종의 성장 변화 및 유전자 변화를 관찰함으로써, 천연 및 인공 합성 휴믹산 시용에 의한 환경스트레스 저항성 기작을 규명하고, 향후 목적 작물을 선별하는데 이용
- ㉔ 식물의 외부 환경 스트레스에 대한 휴믹산 처리의 효과 규명
- ㉕ 휴믹산 처리에 의한 각 스트레스 마커 유전자들의 변화 규명
- ㉖ 각 스트레스 관련 돌연변이체를 통한 휴믹산의 성장 촉진 기작 규명

(다) 다비성 작물에 대한 천연 및 합성 휴믹산의 효과 검증

- ① 토양환경 및 시비량에 따라 생산량의 차이를 보이는 다비성 작물에 대한 천연 및 인공 합성 리그닌 전구체 중합 물질의 생산량 증대 효과를 검증하며, 이를 통한 목적 작물 선정 및 시용량 규정을 통해 실제 작물에 대한 이용효과를 검증함으로써, 산업화 및 기술이전에 대한 자료 제시
- ㉔ 옥수수, 고추 등의 다비성 작물에 대한 휴믹산 시용 효과 검증
- ㉕ 휴믹산 처리에 의한 토양 환경 물리화학적 특성 변화 검증

2. 국내외 기술개발 현황

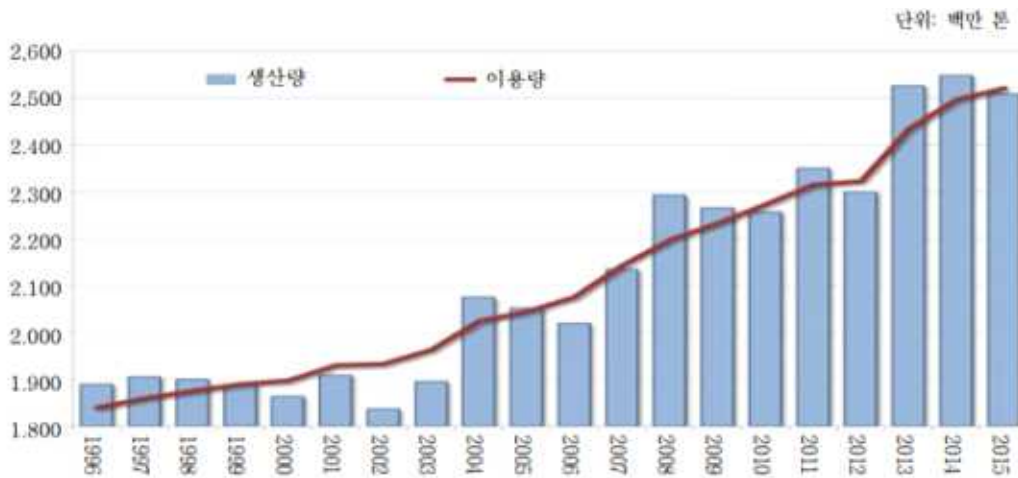
D-04

가. 세계 곡물 생산량

- (1) 2015년 세계 곡물 생산량은 약 24억 2,400만 톤으로 전망하고 있음. 이는 2014 생산 대비 약 1%(2,560만 톤) 감소한 것임. 밀 재배면적은 2014년에 비해 약 1% 증가할 것으로 전망됨.
 - (가) 하지만, 엘리뇨에 의한 가뭄, 미국 중서부 지역 강우에 따른 수확 지연 등으로 밀 전체 생산량은 전년 대비 2% 감소한 7억 700만 톤으로 추정되고 있음
- (2) 2015년 세계 잡곡 생산량은 전년 대비 2% 감소한 12억 5,000만 톤으로 추정되고 있음. 잡곡 생산량의 감소의 대부분은 옥수수 생산량 감소로부터 기인함
 - (가) 2015년 세계 옥수수 생산량은 전년 대비 1% 감소한 1억 3,800만 톤으로 전망되고 있으며, 이는 미국의 재배면적 및 단위당 수확량 감소에 따른 것임
 - (나) 보리 생산량은 전년 대비 1% 감소한 1억 3,800만 톤으로 전망되고 있으며, 이는 유럽연합(EU)과 흑해 지역의 보리 생산량 감소에 따른 것임

- (3) 2015년 세계 유지류 생산량은 전년 대비 약 2% 감소한 5억 2,200만 톤으로 전망되고 있음
- (4) 2015년도 세계 곡물 소비량은 약 24억 8,100만 톤으로 예상되며, 1인당 평균 소비량은 153.3kg으로 전년 대비 소폭 증가할 것으로 전망되고 있음
 - (가) 식용 밀 소비량은 4억 8,800만 톤으로 2014년 대비 1.3% 증가할 것으로 전망되고 있으며, 1인당 평균 밀 소비량은 67.6kg으로 2014년과 비슷한 수준을 유지할 것으로 보임
 - (나) 식용 쌀 소비량은 4억 1,600만 톤으로 2014년 대비 1.5% 증가할 것으로 전망되고 있으며, 1인당 평균 소비량은 57.6kg으로 2014년 대비 약 0.3kg 증가할 것으로 예상됨

<세계 곡물 생산량 및 이용량>



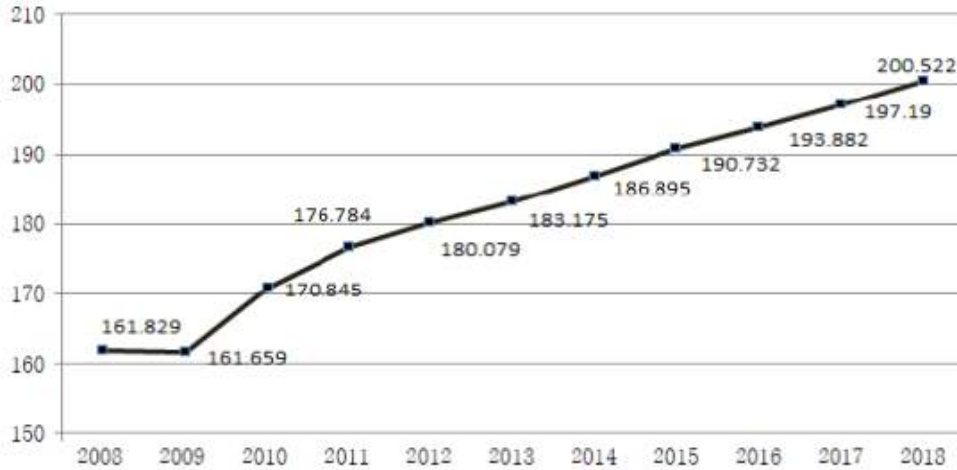
(자료: World fertilizer trends and outlook to 2018)

나. 세계 비료 수요전망

- (1) 전 세계 비료 소비량은 2013년 1억 8,320만 톤에서 2014년 1억 8,690만 톤으로 약 370만 톤 증가한 것으로 추정됨
 - (가) 이러한 추세로 매년 1.8%씩 비료 소비가 증가한다고 가정할 경우, 2018년에는 총 2억 50만 톤의 비료가 전 세계에서 소비될 것으로 전망됨

<세계 비료 소비 동향>

(단위: 백만 톤)



(자료: World fertilizer trends and outlook to 2018)

- (2) 2014년 세계 질소(N), 인산(P₂O₅)과 칼리질(K₂O) 비료에 대한 수요는 2013년에 비해 약 1.5%, 2.4%, 3.3% 증가한 것으로 추정됨
- (3) 2014년부터 2018년까지 질소, 인산 그리고 칼리질 비료에 대한 세계 수요는 각각 1.4%, 2.2%, 2.6% 증가할 것으로 전망되고 있음

<세계 비료 성분별(N+P₂O₅+K₂O) 수요 전망(2014~2018)>

(단위: 천 톤)

	2014년	2015년	2016년	2017년	2018년
질소 비료	113,147	115,100	116,514	117,953	119,418
인산 비료	42,706	43,803	44,740	45,718	46,648
칼리질 비료	31,042	31,829	32,628	33,519	34,456
전체	186,895	190,732	193,882	197,190	200,522

(자료: World fertilizer trends and outlook to 2018)

- (4) 전 세계 질소 비료 수요는 2013년 1억 1,140만 톤에서 2014년 1억 1,310만 톤으로 약 1.5%의 성장률을 기록하였으며, 2018년까지 연평균 약 1.4%의 성장률을 보일 것으로

전망되어 총 1억 1,940만 톤의 질소 비료가 수요될 것으로 예상됨

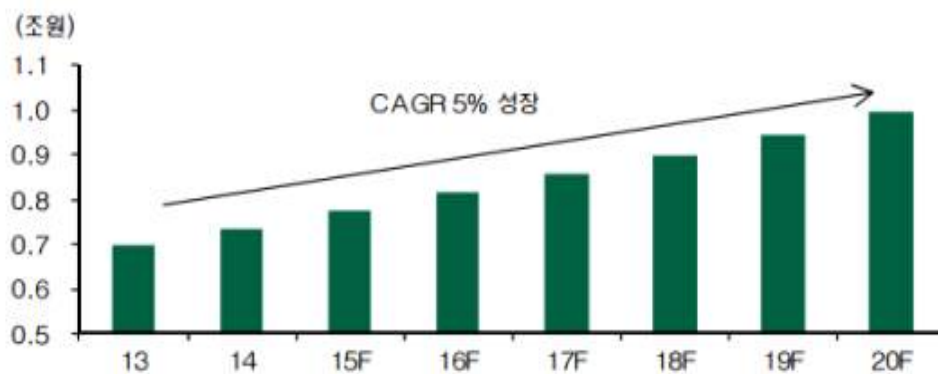
- (5) 인산 비료 수요량은 2013년 4,170만 톤에서 2014년 4,270만 톤으로 약 2.4% 증가한 것으로 추정되며, 2018년까지 약 2.2%의 성장률을 보이며 4,660만 톤이 수요될 것으로 예상됨
- (6) 칼리질 비료는 2013년 3,006만 톤에서 2014년 3,104만 톤으로 약 3.3% 증가하였으며, 2018년까지 약 2.6%의 성장률로 총 3,450만 톤의 수요될 것으로 예상됨

다. 친환경 비료 시장현황

(1) 국내 친환경 비료시장

- (가) 한국농촌경제연구원에 따르면 친환경농산물 시장규모는 2015년 1.3조원을 저점으로 반등하여 2020년에 2.5조원, 2025년에는 3배 이상 성장한 4.0조원 규모에 이를 것으로 전망됨
- (나) 친환경 농산물 시장의 구조적 성장이 전망됨에 따라 친환경농산물 생산의 필수품인 유기질비료와 퇴비의 수요 또한 확대될 것으로 전망됨
- (다) 2013년 이후 친환경농산물 인증의 신뢰성 문제로 인증이 강화되면서 친환경농산물 인증면적은 연평균 16.1%씩 감소하였고 이는 유기질비료 사용 감소로 이어졌지만, 2017년 6월 시행될 정부의 '제4차 친환경농업 육성 5개년 계획'은 친환경농산물 인증면적을 증가추세로 전환시킬 것으로 예상됨

<국내 친환경 비료시장(유기질+부산물) 규모 전망>



(자료: 한국유기질비료산업협동조합, 현대증권, 2015)

- (라) 기후의 변동성이 심해지고 지역에 관계없이 특정 농산물 재배를 위해 시설(하우스)농업이 확대되고 있음. 국내 시설 농산물 재배면적은 전체 재배면적의 약 20~25%로 의미 있는 비중을 차지하고 있음

(마) 시설농업에 바이오제품이 필수인 이유

- ① 시설 내 재배는 보통 한가지의 작물로 제한되어 있어 해당 농산물에 적응한 병충이 외부보다 빨리 생김
- ② 차단한 공간에서 재배되므로 외부보다 병충이 많음
- ③ 발효로 인해 가스가 발생해 온도가 높아지는 유기질비료 대신 부산물비료 또는 인공 토양이 주로 사용되어, 영양원이 한정되어 있음
- ④ 시설 내 적합한 환경과 농산물 품질 유지를 위해 바이오제품 수요가 증가할 것임

(바) 웰빙트렌드 확산으로 도시 시민들이 아파트 옥상, 텃밭, 집안 또는 마당에서 자체적으로 농산물을 재배하고 있음

- ① 서울시는 최근 안전한 먹거리 확보, 공동체 회복 등을 위해 생활 속 농업을 활성화하는 ‘시농업 2.0 마스터플랜’을 발표했다
- ② 2018년까지 도심텃밭 1,800개소를 조성하고, 상자(주머니) 텃밭 13만 세트를 시민들에게 제공할 계획임
- ③ 총 텃밭 규모는 약 420헥타르(130만평)로 평당 5만원 정도의 비용(인공토양 1만원+영양제(액비) 1.5만원+미생물제제 2.5만원)을 가정하면 650억 수준의 시장규모임

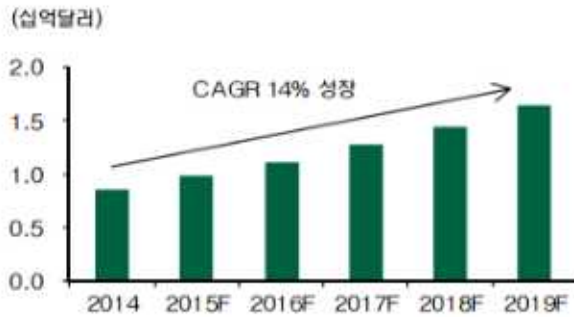
(사) 도시는 지방보다 농산물 재배에 있어 기후, 환경 등이 열악함. 또 직업이 목적이 아닌 환경 조성, 취미, 개인 섭취를 위한 소규모 농산물 재배가 대부분이기 때문에, 알맞은 영양소 공급과 거부감 없는 환경(비료에서 생기는 악취와 병충이 없는)이 필수임

(2) 전 세계 인공비료, 토양처리 시장현황

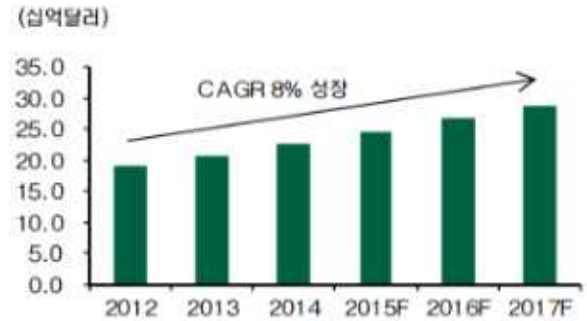
(가) 농업 바이오제품에 대한 수요는 전 세계적으로 증가하고 있음. 전 세계 인공비료 시장은 약 9억 달러로 2019년까지 CAGR 14% 성장할 것으로 보임

- ① 추가로 고품질 농산물 재배를 위해 토양의 질을 높이는 토양처리(soil treatment) 시장도 함께 성장하고 있음
- ② 토양처리 시장규모는 약 226억 달러로 2017년까지 CAGR 8% 성장할 것임

<전 세계 인공비료 시장 전망>



<전 세계 토양처리 시장 전망>



(자료: Markets and Markets, 현대증권, 2015)

(3) 주요 원자재 수출입 현황

(가) 국내에서 시판되고 있는 휴믹산 관련 제품의 경우, 이탄 및 토탄을 주원료로 사용하고 있음

① 이탄의 경우 2017년 수입 금액이 15만 2,000달러로 2016년 대비 205%가 증가하였으며, 수입량 또한 2016년 21톤 대비 2017년 142톤으로 560% 증가하였음

<이탄 수출입 현황>

(단위: US\$, g, %)

년월	수출				수입			
	금액	증감률	증량	증감률	금액	증감률	증량	증감률
2017년	0	0.0	0	0.0	152,085	205.7	142,272,620	560.4
2016년	0	-100.0	0	-100.0	49,751	-8.3	21,543,900	-2.3
2015년	53	0.0	77,000	0.0	54,269	208.2	22,047,000	502.0
2014년	0	0.0	0	0.0	17,608	-67.8	3,662,000	-69.6
2013년	0	-100.0	0	-100.0	54,667	93.1	12,040,000	82.5
2012년	9,594	0.0	120,500	0.0	28,312	-60.2	6,597,000	-81.4
2011년	0	-100.0	0	-100.0	71,218	44.0	35,450,000	40.0
2010년	2,842	0.0	163,000	0.0	49,451	20.7	25,317,000	201.6

(자료: K-stat(무역통계정보시스템))

라. 중국의 친환경 비료 시장현황

(1) 시장현황

(가) 중국 농업 및 관련(농기계, 농산물가공, 농약 등) 시장 발전

- ① 중국의 농작지는 약 24억 묘(1묘는 667m²)로 세계 최대의 농산물 생산국임
- ② 중국 농업부는 2003~2013년 농산물 가공업 관련 기업 영업 수입이 2억 6,300만 위안에서 약 17만 위안으로 급증했음을 발표함
- ③ ‘2015년 중국 농업기계시장 보고서’에 따르면 중국 정부의 지원 정책, 소득의 향상, 농업기계협동조합을 통한 접근 개선, 왕성한 농업 활동의 확대가 농기계시장의 성장을 뒷받침할 전망이다

(나) 비료 수요 증가 요인

- ① 비료수요는 농업과 밀접한 관계가 있어 식량 수요가 증가되면 함께 증가함. 최근 중국의 식량 생산은 10년 동안 증가 추세에 있어 2013년 식량 생산량은 1조 2,000억 근으로 2012년 동기 대비 2.1% 증가함
- ② 식량 가격은 앞으로도 상승할 것이며 이에 따라 비료의 수요 역시 식량의 가격과 함께 증가할 전망이다
- ③ 언론에 따르면 2013년 중국의 기초 화학비료 생산기업이 1,000여 개소를 넘어서며 최대 농업국의 입지만큼 비료생산량도 세계에서 가장 많은 것으로 나타남
- ④ 최근 가정 내에 화초나 원예작물 수요가 꾸준히 증가해 가정용 비료, 양액 등 소매시장 역시 성장 중임

(2) 중국 비료시장 규모

<중국 화학비료 및 기타비료(HS Code 3105)>

(단위: 천달러, %)

	2012년	2013년	2014년(1~9월)
수입	878,752(43.0)	891,126(1.4)	589,210(-17.6)
수출	3,076,249(-34.7)	2,399,810(-22.0)	2,088,652(31.4)
무역수지	2,197,479	1,508,684	1,499,411

(자료: KITA(한국무역협회))

(가) 비료시장을 구성하는 종목으로 비 농사용이 전체의 58%를 차지하고 있으며 원예용

(과수 외) 32.3%, 가정원예용 7.3%, 녹화용 2.4%가 그 뒤를 따름

(3) 중국 친환경비료 시장현황

(가) 중국 친환경비료 시장은 크게 바이오·유기질비료, 복합미생물비료시장으로 고속성장세를 보임

- ① 미생물 비료는 연 생산량 900만 톤, 생산규모 150억 위안으로 수출 품목과 수량이 매년 꾸준히 증가하는 추세임
- ② 2013년 농약부 등록 미생물비료 제품은 1,816개를 기록하고 종사 기업 수는 850여개임
- ③ 중국 미생물 비료산업은 다른 나라에 비해 미생물균종자원이 풍부하고 미생물비료 제품 종류가 다양하여 응용범위가 광범위한 것이 특징임

친환경 비료	현황 및 특징
유기질 비료	<ul style="list-style-type: none"> - 2012년 중국 유기질 비료 생산업체는 약 500여개로 추정되며 생산규모 2만톤 미만인 기업이 66%를 차지하고 있고, 5만톤 이상인 기업은 4%로 전체 비료시장 중 점유율이 낮음 - 유기질 비료 매출액은 연평균 57% 증가세임(2000년에서 10년간 중국의 유기질 비료 매출액은 3억 위안에서 317억 위안으로 가파른 증가세를 보임)
바이오 비료	<ul style="list-style-type: none"> - 친환경 비료시장 중에서도 바이오 비료 산업은 세계 각국의 바이오 에너지산업이 급성장함에 따라 급격히 상승할 수 있는 발판을 마련함 - 바이오산업은 현재 중국정부가 적극 추진하는 전략적 지원산업에 속해 정책적인 협력과 함께 큰 폭의 성장이 기대됨 - 바이오 유기비료는 가격이 비교적 높아 고부가가치 작물 재배에 적합함
미생물 비료	<ul style="list-style-type: none"> - 미생물 비료는 국가 식량안보, 식품안전과 생태 보호에 크게 기여해 정부의 산업정책에서 중요한 분야로 여겨지고, 이러한 정책적 지원으로 업계와 농민으로부터 크게 주목받음 - 가격이 상대적으로 저렴해 미래 식량 증산을 위한 중요한 비료 종류가 될 것으로 전망됨

마. 베트남 비료산업 동향 및 전망

(1) 비료산업 규모 및 소비

(가) 베트남 비료산업은 성장률 둔화와 과잉설비로 알 수 있듯이 성숙 국면에 있음

(나) 2009년 ~ 2013년 연간성장률이 8.6%에 달했지만, 2014년부터는 약 4%의 성장률을 보이면서 성숙단계로 들어선 것으로 판단됨

(다) 2015년 FPT에 따르면 시장규모는 약 1,100만 톤임

- ① 정확한 통계가 없지만, 추정 비료 소비량은 요소비료(urea) 220만 톤, 용성고토인비(P) 180만 톤, 포타슘(K) 96만 톤, 질소인비료(DAP) 90만 톤, 황산암모니움비료(SA) 90만 톤, 질소, 인, 카리 복합비료(NPK) 400만 톤임

(2) 수출입 동향

(가) 2012 ~ 2016년 연간 비료 수입은 400만 톤 수준을 오감

- ① 2016년 최대 수입 비료는 황산암모니움비료(SA)로 전체 수입의 25.6%에 달했으며, 이어 질소인비료(DAP)가 19.7% 요소비료(urea)가 14.8%를 차지함
- ② 최대 수입 시장은 중국으로 전체 수입의 46.1%를 차지하였고, 그 뒤를 이어 러시아가 11.1% 벨라루스가 6.5%를 차지함

(나) 베트남의 비료 수출은 2012년 이후 지속적으로 감소하여 2016년 수출은 746,000톤에 그침

- ① 질소, 인, 카리 복합비료(NPK), 요소비료(urea), 질소인비료(DAP)가 베트남에서 주로 수출되는 비료임
- ② 캄보디아가 베트남 비료의 최대 수출시장으로 전체의 34.6%를 차지하며, 뒤를 이어 對한국 수출비중은 11.4%, 對말레이시아 11.3%, 그리고 필리핀 수출비중은 10.6%로 나타남

<2012 ~ 2016년 베트남의 비료 무역(단위:톤)>



(자료: 베트남 세관)

(3) 시장 분류 및 주요업체 현황

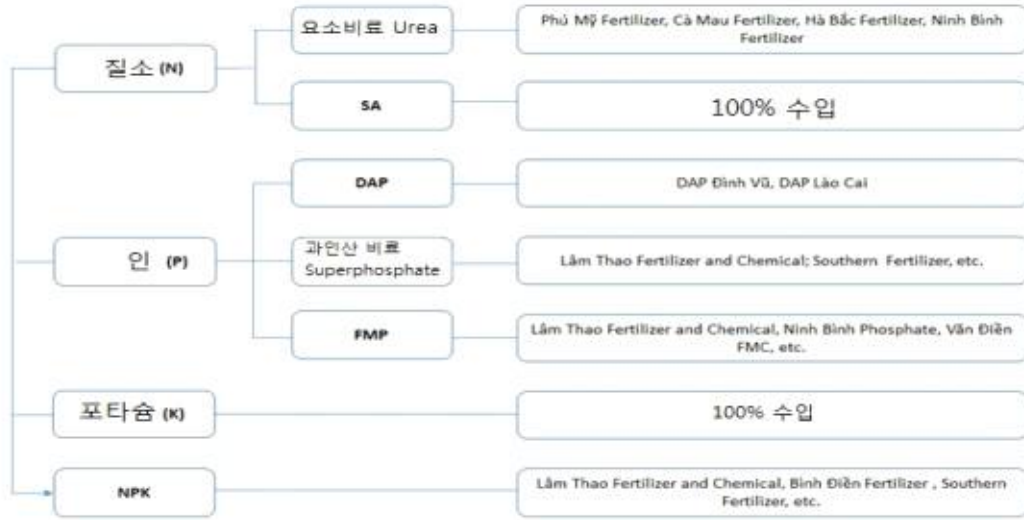
(가) 비료는 크게 유기비료(organic)와 무기질비료(inorganic)로 나뉨

- ① 유기비료는 거름, 낙엽, 퇴비와 같이 식물 혹은 동물성 성분을 기반으로 하여 무기질 비료 혹은 합성비료는 인공적으로 제조됨
 - ② 무기질 비료는 함유된 영양소의 개수에 따라 단일 영양소를 함유한 속효성비료 (straight fertilizer)와 여러 종류의 영양분을 함유한 복합영양비료(Multi-nutrient fertilizer)로 분류됨
- (나) (속효성비료(Straight fertilizers)) 잎의 성장을 돕는 질소(N)와 뿌리·꽃·씨 및 열매의 발달에 기여하는 인(P), 줄기의 성장 및 물의 이동, 개화와 열매 맺기를 촉진하는 포타슘이 주요 성분임
- ① (질소비료) 베트남에서 가장 흔한 질소비료는 요소비료(urea)로 하박(Ha Bac) 비료공장, 닌빈(Ninh Binh) 비료공장, 푸미(Phu My) 비료공장, 까마우(Ca Mau) 비료공장에서 제조됨
 - ② 기타로 100% 수입되는 황산암모니움비료(SA)가 있으며 황산염(S)이 단백질 합성을 포함한 식물의 기본적인 기능을 도움
 - ③ (인삼염 비료) 인삼염 비료의 대부분은 과인산비료(superphosphate), 용성고토인비(FMP:fused-magnesium phosphate), 질소인비료(DAP)임
 - ④ (복합영양비료(Multi-nutrients fertilizers)) 질소, 인, 칼리 복합비료(NPK)가 가장 많이 쓰이며 복합 영양비료가 널리 이용되기 때문에 다수의 생산업체가 활발하게 활동하고 있음

