

저산소 조건이 보리 유묘의 탄수화물대사에 미치는 영향

최혜란* · 박명렬* · 김정곤** · 남궁승박*** · 최경구* · 윤성중*†

*전북대학교 생물자원과학부, **작물과학원 호남농업연구소, ***국립식물검역소 호남지소

Effect of Hypoxia on Carbohydrate Metabolism in Barley Seedlings

Heh Ran Choi*, Myoung Ryoul Park*, Jung Gon Kim**, Seung Bak Namkoong***, Kyeong-Gu Choi*, and Song Joong Yun*†

*Division of Biological Resources Sciences and Institute of Agricultural Science and Technology, Jeonju 561-756, Korea

**National Honam Agricultural Research Institute, NICS, Iksan 570-080, Korea

***National Plant Quarantine Service, Honam Regional Office, Kusan 573-400, Korea

ABSTRACT : Barley plants growing in the wet paddy field easily encounter suboptimal oxygen concentration in the rhizosphere that causes molecular oxygen deficiency in root cells. The capacity of root cells to utilize energy sources is known to be positively related to resistance to hypoxia stress. This study was conducted to investigate effects of hypoxia on enzymes involved in the starch and sucrose metabolism. Barley seedlings at the third leaf stage were subjected to hypoxia (1 ppm dissolved oxygen) by purging the culture solution with nitrogen gas for up to seven days. The protein content was slightly decreased by hypoxia for 7 days. α -Amylase activities increased significantly in the root but not in the shoot after 3 to 7 days of hypoxia. β -Amylase activities were not affected significantly in both tissues. Additionally, sucrose synthase activities were affected little in both tissues by 7 days of hypoxia. The results indicate that root cells activate breakdown of polysaccharide reserves in response to an acute hypoxia to supply energy sources for fermentative glycolysis and cell wall fortification.

Keywords: amylase, barley, hypoxia, glycolysis, sucrose synthase

우리나라에서의 보리 내습성에 대한 연구는 1970년대와 1980년대 전반기에 걸쳐 활발히 수행되었다(Suh, 1971, 1977, 1978; Suh & Park, 1979). 보리의 내습성과 뿌리의 형태적 특성에 대한 연구를 통하여 뿌리의 특성이 내습성과 밀접한 관계가 있음이 밝혀졌다. 즉, 내습성이 강한 품종은 뿌리가 굵고, 부정근 수가 많으며, 근중이 무겁고 주경 하위절의 부정근 수가 많고 근장이 길며 근의 산화력이 높은 특성이 있다 그

러나 내습성의 효율적 개량을 위해서는 형태적 특성과 함께 혐기조건에 대한 보리 뿌리의 기능적 반응특성에 관한 해명이 필요할 것으로 생각된다.

뿌리의 생육과 기능수행을 위해서는 지상부로부터의 탄소에 너지의 공급과 공급된 에너지원의 효율적인 이용이 매우 중요하다. 그러므로 혐기상태에 대한 내성에는 解糖과정의 진행에 충분한 sucrose의 공급(Xia & Saglio, 1992), 解糖과정과 알코올 발효과정의 효율증진(Hole *et al.*, 1992) 및 세포내 적정 pH 조절(Roberts *et al.*, 1985)등이 매우 중요한 것으로 알려져 있다. 지상부로부터 공급되는 sucrose는 sucrose synthase와 invertase에 의해 UDP-glucose, fructose, glucose등으로 분해된다. 뿌리세포에 저장되어 있는 탄수화물은 α -와 β -amylase에 의해 maltose로 분해되고 α -glucosidase에 의해 glucose로 분해된 포도당은 해당과정을 거쳐 pyruvate로 변형된다. Pyruvate는 산소 존재시에는 호기적 대사를 산소 부재시에는 혐기적 대사를 경과하여 산화된다. 호기적 대사에서는 pyruvate는 탈탄산되어 형성된 아세틸기가 보조 효소 A에 연결되어 아세틸-CoA를 생성하며 아세틸 CoA는 시트르산회로를 경과하여 산화된다. 혐기적 대사에서는 pyruvate는 알코올 발효와 혐기적 해당작용을 받게된다. 알코올 발효에 의해 pyruvate는 이산화탄소를 잃고 acetaldehyde가 되고 acetaldehyde는 환원되어 ethanol을 생성한다. 혐기적 해당작용에 의해서는 pyruvate가 lactate로 환원된다. 따라서 식물이 혐기적 조건에 처하게 되면 ethanol이나 lactate의 생성이 증가된다(Bray *et al.*, 2000)

