

Arabidopsis non-specific lipid transfer proteins (AtnsLTP) 처리에 의한 무농약 기능성 잎들깨 생산기술

허상선 · 김학윤¹ · 유선균 · 김경민^{2*}

중부대학교 공과대학 식품생명전공
¹계명대학교 환경학부
²경북대학교 유전공학연구소

The development of non-agricultural chemical leaf perilla using *Arabidopsis* non-specific lipid transfer proteins (AtnsLTP)

Sang Sun Hur, Hak Yoon Kim¹, Sun Kyun Yoo and Kyung Min Kim^{2*}

Food & Biotechnology and Ginseng Medicinal herb Bio-food Research Center, Joongbu University,
Geumsan-Gun, Choobu-Myen, Chungnam, 312-702, Korea

¹Faculty of Environmental Studies, Keimyung University, Taegu, 704-701, Korea

²Institute of Genetic Engineering, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea.

Abstract

Recombinant *Arabidopsis* non-specific lipid transfer proteins (nsLTPs) was purified from yeast. In order to determine the effect of nsLTPs for an production of anthocyanin in perilla leaves, 'Manchudlggae' cultivar was grown at pots that had been applied with different concentration of nsLTPs. The anthocyanin content in AtnsLTP treated leaves increased above two-fold higher than that in control. Also chlorophyll content was increased 16%. It was presumed that AtnsLTPs could be applied to increase high quality of perilla leaves.

Key words – Anthocyanin, AtnsLTP, chlorophyll, perilla

서 론

식물은 항균성을 가진 여러 종류의 단백질 생산을 통하여 병원성 곰팡이로부터 방어한다고 알려져 있다[12]. 식물 방어 단백질은 박테리아와 곰팡이 등의 병원성에 대하여 독성이나 억제 작용을 나타낸다[6,7,13]. 예를 들어 non-specific lipid-transfer proteins (nsLTPs)은 기관과 기관사이를

오가면서 지방성분이 포함되어 있다고 생각되어지고 있으며, 이들의 기능이 정확하지는 않지만 식물의 방어 기능에 관여하고 있을 가능성이 있다고 보고되고 있다[8,9]. 식물의 nsLTP는 벼, 밀 및 보리를 포함한 많은 종들의 식물로부터 분리되었으며[1,15,17], 또한 *Arabidopsis*에서도 분리되었다[10]. 생물적 또는 비생물적 스트레스는 nsLTPs 유전자 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다[5,14,18]. NsLTPs는 식물표면 위의 소수성 층의 형성에서 포함된다고 알려져 있다[18]. 식물에서 스트레스에 방어적인 수단으로 내성이 증가되는 효과적인 기작이 있음에도 불구하고 nsLTPs

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 053-950-5711, Fax : 053-958-6880
E-mail : kkm@bh.knu.ac.kr

의 그 기능은 명확하지 않으나, 개화와 규틴과 코르크의 단위체 이동과 같은 생물학적 작용도 또한 포함하고 있다[4]. 최근에는 nsLTPs가 곡물류에 있어서 식품화학적으로 중요한 역할을 하고 있는 것으로 밝혀졌으며, 밀가루반죽의 유동성과 빵부스러기의 성분에 직접적으로 연성의 효과가 있다고 보고하고 있다[4].

잎들깨는 현재 과도한 농약의 살포와 막대한 노동력이 소요되는 노동집약적 재배방식으로 재배되고 있어서 환경오염의 문제점과 생력재배의 문제점이 나타나고 있다. 또한 품질개선을 위하여 감마선을 처리하여 휘발성 방향성분을 높이거나[11], 잎들깨 재배시 광질에 따른 anthocyanin 및 향기 성분의 변화에 대한 연구가 행해지고 있다[3]. 잎들깨 재배시에 온실과 주연재배에 의한 연작의 피해가 나타나고 있으나 토양소독을 실시함으로써 연작의 피해를 줄이고 있는 실정이다. 따라서 생산성을 높이려면 무엇보다도 친환경재배법의 개발이 시급하다. 본 실험에서는 *Arabidopsis*의 nsLTP를 과대 발현시킨 효모로부터 nsLTP를 분리 정제하여, 잎들깨 재배시 처리함으로써 친환경재배법 개발 및 품질과 기능성 향상을 위한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