<품목별 주요 생산업체>

종류	주요 생산업체
과인산비료 (superphosphate)	Lam Thao Fertilizers & Chemical社, Southern Fertilizers & Chemical社
용성고토인비(FMP)	Van Dien FMC社, Ninh Binh Phosphate Fertilizer社, Lam Thao社
질소인비료(DAP)	DAP Dinh Vu社와 DAP Lao Cai를 운영하는 DAP Vinachem社가 유일
포타슘 비료	탄산칼륨(potash) 매장량이 없어 포타슘 비료는 전량 수입에만 의존함
복합영양비료	Lam Thao社, Binh Dien社, Southern Fertilizer社

<비료 종류 분류 및 주요 생산업체>



(자료: FPTS)

(4) 원료공급 및 유통 체계

(가) 가스 공급 업체

- ① 비료 원자재는 페트로베트남(PVN)社, 비나코민(TKV)社, 비나켄(Vinachem)社에 의해 제공되는 가스, 석탄, 인회석 등이 있음
- ② 가스는 요소비료(urea)의 원료로써, 요소비료 공장은 10억이 넘는 가스를 소비하고, 이는 전체 가스 생산량의 11%에 해당됨
- ③ Phu My Fertilizer는 Bach Ho 및 Cuu Long 지역에 있는 유전에서, Ca Mau Fertilizer는 'PM3-Ca Mau'에서 원료를 공급받음
- ④ Phu My Fertilizer 가스가격은 글로벌 연료유(Fuel Oil) 가격에 연동되어 있고, Ca Mau Fertilizer의 가스가격은 평균 ROE가 12%인 수준에서 정해짐

<베트남의 주요 유전>



(자료: PV Gas)

(나) 석탄 및 인회석 공급업체

- ① 석탄의 가스화 과정은 요소비료(urea) 생산과정에서 반제품인 암모니아를 생산하는 데 이용됨
 - ㉠ 비나코민(TKV)社は 요소비료(urea) 생산 공장인 Ha Bac社와 Ninh Binh Fertilizer社에 석탄을 공급함
 - ㉡ 베트남 석탄 가격은 시장 가격이 아닌 정부 지시 가격에 기초하며 베트남 국내 석탄의 가격은 국제 가격에 비해 낮게 책정되는 편임
 - ㉢ 용성고토인비(Phosphate) 생산업체들 또한 비나코민(TKV)社の 단골 고객임
- ② 인회석은 주로 용성고토인비(Phosphate) 생산에 사용됨
 - ㉠ 인회석은 주로 Lao Cai 지역에 매장되어 있는데, Vinachem社가 채굴 및 관리를 하고 있고, 풍부한 매장량과 채굴 제한으로 생산 규모는 비교적 안정적인 편임
- ③ 유통
 - ㉠ 비료 유통은 도·소매업자, 지역회사를 통하거나 직접 판매로 이루어짐
 - ㉡ 제품의 유통에는 매우 많은 중간상이 연관되어 있어 제품의 품질과 가격 통제에 어려움을 가중시킴
 - ㉢ 모조(fake)비료는 비료의 화학 성분에 있어 대개 기준을 충족하지 못함

㉔ 비료 가격은 원료가격의 상승 혹은 공급부족으로 인해 크게 변동하는 편임

(5) 비료시장 경쟁분석

(가) 시장별로 상이한 경쟁 구도

① (공급자 교섭력) 석탄, 가스, 인회석 등 1차 공급 원료가 국유기업에 의해 독점생산 되기 때문에 공급자의 교섭력은 강함

㉔ 비료 생산에 필요한 2차 원재료를 생산하는 공급자는 선택의 여지가 더 큼

② (소비자 교섭력) 비료 제품이 매우 다양하기 때문에 농부, 비료 업체 등 다양한 최종 소비자의 영향력이 큰 편임

③ (경쟁자 진입의 위험) 일반적으로 요소비료(urea), 용성고토인비(Phosphate), 질소인비료(DAP) 등은 원재료를 구하기 쉽지 않고, 비료 생산은 큰 규모의 초기 자본과 발전된 기술이 필요하므로 진입장벽이 매우 높음

㉔ 단, 복합비료(NPK)는 원재료가 흔하기 때문에 경쟁자의 시장 진입이 용이함

④ (대체제 위험) 무기질비료는 유기농 및 미생물비료(microbial) 등 다른 비료로 대체가 가능

㉔ 유기농비료는 무기질 비료에 비해 환경 친화적이지만 품질 검증이 쉽지 않고 가격이 비싸며, 미생물비료는 토양에 이롭지만 비료의 효과가 나타나기까지 다소 시간이 걸림

⑤ (종류별 상이한 경쟁 수준) 베트남 현지 요소비료 생산업체는 4개, 질소인비료(DAP) 제조업체는 2개로 경쟁이 치열하지는 않은 편임

㉔ 하지만, 복합비료(NPK) 비료의 경우 생산 공장이 많아 비료 생산업체간 경쟁이 심함

㉔ 일부 비료는 현지생산이 가능함에도 불구하고, 값싼 비료를 수입하여 시장을 왜곡시키고 있음

(6) 비료산업의 성장요인 및 장애요인

(가) 성장요인

① 베트남 비료 산업은 왕성한 농업분야에 의해 주도됨

㉔ 베트남 농업은 2,300만 명이 종사하는 주요 분야로, 삼림과 수경재배지를 제외한 농지는 1,020만 헥타르에 달함

㉔ 베트남 비료 소비는 태국(152.3kg/ha), 필리핀(183.1kg/ha), 인도네시아(211.8kg/ha) 등

동남아시아국가연합(ASEAN)과 비교하여 많은 152.3kg/ha임

- ㉔ 베트남 인구가 약 1억명에 달해 농업 및 비료에 대한 수요가 막대함
- ㉕ 베트남 정부는 첨단기술을 활용하며 자연친화적인 농업을 개발할 계획이며 시장의 규모와 농산물 소비 증대 노력은 베트남의 비료 산업에 유리함

(나) 장애요인

- ① 베트남 비료산업은 과도한 수입으로 인한 공급과잉, 비료 가격 하락, 불리한 세금 정책 등 어려움을 겪고 있음
- ㉔ 베트남에서 생산하는 비료로 용성고토인비(Phosphate), 요소비료, 복합비료(NPK)의 수요를 충족하지만, 수입되는 비료로 과잉공급의 문제에 직면함
- ㉕ 비료 가격은 주로 작물 가격과 관련성이 큰데, 작물 가격은 한동안 하락세를 보여 와서 비료 가격도 하락세를 면치 못함
- ㉖ 최근 메콩 강 삼각주(Mekong Delta) 염수 침입과 같은 자연재해는 비료 소비를 감소 시킴

(7) 향후 전망

(가) 가격 전망

- ① 세계은행(WB)은 2017년 글로벌 비료 가격이 전년 대비 1% 상승할 것으로 전망됨
- ㉔ 요소비료(urea) 가격은 미국 수요와 중국의 공급제약에 맞물려 15% 상승 전망됨
- ㉕ 대부분의 다른 비료 가격은 계속되는 공급과잉으로 인해 감소할 것으로 예상됨
- ② 베트남 비료산업에 있어 가장 큰 장애물은 부가가치세(VAT) 정책과 글로벌 가격보다 높은 베트남 현지의 석탄 가격임

(나) 정책 환경 전망

- ① 베트남 정부는 비료 생산과 유통 촉진에 관한 규정을 제정(Decision No. 6886/QD-BCT, 2010)
- ㉔ 요소비료는 현존하는 시설을 이용해 국내 수요를 충족하는 정책방향이며, 용성고토인비(혹은 과인산 비료, FMP 비료) 공장 건립이나 확장을 장려하고 있지 않음
- ㉕ 복합비료(NPK)는 낙후된 기술과 저품질 비료들을 단계적으로 시장에서 사라지도록 재정비할 계획임
- ㉖ 질소인비료(DAP) 생산시설은 국내 시장수요 충족을 위해 현존 공장을 확장하거나 새로운 공장 건립을 장려

- ㉞ 황산암모니움비료(SA)는 해외투자를 통해 베트남에서 자체적으로 생산할 수 있도록 할 계획
- ② 2015년 1월부터 발효된 베트남 법(Law No. 71/2014/QH13)에 따르면 비료는 부가가치세 납부 면제 품목으로 비료 생산업체들은 부가가치세 환급의 대상이 아님
- ㉞ 비료 생산업체 Lam Thao Fertilizer & Chemical社은 부가가치세로 500억~600억 VND를 납부하였으나 2015년 개정법 발효 후 부가가치세 환급 자체가 안 되어 전체적으로 1,800억 VND를 납부

(다) 수출입 전망

- ① 2017년 비료의 자동 수입 허가가 폐지되면서, 중국으로부터의 막대한 비료 유입이 차단됨
- ② 베트남 비료 회사들은 중국의 수출세 인하 정책에 대항하여 비료에 대한 세이프가드 조치 부과를 베트남 정부에 요청
- ㉞ 2017년 중국은 요소비료(urea)의 수출세를 톤 당 80RMB에서 톤 당 0RMB로 낮추고, 질소인비료(DAP) 수출세를 톤 당 100RMB에서 0RMB로, 복합비료(NPK) 수출세는 30%에서 20%로 인하
- ③ 하지만, 수입기간, 수입으로 인한 해당산업에의 심각한 영향의 존재 여부 측면에서 베트남 정부가 세이프가드 조치를 부과할 가능성은 낮은 편인 것으로 사료됨
- ㉞ 중국으로부터의 비료 수입은 2017년 1/4분기에 급증했기 때문에 수입으로 인해 비료 시장에 영향을 끼친 기간이 충분히 길지 않음
- ㉞ 이미 2016년 10월 베트남공정위(VCA: Vietnam Competition Authority)는 비료 수입이 국내 비료생산업체에게 심각한 영향을 끼치지 않았다고 밝힌 바 있음

바. 보조사료 시장현황

(1) 국내 축산농가에서 사용되고 있는 보조사료 현황

- (가) 연도별 보조사료 생산현황과 제조업체 현황 그리고 현재 축산농가에서 사용되고 있는 보조사료를 분석해보면 생균제, 추출제, 비타민제 순으로 사용되고 있음을 확인할 수 있음
- (나) 건강기능사료로 전환할 수 있는 보조사료는 생균제, 추출제가 가장 유력한 것으로 조사되었음

<사료관리법에 따른 농가의 보조사료 이용 순위>

구분	생균제	추출제	비타민	산미제	효소제	혼합제	향미제	항곰팡이제	아미노산제	올리고당	유화제	항응고제	완충제	착색제	소계
순위	1	2	3	4	4	4	7	8	9	9	11	11	11	11	
비율	20.0	15.7	11.4	10.0	10.0	7.1	4.3	2.9	2.9	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	100.0

(다) 축종별 이용현황

① 한우

- ㉠ 증제와 약취제거의 이유로 생균제를 주로 이용하고 있으며, 고급육 생산에 영향을 주는지는 확실하지 않으나, 약취제거에 탁월하여 이용하고 있음
- ㉡ 송아지는 효과가 업다하여 이용하지 않고 벌크에 첨가하여 급여하고 있음

② 낙농

- ㉠ 버퍼제, 칼슘 공급제, 비타민제, 생균제를 주로 이용하고 그 외에 진포제, 곰팡이 흡착제를 사용하고 있음
- ㉡ 효과에 대해서는 확인할 데이터가 없어 영향을 주는지 확증은 없으나 타 농가에서 사용하고 있으니 이용해야 한다는 심적 안정감을 얻기 위해 이용하고 있으며, 또한 생산비에 보조사료가 차지하는 비율이 높지 않아 부담 없이 이용하고 있음
- ㉢ 사료비: 1만 5천원/두, 보조사료비: 400~500원/두)

③ 산란계

- ㉠ 계란의 품질을 유지하기 위해 이용하고 있으며 엽분, 비타민C, 생균제를 주로 사용하고 있음
- ㉡ 색소첨가제는 기존에 사용하였으나 소비자의 트렌드가 변화하면서 줄어드는 추세임
- ㉢ 단위가격에 비해 첨가제의 비용이 많이 들어 이용에 주의를 하고 있음

(2) 세계 동물약품첨가제 시장규모

(가) 가축질병 치료용 의약품의 종류에 있어 항체 단백질 치료제 시장은 지속적으로 증가하고 있는 추세임

(나) Regulations Trends & Global Forecasts의 보고에 의하면 세계 가축사료첨가제 시장

의 규모는 지속적으로 증가되어 왔으며, 2011~2016년 사이 평균 3.8%의 성장률을 보여 시장규모는 18.7억 달러 정도의 규모로 성장할 것으로 예상함

(다) 사료첨가제로서 항생제, 아미노산, 비타민, 효소 등이 이용되고 있으며, 이들의 시장규모는 지속적인 성장추세를 보이며, 2011~2016년까지 약 1.57~5.92% 정도의 성장양상을 보일 것으로 기대됨

(라) 아시아에서 사료첨가제 시장규모는 전 세계의 약 28.5% 정도의 규모를 유지할 것으로 기대되며, 육류소비량의 증가로 CAGR 4.74% 성장률이 전망됨

(마) 사료첨가제는 유럽시장이 차지하는 비중이 세계에서 가장 높으며 향후 육류에 대한 안정성 및 질적 향상의 요구에 의해 사료첨가제의 수요는 지속적으로 늘 것으로 기대됨

<세계 동물약품첨가제 시장규모>

[품목별]

구분	사료첨가제	구충제	생물학적제제	항병원성약	기타
비율(%)	28.5	25.3	14.6	11.7	20.0
백만 달러(\$)	2.2	5.3	4.7	2.7	3.7

[축종별]

구분	소	돼지	가금	양	반려동물 및 기타
비율(%)	25.1	17.6	11.0	4.5	41.7
백만 달러(\$)	4.7	3.3	2.1	0.8	7.8

(자료: 한구동물약품협회, 2009)

사. 휴믹 관련 기업 정보

(1) ㈜패시픽사이언스

(가) 기업 정보

① 일반현황

기업체명	(주)패시픽사이언스	영문기업명	PacificScience co., ltd.
사업자번호	215-86-85736	법인번호	110111-3464693
대표자명	임복희	종업원수	11명
설립형태	신규설립(개업)	설립일자	2006-05-25
기업형태	일반법인	기업규모	소기업
홈페이지	www.pakorea.kr	이메일	hrlee@pakorea.kr
주소	(27432) 충북 충주시 용탄농공1길 31 (용탄동)		
업종(10차)	(C21102)생물학적 제제 제조업		
주요제품(상품)	의약외품살충제(피에이파이더, 델타스타 등)		

② 주요 재무정보

(단위 : 백만원)

구분	2014년	2015년	2016년
매출액	1,231	1,116	1,255
영업이익	134	67	126
당기순이익	72	4	19

(나) 제품 정보

- ① ‘휴머스팜’의 품질을 제대로 갖추기 위해 중국, 독일, 북미 3곳 중 가장 품질이 뛰어난 북미의 레오나르다이트 층에서 채취한 휴믹산만을 사용함(휴믹산 60% 함유)
- ② 토양개량 효과를 높이기 위해 유용미생물 10여종도 포함되어, 10kg을 써야하는 토양개량제를 휴머스팜 2.5kg만으로 해결이 가능함
- ③ 휴머스팜은 과수 등에서 효과를 먼저 인정받았으며, 특히 동해의 냉해를 회복시키는데 탁월한 효과를 보임. 또한 고양시 농업기술센터에서 친환경 수도작 시범포 사업을 실시하여 벼의 미질향상과 증수에도 효과가 있음을 증명하였음

제 품 명	휴머스팜 액제	휴머스팜 입제
제품 사진		
주성분(원료)의 종류 및 함량(%)	-	이탄 100%, 보증성분-부식산 60%
공시번호	-	품질인증-1-3-001(품질인증-1-1-001)
제품 가격	-	15,000원 / 1kg 30,000원 / 2.5kg 60,000원 / 5kg

(2) ㈜일광BT

(가) 기업 정보

① 일반현황

기업체명	(주)일광비티	영문기업명	ilkwang bt co., ltd.
사업자번호	402-86-00160	법인번호	210111-0088023
대표자명	이태용	종업원수	-
설립형태	신규설립(개업)	설립일자	2013-01-15
기업형태	일반법인	기업규모	소상공인
홈페이지	www.moringa.co.kr	이메일	-
주소	(54357) 전북 김제시 금산면 용산3길 21 (용산리)		
업종(10차)	(C20312)복합비료 및 기타 화학비료 제조업		
주요제품(상품)	복합비료 제조업		

② 주요 재무정보

(단위 : 백만원)

구분	2014년	2015년	2016년
매출액	94	264	398
영업이익	-136	13	-84
당기순이익	-143	4	-65

(나) 제품정보

제 품 명	울프라 휴믹	일광 휴믹산
제품 사진		
주성분(원료)의 종류 및 함량(%)	이탄 100%	부식산 15.4%
공시번호	공시-1-3-248(공시-1-1-110)	공시-1-3-001
제품 가격	50,000원 / 25kg	3,300원 / 1L

① 울트라휴믹 제품정보

제품의 형태	그래놀 입상	원산지	캐나다
제품의 종류	이탄(Humalite)	제품의 용도	토양 개량 및 작물 생육
pH	3.5 ~ 4.0	권장 사용량	100g / 1㎡
유기물 함량	80% 이상	제품 포장	25kg, 톤

② 일광 휴믹산의 기능

- ㉠ 인, 칼슘, 철 등의 부족 증상 해소
- ㉡ 식물 품질 향상 및 수확량 증대
- ㉢ 토양 유용 미생물 생육 촉진 및 토양 구조 개선
- ㉣ 뿌리 발달 촉진과 영양 흡수 촉진

- ㉞ 토양 집적 불용성 염류를 붕입하여 가용성 영양원으로 전환(EC저하)
- ㉟ 가뭄, 추위, 고온 등 스트레스 저항성 증대
- ㊱ 제초제, 살충제 등의 농약 잔류물에 의한 스크레스 유발 요인 불용화
- ㊲ 고도로 부식화된 캐나다산 최고급 유기물로 토양 pH를 안정화

③ 일광 휴믹산의 비료성분 분석 결과(단위: %)

질소 전량	수용성 인산	수용성 칼리	수용성 규산	수용성 칼슘	수용성 고토	수용성 망간	수용성 붕소	수용성 몰리브덴	수용성 철
0.06	0.0025	0.81	0.0028	0.079	0.012	0.012	0.001	0.002	0.00003

(3) 블랙어스 휴믹산

제조사	Black Earth Humic LP	
제품 사진		
주요 인증	농진청 유기농자재 목록 공시 및 미국 OMRI 인증 제품	
제품 형태	액상	액상
제품 가격	16,000원 (100ml)	30,000원 (250ml)

(가) 주요 기능

- ① 대부분의 수중 식물이나 관상어 생육에 최적 조건을 가진 아마존 블랙워터로 전환시킴
- ② 열대어의 산란을 촉진하는 영양원이 풍부한 열대 우림의 우기 때 수질 조건을 조성
- ③ 수족관 내부 자유 양이온을 유효태 영양원으로 만들어 수중 미생물, 관상어 그리고 식물의 성장을 촉진
- ④ 연수화, 영양 염류 제거 및 악취 방지

(나) 제품 설명

- ① 블랙워터는 캐나다 한랭지역에서 생성된 연갈탄에서 분리한 천연의 유기탄소화합물로 수족관을 다양한 생명체가 존재하는 깊은 산속의 계곡수나 호수의 천연 수질로 변화시키는 제품임
- ② 본 제품은 한랭지역의 식물이 함유한 단백질, 탄수화물, 폴리페놀, 탄닌 그리고 리그닌 등이 중합되어 생성된 천연 물질로 타 제품과 달리 순수한 휴믹산과 풀빅산으로 이루어진 제품임
- ③ 블랙워터는 소량만 사용하여도 가장 많은 수중 생명체가 존재하는 아마존 강이나 오리노코 강에서 보는 블랙 워터의 수질을 만족하며 관상어에겐 마치 고향을 되찾는 느낌을 주는 환경을 조성해줌
- ④ 열대 우림 지역을 흐르는 리오네그로 강에 우기가 되어 주변 정글의 퇴적된 휴믹산과 풀빅산이 대량으로 녹아들면 수체 내부에 서식하는 물고기의 산란 기능을 촉진하므로 다양한 종류의 치어들이 대량으로 나타남
- ⑤ 블랙워터는 물고기의 산란을 촉진하는 정글에 퇴적된 부엽토 층과 동일한 천연 물질로 블랙워터 농도를 서서히 높여주면 물고기의 산란을 촉진하는 효과를 가져올 수도 있음
- ⑥ 물의 경도를 높이는 칼슘, 철, 마그네슘 등 양이온 미량원소들과 킬레이트 반응을 통하여 흡수 가능한 영양원으로 변환시켜 연수를 만들어 주고 동시에 이를 수중 미생물, 식물 그리고 물고기 생육에 큰 도움을 줌

(4) 유기농업자재 공시 제품현황

(가) 휴믹스플러스

공시번호	공시-3-3-175	자재종류	토양개량 및 작물생육용
상 표 명	휴믹스플러스	자 재 명	혼합유박
가 격	9,240원 / 20kg	등재일자	2017.06.19
공시기간	2017.06.19. ~ 2020.06.18.	제조회사	(주)삼호유비
주 소	전북 김제시 용지면 금백로 875		
주성분(원료)의 종류 및 함량(%)	아주까리유박 65%, 채종유박 30%, 대두유박 5%		

(나) 네오팜휴믹토



공시번호	공시-2-3-037	자재종류	토양개량 및 작물생육용
상 표 명	네오팜휴믹토	자 재 명	토탄+점토광물
가 격	50,000원 / 15kg	등재일자	2014.02.26
공시기간	2017.02.26. ~ 2020.02.25.	제조회사	(주)네오팜
주 소	강원도 원주시 호저면 굴미실길 55		
주성분(원료)의 종류 및 함량(%)	벤토나이트 15% , 토탄 75%		

(다) 대유휴믹산

공시번호	공시-1-3-288	자재종류	토양개량 및 작물생육용
상 표 명	대유휴믹산	자 재 명	토탄+자연암석분말+제당산업 의 부산물
가 격	20,000원 / 10kg	등재일자	2016.12.23
공시기간	2016.12.23. ~ 2019.12.22.	제조회사	(주)대유
주 소	경북 경산시 압량면 압량길 16		
주성분(원료)의 종류 및 함량(%)	토탄 95% , 납석 4% , 당밀 1%		

(라) 라이브휴믹



공시번호	공시-2-3-365	자재종류	토양개량 및 작물생육용
상 표 명	라이브휴믹	자 재 명	토양미생물제제
가 격	25,000원 / 15kg	등재일자	2016.12.21
공시기간	2016.12.21. ~ 2019.12.20.	제조회사	KG케미칼(주)
주 소	울산광역시 울주군 온산읍 당월로 322		
주성분(원료)의 종류 및 함량(%)	미생물배양액(Bacillus subtilis) 1% , 미강 17% , 아주까리유박 72% , 이탄 10%		

(마) 그린에이스휴믹

공시번호	공시-1-3-267	자재종류	토양개량 및 작물생육용
상 표 명	그린에이스휴믹	자 재 명	이탄
가 격	12,000원 / 20kg	등재일자	2016.09.26.
공시기간	2016.09.27. ~ 2019.09.26.	제조회사	삼화상사(주)
주 소	경기도 시흥시 마산로 162		
주성분(원료)의 종류 및 함량(%)	이탄 100%		

(바) 휴믹스

			
공시번호	공시-3-3-090 (공시-3-1-023)	자재종류	토양개량 및 작물생육용
상 표 명	휴믹스	자 재 명	혼합유박
가 격	8,480원 / 20kg	등재일자	2012.11.30.
공시기간	2015.11.30. ~ 2018.11.29.	제조회사	(주)삼호유비
주 소	전북 김제시 용지면 금백로 875		
주성분(원료)의 종류 및 함량(%)	아주까리유박 70% , 채종유박 25% , 대두박 5%		

(사) 이엠에코휴믹

공시번호	공시-1-3-165	자재종류	토양개량 및 작물생육용
상 표 명	이엠에코휴믹	자 재 명	토탄추출물
가 격	11,000원 / 1kg, 15,000원 / 2.5kg 25,000원 / 5kg	등재일자	2015.10.10.
공시기간	2015.10.10. ~ 2018.10.09.	제조회사	(주)이엠자연
주 소	충북 충주시 용탄농공1길 31		
주성분(원료)의 종류 및 함량(%)	부식산 100%		

(아) 휴믹볼



공시번호	공시-2-3-163 (공시-4-1-114, 08-유기-2-104)	자재종류	토양개량 및 작물생육용
상 표 명	휴믹볼	자 재 명	토탄
가 격	25,000원 / 10kg	등재일자	2008.07.07.
공시기간	2015.09.13. ~ 2018.09.12.	제조회사	(주)부국
주 소	경기도 이천시 백사면 원적로 868번길 181-54		
주성분(원료)의 종류 및 함량(%)	토탄 100%		

(자) 바이오휴믹산

공시번호	공시-1-3-242 (공시-1-2-080)	자재종류	토양개량 및 작물생육용
상 표 명	바이오휴믹산	자 재 명	토탄추출물
가 격	15,000원 / 1L	등재일자	2015.04.27.
공시기간	2015.04.27. ~ 2018.04.26.	제조회사	(주)엔바이오캠
주 소	강원도 홍천군 화촌면 야시대리 742-1		
주성분(원료)의 종류 및 함량(%)	토탄추출물 12.5% , 물 87.5%		

(차) 바이오휴믹



공시번호	공시-2-3-103	자재종류	토양개량 및 작물생육용
상 표 명	바이오휴믹	자 재 명	토탄
가 격	20,000원 / 10kg	등재일자	2014.12.23.
공시기간	2014.12.23. ~ 2017.12.22.	제조회사	바이오크롭스
주 소	강원도 원주시 호저면 굴미실길 55		
주성분(원료)의 종류 및 함량(%)	토탄 100%		

