

人蔘葉燒病에서 Active Oxygen Species (1O_2 , O_2^- , H_2O_2)가 Chlorophyll Bleaching 에 미치는 影響 및 防除對策에 관한 研究

양덕조·김명원*·채 쾌**·김명식

충북대학교 자연과학대학 생물학과

*연세대학교 문리대학 생물학과

**충북대학교 자연과학대학 생화학과

(1989년 4월 24일 접수)

Effects of Active Oxygen Species (1O_2 , O_2^- , H_2O_2) and Scavengers on the Chlorophyll Bleaching of Leaf-Burning Disease from *Panax ginseng* C.A. Meyer

Deok-Cho Yang, Myong-Won Kim*, Quae Chae*** and Myeong-Sik Kim

Department of Biology, College of Natural Science, Chungbuk National University, Cheongju 360-763

*Department of Biology, College of Science, Yonsei University, Wonju 220-050, and

**Department of Biochemistry, College of Natural Science,
Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

(Received April 24, 1989)

Abstract □ In order to determine the specific active oxygen species directly related to chlorophyll bleaching in the leaf-burning disease, we investigated the effects of singlet oxygen (1O_2), superoxide radical (O_2^-), and hydrogen peroxide (H_2O_2) on isolated chloroplast suspension and leaf discs from *Panax ginseng* C.A. Meyer. When the singlet oxygen was added to the chloroplast suspension, the chlorophyll and carotenoid contents were decreased by more than 80%, similar to treatment with high light intensity (100 KLux). We assumed that the conversion of dioxygen (O_2) produced either in photolysis or in breakdown of hydrogen peroxide to singlet oxygen resulted from photorespiration. On the basis of these experiments, the inhibitory effects of active oxygen scavengers propylgallic acid (PGA), 2,5-ditetrabutyl hydroquinone (DBH), sodium pyrosulfate (SPS), and ascorbic acid (ABS) were examined. In chloroplast suspension all four scavengers inhibited chlorophyll bleaching by more than 75%, and in the leaf discs the inhibition rates of SPS, PGA and ABS were 46%, 51%, and 96% respectively.

Keywords □ *Panax ginseng* C.A. Meyer, active oxygen, singlet oxygen, superoxide, hydrogen peroxide chlorophyll bleaching, leaf burnign disease.

서 론

인삼엽소병(人蔘葉燒病)은 인삼이 직사태양광선에 장시간 노출되면 엽록소를 비롯한 色素의 本 研究는 1988년도 文教部 育成 研究費 支援에 의한 것임.

bleaching 이 시작되고 (Fig.1), 결국에는 지상부가 고사하는 光被害 (photodamage) 현상으로써 가시광선 중에서도 과도한 적색광 (600-700 nm)에 의해 유발되는 specific photoinjury 로 알려져 있다.

일반적으로 정상적인 양지식물에서는 엽록소의 광산화작용이 거의 일어나지 않으며 인삼을 제외한 음

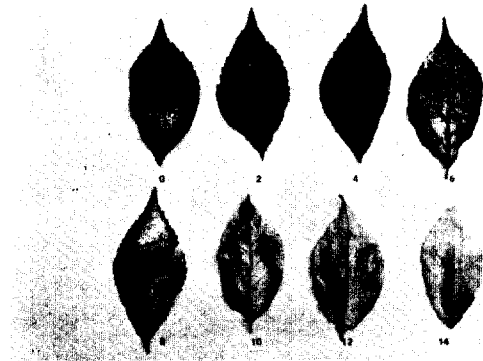


Fig. 1. Bleaching phenomenon of chlorophyll by treatment time of solar radiation in Korean ginseng leaves (Time; 0 - 14 hour).

