GOVP1200508482

최 종
연구보고서

식물면역활성제(elicitor)를 이용한 콩나물의 고품질화 기술 개발

Development of cultivation method for high quality soybean sprout using elicitors

연구기관
목 포 대 학 교

농 림 부

2016/04/06 10:05-운영지원과/허민지

자료출처 : 식물면역활성제(elicitor)를 이용한 콩나물의 고품질화 기술 개발 / 농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “식물면역활성제(elicitor)를 이용한 콩나물의 고품질화 기술개발” 과제의 최종보고서를 제출합니다.

2003 년 1월 일

주관연구기관명 : 목포대학교
총괄연구책임자 : 함 경 식
세부연구책임자 : 김 관 수
연 구 원 : 박 관 하
연 구 원 : 오 봉 윤
연 구 원 : 조 지 은
연 구 원 : 이 정 양
연 구 원 : 오 대 영
연 구 원 : 양 현 철
연 구 원 : 남 경 하

요 약 문

Ⅰ. 제 목

식물면역활성제(elicitor)를 이용한 콩나물의 고품질 기술 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 식물면역활성물질 (elicitor)

Elicitor는 80년대 초반부터 알려지기 시작한 것으로 식물의 여러 가지 방어기작을 증가시키는 모든 분자들을 일컫는다. Elicitor는 식물이 병원균의 침입을 어떻게 인식하고 방어태세를 갖추는지를 연구하다가 발견된 것이다. 대부분의 elicitor는 병원균의 구성 성분 또는 병원균에 의해 부서지는 식물의 구성 성분으로 식물은 진화를 거치면서 이런 성분을 병원균으로 인식, 병원균에 대한 방어태세를 갖춘다고 이해되고 있다. Elicitor에는 단백질, 탄수화물, 지방산 등이 있는데 본 연구에서 사용한 chitosan, β-glucan, oligogalacturonide는 탄수화물 elicitor에 속한다.

Chitosan은 glucosamine이 β-1,4-linkage로 연결된 polymer로 게, 새우껍질에 다량 존재하는 chitin을 탈아세틸화시켜 얻는 것으로 인체에서 항암효과, 혈중콜레스테롤 저하효과 등 생리활성이외에 식물에서는 성장을 촉진하기도 하고 외부 병원균에 대한 저항성을 증가시킨다는 것이 보고되고 있다. 식물이 chitosan을 인식할 수 있게 된 것은 곰팡이균의 세포벽에 있는 chitin이 효소에 의해 deacetylation되어 chitosan이 만들어지는데 식물은 오랜 세월 곰팡이와 상호작용하면서 chitosan을 인식하는 system을 진화시켜왔을 것이라 믿어진다. β-glucan은 곰팡이, 효모, 세포벽 등에서 쉽게 얻을 수 있으며 β-1,3, β-1,6-linkage로 이루어진 탄수화물로서 콩 등의 식물에서 식물방어단백질, 일종의 항생물질인 phytoalexin을 만들게 하는 signal로 작용하여 식물이 병원균에 대한 저항성을 증가하게 만든다. 특히 β-glucan elicitor의 콩에 있어서 역할은

본 연구 책임자를 비롯하여 몇 group에 의해 β-glucan receptor 등 매우 깊이 있게 밝혀져 있다. Oligogalacturonide는 식물의 pectin이 polygalacturonase에 의해 분해될 때 만들어지는 것으로 식물의 방어기작 발달과정 등 다양한 생리학적 반응에 관여하고 있다. 콩에 있어서는 isoflavonoid 생합성과 많은 과정을 같이 하는 phytoalexin 증가 효과 등이 밝혀졌다.

2. 콩나물, 콩의 건강유용성분

대두는 여러 가지 유용한 생리활성물질을 갖고 있기 때문에 현대인들에게 건강식으로 인기가 높아지고 있다. 이들 유용생리활성물질 중 genistein, daidzein과 같은 isoflavonoid 가 많은 관심을 끌어 연구의 대상이 되어오고 있다.

Genistein은 *in vitro* 실험, 동물실험, 임상실험에서 뛰어난 항암효과를 가지고 있음이 밝혀졌고 유방암과 전립선암의 예방효과가 높다고 알려졌다. Genistein의 항암효과는 tyrosine kinase 저해작용, angiogenesis 억제작용, topoisomerase 저해작용 등을 통해 설명되고 있다. 또한 genistein은 체내에서 여성호르몬이 estrogen 과 유사한 작용을 하기 때문에 phytoestrogen으로 불리기도 하며 폐경기 여성의 estrogen 결핍으로 유발되는 골다공증의 예방과 진행억제에도 효과가 있는 것으로 알려지고 있다. Daidzein은 뼈에서 혈액으로 칼슘의 재흡수를 억제함으로써 노인과 여성의 골다공증 방지에 효과적이라는 연구가 발표되었다. 또한 최근에는 이들 isoflavonoid를 유아시기에 많이 섭취하면 성인이 되어서도 유방암 등 호르몬 의존성 질병 발생률이 훨씬 낮아진다는 보고가 있다. 최근의 다른 발표에 의하면 isoflavonoid를 함유한 대두단백은 치매예방효과를 갖기도 한다는 보고가 있다. 이런 유용성과 더불어 isoflavonoid는 콩이 심혈관 질환을 낮추는데 있어 관여하는 주요성분이라는 보고도 있다. 이와 같이 콩 isoflavonoid 성분의 유용성 등이 밝혀지면서 미국 등에서는 대두가공식품의 판매가 급성장하고 있고, 최근에는 isoflavonoid 성분만을 추출하여 상품화되고 있다. 그러므로 이전에는 isoflavonoid 성분이 콩 가공제품의 씁쓸한 뒷맛에 관계하여 함량을 낮추는 연구가 진행되었으나 최근에는 오히려 증가시키는 방향으로 관심이 모아지고 있다. 앞으로 사회적으로 노년층이 증가하여 골다공증, 암 등의 노인성 질병 증가가 예상되기 때문에 isoflavonoid를 많이 함유한 콩의 수요는 더욱 더 증가할 것이다. 그러므로 기

술적, 경제적으로 가능한 isoflavonoid 증가 방법이 있다면 이에 대한 연구지원이 이루어져야할 것이다.

3. 식물면역활성제를 이용하여 유용성분이 증가된 콩나물의 생산 및 이를 통한 콩나물의 고부가가치화

콩나물은 우리나라에서 매년 약 8,000억 원 정도의 시장규모를 가진 식품으로 많은 국민의 사랑을 받고 있다. 그러나 습도가 높은 환경에서 재배가 이루어지기 때문에 병 발생이 많아 특히 여름에 여러 재배 공장에서 농약을 사용하여 매년 여름이면 문제가 되고 있다. 또한 콩나물은 미생물 오염이 많아 수학 후 1~2일 정도의 짧은 유통기간으로 수확된 콩나물의 많은 부분이 버려지는 손실이 있다. 그러므로 콩나물 재배 시 농약 사용을 줄일 수 있는 재배 방법 및 수확 후 저장기간을 연장시키는 방법에 대한 연구는 절실하다 하겠다. 이런 이유 때문에 콩나물 재배 시 미생물 오염을 줄이기 위해 많은 연구가 진행되어 왔으나 여전히 여름에는 농약 사용 때문에 문제가 되고 있다. 그러므로 본 연구에서는 elicitor를 이용하여 콩나물 자체의 방어 기작을 증가시켜 농약사용을 줄이는 콩나물 재배 방법을 개발함과 동시에 elicitor에 대한 많은 문헌을 고찰했을 때 elicitor가 isoflavonoid 합성을 위해서도 이용하는 phenylpropanoid pathway를 자극한다는 사실에 착안하여 elicitor를 이용하였을 때 콩나물에 isoflavonoid 함량이 증가되는지를 확인하는데 있다. 그리고 elicitor를 이용하였을 때 isoflavonoid 함량이 증가하였다면 이의 증가를 위한 최적의 조건을 확립하는데 그 목표가 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발 목표와 내용

○ 항암·항골다공증 등 여러 가지 생리활성이 잘 알려진 isoflavonoid (genistein, daidzein) 함량이 증가된 콩나물의 생산을 통해 콩나물의 부가가치를 높힌다. 부수적으로 콩나물에 적용되었던 기술을 콩에 적용하여 기능성 콩 재배방법을 개발하는 것이 목표이었다.

- 식물면역활성제(elicitor) 처리에 의한 콩과 콩나물의 isoflavone 함량증가 방법 개발

(적정 식물면역활성제 선발 및 효과조사)

- 콩나물, 콩에서 isoflavone 최대생산을 위한 적정 처리조건 구명
- 콩나물 공장에서 실증실험
- 콩나물에서 elicitor처리에 의한 다른 기능성물질 변화 조사

○ 식물면역활성제(elictor)를 이용함으로써 콩, 콩나물의 병에 대한 저항성을 증진시킨다. 이러므로써 농약사용을 줄이는 환경 친화적인 재배방법을 도모한다.

- 콩나물, 콩에서 병 저항성 등 생육특성에 대한 효과 구명
- 여러 가지 병원균에 대한 저항성 검토
- 콩나물의 유통기간 연장에 대한 효과 조사

2. 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2000)	<제 1 세부과제> ○처리 elicitor 종류에 따른 콩나물의 isoflavonoid 함량 변화 조사 및 선발된 elicitor 처리의 최적화	○ β-glucan의 제조 - Cotyledon assay를 통한 활성조사 ○ Oligogalacturonide의 제조 ○ 식물면역활성제 (chitosan, β-glucan, oligogalacturonide)의 효과 조사 (isoflavonoid 함량 변화에 미치는 영향) - chitosan, β-glucan, oligogalacturonide을 각각 처리하였을 때 isoflavonoid 함량 변화. - 식물면역활성제 농도에 따른 효과 - 분자량 변화에 따른 효과 조사 - 식물면역활성제 처리시기 조사 - Phytoalexin 함량 변화 조사 (안전성 확립을 위해 필요) ○ 식물 면역활성제 처리에 의한 다른 기능성 물질의 변화 ○ 콩나물 수확 후 유통기간 연장에 미치는 식물면역활성제의 효과 (Ⅰ)-일부 실험 - 재배 중 처리의 효과
	<제 2 세부과제> ○ 콩 재 배 중 elicitor를 처리하였을 때 isoflavonoid 함량이 증가하는지 확인	○ 식물면역활성제 선발 - 키토산, β-glucan, 혼합처리 등 ○ 식물면역활성제 처리에 의한 콩 생육 및 isoflavonoid 함량 변화 조사 - 처리방법별 isoflavoniod 함량조사 - 처리농도별 효과조사 - 종자성숙시기별 isoflavonoid 함량조사 - 처리에 의한 생육특성변화 조사

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2001)	<제 1 세부과제> ○ 콩나물 재배시 elicitor를 처리하였을 때 여러 가지 병원균에 대한 저항성이 증가하는지 확인 ○ 콩나물 수확 후 유통기간 연장에 관한 연구 ○ 콩나물공장에서의 재배시험	○ 식물면역활성제의 효과 (인위적 감염 이용) - 곰팡이 병원균에 대한 저항성 증가 효과 - 박테리아 병원균에 대한 저항성 증가 효과 - 식물 방어단백질 변화 조사(elicitor 처리에 따른 단백질 변화조사) ○ 동물실험을 통한 생체 유해검사 ○ 콩나물 수확 후 유통기간 연장에 미치는 식물면역활성제의 효과 (Ⅱ) - 재배 중 처리의 효과 - 수확 후 처리의 효과 ○ 공장에서 실증시험 - isoflavonoid 함량에 미치는 효과
	<제 2 세부과제> ○ 콩 재배시 elicitor 처리조건 구명 및 병 저항성 조사	○ 식물면역활성제의 처리 시 전착제 효과 조사 -전착제 혼합처리에 따른 효과 조사 ○ 스트레스 조건하의 식물면역활성제 처리 효과 조사 - 한발 조건하의 식물면역활성제 처리 시 isoflavone 함량조사 ○병 저항성검정 -콩 유모에서의 식물면역활성제 처리시 병 저항성 조사

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

본 연구는 콩나물 재배에서 문제가 되고 있는 농약 사용을 줄이기 위함과 더불어 콩나물의 기능성 물질을 증가시키기 위한 시도로 식물면역활성 물질을 사용하였으

며 이의 이용이 콩나물에 어떤 영향을 주는 지를 조사하였다. 또한 더 나아가 콩나물 재배에 이용했던 기술이 콩 재배 시에도 적용하여 콩수량 및 종실 내 isoflavonoid 함량이 증가된 고품질 기능성 콩을 생산할 수 있는지를 조사하였다.

가. 식물 면역 활성물질을 이용한 콩나물의 고품질화 기술개발

식물 면역 활성물질은 많은 보고에서 식물의 이차대사 산물을 증가시키는 것으로 되어 있다. 많은 이차 대사산물은 인간에 있어서 항암, 항산화, 혈중콜레스테롤 저하 기능 등 다양한 생리조절 능력을 갖는 것으로 알려져 있다. 콩에는 isoflavone같은 2차 대사산물이 있는데, 이것은 인간의 건강에 있어 다양하게 유익한 점을 가지고 있기 때문에 많은 과학자들은 이것에 대한 연구를 계속해서 시도하고 있다. 이에 본 연구에서는 콩나물 재배동안 식물면역활성제로서 chitosan과 β-glucan 두 가지를 처리함으로서 콩나물의 생장특성과 isoflavone함량의 변화, 그리고 다른 기능성 성분의 함량을 조사하였다.

이런 연구를 위해 먼저 elicitor 중 β-glucan과 oligogalacturonide를 제조하였다. oligogalacturonide는 pectin에서 제조하였는데 isoflavonoid 증가 효과를 보았을 때 별로 효과가 없어 이다음 실험에는 chitosan은 회사로부터 공급받았으며 β-glucan은 맥주 폐효모를 산 가수분해하여 얻었다. β-glucan은 콩나물에서 chitosan 보다 훨씬 낮은 농도인 *ng*/㎖ 단위에서 elicitor 활성을 보이는 것으로 나타났으며 이의 경제적 생산을 위하여 기존에 많이 쓰는 Trifluoroacetic acid(TFA) 대신에 단가가 싸고 식품안전성에 문제가 덜한 HCl을 대체 용매로 사용하여 추출조건을 확립하였다.

β-glucan을 TFA대신 HCl으로 제조한 결과 85℃의 온도에서 0.5 M의 농도로 40분간 가수분해한 결과 TFA를 쓸 때 보다 많은 β-glucan을 얻을 수 있었으며, 추출한 β-glucan의 식물면역활성 기능을 soybean cotyledon assay를 통해 측정한 결과 TFA를 이용 추출한 β-glucan과 비슷한 활성을 가지고 있었다. HCl 처리에 의해 생성된 β-glucan의 구성성분은 단백질이 26.4%, 총당은 9%이며 조지방과 회분은 극히 미량이었다. 제조한 β-glucan의 분자량은 10,000과 40,000사이에 존재하였다.

이렇게 생산한 β-glucan과 chitosan을 콩나물 재배에 사용하였을 때 콩나물의 발아

율은 약 5~10%정도 증가하였으며 콩나물의 길이는 짧아지고 굵기는 두꺼워지는 경향이 보였다. Isoflavonoid 증가효과는 β-glucan, chitosan 둘 다 있었으며 chitosan 분자량에 따른 효과를 조사하였을 때 30 cps chitosan을 사용하였을 경우 효과가 좋았다. Chitosan 농도에 따른 효과는 30 cps 키토산을 사용하였을 경우 키토산 농도가 0.05% 일 때 가장 좋았으며 그 이후는 감소하는 경향을 보였다.

다른 기능성분 활성을 조사한 결과 chitosan처리에 의해 항산화 활성이 증가하는 것을 볼 수 있었고, elicitor처리에 의한 아질산염 소거능은 거의 변화가 없는 것으로 나타났고, 이는 무처리구에도 마찬가지이므로 콩나물 자체에 아질산염 소거능이 거의 없는 것으로 판단된다. 또한 여러 기능성이 알려진 사포닌 함량을 조사한 결과 elicitor 처리한 콩나물이 무처리 콩나물보다 높은 함량을 가졌다.

Elicitor 처리가 콩나물의 병에 대한 저항성을 증가시키는 지를 알아보기 위하여 콩의 병원균으로 알려진 *Phytophthora sojae*와 콩나물에서 분리된 병원균 *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*를 인위적으로 감염시켰을 때 무처리 콩나물에 비하여 elicitor 처리 콩나물이 감염정도가 약하고 elicitor 처리 콩나물 중에서도 특히 chitosan, β-glucan 혼합처리 콩나물이 모든 감염 처리에서 강한 저항성을 보였다. 이것은 즉 elicitor 처리에 의해 콩나물 생체 내에서 방어 기작의 변화가 온 것으로 볼 수 있어서 elicitor 처리 콩나물에서 일부 방어 단백질의 변화를 분석한 결과 trypsin inhibitor, β-1,3-glucanase, phenylalanine-ammonialyase activity 는 처음에는 상당량이 존재하나 성장하는 과정에서 많이 감소하는 경향을 나타내었지만 elicitor처리 콩나물이 무처리 콩나물에 비하여 성장한지 6시간까지의 초기 activity도 현저하게 많을 뿐만 아니라 72시간 후에도 잔존하는 activity 또한 훨씬 많다는 것을 확인할 수 있었다.

콩나물은 유통기간이 짧은 것이 문제가 되어 elicitor 처리를 통해 유통기간 연장이 가능한지를 조사하였다. 그 결과 elicitor 처리한 콩나물이 총균수에 있어 약 80~90% 정도 감소하는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 elicitor 처리를 통해 유통기간 연장이 가능하다는 것을 제시한다. 또한 isoflavonoid도 수확 직후의 높은 함량을 그대로 유지하는 것이 관찰되었다.

위와 같은 실험실에서의 재배결과가 공장에서 대규모로 재배하였을 때에도 적용되

는지를 알기 위해 공장에서 실증실험을 한 결과 실험실에서와 비슷한 결과가 나왔다. 즉 발아율 수율에 있어 elicitor를 처리하였을 때 높았으며 isoflavonoid 함량도 증가하였다. 특히 맛에 어떤 영향을 주었는지를 알아보기 위하여 관능평가를 한 결과 기호도가 상승된 것으로 나왔다.

Elicitor가 우리가 모르는 어떤 독성물질을 증가시킬 수 있다는 가능성을 고려하여 쥐를 이용하여 독성 실험을 하였다. 암·수 rat 각 40마리를 이용하여 콩나물 건조분말을 최고 10%까지 시료에 혼합, 90일간 투여하면서 투여군에서 체중의 변화, 사료섭취량, 음수량, 행동의 변화, 혈액학, 혈청생화학적 변수, 주요 장기의 조직학적 측면에 영향이 나타나는가를 시험하였다. 그 결과 어떤 변수에서도 시험시료의 투여와 관련되었다고 판단할 만한 변화가 관찰되지 않았기 때문에 이 콩나물시료가 인간에 심각한 독성을 미칠 가능성은 거의 없다고 판단된다. 이 시험에서 사용한 최고 혼합농도인 10%는 콩나물 습중량으로 역산하면 인간(65 ㎏ 기준)이 매일 2.1~7.5 ㎏(마켓에서 파는 콩나물 25봉지에 해당)를 섭취하는 경우와 비교할 만할 것이다. 일반적으로 인간이 매일 콩나물을 섭취하는 양이 300 g 정도로 가정한다면 rat과 인간의 감도차이를 고려한다고 하더라도 충분히 안전하다고 볼 수 있다.

나. 식물면역활성제(elicitor)를 이용한 기능성 콩 재배기술 개발

식물면역활성제인 키토산과 글루칸 용액을 콩 종자 및 잎에 처리하여 수량 및 isoflavonoid 함량 변화를 조사하였으며 수행된 실험은 발아율 조사, elicitor 처리효과, 한발스트레스하의 elicitor 효과, 전착제 혼용시 elicitor의 효과, 병저항성 조사 등이었다.

Elicitor 처리별 포장출아율을 조사한 결과 신팔달콩에서는 무처리 62%에 비해 처리구인 키토산 70%, 글루칸 68%, 혼합처리 71%로 더 높은 출아율을 보였으며 태광콩의 경우도 동일한 경향을 보였다.

고농도의 elicitor 종자침지 처리 후 유묘생장을 조사한 결과, 키토산 처리에서는 무처리와 비슷한 생육량과 입모율을 보였으나 글루칸처리에서는 발아 및 입모율이 낮았으며 생육저해효과를 보였다.

Elicitor 처리에 의한 콩 수량의 변화를 조사한 결과, 신팔달콩보다는 태광콩에서 수량증가효과를 나타냈고 혼합처리가 단독처리보다 더 높은 종실수량을 보였다. 포트

재배의 경우 두 품종 모두에서 종실수량 증가효과를 볼 수 있었으며 혼합처리구에서 신팔달 23.0g/plant, 태광 13.5g/plant로 가장 높은 수량을 보였고 다음으로 키토산처리구, 글루칸처리구, 무처리 순으로 나타났다. 처리농도별로는 키토산은 중농도, 글루칸은 저농도에서 종실수량이 높았으며, 처리시기에서는 신팔달콩은 개화후처리구, 태광콩은 개화전처리구에서 더 높은 수량을 보였다.

Elicitor 처리에 따른 콩 종실내 isoflavonoid 함량을 조사한 결과, 전반적으로 처리별 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나 태광콩에서 무처리구 보다 처리구에서 높은 함량을 보였으며 키토산 처리구가 3.79mg/10g으로 가장 높은 함량을 보였다. 포트재배에서도 신팔달콩보다 태광콩에서 더 높은 함량증가를 보였고 키토산 고농도처리구에서 4.76mg/10g으로 가장 높은 isoflavonoid 함량을 나타냈다. 처리시기별로는 신팔달콩은 개화후처리, 태광콩은 개화전처리에서 높은 함량을 보였고 처리종류별로는 두 품종에서 모두 혼합처리구가 가장 높은 함량을 보였다.

한발스트레스 조건에서의 elicitor 효과를 조사한 결과, 지상부생육량, 백립중, 그리고 개체 종실수량은 한발처리로 감소하는 경향이었다. 근류발생은 글루칸처리에서 한발처리<한발무처리<무처리 순으로 높았고 키토산처리에서는 한발무처리<무처리<한발처리 순으로 높게 나타나 키토산 처리로 근류발생의 증가 또는 회복이 가능한 것으로 생각되었다. Isoflavonoid 함량을 보면 키토산처리구가 무처리구보다 높은 함량을 보였지만 한발처리로 함량이 증가되지는 않은 것으로 나타났다.

전착제 혼용처리시 elicitor의 효과를 조사한 결과를 보면, 경장 등 생육형질에는 거의 차이가 없었고 종실수량에서는 키토산처리구가 글루칸처리구보다 높았고 전착제 혼용처리구가 비혼용구보다 더 높게 나타났다. 근류발생은 처리구가 높았으나 전착제혼용처리구가 단독처리구보다 낮은 근류발생을 보였다. Isoflavonoid 함량을 보면 키토산처리구가 무처리구보다는 높은 함량을 보였으며 전착제혼용처리에 의해 더 증진된 함량증가 효과를 나타냈다.

Elicitor 처리시 병저항성 정도를 조사하기 위해 콩 잎에 불마름병(*Xanthomonas campestris*)을 접종한 결과, 무처리구 보다 처리구인 키토산처리구, 글루칸처리구, 혼합처리구에서 모두 낮은 감염정도를 보였고 키토산처리구에서 가장 강한 저항성을 보여 elicitor 처리에 의해 저항성이 증진되었음이 확인되었다.

2. 활용에 대한 건의

○ 콩나물은 연간 매출액이 8000억 정도 되는 큰 시장을 형성하고 있다. 그러나 대부분의 재배인들은 영세한 규모로 사업을 운영하고 있다. 이들 영세한 재배인 들은 매년 여름이면 콩나물 재배 중 농약을 사용하였다는 보도에 큰 타격을 입고 있다. 이와 함께 소비자들의 불신만 깊어져 어떤 소비자는 콩나물을 계속적으로 외면하기도 한다. 이렇게 될 경우 콩나물사업 자체가 위태로운 지경에 이를 수도 있다. 여기서 벗어나는 길은 소비자의 신뢰회복을 이끌어 내는 것인데 이를 위해 콩나물의 고급화를 통한 brand화가 하나의 방편이라 생각한다. 즉 어느 콩나물 brand는 믿을 수 있다는 신뢰감을 소비자에게 주는 것이다. 이를 위해 즉 기능성이 증가된 콩나물을 brand화하고 (예를 들어 “후라보콩나물” 등으로 상표등록)철저한 품질관리를 통해 약간 더 비싸더라도 소비자의 신뢰회복을 꾀하는 것이다.

이를 위해 본 연구에서 개발된 기능성분이 증가된 콩나물이 적당할 것이란 생각을 한다. 본 연구에서 개발된 콩나물은 콩나물의 고질적인 문제인 재배중 병에 쉽게 감염되는 점, 짧은 유통기간의 문제를 어느 정도 해결하고 콩의 주요한 기능성분인 isoflavonoid가 증대되었다는 점에서 소비자로부터 호응도가 높을 것이란 생각이 든다.

그러나 이런 좋은 점을 소비자가 알아야 하는데 그러기 위해 광고를 하는게 필요한 실정이나 영세한 중소기업 같은 경우는 이런 광고를 위한 비용을 감당하기가 힘든 형편이다. 개발된 제품의 홍보를 위한 지원이 매우 필요하다.

○ 콩의 국내 총생산량은 14만톤 (1998년)으로 전체 소비량의 약 10%를 차지하고 나머지는 수입해서 사용하고 있다. 앞으로 콩 등을 수입할 때 가격협상을 할 때도 그렇고 식량안보라는 차원에서도 최소한의 국내 생산량은 유지하는 것이 필요할 것이다. 그러나 WTO 체제하에서 국내에서의 콩생산은 점점 경쟁력을 잃어가고 있어 품질 고급화 등을 통한 외국 콩제품과의 차별화가 절실히 필요한 실정이다.

이런 점에 있어 생리활성 성분인 isoflavonoids가 증가된 콩의 재배법 개발은 콩의 부가가치를 상승시킴과 동시에 우리나라 콩생산의 국제 경쟁력을 증가시키는 데 큰 기여를 할 것이라 여겨진다. 또한 콩을 이용한 가공제품 산업에도 영향을 끼쳐 많은 회사 (예 : 두부, 두유, isoflavonoid 생산회사)들이 isoflavonoid 함량이 증가된 콩을

사용할 가능성이 높다. 또한 우리나라는 OECD에 가입 후 농약사용을 줄여야 된다는 압력을 받고 있다. Elicitor를 이용하여 재배하는 콩의 병 저항성이 증가한다면 농약사용을 줄 일 수 있어 환경 친화형 농업이 가능할 것이다.

이런 점을 고려할 때 본 연구는 고무적이라 할 수 있다. 종실수량 증가, 종실에서 isoflavonoid 증가가 일어난다는 확실한 결과는 얻지 못하였지만 유묘 시에는 elicitor 처리에 의하여 크기가 더욱 커지고 병에 대한 저항성이 증가된다는 결과를 얻었기 때문이다 이와 더불어 유묘에 있어 몇가지 방어 단백질을 조사하였을 때 방어 단백질의 증가가 확실이 있어 elicitor가 콩에 영향을 준다는 것은 의심의 여지가 없다. 그러므로 성숙하였을 때 elicitor의 영향이 불확실하게 된 것의 원인이 무엇인지 아는 것이 콩의 중요성에 비추어 보았을 때 매우 필요할 것이라 생각된다. 예를 들면 유묘일때의 처리 방법과 성숙했을때의 elicitor 처리 방법에 차이가 있는데, 원인이 처리 방법의 차이에 기인한 것인지 이런 것들에 대한 정밀한 실험이 보강되어야 하고 이에 대한 지원이 있었으면 한다.

SUMMARY

I. Title

Development of cultivation method for high quality soybean sprout using elicitors

II. Objectives and significance

○ Elicitor: Elicitors are defined as molecules that induce defense responses in plants. Elicitors could be proteins, carbohydrates, fatty acid, etc. In this work, we used carbohydrate elicitors such as chitosan, β-glucan, and oligogalacturonides.

○ Annual total sale of soybean sprout is about 800 billion won. However, soybean sprout industry has frequently been threatened especially during summer time from pesticide use by some growers as soybean grows under high humidity condition and thus gets easily infected by the phytopathogens. Another problem of soybean sprout industry is short shelf-life of soybean sprout. To overcome these problems, we tested whether elicitors enhance resistance against pathogens and therefore increase shelf-life of soybean sprout.

○ Soybean contains various health-beneficial substances. Among them, isoflavonoids attract much attention from many scientists as some of them have anticancer, antiosteoporesis, blood-cholesterol lowering, antioxidative activities, etc. It is known that elicitors stimulate phenylpropanoid pathway and that isoflavonoids are synthesized through this pathway. We tested whether elicitors increase isoflavonoid contents in soybean sprout and soybean.

Ⅲ. Research Results and suggestions

The first part of this research was conducted to develop a method to cultivate soybean sprout with high content of isoflavonoids and longer shelf-life using elicitors such as chitosan and β-glucan. Elicitors are defined as molecules that induce defense responses in plants. Therefore, possibility of using elicitors to improve resistance against phytopathogens was also investigated.

This second study(Part 2) was carried out to develop cultivation method for producing functional soybean enhanced in seed yield and isoflavonoid content through foliar spaying and seed soaking treatment of elicitors, chitosan and β-glucan solution, during soybean growing.

1. Development of cultivation method for high quality soybean sprout using elicitors

Elicitors are defined as molecules that induce defense responses in plants, which include the increased synthesis of secondary metabolites. Many of secondary metabolites have various physiological effects such as anticancer, antioxidative, cholesterol -lowering activities, etc. in human. In soybean, isoflavonoids, which are also secondary metabolites, have had much attention from many scientists because of their various beneficial effects on human health. We have investigated changes of the isoflavonoid contents and other functional substances, and growing characteristics in soybean sprout treated with two elicitors such as chitosan and β-glucan during cultivation. After soaking for six hours in elicitor solution containing lactic acid or acetic acid to dissolve chitosan, soybean was cultivated by supplying water for three min at every four hours and by treating elicitor solution twice a day. Elicitor-treated soybean sprout showed increase in germination rate by 5-10% compared with untreated soybean sprout. β

-Glucan-treated soybean sprout showed that the stem diameter became thicker and the stem length decreased compared to the untreated soybean sprout. Content of isoflavonoids including genistein and daidzein increased in soybean sprout by treatments of both chitosan and β-glucan, and was maintained during storage at 4℃ after harvest. In addition to isoflavonoids, other health-beneficial substances were also investigated. Total phenolic compounds increased by elicitor treatment. Antioxidative activities also increased by elicitor treatment, but nitrite-scavenging activity was not affected.

We have also investigated whether elicitor treatment on soybean sprout enhances resistance against various pathogens and thus increases shelf-life of soybean sprout. Soybean sprouts were treated with chitosan, β-glucan, or combination of chitosan and β-glucan during cultivation. β-glucan was obtained from used btewing yeast by partial acid hydrolysis using HCl. The soybean sprouts were infected with a fungal pathogen *Phytophthpra sojae,* and two bacterial pathogens, *Bacillus subtilis* and *Bacillus coagulans.* The elicitor-treated soybean sprout showed enhanced resistance against all pathogens tested, while untreated woybean sprout was infected severely. The soybean sprout treated by combination of chitosna and β-glucan showed higher resistance than other elicitor-treated soybean sprouts.

The elicitor-treated soybean sprouts contained higher activities of defence-related proteins such as β-1,3 glucanase, protease inhibitor, and phenylalanine ammonia-lyase. About 80-90% reduction of total microorganism number in soybean sprout by elicitor treatment was observed, suggesting that shelf-life of soybean sprout could be extended by elicitor treatment. Reduction of microorganism number was most significant in the soybean sprout treated by combination of chitosan and β-glucan. High contents of isoflavonoids, phenolic compounds, and antioxidative activity were maintained for several days after harvest. Soybean sprout cultivated in large scale at a company. also showed

higher content of isoflavonoids and higher growth rate as soybean sprout cultivated in small scale at laboratory.

There is a possibility that elicitor treatment could increase toxic substances in soyben sprout which we do not know. We checked whether elicitors induce synthesis of phytoalexin which is toxic to animal cells. Chitosan did not induce phytoalexin synthesis. However, β-glucan induced synthesis of phytoalexin, but not significant amount in the condition we used. We also investigated safety of elicitor-treated soybean sprout using rat. The rats were fed with food containing maximum 10% soybean sprout powder. This amount corresponds to the amount of about 7.5 kg in man weighing 65 kg. We checked change of weight, water cosumption, behaviour change, blood, biochemical changes of serum, pathological and histological changes of internal organs. We did not see any differences between rats fed with food containing elicitor-treated soybean sprout and rats fed with regular food.

2. Development of cultivation techniques for producing functional soybean using chitosan and β-glucan, as plant immune elicitor

According to seed soaking and foliar spraying treatment of chitosan and β-glucan solution, changes of content of isoflavonoids, didzein and genistein, and seed yield were investigated by several experiments, germination test, elicitor treatment with different concentration, variety, spraying period and kind of elicitors, elicitor effect under drought stress, elicitor effect by mixing with spreader-sticker, and pathogen resistance test.In emergence rate at field of seeds soaked with elicitor solution, there were higher rates, 70% of chitosan, 68% of glucan, 71% of mixture of chitosan and glucan than 62% of control in Sinpaldalkong, showing similar trends to those in Taekwangkong. In changes of seedling growth according to seed soaking at high concentration of elicitor, chitosan treatment showed the similar growth and establishment rates of

seedling compared with control, but glucan treatment showed lower germination rate and growth inhibition.In changes of soybean seed yield as treated with elicitors during cultivation, treatment effect in Taekwangkong was better than in Sinpaldalkong. Seed yield in plot of mixture solution was higher than single elicitor solution. In case of pot cultivation experiment, yield increase effect was showed in all plots of two varieties. Among them, mixture treatment plot showed the highest yields, 23.0g/plant of Sinpaldalkong and 13.5g/plant of Taekwangkong and higher yield was obtained in order of chitosan, glucan, control plots. In different concentration and treatment periods of elicitors, higher seed yields appeared in middle concentration of chitosan and low concentration of glucan, and in spraying after flowering of Sinpaldalkong and in spraying before flowering of Taekwangkong.

As treated with elicitor, isoflavonoid contents of soybean seed had no significant difference but elicitor treatment plots showed higher contents than control plot in Taekwangkong, showing highest content (3.79mg/10g) in chitosan plot. In pot cultivation experiment, increase effect of isoflavonoid content in Taekwangkong was higher than in Sinpaldalkong, showing highest content of isoflavonoid (4.76mg/10g) in plot of high concentration of chitosan elicitor. Spraying after flowering of Sinpaldalkong and before flowering of Taekwangkong were led to more increase of isoflavonoid than other treatment periods, and mixture solution plot showed higher content of isoflavonoid than plots of chitosan and glucan.

As treated with elicitor under drought stress condition, top growth, 100 seed weight and seed yield per plant were decreased. In number and weight of root nodules produced during cultivation, there were higher in order of drought stress+elicitor (DE) < no stress+elicitor (NE) < control (CO) in glucan plot, while NE < CO < DE in chitosan plot. So it was supposed that roots have increase of nodule or recovery of nodule productivity by treatment of chitosan elicitor. Chitosan plot showed higher content of isoflavonoid than control, and

drought stress did not showed any increase of isoflavonoid contents.

The treatment of elicitors mixed with spreader-sticker(SS) for adsorbing of elicitor did not showed great differences between treatments in growth characters such as plant height, node numbers etc. but seed yield was higher in chitosan plot than in glucan plot. Elicitor mixed with SS more increased seed yield than only elicitor. Production of root nodules was higher in elicitor plots than in control plot, and was lower in plot of elicitor mixed with SS than in plot of only elicitor. Chitosan plot showed higher content of isoflavonoid than control plot, and elicitor mixed with SS induced to more increase of isoflavonoid content.

To understand changes of disease resistance by elicitor treatment, soybean leaves were infected with bacterial pustule(*Xanthomonas campestris*). In all elicitor plots, chitosan, glucan and mixture plot was observed lower infection degree, showing highest resistance in chitosan plot. This indicated that pathogen resistance of soybean plant was increased with elicitor treatment.

