

저온과 Polyamine 처리에 의한 봄무우와 가을무우 자엽과 상배측에서 당류와 총 아미노산 분석에 관한 연구

조봉희 · 박선영*

수원대학교 자연과학대학 생명과학부

*전국대학교 이과대학 화학과

(1996. 6. 26. 접수)

Analysis of sugars and total amino acids-content of young spring and fall-radish cotyledons and hypocotyls by cold and polyamine-treatments

Bong-Heuy Cho, Sun Young Park*

Division of Life Science, University of Suwon, Suwon 445-742, Korea

**Department of Chemistry, University of Kon-Kuk, Seoul 133-701, Korea*

(Received June 26, 1996)

요약 : 봄무우의 자엽에 저온과 polyamine(PA)을 처리하면 세포내의 환원당과 설탕의 농도가 증가되었고, 가을무우의 자엽에 저온처리를 하면 환원당과 설탕의 농도가 증가되나, 저온과 PA를 동시에 처리하면 세포내에 당류의 농도가 증가되지 않았다. 봄무우 자엽에서는 저온처리에 의해 총 아미노산의 농도는 증가되나, 가을무우에서는 증가되지 않았다. 이 결과는 저온에 예민한 봄무우는 세포내의 삼투조절에 의하여 적응하며, 봄무우와 가을무우 사이에 생리 및 생화학적 인 대사가 다름을 보여 주었다. 저온에 예민한 봄무우에서 PA는 저온처리와 함께 상승효과를 보이나, 저온 스트레스에 강한 가을무우에서는 PA 처리로 상승효과를 나타내지 못하는 처음 보고하는 결과이다.

Abstract : The content of reducing sugars and sucroses was increased by cold- and PA-treatment in cotyledons of spring radish. But in cotyledons of fall radish, the content of reducing sugars and sucroses was increased by cold treatment but was not increased by cold- and PA-treatment. Total free amino acids in cotyledons of spring radish were increased by cold treatment, but were not increased in cotyledons of fall radish. The results show that cold sensitive spring radishes were adapted by regulating of cellular osmosis and show that the physiological and biochemical metabolism of spring radish was much different from the fall radish. We report first that polyamine has synergetic effect with cold stress on cotyledons of spring radish, but not on cotyledons of fall radish.

Key words : spring radish, fall radish, cold treatment, polyamine

1. 서론

생명체는 생물학적인 요인과 물리적인 요인에 의해 항상 스트레스를 받고, 주어진 스트레스에 대항하여 적응해 나가는 경향이 있다. 그 예로 온도의 변화를 주면 식물체내에 존재하는 질소원과 탄소원의 농도의 변화를 초래한다.¹⁻³ 대부분의 식물은 외부환경의 변화에 대항하여 생체내에 질소원, 즉 polyamine(PA), proline, glycine 등을 축적시키고^{4,5}, 설탕과 환원당을 세포내에 축적시켜⁶, 급작스런 환경 변화에 대응하여 적응해 나간다. 생물체가 스트레스를 받으면 PA는 세포내에 축적되고⁴, 또 PA 그 자체가 식물체에 스트레스를 유발시킨다.⁷⁻⁹ 스트레스를 받은 세포내에는 암모니아의 농도가 증가되었고¹⁰, 암모니아에서 아르기닌이 합성되며, 아르기닌에서 PA를 합성하여 스트레스 적응에 영향을 준다. 스트레스에 민감한 식물에서는 스트레스를 받으면 암모니아의 농도가 증가된 반면, 생체내 PA의 농도는 감소되고, 스트레스에 내구력을 지닌 식물에서는 아르기닌 대사가 촉진되어 PA의 농도는 증가되나, 암모니아의 농도는 감소한다고 알려져 있다.¹⁰ 이처럼 스트레스에 저항력을 가진 식물과 예민한 식물에서는 생체내에 생리 및 생화학적인 변화가 다르게 나타나며, 이 차이가 바로 환경에 대한 생물체의 적응력을 나타내는 것이라 사료된다.

