

# 봄 무 (*Raphanus sativus*) 유식물에서 저온, ABA와 염분 스트레스가 Acid Phosphatase 활성에 미치는 영향

박지훈 · 조봉희\*

수원대학교 자연과학대학 생명과학과 & 기능성생명소재연구소

## Effect of the Cold, ABA and Salt Stress on the Activity of Acid Phosphate in the Young Plants of Spring Radishes (*Raphanus sativus*)

PARK, Ji Hun · CHO, Bong-Heuy

Department of Life Science, the University of Suwon, Suwon 445-890, Korea & Center for Smart Bio-Materials

**ABSTRACT** Acid phosphatase in the radish young plant showed optimal activity at pH 5.5. The activity of acid phosphatase was maintained longer during the ABA (0.5 mM) treatment than those in control, whereas that was similar to the treatment of NaCl (0.5 mM). But during the cold (4°C) treatment, the activity of acid phosphatase was decreased dramatically compared to the control, which was maintained almost on a constant level and increased gradually during 6 days. It showed that acid phosphatase was in relation to the change of biochemical reaction, which plants were coped with cold, NaCl and ABA stress.

**Key words:** Acid phosphatase, ABA, low temperature, NaCl, spring radish

### 서 론

Acid phosphatase는 효소의 특성상 비교적 산성 pH에서 활성을 나타낸다. 동물에서는 acid phosphatase의 생리적인 역할과 기작이 어느 정도 알려져 있으므로 (Andersen and Matthiessen 1966), 생체내에 존재하는 acid phosphatase의 활성도를 측정하여 대사작용의 이상 또는 질병에 대한 진단에 사용하고 있다 (Cohn and Bensen 1961). 곤충에서는 성충이 될 때 acid phosphatase isozyme 활성이 증가되면서 곤충의 탈피를 촉진시킨다 (Masaharu and Yoichi 1987). 식물에서는 acid phosphatase에 대해서는 잘 알려져 있지 않고 다만 씨앗에 acid phosphatase가 존재하고, 씨앗이 발아될 때 acid phosphatase의 함량이 증가된 후 어린 싹이 성장함에 따라 감소되므로 식물의 분화와 관련이 있다고 보고되었다 (Joyce and Grisolia 1960).

담배 조직배양세포에 sucrose starvation 상태를 유지시키면, 배양세포의 autophagy 현상이 일어나는데, 당류고갈 2일에는 생체에 존재하는 총 단백질의 30~40%가 분해된다 (Moriyasu and Ohsumi 1996). 반면 이 시기에 세포를 quinacrine으로 염색하여 광현미경에서 관찰하면 세포 안에는 새로 형성된 소포체들과 액포가 염색되는 것으로 보아 소포체와 액포 안에 새로 합성된 단백질이 축적되어 있음을 암시한다. 1-naphthylphosphate와  $\beta$ -glycerophosphate를 기질로 acid phosphatase의 활성을 측정한 결과는 당류고갈 동안 acid phosphatase의 농도와 활성이 증가됨을 확인하여 acid phosphatase는 스트레스와 관련이 있고, 세포가 스트레스에 대항하기 위해서 불필요한 단백질을 분해시키기 위해서 acid phosphatase의 농도가 증가된다고 설명하였다 (Moriyasu and Ohsumi 1996).

식물이 스트레스를 받으면 생체내에는 생화학적 변화가 동반된다 (Journet et al. 1986). NaCl 스트레스를 주면, 식물생장이 저하되고, 막과 연결된 60 kDal 단백질이 증가되고, 이 단백질은 ionic homeostasis를 유지시키는 역할을 한다

\*Corresponding author Tel 033-330-7815 Fax 033-330-7715  
E-mail shwonkw@rda.go.kr

(Fischer et al, 1994). 무 자엽과 하배축에서도 cold와 abscisic acid (ABA)처리를 하면 여러 개의 중탕에 강한 단백질이 유도되어 스트레스에 대항한다 (Cho 2000).

본 연구에서는 어린 무 전 식물체에 ABA (0.5 mM), NaCl (0.5 mM)과 저온 (4°C) 스트레스를 주어 acid phosphatase가 스트레스와 관련있는지를 연구하고, 스트레스 동안에 변화하는 acid phosphatase 활성을 연구하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 배양조건

장춘대형 봄무 (*Raphanus sativus* L, F1 Spring White) 종자는 서울 종묘사 (품종등록 Na,VR-Hy-175)에서 구입하였다. 유리 Petri dish에 여과지를 이중으로 깔고 멸균시킨 후 멸균 증류수를 첨가하였다. 무 씨는 1% NaOCl로 10분간 멸균한 후 멸균 증류수로 3번 세척한 후 22°C 암소에서 발아시켰다. 실험진행에 따라 진행일에 유식물을 채취하여 실험에 사용하였다.

