

담배의 노화과정 중 광합성 및 단백질 함량의 변화

이상각*, 심상인, 강병화
고려대학교 식량자원학과
(1995년 3월 23일 접수)

Changes in Photosynthetic Rate and Protein Content in the Leaf during the Senescence of Tobacco Plant (*Nicotiana tabacum* L.)

Sang Gak Lee*, Sang In Shim and Byeung Hoa Kang

Dept. of Agronomy, Korea Univ.

(Received March 23, 1995)

ABSTRACT : This study was carried out to obtain the basic data which include the change of the photosynthetic rate and protein content according to growth stage in the process of senescence of tobacco plant. The photosynthetic rate was the maximum with $26.31 \mu\text{mol}\cdot\text{CO}_2/\text{m}^2\cdot\text{sec}$ and stomatal resistance was the minimum with $0.2552\text{cm}/\text{sec}$ at 15th days after leaf emergence. However, after 50 days the photosynthesis was very little occurred. During leaf development, the number of chloroplast was increased and reached at the maximum at 25th days after emergence of leaf, thereafter, it was decreased gradually. The content of protein increased continuously and showed the highest value at 15th days after leaf emergence. The degradation rate of soluble protein was more rapid than that of insoluble protein at early stage of senescence. The range of decrement in the insoluble protein was low at late stage of senescence. The content of Rubisco, the key enzyme of photosynthesis, corresponded to about 50% of soluble protein and reached to the maximum at 15th days after leaf emergence. As the senescence progressed, the content of large subunit(LSU) of Rubisco showed a tendency to decrease more rapidly than that of small subunit(SSU). The total amount of amino acids was the highest at 15th days after leaf emergence.

Key words : Photosynthetic rate, Senescence, Protein content, Rubisco

* 연락저자 : 136-701, 서울시 성북구 안암동 5-1 고려대학교 자연자원대학 식량자원학과

* Corresponding Author : *Dept. of Agronomy, Korea Univ. 1,5-Ka Anam-dong, Sungbuk-ku, Seoul 136-701, Korea.*

식물의 생장은 종자로 받아하여 시간이 경과함에 따라서 비가역적으로 그 크기를 더해 가는 현상으로서 세포의 분열 신장 및 기관분화의 중요한 과정을 거쳐 발달된 식물체가 생식생장기를 통해 종자생산을 이루고 생육이 종료되는 과정이다. 담배의 경우 생식기관이 아닌 영양생장기관을 경제적 수확부위로 이용하는 작물로서 엽의 형질은 수광과 품질에 많은 영향을 준다(Nooden and Leopold 1988).

식물의 노화는 생명활동을 마감하는 과정으로서 노화가 시작되면 잎의 저장물질이 생식기관으로 전류가 일어나게 된다. 그러나 담배의 경우는 잎의 동화산물이 생식기관으로 전류가 시작되기 전에 수확을 해야하므로 생육과정에서 물질축적상태와 조성의 변화에 영향을 주는 엽의 광합성과 단백질의 변화 양상은 최적 수확기의 예측 등에 이용될 수 있으므로 중요한 가치가 있다. 식물의 노화는 식물체의 기능감소와 기관, 조직, 세포의 죽음을 나타내는 단계적인 변화이며, 관련 요인들 중 엽록소, 단백질, RNA 등이 감소하고, protease와 같은 가수분해효소의 활성과 ABA를 비롯한 성장억제물질은 증가하는 것으로 보고되었다(Dalling and Nettleton 1986; Goldberg and John 1989; Krul 1974; Martin and Thimann 1972; Kawashima and Tamaki 1971). 식물의 단백질은 저장단백질로서 종자에 축적이 되는 경우도 있지만 엽단백질의 경우 광합성을 비롯한 세포의 주요기능에 관여하는 효소가 대부분을 차지한다. 그러므로 엽내 단백질의 경우 광합성을 비롯한 세포의 주요기능에 관여하는 효소가 대부분을 차지한다. 그러므로 엽내 단백질의 변화양상은 엽의 대사활성도와 깊은 관계가 있다. 지금까지의 연구를 토대로 보면 노화에 따라 엽내 단백질의 양은 감소한다고 보고되어 있고 감소하는 추이는 외견상 노화의 증후나 광합성률의 변화(Kisaki *et al.* 1973), 또는 엽록소함량의 변화(Mariko *et al.* 1987)와는 깊은 관계가 있으나 시기적으로 이들의 변화양상은 반드시 일치하지 않는다. 본 실험은 엽의 생육단계별 광합성률과 단백질함량의 변화를 파악하여 담배의 노화연구에 필요한 기초자료를 제공하고자 실시하였다.

