

人蔘葉의 Photobleaching과 항산화효소 활성

양덕조 · 이성종 · 윤길영 · 강영희*

충북대학교 자연과학대학 생물학과

*연세대학교 이과대학 생물학과

(1991년 8월 20일 접수)

Activities of Antioxidative Enzymes in Photobleaching of Leaves from *Panax ginseng* C. A. Meyer

Deok-Cho Yang, Sung-Jong Lee, Kil-Young Yun and Young-Hee Kang*

Department of Biology, College of Natural Science,

Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

*Department of Biology, College of Science, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

(Received August 20, 1991)

Abstract □ This study investigated the relations between the photosynthetic rate and the activities of antioxidative enzymes, glutathione reductase, ascorbate free radical reductase, ascorbate peroxidase, glutathione peroxidase, and ascorbate oxidase, in the leaves of *Panax ginseng*. Under the normal cultivation condition, *Panax ginseng* showed lower glutathione reductase and ascorbate free radical reductase activities than *Glycine max*. But *P. ginseng* showed higher glutathione peroxidase, ascorbate peroxidase, and ascorbate oxidase activities than *G. max*. Therefore, *P. ginseng* showed weak activities of reductases for the reduction of the oxidized antioxidants. Under the light intensity of 25 KLux, the reductases showed a decrease of over 75% after 24 hours. But the perox/oxidases decreased about 40%. These results showed that the decrease of reductases activities was consistent with the decrease of photosynthetic rate. Therefore, we consider that the regulation of antioxidative enzymes or the application of exogenous antioxidants will be effective means for the protection of photodamage in *P. ginseng*.

Keywords □ *Panax ginseng*, Antioxidative enzymes, Antioxidants, Photodamage

서 론

人蔘은 재식지의 광투과율이 자연광의 10% 내외에서 최적광합성율을 나타내고, 20%까지 증가하지만 15~20% 범위에서는 광량에 따른 장해현상이 나타나며,¹⁻⁴⁾ 태양 직사광선에 노출되었을 때 나타나는 색소의 표백화현상은 엽록소에 의한 산소분자의 활성화가 주요 원인인 것으로 알려져 있다.^{5,6)} 그러나, 대부분의 식물체는 생리적 산화로부터 자신을 보호

하는 항산화물질과 항산화효소계를 가지고 있으며,⁷⁾ 人蔘에서도 엽질편이나 엽록체 현탁액에 활성화산소 quencher나 exogenous한 항산화물질을 처리하면 색소의 표백화현상이 현저하게 억제되는 효과를 나타낸다.⁸⁾ 고등식물체의 대표적인 내성항산화물질로는 α -tocopherol과 ascorbic acid 그리고 glutathione 등이 있는데,^{9,10)} 이 중에서 lipophilic한 α -tocopherol은 효과적인 radical chain-breaking 물질로 작용하며,¹¹⁾ 이 과정에서 산화된 α -tocopherol 분자는 ascorbate에 의해서 환원된다.¹²⁾ 수용성인 ascorbate와 glutathione은 식물체의 매우 중요한 항산화물질로써 두

본 연구는 1990년도 교육부 기초과학육성 연구비 지원에 의한 것임(BSRI-90-416) (3)

항산화물질은 여러 외부환경 스트레스에 의한 산화 작용으로부터 식물체를 보호하는 순환적인 항산화작용 메커니즘이 잘 알려져 있다.^{13,14)} 이러한 순환적 항산화작용은 5종류의 항산화효소에 의해 조절되는데, ascorbate나 glutathione이 직접 또는 specific/non-specific-peroxidase의 촉매에 의해 활성화된 산소분자를 scavenging 또는 quenching함으로써 방어작용이 시작된다.¹⁵⁾ 이 때 산화된 ascorbate는 ascorbate free radical reductase(EC 1.6.5.4)나 GSH에 의해서 환원되고,^{16,17)} 산화된 glutathione(GSSG)은 NADPH의 존성 glutathione reductase(EC 1.6.4.2)에 의해 환원되며, 산화된 NADP⁻는 광합성 전자전달계의 환원력에 의해 환원된다.¹⁸⁾ 이와같은 활성화 산소의 detoxification 기작은 항산화물질의 redox potential을 조절하는 효소계의 활성과 매우 밀접한 관계를 가지고 있다.¹⁹⁾

그러나 강광에서 人蔘의 광합성율이 감소된다는 사실은 많이 보고되어 있지만,^{5,6,20)} 광합성율 감소에 대한 원인분석과 광합성과정에서 중요한 역할을 담당하고 있는 내성항산화 system에 관한 연구는 시도된 바 없었다. 따라서, 본 연구는 人蔘엽소병 원인 구명을 위한 기초연구의 일환으로, 강광에서 광합성율 감소와 내성 항산화효소의 활성과의 상호관계를 알아보고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료

본 연구에 사용된 人蔘(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 부여 인삼경작조합으로부터 구입한 1년생 묘삼을 본 연구실의 포장에서 일반 관행법²¹⁾에 따라 재배하여 사용하였으며, 콩(*Glycine max* Merr.)은 본 연구실의 야외포장에서 자연광하에서 재배하여 사용하였다.

