

## Peroxidase와 Lipoxygenase에 대한 농약의 저해작용

황인영\* · 장병선\*\* · 박관화\*\* · 노정구\*

(1984년 11월 10일 접수)

## Inhibition of Peroxidase and Lipoxygenase by Pesticides

In-Young Hwang\*, Byeong-Seon Chang\*\*, Kwan-Hwa Park\*\* and Jung-Koo Roh\*

### Abstract

The effect on the activities of peroxidase and lipoxygenase by chemicals was determined.

Peroxidase activities of horseradish and apple were inhibited strongly by maneb and comparatively by mancozeb, zineb. The inhibitory rate of enzyme activity was ranged in 12.5~34.5% by maneb, 11.0~30.5% by mancozeb, and 9.7~27.5% by zineb in the level of 10~30 ppm at the final concentration. No signification was in the peroxidase activity of apple during ripening between control and plot, treated with 500 ppm mancozeb.

On the activity of purified soybean lipoxygenase, zineb inhibited it more strongly than carbofuran or phosphamidon, but maneb did not have inhibitory effect on that. The inhibition ranges of 14.0~40.0% by zineb, 6.5~20.0% by carbofuran and 4.5~13.0% by phosphamidon were shown in the final pesticide concentration of 10~30 ppm. But in 100~200 ppm, lipoxygenase activity was almost inhibited by carbofuran and phosphamidon.

### 緒 論

農藥이 生體나 環境에 미치는 影響中, 生體內에 存在하는 酵素作用을 阻害하기도 한다. 이 들로는 esterase<sup>(1)</sup>, ATPase<sup>(2)</sup>, mixed function oxidase<sup>(3)</sup>의 阻害가 널리 알려져 있다. 특히 神經傳達系 酵素인 cholinesterase는 磷含有 有機化合物에 敏感한 力價阻害作用을 나타내어<sup>(4)</sup> 農藥處理時 人體가 威脅을 받기도 하며<sup>(5)</sup>, 이 물질들이 주위 環境으로 移行될 때에는 環境汚染을 일으키기도하여 그 汚染度를 測定하는데 使用하기도 한다<sup>(6)</sup>. 또한 amylase<sup>(7)</sup>, invertase<sup>(7)</sup>, peroxidase<sup>(8)</sup>, polyphenoloxidase<sup>(8)</sup>등 많은 酵素들이 農藥處理에 의

해 影響을 받는다고 報告되어 있다.

Peroxidase<sup>(9)</sup>는 植物의 成長<sup>(10)</sup>, 果實의 熟成<sup>(11,12)</sup> 등에 關與하는 酵素로 植物의 成長中 生育條件에 따라 力價가 달라지고<sup>(13,14)</sup> polyamine<sup>(15)</sup>, 重金屬<sup>(16)</sup>등에 의해서도 力價變化가 생긴다. 이 酵素는 植物體에 널리 分布되어 있고 酵素力價測定이 비교적 간편하여, 環境汚染의 尺度로 사용될 수 있다면 便利한 手段이 될 것으로 推測된다.

한편 Al-Obaidy 등은 carbamate의 10<sup>-4</sup>M 濃度에서 lipoxygenase의 力價가 크게 減少됨을 報告하였다<sup>(17)</sup>. 이로 미루어 보아 殘留農藥이 lipoxygenase의 力價에 影響을 줄것으로 推測된다. 따라서 本 研究에서는 peroxidase와 lipoxygenase가 生體中에서, 또는 精製

\* 韓國化學研究所 安全性研究센터 (Toxicology Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon)

\*\* 서울대학교 食品工學科 (Dept. of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon)

된 상태에서 化學物質 등에 의해 力價가 阻害되는 程度를 實驗하였고 化學物質의 環境汚染度를 測定하는 指標로 利用可能性을 檢討하였다.

리는 6 m 로 하였다. 서양고추냉이(horseradish)는 서울大學校 食品工學科에서 栽培한 것을 試料로 使用하였고 lipoxygenase 는 Sigma Co. (Type V, 602,400 units/mg protein)에서 購入하였다.