지식물에서는 재식위치 변화에 따라 光被害현상이 유발되나 대부분의 식물은 생리, 생태학적으로 적응되는 것으로 알려져 있고²⁾, 외부환경요인에 의한 chlorophyll degradation에 관한 연구는 비교적 장시간 소요되는 노쇠현상을 중심으로 많이 보고되어 있다³⁻⁶⁾. 일반적으로 active oxygen species에 의한 엽록소의 파괴는 주로 양지식물을 대상으로 연구되었는데 Noack⁷⁾은 光呼吸이 증가할 때 다량 생산되는 과산화수소가 엽록소를 직접 파괴시킬 수 있다고 보고하였고, Foote⁸⁾와 Krinsk⁹⁾는 superoxide radical (O_2^-)을 통한 광산화작용을 보고하였다. 식물엽에서 singlet oxygen (1O_2)은 엽록소와 flavin 등이 관여하는 photodynamic reaction에 의해 생성되며^{10,11)}, 이 1O_2 가 엽록소를 포함한 색소 분자 뿐만 아니라 membrane과 핵산 및 효소에 이르는 거의 모든 생체물질을 파괴할 수 있다고 알려져 있다¹²⁻¹⁴⁾. 정상적인 고등식물체에서는 이러한 oxygen species에 대한 protective mechanism (superoxide dismutase, catalase, carotenoid 등)이 존재하여 광산화작용을 억제하고 있다¹⁵⁻¹⁸⁾. 그러나 인삼에서는 광량변화에 따른 광보호 mechanism에 관한 연구는 전혀 시도된 바 없으며, 人參葉燒病에서 光被害에 대한 생리, 생화학적인 반응 mechanism도 보고된 바 없다. 본 연구실에서는 人參葉燒病이 thermal energy에 의한 단순연소 (simple burning)가 아니며, 과산화수소의 축적에 따른 autooxidation과 엽록체에서 다량 생산될 수 있는 O_2 가 photosensitizer에 의해 1O_2 으로 전

환되어 엽록소를 파괴한다는 광산화작용에 대한 가설을 제시한 바 있다^{19,20)}. 또한 인삼엽에서 superoxide의 광화학적 생성물 및 saponin의 효과에 대해서도 보고하였다²⁹⁾.

본 연구에서는 人參葉燒病의 원인을 究明하기 위하여 O_2 대사과정에서 광에 의해 생성되는 oxygen radical 중 chlorophyll bleaching에 결정적으로 영향을 주는 oxygen species를 밝히고 protective system의 효율적인 작용여부를 조사하여, 이 결과를 토대로 specific oxygen scavenger를 이용하는 방제대책에 관한 기초자료를 얻고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 재배 조건

본 실험에 사용한 고려인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 한국인삼연초연구소에서 분양받은 苗參 (생체 중; 1.5g)을 광량 및 온도가 조절되는 growth chamber (30°C, 20 KLux)와 일반관행법²¹⁾에 준하여 재배하였다.

2. 엽록체 분리 정제 및 엽록소 함량 측정

인삼엽 10g fr wt.를 사용하여 Robinowitch와 Govindjee²²⁾의 방법에 따라 엽록체를 분리 정제하였으며, Robbellen의 방법²³⁾에 준하여 엽록소 및 carotenoid 함량을 측정하였다.

3. Singlet oxygen (1O_2) 및 superoxide radical (O_2^-)의 처리

1O_2 에 의한 색소 파괴율은 엽록체 현탁액에 rose bengal (25g/ml, pH 8.0)을 가하여 20 KLux 유도 광량하에서 시간별로 처리하여 엽록소 및 carotenoid 함량을 측정하여 조사하였다. Superoxide radical에 의한 색소파괴율은 riboflavin (0.17 mM, pH 7.0)을 photosensitizer로 사용하고 electron donor로서는 methionin을 이용하여²⁴⁾ 20 KLux 광량하에서 시간별 처리 후 색소의 함량을 측정 조사하였다.

4. 기공저항(stomatal resistance) 및 엽온 (leaf temperature) 측정

광량증가에 따른 인삼엽의 기공저항 및 엽온은 Phytotron (Dae-sung scientific precision)에서 적응시킨 후, Automatic stomatal porometer MK₃

(Delta-T devices LTD)를 이용하여 온도 30°C, 습도 63%의 환경조건에서 측정하였다. 광량은 photosynthetic illuminator의 형광등 및 metal lamp를 사용하여 조절하였다.