*Arabidopsis*의 AtnsLTP 분리정제

pTS909-LTP (Fig. 1)가 형질전환된 효모를 500 ml 삼각 플라스크에 200 ml SD-galactose-T-U 액체배지에 접종하여 30°C, 160 rpm으로 만 2일간 배양하여 50 ml tube에 옮겨 담은 후 3,500 rpm 원심 한 후 상등액은 버리고, 1 ml 멸균된 물을 넣은 후 잘 섞은 다음 4,500 rpm 원심 한 후 상등액을 새로운 튜브에 옮긴다. 3 배량의 추출버퍼 (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 5% glycerol)와 동량의 glassbead를 넣고 vortex로 30초간 교반하고 얼음에 1분간 방치한다. 이 작업을 약 20회 가량

수행한 뒤 현미경으로 효모세포가 80-90% 파괴된 것을 확인하고 OD₅₉₅를 측정하였다. 단백질 정량은 Bio-Rad Protein Assay Control (66872A)를 이용하였다. 약 25 kD의 AtnsLTP를 분리 정제하기 추출한 단백질을 전기영동 한 후 25 kD의 단백질만을 회수하여 50, 100, 150 ppm의 농도로 맞추어 사용하였다.

들깨잎에 AtnsLTP의 처리 방법

공시품종은 '만추들깨'를 이용하여 노지와 온실에 산파 방법으로 146-149 kg/10a 하였고, 2002년 5월 28일에 파종하였다. 시비는 N-P₂O₅-K₂O=4-3-2 kg/10a으로 전량 기비로 하였다. AtnsLTP처리는 농도 (0, 50, 100, 150ppm)별 시비회수별(0, 1, 2회/주)로 실험하였다.

Anthocyanin의 분석

신선한 들깨잎을 채취하여 1% 염산메탄올을 첨가하여 막자사발로 마쇄 한 후, 3 MM 여과지로 거른 후 1/2로 나누어 tube에 옮긴 후, 1% 염산메탄올로 추출액을 pH 3.4, pH 2.0로 조정한다. 각각의 추출액을 자기분광광도계로 파장이 900-500 nm의 구간 흡광도 곡선을 작성하고, 파장 500 nm에서 흡광도 측정시 양 pH 간의 차를 구하였다. 농도의 변화에 따른 검량선을 작성하고 상대적인 함량을 ppm으로 계산하였다.

엽록소 함량의 분석

엽록소 함량 조사는 들깨잎 재배시 노지에서 Minolta chlorophyll meter (SPAD-502, Japan)로 측정하여 상대적인 숫자로 표시하였다.

결과 및 고찰

만추들깨의 지역적응성 실험을 수행하기 위하여 2002년 7월 18일부터 9월 12일까지 2개월간 온실재배와 노지재배에서 온도와 습도를 조사한 바, 온실재배의 온도는 15-45°C의 범위로 평균온도는 25.5°C이며, 습도는 34-90%로 평균 습도는 70.5%이었다. 노지재배의 온도는 19-34°C의 범위로 평균온도는 23.0°C이며, 습도는 40-100%로 평균습도는 86.0%로 나타났다. 재배기간동안의 온도와 습도의 차이를 비교하면 재배온도에서는 온실재배가 습도는 노지재배가

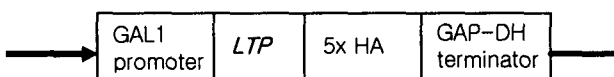


Fig. 1. Vector, pTS909-LTP, construction used for the transformation of the gene (LTP) into yeast. LTP; *Arabidopsis* non-specific lipid transfer proteins.

높은 경향으로 조사되었다(Fig. 2). Lee 등[11]에 의하면 잎 들개의 재배적온은 15-18℃이며 최고 30℃이상, 최저 7℃ 이하가 되지 않도록 하며 가급적 야간은 10℃이하가 되지 않도록 하여야 한다고 보고하였다. 또한 재배온도가 높으면 수확횟수가 많아지고 엽면적 증가와 엽중, 생체중, 건물중이 증가되며, 들개 잎에 함유된 자색색소도 증가하는 경향이었다고 보고하고 있다. 따라서 본 실험에서 이용된 각각 다른 포장조건의 재배환경을 비교한 바, 노지재배보다 온실재배의 온도가 잎들개 생육에 다소 높은 경향을 나타내었지만 고품질 들개 생육에는 적정환경이라고 생각되어진다.