### 材料 및 方法

#### 1. 試料

경기도 수원시 권선동 소재 韓國科學技術院 安全性 試驗圃場(土性: 砂壤土, pH=5.1, 有機物含量 2.06%)에서 5~6 年生 사과나무(品種: 후지)를 택하고 株間거

#### 2. 農藥

實驗室에서 使用된 農藥은 현재 國內에서 많이 使用되고 있는 것으로 Table 1 과 같다. 이들을 dimethyl sulfoxide, ethanol, acetonitrile 및 acetone 등에 溶解시킨 후 증류수로 희석하여 使用했다.

Table 1. Chemical and common name of pesticides used for experiment

Common Name	Chemical Name
Captafol	N-Tetrachloro-ethyl thio tetrahydrophthalimide
Captan	N-Trichloro-methyl thio-4-cyclohexene-1,2-dicarboximide
Carbofuran	2,3-Dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranyl methyl carbamate
Daconil	Tetra chloro isophthalo nitrile
DDVP	O,O-Dimethyl-2,2-dichloro vinyl phosphate
Mancozeb	a coordination product of zineb and maneb
Maneb	1,2-EthanediyI bis(carbamodithioato)-2-manganese
Omethoate	O,O-Dimethyl S-2-methylamino-2-oxoethyl phosphorothioate
Ortran	O,S-Dimethyl acetyl phosphoramido thioate
Oxydong	8-Hydroxy quinolin copper
Phosphamidon	2-Chloro-2-diethyl carbamoyl-1-methyl vinyl dimethyl phosphate
Plictran	Tricyclo hexylitin hydroxide
Tricyclazole	5-Methyl-1,2,4-triazolo (3,4-β)-benzothiazole
Zineb	1,2-EthanediyI bis(carbamodithioato)-2-zinc

圃場에 農藥을 撒布한 方法은 農藥을 1,000 倍 희석하여 0.24 kg a.i./10 a 의 量을 各各 處理하고 處理日로부터 1, 3, 6, 10, 17, 24 日 徑過된 試料를 採取하였고 24 日째 2 次 農藥處理를 前과 同一하게 실시한 후 같은 間격으로 試料를 採取하였다. 대조구로써는 藥劑處理하지 않은 同品種의 사과나무를 利用하였다.

에 통과시켜 酵素를 分離(purification fold=250)하고 分離된 液을 粗酵素液으로 使用하였다. 사과 peroxidase 抽出은 다음과 같았다. 껍질을 얇게 벗긴 果肉切片을 同一量의 0.1 M 磷酸緩衝溶液(pH 7.0)과 함께 均質化시킨 후 천으로 濾過하고 遠心分離(6,000×g, 15分)하여 그의 上澄液을 粗酵素液으로 하였다. 또한 lipoxygenase 는 0.1 M 磷酸緩衝溶液(pH 6.0)으로 희석하여 1.9 mg protein/ml 의 濃度가 되게 한 후 使用하였다.

#### 3. 酵素의 精製

서양고추냉이로부터 peroxidase 의 分離는 Fig. 1 과 같이 하였다<sup>(18)</sup> 잘게 썬 뿌리부분을 同一量의 0.1 M 磷酸緩衝液(pH 7.0)과 함께 Waring blender 로 均質化시킨 후 35%포화 황산암모늄 용액을 만들고 4°C, 6,000×g 로 遠心分離한 다음, 상정액을 90%포화황산암모늄 용액으로 (沈沈)하고 4°C, 20,000×g 로 遠心分離한 沈澱物을 취하여 0.05 M Tris 緩衝溶液中에서 透析하고 0.005 M 醋酸緩衝溶液(pH 4.4)으로 平衡시켰다. 이것을 carboxymethyl cellulose (CM-cellulose) column

#### 4. 酵素力價의 測定

Peroxidase 의 力價測定은 Wilder<sup>(19)</sup>의 方法을 다소 變形하여 利用하였다. 즉 0.1 M 磷酸緩衝溶液(pH 7.0)에 20 mM guaiacol 溶液 0.1 ml 와 酵素液 0.1 ml 를 잘 혼합한 후 稀釋된 農藥液을 0.01~0.1 ml 씩 加하고, 40 mM hydrogen peroxide 溶液을 0.02 ml 넣은 다음 磷酸緩衝溶液으로 채워 5.0 ml 가 되게 한 다음 470 nm 에서의 吸光度變化(ΔE/Δt)를 測定하였다. 이때 대조

구에는 農藥稀釋時 使用된 溶媒를 同一量 處理하였다.

