

低温處理한 벼 幼植物의 아미노산 組成의 變化

文炳鎔*·洪英男·權寧命

(서울대학교 自然科學大學 植物學科)

Changes in the Compositions of Amino Acids in the Rice Seedlings under Low Temperature

Moon, Byoung Yong, Young-Nam Hong and Young Myung Kwon

(Department of Botany, Seoul National University, Seoul)

ABSTRACT

The contents and the compositions of total free amino acids were investigated in the rice(*Oryza sativa* L. cv. Chucheong) seedlings under low temperatures. Activities of some enzymes associated with the markedly changed amino acid content were also investigated. Under low temperature, the contents of soluble protein and the total free amino acids increased, while the content of total nitrogen decreased. Although asparagine+glycine were the most abundant amino acid species in the rice seedlings at the control temperature, low temperature treatment for 3days brought about the decrease in their amount to about 60% level of the control plants. On the other hand, alanine showed the highest increase in the content among all the free amino acids, though glutamine, proline, aspartic acid, valine and tyrosine also increased after low temperature treatment. To elucidate the decrease of asparagine+glycine level under low temperature, the activities of asparagine aminotransferase and asparaginase which metabolize asparagine were investigated in the rice seedlings under low temperature. The activity of asparaginase increased markedly, while that of asparagine aminotransferase decreased under low temperatures. Therefore, it was suggested that asparaginase metabolizes asparagine predominantly in the rice seedlings under low temperatures.

서 론

식물은 저온에서 세포막의 상전이 현상과 투과성의 변화 등으로 인하여 호흡 및 광합성과 같은 생리적 대사 과정이 영향을 받는다(Lyonss, 1973). 저온 저항성 식물과 저온 감수성 식물 사이에는 이러한 생리적 대사 과정의 변화 내용에 차이가 있으며 (Lyons, 1973; Burke *et al.*, 1976), 같은 종류의 식물이라하더라도 외부의 온도 즉 빙점 이상의 온도에 대한 반응과 빙점

* 인제대학교 자연과학대학 생물학과

본 논문은 1988년도 문교부 연구비로 수행된 연구 결과의 일부임.

이하 온도에 대한 반응의 메카니즘이 서로 다르게 나타난다(Levitt, 1980). 특히, 저온 감수성 식물에 대하여는 빙점 이상의 저온(통상 0~15°C)이 중요시되는데, 저온에 대한 생리적 반응 중 식물체 내의 단백질 대사는 아미노산의 변화 및 관련 효소의 활성 변화와 관련하여 매우 중요한 의미를 지닌다(Graham and Patterson, 1982). 저온에서 일어나는 단백질의 합성과 분해는 protease의 활성에 따라 좌우되며(Tan, 1980) 저온에서 나타나는 아미노산의 동태 변화는 단백질이 분해된 데서 기인한 결과인지 또는 아미노산의 새로운 합성이 일어난 데서 비롯된 결과인지 분명하지 않다(Rosinger *et al.*, 1984; Meza-Basso *et al.*, 1986).

저온에 수반하여 수분 부족현상이 일어날 때 아미노산 중 proline이 식물체내에 현저하게 증가하는 것으로 알려져 있으나(Chu *et al.*, 1978), 식물에 따라서는 이와 달리 저온에서 특이한 방식으로 아미노산의 변화가 일어나기도 한다. 감귤나무를 저온에서 경화(hardening)시키면 탄수화물의 축적과 더불어 proline이외에도 glutamic acid와 valine의 축적이 일어난다(Yelenosky, 1978, 1979). 또한, Sagisaka(1987)가 조사한 동절기 초본 내의 아미노산 분포는 (i) arginine을 축적하는 식물군, (ii) arginine과 proline을 축적하는 식물군, (iii) glutamate와 glutamine을 축적하는 식물군, (iv) asparagine을 축적하는 식물군, (v) proline을 축적하는 식물군 등으로 다양하게 나타났다. 한편, *Passiflora* sp.(시계꽃 종류)의 저온 감수성 종류는 저온에서 alanine을 축적한다고 알려져 있다(Patterson *et al.*, 1981). 저온 조건 하에서 일어나는 식물의 아미노산 축적에 있어서 이와 같이 alanine을 우선적으로 축적하는 식물들에 대한 보고는 매우 드물 뿐 아니라 이들 식물에 있어서 alanine을 생산하는 효소들에 대한 연구는 이루어지지 않은 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 저온 감수성 식물인 벼의 유식물을 재료로 하여 저온 처리(15 및 4°C)를 행하고 체내의 단백질 함량과 전 질소함량의 변화를 총 유리 아미노산과 관련하여 조사하고자 하며, 저온에서 나타나는 아미노산의 조성 변화를 HPLC법으로 분석함으로써 asparagine이나 alanine과 같이 저온에서 특이하게 변화하는 아미노산을 대상으로 하여 그 대사과정을 일부 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 배양 조건. 본 실험의 재료는 경기도 화성군 농촌 지도소 태안지소로부터 입수한 추청(일명 Akibare) 품종의 벼로서, 사용 전 4°C의 냉장실에 보관하였다. 종자는 파종 전에 1%의 sodium hypochlorite용액으로 30분간 표면 살균한 후 증류수로 수 회 세척하고 48시간 동안 침윤시켰다. 플라스틱 용기에 종자를 파종한 후 증류수를 첨가하고 growth chamber에서 8일 간 배양한 후 배양액을 Hoagland 용액(full strength)으로 교체하였다. 이때, 온도는 28±1°C였으며 조도는 형광등 빛으로 4,000~5,000 룩스(16:8)이었다.

