

대두 발아중 오존수 처리가 acid phosphatase 및 배유세포의 형태학적인 변화

박 홍 덕

대구가톨릭대학교 생물학과

Ozone-water Treatment on the Morphological Changes of Endosperm cell and the activity of Acid Phosphatase during Soybean(*Glycine max*) Germination

Park Hong Duok

Dept. of Biology, Catholic University of Daegu, Kyongbuk 712-702, Korea

Abstract

The effect of ozone-water treatment on the morphological changes of endosperm cells and the activity of acid phosphatase during *Glycine max* germination was investigated with electron microscope. Acid phosphatase showed the activity in the cell organelles of germinating endosperm of seed, and its' activity occurs in 12 hrs cultivation after 0.5 ppm ozone-water treatment. As the differentiation of endosperm, reaction products of the acid phosphatase appear to be accumulated in vacuole after treatment of ozone-water. This result confirm that acid phosphatase is involved in the decomposition and translation of the intracellular storage materials. The characteristics of organelle in the endosperm cell during germination were discussed.

Key words – *Glycine max*, ozone-water, morphological changes, acid phosphatase

서 론

오존(ozone)은 생태계에서 어떤 특정한 성분과 선택적으로 결합하거나 축적되지 않지만 광화학산물의 대부분을 차지하며 독성이 높아 식물체에 직접적으로 심각한 영향을 주어 많은 손상을 초래한다[1]. 오존층은 생물체에 해로운 자외선을 흡수하여 동·식물체에서 보호막의 역할을 하고 있다. 지표로부터 10km이내의 대류권에 있는 10%의 오존은 강한 산화제의 특성으로 적당량이 있을시에는 살균, 탈취 등의 작용이 있다[28,38]. 식물체에서 과량의 오존(O₃)은 잎

의 노화, 성장 억제 등의 대사작용을 억제하는 현상을 초래한다[21,22]. 1900년대부터 오존은 산업분야에서 오염된 미생물에 처리하여 이용되었고, 그 후 식품에 오존을 처리하여 미생물의 살균효과[4,7], 달걀 보존, 어류 저장, 채소류, 곡류 및 청과물의 보존[17] 및 aflatoxin의 분해[6,8]에 대해서 많이 보고되고 있다. 요즘은 발아식품에 처리하여 생육촉진 뿐만 아니라 발아중에 일어나는 각종 미생물들을 사멸시킨다고 한다[16]. 그러나 식물에 오존수를 처리하여 형태학적인 변화에 관해서 보고되어 있는 것이 거의 없다.

그러므로 본 연구는 대두 발아 중에 오존수의 농도를 달리하여 종자에서 배유세포내 세포소기관과 acid phosphatase의 변화상을 규명하였다.

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 053-850-3773, Fax :
E-mail : hdpark@cuth.cataegu.ac.kr

재료 및 방법

제주도산 콩나물 콩인 준저리(*Glycine max* Merr cv. Joonjuli)의 개체중량이 $100 \pm 10\text{mg}$ 인 것을 시료로 하였다. 오존발생장치는 대기를 이용하여 전압으로 발생량을 조절하는 오존발생기(Woo-Sung Hi Tech Co., SP-100, Korea)를 사용하였고, 용존오존농도는 오존모니터(Ebara Jitsugyo Co., PL-320, Jap)로 측정하였다. 오존수의 농도는 air상태로 출구농도가 100~1500ppm인 것을 전압에 의해서 농도를 조절하여 수중 오존 농도를 0.1, 0.3 및 0.5ppm으로 각각 맞춰 20분간 처리한 후 8시간 침수시킨 종자를 72시간 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 에 배양한 것을 공시시료로 하였다.

