

## 담배의 성숙에 따른 수확엽의 생화학적 활성변화

이상각\* · 강병화 · 이학수<sup>1</sup> · 배길관<sup>1</sup> · 노재영<sup>1</sup>

고려대학교 자연자원대학, <sup>1</sup>충북대학교 농과대학  
(1997년 9월 23일 접수)

### Changes of Biochemical Activities in Harvested Leaves of Tobacco Plant During Maturing Period

Sang Gak Lee\*, Byeung Hoa Kang, Hak Soo Lee<sup>1</sup>, Kill Kwan Bae<sup>1</sup> and Jae Yong Roh<sup>1</sup>  
College of Natural Resources, Korea University, <sup>1</sup>College of Agriculture, Chung buk National University  
(Received September 23, 1997)

**ABSTRACT** : In order to investigate biochemical activities of harvested tobacco leaves, photosynthetic rate, soluble protein contents, and peroxidase activities were analysed during different maturing period. Physiological activities of harvested leaves during maturing period were higher in topped than those of non-topped plants. Chlorophyll content and photosynthetic rate in both topped and non-topped plants decreased at 4 days and 3 days before harvest, respectively. The chloroplast numbers in topped and non-topped plants decreased at 3 days and 5 days before harvest, respectively. Changes of soluble protein and total RNA contents showed similar patterns during maturing period. Soluble protein contents were slightly decreased from 5 days before harvest in topped plants, but decreased drastically from 3 days before harvest in non-topped plants. Not much changes were found in total RNA contents in topped plants until 2 days before harvest, and it was largely decreased after 5 days before harvest in non-topped plants. The peroxidase activities drastically decreased in topped plants and increased in non-topped plants after 3 days before harvest during maturing period. The largest change of biochemical activities in tobacco leaves during maturing periods were observed at 3 days before harvest.

**Key words** : maturing period, topping, soluble protein, photosynthesis, peroxidase activity. *Nicotiana tabacum*.

담배식물은 성장함에 따라 하부로부터 상부로 진행되는 점진적 노화형(progressive or sequential leaf senescence type)으로서, 진행과정에는 양분, 호르몬 및 토양수분이 크게 영향을 미친다(이 등, 1996; Nooden과 Leopold, 1988; Lichtenthaler, 1996). 그러나 잎의 크기와 성장속도는 토양의 이 화학성

및 재배법에 따라 차이가 커 노화정도는 환경적 요인에 크게 지배된다(Tso, 1990; Collins와 Hawks, 1993; Nooden과 Leopold, 1988).

담배는 영양생장기관을 수확대상으로 하는 작물로 수확방법은 기계적인 방법과 사람에 의해 성숙 상태에 따라 하위엽부터 수확하는 방법이 있다. 손

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

\* Corresponding author : Department of Agronomy, College of Natural Resources, 5-Ka Anam-Dong  
Sungbuk-Ku, Korea University, Seoul 136-701, Korea

수확은 약 1주일 주기로 5~7회에 걸쳐 식물개체 당 2~4매씩 엽을 수확을 하게 되는데, 성숙정도는 있다(Collins와 Hawks, 1993). 적숙엽의 수확은 엽령 증가에 따른 생화학적인 변화보다도 엽록소 파 품종, 기후, 비료 및 토양수분조건에 따라 차이가 괴에 의한 외형적인 형태변화의 판단에 의해 관행적으로 수행되고 있다(Walker, 1968; Collins와Hawks, 1993). 잎의 성숙은 외부환경과 생체내부의 유전자조절에 의해 진행 (Hatfield와 Vierstra, 1997; Bray, 1993; 이 등, 1996; Lichtenthaler, 1996)되며 수확엽의 소질이 제조담배의 품질에 크게 영향을 미친다(Gopalachari, 1970). 그러나 엽의 성숙기간에 일어나는 생화학적인 변화에 관해서는 연구가 미흡한 실정이다.