저온처리. Growth chamber에서 11일간 배양한 벼 유식물을 각각 15°C, 4°C로 유지되는 배양실로 옮기고 동일한 광도와 광주기 하에서 계속 배양하면서 저온 처리를 행하였다.

수용성 단백질 함량의 측정. 벼 잎의 생체량 0.5g을 취하여 70mM 인산완충액(pH 8.0) 10ml와 함께 마쇄한 후 10,000xg에서 20분 간 원심분리하고 상정액을 20% TCA용액으로 침전시킨 후 Lowry의 방법(Lowry *et al.*, 1951)에 따라 단백질 함량을 측정하였다.

전 질소 함량 및 수용성 단백질 내 질소 함량의 측정 전 질소 함량은 80°C에서 48시간 동안 건조시킨 벼 잎을 습식분해한 후 micro-Kjeldahl 법을 이용하여 측정하였고, 수용성 단백질 내 질

소 함량은 신선한 벼 잎으로부터 수용성 단백질의 침전을 생성한 후 마찬가지로 방법으로 습식분해하여 micro-Kjeldahl법으로 측정하였다(Jackson, 1967).

총 유리 아미노산 함량의 측정. 가용성 성분을 추출하기 위하여 Sagisaka(1987)의 방법을 변형하여 벼 잎을 0.2 N perchloric acid 용액과 함께 마쇄한 후 10,000xg에서 20분 간 원심분리하고, 상징액에 KHCO_3 분말을 가하여 pH 4정도 되도록 조정하였다. 침전물을 원침시켜 버린 후 상징액을 총 유리 아미노산의 함량 측정에 사용하였다. 총 유리 아미노산의 함량은 Yemm과 Cocking(1955)의 방법을 수정한 ninhydrin법으로 glycine 표준 곡선을 이용하여 측정하였다.

HPLC에 의한 아미노산의 분석. Henrikson과 Meredith(1984)의 방법과 Ebert(1986)의 방법을 기초로 하여 분석하였다. Phenylisothiocyanate(PITC)와 아미노산을 반응시켜 phenylthiocarbonyl 유도체를 제조하고 reverse-phase high-performance liquid chromatography를 시행하여 분리 정량하였다. 벼 잎을 0.2N perchloric acid로 마쇄하여 아미노산을 추출한 후 원심분리하고 상징액을 무수 탄산칼륨 분말로 pH7~8이 되도록 중화시켰다. 다시 원심분리한 상징액을 Dowex -50 resin column(0.5 x 4cm)에 loading하고 물로 세척한 후 4 N ammonium hydroxide로 아미노산을 용출시켰다. 용출액을 진공 evaporator에서 건조시키고 그 잔사에 HPLC용 물을 가하여 녹인 시료 용액을 PITC유도체 제조에 사용하였다.

PITC유도체를 만들기 위하여 시료용액을 건조시킨 후 PITC혼합용액(methanol 7: triethylamine 1: water 1)의 혼합액과 PITC시약을 9:1로 섞은 용액)을 가하여 실온에서 20분간 반응시키고 진공 건조기에서 건조시켰다. 건조된 잔사에 starting buffer를 가하여 용해시키고 여과한 후 HPLC분석시료로 사용하였다. 표준 아미노산은 2.5mM stock용액을 사용하여 동일한 방법으로 PITC유도체를 제조하여 분석하였다.

Chromatography에 의한 분석 과정은 Seferiadis 등(1987)의 방법을 기초로 하여 시행하였다. HPLC분석 시스템은 Beckman Model 338 conventional gradient system이었고 분석 시료는 20 μ l의 injection loop가 장착된 Model 210 manual injector를 이용하여 주입하였다. Column은 Ultrasphere ODS(C₁₈), 5 micron, 4.6x250mm(Altex)의 규격을 사용하였고 아미노산의 분리에 따라 나타나는 chromatogram은 Model 427 computing integrator (Beckman)로 기록하였다.