각 시료에서 배를 포함한 배유 소편(1mm^3)을 paraformaldehyde-glutaraldehyde용액에서 1시간 전고정한 후 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 수세하였다. 시료의 일부는 약 $50\mu\text{m}$ 의 절편을 만들어 acid phosphatase [10] 반응기질을 37°C 에서 20분간 각각 반응시켰고 대조구는 기질반응을 생략하였다. 기질에 반응시킨 후의 공시재료는 막성구조를 현저하게 관찰하기 위하여 0.8% potassiumhexacyanoferrate가 함유된 OsO_4 용액에 후고정한 후 [23] 위와 동일한 완충용액으로 수세하였다. 저농도에서 고농도의 알콜 순으로 탈수하여 LR White(high)로 60°C 에서 24시간 처리한 후 포매하였다. 포매된 시료는 $1\mu\text{m}$ 두께로 절편을 만든 후 toludin blue로 염색하여 관찰 대상부위를 확인한 다음 동일한 부위에서 uranyl acetate-lead citrate로 이중 염색한 후 투과전자현미경(Hitachi-7000)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

오존수를 처리한 후 대두 종자에서 배유세포의 세포질은 인삼의 배유에서 보는 바와 같이[19] 대부분 스페레조움(spherosome)과 단백질립(protein body)으로 구성되어 있다(Fig. 1A, 1B, 2). 식물 종자가 성숙함에 따라 배유세포 내의 지질과립은 화학적 조성과 형태학적인 특성에 따라 저장지방, 지질소낭, 유적, oleosome, 지질체 및 mitosome, 스페레조움 등으로 다양하게 분리위지고 있으므로[2,11,26, 32,34], 지질과립에 대한 연구는 앞으로 더욱 추구하여야 될 것 같다. 단백질립은 전자밀도가 높은 무정형의 물질

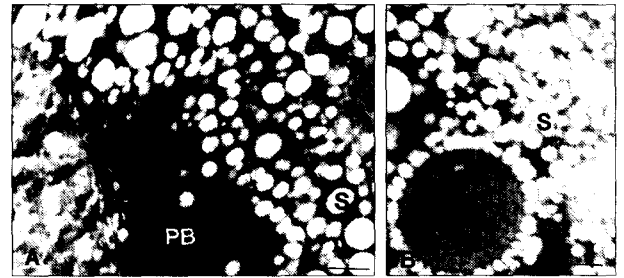


Fig. 1. Electron micrographs of endosperm cells during *Glycine max* seed germination after ozone-water treatment.

A) 0.1ppm treatment. Electron dense protein body and spherosome in the endosperm. B) 0.3ppm treatment. Electron dense protein body and round shaped electron lucent spherosome are observed. PB, protein body; S, spherosome. Bars= $0.5\mu\text{m}$ (A~B).

(Fig. 1A)과 전자밀도가 낮은 단백질성 기질(Fig. 1B)로 된 것으로 나타났다. 단백질립은 종자의 배 성장에 필요한 에너지원으로 알려지고 있으나 이들의 형성과 분해과정 및 화학적인 성분은 현저하게 밝혀져 있지 않다.

Kim[16]은 콩나물에 오존수를 처리하면 성장이 촉진되고, 재배기간도 단축된다고 하였는데, 대두를 오존처리한 후 발아 초기에 배유세포내에서 스페레조움과 단백질립 주위에는 세포소기관이 거의 나타나지 않았으나(Fig. 1A, 1B), 0.5ppm의 오존수를 처리하여 12시간 발아시킨 배유세포에서는 소포체에서 acid phosphatase활성이 나타났다(Fig. 2). 이러한 현상은 오존수를 처리하면 종자의 생육이 대조군보다 빠르게 나타나는 것으로 여겨진다.

0.1ppm의 오존을 처리하여 24시간 배양한 배유세포에는 색소체, 소포체, 스페레조움이 나타났고(Fig. 3A), 효소 활성(Fig. 3B)은 소포체에서 나타났다. 0.3ppm의 오존수를 24시간 처리한 배유세포의 세포질, 소포체, 원형질막, 단백질립 등에서 효소 활성이 나타났는데(Fig. 3C, 3D), 이것은 Van der Wilden과 Herman[35]의 견해와 일치하나 Jones [15]은 이외에도 스페레조움에 활성이 나타나는 것으로 보고되어 있다.