재료 및 방법

공시품종은 황색종담배(*Nicotiana tabacum* L.) NC 82로서 고려대학교 자연자원대학 부속농장 포장에 이식하여, 개량밀칭 표준재배법에 준하여 개화시 적심 없이 재배하였다. 시료는 각 식물 개체 당 엽위가 12번째인 중위엽을 출엽 후 5일 부터 광합성 측정을 실시한 후 출엽 10일부터 5일 간격으로 12회 채취하여, 생체시료는 -70°C 의 deep freezer에 보관하였고 분석시료는 70°C 의 건조기에서 48시간 건조시켜 사용하였다. 광합성률과 기공저항의 측정은 시료 채취 당일 10시 30분부터 11시30분 사이에 Infra-red CO_2 Analyzer(Licor Co, LI-6250)와 Portable Photosynthesis System(LI-200)을 이용하여 실시하였다. 엽록체 수는 생엽 3g에 추출완충액[0.33M glucose, 50mM Na_2HPO_4 , 5mM MgCl_2 , 0.1% (w/v) BSA, pH 6.5] 12ml을 가한 후 Polytron homogenizer로 분쇄한 다음 $500\times g$ 에서 90초간 원심분리하여 상정액을 취하고 $3,000\times g$ 에서 60초간 원심분리하여 엽록체를 회수하고 현미경하에서 수를 조사하였다(Kura-Hotta *et al.* 1990). 아미노산 함량 및 조성은 분말시료 150mg에 6N HCl를 가하여 진공상태로 밀봉한 채 110°C 에서 24시간 분해시킨 후 감압 건조한 다음 Na-citrate buffer로 용해하여 High Speed Amino Acid Analyzer(Hitachi, Model 835)로 정량하였다. 조단백질의 함량은 micro-kjeldahl(A.A.C. C. 1983)법으로 분석하였고, 가용성단백질은 Bradford(1976)의 방법에 의하여 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 정량하였다. Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase(Rubisco)의 함량은 Laemmli(1970)의 방법에 따라 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 시킨 다음 large subunit(LSU), small subunit(SSU)로 구분한 후 densitometer(Shimadzu, Cs-9000, 560nm)를 이용하여 각 subunit들과 다른 band들의 면적을 구하고, Bradford법을 통하여 얻어진 단백질 함량을 기준으로 하여 각 band의 면적에 비례한 subunit들의 함량을 계산하였다.

결과 및 고찰

잎의 성장단계별 광합성률, 기공저항 및 엽록체 수의 변화는 표 1과 같다. 출엽 후 5일째의 광합성률은 $9.42\mu\text{mol.CO}_2/\text{m}^2\cdot\text{sec}$, 15일에는 $26.31\mu\text{mol.CO}_2/\text{m}^2\cdot\text{sec}$ 로 증가폭이 커서 가장 높았으며, 이후 20일, 25일까지는 광합성이 왕성하다가 30일에 50% 정도로 감소하여, 35일부터는 약 75%로 생명유지를 위한 미소한 양의 광합성만이 일어났으며 50일 이후에는 거의 광합성을 하지 않았다. 기공저항의 변화는 출엽 후 5일까지는 높은 경향을 나타내다가 10일, 15일까지 감소한 다음 다시 증가하였다. 엽록체는 출엽 후 성장속도가 커지면서 그 수가 계속 증가해 25일에 이르러 최대에 이르다가 일정한 감소폭으로 줄어들었다. 엽록체수가 증가가 일어나는 시기는 광합성, 단백질 변화와 같이 세포내의 대사작용이 왕성한 시기이며, 50일, 55일까지 엽록체 수의 감소 경향은 노화의 급격한 진전과 시기적으로 일치하였다. 결과적으로 광합성은 잎의 성장과 비슷하게 증가하고 잎의 노화함에 따라 감소되는데, 이러한 결과는 엽내 광합성효소의 감소는 물론 엽 주변의 CO_2 가 엽록체 중심부에 도달하는데 있어서 엽표면의 외기저항, 기

공저항 및 엽육세포저항 등의 요인으로 인하여 CO_2 확산저항이 발생하여 CO_2 이용효율이 감소되기 때문으로 생각된다(Friedrich and Huffaker 1980; Makino *et al.* 1983; Woolhouse 1984).