아미노산의 용출에 사용한 완충 용액으로서는 0.05M ammonium acetate(pH 6.8)의 용매 A와 0.1M ammonium acetate가 첨가된 acetonitrile/methanol/water(44:10:46)인 용매 B를 사용하였고, gradient의 조건은 0-15% B(15분), 15-38% B(10분), 38-60% B(10분) 및 60% B(7분)으로 하였다. Washing은 100% B로 40분간 행하고, equilibration은 100% A로 5분간 행하였다. 유속은 1ml/min, 온도는 40 $^{\circ}$ C로 유지하였으며, detection은 254nm에서 0.05AUF-S(absorbance unit full scale)로 하였고 injection volume은 50~500pmol의 시료에 대하여 20 μ l이었다.

조효소 용액의 제조. Ireland와 Joy(1981)의 방법에 따라 준비하였다. 벼 잎을 50mM Tris-HCl 완충 용액(pH 8.2, 0.1mM EDTA 및 2mM DTT 포함)과 함께 마쇄하고 12,000xg로 20분간 원심 분리한 상징액을 얻었다. 상징액에 50%(WV)의 polyethylene glycol을 가하여 최종 18%의 포화 용액으로 만든 후 다시 원심분리하여(12,000xg, 20분) 얻은 pellet을 homogenization buffer에 녹여 이것을 조효소 용액으로 사용하였다.

효소 활성의 측정. Asparagine aminotransferase와 asparaginase의 활성을 측정하기 위하여 Ireland와 Joy(1981)의 방법을 수정하여 사용하였다. Asparagine aminotransferase의 활성을 측정하기 위하여 20 mM L-asparagine, 20 mM sodium pyruvate, 50mM Tris-HCl완충 용액 (pH8.2)과 조효소 용액 0.1ml를 첨가하여 30°C에서 20분간 반응시킨 후 반응 혼합액으로부터 0.5ml를 취하여 0.1N NaOH 0.5ml와 섞어 반응을 중지시켰다. 반응이 중지된 용액의 흡광도를 289nm에서 측정하고 반응전과 20분 반응 후의 값의 차이를 효소 활성으로 나타냈다. Asparaginase의 활성을 측정하기 위하여 1.5ml의 반응 혼합액에 20mM L-asparagine, 30 mM KCl, 50 mM Tris-HCl완충 용액 (pH 8.2)과 조효소 용액 0.2ml를 첨가하여 30°C에서 20분간 반응시킨 후 반응혼합액중 0.5ml를 취하고 0.2N perchloric acid 0.5 ml와 섞어 반응을 중지시켰다. 반응 중지액을 무수 탄산칼륨 분말로 중화하고, 효소 반응이 일어나는 동안에 분해된 asparagine의 양을 정량하기 위하여 PITC유도체를 만들어 HPLC분석을 시행하고 단위 시간당 분해된 asparagine의 양을 효소 활성으로 표시하였다.

결과 및 고찰

단백질과 전 질소 함량의 변화. 저온에서 벼 유식물의 질소 대사를 이해하기 위하여 단백질을 비롯한 질소 성분의 함량을 조사하였다. 수용성 단백질의 함량은 15°C로 처리한 유식물에서 28°C의 대조구(생체량 당 9.0mg)에 비하여 1일 째에 30%, 3일째에 35% 증가하였으나, 5일째에는 대조구와 거의 동일한 값을 나타냈으며, 4°C로 처리한 유식물은 처리 후 1일째에 29%, 3일째에 최대 증가율인 111%를 기록하였으나, 4일째에는 64%로 증가폭이 둔화되었다 (Fig. 1). 또한, 전 질소 함량은 15°C로 처리한 유식물에서 대조구에 대하여 처리 1~2일 까지는 서로 비슷한 값을 보였으며, 4일 째에 14%의 최대 증가율을 기록한 후 5일 째에는 다시 대조구와 비슷한 값으로 유지되었고, 전반적으로 대조구와 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나, 4°C

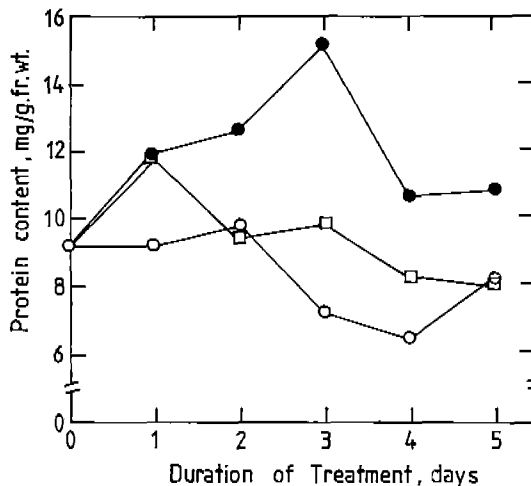


Fig. 1. Changes in the content of soluble protein in the leaves of rice seedlings grown under low temperature. —○—, 28°C; —□—, 15°C; —●—, 4°C.

