creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

약학석사학위논문

GC/MS 기반 대사체학 기법을 이용한 인삼 종자의 활력 연구

GC/MS-based metabolomics study on the viability of *Panax ginseng* seeds

2015년 2월

서울대학교 대학원
약학과 약품분석학전공
홍 지 연

GC/MS 기반 대사체학 기법을 이용한 인삼 종자의 활력 연구

GC/MS-based metabolomics study on the viability of *Panax ginseng* seeds

지도교수 박 정 일

이 논문을 약학석사학위논문으로 제출함

2014년 12월

서울대학교 대학원

약학과 약품분석학전공

홍 지 연

홍지연의 약학석사학위논문을 인준함

2014년 12월

위 원 장 **송 준 명** (인)

부 위 원 장 **권 성 원** (인)

위 원 **박 정 일** (인)

국 문 초 록

인삼 (*Panax* ginseng)은 정상 작물과는 달리 채종할 당시 배의 발달이 미숙하며, 적정한 발아 조건을 갖추었어도 일정기간의 저온감응을 받아야 발아가 가능한 3중 휴면성 특성을 가지고 있다. 때문에 종자를 널리 보급하는 데는 상당한 노력과 시간이 필요하다. 종자의 수명이 다하면 종자가 발아 능력을 잃게 되므로, 종자의 활력은 연구하는 것은 종자의 수명을 예측하는데 도움이 될 것이라 사료된다. 본 연구에서는 인삼 종자가 활력을 잃었을 때 특정 발아인자에 대응하여 생기는 종자 속 대사체의 발현 변화를 metabolomics 기반 연구를 통해 알아보고자 하였다.

이를 위하여 종자를 가혹 조건이 처리되지 않은 정상 종자와 인위적인 조건으로 노화시킨 가혹 종자로 실험군을 나누었다. 정상 종자와 노화된 종자의 활력을 검증한 뒤 두 그룹에 대표적인 발아인자인 gibberellic acid (GA_3)을 농도별로 처리하였다. GC-MS를 이용하여 두 그룹간의 대사체의 차이를 분석하였고 기존에 설립된 internal library를 이용하여 다양한 내인성대사체들을 putative하게 동정하였다. 이들의 유의성을 확인하기 위하여 *t*-test 및 fold change analysis를 실행하였으며 다변량 통계분석을 통해 경향성을 확인하였다. 통계분석을 통해 선별된 대사체들을 표준품을 사용하여 2차적으로 동정하였다. 정상 종자에서는 GA_3의 농도가 증가할수록 몇 가지 당류 및 당알코올과 아미노산류 등이 유의성 있게 감소하였다. 반면에, 활력이 강한 정상 종자 그룹에서 증가된 대사체도 있었다. 이와 같은 변화는 노화된 종자에서는 나타나지 않았다. 선별된 대사체들은 활력이 있는 종자와 없는 종자를 구분하여 종자의 활력을 예측하는 하나의 지표의

예로써 제시될 수 있는 가능성이 있다. 본 실험을 통하여 밝혀진 활력의 유무에 따른 인삼 종자의 특정 대사체의 변화는 앞으로의 인삼 종자 연구에 발판이 될 것으로 기대된다.

주요어: 인삼 종자 (*Panax ginseng* seed), Viability, Metabolomics, GC/MS (Gas chromatography-mass spectrometry)

학번: 2013-21625

목 차

국문초록 ····· i
목 차 ····· iii
List of Figures ····· iv
List of Tables ····· v

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 실험 ····· 3
1. 시험 재료 ····· 3
2. 시약 및 기기 ····· 3
2-1. 시약 및 용매 ····· 3
2-2. 실험 기구 ····· 4
2-3. 분석 기기 ····· 4
3. 실험방법 ····· 6
3-1. 종자 노화 및 생장 호르몬 처리 ····· 6
3-2. 종자 활력 검사 ····· 8
3-3. 종자 전처리 및 Derivatization ····· 9
3-4. GC/MS를 이용한 종자 분석 ····· 11
3-5. 데이터 전처리와 통계 분석 ····· 13

Ⅲ. 결과 및 고찰 ····· 15
1. 활력 검사 ····· 15
2. 종자의 GC/MS 분석 결과 ····· 16
3. Principal Component Analysis (PCA) ····· 19
4. 두 그룹간의 대사체 비교 분석 ····· 21
4-1 대사체 증감 ····· 22
4-2 관련 pathway ····· 24

Ⅳ. 결론 ····· 28

Ⅴ. 참고문헌 ····· 29

Abstract ····· 31

List of Figures

Figure 1. 인삼 종자 실험군 ····· 7

Figure 2. 인삼 종자의 전처리 및 유도체화 과정 ····· 10

Figure 3. 데이터 전처리 및 통계 분석 과정 ····· 14

Figure 4. 대사체 선별 과정 예시 ····· 14

Figure 5. 인삼 종자의 활력 검사 결과 ····· 15

Figure 6. 정상 인삼 종자의 overlaid chromatogram ····· 16

Figure 7. 노화된 인삼 종자의 overlaid chromatogram ····· 16

Figure 8. Alanine의 identification 과정의 예시 ····· 18

Figure 9. 주성분분석 (PCA) plot ····· 20

Figure 10. 인삼 종자의 수명에 연관되어 있는 대사체 수 ····· 21

Figure 11. 정상 인삼 종자에서 GA_3의 농도가 증가할수록 유의성 있게 변화한 9 가지 대사체 ····· 23

Figure 12. 호흡 작용에 관련된 인삼 종자 속 대사체 ····· 25

Figure 13. 단백질 생합성에 관련된 인삼 종자 속 대사체 ····· 26

List of Tables

Table 1. GC/MS 분석조건 ····· 12

Table 2. GC/MS library를 이용하여 ID된 대사체 목록 ····· 16

Ⅰ. 서론

인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 고대에서부터 사용된 약용 식물로써 두릅나무과에 속하며 건강 및 수명을 향상시키는데 매우 효과적인 약초로 알려져 있다. 현재까지 인삼에 대한 연구는 활발히 이루어졌으나, 흥미롭게도 인삼의 종자에 대한 연구는 현저히 적으며 인삼 종자의 수명에 관련된 연구 사례 또한 없다. 인삼 종자는 정상 작물의 종자와는 달리 채종 당시에는 배의 발달이 10% 미만으로 매우 미숙하며 발아에 필요한 적정 조건을 갖추었어도 두꺼운 경실 종피 때문에 개갑 처리 과정 및 일정 기간의 저온 감응 과정을 거쳐야 형태적 및 생리학적인 휴면을 타파함으로써 발아가 가능하다. 이러한 특성 때문에 인삼을 널리 보급하는 데는 상당한 노력과 시간이 필요하다.

종자의 수명이 다하면 종자가 활력을 잃게 되므로 종자의 발아 능력은 수명과 깊이 연관되어 있다고 볼 수 있다. 종자가 발아할 능력을 잃으면 발아 요소와 관련된 기전에서 대사체적인 어떠한 변화가 일어난다고 예상된다. 식물의 발아를 조절하는 발아 요소 중 가장 널리 알려진 gibberellin은 식물 호르몬의 일종으로서, 호흡 및 단백질 생합성 같은 세포 대사를 촉진하며 종자의 배가 자라나는데 필요한 영양분의 이동을 증진한다. 또한 종자 내의 gibberellin은 지질을 당류로 대사시킴으로써 중요한 역할을 하는 것과 같이 종자의 생장과 발아 및 휴면타파에 다양한 생리학적 역할을 한다고 알려져 있다. 종자가 만약 수명이 다하여 활력을 잃는다면 이러한 발아 요소에 연관된 기전에 변화가 일어날 것이라고 가정하고 본 연구를 진행하였다.

본 연구에서는 대사체학적 기법을 이용하여 활력이 강한 정상 인삼 종자와 가혹 조건으로 노화되어 활력을 잃은 인삼 종자에서 대표적인 생장 촉진 호르몬인 gibberellic acid (GA_3)를 농도별로 처리함에

따라 유의적인 차이를 보이는 대사체를 GC/MS를 이용하여 분석하고자 하였다. 또한 통계 분석을 적용하여 인삼 종자에 높은 농도의 GA_3가 처리될수록 일어나는 대사체적인 변화에 초점을 맞춰 노화된 종자에서는 유의적인 변화가 없지만 정상적인 종자에서 증가하거나 감소하며 유의적인 변화를 보이는 대사체를 선별하고자 하였다.

