

땅콩發芽時 貯藏蛋白質의 變化

金鐘震* · 朴栽郁* · 申東賢*

Change in Storage Protein during Germination of Peanut Seed

Jong Jin Kim* · Jea Wook Park* and Dong Hyun Shin*

ABSTRACT : This experiment was conducted to determine seed storage protein pattern and structural character of differed peanut cultivars during germination.

Soluble protein content in both Namdae and Daekwang cultivars remarkably decreased in cotyledon site at 2 or 3 days after incubation(DAI) and in embryonic axis site at 1 or 2 DAI, showing 28~29% in cotyledon site and 10% in embryonic axis site at 5 DAI. Protein subunits such as 66, 43, 40 and 35.5kD bands in the cotyledon site of Namdae and Daekwang cultivars disappeared, but 21.5-23kD band disappeared slightly, but low polypeptide band such as 14-16kD increased gradually, and the same trend has been obserbed in embryonic axis site during 2 DAI.

The amount of new protein formed during germination period was highest in cotyledon site at 3 DAI, and in embryonic axis site at 2 DAI. 16kD bend detected in cotyledon site of Daekwang cultivar during germination.

Key word : Protein pattern, Storage protein, Cotyledon, Embryonic axis, Polypeptide

땅콩은 油肥作物로서 뿐만 아니라 蛋白質 食品으로 널리 利用되고 있는 作物로서 種實의 26% 정도가 貯藏蛋白質이며, 이들은 globulin과 albumin으로 構成되고, globulin은 다시 arachin과 conarachin으로 構成된다^{10,12)}고 하였다. 그러나, 땅콩은 無限花序의 植物이므로 個體間에도 粒重의 差異가 크고, 莢의 착생위치나 種實의 부위에 따라서도 蛋白質의 差異가 있는 등 蛋白質 含量에 關係하는 要因이 다양하며, 이들 貯藏蛋白質은 貯藏위치에 따라 서로 다른 特性을 갖고 있어서 發芽하는 동안에 서로 다른 代謝的 機能과 役割을 하는 것으로 알려져 있다^{7,16)}.

그러나, 發芽過程에서의 貯藏蛋白質의 變化에

대한 研究는 그리 많지 않다.

일반적으로 種子의 貯藏蛋白質들은 水分을 吸水함으로써 加水分解酵素에 의하여 급격한 分解作用을 받게 되며 특히, 貯藏蛋白質은 new protein의 合成을 위해 蛋白質 分解酵素(protease, peptidase)의 作用으로 amino acid나 加溶性의 底分子物로 分解되어⁵⁾, 生長部의 窒素源으로 提供된다고 알려져 있다.

땅콩 種子는 成熟 段階別로 non-arachin(albumin)은 成숙초기에 貯藏되고, 主貯藏 蛋白質인 arachin(globulin)은 成숙후기에 급속히 合成된다^{1,2,15)}고 보고하였으며 또한, 成숙후기에 蓄積되는 arachin은 6個의 subunit로 구성되며, 개개의 蓄

* 慶北大學校 農學科(Dept. of Agronomy, Kyungpook Nat'l University, Taegu 702-701, Korea)

〈'94. 9. 14 接受〉

積이 아닌 arachin complex로 蓄積된다¹⁴⁻¹⁶⁾고 보고 되어 있다.

본 實驗은 筆者 등이 땅콩의 品種間 protein pattern 差異를 調査한 研究에서, 相異한 蛋白質 pattern을 보인 두 品種 대광, 남대를 供試하여 發芽過程 中の reducing, nonreducing 조건을 통해 主貯藏蛋白質의 構造的 特性과 量的變化를 調査함으로써, 種子發芽와 貯藏蛋白質의 代謝過程을 理解하는데 基礎資料를 마련코자 實施하였던바 약간의 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

본 實驗에 供試된 땅콩 品種, 남대와 대광은 1992년에 嶺南作物試驗場 圃場 品種보존구에서 生産된 것을 分讓받아 사용하였다.