그림 1은 생육단계별 단백질함량의 변화를 나타낸 것이다. 단백질의 변화는 출엽 후 독립기관으로서의 대사작용을 영위하고 광합성활동을 시작함에 따라

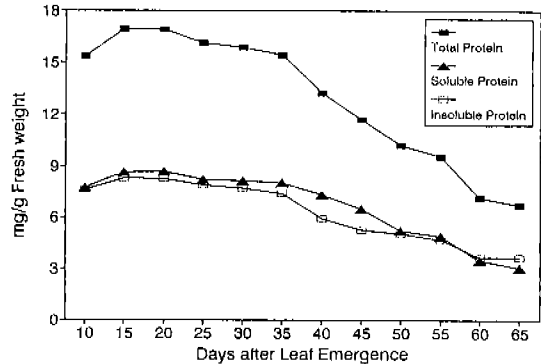


Fig.1. Changes in the amounts of proteins extracted from the 12th leaf of tobacco plant according to the leaf development.

Table 1. Changes in photosynthetic rate, stomatal resistance and number of chloroplast in the 12th leaf of tobacco plant according to the leaf development.

Days after leaf emergence	photosynthetic rate	stomatal resistance	chloroplast number
	$\mu\text{mol.CO}_2/\text{m}^2\cdot\text{sec}$	sec/cm	$\times 10^7/\text{g(F.W.)}$
5	9.42 ± 0.47	1.3450 ± 0.05	—
10	17.26 ± 0.55	0.5919 ± 0.03	2.72 ± 0.19
15	26.31 ± 1.60	0.2552 ± 0.06	4.27 ± 0.33
20	25.98 ± 0.65	0.3523 ± 0.05	5.60 ± 0.41
25	20.10 ± 1.80	0.6350 ± 0.11	5.87 ± 0.47
30	13.92 ± 0.31	0.8634 ± 0.04	5.67 ± 0.45
35	7.33 ± 0.55	1.2290 ± 0.08	5.20 ± 0.47
40	4.04 ± 0.04	1.9346 ± 0.06	4.62 ± 0.33
45	2.62 ± 0.05	2.1830 ± 0.20	4.10 ± 0.39
50	0.68 ± 0.07	2.3960 ± 0.09	3.88 ± 0.42
55	—	—	2.13 ± 0.24
60	—	—	1.81 ± 0.17
65	—	—	1.09 ± 0.10
LSD(5%)	1.76	0.19	0.72

단백질함량의 증가가 일어나고 일정기간이 경과되어 노화가 시작되면 합성보다는 분해되는 양이 많아 전체적으로 볼때 단백질 함량이 감소하는데 이 시기를 노화의 생리적인 시기로 설명하였다(Gildberg and John 1989; Martin and Thimann 1972). 본 실험에서 단백질함량 변화의 폭은 잎 전개 후 10일(15.34mg)이 지나면서 대사작용이 왕성하여 단백질 함량이 증가하여 15일(16.93mg)에 최대의 함량을 보여 30일(16.11 - 15.86mg)까지 높게 유지되었다.

광합성률과 단백질함량의 관계를 보면 둘 사이에는 높은 정(+)의 상관(Fig.2)이 있지만 환경조건에 따라 다소간 변화하는 것으로 생각된다. 단백질의 함량은 15일경부터 감소되기 시작하여 30일부터 35일(15.86 - 15.41mg) 사이에 큰 폭의 분해가 일어나 함량의 급격한 감소가 일어났다. 엽의 생육상은 단백질함량이 증가하는 20일까지를 생장기, 감소하기 시작하는 25일에서 30일까지를 성숙기 또는 노화초기, 30일 이후를 노화기로 구분할 때, 담배의 경우 잎의 생리적 수명은 60일 정도로 사료된다. 가용성 단백질과 비가용성단백질의 변화는 조단백질함량의 변화와 같은 경향이나 비가용성단백질이 35일에서

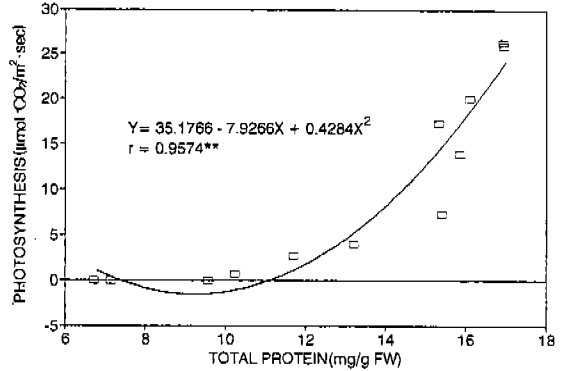


Fig.2. Relationship between total protein content and photosynthesis rate in tobacco leaf.

