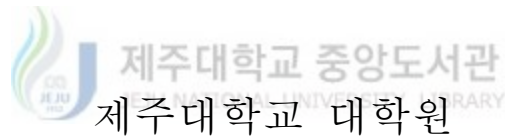


석사학위논문

키토산 엽면시비가 식물체내
질산성질소 감소 및 내병성 관련
단백질 유도에 미치는 영향



농화학과

이 종 욱

2003년 12월

Effect of Foliar Application of Chitosan on
Nitrate Accumulation and Pathogenesis-Related
Proteins Induction in Plants

Jong-Wook Lee

(Supervised by professor Key-Zung Riu)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF MASTER OF
AGRICULTURE

DEPARTMENT OF AGRICULTURAL CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2003. 12.

키토산 엽면시비가 식물체내
질산성질소 감소 및 내병성 관련
단백질 유도에 미치는 영향

지도교수 류 기 중

이 종 욱

이 논문을 농학 석사학위 논문으로 제출함



이종욱의 농학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 송 관 정 인

위 원 류 기 중 인

위 원 이 호 연 인

제주대학교 대학원

2003년 12월

목 차

Summary	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 상추의 질산성질소 축적에 관한 실험	
1) 식물체 준비	7
2) 키토산 유도체 준비	8
3) 키토산 처리 방법	10
① 키토산 유도체간 비교 실험	
② LT와 Mo 혼합 시비 실험	
③ LT 시비 농도별 비교 실험	
④ LT 시비 후 수확시기별 비교 실험	
4) 시료 전처리 및 NO_3^- 분석	11
2. 토마토와 고추에서 내병성 관련 단백질 유도 실험	
1) 식물체 준비	12
2) 키토산 유도체 준비 및 처리	12
3) 효소활성조사	13
① 식물체 채취	
② 조효소액 준비	
③ 효소활성분석	

Ⅲ. 결과 및 고찰	16
1. 키토산 엽면시비가 상추의 질산성질소 축적에 미치는 영향	
1) 키토산 유도체간 질산성질소 감소 효과	16
2) LT와 Mo 혼합 시비 효과	17
3) LT 시비 농도와 수확시기에 따른 효과	18
2. 키토산 엽면시비가 토마토와 고추에서 내병성 관련 단백질 유도에 미치는 영향	
1) Chitinase와 β -1,3-glucanase 활성 유도 효과	21
2) OT 처리와 peroxidase, β -1,3-glucanase, chitinase 활성 변화	24
① Peroxidase 활성 증진 효과	
② β -1,3-glucanase 활성 증진 효과	
③ Chitinase 활성 증진 효과	
Ⅳ. 요약	33
참고문헌	35



SUMMARY

This study was carried out to investigate the effect of chitosan derivatives on the accumulation of nitrate and induction of pathogenesis-related proteins in plants. Five types of partially or fully deacetylated chitosan derivatives (HS: high viscosity chitosan, LS: low viscosity chitosan, LT: low viscosity chitin, OS: oligo chitosan and OT: oligo chitin) were used.

Among the tested five types of chitosan, only LT reduced nitrate content in lettuce when the chitosan solution was foliar-applied together with molybdate. The nitrate content was decreased with increase of LT concentration over the range of 25 - 200ppm and the degree of nitrate reduction at 200ppm of LT was 19% compared to the control. No significant reduction of nitrate was observed until 3 days after LT treatment, however nitrate was reduced up to 35% at 9 days.

Effects of chitosan derivatives on pathogenesis-related(PR) proteins, chitinase and β -1,3-glucanase, induction were analyzed in tomato and pepper. Of the tested 5 types of chitosan, only OT elicited PR proteins, chitinase by 1.5 folds and β -1,3-glucanase by 1.3 folds compared to the control.

In the time-course experiments, OT-treated leaves showed increase of peroxidase, β -1,3-glucanase and chitinase activity. Compared with control, peroxidase activity was increased in tomato by 42%~79% at 3 to 5 days after OT spraying. But no peroxidase was induced in pepper.

The activities of β -1,3-glucanase at 1, 3 or 5 days after OT spraying were increased by 28%, 17% and 16%, respectively in tomato leaves. In pepper leaves, the highest increase, 32%, of β -1,3-glucanase activity was observed at 3 days after OT spraying.

Compared with control, chitinase activity in tomato was increased by 34% at 1 days after OT spraying. OT spraying at 1, 3 or 5 days before sampling increased chitinase activity in pepper leaves by 54%, 206% and 105%, respectively.

These results implied that certain chitosan derivatives might be used for the reduction of nitrate content in vegetables and for increase of plant resistance against biotic or abiotic stress through PR-proteins induction.



I. 서 론

키틴(chitin)은 N-acetyl-D-glucosamine(GlcNAc)이 β -(1-4) 결합으로 중합된 고분자 물질로 게껍질, 곤충의 껍질과 연체동물, 곰팡이 등의 세포벽 구성 물질이며, 키토산은 키틴을 탈아세틸화한 것을 말한다. 'Chitin'이라는 용어는 Greek 문자인 "chiton"(coat of mail)에서 유래하였고 1811년 Bradconnot에 의해 최초로 사용되었다. 키토산은 Rouget(1859)에 의해 처음 보고되었고, 키틴으로부터 키토산의 제조(Ribgy) 및 키토산의 결정구조에 관한 보고(Clark, Smith)가 연구의 시초였다. 키토산은 1960~1970년대 폐기물 처리 차원에서 산업적 이용이 본격적으로 연구되기 시작하였으며, 천연적으로 풍부하게 존재할 뿐 아니라 인축에 대한 독성이 없으며 생분해 될 수 있는 친환경적 특징 때문에 연구가 가속화되었다. 더욱이 최근에는 키토산에 대한 다양한 기능성이 밝혀지면서 연구 및 활용 영역이 넓어지고 있다(Li 등, 1997).

키틴/키토산의 농업 부문에 이용될 수 있는 대표적인 기능성으로는 항균성, 식물의 자기 방어 활성화 기능과 미네랄 흡수 촉진 기능이 있다. *Phytophthora cactorum*, *P. megaspema* 등에 대한 키토산의 생육 억제가 처음 보고된 이래(Allan 등, 1979), *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerear*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum* 등의 병원균에 대해서도 키토산의 항균 효과가 확인되었다(El-Ghaouth 등, 1992; Stossel 등, 1984; Shahide 등, 1999).

키토산은 항균성과 더불어 식물의 자기 방어 기능 활성화와 관련한 연구도 활발하게 진행되어 왔다(Benhamou, 1999; Shibuya, 1998; Kuchitsu 등, 1997; Lee 등, 1999; Kneer 등, 1999). 일일초(*Catharanthus roseus*) 현탁

세포와 원형질에 있어서 키토산 처리는 세포벽 성분인 callose(β -1,3-glucan) 형성을 촉진하여 식물 저항성을 증가시켰고(Kauss 등, 1989), chitosan oligomer가 콩에서 phytoalexin의 일종인 pisatin 생성을 촉진하였다(Kendra 등, 1984). 그리고 벼세포를 이용한 실험에서는 chitin oligomer 처리가 momilactone A 유도를 촉진하였고, 또한 키토산 유도체의 중합도에 따라 phytoalexin 유도 함량이 각각 다르게 나타났다(Yamada 등, 1993). 그리고 밀에서 분자량과 탈아세틸화도가 서로 다른 키토산 유도체를 처리하였을 때, phenylalanin ammonia-lyase, peroxidase 활성, lignin 생합성 유도 효과가 차이가 있었다(Vander 등, 1998).

토마토와 *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*의 상호작용에 대한 연구에서는 키토산 처리에 의해 병원성 미생물은 세포막 구조가 변화되어 생육이 억제되고 식물조직에서는 phenolic-like 화합물이 유도, 상피조직에 집적됨과 동시에 callose를 형성하여 물리적인 장벽을 구축하는 과정을 통해 병원성 미생물의 세포 내 침입이 저지된다고 하였다(Benhamou, 1998). 그리고 토마토, 양배추, 딸기에서 키토산의 항균성과 식물방어기능의 활성화를 이용하여 키토산 코팅 방법으로 병발생률을 감소시켰다(El-Ghaouth 등, 1994).

키토산의 또 다른 농업적 응용이 가능한 부분은 미네랄의 흡수 촉진과 관련한 부분이다. 평균분자량 300~50000Da를 갖는 수용성 키토산 조성물이 배추와 상추에서 Ca 흡수를 촉진하였다(Kato 등, 1993). 그리고 Shibuya(2000)는 결구상추에서 키토산 처리가 식물체내 Ca 함량을 12% 증가시켰다고 보고하였으며, 또한 상추와 배추에서 키토산과 molybdate을 동시 처리하였을 때 식물체내 molybdate 함량은 크게 증가시키고, 질산성 질소함량을 감소시킴으로써 키토산을 포함하는 저초산(低硝酸)화제 개발 가능성을 제안하였다. 특히 질산성질소는 소아 청색증(methemoglobinemia) 현상

의 유발과 발암물질로 알려진 nitrosamines 생성에도 관련된다는 사실 때문에 위해성 논란이 매우 큰 물질이다(Wolff 등, 1972). 농업 생산 현장에서 빈번히 일어나는 질소질 비료의 과용과 높은 채소 소비율로 인해 국내에서도 질산성질소의 축적 문제를 시비 기술의 개선을 통해 해결하려는 연구가 다수 진행되어 왔다(Sohn 등, 1993; Sohn 등, 1996).

