

인삼 잎의 CO₂ 固定能과 光呼吸에 관한 研究

李寅鐵·盧根昊·李舜熙
(延世大學校 理科學 生物學科)

Studies on CO₂-Fixation Ability and Photorespiration in Ginseng Leaves

Lee, In Cheol, Keun Ho Ro and Sun Hi Lee
(Department of Biology, Yonsei University, Seoul)

ABSTRACT

These studies were undertaken to elucidate the reasons for the low productivity of ginseng by comparing the rate of CO₂-fixation and photorespiration, variation in the amounts of intermediates and enzyme activities of glycolate oxidase and catalase in ginseng with those of potato.

The ability of CO₂-fixation in ginseng was found to be one half of that of potato and there were significant differences between those two plants in the rate of ¹⁴C incorporated into glutamate, aspartate, malate and 3-PGA, but little differences in P-glycolate, glycolate, serine and glycine. The ratio of photorespiration to dark respiration and the activities of glycolate oxidase and catalase in the two species were about same, but ginseng showed higher ratio in photorespiration to total CO₂-fixation than potato did.

These results indicated that the low productivity of ginseng may resulted from the low CO₂-fixation ability and high rate of photorespiration.

緒 論

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 오갈피나무과에 속하는 多年生 草本으로, 그 재배 기간이 길고 직사 광선을 싫어하여 日覆을 要하며 한랭한 곳에서 잘 자라는 독특한 성장 조건을 가지고 있다. 그러나 인삼은 예로부터 독특한 약효를 가지고 있음이 인정되었기 때문에 현재까지 연구 발표된 실험의 대부분이 인삼의 成分이나 약효에 관한 것이었다(Petkov, 1959; Oh *et al.*, 1968; Park, 1962; Hiai *et al.*, 1971; Namba, 1974). 그러나 인삼 자체의 생리나 성장에 영향을 미치는 要因에 대한 연구는 매우 미미한 실정이다. 최근에 보고된 바에 의하면 인삼의 인룩소 성분은 a/b=3으로 음식물과 유사하고(Proctor, 1980)

2年生 성엽의 광합성 최적 온도는 15°C 이며 (Park, 1979), 광합성 최대 용량이 $0.175 \text{ g} \cdot \text{CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ (Proctor, 1980) 이라는 연구결과가 나온 바 있다. 이에 인삼의 광합성능을 밀 ($3.0 \sim 3.5 \text{ g} \cdot \text{CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, Evans *et al.*, 1975) 이나 완두 ($3.3 \text{ g} \cdot \text{CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{hr}^{-1}$, Shibles, 1975) 에 비교해 보면 인삼은 C_3 -plant 에 비해 약 1/20 정도의 낮은 광합성능을 나타내고 있다. 한편 인삼잎의 greening 과정에 따르는 chlorophyll-protein complex 형성 양상이나 (Park *et al.*, 1982) 엽록체 발달에 따른 CO_2 고정양상 (Lee *et al.*, 1982) 은 다른 C_3 -plant 와 유사함을 보여 주고 있다. 그러나 인삼이 다른 C_3 -plant 에 비해 매우 낮은 성장율을 갖는 원인에 대해서는 별다른 연구 보고가 없다. 본 실험에서는 인삼의 성엽을 使用하여 광합성능 및 광호흡율과 이들의 중간 대사 산물을 양지 식물인 감자에 비교하여 이 두 식물 사이의 차이점을 밝혀 인삼이 다른 C_3 -plant 에 비해 낮은 성장율을 갖는 원인을 알아보고자 하였다.

材料 및 方法

실험 재료로는 일반적인 성장 조건에서 재배한 2年生 人蔘 (*Panax ginseng* C.A. Meyer) 의 成葉을 使用하였으며, 대조구로는 감자 (*Solanum tuberosum* L.) 의 成葉을 使用하였다.

$^{14}\text{CO}_2$ feeding 및 대사산물의 추출. $^{14}\text{CO}_2$ 는 $50 \mu\text{Ci NaH}^{14}\text{CO}_3$ (59.7 mCi/m mole) 을 $20 \mu\text{mole}$ 이 되도록 cold NaHCO_3 를 혼합하여 Zelitch (1965) 의 방법에 의해 고정시켰다. 고정 시간은 각 1分, 3分, 10分으로 하였고 고정시킨 후 즉시 70% ethylalcohol 100 ml 에 열탕 처리하여 대사를 중지시킨 다음 30分 간격으로 3회 재처리하여 labelled components 를 추출하였다. 인삼과 감자의 CO_2 고정능은 상기추출액을 모두 혼합하여 1 ml 씩 취해 liquid scintillation counter (Beckman Inst. LT-250) 로 측정할 cpm 값과 상기 처리에 의해 추출되지 않은 물질의 cpm 값을 합한 것으로 하였다.

