

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **038667**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.09.30**

**(51)** Int. Cl. *A01N 31/16* (2006.01)  
*A01N 65/00* (2009.01)

**(21)** Номер заявки  
**201892500**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.06.26**

---

**(54) ПРИМЕНЕНИЕ ФРАКЦИИ ЛИГНИНА В КАЧЕСТВЕ АНТИФИТОПАТОГЕННОГО АГЕНТА И СОДЕРЖАЩИЕ ЕЕ АНТИФИТОПАТОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ**

---

**(31)** 102016000068623

**(32)** 2016.07.01

**(33)** IT

**(43)** 2019.07.31

**(86)** PCT/EP2017/065652

**(87)** WO 2018/001935 2018.01.04

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**УПМ-КЮММЕНЕ КОРПОРЕЙШН  
(FI); ГРИН ИННОВЕЙШН ГМБХ  
(AT)**

**(72)** Изобретатель:  
**Пиетаринен Суви, Хюбш Кристиан  
(FI), Леонарди Джулиано (AT)**

**(74)** Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

**(56)** TATIANA DIZHBITE ET AL:  
"Characterization of the radical scavenging activity of lignins - natural antioxidants", BIORESOURCE TECHNOLOGY, ELSEVIER BV, GB, vol. 95, no. 3, 1 December 2004 (2004-12-01), pages 309-317, XP008149292, ISSN: 0960-8524, DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2004.02.024 [retrieved on 2004-04-30] table 3 figure 4 page 316, column 1, line 21 - line 29 page 310, column 2, line 47 - page 311, column 1, line 7

WO-A1-2013182751

ROGOSIC M ET AL: "Polydispersity index and molecular weight distributions of polymers", EUROPEAN POLYMER JOURNAL, PERGAMON PRESS LTD. OXFORD, GB, vol. 32, no. 11, 1 November 1996 (1996-11-01), pages 1337-1344, XP004077684, ISSN: 0014-3057, DOI: 10.1016/S0014-3057(96)00091-2 figures 1-4, 7

---

**(57)** Раскрыто применение фракции лигнина в качестве антифитопатогенного агента, содержащие ее антифитопатогенные композиции, а также способы защиты растений от фитопатогенов.

---

**B1**

**038667**

**038667 B1**

### Область техники

Настоящее изобретение относится к применению фракции лигнина в качестве антифитопатогенного агента, содержащим ее антифитопатогенным композициям, а также к способам защиты растений от фитопатогенов.

### Уровень техники

Болезни растений могут быть трудно диагностируемыми. Часто они проявляют те же симптомы, что и совершенно здоровые растения. Когда растение заболевает, это происходит из-за бактерий, грибка или вируса.

#### Бактерии

Не все бактерии вредны для растений и почвы. Тем не менее, существует примерно 200 видов бактерий, которые вызывают болезни у растений. Они наиболее активны в теплой и влажной среде. Существует несколько симптомов бактериальной инфекции. Одним из них является пятнистость листьев. В этом случае бактерии, которые атакуют растения, вырабатывают токсичное химическое вещество, которое убивает окружающие клетки растения. Затем растение проявляет защитную реакцию, убивая окружающие клетки растения, таким образом изолируя зараженные клетки. В некоторых случаях указанные области мертвых клеток опадают, образуя то, что выглядит, как "пробоины" в листьях.

Бактерии могут блокировать способность растений доставлять воду и питательные вещества к остальной части растения. Со временем растение начинает увядать или поникать. Указанный процесс может происходить быстро и в течение одного дня.

Другие симптомы вызывают отмирание тканей растения, например, язвы и мягкую гниль, которые представляют собой впалые области, образованные мертвой тканью растения. В других случаях аномальный рост является симптомом, называемым галлами. Растения реагируют на указанные бактериальные заражения, быстро продуцируя обилие новых клеток.

Бактерии могут распространяться несколькими способами, включая насекомых, брызги воды, другие больные растения или инструменты. Они проникают в растения через крошечные отверстия или через повреждения, или порезы, но также через естественные отверстия в самом растении.

После поражения растений процесс может быть трудно контролировать.

#### Грибки

Как и в случае бактерий, большинство грибов являются полезными, но в отличие от бактерий существуют тысячи грибов, которые вредны для растений. Поскольку грибки присутствуют в почве и на поверхности земли, симптомы грибкового поражения могут проявляться на поверхности земли и под ней. Они включают гниющие или мертвые корни или большие отеки на корнях под землей. На уровне почвы новые стебли семян могут гнить и переворачиваться. Над уровнем почвы растения могут демонстрировать пятнистость листьев, милдью (белые или серые мучнистые пятна на листе), ржавчины и увядания.

Грибковые споры очень мелкие и легкие и могут распространяться на большие расстояния по воздуху, заражая другие растения или деревья. Они также распространяются водой, животными, насекомыми и людьми.

#### Вирусы

Даже вирусы в некоторых случаях могут являться полезными, но, как правило, не являются. Они могут сохраняться в течение многих лет, прежде чем приведут к появлению проблем, и, когда это происходит, они часто проявляют себя одним из нескольких основных способов. В первую очередь, листья растений могут выглядеть желтыми, или они могут выглядеть, как мозаичные пятна желтого, светло-зеленого или белого цвета. Также растение может выглядеть чахлым. Кроме того, растения часто деформируются. В частности, листья могут быть скрученными, набухшими или сморщенными, или они могут быть аномально узкими.

В отличие от бактерий и грибов вирусы не переносятся водой или ветром. Вместо этого они должны физически попасть в растение. Одним из наиболее распространенных переносчиков вирусов являются насекомые. Насекомые питаются зараженными растениями и передают вирусы здоровым растениям при поедании их. Другие способы включают размножение растений, контакт с людьми и зараженные семена.

К сожалению, после заражения не существует химических средств для уничтожения вируса. После обнаружения следует удалить все подозрительные растения. Хотя это может показаться радикальными мерами, это наиболее эффективный способ сокращения продолжающегося распространения.

Таким образом, наблюдается необходимость в способе, позволяющем эффективно противостоять указанным микроорганизмам, при этом сохраняя растения и окружающую среду, а также являющемся простым в применении и безопасным для пользователей.

### Краткое описание изобретения

Указанную выше цель достигают путем применения фракции лигнина в качестве антифитопатогенного агента, как заявлено в п.1 формулы изобретения.

