

중금속이 붙여귀(*Persicaria vulgaris* Webb. et Moq.)의 항산화효소활성에 미치는 영향

성미향¹ · 정형진¹ · 김건우¹ · 곽상수²

Effect of Metals on Anti-Oxidase Activity in *Persicaria vulgaris* Webb. et Moq.

Sung, Mi-Hyang¹, Hyung-Jin Jeong¹, Kun-Woo Kim¹ and Sang-Soo Kwak²

ABSTRACT

To study the effects of metal ions on the activities of antioxidative enzymes, the activities of superoxide dismutase(SOD), peroxidase(POD), catalase(CAT) of *Persicaria vulgaris* has been studied after treating with Cd, Cu, Zn and Al.

1. The activities of SOD in leaf and stem were decreased, but that in root was increased. Among the metal ions studied in this report, Al gave the highest increase in SOD activity in root.
2. The activities of POD after treating with Cd or Cu did not show any significant differences. POD activities after treating with Zn and Al has been decreased, however, that in root showed increased activities after treating with Zn 5,000 ppm or Al 500 ppm.
3. The activity of CAT in leaf was decreased with every metals studied. The CAT activity in root was increased with increased concentration. The root treated with Al showed highest activity.
4. The presence of isozymes after treated metal ions has been studied in gel electrophoresis. The POD treated plant did not show any new isozymes, but the intensity of one of pre-existent band was increased. The SOD treated plant showed the several new isozymes.

Key word : *Persicaria vulgaris*, Anti-oxidase, Metal ions

緒 言

오늘날 산업의 급격한 발달, 인구증가 및 교통문제 등으로 인해 지구환경의 파괴가 심각한 문제로 대두되어지고 있다. 환경오염은 크게 대기, 수질, 그리고 토양오염으로 볼 수 있으며 이러한 환경오염이 식물체에 미치는 영향

향은 이미 많이 보고되어 있다. 산화적스트레스(Oxidative Stress)는 요즈음 많은 주목을 받고 있는 것 중의 하나이며 특히, 환경오염과 불리한 생육조건하에서 일어나는 것으로^{14,25)} 정상적인 산소분자(O₂)외에 Superoxide, Singlet oxygen, Hydrogen peroxide, Hydroxy radical 등 반응성이 강하고 독성이 있는 산소종들에 의해 광합성에 관여하는 산소들의 불활성화^{7,8,9)}, 식

¹ 안동대학교 자연과학대학(Andong National University, Andong 760-749, Korea)

² 한국과학기술연구원 생명공학연구소(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology Taejon 305-600, Korea)
<1996. 11. 4 접수>

물색소의 파괴^{3,26)}, 지질산화에 의한 생체막 파괴^{23,27)} 등 식물체의 기능을 저하시키거나 고사에 이르게 한다^{4,10)}. 식물체는 이러한 산화스트레스의 독성으로부터 자신을 보호하기 위하여 Superoxide dismutase(SOD), Peroxidase(POD), Catalase(CAT) 등의 항산화효소와 ascorbic acid, α -tocopherol, glutathion 등의 항산화물질을 생산하며^{4,18,21,22)}, 활성화된 산소, 과산화수소 및 생성된 효소활성에 의하여 과산화지질생성을 효과적으로 억제할 수 있다¹⁶⁾. 각종 식물로부터 항산화활성물질들은 분리 보고 되어 있다²⁴⁾.

SOD(EC 1.15.1.1)는 자연의 항산화효소 중의 하나이며 식물을 포함한 모든 생물에 존재한다. 화장품, 의약품, 식품의 첨가제로 사용되고 있으며 항염작용이 있어 류마티스 관절염 등 각종 질병치료제로도 개발되고 있는 중요한 효소이다²⁸⁾. SOD는 세포에 해로운 산소종을 과산화수소로 전환시키는 반응($2O_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)을 촉매하는 효소⁹⁾로서 생성된 H_2O_2 는 CAT(EC 1.11.1.6)나 POD(EC 1.11.1.7)에 의해 무해한 불분자와 산소분자로 전환된다.

POD는 고등식물에서 세포의 성장과 분화에 관여하는 효소로서 리그닌합성에 관여하며 과산화수소를 제거하는 기능을 가지고 있어서 임상시험의 진단시약, 유기화합물의 산화반응 등에 사용되는 매우 중요한 효소이다¹²⁾.

