

최 종
연구보고서

**키토산, PFC 및 자생식물을 이용한
종자코팅제의 개발에 관한 연구**

Development of Seed Coating using
Chitosan, PFC and Herbs in Wild Plant

계 명 문 화 대 학

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “키토산, PFC 및 자생식물을 이용한 종자코팅제의 개발에 관한 연구” 과제 (협동연구과제 “생리활성 물질의 개발 및 코팅제의 항균력 검사에 관한 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

2003년 8월 7일

주관연구기관명 : 계명문화대

총괄연구책임자 : 김 용 원

연 구 원 : 정 병 걸

연 구 원 : 김 성 완

연 구 원 : 안 형 근

협동연구기관명 : 계 명 대

협동연구책임자 : 유 대 식

연 구 원 : 김 현 수

요 약 문

I. 제 목

키토산, PFC 및 자생식물 추출물을 이용한 종자코팅제의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

키토산과 그 유도체 및 자생식물내의 생리활성물질을 이용하여 환경 친화성, 고효성 종자코팅제로 활용하는 한편, 이들 내에 함유된 **유용 생리활성물질의 검색 및 분리·정제를 통하여 다양한 생리활성기능을 체계적으로 연구 개발함으로써 신물질의 생산과 응용에** 역점을 두고 본 연구를 실시하였다.

2. 연구개발의 필요성

최근 들어 국내·외에선 종자의 기계적인 과종과 발아, 생육의 유효성을 높이기 위하여 종자 표면에 유효성분을 함유하는 얇은 층으로 코팅(coating)하는 기술이 개발되어 이용하고 있다.

종자 coating은 초기에는 곰팡이와 곤충의 침입으로부터 종자를 보호하기 위하여 사용되어 왔으나, 현재는 근류균의 보호, 多量 및 微量元素의 공급, 식물 생장조절제 공급, 발아촉진 유도, 종자 무게 및 크기의 증가, 선택성 및 해독성 제초제 공급 등에 광범위하게 이용되고 있다.

또한 코팅처리 시 피막(被膜)의 두께를 유지시키기 위한 도포제의 개발, 이들 유효성분을 종자표면에 유지시키기 위한 피막형성제의 개발에 대한 연구가 많이 이루어

어지고 있다.

종자 코팅시 경제성을 고려하여 종자의 종류에 따라 여러 가지 유효성분의 적정 농도를 구하여 조절하는 것은 극히 곤란하다. 특히 살균제는 병원균뿐만 아니고 고농도 상태에서는 식물의 기형적인 생육을 유기할 위험이 있으며, 또 식물의 발아 성장에 유효한 토양미생물 살균의 우려가 있기 때문에 적용할 수 있는 종자나 토양에 대한 개별적인 대응이 필요하다. 또 분말의 살균제를 입자가 작은 종자 표면에 일정한 비율로 부착시키는 것은 쉽지 않는 작업이다. 또 코팅제로 사용하는 합성 살균제는 작업장 근로자의 건강을 해칠 우려도 있으며 토양에 잔류시 장기간에 걸쳐 오염을 진행시켜 연작피해의 원인이 되기도 한다.

본 연구에서는 상기 문제점을 해결하고 피막중 유효성분을 적당한 비율로 균등하게 코팅을 할 수 있으며, 취급상 위험성이 없고 환경오염이 없는 코팅종자를 개발하기 위하여 먼저 정부가 지정한 친환경 자재중 하나인 키토산 및 그 유도체를 제1의 분해성 피막제로 코팅하며, 2차로 맥반석, 송이석, 거정석, 흑운모석 등 광물질 재료를 혼합한 분해성 자재를 사용하여 제2의 분해성 피막제로 코팅한다. 피막형성제는 전분, PVA, 아라비아검, 젤라틴 등 분해성 물질을 처리하여 가장 효율적인 피막제를 찾고자 한다.

상기 연구와 함께 종자 코팅시 항균효과와 종자 발아 및 초기생육에 영향을 줄 수 있는 천연물 유래의 활성물질을 탐색하고자 한다.

식물은 인류에게 유용한 물질의 제공과 화학공장으로서 역할을 수행하며 이들에 의해 유래된 신규생리활성 물질들이 20,000개 이상이 밝혀져 왔다. 대부분 이차대사산물인 이들 유용물질들은 의약품, 향신료, 방향제, 식품, 생물농약 및 고순도 화학제품 등의 다양한 용도로 사용되고 있다. 최근에는 생약 및 식용식물 등으로부터 새로운 기능을 가진 천연생리활성물질의 연구가 동·서양을 비롯하여 활발히 진행되면서, 약용식물에서 항세균 및 항암효과에 대한 연구가 이루어지고 있다. 본 연구자는 한국산 도꼬마리로부터 새로운 항균 및 항암효과 등 다양한 생리활성기능이 있는 신규물질의 탐색과 응용을 위한 일환으로서 도꼬마리의 각 부위로부터 추출한 성분을 각종 식물병원균을 대상으로 항균 및 항암효과에 대하여 조사를 수행하고 이들 물질을 종자 코팅시 처리하여 코팅종자의 항균, 살균 및 성장능력 향상 등을 도모코자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 키토산 및 자생식물 추출물을 이용하여 종자코팅제로의 개발을 목적으로 하고 있는데, 그 세부 과제 중 첫째로는 종자코팅재료로 이용 가능한 키토산 및 그 유도체의 개발, 둘째로는 종자 코팅시 항균력 및 활력을 촉진시킬 수 있는 자생식물내 천연활성물질의 개발과 셋째로는 개발된 활성물질의 항균력 테스트를 통한 종자 코팅제로의 이용 가능성 조사, 넷째로는 식물에 함유된 **항균성 물질 및 항암성 물질을 비롯하여 다른 생리기능을 가지는 물질을 규명**하고 이들 물질의 분리, 정제와 함께 구조결정을 통한 합성법을 개발함과 더불어 **항암성 물질의 작용기작을 연구함으로써 각종 암세포에 대한 약제로서의 응용면을 확립**하고자 한다.

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

키토산과 그 유도체 및 자생식물내 생리활성물질이 종자코팅시 효과적인 코팅제로써 활용이 가능할 것으로 생각되며 이에 따라 기계적 파종, 미세종자의 직파, 작업능률 향상에 한층 더 기여할 것으로 사료됨. 또한 이들 기술들은 고품질 종산생산 유도 및 종묘회사등에 기술을 이전함으로써 산업화가 가능하고, 종자 처리 기술에 대한 특허 출원이 가능할 것으로 생각된다.

한국 고유의 토착 약용식물로부터 생리활성물질을 체계적으로 이루기 위해서는 ① 신기능성이며, 부가가치가 높은 토착 약용식물의 확보와 연구개발, ② 도꼬마리로부터 신규 생리활성물질의 분리 및 정제법 확립, ③ 유효성분의 구조결정, ④ 각종 항균, 항암 및 생리활성물질들의 작용기작 등을 규명하여야 한다.

SUMMARY

I. Title

Development of Seed Coating using Chitosan, PFC and Herbs in Wild Plant

II. Objective and Importance

1. Objective

This project was carried out to examine an application capability of chitosan, their modifier and physiological active substances of native plants as materials of seed coating to rise the quality of seeds. Also, bioactive compounds isolated in a medicinal herb, that are potentially useful for biotechnological application, from endemic natural habitats, a medicinal plant in Korea.

2. Importance

Seed coating have been used as means for protecting and enhancing the environment next to the natural seed coat, to control seed germination and/or improve seedling survival and growth rate.

Seed coating often has been used as a broad term to include true seed coating, pelleting, and film coating. A significant number of agronomic, vegetable, and flower seeds are either coated, pelleted, or film coated today for diverse objectives. Seed pelleting is the deposition of layers of inert materials to substantially increase seed weight and to improve gemination ability of seed. The main application of seed pelleting to pelletize small, light, variably-sized, or

irregularly-shaped seeds, which are hard to handle into spherical or near spherical capsules for precision sowing.

Toward these ends, coatings have been used as carriers for a variety of components; agrochemicals, Rhizobium bacteria, nutrients, beneficial elements, and plant growth regulators. Such components can be effective in improving seed germination and seedling survival and growth in the face of diseases, insects, and poor soil fertility.

These experiments were carried out to examine an application capability of chitosan, their modifier and the extracts of native substances as a materials of seed coating.

A medicinal plants are an unique source of high value bioactive products, notably *Batura metel*, *Cirsium japonicum*, *Datura alba*, *Gentiana scabra*, *Houttuynia cordata* and *Xanthium strumarium* L. Approaches to the search for, and discovery of, new bioactive compounds are generally based on screening of medicinal herb. Current efforts to find the next generation of new bioactive compounds of therapeutic value are comprised as the number of known antibiotics is increasing. It is, therefore, important in search and discovery programmes to screen novel and a medicinal plants in order to raise the probability of finding novel bioactive compounds. Screening methods, which are increasingly target directed, are also important in the search for new product.

The conservation of this important biological resources have become international themes of great importance which let to the establishment of a number of programs. This will require the exploration, characterization, and preservation of indigenous a medicinal plants in order to sustainably use them for the present and future needs of mankind.

III. Contents

1. Development of chitosan and their modifier for utilization as a material of seed coating.
2. Effect of crude extracts of native plants for utilization as a material of seed coating.
3. Effect of chitosan, their modifier and crude extracts of *Xanthium strumarium* L on gemination and growth of various seeds.
4. Seed coating using chitosan, their modifier and crude extracts of *Xanthium strumarium* L
5. Screening of antimicrobial and antitumor agents from indigenous medicinal plants.
6. Development of methods for the isolation, purification of novel bioactive compounds from *Xanthium strumarium* L extract.
7. Screening of antioxidant materials from indigenous medicinal plants.
8. Effect of antimicrobial and antitumor activity against animal cell lines.

IV. Results

Deacetylation of red crab chitin showed many a difference according to time and temperature of reaction. To progress deacetylation of 80%, 100%, it is necessary to react above 4 hours, 8 hours at 110°C in 48% concentration of NaOH solution, respectively. At this time, the viscosity of Chitosan was convinced at 350 cps.

Low viscosity was commonly used to seed test for enhancement of germination rate and growth of first stage. So, we made chitosan(chitosan-oligosaccharide) of low viscosity with 10 cps at 60°C, pH 4.0-5.0.

In accordance with a kind of pathogenic microorganism, film of three kinds made, N-acyl chitosan solution plus 1% chitosan-oligosaccharide, 2% N-acyl chitosan and 1% chitosan-oligosaccharide plus 1% of crude extracts of *Xanthium*

strumarium L.

Mixing solutions of Chitosan, oligosaccharide and the crude extracts of *Xanthium strumarium* L accelerated germination and seedlings growth of pepper, radish, cucumber, *pulsatilla korea*, *Aquilegia buergeriana*, the other hand, growth of lettuce inhibited at low concentration.

To isolate and purify the antimicrobial and antitumor agents in *Xanthium strumarium* L. hydrothermal extract. The crude extract was extracted in ether or ethylacetate under neutral, acidic, and alkali conditions. The antimicrobial activity of each extract was tested against 16 strains of bacteria, 2 strains of yeast, and 2 strains of fungus. The ether neutral extract (XE-N) exhibited the strongest growth inhibition upon the 8 strains of gram-positive bacteria, 6 strains of gram-negative bacteria and *Cryptococcus neoformans*. Fluorescein diacetate (FDA) testing of XE-N and XEA-N showed growth inhibition of the 3 strains of *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans* even at 30 ng/ml, with the exception of *P. aeruginosa*. XE-N-S1 and XE-N-S3 from neutral ether extract (XE-N), XE-N-S3 from the acidic ether extract (XE-A), and XEA-N-S1 from ethylacetate (XEA-N) were purified as antimicrobial and antitumor agents. However all purified compounds decomposed with the exception of XE-N-S1. The results upon the antitumor activities of the crude extract and of its purified compounds, showed that XE-N-S1 had the best antitumor activity against HeLa cells. In terms of antitumor activity against HepG2 cells, XE-N-S1 and XE-N-S3 were superior, and against HT29 cells XE-N and XE-N-S1 were good, against Saos2, NCI H522, NCI H1703, Clone M3 cells XE-N-S1 was very good, and against LN CAP cells XE-N-S3 was the best. Comparing of cellular toxicities various extracts and purified compounds with the existing antitumor agents, XE-A, XEA-A and XEA-B had the lowest toxicity, and XE-B had a lower toxicity than etoposide. XE-N-S1 and XE-N-S3 showed higher toxicities than etoposide, and the toxicity of XE-A-S3 was higher than that of etoposide, and lower than that of cisplatin.

In the mutagenicity test using *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100, the *Xanthium strumarium* L. extracts had not a mutagenicity. The extracts were assayed for its antioxidative effect with colony formation assay. The extracts showed protective effects against the cytotoxicity of H₂O₂ and immunity increase effect for TNF and IL-1 β . The modifying effects on *Xanthium strumarium* L. extracts on the induction of carcinogenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) were investigated in Wistar rats. The GSH content was decreased by MNNG treatment but was increased by adding extracts. In addition to the *Xanthium strumarium* L. extracts increased the p53 expression as compared with the value of MNNG alone.

V. Application

1. Enhancement of seed quality.
2. The transfer of technique and physiological active substances developed as seed coating substances.
3. The possibility of mechanical sowing of small size seeds.
4. Preservation and supply of novel bioactive compounds and a medicinal plants.
5. Development of methods for the isolation, purification of novel bioactive compounds from *Xanthium strumarium* L extract.
6. Development of new pharmaceutical, new bioactive compounds and determined of structure from useful compounds.
7. Establishment of mechanism for a novel antimicrobial, antitumor and bioactive compounds from a medicinal plants.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	12
Chapter 2. Recent advances in conservation of bioactive compounds	16
Chapter 3. Contents and results	25
Section 1. Development of chitosan and their modifier for utilization as a material of seed coating	25
Section 2. Effect of antimicrobial activity of extracts of native plants	40
Section 3. Effect of mixing solution of chitosan, their modifier and extracts of <i>Xanthium strumarium</i> on growth of crops and native plant	59
Section 4. Seed coating using chitosan, their modifier and extracts of <i>Xanthium strumarium</i>	67
Section 5. Establishment of mechanism for a antitumor and bioactive compounds	103
Section 6. Structure of S1 compound	127
Section 7. Utilization of mixing solution of chitosan, their modifier and extracts of <i>Xanthium strumarium</i> about life extension of cut flower	130
Chapter 4. The achievement degree of research goals and the degree of contribution to the related field	133
Chapter 5. Plan for using research results	139
Chapter 6. Collection of foreign technique information	140
Chapter 7. Reference	144

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	12
제 2 장	국내외 기술개발 현황	16
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	25
제 1절	종자코팅제로 활용이 가능한 키토산 및 그 유도체 개발	25
제 2절	자생식물 조추출물의 항균효과	40
제 3절	키토산, 올리고당 및 도꼬마리 추출액을 이용한 종자의 priming처리가 작물 및 야생화종자 발아에 미치는 영향	59
제 4절	키토산 올리고당 및 도꼬마리 추출물을 이용한 종자 코팅	67
제 5절	도꼬마리 추출물로부터 항암 물질의 분석	103
제 6절	도꼬마리 추출물인 S1의 구조 결정	127
제 7절	키토산, 키토산 올리고당 및 도꼬마리 추출액의 절화수명 연장제로 활용 방안	130
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	133
제 5 장	연구개발 결과의 활용계획	139
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	140
제 7 장	참고문헌	144

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목적

키토산과 그 유도체 및 자생식물내의 생리활성물질을 이용하여 환경 친화성, 고효성 종자코팅제로 활용하는 한편, 이들 내에 함유된 **유용 생리활성물질의 검색 및 분리·정제를 통하여 다양한 생리활성기능을 체계적으로 연구, 개발함으로써 신물질의 생산과 응용에** 역점을 두고 본 연구를 실시하였다.

2. 연구개발의 필요성

세계의 종자시장 규모는 450억달러로 추정된다.(농협 CEO Foucs, 종자산업 전망과 종자주권 : 인터넷 자료). 이 중에서 종자회사에 의해서 공급되는 규모는 약 150억달러로 전체의 1/3을 차지하고 있으며 국내에는 6대 종자 회사에서 1천5백억원 규모의 시장을 갖고 있다. 그 중 4개 회사는 외국회사가 인수. 합병하여 국내 종자시장의 57%를 점유하고 있는 실정이다.

최근 들어 국내·외에선 종자의 기계적인 파종과 발아, 생육의 유효성을 높이기 위하여 종자 표면에 유효성분을 함유하는 얇은 층으로 코팅(coating)하는 기술이 개발되어 이용하고 있다. 종자 coating은 초기에는 곰팡이와 곤충의 침입으로부터 종자를 보호하기 위하여 사용되어 졌으나, 현재는 근류균의 보호, 多量 및 微量元素의 공급, 식물 생장조절제 공급, 발아촉진 유도, 종자 무게 및 크기의 증가, 선택성 및 해독성 제초제 공급 등에 광범위하게 이용되고 있다.

이에 따라 상기 코팅제에는 피막(被膜)의 두께를 유지시키기 위한 도포제의 개발, 이들 유효성분을 종자표면에 유지시키기 위한 피막형성제의 개발에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다.

또한 경제성을 고려하면 종자의 종류에 따라 여러 가지 유효성분의 적정 농도를 구하여 조절하는 것은 극히 곤란하다. 특히 살균제는 병원균뿐만 아니고 고농도 상태

에서는 식물의 기형을 발생할 위험이 있으며, 또 식물의 발아 성장에 유효한 토양미생물 살균의 우려가 있기 때문에 적용할 수 있는 종자나 토양에 대한 개별적인 대응이 필요하다. 또 분말의 살균제를 입자가 작은 종자 표면에 일정의 비율로 부착시키는 것은 쉽지 않은 작업이다. 또 코팅제로 사용하는 합성 살균제는 작업장 근로자의 건강을 해칠 우려도 있으며 토양에 잔류시 장기간에 걸쳐 오염을 진행시켜 연작피해의 원인이 되기도 한다.

본 연구에서는 상기 문제점을 해결하고 피막중 유효성분을 적당한 비율로 균등하게 코팅을 할 수 있으며, 취급상 위험성이 없고 환경오염이 없는 코팅종자를 개발하기 위하여 먼저 정부가 지정한 친환경 자재중 하나인 키토산 및 그 유도체를 제1의 분해성 피막제로 코팅하며, 2차로 맥반석, 송이석, 거정석, 흑운모석 등 광물질 재료를 혼합한 분해성 자재를 사용하여 제2의 분해성 피막제로 코팅한다. 피막형성제는 전분, PVA, 아라비아검, 젤라틴 등 분해성 물질을 이용할 수 있다. 마지막으로 발수 코팅제는 불소화합물 등을 사용하는 기술을 개발코자 한다.

또한 천연물을 이용한 생명공학분야(BT)의 산업화 정책이 몇몇 지방자치단체에 의하여 특성화 분야로서 한방 바이오 등의 이름으로 지원함에 따라 학계와 산업계에서 신물질 개발에 대한 관심이 고조되고 있으며, 이에 부응하여 전통적으로 사용되어오던 생약 및 민간 처방약의 약효에 대한 관심도가 높아지고 있다. 실제 동·서양을 막론하고 전통 약물은 현대 의학에 사용되고 있는 많은 의약품의 중요한 자원으로 이용되어왔으나, 항세균제의 분야에 있어서는 기존 항세균제의 낮은 생산 경비와 우수한 효과 때문에 상대적으로 연구 실적이 미미한 점이 없지 않았다. 본 연구의 재료로서 국화과(Compositae)에 속하는 도꼬마리(*Xanthium strumarium* L.)는 전체에 거센 털이 나 있으며 줄기는 곧게 서고, 키는 1.5 m 정도로 꽃은 8-9월경에 황갈색을 띤 머리꽃이 줄기 끝에서 핀다. 열매는 대추씨와 비슷하고 과피 부분에 갈고리 모양의 억센 털이 나 있으며 들이나 길가에서 주로 자라는 한해살이풀로 한국을 포함한 동북아시아 및 유럽 등지에 폭넓게 분포·자생하는 것으로 알려져 있다. 도꼬마리에 관한 연구는 중국산 도꼬마리(*Xanthium sibiricum* Patr. ex Widd)가 시초로서 열매의 씨(창이자)가 해열, 발한, 진통, 산풍, 거습, 궤양성 피부병, 신경통 및 악성 종양 등에 탁월한 효과가 있으며, 항균효과로서는 티푸스균, 이질균과 더불어 황색포도상구균에 상당한 저해효과가 있는 것으로 알려져 있다. 창이자에는 거풍습, 진

통, 해열, 살충 등 다양한 효능이 있으며, 함유된 성분으로는 γ -lactone구조를 가진 xanthinin과 carotenoid, alkaloid, saponine, xanthostrumarin, xanthostrunarlin 및 oleic acid 등이 알려져 있다. 이러한 성분을 지닌 도꼬마리가 전통적 민간요법으로 정착되어 습진 등의 피부병 치료에 널리 이용되었을 뿐만 아니라, 다양한 약리 작용을 하는 것으로 보아 항균성 및 항암성 물질의 존재가 예상된다. 최근에는 생약 및 식용식물 그리고 각종 난배양성 유용미생물(VBNC) 등으로부터 새로운 기능을 가진 천연생리활성물질의 연구가 동·서양을 비롯하여 활발히 진행되면서, 천연 한약재 중에서 항세균효과 및 항암효과를 갖는 성분에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 특히, 단풍나무에서 추출된 ginnalin, 황화호에서 추출된 astemistic acid, 황백이나 황련 등에서 추출된 berberin, 감귤류의 과피에 포함된 hesperidin 등의 성분이 항세균효과를 가지며, 충치 유발균인 *Streptococcus mutans* 증식억제 효과를 가진 생약제 및 향신료, 초피 추출물의 항암효과, 심황(turmeric)으로부터 분리된 phenol 화합물의 항암효과 등 다수가 보고된 바 있으며, 약용식물의 성분 중 flavonoids, alkaloids, glycosides, polyphenols 등 각종 성분의 항균·항암효과가 알려져 있다. 또한, 녹차를 비롯하여 식품 중에 함유된 성분을 분리하여 항균·항암 및 각종 생리 기능 효과에 관한 수많은 연구가 수행되어 있다(3, 7, 13, 14, 18, 21). 이와 같은 관점에서 본 연구자는 한국산 도꼬마리로부터 새로운 항균 및 항암효과 등 다양한 생리활성기능이 있는 신규물질의 탐색과 응용을 위한 일환으로서 도꼬마리의 각 부위로부터 추출한 성분이 세균 및 진균류 등에 대한 광범위한 항균효과를 가진다는 사실과 더불어 분자량 386 및 230인 2종류의 항균성 물질을 분리·정제한 결과를 보고하였다(5). 그후 계속된 연구에서 이들 항균성 물질이 직장암 세포주에 강력한 생육저해 효과를 보임에 따라 다양한 암세포 주에 대한 항암효과를 비롯하여 항변이원성 효과, 기타 각종 생리활성기능을 가진 성분의 규명이 기대되고 있으나, 이전의 연구 결과는 분리된 항균성 물질의 안정성에 문제가 야기되었다.

따라서 본 연구는 키토산과 그 유도체를 개발하고, 자생식물중 항균력이 증명된 도꼬마리 추출물을 이용하여 종자 코팅제로 활용할 수 있는 기술을 개발코자 한다. 또한 항균력이 있는 도꼬마리 추출물의 안정적인 생산과 효율적인 새로운 정제방법을 확립하여 항균효과 및 변이원성, 항변이원성 등 생리활성 효과를 조사코자 한다.

2. 연구개발의 범위

제 1절 종자 코팅제로 이용 가능한 키토산 및 그 유도체의 개발

제 2절 키토산, 올리고당 및 도꼬마리 추출액 처리가 작물 및 야생화 종자 발아에 미치는 영향

제 3절 자생식물 조추출물의 항균효과

제 4절 도꼬마리 내 항균성 물질의 분석

1. 항암, 항균 물질의 분리 및 특성
2. 식물 병원균에 대한 항균성 물질 분리

제 5절 도꼬마리 추출물인 S1의 구조 결정

제 6절 키토산 올리고당 및 도꼬마리 추출물을 이용한 종자 코팅

제 7절 기타 이용법

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 키토산의 이용

키틴, 키토산은 새우, 게 등의 갑각류의 껍질, 갑충의 갑피 등 절족동물의 외골격, 연체동물의 기관, 곰팡이, 효모, 버섯 등 진균류의 세포벽 등에 함유되어 존재한다. 그리고 생체 내에서는 탄수화물과 단백질의 결합된 형태로 존재한다.

키틴이 생물의 외피를 형성하기 때문에 1811년에 프랑스의 식물학자 Braconnot는 야생버섯을 푼 알카리로 가열처리시 불용성물질을 Fungine이라 명명하였다. 1823년 Odier은 곤충의 갑피에서 이와 유사한 물질을 발견하고 그리스어로 Chitin으로 명명하였다.

그러나 키틴은 사람의 소화효소로는 분해되지 않아 어느 정도 식이섬유와 같은 성질을 가지고 있다. 하지만 키틴의 항종양성, 지혈작용, 면역증진효과, 콜레스테롤강화효과, 비피더스균 증식효과에 대해서도 연구가 진행되고 있다. 키틴[chitin, (1->4)-2-acetamino-2-β-D-glucan]은 N-아세틸-D-글루코사민 잔기가 5,000개 이상이 결합한 분자량이 100만 이상의 탄수화물이다. 갑각류, 곤충류, 균류 등에 의해 연간 약 1,000억톤 이상 생산되는 것으로 추산되며, 천연에 존재하는 키틴은 부분적으로 탈아세틸화되어 있는 것이 보통인데 아세틸기가 떨어져 나간 형태의 D-글루코사민이 5,000개 이상이 반복적으로 결합하여 분자량이 100만 이상인 탄수화물을 키토산[chitosan, (1->4)-2-amino-2-doxy-β-D-glucan] 즉 Poly-β-D-glucosamine이라 부른다. 키토산 그 자체로서는 수용액에 쉽게 용해되지 않고 체내 흡수율도 낮은 고분자 물질이다. 그래서 키토산은 초기에는 주로 공업용으로 폐수 응집제로서 이용되었기 때문에 다른 고부가가치의 확충을 목적으로 여러 가지 생리기능성을 연구한 결과 항고혈압성, 항지혈성, 항콜레스테롤 작용, 항암작용, 면역활성 증강작용 및 갈슘흡수촉진작용 등의 매우 우수한 기능성들이 차츰 밝혀지면서 최근에는 건강보조식품과 의약품 분야에서의 이용이 가능한 것으로 밝혀지고 일부 산업화가 이루어지고 있다. 또한 최근에 키틴 키토산 유도체에서 여러 가지 흥미있는 생물활성이 밝혀지고 있어 크게 주목을 받고 있으며, 그 자체가 아미노당이기에 때문에 각종의 기능을 부여하는데 적합한 분자구조를 하고 있어 기능성을 갖고 있을 것으로 기대되었다.

키틴-키토산을 부분 분해하여 인체 흡수가 잘 되도록 만든 것이 키토올리고당이다. 키토올리고당(Chitosan Oligo-Saccharide)은 키토산의 구조를 가지면서 글루코사민 6 단당(단당류)이 2개에서 10개 정도로 결합되어 있는 당을 말한다. 키토산 올리고당은 단량체로서 D-글루코사민을 갖는 키토산이 효소 또는 산에 의해 분해되어 연속적인 결합이 5,000개가 되지 않고 10개 정도로 분해된 것을 말한다. 즉, 올리고당은 여러 가지의 단량체가 10개 정도로 결합된 것을 말하며 그 단량체가 D-글루코사민이면 키토산-올리고당이다.

키토올리고당은 이상한 맛이나 냄새가 없고 수용성이나 미색으로 투명하고 고차 올리고당만이 제대로 효능을 낼 수 있다. 즉 단당, 2당, 3당보다는 4당, 5당, 6당, 7당 등 고차올리고당의 조성이 많은 것이 항암, 항균작용, 면역기능 강화작용 등의 생리기능 활성이 높은 고품질의 원료인 것이다.

키토산의 제조에 관한 연구는 1960년대 이후부터 진행되었다. 키토산 제조에는 수많은 연구자에 의해 개발되었으나(문헌 : 1~2) 주로 Hackman의 방법(문헌 : 3)이 적용되고 있는데. 그 방법은 폐 껍질을 염산으로 탈회하고 100℃의 가성소다 용액 중에서 탈단백처리를 한 후, 세척하여 키틴을 얻는다. 그 다음 키토산의 제조방법도 많은 방법(문헌 : 4~5)이 제안되어 있지만, 주로 이용되는 Mima의 방법(문헌 : 6)은 키틴을 불활성가스 분위기에서 탈아세틸화하는데, 그 반응은 일반적으로 100~120℃의 고농도 알칼리용액중에서 2~6시간 정도 진행시켜 약 90%의 탈아세틸화도를 얻는다. 오세욱 등은 키토산의 항균효과를 알아보기 위한 보고에서 분자량이 다른 3종의 키토산을 이용하여 식중독 유발세균인 *Escherichia coli* O157 : H7과 Gram positive인 *Staphylococcus aureus*, 그리고 candidiasis를 일으키는 균으로 알려진 진균류의 일종인 *Candida albicans*에 대한 항균효과를 분석한 결과 *E.coli* O157:H7와 *S.aureus*에 대해서는 분자량 10,000인 키토산이 가장 강한 항균 활성을 나타내었고, *C.albicans*에 대하여는 6당량체의 키토산-올리고당이 강한 활성을 나타내었다.(문헌 7) 키토산의 첨가농도는 0.1mg/ml 또는 키토산-올리고당의 첨가농도는 chito-hexaose 1mg/ml의 농도에서 강한 항균활성을 나타내었고, 처리시간은 1시간 이내라 하고, 세포막 손상을 측정된 결과 미생물균체중 약 10%에 상당하는 균수가 막손상을 가져왔다는 보고를 한 바 있다. 이현영 등은 120kDa의 키토산 용액을 식빵 반죽에 직접 첨가하여 식빵을 제조하고 식빵의 품질 변화를 측정해 본 결과 반죽의

부피를 크게 할뿐만 아니라 저장기간중 경도변화를 낮게 유지하고 수분 활성이 안정되는 등 품질향상효과를 인정하는 보고를 한 바 있다.(문헌 8) 윤선경 등은 축육소시지의 보존기간을 연장시키기 위한 목적으로 키토산을 이용함에 있어 첨가하는 키토산의 분자량에 따른 향균성 및 보존성의 차이를 검토한 결과 분자량 약 120kDa의 키토산이 가장 강한 향균성을 나타내었다. 120kDa의 키토산을 0.5% 첨가하여 제조한 유화형 소시지를 30℃에 보존하면서 관찰한 결과 7일간 저장하여도 부패되지 않은 사실을 보고한 바 있다.(문헌 9)

따라서 키토산의 항균작용은 키토산의 분자내 아미노기와 분자량에 상당한 관계가 있는 것으로 추정되며 키토산을 항균제로 응용하기 위해서는 탈아세틸화도, 분자량 및 pH 등 제반 인자를 고려하여야 할 것으로 생각한다.

국내 시장의 현황을 살펴보면 키토산.키토산이 시장에 출현한지 15여년이 경과되었지만 제조업체의 영세성, 기술낙후 등으로 품질면에서 많은 문제점과 다양한 용도개발이 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 시장규모는 연간 600톤이고 이중 식품용은 90톤 정도인데 이중 40톤 정도는 일본에서 수입하여 사용하고 있다. 아직 종자코팅용의 시장은 형성되지 않고 있다.

가. 일본의 기술개발

키토산. 키토산의 공업적 생산은 세계에서 일본이 가장 먼저 시작하였다. 일본의 시장 규모는 日本水産(주)이 1968년 게껍질을 이용한 키토산.키토산의 제조공장을 건설한 이래 協和油脂, 共和테크노스, 片倉치카린 등 약 10여개 회사에서 연간 800여톤(1998년 기준)의 키토산.키토산을 생산하고 있다. 이중 대부분은 배수처리용 응집제(약 50%)로 사용되고 항균제(15%), 식품소재(20%), 의료용 재료(6%), 효소 담체(5%) 등으로 이용되고 있다.문헌 10) 종자코팅용 연구개발과 관련된 연구로서 coating종자는 접종 뒤 흙중의 수분 혹은 관수에 의해서 coating층이 흡수하고 1~2개소에 구멍이 생기는 것에 의해 발아가 시작된다. 따라서 이 방법에 의하면 특히 꽃의 미세종자는 발아력이 약하기 때문에 coating층의 작은 구멍 부분에 물이 고여 산소의 공급을 저해하기 때문에 순조로운 발아가 방해되는 경우가 있다. 이를 해결하는 방법으로서 조립제중에 방수제를 혼합분산시켜 조립제로 종자를 coating하는 방법이 개발되었다.(예컨대 日特公昭 38-3469. 日特開昭 54-85908. 日特開昭

69-12905. 日特開平 3-30602. 日特開平 3-94604)(문헌 11-15)등이다. 그러나 이들의 방법은 흡수의 함수량이 적으면 발아불량이 일어나는 경우가 많다. 최근 Japan tobacco사에서는 지방산과 그 염을 포화시킨 용액에 침지하는 방법이 소개되었다.(문헌 16) 또 일본 Yazaki co.에서는 종자를 먼저 alginate로 coating한 후 사용할 때 과산화수소수에 침지하여 사용하는 방법(문헌 17)을 개발하였다.

일본 TS Shokubutsu연구소는 저장성이 좋고 종자를 coating하면 농약 등이 종자에 완만하게 고착되어 수송때나 파종시에 탈락되지 않고 발아에 악영향을 미치지 않은 산화알루미늄이나 2산화규소 등으로 표면 처리된 산화 titanium과 수용성polymer를 함유하는 수용액으로 구성된 coating제를 개발(문헌 18)하였고, 일본 Agri techno yazaki사는 종자 자체가 양분을 가지지 않는 식물 종자 예를 들면 꽃이나 야채 등의 아주 미세한 종자에 진분, 당을 먼저 분의(粉衣)하고 그 주위를 Gel등 coating제에 의해 피복하는 방법도 개발(문헌 19)하였으며, 일본Rontai사는 종자의 coating시 4단계로 하면서 3단계는 점토 등 광물질재료이고 여기에 목초액 또는 목탄을 혼합한 분해성 피막으로 coating하는 방법을 개발하였다.(문헌 20)

나. 미국의 기술개발

미국에서 키틴.키토산은 주로 농업, 화장품, 식품, 의료용, 고정화 및 세포배양 등의 용도에 중점을 두고 710백만달러(1999년도 예측)정도의 시장이 형성된다고 한다.

종자코팅과 관련된 기술을 살펴보면 최근 Struszczyk, et al등은 종자의 껍질에 분자량 1,000이상, 탈아세틸화도 35%이상, 수분함수율 200%에서 5,000%까지의 미정질키토산(Microcrystalline chitosan)으로 0.1~100 μ m의 크기로 coating하는 방법(문헌 21)을 개발하였다. Asano는 종자를 double-chain구조의 점토광물로 종자를 coating한 후 저장한다. 그리고 필요시 파종하는 방법(문헌 22)을 개발하였고, Narayanan은 수용성 $Mn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 를 함유한 종자 coating제(문헌 23)를 발명하였으며, Harms, et al등은 수용성 non-aromatic polyamino acid를 종자표면에 처리하여 발아율을 높이는 방법(문헌 24)을 발명하였다. Huang 등은 젤라틴전분과 가소제(Plasticizer)를 혼합하여 분말 또는 액상으로 장기간 보존이 가능하고 부식을 조절할 수 있으며 발아를 촉진하는 방법(문헌 25)을 개발하였다.

또한 Turnblad, er al등은 종자에 고분자물질로서 polyvinyl acetate, methyl

cellulose, polyvinyl alcohol, vinylidene chloride, acrylic, cellulose, polyvinylpyrrolidone와 polysaccharide중에서 선택하고 살충제로 coating하는 방법(문헌 26)을 개발하였고 Otani, et al등은 종자에 montmorillonite, bentonite 및 수용성 PVA로 coating하는 방법(문헌 27)을 발명하였다. Shors, et al등은 종자를 초음파 처리하여 발아를 촉진하는 방법(문헌 28)을 개발하였고, Barclat, et al등은 종자에 유황 함유-모리브덴 석고물을 coating하는 방법(문헌 29)을 개발하였다.

캐나다 Lavel대학의 M.V.Bhaskara reddy는 밀종자(2종류)에 키토산을 4mg/mL의 농도로 처리한 결과 발아율은 베노밀과 키토산 coating 처리한 군에서 대조군(80%이하)과 비교하여 85%이상으로 효과가 있었으며 seed-borne fusarium graminearum 감염군에서도 대조군과 비교하여 50%이상 감소하였다는 보고를 한 바 있다.

위의 내용으로 보아 본 연구과제와 유사한 과제는 발표되고 있으나 종자를 직접적으로 소독하는 방법은 아직 없고 모두가 취급자의 농약오염, 보관중의 변질, 이송의 안전성문제가 계속되고 특히 종자를 파종직전 종자를 소독하고 사용하는 방법에 대한 약제의 연구와 개발은 아직까지 미진한 상태로서 개발의 여지가 많은 것으로 생각할 수 있다.