토양이 과습하면 근권토양에 산소가 부족하게 된다. 뿌리 또는 근경과 같은 토양 중 식물기관은 산소의 일시적 또는 장기적 부족에 의해 대사과정의 변화를 겪게 된다. 저산소조건에 있는 식물세포는 호흡과정의 최종 전자수용체인 산소가 부족하여 산화환원계가 포화되어 환원형의 조효소가 축적되며 ATP

†Corresponding author (Phone) +82-63-270-2508 (E-mail) sjyun@chonbuk.ac.kr <Received June 1, 2005>

합성이 감소한다. 따라서 세포의 에너지 수준은 낮아지고, 환원력은 높아지며 전자전달계는 포화되어 활성산소종의 생성에 유리한 조건이 조성된다(Crawford & Brandle, 1996; Kennedy *et al.*, 1992; VanToai & Bolles, 1991).

우리나라에서 발생하는 동계 또는 춘계습해의 주된 원인은 토양과습에 의한 근권의 산소부족이다. 산소부족 조건에서의 생육저하 정도가 낮은 품종의 육성을 위해서는 산소부족 조건에서의 생리·생화학적 대사작용의 특성에 대한 정보가 우선적으로 필요하다 그러나 산소부족 조건하에서 보리의 에너지 획득대사에 관한 연구 결과는 찾아보기 어렵다. 따라서 본 연구에서는 보리 유묘를 이용하여 산소부족 조건에서의 전분 및 자당 대사관련 효소의 반응 특성을 조사 분석하였다

재료 및 방법

식물재료

공시품종으로는 내한쌀보리를 사용하였다 종자는 sodium hypochlorite(Duksan, Korea) 1% 용액에 20분 진탕 배양하여 소독한 다음 2차 증류수로 5번 세척하고, 상온에서 12시간 침종하였다 침종한 종자는 페트리디쉬에 치상하여 20°C 배양상에서 16시간 배양하여 발아시켰다. 발아된 종자는 양액재배용 포트에 옮겨 심고 3엽기 식물체로 생육시켜 실험에 사용하였다. 양액은 전작물용 木村氏 양액을 개량하여 사용하였다(Park *et al.*, 2003). 혐기처리는 질소가스를 약 0.25 kgf/cm² L/mm으로 통기시켜 배양액의 산소농도를 1~2 ppm으로 조절하였고, 대조처리는 공기를 통기시켜 산소농도를 8-10 ppm으로 조절하였다.

효소의 활성 및 등위효소 검정

효소 추출액의 준비 - 효소활성 검정용 시료는 액체질소하에서 마쇄하여 사용하였다. α-Amylase(E.C. 3.2.1.1)와 β-amylase(E.C. 3.2.1.2) 활성측정용 단백질은 맥류의 α-amylase assay kit와 β-amylase assay kit(Megazyme, Ireland)를 이용하여 추출하였다 Sucrose synthase(E.C. 2.4.1.13; SuSy) 활성측정용 단백질 추출액은 200 mM HEPES(pH 8.0), 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 1 mM ethylene glycerol bis(β-aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid(EGTA), 20 mM sodium ascorbate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 그리고 10%(w/v) polyvinylpyrrolidone(PVPP)이 포함된 완충액을 이용하여 추출하였다. 시료균질액을 4°C에서 14000 g로 20분간 원심분리하였고 그 상정액을 MICROCON YM-10을 이용하여 제염하였다(Zeng *et al.*, 1998). 효소추출액의 단백질 함량은 Bradford법(Bradford, 1976)을 이용하여 측정하였다 단백질(30 μg)의 polyacrylamide gel을 이용한 전기영동 및 silver staining을 이용한 검출은 상법에 따라 실시하였다(Baek *et al.*, 2000).