식물체에서 SOD의 활성은 병균의 침입, 저온 등 여러가지 환경적·화학적 자극에 의해 증가되는 것으로 알려져 있으며 일반적으로 POD도 바이러스, 미생물, 곰팡이 등의 생물학적 스트레스와 급격한 환경변화, 공기오염물질 및 상처 등의 비생물학적 스트레스에 반응하여 그 활성이 증가된다고 하였다^{5,11,19)}. 그러나 환경오염과 연관되어 상당한 관심을 모으고 있는 중금속 오염의 자극에 대한 항산화효소적 활성에 대한 보고는 아주 미미한 실정이다.

중금속은 식물체에 흡수되면 생육에 장애를 초래하며 많은 생리적 장애를 일으켜 광합성 기능을 억제하고 질소고정능력과 호흡에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

따라서, 본 연구는 중금속 처리시 중금속

stress가 여뀌의 항산화효소적 활성과 이들의 Isozyme pattern에 미치는 영향을 조사하였다.

材料 및 方法

1. 재 료

봄여뀌(*Persicaria vulgaris* Webb. et Moq) 종자를 파종하여 16시간 광조건하, 24-28℃에서 30일간 생육시킨 유묘들을 250mL의 상토가 들어있는 pot에 이식하여 7일 후 중금속($CdCl_2 \cdot H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O_2$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, Al_2Cl_3)을 농도별(50, 500, 5000ppm)로 50mL씩 토양에 처리하였다. 중금속 처리는 농도마다 6반복의 완전임의 배치로 수행하였으며 처리 15일 후에 효소활성을 측정하였다.

2. 방 법

가. 효소의 추출

중금속이 처리된 상토에서 15일간 생육시킨 봄여뀌를 부위별로 나누어 0.5g씩 0.05M 인산완충액(pH 7.8) 1.5mL와 함께 얼음위의 유발에서 마쇄한 후, 4℃ 14,000rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 효소액으로 사용하였다.

나. 효소의 활성 측정

SOD 활성

SOD 활성은 Xanthine oxidase(XOD)와 cytochrome c를 이용한 McCord와 Fridovich(1969)의 방법에 의해 측정하였고 효소측정을 위한 반응액(10mM xanthine 2.5mL, 10mM cytochrome c 0.5mL, 0.1mM EDTA를 포함한 0.05M 인산완충액(pH 7.8) 47mL의 혼합액을 사용)을 조제하여 사용하였다. 반응액중 효소반응은 상기 반응액 1mL와 효소액(10 μ L전후)을 cuvette에 넣은후, 10⁻⁴M EDTA를 포함한 0.05M 인산완충액(pH 7.8)으로 25배 희석한 XOD 5.5 μ L를 첨가하여 시작하였다. 효소활성의 1단위(unit)는 25℃에서 반응을 시작하여 2분동안 550nm에서 흡광도 변화를 조사하여 XOD활성이 50% 억제된 것으로 정의하였다.

POD 활성

POD 활성은 pyrogallol을 기질로 사용하여 측

정하였다. 효소액 100 μ l를 3mL cuvette에 넣고 assay buffer 2.9mL를 첨가하여 420nm에서 20초간 상온에서 흡광도 변화를 측정하였다. UV 측정시 반응액의 흡광도가 1.0을 넘지 않도록 희석하여 효소활성을 측정하였으며 assay buffer는 0.1M KPB(pH6.0) 3.2mL, 0.147M H₂O₂ 1.6mL, 5% pyrogallol 3.2mL과 증류수 21mL을 혼합하여 사용하였다.

CAT 활성

CAT 활성은 hydrogen peroxide를 기질로 사용해서 측정하였으며 3mL cuvette에 substrate(30% hydrogen peroxide 150 μ l와 0.05M Kpi buffer pH7.0 25mL를 혼합해서 사용)을 1mL 넣고 0.05 M Kpi buffer(pH 7.0) 1998 μ l와 효소액 2 μ l를 혼합해서 240nm에서 70초간 상온에서 흡광도 변화를 측정하였다.

다. 전기영동

SOD Native PAGE

SOD native gel 전기영동은 Beauchamp와 Fridovich(1971)의 방법을 약간 변형 실시한 You et al(1996)의 방법을 이용하였다. 동일량의 단백질 농도가 되도록 조정된 효소액을 13% polyacrylamide gel을 사용하여 215V에서 40분간 전개시켰다. SOD 활성 band의 검출은 gel을 염색액(50mM KH₂PO₄, 0.1mM EDTA, 0.2% TEMED, 0.026mM riboflavin, 0.25mM nitro blue tetrazolium의 혼합액)에 30분간 넣고 암상태의

25 $^{\circ}$ C 항온수조에서 진탕한 후 gel에 뚜렷한 효소활성 band가 나타날 때까지 광원에 반응시키는 방법을 이용하였다¹³⁾.