В связи с этим настоящее изобретение также относится к способу защиты растений от фитопатогенов, при этом указанный способ включает стадии:

- i) обеспечения фракции лигнина согласно настоящему изобретению, и
- ii) нанесения фракции лигнина на растение или почву растения.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антифитопатогенным композициям, содержащим указанную фракцию лигнина и подходящие агрохимические добавки.

В другом аспекте настоящее изобретение также относится к способу защиты растений от фитопатогенов, при этом указанный способ включает стадии:

a) обеспечения антифитопатогенной композиции согласно настоящему изобретению, и

b) нанесения антифитопатогенной композиции на растение или почву растения. Характеристики и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из следующего подробного описания и из демонстрационных примеров, представленных в иллюстративных целях.

#### Подробное описание изобретения

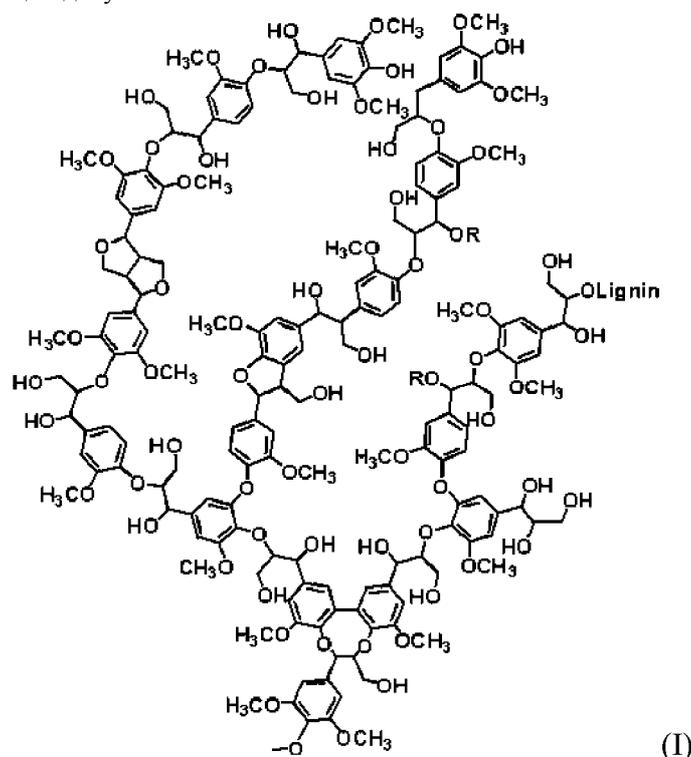
Таким образом, объектом настоящего изобретения является применение фракции лигнина в качестве антифитопатогенного агента, где указанная фракция лигнина содержит фрагменты, имеющие среднюю молекулярную массу до 6000 Да, измеренную путем гель-проникающей хроматографии.

Лигнин представляет собой класс сложных органических полимеров, которые образуют важные структурные материалы в опорных тканях некоторых водорослей, сосудистых растений, включая их кору, и травянистых растений, таких как древесина (т.е. древесина мягких и твердых пород), солома всех злаков, жом сахарного тростника, трава, лен, джут, пенька или хлопок. Лигнин также может иметь минеральное происхождение, такое как торф, леонардит и каменный уголь.

Химически лигнин является очень нерегулярным, случайно сшитым полимером из фенилпропано-вых звеньев, соединенных многими различными связями, со средней молекулярной массой 20000 Да или более. Указанный полимер является результатом опосредованной ферментами полимеризации с дегидрогенированием трех предшественников фенилпропаноидного мономера, т.е. кониферилового, синапового и кумарилового спиртов.

Кониферилловый спирт встречается во всех видах и является доминирующим мономером у хвойных (древесины мягких пород). Лиственные (древесины твердых пород) виды содержат до 40% звеньев сиреневого спирта, тогда как травы и сельскохозяйственные культуры могут также содержать звенья кумарилового спирта.

Типичный и иллюстративный фрагмент лигнина (I), содержащий наиболее важные схемы связывания, приведен в настоящем документе ниже:



Под выражением "по существу чистый лигнин" следует понимать по меньшей мере 90% чистый лигнин, предпочтительно по меньшей мере 95% чистый лигнин, при этом остальное составляют экстрактивные вещества и углеводы, такие как гемицеллюлозы, а также неорганические вещества.

Под выражением "крафт-лигнин" следует понимать лигнин, который получают из черного щелока крафт-варки. Черный щелок представляет собой щелочной водный раствор остатков лигнина, гемицеллюлозы и неорганических химических веществ, применяемых в крафт-варке. Черный щелок, полученный путем варки, содержит компоненты, получаемые из разных пород мягкой и твердой древесины, в различных пропорциях. Лигнин можно отделять от черного щелока различными способами, включая, например, осаждение и фильтрование. Лигнин обычно начинает осаждаться при значениях pH ниже 11-12. Различные значения pH можно применять для осаждения фракций лигнина с различными свойствами. Указанные фракции лигнина могут отличаться друг от друга молекулярно-массовым распределением, например,  $M_w$  и  $M_n$ , полидисперсностью, содержанием гемицеллюлозы и экстрактивных веществ, содержанием неорганического материала. Осажденный лигнин можно очищать от неорганических примесей, гемицеллюлозы и древесных экстрактивных веществ с применением стадий кислотной промывки. Дальнейшую очистку можно проводить путем фильтрования.

Альтернативно лигнин выделяют из чистой биомассы. Процесс выделения можно начинать с разжижения биомассы при помощи сильной щелочи с последующим процессом нейтрализации. После щелочной обработки лигнин можно осаждать способом, аналогичным представленному выше.

Альтернативно выделение лигнина из биомассы включает стадию ферментативной обработки. Ферментативная обработка модифицирует лигнин, экстрагируемый из биомассы. Лигнин, выделяемый из чистой биомассы, по существу не содержит серы (содержание серы менее 3%) и, следовательно, подходит для дальнейшей переработки.

Предпочтительно лигнин, выделяемый таким образом, также подвергают процессу деполимеризации для дополнительного снижения среднemasсовой молекулярной массы фрагментов.

Предпочтительно лигнин, выделяемый таким образом, также подвергают процессу деполимеризации для дополнительного снижения массы и среднечисленной молекулярной массы фрагментов.

Подходящие процессы деполимеризации включают деполимеризацию, катализируемую основанием, деполимеризацию, катализируемую кислотой, деполимеризацию, катализируемую металлом, деполимеризацию с применением ионогенных жидкостей и деполимеризацию лигнина с применением сверхкритических жидкостей.

