

# 담배잎의 一生에 있어서 RuBisCO 含量과 Protease 活性의 變動

李 鶴 洙

충북대학교 농과대학 연초학과

## Changes of RuBisCO Content and Protease Activity during the Life Span of Tobacco Leaf

H. S. Lee

Coll. of agric., Chungbuk nat'l univ.,  
Cheongju, 360-763, Korea.

### ABSTRACT

Changes in the amount of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase(=RuBisCO) protein, namely fraction I protein, and the protease activity were determined in the 10th leaf of tobacco(*Nicotiana tabacum*, var. Ky-57) from 10 days after emergence through senescence at 5 days interval.

The amount of RuBisCO per devedined leaf rapidly increased during the early growing season, reached a maximal quantity at the around 20 days after leaf emergence, when the leaf has gone through its most rapid expansion, and began gradually to decrease till 30 days after leaf emergence, thereafter significantly declined to 45 days that the leaf has been dried up partly. The pattern of the ratio of RuBisCO protein to soluble protein in quantity changed similar to that of RuBisCO contents in a leaf, that was 43%, 60%, and 21% at the around 10 days, 20 days, and 45 days, respectively. And RuBisCO contents was linearly correlated with the concentration of chlorophyll( $r=0.98$ ) throughout the life span of the leaf. So, it was assumed that the leaf color can be a useful indicator for judging whether RuBisCO contents higher or not in tobacco leaves without homogenization. On the other hand, the protease activities for degradation of casein were assayed at pH 5.5, 7.0, and 8.5 with crude extracts

desalted on Sephadex G-25. The highest caseolytic activity was found at pH 5.5 throughout the life span of the leaf. Also, the activity at 5.5 became gradually to increase from 30 days after leaf emergence, when RuBisCO protein had become to disappear and remarkably increased in the last stage of senescence, although nitrogen contents of the leaf had reached low levels.

The caseolytic activity at pH 5.5 was in negative correlation with RuBisCO contents throughout the life span of the leaf, but not in lineality between them. In other words, the caseolytic activity increased in a rapid exponential manner when RuBisCO contents had reached some low levels.

These results showed that the leaf age, namely harvesting time, is a very important factor for the production of the tobacco leaf containing higher RuBisCO protein. It was concluded that the practical harvesting time is between 20 days and 30 days after the leaf emergence from the present results.

## 서 론

담배는 RuBisCO(=Ribulose-1, 5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase, E.C. 4.1.1.39) 단백질이 無色, 無味, 無臭의 순수한 結晶體로 單離抽出되는 최초의 唯一한 식물이다.<sup>1)</sup> 抽出 및 精製操作이 매우 간편하고,<sup>2)</sup> 정제된 RuBisCO 단백질은 영양가도 높아,<sup>3)</sup> 최근 이를 추출하여 인간의 식료 및 의약품으로 이용하고자 하고 있다.<sup>10, 26)</sup> 이의 實用化에 있어서 중요한 점은, RuBisCO 함량이 높은 잎을 생산함과 동시에 그 잎으로 부터 高收率로 回收하는 것이다.

식물엽중의 RuBisCO의 量은 合成과 分解의 均衡에 의하여 維持된다.<sup>7)</sup> 따라서 RuBisCO 함량이 높은 잎을 생산하기 위해서는 먼저 잎의 一生을 통한 量의 變動을 상세하게 조사해 볼 필요가 있다. Dorner et al<sup>4)</sup>은 담배 2품종을 供試하여 地上 10~12번째내 잎의 生長에 따른 變化를 조사하였는데, RuBisCO는 葉面積이 最終面積의 약 90%에 달하였을 때 그 合成이 가장 왕성하고 그후 재빨리 低下한다고 하였을 뿐, RuBisCO 단

백질의 함량이 많은 잎을 生産하는데 도움이 될 最高含量에 달하는 時期라든가 그 程度 등에 대해서는 상세히 밝히지 않았다.

한편, 식물엽중의 protease 活性은 잎의 生理의 나이와 密接한 관계에 있고,<sup>6)</sup> protease는 엽중의 단백질은 물론, 잎을 磨碎하여 얻는 蛋白質 抽出液中の RuBisCO단백질을 크게 分解하는 것으로 알려져 있다.<sup>21, 23, 25)</sup> 따라서, 잎중의 RuBisCO단백질을 高收率로 回收하기 위해서는 protease活性이 보다 낮은 잎을 抽出材料로 이용하는 것이 바람직 할 것이다. 生長 또는 乾燥中인 담배잎에는 酸性側에서 gelatine이라든가<sup>2)</sup> casein,<sup>8)</sup> 또는 hemoglobin을<sup>13)</sup> 分解하는 protease가 존재하는 것으로 報告되어 있지만, 잎의 成長에 따른 이의 活性變化樣相과 단백질 감소와의 關係에 관해서는 조사되지 않았다.

본 연구는 RuBisCO의 함량이 많고 protease의 활성이 낮은 담배잎을 生産하는데 도움이 될 識見을 얻기 위하여, 葉位가 同一한 잎의 成長에 따른 RuBisCO 함량과 protease의 활성의 變化를

조사하고 이들간의 관계를 分析해 본 것이다. 여기서, 조사된 결과는 喫煙用 잎담배 생산에 있어서 適熟葉 判斷을 위한 참고자료로도 活用할 수 있을 것이다.