본 실험은 담배식물에서 적심구와 무적심구간 수확대상엽의 생화학적인 활성변화를 조사하기 위하여, 엽내의 광합성능 및 가용성단백질 등을 분석하고, 엽내 스트레스에 반응하는 peroxidase의 활성을 측정함으로써, 성숙기간에 일어나는 엽의 대사기능과 소질을 파악하고자 실시하였다.

### 재료 및 방법

본 실험은 고려대학교 자연자원대학 부속 온실에서 황색종 담배 NC82를 사용하여 1/3000 a 포트에서 실시하였다. 실험에 사용한 토양은 원야토로 완숙퇴비 800g과 연초용복합비료 (N:P:K=10:10:20) 35g을 전량기비로 사용하여 재배하였다. 실험토양

의 이화학적은 pH 6.72, CEC 10.25me/100g, 전질소 0.09%, 인산 26.53ppm, 유기물함량 1.37%이었다. 성숙과정에 따라 수확엽의 생화학적 활성변화를 조사하기 위해 무적심구와 적심구 (개화1륜시제1화지밀)를 두었다. 분석시료는 무적심구와 적심구 모두 2차 수확을 마친 후 3차 수확이 시작되는 시기에 지체부로부터 8매째엽(출엽 후 32일부터 37일까지)을 조사하였다. 광합성측정은 photosynthesis system(Li-cor, LI.6200)을 이용하였고, 엽록소함량은 잎담배분석법(인삼연초연구소, 1991)에 의해, 가용성단백질(Bradford; 1976)은 생엽 1g에 2.0ml의 citrate buffer(pH 5.0)를 가해 추출하여, 100 $\mu$ l의 CBB(Coomassie brilliant blue) 용액 5ml를 가한 후 595nm에서 흡광도를 측정하여 비색정량하였고 표준물질은 BSA를 사용하였다. 엽록체수(Walker 등, 1987; Lamppa 등, 1980)는 생엽 3g에 추출완충액[0.33M glucose, 50mM NaHPO<sub>4</sub>, 50mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1%(w/v) BSA, pH6.5] 12ml를 가하여 homogenizer로 분쇄하여 5000g에서 90초간, 3000g에서 60초간 원심분리 후 2회 반복하여 순수한 엽록체만을 분리하여 hemocytometer를 이용해서 현미경상에서 계산하였다. 총 RNA함량(Rogers and Bendech, 1988)은 생엽 1g에 추출완충액(100mM LiCl, 1% SDS, 100mM Tris-NaOH, 10mM EDTA와 hydroxy-guinaline)과 phenol(1:1)의 혼합용액 1ml를 가하여 30분간 원심분리하고, 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 방치 후 12000g에서 원심분리하여 2차 증류수로 녹여 260nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

Table 1. Photosynthetic rate and chloroplast number in leaves of topped and non-topped tobacco plants during maturing period

Days before harvest	Photosynthetic rate ( $\mu$ mol. CO <sub>2</sub> /m <sup>2</sup> .sec)		Chloroplast number ( $\times 10^7$ /g, F.W.)	
	Topping	Non-topping	Topping	Non-topping
6	13.18	10.78	4.50	3.31
5	10.12	10.74	5.17	3.45
4	9.36	9.76	4.67	3.67
3	8.31	7.84	4.33	4.06
2	4.08	5.61	3.97	3.70
1	2.56	3.24	3.33	3.43

Peroxidase활성도(Macdam et al, 1992 ; Evans, 1970)는 생엽 1g을 액체질소상태하에서 마쇄하여 추출완충액[0.1M Tris-HCl (pH 7.3), 0.02M sucrose, 5% (w/v)PVP, 10ml MgCl<sub>2</sub>, 2mM EDTA, 2mM K<sub>2</sub>H-PO<sub>4</sub>] 5ml를 가하여 20000g에서 원심분리 후 상정액을 취하여 활성도측정에 사용하였다.

3.2M guaiacol을 0.1ml, 649mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 0.05ml과 0.01mM Tris-HCl 완충액(pH 7.3)을 3.12ml를 취한 후 준비된 시료 0.02ml을 가하여 436nm에서 흡광도 증가변화를 측정하였다.