Table 1. Content of total and soluble protein nitrogen(mg/g, dry wt.) in the leaves of rice seedlings grown under low temperature

Days	Temperature(°C)								
	28			15			4		
	Total N	Protein N	Ratio	Total N	Protein N	Ratio	Total N	Protein N	Ratio
0	44.4	23.5	0.57	-	-	-	-	-	-
1	44.9	21.9	0.49	45.8	22.5	0.49	44.5	21.7	0.49
2	51.0	18.5	0.36	54.0	21.8	0.40	46.1	23.0	0.50
3	51.7	17.2	0.33	47.1	21.4	0.45	43.3	22.2	0.51
4	45.5	17.0	0.37	51.8	20.7	0.40	43.5	19.8	0.46
5	49.8	13.5	0.27	49.5	18.0	0.36	43.8	22.0	0.50

로 처리한 유식물의 경우 처리 후 1일째에는 대조구와 비슷한 값이었으나, 2일째에 10%, 3일째에 16%의 감소율을 보였으며 처리 기간(5일)중 전반적으로 대조구보다 낮은 값을 나타냈다(Table 1).

또한, 수용성 단백질 내에 포함된 질소함량의 측정은 총 질소에 대한 단백질 질소의 비율을 비교하기 위한 것으로 총 질소 성분 중 단백질이 차지하는 비중을 나타낸다. 단백질 질소의 함량은 처리 기간 중 대조구에서 점차 감소하는 경향을 보였으며, 상대적으로 15°C로 처리한 유식물은 처리 후 3일째와 5일째에 24%, 33%의 증가율을 보였고, 4°C로 처리한 유식물은 처리 후 2일, 3일 및 5일째에 각각 24%, 29%, 63%의 증가율을 나타냈다(Table 1). 이와 더불어 수용성 단백질의 질소 함량에 대한 전 질소함량의 비율은 대조구에서 점차 감소하는 경향을 보인 반면, 15°C로 처리한 유식물은 감소가 매우 완만하게 나타났으며, 4°C로 처리한 유식물은 그 비율이 감소하지 않고 거의 일정한 값을 유지하였다(Table 1).

Levitt(1980)은 저온에서 단백질 합성의 감소와 함께 단백질의 분해가 일어나며, 이로 인하여 단백질의 결핍 혹은 단백질 분해 산물(아미노산, NH₃)의 독성 때문에 냉해가 발생한다고 하였으나, 저온이 아닌 암조건에서도 단백질의 분해가 일어날 뿐 아니라, 0°C로 10일간 처리한 고구마의 미토콘드리아에서 호흡 활성이 감소함에도 불구하고 단백질의 분해가 일어나지 않았다고 한다(Minamikawa *et al.*, 1961). 특히, 수용성 단백질은 저온에서 증가하는 경향이 있다(Kacperska-Palacz, 1978). Phenylalanine ammonialyase(PAL), hydroxycinnamoyl CoA quinate hydroxycinnamoyl transferase 및 invertase 등은 증가하는 단백질의 대표적인 경우이며, 이들의 증가는 protease 활성의 감소에 기인한다(Graham and Patterson, 1982). 본 실험에서도 저온 처리에 따라 수용성 단백질의 함량이 증가한 것은 이러한 효소들의 활성 증가와 밀접한 관련이 있을 것으로 생각되며 실제로 저온 처리한 벼 잎에서 PAL의 활성 증가를 확인할 수 있었다(미발표 결과).

사과의 출기를 저온 처리하면 질소의 흡수가 감소되는데(Tromp and Ova, 1984), 벼를 저온 처리하면(낮 17°C/밤 12°C) 전 질소 함량이 감소하고 그 감소는 광합성의 저하와 정의 상관을 나타낸다(Park and Tsunoda, 1983). 또한, Place 등(1971)은 저온 처리한 벼에서 P, Mg, Mn을 제외하고 질소를 비롯한 모든 무기원소 성분의 흡수가 저해됨을 밝혔는데 이는 저온에서 벼의 대사 활성이 낮아진 때문이라고 하였다. 본 실험 결과에서도 저온 처리에 따라 전 질소의 함량이 감소하였는데 이것은 위와 같은 사실을 반영한 결과라고 해석된다. 또한, 저온 처

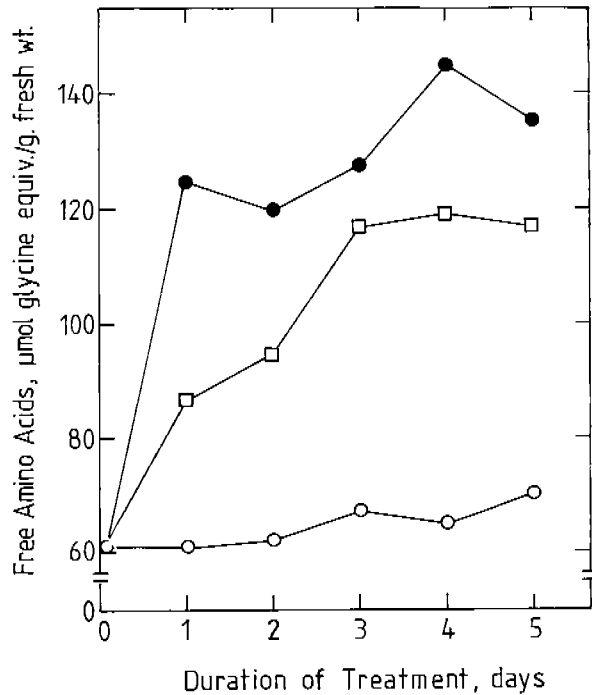


Fig. 2. Changes in the content of total free amino acids in the leaves of rice seedlings grown under low temperature. The symbols are the same as those shown in Fig. 1.