В предпочтительных вариантах реализации указанную фракцию лигнина получают путем деполимеризации, катализируемой основанием.

Предпочтительно указанную фракцию лигнина получают путем катализируемой основанием деполимеризации выделяемого лигнина при температуре ниже 300°C и давлении ниже 30 МПа.

pH устанавливают между 11 и 14 путем добавления основания, такого как NaOH, KOH, Ca(OH)<sub>2</sub>, LiOH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> или их смеси.

Для целей настоящего изобретения среднemasсовую молекулярную массу ( $M_w$ ) фрагментов во фракции лигнина измеряют путем гель-проникающей хроматографии (или "ГПХ"). В ГПХ применяют неподвижную жидкость, присутствующую в порах пузырьковой неподвижной фазы, и движущуюся жидкость в качестве подвижной фазы. Таким образом, подвижная фаза может протекать между пузырьками и может входить и выходить из пор пузырьков. Механизм разделения основан на размере молекул полимера в растворе. Более крупные молекулы элюируются первыми. Небольшим молекулам, которые могут проникать во многие поры в пузырьках, требуется много времени на прохождение через колонку и, следовательно, они выходят из колонки медленно. Для определения молекулярных масс компонентов образца полимера необходимо провести калибровку со стандартными полимерами с известной массой. Затем значения неизвестного образца сравнивают с калибровочным графиком. Время удерживания зависит от применяемого материала колонки, элюента и от того, насколько применяемые стандарты похожи на образцы. В настоящем изобретении элюент предпочтительно представляет собой 0,1 М раствор NaOH.

Фракция лигнина согласно настоящему изобретению неожиданно оказалась очень эффективной в отношении фитопатогенов, поражающих растения и сельскохозяйственные культуры, даже в подходящих низких концентрациях, как будет показано в примерах.

Для целей настоящего изобретения термин "фитопатоген" обозначает организм, паразитирующий на растении-хозяине и вызывающий, таким образом, почвенную болезнь или инфекцию, при этом указанный организм представляет собой бактерию, грибки, оомицеты или вирус.

Термин "растение" обозначает растение или растения, которые можно выращивать и собирать для получения прибыли или пропитания, и, таким образом, включает сельскохозяйственные культуры, злаки, овощи, фрукты и цветы, а также растения, выращиваемые и собираемые для садоводства или личного использования.

Термин "почва растения" обозначает почву, в которой растение растет, или в которой растение посеяно, или в которой растение будет посеяно, и, таким образом, включает почвы, земли и беспочвенные среды, такие как применяемые для гидрокультур и в гидропонике.

В частности, указанную фракцию лигнина можно применять в качестве антифитопатогенного аген-

та против бактерии, грибов, оомицетов или вируса.

В связи с этим указанную фракцию лигнина можно применять в качестве антифитопатогенного агента против бактерий, таких как *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas arboricola*, *Xanthomonas campestris*,

против патогенных грибов, таких как *Botrytis cinerea*, *Cercospora beticola*, *Zymoseptoria tritici*, *Fusarium solani*, *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani*, *Monilia laxa*, Anthracnose of turfgrass, Apple powdery mildew, Apple scab, Black knot, Black sigatoka, Blackleg of oilseed rape, Brown rot of stone fruits, Dollar spot of turfgrass, Dutch elm disease, Early blight of Potato and Tomato, Ergot of rye, Fusarium head blight, Fusarium wilt of watermelon and other cucurbits, Leucostoma canker of stone fruits, Monosporascus root rot, Mummy Berry, Rice blast, Septoria tritici blotch (STB) of wheat, Sudden death syndrome of soybean, Take-all root rot, Tan spot of cereals, Verticillium wilt, White mold (Sclerotinia), Armillaria root disease, shoestring root rot, Brown root rot, Coffee rust, Common smut of corn, Daylily rust, Rhizoctonia diseases of turfgrass, Southern blight, southern stem blight, white mold, Soybean rust, Stem rust of wheat, Stinking smut of wheat, Wheat Stem Rust, White pine blister rust,

против оомицетов, таких как *Phytophthora infestans*, *Plasmopara viticola*, *Aphanomyces* root rot or common root rot of legumes, Black shank of tobacco, Downy mildew of cucurbits, Downy mildew of grape, Late blight of potato and tomato, Phytophthora blight of cucurbits, Phytophthora root and stem rot of soybean, Pythium blight of turfgrass, Sudden oak death and ramorum blight, Taro leaf blight, Rapid Blight of Turfgrass, и

против вирусов, включая вириды и вирусоподобные организмы. Большинство вирусов растений имеют небольшие, одноцепочечные РНК-геномы. Тем не менее, некоторые вирусы растений также имеют двухцепочечные РНК-геномы или одно- или двухцепочечные ДНК-геномы. Указанные геномы могут кодировать только три или четыре белка: репликазу, белок оболочки, транспортный белок, позволяющий клетке перемещаться через плазмодесмы, и иногда белок, который позволяет осуществлять передачу при помощи носителя. Вирусы растений могут содержать еще несколько белков и могут использовать множество различных способов молекулярной трансляции.

Вирусы растений обычно передаются от растения к растению при помощи носителя, но также наблюдается механическая передача и передача через семена. Передача при помощи носителя часто осуществляется насекомыми (например, афидами), но иногда носителями вирусов являются грибки, нематоды и простейшие. Во многих случаях насекомое и вирус являются специфичными для передачи вируса, например, цикада свекловичная, которая передает вирус курчавости верхушки, вызывающий болезнь у некоторых видов сельскохозяйственных культур.

Предпочтительно указанная фракция лигнина содержит фрагменты, имеющие среднюю молекулярную массу до 5500 Да.

В предпочтительных вариантах реализации указанная фракция лигнина содержит фрагменты, имеющие среднюю молекулярную массу до 5000 Да.

В некоторых вариантах реализации указанная фракция лигнина содержит фрагменты, имеющие среднюю молекулярную массу до 90 Да.

В предпочтительных вариантах реализации указанная фракция лигнина содержит фрагменты, имеющие среднюю молекулярную массу от 90 до 6000 Да, предпочтительно имеющие среднюю молекулярную массу от 90 до 5500 Да, более предпочтительно имеющие среднюю молекулярную массу от 90 до 5000 Да.