5. Singlet oxygen (1O_2)이 효소활성에 미치는 영향

효소활성도 측정을 위한 효소액은 인삼엽 2g 생체 중을 증류수로 세척하여 40 ml K-phosphate (0.1 M, pH 7.0) buffer에 넣고 30초간 homogenize 한 후 12,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 이용하였다. 분리된 효소액에 rose bengal (25g/ml)을 가하여 20 KLux에서 15분 간격으로 60분간 처리하여 각 효소의 활성도를 측정하였다. Superoxide dismutase (EC. 1.15.1.1) 활성도 측정은 양 등의 방법²⁵⁾에 준하였고, Peroxidase (EC. 1.11.1.7) 활성도는 Chance와 Meahly의 방법²⁶⁾을 이용하였으며 catalase (EC. 1.11.1.6)의 활성도는 양 등의 Decoupling 방법²⁷⁾을 사용하였다.

6. Chlorophyll bleaching에 대한 active oxygen scavengers 억제효과

본 연구에 사용된 active oxygen scavengers는 propyl-gallic acid, 2, 5-ditetrabutyl hydroquinone, sodium pyrosulfate, 그리고 ascorbic acid로써 엽록체 현탁액 및 leaf disc에 각각 0.2 mg/ml씩 처리하여 100 KLux 자연광하에서 30분 간격으로 엽록소 및 carotenoid 함량을 측정하여 chlorophyll bleaching 억제효과를 조사하였다.

결과 및 고찰

인삼엽소병에서 chlorophyll bleaching 현상 (Fig.2)에 직접적으로 관계하는 특정 active oxygen species를 밝히기 위하여 인삼엽으로부터 추출 정제한 엽록체 현탁액에 1O_2 와 O_2^- 를 생산할 수 있는 system과 과산화수소를 각각 처리하여 엽록소 및 carotenoid의 파괴양상을 조사하였던 바, 과산화수소 처리구에서는 3시간 처리시 엽록소와 carotenoid의 함량이 각각 5%와 10% 정도 감소하였으며, superoxide radical 처리구에서는 약 35%와 45%의 함량 감소를 나타내었다. 1O_2 처리구에서는 3시간 처리시 엽록소와 carotenoid 함량이 공

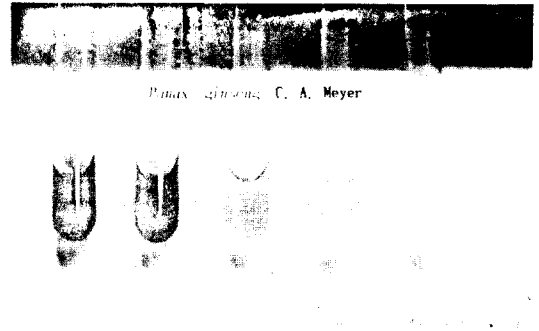


Fig. 2. Patterns of chlorophyll bleaching phenomenon on the treatment of light intensity (100 KLux) in chloroplast suspension of ginseng plant.

Table 1. Changes of chlorophyll and carotenoid contents of isolated chloroplast suspension by treatment with solar radiation (100 KLux) from *Panax ginseng* C.A. Meyer leaves.

Time (min)	Pigment contents (mg chl/l chl. suspension)				
	Chl.T	Chl.a	Chl.b	a/b	carotenoids
0	8.45	5.00±0.11	3.45±0.08	1.45	4.43±0.10
30	3.01	1.67±0.01	1.41±0.60	1.19	1.53±0.05
60	0.65	0.23±0.01	0.42±0.04	0.55	0.34±0.01
90	0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	—	0.00±0.00

± ; standard error

히 80% 이상 감소하여 solar radiation 처리 (100 KLux, Table 1)와 유사한 양상을 나타내었다 (Fig. 3).

일반적으로 생체내에서 엽록소를 직접 파괴시킬 수 있다고 알려져 있는 과산화수소⁴⁾는 광호흡과정에서 주로 생산되고, superoxide radical은 photosensitizer가 electron donor로부터 전자를 O_2 에 전달함으로써 생성되는데²⁸⁾, 정상조직에서는 superoxide dismutase와 catalase 및 peroxidase에 의해 $O_2^- \rightarrow H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$ 로 전환되어 이들에 의한 엽록소의 파괴를 억제하고 있다^{16,17)}. O_2 은 식물체내에서 엽록소, flavin과 같은 photosensitizer가 ground state의 triplet oxygen (3O_2)에 energy를 전달해 줌으로써 생성되며, 엽록소를 비롯한 거의 모든 생체구성물질을 파괴한다는 사실은 잘 알려져 있다^{13,14)}. 그러므로