토양 중에서 흡수되는 질산은 동화작용을 거쳐 유기화된다. 질산태질소의 환원 과정에 관여하는 질산환원효소(nitrate reductase)는 두 개의 전자를 NADH로부터 질산으로 전달하여 환원시키는 역할을 하며, FAD와 heme 등 두개의 보결족과, molybdate와 pterin으로 이루어진 MoCo cofactor를 포함하는 세포질 효소이다. 질산환원효소 활성은 cofactor를 구성하고 있는 Fe, Mo, Cu 등 미량 요소의 공급과 에너지원과 전자전달체로서 NADH의 생성에 의해 영향을 받는다(Guerrero 등, 1981). 따라서 적절한 미량요소의 공급과 광합성 활성을 증진시킨다면 질산환원효소 활성을 증진시킴으로써 체내 질산 함량을 줄일 수 있으리라 판단되고, 이러한 관점에서 적절한 미량 요소와 미량요소 흡수 및 식물 생육 촉진 기능을 갖고 있는 키토산과의 조합도 가능하리라 생각된다.

앞에서도 언급했듯이 키토산의 여러 기능성은 분자량과 탈아세틸화도로 대표되는 화학성에 크게 의존한다. 따라서 키토산의 농업적 이용 가능성을 올바르게 평가하기 위해서는 키토산의 화학성과 기능성간 상관관계를 추적하는 작업이 필요하리라 생각한다. 본 실험은 이와 같은 작업의 일환으로 화학성을 달리하는 키토산 유도체간 식물체내 질산성질소 축적과 Pathogenesis-Related(PR) proteins 유도를 통한 식물 저항성 증가에 미치는 영향을 조사하여 기능별 효과가 큰 키토산 유도체를 선발하였다. 그리고 선발된 유도체의 적절한 사용방법 도출과 새로운 농업 자재 개발에 필요한 기초자료를 얻기 위해, 질산성질소 축적 시험에서는 처리 농도 및

시기별, 저항성 유도 시험에서는 작물별, PR-proteins 별로 세분화하여 시험을 수행하였다. 본 시험에서 측정된 PR-proteins은 chitinase, β -1,3-glucanase, peroxidase로서 대표적인 식물 저항성 표지 효소들이다 (Bowles, 1990).



II. 재료 및 방법

1. 상추의 질산성질소 축적에 관한 실험

1) 식물체 준비

본 시험에 사용된 상추는 농우바이오 청치마상추(*Lactuca sativa* L. cv. chungchima) 종자를 구입하여 사용하였다. 종자를 72구 트레이에 구 당 2립씩 파종하여 24℃ 생육상에서 발아 후 3주 동안 성장시켰다. 4주차에 1a/20000 크기의 포트에 1주씩 이식하여 온실로 옮겨 6~7주차까지 키운 후 생장이 양호한 식물체를 선별하여 시험에 사용하였다. 파종 및 이식 시 사용된 재배 상토는 동부한농(주) “원예용상토”였다.

시비내용은 이식 시 석회고토 2g/pot 과 자체 제조한 미량요소 복합 비료(Table 1) 1mL/pot 를 투여하였다. 그리고 이식 2~3일 후 키토산 엽면 시비 전에 질산태질소와 암모니아태질소가 1:1로 배합된 N-P-K 액상 복합 비료(Table 2)를 7일 간격으로 10mL/pot, 2회 공급하였다. 단, “유도체 간 질산성질소 감소 효과” 시험에서는 미량요소를 투여하지 않았고 N-P-K 액상 비료 공급도 이식 후 15일 경과 후 10mL/pot, 키토산 엽면 시비 5일 후 5mL/pot 씩 각각 1회 투여하여 다른 시험과 시비 시기 및 시비량에 차이가 있었다.

Table 1. Composition of micro-nutrient fertilizer

Nutrients	Concentration(g/L)
FeEDTA	2.6
MnSO ₄ · H ₂ O	0.7
H ₃ BO ₃	0.98
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.056
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.056
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂ · 24H ₂ O	1.4

2) 키토산 유도체 준비

일반적인 키토산의 산업적 제조 과정을 요약하면, 우선 게나 새우의 껍질을 3~5 % 수산화나트륨 용액을 이용하여 단백질을 제거한다. 그리고 중화한 후 상온에서 3~5 % 염산 용액으로 칼슘과 색소를 제거하면 키토신이 된다. 키토신에 고온, 40~50 % 수산화나트륨을 첨가하여 반응 시간을 조절하면 분자량과 탈아세틸화도가 다른 키토산을 얻을 수 있다(Knorr, 1991; Hirano, 1996). 키토산에 효소 혹은 염산 용액을 처리하여 가수분해시키면 키토산 올리고머가 생성된다(김 등 1998).

본 실험에 사용된 키토산 유도체는 (주)건풍바이오에서 제공한 3종류와 알칼리 조건(pH 11)에서 무수초산 반응에 의해 탈아세틸화도를 변화시켜 얻은 물질 2종을 포함한 5종류였다(Table 3). (주)건풍바이오에서 제공된 키토산 유도체는 점도를 달리하는 고분자 키토산 2종류(HS: high viscosity chitosan, LS: low viscosity chitosan)와 고분자 키토산을 효소 분해하여 얻은 키토산올리고당(OS: oligo chitosan)이었다. 그리고 저점도 고분자 키토산과 키토산올리고당을 아세틸레이션 반응시켜 탈아세틸화도가 50 % 전후인 두 종류의 키토신을 얻었으며 그 세부 과정은 Fig. 1과 같았다(키토신, 키토산 연구회, 1991). 키토산 유도체의 탈아세틸화도는 0.0025N 폴리비닐황산칼륨(Wako chemical.) 시약을 이용하여 측정하였다(키토신, 키토산 연구회, 1995).

Table 2. Composition of macro-nutrient fertilizer

Nutrients	Concentration(%)
NH ₄ NO ₃	2.85
KH ₂ PO ₄	1.92
KCl	0.53
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.50
Water	94.20
Total	100

Table 3. Chitosan derivatives used in experiments

Type	Derivatives	Viscosity ¹⁾ (cp)	DA ²⁾ (%)	Origin
HS	High viscosity chitosan	1980	90	Kunpoong Bio.
LS	Low viscosity chitosan	30	91	Kunpoong Bio.
LT	Low viscosity chitin	-	54	From LS ³⁾
OS	Oligo chitosan	-	88	Kunpoong Bio.
OT	Oligo chitin	-	48	From OS ³⁾

- 1) Viscosity of 1% chitosan solution dissolved in 0.5% acetic acid.
- 2) Degree of acetylation determined by titration method with potassium polyvinyl sulfate solution
- 3) Acetylation of chitosan with acetic anhydride

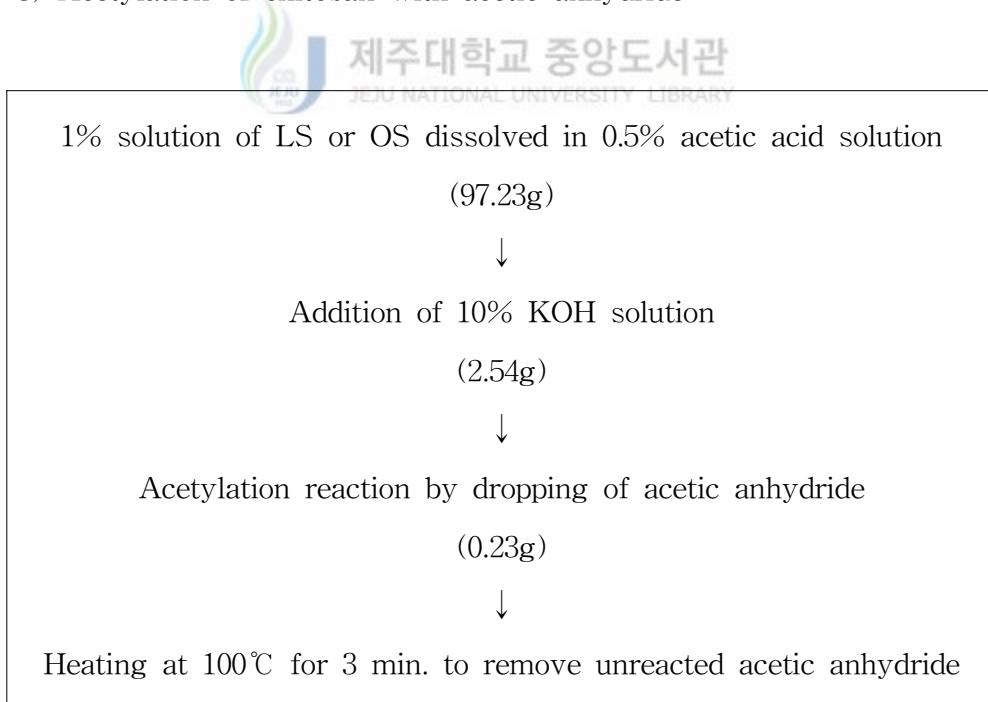


Fig. 1. Acetylation of chitosan

3) 키토산 처리 방법

① 키토산 유도체간 비교 실험

준비된 5종류의 키토산 유도체를 0.5% 초산 용액에 glucosamine 함량으로 1% 용액을 각각 만들었다(“용액 1”). 그리고 암모늄몰리브데이트($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 24\text{H}_2\text{O}$)로 Mo 함량 0.5% 용액(“용액 2”)을 준비하였다. 7~8주 된 상추에 용액 1은 50ppm이 되도록 200배 희석하고, 용액 2는 100배 희석하여 50ppm 농도가 되도록 혼합한 후 살포기를 이용 개체당 50mL 정도의 양으로 엽면에 고르게 살포하였다. 살포액에는 엽면의 표면 흡착력을 증가시키기 위해 계면활성제인 Tween-80을 0.03% 농도로 첨가하였다. 이 시험에서는 대조구로 용액 2를 100배 희석한 용액(50ppm Mo)을 동일한 방법으로 처리하여 비교하였다.