2. 종자 소독제의 이용

가. 국내 현황

국내 연구 동향을 살펴보면 목기호는 콩나물 종자를 차아염소산 나트륨과 에틸알콜, 초산등을 혼합한 용액에 콩나물 종자를 침지하는 방법(한특공개1999-078800)를 개발하였고, 홍농종묘에서는 살균제를 1차 분의한 다음 탈크등 점토광물에 식물 홀몬과 식물 영양물질을 혼합한 용액으로 2차 분의하여 건조시키는 종자의 펠렛 coating처리방법(한특공고 제1997-001087)를 개발하였으며, 문제덕은 비열플라즈마 반응장치와 자기활성 정수장치를 혼합한 전자종자처리장치(한특등록 제163345호)를 발명하였다.

한편 벼, 콩, 옥수수등과 채소류, 화훼종자 등을 불량환경에서의 입묘율을 향상시

키기 위하여 N,P,K등 영양제를 혼합한 PEG용액에서 수일간 처리하는 종자Priming 또는 coating기술을 개발하였다는 보고가 있으나 그 내용을 보면 외국의 기존보고와 큰 차이점이 없을 뿐만 아니라 실용적으로 농가에서 직접 실용적으로 사용하기가 불가능한 것이었다.

나. 외국의 현황

1) 일본

일본의 일반적인 농가에서 사용하는 종자소독방법은 우리와 마찬가지로 직접 소독하는 방법으로서 카바메이트계, 디치오카바메이트계, 시아노페놀계통의 약제를 사용한다. 그러나 1982년 벤즈이미다졸(Benzimidazole)계 약제가 벼의 병원균에 대한 내성균 출현이 보고(日本農藥學會誌, 24, p.230-240, 1999)되고 난 뒤 새로운 종자 소독제로 개발된 퍼프라조에이트(Pefurazoate)를 사용한다. 그러나 노동력의 절감 등을 위해 농가에서는 coating종자를 사용하는 인구가 늘고 있는 추세이다. 특히 꽃씨앗은 미세종자가 많다. 베코니아 등 미세 종자에 무기물로 coating하므로 취급이 쉽고 또 plug tray에 의한 기계 파종이 가능해진다.

종자를 조립 coating하는 기술은 이미 알려진 기술이다.

coating종자는 접종 뒤 흙중의 수분 혹은 관수에 의해서 coating층이 흡수하고 1~2개소에 구멍이 생기는 것에 의해 발아가 시작된다. 따라서 이 방법에 의하면 특히 꽃의 미세종자는 발아력이 약하기 때문에 coating층의 작은 구멍 부분에 물이 고여 산소의 공급을 저해하기 때문에 순조로운 발아가 방해되는 경우가 있다. 이를 해결하는 방법으로서 조립제중에 방수제를 혼합분산시켜 조립제로 종자를 coating하는 방법이 개발되었다.(예컨대 日特公昭 38-3469. 日特開昭 54-85908. 日特開昭 69-12905. 日特開平 3-30602. 日特開平 3-94604) 등이다. 그러나 이들의 방법은 흙중의 함수량이 적으면 발아불량이 일어나는 경우가 많다.

최근 Japan tobacco사에서는 지방산과 그 염을 포화시킨 용액에 침지하는 방법이 소개되었다.(日特開平10-017414). 또 일본 Yazaki co.에서는 종자를 먼저 alginate로 coating한 후 사용할 때 과산화수소수에 침지하여 사용하는 방법(日特開平 10-033013)을 개발하였다. 일본 TS Shokubutsu연구소는 저장성이 좋고 종자를

coating하면 농약 등이 종자에 완만하게 고착되어 수송때나 파종시에 탈락되지 않고 발아에 악영향을 미치지 않은 산화알루미늄이나 2산화규소 등으로 표면 처리된 산화 titanium과 수용성 polymer를 함유하는 수용액으로 구성된 coating제를 개발(日特開平 11-146707)하였고, 일본 Agri techno yazaki사는 종자 자체가 양분을 가지지 않는 식물 종자 예를들면 꽃이나 야채 등의 아주 미세한 종자에 전분, 당을 먼저 분의(粉衣)하고 그 주위를 Gel등 coating제에 의해 피복하는 방법도 개발(日特開平 11-155308)하였으며, 일본 Rontai사는 종자의 coating시 4단계로 하면서 3단계는 점토 등 광물질재료이고 여기에 목초액 또는 목탄을 혼합한 분해성 피막으로 coating하는 방법을 개발하였다.(日特開平11-60422)

2) 미국

미국의 종자소독방법은 우리와 유사하다. 다만, 최근 Struszczyk, et al등은 종자의 껍질에 분자량 1,000이상, 탈아세틸화도 35%이상, 수분함수율 200%에서 5,000%까지의 미정질키토산(Microcrystalline chitosan)으로 0.1~100 μ m의 크기로 coating하는 방법(USP5,554,445)을 개발하였다. Asano는 종자를 double-chain구조의 점토광물로 종자를 coating한 후 저장한다. 그리고 필요시 파종하는 방법(USP 5,525,131)을 개발하였고, Narayanan은 수용성 $Mn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 를 함유한 종자 coating제(USP 5,622,003)를 발명하였으며, Harms, et al등은 수용성 non-aromatic polyamino acid를 종자표면에 처리하여 발아율을 높이는 방법(USP 5,661,103)을 발명하였다. Huang, et al등은 젤라틴전분과 가소제(Plasticizer)를 혼합하여 분말 또는 액상으로 장기간 보존이 가능하고 부식을 조절할 수 있으며 발아를 촉진하는 방법(USP5,683,957)을 개발하였다. 또한 Turnblad, et al등은 종자에 고분자물질로서 polyvinyl acetate, methyl cellulose, polyvinyl alcohol, vinylidene chloride, acrylic, cellulose, polyvinylpyrrolidone와 polysaccharide중에서 선택하고 살충제로 coating하는 방법(USP 5,849,320)을 개발하였고 Otani, et al등은 종자에 montmorillonite, bentonite 및 수용성 PVA로 coating하는 방법(USP 5,918,413)을 발명하였다. Shors, et al등은 종자를 초음파 처리하여 발아를 촉진하는 방법(USP 5,950,362)을 개발하였고, Barclat, et al등은 종자에 유황함유-모리브덴 석고물을 coating하는 방법(USP 5,994,265)을 개발하였다. 캐나다 Lavel대학의 M.V.Bhaskara reddy는 밀종자(2종류)

에 키토산을 4mg/mL의 농도로 처리한 결과 발아율은 베노밀과 키토산 coating 처리한 군에서 대조군(80%이하)과 비교하여 85%이상으로 효과가 있었으며 seed-borne fusarium graminearum 감염군에서도 대조군과 비교하여 50%이상 감소하였다는 보고를 한 바 있다.

위의 내용으로 보아 본 연구과제와 유사한 과제는 발표되고 있으나 종자를 직접적으로 소독하는 방법은 아직 없고 모두가 취급자의 농약오염, 보관중의 변질, 이송의 안전성문제가 계속되고 특히 종자를 과중직전 종자를 소독하고 사용하는 방법에 대한 약제의 연구와 개발은 아직까지 미진한 상태로서 개발의 여지가 많은 것으로 생각할 수 있다.

3). 생리활성물질의 이용

식물은 인류에게 매우 유용한 물질을 제공할 뿐만 아니라, 훌륭한 화학공장으로서의 역할을 수행하며 이들에 의해 유래된 복잡하고 독특한 신규생리활성 물질들이 지금까지 20,000개 이상이 밝혀져 왔다. 대부분 이차대사산물인 이들 유용물질들은 의약품, 향신료, 방향제, 색소, 살충제 및 고순도 화학제품 등의 다양한 용도로 사용되고 있으며, 전세계 의약품 시장의 25%을 차지하고, 미국에서만 90억 달러 이상의 판매고 및 매년 1,600개 이상 식물 유래의 신물질이 발견되어왔다. 천연물을 이용한 생명공학분야(BT)의 산업화 정책이 몇몇 지방자치에 의하여 특성화 분야로서 한방 바이오 등의 이름으로 지원함에 따라 학계와 산업계에서 신물질 개발에 대한 관심이 고조되고 있으며, 이에 부응하여 전통적으로 사용되어오던 생약 및 민간 처방약의 약효에 대한 관심도가 높아지고 있다. 실제 동서양을 막론하고 전통 약물은 현대 의학에 사용되고 있는 많은 의약품의 중요한 자원으로 이용되어왔으나, 항세균제의 분야에 있어서는 기존 항세균제의 낮은 생산 경비와 우수한 효과 때문에 상대적으로 연구 실적이 미미한 점이 없지 않았다. 그러나 근래에 들어서 여러 가지 한약재들에 대해서 항세균, 항진균, 항산화 효과가 발표되고 있으며(15, 16, 19), 황백(17), 오미자(10), 대황 및 황련(2) 등이 광범위한 항균성을 나타낸다고 보고되었다. 또한 충치 유발균인 *Streptococcus mutans* 증식억제 효과를 가진 생약제 및 향신료(21), 초피 추출물의 항암효과(7), 심황(turmeric)으로부터 분비된 phenol 화합물의 항암효과(14) 등에 관한 연구가 수행되고 있다. 특히, 국내 토착 약용식물인 도꼬마리(*Xanthium*

strumarium L.)는 자원이 풍부하고 민간요법에서 창이자라 하여 감기, 두통, 류머티스, 관절염, 해열 및 발한 등 각종 질병(20)에 빈번히 응용되고 있는 것으로 보아 항균 및 항암성 물질의 존재가 예상되어진다. 국내의 경우, 다양한 생리활성기능이 있는 도꼬마리로부터 신규물질의 탐색과 응용을 위한 일환으로서 본 연구진에 의해, 도꼬마리 추출물로부터 항균 및 항암성 물질의 분리·정제를 보고한 실정이다(5, 6).

일본에서는 아욱과 식물에서 추출한 엑기스를 올리고당화하여 이용한 식물성장촉진제(日特開平11-071218, 99.03.16)를 개발하였으며 eucalyptus속 식물 기엽의 극성유기용매 추출물을 이용한 항균제를 개발(日特開平11-080012, 99. 03. 23)한 사례도 있다.

한편 박문수의 “영경귀의 Flavonoids에 관한 연구”(1990년도 한국외국어대학교 대학원 화학과 석사학위논문)에 의하면 영경귀는 국화과에 속하는 다년생 초본으로 혈압강화작용, 결핵균의 성장을 억제하는 항균작용이 있으며 국내에 20종이 자생하고 있다고 보고하였다. 또한 MeOH로 추출한 후 CHCl_2 과 n-BuOH로 분획하고 각 분획에 대하여 sephdex LH-20과 silica gel column chromatography를 행한 결과 n-BuOH 가용부로부터 flavonoids화합물인 pectolinarigenin, acetic-6-methoxy-7-O-rutinoside 및 pectolinarigenin-7-O-glucoside, hispidulin-7-O-neohesperidose를 분리하였다고 보고한 바 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절. 종자코팅제로 활용이 가능한 키토산 및 그 유도체 개발

1. 키토산의 항균특성

키토산 및 그 가수분해물이 식물병원성 곰팡이균에 대해 생육저지효과를 나타낸다는 사실은 Kendra 등에 의해 처음 밝혀졌다.(문헌 30) 키토산의 항균작용을 알아보면 99% 이상의 탈아세틸화키토산은 0.1% 범의 농도에서도 *Fusarium solani*, *F.oxysporum*, *F.oxysporum cepae* 등 식물병원균에 대해 항균력을 나타내었으며 항균력은 탈아세틸화도가 높으면 높을수록 우수한 것으로 평가되었다. (문헌 31). 이와 같은 키토산의 항균 효과는 키토산이 곰팡이의 세포 표층부와 반응하여 세포 투과성을 증대시키므로 항곰팡이성을 나타내는 것을 시사하고 있다.

키토산은 세균에 대해서도 항균성을 나타내고, 대장균, *Bacillus subtilis*, *salmonella aureus* 등에 대한 생육최소저지농도(MIC)가 유산균 보다 크다. 이는 키토산내에 존재하는 양이온성 아민기가 세균류의 세포벽에 존재하는 카아복실기 등 산성기와 반응함으로써 나타난다. 키토산-올리고당을 이용한 항균시험에서는 40~50mg 환원당/g 키토산분해물이 키토산보다 높은 항균성을 나타내었으며 3~4당량체 당이 주성분인 분해물보다는 5~6당량체 이상의 당이 항균성이 높은 것으로 알려져 있다. 키토산-올리고당의 항균성은 최소 5당량체 이상에서 나타내는 것으로 추정할 수 있다. 한편, 수용성 키토산유도체인 N-carboxymethyl키토산, N-carboxypropyl키토산 및 trimethyl키토산을 만들고 *Fusarium solani*의 증식에 미치는 영향을 조사한 결과 이들 유도체는 각각 0.033%첨가시 8일만에 N-carboxymethyl키토산, N-carboxypropyl키토산은 *F.solani*의 증식을 억제하였고, trimethyl키토산은 증식을 완전히 저해하는 것을 보고한 바 있다.(문헌 32) 키토산은 천연항균물질로서 토마토, 오이, 딸기, 피망 등에서 수확후 부패를 지연시키는 효과가 있는 것으로 보고되었다.(문헌 33)

2. 종자 coating용 키토산의 개발

종자의 저장시에는 항균필름으로서 종자를 보호하지만 어느 정도 수분과 접촉하면 분해되면서 그 자체가 항균성을 갖는 필름의 개발이 절실하다. 계, 새우 등 갑각류 껍질에서 추출한 키토산. 키토산이지만 그 유도체는 CA(Cheical abstract)에 등록된 것만 53종(문헌 34)이 넘고, 유도체마다 특성과 기능이 다르다. 안준철 등의 연구에 의하면 효소로 가수분해한 키토산-올리고당으로 국내 종묘회사에서 생산하는 배추, 무, 오이, 수박, 참외 등의 종자를 대상으로 키토산-올리고당에 침지(코팅)하여 발아율 등을 조사한 결과, 키토산의 농도가 0.05%와 0.01%에서 효과가 가장 좋았다는 사실을 보고한 바 있다.(문헌 35) 임종환 등은 분자량이 다른 4종류의 키토산을 제조한 다음 필름의 색깔, 수증기투과도, 수분용해도, 인장강도 및 연신율을 측정하여 키토산 필름의 특성에 관한 조사를 한 바 있다.(문헌 36) 김형섭 등은 키토산을 식품분야의 적용가능성을 알아보기 위하여 토마토의 수확후 저장기간의 연장을 위하여 도포제로 키토산의 효과를 과실경도, 유기산, pH, 유리당 등에 대한 종합적인 검토 결과 2%-키토산 도포구에서 저장기간을 2배 정도 연장이 가능함을 확인하였다.(문헌 37) 현재까지 키토산-올리고당을 생산하기 위하여 *Bacillus* sp., *Penicillium* sp., *Pseudomonas* sp., *DStreptomyces griceus* 등 다양한 chitosanase가 개발되어 시판되기도 하나 경제적인 측면에서는 한계가 있다.

본 연구에서 사용하고자 하는 항균 필름의 조제는 키토산과 키토산-올리고당을 사용하였다. 이들 키토산 및 그 유도체는 이미 상당한 수준의 연구를 진행하여 특허를 등록(문헌 38)한 바 있는 아실화도 0.5 정도의 N-아실키토산을 사용하였다. 그 이유는 N-아실키토산의 제조공정이 비교적 간단하고 필름화가 용이하며 특히 N-아실화체가 항균력이 우수하다는 것은 이미 밝혀진(문헌 39)바 있다. 또한 키토산의 아실화도가 0.5를 넘으면 수용성 유도체가 어렵기 때문이다.

3. 키토산과 그 유도체 및 키토산-올리고당의 제조 및 기능

가. 재료

키토산 및 키토산-올리고당의 제조 및 기능을 알아보기 위하여 필요한 키토산 강원도 속초시 소재 동보교역에서 생산된 키토산 후레이크(3~15mm 크기)를 실험재료로 사용하였다.

나. 실험장치 및 방법

키토산의 탈아세틸화 반응은 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 질소분위기에서 수행하였다. 소정의 NaOH용액을 반응기에 넣고 질소를 약 50cc/min으로 흘리면서 원하는 온도로 조절하였다. 일정온도에 도달하면 질소의 유량을 약 300cc/min으로 하였다. 원하는 반응시간에서 냉각시켜 세척 · 건조한 다음, 탈아세틸화도 및 점도측정을 위한 시료로 하였다.

키토산-올리고당을 제조하기 위한 효소는 한국과학기술원 유전공학 연구소에 제 KCTC 0139BP호로 기탁된 *aspergillus fumigatus* KB-1균주를 사용하였다. 동 균주를 배양하기 위한 배지는 한국특허청등록번호 특0140430호에 따라 제조한 배지를 온도 20~30℃에서 70~150rpm에서 3~6일간 진탕 배양하였다.

키토산-올리고당을 생산하는 방법중 상기 균사체와 키토산의 반응은 온도 50~60℃, pH 4.0~5.0에서 반응시간 10~60분간 반응시키는 방법을 채택하였으며, 이때 키토산의 농도는 5중량%였다.

아실화 키토산의 제조방법은 용해성과 안전성을 고려하여 무수(無水)유기산을 사용하지 않은 대신 중점도의 키토산을 초산에 용해한 후 온도 50~60℃의 항온조에서 가열 반응하므로 치환도 0.2~0.5정도의 아실화키토산을 제조하였다.

다. 탈아세틸화도 측정

탈아세틸화도(degree of acetylation)는 콜로이드 적정법(문헌 40)에 의해 계산하였다. 건조한 시료 0.5g을 5v/v% 초산에 녹여 정확히 100ml로 하였다. 이 키토산초산 용액 1ml를 200ml 삼각후라스크에 취하여 이에 물 30ml를 가하면서 교반한 다음 지시약으로 toluidine blue 2~3방울을 떨어뜨린 후 N/400PVSK(polyvinyl sulfatate K Salt)용액으로 적정하여 다음 식으로 계산하였다.

$$DA(\%) = X/161 / (X/161 + Y/203) \times 100$$

$$X = 1/400 \times 1/1,000 \times f \times 161 \times v$$

$$Y = 0.5 \times 1/100 - x$$

v : 0.0025N-폴리비닐황산칼륨용액 소비량(ml)

f : 0.0025N-폴리비닐황산칼륨용액 규정도계수

라. 분자량 측정

탈아세틸화 후의 분자량은 점도를 측정하여 추정하였다. 키토산 분말 0.2g을 0.2M acetic acid-0.1M NaCl-4M urea용액 50cc에 용해시켜 0.4%(w/v)용액을 제조하였다. 이 용액을 앞의 0.2M acetic acid용액을 사용하여 1/2농도로 희석하였다. 각 용액에 대하여 Ubbelohde점도계로 점도를 측정하여 절대점도(고유점도)를 계산하고 다음 식에 의해 분자량을 추정하였다. 여기서 사용한 정수, K와 α 는 Lee(문헌 41)가 결정한 값 즉 8.93×10^{-4} 과 0.71을 사용하였다.

$$(\eta) = K \cdot M^{\alpha}$$

(η) : 절대 점도(고유점도)

K : 정수 M : 분자량

α : 정수

마. 키토산-올리고당의 분석

얻어진 키토산-올리고당의 분석은 겔-투과 크로마토그래피(gel permeation chromatography: GPC)를 이용하여 구하였으며 그 측정조건은 다음과 같다.

column : Asahi Pack GFA-30F

solvent : acetonitrile : H₂O(65 : 35)

Flow rate : 1.0ml/min

Temp : 50℃.

Detector : RI detector

standard : pullulan standard

바. N-아실키토산의 아실화도 분석

얻어진 N-아실키토산의 아실화도 분석은 SANSHO SEIYAKU Co에서 제안한 일본특허청 공개번호1995-196468호에 의하여 탈아세틸화도, 전질소비 등의 분석결과

를 토대로 계산하였다.

사. 수증기 투과도

필름의 수증기투과도(Water vapor permeability;WVP)는 25℃와 50% RH구배하에서 측정하였다.(문헌 42) 즉 투습컵을 사용하여 상부까지 약 1cm의 공간이 생기도록 약 18ml의 증류수를 넣고, 수증기투과도 측정용 필름을 투습컵의 입구(지름 4.6cm)에 밀착시켜 밀봉한 후 무게를 측정하여 25℃와 50%RH로 조절되고 198m/min의 속도로 공기가 순환되는 향온항습기(model FX 1077, (주)제이오텍, korea)에 넣고 8시간 동안 1시간 간격으로 투습컵의 무게를 0.0001g의 정밀도로 측정하였다. 시간변화에 따른 무게 감소값으로 부터 필름의 투습율(water vapor transmission rate)를 구한 후, 다음 식에 따라 수증기 투과도를 결정하였다.

$$WVP = (WVTR \times L)/\Delta p$$

여기서 WVTR : 필름의 투습율* $g/m^2.s$)

L : 필름의 평균두께(m)

Δp : 필름양쪽의 수증기압차(Pa)

이 때 필름하부의 수증기압은 필름의 하부와 증류수의 표면사이에 있는 공기의 저항에 의한 영향을 McHugh 등(문헌 43)과 Gennadios 등(문헌 44)의 방법에 따라 보정하였다.

아. 수분용해도

필름의 수분용해도(water solubility : WS) 는 Rhim 등(문헌 42)의 방법에 따라 측정하였다. 먼저 수분용해도측정용 필름 3매를 취하여 105℃의 건조기에서 24시간 건조하여 초기의 건물함량을 측정하고, 수분용해도 측정용 필름 3매를 따로 취하여 50ml용량의 비이커에 증류수 약 30ml와 함께 넣고 입구를 parafilm으로 밀봉한 후 25℃의 정온기에 넣고 가끔 흔들어 주면서 24시간 동안 저장하였다. 24시간 후에 물에 용해되지 않은 필름을 꺼내어 105℃의 건조기에서 24시간 동안 건조시켜 건물함량을 측정하였다. 필름의 용해도는 초기 건물에 대한 물에 용해된 양의 백분율로 나

타낸다.

자. 인장강도와 연신율

필름의 인장강도(Tensile strength : TS)와 연신율(Elongation at break : E)은 Instron universal testing machine(Model 4465, Instron corp., Canton, MA, USA)을 사용하여 측정하였다. 이 때 초기의 grip간의 거리는 5cm이고, cross-head의 속도는 500mm/min의 표준방법을 사용하였다.

4. 결과 및 고찰

가. 키토산의 제조시 반응시간 및 온도의 영향

구입한 키틴을 사용하여 진한 농도의 NaOH수용액중에서의 탈아세틸화반응에 의해 키토산을 제조하였다. 예비실험결과 test 1과 test 2는 알카리 농도 40% 이하이고, 반응시간이 2시간에 지나지 않아 점도를 측정할 수 없을 뿐만 아니라 탈아세틸화도가 40% 이하이므로 test 3이하의 실험에서는 NaOH 농도 48%, 반응온도 110°C에서 반응시간의 변화에 따른 탈아세틸화도와 점도를 조사하여 표. 2에 나타내었다.

키토산의 특성은 표 1-1에서 나타난 바와 같이 반응시간이 길어짐에 따라 또 반응온도가 증가함에 따라 탈아세틸화($-NHCOCH_3 \rightarrow -NH_2$)는 쉽게 진행되지만 분자량은 크게 감소함을 알 수 있었다. 이는 고온의 고농도 알칼리용액 중에서 키토산이 분해되기 때문으로 생각할 수 있었다. 키토산의 탈아세틸화도는 같은 반응시간에서 반응온도의 증가와 함께 크게 증가하였는데, 탈아세틸화도가 약 80%이상 되려면 110°C에서는 4시간 이상의 반응시간이 필요로 하고, 키토산의 분자량은 반응온도가 증가함에 따라 크게 감소하는 경향을 보였다. 탈아세틸화도가 100%에 도달하려면 NaOH농도 48%에서 110°C 8시간의 반응시간이 필요로 함을 알 수 있었다. 이 때 생산된 키토산의 점도는 350cps였다. 본 연구결과로부터 키토산의 응용분야를 확대함에 있어 최대의 효과를 갖는 키틴과 키토산, 다양한 분자량과 탈아세틸화도를 갖는 규격화된 키토산 및 그 유도체를 생산할 수 있는 각종 조건을 제시할 수 있다.

Table 1-1. Chitosan characteristics according to alkali concentration, reaction time and change of temperature.

	Time (hr)	Temperature (°C)	Alkali concentration(%)	D.A (%)	Viscosity (cps)
test 1	1	110	30	35	-
test 2	2	110	40	40	-
test 3	3	110	48	65	880
test 4	4	110	48	80	700
test 5	5	110	48	90	600
test 6	6	110	48	95	550
test 7	7	110	48	98	450
test 8	8	110	48	100	350

나. 키토산-올리고당의 제조

키토산-올리고당의 제조는 교반기를 부착한 4구후라스크에 온도계를 설치하여 멘틀히터로 온도를 40~90°C로 가변이 가능하도록 조립하였다.

저분자형 키토산 즉 10cps의 점도를 가진 키토산을 유기산에 용해한 후 *aspergillus fumigatus* 변이균(KCTC 0139BP호)을 투입하여 온도 60°C, pH 4.0~5.0의 범위에서 효소반응을 행하여 키토산-올리고당을 생산하였다. 이를 여과한 후 동결건조하여 보관하였다. 이 동결 건조물을 이온크로마토그래피로 분리, 정제하였다. 즉 상기 분해물 3g을 이온교환수지(Dowax 50WH⁺ form 1.8x50cm)에 흡착시킨 다음 염산으로 순차적으로 용출하였다. 이 용출물을 HPLC로 검사한 결과는 그림 1-1과 같다. 이 그림에서 보면 제조된 키토산-올리고당은 5~7당량체가 50%를 상회함으로 5~7당이 중심당임을 확인할 수 있고, 또한 본 연구에 적합한 키토산-올리고당임을 확인하였다.

이 결과로부터 키토산-올리고당의 제조는 산-가수분해법에 비해 고중합도의 올리고당을 생산할 수 있다는 사실을 확인할 수 있었다.

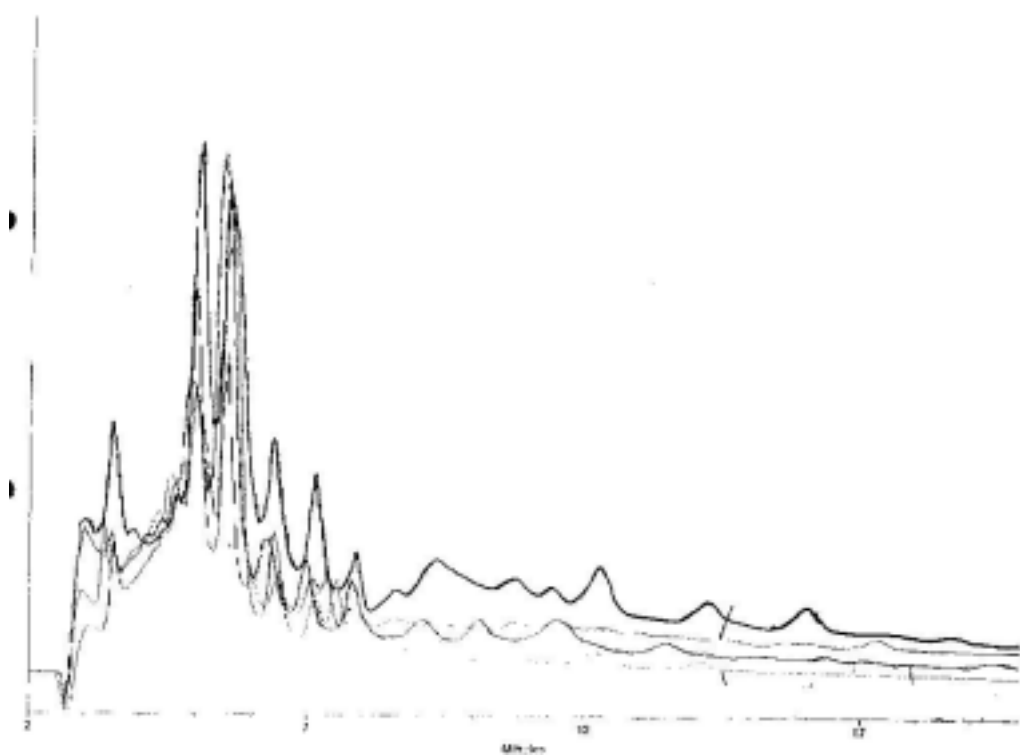


Fig. 1-1. HPLC analysis data of chitosan-oligosaccharide

다. N-아실키토산의 제조

항균력을 확보하기 위한 키토산의 아실화 반응은 교반기를 부착한 4구후라스크에 온도계를 설치하여 멘틀히터로 온도를 40~90℃로 가변이 가능하도록 조립하였다. 중분자형 키토산 즉 400cps의 점도를 가진 키토산을 초산에 용해하여 반응기에 투입한 후 온도 50℃, pH 4.0~5.0의 범위에서 아실화반응을 실시하여 아실화 키토산을 생산하였다. 이 때 제조된 N-아실화키토산의 치환도는 0.4이었다.

라. 키토산 및 그 유도체 필름의 제조와 그 필름의 항균력 시험

사용하는 키토산 및 그 유도체 필름의 성질과 항균력을 알아보기 위하여 위에서 제조된 N-아실키토산 수용액 100 ml을 whatman No.4를 이용하여 여과, 불용분을 제거한 다음 이 용액에 비이온계 계면활성제인 tween 80(polyoxyethylenesorbitan monooleate) 1 ml를 혼합한 다음 기계적으로 균질화하였다. 이 용액을 탈포한 다음 유리판 위에 도포하여 필름을 조제하였다. 이 필름은 실온에서 3일간 건조한 다음, 60℃에서 24시간 건조시켜 실험용 필름으로 사용하였다. 이 실험은 4회 반복하였다. 이 필름을 한국원사직물시험연구원에 항균시험을 의뢰한 결과는 아래 표 1-2와 같다. 이 결과로부터 N-아실키토산 필름의 항균력은 99.8% 이상을 나타내었으므로 항균력은 우수한 것으로 판단되었다. 따라서 본 연구에 사용하는 N-아실키토산은 필름의 형성, 제조공정 등을 감안하여 시료 #3(450cps)을 사용하기로 하였다.

Table 1-2. Antibiosis of N-acylchitosan film

	#1 (600cps)	#2 (550cps)	#3 (450cps)	#4 (350cps)	대조군
초기균수	1.6 x 10 ⁵	1.6 x 10 ⁵	1.6 x 10 ⁵	1.6 x 10 ⁵	1.6 x 10 ⁵
24시간수	1.6 x 10 ⁴	<10	<10	<10	7.4 x 10 ⁶
감소율	99.8	99.9	99.9	99.9	

참고 *1) 접종균 농도 1.6±0.1 x 10⁵/ml

*2) 시험조건 : 시험균액을 35±1℃에서 24시간 진탕 배양한 후 균수 측정

*3) 사용공시균주 : Staphylococcus aureus ATCC 6538

마. N-아실키토산과 혼합필름의 제조

종자 코팅용 키토산 및 그 유도체 필름의 성질을 알아보기 위하여 2% N-아실키토산 용액에 1%의 키토산-올리고당을 혼합한 용액, 또 2%N-아실키토산과 1% 키토산-올리고당 혼합용액에 자생식물인 도꼬마리 추출액을 1% 혼합하는 등 3종류의 필름(표 1-3)을 제조하였다.

필름의 제조방법은 위 N-아실키토산 단독 필름의 제조방법과 같이 하였다.

Table 1-3. Mixing rate of film

시료번호	N-아실키토산	키토산-올리고당	도꼬마리추출액	비고
#3-1	o			
#3-2	o	o		
#3-3	o	o	o	

바. 수증기투과도와 수분용해도

필름의 수증기투과도(WVP)는 표 1-4에 나타낸 바와 같이 $2.5 \sim 2.8 \times 10^{-9}$ 으로 N-아실키토산의 종류에 따라 큰 차이를 나타내지는 않았다. N-아실키토산 필름의 수분용해도(WS)는 점도가 높을수록 필름의 수분함량은 낮은 것으로 나타났다. 이 결과로부터 필름의 수증기투과도는 수분용해도와 상관관계가 없는 특성을 가지며 키토산의 분자량도 필름의 수분용해도와 상관관계가 없는 것을 알수 있다.

Table 1-4. Water solubility and water vapor permeability of film

시료	WVP ($\times 10^{-9}$ g.m/m ² .s.Pa)	WS(%)	비고
#3-1	2.5±0.15	17.5±0.1	N-아실키토산 단독필름
#3-2	2.7±0.08	18.5±0.2	N-아실키토산 + 키토산-올리고당 혼합필름
#3-3	2.8±0.25	16.5±0.2	N-아실키토산 + 키토산-올리고당 + 도꼬마리추출액 혼합필름

참고 : 본 연구에 사용한 시료는 키토산의 DA값이 90%이상의 것을 사용하였음.

사. 인장강도와 연신율

제조된 N-아실키토산 필름의 특성을 표 에서 보면, 인장강도는 0.6~1.2MPa 로 다소 낮은 값이었으며, 점도가 높을수록 낮은 인장강도를 나타내었다. 연신율은 12.5~16.5%로 다소 높은 값을 나타내었고, 점도가 낮을수록 연신율도 높은 값을 나타내었다. 일반적으로 연신율은 필름의 인장강도와 반비례하는 것으로 알려져 있으나 N-아실키토산의 경우 다소 특이한 결과(표 1-5)를 나타내었다.

Table 1-5 Characteristics of chitosan film.

시료	Thickness(μm)	TS(MPa)	E(%)	비고
#3-1	33.5 \pm 2.1	0.6 \pm 0.1	12.5 \pm 1.0	N-아실키토산 단독필름
#3-2	35.5 \pm 1.8	0.7 \pm 1.5	13.0 \pm 1.2	N-아실키토산 + 키토산 -올리고당 혼합필름
#3-3	37.5 \pm 0.8	0.9 \pm 1.2	14.5 \pm 0.7	N-아실키토산 + 키토산 -올리고당 + 도꼬마리 추출액 혼합필름

5. 요약

종자의 코팅은 우량종자의 품질 향상, 장기 저장으로 부가가치의 상승, 기계화 파종으로 인한 노동력의 절감, 유묘시 병충해의 효율적 방제 등에 효과적이다.

외국의 종자 코팅기술은 상당한 수준에 도달되어 상업적으로 널리 보급된 기술이지만 우리의 현실은 외국과 많은 격차를 나타내고 있는 것이 현실이다.

지금까지 알려진 종자의 코팅방법은 종자 표면에 병원성 미생물의 오염과 예방을 위한 살균제의 1차 코팅과 피막(被膜)의 두께를 유지시키기 위한 광물질 재료, 착색용 염료나 안료, 식물의 발아와 성장을 촉진시키는 발아생장촉진제 및 이들 유효성분을 종자표면에 유지시키기 위한 피막형성제를 피막하는 2차 코팅제로 구성되어 있다. 또 필요에 따라 장기 저장시 수분흡수로 인한 코팅제의 탈락을 방지하기 위하여 발수제로 3차 코팅하는 방법을 택할 수 있다. 또한 경제성을 고려하면 종자의 종류

에 따라 여러 가지 유효성분의 적정 농도를 구하여 조절하는 것은 극히 곤란하다. 특히 살균제는 병원균뿐만 아니고 고농도 상태에서는 식물의 기형을 발생할 위험이 있으며, 또 식물의 발아 생장에 유효한 토양미생물 살균의 우려가 있기 때문에 적용할 수 있는 종자나 토양에 대한 개별적인 대응이 필요하다. 또 분말의 살균제를 입자가 작은 종자 표면에 일정한 비율로 부착시키는 것은 쉽지 않는 작업이다. 또 코팅제로 사용하는 합성 살균제는 작업장 근로자의 건강을 해칠 우려도 있으며 토양에 잔류시 장기간에 걸쳐 오염을 진행시켜 연작피해의 원인이 되기도 하였다.

본 연구에서는 상기 문제점을 해결하고 피막중 유효성분을 적당한 비율로 균등하게 코팅을 할 수 있으며, 취급상 위험성이 없고 환경오염이 없는 코팅종자를 개발하기 위하여 먼저 정부가 지정한 친환경자재중 하나인 키토산 및 그 유도체를 제1의 분해성 피막제로 코팅하였다. 다음, 기계적인 파종을 쉽게 하기 위하여 제1피막형성제로 코팅한 코팅종자에 2차로 맥반석, 송이석 등 광물질 재료를 혼합한 분해성 재료를 사용하여 제2의 분해성 피막제로 코팅하였다. 피막형성제는 PVA, 아라비아검, 등 분해성 물질을 이용할 수 있다. 마지막으로 발수코팅제는 불소화합물 등을 사용하였다.

이와 같은 기술은 농약을 사용하지 않은 종자 코팅제의 개발로 종자회사에서는 친환경적인 종자를 생산 저장, 판매할 수 있게 되고 농가에서는 기계파종으로 인한 노동력 절감과 무독성 종자를 직접 이용할 수 있게 된다.

본 연구에서는 종자표면에 피막을 형성하도록 하는 1차코팅제로 천연자원물질이면서 친환경자재인 키토산과 그 유도체를 살균제 등 농약대용품으로 사용이 가능한지의 여부를 판단하기 위한 연구 결과를 정리하면 다음과 같이 요약할 수 있다.