45일까지 분해량이 큰 것은 세포막에 위치하는 단백질이 노화에 따른 막의 구조파괴로 인하여 protease에 노출되어 분해의 폭이 컸던 것으로 사료된다(Dalling and Nettleton 1986).

표 2는 잎의 성장단계별 Rubisco 함량의 변화를 나타낸 결과이다. Rubisco는 출엽 후 10일부터 증가하다가 20일에 이르러 감소하기 시작하여 50일, 60일에 감소폭이 컸다. 또한 Rubisco의 LSU, SSU 각

Table 2. Changes in the contents and ratios of large subunits, small subunits and total ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase(Rubisco) the 12th leaf of the tobacco plant according to the leaf development.

Days after Emergence	LSU ^{z)}	SSU ^{y)}	Total Rubisco	LSU/SP ^{x)}	SSU/SP	T-R ^{w)} /SP
	mg/g FW			%		
10	2.08	0.98	3.06	26.87	12.66	39.53
15	2.60	1.11	3.71	30.09	12.85	42.94
20	2.64	1.44	4.08	30.48	16.63	47.11
25	2.39	1.44	3.83	29.08	17.52	46.59
30	2.36	1.34	3.70	28.96	16.44	45.40
35	2.33	1.26	3.50	29.05	15.71	44.76
40	2.30	1.23	3.53	31.46	16.83	48.29
45	2.07	1.13	3.20	32.04	17.49	49.53
50	1.66	1.01	2.67	31.86	19.39	51.25
55	1.27	1.11	2.38	26.02	22.75	48.77
60	1.02	0.82	1.84	29.31	23.56	52.87
65	0.62	0.59	1.31	23.45	19.22	42.67

z) LSU=Large Subunit

y) SSU=Small Subunit

x) SP=Soluble Protein

w) T-R=Total Rubisco

각의 함량변화는 Rubisco와 같은 경향이었지만 LSU의 생성은 10일 전후로 생성이 빨랐으며, 잎이 전개 후 노화에 이르기까지는 일정량의 분해속도를 보이고, 노화말기에는 73%의 감소량을 보였다. SSU의 합성은 15일까지 증가하다가 20일, 25일까지 유지되었으며, 30일 이후 감소하였다. 그러나 LSU와는 달리 SSU는 노화말기까지 잔존량을 유지하며 60%의 감소폭을 나타내고 있다. 또한 LSU, SSU의 함량비율은 LSU는 노화가 진행됨에 따라 감소하는 경향이었으나 SSU의 비율은 증가하였다. 이러한 결과는 두가지 측면에서 볼 수가 있는데, 첫째 LSU는 엽록체에서 형성되는 단백질이므로 엽록체 ribosome의 기능 저하가 세포질 ribosome의 기능저하보다 빠른 것을 의미하는 것으로 노화가 엽록체의 활성에 먼저 영향을 준 것으로 볼 수 있고, 둘째 LSU가 SSU보다 protease에 의해 쉽게 분해되기 때문인 것으로 보여진다. 잎의 출엽 초기에는 가용성 단백질에 대한 Rubisco 함량비는 40% 미만의 적은 경향을 보이다 잎의 전개가 완료된 후 성숙단계를 거쳐 노화말기인 출엽 후 50일 경에는 약 50%의

함량비를 나타내고 있어 표 1에서 50일 경부터 광합성이 거의 일어나지 않음을 고려할 때 Rubisco의 함량 그 자체가 광합성률을 조절하는 중요한 요인은 아닌 것으로 추정된다.