Предпочтительно в указанных вариантах реализации указанные фрагменты содержат до 33 фенилпропановых звеньев в расчете на среднюю молекулярную массу, более предпочтительно до 28 фенилпропановых звеньев в расчете на среднюю молекулярную массу.

Молекулярная масса трех предшественников фенилпропаноидного мономера варьируется между 150 Да для кумарилового спирта, 180 Да для кониферилового спирта и 210 г/моль для сиреневого спирта. Следовательно, средняя масса составляет 180 Да, и указанное значение применяют в качестве "фенилпропанового звена". Значения  $M_w$  делят на 180 Да, получая таким образом количество фенилпропановых звеньев в расчете на среднюю молекулярную массу.

Особенно предпочтительные варианты реализации представляют собой варианты реализации, в которых указанная фракция лигнина содержит фрагменты, имеющие среднюю молекулярную массу от 90 до 5000 Да и от 1 до 28 фенилпропановых звеньев в расчете на среднюю молекулярную массу.

В других вариантах реализации фракция лигнина содержит фрагменты, имеющие среднюю молекулярную массу ( $M_n$ ) до 2000 Да.

Для целей настоящего изобретения среднюю молекулярную массу ( $M_n$ ) фрагментов во фракции лигнина измеряли путем гель-проникающей хроматографии. Предпочтительно фракция лигнина содержит фрагменты, имеющие среднюю молекулярную массу ( $M_n$ ) до 1500 Да.

Не желая ограничиваться теорией, полагают, что более низкие средние молекулярные массы означают более активные молекулы. Это обусловлено тем, что более низкие молекулярные массы означают более мелкие фрагменты, и более мелкие фрагменты означают менее сшитые/более короткие фрагменты, и менее сшитые/более короткие фрагменты означают более количество свободных функциональных групп на них, и, следовательно, более реакционноспособные фрагменты.

Кроме того, полагают, что более мелкие молекулы могут легко проходить через клеточную мембрану фитопатогенов и диффундировать в них, таким образом значительно повышая общую эффективность фракции лигнина.

Предпочтительно в указанных вариантах реализации указанные фрагменты содержат до 15 фенилпропановых звеньев в расчете на среднечисленную массу, более предпочтительно до 9 фенилпропановых звеньев в расчете на среднечисленную массу.

Молекулярная масса трех предшественников фенилпропаноидного мономера варьируется между 150 Да для кумарилового спирта, 180 Да для кониферилового спирта и 210 г/моль для сиреневого спирта. Следовательно, средняя масса составляет 180 Да, и указанное значение применяют в качестве "фенилпропанового звена". Значения  $M_n$  делили на 180 Да, получая таким образом количество фенилпропановых звеньев в расчете на среднечисленную массу.

В предпочтительных вариантах реализации указанная фракция лигнина содержит фрагменты, имеющие среднечисленную молекулярную массу ( $M_w$ ) от 90 до 5000 Да, и фрагменты, имеющие среднечисленную молекулярную массу ( $M_n$ ) до 1500 Да.

Более предпочтительно указанная фракция лигнина содержит фрагменты, имеющие среднечисленную молекулярную массу ( $M_w$ ) от 90 до 5000 Да и от 1 до 28 фенилпропановых звеньев в расчете на среднечисленную массу, и фрагменты, имеющие среднечисленную молекулярную массу ( $M_n$ ) до 1500 Да и до 11 фенилпропановых звеньев в расчете на среднечисленную массу.

В других вариантах реализации фракция лигнина имеет коэффициент полидисперсности (PDI) от 2 до 6.

Коэффициент полидисперсности (PDI), или коэффициент гетерогенности, или просто дисперсность, представляет собой меру распределения молекулярной массы в данном образце полимера. PDI представляет собой среднечисленную молекулярную массу ( $M_w$ ), деленную на среднечисленную молекулярную массу ( $M_n$ ). Он указывает на распределение отдельных молекулярных масс в партии полимеров.

Особенно предпочтительные варианты реализации представляют собой варианты реализации, в которых указанная фракция лигнина содержит фрагменты, имеющие среднечисленную молекулярную массу ( $M_w$ ) от 90 до 5000 Да и от 1 до 28 фенилпропановых звеньев в расчете на среднечисленную массу, и в которых указанная фракция лигнина имеет коэффициент полидисперсности от 2 до 6.

Особенно предпочтительные варианты реализации также представляют собой варианты реализации, в которых указанная фракция лигнина содержит фрагменты, имеющие среднечисленную молекулярную массу ( $M_n$ ) до 2000 Да и до 11 фенилпропановых звеньев в расчете на среднечисленную массу, и в которых указанная фракция лигнина имеет коэффициент полидисперсности от 2 до 6.

Наиболее предпочтительные варианты реализации представляют собой варианты реализации, в которых указанная фракция лигнина содержит фрагменты, имеющие среднечисленную молекулярную массу ( $M_w$ ) от 90 до 5000 Да и от 1 до 28 фенилпропановых звеньев в расчете на среднечисленную массу, и среднечисленную молекулярную массу ( $M_n$ ) до 2000 Да и до 11 фенилпропановых звеньев в расчете на среднечисленную массу, и в которых указанная фракция лигнина имеет коэффициент полидисперсности от 2 до 6.

Фракция лигнина эффективна даже в очень небольших количествах, т.е. в количестве менее 20000 г/га, предпочтительно менее 5000 г/га, более предпочтительно в количестве 2000-4000 г/га.

Фракция лигнина может находиться в твердой или жидкой форме.

Когда фракция лигнина находится в твердой форме, указанная твердая форма может представлять собой таблетку, минитаблетку, микропланшетку, гранулу, микрогранулу, пилюлю, множество частиц, микронизированные частицы или порошок.

Когда фракция лигнина находится в жидкой форме, указанная жидкая форма может представлять собой раствор растворителя.

Подходящие растворители представляют собой воду, гликоли, спирты, полиспирты, альдегиды, кетоны, органические кислоты, ДМСО и их комбинации.

Предпочтительные растворители представляют собой воду, метанол, этанол, н-пропанол, изопропанол, н-бутанол, изобутанол, аллиловый спирт, 1,2-пропиленгликоль, 1,3-пропиленгликоль, 1,2-этиленгликоль, полиэтиленгликоль (ПЭГ), бензиловый спирт, глицерин, ацетон, молочную кислоту, полимолочную кислоту, ДМСО и их смеси.

Более предпочтительные растворители представляют собой воду, 1,2-пропиленгликоль, 1,3-пропиленгликоль, 1,2-этиленгликоль, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и их смеси.

