

煙草葉組織의 物質代謝에 관여하는 몇가지 酵素活性에 관하여

金 濟 喆 · 尹 慶 恩 · 姜 瑞 奎

韓 國 人 蔘 煙 草 研 究 所 耕 作 研 究 室

Changes in the Activities of Certain Enzymes in Tobacco Leaf (*Nicotiana tabacum*) during Growth

Jun-Chul Kim, Kyung - Eun Yoon and Su-Kyoo Kang

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Suweon Division

(Received Mar. 3, 1982)

Abstract

The metabolic enzymes, nitrate reductase, amylase and peroxidase and the photorespiratory enzyme, glycolate oxidase in *Nicotiana tabacum* varieties were studied at various growth stages.

The enzyme activities of young leaves with rapid growth were different from those of old ones with stationary growth. In young leaves, activity of nitrate reductase was higher than that in mature ones and amylase activity was fairly constant in all stages. Activities of glycolate oxidase and peroxidase were found to be significantly lower in young leaves than in mature ones.

Activity of glycolate oxidase in mature middle leaves was 2.45 times higher than that of young ones and inhibited by 36% when the enzyme was treated with 0.16 mM isonicotinic hydrazide

緒 論

식물체의 基本構造와 作用을 유지하는 합질소유기 物 變化를 조절하는 窒素代謝와 에너지 공급원으로 作用하는 炭水化物 축적과정이 作物의 生産量變化에 크게 영향을 주는 것으로 알려져 이에 関한 農學的인 生理學的인 많은 實驗이 進行되고 있다.

窒素原공급에 의한 生産量 增加와 葉組織의 生理學的인 變化, 光合成에 의한 탄수화물 축적과정 및 光呼吸등을 밝혀 作物의 生産량을 높히려는 方向으로 研究되었으나 效率面에서 單面積당 CO₂ 固定率은 光呼吸에 의한 손실로 限定되어 있다(19). 煙草의 경우도 固定된 CO₂의 55%정도가 光呼吸 즉 Glycolate 代謝를 통해 잃어버려 生産량이 減少된다고 報告 되었으며(8) 光呼吸억제제에 의한 作物의 物質生産性을 높일수 있는 可能性 대해서도 研究되기 시작하고 있다(5, 12, 13).

本試驗은 煙草의 生育過程中에 몇가지 酵素活性 變化와 光合成能力 및 光呼吸 억제가능성을 밝혀 生産량과 聯關된 葉組織의 生理學的인 變化를 調査코져 하였다.

材料 및 方法

供試品種은 *Nicotiana tabacum* 中 黃色種으로 Va 115와 Hicks, 香契味種으로 소향과 향초, Burley種으로 Burley21을 溫室에서 Pot 재배하여 使用하였다. Peroxidase, Amylase 및 Glycolate oxidase 分析에 使用한 酵素液은 葉組織 1g을 0.1M Tris-HCl(pH 7.5, Sigma) 완충액 3 ml를 첨가한후 4 ℃에서 물탕을 使用하여 갈았으며 12,000g에서 30분동안 원심분리하여 上澄液을 使用하였다.

Nitrate reductase 活性은 Jaworski(4) 方法, Amylase와 peroxidase는 Kim等(6.7)의 方法에 의하여 分析하였고 Amylase 活性은 분당 mg Protein의 酵素液이 가수분해할 수 있는 전분량(mg)을 Unit로 表示하였다. Glycolate oxidase 活性分析은 1 ml의 기질 완충혼합액(Tris 100 μ M, glycolate 79.3 μ M, FMN (Hayashi) 0.23 μ M, pH 7.8)에 0.5ml의 酵素液을 넣고 50 μ l의 Phenyl hydrazine(50 μ M, Wako)을 첨가하여 反應을 시작하였다. 酵素活性은 324nm에서 1 분당 흡광도 변화치와 glyoxylate-phenyl hydrazine complex의 몰흡광계수로 부터 산출하였다(2).

光合成은 25 $^{\circ}$ C, 40K lux下에서 잎이 植物体에 부착

된 狀態에서 測定하였으며 光呼吸抑制劑 DNP(dinitro phenol, BDH), INH(Isonicotinic hydrazide, TCI)를 0.16mM농도로 酵素液에 첨가하여 각각 酵素活性을 測定하여 光呼吸抑制 效果를 調査하였다.

結果 및 考察

品種別 酵素活性은 Table 1에서와 같이 差異가 있으며 Nitrate reductase 活性은 소향에서 높고 Burley品種에서 Peroxidase, Amylase 및 Glycolate oxidase 活性이 높게 나타난다.