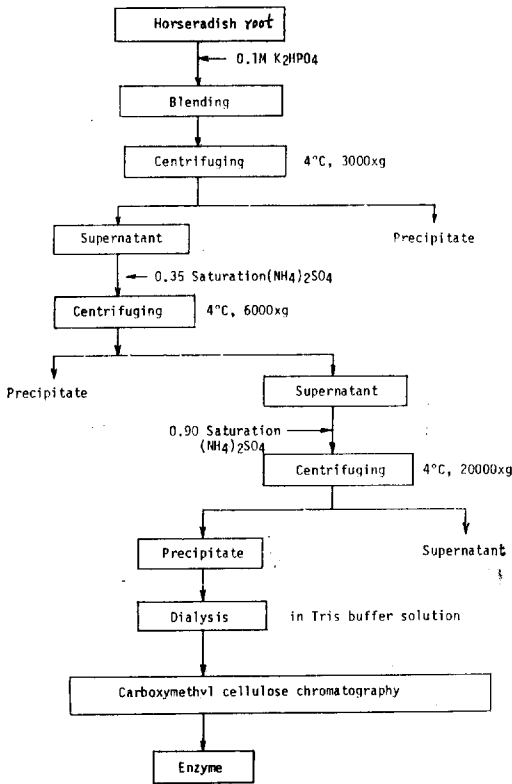


Fig. 1. Schematic diagram for purification of peroxidase from horseradish

Lipoxygenase는 Rackis 등<sup>(20)</sup>의 變法에 따랐다. Lino-leic acid 500 mg 과 tween-20 500 mg 을 1.0 N NaOH 2.0 ml 에 녹인 후 증류수로 50 ml 되게 稀釋한 것을 基質로 使用하였다. 基質液 25 μl 와 앞서 製造한 酵素液 100 μl 를 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH6.0)에 稀釋한 후 peroxidase 의 경우와 마찬가지로 農藥稀釋液을 各各 0.01~0.1 ml 씩 가한 후 磷酸緩衝溶液으로 2.5 ml 가 되도록 조절한 후 234 nm 에서의 吸光度 變化를 測定하였다. 대조구는 peroxidase 경우와 동일하게 하였다. 各 酵素들의 化學物質에 대한 影響은 다음식과 같이 계산하였다.

$$\%Residual\ activity = \frac{a}{b} \times 100$$

a : enzyme activity, chemicals treated

b : enzyme activity, control

殘存力價는 農藥 및 有機溶媒를 處理하지 않았을때의 酵素力價와 農藥이나 有機溶媒가 處理되어 阻害되고 남은 酵素의 力價比로써 各物質의 影響을 나타내었다.

## 結果 및 考察

### 1. Peroxidase 의 力價阻害

農藥을 處理하기 위한 溶劑로 使用되는 有機溶媒가 精製된 서양고추냉이의 peroxidase 의 力價에 미치는 影響은 Fig. 2 와 같다. 有機溶媒의 添加量에 比例하여 peroxidase 의 力價阻害가 나타났으며 同一濃度下에서는 ethanol, acetonitrile, acetone, DMSO 등의 順으로 力價阻害정도가 增加하였다. Plummer 등<sup>(21)</sup>은 DMSO 가 acetylcholinesterase 에 대하여 競合的 阻害作用을 하며 약 2%의 DMSO 濃度에서 80%의 力價阻害가 있음을 觀察하였다. 本 實驗에서는 DMSO 2%의 濃度에서 약 12%의 阻害를 보이고 있음으로 보아 acetylcholinesterase 보다는 낮은 阻害度를 나타내고 있다. 또한 實驗에서 一般農藥의 阻害實驗에 使用된 有機溶媒의 濃度範圍는 0.1~1.0% 였으므로 各 有機溶媒에 의한 阻害效果는 그리 크지 않다고 判斷된다. 즉 有機溶媒의 濃度가 1%일때 ethanol과 acetonitrile에 의한 阻害는 각각 4%, acetone과 DMSO는 5.7% 정도이다. 사과에서 抽出된 peroxidase의 경우도 서양고추냉이의 것과 매우 類似한 結果를 얻었다.