② LT와 Mo 혼합 시비 실험

“키토산 유도체간 비교 실험”에서 선발된 LT가 Mo과의 혼합 살포에 의한 상승효과임을 확인하기 위해 무처리구, Mo 단독 처리구, LT 단독 처리구, LT와 Mo 혼합처리구로 구분하여 시험을 실시하였다. 처리액의 제조 및 처리 방법은 3)-(1)에 서술된 것과 동일하게 수행하였다.

③ LT의 시비 농도별 비교 실험

“키토산 유도체간 비교 실험”에서 선발된 LT의 시비 농도에 따른 질산성질소 감소 경향을 알아보기 위해 3)-(1)에서 사용된 “용액 1”을 400배(25ppm), 200배(50ppm), 100배(100ppm), 50배(20ppm)로 각각 희석하여 Mo과 혼합 시비하였다. 처리방법은 3)-(1)에 서술된 것과 동일하게 수행하였으며 무처리구와 대조구로서 Mo 단독처리구를 두었다.

④ LT 시비 후 수확시기별 비교 실험

“키토산 유도체간 비교 실험”에서 선발된 LT의 시비 시기에 따른 질산성질소 감소 경향을 알아보기 위해 3)-(1)에서 사용된 “용액1”을 200배 희석하여 Mo과 혼합 살포하였다. 처리 방법은 3)-(1)에 서술된 것과 동일하게 수행하였으며, 무처리구와 대조구로서 Mo 단독처리구를 두었다. 수확은 처리 후 3일, 6일, 9일차에 각 실험구별로 시료 채취하였다.

4) 시료 전처리 및 NO_3^- 분석

키토산 유도체 처리 10일 경과 후에 뿌리를 제외한 전 부분을 채취하여 생체중을 측정하였다. 생체중 측정 후 식물체를 70℃에서 충분히 건조시킨 후 막자사발에서 분쇄하여 60mesh를 체를 통과한 시료를 질산함량과 Mo 함량 측정 시료로 사용하였다.

식물체내 질산함량 측정은 Cataldo(1975) 방법을 변형하여 이용하였다. 시료 0.1g을 정확히 취하여 10mL 증류수를 첨가한 후 shaking incubator에서 45℃로 1시간 동안 추출하였다. 추출액은 상온에서 식힌 후 Advance 5C 여과지로 여과하였다. 여과액 50 μ l에 0.2mL salicylic 용액 (5% solution(W/V) in conc. H_2SO_4)을 첨가하여 상온에서 20분간 방치하였다. 그리고 2N NaOH 용액 4.75mL 넣고 중화하여 상온에서 식힌 후 분광광도계(Shimazu UV-1601PC, JAPAN)를 이용하여 420nm에서 흡광도를 측정하였다.

Mo 함량은 건식분해법(dry ashing method)으로 분해하였는데 회화로에서 1g의 시료를 완전히 회화시킨 후 잔존물을 1:1 염산 5mL에 녹이고 50mL 까지 증류수로 채웠다. 이 용액을 ICP(Inductively Coupled Plasma, JY70C, FRANCE)로 분석하여 Mo 함량을 정량하였다.

2. 토마토와 고추에서 내병성 관련 단백질 유도 실험

1) 식물체 준비

본 시험에 사용된 토마토(*Lycopersicon esculentum* Mill cv. pinkle)와 고추(*Capsium annuum* L. cv. miraegochu)는 각각 경종종묘와 평화종묘에서 판매하는 종자를 시중에서 구입하여 사용하였다. 각 종자를 72구 트레이에 구당 2립씩 파종하여 24℃ 생육상에서 발아시킨 후 3주 동안 성장시켰다. 4주차에 1a/20000 크기의 포트에 1주씩 이식하여 온실로 옮겨 10주차까지 키운 후 생장이 양호한 식물체를 선별하여 시험에 사용하였다. 파종 및 이식에 사용된 상토는 동부한농(주)에서 판매하고 있는 “원예용 상토”를 이용하였다. 시비는 이식 시 석회고토 2g/pot과 자체 제조한 미량요소 복합비료(Table 1)를 1mL/pot 투여하였다. 그리고 N-P-K 액상 복합 비료(Table 2)를 10일 간격으로 10mL/pot 씩 키토산 처리 전에 총 3회 공급하였다.

2) 키토산 유도체 준비 및 처리

본 실험에 사용된 키토산 유도체의 종류와 처리 방식은 질산성질소 감소 실험과 같았다. 다만 키토산 처리 농도는 glucosamine 함량 기준으로 1000ppm이었고 대조구로 10mM DL-β-amino-butyrac acid(이하 BABA) 처리구를 두었다. BABA는 이미 elicitor로 알려진 물질(Oostendorp 등, 2001)이며 키토산 처리구와 내병성 관련 단백질(이하 PR-proteins) 유도 효과를 서로 비교하기 위해 사용하였다.

3) 효소활성조사

① 식물체 채취

키토산 유도체간 PR-proteins 유도 효과 확인 시험에서는 토마토에서 키토산 처리 24시간 경과 후 4~5 분엽 중 완전히 전개된 엽 3~4매를 시료 채취하였다. OT 처리에 의한 PR-proteins 유도 효과 확인 시험에서는 토마토, 고추 공통적으로 키토산 처리 1일, 3일, 5일 경과 후 동일한 방식으로 시료 채취하였다.

② 조효소액 준비

시료는 채취한 후 바로 액체질소를 이용하여 막자사발에서 마쇄하고 -70°C 에 보관하여 추출을 위한 시료로 이용하였다. Chitinase와 β -1,3-glucanase 효소는 homogenizer(Tissue TearorTM, BioSpec Products, Inc.)를 이용하여 시료 2~2.5g을 100mM acetate buffer(pH 5.2, 1mM EDTA, 10mM mercaptoethanol, 50mM sodium ascorbate, 0.02M sodium metasulfite, 5% polyvinylpolypyrrolidone(PVPP)) 3mL로 추출하였다. 추출액은 20,000g 에서 20분간 원심분리하여 PVPP를 제거하였다. 그리고 나머지 잔사물들을 제거하기 위해 20,000g에서 20분간 원심분리하고 상등액을 취하여 효소활성 측정에 사용하였다. Peroxidase 효소는 시료 1g을 50mM K-phosphate buffer(pH 7.0, 1mM EDTA, 1mM dithiothreitol, 5% PVPP) 3mL를 이용하여 추출하였는데 추출방식은 위와 같게 하였다. 그리고 추출 전 과정은 4°C 에서 수행하였다.

③ 효소활성분석

Chitinase : Chitinase 효소 활성 측정은 Jeuniaux(1966)의 방법을 변형하여 실시하였다. 재생키티틴(キチン,キトサソ研究會, 1991)을 기질로 10mg, 효소 추출 완충액 0.5mL 그리고 조효소액 0.5mL를 혼합하여 37℃하에서 2시간 동안 반응시켰다. 100℃하에 3분간 방치하여 반응을 종결시키고 상온에서 식힌 후 10,000rpm 으로 10분간 원심분리하였다. 여기서 상등액을 취하여 생성된 N-acetylglucosamine(NAG)의 함량을 Reissig(1955)의 방법에 의해 측정하였다. NAG 측정은 상등액 0.5mL에 0.1mL sodium tetraborate 용액(0.8M)을 첨가하여 100℃에서 2분 동안 방치 한 후 상온에서 식혔다. 이 용액에 1% DMAB용액(p-dimethylaminobenzaldehyde, 1% concentrated HCl in glacial acetic acid) 3mL를 첨가하여 37℃에서 20분간 발색시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. Chitinase의 활성은 37℃에서 1시간 동안 1 μ g의 N-acetylglucosamine을 생성하는 효소량을 1unit로 하였다.



β -1,3-glucanase : β -1,3-glucanase 효소 활성은 Reuveni 등(1997)의 방법을 일부 변형하여 사용하였으며, laminarin(Sigma-Aldrich chem.)을 기질로 하여 반응 후 생성되는 환원당을 정량함으로써 측정하였다. 2% laminarin 용액 75 μ L에 조효소액 25 μ L를 혼합하여 40℃하에서 60분 동안 반응시켰다. 반응 종결을 위해 400 μ L 3,5-dinitrosalicylic reagent를 첨가한 후 100℃하에서 정확히 10분간 방치하였다. 상온에서 식힌 후 증류수 2.5mL 첨가하여 희석한 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. β -1,3-glucanase의 활성은 40℃에서 1분 동안 1 μ g의 glucose를 생성하는 효소량을 1unit로 하였다.

Peroxidase : Peroxidase 효소 활성은 guaiacol(Sigma-Aldrich chem.)을

기질로하여 470nm에서의 흡광도 변화율로 측정하였다(Hammerschmidt 등, 1982). 기질로써 13mM guaiacol 용액 2mL, 반응개시를 위한 1mM H₂O₂ 용액 0.1mL에 조효소액 0.1mL를 첨가한 후 상온에서 30초 간격으로 5분 동안 470nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. Peroxidase의 활성은 1분 동안 470nm에서 흡광도 0.017을 변화시키는 효소량을 1unit로 하였다.