## 재료 및 방법

### 1. 담배의 재배와 시료 채취

버어리 栽培品種 Ky-57(N, *tabacum*, cv. Ky-57)을 phytotron(溫度 20°C, 日照時間 12hr., 光量 240 $\mu$ mol. quanta. m<sup>-2</sup>. S<sup>-1</sup>)내에서 發芽시켜 移植前까지 키웠다. 엽수 7매가 되었을 때, 생육이 균일한 健全苗를 採收하여 초자실에서 포트 재배하였다. 施肥量은 담배 1주, 즉 포트당 窒素로서 2.5g에 해당하는 연초용 복합비료(NPK, 10-15-20)를 이식시에 全量 施用하였다.

地上 10번째엽을 시료로 이용하였다. 葉長이 약 1cm정도 되었을 때를 出葉初日로 하여 出葉後 10日 부터 잎이 완전히 黃化하여 先端部가 부분적으로 枯死할 때까지 5日間隔으로 午前 8時 30分에서 9時 사이에 담배 2株에서 각각 1매씩을 채취하여 분석에 이용하였다. 채취한 엽 2매의 面積과 生重을 관행법으로 각각 측정한다. 直徑 1mm 이상의 支骨과 中骨을 모두 제거하고 남은 葉肉의 무게를 조사하여 葉肉重으로 하였다.

### 2. 엽록소와 단백질의 정량

葉肉에서 골고루 취한 直徑 1.5cm의 葉片 2g에 30mM 2-mercaptoethanol(=2-Me)과 12.5% (v/v) glycerol을 함유하는 50mM citrate-phosphate 완충액(pH 7.5) 4배量(v/w)을 넣고, 미리 얼음속에서 冷却시켜 놓은 유발과 유봉으로 철

저히 磨碎하였다. 이 마쇄물의 일부를 이용하여 Aron법<sup>3)</sup>으로 葉綠素를 정량하고, 나머지 磨碎物은 4°C에서 15분간 36,000×g로 遠心하여 上清液과 殘渣를 얻었다. 이때 얻은 上清液을 可溶性蛋白質으로 하여 가용성질소와 가용성단백질의 정량에 이용하였다.

한편, 殘渣는 마쇄완충액과 90% (v/v) acetone으로 각각 1회씩 冼아낸 다음, 2% (w/v) sodium dodecyl sulfate(=SDS)와 2% (v/v) 2-Me를 함유하는 50mM citrate-phosphate완충액(pH 7.5) 4배量에 懸濁시켜, 40°C에서 30분간 incubation시켜 不溶性蛋白質을 可溶化하였다. 현탁액을 25°C에서 15분간 30,000×g로 遠心하여 얻은 上清液을 不溶性蛋白質으로 하여 不溶性蛋白質의 정량에 이용하였다.

可溶性蛋白質量은 가용성단백액 0.1~0.2ml에 最終濃度 7.5% (w/v)가 되도록 trichloroacetic acid(=TCA)를 넣어 단백질을 침전시킨 다음, 80% (v/v) ethanol로 冼아 Kjeldhal 분해하여 Nessler 반응으로 窒素量을 구했다. 그리고 不溶性蛋白質態 窒素는 불용성단백액을 그대로 Kjeldhal 분해하여 가용성단백태 질소와 같은 방법으로 구했다. 이들 질소량에 蛋白質係數 6.25를 곱하여 각각의 단백질량을 산출하였다.

### 3. RuBisCO의 정량

RuBisCO량은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(=SDS-PAGE)의 결과를 densitometer로 gel scanning하여 구하였다. 가용성단백액 0.5ml에 2% (w/v) SDS, 2% (w/v) 2-ME, 20% (v/v) glycerol를 함유하는 0.26M Tris-HCl buffer(pH 6.8) 同量을 가하고,

100°C에서 1분간 끓여 SDS-PAGE의 시료로 하였다.

調製한 시료를 실온으로 식힌 다음, polyacrylamide gel(分離 gel: 12.7% T, 2.5% C, 濃縮 gel: 4%, 2.5% C, gel의 크기: 137×127×1mm)에 주입하여, slab gel 電氣泳動裝置(Atto ST-1600 SD type, Japan)를 이용하여 10~15mA로 Laemmli의 buffer系<sup>12)</sup>로 泳動하였다. 영동된 gel중의 polypeptide는 45%(v/v) methanol과 10%(v/v) acetic acid 혼합액으로 조제한 0.25%(w/v) coomassie brilliant blue R-250(=CBBR; Fluka, AG, Buch, Switzerland)으로 온화하게 교반하면서 2시간 染色되었다. 染色이 끝난 gel은 21%(v/v) methanol과 7%(v/v) acetic acid 혼합액으로 gel의 background가 無色 透明해질 때까지 脫色한 다음, 60°C에서 乾燥하였다.

건조된 gel을 dual wavelength chromatometer(Shimadzu CS-930, Kyoto, Japan)로 波長 565nm에서 RuBisCO의 large subunit와 small subunit의 면적을 측정하여 그 함량을 계산하였다.

#### 4. 粗酵素液의 調劑와 protease活性的의 測定

가용성단백질의 1ml를 미리 10mM citrate-phosphate 완충액(pH 7.0)으로 平衡化 시킨 Sephadex G-25column(gel vol.; 9ml)에 넣고, 600×g에서 1분간 원심하여 脫鹽된 단백액을<sup>20)</sup> 酵素液으로 하여, Kawashima et al<sup>8)</sup>의 방법에 준하여 casein을 基質로 pH 5.5, 7.0 및 8.5에서 protease 활성을 측정하였다.