2. 광합성율의 측정

人蔘과 콩의 광합성율 측정은 광량이 조절되는 photoilluminator를 이용하여 광량을 각각 10 KLux와 25 KLux로 조절한 다음 chamber 내부의 온도를 28±1°C로 유지시켰다. 人蔘과 콩 모두 葉柄 1개만을 투명 acryl chamber(20×17×12 cm)에 넣어 각각의 광량에서 24시간 동안의 CO₂ 고정율을 Carbon Dioxide Analyser(ADC Ltd. 225 MK 3)를 이용하여 측정하

였다.

3. 항산화 효소의 활성도 측정

식물 엽조직 0.5g fr.wt.를 1 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 0.1% BSA, 0.05% cystein이 포함된 5 ml/50 mM Tricine-NaOH(pH 7.8) 완충용액으로 마쇄하여, 10,000g로 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 효소용액으로 하였다.

Glutathione Reductase(EC 1.6.4.2)의 활성도 측정 : Halliwell과 Foyer 등¹³⁾의 방법을 다소 수정하여 수행하였다. 3 ml의 반응액에는 0.1M tricine buffer(pH 7.8), 0.16 mM NADPH, 15 mM EDTA, 2.18 mM oxidized glutathione(GSSG), 그리고 0.1 ml의 효소 추출액이 첨가된다. 활성도는 thermoelectric cell holder(25°C)가 부착된 UV/Vis-spectrophotometer(Hitachi U-3400)를 이용하여 340 nm에서 NADPH의 산화율로 측정하였다.

Ascorbate Free Radical Reductase(EC 1.6.5.4)의 활성도 측정 : Arrigoni 등¹⁶⁾의 방법에 따라 0.1M tricine buffer(pH 7.8), 0.1 mM NADH, 1 mM ascorbate, 0.5U ascorbate oxidase, 그리고 50 μl의 효소용액이 포함된 ascorbate free radical generating system에서 NADH의 산화율을 340 nm에서 측정하였다.

Ascorbate Peroxidase(EC 1.11.1.7)의 활성도 측정 : Dalton 등²²⁾의 방법에 준하여 수행하였다. 0.1M tricine(pH 7.8), 0.1 mM ascorbate, 0.1 ml의 효소액이 첨가된 반응액에 0.5 mM hydrogen peroxide의 첨가에 의해 반응이 시작되고, 265 nm에서 ascorbate의 감소율을 측정하였다.

Glutathione Peroxidase(EC 1.11.1.9)의 활성도 측정 : glutathione reductase와의 coupling을 이용한 Paglia 등²³⁾의 방법을 다소 수정하여 실시하였다. 3 ml의 반응액에는 0.1M tricine buffer(pH 7.8), 0.15 mM NADPH, 1.5U glutathione reductase, 0.25 mM reduced glutathione(GSH), 그리고 50 μl의 효소액이 포함되며, 0.5 mM hydrogen peroxide의 첨가에 의해 반응이 시작된다.

Ascorbate Oxidase(EC 1.10.3.3)의 활성도 측정 : 1 ml tricine buffer 추출액을 1 ml 0.1M phosphate buffer(pH 5.6)를 첨가한 후, 10,000g로 10분간 원심분리한 상등액을 Bergmeyer 등²⁴⁾의 방법에 따라 265 nm에서 ascorbate의 산화로 측정하였다. 반응액은 10 mM phosphate buffer(pH 5.6)와 1 mM ascorbate,

그리고 0.2 ml의 효소액을 혼합하여 5분간 반응시킨 후 1.5 ml 0.4N HCl을 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 흡광도를 측정한다(OD-Test). 또한 반응액과 1.5 ml 0.4N HCl을 함께 혼합하여 5분간 반응시킨 후, 효소추출액을 첨가하여 흡광도를 측정한다(OD-Blank). 측정된 두 OD값을 이용하여 ascorbate oxidase의 활성도를 계산하였다.