Cocktail solution 은 ppo 4.125 g, popop 0.175 g 을 toluene : triton X-100 = 2 : 1 의 혼합 용액 1000 ml 에 녹인 후 이 용액을 ethanol 과 1 : 1 로 혼합하여 10 ml 씩 使用하였다.

대사 중간산물의 분석. Ethanol 추출물을 분리하기 위해 40°C 이하에서 rotary evaporator 로 농축시킨 후 Dowex-50 \times 2 (H^+ type) 과 Dowex-1 \times 8 (Cl^- type) 을 使用하여 아미노산, 유기산 및 당류를 분획하였다.

아미노산은 paper chromatography 에 의해 분획하였다. 1차 전개 용매는 phenol : water = 4 : 1 (v/v) 의 혼합액을, 2차 전개 용매로는 n-butanol : acetic acid : water = 9 : 1 : 3 (w/w) 의 혼합액을 使用하였다. 전개 후에 완전히 건조시켜 1 cm^2 씩 절단하여 vial 에 넣어 liquid scintillation counter 로 측정하였다.

유기산은 Zelitch (1965) 의 방법으로 분획하였으나 resin bed 를 $1 \times 14 \text{ cm}$ 로 使用하였다. 분획된 유기산은 Stark *et al.* (1969) 의 방법에 의해 확인한 다음 1 ml 씩 취하여 liquid scintillation counter 로 측정하였다.

당 분획물은 양쪽 resin 에 흡착되지 않은 유출물을 상기 방법으로 측정하였다.

광호흡율의 측정. 광호흡율은 Zelitch (1968) 의 방법을 이용하여 측정하였다. 이때 使用한 Warburg vessel 의 volume 은 20 cm^3 였으며, $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ 는 $5 \mu\text{mole}$ ($20 \mu\text{Ci}$) 였고 leaf disk 의 직경은 1 cm 였다. Warburg vessel 내의 CO_2 를 모두 제거한 후에 $^{14}\text{CO}_2$ 를 고정시켰으며 이때 온도는 30°C , 광도는 2000 ft.C 를 유지하였다. 광호흡에 의해 방출되는 $^{14}\text{CO}_2$ 는 mono-

ethanolamine : Ethyleneglycolmonoethyl ether = 2 : 1 용액에 10分 간격으로 흡수시켜 1ml 씩 취한 다음 cocktail solution 5 ml와 혼합하여 liquid scintillation counter로 측정하였다. 광호흡을 측정할 후에는 광원을 제거하여 암상태에서 발생하는 $^{14}\text{CO}_2$ 의 양을 같은 방법으로 측정하였다.

광호흡과 암호흡의 비율은 광이 있는 상태에서와 없는 상태에서 10分에서 30分 사이에 방출되는 $^{14}\text{CO}_2$ 의 양으로 계산하였다.

酵素 活性的 측정. 粗酵素 추출액은 200 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 10 mM MgCl_2 , 0.2 mM EDTA의 조성으로 사용하였다. 2~3 g의 시료엽에 추출액 10 ml를 넣어 마쇄시킨 다음 8겹의 gauze로 여과하여 600 g에서 10分간 원심분리하여 cell debris를 제거하였다. 원심분리후 그 상정액을 다시 6,000 g에서 30分간 원심분리하여 여기에서 얻어진 상정액을 효소 활성 측정에 사용하였다. 이상의 모든 과정은 0~4°C에서 실시하였다.

Glycolate oxidase (E.C. 1.1.3.1)의 活性은 De Jong(1973)의 방법을 이용해 측정하였다. 반응액은 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8)에 horseradish peroxidase (1 mg/ml) 100 μl , 1.6 mM o-dianisidine 200 μl , 단백질 함량이 1 mg/ml인 粗酵素液 200 μl 를 첨가한 후 0.2 M Na-glycolate 200 μl 를 넣어 최종 부피가 2.7 ml가 되게 하였다.

반응은 Na-glycolate 용액을 가함으로 시작되어 460 nm에서 o-dianisidine의 산화도를 측정하였다.

