

벼 세포 현탁배양중 chitooligosaccharides 처리에 의해 유도되는 chitinase

박희영 · 김수일

서울대학교 농업생명과학대학 농화학과 및 농업생물신소재연구센터

초록 : Chitooligosaccharides 혼합물을 처리한 벼 세포 현탁배양액과 처리하지 않은 배양액의 단백질 및 효소활성을 비교하여 이 elicitor에 의해 유도되는 chitinase를 확인하였다. Chitooligosaccharide 혼합물 처리로 chitinase 활성은 비처리구에 비하여 3.5배 증가하였으며 증가율이 단백질 증가보다 10배 이상 높아 본 효소가 선택적으로 유도되는 것으로 나타났다. Polyacrylamide gel 전기영동상 나타나는 총 11종의 chitinase중 4종이 유도효소로 판명되었으며 DEAE-cellulose chromatography 결과 3개는 26~58 KD의 분자량을 가진 acidic chitinase 분획에, 나머지 1개는 basic chitinase 분획에 속한 것으로 나타나서 주로 acidic chitinase가 유도되는 것으로 확인되었다(1992년 12월 8일 접수, 1992년 12월 17일 수리).

Chitin이 존재하지 않는 식물에서도 발견되고 있는 chitinase(EC 3.2.1.14)는 병원성 곰팡이의 세포벽을 가수분해하는 효소활성이 있어 식물의 자체방어에 관련된다고 보고되고 있다.¹⁻³⁾ 실제 chitinase는 여러식물에서 병원균의 침입시 또는 비생물학적 자극에 의해 유도되는 단백질의 주구성성분으로^{4,5)} 병원성 곰팡이의 생장을 저해하는 것으로 발표되고 있다.^{6,7)} 이러한 식물체 chitinase는 대부분이 endo형으로 chitin으로부터 chitooligosaccharide를 생산하며 비교적 열이나 산에 안정하고 미생물 세포벽추출물,⁸⁾ chitin가수분해물,⁹⁾ 식물 hormone¹⁰⁾ 등 생물적 elicitor나 acetylsalicylic acid(ASA) 등 비생물적 elicitor¹¹⁾의 처리에 의하여 3~80배로 활성이 증가, 유도되는 것으로 알려져 있다. 25~39 KD의 분자량인 본 효소는 한 식물에서도 여러 종류의 isozyme이 존재하는 것으로 보고되고 있으며 이들은 chitin과 결합하는 부위로 알려진 hevein domain의 존재여부, pI value, 세포내존재 위치 등에 따라 염기성, 산성, 기타 등 크게 3가지로 분류하고 있다.^{12,13)}

이들 chitinase에 대한 연구는 대부분이 쌍자엽식물에 대한 것으로 완두,^{14,15)} 대두,¹⁶⁾ 담배,¹⁷⁾ 당근,¹⁸⁾ 오이,¹⁹⁾ 토마토²⁰⁾ 등 많은 식물의 잎, 뿌리, 종자 또는 세포배양액 등에 대하여 이루어졌다. 화분과 식물인 벼에 대한 연구는 주로 유전자에 대한 것으로 1991년 발표된 chitinase 유전자의 염기배열순서^{21,22)} 및 stress나 chitin 유

도체에 의한 유도생산 검증^{9,23)}에 대한 발표가 있을 뿐으로 이들 효소단백질에 대한 연구 보고는 많지 않다. 본 연구에서는 벼세포 현탁 배양액에서 여러가지 elicitor를 처리, chitinase를 유도, 생산하고 이들의 전기영동 및 chromatography 양상을 비교하여 유도된 효소를 분리, 확인하였다.

재료 및 방법

벼 세포 현탁배양

벼 세포는 낙동품종에서 유도한 것으로 현탁배양 배지는 MS배지를 기본으로 하고 질소원으로 무기염이 아닌 Gly, Glu, Asp 및 Arg 등의 아미노산을 각각 75.2 mg/l, 877.2 mg/l, 268.0 mg/l 및 228.0 mg/l의 농도로 사용한 AA3 배지를²³⁾ 사용하였으며 배양은 26°C 암소에서 행하였고 계대배양은 1주일 간격으로 수행하였다. Chitinase 유도를 위한 elicitor 처리는 계대배양 후 30시간이 지난 벼세포현탁 배양액에 chitooligosaccharide, 도열방법 세포벽 추출물 및 acetylsalicylic acid를 각각 200 µg/ml, 200 µg/ml 및 100 µg/ml의 농도로 첨가하여 행하였다.

