

## 효모세포벽추출물에 의한 고추내 salicylic acid 생성유도

강대선<sup>1</sup> · 조수목<sup>3</sup> · 강희완<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>한경대학교 바이오·정보기술대학원, <sup>2</sup>한경대학교 유전공학연구소, <sup>3</sup>국립농업과학원 기능성식품과

### Induction of Salicylic Acid Production in Pepper by Yeast Cell Wall Extract

Dae Sun Kang<sup>1</sup>, Soo Muk Cho<sup>3</sup> and Hee-Wan Kang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Biotechnology and Information Technology, Hankyong National University, Ansung 456-749, Korea

<sup>2</sup>Institute of Genetic engineering, Hankyong National University, Ansung 456-749, Korea

<sup>3</sup>Functional Functional Food & Nutrition Division, Department of Agrofood Resources, Suwon 441-707, Korea

(Received 30, October 2012., Revised 7, November 2012., Accepted 13, November 2012)

**ABSTRACT:** Yeast cell wall extract (YCWE) was treated on leaves and roots of pepper seedlings at the dosage of 4 mg/mL and salicylic acid (SA) production in pepper was detected by ultra high performance liquid chromatography (UHPLC). The SA production in pepper stem was induced by YCWE. SA was produced at the highest level of 20.29 µg/g after 48 hrs of foliar spray with YCWE, which is 3.7 times higher than that of root perfusion with YCWM. SA production was gradually reduced after 72 hrs of YCWE treatment.

**KEYWORDS :** Pepper, Salicylic acid, Yeast cell wall extract

병 방어반응은 병원균의 세포벽성분인 oligosaccharides, peptide, glycoprotein으로 구성되어 있으며 microbe-associated molecular patterns(MAMPs)로 알려져 있다. MAMPs는 elicitor로 기주세포내의 수용체에서 인식 되고 salicylic acid(SA)나 jasmonic acid(JA)와 같은 병 저항성 유도 신호전달물질을 자극 하여 병 저항성 유전자 발현을 유도 하여 병 저항성 물질인 phytoalexin생합성물에 의한 병 저항성 반응이 나타나게 된다(Bent and Mackey 2007; Nürnberger *et al.*, 2004). 유도저항은 전신획득저항(systemic acquired resistance, SAR)과 induced systemic resistance (ISR)이 있으며 SAR은 SA 의존적으로 PR-1a를 포함하는 pathogenesis-related(PR) 유전자의 발현을 유도한다. ISR은 SA대신해서 Jasmonic acid(JA)와 ethylen(ET)의존적인 신호전달체계로 plant defensin 1.2(PDF 1.2)과 같은 다른 PR 유전자를 유도한다(Minami *et al.*, 2011).

효모(*Saccharomyces cerevisiae*)는 식물체에 대하여 비병원성 미생물이며 효모추출물(Yeast Cell Wall Extract, YCWE)이 MAMPs로 병 저항성 유전자발현 유도가 확인 되었으며 효모세포벽추출물을 식물체 경엽 또는 관주처리 하였을 때 식물병원진균과 세균병 방제에 효과적인 것으로 보고되었다(Kitakawa *et al.*, 2005; Minami *et al.*, 2011; Obara *et al.*, 2007; Raacke *et al.*, 2006). 효모는 맥주, 막걸리 주류산업과 제빵발효에 필수적인 미생물로

다량의 폐자원이 생산되며 그 이용성이 요구되고 있다. 일본 Housaku Monogatari(HM)사는 YCEW를 주요성분으로 하는 친 환경비료제로 시판되고 있으며 세균병과 흰가루병 등의 식물병원균 방제에 효과적인 것으로 보고되었다(Kitakawa *et al.*, 2005; Minami *et al.*, 2005). 스페인 Lida Quimica사(www.lidaquimica.com)는 효모추출물을 재제화하여 친 환경비료제로 등록하여 시판되고 있으며 *Pysium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora* 등에 의한 뿌리썩음병 방제에 효과적인 것으로 나타났다. 고추재배에 있어 고추역병(*Phytophthora capsici*)과 탄저병(*Collectotrichum spp.*)은 우리나라 고추 생산에 큰 감소 요인이 되고 있다. 특히 고추역병균은 주요 고추재배지역에서 8-25% 발병되고 있으며 역병발생이 심했던 1986년에는 병 발생율이 60%를 초과한 지역이 1/3에 달한 경우도 있다(Yang *et al.*, 1991).