POD Native PAGE

POD native gel 전기영동은 동일량의 단백질 농도가 되도록 효소액을 조정하였고 12.5% acrylamide gel에 15mA로 40분간 25mA로 1시간 30분간 전개시켰다. POD 단백질의 발색반응은 benzidine 용액(benzidine 1g, 빙초산 9mL, 증류수 36mL)과 3% 과산화수소 용액을 1:1로 섞은 후 gel상에서 반응시켜 수행하였다. 전기영동은 4 $^{\circ}$ C에서 수행하였으며 단백질 정량은 Bradford(1976)방법으로 하였다.

結果 및 考察

1. SOD, POD, CAT활성

중금속처리 후 15일 동안 생육시킨 봄여뀌를 대상으로 SOD, POD, CAT활성을 조사한 결과(Table 1) SOD활성은 부위별로 볼 때, 뿌리>줄기>잎의 순으로 높았으며 중금속별 활성의 정도는 Al>Zn>Cu>Cd의 순이었다. 그러나 중금속 농도와 부위에 따른 상관관계는 일정한 경향을 나타내지 않았다. 잎에서 SOD활성은 공시된 중금속 및 농도 처리시 무처리에 비하여 감소되었다. 중금속 처리된 봄여뀌의 부위별 POD활성은 줄기부위(37.5-735.9)에 비

Table 1. Effect of Metals on peroxidase and catalase activity in *Persicaria vulgaris*.

Metals	Conc. (ppm)	SOD activity			POD activity			CAT activity		
		Leaf	Stem	Root	Leaf	Stem	Root	Leaf	Stem	Root
		activity(U/mg protein)			activity(U/mg protein)			activity(U/mg protein)		
	Control	491363.6	37875	35250	163.6	328.1	675	188	129	26
Cd	50	11434.8	7871	41000	146.7	154.8	1200	90	67	668
	500	2649.4	15000	25908	226	416.7	346.9	13	229	258
	5000	25588.2	16833.3	34333.3	147.8	412.5	800	30	86	344
Cu	50	44642.9	85500	27200	208.9	337.5	825	74	516	206
	500	45368.4	39666.7	54250	73	237.5	675	68	57	258
	5000	15000	25000	44666.7	123.4	735.9	1050	67	129	1376
Zn	50	36750	25714.3	24500	243.8	48.2	900	64	221	172
	500	15888.9	20600	43000	116.7	37.5	660	114	309	612
	5000	15028.6	25777.8	136000	77.9	266.7	4800	30	573	2064
Al	50	29761.9	29222.2	60250	110.7	50	356.3	62	57	258
	500	25272.7	55333.3	202000	61.4	260	3300	94	34	516
	5000	123466.7	96000	175500	135	358.3	900	23	115	7740.8

해 뿌리부위(346.9-4800)가 7-9배 정도 더 높았으며 단백질함량이 높은 잎부위에서는 뿌리부위에 비해 1/6-1/20 더 낮은 활성을 보였다(61.4-243.8unit/mg protein). 이와 같은 결과는 관련 보고들의 견해와 동일하였다.^{2,20)} 부위별 CAT 활성은 뿌리>줄기>잎의 순으로 POD활성과 동일한 경향을 보였는데 이는 CAT활성이 뿌리에서 높은 활성을 보인 POD와 상반된 결과를 보였다는 견해²⁰⁾와는 다른 결과를 보였다. CAT 활성은 중금속 처리시 POD보다 잎에서 민감하게 반응하여 낮게 나타났다. 특히, CAT활성은 중금속의 종류 및 농도에 관계없이 무처리에 비하여 현저히 증가하였으며 Cu, Zn, Al처

리시 농도가 증가함에 따라 활성이 급격히 증가하였다.