Elicitor의 제조

Chitooligosaccharides는 crab shell chitin(Sigma C-

3387) 5 g에 6 N HCl 100 ml을 첨가하여 40°C에서 1시간 30분간 가수분해한 후 감압농축하여 HCl을 제거하고 Sephadex G-25 gel filtration으로 *N*-acetylglucosamine (NAG) monomer 및 dimer를 제거한 NAG 중합도가 3 이상인 분획을 수집하여 제조하였다. 도열병균 세포벽 추출물은 PDA배지(감자 추출액 200 g, dextrose 20 g, 증류수 1 l, pH 5.6)에서 자란 도열병균(*Pyricularia oryzae*)으로부터 Ayer 등²⁴⁾의 방법을 일부 수정하여, 도열병균을 모아 멸균한 후 500 mM potassium phosphate buffer(pH 7.2)로 일차 세척한 다음 마쇄하여, 상기 buffer 및 chloroform-methanol(1 : 1), acetone의 순서로 세척하여 세포벽 성분을 분리, 수집하였다.

조효소 제조

54시간 동안 배양한 세포배양액에서 부유 비세포를 제거한 후, 여액을 60°C에서 20분간 가열처리한 다음 냉각시키고 10,000×g에서 15분간 원심분리하여 상정액을 얻었다. 이 상정액을 ammonium sulfate를 첨가, 70% 포화 침전물을 원심분리하여 증류수로 투석한 후 냉동 건조, 조효소로 사용하였다.

효소의 정제

50 mM Tris·HCl buffer(pH 7.2) 용액에 평형을 시킨 DEAE-cellulose column(3×40 cm)에 조효소 시료용액을 주입한 후, 동일 buffer 150 ml, 20 mM sodium acetate buffer(pH 4.8) 150 ml 및 0.25 M NaCl 함유 상기 buffer 용액을 사용, 0~0.25 M NaCl linear gradient 방법으로 3 ml/10 min의 속도로 순차적으로 용출하고 3 ml씩 분획하였다. 각 분획은 280 nm에서의 흡광도 및 chitinase 효소활성을 측정, 분석하였다.

효소활성 측정

효소활성은 Boller 등¹⁴⁾의 방법을 일부 수정한 것으로, Molano²⁵⁾의 방법으로 제조한 regenerated chitin이 효소에 의해 분해되어 생성되는 NAG를 *p*-dimethyl amino-benzaldehyde(DMAB)로 측정함으로써 결정하였다. 즉, 효소액을 20 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)에 평행된 1% regenerated chitin 용액과 혼합하여 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후, 상정액 0.5 ml에 대하여 1% DMAB 용액과 37°C에서 30분 동안 반응시켜 585 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 단위 1 unit는 위의 반응 조건에서 1분에 1 nmole의 NAG를 생산하는 효소량으로 하였다.

Polyacrylamide gel 전기영동 및 gel상의 효소활성

측정

Native-PAGE는 Davis²⁶⁾의 방법을 일부 수정하여 10% polyacrylamide gel을 사용하여 수행하였으며, SDS-PAGE는 Laemmli²⁷⁾의 방법에 의해 0.1% SDD를 함유하는 12.5% polyacrylamide gel을 사용하였고 단백질 검출은 coomasie brilliant blue R-250 염색방법으로 실시하였다.

Native-PAGE gel상에서의 효소활성 band 검출은 Trudel 등^{28,29)}의 방법을 사용한 것으로 전기영동 gel 위에 0.01% glycol chitin을 포함하는 7.5% polyacrylamide gel을 overlay gel로 사용하여 반응시킨 후 glycol chitin이 분해된 위치를 calcofluor white M2R(Sigma)로 염색하여 UV하에서 chitinase 효소활성을 조사하였다. SDS-PAGE gel상에서의 효소활성 측정은 0.01% glycol chitin을 함유하는 SDS-PAGE를 실시한 후, Triton X-100으로 gel상의 SDS를 제거한 후 효소활성을 검정하였다.^{28,29)} 단백질 함량은 bicinchoninic acid를 사용하는 방법³⁰⁾으로 측정하였다.