### 결과 및 고찰

담배의 성숙에 따른 수확엽의 생화학적 활성변화를 파악하기 위해 조사된 광합성량 및 엽록체수의 변화는 Table 1과 같다. 3차시기와 4차수확시기 사이의 광합성량의 변화는 수확 6일전에는 적심구에서 성숙초기의 광합성능이 무적심구보다 컸다. 이 등(1995)이 담배잎은 출엽 후 15에서 20일까지 광합성량이 가장 높아 잎의 활성이 큰 시기라 한 것으로 보아, 본 실험에서 수확 6일전(출엽 후 32일)은 엽내에서 이미 생리적인 노화가 진행되는 시기로 생각되지만 외형적인 엽색의 판단으로는 노화의 징후는 감지되지 않았다. 엽령의 증가로 수확예정일이 가까워지면서 광합성량은 일정하게 감소되었고, 수확 3일전부터 광합성량의 감소폭이 커지면서 수확대상엽의 외형적인 성숙징후(황화현상)가 나타나기 시작하였다. 성숙후반기의 광합성량은 적심구에 비하여 무적심구가 컸지만, 외형적인 관찰로서는 무적심구에서 노화가 빨리 진행되었다. 이는 동화산물이 화아형성기관으로 전류로 인해 엽내의 물질축적이 감소되어 노화를 빠르게 진행시키는 것으로 생각된다. 엽록체수의 변화는 적심구에서 수확 5일전까지는 증가 후 감소하였으며, 특히 수확 2일전부터 감소폭이 커서 무적심구와 상이한 결과를 보였다. 무적심구는 잎이 성장하면서 엽록체수가 수확 3일전까지 증가한 후 수확 2일전에 감소폭이 컸는데, 이는 엽록체수는 출엽 후 35일까지 일정하게 유지하다가 감소한다는 이 등(1995)의 결과와 일치하는 것이었다.

본 실험결과에서 성숙기간중 광합성량의 감소폭은 적심구와 무적심구에서 비슷한 경향이었으나

엽록체수에서는 상이한 결과를 나타냈다. 이는 적심구에서는 생장기관의 제거로 체내대사작용이 향상되어 생리적인 활력이 초기에는 무적심구보다 컸지만 후기에서는 노화진행이 빨라져 적심처리간의 차이는 없었다. Kasaki 등 (1973)과 Lamppa 등 (1980)도 각각 담배와 완두에서 유사한 결과를 보고한 바있다.

식물의 생리적 상태의 기준(Griffith 등, 1984; Gwynn, 1978)이 되는 엽록소함량의 변화는 Figure 1과 같다. 총엽록소, 엽록소 a 및 엽록소 b 함량의

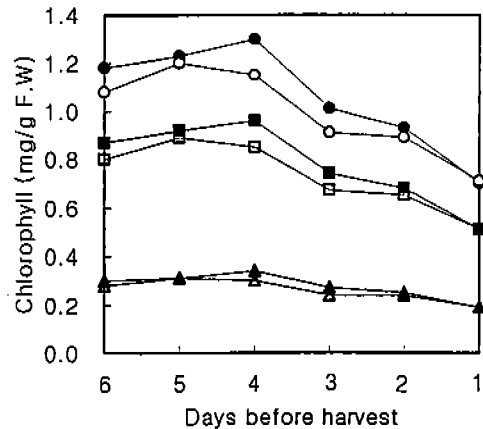


Fig. 1. Chlorophyll contents in harvested leaves of topped and non-topped tobacco plants during the maturing period. The filled and empty symbols indicate the topped and non-topped plants, respectively. Each symbol indicates total chlorophyll (circle), chlorophyll a(square) and chlorophyll b(triangle).