총단백질 : Bradford(1976)법을 이용하였고, 표준물질로 bovine serum albumin(Sigma-Aldrich chem.)을 사용하였다.



III. 결과 및 고찰

1. 키토산 엽면시비가 상추의 질산성질소 축적에 미치는 영향

1) 키토산 유도체간 질산성질소 감소 효과

상추에서 다섯 종류의 키토산 유도체 처리에 의한 생체중, 질산성질소, Mo 함량은 Table 3과 같았다. 생체중에서는 Mo 단독 처리구에서 다른 시험구에 비해 가장 높게 나타났으나 유의성을 보이는 수준은 아니었다. 질산성질소 함량은 무처리구에 비해 Mo, 키토산 유도체 엽면시비구 모두에서 감소하는 경향을 보였는데, 함량은 무처리 > OT > OS > HS > MO = LS > LT 순으로 낮게 나타났다. 특히 LT 처리구에서는 무처리구 대비 20% 감소로 유의성이 있었다($P < 0.01$).

Mo 함량은 모든 시험구에서 무처리구에 비해 높았으며, 그 순서는 LS > HS > OS > LT > OT > MO > 무처리 순으로 높았다. 무처리구에 비해 Mo이 처리된 모든 시험구에서 식물체내 Mo이 증가하고 질산성질소가 감소한 것은 질산성질소 축적에 Mo이 영향을 미치고 있음을 보여준다. 그리고 키토산 유도체 처리구 중에서 HS, LS 처리구는 Mo 단독 처리구 보다 Mo 함량이 각각 2.7배, 5배씩 증가하여 Mo 흡수 촉진효과가 뚜렷하였지만 질산성질소 감소 경향은 상대적으로 크지 않아 질산 동화 작용에는 또 다른 요인들이 관여하고 있는 것으로 보인다. 이와 같은 결과는 시금치 등에서 키토산과 미네랄을 혼합 살포하여 10~23% 질산성질소 감소 및 Mo 흡수 촉진 경향을 보여주었던 결과와 유사하였다(엄 등; 2001). 그리고 HS, LS 처리구에서 식물체내 높은 Mo 흡수 경향은 키토

산의 미네랄 흡수 촉진 효과와 관련하여 앞으로 좀더 세밀한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Table 3. Effect of foliar application of chitosan derivatives on the fresh weight, nitrate and Mo content in lettuce edible part

Treatment	Fresh weight (g/plant)	Nitrate content (%,Dry wt.)	Mo (mg/kg)
Control	24.1±2.3	2.48±0.17a	-
MO	26.0±2.6	2.23±0.21a	5.09±2.00c
HS	25.7±3.0	2.24±0.18a	13.87±3.26b
LS	23.1±3.0	2.23±0.11a	25.47±5.25a
LT	23.7±2.0	1.98±0.16b	8.58±1.43bc
OS	23.1±2.4	2.28±0.11a	9.17±1.43bc
OT	22.9±3.0	2.36±0.11a	7.88±1.63c

MO : Mo only, HS : High viscosity chitosan + Mo, LS : Low viscosity chitosan + Mo,

LT : Low viscosity chitin + Mo, OS : Oligo chitosan + Mo, OT : Oligo chitin + Mo

Each value represents means of triplicates ± standard deviation

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at P=0.05

- : Not detected

2) LT와 Mo 혼합 시비 효과

상추에서 Mo과 LT를 혼합 시비하여 질산성질소를 감소시키는 효과가 Mo에 의한 효과인지 또는 키토산 유도체인 LT에 기인한 것인지를 알아보기 위해 각각을 단독으로, 그리고 혼합하여 시비하여 질산 축적 경향을 살펴보았는데 결과는 Table 4와 같았다.

질산성질소 함량은 무처리구에 비해 Mo, Mo+LT 그리고 LT 처리구에서 모두 감소하였으며 LT+Mo 처리구에서 가장 낮았다. 그리고 Mo가

포함되지 않은 LT 처리구에서도 질산 감소 경향이 나타나 Mo과는 다른 식으로 키토산 유도체가 질산성질소 대사에 영향을 미치는 것으로 판단된다. 키토산은 엽 중 엽록소 함량을 증가시키는 것으로 여러 연구(엄 등, 2001 ; Chibu, 1999)에서 밝혀지고 있는데, 키토산의 광합성 증진 효과로 질산 환원에 필요한 에너지원과 전자의 수소 공급원(NADH⁺)의 생성을 원활히 함으로써 질산의 동화작용에 영향을 미칠 수 있는 것으로 생각된다. 즉 Mo 공급에 의한 조효소의 공급과 키토산의 광합성 촉진 및 미네랄 흡수 촉진 기능이 서로 상승 작용을 통해 식물체내 질산 함량을 줄이는 것으로 판단된다.

Table 4. Effect of combined foliar application of LT and molybdate on nitrate reduction in lettuce edible part

Treatment	Fresh weight (g/plant)	Nitrate content (mg/g,Dry wt.)
Control	41.1±7.1	7.54±1.30
MO	38.2±6.5	6.58±1.05
LT	41.0±0.6	6.79±0.57
LT+MO	44.2±3.1	5.59±0.57

MO=Mo only ; LT=Low viscosity chitin only ; LT+MO=Low viscosity chitin + Mo

Each value represents means of triplicates ± standard deviation

3) LT 시비 농도와 수확시기에 따른 효과

1차 실험에서 선발된 키토산 유도체 LT의 시비 농도와 처리 후 수확시기에 따른 질산성질소 함량을 조사하였다. LT의 농도는 각각 25, 50, 100, 200ppm 으로 하여 시비하였는데, 처리구별 질산성질소 함량은 Table 5와 같았다. 그리고 LT 처리 3, 6 그리고 9일 후 시료를 채취하여 수확시기에

따른 상추의 질산성질소 함량을 측정하였는데 결과는 Table 6과 같았다.

시비 농도별 시험에서는 처리 농도가 높을수록 질산성질소 함량이 낮은 경향을 보였으며, 특히 200ppm 처리구에서는 대조구에 비해 약 19% 정도 질산 함량이 감소하였다. 그런데 100ppm 처리구에서는 다소 경향에서 벗어난 결과를 보여주었는데, 이는 조사된 개체들의 상대적인 생육 불량(생체중 31.6g)으로 인한 실험적 오차에 그 원인이 있는 것으로 생각된다.

LT 처리 후 수확시기를 달리하여 상추에서 질산성질소 함량을 측정한 결과, 우선 질산성질소 함량은 6일차까지 증가하였다가 그 후 9일에 급격히 감소하는 경향을 보여주었으며, 특히 9일차에서 대조구 대비 질산성질소 감소가 뚜렷하였다. 이러한 경향은 질소 시비에 의한 식물체의 질소 흡수에 의해 식물체내 질산 함량이 급격히 증가하고 또한 질산의 동화에 필요한 질산환원효소는 대부분 *de novo synthesis* 경로를 거치기 때문에 (Sawhney 등, 1990) 활성을 나타내기 위해서는 일정한 시간이 필요함을 보여주는 것으로 생각된다. 즉 6일차까지는 pot 재배 조건에서 흡수와 동화가 동시에 이루어져 개체간 질산성질소 함량의 편차도 심하고 점차 시간이 흐르면서 흡수보다는 동화과정이 우세해지면서 체내 질산 함량은 급격히 떨어지고 또한 생체중은 급격히 증가하는 것으로 생각된다. 이 시험에서도 조사된 3차례 경우에서 오직 9일차에 채취된 개체들에서 질산성질소 함량에 유의성을 나타내었으며 이러한 결과는 작물에서 키토산 처리 시 4일 경과 후에 효과가 있었음을 보여준 Shibuya(2000)의 경우와 유사하였다.

Table 5. Effect of concentration of LT application on fresh weight and nitrate accumulation in lettuce

Treatment		Fresh weight (g/plant)	Nitrate content (mg/g, Dry wt.)
Control		36.8±5.1	7.31±0.77a
MO		36.3±3.8	7.13±0.76ab
LT (ppm)	25	32.2±3.2	6.92±0.77ab
	50	36.2±5.5	6.26±0.17bc
	100	31.6±3.9	6.99±0.56ab
	200	37.6±4.9	5.91±0.60c

MO=Mo only; LT 25~200=Low viscosity chitin 25~200ppm + Mo

Means ± standard deviation(n=4)

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at P=0.05

Table 6. Time course change of fresh weight and nitrate accumulation after LT treatment in lettuce

Treatment	Time after treatment(days)	Fresh weight (g/plant)	Nitrate (mg/g, dry wt.)
Control	3	29.6±2.1	16.41±8.03
LT+MO		30.1±1.5	19.10±9.73
Control	6	32.6±2.0	25.61±3.95
LT+MO		35.7±4.9	21.15±2.51
Control	9	50.3±2.4	8.30±0.76a
LT+MO		52.5±4.3	5.36±1.18b

LT+MO=Low viscosity chitin 50ppm + Mo

Means ± standard deviation(n=4)

Mean separation within columns(9 days after treatment) by Duncan's multiple range test at P=0.05

2. 키토산 엽면시비가 토마토와 고추에서 내병성 관련 단백질 유도에 미치는 영향

1) Chitinase와 β -1,3-glucanase 활성 유도 효과

키토산 유도체 5종류와 BABA를 토마토에 엽면 시비하였을 때 나타난 chitinase와 β -1,3-glucanase 유도 효과는 Fig. 2, Fig. 3과 같았다.

