尿素分解酵素 抑制物質의 作用과 應用에 關한 硏究

朱 泳 圭
延世大學校 文理大學

The Activity and Utilization of Urease Inhibitors

Joo, Young Kyoo
College of Art & Science, Yonsei University

SUMMARY

Urea, the major N source of world agriculture involves a serious urea-N loss through NH_3 volatilization. Approaches to decrease N loss include using urease inhibitors in view of the environmental protection and the increase of urea-N efficiency. The purpose of laboratory researches was to assess the potential value of urease inhibitors to increase urea-N efficiency in soil and Kentucky bluegrass(*Poa pratensis* L.) turf. The activity of urease inhibitors Phenylphosphorodiamidate(PPD) and *N*-(*n*-butyl) thiophosphoric triamide(NBPT) measured to break-down ammonia volatilization. The soil and turf used in this project were from the fairway in one of the Korean golf course.

The researches were carried out for two weeks to measure the urease activities on urea hydrolysis under four temperatures(10~40℃) and for one week on turfgrass using forced-draft system. Results indicated that Urea-N involves considerable loss through gaseous NH_3 by urease activities in plant-soil systems. Urease inhibitors PPD and NBPT have potential value for increasing N use efficiency by reduing NH_3 volatilization. NBPT deserves futher evaluation as fertilizer amendment than PPD use of urea in turf industries.

KEY-WORD : Urease, Urease inhibitor, NH_3 volatilization, Turfgrass

Ⅰ. 序 論

세계의 농업에서 가장 많이 사용되고 있는 질소비료원인 요소(Urea)는 낮은 염기율(Salt index)과 저렴한 원가로 인해 잔디산업의 비료로 가장 널리 사용되는 질소원이다. 그러나 엽면 살포된 요소의 질소성분은 기체 형태의 암모니아(NH_3)로 손실되어 버리는 문제점을 가지고 있다(Terman, 1979; Vlek and Craswell, 1981; Nelson, 1982; Freney et al., 1983; Joo et al., 1987). 이러한 요소의 암모니아로

*이 논문은 1990년도 연세대학교 학술연구비와 한국과학재단 연구과제(903-1510-014-1)에 의해 작성된 것임.

의 질소 손실을 줄이기 위해 토양중 요소분해효소 즉 Urease의 활성을 억제시키는 화학물질의 사용, 요소의 가수분해를 늦추기 위한 요소의 Coating화, 혹은 요소 사용상의 방법개선 등의 접근방법이 연구되고 있다(Hauck, 1984). 상기의 방법 중 요소분해효소 억제물질(Urease inhibitor)의 사용에 관한 연구가 진전되고 있는데 Bremner와 Chai(Bremner and Chai, 1986; Chai and Bremner, 1986)에 의하면 *N*-(*n*-butyl) thiophosphoric triamide(NBPT)와 Phosphoroamide(PPD) 등이 실험실내의 연구 결과 요소의 가수분해를 효과적으로 억제시키는 것으로 판명되고 있다.

요소의 가수분해로 인한 암모니아 발생측정의 여러 가지의 방법이 연구되었는데 초기에는 Static한 측정방법(Volk, 1959)에서 순환식 측정방법(Forced-draft system) (Simpson and Melsted, 1962; Hargrove and Kissel, 1979; Nelson, 1982; Torello et al., 1983; Wesely, 1983; Sheard and Beauchamp, 1985; Joo et al., 1987)으로 발달되어 가고 있다. 본 실험에서는 토양에서의 실험에서는 Static method를, Kentucky bluegrass pot 실험에서는 Forced-draft system을 응용한 방법을 사용하였다.

본 연구의 목적은 요소의 가수분해에 관여하는 요소분해효소인 Urease의 활성도를 토양과 식생에서 측정하고 가수분해의 Activity를 억제하는 Urease inhibitors의 Inhibition mechanism을 밝히기 위한 기초연구를 토양과 식생계 하에서 실시하여 Urease inhibitor의 실용 가능성을 연구하였다.