CONTENTS

Summary 2

Chapter 1. Development of cultivation method for high quality soybean sprout using elicitors 41

Section 1. Meterials & Methods 41

1. Material and prepartation 41

a. Soybean 41

b. Preparation of chitosan solution 41

c. Preparation of β-glucan 41

d. Preparation of oligogalacturonid 43

2. Methods 43

A. Isoflavone analysis 43

1) Extrction of glycosides 43

2) Aglycone 43

3) Determination of flavonoid contents 43

4) Cultivation conditions of soybean sprout 44

B. Analysis of other functional substances 44

1) Determination of total phenolic compounds 44

2) Antioxidantive activities based on electron-donating ability 44

3) Determination of nitrite-scavenging activity 45

4) Saponin ····· 46
a) Extraction of crude glucoside mixture ····· 46
b) Analysis of saponin using Lieberman-Burchurd colorimeteric assay ····· 46
c) HPLC analysis ····· 46
C. β-glucan analysis ····· 47
1) Determination of β-glucan using anthrone ····· 47
2) Soybean cotyledon elicitor bio-assay ····· 47
3) Analysis of general compounds ····· 47
4) Sugar analysis ····· 47
5) Molecular weight determination using Gel-filtration Chromatography ····· 47
D. Artificial infection using plant pathogens ····· 48
1) Pathogens ····· 48
2) Media ····· 48
3) Cultivation of pathogens ····· 48
4) Infection ····· 48
E. Defence - related substances ····· 49
1) Preparation of crude proteins ····· 49
2) Protease inhibitor activity ····· 49
3)β-1,3 glucanase activity ····· 49
4) Phenylalanine ammonia-lyase activity ····· 49
5) Total phenolic compounds ····· 50
F. Effects of elicitor treatments on shelf-life of soybean sprout ····· 50
1) Decay rate ····· 50
2) Chlorophyll content ····· 51
3) Colorimetric analysis ····· 52
4) Determination of total microorganisms ····· 52
G. Growth characteristics of soybean sprout ····· 52
1) Stem length ····· 52

2) Stem diameter ····· 52
3) Germination rate조사 ····· 52
4) Yield ····· 53
5) Sensory evaluation ····· 53

Section 2. Results & Discussion ····· 53

1. Extraction of β-glucan ····· 53
a. Extraction time ····· 53
b. Effect of acid concentration ····· 54
c. Effect of acid type ····· 54
d. Cotyledon assay for elicitor activity determination ····· 55
e. General component analysis ····· 55
f. Determination of molecular weight ····· 55

2. Effect of various elicitors on isoflavonoid contents of soybean sprout ····· 61
a. Effect of β-glucan ····· 61
b. Effect of chitosan ····· 63
1) Effect of concentration ····· 63
2) Effect of molecular weight ····· 65
3) Effect of water-soluble chitosan ····· 65
다. Effect of oligogalacturonide ····· 67

3. effect of elicitors on growth characteristics and functional substances ····· 68
A. Growth characteristics ····· 68

1) Germination rate ····· 68
2) Stem length and diameter ····· 69
B. Various elicitors and isoflavonoid content ····· 71
1) Glycoside content ····· 71
2) Aglycone content ····· 72
3) Phytoalexin content ····· 72
C. Analysis of other functional substances ····· 73
1) Total phenolic content ····· 73
2) Antioxidative activity ····· 74
3) Nitrite-scavenging activity ····· 75
4) Saponin content ····· 76
a) Effect of chitosan ····· 77
b) Effect of β-glucan ····· 78
c) Effect of oligogalacturonide ····· 79

4. Effect of elicitors on shelf-life of soybean sprout ····· 80
A. Change of tatal microorganism number ····· 80
B. Decay rate ····· 81
C. Changes of functional substances ····· 82
1) Isoflavone ····· 82
2) Total phenolic compounds ····· 84
3) Antioxidative activity ····· 86
4) Chlorophyll content ····· 87

5. Analysis of resistance against phytopathogens using artificial infection ····· 90
A. Enhanced resistance against phytopathogens ····· 90
B. Defence-related substances ····· 92

1) β-1,3- glucanase activity ····· 92
2) Protease inhibitor activity ····· 93
3) Phenylalanine ammonia-lyase activity (PAL) ····· 93
4) Total phenolic compounds ····· 93

6. Experiments in soybean sprout company ····· 97
a. Yield ····· 97
b. Germination rate ····· 98
c. Isoflavonoid content ····· 98
d. Sensory evaluation ····· 98

Chapter 2. Safety evaluation of functional soybean sprout using rat ····· 104

Section 1. Purpose ····· 104

Section 2. Materials & Methods ····· 104

1. Materials ····· 104
2. Animals and growing conditions ····· 105
3. Observation and Analysis ····· 105
a. Clinical diagnosis and body weight ····· 105
b. Feed intake and water consumption ····· 106
c. Blood analysis ····· 106
d. Biochemical analysis of serum ····· 106
e. Internal organ weight analysis ····· 106

f. Pathological and histological analysis ····· 107
4. Statistical analysis ····· 107

Section 3. Results ····· 107

1. Dead animals and clinical diagnosis ····· 107
2. Body weight ····· 107
3. Feed consumption ····· 107
4. Water consumption ····· 107
5. Blood analysis ····· 108
6. Biochemical analysis of serum ····· 108
7. Internal organ weight analysis ····· 108
8. Eye observation ····· 108
9. Pathological and histological analysis ····· 108

Section 4. Concluding remarks ····· 109

Chapter 3. Development of cultivation techniques to produce soybean ····· 124

Section 1. Purpose ····· 124

Section 2. Materiala & Methods ····· 125

1. Materials ····· 125

2. Germinations and seedling growth characteristics ····· 125
3. Cultivation ····· 126
4. Elicitor treatment ····· 126
5. Application of draught and detergent ····· 126
6. Growth and yield ····· 127
7. Isoflavonoid content석 ····· 127
8. Infection ····· 128

Section 3. Results and Discussion ····· 128

1. Germination and seedling growth characteristics ····· 128
2. Effect of elicitor type and treatment methods on soybean growth characteristics ····· 135
3. Isoflavonoid content ····· 142
4. Effect of elicitors under draught condition ····· 149
5. Effect of detergents ····· 152
6. Effect of elicitors on resistance against phytopathogens ····· 156

목 차

요 약 문 ····· 2

Summary ····· 14

제1장 식물면역활성제를 이용한 기능성 콩나물의 재배 ·· 41

제 1절 재료 및 방법 ····· 41

1. 실험재료 및 제조 ····· 41

가. 콩 ····· 41

나. Chitosan 용액 제조 ····· 41

다. β-glucan 용액 제조 ····· 41

라. Oligogalacturonide 제조 ····· 43

2. 실험방법 ····· 43

가. Isoflavone 분석 ····· 43

1) glycoside 추출액의 제조 ····· 43

2) Aglycone ····· 43

3) HPLC 분석과 flavonoid 정량 ····· 43

4) 콩나물 재배 조건 ····· 44

나. 다른 기능성 물질의 분석 ····· 44

1) 총 페놀 화합물 측정 ····· 44

2) 전자공여능에 의한 항산화측정 ····· 44

3) 아질산염 소거작용의 측정 ····· 45
4) 사포닌함량 측정 ····· 46
가) Crude glucoside mixture 추출 ····· 46
나) Lieberman-Burchurd 정색반응을 통한 사포닌 분석 ····· 46
다) Saponin의 HPLC 분석 ····· 46
다. β-glucan의 분석 ····· 47
1) Anthrone assay에 의한 β-glucan의 정량 ····· 47
2) β- glucan의 soybean cotyledon elicitor bio-assay ····· 47
3) 일반성분 분석 ····· 47
4) 당분석 ····· 47
5) Gel- filtration Chromatography에 의한 분자량 측정 ····· 47
라. 병원균 감염에 의한 저항성 비교 ····· 48
1) 사용 균주 ····· 48
2) 배지조성 ····· 48
3) 병원균의 배양 ····· 48
4) Infection 조건 ····· 48
마. 콩나물에 존재하는 여러 방어물질 조사 ····· 49
1) 콩나물 조효소액 조제 ····· 49
2) Protease inhibitor activity 측정 ····· 49
3)β-1,3 glucanase activity 측정 ····· 49
4) Phenylalanine ammonia-lyase activity 측정 ····· 49
5) Total phenolic compound 측정 ····· 50
바. 콩나물 수확 후 유통기간에 미치는 elicitor의 효과 ····· 50
1) 부패율 측정 ····· 50
2) Chlorophyll 함량 측정 ····· 51
3) 색도 측정 ····· 52
4) 총균수 측정 ····· 52
사. 콩나물의 생장 특성 관찰 ····· 52

1) 콩나물 줄기의 길이 측정 ····· 51
2) 콩나물 줄기의 굵기 측정 ····· 52
3) 콩나물의 발아율 조사 ····· 52
4) 콩나물의 수율조사 ····· 53
5) 관능검사 ····· 53

제2절 결과 및 고찰 ····· 53

1. β-glucan 의 최적 추출 조건 ····· 53
가. 추출시간에 따른 조건 ····· 53
나. 추출농도에 따른 조건 ····· 54
다. 산 종류에 따른 β-glucan의 함량 조사 ····· 54
라. Cotyledon assay를 통한 β-glucan의 활성 측정 ····· 55
마. 제조한 β-glucan의 일반성분 ····· 55
바. 제조한 β-glucan의 분자량 ····· 55

2. 처리 elicitor 종류에 따른 콩나물의 isoflavonoid 함량 변화조사 · 61
가. β-glucan을 처리하였을 때 isoflavone 함량 변화 ····· 61
나. Chitosan을 처리하였을 때 isoflavone 함량 변화 ····· 63
1) Chitosan 농도별 처리에 따른 효과 ····· 63
2) Chitosan 분자량 변화에 따른 효과 ····· 65
3) 수용성 chitosan 분자량 변화에 따른 효과 ····· 65
다. Oligogalacturonide를 처리했을 때 isoflavone 함량변화 ····· 67

3. 콩나물 재배시 elicitor 처리에 따른 생장특성과 기능성 성분함량 변화
····· 68
가. 콩나물의 생장특성 ····· 68

1) 발아율 ····· 68
2) 콩나물의 길이 및 굵기 측정 ····· 69
나. 다양한 식물면역활성제 처리에 따른 isoflavone 함량 ····· 71
1) Elicitor 처리한 콩나물의 glycoside 함량 ····· 71
2) Elicitor 처리한 콩나물의 aglycone 함량 ····· 72
3) Phytoalexin 함량 변화 조사 ····· 72
다. 다른 기능성 성분의 분석 ····· 73
1) 총 페놀성 화합물의 측정 ····· 73
2) 항산화효과 측정 ····· 74
3) 아질산염 소거능 ····· 75
4) 사포닌 함량 ····· 76
가) 키토산 처리 농도에 따른 조 사포닌 함량 ····· 77
나) β-glucan 처리 농도에 따른 사포닌 함량 ····· 78
다) Oligogalacturonide 처리 농도에 따른 사포닌 함량 ····· 79

4. 콩나물 수확 후 유통기간에 미치는 식물면역활성제의 효과 ····· 80
가. 콩나물 유통기간 동안의 미생물 수의 변화 ····· 80
나. 부패율 측정 ····· 81
다. Elicitor 처리에 따른 기능성 성분의 변화 ····· 82
1) Isoflavone 함량변화 ····· 82
2) Total phenolic compound 변화 ····· 84
3) DPPH 에의한 전자공여능(항산화능) 변화 ····· 86
4) Chlorophyll 함량과 색도 변화 ····· 87

5. 콩나물 재배 시 elicitor처리에 따른 병원균감염에 의한 저항성 비교 90
가. 박테리아, 곰팡이 병원균에 대한 저항성 증가 효과 ····· 90
나. 콩나물에 존재하는 여러 방어단백질 발현 조사 ····· 92
1) β-1,3- glucanase activity 변화 ····· 92

2) Protease inhibitor activity 변화 ····· 93
3) Phenylalanine ammonia-lyase activity (PAL)변화 ····· 93
4) Total phenolic compounds 의 분석 ····· 93

6. 콩나물 공장에서의 실증 실험 ····· 97
가. 수율 ····· 97
나. 발아율 ····· 98
다. Isoflavonoid 함량에 미치는 효과 ····· 98
라. 관능 평가 ····· 98

제 2 장 기능성콩나물의 3개월 연속 투여에 따른 안전성 평가 ····· 104

제 1 절 연구목적 ····· 104

제 2 절 재료 및 방법 ····· 104

1. 시험물질 ····· 104
2. 시험동물 및 동물사육조건 ····· 105
3. 관찰항목 ····· 105
가. 임상증상 및 체중 측정 ····· 105
나. 사료섭취량 및 음수량 ····· 106
다. 혈액학적 검사 ····· 106
라. 혈청생화학적 검사 ····· 106
마. 장기중량 ····· 106
바. 병리조직학적 검사 ····· 107

4. 통계학적 분석 ····· 107

제 3 절 결과 ····· 107

1. 사망동물 및 임상증상의 관찰 ····· 107
2. 체중변화 ····· 107
3. 사료소비량의 변화 ····· 107
4. 음수량에 미치는 영향 ····· 107
5. 혈액학적 검사 ····· 108
6. 혈청생화학적 검사 ····· 108
7. 장기중량측정 ····· 108
8. 육안적 병변 ····· 108
9. 병리조직학적 소견 ····· 108

제 4 절 결론 ····· 109

제 3 장 식물면역활성제(Elicitor)를 이용한 기능성 콩 재배기술 개발 ····· 124

제 1 절 연구목적 ····· 124

제 2 절 재료 및 방법 ····· 125

1. 시험재료 ····· 125
2. 발아 및 유묘생장 시험 ····· 125

3. 시험 및 재배방법 ····· 126
4. Elicitor 처리방법 ····· 126
5. 한발 처리 및 전착제 혼합처리 시험 ····· 126
6. 생육 및 수량조사 ····· 127
7. 이소플라보노이드(isoflavonoid) 함량분석 ····· 127
8. 병저항성 조사 ····· 128

제 3 절 결과 및 고찰 ····· 128

1. Elicitor 처리에 따른 포장 출아율 및 유묘생장의 차이 ····· 128
2. Elicitor 종류 및 처리방법에 따른 콩 생육특성 변화 ····· 135
3. Elicitor 처리에 따른 콩 종실 함유 isoflavonoid 함량 변화 ····· 142
4. 한발스트레스하에서 elicitor의 효과 ····· 149
5. 전착제 혼용시 elicitor의 효과 ····· 152
6. Elicitor 처리에 따른 병 저항성 조사 ····· 156

제 1 장 서론

제1절 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 필요성 및 목적

가. 식물면역활성물질 (elicitor)이란?

Elicitor는 80년대 초반부터 알려지기 시작한 것으로 식물의 여러 가지 방어기작을 증가시키는 모든 분자들을 일컫는다. Elicitor는 식물이 병원균의 침입을 어떻게 인식하고 방어태세를 갖추는지를 연구하다가 발견된 것이다. 대부분이 elicitor병원균의 구성 성분 또는 병원균에 의해 부서지는 식물의 구성 성분으로 식물은 진화를 거치면서 이런 성분을 병원균으로 인식, 병원균에 대한 방어태세를 갖춘다고 이해되고 있다. Elicitor에는 단백질, 탄수화물, 지방산 등이 있는데 본 연구에서 사용하려고 하는 chitosan, β-glucan, oligogalacturonide는 탄수화물 elicitor에 속한다.

Chitosan은 glucosamine이 β-1,4-linkage로 연결된 polymer로 게, 새우껍질에 다량 존재하는 chitin을 탈아세틸화시켜 얻는 것으로 인체에서 항암효과, 혈중콜레스테롤 저하효과 등 생리활성이외에 식물에서는 성장을 촉진하기도 하고 외부 병원균에 대한 저항성을 증가시킨다는 것이 보고되고 있다. 식물이 chitosan을 인식할 수 있게 된 것은 곰팡이균의 세포벽에 있는 chitin이 효소에 의해 deacetylation되어 chitosan이 만들어지는데 식물은 오랜 세월 곰팡이와 상호작용하면서 chitosan을 인식하는 system을 진화시켜왔을 것이라 믿어진다. β-glucan은 곰팡이, 효모, 세포벽 등에서 쉽게 얻을 수 있으며 β-1,3, β-1,6-linkage로 이루어진 탄수화물로서 콩 등의 식물에서 식물방어단백질, 일종의 항생물질인 phytoalexin을 만들게 하는 signal로 작용하여 식물이 병원균에 대한 저항성을 증가하게 만든다. 특히 β-glucan elicitor의 콩에 있어서 역할은 본 연구 책임자를 비롯하여 몇 group에 의해 β-glucan receptor 등 매우 깊이 있게 밝혀져 있다. Oligogalacturonide는 식물의 pectin이 polygalacturonase에 의해 분해될 때 만들어지는 것으로 식물의 방어기작 발달과정 등 다양한 생리학적 반응에 관여하고 있다. 콩에 있어서는 phytoalexin 증

가 효과 등이 밝혀졌다.

나. 콩나물, 콩의 고부가가치화를 위한 elicitor 의 이용

대두는 여러 가지 유용한 생리활성물질을 갖고 있기 때문에 현대인들에게 건강식으로 인기가 높아지고 있다. 이들 유용생리활성물질 중 genistein, daidzein과 같은 isoflavonoid 가 많은 관심을 끌어 연구의 대상이 되어오고 있다.

Genistein은 *in vitro* 실험, 동물실험, 임상실험에서 뛰어난 항암효과를 가지고 있음이 밝혀졌고 유방암과 전립선암의 예방효과가 높다고 알려졌다. Genistein의 항암효과는 tyrosine kinase 저해작용, angiogenesis 억제작용, topoisomerase 저해작용 등을 통해 설명되고 있다. 또한 genistein은 체내에서 여성호르몬이 estrogen과 유사한 작용을 하기 때문에 phytoestrogen으로 불리기도 하며 폐경기 여성의 estrogen 결핍으로 유발되는 골다공증의 예방과 진행억제에도 효과가 있는 것으로 알려지고 있다. Daidzein은 뼈에서 혈액으로 칼슘의 재흡수를 억제함으로써 노인과 여성의 골다공증 방지에 효과적이라는 연구가 발표되었다. 또한 최근에는 이들 isoflavonoid를 유아시기에 많이 섭취하면 성인이 되어서도 유방암 등 호르몬 의존성 질병 발생률이 훨씬 낮아진다는 보고가 있다. 최근의 다른 발표에 의하면 isoflavonoid를 함유한 대두단백은 치매예방효과를 갖기도 한다는 보고가 있다. 이와 같이 콩 isoflavonoid 성분의 유용성 등이 밝혀지면서 미국 등에서는 대두가공식품의 판매가 급성장하고 있고, 최근에는 isoflavonoid 성분만을 추출하여 상품화되고 있다. 그러므로 이전에는 isoflavonoid 성분이 콩 가공제품의 씁쓸한 뒷맛에 관계하여 함량을 낮추는 연구가 진행되었으나 최근에는 오히려 증가시키는 방향으로 관심이 모아지고 있다. 앞으로 사회적으로 노년층이 증가하여 골다공증, 암 등의 노인성 질병 증가가 예상되기 때문에 isoflavonoid를 많이 함유한 콩의 수요는 더욱 더 증가할 것이다. 그러므로 기술적, 경제적으로 가능한 isoflavonoid 증가 방법이 있다면 이에 대한 연구지원이 이루어져야할 것이다.

콩나물은 우리나라에서 매년 약 8,000억 원 정도의 시장규모를 가진 식품으로 많은 국민의 사랑을 받고 있다. 그러나 습도가 높은 환경에서 재배가 이루어지기 때문에 병발생이 많아 특히 여름에 여러 재배 공장에서 농약을 사용하여 매년 여름이면 문제가

되고 있다. 또한 콩나물은 미생물 오염이 많아 수학 후 1~2일 정도의 짧은 유통기간으로 수확된 콩나물의 많은 부분이 버려지는 손실이 있다. 그러므로 콩나물 재배시 농약 사용을 줄일 수 있는 재배 방법 및 수확 후 저장기간을 연장시키는 방법에 대한 연구는 절실하다 하겠다. 이런 이유 때문에 콩나물 재배 시 미생물 오염을 줄이기 위해 많은 연구가 진행되어 왔으나 여전히 여름에는 농약 사용 때문에 문제가 되고 있다. 그러므로 본 연구에서는 elicitor를 이용하여 콩나물 자체의 방어 기작을 증가시켜 농약 사용을 줄이는 콩나물 재배 방법을 개발함과 동시에 elicitor에 대한 많은 문헌을 고찰했을 때 elicitor가 isoflavonoid 합성을 위해서도 이용하는 phenylpropanoid pathway를 자극한다는 사실에 착안하여 elicitor를 이용하였을 때 콩나물에 isoflavonoid 함량이 증가되는지를 확인하는데 있다. 그리고 elicitor를 이용하였을 때 isoflavonoid 함량이 증가하였다면 이의 증가를 위한 최적의 조건을 확립하는데 그 목표가 있다.

2. 연구개발의 목표 및 내용

가. 연구개발 목표와 내용

○ 항암·항골다공증 등 여러 가지 생리활성이 잘 알려진 isoflavonoid (genistein, daidzein)

함량이 증가된 콩나물의 생산을 통해 콩나물의 부가가치를 높힌다. 부수적으로 콩나물에 적용되었던 기술을 콩에 적용하여 기능성 콩 재배방법을 개발한다.

- 식물면역활성제(elicitor) 처리에 의한 콩과 콩나물의 isoflavone 함량증가 방법 개발

(적정 식물면역활성제 선발 및 효과조사)

- 콩과 콩나물에서 isoflavone 최대생산을 위한 적정 처리조건 구명
- 콩나물 공장에서 실증실험
- 콩나물에서 elicitor처리에 의한 다른 기능성물질 변화 조사

○ 식물면역활성제(elictor)를 이용함으로써 콩, 콩나물의 병에 대한 저항성을 증진시킨다. 이러므로써 농약사용을 줄이는 환경 친화적인 재배방법을 도모한다.

- 콩·콩나물에서 병 저항성 등 생육특성에 대한 효과 구명
- 여러 가지 병원균에 대한 저항성 검토
- 콩나물의 유통기간 연장에 대한 효과 조사

○ 최종목표 : Isoflavonoid 성분이 증가된 기능성 콩나물 및 콩의 생산기술 개발

나. 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2000)	<제 1 세부 과제> ○처리 elicitor 종류에 따른 콩나물의 iso-flavonoid 함량 변화 조사 및 선발된 eli-citor처리의 최적화	○ β-glucan의 제조 - Cotyledon assay를 통한 활성조사 ○ Oligogalacturonide의 제조 ○ 식물면역활성제 (chitosan, β-glucan, oligogalacturonide)의 효과 조사 (isoflavonoid 함량 변화에 미치는 영향) - chitosan, β-glucan, oligogalacturonide을 각각 처리하였을 때 isoflavonoid 함량 변화. - 식물면역활성제 농도에 따른 효과 - 분자량 변화에 따른 효과 조사 - 식물면역활성제 처리시기 조사 - Phytoalexin 함량 변화 조사 (안전성 확립을 위해 필요) ○ 식물 면역활성제 처리에 의한 다른 기능성 물질의 변화 ○ 콩나물 수확 후 유통기간 연장에 미치는 식물면역활성제의 효과 (Ⅰ)-일부 실험 - 재배 중 처리의 효과
	<제 2 세부 과제> ○ 콩 재 배 중 elicitor를 처리하였을 때 iso-flavonoid 함량이 증가하는지 확인	○ 식물면역활성제 선발 - 키토산, β-glucan, 혼합처리 등 ○ 식물면역활성제 처리에 의한 콩 생육 및 isoflavonoid 함량 변화 조사 - 처리방법별 isoflavoniod 함량조사 - 처리농도별 효과조사 - 종자성숙시기별 isoflavonoid 함량조사 - 처리에 의한 생육특성변화 조사

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2001)	<제 1 세부 과제> ○ 콩나물 재배시 elicitor를 처리하였을 때 여러 가지 병원균에 대한 저항성이 증가하는지 확인 ○ 콩나물 수확 후 유통기간 연장에 관한 연구 ○ 콩나물공장에서의 재배시험	○ 식물면역활성제의 효과 (인위적 감염 이용) - 곰팡이 병원균에 대한 저항성 증가 효과 - 박테리아 병원균에 대한 저항성 증가 효과 - 식물 방어단백질 변화 조사(elicitor 처리에 따른 단백질 변화조사) ○ 동물실험을 통한 생체 유해검사 ○콩나물 수확 후 유통기간 연장에 미치는 식물면역활성제의 효과 (Ⅱ) - 재배 중 처리의 효과 - 수확 후 처리의 효과 ○공장에서 실증시험 - isoflavonoid 함량에 미치는 효과
	<제 2 세부과제> ○ 콩 재배시 elicitor 처리조건 구명 및 병 저항성 조사	○ 식물면역활성제의 처리 시 전착제 효과 조사 -전착제 혼합처리에 따른 효과 조사 ○ 스트레스 조건하의 식물면역활성제 처리 효과 조사 - 한발 조건하의 식물면역활성제 처리 시 isoflavone함량조사 ○병 저항성검정 -콩 유모에서의 식물면역활성제 처리시 병 저항성 조사

제 2 절 국내외 기술개발 현황

1. 국내의 경우

국내에서는 chitosan을 농업에 이용하려는 시도는 본 연구책임자 등 여러 group 에서 토마토, 벼, 고추, 마늘, 보리 등 여러 작물에 처리하여 효과를 보았다. 그러나 이들 연구의 대부분은 작물의 성장, 수확증가 등에 초점이 맞추어졌고 병에

대한 저항성 증가 등의 연구는 극히 드물다. 최근에 콩나물에 chitosan 처리 효과를 본 연구가 있는데 주로 성장, lipoxygenase (콩나물의 비린내에 영향을 주기 때문에 조사)의 변화에 대하여 조사하였의나 elicitor 의 개념을 갖고 연구되어지지 않았다.

그리고 isoflavonoid 함량을 증가시키려는 시도는 주로 isoflavonoid 함량이 높은 콩나물을 선정하는 방법을 쓰거나 육종의 방법을 이용한 시도가 있어왔다. 또한 최근에는 isoflavonoid 생합성과정에 key regulatory 효소의 overexpression을 통한 isoflavonoid 함량시도가 진행되는 것으로 알고 있다.

2. 국외의 경우

외국에서 탄수화물 elicitor에 대한 연구를 가장 활발히 하는 group은 미국 죠지아 대학 탄수화물 연구소를 들 수 있는데 주로 β-glucan, oligogalacturonide가 어떻게 생성되고, 식물세포에 주는 영향, 식물이 인식하는 방법 등을 세포배양, 식물조직을 이용하여 구명하고 있다. Canada의 어떤 group에서는 주로 chitosan을 처리하여 토마토 등의 병에 대한 저항성을 증가시키는 연구 등을 하고 있다. 그리고 일본 등 세계 여러 나라에서 chitosan을 농업에 이용하려는 노력은 매우 활발하게 진행되고 있다. 그러나 이들 대부분의 연구는 chitosan 을 elicitor란 개념으로 하기보다는 성장촉진제 등으로 보아 실험한 경우가 많다. 특히 β-glucan, oligogalacturonide를 실제 농업에 적용하려는 시도는 전혀 보고되지 않은 상태이다. 아마 본 연구가 최초의 시도가 아닌가 생각된다. 무엇보다도 chitosan 등 elicitor 를 이용하여 식물의 대사작용을 바꾸어 부가가치가 증가된 기능성 농산물을 만들려는 시도는 본 연구팀이 알기로 세계최초라고 판단된다.

연구개발수행 내용 및 결과

제1장 식물면역활성제를 이용한 기능성 콩나물의 재배

제 1절 재료 및 방법

1. 실험재료 및 제조

가. 콩

본 실험에 사용한 나물콩은 2001년도산 은하콩으로 전남 농촌 진흥원으로부터 구입하여 -20℃에서 저장하면서 시료로 사용하였다.

나. Chitosan 용액 제조

Chitosan은 (주) 바이오텍에서 구입한 30 cps (M.W.=75,000)이며, 0.025% lactic acid에 용해하여 0.05% chitosan용액으로 제조한 후 NaOH로 pH를 5.5로 조정하여 사용하였다.

다. β-glucan 용액 제조

맥주 효모박을 물에 현탁하여 원심분리한 후, 불용성 부분에 2 N Trifluoroacetic acid (TFA)를 1 : 10의 비율 (Residue g : TFA mL)로 혼합한 후 85℃에서 2시간 반동안 가수분해하였다.

원심분리 후 상등액만을 취해 감압 농축하여 TFA은 제거하였고, 남은 액을 1,000 M.W.C.O 투석 망으로 투석하여 염을 제거하였다. 사용 용매에 따라 Trifluoroacetic acid(TFA)와 HCl로 나누어 제조하였다. (Fig. 1.)

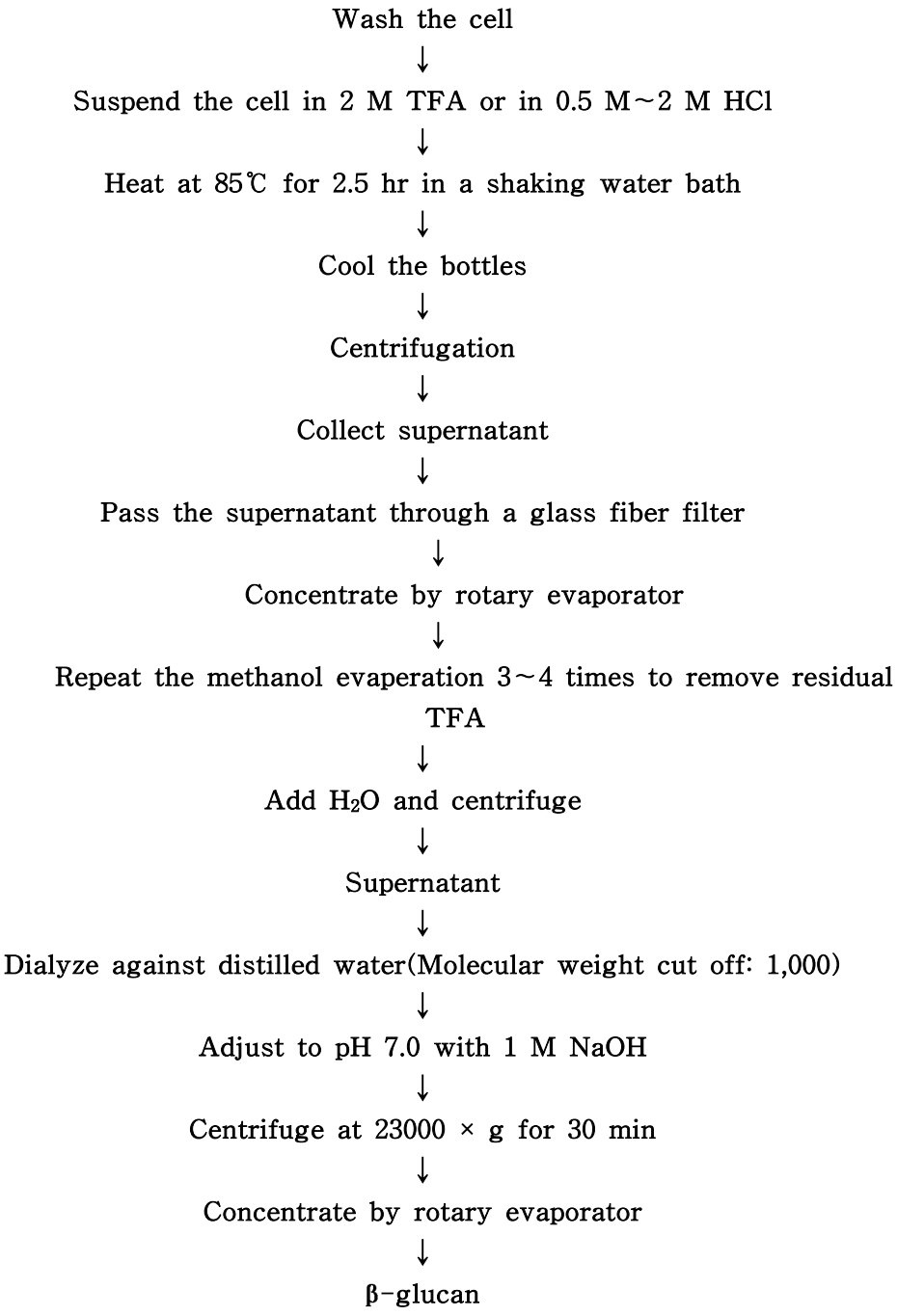


Fig. 1. Preparation of β-glucan by partial acid hydrolysis from brewing yeast waste.

라. Oligogalacturonide 제조

펙틴질과 2 N TFA를 1 : 20의 비율로 섞어 85℃에서 4시간 동안 진탕하면서 가수분해하여 얻은 액을 GF/A 여과지로 여과하였다. 여과액을 paste가 될 때까지 감압농축하면서 메탄올을 조금씩 넣어 TFA를 제거하였다. 1 M imidazol-HCl로 pH를 7.0으로 맞춘 후 다시 여과하고, 투석하여 염을 제거하였다. 이렇게 제조된 액의 oligogalacturonide 함량은 m-hydrxybiphenyl assay로 측정하였다.

2. 실험방법

가. Isoflavone 분석

1) glycoside 추출액의 제조

콩나물 3 g에 80% 에탄올 12 mL를 가하고 해사를 넣어 5분간 마쇄하여 20℃에서 12시간 진탕하여 추출하고 원심 분리한 상등액을 배당체 추출 시료로 사용하였다.

2) Aglycone

배당체 추출액에 동량의 2 N HCl을 넣은 반응액을 heating block을 이용하여 100℃에서 1시간동안 가수분해한 후 원심 분리하여 상등액을 사용하였다.

3) HPLC 분석과 flavonoid 정량

HPLC를 이용한 Isoflavone분석은 Graham의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. Isoflavone추출액은 배당체와 aglycon 모두 0.2 ㎛ filter로 여과하여 사용하였고, Fluofix RP-18(10 ㎛ C18, 4.6 mm i.d. × 250 mm) column을 사용하여 flow rate 1.2 mL/min 으로 25분간 분석을 수행하였으며, 용매는 증류수 (pH 3.0)에 acetonitrile (100%)를 gradient로 하였다. 표준물질인 Daidzein, Genistein, Genistin은 Sigma (U.S.A)에서 구입하여 표준 곡선을 작성한 후 콩나물에서 분석한 isoflavone을 정량하였다.

4) 콩나물 재배 조건

은하콩 20 g씩을 5% 차아염소산 나트륨 용액으로 5분간 표면 살균한 후 흐르는 물에 6 회 이상 세척하고, 각 elicitor용액에 6시간 침지하여 재배용기 (플라스틱 컵 10 cm × 7 cm i.d.)에 옮겨 재배기 ((주) 남해기전에서 구입한 것으로 수주 시 물의 압력에 의한 스트레스를 줄이기 위해 3중 tray로 제작하여 한 tray를 거쳐 물이 수주되며, 한번 수주된 물은 맨 밑의 tray에서 받아 배출되는 구조)에 넣었다. 재배기 내부의 온도는 22~23℃ 이고, 수주는 4시간마다 3분 동안 하여 3일간 재배한 콩나물을 완제품으로 하였다. Elicitor처리는 12시간마다 100 mL씩 처리하였다.

나. 다른 기능성 물질의 분석

1) 총 페놀 화합물 측정

에탄올 추출액 0.1 mL에 증류수 0.9 mL를 가하여 10배 희석한 후 Folin & Ciocalteu's phenol reagent (2 N, Sigma Co.)를 이용하여 735 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

2) 전자공여능에 의한 항산화측정

콩나물의 에탄올 추출액의 전자공여 작용(Electron donating abilities, EDA)의 측정은 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료 0.4 mL에 에탄올에 녹인 500 μM DPPH(α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl)용액 0.6 mL을 가한 후 vortex mixer로 10초간 진탕하여 호일로 완전히 싸서 빛을 가린 후 상온에서 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하여 전자공여능을 백분율로 나타내었다.

$$EDA(\%) = (1-A/B) \times 100$$

A : 추출물 첨가구의 흡광도

B : 추출물 무첨가구의 흡광도

3) 아질산염 소거작용의 측정

아질산염 소거 작용 (Nitrite-scavenging ability)은 Gray등의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, 1 mM $NaNO_2$ 1 mL에 에탄올 추출물 0.2 mL을 첨가하고 여기에 0.1 N HCl (pH 1.2)을 넣어 반응용액의 총 부피를 10 mL로 하였다.

37℃ 항온수조에서 1시간 반응시킨 반응액을 1 mL를 취하여 2% acetic acid 5 mL와 Griess Reagent 0.4 mL를 가한 후 15분간 상온에서 반응하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였으며 대조구는 Griess Reagent대신 증류수 0.4 mL를 가하여 상기와 동일하게 행하였다. 아질산염소거능은 에탄올 추출물 첨가 전후의 질산염 백분율(%)로 표시하였다.

$$N(\%) = (1-(A-C)/B)\times 100$$

N : 아질산염 소거율

A : 1 mM $NaNO_2$ 용액에 시료를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도

B : 1 mM $NaNO_2$ 용액에 시료대신 증류수를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도

C : 시료 추출물 자체의 흡광도

4) 사포닌함량 측정

가) Crude glucoside mixture 추출

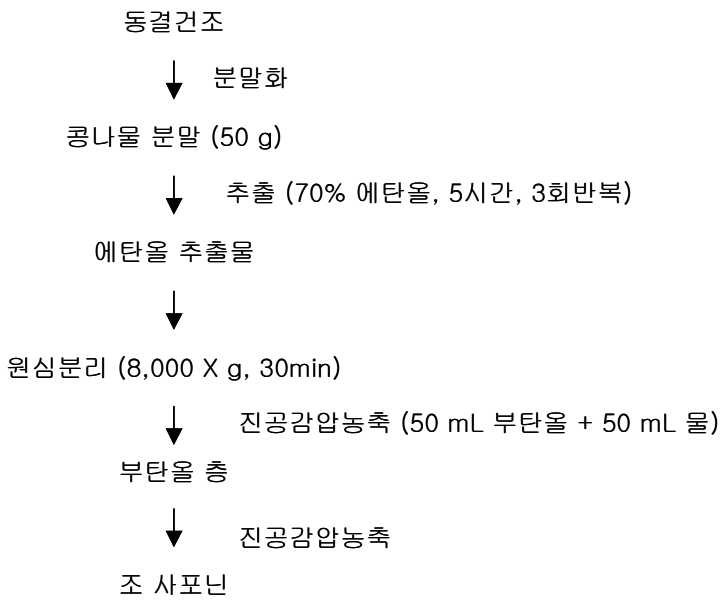


Fig. 2. 조 사포닌의 추출

나) Lieberman-Burchurd 정색반응을 통한 사포닌 분석

Fig. 1의 방법에 의해 제조된 조 사포닌의 분석은 Lieberman-Burchurd의 방법을 사용하였다. 메탄올에 용해시킨 조 사포닌 0.2 mL에 acetic acid 3 mL를 가한 후, 진한황산을 천천히 가하면서 흔들어 색깔 변화를 관찰하고, 30분 후에 색깔변화가 안정될 때 분광광도계를 사용하여 436 nm에서 흡광도를 측정하였다.

다) Saponin의 HPLC 분석

Dionex (U.S.A)사의 atosampler HPLC system을 이용하였으며, column은 Fluofix C_{18}(4.6×250mm)을 사용하였다. 이동상은 MeOH과 0.1% formic acid를 함유한 H_2O를 단계별 gradient를 이용해 혼합한 용매를 사용하였다

다. β-glucan의 분석

1) Anthrone assay에 의한 β-glucan의 정량

두 용매를 사용하여 제조한 β-glucan를 정량하기 위한 anthrone assay는 0.2% anthrone 용액 200 μL에 sample 100 μL를 넣은 반응액을 끓는 물에서 5분간 반응시킨 후 냉각하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였으며 glucose 를 표준시료로 사용하여 비교 분석하였다.

2) β- glucan의 soybean cotyledon elicitor bio-assay

Elicitor activity 측정을 위해 9일간 재배한 콩의 떡잎을 사용하여 분석하였다.

