

人蔘 葉燒病에서 색소의 광산화작용에 관한 연구

II. Chlorophyll bleaching의 생리적 반응기작에 관한 연구*

양덕조·유희수·윤재준

충북대학교 자연과학대학 생물학과

(1987년 8월 24일 접수)

Investigation on the Photooxidation of Pigment in Leaf-Burning Disease of *Panax ginseng*

II. Investigation and analysis of physiological reaction mechanism on the chlorophyll bleaching phenomenon

Deok Cho Yang, Hi Soo Yoo and Jae Jun Yoon

Department of Biology, College of Natural Science, Chungbuk National University, Chongju 310, Korea

(Received August 24, 1987)

Abstract

This study was investigated and analyzed the physiological reaction mechanisms and the factors of the chlorophyll bleaching phenomenon on leaf burning-disease of the Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). Chlorophyll bleaching phenomenon was mainly caused by the photooxidation of singlet oxygen and the autooxidation of hydrogen peroxide (H_2O_2) accumulation resulted from inactivation of catalase and peroxidase. Chlorophyll bleaching phenomenon was remarkably accelerated by addition of saponin.

서 론

人蔘 (*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 多年生 草本 藥用식물로 그 재배기간이 3~6년이나 되며, 직사광선을 받으면 初期에는 잎이 bleaching되고 시간이 점점 경과하면 枯死된다. 그래서 옛 고려인들은 人蔘의 독특한 약효를 인정하였기에 해가림을 해서 재배하였으며, 한랭한 장소를 適地로 택하였다. 근래에 와서는 일부 研究팀들에 의하여 日覆의 자재 및 방법에 대하여 研究되었으나¹⁻³⁾, 직사광선에 의한 잎의 chlorophyll 파괴현상(photooxidation)에 대한 研究는 전무한 실정이다. 일반적으로 자연환경조건에서 chlorophyll의 分解는 老化과정에서 뿐만 아니라 광역학적반응(photodynamic reaction)인 photooxidation에 의하여 일어날 수 있다^{4) 5)}. 생체내에서 photooxidation과 관련된 물질은 singlet oxygen(1O_2)과 free radical이다.

* 본 논문은 1986년도 문교부 학술연구조성비에 의하여 이룩되었음.

Free radical에는 산화력이 강한 superoxide(O_2^-)와 hydrogen peroxide(H_2O_2) 그리고 hydroxyl radical($-OH$) 등이 있으며, 이들은 생체막의 지질성분을 peroxidation시키고 유전 정보물질인 DNA, RNA의 구조변화 및 enzyme protein과 chlorophyll을 파괴시킨다⁷⁻⁹). 그러나 고등식물에서는 이런 현상이 거의 일어나지 않고 있으나, prokaryote에서는 높은 光度에 의한 photooxidation이 발견되고 있다¹⁰⁻¹²). Elstner *et al.*¹³⁾은 *Euglena*에 高光度를 조사한 결과 chlorophyll이 bleaching되는 현상을 확인하였으며, Harbour *et al.*¹⁴⁾은 *in vivo*에서 photooxidation에 의한 chlorophyll의 bleaching 현상이 hydroxyl radical의 영향이라고 하였다. 유사한 실험에서 Kandler *et al.*¹⁵⁾은 *Chlorella*에 높은 광량을 처리한 후 나타나는 chlorophyll 파괴현상을 photooxidation으로 설명하였으며, 또한 Krinsky¹⁶⁾는 chlorophyll의 photooxidation이 oxygen작용에 기인된다고 보고하였다. 이상 연구결과의 공통적인 견해는 prokaryote에서 bleaching 현상은 고광도에 따른 photooxidation이다. 그러나 고등식물 중 특히 육지식물에서의 고광도에 의한 photooxidation이나 생리적 반응에 대한 보고는 전무한 상태이다. 前報¹⁷⁾에서 필자들은 chlorophyll의 bleaching을 현상학적 측면에서 관찰, 분석한 결과를 specific photoinjury 현상이라 보고하였다. 따라서 著자들은 前報에 이어 人蔘根의 生育에 막대한 지장을 초래하는 葉燒病에 의한 枯死원인을 밝히고자, chlorophyll의 photooxidation 현상에 대한 생리반응기작을 조사, 분석하였다.

재료 및 실험방법

1. 植物 및 栽培條件

前報와 동일한 조건에서 재배한 人蔘잎을 재료로 실험을 행하였다.