Ⅱ. 材料 및 方法

1. 토양에서의 실험

실험에 사용된 토양은 조성된지 20년 이상이 경과되고 한국들잔디(*Zoysia japonica* Steud)로 조성된 골프코스의 페어웨이 상토부위 토양을 채취하여 사용하였는데 그 토양의 물리, 화학적 특성은 Table 1과 같은데 분석방법은 Zantua and Bremner (1975)에 의하였다.

토양내에서의 요소 가수분해에 대한 실험은 풍건 토양시료 5g을 10mg 요소를 포함한 2ml의 용액에 Urease inhibitor 50μg을 첨가한 후 Incubator의 온도를 10, 20, 30, 40℃에 각각 치상하고 3, 7, 14일 후 요소 가수분해에 대한 억제효과를 측정하였다. 분석방법은 Douglas and Bremner(1970)과 Mulvaney and Bremner(1979)의 방법을 사용하였으며 억제효과에 대한 계산식은 다음과 같다.

(대조구의 요소분해량－처리구의 요소분해량)/대조구의 요소분해량×100=요소 가수분해 억제효과 (% Inhibition of urea hydrolysis)

2. Kentucky bluegrass turf에서의 실험

본 실험에 사용된 잔디 포장은 10년된 Kentucky bluegrass('Parade', 'Adelphi', 'Glade', 'Rugby' 각 25% 혼합)로 조성된 Sod를 직경 21cm, 높이 16cm의 플라스틱 화분에 옮겨심고 3개월간 온실(실내 평균 낮기온 21℃, 밤기온 15℃)에서 재배하였는데 1회 49kg N ha^{-1}을 요소로 엽면시비하고 매주 5cm 높이로 깎았으며 시료 엽면 살포 1일전 2.5g cm^{-2}의 관수를 실시하였다.

Growth chamber내 암모니아 휘발을 측정하기 위한 Forced-draft system의 Air flow rate는 1L min^{-1}이며 Fig. 1과 같이 설치되었다. Air는 여러과정을 거치면서 불순물이 제거되고 수세된 후 가습되어진 다음 Manifold를 통과하여 Pot이 설치된 Desiccator를 지나면서 잔디표면에서 휘발된 NH_3는 100ml의 0.25N 황산용액에서 Trap된다. Growth chamber의 온도는 12시간 광주기로 300μe m^{-2} sec^{-1}이며 주/야간 27/18℃를 유지하였다. Pot의 잔디표면(450cm^2)에는 10% 요소용액을 49kg N

Table 1. Properties of soils used

pH	Organic C	Sand	Silt	Clay	C.E.C
5.7	13g Kg^{-1} soil	45%	42%	13%	14me

ha⁻¹을 처리한 대조구(Control)와 PPD(N Wt의 0.5, 1, 2%)와 NBPT(N Wt의 0.125, 0.25, 0.5, 1.0%)을 Combination 처리하였다. 시험구 배치는 4반복 완전임의배치법으로 실시하였으며 실험기간인 7일간 매일 Trapping된 Sample을 냉암소에 보관 후 Bremner and Breitenbeck(1983) 방식을 채택하였다.

Ⅲ. 結果 및 考察

1. 토양에서의 실험

Urea의 가수분해에 대한 Inhibitors의 Activity는 온도에 의해 Direct control을 받았으며 PPD보다는 NBPT가 고온에 의한 Inhibition activity 제한이 낮았으며 작용기간도 긴 것으로 나타났다. Table 2에서와 같이 상대적 저온(10℃)에서는 2주 동안 PPD, NBPT 모두 Activity가 지속되었으나 20℃에서는 현저히 저하하였다. 이는 상대적 고온(30, 40℃)에서 더욱 현저하였는데 40℃에서는 PPD, NBPT 공히 Activity가 현저히 저하하였고 특히 PPD에서는 Inhibition mechanizm이 정지되었다. NBPT는 40℃하에서도 1주후 12%의 Urea hydrolysis inhibiton 효과가 있었으나 처리 2주후에는 5%로 하락하였다. 이러한 결과는 여러가지 자연적 기상조건하에서 요소와의 혼용처리시 NBPT가 PPD보다는 온도의 변화에 대한 Inhibition mechanism의 안정성이 상대적으로 높다는 것을 보여주고 있다.