가. 키토산의 제조시 반응시간 및 온도의 영향을 알아보기 위하여 시중에서 구입한 홍게키토산을 진한 농도의 NaOH수용액중에서의 탈아세틸화반응에 의해 키토산을 제조하였다. 이 결과로부터 반응시간이 길어짐과 동시에 반응온도가 증가함에 따라 탈아세틸화(-NHCOCH₃ →-NH₂)는 쉽게 진행되지만 분자량은 크게 감소함을 알 수 있었다. 이는 고온의 고농도 알칼리용액중에서 키토산이 분해되기 때문으로 생각할 수 있었다.

키토산의 탈아세틸화도는 같은 반응시간에서 반응온도의 증가와 함께 크게 증

가하였는데, 탈아세틸화도가 약 80% 이상이 되려면 110℃에서는 4시간 이상의 반응시간이 필요로 하고, 키토산의 분자량은 반응온도가 증가함에 따라 크게 감소하는 경향을 보였다. 탈아세틸화도가 100%에 도달하려면 NaOH농도 48%에서 110℃ 8시간의 반응시간이 필요로 함을 알 수 있었다. 이 때 생산된 키토산의 점도는 350cps였다.

이 결과로부터 키토산의 응용분야를 확대함에 있어 최대의 효과를 갖는 키틴과 키토산, 다양한 분자량과 탈아세틸화도를 갖는 규격화된 키토산 및 그 유도체를 생산할 수 있는 각종 조건을 제시할 수 있었다.

나. 종자의 발아율 향상과 발아소요기간의 단축, 초기생육 촉진 효과를 기대하기 위하여 wuj분자화된 키토산 즉 키토산-올리고당의 제조방법으로 교반기를 부착한 4구후라스크에 온도계를 설치하여 멘틀히터로 온도를 40~90℃로 가변이 가능하도록 조립하였다.

저분자형 키토산 즉 10cps의 점도를 가진 키토산을 유기산에 용해한 후 *aspergillus fumigatus* 변이균(KCTC 0139BP호)을 투입하여 찾아 온도 60℃, pH 4.0~5.0의 범위에서 효소반응을 행하여 키토산-올리고당을 생산하였다. 이를 여과한 후 동결건조하여 보관하였다.

이 동결 건조물을 이온크로마토그래피로 분리, 정제하였다. 즉 상기 분해물 3g을 이온교환수지(Dowax 50WH⁺ form 1.8x50cm)에 흡착시킨 다음 염산으로 순차적으로 용출하였다. 이 용출물을 HPLC로 검사한 결과는 그림 와 같다. 이 그림에서 보면 제조된 키토산-올리고당은 5~7당량체가 50%를 상회함으로 5~7당이 중심당임을 확인할 수 있고, 또한 본 연구에 적합한 키토산-올리고당임을 확인하였다.

이 결과로부터 키토산-올리고당의 제조는 산-가수분해법과 비교하여 고중합도의 올리고당을 생산할 수 있다는 사실을 확인할 수 있었다.

다. 키토산의 항균력 강화를 위한 방법의 일환으로 키토산 유도체의 제조방법을 검토하기 위하여 키토산의 아실화반응을 검토하였다. 아실화 반응은 교반기를 부착한 4구후라스크에 온도계를 설치하여 멘틀히터로 온도를 40~90℃로 가변이 가

능하도록 조립하였다.

400cps의 점도를 가진 중분자형 키토산을 초산에 용해하여 반응기에 투입한 후 온도 50℃, pH 4.0~5.0의 범위에서 아실화반응을 실시하여 아실화 키토산을 생산하였다. 이 결과로부터 무수 유기산을 사용한 경우 아실화 반응은 촉진되었으나 비수용성으로 사용에 제한을 받기 때문에 중자코팅용으로는 부적합하다는 결론을 얻고 경제적인 방법을 검토한 결과 키토산의 유기산 용해시 가열반응에 의해 간단하게 아실화 치환도 0.4이하로 수용성 키토산을 생산할 수 있었다. 이때 제조된 N-아실화키토산의 치환도는 0.4이었다.

라. 키토산 및 그 유도체 필름을 제조하고 제조된 필름의 항균력을 알아보기 위하여 먼저 치환도 0.4의 N-아실키토산 수용액 100 ml을 whatman No.4를 이용하여 여과. 불용분을 제거한 다음 이 용액에 비이온계 계면활성제인 tween 80(polyoxyethylenesorbitan monooleate) 1 ml를 혼합한 다음 기계적으로 균질화하였다. 이 용액을 탈포한 다음 유리판 위에 도포하여 필름을 조제하였다. 이 필름은 실온에서 3일간 건조한 다음, 60℃에서 24시간 건조시켜 실험용 필름으로 사용하였다. 이 실험은 4회 반복하였다. 이 필름을 항균시험 결과는 항균력은 99.8% 이상으로 항균력은 우수한 것으로 판단되었다. 따라서 본 연구에 사용하는 N-아실키토산은 필름의 형성, 제조공정 등을 감안하여 시료 #3(450cps)을 사용하기로 결정하였다.

마. 병원성 미생물의 종류에 따라 항균력이 다소 미흡한 N-아실키토산을 보완하기 위하여 2% N-아실키토산 용액에 1%의 키토산-올리고당을 혼합한 용액, 또 2%N-아실키토산과 1% 키토산-올리고당 혼합용액에 자생식물인 도꼬마리 추출액을 1% 혼합하는 등 3종류의 필름을 제조하였다.

바. 제조된 혼합필름의 수증기투과도와 수분용해도를 측정한 결과 $2.5 \sim 2.8 \times 10^{-9}$ 으로 N-아실키토산의 종류에 따라 큰 차이를 나타내지는 않았으나 N-아실키토산 필름의 수분용해도(WS)는 점도가 높을수록 필름의 수분함량은 낮은 것으로 나타났다.

이 결과로부터 필름의 수증기투과도는 수분용해도와 상관관계가 없는 특성을 가지며 키토산의 분자량도 필름의 수분용해도와 상관관계가 없는 것을 나타내고 있다.

사. 제조된 혼합필름의 인장강도와 연신율을 측정된 결과 혼합필름의 인장강도는 0.6에서 0.9MPa로 다소 낮은 값을 나타내고 점도가 높을수록 인장강도는 낮음을 알 수 있었다.

연신율은 12.5에서 16.5%로 다소 높은 값을 나타내었고, 점도가 낮을수록 연신율도 높은 값을 나타내었다. 일반적으로 연신율은 필름의 인장강도와 반비례하는 것으로 알려져 있으나 N-아실키토산의 경우 다소 특이한 결과를 나타내었다. 그러나 종자코팅용으로는 사용이 가능함을 알 수 있었다.

제 2절 자생식물 조추출물의 항균효과

1. 서론

종자의 발아율을 높이는 것은 성장시 양분흡수의 균형을 맞추어 식물체를 건강하게 하고, 생육을 향상시키며, 고품질의 농산물을 다수확할 수 있고, 내병성을 높여 주기 때문에 대단히 중요하다.

자생식물의 생리활성분야의 국내 연구를 살펴보면 강시현은 Jasmonic acid(이하 "JA"라 하였다)의 Elicitation 관련 Mechanism을 밝히기 위해 Model system으로 고추의 JA 100 μ m을 가했을 때 배양액으로 capsidiol이 유리됨을 관찰하였고, 윤희정은 elicitation의 작용기전 연구에서 model system으로서 꿀풀과(Labiatae) 식물인 황금(*Scutellaria baicalensis*)을 선택하여 elicitation에 의한 phytoalexin의 생성과 그 기전을 연구한 결과 황금 세포에 대한 elicitor 선정을 위해 yeast extracts(YE)와 chitosan을 사용하였으며 현탁 배양세포를 elicitation시킨 후 세포와 배지의 추출물을 분석하여 배지에 elicitation 전에 비해 증가하는 성분들이 있음을 확인하였고 분자량 10,000 이상의 YE분획이 가장 강한 작용을 나타낸다고 보고하였다.

일본에서는 아욱과 식물에서 추출한 엑기스를 올리고당화하여 이용한 식물성장촉진제(日特開平11-071218, 99.03.16)를 개발하였으며 eucalyptus속 식물 잎과 가지의 극성유기용매 추출물을 이용한 항균제를 개발(日特開平11-080012, 99. 03. 23)한 사례도 있다.

한편 박문수의 "영경귀의 Flavonoids에 관한 연구"(1990년도 한국외국어대학교 대학원 화학과 석사학위논문)에 의하면 영경귀는 국화과에 속하는 다년생 초본으로 혈압강화작용, 결핵균의 생장을 억제하는 항균작용이 있으며 국내에 20종이 자생하고 있다고 보고하였다. 또한 MeOH로 추출한 후 CHCl₂ 과 n-BuOH로 분획하고 각 분획에 대하여 sephdex LH-20과 silica gel column chromatography를 행한 결과 n-BuOH가용부로부터 flavonoids 화합물인 pectolinarigenin, acetic-6-methoxy-7-O-rutinoside 및 pectolinarigenin-7-O-glucoside, hispidulin-7-O-neohesperidose를 분리하였다고 보고한 바 있다.

용담과 식물의 추출물을 이용하여 백선균, 열대피부병 및 일반 곰팡이의 치료에 효과적인 항곰팡이 제제를 합성한 사례도 있다(USP 5,760,052호. 98. 06. 02).

또한 용담(*Gentiana scabra Bunge*)은 뿌리에 고미배당체인 gentiopicrin과 삼당체인 gentianose를 함유하고 있어 쓰고(苦) 차며(寒) 무독(無毒)하고 뿌리는 건위, 부인병 등에 효과가 있으며 특히 여성의 '밑' 가려울 땐 용담을 사용하였다고 하였다.

2. 용담, 엉겅퀴 추출물의 항균 효과

가. 실험재료 및 연구방법

1) 실험재료

대구광역시 소재 약령시로부터 건조된 시료, 자생식물인 용담(*Gentiana scabra*)과 엉겅퀴(*Cirsium japonicum*, 중국산)를 구입하였으며(표 2-1), 한국산 엉겅퀴는 공동 연구자의 시험재배중인 시료를 사용하였다.

Table 2-1. Various sample used in this study.

Samples	Amount (g)
<i>Gentiana scabra</i> (root) - No.1	200
<i>Cirsium japonicum</i> (Domestic; stem · leaf) - No.2	200
<i>Cirsium japonicum</i> (China-made; root) - No.3	200

2) 시료 추출법

각 시료 200 g에 메탄올 500 ml을 첨가하여 3일간 방치 후, 여과 및 농축하여 메탄올 추출분으로 사용하였으며, 메탄올 추출 후 동량의 에테르를 첨가하여 3일간 방치 후, 추출 농축하여 에테르 추출분으로 사용하였다.

3) 항균력 측정

각 추출액의 항균력은 agar diffusion법을 사용하였으며, 각 농축액을 적량의 추출용매에 농도별로 용해 후 paper disc에 20 µl씩 첨가하여 건조한 다음 시험균이 함유된 plate에 얹고 28°C(효모, 곰팡이) 및 37°C(세균)에서 24시간 배양하여 항균력을 비교하였다.

4) 시험균주

항균시험에 사용한 공시균주는 세균과 효모를 포함하여 14균주와 식물 병해균 11균주를 사용하였다.

나. 연구내용 및 고찰

1) 시료의 유기용매 추출

각 시료의 유기용매 추출결과 표 2-2에서 보는 바와 같이 극성물질(메탄올 추출) 및 비극성 물질(에테르 추출)을 얻었으며, 이들 물질을 이용하여 항균효과를 검토하였다.

Table 2-2. Extract of each sample using methanol and ether.

Extract solvent	Samples (No.)	Extract (g)
Methanol	1	0.462
	2	0.088
	3	0.047
Ether	1	0.037
	2	0.005
	3	0.017

2) 항균효과

Table 2-3. Antimicrobial spectrum of ether extract by Korean *Cirsium japonicum*.

Test strains	Addition	
	(200 µg/20 µl)	(50 µ/20 µl)
I. Bacteria		
<i>E. coli</i>	+ (8 mm)	± (6 mm)
<i>S. aureus</i>	+ (7 mm)	± (6 mm)
<i>B. thermoglycosidis</i>	-	-
<i>B. circulans</i>	-	-
<i>B. licheniformis</i>	-	-
<i>B. megaterium</i>	-	-
<i>S. zooepidermicus</i>	-	-
<i>S. equii</i>	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-
<i>P. fluorescens</i>	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-
<i>S. paratyphi</i>	-	-
II. Yeast		
<i>S. cerevisiae</i>	-	-
<i>H. anomala</i>	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-
<i>C. neoformans</i>	-	-

추출시료 중 메탄올 추출물의 경우, 0.5~200 µg첨가시에도 항균효과를 보이지 않았으며, 에테르 추출물의 경우 표 2-3에서 보는 바와 같이 시료 No. 2 (*Cirsium japonicum*, 한국산)에서 세균에 대해 항균력을 보였다.

3) 식물병원균에 대한 항균효과

각 추출시료의 식물 병원균(11종류)을 대상으로 항균력을 측정한 결과, 메탄올 추출물은 항균효과를 보이지 않았으며, 에테르 추출물인 No. 2의 경우 200 µg/20 µl

첨가시 표 2-4에서 보는 바와 같이 *Sclerotinia sclerotiorum* (수박 균핵병균)에서 항균효과를 나타내었다. 이들 결과는 사용시료의 성분 중 항균력을 보이는 물질이 존재하였다고 예상되며, 이들 물질의 정제도에 따라 다소 강한 항균효과와 넓은 항균 spectrum이 나타날 것으로 사료되었다.

Table 2-4. Antifungal spectrum on plant pathogens by ether extract of Korean *Cirsium japonicum*.

Test strains	Addition (200 µg/20 µl)
<i>Phytophthora capsici</i> (고추역병균)	-
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (수박균핵병균)	+ (8 mm)
<i>Fusarium</i> sp. (콩시들음병균)	-
<i>Phythium</i> sp.(강남콩마름병균)	-
<i>Botryosphaeria clothidea</i> (배겍무늬병균)	-
<i>Fusarium oxysporium</i> (고구마밀씩음병균)	-
<i>Cercospora</i> sp. (고추갈색점무늬병균)	-
<i>Colletotrichum lilicearum</i> (맥문동탄저병균)	-
<i>Glomerella cingulata</i> (포도탄저병, 만부병)	-
사과부패균	-
고추탄저병균	-

3. 흰독말풀, 어성초, 삼백초에 대한 항균력 test

가. 실험재료 및 연구방법

1) 실험재료

대구광역시 소재 약령시로부터 구입한 건조시료, 자생식물인 흰독말풀(*Batura metel*), 어성초(*Houttuynia cordata*), 삼백초(*Saururus chinensis*)를 사용하였다.

2) 시료 추출법에 따른 항균력 측정

가) 열수 추출물의 항균 Test

각 시료 50 g에 증류수 1 L을 첨가하여 boiling한 후, 열수 추출물을 회수하여 각각의 추출물 20 μ l을 agar diffusion method로 항균 test를 수행하였다.

나) 유기용매 이용 추출물의 항균 Test

열수 추출물에 유기용매인 메탄올과 에탄올을 각각 500 ml을 첨가하여 24시간 동안 침적시켜 여과 및 농축한 후, 각각의 유기용매를 1 ml첨가하여 추출물을 녹인 후, 농도별(5 mg/ml, 1 mg/ml 500 μ g/ml, 100 μ g/ml 및 50 μ g/ml)로 희석하여 항균 test를 수행하였다.

다) 식물 병원균 곰팡이에 대한 항균 Test

열수 추출물 및 유기용매 추출물(20 μ l)을 agar diffusion method로 항균 test를 수행하였다.

나. 연구내용 및 고찰

1) 열수 추출물의 항균 Test

Table 2-5. Antimicrobial activity of extracted samples.

Samples Test strains	<i>Batura metel</i>	<i>Houttuynia cordata</i>	<i>Saururus chinensis</i>
	Inhibitory zone (Ψ , mm)		
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	\pm (6 mm)
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Serratia marscens</i>	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	-

각각의 시료 열수 추출물에 각종 시험균을 대상으로 항균력 test를 한 결과, 표 2-5에 나타난 바와 같이 삼백초(*Saururus chinensis*)의 열수 추출물은 *B. subtilis*에 대하여 생육 저지환이 6 mm를 나타내어 아주 약한 항균 효과를 나타내었으며, *B. subtilis*를 제외한 전 시험균에 대하여 항균효과를 나타내지 않았다. 그리고 흰독말풀(*Batura metel*)과 어성초(*Houttuynia cordata*)의 열수 추출물은 시험에 사용한 10 균주의 시험균에 대하여 항균 효과를 전혀 나타내지 않았다.

2) 유기용매 이용 추출물의 항균 Test

각각의 시료별 유기용매 추출물을 각종 시험균을 대상으로 한 항균력 test를 한 결과, 표 2-6에 나타난 바와 같이 흰독말풀(*Batura metel*)의 메탄올과 에테르의 유기용매 추출은 전 시험균에 대한 항균 효과를 보이지 않았으며, 어성초(*Houttuynia cordata*)의 경우는 표 2-7에 나타난 바와 같이 대장균에서만 에테르 추출물(5 mg/ml)에서 11 mm의 생육 저지환을 나타내어 약간의 항균효과를 나타내었다. 그 이외의 시험균에서는 항균 효과를 나타내지 않았다. 그러나, 삼백초(*Saururus chinensis*)의 경우도 *E. coli*에서 에테르 추출물 5 mg/ml 농도에서만 12 mm의 생육 저지환을 나타내어 약간의 항균효과를 나타내었다(표 2-8). 따라서, 본 실험에 사용된 유기용매는 메탄올보다는 에테르로 추출하는 것이 더 양호한 것으로 사료되었다.

Table 2-6. Antimicrobial activity of extracted sample.

Test strains	<i>Batura metel</i> (Ψ , mm)									
	Methanol					Ether				
	5 mg	1 mg	500 μ g	100 μ g	50 μ g	5 mg	1 mg	500 μ g	100 μ g	50 μ g
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. marscens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. fumigatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 2-7. Antimicrobial activity of extracted sample.

Test strains	<i>Houttuynia cordata</i> (Ψ , mm)									
	Methanol					Ether				
	5 mg	1 mg	500 μ g	100 μ g	50 μ g	5 mg	1 mg	500 μ g	100 μ g	50 μ g
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. marscens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. fumigatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 2-8. Antimicrobial activity of extracted sample.

Samples Test strains	<i>Saururus chinensis</i> (Ψ, mm)									
	Methanol					Ether				
	5 mg	1 mg	500μg	100μg	50 μg	5 mg	1 mg	500μg	100μg	50 μg
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	12	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. marcescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. fumigatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3) 식물 병원균 곰팡이에 대한 항균 Test

흰독말풀(*Batura metel*), 어성초(*Houttuynia cordata*) 및 삼백초(*Saururus chinensis*)의 유기용매 추출물의 항균 효과를 측정 한 결과, *Phytophthora capsici* (고추역병), *Sclerotinia sclerotiorum* (수박균핵병), *Fusarium* sp. (콩시들음병), *Phythium* sp. (강남콩마름병), *Cercospora* sp. (고추갈색점무늬병), *Botryosphaeria clothidea* (배곶무병), *Fusarium oxysporium* (고구마밀썩음병), *Colletotrichum liliacearum* (맥문동탄저병), *Glomerella cingulata* (포도탄저병,만부병) 및 사과 부패균, 고추 탄저병 등의 11종 식물 병원균 곰팡이에 대한 흰독말풀, 어성초와 삼백초의 유기용매 추출물은 항균 효과를 나타내지 않았다.

4. 도꼬마리추출물의 식물병원균에 대한 항균 효과

가. 추출물의 항균력 검정

1) 재료 및 방법

계명문화대학 시험포장에서 재배한 ‘도꼬마리’를 채취하여 추출재료로 사용하였다. 도꼬마리 경엽의 전체중 250g을 각각 칭량한 뒤 증류수 3배액을 가하여 균질화한 후 온탕상에서 3일간 추출하였다. 그 후 6,000rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 상등액을 회전식 진공감압기로 37℃ 에서 완전히 농축한 뒤 농축액에 증류수를 가하여 100ml가 되도록 조절한 것을 원액으로 사용하였다. 처리 농도는 건조물의 중량을 기준으로 0, 500, 1000, 2000 및 3000이 되게 희석하여 사용하였다.

또한 경북대학교에서 분양받은 역병균주 (*Phytophthora capsici*)를 공시재료로 하여 항균 test를 실시하였다. 5mm Cork borer를 사용하여 일정크기로 채취한 균주를 농도별로 조제된 배지내에 치상한후 3일간 배양하여 실험결과를 얻었다.

2) 결과 및 고찰

접종 3일 후 역병균의 생장을 조사해본 결과를 그림 2-1, 2-2에서 보는바와 같이 1000ppm의 농도까지는 대조구와 큰 차이를 보이지 않았지만, 이보다 고농도인 2000ppm과 3000ppm에선 현저히 억제되었다. 본 실험의 결과로 볼 때 도꼬마리내에는 역병균의 생장을 억제시키는 항균성 물질이 내재되어 있는 것을 시사하고 있다.

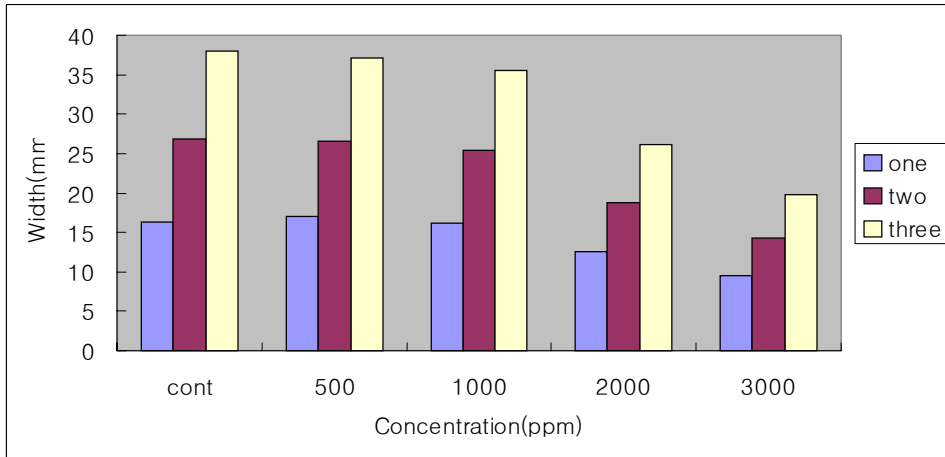


Fig. 2-1. Effect of crude extracts of *Xanthium strumarium* L. on growth of *Phytophthora capsici*.

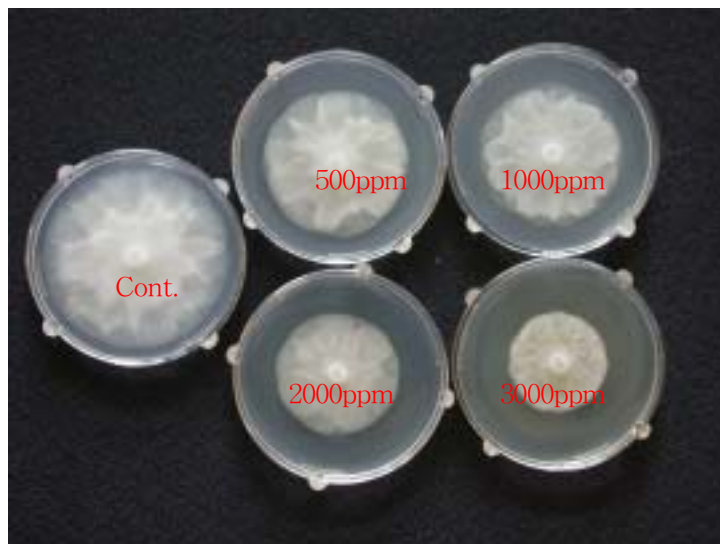


Fig. 2-2 Effect of crude extracts of *Xanthium strumarium* L. on growth of *Phytophthora capsici*.

또한 키토산과 키토산 도꼬마리 추출물 혼합액을 조제하여 역병균에 처리해본 결과는 그림 2-3, 2-4에서 보는바와 같이 50ppm의 저농도부터 역병균의 성장을 저해하여 농도가 높아질수록 그 활성을 현저히 강해지는 것을 확인할 수 있었다. 이

것으로써 키토산, 또는 키토산 도꼬마리 추출물 혼합액을 종자에 코팅처리 할 경우 종자 코팅제로서의 효과가 클 것으로 사료된다.

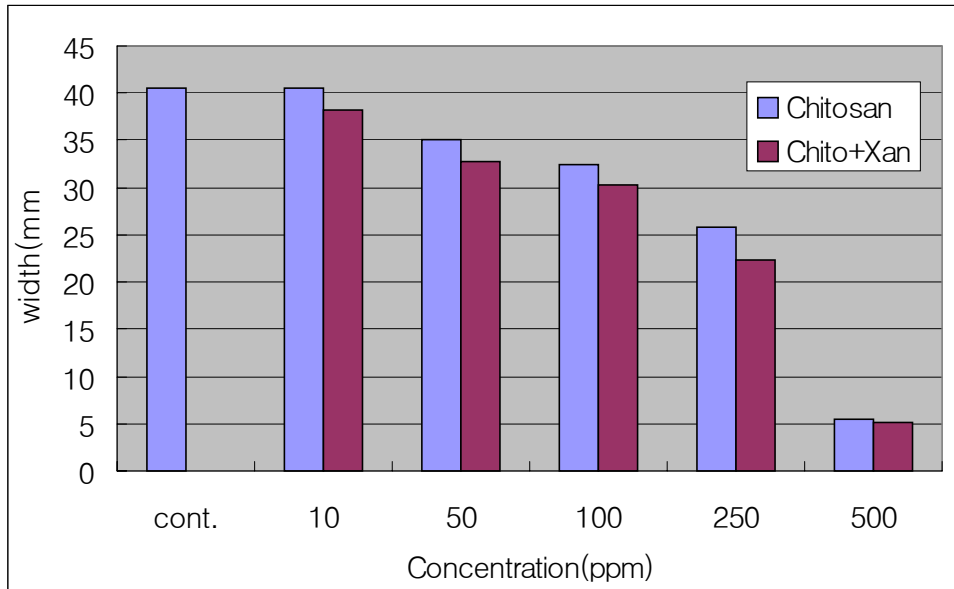


Fig. 2-3. Effect of Chitosan and crude extracts of *Xanthium strumarium* L. on growth of *Phytophthora capsici*.



Fig. 2-4. Effect of Chitosan(left) and crude extracts of *Xanthium strumarium* L.(Right) on growth of *Phytophthora capsici*.

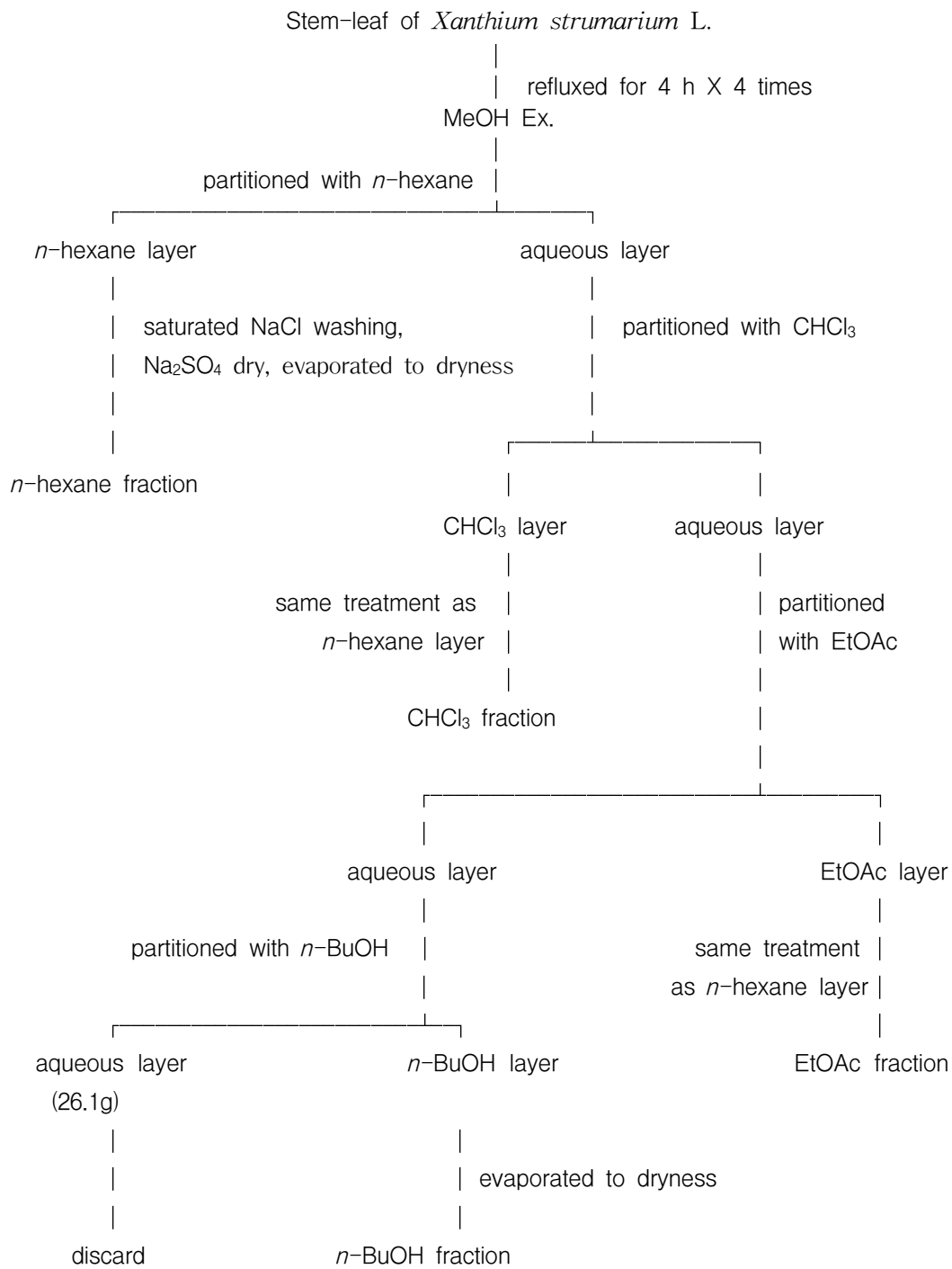


Fig. 2-5. Fractionation procedure for obtaining physiological active substances of *Xanthium strumarium* L.

도꼬마리의 경엽을 80% MeOH로 4시간씩 4회 환류 추출하여 여과 후 여액을 감압 건조하여 메탄올 조추출물 2.2kg을 얻었다. 이를 증류수에 용해시킨 후 *n*-hexane, chloroform, ethylacetate 및 *n*-butanol로 순차적으로 분배 추출하였다(그림 2-5).

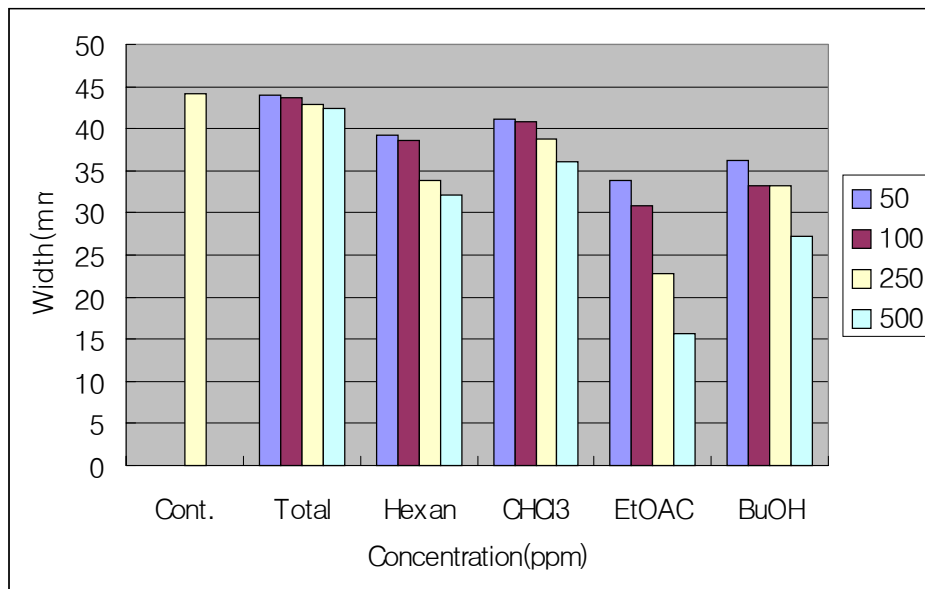


Fig. 2-6. Effect of organic solvent-soluble fractions of *Xanthium strumarium* L. on growth of *Phytophthora capsici*.

도꼬마리 조추출물을 상기 그림2-6, 2-7과 같이, Hexan층, CHCl₃층, Ethyle acetate층, Butanol층으로 각각 분배 추출하여 역병균의 활성을 저해시키는 물질의 이행정도를 조사해본 결과, BuOH 층과 EtOAC 층에서 강한 억제활성이 관찰되었다. 또한 이들 두 층에서도 활성차이를 보였는데, BuOH 층에 비해 EtOAC 층에서 더 강한 활성이 관찰되었다.

EtOAC층을 다시 산도에 따라 산성, 중성 및 염기성 분획으로 분리하여 활성검정을 해본 결과, 역병균의 성장을 억제시키는 활성물질은 강산성 분획으로 이행되는 것으로 확인되었다.



Fig. 2-7. Effect of organic solvent-soluble fractions of *Xanthium strumarium* L. on growth of *Phytophthora capsici*.

지금까지의 결과들로 보아 역병균의 성장을 억제시키는 활성물질은 여러 분획중 EtOAC 분획으로 이행되는 이들을 더 분리해본 결과 강산성 분획쪽으로 이행되는 것으로 최종 확인되었다. 이로써 차후에 활성물질을 분리 동정시에는 이 분획을 이용하는 것이 타당할 것으로 사료된다.

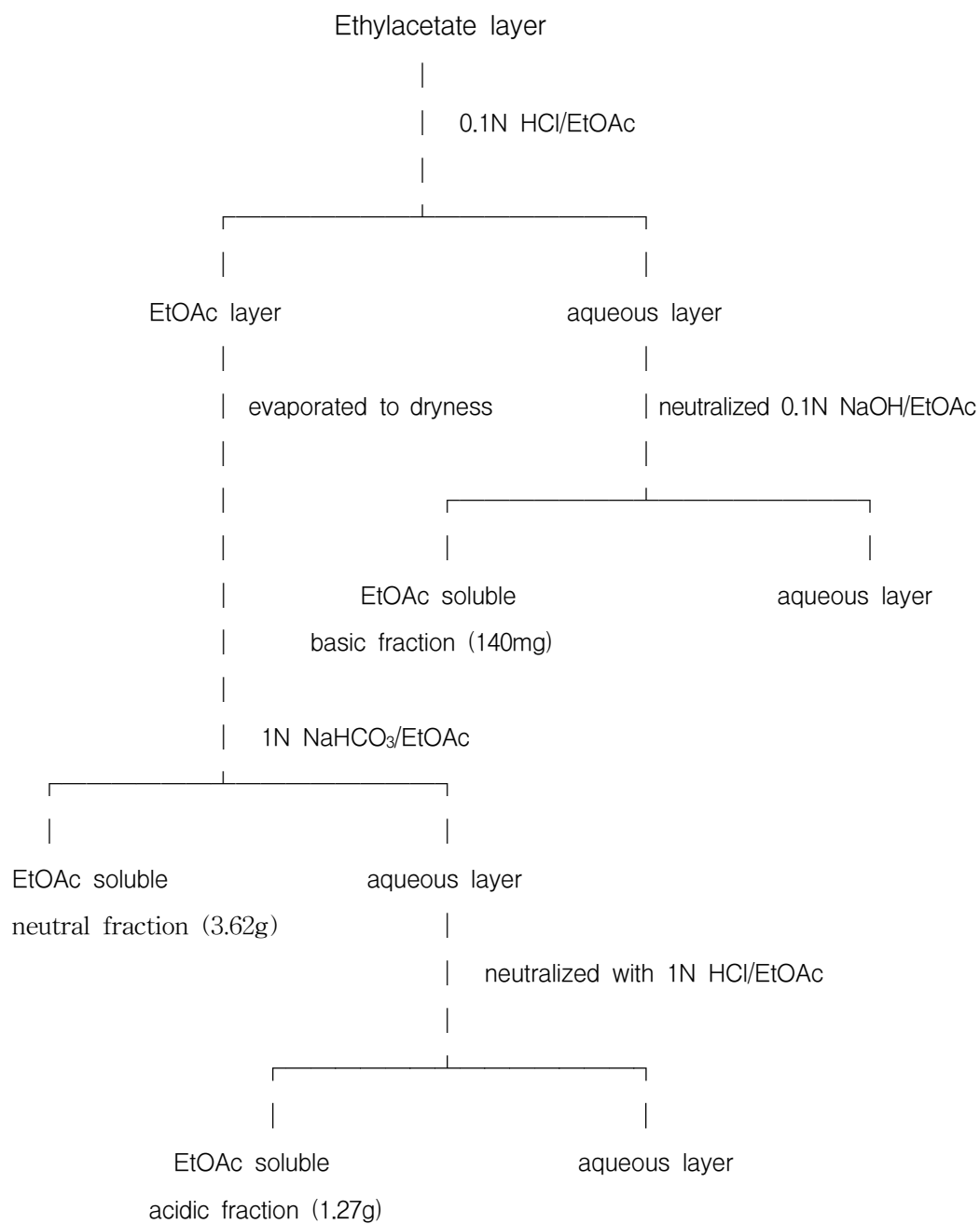


Fig. 2-8. Fractionation procedure for obtaining ethylacetate soluble layer.