2. 광산화에 따른 단계별 chlorophyll의 흡수스펙트럼 측정

Photooxidation에 따른 chlorophyll의 흡수스펙트럼은 2가지 방법으로 진행하였다. 첫째, 人蔘잎으로부터 85% acetone을 이용하여 chlorophyll을 분리한 후 100 KLux광에 노출시켜 photooxidation시켰다. 측정시간은 5분간격으로 6개의 sample을 취하여 흡수스펙트럼을 측정하였다. 둘째, 人蔘잎을 자연광 100 KLux에 처리하여 photooxidation시켰다. 측정시간은 0, 60, 90, 120, 140, 160, 180분으로 처리하여 Shimadzu UV-Vis Recording Spectrophotometer(UV-240)를 이용해서 흡수스펙트럼을 측정하였다.

3. 酵素 活性度

Crude enzyme extract는 供試試料 1g을 증류수로 세척한 다음 10 ml ammonium phosphate buffer(pH 7.0)에 5분간 마쇄한 후 16겹의 gauze로 여과시켜 2000×g에서 15분간 원심분리하여 그 상등액을 이용하였다. 人蔘잎에서 catalase(EC.1.11.1.6)의 activity는 Yang *et al.*¹⁸⁾(1985)의 decoupling method를 이용하였으며, peroxidase(EC.1.11.1.7)의 activity 측정은 Chance & Maehly¹⁹⁾ 방법에 따랐다.

4. H_2O_2 와 saponin이 chlorophyll의 bleaching현상에 미치는 영향

人蔘잎의 切片(직경 1.5 cm)을 과산화수소용액 0.1, 0.5, 1.0 M에 3시간 동안 압처리(실온)한 후 chlorophyll 함량 및 chlorophyll 분해속도 양상을 측정하였다. Saponin이 미치는

영향을 측정하는 실험에서는 saponin 추출액(3g fresh weight equivalent)를 처리하여 切片에서의 chlorophyll 함량 및 흡수스펙트럼을 측정하였으며, saponin과 과산화수소의 상호관계를 알아보고서 H_2O_2 와 saponin을 복합처리하여 chlorophyll 함량에 미치는 영향을 조사하였다.

5. Chlorophyll 및 carotenoid 함량측정

前報와 동일한 Roebbelen's²⁰⁾ 방법으로 하였다.

결과 및 고찰

1. 광산화에 따른 단계별 chlorophyll의 흡수스펙트럼 측정

Chlorophyll의 photooxidation에 의한 人蔘잎 切片의 bleaching 현상은 光을 처리한 후 90분 부터 나타나기 시작하였고, 150분이 지난 후에는 절반이상이 bleaching되었으며, 180분 이후에는 모든 시료에서 완전한 bleaching 현상이 관찰되었다(Fig. 1). 光을 처리한 후 30분 간격으로 chlorophyll과 carotenoid 함량을 측정한 결과 chlorophyll 함량이 90분간 광처리시에는 2.86 mg/g·fr. wt.였으며 180분 처리후에는 0.26으로 현저히 감소하였다. Chlorophyll a/b-ratio와 carotenoid 함량도 chlorophyll 함량과 비례하여 광처리 시간이 경과할수록 급속히 감소하는 경향을 나타냈다(Table 1).

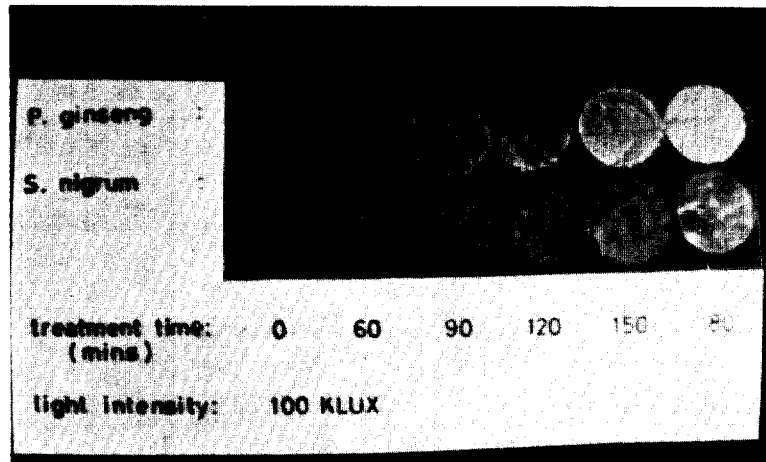


Fig. 1. Bleaching phenomenon of chlorophylls in treatment time of solar radiation.