Table 1. Leaf area and enzyme activities in the middle leaf of aromatic, flue-cured and burley tobacco varieties. The activities were measured at 8 weeks after transplanting.

Variety	Leaf Area 100 cm ²	Nitrate	Peroxidase Δ OD/min	Amylase unit	Glycolate
		Reductase μ M/gm. hr			Oxidase μ M/min
Sohyang	1.39	12.90	2.02	8.0	1.36
Hwangchoi	2.02	3.59	1.54	9.3	0.51
Hicks	1.56	4.05	0.89	4.5	1.15
Va 115	2.65	2.55	3.99	8.4	1.30
Burley 21	2.32	1.18	13.31	21.5	2.95

品種別 Glycolate 活性의 差異는 煙草 純光合成에 對한 光呼吸의 遺傳的 反應이 差異가 있다는 Ze litch等(20)의 結果와 一符 하였으며 향초품종이 Glycolate oxidase 活性이 가장 낮아, 物質生産性 測面에서 固定된 CO₂량을 가장 적게 光 호흡으로 잃어버

리는 것으로 해석할 수 있다.

生育過程中 잎의 生理學的 變化를 調査하기 위해 Nitrate reductase, Amylase, Glycolate oxidase 및 Peroxidase 活性을 生育時期別로 調査하였는데

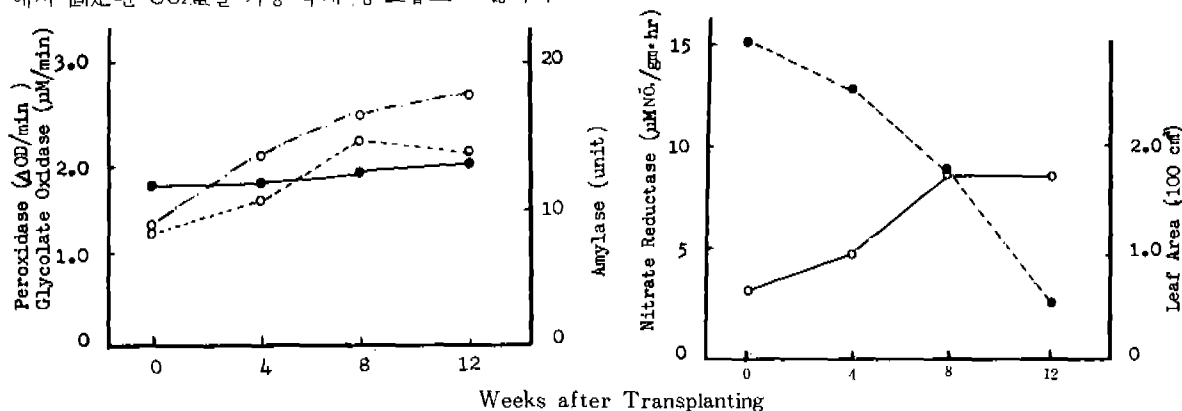


Fig. 1. Changes of enzyme activities in the middle leaf of *N. tabacum* var. sohyang at the different growth stages. ●—● : Nitrate Reductase, ○—○ : Leaf area, ○---○ : Peroxidase. ○-·-○ : Glycolate Oxidase, ●—● : Amylase.

Nitrate Reductase는 供試된 모든 品種에서 生育후기로 갈수록 감소하였으며 잎이 완전히 성숙한 생육 12주(移植後)에서는 거의 活性이 나타나지 않았다. 즉 이 효소활성은 잎의 속도와는 반비례 경향이었으며 Table 2의 葉位別 효소活性에서도 下位葉보다 生育이 旺盛한 上位葉이 높아, 같은 경향이였다. 生育初에 葉中 질소원은 증가하다가 生育후기에 감소하여 開化期에는 질소원 흡수가 거의 없는 것으로

알려져(15). 生育初, 엽록소, 핵산 및 단백질合成에 많은 질소원을 필요로 하여 Nitrate Reductase 活性이 높아 진다고 解析할 수 있다. 生育期間中 amylase 活性은 Fig1과 같이 活性의 變化는 뚜렷하지 않으나 生育初期보다는 生育後期(移植後12주)에 약간 增加하는 傾向이였다. Amylase는 전분을 당분으로 가수분해하는 酵素로써 잎이 成熟할수록 活性이 강해져 전조후까지 作用하는 것으로 알려졌다.

Table 2. Net photosynthesis and glycolate oxidase activity of the leaf in different leaf position of *N. tabacum* Br. 21.