효소활성 검정 - α-Amylase와 β-amylase 활성은 α-amylase assay kit와 β-amylase assay kit(Megazyme, Ireland)를 이용하여 측정하였다. SuSy 활성은 합성방향으로 진행시켜 측정하였다. 50 mM HEPES-NaOH(pH 7.5), 15 mM MgCl₂, 10 mM fructose, 5 mM UDP-glucose가 포함된 반응액에 추출한 효소액을 첨가하였다. 효소반응은 30°C에서 30분간 진행하였고 30% KOH을 첨가하여 반응을 중지하였다. 반응 중지액을 100°C에서 10분간 배양하여 반응에 사용되지 않고 남아 있는 fructose를 제거하였다. 실온으로 냉각 후 0.14%의 anthrone을 첨가하고 40°C에서 20분간 배양하였다. 반응액의 흡광도는 620 nm에서 측정하여 효소활성을 환산하였다(Zeng *et al.*, 1998). 효소활성 측정 실험을 3반복하여 실시하였으며, 성적의 통계처리는 SAS(SAS Institute Inc., Cary, USA)를 이용하여 실시하였다.

결 과

단백질의 변화

혐기처리 직후 뿌리의 단백질 함량은 대조에 비하여 약 20% 증가하였으나 처리 3일 후부터는 줄곧 직선적으로 감소하여 혐기처리 7일 후에는 대조처리에 비하여 약 40% 감소하였다(Fig. 1A). 반면, 지상부의 단백질 함량은 혐기처리 5일째 까지 별다른 영향을 받지 않았으나 7일째에는 대조처리에 비하여 약 10%정도 감소하였다(Fig. 1A) 벼와 옥수수에서도 혐기처리 조건에서 단백질 함량이 감소한다고 보고된 바 있다(Kennedy *et al.*, 1992, Sachs *et al.*, 1996) 그러나 혐기처리에 의한 단백질의 질적 변화는 polyacrylamide gel 전기영동과 silver staining에 의해 검출되지 않았다(Fig. 1B).

Amylase 활성의 반응

보리 유묘의 α-amylase활성은 뿌리가 지상부보다 6배 이상 높았다. 각 처리구의 뿌리의 단백질당 α-amylase활성은 처리 전의 대조구에 비하여 1, 3, 5, 7일 처리에서 각각 29%, 102%, 65%, 14% 증가하였다. 각 처리일의 대조구에 비하여는 1, 3, 5, 7일 처리에서 각각 13%, 35%, 81%, 44% 증가하였다(Fig. 2A) 지상부의 단백질당 α-amylase활성은 처리 3일째 이후 약간 감소하는 경향이였으며, 혐기처리에 의한 변화는 처리 5일째 이외에는 유의 차가 인정되지 않았다(Fig. 2B).

보리 유묘의 β-amylase활성은 뿌리와 지상부가 비슷하였으나 그 수준은 매우 낮았다. 보리 뿌리의 단백질당 β-amylase 활성은 처리 일수에 따라 차이를 보였으나 혐기처리 3일과 5일에서 각각 64%와 25% 증가하였다(Fig. 3A). 지상부의 단백질당 β-amylase활성은 처리 7일에는 대조처리에 비하여 약간 증가하였으나 그 이외의 처리에서는 유의하게 변화하지 않았다(Fig. 3B).

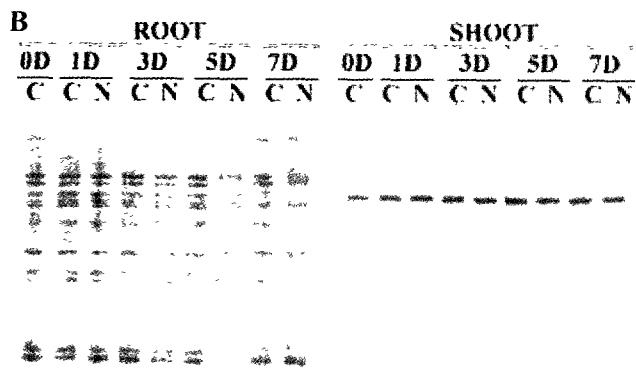
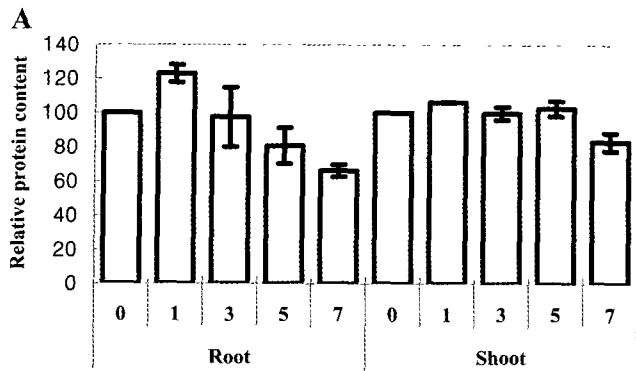