아. 휴믹 시장 조사의 결론

- (1) 현재 휴믹물질의 사용분야는 농업이나 축산 분야에 국한되어 있으며, 일부 공업이나 환경분야에서는 정확한 근거가 없으나 전통적인 방법이나 경험에 의존하여 사용되고 있음
- (2) 휴믹 물질은 토양의 물리적인 성질과 수분 함량에 영향을 미치고, 염기질을 함유함으로써, 토양의 성질을 변화시킴. 따라서 비료의 이용성을 높이는 기능이 있어, **비료에 첨가제로 사용되고 있음**
- (3) 전 세계 비료 소비량은 2013년 1억 8,320만 톤에서 2014년 1억 8,690만 톤으로 약 370만 톤 증가한 것으로 추정됨. 이러한 추세로 매년 1.8%씩 비료 소비가 증가한다고 가정할 경우, **2018년에는 총 2억 50만 톤의 비료가 전 세계에서 소비될 것으로 전망됨**
- (4) 한국농촌경제연구원에 따르면 국내 친환경농산물 시장규모는 2015년 1.3조원을 저점으로 반등하여 2020년에 2.5조원, **2025년에는 3배 이상 성장한 4.0조원 규모에 이를 것으로 전망됨**
- (5) 친환경농산물 시장의 구조적 성장이 전망됨에 따라 **친환경농산물 생산의 필수품인**

유기질비료와 퇴비의 수요 또한 확대될 것으로 전망됨

- (6) 중국의 친환경 비료 시장은 크게 바이오·유기질비료, 복합미생물 비료시장으로 고속 성장세를 보이고 있음
- (7) 베트남의 비료산업은 왕성한 농업분야에 의해 주도되고 있으며, 베트남 인구가 약 1억 명에 달해 농업 및 비료에 대한 수요가 막대함
 - ① 베트남 정부는 첨단기술을 활용하며 자연친화적인 농업을 개발할 계획임
- (8) 국내 축산농가에서 사용되고 있는 보조사료는 생균제, 추출제, 비타민제 순으로 사용되고 있음
- (9) 사료첨가제는 유럽시장이 차지하는 비중이 세계에서 가장 높으며, 향후 육류에 대한 안정성 및 질적 향상의 요구에 의해 사료첨가제의 수요는 지속적으로 늘 것으로 기대됨
- (10) 국내에서 시판되고 있는 휴믹산 관련 제품의 경우, 이탄 및 토탄을 주원료로 사용하고 있음
 - ① 이탄의 경우 2017년 수입 금액이 15만 2,000달러로 2016년 대비 205%가 증가하였으며, 수입량 또한 2106년 21톤 대비 2017년 142톤으로 560% 증가하였음
- (11) 국내에서는 2007년 최초로 친환경유기농자재 목록 공시제를 시작으로 2011년 친환경 유기농자재 공시 및 품질인증제가 시행되었으며, 2012년에 「친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙」이 제정되었으며, ‘유기농업자재’란 용어를 사용하고 있음
 - ① 유기농업자재란 ‘유기농산물을 생산, 제조, 가공 또는 취급하는 과정에서 사용할 수 있는 허용물질을 원료 또는 재료로 하여 만든 제품’임
 - ② 유기농업자재정보시스템에 공시된 제품 중 ‘휴믹’으로 검색되는 제품은 총 12개임
- (12) 국내에서 제조/판매되고 있는 주요 제품은 (주)패시픽사이언스의 ‘휴머스팜 액제’, ‘휴머스팜 입제’, (주)일광BT의 ‘울트라휴믹’, ‘일광휴믹산’등이 있으며, 유기농업자재 공시제품임
- (13) ‘저분자 페놀계 산화 고분자를 통한 식물생장 자극제’기술을 활용하여 휴믹산 관련 제품을 출시할 경우, 국립농산물품질관리원의 유기농업자재 제품 등록이 우선시 되어야 할 것으로 사료됨

3. 연구수행 내용 및 결과

D-05

1) 제1세부 : 리그닌 전구체를 이용한 인공 휴믹산 합성 및 식물생장조절제 개발

가) 다양한 리그닌계 페놀 물질을 이용한 산화 고분자화

(1) 다양한 리그닌계 페놀 물질을 이용한 산화 고분자화 반응

산화 고분자화를 수행하기 위해 산화 촉매에 영향을 받을 수 있는 페놀기를 함유한 물질 선별을 시도하였다. 리그닌 유래 물질을 대상으로 평가하였으며 이는 휴믹산의 전반적인 구조 자체가 리그닌과 유사하기 때문이다. 또한 리그닌 기반의 저분자를 고분자화 할 경우 리그닌 또는 휴믹 유사 구조가 형성될 가능성이 매우 높기 때문이기도 하다. 리그닌 유래 물질이라 함은 리그닌 물질이 물리화학적 공정으로 저분자로 분해되었을 때 나올 수 있거나 그와 거의 구조가 유사하다고 보이는 다양한 페놀 구조를 의미하며 부가적으로 상업적으로 대량 구입이 가능한 물질로 한정하였다. 산화 촉매 반응의 정도는 GPC 등 다양한 고분자 기기분석 장비로 측정할 수 있으나 가장 손쉬운 방법은 coloration 정도를 바탕으로 평가하는 것이다. 저분자 페놀계 물질은 가시광을 흡광하는 chromophore가 거의 없으나 고분자화가 진행될수록 흡광 능력이 증가하는 경향이 있고 이러한 방식을 바탕으로 육안으로 색의 질기를 평가하여 고분자화가 잘 일어나는 단량체를 선별할 수 있었다. 초기 고분자화 스크리닝 대상 물질로는 이제인(daizein), 다이진(daidzin), 글리시테인(glycitein), 글리시틴(glycitin), 제니스테인(genistein), 제니스틴(genistin), 카테킨(catechin), 카테킨 갈레이트(catechin gallate), 에피갈로카테킨(epigallocatechin), 에피카테킨(epicatechin), 에피카테킨 갈레이트(epicatechin gallate), 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate), 크리신(chrysin), 루틴(rutin), 아피게닌(apigenin), 루테올린(luteolin), 캄프페롤(kaempferol), 퀘세틴(quercetin), 미리세틴(myricetin), 나리진(naringin), 나린제닌(naringenin), 택시폴린(taxifolin), 시아니딘(cyanidin), 말비딘(malvidin), 갈산(gallic acid), 프로토카테쿠인산(protocatechuic acid), 바닐릭산(vanillic acid), P-하이드록시벤조산(P-hydroxybenzoic acid), 엘라그산(ellagic acid), 실린산(syringic acid), 젠티신산(gentisic acid), 살리실산(salicylic acid), 페룰산(ferulic acid), 카페인산(caffeic acid), 쿠마르산(coumaric acid), 탄닌산(tannic acid), 시나핀산(sinapic acid), 카테콜(catechol), 피로갈올(pyrogallol) 및 클로로겐산(chlorogenic acid)와 같은 물질들을 테스트 하였으며 색 형성 정도와 Sigma에서 비교한 가격적 요소를 바탕으로 후보 물질들을 선별하였다. 최종적으로 Catechol과 Vanillic acid 물질을 사용하였다. 이는 이러한 물질의 단가가 다른 물질에 비해 현저히 낮으며 또한 산화 촉매와의 반응성이 매우 높기 때문이다.

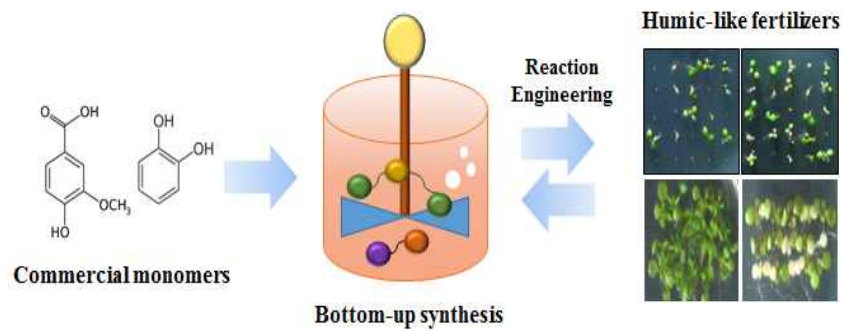


그림 1. 1차년도 연구수행 결과의 Scheme - Catechol과 Vanillic acid를 선택하여 Bottom-up 방식으로 산화 고분자화를 유도하여 인공 휴믹산을 제조함

(2) 고분해능 질량분석기를 이용하여 합성된 고분자 물질의 구조 분석

휴믹산은 구조가 정형화되지 않은 다양한 물질의 혼합물로 정확한 구조 파악이 매우 어렵다고 알려져 있다. 이러한 혼합물을 효과적으로 분석할 수 있는 분석적 방법론으로 고분해능 질량 분석 기술이 매우 효과적이라고 알려져 왔다. 이는 정확한 m/z 값을 바탕으로 유기물에 가장 많이 함유되어 있는 C, H, O, N, S 원소의 비율을 추정하는 방식으로 고분해능 질량 분석을 통해 측정되는 정확한 m/z 값의 분자식을 추론하여 각 원소의 비율들을 구할 수 있다. 일반적으로 다양한 고분자 물질의 구조적 특징에 따라 정형화된 O/C와 H/C 값을 나타내는 것으로 알려져 있어 합성된 고분자 물질이 어떠한 종류의 가령 탄닌, 탄수화물, 지방, 리그닌, 휴믹 등과 비슷한지 비교하기가 유용하다. 따라서 본 연구에서 수행하는 상업화된 휴믹산과 인공적으로 합성한 휴믹산의 구조적 유사성 및 차이점을 비교하는데 유용한 방식이라 할 수 있어 분석을 시도하였다. 15T 고분해능 ESI-FT-ICR 분석기를 이용하여 van Krevelen diagram을 작성하였으며 H/C와 O/C ratio를 추적한 결과 실제 상업화된 휴믹산 또는 문헌상으로 보고된 휴믹산의 ratio와 상당히 유사한 결과를 보이는 것으로 관찰되었다. 이는 본 과제에서 제안한 저분자 물질을 산화 고분자화 시킬 경우 휴믹산 유사 구조가 형성될 수 있다는 가설을 확실히 증명하는 결과이다. 또한 사용한 단량체의 종류를 변경함에 따라 H/C와 O/C ratio의 자세한 값이 달라지는 것을 확인할 수 있었으며 이는 초기 시작 물질의 구조적 차이에 의해 최종 합성된 고분자 구조가 확연히 달라질 수 있음을 시사하는 결과이다. ESI로 이온화하기 위해 다양한 조건들을 사용하였으며 본 연구 결과에서 20% NH_4OH 용액을 이용하여 어느 정도 이온화가 가능함을 확인하였다. 더 많은 수의 m/z 값을 확보하기 위해 다양한 조건을 적용할 필요성이 있다. 이를 통해 좀 더 명확한 van Krevelen diagram 제조가 가능할 것으로 보이며 더 많은 해석이 가능할 것으로 판단된다.

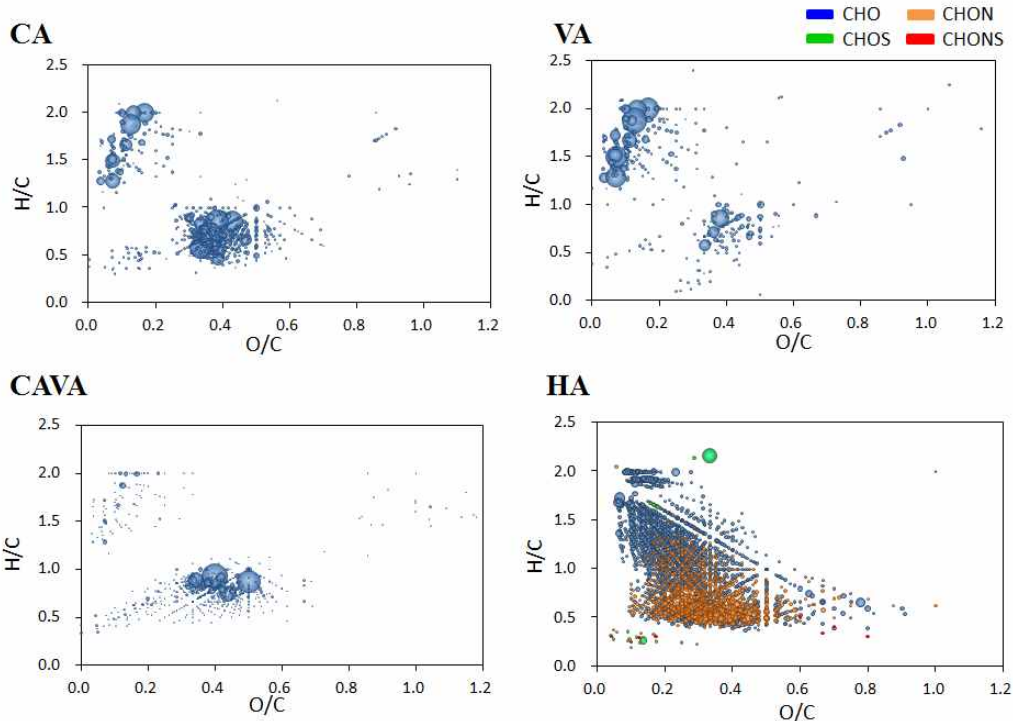


그림 2. 15T 고분해능 ESI-FT-ICR 질량분석을 통해 얻은 상업적 휴믹산 (HA)과 Catechol (CA)과 Vanillic acid (VA)로 제조된 인공 휴믹산의 van Krevelen diagram.

(3) 합성된 고분자성 물질과 상업적 휴믹산의 다양한 물리화학적 특징 비교

- 원소 분석

상업적 휴믹산의 원소 분석 결과 C, H, O가 주요 원소로 판명되었다. 따라서, 고분자 합성 반응 시 사용하는 단량체는 C, H, O로 이루어진 물질을 사용해야 할 것으로 판단되며 상업적 휴믹산에서 소량의 N이 검출되는 것으로 확인되어 이는 향후 고분자를 합성할 때 N 기반의 작용기를 보유한 단량체를 사용해야 함을 시사한다.

Sample [Ⓢ]	C [Ⓢ]	H [Ⓢ]	O [Ⓢ]	N [Ⓢ]	Atomic	Atomic	Atomic
					N/C [Ⓢ]	H/C [Ⓢ]	O/C [Ⓢ]
Commercial humic acids [Ⓢ]	40.97±0.01 [Ⓢ]	3.49±0.02 [Ⓢ]	17.07±0.0 [Ⓢ]	1.19±0.01 [Ⓢ]	0.029 [Ⓢ]	0.085 [Ⓢ]	0.42 [Ⓢ]
Catechol [Ⓢ]	52.35±0.00 [Ⓢ]	3.47±0.01 [Ⓢ]	22.26±0.01 [Ⓢ]	0.20±0.02 [Ⓢ]	0.0038 [Ⓢ]	0.062 [Ⓢ]	0.43 [Ⓢ]
Vanillic acid [Ⓢ]	60.49±0.01 [Ⓢ]	4.34±0.01 [Ⓢ]	18.79±0.01 [Ⓢ]	0.24±0.03 [Ⓢ]	0.0040 [Ⓢ]	0.072 [Ⓢ]	0.31 [Ⓢ]
Catechol/Vanillic acid [Ⓢ]	46.89±0.02 [Ⓢ]	3.75±0.00 [Ⓢ]	19.57±0.04 [Ⓢ]	0.42±0.00 [Ⓢ]	0.0090 [Ⓢ]	0.080 [Ⓢ]	0.42 [Ⓢ]

그림 3. 상업적 휴믹산 (HA)과 Catechol (CA)과 Vanillic acid (VA)로 제조된 인공 휴믹산의 원소 분석 결과.

- SEM 분석

SEM 분석을 통해 상업적 휴믹산과 합성 기반의 인공 휴믹산의 외형적 구조를 관찰하였으며 모두 구형 및 budding되는 구조를 보여 유사성을 띠는 것으로 관찰되었다. 또한 사용하는 단량체의 종류에 따라 구형 구조의 roughness가 확연히 달라지는 것을 확인할 수 있었으며 특히 Vanillic acid만으로 합성한 인공 휴믹산의 경우 거의 구형의 모습을 띠는 것을 관찰하였다. 이러한 외형적 모습이 실제 식물에 미치는 영향에 대해 자세히 평가할 필요가 있으며 이는 식물을 배양하는 매트릭스 내지는 토양의 물리화학적 환경과 결합되어 해석이 될 것으로 기대된다.

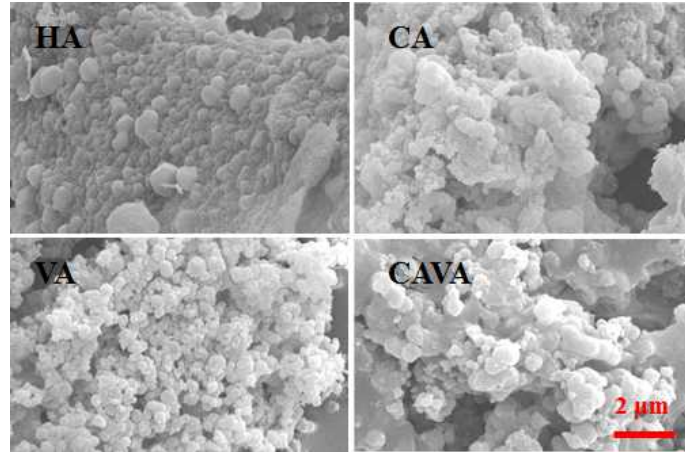


그림 4. 상업적 휴믹산 (HA)과 Catechol (CA)과 Vanillic acid (VA)로 제조된 인공 휴믹산의 SEM 분석 결과.

- EFM 분석

EFM 분석을 통해 합성된 인공 휴믹산의 표면 Charge 분산 정도를 측정하였으며 불균일한 Charge가 관찰되는 것을 확인하였다. 이는 표면에 다양한 dipole 구조가 형성되어 있는 것을 의미하며 상업화된 휴믹산 역시 불균일한 Charge가 관찰되는 것을 보아 비슷한 표면 특성이 재현됨을 알 수 있다.

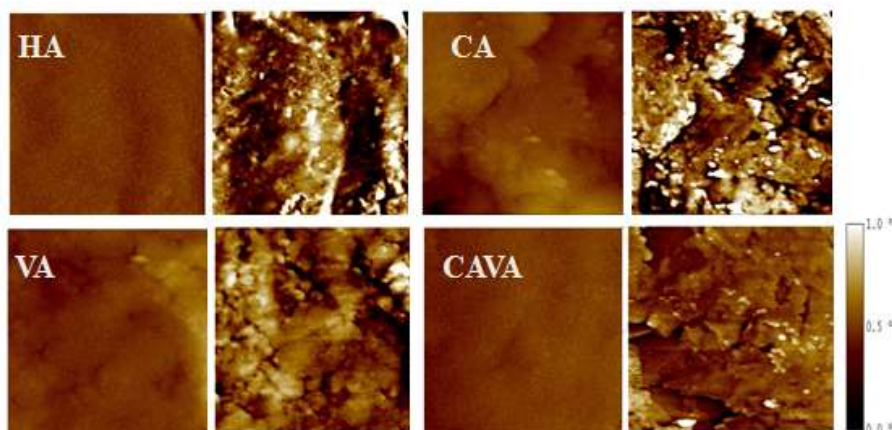


그림 5. 상업적 휴믹산 (HA)과 Catechol (CA)과 Vanillic acid (VA)로 제조된 EFM 결과.

- Zeta-potential 및 BET 기반 표면적 분석

Zeta-potential과 BET 기반의 표면적 넓이를 측정하였다. 상기 EFM 분석을 통해 다량의 dipole 구조가 표면에 함유된 것으로 관찰되었고 Zeta-potential 값이 상업적 휴믹산과 인공 휴믹산 모두 음수 값을 띠는 것으로 보아 음의 dipole을 유도하는 카르복실기 또는 페놀기와 같은 작용기가 다량 분포하는 것으로 추정되었다. BET 기반 표면적은 사용되는 단량체의 종류에 따라 다양한 수치가 측정이 되었으며 상기 SEM 결과와 비교할 때 가장 작은 구형의 모습이 관찰되었던 vanillic acid의 경우 가장 넓은 표면적이 측정되었다. 이러한 결과는 인공 휴믹산이 존재하는 매트릭스의 물리화학적 특징에 따라 달라질 것으로 판단되며 향후 식물 영향성 평가와 함께 수행하여 영향력을 더 확인할 예정이다.

Sample Name [Ⓢ]	BET surface area [Ⓢ] (m ² /g) [Ⓢ]	EFM R _{rms} value [Ⓢ] (deg) [Ⓢ]	Zeta potential [Ⓢ]
Commercial humic acids [Ⓢ]	1.44 [Ⓢ]	0.46 [Ⓢ]	-36.12 [Ⓢ]
Catechol [Ⓢ]	2.78 [Ⓢ]	0.40 [Ⓢ]	-31.71 [Ⓢ]
Vanillic acid [Ⓢ]	19.9 [Ⓢ]	0.20 [Ⓢ]	-29.51 [Ⓢ]
Catechol/Vanillic acid [Ⓢ]	0.674 [Ⓢ]	0.14 [Ⓢ]	-29.98 [Ⓢ]

그림 6. 상업적 휴믹산 (HA)과 Catechol (CA)과 Vanillic acid (VA)로 제조된 인공 휴믹산의 BET 기반의 표면적, EFM 측정의 Roughness값 그리고 Zeta potential 값.

- FT-IR-ATR 분석

FT-IR-ATR 분석을 통해 음의 dipole을 유도하는 작용기가 검출되는지를 확인하였으며 합성 시 사용한 단량체가 보유한 작용기에 따라 peak가 검출되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 고분자 합성 시 특정 작용기를 보유한 단량체를 선별해야 하는 필요성을 시사한다. 상업적 휴믹산의 경우 구체적인 구조적 특징을 알아내기 어려우나 작용기 peak를 통해 추론할 경우 다량의 페놀기를 보유한 것으로 판단되며 또한 원소분석 결과와 함께 특이적으로 amide 그룹에 해당하는 peak가 존재하는 것으로 추론할 수 있었다. 이러한 결과는 N 성분이 함유된 단량체를 사용하면 더욱 더 상업적 휴믹산과 비슷한 식물생장조절 능력을 발휘될 수 있음을 시사하며 2차년도에 단량체 합성 공정에 적용하여 보다 더 심도 있게 평가할 필요가 있어 보인다.

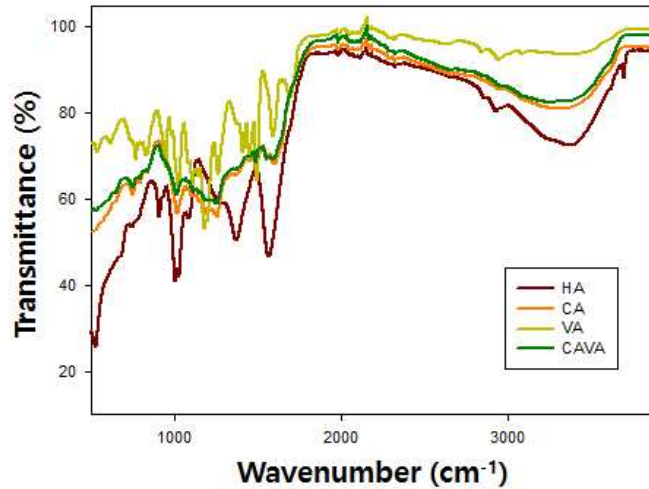


그림 7. 상업적 휴믹산 (HA)과 Catechol (CA)과 Vanillic acid (VA)로 제조된 인공 휴믹산의 FT-IR-ATR spectra.

- Solid-state ^{13}C NMR 분석

상업적 휴믹산과 리그닌계 저분자 페놀 물질을 이용해 합성한 인공 휴믹산을 solid-state ^{13}C NMR을 통해 구조적 분석을 시도하였다. 분석을 통해 지방족 그룹과 방향족 그룹의 양적인 비율을 측정하였고 이를 통해 상업적 휴믹산은 인공 휴믹산에 비해 지방족 그룹이 더 많이 관찰되는 것을 확인하였으며 인공 휴믹산의 경우 사용한 단량체 구조 특징처럼 방향족 그룹이 더 많이 관찰되었다. 식물 영향성 효과를 바탕으로 산화 고분자화 방식으로 합성 시 좀 더 상업적 휴믹산과 유사한 구조를 제조하기 위해서는 지방족 그룹을 함유한 단량체를 추가할 필요성이 있다고 판단된다.

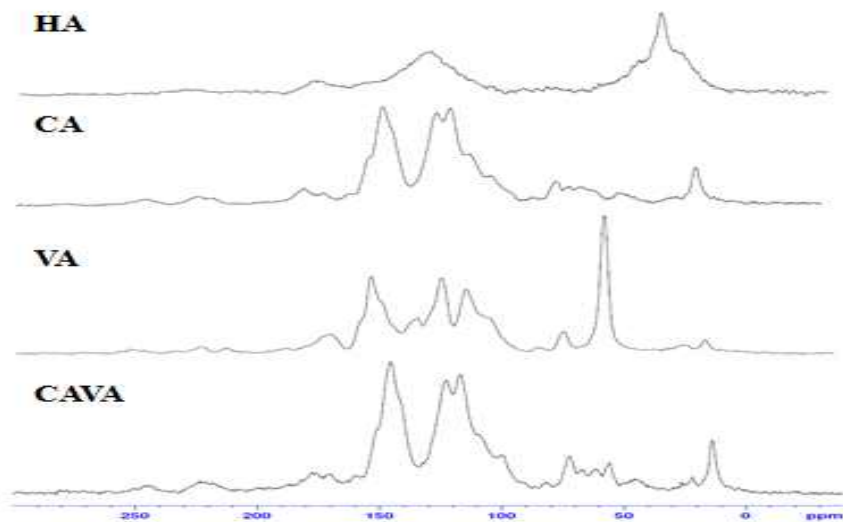


그림 8. 상업적 휴믹산 (HA)과 Catechol (CA)과 Vanillic acid (VA)로 제조된 인공 휴믹산의 solid-state ^{13}C NMR spectra.