따라서 본 연구에서는 무우를 실험재료로 사용하였다. 한 품종은 봄무우로, 저온 스트레스에 예민하고, 다른 한 품종은 가을무우로, 저온 스트레스에 저항력이 강하다. 따라서 두 품종을 재료로 하여 저온처리와 PA를 처리하였을 때 스트레스에 견디는 능력을 비교 검토하였다. 특히 저온 스트레스와 PA를 처리할 때 생체내에 변화하는 당류, 총 아미노산 등의 변화를 추적하여 두 품종 사이에 차이점을 비교 연구하였다. 특히 PA는 그 자체가 스트레스를 가져오고, 또 스트레스에 대항하여 합성되므로⁷⁻⁹, 외부 배지에 PA를 직접 처리시켜 스트레스를 준 후 봄무우와 가을무우가 스트레스에 적응하는 과정을 분석하고자 하였다.

2. 실험방법

2.1. 기기 및 시약

분석에 사용한 기기는 UV-spectrophotometer(Hitachi, U-2000, JAPAN), cold microcentrifuge

(VS-15000, CF, Vision Scientific Co., Ltd.), cold Lab. Chamber(KMC-1202L, Vision Scientific Co., Ltd.)를 사용하였다. 이 연구에 사용된 모든 시약들은 Sigma Company(U.S.A)를 사용하였다.

2.2. 실험재료

실험재료로 사용한 장춘 대형 봄무우(F1 Spring White)와 가을무우(F1 Handsome Fall)는 서울종묘에서 구입하였다. 봄무우는 1월에 파종하여 4월에 수확하고, 가을무우는 8월에 파종하여 11월에 수확하는 품종이다.

2.3. 발아조건

종자에 붙어 있는 불순물을 제거시키기 위해 무우 종자를 2% NaOCl에서 10분간 소독한 후 흐르는 물에서 하룻밤 씻었다. 소독된 종자는 비커에 스폰지를 이중으로 깔고 그 위에 여과지를 깔 후 종자를 여과지 위에 놓아 물을 빨아들일 수 있게 하였고, 심은 후 25℃ 암소에서 3일간 발아시켰다. 물은 매일 일정량을 규칙적으로 주었고, 습기를 일정하게 유지시켜 주어 발아조건을 균일하게 하였다.

2.4. 저온처리

3일간 암소에서 발아된 어린 싹은 4℃ 암소에서 주어진 시간만큼 200rpm으로 흔들면서 저온처리하였다. 저온처리 동안 모든 조건은 발아 때와 같다.

2.5. Polyamine의 처리

5mM spermidine을 저온처리 때와 같은 조건하에서 시료에 처리하였다. PA는 단독 또는 저온처리와 동시 처리 후 그 상승효과를 분석하였다.

2.6. 당류의 추출과 분석법

대조군(처리하지 않은 시료)과 저온처리 또는 저온처리와 PA를 동시에 처리한 무우의 어린 싹에서 자엽을 분리시켜, 미리 준비한 80% 에틸알코올에 넣어 60℃에서 1시간 동안 용해성인 당류를 추출한다. 20,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 당류를 분석할 때까지 -20℃로 냉동시켰다. 환원당은 Nelson¹¹ 방법으로 분석하였고, 설탕의 분석은 Van Handel¹² 등의 방법으로 측정하였다.

2.7. 아미노산의 추출과 분석법

시료 1g에 10mM 인산 완충액(pH 6.0) 1mL를 넣고, 4℃에서 막자사발에서 분쇄하였다. 분쇄된 시료는 4℃, 12,000rpm에서 20분간 원심분리한 후 침전물을 제거하였다. 침전물에 다시 1mL의 동일 완충액을 넣고, 위의 과정을 반복하여 두 상등액을 합하였다. 상등액 1mL에 5% sulfosalicylic acid 0.5mL를 넣고, 얼음 위에서 10분간 단백질을 침전시킨 후 다시 12,000rpm에서 10분간 원심분리시킨 후 침전된 단백질은 제거시켰다. 이 과정을 반복하여 남아 있는 단백질을 완전히 제거시켰다. 상등액 1mL를 분석할 때까지 -20℃에 보관하였다. 이 시료는 총 유리아미노산 분석에 사용되었다. 총 아미노산의 분석은 시료 1mL에 ninhydrin reagent(75% methyl cellulose+2% ninhydrin+0.3% hydindantin+25% 4M 아세테이트 완충액; pH 5.5) 1mL를 첨가한 후 끓는 물에서 15분간 증탕하였다. 실온으로 냉각한 후 50% 에틸알코올 1.5mL를 첨가하였다. 표준시료는 proline을 사용하였고, UV-spectrophotometer를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 아미노산의 농도는 회석배수와 시료 무게를 기준하여 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Polyamine과 저온처리에 의한 환원당의 분석