Catalase (E.C.1.11.1.6)는 Chance and Maehly(1955)의 방법으로 측정하였으며, 단백질 함량은 Lowry *et al.* (1951)의 방법에 따라 측정하였다.

結果 및 考察

인삼 잎에 $^{14}\text{CO}_2$ 를 각 1分, 3分 고정시켰을 때, 인삼잎의 CO_2 고정능은 감자잎의 약 1/2 정도로 나타났다 (Fig. 1). 그러나 고정시간을 10分으로 연장시키면 인삼 잎의 CO_2 고정능은 1.08×10^6 cpm 이었고 감자 잎에서는 1.50×10^6 cpm 으로 나타나 인삼의 CO_2 고정능이 1分과 3分에 비해 높아진 것으로 나타났다. 이는 인삼 잎의 CO_2 고정능이 높아졌다기 보다는 감자가 상대적으로 높은 CO_2 고정능을 가지고 있으므로 밀폐된 용기내의 CO_2 농도가 낮아진 반면 인삼은 낮은 CO_2 고정능을 갖고 있으므로 10分까지도 용기내에 비교적 높은 수준의 CO_2 농도를 유지할 수 있어 지속적인 CO_2 고정이 일어난 것에 기인한다고 생각된다.

각 고정시간 별로 유기산, 아미노산 및 糖類에 고정 유입된 ^{14}C 의 분포율은 Table 1에 나타난 바, 양 식물간에 몇가지 차이점이 있었다.

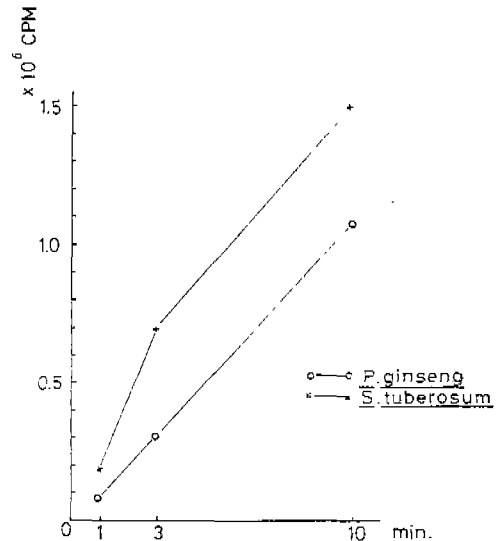


Fig. 1. Comparison of total amount of $^{14}\text{CO}_2$ incorporated into ginseng and potato leaf by CO_2 -fixation.

유기산에서의 ^{14}C 의 변화율을 보면 인삼에서는 49.1%, 42.3% 및 33.7%로 나타나 감자의 42.1%, 31.1% 및 18.3%에 비해 변화율이 매우 낮다. Amino acids의 경우에는 인삼이 29.4%, 24.6% 및 18.4%로 나타났고 감자가 33.1%, 22.8% 및 18.1%로 나타나 두 식물간에서의 차이가 유기산처럼 크지는 않았다. 그러나 1분 고정시켰을 때에는 인삼보다는 감자에서 amino acid로 유입되는 ^{14}C 가 많았지만, 고정시간이 길어짐에 따라 인삼의 amino acid에서 ^{14}C 분포율이 감자보다 높아졌다. 이런 차이는 감자보다는 인삼에 있어서 organic acid와 amino acid가 저장 산물인 sugar와 insoluble material로 전환되는 속도가 느린 것에 연유한다고 생각된다.

Table 1. Proportion of ^{14}C incorporated into components for 1, 3 and 10 min. photosynthesis (percentage of total ^{14}C incorporated)

	<i>P. ginseng</i>			<i>S. tuberosum</i>		
	1 min	3 min	10 min	1 min	3 min	10 min
Amino acid	29.4	24.6	18.4	33.1	22.8	18.1
Organic acid	49.1	42.3	33.7	42.1	31.1	18.3
Sugar	11.2	20.7	32.6	13.8	33.1	44.4
Residue	10.3	14.4	15.3	11.0	13.0	19.2

Table 2. Proportion of ^{14}C incorporated into individual components of organic acid for 1, 3 and 10 min. photosynthesis (percentage of total ^{14}C incorporated)