본 연구에서 적용된 대사체학은 오믹스 실험 기법중 하나로써 다양한 분석기기를 이용하여 phenotype에 따라 변화하는 대사체의 발현을 연구하고 이해하는 학문이다. 인삼 종자 내의 대사체를 분석함으로써 정상 종자와 노화된 종자간의 대사체적 차이를 밝히고 이와 관련된 대사과정 및 기전을 추측함으로써 활력의 유무에 따라 결정되는 종자의 수명을 예측하고자 하였다. 이를 통해 인삼 종자에 대한 추가적인 연구에 발판이 되고자 하였으며 종자의 수명과 관련된 기전을 밝혀내어 인삼 종자의 수명을 예측할 수 있다면 인삼뿐만 아니라 농업 및 의학에서 중요한 식물 자원들을 보존하고 전파하는데 매우 큰 역할을 할 것이라 기대된다. 식물체와 인간의 생명기전은 다른듯하나 매우 유사한 관계에 있다고 생각된다. 작은 단위의 줄기 세포가 인간의 다양한 조직 및 기관으로 발달하듯이, 식물에서 종자 역시 새로운 한 개체로 거듭난다는 점에서 유사점을 가지고 있다. 종자의 활력 및 수명의 예측 지표를 발굴함으로써, 더 나아가서는 동물 및 인간 수명 예측 시스템에도 적용할 수 있을 것이라 기대된다.

Ⅱ. 실험

1. 시험 재료

인삼 종자는 한국인삼공사에서 제공하였으며, 2014년 7월 수확한 고려인삼의 대표적인 품종 중 하나인 천풍의 종자를 사용하였다.

2. 시약 및 기기

2-1. 시약 및 용매

인삼 종자를 추출하고 처리하는데 다음과 같은 용매 및 시약을 사용하였다.

- Chloroform (J.T. Baker, USA)
- Methanol (J.T. Baker, USA)
- Water (J.T. Baker, USA)
- Gibberellic acid (Sigma Aldrich, USA)

인삼 종자의 활력을 검사하는데 다음과 같은 용매 및 시약을 사용하였다.

- Water (J.T. Baker, USA)
- 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (Sigma Aldrich, USA)
- Sodium phosphate dibasic (Sigma Aldrich, USA)
- Potassium phosphate monobasic (Sigma Aldrich, USA)

GC/MS 분석을 위한 유도체화에 다음과 같은 용매 및 시약을 사용하였다.

- Toluene (Sigma Aldrich, USA)
- Methoxyamine Hydrochloride (Sigma Aldrich, USA)
- N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with trimethylchlorosilane (1% TMCS) (Sigma Aldrich, USA)
- Pyridine (Sigma Aldrich, USA)
- Benzoic acid, Ring-D5 (Cambridge Isotope Lab, Inc., USA)

2-2. 실험 기구

- Adjust pipette (0.5～10μL, 20～200μL, 100～1000μL, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Pipette tips (0.5～10μL, 20～200μL, 100～1000μL, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Centrifuge tube (2mL, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Centrifuge (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Conical tube (15mL, SPL Life Sciences Co. Ltd)
- Vortex Mixer (Vortex Genie 2)
- Ultrasonicator (Sonics & Material, Inc., USA)
- Nitrogen purge (EYELA MG-2200)
- Filter paper (Whatman, GE Healthcare UK Ltd)
- Liquid nitrogen
- Pestle and mortar
- Thermo-hygrostat (Neuron Fit Co., LTD. Korea)
- pH meter (Thermo Scientific Orion, Korea)

- Freeze-Dryer (Operon, Korea)
- Hypodermic syringe (Kovax syringe, 10 mL, Korea)
- Petri-dish (SPL life science, 90X15 mm, Korea)

2-3. 분석 기기

- GCMS-QP2010 (Shimadju, Japan)
- Columns: DB-5MS (30 m X 0.25mm, 0.25 μm, Agilent, USA)

3. 실험방법

3-1. 종자 노화 및 생장 호르몬 처리

인삼 종자의 노화를 위해 1973년에 발표된 James Harrington Rule을 참고하였다. Rule에서 정의된 종자의 최적 저장 조건은 상대습도의 값과 Fahrenheit로 변화된 온도의 값을 더했을 때 100 보다 적거나 같을 때라고 기술되어 있다. 이에 기초하여 종자의 가혹 조건을 최적 저장조건 규칙에서 벗어난 45 ℃ (113 °F) 의 고온과 75%의 상대습도로 결정한 후, 그 조건이 일정하게 유지되는 항온항습기에서 48 시간동안 종자를 처리하였다. 정상 인삼 종자는 같은 시간동안 4 ℃의 냉장온도에서 처리하였다. 반복실험을 위하여 정상 종자 400 개 가혹 종자 400 개를 가지고 실험하였다 (Figure 1).

대표적인 식물 생장 호르몬인 gibberellic acid (GA_3) 를 처리한 뒤 그에 따른 두 그룹 종자의 점차적인 대사체 변화를 보기 위하여 다양한 농도의 GA_3를 정상 종자와 가혹된 종자에 각각 처리하였다. 사용된 GA_3의 농도는 100 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L이며, 오직 이차증류수로만 처리된 종자를 비교군 으로 지정하였다. GA_3 solution은 이차증류수에 각 농도에 맞게 GA_3를 녹여 만들었다. Petri-dish에 적당량의 용액을 넣어 종자가 잘 담기도록 하였으며, 상온에서 빛을 차단한 후 48 시간 동안 처리하였다. 처리가 완료된 종자는 초저온 냉동고 (-70 ℃)에서 24 시간 보관한 뒤, 다른 외부요인과 오염물질을 제거하고 종자의 수명 및 활력은 배와 배유에 강하게 연관되어 있다고 판단하여 종자의 껍질을 벗기고 24 시간 동안 동결건조 (lyophilization)하여 수분을 제거하였다.

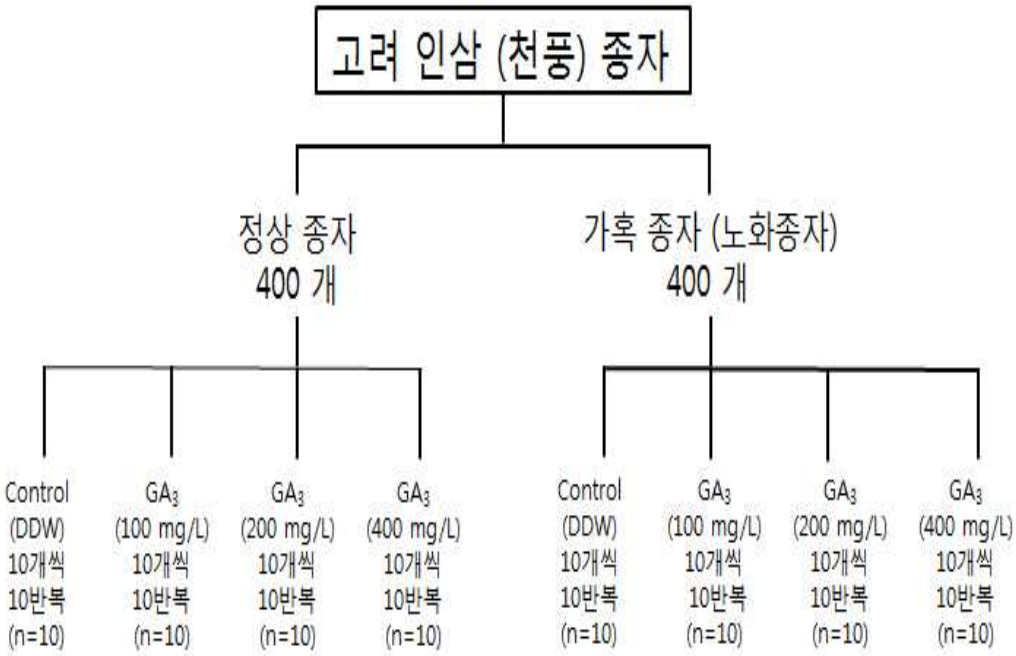

Figure 1. 인삼 종자 실험군

3-2. 종자 활력 검사

정상 인삼 종자와 노화된 인삼 종자의 활력을 검사하기 위하여 정확하고 빠르게 검사할 수 있는 정상적인 방법으로 널리 알려진 Tetrazolium test를 시행하였다. 이 시험법은 살아있는 종자와 죽은 종자를 간단한 염색법을 사용하여 빠르고 간편하게 구분할 수 있도록 한다. 종자가 살아서 적당한 수분을 유지하며 호흡 작용이 일어난다면, 무색인 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 물질이 cellular metabolism에서 중요한 역할을 하는 enzyme인 다양한 dehydrogenases로 인한 reduction 작용으로 인하여 빨간색을 띄는 1,3,5-triphenylformazan으로 변화된다.

