

들깨 조직으로부터 callus 유기에 따른 지질 및 단백질 조성의 변화

김현경¹ · 김도훈 · 정순재 · 남재성 · 정대수*

동아대학교 생명자원과학대학
¹영남농업시험장

Changes of Protein and Lipid During Callus Induction and Plant Regeneration from *Perilla frutescens*

Hyeon-Kyoung Kim¹, Doh-Hoon Kim, Soon-Jae Jeong, Jaesung Nam and Dae-Soo Chung*

College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Pusan
¹National Yeongnam Agricultural Experiment Station, RDA

Abstract

The biochemical changes during regeneration of perilla callus were investigated by comparing total protein and lipid contents, protein band pattern in SDS-PAGE, and fatty acid composition in the calli cultured for various period(0, 1, 3, 5, and 6 weeks). Calli were induced from cotyledon and hypocotyl explants of perilla on MS medium containing BA(0.5mg/L) and NAA(0.5mg/L).

The protein contents reached the peak at 3 weeks after induction of calli, and then was decreased. Total lipid contents was decreased as the culture period increased. The band pattern of polypeptides showed that 30KD and 45KD polypeptides and 22KD and 45KD polypeptides were major proteins in the cotyledon and hypocotyl explants, respectively. However increase of culture period, only 30KD protein was highly accumulated.

Key words – Perilla, callus, regeneration, protein, lipid, fatty acid

서 론

들깨는 불포화지방산의 함량이 높은 고급지방산으로서 주로 유료작물로 이용되어져 왔으나 최근에는 엽채용으로 널리 이용되어지고 있다[15]. 또한 파종 한계기가 4월 하순부터 7월 중순까지로 길어 운작 및 대용작으로도 이용이 가능하며, 환경적응성이 높아 척박한 토양에서도 재배가 가능하다. 그리고 들깨잎에는 아미노산, 비타민, 양질의 지

방 및 미네랄이 다량 함유되어 건강식품으로 이용되어지며, 특유의 향기가 생선 및 육류의 비린내를 제거한다 하여 엽채소용으로 소비가 증가 추세에 있을 뿐만 아니라[12,13], 특히 잎들깨는 고소득 작물로서 재배면적이 증가하고 있는 실정이다.

이처럼 잎들깨는 저공해 채소의 안정적인 공급의 측면에서 농가소득에 크게 기여 할 뿐 만 아니라 농산물 개발에 대처할 작목으로서 개발 가능성이 높으며[11], 우리 농산물의 국제 경쟁력 제고를 위해 큰 역할을 할 것으로 생각된다. 그러므로 들깨 유전자원을 대상으로 다양한 용도 개발과 동시에 들깨에 관한 기초적인 유전분석, 개화생리 및 재배

*To whom all correspondence should be addressed
Tel: (051) 200-7509, Fax: (051) 200-7505
E-mail: dschung@mail.donga.ac.kr

에 관한 연구가 수행되어야 할 필요성이 높아지고 있는 실정이다.

식물의 재분화는 식물 조직 절편에 대한 배지내 auxin 류와 cytokinin류의 조성에 의해 좌우되는 것으로 알려져 있다[13]. 식물의 호르몬에 대한 연구는 많이 이루어져 있으나, 식물기관 분화에 작용하는 호르몬의 작용기작 등에 대해서는 연구가 많이 이루어져 있지 않다.

따라서 본 연구는 들깨의 주요 저장물질인 동시에 주요 에너지 공급원으로 알려져 있는 단백질과 지방을 대상으로 들깨조직의 callus 형성 및 재분화 과정 중의 변화를 조사하여 들깨의 기내 육종을 위한 기초자료를 얻고자 실시하였다.