결과 및 고찰

벼 세포 현탁배양액의 단백질 양 및 chitinase 활성 변화

벼 세포 현탁배양에서 배양액내 분비되는 단백질의 양은 배양시간에 따라 증가하였으나 그 양상은 elicitor 종류 및 처리여부에 따라 다르게 나타났다. Elicitor를 처리하지 않은 시료에서도 배양시간이 경과함에 단백질 양이 증가하여 초기 0.2 mg/ml의 단백질농도에서 배양 44시간이 0.81 mg/ml로 약 4배가 증가하였다(Fig. 1). 반면 도열병균 세포벽 추출물 및 chitooligosaccharide 혼합물 처리구에서는 처리 14시간 후(배양 44시간)에 0.96 및 1.18 mg/ml로 5~6배 증가되었고 특히 chitooligosaccharides 처리구에서는 54시간 배양까지 단백질 분비량이 증가, 1.38 mg/ml로 약 7배가 증가하였다.

배양액에 분비되는 chitinase의 활성도 단백질양의 증가와 같이 배양시간에 따라 증가하나 그 양상은 단백질양의 경우와 같이 elicitor 처리에 따라 상이하게 나타났다. 초기 0.084 U/ml에서 비처리구에서는 44시간 배양 후 2 U/ml 내외까지 증가, 약 25배의 효소활성이 증가되었다. 그러나 세포벽 추출물 및 chitooligosaccharides 처리에서는 비처리구보다 elicitor처리 후 효소활성이 증가되는데 소요되는 배양시간도 전반적으로 빨라졌으며 또한 배양액내의 최종 효소활성도 높아, chitooligosaccharides를 elicitor로 처리한 경우 배양 54시간에 7 U/ml 내외로 배양초기보다 약 80배 증가되어 비처리구와 비

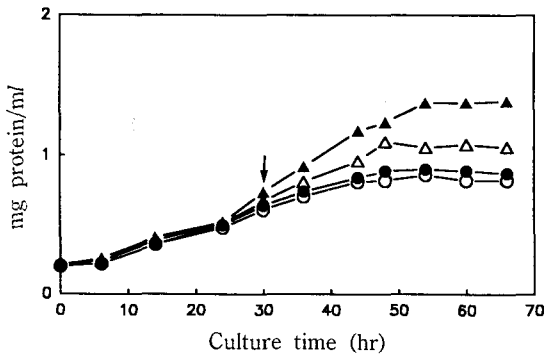


Fig. 1. Changes in protein contents in rice cell suspension culture media after treatment with elicitors (arrow indicates elicitor treatment). ○—○, Untreated; ●—●, Treated with acetylsalicylic acid; △—△, Treated with cell walls of *Pyricularia oryzae*; ▲—▲, Treated with chito oligosaccharides mixture

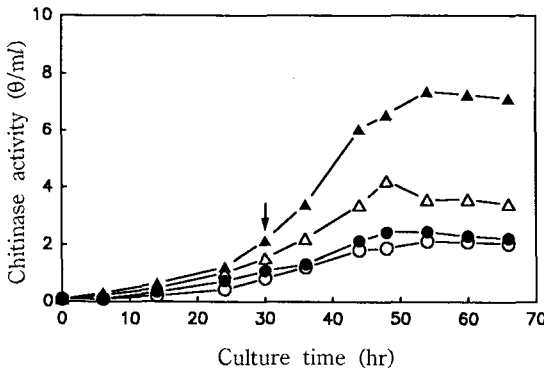


Fig. 2. Enhancement of chitinase activity in rice cell suspension media after treatment with elicitors (arrow indicates elicitor treatment). ○—○, Untreated; ●—●, Treated with acetylsalicylic acid; △—△, Treated with cell walls of *Pyricularia oryzae*; ▲—▲, Treated with chito oligosaccharides mixture

교하면 약 3.5배 증가되었다(Fig. 2). 이러한 chitinase 활성의 증가는 단백질 증가보다 높은 증가율을 보여서 특히 chito oligosaccharides 처리구에서는 단백질보다 10배 이상의 증가율을 보여서 특히 chito oligosaccharides 처리구에서는 단백질보다 10배 이상의 증가율을 나타내고 있다. Elicitor로 acetyl salicylic acid를 사용하였을 때는 단백질양이나 효소활성의 증가와 비처리구와 거의 같은 양상을 보여주어서 본 물질은 벼 세포배양에서의 elicitor로는 적합하지 않는 것으로 나타났다.