리에 따라 수용성 단백질 내의 질소 함량이 증가하고 전 질소 함량에 대한 단백질 질소의 함량의 비율이 증가한 것은(Tabel 1) 저온 처리에 따라 벼 유식물이 수용성 단백질의 함량이 증가한 사실을 뒷받침하고 있다고 생각된다.

총 유리 아미노산의 함량과 조성의 변화. 식물의 아미노산은 체내의 대사 중 단백질 합성과 단백질의 분해 및 식물 기관 간의 수송 과정이 동적평형상태를 이룬 결과를 반영하는 것이라 할 수 있다(Meza-Basso *et al.*, 1986). 따라서 아미노산 함량이나 그 조성은 식물의 생리적 특성이나 발달단계 및 환경 요인의 영향을 크게 받는다. 저온처리가 벼 유식물에서 어떠한 특정 아미노산의 축적을 초래하는지 알아보기 위하여 총 유리 아미노산의 함량과 그 조성을 조사하였다(Fig. 2 및 3).

15°C로 처리한 벼 유식물의 총 유리 아미노산은 처리 후 1일 및 3일째에 각각 42%, 74%의 증가율을 보였고, 4일 째에는 83%의 최대 증가율을 나타냈다(Fig. 2.) 또한, 4°C로 처리한 유식물은 처리 후 1일 및 2일째에 각각 105%, 94%의 증가율을 보였고 4일 째에 122%의 최대 증가율을 나타냈다. 이와 같은 총 유리 아미노산의 증가는 저온에서 다른 식물의 아미노산 함량의 변화를 조사한 Draper(1972), Pauli와 Mitchell(1960) 및 Srivastava와 Fowden(1966)의 보고와 같았으며 저온에서의 수분 퍼텐셜의 저하와도 관련이 있는 것 같다(Singh *et al.*, 1973).

한편, 저온 처리를 시작하기 전의 벼 유식물로부터 총 유리 아미노산을 추출하여 HPLC분석한 결과, asparagine+glycine, glutamic acid, aspartic acid, glutamine, serine순으로 많이 분포

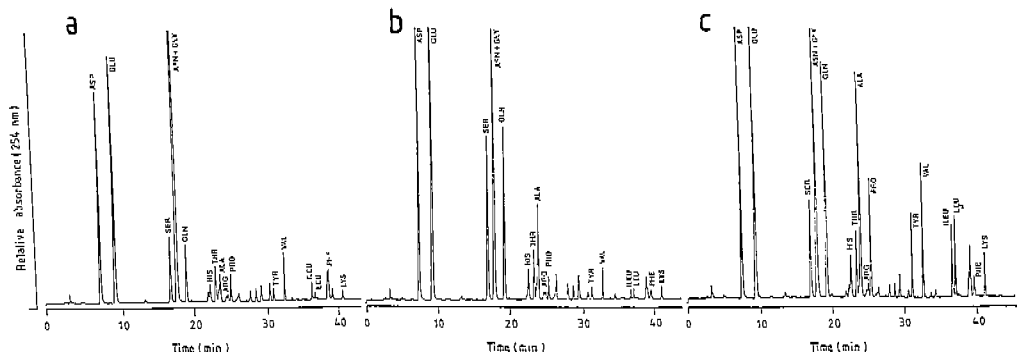


Fig. 3. HPLC chromatograms of amino acids extracted from the leaves of rice seedlings grown at 28°C(a), 15°C (b) and 4°C(c).

되어 있었고 기타 phenylalanine, alanine, threonine, histidine, valine, arginine, proline, lysine, tyrosine, leucine, isoleucine 등이 검출되었으나 그 함량은 극히 낮았다. 저온 처리를 행하였을 때 대조구에서는 저온 처리를 시작하기 전과 비슷하게 asparagine+glycine의 peak가 가장 높게 나타났고, 그 다음 glutamic acid, aspartic acid 순이었으며 glutamine보다 serine이 약간 많이 분포하였다. 그러나, 15°C로 처리한(3일간) 유식물의 경우에도 20종의 아미노산이 모두 검출되었으나 대조구보다 뚜렷하게 증가한 아미노산은 glutamic acid, glutamine, serine, alanine 및 aspartic acid 등이었으며 (Fig. 3), glutamic acid가 전체 증가분의 23%를 차지하여 가장 많이 증가하였고 glutamine이 22%, serine이 20%, alanine이 15%, aspartic acid가 13%를 차지하였으며 나머지 아미노산들은 모두 3%미만의 비율이었다. 반면에 15°C 처리로 인하여 감소된 아미노산은 asparagine+glycine, phenylalanine, valine, isoleucine, proline, 기타 arginine, methionine 등이었으며, 이 중 asparagine+glycine이 전체 감소분의 83%를 차지하여 가장 많이 감소하였고, phenylalanine, valine, isoleucine, proline 순으로 나타났다.