봄무우를 저온처리한 후 60시간 동안 환원당의 변화를 살펴본 결과 대조군인 경우(처리하지 않은 시료) 세포내의 환원당의 농도는 서서히 감소하였으나(Table 1), 저온처리한 봄무우에서는 증가하는 경향을 관찰할

수 있었다. 또한 동일 시료에 SPD와 저온처리를 병행할 경우 세포내 환원당의 농도는 반응 1시간 후 저온처리시보다 증가하였으나 시간이 경과함에 따라 큰 유의차를 발견할 수 없었다.

반면, 가을무우에서는 저온처리시 세포내 환원당의 농도는 봄무우에 비해 약 7~12mmole · g fresh weight⁻¹ 더 증가되었으나, PA의 처리로 세포내 환원당의 농도가 더 증가되지는 않았다(Table 2). 자엽에서 환원당의 증가는 삼투작용보다는 저온에서 견디려는 적응력에 필요한 다른 화합물을 합성하거나 또는 다른 화합물을 합성하는 데 필요한 에너지로 사용되는 것이 아닐까 추정된다.

저온처리로 유도된 환원당은 invertase의 활성도가 증가되어, 설탕을 가수분해시켜 증가된 결과이거나¹³ 또는 저온처리로 전분의 분해효소가 증가되어¹⁴ 전분을 분해시켜 세포내의 환원당의 농도가 증가될 것이다. 그러나 이 부분에 대한 설명은 해당작용에 관여하는 효소들을 연구해야만이 확실히 답변할 수 있을 것 같다.

3.2. Polyamine과 저온처리에 의한 설탕의 분석

봄무우의 대조군에서는 시간에 따라서 세포내 설탕의 농도가 감소되었으나 동일 시료에 저온처리를 하면 세포내 설탕의 농도가 약간 증가되었고, SPD와 저온을 동시에 처리하면 세포내 설탕의 농도 증가의 상승효과를 나타내었다(Table 3). 이 결과 PA는 식물에 스트레스를 주어서 생체내의 생리 및 생화학적인 변화를 주는데, 특히 PA의 처리로 증가된 설탕은 세포내에 삼투적인 역할을 하여 스트레스에 견디는 능력을 증가시

Table 1. Reducing sugar content during the cold- and 5mM spermidine- treatment of spring radish cotyledons at 10℃.

time(hr.)	sugar content (mmoles · g fresh weight ⁻¹ of cotyledons)			
	control	cold	spermidine	spermidine + cold
0	28.0±1.2	28.0±1.2	28.0±1.2	28.0±1.2
1	31.0±0.5	31.0±0.9	29.0±0.9	33.0±1.4
2	32.0±2.4	33.0±2.8	33.0±0.9	34.0±2.8
12	30.0±2.0	35.0±1.5	34.0±1.7	36.0±0.6
24	30.0±1.2	35.0±1.8	35.0±0.9	35.0±1.3
36	29.0±0.9	34.0±2.7	35.0±1.2	36.0±1.1
60	27.0±1.5	34.0±2.4	35.0±2.2	35.0±2.0

Table 2. Reducing sugar content during the cold- and 5mM Spermidine- treatment of fall radish cotyledons at 10°C.