Shigezo와 Ichizo[31]은 콩나물이 발아할 때 오존을 처리하면 superoxide dismutase(SOD) 활성을 촉진하여 체내의 생육을 저해하는 과산화물을 분해시킨다고 하였다. 김[16]은 오존수를 처리하면 24~36시간에서 SOD 활성이 높다고 하였다.

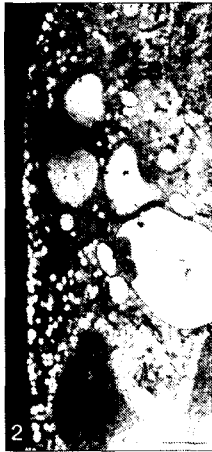


Fig. 2. Electron micrographs of endosperm cells during *Glycin max* seed germination after ozone-water treatment.

12 hrs germination. Reaction substrate of acid phosphatase after 0.5ppm treatment. Endoplasmic reticulum in observed its enzyme activity. ER, endoplasmic reticulum. Bar=0.5 μ m.

배유세포가 분화됨에 따라 세포내 acid phosphatase의 활성이 나타나면서 단백질은 다양하게 분해되는 양상을 보여 전자밀도가 다르게 나타났는데(Fig. 3C, 3E), Melroy와 Jones[24]는 종자 발아과정에서 acid phosphatase는 골지체를 통해 세포외부로 방출하고, Jones[15]는 이 효소가 골지체와 소포체에 의하여 합성되고, 세포내 이동에 관여한다고 보고하였다. 이와 같이 대두의 배유세포에서도 저장물질이 분해됨에 따라 세포소기관에 acid phosphatase 활성이 나타나는 것으로 보아 이 효소는 저장물질의 분해와 이동과정에 관련되어 있는 것으로 사료된다. Acid phosphatase의 활성은 단백질과 그 함유물내[35], 구상체의 주요성분인 phytin 주변[29] 또는 단백질의 구상체[20]에 산재되어 있고, Jelsema 등[14]은 호분층[9,13,37]의 스페레조움에서 acid phosphatase의 활성이 나타난다고 하였다.

배유세포가 점차 분화됨에 따라 세포질은 충만하였고, 세포소기관도 증가하기 시작하였다(Fig. 3D, 3F). 또한 액포내에는 acid phosphatase의 반응 산물이 축적되어 있었다(Fig. 3E, 4A). 0.5ppm의 처리에서 36시간 배양시킨 배유세포에서는 스페레조움에 acid phosphatase 활성이 나타나고(Fig. 4C), 다른 한편에서는 이 효소의 분해산물도 관찰되었다.