Fig. 1. Effect of hypoxia on the root and shoot proteins. A. Percent protein contents relative to controls of each day (D) after hypoxia treatment. Protein contents of the root and shoot at 0 day of treatment were 5.01 and 10.62 mg/gFW, respectively. B. Equal amount of protein (30 µg) was loaded in each lane. The culture solution for 3-week-old seedlings was purged with ambient air (C) or nitrogen gas (N) for 1, 3, 5 and 7 days, respectively.

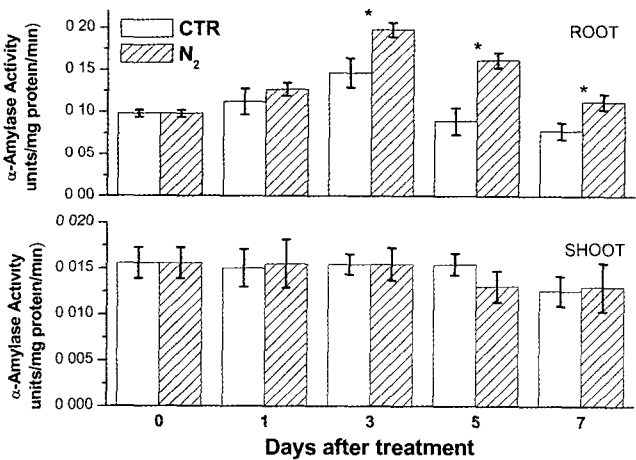


Fig. 2. Effect of hypoxia on α -amylase activities in the root and shoot. The culture solution for 3-week-old seedlings was purged with ambient air (CTR) or nitrogen gas (N₂) for 1, 3, 5 and 7 days, respectively.

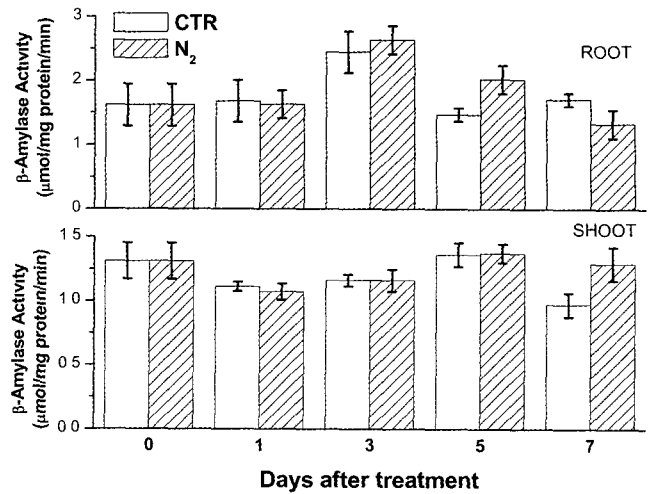


Fig. 3. Effect of hypoxia on β -amylase activities in the root and shoot. The culture solution for 3-week-old seedlings was purged with ambient air (CTR) or nitrogen gas (N₂) for 1, 3, 5 and 7 days, respectively.