결과 및 고찰

1. 人蔘과 콩의 광합성율

人蔘의 광합성율은 10 KLux에서는 큰 유의차가 없었으나, 25 KLux에서는 6시간까지 급격히 감소하였으며, 12시간 이후에는 CO₂ 고정율이 완전히 억제되었고, 24시간까지 호흡율이 계속 증가하였다(Fig. 1). 반면, 콩의 경우 25 KLux의 광량에서도 광합성율의 억제현상은 나타나지 않았다(Fig. 1).

人蔘 광합성기구의 미세구조적 특징을 살펴보면, 그러나 thylakoid가 잘 발달하여 상대적으로 스트로마를 거의 찾아볼 수 없으며,²⁵⁾ 또한 人蔘은 양지식물에 비해 광수확 염록/단백질 복합체(LHCP)의 함량이 높다고 보고되어 있다.²⁶⁾ 그러므로, 人蔘은 같은 광량에서도 콩에 비해 상대적으로 많은 광자를 흡수하게 되어 전자전달계가 쉽게 포화되고, 여분의 광에너지는 주위의 O₂ 분자에 에너지를 전이하여 active oxygen radical을 다량 생성하게 될 것이다. 따라서, 활성화 에너지 산소의 생성은 광합성 억제현상과 밀접한 관계가 있을 것으로 생각되며, 광합성 전자전달계의 억제로 NADPH의 공급이 중단되면, NADPH의존형 抗酸化酵素의 활성에 대한 저해요인으로 작용할 것으로 생각된다.

2. 항산화 효소의 활성

人蔘과 콩의 항산화 효소활성: 재식지의 광량에서

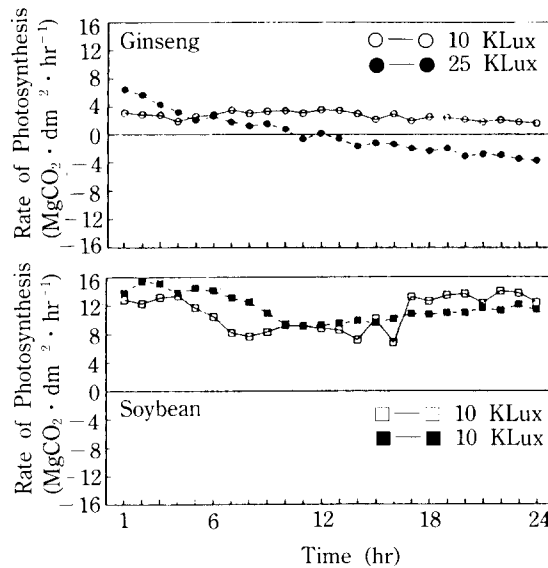


Fig. 1. Effects of light intensity on the photosynthetic rate in *Panax ginseng* C.A. Meyer and *Glycine max* Merr.

재배된 人蔘과 콩의 抗酸化酵素 활성을 비교한 결과 glutathione reductase의 경우 약 2배, ascorbate free radical reductase는 약 1.2배 정도 콩이 높게 나타났으나, glutathione peroxidase와 ascorbate peroxidase 그리고 ascorbate oxidase는 人蔘이 콩보다 각각 1.5배, 7배 정도 높았다(Table 1).

人蔘에서 산화형 항산화물질을 환원시켜주는 reductase의 활성은 콩에 비해 낮은 반면 항산화물질과 oxygen radical과의 반응을 촉매하는 specific-, non-specific- peroxidase의 활성은 오히려 人蔘에서 높았으며, 특히 ascorbate를 산화시키는 ascorbate oxidase의 활성이 人蔘에서 매우 높게 나타났다. 이러한 결과는 강광에 오래 노출되지 않을 경우에는 일시적으로 활성화 산소를 제거하는데는 효과적일 수도 있

Table 1. Activities of major antioxidative enzymes in leaves from *Panax ginseng* C.A. Meyer and *Glycine max* Merr. under normal cultivation conditions

	GR*	AFR*	GPO*	APO*	AAO***
Ginseng	1.405 ± 0.076	13.311 ± 1.047	94.168 ± 4.351	46.580 ± 3.589	0.325 ± 0.009
Soybean	2.740 ± 0.564	16.578 ± 0.051	57.040 ± 2.864	32.751 ± 2.122	0.044 ± 0.002

*: Oxidized NADPH μM · dm² · min⁻¹, **: Oxidized NADH μM · dm⁻² · min⁻¹
 ***: Oxidized Ascorbate μM · dm² · min⁻¹
 GR: glutathione reductase; AFR: ascorbate free radical reductase
 GPO: glutathione peroxidase; APO: ascorbate peroxidase; AAO: ascorbate oxidase

