

## 저온 처리한 보리 유식물 잎의 설탕함량과 Invertase의 활성변화

李 明 愛·孟 柱 善\*·金 相 九·權 寧 命

(서울대학교 自然科學大學 生物學科, \*西江대학교 理工大學 生物學科)

### Changes of Sucrose Content and Invertase Activity in Leaves of Barley Seedlings under Low Temperature

Lee, Myung Ae, Ju Sun Maeng\*, Sang Gu Kim and Young Myung Kwon

(Department of Biology, College of Natural Sciences, Seoul National University, Seoul and

\*Department of Biology, College of Science and Engineering, Sogang University, Seoul)

#### ABSTRACT

Changes of contents of reducing sugar and sucrose and activities of sucrose-phosphate synthase, sucrose synthase and invertase from the leaves of barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Chalssal) seedlings grown at 4°C were investigated, and the property of acid invertase were also examined. In the seedlings grown at 4°C for 3 days, the contents of reducing sugar and sucrose were increased to 1.3 and 2.4 times, respectively. Activity of acid invertase was decreased markedly by cold treatment while the activities of sucrosephosphate synthase, sucrose synthase, and alkaline invertase were not changed. In acid phosphatase purified partially by ammonium sulfate fractionation and DEAE-Sephacel column chromatography, the  $K_m$  value for sucrose was 9.5 mM and the optimum pH and temperature was 5.5 and 35°C respectively. This enzyme was supposed to be  $\beta$ -fructosidase by studies on the substrate specificity and the molecular weight was estimated to be 63 Kd by Sephadex G-200 gel chromatography.

#### 서 론

식물은 온도가 저하하면 각종 대사활동이 변하고 세포막의 상전이가 일어나서 생장에 변화를 일으키게 된다. 이러한 반응은 종에 따라 다르며, 같은 종의 식물에서도 온도변화의 정도와 기간에 따라서도 달라지는 것으로 유전적인 특성에 의해 결정되는 것으로 이해되고 있다(Graham and Patterson, 1982; Lyons, 1973). 일반적으로 저온저항성 식물은 저온일 때 탄수화물의 가수분해가 촉진되며, 이때 생성되는 당은 세포의 삼투 포텐셜을 조절하고, 단백질의 기능을 유지하며 세포막을 보호하는 기능을 갖는다(Ackerson, 1981; Guy, 1990; Perras and Sarhan, 1984). 그래서 벼 유식물에 환원당을 공급하면 저온에 대한 내성이 어느 정도 증가한다(Tajima and Kabak, 1981).

저온에서 일어나는 당축적에 관한 효소학적 연구는 비교적 일찍부터 진행되어서, 저온일 때 invertase의 활성중가로 환원당이 증가하는 경우(Purvis and Rice, 1983; Roberts, 1979)와, sucrosephosphate synthetase 와 sucrose synthetase의 양적증가에 원인이 있는 경우(Calderon and Pontis, 1985; Guy, 1990) 등이 알려지고, 최근에는 fructose-2, 6-bisphosphatase와의 관계도 밝혀지고 있다(Phelps and McDonald, 1989; Pollock *et al.*, 1989). 설탕대사와 관련이 높은 invertase는 세포벽, 액포, 시토플 등에 분포하며, 활성의 최적 pH에 따른 acid invertase와 alkaline invertase로 구분한다(Karuppiah *et al.*, 1989). 식물에서 acid invertase의 활성이 일반적으로 높으며, 특히 단백질 함량이 낮거나, 빠르게 소비되는 조직에서는 특히 높다(Hong and Kwon, 1991; Ricardo and ap Rees, 1970).

본 연구에서는 보리 유식물에서 저온일 때 일어나는 당의 양적변화와 이에 관련된 일부효소의 활성변화를 조사하고,

본연구는 학술진흥재단(1990년) 연구비의 일부로 수행된 것임.

