

아연 스트레스를 받는 식물의 성장을 위한 생분해되는 킬레이트로서 에틸렌디아민

이상만*

경북대학교 응용생명과학부
(2010년 6월 9일 접수, 2010년 6월 23일 수리)

Ethylenediamine as a Promising and Biodegradable Chelating Agent in Growth of Plant Under Zinc Stress

Sangman Lee (School of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu, 702-701, Korea)

Zinc (Zn) is an essential element required for growth and development of plants. However, Zn can be toxic to plants when it presents excessive amount. Phytoextraction is an economic and environment-friendly technique using plants to clean-up metal-contaminated soils. However, the technique cannot be applied in highly metal-contaminated areas because plants will not normally grow in such conditions. Therefore, this research focuses on identifying chelating agents which are biodegradable and applicable to highly metal-contaminated areas. Zn as a target metal and cysteine (Cys), histidine (His), malate, citrate oxalate, succinate, and ethylenediamine (EDA) as biodegradable chelating agents were selected. Plants were grown on agar media containing various chelating agents with Zn to analyze the effect on plant growth. Malate and His slightly increased the inhibitory effect of Zn on root growth of plants, whereas Cys, citrate, oxalate, and succinate did not show significant effects. However, EDA strongly diminished the inhibitory effect of Zn on root growth. The effect of EDA is correlated with decreased Zn uptake into the plants. In conclusion, as biodegradable chelating agents, EDA is a good candidate for growth of plants in highly Zn-contaminated areas.

Key Words: Chelate, Heavy metal, Phytoextraction, Phytoremediation, Zinc

서 론

농경지에 고농도로 존재하는 금속의 기원은 지리학적으로 자연적인 경우도 존재하지만 대개는 인간의 활동에 의한 부산물로서 심각한 환경오염이라는 문제를 야기시킨다. 이는 인간의 건강을 위협하고 더 나아가 생태계를 파괴하는 요소이기 때문에 오염된 환경을 빠른 시일 내에 정화하여야 한다. 물리적 화학적 방법을 이용하는 환경정화는 빠르고 간편하다는 장점이 있는데 비해 비용이 비싸기 때문에 모든 오염된 지역을 정화하기란 현실적으로 어렵고 또한 토양을 황폐화시키는 단점이 존재한다(Raskin and Ensley, 2000).

최근에 관심을 받고 있는 생물학적 환경정화는 식물과 미생물을 이용하는 것으로서 비용이 저렴하다는 면에서 경제적이며, 아주 적은 농도의 오염물질이 광범위한 지역에 존재할 때 효과적으로 사용이 가능하며 또한 오염지역을 파괴하지 않는 친환경적 방법으로서 방사능물질, 중금속 및 유기오염물질을 정화하는데 주로 사용된다. 식물을 이용하여 오염된 토양과 수질을 정화하는 식물환경정화(phytoremediation)는 저렴한 비용과 친환경적이기 때문에 미래의 유망한 환경복원 기술로서 phytoextraction, phytostabilization, phyto-volatilization, rhizofiltration 등의 세부적인 방법으로 분류된다 (Rausser, 1990; Salt et al., 1998; Blaylock, 2000; Cobbett, 2000; Dushenkov and Kaupulnik, 2000).

Phytoextraction은 토양에 존재하는 금속이 식물의 뿌리를 통해서 식물 내로 들어와 식물의 잎이나 줄기에 축적이 되면 이를 인위적으로 수거해서 따로 처리하는 방법이다. Phytoextraction의 효과를 높이기 위해서 주로 두 가지 방

*연락처:

Tel: +82-53-950-7345 Fax: +82-953-7233
E-mail: sangman@knu.ac.kr

법이 사용되는데 하나는 금속을 잘 흡수하는 식물을 선택하는 것이다. 하지만 대부분의 선택된 식물은 생체량이 작고 잘 흡수하는 금속의 종류가 한 두 가지 정도로 선택의 폭이 좁다는 단점이 존재한다. 두 번째 방법은 비록 금속 흡수 능력이 적어도 생체량이 큰 식물을 이용하는데 이때 식물의 금속 흡수력을 높이기 위해서 이를 도와주는 킬레이트를 사용하는 것이다(Wu et al., 1999). 킬레이트의 도움을 받아 진행되는 생물학적 환경정화에서 킬레이트는 토양에 흡착된 금속을 떼어내어 금속의 이동성을 높여주고 이는 식물이 뿌리를 통해서 금속 흡수를 용이하게하여 다량의 금속이 식물 내로 축적이 가능하도록 해준다. EDTA(ethylenediamine tetraacetic acid)는 phytoextraction에서 다양한 종류의 중금속을 토양에서 추출하는데 자주 이용되는 킬레이트로서의 장점이 큰데 비해서 환경에서 자연적인 분해가 잘 일어나지 않아 새로운 환경오염문제를 야기시키는 단점이 존재한다(Huebert and Shay, 1992). 따라서 최근에는 자연적으로 생분해가 잘 일어나는 친환경적인 킬레이트에 대한 연구가 활발히 일어나고 있으며 그 대표적인 예로서 식물의 뿌리에서 토양으로 분비되는 분자량이 적은 유기산(LMWOA, low molecular weight organic acid)과 EDDS(ethylenediamine disuccinic acid) 등이 있다(Tandy et al., 2006).

아연은 중금속으로서 여러 효소 및 다른 단백질의 구성성분이기때문에 식물의 성장과 발달에 중요한 필요요소이다. 하지만 비록 필요요소이나 그 농도가 너무 높으면 식물에게 해를 끼쳐 성장을 억제시키게 된다. 아연은 세포 내에서 주로 단백질 또는 핵산과 결합된 상태로 존재하여 대사의 중간과정에 관여를 하게 된다(Broadley et al., 2007). 토양에서 아연은 보통 세 분획에 존재하는데 아연이온을 포함하여 물에 녹는 유기물질 형태로 수용액에 존재하는 아연, 콜로이드 상태로서 치환 가능하고 점토, 부식토, Al-hydroxide, Fe-hydroxide 등에 흡착된 아연, 그리고 불용성 상태로서 복합체인 아연이다(Barber, 1995). 토양의 pH는 아연의 토양 내 존재상태를 결정하는 중요한 요소이다. pH가 높으면 아연은 양이온 치환 자리에 쉽게 흡착이 되고 pH가 낮아지면 CaCl_2 에 의해서 쉽게 치환 된다. 토양에 존재하는 아연의 90% 이상은 불용성 상태이기 때문에 식물이 이용하기 어려운 상태이다. 아연에 의한 농작물의 독성은 주로 채광과 제련으로 오염된 경작지 때문이며 피해를 받은 작물의 증세는 아연의 축적 농도가 $300 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ 이상이면 눈으로 확인이 가능하게 된다(Chaney, 1993; Marschner, 1995).

현재까지의 phytoextraction에 관한 주된 연구 중 하나는 토양에 존재하는 금속을 킬레이트를 이용하여 식물 내로 흡수가 용이하도록 하는 것에 주력을 해 왔다. 하지만 생물학적정화의 단점은 오염물질의 농도가 너무 높으면 생물이 정화는 물론 성장도 불가능하다는 것이다. 따라서 본 연구는 고농도의 중금속이 오염된 지역에서도 생물학적정화가 가능하게 하는 것을 목적으로 대표적인 중금속 오염물질 중 하나인

아연을 선택하였으며 고농도의 아연이 존재하는 조건에서도 식물이 성장이 가능하며 생분해가 잘 되는 친환경적인 킬레이트 선별에 연구 초점을 두었다.

재료 및 방법

식물재료 및 성장조건

애기장대(*Arabidopsis thaliana* cv. Columbia)의 야생형(wild-type) 종자를 1/2 농도의 Murashige & Skoog 염, 2% (w/v) sucrose (pH 5.8)를 포함하는 $100 \times 100 \times 15 \text{ mm}$ square plates의 고체 배지에서 7일간 배양하였으며 배양 조건은 23°C 에서 18시간 빛을 조사하였다. 배지에는 다양한 농도(0, 25, 50, 100, 250, 500 μM)의 아연 (ZnCl_2)과 여러 가지 킬레이트 (Cys, His, malic acid, citric acid, succinic acid, oxalic acid, EDA)를 조합하여 처리 하였으며 배양을 마친 후 식물의 뿌리 길이를 측정하였다.