	<i>P. ginseng</i>			<i>S. tuberosum</i>		
	1 min	3 min	10 min	1 min	3 min	10 min
Glycolate	4.8	4.2	2.2	4.7	4.5	2.1
Glycerate	7.5	6.6	7.1	5.7	3.9	1.9
Malate	5.3	5.1	4.9	4.5	2.9	1.4
Citrate	10.4	8.9	8.2	13.1	9.4	10.2
p-Glycolate	4.0	3.2	3.0	5.6	3.9	1.1
3-PGA	10.8	10.4	6.3	3.9	3.4	0.9
Other	6.3	3.9	2.0	4.6	3.1	0.7
Total	49.1	42.3	33.7	42.1	31.1	18.3

Organic acid의 각 분획물에 나타난 ^{14}C 의 분포율은 3-PGA, glycerate, malate 등에서 현저한 차이를 나타내고 있다(Table 2). Wilson and Calvin(1955)의 보고에 의하면 3-PGA의 농도는 대기 CO_2 의 수준에 영향을 받는다. 즉 대기중의 CO_2 농도가 감소하면 ribulose-1,5-diphosphate(RuDP)의 농도는 서서히 증가하는 반면에 3-PGA의 농도는 급격히 감소한다. 인삼과 감자의 CO_2 고정능에 따른 두 실험구에서의 vessel 內 $^{14}\text{CO}_2$ 농도차이를 고려하면 본 실험결과는 위의 보고와 일치한다. 또한 3-PGA는 RuDP로부터 생성되거나, 광호흡 중간산물인 glycerate로부터 glycerate kinase에 의해 합성된다(Slack *et al.*, 1969). 따라서 인삼 잎에서 3-PGA와 glycerate에 ^{14}C 이 비교적 많이 incorporated된 것은 감자에

Table 3. Proportion of ^{14}C incorporated into individual components of amino acid for 1, 3 and 10 min. photosynthesis (percentage of total ^{14}C incorporated)

	<i>P. ginseng</i>			<i>S. tuberosum</i>		
	1 min	3 min	10 min	1 min	3 min	10 min
Aspartate	2.4	2.2	1.8	2.7	1.5	1.2
Glutamate	1.9	2.9	2.5	4.5	2.8	1.8
Glycine	9.5	6.2	5.0	10.3	6.2	4.5
Serine	6.2	5.1	3.3	7.6	5.6	3.3
Other	9.4	8.2	5.8	8.0	6.7	7.3
Total	29.4	24.6	18.4	33.1	22.8	18.1

Table 4. Amount of $^{14}\text{CO}_2$ released from ginseng and potato leaves in light and dark

	Total ^{14}C (cpm) fixed	*Residues	$^{14}\text{CO}_2$ released		**Lt/Dk
			in light	in dark	
			(cpm/mg·fr·wt/min.)		
<i>P. ginseng</i>	8.94×10^6	3.7×10^3	2.1×10^3	1.2×10^3	1.8
<i>S. tuberosum</i>	14.3×10^6	16.54×10^3	1.16×10^3	0.53×10^3	2.1

* Residues are the extracts of 80% ethanol and insoluble compounds.

**Lt/Dk is the ratio of photorespiration to dark-respiration.

비해 CO_2 고정능이 낮은 반면 (Fig. 1, Table 4) 광호흡율이 감자와 비슷한 수준이기 (Fig. 2, Table 4) 때문이라 사료된다.

인삼과 감자의 amino acid에 incorporated된 ^{14}C 의 비율은 각각 29.4%, 24.6%, 18.4%와 33.1%, 22.8%, 18.1%로 나타났다 (Table 1). 이중 glutamate는 감자에서 4.5%, 2.8%, 1.8%로 감소하는 경향을 보여 준 반면에 인삼에서는 거의 일정한 분포를 유지하고 있었다. Glutamate는 α -ketoglutarate에서 합성되므로, CO_2 고정 초기에 감자가 인삼보다 glutamate의 ^{14}C 분포율이 높다는 것은 3-PGA에 최초로 incorporated된 ^{14}C 의 전환이 빠름을 의미한다. 이는 aspartate의 경우에도 비슷한 결과를 보여 주고 있었다 (Table 3).