한편, 4°C로 처리한(3일간) 벼 유식물로부터 추출한 아미노산을 HPLC로 분석한 결과, 20종의 아미노산이 모두 검출되었으나 대조구보다 뚜렷이 증가한 아미노산은 alanine, glutamine, proline, aspartic acid, valine, tyrosine 등으로 나타났으며 (Fig. 3), alanine이 전체 증가분의 22%를 차지함으로써 가장 많은 증가율을 나타냈고 glutamine 19%, proline 8%, aspartic acid 7%, valine 7%, tyrosine 6%, glutamine 6% 순으로 나타났다. 반면에 저온 처리와 함께 감소한 아미노산은 asparagine+glycine이 유일하게 감소하였는데 대조구의 60% 수준까지 감소하였다. 여기에서 주목할 만한 사실은 저온 처리한(4°C) 벼에서 alanine과 glutamine이 proline보다 더욱 현저하게 증가한 사실이다. 이와 같은 현상은 저온 저항성 식물에서 나타나는 proline의 지배적인 증가 현상 (Meza-Basso *et al.*, 1986; Yelenosky, 1979)과는 매우 대조적이다.

Sagisaka(1974)와 Sagisaka 및 Araki(1983)는 월동하는 목본 식물의 눈, 목부 및 수피에서 arginine 또는 arginine+proline이 축적된다고 하였으며 이러한 축적은 저장형 질소의 대사에 있어서 정상적인 생리 작용으로 이해되었다. 또한, Sagisaka(1987)는 자연조건에서 40종의 다년생 초본을 대상으로 월동기의 유리 아미노산 조성을 조사하였는데, 조사한 40종의 식물중 20종은 arginine을, 9종은 arginine과 proline을, 3종은 glutamate와 glutamine을, 4종은 aspar-

agine을, 4종은 proline을 축적한다고 하였다. 뿐만 아니라 월동 기간 동안 대부분의 유리 아미노산의 생합성이 일어났음을 시사하여 준다고 하였다. *Lolium perenne* L.(호밀풀)에서는 저온 기간 동안 proline과 glutamate가 축적되었고(Draper, 1972), proline과 arginine은 저온의 상해 효과로부터 틸라코이드 막의 기능을 보호하여 준다고 하였다(Heber *et al.*, 1971). 그러나, Patterson등(1981)에 의하면 *Passiflora* sp.(시계꽃 종류)의 저온 감수성 종류는 저온에서 glutamate가 감소하고 alanine의 함량이 크게 증가한 반면, 저온 저항성인 종류는 alanine의 함량이 거의 변화가 없다고 하고, *Passiflora*의 저온 저항성은 저온에서 alanine의 축적을 방지하는 능력에 비례할 것이라고 하였다.

이러한 사실을 참고로 할 때, 본 실험에서 저온 처리한 벼 유식물의 alanine함량이 뚜렷하게 증가한 현상은 벼가 저온 감수성 식물이라는 사실을 다시 한번 상기시켜 주지만, *Passiflora*의 경우와 상이한 점은 *Passiflora*에서 감소한 glutamate가 저온 처리한 벼에서는 현저하게 증가한 반면, 벼에서 감소한 것은 asparagine+glycine이라고 하는 사실이다. 따라서, 저온 처리와 함께 벼의 유식물에서 alanine의 함량이 증가하는 것이 벼의 유식물에게 피해를 주는 하나의 요인으로 작용할 수 있는지의 여부는 보다 신중한 접근이 요구되는 사항이라 하겠다.

Asparagine aminotransferase와 asparaginase의 활성. 저온 처리한(4°C) 벼 유식물에서 대조구에 대하여 유일하게 감소한 아미노산은 asparagine+glycine이었다(Fig. 3). 그런데, 대부분의 식물에서 glycine의 함량은 asparagine의 1/10~1/200에 불과하기 때문에(Sagisaka, 1987) asparagine+glycine의 peak는 주로 asparagine에 해당되는 것으로 생각된다. 따라서, 저온 처리한 벼에 있어서 asparagine의 감소와 더불어 alanine의 현저한 증가는 우선 asparagine의 분해 과정이 저온과 관련되어 있음을 시사하여 준다. Asparagine은 두 가지 주요한 대사 경로를 통하여 변화하는데, 이들 대사 경로에 관여하는 효소들이 asparagine aminotransferase와 asparaginase이다. 이와 같은 실로부터 벼의 유식물에서 저온 처리가 asparagine aminotransferase와 asparaginase의 활성에 미치는 영향을 조사하였다. Asparagine aminotransferase는 대조구와 4°C처리구에서 처리 후 3일 째까지 비슷한 활성을 보였으나 처리 후 5일 째에 4°C처리구의 활성이 대조