Chitinase 효소 활성은 대조구 43.52 ± 5.63 , BABA 64.71 ± 2.59 , HS 40.67 ± 2.95 , LS 29.22 ± 2.27 , LT 27.78 ± 3.18 , OS 42.12 ± 2.52 , OT 58.17 ± 0.48 unit 로 나타나 BABA와 키토산 유도체 중 OT 처리구 만이 대조구에 비해 효소 활성이 유의성 있게 높았다($P < 0.05$). 반면에 LS와 LT 처리구에서는 오히려 효소 활성을 감소시켜 대조적이었다. Cohen 등(1994)의 실험에서 BABA를 토마토에 처리하였을 때 chitinase 유도 효과가 무처리구에 비해 70~200% 증가한다고 보고하였다. 본 실험에서의 활성 증가율은 약 48%인데 Cohen 등(1994)의 실험 결과에 비해 다소 적은 것은 처리 약량과 시료채취 시기가 다른 것에 기인하는 것 같다. 분자량이 큰 키토산 유도체들은 chitinase 활성 유도 효과가 미미하였다. 이와 같은 결과는 토마토와 감자에서 분자량이 작을수록 chitinase와 β -1,3-glucanase 활성 유도 효과가 크다고 한 것(Vasyukove 등, 2001)과 오이에서 chitosan 보다는 chitin oligomer가 chitosanase, peroxidase 활성 유도 효과가 훨씬 크다고 보고한 내용(Ben-Salmon 등, 2003)과 일치하는 결과였다. 하지만 콩(Mauch 등, 1984)과 땅콩(Sathiyabama 등, 1998)에서 고분자 chitosan 처리 시 chitinase와 β -1,3-glucanase 활성 유도 증가 효과가 크다고 보고된 부분과는 차이가 있었다.

β -1,3-glucanase 효소 활성은 대조구 410.3 ± 10.2 , BABA 586.4 ± 78.1 , HS 431.9 ± 24.8 , LS 349.1 ± 54.1 , LT 421.4 ± 38.6 , OS 384.3 ± 18.6 , 그리고 OT 523.0 ± 37.5 unit 로 나타나 chitinase 활성 유도 효과와 비슷한 경향을 보

여주었다. 즉 BABA 처리구에서 43%, OT 처리구에서 28% 효소 활성이 유의성 있게 증가하였다($P < 0.05$). 토마토(Cohen 등, 1994), 고추(Hwang 등, 1997), 그리고 상추(Pajot 등, 2001)에서 BABA 처리 시 β -1,3-glucanase 효소 활성이 증가한다고 보고되었다.

이상의 결과에서 키토산의 화학성, 특히 분자량과 탈아세틸화도가 chitinase와 β -1,3-glucanase의 효소 활성에 크게 영향을 미치는 것으로 사료된다.

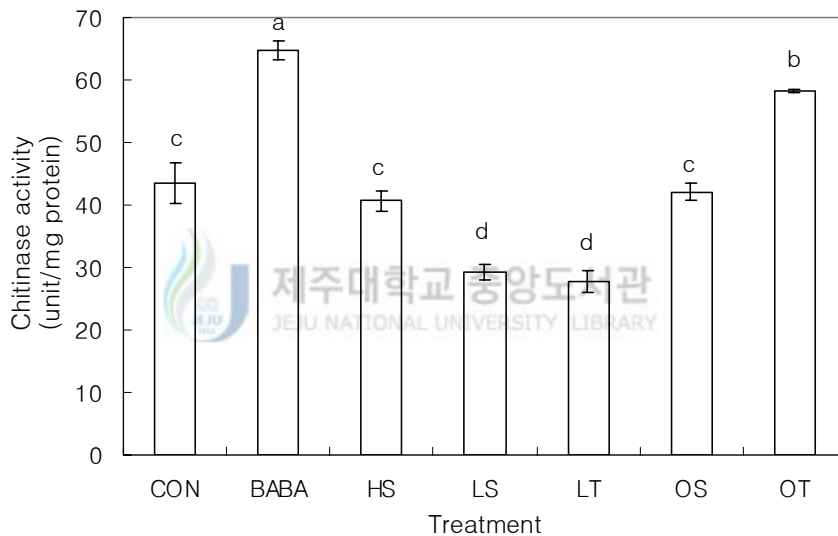


Fig. 2. Activity of chitinase in tomato leaves treated with different chitosan derivatives.

CON : Control, BABA : β -Amino-butyric acid, HS : High viscosity chitosan, LS : Low viscosity chitosan, LT : Low viscosity chitin, OS : Oligo chitosan, OT : Oligo chitin

Values are means \pm standard errors

Bars with different superscripts are significantly different from each other, $p < 0.05$, $n = 3$.

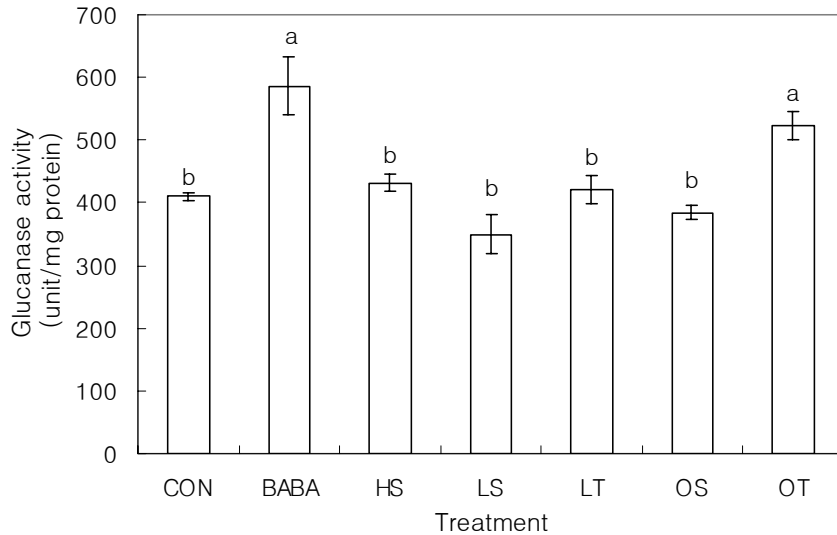


Fig. 3. Activity of β -1,3-glucanase in tomato leaves treated with different chitosan derivatives.

CON : Control, BABA : β -Amino-butyrlic acid, HS : High viscosity chitosan, LS : Low viscosity chitosan, LT : Low viscosity chitin, OS : Oligo chitosan, OT : Oligo chitin

Values are means \pm standard errors

Bars with different superscripts are significantly different from each other, $p < 0.05$, $n = 3$.

2) OT 처리와 peroxidase, β -1,3-glucanase, chitinase 활성 변화

키토산 유도체간 시험에서 선발된 OT(Oligo chitin)를 토마토와 고추에 각각 처리하여 내병성 단백질 활성의 시간적 변화를 측정하였다.

① Peroxidase 활성 증진 효과

토마토와 고추에 OT를 엽면 처리한 후 1일, 3일, 5일에 시료 채취하여 효소 활성을 측정하였는데 결과는 Fig. 4, Fig. 5와 같았다.

Peroxidase 활성은 무처리구는 토마토에서 1일차 60.7 ± 8.5 , 3일차 81.4 ± 7.1 , 5일차 118.3 ± 8.7 unit로 나타났고, 고추에서는 1일차 115.9 ± 19.1 , 3일차 119.6 ± 11.4 , 5일차 149.5 ± 4.8 unit였다. 토마토와 고추 모두에서 시간이 경과함에 따라 점차 효소활성이 증가하는 것으로 나타났는데 그 이유는 phosphate buffer에서 추출된 총 단백질의 양이 지속적으로 감소하여 상대적으로 효소의 비활성(specific activity)이 증가한데 그 원인에 있다고 생각된다. 이러한 경향은 토마토가 심하여 무처리구에서 시기별 효소 활성 변화율이 고추에 비해 크게 나타났다.

BABA 처리구는 토마토와 고추 모두에서 1일차부터 무처리구 대비 각각 30%, 51% 이상 효소 활성이 증가하였고 조사된 마지막 5일차에서는 상대적인 비율이 가장 높게 나타나 무처리구에 비해 각각 97%, 147% 증가하였다. 따라서 BABA는 고추, 토마토 모두에서 peroxidase 활성 유도 효과가 인정된다. 그리고 유도된 활성의 지속시간도 5일 이상임을 알 수 있었다.

OT 처리구는 토마토에서 3일차부터 무처리구에 비해 peroxidase 효소 활성이 42% 정도로 유의성 있게 증가하여 조사 마지막 5일차에서 상대적 비율이 79%에 이르렀다. 하지만 고추에서는 토마토에 비해 효소 활성 유도 효과가 미미하여 작물별 차이가 있는 것으로 나타났다.