time(hr.)	sugar content (mmoles · g fresh weight ⁻¹ of cotyledons)			
	control	cold	spermidine	spermidine + cold
0	28.0±1.3	28.0±1.3	28.0±1.3	28.0±1.3
1	28.0±2.3	38.0±3.8	29.0±3.4	30.0±4.2
2	28.0±3.2	40.0±5.1	30.0±2.5	42.0±4.2
12	28.0±1.4	51.0±3.7	32.0±2.6	43.0±2.8
24	28.0±4.5	48.0±4.5	33.0±0.5	46.0±4.3
36	28.0±2.2	47.0±4.2	32.0±3.2	44.0±2.2
60	28.0±2.2	46.0±1.2	33.0±2.8	38.0±2.4

Table 3. Sucrose content during the cold- and 5mM spermidine- treatment of spring radish cotyledons at 10°C.

time(hr.)	mmoles · g fresh weight ⁻¹ of cotyledons			
	control	cold	spermidine	spermidine + cold
0	68.0±2.8	68.0±2.8	68.0±2.8	68.0±2.8
1	60.0±2.4	68.0±2.5	69.0±0.5	69.0±1.2
2	60.0±2.8	69.0±2.2	69.0±1.3	72.0±1.7
12	59.0±2.8	68.0±3.0	72.0±1.9	74.0±1.7
24	59.0±3.1	68.0±3.2	71.0±1.2	74.0±0.9
36	59.0±2.5	69.0±2.8	71.0±1.5	74.0±1.3
60	58.0±2.8	69.0±3.4	73.0±2.5	73.0±1.8

킨다고 사료된다. 이 결과는 피마자 자엽의 결과와 매우 유사하였다.⁵

반면, 가을무우에서는 저온처리로 인해 세포내 설탕의 농도가 증가되지 않았고, SPD도 설탕농도의 증가에 영향을 미치지 못했으며, 오히려 설탕 농도의 감소를 초래하였다(Table 4). 그러나 Table 2와 비교하면 환원당의 농도가 SPD와 저온을 동시에 처리할 때를 분석하면 대조군과 비교해서 당류의 농도가 증가되어 저온처리 또는 PA의 처리 동안 설탕의 일부가 환원당으로 분해되는 것으로 보인다. 따라서 저온에 예민한 봄무우는 설탕의 농도를 증가시켜 스트레스에 견디는 능력을 증가시키고, 저온에 비교적 강한 가을무우에서는 설탕의 농도는 스트레스 해소에 큰 기여를 못하는 것으로 추정된다. 가을무우에서는 반면 환원당의 농도를 증가시켜 두 품종 사이에 생리 및 생화학적인 대사작용의 차이가 있음을 암시해 준다.

설탕과 환원당의 증가는 해당작용을 방해하는 것으로 보고되었으며⁵, 이 결과는 해당작용에 관여하는 phosphofructokinase(PFK)의 활성도를 방해하며¹⁶, 세포내의 PFK의 활성도의 감소는 해당작용의 속도를 감소시켜, 그 결과로 설탕의 축적을 초래한다. 전분은 amylase에 의해 가수분해된 후 maltose로 전환되고¹⁷, 이것은 곧 설탕으로 전환된다.

스트레스에 비교적 약한 품종에서는 세포내의 질소원의 농도가 증가되어 설탕의 합성을 방해하였고¹⁸, 이 결과는 삼투에 영향을 주어 스트레스에 대한 적응력이 떨어진다고 본다.

3.3. 스트레스를 받는 동안 변화하는 총 아미노산의 분석

저온 스트레스 동안 세포내에 용해되어 있는 총 유리 아미노산을 비교 분석하였다(Table 5). 봄무우에서

Table 4. Sucrose content during the cold- and 5mM spermidine- treatment of fall radish cotyledons at 10°C.

time(hr.)	mmoles · g fresh weight ⁻¹ of cotyledons			
	control	cold	spermidine	spermidine + cold
0	61.0±0.8	61.0±0.8	61.0±0.8	61.0±0.8
1	55.0±3.8	55.0±2.7	60.0±2.3	61.0±2.4
2	54.0±2.6	55.0±2.8	60.0±2.2	62.0±2.6
4	53.0±2.8	55.0±2.8	60.0±3.2	60.0±2.7
6	53.0±2.4	55.0±3.1	61.0±0.5	61.0±1.4
12	54.0±2.2	55.0±2.4	61.0±0.7	62.0±2.9
24	50.0±2.8	51.0±2.9	62.0±2.9	61.0±2.5
36	50.0±3.2	52.0±2.8	61.0±2.7	61.0±2.7
48	51.0±2.4	52.0±3.2	63.0±3.6	62.0±2.5
60	50.0±2.4	53.0±2.8	63.0±2.7	63.0±2.2