3) 일반성분 분석

분리된 β-glucan 성분을 알아보기 위하여 수분은 105℃ 직접건조법, 조지방은 ethyl ether을 이용한 soxhlet추출법, 회분은 550℃의 직접회화법, 단백질은 Bradford 방법을 이용하여 정량하였으며 γ-globulin을 표준물질로하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 당분석

Thomas의 방법을 이용하였으며 490 nm파장에서 0~150 μg glucose 의 흡광도를 이용하여 glucose standard curve를 작성하였다. 시험관에 적당한 농도로 1 mL sugar solution을 만들어 phenol regent (5%) 1 mL 과 혼합한 후 98% H_2SO_4 5 mL를 첨가하여 총 7 mL 의 용액을 즉시 혼합한 후 얼음에서 냉각시킨다. 30분이상 정치시킨 후 490 nm에서 흡광도값을 측정하였다.

5) Gel- filtration Chromatography에 의한 분자량 측정

β-glucan 의 분자량을 측정하기 위하여 Sephacryl S-200-HR column(1.5×47 cm)을 이용하였으며, 분자량 측정을 위한 standard로 dextran (M.W: 10,400 ; 40,210, Sigma Chemical Co. USA)을 이용하고 included volume측정을 위해서는

glucose를 이용하였다. 유속은 10 mL/hr로 1 mL씩 분획하여 사용하였다.

라. 병원균 감염에 의한 저항성 비교

1) 사용 균주

물곰팡이균인 *Phytophthora sojae*와 콩나물에서 분리한 병원균인 *Bacillus subtilis, B. coagulans* 을 농촌진흥청 농업과학기술원의 식물병리연구실에서 분양받아 사용하였다.

2) 배지조성

Phytophthora sojae 배양에 사용된 배지는 V8배지로 시중에서 판매되는 V8주스에 $CaCO_3$와 한천을 넣어 고체배지로 제조하여 사용하였으며 *Bacillus subtilis, B. coagulans*는 KB배지 [proteous peptone #3 (Difco) 20 g, K_2HPO_4 1.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5 g, Glycerol 15 mL, Agar 15 g, D.W 1 L]를 사용하였다.

3) 병원균의 배양

분양받은 *P. sojae*가 자란 배지 조각을 새로운 V8배지 위에 놓고 상온 암실에서 약 7일 정도 배양하여 사용한다. 배양된 균에 멸균수를 가득 채우고 30분간 방치한 후 다시 새로운 멸균수로 채우는 과정을 6회 반복한 후, 마지막에 15 mL 정도의 멸균수를 넣어서 15~18℃의 암실에서 하룻밤 정도 두어 zoospore를 만들고 현미경으로 관찰하였다. *B. subtilis, B. coagulans*는 KB배지에 액체배양하여 접종농도는 5×10^5/mL~1×10^6/mL로 희석하여 사용하였다.

4) Infection 조건

2일동안 성장한 콩나물을 채취하여 줄기에 주사바늘로 살짝 상처를 낸 뒤 배양액을 상처 위에 10 μL을 주입하고 멸균된 petri-dish 에 filter paper를 깐 뒤 멸균수로 충분히 적시고 그 위에 병원균이 주입된 콩나물을 놓고 뚜껑을 닫아 25℃ waterbath에 넣고 변화를 관찰하였다.

마. 콩나물에 존재하는 여러 방어물질 조사

1) 콩나물 조효소액 조제

Protease inhibitor activity 측정을 위한 조효소액은 Fig. 2와 같은 방법으로 제조하였으며 조제된 조효소액은 4℃에 보관 사용하였다.

2) Protease inhibitor activity 측정

Protease inhibitor activity 측정은 Hamerstrand 방법에 준하여 실험하였다. 콩나물 조효소액 10 μL, 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.1) 240 μL, 0.005% trypsin 250 μL, 기질인 0.03% BAPNA(Nα-benzoyl-D_L-arginine -P-nitroanilide)를 1 mL 넣은 반응액을 37℃에서 10 분간 incubation한 다음 30% acetic acid 0.5 mL를 넣어 반응을 중지시켰다. 이후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3)β-1,3 glucanase activity 측정

제조된 조효소액의 β-1,3 glucanase 역가 측정은 Somogyi-Nelson 방법을 사용하여 β-1,3-glucanase 활성을 측정하였다. β-1,3-glucanase 활성은 기질인 laminarin과 조효소액을 넣은 반응액에 Somogyi-Nelson reagent을 넣어 incubation 시킨 후 640 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit은 37℃에서 분당 μmole glucose을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

4) Phenylalanine ammonia-lyase activity 측정

효소액 1 mL와 0.05 M borate buffer (pH 8.0) 2 mL, 0.01 M phenylalanine 1 mL을 가하여 30℃에서 3시간 유지하였다. 여기에 6 N HCl 0.1 mL를 가하여 반응을 정지시킨 후 생성된 cinamic acid을 ethyl ether 5 mL을 가하여 충분히 혼합한 후 ether layer에 옮겨서 추출한 후 0.05 M NaOH 4 mL에 용해시켜 268 nm에서 흡광도를 측정하였다. 동일조건에서 측정한 cinamic acid 검량선에 의하여 그 함량을 측정하였으며, Phenylalanine ammonia-lyase 활성 unit는 결과로부터 생성된 cinamic acid mμ moles로 측정하였다.

5) Total phenolic compound 측정

Total phenolic compound는 Amerine, M.A.와 Ough, C.S.의 Folin-Ciocalteu´s 방법을 변형하여 실험하였다. 에탄올 추출액 0.1 mL에 증류수 0.9 mL, 2 N Folin-Ciocalteu´s reagent (2 N, Sigma Co.) 0.5 mL, 20% Na_2CO_3 2.5 mL를 넣어 혼합한 후 원심분리하여 염을 제거한 다음 25℃에서 20분간 incubation시킨 후 735 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 gallic acid를 이용하여 작성한 표준 곡선으로부터 mg% gallic acid 당량으로 환산하여 나타내었다.

바. 콩나물 수확 후 유통기간에 미치는 elicitor의 효과

1) 부패율 측정

총수량에 대한 부패한 콩나물 수량의 비로 나타내었으며, 부패한 콩나물의 기준은 배축이나 머리부위에 갈색 내지 흑색의 부패흔이 2곳이상 있는 경우를 모두 포함하였다.

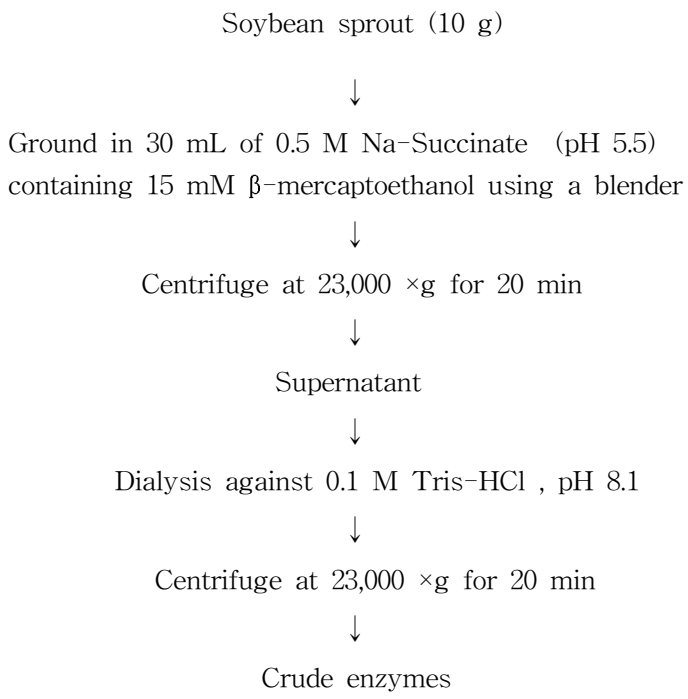


Fig. 3. Preparation of crude enzymes from soybean sprout.

2) Chlorophyll 함량 측정

Vemon의 방법에 준하여 콩나물 5 g을 80% aceton을 50 mL 정도 가하여 약 10분동안 방치한 다음 감압여과기로 여과하였다. 잔사는 80% acetone을 소량 가하여 저어주면서 10분 정도 방치하였다가 여과하고 잔사에 색소가 없을때까지 반복한 후 모든 여액을 합한 것을 전량이 100 mL가 되게 하였다. 추출액의 일정량을 663 nm와 645 nm에서 흡광도를 측정하였고, total chlorophyll(mg/L)=20.2×$O.D._{645}$ +8.02×$O.D._{663}$ 의 계산식에 의하여 그 함량을 산출하였다.

3) 색도 측정

색차계 (CR-300 Minolta Chroma Meter, Minolta Camer Co., Osaka, Japan)를 사용하여 Hunter L, a 및 b 값을 측정하였다. 색도 측정은 시료를 색좌표값이 L= 96.86, a =-0.02 및 b =1.99 인 표준백색판 (Calibration Plate CR-143) 위에 놓고 시료의 중심과 주변 네 부위를 포함하여 다섯부위의 색도를 측정하여 평균값으로 표시하였다. 여기에서 L값은 색의 밝기를 나타내는 것으로 L = 0(black)에서 L =100(white)을 나타내고, a = -80(greeness)에서 a = 100 (redness) 을 나타내고, b 값은 청색과 황색도를 나타내는 것으로 b = -80 (blueness)에서 b = 70 (yellowness)을 나타낸다.

4) 총균수 측정

Plate count agar (Difco, MI, USA)를 넣은 petri dish에 sample을 200 μL 취하여 pour plating 방법으로 접종한 후 35℃에서 24시간 배양한 다음 colony 수가 1평판당 250개 이하의 집락을 형성한 것을 택하여 colony를 CFU(colony forming units)/g로 표시하였다.

사. 콩나물의 생장 특성 관찰

1) 콩나물 줄기의 길이 측정

콩나물을 100개씩 채취하여 표면의 물기를 제거한 후 사용하였으며, 줄기길이 측정은 구부러진 부분을 펴서 콩나물 머리를 제외한 전 길이를 측정하여 평균값으로 나타내었다.

2) 콩나물 줄기의 굵기 측정

콩나물 100개씩 채취하여 표면의 물기를 제거한 후 Calipers를 이용하여 굵기를 측정하여 평균값으로 나타내었다.

3) 콩나물의 발아율 조사

콩나물 머리부분에서 줄기가 1 cm이상 자란 것을 발아된 콩나물로 택하였으며

그 콩나물의 수를 백분율로 나타내었다.

4) 콩나물의 수율조사

처음에 치상한 콩의 무게에 대하여 발아 후 얻은 콩나물의 무게로 나타내었다.

5) 관능검사

콩나물을 흐르는 물로 깨끗이 씻은 후 400 g씩 냄비에 넣고 물 550 mL, 소금 7 g을 첨가한 후 가열하여 끓기 시작 할 때부터 1분간 익힌 후 일정량씩을 접시에 담아 관능요원에 의하여 5점법으로 색상, 냄새, 종합적 기호도에 대하여 매우 나쁘다(1점), 나쁘다 (2점), 보통이다(3점), 좋다(4점), 아주 좋다(5점)로 평가하였다. 관능평가의 결과들은 평균치±표준편차로 나타내었으며 유의성 검정은 student's t-test로 확인하였다.

제2절 결과 및 고찰

1. β-glucan 의 최적 추출 조건

가. 추출시간에 따른 조건

가수분해 용매로써 Trifluoroacetic acid(TFA)와 HCl을 사용한 β-glucan을 제조하고, 그 함량을 anthrone assay로 분석 비교한 결과는 Fig. 4와 같다.

β-glucan 제조시 가수분해 용매로 사용되는 TFA는 독성 시험이 명확하게 밝혀져 있지 않을 뿐만 아니라 값이 비교적 비싸 식품의 첨가물로 사용 할 경우 β-glucan제조에는 부적절하다고 판단되어 이의 대체용매로 가격이 저렴하고 안전한 추출을 하기 위해서 HCl을 사용하여 폐 맥주 효모박으로부터 β-glucan을 제조하였다.

HCl을 10, 40, 60, 90분까지 가수분해 시간을 달리한 다음 가수분해온도를 35℃, 65℃, 85℃에서 β-glucan을 제조한 결과 40분간 가수분해 한 것이 각각 3.5 mg/mL, 12.4 mg/mL, 15.2 mg/mL로 가장 많은 양의 β-glucan이 제조되었다. 가수분해 시간이 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타내는데 β-glucan이 점점 가수분해되어 monomer, dimer등 단당류의 형태로 많아지게 됨에 따라 anthrone assay에선 β-glucan만 측정이 가능하기 때문이다. 그리고 85℃에서 추출한 β-glucan이 35℃, 65℃보다 많은 양이 추출되었다.

나. 추출농도에 따른 조건

β-glucan의 가수분해 최적시간을 40분으로 결정하여 가수분해 용매로써 HCl을 농도별로 처리하여 65℃, 85℃의 온도조건에서 β-glucan을 제조한 결과는 Fig. 5, 6과 같다. 85℃에서의 온도에서는 0.5 M의 HCl로 처리하였을 때 β-glucan의 함량이 가장 많았으며 몰농도가 증가함에 따라서 β-glucan함량이 점점 감소하는 경향을 나타내었다. 이것은 생산된 β-glucan이 분해되어 glucose monomer나 올리고당이 되어 최종 투석과정에서 제거 되었기 때문으로 생각된다. 65℃에서는 몰농도가 2.5 M에서가 함량이 가장 많았고 3 M 이후에서 saturation되는 것을 알 수 있었다. 그리하여 85℃의 온도조건에서 2 M의 농도로 40분간 가수분해 함이 가장 적절하다고 판단되었다. 이의 결과로 보아 기존의 가수분해 용매인 TFA 대신에 HCl을 사용하여 β-glucan을 제조함으로써 적은 시간동안 가수분해하여 더 많은 양의 β-glucan을 생산할 수 있음으로 에너지 효율면이나 안전성면에 실효성이 있음을 알 수 있었다.

다. 산 종류에 따른 β-glucan의 함량 조사

TFA와 HCl으로 가수분해한 β-glucan의 함량을 조사함과 동시에 여러 다른 종류의 산(acetic acid, formic acid, phsphoric acid)등으로 추출한 β-glucan의 함량을 측정한 결과는 Fig. 7.과 같다. Acetic acid, formic acid, phsphoric acid 등으로 추출한 β-glucan의 함량은 TFA와 HCl으로 가수분해 한 β-glucan함량보다 아주 낮았

으며 TFA로 추출한 것보다 85℃에서의 온도에서 0.5 M의 HCl농도로 40분간 가수분해하였을 때 생산되는 β-glucan이 보다 많음을 알 수 있었다.

라. Cotyledon assay를 통한 β-glucan의 활성 측정

제조한 β-glucan이 실제적으로 활성을 나타내는지를 측정하기 위하여 growth chamber에서 9일간 재배한 작물 콩의 떡잎을 이용하여 cotyledon assay 하였다. 각 glucan의 농도를 5 ng/ml, 20 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml의 함량으로 하여 떡잎의 표피를 벗겨낸 부위에 제조한 β-glucan을 올려 놓은 후 생성되는 식물 방어물질인 phytoalexin함량으로 β-glucan 활성을 측정한 결과 Fig. 8.과 같다. 각 β-glucan의 농도가 ng의 수준에서도 그 activity가 있음을 볼 수 있었으며, HCl으로 가수분해한 β-glucan이 기존의 TFA로 만든 β-glucan보다 조금 더 높은 활성을 가지고 있었다. 그리고 400 ng에서 β-glucan이 saturation 되는 것으로 생각되어진다. cotyledon assay를 통한 β-glucan의 활성을 측정한 결과, HCl으로 가수분해 한 β-glucan이 활성이 높은 것으로 보아 더 많은 β-glucan을 생산 할 수 있음을 볼 수 있었다.

마. 제조한 β-glucan의 일반성분

제조한 β-glucan의 일반성분은 Table 1.에 표시된 바와 같다. 성분을 본 결과 단백질이 74%, 총당이 25.4%, 회분과 조지방은 극히 미량이었음을 볼 수 있었다.

바. 제조한 β-glucan의 분자량

Sephacryl S-200-HR column을 이용하여 gel-filtration chromatography를 실시한 결과 Fig. 9.와 같다. 제조한 β-glucan은 10,000과 40,000사이의 분자량 분포를 보여 주었다.

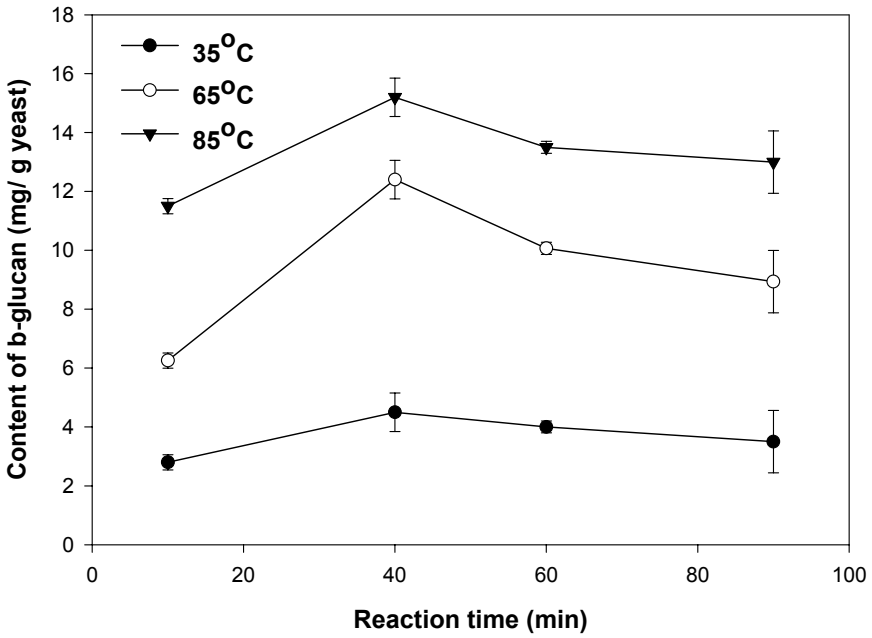


Fig. 4. Content of b-glucan produced from yeast using HCl.

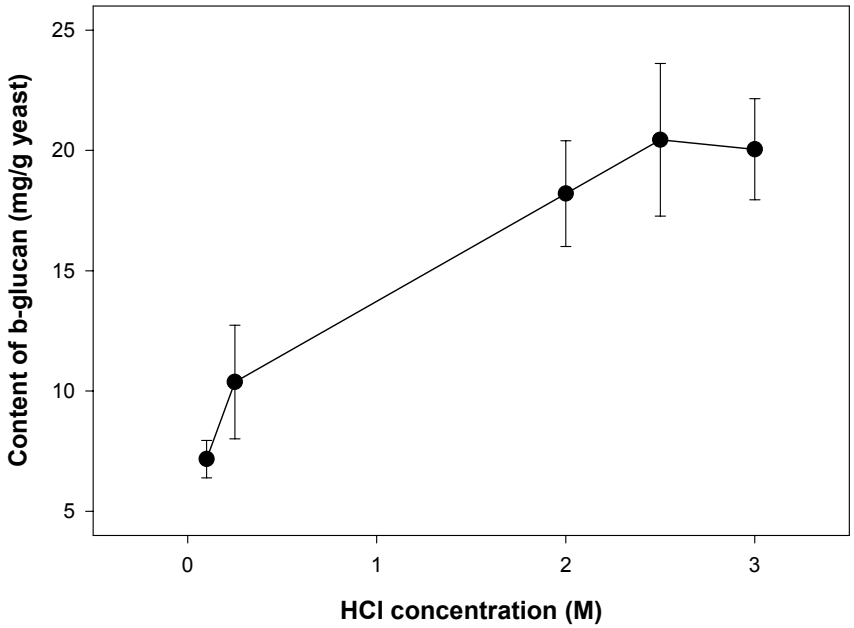


Fig. 5. Effect of HCl concentration on the production of β-glucan at 65^{O}C.

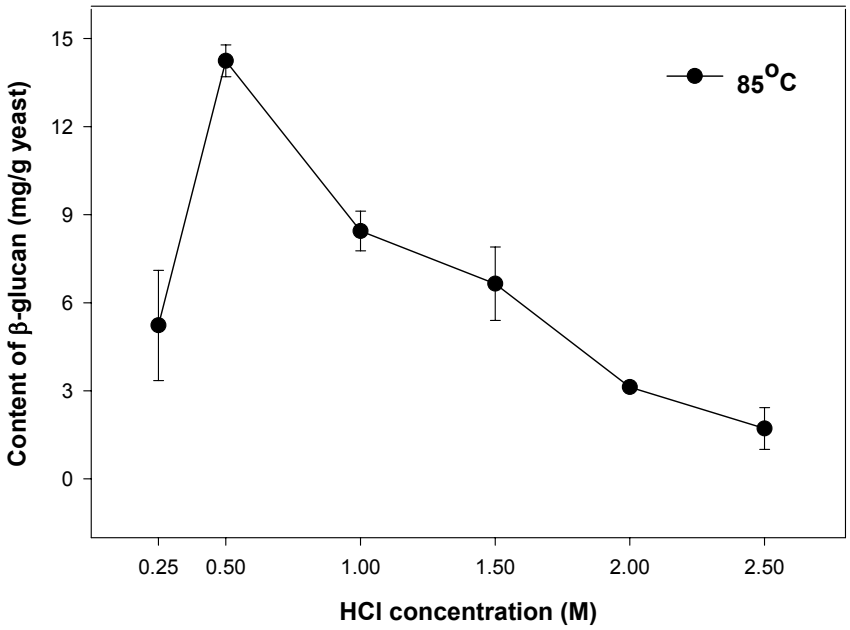


Fig. 6. Effect of HCl concentration on the production of β-glucan at 85°C.

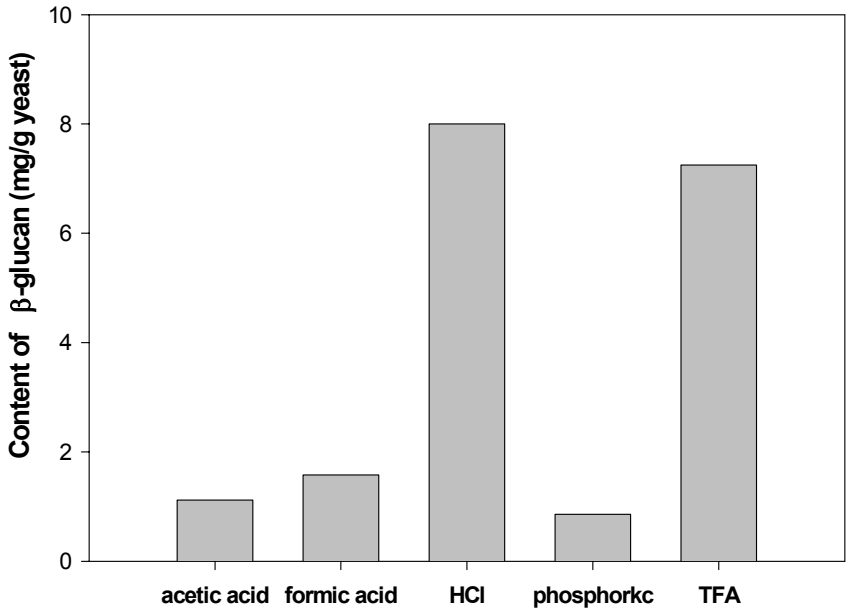


Fig. 7. Production of b-glucan with various acids.

Yeast paste was hydrolyzed with two molar concentration of each acid at 65 ^{O}C for 40 min.

Fig.8은 color 그림이므로 편집의 용이성을 위해 page 157에 나타내었음.

Table 1. Proximate composition of extracted β-glucan.

	% (dry weight basis)
Protein (%)	74 %
Crude fat (%)	0.002 %
Sugar (%)	25.4 %
Ash (%)	0.11 %

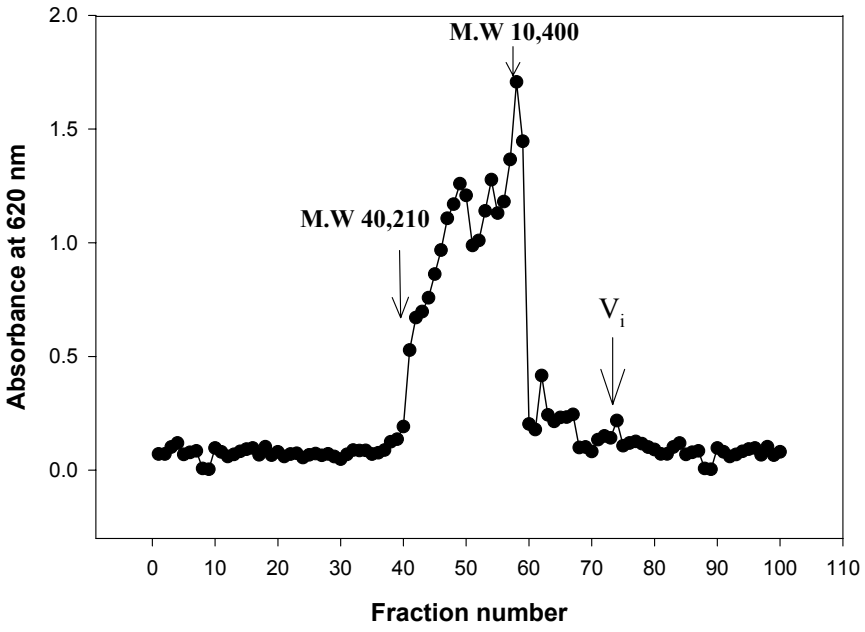


Fig. 9. Sephacryl S-200-HR gel filtration chromatography of β-glucan prepared from yeast with HCl.

2. 처리 elicitor 종류에 따른 콩나물의 isoflavonoid 함량 변화조사

콩나물 재배시 elicitor처리 최적조건을 결정하기 위하여 식물면역활성제인 chitosan, β-glucan, oligogalacturonide을 각각 처리하였을 때 여러 가지 isoflavonoid 중 다양한 기능성이 밝혀진 genistin, daidzein, genistein의 함량 변화를 조사하였다.

가. β-glucan을 처리하였을 때 isoflavone 함량 변화

콩나물에 처리할 β-glucan의 농도를 최적화 하고자 β-glucan을 농도별로 제조하여 콩나물에 처리하고 그 isoflavone함량을 비교한 결과는 Fig. 10과 같다. Daidzein의 경우 β-glucan농도의 증가에 따라 약간 증가하는 것을 볼 수 있으나, genistein의 경우 β-glucan의 농도가 증가함에 따라 조금 증가하는 경향을 보이다가 200 mg/L 처리 시에 오히려 조금 감소하는 것을 볼 수 있었다.

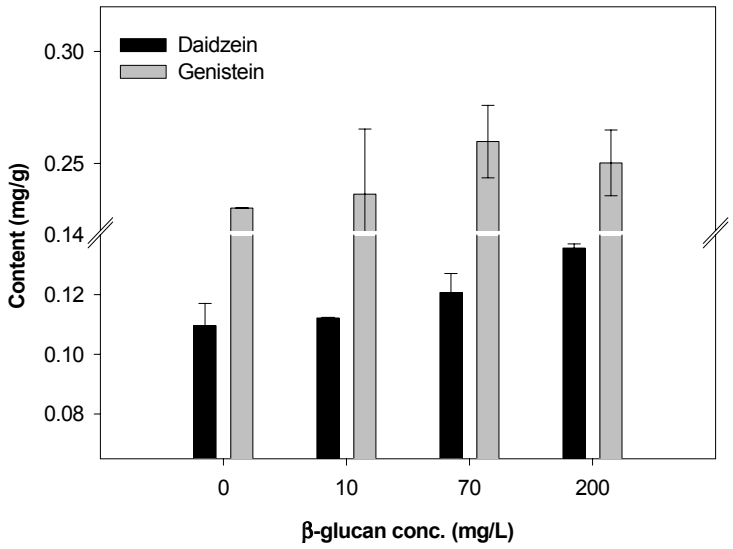


Fig. 10. Flavonoid contents of soybean sprouts treated with β-glucan.

나. Chitosan을 처리하였을 때 isoflavone 함량 변화

1) Chitosan 농도별 처리에 따른 효과

콩나물을 재배시에 chitosan을 농도별로 다르게 제조하여 처리한 결과 isoflavone의 함량변화는 Fig. 11과 같다. 키토산 농도가 0.05% 일때보다 0.1% 일 때 isoflavone의 함량은 감소하였으나 농도가 높아짐에 따라 다시 isoflavone의 함량은 증가하는 경향이었으며, 대조구와 비교했을 때는 키토산 처리한 콩나물의 isoflavone 특히 daidzein의 함량이 뚜렷이 증가하였다.

0.5% chitosan처리 시 대조구에 비해 83% 의 daidzein함량이 증가하였고, genistein은 38.6% 증가하였다. 그리고, 0.05% 키토산을 처리했을 때의 콩나물의 isoflavone 함량을 보면 daidzein함량이 82.5%, genistein함량이 38% 증가하였다. 결국 0.05% 키토산을 처리한 것과 0.5% 키토산을 처리한 콩나물의 isoflavone함량이 거의 비슷하게 나온 것을 볼 수 있다. 그러므로 키토산의 가격을 고려했을 때 0,5%의 용액을 제조하여 콩나물에 처리하는 것이 경제적으로 효율적이라 판단하여, 00.5% 키토산 처리하는 것을 최적조건으로 택하여 이후의 실험에 적용하였다.

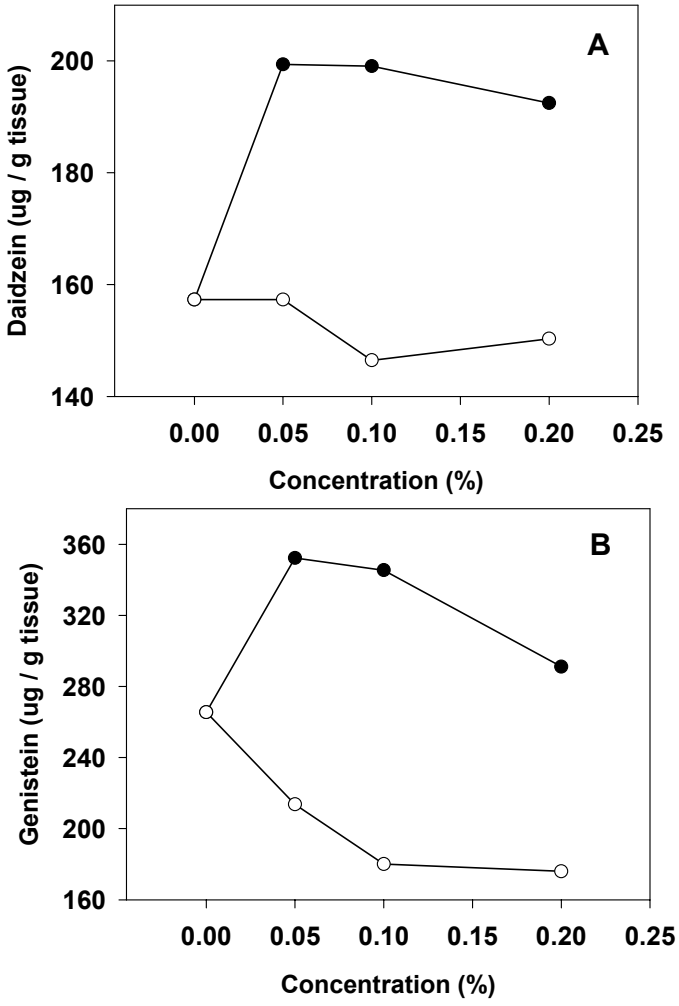

A
Daidzein (ug / g tissue)
200
180
160
140
0.00
0.05
0.10
0.15
0.20
0.25
Concentration (%)
B
Genistein (ug / g tissue)
360
320
280
240
200
160
0.00
0.05
0.10
0.15
0.20
0.25
Concentration (%)

Figure. 11. Change of isoflavonoids contents (daidzein, genistein) in soybean sprouts after treatment with various concentrations of chitosan (●) and water (○).

Chitosan solution contained acetic acid to dissolve chitosan, therefore control (water-treated) soybean was also treated with water containing same amount of acetic acid.

2) Chitosan 분자량 변화에 따른 효과

분자량이 다른 chitosan의 농도를 0.05%로 고정하여 콩나물을 재배한 후 daidzein과 genistein의 함량을 분석한 결과 Fig. 12와 같다. Chitosan의 분자량이 증가함에 따라 daidzein과 genistein의 함량이 linear하게 증가하여 30 cps에서 각각 80 mg/mL. 90 mg/mL로 대조구에 비해 각각 33%, 22% 증가하였으나 90 cps에서는 30 cps에 비해 다소 감소하는 추세를 보여 0.05% 30 cps가 가장 적합한 것으로 사료된다.

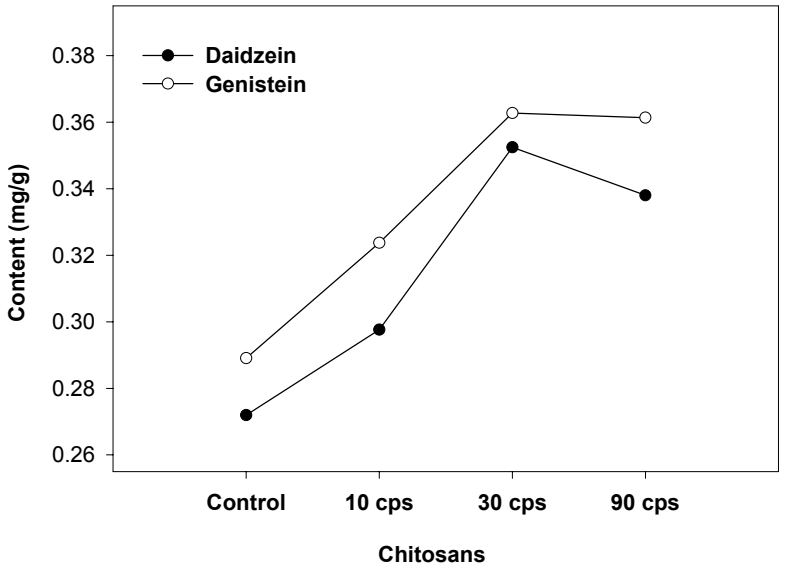


Fig. 12. Flavonoid contents of soybean sprouts treated by various chitosans with different molecular weights.

3) 수용성 chitosan 분자량 변화에 따른 효과

분자량이 다른 수용성 chitosan은 경기도 평택에 위치한 키토라이프에서 구입하여 사용하였으며 0.5 M NaOH를 이용하여 pH 5.5로 조절한 0.05% 키토산을 콩나물 재배시 처리하여 diadzein과 genistein을 분석한 결과는 Fig. 13에서 보는 바와 같이

분자량이 증가할수록 isoflavone함량이 증가하는 경향을 보였으며, 분자량 1,000~3,000인 경우 daidzein이 45%, genistein이 26% 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이와 같은 결과를 통해 볼 때 수용성 chtiosan은 비수용성 chitosan을 처리한 콩나물이 genistein을 증가시키는 것과는 상반되게 daidzein의 함량을 더 증가시키는 것을 볼 수 있었다. 그리고, 분자량 1000-5000의 수용성 키토산이 10 cps chitosan보다 isoflavonoid 함량을 더 증가시키는 것은 분자량이 큰 chitosan의 경우 물에 녹이기 위해 젖산을 사용하였는데 젖산의 영향때문으로 판단된다. 실제 chitosan 없이 젖산만을 이용 콩나물을 재배할 경우 isoflavonoid 함량은 오히려 감소한다. 결론적으로 수용성 chitosan은 저분자에서 isoflavonoid 함량을 증가시키기는 하지만 가격면에 있어서 수용성 chitosan이 비수용성 chitosan 보다 훨씬 비싸므로 콩나물 재배용으로 사용하기는 부적합하다.

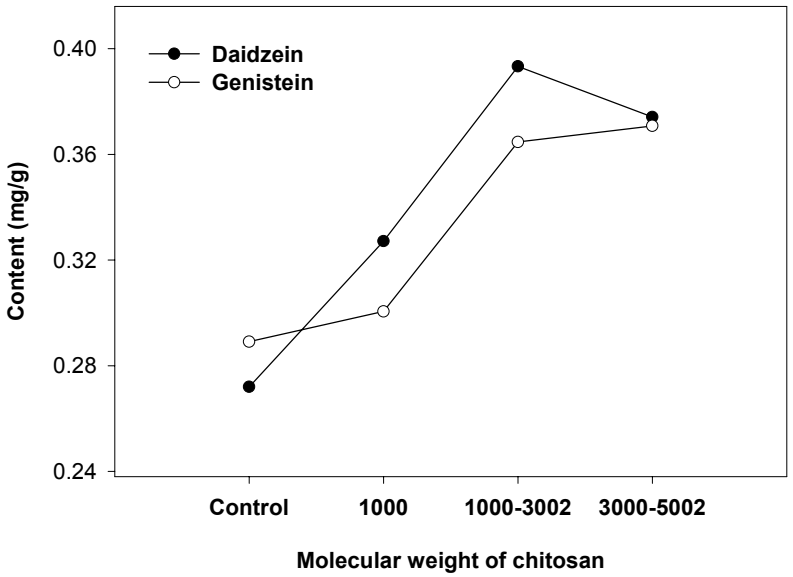


Fig. 13. Flavonoid contents of soybean sprouts treated by various water-soluble chitosans with different molecular weights.