Table 1. Changes in chlorophyll a, b and carotenoid contents and a/b ratio in treatment of solar radiation

time (min)	Pigment content (mg/g.fr.wt.)				
	chl.t	chl.a	chl.b	a/b	carotenoid
0	4.26	2.68 ± 0.19	1.58 ± 0.28	1.70	1.76 ± 0.07
60	4.18	2.62 ± 0.04	1.56 ± 0.07	1.68	1.76 ± 0.04
90	2.86	1.76 ± 0.03	1.10 ± 0.02	1.60	1.22 ± 0.03
120	1.54	0.88 ± 0.01	0.66 ± 0.05	1.33	0.84 ± 0.03
150	1.06	0.54 ± 0.05	0.52 ± 0.03	1.04	0.62 ± 0.04
180	0.26	0.10 ± 0.04	0.16 ± 0.05	0.61	0.22 ± 0.07

*In vitro*와 *in vivo* 상태에서 광조사 후 chlorophyll의 bleaching 경향을 흡수스펙트럼으로 비교해 본 결과 현저한 차이점이 나타났는데 (Fig. 2, 3), *in vivo* 상태에서는 saponin peak (320 nm)의 감소가 뚜렷하였으나, *in vitro* 상태에서는 감소현상이 나타나지 않았다. Chlorophyll peak (410, 435, 460, 670 nm)의 경우 *in vitro*에서는 광조사시 빠른 시간내에 4개의 peak 감소율이 비슷한 경향을 보이는 반면, *in vitro*에서는 광조사 시간이 경과할수록 435, 460, 670 nm peak의 감소율 보다 410 nm peak의 감소율이 현저히 적게 나타났다.

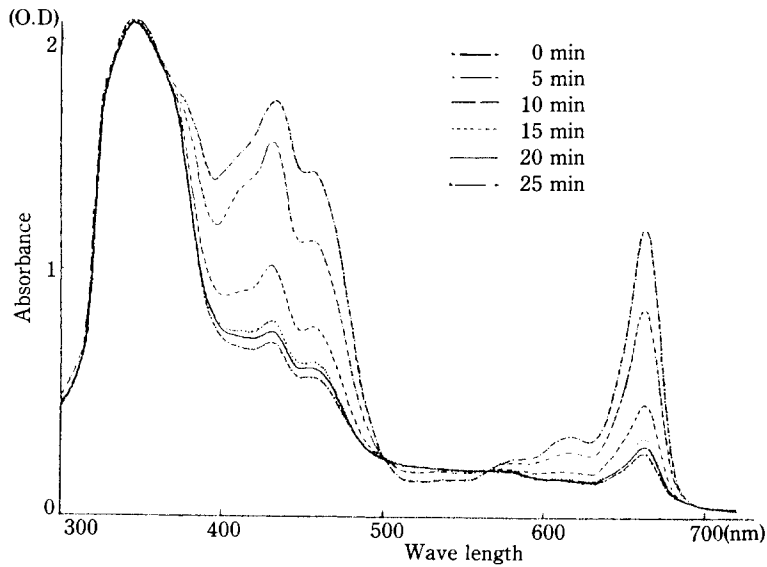


Fig. 2. Absorption spectra of chlorophyll according to degree of bleaching *in vitro*.