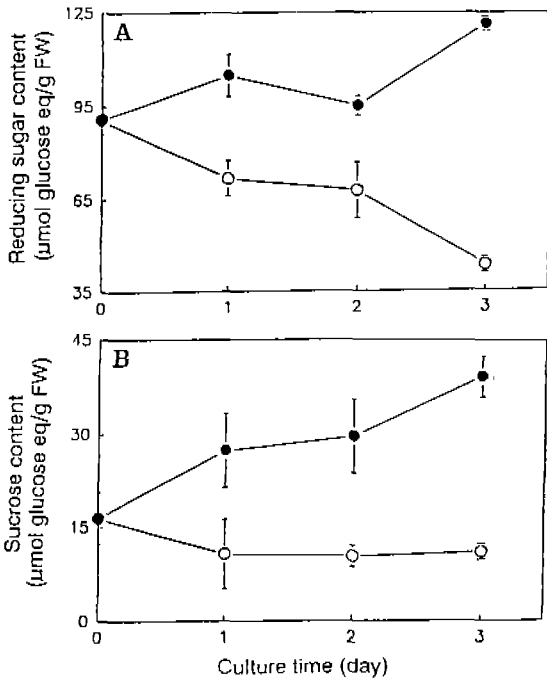


Fig. 1. Changes in the contents of reducing sugar (A) and sucrose (B) in the leaves of barley seedlings grown at 25°C (○) and 4°C (●).

활성변화가 뚜렷한 acid invertase의 성질을 조사하여 보리와 밀의 품종간의 생리생화학적 성질을 비교할 수 있는 자료를 마련하고자 하였다.

### 재료 및 방법

본 연구에서 사용한 시료는 찰쌀 품종의 보리(*Hordeum vulgare* cv. Chalsal)로서 파종전에 종자를 sodium hyperchlorite로 소독하였다. 플라스틱 용기에서 2일간 암발아한 유식물을 하루에 16시간씩 광조사(250 μE·m<sup>-2</sup>·sec<sup>-1</sup>)하면서 5일간 배양한 다음 4°C에 옮겨 배양하면서 제 1엽을 경시적으로 취하여 실험재료로 사용하였다.

채취한 잎으로부터 당을 추출하고(Sagisaka, 1987) 여기에 들어있는 환원당(Nelson, 1944)과 설탕함량(Bergmeyer and Bernt, 1974)을 측정하였다. 그리고 같은 시료에서 조효소액(Heber, 1967)을 얻어 이것으로부터 sucrosephosphate synthase 및 sucrose synthase (Stitt *et al.*, 1988) 그리고 acid 및 alkaline invertase(Hong and Kwon, 1991)의 활성을 측정하였다.

Acid invertase의 일반적 성질을 알아보기 위해서는 3일간 저온처리한 시료에서 얻은 조효소액으로부터 75%

Table 1. Changes in the activities of sucrose phosphate synthase (SPS) and sucrose synthase (SS)

Culture Temp.(°C)	Time (day)	SPS activity (μmol UDP* formed·min <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup> FW)	SS activity
25	0	11.96 ± 0.56	12.32 ± 2.62
	1	10.52 ± 1.25	11.73 ± 1.31
	2	10.27 ± 1.19	11.98 ± 2.76
	3	10.73 ± 2.23	12.34 ± 1.88
4	1	12.03 ± 2.71	12.25 ± 1.86
	2	11.03 ± 1.55	11.76 ± 2.82
	3	11.43 ± 3.19	12.55 ± 2.29

\*UDP, uridine diphosphate. Each value represents mean SD of separate three experiments.

ammonium sulfate 분획을 얻어 DEAE-Sephacel 컬럼 크로마토그래피를 실시하고, 여기에서 얻은 acid invertase 분획으로 최적 pH, 최적온도 및 기질특이성 등을 조사하였다. 분자량의 측정은 Sephadex G-200 컬럼 크로마토그래피에 의하였다.