다. Oligogalacturonide를 처리했을 때 isoflavone 함량변화

콩나물을 재배하는데 있어 oligogalacturonide를 농도별로 처리하여 glycone상태의 genistein의 함량을 조사해본 결과는 Fig. 14과 같다. 본 연구실에서 예비실험한 결과 oligogalacturonide는 콩나물의 성장과정에서 생길 수 있는 잔뿌리 생성을 일부 억제하는 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 oligogalacturonide 처리에 의해 담배에 있어 뿌리 생성이 억제 된다는 보고와 어느정도 일치하고 있다.
그러나 Oligogalacturonide의 농도별에 따른 isoflavone함량에 있어, 대조구와 비교했을 때 그 함량이 오히려 감소되는 것을 볼 수 있었다. 더 많은 조건을 실험해 봐야 하겠지만, 펙틴에서 제조하는 비용과 처리농도 등을 고려했을 때 콩나물에 처리하는 elicitor로의 제제로는 부적당하다고 사료된다. 그러므로, 이 후의 실험에 있어서는 oligogalacturonide의 처리는 하지 않는 것으로 결정하였다

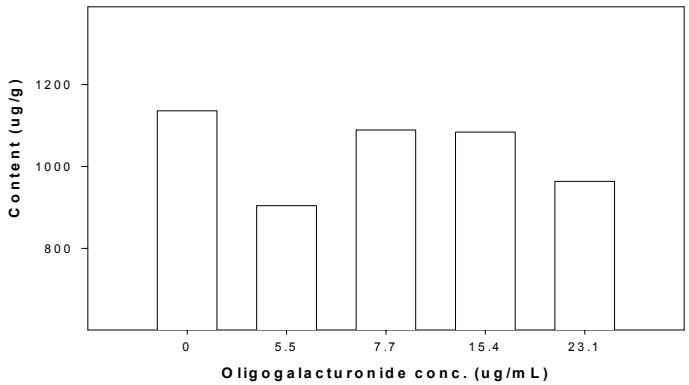


Fig. 14. Genistein contents of soybean sprouts treated with various concentrations of oligogalacturonide.

3. 콩나물 재배시 elicitor 처리에 따른 생장특성과 기능성 성분함량 변화

가. 콩나물의 생장특성

1) 발아율

Elicitor를 처리하여 3일간 키운 콩나물에 있어 발아율을 조사한 결과는 Table 2.와 같다. Chitosan을 처리하여 키운 콩나물의 경우 발아율이 5~8% 증가하는 것이 보였고, β-glucan을 처리한 경우는 오히려 발아율은 조금 감소하는 경향을 보였다. 그렇지만 대조구에 비해 발아율이 저하되는 것이 아니므로, β-glucan이 콩나물의 발아율 자체를 저하시킨다고는 판단되지 않으며, 키토산과 β-glucan을 섞어서 처리한 경우 콩나물에 있어 대조구에 비해 약 5% 이상의 발아율이 증가하는 것을 볼 수 있었다.

Table. 2 Germination of soybean sprout treated with elicitors.

	Germination (%)
D.W.	76±5
0.05% Chitosan	95±5
β-Glucan (100mg/L)	80±5
Chitosan + Glucan	90±5

2) 콩나물의 길이 및 굵기 측정

각 elicitor 처리에 따른 콩나물의 생장특성은 Fig. 15와 같다. 키토산을 처리한 콩나물은 대조구에 비해 5% 정도 굵어지는 것을 볼 수 있었고, β-glucan처리한 콩나물은 5.5% 정도 굵어졌다. 그 길이에 있어서는 키토산 처리와 β-glucan처리에 의해 전 길이가 5% 정도 감소하는 경향이었으며, 뿌리부분은 길어지는 것을 볼 수 있었다. 또한 두 용액을 섞어서 처리한 콩나물에서는 상승효과를 볼 수 있었다. 이 결과는 콩나물재배 시 잔뿌리가 나지 않게 하고 통통하게 하기 위해 여러 콩나물 재배업자 들이 인돌빈을 사용한다는 점을 고려할 때 고무적이라 할 수 있다.

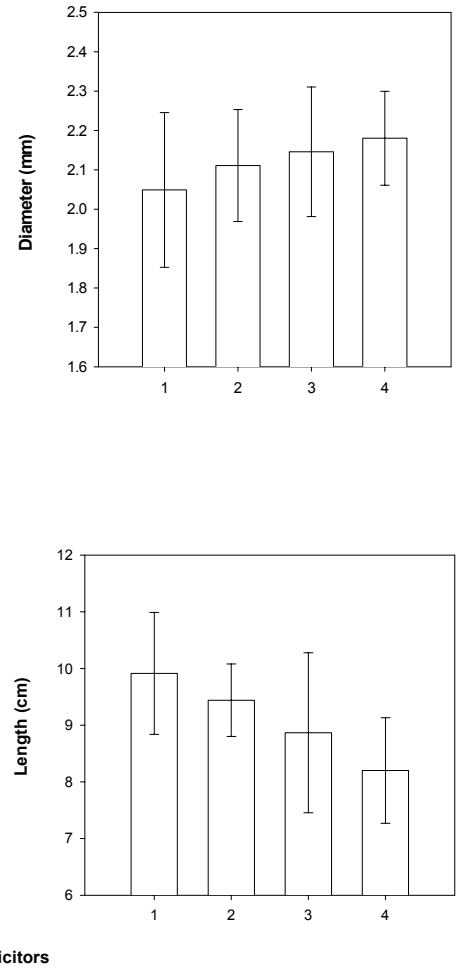


Fig. 15. Effects of elicitor treatments during cultivation of soybean sprouts on stem diameter and length.

1. Water-treated soybean sprout (control).
2. 0.05% Chitosan (30 cps)-treated soybean sprout.
3. β-Glucan (100 mg/L)-treated soybean sprout.
4. 0.05% Chitosan + β-glucan (100 mg/L)-treated soybean sprout.

나. 다양한 식물면역활성제 처리에 따른 isoflavone 함량

Isoflavone은 식물에서 95% 이상이 glycoside형태로 존재하지만 사람의 체내에서 일부가 가수분해되어 인체 내로 흡수가 잘 되는 aglycone상태로 된다는 점을 고려하여 두 가지 형태의 isoflavone을 분석하였다.

1) Elicitor 처리한 콩나물의 glycoside 함량

콩나물에서 isoflavone을 추출하여 가수분해하지 않은 glycoside형태인 genistin을 C_{18} column을 이용하여 HPLC 분석을 한 결과는 Fig. 16과 같다. 키토산과 β-glucan을 단독으로 처리하여 키운 콩나물의 isoflavone함량은 무처리 콩나물에 비해 뚜렷이 증가하였으며 특히 synergy효과를 보기 위해 키토산과 β-glucan 혼합용액을 처리한 콩나물이 무처리구나 elicitor 단독으로 처리한 콩나물보다 isoflavone함량이 증가되는 결과를 보여 elicitor를 단독으로 처리하는 것보다 혼합하여 처리하는 것이 보다 효과적임을 알 수 있다.

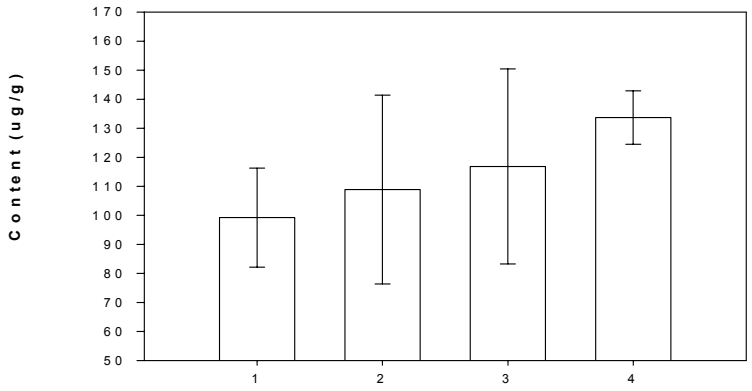


Fig. 16. Genistin content of soybean sprouts treated with elicitors.

1. Water-treated soybean sprout (control).
2. 0.05% chitosan (30 cps)-treated soybean sprout.
3. β-glucan (100 mg/L)-treated soybean sprout.
4. 0.05% chitosan + β-glucan (100 mg/L)-treated soybean sprout.

2) Elicitor 처리한 콩나물의 aglycone 함량

콩나물 추출물을 2 N HCl로 100℃에서 1시간 동안 가수분해시킨 aglycone형태인 daidzein과 genistein을 C18 column을 이용하여 HPLC 분석을 한 결과는 Fig. 17과 같다. Elicitor들을 혼합하지 않고 단독으로 처리한 경우 daidzein과 genistein함량이 무처리구에 비해 chitosan 처리시에는 각각 40%, 250% 증가했고, β-glucan 처리시에는 각각 30%, 173% 증가한 반면 한 반면 두 elicitor를 혼합하여 처리한 경우 무처리구에 비해 57%, 300% 증가하여 chitosan과 β-glucan을 혼합하지 않고 처리한 경우에 비해 뚜렷한 상승효과를 볼 수 있었다.

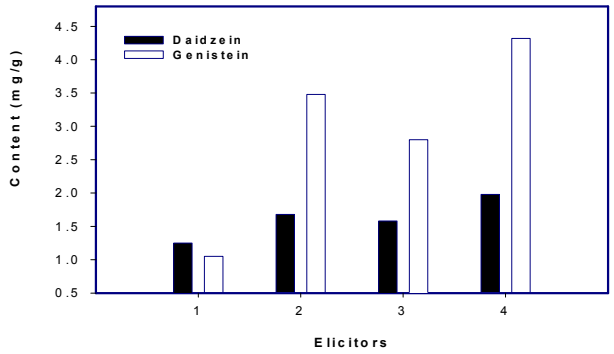


Fig. 17. Flavonoid contents of soybean sprouts treated with elicitors.

1. Water-treated soybean sprout (control).
2. 0.05% Chitosan (30 cps)-treated soybean sprout.
3. β-Glucan (100 mg/L)-treated soybean sprout.
4. 0.05% Chitosan + β-glucan (100 mg/L)-treated soybean sprout.

3) Phytoalexin 함량 변화 조사

콩나물 재배시 여러 elicitor를 처리함에 있어 식물의 방어물질의 일종인 phytoalexin의 변화를 조사한 결과는 Fig. 18과 같다. Phytoalexin은 약간의 독성을 가지는 것으로 알려져 있어, 식품에 적용할 경우 그 안전성의 확립이 필요함으로 인하여 이 함량이 얼마만큼 증가하는지를 조사하였다. 키토산을 처리한 콩나물에서는 대조구에 비해 glyceolin함량의 변화가 거의 없는 대신 다른 flavonoid함량은 증가하

는 것을 볼 수 있었다. 이런 결과는 phytoalexin이 phenylpropanoid pathway의 최종 산물이고 기능성을 갖고 있는 isoflavone은 pathway의 중간단계에서 생산됨을 고려할 때 콩나물의 재배기간 동안 phenylpropanoid pathway의 최종산물까지 가는데 관계하는 효소는 키토산 처리에 의해 활성이 증가하지 않기 때문이라 생각된다. 그러나 chitosan과는 달리 β-glucan처리 시에는 glyceolin의 함량이 뚜렷이 증가하는 것을 볼 수 있었지만, 이것은 우리가 일반적인 식생활을 통해서 어느 정도 섭취하고 있는 양임을 감안할 때 식품의 안전성에는 문제가 없을 것으로 사료된다.

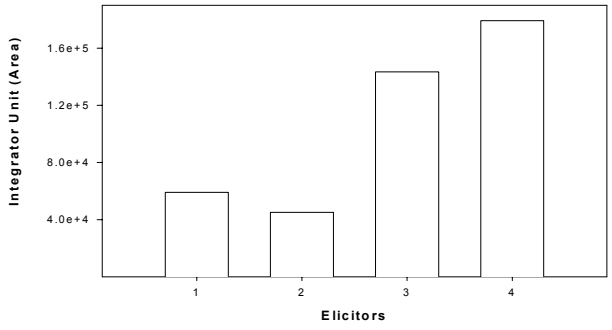


Fig. 18. Changes of glyceolin contents in soybean sprout treated with various elicitors.

1. Water-treated soybean sprout (control).
2. 0.05% chitosan (30 cps)-treated soybean sprout.
3. β-glucan (200 mg/L)-treated soybean sprout.
4. 0.05% chitosan + β-glucan (200 mg/L)-treated soybean sprout.

다. 다른 기능성 성분의 분석

1) 총 페놀성 화합물의 측정

기능성을 보이는 많은 2차대사 산물들이 페놀성 물질이 많기 때문에 총페놀화합물 함량을 측정하였다. Elicitor를 처리한 콩나물에서 총 페놀성 화합물을 조사한 결과 Fig. 19와 같다. Elicitor를 처리하여 재배한 콩나물이 무처리 콩나물의 총 페

놀성 화합물의 함량에 비해 약 6% 증가한 반면 상승효과를 보기 위해 chitosan과 β-glucan을 혼합하여 처리한 경우 무처리 콩나물에 비해 약 16% 증가하여 상승효과가 있음을 알 수 있었다.

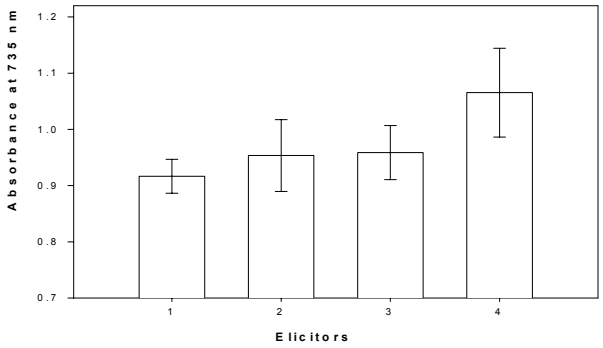


Fig. 19. Total phenolic compounds of soybean sprouts treated with elicitors.

1. Water-treated soybean sprout (control).
2. 0.05% chitosan (30 cps)-treated soybean sprout.
3. β-glucan (100 mg/L)-treated soybean sprout.
4. 0.05% chitosan + β-glucan (100 mg/L)-treated soybean sprout.

2) 항산화효과 측정

콩나물 추출물의 항산화 능력을 조사한 결과는 Fig. 20 과 같다. 총 페놀성 화합물이 무처리구에 비해 증가한 것으로 보아 항산화 효과도 증가할 것으로 예상되었으나 chitosan처리한 콩나물이 무처리 콩나물에 비해 약 12.5% 증가한 것을 제외하고는 β-glucan과 두 elicitor의 혼합용액 처리시 약 22% 정도 감소하는 경향을 보였다.

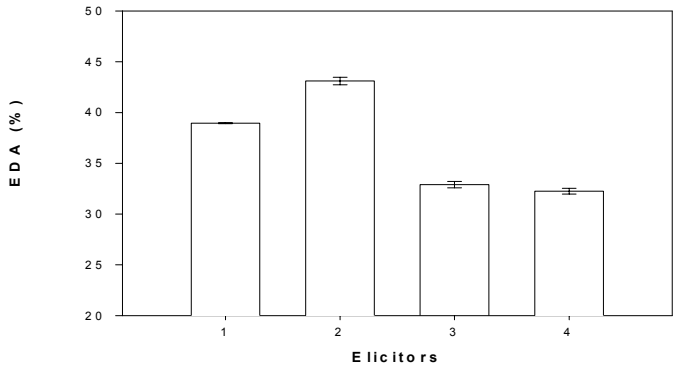


Fig. 20. Electron-donating ability (EDA) of soybean sprouts treated with elicitors.

1. Water-treated soybean sprout (control).
2. 0.05% Chitosan (30 cps)-treated soybean sprout.
3. β-Glucan (100 mg/L)-treated soybean sprout.
4. 0.05% Chitosan + β-glucan (100 mg/L)-treated soybean sprout.

3) 아질산염 소거능

아질산염은 식품내 아민류와 반응하여 발암성 니트로사민을 생성한다고 알려져 있다. 콩나물에 elicitor를 처리하였을 때 콩나물이 이런 아질산염을 소거할 수 있는 능력이 있는지를 실험한 결과는 Fig. 21과 같다. 무 처리 콩나물과 elicitor를 처리하여 키운 콩나물의 아질산염 소거능력이 모두 20% 이하를 보이고 처리구간의 차이도 적어 콩나물 자체가 아질산염 소거능력은 거의 없다고 사료된다.

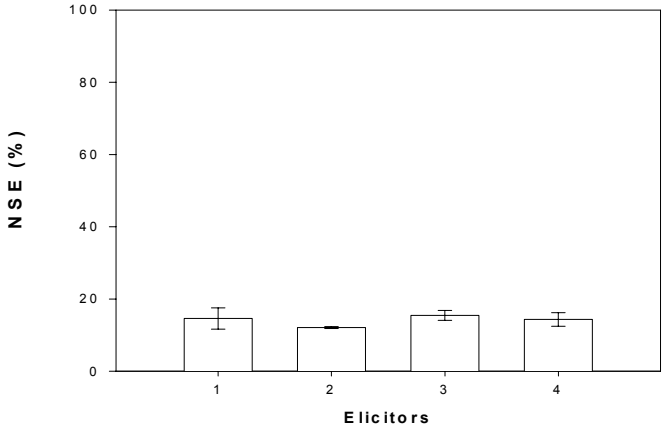


Fig. 21. Nitrite-scavenging effect (NSE) of soybean sprouts treated with elicitors.

1. Water-treated soybean sprout (control).
2. 0.05% Chitosan (30 cps)-treated soybean sprout.
3. β-Glucan (100 mg/L)-treated soybean sprout.
4. 0.05% Chitosan + β-glucan (100 mg/L)-treated soybean sprout.

4) 사포닌 함량

최근 여러 보고에 의한 *in vivo* 및 *in vitro* 실험을 통해 밝혀진 soyasaponin의 생리활성 및 생명활동에 대한 유지·조절기능은 혈중 콜레스테롤의 저하, 혈청 지질 개선, 과산화지질 억제, 항산화 작용, 비만 억제, 간장해발증 억제, 암세포에 대한 독성 및 성장 저해작용 등 알려져 있고, 또한 인체내 유해한 활성산소 superoxide O_2^-를 산소와 과산화수소로 분해하는 SOD (Superoxide dismutase)의 활성을 높인다고 알려져 노화방지에 대한 관심의 대상이 되고 있는 사포닌의 함량 변화를 chitosan, β-glucan 및 oligogalacturonide을 농도별로 처리하여 콩나물의 사포닌 함량에 대한 변화가 있는지를 조사하였으며, 콩나물의 원료인 은하콩과도 비교하였다.

가) 키토산 처리 농도에 따른 조 사포닌 함량

키토산을 농도별로 처리하여 재배한 콩나물의 조 사포닌 함량 변화는 Libermann-Buchard 정색반응법을 이용하여 정량하였으며 그 결과는 Fig. 22와 같다. 초기 crude saponin 함량은 4.40±0.11mg/g이였으나 6시간 침지 후 12시간 발아 성장을 하면서 3.29±0.17~4.90±0.37mg/g로 감소 하였다가 생장하면서 그 함량도 증가하였고, 증가정도는 무 처리 콩나물보다 chitosan을 농도별로 처리했을 때 더 높은 함량을 보였으며, 생장 6일째 가장 높은 함량으로 무처리 콩나물은 7.01±0.22mg/g, 2000ppm 처리한 콩나물은 7.13±0.29mg/g, 1000ppm 처리한 콩나물은 8.40±0.15mg/g, 500ppm 처리한 콩나물은 8.47±0.29mg/g, 그리고 250ppm처리한 콩나물은 9.41±0.27mg/g 증가하였으며, 7일째에는 감소하였다.

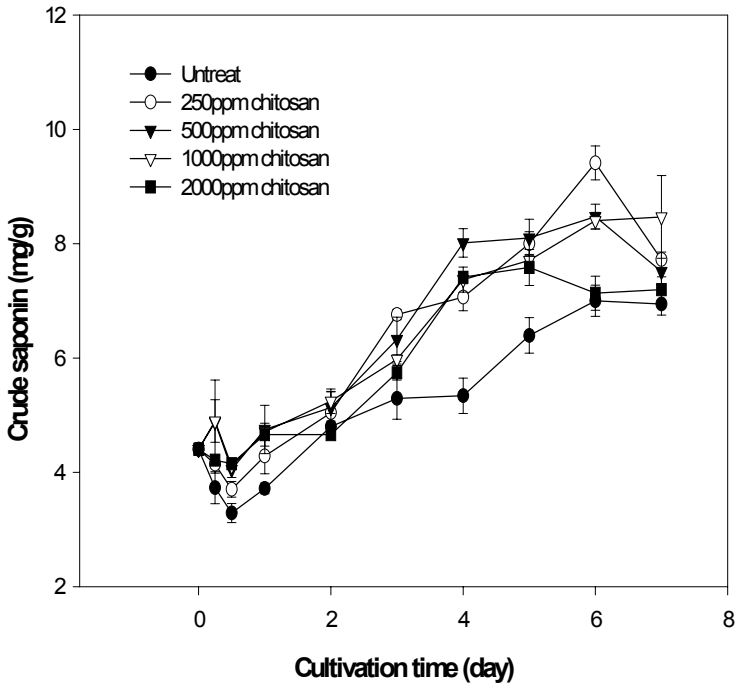


Fig. 22. Crude saponin contents of soybean sprouts treated with various concentrations of chitosan.

나) β-glucan 처리 농도에 따른 사포닌 함량

β-glucan을 농도별로 처리하여 재배한 콩나물의 조 사포닌 함량변화는 Fig. 23과 같다. 콩나물은 발아·성장하면서 사포닌 함량이 증가하였고, β-glucan처리 농도에 따른 변화는 70 mg/L로 처리하였을 때 약간 증가하는 경향이 있는데 확실한 결과를 얻기 위해서 좀 더 다양한 농도 처리가 필요하다.

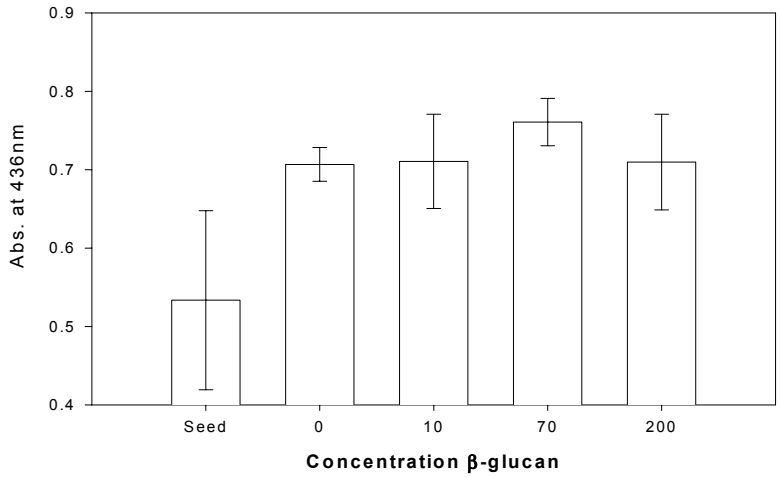


Fig. 23. Saponin contents of soybean sprouts treated with various concentrations of β-glucan.

다) Oligogalacturonide 처리 농도에 따른 사포닌 함량

Oligogalacturonide을 농도별로 처리하여 재배한 콩나물의 조 사포닌 함량변화는 Fig. 24과 같다. 콩나물은 발아·성장하면서 사포닌 함량이 증가하였고, oligogalacturonide 처리 농도에 따른 변화는 15.4 mg/L과 23.1 mg/L로 처리하였을 때 감소하는 경향을 보였다.

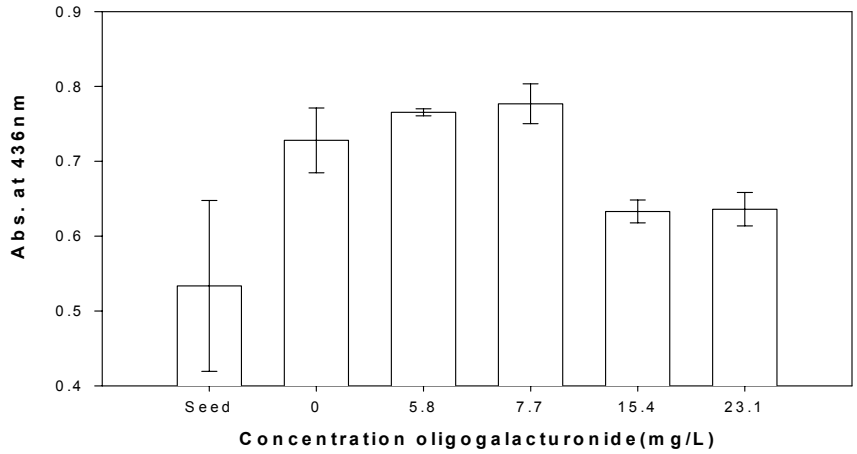


Fig. 24. Saponin contents of soybean sprouts treated with various concentrations of oligogalacturonide.

4. 콩나물 수확 후 유통기간에 미치는 식물면역활성제의 효과

가. 콩나물 유통기간 동안의 미생물 수의 변화

콩나물 재배 시에 처리한 elicitor로 인해 수확 후 콩나물의 면역이 증가되었는지를 조사하고자 유통기간동안 콩나물의 총균수를 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 25와 같다. 키토산을 처리한 콩나물의 경우 대조구와 비교해 90% 정도 미생물 총균수가 감소하는 것을 보였으며 β-glucan의 경우도 어느 정도 총균수를 감소시키는 것으로 나타났다. 키토산은 자체의 항균력이 있는 것으로 알려져 있어 어느 정도 예상했던 결과를 보였으나, β-glucan이 자체의 항균성을 지녔다는 보고는 아직 없으므로, 이것은 β-glucan이 식물체와 반응하여 식물의 저항성을 증가시켰기 때문이라고 생각된다. 이런 결과는 기존의 콩나물이 미생물오염으로 인해 유통기간이 2~3일로 짧아 폐기되는 경우가 많아 문제이었는데 이의 해결을 위하여 고무적인 결과라 생각된다.

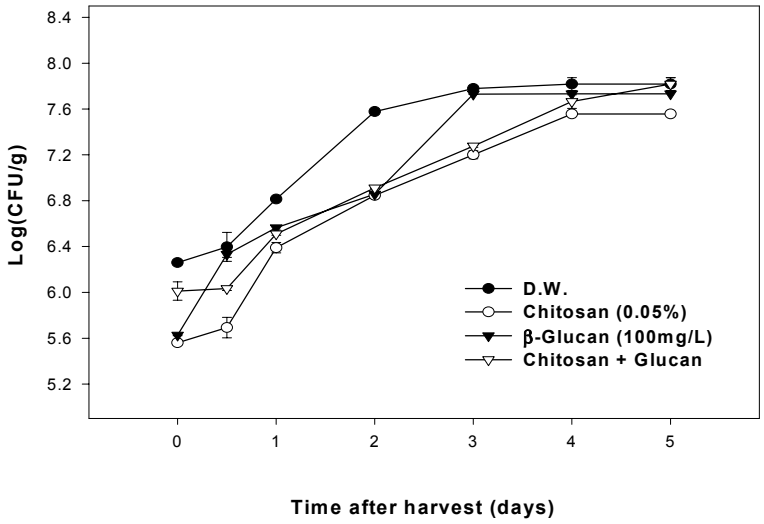


Fig. 25. Changes of total cell counts after harvest in soybean sprout treated with elicitors during cultivation.

나. 부패율 측정

콩나물 재배 시에 처리한 elicitor로 인해 수확 후 콩나물의 면역이 증가되었는지를 조사하고자 유통기간 동안 콩나물을 10℃ chamber에서 저장하면서 5일째 되었을 때의 부패율을 조사한 결과는 Fig. 26.와 같다. elicitor를 처리한 콩나물은 무처리구에 비해 부패율이 감소하는 경향을 보였으며 chitosan과 β-glucan으로 키운 콩나물은 무처리구에 비해 약 5%의 감소율을 나타내었다. 따라서 이 결과와 같이 콩나물에 elicitor를 처리함으로써 부패율이 5% 감소율의 차이는 8천억이라는 콩나물 시장을 고려할 때 경제성이 있다고 보여진다.

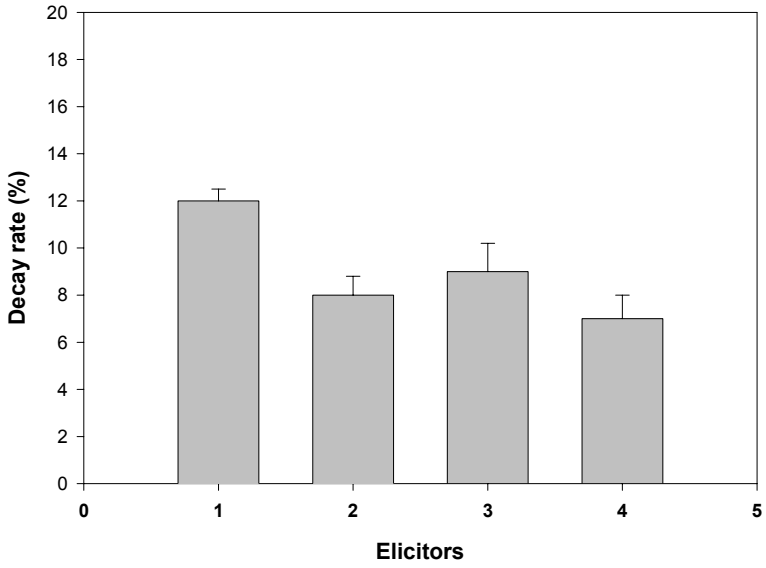


Fig. 26. Decay rate (%) of soybean sprouts treated with elicitors.

1. Water -treated soybean sprout (control).

2. 0.05% Chitosan (30 cps) -treated soybean sprout.

3.β-Glucan (100 mg/L)-treated soybean sprout.

4. 0.05% Chitosan + β–Glucan (100 mg/L)-treated soybean sprout.

다. Elicitor 처리에 따른 기능성 성분의 변화

1) Isoflavone 함량변화

콩나물의 수확 후 증가된 isoflavone이 감소될 가능성이 있어 elicitor처리에 따른 수확 후 isoflavone함량변화를 조사하였다 (Fig. 27).

유통기간 동안 daidzein과 genistein의 함량은 수확직후의 함량을 거의 그대로 유지하였음을 볼 수 있었다. 이 결과로부터 콩나물의 유통기간이 연장되어도 이 기간 중에는 인체에 유용한 생리활성물질인 isoflavone의 함량 변화가 없다고 판단할 수 있었다.

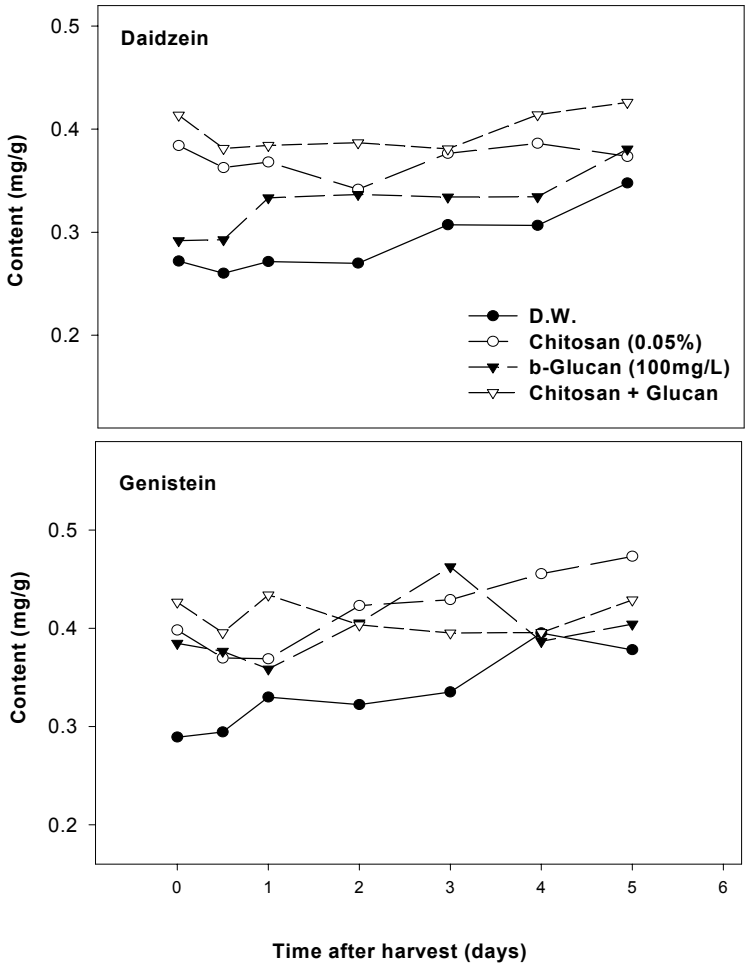


Fig. 27. Changes of isoflavonoid contents after harvest in soybean sprouts treated with elicitors during cultivation.

2) Total phenolic compound 변화

콩나물 수확 후 총 페놀화합물의 함량변화는 Fig. 28과 같다. 각 elicitor를 처리한 콩나물의 수확 직후 총 페놀화합물 함량에서 전체적으로 약간 증가하는 경향을 보였다. 특히 대조구에서의 페놀화합물 함량은 처음에는 키토산 처리 콩나물보다 적었으나 나중에는 함량이 더 높게 되었는데 이 이유는 식물이 미생물공격을 받았을 때 페놀화합물함량이 증가한다는 점을 고려할 때 무처리 콩나물에 미생물오염이 더 많기 때문이 아닌가 생각된다. 한편 콩나물을 cotyledon과 hypocotyl로 나누어 total phenolic compounds를 분석한 결과는 Fig. 29와 같다. Fig. 29에서 보듯이 cotyledon과 hypocotyl 모두에서 elicitor 처리한 콩나물이 총페놀물질 함량이 높았다.

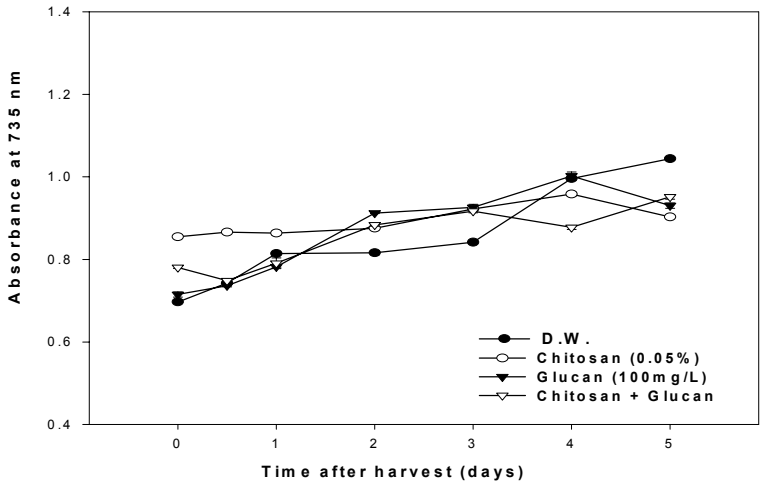


Fig. 28. Changes of total phenolic compouds after harvest in soybean sprouts treated with elicitors during cultivation.

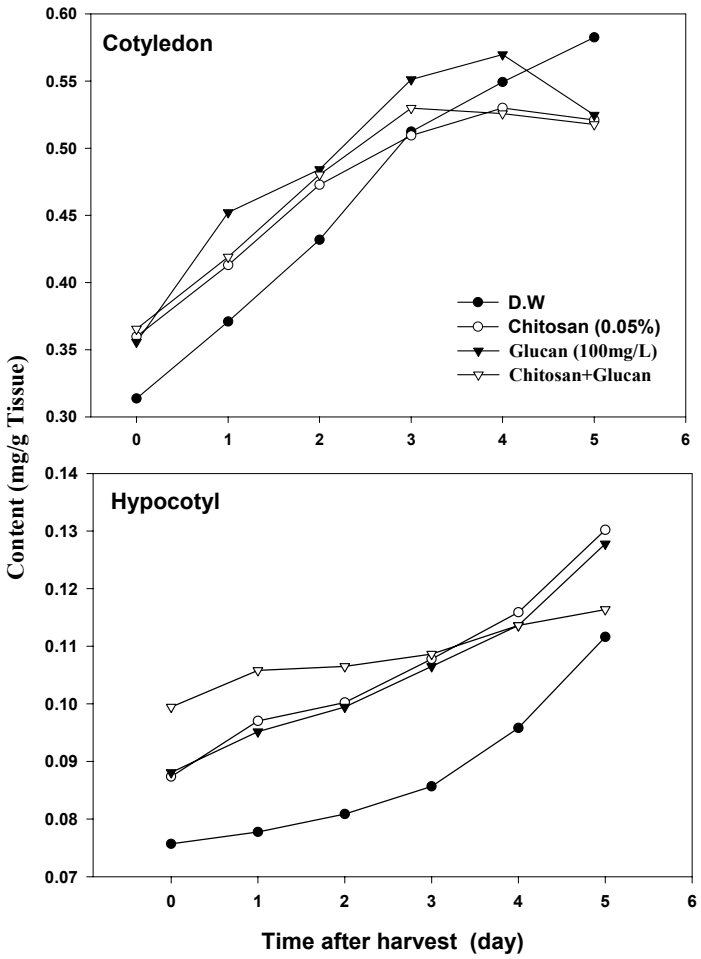


Fig. 29. Changes of total phenolic compounds after harvest in soybean sprout treated with elicitors during cultivation.

3) DPPH 에의한 전자공여능(항산화능) 변화

콩나물 수확 후 항산화능의 함량변화는 Fig. 30과 같다. 수확 후 항산화능은 elicitor에 상관없이 전체적으로 소폭의 증가가 있었다. 항산화력에 있어서는 수확 후에 cotyledon, hypocotyl 모두 약간의 증가를 보였고 cotyledon에서는 처리에 따른 차이가 크지 않았으나 hypocotyl에서는 elicitor처리 콩나물에서 대체로 높은 값을 보였고 특히 glucan과 chitosan 혼합 처리 콩나물에서 높은 값을 보였다(Fig. 31).

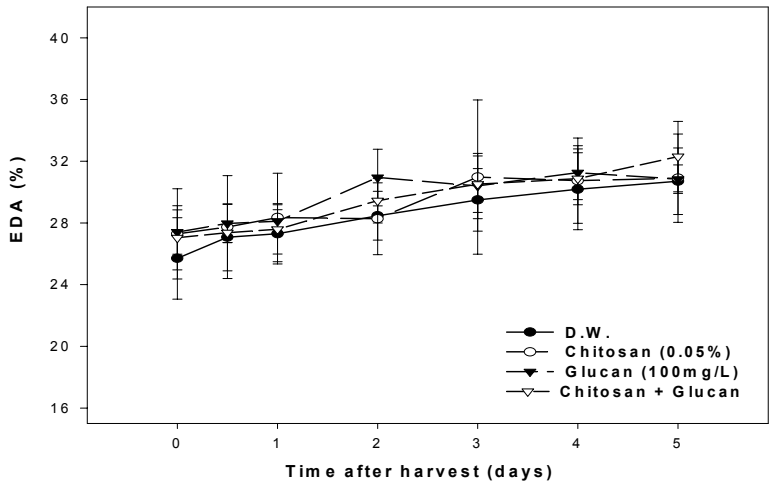


Fig. 30. Changes of electron-donating ability (EDA) after harvest in soybean sprouts treated with elicitors during cultivation.