아연 농도 분석

배양을 마친 식물을 초순수로 5번 세척하였고 이를 70°C 에서 식물 무게의 변화가 없을 때까지 오븐에서 건조시켰다. 건조된 샘플을 가루로 만든 후 HNO_3 (65%) 와 H_2O_2 (30%)를 포함하는 용액을 넣고 120°C 에서 8 시간 반응시켜 샘플을 분해시켰다. 분해를 마친 샘플은 140°C 에서 건조를 시킨 후 희석된 질산용액으로 다시 용해시켰다. 아연의 양 측정은 inductively coupled plasma atomic emission spectrometry(ICP-AES; Thermo Jarrell Ash, Franklin, MA)을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

아미노산 중에서 시스테인(Cys)과 히스티딘(His)은 중금속 이온과 결합하는 경향이 강하다. 시스테인은 생물의 중금속 해독작용에서 중요한 역할을 하는 단백질(예, metallothioneins) 또는 폴리펩타이드(예, phytochelatin)의 주된 구성 성분으로서 카드뮴, 구리, 아연 등과 chelation 하는데 관여를 하고 있다(Stillman et al., 1992; Hell, 2002). 반면에 히스티딘은 니켈과 chelation에 관여하여 해독 작용에서 중요한 역할을 한다(Kerkeb and Krämer, 2003). 따라서 이 두 아미노산이 식물의 아연을 흡수하는데 있어 어떠한 영향을 미치는지를 알아보았다(Fig. 1). 시스테인의 농도가 $250 \mu\text{M}$ 이하에서는 식물의 성장에 별다른 영향이 없었으며 그 이상의 농도로 증가되면 시스테인은 식물에게 독성을 나타내기 시작하며 아연의 농도는 $50 \mu\text{M}$ 정도가 되면 식물의 성장이 절반 수준으로 억제가 된다(Fig. 1a). 히스티딘은 처리 농도가 $1000 \mu\text{M}$ 이 되어도 식물의 성장에는 별다른 효과가 없어 보인다(Fig. 1b). $50 \mu\text{M}$ 아연의 처리 조건에서 다양한 농도의 시스테인 처리에 의한 식물성장 억제의 양상이 서로 비

슷하게 나타난 결과를 근거로 해서 시스테인은 식물이 받는 아연에 대한 스트레스에 큰 영향을 주지 않는 것으로 판단된

다. 반면에 히스티딘은 식물이 받는 아연에 대한 스트레스를 약간 더 촉진시켜 식물의 성장을 억제한다. 이러한 결과는 시

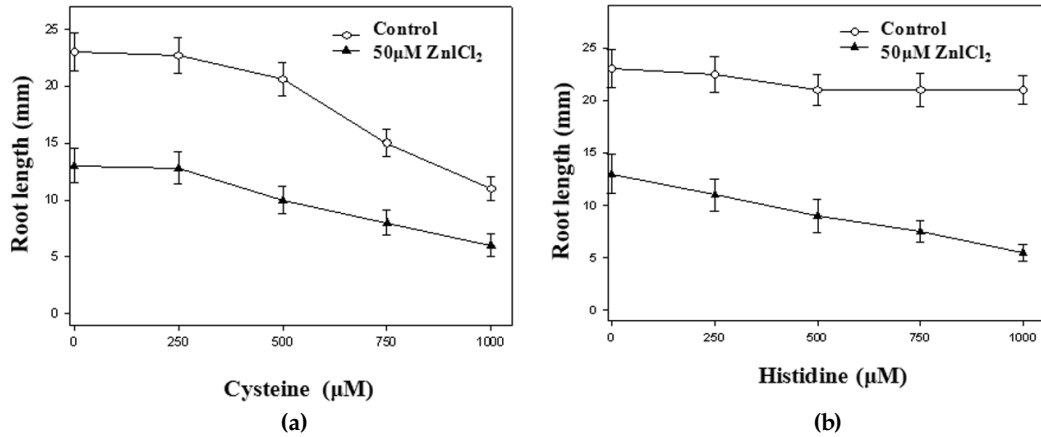


Fig. 1. Effects of cysteine and histidine on growth of *Arabidopsis* roots under zinc stress. *Arabidopsis* seeds were germinated and grown for 7 days on an agar medium containing various concentrations of either cysteine (a) or histidine (b) with or without 50 μM ZnCl₂. Afterward, root lengths were measured. Values are means ± SE of 30 seedlings.