粗酵素液 0.1ml를 0.6%(w/v) casein액 0.4ml와 잘 섞어 온화하게 교반하면서 40°C에서 3시간 incubation한 다음, 같은 량의 15%(w/v) TCA를

가하여 반응을 中止시켰다. 0°C에서 30분간 방치한 다음, 4°C에서 1,300×g에서 10분간 2회 원심하여 얻은 상청액중의 遊離 amono酸을 Ninhydrin반응<sup>28)</sup>으로 측정하였다.

protease의 활성은 RuBisCO량을 제외한 可溶性蛋白質 mg當 570nm에서의 吸光度로 조사하였다.

결과는 잎 2매를 각각 3반복으로 분석하고 그 평균치를 中支骨을 제외한 葉肉重을 토대로 한 잎 1매당 함량으로 나타내었다. 그리고 본 실험에서 사용한 시약중 특기하지 않은 것은 Wako社의 生化學用級을 사용하였다.

## 결 과

### 1. 葉面積, 一葉生重, 生重 g當 葉面積의 變化

그림 1은 엽면적, 일엽생중, 그리고 생중 g당 엽면적의 변화를 조사한 결과이다. 이식으로 부터 7~8일이 지나 제 10번째 잎이, 그리고 18~19일 뒤에는 제 15번째 잎이 나왔고, 出葉後 45日頃부터 잎이 완전히 黃化하여 先端部가 枯死하기 시작하였다.

移植直後 3~4일간을 묘의 活着期間으로 간주한다면, 활착후 약 15, 16일동안에 총 8매의 엽이 새로 나왔으므로 엽 1매가 나오는데 약 2일이 소요된 셈이 된다.

出葉한지 2~3일이 되면 잎의 선단부가 濃綠色으로 되고, 그후 이틀정도 지나면서 급속히 展開하기 시작, 出葉 20일경 이후부터는 엽면적과 일엽생중은 거의 변화하지 않았다(그림 1참조). 葉面積의 경우, 出葉 10일경에는 103cm<sup>2</sup>이었으나 15일에는 382cm<sup>2</sup>, 그리고 20일에는 713cm<sup>2</sup>으로 크

게 伸長하여, 출엽후 10일경의 엽면적에 대하여 그후 10일동안에 무려 590%나 증가한 것으로 나타났다. 一葉生重도 이와같은 경향으로 변화하였다. 출엽 10일경에 4.95g이었던 생중은 15일에 17.92g, 그리고 20일경에는 32.86g으로 급增加하여 그 후에는 거의 변화하지 않았다.

한편, 엽면적과 생중에 있어서 中支骨이 차지하는 비율은 잎이 신장함에 따라 낮아지는 경향이였다. 엽면적에 있어서 中支骨比는 출엽 10일

경에 11.9%이었으나 엽면적이 급속히 증가하는 15일부터는 약 7%로 크게 감소하여 그후 큰 변동없이 평균 6.8% 수준을 유지하였고, 일엽생중에 있어서의 점유율은 출엽 10일 55.8%에서, 20일에는 51.4%로 낮아지기 시작하여 그후에는 평균 46.3%에 머물렀다.

生重·6g當 葉面積은 잎이 급격히 전개하는 출엽 20일경까지는 약 41cm<sup>2</sup>로 많았으나, 그후 계속 감소하다 출엽 35일경(31cm<sup>2</sup>)부터 다시 증가하는 경향이였다.

## 2. 葉綠素, 全窒素 및 蛋白質含量的 變化

一葉生重當 含量; 그림 2는 엽록소, 전질소 및 단백질질을 일엽생중당 함량으로 조사한 결과이다. 엽록소, 전질소, 그리고 단백질함량은 잎의 展開가 거의 끝난 출엽후 20일경에 최대에 이르러 그후 서서히 감소하기 시작, 出葉 30日에서 35日 사이에 급격히 감소하는 경향으로 生重 g當 含量에서의 경향과는 크게 달랐다. 출엽 30일경 이후의 감소현상은 엽록소에서 특히 顯著하여 40일경까지는 87%로 높았으나 그 후 서서히 감소하여 잎이 완전히 黃化하는 45일경에는 64%로 크게 낮아졌다. 반면, 非蛋白質態 질소량은 서서히 증가하는 경향이였다.

한편, 가용성 및 불용성 단백질량은 엽의 一生을 통하여 각각 서로 비슷하였는데, 生育全半에는 가용성 단백질이 많았으나 後半期에는 불용성 단백질이 보다 많았다.

生重 g當 含量; 여기서 엽록소, 전질소 그리고 단백질질의 변화를 일엽생중 g당 함량으로 조사해 보았다. 그림 3은 그 결과를 나타낸 것이다. 엽록소는 출엽후 10일부터 서서히 증가하여, 잎의

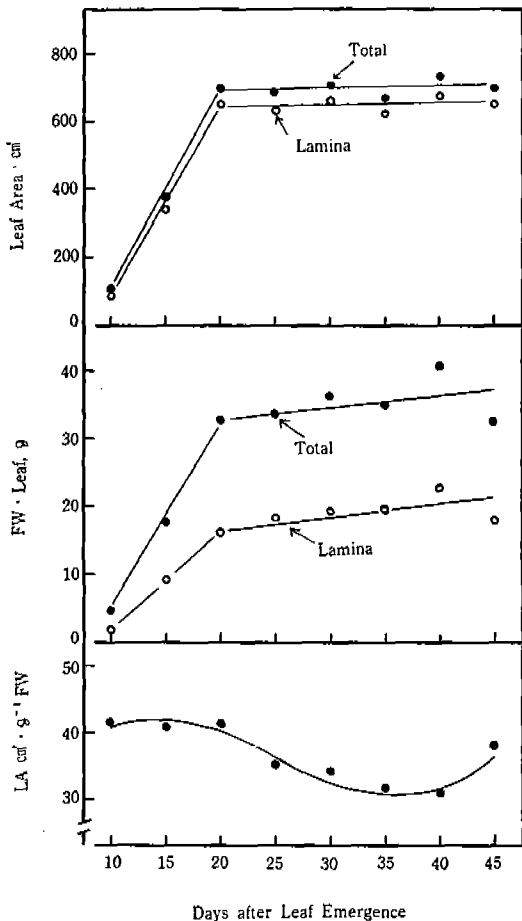


Fig. 1. Changes in leaf area, fresh weight, and lamina area per g fresh weight in the 10th leaf of tobacco during its life span.