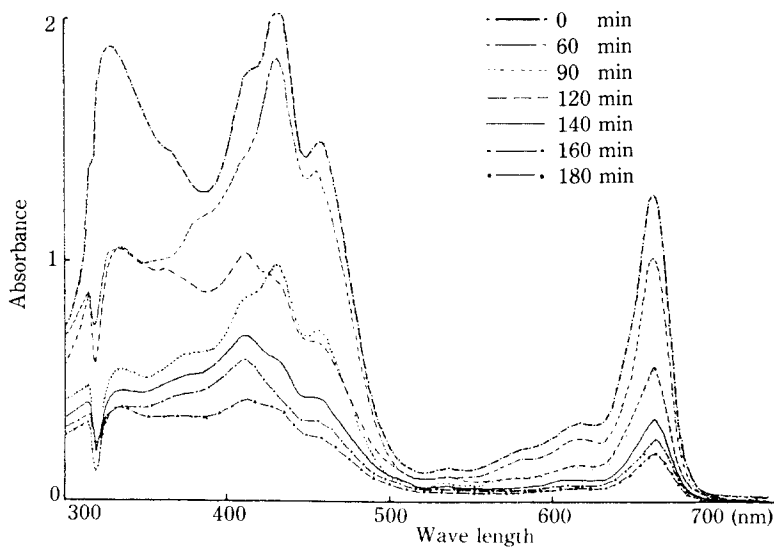


Fig. 3. Absorption spectra of chlorophyll according to degree of bleaching *in vivo*.

2. Chlorophyll의 bleaching 과정중 酵素(catalase, peroxidase) 活性度

생체내에서 자유로이 생성되는 superoxide(O_2^-)는 superoxide dismutase(EC.1.15.1.1)의 촉매에 의하여 H_2O_2 로 전환된다. 과산화수소가 세포내에 축적되면 여러 물질대사를 chaos상태로 만들 수 있다. 일복하에서 재식되어 있는 人蔘잎에서의 catalase activity와 peroxidase activity는 상당히 높았으나, 自然光에 노출시키면 catalase activity가 급속히 감소하였다. Fig. 4a에서 보듯이 대조구(200 Lux)에서는 catalase activity에 아무런 변화가 없었으나, 100 KLux를 처리한 人蔘잎에서는 30분처리후 부터는 activity가 직선적으로 감소하여 180분에는 약 98% 감소하였다. 광에 대한 peroxidase activity 감소율도 catalase와 똑같은 양상을 나타냈다. 이 결과를 미루어 볼때 人蔘에서의 bleaching 현상은 광에 의한 enzyme inactivation과 그 결과로 나타나는 H_2O_2 의 축적으로 기인된다고 사료된다.

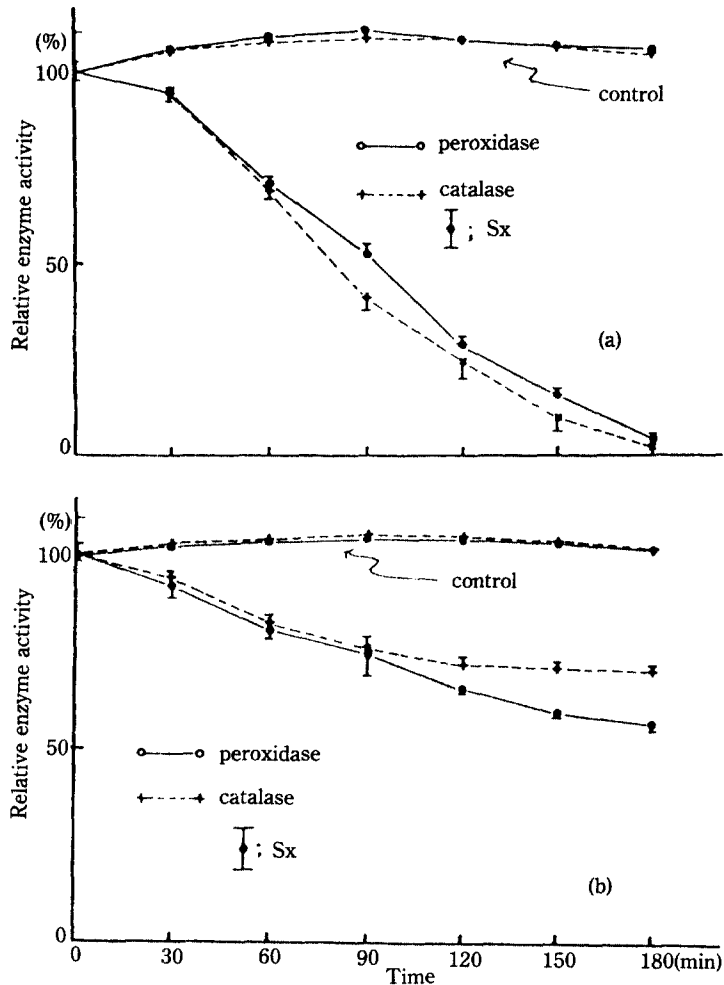


Fig. 4. Changes of catalase and peroxidase activities in treatment of solar radiation ((a). *Panax ginseng* C.A. Meyer., (b). *Solanum nigrum* L., Control, lab. condition, 200 Lux., *P. ginseng*; 10% catalase activity = 4.78, 10% peroxidase activity = 4.26, *S. nigrum*; 10% catalase activity = 1.62, 10% peroxidase activity = 4.32).