활력 검사에 사용되는 TTC buffer는 물 1 L에 9.078 g의 KH_2PO_4를 넣어 만든 첫 번째 용액과 물 1 L에 9.472 g의 Na_2HPO_4를 넣어 만든 두 번째 용액을 2:3 비율로 섞어 만든 뒤, 용액의 pH가 6.5에서 7.5 범위 안에 있는지 확인한 후에 사용하였다. 그 후, 1 g의 TTC를 100 mL의 buffer에 녹여 1% TTC test solution을 만들었다. 활력 검사 시행 전에 정상 종자와 노화된 종자를 각각 20 개씩을 주사기 바늘을 이용하여 살짝 구멍을 뚫어준 뒤, 염색이 용이해지도록 20 ℃의 incubator에서 4 시간 동안 이차증류수에 침지시키는 pre-treatment 과정을 진행하였다. 그 후에 종자를 반으로 절개하여 1% TTC test solution이 담긴 petri-dish에서 1 시간 동안 30 ℃의 incubator에서 처리하였다.

3-3. 종자 전처리 및 Derivatization

인삼 종자 속의 대사체들을 추출하기 위하여 다음과 같은 방법을 사용하였다 (Figure 2). Gibberellic acid 처리가 완료된 종자를 건조시킨 뒤, mortar와 pestle 및 액체질소를 이용하여 추출이 용이하도록 곱게 갈아주었다. 분쇄된 인삼 종자 35 mg에 Chloroform : Methanol : Water (2 : 5 : 2) 혼합액 1 mL를 넣은 뒤 internal standard인 benzoic acid D5를 spike하였다. 그 다음 vortex를 1 분간 진행한 뒤 ultrasonication을 40 ℃에서 30 분간 진행하였다. 추출 용액 내에 불순물을 제거하기 위하여 16,000 rcf에서 5 분간 cetrifugation을 진행한 후 600 μL의 supernatant를 따로 취하였다. 남은 300 μL는 quality control sample을 만드는데 사용되었다. 따로 취한 600 μL 50 ℃에서 nitrogen purge를 이용하여 모두 날려 보냈다. 수분제거는 완전한 유도체화 과정에 매우 중요하므로 남아있는 수분을 완전히 제거하기 위하여 anhydrous toluene을 100 μL 넣어주고 2 분간 voltex한 뒤, 50 ℃에서 nitrogen purge를 이용하여 모두 날려 보냈다. 그 후, methoxyamine hydrochloride와 pyridine을 준비하여 20 mg/mL의 농도로 만든 뒤, 이 용액을 100 μL 넣고 10 분간 ultrasonication을 진행하였다. 안정적인 유도체화를 위해 30 ℃에서 90 분 동안 incubation 하였다. 이어서 1%의 TMCS가 포함된 BSTFA 100 μL를 추가로 넣고 60 ℃에서 15 분간 incubation 하였다. 이와 같은 유도체화 과정으로 준비한 시료 200 μL를 GC/MS를 이용하여 분석하였다.

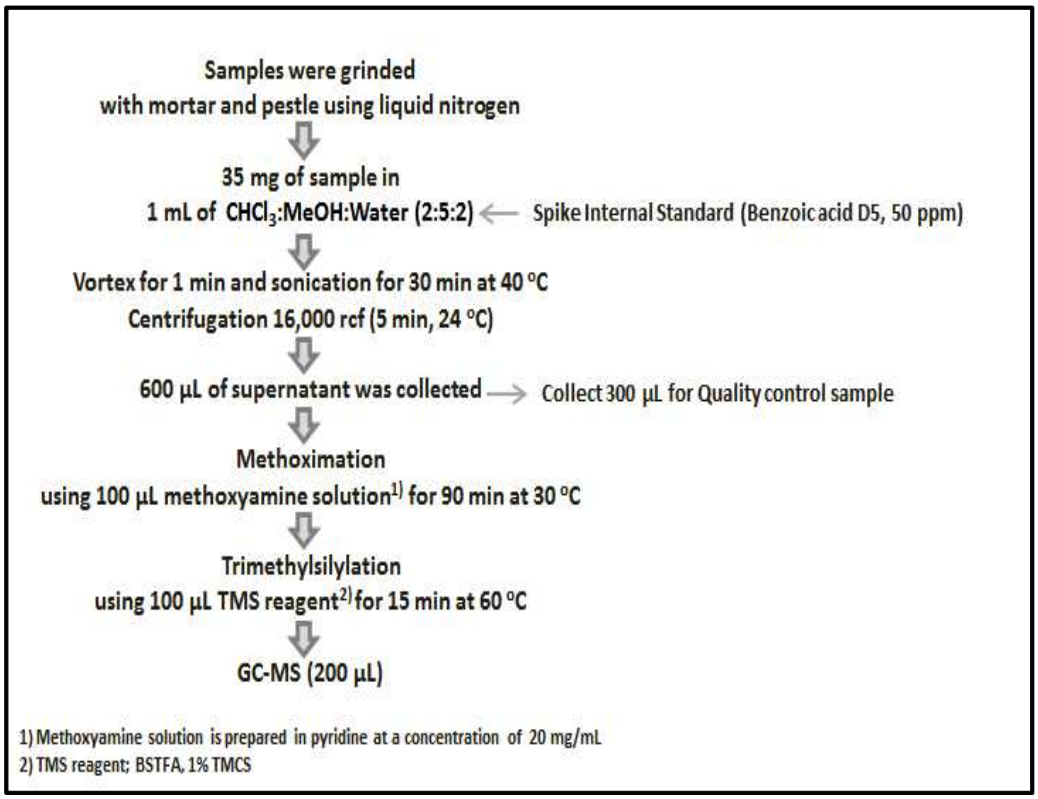

Figure 2. 인삼 종자의 전처리 및 유도체화 과정

3-4. GC/MS를 이용한 종자 분석

인삼 종자내의 대사체를 추출한 시료를 Shimadzu-QP2010을 사용하여 분석하였다 (Table 1). 컬럼은 5% Phenyl Methylpolysiloxane 구조를 가진 DB-5MS (30 M X 0.25 mm, 0.25 μm, Agilent)를 사용하였으며, MS detector는 30~600 m/z를 scan mode에서 electron impact를 가해 fragment ion을 생성하는 방법인 EI (Electron Impact Ionization) 방식으로 이온화 하였다. 일정한 전압인 70 eV에서 분석물을 이온화시킴으로써, 이미 구축된 library 상에서 표준물질 없이도 putative하게 물질을 동정할 수 있었다.

같은 시료를 계속 injection해서 분석할 때 분석과정상 기기적인 오차가 없다는 것을 증명하기 위해, 80 개의 시료에서 300 μL 취하여 전부 섞어서 만든 quality control (QC) sample을 random sequence 중간마다 일정한 간격으로 분석하였다. 이는 QC sample의 reproducibility를 확인함으로써 data interpretation의 reliability 또한 증명하기 위함이다.

Gas Chromatography	• GC-2010 gas chromatograph (Shimadzu, Japan)
Mass spectrometry	• GCMS-QP2010 gas chromatograph mass spectrometer (Shimadzu, Japan)
Column	• DB-5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 μm)
Flow rate	• Carrier gas; Helium (1.0 mL/min)
Injection parameter	• Injection mode; split 5:1, • Injection volume; 1 μL , • Injector temp; 300 ℃
Column temperature program	• 70 ˚C – 5 ˚C/min → 150 ˚C - 8 ˚C/min → 250 ˚C - 5 ˚C/min → 300 ˚C (10 min)
Mass parameter	• Ionization mode; EI 70eV • Acquisition mode; scan mode(30~600 m/z)

Table 1. GC/MS 분석조건

3-5. 데이터 전처리와 통계 분석

분석하여 얻은 데이터는 MZmine 2.10 software를 통하여 peak alignment를 진행하여 보정하였다. Mass detection 기능 속 Centroid algorithm을 통하여 noise level은 30,000으로 설정하였다. 이어서 Chromatogram builder 기능을 이용하여 minimum height 200,000으로 지정하고, m/z tolerance를 0.5 m/z으로 지정하였다. Chromatogram deconvolution 단계에서는 Savizky-Golay를 선택하여 minimum peak height는 200,000으로 지정하고, threshold level은 80%로 작성하였다. 이어지는 Peak alignment 단계에서는 RANdom SAmple Consensus (RANSAC) aligner 기능을 이용하여 반복시킴으로써 m/z tolerance는 0.5 m/z, retention time tolerance는 1 min 그리고 RANSAC iterations는 50,000으로 지정하였다. 최종 aligned data는 csv file 형식으로 변환하여 export하였다. Alignment가 끝난 데이터를 internal standard로 normalization을 수행하였다. 이어서 QC sample의 relative standard deviation (RSD)가 30% 이하인 각 variable를 제거함으로써 data filtration을 진행하였다.