В наиболее предпочтительных вариантах реализации растворитель представляет собой воду.

Предпочтительно фракцию лигнина в качестве антифитопатогенного агента применяют в концентрации менее 1000 г/100 л растворителя, более предпочтительно менее 500 г/100 л растворителя.

Настоящее изобретение также относится к способу защиты растений от фитопатогенов, при этом указанный способ включает стадии:

- i) обеспечения фракции лигнина, как описано выше,
- ii) нанесения фракции лигнина на растение или почву растения.

На стадии i) фракцию лигнина получают в твердой или жидкой форме, как описано выше.

На стадии ii) фракцию лигнина можно наносить, как таковую, т.е. в форме, представленной на стадии i), или можно предварительно разбавлять в воде.

В некоторых вариантах реализации на стадии ii) фракция лигнина находится в твердой форме, например, в форме порошка, и ее наносят, как таковую, на растение или почву растения.

В других вариантах реализации нанесение фракции лигнина на стадии ii) осуществляют путем разбавления в воде фракции лигнина, полученной на стадии i), и распыления полученного раствора на растение в разное время в ходе развития растения в соответствии с параметрами роста патогенов, или на почву растения, например, до или после посева. Более предпочтительно фракцию лигнина разбавляют в воде в концентрации менее 1000 г/100 л воды, предпочтительно менее 500 г/100 л воды.

Предпочтительно фракцию лигнина наносят по меньшей мере один раз в год.

Более предпочтительно фракцию лигнина наносят на растение 1-10 раз в год.

В предпочтительных вариантах реализации способа фракцию лигнина на стадии ii) наносят на растение в количестве менее 20000 г/га, предпочтительно менее 5000 г/га, более предпочтительно в количестве 2000-4000 г/га. В особенно предпочтительных вариантах реализации фракцию лигнина на стадии ii) наносят на растение в количестве 3000 г/га.

Более предпочтительно фракцию лигнина наносят на почву растения 1-3 раза в год.

В предпочтительных вариантах реализации способа фракцию лигнина на стадии ii) наносят на почву растения в количестве менее 100000 г/га, предпочтительно менее 50000 г/га, более предпочтительно в количестве 20000-40000 г/га. В особенно предпочтительных вариантах реализации фракцию лигнина на стадии ii) наносят на почву растения в количестве 30000 г/га.

Фракцию лигнина можно применять, как таковую, непосредственно на растении или почве растения, как описано выше, или можно обеспечивать в виде композиции.

В связи с этим в дополнительном аспекте настоящее изобретение также относится к антифитопатогенной композиции, содержащей фракцию лигнина для применения, как описано выше, и подходящие агрохимические добавки.

Указанная антифитопатогенная композиция может находиться в твердой или жидкой форме.

Если антифитопатогенная композиция находится в твердой форме, указанная твердая форма может представлять собой таблетку, минитаблетку, микротаблетку, гранулу, микрогранулу, пилюлю, множество частиц, микронизированные частицы или порошок.

Если антифитопатогенная композиция находится в твердой форме, указанная твердая форма содержит плотность до 99 мас.% фракции лигнина, предпочтительно 5-90 мас.% фракции лигнина.

Если антифитопатогенная композиция находится в жидкой форме, указанная жидкая форма может представлять собой раствор, эмульсию, дисперсию, суспензию, гель, капли или спрей.

Если антифитопатогенная композиция находится в жидкой форме, указанная жидкая форма содержит до 50 мас.% фракции лигнина, предпочтительно 1-25 мас.% фракции лигнина. Это означает, что композиция представляет собой концентрат, который можно подходящим образом разбавлять в воде перед применением на растении или почве растения.

Подходящие агрохимические добавки представляют собой регуляторы pH, регуляторы кислотности, регуляторы жесткости воды, минеральные масла, растительные масла, удобрения, листовой навоз, эмульгаторы, усилители клейкости, смачивающие агенты и их комбинации.

Антифитопатогенная композиция может дополнительно содержать растворитель.

Подходящие растворители представляют собой воду, гликоли, спирты, полиспирты, альдегиды, кетоны, органические кислоты, ДМСО и их комбинации.

Предпочтительные растворители представляют собой воду, метанол, этанол, n-пропанол, изопропанол, n-бутанол, изобутанол, аллиловый спирт, 1,2-пропиленгликоль, 1,3-пропиленгликоль, 1,2-этиленгликоль, полиэтиленгликоль (ПЭГ), бензиловый спирт, глицерин, ацетон, молочную кислоту, полимолочную кислоту, ДМСО и их смеси.

Более предпочтительные растворители представляют собой воду, 1,2-пропиленгликоль, 1,3-пропиленгликоль, 1,2-этиленгликоль, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и их смеси.

Антифитопатогенные композиции, описанные выше, можно применять в способе защиты растений от фитопатогенов, при этом указанный способ включает стадии:

а) обеспечения антифитопатогенной композиции согласно настоящему изобретению, и

б) нанесения антифитопатогенной композиции на растение или почву растения.

На стадии а) антифитопатогенную композицию получают в твердой или жидкой форме, как описано выше.

На стадии б) антифитопатогенную композицию можно наносить, как таковую, т.е. в форме, представленной на стадии а), или можно предварительно разбавлять в воде.

В некоторых вариантах реализации на стадии б) антифитопатогенная композиция находится в твердой форме, например, в форме порошка, и ее наносят, как таковую, на растение или почву растения.

В других вариантах реализации нанесения антифитопатогенной композиции на стадии б) осуществляют путем разбавления композиции в воде с последующим распылением полученного раствора на растение в разное время в ходе развития растения в соответствии с параметрами роста патогенов, или на

почву растения, например, до или после посева. Более предпочтительно на стадии б) разбавление композиции в воде приводит к концентрации фракции лигнина менее 1000 г/100 л воды, предпочтительно менее 500 г/100 л воды.

Предпочтительно антифитопатогенную композицию наносят по меньшей мере один раз в год.

Более предпочтительно антифитопатогенную композицию наносят на растение 1-10 раз в год.

В предпочтительных вариантах реализации способа антифитопатогенную композицию на стадии б) наносят на растение таким образом, чтобы достигать количества фракции лигнина менее 20000 г/га, предпочтительно менее 5000 г/га, более предпочтительно количества 2000-4000 г/га. В особенно предпочтительных вариантах реализации антифитопатогенную композицию на стадии б) наносят на растение таким образом, чтобы достигать количества фракции лигнина 3000 г/га.