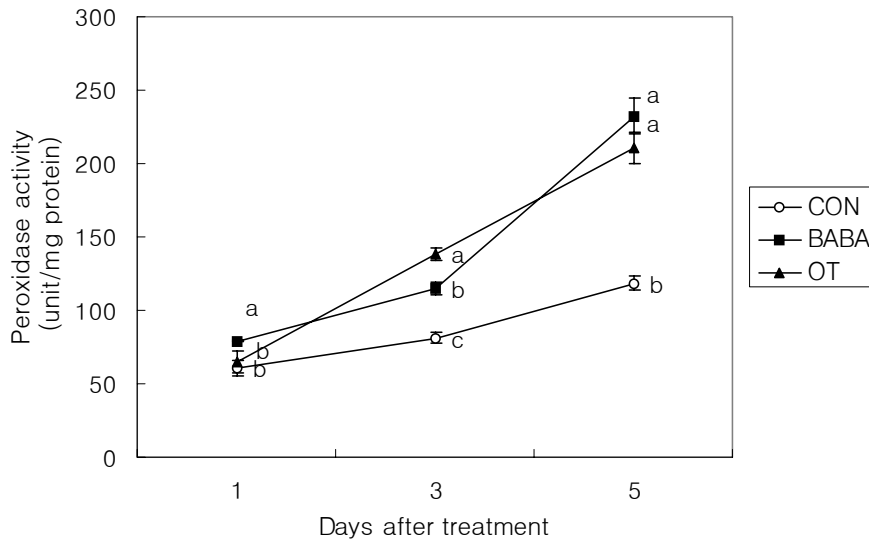


Fig. 4. Time course change of peroxidase activity after OT treatment in tomato leaves.

CON : Control, BABA : β -Amino-butyric acid, OT : Oligo chitin

Values are means \pm standard errors

Bars with different superscripts are significantly different from each other, $p < 0.05$, $n = 3$.

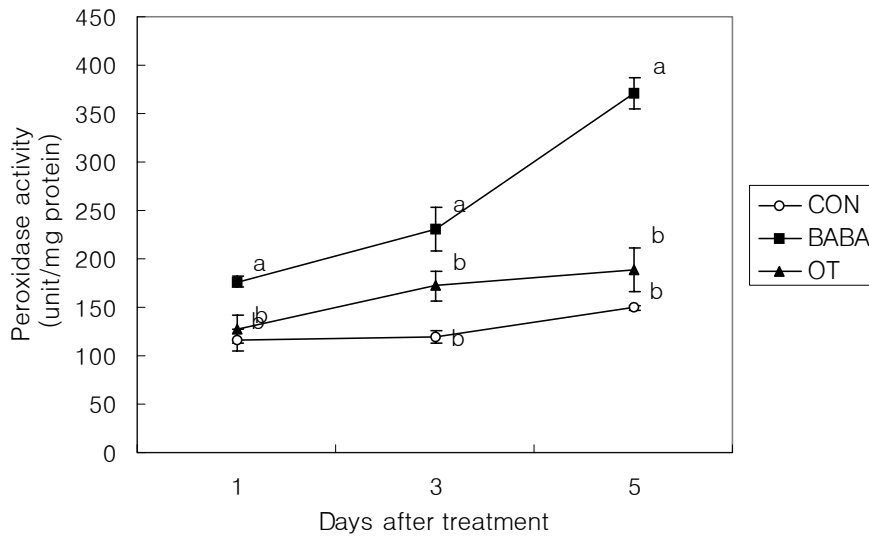


Fig. 5. Time course change of peroxidase activity after OT treatment in pepper leaves.

CON : Control, BABA : β -Amino-butyric acid, OT : Oligo chitin

Values are means \pm standard errors

Bars with different superscripts are significantly different from each other, $p < 0.05$, $n=3$.

② β -1,3-glucanase 활성 증진 효과

각 작물에 OT를 엽면 처리한 후 1일, 3일, 5일에 시료 채취하여 β -1,3-glucanase 효소 활성을 측정하였는데 결과는 Fig. 6, Fig 7과 같았다.

β -1,3-glucanase 효소 활성은 무처리구는 토마토에서 1일차 410 ± 10.2 , 3일차 406 ± 3.9 , 5일차 436 ± 24.0 unit, 그리고 고추에서는 1일차 168 ± 18.8 , 3일차 154 ± 15.9 , 5일차 159 ± 2.9 unit로 대체로 균일하였다.

BABA 처리구는 토마토에서 무처리구에 비해 β -1,3-glucanase 활성이 조사 기간 내에 8%에서 43%까지 증가하였다. 효소 활성은 토마토에서 1일차에서 약 43%로 가장 높고 3일차에서 다소 감소하였다가 5일차에 다시 증가 경향을 보였다. 고추에서는 효소 활성이 시간이 경과함에 따라 계속 증가하여 대조구에 비해 1일차 7%, 3일차 32%, 그리고 5일차에는 35% 증가하였다.

OT 처리구는 토마토에서 BABA 처리구와 비슷한 경향으로 변화하였으며 대조구에 비해 1일차 28%($P < 0.05$), 3일차 17%, 5일차 16% 증가한 것으로 나타났다. 고추에서는 오직 3일차에서만 대조구에 비해 32% 효소 활성이 증가한 것으로 나타났다. 따라서 토마토와 고추에 OT 처리 시 β -1,3-glucanase 효소 활성은 1~3일차에 최대에 이르렀다가 이후에는 감소하는 경향을 보이는 것으로 판단된다.

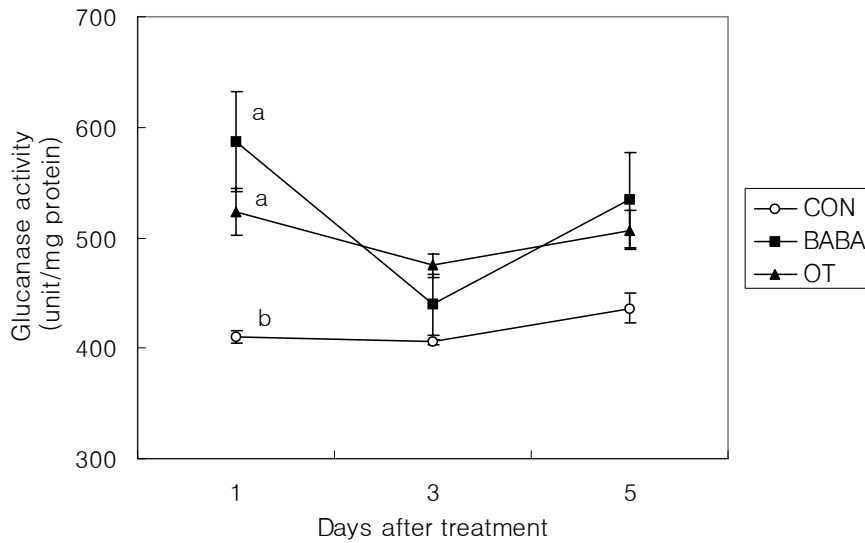


Fig. 6. Time course change of β -1,3-glucanase activity after OT treatment in tomato leaves.

CON : Control, BABA : β -Amino-butyric acid, OT : Oligo chitin

Values are means \pm standard errors

Bars with different superscripts are significantly different from each other, $p < 0.05$, $n = 3$.

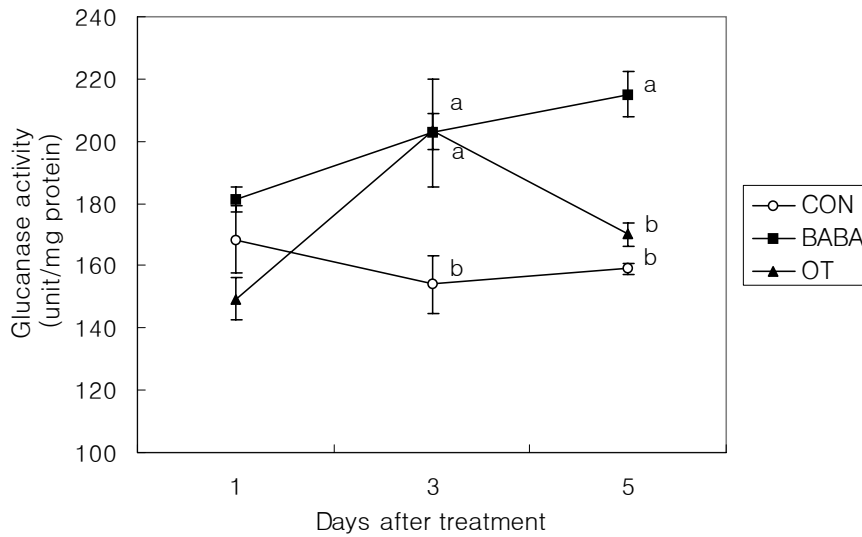


Fig. 7. Time course change of β -1,3-glucanase activity after OT treatment in pepper leaves.

CON : Control, BABA : β -Amino-butyric acid, OT : Oligo chitin

Values are means \pm standard errors

Bars with different superscripts are significantly different from each other, $p < 0.05$, $n=3$.

③ Chitinase 활성 증진 효과

토마토와 고추에 OT를 엽면 처리한 후 1일, 3일, 5일에 시료 채취하여 효소 활성을 측정하였는데 결과는 Fig. 8, Fig. 9와 같았다.

Chitinase 활성 변화는 토마토와 고추에서 OT 처리구와 BABA 처리구가 서로 비슷한 경향을 보였다. 즉 1일차에 증가, 3일차에 감소, 5일차에 다시 증가하였다. 그리고 토마토보다는 고추에서 chitinase 활성 유도 효과가 뚜렷하였다. 토마토에서 BABA 처리구와 OT 처리구는 1일차에서 대조구에 비해 각각 49%, 34% 효소 활성이 증가하였다($P < 0.05$). 고추에서도 OT 처리구는 1일차 41.6 ± 7.5 , 3일차 20.77 ± 0.1 , 5일차 33.35 ± 2.8 unit로 변동이 심했지만 대조구에 대한 상대적 효소 활성은 1일차 54%, 3일차 262%, 그리고 5일차에 105% 증가($P < 0.05$)한 것으로 나타났다.