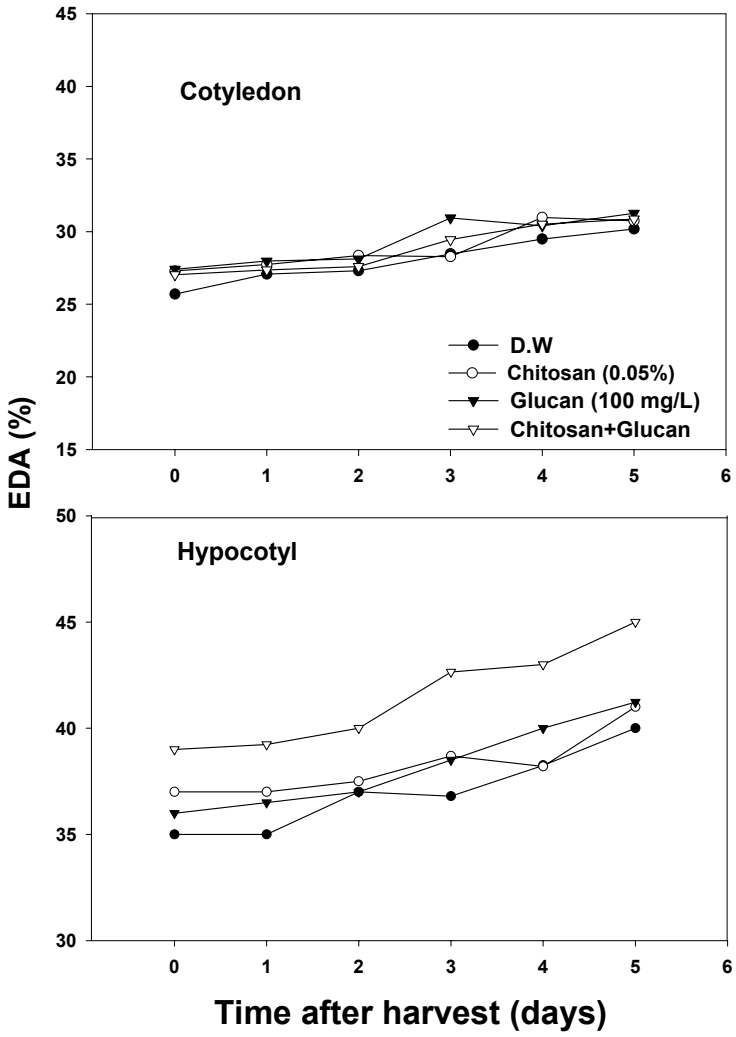


Fig. 31. Changes of electron donating ability (EDA) after harvest in soybean sprout treated with elicitors during cultivation.

4) Chlorophyll 함량과 색도 변화

Elicitor 처리에 의하여 기능성 물질이 증가되고 병에 대한 저항성 및 저장성이

증가되는 장점이 있지만 elicitor를 처리한 콩나물에서 빛에 의한 녹변현상이 대조구보다 빨리 진행되는 단점을 발견하였다 (Table 3).

녹변이 진행된 콩나물은 소비자의 선호도가 떨어져 이에 대한 방지방법을 개발하는 것이 필요하다. 그러기 위해 먼저 원인이 chlorophyll 합성의 증가인지 확인하였다. 그리하여 실험실에서 인위적으로 10℃의 chamber 안에서 빛을 쬐어 주면서 저장한 콩나물의 색차계를 조사한 결과는 Table 3.와 같다. 밝기를 타나태는 L값이 커질수록 백색에 가까워지는데 elicitor를 처리한 콩나물보다 무처리콩나물에서 높은 L값(60.1)을 나타내었으며 적색도를 나타내는 a값은 elicitor를 처리한 콩나물이 대조군에 비하여 낮았으며 황색도를 나타내는 b값 역시 낮았다. 즉 색차계에서 chitosan과 glucan을 혼합처리한 콩나물의 경우 녹색의 강도가 강하였는데 이 경향은 Fig. 32.에서의 chlorophyll의 함량 변화의 결과와 일치하였다. Fig. 32.에서 보듯이 콩나물이 chlorophyll 함량도 더 높음을 알 수 있었다. 시간이 지남에 따라서 elicitor처리한 콩나물에서 chlorophyll 증가가 더욱 뚜렷하였고, 무처리콩나물은 각 elicitor를 처리한 콩나물에 대해서 그 생성량이 더 적음을 볼 수 있었다. 콩나물의 녹변은 chlorophyll의 직접전구체인 chlorophillide까지는 암소하에서도 생성되기 때문에 일시적인 광 노출에 의하여 바로 녹변하는 특성을 지니고 있다. elicitor를 처리함으로써 콩나물의 생육을 촉진함과 동시에 녹변을 억제할 수 있는 좋은 방안이 될 수 있을 것으로 생각되었으나 본 실험에서는 녹변현상에 대한 뚜렷한 효과가 나타나지 않았다. chlorophyll 합성이 phytochrome에 의해 중재될 것이라는 생각에 다음에는 phytochrome 이 인식하는 파장의 빛을 차단하여 녹변현상을 줄이는 실험을 하려한다.

Table 3. Changes of total cotyledon color after harvest in soybean sprouts treated with elicitors during cultivation

Samples		Time after harvest (day)					
		0	1	2	3	4	5
L	D.W	78.5	72.1	67.7	63.1	60.5	60.1
	Chitosan	78.2	71.8	66.2	62.5	58.1	57.8
	Glucan	78.3	71.3	66.8	61.8	58.3	57.6
	C+G*	78.0	71.0	65.2	60.8	56.2	55.3
a	D.W	-12.6	-15.7	-16.4	-17.3	-19.5	-21.5
	Chitosan	-13.0	-16.3	-17.5	-20.7	-22.5	-24.3
	Glucan	-13.2	-17.7	-20.2	-21.9	-23.1	-23.8
	C+G*	-12.8	-18.5	-20.3	-23.0	-24.8	-26.9
b	D.W	44.0	40.8	38.2	36.7	33.5	30.7
	Chitosan	45.2	39.2	36.5	34.5	31.1	27.5
	Glucan	45.6	39.7	36.1	34.8	31.8	27.2
	C+G*	44.2	38.5	34.1	30.5	28.5	25.2

[1)] Soybean sprouts treatedd with chitosan and glucan.

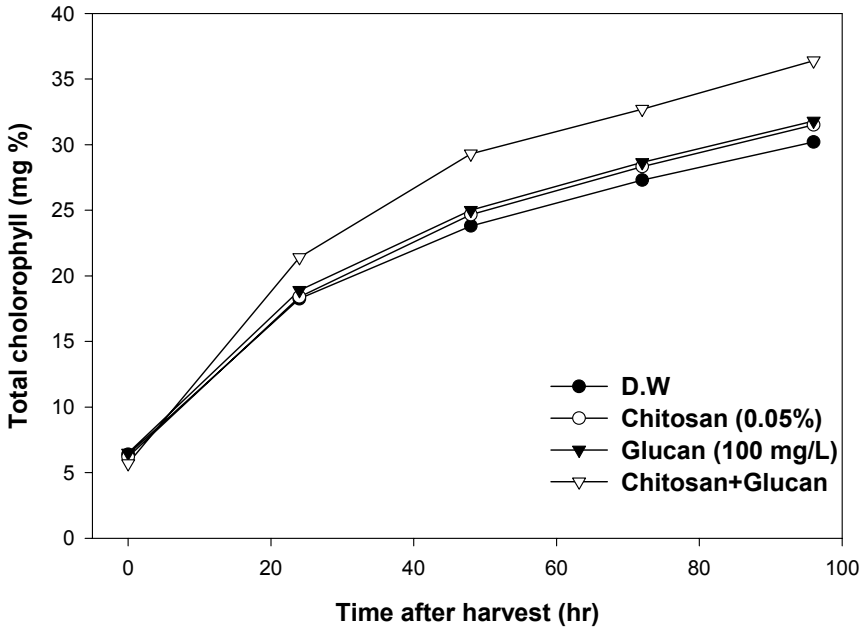


Fig. 32. Changes of total chlorophyll content after harvest in soybean sprouts treated with elicitors during cultivation.

5. 콩나물 재배 시 elicitor처리에 따른 병원균감염에 의한 저항성 비교

가. 박테리아, 곰팡이 병원균에 대한 저항성 증가 효과

키토산과 β-glucan이 여러 식물에 elicitor로 작용하여 식물 면역활성을 증진시킨다는 사실에 착안하여 콩나물 재배시 키토산 또는 β-glucan을 처리 후 곰팡이균에 대한 저항성을 조사하였다. 이 연구를 위해 대두의 뿌리 썩음병을 일으키는 *Phytophthora soiae*의 유주자를 만들어 감염을 시킨 결과 키토산 또는 β-glucan을 처리한 콩나물의 경우 저항성의 식물에서 나타나는 hypersensitive response와 같은

작은 점이 보이고 감염이 더 이상 확대되지 않는데 비해 대조구는 심하게 감염된 것이 관찰되었다(Fig.33). 이 결과는 콩나물 재배시 키토산 또는 β-glucan을 처리함으로써 콩나물의 방어능력을 키워 농약사용을 줄일 수 있다는 가능성을 제시한다고 할 수 있다.

*Bacillus subtilis*는 박테리아의 일종으로 콩에 있어 생육이상과 뿌리에 균열을 일으키게 하는 병원균으로 잘 알려져 있는데 *Bacillus subtilis*에 의해 감염된 콩나물의 모습은 Fig. 34.에 나타난 바와 같다.

Fig. 34.은 재배시작 72시간째 콩나물을 채취하여 감염시킨 것으로 감염된 지 48시간이 지난 후의 모습이다. 줄기에 병원균을 감염시켰을 때 무처리 콩나물은 감염된 부위의 갈변화 정도가 심하고 조직의 연화 또한 매우 심할 뿐 만 아니라, 콩나물 머리에서 줄기로 이어지는 부분의 갈변이 매우 심하게 나타났다. 이에 반하여 elicitor 처리 콩나물은 감염 부위의 갈변화나 연화가 무처리 콩나물에 비하여 적었고, 머리에서 줄기로 이어지는 부분의 갈변현상 또한 거의 나타나지 않았다.

또한 Fig. 35.에서도 역시 재배시작 72시간째 콩나물에 *B. coagulans*을 감염시킨 것으로 48시간이 지난 후의 모습이다. *B. coagulans*는 종자짓무름과 뿌리를 썩게 하는 병원균으로 알려져 있으며 무처리구의 콩나물에서는 종자의 짓무름과 뿌리부분에 갈변이 심하였으나 elicitor처리구는 종자의 짓무름 정도가 약하였고 뿌리부분의 갈변정도 또한 무처리구에 비해 약하였다.

따라서 elicitor를 처리한 나물콩은 발아에 영향을 미칠 뿐만 아니라 콩나물의 성장에 있어서도 영향을 준다는 사실을 확인할 수 있는데, elicitor처리에 의하여 콩나물 내부의 생화학적 변화가 일어나게 된다는 것을 알 수 있었다.

그러한 생화학적 변화 중 하나가 병원균 감염 실험에서 보여 주듯이 콩나물이 chitosan과 glucan을 인식하게 되고 이렇게 인식된 chitosan과 glucan는 콩나물 내부에서 외부 stress에 대해 방어를 할 수 있은 어떤 물질들을 생산하는데 관여하여 생화학적으로 저항성을 향상시키는 생리활성 물질로써 작용한다는 사실을 알 수 있다. 즉 앞서 서론에서 말한 것처럼 chitosan이나 glucan이 콩나물에 있어 elicitor로 작용한다는 것을 알 수 있었다. 키토산 및 그 염산가수분해물이 식물병원성 곰팡이에 대하여 생육저지효과를 나타내는 것이 1979년 Allan과 Hadwiger에 의해서 처음

으로 보고 된 이래로 1984년 Kendra과 Hadwiger에 의해 더욱 명확하게 밝혀졌으며 또한 곰팡이 뿐만 아니라 *E.coli, B.subtilis, S.aureus*등의 세균류에 대해서도 현저한 증식억제작용이 있다는 사실이 밝혀졌다. 키토산의 탈아세틸화도의 차이에 따라서 *Fusarium solani*에 대한 항곰팡이를 검토한 결과 탈아세틸화도가 높을수록, 즉 유리아미노기가 많을수록 항곰팡이 활성이 강하다는 것을 보여주었다.

Fig. 33-35는 color 그림이므로 편집의 용이성을 위해 **page 158,159에** 나타내었음.

나. 콩나물에 존재하는 여러 방어단백질 발현 조사

1) β-1,3- glucanase activity 변화

식물체내에서 병원균의 침입에 의해 유도되는 단백질인 pathogenesis-related (PR) protein 은 분자량이 25~40 kD인 저분자 단백질로 곰팡이의 세포벽 구성성분인 β-1.3 ,β-1.6- glucan을 가수분해하는 β-1,3- glucanase를 포함하고 있어 이들이 식물의 자체 방어에 관련된다고 보고되고 있다. β-1,3- glucanase는 지금까지 조사된 모든 식물에서 병원균의 공격이 있을 때 발현이 증가되는 것으로 침입하는 곰팡이균등의 세포벽을 분해시키는 작용이 있다고 믿어져 오고 있다. Fig. 36.은 72시간동안 키운 무처리 콩나물과 elicitor처리 콩나물의 β-1,3- glucanase의 activity를 측정한 결과이다. 콩에서 6시간 침지하였을 때가 β-1,3- glucanase가 가장 activity가 가장 높았으며 시간이 지나감에 따라 β-1,3- glucanase는 감소함을 보였다. 무처리 콩나물보다는 elicitor처리구가 activity가 높게 나타났으며 이렇게 elicitor처리 콩나물에서 β-1,3- glucanase의 activity가 더 높다는 사실은 elicitor가 콩나물에 있어 세포 내에서 외부 스트레스에 대한 방어물질을 만들어 내게 하는 signal이 되고 있을 뿐만 아니라, 콩나물 자체의 저항성 또한 증가시키는 요인이 될 수 있을 것이다.

2) Protease inhibitor activity 변화

여러 식물에서 키토산 및 oligouronide 처리에 의해 protease inhibitor 활성이 높아진다는 보고가 있어 콩나물에서 elicitor 처리 시 protease inhibitor 활성의 변화를 조사한 결과는 Fig. 37과 같다. 처음에는 상당량이 존재하나 재배기간 동안 약간 감소하는 경향을 나타내었지만 elicitor처리 콩나물이 무처리 콩나물에 비하여 성장한지 6시간까지의 초기 activity도 현저하게 많을 뿐만 아니라 72시간 후에도 잔존하는 activity 또한 훨씬 많다는 것을 확인할 수 있었다.

3) Phenylalanine ammonia-lyase activity (PAL)변화

PAL 효소는 식물의 방어관련대사 과정에 관여하는 효소로서 식물이 갖고 있는 많은 종류의 2차대사 과정의 첫단계인 Phenylalanine을 trans-cinnamic acid로 전환하는 반응을 촉매한다. cinammaic acid는 다시 몇 단계의 반응을 거쳐 식물의 세포벽을 형성하는 lignin, suberin등의 식물생장에 기본적으로 필요한 물질 뿐만 아니라 병원균 또는 elicitor처리 시 생성되는 phytoalexin, UV 조사시 방어물질로 생성되는 iosflavonoid 등을 합성한다. 이미 잘알려진 예로 상처, 병원균의 침입, 빛의 조사 등의 자극을 가하였을 때 PAL 효소의 합성은 크게 증가한다고 한다고 알려져 있다. PAL은 phenylpropanoid 대사과정에 있어서 key regulatory 효소로 알려져있고 isoflavonoid도 phenylpropanoid pathway를 거쳐 합성되는 것으로 알려져 있어 elicitor 처리 시 콩나물에서 이 효소가 증가하는지를 조사하였다. Fig.38.은 72시간동안 키운 무처리 콩나물과 elicitor처리 콩나물의 PAL의 activity를 측정한 결과이다. 침지 6시간 후 모든 elicitor처리구에서 PAL activity는 급격한 증가를 보였으며 재배 기간동안 감소하는 경향을 나타내었으나 대조구보다 높은 activity를 유지하였다.

4) Total phenolic compounds 의 분석

콩나물을 72시간 성장하는 동안에 Total phenolic compounds를 분석한 결과는 Fig. 39이다. phenolic compounds는 시간이 지날수록 전체적으로 계속 증가하는 경향을 나타내고 있으며, 무처리 콩나물에서보다는 elicitor처리한 콩나물에서 phenolic compounds의 함량이 더 높았다.

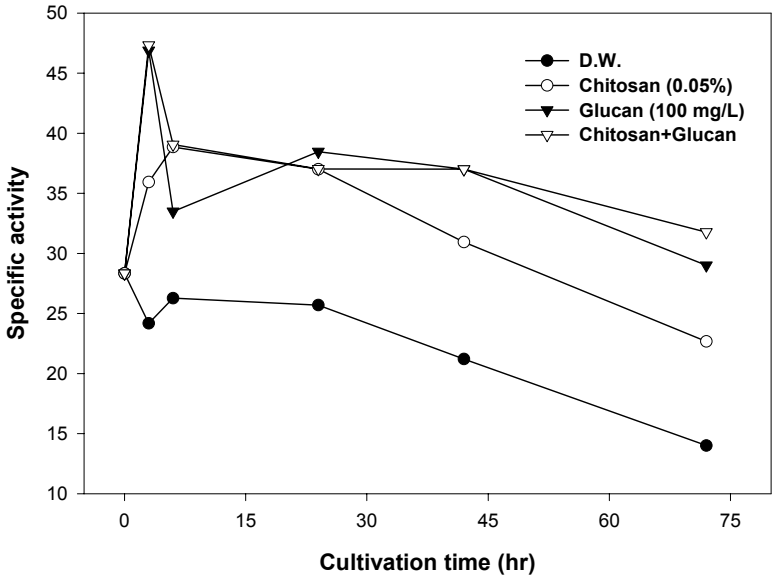


Fig. 36. Change of β-glucanase activity in soybean sprouts treated with various elicitors during cultivation.

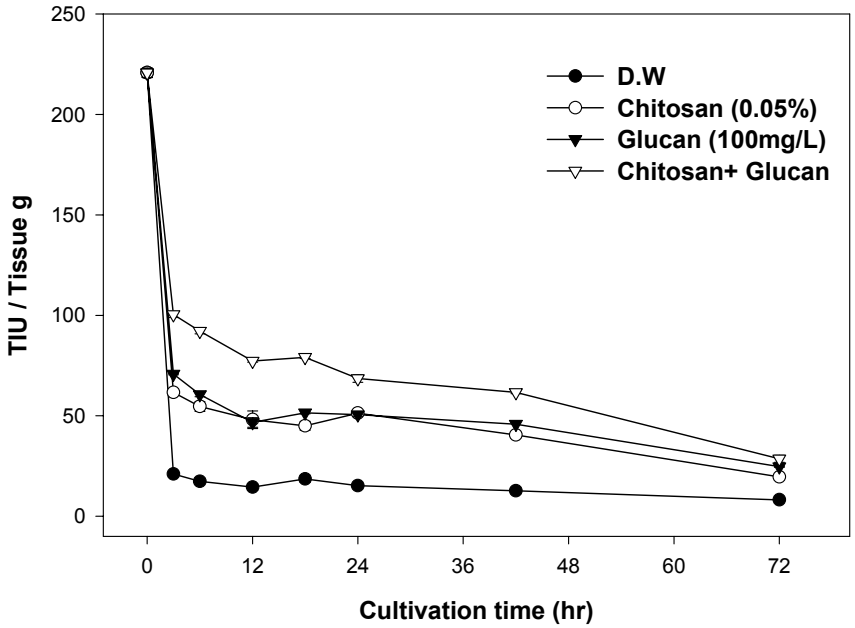


Fig. 37. Changes of trypsin inhibitor activity in soybean sprouts treatd with various elicitors during cultivation.

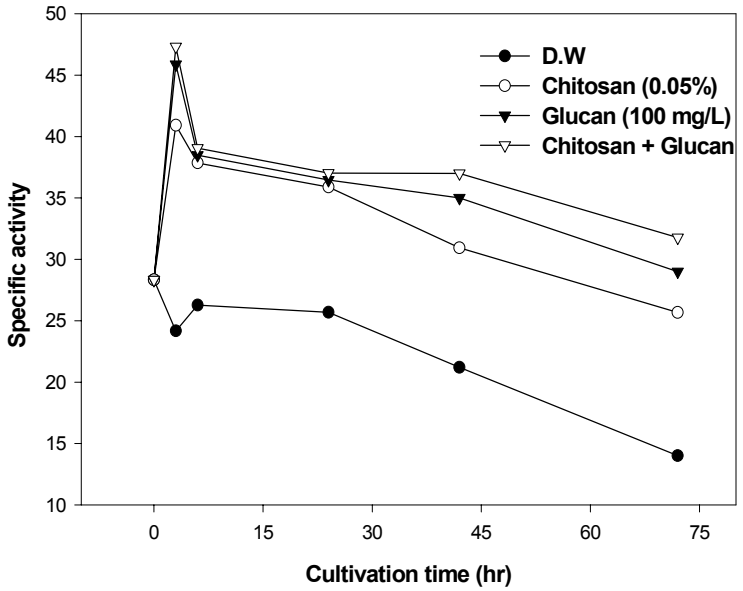


Fig. 38. Changes of phenylalanine ammonia-lyase activity in soybean sprouts treated with various elicitors during cultivation.

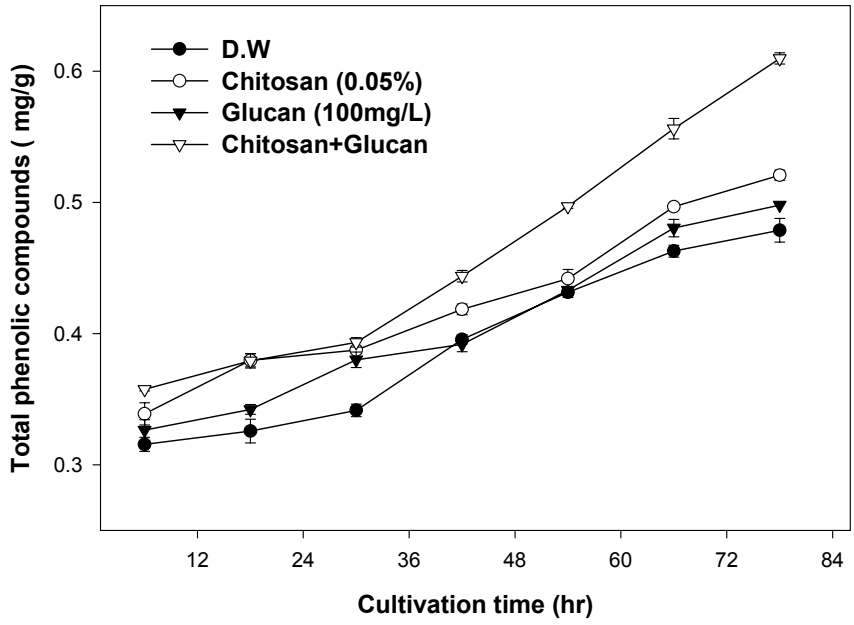


Fig. 39. Changes of total phenolic compounds in soybean sprouts treated with various elicitors during cultivation.

6. 콩나물 공장에서의 실증 실험

전남 무안군 일로읍에 있는 콩나물 공장을 빌려 공장규모로 콩나물을 재배하였을 때에도 실험실에서 재배하였을 때와 같은 효과가 나오는지를 조사하였다. 은하콩 2 kg으로 하였으며 수침온도는 16±2℃로 각각 elicitor 용액 4 L씩에 6시간 침지한 후 12시간마다 elicitor 용액을 2 L씩 주어 8일간을 키웠다.

가. 수율

Fig. 40은 수확 한 콩나물의 비교 사진이다. 무처리 콩나물은 보이는 것처럼 통 위로 올라오지 않았지만 elicitor 처리한 콩나물은 통 위에까지 올라왔으며 빽빽하

게 있는 것을 볼 수 있었다. 수확 후 콩나물의 수율을 측정한 결과는 Fig. 41.와 같다. 무처리 콩나물은 600%의 증가율을 보였고 chitosan+β-glucan으로 키운 콩나물은 665%의 증가율을 보였다. 콩나물의 수율의 높은 증가율은 발아율의 높은 결과와 상관관계가 높은 것으로 생각된다.

나. 발아율

콩나물 수확후 발아율을 측정한 결과는 Fig. 42.와 같다. 같은 재배조건으로 동시에 재배하였을 때 무처리 콩나물은 95%이며 elicitor처리 콩나물은 99.7%로 무처리 콩나물에 비해 약 4.7%정도의 발아율이 높음을 알 수 있었다. 전체적으로 발아율의 수치가 높은 것은 2002년도산 나물콩을 사용했기 때문이라 사료되며, 콩나물에 있어서 오랜 저장기간을 거친 원료콩을 사용하여 키운 콩나물의 수율 저조는 일반적인 사실이다. 이러한 결과는 나물콩이 elicitor용액에 침지되는 동안에 나물콩에 영향을 주고 있다는 사실을 확인할 수 있을 뿐 아니라, 나물콩에 있어 elicitor을 인식할 수 있는 어떤 수용체가 존재할 것이라는 예측을 할 수 있다. 따라서 이 결과와 같이 콩나물에 elicitor을 처리함으로써 증가되는 4.7%발아율의 차이는 8천억이라는 콩나물 시장을 고려할 때 적은 양이 아니라 할 수 있다.

다. Isoflavonoid 함량에 미치는 효과

콩나물의 에탄올추출물을 2 N HCl로 100℃에서 1시간 동안 가수분해시켜 C18 column을 이용하여 HPLC 분석을 한 결과는 Fig. 43.과 같다. chitosan+β-glucan을 혼합하여 처리한 경우 무처리구에 비해 50%, 300% 의 뚜렷한 증가를 볼 수 있었다.

라. 관능 평가

공장에서 키운 elicitor를 처리한 콩나물과 무처리 콩나물에 대한 관능적 품질을 평가한 결과는 Table 4.과 같다. 조리 후의 콩나물 색상으로는 갈변정도, 자엽의 황색도, 배축의 투명도 등을 감안하였으며, 냄새는 비린내의 정도와 구수한 냄새를 고려하였다. 그리고 경도 및 기호성으로 평가하였다. 갈변정도, 자엽의 황색도, 아삭아

삭 씹히는 정도등 무처리구와 elicitor처리를 한 콩나물의 뚜렷한 차이가 발견되지 않았으며, elicitor를 처리한 콩나물이 비린내와 비린맛, 구수한 냄새와 고소한 맛에서 높은 점수를 보여 유의적인 차이가 있었다. 종합적인 기호도에서 elicitor를 처리한 콩나물이 높은 점수를 얻었으며, 전반적으로 콩나물의 맛과 냄새에 영향을 크게 받는 듯 보였다.

Fig. 40은 color 그림이므로 편집의 용이성을 위해 **page 160**에 나타내었음.

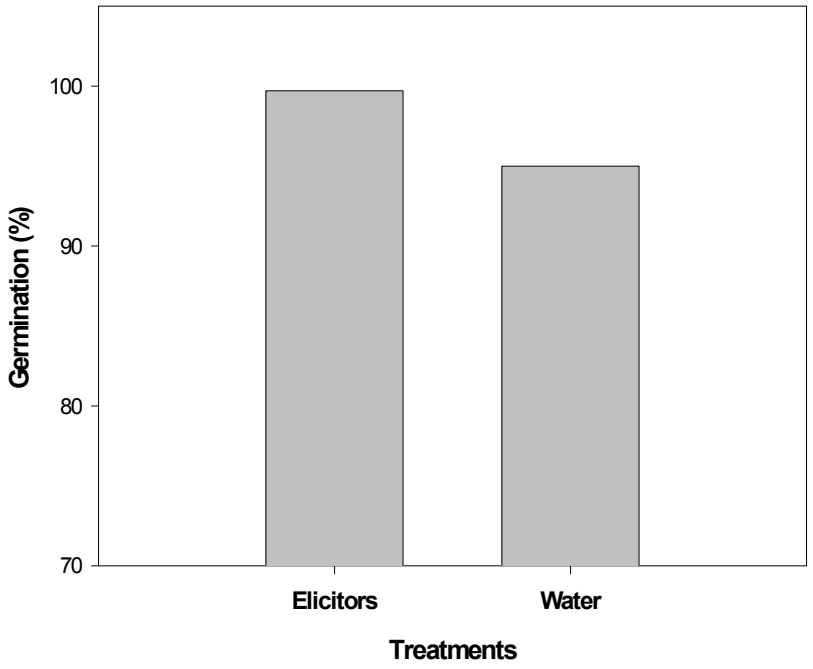


Fig. 41. Effect of elicitor treatment on the germination of soybean sprout.

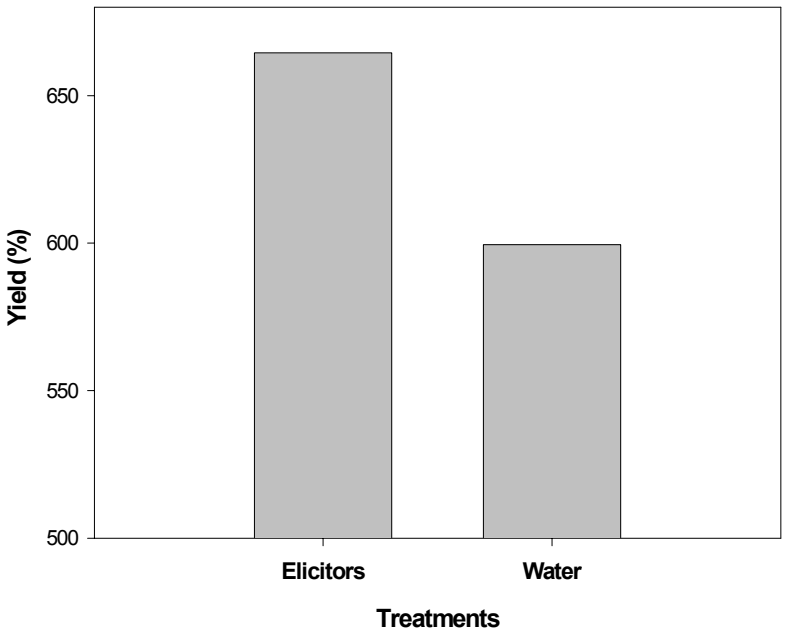


Fig. 42. Effect of elicitor treatment on the yield of soybean sprouts.

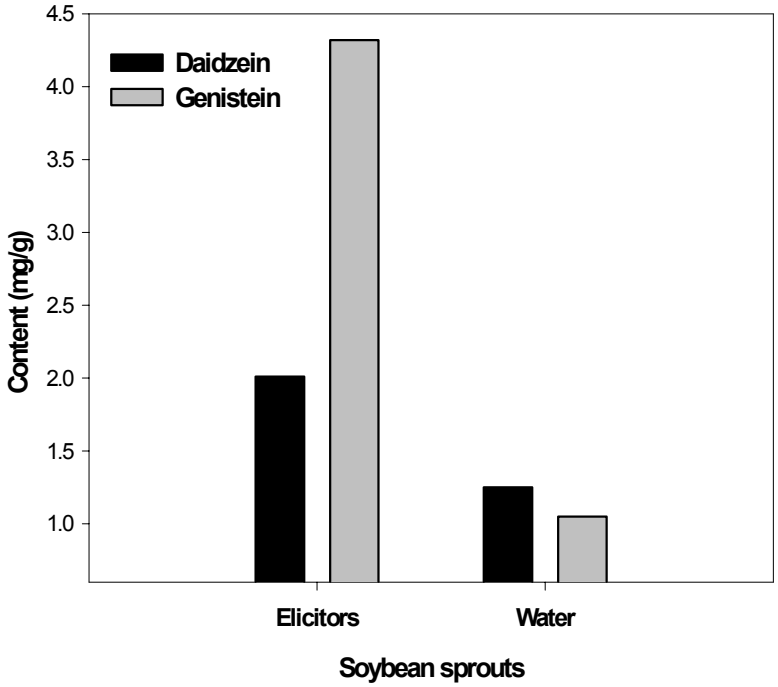


Fig. 43. Flavonoid contents of soybean sprouts treated with elicitors.

Table 4. Sensory evaulation of soybean sprouts

	sample (n=17)	M±SD[1-3)]	t값	유의확률(양쪽)
갈변정도	키토산+β-glucan	3.29±0.69	-1.750	0.090
	대조구	3.70±0.69	-1.750	0.090
자엽의 황색도	키토산+β-glucan	3.58±0.51	0.771	0.446
	대조구	3.41±0.80	0.771	0.447
배축의 투명도	키토산+β-glucan	3.35±0.50	-2.685	0.011
	대조구	3.82±0.53	-2.685	0.011
비린내 정도	키토산+β-glucan	3.41±0.62	3.599	0.001
	대조구	2.53±0.80	3.599	0.001
구수한 냄새	키토산+β-glucan	3.94±0.66	3.983	0.000
	대조구	2.82±0.95	3.983	0.000
비린맛	키토산+β-glucan	3.59±0.72	3.862	0.001
	대조구	2.59±0.80	3.862	0.001
고소한 맛	키토산+β-glucan	3.77±0.66	2.317	0.027
	대조구	3.18±0.90	2.317	0.027
아삭아삭 씹히는 정도	키토산+β-glucan	3.65±0.61	0.684	0.499
	대조구	3.47±0.88	0.684	0.500
종합적인 기호도	키토산+β-glucan	3.89±0.70	3.273	0.003
	대조구	3.00±0.87	3.273	0.003

[1)] Each item was evaulated in 5 hedonic scale. 5: very good, 4: good …2: poor,1: very poor

[2)] Each value was represented as mean ±SD(standard deviation).

The number of panelists was 17.

[3)] Significantly different from the control at $p < 0.05$ by student's t-test.

제 2 장 기능성콩나물의 3개월 연속 투여에 따른 안전성 평가

제 1 절 연구목적

기능성 물질을 가하여 재배한 새로운 기능성콩나물을 장기간 섭취하는 경우의 안전성을 평가하기 위하여 rat에서 3 개월간 투여 후의 다양한 변수를 측정하고자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 시험물질

목포대학교의 함경식 교수팀에서 재배한 콩나물을 미세분말화하여 동결건조하고 -20℃에서 사용시까지 보관하면서 사용하였다. 콩나물 습중량 14.5kg에서 건조분말 2kg의 비율로 시험시료의 생산이 가능하였으며 65kg의 인간이 콩나물 매일 300g(콩나물습중량)을 섭취한다는 조건을 고려하여 최소투여용량(1%)을 설정하였다. 시험군의 설정, 사용동물수, rat의 혼합사료 섭취량에 근거한 rat 및 인간의 콩나물추정 섭취량은 Table 5와 같다.

Table 5. Experimental groups and approximation of test substance intake

Group		# of rats	Dry powder intake range in rats (mg/kg/day)	Extrapolated human wet sprout intake (g/person/day)
Male	Control	10	0	0
	1%	10	461～1,588	217～746
	3%	10	1,349～4,705	636～2,217
	10%	10	4,481～15,898	2,112～7,492
Female	Control	10	0	0
	1%	10	599～1,456	282～686
	3%	10	1,794～4,646	845～2,189
	10%	10	5,907～14,52	2,784～6,858

2. 시험동물 및 동물사육조건

암・수 4주령 Sprague-Dawley(SD) rat 각각 40마리씩을 대한실험동물로부터 구입하여 사용하였다. 사육조건은 12시간 명암주기(8:00-20:00), 온도 22±2℃, 상대습도 55±10%를 유지시킨 동물사육장에서 1주일간 순치시킨 뒤, 동일조건에서 전시험기간동안 사육하였다. 동물은 rat용 cage(명진기기)당 5마리씩 수용하였다. 전 실험기간 중 분말화한 설치류용 사료(삼양사료) 및 수도수를 자유로이 공급하였다. 실험군은 대조군(0%), 콩나물 분말을 각각 1, 3 및 10%를 균질하게 혼합하여 공급하였다.

3. 관찰항목

가. 임상증상 및 체중 측정

시험기간 중 매일 1회 이상증상을 관찰하였으며 시험기간 중 3일 간격으로 체중을 측정하였다.

나. 사료섭취량 및 음수량

매일 사료급이량 및 음수공급량과 그 잔존량으로부터 실제섭취량을 구하여 3일 간격으로 표현하였다.

다. 혈액학적 검사

3개월간의 연속투여가 종료된 후 12시간 동안 절식한 후, 동물을 ether 마취하고 복대동맥으로부터 혈액을 채취하였다. Heparin으로 혈액을 처리하고 적혈구수, 백혈구수, hemoglobion 농도, hematocrit치, mean corpuscular volume(MCV), mean corpuscular hemoglobin content(MCHC) 및 platelet를 hematological analyzer(Minos Vet®, Minos)로 분석하였다. 백혈구 백분율은 혈액을 slide glass에 도말하고 Wright-Giemsa 염색하여 광학현미경으로 계수하였다.

라. 혈청생화학적 검사

혈청생화학적 검사를 의해 혈액을 실온에 20분간 방치하여 응고시킨 후 원심분리(5,000xg, 30분)하여 혈청을 분리하였다. 혈청중의 albumin, alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, bilirubin, calcium, cholesterol, creatine kinase, creatinine, glucose, total protein, lactate dehydrogenase, triglyceride 및 blood urea nitrogen의 농도를 Sigma assay kit(St. Louis, MO)를 사용하여 분석하였다.

마. 장기중량

전 시험동물에 대하여 부검시 간장, 신장(좌우), 비장, 심장, 부신, 뇌, 뇌하수체, 감상선, 난소(난소), 자궁, 고환(좌우), 정낭, 전립선, 폐, 흉선, 타액선의 중량을 측정하고 체중에 대한 상대적 비율을 계산하였다.

바. 병리조직학적 검사

장기중량을 측정한 장기를 10% 중성 formalin에 고정한 후 paraffin포매기(Histomatic Tissue Processor, Fisher Scientific)로 포매하여 rotary microtome으로 5μm의 두께로 절편하여 hematoxylin/eosin 염색을 행하였다. 만들어진 조직표본을 광학현미경으로 검경하였다.