효모에서 과 발현시켜 정제한 AtnsLTP를 농도별 및 주당 처리횟수에 따른 식물의 키와 엽면적을 조사하였다(Fig. 3). AtnsLTP를 처리하지 않은 대조구보다 처리한 것이 대체적으로 식물의 키와 엽면적이 증가하는 경향을 보였으며, 식물의 키는 100 ppm의 농도로 주당 2회 처리한 것이 가장 생육이 좋았으며, 엽면적은 50 ppm 농도로 주당 1회 처리한 것이 가장 크게 나타났으나, 100 ppm 농도를 주당 2회 처리한 것이 비교적 크게 나타났다. 따라서 AtnsLTP의 농도를 100ppm, 주당 2회 처리하는 것이 생육양상이 양호한 것으로 나타났다.

Fig. 4에서와 같이 유충의 피해 양상을 잎의 손상된 구멍수로 조사한바, 대조구와 비교하여 nsLTP를 처리한 것이 대체적으로 손상된 구멍의 수가 적었으며, 150ppm의 농도로 1주일에 2번 처리하는 것이 가장 구멍의 수가 적게 나타났다. 또한 처리구와 무처리구에서의 녹병 발생양상

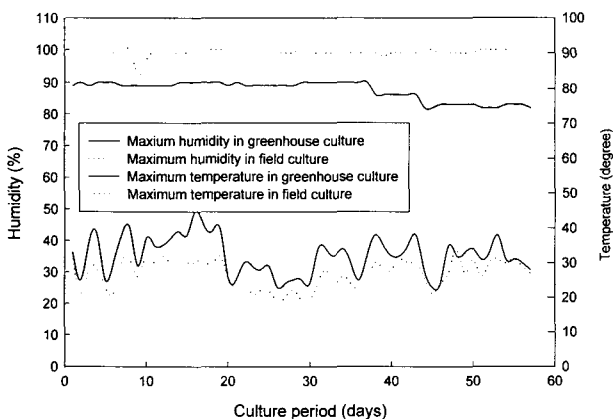


Fig. 2. Variation of temperature and humidity in field and greenhouse.

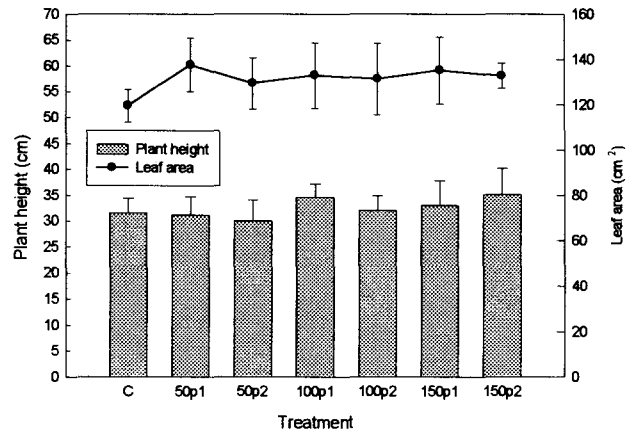


Fig. 3. Growth characteristics of perilla treated AtnsLTP in field. C; Control, 50p1; Perilla was treated 50 ppm AtnsLTP at one times a week, 50p2; Perilla was treated 50 ppm AtnsLTP at two times a week, 100p1; Perilla was treated 100 ppm AtnsLTP at one times a week, 100p2; Perilla was treated 100 ppm AtnsLTP at two times a week, 150p1; Perilla was treated 150 ppm AtnsLTP at one times a week, 150p2; Perilla was treated 50 ppm AtnsLTP at two times a week.