오이에서 oligo chitin이 chitosanase은 2.4배, peroxidase는 2.0배 효소 활성을 증가시켰고(Ben-Shalom 등, 2003), 벼세포에서 chitosan, oligo chitosan, oligo chitin을 처리하였을 때 7이상의 중합도를 보이는 oligo chitin만이 phytoalexin의 유도를 보여주어(Yamada 등, 1993) 위 시험 결과와 유사하였다.

농업 현장에서 병해충의 방제 수단으로 phytoalexin, PR-proteins 유도를 통한 식물체의 저항성을 증가시키는 elicitor를 활용되는 예가 아직까지는 미미하다. 하지만 대표적인 elicitor이면서 salicylic acid 유도체인 benzothiadiazole(BTH)이 병해충 예방에 기존 합성농약에 못지 않은 결과(Inbar 등, 1998; Oostendorp 등, 2001; Godard 등, 1999)를 얻었고 농약회사인 노바티스에서 BTH를 이용하여 “Bion”이라는 상품을 개발한 사례는 elicitor를 이용한 생물학적 방제 가능성을 확인시켜주는 일이라 생각한다. Oligo chitin의 경우도 탈아세틸화도 및 분자량을 세분화하여 저항성 유도 효과를 극대화시키고, 서로 상승작용을 일으킬 수 있는 적절한 생물학적 방제수단과 결합(Benhamou, 1998)시키는 방법 등을 통해 실제적인 병해충 방제제로서의 가능성을 검토하는 부분이 계속적으로 연구되어야 하겠다.

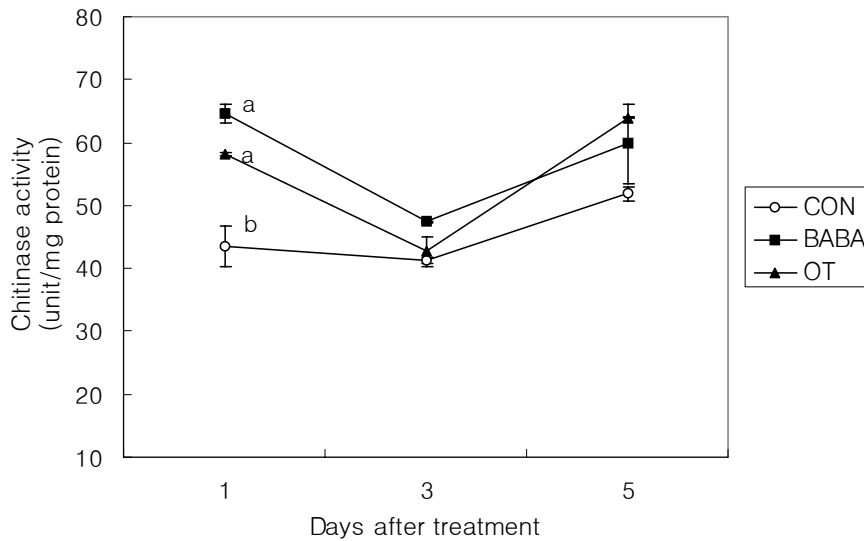


Fig. 8. Time course change of chitinase activity after OT treatment in tomato leaves.

CON : Control, BABA : β -Amino-butyric acid, OT : Oligo chitin

Values are means \pm standard errors

Bars with different superscripts are significantly different from each other, $p < 0.05$, $n = 3$.

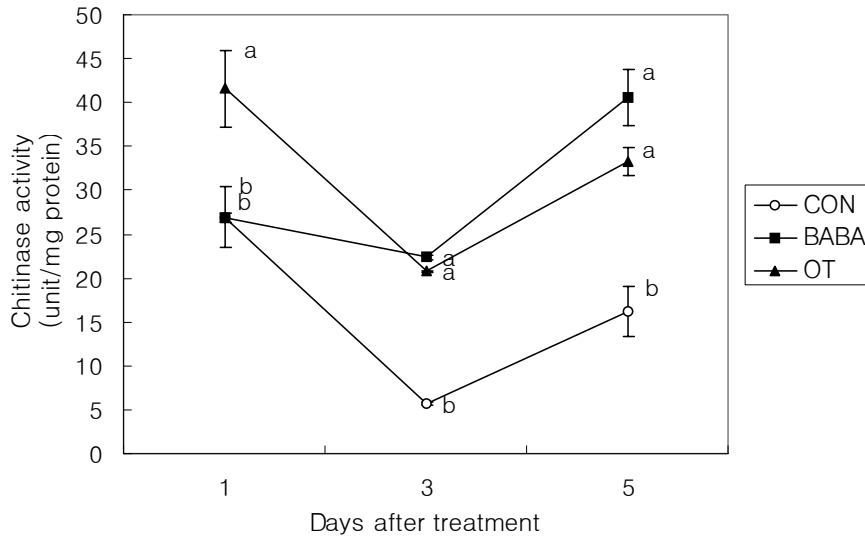


Fig. 9. Time course change of chitinase activity after OT treatment in pepper leaves.

CON : Control, BABA : β -Amino-butyric acid, OT : Oligo chitin

Values are means \pm standard errors

Bars with different superscripts are significantly different from each other, $p < 0.05$, $n=3$.

IV. 요약

본 연구에서는 키토산의 농업적 이용 가능성을 알아보기 위해 화학성(분자량, 탈아세틸화도)을 달리하는 5종류의 키토산 유도체를 준비하여 상추에서의 질산성질소 축적에 미치는 영향과 토마토, 고추에서의 내병성 관련 효소(Pathogenesis-Related Proteins(PR-proteins)) 활성 유도 효과를 조사하였다.

식물체내 질산성질소 축적과 관련한 시험에서는 조사된 5종류의 키토산 유도체 중 LT(Low viscosity chitin)가 Mo과 혼합 엽면 시비시 상추에서 질산성질소의 축적을 20% 정도 감소시켰다($P < 0.01$). 또한 LT 처리를 25, 50, 100, 200ppm 농도로 달리하였을 때, 질산성질소는 5~19% 정도 감소하였고 200ppm 처리구가 질산성질소 감소 비율이 가장 컸다($P < 0.05$). LT 처리 후 수확 시기를 달리하여 상추에서 질산성질소 변화를 조사하였는데 점차 감소 경향을 보인 후 9일차에서는 생육 촉진과 함께 35%까지 질산성질소 함량이 감소하였다($P < 0.05$).

키토산 유도체 종류별 식물 PR-proteins 유도 효과를 보기 위하여 키토산 유도체들을 토마토에 처리하고 24시간 경과 후 chitinase와 β -1,3-glucanase 유도 효과를 측정한 결과 조사된 5종류의 키토산 유도체 중에서 OT(oligo chitin)만이 효소 활성을 증가 시켰다. OT의 PR-proteins 유도 효과를 보다 자세히 보기 위하여 토마토와 고추에 엽면 처리하고 peroxidase, β -1,3-glucanase, chitinase의 활성변화를 시간별(1,3,5일차)로 조사하였다.

Peroxidase 효소 활성은 토마토에서 OT 처리 3일 후부터 대조구에 비해 42% 정도로 유의성 있게 증가하여, 조사 마지막 5일차에서 상대적 비율이 79%에 이르렀지만 고추에서는 토마토에 비해 peroxidase 효소 활성

유도 효과가 미미하여 작물간에 차이가 있었다.

β -1,3-glucanase 효소 활성은 토마토에서 OT 처리구가 대조구에 비해 1일차 28%($P<0.05$), 3일차 17%, 5일차 16% 증가하였다. 고추에서는 오직 3일차에서만 대조구에 비해 β -1,3-glucanase 효소 활성이 32% 증가하였다. 따라서 토마토와 고추에서 OT 처리 시 β -1,3-glucanase 효소 활성은 1~3일차에 최대에 이르렀다가 이후에는 감소하는 것으로 나타났다.

Chitinase 효소 활성은 토마토에서 OT 처리구가 1일차에서 대조구에 비해 34% 효소 활성이 증가하였다($P<0.05$). 고추에서도 OT 처리구는 대조구에 비하여 chitinase 효소 활성이 1일차 54%, 3일차 262%, 5일차 105% 증가하였다($P<0.05$).

이상의 결과를 종합해 볼 때 키토산 유도체의 종류에 따라 식물체에 미치는 생리 활성이 차이가 있으나, 적절한 키토산 유도체 처리에 의해 식물체 유해 물질인 질산성 질소가 감소될 수 있고, PR-proteins 유도에 의한 식물의 저항성이 증가될 수 있는 것으로 생각된다.

참고문헌

Allan, C. R. and Hadwiger, L. A., 1979. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Exp. Mycol.*, 3, pp. 285-287.

Benhamou, N., 1999. Chitosan-mediated induced resistance : a promising strategy for plant disease management. *International Symposium on Utilization of Chitin and Chitosan*. pp. 135-151.

Benhamou, N., 1998. Induction of resistance against Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta*, 204, pp. 153-168.

Ben-Salmon, N., Arid, R., Pinto, R., Aki, C. and Fallik, E., 2003. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protection*, 22, pp. 285-290.

Bowles, D. J., 1990. Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.*, 59, pp. 873-907.

Bradford, M. M., 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, pp. 248-254.

Cataldo, D. A., Haroon, M., Schrader, L. E., and Youngs, V. L., 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communication in Soil Science and Plant Analysis*, 6, pp. 71-80.

Chibu, H. and Shibayama, H., 1999a. Effects of chitosan application on shoot growth of several crop seedling. *Report Marine Highland Biosci. Cent.*, 9, pp. 15-20.