재료 및 방법

Callus 형성 및 재분화

엽실들깨의 종자를 70% 에탄올에 1분간 소독하고 멸균수로 수세한 후 1% sodium hypochlorite에 살균한 다음 멸균수로 수세하고 MS배지[12]에 파종하여 발아 1주일 후에 자엽 및 배측 조직을 시료로 사용하였다. Callus 형성과 재분화가 가장 잘 되는 NAA와 BA를 각각 0.5mg/l를 혼용한 배지에 치상하여[16], 치상전 자엽 및 배측 조직과 치상 후 1, 3, 5 및 6주로 구분하여 1 및 3주는 callus를 5 및 6주는 callus와 일부 진행된 재분화조직을 실험재료로 사용하였다.

단백질 추출 및 SDS-PAGE

조단백질의 추출을 위해서 생체시료 1g을 0.1 M potassium phosphate buffer (in 1mM EDTA, 2mM DTT, 2% Triton X-100, pH 7.2)를 첨가한 뒤 15,000 rpm에서 40분간 원심분리하여 상등액을 취해 사용하였으며, 단백질 함량은 Bradford법[2]에 따라 595 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

SDS-PAGE는 Laemmli 방법[10]에 따라 실시하였으며, polyacrylamide는 separating gel과 stacking gel을 각각 12.5%와 5.0%로 하여 사용하였으며, 단백질 함량은 10 µg 씩 loading 하여 mini gel system (Bio-Rad Co.)에서 200V로 전기영동을 실시하였다. Gel의 염색은 0.1% comassie Brilliant Blue (G-250)로 하였으며, methanol과 acetic acid 혼합용액으로 탈색한 후 단백질의 band를 관찰하였다.

총지질의 추출 및 지방산 조성의 분석

총지질의 추출은 Bligh & Dyer법[1]을 변형한 방법으로 실시하였다. 시료 1g을 마쇄한 다음 여기에 chloroform : methanol(2:1, v/v)의 혼합 용액을 넣어 방치한 후 여과지로 여과하여 1% NaCl용액을 가지고 수용성물질을 제거한 뒤 chloroform층만을 회수하고 감압 농축하여 총지질을 구하였다. 지방산 조성의 분석은 총지질에 10% KOH-methanol 혼합용액을 넣어 가수분해한 후 얻어진 지방산염에 14% BF₃-methanol을 넣어 70°C에서 30분간 가열하여 methyl ester화한 후 GC로 지방산 조성을 분석하였다.

결과 및 고찰

단백질 및 총지질함량의 변화

들깨 조직을 자엽 및 배측으로 구분하여 MS배지에 NAA와 BA를 0.5 mg/l를 첨가하여 조직을 배양한 후 1, 3, 5 및 6주로 구분하여 단백질 및 총지질 함량을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 단백질 함량은 발아후 7일 경과한 자엽의 경우 23.75 mg으로 나타났으나 치상 후 1주에는 15.26 mg, 치상 후 3주에는 1.87 mg으로 급격히 감소하였으며, 치상 후 5, 6주에는 2.58 mg, 3.87 mg으로 증가하였다. 배측도 자엽과 비슷한 경향을 나타내었으나 치상 후 5주에 2.56 mg에서 치상 후 6주에 2.45 mg으로 감소하였다. 이처럼 배양 직전 및 배양초기에 단백질함량의 급격한 감소는 조직의 수분함량이 증가함에 따른 상대적인 감소로 생각되며, 배양 기간이 길어짐에 따라 단백질 함량이 증가한 것은 새로운 기관의 분화에 따른 함량의 증가로 생각된다. 한편 배양직전 및 배양초기에 자엽보다 배측의 단백질 함량이 높게 나

Table 1. Changes of protein and total lipid contents during callus induction and shoot formation from cotyledon and hypocotyl of perilla

Culture period (weeks)	Protein content (mg/g f.w)		Oil content (mg/g f.w)	
	Cotyledon	Hypocotyl	Cotyledon	Hypocotyl
0	23.75	30.67	64.57	21.34
1	15.26	20.47	34.21	6.31
3	1.87	2.04	7.61	4.54
5	2.58	2.65	8.30	4.78
6	3.87	2.45	12.25	4.79

타났으나 배양 후기에는 자엽이 높게 나타났는데, 이는 조직의 재분화 정도에 따른 차이에서 기인된 것으로 생각된다.