이상의 결과로서 벼 세포 현탁배양에서 chitinase의 유도는 elicitor로 chito oligosaccharides를 사용하였을 때

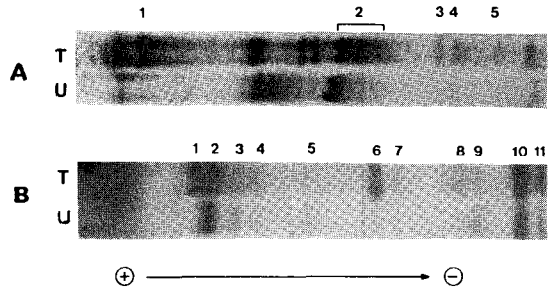


Fig. 3. Native polyacrylamide gel electropherogram of crude chitinase from rice cell suspension culture media. A, Protein bands (stained with Coomassie brilliant blue); B, Chitinase activity bands (stained with Calcofluor white M2R²⁸); U, Untreated; T, Treated with chito oligosaccharides mixture

가장 효과적이며 또한 다른 단백질에 비하여 보다 선택적으로 유도된다는 것을 알 수 있었다. 따라서 앞으로의 chitinase의 유도생산 실험에서는 chito oligosaccharides를 사용하였을 때 가장 효과적이며 또한 다른 단백질에 비하여 보다 선택적으로 유도된다는 것을 알 수 있었다. 따라서 앞으로의 chitinase의 유도생산 실험에서는 chito oligosaccharides 혼합물을 elicitor로 사용하여 행하였다. 최근 Nishizawa와 Hibi²⁹⁾는 벼 세포 현탁배양액에 glycol chitin 및 salicylic acid를 처리한 후 RNA blot hybridization 방법으로 chitinase 유도여부를 검정한 결과 glycol chitin에 의하여 3일 후 chitinase mRNA가 2배 증가됨을 발표한 바 있으며 또한 Inui 등³⁰⁾은 callus에서도 동일처리로 같은 결과를 얻었다. 본 실험은 효소단백질 수준에서 이를 확인하고 있다.

Chito oligosaccharides 처리에 의해 유도되는 단백질 및 chitinase

Chito oligosaccharides의 처리에 의하여 유도되는 단백질 및 chitinase를 분류해 보기 위하여 배양액의 조효소를 전기영동 후 그 양상을 비교하였다. Coomassie brilliant blue로 염색하여 나타나는 단백질 band들을 비교하면 elicitor 처리에 의하여 적어도 5개 이상의 단백질 band가 새로이 유도되는 것으로 보인다(Fig. 3(A), 1~5). 또한 각 전기영동 band의 chitinase 효소활성을 검정하였으며 그 결과 모두 11개의 효소활성 band(band 1~11)가 나타났다. 이들을 비처리구와 비교하면 새로이 유도된 chitinase는 band 1, 6, 7, 8 등 4개로 이중 band 6, 7은 단백질 band로는 Fig. 3(A)의 2번 band 부근에, 8은 4번에 해당하는 것으로 각각 추정되었다(Fig. 3(B)). 이드 조효소 단백질은 SDS-PAGE로 검정한 결과 10

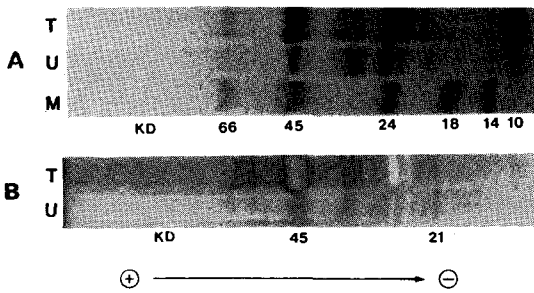


Fig. 4. SDS polyacrylamide gel electropherogram of crude chitinase from rice cell suspension culture media. A, Protein bands (stained with Coomassie brilliant blue); B, Chitinase activity bands (stained with Calcofluor white M2R²⁸); U, Untreated; T, Treated with chitooligosaccharides mixture