種子發芽는 粒種이 비슷한 優良種자를 선별하여 28±1℃의 incubator에 置床하였으며 남대 및 대광 品種의 置床種자를 日數別(0, 1, 2, 3, 4, 5日), 24hr 간격으로 取하여 子葉部와 胚軸部로 分離하여 貯藏蛋白質 含量을 調査하고자 各各의 脫脂肪試料 10mg에 extract buffer(62.5 mM Tris-HCl, 2% SDS) 1ml를 加하여 95℃ 항온수조에서 5분간 boiling하여 放置한 後, 13,000rpm으로 30분간 遠心分離하여 蛋白質을 추출한 다음 上澄液을 30μl를 取하여 Lowry方法¹¹⁾으로 蛋白質 含量을 測定하였으며, 標準曲線은 BSA(Bovin Serum Albumin)를 사용하여 550nm에서 흡광도를 測定하여 求하였다.

한편 發芽時 貯藏蛋白質의 패턴을 調節하기 위해 脫脂肪試料 5mg을 Eppendoff tube에 넣고 여기에 +ME(62.5mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% Glycerol, 5% β-Mercaptoethanol, 0.002% BPB, pH 6.8), -ME(62.5mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% Glycerol, 0.002% BPB, pH 6.8)의 extract buffer 0.4ml씩을 가하고 95℃ 항온수조에서 5분간 boiling 한 다음 13,000rpm(4℃)으로 30분간 遠心分離하여 上澄液을 試料하여 取하였는데 子葉部는 10μl, 胚軸部는 40μl의 試料를 loading하였다.

SDS-PAGE는 Laemmli 方法⁹⁾에 따라, poly-

acrylamide 농도는 stacking gel이 3.75%, separating gel이 12.5%로 사용하였고, stacking gel에서 23mA, separating gel에서는 30mA로 전기영동하였다. 전기영동을 마친 gel은 固定液(50% MeOH, 10% glacial acetic acid)에서 1시간 固定한 後, 染色液(0.1% coomassie blue R-250, 45% MeOH, 10% glacial acetic acid)에 12시간 染色하였으며, 脫色液(30% MeOH, 10% glacial acetic acid)으로 반복해서 수회 脫色하였다. 主要 band(arachin, new protein)의 定量은 20μl를 loading하여 Ballag의 方法³⁾에 따랐다.

結果 및 考察

땅콩 種자의 貯藏蛋白質 pattern은 品種間 큰 差異를 보이고 있으므로, 發芽過程에서 이들 貯藏蛋白質의 變化를 調査하고자 發芽種자의 吸水量, 加溶性 蛋白質의 含量, 貯藏蛋白質의 pattern 등을 調査하였다.

1. 땅콩 發芽時 含水率 變化

땅콩의 貯藏蛋白質 pattern에서 뚜렷한 差異를 보인 남대와 대광 品種을 대상으로 置床 1日부터 5日까지의 種자를 子葉部와 胚軸部로 分離하여 各 生體中과 乾燥重을 測定한 後, 含水率을 算出하였던 바 表 1에서와 같이 남대와 대광 두 品種間에서 子葉部에 대한 含水率의 變化는 거의 비슷하였으며, 胚軸部에서는 2日과 3日에 남대가 75.0%,

Table 1. Changes of water content of peanut cultivar during germination (Unit:%)

Cultivar	Day after incubation						
	0	1	2	3	4	5	
Namdae	Cot. ¹⁾	7.60	27.93	31.71	42.64	47.22	49.06
	Emb. ²⁾	20.00	55.00	75.00	89.10	89.79	88.98
	Int. ³⁾	8.13	28.86	36.14	54.96	65.30	69.58
Daekwang	Cot.	7.87	27.86	31.64	42.58	47.18	48.96
	Emb.	20.00	55.29	66.00	83.52	89.55	87.82
	Int.	8.15	28.29	33.42	50.85	62.13	65.72

¹⁾ Cot.: Cotyledon ²⁾ Emb: Embryonic axis

³⁾ Int.: Intact plant

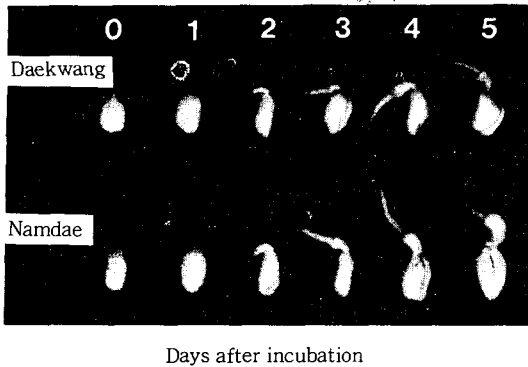


Fig. 1. Growth and development of dark-grown seedlings of Namdae and Daekwang cultivars.