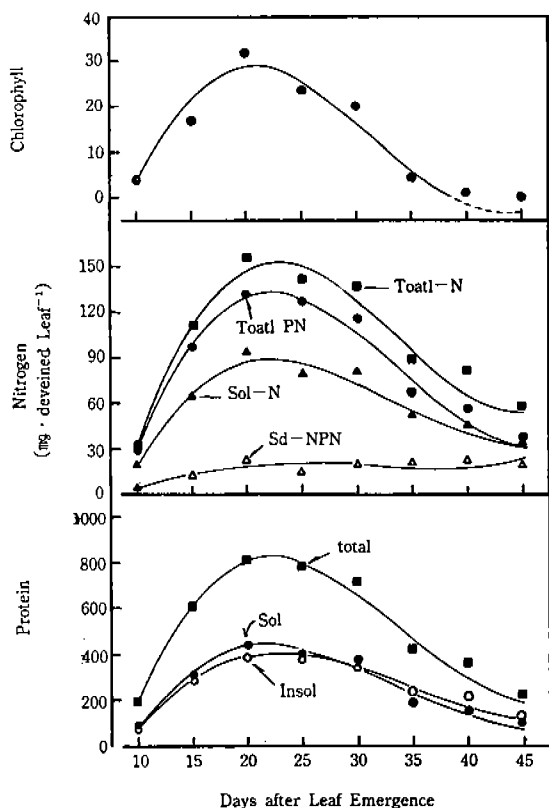


Fig. 2. Changes in the amounts of chlorophyll, nitrogen, and protein in the 10th leaf of tobacco during its life span.

A fresh leaf disks was immediately homogenized in 50mM citrate-phosphate buffer containing 30mM 2-Me and 12.5% (v/v) glycerol in a chilled mortar with a pestle. Chlorophyll in the homogenate was determined by Aron. The soluble fraction was obtained by centrifuging the homogenate at  $36,000 \times g$  for 20 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , and insoluble protein was solublized in 50mM citrate-phosphate buffer containing 2% (v/v) SDS and 2(v/v) 2-Me with incubation at  $40^{\circ}\text{C}$  for 30min. N content was measured with Nessler's reagent after Kjeldahl digestion. The amount of the protein was calculated by multiplying its N content by 6.25.

신장이 거의 끝나는 20일경에 최대에 달하여 그 후 감소하기 시작, 35일경에 급격히 감소하였다. 그러나, 전질소와 가용성질소는 출엽후 10일경에 가장 높았고 잎이 展開함에 따라 계속 감소하는 경향이었는데, 감소의 폭은 잎의 伸長이 왕성하였던 출엽후 25일전에서 현저하였다. 잎의 전개에 따른 이와같은 감소현상은 가용성 및 불용성 단백태질소에서도 동일한 경향이였다. 출엽후 25일전에서는 수용성 단백태질소량이 높았지만, 그 후에는 불용성 단백태질소량이 많았다.

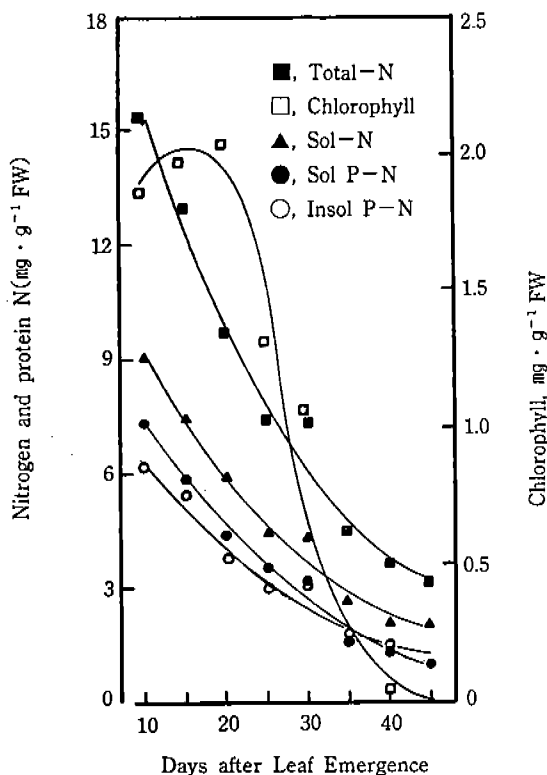


Fig. 3. Changes in concentrations of chlorophyll, nitrogen, and protein-N per g of fresh lamina in the 10th leaf of tobacco during its life span.

### 3. RuBisCO 含量的 變化

그림 4는 가용성 단백질에 있어서 RuBisCO의 占有率과 一葉生重當 含量的 變化를 나타낸 결과이다. 가용성 단백질에 대한 RuBisCO의 비율은 잎의 전개가 거의 끝난 출엽후 20일경에는 60%나 되었지만, 엽록소의 감소가 현저하였던 35일 이후에는 급격히 감소하여 잎이 완전히 黃化하는 45일경에는 21%밖에 되지 않았다.