Sample Name	Peak intervals (ppm)			
	0 – 40	40 – 90	90 – 163	163 – 200
Commercial humic acids	43.1	11.1	41.5	4.1
Catechol	6.4	6.9	80.1	3.8
Vanillic acid	2.9	22.6	68.2	5.1
Catechol / Vanillic acid	6.5	9.8	76.2	3.5

그림 9. 상업적 휴믹산 (HA)과 Catechol (CA)과 Vanillic acid (VA)로 제조된 인공 휴믹산의 solid-state ¹³C NMR peak 넓이.

-EPR 분석

EPR 분석을 통해 상업적 휴믹산과 합성된 인공 휴믹산의 Semiquinone-type free radicals의 존재를 확인하였으며 peak의 세기와 line width를 비교하였을 경우 NMR 결과와 일치하는 결과임을 확인하였다. 따라서 상업적 휴믹산과 좀 더 비슷한 구조를 산화 고분자화 반응을 통해 제조하기 위해서는 지방족 그룹을 함유한 단량체를 추가할 필요성이 있음을 다시 한번 확인하였다.

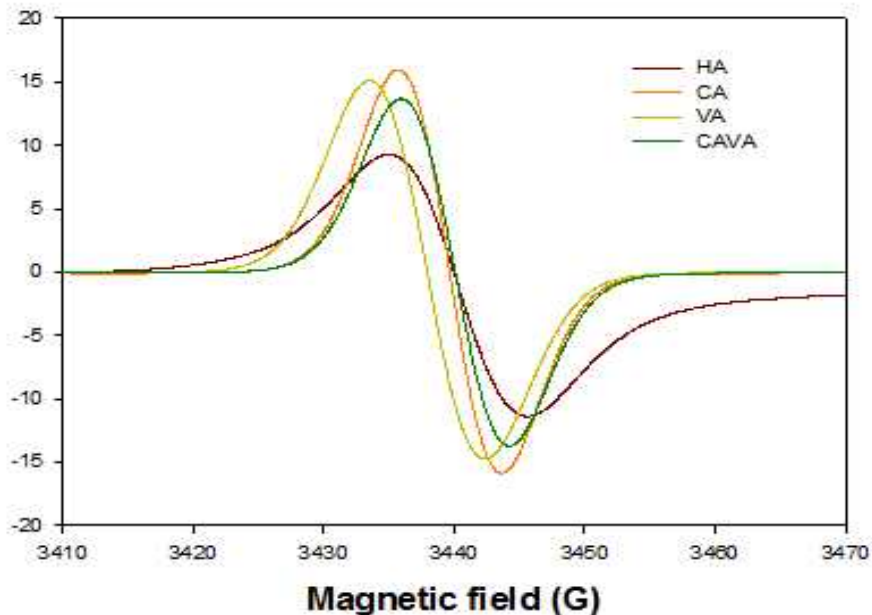


그림 10. 상업적 휴믹산 (HA)과 Catechol (CA)과 Vanillic acid (VA)로 제조된 인공 휴믹산의 EPR spectra.

Sample Name ^{a)}	Line width (G) ^{a)}	g value ^{a)}	Intensity (peak to peak) ^{a)}
Commercial humic acids ^{b)}	81 ^{a)}	2.00327 ^{a)}	21.0 ^{a)}
Catechol ^{b)}	37.5 ^{a)}	2.00325 ^{a)}	31.7 ^{a)}
Vanillic acid ^{b)}	37.2 ^{a)}	2.00402 ^{a)}	30.2 ^{a)}
Catechol/Vanillic acid ^{b)}	34.9 ^{a)}	2.00329 ^{a)}	27.7 ^{a)}

그림 11. 상업적 휴믹산 (HA)과 Catechol (CA)과 Vanillic acid (VA)로 제조된 인공 휴믹산의 EPR spectra에서 나타나는 peak의 width, 세기 그리고 g value 값.

- ABTS 라디칼 제거능 분석

ABTS 라디칼 물질을 이용하여 항산화 정도를 평가하였고 상업적 휴믹산과 인공 휴믹산 모두 항산화 능력이 나타날 수 있음을 확인하였고 이는 Phenol 구조에 기반한 방향족 구조를 모두 보유하고 있어 나타나는 특징으로 판단된다.

- Hydrodynamic size distribution 분석

수용액 상태에서 상업적 휴믹산과 인공 휴믹산의 Hydrodynamic size 분석을 수행하였고 10³nm 이하에서는 비슷한 크기의 사이즈가 관찰되나 그 이상에서는 서로 확연히 다른 형태의 사이즈가 분포함을 확인하였다. 이는 식물이 재배되는 매트릭스에 따라 많은 영향을 받을 것으로 판단되며 향후 사이즈 분포가 식물 영향성에 미치는 영향을 좀 더 심도있게 평가해 볼 필요가 있다. 이러한 연구를 수행하기 위해서는 적절한 사이즈로 인공 휴믹산을 분획하여 식물 영향성을 평가해 볼 예정이다.

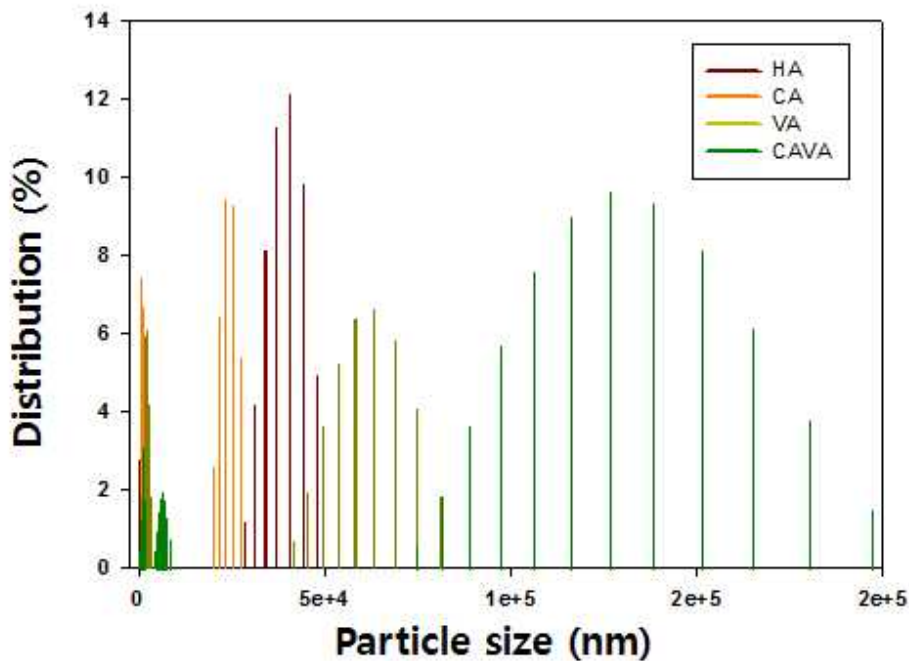


그림 12. 상업적 휴믹산 (HA)과 Catechol (CA)과 Vanillic acid (VA)로 제조된 인공 휴믹산의 hydrodynamic size 분포도.

나) 고분자 반응 조건 스크리닝

(1) 저분자 리그닌 단량체 종류 및 혼합 비율에 따른 식물생장 증진 효과 평가

단량체 종류는 Catechol (CA)과 Vanillic acid (VA) 두 종류를 사용하였으며 각각 단독 또는 혼합으로 산화 고분자화 했을 때의 식물 영향성을 평가하였다. 제2세부 연구내용에서 제시되었듯이 CAVA의 샘플에서 가장 높은 그리고 상업적 휴믹산과 비슷한 효능이 발휘되었다. 이는 방향족 구조 뿐만 아니라 유기 작용기의 종류 역시 식물 영향성에 중요하게 영향을 주는 것으로 추론할 수 있다. 또한 당해 연도에서 1:1의 질량 비율만을 이용해 혼성 중합체를 확보하였으나 비율을 변경할 경우 어떤 종류의 작용기가 더 주되게 식물에 영향을 줄 수 있는지를 확인할 예정이다. 또한 상기에서 언급했듯이 amine 기 또는 지방족 구조를 보유한 단량체를 사용하여 추가 tuning 작업을 수행할 예정이다.

(2) 고분자화 정도에 따른 식물 영향성 비교

당해연도에서 고분자 분자량에 따른 식물 영향성 평가는 수용액에서의 용해도를 바탕으로 평가하였다. 방향족 구조를 보유하고 있기 때문에 분자량이 증가할수록 수용액에 대한 용해도가 현저히 떨어지게 된다. 따라서, 반응 시간을 오래 지속하여 분자량이 높아질 경우 insoluble한 부분으로 따로 분리가 되는데 원심분리 기술을 이용해 침전을 통해 손쉽게 분획할 수 있다. 크로마토그래피 기술을 통해 좀 더 정밀한 분획을 시도하였으나 본 연구에서 제시한 방식으로 얻어지는 고분자 물질은 대다수의 용매에 완전히 용해되지 않아 식물에 처리할 만큼의 충분한 양 확보가 불가능한 것으로 판단하였다. 따라서 간단한 원심분리 과정을 통해 insoluble한 부분을 분리하여 식물 영향성을 평가하였고 용해도 차이에 따라 식물 영향성 정도가 거의 차이가 없는 결과를 얻었다. 내년도 추가 연구에서 분자량에 따른 좀 더 정밀한 분획을 시도하여 추가 결과를 얻을 예정이다. 합성 후에 분획하는 것은 불가능해보이기

때문에 반응 시간별로 산화 반응을 중지시키고 이를 바탕으로 분자량을 좀 더 세밀하게 조절할 예정이다.

다) CAVA 기반 구조 변형체 제조

CA와 VA로 합성되는 휴믹 유사 구조는 단량체 구조의 특징인 방향족과 Phenol/Carboxyl group이 발현되는 것으로 보이나 Sigma에서 구매한 상업 휴믹산의 구조 분석 결과를 봤을 때 차이점으로 그림 13에서처럼 지방족과 N 원소가 부족한 것으로 판단된다. 또한 일부 문헌에서 나프탈렌과 같은 polynuclear aromatic hydrocarbon 구조가 휴믹에서 검출될 수 있음이 보고되었다. 따라서, 본 실험에서는 N기를 도입하면서 CA와 VA와 공중합 할 수 있는 L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)을 이용해 휴믹 유사 구조를 제조하였다. Polynuclear aromatic hydrocarbon 구조를 유도하기 위해 Dihydroxynaphthalene (DHN)을 사용하여 단독으로 산화 중합을 유도하였다. 긴 지방족 기를 도입하기 위해 3-pentadecylphenol (3-PP)을 이용하여 CA와 VA와 공중합을 유도하였다.



그림 13. 상업 휴믹과 유사한 식물 자극 효과를 보이는 CAVA 구조와 Sigma에서 구매한 Humic acid의 차이점

산화 촉매인 Laccase 효소 사용을 통해 고분자화 반응을 유도하였고 사용한 sodium acetate buffer의 desalting을 위해 5 kDa으로 cut-off한 물질을 사용하였다. 합성한 휴믹 유사 물질을 완전 건조하여 전자현미경을 통해 외형적 이미지 변화를 관찰하였다. 자가 조립 현상에 의한 특정 외형적 모양을 측정된 결과 그림 14와 같은 결과를 얻었다. 기존의 문헌에서 휴믹산과 같은 휴믹 계열의 물질이 globular 구조를 보였는데, 마찬가지로 CAVA, L-DOPA, DHN은 globular 구조를 보였다. 특히적으로 L-DOPA의 경우 구형 모양의 사이즈가 좀 더 작고 촘촘함을 확인할 수 있었다. 3-PP의 경우 다른 샘플들과 다르게 구형의 모습은 관찰할 수 없었으며 오히려 판모양 및 판이 쪼개진 모양을 관찰할 수 있었다.

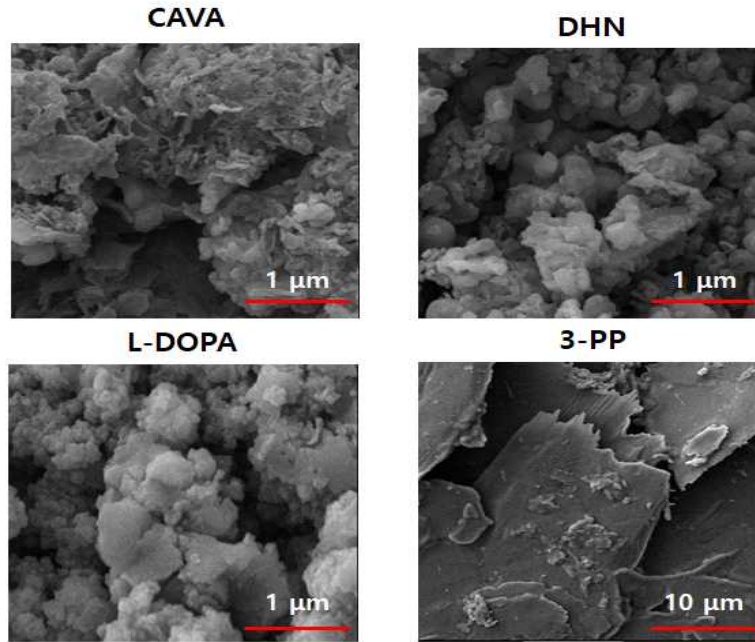


그림 14. N을 함유한 L-DOPA/CAVA, 긴 알킬 체인을 함유한 3-PP/CAVA, 다방향족 구조를 함유한 함유한 DHN 그리고 CAVA의 SEM 구조

N을 함유한 L-dihydroxyphenylalanine를 이용했을 경우 실제 N 함량이 높아지는지 확인하기 위해 원소 분석을 실시하였다. 그림 15와 같이 예상처럼 L-DOPA 샘플에서 2% 이상의 N이 검출되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 문헌상으로 식물 자극에 영향을 주는 것으로 알려진 O 기반의 작용기의 비율을 대략적으로 추정할 수 있는 O/C ratio가 L-DOPA 샘플에서 가장 높은 것으로 확인됐다.

Sample (%)	N	C	H	O
DHN		72.34 ± 0.03	4.89 ± 0.00	20.58 ± 0.01
L-DOPA	2.81 ± 0.07	55.69 ± 0.06	3.67 ± 0.04	29.42 ± 0.25
3-PP		81.77 ± 0.12	11.88 ± 0.02	6.59 ± 0.00
CA		49.60 ± 0.07	4.54 ± 0.02	33.93 ± 0.02

그림 15. 원소 분석을 통한 C/H/O/N 비율

기존에 알려진 CA/VA 조합보다 상업 휴믹 구조를 모사한 변형체가 좀 더 식물 자극을 하는지 확인하기 위해 염 저항 능력 향상 장도를 테스트하였다. 그림 16에서 보는 것처럼 상업 휴믹인 Sigma humic acid (HS)를 이용할 경우 백화 현상이 뚜렷한 Control에 비해 엽록체가 현저히 남아 있음을 확인할 수 있었다. 이전에 한번 증명한 것처럼 CAVA 조합을 처리하였을 경우 염 저항 능력이 향상되는 것을 또 다시 확인할 수 있었으며 DHN이나 L-DOPA

역시 상업 휴믹 (HA) 수준 이상으로 염 저항 능력 향상을 유도하는 것을 확인할 수 있었다. 반면에 3-PP 또는 산화 고분자화를 위한 촉매 (i.e. Lac)만을 단독 처리한 샘플의 경우 큰 변화가 없었다.

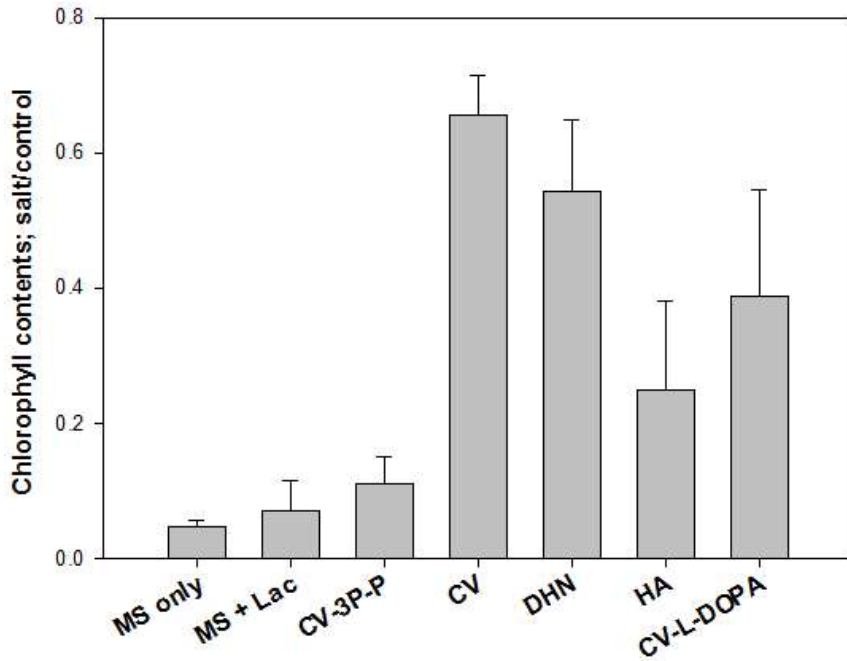


그림 16. CAVA 변형체의 염 저항 능력 평가

합성된 물질의 구성 성분을 추적하기 위해 고분해능 ESI 방식의 FT-ICR 분석을 수행한 결과 그림 17과 같은 결과를 얻었다. 이온화된 숫자는 DOPA에서 가장 많이 검출되었으며 이는 DOPA에서 산소의 비가 가장 높은 결과와 일맥상통한다. 3PP의 경우 가장 낮은 O/C의 비율과 가장 높은 H/C 비율을 보였는데 이는 길이가 긴 지방족기의 존재 때문인 것으로 보인다. DHN의 경우 DBE 값이 가장 높게 나왔는데 이는 나프탈렌 구조의 존재로 인해 Unsaturated 된 C 구조가 많이 발견되기 때문인 것으로 사료된다.

Sample Name	Number of assigned peaks	DBE _{ave}	Average composition		
			O/C	H/C	N/C
CAVA	366	15.42	0.33	0.80	-
3PP	326	7.81	0.18	1.48	-
DHN	247	20.06	0.25	0.79	-
DOPA	1,140	12.55	0.37	0.84	0.08

그림 17. CAVA 변형체의 ESI-FT-ICR 분석 결과

원자 수준에서 H/C와 O/C 비율을 나타내는 van Krevelen diagram을 비교한 결과 아래 그림 18과 같은 diagram을 얻었다. DOPA를 제외한 3가지 toavf에서 주로 H/C는 1.0 ~ 2.0 이며 O/C 비율은 0.2 ~ 0.6 사이를 분포하였다. 이는 이전에 분석한 상업 휴믹과 겹치는 부분이다. 특히적으로 3-PP 샘플의 경우 지방이 나타내는 특징을 보이는데 이는 긴 지방족 체인의 존재 때문인 것으로 보인다. 또한 DOPA의 경우에는 N을 함유한 물질이 O/C 비율이 1.0 까지 확장되는 경향을 보이는데 가장 광범위한 영역의 분포를 나타내는 것으로 확인되었다.

van Krevelen diagrams

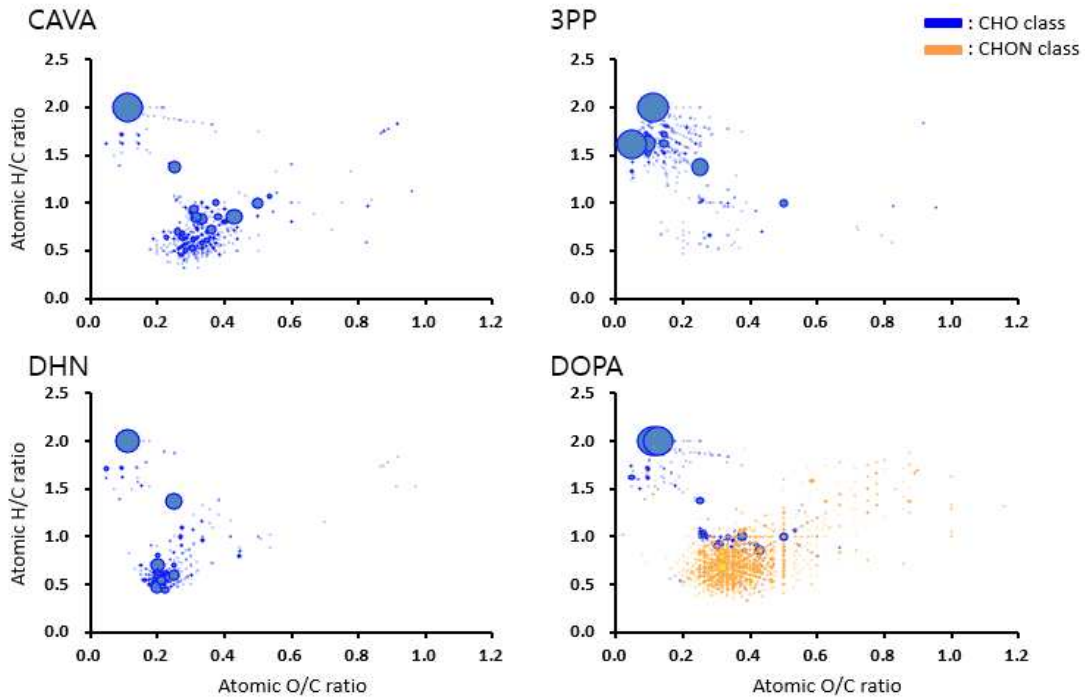


그림 18. CAVA 변형체들의 ESI-FT-ICR 분석 결과

그림 19에서 보이는 것처럼 DBE 분포의 경우 3-PP가 가장 낮고 DHN이 상당히 높은 값을 나타내었다. 이는 3-PP의 saturation된 C, 나프탈렌의 unsaturated된 C의 존재 때문인 것으로 판단된다. DOPA의 경우 N이 함유될 경우 다소 높은 DBE 값을 나타내는 경향이 관찰되었고 이는 N 기반의 이중 결합이 형성된 것으로 추정할 수 있다.

DBE vs Carbon number plots

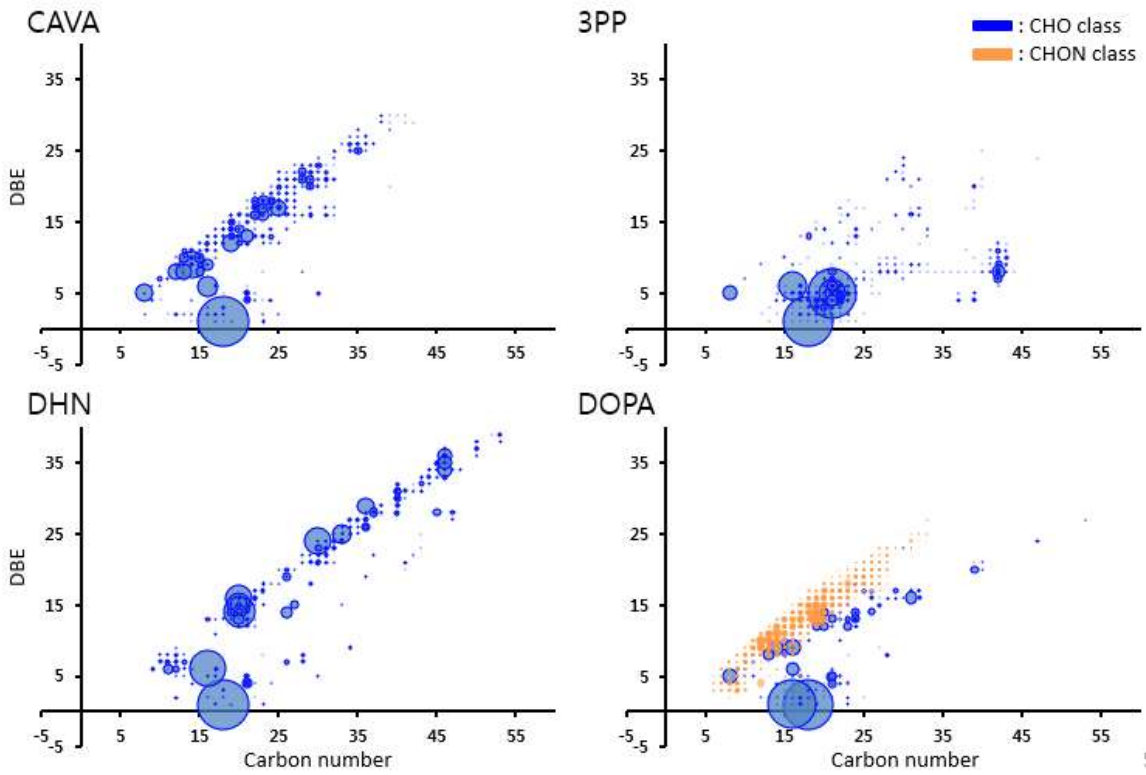


그림 19. ESI-FT-ICR 분석 결과를 바탕으로 DBE 값을 분석한 결과

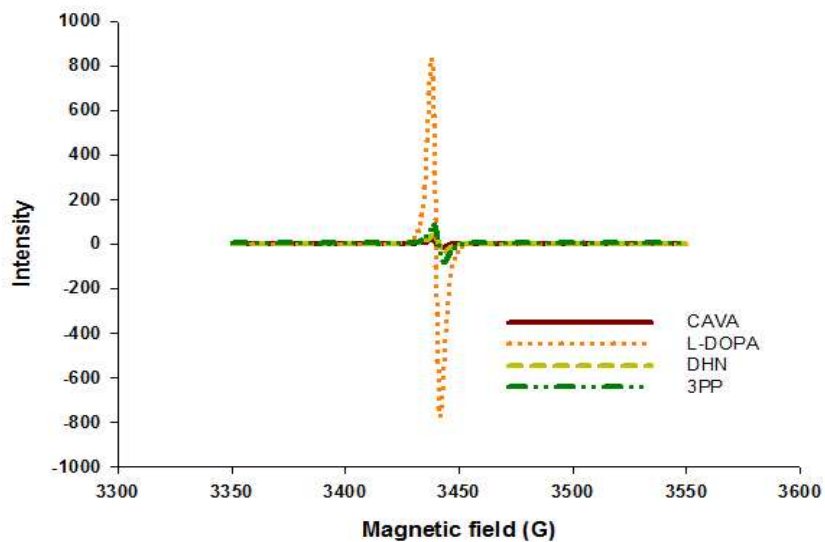


그림 20. CAVA 변형체의 EPR spectra

Radical 양을 측정하는 EPR을 측정한 결과 semi-quinone type의 radical이 L-DOPA에서 월등히 많이 검출됨을 확인할 수 있었다. 이는 Quinone 그룹을 잘 형성할 수 있는 catechol 그

룹이 월등히 많이 보유하고 있기 때문인 것으로 판단된다.