### 결과 및 고찰

3일간의 저온처리(4°C) 보리 유식물 제 1엽의 환원당 함량은 30% 이상 증가하였고, 설탕의 경우는 240%나 그 함량이 증가하였다. 그러나 대조구에서는 환원당이 50% 이상 그리고 설탕은 30% 정도 함량저하가 일어나서(Fig. 1) 저온처리구와 대조구간의 함량비가 각각 3:1과 3.8:1 정도가 되었음을 알 수 있었다. 저온일 때 수용성 탄수화물이나 당의 함량이 증가하는 것은 일반적으로 볼 수 있는 현상이다(Levitt, 1980). 당의 증가가 저온대응에 필요한 물질대사를 유도하고 세포막의 안정화를 도모하지만(Lineberger and Steponkus, 1980; Steponkus, 1984), 생장온도 범위에서도 온도가 저하하면 48시간 이내에 세포막의 투과성이변하고 세포내 일부 물질의 함량이 변하는 것으로 보아(Kwon and Son, 1984; Moon, 1989), 온도저하에 따른 당의 함량증가가 반드시 내한성 획득이나 저온에 대한 순화에 필요한 것은 아닌 것 같다. 특히 저온감수성 식물인 벼에서도 저온처리(4°C)로 당의 함량이 크게 증가하지만 저온에 노출된 시간이 길어지면 정상온도에서도 결코 성장이 회복되지 못하는 피해가 나타난다(Moon, 1989).

저온처리에 의한 설탕함량의 증가를 설탕대사와 직접관련된 효소들의 활성과 연계시켜 보고자 sucrosephosphate synthase(SPS)와 sucrose synthase(SS)의 활성을 측정하였다. 그 결과 이 두 효소의 활성은 대조구와 저온처리구 모두에서 별다른 변화가 일어나지 않았다(Table 1). 이러한 결과는 *Chlorella*에서는 SPS가(Salerno and Pontis, 1989),

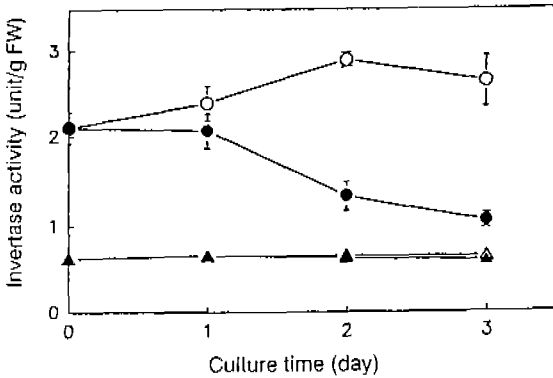


Fig. 2. Changes in the activities of acid invertase and alkaline invertase from the leaves of barley seedlings grown under low temperature. 25°C-acid invertase (○—); 4°C-acid invertase (●—); 25°C-alkaline invertase (△—); 4°C-alkaline invertase (▲—). One unit of invertase is defined as that amount which hydrolyze 1 μmol of sucrose in 1 min.

밀에서는 SS가(Calderon and Pontis, 1985) 각각 저온에서 증가한다는 내용과는 다르지만 벼에서 활성변화가 없다는 결과(Hong and Kwon, 1991)와는 같았다. 그러므로 저온일 때 설탕함량의 증가가 반드시 SPS나 SS의 활성변화와 직접 연관된 것은 아닌 것 같다.

한편 설탕의 가수분해를 담당할 acid invertase 및 alkaline invertase의 활성변화를 보면, alkaline invertase는 상대적으로 활성이 낮았으며 저온처리로 활성에 아무런 변화가 일어나지 않았다. 반면에 acid invertase는 3일간의 저온처리에 활성이 크게 저하하여서 대조구의 효소활성보다 60% 감소한 활성만을 보였을 뿐이다(Fig. 2). 저온처리한 벼에서는 이들 두 효소의 활성이 본 실험에서와 같게 변하였다(Hong and Kwon, 1991). 그러나 포도에서는 저온 처리로 활성이 증가하고 그 결과 환원당의 양적증가를 가져오며(Purvis and Rice, 1983), 밀에서는 저온에서 활성이 증가하는 동위효소와 저하하는 동위효소가 있는 것으로 보고되기도 하였다(Roberts, 1979). 본 연구에서 사용된 보리의 acid invertase는 벼(Hong and Kwon, 1991)의 경우처럼 저온에 민감한 것 같으며 이것이 설탕의 함량증가를 가져오는 요인의 하나로 해석된다(Acid invertase의 활성을 전기영동적으로 분석한 결과 동위효소는 없었으며 저온처리에 의하여 효소의 비활성이 저하하는 것을 볼 수 있었다).