89.10%이고, 대광이 66.0%, 83.5%로서 남대가多少 높은 수량을 나타내었다. 이러한 결과는 남대가 대광보다는 약간 빠른 胚軸部の 生長을 이루는 것으로 인정되어지며, 金⁸⁾ 등은 GA와 BA 處理濃度가 옥수수의 發芽와 胚乳의 養分消藏에 미치는 影響에서 發芽種子의 吸水量 變化는 각 處理區에 다른 發芽時期와 關係되고, control區에서 置床 5日에 64%의 含水率을 나타냈다는 報告와 거의 비슷한 傾向을 나타냈다.

2. 發芽中 可溶性 蛋白質의 含量

發芽中の 남대 및 대광 品質의 子葉部の 可溶性 蛋白質의 含量은 그림 2에서 보는 바와 같이 品種에 關係없이 減少하는 傾向이었으며, 子葉部보다 胚軸部の 蛋白質 含量이 發芽가 進行됨에 따라 급속히 減少하여 置床 後 3日째에는 10%까지 감소한 반면에 子葉部는 5日째 調査에서도 30%정도의 含量을 유지하고 있었으며, 品種間 發芽中の 蛋白質 含量의 變化는 큰 差異가 없이 子葉部와 胚軸部에서 거의 同一한 傾向을 나타내었다.

3. 發芽中の arachin과 new protein의 含量變化

發芽中 땅콩種子의 貯藏蛋白質인 Arachin과 새로이 生成되는 蛋白質의 含量은 그림 3과 같다. 남대와 대광 두 品種의 子葉部에서 arachin band group는 吸水前에 남대가 0.370, 대광이 0.364로서 three-band type를 이루는 남대가 약간 높은

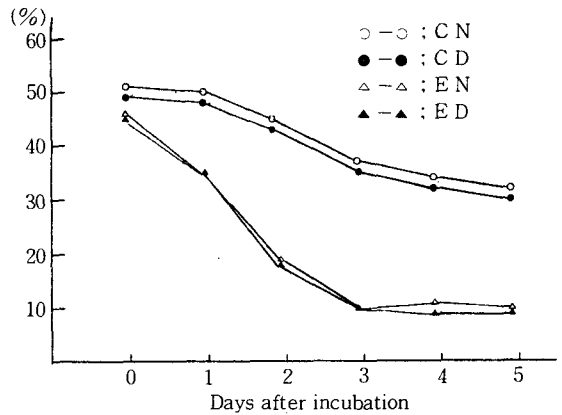


Fig. 2. Protein content of defatted meals of two peanut cultivars during germination.

CN: Cotyledon of Namdae, CD: Cotyledon of Daekwang, EN: Embryonic axis of Namdae, ED: Embryonic axis of Daekwang

값을 나타냈으며, 1日에는 두 品種 모두 미미한 減少를 보이다가 2日에 가서 급격한 減少가 시작되어 3日에서는 가장 큰 幅으로 減少되어 각각 0.086, 0.094의 값을 나타내었다. 胚軸部에서도 吸水前에 남대와 대광이 각각 0.328, 0.306으로서 남대가 높은 값을 보였으나, 子葉部에 비해 약간 낮은 값을 나타내었지만, 훨씬 빠른 감소를 보여 置床 後 2日째 調査에서는 測定할 수 없을 정도로 낮은 수준이었다.

반면에 new protein band는 子葉部에 있어서 3日까지는 顯著的한 增加를 보여 남대가 0.136, 대광이 0.138로서 가장 높은 값을 나타냈고 4日부터는 緩慢하게 減少되었다. 胚軸部에서도 子葉部와 같은 傾向을 보였으나 2日頃에 최고 값을 나타내었고, 3日에는 거의 消失되어 測定되지 않았다. 發芽中の 아주까리 種子에서 crystalloid protein은 發芽 48時間內에 低分子는 아주 서서히 일어남으로써 發芽 後에도 相當量 남아 있어 蛋白質 種類間에 差異를 보였다고 하였다³⁶⁾.