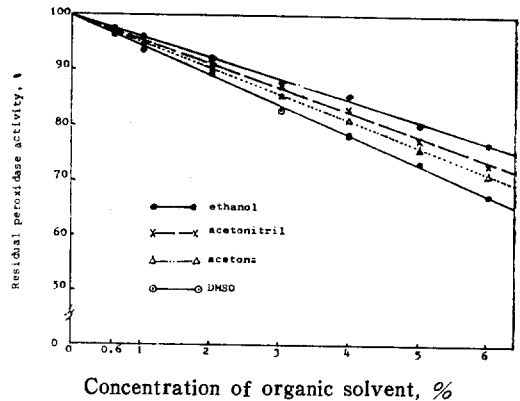


Fig. 2. Effect of organic solvent on the partially purified horseradish peroxidase activity in vitro

서양고추냉이로부터 分離 精製된 peroxidase에 農藥을 0에서 40 ppm까지 各各 處理하고 그의 力價變化를 測定하였다. Fig. 3에서와 같이 maneb가 가장 크게 peroxidase 阻害作用을 나타내었으며 zineb가 maneb보다는 낮은 peroxidase 力價阻害作用을 함을 알 수 있었다. Maneb와 zineb의 主成分이 75 : 25의 比率로 混合된 mancozeb의 경우는 maneb보다는 약하게 그러나

zineb보다는 강한 沮害效果를 보여 주었다. 이들 農藥外에 plictran, tricyclazole, DDVP, daconil, captafol, oxydong등은 주어진 濃度範圍에서 아무런 影響이 없었다. 사과에서 抽出된 peroxidase에 maneb, zineb, mancozeb를 각각 0~40 ppm으로 處理한 結果 Fig. 4에서처럼 서양고추냉이 peroxidase와 거의 같은 傾向을 나타내었다. 이때 各 農藥들의 10, 20, 30 ppm濃度에서의 沮害정도는 maneb가 12.5, 23.0, 34.5%, zineb가 9.5, 17.5, 27.5%, 그리고 mancozeb가 11.0, 20.5, 30.5% 씩이었다.