변화는 적심구와 무적심구에서 양적인 차이는 있어도 변화의 양상은 같은 경향이였다. 엽록소 대사과정의 생화학적 경로는 확실히 밝혀지지 않았으나, 엽록소함량의 변화는 수확 4일전까지 증가하였고, 특히 수확 3일전에 감소폭이 컸으며, 이후의 함량은 크게 변화하지 않고 수확시기까지 일정하게 유지하였다. 엽록소 b는 총엽록소함량과 엽록소 a와는 달리 성숙기간동안 변화의 폭이 작았다. 본 실험결과에 의하면 엽록소 파괴에 따른 외형적 판단의 성숙징후는 수확 3일전부터 나타나기 시작하였다.

엽내의 생리적 활성과 대사조절에 중요한 역할을 담당하는 가용성 단백질과 총 RNA함량 변화는

Fig 2와 같다. 성숙기간에 일어나는 가용성 단백질과 총 RNA함량의 변화양상은 비슷하였으나 적심구와 무적심구간의 함량 차이는 컸다. 가용성 단백질은 적심구에서 수확 5일전까지는 증가하다가 점진적으로 감소하여, 성숙후기인 수확 2일전과 수확

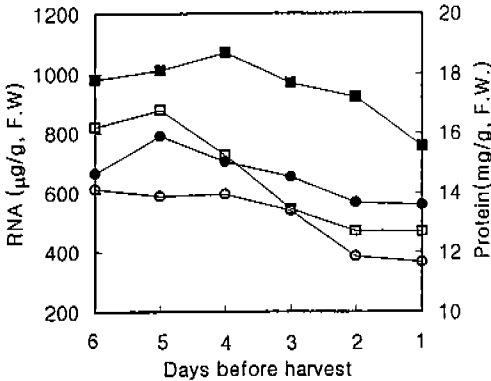


Fig. 2. Total RNA contents and soluble protein contents in harvested leaves of topped and non-topped tobacco plants during the maturing period. The filled and empty symbols indicate the topped and non-topped plants, respectively. Each symbol indicates RNA content (square) and soluble protein (circle).

1일전에는 변화의 양은 적었다. 그러나 무적심구는 변화의 양상이 달라 수확 4일전까지 단백질은 일정한 함량을 유지하고 수확 3일전부터 감소하였지만, 수확시기까지도 일정량의 단백질은 함유하고 있었다. 총 RNA함량의 변화는 가용성 단백질과 변화의 양상은 비슷하였으나 성숙시기에 따라 함량의 변화는 약간 상이하였다. 적심구에서는 수확 2일전까지 점진적으로 감소되어 일정하게 함량이 유지되었지만, 무적심구에서는 수확 5일전을 정점으로 수확 3일전까지 감소의 폭이 컸고 그후의 감소량은 적었다. 본 실험에서 성숙기간에 생식생장 기관의 제거는 단백질의 양적인 차이가 커 엽내의 생화학적 변화는 크게 일어났는데, 가용성단백질은 합성 후 분해기간이 3~7일(Hatfield와 Vierstra, 1997)로서 성숙기간에 단백질의 변화양상은 엽의 활성에 직접적으로 영향을 주는 것으로 생각된다. 따라서 적심구에서 가용성 단백질과 총 RNA함량이 높은 것은 생식생장 기관의 제거에 따른 동화산물

이 생장점에서의 이동이 제한되어 양분의 축적이 모든 세포의 활성을 유지시켰고, 무적심구에서는 합성량의 차이보다도 동화산물이 생식기관으로의 전류, 엽령의 증가와 동반한 양분축적감소 및 엽내의 고분자화합물의 분해가 노화의 진행을 가속화시켜 전반적인 엽내활성을 저하시켰기 때문(Tso, 1990; 이 등, 1996)으로 생각된다.