4. 發芽中 貯藏蛋白質의 pattern

Arachin type이 相異한 남대와 대광 品種을 대상으로 發芽中인 種子의 子葉部와 胚軸部에 대하

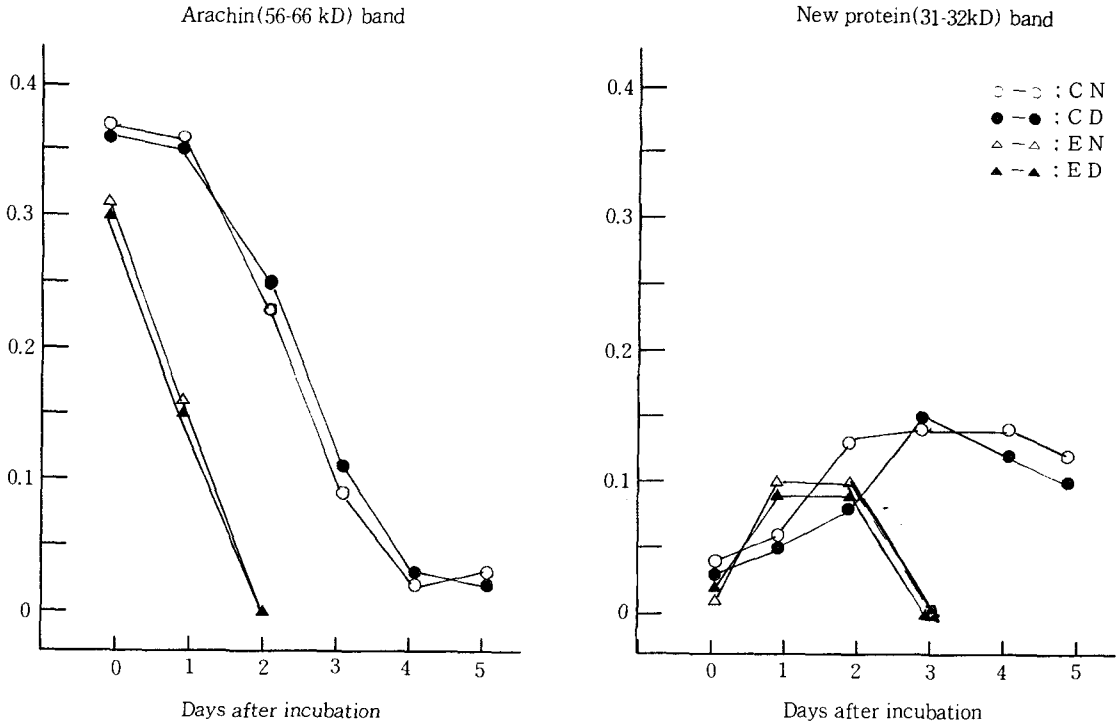


Fig. 3. Amount of dye(Coomassie Blue R-250) from stained protein bands on non-reducing gel (-ME).

CN : Cotyledon of Namdae, CD : Cotyledon of Daekwang

EN : Embryonic axis of Namdae, ED : Embryonic axis of Daskwang

여 저장蛋白質의 pattern 變化를 調査하였다.

發芽中 子葉部의 貯藏蛋白質은 品種에 관계없이 66kD의 conarachin과 43, 40 또는 35.5 kD의 arachin subunits는 發芽가 進行됨에 따라 顯著하게 지속적인 감소를 나타내었고, 21.5~23.5 kD의 arachin subunits는 置床 5日까지 緩慢한 減소를 보였으며, 23.7kD의 band는 3日頃에 消失된 반면에 같은 時期에 21.7 kD의 새로운 band가 形成되었다. arachin 이외의 蛋白質들은 發芽가 進行됨에 따라 점차 감소되어 3日頃에 거의 消失되었고, 16 kD 以下의 low polypeptides들은 1日째부터 顯著한 증가를 보이면서 14.2 kD 부근의 뚜렷한 새로운 band가 形成되었다(그림 4參照).