Более предпочтительно антифитопатогенную композицию наносят на почву растения 1-3 раза в год.

В предпочтительных вариантах реализации способа антифитопатогенную композицию на стадии б) наносят на почву растения таким образом, чтобы достигать количества фракции лигнина менее 100000 г/га, предпочтительно менее 50000 г/га, более предпочтительно в количестве 20000-40000 г/га. В особенно предпочтительных вариантах реализации антифитопатогенную композицию на стадии б) наносят на почву растения таким образом, чтобы достигать количества фракции лигнина 30000 г/га.

Следует понимать, что все аспекты, определенные, как предпочтительные и выгодные для применения фракции лигнина, следует рассматривать, как также одинаково предпочтительные и выгодные для способов защиты растений, антифитопатогенных композиций и их применений.

Также следует понимать, что все комбинации предпочтительных аспектов применения фракции лигнина согласно настоящему изобретению, а также способов защиты растений, антифитопатогенных композиций и их применений, как указано выше, следует считать описанными в настоящем документе.

Ниже приведены демонстрационные примеры согласно настоящему изобретению, приведенные в иллюстративных целях.

### Примеры

$M_w$  и  $M_n$  в указанных примерах измеряли путем гель-проникающей хроматографии в соответствии со следующей процедурой.

Реагенты и материалы

Элюент: 0,1 М раствор NaOH, расход 0,5 мл/мин.

Калибровка для детектора показателя преломления: стандарты пуллулана,  $M_p$ : 100000 - 1080 (шесть стандартов), где  $M_p$  представляет собой максимальный пик молекулярной массы.

Калибровка для УФ-детектора (280 нм): стандарты PSS, натриевая соль полистиролсульфоната,  $M_p$  65400 - 891 (шесть стандартов). Стандартны растворяли в ультрачистой воде, концентрация должна составлять примерно 5 мг/мл. Объем инъекции составлял примерно 20 мкл.

Образцы контроля качества: применяли лигнин с известным распределением  $M_w$ .

Оборудование и инструменты

Автодозатор Dionex Ultimate 3000 Autosampler, колоночное отделение и насос.

Детектор на диодной матрице Dionex Ultimate 3000 Diode Array Detector.

Детектор показателя преломления: Shodex RI-101.

Колонки: колонки PSS MCX: предколонка и две аналитические колонки: 1000 Å и 100000 Å, материалом колонки являлась матрица сульфированного сополимера дивинилбензола.

0,45 мкм шприцевые фильтры и стеклянные колбы для стандартных проб. Фильтрация образца: бесшприцевое фильтровальное устройство Mini-Uniprep из ПТФЭ или нейлона, 0,45 мкм. При необходимости для предварительного фильтрования применяли 5 мкм шприцевый фильтр.

Мерные колбы.

Процедура

Приготовление элюента.

В идеале, вода, применяемая для приготовления элюентов, должна представлять собой высококачественную деионизированную воду с низким удельным сопротивлением (18 МОм·см или менее), которая содержит как можно меньше растворенного диоксида углерода. Вода не должна содержать биологических загрязнений (например, бактерий и плесневых грибов) и твердых частиц.

Промывание иглы 10% смесью MeOH-вода.

Жидкие образцы.

Сильнощелочные растворы образцов разбавляли 1:100 и фильтровали во флаконы при помощи шприцевых фильтров из ПТФЭ (0,45 мкм). Образцы твердого лигнина растворяли и разбавляли в 0,1 М растворе NaOH и фильтровали при помощи 0,45 мкм шприцевых фильтров из ПТФЭ. Готовые образцы загружали в автодозатор. Объем инъекции составлял примерно 20 мкл. После образцов вводили 1 М раствор NaOH в качестве образца для очистки колонки.

Параметры прибора:

расход: 0,5 мл/мин,

элюент: 0,1 М раствор NaOH,

температура колоночного термостата: 30°C,

изократический режим,  
 время анализа: 48 мин,  
 твердые образцы.

При необходимости твердые образцы (лигнин) сушили в течение ночи в сушильном шкафу при 60°C. Примерно 10 мг взвешивали в 10 мл мерной колбе. Образец растворяли и разбавляли в 0,1 М растворе NaOH и заполняли до метки. Образец фильтровали при помощи 0,45 мкм фильтров из ПТФЭ. Если образец не растворялся должным образом, его помещали в ультразвуковую водяную баню или фильтровали через 5 мкм шприцевой фильтр.

Стандартные образцы для калибровки.

Примерно 50 мг каждого из стандартов взвешивали в 10 мл мерной колбе, добавляли ультрачистую воду до метки. Стандарты фильтровали при помощи 0,45 мкм шприцевых фильтров из ПТФЭ. После применения калибровочных образцов результаты калибровки интегрировали и обрабатывали при помощи метода обработки и сохраняли. Калибровка представляла собой линейную калибровку 1-го порядка.

Образцы контроля качества.

Для образцов лигнина в качестве образца контроля качества применяли лигнин с известным распределением  $M_w$ . Лигнин растворяли в 0,1 М растворе NaOH, и концентрация составляла примерно 1 мг/мл.

Пример 1

Следующую фракцию лигнина экстрагировали из черного щелока крафт-варки, при этом указанная фракция лигнина имела следующие характеристики:

>95% от общего содержания твердых веществ

Единственная порода: Южная сосна

$M_w$  4400-5000 Да (24-28 фенилпропановых звеньев)

$M_n$  1200-1300 Да (6-7 фенилпропановых звеньев)

Структуры ОН-групп:

алифатическая	2,1 ммоль/г
карбоновая	0,5 ммоль/г
конденсированная и сиригильная	1,7 ммоль/г
гваяциловая	2,0 ммоль/г
катехольная и <i>n</i> -ОН-фенильная	4,0 ммоль/г

Пример 1а

100 г указанной выше фракции лигнина (10 мас.%/мас.%) подвергали горячему смешиванию с 840 г 1,3-пропиленгликоля и 60 г NH<sub>4</sub>OH (30% раствор).

Смесь охлаждали до комнатной температуры, а затем отфильтровывали, получая таким образом черный раствор (сокращенно называемый "OX11").

Пример 1б

100 г указанной выше фракции лигнина (10 мас.%/мас.%) подвергали горячему смешиванию с 840 г 1,3-пропиленгликоля и 60 г NaOH (30% раствор).