생체내에서 자유로이 생성되는 O_2^- (superoxide)는 산화력이 강한 radical로써, lipid의 peroxidation 뿐만 아니라 특히 생체막에 damage를 주어 세포를 파괴시킬 수 있는 힘을 지니고 있다²¹⁻²⁴). 그러나 다행히도 생체내에 생성되는 superoxide는 superoxide dismutase의 촉매작용으로 인하여 H_2O_2 로 빨리 전환되며, H_2O_2 는 또 catalase나 peroxidase에 의해 H_2O 와 $1/2 O_2$ 로 분해된다. 본 실험에서는 superoxide dismutase의 activity를 측정하지 아니하였으나, catalase와 peroxidase activity가 광처리 후 급속히 감소하는 것으로 미루어 보아 축적된 H_2O_2 가 chlorophyll을 autooxidation시키며, 또 한편으로는 강한 적색광파가 기공을 폐쇄시켜 CO_2 고정은 이루어지지 않는 반면 물의 광분해 (photolysis)는 활발히 일어나 생체내에 O_2 분압이 상승하게 되고, 이 산소는 photosensitizer로부터 energy를 받아 1O_2 로 전환되는데 이렇게 생성된 1O_2 은 chloroplast membrane system, nucleic acid, enzyme 그리고 여러 pigment system에 작용하여 photooxidation을 유발시킬 것으로 사료된다. 人蓼에서 나타나는 이런 현상이 양지식물에도 유발되는지를究明코저 까마중 잎에 100 KLux 광을 조사한 결과, 광처리 180분이 경과한 후에도 약 25% 정도의 activity만이 감소하였다 (Fig. 4b). 이와 같은 감소율은 人蓼에 비해 아주 적은 감소율이었다. 따라서 人蓼葉燒病에서의 bleaching 현상은 H_2O_2 에 의한 chlorophyll의 autooxidation과 singlet oxygen에 의한 photooxidation으로 수렴된다.

3. H_2O_2 와 saponin이 chlorophyll의 bleaching 현상에 미치는 영향

암상에서 人蓼 잎 切片에 H_2O_2 의 농도를 달리 처리한 결과 H_2O_2 의 농도가 증가함에 따라 chlorophyll의 흡수스펙트럼이 급격히 감소하였을 뿐만 아니라, saponin (320 nm) peak 역시 급격히 감소하였다 (Fig. 5). 이와 같은 결과는 광산화에 의한 chlorophyll의 흡수스펙트럼과 같은 양상이었다.

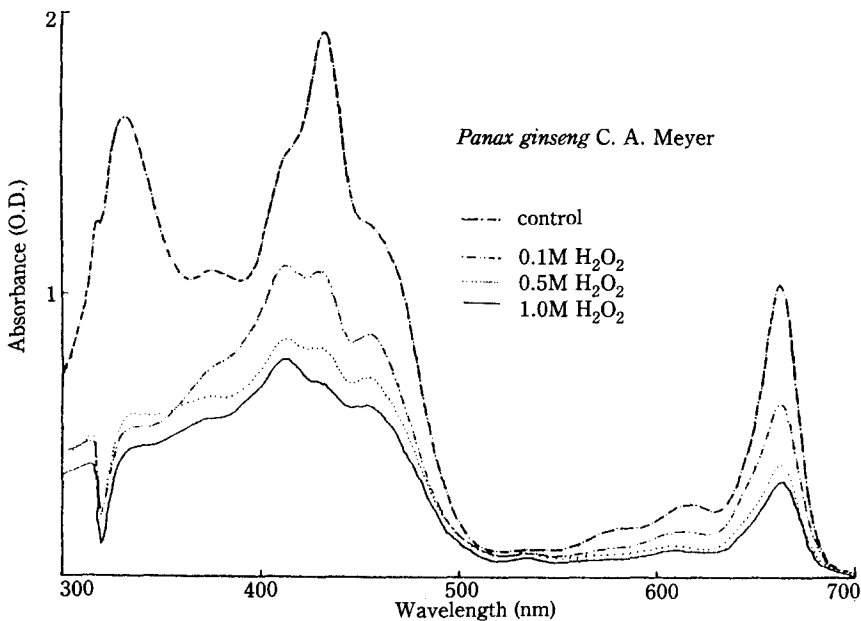


Fig. 5. Changes of absorption spectra of chlorophyll in concentration of H_2O_2 .