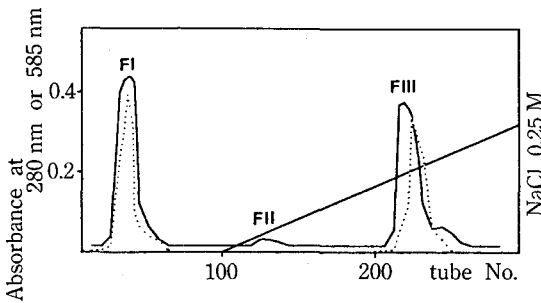


Fig. 5. DEAE-cellulose chromatogram of crude chitinase from rice cell suspension medium treated with chitooligosaccharides mixture. —, Absorbance at 280 nm; ·····, Absorbance at 585 nm (chitinase activity)

KD에서 66 KD 내외의 분자량을 가지고 있으며(Fig. 4 (A)) 이중 chitinase 효소활성은 21 KD와 45 KD 사이의 분자량을 가진 단백질에서 주로 발견되었다(Fig. 4(B)). 그러나 native-PAGE, SDS-PAGE 두 경우 모두 단백질 band와 효소활성 band가 반드시 일치하는 것은 아니었다. 예를 들면 강한 효소활성을 보이는 10번 band는 단백질염색으로는 나타나지 않은 것이었고(Fig. 3) 10 KD의 단백질은 효소활성이 없는 것으로 검출되었다(Fig. 4).

밀,²⁵⁾ 옥수수,²⁾ 보리³¹⁾ 등 단자엽 식물에서 발견되는 chitinase는 분자량이 28 KD에서 36 KD에 분포되어 있으며 또한 여러 종류의 isozyme이 존재하는 것으로 보고되고 있는데 벼의 경우에도 비교적 저분자량을 가진 최소한 10종 이상의 chitinase isozyme이 존재하는 것으로 본 실험에 나타났다. 지금까지는 3종류의 벼 chitinase가 발표되었으며 이들은 32~37 KD의 분자량을 가

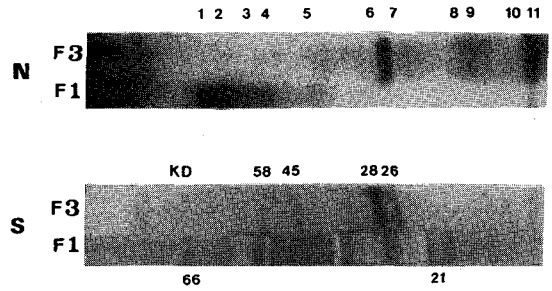


Fig. 6. Chitinase activity after polysacrylamide gel electrophoresis of fractions from DEAE-cellulose chromatography. N, Native PAGE; S, SDS-PAGE

진 것들로서 모두 DNA base sequence로 부터 유추된 것이다.²¹⁻²³⁾

Chromatography에 의한 chitinase의 분리

Elicitor 비처리구와 처리구의 세포배양액으로부터 조제한 chitinase 조효소의 비활성도는 각각 4.5 U/mg protein 및 20.8 U/mg protein으로 처리구에서 비활성도가 약 5배 높았다. 이들 조효소는 DEAE-cellulose column chromatography로 흡착되지 않고 용출되는 FI 분획을 포함하여 세개의 분획(FI, FII, FIII)으로 분리되었으며 이중 FI와 FIII에서 chitinase 효소활성을 나타내었다(Fig. 5). 주입한 조효소 36 unit에서 38%가 FI에, 59.4%가 FIII에서 발견되었다. 비처리구에서도 처리구의 조효소와 비슷한 분리양상을 보였으나 각 분획에 발견되는 총 효소활성비는 FI에 76%, FIII에 21%여서 효소수율은 97% 내외로 동일하나 처리구에서와는 반대로 대부분의 chitinase가 FI에 존재하였다. 따라서 elicitor 처리에 의하여 유도되는 chitinase는 주로 FIII 분획의 것으로 추정되었으며 이는 처리구 분획의 chitinase 비활성도가 FI에 14.5, FIII는 120.5 U/mg protein인 것에 비하여 비처리구에서는 각각 5.2, 7.5 U/mg protein으로 FIII의 경우 특히 낮아 처리구의 1/16에 해당되는 사실로도 확인할 수 있었다.