아미노산 함량과 조성의 변화는 표 3의 결과와 같다. 출엽 후 10일째의 아미노산 함량은 출엽일수가 진행됨에 따라 15일에 최대치에 이르고, 20일부터 25일까지 유지되다가, 30일에는 13.38mg로 감소되어 55일까지는 일정함량을 유지하다가, 65일은 8.83mg으로 감소하였다. 아미노산 조성의 변화는 glutamic acid, aspartic acid, leucine은 높았으며 methionine, histidine의 조성은 극히 적었다. 각각의 아미노산 조성은 아미노산의 결과와 같은 경향으로 초기에는 증가하여 15일 이후 잎의 전개가 진행됨에 따라 양이 감소하는 것으로 나타났다. 특히 출엽시기에 따른 엽의 아미노산의 함량에 따른 아미노산 조성의 비율은 aspartic acid 10-11%, threonine 4.5%, serine 3-4%, glutamic acid 13-14%, proline 4-5%, glycine 4-5%, alanine 8-11%, valine 약 7%, methionine 1-2%, isoleucine 4-5%, leucine 9%, tyrosine 3-4%.

Table 3. Amino acid composition of the 12th leaf of tobacco plant according to the leaf development.

(Units : mg/g)

Amino acid	Days after leaf emergence											
	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Aspartic acid	2.47	2.68	2.02	1.97	1.61	1.47	1.47	1.17	1.46	1.67	1.16	0.94
Threonine	1.10	1.21	0.93	0.87	0.42	0.50	0.53	0.34	0.53	0.55	0.39	0.34
Serin	1.05	1.08	0.761	0.72	0.42	0.44	0.50	0.37	0.57	0.65	0.45	0.38
Glutamic acid	3.24	3.64	2.53	2.44	1.89	1.84	1.83	1.41	1.75	1.89	1.34	1.14
Proline	1.05	1.17	1.01	1.03	0.54	0.51	0.52	0.38	0.53	0.59	0.43	0.38
Glycine	1.15	1.21	0.89	0.88	0.67	0.60	0.61	0.56	0.66	0.76	0.52	0.48
Alanine	1.74	2.00	1.47	1.48	1.14	1.04	1.23	1.17	1.44	1.64	1.16	0.92
Valine	1.61	1.75	1.28	1.23	0.93	0.86	0.84	0.67	0.82	0.87	0.60	0.54
Methione	0.50	0.50	0.38	0.34	0.22	0.21	0.20	0.17	0.20	0.24	0.16	0.14
Isoleucin	1.05	1.12	0.83	0.83	0.57	0.52	0.52	0.44	0.56	0.61	0.43	0.40
Leucine	2.20	2.41	1.77	1.70	1.36	1.24	1.25	1.01	1.27	1.36	0.92	0.78
Thyrosine	0.95	1.14	0.84	0.78	0.49	0.43	0.43	0.36	0.43	0.49	0.32	0.27
Phenylaline	1.49	1.68	1.21	1.20	0.86	0.75	0.77	0.62	0.79	0.87	0.58	0.49
Lysine	1.44	1.48	1.09	1.04	0.77	0.70	0.69	0.57	0.70	0.78	0.54	0.51
Ammonia	0.80	0.67	0.49	0.50	0.62	0.58	0.58	0.52	0.62	0.76	0.55	0.54
Histidine	.33	0.35	0.30	0.30	0.23	0.22	0.22	0.22	0.23	0.23	0.20	0.19
Arginine	1.25	1.31	1.01	0.93	0.65	0.59	0.59	0.50	0.59	0.64	0.44	0.40
Total	23.36	25.40	18.81	18.23	13.38	12.54	12.78	10.48	13.15	14.60	10.18	8.83

phenylalanine 6%, lysine 5-6%, histidine 2%, arginine 4-5% 범위였으나 aspartic acid, serine, glycine, alanine, histidine 등은 생육초기의 조성 비율간과 비교하여 60일 이후 노화말기까지 비율이 커지는 것으로 나타났다.

본 실험결과에 의하면 생체내부의 유전자조절에 의해서 일어나는 노화의 증상은 다른 연구 결과들 (Friedrich and Huffaker 1980; Makino *et al.* 1984) 과 같이 잎의 생육단계에 따라 단백질함량의 50%를 차지하는 광합성효소인 Rubisco의 함량감소가 광합성감소의 초기과정에 많이 일어나면서 체내에너지 흐름의 불균형을 좌우하는 것으로 생각되며, 생육 후기에는 엽록체 수의 변화가 노화와 밀접한 연관이 있고, 이것은 엽록체막의 구조적 변화와 plastoglobuli 수 및 크기 변화에 관련하는(Nooden and Leopold 1988; Wardley *et al.* 1984; Woolhouse 1984) 비가용성단백질의 분해가 일어나기 때문으로 사료된다.