Table 2. The activities of asparagine aminotransferase from the leaves of rice seedlings grown und low temperaturc

Days	Asparagine aminotransferase activity(Δ A289/mg protein·h)	
	Temperaturc(°C)	
	28	4
0	0.67	-
3	0.69	0.68
5	3.01	1.72

Table 3. The activity of asparaginase from the leaves of rice seedlings grown at 4 for 3 days

	Asparaginase activity(nmol asparagine converted/mg protein · h)	
	Temperature(°C)	
	28	4
	3.07	71.03

구에 비하여 4% 감소하였다(Table 2). 반면에 asparaginase의 활성은 4°C처리구에서 처리 후 3일 째에 대조구에 대하여 약 2배 증가하였다(Table 3). 이와 같은 결과는 저온에서 asparagine의 분해 경로가 asparagine aminotransferase를 이용하기 보다는 주로 asparaginase를 통하여 이루어짐을 시사하여 준다. 따라서, 저온 처리한 벼에서 나타나는 alanine의 현저한 증가를 asparagine aminotransferase의 활성 변화와 관련시켜 설명할 수는 없었지만, 저온 처리시 asparagine이 감소한 현상은 저온에서 asparaginase의 활성이 현저하게 증가한 사실로부터 설명 가능한 것으로 보인다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 저온 처리한(15 및 4°C)벼의 유식물에서 총유리 아미노산의 함량이 증가한 것은 저온 처리시 수용성 단백질의 함량이 증가한 사실에 비추어 체내 단백질이 분해된 데서 기인한 것이 아니라 아미노산의 생합성이 증가하였기 때문인 것으로 사료되었다. 또, 증가한 아미노산의 조성을 조사하였을 때, alanine의 함량이 현저하게 증가하고 반대로 asparagine의 함량이 감소한 것은 저온처리시 나타나는 벼 유식물의 중요한 특징의 하나로 볼 수 있으며, 저온 저항성 식물에서 볼 수 있는 바와 같은 proline의 증가 현상과는 매우 대조적이다. 뿐만 아니라, 저온 처리시 감소하는 asparagine의 경우, 그 분해 과정은 asparaginase에 의하여 주도적으로 수행되는 것으로 해석되었다.

적 요

저온처리(15 및 4°C)가 벼(*Oryza sativa* L. cv. Chucheong)유식물의 총유리 아미노산 함량 및 아미노산 조성에 미치는 영향을 조사하고 가장 현저하게 변화된 아미노산의 대사와 관련된 일부 효소의 활성을 조사하였다. 벼 유식물에 대한 저온 처리시 수용성 단백질의 함량은 증가하고 전 질소 함량은 감소하였다. 총 유리 아미노산의 함량은 증가하였고 이와 같은 증가는 저온에서 단백질이 분해된 때문이 아니라 아미노산의 합성이 증가하였기 때문인 것으로 보였다. 또한, 저온 처리시 아미노산의 조성을 조사하였을 때 대조구의 유식물에서 asparagine+glycine이 가장 풍부하게 존재하였으나 3일간의 저온 처리 후 이들 아미노산은 대조의 60% 수준으로 감소하였다. 한편, alanine은 저온 처리에 의하여 가장 많이 증가하였고 glutamine, proline, aspartic acid, valine 및 tyrosine 역시 크게 증가한 것으로 나타났다. 저온에서 asparagine+glycine의 감소를 조사하기 위하여 asparagine의 분해에 관여하는 효소인 asparaginase와 asparagine aminotransferase의 활성을 조사한 결과 asparagine aminotransferase의 활성은 감소한 반면 asparaginase의 활성은 크게 증가하였다. 따라서 저온처리한 벼의 유식물에서 asparagine의 분해에 관여하는 효소는 asparaginase인 것으로 해석되었다.

참 고 문 헌

- Burke, M. J., L. V. Gusta, H. A. Quamme, C. J. Weiser and P. H. Li. 1976. Freezing and injury. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **27** : 507-528.
- Chu, T. M., M. Jusaitus, D. Aspinall and L. G. Palcg. 1978. Accumulation of free proline at low temperatures. *Physiol. Plant.* **43** : 254-260.
- Draper, S. R. 1972. Amino acid changes associated with low temperature treatment of *Lolium perenne*. *Phytochemistry* **11** : 639-641.
- Ebert, R. F. 1986. Amino acid analysis by HPLC: optimized conditions for chromatography of