정상 종자와 가혹 종자의 경향성을 확인하기 위하여 MetaboAnalyst 2.0을 이용하여 Principal Component Analysis (PCA)와 같은 다변량 통계 분석을 진행하였다. 그 후에 종자 내 발현이 유의성 있게 변화한 대사체만을 선별하기 위하여 fold change analysis 및 *t*-tests을 실행하였으며 correlation analysis (Spearman rank correlation) 과 pattern searching 이용하여 각 그룹에서 증가되거나 감소되는 대사체를 확인하였다. 1차적으로 GA_3가 농도별로 처리됨에 따라 정상 인삼 종자 그룹에서만 증가가 되거나 감소가 되는 variable

을 선별하였다. 2차적으로 생명현상이 가장 활발히 일어날 때, 즉 생장호르몬 GA_3가 가장 강하게 처리가 되었을 때 (400 mg/L) 정상 인삼 종자에서 노화된 종자에서 보다 더 증가가 되거나 감소가 되는 variable이 의미가 있다고 생각하여 match statistic을 수행함으로써 두 조건을 모두 충족하는 대사체를 선별하였다 (Figure 3, Figure 4).

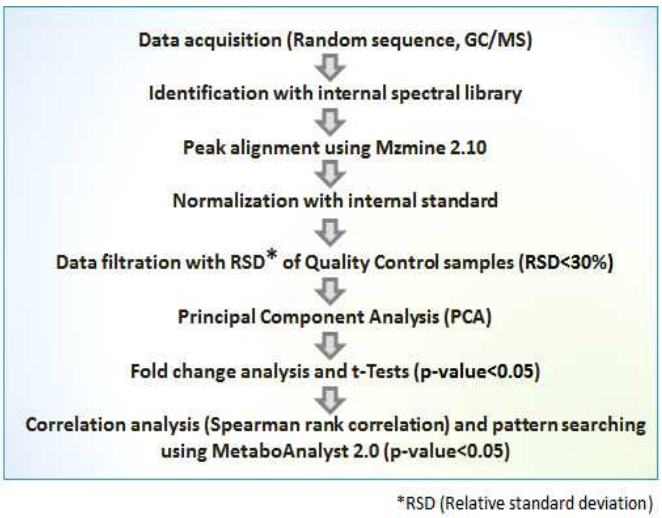

Figure 3. 데이터 전처리 및 통계 분석 과정

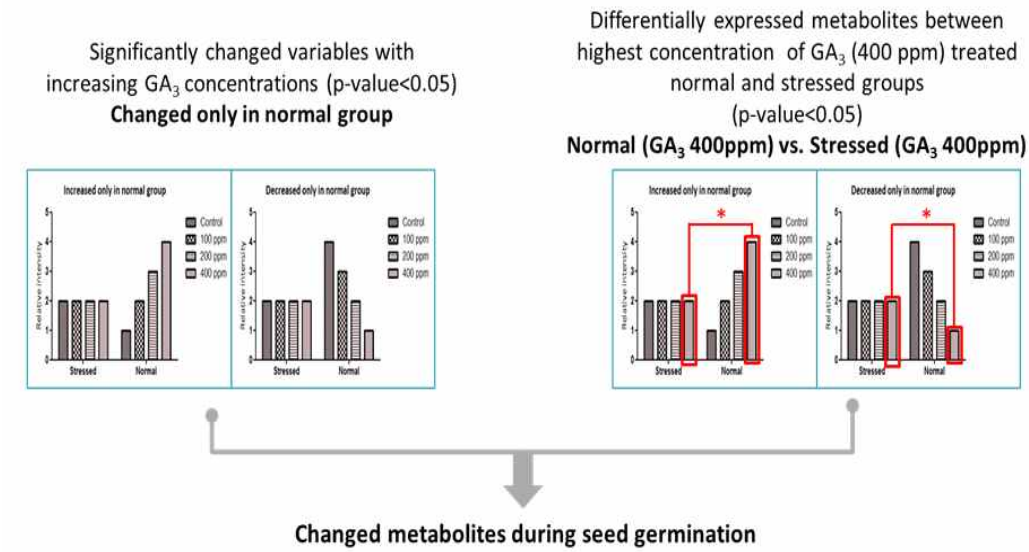

Figure 4. 대사체 선별 과정 예시

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 활력 검사

본 연구에 사용된 정상 인삼 종자와 가혹 조건으로 노화된 인삼 종자의 실질적인 발아 능력인 활력을 검사함으로써 실험의 신뢰도를 높이기 위하여 정상 종자와 가혹된 종자 각각 20 개씩을 이용하여 TTC test 방법을 적용한 활력 검사를 진행하여 아래 그림과 같은 결과를 얻을 수 있었다 (Figure 5). 정상 인삼 종자는 20 개 모두 강한 빨간색을 띄며 활력이 우수함을 나타낸 반면에, 설정된 가혹 조건에서 노화된 인삼 종자는 염색이 불규칙하게 되거나 무색을 띠어 활력이 없음으로 나타났다. 이 결과를 통하여 정상 종자의 정상적인 활력과 가혹 조건이 알맞게 잘 적용된 종자의 노화를 확인하였다.

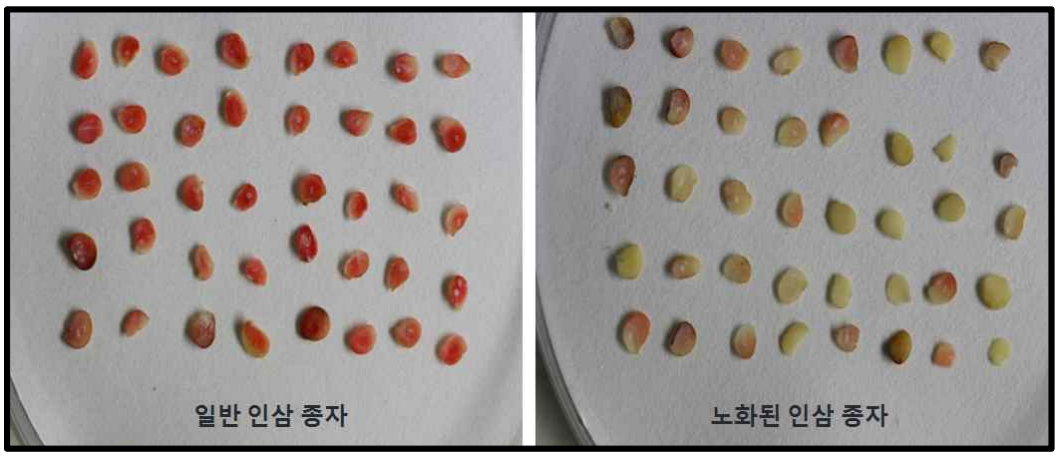

Figure 5. 인삼 종자의 활력 검사 결과

2. 종자의 GC/MS 분석 결과

GC/MS를 이용하여 정상 종자와 가혹 종자의 시료를 분석한 결과로 얻은 overlaid total ion chromatogram을 비교하였을 때, 두 chromatogram의 peak pattern은 비슷하나 peak intensity가 다름을 육안으로도 확인할 수 있었다 (Figure. 6, Figure. 7).

각각의 peak에 해당하는 mass spectrum과 기존의 internal library 상의 retention time과 mass spectrum의 비교를 통해 물질의 동정을 1차적으로 putative하게 진행하였고, 결과적으로 다양한 종류의 대사체가 ID되었다 (Table 2).