Acid invertase의 일반적인 성질을 알아보기 위하여 DEAE-Sephacel 컬럼 크로마토그래피를 실시한 결과(Fig. 3) 효소의 활성 peak가 한 개로 밝혀졌고, 설탕에 대한 본 효소의  $K_m$ 은 9.5 mM로(Table 2) 백합화분의 경우(0.65

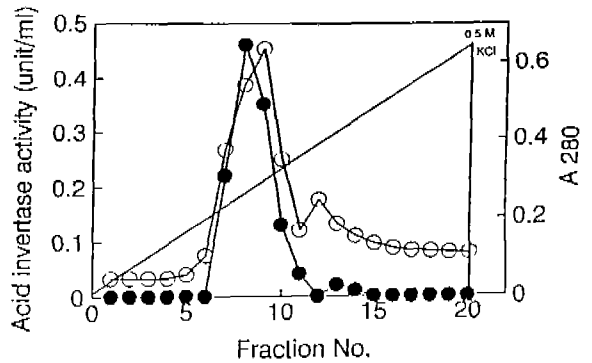


Fig. 3. DEAE-Sephacel column chromatography of acid invertase in the leaves of barley seedlings. Fractions (1.2 ml) were assayed for acid invertase activity (●—) and protein content (○—) by A280. Purification fold and enzyme yield of the peak (fraction number 7-10) were 10 and 45%, respectively.

Table 2. Michaelis constant, optimum pH and optimum temperature of acid phosphatase.

Substrate	$K_m$	Optimum pH	Optimum Temp.
	mM	pH	°C
Sucrose	9.5	5.5	35

The activity of acid phosphatase was measured in the enzyme fraction eluted from a DEAE-Sephacel column as shown in Fig. 3.

mM)보다는(Singh and Knox, 1984) 높았으나, 고구마(6 mM)(Matsushita and Uritani, 1974), 보리(12 mM)(Karupiah *et al.*, 1989)의 결과들과는 비슷한 것으로 나타났다. 그리고 최적 pH는 5.5, 최적온도는 35°C로 측정되었다(Table 2). 이러한 결과들은 백합에서 최적 pH가 4.0(Singh and Knox, 1984), 고구마에서는 4.6인(Matsushita and Uritani, 1974) 것과는 차이가 있으나 밀과 보리의 경우(pH 5.5)와는 (Krishhan *et al.*, 1985; Karupiah *et al.*, 1989) 같은 것으로 나타났다. 한편 최적온도의 경우도 포도에서 65°C까지 활성이 증가된다고 하지만(Purvis and Rice, 1983), 대개의 경우는 25~37°C 범위인 점과(Faye and Ghorbel, 1983; Matsushita and Uritani, 1974) 비교하면 본 효소의 최적온도는 이들과 같은 범위에 있음을 알 수 있다.

부분정제된 본 효소분획에 의한 기질특이성을 보면(Table 3) raffinose가 약간 이용될 수 있었으나 설탕이 가장 좋은 기질을 알 수 있었다. Melezitose와 inuline은 반응시간이 연장될 때 극히 일부의 환원당을 생성시켰으나 maltose는 결코 기질로 이용될 수 없었다. 이러한 결과로 보아 본 효소는 전형적인 β-fructosidase임을 알 수 있었다

Table 3. Activity of invertase for five saccharides

Saccharides	Activity, unit/ml (Relative activity, %)	
	30 min	80 min
Sucrose	0.98 (100)	1.18 (100)
Raffinose	0.14 (15)	0.24 (22)
Melezitose	0	0.05 (4)
Inulin	0	0.05 (4)
Maltose	0	0

The concentration of four saccharides is 50 mM and that of inulin is 0.5% (v/v). Relative activity is calculated when the activity for sucrose is taken as 100%. SD for each value do not exceed 10%.