2. Kentucky bluegrass turf에서의 실험

Kentucky bluegrass turf pot을 이용한 생장상 실험의 분산분석 결과는 암모니아 휘발에 의한

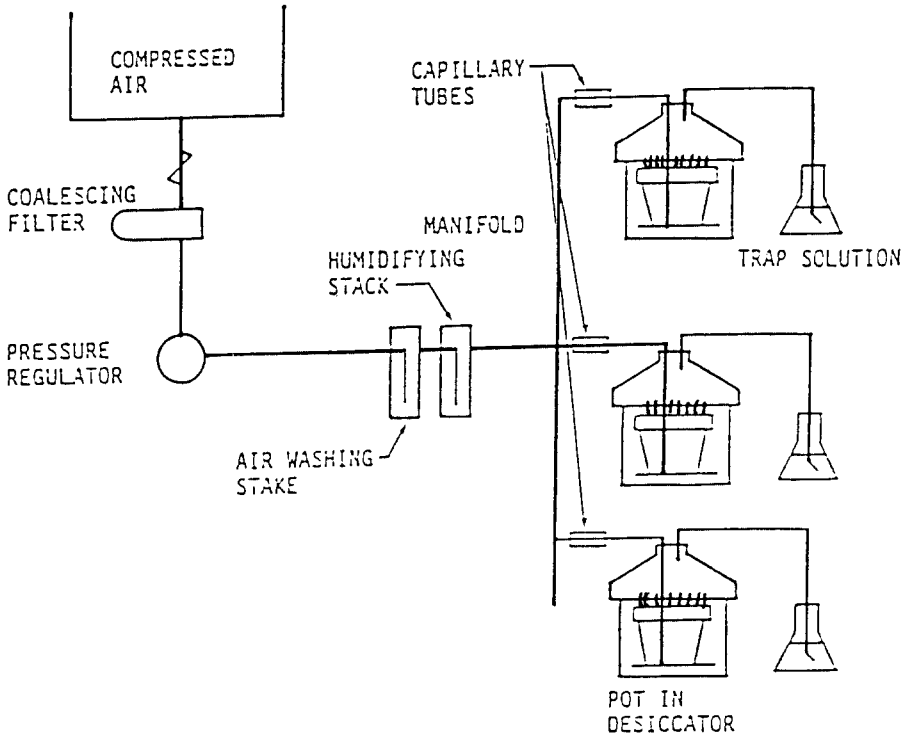

Fig. 1. Ammonia trapping system used for the growth chamber studies.

Table 2. Effects of urease inhibitors on hydrolysis of urea in soils at 4 different temperatures*

Days	Temperature	% Inhibition of urea hydrolysis	
		PPD	NBPT
3	10℃	99	95%
	20	97	89
	30	74	72
	40	57	58
		$LSD_{0.05} = 2.5$	
7	10℃	97	93%
	20	89	78
	30	54	46
	40	0	12
		$LSD_{0.05} = 2.9$	
14	10℃	90	86%
	20	16	31
	30	0	30
	40	0	5
		$LSD_{0.05} = 3.5$	

* 5g samples of soil were incubated for 3, 7 or 14 days after treatment with 10 mg urea (with 2 mL water) and 50 μg of compoud specified.

Table 3. Analysis of variance for the loss of NH_3-N as affected by urease inhibitors PPD and NBPT in the growth chamber study.

Source of variance	df	Mean square
Replications	3	
Inhibitors tested	7	49.73**
Error A	21	0.64
Day measured	6	10.87**
Inhibitor X day measured	42	8.46**
Error B	144	0.54

**Significant at the 0.01 probability level.

Urea-N의 손실은 3 level의 PPD와 4 level의 NBPT에 의해 크게 영향을 받았다. 분산분석표(Table 3)와 Table 4의 결과에 의하면 Urease inhibitor는 잔디에 엽면살포된 요소의 효율증대에 효과적이며 NH_3의 휘발성에 의한 손실량은 대조구에서 시간이 경과함에 따라 감소하였다. Urease inhibitor의 효과는 시간이 경과함에 따라 달라졌으나 그 효과는 지속적인 것으로 나타났다.