일반적으로 種子의 貯藏物質들은 水分을 吸水함으로써 加水分解酵素에 의하여 급격한 分解作用을 받게 되며, 특히 貯藏蛋白質은 new protein을 合成을 위해 蛋白質 分解酵素(protein, peptidase)

의 作用으로 amino acid나 可溶性의 低分子物로 分解되어, 生長部의 窒素源으로 提供된다고 알려져 있는데 땅콩 種子의 發芽過程에 arachin group이나 subunits 間의 分解속도는 多少差異가 있었으며, 品種間에는 큰 差異가 없었다.

아주까리 種子는 crystalloid protein과 lectins로 構成되어 있는데 種子의 吸水가 시작되면 crystalloid protein은 吸水後 12~18時間內에 加水分解가 거의 完了되어 遊離아미노산은 일정한 증가를 보였으며 반면, lectins의 경우에는 加水分解作用이 매우 느리게 일어나는데 이것은 發芽 以後의 初期 幼苗期 동안에 중요한 營養的 役割을 수행할 것이라고 한 보고^{4,6,7}로 미루어 보아 發芽中의 貯藏蛋白質의 分解는 蛋白質의 종류에 따라서 다름을 알 수 있다.

한편 β -mercaptoethanol을 處理하지 않은 區에서 arachin이 현저하게 감소됨에 따라 31~32

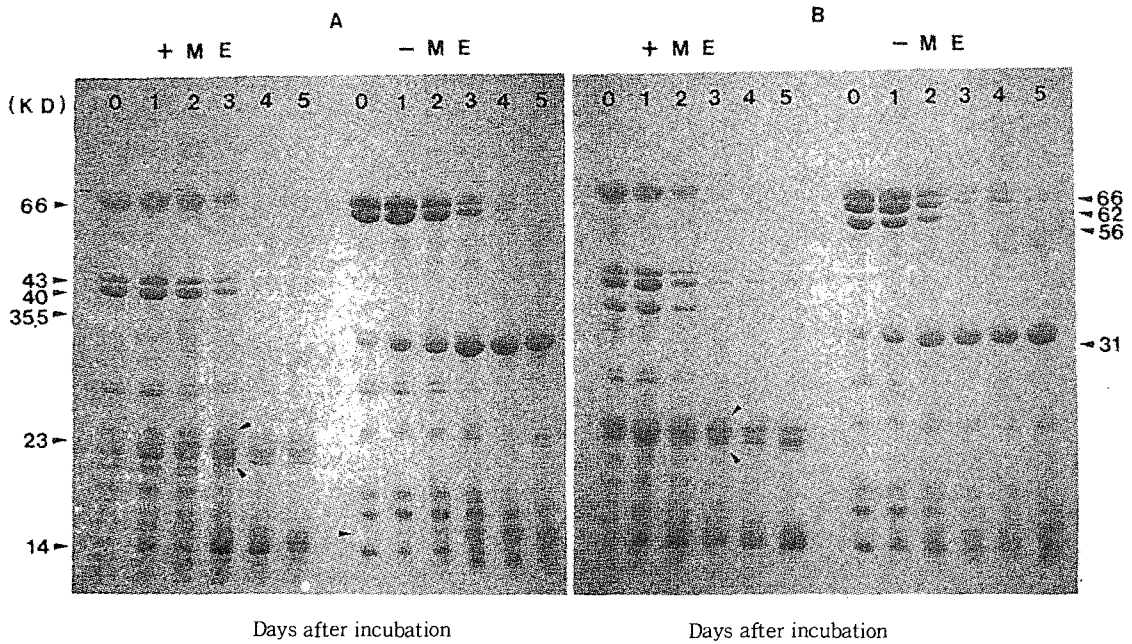


Fig. 4. SDS-PAGE profiles in cotyledons of Namdae and Daekwang in the presence and absence of β -mercaptoethanol during germination.
 A: Daekwang B: Namdae ME: β -mercaptoethanol