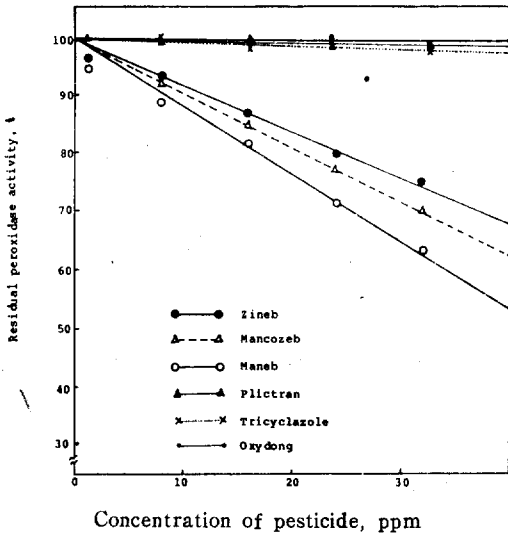


Fig. 3. Inhibition of horseradish peroxidase by pesticides

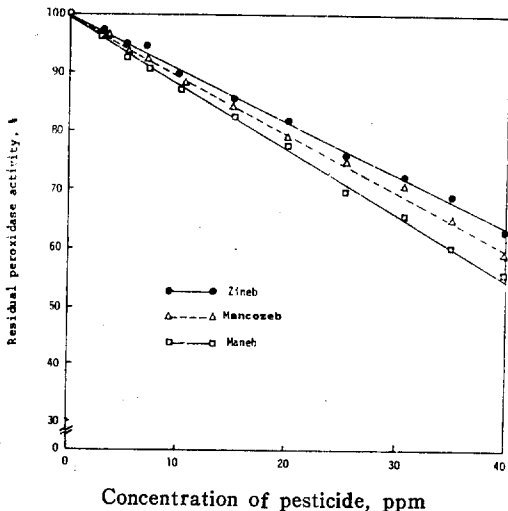


Fig. 4. Inhibition of apple peroxidase by pesticides

이 農藥들은 1,2-ethanediyi bis(carbamodithioate)의 基本 構造를 가지며 Mn<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup> 이온이 各 構造의 結合을 하고 있다. 한편 oxydong은 Cu<sup>++</sup>이온을 含有하고 있고 plictran은 Sn<sup>++</sup>이온을 含有하고 있으나 peroxidase 力價에 影響을 주지 않았다. 또한 Mn<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup>, Sn<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup>의 chloride염을 同一量 處理하였을 때 peroxidase 力價에 變化가 없었다. 이로 미루어보아 maneb, zineb, mancozeb의 基本構造인 1,2-ethanediyi bis(carbamodithioate)가 酵素에 沮害作用을 하는 것으로 생각된다. 또한 maneb가 zineb보다 沮害效果가 큰 이유는 그들의 構造의 特性때문인 것으로 推測된다.

사과나무에 直接 農藥을 撒布하고 사과의 熟成過程 中에서의 peroxidase 力價變化를 알아보기 위하여 現在 國內에서 널리 利用되는 殺菌劑中 mancozeb의 酵素沮害作用을 調査하였다. Fig. 5에서와 같이 사과의 發育이 進行됨에 따라 peroxidase의 力價는 農藥을 處理한 區와 無處理區에서 各같이 서서히 減少하고 있다. 無處理區와 農藥을 處理한 實驗區(農藥處理量: 0.24 kg ai/10 a)間의 peroxidase 力價는 95% 信賴限界範圍에서 差異가 없었다. 따라서 勸奨使用量水準(0.24 kg a.i./10 a/year)의 處理濃度에서는 生體內의 peroxidase 力價에 影響을 미치지 못하는 것으로 判斷된다. 그러나 過量으로 많은 回數를 撒布할때에는 사과內의 酵素系에 影響을 미칠것으로 豫想된다.

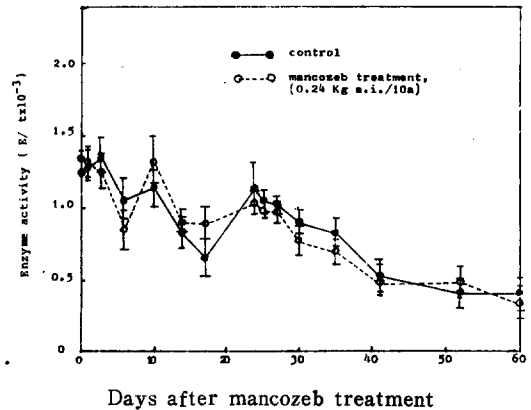


Fig. 5. Influence of mancozeb upon the peroxidase activity during ripening of Fuji apple, confidence interval 95% shown by vertical bars

2. Lipoxygenase의 力價 沮害

酵素反應液에 一定濃度の 農藥을 添加한 후 lipoxygenase의 力價를 測定하여 沮害程度를 調査하였다. Fig. 6에서 보는바와 같이 omethoate, ortran, 및 maneb는

40 ppm까지 거의沮害作用을 보이지 않았으나 zineb는 30 ppm에서 약 40%의沮害作用이 나타났다. 有機磷劑인 phosphamidon이나 carbamate劑인 carbofuran도沮害效果가 있었는데 10, 20, 30 ppm 處理濃度에서 phosphamidon이 4.5, 9.0, 13.0%, carbofuran이 6.5, 12.5, 20.0% 정도沮害되었다. 위의 세農藥들은 100~200 ppm에서는 다같이 100%沮害效果를 보였다. Al-O baidy 등<sup>(17)</sup>은 10<sup>-4</sup>M 濃度の carbamate가 lipoxygenase를 약 15%정도沮害한다고報告했다. Carbofuran은 一種의 carbamate劑로서 30 ppm(1.3×10<sup>-4</sup>M)에서 20%의沮害效果가 있었다. 有機磷劑의 경우 10<sup>-7</sup>~10<sup>-6</sup>M의 低濃度에서 cholinesterase를 크게沮害하였으나<sup>(17)</sup> lipoxygenase의 phosphamidon에 의한沮害作用은 cholinesterase에 비해 그리 크게 나타나지 않았다.