4. 통계학적 분석

Data를 평균±표준편차로 표현하였으며 대조군과의 통계학적차이는 ANOVA 분석 후 Dunnett's t-test를 사용하여 유의성을 검정하였다. P의 값이 0.05이하일 때 차이가 있다고 판단하였다.

제 3 절 결과

1. 사망동물 및 임상증상의 관찰

대조군을 포함한 모든 암·수 시험군에서 사망한 동물은 없었으며 콩나물분말의 투여와 관련지을 만한 비정상적인 행동은 나타나지 않았다.

2. 체중변화

시험 전기간을 통해 대조군과 콩나물 투여군사이에는 아무런 차이가 발견되지 않았다(Figs. 44-45).

3. 사료소비량의 변화

Fig. 46-47는 전 시험기간 중의 사료소비량을 보여주고 있는 바, 대조군과 콩나물분말 혼합사료 투여군간에 아무런 차이가 없었다.

4. 음수량에 미치는 영향

음수량이 콩나물분말의 추가에 의해 변화하지 않았다(Figs. 48-49).

5. 혈액학적 검사

Table 6와 7에서는 대조군 및 콩나물분말이 함유된 사료를 3개월간 연속투여한 후 측정한 혈액학적 변수를 나타내고 있다. 이 표에서 보는 바와 같이 총 6종의 변수에서 대조군과 콩나물투여군간의 유의한 차이가 발견되지 않았다.
백혈구의 백분율에서도 시료의 투여에 따른 영향이 발견되지 않았다(Tables 8-9).

6. 혈청생화학적 검사

Table 10과 11에서 보는 바와 같이 대조군 및 콩나물분말을 혼합한 사료를 함유한 사료를 투여한 실험군간에 총 14종의 변수에서 아무런 차이가 발견되지 않았다.

7. 장기중량측정

웅성에서 총 9종, 자성에서 8종의 장기에 대한 절대장기중량을 측정하였으며 Table 12과 13에서 보는 바와 같이 대조군과 콩나물분말 투여군간에 아무런 차이가 발견되지 않았다.

8. 육안적 병변

부검시 모든 동물에 대해, 피부, 흉강내, 복강내, 근육, 내부장기 표면 등에 어떤 이상이 나타나는가를 확인하기 위하여 육안적으로 관찰하였으나 콩나물분말의 투여와 관련지을 만한 아무런 이상도 발견되지 않았다.

9. 병리조직학적 소견

모두 8-9종의 주요 장기로부터 제작한 조직절편에 대하여 병리학적 이상의 유뮤를 관찰하였다. 그 결과 Table 14과 15에서 보는 바와 같이 검사한 대부분의 다른 장기에서는 비정상적으로 판단되는 어떠한 이상도 발견되지 않았지만 대조군을 포함한 3% 투여군 1-2마리의 간장에서 충혈이나 미약한 공포화가 발견되었다. 또 웅

성 1% 투여군 1마리의 폐에서는 경미한 수준의 폐렴이 나타났다. 그러나 간장과 폐의 이러한 변화가 대조군에서도 나타나거나, 투여군에서 나타나더라도 콩나물분말의 투여 농도와 상관성이 없는 것을 보면 이러한 병변이 시험물질의 투여와는 상관이 없다고 판단된다. 폐렴이 분말사료의 급이와 관련되어있을 가능성은 있으나 현재로써는 분명한 증거는 없다.

Figs. 50-51에서 각각 대조군과 10% 투여군 웅성의 전형적인 조직절편 slide사진을 보여주고 있다.

제 4 절 결론

암·수 rat에서 콩나물 건조분말을 최고 10%까지 사료에 혼합하여 90일간 투여하면서 투여군에서 체중의 변화, 사료섭취량, 음수량, 행동의 변화, 혈액학, 혈청생화학적 변수, 주요 장기의 조직학적 측면에 영향이 나타나는가를 시험하였다. 그 결과 어떤 변수에서도 시험시료의 투여와 관련되었다고 판단할 만한 변화가 관찰되지 않았기 때문에 이 콩나물시료가 인간에 심각한 독성을 미칠 가능성은 거의 없다고 판단된다. 이 시험에서 사용한 최고 혼합농도인 10%는 콩나물 습중량으로 역산하면 인간(65kg 기준)이 매일 2.1~7.5kg을 섭취하는 경우와 비교할 만할 것이다. 일반적으로 인간이 매일 콩나물을 섭취하는 양이 300g 정도로 가정한다면 rat과 인간의 감도차이를 고려한다고 하더라도 충분히 안전하다고 볼 수 있다.

Table 6. Hematological parametes in male rats administered with bean sprout powders for 90 days (n=10 in each group).

Parameters	Treatment groups			
	Control	1%	3%	10%
WBC ($1x10^3/mm^3$)	8.4±2.1	8.0±2.3	7.9±2.0	8.1±1.7
RBC ($1x10^6/mm^3$)	7.7±0.4	8.1±0.8	7.5±1.0	7.9±0.4
Hb (g/dl)	14.2±0.6	15.0±1.0	14.4±0.4	13.5±0.5
Hct (%)	48.0±1.2	46.2±2.1	44.7±0.9	45.8±1.4
MCV (fl)	59.0±3.1	62.1±4.0	57.8±2.2	55.8±4.7
MCHC (%)	32.2±2.1	30.4±3.6	33.6±2.6	30.5±3.3

Table 7. Hematological parametes in female rats administered with bean sprout powders for 90 days (n=10 in each group).

Parameters	Treatment groups			
	Control	1%	3%	10%
WBC ($1x10^3/mm^3$)	7.1±0.6	7.9±4.1	6.7±1.0	7.1±1.2
RBC ($1x10^6/mm^3$)	6.6±0.8	6.0±1.1	5.7±1.2	6.9±0.7
Hb (g/dl)	14.0±0.7	14.0±1.0	15.2±0.8	13.3±0.8
Hct (%)	45.2±1.6	44.7±2.2	40.6±0.8	43.5±1.0
MCV (fl)	58.8±2.1	61.1±3.0	59.5±4.2	61.3±3.3
MCHC (%)	33.3±4.1	31.7±2.5	30.5±2.1	33.7±2.8

Table 8. Differntial leucocyte count of male rats administered with bean sprout powders for 90 days (n=10 in each group).

Parameters (%)	Treatment groups			
	Control	1%	3%	10%
Neutrophil	16.7±6.9	14.2±3.1	17.5±5.0	13.7±5.2
Lymphocyte	81.5±8.8	84.0±7.8	80.6±6.0	84.0±6.3
Monocyte	0.92±0.40	0.64±0.52	1.20±0.90	1.02±0.88
Eosinophil	0.88±0.71	1.16±0.10	0.70±0.86	1.28±1.20
Basophil	0.0±0.0	0±0	0±0	0±0

Table 9. Differential leucocyte count of female rats administered with bean sprout powders for 90 days (n=10 in each group).

Parameters (%)	Treatment groups			
	Control	1%	3%	10%
Neutrophil	17.2±5.7	18.7±7.1	14.6±5.0	15.8±5.3
Lymphocyte	80.7±7.7	87.3±8.2	83.1±6.8	73.5±11.2
Monocyte	1.11±0.67	0.77±0.52	1.20±1.0	0.57±1.45
Eosinophil	0.95±0.44	0.77±1.0	1.1±0.78	1.11±0.94
Basophil	0.04±0.01	0±0	0.01±0.01	0.02±0.01

Table 10. Serum biochemical values of male rats administered with bean sprout powders for 90 days (n=10 in each group).

Parameters	Treatment groups			
	Control	1%	3%	10%
Total protein (g/dl)	8.3±0.9	7.7±1.1	8.2±0.9	7.6±0.8
Albumin (g/dl)	4.4±0.6	4.1±0.4	4.8±0.5	4.5±0.4
Total bilirubin (mg/dl)	0.02±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.03±0.02
Glucose (mg/dl)	117.6±20.6	123.9±23.5	107.0±15.2	97.6±28.7
AST (IU/l)	138.0±22.2	159.1±24.6	143.3±27.5	150.0±36.5
ALT (IU/l)	35.4±7.2	33.6±6.1	42.9±7.0	44.4±6.8
ALP (IU/l)	143.2±30.2	125.4±27.5	156.8±28.0	137.0±34.0
Lactate dehydrogenase (IU/l)	212.7±44.5	196.6±23.9	188.4±31.6	209.4±33.0
Cholesterol (mg/dl)	62.0±8.4	68.7±5.3	70.4±8.2	66.9±7.4
BUN (mg/dl)	18.8±4.6	21.8±4.0	24.7±6.4	21.0±5.0
Creatinine (mg/dl)	0.8±0.1	0.9±0.1	0.6±0.1	0.6±0.2
Triglyceride (mg/dl)	98.4±10.2	102.6±11.0	87.1±11.4	110.8±15.2
Creatine kinase (IU/l)	224.7±37.2	193.7±48.0	209.6±21.4	186.6±28.1
Calcium (mg/dl)	10.4±1.1	9.7±0.7	11.5±0.8	10.3±0.7

Table 11. Serum biochemical values of female rats administered with bean sprout powders for 90 days (n=10 in each group).

Parameters	Treatment groups			
	Control	1%	3%	10%
Total protein (g/dl)	7.2±0.8	7.6±0.9	7.8±1.0	6.8±0.6
Albumin (g/dl)	4.6±0.7	4.9±0.6	4.0±0.5	4.4±0.8
Total bilirubin (mg/dl)	0.01±0.01	0.0±0.0	0.02±0.01	0.02±0.0
Glucose (mg/dl)	100.2±14.9	127.6±18.7	110.8±22.2	129.4±23.5
AST (IU/l)	148.6±27.3	120.0±35.6	155.4±25.5	127.6±34.8
ALT (IU/l)	28.8±8.9	34.2±11.2	26.2±8.8	21.5±6.5
ALP (IU/l)	128.3±21.0	108.8±15.7	145.2±34.0	107.2±21.2
Lactate dehydrogenase (IU/l)	233.7±45.9	205.5±28.4	212.0±24.6	199.8±30.0
Cholesterol (mg/dl)	78.6±9.9	68.4±11.0	81.3±12.7	74.2±6.4
BUN (mg/dl)	22.5±6.2	19.6±5.4	19.3±3.6	24.1±7.2
Creatinine (mg/dl)	0.7±0.1	1.1±0.2	0.6±0.2	0.8±0.2
Triglyceride (mg/dl)	112.2±12.8	97.3±21.0	132.6±20.0	124.1±17.5
Creatine kinase (IU/l)	202.7±32.0	187.6±23.2	214.8±25.6	232.7±33.2
Calcium (mg/dl)	9.2±0.7	9.5±0.8	1.12±0.6	1.15±0.9

Table 12. Organ weights of male rats administered with bean sprout powders for 90 days (n=10 in each group).

Organs	Treatment groups			
	Control	1%	3%	10%
Body weight (g)	492.6±12.4	502.7±12.0	498.3±11.4	499.9±13.0
Lung (g)	1.44±0.16	1.58±0.20	1.51±0.19	1.52±0.22
Kidney (g)	1.24±0.17	1.36±0.19	1.20±0.21	1.34±0.15
Liver (g)	13.0±3.0	14.1±1.9	14.5±1.5	14.4±2.5
Heart (g)	1.22±0.18	1.25±0.10	1.30±0.18	1.24±0.16
Brain (g)	1.90±0.09	1.94±0.08	2.01±0.11	1.90±0.11
Adrenal (mg)	29.9±5.0	30.6±8.1	29.6±6.4	29.3±5.7
Spleen (g)	0.80±0.06	0.76±0.11	0.76±0.12	0.73±0.12
Thymus (g)	0.64±0.07	0.61±0.09	0.64±0.10	0.62±0.13
Testis (g)	1.58±0.06	1.65±0.14	1.55±0.13	1.60±0.11

Only the right side organs were used in the kidney, adrenal gland and testis.

Table 13. Organ weights of female rats administered with bean sprout powders for 90 days (n=10 in each group).

Organs	Treatment groups			
	Control	1%	3%	10%
Body weight (g)	293.7±9.6	290.3±12.4	292.6±7.5	291.2±10.5
Lung (g)	1.98±0.19	1.92±0.10	1.99±0.43	1.94±0.49
Kidney (g)	1.16±0.09	1.04±0.09	1.02±0.08	1.13±0.09
Liver (g)	9.5±0.6	9.4±0.8	9.2±0.8	9.6±1.0
Heart (g)	0.92±0.07	0.90±0.06	0.95±0.08	0.91±0.08
Brain (g)	1.89±0.06	1.94±0.09	1.95±0.06	1.92±0.06
Adrenal (mg)	31.0±6.2	35.7±8.0	36.0±4.4	32.1±5.0
Spleen (g)	0.70±0.06	0.74±0.09	0.75±0.08	0.71±0.08
Thymus (g)	0.61±0.10	0.62±0.13	0.67±0.12	0.70±0.11

Only the right side organs were used in the kidney and adrenal gland.

Table 14. Histopathological findings of male rats administered with bean sprout powders for 90 days.

Organs	Treatment groups			
	Control	1%	3%	10%
Lung inflammation	NA	1/10	NA	NA
Kidney	NA	NA	NA	NA
Liver focal hemorrhage vacuole	1/10	NA	2/10 1/10	NA
Heart	NA	NA	NA	NA
Cerebrum	NA	NA	NA	NA
Adrenal	NA	NA	NA	NA
Spleen	NA	NA	NA	NA
Thymus	NA	NA	NA	NA
Testis	NA	NA	NA	NA

NA: No abnormality in all 10 rats

The number indicates number of rat(s) in which abnormality was observed.

Table 15. Histopathological findings of female rats administered with bean sprout powders for 90 days.

Organs	Treatment groups			
	Control	1%	3%	10%
Lung	NA	NA	NA	NA
Kidney	NA	NA	NA	NA
Liver				
focal hemorrhage	1/10	NA		NA
vacuole	1/10		1/10	
Heart	NA	NA	NA	NA
Cerebrum	NA	NA	NA	NA
Adrenal	NA	NA	NA	NA
Spleen	NA	NA	NA	NA
Thymus	NA	NA	NA	NA

NA: No abnormality in all 10 rats

The number indicates number of rat(s) in which abnormality was observed.

Fig. 44. Body weight change in male rats administered with bean sprout powders for 90 days (n=10 in each group).

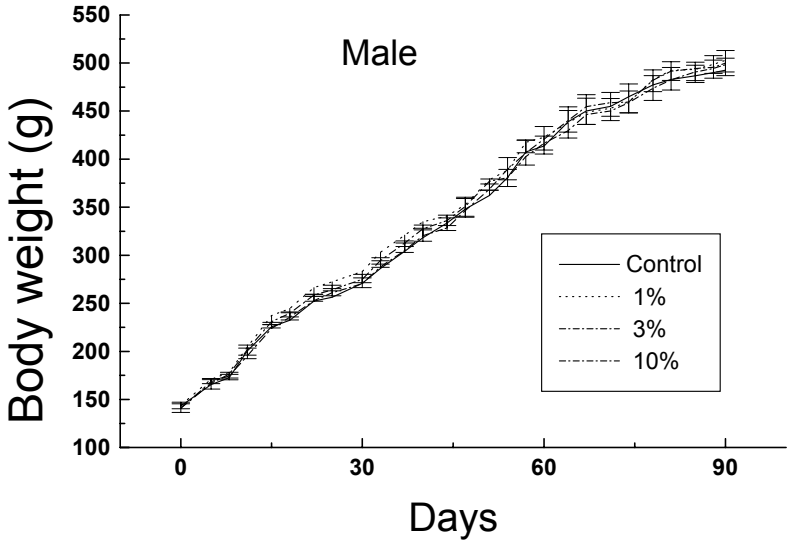


Fig. 45. Body weight change in female rats administered with bean sprout powders for 90 days (n=10 in each group).

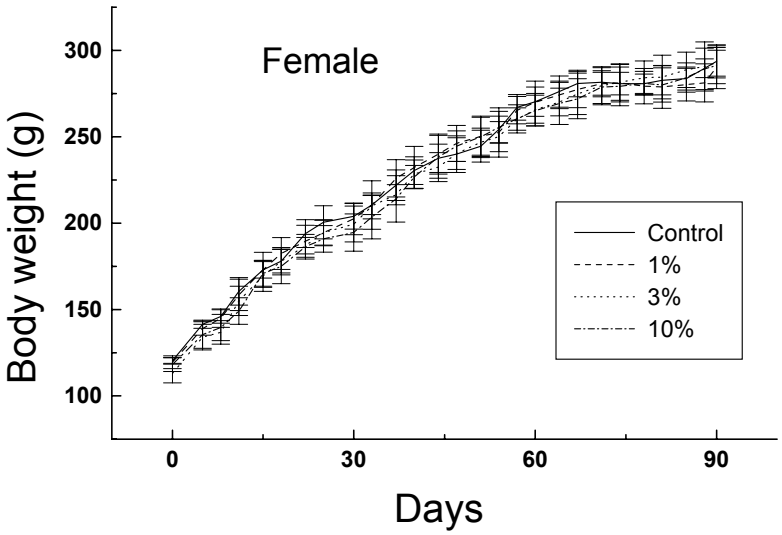


Fig. 46. Food intake in male rats administered with bean sprout powders for 90 days (mean values measured for each cage of 5 rats).

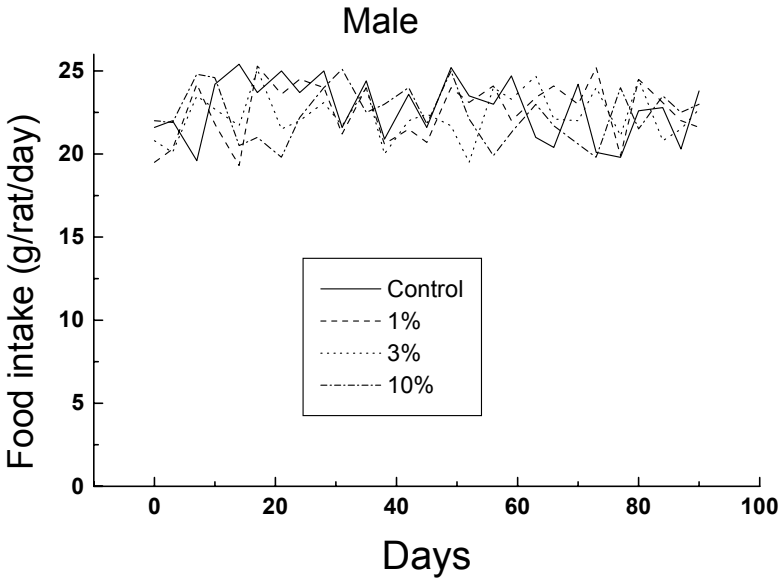


Fig. 47. Food intake in female rats administered with bean sprout powders for 90 days (mean values measured for each cage of 5 rats).

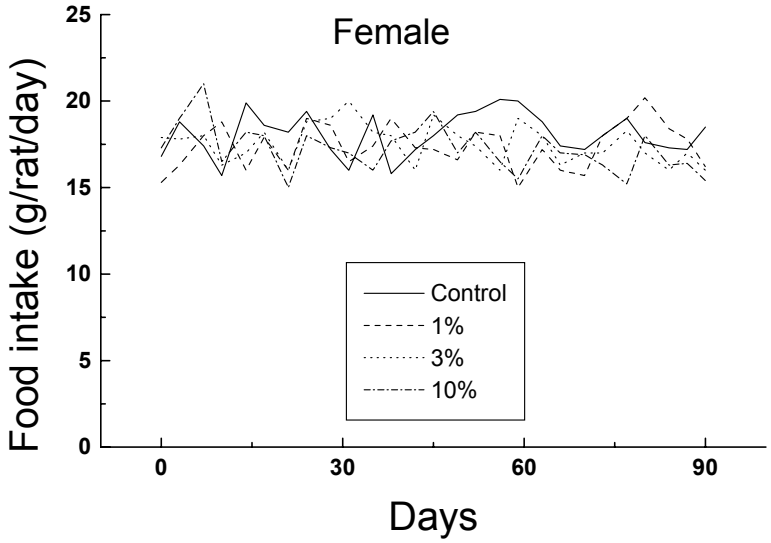


Fig. 48. Water intake in male rats administered with bean sprout powders for 90 days (mean values measured for each cage of 5 rats).

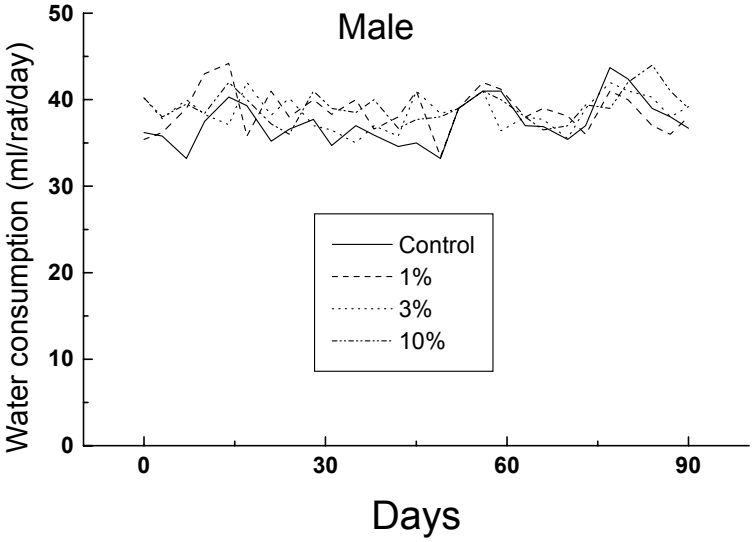


Fig. 49. Water intake in female rats administered with bean sprout powders for 90 days (mean values measured for each cage of 5 rats).

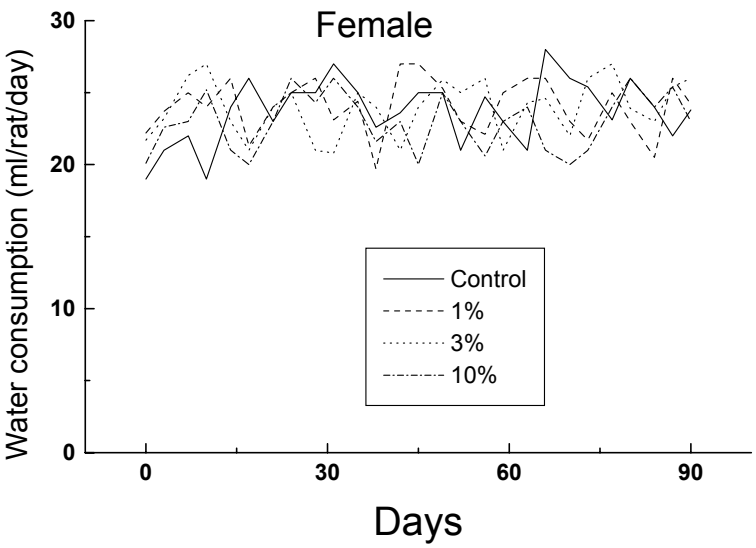


Fig. 50, 51은 color 그림이므로 편집의 용이성을 위해 page 161-170에 나타내었음.

제 3 장 식물면역활성제(Elicitor)를 이용한 기능성 콩 재배기술 개발

제 1 절 연구목적

식물면역활성제(elicitor)는 식물체내 병충해와 같은 스트레스를 받았을 때 면역체계의 반응을 유도하는 물질로서, 이 때 반응된 식물체의 세포내 phytoalexin과 같은 저항물질을 생성하는 원리를 이용하여 콩에서도 재배시에 식물 곰팡이의 세포벽 구성물질인 chitosan이나 β-glucan을 elicitor로서 처리함으로써 스트레스 저항반응을 유도해 콩 종자내 isoflavonoid 성분의 축적을 증가시킬 수 있다는 이론적 배경을 기본으로 실험을 수행하였다.

여러 가지 생리활성 기능이 있는 isoflavonoid 성분의 함량이 증가된 고품질의 기능성 콩을 생산할 수 있다면 부가가치를 높인 콩과 콩을 이용한 제품을 생산할 수 있어 농가소득은 물론 관련업계에도 많은 도움일 있을 것으로 기대된다.

본 실험의 1차년도의 초점은 과연 elicitor를 처리하였을 때 콩 종실내 isoflavonoid의 함량이 높아질 수 있는가 이며 또한 적합한 elicitor의 종류와 농도를 찾는 것이다. 이를 위해 포트시험과 포장시험을 병행하여 실험의 정확성을 기하고자 하였다.

그리고 2년차실험은 1차년도 결과에 대한 보강실험으로서 품종수를 줄이고 처리방향을 좁혀서 elicitor 효과에 대해 분명히 하고자 수행되었는데, 환경스트레스를 받은 식물체가 스트레스 저항하여 발현하는 물질생산을 좋은 환경에서 자란 식물보다 더 잘 할 수 있을 것이란 생각으로 한발스트레스에서의 elicitor 효과와 그리고 elicitor 흡수문제로서 전착제 혼합처리에서의 효과를 보고자 하였고 아울러 병저항성을 조사하였다. 전체적 실험 구성은 발아율 조사, elicitor 처리효과, 한발 동시처리시 효과, 전착제 혼합처리시 효과, 병저항성 조사로 되어 있으며 이에 대한 결과를 보고하고자 한다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 시험재료

본 시험에 사용된 콩의 품종은 장류콩인 신팔달콩(신팔달2호)과 태광콩을 사용하였으며 한발처리, 전착제처리, 그리고 병 저항성 시험에서는 조숙성인 신팔달콩만을 사용하였다. 사용된 콩 종자는 작물시험장으로부터 분양받았으며 정선하여 사용하였다.

처리된 elicitor, 즉 식물면역활성제로는 키토산(chitosan)과 글루칸(β-glucan)을 단독 또는 혼합하여 사용하였다. 키토산은 (주)바이오텍에서 구입한 것으로 30 cps (MW=75,000)를 0.025% 젖산(latic acid)에 용해하여 0.05% 키토산용액으로 마추고 NaOH로 pH를 5.5로 조정하여 사용하였으며, 글루칸은 식품 부산물(수산물)을 물에 현탁하여 원심분리한 후, 불용성 부분과 2N Trichroloacetic acid (TFA)를 1 : 10의 비율 (Residue g : TFA mL)로 혼합한 후 2시간 30분 동안 가수분해 하였으며, 이것을 원심분리 후 상등액만을 취해 감압농축하여 TFA는 제거하였고, 남은 액을 1,000 M.W.C.O 투석 망으로 투석하여 염을 제거하여 제조하였다. 이렇게 제조된 액의 글루칸함량은 Anthrone assay방법으로 확인하고 글루칸의 실제적인 활성은 cotyledon assay로 측정하였다.

2. 발아 및 유묘생장 시험

파종 전에 각 elicitor 처리농도의 10배액으로 제조한 바, 키토산 용액 200, 1,000, 5,000ppm, 그리고 글루칸 용액은 100, 500, 2,500ppm을 각 처리별로 10분간 종자침지 및 하루 음건하여 파종한 후 각 처리별로 포장발아율을 조사하여 비교하였다. 무처리의경우는 증류수로 침지처리하였으며 혼합처리는 각 elicitor의 중농도인 키토산 1,000ppm, 글루칸 500ppm으로 맞추어 혼합하여 처리하였다.

유묘생장시험은 신팔달콩을 이용하여 키토산(C) 2500, 500, 100ppm, 글루칸(G)

5500, 1100, 220ppm의 농도로 처리하였다. 혼합처리는 각 elicitor의 중농도를 기준으로 하였다. 처리방법은 20분간 종자침지하고 1일 음건한 후 상토를 채운 파종상자에 파종하고 식물생장상 주야 27/23℃, 명암 14/10hrs의 조건에서 수행하였다. 파종 15일 후에 발아된 유묘의 초장, 근장, 배축장, 경엽중, 근중, 입모율 등을 조사하였다.

3. 시험 및 재배방법

파종은 6월 중순경에 하였고 수확은 10월 초순경에 하였으며 입모후 솎음은 복엽이 발생된 후인 7월 중순경에 하였다. 모든 처리는 3반복으로 수행되었고 분할구배치법 3반복을 기준으로 설계되고 관배수, 제초 및 병충해 방제를 하여 건전한 생육을 유도하였다. 온실 및 비가림재배의 경우는 점적관수시설을 갖추어 자동으로 제어할 수 있도록 장치하였다. 포장시험 및 비가림재배의 경우는 60cm 이랑나비, 1주 2본식의 보통 재배법을 적용하였으며 포트시험의 경우 지름 30cm 정도의 포트에 상토와 밭토양을 섞어서 사용하였으며 포트당 4립 파종 후 2주를 남겨 재배하였다.

4. Elicitor 처리방법

사용된 elicitor는 키토산, 글루칸, 그리고 혼합된 것으로 처리농도는 각각 3수준으로 키토산의 경우 저농도(20ppm), 중농도(100ppm), 고농도(500ppm)이었으며 글루칸의 경우는 저농도(10ppm), 중농도(50ppm), 고농도(250ppm)이었으며 혼합처리의 경우는 각 elicitor의 중농도로 맞추어 사용하였다. 처리방법은 주로 엽면살포를 하였으며 토양관주도 일부 하였다. 처리시기는 복엽발생하여 완전히 전개된 후 10일 또는 15일 간격으로 성숙기까지 처리하였으며 개화전 후로 구분하여 일부 처리하였다.

5. 한발 처리 및 전착제 혼합처리 시험

사용된 콩 품종은 신팔달콩이며 elicitor 처리와 함께 한발처리 및 전착제 혼합처리를 하였다. 한발처리는 비가림시설인 비닐하우스에서 재배되었고 전착제혼합처리

는 포장재배를 하였다. 처리농도는 글루칸 고농도(250ppm), 저농도(50ppm), 키토산 고농도(500ppm), 저농도(100ppm)로 엽면살포 처리를 복엽발생 후 15일 간격으로 하였다. 파종 전 종자침지는 키토산 1,000ppm, 글루칸 500ppm 용액으로 10분간 침지처리하였다. 그리고 한발처리는 개화기를 전후로 V4기와 R5기 2회에 걸쳐 25-30일 정도 관수중단하여 처리하였다. 전착제는 글루칸용액에는 주식회사 Aventis에서 구입된 분제형태의 NK-DBS75(Takeda, Japan)를 사용하고 키토산용액은 (주)동방아그로의 카바액제를 사용하였으며, 10g/20l의 농도로 각각 사용하였다. 무처리구는 키토산처리구와 글루칸처리구를 별도로 분리하여 배치하고 각 처리구와 비교 분석하였다.

6. 생육 및 수량조사

생육조사는 개화기, 성숙기, 경장, 마디수, 협수, 협당립수 등을 조사하였다. 수량관련요소 이외에 경장, 마디수 등은 성숙기인 9월 초에 조사하였으며 종실수량은 수호가 후 조사하였다. 수확은 10월 초순에 하고 개체당종실중, 백립중, 수량 등을 조사하였다. 근류균의 수와 무게는 성숙기인 9월 초에 처리 반복구당 5개체의 뿌리를 수확하여 흙을 흐르는 물로 씻어 낸 후 근류균을 조사하였다.

7. 이소플라보노이드(isoflavonoid) 함량분석

수확 및 건조된 시료로부터 이소플라보노이드를 추출 및 HPLC 분석 하였다. 추출은 배당체형태로 추출하였는데, 수확한 콩 20g 정도를 전량 마쇄한 후 가루 3g을 취하여 80% 에탄올 12 mL를 넣어 20℃에서 12시간 진탕한 후 원심분리하여 추출하였다. 이 추출된 배당체 상태의 추출물을 가수분해하여 aglycone으로 제조하기 위하여 에탄올 추출액에 동량의 2N HCl을 넣은 반응액을 heating block을 이용하여 100℃에서 1시간동안 가수분해한 후 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액은 HPLC 분석을 통해 isoflavonoid 정량을 하였는데, isoflavonoid 추출액은 배당체와 aglycon 모두 0.2 ㎛ filter로 여과한 시료액을 이용하여 분석하였다. HPLC 조건은 Fluofix RP-18(10㎛ C18, 4.6 mm i.d. × 250 mm) column을 사용하여 유속 1.2 mL/min으로 증류수(pH 3.0)와 acetonitrile (100%) 용매로 25분간 gradient 하는 이

동상 조건으로 분석하였다. 분석에 사용된 표준물질인 daidzein, genistein(Sigma co.)의 표준검량선을 작성한 후 isoflavonoid 추출액을 분석시료액으로 하여 정량하였다.

8. 병저항성 조사

사용된 병원균은 콩 불마름병의 원인균인 *Xanthomonas campestris*로서 농촌진흥청 농업과학기술원의 식물병리연구실에서 분양받아 사용하였다. *Xanthomonas campestris*는 KB배지를 사용하여 배양하였으며 infection 조건은 7일간 성장한 신팔달콩 잎에 주사바늘로 살짝 상처를 낸 뒤 병원균배양액을 상처위에 20μL을 주입하고 멸균된 petri-dish에 filter paper를 깐 뒤 멸균수로 충분히 적시고 그 위에 병원균이 주입된 콩잎을 놓고 뚜껑을 닫아 25℃ 수조에 넣고 변화를 관찰하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. Elicitor 처리에 따른 포장 출아율 및 유묘생장의 차이

콩 재배시 elicitor의 종자침지 처리에 의해 발아율에 미치는 영향을 알아보기 위해 파종전 elicitor로서 키토산과 글루칸 용액을 종자침지하여 파종한 후 포장발아율을 조사한 결과는 표 16과 같다. 처리농도는 키토산 20, 100, 500ppm, 그리고 글루칸 10, 50, 250ppm이었으며 6월 15일에 파종하여 7월 2일 출아한 비율을 조사한 것이다. 먼저 품종간 차이를 비교하면 신팔달콩은 68%, 태광콩은 79%의 출아율을 보여 태광콩이 더 높은 출아율을 보였으며 전체 평균 출아율은 74%로 나타났다. Elicitor 처리에서는 키토산과 글루칸 처리가 무처리에 비해 약간 높은 출아율을 보였으며 글루칸에 비해 키토산 처리구에서 좀 더 높은 출아율을 보였으나 처리농도별로는 일정한 경향을 보이지 않았다.

표 16. Elicitor 처리별 포장 출아율 차이.

품종	Elicitor	농도(ppm)	출아율(%)	평균
신팔달2호	Chitosan	저농도(20)	67	70
		중농도(100)	70	
		고농도(500)	73	
	Glucan	저농도(10)	67	68
		중농도(50)	64	
		고농도(250)	72	
	혼합처리	중농도(C100+G50)	71	
	무처리	무처리	62	
			소평균	68
태광콩	Chitosan	저농도(20)	77	82
		중농도(100)	85	
		고농도(500)	84	
	Glucan	저농도(10)	83	77
		중농도(50)	73	
		고농도(250)	79	
	혼합처리	중농도(C100+G50)	80	
	무처리	무처리	76	
			소평균	79
			전체평균	74

Elicitor의 종자침지 처리가 신팔달콩의 유묘생장에 미치는 영향을 알아보기 위해 키토산과 글루칸을 처리하여 유묘생장을 조사한 결과는 표 17과 같다. 처리농도는 엽면살포 농도보다 높은 농도의 elicitor 용액에 정선된 종자를 10분간 침지하고 하루 음건한 후 육묘상자에 주야온도 27/23℃, 명암 14/10hrs의 식물생장상 조건에서 파종하고 유묘생장을 조사하였다. 처리농도는 키토산(C) 2500, 500, 100ppm, 글루칸(G) 5500, 1100, 220ppm의 농도이며 혼합처리는 각 elicitor의 중농도 즉 C 500ppm과 G 1100ppm으로 맞춰 처리하였다. 키토산 처리에서는 무처리와 비슷한 생육량과 입모율을 나타냈으나 글루칸의 경우는 전반적으로 발아율과 입모율이 낮았으며 생육량도 매우 저조했다. 키토산의 경우 무처리에 비해 저농도에서 입모율과 생육량이

다소 높은 편이고 고농도에서는 약간 저해하는 경향이나 글루칸의 고농도 처리에서는 생육 및 발아에 큰 저해효과를 나타내었다. 종합하면 고농도의 키토산이나 글루칸 처리는 오히려 생육이나 발아를 저해하므로 한계농도가 있을 것으로 생각되고 종자침지시 침지시간에 따라 발아율 차이를 조사할 필요가 있을 것으로 생각된다. 그리고 혼합처리의 경우는 글루칸 단독처리의 생육저해 효과를 보이지 않고 오히려 키토산의 생육반응을 초월하여 더 좋은 생육을 보인 것으로 나타냈다. 전체적으로 사용된 농도수준에서 키토산은 유묘생장 촉진에 도움을 주는 반면 고농도의 글루칸은 억제하는 효과를 뚜렷이 보여 주었다.

표 17. Elicitor 처리에 따른 신팔달콩의 유묘생장율 차이.

처리	농도 (ppm)	초장 (cm)	배축장 (cm)	초엽장 (cm)	근장 (cm)	경엽중 (g)	근중 (g)
키토산	2500	17.9	8.4	9.1	4.4	3.54	0.57
	500	20.2	8.7	10.1	5.6	3.02	0.58
	100	15.2	8.5	10.0	5.7	3.52	0.78
글루칸	5500	0.0	2.2	0.0	1.6	0.00	0.00
	1100	6.4	4.3	3.4	3.4	1.69	0.15
	220	6.3	4.5	3.5	2.3	1.64	0.25
혼합처리	C500+G1100	19.1	8.6	12.2	6.5	4.04	0.77
무처리	0	17.2	8.9	12.0	6.2	3.09	0.70

표 17.(계속).