식물 체내의 불량조건에 민감하게 반응하여 체내의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 제거에 관여하는 peroxidase효소의 활성도는 Figure 3과 같다. Peroxidase의 활성은 적심구와 무적심구 모두 수확 6일전부터 수확 3일전

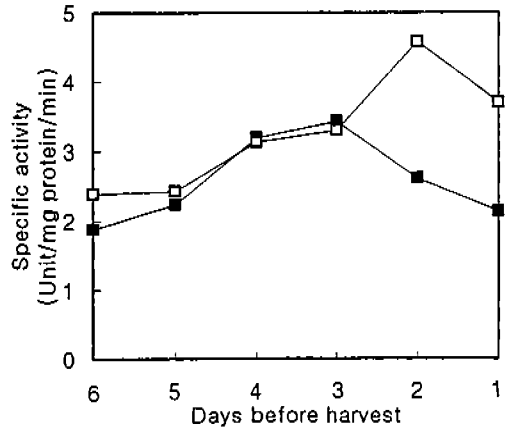


Fig. 3. Changes of peroxidase activity in harvested leaves of topped and non-topped tobacco plants during the maturing period. The filled and empty symbols in square indicate the topped and non-topped plants, respectively.

까지 일정하게 증가하였지만, 수확3일전을 정점으로 peroxidase활성은 적심구에서는 급격히 감소하고 무적심구에서는 급격히 증가하여 체내의 대사 불균형이 크게 일어났다. 성숙후는 체내의 생화학적 대사 저하를 통해 외형적인 형태변화로 노출되는데, 수확 3일전의 상대적인 효소활성차이는 적심구에서는 생식생장 기관의 제거로 동화산물의 전류가 제한되어 엽령이 증가하더라도 sink의 개념(Charlotte 등 1990)하에 잎 자체의 활성이 유지되었고, 무적심구에서는 생식생장 기관으로 동화물질이 전류되고 또한 엽령의 증가에 따라 엽록소와 가용성 단백질 등의 분해의 가속화로 체내 에너지 흐름의 불균형이 이루어져 식물세포에 피해를 주

는  $H_2O_2$ 가 생성되고, 식물체가 이에 대한 대응으로 peroxidase합성의 증가로 인해 활성이 갑자기 높아 진것(Collins와 Hawks, 1993; Macdam 등, 1992; Weston, 1969)으로 생각된다.

이상의 결과를 종합하면 적심과 무적심에 따라 엽내 생화학적 활성은 크게 달랐고, 엽록체수, 엽록소함량 및 광합성량과의 관계는 시기적으로 불일치하였는데 이는 생식성장 기관의 제거에 의한 동화물질의 전류 및 대사의 양적인 차이보다도 생리적인 기능분담에 따라 세포 소기관의 활력차이에 기인된 것으로 생각된다. Peroxidase의 활성변화는 엽령의 증가에 따라 수확 3일전에 엽내의 생화학적인 변화가 크게 일어나 엽의 노화에 따른 활성이 저하되는 시기로 생각되며, 외부스트레스에 따른 엽내의 단백질합성과 분해의 불균형(Hatfield와 Vierstra, 1997; Nooden과 Leopold, 1988; Lichtenthaler 1996; 이 등, 1996; Kisaki 등, 1973)은 체내대사에 크게 영향하더라도 전반적인 성숙양상은 비슷하여 결과적으로 식물의 노화는 유전자의 계획된 유전정보에 의해 진행되는 생육과정의 하나로 생각된다.

## 결 론

본 실험은 담배식물을 적심구와 무적심구로 처리하여 수확 대상엽의 생화학적인 활성변화를 조사하기 위하여 엽내의 광합성능 및 가용성단백질 등을 분석하고, 엽내 스트레스에 반응하는 peroxidase의 활성을 측정함으로써, 성숙기간에 일어나는 엽의 대사기능과 엽의 소질을 파악하고자 실시한 결과는 다음과 같다.

1. 적심과 무적심에 따른 성숙기간에 잎의 생리적인 활력은 적심구에서 컸고, 엽록소함량은 수확 4일전부터, 광합성량은 수확 3일전부터, 엽록체수는 무적심구에서 수확 3일전부터 적심구에서 수확 5일전부터 감소하였다.