Смесь охлаждали до комнатной температуры, а затем отфильтровывали, получая таким образом черный раствор (сокращенно называемый "OX10").

Пример 2

Лигнин из органосольвентного способа варки, полученный из древесины бука (*Fagus sylvatica*), подвергали катализируемой основанием деполимеризации ("BCD"). Процесс BCD проводили при 280°C и 250 бар в течение 8 мин при pH 12-14. Полученный продукт лигнина состоял из жидкой фракции и твердой фракции.

Затем указанные фракции разделяли.

Жидкая фракция лигнина представляла собой маслянистую жидкость и имела следующие характеристики:

Единственная порода: *Fagus sylvatica*

$M_w$  100-300 Да (1-2 фенилпропановых звеньев)

фенолы	0%
гваяколы	15-20%
сириголы	50-60%
катехолы и метоксикатехолы	5-10%
олигомеры/неизвестные	15-30%

Твердая фракция лигнина имела следующие характеристики:

Единственная порода: *Fagus sylvatica*

$M_w$  800-1500 Да (4-8 фенилпропановых звеньев)

$M_n$  300-700 Да (2-4 фенилпропановых звеньев)

Структуры ОН-групп:

алифатическая	0,2-0,4 ммоль/г
карбоновая	0,3-0,5 ммоль/г
конденсированная и сиригильная	1,0-2,0 ммоль/г
гваяциловая	0,4 ммоль/г
катехольная и <i>n</i> -ОН-фенильная	1,0-1,8 ммоль/г

Пример 2а

50 г указанной выше маслянистой фракции лигнина (5 мас.%/мас.%) подвергали горячему смешиванию с 950 г 1,3-пропиленгликоля и грели при 40-50°C.

Смесь охлаждали до комнатной температуры, получая таким образом вязкий раствор (сокращенно называемый "LMW12").

Пример 2b

100 г указанной выше твердой фракции лигнина (10 мас.%/мас.%) подвергали горячему смешиванию с 800 г 1,3-пропиленгликоля и 100 г NH<sub>4</sub>OH (30% раствор).

Смесь охлаждали до комнатной температуры, а затем отфильтровывали, получая таким образом черный раствор (сокращенно называемый "LMW11").

Пример 2с

100 г указанной выше твердой фракции лигнина (10 мас.%/мас.%) подвергали горячему смешиванию с 835 г 1,3-пропиленгликоля и 65 г KOH (20% раствор).

Смесь охлаждали до комнатной температуры, а затем отфильтровывали, получая таким образом черный раствор (сокращенно называемый "LMW10").

Пример 3

Антифитопатогенную активность продуктов из примеров 1-2 оценивали при помощи испытания *in vitro* на антимикробную чувствительность методом микроразведения в бульоне (протокол CLSI - Институт клинических и лабораторных стандартов). Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) семи продуктов (контроль, LMW 12, LMW 11, LMW 10, OX 12, OX 11 и OX 10) определяли в многолуночных планшетах, где контроль представлял собой индивидуальный 1,3-пропиленгликоль.

Антифитопатогенную активность продуктов исследовали на микроорганизмах (бактерии и грибки), перечисленных ниже.

Биоконтроль для специфического скрининга

Бактерии

*Erwinia amylovora*

*Xanthomonas arboricola*

*Xanthomonas campestris*

Грибки

*Fusarium solani*

*Alternaria solani*

*Botrytis cinerea*

*Monilia laxa*

Результаты

Измеренные и зарегистрированные рН испытываемых продуктов имели следующие значения:

Продукт	рН
контроль	5,7
LMW12	3,4
LMW11	10,5
LMW10	7,0
OX11	10,3
OX10	13,1

Из-за высокой изменчивости указанного параметра и возможного сильного влияния на показатели роста рассматриваемых микроорганизмов проводили несколько испытаний без какой-либо коррекции и с регулированием значения рН до 7 или 8.

Все испытания проводили в трех повторностях, получая очень близкие результаты ингибирования. Результаты приведены в таблице ниже.

Минимальная концентрация (мкг/мл) фракции лигнина для каждого из продуктов, при которой бактерия ингибируется			
	<i>E. amylovora</i>	<i>X. campestris</i>	<i>X. arboricola</i>
контроль	н/д	н/д	н/д
контроль pH 7	н/д	н/д	н/д
контроль pH 8	н/д	н/д	н/д
LMW12	5	45	295
LMW12 pH 7	145	295	295
LMW12 pH 8	45	45	195
LMW11	48	90	780
LMW11 pH 7	90	1170	390
LMW11 pH 8	390	390	590
LMW10	90	290	590
LMW10 pH 7	90	290	590
LMW10 pH 8	190	390	590
OX10	190	190	1560
OX10 pH 7	780	1170	780
OX10 pH 8	390	390	3120
OX11	190	390	3120
OX11 pH 7	2340	1560	3120
OX11 pH 8	390	390	6250

Минимальная концентрация (мкг/мл) фракции лигнина для каждого из продуктов, при которой грибок ингибируется				
	<i>F. solani</i>	<i>M. laxa</i>	<i>A. solani</i>	<i>B. cinerea</i>
контроль	н/д	н/д	н/д	н/д
контроль pH 7	н/д	н/д	н/д	н/д
контроль pH 8	н/д	н/д	н/д	н/д
LMW12	780	780	45	195
LMW12 pH 7	1560	2345	195	195
LMW12 pH 8	780	585	95	95
LMW11	3120	1560	3120	190
LMW11 pH 7	3120	3120	3120	590
LMW11 pH 8	1560	1560	1560	780
LMW10	3120	4690	2340	590
LMW10 pH 7	3120	4690	2340	590
LMW10 pH 8	3120	780	1560	390
OX10	6250	3120	1560	3120
OX10 pH 7	9400	9400	1560	1560
OX10 pH 8	18700	6250	1560	780
OX11	3120	1560	1560	3120
OX11 pH 7	18700	6250	3120	1560
OX11 pH 8	6250	3120	1560	780

В заключение, в следующих таблицах представлена оценка активностей:

	<i>E. amylovora</i>	<i>X. campestris</i>	<i>X. arboricola</i>
LMW12	****	****	***
LMW11	****	***	**
LMW10	***	***	***
OX11	***	***	**
OX10	***	***	**

	<i>F. solani</i>	<i>M. laxa</i>	<i>A. solani</i>	<i>B. cinerea</i>
LMW12	**	**	****	***
LMW11	**	**	**	***
LMW10	**	**	**	***
OX11	**	**	**	**
OX10	*	**	**	**

Приведенные выше звездочки представляют диапазон минимальной концентрации (мкг/мл) фракции лигнина для каждого из продуктов, при которой бактерия/грибок ингибируется: \* = от 250000 до 6250; \*\* = от 4690 до 780; \*\*\* = от 590 до 90; \*\*\*\* = от 73 до 12.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение фракции лигнина в качестве антифитопатогенного агента, где указанная фракция лигнина содержит фрагменты, имеющие среднemasсовую молекулярную массу до 5500 Да, измеренную путем гель-проникающей хроматографии, и имеющие среднечисленную молекулярную массу до 2000 Да, измеренную путем гель-проникающей хроматографии.