대조구에서의 암모니아로 인한 N의 손실량은 1일후 시비된 N의 전량중 15.6%가 되었고 처리 1주후에 기체 암모니아로 제거된 N은 49.9%이었는데 시비하지 않는 Blank구의 숫치를 보정한 결과 43.0%의 N 손실율을 보였다. 최대 NH_3의 손실율은 대조구에서는 1일째이었으며 Urease inhibitor처리구에서는 2일째 Peak를 이루었다. NBPT를 처리구는 7일후의 총 손실율은 29.0%(0.125% NBPT), 24.6%(0.

25% NBPT), 22.8%(0.5% NBPT)와 20.4%(1% NBPT)이었으며 PPD처리구에서는 32.8%(0.5 PPD), 26.7%(1% PPD)와 24.2%(2% PPD)이었다.

상기 결과를 토양에서의 실험과 동일하게 암모니아 휘발의 억제율(% Inhibition of NH_3 volatilization)로 계산해 본 결과 1주후에는 41.8%(0.125% NBPT), 50.7%(0.25% NBPT), 54.2%(0.5% NBPT)와 57.2%(1% NBPT)이었으며 PPD에서는 34.3%(1% PPD), 46.5%(2% PPD), 50.1%(3% PPD)로 NBPT에서는 PPD보다 약 4배가량의 낮은 처리농도에서 동일한 억제효과를 나타냄으로써 PPD보다 효과적임을 나타내었다. 토양 실험과 Kentucky bluegrass turf pot 실험결과에 의하면 식물·토양계에 시비된 요소는 상당량이 Urease의 activity에 의해 NH_3 gas로 휘발되는 Mechanism이 진행되며 Urease inhibitor인 NBPT와 PPD는 이 Mechanism을 억제하여 N-efficiency를 증진시키는데 효과적임이 판명되었다. 또 이러한 물질은 요소의 첨가제로 사용될 수 있는 가능성을 가지고 있을 것으로 고찰되었다. Urease inhibitor의 Urease activity를 저해하는 정밀한 생화학적 기작은 앞으로 연구되어야할 과제라 판단된다.

Ⅳ. 摘 要

우리 나라 뿐만 아니라 세계적으로 가장 널리 사용되고 있는 요소(Urea)는 토양 중에서 요소분해효소(Urease)에 의해 쉽게 분해되어 버리는 인위적 N-source이다. 이 요소의 효용증대는 환경보존과 작물생산성의 제고라는 관점에서 중요한 과제로 연구되고 있다. 본 실험에서는 몇가지 효소억제물질에 의한 Ammonia volatilization(휘발)의 기작을 저해시키어 Urea-N의 효율증진에 관한 연구를 토양과 켄터키 블루그라스(*Poa pratensis* L.)를 사용한 실험실 내에서 행하였다. 본 연구에 사용된 효소억제물질은 실험실 test에서 효과가 인정된 Phenylphosphorodiamidate(PPD)와 *N*-(*n*-butyl) thiophosphoric triamide(NBPT)를 사용하였으며 토양은 칼프코스 페어웨이의 샘플을 사용하였다. Incubator내 토양에서의 Urea hydrolysis 실험은 4가지 온도(10~40도)로 2주간 실험을 행하였으며 Forced-draft system을 이용한 캔터키블루그라스에서의 실험은 1주일간 역시 실험실내에서 Urea가 NH_3로 휘발되는 정도와 이에 따른 Inhibitor의 작용을 연구하였다. 실험결과에 의하면 식물-토양계에 시비된 요소는 Urea-N이 Urease의 activity에 의해 NH_3 gas로 휘발되는 기작이 진행되며 Urease inhibitor인 NBPT는 이 기작을 억제하여 N-efficiency를 증진시키는데 PPD보다 더 효과적임이 판명되었다. 또 이러한 Inhibitor들은 요소 첨가제로 사용될 수 있는 가능성을 가지고 있을 것으로 고찰되었다.