Leaf position	CO ₂ Uptake	Glycolate oxidase	Nitrate reductase
	mg/100cm ² ·hr	μM/mg protein·min	μM/gm·hr
13	8.4	1.95	3.33
10		2.79	
7	10.9	3.15	1.67
4		2.90	
1	7.4	2.85	0.83

生育後期 活性이 增加하는 Peroxidase와 glycolate oxidase는 生体内 代謝物質을 산화시키는 酵素로써 Peroxidase는 잎의 成熟過程中 葉色變化에 큰영향을 주는 것으로 알려졌다(7) 生育後期에 活性이 增加하는 것은 잎의 黃變에 重要한 역할을 한다는 것을 의미한다. Glycolate oxidase는 生育이 進行 될수록 增加하는 경향이였으며 葉面積增加와 비슷한 경향이였다(Fig 1). Zelitch(18)는 光呼吸이 활발한 植物体内에서 glycolate oxidase活性이 높다고 報告하였는데 Table 2에서 잎이 成熟하여 완전히 전개함에 따라 光合成이 감소하고 Glycolate oxidase활성이 증가 하였으며 葉位別 光合成은 中位葉, Glycolate oxidase 活性은 下位葉쪽에서 높게나타나 光呼吸은 잎이 완전히 전개한 후에 높아진다고 할 수 있다. 光合成은 葉面積增加와 비슷한 傾向으로 증가하다 잎이 노후함에 따라 감소하였는데(Table 2) 이것은 잎이 노후함에 따라 葉周邊의 CO₂가 葉綠体 中心部에 도달하는데 있어 엽표면의 외기저항, 기공저항 및 엽육 세포저항으로 CO₂확산 저항이 증가하여 CO₂ 이용효율이 감소하기 때문으로 해석되었다. 잎의 CO₂ 固定은 호흡에 의해 소비되는데 作物의 生育과 밀접한 연관이 밝혀지지않은 광호흡을 억제함으로써 作物의

生産効率을 높일수 있는 것으로 報告된 바 있다(18). 生育後期の glycolate oxidase 活性은 生育初期에 비해 2.45배 높고(Table 3) 葉位別 酵素活性도 Table 2에서 보는 바와 같이 잎이 완전히 전개된 中下位葉에서 높아 光呼吸抑制劑는 잎이 완전히 전개한 生育後期에 處理하는 것이 효과적이다. 光呼吸 억제제로 INH와 MHB(methyl D. L-2 hydroxy-3-butynoate) 등이 報告되었는데 이것은 Glycolate 代謝에 關여하는 효소활성을 억제시켜 Calvin회로로 固定된 CO₂物質代謝를 하게 하는 것이다.

Table 3. Leaf area and glycolate oxidase activity in the leaf of *N. tabacum* var. Br. 21 at different growth stage.

Weeks after transplanting	Leaf area 100 cm ²	Glycolate oxidase μM/mg protein·min	
0	0.52	1.53	100
4	1.40	2.18	
8	2.30	3.72	245
12	3.15	3.53	

光呼吸抑制測定으로 化學的 物質에 의한 抑制와 植物自體의 光呼吸이 적은 쪽으로 育종을 해야하는

데 (19) Table 4와 Fig 2는 INH와 DNP에 의한 glycolate oxidase 억제효과를 나타낸 것이다.

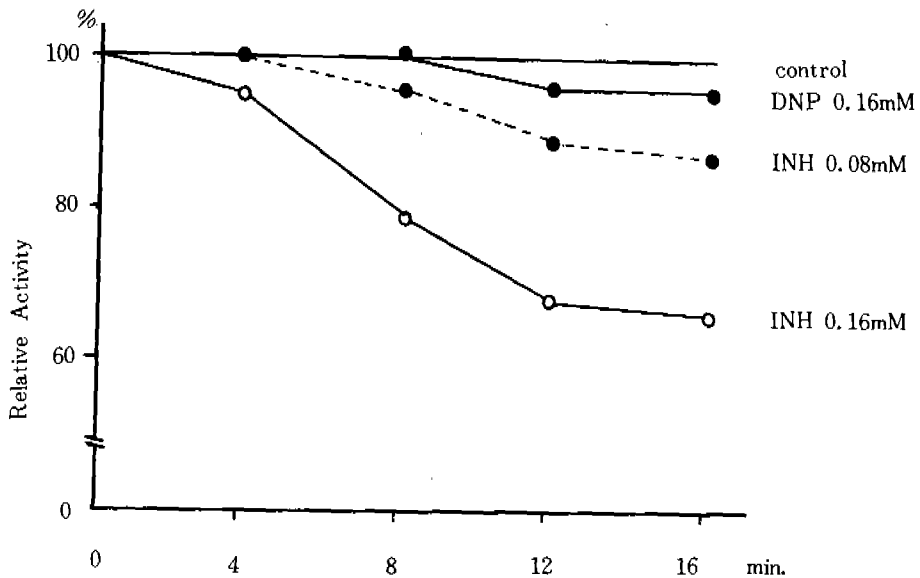


Fig. 2. Effect of INH and DNP on the glycolate oxidase activity during reaction time.