### Acid phosphatase 활성의 측정과 pH에 대한 영향

채취된 시료는 즉시 적정 무게 (fresh weight)를 측정하고, 액화질소로 급속냉동시킨 후 막자사발에 0.1 mM standard assay buffer (sodium acetate buffer, pH 3.0~6.0; Tris-HCl buffer, pH 7.0~8.0; sodium borate buffer, pH 9.0~10.0) 동량을 넣고 얼음 위에서 마쇄하였다. 마쇄된 시료는 4°C, 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하였다. 침전물을 제거하고, 상층액에 100  $\mu$ L의 p-nitrophenyl phosphate 첨가하여 40°C에서 1시간 반응시킨 후에 spectrophotometer (Hitachi Ltd, Model U-2000, Japan)를 사용하여 410 nm에서 acid phosphatase의 활성을 측정하였다 (Carreno et al. 1982). p-nitrophenyl phosphate를 표준으로 하여 acid phosphatase의 활성을 정량하였다. Acid phosphatase의 활성 1 units는 주어진 조건하에서 1분당 1  $\mu$ mole p-nitrophenyl을 생성하는 효소의 양으로 정하였다. 단백질 정량은 Lowry 정량방법에 의해 분석하였고 (Lowry et al. 1951), 표준 단백질은 bovine serum albumen을 사용하였고, 단백질의 양은 750 nm에서 흡광도에서 측정하였다.

### ABA, NaCl과 저온 처리

봄 무 발아 2일 후부터 0.5 mM의 ABA와 0.5 mM의 NaCl를 3시간 간격으로 50 mL씩 분무하였고, 실험진행에 따라 유식물을 채취하였다.

저온처리는 발아 2일 후부터 4°C cold chamber에서 지속적으로 처리하여 실험진행에 따라 시료를 채취하여 acid

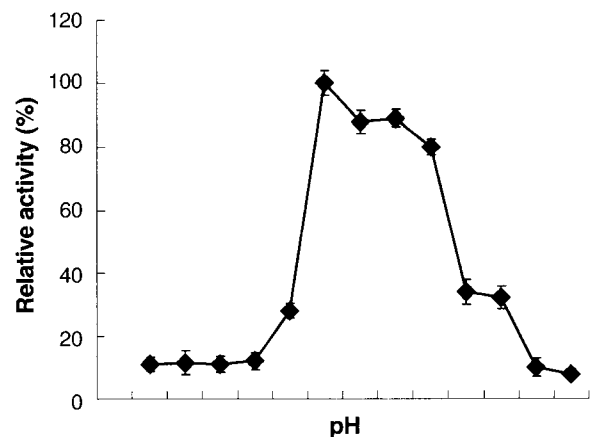
phosphatase 활성 측정에 사용하였다. Optimal pH 실험 외에 모든 실험은 sodium acetate buffer pH 5.5에서 수행하였다. 모든 연구는 3번 이상 수행한 data의 평균값을 표시하였다.

## 결과 및 고찰

### Acid phosphatase 활성에 미치는 pH에 영향

세포가 스트레스를 받으면 산성에서 활성을 나타내는 acid phosphatase의 활성이 증가된다 (Moriyasu and Ohsumi 1996). Acid phosphatase 활성에 미치는 pH의 영향을 알기 위해서 pH 3.0~pH 9.0 범위에서 acid phosphatase의 활성을 분석하였다 (Figure 1). 무 (자엽과 하배축)에서 p-nitrophenyl phosphate를 기질로 사용하여 각각의 pH에 대한 acid phosphatase의 활성을 측정한 결과는 pH 5.5에서 최대의 활성을 나타내었으나 pH 5.0과 pH 7.0 범위에서 acid phosphatase 활성에 큰 차이를 나타내지 않았다. 무에서는 pH 5.5에서 중성인 pH 7.0 사이에서 acid phosphatase의 활성을 측정할 수 있다고 본다. 일본산 무에서도 pH 5.5에서 acid phosphatase는 최대의 활성을 나타내어 봄 무와 유사한 결과를 보이거나 (Yoshimoto et al. 1992), papaya에서는 pH 6.0에서 최대 활성을 보여주어 (Carreno et al. 1982) 식물의 따라서 acid phosphatase의 최대 활성은 차이를 보임을 알 수 있었다.