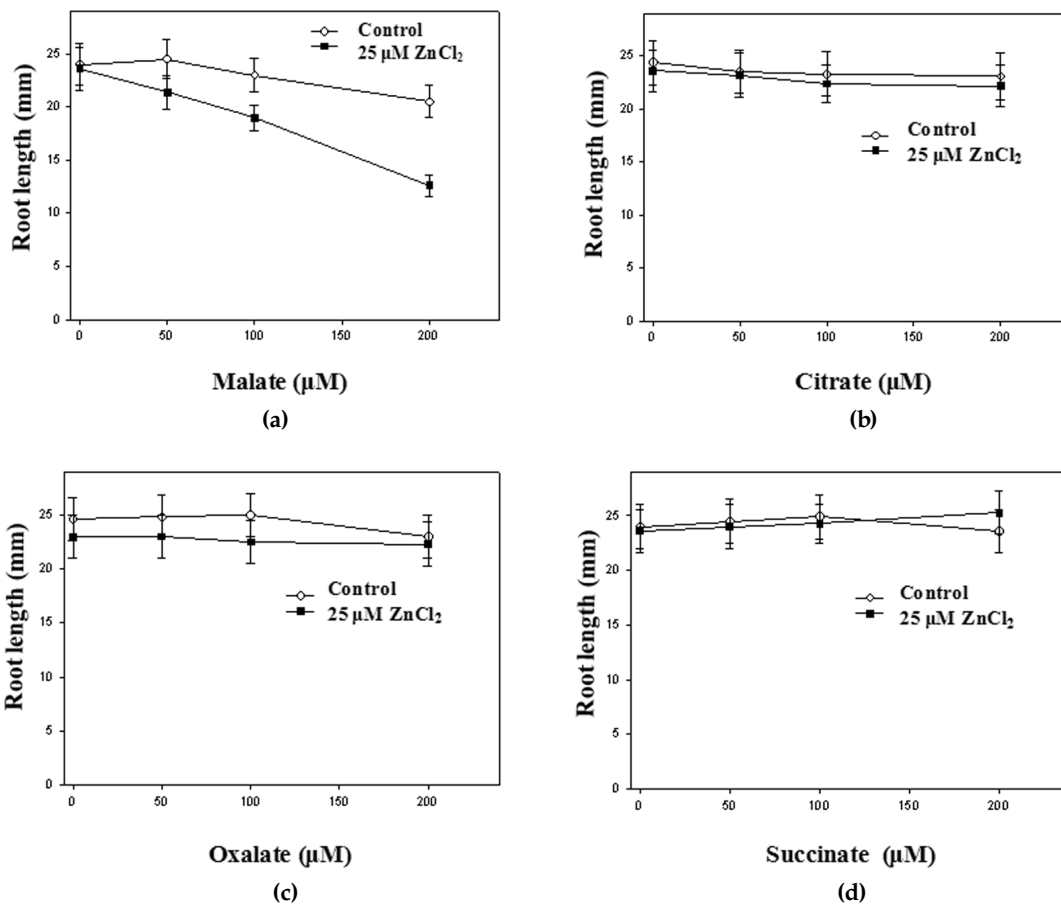


Fig. 2. Effects of malate, citrate, oxalate, and succinate on growth of *Arabidopsis* roots under zinc stress. *Arabidopsis* seeds were germinated and grown for 7 days on an agar medium containing various concentrations of malate (a), citrate (b), oxalate (c), and succinate (d) with or without 25 μM ZnCl₂. Afterward, root lengths were measured. Values are means ± SE of 30 seedlings.