- phenylthiocarbonyl derivatives. *Anal. Biochem.* **154** : 431-45.
- Graham, D. and B. D. Patterson. 1982. Responses of plants to low, nonfreezing temperatures: Proteins, metabolism and acclimation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **33** : 347-72.
- Heber, U., L. Tyankova and K. A. Santarius. 1971. Stabilization and inactivation of biological membranes during freezing in the presence of amino acids. *Biochim. Biophys. Acta* **241** : 578-592.
- Heinrikson, R. L. and S. C. Meredith. 1984. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.* **136** : 65-74.
- Ireland, R. J. and K. W. Joy. 1981. Two routes for asparagine metabolism in *Pisum sativum* leaves. *Planta* **151** : 289-292.
- Jackson, M. L. 1967. Nitrogen determinations for soils and plant tissue. In: Soil Chemical Analysis. pp. 183-204. Prentice-Hall, New Delhi.
- Kacperska-Palacz, A. 1978. Mechanism of cold acclimation in herbaceous plants. In: Plant Cold Hardiness and Freezing Stress: Mechanisms and Crop Implications. Li, P. H. and A. Sakai(eds.), 416p. Academic Press, New York.
- Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Vol. 1. Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses. pp. 2-64. Academic Press, New York.
- Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagents. *J. Biol. Chem.* **193** : 256-275.
- Lyons, J. M. 1973. Chilling injury in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **24** : 445-466.
- Mcza-Basso, L., P. Guarda, D. Rios and M. Alberdi. 1986. Changes in free amino acid content and frost resistance in *Nothofagus dombeyi* leaves. *Phytochemistry* **25** : 1843-1846.
- Minamikawa, T., T. Akazawa and I. Uritani. 1961. Mechanism of cold injury in sweet potatoes. II. Biochemical mechanism of cold injury with special reference to mitochondrial activities. *Plant Cell Physiol.* **2** : 301-309.
- Park, I. -K. and S. Tsunoda. 198. Photosynthetic responses of rice varieties to low temperature treatment, with special reference to soluble sugars and starch in the leaves. *Japan. J. Breed.* **33** : 404-410.
- Patterson, B. D., J. A. Pearson, L. A. Payne and I. B. Ferguson. 1981. Metabolic aspects of chilling resistance: Alanine accumulation and glutamate depletion in relation to chilling sensitivity in passionfruit species. *Aust. J. Plant Physiol.* **4** : 541-554.
- Pauli, A. W. and H. L. Mitchell. 1960. Changes in certain nitrogenous constituents of wheat as related to cold hardiness. *Plant Physiol.* **25** : 539-542.
- Place, G. A., M. A. Siddiqui and B. R. Wells. 1971. Effects of temperature and flooding on rice growing in saline and alkaline soil. *Agron. Jour.* **63** : 62-65.
- Rosinger, C. H., J. M. Wilson and M. W. Kerr. 1984. Changes in the soluble protein and free amino acid content of chill-sensitive and chill-resistant plants during chilling and hardening treatments. *J. Exp. Bot.* **35** : 1460-1471.
- Sagisaka, S. S. 1974. Effect of low temperature on amino acid in wintering poplar. *Plant Physiol.* **53** : 319-322.
- Sagisaka, S. 1987. Amino acid pools in herbaceous plants at the wintering stage and at the beginning of growth. *Plant Cell Physiol.* **28** : 171-178.

- Sagisaka, S. and T. Araki. 1983. Amino acid pools in perennial plants at the wintering stage and at the beginning of growth. *Plant Cell Physiol.* **24** : 479-494.
- Seferiadis, K. S., S. Frillingos and O. Tsolas. 1987. Amino acid analysis by PITC derivatization. *Chromatogram. Sept.* **2**.
- Singh, T. N., L. G. Paleg and D. Aspinall. 1973. Stress metabolism. I. Nitrogen metabolism and growth in the barley plant during water stress. *Aust. J. Biol. Sci.* **26** : 45-56.
- Srivastva, G. C. and L. Fowden. 1972. The effect of growth temperature on enzymic and amino acid levels in wheat plants. *J. Exp. Bot.* **23** : 921-929.
- Tan, S. C. 1980. Phenylalanine ammonia-lyase and the phenylalanine ammonia-lyase inactivating system-effects of light temperature and mineral deficiencies. *Aust. J. Plant Physiol.* **7** : 159-166.
- Tromp, J. and J. C. Ova. 1984. Effect of root temperature on the amino-nitrogen composition of leaves in successive segments of apple shoots. *Physiol. Plant.* **62** : 209-214.
- Yelenosky, G. 1978. Cold hardening 'Valencia' orange trees to tolerate -6.7 without injury. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **103** : 449-452.
- Yelenosky, G. 1979. Accumulation of free proline in citrus leaves during cold hardening of young trees in controlled temperature regions. *Plant Physiol.* **64** : 425-427.
- Yemm, E. W. and E. C. Cocking. 1955. The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst.* **80** : 209-213.
- 추가 : Asparagine + glycine에서 대부분(90%이상)이 asparagine을 추후실험(HPLC)에서 확인되었읍니다.

(1989. 8. 22 接受)