Metabolites in ginseng seed	
N,N-diethylacetamide	Asparagine
Lactic acid	d-Ribose
L-Valine	Ribitol
Alanine	Glycerophosphate
Glycine	Arabinofuranose
2-Aminoethanol	L-Lysine
Phosphoric acid	D-Fructose
L-Isoleucine	Galactose
Proline	Tyrosine
4-aminobutyric acid	Glucose
Succinate	Sorbitol, d-Glucitol
Propanoic acid	D-Gluconic acid
Fumaric acid	Galactaric acid
L-Serine	Palmitic acid
2-Piperidinecarboxylic acid	Myo-inositol
L-Threonine	Ferulic acid
Glutaric acid	3-deoxy-arabino-hexaric acid
Isoserine	Linoleic acid
2-Piperidone	Stearic acid
Malic acid	D-Mannose
Pyroglutamic acid	Sucrose
Pentitol	Lactose

Table 2. GC/MS library를 이용하여 ID된 대사체 목록

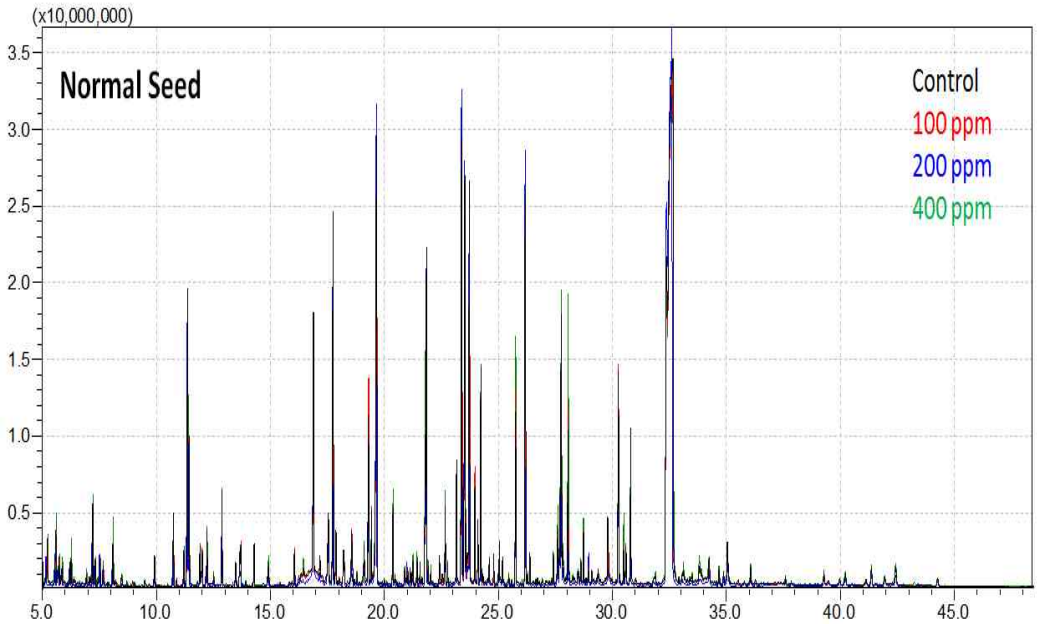

Figure 6. 정상 인삼 종자의 overlaid chromatogram

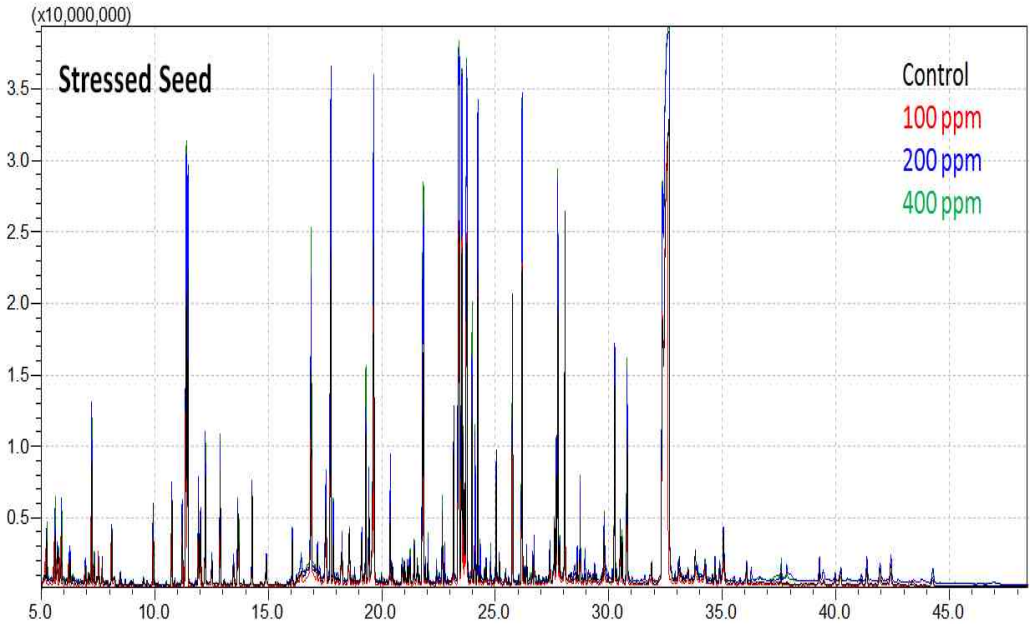

Figure 7. 노화된 인삼 종자의 overlaid chromatogram

그 중에서 통계적으로 두 그룹간 유의성 있게 변화한 대사체 9 종은 2차적으로 standard의 mass spectrum과 비교함으로써 더욱 정확하게 identification을 진행하였다 (Figure 8). 그 결과 당류 및 아미노산과 같은 식물의 대사에서 중요한 역할을 하는 내인성 대사체들을 발견할 수 있었다.

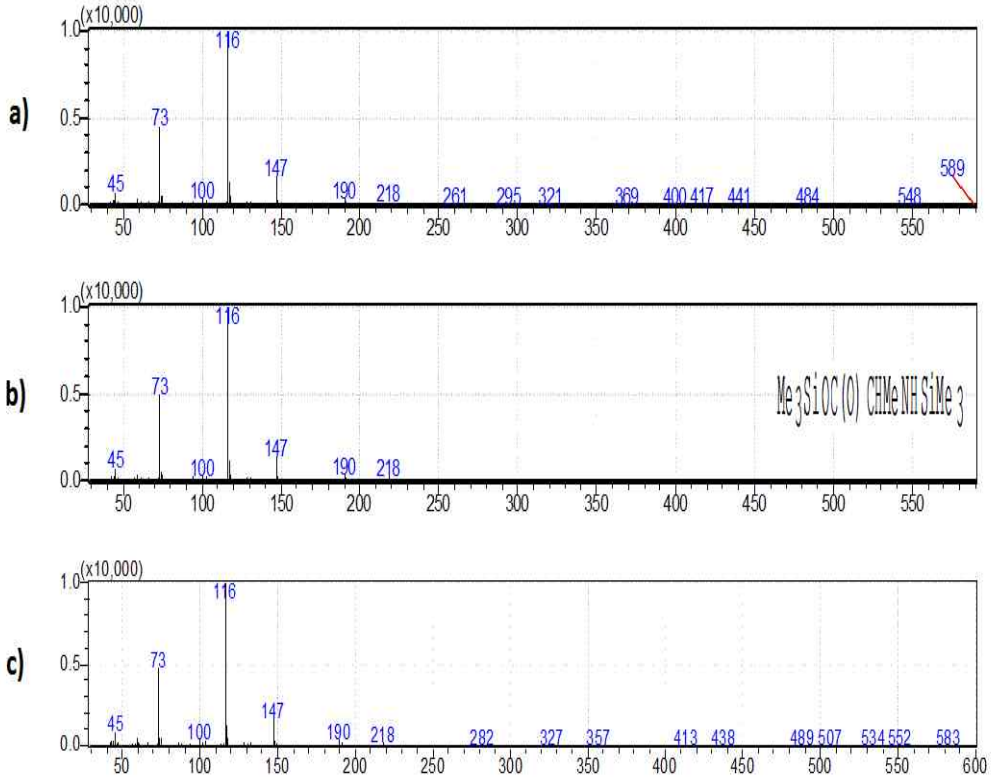

Figure 8. Alanine의 identification 과정의 예시:

a) Mass spectrum of target peak in sample chromatogram,
b) Mass spectrum of alanine in GC/MS internal library,
c) Mass spectrum of alanine standard

3. Principal Component Analysis (PCA)

정상 종자와 가혹 종자의 경향성을 확인하기 위하여 MetaboAnalyst 2.0을 이용하여 주성분분석 (Principal Component Analysis)를 진행하였다. 주성분분석은 multivariate analysis의 일종으로써 다양한 변수들에 대하여 데이터 집합을 분석하는 통계학 기법이다. 분포된 다변량 변수들을 principal component 1 (PC1)과 principal component 2 (PC2)로 나타냄으로써 데이터의 variation을 설명하였다. 총 80 개의 종자 시료 및 15 개의 QC sample은 각각 다른 색으로 표시되었으며 주성분에 따라 데이터가 분포된 결과를 보여주는 PCA plot을 얻을 수 있었다 (Figure 9). 결과적으로 정상 종자와 가혹된 종자는 그룹지어 나타난 분포를 이루며 잘 분리되었음을 확인할 수 있었으며 QC sample들의 clustering과 deviation을 통해 실험의 accuracy 및 precision을 확인하였다.