총지질 함량은 자엽과 배축 모두 단백질 함량의 변화와 비슷한 경향으로써 배축은 치상 후 3주까지는 급격히 감소하였으나 그 이후에는 배양 시간이 증가함에 따라 callus의 형성과 조직의 형성에 따라 미미하기는 하나 다소간 증가하는 경향을 보였다. 한편 자엽은 시간이 경과함에 따라 감소하다가 치상 후 6주에서는 증가하는 경향을 보였다. 일반적으로 발아가 진행됨에 따라 유묘기에서는 자엽에 저장되어 있던 지질이 에너지원으로 이용되어지기 때문에 자엽의 지질 함량이 감소하는 반면 유묘의 성장에 따라 배축의 지질은 증가된다고 알려져 있다[16,17].

본 실험에서는 자엽 및 배축 모두 치상 후 3주 이전에 감소하다가 그 이후에 증가하였는데 이는 배양 초기에는 기존의 조직내의 지질이 callus 형성에 따른 에너지원으로 이용되어짐에 따라 급격한 감소를 보인 것으로 생각된다. 이는 치상 후 3주 이후의 증가는 조직의 재분화에 따라 조직유기 생합성 되어짐에 따라 증가되어진 것으로 생각된다. 한편 들깨에서 조직의 재분화 정도는 자엽이 배축보다 다소 잘 형성되어지는 것으로 나타났는데, 이러한 조직의 재분화 정도의 차이 배축에서 치상 후 3주 이후의 지질 및 단백질 함량의 증가 폭이 적게 나타난 것으로 사료된다.

조직단백질의 전기영동적 변화

배양기간에 따른 조직단백질의 변화 pattern은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 배양전 자엽조직에서는 약 30KD와 45KD에서 polypeptide band가 다소 진하게 나타났으며, 배양전 배축은 자엽의 단백질 pattern과 비슷하였으나 22KD에서 2개의 polypeptide band가 나타났다. 일반적으로 종자의 저장단백질이 수분을 흡수함으로써 가수분해효소에 의하여 급격한 분해 작용을 거쳐 새로운 단백질의 합성을 위해 protease나 peptidases 등의 단백질 분해효소의 작용으로 아미노산과 가용성 저분자물로 분해되어 성장부의 질소원으로 이용되어진다고 하였으며[5], 들깨종자 발아시 종실내 저장단백질은 거의 분해되고 22~23KD 부근의 일부 단백질만 존재한다고 하였는데[4], 본 실험에서도 배양전 자엽과 배축 조직의 경우에서 이와 유사하였다.

자엽 및 하배축조직을 배양한 후 배양기간에 따라 callus로부터 추출한 단백질의 변화 pattern은 자엽조직에서는

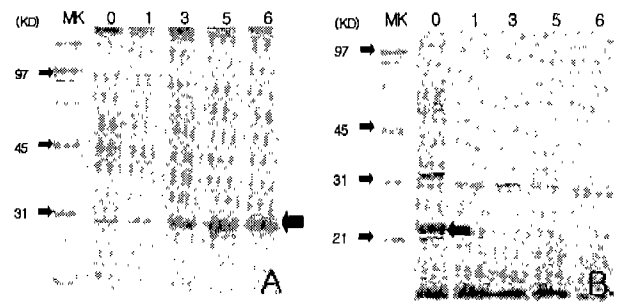


Fig. 1. SDS-PAGE of soluble protein isolated from callus of cotyledon (A) and hypocotyl (B) of perilla. M, molecular weight standard (Sigma Co.); O, cotyledon (A) and hypocotyl (B); 1~6, Cultured calli for 1 to 6 weeks.