^{13}C solid-state NMR을 분석하였을 때 그림 21과 같은 spectra을 얻을 수 있었다.

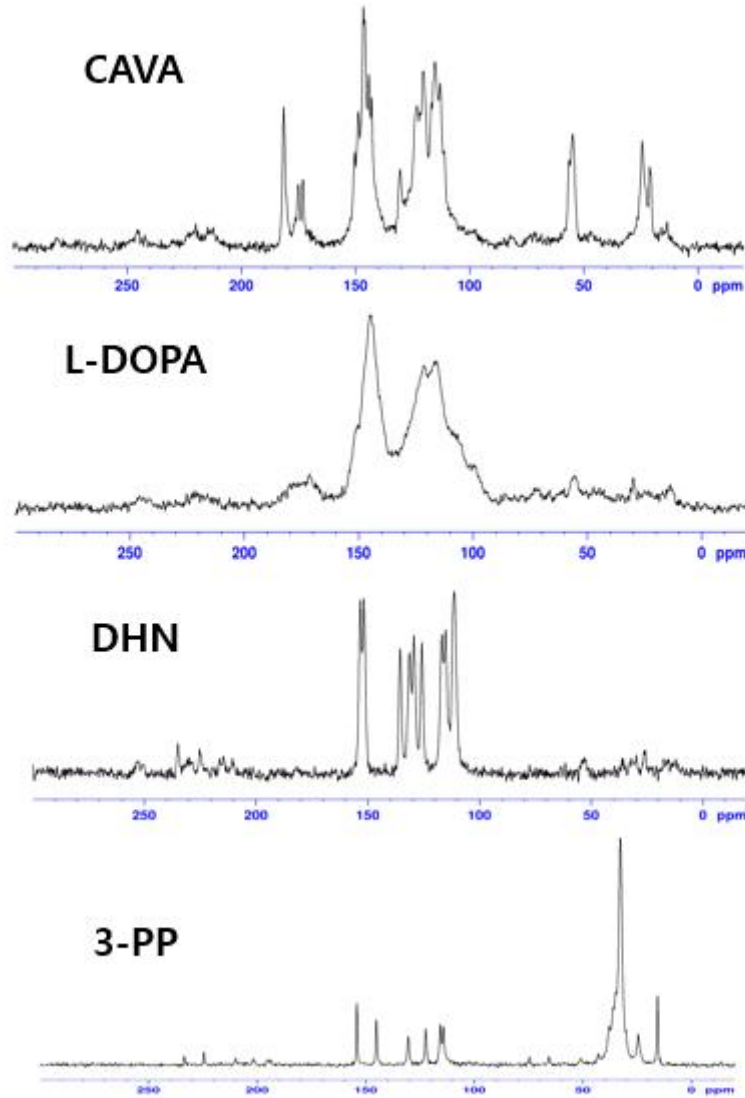


그림 21. CAVA 변형체의 ^{13}C NMR spectra

3-PP 물질에서는 길이가 긴 지방족 체인으로 인해 50 ppm 밑의 신호가 강하게 검출되었고 나프탈렌이 함유된 DHN의 경우 방향족 신호인 100 ppm 이상의 신호가 강하게 검출되었다.

Zeta potential (mV)

CAVA	-13.5
L-DOPA	-13.5
DHN	-12.4
3-PP	-10.8

그림 22. CAVA 변형체의 Zeta potential 값

폐놀기의 존재로 인해 모든 물질에서 음의 값이 검출되는 것을 확인할 수 있었다.

제2세부 : 천연 및 인공 휴믹산을 이용한 식물 생산 증진 효과 기작 규명과 작물 대상 효과 검증

가) 천연 및 인공 합성 휴믹산의 식물 성장 증진 효과 검증

(1) 천연 휴믹산의 식물 발아 및 성장 촉진 기능

- 천연 및 1차 인공 합성(CAVA) 휴믹산 처리에 의한 애기장대 종자 발아 증진

연구계획서에 언급하였듯이 현재 시장에 유통되는 휴믹산은 추출 소스에 따라 식물 반응이 균일하지 않은 단점이 있다. 따라서 이에 대한 기술적 solution을 제시하기 위해 본 연구진은 폐놀계 물질을 이용한 인공 합성 휴믹산 제조를 본 과제의 핵심 목표로 선정하였으며, 제1세부 연구진에서 합성한 인공 휴믹산을 제2세부 연구진에서 식물 영향성 평가 및 식물 성장 조절 기작을 규명하였다. 현재까지 학계에 보고된 휴믹산의 식물 bioactivity 기능 외에, 새로운 식물 성장 조절 기능을 확인하고자, Sigma aldrich에서 판매하는 천연 휴믹산을 전체 유전자 서열이 완성된 모델 식물인 애기장대에 사용하여 각 bioactivity를 검증하였다. 휴믹산 처리 이외 식물의 모든 외부환경을 균일하게 조성하기 위해 식물 영양 배지를 토양원으로 사용해 천연 휴믹산 처리 농도별로 성장 증진 효과를 빛과 습도 조건이 조절되는 식물 성장 조절실내에서 검증하였다. 그림 1에 나타나듯이, 천연 휴믹산 처리 농도 증가에 따라 애기장대 종자의 발아율이 촉진함을 관찰하였다. 발아는 식물의 전 발달 기간중 가장 초기 생육 단계로 이 시기의 생육 증진은 토양에 초기 정착을 좋게 할 뿐만 아니라, 영양성장단계로의 진입을 원활하게 하는 주요한 생리 단계이다. 실제 쌍떡잎(cotyledon)의 출현 또한 무처리구에 비해 빠른 것을 볼 수 있으며, 이는 최근 도시농업의 확산을 통한 유묘 판매가 증가하고 있는데, 휴믹산 처리를 통해 초기 작물 성장 및 정착에 발아율 증진이 도움이 되리라 사료된다.

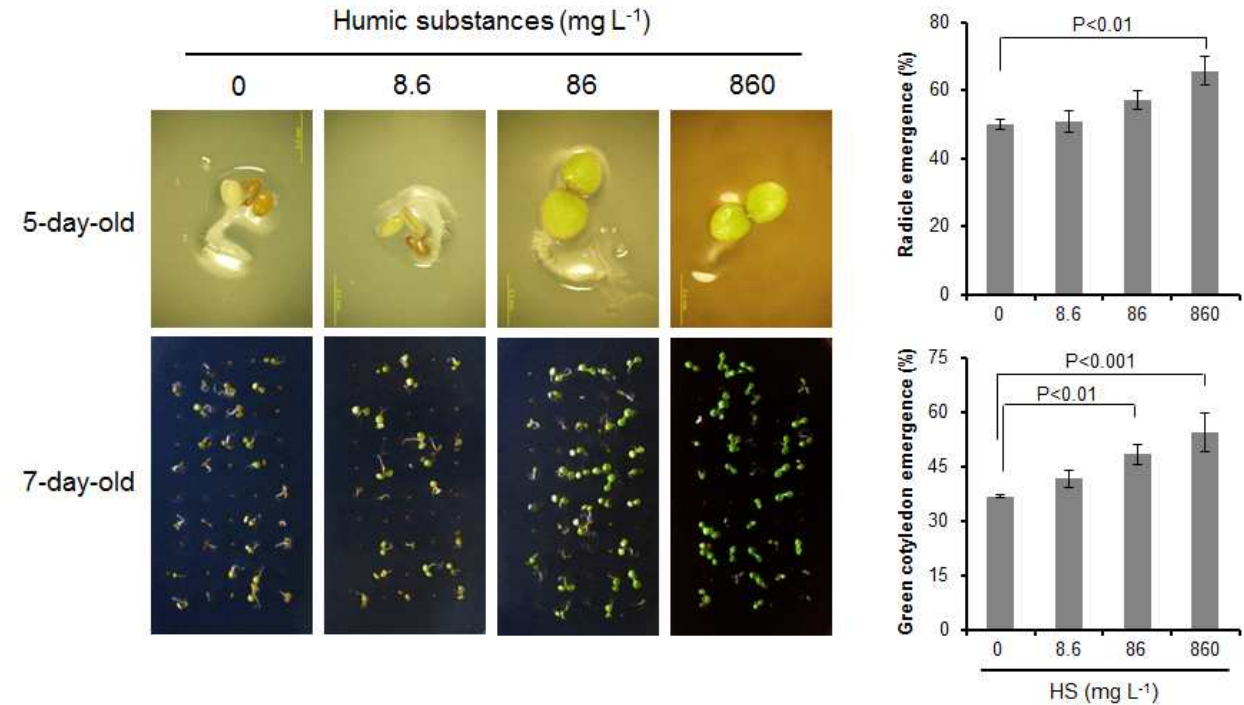


그림 1. 천연 휴믹산에 의한 애기장대 발아 및 성장 증진 효과.

A, 천연 휴믹산 처리별 애기장대 성장 표현형 비교. B, 휴믹산 처리 농도별 유근(radicle) 성장 비교. C, 휴믹산 처리 농도별 유묘(cotyledon) 출현을 비교.

또한 천연 휴믹산 처리 농도 증가와 함께, 식물의 생장은 촉진 되는 것을 관찰할 수 있으며, 생체중 또한 증가하였다. 이와 함께 휴믹산 처리에 의해 잎색이 짙어짐을 육안으로 관찰하였으며, 이를 식물 잎내 엽록소 측정을 통해 검증한 결과, 휴믹산 처리에 의해 엽록소 함량이 증가됨을 확인하였다. 본 결과는 휴믹산 처리가 식물체의 광합성 효율을 증진시키는 것으로 보이며, 그로 인해 식물의 생산성 역시 증가함을 알 수 있다(그림 2). 본 결과는 휴믹산 처리에 따라 식물의 광합성 효율이 증가하며, 이를 통해 직접적인 작물 생산량 증가로 이어질 수 있음을 보여준다. 이상의 두 연구결과는 현재까지 보고된 바 없는 새로운 휴믹산의 식물 성장 조절 효과로 이후 인공 합성 휴믹산의 식물 bioactivity를 검증하는 지표로 이용하였다.

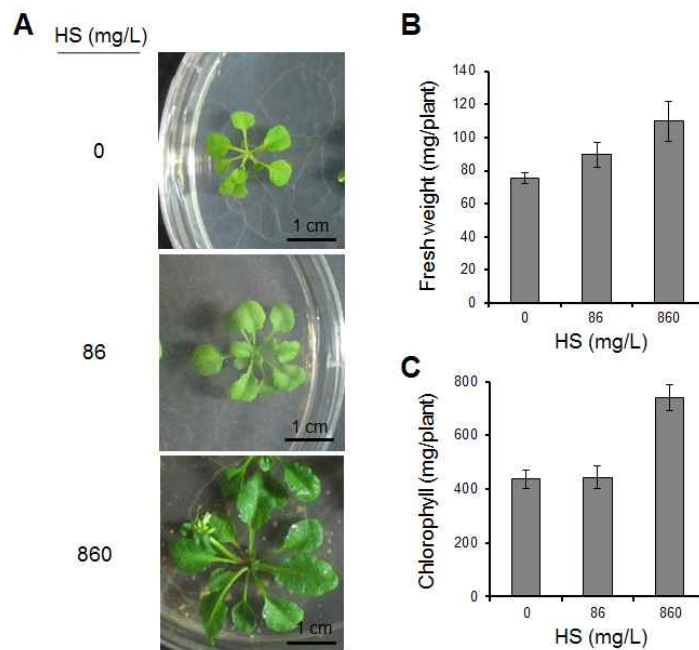


그림 2. 천연 휴믹산 처리에 대한 식물 성장 촉진 기능.

A, 천연 휴믹산 처리 농도별 식물 성장 증진 효과 비교. B, 생체중. C, 엽록소 함량.

(2) 인공 합성 휴믹산(CAVA와 L-DOPA)의 식물 발아 및 성장 촉진 기능

이상에서 확인한 천연 휴믹산의 식물 성장 조절 효과를 제1 세부 연구진에서 fungal laccase 처리를 통해 중합한 페놀계 물질들을 이용해 휴믹 유사 활력을 검증하였다. 그림 3에 나타난 바와 같이 모든 페놀계 물질(CA, VA, CAVA) 처리가 종자의 유근 및 유묘 발달 촉진에 도움을 주었다. 하지만, CA와 VA의 경우, 처리 농도 의존적인 증가 패턴을 보이진 않았으나, CAVA의 경우, 86 mg/L 까지 유근 및 유묘의 발달을 촉진 시키는 것을 확인하였다. 이는 인공 합성 페놀계 물질이 휴믹산 처리 농도와 유사한 발아 증진 효과를 보였으며, 제1세부 연구진이 합성한 페놀계 CAVA 물질이 휴믹산을 대체할 수 있는 인공 합성 물질임을 시사한다. 이상의 천연 휴믹산 및 인공 합성 페놀계 물질의 발아 촉진 기작을 식물 생리학적 개념에서 증명하기 위해, 발아 억제 식물 호르몬인 Abscisic acid(ABA) 및 발아 촉진 호르몬인 Gibberellin (GA)의 억제제인 paclobutrazol(PAC) 처리를 통해 천연 및 페놀계 인공 합성 휴믹산에 의한 종자의 휴면 타파 기능을 검증하였다. 그림 4에서 보듯이, ABA와 PAC 처리는 애기장대의 종자 발아를 억제함을 확인할 수 있다. 반면, 천연 휴믹산(HA)은 ABA 처리 대비 2.5배, PAC 처

리 대비 2배의 종자 발아 촉진 효과를 보였다. 또한, 그림 3에서 확인하였던 CAVA의 경우도 HA와 동일 처리 농도에서 비슷한 발아 촉진 효과를 보임을 확인하였다. 본 결과는 천연 휴믹산 및 페놀계 인공 합성 휴믹산이 탁월한 종자의 휴면 타파 기능을 가짐을 알 수 있다.

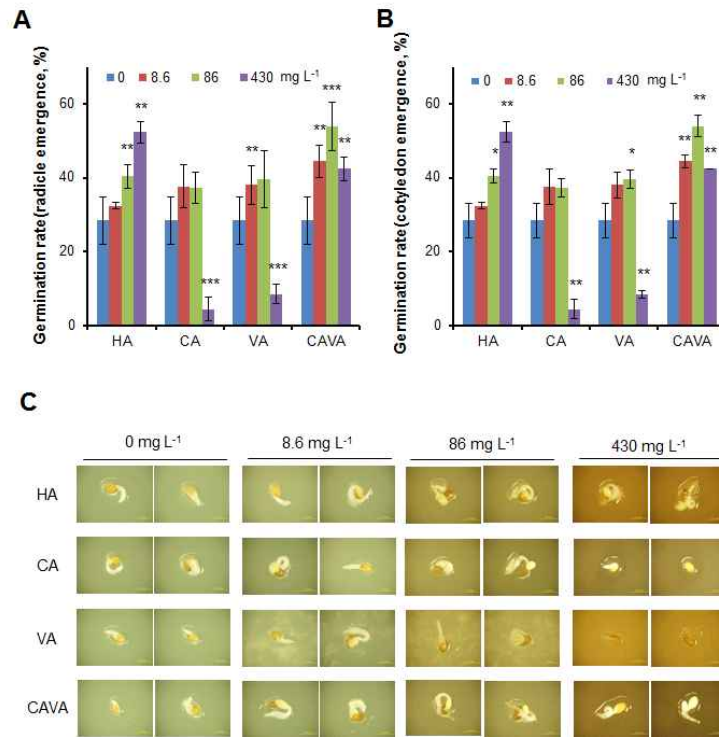


그림 3. 휴믹산 및 페놀계 합성 물질에 의한 애기장대의 발아 촉진 효과.

A, 휴믹산 처리 농도별 유근(radicle) 성장 비교. B, 휴믹산 처리 농도별 유묘(cotyledon) 출현을 비교. C, 천연 휴믹산 처리별 애기장대 성장 표현형 비교.

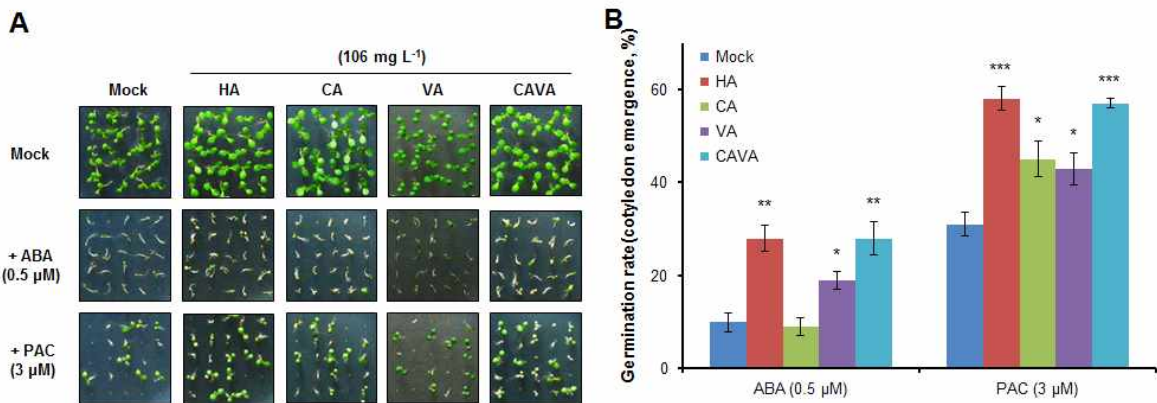


그림 4. ABA 및 PAC 유래 발아억제에 대한 천연 휴믹산 및 페놀계 합성 물질의 휴면 타파 효과 검증.

A, ABA와 PAC 유래 발아 억제에 대한 천연 휴믹산 및 페놀계 인공 합성 휴믹산의 발아 촉진 비교. B, ABA와 PAC 유래 발아 억제에 대한 천연 및 페놀계 인공 합성 휴믹산의 종자 휴면 타파 활력 비교.

이상의 일차 합성된 페놀계 유사 휴믹산 이의 동일한 fungal laccase oxidation을 통해 산화 고분자화를 기반으로 DHN, 3P-P와 L-DOPA를 합성하였다. 이상의 천연 휴믹산 및 CAVA를 통해 검증된 발아율 증진 실험을 수행하였다. 그림 5와 같이, 천연 휴믹산(HA)은 처리 농도 증가에 따라 발아율이 촉진됨을 볼 수 있고, CAVA의 경우 그림 3과 같이 86 mg/L까지 증가하지만 그 이상의 처리 농도에서는 오히려 감소함으로써 본 연구진의 휴믹산 발아 촉진 효과 실험에 대한 신뢰성이 검증되었다. 동일 실험 조건에서 DHN, 3P-P 및 L-DOPA를 배지내 다른 농도 구배하에서 검증해 본 결과, DHN과 3P-P는 무처리구와 비교해 발아증진 효과를 관찰할 수 없었다. 하지만 L-DOPA의 경우 86 mg/L 조건까지 CAVA와 비슷한 발아 촉진 효과를 나타내었다(그림 5). 이와 더불어 실제 생산량 증가에 관여하는지 생체중을 통해 관찰하였다. 그림 6에 나타나듯이, 처리 농도에 따라 HA의 생체중 증가가 관찰되었지만, DHN과 3P-P는 고농도 처리(86 mg/L)에서부터 오히려 감소하였다. 반면 CAVA와 L-DOPA의 경우 86 mg/L 처리농도까지 생체중의 증가가 관찰되었다(그림 6).

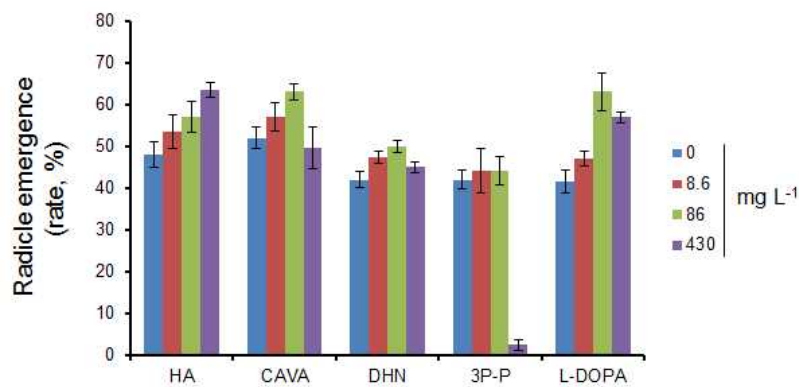


그림 5. 2차 인공 합성 휴믹산의 애기장대 발아 촉진 효과.

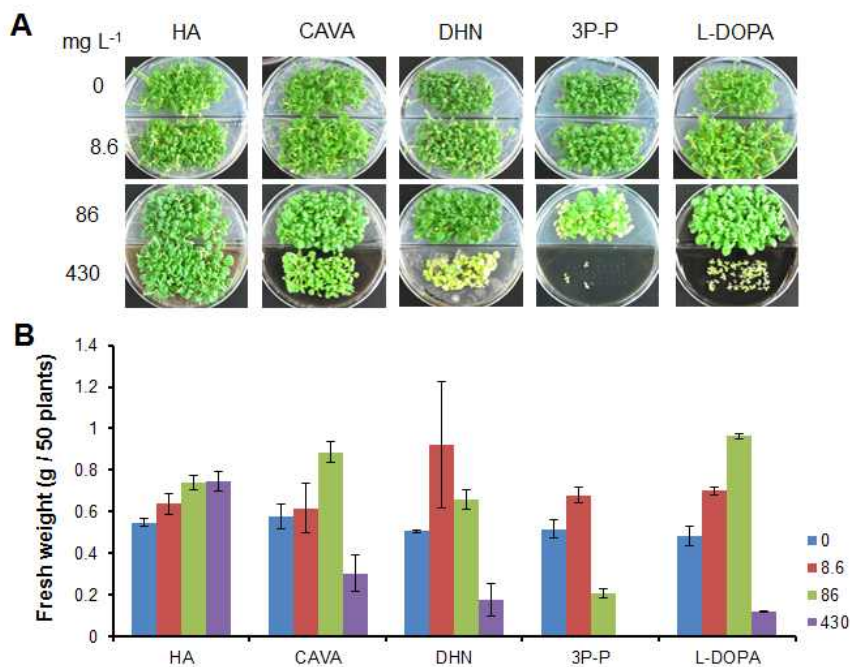


그림 6. 천연 및 인공 합성 휴믹산 처리를 통한 식물 생산량 증진 효과.

A, 천연 및 인공 합성 휴믹산 처리에 따른 생체중 증가 비교. B, 생체중 비교

(3) 천연 및 페놀계 인공 합성 휴믹산의 옥신 유사 기능을 통한 식물체의 뿌리 발달 촉진
 2009년 식물 생리학 분야 저명 국제 학술지인 Plant Physiology 보고에 따르면 지렁이 배설물에서 분리한 휴믹산이 식물 성장 호르몬의 하나인 옥신과 유사한 역할을 통해 식물의 측근(lateral root) 신장에 필요한 유사분열을 촉진하며, 옥신 반응 유전자인 *IAA19*의 발현을 증가시킨다고 보고한 바 있다. 따라서 본 연구진은 식물체내 옥신 함량을 검출할 수 있는 DR5:GUS 유전자가 삽입된 애기장대를 통해 휴믹산 처리를 통한 식물체내 옥신 축적을 관찰하였다. 그림 7A에 나타난 바와 같이, 천연 휴믹산은 뿌리 정단부(root tip)내 DR5:GUS 발현을 증가시켰으며, 페놀계 인공 합성 휴믹산인 CAVA의 경우도 CA 혹은 VA 보다 많은 발현을 보임을 확인하였다. 또한 측근의 길이 또한 대조구(control), CA 혹은 VA 처리구 보다 천연 휴믹산(HA)과 CAVA 처리구에서 옥신(IAA) 처리구와 유사하게 발달하는 것이 관찰되었다. 이상의 관찰을 토대로 페놀계 인공 합성 휴믹산에 의한 측근 발달 효과를 알아보기 위해 각 처리구에서 측근수를 검사하였으며, 그 결과, 그림 7B와 같이 CAVA와 HA는 처리 농도와 함께 측근의 수가 증가함을 역시 확인하였다.

이상의 결과는 fungal laccase 처리에 의한 페놀계 인공 합성 휴믹산 CAVA 물질이 천연 휴믹산과 유사한 식물 발아, 성장 및 뿌리 발달을 촉진시킴을 확인하였으며, 이와 같은 식물 성장 촉진 효능이 있는 인공 휴믹산 생산이 가능하리라 사료된다. 또한 추출 source에 따라 quality control이 되지 않는 기존 시판 휴믹산을 대체할 수 있는 합성 휴믹산으로서의 산업화 또한 양산 규모 확대를 통해 가능하리라 사료된다.