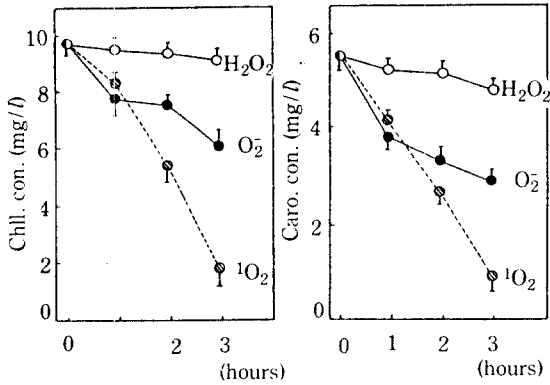


Fig. 3. Effects of hydrogen peroxide(H₂O₂), superoxide radical (O₂⁻) and singlet oxygen (¹O₂) treatment on the chlorophyll and carotenoid contents of isolated chloroplast suspension from *Panax ginseng* C.A. Meyer leaves.

인삼엽소병이 과도한 적색광 (600-700 nm)에 의해 유발된다는 양 등¹⁾의 보고와 Fig.3에서 ¹O₂ 처리가 강광에서의 bleaching 현상과 유사한 pattern인 것으로 미루어 보아, *in vivo*에서도 chlorophyll mediated photosensitization 과정을 통해 다량 생산되는 ¹O₂을 효과적으로 제거하지 못하여 bleaching 현상이 유발되는 것으로 사료된다.

인삼엽소병 과정 중 ¹O₂으로 전환되는 O₂의 source를 밝히기 위하여 과산화수소와 온도 40°C 및 light (20 KLux)를 복합처리한 결과(Fig.4) 과산화수소 단독처리 및 온도 40°C 복합처리구에서는 엽록소 및 carotenoid의 함량감소율이 15% 미만인 반면, 과산화수소와 light 복합처리구에서는 chlorophyll 및 carotenoid 함량이 75% 이상 급격히 감소하여 강광 및 ¹O₂ 처리와 유사한 양상을 보였다. 이러한 결과는 과산화수소가 light에 의해 물과 O₂로 분해되고 이 과정에서 생긴 O₂가 excited chlorophyll에 의해 ¹O₂로 전환되어 효과적으로 chlorophyll bleaching을 유발시킨 것으로 사료되며, 생체내에서도 광호흡과정에서 다량 생산되는 과산화수소가 물리적인 요인(light, pH 등)에 의해 분해되고 이때 생기는 O₂가 ¹O₂로 전환되는 O₂ source로 추측할 수 있다.

인삼엽을 광도별로 처리하여 기공저항 및 엽온을 측정된 결과(Fig.5) 20 KLux 이상의 광도하에서는 기공저항이 계속적으로 증가하였으며, 엽온은 20 KLux 일 때에 비해 60 KLux 까지는 1°C 정도 증가

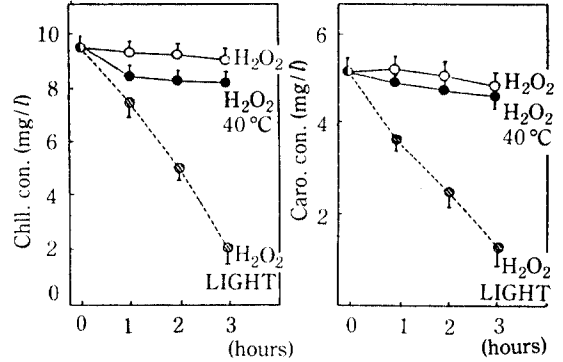


Fig. 4. Changes of chlorophyll and carotenoid contents of isolated chloroplast suspension by treatments with hydrogen peroxide (H₂O₂), H₂O₂ and high temperature (H₂O₂ + 40°C), and high light intensity (H₂O₂ + 20KLux) from *Panax ginseng* C.A. Meyer leaves.