처리	농도 (ppm)	입모율 (%)	최종발아율 (%)	복엽발생 개체(%)
키토산	2500	69.7	81	69
	500	72.7	73	66
	100	85.9	88	76
글루칸	5500	2.0	6	0
	1100	30.0	48	6
	220	56.0	54	0
혼합처리	C500+G1100	71.7	70	67
무처리	0	74.7	77	66

한편 콩은 어린 경우 elicitor 효과가 성숙했을 때보다 확실한 것으로 보여 식물 면역활성제 (elicitor)의 일종인 chitosan (0.05%)을 이용하여 9일간 신팔달콩을 재배한 결과 chitosan 처리구가 무처리구에 비해 약 17.7%의 길이 신장율을 보였다 (Fig. 52 & Fig. 53). 이는 본 연구팀에서 실험한 마늘이나 다른 연구팀들이 다른 식물을 이용하여 chitosan의 growth stimulation효과를 실험한 결과와 비슷한 결과를 보여주고 있으며 이는 콩이 chitosan에 반응을 보이는 것으로 사료된다. 이를 확인하기 위하여 elicitor 처리 시 특이적으로 반응을 보이는 β-1,3-glucanase와 Phenylalanine ammonialyase (PAL) 활성을 측정한 결과 Fig. 54, 55와 같다. 식물체가 상처나 stress(abiotic or biotic)를 받았을 때 induction되는 β-1,3-glucanase는 식물체의 병에 대한 저항성을 증가시켜주는 효소로서 본 실험에서도 chitosan을 이용하여 콩을 재배한 경우 6일째 무처리구에 비해 118%까지 증가하다 9일째는 다시 감소하여 무처리구와 거의 비슷하게 되었다. 또한 elicitor 처리 시 생성되는 이차대사산물의 key regulatory enzyme인 PAL을 측정한 결과 무처리구는 재배 시기에 따라 거의 변화가 없는 반면 chitosan 처리구는 재배 초기에 증가했다가 감소하는 경향을 보여주었다. 재배 4일째 chitosan 처리구가 무처리구에 비해 약 200% 증가되었다가 9일째에는 무처리구와 거의 비슷한 경향을 보였다. Elicitor 처리 시 생성되는 이차대사산물은 다양한 생리활성을 갖고 있는 phenolic compound가 주성분임을 감안할 때 chitosan 처리 시 PAL 활성이 증가했다는 것은 이차대사산물이 chitosan 처리구가 무처리구에 비해 더 많이 생성될 가능성이 있으며 이로 인해 다른 여러 기능성 물질의 생성이 증가될 수 있을 것으로 사료된다.

Chitosan을 이용하여 실험실적으로 콩을 재배한 결과 외형상 길이 신장율을 보일 뿐만 아니라 내부적으로 다른 여러 가지 기능을 보이는 효소들의 활성 증가를 보임으로 인하여 병에 대한 저항성이나 다양한 생리활성물질이 증가될 가능성을 보여주고 있다.

Fig.52는 color 그림이므로 편집의 용이성을 위해 **page 171**에 나타내었음.

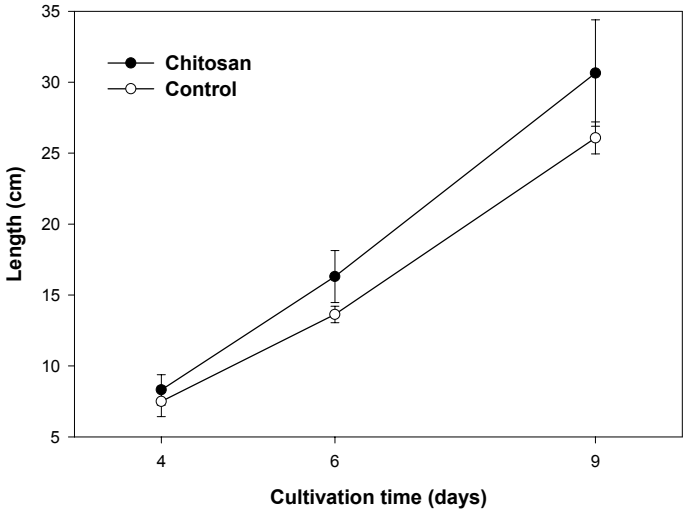


Fig. 53. Effect of chitosan treatment on soybean length.

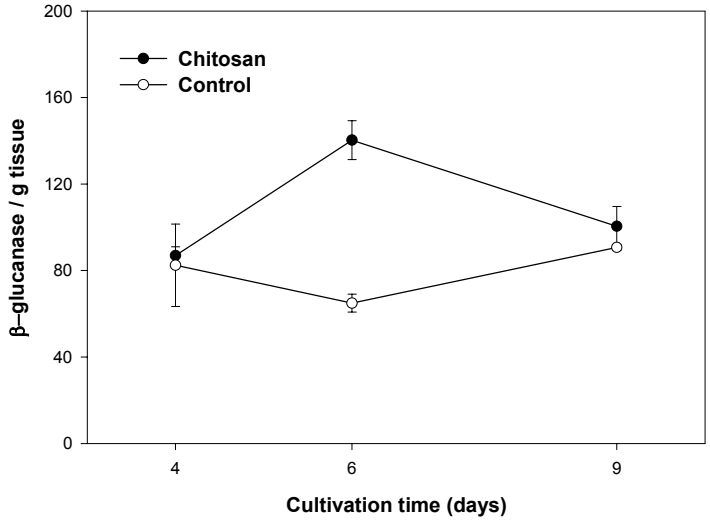


Fig. 54. β-1,3-glucanase activity of soybean treated with chitosan.

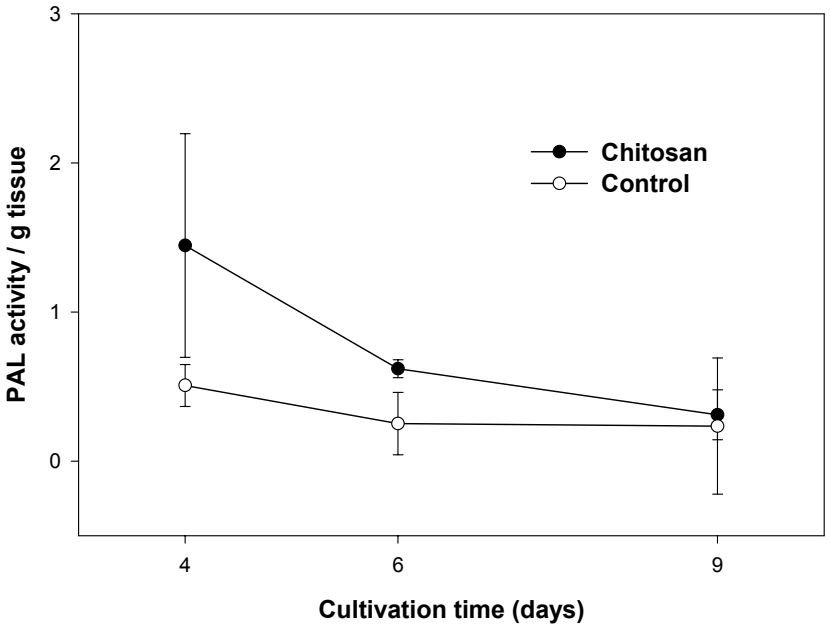


Fig. 55. PAL activity of soybean treated with chitosan.

2. Elicitor 종류 및 처리방법에 따른 콩 생육특성 변화

식물면역활성제(elicitor)로서 키토산과 글루칸 용액을 생육중에 처리하여 콩의 생육특성을 비교한 결과는 표 18과 그림 56과 같다. 신팔달콩에서 경장은 키토산 중농도와 혼합처리에서 가장 높았고 분지수에서는 무처리가 가장 높게 나타나는 유의한 결과를 보였으나 수량, 백립중 등 형질에서는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 한편 태광콩에서는 수량에서 글루칸 저농도에서 310.4kg/10a로 무처리 259.7kg/10a 보다 유의하게 높았으며 백립중은 키토산 고농도에서 23.0g으로 무처리 19.9g 보다 높게 나타났으나 경장, 분지수, 협수 등 다른 형질에서는 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 각 elicitor 농도에 따른 생육량에서 일관성있는 결과를 보이지 않았는데 elicitor 반응보다는 품종 차이가 더 커서 유의한 결과를 보이지 않았다. 앞으로 elicitor의 흡수 및 이행에 대한 해석, 그리고 적절한 재배환경과 환경스트레스와 같은 열악한 환경에서의 반응차이에 대한 연구가 필요하며 특히 집단내 개체변이를 좀 더 조사를 해야할 것으로 생각된다.

표 18. 콩 포장재배시 elicitor 처리방법에 따른 생육특성 및 종자수량 차이.

처리			개화기	성숙기	경장	분지수	협수	백립중	수량
품종	Elicitor	농도	(월.일)	(월.일)			/개체	(g)	(kg/10a)
신팔달콩	Chitosan	저농도	7.23	10.07	33.4b	3.0ab	35.4	19.2	290.6
		중농도	7.22	10.09	38.1a	3.0ab	36.5	19.4	299.2
		고농도	7.22	10.09	34.3b	2.3c	35.5	19.3	293.6
	Glucan	저농도	7.24	10.08	35.4ab	2.9abc	41.1	18.6	297.3
		중농도	7.22	10.08	34.3b	2.7bc	36.7	18.4	283.6
		고농도	7.22	10.10	33.1b	2.6bc	36.4	19.1	302.3
	혼합처리(중농도)		7.22	10.10	38.1a	2.8abc	36.6	19.1	295.2
	무처리		7.24	10.07	34.5b	3.3a	37.7	19.1	306.6
태광콩	Chitosan	저농도	7.27	10.06	42.1	5.5	37.5	21.3ab	262.4ab
		중농도	7.26	10.07	41.7	5.4	34.5	21.4ab	265.1ab
		고농도	7.28	10.05	41.2	5.2	38.3	23.0a	294.1ab
	Glucan	저농도	7.28	10.05	41.7	5.5	32.5	22.2ab	310.4a
		중농도	7.28	10.06	38.3	5.3	32.1	20.1ab	243.2b
		고농도	7.28	10.05	41.1	5.3	35.0	22.5ab	292.1ab
	혼합처리(중농도)		7.28	10.05	41.4	5.4	35.5	22.0ab	297.2ab
	무처리		7.29	10.05	42.1	5.6	30.7	19.9b	259.7ab

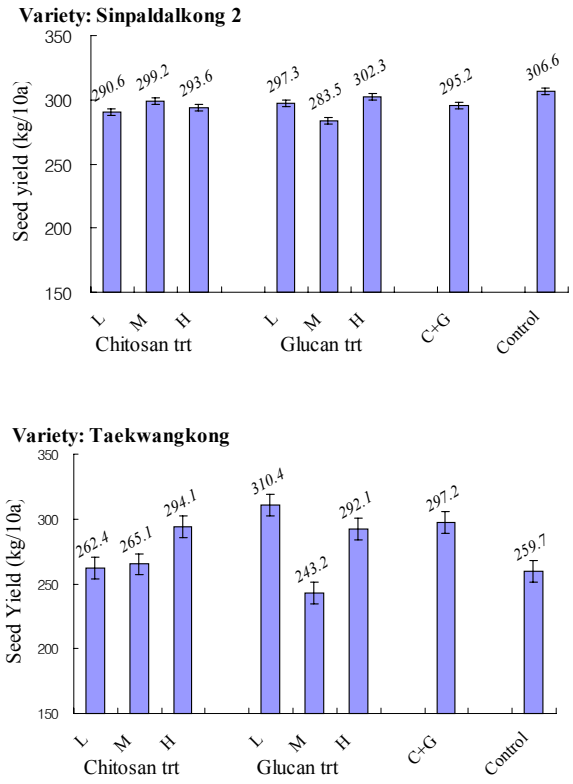


그림 56. 콩 포장재배시 elicitor 종류와 처리농도에 따른 수량차이.

L: 저농도, M: 중농도, H: 고농도, C+G: 혼합처리, Control: 무처리

표 19는 표18의 결과를 기준으로 각 elicitor 처리별 차이를 간략하게 본 것인데, 전체적으로 유의한 결과를 얻지 못했으나 태광콩보다 신팔달콩의 수량이 높았으며 태광콩은 신팔달콩보다 경장과 분지수가 컸으나 협수는 작았고 백립중은 높았으나 수량은 태광콩 278.0kg/10a보다 신팔달콩 296.1kg/10a이 높게 나타났다. 신팔달콩에서 무처리의 수량이 가장 높았고 태광콩에서는 혼합처리가 가장 높은 수량을 보였으나 각 처리구는 유의한 차이는 보이지 않았다.

표 19. 콩 포장재배시 elicitor 종류 및 품종별 생육특성 및 종자수량 변화.

처리		개화기 (월.일)	성숙기 (월.일)	경장	분지수	협수 /개체	백립중 (g)	수량 (kg/10a)
품종	Elicitor							
신팔달콩	Chitosan	7.22	10.08	35.3	2.8	35.8	19.3	294.5
	Glucan	7.23	10.09	34.2	2.7	38.1	18.7	294.4
	혼합처리	7.22	10.10	38.1	2.8	36.6	19.1	295.2
	무처리	7.24	10.07	34.5	3.3	37.7	19.1	306.6
	평균	7.23	10.09	35.2	2.8	37.0	19.0	296.1
태광콩	Chitosan	7.27	10.06	41.7	5.4	36.8	21.9	273.8
	Glucan	7.28	10.05	40.4	5.4	33.2	21.6	281.9
	혼합처리	7.28	10.05	41.4	5.4	35.5	22.0	297.2
	무처리	7.29	10.05	42.1	5.6	30.7	19.9	259.7
	평균	7.28	10.06	41.2	5.4	34.5	21.6	278.0
LSD(5%) between varieties		-	-	1.3	0.2	3.2	0.7	15.2

표 20과 그림 57는 포장시험의 환경변이를 줄이기 위해 온실내 포트실험을 수행한 결과이다. 품종으로 태광콩과 신팔달콩, 처리농도로 저, 중, 고농도, 그리고 엽면살포 이외에 토양관주, 처리시기를 구분한 개화후 및 개화전 처리가 포함되었으며 수분관리는 자동점적관수장치를 이용하였다. 개체수량을 비교해보면 우선 품종간 차이는 포장시험과 같은 경향을 보여 신팔달콩이 더 높은 수량을 전체적으로 보였으며 무처리보다는 elicitor 처리구에서 경장이나 개체수량이 높았음을 알 수 있었다. 구체적으로 보면 키토산, 글루칸 농도별 시험에서 고농도 처리가 가장 낮은 개체수량을 공통적으로 보였으며 글루칸에서 농도별 차이가 더 뚜렸하여 유묘생장시험과 비슷한 결과로 생각되었다. 신팔달콩과 태광콩 모두에서 키토산 중농도 처리구가 가장 높은 수량을 보였으며 글루칸의 농도별 시험에서는 저농도가 가장 높은 수량을 나타냈다. 또한 전반적으로 태광콩보다 신팔달콩에서 처리효과가 높은 경향이었다. 개화전과 개화후 처리시기 시험에서 신팔달콩은 개화후에 태광콩은 개화전처리구가 더 높은 개체수량을 나타냈는데 개화가 빠른 신팔달콩의 경우 태광콩보다는 처리횟

수가 더 많았기 때문이며 개화기가 늦은 태광콩의 경우는 개화전 처리횟수가 더 많았기 때문인 것으로 생각된다. 토양관주 시험에서는 태광콩의 키토산처리 이외에는 거의 효과를 보이지 않아 엽면살포시와 같은 량의 elicitor 용액을 처리해서 상대적으로 낮은 량이 흡수가 되었을 것으로 생각된다. 그리고 혼합처리에서 신팔달콩과 태광콩 모두에서 비교적은 높은 개체수량인 23.0g과 13.5g을 나타내었다.

표 21은 표 20의 결과를 근거로 간결하게 결과를 나타낸 것인데 신팔달콩에서 무처리에 비해 elicitor 처리구가 개체수량이 높았으며 혼합처리가 무처리 15.3g 보다 높은 23.0g을 나타냈으며 키토산 처리구의 19.6g은 글루칸 처리구의 16.4g 보다 높은 결과를 보였다. 경장, 백립중 등은 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 태광콩에서는 무처리에 비해 처리구에서 높은 수량을 보였으며 혼합처리, 키토산, 글루칸의 순으로 신팔달콩에서와 같은 경향으로 높은 개체수량을 나타냈으나 반복간 차이가 커서 통계적으로 유의한 결과를 보이지 않았다. 두 품종 모두에서 혼합처리 효과가 가장 컸으며 글루칸처리보다는 키토산의 효과가 더 좋은 것으로 나타났다.

표 20. 콩 포트재배시 elicitor 종류 및 농도에 따른 생육특성 및 종자수량의 변화.

처리			경장 (cm)	초장 (cm)	마디수	백립중 (g)	개체수량 (g/plant)
품종	Elicitor	농도					
신팔달콩	Chitosan	저농도	49.8	84.3	10.8	21.7a	19.7bcd
		중농도	45.2	84.3	10.4	22.0a	26.0a
		고농도	47.8	86.9	10.3	21.8a	16.6bcd
		개화후	45.2	88.4	10.5	22.6a	20.7abc
		개화전	47.8	88.4	10.4	22.9a	18.3bcd
		토양관주	51.1	85.8	10.7	21.7a	16.5cd
	Glucan	저농도	48.6	86.4	10.2	23.2a	18.1bcd
		중농도	47.0	87.7	10.3	23.1a	16.3cd
		고농도	47.6	84.4	10.4	22.5a	13.5d
		개화후	49.9	92.8	10.6	23.9a	18.1bcd
		개화전	49.1	90.7	10.1	22.5a	16.3cd
		토양관주	46.4	86.7	10.1	22.8a	16.1cd
	혼합처리(중농도)		46.6	85.4	10.2	22.7a	23.0ab
	무처리		47.6	85.6	10.5	22.3a	15.3cd
태광콩	Chitosan	저농도	58.1	91.3ab	13.1	27.8abc	13.8ab
		중농도	57.4	91.1ab	13.4	28.4abc	16.8a
		고농도	60.5	90.6ab	13.0	25.2bc	6.7b
		개화후	60.0	91.1ab	13.0	29.1ab	6.5b
		개화전	59.8	94.9ab	13.2	25.8bc	6.7b
		토양관주	56.8	86.8b	13.4	29.6a	13.4ab
	Glucan	저농도	60.8	92.8ab	13.5	29.2ab	10.5ab
		중농도	59.7	92.6ab	13.2	29.2ab	8.7ab
		고농도	62.4	95.0ab	13.4	28.8ab	5.5b
		개화후	58.1	94.8ab	12.9	29.3ab	12.3ab
		개화전	60.2	98.7a	13.1	30.7a	13.8ab
		토양관주	61.3	96.1ab	12.6	30.2a	8.5ab
	혼합처리(중농도)		58.5	90.3ab	12.9	28.8ab	13.5ab
	무처리		57.6	89.1ab	13.3	29.0ab	9.5ab

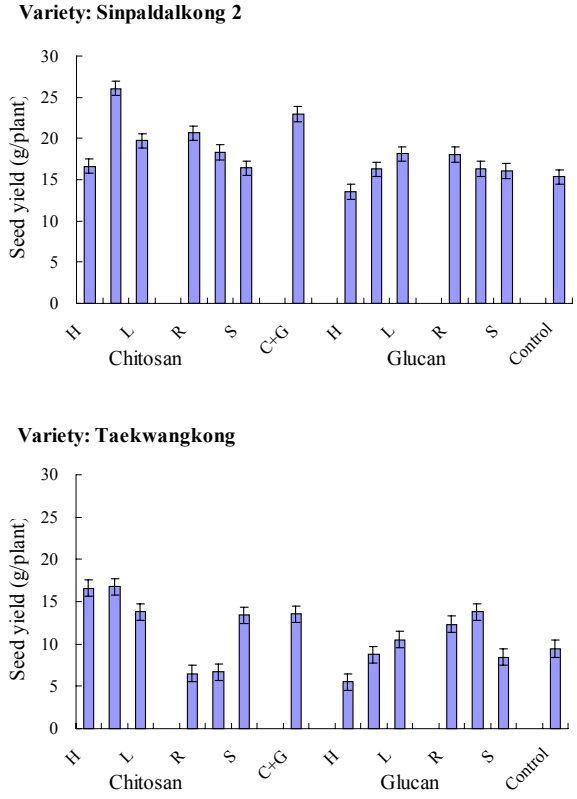


그림 57. 콩 포트재배시 elicitor 종류 및 처리농도에 따른 개체수량의 차이.

* H: 고농도, M: 중농도, L: 저농도, R; 개화후 처리, V; 개화전 처리, S: 토양관주처리, C+G: 혼합처리, Control: 무처리

표 21. 콩 포트재배시 elicitor 종류 및 품종별 생육특성 및 종자수량의 변화.

처리		경장	초장	마디수	백립중 (g)	개체수량 (g/plant)
품종	Elicitor					
신팔달콩	Chitosan	47.8	86.1	10.5	22.1	19.6ab
	Glucan	48.0	87.7	10.3	23.0	16.4bc
	혼합처리	46.6	85.4	10.2	22.7	23.0a
	무처리	47.6	85.6	10.5	22.1	15.3c
	평균	47.7	86.6	10.4	22.6	18.2
태광콩	Chitosan	58.8	91.0	13.2	27.7	12.3a
	Glucan	60.5	94.7	13.2	29.6	9.9a
	혼합처리	58.5	90.3	12.9	28.8	13.5a
	무처리	57.6	89.1	13.3	29.0	9.5a
	평균	59.3	92.1	13.2	28.7	11.2
LSD(5%) between varieties		1.3	2.2	0.3	0.8	2.1

3. Elicitor 처리에 따른 콩 종실 함유 isoflavonoid 함량 변화

식물면역활성제(elicitor)를 처리하여 재배생산된 콩의 종실내 함유된 isoflavonoid 성분 함량을 조사한 결과는 표 22과 그림 58과 같다. 전반적으로 유의한 통계적 차이를 보이지는 않았으나 태광콩에서는 무처리 보다 처리구에서 didzein과 genistein 함량이 높게 나타났다. 신팔달콩에서는 무처리보다 처리구가 낮게 나오는 결과를 보였는데 신팔달콩과 태광콩에서 처리농도별 경향은 키토산처리구는 저농도에서 높았고 글루칸처리군는 고농도에서 높은 isoflavonoid 함량을 보였다. 신팔달콩의 처리구 중에 글루칸 고농도처리구가 6.22mg/10g, 태광콩에서는 키토산저농도가 3.64mg/10g으로 가장 높은 isoflavonoid 함량을 나타냈다.

표 22. 콩 포장재배시 elicitor 종류 및 처리농도별 isoflavonoid 함량차이.

처리			Isoflavonoid(mg/10g)		
품종	Elicitor	농도(ppm)	Daidzein	Genistein	Total
신팔달콩	Chitosan	저농도(20)	4.00	2.09	6.09
		중농도(100)	3.70	1.95	5.65
		고농도(500)	3.81	1.94	5.75
	Glucan	저농도(10)	3.78	2.02	5.80
		중농도(50)	3.76	1.94	5.70
		고농도(250)	4.04	2.18	6.22
	혼합처리	중농도(C100+G50)	4.07	2.11	6.18
	무처리		4.18	2.19	6.37
태광콩	Chitosan	저농도(20)	2.44	1.50a	3.94
		중농도(100)	2.15	1.52a	3.67
		고농도(500)	2.38	1.39ab	3.77
	Glucan	저농도(10)	2.39	1.29ab	3.68
		중농도(50)	2.26	1.16c	3.42
		고농도(250)	2.51	1.27ab	3.78
	혼합처리	중농도(C100+G50)	2.28	1.18c	3.46
	무처리		2.14	1.19c	3.33

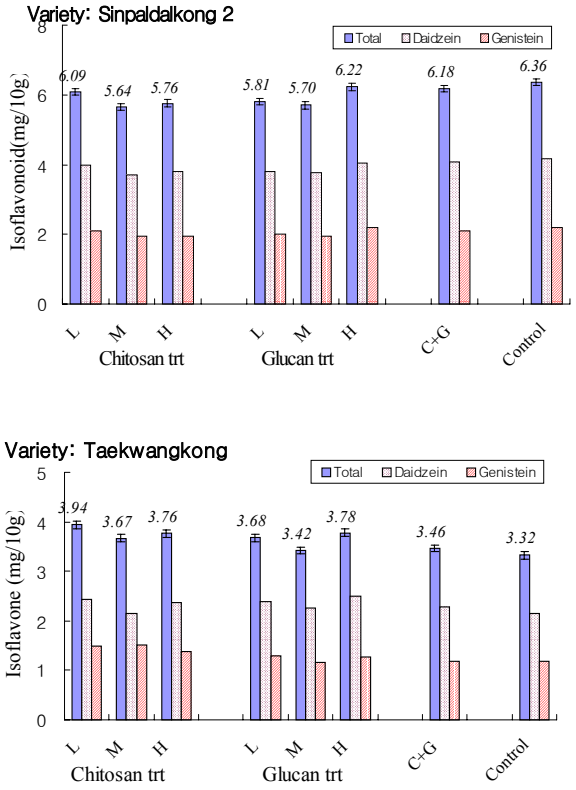


그림 58. 콩 포장재배시 elicitor 종류 및 처리농도에 따른 isoflavonoid 함량비교.

표 23은 표 22의 결과에 근거하여 품종별 elicitor 종류별 isoflavonoid 성분함량의 차이를 나타낸 것이다. 품종별로 보면 신팔달콩에서 5.97mg/10g을 나타내 태광콩 3.63mg/10g 보다 높은 isoflavonoid 함량을 나타냈다. 이 결과는 통계적으로 유의한 품종간 차이를 보였으나 품종내 즉 처리간 차이는 유의한 결과를 보이지 않았다. 태광콩에서는 전반적으로 무처리에 비해서는 처리구에서 높은 isoflavonoid 함량을 보였으며 특히 태광콩에서는 키토산 처리구가 3.79mg/10g으로 가장 높은 함량을 보였다. 그러나 신팔달콩에서는 오히려 무처리구보다 낮은 함량을 보여 품종간 반응양상에 차이를 보였으나 개체간 변이를 좀더 조사할 필요가 있는 것으로 생각된다. 분

석된 isoflavonoid 두 종류인 daidzein과 genistein의 처리별 함량 경향은 비슷하였다. 표 23에서 Total 은 두 성분을 합산하여 나타낸 값이다.

표 23. 콩 포장재배시 elicitor 종류 및 품종별 isoflavonoid 함량차이.

처리		isoflavonoid(mg/10g)		
품종	Elicitor	Daidzein	Genistein	Total
신팔달콩	Chitosan	3.84	1.99	5.83
	Glucan	3.86	2.05	5.91
	혼합처리	4.07	2.11	6.18
	무처리	4.18	2.19	6.37
	평균	3.92	2.05	5.97
태광콩	Chitosan	2.32	1.47	3.79
	Glucan	2.39	1.24	3.63
	혼합처리	2.28	1.18	3.46
	무처리	2.14	1.19	3.33
	평균	2.32	1.31	3.63
LSD(5%) between varieties		0.22	0.16	0.36

표 24와 그림 59는 두 품종, 신팔달콩과 태광콩을 온실에서 포트재배하면서 elicitor인 키토산과 글루칸을 농도별로 처리한 후 수확한 종실에 함유된 isoflavonoid 함량을 분석한 결과이다. 신팔달콩 처리구가 태광콩 처리구보다 전체적으로 함량이 높았으며 두 isoflavonoid 성분 중 daidzein 함량이 genstein 보다 높은 것은 포장재배 시험과 같은 경향이었다. 신팔달콩에서는 전체적으로 무처리에 비해 유의한 결과를 얻지 못하였으나 종실수량이 신팔달콩보다 낮았던 태광콩에서는 무처리구보다 처리구에서 전반적으로 높은 경향을 보였다. 또한 태광콩 처리구에서 키토산, 글루칸 두 elicitor의 농도별 결과는 고농도가 저농도에 비해 함량이 다소 높은 경향이어서 고농도가 생육을 다소 억제하지만 isoflavonoid 생합성은 많이 한 것으로 나타났다. 그러나 신팔달콩에서는 키토산고농도와 글루칸저농도에서 함량이 높게 나타나 뚜렷한 농도별 처리경향을 볼 수 없었다. 개화전과 개화후 처리 결과를 보면 개화기가 빠른 신팔달콩은 개화후에서, 개화기가 다소 늦은 태광콩에서는 개화전의

처리에서 다소 높은 함량을 나타내어 개체수량 결과와 유사한 결과를 보였다. 그리고 혼합처리시 isoflavonoid 함량은 다른 처리구에 비해 다소 높은 결과를 나타냈다.

표 24. 콩 포트재배시 elicitor 종류 및 처리농도에 따른 isoflavonoid 함량 변화.

처리			Isoflavonoid(mg/10g)				
품종	Elicitor	농도	Daidzein	STD	Genistein	STD	Total
신팔달콩	Chitosan	고농도	5.35abcd	0.49	3.71a	0.27	9.06ab
		중농도	5.24bcd	0.49	3.59ab	0.12	8.83abc
		저농도	5.32abcd	0.21	3.53ab	0.16	8.85abc
		개화후	4.94cd	0.08	3.66a	0.19	8.60abcd
		개화전	4.92cd	0.16	3.29ab	0.56	8.21cd
		토양관주	5.11bcd	0.34	3.24ab	0.46	8.35bcd
	Glucan	고농도	5.13bcd	0.07	3.08b	0.11	8.21cd
		중농도	5.44abc	0.01	3.37ab	0.13	8.80abc
		저농도	5.45abc	0.04	3.70a	0.10	9.15a
		개화후	5.66ab	0.18	3.45ab	0.98	9.10ab
		개화전	5.33abcd	0.23	3.66a	0.26	8.99ab
		토양관주	4.80cd	0.41	3.06b	0.50	7.87d
	혼합처리(중농도)		5.43abc	0.27	3.63a	0.92	9.06ab
	무처리		5.86a	0.50	3.07b	0.47	8.93abc
태광콩	Chitosan	고농도	2.49abcd	0.30	2.26a	0.69	4.76a
		중농도	2.44abcd	0.18	1.92ab	0.44	4.36abc
		저농도	2.33cd	0.43	1.50b	0.02	3.83bc
		개화후	2.82ab	0.40	1.63b	0.13	4.44abc
		개화전	2.77abc	0.09	1.77ab	0.19	4.54abc
		토양관주	2.75abc	0.22	1.76ab	0.17	4.51abc
	Glucan	고농도	2.83a	0.05	1.53b	0.05	4.36abc
		중농도	2.35cd	0.26	1.57b	0.17	3.92abc
		저농도	2.34cd	0.07	1.50b	0.10	3.84bc
		개화후	2.37bcd	0.16	1.68b	0.27	4.05abc
		개화전	2.47abcd	0.28	1.76ab	0.22	4.24abc
		토양관주	2.35cd	0.34	1.57b	0.14	3.92bc
	혼합처리(중농도)		2.64abcd	0.53	2.01ab	0.38	4.65ab
	무처리		2.23d	0.18	1.52b	0.05	3.74c

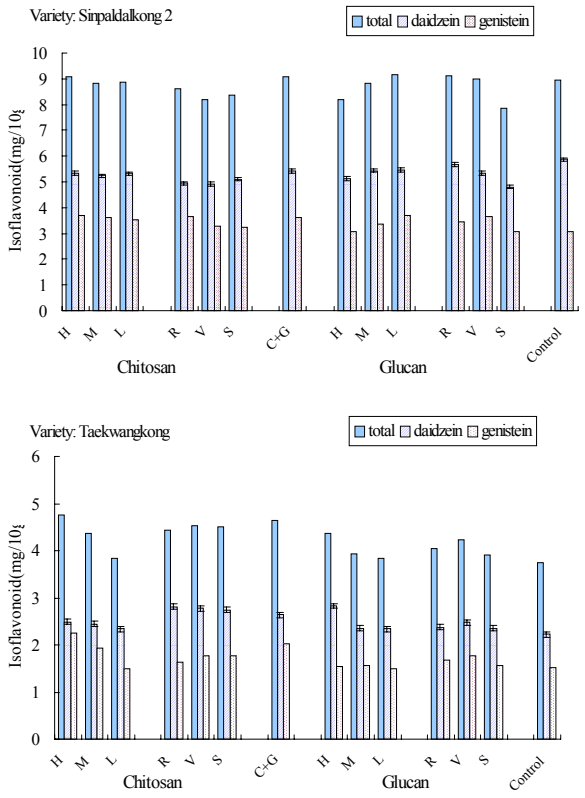


그림 59. 콩 포트재배시 elicitor 종류 및 처리농도에 따른 isoflavonoid 함량비교.

* H: 고농도, M: 중농도, L: 저농도, R; 개화후 처리, V; 개화전 처리, S: 토양관주처리, C+G: 혼합처리, Control: 무처리

표 25은 품종 및 elicitor 종류별 isoflavonoid 함량을 나타낸 것으로 태광콩 4.22mg/10g, 신팔달콩 8.71mg/10g으로 나타났고 신팔콩에서 elicitor 종류별로는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나 태광콩 처리구에서는 무처리 3.74mg/10g 보다는 유의성 있게 높은 함량을 나타냈다. 특히 혼합처리구에서 4.65mg/10g으로 가장 높게 나타났으며 글루칸보다는 키토산 처리구에서 높게 나타났다. 그리고 혼합처리구는 두 품종에서 모두 가장 높은 함량을 보였다.

표 25. 콩 포트재배시 elicitor 종류 및 품종별 isoflavonoid 함량차이.

처리		Isoflavonoid(mg/10g)		
품종	Elicitor	Daidzein	Genistein	Total
신팔달콩	Chitosan	5.14b	3.50a	8.65a
	Glucan	5.30b	3.39ab	8.69a
	혼합처리	5.43b	3.63a	9.06a
	무처리	5.86a	3.07b	8.93a
	평균	5.28	3.43	8.71
태광콩	Chitosan	2.60a	1.81ab	4.41ab
	Glucan	2.45ab	1.60b	4.05bc
	혼합처리	2.64a	2.01a	4.65a
	무처리	2.2b	1.52b	3.74c
	평균	2.51	1.71	4.22
LSD(5%) between varieties		0.12	0.12	0.18
LSD(5%) between elicitors in Sinpaldal		0.38	0.36	0.51
in Taekwang		0.29	0.36	0.55

4. 한발스트레스하에서 elicitor의 효과

콩 재배시험의 좀 더 분명한 elicitor의 처리효과, 즉 종실수량이나 isoflavonoid 함량증가를 알아보기위한 시험으로 열악한 환경에서 이차대사물질의 생합성이 더 증가할 것이란 가정으로 elicitor 처리와 함께 비가림시설을 이용하여 한발스트레스를 동시에 주어서 재배한 콩의 종실수량을 조사한 결과는 표 26과 표 27이다. 한발처리구에서 지상부중과 개체당 종실중은 무처리에 비해 다소 낮았으나 백립중의 경우는 무처리구가 더 높았다. 한발처리구에서는 elicitor 저농도에서 고농도 처리구보다 다소 높았으나 한발무처리구에서는 거의 차이를 보이지 않았다. 간장, 마디수, 개체당 협수 등은 한발처리구가 다른 처리구보다 다소 낮았으나 무처리에 비해 큰 차이를 보이지 않았다. 전체적으로 글루칸처리구보다는 키토산처리구에서 지상부중과 종실수량이 다소 높았다.

표 28은 한발 및 elicitor 동시처리시 근류균을 조사한 결과이다. 한발처리구에서 키토산처리구가 글루칸처리구에서 보다 근류균수가 더 많았으며 근류중도 높은 것으

로 나타났다. 한발을 처리하지 않고 elicitor만을 처리한 한발무처리구에서는 글루칸 처리구에서 키토산처리구보다 다소 높은 근류균이 발생한 것으로 상반된 결과가 나타났다. 글루칸 처리구에서는 무처리구에서 오히려 근류가 더 많이 발생하였지만 키토산 처리구에서는 무처리에 비해 다소 높은 근류가 발생했으며 특히 키토산 저농도에서는 근류중이 다소 높게 나타났다. 따라서 한발처리에 의해 근류균이 감소하였으며 키토산처리에 의해 근류균이 증가되어 회복된 결과라 생각할 수 있지만 무처리에 비해 뚜렸한 증가를 보이지 않았고 특히 한발처리구의 키토산저농도에서 근류중이 0.95g/plant로 높았다.

표 26. 한발스트레스 및 elicitor 동시처리에 따른 지상부중 및 개체당 종실수량의 변화.

처리내용		개체당 지상부중 (9월 2일)	개체당 종실중		백립중 (g)
			9월 2일	10월 8일	
한발처리	키토산 고농도 (500ppm)	17.4	5.3	9.4	18.4
	키토산 저농도 (100ppm)	18.2	4.9	11.2	18.0
한발무처리	키토산 고농도	20.9	5.0	12.9	18.8
	키토산 저농도	23.2	5.9	12.3	18.4
	무처리	21.8	5.4	11.3	19.2
한발처리	글루칸 고농도 (250ppm)	20.0	4.7	10.6	17.6
	글루칸 저농도 (50ppm)	19.6	5.0	11.2	17.4
한발무처리	글루칸 고농도	19.8	4.8	10.3	17.3
	글루칸 저농도	20.0	4.7	10.5	17.0
	무처리	20.6	4.7	10.1	18.2

표 27. 한발스트레스 및 elicitor 동시처리에 따른 지상부 생육량의 변화.

처리내용		간장(cm)	마디수(개)	개체당협수(개)
한발처리	키토산 고농도	68.0	10.3	31.3
	키토산 저농도	70.7	10.5	32.8
한발무처리	키토산 고농도	62.5	11.4	41.9
	키토산 저농도	65.1	11.6	37.5
	무처리	64.7	12.0	40.5
한발처리	글루칸 고농도	66.3	11.1	34.4
	글루칸 저농도	63.1	10.5	29.8
한발무처리	글루칸 고농도	72.2	10.4	35.9
	글루칸 저농도	68.5	10.7	35.1
	무처리	72.6	11.1	38.9

표 28. 한발 및 elicitor 동시처리에 따른 근류균의 변화.

처리내용		개체당근류수(개)	개체당근류중(g)
한발처리	키토산 고농도	31.1	0.1819
	키토산 저농도	32.6	0.9464
한발무처리	키토산 고농도	18.4	0.1381
	키토산 저농도	15.6	0.0497
	무처리	30.7	0.1860
한발처리	글루칸 고농도	15.5	0.0589
	글루칸 저농도	17.8	0.0964
한발무처리	글루칸 고농도	25.8	0.1228
	글루칸 저농도	40.6	0.2422
	무처리	41.4	0.3733

표 29는 한발 및 elicitor 동시처리시의 isoflavonoid 함량을 조사한 결과인데 한발처리구와 한발무처리구를 비교할 때 거의 차이를 보이지 않거나 한발무처리구에서 다소 높았다. 그리고 elicitor 종류인 키토산과 글루칸처리구에서는 키토산처리구에서

좀 더 높은 isoflavonoid 함량을 보였다. 처리농도에서는 일관성있는 경향을 나타내지 않았으나 키토산고농도처리구가 저농도보다 높았다. 이러한 결과는 한발처리에 의해 isoflavonoid 함량이 증가될 것이란 예상과는 다른 결과를 나타내 좀 더 정밀한 시험이 필요하며, 특히 eliciotr를 처리했을 때 콩 식물체 잎에서 elicitor의 흡착, 흡수, 이행 등의 과정에 대한 검토가 필요할 것으로 생각되었다.