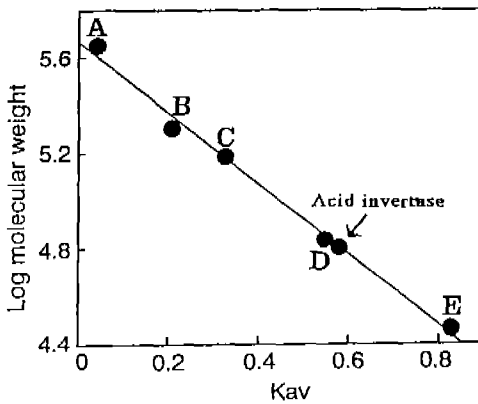


Fig. 4. Determination of molecular weight by gel filtration. Standard proteins (—●—) and acid invertase (↙) eluted from a Sephadex G-200 column with buffer containing 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0), 0.5 mM DTT. Fractions (1.8 ml) were assayed for acid invertase. A, apoferritin (443 Kd); B,  $\beta$ -amylase (200 Kd); C, alcohol dehydrogenase (150 Kd); D, BSA (66 Kd); E, carbonic anhydrase (29 Kd).

(Karuppiyah *et al.*, 1989).

한편 분자량은 63 Kd로 산출되어(Fig. 4) 귀리(63 Kd) (Pressey and Avants, 1980)의 경우와 비슷하였으나, 식물에서 acid invertase의 분자량이 48.5~450 Kd 범위에서 폭넓게 분포한다는 것은(Faye *et al.*, 1981; Singh and Knox, 1984) 종에 따라 변이가 큰 효소임을 알 수 있다.

지금까지의 결과를 종합하면 보리유식물은 저온에서 주로 acid invertase의 활성저하로 설탕함량이 증가하는 것으로 해석되며, acid invertase의 일반적인 성질은 다른 화본과 식물의 경우와 크게 다르지 않음을 알 수 있었다.

## 적 요

저온처리(4°C)하에서 보리(*Hordeum vulgare* L. cv. Chalsal) 유식물 잎의 당함량과 sucrosephosphate synthase, sucrose synthase, invertase의 활성의 변화를 측정하고, 또한 acid invertase의 성질을 조사하였다. 저온처리 3일만에 보리유식물의 환원당과 설탕의 함량은 1.3배 및 2.4배로 각각 증가하였다. 그리고 sucrosephosphate synthase, sucrose synthase 및 alkaline invertase의 활성에는 별다른 변화가 없었으나 acid invertase의 활성은 크게 저하하였다. Ammonium sulfate 분획과 DEAE-Sephacel 컬럼으로 부분정제한 acid invertase에서, 설탕에 대한  $K_m$ 은 9.5 mM 이고 최적 pH는 5.5, 최적온도는 35°C로 측정되었다. 여러 가지 기질에 대한 특이성을 조사한 결과 본 효소는  $\beta$ -fructosidase로 추정할 수 있었으며, 효소의 분자량은 Sephadex G-200 컬럼 크로마토그래피로 산출하였을 때 63 Kd이었다.

## 참 고 문 헌

- Ackerson, R.C. 1981. Osmoregulation in response to water stress. II. Leaf carbohydrate status in relation to osmotic adjustment. *Plant Physiol.* 67: 479-483.
- Bergmeyer, H.U. and E. Bernt. 1974. Sucrose. In, *Methods of Enzymatic Analysis*, H.U. Bergmeyer (ed.). Vol. 2, Academic, New York. pp. 1176-1179.
- Calderon, P. and H.G. Pontis. 1985. Increase of sucrose synthase activity in wheat plants after a chilling shock. *Plant Sci.* 42: 173-176.
- Faye, L. and A. Ghorbel. 1983. Studies on  $\beta$ -fructosidase from radish seedlings III. Comparative studies on soluble and wall-bound forms. *Plant Sci. Lett.* 29: 49-60.
- Faye, L., C. Berjonneau and P. Rollin. 1981. Studies of  $\beta$ -fructosidase from radish seedlings. I. Purification and partial characterization. *Plant Sci. Lett.* 22: 77-87.
- Graham, D. and B.D. Patterson. 1982. Response of plants to low, nonfreezing temperature: Protein, metabolism and acclimation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33: 347-372.
- Guy, C.L. 1990. Cold acclimation and freezing stress tolerance. Role of protein metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 187-223.
- Herber, U. 1967. Freezing injury and uncoupling of phosphorylation from electron transport in chloroplast. *Plant Physiol.* 42: 1343-1350.
- Hong, S.B. and Y.M. Kwon. 1991. Alteration of carbohydrate metabolism in rice seedlings under low temperature. *Korean J. Bot.* 34: 113-119.
- Karuppiyah, N., B. Vadlamudi and P.B. Kaufman. 1989. Purification and characterization of soluble (cytosolic) and bound (cell wall) isoforms of invertases in barley (*Hordeum vulgare*) elongation stem tissue. *Plant Physiol.* 91: 993-998.
- Krishnan, H.B., J.T. Blanchette and T.W. Okita. 1985. Wheat