Chibu, H. and Shibayama, H. and Arima, S., 1999b. Effects of chitosan application on the growth of radish seedling. *Jpn. J. Crop Sci.*, 68, pp. 199-205.

키티친,키티사조연구회, 1995. 키티친,키티사조호드북, 技報堂出版. 258 p.

키티친,키티사조연구회, 1991. 키티친,키티사실험마ニュアル, 技報堂出版. pp. 37-38, 125.

Cohen, Y., Niderman, T., Mosinger, E. and Fluhr, R., 1994. β -Aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and resistance to late blight infection caused *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.*, 104, pp. 59-66.

El-Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J., Asselin, A., 1992. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology*, 82, pp. 398-402.

El-Ghaouth, A., Arul, J., Wilson, C., Benhamou, N., 1994. Ultrastructural and cytochemical aspects of the effect of chitosan on decay of bell pepper fruit. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 44, pp. 417-422.

엄진섭, 박누리, 박상규, 박신, 정종배, 2001. 미량원소 엽면 처리에 의한 엽채류의 질산태 질소 축적 억제. *J. Korean Soc. Agric. Chem.*

Biotechnol. 44(4), pp. 240-245.

Godard, J., Ziadi, S., Monot, C., Le Corre, D. and Silue, D., 1999. Benzothiadiazol(BTH) induces resistance in cauliflower(*Brassica oleracea* var *botrytis*) to downy mildew of crucifers caused by *Peronospora parasitica*. *Crop Protection*, 18, pp. 397-405.

Guerrero, M. G., Vega, J. M. and Losada, M., 1981. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32, pp. 169-204.

Hammerschmidt, R., Nuckles, E. M. and Kuc, J., 1982. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 20, pp. 43-47.

Hirano, S., 1996. Chitin biotechnology application. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 2, pp 237-258.

Hwang, B. K., Sunwoo, J. Y., Kim, Y. J. and Kim, B. S., 1997. Accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoform, and salicylic acid in the DL- β -amino-n-butyric acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51, pp. 305-322.

Inbar, M., Doostadar, H., Sonoda, R. M., Leibe, G. L. and Mayer, R. T., 1998. Elicitor of plant defensive system reduce insect densities and disease incidence. *Journal of Chemical Ecology*, 24(1), pp. 135-149.

Jeuniaux, C., 1966. Chitinases. *Method in Enzymology*. V. Ginsburg.

New York, Academic Press, 8, pp. 644-650.

Kato, H., Matsubara, Y. and Inoue, T., 1998. Calcium agent for plants. United State Patent US 5,720,793.

Kauss, H., Jeblick, W. and Domard, A., 1989. The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta*, 178, pp. 385-392.

Kendra, D. F. and Hadwiger, L. A., 1984. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Exp. Mycol.*, 8, pp. 276-281.

김세권, 전유진, 김철호, 1998. 키틴, 키토산 올리고당의 제조. 한국키틴키토산학회, 3(2), pp 140-145.

Kneer, R., Ponlev, A., Olesinski, A. and Raskin, I., 1999. Characterization of the elicitor-induced biosynthesis and secretion of genistein from roots of *Lupinus luteus* L. *Journal of Experimental Botany*, 50(339), pp. 1553-1559.

Knorr, D., 1991. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *Food Technology*, 26, pp 114-122.

Kuchitsu K., Yazaki, Y., Sakano, K. and Shibuya, N., 1997. Transient cytoplasmic pH change and ion fluxes through the plasma membrane in suspension-cultured rice cells triggered by N-acetylchitoooligosaccharide elicitor. *Plant Cell Physiol.* 38(9). pp. 1012-1018.

Lee, S. M., Choi, H. J., Shu, S. J., Doo, I. S., Oh, K. Y., Choi, E. J., Taylor, A. T. S., Low, P. S. and Lee, Y. S., 1999. Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cell of tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiology*, 121, pp. 147-152.

Li, Q., Dunn, E. T., Grandmaison, E. W. and Goosen, M.F.A., 1997. Application properties and of chitosan. In *Application of chitin and chitosan*, Goosen, M.F.A.(ed.), Technomic. Lancaster, PA, UK, pp. 3-29.

Mauch, F., Hadwiger, L. A. and Boller, T., 1984. Ethylene: symptom, not signal for the induction of chitinase and β -1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. *Plant Physiology*, 76, pp. 607-611.

Oostendorp, M., Kunz, W., Dietrich, B. and Staub, T., 2001. Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology*, 107, pp 19-28.

Pajot, E., Corre, D. L. and Silue, D., 2001. Phytogard and DL- β -amino butyric acid(BABA) induce resistance to downy mildew(*Bremia lactucae*) in lettuce(*Lactuca sativa* L.). *European Journal of Plant Pathology*, 107, pp. 861-869.

Reissig, J.L., Strominger, et al., 1955. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugar. *Journal of Biological Chemistry*, 217, pp. 959-966.

Reuveni, M., Agapov, V. and Reuveni, R., 1997. A foliar spray of micronutrient solution induces local and systemic protection against powdery mildew(*Sphaerotheca fuliginia*) in cucumber plants. *European Journal of Plant Pathology*, 103, pp. 581-588.

Sathiyabama, M. and Balasubramanian, R., 1998. Chitosan induces resistance components in *Arachis hypogaea* against leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg. *Crop Protection*, 17(4), pp. 307-313.

Sawhney, S. and Naik, M., 1990. Role of light in nitrate assimilation in plants. In *Nitrogen in Higher Plants*. Research Studies Press Ltd., Taunton, UK. pp. 93-128.

Shahide, F., Arachchi, J. K. V. and Jeon, Y. J., 1999. Food application of chitin and chitosan. *Trends in Food Science & Technology*, 10, pp. 37-51.

Shibuya M., 2000. キトサソの農業利用の理論と實際. 技報堂出版. pp. 24-56.

Shibuya, N., 1998. Chitin and chitosan oligosaccharide as a signal molecule to activate plant defence machinery. *Chitin and Chitosan Research*, 4(3), pp. 294-300.

Sohn, S. M. and Oh, K. S., 1993. Influence of nitrogen level on the accumulation of NO_3^- on edible parts of chinese cabbage, radish and cucumber. *J. Korean Soc. Soil Fert.*, 26, pp. 10-19.

Sohn, S. M., Han, D. H. and Kim, Y. H., 1996. Chemical characteristic of soils cultivated by the conventional farming, greenhouse cultivation

and organic farming and accumulation of NO_3^- in chinese cabbage and lettuce. *Korean J. Organic Agric*, 5, pp. 149–165.

Stossel, P. and Leuba, J. L., 1984. Effect of chitosan, chitin and some amino sugars on growth of various soilborne pathogenic fungi. *Phytopathol. Z.*, 111, pp. 82–90.

Vander, P., Kjell, M. V., Domard, A., El-Gueddari, N. E. and Moerschbacher, B. M., 1998. Comparison of ability of partially N-acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance in wheat leaves. *Plant Physiology*, 118. pp. 1353–1359.

Vasyukova, N. I., Zinov'eva, S. V., Il'inskaya, L. I., Perekhod, E. A., Chalenko, G. I., Gerasimova, N. G., Il'ina, A. V., Varlamov, V. P. and Ozeretskovskaya, O. L., 2001. Modulation of plant resistance to disease by water-soluble chitosan. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37(1), pp. 103–109.

Wolff, I .A. and Wasserman, A. E., 1972. Nitrate, nitrite, and nitrosamines. *Science*, 177, pp. 15–19.

Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O. and Akatsuka, T., 1993. Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitooligosaccharides. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57(3). pp. 405–409.

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 아낌없는 지도와 격려를 하여 주신 류기중 교수님께 감사 드리며, 바쁘신 와중에도 본 논문을 심사해 주신 송관정 교수님, 이효연 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 또한 평소 많은 가르침을 주신 유장걸 교수님, 고정삼 교수님, 현해남 교수님, 김찬식 교수님께 감사 드립니다.

돌이켜보면 이 자그마한 논문이 이루어지기까지 수많은 분들의 도움이 없었다면 불가능했을 겁니다.

개인적으로 키토산과의 인연뿐만 아니라 직장생활과 학업을 병행할 수 있도록 배려해 주신 건풍바이오 오천금 사장님 그리고 박승림 연구소장님, 오승기 본부장님께 깊이 감사 드립니다. 그리고 같이 생활하면서 협조를 아끼지 않았던 건풍바이오 동료 직원분들에게도 고마움을 전합니다.

가끔씩 찾아와서는 부탁하기 일쑤인 귀찮은 선배에게 싫은 소리하지 않고 자기일 처럼 도와주었던 실험실 후배들, 경환, 승범, 도승, 대운, 태우, 호아 모두에게 깊은 감사를 드립니다. 그리고 본 논문에 대한 관심과 함께, 토론과 조언을 아끼지 않았던 바이오애그 전경용 후배님께도 고마움을 전합니다.

늘 자식 걱정만 하시면서 오늘도 당신 손자를 돌보는데 여념이 없는 부모님, 관심과 애정이 많은 두 분의 누님과 서연, 서희 조카들, 그리고 일본에서 고생하면서 공부하고 있는 동생 종철이 모두에게 미안하고 고맙습니다.

끝으로 갓 돌이 지나 걸음마 익히기에 여념이 없는 사랑스런 승훈이와 힘든 직장생활과 승훈이 돌보기로 녹초가 되면서도 본 논문의 세세한 부분까지 조언과 지적을 아끼지 않았던 사랑하는 아내에게 이 논문을 바칩니다.