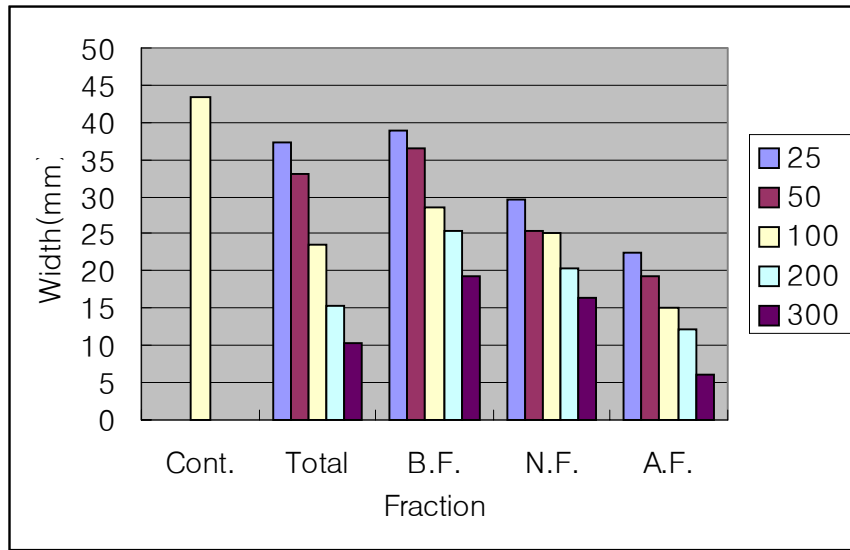


Fig. 2-9. Effect of acidic degree fractions of *Xanthium strumarium* L. on growth of *Phytophthora capsici*.

5. 요약

종자 코팅제의 보조역할을 수행하는 항균물질로서 화학적 합성품을 사용하지 않고 친환경적 물질로 국내 자생식물중에서 식물의 자기방어기능을 도와주는 elicitor 기능을 갖는 물질을 탐색하고 분리. 정제하여 종자 소독제의 첨가물로 활용이 가능한 물질을 검색하고자 본 연구에서는 공시식물인 영경귀, 용담, 흰독말풀, 어성초, 삼백초를 대상으로 시료추출방법에 따른 생리활성물질인 식물성 다당의 추출과 항균력 측정 및 MIC측정을 비교 평가한 결과는 아래와 같이 요약할 수 있다.

가. 국내산 자생식물인 용담(*Gentiana scabra*)와 영경귀(*Crisium japonicum*)의 추출물을 11종의 식물병원균에 대한 항균효과를 살펴본 결과 영경귀의 에테르추출물 200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 첨가시 수박균핵병균(*Sclerotinia sclerotiorum*)에서 항균효과를 나타내었지만, 그 외의 균에서는 거의 항균효과를 찾아볼 수 없었다.

나. 또한 자생식물인 흰독말풀(*Batura metel*), 어성초(*Houttuynia cordata*), 삼백초

(*Saururus chinensis*)의 추출물을 11종의 식물병원균에 대한 항균효과를 살펴본 결과 삼백초의 열수 추출물은 *B. subtilis*에 대하여 생육 저지환이 6 mm를 나타내어 아주 약한 항균 효과를 나타내었지만, 흰독말풀과 어성초의 열수 추출물은 시험에 사용한 10균주의 시험균에 대하여 항균 효과를 전혀 나타내지 않았다. 또한 유기용매 추출물을 각종 시험균을 대상으로 한 항균력 test를 한 결과 흰독말풀의 메탄올과 에테르의 유기용매 추출은 전 시험균에 대한 항균 효과를 보이지 않았으며, 어성초의 경우는 대장균에서만 에테르 추출물(5 mg/ml)에서 11 mm의 생육 저지환을 나타내어 약간의 항균효과를 나타내었다. 그 이외의 시험균에서는 항균 효과를 나타내지 않았다.

삼백초의 경우도 *E. coli*에서 에테르 추출물 5 mg/ml 농도에서만 12 mm의 생육 저지환을 나타내어 약간의 항균효과를 나타내었다. 위 유기용매 추출물의 항균효과를 측정한 결과 *Phytophthora capsici*(고추역병) 등 11종의 식물병원균에 대한 항균효과는 나타내지 않았다.

다. 한편 도꼬마리(*Xanthium strumarium* L)을 채취하여 음건, 세절한 후 열매를 대상으로 열수 추출후 에테르, 에틸아세테이트를 이용하여 분별 추출하여 filter paper로 여과한 후, 수지성분 및 유독 성분으로 알려진 불용성의 황색물질인 xanthostrumarin 배당체를 제거한 검사 시료로 사용하여 항균테스트를 한 결과 에테르중성추출물에서 세균인 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* 및 효모인 *C. albicans*를 대상으로 검토한 결과, *P. aeruginosa*를 제외한 3균주에 대해 30 ng/ml에서도 뚜렷한 저해효과를 나타내었다.

이를 분취용 Metachem nucleosil (C₁₈) column을 사용하여 MeOH : H₂O = 6:4의 용매로서 흡광도 254 nm에서 검출된 peak를 분취하여 Chromatopak (Shimadzu Co.)으로 분석한 결과, 순도가 100%로 정제(XE-N-S1)되었음을 알 수 있었다.

정제된 XE-N-S1을 UV/Visible spectrophotometer (Parmacia Co. Biochrom 4060)를 사용하여 200~900 nm에서 scanning한 결과 215 nm에서 최대 흡광도를 나타내었으며, GC/MS를 통하여 분석한 결과, Fig. 3-4에서 보는바와 같이 분자량이 248인 단일물질로 확인되었다.

라. 도꼬마리 경엽을 온탕상에서 추출하고, 역병균주 (*Phytophthora capsici*)를 공시 재료로 하여 항균 test를 실시한 결과 1000ppm의 농도까지는 대조구와 큰 차이를 보이지 않았지만, 2000ppm과 3000ppm에선 현저히 억제되었다. 본 실험의 결과로 볼 때 도꼬마리내에는 역병균의 성장을 억제시키는 항균성 물질이 내재되어 있는 것을 시사하고 있다. 또한 키토산과 키토산 도꼬마리 추출물 혼합액을 조제하여 역병균에 처리해본 결과, 50ppm의 저농도부터 역병균의 성장을 저해하여 농도가 높아질수록 그 활성을 현저히 강해지는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 도꼬마리의 경엽을 MeOH로 환류 추출하여 증류수에 용해시킨 후 *n*-hexane, chloroform, ethylacetate 및 *n*-butanol로 순차적으로 분배추출한 결과 BuOH 층과 EtOAC 층에서 강한 억제활성이 관찰되었다. 또한 이들 두 층에서도 활성차이를 보였는데, BuOH 층에 비해 EtOAC 층에서 더 강한 활성이 관찰되었다. EtOAC층을 다시 산도에 따라 산성, 중성 및 염기성 분획으로 분리하여 활성검정을 해본 결과, 역병균의 성장을 억제시키는 활성물질은 강산성 분획으로 이행되는 것으로 확인되었다.

제 3절 키토산, 올리고당 및 도꼬마리 추출액을 이용한 종자의 priming처리가 작물 및 야생화종자 발아에 미치는 영향

종자의 발아는 종피의 산소투과성, 삼투성, 배(胚)의 생리적 불안전 등과 연계된 휴면, 종자의 충실도 등에 의하여 큰 영향을 받는다. 이러한 요인들을 타파하기 위하여 성장조절물질 또는 무기물질 등을 종자내에 침투시켜 효과를 증진시키는 것이 일반적인 예이다. 이러한 종자처리는 몇몇 연구자들에 의해 간헐적인 연구가 진행되었으나 아직까지 효율적인 방법은 부족한 것이 현실이다.

본 연구에서는 기계적인 파종을 위한 종자 코팅처리의 전단계로 본 연구과제의 기본 물질인 키토산과 그 유도체 및 향균성이 뛰어나다는 연구결과에 따른 도꼬마리 추출액을 이용한 종자의 priming처리가 작물 및 야생화종자 발아에 미치는 영향을 알아본 결과는 다음과 같다.

1. 실험 방법

키토산 3%, 올리고당 3% 용액에 도꼬마리 조추출물 (0.1%)을 혼합시킨 액을 공시재료로 사용하였다. 이 용액에 일정량의 증류수를 이용하여 10,000배, 7,500배, 5,000배, 2,500배, 1,000배, 500배 액이 되게끔 희석하여 종자 발아시험에 이용하였다.

발아시험에 사용된 종자는 고추(부강), 무(장형봄), 할미꽃, 매발톱꽃을 각각 사용하였다. 종자의 발아시험은 직경 10cm의 petri-dish 에 각 농도별로 조절된 액을 각각 5cc 씩 첨가한 후 고추는 50립, 무는 25립, 할미꽃과 매발톱꽃은 100립씩 3반복으로 각각 치상하고 파라핀 테이프로 밀봉하였다. 발아시험은 $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ 로 조절된 배양실 내에서 행하였으며, 고추는 치상후 22일후, 무는 13일후 각각 생육조사를 실시하였고 발아율은 치상 후 고추는 20일, 무는 5일, 할미꽃과 매발톱꽃은 25일까지 발아된 개체수를 조사하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 고추

고추의 종자발아에 미치는 영향을 보면(그림 3-1), 대조구는 약 88%의 발아율을 보였으며, 10,000배 액에서는 큰 차이를 보이지 않았다. 하지만 7,500배에서 1,000배액까지는 대조구에 비해 약 2-5% 정도 발아율이 높았다. 500배의 고농도 액에서는 대조구에 비해 약 5% 이상 떨어지는 것이 관찰되었다.

고추 유묘의 생육을 보면(그림 3-2) 모든 처리구에서 대조구와 큰 차이는 보이지 않았지만 5,000배와 2,500배 액에서 약간 높아지는 경향을 보였다.

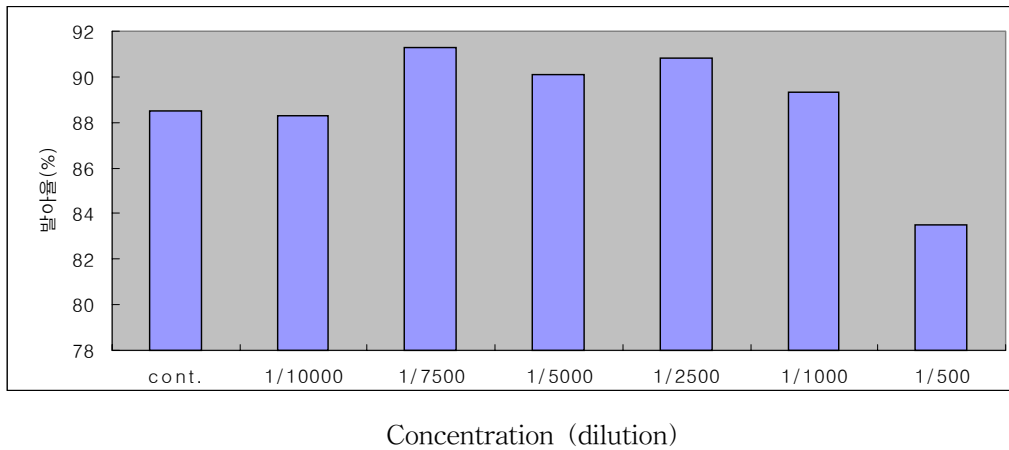
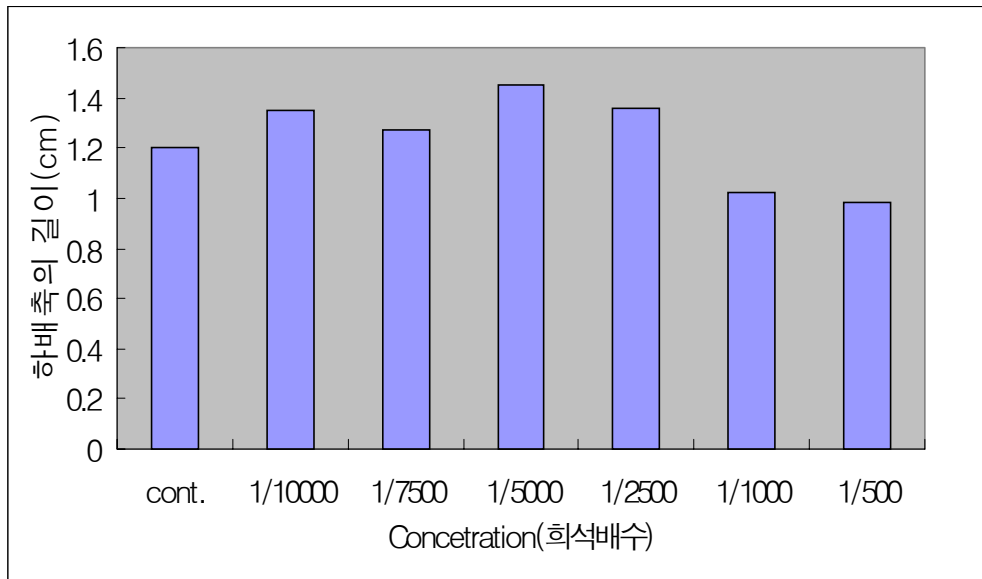


Fig. 3-1. Effect of mixing solution of chitosan, chitosan-oligosaccharide and crude extracts of *Xanthium strumarium* L. on germination rate of red pepper.

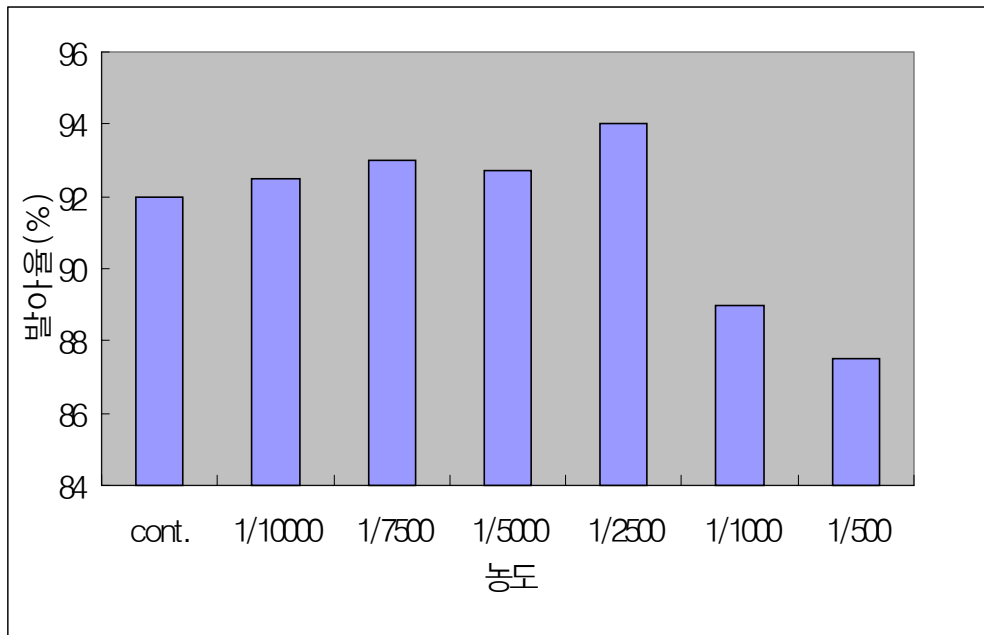


Concentration (dilution)

Fig. 3-2. Effect of mixing solution of chitosan, chitosan-oligosaccharide and crude extracts of *Xanthium strumarium* L. on seedlings growth of red pepper.

나. 무

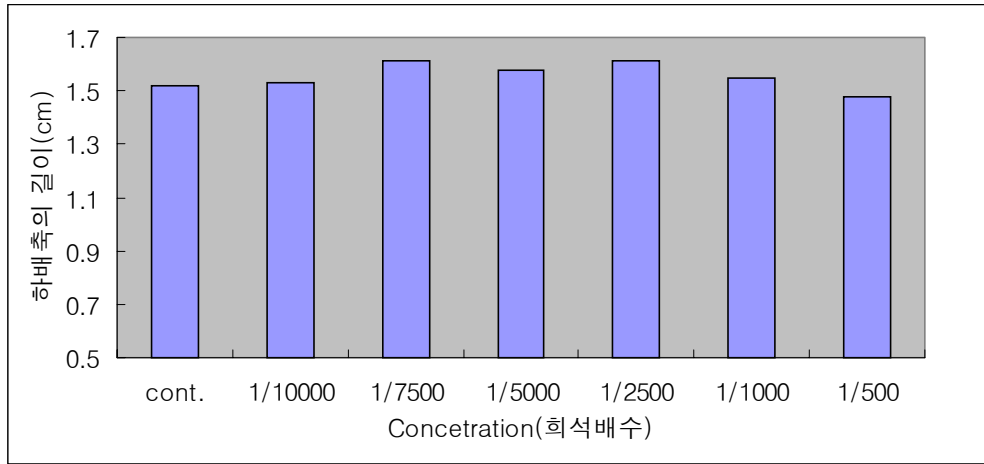
무의 종자 발아에 미치는 영향을 보면(그림 3-3), 2500배까지의 저농도액에서는 농도가 증가함에 따라 발아율이 약간씩 증가하는 경향을 보였으며, 2,500배 액에서는 약 4%정도의 발아율 향상이 관찰되었다. 하지만 1,000배와 500배 액에서는 오히려 발아율 억제가 큰 것으로 나타났다.



Concentration (dilution)

Fig. 3-3. Effect of mixing solution of chitosan, chitosan-oligosaccharide and crude extracts of *Xanthium strumarium* L. on germination rate of radish.

무의 유묘 생육에 미치는 영향을 그림 3-4에서 보면, 앞의 고추와 유사한 경향을 나타냈으며, 10,000배 액에서는 대조구와 큰 차이를 보이지 않았지만 7,500배에서 1,000배 액까지는 대조구에 비해 하배축의 신장이 약간 증가되는 경향이였다. 500배에서는 대조구와 큰 차이를 보이지 않았다.



Concentration (dilution)

Fig. 3-4. Effect of mixing solution of chitosan, chitosan-oligosaccharide and crude extracts of *Xanthium strumarium* L. on seedlings growth of Radish.

다. 오이

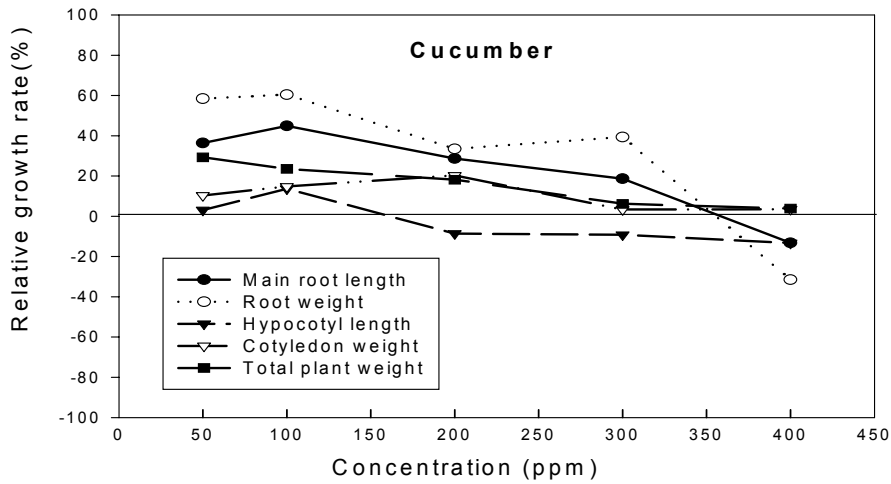


Fig. . Effect of chitosan solution on growth of cucumber.
Horizontal line - Control(Distilled water)

오이의 유묘 생육을 보면(그림 3-5), 주근의 길이와 뿌리 무게의 경우 100ppm에서 가장 촉진되었으며 300ppm까지는 대조구에 비해 증가되는 경향을 나타내었다. 하지만 400ppm에서는 대조구에 비해 오히려 생육이 저해됨이 확인되었다. 전체중의 경우는 50ppm에서 가장 무거웠으며 농도가 증가함에 따라 점차로 감소되었다.

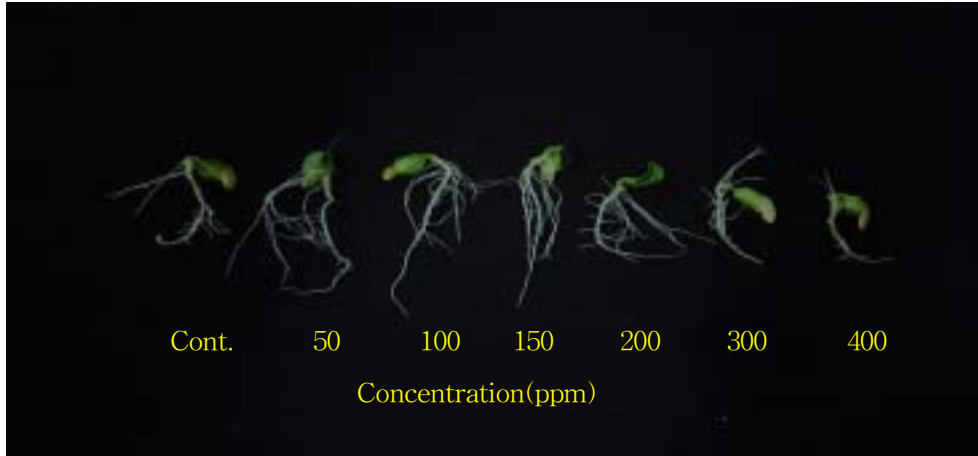


Fig. 3-6. Effect of mixing solution of chitosan, chitosan-oligosaccharide and crude extracts of *Xanthium strumarium* L. on seedlings growth of Cucumber.

라. 상추

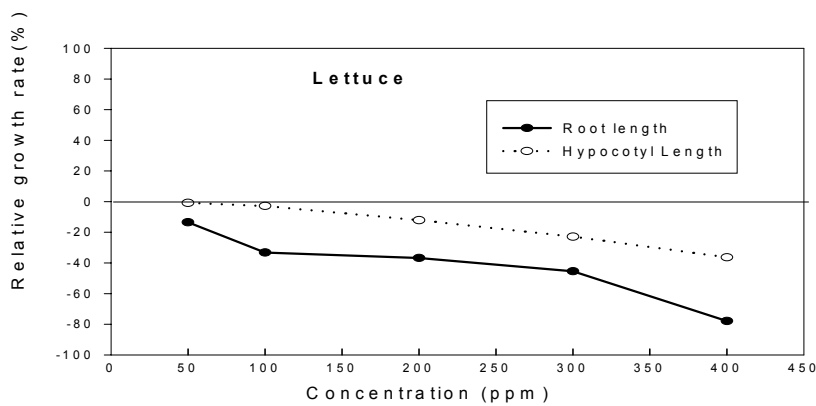


Fig. 3-7. Effect of chitosan solution on growth of Lettuce. Horizontal line - Control (Distilled water)

키토산, 키토산 올리고당 및 도꼬마리 추출물을 상추의 종자발아시 처리해본 결과(그림 3-7), 유묘 생육은 타 작물의 테스트와는 달리 50ppm의 저농도부터 억제되기 시작하여 농도가 증가함에 따라 그 억제 정도는 커지는 것을 확인하였으며, 400ppm의 고농도에서는 대조구에 비해 80% 정도로 억제되는 것이 확인되었다.

마. 할미꽃

야생화 종자인 할미꽃의 발아에 미치는 키토산, 올리고당 및 도꼬마리 조추출물 혼합액의 효과를 보면(그림 3-8), 5,000배 액까지는 대조구와 큰 차이를 보이지 않았지만 이보다 고농도인 2,500배 이상액에서는 대조구에 비해 농도가 증가할수록 발아율의 저하가 커지는 것이 확인되었다.

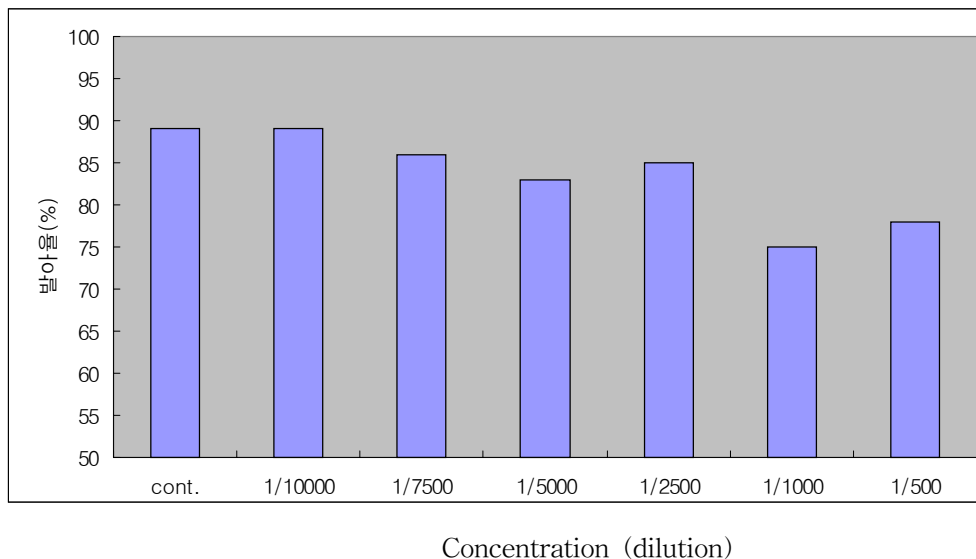


Fig. 3-8. Effect of mixing solution of chitosan, chitosan-oligosaccharide and crude extracts of *Xanthium strumarium* L. on germination rate of *Pulsatilla koreana*.

바. 매발톱꽃

매발톱꽃의 종자발아에 미치는 영향을 조사해본 결과(그림 3-9), 2,500배까지의 저농도구에서는 발아율이 대조구와 비슷하거나 약간 증가하는 경향을 보였다. 하지만 1,000배 이상의 농도에서는 오히려 대조구에 비해 떨어지는 경향을 나타내었다.

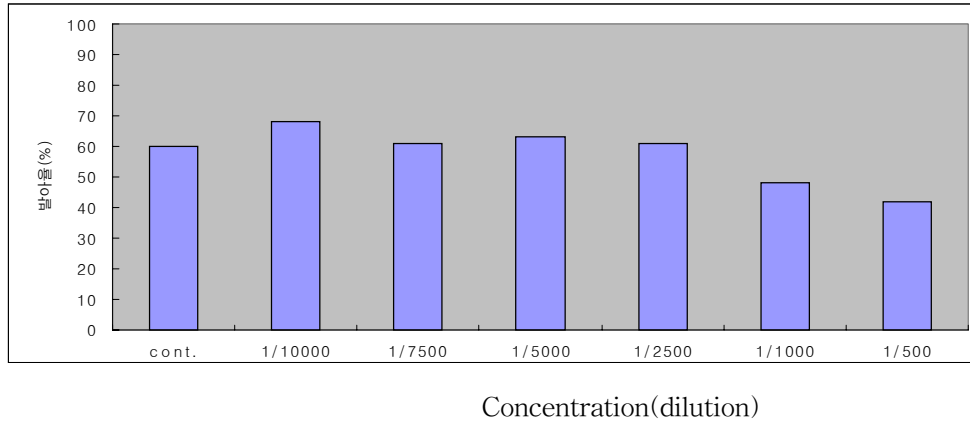


Fig. 3-9. Effect of mixing solution of chitosan, chitosan-oligosaccharide and crude extracts of *Xanthium strumarium* L. on germination rate of *Aquilegia buergeriana*.

3. 요약

키토산, 키토산 올리고당 및 도꼬마리 추출물의 혼합용액을 priming 처리제로 이용하여 종자 발아 및 유묘의 생육을 조사해본 결과, 고추, 무, 오이와 할미꽃, 매발톱꽃의 종자발아시 저농도에선 모두 향상되었으며, 유묘의 생육도 촉진되었다. 하지만 모든 작물에서 500배 로 희석한 고농도 용액에선 대조구에 비해 억제되었다. 하지만 상추의 생물검정에선 유묘의 생육이 저농도부터 억제되어 농도가 높아질수록 억제 정도가 커짐이 확인되었다.

제 4절 키토산 올리고당 및 도꼬마리 추출물을 이용한 종자 코팅

1. 서론

지금까지 개발된 종자코팅기술은 모두가 살균, 살충제를 포함하는 농약을 1차적인 물질로, 기계적인 파종을 용이하게 하기 위하여 점토광물 등 증량제, 이를 종자표면에 밀착시키기 위한 접착제로 구성되어 있다.

한편 살균제나 살충제와 함께 발아촉진이나 종묘의 초기생장을 촉진하는 영양물질, 성장조절물질, 산소공급, 또는 유효미생물 등을 혼합 처리하는 기술이 실용화 또는 연구되고 있다. 그리고 농약함유의 유무, 농약종류의 식별, 파종정도의 확인 및 작물 품종의 구별 등을 위해 film coating시 착색제를 병용하는 기술도 검토되고 있다.

그리고 film coating기술은 수용성 혹은 친수성 polymer의 수용액에 농약 등을 용해, 분산하여 sprayer법 등으로 표면에 film상으로 고착시킨 뒤 40-50℃에서 송풍건조시키는 방법이다. 이때 사용하는 수용성polymer로서 PEG(polyethylene glycol), 셀룰로오스(cellulose)유도체, PVA(polyvinyl alcohol), 전분 또는 천연의 다당류를 사용하고 그것을 물에 용해시켜 농약 등을 가하여 수용액을 조제하고 이 수용액을 종자에 스프레이 등으로 coating하는 기술이다. 이 경우 사용하는 수용성 폴리머의 분자량이 크면 수용액의 점성이 높아서 작업성이 나빠 폴리머를 소량만 사용할 수 있기 때문에 부착성이 나쁜 문제가 있다. 또한 coating처리된 종자를 파종하였을 경우 coating제가 수분을 흡수하여 재용해되는 초기에는 수용성 폴리머의 점성이 높아서 발아를 억제하고, 균일하지 않으며, 수분 공급시에 완전히 용해되어 버리기 때문에 부착한 농약도 쉽게 탈락, 유출하여 그 효과가 떨어지는 문제가 있다.

종자 소독시 농약오염으로 인한 작업자의 안전성, 종자 파종시 작업의 효율화, 종자의 장기간 보관, 국제간 무역의 편리성이라는 목적을 달성하기 위하여 종자를 코팅하는 새로운 기술이 개발되어야 하였다. 이러한 문제점을 모두 충족시키면서 기존에 사용되는 일부 약제와는 다른 용도 즉 절화 보존제로도 기능을 갖고 침투 이행성이 강하면서 환경 친화성을 갖춘 종자처리제를 개발하고자 하였다. 본 연구에서

개발된 종자 처리제는 발아율이 높고, 유묘의 생장률이 월등히 높아짐과 동시에 독성이 낮고 농민이 쉽게 사용할 수 있도록 값이 싸야하는 원칙에 부합하는 새로운 제품을 연구·개발하고자 하였다.

종자 코팅제로의 활용을 위한 연구는 첫째 최적 코팅제의 개발을 위한 적정 배합비율을 구명하고, 둘째 시제품의 pilot plant 생산을 통해 농작물, 채소작물 및 단명 종자의 펠레팅 시 바인더를 결정하고 상기 종자들의 발아율을 촉진시킬 수 있는 기술을 개발하며, 셋째 코팅종자의 크기 및 발아율 등에 대해 조사코자 하였다.

2. 실험방법

가. 종자의 종류

본 연구에 사용된 종자는 시판용 종자로 표 4-1과 같다.

Table 4-1. The crop and cultivar used in this experiments

Crop	Cultivar	Company
Rice	화성벼	정부 보급종
Onion	라운드황양파	동서농예
Lettuce	청치마상추	대경종묘
Chinese cabbage	휘파람배추	사카나종묘
Welsh onion	흑금장파	대농종묘
Bean	쥐눈이콩	일반종
Pepper	금탑	세미니스
melon	금싸라기은천참외	세미니스
Radish	은초롱무	동부한농

나. 종자 코팅제의 처리

- 1단계 : 종자소독

방법 : 시판 차아염소산소다(상품명 : 유한락스, 유효성분 6~7%)를 구입하여 2,000배 내지 10,000배 희석한 용액에 종자를 30분간 침종한 후 탈수하여 건조하였다.

- 2단계 : 키토산 코팅

방법: 1단계로 처리된 종자를 이미 만들어진 키토산유도체 및 도꼬마리 추출액 혼합 용액(키토산 3%, 키토산-올리고당 3%, 도꼬마리 추출액 0.1%)을 적의 희석한 용액에 (1) 침종하거나, (2) 가정용 분무기로 종자의 표면에 골고루 분무(spray)한 다음 1%-NaOH용액을 그 표면에 살포하여 피막이 형성되도록 한 다음 자연 건조하였다.

- 3단계 : 코팅재료(pellet형성 ~3mm내외)

방법 : 기계화 파종의 원활을 위하여 종자의 크기를 키우거나 고르게 할 필요가 있다. 이 목적을 달성하기 위하여 경제성을 고려한 맥반석, 거정석, 머드(충남 보령산), 황토(충남 홍성산)를 택하여 농도를 다양하게 결정하였다. 결합제로서 PVA 0.5%와 아라비아검(Arabic gum) 8%의 비율로 혼합하여 사용하였다. 코팅제의 두께는 기계화 파종을 원칙으로 하기 때문에 종자별로 그 두께를 달리하였다(표 4-2).

Table 4-2. Coating materials used in pelleting

	거정석	맥반석	머드	황토
제1안	30%	70%		
제2안			100%	
제3안			50%	50%
제4안				100%

- 4단계 : 종자 코팅시 접착제의 종류

방법 : PVA 0.5%, arabic gum 8%의 농도로 잘 풀어 코팅용 접착제로 사용하였다.

I : 키토산, 올리고당+거정석 30%+맥반석70%+PVA 0.5%+Arabic gum8%

II : 키토산, 올리고당+머드 100% +PVA0.5%+Arabic gum 8%

III : 키토산, 올리고당+황토 50%+머드 50%+PVA 0.5%+Arabic gum 8%

IV : 키토산, 올리고당+황토100%+PVA0.5%+Arabic gum 8%

V : 키토산, 올리고당2%

VI : Control

- 5단계 : 표면처리

코팅된 종자의 운송중 파괴나 장기간 보관중 과도한 수분흡수로 코팅제가 탈락하는 경우가 있다. 이를 막기 위하여 최종적으로 과불화물인 PFC(3M사 제품 FC-5204호)를 물에 적당하게 용해한 후 위 종자코팅기에 넣고 분무코팅을 시행한 다음 상온에서 건조하였다. 코팅제의 두께는 200 μ m 정도로 하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 벼(화성벼)

1). 코팅후 무게변화

코팅 종자의 운반, 포장 등을 고려하여 코팅후 무게변화를 알아본 결과는 표 4-3과 같았다. 코팅제의 무게증가율은 IV의 경우가 가장 높았다. 이는 황토의 영향으로 생각하였다.

Table 4-3. Effect of various coating materials on weight change of rice seed after coating

구분	코팅전무게	코팅후	
		종자무게(g)	증가율(%)
I	2.30	4.35	189.1
II		3.97	172.6
III		3.79	164.7
IV		4.67	203.0

2). 코팅종자의 실내 검정 발아율

종자코팅후 발아접시에서 발아율을 알아본 결과는 표4-4와 같았다. 이 결과로부터 코팅제 III(황토+머드)과 IV(황토)인 경우가 벼의 발아율이 가장 낮은 이유는 머드에 함유된 염분과 살균이 되지 않은 황토의 영향으로 추정된다.

Table 4-4. Effect of various coating methods on germination rate of rice seed.

코팅제의 종류	I	II	III	IV	V	VI
발아율(%)	85	83	76	65	85	92

3). 육묘 트레이 검정

코팅된 벼 종자를 육묘 트레이에 파종하여 발아율을 조사한 결과는 표 4-5와 같다. 코팅제 IV(황토)의 경우 벼의 발아율이 낮은 이유는 염분을 가진 머드와 살균작용이 생략된 황토의 영향으로 추정된다.

Table 4-5. Effect of various coating materials on germination rate of rice seed coated in tray test.

코팅제의 종류	I	II	III	IV	V	VI
발아율(%)	86	85	75	60	80	85

4). 사진

본 연구결과에 의한 종자(벼)의 코팅결과는 아래 사진 6-1과 같다.