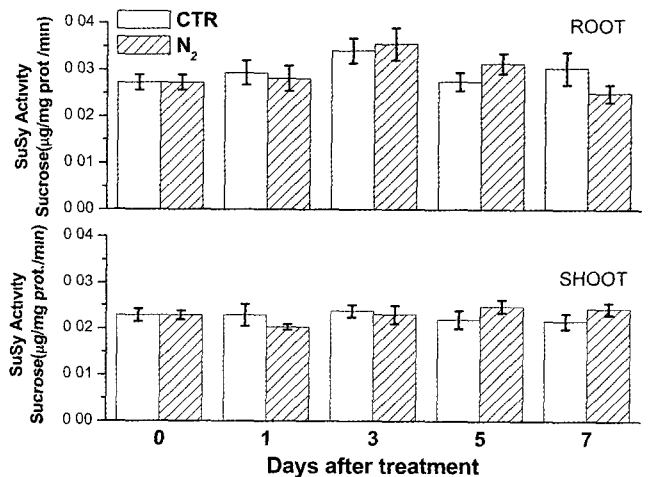


Fig. 4. Effect of hypoxia on sucrose synthase activities in the root and shoot. The culture solution for 3-week-old seedlings was purged with ambient air (CTR) or nitrogen gas (N₂) for 1, 3, 5 and 7 days, respectively.

Sucrose synthase 활성의 반응

보리 유묘의 총SuSy활성은 뿌리와 지상부에서 유사하였다. SuSy활성의 혐기처리에 대한 반응은 처리기간에 따라 다소 상반된 결과를 보였으나 일반적으로 큰 차이는 나타나지 않았다. 각 처리구의 뿌리의 단백질당 총SuSy활성은 처리 전의 대조구에 비하여 1, 3, 5일 처리에서 각각 3%, 30%, 15% 증가하였으나 7일 처리에서는 8% 감소하였다. 각 처리일의 대조구에 비하여는 1일과 7일은 4%와 18% 감소하였고 3일과 5일은 4%와 14% 증가하였다(Fig. 4A). 지상부의 총SuSy활성은 모든 처리시기에서 처리와 대조구간에 차이를 보이지 않았다(Fig. 4B).

고 찰

혐기조건에 처한 식물체는 전분과 자당의 분해에 의하여 공급되는 포도당의 혐기적 해당과정을 통하여 에너지를 얻는다. 따라서 전분의 분해와 자당의 분해에 관여하는 amylase와 SuSy의 혐기조건에 대한 반응은 혐기대사에서 매우 중요하다.

혐기조건에 대한 α -amylase나 β -amylase의 반응에 대한 연구는 주로 발아종자를 이용하여 진행되었다. 벼나 피와 같은 식물의 종실은 완전한 무산소 조건에서도 발아와 자엽의 생장이 진행된다(Alpi & Beevers 1983; Kennedy *et al.*, 1980). 그러나 보리, 밀, 귀리, 호밀의 종실은 무산소조건에서는 α -amylase 활성이 나타나지 않는다(Perata *et al.*, 1992). 종실 이외의 식물체의 뿌리나 잎 조직에서의 amylase에 대한 연구 결과는 찾아보기 어렵다. 본 연구에서 관찰된 혐기조건인 뿌리에서의 α -amylase 활성의 증가는 보리 유묘의 뿌리에 고분자 탄수화물이 존재함을 의미한다. 이와 같이 뿌리에 존재하는 고분자 탄수화물은 혐기조건에서 분해되어 혐기적 해당과정의 진행에 필요한 에너지원으로 사용되는 것으로 생각된다.

SuSy는 sucrose를 분해하여 UDP-glucose와 fructose를 생성하는 반응을 촉매하여 해당과정의 진행에 필요한 재료를 공급한다. 벼와 옥수수에서 SuSy는 혐기조건인 뿌리 조직에서 합성이 유도되고 효소활성이 증가한다(Gughelminetti *et al.*, 1995; Springer *et al.*, 1986) 또한 SuSy의 유전자는 밀(Crespi *et al.*, 1991; Marana *et al.*, 1990)과 벼(Ricard *et al.*, 1991)에서 혐기조건에 의해 발현이 유도된다. 옥수수에서는 혐기조건에서의 뿌리 세포의 에너지원 획득과정에 관여하는 SuSy가 내습성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Ricard *et al.*, 1998). 그러나 보리의 SuSy활성은 벼와 옥수수의 SuSy활성과 달리 혐기조건에서 큰 변화를 보이지 않았다. 이러한 결과는 SuSy활성의 혐기조건에 대한 반응이 식물종에 따라 차이가 있음을 의미하는 것으로 생각된다. 다만, 연구에 따라 다소 상이한 혐기처리를 실시한 경우가 있다. 본 연구에서는 배양액의 용존산소 농도를 1~2 ppm으로 조절하는 혐기처리를 하였으나, 일부 연구에서와 같이 지상부를 포함한 혐기처리에 대한 SuSy효소활성의 반응에 대한 연구를 통하여 식물종간 변이 정도를 보다 정확히 비교할 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서 지상부에서는 SuSy의 활성이 대조구와 혐기처리구간에 차이를 보이지 않았는데, 이러한 결과는 배양액에 한정된 혐기처리로 인해 지상부는 혐기조건이 유도되지 않은 처리조건과 관계가 있는 것으로 생각된다.