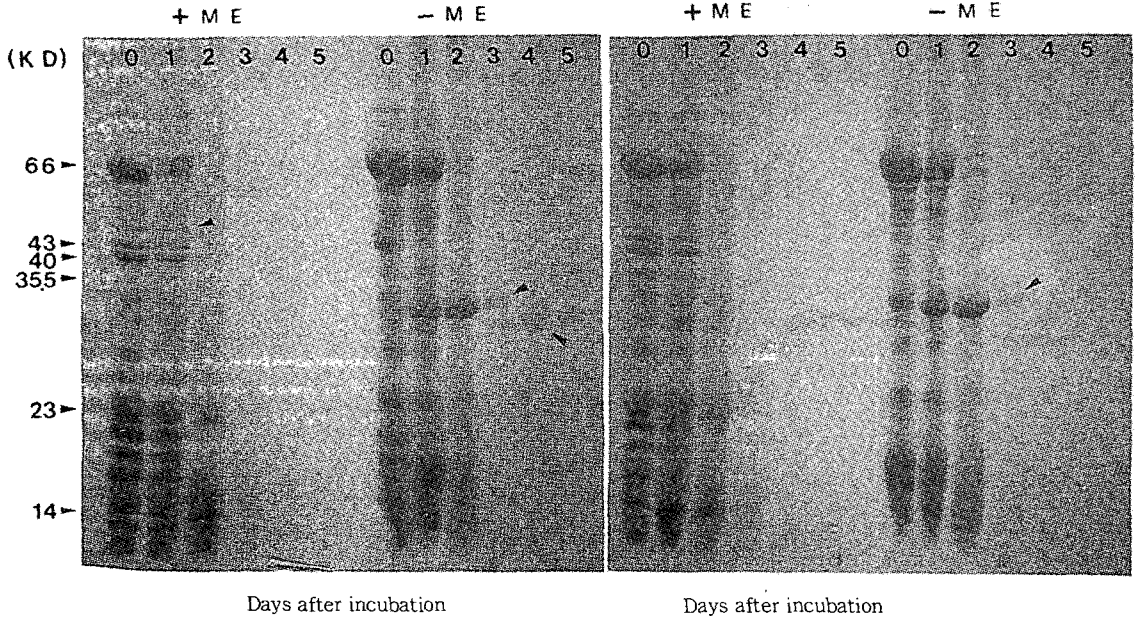


Fig. 5. SDS-PAGE profiles in embryonic axis of Namdae and Daekwang in the presence and absence of β -mercaptoethanol during germination.
 A: Daekwang B: Namdae ME: β -mercaptoethanol

kD의 band는 1日째부터 顯著한 量的증가를 나타내었다. 대광에서는 2日頃부터 16kD의 새로운 band를 形成하였으나, 남대에서는 나타나지 않는 差異를 보였다(그림 4). 以上の 結果에서 β -mercaptoethanol의 處理와 無處理를 比較함으로써 31~32kD의 new protein band는 21.5~23.0kD와 14~15kD의 low polypeptides와 S=S 結合을 이루고 있음을 알 수 있었다.

發芽中 胚軸部(embryonic axis)의 貯藏蛋白質의 變化는 그림 5에서 보는 바와 같이 子葉部の pattern과 類似하였으나 conarachin non-arachin은 상대적으로 많은 量을 이루었고, 특히 대광에서는 子葉部에서 볼 수 없었던 50kD band가 β -mercaptoethanol 處理區에서 나타나내었다. 加水分解 pattern은 子葉部에서 일치하였으나 arachin은 2日頃에 거의 消失되었으며, 반면에 β -mercaptoethanol을 處理하지 않은 區에서는 3日에 32.5kD, 4日과 5日에 29.5kD의 어린 band를 나타내었다. 따라서 成熟 種子에서 胚軸部の 蛋白質은 種子가 吸水함에 따라 급속히 分解되어 子葉部の 主要 貯藏蛋白質이 본격적인 分解移動 前에 發芽에 필요한 物質을 供給하는 것으로 여겨진다.

摘 要

땅콩 品種에 있어서 種子發芽 동안에 蛋白質의 含量 및 pattern(subunits)의 變化를 調査하였던 바 다음과 같은 結果를 얻었다.

땅콩의 貯藏蛋白質 패턴이 다른 남대와 대광의 子葉部에 대한 含水率의 變化는 거의 비슷하였으나 胚軸部에서는 置床 2日과 3日에 남대가 75.0%, 89.1%였고, 대광이 66.0%, 83.5%로서 남대가 多少 높은 含量을 나타내었다. 可溶性 蛋白質의 含量 變化는 남대와 대광 두 品種 供히 子葉部에서는 2~3日, 胚軸部에서는 置床 1~2日 사이에 顯著히 감소되었으며, 置床 5日에 子葉部에서는 28~29%, 胚軸部에서는 10%의 含量을 나타내었다.