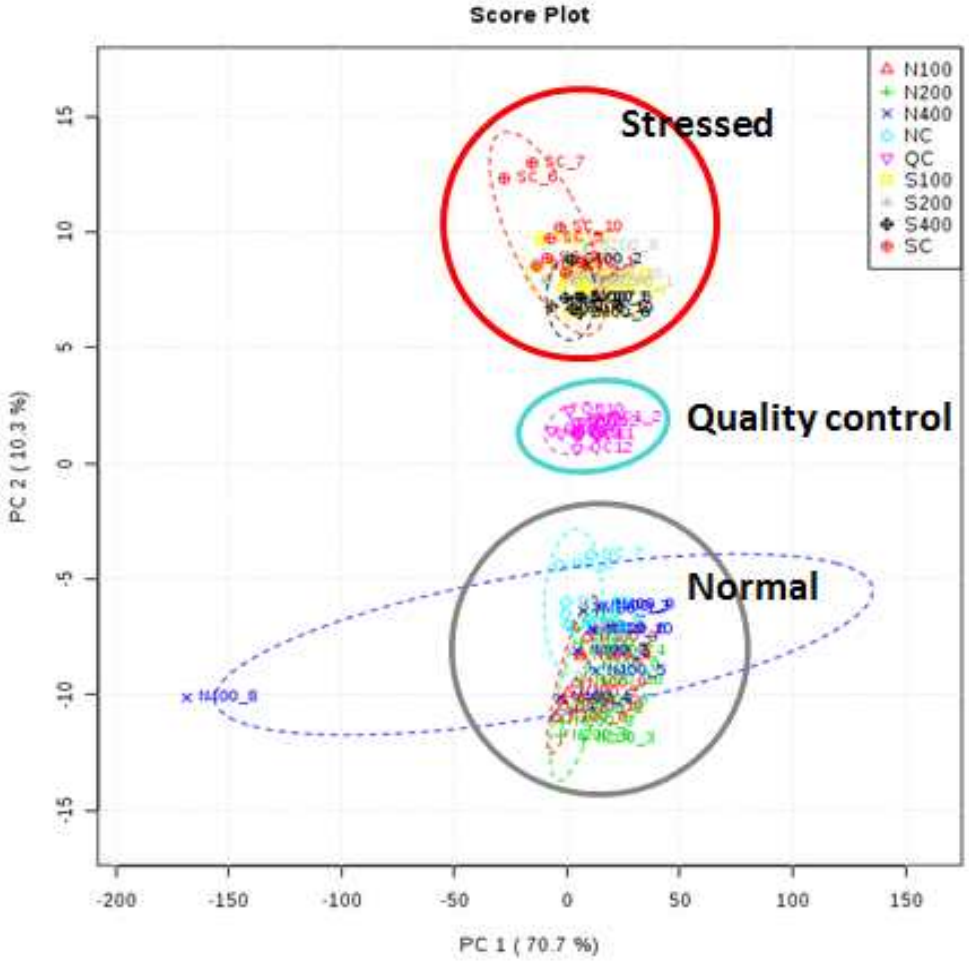

Figure 9. 주성분분석 (PCA) plot

4. 두 그룹간의 대사체 비교 분석

정상 종자와 가혹된 종자 그룹 사이에서 유의성 있게 변화한 대사체를 선별하기 위해서 먼저 GA_3가 농도별로 처리됨에 따라 노화된 종자에서는 변화가 없으며 정상 인삼 종자 그룹에서만 대사체의 양이 증가되거나 감소되는 81 종의 variable을 선별하였다. 이어서 400 mg/L 농도의 GA_3가 처리가 되었을 때, 정상 인삼 종자에서 노화된 종자에서 보다 증가되는 variable 89 종 및 감소되는 variable 228 종을 각각 선별하였다. Match statistic과 authentic standards를 이용한 ID를 수행하여 이 두 가지 조건에서 모두 유의성 있게 변화하는 대사체 총 9 종을 선별하였다 (Figure 10). 마지막으로 선별된 9 종의 대사체는 활력이 강한 정상 종자에서만 유의성 있게 변화하며, 특히 생명 현상이 가장 활발해질 수 있도록 처리되는 생장 촉진 호르몬인 GA_3의 농도가 실험군중에 가장 높은 400 mg/L으로 처리가 되었을 때 유의성 있게 증가되거나 감소되는 특징적인 대사체이다. 따라서 9 종의 대사체는 인삼 종자의 발아에 깊이 관련되어 있으며 수명에도 연관이 되어 있을 것이라 사료된다.

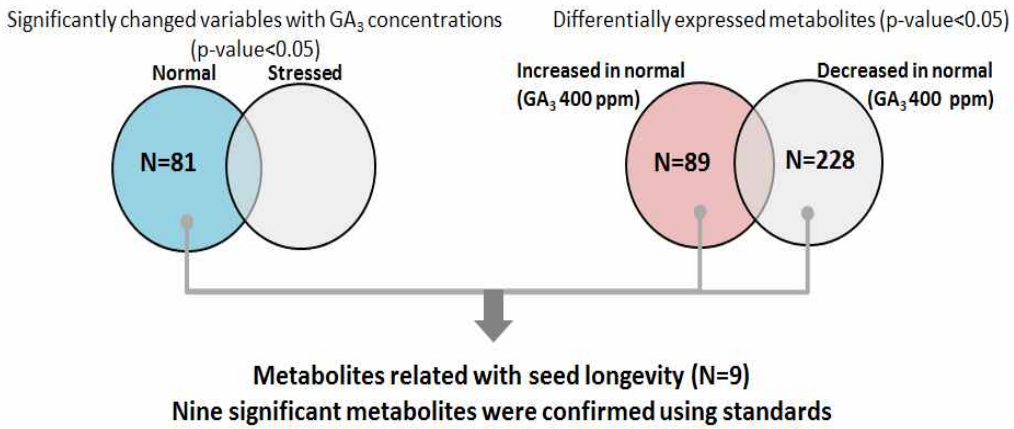

Figure 10. 인삼 종자의 수명에 연관되어 있는 대사체 수

4-1. 대사체 증감

정상 종자와 가혹 종자에서 유의성 있게 차이가 나는 대사체 중에서 생장 호르몬인 GA_3를 가장 높은 농도로 처리하였을 때 활력이 강한 정상적인 종자에서 활력이 없는 노화 종자에서와 다르게 변화한 대사체 9 종은 다음과 같다 (Figure 11). 노화된 종자에서는 유의성 있는 변화가 없으나 정상 종자에서 활력이 강해질수록 당류 및 당알코올인, 아미노산류 그리고 인산은 감소하는 것으로 나타났다. 반면에, GA_3를 강하게 처리할수록 젖산은 노화된 종자에서는 특정한 변화가 없지만 정상 종자에서는 유의성 있게 증가되어 있었다.

단당류의 일종인 글루코오스는 세포호흡을 통해 에너지원으로 분해되며 세포벽을 구성하는 중요한 물질이다. 또한 종자의 발아와 발아 후 성장을 조절하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 마찬가지로 단당류인 프룩토오스 역시 식물에서 중요한 역할을 하며 글루코오스와 결합하여 이당류인 수크로오스를 생성한다. 대표적인 당알코올인 소비톨은 글루코오스의 reduction 작용으로 aldehyde기가 hydroxyl기로 바뀌면서 생성되며 sorbitol-6-phosphate dehydrogenase에 의해 프룩토오스로 변환된다.