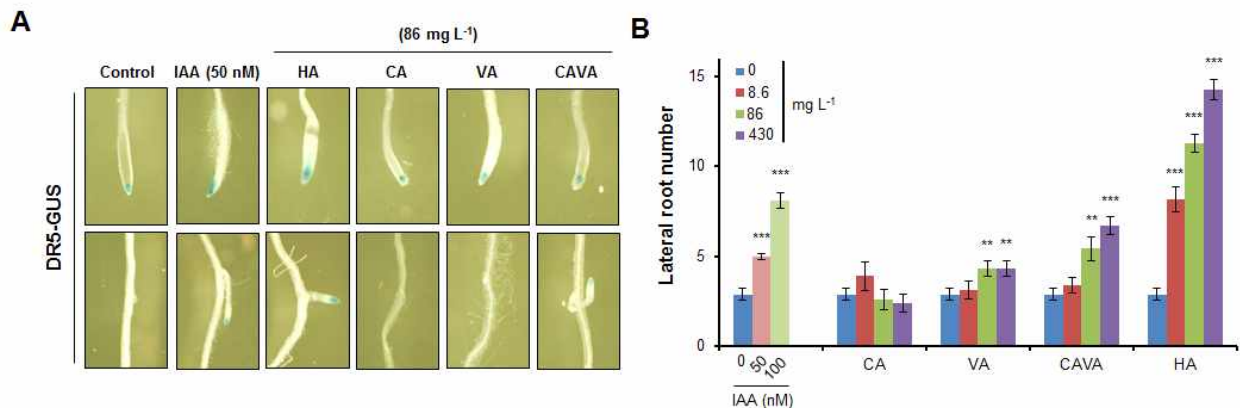


그림 7. 천연 및 페놀계 인공 합성 휴믹산 처리에 의한 뿌리 발달.

A, 천연 및 페놀계 인공 합성 휴믹산 처리에 따른 옥신 축적과 측근 발달. B, 천연 및 인공 합성 휴믹산에 의한 측근 수 증가.

나) 천연 및 합성 휴믹산 처리에 의한 식물 환경스트레스 저항성 기작

(1) 염 스트레스하에서 천연 휴믹산 처리의 효과 규명

- 천연 휴믹산 처리 식물체의 염 스트레스 저항성 획득

작물 생산성은 외부 환경스트레스와 밀접한 연관을 가지며, 최근의 지구온난화는 기존에 각 지역별로 조성된 토종 작물 재배에 변화를 유도하고 있다. 따라서 환경 재해 내성 기능을 작물에 부여할 수 있는 비료제의 개발은 새로운 농업적 대안으로 부각되고 있으며, 기존 재배 작목의 변화 없이 생산성을 유지할 수 있는 큰 농업적 잇점이 있다. 따라서 본 연구진은 농업에 폭넓게 이용되고 있는 휴믹산 처리를 통한 환경스트레스 내성 기작 규명을 통해 환경 변화에 대응할 기술적 대안을 제시하고자 본 연

구를 수행하였다. 먼저 다양한 환경스트레스 중, 식물 배지내에서 동일한 환경스트레스를 줄 수 있는 염 스트레스 저항성을 관찰하였으며, 이는 토양내 염류 집적으로 유발되는 염 스트레스를 그림 8과 같이 배지 환경내에서 천연 휴믹산 첨가를 통해 검증하였다. 그 결과, 휴믹산 처리구의 경우 바닷물의 염 농도에 가까운 250 mM NaCl 처리에 있어서도 식물체의 성장이 무처리구(0 mM NaCl)와 큰 차이를 보이지 않으면서 염 저항성을 나타냄을 확인하였다.

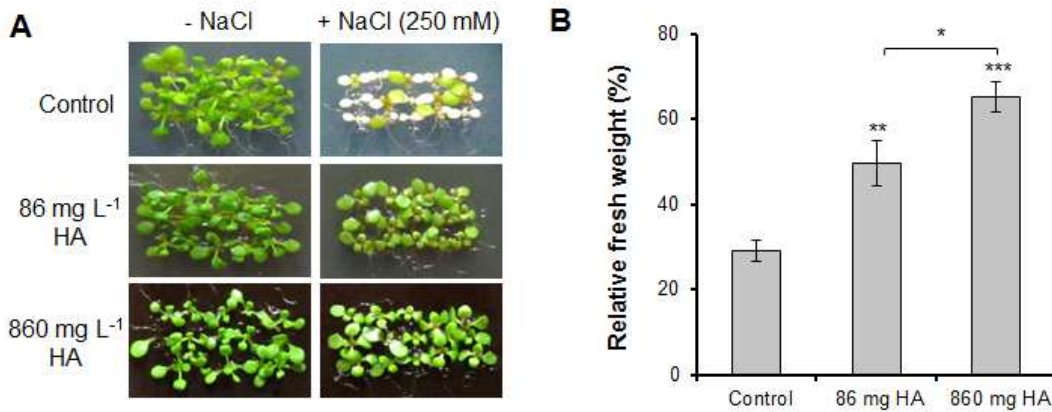


그림 8. 천연 휴믹산 처리에 의한 애기장대의 염 스트레스 저항성.

A, 천연 휴믹산 처리에 의한 염 스트레스 저항성 표현형. B, 염 스트레스(250 mM NaCl)하에서 천연 휴믹산 처리에 의한 애기장대 생체중 증가.

- 염 스트레스하에서 휴믹산 처리를 통한 식물 세포내 Na⁺ 흡수

본 연구진이 그림 7에 나타낸바와 같이 천연 휴믹산은 식물체의 뿌리 발달을 촉진하며, 이전 보고에 따르면, 토양 구조 개선에도 관여한다고 알려져 있기에 그림 8에 제시한 천연 휴믹산 처리에 의한 애기장대 염 스트레스 저항성이 배지내 염이온을 휴믹산이 chelating하는지를 알아보기 위해 식물체내 흡수된 염이온의 축적정도를 ICP-MS를 통해 관찰하였다. 그림 9에 나타난 바와 같이, 배지내 염 처리는 식물체내 염이온의 축적을 야기하지만, 휴믹산과 동시에 처리하였을 때도 식물체내 염 축적이 염 스트레스 처리에 비해 줄어들지 않았다. 즉, 애기장대의 염 스트레스 저항성이 천연 휴믹산의 토양내 염이온의 chelating에 있지 않으며, 식물세포내 특이적인 저항성 기작이 있음을 제시한다. 따라서, 휴믹산의 염 스트레스 저항성 기작을 규명하기 위해, 식물 분자생물학적 기법을 이용하였으며, 염 저항성 기작에 핵심적인 세포내 염 수송 유전자 과발현 및 결핍 식물체를 이용해 휴믹산의 세포내 염 스트레스 조절 기작을 연구하였다.

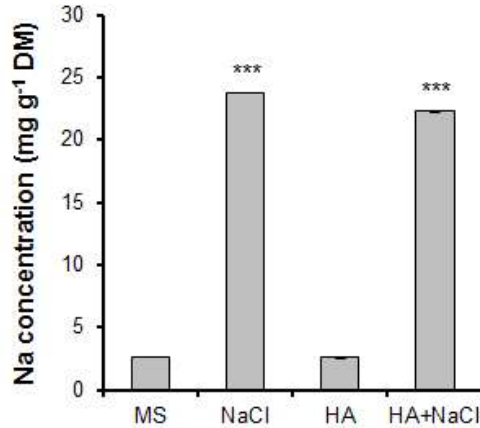


그림 9. 염 스트레스 하에서 휴믹산 처리를 통한 식물체내 Na⁺ 함량 비교.

- 염 수송 유전자 발현 조절 식물체를 이용한 휴믹산-유도 염 스트레스 저항성 기작

식물에 있어 염 스트레스는 세포내 secondary messenger인 Ca²⁺과 ROS의 증가를 초래하며, 세포내 2차 스트레스로 ion toxicity 및 osmotic stress를 유발한다. 이를 경감하기 위해 식물 세포는 다양한 염 수송 단백질을 통해 세포외로 염 배출을 담당하는 SOS1과 뿌리로부터 흡수한 염을 지상부로 수송하는 HKT1등이 대표적인 세포내 염 수송 단백질이다. 본 연구진은 이들 유전자의 과발현 식물체(-OX)와 *sos1-1/hkt1-1* 돌연변이 식물체를 이용해 휴믹산에 의해 획득되는 염 스트레스 저항성 기작을 유전학적으로 연구하였다. 그림 10A에서 보듯이, 염 민감성 식물체인 *sos1-1*과 HKT1-OX 식물체는 100 mM 염 배지하에서 민감한 표현형을 보이는 반면, 휴믹산+염 첨가 배지에선 HKT1-OX 식물체의 경우 모든 식물체가 녹색 잎을 보이며 정상적으로 성장함을 확인하였다. 실제 지상부의 생체중을 통해 염 저항성 표현형을 살펴본 결과, 모든 식물체에서 휴믹산+염 처리가 염 처리구에 비해 최소 1.3배 이상 잘 자라는 것을 관찰할 수 있고, 특히 HKT1-OX의 경우 2.3배 생체중이 증가함을 확인하였다(그림 10B). 식물 뿌리는 토양으로부터 영양분을 흡수하는 기관으로 염 스트레스 하에서 성장 억제로 뿌리가 제대로 자라지 못하며 이전 보고에서 휴믹산은 옥신 유사 효과로 식물 뿌리 발달을 촉진시킨다고 알려져 있으며, 그림 7을 통해 본 연구진도 확인한 바 있다. 따라서 뿌리 길이를 통해 각 염 수송 유전자 발현 조절 식물체들의 휴믹산에 의한 염 스트레스 표현형 변화를 관찰하였다. 지상부와 마찬가지로 염 민감성 식물체인 *sos1-1*과 HKT1-OX는 염 스트레스 하에서 뿌리 발달이 억제되지만, 휴믹산+염 처리구에선 HKT1-OX 식물체의 염 민감성이 회복되는 것이 관찰되었다(그림 11A). 이 표현형을 primary root length를 측정해 검증해 보았으며, 야생형(Col-g1), SOS1-OX, *sos1-1*, *hkt1-1*의 경우 염 스트레스와 휴믹산+염 처리구간 유의적 차이가 없었다. 반면 HKT1-OX의 경우 휴믹산+염 처리구가 염 처리구에 비해 1.5배 뿌리 발달이 증가함을 관찰함으로써, 휴믹산을 통한 염 저항성 기작이 염 수송 단백질 HKT1을 통해 이루어 짐을 확인하였다(그림 11B).

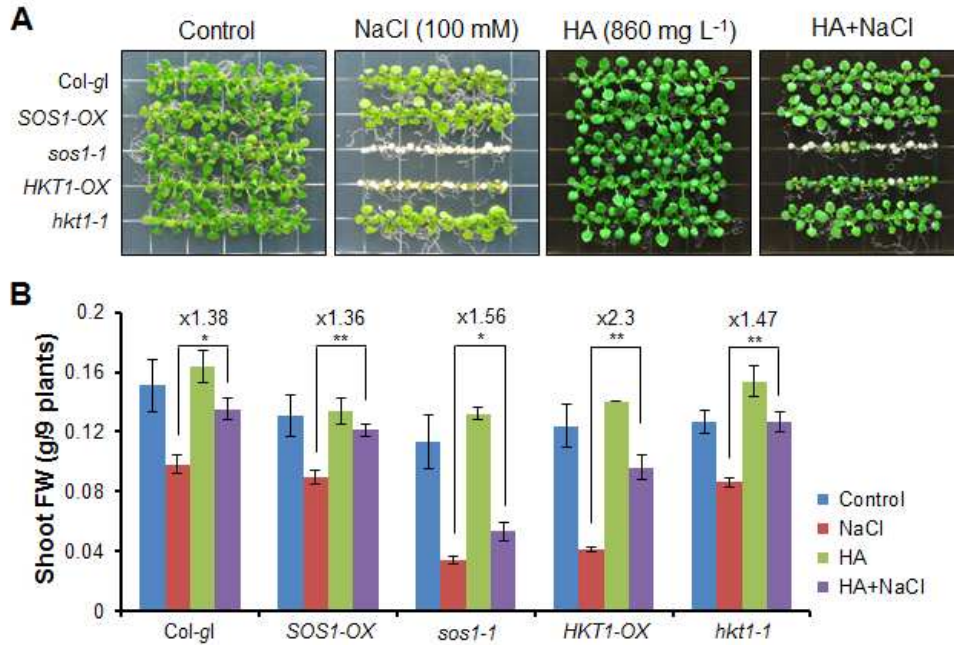


그림 10. 염 수송 유전자 발현 식물체를 이용해 휴믹산 처리에 의한 지상부(shoot) 염 저항성 획득. A, 염, 휴믹산, 휴믹산+염 배지에서 염 수송 유전자 발현 조절 식물체 지상부의 염 스트레스 표현형 비교. B, 지상부 생체중을 통한 휴믹산의 염 저항성.

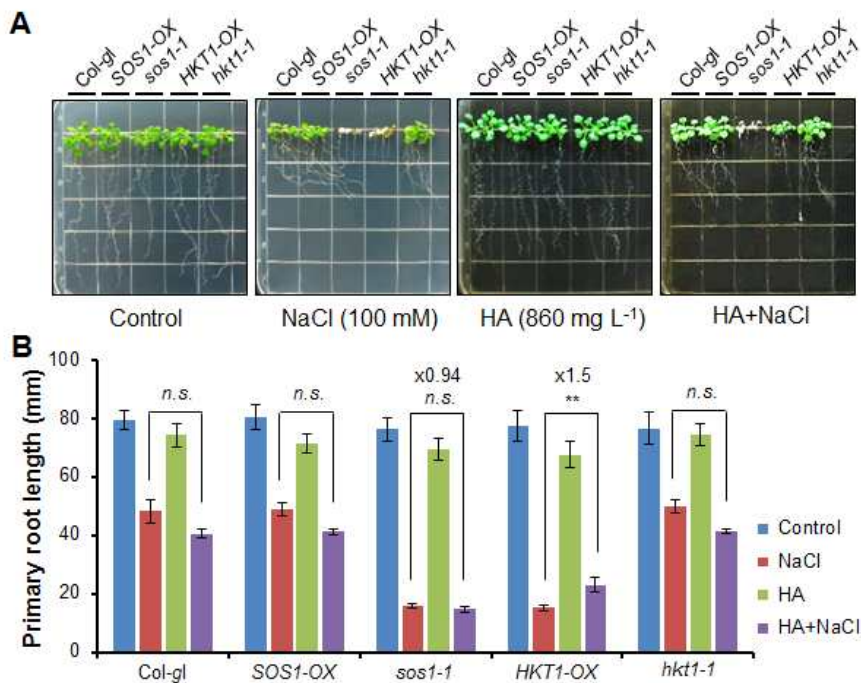


그림 11. 염 수송 유전자 발현 식물체를 이용해 휴믹산 처리에 의한 지하부(root) 염 저항성 획득. A, 염, 휴믹산, 휴믹산+염 배지에서 염 수송 유전자 발현 조절 식물체 지하부의 염 스트레스 표현형 비교. B, Primary root length를 통한 휴믹산의 염 저항성.

- *HKT1* 유전자 발현 조절 식물체(*hkt1-1*과 HKT1-OX) 뿌리 세포내 염 축적도 변화

HKT1 단백질은 염 스트레스에 의해 축적된 염 이온을 세포내로 유입하는 단백질로 주로 물관부(xylem)를 통해 지상부로 이동하는 염 이온을 xylem parenchyma cell로 unloading 시키면서 지상부의 염 스트레스 독성을 감소시킨다. 따라서 형광현미경하에서 염 이온을 검출할 수 있는 녹색의 형광 물질(Corona-green dye)를 이용해 세포내 염 이온의 이동을 확인하였다. *HKT1* 유전자 돌연변이체인 *hkt1-1*과 과발현체인 HKT1-OX 식물체를 염 혹은 휴믹산+염 처리한 후, Corona-green과 세포 구획을 알아보기 위해 propidium iodine으로 염색해 세포내 염 축적의 변화를 그림 12와 같이 관찰하였다. 먼저 뿌리 정단부(root tip zone)의 경우 모든 식물체에 대한 control 처리에서 녹색의 염 축적을 전혀 관찰할 수 없었지만, 염 처리조건에선 뿌리 정단부 전체적으로 고르게 염이 축적됨을 확인하였다. 하지만 휴믹산+염 처리구의 경우 야생형(Col-g1)과 HKT1-OX 식물체의 뿌리 정단부에 염의 축적이 관찰되지 않았고, 뿌리 위쪽으로 형광이 옮겨가 있음을 확인하였다. 이에 그림 12B에서는 뿌리 신장부(root elongation zone)를 관찰하였으며, 염 처리에 의해 cortex와 epidermis에 다량의 염이 축적된 것이 관찰되었고, 야생형과 HKT1-OX 식물체에 대한 휴믹산+염 처리구에서 xylem parenchyma cell내 염 축적이 증가함을 볼 수 있다. 반면 *hkt1-1* 돌연변이체의 경우 이 부분의 염 축적이 관찰되지 않았다. 즉, 물관부를 통해 지상부로 이동하는 염이 HKT1에 의해 물관부 주변 세포로 unloading 되며, 이는 지상부로의 염 이동을 억제해 식물체에 염 저항성을 부여한다는 기존 결과와 동일하며, 휴믹산이 HKT1의 염 유입을 촉진시킬 수 있음을 제시한다.

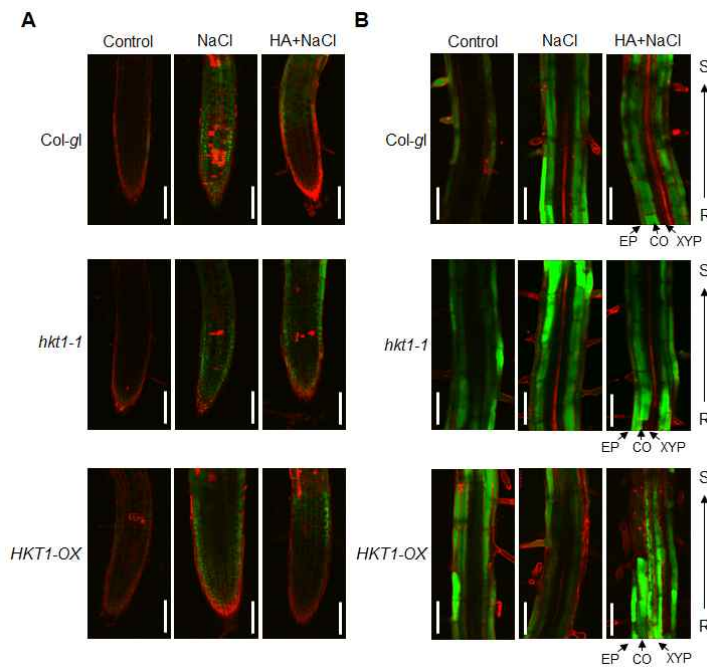


그림 12. HKT1 발현 조절 식물체의 뿌리 세포내 염 축적 변화 관찰.

A, 뿌리 정단부(root tip zone)내 염 축적도 변화. B, 뿌리 신장부(root elongation zone)내 염 축적도 변화. S, shoot; R, root; EP, epidermis; CO, cortex; XYP, xylem parenchyma cell. Bars=50 μm.

- 휴믹산에 의한 *HKT1* 단백질 안정성 획득

휴믹산 처리가 HKT1 단백질을 통한 염 저항성 획득 기능을 식물 생리/생화학적으로 규명하기 위해, HKT1 단백질 안정성 변화를 western blot 분석으로 확인하였다. 식물체내 HKT1 단백질을 검출할 수 있게 GFP가 tagging된 식물체를 이용해 GFP 항체로 확인하였다. 특이하게도 염 스트레스 조건하에서

HKT1 단백질 분해가 이루어 지며, 휴믹산을 처리하였을 때, HKT1 단백질 분해가 이루어지지 않았다. 이는 전체 식물체(whole plant) 뿐만 아니라 지상부(shoot)와 지하부(root) 모두에서 관찰되었으며, 휴믹산에 의한 HKT1 단백질 안정성 획득이 지상부로의 염 수송을 억제하며 물관부 주위 세포(xylem parenchyma cell)로 염을 unloading 시킴으로써 식물체가 염 스트레스에 대한 저항성을 획득하게 도와 줌을 확인 하였다(그림 13).

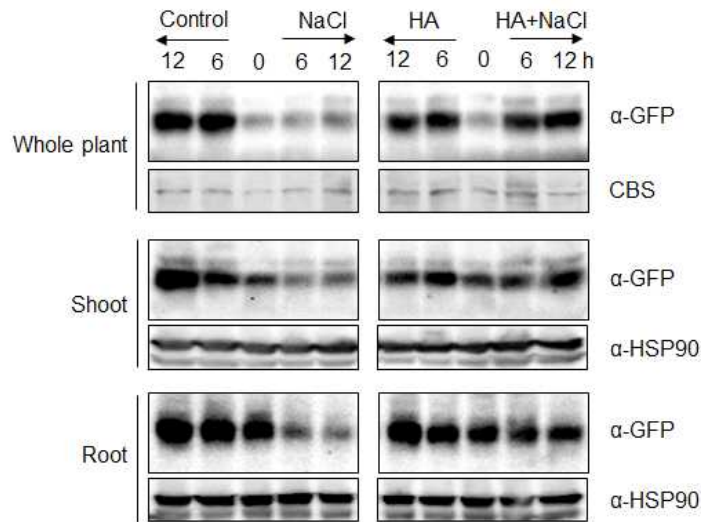


그림 13. 염 스트레스 하에서 휴믹산에 의한 HKT1 단백질의 안정성 획득. HKT1-GFP 식물체(whole plant), 지상부(shoot) 및 지하부(root)에서의 HKT1 단백질 안정성.

- 휴믹산 처리를 통한 스트레스 유도 유전자들의 발현 감소

본 연구진은 휴믹산 처리에 의해 나타나는 다양한 식물체의 환경스트레스 저항성 표현형을 유전자 수준에서 관찰하기 위해, 먼저 염 및 환경스트레스에 대한 대표적인 하위 유전자들인 *RD22*와 *RD29* 유전자들의 발현을 관찰하였다(그림 14A와 B). 이상의 두 유전자들은 염 스트레스 처리에 의해 각각 3배와 5배 발현 증가를 나타내었다. 하지만 휴믹산 처리의 경우 오히려 일반배지 조건(MS)에 비해 감소한 것을 확인하였다. 또한 염 스트레스와 휴믹산을 같이 처리한 구(Salt+HA)에서는 염 처리구에 비해 두 유전자 모두 발현양이 감소하였다. 이상의 결과는 휴믹산 처리만으로도 식물에 대한 환경스트레스의 유무와 상관없이 스트레스 관련 유전자들의 발현을 감소시키는 것을 확인할 수 있다. 더 나아가 기존에 보고된 휴믹산의 옥신 관련 유전자(*IAA19*) 발현 증가를 염 스트레스와 접목해 관찰하였다. 본 연구진은 이전 보고를 통해 세포내 스트레스로 인해 증가하는 활성산소가 옥신 수송을 저해함을 보고한 바 있다. 이러한 보고와 공통되게 식물체가 염 스트레스에 노출되었을 때 *IAA19* 유전자의 발현이 감소하였으며, 이와 반대로 휴믹산 처리에 의해 발현이 증가하는 것을 확인함으로써 이전 보고와 공통된 결과를 확인하였다. 흥미롭게도 염 스트레스와 휴믹산을 동시에 처리하였을 경우, 염 스트레스 단독 처리구에 비해 발현양이 증가함을 확인함으로써 염 스트레스에 대한 식물체의 민감도가 휴믹산 처리에 의해 감소하였음을 관찰하였다(그림 14C). 이상의 유전자 수준에서의 실험 결과는 휴믹산 처리가 식물체의 스트레스 민감도를 낮추며, 그로 인해 식물체의 스트레스 저항성이 증진시키는 것으로 해석된다.

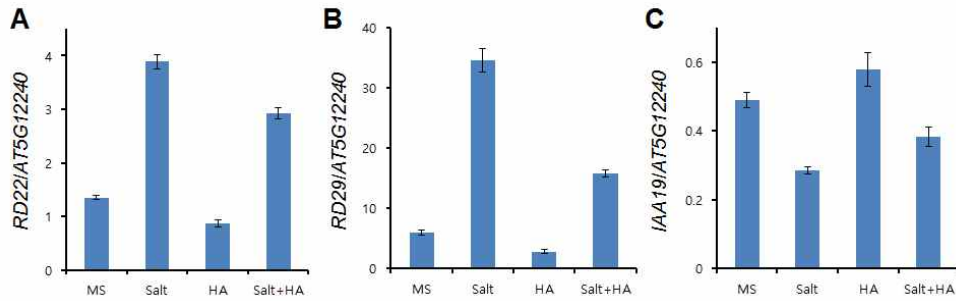


그림 14. 염 스트레스하에서 휴믹산 처리가 스트레스 및 옥신 관련 유전자 발현에 미치는 영향. A, *RD22*. B, *RD29*. C, *IAA19* 유전자의 발현 비교

(2) 페놀계 인공 합성 휴믹산 처리에 의한 애기장대 염 스트레스 저항성 획득

본 연구진은 이상의 천연 휴믹산에 의한 식물체의 염 스트레스 저항성 획득을 페놀계 인공 합성 휴믹산을 통해 재검증 하였다. 그림 15에서 나타났던 천연 휴믹산의 염 스트레스 저항성 기능을 재차 확인 하였으며, 페놀계 인공 합성 휴믹산인 CA, VA, CAVA 모두 대조구(control)에 비해 염 스트레스 저항성이 증가되었다. 더 나아가 염 스트레스에 대한 민감성으로 나타나는 엽록소 결핍을 식물체내 엽록소 측정치를 통해 확인하였으며(그림 15A), 그림 15B와 같이 CAVA 처리는 천연 휴믹산(HA) 처리와 유사한 엽록소 축적을 보여주는 것으로 보아, 제1세부 연구진이 합성한 인공 휴믹산 CAVA의 경우 식물 성장에 관여할 뿐만 아니라 천연 휴믹산이 가지는 염 스트레스 저항성 기능 또한 동일하게 재현함을 확인하였다.