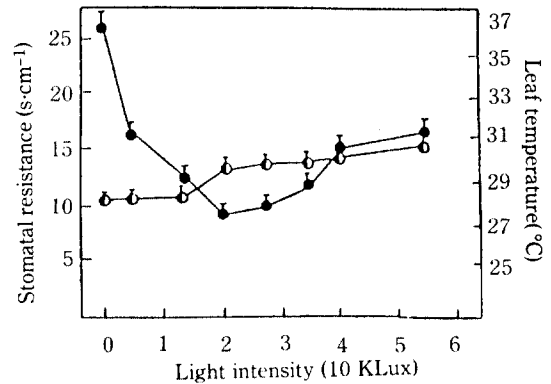


Fig. 5. Changes of stomatal resistance (●-●) and leaf temperature (○-○) in the different light intensities from *Panax ginseng* C.A. Meyer.

하는데 그쳤다. 이는 인삼엽이 강광에 노출되면 기공이 폐쇄되고 광량증가 및 기공폐쇄에 따른 엽온상승률이 높지 않음을 잘 제시해주고 있는 바, 인삼엽소병이 엽온상승으로 인한 단순연소가 아님을 재확인해주고 있다. 또한 강광에 의해 기공이 폐쇄되면 photolysis 과정에서 생기는 O₂가 직접 ¹O₂로 전환되어 bleaching을 유발시키거나, 아니면 세포내 O₂의 분압을 높여 광호흡을 촉진시킴으로써 Fig.4와 같이 과산화수소를 통해 2차적으로 O₂의 공급을 촉진할 것으로 사료된다.

양 등²⁾은 전보에서 인삼엽의 catalase와 peroxidase가 45°C까지 비교적 높은 thermal stability(70% 이상)를 갖고 있으며 강광에 의해

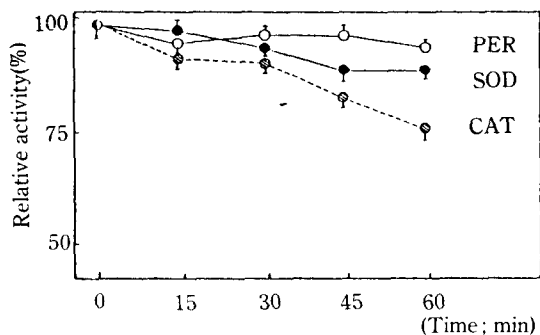


Fig. 6. Inhibitory effects of singlet oxygen (1O_2) on superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), peroxidase(PER) activities in *Panax ginseng* C.A. Meyer.

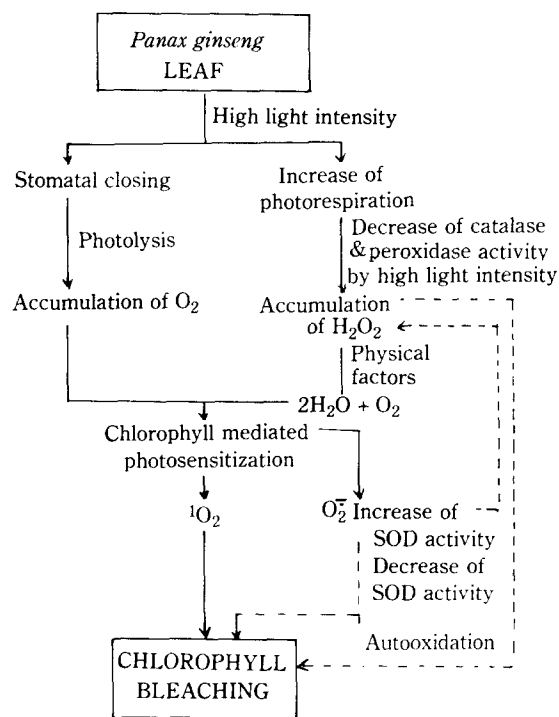


Fig. 7. Postulated mechanism of chlorophyll bleaching by singlet oxygen (1O_2) in leaf-burning disease from *Panax ginseng* C.A. Meyer.