암상태에서 saponin이 chlorophyll의 bleaching 현상에 관여하는지에 대한 여부를 알아보고 저 saponin, H_2O_2 단독처리 및 H_2O_2 와 saponin을 복합처리 하였던 바, control로 정한 saponin 단독처리에서는 chlorophyll의 bleaching 현상에 전혀 영향을 미치지 않았으나 H_2O_2 단독처리구와 H_2O_2 와 saponin 복합처리구에서는 흡수스펙트럼이 현저히 감소되었으며, 특히 복합처리구에서 가장 높은 감소율을 보였다(Fig. 6).

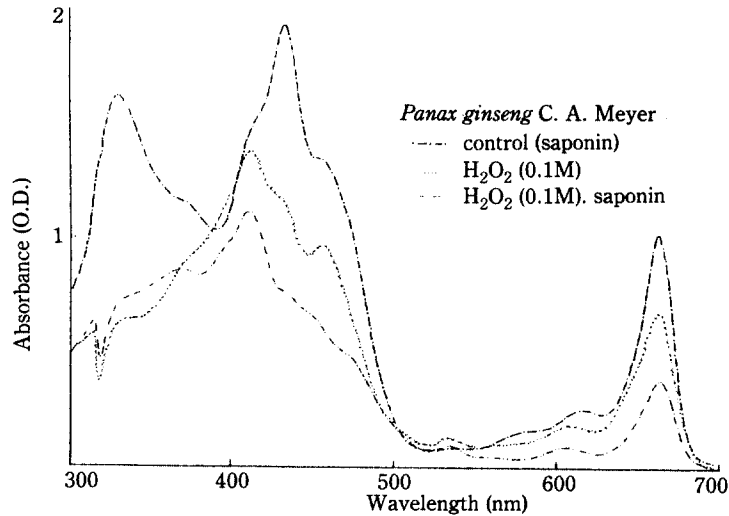


Fig. 6. Changes of absorption spectra of chlorophyll in treatments of saponin and H_2O_2 .

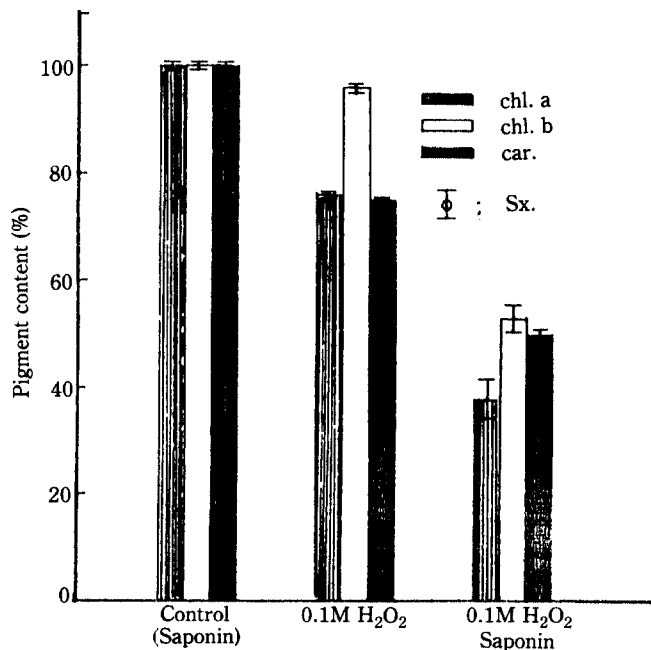


Fig. 7. Changes of chlorophyll a, b and carotenoid content in treatments of H_2O_2 and saponin (treatment time; 60mins, 10%chl. a; 0.28, 10% chl. b; 0.16, carotenoid 10%, 0.24, unit; mg/g. fr. wt., Sx; standard error).