본 연구는 효모추출액(YCEW)에 대한 고추내의 SA함량변화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 수행 하였으며 그 결과를 보고 하고자 한다.

#### 효모추출액처리에 의한 고추내 salicylic acid 생성유도

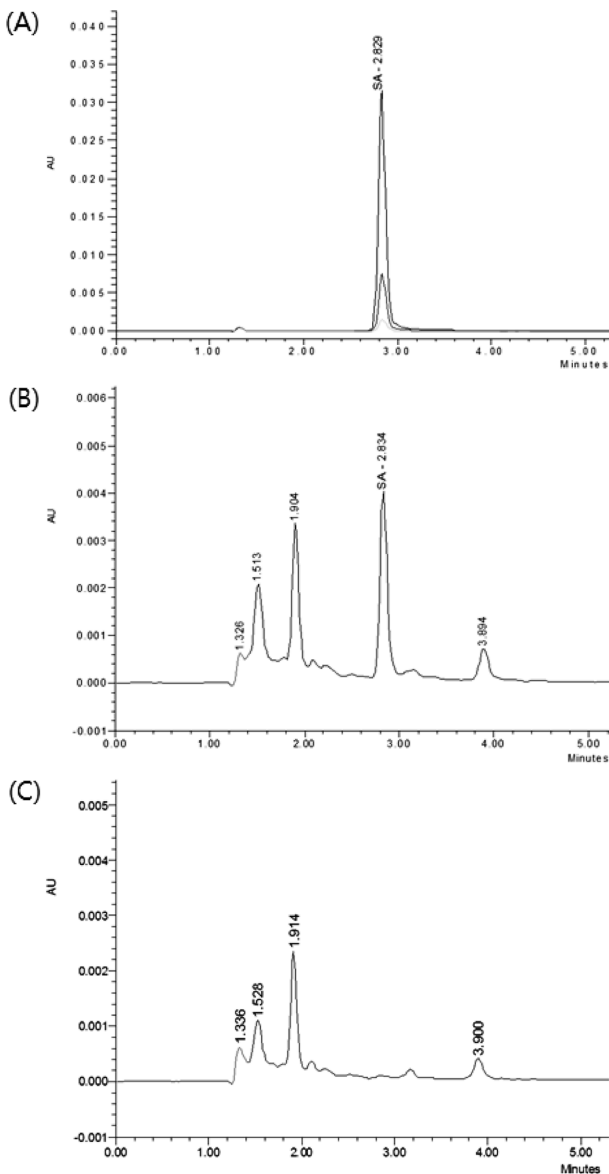
고추종자(마니파 품종)를 과중하여 온실에 6주 동안 성장시킨 건전유묘를 식물재료로 사용 하였다. 효모추출물(YCWE)은 스페인 Lida Quimica사로부터 도입하여 사용 하였으며, 이를 4 mg/mL 농도로 물에 희석하여 고추 잎에 충분히 묻도록 경엽처리를 하고 포기당 30 mL로 뿌리

\*Corresponding author <E-mail : kanghw2@hknu.ac.kr>

에 관주처리를 하였으며 대조구는 물로 같은 방법으로 처리하였다. YCWE를 처리한 고추유묘를 24시간, 48시간, 72시간 후에 줄기를 절단하여  $-80^{\circ}\text{C}$  냉동보관 후 SA분석용 시료로 사용하였다.

SA 추출방법은 Verberne 등(2002)에 의한 방법으로 수행 하였다. 액화질소로 고추줄기 0.5 g을 마쇄하여 균질화시킨 재료를 1.5 mL 원심분리용 에펜도르프 튜브에 옮긴 후 90% 메탄올 1 mL와 내부 대조용액 3,4-DHBA 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  혼합한 후 1분간 vortex하였다. 이어서 5분간 초음파 처리한 다음에 15,000 rpm으로 5분간 초고속원심분리기에서 원심분리한 후 상등액을 제거하고 침전물을 0.5 $\mu\text{l}$