一葉當 RuBisCO量은 출엽후 10일경에는 44mg이었으나, 20일경에는 263mg으로 무려 500%나 증가하였다. 그러나 엽록소가 급격히 감소하는 출엽후 30일경 이후에는, RuBisCO도 급격히 감소하여 45일경에는 22mg으로 크게 감소하였다.

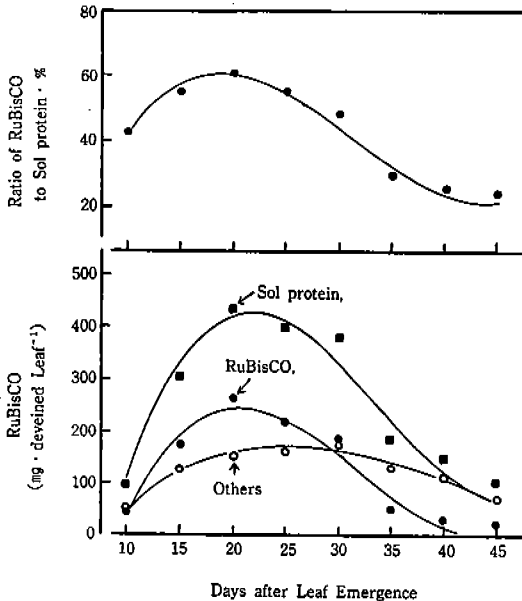


Fig. 4. Changes in the ratio of RuBisCO to soluble protein and RuBisCO content in the 10th leaf of tobacco during its life span. The ratio of RuBisCO to soluble protein was determined using SDS-PAGE with a Dual-wavelength Chromato Scanner (Shimadzu, CS-930) at 565 nm.

이와같은 RuBisCO의 감소는 RuBisCO 이외의 가용성 단백질의 감소보다도 현저하여, 生育後半期에 있어서의 가용성단백질의 주요 감소원인이 되는 것으로 보였다.

### 4. 葉面積과 葉綠素量, RuBisCO量과의 關係

엽록소를 비롯한 전질소, 전단백질 그리고 RuBisCO의 일엽당 함량변화는 엽의 신장이 왕성할 때 급격히 증가하는 경향에 있었으므로, 엽면적과 생엽 g당 엽록소 및 RuBisCO량과의 관계를 조사해 보았다. 그림 5는 그 결과를 나타낸 것이다.

全生育期間에 걸쳐 엽면적과 엽록소 및 RuBisCO량과의 相關關係는 각각  $r = -0.59$ 와  $r = -0.69$ 로 有意하지 않았다. 그러나 엽의 생장이 왕성하였던 출엽후 20일까지의 조사에서는 엽록소가  $r = -0.99$ , 그리고 RuBisCO가  $r = -0.91$ 로 高度의 相關關係가 인정되었는데 출엽 25일 이후

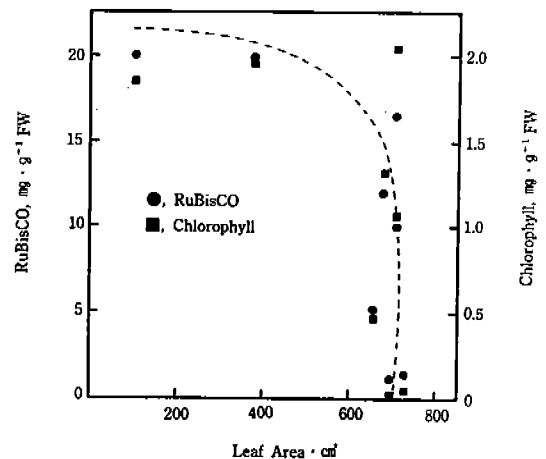


Fig. 5. Relationship between leaf area and the content of RuBisCO, chlorophyll in the 10th leaf of tobacco during its life span.

에는  $r = -0.13$ ,  $r = -0.12$ 로 유의하지 않았다. 이와같은 결과로부터, 엽의 전개가 왕성한 생육 초기에 있어서 생엽 g당 엽록소의 함량은 엽면적이 증가함에 따라 증가하지만 RuBisCO의 함량은 엽면적이 증가함에 따라 감소하고, 엽의 전개가 완료되면 두 성분은 모두 감소하는데 減少하는 傾向은 葉面積과 直接的인 關係는 없는 것으로 나타났다.

아울러, 生重 g당 葉綠素와 RuBisCO의 含量間 關係를 조사하였는 바, 이들간에는  $r = -0.98$ 이라는 高度의 正의 相關關係가 인정되었다.

### 5. Protease의 活性 變化

그림 6은 protease의 활성을 pH별로 조사한 결과이다. 잎의 全生育期間에 걸친 protease의 활성도는 pH별로 큰 차이가 있었는데, alkali側에서 보다 酸性側에서 높았다. pH 5.5에서의 활성을 100으로 하였을 때, pH 7.0에서의 활성은 평균 약 48%이었고 pH 8.5에서는 평균 20%밖에 되지 않았다. 이와같은 결과에서 담배잎중의 주요 protease는 酸性側에서 活性를 갖고 있는 것들이라는 것이 나타났다.

pH 5.5에서 측정된 protease 활성은 출엽후 30일경까지는 서서히 증가하였으나, 그 후부터는 급격히 증가하여 잎이 황화하였을 때(출엽후 45일경)의 활성은 출엽후 10일경의 활성에 대하여 무려 약 18배나 증가하였다. 즉, protease 활성이 가장 높았던 출엽후 45일경의 활성을 100으로 하였을 때, 활성이 급격히 높아지기 전인 30일경의 활성은 18.8%이었고 그 이전에는 평균 11%에 불과하였다. 이 결과로부터, 담배잎의 protease 활성은 잎의 생리적 나이와 밀접한 관계에 있어

잎이 老化함에 따라 높아진다는 사실이 명확해졌다.