Table 2. Effects of light intensity on the activities of major antioxidative enzymes after 24 hours in leaves from *Panax ginseng* C.A. Meyer

	GR*	AFR*	GPO*	APO*	AAO***
10 KLux	1.891 ± 0.335	22.935 ± 2.518	77.536 ± 0.386	29.127 ± 3.266	0.421 ± 0.116
25 KLux	—	4.149 ± 1.161	83.973 ± 9.607	17.208 ± 5.474	0.193 ± 0.057

*: Oxidized NADPH $\mu\text{M} \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{min}^{-2}$ **: Oxidized NADH $\mu\text{M} \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$
 ***: Oxidized Ascorbate $\mu\text{M} \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$

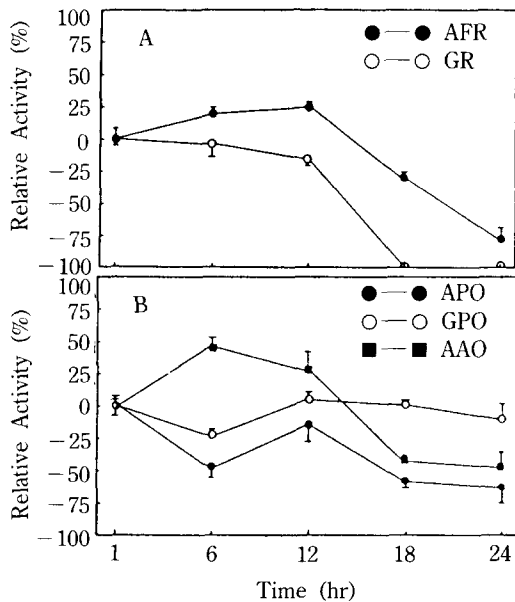


Fig. 2. Effects of 25 KLux of light intensity on the activities of major antioxidative enzymes in leaves from *Panax ginseng* C.A. Meyer.

다. 그러나 강광에 장시간 노출되게 되면, 활성화 산소와 반응은 빠르게 진행되는 반면 이 때 생성되는 산화형 항산화물질을 환원시키는 속도가 늦기 때문에 시간이 경과할수록 인삼의 항산화작용은 약화될 것이다.

광량 증가와 광처리 시간에 따른 항산화효소 활성 변화: 인삼 엽조직에 25 KLux의 광을 24시간 동안 처리한 후, 항산화 효소의 활성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 또한 25 KLux에서 GR과 AFR은 6시간까지는 큰 유의차가 없었으나, 12시간 이후부터는 급격히 감소하였으며 24시간 후에는 GR은 100% AFR은 75% 이상의 활성감소를 나타내었다(Fig. 2a). 반면에, GPO는 24 시간후에는 큰 변화가 없었으며, APO는 60% 정도 감소하였고 AAO는 6시간에서는

40%까지 증가하였으나, 24시간후에는 50% 정도의 활성감소를 나타내었다(Fig. 2b). 이와같이 강광에서 reductases 활성의 급격한 감소는 순환성 항산화계의 불균형을 초래하여 지속적인 항산화 작용이 불가능함을 의미한다. 25 KLux에서 인삼 reductases의 활성 감소양상이 광합성율의 감소 및 억제양상과 유사하게 진행되었는데, 이러한 결과는 인삼이 강광에 노출되면 6시간까지는 생성되는 oxygen radical을 항산화 system에 의해 scavenging 또는 quenching이 가능하지만, 12시간 이후부터는 조직내 oxygen radical이 축적되어 광합성기구의 membrane, protein, 그리고 pigment system 등이 damage를 받을 것으로 생각된다. 이 때 전자전달계의 구성단백질에 대한 장애는 항산화 효소의 환원으 촉매하는 NADPH의 생성을 억제하여 항산화 기능을 담당하는 reductases의 활성을 급격히 저하시킬 것으로 생각된다. 또한 Yang 등²⁷⁾에 의하면 人蔘은 강광에서 proteolytic activity가 급격히 증가한다고 보고하였는데, 본 실험에서도 25 KLux의 광량에서 24시간동안 노출된 후 단백질 함량이 현저히 감소됨을 관찰하였다. 이와같이 강광에서 높은 효소 단백질의 함량 감소가 항산화력의 감소를 가속화시키는 또 다른 요인일 것으로 생각된다. 따라서 人蔘 photodamage의 효과적인 보호방법으로 항산화 효소의 조절이나, 항산화물질의 처리를 고려해 볼 수 있겠다.