FI와 FIII분획의 효소활성을 보유하는 전기영동 band들은 Fig. 6에 나타내었다. 분획 FI은 pH 7.2에서도 DEAE-cellulose에 흡착되지 않고 pH 8인 polyacrylamide gel에서도 비교적 이동도가 낮은 band 1부터 5를 포함한 것으로 나타났으며 반면 분획 FIII는 상기조건에서 흡착되며 전기영동시 이동도가 높은 band 6부터 11을 포함하였다(Fig. 6-N). 따라서 담배의 경우와 같이³²⁾ 분획 FI은 혐기성 chitinase군으로, 분획 FIII는 산성 chitinase군으로 분류하였다. 분획 FI은 66~21 KD의 분자량을 가진 여러가지 효소로 구성되어 있으나 분획 FIII은

26, 28, 45, 58 KD인 효소활성 band를 포함하고 있었다 (Fig. 6-S). 특히 elicitor 처리에 의하여 유도되는 4 band중 3개(6~8)가 분획 FIII에서 발견되었으며 나머지 1개(band 1)는 분획 FI에서 발견되었다. 이상의 결과를 종합하여 보면 elicitor로 chitoooligosaccharides 혼합물을 사용할 때 벼 세포현탁배양에서 유도되는 chitinase는 주로 산성 chitinase들임을 알 수 있었다.

Shinshi 등²⁹⁾은 cystein이 많은 hevein domain이 존재하는 것을 염기성 chitinase로(class I), 존재하지 않은 것을 산성 chitinase로(class II), 이들과는 전혀 유사성이 없는 것을 class III chitinase로 분류하였다. Nishizawa와 Hibi²³⁾ 및 Zhu와 Lambi 등²¹⁾은 ethephon이나 fungal elicitor 등을 벼에 처리하였을 때 hevein domain이 있는 염기성 chitinase가 유도된다고 보고하고 있다. 본 연구 결과와 상이할 수 있는 이러한 보고는 hevein domain을 제외하고는 산성 chitinase와 염기배열순서에 있어 상동성이 높은 염기성 chitinase 유전자를 probe로 사용하여 blot hybridization을 행하므로써 산성 chitinase mRNA가 같이 검출된 결과에 기인한다고 추정할 수도 있다. 실제로 담배의 경우 염기성과 산성 chitinase는 65% 이상의 상동성을 가지고 있다고 보고되고 있다.³⁰⁾ 이러한 차이점의 해석은 elicitor에 유도되는 산성 chitinase 뿐만 아니라 염기성 chitinase에 대하여도 단백질 수준에서 특성을 규명함으로써 가능할 것이다.

감사의 글

이 논문은 1991년도 교육부 지원 한국학술진흥재단의 대학부설연구소 지원 학술연구조성에 의하여 연구되었으며 또한 한국과학재단 지정 농업생물신소재 연구센터의 부분적 지원을 받았기에 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Métraux, J. P., Burkhart, W., Moyer, M., Dincher, S., Middlesteadt, W., Willias, S., Payne, G., Carnes, M. and Ryals, J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 : 896(1989)
2. Huynh, G. K., Hironaka, C. M., Levine, E. B., Smith, C. E., Borgmeyer, J.R. and Shah, D. M.: J. Biol. Chem., 267 : 6635(1992)
3. Broekaert, W. F., Parijs, V., Allen, A. K. and Peumans, W. J.: Physiol. Mol. Plant Pathol., 33 : 319 (1988)
4. Mauch, F., Hadwiger, L. A. and Boller, T.: Plant Physiol., 87 : 325(1988)