효소활성도가 급격히 감소한다고 보고하였던 바, 1O_2 가 광산화 억제효소인 superoxide dismutase와 catalase 그리고 peroxidase의 활성도에 미치는 영향을 조사한 결과(Fig.6) superoxide dismutase는 1O_2 처리시 활성도 변화가 거의 없는 반면, peroxidase는 약 10% 정도 그리고 catalase는 20% 정도 활성도가 감소하였는데, 이는 1O_2 가 염록

Table 2. Inhibitory effects of ascorbic acid(ABS), propyl-gallic acid(PGA) sodium pyrosulfate(PS), and 2,5-ditetra-butylhydroquinon(DBH) on the chlorophyll bleaching by high light intensity (100 KLux) in isolated chloroplast suspension from *Panax ginseng* C.A. Meyer.

Scavenger	Chloroplast suspension		Leaf disc	
	mg chl/L	inhibition rate(%)	mg chl/L	inhibition rate(%)
Control	0.50 ± 0.90	0.00	3.57 ± 0.07	0.00
SPS	3.55 ± 0.10	76.25	6.19 ± 0.03	46.34
DBH	3.80 ± 0.05	82.50	—	—
PGA	3.80 ± 0.08	82.50	6.45 ± 0.11	51.76
ABS	3.50 ± 0.02	75.00	8.81 ± 0.08	96.38

± ; standard error

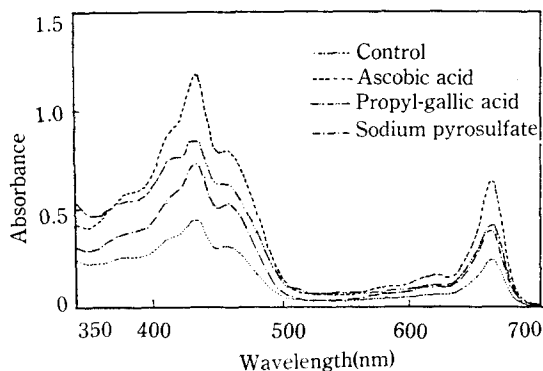


Fig. 8. Inhibitory effects of ascorbic acid(ABS), propyl-gallic acid(PGA), and sodium pyrosulfate(PS) on the chlorophyll bleaching in leaf-burning disease from *Panax ginseng* C.A. Meyer.

소 파괴 뿐만 아니라 photooxidation protective system의 효소에서 직접 작용하여 인삼엽소병에서 bleaching 현상을 촉진시킨다는 것을 보여주고 있다.

이상의 결과를 종합해 보면 인삼엽소병에서 chlorophyll bleaching을 유발시키는 active oxygen species는 photolysis 과정에서 또는 광호흡과정에서 파생된 O_2 가 excited chlorophyll로부터 전환된 1O_2 인 것으로 확인되었다(Fig.5).

인삼엽소병의 방제대책에 관한 기초자료를 얻고자 인삼 chloroplast 현탁액 및 leaf disc에 active oxygen scavenger를 처리하여 chlorophyll bleaching 억제효과를 조사한 결과(Table 2), 인삼의 엽

록체 현탁액에서는 propylgallic acid(PGA)와 2,5-ditetrabutyl hydroquinon(DBH) 처리구가 control 에 비하여 chlorophyll bleaching 율이 82% 이상 억제되었으며, sodium pyrosulfate (SPS)와 ascorbic acid(ABS)는 각각 76%와 75%의 억제율을 보였다. Leaf disc 에서는 SPS 와 PGA 가 각각 46%, 51%의 억제효과를 나타냈으며 특히 ABS 는 96%의 높은 chlorophyll bleaching 억제효과가 있는 것으로 확인되었다.

1O_2 quenching 을 위한 Model System 정립과 scavenger 의 screening test, 그리고 thylakoid membrane 의 LHCP(light harvesting chlorophyll a/b protein)와 1O_2 사이의 상호관계에 대한 연구는 현재 진행 중에 있다.

요 약

인삼엽소병에서 chlorophyll bleaching 현상에 직접적으로 관계하는 특정 active oxygen species 를 구명하기 위하여 인삼엽으로부터 추출정제한 엽록체 현탁액에 singlet oxygen(1O_2)과 superoxide radical(O_2^-) 및 hydrogen peroxide(H_2O_2)를 각각 처리하여 엽록소 및 carotenoid 의 파괴 양상을 조사하였던 바, 1O_2 처리구에서 공히 80% 이상 감소하여 태양직사광선(100 KLux) 처리와 유사한 양상을 보였다. 1O_2 로 전환되는 세포내 O_2 의 source 로서는 물의 광분해와 광호흡과정에서 생기는 과산화수소가 분해될 때 나오는 O_2 가 주요 O_2 source 로 사료된다.