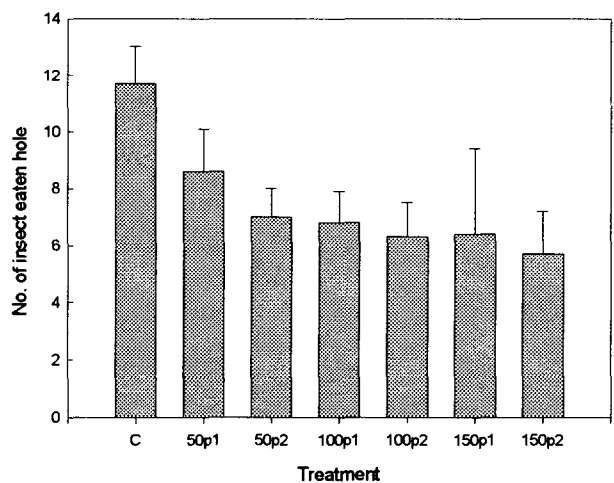


Fig. 4. Damage by larva in perilla leaves. C; Control, 50p1; Perilla was treated 50 ppm AtnsLTP at one times a week, 50p2; Perilla was treated 50 ppm AtnsLTP at two times a week, 100p1; Perilla was treated 100 ppm AtnsLTP at one times a week, 100p2; Perilla was treated 100 ppm AtnsLTP at two times a week, 150p1; Perilla was treated 150 ppm AtnsLTP at one times a week, 150p2; Perilla was treated 50 ppm AtnsLTP at two times a week.

(Fig. 7A)은 처리구에서 현저히 적게 나타나는 것을 알 수 있었다. 이는 Buhot[2]가 LTP를 이용하여 담배의 모자이크 바이러스에 처리한바 모자이크바이러스가 격감된다고 보고하고 있어서 본 실험에서도 AtnsLTP의 처리구와 무처리구와는 차이를 보이고 있다. 따라서 nsLTPs는 병원체에 저항성을 가지는 항균물질로 생각되며, 또한 처리식물의 방어기능을 증가시키는 것으로 사료된다.

AtnsLTP 처리에 의한 들깨잎의 엽록소 함량과 anthocyanin 함량을 조사한바(Fig. 5), AtnsLTP의 농도 증가와 처리횟수에 따른 엽록소 함량은 무처리에 비해 다소 증가하는 경향을 나타내었으며, 50 ppm 농도로 1주일에 1회 처리 한 것이 다른 처리구에 비해 가장 많은 함량을 나타내었다. Anthocyanin의 함량은 무처리에 비해 처리구가 모두 증가하는 경향이며, 100 ppm과 200 ppm 에서는 처리횟수에 관계없이 무처리에 비해 2배정도 증가하는 경향을 나타내었다. 들깨잎 뒷면의 자색양상을 조사한바(Fig. 7B), 처리구가 무처리에 비해 자색의 정도가 진하게 나타났다. 이는 Maldonado 등[13]은 LTP가 *Arabidopsis*의 잎에서

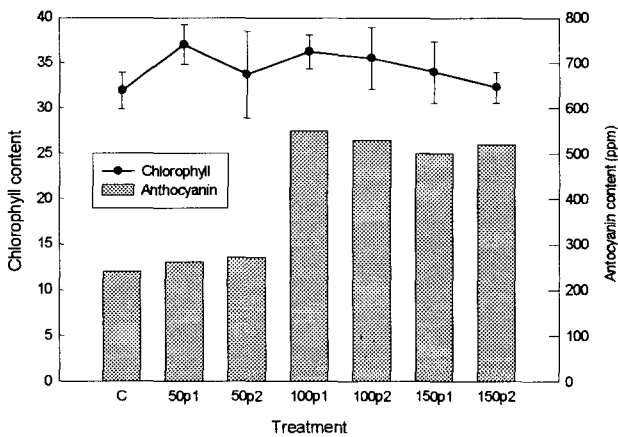


Fig. 5. Comparison of anthocyanin and chlorophyll contents of perilla leaves on different concentrations of AtnsLTP. C; Control, 50p1; Perilla was treated 50 ppm AtnsLTP at one times a week, 50p2; Perilla was treated 50 ppm AtnsLTP at two times a week, 100p1; Perilla was treated 100 ppm AtnsLTP at one times a week, 100p2; Perilla was treated 100 ppm AtnsLTP at two times a week, 150p1; Perilla was treated 150 ppm AtnsLTP at one times a week, 150p2; Perilla was treated 50 ppm AtnsLTP at two times a week.