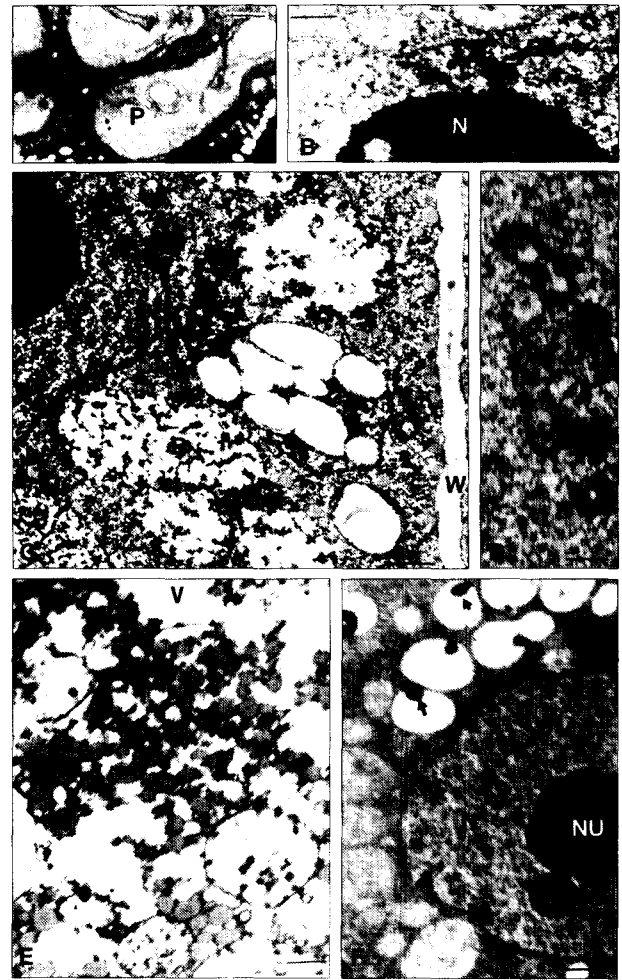


Fig. 3. Electron micrographs of endosperm cells during *Glycin max* seed germination after ozone-water treatment.

24 hrs germination. A) 0.1ppm treatment. Plastid, endoplasmic reticulum and spherosome in the endosperm are observed. B) Reaction substrate after acid phosphatase after 0.1 ppm treatment. Enzyme activities appear on the cytoplasm. C) 0.3ppm treatment. Acid phosphatase activities appear on the cytoplasm, endoplasmic reticulum, plasma membrane and protein bodies after treatment of 0.3ppm. Loosed protein matrix are present in the protein body. D) Acid phosphatase activities appear on cytoplasm after treatment of 0.3ppm. E) Degraded process of the protein body are observed in the endosperm cell after treatment of 0.5ppm. F) Reaction products(arrows) of its enzyme appear to be accumulated in vacuole after treatment of 0.5ppm. ER, endoplasmic reticulum; M, mitochondria; N, nucleus; P, plastid; PB, protein body; V, vacuole; W, cell wall. Bars=1 μ m(C~F) and 0.5 μ m(A~B).

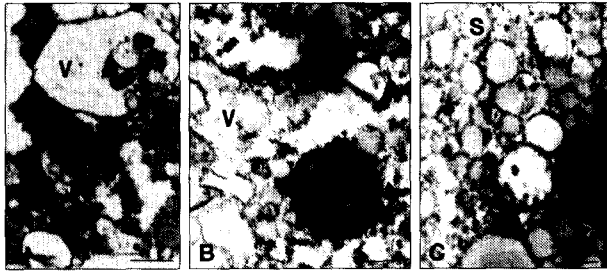


Fig. 4. Electron micrographs of endosperm cells during *Glycin max* seed germination after ozone-water treatment. 36 hrs germination. A) 0.1ppm treatment. Spherosome and vacuole in endosperm cell. B) 0.3ppm treatment. Vacuole in endosperm cell. C) Action substrate of acid phosphatase after 0.5ppm treatment. Acid phosphatase activities appear on spherosomes. Also reaction products of its enzyme in spherosome. S, spherosome; V, vacuole. Bars=1 μm (A, C) and 0.5 μm (B).

분화하고 있는 배유세포에 존재하는 색소체는 종, 부위에 따라 틸라코이드가 내포된 엽록체[3], 단백질형성체[28] 및 색소체내 osmiophilic body[36]가 나타난다고 보고되고 있다. 0.1ppm의 오존수 처리구에서 24시간 배양한 후의 세포에서는 색소체, 소포체 등이 나타났을 뿐(Fig. 2, 3A, 3B) 그 외의 세포소기관은 관찰되지 않았다. 대두의 색소체내에는 분화되어 있지 않은 라멜라만 나타나고, 전분립은 전혀 나타나지 않았는데(Fig. 3A), 김 등[19]은 인삼의 배유세포에서도 전분립은 전혀 나타나지 않았고, 배의 유근부, 배축 및 자엽의 외면부 세포에는 전분을 함유한 색소체가 나타난다고 하였다.