무에서는 acid phosphatase의 활성은 3.30 units/mL이고, pH 5.5에서는 18.77 units/g fresh weight에 활성을 나타내었다. Wheat germ에서 추출한 acid phosphatase의 활성은 0.9 units/mL, 9 units/g fresh weight를 보였고 (Waymark and Van Etten 1991) Papaya에서 acid phosphatase의 활성은 6.03 units/mL, 12.87 units/g fresh weight (Carreno et al. 1982)로 식물에 따라서 차이를 보여준다.



**Figure 1.** Change in the activity of acid phosphatase at various pH values. The buffer system used were as follows; sodium acetate buffer, pH 3.0-6.0; Tris-HCl buffer, pH 7.0-8.0; sodium borate buffer, pH 9.0-10.0.

Acid phosphatase 활성에 미치는 스트레스에 영향

식물 생장호르몬 중에서 ABA는 스트레스 호르몬으로 세포내에 수분고갈 신호에 의해서 유도되며 (Singh et al. 1989), 수분고갈 현상은 NaCl 처리 (Binzel et al. 1987), 저온 처리 (Hon et al. 1995) 등에 의해서 같은 ABA를 유도하여 생체로 하여금 수분고갈에 대처하도록 지시하여 스트레스에 대항하도록 유도한다. 저온, NaCl 스트레스는 생체에 대해 수분고갈을 유도하는 원인이 된다 (Singh et al. 1989; Binze et al. 1987). 식물에서 외부에 처리된 ABA는 저온, 수분고갈, 염분 스트레스를 처리한 것과 같은 효과를 나타내므로 (Singh et al, 1989; Cho 2000), 무 유식물에 0.5 mM ABA를 처리하여 스트레스에 대한 acid phosphatase 활성의 변화를 측정하였다 (Figure 2). 대조구에서 6시간에서 가장 높은 acid phosphatase의 활성을 나타내었고, 6시간 이후에는 acid phosphatase의 활성이 급속히 감소된 후 12시간 이후에는 acid phosphatase 활성이 거의 유사하게 유지되었다. 반면 같은 무 유식물에 ABA를 처리하면, 처리 6시간까지는 acid phosphatase의 활성이 약간 감소되었으나 처리 6시간 이후에는 활성이 증가되었다가 서서히 감소되었다. ABA를 처리한 무 유식물에서 acid phosphatase 활성의 감소가 대조구보다는 서서히 진행되었다. 대조구에서 acid phosphatase의 최대 활성값은 18.77 units/g fresh weight이나 ABA처리 때에 최대 활성은 18.39 units/g fresh weight를 보였다. 그러나 acid phosphatase가 스트레스에 어떻게 관여하는지는 아직 상세히 설명할 수가 없으나 스트레스에 대하여 반응을 보이는 것으로 판단하였다.

ABA가 acid phosphatase 활성에 영향을 미치는 것으로 판단되어 같은 유식물에 0.5 mM의 염분을 처리한 후 acid phosphatase의 활성을 분석하였다 (Figure 3). 무 실험에서 0.5 mM ABA와 0.5 mM NaCl 처리 등 단일 농도를 선택한 이유는 native gel 상에서 acid phosphatase의 활성이 잘 검지 되었

고 (Data not shown), 무 유식물에서 스트레스 연구에서 적합하여 단일 농도로 활용했던 농도이고 (Cho 2000), 장시간 NaCl를 처리하면 무 유식물이 연약하여 염분처리에 견디지 못하고 하배축이 늘어지는 현상이 나타나므로 실험목적에 가장 적합한 농도를 선택하였다. 염분처리한 무 유식물의 acid phosphatase 활성은 ABA 처리와 매우 유사하였으나 acid phosphatase의 최대 활성이 ABA 처리 때보다는 3시간 정도 지연되었다. 염분처리한 acid phosphatase의 최대 활성값은 18.20 units/g fresh weight를 보였다.