정상 종자에서 감소한 인산 역시 세포 내에서 adenosine triphosphate (ATP), glucose-6-phosphate, 인지질 및 핵산으로 생성되어 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

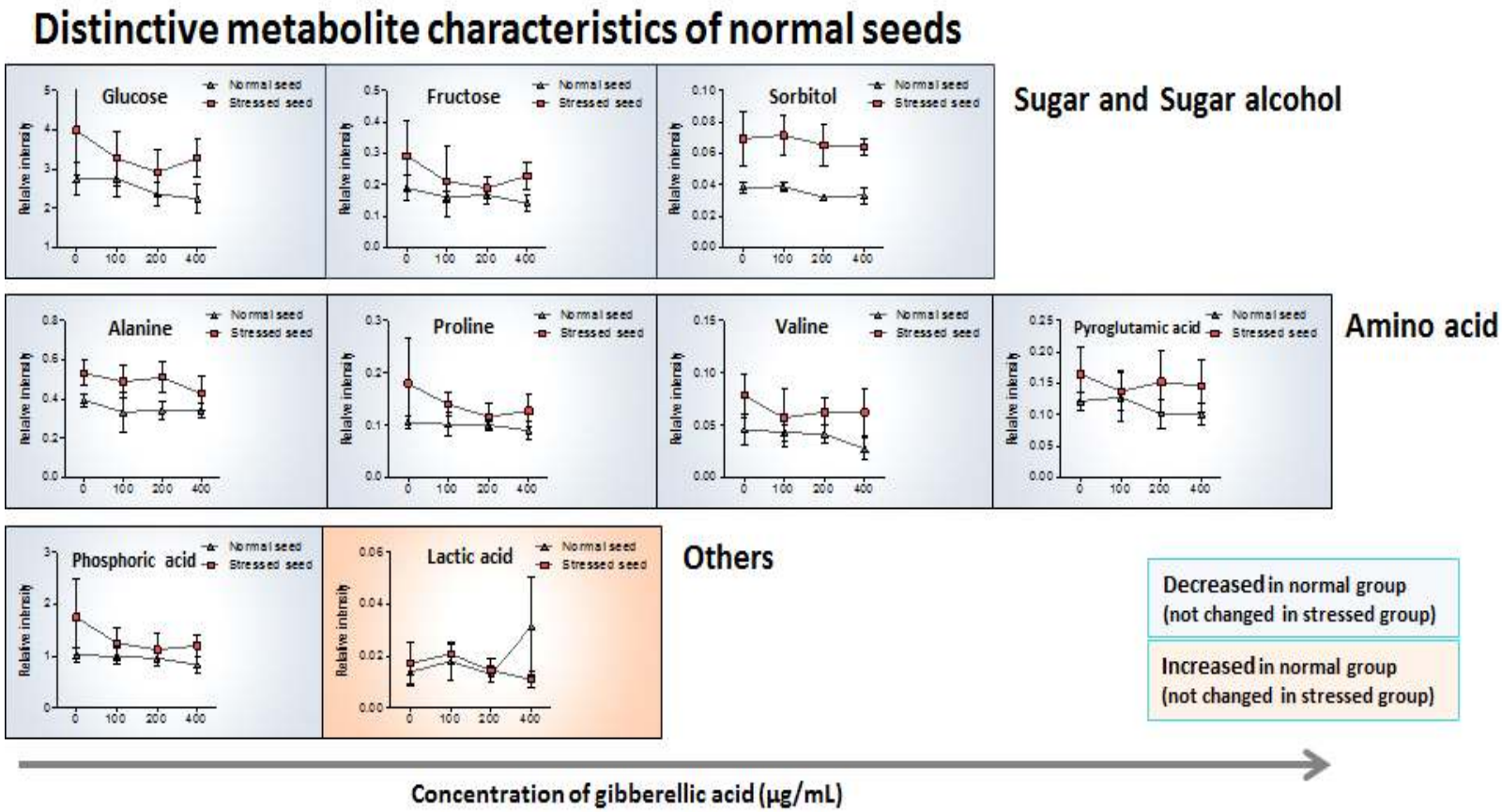

Figure 11. 정상 인삼 종자에서 GA_3의 농도가 증가할수록 유의성 있게 변화한 9 가지 대사체

4-2. 관련 pathway

정상 인삼 종자에서 발견된 대사체들과 관련된 pathway를 살펴본 결과, 이들은 모두 해당과정 및 호흡작용에 연관되어 있음을 알 수 있었다 (Figure 12). 문헌에 의하면 gibberellic acid는 생장 활성 호르몬 중 하나이며 세포질 대사 경로를 활성화함으로써 식물의 생장을 촉진시킨다고 알려져 있다. 즉, 활력이 강한 정상적인 인삼 종자에서는 에너지 생성이 활발하며 호흡이 강하게 이루어지므로 해당과정 및 호흡 과정에 쓰이는 대사체들이 노화된 인삼 종자에서 보다 현저히 감소되어 있음을 대사체학적 분석을 통해 직접 확인하였다. 호흡 과정 및 해당과정으로 인하여 글루코오스가 break down 됨으로써 ATP가 생성되면 이는 활력이 왕성한 종자의 에너지대사에 매우 중요한 역할을 할 것이다. 또한 당의 양이 정상적인 인삼 종자에서 현저히 줄어든 이유는 당이 식물의 life cycle의 중심이 되는 역할을 함으로써 에너지 저장 구성요소로 쓰이는 polymer인 starch나 fructan 및 구조 구성요소인 셀룰로오스로 많이 변환되었기 때문이라고 예상 가능하다. 또한 당들은 다양한 유전자를 조절함으로써 식물의 많은 작용에 큰 역할을 하므로 활력이 활발한 정상 종자에서 양이 현저히 줄어들었을 것이다.

정상적인 인삼 종자에서는 젖산의 양이 유의적으로 증가하였는데 이는 인삼 종자가 정상적으로 활력이 유지될 때 무기호흡이 이루어진다고 예상 가능하다. 문헌에 따르면 종자 내에서 발아가 시작되는 초기단계에는 종자의 껍질 때문에 산소가 침투하기 힘들다고 밝혀졌으므로 본 연구의 결과를 뒷받침한다고 볼 수 있다.

또한 인삼 종자에서 줄어든 인산은 종자 내에서 종자가 활력을 유지하거나 발아할 때 쓰이는 에너지를 만들고 저장하는데 사용되는 ATP를 생성하는데 사용되었을 것이다. 더불어 종자의 성장을 위해

필요한 단백질 생합성에 활용되는 아미노산의 sequence 및 종류를 결정짓는 messenger RNA와 DNA의 합성에 쓰였을 가능성도 있다.

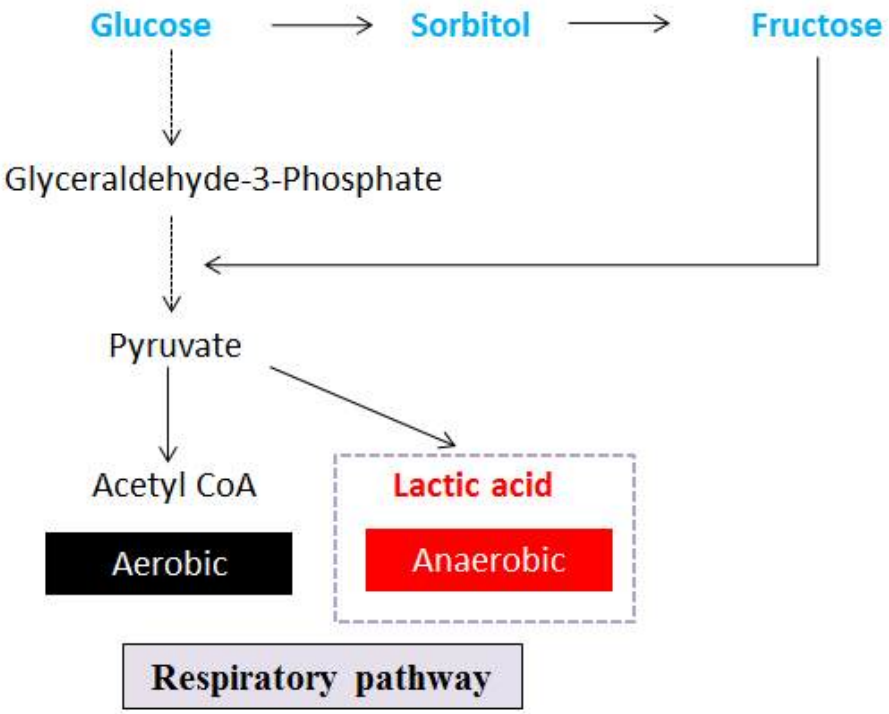

Figure 12. 호흡 작용에 관련된 인삼 종자 속 대사체

아미노산은 단백질 생합성에 필요하다 (Figure 13). 문헌에 의하면 종자의 endosperm의 아미노산의 양은 종자가 발아하기 위한 초기단계에 매우 많이 필요하다고 알려져 있다. 그 시기에는 endosperm의 RNA의 양도 현저히 증가가 되는데, 이는 아미노산 합성에 쓰임으로써 종자가 발아하는데 중요한 역할을 할 것이다.