要 約

본 연구에서는 人蔘 엽소현상의 원인규명과 방제의 일환으로 내성 항산화 효소계의 활성과 광합성율과의 관계를 알아보았다. 산화된 항산화물질을 환원시키는 glutathione reductase와 ascorbate free radical reductase의 활성은 콩이 人蔘에 비해 높았으며, glutathione peroxidase, ascorbate peroxidase, 그리고 as-

corbate oxidase의 활성은 人蔘이 높았다. 人蔘의 광합성비율은 25 KLux에서 6시간 이후부터 억제되기 시작하여 12시간후에는 인삼엽으로부터 CO₂가 방출되기 시작하였고, 색소의 bleaching은 12시간 이후부터 관찰되기 시작하여 24시간 후에는 엽면적의 90% 이상이 bleaching 되었다. 25 KLux의 광량에서 reductases의 활성은 75% 이상의 현저한 감소를 나타낸 반면, peroxi/oxidases의 활성은 40% 정도의 감소를 나타내었다. 본 실험 결과에서 人蔘의 항산화효소 활성감소는 광합성율의 감소 및 억제현상과 일치함을 나타냈는데, 그러므로 人蔘의 엽소현상은 항산화 system과 밀접한 관계가 있음을 제시해 주고 있다. 따라서, 人蔘 엽소현상의 효과적인 방제방법으로 抗酸化 system의 조절이나, exogeneous한 抗酸化物質의 처리를 고려해 볼 수 있겠다.

인용문헌

- Salisbury F.B. and Ross, C.W.: Plant physiology 3rd, Wadsworth Publishing Co., California, pp. 216-228 (1985).
- Buchanan, B.B.: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **31**, 341-374 (1980).
- Lee, C.H.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **12**(1), 11-29 (1988).
- Lee, C.H.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **12**(1), 40-46 (1988).
- Yang, D.C., Yoo, H.S. and Yoon, J.J.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **11**(2), 91-100 (1987).
- Yang, D.C., Yoo, H.S. and Yoon, J.J.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **11**(2), 101-110 (1987).
- Foyer, C.H., Halliwell, B.: *Planta*, **133**, 21-25 (1976).
- Yang, D.C., Kim, M.W., Chae, Q., Kim, M.S.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **13**(1), 98-104 (1989).
- Finckh, B.F., Kunert, K.J.: *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 574-577 (1985).
- Tappel, A.L.: Free radicals in biology, Vol. IV, Pryor W.A. ed. Academic Press, New York, pp. 1-44 (1980).
- Burton, G.W., Joyce, A., Ingold, K.U.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **221**, 281-290 (1983).
- Grill, D., Esterbauer, H., Kloss, U.: *Environ. Pollut.*, **19**, 187-194 (1979).
- Halliwell, B., Foyer, C.H.: *Planta*, **139**, 9-17 (1978).
- Willson, R.L.: Radioprotectors and Anticarcinogens, Nygaard O.F. and Simic MG, ed. Academic Press, New York, pp. 1-22 (1983).
- Jablonski, P.P., Anderson, J.W.: *Plant Physiol.*, **67**, 1239-1244 (1981).
- Arrigoni, O., Dipierro, S. and Borraccino, G.: *FEBS Letters*, **125**(2), 242-244 (1981).
- Munday, R. and Winterbourn, C.C.: *Biochemical Pharmacology*, **38**(24), 4349-4352 (1989).
- Dalton, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 3811-3815 (1986).
- Burke, J.J. and Hatfield, J.L.: *Plant Physiol.*, **85**, 100-103 (1987).
- Cheon, S.K., et al.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **15**(1), 21-30 (1991).
- Kim, D.J.: Korean Ginseng Culture, Ilhan, Seoul p. 47 (1973).
- Dalton, D., et al.: *Plant Physiol.*, **83**, 789-794 (1987).
- Paglia, D.E. and Valentine, W.N.: *J. Lab. Clin. Med.*, **70**, 158-169 (1967).
- Bergmeyer, H.U., et al.: Methods of Enzymatic Analysis Vol. II, 3rd, Verlag Chemie. Weinheim, pp. 157-158 (1983).
- Yang, D.C., Kim, M.W., Lee, S.J. and Yun, K.Y.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **14**(3), 416-421 (1990).
- Yang, D.C., Lee, S.T., Lee, S.J., Kim, Y.H. and Kang, Y.H.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **13**(2), 158-164 (1989).
- Yang, D.C., Kim, M.W., Choi, J.D., Lee, S.J.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **13**(1), 92-97 (1989).