5. Nasser, W., de Tapia, M., Kauffmann, S., Montasser-Kouhsari, S. and Burkard, G.: Plant Mol. Biol., 11 : 529(1988)
6. Pegg, G. F. and Young, D. H.: Physiol. Plant Pathol., 21 : 389(1982)
7. Jacobsen, S., Mikkelsen, J. D. and Hejgaard, J.: Physiol. Plantarum., 79 : 554(1990).
8. Vogelsang, R. and Barz, W.: Z. Naturforsch., 45 : 233 (1990)
9. Inui, H., Kosaki, H., Uno, Y., Tabata, K. and Hirano, S.: Agric. Biol. Chem., 55 : 3107(1991)
10. Shinshi, H., Mohnen, D. and Meins, F.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84 : 89(1987)
11. Malamy, J., Carr, J. P., Kleisig, D. F. and Raskin, I.: Science, 250 : 1002(1990)
12. Shinshi, H., Neuhaus, J. M., Ryals, J. and Meins, F. Jr.: Plant Mol. Biol., 14 : 357(1990)
13. Payne, G., Ahl, P., Moyer, M., Harper, A., Beck, J., Meins, F. Jr. and Ryals, J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 : 98(1990)
14. Boller, T., Gehri, A., Mauch, F. and Vögeli, U.: Planta, 157 : 22(1983)
15. Boller, T. and Vögeli, U.: Plant Physiol., 74 : 442 (1984)
16. Wadworth, S. A. and Zikakis, J. P.: J. Agric. Food Chem., 32 : 1284(1984)
17. Linthost, H. J. M., van Loon, L. C., van Rossum, C. M. A., Mayer, A., Bol, J. F., van Roekel, J. S. C., Meulenhoff, E. J. S. and Cornelissen, B. J. C.: Mol. Plant-Microbe Interaction, 3 : 252(1990).
18. Kurosaki, F., Tashiro, N. and Nishi, A.: Physiol. Mol. Plant Pathol., 31 : 211(1987)
19. Métraux, J. P. and Boller, T.: Physiol. Mol. Plant Pathol., 28 : 161(1986)
20. Joosten, M. H. A. J. and De Wit, P. J. G. M.: Plant Physiol., 89 : 945(1988)
21. Zhu, G. and Lamb, C. J.: Mol. Gen. Genet., 226 : 289(1991)
22. Huang, J. K., Wen, L., Swegle, M., Tran, H. C., Thin, T. H., Naylor, H. M., Muthkrishnan, S. and Reeck, G. R.: Plant Mol. Biol., 16 : 479(1991)
23. Nishizawa, Y. and Hibi, T.: Plant Science, 76 : 211 (1991)
24. Ayer, A. R., Ebel, J., Valent, B. and Albersheim, P.: Plant Physiology, 57 : 760(1976)
25. Molano, J., Polacheck, I., Duran, A. and Cabib, E.: J. Biol. Chem., 254 : 4901(1979)
26. Davis, B. J.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 121 : 404(1964)
27. Lammeli, U. K.: Nature, 227 : 680(1970)
28. Trudel, J. and Asselin, A.: Anal. Biochem., 178 : 362

- (1989)
29. Trudel, J., Audy, P. and Asselin, A.: *Mol. Plant-Microbe Inter.*, 2 : 315(1989)
30. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C.: *Anal. Biochem.*, 15 : 76(1985)
31. Kragh, K. M., Jacobsen, S. and Mikkelsen, J. D.: *Plant Science*, 71 : 55(1990)
32. Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P. and Fritig, B.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84 : 6750(1987)
33. Hooft van Huijsduijnen, R. A. M., Kauffman, S., Bredeode, F. T., Cornelissen, B. J. C., Legrand, M., Fritig, B. and Bol, J. F.: *Plant Mol. Biol.*, 9 : 41 (1987)

Induction of chitinase in rice cell suspension culture treated with chitooligosaccharides mixture

Hee-Young Park and Su-Il Kim (Department of Agricultural Chemistry and Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea)

Abstract : Chitinase was induced in rice cell suspension culture with treatment of chitooligosaccharides mixture. Among eleven isozymes found in 10% polysacrylamide gel electropherogram, four isozymes were identified as induced enzymes. Acidic chitinase fraction separated in DEAE-cellulose column chromatography, includes three induced chitinase, while basic fraction contains only one induced isozyme. Treatment of chitooligosaccharides mixture enhanced the contents in both protein and chitinase activity in cell suspension culture media, but increase in chitinase activity was much higher than in protein.