결 론

담배의 생육단계별 광합성률과 단백질함량의 변화를 파악하여 담배노화에 필요한 기초자료를 얻고자 본 실험을 수행하였으며 그 결과는 다음과 같다.

광합성률의 변화는 출엽 후 15일에 $26.31 \mu\text{mol CO}_2 / \text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 로 최대량을 보이며 50일 이후에는 광합성률 거의 하지 않았다. 기공저항은 출엽 후 15일에 $0.2552 \text{ cm} / \text{sec}$ 로 가장 적었다. 엽록체 수는 25일에 가장 많았고 점진적으로 감소하였다. 단백질함량은 출엽 후 15일에 가장 많았고 가용성 단백질은 노화 초기 분해가 빨랐고 비가용성단백질은 노화말기까지 분해가 작았다. Rubisco 함량은 가용성단백질의 약 50%이며, 출엽 후 15일에 Rubisco 함량이 가장 많았고, Rubisco LSU와 SSU의 상대적 함량이 많았으며, methionine, histidine은 미량으로 존재하였다. 노화말기에 aspartic acid, serine, glycine, alanine, histidine 조성비율은 커졌다.

참 고 문 헌

1. A.A.C.C. (1969) Cereal Laboratory Method. 46 -

10. Crude Protein-improved Kjeldahl Method. 7th. American Association Cereal Chemistry Inc.
2. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing in principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
3. Dalling, M.J. and A.M. Nettleton (1986) Chloroplast senescence and proteolytic enzymes, Vol.II, ed. M.J. Dalling. CRC Press, Boca Raton. p.125 - 153.
4. Feiedrich, J.W., and R.C. Huffaker (1980) Photosynthesis, leaf resistances and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase degradation in senescing barley leaves. *Plant Physiol.* 65 : 1103 - 1107.
5. Goldberg, A.L., and St. A. John (1989) Protein degradation. *The Biochemistry of Plants*. vol.15, Molecular biology. Academic press. P.521 - 533.
6. Kawashima, N., and E. Tamaki (1967) Studies on protein metabolism higher plant leaves-II, *Phytochemistry* 6 : 339 - 345.
7. Kisaki, T., S. Hirabayashi and N. Yano (1973) Effect of the age of tobacco leaves on photosynthesis and photorespiration. *Plant & Cell Physiol.* 14 : 505 - 514
8. Krul, W.R. (1974) Nucleic acid and protein metabolism of senescing and regenerating soybean cotyledons. *Plant Physiol.* 54 : 36 - 40.
9. Kura-Hotta, M., H. Hashimoto, K. Satoh and S. Katoh (1990) Quantitative determination of changes in the number and size of chloroplast in naturally senescing leaves of rice seedlings. *Plant Cell Physiol.* 31 : 33 - 38.
10. Laemmli, V.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227 : 680 - 685.
11. Makino, A., T. Mae and K. Ohira (1983) Photosynthesis and ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase in rice leaves. *Plant Physiol.* 73 : 1002 - 1007.
12. Makino, A., T. Mae and K. Ohira (1984) Changes in photosynthetic capacity in rice leaves from emergence through senescence(Analysis

- from ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase and leaf conductance). *Plant & Cell Physiol.* 25 : 511 - 521.
13. Mariko, K.H., S. Kasuhiko and S. Katoh (1987) Relationship between photosynthesis and chlorophyll content during leaf senescence of rice seedling. *Plant Cell Physiol.* 28 : 1321 - 1329.
14. Martin C., and K.V. Thimann (1972) Role of protein synthesis in the senescence of leaves. *Plant Physiol.* 50 : 432 - 437.
15. Nooden, L.D., and A.C. Leopold (1988) Senescence and aging in plants. Academic Press Inc. p.2 - 171.
16. Wardley, T.M. P.L., Bhalla and M.J. Dalling (1984) Changes on the number and composition of chloroplast during senescence of mesophyll cell of attached and detached primary leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.* 75 : 421 - 424.
17. Woolhouse, H.W. (1984) The biochemistry and regulation of senescence in chloroplast. *Can. J. Bot.* 62 : 2934 - 2942.