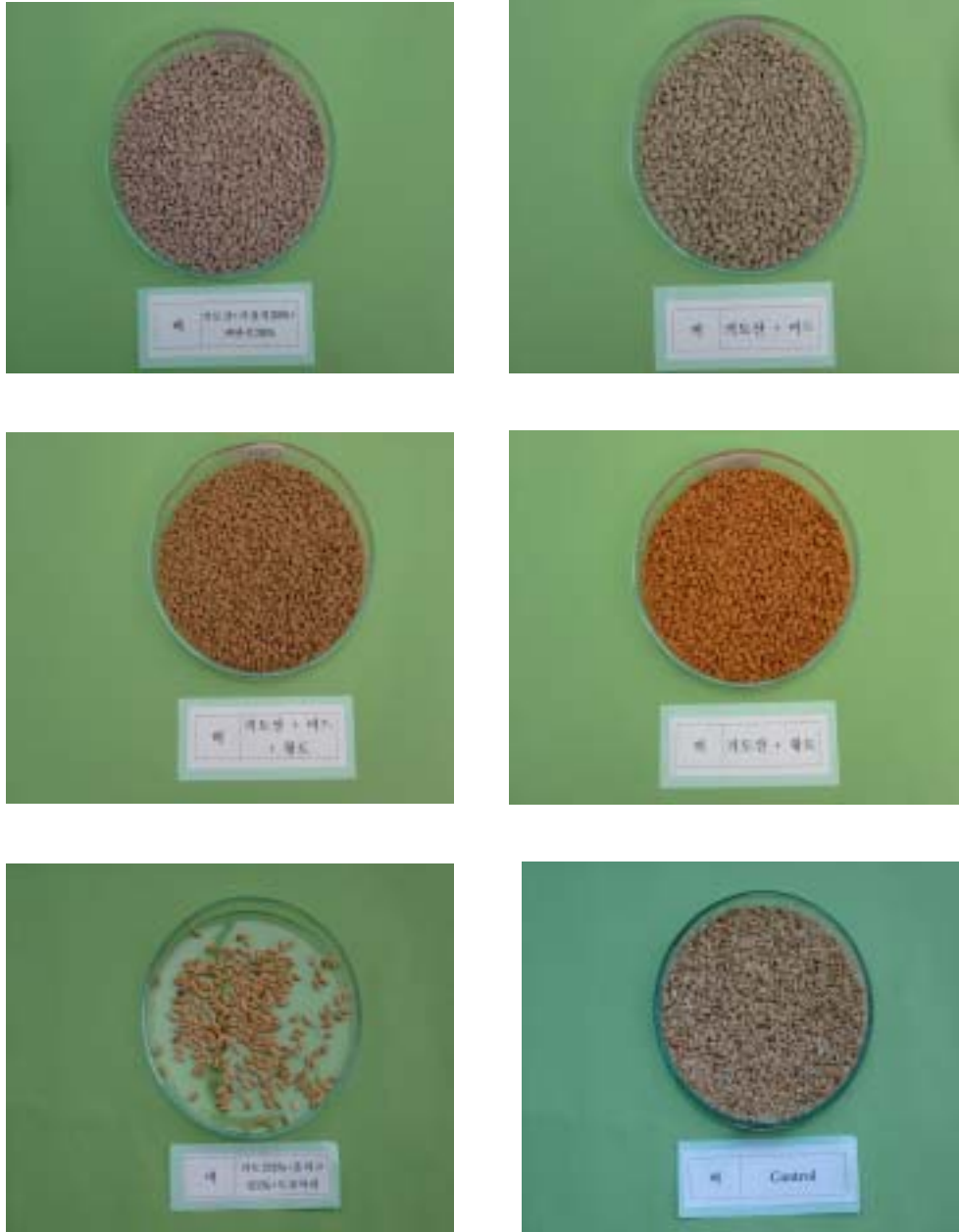


Fig. 4-1. Photo. of coating seed using various materials.

5). 육묘시험

코팅된 종자를 pot실험을 실시한 결과는 아래 표4-6과 같았다.

Table 4-6. Effect of various coating materials on growth of rice seedling in raising seedling test.

조사항목 처리	엽수	엽중(gr)	엽장(cm)	근중(gr)	근장(cm)
I	5.0	0.16	18.8	0.10	12.6
II	5.6	0.21	19.5	0.11	11.1
III	5.3	0.20	19.4	0.06	9.3
V	5.0	0.20	17.0	0.06	9.6
VI	5.0	0.20	17.9	0.07	10.6

I, II, III, IV, V, VI : 4단계- 종자 코팅시 접착제의 종류 참조



Fig. 4-2. Effect of various coating materials on growth of rice seedling

나. 양파(라운드황양파)

1). 양파의 코팅전후 무게의 변화

코팅 종자의 운반, 포장 등을 고려하여 코팅후 무게변화를 알아본 결과는 표 4-7과 같았다. 코팅제의 무게는 I, IV의 경우 증가율이 가장 높았다. 이는 맥반석(I)과 황토(IV)의 영향으로 생각하였다.

Table 4-7. Effect of various coating materials on weight change of onion seed after coating

구분	코팅전무게	코팅후	
		종자무게(g)	증가율(%)
I	0.35	0.87	248.5
II		0.82	234.2
III		0.71	202.8
IV		0.85	242.8

2). 코팅종자의 발아율

종자를 코팅한 후 발아접시에서 발아율을 알아본 결과는 표 4-8과 같았다. 코팅제 II, III인 경우 55% 미만으로 가장 낮은 이유는 머드에 함유된 염분의 영향으로 생각된다. 그러나 종자표면에 접착과 외관상 비교에서는 머드가 가장 우수하였다. 이는 머드중의 염분을 제거하여 사용하였다면 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각하였다.

Table 4-8. Effect of various coating methods on germination rate of onion seed.

코팅제의 종류	I	II	III	IV	V	VI
발아율	62	52	55	58	58	65

3). 육묘 트레이 검정

코팅된 종자를 육묘 트레이에 파종하여 발아율을 조사한 결과는 표4-9와 같았다. 발아율은 45%~60%로 많은 차를 나타내었다.

Table 4-9. Effect of various coating materials on germination rate of onion seed coated in tray test.

코팅제의 종류	I	II	III	IV	V	VI
발아율	50	45	60	45	65	65

4). 사진

본 연구결과에 따른 종자의 코팅결과는 아래 사진 4-3과 같다.



Fig. 4-3. Photography of onion coating seed using various materials.

5). 육묘시험

코팅된 벼 종자를 육묘 트레이에 파종하여 발아율을 조사한 결과는 표4-10과 같았다. 이 결과로부터 양파 종자는 코팅제의 종류와 관계없이 부적합함을 알 수 있었다.

Table 4-10. Effect of various coating materials on growth of onion seedlings in raising seedling test.

조사항목 처리	엽수	엽중(gr)	근중(gr)	근장(cm)
I	4.0	2.00	0.15	9.8
II	4.0	2.80	0.23	14.7
III	4.6	3.06	0.26	13.1
IV	5.0	2.60	0.06	11.2
V	4.3	2.13	0.20	13.6
VI	5.0	4.03	0.83	17.6

I, II, III, IV, V, VI : 4단계- 종자 코팅시 접착제의 종류 참조



Fig. 4-4. Effect of various coating materials on growth of onion seedling

다. 상추(청치마 상추)

1). 상추의 코팅전후 무게의 변화

코팅 종자의 운반, 포장 등을 고려하여 코팅후 무게변화를 알아본 결과는 표 4-11과 같았다. 코팅제의 무게는 IV의 경우 증가율이 가장 높았다. 이는 황토의 영향으로 생각하였다

Table 4-11. Effect of various coating materials on weight change of lettuce seeds after coating

구분	코팅전무게	코팅후	
		종자무게	증가율
I	0.09	0.31	344.4
II		0.27	300.0
III		0.28	311.1
IV		0.32	355.5

2). 코팅종자의 실내 검정 발아율

종자를 코팅한 후 발아접시에서 발아율을 알아본 결과는 표 4-12와 같았다. 코팅제 III과 IV인 경우 발아율이 다소 낮은 이유는 머드에 함유된 염분(III)과 황토(IV)의 영향으로 생각된다.

Table 4-12. Effect of various coating methods on germination rate of lettuce seed.

코팅제의 종류	I	II	III	IV	V	VI
발아율	99	99	94	91	99	99

3). 육묘 트레이 검정

코팅된 종자를 육묘 트레이에 파종하여 발아율을 조사한 결과는 표4-13과 같았다. 발아율은 60%~75%로 많은 차를 나타내었다.

Table 4-13. Effect of various coating materials on germination rate of lettuce seed coated in tray test.

코팅제의 종류	I	II	III	IV	V	VI
발아율	95	75	60	70	100	100

4). 사진

본 연구결과에 의한 종자(상추)의 코팅결과는 아래 사진 4-5와 같다.

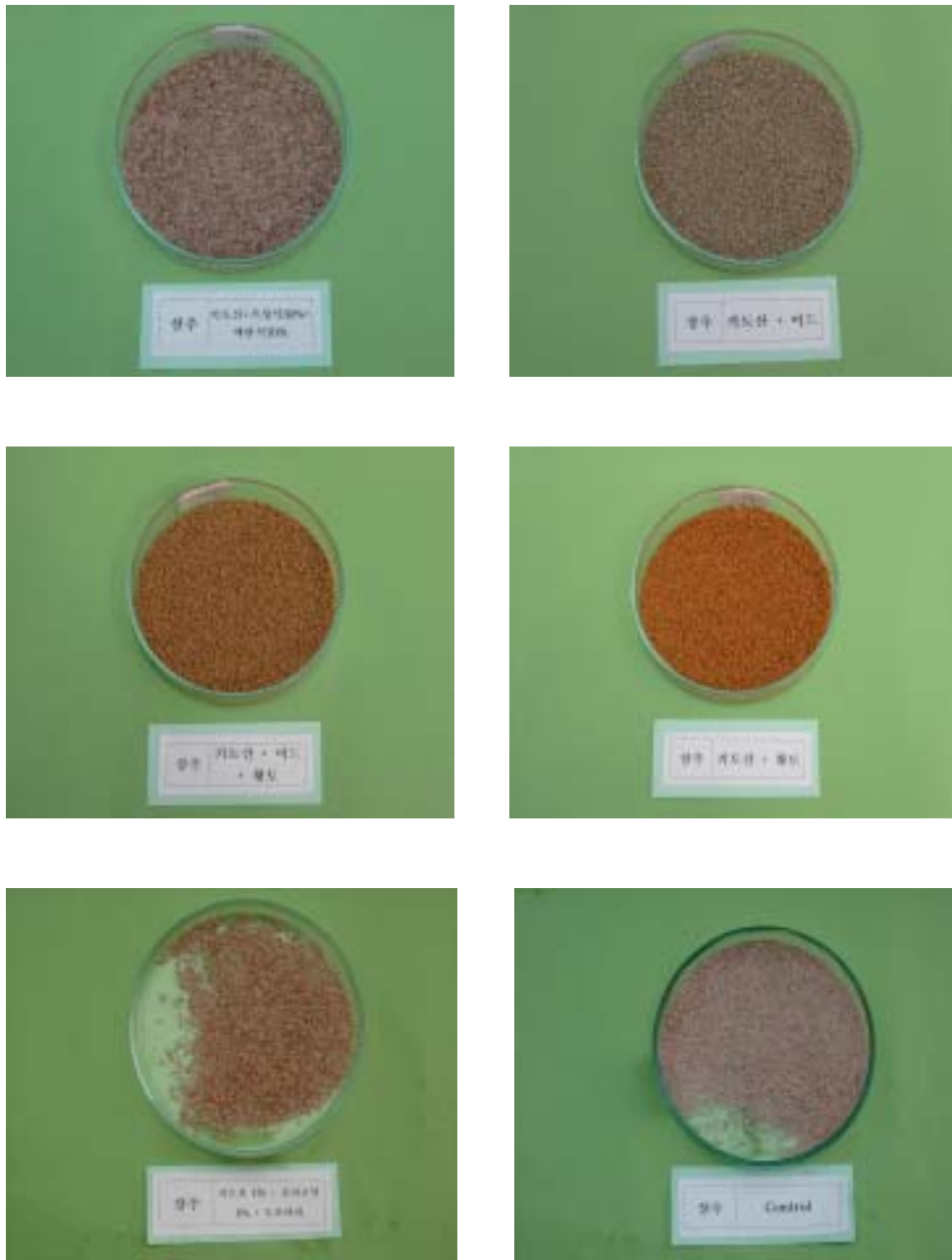


Fig. 4-5. Photography of lettuce coating seed using various materials.

코팅제 Ⅱ(머드), Ⅲ(황토+머드), Ⅳ(황토)의 경우 발아율이 낮은 이유는 머드와 황토의 영향으로 생각하고 상추의 코팅제로는 기계과종을 감안하여 Ⅰ(거정석 + 맥반석)이 가장 적합함을 알 수 있다.

상추종자는 모양이 길고 작기 때문에 기계과종이 곤란하여 재배농가의 어려움이 많다. 본 시험 결과 종자 코팅을 하였을 경우 초기 생육은 약간 떨어지는 경향이 있으나 기계과종이 가능하며 생산비용 절감에 크게 기여할 것으로 사료된다.

5). 육묘 실험

코팅된 종자를 pot실험을 실시하여 발아율을 조사한 결과는 표 4-14와 같이 대체로 양호하였다.

Table 4-14. Effect of various coating materials on growth of lettuce seedling in raising seedling test.

조사항목 처리	엽수	엽중(gr)	근중(gr)	근장(cm)
I	8.0	3.2	0.40	17.3
Ⅱ	8.2	3.0	0.30	17.1
Ⅲ	8.0	2.8	0.40	15.5
Ⅳ	7.3	3.3	0.50	18.7
V	8.3	3.1	0.45	17.4
Ⅵ	8.3	3.7	0.60	18.5

I, Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ, V, Ⅵ : 4단계- 종자 코팅시 접착제의 종류 참조



Fig. 4-6. Effect of various coating materials on growth of lettuce seedling

라. 배추

1). 코팅후 무게변화

코팅 종자의 운반, 포장 등을 고려하여 코팅후 무게변화를 알아본 결과는 표 4-15와 같았다. 이 결과로부터 코팅제의 무게는 IV(황토)의 경우 증가율이 가장 높았다.

Table 4-15. Effect of various coating materials on weight change of chinese cabbage seed after coating

구분	코팅전무게	코팅후	
		종자무게(g)	증가율(%)
I	0.32	0.61	190.6
II		0.60	187.5
III		0.69	215.6
IV		0.82	256.2

2). 코팅종자의 실내 검정 발아율

종자를 코팅한 후 발아접시에서 발아율을 알아본 결과는 표 4-16과 같았다. 이 결과로부터 대체로 거의 유사한 발아율을 나타내었다.

Table 4-16. Effect of various coating methods on germination rate of chines cabbage seed.

코팅제의 종류	I	II	III	IV	V	VI
발아율	93	95	92	94	95	96

3). 육묘 트레이 검정

코팅된 배추 종자를 육묘 트레이에 파종하여 발아율을 조사한 결과는 아래 표 4-17과 같았다. 이 결과로부터 코팅제 IV(황토)의 경우 배추의 발아율이 낮은 이유는 염분을 가진 머드와 살균이 안된 황토의 영향으로 생각하고 배추의 코팅제로는 기계 파종을 감안하여 I(거정석 + 맥반석)과 V(키토산, 올리고당)이 가장 적합함을 알 수 있다.

Table 4-17. Effect of various coating materials on germination rate of chinese cabbage seed coated in tray test.

코팅제의 종류	I	II	III	IV	V	VI
발아율	84	80	80	75	85	85

4). 사진

본 연구결과에 의한 종자(배추)의 코팅결과는 아래 그림 4-7에서 보는바와 같다.

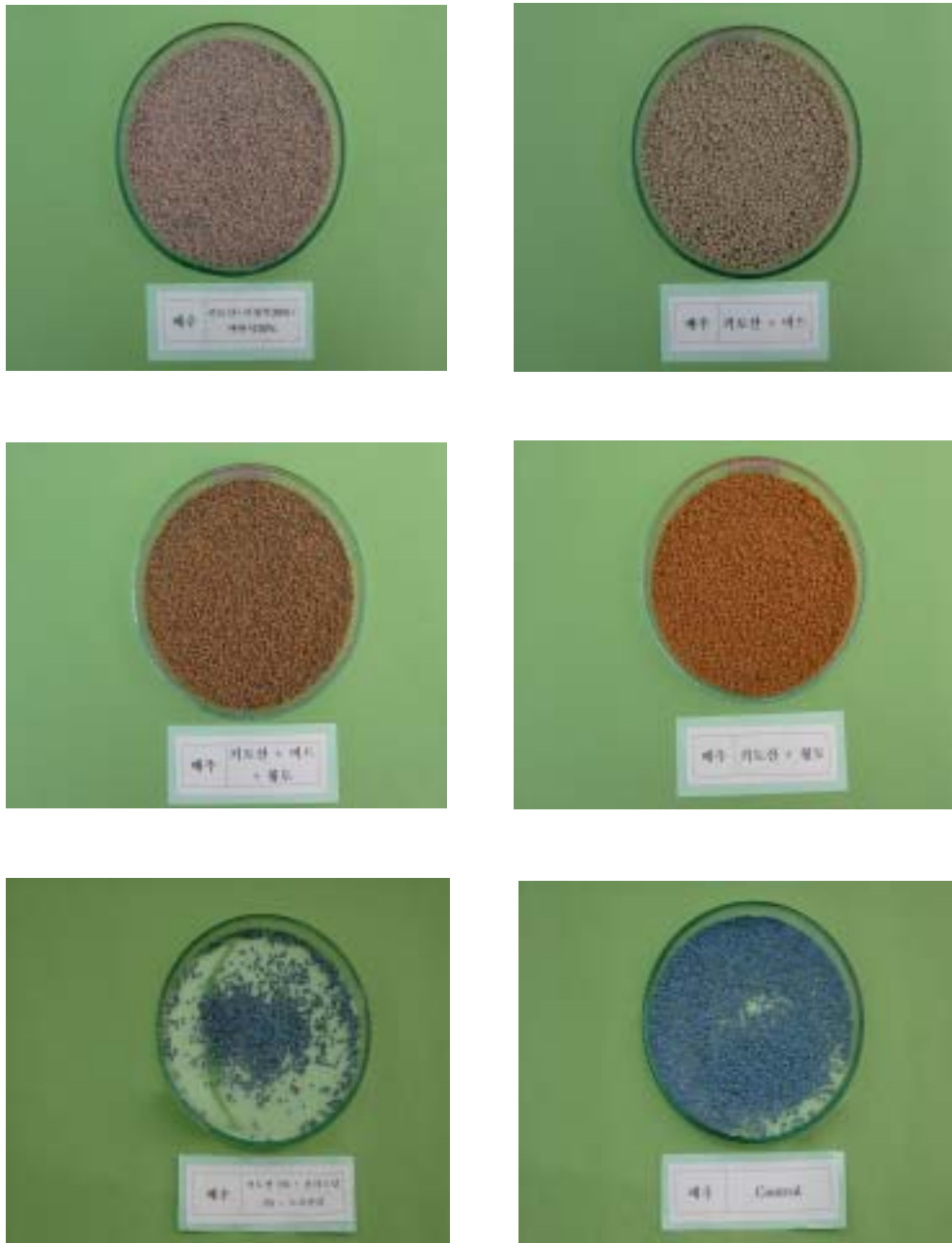


Fig. 4-7. Photography of chinese cabbage coating seed using various materials.

5). 육묘시험

코팅된 종자를 pot실험을 실시하여 발아율을 조사한 결과는 표 4-18과 같이 대체로 양호하였다

Table 4-18. Effect of various coating materials on growth of chinese cabbage seedlings in raising seedling test.

조사항목 처리	엽수	엽중(gr)	근중(gr)	근장(cm)
I	8.3	4.5	2.1	15.8
II	8.3	4.1	1.8	12.3
III	8.3	4.4	1.9	13.3
IV	8.6	4.3	1.1	12.3
V	8.6	5.0	2.2	14.5
VI	9.0	4.9	1.3	13.5

I, II, III, IV, V, VI : 4단계- 종자 코팅시 접착제의 종류 참조



Fig. 4-8. Effect of various coating materials on growth of chinese cabbage seedling

마. 파(흑금장파)

1). 코팅후 무게변화

코팅 종자의 운반, 포장 등을 고려하여 코팅후 무게변화를 알아본 결과는 표 4-19와 같았다. 이 결과로부터 코팅제의 무게는 IV의 경우 증가율이 가장 높았다.

Table 4-19. Effect of various coating materials on weight change of welsh onion seed after coating

구분	코팅전무게	코팅후	
		종자무게(g)	증가율(%)
I	0.22	0.67	303.5
II		0.62	281.8
III		0.53	240.9
IV		0.71	322.7

2). 코팅종자의 실내 검정 발아율

종자를 코팅한 후 발아접시에서 발아율을 알아본 결과는 표 4-20과 같았다. 이 결과로부터 대체로 거의 유사한 발아율을 나타내었다. 다만, IV(황토)의 경우 발아율이 현저한 차를 나타냄을 알 수 있었다. 이는 황토의 미살균처리가 원인으로 생각된다.

Table 4-20. Effect of various coating methods on germination rate of welsh onion seeds.

코팅제의 종류	I	II	III	IV	V	VI
발아율	89	86	85	74	90	93

3). 육묘 트레이 검정

코팅된 파 종자를 육묘 트레이에 파종하여 발아율을 조사한 결과는 그림 4-21과 같다. 이 결과로부터 코팅제 II(머드), III(황토+머드)의 경우 파 종자의 발아율이 낮은 이유는 염분을 가진 머드의 영향으로 생각하고 파 종자의 코팅제로는 기계파종을 감안하여 I(거정석 + 맥반석)과 IV(황토)가 가장 적합함을 알 수 있다.

Table 4-21. Effect of various coating materials on germination rate of welsh onion seed coated in tray test.

코팅제의 종류	I	II	III	IV	V	VI
발아율	75	70	70	80	70	75

4). 사진

과 종자코팅의 결과는 그림 4-9와 같다.

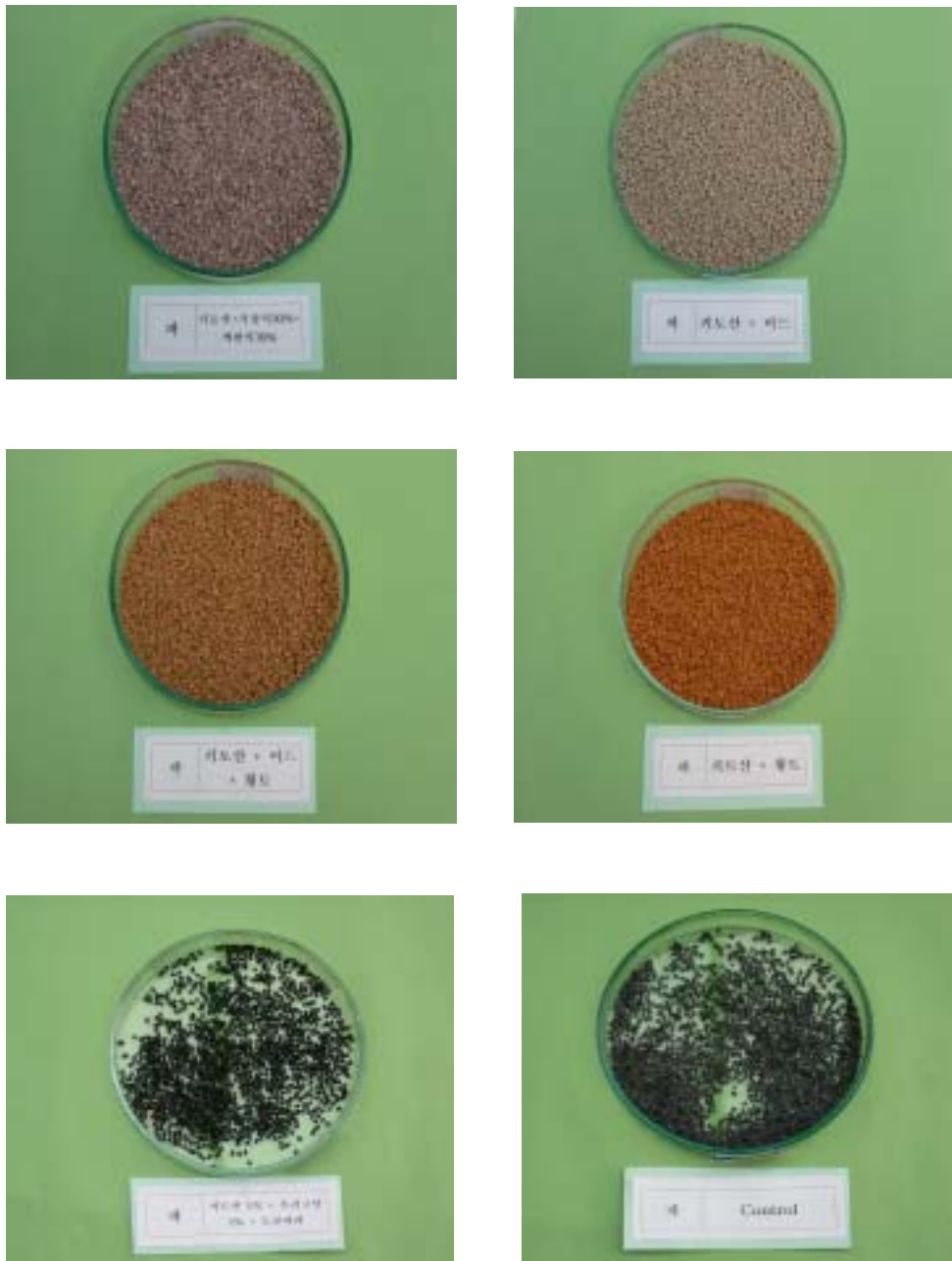


Fig. 4-9. Photography of welsh onion coating seed using various materials.

5). 육묘시험

코팅된 종자를 pot실험을 실시하여 발아율을 조사한 결과는 표 4-22와 같이 대체로 양호하였다

Table 4-22. Effect of various coating materials on growth of welsh onion seedlings in raising seedling test.

조사항목 처리	엽수	엽중(gr)	엽장(cm)	근중(gr)	근장(cm)
I	3.0	0.45	22.8	0.043	7.5
II	3.0	0.40	16.4	0.040	6.1
III	3.3	0.50	22.7	0.053	5.9
IV	3.0	0.38	18.8	0.038	4.5
V	2.6	0.48	17.5	0.053	5.9
VI	3.0	0.53	19.7	0.056	7.4

I, II, III, IV, V, VI : 4단계- 종자 코팅시 접착제의 종류 참조

Fig. 4-10. Effect of various coating materials on growth of welsh onion seedling

바. 콩

1). 코팅후 무게변화

코팅 종자의 운반, 포장 등을 고려하여 코팅후 무게변화를 알아본 결과는 표 4-23과 같았다. 코팅제의 무게는 코팅제와 관계없이 거의 유사한 결과를 나타내다. 이는 콩 종자의 무게가 크기 때문으로 생각하였다.

Table 4-23. Effect of various coating materials on weight change of bean seeds after coating

구분	코팅전무게	코팅후	
		종자무게(g)	증가율(%)
I	12.68	16.76	132.1
II		16.50	130.1
III		16.18	127.6
IV		16.70	131.7

2). 코팅종자의 실내 검정 발아율

종자를 코팅한 후 발아접시에서 발아율을 알아본 결과는 표 4-24와 같았다. 이 결과로부터 대체로 97% 이상의 발아율을 나타내었다. 콩의 경우 코팅제의 종류에 의한 영향을 거의 받지 않는 것으로 생각된다.

Table 4-24. Effect of various coating methods on germination rate of bean seeds.

코팅제의 종류	I	II	III	IV	V	VI
발아율	99	97	100	99	97	100

3). 육묘 트레이 검정

코팅된 콩 종자를 육묘 트레이에 파종하여 발아율을 조사한 결과는 표 4-25와 같다. 이 결과로부터 콩 종자는 대체로 양호하였으나 코팅제 II(머드)가 가장 낮은 값을 나타내었다. 콩 종자는 염분의 피해가 많음을 알 수 있다.

Table 4-25. Effect of various coating materials on germination rate of bean seed coated in tray test.

코팅제의 종류	I	II	III	IV	V	VI
발아율	90	80	80	85	90	95

4). 사진

본 연구결과에 의한 콩 종자의 결과는 그림 4-11에서 보는바와 같다.



Fig. 4-11. Photography of bean coating seed using various materials.

5). 육묘시험

코팅된 종자를 pot실험을 실시하여 발아율을 조사한 결과는 표 4-26과 같이 대체로 양호하였다

Table 4-26. Effect of various coating materials on growth of bean seedling in raising seedling test.

조사항목 처리	엽수	엽중(gr)	근중(gr)	근장(cm)
I	11.3	2.8	1.40	14.1
II	12.0	2.5	1.65	16.5
III	12.3	2.7	1.55	15.5
IV	12.5	2.9	1.75	16.3
V	13.0	2.5	1.60	16.2
VI	12.3	2.8	1.60	16.2

I, II, III, IV, V, VI : 4단계- 종자 코팅시 접착제의 종류 참조

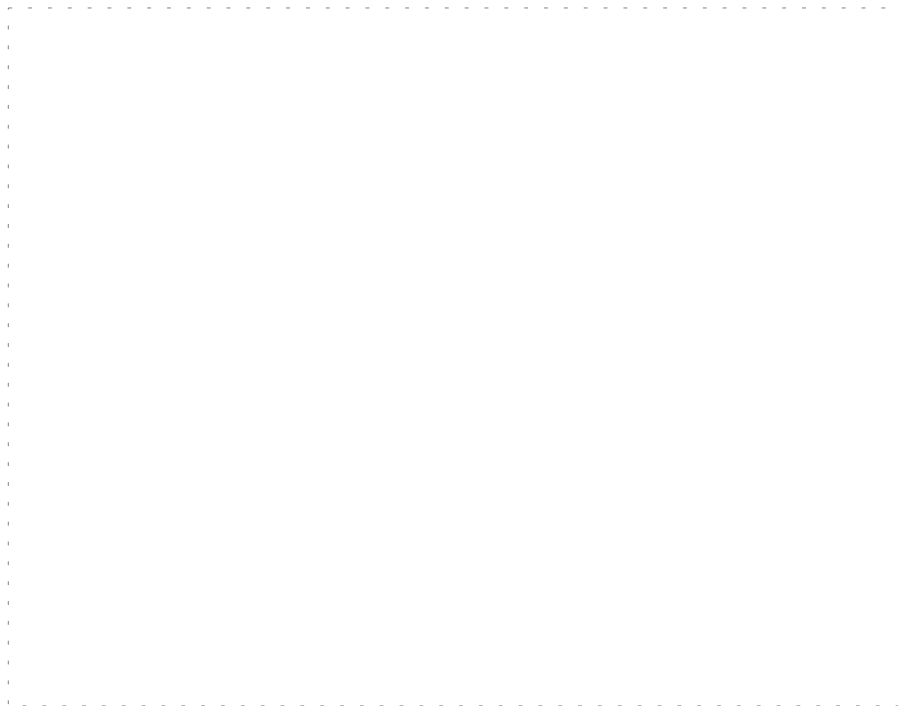


Fig. 4-12. Effect of various coating materials on growth of bean seedling

사. 고추(금탑고추)

1). 코팅후 무게변화

코팅 종자의 운반, 포장 등을 고려하여 코팅후 무게변화를 알아본 결과는 표 4-27과 같았다. 이 결과로부터 코팅제의 무게는 코팅제와 관계없이 거의 유사한 결과를 나타내었다. 이는 고추 종자의 무게가 크기 때문으로 생각하였다.

Table 4-27. Effect of various coating materials on weight change of pepper seed after coating

구분	코팅전무게	코팅후	
		종자무게(g)	증가율(%)
I	0.61	1.30	213.1
II		1.28	213.3
III		1.34	219.6
IV		1.30	213.1

2). 코팅종자의 실내 검정 발아율

종자를 코팅한 후 발아접시에서 발아율을 알아본 결과는 표 4-28과 같았다. 이 결과로부터 대체로 97% 이상의 발아율을 나타내었다. 고추의 경우 코팅제의 종류에 의한 영향을 거의 받지 않는 것으로 생각된다.

Table 4-28. Effect of various coating methods on germination rate of pepper seed.

코팅제의 종류	I	II	III	IV	V	VI
발아율	97	90	95	95	100	100

3). 육묘 트레이 검정

코팅된 고추 종자를 육묘 트레이에 파종하여 발아율을 조사한 결과는 표4-29에서 보는바와 같이 고추 종자는 코팅제 II(머드), III(황토+머드)가 가장 낮은 값을 나타내었다. 콩 종자는 염분의 피해가 많음을 알 수 있다.

Table 4-29. Effect of various coating materials on germination rate of pepper seed coated in tray test.

코팅제의 종류	I	II	III	IV	V	VI
발아율	95	80	80	90	100	100

4). 고추종자 코팅 결과

본 연구결과에 의한 종자(고추)의 코팅결과는 그림 4-13에서 보는바와 같다.

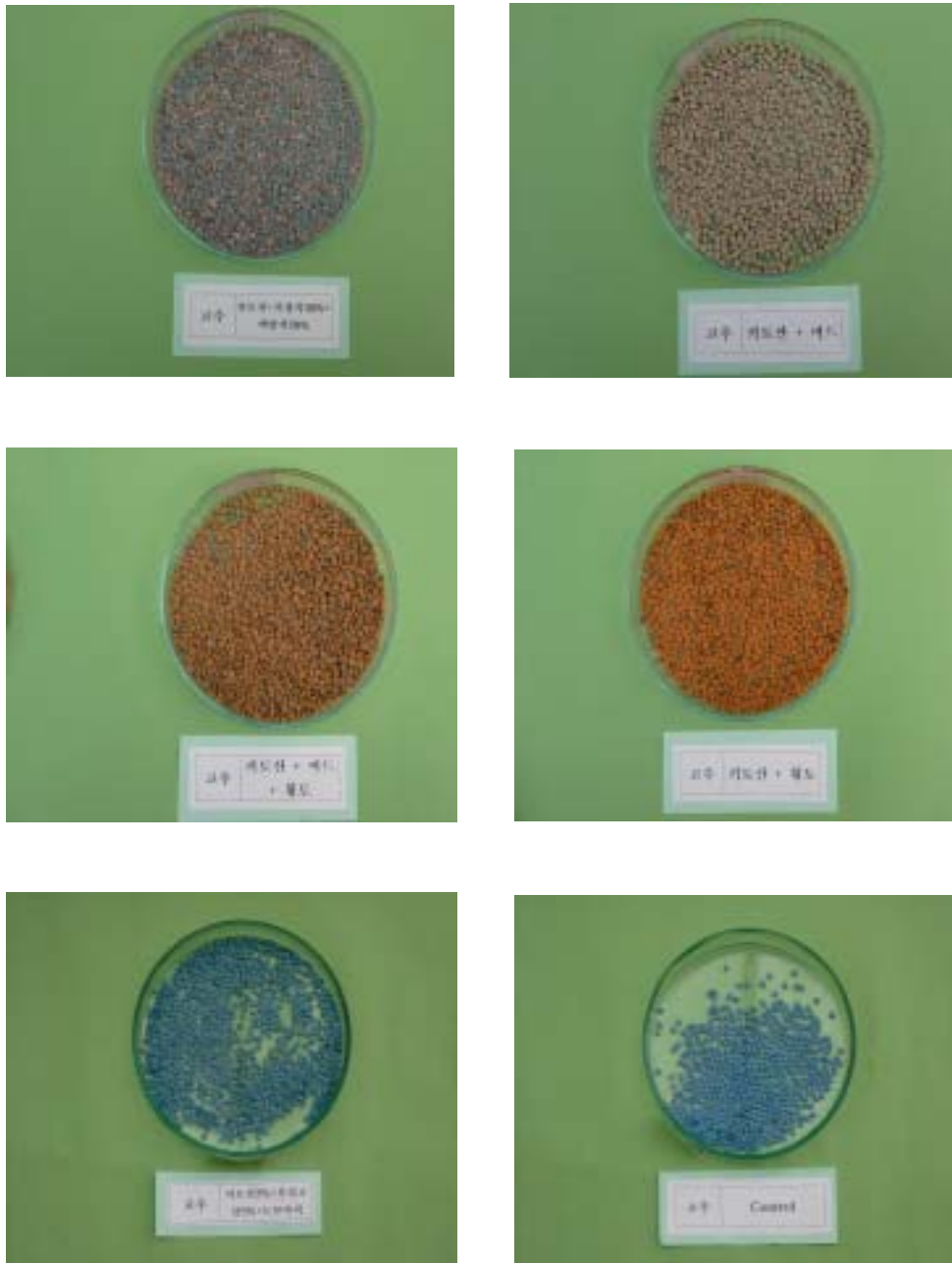


Fig. 4-13. Photography of pepper coating seed using various materials.

5). 육묘시험

코팅된 종자를 pot실험을 실시하여 발아율을 조사한 결과는 표 4-30과 같이 대체로 양호하였다.

Table 4-30. Effect of various coating materials on growth of pepper seedlings in raising seedling test.