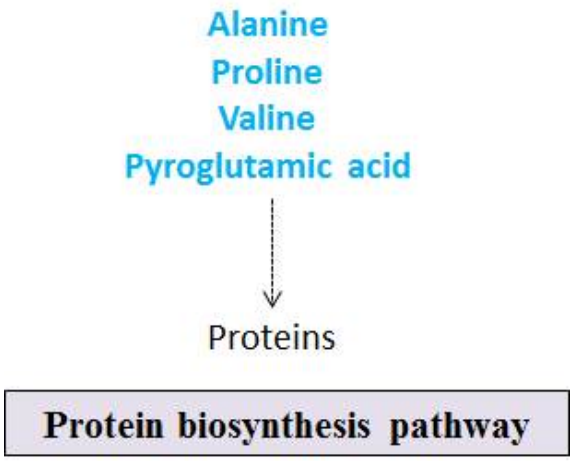

Figure 13. 단백질 생합성에 관련된 인삼 종자 속 대사체

종자의 배가 성장할 때 아미노산을 이용하여 단백질을 합성함으로써 발아하는데 도움을 준다. 문헌에 의하면 종자의 발아 및 성장 기능이 현저히 저하되는 것은 ribosome의 dissociation과 관련되어 있다고 알려져 있다. 활력이 강한 종자가 발아할 때는 polyribosome이 분리됨으로써 단백질의 합성을 초래하는데 활력이 없는 종자에서는 ribosome의 dissociation 기능이 저하되면서 단백질 합성이 지연된다. 단백질 합성의 저하는 노화의 가장 큰 증상이라고 알려져 있다.

요약해 보면, 본 연구를 통해 밝혀진 9 가지의 대사체는 활력이 강

하거나 노화가 된 인삼 종자를 구분함으로써 인삼 종자의 수명을 예측하는데 사용될 수 있는 marker candidate로써 제시될 수 있는 가능성이 있다. 또한 종자의 발아 능력에 관련된 기존의 연구들에서 제시된 결과와 연관되어 있음을 알 수 있었다.

본 연구 결과에서 밝혀진 인삼 종자 수명에 관련된 대사체 및 pathway를 더욱 깊이 있게 연구하기 위하여 관련 효소 및 유전자에 대하여 추후 연구하여 인삼 종자의 노화의 과정 및 연관된 기전을 더욱 깊이 있게 연구해 볼 가치가 있다고 사료된다.

Ⅳ. 결론

1. Gas chromatography-mass spectrometry를 이용한 대사체학적인 방법을 적용하여 인삼 종자의 내인성 대사체를 연구함으로써 정상적인 인삼 종자와 노화된 인삼 종자의 특정한 차이가 있는 대사체를 규명하였다.

2. 통계 분석을 통하여 두 그룹간의 유의성 있는 대사체를 선별한 결과, 9 종의 내인성 대사체를 동정하였으며, 그 가운데 당류 및 당알코올, 아미노산류 그리고 인산은 정상적인 인삼 종자에서 감소하였으며, 오직 젖산만 유의성 있게 증가되어 있었다. 이들과 관련하여 식물 및 세포의 대사과정에 대해 조사해 본 결과, 노화된 인삼 종자에서는 차이가 없었으나 정상적인 인삼 종사에서 유의적인 발현 차이를 보이는 대사체 9 종은 무기호흡 및 단백질 생합성 pathway에 관련되어 있었다.

3. 선별된 9 종의 대사체는 인삼 종자의 활력을 예측하는 marker candidate로 제시될 수 있는 가능성이 있다. 본 연구를 통하여 밝혀진 인삼 종자의 대사체적인 변화를 이용하여 정상 종자와 노화된 종자를 구별하는 방법은 앞으로의 인삼 및 인삼 종자에 대한 추가적인 연구에 도움이 될 것으로 사료된다.

Ⅴ. 참고문헌

1) Kwon W.S., Lee J.H,, and Lee M.G., *Optimum Chilling Terms for Germination of the Dehisced Ginseng*. J. Ginseng. Res., 2001. Vol.25, No. 4, 167-170.

2) Kennedy, R.A., M.E. Rumpho, and T.C. Fox, *Anaerobic metabolism in plants.* Plant Physiology, 1992. 100(1): p. 1-6.

3) Bose S.K., Yadav R.K., Mishra S., Sangwan R.S., Singh A., Mishra B., Srivastava A.K., Sangwan N.S., *Effect of gibberellic acid and calliterpenone on plant growth attributes, trichomes, essential oil biosynthesis and pathway gene expression in differential manner in Mentha arvensis L.* Plant Physiology and Biochemistry, 2013. 66:150-8(2013).

4) Kuo, Y.-H., F. Ikegami, and F. Lambein, *Neuroactive and other free amino acids in seed and young plants of Panax ginseng*. Phytochemistry, 2003. 62(7): p. 1087-1091.

5) Perata, P. and A. Alpi, *Plant responses to anaerobiosis.* Plant Science, 1993. 93(1): p. 1-17.

6) Kim H.J., Yoo K.M., Lee S., Kim K.T., Hwang I.K., *Physicochemical characteristics of various ginseng seeds.* Korean J. Food Sci. Technology, 2013. 45(3): p. 274-278.

7) Ryan, C.A. *Proteolytic enzymes and their inhibitors*. Annual Review of Plant Physiology, 1973. 24:173-196.

8) App, A. A., M.G. Bulis, and W.J. McCarthy., *Dissociation of ribosomes and seed germination*. Plant Physiology, 1971. 47:81-86.

9) Bray, C. M., and T. Y. Chow, *Lesions in ribosomes of nonviable pea (Pisum arvense) embryonic axis tissue*. Biochim Biophys Acta, 1976. 442:14-23

10) Dekkers, B.J., J.A. Schuurmans, and S.C. Smeekens, *Glucose delays seed germination in Arabidopsis thaliana*. Planta, 2004. 218(4): p. 579-588.

Abstract

GC/MS-based metabolomics study on the viability of *Panax ginseng* seeds

Ji Yeon Hong
Department of Pharmacy, Pharmaceutical Anaysis
The Graduate School
Seoul National Univerity

Unlike other plant seeds, *Panax ginseng* seeds have the strong triple dormancy and prolonged germination period due to immature embryo development at the time of seed harvesting. Therefore, it takes huge time and effort to widely propagate ginseng. The viability and germination rate of seed are closely associated with its longevity. In this study, it assumed that specific alterations in the metabolic pathway mediating germination factors might be arisen once seeds lose their viability. In order to test assumption, metabolomics study was applied to ginseng seeds and aimed to observe metabolic changes in ginseng seeds by dividing seeds into two different groups: normal and stressed group (acceleratedly aged group). Both groups were treated with various concentrations of gibberellic acid (GA_3) and underwent extraction procedure and derivatization for the analysis using gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS). As a result, various metabolites were putatively identified using internal library mass spectrum . To test their significance and tendency, *t*-test and fold change analysis

were performed followed by multivariate analysis. Using principal component analysis (PCA) plot, significant metabolites that changed distinctively in normal and stressed groups were selected and they were further identified using authentic standards. Increased and decreased metabolites in normal ginseng seeds compared to the stressed seeds might be suggested as possible marker candidates for the prediction of ginseng seed longevity. This study may facilitate ginseng propagation by regulating specific metabolic features of ginseng seeds.

Keywords: *Panax ginseng* seed, Viability, Metabolomics, GC/MS (Gas chromatography-mass spectrometry)

Student Number : 2013-21625