- invertase. *Plant Physiol.* **78**: 241-245.
- Kwon, Y.M. and J.H. Son. 1984. Effects of low temperature and BASF 13-338 on the osmotic ground value and solute permeability of barley coleoptile segments. *Proc. Coll. Natur. Sci. SNU* **9**: 117-125.
- Levitt, J. 1980. Chilling injury and resistance. In, Responses of Plants to Environmental Stress. Vol. 1, Academic, New York. pp. 23-64.
- Lineberger, R.D. and P.L. Steponkus. 1980. Cryoprotection by glucose and raffinose to chloroplast thylakoids. *Plant Physiol.* **65**: 298-304.
- Lyons, J.M. 1973. Chilling injury in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **24**: 445-466.
- Matsushita, K. and I. Uritani. 1974. Change in invertase activity of sweet potato in response to wounding and purification and properties of its invertase. *Plant Physiol.* **54**: 60-66.
- Moon, B.Y. 1989. Physiological characteristics of rice seedlings under low temperature. Ph.D. thesis. Seoul Nat'l Univ., Seoul, Korea.
- Nelson, M.F. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**: 375-380.
- Perras, M. and F. Sarhan. 1984. Energy state of spring and winter wheat during cold hardening, soluble sugars and adenine nucleotides. *Physiol. Plant.* **60**: 129-132.
- Phelps, D.C. and R.E. McDonald. 1989. Changes in fructose 2,6-bisphosphate levels in green pepper (*Capsicum annuum* L.) fruit in response to temperature. *Plant Physiol.* **90**: 458-462.
- Pollock, C.J., A.J. Cairns, B.E. Collins and R.P. Wiclker. 1989. Direct effects of low temperature upon components of fructan metabolism in leaves of *Lolium temulentum* L. *J. Plant Physiol.* **134**: 203-208.
- Pressey, R. and J.K. Avants. 1980. Invertase in oat seedlings. *Plant Physiol.* **65**: 136-140.
- Purvis, A.C. and J.D. Rice. 1983. Low temperature induction of invertase activity in grapefruit flavedo tissue. *Phytochemistry* **22**: 831-834.
- Ricardo, C.P.P. and T. ap Rees. 1970. Invertase activity during the development of carrot roots. *Phytochemistry* **9**: 239-247.
- Roberts, D.W.A. 1979. Changes in the proportion of two forms of invertase associated with the cold acclimation of wheat. *Can. J. Bot.* **57**: 413-419.
- Sagisaka, S. 1987. Amino acid pools in herbaceous plants at wintering stage and at the beginning of growth. *Plant Cell Physiol.* **28**: 171-178.
- Salerno, G.L. and H.G. Pontis. 1989. Raffinose synthesis in *Chlorella vulgare* cultures after a cold shock. *Plant Physiol.* **89**: 648-651.
- Singh, M.B. and R.B. Knox. 1984. Invertase of *Lilium* pollen. *Plant Physiol.* **74**: 510-515.
- Stitt, M. 1988. *In vivo* degradation of starch granules. In, The Biochemistry of Plants, P.K. Stumpf and E.E. Conn (eds.). Vol. 14, Academic, New York. pp. 282-285.
- Steponkus, P.L. 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**: 543-584.
- Tajima, K. and N. Kabaki. 1981. Effect of sugars and several growth regulator on the chilling injury of rice seedlings. *Jap. J. Crop Sci.* **50**: 411-412.