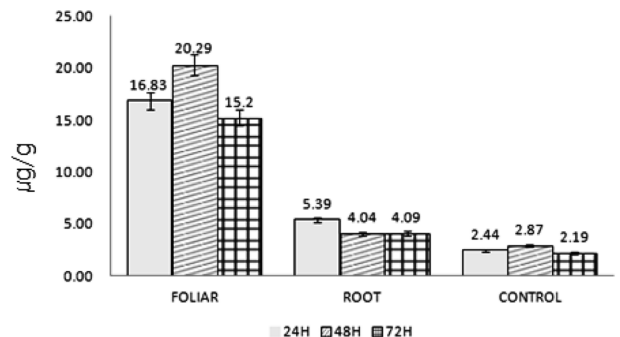
100% 메탄올로 한 다음 반복하여 5분간 초음파처리 및 5분간 최고속도로 원심 분리하였다. 상등액을 0.2M NaOH 10  $\mu\text{l}$  을 첨가하고 SpeedVac에서 농축하였다. SA는 Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)분석에 의해 HSS T<sub>3</sub> 컬럼(1.8  $\mu\text{m}$ , 2.1  $\times$  100 mm); Injection volume 1 $\mu\text{l}$ ) 275 nm와 310 nm에서 수행 되었다. Methanol과 1 mM Trifluoro acetic acid(60:40) 혼합액은 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  Flow rate 0.2로 상온에서 용리하였다. 컬럼에 20  $\mu\text{l}$ 의 시료를 주입하였으며, SA는 표준품 SA와 체류시간을 비교하여 검출하였다. SA량은 ppm으로 표시되는 포물선에 의해 전산처리 되었으며 이는 작업 상수를 계산하여  $\mu\text{g}$ 으로 환산되었다. YCWE를 고추에 경엽 및 뿌리에 관주 처리 후 고추줄기로 부터 SA를 추출하고 UHPLC에 의해 SA검출여부를 조사하였다. SA를 확인하기 위해 salicylic acid(Sigma)를 standard로 사용하였다. 고추에 YCWE 처리 한 후 고추 줄기의 SA 검출여부를 UHPLC로 확인한 결과 2.829 minute에서 SA 표준 peak(Fig. 1A)와 동일한 Peak가 검출되었으나(Fig. 1B), 물로 처리된 대조구에서는 상응하는 peak가 검출되지 않았다(Fig. 1C). 따라서 YCWE로 처리된 고추에서 SA가 생성유도 되는 것으로 확인 할 수 있었다.



**Fig. 1.** Overlay of ultra high performance liquid chromatography chromatogram UHPLC showing accumulation of salicylic acid. Standard (A), treated pepper leaf with yeast cell wall extract (B) and pepper leaf treated with D.W (C) by foliar spray.

**효모추출액처리 부위 및 시간별 고추내 salicylic acid 생성 변화**

고추 모에 4 mg/mL의 YCWE를 경엽과 관주 처리한 후 24, 48, 72시간 후 줄기에서 SA량을UHPLC분석방법으로 측정하였다. 경엽처리 24시간 후 조사된 SA량은 16.83  $\mu\text{g}/\text{g}$ 으로 관주처리시의 5.39  $\mu\text{g}/\text{g}$  보다 3배 이상 높았다(Fig. 2). YCWE 처리 48시간 후에는 SA함량이 20.29  $\mu\text{g}/\text{g}$ 으로 가장 높게 검출되었으며 이 결과는 관주 처리시의 4.04  $\mu\text{g}/\text{g}$  보다 약 5배 이상 높게 나타났다. 72시간 후에는 경엽처리의 경우 15.20  $\mu\text{g}/\text{g}$ 으로 SA함량이



**Fig. 2.** Accumulation of free salicylic acid in stem of pepper treated with yeast cell wall extract through root and foliar. Stems were harvested at 24, 48, 72h after treatment and the salicylic acid extracts were analyzed by ultra high performance liquid chromatography (UHPLC). The quantities are the average of three repeats.

감소하는 양상을 보였다. 이는 관주 처리 시에도 24시간 후 SA함량이 5.39 µg/g에서 48시간, 72시간 후에 각각 4.04 µg/g, 4.09 µg/g으로 소폭 감소하는 것과 유사한 유형을 볼 수 있었다. 본 실험에서 결과적으로 YCWE 관주 처리보다 경엽처리 하는 것이 SA함량을 증가 시키는데 효과적임을 알 수 있었다.