이상의 결과로 미루어 보아 혐기조건에서 α -amylase 활성의 증가는 세포에 필요한 에너지원의 공급과 관련이 있는 것으로 사료된다. 그러나 고분자 탄수화물이 분해되어 생성되는 sucrose를 분해하여 해당과정의 재료를 공급하는 역할을 하는 효소인 SuSy는 혐기처리에 의해 변화하지 않았다. 한편, 보리에서도 혐기조건에서 진행되는 해당과정의 최종 산물인 lactate

와 ethanol을 생성하는 효소인 LDH와 ADH는 혐기조건에서 세포의 생활에 필요한 에너지를 얻을 수 있는 방향으로 반응하는 것으로 알려져 있다(Choi *et al.*, 2004). 즉, 보리 세포는 탄수화물대사를 통한 에너지 획득과정에 관여하는 효소가 SuSy 이외에는 모두 혐기조건에서 촉진되는 것을 의미한다. 따라서, SuSy 이외에 sucrose의 분해에 관여하는 효소인 invertase가 존재하므로 혐기 조건에서의 에너지 획득과정에서 invertase의 역할에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

적 요

본 연구에서는 보리 습해의 원인인 과습에 의한 근권의 산소부족이 보리의 뿌리와 지상부의 amylase 및 sucrose synthase 활성에 미치는 영향을 배양액의 용존산소를 1~2 ppm의 혐기조건으로 1-7일간 처리한 3엽기 보리 유묘를 이용하여 조사하였다. 해당과정의 재료인 glucose의 공급에 관여하는 효소 중에서 전분을 분해하는 α -amylase의 활성은 혐기조건에서 증가하나 자당을 분해하는 sucrose synthase활성은 혐기조건에서도 호기적 상태의 수준을 유지하였다. 이러한 결과는 에너지 획득과정에서의 α -amylase의 역할이 호기조건에서보다 혐기조건에서 상대적으로 증대하는 것을 의미하는 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청의 산학연 공동연구사업의 지원으로 수행하였음.

참 고 문 헌

- Alpi, A. and H Beevers 1983. Effect of O₂ concentration on rice seedling Plant Physiol 71 : 30-34
- Baek, S. H., I S Kwon, T I. Park, S J. Yun, J. K. Kim, and K. G. Choi 2000. Activities and isozyme profiles of antioxidant enzymes in intercellular compartment of overwintering barley leaves. J. Biochem Mol Biol 33 : 385-390
- Bradford, 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.
- Bray, E., J. Bailey-Serres, and E. Weretilnyk 2000. Response to abiotic stresses In Biochemistry & Molecular Biology of Plants (B. Buchanan, W. Gruissem, and R. Jones, Eds.). American Soc Plant Physiologists Rockville, Maryland, USA p1158-1203
- Choi, H. R., J. H. Lim, J. G. Kim, K. G. Choi, and S. J. Yun 2004. Growth and anaerobic glycolysis in barley seedling in response to acute hypoxia Kor. J. Crop Sci 49 : 522-527.
- Crawford, R. M. M. and R. Brandle 1996 Oxygen deprivation stress in a changing environment J. Exp. Bot 47 : 145-159
- Crespi, M. D., E. J. Zabaleta, H. G. Pontus, and G. L. Salerno. 1991. Sucrose synthase expression during cold acclimation in wheat Plant Physiol 96 : 887-891.