저온 스트레스를 주면, 저온처리 즉시 acid phosphatase 활성이 급속히 감소하였다가 시간이 지남에 따라서 서서히 증가를 보였다 (Figure 4). 저온처리 동안 ABA (Figure 2)와 NaCl 처리 (Figure 3)와는 전혀 다른 acid phosphatase의 활성을 보였다. 24시간 동안의 저온처리 동안 acid phosphatase의 최대 활성값은 9.76 units/g fresh weight로 대조구의 활성값 18.77 units/g fresh weight보다 매우 낮음을 알 수 있다. 저온처리로 24시간 이상 acid phosphatase의 활성이 증가되므로 저온처리를 계속하여 acid phosphatase 활성의 변화를 측정하였다 (Figure 5). 저온처리 6일까지 acid phosphatase의 활성이 증가되었다가 저온처리 7일부터 약간 그 활성이 감소되었으나 저온처리 10일까지 그 활성이 유지되었다. 그러나 대조구에서 acid phosphatase 활성은 2일부터 약간 증가되었으나 효소의 활성에 큰 차이를 보이지 않았다. 저온처리 2일 후부터 acid phosphatase의 활성이 증가되는 것은 생체가 지속적인 저온처리에 견디기 위해서 적응하기 위한 수단으로 보인다. 그러므로 acid phosphatase는 스트레스에 관여하는 것은 분명하나 어떤 기작으로 작용하는지는 분명히 설명할 수가 없다. 다만 acid phosphatase는 스트레스에 대항하여 합성되고, 생체는 스트레스에 피해를 막기 위해서 생체를 유지하는 데 꼭 필요하지 않는 단백질을 분해시켜서 (Fisher et al. 1994; Moriyasu and Ohsumi 1996; Cho 2000), 스트레스에 대항할 수

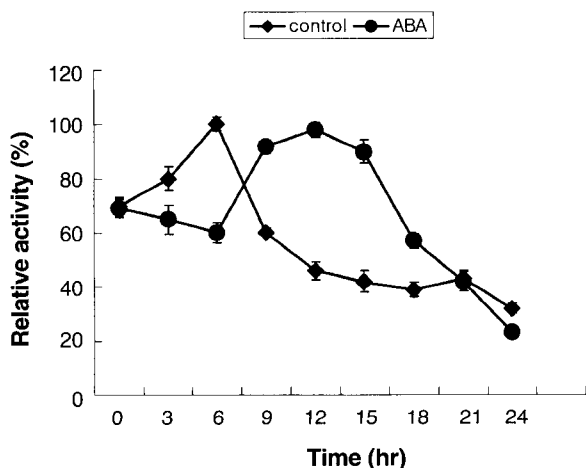


Figure 2. Change in the activity of acid phosphatase in the presence of 0.5 mM ABA. The radishes were incubated in the dark at 22°C.

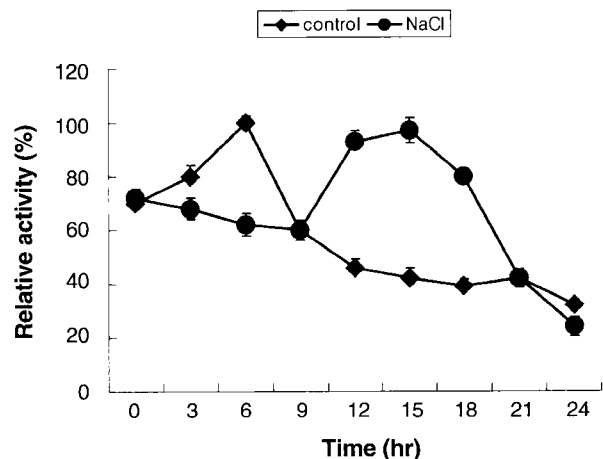


Figure 3. Change in the activity of acid phosphatase in the presence of 0.5 mM NaCl. The radishes were incubated in the dark at 22°C.

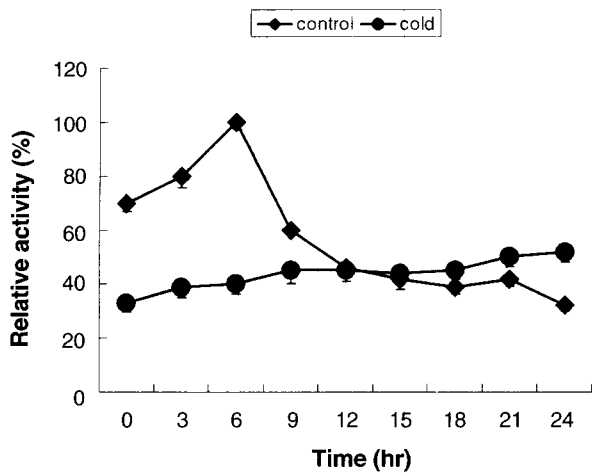


Figure 4. Change in the activity of acid phosphatase during the cold treatment. The radishes were incubated in the dark at 4°C.