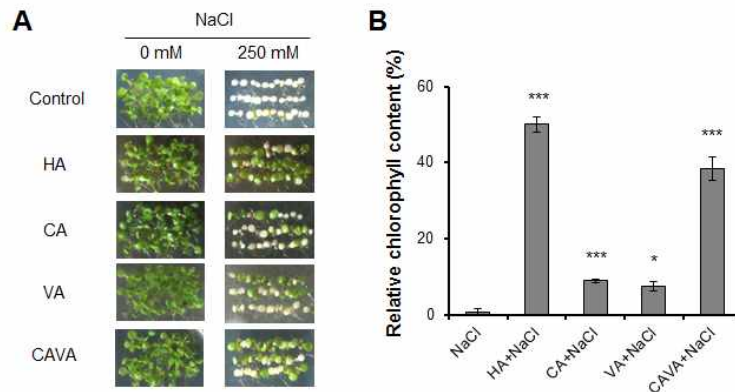


그림 15. 페놀계 인공 합성 휴믹산 처리를 통한 식물체의 염 스트레스 저항성 획득.

A, 천연 및 페놀계 인공 합성 휴믹산 처리를 통한 식물체 염 스트레스 저항성 비교. B, 엽록소 함량 측정을 통한 식물체 염 스트레스 저항성 검증.

(3) 천연 휴믹산 처리에 의한 애기장대의 온도 스트레스 저항성 획득

본 연구진은 염 스트레스 이외 최근 지구온난화로 대두되는 온도 스트레스에 대한 휴믹산의 식물체 저항성 증진 효과를 규명하기 위해 그림 16에 나타난 것과 같이 다양한 휴믹산 농도 구배 조건에서 애기장대의 정상 생육온도인 23 °C에서 7일간 생육 시킨 후, 10 °C의 저온에 10일간 노출시켰다. 이후 정상온도내에서 회복시켰을 때, 휴믹산 농도 증가와 함께 저온 내성이 획득됨을 확인하였다.

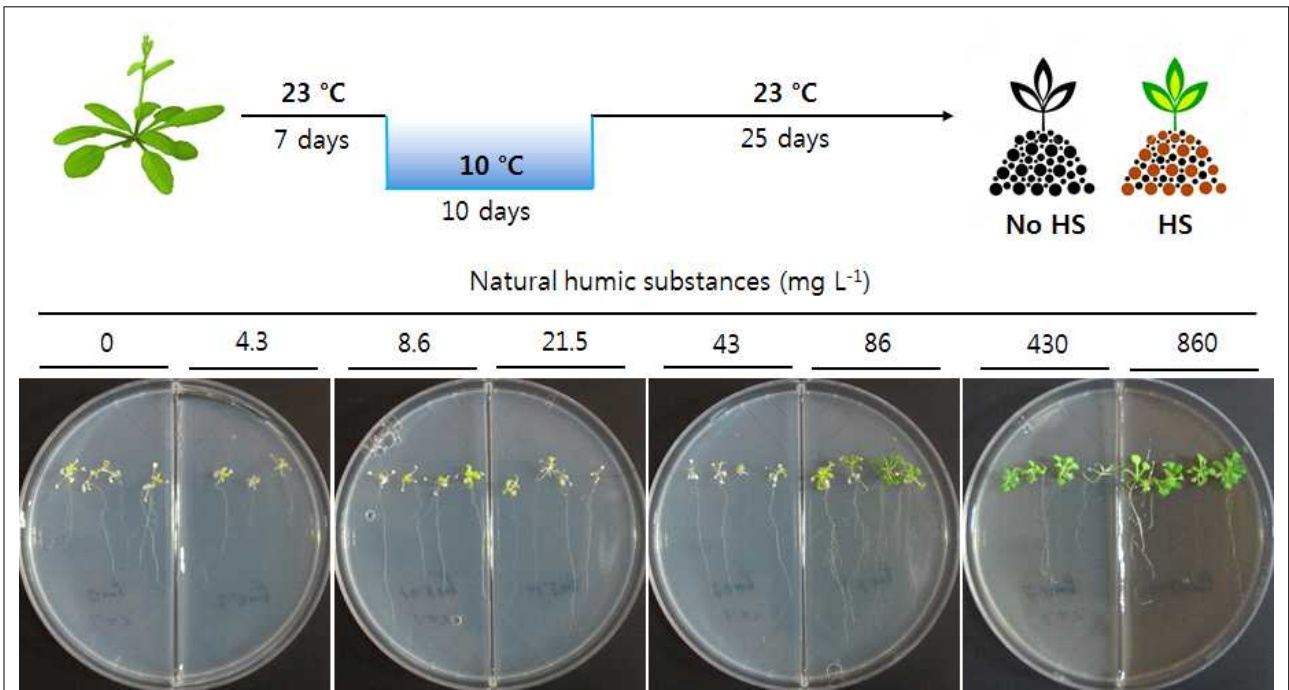


그림 16. 휴믹산 처리에 의한 식물체의 저온 스트레스 내성 획득

또한 고온 스트레스에 대한 휴믹산의 효과를 검증하기 위해, 7일간 일반 배지에서 생육시킨 후, 휴믹산 함유 배지로 옮겨 2일간 순화시켰다. 이후 37 °C의 고온 순화처리 1시간에 이어 45 °C의 고온 스트레스를 처리한 후 2일 뒤 표현형을 관찰하였으며, 고온에 민감한 표현형을 보이는 NADPH-dependent thioredoxin reductase C (NTRC) 돌연변이 애기장대를 비교 식물체로 이용하였다. 그림 17에 나타난 바와 같이, 고온 처리후 일반배지에 키운 야생형의 애기장대는 pale green 잎색을 나타내며 고온에 민감성을 나타낸 반면, 휴믹산(HA)이 함유된 배지의 식물체는 여전히 짙은 녹색을 띄며 건강히 살아있음을 확인하였다. 더 나아가 *ntrc* 돌연변이체의 경우 일반배지에서 완전히 하얀 잎색을 띄며 완전히 사멸한 것을 볼 수 있지만, 휴믹산 함유 배지의 식물체는 강한 생존율을 보였다. 따라서 휴믹산은 식물체가 저온 및 고온과 같은 심각한 온도 스트레스에 대한 저항성을 가지게 도와주는 것을 확인할 수 있었으며, 지구온난화를 통한 다양한 환경스트레스 하에서 작물의 환경적응성을 증진시켜 생산성을 유지할 수 있는 신 기능성 탑재 비료원으로서의 가치를 인정할 수 있었다.

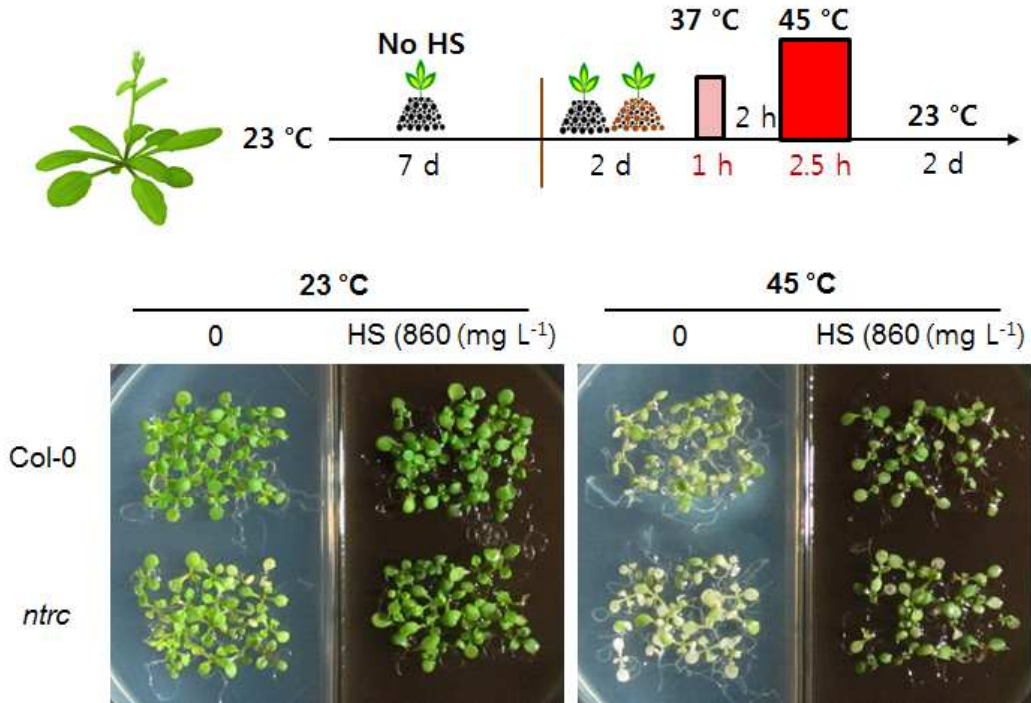


그림 17. 휴믹산 처리에 의한 식물체의 고온 스트레스 내성 획득

- 휴믹산 처리에 의한 애기장대 전사체 분석

휴믹산의 식물 성장 촉진 효과는 몇몇 식물체에서 보고된 바 있지만, 이에 대한 정확한 기작 및 유전자 수준에서의 해석이 옥신 관련 유전자의 발현 조절 이외에는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구진은 휴믹산의 식물체 효과를 좀더 면밀히 관찰하고자 최근의 각광받는 유전체 분석기술중 하나인 RNAseq 분석 기법을 통해 관찰하였다. 단 고가의 분석료로 인해 한 set를 이용해 분석을 진행하였으며, 추후 다른 재원 확충을 통해 반복 분석을 할 예정이다. 하지만 일차 분석결과 휴믹산 처리를 통해 증가되는 유전자가 416개(log 값 1 이상), 감소하는 유전자가 347개(log 값 1 이하) 검출되었다. 이중 의미 있게 증가하는 유전자의 분포도를 살펴본 결과 휴믹산 처리만으로도 스트레스 관련 유전자들의 발현이 상당히 증가해 있음을 확인할 수 있었다(그림 18). 이들은 주로 external stimulus, stress 및 chemical stimulus등에 의해 증가하는 유전자들로서 휴믹산 처리에 의해 증가하는 주요 유전자군을 형성하였다(그림 18). 따라서 식물체에 대한 휴믹산 처리는 스트레스가 오지 않았음에도 이에 대한 초기 대응 기작을 유전자 수준에서 이미 프로그래밍화 하고 있음을 제시하며, 이로 인해 다양한 환경스트레스에 대응하는 것으로 사료된다.

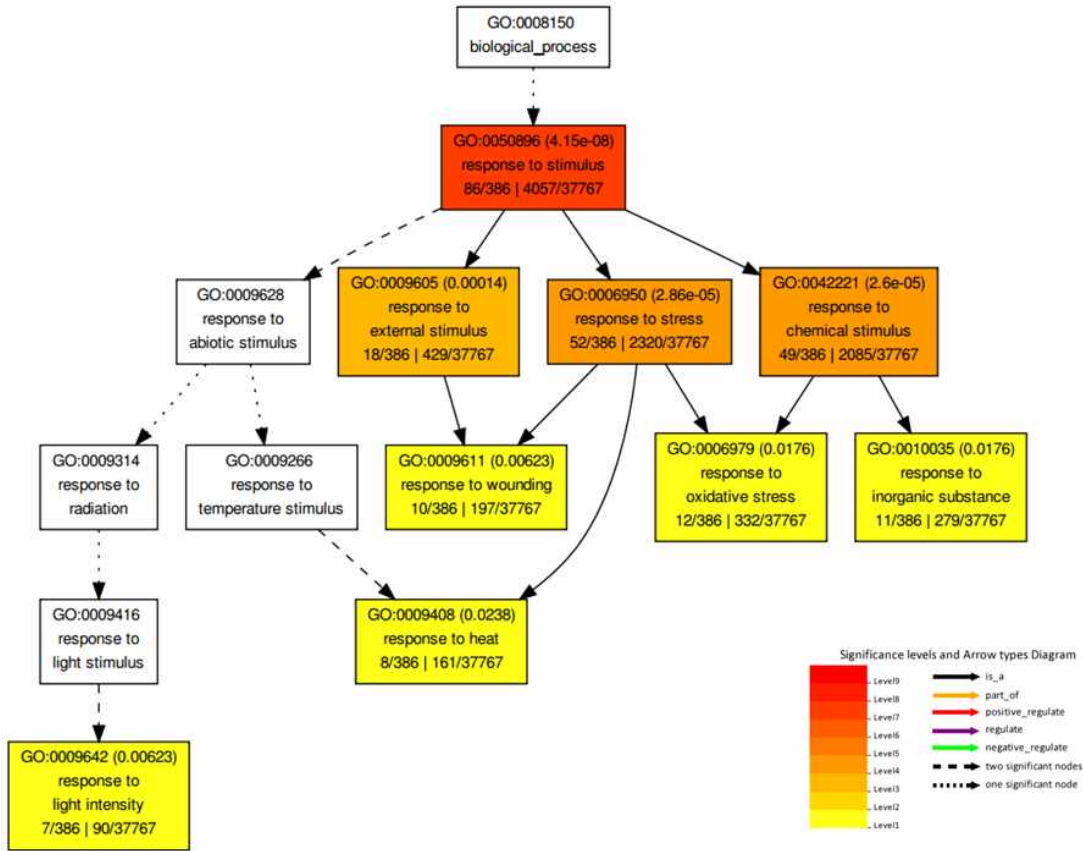


그림 18 전사체 분석을 통해 휴믹산에 의해 증가하는 주요 유전자군(Control vs. 휴믹산).

다) 작물에 대한 천연 및 인공 합성 휴믹산의 효과 검증

(1) 천연 및 인공 합성 휴믹산 처리에 의한 알팔파 생육 촉진

천연 및 본 연구진이 제조한 폐놀계 물질 인공 합성 휴믹산의 작물 생산성 증진 효과를 검증하기 위해 토양조건에서 키운 대표적 콩과 식물인 알팔파 유묘에 발아후 8일, 15일차에 휴믹산을 옆면 시비한 후, 22일차에 생육 촉진 효과를 검증하였다. 먼저 지상부 생육을 살펴본 결과, 그림 18A에 나타난 바와 같이 천연 휴믹산(HA) 뿐만 아니라 본 연구진이 모델식물인 애기장대에서 생육 촉진 효과를 검증했던 두가지 인공합성 휴믹산(CAVA와 L-DOPA) 모두에서 물(H₂O) 처리구에 비해 생육이 촉진됨을 확인하였다. 실제 초장 및 생체중을 통해서도 휴믹산 처리가 물 처리구에 비해 유의적으로 증가된 생육을 관찰할 수 있었다(그림 19B와 C). 지상부의 대부분을 차지하는 잎의 크기에서도 휴믹산 처리가 물 처리구에 비해 증가된 옆 면적을 보임으로써, 옆 면적 증가로 인한 식물 생체중 증가로 이어짐을 확인 할 수 있었다(그림 20). 따라서 휴믹산 처리는 실제 작물의 생산량 증가를 유도 할 수 있는 생장 촉진제로서의 기능이 검증되었으며, 본 연구진이 합성한 인공 휴믹산 역시 휴믹산과 동일한 작물 생산량 증가 효과를 나타냄을 확인하였다. 더 나아가 토양 시비보다 시용량이 적은 옆면 시비를 통해서도 작물의 생육 증진효과가 검증됨으로 인해 실제 작물에 대한 시비량 절감 효과도 기대할 수 있었다.

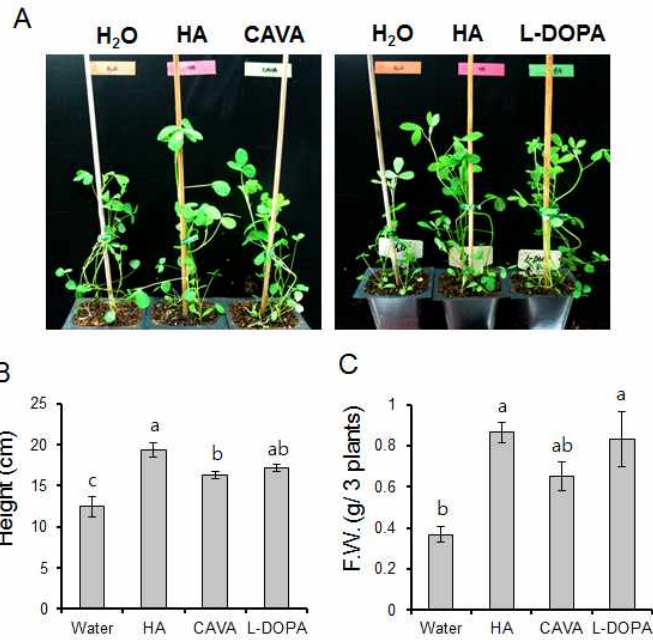


그림 19. 천연 및 인공 합성 휴믹산 옆면 시비를 통한 알팔파 지상부 생육 증진 효과. A, 두 번의 옆면 시비를 통한 22일령 알팔파의 성장 사진. B, 옆면 시비를 통한 초장 변화. C, 옆면 시비를 통한 생체중 변화.

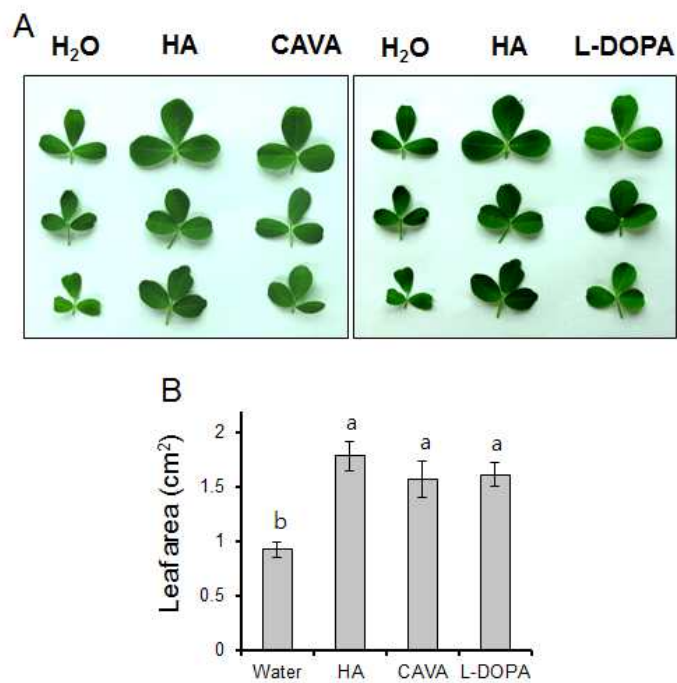


그림 20. 천연 및 인공 합성 휴믹산 옆면 시비를 통한 알팔파 잎 크기 증가. A, 두 번의 옆면 시비를 통한 22일령 알팔파의 잎 크기 사진. B, 옆면 시비를 통한 잎 면적변화.

이전 문헌 보고 및 애기장대를 통한 본 연구진의 보고(그림 7)에서 휴믹산은 옥신 유사 반응을 통해 뿌리 활력을 증가시킨다고 보고한 바 있다. 따라서 천연 및 인공 합성 휴믹산을 이

전과 같이 옆면 시비한 후 지하부의 뿌리 발달 변화를 관찰하였다. 그림 21에 나타난 바와 같이 천연 휴믹산 처리구의 경우 물 처리 대조구에 비해 5배 이상의 뿌리 발달이 증가됨을 확인하였으며, 인공 합성 휴믹산의 경우도 물 처리 대조구에 비해 2배 이상의 뿌리 무게의 증가를 보임으로써, 휴믹산의 옆면 시비를 통해서도 지하부의 생장이 촉진되며, 이는 토양 무기물의 흡수를 촉진해 작물 생육을 증진 시킬 것으로 사료된다.

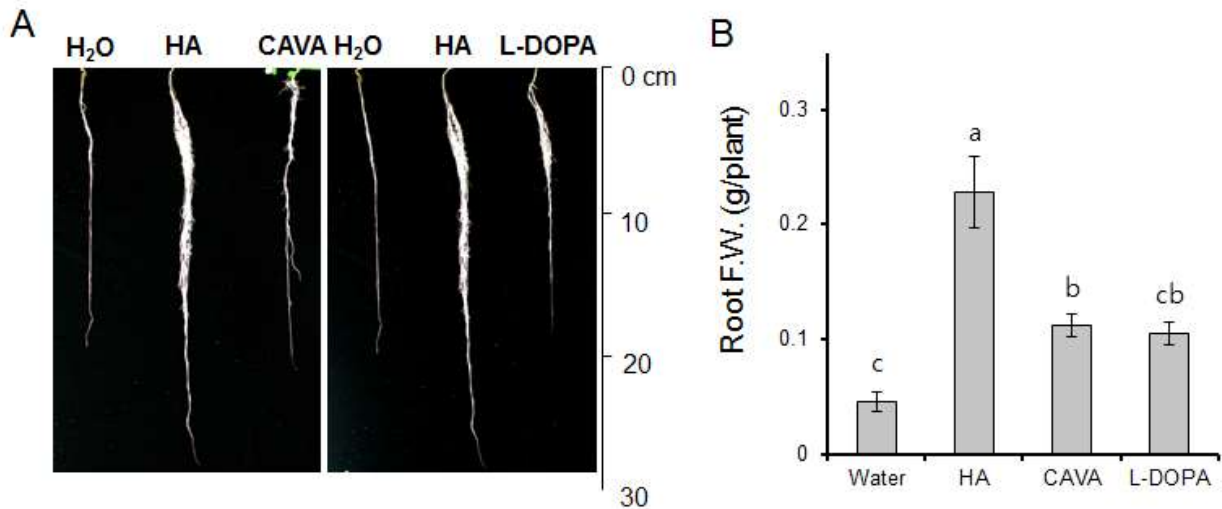


그림 21. 천연 및 인공 합성 휴믹산 옆면 시비를 통한 알팔파 지하부 발달 증진 효과. A, 두 번의 옆면 시비를 통한 22일령 알팔파의 뿌리 발달 사진. B, 옆면 시비를 통한 뿌리 생체중 변화.

(2) 천연 및 인공 합성 휴믹산 처리에 의한 이탈리아 라이그라스 생육 촉진

국내 뿐만 아니라 전세계적으로 많이 재배하는 대표적 벼과 사료작물인 이탈리아 라이그라스를 통해 콩과 작물 이외의 벼과 작물에 대한 천연 및 인공 합성 휴믹산의 생육 촉진 효과를 검증하였다. 토양조건에 파종한 후, 발아 5일과 10일차에 옆면 시비를 2회 실시하였으며, 17일차에 지상부 표현형을 관찰한 바, 천연 휴믹산 뿐만 아니라 CAVA 및 L-DOPA 모두 물 처리 대조구에 비해 증가된 생육을 보였다(그림 22A). 이를 확인하기 위해 초장 및 생체중을 측정된 결과, 모든 휴믹산 처리구가 물 처리구에 비해 유의적으로 생육 증진 효과를 보였다(그림 22B와 C). 따라서 본 연구진이 합성한 인공 합성 휴믹산은 천연 휴믹산과 동일한 생육 증진 효과를 보이며, 콩과 및 벼과 작물 모두에 효과적임을 관찰하였다. 또한 알팔파와 같이 동일한 뿌리 발달 변화를 관찰하였으며, 그림 23과 같이 휴믹산을 옆면 시비 하였을 때 도 이탈리아 라이그라스의 뿌리 발달이 물 처리구에 비해 증가된 것을 관찰할 수 있으며, 실제 뿌리 무게를 통해서 유의적으로 증가되었음을 확인하였다.

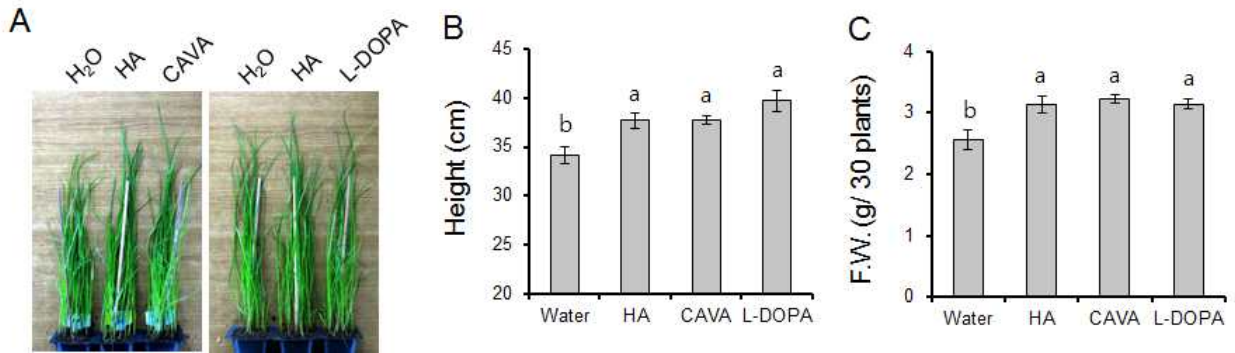


그림 22. 천연 및 인공 합성 휴믹산 옆면 시비를 통한 이탈리아 라이그라스 지상부 생육 증진 효과. A, 두 번의 옆면 시비를 통한 17일령 이탈리아 라이그라스 성장 사진. B, 옆면 시비를 통한 초장 변화. C, 옆면 시비를 통한 생체중 변화.

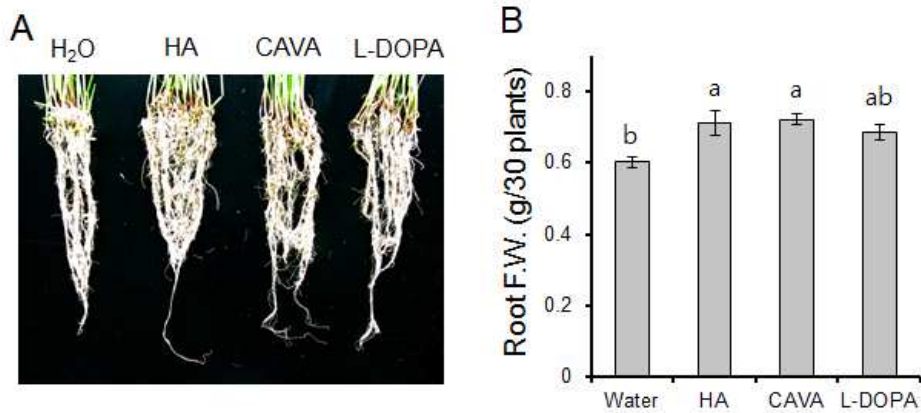


그림 23. 천연 및 인공 합성 휴믹산 옆면 시비를 통한 이탈리아 라이그라스 지하부 발달 증진 효과. A, 두 번의 옆면 시비를 통한 17일령 이탈리아 라이그라스의 뿌리 발달 사진. B, 옆면 시비를 통한 뿌리 생체중 변화.