- Guglielminetti, L., P. Perata, and A. Alpi 1995. Effect of anoxia on carbohydrate metabolism in rice seedlings. *Plant Physiol* 108 : 735-741
- Hole, D. J., B. G. Cobb, P. S. Hole, and M. C. Drew. 1992. Enhancement of anaerobic respiration in root tips of *Zea mays* following low-oxygen (hypoxia) acclimation. *Plant Physiol* 99 : 213-218
- Kennedy, R. A., D. Barret, D. van de Zee, and M. E. Rumpho 1980. Germination and seedling growth under anaerobic conditions in *Echinochloa crus-galli* (Barnyard grass). *Plant Cell Environ* 3 : 243-248.
- Kennedy, R. A., M. E. Rumpho, and T. D. Fox 1992. Anaerobic metabolism in plants. *Plant Physiol* 100 : 1-6
- Marana, C., F. Garcia-Olmedo, and P. Carbonero. 1990. Differential expression of two types of sucrose synthase-encoding genes in wheat in response to anaerobiosis, cold shock and light. *Gene* 88 : 167-172.
- Park, M. E., H. R. Choi, J. S. Choi, J. K. Kim, S. J. Seo, H. J. Kang, J. G. Kim, K. G. Choi, and S. J. Yun 2003. Characteristics of barley seedlings in hydroponic culture conditioned artificial wet injury. *Kor. J. Crop Sci.* 48 : 160-168
- Perata, P., J. Pozueta-Romero, T. Akazawa, and J. Yamaguchi 1992. Effect of anoxia on starch breakdown in rice and wheat seeds. *Planta* 188 : 611-618.
- Ricard, B., J. Rivoal, A. Spiteri, and A. Pradet 1991. Anaerobic stress induces the transcription and translation of sucrose synthase in rice. *Plant Physiol* 95 : 669-674
- Ricard, B., T. Vantoai, P. Chourey, and P. Saglio. 1998. Evidence for the critical role of sucrose synthase for anoxic tolerance of maize roots using a double mutant. *Plant Physiol* 116 : 1323-1331
- Roberts, J. K. M., F. H. Andrade, and I. C. Anderson 1985. Further evidence that cytoplasmic acidosis is a determinant of flooding intolerance in plants. *Plant Physiol* 77:492-494.
- Sachs, M. M., C. C. Subbiah, and I. N. Saab. 1996. Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize. *J. Exp. Bot.* 47 : 1-15.
- Springer, B., W. Werr, P. Starlinger, D. C. Bennett, M. Zokolica, and M. Freeling 1986. The Shrunken gene on chromosome 9 of *Zea mays* L is expressed in various plant tissues and encodes an anaerobic protein. *Mol. Gen. Genet.* 205 : 461-468.
- Suh, H. S. 1971. Studies on the wet-injury of wheat and barley varieties. I. Varietal difference of wet-injury resistance of wheat and barley. *Kor. J. Breeding* 3 : 98-106.
- Suh, H. S. 1977. Studies on the wet-injury of wheat and barley varieties III. Effect of various moisture levels on the top and root growth of barley crop. *Kor. J. Crop Sci.* 22 : 80-92.
- Suh, H. S. 1978. Studies on the wet-injury of wheat and barley varieties. IV. Effect of Excess-moisture in the soil on the growth of wheat, six row and two row barley at various stage. *Kor. J. Crop Sci.* 23 : 26-31
- Suh, H. S. and R. K. Park. 1979. Studies on the wet-injury of wheat and barley varieties. V. Interrelationship among the characters of roots and those of tops in barley and wheat crop. *Kor. J. Crop Sci.* 24 : 66-72
- VanToai, T. T. and C. S. Bolles. 1991. Postanoxic injury in soybean (*Glycine max*) seedlings. *Plant Physiol* 97 : 588-592.
- Xia, J. H. and P. H. Saglio. 1992. Lactate acid efflux as a mechanism of hypoxia acclimation of maize root tips to anoxia. *Plant Physiol* 100 : 40-46.
- Zeng, Y., W. Wu, W. T. Avigen, and K. E. Koch 1998. Differential regulation of sugar-sensitive sucrose synthases by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and posttranscriptional responses. *Plant Physiol* 116 : 1573-1583.