30KD의 polypeptide band는 배양 1주에서는 변화가 없었으나 3주 후부터는 계속 증가하였으며, 29KD의 polypeptide band는 배양 3주 후부터 나타났으나 양적 증가는 없었다. 그러나 배양전 자엽조직에서 나타난 22KD와 45KD 및 기타 polypeptide band는 배양 1주 후부터는 거의 나타나지 않았다. 배축은 30KD의 polypeptide band와 22KD의 polypeptide band가 배양 초기부터 나타나기 시작하여 배양 6주까지 계속 나타났으나 양적인 증가는 없었다. 한편 30KD 전후의 polypeptide band는 peroxisomal membrane polypeptide와 glyoxysomal membrane polypeptide로 알려져 있다[3,14]. 이들 polypeptide는 ascorbate peroxidase 활성을 가지며, 이러한 peroxidase는 조직의 분화, 기관의 형성 및 체세포배 형성 등과 같이 조직 형성과정에 직접적으로 관여하는 것으로 알려져 있다[7]. 따라서 본 실험의 결과 자엽 조직이 배축 조직에 비해서 조직 재분화가 다소 좋게 나타났는데, 이는 단백질 pattern의 변화에서 30KD의 peroxidase의 증가가 조직의 분화, 기관의 형성 등과 같은 조직 형성과정에 직접적으로 관여함으로써 자엽 조직의 배양이 다소 잘 되어지는 것으로 생각된다.

지방산 조성의 변화

자엽과 배축을 배양한 후 callus와 재분화된 식물체의 지방산 조성의 변화는 Table 2 및 3과 같다. 자엽에서는 배양 기간이 증가함에 따라 palmitic acid는 증가하였으며, 특히 배양 직전에서는 24.30%에서 배양 1주일 후에는 58.38%로 급격히 증가하였고, 그 이후에는 증가의 폭이 적었다. Stearic

Table 2. Changes of fatty acid composition during callus induction of cotyledon in perilla (%)

	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
0	24.30	7.98	18.55	12.36	36.81
1	58.38	10.53	7.21	2.46	21.42
3	60.45	14.66	2.60	0.82	21.47
5	62.52	18.04	1.32	0.31	17.81
6	69.18	18.77	0.99	-	11.06

Table 3. Changes of fatty acid composition during callus induction of hypocotyl in perilla (%)

	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
0	82.66	14.03	0.27	-	3.04
1	79.35	16.01	1.35	-	3.29
3	74.47	15.77	5.35	0.15	4.26
5	69.70	17.68	7.67	-	4.95
6	69.98	17.24	6.96	1.93	3.89

acid는 배양직전부터 배양 후 3주까지는 증가하였으나 그 후 5주 이후에는 큰 변화가 없었다. Oleic acid는 배양전 18.55%에서 배양 1주 후에는 7.21%, 배양 3주 후에는 2.6%로 급격히 감소하였으며, 그 이후에는 감소의 폭이 둔화되었다. Linoleic acid도 배양 1주까지는 급격히 감소하였으며, 그 이후에는 거의 나타나지 않았던 반면, linolenic acid는 배양기간이 길어질수록 감소하였다. 이러한 경향은 종실내 저장 지질인 중성지질이 식물체의 성장과 더불어 발아에 이용되고, 배양 후에는 조직유인 인지질과 당지질의 형태로 전환됨으로서 주요 저장지방산인 oleic, linoleic 및 linolenic acid는 감소된 결과로 해석된다.

배축에서의 지방산 조성의 변화는 palmitic acid는 배양기간이 길어짐에 따라 감소하였으나, stearic acid는 증가하여 자엽과 비슷한 경향을 보였다. 그러나 oleic acid와 linoleic 및 linolenic acid는 배양기간이 길어짐에 따라 증가하여 자엽과는 상반된 결과를 보였다. 한편, linoleic acid는 거의 검출되지 않았으며 linolenic acid는 자엽부에 비해 함량이 작게 나타났는데, 이는 조직 내의 구성 지방산의 차이에서 기인된 것으로 생각된다.