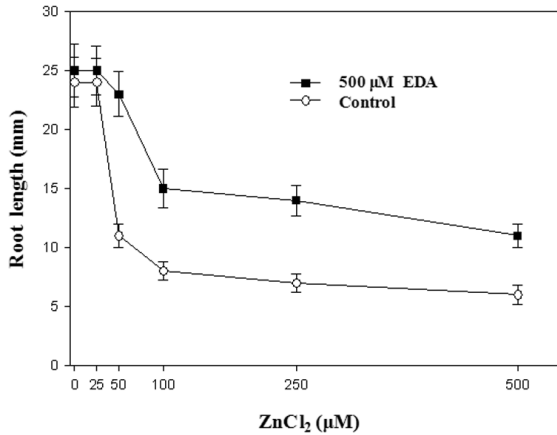


Fig. 3. Effect of EDA on growth of *Arabidopsis* roots under zinc stress. *Arabidopsis* seeds were germinated and grown for 7 days on an agar medium containing various concentrations of $ZnCl_2$ with or without $500 \mu M$ EDA. Afterward, root lengths were measured. Values are means \pm SE of 30 seedlings.

스테인이 비록 아연과 chelation이 가능하지만 식물 외부에서 식물 내부로 흡수되는 아연의 양에는 미치는 효과는 미미한 수준이며 히스티딘은 식물 내부로 흡수되는 아연의 양을 약간 촉진 시키는 것으로 생각된다.

Citrate, malate, oxalate, 그리고 succinate 같은 저분자 형태의 유기산은 금속 스트레스에 대한 저항성에 관여 하는데 이는 이들이 여러 금속과 chelation을 하기 때문이다 (Mench et al., 1988). 따라서 저분자의 유기산이 아연 스트레스를 받는 식물에 어떠한 영향을 주는지 알아보았다(Fig. 2). Malate의 처리 농도가 $200 \mu M$ 이하이거나 또는 아연의 처리 농도가 $25 \mu M$ 이하에서 식물의 성장은 거의 억제되지 않았다(Fig. 2a). 하지만 아연의 농도가 $25 \mu M$ 에서 식물의 성장에 영향을 주지 않지만 malate의 농도가 $50 \mu M$ 에서 $200 \mu M$ 이내로 처리하면 식물의 성장이 현저하게 억제되었다. 이러한 결과는 malate가 식물의 뿌리로 흡수되는 아연의 이동을 촉진한 것이라고 추측할 수 있다. Malate외의 다른 유기산인 citrate, oxalate, 그리고 succinate는 malate 처리에서 나타난 결과는 볼 수 없었다(Fig. 2b-d). 따라서 malate는 본 연구 목적과 반대의 결과를 보이고 있으며 이는 기존의 방법인 phytoextraction에 사용하는데 적합한 킬레이트이고 그 외의 본 연구에 사용된 유기산은 별다른 효과가 없어 다른 킬레이트를 알아보았다.

EDA(ethylenediamine)의 구조식은 $C_2H_4(NH_2)_2$ 로 화학공장에서 여러 화학물질 생산에 사용되고 있으며 $[Co(EDA)_3]^{3+}$ 형태로 전형적인 킬레이트 리간드로 작용한다. EDA 자체는 처리 농도가 $500 \mu M$ 에서도 식물의 성장에 별다른 영향을 보이지 않았지만 아연 스트레스를 받아 식물의 성장억제가 되는 것을 현저하게 약화시키는 것으로 나타났다

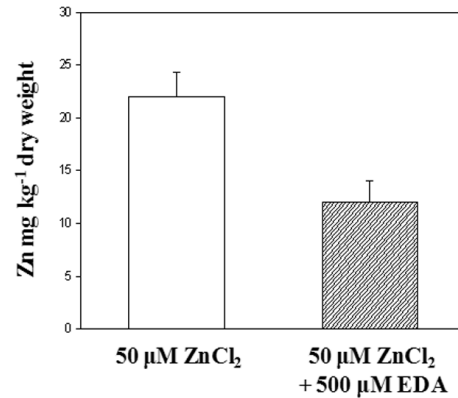


Fig. 4. Effects of EDA on zinc concentration in *Arabidopsis* seedlings. *Arabidopsis* seeds were germinated and grown for 7 days on an agar medium containing $50 \mu M$ $ZnCl_2$ with or without $500 \mu M$ EDA. Afterward, zinc concentrations were measured by ICP-AES. Values are means \pm SE of 3 replicates.