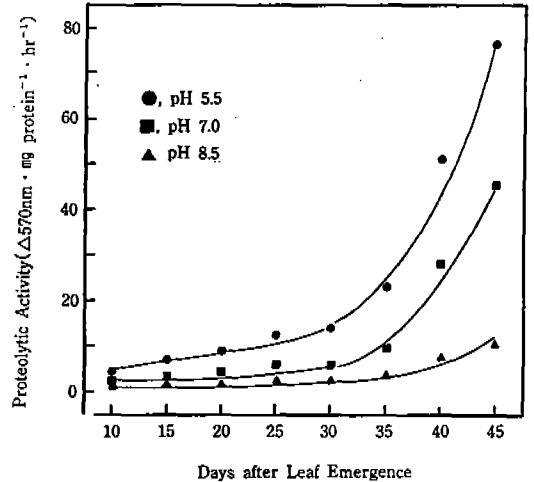


Fig. 6. Changes in casein-proteolytic activity in the 10th leaf of tobacco during its life span. The crude extract was desalted on Sephadex G-25 equilibrated with 10 mM citrate-phosphate buffer (pH 7.0), and used for assay of proteolytic activity for degradation of casein). Assay was carried out at the indicated pH and 40°C for 3h.

### 6. RuBisCO 含量과 Protease 活性間的 關係

葉肉生重 g당 단백질 함량 변화와 엽중에서 활성이 가장 높았던 酸性側 protease 활성의 변화간의 關係를 조사해 보았다. 그림 7은 그 결과를 나타낸 것이다. 全生育期間에 걸친 가용성 단백질 함량 및 RuBisCO 함량과 protease 활성과의 關係에서 가용성 단백질과는  $r = -0.76$  그리고 RuBisCO  $r = -0.80$ 이라는 負의 關係가 성립하였지만, 實測值를 plot하였을 때 그림 7에서 보는 바와 같이 直線의 關係는 성립하지 않았다. 여기서, 출엽후 10일경부터 상관계수  $r$ 이 가장



적은 시기와 가장 큰 시기를 각각 조사해 보았다. 그 결과,  $r$ 이 가장 적은 시기는 출엽후 20일경으로서 가용성단백질은  $r = -0.04$ 였고 RuBisCO는  $r = -0.40$ 이었으며, 가장 큰 값은 출엽후 35일경으로서 가용성 단백질은  $r = -0.86$ , RuBisCO는  $r = -0.94$ 이었다. 그리고 출엽후 35일경부터 45일경까지에서는 가용성 단백질과 RuBisCO 모두  $r = -0.92$ 로 높아, protease활성과 단백질 함량간의 관계는 高度의 直線關係가 성립되는 출엽후 10일경부터 35일경까지와 35일경부터 45일경까지의 두 구역으로 구분하여 해석하여야 할 필요가 있는 것으로 나타났다. 즉, 생중 9당 단백질 함량이 높은 時期에는 protease의 활성이 낮고 단백질 함량이 어느 一定水準(본 결과에서는 가용성 단백질 : 약  $20\text{mg g}^{-1}$  FW, RuBisCO : 약  $10\text{mg g}^{-1}$  FW)이하로 감소한

시점에서 protease의 활성은 급상승하는 관계에 있었다. 그러나, 단백질 함량이 높은 시점에도 最大活性值의 약 25% 정도에 해당하는 protease의 활성이 存在하고 있다는 점에 注目하여야 할 것이다.

## 고 찰

잎의 生育은 後半期에 들어 엽면적과 일엽생중에 다소의 변동은 있었지만, 전반적으로 전형적인 sigmoid형을 나타냈고<sup>1)</sup> 출엽후 20일경에 거의 완료되었다. 잎이 급격히 신장하는 출엽 20일경까지의 생중 9당 엽면적은 평균  $41\text{cm}^2$ 로 많았으나 35일경까지는 서서히 감소하다 잎이 黃化하는 40일경부터는 다시 증가하는 경향이어서 출엽후 25일에서 35일경 사이가 物質의 蓄積量이 增加하는 成熟期에 해당하는 것으로 해석되었다.

엽록소, 전질소, 단백태질소의 함량을 생중 9당으로 조사한 결과(그림 2)에서는 測定開始日 즉, 출엽후 10일경부터 잎이 枯死할 때까지 거의 直線的으로 감소하는 것으로 나타나, 생중 9당 엽면적에서의 물질 축적도와는 일치하지 않았다. 이와같은 결과는 이들 성분변화를 乾物 9당 葉面積當으로 조사하였을 경우에도 同一하였다.

그러나 이들 성분을 一葉當 함량으로 조사한 결과에서는 엽의 신장이 거의 끝난 출엽후 20일에서 25일경 사이에서 頂點을 이루고 35일경부터 급격히 감소하는 曲線의 형태로 나타났다. 이와같은 경향은 RuBisCO의 함량변화에서도 마찬가지로 지었다. 생중 9당 함량변화에서 엽록소를 제외한 전질소 및 단백태질소는 출엽 10일경부터 감소

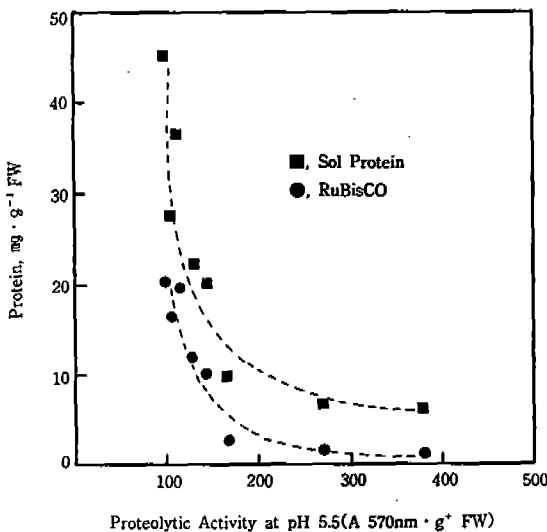


Fig. 7. Relationship between casein-proteolytic activity and the content of soluble proteins in the 10th leaf of tobacco during its life span.