표 29. 한발스트레스 및 elicitor 처리에 따른 isoflavonoid 함량차이.

처리내용		Isoflavonoid(mg/10g)		
		Daidzein	Genistein	Total
한발처리	키토산 고농도	2.48	3.33	5.80
	키토산 저농도	2.92	2.76	5.68
한발무처리	키토산 고농도	4.23	3.10	7.33
	키토산 저농도	3.18	3.51	6.69
	무처리	2.95	2.55	5.51
한발처리	글루칸 고농도	2.89	2.18	5.07
	글루칸 저농도	2.26	2.13	4.40
한발무처리	글루칸 고농도	2.60	2.11	4.71
	글루칸 저농도	3.44	3.31	6.75
	무처리	3.52	3.22	6.74

5. 전착제 혼용시 elicitor의 효과

콩 재배시 elicitor 처리시 효과를 증진시키기 위한 목적으로 전착제를 혼합하여 처리했을 때의 효과를 알아보기 위해 포장재배하여 생육특성 및 종실수량을 조사한 결과는 표 30와 표 31과 같다. 개화기, 성숙기, 도복정도, 바이러스, 경장 등 생육형질은 전착제 및 elicitor 처리에 의해 거의 변하지 않은 것으로 나타났다(표 30). 표 16은 종실수량을 나타낸 것으로 글루칸처리구 보다 키토산처리구에서 다소 높았으며 전착제 혼용처리구가 비혼용구보다 좀 더 높은 수량을 보였다. 키토산 농도에서는 저농도처리가 고농도처리보다 다소 높은 편이나 큰 차이를 보이지는 않았다. 백

립중의 경우는 모든 처리구에서 비슷한 경향을 보였다. 특히 키토산처리구에서 종실 수량 증가효과가 높았는데 무처리 165kg/10a, 키토산처리구 183kg/10a, 전착제 혼용처리구 196kg/10a으로 키토산 처리효과 및 전착제의 증진효과를 보였으며, 키토산저농도+전착제구에서 가장 높은 202kg/10a의 수량을 보였다.

표 30. 전착제 혼용에 의한 elicitor 처리에 따른 생육특성의 변화.

처리내용	개화기 (월.일)	성숙기 (월.일)	도복 (0-9)	SMV (0-9)	경장 (cm)
키토산저농도	7.29	10.06	1	2	51
키토산고농도	7.29	10.06	2	2	47
키토산저농도+전착제	7.29	10.06	2	1	50
키토산고농도+전착제	7.29	10.06	2	1	51
무처리	7.29	10.06	2	1	50
글루칸저농도	7.29	10.06	1	1	50
글루칸고농도	7.28	10.06	2	2	49
글루칸저농도+전착제	7.28	10.05	3	1	52
글루칸고농도+전착제	7.29	10.07	2	2	51
무처리	7.29	10.05	2	1	47

표 31. 전착제 혼용에 의한 elicitor 처리에 따른 종실수량 변화.

처리내용	협당립수 (개)	주당협수 (개)	구당수량 (g)	단위수량 (kg/10a)	백립중 (g)
키토산저농도	1.9	41	666	185	23.1
키토산고농도	2.0	46	649	180	23.9
키토산저농도+전착제	2.1	43	728	202	23.7
키토산고농도+전착제	1.8	44	685	190	23.8
무처리	2.3	44	594	165	22.9
글루칸저농도	1.7	40	664	184	23.8
글루칸고농도	2.1	42	746	207	23.4
글루칸저농도+전착제	2.0	45	658	183	23.9
글루칸고농도+전착제	2.2	47	693	192	23.4
무처리	2.1	41	743	207	23.1

표 32은 전착제 혼용시 elicitor 처리에 의한 근류균을 조사한 결과이다. 군류균수는 무처리구에 비해 elicitor 처리구에서 높게 나타났으며 근류무게에서도 다소 높은 경향을 보였다. 근류균수와 근류중을 평균하여 보면 글루칸처리구 610개, 6.61g 글루칸+전착제 540개, 5.63g, 키토산 504개, 6.37g, 키토산+전착제 491개, 5.40g, 그리고 무처리구에서 453개, 5.79g으로 각각 나타났다. 전착제처리구와 키토산처리구가 다소 낮았으며 모든 처리구에서 무처리구 보다 높게 나타났다. 처리농도별로는 키토산은 저농도가 고농도보다 근류수와 근류중이 높았고 클루칸의 경우는 고농도가 저농도보다 높은 근류중을 나타냈으나 근류수는 오히려 작았다.

표 33은 전착제 혼용처리에 따른 종실내 isoflavonoid 함량변화를 조사한 결과이다. 키토산 처리구에서는 무처리구보다 높은 함량을 보였으며 전착제 혼용처리구가 단용처리구보다 다소 높게 나타났다. 그러나 글루칸 처리구의 경우 전착제 혼용처리구

가 다소 높았지만 무처리구가 오히려 높은 경향을 보였다. 키토산고농도+전착제 처리구에서 5.39mg/10g, 종실수량이 가장 낮았던 글루칸저농도+전착제에서 7.05mg/10g으로 가장 높았는데, 종실수량은 대체적으로 isoflavonoid 함량과는 부의 관계를 보이는 경향이었다.

표 32. 전착제 혼용시 elicitor 처리에 의한 따른 근류균 변화.

처리내용	근류균수 (개/5 plants)	생중 (g/5 plants)	건중 (g/5 plants)
키토산저농도	535	6.93	1.79
키토산고농도	473	5.82	1.50
키토산저농도+전착제	506	6.10	1.60
키토산고농도+전착제	477	4.71	1.28
무처리	410	5.65	1.40
글루칸저농도	665	5.88	1.45
글루칸고농도	554	7.33	1.86
글루칸저농도+전착제	553	4.91	1.26
글루칸고농도+전착제	527	6.35	1.57
무처리	495	5.93	1.57

표 33. 전착제 혼용에 의한 elicitor 처리에 따른 isoflavonoid 함량 변화.

처리내용	Isoflavonoid(mg/10g)		
	daidzein	genistein	sum
키토산저농도	1.69	2.25	3.95
키토산고농도	3.04	2.11	5.15
키토산저농도+전착제	2.00	2.59	4.59
키토산고농도+전착제	2.66	2.73	5.39
무처리	1.76	2.45	4.21
글루칸저농도	2.40	3.19	5.59
글루칸고농도	2.62	3.08	5.70
글루칸저농도+전착제	3.40	3.65	7.05
글루칸고농도+전착제	2.84	3.10	5.94
무처리	2.93	3.51	6.43

6. Elicitor 처리에 따른 병 저항성 조사

사용된 품종은 신팔달콩이며 키토산은 500ppm, 글루칸은 250ppm의 농도로 제조하여 10분간 종자침지 후 파종하였으며 본엽 완성시에 1회 동일농도의 elicitor를 엽면살포 처리한 후 3일 후 본엽에 병원균을 접종하고 7일 후 감염정도를 조사하였다. 콩 생육은 식물생장상을 이용하고 생육조건으로 주야 27/23℃, 습도 70-80%, 명암 14/10 hrs의 조건이었으며 충분히 관수를 하였다. 접종된 균은 *Xanthomonas campestris*으로 불마름병을 일으키게 하는 병원균이며 병에 걸린 잎에는 옅은 녹색의 반점이 생기는데 점차 진행되면서 가장자리가 노랗게 되며 코투리에 중상이 나타나기도 한다. 얻어진 결과는 표 34와 같은데 무처리에 비해 키토산 처리구가 가장 높은 병 저항성을 보였으며 다음으로 글루칸 처리구와 혼합처리구에서 저항성을 나타내었다.

표 34. Elicitor 처리에 따른 병 저항성 비교.

처리	키토산	글루칸	혼합처리	무처리
저항성(0-9)	1.2	1.5	2.0	3.7

Fig. 60는 각 처리별 감염정도를 사진으로 나타낸 것으로 무처리의 감염정도를 볼 때 elicitor 처리된 콩 엽의 건전함이 비교될 수 있었으며 elicitor 로서 키토산과 글루칸의 병저항성을 확인할 수 있었다.

Fig. 60은 color 그림이므로 편집의 용이성을 위해 **page 171**에 나타내었음.

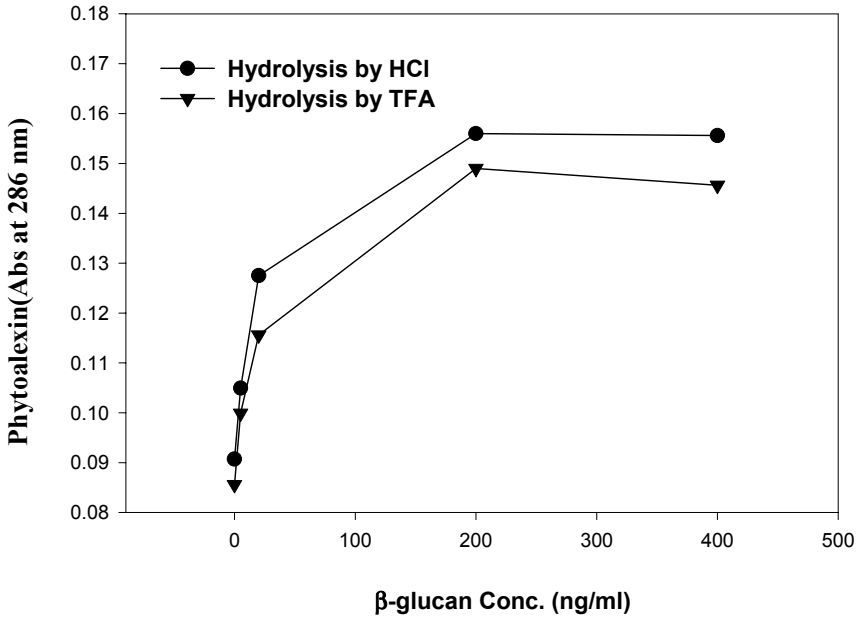


Fig. 8. Elicitation activities of β-glucans prepared from yeast with HCl or TFA.

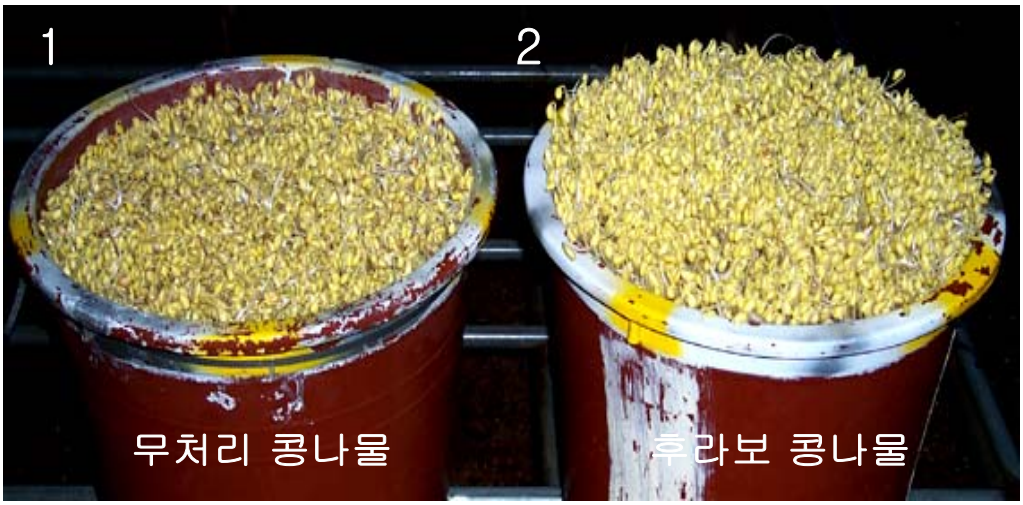
Elicitation activity was determined using soybean cotyledon assay.

Inset: A typical result of soybean cotyledon bioassay. Red color on the surface of cotyledon indicates that sample has elicition activity.

Fig. 33. Soybean sprouts incubated for 72 hours at room temp erature after infection with a fungal pathogen *P. sojae.*

Fig. 34. Soybean sprouts incubated for 72 hrs at room tempe rature after infection with a bacterial pathogen *B. subtilis.*

Fig. 35. Soybean sprouts incubated for 72 hrs at room temperature after infection with a bacterial pathogen *B. coagulans.*



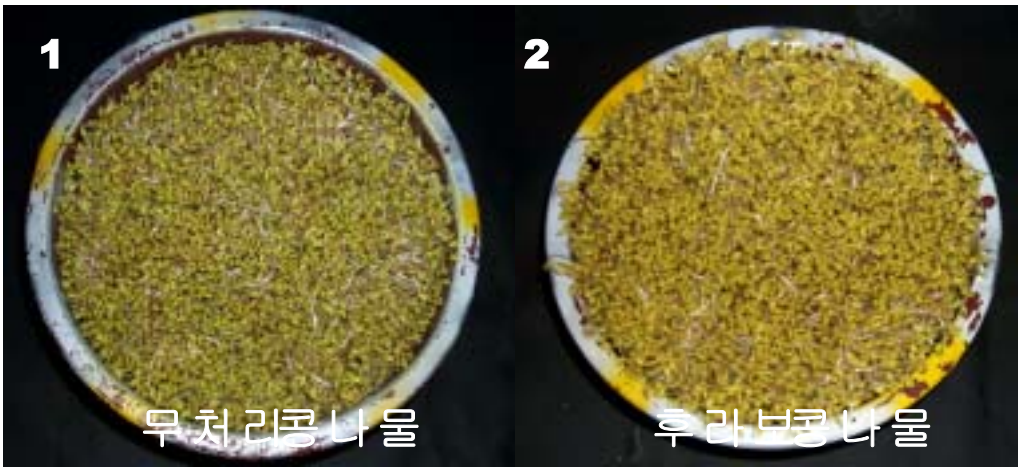
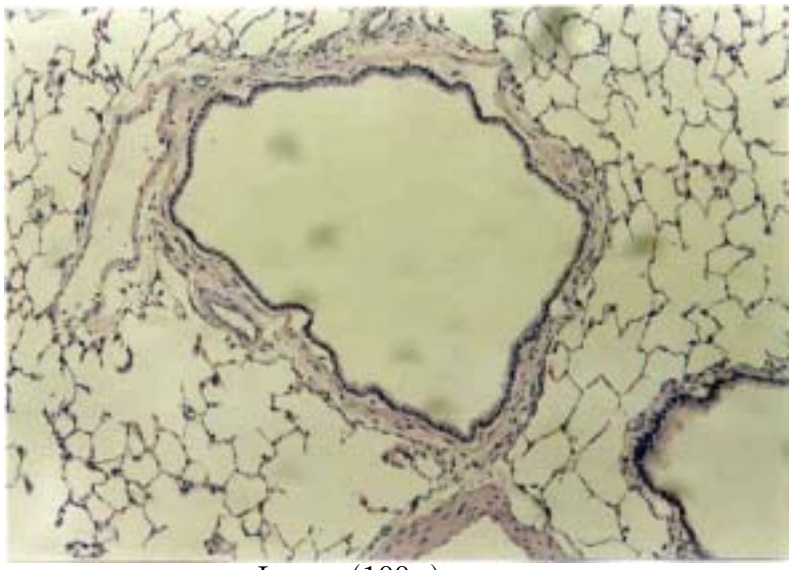


Fig. 40. Soybean sprouts treated with elicitors during cultivation in large scale at a soybean sprout company.

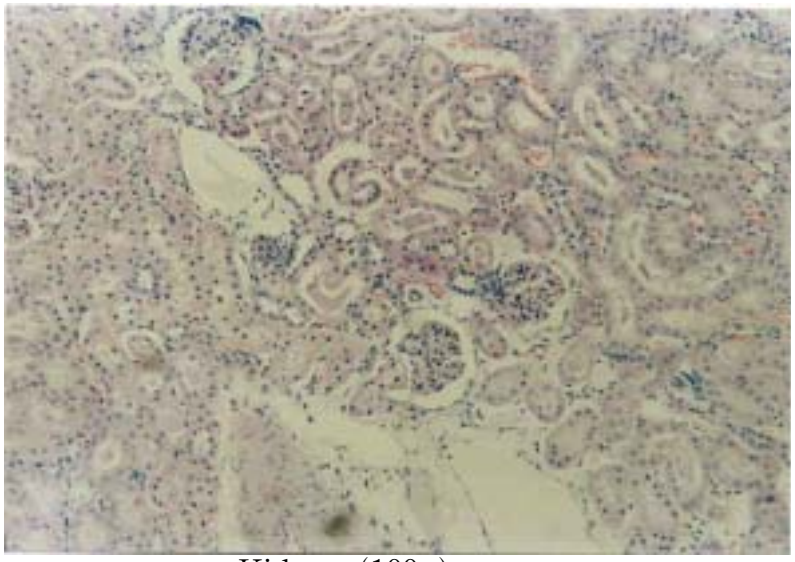
A: Viewed from the front. B: Viewed from the top.

1. Soybean sprout treated with water (Control).
2. Soybean sprout treated with chitosan and β-glucan.

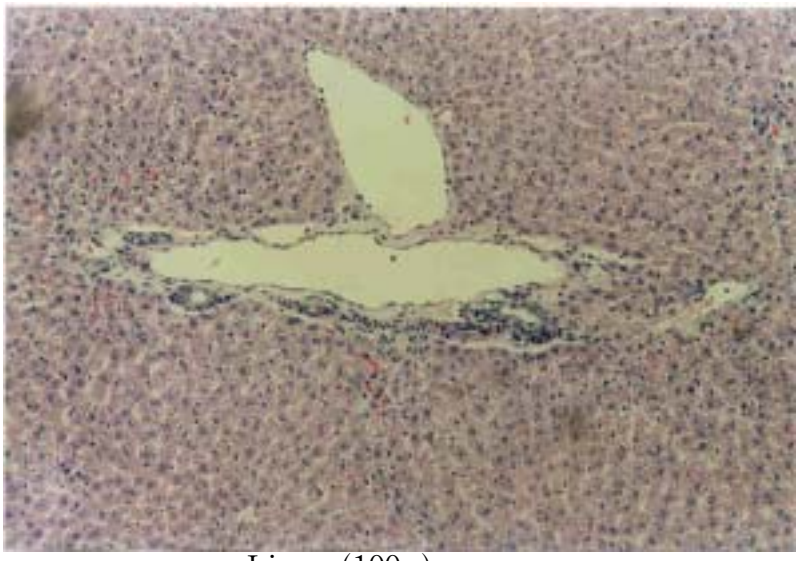
Fig. 50. Representative histological sections of control male rats (in the order of lung, kidney, liver, heart, brain (cerebrum), adrenal gland, spleen, thymus and testis).



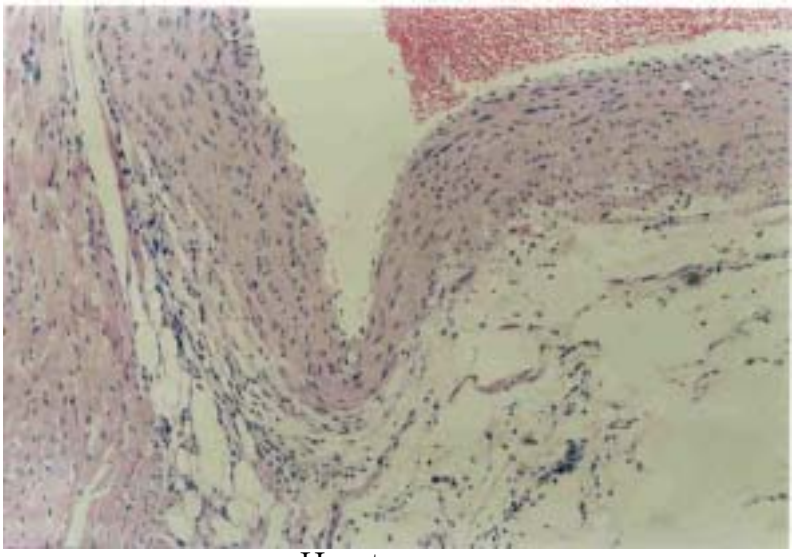
Lung (100x)



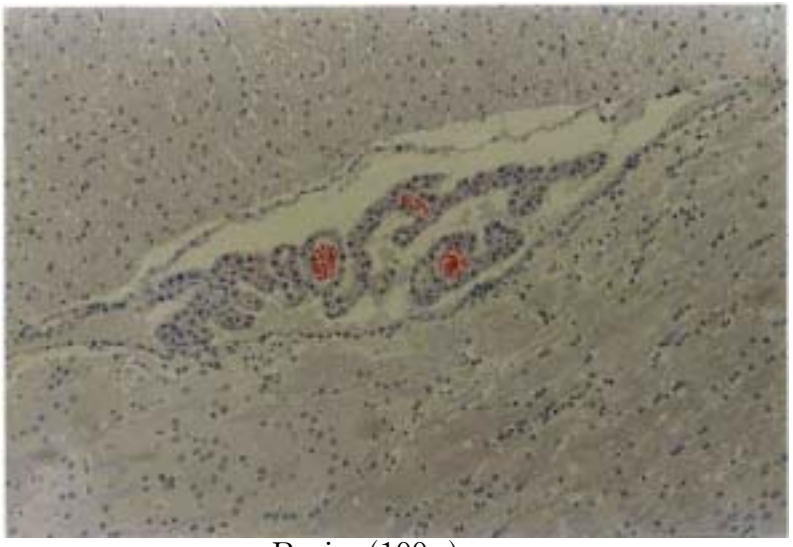
Kidney (100x)



Liver (100x)

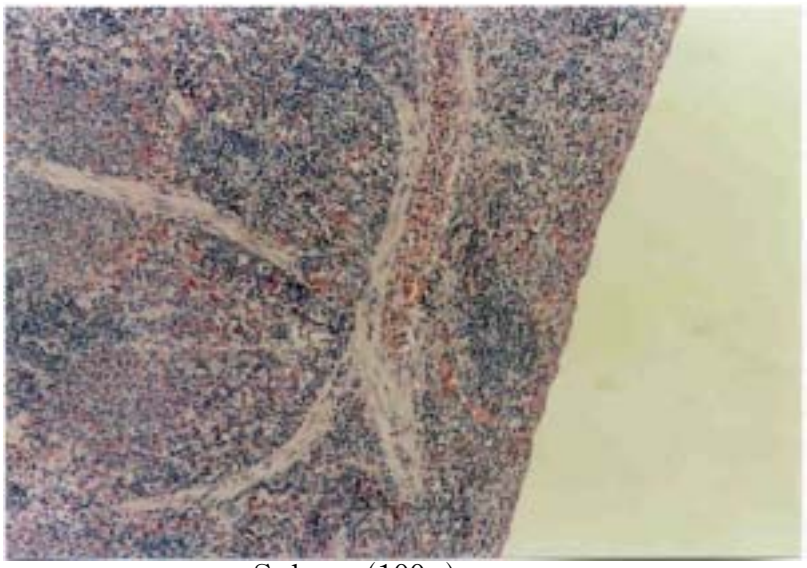


Heart



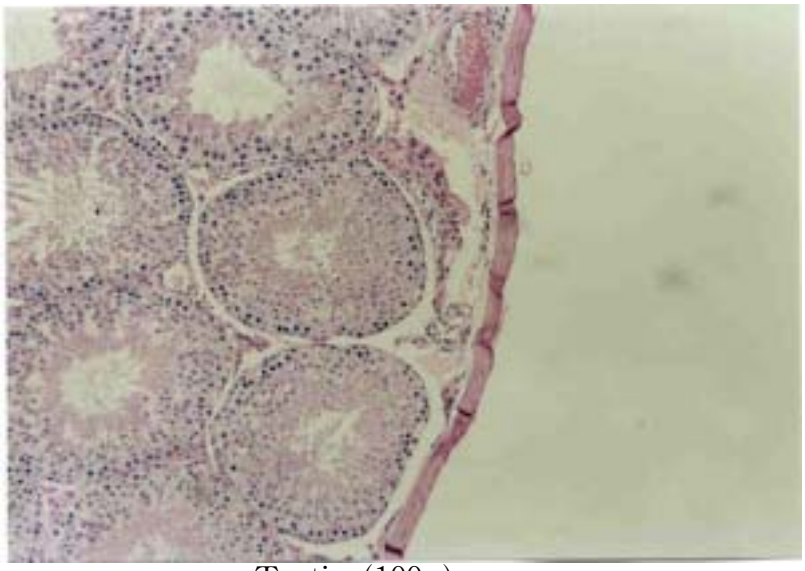
Brain (100x)

Adrenal gland (100x)



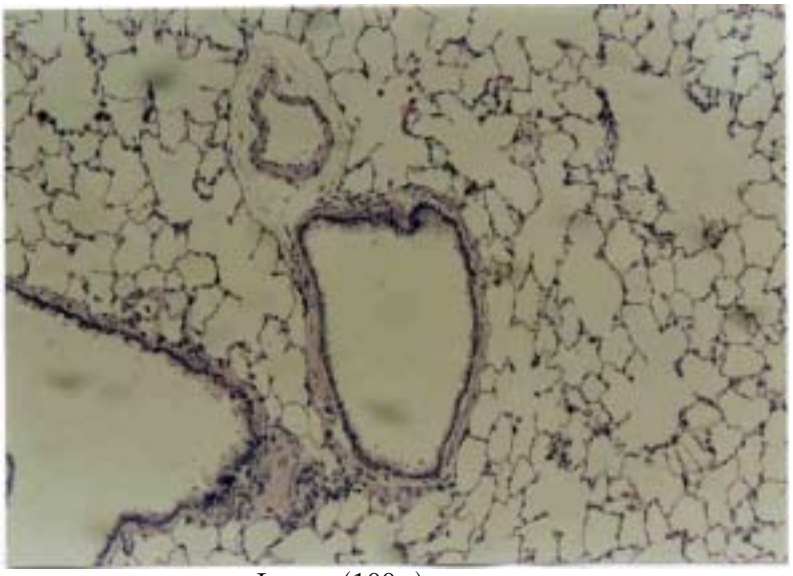
Spleen (100x)

Thymus(100x)

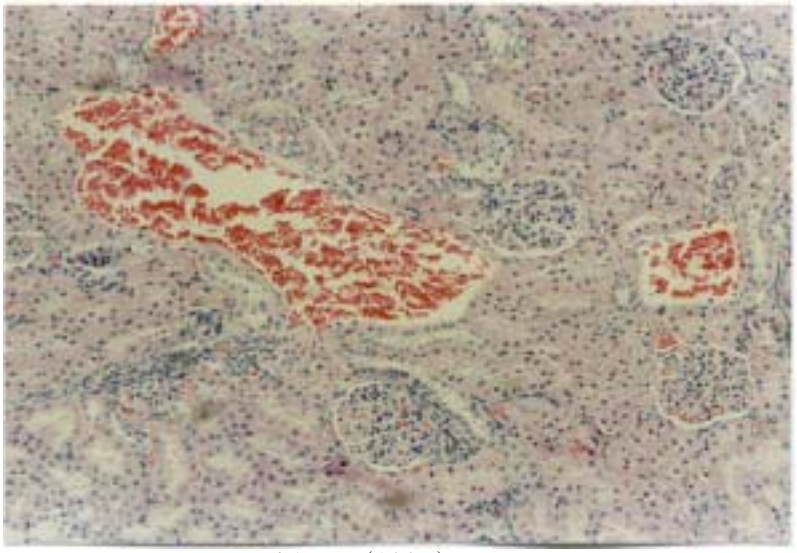


Testis (100x)

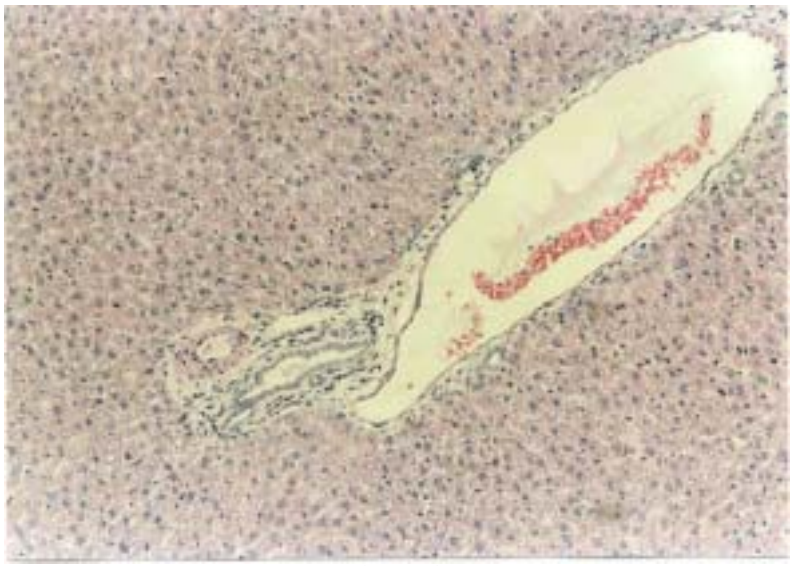
Fig. 51. Representative histological sections of 10%-sprout treated male rats (in the order of lung, kidney, liver, heart, brain (cerebrum), adrenal gland, spleen, thymus and testis).



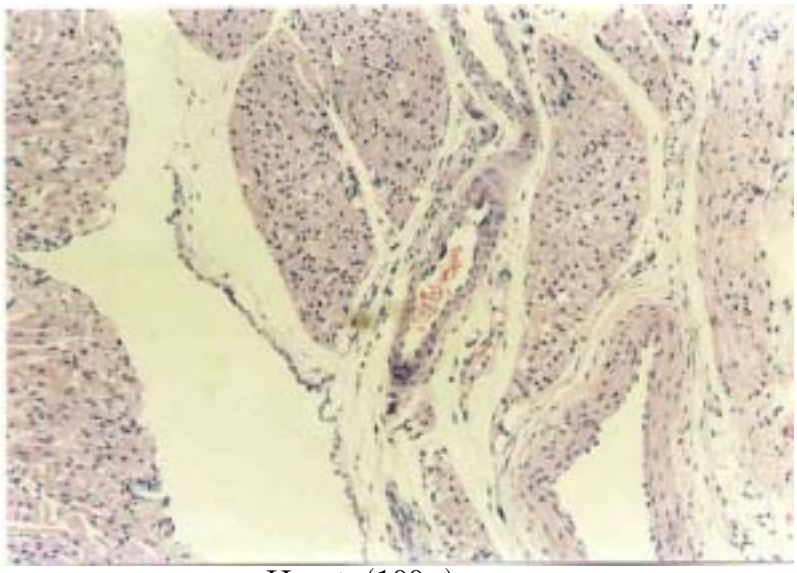
Lung (100x)



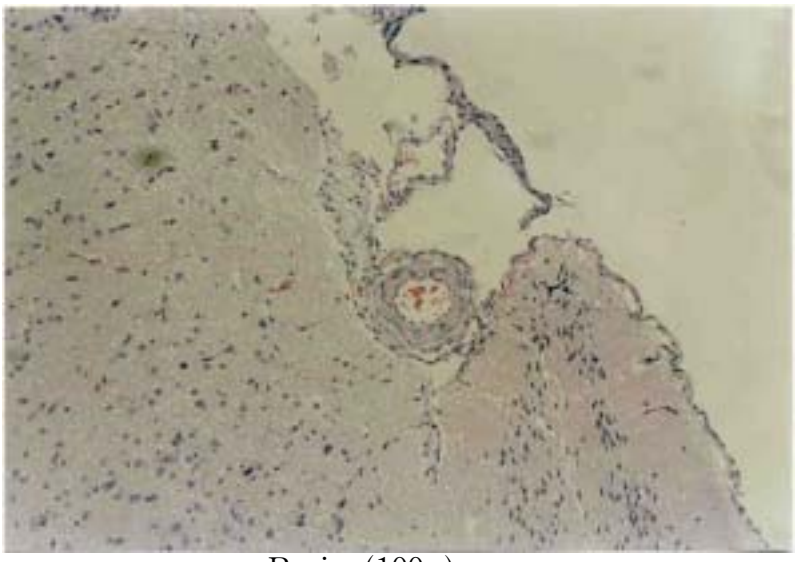
Kidney (100x)



Liver (100x)

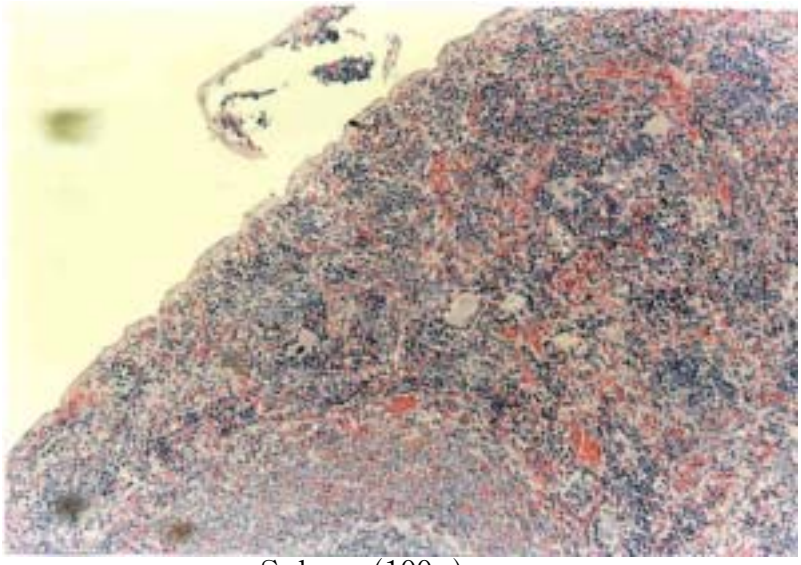


Heart (100x)



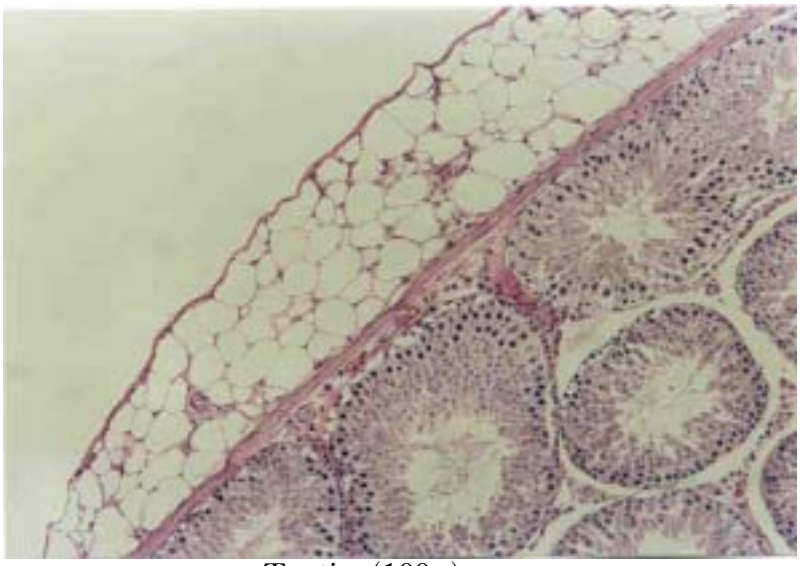
Brain (100x)

Adrenal gland (100x)



Spleen (100x)

Thymus (100x)



Testis (100x)

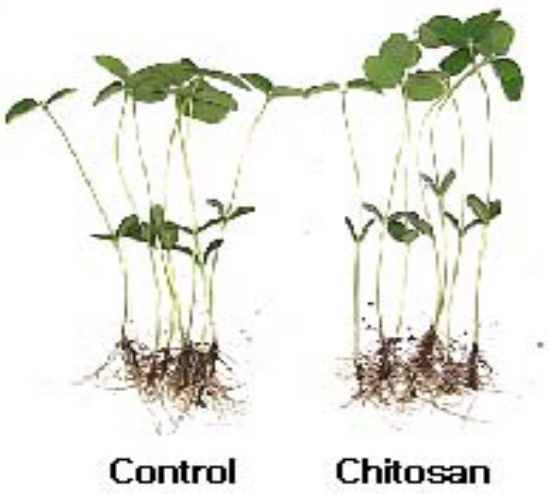


Fig. 52. Photograph of soybean treated with chitosan after cultivation for 4 days.

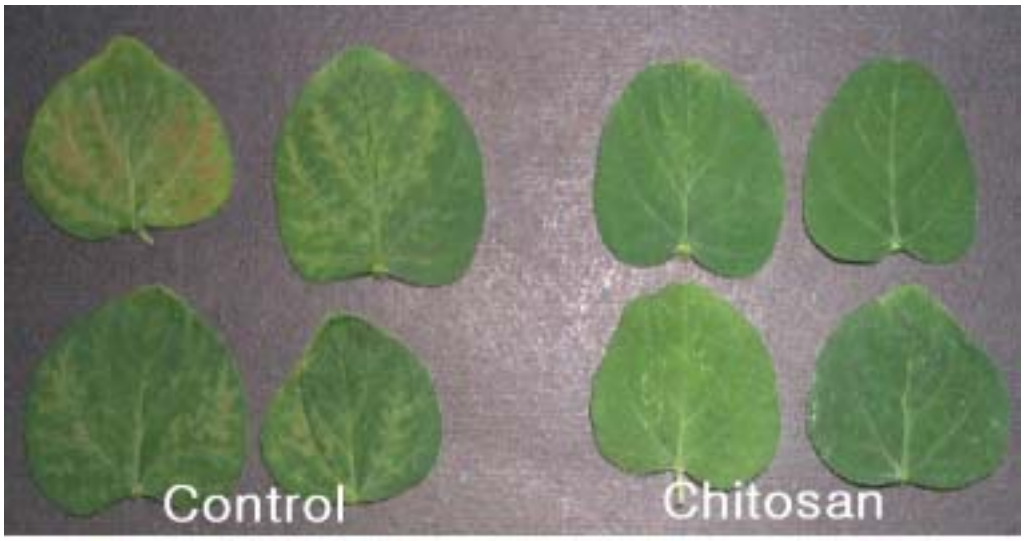


Fig. 60. Soybean leaves incubated for 7 days at room temperature after infection with a bacterial pathogen *Xanthomonas campestris*.