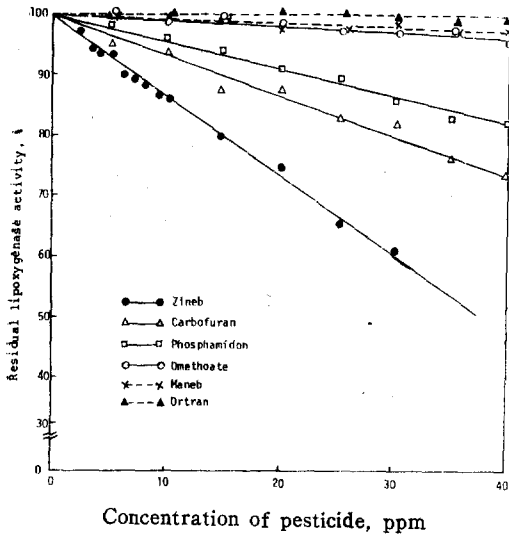


Fig. 6. Inhibition of lipoxygenase by pesticides

Peroxidase의 경우와 相異한 점은 같은 基本構造의 zineb와 maneb중 Zn<sup>++</sup>이온을 含有한 zineb의 경우 lipoxygenase의 力價에 큰沮害效果가 있으나 Mn<sup>++</sup>이온을 含有한 maneb는 별效果가 없었다는 점이다. 이 같은 現象이 일어나는 기작을 밝혀야 함이 앞으로 계속되어야 할 연구과제이다.

以上과 같은 研究結果로 미루어 볼때 測定法이 簡便하고 化學物質등에 力價變化가 敏感한 여러 種類의 酵素들을 利用한다면 環境汚染物質의 汚染度 測定이나 園藝農產物등의 貯藏 및 食品加工學의 面에 있어서의 應用을 可能케 할 것으로 豫測한다.

要 約

化學物質에 依한 서양고추냉이와 사과的 peroxidase

및 정제된 大豆 lipoxygenase 力價沮害를 調査하였다. 서양고추냉이와 사과的 peroxidase 力價에沮害效果를 주는 農藥中 maneb가 zineb의 效果보다 컸으며 10, 20, 30 ppm의 處理濃度에서 maneb는 12.5, 23.0, 34.5%, zineb는 9.5, 17.5, 27.5%의 力價沮害를 보였다. Maneb와 zineb의 混合體인 mancozeb를 500 ppm의 濃度로 사과나무에 撒布했을때 사과的 peroxidase 力價變化는 無處理區와 별 差異가 없었다. 大豆의 lipoxygenase 力價에 미치는 影響은 zineb의 경우 가장沮害도가 컸으며 phosphamidon과 carbofuran이 또한沮害效果가 있었다. 그러나 maneb는沮害效果가 없었다. 10, 20, 30 ppm의 處理濃度下에서의 lipoxygenase 力價沮害度는 zineb가 14.0, 27.0, 40.0%, carbofuran이 6.5, 12.5, 20.0% 그리고 phosphamidon이 4.5, 9.0, 13.0%였다. 또한 이들 세農藥은 100~200 ppm에서 100% lipoxygenase 力價沮害를 보였다.