대조구(0ppm)의 활성을 100%로 보았을 때 SOD활성은 뿌리>줄기>잎의 순으로 높게 나타났으며 모든 금속에서 잎의 활성은 감소되었다(Fig. 1). 특히, Cd 500ppm이 처리된 잎에서는 95%활성이 감소되었다. 줄기에서는 Cd와 Zn처리에서 억제된 반면 Cu 50ppm(125.7%)과 Al 500, 5000ppm(44.6%, 153.5%)처리에서 활성의 증가를 나타내었으나 그 정도가 높지 않았다. 뿌리에서는 모든 중금속 처리에서 활성의 증가를 나타내었으며 Cd와 Cu처리시의 증가 정도가 작았으나, Zn의 500ppm에서 285.8%, Al의 5000ppm에서 397.9%의 증가를 보였다. 또한 Al의 500ppm은 473.1%의 가장 높은 활성의 증가를 나타내었다.

Control에 대한 처리별 POD활성을 조사한 결과(Fig. 2), 중금속 농도 및 부위별의 경향은 일정하게 나타나지 않았다. 처리한 중금속의 농도별로 볼 때, Cd처리의 POD활성은 잎과 줄기의 50ppm처리에서 억제되었고(각각 57.2%, 10.3%), 500ppm처리시 38.1%, 27%, 줄기의 5000ppm처리에서 25.7%가 증가하였다. 반면에 뿌리에서는 50ppm처리에서 77.8%증가 하였으나 500, 5000ppm에서는 억제되어 상반된 결과를 나타내었다(각각 48.6%, 9.7%). Cu의 경우 POD활성은 500, 5000ppm처리시 잎에서 활성이 각각 55.4%, 24.6%로 억제되었으나, 줄기와 뿌리의 5000ppm에서는 124.3%, 55.6%로 증가되었다. Zn처리에 의한 POD활성은 잎과 뿌리의 50ppm에서 증가하였고 줄기에서는 88.6%가 억제되었으며 뿌리에서는 농도가 증가될수록 활성이 높아졌다. 특히, 5000ppm처리시 뿌리의 POD활성은 611.1%로 가장 높은 증가를 보였다. Antje Blinda *et al.*(1996)은 식물을 높은 level의 중금속을 함유한 곳에서 생육시켰을 때 POD활성이 감소했으며 Cd은 약한 결과를 나타내었고, Zn은 POD활성 증가의 원인이 되었다고 보고한 것과 일치하는 경향을 나타내었다. Al의 경우 POD활성은 잎, 줄기, 뿌리 모든 부위에서 전반적으로 억제되었으나 뿌리의 500ppm

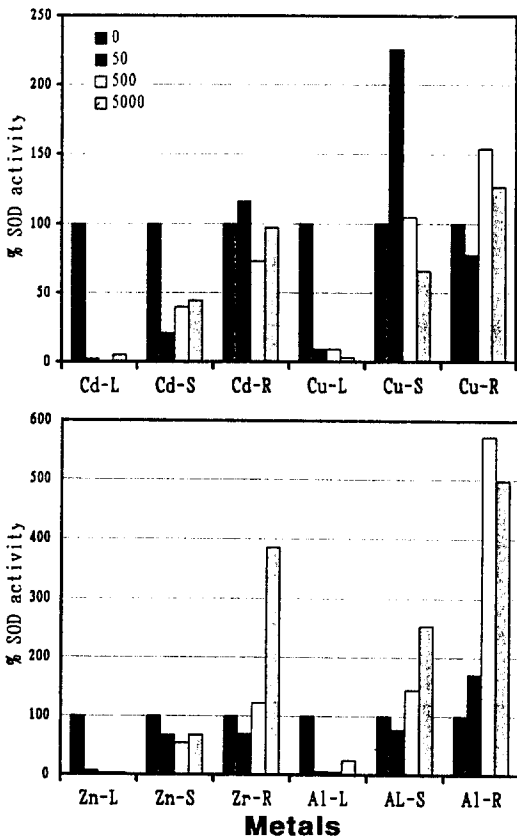


Fig. 1. Superoxide dismutase activity expressed as % of controls(0ppm).
L : Leaves; S : Stem; R : Root. Absolute values for control activity(100%) expressed in unit/mg protein were 491363.6, 37385, 35250.