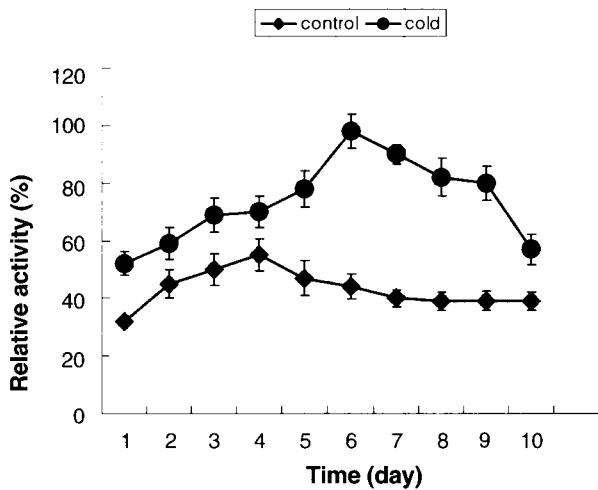


Figure 5. Change in the activity of acid phosphatase during the cold treatment. The radishes were incubated in the dark at 4°C.

있는 물질들을 합성하는 것으로 추측한다.

## 적 요

무 유식물에서 acid phosphatase의 활성은 산성인 pH 5.5에서 최대치를 보였다. 0.5 mM ABA 처리로 acid phosphatase의 활성이 대조구보다는 오래 지속되었고, 0.5 mM NaCl 처리시 acid phosphatase 활성의 변화는 ABA 처리 때와 유사하였다. 그러나 저온처리를 하면, 대조구에 비해서 효소의 활성이 급속히 감소되었다가, 대조구의 acid phosphatase는 거의 같은 활성을 유지하는 동안 처리구의 acid phosphatase의 활성은 6일까지 서서히 증가되었다. Acid phosphatase는 저온처리, ABA와 NaCl 처리에 대항하여 식물이 스트레스에 대처하도록 생화학적 반응에 관여하는 것으로 보인다.

## 인용문헌

- Andersen H, Matthiessen ME (1966) The histiocyte in human foetal tissues. Its morphology, cytochemistry, origin, function and fate. *Zeit Zellforsch* 72:193-211
- Binzel M, Hasegawa PM, Rhodes D, Handa S, Handa AK, Bressan RA (1987) Solute accumulation in tobacco cells adapted to NaCl. *Plant Physiol* 84:1408-1415
- Carreno R, Harvey T, Chan JH (1982) Partial purification and characterization of an acid phosphatase from Papaya. *J Foods Sci* 47:1498-1502
- Cho BH (2000) Induction of boiling stable proteins by cold and ABA treatment in radish cotyledon and hypocotyls. *Analytical Sci Tech* 13:346-350
- Cohn ZA, Benson B (1965) The differentiation of mononuclear phagocytes. I. The influence of inhibitors and results of autoradiography. *J Exp Med* 121:279-288
- Fisher M, Pick K, Zamir A (1994) A induced 60 kdalton plasma membrane protein play a potential role in the extreme Halotolerance of the alga *Dunaliella*. *Plant Physiol* 106:1359-1365
- Hon WC, Griffith M, Mlynarz A, Kwok YC, Yang DS (1995) Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol* 109:879-889
- Journet E, Bligny R, Douce R (1986) Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells. *J Biol Chem* 261:3193-3199
- Joyce B, Grisolia, S (1960) Purification and properties of a nonspecific acid phosphatase from Wheat germ. *J Biol Chem* 235:2278-2291
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:189-275
- Masaharu E, Motoko T, Shojii H (1988) A novel variant of acid phosphatase isozyme from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Japan J Genet* 63:149-157
- Singh NK, Nelson D, Kuhn D, Hasegawa PM, Bressan RA (1989) Molecular cloning of osmotin and regulation of its expression by ABA and adaptation to low water potential. *Plant Physiol* 90:1096-1101
- Yoshimoto M, Kimura T, Miyamoto T, Sakamoto J, Hatano S (1992) Purification and properties of acid phosphatase from Japanese radish. *Biotech Biochem* 56:147-152
- Waymark PP, Van Etten RL (1991) Isolation and characterization of a homogeneous isozyme of wheat germ acid phosphatase. *Arch Biochem Biophys* 288:621-633