INH와 DNP 處理濃度는 Oliver (12)가 報告한 0.16mM 농도를 使用하였으며 Fig 2와 같이 反應初期에는 거의 抑制 되지 않으나 反應後 10 分경과시 INH에서

36%정도 抑制되었으며 산화인산화 作用에 關여하는 DNP에서 4%정도의 抑制效果를 나타냈다. Oliver (12)는

Table 4. Effect of INH and DNP on the glycolate oxidase, amylase and peroxidase activities of the leaf in *N. tabacum* var. Hicks.

Assay conditions	Glycolate		
	oxidase $\mu\text{M}/\text{mg protein} \cdot \text{min}$	Amylase unit	Peroxidase $\Delta\text{OD}/\text{min}$
Glycolate 0.08mM	1.64	5.1	0.92
+INH 0.16mM	0.98	4.9	0.91
+DNP 0.16mM	1.58	4.8	0.88

分離된 Soybean 세포에서 INH를 0.16mM 處理하여 glycine 75%, glycolate 25%정도의 CO₂ 방출을 抑制할 수 있다고 報告하였으며 Table 4의 結果에서 INH와 DNP가 적속엽에 主로 作用하는 Amylase와 Peroxidase 活性에는 거의 影響을 주지않는 것으로 나

타나 다른 代謝에는 影響을 미치지않으며 光呼吸 관련 酵素活性을 선택적으로 抑制하므로 INH와 DNP의 利用可能性을 암시하였다. 그러나 이 抑制劑에 의한 作物生産量의 提高가능성은 많은 研究가 進行되어야만 할것으로 생각된다.

結 論

煙草의 生育過程에서 物質代謝에 關連된 nitrate reductase, amylase 및 peroxidase 活性變化와 光呼吸인 glycolate 代謝억제 가능성을 調査하였다.

初期生育에서 nitrate reductase 活性이 높아, 多量의 질소를 필요로 하며 熟期와는 反比例 경향이었으며 生育過程中 Amylase 活性은 비슷한 경향을 나타냈다. 後期生育에서 Peroxidase와 Glycolate oxidase 活性이 높았으며 煙草의 成熟過程에 따라 增加하였다.

光呼吸에 關하여는 glycolate oxidase는 生育後期中下位葉에서 가장 높았으며 INH(0.16mM) 처리시 glycolate oxidase 活性을 選擇的으로 억제하여 物質生産 效率을 높힐 가능성을 暗示하였다.

참 고 문 헌

- Gibbs, M. and N. Calo. *Plant Physiology*, 34:318-323. (1959).
- Hong, Y. N. Dissertation, Univ. Freiburg. Br. (1978).
- Hopkinson, J. M. *Journal of Experimental Botany*, 15: 125-137. (1964).
- Jaworski, E. G. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 43: 6, 1274-1279. (1971).
- Jewess, P. J., M. W. Kerr, D. R. Whitaker. *FEBS Lett.* 53: 292-296. (1975).
- Kim, J. C. M. S. Thesis. Dept. Botany, Seoul National Univ. (1978).
- K. E. Yoon-park and K. W. Lee. *Korean Journal of Botany*, 24: 2, 87-93. (1981)
- Kisaki, T. *Plant Cell Physiology*, 14: 505. (1973).
- Laing, W. A., W. L. Ogren and R. H. Hageman. *Plant Physiol* 54: 678-685. (1974).
- Marvin, L. S. and P. H. Homann. *Plant Physiology*. 48: 193-196. (1971).
- Mengel, K. and N. E. A. Kirkby. *International Potash Institute*, pp 295-328. (1978).
- Oliver, D. J. *Plant Physiology*, 64: 1048-1052. (1979).
- Pritchard, G. G., W. J. Griffin and C. P. Whittingham. *J. Exp. Bot.* 14: 281-289. (1962).
- Vines, H. M. and R. T. Wedding. *Plant Physiology*, 35: 820-825. (1960).
- Watson, R. and A. H. K. Petrie. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sic.* 18: 313-339. (1940).
- Wojcieszka, U. B., W. L. Ogren and R. H. Hageman. *Plant Physiology*. 49: Suppl. 227. (1972).
- Zelitch, I. J. *Biol. Chem.* 233: 1299-1303. (1958).
- Proc. Nac. Acad. Sci. USA.* 70: 579-584. (1973).
- Science* 183: 626-633(1975).
- and P. R. Day. *Plant Physiology*, 43: 1838-1844. (1968).