적 요

들깨의 자엽 및 하배축 조직을 치상하여 치상직전, 치상

후 1, 3, 5 및 6주로 나누어 callus 생성 및 재분화 과정중의 단백질 및 총지질 함량, 단백질의 SDS-PAGE pattern과 지방산 조성의 변화를 분석한 결과는 다음과 같다.

배양기간의 경과에 따라 단백질 함량은 배양 3주까지는 감소하였으나 이후에는 증가하였으나, 총지질함량은 배양기간의 경과에 따라 감소하였다. Polypeptide band pattern은 자엽조직에서는 30KD과 45KD의 polypeptide band가 배축조직에서는 30KD과 22KD의 polypeptide band가 진하게 나타났다. 30KD의 polypeptide band는 배양기간의 경과에 따라서 증가하였다. 배양기간의 경과에 따른 지방산 조성은 자엽과 배축에서 palmitic acid는 감소하였으나, stearic acid는 증가하는 하였다. 그러나 oleic acid는 자엽부에서 감소하였으나 배축부에서는 증가하였다.

감사의 글

본 연구는 1997년 동아대학교 학술연구 조성비의 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Bligh, E. G. and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917.
2. Bradford, M. M. 1976. A rapid and method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* **72**, 248-254.
3. Bunkelman, J. R. and R. N. Trelease. 1996. Ascorbate peroxidase; A prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes. *Plant Physiol.* **11**, 589-598.
4. Chung D. S. and H. K. Kim. 1998. Changes of protein and lipid composition during the germination of *Perilla frutescens* Seeds. *Korean J. Life Science.* **8**, 318-325.
5. Daussant, J., N. J. Neucere and E. J. Conkerton. 1969. Immunochemical studies on arachis hypogaea proteins with particular to the reserve protein, II. Proteins modification during germination. *Plant Physiol.* **44**, 480-484.
6. Han, S. I., J. G. Gwag, K. W. Oh, S. B. Pae, J. T. Kim and Y. H. Kwack. 1990 Flowering and maturing response to seeding data and short-day treatment in

- vegetable perilla. *Korean J. Crop Sci.* **42**, 466-472
7. Joersbo, M., Anderson, J. M., Okkels and R. Rajagopal. 1989. Isoperoxidase as markers of somatic embryogenesis in carrot cell suspension culture. *Physiol. Plant* **76**, 10-15.
 8. Jung, S. H., S. K. Yang, H. K. Kim, D. S. Chung, Y. S. Cho and D. H. Kim. 1999. Changes of RNA and Protein During Callus Induction and Plant Regeneration from *Perilla frutescens*. *Korean J. life Science.* **9**, 29-34.
 9. Kwak, T. S. and B. H. Lee. 1995. Leaf quality and fatty acid composition of collected perilla related genus and species germplasm. *Korean J. Crop Sci.* **40**, 328-333.
 10. Laemunli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
 11. Lee, J. I., C. B. Park and S. Y. Son. 1993. Quality improvement in perilla III. varietal differences of protein content and amino acid composition in perilla. *Korean J. Crop Sci.* **38**, 15-22.
 12. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.* **15**, 473-497.
 13. Skoog and Miller. 1957. The biological action of growth substances. *Symp. Soc. Exp. Biol.* No. 118.
 14. Yamaguchi, K., Y. Takeuchi, H. Mori and M. Nishimura. 1995. A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. *Plant Cell Physiol.* **36**, 1157-1162.
 15. 磯田好弘, 崔春彦. 1990. α -Linolenic acid의 生理機能. *식품과 産業.* **23**, 58-67
 16. 井上利志榮, 今村賢. 1954. 菜種上における發芽種子の油分含量と役割. *九州農業研究.* **14**, 69-72
 17. 李正日. 1976. ナタネ (*Brasica napus* L.)의 脂肪酸組成に關する育種學的研究. 東京農大博士學位論文.

(Received April 6, 2001; Accepted May 10, 2001)