(Fig. 3). 아연에 의한 식물의 성장 억제가 EDA에 의해서 감소되었는데 이 효과는 $50 \mu M$ 아연에서 현저하며 $500 \mu M$ 아연에서도 나타나는데 이는 EDA가 식물의 아연 흡수를 억제하는 효과가 존재한다는 것을 암시한다. EDA의 영향이 실제로 식물 내로 아연이 흡수되는 것을 억제하였기 때문인지를 확인하기 위해서 식물 내 축적되는 아연의 농도를 분석하였다 (Fig. 4). 실험 결과는 EDA가 식물 내로 흡수되는 아연의 양을 현저하게 억제한 것으로 나타났다.

본 연구 결과는 고농도의 아연으로 오염된 토양을 식물을 이용하여 정화할 때 식물이 오염된 지역에서 성장이 가능하고 정화도 가능하게 해주는 친환경적인 킬레이트로서 EDA가 강력한 후보임을 제시를 하며 실제로 현장에서 적용이 가능한지는 앞으로 더 연구가 수행되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: 20070-301033009)의 지원에 의해 이루어진 것이며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

- Barber, S.A., 1995. *Soil nutrient bioavailability*, 2nd (ed.) New York, NY, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Blaylock, M.J., 2000. Field demonstration of phytoremediation of lead contaminated soils, In: Terry, N., Banuelos, G., (ed.) *Phytoremediation of contaminated soil and water*, Lewis Publ., Boca Raton, FL, pp. 1-12.

- Broadley, M.R., White, P.J., Hammond, J.P., Zelko, I., Lux, A., 2007. Zinc in plants. *New Phytologist* 173, 677-702.
- Chaney, R.L., 1993. Zinc phytotoxicity. In: Robson AD, ed. *Zinc in soil and plants*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 135-150.
- Cobbett, C.S., 2000. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification, *Cur. Opin. Plant Biol.* 3, 211-216.
- Dushenkov, S., Kapulnik, Y., 2000. Phytofiltration of metals, In: *Phytoremediation of Toxic Metals*. Raskin, I., Ensey, B.D., eds. John Wiley, New York. pp. 89-106.
- Hell, J.L. , 2002. Cellular mechanism for heavy metal detoxification and tolerance, *J. Exp. Bot.* 53, 1-11.
- Huebert, D.B., Shay, J.M., 1992. The effect of EDTA on cadmium and zinc uptake and toxicity in *Lemna trisulca* L, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 313-318.
- Kerkeb, L., Krämer, U., 2003. The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Asylum lesbiacum* and *Brassica juncea*, *Plant Physiol.* 131, 716-724.
- Marschner, H., 1995. *Mineral nutrition of higher plants*, 2nd (ed.) London, UK: Academic Press.
- Mench, M., Morel, J.L., Guckert, A., Gruillet, B., 1988. Metal binding with root exudates of low molecular weight, *J. Soil Sci.* 39, 521-527.
- Raskin, I., Ensey, B.D., 2000. *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean up the Environment*, John Wiley, New York.
- Rausser, W.E., 1990. Phytochelatin, *Annu. Rev. Biochem.* 59, 61-86.
- Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I., 1998. Phytoremediation, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 643-668.
- Stillman, M.J., Shaw, C.F., Suzuki, K.T., 1992. metallothioneins, synthesis, structure and properties of metallothioneins, phytochelatin and metal-thiolate complexes, VCH, New York.
- Tandy, S., Schulin, R., Nowack, B., 2006. The influence of EDDS on the uptake of heavy metals in hydroponically grown sunflowers, *Chemosphere* 62, 1454-1463.
- Wu, J., Hsu, F.C., Cunningham, S.D., 1999. Chelate-assisted Pb phytoextraction: Pb availability, uptake, and translocation constraints, *Environ. Sci. Technol.* 33, 1898-1904.