조사항목 처리	엽수	엽중(gr)	근중(gr)	근장(cm)
I	8.0	1.00	0.40	10.0
II	9.2	0.70	0.40	10.0
III	6.3	0.80	0.43	8.5
IV	8.6	0.83	0.43	9.9
V	8.7	1.13	0.56	11.6
VI	9.0	0.90	0.50	11.1

I, II, III, IV, V, VI : 4단계- 종자 코팅시 접착제의 종류 참조

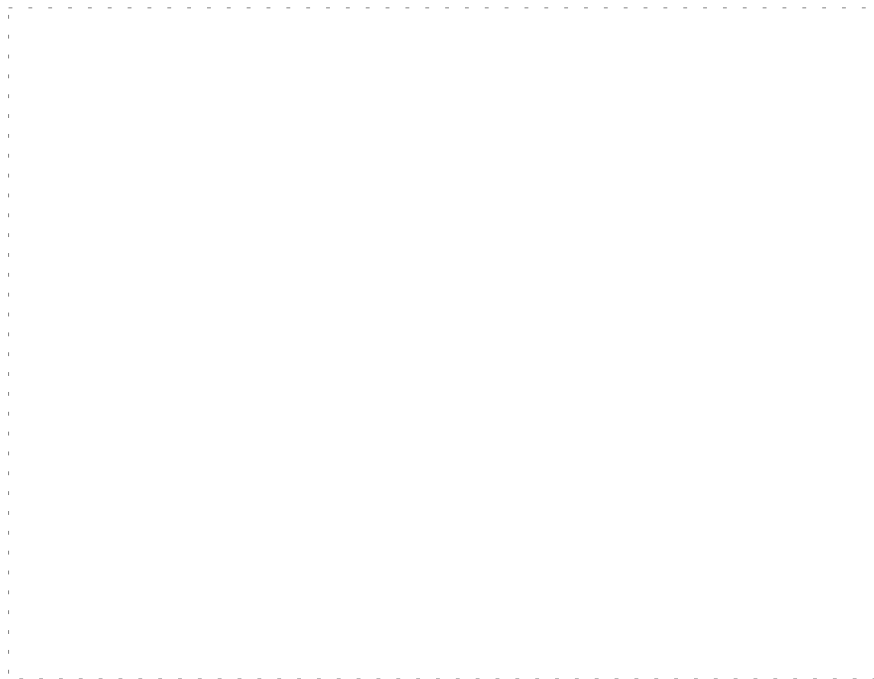


Fig. 4-14. Effect of various coating materials on growth of pepper seedling.

아. 참외

1). 코팅후 무게변화

코팅 종자의 운반, 포장 등을 고려하여 코팅후 무게변화를 알아본 결과는 표 4-31과 같았다. 코팅제의 무게는 코팅제와 관계없이 거의 유사한 결과를 나타내었다. 이는 참외 종자는 종자 표면에 코팅제가 골고루, 두껍게 부착되었음을 알 수 있었다.

Table 4-31. Effect of various coating materials on weight change of oriental melon seed after coating.

구분	코팅전무게	코팅후	
		종자무게(g)	증가율(%)
I	0.95	3.10	326.3
II		3.20	336.8
III		3.38	355.7
IV		3.65	384.2

2). 코팅종자의 실내 검정 발아율

종자를 코팅한 후 발아접시에서 발아율을 알아본 결과는 표 4-32과 같았다. 대체로 92% 이상의 높은 발아율을 나타내었다. 참외의 경우 코팅제의 종류에 의한 영향을 거의 받지 않는 것으로 생각된다.

Table 4-32. Effect of various coating methods on germination rate of oriental melon seed.

코팅제의 종류	I	II	III	IV	V	VI
발아율	95	92	94	96	96	95

3). 육묘 트레이 검정

코팅된 참외 종자를 육묘 트레이에 파종하여 발아율을 조사한 결과는 표4-33에서 보는 바와 같다. 이 결과로부터 코팅제 II(머드)의 경우 가장 낮은 값을 나타냄을 알 수 있었다.

Table 4-33. Effect of various coating materials on germination rate of oriental melon seed coated in tray test.

코팅제의 종류	I	II	III	IV	V	VI
발아율	95	85	90	90	90	95

4). 참외 종자 코팅 결과

본 연구결과에 의한 참외 종자의 코팅결과는 그림 4-15에서 보는 바와 같다.

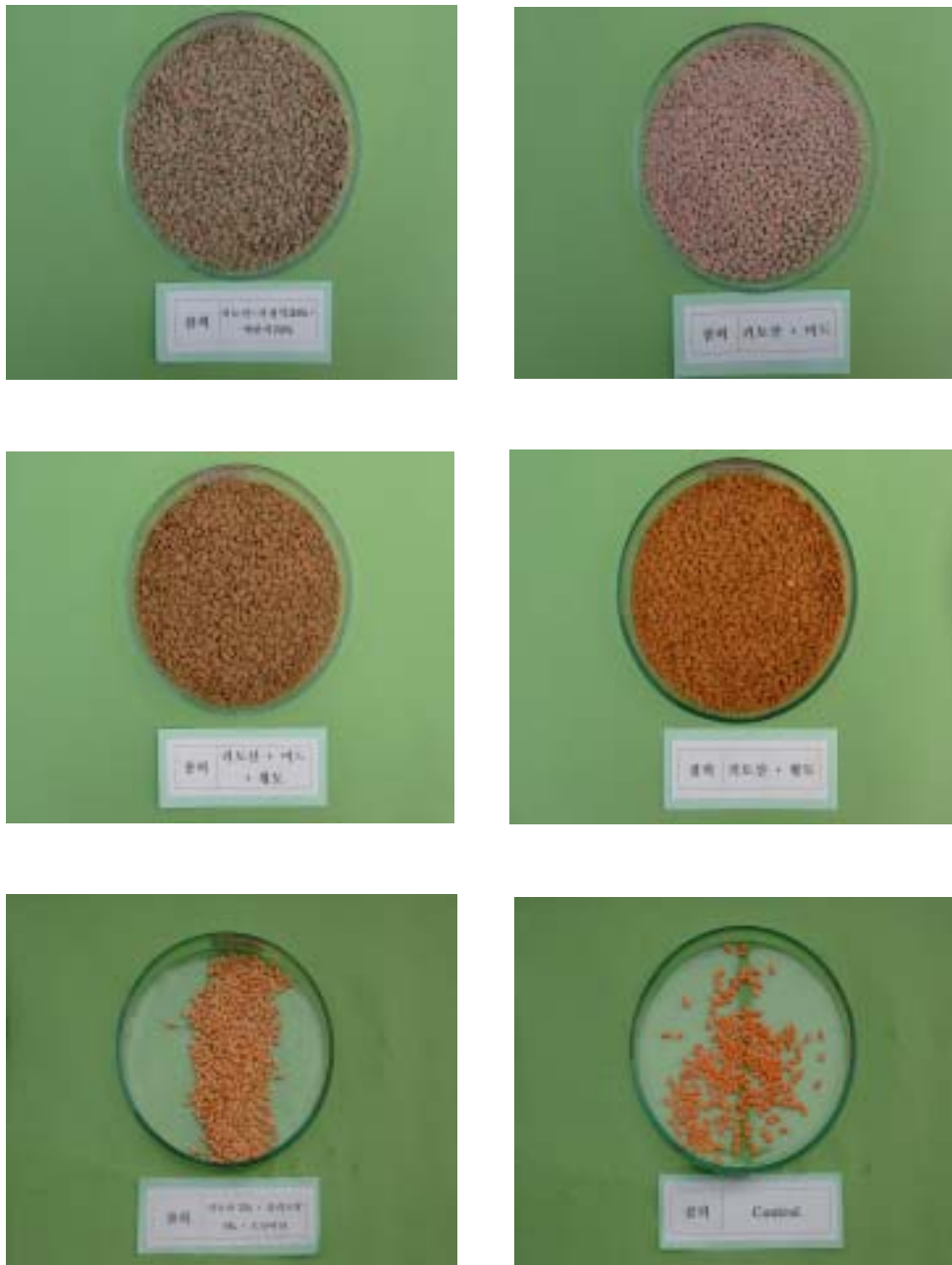


Fig. 4-15. Photography of oriental melon coating seed using various materials.

5). 육묘시험

코팅된 종자를 pot실험을 실시하여 발아율을 조사한 결과는 표 4-34와 같이 대체로 양호하였다

Table 4-13. Effect of various coating materials on growth of oriental melon seedlings in raising seedling test.

조사항목 처리	엽수	엽중(gr)	근중(gr)	근장(cm)
I	5.6	2.2	1.46	21.2
II	5.6	2.5	1.83	14.3
III	6.3	2.9	2.30	16.8
IV	5.0	1.7	1.30	14.1
V	5.6	2.7	1.70	15.4
VI	6.0	3.1	1.60	12.5

I, II, III, IV, V, VI : 4단계- 종자 코팅시 접착제의 종류 참조

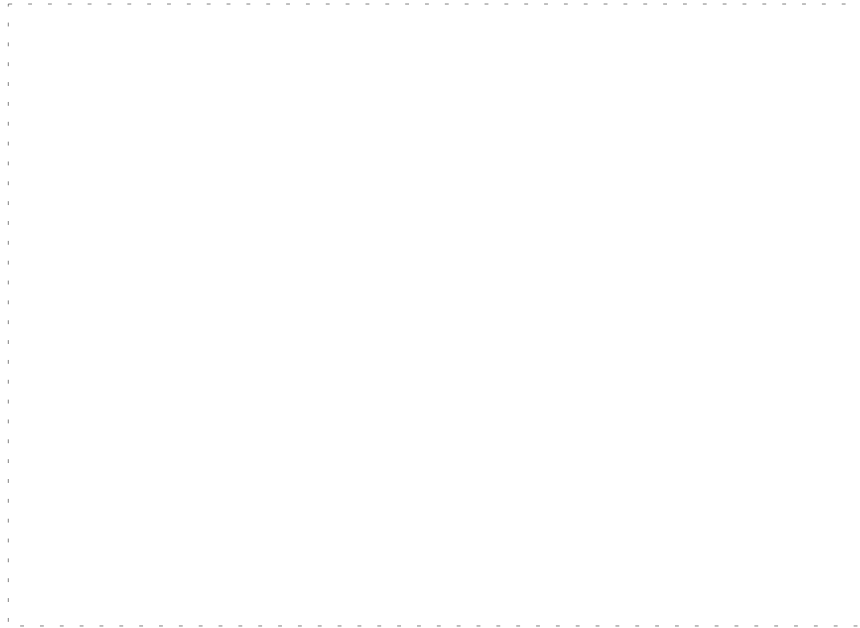


Fig. 4-16. Effect of various coating materials on growth of oriental melon seedling.

자. 무(은초롱무)

1). 코팅후 무게 변화

코팅 종자의 운반, 포장 등을 고려하여 코팅후 무게변화를 알아본 결과는 표 4-35과 같았다. 코팅제의 무게는 코팅제와 관계없이 거의 유사한 결과를 나타내었다.

Table 4-35. Effect of various coating materials on weight change of radish seed after coating

구분	코팅전무게	코팅후	
		종자무게(g)	증가율(%)
I	1.12	1.74	155.3
II		1.70	151.7
III		1.65	147.3
IV		1.70	151.7

2). 코팅종자의 실내 검정 발아율

종자를 코팅한 후 발아접시에서 발아율을 알아본 결과는 표 4-36과 같았다. 대체로 88% 이상의 높은 발아율을 나타내었다.

Table 4-36. Effect of various coating methods on germination rate of radish seed.

코팅제의 종류	I	II	III	IV	V	VI
발아율	90	88	90	91	90	89

3). 육묘 트레이 검정

코팅된 무 종자를 육묘 트레이에 파종하여 발아율을 조사한 결과는 표 4-37과 같았다. 코팅제와 상관없이 무 종자의 발아율은 매우 높은 것으로 나타났다.

Table 4-37. Effect of various coating materials on germination rate of radish seed coated in tray test.

코팅제의 종류	I	II	III	IV	V	VI
발아율	90	89	88	90	90	90

4). 무 종자 코팅의 결과

본 연구결과에 의한 무 종자의 코팅결과는 그림 4-17과 같았다.



Fig. 4-17. Photography of radish coating seed using various materials.

5). 육묘시험

코팅된 종자를 pot실험을 실시하여 발아율을 조사한 결과는 표 4-38과 같이 대체로 양호하였다

Table 4-38. Effect of various coating materials on growth of radish seedlings in raising seedling test.

조사항목 처리	엽수	엽중(gr)	근중(gr)	근장(cm)
I	5.0	4.00	0.75	19.8
II	5.0	4.80	0.73	19.7
III	4.6	3.86	0.76	16.1
IV	5.0	4.00	0.86	16.2
V	4.3	4.13	0.80	16.6
VI	5.0	4.03	0.83	16.6

I, II, III, IV, V, VI : 4단계- 종자 코팅시 접착제의 종류 참조



Fig. 4-18. Effect of various coating materials on growth of radish seedling.

4. 요약

종자 소독시 농약오염으로 인한 작업자의 안전성, 종자의 파종시 작업의 효율화, 종자의 장기간 보관, 국제간 무역의 편리성이라는 목적을 달성하고, 기존에 사용되는 종자코팅제와는 다른 용도 즉 절화 활성제로도 기능을 갖고 침투 이행성이 강하면서 환경 친화성을 갖춘 종자처리제를 개발하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

가. 본 연구에 사용된 종자는 주곡인 벼와 양파, 상추, 배추, 파, 콩, 고추, 참외, 무 등 시설원에 생산 빈도가 많은 종자를 택하였다.

나. 종자의 코팅방법으로써 1차 작업은 종자의 살균, 소독, 2차 작업은 키토산과 그 유도체 및 자생식물 추출액의 코팅, 3차 작업은 기계파종이 가능하도록 무기성 광물질에 의한 pellet형성작업, 4차 작업은 종자 표면의 방수, 탈락방지용 PFC의 코팅작업으로 구성하였다.

다. 종자 코팅용으로 키토산은 아실화도가 0.4도내외인 키토산을 사용하였으며, 키토산-올리고당은 저분자 키토산을 효소발효에 의해 분해된 키토산-올리고당을 사용하였다.

라. 종자코팅용 미네랄제제는 거정석, 맥반석, 머드, 황토 등을 사용하고, 접착제는 0.5% PVA용액과 8% 아라비아검(Arabic gum)을 사용하고, 마지막으로 방수를 위하여 PFC를 코팅하였다.

마. 개별 종자의 코팅후 평가는 아래와 같았다.

1) 벼

벼는 코팅제의 영향을 많이 받는 종자로 판명되었다. 황토로 코팅하였을 경우 코팅후 종자 무게는 평균 2배 가까이 늘어났고, 발아율도 콘트롤 92%에 비하여 65%~83%로 다소 떨어짐을 알 수 있었다. 육묘트레이에 파종한 후 발아율

을 조사한 바 65%~86%로 많은 차를 나타내었다. 이는 머드에 함유된 염분과 살균이 되지 않은 황토의 세균과 관련된 결과로 추정하였다. 또한 코팅종자의 육묘시 처리별 묘의 상태를 확인한 바 IV(키토산과 키토산-올리고당 혼합액)과 I(거정석과 맥반석), II(머드)의 경우가 대체로 양호하였다.

결과적으로 벼 종자의 코팅은 키토산과 그 유도체의 혼합액으로 코팅한 후 기계에 의한 자동 파종을 고려하여 I(거정석과 맥반석 혼합물) 또는 II(머드)를 증량제로 사용하고 접착제는 8% 아라비아검(Arabic gum)을 사용하며, 마지막으로 PFC를 코팅하는 것이 타당하다는 결론을 얻었다.

2) 양과

양과도 코팅제의 영향을 많이 받는 종자로 판명되었다. 양과 종자의 발아율은 콘트롤 65%에 비하여 I(거정석+맥반석)을 제외하면 52%~58%로 매우 낮음을 알 수 있었다. 육묘트레이에 파종한 후 발아율을 조사한 바 45%~60%로 많은 차를 나타내었다. 또한 코팅종자의 육묘시 처리별 묘의 상태를 확인한 바 대체로 부적합하였다.

결과적으로 양과 종자의 코팅은 키토산과 그 유도체의 혼합액으로 코팅한 후 기계에 의한 자동 파종을 고려하여 I(거정석과 맥반석 혼합물)를 증량제로 사용하고 접착제는 8% 아라비아검(Arabic gum)을 사용하였다.

3) 상추

상추는 코팅제의 영향을 많이 받지 않는 종자로 판명되었다. 양과 종자의 발아율은 91%이상이었으나 육묘트레이에 파종한 후 발아율을 조사한 바 60%~95%로 많은 차를 나타내었다. 또한 코팅종자의 육묘시 처리별 묘의 상태를 확인한 바 대체로 양호하였다.

결과적으로 상추 종자의 코팅은 키토산과 그 유도체의 혼합액으로 코팅한 후 기계에 의한 자동 파종을 고려하여 IV(황토)를 제외한 모든 무기미네랄 제제를 증량제로 사용하여도 무방한 것으로 판명되었다.

4) 배추

배추는 코팅제의 영향을 많이 받지 않는 종자로 판명되었다. 배추 종자의 발아율은 92%이상이었으나 육묘트레이에 파종한 후 발아율을 조사한 바 75%~82%로 다소 적은 차를 나타내었다. 또한 코팅종자의 육묘시 처리별 묘의 상태를 확인한 바 대체로 양호하였다.

결과적으로 배추 종자의 코팅은 키토산과 그 유도체의 혼합액으로 코팅한 후 기계에 의한 자동 파종을 고려하여 모든 무기미네랄 제제를 증량제로 사용하여도 무방한 것을 알 수 있었다.

5) 파

파는 황토를 제외한 다른 코팅제의 영향을 많이 받지 않는 종자로 판명되었다. 파 종자의 발아율은 85%이상이었으나 육묘트레이에 파종한 후 발아율을 조사한 바 70%~75%로 다소 적은 차를 나타내었다. 또한 코팅종자의 육묘시 처리별 묘의 상태를 확인한 바 대체로 양호하였다. 결과적으로 파 종자의 코팅은 키토산과 그 유도체의 혼합액으로 코팅한 후 기계에 의한 자동 파종을 고려하여 황토를 제외한 다른 무기미네랄 제제를 증량제로 사용하여도 무방한 것을 알 수 있었다.

6) 콩

콩은 모든 코팅제의 영향을 많이 받지 않는 종자로 판명되었다. 콩 종자의 발아율은 97%이상이었으나 육묘트레이에 파종한 후 발아율을 조사한 바 80% 이상으로 나타내었다. 또한 코팅종자의 육묘시 처리별 묘의 상태를 확인한 바 대체로 양호하였다.

결과적으로 배추 종자의 코팅은 키토산과 그 유도체의 혼합액으로 코팅한 후 기계에 의한 자동 파종을 고려하여 모든 무기미네랄 제제를 증량제로 사용하여도 무방한 것을 알 수 있었다.

7) 고추

고추는 모든 코팅제의 영향을 많이 받지 않는 종자로 판명되었다. 고추 종자

의 발아율은 90%이상이었으나 육묘트레이에 파종한 후 발아율을 조사한 바 80%이상으로 나타내었다. 또한 코팅종자의 육묘시 처리별 묘의 상태를 확인한 바 대체로 양호하였다.

결과적으로 고추 종자의 코팅은 키토산과 그 유도체의 혼합액으로 코팅한 후 기계에 의한 자동 파종을 고려하여 모든 무기미네랄 제제를 증량제로 사용하여도 무방한 것을 알 수 있었다.

8) 참외

참외는 모든 코팅제의 영향을 많이 받지 않는 종자로 판명되었다. 참외 종자의 발아율은 92%이상이었으나 육묘트레이에 파종한 후 발아율을 조사한 바 90%이상으로 나타내었다. 또한 코팅종자의 육묘시 처리별 묘의 상태를 확인한 바 대체로 양호하였다.

결과적으로 참외 종자의 코팅은 키토산과 그 유도체의 혼합액으로 코팅한 후 기계에 의한 자동 파종을 고려하여 모든 무기미네랄 제제를 증량제로 사용하여도 무방한 것을 알 수 있었다.

8) 무

무는 모든 코팅제의 영향을 많이 받지 않는 종자로 판명되었다. 무 종자의 발아율은 90%이상이었으나 육묘트레이에 파종한 후 발아율을 조사한 바 88% 이상으로 나타내었다. 또한 코팅종자의 육묘시 처리별 묘의 상태를 확인한 바 대체로 양호하였다.

결과적으로 무 종자의 코팅은 키토산과 그 유도체의 혼합액으로 코팅한 후 기계에 의한 자동 파종을 고려하여 모든 무기미네랄 제제를 증량제로 사용하여도 무방한 것을 알 수 있었다.

제 5절 도꼬마리 추출물로부터 항암 물질의 분석

1. 도꼬마리로부터 생리활성물질 분리법의 개선

가. 실험재료 및 연구방법

1) 실험재료

본 실험에서 사용된 재료는 경남·경북 지역의 산야에 자생하는 *Xanthium strumarium* L.(한국명: 도꼬마리)을 채취하여 음건, 세절한 후 사용하였다.

2) 시료의 조제

도꼬마리 추출액의 조제는 열매를 대상으로 시료 300 g를 3~5회 열수 추출하여 evaporator (EYELA Co. Japan)로 농축한 추출액 1 L을 유기용매인 에테르 및 에틸 아세테이트를 이용하여 분별 추출하였다. 각 추출물을 중성, 산성 및 알칼리성 조건에서 추출하여 filter paper로 여과한 후, 수지성분 및 유독 성분으로 알려진 불용성의 황색물질인 xanthostrumarin 배당체를 제거하여 항균 및 항암활성의 검사 시료로 사용하였다.

3) 시험균주 및 사용배지

도꼬마리 추출물의 항균효과를 검토하기 위하여 본 실험에 사용한 시험균주는 9종의 그람 양성세균, 7종의 그람 음성세균 및 3종의 진균류를 선정하여 사용하였다. 시험균주의 생육배지는 세균의 경우 LB agar (tryptone 10 g, NaCl 10 g, yeast extract 5 g/L)를 효모류는 Y agar (yeast extract 10 g, peptone 20 g, glucose 20 g/L) 그리고 곰팡이는 YM agar (yeast extract 3 g, malt extract 3 g, peptone 5 g, glucose 10 g/L, pH 5.5)를 사용하였다.

4) 항균효과 및 Minimal Inhibitory Concentration (MIC) 측정

가) Agar Diffusion법

18~24시간 배양한(*A. fumigatus*는 7일 배양한 slant로부터 조제한 spore 용액을 사용) 각 시험균주가 포함된 고체배지에 각 종 시료 20 µl가 첨가된 건조한 paper disc (ø 6 mm, Whatman Co.)를 올려놓고, 28°C(효모, 곰팡이)와 37°C(세균)에서 24시간 배양하였다. 항균력 test는 clear zone의 형성유무로 확인하였으며 50, 100, 150 및 200 µg의 농도에 따른 항균효과를 검토하였다. 항균성 물질의 확인은 시험균이 함유된 agar plate위에 전개한 TLC plate를 얹고 30분간 방치한 후, TLC plate를 제거하고, 37°C에서 agar plate를 24시간 배양하였을 때 spot 부위의 clear zone 형성유무로서 확인하였다.

나) FDA (fluorescein diacetate)법

FDA 측정은 Chand 등(1)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, 대수증식기의 시험균 175 µl와 시료 20 µl(각 시료당 3점씩) 96 well microplate에 넣고 30°C에서 40분간 배양 후, 0.2% FDA (아세톤에 용해) 5 µL을 첨가하여 90분간 배양을 계속하였다. 항균효과는 microplate reader (Bio-rad Co. Model 550)를 사용하여 시험균이 생산하는 에스테라아제에 의한 FDA 분해산물인 fluorescein 생성량을 흡광도 490 nm에서 그리고 균 생육도는 655 nm에서 측정하였으며, 항균효과는 시료의 첨가 및 미첨가의 차이로서 확인하였다.

5. 항균성 물질의 항균 Spectrum

각 추출물중 항균효과가 가장 우수한 추출 획분 10 µg에 대하여 그람 양성세균 9균주, 그람 음성세균 7균주 및 진균 3균주에 대한 항균 spectrum을 조사하였다.

6) 세포배양

위암 세포주(SNU 668), 폐 편평세포암 세포주(NCI H1703), 폐 선암 세포주(NCI H 522), 전립선암 세포주(LN CAP clone), 흑색종 세포주(Clone M3) 및 대장암 세포주(HT29)는 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine이 함유된 RPMI-1640 media를

사용하였고, 자궁암 세포주인 HeLa cell과 간암 세포주인 HepG2 cell은 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine이 함유된 F10 media를 사용하였으며, 골육종 세포주인 Saos2 cell 및 인간 정상피부 섬유아세포(Human Normal Skin Fibroblast)는 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine이 함유된 DMEM high glucose media를 사용하여 36°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

7) Trypan Blue Exclusion Assay

0.4% trypan blue 50 µL에 trypsin이 처리된 세포 50 µL을 넣고 섞은 후, hemocytometer에 넣고 1분 후 세포수를 세어 viable cell counting을 시행하였다.

8) 배양 세포계를 이용한 추출물의 항암효과(MTT assay)

위암 세포주, 폐암 세포주, 자궁암 세포주, 간암 세포주, 대장암 세포주, 골육종 세포주, 전립선암 세포주, 흑색종 세포주 및 인간 정상피부 섬유아 세포주를 각각 배양하다가 대수증식기에 도달되면, 단계별로 희석된 농도의 추출물 시료를 각각의 배양세포에 접종하고 일정시간 배양한 후, 나타나는 항종양 효과를 검토하였다. 항종양 효과의 분석방법은 3-(4, 5-dimethyl-2-tetrazolyl)-2, 5-diphenyl-2H tetrazolium bromide (MTT)검사를 하였다. 즉, 대수증식기에 있는 세포 1×10⁴개씩을 180 µl의 배양액에 부유시켜 96 well plate에 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 하루동안 배양한 후, 단계적으로 희석된 추출물 10 µl을 첨가하여 24시간 배양하였다. 배양 후 5 mg/ml 농도의 MTT 10 µl을 첨가하여 4시간 더 배양하고, 상층액 180 µl을 제거한 다음 DMSO 150 µl을 첨가하여 rocker에서 20분간 흔들어 준다. ELISA reader (Dynatech Co.)를 이용하여 570 nm 파장에서 O. D를 측정하여 항암효과를 판정하였으며, 대조군으로 항암제를 녹인 용매를 사용하였다. 또한, 기존에 시판되는 항암제와 항암효과를 비교·검토하기 위하여 etoposide, cisplatin 및 5-fluorouracil (5-FU) 등을 사용하였다.

9) 항균 및 항암성 물질의 분리·정제

항균 및 항암성 물질의 분리·정제는 Fig. 3-1에서 보는바와 같이 도꼬마리 300 g(잎 및 열매)를 증류수를 사용하여 3회 열수 추출하여 감압 농축한 열수 추출액(1

L)을 에테르 및 에틸아세테이트를 이용하여 분별 추출하고, 각 추출물을 다시 중성, 산성, 염기성의 6개 fraction으로 나누어 추출하였다. 무수 Na₂SO₄로 건조한 후, 농축하여 항균 및 항암효과를 검토한 다음, 농축액을 소량의 메탄올로 용해시켜 TLC (Silica gel 60 F₂₅₄)를 사용하여 정성 분석하고 항균활성이 우수한 signal을 silica gel column을 사용하여 분리하였다. 분리된 물질은 HPLC (Shimadzu LC-10AD, Shimpak column C₁₈) 및 GC/MS를 통하여 분석하여 정제도와 분자량을 확인하였으며, 정제과정 중의 항균성 물질의 확인은 *E. coli* K-12 및 *B. subtilis* PCI-219주를 사용하여 agar diffusion법으로 확인하였다.

나. 연구내용 및 고찰

1) 도꼬마리 추출물의 항균효과 및 MIC

항균 및 항암성 물질의 분리·정제를 위하여 도꼬마리 열수 추출액을 에테르 및 에틸아세테이트를 이용하여 분별 추출하였다. 각각의 추출물을 다시 중성, 산성, 염기성 조건에서 추출한 후, *E. coli* 및 *B. subtilis*를 대상으로 agar diffusion법으로 항균활성을 검토한 결과 에테르 및 에틸아세테이트의 중성 및 산성 추출물에서 우수한 항균효과를 나타내었다(결과 미공개). 따라서, 이들 추출물을 각각의 농도로 희석하여 항균활성을 검토한 결과, 50 µg의 농도에서 에틸아세테이트의 중성 추출물보다 에테르의 중성 추출물에서의 항균효과가 우수하였다(표 5-1).

2) 항균 spectrum

각 추출물중 에테르 중성 추출물(XE-N)의 항균효과가 가장 우수하였으므로 이획분에 대하여 항균 spectrum을 조사하였다. 추출물 10 µg에 대해 항균효과는 표 5-2에서 보는바와 같이 그람 양성세균 8균주, 그람 음성세균 6균주를 비롯하여 진균 중 병원성 효모인 *Cryptococcus neoformans*에서도 항균효과를 나타내었다.

Table 5-1. Antibacterial activity of each extract by various concentration.

Samples (μg)	Test strains	Inhibitory zone (\emptyset , mm)	
		<i>E. coli</i> K-12	<i>B. subtilis</i> PCI 219
XE-N	50	15	13
	100	16	17
	150	17	21
	200	17	23
XE-A	50	8	9
	100	10	11
	150	11	13
	200	11.5	15
XEA-N	50	–	–
	100	7	–
	150	8.5	10
	200	10.5	11
XEA-A	50	–	–
	100	–	6
	150	–	8
	200	–	9

Symbols: –, no inhibition

Table 5-2. Antibacterial spectra of extract by neutral ether.

Strains	Sample XE-N (10 µg)
Inhibitory zone (ø, mm)	
Gram-positive	
<i>Mycobacterium phlei</i> KCTC 1932	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1927	10.5
<i>Serratia marcescens</i>	7.5
<i>Streptococcus equii</i>	13
<i>Streptococcus zooepidermicus</i>	7.5
<i>Bacillus megaterium</i>	8
<i>Bacillus subtilis</i>	7.5
<i>Bacillus thermoglucosis</i>	—
<i>Bacillus licheniformis</i> IFO 12197	7.5
Gram-negative	
<i>Escherichia coli</i> K-12	10.5
<i>Escherichia coli</i> KCTC 1923	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 1930	9
<i>Pseudomonas fluorescens</i> KCTC 1645	13
<i>Enterobacter aerogenes</i> KCTC 2190	10.5
<i>Salmonella typhi</i>	7.5
<i>Proteus vulgaris</i>	9
Yeasts	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	7.5
<i>Hansenulla anomala</i> B-7	—
Fungus	
<i>Aspergillus fumigatus</i> IFO 5840	—

3) FDA method에 의한 도꼬마리 추출물의 항균효과

도꼬마리 추출물 중 항균활성의 효과는 지금까지 agar diffusion법을 사용하여 확인하였다. Agar diffusion법은 시료의 확산, 배지중의 성분, 장시간이 요구되는 점등에서 시료에 따라 다소 부정확한 경우도 있다. 따라서, 액체배양을 통한 항균효과의

정량분석을 하기 위해 시험균이 생산하는 에스테라아제생산 저해를 지표로 하는 fluorescense diacetate (FDA)법을 사용하였다. 우선 항균효과가 입증된 추출물을 대상으로 FDA분석조건을 확립하기 위해 XE-N (에테르의 중성 추출물), XEA-N (에틸아세테이트의 중성 추출물)을 대상으로 항균효과를 분석하였다. 표 5-3에서 보인 바와 같이 시험균으로서 세균인 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* 및 효모인 *C. albicans*를 대상으로 검토한 결과, *P. aeruginosa*를 제외한 3균주에 대해 30 ng/ml에서도 뚜렷한 저해효과를 나타내었다.

Table 5-3. Antimicrobial activity of XE-N and XEA-N by FDA method.

Samples	Wavelength	490 nm (FDA)				655 nm			
		<i>E</i>	<i>P</i>	<i>S</i>	<i>C</i>	<i>E</i>	<i>P</i>	<i>S</i>	<i>C</i>
Control		1.101	1.485	0.715	0.539	0.171	0.171	0.294	0.371
	30 ng	0.943	1.634	0.666	0.507	0.201	0.372	0.291	0.339
XE-N	50 ng	1.017	1.624	0.667	0.514	0.206	0.352	0.269	0.349
	100 ng	0.964	1.622	0.700	0.479	0.207	0.348	0.286	0.317
XEA-N	30 ng	0.907	1.474	0.608	0.477	0.190	0.398	0.281	0.325
	50 ng	0.917	1.568	0.667	0.536	0.183	0.366	0.302	0.384
	100 ng	0.910	1.525	0.683	0.526	0.192	0.350	0.289	0.366
Control		1.391	0.543	0.578	0.559	0.175	0.180	0.245	0.371
	1 µg	1.237	0.641	0.653	0.494	0.197	0.195	0.258	0.319
XE-N	5 µg	0.935	0.693	0.550	0.482	0.221	0.282	0.215	0.292
	10 µg	0.816	0.738	0.556	0.516	0.228	0.362	0.233	0.321
	1 µg	1.110	0.730	0.501	0.475	0.209	0.246	0.238	0.310
XEA-N	5 µg	0.970	0.616	0.494	0.497	0.234	0.272	0.213	0.323
	10 µg	0.873	0.718	0.506	0.501	0.283	0.334	0.187	0.310

Symbols: *E*, *Escherichia coli*; *P*, *Pseudomonas aeruginosa*; *S*, *Staphylococcus aureus*; *C*, *Candida albicans*.

9:1의 비율로 혼합하여 사용하였으며, short wave UV lamp (254 nm)로 확인한 결과, Rf치가 0.71 (S1), 0.59 (S2) 및 0.39 (S3)로서 세 개의 signal이 검출되었다. TLC plate assay를 통하여 항균활성이 우수한 signal S1, S2 및 S3을 silica gel column을 이용하여 각각 분리하였다. 분리된 S1을 HPLC (Shimadzu LC-10AD, Shimpak column C₁₈, MeOH : H₂O = 1:1)를 이용하여 분석한 결과, retention time 20.664분에서 peak가 나타났으나 소량의 혼합물이 공존함으로 Second-HPLC로서 재 정제를 수행하였다. 분취용 Metachem nucleosil (C₁₈) column을 사용하여 MeOH : H₂O = 6:4의 용매로서 흡광도 254 nm에서 검출된 peak를 분취하였다. 그림 5-2에서 보인바와 같이, 22.477분에서 single peak로서 검출되었으며, Chromatopak (Shimadzu Co.)으로 분석한 결과, 순도가 100%로 정제되었음을 알 수 있었다. 정제된 XE-N-S1을 UV/Visible spectrophotometer (Parmacia Co. Biochrom 4060)를 사용하여 200~900 nm에서 scanning한 결과 그림 5-3에서 보는바와 같이, 215 nm에서 최대 흡광도를 나타내었으며, GC/MS를 통하여 분석한 결과, 그림 5-4에서 보는바와 같이 분자량이 248인 단일물질로 확인되었다.

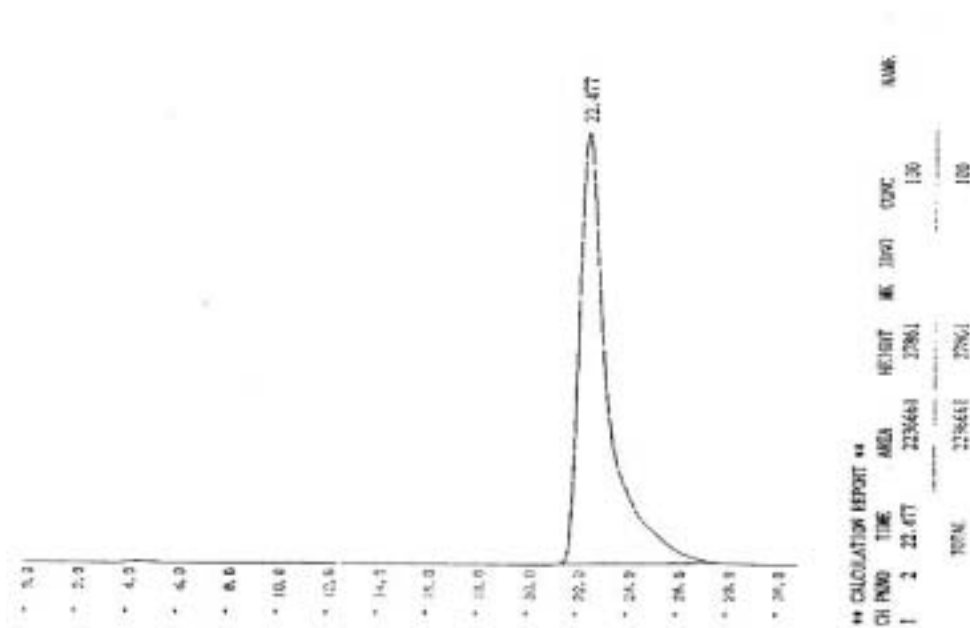


Fig. 5-2. Purification of XE-N-S1 by second-HPLC.

Start Wavelength 200.0 nm
End Wavelength 900.0 nm
Temperature Off
Plot Step 1.0 nm
Scan mode Abs
Scan speed 2400 nm/min

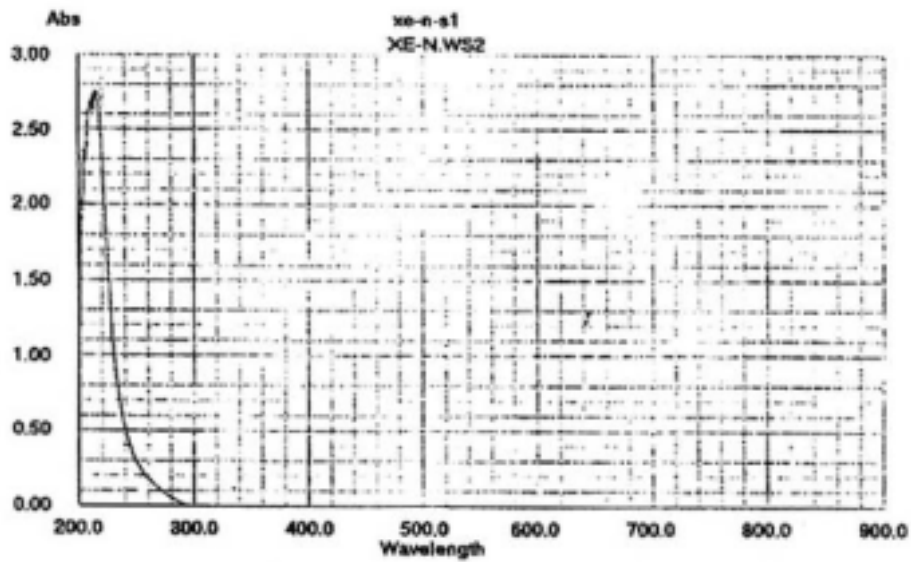


Fig. 5-3. Absorption spectrum of XE-N-S1 by UV/Visible spectrophotometer.