하였던 점과 엽면적과 엽록소 및 RuBisCO 함량과의 관계조사에서 엽록소와 RuBisCO의 함량은 엽면적이 적었을때 높았고 잎의 전개가 끝나면 지속적으로 감소하였던 결과(그림 5)를 감안하면, 출엽 10일에서 20일경사이에에서 증가현상은 곧 葉重의 增加에 따른 것이지 生重 g當 含量의 增加에 의한 것이 아니라는 것을 의미하는 것이라 하겠다.

이와같은 결과는, 葉의 生理的 나이가 同一할 경우 一葉當 또는 담배個體當 RuBisCO蛋白質을 最大化 시키기 위해서는 生體 單位重量當 含量 보다는 收量이 중요한 要因이라는 사실을 示唆하는 것이라 하겠다.

葉中の 窒素量은 葉의 老化정도를 진단하는 指標로 이용된다.<sup>14, 17)</sup> 全窒素의 함량이 감소하는 시기를 老化開始期로 본다면, 본 연구의 결과에서는 出葉後 20일경까지를 成長期, 20일에서 30일경까지를 成熟期, 그리고 엽록소와 질소함량이 급격히 감소하는 35일경이후를 老化期로 구분할 수 있을 것으로 보았다. 가용성 단백질에 대한 RuBisCO의 占有率은 出葉 10일경에 43%이었고 20일경에는 60%, 그리고 35일경에는 32%로 그 변화의 폭이 커 RuBisCO는 잎이 급격히 伸長할 때 가장 왕성하게 生合成되는 단백질인 반면, 잎이 老化하면 보다 빨리 감소하는 단백질이라는 것이 분명해졌다. 이와같은 결과는 여러 作物에서도 확인되었다.<sup>15, 22, 27)</sup>

한편, 식물엽중에는 性質이 서로 다른 protease가 複數個 들어 있지만 酸性側에서 높은 활성을 갖는 protease가 主種이고,<sup>18, 19)</sup> 담배에는 酸性側에서 gelatine<sup>2)</sup> 이라든가 casein,<sup>8)</sup> 그리고 hemoglobin<sup>13)</sup> 을 分解하는 protease가 들어 있는 것으로

보고되어 있다. 본 결과에서도 出葉後 枯死할 때까지 잎의 一生을 통한 protease 활성은 pH 5.5에서 顯著히 높았고, 그 활성은 잎이 成熟하면서 높아지기 시작하여 老化하면 急激히 上昇하는 것으로 나타났다. 이와같은 경향은 벼에서도 보고된 바 있다.<sup>16)</sup>

protease활성과 가용성 단백질 및 RuBisCO함량 사이에는 頁의 相關關係에 있었지만 直線性은 성립되지 않아, 生重 g當 protease의 活性이 낮은 時期에서 단백질 함량이 높고 활성이 높아지면 단백질 함량이 낮아지는 경향이였다. 다시 말하면, 생중 g당 단백질 함량은 570nm에서의 吸光度로 측정된 생중 g당 protease활성 약 150 이하에서 높았고 활성 150이상에서 현저히 낮았다(그림 7). protease 활성이 150이 되는 時期는 出葉後 30日頃에 해당한다. 출엽후 10일경부터 35일경까지에서 protease 활성과 가용성 단백질 함량간에는  $r = -0.86$ , 그리고 RuBisCO와는  $r = -0.94$ 라는 비교적 높은 相關關係가 성립하였다. 그러나 잎의 伸長이 가장 왕성한 반면 생중 g당 단백질 함량이 감소하였던 출엽후 10일에서 20일경까지에서는 가용성 단백질과는  $r = -0.04$ , RuBisCO와는  $r = -0.40$ 으로 相關關係가 인정되지 않았다. 즉, 이와같은 결과는 출엽후 10일에서 20일경에 있어서의 생중 g당 단백질 함량의 감소는 protease에 의한 것이라기 보다는 잎의 급격한 伸長에 따른 葉中 窒素濃度의 稀釋에 의한 것임을 의미하는 것이라 하겠다. 그렇지만 이 기간중에도 生中 g當 最大活性值의 약 25% 정도에 해당하는 protease의 활성이 존재하고 있었다는 점에 주목해야 할 것이다(그림 7 참조).

단백질 함량의 변화와 protease활성간의 관계

가 이와같이 잎의 生理的 나이에 따라 해석이 달라진다는 사실은 곧 RuBisCO 단백질의 생산에 있어서 잎의 收穫時期가 매우 중요하다는 것을 의미하는 것이라 하겠다. 본 결과에 의하면, RuBisCO량은 출엽후 20일경에 最大였고 30일경 이후에는 급격히 감소하였다(그림 4 참조). 한편, protease활성은 출엽후 30일경 이후에 급상승 하였다(그림 6 참조). 따라서, RuBisCO함량이 많고 protease의 활성이 낮은 잎은 出葉後 30日 以前에 收穫하는 것이 適合한 것으로 結論되었다.