Ⅴ. 引用文献

1. Bremner, J.M., and G.A. Breitenbeck. 1983. A simple method for determination of ammonium in semimicro-Kjeldahl analysis of soils and plant materials using a block digester. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 14:905-913.
2. Bremner, J.M., and H.S. Chai. 1986. Evaluation of *N*-butyl phosphorothioic triamide for retardation of urea hydrolysis in soil. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 17:337-351.
3. Chai, H.S., and J.M. Bremner. 1986. Effects of phosphoroamides on ammonia volatilization and nitrite accumulation in soils treated with urea. Agron. Abstr. 1987:176.
4. Douglas, L.A., and J.M. Bremner. 1970. Extraction and colorimetric determination of urea in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 34:859-862.
5. Freney, J.R., J.R. Simpson, and O.T. Denmead. 1983. Volatilization of ammonia. p. 1-32. *In* J.R. Freney and J.R. Simpson(ed.). Gaseous Loss of Nitrogen from Plant-Soil Systems. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk.
6. Hargrove, W.L., and D.E. Kissel. 1979. Ammonia volatilization from surface applications

of urea in the field and laboratory. Soil Sci. Soc. Am. J. 43:359-363.

7. Hauck, R.D. 1984. Technological approaches to improving the efficiency of nitrogen fertilizer use by crop plants. p.551-560. *In* R. D. Hauck(ed.). Nitrogen in Crop Production. American Society of Agronomy, Madison, WI.
8. Held, P., S. Lang, E. Tradler, M. Klepel, D. Drohne, H.J. Hartbrich, G. Rothe, H. Scheler, S. Grundmeier, and A. Trautmann. 1976. Cultivated soil. East German Patent No. 122, 177. Chem. Abstr. 87:67315w.
9. Joo, Y.K., N.E. Christians and J.M. Bremner. 1987. Effect of *N*-(*n*-Butyl) thiophostoric triamide(NBPT) on growth response and ammonia volatilization following fertilization of Kentucky bluegrass(*Poa pratensis* L.) with urea. J. Fert. Issues 4:98-102.
10. Mulvaney, R.L., and J.M. Bremner. 1979. A modified diacetyl monoxime method for colorimetric determination of urea in soil extracts. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 10:1163-1170.
11. Mulvaney, R.L., and J.M. Bremner. 1981. Control of urea transformation in soils. p. 153-196. *In* E.A. Paul and J.E. Ladd, Eds. Soil Biochemistry, Vol 5. Marcel Dekker, Inc., New York.
12. Nelson, D.W. 1982. Gaseous losses of nitrogen other than through denitrification. p. 327-363. *In* F.J. Stevenson(ed.). Nitrogen in Agriculture Soils. American Society of Agronomy, Madison, WI.
13. Sheard, R.W., and E.G. Beauchamp. 1985. Aerodynamic measurement of ammonium volatilization from urea applied to bluegrass fescue turf. Proc. 5th Int. Turfgrass Res. Conf. 1985:549-555.
14. Simpson, D.H.M. and S.W. Melsted. 1962. Gaseous ammonia losses from urea solution applied as a foliar spray to various grass sods. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 26:186-189.
15. Terman, G.L. 1979. Volatilization loss of nitrogen as ammonia from surface-applied fertilizers, organic amendments, and crop residues. Adv. Agron. 31:189-223.
16. Torello, W.A., and D.J. Wehner. 1983. Urease activity in a Kentucky bluegrass turf. Agron. J. 75:654-656.
17. Vlek, P.L.G., and E.T. Craswell. 1981. Ammonia volatilization from flooded soil. Fertil. Res. 2:227-245.
18. Volk, G.M. 1959. Volatile loss of ammonia following surface application of urea to turf of bare soils. Agron. J. 51:746-749.
19. Wesely, R.W. 1983. Turfgrass response to foliar applied nitrogen. Ph. D. Thesis. University of Nebraska, Lincoln, NE. 70pp.
20. Zantua, M.I., and J.M. Bremner. 1975. Comparison of methods of assaying urease activity in soils. Soil Biol. Biochem. 7:292-295.