References

- Ernst, G. F., Pieterse, C. and Martens, L. J.H. (1977) : Comparison of drosophila, rat-liver and bee-head esterases in detecting residues of organophosphorus and carbamate pesticides in vegetables and fruits, *J. Chromatogr.*, **133**(1), 245.
- Chowdhury, J. S., Dedeja, P. K., Mehta, S. K. and Mahmood, A. (1980) : Effect of a single oral dose of malathion on D-glucose and glycine uptake and on brush border enzymes in rat intestine, *Toxicol. Lett.*, **6**(6), 411.
- Hodgson, E., Kulkarni, A. P., Fabacher, D. L. and Robacker, K. M. (1980) : Induction of hepatic drug metabolizing enzymes in mammals by pesticides, *A review, J. Environ. Sci. Health B*, **15**(6), 723.
- Weil, L. (1981) : Cholinesterase inhibition-current status of the process technology and evaluation, *Hydrochem. Hydrogeol. Mitt.*, **4**, 149.
- Knaak, J. B. and Maddy, K. T. (1978) : Cholinesterase activity in blood samples collected from field workers and non-field workers in California, *Toxicol. App. Pharmacol.*, **45**(4), 755.
- Goodson, L. H. and Jacobs, W. B. (1973) : An immobilized cholinesterase product for use in the rapid detection of enzyme inhibitors in air or water, *Anal. Biochem.*, **51**, 362.
- Nilova, V. P. and Guseva, T. A. (1978) : Effect

- of chemical immunization on the activity of natural inhibitors of amylase and invertase of potato tubers in the winter storage period, *Ref Zh, Biol. Khim. No. 12Kh 562* (USSR),
8. Matsutsina, L. B. (1974) : Changes in the activities of oxidases in the sugar beet leaves caused by insecto-fungicides, *Mater. Resp. Nauchno-p-roizvod.* 3rd, 152~153. (USSR).
  9. Saunders, B. S., Homles-Stedle, A. G. and Stark, B. P. (1964) : *Peroxidase*, Butterworths, London.
  10. Huystee, R. B. V. and Cairns, W. L. (1982) : Progress and prospects in the use of peroxidase to study cell development, *Phytochemistry*, **21**, 18 43.
  11. Ranadive, A. S. and Haard, N. F. (1972) : Peroxidase localization and lignin formation in developing pear fruit, *J. food Sci.*, **37**, 381.
  12. Glennie, C. W. (1981) : Preharvest changes in polyphenols, peroxidase and polyphenoloxidase in sorghum grain, *J. Agr. Food Chem.*, **29**, 33.
  13. Stevens, H. C. (1978) : Peroxidase activity as a screening parameter for salt stress in Brassica species, *Phytochemistry.*, **17**, 1521.
  14. Thomas, P. and Delincee, H. (1979) : Effect of gamma irradiation on peroxidase isoenzymes during suberization of wounded potato tubers, *Phytochemistry*, **18**, 917.
  15. Srivastava, S. K. and Rajbabu, B. (1983) : Effect of amines guanidines on peroxidase from maize scutellum, *Phytochemistry*, **22**, 2681.
  16. Lee, K. C., Cunningham, B. A. and Chung, K. H. (1988) : Lead effect of on several enzymes and nitrogeous in soybean leaf, *J. Environ. Qual.*, **5**(4), 357.
  17. Al-Obaidy, H. M. and Siddiqi, A. M. (1981) : Inhibition of broad bean lipoxygenase, *J. food Sci.*, **46**, 597.
  18. Shannon, L. M., Kay, E. and Lew, J. Y. (1966) : Peroxidase isoenzymes from horseradish roots, I. Isolation and physical properties, *J. Biol. Chem.*, **241**, 2166.
  19. Wielder, C. J. (1962) : Factors affecting heat inactivation and partial reactivation of peroxidase purified by ion-exchange chromatography, *J. Food Sci.*, **37**, 562.
  20. Rackis, J. J., Honig, D. H., Sessa, D. J. and Morser, H. A. (1972) : Lipoxygenase and peroxidase activities of soybean samples as related to the flavor profile during maturation, *Cereal Chem.*, **49**(5), 586.
  21. Plummer, J. R., Greenberg, M. J., Lehman, H. K. and Watts, J. A. (1983) : Competitive inhibition of dimethylsulfoxide of molluscan and vertebrate acetylcholinesterase, *Biochem. Pharm.*, **32**, 151.