## 결 론

Raacke 등(2006)은 아라비돕시스에 효소추출물을 처리 하였을 때 SA 활성이 유도되었다고 보고하여 본 연구와 유사한 결과로 나타났다. 효모와 메디카고와의 세포배양 실험에서 효모에 의한 식물체 저항성 유도 반응은 JA 과정에 의하여 중계 되지 않는다고 하였다(Suzuki *et al.*, 2005). *PR-1a*와 *PDF 1.2*저항성 유전자 promoter: bioluminescence 유전자 융합 형질전환 아라비돕시스를 이용하여 YCWE처리에 따른 저항성 유도 기작을 연구 하였다. YCWE를 처리하였을 경우 4일 후에 *PR-1a*활성이 최대치로 나타났으며 처리 후 4시간만에 *PDF 1.2* 발현이 최대치를 보여 YCWE는 SA와 JA 생성에 모두 관여 한다고 하였다(Minami *et al.*, 2011).

식물체의 병 저항성 반응은 병원균 또는 식물조직과괴 인식에 의하여 발단된다. 반면에 비 병원성 또는 비 기주 미생물은 주로 JA과정을 활성화 한다(Verhagen *et al.*, 2004; Zimmerli *et al.*, 2004). 효모는 고추에 대하여 비 병원성 이면서 비 기주 미생물이므로 JA 과정에 관여 할 것으로 생각 되었지만 SA활성을 유도함으로써 효모추출물내에 SA활성을 유도하는 유효 성분이 포함 되어 있을 가능성도 배제 할 수 없었다.  $\beta$ -amino-butyric acid (BABA), benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothioic acid S-methylester(BTH) 등의 화학물질이 SA pathway를 활성화 하는 것으로 알려져 있다(Zimmerli *et al.*, 2004). SA는 식물에 있어서의 전신획득저항성을 유도하는 매우 중요한 기능을 하는 내생적 신호전달 분자로 잘 알려져 있다(Dempsey *et al.*, 1999; Durrant and Dong, 2004). 고추유묘에 효모추출물을 처리하였을 경우 잎의 SA함량이 증가 되어 전신획득저항성이 유도 되었을 가능성이 있을 것으로 사료 되었다. SA의 증가는 수경 재배 토마토에서 점무늬병(*Alternaria solani*)에 대한 저항성을 촉진하는 것으로 보고되어있다(Spletzer and Enyedi, 1999). 아라비돕시스 실험에서 시들음병(*F. oxysporum*) 접종 전 외생적인 SA의 처리시 잎사귀 괴사나 식물고사를 줄여주는 병 저항성이 확인된 바 있다(Edgar *et al.*, 2006). 맥주생산에 효모가 이용되어 다량의 폐 효모자원이 생산 되고 있으며 이를 항생제 대체 또는 병저항성 유도를 위한 잠재적인 면역조절자로서 가축의 사료 첨가물로 이용되고 있으며, 동물의 성장, 병저항성, 스트레스 해소에 유용하고 oxidative burst활성을 증가 시키며 Inoleic acid, linoletic

acid가 다량 함유되어 있는 것으로 보고되어있다(Huff *et al.*, 2010). 이러한 효모 폐자원으로부터 YCWE를 생산하고 작물에 이용 할 수 있다면 비료와 병 방제의 친환경 복합 기능성 재제로 활용 할 수 있을 것으로 전망 된다.

결론적으로 본 연구에서 YCWE처리에 의하여 고추 내에 SA생성 유도하는 것을 확인 하였으며 이는 간접적으로 저항성유도를 시사하고 있다. 그러나 향 후 SA 단독반응인지 또는 JA 복합적 저항성 반응을 나타내는지에 대한 정밀실험과 각 pathway의 표적 저항성 유전자 발현 양상을 조사하여 구명 되어야 하며 실질적으로 YCWE가 고추탄저병이나 고추역병균과 같은 고추 병원균에 대한 병 저항성유도실험이 수행 되어야 할 것으로 사료된다.