오존을 처리하여 48시간 한 배유세포에서는 스페레조움과 단백질립이 분해되기 시작하여 액포내 그 분해산물이 나타나고(Fig. 5A), 신장된 소포체(Fig. 5C)와 현저한 핵이 나타났다(Fig. 5D).

72시간 배유세포에서는 퇴행과정이 진행되어 스페레조움과 단백질립이 분해되기 시작하였다. 대두에서 처음에 배는 신장하였으나 배와 인접한 배유세포들은 계속 분해·소실되어 배유의 크기는 점차 감소되어 배가 발달하는데 양분공급의 역할을 수행하고 있음을 보여준다.

액포내에는 팽창한 미토콘드리아가 나타나고(Fig. 6A, 6E), 신장된 소포체(Fig. 6D)가 나타났다. Bhatanagar과 Sawhney [3]는 목화속, 냉이속 등이 수정한 후 배유세포내의 미토콘드리아에서는 분화되지 않은 크리스테를 가지고 있다고 하

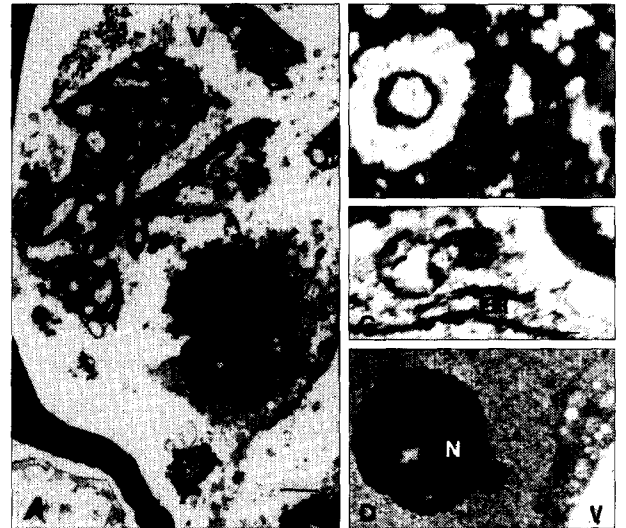


Fig. 5. Electron micrographs of endosperm cells during *Glycin max* seed germination after ozone-water treatment. 48 hrs germination. A) Action substrate after 0.1ppm treatment. Degraded process of the protein body in vacuole. Reaction products(arrow) of the its enzyme appear to be accumulated in vacuole. B) 0.1ppm treatment C) 0.3ppm treatment. Degraded process of the protein body and spherosomes(B and D). In endosperm cell, endoplasmic reticulum. D) 0.5ppm treatment. Nucleus are observed. ER, endoplasmic reticulum; N, nucleus; V, vacuole. Bars=1 μm .

였다. 이와 같이 크리스테가 팽창하는 것은 세포내의 생화학적 활성화에 기인한 것으로 사료된다.

식물세포의 분화과정에서는 액포가 발달하는데 세포질에서 myelin figures[5], membrane complex[33], cytolysosomes [25], multivesicular body[12]등으로 알려진 다층막성구조는 액포형성과 밀접한 관계가 있고, 이 구조는 원형질막의 함입으로 분화되는 경우[18]와 세포질내에서 활면소포체가 세포질의 일부를 분리시켜 다층막성계로 분화하여[25] 액포내로 유리되어 자식성 소화과정을 거쳐 1차 액포가 확장되거나 또는 2차 액포가 형성되는 것으로 알려져 있다.

대두의 액포내에는 전자밀도가 높은 동심원상의 막성 구조물인 다층막성 구조가 세포질에서 유리된 것으로 보인다(Fig. 6B).