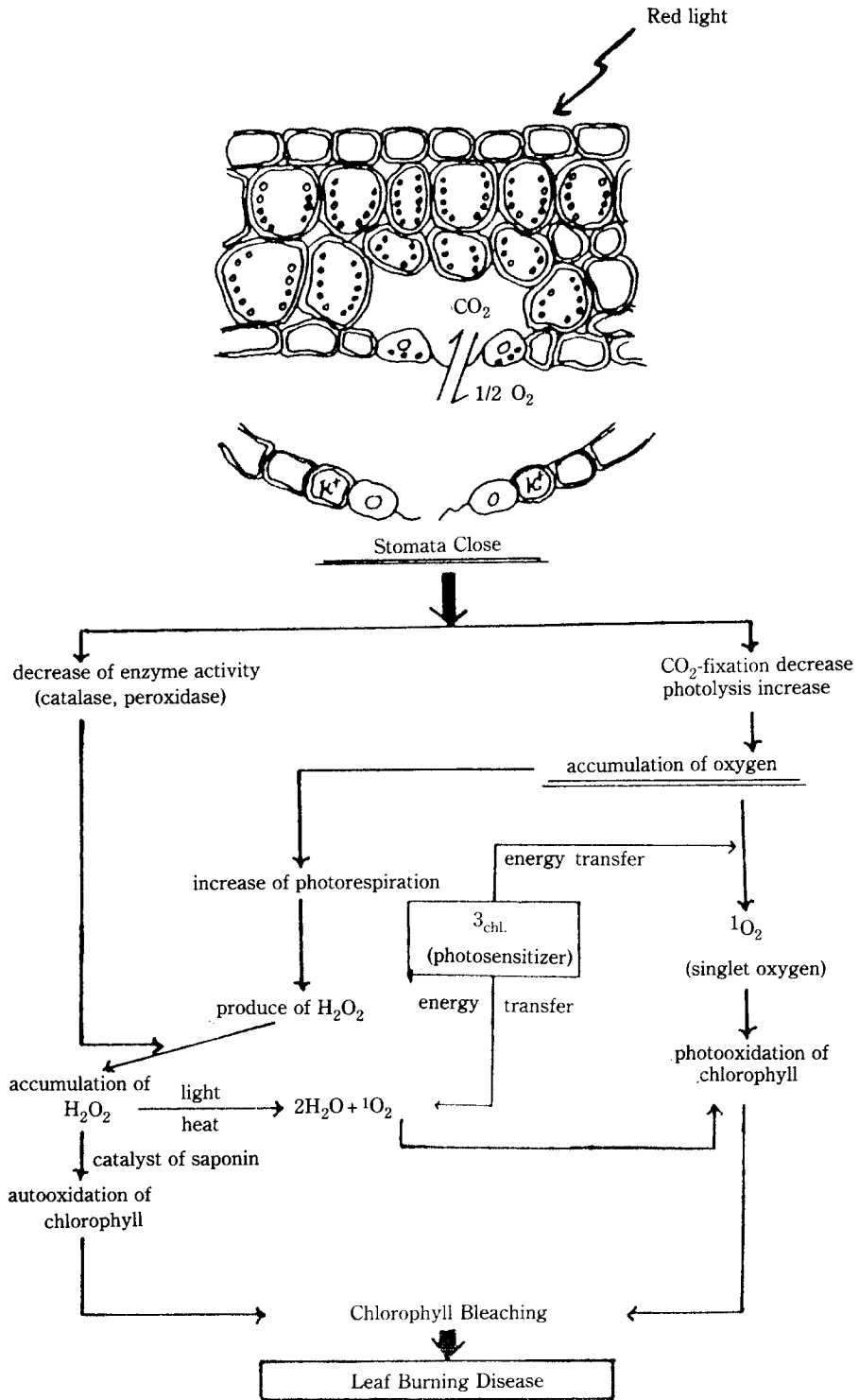


Fig. 8. Hypothetical bleaching pathway of chlorophyll in *Panax ginseng* C. A. Meyer.

처리구별 chlorophyll의 함량변화는 H_2O_2 와 saponin 복합처리구에서 가장 높은 감소율을 보였다. 즉 H_2O_2 단독처리시 total chlorophyll 함량은 약 15% 감소하였다 (Fig. 7).