인삼 및 감자 잎을 30분간 광호흡시켰을 때 방출되는 ^{14}C 량은 Fig. 2와 Table 4에 나타낸 바와 같다. 광호흡에 의해 방출되는 $^{14}\text{CO}_2$ 의 양은 인삼 잎에서 2.1×10^3 cpm/min·mg·fr·wt이고 감자 잎에서는 1.16×10^3 cpm/min·mg·fr·wt로 인삼이 감자의 1.8배 정도 높은 수준을 보여주었다. 한편 암호흡에 의해 방출되는 $^{14}\text{CO}_2$ 의 양도 인삼 잎이 1.2×10^3 cpm/min

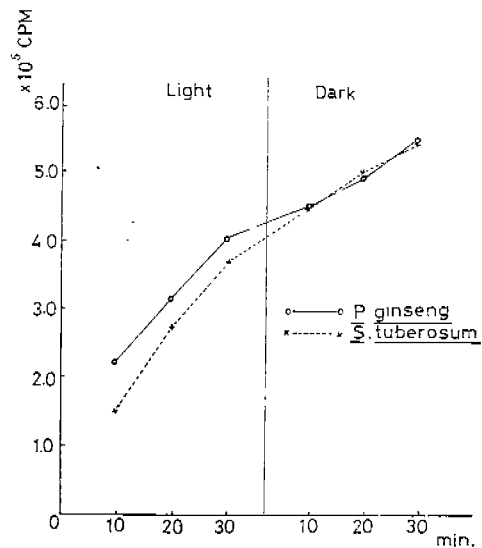


Fig. 2. Comparison of $^{14}\text{CO}_2$ released in the light and dark by ginseng and potato leaf.

·mg·fr·wt로 감자 잎의 0.53×10^3 cpm/min·mg·fr·wt보다 높았으나 인삼의 Lt/Dk는 1.8, 감자의 Lt/Dk는 2.1로 나타나 인삼의 안호흡에 대한 광호흡의 비율이 감자보다 조금 낮았다. 이런 결과들은 인산 잎이 감자 잎과 거의 비슷한 광호흡율을 갖고 있음을 의미하며 광호흡 중간 대사 산물에서의 ^{14}C 변이와 광호흡 관련 enzyme 活性度를 측정했을 때도 유사한 결과를 나타내었다. 즉 광호흡 중간 대사 산물인 p-glycolate와 glycolate에서의 경시적 $^{14}\text{CO}_2$ feeding에 따른 ^{14}C 분포율은 인삼에서 4.0%, 3.2%, 3.0%와 4.8%, 4.2%, 2.2%로 나타나 감자의 5.6%, 3.9%, 1.1%와 4.7%, 4.5%, 2.1%에 비교해 거의 차이가 없었다(Table 2). 또한 amino acid 중 광호흡 중간 대사 산물로 생성되는 glycine과 serine에서도 두 식물간에 유의한 차이가 없었다(Table 3). Glycolate oxidase와 catalase의 활성도는 인삼에서 1.15 $\Delta\text{A}/\text{min}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein}$, 4.80 $\Delta\text{A}/\text{min}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein}$ 이었고 감자에서는 1.33 $\Delta\text{A}/\text{min}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein}$, 5.50 $\Delta\text{A}/\text{min}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein}$ 으로 나타났다(Table 5). 이는 보리 莖葉에서의 glycolate oxidase 및 catalase의 활성도가 1.50 $\Delta\text{A}/\text{min}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein}$, 7.5 $\Delta\text{A}/\text{min}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein}$ (Lee and Kang, 1981)에 비교해 보면 다소 낮은 것으로 나타났다. 그러나 인산 잎은 감자 잎의 약 85% 이상의 enzyme activities를 보여 주었다.

Table 5. Activities of glycolate oxidase and catalase in ginseng and potato leaves

	Protein (mg/g·fr·wt)	Glycolate oxidase ($\Delta\text{A}/\text{min}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein}$)	Catalase
<i>Panax ginseng</i>	5.90	1.15	4.80
<i>Solanum tuberosum</i>	8.49	1.33	5.50

以上の 결과로 미루어 인산 잎의 total CO_2 고정능은 다른 C_3 -plant의 50~60%에 불과한 반면, 광호흡은 거의 비슷한 수준이라 사료되며, 인삼의 성장율이 낮은 것은 일차적으로 이에 기인한다고 생각된다. 그러나 인삼의 total CO_2 고정능이 낮은 원인은 효소학적 혹은 영양학적인 측면에서 더욱 자세한 연구가 이루어져야 규명될 수 있을 것이다.

摘 要

本實驗은 人蔘(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 生産性이 낮은 원인을 규명하기 위하여 人蔘의 CO_2 고정능, 광호흡율과 이들의 중간대사산물의 變異 및 glycolate oxidase와 catalase의 活性度를 감자(*Solanum tuberosum* L.)와 비교 조사한 실험이다.