0.3ppm의 오존을 처리하여 72시간 배양한 배유세포에서는 현저한 인이 내포된 커다란 핵이 나타나고, 핵 주위에는 소포체가 나타난다(Fig. 6I). 배유세포내에서는 색소체

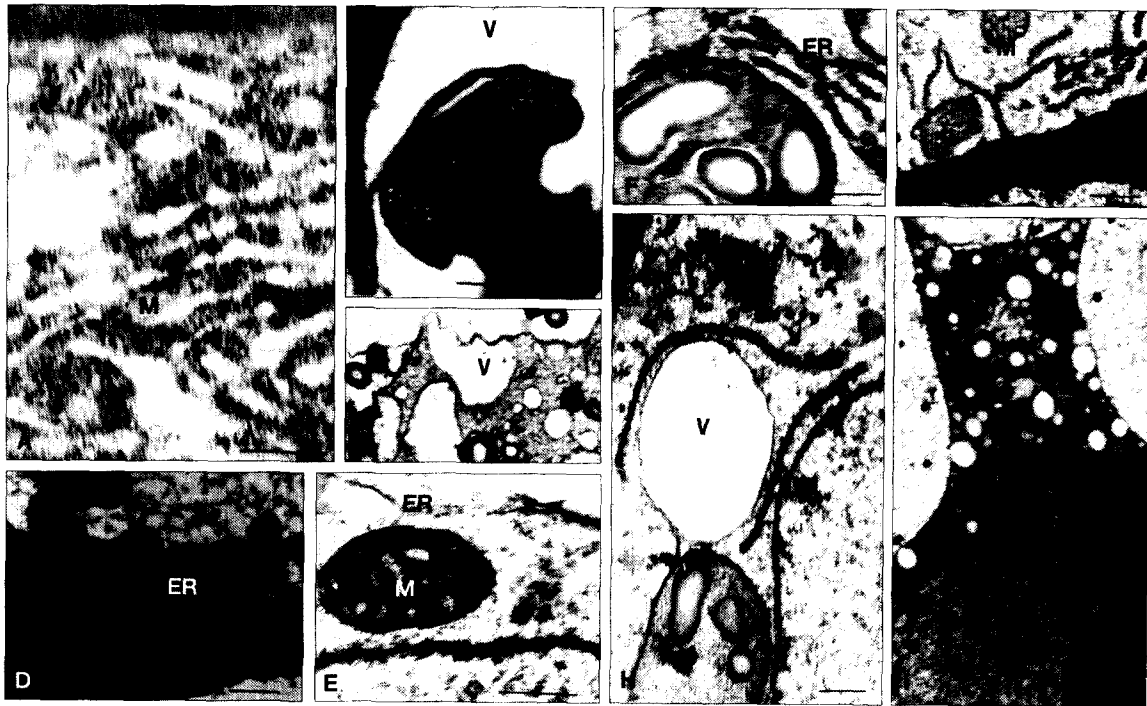


Fig. 6. Electron micrographs of endosperm cells during *Glycin max* seed germination after ozone-water treatment. 72 hrs germination. A)~E) 0.1ppm treatment. Expanded mitochondria and multivesicular body in vacuole. F)~H) 0.3ppm treatment. Plastid, mitochondria and vacuole in endosperm cell are observed. I) Reaction substrate of acid phosphatase after 0.3ppm treatment. Reaction products of its enzyme are observed in vacuole. ER, endoplasmic reticulum; M, mitochondria; N, nucleus; P, plastid; V, vacuole; W, cell wall. Bars=1 μ m(A,D,F,I) and 0.5 μ m(B,C,E,G,H).

나타났다. 액포 주위에는 acid phosphatase의 분해산물이 (Fig. 6F), 소포체(Fig. 6F, 6H, 6I), 미토콘드리아(Fig. 6G)가 관찰되었고, 분화중인 배유에서는 핵과 액포가 세포의 대부분을 차지하는데(Fig. 6I), 이러한 현상은 대두의 배유가 퇴행과정을 거치는 것으로 여겨진다

요 약

대두 발아중 오존수 처리에 의한 배유세포와 산성 인산화효소의 변화에 관해서 전자현미경으로 조사한 결과는 다음과 같다. 산성 인산화효소의 활성은 발달하고 있는 종자 배유의 여러 소기관에서 나타났는데, 효소의 활성은 0.5 ppm 오존수를 처리한 후 12시간 배양중에 나타났다. 오존수를 처리한 후 배유가 분화함에 따라 산성 인산화효소의 반응산물은 액포내에 축적되는 것으로 나타나는데, 이것은 산성 인산화효소가 세포간 저장물질의 분해와 이동에 관여하는 것으로 여겨진다.