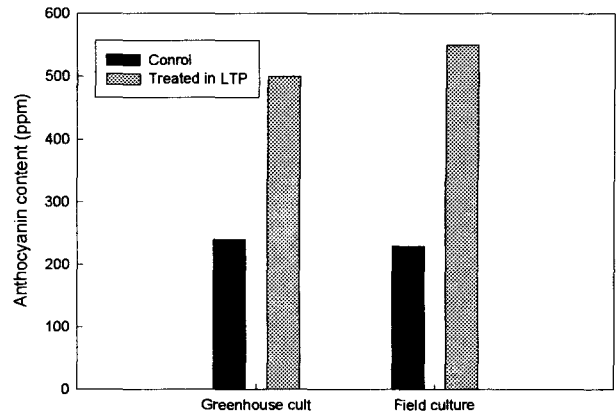


Fig. 6. Comparison of anthocyanin contents of perilla leaves grown in field and greenhouse.

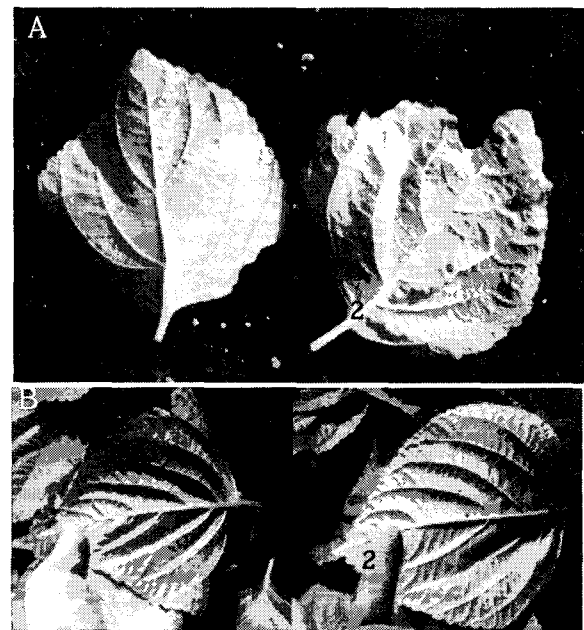


Fig. 7. Comparison between control and AtnsLTP treated perilla leaves. A: Symptoms of rust (1; treated AtnsLTP, 2; control). B: Purple color of reverse side of perilla leaves.

systemic 저항성이 있어서 잎의 황화현상을 저해하는 것을 보고하고 있어서, 본 실험에서도 AtnsLTP의 처리가 엽록소 함량과 anthocyanin 함량이 무처리에 비해 증가하는 것으로 보아 *Arabidopsis*의 nsLTP도 systemic 저항성이 있을 것으로 추정된다.

온실재배와 노지재배에서의 100 ppm AtnsLTP를 1주일에 2회 처리한 anthocyanin 함량을 조사한바(Fig. 6), 온실재

배나 노지재배 모두가 무처리에 비해 처리구가 2배정도 anthocyanin 함량이 증가되었으며, 노지재배가 온실재배보다 anthocyanin 함량이 증가됨을 알 수 있었다. Choung 등 [3]이 보고한 광질에 따른 anthocyanin에 관한 연구에서도 온실에서 사용하고 있는 투명 PE 필름이 가장 많은 anthocyanin을 형성한다고 보고하고 있다. 따라서 고품질 고기능성 들깨잎을 생산하기 위하여서는 온실보다 노지재배가 유익할 것으로 생각되며, 무농약과 저비용을 이용한 친환경재배에도 효과적인 것이라 사료된다.