한편, RuBisCO 함량과 엽록소 함량간에는  $r=0.98$ 이라는 高度의 正의 相關關係가 인정되어 葉의 色은 RuBisCO 함량이 높은 잎의 外的判斷基準으로 活用할 수 있을 것으로 보였다.

## 결 론

RuBisCO량이 많고 protease의 활성이 낮은 담배잎을 生産하는데 도움이 될 識見을 얻기 위하여, 담배를 포트재배하고 地上 제10번째 엽에 대하여 出葉 10日頃부터 잎의 先端部가 褐變 또는 枯死할 때까지 5일 간격으로 RuBisCO의 量的變動과 protease의 活性變化를 조사하였다.

一葉當 RuBisCO단백질의 含量은 葉의 展開가 거의 끝나는 出葉 20--頃에 最大에 달하고 그후 서서히 減少하기 시작하여 葉綠素가 현저히 減少하는 出葉後 30日 以後에 급격히 減少하는 傾向이었다. 가용성 단백질에 대한 RuBisCO단백질의 점유율도 생육시기에 따라 크게 변화하였는데, 출엽후 10일경에는 43%, 20일경에는 60%, 그리고 45일경에는 21%이었다. 잎의 一生을 통한 RuBisCO량과 葉綠素含量間에는 高度의 正의 相

關關係( $r=0.98$ )가 認定되어, 잎의 色은 RuBisCO 함량이 높은 잎의 判斷基準으로 活用할 수 있을 것으로 보였다.

한편, pH 5.5, 7.0 그리고 8.5에서 casein을 基質로 하여 측정한 粗抽出液中の protease 活性은 葉의 全生育期間에 걸쳐 酸性側에서 顯著히 높았다. 이의 活性은 RuBisCO의 含量이 현저히 減少하는 出葉 30日부터 서서히 上昇하여 잎이 枯死하기 直前に 急上昇하였다. 그러나 RuBisCO량과 protease 活性間의 關係는 負의 關係이었지만 直線性은 成立되지 않아, protease活性은 RuBisCO의 含量이 어느 水準以下로 減少하였을 때 急上昇하는 것으로 나타났다.

이상의 結果로부터, RuBisCO含量이 높은 담배잎을 生産하기 위해서는 잎의 生理的 나이, 잎의 收穫時期가 매우 重要하다는 것을 알았다. 본 연구의 결과에서 收穫適期는 RuBisCO含量이 最大이었던 出葉 20日頃부터 protease의 活性이 急上昇하기 前인 30日頃 사이인 것으로 나타났다.

## 참 고 문 헌

1. Akehurst, B.K., Tobacco(Longman Group Ltd., Essex, U.K., 1981), pp. 45~95.
2. Anderson, J. W. and K. S. Rowan, Biochem. J., 97 : 741~746(1965).
3. Arnon, D. I., Plant Physiol., 24 : 1~15(1949).
4. Dorner, R. S., A. Kahn and S. G. Wildman, J. Biol. Chem., 229 : 945~952(1957).
5. Ershoff, B. H., S. G. Wildman and P. Kwanyuen, Proc. Sod. Exp. Biol. Med., 157 : 626~630(1978).

6. Feller, U. K., Plant Proteolytic Enzyme, Vol 11(CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1986) pp. 49~68.
7. Huffaker, R. C. and S. W. Perterson, Annu Rev. Physiol., 25 : 363~391(1974).
8. Kawashima, N., H. Fukushima, A. Imal and E. Tamaki, Agric. Biol. Chem. 32 : 1141~1146 (1968).
9. Kawashima, N. and S. G. Wildman, Biochim. Biophys. Acta, 229 : 240~249(1971).
10. Kung, S. D. and T. C. Tso, *J. Food Sci.*, 43 : 1844~1847(1978).
11. Kung, S. D., R. Chollet and T. V. Marsho, Meth. Enzym. 69 : 326~336(1980).
12. Laemmli, U. K., *Nature* 277 : 680~685(1970).
13. Liu, D. and S. J. Sheen, *Beit. Tabakforschung* 12 : 219~226(1984).
14. Long, R. C. and C. A. Weybrew, Recent Advances in Tobacco Science, Vol. 2., pp. 40~74(1976).
15. Mae, T., A. Makino and K. Ohira, Plant and Cell Physiol., 24 : 1079~1086(1983).
16. Mae, T. and K. Ohira, Soil Sci. Plant Nutr., 30 : 427~434(1984).
17. Makino, A., T. Mae and K. Ohira, Plant and Cell Physiol., 25 : 429~427(1984).
18. Miller, B. L. and R. C. Huffaker, Plant Physiol., 68 : 930~936(1981).
19. Miller, B. L. and R. C. Huffaker, Plant Physiol., 69 : 58~62(1982).
20. Neal, M. W. and J. R. Florini, Anal. Biochem., 55 : 328~330(1973).
21. Peoples, M. B. and M. J. Dalling, *Planta*, 138 : 153~160(1978).
22. Ragster, L. E. and M. J. Chrispeels, *Plant Physiol.*, 51 : 1042~1045(1973).
23. Ragter, L. E. and M. J. Chrispeels, *Plant Physiol* 67 : 104~109(1981).
24. Simpson, E., R. J. Cooke and D. D. Davies, *Plant Physiol.*, 67 : 1214~1219(1982).
25. Thomas, H. and R. C. Huffaker, *Plant Sci. Lett* 20 : 251~262(1981).
26. Tso, T. C., *Beit. Tabakforschung*, 9 : 63~66 (1977).
27. Walden, R. and C. J. Leaver, *Plant Physiol.*, 67 : 1090~1096(1981).
28. Yemm, E. W. and E. C. Cocking, *Analyst.*, 80 : 209~213(1955).