전향에서 제시한 人蔘 葉燒病에서의 bleaching 현상은 H_2O_2 에 의한 chlorophyll의 autooxidation에 기인된다는 假定을 뒷받침하기 위하여 *in vitro* 상태에서 H_2O_2 처리에 의한 bleaching 현상의 특징, 즉 chlorophyll의 함량과 흡수스펙트럼은 自然光처리시 나타난 bleaching 현상과 일치하였다. 이 결과는 *in vivo* 상태에서도 H_2O_2 가 chlorophyll을 bleaching시킨다는 것을 재임증 해주고 있다. 또한 saponin은 人蔘의 잎에서 생합성되는 이 식물의 특유한 내성성분이다. 따라서 이 식물 특유의 saponin이 고광도에 의한 chlorophyll의 bleaching 현상에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보고자 saponin 有無에 따른 H_2O_2 의 작용을 조사하였던 바, saponin이 Fig. 6, 7과 같이 H_2O_2 에 의한 autooxidation을 촉진시켜주는 것으로 확인되었다. 이상의 결과를 종합하여 Fig. 8과 같은 가설을 설정하였다.

요 약

人蔘 (*Panax ginseng* C.A. Meyer) 葉燒病에서 chlorophyll의 bleaching 현상에 대한 생리적 반응기작을 조사, 분석한 결과 chlorophyll의 bleaching 현상은 singlet oxygen (1O_2)에 의한 photooxidation과 catalase와 peroxidase의 inactivation에 의한 H_2O_2 의 autooxidation이었다.

Chlorophyll의 bleaching 현상에 원인으로 추려된 H_2O_2 를 농도별로 人蔘 잎 切片에 처리하였던 바, chlorophyll의 함량과 chlorophyll의 흡수스펙트럼은 自然光 처리시 유발된 bleaching 현상과 일치하였으며, saponin 첨가로 인하여 bleaching 현상은 현저히 촉진되었다.

인용문헌

1. 김요태, 천성기, 이성식 : 인삼연구보고서 231(1978).
2. 김요태, 이종길, 천성기 : 인삼연구보고서(재배분야), 489(1979).
3. 양덕조, 김요태, 천성기 : 인삼연구보고서(재배분야), 349(1981).
4. Imamura, M. and Shimizu, S.: *Plant Cell Physiol.* **15**, 187 (1974).
5. Kok de L. van Hasselt P.R. and Kuiper, P.J.C.: *Physiol. Plant* **43**, 7 (1978).
6. Peiser, G.D. and Yang, S.F.: *Photochemistry* **17**, 79 (1978).
7. Kono, Y., Takahashi, M.A. and Asada, K.: *Arch. Biochem. Biophys.* **174**, 454 (1976).
8. Yost, F.J. and Fridovich, I.: *Arch. Biochem. Biophys.* **175**, 514 (1976).
9. Heath, R.L. and Packer, L.: *Arch. Biochem. Biophys.* **125**, 189 (1968).
10. Lesco, S.A., Lorenzen, J.R. and Ts'o, P.O.P.: *Biochem.* **19**, 3023 (1980).
11. Abelovich, A., Kellenberg, D. and Shilo, M.: *Photochem. Photobiol.* **19**, 379 (1974).
12. Elstner, E.F. and Pils, I.: *Z. Naturforsch. Teil C.* **34**, 1040 (1979).
13. Elstner, E.F. and Osswald, W.: *Z. Naturforsch. Teil C.* **35**, 129 (1980).
14. Harbour, J.R. and Bolton, J.R.: *Photochem. Photobiol.* **28**, 231 (1978).
15. Kandler, O. and Sironval, C.: *Biochem. Biophys. Acta* **33**, 207 (1959).
16. Krinsky, N.I.: *Trends Biochem. Sci.* **2**, 35 (1977).
17. 양덕조·윤희수·윤재준 : Chlorophyll bleaching의 현상학적 연구(1987).

18. Q., Yoon, J.J., Lee, S.J. and Lee, A.R.: *Korean J. Ginseng Sci.* **9**(2), 154 (1985).
19. Chance, B. and Maehly, A.C.: *Method in Enzymol.* **2**, p. 764 (1955).
20. Roebbelen, A.: *Experimente zur stoffwechsel-physiologie der pflanzen*, Georg Thieme Verlage Stuttgart, (1976).
21. Tyler, D.D.: *FEBS Lett.* **51**, 180 (1975).
22. Mead, J.F.: *Free radicals biology*, Academic Press, New York, p. 51 (1976).
23. Elstner, E.F. and Konze, J.R.: *Ber. Dtsch. Ges.* **89**, 335 (1976).
24. Sandmann, G. and Boger, P.: *Plant Physiol.* **66**, 797 (1980).