남대와 대광 두 品種의 arachin의 含量은 子葉部, 胚軸部에서 모두 남대 品種이 높은 값을 나타내었고, 發芽 동안에 生成된 new protein은 子葉

部에서 3日, 胚軸部에서 2日에 最高量을 보였다. arachin type이 相異한 남대와 대광 品種에서 發芽 동안에 대광의 子葉部에서만 置床 2日頃부터 16kD의 band를 나타내었다.

發芽가 진행됨에 따라 남대와 대광 品種의 子葉部에서는 66, 43, 40, (35.5)kD의 subunit들이 顯著히 감소되어 置床 4日頃에 消失되었고, 21.5~23.0kD의 subunits는 緩慢한 감소로 유지되었으며, 14~16kD의 low polypeptides는 점차 증가를 나타내었다.

또한, 胚軸部에서도 置床 2日 동안에 子葉部와 같은 경향을 나타내었다.

參 考 文 獻

1. Basha, S.M., Cherry, J.P., and Young, C. T. 1976. Changes in free amino acids, carbohydrates and protein of maturing seeds from various peanut(*Arachis hypogaea* L.) cultivars, *Cermistry*, 53:586-597.
2. Beevers, L. and Poulson, R. 1972. Protein synthesis in cotyledons of *Pisum sativum* L. I. Changes in cell-free amino acid incorporation capacity during seed development and maturation, *Plant Physiol.*, 49:476-481.
3. Bollag, D.M. and Edelstein, S.J. 1991. *Protein Methods*, pp. 93-116, 136-142., Wiley-Liss, New York.
4. Catsimpooolas, N., Campbell, T.G., and Meyer, E.W. 1968. Immunochemical study of changes in reserve proteins of germinating soybean seeds, *Plant Physiol.*, 43:799-805.
5. Daussant, J., Neucere, N.J., and Conker-ton, E.J. 1969. Immunochemical studies on *Arachis hypogaea* proteins with particular to the reserve proteins. II. Protein modification during germination. *Plant Physiol.*, 44:480-484.

6. Gifford, D.J., Imerson, H.C., Thakore, E. and Bewley, J.D. 1986. Hydrolysis of crysdalloid storage protein in castor bean endosperm during and following germination. *J.Exp. Bot.*, 37:1879-1886.
7. Kermode, A.R. and Bewley, J.D. 1986. The role of maturation drying in transition from seed development to germination, *Exp. Bot.*, 37:1887-1898.
8. 金種震, 李英燦, 金靜妍. 1990. GA와 BA 處理濃도가 옥수수(Zeamays)의 發芽와 胚乳의 養分消藏에 미치는 影響. 慶北大 農學誌. 8:1~8.
9. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227:680-685.
10. 李正日, 朴喜運, 姜光熙, 金基駿. 1990. 땅콩品種의 蛋白質含量과 아미노산 組成, 韓作誌., 35(5):424-439.
11. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L. and randall, R.J. 1951, Protein measurement with the Folin-phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
12. Tai, Y.P. and Young, C.T. 1974. Variation in protein percentage in different proteins of peanut cotyledons, *Crop.*, 14: 227~229.
13. Yamada, T., Aibara, S., and Morita, Y. 1979. Dissociation-association behavior of arachin between dimeric and monomeric forms, *Agric. Biol. Chem.*, 43: 2549-2556.
14. Yamada, T., Aibara, S., and Morita, Y. 1979. Isolation and some properties of arachin subunits, *Agric. Biol. Chem.*, 43: 2563-2566.
15. Yamada, T., Aibara, S., and Morita, Y. 1980. Accumulation pattern of arachin and its subunit in maturation of groundnut seed, *Plant & Cell Physiol.*, 21:1217-1226.
16. Youle, R.J. and Huang, A.H.C. 1976. Protein bodies from the endosperm of castor bean; Subfractionation, protein components, lectins, and changes during germination, *Plant Physiol.*, 58:703-709.