요 약

AtnsLTP (*Arabidopsis* nonspecific lipid transfer proteins)를 효모로부터 분리정제 하였다. AtnsLTP를 들깨 재배시 처리함으로 병해충의 피해와 기능성 물질 향상에 관계되는 실험을 수행하여 얻어진 결과는 다음과 같다. ‘만천들깨’ 잎에 각기 다른 농도의 AtnsLTP를 처리한바, anthocyanin의 함량변화는 무처리에 비해 약 2배 이상 증가하였다. 또한 엽록소 함량은 16% 이상 증가하였다. 따라서 AtnsLTP는 고기능성과 고품질 들깨잎 생산에 효과적이라고 생각되어진다.

참 고 문 헌

1. Arondel, V., C. Vergnolle, C. Cantrel and J. C. Kader. 2000. Lipid transfer protein are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* **157**, 1-12.
2. Buhot, N., J. P. Douliez, A. Jacquemard, D. Marion, V. Tran, B. F. Maume, M. L. Milat, M. Ponchêt, V. Mikes, J. C. Kader and J. P. Blein. 2001. A lipid transfer protein binds to receptor involved in the control of plant defence responses. *FEBS Letters* **509**, 27-30.
3. Choung, M. G., Y. C. Kwon and Y. H. Kwak. 1998. Test of components related to quality in perilla leaves. III. Changes of anthocyanin and flavor components at different light quality. *RDA. J. Agri. Sci.* **40**, 133-139.
4. Douliez, J. P., T. Michon and D. Marion. 2000. Steady-state tyrosine fluorescence to study the lipid-binding properties of a wheat non-specific lipid-transfer protein (nsLTP1). *Biochim. Biophys. Acta.* **1467**, 65-72.
5. Dunn, M. A., M. A. Hughes, L. Zhang, R. S. Pearce, A. S. Quigley and P. L. Jack. 1991. Nucleotide sequence and molecular analysis of the low temperature induced cereal gene. BLT4. *Mol. Gen. Genet.* **229**, 389-394.
6. Gao A., S. M. Hakimi, C. A. Mittanck, Y. Wu, B. M. Woerner, D. M. Stark, D. M. Shah, J. Liang and C. M. T. Rommens. 2000. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defence in peptide. *Nature Biotechnology* **18**, 1307-1310.
7. Green D. R. 2000. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* **102**, 1-4.
8. Guiderdoni, E., M. J. Cordero, F. Vignols, J. M. Garcia-Garrido, M. Lescot, D. Tharreau, D. Meynard, N. Ferrière, J. L. Notteghem and M. Delseny. 2002. Inducibility by pathogen attack and developmental regulation of the rice *Ltp1* gene. *Plant Molecular Biology* **49**, 683-699.
9. Kader, J. C. 1996. Lipid-transfer proteins in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 627-654.
10. Kim, K. M., D. H. Kim, M. Kawai-Yamada and H. Uchimiya. 2003. Isolation of the cell death AtLTP2 suppressing bcl-2 by functional screening in yeast. *PNAS* submitted.
11. Lee, B. H., S. T. Lee and Y. S. Kim. 1998. References review for the scientific researches on perilla. *RDA. J. Crop Sci.* **40**, 80-112.
12. Leon, J., N. Yalpani, I. Raskin and M. A. Lawton. 1993. Induction of benzoic acid 2-hydroxylase in virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol.* **103**, 323-328.
13. Maldonado, A. M., P. Doerner, R. A. Dixon, C. J. Lamb and R. K. Cameron. 2002. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature* **419**, 399-403.
14. Molina A., A. Segura and F. Garcia-Olmedo. 1993. Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Letters* **316**, 119-122.
15. Poznanski, J., P. Sodano, S. W. Suh, J. Y. Lee, M. Park and F. Vovelle. 1999. Solution structure of a lipid transfer protein extracted from rice seeds. Comparison with homologous proteins. *Eur. J. Biochem.* **259**, 692-708.
16. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2nd ed.

- Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
17. Samuel, D., Y. J. Liu, C. S. Cheng and P. C. Lyu. 2002. Solution structure of plant-specific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *J. Biol. Chem.* **277**, 35267-35273.
 18. Trevino, M. B. and O. C. MA. 1998. Three drought-responsive members of the nonspecific lipid-transfer protein gene family in *Lycopersicon pennellii* show different developmental patterns of expression. *Plant Physiol.* **116**, 1461-1468.

(Received April 8, 2003; Accepted September 29, 2003)