Table 5. The change of free amino acids of spring radish during the cold treatment at 10°C.

time(hr.)	mmoles · g fresh weight ⁻¹ of cotyledons and hypocotyls			
	cotyledons	cotyledons+cold	hypocotyl	hypocotyl + cold
0	385	385	78	78
1	454	580	88	78
2	515	624	80	82
12	536	678	72	83
24	556	626	70	85
36	628	626	68	84
48	427	632	72	82
60	386	640	82	86

Table 6. The change of free amino acids of fall radish during the cold treatment at 10°C.

time(hr.)	mmoles · g fresh weight ⁻¹ of cotyledons and hypocotyls			
	cotyledons	cotyledons+cold	hypocotyl	hypocotyl + cold
0	480	480	85	85
1	446	420	74	75
2	430	425	70	72
12	405	440	60	72
24	375	438	60	73
36	351	395	62	73
48	315	345	65	74
60	294	240	68	74

는 저온처리로 총 유리 아미노산의 농도가 증가되었는데, 가을무우에서는 저온 스트레스로 인해 총 유리 아미노산의 증가가 거의 없었다(Table 6). 봄무우는 가을무우와 비교할 때 비교적 총 유리 아미노산의 농도가 높았다. 이는 아마도 저온에 적응하기 위해 새로운 단백질 합성을 합성하기 위해 준비되어지는 것이 아닐까 생각된다.

감사의 글

본 연구는 1995-96년도 기초과학연구소 학술연구비 지원에 의해 수행되었기에 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. G. R. Stewart and F. Larher, In PK Stumpf, E. E. Conn, Eds. *The Biochemistry of Plants* Vol. 5 Academic Press, New York pp. 609(1980).
2. J. N. E. Forte and T. C. Tucker, *Soil Sci. SOC. Am. J.*, **42**, 743(1978).
3. S. R. Freiberg and F. C. Steward, *Am. Bot.*, **24**, 147(1980).
4. H. E. Flores and A. W. Galston, *Science* **217**, 1259 (1982).
5. B. H. Cho, S. Y. Park and M. Y. Park, *Anal. Sci. Technology*, **8**, 181(1995).
6. C. G. Pollock and T. Ap. Rees, *Phytochem.*, **14**, 613(1975).
7. A. W. Galston, *Bioscience*, **33**, 382(1983).
8. R. D. Slocum, R. Kaul-Sawhney and A. W. Galston, *Arch. Biochem. Biophys.*, **235**, 283(1984).
9. S. Y. Wrong and G. L. Steffens, *Phytochem.*, **24**, 2185(1985).
10. G. J. Lovett, 5th. *Annual Penn State Symposium in Plant Physiol.*, pp. 166(1990).
11. N. Nelson, *J. Biol. Chem.*, **153**, 375(1964).
12. E. Van Handel, *Anal. Biochem.*, **22**, 280(1968).
13. R. Pressey and R. Shaw, *Plant Physiol.*, **41**, 1567 (1966).
14. F. A. Isherwood, *Phytochem.*, **15**, 33(1976).
15. W. L. Dixon and T. PA Rees, *Phytochem.*, **19**, 1653(1980).
16. G. M., Bredemeijer, H. C. J. Burg, P. A. Classen and W. J. Stickema, *J. Plant Physiol.*, **138**, 129 (1991).
17. J. J. Sauter and B. Van Cleve, *J. Plant Physiol.*, **139**, 19(1992).
18. M. L. Champigny, M. Brauer, E. Bismuth, C. L. Manh, G. Siegl, L. V. Quv and M. Stitt, *J. Plant Physiol.*, **139**, 361(1992).