참 고 문 헌

1. Aber, J. D. and J. M. Melillo. 1991. Terrestrial Ecosystems. Saunder College Publishing.
2. Adams, C. A. and L. Nonellie. 1975. Composition and structure of protein bodies and spherosomes isolated from ungerminated seeds of *Sorghum bicolor* Monch. *Plant Physiol.* 55, 1-6.
3. Bhatanagar, S. P. and V. Sawhney. 1981. Endospermits morphology, ultrastructure and histochemistry. *Int. Rev. of Cytol.* 73, 55-102.
4. Burlison, G. R. and K. J. Caulfield, and P. Morris. 1979. Ozonation of mutagenic and carcinogenic pol-yaromatic amines and polyaromatic hydrocarbons in water. *Cancer Reser.* 39, 2149.
5. Carbonell, L. M. and J. E. Pollak. 1962. Myelin figures in yeast cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bacteriol.* 83, 1356-1357.
6. Caulfeld, H. J., G. R. Burlison and M. Pollard. 1979. Ozonation of mutagenic and carcinogenic alkylating agents, pesticides, aflatoxin B1, and benzidine in

- water. *Cancer Res.*, **39**, 2155-2159.
7. Cotruvo, J. A. 1979. Investigation of mutagenic effect of products of ozonation reaction in water. *Annals N.Y. Academic of Sciences* **298**, 124.
 8. Dolara, P., V. Ricci., D. Burrini and O. Griffini. 1981. Effect of ozonation and chlorination on the mutagenic potential of drinking water. *Bull. Environm. Toxicol.*, **27**, 1.
 9. Gabard, K. A. and R. L. Jones. 1986. Localization of phytase and acid phosphatase isoenzymes in aleurone layers of barley. *Physiol. Plant.* **67**, 182-192.
 10. Gahan, P. B. 1984. Plant histochemistry and cytochemistry. An introduction, Academic Press. 217-219.
 11. Guilliermond, A. 1941. The cytoplasm of the plant cell. Chonica Botanica Co., Waltham, Mass. pp. 170-173.
 12. Halperin, W. and A. C. Jensen. 1973. Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures. *J. Ultrastruct. Res.* **18**, 428-432.
 13. Hooley, R. 1984. Gibberellic acid controls specific acid phosphatase isoenzyme in aleurone cells and protoplasts of *Avena fatua* L. *Planta* **161**, 355-360.
 14. Jelsema, C. L., M. J. Powell, D. J. Morre, M. Ruddat and H. H. Mollenhauer. 1980. Isolation of lamellar bodies from aleurone layers wheat grains. *Bot. Gaz.* **141**, 34-56.
 15. Jones, R. L. 1987. Localization of ATPase in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus of barley aleurone. *Protoplasma* **138**, 73-88.
 16. Kim, I. D. 2000. Effect on ozone water treatment on growth and quality of soybean sprouts. Ph. D. Thesis. Catholic University of Daegu.
 17. Kim, I. D. and S. D. Kim. 1991. Ozone treatment for circulation of fresh poultry meat. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **20**, 483-487.
 18. Kim, W. K., C. W. Kim, H. D. Park and H. Y. Yang. 1976. Electron microscopic studies on the multivesicular bodies and cytolysosomes. *Kor. J. Elect. Micros.* **6**, 21-32.
 19. Kim, W. K., H. D. Park, E. S. Kim, E. S. Kim and S. S. Han. 1979. Ultrastructural changes during germination of ginseng seeds(*Panax ginseng*). *Korean J. Electron microscopy* **9**, 57-64.
 20. Kim, W. K. 1984. Ultrastructural and histochemical studies of the ginseng seed. Matured endosperm cells. *Korean J. Electron Microscopy* **14**, 15-28.