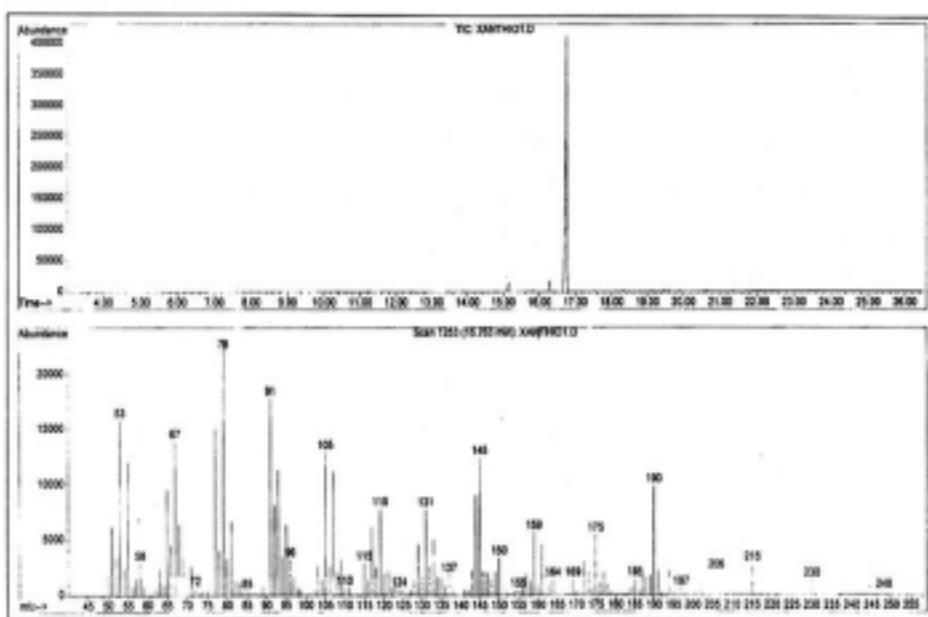


Fig. 5-4. Analysis of purified XE-N-S1 by GC/MS.

5) XE-N-S3의 분리

에테르 중성 추출물 중, 위에서 분리한 S1이외의 혼합된 S2와 S3을 분리하기 위하여 먼저 XE-N-S1을 분리한 후, Rf치가 0.59 (S2)와 0.39 (S3)를 포함한 농축액을 소량의 메탄올로 용해시킨 다음, TLC를 사용하여 분석하였다. 전개용매로는 CH₂Cl₂와 ethylacetate를 각각 8.5:1.5의 비율로 혼합하여 사용하였으며 TLC분석 결과를 참조하여 동일용매 조건하에서 silica gel column을 사용하여 분리하였다. 분리된 XE-N-S3을 HPLC (Shimadzu LC-10AD, Metachem nucleosil C₁₈, MeOH : H₂O = 6:4)를 이용하여 분석한 결과, retention time 10.735분의 peak가 main으로 정제도는 91%를 보였으며, 8.979분의 peak가 혼합되어 나타났다(결과 미계재). 이들 화합물을 단리하기 위하여 Second-HPLC (Shimadzu LC-10AD, Methachem nucleosil C₁₈, MeOH : H₂O = 1:1)을 실시하여 재 정제한 결과, retention time 20.275분의 단일 peak임을 확인하였다. 분리된 화합물의 분자량을 조사하기 위하여 GC/MS로 측정 한 결과, 분자량 262인 단일 물질로 확인되었지만, 정제 후 수일 내에 분해되는 것으로 보아 상당히 불안정한 물질로 판단되었다.

6) Ether 산성 추출물(XE-A)로부터 향균, 항암성 물질의 분리·정제

향균효과가 입증된 XE-A로부터 향균, 항암성 물질의 분리·정제는 XE-N의 정제과정과 동일한 방법을 사용하였다. 먼저 추출 농축액을 소량의 MeOH로 용해시킨 다음 TLC로 분석하였다. 전개용매로는 CH_2Cl_2 와 ethylacetate를 각각 9:1의 비율로 혼합하여 사용하였으며, short wave UV lamp (254 nm)로 확인한 결과, Rf치가 0.74 (S1), 0.63 (S2), 0.55 (S3)와 0.38 (S4)로 4 종류의 signal이 검출되었다. 이들 signal에 대한 항균활성은 TLC plate assay를 통하여 확인한 결과, 3 개의 signal 즉, S1, S2, S3에서 각각 항균활성을 나타내었다. 따라서 이들을 분리하기 위해 TLC분석 결과를 기초로 농축액을 silica gel 60 column에 충전한 후, 위와 동일한 용매를 사용하여 용출하였다. 그 결과 4개의 signal중 분리가 용이한 XE-A-S3을 단리 하였으며, HPLC (Shimadzu LC-10AD, Metachem nucleosil C₁₈, MeOH : H₂O = 6:4)를 이용하여 분석한 결과, retention time 11.222분의 peak가 main으로 정제도가 92%를 보였으며, 8.930분의 peak가 약간 혼합되어 나타났다. 이들 물질을 단리하기 위해 용매조건을 달리하여 HPLC (Shimadzu LC-10AD, Methachem nucleosil C18, MeOH : H₂O = 1:1)로 정제하였으나 (결과 미계재), XE-N-S3과 마찬가지로 수일 내에 분해되는 것으로 보아 이 물질 또한 상당히 불안정한 것으로 추정되었다.

7) 에틸아세테이트 중성 추출물(XEA-N)로부터 향균, 항암성 물질의 분리 및 정제

향균 및 항암효과가 입증된 한국산 도꼬마리의 에틸아세테이트 중성 추출물 (XEA-N)로부터 향균, 항암성 물질의 분리·정제는 XE-N의 정제과정과 동일한 방법으로 수행하였다. 먼저 추출 농축액을 소량의 메탄올로 용해시킨 후, TLC (Silica gel 60 F₂₅₄)로 분석하였다. 전개용매로는 CH_2Cl_2 와 ethylacetate를 각각 9:1의 비율로 혼합하여 사용하였으며, short wave UV lamp (254 nm)로 확인한 결과, Rf치가 0.73 (S1), 0.61 (S2) 및 0.46 (S3)으로서 3 종류의 물질이 검출되었다. TLC분석 결과를 바탕으로 농축액을 silica gel 60 column에 충전한 후, 위와 동일한 용매를 사용하여 용출하였다. 그 결과, XEA-N-S2를 분리하였으며, HPLC (Shimadzu LC-10AD, Metachem nucleosil C₁₈, MeOH : H₂O = 6:4)를 이용하여 재 정제한 결과, retention time 14.691분의 단일 peak임이 확인되었지만, 이 물질 또한 빠른 시간 내에 분해되었다.

8) 도꼬마리 추출물 및 정제된 유효물질의 항암효과

항암효과를 검토하기 위하여 도꼬마리 추출물 및 정제된 생리활성물질을 DMSO 및 EtOH에 용해하여 사용하였는데, XE-A와 XE-B 및 XEA-A와 XEA-B는 잘 용해되지 않았다. 각종 시료에 대한 암세포 억제농도(MIC)는 표 3-4와 3-5에 나타낸 바와 같이, HeLa 자궁암 세포에 대한 항암효과는 XE-N-S1이 가장 우수하였고 XE-N-S3도 우수한 효과를 나타내었다. HepG2 간암세포에 대한 항암효과는 2종류, XE-N-S1과 XE-N-S3의 물질, HT29 대장암세포에 대한 항암효과는 XE-N 추출물과 XE-N-S1의 물질이 우수하였고, Saos2 골육종암세포에 대한 항암효과는 XE-N-S1이 가장 우수하였지만 XE-N 추출물도 우수하였다. 또한 NCI H522 폐 선암세포에 대한 항암효과는 XE-N-S1이 가장 우수하였고, NCI H1703 폐 편평세포암 세포에 대한 항암효과는 XE-N-S1이 가장 우수하였으며, XE-N-S3 물질도 상대적으로 우수한 효과를 나타내었다. LN CAP 전립선 암세포에 대한 항암효과는 XE-N-S3가 가장 우수하였고, XE-A-S3, XE-N-S1 물질도 우수한 효과를 나타내었다. Clone M3 흑색종암세포에 대한 항암효과는 XE-N-S1이 가장 우수한 물질이었다. 실험에 사용한 추출물과 정제품중 XE-A, XE-B, XEA-A 및 XEA-B 추출물은 용매에 잘 녹지 않았기 때문에 실제로 이들에 대한 항암효과는 표 3-4와 3-5에 나타낸 것보다 더 높은 항암효과를 가지고 있을 것으로 생각된다. 또한 HSF 인간 정상 피부 섬유아세포에 대한 각종 추출물 및 정제물의 세포독성을 조사하기 위해 기존에 시판되는 항암제 etoposide와 cisplatin을 구입하여 비교·검토해 본 결과, XE-A, XEA-A 및 XEA-B 추출물이 가장 독성이 낮았으며, XE-B 추출물도 etoposide에 비해 상대적으로 독성이 낮았다. 한편 XE-N-S1과 XE-N-S3 물질은 항암제인 etoposide보다 높은 독성을 나타내었으며, XE-A-S3 물질은 etoposide보다는 독성이 높았으나, cisplatin보다는 낮았다. 이러한 결과로부터 본 연구에서 분리·정제된 물질 중, 항균 및 항암효과가 뚜렷이 있으며 안정성이 있는 XE-N-S1 물질에 대하여 현재 구조결정을 수행 중에 있으며, 또한, 항암효과는 뚜렷이 있으나 불안정한 물질에 대해서 안정한 형태를 유지할 수 있는 조건을 검토 중에 있다.

Table 5-4. Minimal inhibitory concentration (MIC) of anticancer agents tested against SNU668, HeLa, HepG2, HT29 and Saos2 cancer cells.

Samples	MICs ($\mu\text{g/ml}$) in each of human cancer cells ^a tested				
	SUN668	HeLa	HepG2	HT29	Saos2
XE-N	228.8	110.9	110.9	55.4	13.8
XE-A	>1625.0	>1625.0	>1625.0	>1625.0	NT
XE-B	1250.0	625.0	625.0	312.5	NT
XE-N-S1	109.3	27.3	27.3	54.7	<13.6
XE-N-S3	365.0	46.8	46.8	93.7	NT
XE-A-S3	650.0	162.5	81.2	325.0	NT
XEA-N	425.0	425.0	425.0	106.2	106.2
XEA-A	>1800.0	>1800.0	>1800.0	>1800.0	NT
XEA-B	1700.0	1700.0	1700.0	1700.0	1700.0
Etoposide	125.0	250.0	125.0	125.0	250.0
Cisplatin	>75.0	50.0	>75.0	>75.0	75.0
5-FU	7500.0	5000.0	2500.0	>7500.0	5000.0

Human cancer cells^a: SNU668, stomach cancer cell; HeLa, cervical cancer cell; HepG2,

hepatic cancer cell; HT29, colon cancer cell; Saos2, osteosarcoma cell; NT, not tested.

Table 5-5. Minimal inhibitory concentration (MIC) of anticancer agents tested against NCI H522, NCI H1703, LN CAP, Clone M3 and HSF.

Samples	MICs ($\mu\text{g/ml}$) in each of human cancer cells ^a tested				
	NCI H522	NCI H1703	LN CAP	Clone M3	HSF
XE-N	NT	NT	NT	NT	NT
XE-A	NT	>1625.0	203.1	NT	>1625.0
XE-B	NT	625.0	78.1	NT	625.0
XE-N-S1	<6.8	<6.8	27.3	13.6	54.7
XE-N-S3	NT	46.8	<5.8	NT	46.8
XE-A-S3	NT	81.2	20.3	NT	162.5
XEA-N	NT	NT	NT	NT	NT
XEA-A	NT	>1800.0	>900.0	NT	>1800.0
XEA-B	NT	1700.0	850.0	NT	>1700.0
Etoposide	250.0	125.0	125.0	125.0	250.0
Cisplatin	50.0	50.0	50.0	>75.0	75.0
5-FU	5000.0	5000.0	5000.0	2500.0	5000.0

Human cancer cells^a: NCI H522, lung adenocarcinoma cell; NCI H1703, lung squamous cell carcinoma cell; LN CAP, prostate cancer cell; Clone M3, melanoma cell; HSF, human skin fibroblast; NT, not tested.

2. 도꼬마리내 향암, 항균물질의 분리 및 특성

가. 향암물질의 분리 및 특성

1) 재료 및 방법

가) 실험재료

본 실험에서 사용된 재료는 경남·경북 지역의 산야에 자생하는 *Xanthium strumarium* L.(한국명: 도꼬마리)을 채취하여 음건, 세절한 후 사용하였다.

나) 시료의 조제

김 등(6)의 방법에 따라 도꼬마리 300 g(잎 및 열매)를 증류수를 사용하여 3회 열수 추출하여 감압 농축한 열수 추출액(1 L)을 에테르 및 에틸아세테이트를 이용하여 분별 추출하고, 각 추출물을 다시 중성, 산성, 염기성의 6개 fraction으로 나누어 추출하였다. 무수 Na_2SO_4 로 건조한 후, 농축하여 향균 및 향암효과를 검토한 다음, 농축액을 소량의 메탄올로 용해시켜 TLC (Silica gel 60 F₂₅₄)를 사용하여 정성 분석하고 항균활성이 우수한 signal을 silica gel column을 사용하여 분리하였다. 분리된 물질은 HPLC (Shimadzu LC-10AD, Shimpak column C₁₈) 및 GC/MS를 통하여 분석하여 정제도와 분자량을 확인하였으며, 정제과정 중의 항균성 물질의 확인은 *E. coli* K-12 및 *B. subtilis* PCI-219주를 사용하여 agar diffusion법으로 확인하였다.

다) 변이원성 검토

도꼬마리 추출물의 변이원성을 검토하기 위하여 Ames법(12)을 이용하여 변이원성의 유무를 확인하였다. *Salmonella typhimurium* TA98 및 *Salmonella typhimurium* TA100을 하룻밤 배양시킨 배양액 100 μl 을 가한 후 XE-N (ether 중성 추출물) 및 XEA-N (ethylacetate 중성 추출물)의 최종 농도를 각각 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 조제하여 분주하고, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 전체 용량이 700 μl 가 되도록 하였다. 이것을 37°C에서 20분간 incubation한 후 histidine/biotin이 첨가된 top agar를 2 ml씩 가하여 잘 혼합한 후 minimal glucose agar plate상에 평판 고화시킨 후, 37°C에서 48시간 배양하여 His⁺ 복귀변이 colony수를 계측하여 돌연변

이원성의 유무를 판정하였다. 변이원으로는 4-nitro-0-phenylenediamine (NPD), 4-nitroquinoline-N-oxide (NQNO) 및 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)를 대조구로서 비교하였다.

라) 세포배양

세포주는 Raw 264.7(대식세포주) 그리고 Chinese Hamster V79 (lung fibroblast) 등을 동경공업대학으로부터 분양 받아 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% antibiotics (streptomycin /penicillin)가 함유된 RPMI-1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다.

마) 항산화능 검색

V79 cell을 2일간 배양한 후, 200 cells/ml 이 되도록 조정하여 dish (60 mm)당 10% FBS가 함유된 MEM배지에서 37°C, 5% CO₂배양기에서 2시간 배양하고, 배지를 제거하여 무혈청 MEM배지에 시료를 첨가한 후, 다시 4시간 동안 배양하였다. HBS (HEPES buffer saline : NaCl 0.8%, KCl 0.04%, NaHPO₄ · 12H₂O 0.025%, glucose 0.1%, HEPES 0.59%, pH 7.0)로 세척한 다음, 50 µM H₂O₂가 첨가된 HBS buffer를 넣고 30분간 다시 배양한 후 10% FBS가 첨가된 MEM배지를 넣어 5일간 배양하였다. 다시 MEM배지를 제거하고 99% 메탄올을 첨가하여 cell을 고정시킨 다음, Giemsa stain용액으로 염색하여 세포수를 측정하였다. 세포 생존율은 시료 무첨가 대조군에 대한 시료 첨가군의 세포수로 표시하였다.

바) 면역증강 효과

대식세포의 IL-1 β , IL-2 및 TNF α 의 활성은 rat anti mouse IL-1 β 단클론 항체(Endogen), rat anti mouse IL-2 단클론 항체 및 rat anti mouse TNF α 단클론 항체와 ELISA법을 이용하여 측정하였다. 먼저 5 \times 10⁵ cells/ml로 대식세포를 조정하여 96 well culture plate의 각 well에 180 µl씩 분주하고 적당한 농도로 조절한 각 시료들을 20 µl씩 넣어 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양 후 상층액을 취하여 실험에 바로 사용하거나, -20°C에서 보관하면서 사용하였다. IL-1 β , IL-2 및 TNF α 에 대한 면역증강 효과 검색은 각각의 monoclonal antibody가 coating된 polystyrene microtiter plate에 배양 상층액과 표준 용액을 각각 넣고 37°C

에서 2시간 반응시킨 후 세척하였다. 세척 후, Streptavidin-HRP가 결합된 anti-rat 이차항체(Endogen)를 부가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 다시 세척한 다음, 100 μ l의 TMB substrate 용액을 넣어 20~25°C에서 30분 동안 반응시킨 후, 반응 정지액을 첨가하여 ELISA reader로 450~550 nm에서 30분 이내로 그 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 recombinant IL-1 β , IL-2 및 TNF α 를 각각 사용하여 작성하였고, 단위는 pg/ml로 나타내었다.

사) Wistar rat을 이용한 chemoprevention mechanism의 규명

6주령된 Wistar male rat을 SLC, Inc. (Shizuoka, Japan)으로부터 분양 받아 사용하였고, 이들 rat은 23 \pm 2°C, 상대습도 55 \pm 10%를 유지하고 밤, 낮의 길이를 12시간씩 인공조명으로 조절하여 사육하였다. 이 때 사료(CRF-1, Japan Charles River Co., Japan)와 정제수는 자유로이 공급하였다. 실험동물은 각각 5마리씩 네 군으로 나누었으며, 도꼬마리의 정제물과 추출물은 각각 사료의 0.2% 및 1% 농도로 첨가하여 제공하였고 발암물질인 MNNG는 10% DMSO에 용해한 후, 150 mg/kg b. w.으로 1회 경구 투여하였다. 즉 MNNG 투여 4시간 후부터 시료가 혼합된 사료를 3일간 공급하였으며, 이때 대조군은 10% DMSO를 150 mg/kg b. w.으로 1회 경구 투여한 다음 사료만 3일간 공급하였다. 동물의 처치는 CO₂로 마취시켜 복부 정중선을 따라 개복하였다. 분리한 간은 생리식염수로 표면에 묻은 혈액을 씻은 후 여지로 압박하여 생리식염수를 가능한 모두 제거한 후, 무게를 칭량하였다. 적출한 간조직 1 g당 4배량의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4)를 가한 후, glass teflon homogenizer로 빙냉하에 마쇄하여 간 균질액(20% w/v)을 만들어 glutathione 함량 측정에 사용하였다. 조직 중의 glutathione 함량은 Ellman의 방법(4)에 의하여 측정하였고, 그 함량은 조직 1 g 당 μ mole로 나타내었다.

아) 암억제 유전자인 p53 발현 측정

Liver microsomal fraction의 단백질 양이 10 μ g이 되도록 조정된 다음, 2배의 sample buffer와 혼합하여 95°C에서 5분간 가열한 후 준비된 acrylamide gel에 60 volts에서 2시간 전기영동(Electrophoresis Unit, Hoefer Co., U.S.A)을 하였다. 전기영동한 gel의 단백질을 PVDF membrane으로 전사시키고 이 membrane을 5% skim milk가 함유된 TBS buffer에 넣어 4°C에서 1일간 방치하여 membrane의 비특이성

부위들을 차단하였다. 이 skim milk를 제거한 후 membrane을 1차 항체인 p53 (Ab-3)을 1 : 500 비율로 희석한 용액에 침윤시켜 실온에서 2시간 반응시킨 후, 세척하여 2차 항체인 peroxidase Goat anti Mouse IgG를 넣어 실온에서 1~2시간 반응하였다. 세척한 membrane을 ECL detection kit (Amersham Co., U.S.A)의 발색시약 혼합액으로 도포한 다음, X-ray 필름에 감광시켜 발현된 단백질의 signal을 관찰하였다.

나. 연구내용 및 고찰

1) 변이원성 효과

도꼬마리 추출물의 발암성의 유무를 검토하기 위하여 시험균 *S. typhimurium* TA98 및 TA100에 대한 변이원성 실험 결과를 표 5-6에 나타내었다. 변이원으로는 NPD, NQNO 및 NTG를 사용하여 대조구로서 비교하였으며, 시료인 추출물 XE-N과 XEA-N의 농도가 증가해도 TA98 및 TA100 두 균주의 복귀변이 colony수가 대조구에 비해 변화가 크지 않은 점을 미루어 보아 각 추출물은 변이원성이 없는 것으로 확인되었다.

Table 5-6. Mutagenicity test of XE-N and XEA-N using *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.

Samples	Strains	
	TA 98	TA 100
Control	8 ¹⁾	67
4-nitro-o-phenylenediamine (NPD)	1304	196
4-nitroquinoline-N-oxide (NQNO)	> 3000	552
N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)	5	199
XE-N ²⁾	1 µg	9
	10 µg	12
XEA-N	1 µg	20
	10 µg	23

¹⁾ : Revertant colony count

²⁾ : XE-N; Ether neutral extract, XEA-N; Ethylacetate neutral extract.

2) 항산화능 검색

Table 5-7. Effects of XE and XEA series against H₂O₂ induced cytotoxicity.

Samples	S cell count (SR %) ¹⁾	SH cell count (SR %) ²⁾
Control	98±3 (100)	23±3 (23.5)
XEA-N ³⁾	66±6 (67)	25±3 (26)
XEA-A	84±7 (86)	57±2 (58)*
XEA-B	80±4 (82)	52±8 (53)*
XE-N	81±6 (83)	29±2 (30)
XE-A	88±3 (90)	62±6 (63)*
XE-B	62±5 (63)	26±1 (27)
XE-N-S1 ⁴⁾	89±9 (91)	32±5 (33)

Control : S; no sample group, SH; no sample + 50 µM H₂O₂ group (positive control),

Sample : S; sample group, SH; sample + 50 µM H₂O₂ group.

¹⁾ S SR (Survival rate) %= sample group cell / control group cell × 100.

²⁾ SH SR(Survival rate) %= sample + H₂O₂ group cell / control group cell ×100.

³⁾ XEA-N, A, B; Ethylacetate neutral (N), Acidic (A) and Basic (B) extract, respectively. XE-N, A, B; Ether neutral (N), Acidic (A) and Basic (B) extract, respectively.

⁴⁾ XE-N-S1; purified XE-N-S1 from Kim et al.(12).

* Significantly different from the control by Student's t-test(p<0.05).

Chinese hamster V79 cell을 이용하여 H₂O₂로 유도된 세포 독성에 대한 도꼬마리 추출물 및 정제물의 억제효과를 colony formation assay로 조사하였다. 표 5-7에서 보는바와 같이 H₂O₂만 처리시 세포의 생존율은 23.5% 정도인데 비하여 H₂O₂와 XEA-A, XEA-B 및 XE-A 추출물을 함께 처리하였을 때는 각각 58%, 53% 및 63%로서 생존율이 2배 이상 증가하여 H₂O₂에 의해 야기된 cytotoxicity를 예방할 수 있다고 사료되었다. 한편, XE-N 및 XE-N에서 분리된 향균, 항암효과를 가지는 XE-N-S1 (6)은 대조구에 비하여 약 10%정도의 효과가 있다고 추정되었다.

3) 면역증강 효과

도꼬마리 추출물 및 정제물이 TNFα, IL-1β 및 IL-2의 생성에 미치는 영향으로

면역 증강 활성을 검토하였다. 그림 5-5에서 보는바와 같이 TNF의 경우 XE-N 추출물에서 1,400 pg/ml로 가장 높은 활성을 나타내었으며, XEA-N 추출물에서도 1,240 pg/ml로 높은 활성을 나타내었다. IL-1 β 의 생성은 XE-B 추출물에서 높게 나타났으며(그림 5-6), IL-2의 생성에는 뚜렷한 활성을 나타내지 않았다(그림 5-7). 따라서 도꼬마리 추출물 중 몇 종이 대식세포 활성화 및 cytokine류 생성에 관여하였다고 사료되었으며, XE-N의 경우 대식세포를 활성화하여 가장 높은 cytokine류를 유리함을 확인하였다.

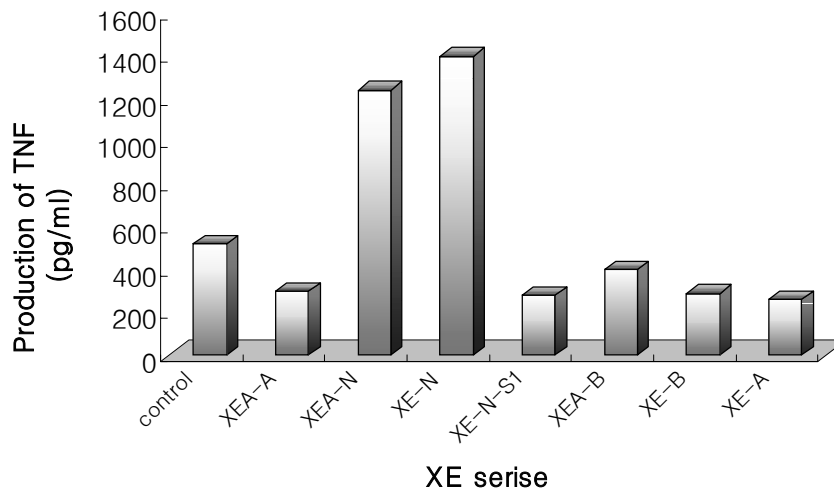


Fig. 5-5. Production of tumor necrosis factor (TNF) in macrophage cell culture by XE series.

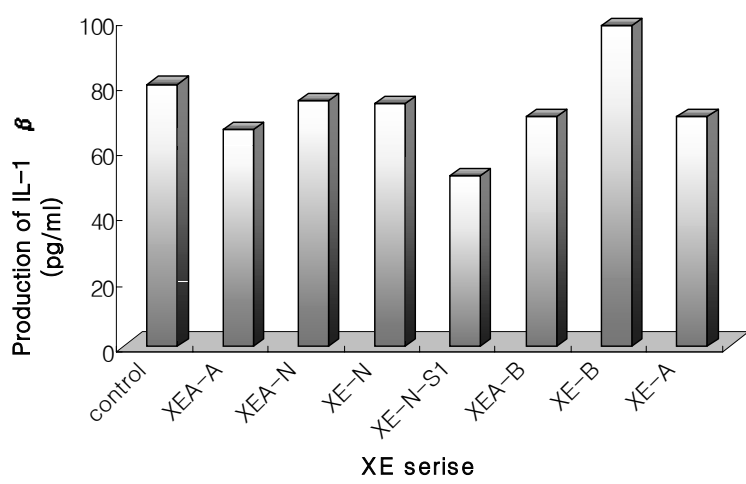


Fig. 5-6. Production of interleukin-1 β (IL-1 β) in macrophage cell culture by XE series.

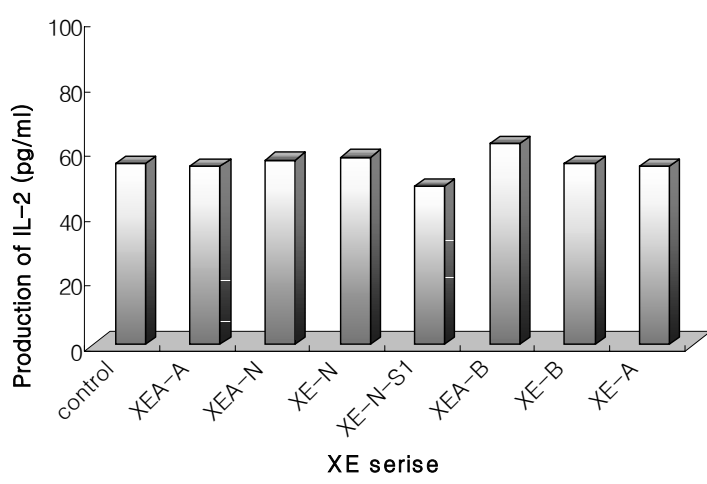


Fig. 5-7. Production of interleukin-2 (IL-2) in macrophage cell culture by XE series.

4) Chemoprevention 기전

도꼬마리 추출물(XE-N) 및 정제물(XE-N-S1)의 GSH의 함량변화에 대한 영향을 MNNG를 투여한 rat을 통하여 살펴본 결과, 그림 5-8와 같이 MNNG를 투여한 GSH 함량을 살펴보면 MNNG 단독 투여로 감소한 GSH 함량이 도꼬마리 정제물 0.2% 투여군에서 약 44.6%, 도꼬마리 추출물 투여군에서 약 41.5% 증가되었음을 알 수 있었다. GSH는 생체 내에서 환원상태로 존재하며 DNA 합성물질의 이동, 효소활성 조절, 활성산소나 free radical에 의한 세포손상 예방 등에 직접 또는 간접적으로 관여하였다(9). 따라서 산화상태 혹은 산화적 스트레스의 영향을 받아 그 함량이 낮을 경우, 세포손상 및 독성에 대한 민감도가 높아져 간 질환, AIDS 등의 질병을 일으키게 된다(11). 따라서 MNNG가 체내로 흡수되면서 조직에 산화상태 혹은 산화적 스트레스 환경을 유발하여 이를 해독하기 위한 GSH의 소모로 인해 체내 GSH가 감소하였으며, 도꼬마리 정제물 및 추출물의 투여로 체내의 GSH 소모를 덜어주어 그 함량이 증가된 것으로 추측된다.

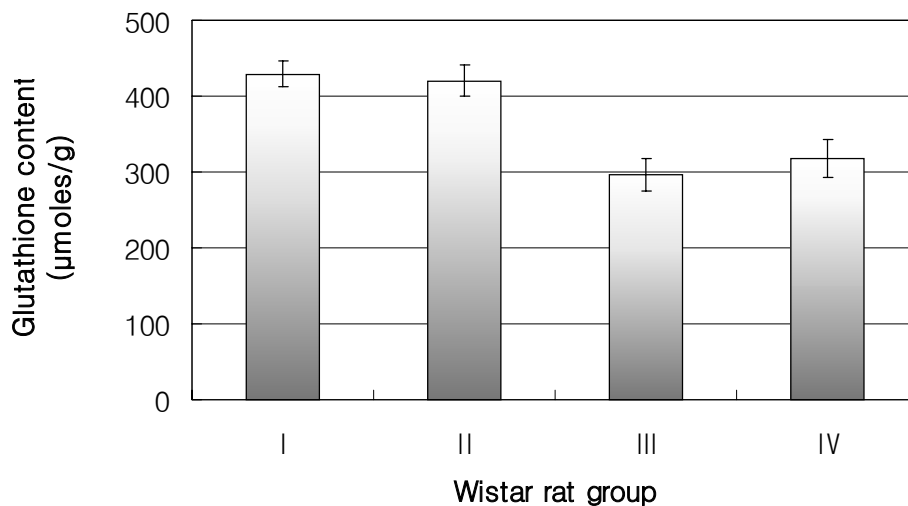


Fig. 5-8. Effect of XE series on glutathione the content in liver of rats treated with MNNG.

I : XE-N-S1 purified group 0.2% + MNNG group.

II : XE-N extract group 1% + MNNG group.

III : MNNG group.

IV : Control group.

5) p53 발현에 미치는 영향

p53 유전자는 세포분화과정 중 G1기에서 손상된 DNA가 있을 때는 세포 조절물질들과 결합하여 이 물질들을 불활성화시켜 G1기에서 S기로의 진입을 억제하며, 또한 PCNA와 결합하여 이를 불활성화시킴으로서 손상된 DNA가 증식되는 것을 차단시키는 이중작용을 하였다. 또한, DNA 손상정도가 심하여 복구가 불가능할 경우, 세포사(apoptosis)를 일으켜 손상된 DNA로부터 증식되는 세포를 미리 제거시키는 암억제 유전자로 알려져 있다(8). 도꼬마리 정제물(XE-N-S1) 및 추출물(XE-N)과 MNNG를 투여한 rat의 microsome을 이용한 immunoblot 분석에서 p53의 수준이 MNNG 투여군에 비하여 도꼬마리 추출물을 함께 투여한 경우에 증가하였다(그림 5-9). 이는 p53 암억제 유전자의 발현으로 MNNG에 의해서 손상된 세포의 무절제한 증식이 억제되어 종양으로의 발전이 차단된 효과로 생각된다.

이상의 결과에서 도꼬마리 추출물은 전반적으로 항산화능, 면역증강효과, 암 예방효과 등의 기능성이 있는 것으로 입증되었으며, 각 기능에 따른 다양한 물질을 분리하여 신소재로의 개발 가능성이 큰 약제임이 확인되었다.



Fig. 5-9. Immunoblot analysis of p53 expression in rats treated with MNNG and/or XE series. Each lane was loaded with 10 μ g of rat liver microsome. p53 (Aab-3) antibody (diluted 1 : 500) was used.

Lane 1 : control group.

Lane 2 : 0.2% purification of XE-N-S1 in diet + MNNG.

Lane 3 : 1% extract of XE-N in diet + MNNG.

Lane 4 : MNNG (150 mg /kg) treatment.

제 6 절 도꼬마리 추출물인 S1의 구조 결정

1. 실험재료 및 연구방법

가. 실험재료

본 연구에 사용된 분석 기기는 IR Spectrophotometer (Shimadzu IR-470, Japan), NMR Spectrometer (Advance 400, 400 MHz, Bruker, Germany), Mass Spectrometer (Quattro II, VG, U.K)를 사용하였다.

2. 연구내용 및 고찰

가. 도꼬마리 추출물 S1의 구조 및 분자량 결정

김 등(6)의 방법에 따라 분리한 물질의 구조결정을 하기 위해, HPLC (Shimadzu LC-10AD, Shimpak column C₁₈)의 정제공정을 거쳐 단일 물질로 단리된 S1물질을 EIMS와 NMR 분석 한 후, C₁₅H₂₀O₃의 화학식을 갖는 것으로 추정되었다.

또한, IR spectrum의 결과, 1760 cm⁻¹에서 강한 흡수 signal을 보여줌으로서 5각 고리 화합물인 lactone구조가 예상되고, 1710 cm⁻¹에서 강한 signal은 ketone 또는 ester group의 존재가 예상된다. 단리된 S1물질은 NH 혹은 OH group 등과 같은 polar group은 존재하지 않는 것으로 확인되었다.

S1의 ¹H NMR spectrum은 terminal olefin proton으로 추정될 수 있는 두 개의 doublet [δ 6.25 (d, J = 3.3 Hz, 1H)와 5.52 (d, J = 3.3 Hz, 1H)]를 보여 주었다. 이들의 coupling constant가 일치함으로 인해 geminal proton으로 추정되었다. 또한, 2.15 ppm에서 acetyl group의 특징적인 methyl signal (s, 3H)과 1개의 terminal methyl signal (δ 1.13 9s, 3H)이 존재하는 것을 알 수 있었다.

¹³C-NMR과 DEPT spectra의 결과로부터 2개의 carbonyl carbon (δ 208.1 과 170.2), 2개의 quaternary carbon, 4개의 methine carbon, 5개의 methylene carbon 및 2개의 methyl carbon이 함유된 총 15개의 carbon signal과 20개의 proton으로 구성 되어 있다.

H-H correlation spectrum인 COSY spectrum에서 terminal olefin group과 또한,

acetyl group에 ethylene unit가 붙어 있는 부분적 구조(그림 6-1)를 얻을 수 있었으며, terminal methyl group에 연결된 methine proton의 존재를 확인할 수 있었다.

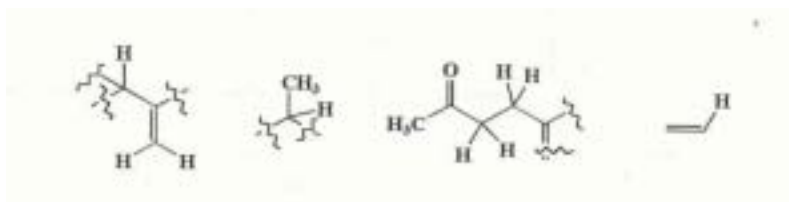


Fig. 6-1. Analysis of COSY spectrum.

마지막으로 HMQC에 의하여 추정된 화학적 구조가 문헌상에 보고된 화합물의 ^1H NMR, ^{13}C NMR spectra(그림 6-2) 등이 일치함으로 인해, **S1 화합물의 구조는 tomentosin으로 확인**되었고, 분자량은 **248.321**이었다.