2. 성숙기간의 가용성 단백질함량과 총 RNA함량의 변화양상은 비슷하였다. 가용성 단백질 함량은 적심구에서 수확 5일전부터 감소하면서 일정 함량을 유지하였고, 무적심구에서는 수확 3일전에 크게 감소하였다. 총 RNA함량은 적심구에서는 수확 2일전까지 변화의 양은 적었고, 무적심구에서는 수

확 5일전부터 크게 감소하였다.

3. Peroxidase의 활성은 수확3일전을 정점으로 적심구에서는 급격히 낮아졌고 무적심구에서는 급격히 증가하여 엽내의 생화학적 활성변화가 크게 일어났다.

## 참 고 문 헌

- 이상각, 심상인, 강병화 (1996) 담배의 노화과정에 따른 단백질의 생화학적 변화. 한국작물학회지 41(5) : 563-568.
- 이상각, 강병화, 석영선, 배길관, 노재영 (1996) 담배의 엽 발달 및 노화과정 중 이화학적 변화. 한국연초학회지 18(2) : 138-144.
- 이상각, 심상인, 강병화 (1995) 담배의 노화과정 중 광합성 및 단백질함량의 변화. 한국연초학회지 17(1) : 20-26.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
- Charlotte, B. Z., A. B. Glamm, J. Hoddinott, and C. A. Swanson (1990) Alterations in source-sink patterns by modification of source strength. *Plant Physiol.* 66 : 945-949.
- Collins, W. K and S. N. Hawks., Jr. (1993) Principles of flue cured tobacco production. N. C. State Univ. p 212-232.
- Evans, J. J. (1970) Spectral similarities and kinetic differences of two tomato plant peroxidase isozymes. *Plant Physiol.* 45 : 66-69.
- Gopalachari, N. C., A. S. Sastry, and D. Sabba Rao (1970) Effect of maturity of leaf at harvest on some physical and chemical properties of cured leaf of "Delcrest" fluecured tobacco. *Ind. J. Agri. Sci.* 40 : 901-910.
- Griffith, R. B., W. D. Valleau, and R. N. Jeffrey (1984) Chlorophyll and carotene content of eighteen tobacco varieties. *Plant Physiol.* 19:689-693.
- Gwynn, G. R. (1978) Chlorophyll disappearance in yellow and green tobaccos. *Tob. Sci.* 22 : 141-143.

- Hatfield, P. M. and R. D. Vierstra (1997) Protein degradation. In Dennis, D. T., D. H. Turpin and D. B. Layzell. *Plant metabolism*. p 26-36. Longman. England.
- 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.
- Korea, Ginseng & Research Institute (1991) Analytical methods of tobacco & tobacco smoke. p 165-167.
- Lamppa, G. K., L. V. Elliot and A. J. Bendich (1980) Changes in chloroplast number during pea leaf development. *Planta.* 148 : 437-443.
- Lichtenthaler, H. K. (1996) Vegetation stress : an introduction to the stress concept in plants. *J. Plant Physiol.* 148 : 4-14.
- Macdam, J. W., C. Nelson and R. Sharp (1992) Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. *Plant Physiol.* 99 : 872-878.
- Nooden, L. D. and A. C. Leopold (1988) Senescence and aging in plants. Academic Press Inc. p 2-171.
- Rogers, S. O. and A. J. Bendich. (1988) Plant molecular biology manual. Kluwer Academic Publisher. A6 : 1-10.
- Tso, T. C. (1990) Production, physiology, and biochemistry of tobacco plants. IDEALS, Inc. p 91-124.
- Walker, D. A., Z. G. Carovic and S. P. Robinson. (1987) Isolation of intact chloroplast: General principles and criteria of integrity. In *Method of enzymology*. Academic press. New york. 148: 145-150.
- Walker, E. K. (1968) Some chemical characteristics of cured leaves of flue-cured tobacco relative to time of harvest, stalk position, and chlorophyll content of green leaves. *Tob. Sci.* 12 : 58-65.
- Weston, T. J. (1969) The behaviour of peroxidase and polyphenol oxidase during the growth and senescence of tobacco leaves. *J. Exp. Bot.* 20 : 56-63.