 21. Mansfield, T. A. and M. Pearson. 1993. Ozone, sulphur dioxide and nitrogen oxides: So Effects on the water relations of herbaceous plants and trees. pp. 77~88. In *Interacting Stresses on Plants in a Changing Climates*(Ed. By Michael B.Jackson), Springer-Verlag.
 22. Mansfield, T. A. and M. Pearson. 1993. Physiological Basis of Stress Imposed by Ozone Pollution, pp. 155~170. In *Plant Adaptation to Environmental Stress* (Ed. By Leslie Fowden et al.), Chapman & Hall.
 23. McDonald, K. 1984. Osmium ferricyanide fixation improves microfilament preservation and membrane visualization in a variety of animal cell types. *J. Ultr. Res.* **86**, 107-118.
 24. Melroy, D. and R. L. Jones. 1986. The effect of monensin on intracellular transport and secretion of α -amylase isoenzymes in barley aleurone. *Planta* **167**, 252-259.
 25. Mesquita, J. F. 1972. Ultrstructure de formations comporables aux vacuoles autophagiques dans des racines de l'*Allium cepa* L. et du *Lupinus albus* L. *Cytologia* **37**, 95-110.
 26. Mollenhauer, H. H. and C. Totten. 1971b. Studies on seeds. II. Origin and degradation of lipid vesicles in pea and bean cotyledons. *J. Cell Biol.* **48**, 395-495.
 27. Morton, R. K. and J. K. Raison. 1963. A complete intracellular unit for incorporation of amino acids into storage protein utilizing adenosine triphosphate generated from phytate. *Nature* **200**, 429-434.
 28. O'Donovan, D. C. 1965. Treatment with ozone. *J. AWWA*, pp. 1167-1193.
 29. Pernollet, J. C. 1978. Protein bodies of seeds. Ultrastructure, biochemistry, biosynthesis and degradation. *Phytochemistry* **17**, 1473-1480.
 30. Poux, N. 1963. Localization de l'active phosphatasique acide et des phosphates dans les grains d'aleurone. I. Grains d'aleurone refermant a la fois globoides et cristalloides. *J. Microsc.* **4**, 771-782.
 31. Shigezo, N. and S. Ichizo. 1989. Effect of ozone treatment elongation of hypocotyl and microbial counts of bean sprouts. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **36**, 181-188.
 32. Sorokin, H. P. 1967. The spherosomes and the reserve fat in plant cells. *Amer. J. Bot.* **54**, 1008-1016.
 33. Thomas, P. L. and P. K. Issac. 1967. An electron microscope study of intravacuolar bodies in the uredia of wheat stem rust and in hyphae of other fungi. *Can. J. Bot.* **45**, 1473-1478.

34. Van der Eb, A. A. and P. J. Nieuwdrop. 1967. Electron microscopic structure of the aleurone cells of barley during germination. *Acta Botanica Neerlandica* **15**, 690-699.
35. Van der Wilden, W. and E. M. Herman. 1980. Protein bodies of mung bean cotyledons as autophagic organelles. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **77**, 428-432.
36. Vigil, E. L. 1970. Cytochemical and developmental changes in microbodies(glyoxysomes) and related organelles of castor bean endosperm. *J. Cell Biol.* **46**, 435-454.
37. Yamagata, H., K. Tanaka and Z. Kasai. 1979. Isoenzymes of acid phosphatase in aleurone particules of rice grains and their interconversion. *Agric. Biol. Chem.* **43**, 2059-2066.
38. Yang, P. P. W. and T. C. Chen. 1979. Stability of ozone and its germicidal properties on poultry meat microorganism in liquid phase. *J. Food Sci.* **44**, 501-504.

(Received July 18, 2001; Accepted August 31, 2001)