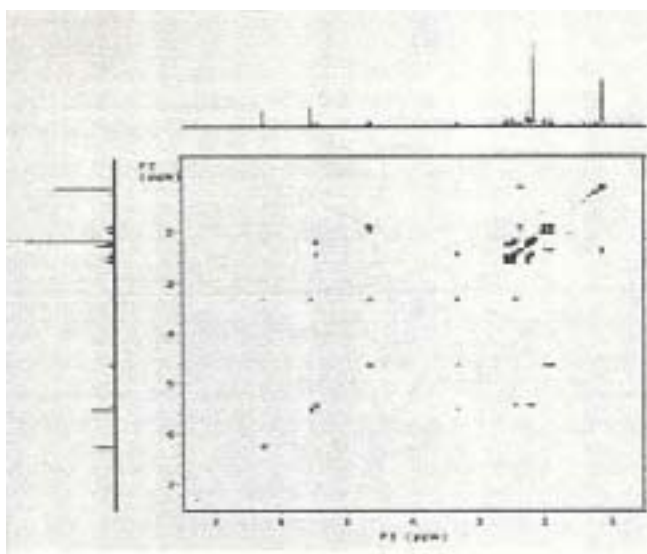


Fig. 6-2. Analysis of HMQC NMR spectra.

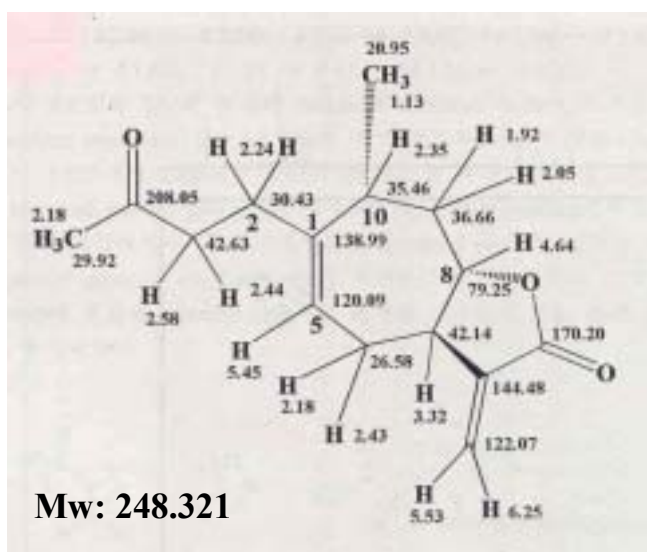


Fig. 6-3. Gross structure of S1 compound by ^1H and ^{13}C NMR spectra.

제 7절 키토산, 키토산 올리고당 및 도꼬마리 추출액의 절화수명 연장제로 활용 방안

1. 서론

상기의 실험에서 키토산, 키토산 올리고당 및 도꼬마리 추출액이 여러 작물의 종자 발아 및 유묘생장에 촉진적인 작용을 나타냄을 확인하였고, 또한 키토산 내에는 미생물의 생장을 억제시키는 항균물질이 내재되어 있음이 확인되었다. 따라서 이들 혼합물질을 절화수명의 연장에 활용 가능한지를 조사하기 위해 본 실험을 실시하였다.

2. 재료 및 방법

밀양시 대성 농원에서 재배한 거베라를 공시재료로 사용하였다. 초장 45cm로 균일하게 수중 절단 시킨 후 각 용액 35cc가 첨가된 glass tube에 꽂아 25℃로 조절된 배양실 내에서 실험하였다. 매일 흡수된 량과 중량을 측정하였으며, 흡수량의 경우

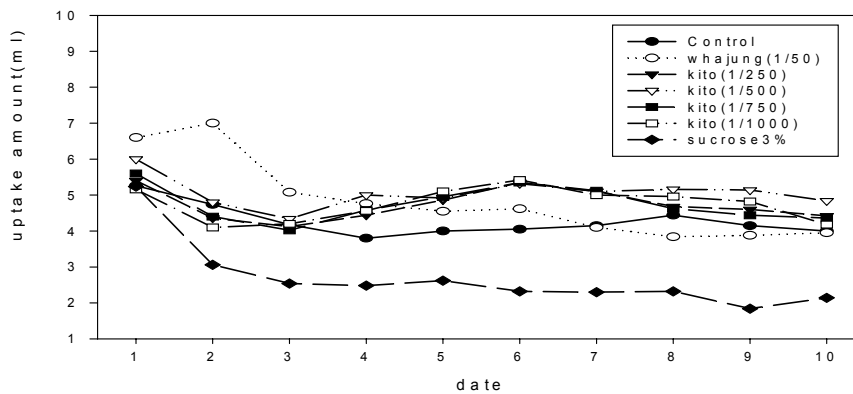


Fig. 1. Effect of various solution on water uptake amount of gerbera

Fig. 7-1. Effect of various solution on water uptake amounts of gerbera.

키토산 올리고당 및 도꼬마리의 혼합액이 거베라의 절화보존시 흡수량에 미치는 영향을 조사해본 결과(그림 7-1), 시판용 절화보존제인 화정은 보존 4일까지는 키토산 혼합액에 비해 훨씬 많았지만 그 이후부터는 키토산 혼합액의 흡수량이 많았다. 키토산 혼합액의 경우 보존 3일까지는 흡수량이 점차로 감소하다가 그 이후부터는 급격히 증가하여 6일째에는 대조구에 비해선 30%이상, 시판용 절화보존제인 화정에 비해선 5% 이상 흡수량이 증가되는 것을 확인하였다. 하지만 타 작물에서 절화보존제로 많이 이용되고 있는 sucrose의 경우는 거베라에선 큰 효과를 보이지 않는 것으로 확인되었다.

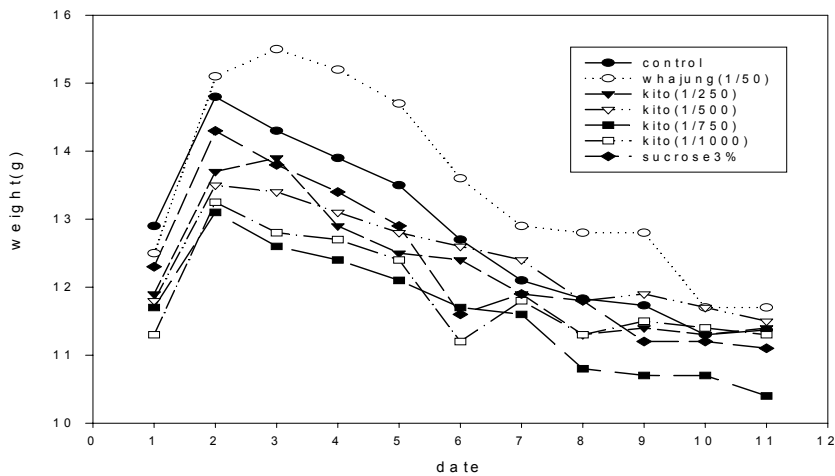


Fig. 2. Effect of various solution on cut flower weight of gerbera

Fig. 7-2. Effect of various solution on cut flower weight of gerbera.

절화중을 조사해본 결과(그림 7-2), 타 처리구에 비해선 화정이 가장 무거웠으며, 키토산 혼합액과 대조구간에는 큰 차이는 보이지 않았다.

관상 가능 일수는 키토산 올리고당 처리용액에서 대조구에 비해 3-4일 증가하는 것으로 확인되었으며, bent neck 현상도 더 늦게 발생되었다.

위의 결과들을 종합해 보면 키토산 올리고당 및 도꼬마리 혼합액은 절화중에는 큰 영향을 미치지 않았지만 후기의 수분 흡수량의 증가시켜 관상가능 일수를 3-4일 연장시키는 것으로 확인되어(그림 7-3), 앞으로 다른 화훼 작물인 장미, 국화, 과꽃, 백합등에도 충분히 활용해 볼 만한 것으로 사료된다.



Control whajung 1/50 kito 1/500 sucrose 3%

Fig. 7-3. Effect of various solution on the growth of gerbera cut flower.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구개발 목표 달성도

가. 키토산 유도체의 개발

자연계에서 생분해가 가능하고 환경친화적인 물질인 키틴. 키토산의 항균력을 높이기 위하여 키토산을 아실화 및 자생식물 추출물중에서 항균력이 강한 물질을 경제적인 방법으로 생산하는 방법과 아실화키토산 또는 아실화키토산과 천연항균물질의 혼합용액의 필름화, 인장강도, 적정분자량과 관련된 연구를 수행하였다.

1년차 연구과제인 키토산의 아실화는 이미 잘 알려진 Hirano방법에 따라 무수유기산을 이용하여 제조하였으나 불용성으로 실제적인 이용에 어려움이 많았다. 본 연구에서는 새로운 방법을 개발하기 위하여 연구 검토를 한 결과 450cps의 점도를 가진 키토산을 온도 50℃, pH 4.0~5.0의 범위에서 아실화 반응을 실시하여 아실화도가 0.4% 내외의 수용성으로 다른 물질과 혼합이 가능하고 또한 항균력도 우수한 키토산유도체를 개발하였다.

이때 점도측정계로 점도를 측정한 바 350cps으로 본 연구개발에 사용이 가능함을 확인하였다.

2년차 연구과제인 혼합필름을 제조하기 위하여 아실화키토산 용액(450cps)을 여과하여 불용액을 제거한 다음 도꼬마리 추출액을 0.1% 함유한 혼합용액을 만들고 이 용액에 계면활성제를 첨가한 다음 탈포공정을 거쳐 유리판 위에 도포하여 필름을 조제하였다. 건조한 다음 이 필름의 항균력을 검사한 결과 항균력은 99.8%이상으로 판명되었다. 이 필름의 수증기투과도와 수분용해도는 $2.5 \sim 2.8 * 10^9$ 으로 혼합용액의 종류에 따른 큰 차이는 나타나지 않았다. 또한 이 필름의 인장강도와 연신율을 측정 한 바 인장강도는 0.6에서 0.9MPa로 다소 낮은 값을 나타내고 점도가 높을수록 인장강도는 낮았지만, 연신율은 12.5에서 16.5%로 다소 높은 값을, 점도가 낮을수록 연신율도 높은 값을 나타내었다.

나. 생리활성물질의 개발

식물종자의 보호와 병해방지 및 안전성을 부여하기 위한 일환으로 자생식물 추출물을 이용한 종자코팅제의 개발을 목표로 하여 연구를 수행하였다.

1년차는 용담(*Gentiana scabra*)과 엉겅퀴(*Cirsium japonicum*)를 사용하여 추출물중의 항균성 물질의 검색을 수행하였다.

시험균으로 각종 세균, 효모, 곰팡이 및 식물병해균을 대상으로 항균효과를 검토하였다. 추출시료 중 메탄올의 경우, 전혀 항균효과를 보이지 않았고, 에테르 추출물의 경우는 한국산 엉겅퀴에 대해서만 항균력(세균)을 나타내었다. 또한, 11종류의 식물 병원균을 대상으로 항균력을 측정된 결과, 메탄올 추출물에서는 항균효과가 없었고, 에테르 추출물 No. 2의 경우에 한해서, 수박 균핵병균에 항균효과를 나타내었다. 이들 결과는 사용시료의 성분 중 항균력을 보이는 물질이 존재하였다고 예상되며, 정제도에 따라 다소 강한 항균효과와 넓은 항균 spectrum이 나타날 것으로 사료되었다.

2년차는 1년차에서 사용한 자생식물의 항균효과가 미약한 결과로부터 다른 자생식물을 검토하였다.

흰독말풀(*Batura metel*), 어성초(*Houttuynia cordata*), 삼백초(*Saururus chinensis*), 도꼬마리(*Xanthium strumarium* L),를 대상으로 1년차와 같이 동일한 방법으로 열수 및 유기용매(에테르, 에틸아세테이트)로 추출하여 항균효과를 검토하였다. 그 결과 도꼬마리(*Xanthium strumarium* L)에서 우수한 항균효과가 확인되었으므로 유효한 성분의 분리를 위하여 대량생산조건 및 분리정제를 시도하였다.

용매인 에테르 및 에틸아세테이트를 사용하여 중성, 산성, 알칼리 추출을 시도하여 각 추출물의 항균효과를 검토한 결과, 에테르 중성추출물에 대해서 항암 및 항균 효과(세균 및 진균)가 가장 우수하였다.

그 외 에테르 산성추출물, 에틸아세테이트 중성추출물에서도 항균·항암효과가 확인되었으며, 이들 물질 중 항균·항암효과를 보이는 물질의 정제를 수행하여 가장 항균효과가 우수한 XE-N-S1을 분리하였다.

3년차는 2차년도에서 도꼬마리 추출물의 항균효과가 입증된 물질을 다양하게 분리·정제하여 독성, 항암효과 및 항산화효과 등의 생리·기능적 측면을 검토하였다.

도꼬마리 추출물의 발암성 유무를 검토하기 위하여, 시험균 *S. typhimurium* TA98 및 TA100에 대한 변이원성 실험 결과, 추출물 XE-N과 XEA-N의 추출물은 변이원성이 없는 것으로 확인되었다.

도꼬마리 추출물(XEA-A, XEA-B 및 XE-A)의 H₂O₂로 유도된 세포 독성에 대한 억제효과는 각각 58%, 53% 및 63%로서 생존율이 2배 이상 증가하였다.

면역 증강 활성은 TNF의 경우, XE-N 추출물에서 1,400 pg/ml로 가장 높은 활성을 나타내었으며 XEA-N 추출물에서도 1,240 pg/ml으로 높은 활성을 나타내었다.

IL-1 β 의 생성은 XE-B 추출물에서 높게 나타났으며, IL-2의 생성에는 뚜렷한 활성을 나타내지 않았음.

따라서 도꼬마리 추출물은 전반적으로 항산화능, 면역증강효과, 암 예방효과 등의 기능이 있는 것으로 입증되었다.

다. 종자코팅제의 개발

종자 소독시 농약오염으로 인한 작업자의 안전성, 종자의 파종시 작업의 효율화, 종자의 장기간 보관, 국제간 무역의 편리성이라는 목적을 달성하고, 기존에 사용되는 종자코팅제와는 다른 용도 즉 절화 활성제로도 기능을 갖고 침투 이행성이 강하면서 환경 친화성을 갖춘 종자처리제를 개발한 결과를 요약하면 다음과 같다.

2차 년도 연구에 사용된 종자는 주곡인 벼와 양파, 상추, 배추, 사과, 콩, 고추, 참외, 무 등 시설원에 생산 빈도가 많은 종자를 택하였다. 종자의 코팅방법으로써 1차 작업은 종자의 살균, 소독, 2차 작업은 키토산과 그 유도체 및 자생식물 추출액의 코팅, 3차 작업은 기계파종이 가능하도록 무기성 광물질에 의한 pellet형성작업, 4차 작업은 종자 표면의 방수, 탈락방지용 PFC의 코팅작업으로 구성하였다. 종자 코팅용으로 키토산은 아실화도가 0.4도 내외인 키토산을 사용하였으며, 키토산-올리고당은 저분자 키토산을 효소발효에 의해 분해된 키토산-올리고당을 사용하였다. 증량제의 역

할을 하면서 발아시 초기 영양원이 될 수 있는 종자코팅용 미네랄제제는 거정석, 맥반석, 머드, 황토 등을 사용하고, 접착제는 0.5% PVA용액과 8% 아라비아검(Arabic gum)을 사용하고, 마지막으로 방수를 위하여 PFC를 코팅하였다.

3차 년도에는 코팅방법, 코팅제의 두께 결정, 흡수율을 결정하고 발아율, 육묘트레이 발아율, 육묘시 묘의 상태 등을 검토하였다.

이 결과로부터

1) 벼는 코팅제의 영향을 많이 받는 종자로 판명되었다. 황토로 코팅하였을 경우 코팅후 종자 무게는 평균 2배 가까이 늘어났고, 발아율도 콘트롤 92%에 비하여 65%~83%로 다소 떨어짐을 알 수 있었다. 육묘트레이에 파종한 후 발아율을 조사한 바 65%~86%로 많은 차를 나타내었다. 이는 머드에 함유된 염분과 살균이 되지 않은 황토의 세균과 관련된 결과로 추정하였다. 또한 코팅종자의 육묘시 처리별 묘의 상태를 확인한 바 IV(키토산과 키토산-올리고당 혼합액)과 I(거정석과 맥반석), II(머드)의 경우가 대체로 양호하였다.

결과적으로 벼 종자의 코팅은 키토산과 그 유도체의 혼합액으로 코팅한 후 기계에 의한 자동 파종을 고려하여 I(거정석과 맥반석 혼합물) 또는 II(머드)를 증량제로 사용하고 접착제는 8% 아라비아검(Arabic gum)을 사용하며, 마지막으로 PFC를 코팅하는 것이 타당하다는 결론을 얻었다.

2) 양파도 코팅제의 영향을 많이 받는 종자로 판명되었다. 양파 종자의 발아율은 콘트롤 65%에 비하여 I(거정석+맥반석)을 제외하면 52%~58%로 매우 낮음을 알 수 있었다. 육묘트레이에 파종한 후 발아율을 조사한 바 45%~60%로 많은 차를 나타내었다. 또한 코팅종자의 육묘시 처리별 묘의 상태를 확인한 바 대체로 부적합하였다.

3) 상추는 코팅제의 영향을 많이 받지 않는 종자로 판명되었다. 양파 종자의 발아율은 91%이상이었으나 육묘트레이에 파종한 후 발아율을 조사한 바 60%~95%로 많은 차를 나타내었다. 또한 코팅종자의 육묘시 처리별 묘의 상태를 확인한 바

대체로 양호하였다.

4) 배추는 코팅제의 영향을 많이 받지 않는 종자로 판명되었다. 배추 종자의 발아율은 92%이상이었으나 육묘트레이에 파종한 후 발아율을 조사한 바 75%~82%로 다소 적은 차를 나타내었다. 또한 코팅종자의 육묘시 처리별 묘의 상태를 확인한 바 대체로 양호하였다.

5)파는 황토를 제외한 다른 코팅제의 영향을 많이 받지 않는 종자로 판명되었다. 파 종자의 발아율은 85%이상이었으나 육묘트레이에 파종한 후 발아율을 조사한 바 70%~75%로 다소 적은 차를 나타내었다. 또한 코팅종자의 육묘시 처리별 묘의 상태를 확인한 바 대체로 양호하였다.

6)콩은 모든 코팅제의 영향을 많이 받지 않는 종자로 판명되었다. 콩 종자의 발아율은 97%이상이었으나 육묘트레이에 파종한 후 발아율을 조사한 바 80%이상으로 나타내었다. 또한 코팅종자의 육묘시 처리별 묘의 상태를 확인한 바 대체로 양호하였다.

7)고추는 모든 코팅제의 영향을 많이 받지 않는 종자로 판명되었다. 고추 종자의 발아율은 90%이상이었으나 육묘트레이에 파종한 후 발아율을 조사한 바 80%이상으로 나타내었다. 또한 코팅종자의 육묘시 처리별 묘의 상태를 확인한 바 대체로 양호하였다.

8)참외는 모든 코팅제의 영향을 많이 받지 않는 종자로 판명되었다. 참외 종자의 발아율은 92%이상이었으나 육묘트레이에 파종한 후 발아율을 조사한 바 90%이상으로 나타내었다. 또한 코팅종자의 육묘시 처리별 묘의 상태를 확인한 바 대체로 양호하였다.

8)무는 모든 코팅제의 영향을 많이 받지 않는 종자로 판명되었다. 무 종자의 발아율은 90%이상이었으나 육묘트레이에 파종한 후 발아율을 조사한 바 88%이상으로 나타내었다. 또한 코팅종자의 육묘시 처리별 묘의 상태를 확인한 바 대체로 양호

하였다.

결과적으로 모든 종자의 코팅은 키토산과 그 유도체의 혼합액으로 코팅한 후 기계에 의한 자동 파종을 고려하여 모든 무기미네랄 제제를 증량제로 사용하여도 무방한 것을 알 수 있었다. 특히 상추종자는 모양이 길고 작기 때문에 기계파종이 곤란하여 재배농가의 어려움이 많다. 본 시험 결과 종자 코팅을 하였을 경우 초기 생육은 약간 떨어지는 경향이 있으나 기계파종이 가능하며 생산비용 절감에 크게 기여할 것으로 사료된다.

2. 대외 기여도

본 연구의 목표인 종자코팅제의 소재로서 이들 항균성물질의 대량생산기술의 개발과 효능을 이용하여 안정되고 발아율이 우수하며, 항균력을 보유한 코팅제의 개발이 가능하게 되었다.

이들 코팅제의 사용으로 인하여 종자발아시 문제가 되는 유해 근권미생물의 억제에 따른 건강한 발근의 촉진과 식물성장효과가 예상된다.

이들 유용항균효과를 이용한 종자주위의 유용 근권미생물의 군(group)의 형성에 따른 토양내 미생물총의 변화가 기대되며, 이들 개발물질의 생물비료로서의 활용도 시사되고 있다.

본 연구를 통하여 한국산 자생식물인 도꼬마리의 항균, 항암효과, 항산화 등 생리·기능효과 및 무독성을 보이는 결과로부터 다양한 물질을 분리하여 신소재로의 개발 가능성이 큰 약제임이 확인되었다.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

코팅제의 개발을 통해 고품질 종자생산 유도, 종묘회사나 기업등에 기술을 이전함으로써 산업화가 가능하고, 종자 처리기술에 대한 특허 출원 및 코팅제의 해외 이전시 royalty 획득 등이 가능할 것으로 사료된다. 이를 통해 농가의 일손부족, 노임상등 의 문제 해결에 기여할 것으로 사료된다.

공동연구기관을 중심으로 신규 생리활성물질 정보 네트워크를 구축하여 정보를 제공함으로써 생리활성물질의 연구 활성화 및 활용을 유도한다.

분리한 생리활성물질의 정보를 공개하고, 국내 약용 식물로부터 생물의약품, 생리활성소재 등 전통 약용식물 유래 생물공학 제품의 개발에 적극 활용토록 한다.

생리활성물질의 탐색, 정제 및 응용 등에 관한 산·학·연 교육 프로그램을 시행하여 전문인력양성으로 효율적 활용이 이루어지도록 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 해외 수집 과학기술 정보

(가) 일본

일본의 일반적인 농가에서 사용하는 종자소독방법은 우리와 마찬가지로 직접 소독하는 방법으로서 카바메이트계, 디치오카바메이트계, 시아노페놀계통의 약제를 사용한다. 그러나 1982년 벤즈이미다졸(Benzimidazole)계 약제가 벼의 병원균에 대한 내성균 출현이 보고(日本農藥學會誌, 24, p.230-240, 1999)되고 난 뒤 새로운 종자 소독제로 개발된 퍼프라조에이트(Pefurazoate)를 사용한다. 그러나 노동력의 절감등을 위해 농가에서는 coating종자를 사용하는 인구가 늘고 있는 추세이다. 특히 꽃 씨앗은 미세종자가 많다. 베코니아 등 미세 종자에 무기물로 coating하므로 취급이 쉽고 또 plug tray에 의한 기계 파종이 가능해진다.

종자를 조립 coating하는 기술은 이미 알려진 기술이다.(예를들면 日特公昭 38-3469호. 日特開昭 54-85908호. 日特開昭 60-12905호).

coating종자는 접종 뒤 흙중의 수분 혹은 관수에 의해서 coating층이 흡수하고 1~2개소에 구멍이 생기는 것에 의해 발아가 시작된다. 따라서 이 방법에 의하면 특히 꽃의 미세종자는 발아력이 약하기 때문에 coating층의 작은 구멍 부분에 물이 고여 산소의 공급을 저해하기 때문에 순조로운 발아가 방해되는 경우가 있다. 이를 해결하는 방법으로서 조립제중에 방수제를 혼합분산시켜 조립제로 종자를 coating하는 방법이 개발되었다.(예컨대 日特公昭 38-3469. 日特開昭 54-85908. 日特開昭 69-12905. 日特開平 3-30602. 日特開平 3-94604) 등이다. 그러나 이들의 방법은 흙중의 함수량이 적으면 발아불량이 일어나는 경우가 많다.

최근 Japan tobacco사에서는 지방산과 그 염을 포화시킨 용액에 침지하는 방법이 소개되었다.(日特開平10-017414). 또 일본 Yazaki co.에서는 종자를 먼저 alginate로 coating한 후 사용할 때 과산화수소수에 침지하여 사용하는 방법(日特開平 10-033013)을 개발하였다. 일본 TS Shokubutsu연구소는 저장성이 좋고 종자를 coating하면 농약 등이 종자에 완만하게 고착되어 수송때나 파종시에 탈락되지 않고

발아에 악영향을 미치지 않은 산화알루미늄이나 2산화규소 등으로 표면 처리된 산화 titanium과 수용성 polymer를 함유하는 수용액으로 구성된 coating제를 개발(日特開平 11-146707)하였고, 일본 Agri techno yazaki사는 종자 자체가 양분을 가지지 않는 식물 종자 예를들면 꽃이나 야채 등의 아주 미세한 종자에 전분, 당을 먼저 분의(粉衣)하고 그 주위를 Gel등 coating제에 의해 피복하는 방법도 개발(日特開平 11-155308)하였으며, 일본Rontai사는 종자의 coating시 4단계로 하면서 3단계는 점토 등 광물질재료이고 여기에 목초액 또는 목탄을 혼합한 분해성 피막으로 coating하는 방법을 개발하였다.(日特開平11-60422)

(나) 미국

미국의 종자소독방법은 우리와 유사하다. 다만, 최근 Struszczyk, et al등은 종자의 껍질에 분자량 1,000이상, 탈아세틸화도 35%이상, 수분함수율 200%에서 5,000%까지의 미정질키토산(Microcrystalline chitosan)으로 0.1~100 μ m의 크기로 coating하는 방법(USP5,554,445)을 개발하였다. Asano는 종자를 double-chain구조의 점토광물로 종자를 coating한 후 저장한다. 그리고 필요시 파종하는 방법(USP 5,525,131)을 개발하였고, Narayanan은 수용성 $Mn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 를 함유한 종자 coating제(USP 5,622,003)를 발명하였으며, Harms, et al등은 수용성 non-aromatic polyamino acid를 종자표면에 처리하여 발아율을 높이는 방법(USP 5,661,103)을 발명하였다. Huang, et al등은 젤라틴진분과 가소제(Plasticizer)를 혼합하여 분말 또는 액상으로 장기간 보존이 가능하고 부식을 조절할 수 있으며 발아를 촉진하는 방법(USP5,683,957)을 개발하였다.

또한 Turnblad, er al등은 종자에 고분자물질로서 polyvinyl acetate, methyl cellulose, polyvinyl alcohol, vinylidene chloride, acrylic, cellulose, polyvinylpyrrolidone와 polysaccharide중에서 선택하고 살충제로 coating하는 방법(USP 5,849,320)을 개발하였고 Otani, et al등은 종자에 montmorillonite, bentonite 및 수용성 PVA로 coating하는 방법(USP 5,918,413)을 발명하였다. Shors, et al등은 종자를 초음파 처리하여 발아를 촉진하는 방법(USP 5,950,362)을 개발하였고, Barclat, et al등은 종자에 유황함유-모리브덴 석고물을 coating하는 방법(USP 5,994,265)을

개발하였다. 캐나다 Lavel대학의 M.V.Bhaskara reddy는 밀종자(2종류)에 키토산을 4mg/mL의 농도로 처리한 결과 발아율은 베타노밀과 키토산 coating 처리한 군에서 대조군(80%이하)과 비교하여 85%이상으로 효과가 있었으며 seed-borne fusarium graminearum 감염군에서도 대조군과 비교하여 50%이상 감소하였다는 보고를 한 바 있다.

위의 내용으로 보아 본 연구과제와 유사한 과제는 발표되고 있으나 종자를 직접적으로 소독하는 방법은 아직 없고 모두가 취급자의 농약오염, 보관중의 변질, 이송의 안전성문제가 계속되고 특히 종자를 파종직전 종자를 소독하고 사용하는 방법에 대한 약제의 연구와 개발은 아직까지 미진한 상태로서 개발의 여지가 많은 것으로 생각할 수 있다.

2. 국가정책과제로 계속 연구의 필요성

생명과학기술의 발전을 위하여 토착 생물 자원의 중요성은 과거부터 널리 인식되어 왔다. 최근, 인간 유전자 서열이 밝혀진 이래 21세기 계몽시대에 대비하여 각 국에서는 미생물 및 식물체 등에 대한 유전자 정보 획득의 중요성을 새삼 인식하고 유전자원의 발굴과 확보에 연구를 집중하고 있다. 생물다양성 협약에 의하여 생물자원에 대한 원산국의 주권이 인정됨에 따라 세계 각 국에서는 생물자원이 지하자원과 마찬가지로 미래 국가의 부를 창출하는 원동력이 된다는 생물의 중요성에 대한 인식이 높아지고 자원 nationalism이 강해지고 있다. 따라서 본 과제는 우리나라 토착 약용식물인 도꼬마리로부터 신규 생리활성물질을 분리·탐색을 수행한 중요한 과제로서 제약 및 의료분야의 산업발전을 위해서도 국가적으로 중점 연구되어야 할 분야이다.

3. 학술성과

1. Kim Hyun-Soo, T. S. Yu, I. S. Lee, Y. W. Kim, and S. H. Yeo (2003). Screening of the antimicrobial and antitumor activity of *Xanthium strumarium* L extract. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **18**. 55-61

2. Kim Hyun-Soo, I. S. Lee, S. H. Yeo, L. S. Seong, and T. S. Yu (2003).
Isolation and characterization of antitumor agent from *Xanthium strumarium*
L extract. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* (Submitted).

제 7 장 참고문헌

- 키토산 관련 연구의 참고문헌

1. Foster.A.B., and Webber.J.M., Chitin, advanced in carbohydrate chemistry, 15, 371-393, 1960.
2. Mussarelli.R.A.A., Chitin, pergamon press, oxford., 45-154, 1977.
3. Hackman. R.H., Studies on chitin, Austrlian J. Biol. Sci., 7, p.168-178, 1954
4. Horowits S,T., Roseman.S., and Blumenthal.H.J., The preparation of glucosamine oligosaccharides. I. Separation J. Amer. Chem. Soc., 79, p.5046-5049, 1957
5. Bemiller. J. N. and Whistler R.L., Alkaline degradation of amino sugars., J.Org.Chem., 27, p.1161-1164, 1962
6. Mima. S., Miya.M., Iwamoto. R., and Yoshikawa. S., Highly deacetylated chitosan and its properties., J.Appl.Polym.Sci., 28, p.1909-1917, 1983
7. 오세욱. 홍상필. 김현정. 최용진: Escherichia coli O157 : H7, Staphylococcus aureus 및 candida albicans에 대한 키토산의 항균효과, 한국식품과학회지, 32, p.218-224, 2000
8. 이형영, 김성미. 김진영. 윤선경. 최정수. 박선미. 안도현 : 키토산 첨가에 따른 식빵의 품질변화, 한국식품과학회지, 34, p.449-453, 2002
9. 윤선경. 박선미. 안동현.: 키토산 첨가에 의한 축육 소시지의 보존성 개선에 관한 연구-2, 키토산의 분자량에 따른 보존성의 차이, 한국식품영양과학회지, 29, p.849-853, 2000
10. 기술정보분석시리즈, 키토산의 연구동향과 전망, 산업기술정보원, 87-100, 1999
11. 日特公昭 38-3469
12. 日特開昭 54-85908
13. 日特開昭 69-12905
14. 日特開平 3-30602
15. 日特開平 3-94604)

16. 日特開平10-017414
17. 日特開平10-033013
18. 日特開平11-146707
19. 日特開平11-155308
20. 日特開平11-60422
21. USP 5,554,445
22. USP 5,525,131
23. USP 5,622,003
24. USP 5,661,103
25. USP 5,683,957
26. USP 5,849,320
27. USP 5,918,413
28. USP 5,950,362
29. USP 5,994,265
30. D.F.Kendra. and L.A.Hadwiger., *Exp. Mycol*, 8, 276, 1964
31. 内田 泰 : キチンキトサンの抗菌性. 月刊フードケミカル, 22, 1988
32. 馬場由成, 山下勉, 内田泰 : キトサン誘導體の抗菌と除菌作用. 化學工業會, 36, 1993
33. El Ghaouth, A., Arul, J. Ponnampalam, R., and Boulet, M. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh srrawberries, *J. Food. Sci.* 56, 1618-1620, 1991
34. 1995년도판, 키티.키토산 핸드북, 日技報堂出版刊
35. 안준철. 정영재. 김성호. 김용식. 여문환. 황백. 송형철. 유광재. 김정우 : 키토산을 리고당이 주요 종자의 발아와 in vitro유식물의 생육에 미치는 효과: 한국키티키토산학회지. 6, p.102-106, 2001
36. 임중환. 함경식. 박선영 : 분자량에 따른 키토산필름의 특성, 한국포장학회지, 6, p.80-96, 2000
37. 김형섭. 손병일. 박성민. 이근태: 계껍질에서 추출한 키토산필름의 이용에 관한 연구, 한수지, 32, p.568-572, 1999

38. 한국특허등록번호 제10-0277572호, 2000. 10. 11: 엔-아실키토산을 이용한 키틴섬유의 제조방법 및 이 방법으로 제조된 소화 흡수성이 향상된 키틴 섬유, 발명자 : 정병걸
39. 日特開平08-253503, 1996.10.01
40. 식품의약품안전청 고시 제 2000-57호, 2000.11.28. 식품첨가물 공전, p. 758-759
41. Lee,V.F.P., : Solution and shear properties of chitin and chitosan., Ph.D. Thesis, University of Washington, p.14-44, 1978
42. Rhim.J.w, Weller.C.L, and Ham.K.S.: Characteristics of chitosan films as affected by the type of solvent acid, Food. Sci. Biotechnol, 7, 263, 1998
43. McHugh.T.H, Avena-Bustillos, R. and Krochta.T.M: Hydrophilic edible films:Modified procedure for water vapor permeability and expansion of thickness effects. J.Food.Sci, 58, 899, 1993
44. Gennadios.A., Weller.C.L, and Gooding.C.H : Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films, J.Food Engr, 2, 395, 1994

- 항균성 관련 참고문헌

1. You, Y. S., K. M. Park, and Y. B. Kim (1993), Antimicrobial activity of some medical herbs and spices against *Streptococcus mutans*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 187-191.
2. Kim, S. H. and K. Y. Park (1993), Inhibitory effects of chinese pepper on the mutagenicity and the growth of MG-63 human osteosarcoma cells. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 628-634.
3. Nagabhushan, M. and S. V. Bhide (1992), Curcumin as an inhibitor of cancer. *J. Am. Coll. Nutr.*, **11**, 192-198.
4. Dkai, Y., T. Eksttikul, O. Svendsby, M. Ilzuka, K. Ito, and N. Minamiura (1993), Antitumor activity in an extract of Thai rice seedling. *J. Ferment. Bioeng.*, **76**, 367-370.

5. Kim, H. S., J. O. Shin (1997), Isolation and Antimicrobial Activity of *Xanthium strumarium* L. Extract. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 183-188.
6. Kim, H. S., T. S. Yu, I. S. Lee, Y. W. Kim, and S. H. Yeo (2003), Screening of the Antimicrobial and Antitumor Activity of *Xanthium strumarium* L. Extract, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 55-61.
7. Kim, S. H. and K. Y. Park (1993), Inhibitory effects of chinese pepper on the mutagenicity and the growth of MG-63 human osteosarcoma cells. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 628-634.
8. Kuerbiz, S. J., B. S. Plunkett, and W. V. Walsh (1992), Wild type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 7491-7495.
9. Lasini, A. F., A. Pompella, and M. Comporti (1985), Liver glutathione depletion induced by bromobenzen, iodobenzen and diethylmalate poisoning and its relation to lipid peroxidation and necrosis. *Am. J. Pathol.* **118**, 225-237.
10. Chung, S. K., S. J. Lee, Y. J. Chung, W. P. Park, D. S. Lee, and S. H. Cho (1998), Antimicrobial effect of Korean medicinal herb extracts for preserving greenhouse fresh produce. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.*, **5**, 13-21.
11. Lee, U. W. and L. L. Ji (1996), Alteration of glutathione and antioxidant status with exercise in unfed and refed rats. *J. Nutr.* **126**, 1833-1843.
12. Maron, D. M. and B. N. Ames (1983), Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**, 173.
13. Mizuno, M., M. Toda, N. Ueno, G. Danno, and K. Kanazawa (1989), Desmutagenicity of a dibenzofuran-quinone derivative toward the mutagenicity of Trp-p-2, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 959-964.
14. Nagabhushan, M. and S. V. Bhide (1992), Curcumin as an inhibitor of cancer. *J. Am. Coll. Nutr.*, **11**, 192-198.
15. Odachi, J., E. Ishii, A. Fukumoto, and M. Tanaka, (1993), Antimicrobial activity of medicinal plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Seikatsu*

Eisei, **37**, 15-19.

16. Oh, D. H., S. S. Ham, B. k. Park, C. Ahn, and J. Y. Yu (1998), Antimicrobial activities of natural medicinal herbs on the food spoilage or foodborne disease microorganisms. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **30**, 957-963.
17. Park, W. Y., D. S. Chang, and H. R. Cho (1992), Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **21**, 91-97.
18. Senji, S., M. Kim, M. Taniguchi, and T. Yamamoto (1989), Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a Cariogenic Bacterium. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2307-2311.
19. Shin, D. W., M. S. Kim, and J. S. Han (1997), Antimicrobial effect of ethanol extracts from some medicinal herbs and their fractionates against food-borne bacteria. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**, 808-816.
20. Yook, C. S. (1989), Coloured medicinal plants of Korea. Printed by academy, Seoul.
21. You, Y. S., K. M. Park, and Y. B. Kim (1993), Antimicrobial activity of some medical herbs and spices against *Streptococcus mutans*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 187-191.