人蔘의 CO_2 고정능은 감자의 1/2 정도이며, glutamate, malate, aspartate와 3-PGA 등 광합성 대사 산물에 incorporated된 ^{14}C 의 경시적 變異 양상은 두 식물 사이에 현저한 차이가 있었다. 그러나 광호흡 중간대사 산물인 p-glycolate, glycolate, serine 및 glycine에서는 人蔘과 감자 사이에 거의 차이가 없었다. 人蔘 잎의 광호흡/안호흡율은 감자 잎과 거의 같았으나, 총 CO_2 고정에 대한 광호흡이 감자보다 높았다. 또한 glycolate oxidase와 catalase의 활성도 비슷한 수준이었다. 以上으로 광합성 측면에서 볼 때, 人蔘의 生産性이 낮은 원인은, CO_2 고정이 낮고 광호흡율이 높은 데 기인한다고 사료된다.

參 考 文 獻

- Chance, B. and A. C. Maehly. 1955. Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymol.* 2 : 764~775.
- De Jong, D. W. 1973. Modification of tobacco leaf glycolate oxidase activity by chlorogenic acid and other polymers. *Physiol. Plant.* 29 : 150~156.
- Evans, L. T., I. F. Wardlaw and R. A. Fisher. 1975. Wheat. *In* Crop physiology, L. T. Evans, (ed.) p. 110. Cambridge Univ. Press.
- Hiai, S., H. Oura, K. Tsukada and Y. Hirai. 1971. Stimulating effect of *P. ginseng* extract on RNA polymerase activity in rat liver nuclei. *Chem. Pharm. Bull.* 19 : 1656~1663.
- Lee, S. H. and Y. H. Kang. 1981. Studies on the mechanism of photorespiration following the differentiation of cell organelles. *J. Natural Science Research Institute* 7 : 99~107.
- , Y. D. Cho, Y. N. Hong and Y. M. Kwon. 1982. Studies on the development of chloroplast and CO₂ fixation patterns in ginseng leaves. *Korean Biochem. J.* 15 : 141~150.
- Lowry, O. H., H. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265~275.
- Namba, T. M., T. Tomimori, K. Kobashi, K. Mitsui and J. Hase. 1974. Fundamental studies on the evaluation of the crude drugs (I). *Planta Med.* 25 : 28~37.
- Oh, J. S., J. K. Lim, C. W. Park and M. J. Han. 1968. The effect of ginseng on experimental hypertension. *Kor. J. Pharmacol.* 4 : 27~31.
- Park, D. I. 1962. Pressor and depressor action of *P. ginseng* in mammals. *Kor. J. Med.* 5 : 818~831.
- Park, H. 1979. Physiological response of *Panax ginseng* to temperature. *Kor. J. Ginseng Sci.* 3 : 156~167.
- Petkov, W. 1959. Pharmacodynamics of *P. ginseng*. *Arch. Expl. Pathol. Phaimakol.* 236 : 298~299.
- Proctor, J. T. A. 1980. Some aspects of the canadian culture of Ginseng, Particularly the Growing environment. *In* Proceedings of the 3rd International ginseng symposium. pp. 39~47.
- Shibles, R. M., I. C. Anderson and A. H. Gibson. 1975. Soybean *In*. Crop physiology, L. T. Evans (ed). p. 167. Cambridge Univ. Press.
- Slack, C. R., M. D. Hatch and D. J. Goodchild. 1969. Distribution of enzymes in mesophyll and parenchyma sheath chloroplasts of maize leaves in relation to the C₄-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Biochem. J.* 114 : 489~498.
- Stark, J. B., A. E. Goodban and H. S. Owens. 1951. Paper chromatography of organic acid. *Analr. Chem.* 23 : 413~415.
- Wilson, A. T. and M. Calvin. 1955. The photosynthetic cycle CO₂ dependent transients. *J. Amer. Chem. Soc.* 77 : 5948~5951.
- Zelitch, I. 1965. The relationship of glycolic acid synthesis to the primary photosynthetic carboxylation reaction in leaves. *J. Biol. Chem.* 240 : 1869~1876.
- . 1968. Investigation on photorespiration with a sensitive ¹⁴C-assay. *Plant Physiol.* 43 : 1829~1839.

(1982. 10. 11. 接受)