목초 및 사료작물은 방목지에서의 가축에 의한 섭취 및 기계적 예취를 통해 생산을 하는 특성으로 식물의 재생력이 중요한 인자이다. 따라서 전세계 주요 목초인 이탈리아 라이그라스의 예취후 재생력을 확인하기 위해 발아후 7일령의 유식물기에 지상부 3 cm만 남긴채 예취하였으며, 5일 간격으로 옆면 시비를 진행한 후 21일차에 지상부의 재생력을 조사하였다. 그림 24A와 같이 천연 및 두가지 인공 합성 휴믹산 처리구 모두가 물 처리 대조구에 비해 재생력이 뛰어난 것을 확인하였다. 이를 지상부의 초장 및 생체중을 측정하여 확인해 본 결과, CAVA의 예취후 재생력이 가장 뛰어났으며, 그 다음으로 천연 휴믹산과 L-DOPA가 대조구에 비해 높게 나타났다. L-DOPA의 경우 430 mg/L 처리가 86 mg/L 처리에 비해 오히려 낮은 재생력을 보임을 볼 때 과도한 양의 L-DOPA 처리는 오히려 식물 생육을 감소시키는 요인으로 작용하고, 이는 애기장대의 발아율(그림 3, 5와 6)과 동일하게 나타났다. 본 옆면 시비의 경우 실제 잎 표면에 처리된 양은 수백 ng 수준으로 판단되며 현재 Control로 사용한 Sigma 휴믹 외에 농장에서 직접 사용되는 soluble 휴믹의 경우 1 g/L로 시비되는 것을 고려할 때 본 과제에서 제시된 물질이 훨씬 더 경제적인 가능성이 있다.

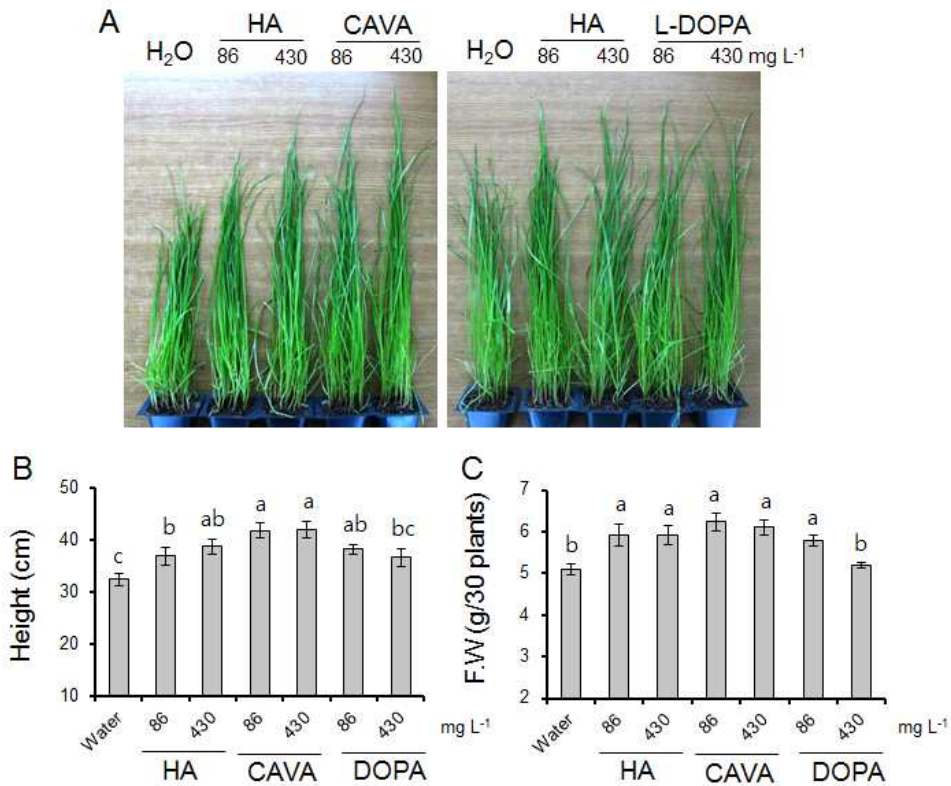


그림 24. 천연 및 인공 합성 휴믹산 엽면 시비를 통한 이탈리아 라이그라스의 예취후 지상부 재생 효과. A, 두 번의 엽면 시비를 통한 17일령 이탈리아 라이그라스 성장 사진. B, 엽면 시비를 통한 초장 변화. C, 엽면 시비를 통한 생체중 변화.

(3) 천연 및 인공 합성 휴믹산 처리에 의한 벼 생육 촉진

우리나라의 주요 식량 자원 식물인 벼에 대한 천연 및 인공 합성 휴믹산의 bioactivity를 검증하였다. 이를 위해 애기장대에서 검증된 방법과 동일하게, 배지내 천연 휴믹산 및 인공 합성 휴믹산인 CAVA를 두가지 서로 다른 농도 조건으로 준비한 후, 벼 종자의 발아 및 초기 성장 효과를 조사해본 결과, 그림 25A와 같이 HA와 CAVA 모두 86 mg/L까지 초기 생육이 control 대조구에 비해 유묘 생장이 촉진되었다. 또한 100 mM의 NaCl이 함유된 배지에서 벼 종자의 경우 발아율 억제와 함께 유묘 생장이 거의 되지 않음을 볼 수 있다(그림 25B). 하지만 86 mg/L의 HA 혹은 CAVA가 같이 처리될 경우, 염 스트레스에 의한 유묘 성장 억제가 감소함으로써 정상적인 생육을 하였다. 따라서 본 연구진이 합성한 CAVA 및 L-DOPA는 휴믹산을 대체할 수 있는 식물 성장 조절제로서 모델식물인 애기장대 뿐만 아니라 콩과, 벼과의 실제 작물에서도 동일한 식물 성장 촉진 기능을 보임으로써 농업 생산량 증대에 기여할 수 있는 새로운 유기물 합성 비료원으로써의 가치를 입증하였다.

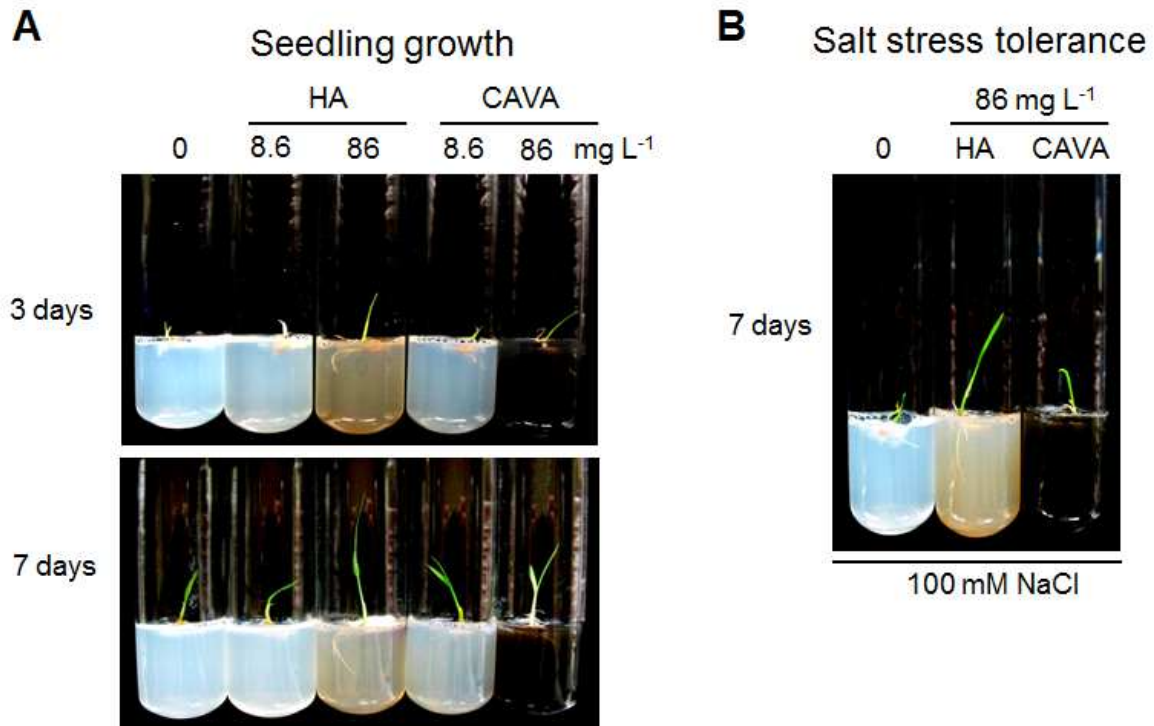


그림 25. 벼 유묘 생육 증진 및 염 저항성에 있어 천연 및 인공 합성 휴믹산 CAVA의 효과. A, 벼 유묘 생장에 천연 휴믹산 및 CAVA의 효과. B, 염 스트레스 저항성에 있어 천연 및 CAVA의 기능.

연구개발성과

(1) 논문 출판

Jeon et al., Dihydroxynaphthalene-based mimicry of fungal melanogenesis for multifunctional coatings. *Microbial Biotechnology*, 2016, 9, 305-315 (SCI급 IF: 3.991)

Khaleda et al., Humic acid confers HIGH-AFFINITY K⁺ TRANSPORTER 1-mediated salinity stress tolerance in *Arabidopsis*. *Molecules and Cells*, 2017, 40, 966-975 (SCI급 IF: 3.054)

Khaleda et al., Foliar application of humic acid or a mixture of catechol and vanillic acid enhanced growth and productivity of alfalfa. *Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science*, 2017, 37, 248-253 (KCI 등재지)

Khaleda et al., Humic Acid and Synthesized Humic Mimic Promote the Growth of Italian Ryegrass. *Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science*, 2017, 37, 242-247 (KCI 등재지)

Cha et al., Fungal Laccase-Catalyzed Oxidation of Naturally Occurring Phenols for Enhanced Germination and Salt Tolerance of *Arabidopsis thaliana*: A Green Route for

Synthesizing Humic-like Fertilizers. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65, 1167-1177 (SCI급 IF 3.154)

Im et al., Metal-Chelation-Assisted Deposition of Polydopamine on Human Hair: A Ready-to-Use Eumelanin-Based Hair Dyeing Methodology. ACS biomaterials science engineering, 2017, 3, 628-636 (SCI급 IF 3.234)

(2) 기술이전 (총 2천만원)

GS칼텍스 주식회사에 노하우 이전, 산화 공정을 이용한 GS 목질계 리그닌 휴믹화 기술 (2016년 12월 29일)

(3) 특허권 출원

페놀계 중합체를 유효성분으로 함유하는 식물 발아 촉진용 조성물 및 이의 용도. 국내특허출원 (10-2016-0013006)

휴믹산에서 분리된 휘발성 유기물질을 생산하는 바실러스 메가테리움 균주, 이를 함유하는 식물환경복원용 조성물 및 이를 이용한 식물환경복원 방법. 국내특허출원 (10-2016-0119144)

페놀계 중합체를 유효성분으로 함유하는 식물의 염 스트레스 내성 증진용 조성물 및 이의 용도. 국내특허출원 (10-2016-0137728)

크라프트 리그닌의 펜톤 반응 변환체를 이용한 식물 성장 조절제. 국내특허출원 (10-2016-0183038)

페놀계 중합체를 유효성분으로 포함하는 식물의 성장 촉진 및 바이오매스 증진용 조성물 및 이의 용도. 국내특허출원 (10-2017-0138501)

나프탈렌 또는 페놀계 물질의 중합체를 유효성분으로 함유하는 식물의 발아 촉진 및 염 스트레스 내성 증진용 조성물 및 이의 용도. 국내특허출원 (10-2017-0154256)

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

D-06

4-1. 목표달성도

○ 정량 실적 달성도

성과지표	계획(A)	실적평가(B)	목표달성률 (C:B/A)
지식재산권(출원)	5	6	120.0%
지식재산권(등록)			-
논문(SCI)	4	4	-
논문(비SCI)	4	2	-
학술발표	4	6	150.0%
기술실시	1	1	100.0%
교육/지도			-
사업화			-
기술인증			-
인력양성	4	2	50.0%
정책활용			-
홍보전시	2	1	50.0%
기타(유전자원 등)			-

○ 세부 목표 달성도

연구개발계획		추진일정	
		수행 내용	달성도
1차년도	리그닌 전구체 페놀 물질 산화 고분자화	1. 산화 촉매를 이용하여 다양한 리그닌계 페놀물질의 산화 고분자화 반응을 유도하였음. 2. 휴믹의 특징인 Visible 흡광 능력이 고분자화 반응을 통해 나타나는지 확인함.	100%
	고분자 반응 조건 스크리닝	1. 40 mL의 RT 조건에서 1 L 항은 반응기 수준으로 반응 조건을 조절하였음. 2. Ultrafilter 조건을 조절하여 최적의 수율 확보를 시도하였음.	100%
	천연 및 인공 합성 휴믹산의 식물생장 증진 효과 검증	1. 상업 휴믹은 Sigma에서 구매된 humic acid를 이용하였으며 식물 생장을 확인하기 위해 애기장대를 이용해 발아를 통한 유근 또는 떡잎 발현의 속도를 비교함. 고분자 반응 중에 상업 휴믹산 수준의 능력을 보이는 CAVA 또는 L-DOPA 물질을 발굴함.	100%
	천연 및 합성 휴믹산 처리에 의한 식물 환경스트레스 저항성 기작	1. 비생물학적 스트레스 저항 능력이 향상되는지를 확인하기 위해 NaCl 존재 하에서 잎의 백화 현상 방지가 일어나 엽록체가 그대로 유지되는지를 확인하였음. 고분자 합성 소재인 CAVA 또는 L-DOPA 물질이 상업 휴믹 만큼의 염 저항 능력 유도를 확인하였음.	100%
2차년도	리그닌 전구체 중합체의 구조 분석 및 천연 휴믹산과 비교	1. 다양한 표면분석/질량분석 장비들을 이용하여 상업 휴믹 물질인 Sigma humic acid와 비교함.	100%
	합성 scale-up 실험	1. CAVA 및 N/긴 알킬 체인 기반 변형 구조를 바탕으로	100%

		1 L 반응기로 scale-up을 시도하였으며 주요 반응 인자들에 대한 Know-how를 확보함. 그러나 단백질 촉매의 무기촉매화는 진행하지 않았음. 이는 1 L 규모 반응기 처리에 단백질 촉매 20 mg 정도 소모되어 크게 경제성에 악영향을 주지 않는 것으로 평가하였음.	
	인공 휴믹산의 생분해성 정도 평가	1. 시행하지 않았음. 알파과/이탈리안 라이그라스 평가 결과 관주 시비보다는 엽면 시비가 효과적임을 확인하였고 또한 엽면 시비의 양이 매우 극미량이라서 생분해성 이슈는 크게 없는 것으로 판단하였음.	0%
	천연 및 합성 휴믹산 처리에 의한 식물 환경스트레스 저항성 기작	1. 애기장대 식물을 사용하여 휴믹 구조 존재 하에서 NaCl의 저항성이 확보되는 분자적 기작을 규명하였음. 2. RNAseq 기술을 사용하여 휴믹 구조 존재 하에서 발현되는 mRNA를 집단 분석하였음. 스트레스/수송 관련 다양한 유전자가 휴믹 구조에 의해 발현될 수 있음을 확인하였음.	100%
	다비성 작물에 대한 천연 및 합성 휴믹산의 효과 검증	1. 알파과와 이탈리안 라이그라스를 이용하여 상업 휴믹인 Sigma humic acid와 CAVA/L-DOPA를 비교하였을 때 비슷한 수준의 작물 성장 자극을 유도하는 것을 확인하였음. 2. 사료 작물인 이탈리안 라이그라스의 경우 바이오 매스 Cut 후 재생장을 유도할 때도 엽면 시비를 통한 인공 휴믹 구조가 상업 휴믹 만큼 효과적임을 확인하였음.	100%

4-2. 관련분야 기여도

- 양질의 휴믹은 국내에서 생산이 거의 이루어지고 있지 않기 때문에 본 기술을 이용할 경우 엔지니어링 플라스틱 합성을 모사하여 대용량 합성 공정 개발이 가능할 것으로 보임.
- 본 기술은 천연 자원에 의존하지 않고 양질의 휴믹을 인위적으로 생산하는 방법으로 반응 조건을 세심하게 조절하여 상업 휴믹보다 더 효과가 뛰어난 인공 휴믹 제조가 가능할 것으로 판단됨.
- 국외에서는 피콜로 그룹이 리그닌을 이용하여 인공 휴믹 구조를 제조하려는 시도들을 해왔으나 본 과제처럼 고분자화 방식을 이용해 시도한 경우는 처음임.
- 본 과제에서 발명한 인공 휴믹 물질을 작물에 적용할 경우 수십 나노 그램 수준의 매우 극미량의 엽면 시비로 바이오매스 증가를 유도할 수 있어 사료 작물 또는 잔디 등에 효과적으로 적용할 수 있을 것을 판단됨.
- 기존의 휴믹이 어떤 구조를 보유하기 있어 식물을 자극하는지 규명이 거의 되지 않은 상황인데 본 과제에서 구조 정보를 알고 있는 단량체를 사용하여 식물 자극에 필수적인 휴믹 구조를 추론할 수 있었음.
- 폐놀 물질의 산화 고분자화는 엔지니어링 플라스틱/항산화제 등 다양한 분야에 응용되어 왔으나 식물 자극 능력에 대해서는 학계에서 보고된 바가 없었음. 본 연구를 통해 새로운 기능성인 식물 자극 능력을 규명함.
- 특정 단량체 구조를 특허 출원하여 원천 기술을 확보함.

5. 연구결과의 활용계획

D-07

- 목질계 당화공정을 추진하고 있는 GS칼텍스에 1차 기술이전을 한 상황이며 이를 바탕으로 협업체계를 지속적으로 유지하여 2차 기술이전을 추진하고자 함. 공정의 경제성을 평가하여 scale-up 가능성을 평가해볼 예정임.
- 현재 관련 연구자는 본 과제를 바탕으로 Top-down 방식의 리그닌 휴믹화 공정 개발과 휴믹을 통한 애기장대 유전자 발현 조절과 관련된 연구 과제 추진에 성공하였으며 현재 관련 연구를 진행하고 있음.
- 리그닌 구조의 Bottom-up/Top-down 구조 전환을 통해 식물 자극 이외의 흡광/항산화 등 다양한 기능성들을 규명하고 있음. 이를 바탕으로 다양한 기술 포토폴리오를 확보하고 있음.
- 현재 본 과제의 성과는 한국임업진흥원/연구재단 과제 수주로 연결되어 휴믹화에 대한 다양한 이학적/공학적 결과들을 현재 확보하고 있음. 본 과제에서 달성이 부족한 인력 양성/홍보 전시에 관련된 실적들은 추후 연계 과제를 통해 보강하고자 함.
- 대략적 단가 계산을 실시한 결과 아래와 같은 결과를 얻음. 현재 Soluble 상업 휴믹의 Kg 당 소비자 가격이 만원에서 3만원을 형성하고 있는 것으로 판단할 때 다소 비싼 편임. 향후 Vanillic acid를 조금 더 싼 다른 단량체를 이용해야 할 것으로 판단됨. 향후 추가적인 연구를 통해 증명하고자 함.

CAVA 제조 단가 예측

1. 제조사 정보 및 Chemical 단가는 알리바바 사이트에서 확인함
2. 가격을 최소화 할 수 있는 PPO 수지 합성법을 활용하여 예측함
3. 용매는 재활용이 가능하기 때문에 생략함
4. 수율은 분리/정제 공정이 따로 필요 없기 때문에 결합하지 못한 단량체 10%를 뺀 90%로 추정함

- Catechol 4\$/Kg (Orchid Chemical Supplies Ltd.)

- Vanillic acid 30\$/Kg ([Wuhan Benjamin Pharmaceutical Chemical Co., Ltd.](#))

- CuCl(I) 0.18\$/20 g (산화 고분자화 촉매/Foshan City Qiruide Additives Co., Ltd.)

- 38\$/Kg 수준으로 제조가 가능할 것으로 판단됨.

가격 단가를 더 낮추기 위해서는 Vanillic acid 대신에 유사 구조를 갖는 값싼 물질을 사용해야 할 것으로 판단됨.

- 본 연구에서 합성한 Bottom-up 인공 휴믹산 구조는 리그닌 유사 구조로 곰팡이의 다양한 산화 효소 시스템에 의해 분해가 일어날 것이 명확하나 현재 본 연구 과제에서는 실험이 수행되지 않음. 따라서, 한국임업진흥원/연구재단에서 수주한 과제를 통해 본 현상을 증명하고자 함.
- 한국임업진흥원/연구재단에서 수주한 과제에서 Top-down 샘플을 이용해 토양의 물리화학적 특징 변화를 토양의 입단성 및 양이온 치환 능력 면에서 확인할 예정임. 이 실험에서 Bottom-up 샘플을 같이 사용하여 비교/평가하고자 함.
- 한국임업진흥원/연구재단에서 수주한 과제에서 토양 샘플에서 작물 실험을 하면서 본 과제에서 제시된 Bottom-up 물질을 이용하여 발아 및 염 저항성이 작물 생리적으로 어떤 영향을 미치는지 비교/평가하고자 함.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

D-08

- 현재 해외의 휴믹 연구는 크게 구조 분석과 기능성 탐구 연구가 주를 이루고 있으며 리딩 그룹은 이탈리아의 피콜로 그룹인 것으로 판단됨. 피콜로 그룹은 수십년 전부터 휴믹 구조 분석과 기능성 연구에 집중해 왔으며 2015년 초부터 휴믹 유사 구조를 리그닌에서 분리하는 시도들을 진행하고 있음. 본 과제 역시 리그닌 유래 페놀 물질을 이용하고 있어 피콜로 그룹과 큰 틀에서 비슷한 연구 결과를 내고 있는 것으로 판단됨.
- 피콜로 그룹은 현재 리그닌에서 추출할 수 있는 soluble한 영역에 집중하고 있으나, 추출 기반의 기술을 활용할 경우 Catechol/Guaiacol/Vanillin 등의 식물 독성을 보이는 단분자 페놀이 다량 존재할 것으로 판단되며, 본 과제 기술을 융합하여 추가적인 구조적 변환이 필요한 것으로 판단됨.

7. 연구개발결과의 보안등급

	D-09
○ 보안 대상이 아님.	

8.

등록한 연구시설·장비 현황

해당 사항 없음.

9. 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	D-11
<ul style="list-style-type: none">○ 매월 정기 1회 안전관리 회의를 실시함.○ 매월 정기 1회 소화기 등 안전관리 장비를 점검함.○ 실험복 및 안전 장비 착용을 랩장이 상시 점검함.	

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	D-12	
								사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Fungal Laccase-Catalyzed Oxidation of Naturally Occurring Phenols for Enhanced Germination and Salt Tolerance of Arabidopsis thaliana: A Green Route for Synthesizing Humic-like Fertilizers	경상대학교	제 1저자/ 교신저 자	미국	3.154	2017-02-15	단독사사	SCI급/JCR 상위 10%
2	논문	Humic Acid Confers HIGH-AFFINITY K ⁺ TRANSPORTER 1-Mediated Salinity Stress Tolerance in Arabidopsis	경상대학교	제 1저자/ 교신저 자	한국	3.054	2017.12.31	중복사사	SCI급
3	논문	Dihydroxynaphthalene-based mimicry of fungal melanogenesis for multifunctional coatings	경상대학교	제 1저자/ 교신저 자	영국	3.991	2016.05.01	단독사사	SCI급/SfAM (영국미생 물학회) 주목할 만한 논문 선정

4	특허	폐놀계 중합체를 유효성분으로 포함하는 식물의 성장 촉진 및 바이오매스 증진용 조성물 및 이의 용도	경상대학교	발명자	국내		2017.10.24	중복사사	인공 휴믹 물질 시비법이 기술된 핵심 기술 특허
5	특허	폐놀계 중합체를 유효성분으로 함유하는 식물 발아 촉진용 조성물 및 이의 용도	경상대학교	발명자	국내		2016.02.02	단독사사	인공 휴믹 합성을 위한 단량체 구조가 기술된 핵심 기술 특허

11. 기타사항

	D-13
--	------

- | |
|---|
| <p>○ 본 기술의 기본 개념은 GS칼텍스 리그닌 고부가가치화 공정의 한 방법으로 Know-how 이전을 실시하였음.</p> |
|---|

12. 참고문헌

D-14

Jeon et al., Dihydroxynaphthalene-based mimicry of fungal melanogenesis for multifunctional coatings. *Microbial Biotechnology*, 2016, 9, 305-315

Khaleida et al., Humic acid confers HIGH-AFFINITY K⁺ TRANSPORTER 1-mediated salinity stress tolerance in *Arabidopsis*. *Molecules and Cells*, 2017, 40, 966-975

Khaleida et al., Foliar application of humic acid or a mixture of catechol and vanillic acid enhanced growth and productivity of alfalfa. *Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science*, 2017, 37, 248-253

Khaleida et al., Humic Acid and Synthesized Humic Mimic Promote the Growth of Italian Ryegrass. *Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science*, 2017, 37, 242-247

Cha et al., Fungal Laccase-Catalyzed Oxidation of Naturally Occurring Phenols for Enhanced Germination and Salt Tolerance of *Arabidopsis thaliana*: A Green Route for Synthesizing Humic-like Fertilizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65, 1167-1177

Piccolo, The supramolecular structure of humic substances, *Soil Science*, 2001, 166, 813-832

Piccolo et al., Use of humic substances as soil conditioners to increase aggregate stability. *Geoderma*, 1997, 75, 267-277

Piccolo et al., Structural characteristics of humic substances as related to nitrate uptake and growth regulation in plant systems. *Soil Biology & Biochemistry*, 1992, 24, 373-380

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.