## 적 요

효모추출물 4 mg/mL를 고추유묘에 경엽 및 뿌리 관주 처리 24시간 후에 salicylic acid(SA)함량을 ultra high performance liquid chromatography(UHPLC)분석방법으로 측정된 결과 yeast cell wall extract(YCWE)처리구에서 대조구의 SA처리구와 동일한 peak가 검출되어 SA가 생성 유도 되는 것으로 확인 되었다. SA는 YCWE를 경엽처리 48시간 후 20.29 µg/g으로 가장 높게 나타났으며 관주처리보다 약 3.7배의 높은 SA검출함량을 보였으나 처리 후 72시간부터는 점차적으로 SA함량이 감소하는 양상을 보였다.

## 감사의 말씀

본 연구는 2012년도 농촌진흥청 아젠다 과제(Code# PJ00735808)지원에 의하여 수행 되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Bent, A. F. and Mackey, D. 2007. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45:399-436.
- Dempsey, D. A., Shah, J. and Klessig, D. F. 1999. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18:547-575.
- Durrant, W. E. and Dong, X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:185-209.
- Edgar, C. I., McGrath, K. C., Dombrecht, B., Manners, J. M., Maclean, D. C., Schenk, P. M. and Kazan, K. 2006. Salicylic acid mediates resistance to the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* in the model host *Arabidopsis thaliana*. *Aust. Plant Pathol.* 35:581-591.
- Huff, G. R., Huff, W. E., Farnell, M. B., Rath, N. C., Solis de Los Santos, F. and Donoghue, A. M. 2010. Bacterial clearance, heterophil function, and hematological parameters of transport-

- stressed turkey poult supplemented with dietary yeast extract. *Poult. Sci.* 89:447-56.
- Kitagawa, T., Shirai, T., Takasaki, S. and Kinoshita, M. 2005. Induction of resistance to crown and root rot and powdery mildew on tomato by yeast extract. *Engei Gakkai Zasshi Bessatsu* 74:413.
- Minami, T., Kitagawa, T. and Kinoshita, M. 2005. Induction of resistance to Bacterial soft rot, Bacterial rot and Bacterial spot on lettuce by yeast extract. *Engei Gakkai Zasshi Bessatsu* 74:189.
- Minami, T., Tanaka, T., Takasaki, S. and Kawamura, K. 2011. *In vivo* bioluminescence monitoring of defense gene expression in response to treatment with yeast cell wall extract. *Plant. Biotech.* 28:481-484.
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B. and Piater, L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* 198:249-266.
- Obara, N., Mitsuura, I., Seo, S., Ohashi, Y., Hasegawa, M. and Matsuura, Y. 2007. Mechanism of PR gene expression by treatment of tobacco leaves with yeast extract (AGREVO EX). *Jpn. J. Phytopathol.* 73:94-101.
- Raacke, I. C., Rad, U. von., Mueller, M. J. and Berger, S. 2006. Yeast increases resistance in *Arabidopsis* against *Pseudomonas syringae* and *Botrytis cinerea* by Salicylic Acid-dependent as well as independent Mechanisms. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:1138-1146.
- Suzuki, H., Reddy, M. S. S., Naoumkina, M., Aziz, N., May, G. C., Huhman, D. V., Summer, L. W., Blount, J. W., Mendes, P. and Dixon, R. A. 2005. Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic re-programming in cell suspension cultures of the model legume. *Medicago truncatula*. *Planta* 220:696-707.
- Spletzer, M. E. and Enyedi, A. J. 1999. Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. *Phytopathol.* 89:722-727.
- Verberne, M. C., Brouwer, N., Delbianco, F., Linthorst, H. J. M., Bol, J. F. and Verpoorte, R. 2002. Method for the extraction of the volatile compound salicylic acid from tobacco leaf material. *Phytochem. Anal.* 13:45-50.
- Verhagen, B. W. M., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H. S., van Loon, L. C. and Pieterse, C. M. J. 2004. The transcriptome of rhizobacteria induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:895-908.
- Yang S. S., Kim C. H., Cho E. K. and Lee E. J. 1991. Distribution and characteristics of suppressive soil to *Phytophthora blight* to fred-pepper in Korea. *Res. Rep. RDA* 33:18-22. (in Korean).
- Zimmerli, L., Stein, M., Lipka, V., Schulze-Lefert, P. and Somerville, S. 2004. Host and non-host pathogens elicit different jasmonate/ethylene responses in *Arabidopsis*. *Plant J.* 40:633-646.