2. Применение по п.1, отличающееся тем, что фракция лигнина представляет собой антифитопатогенный агент против бактерии, грибков, оомицетов или вируса.

3. Применение по п.1 или 2, отличающееся тем, что фракция лигнина содержит фрагменты, имеющие среднemasсовую молекулярную массу до 5000 Да.

4. Применение по любому из пп.1-3, отличающееся тем, что фракция лигнина содержит фрагменты, имеющие среднечисленную молекулярную массу до 1500 Да.

5. Применение по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что фракция лигнина содержит фрагменты, имеющие среднemasсовую молекулярную массу от 90 до 5000 Да и имеющие среднечисленную молекулярную массу до 1500 Да.

6. Применение по любому из пп.1-5, отличающееся тем, что фракцию лигнина применяют в концентрации менее 1000 г/100 л воды, предпочтительно менее 500 г/100 л воды.

7. Способ защиты растений от фитопатогенов, включающий стадии:

i) обеспечения фракции лигнина, содержащей фрагменты, имеющие среднemasсовую молекулярную массу до 5500 Да, измеренную путем гель-проникающей хроматографии, и имеющие среднечисленную молекулярную массу до 2000 Да, измеренную путем гель-проникающей хроматографии, и

ii) нанесения фракции лигнина на растение или почву растения.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что фракция лигнина содержит фрагменты, имеющие среднemasсовую молекулярную массу до 5000 Да.

9. Способ по п.7 или 8, отличающийся тем, что фракция лигнина содержит фрагменты, имеющие среднечисленную молекулярную массу до 1500 Да.

10. Способ по любому из пп.7-9, отличающийся тем, что фракция лигнина содержит фрагменты, имеющие среднemasсовую молекулярную массу от 90 до 5000 Да, и имеющие среднечисленную молекулярную массу до 1500 Да.

11. Способ по любому из пп.7-10, отличающийся тем, что фракция лигнина на стадии i) имеет концентрацию менее 1000 г/100 л воды, предпочтительно менее 500 г/100 л воды.

12. Способ по любому из пп.7-11, отличающийся тем, что фракцию лигнина на стадии ii) наносят на растение в количестве менее 20000 г/га, предпочтительно менее 5000 г/га, или фракцию лигнина на стадии ii) наносят на почву растения в количестве менее 100000 г/га, предпочтительно менее 50000 г/га.

13. Антифитопатогенная композиция, содержащая:

фракцию лигнина, содержащую фрагменты, имеющие среднemasсовую молекулярную массу до 5500 Да, измеренную путем гель-проникающей хроматографии, и имеющие среднечисленную молекулярную массу до 2000 Да, измеренную путем гель-проникающей хроматографии, и агрохимические добавки.

14. Антифитопатогенная композиция по п.13, отличающаяся тем, что фракция лигнина содержит фрагменты, имеющие среднemasсовую молекулярную массу до 5000 Да.

15. Антифитопатогенная композиция по п.13 или 14, отличающаяся тем, что фракция лигнина содержит фрагменты, имеющие среднечисленную молекулярную массу до 1500 Да.

16. Антифитопатогенная композиция по любому из пп.13-15, отличающаяся тем, что фракция лиг-

нина содержит фрагменты, имеющие среднemasсовую молекулярную массу от 90 до 5000 Да и имеющие среднечисленную молекулярную массу до 1500 Да.

17. Антифитопатогенная композиция по любому из пп.13-16, содержащая фракцию лигнина в количестве до 500 г на 1 кг композиции, предпочтительно 10-250 г на 1 кг.

18. Антифитопатогенная композиция по любому из пп.13-17, дополнительно содержащая растворитель, выбранный из воды, метанола, этанола, н-пропанола, изопропанола, н-бутанола, изобутанола, аллилового спирта, 1,2-пропиленгликоля, 1,3-пропиленгликоля, 1,2-этиленгликоля, полиэтиленгликоля (ПЭГ), бензилового спирта, глицерина, ДМСО и их смесей.

19. Способ защиты растений от фитопатогенов, включающий стадии:

а) обеспечения антифитопатогенной композиции, содержащей фракцию лигнина, содержащую фрагменты, имеющие среднemasсовую молекулярную массу до 5500 Да, измеренную путем гель-проникающей хроматографии, и имеющие среднечисленную молекулярную массу до 2000 Да, измеренную путем гель-проникающей хроматографии, и агрохимические добавки, и

б) нанесения антифитопатогенной композиции на растение или почву растения.

20. Способ по п.19, отличающийся тем, что фракция лигнина содержит фрагменты, имеющие среднemasсовую молекулярную массу до 5000 Да.

21. Способ по п.19 или 20, отличающийся тем, что фракция лигнина содержит фрагменты, имеющие среднечисленную молекулярную массу до 1500 Да.

22. Способ по любому из пп.19-21, отличающийся тем, что фракция лигнина содержит фрагменты, имеющие среднemasсовую молекулярную массу от 90 до 5000 Да, и имеющие среднечисленную молекулярную массу до 1500 Да.

23. Способ по любому из пп.19-22, включающий фракцию лигнина в количестве до 500 г на 1 кг композиции, предпочтительно 10-250 г на 1 кг.

24. Способ по любому из пп.19-23, отличающийся тем, что антифитопатогенная композиция дополнительно содержит растворитель, выбранный из воды, метанола, этанола, н-пропанола, изопропанола, н-бутанола, изобутанола, аллилового спирта, 1,2-пропиленгликоля, 1,3-пропиленгликоля, 1,2-этиленгликоля, полиэтиленгликоля (ПЭГ), бензилового спирта, глицерина, ДМСО и их смесей.