이 결과를 토대로 active oxygen scavenger 를 인삼엽록체 현탁액 및 엽조직에 처리하여 색소파괴 억제양상을 조사하였던 바, 엽록체 현탁액에서는 propylgallic acid(PGA), 2,5-ditetrabutyl hydroquinon(DBH), sodium pyrosulfate(SPS), 그리고 ascorbic acid(ABS)가 공히 75% 이상의 bleaching 억제율을 나타냈고, 엽조직에서는 SPS 와 PGA 그리고 ABS 가 각각 46, 51, 96%의 억제효과를 확인하였다.

인용문헌

1. 양덕조, 채쾌: 산학협동재단 연구결과 보고서

(1983).

2. Boardman, N.K.: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **28**, 355 (1977).
3. Jen, J.J. and Mackinney, G.: *Photochem. Photobiol.*, **11**, 303 (1970b).
4. Jen, J.J. and G. Mackinney: *Photochem. Photobiol.*, **11**, 303 (1970b).
5. Ellsworth, R.K. and Pierre, L.A.: *Photosynthetica*, **10**, 312 (1976).
6. Holden, M.: *J. Sci. Food Agric.*, **25**, 1427 (1974).
7. Noack, K.: *Bochem. Z.*, **316**, 166 (1944).
8. Foote, C.S.: *Free radicals in biology*, Academic Press, New York, 1, 85 (1976).
9. Krinsky, N.I., *Trends Biochem. Sci.*, **2**, 35 (1977).
10. Foote, C.S., F.C. Shook and R.B. Abakeril, *Method in Enzymol.*, **105**, 36 (1984).
11. Foote, C.S.: *Biochemical and clinical aspects of oxygen*, Academic Press, New York, 85 (1976).
12. Elstner, E.F. and Kwiatowski, G.: *Z. Naturforsch Teil C.*, **35**, 303 (1980).
13. Harman, G.E. and Mattick, C.R.: *Nature*, **260**, 323 (1976).
14. Gorsch, W. and Laskawy, G.: *Biochem. Biophys.* **575**, 439 (1979).
15. Elstner, E.F. and Frommeyer, D.: *FEBS Lett.*, **86**, 143 (1980).
16. Fridovich, I.: *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 147 (1975).
17. Takahama, U.: *Plant Cell Physiol.*, **19**, 1563 (1978).
18. Daub, M.E.: *Phytopathology*, **78**, 421 (1983).
19. Yang, D.C., H.S. Yoo and Yoon, J.J.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **11**(2), 91 (1987).
20. Yang, D.C., H.S. Yoo and Yoon J.J.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **11**(2), 101 (1987).
21. 김득중: 인삼재배, 일한도서출판사, 서울, 47(1973).
22. Rabinowitch, E. and Goviudjee: *Photosynthesis*, John Wiley & Sons, New York, 235 (1969).
23. Robbellen, A.: *Experimente zur Stoffwechsel-Physiologie der Pflanzen*, Gerog Thieme Verlag Stuttgart, (1976).
24. Bekina, R.M., V.A. Shuvalov, G.G. Lysenko, V.N. Moshentseva and Lebedeva, A.F.: *Sov. Plant Physiol.*, **22**, 577 (1976).
25. Yang, D.C., M.S. Kim and Lee, S.J.: *Korean J. Gin-*

- seng Sci.*, **11**(1), 24 (1987).
26. Chance, B., and A.C. Meahly: *Method in Enzymol.*, **2**, 755-764 (1955).
27. Yang, D.C., Q. Chae, J.J. Yoon, S.J. Lee and Lee, A.R.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **9**(2), 154 (1985).
28. Yost, F.J. and Fridovich, I.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **175**, 514 (1976).
29. Yang, D.C., M.W. Kim and Lee, S.J.: *Korean J. Ginseng Sci.*, presented (1989).