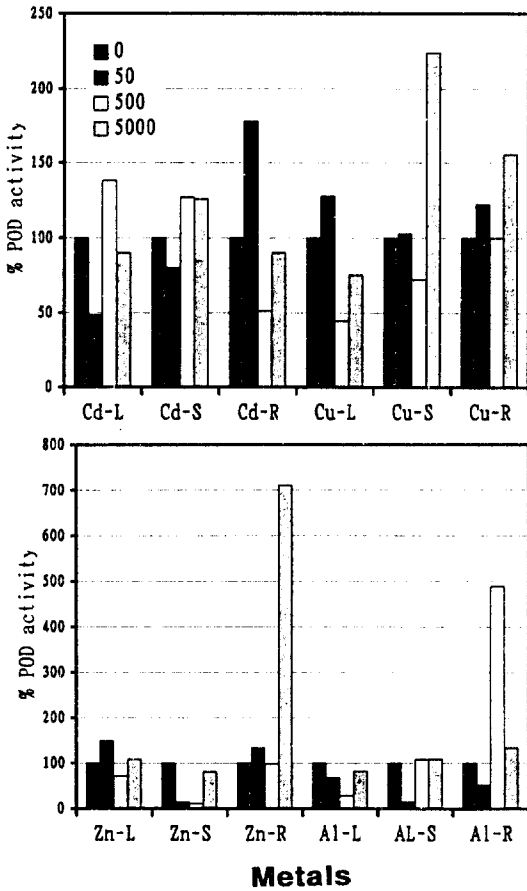


Fig. 2. Peroxidase activity expressed as % of controls(0ppm).
L : Leaves; S : Stem; R : Root. Absolute values for control activity(100%) expressed in unit/mg protein were 163.6, 328.1, 675.

에서는 388.9%의 높은 증가를 보여 Al도 또한 뿌리에서 POD활성을 증가시키는 원인으로 작용한다고 생각된다.

처리별 CAT활성을 control과 비교 조사한 결과(Fig. 3), 중금속 처리시 앞에서는 모든 농도에서 감소되었으며(93.1-50%) 줄기에서는 감소되거나(89.1-26.4%) 미미한 정도의 증가(344.2-71.3%)를 보인 반면, 뿌리에서는 현저한 증가를 보였으며 농도가 증가할수록 활성도 높게 나타났다. Cd 5000ppm에서 1223.1%, Cu에서 5192.3%, Zn처리에서 7838.5%의 높은 증가를 보였고 특히, Al처리시 29772.3%의 가장 높은 CAT활성을 나타내었다.

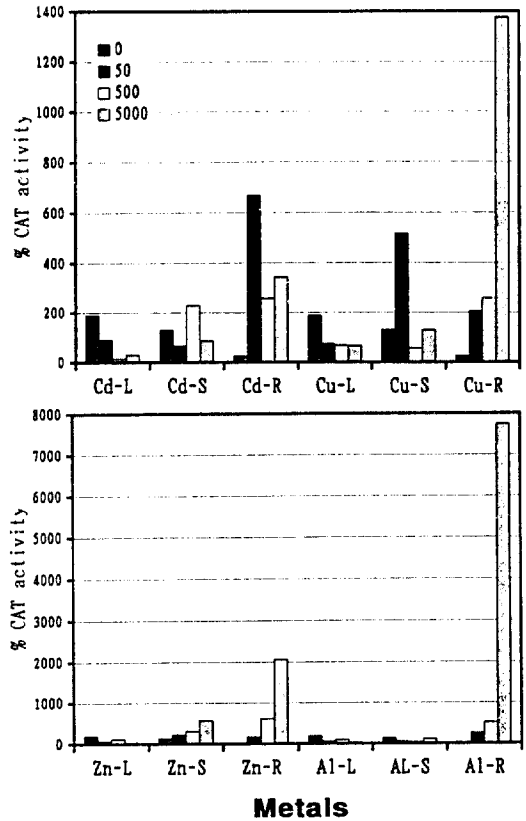


Fig. 3. Catalase activity expressed as % of controls (0ppm).
L : Leaves; S : Stem; R : Root. Absolute values for control activity(100%) expressed in unit/mg protein were 188, 129, 26.

전기영동

중금속 처리에 따른 동위효소 pattern 변화를 조사한 결과(Fig. 4), POD의 경우(자료 미제시)는 한 개의 band에서 새로운 동위효소의 출현은 없었으며 단지 잎, 줄기, 뿌리로 갈수록 band의 강도가 커졌다.

SOD의 경우 Cd처리에서 줄기와 뿌리의 band가 고농도로 갈수록 약해졌으나 Cu처리에서는 줄기와 뿌리에서 큰 변화가 없었고, 잎에서는 500ppm에서 한 개의 band가 더 나타났으며 농도가 증가할수록 band의 강도는 더 커졌다. Zn과 Al처리에서는 5000ppm에서 일부위에 한 개의 band가 더 나타났고 뿌리의 band는 고농도로 갈수록 강도가 약해졌으며 5000ppm에서는 band가 거의 없어졌다.

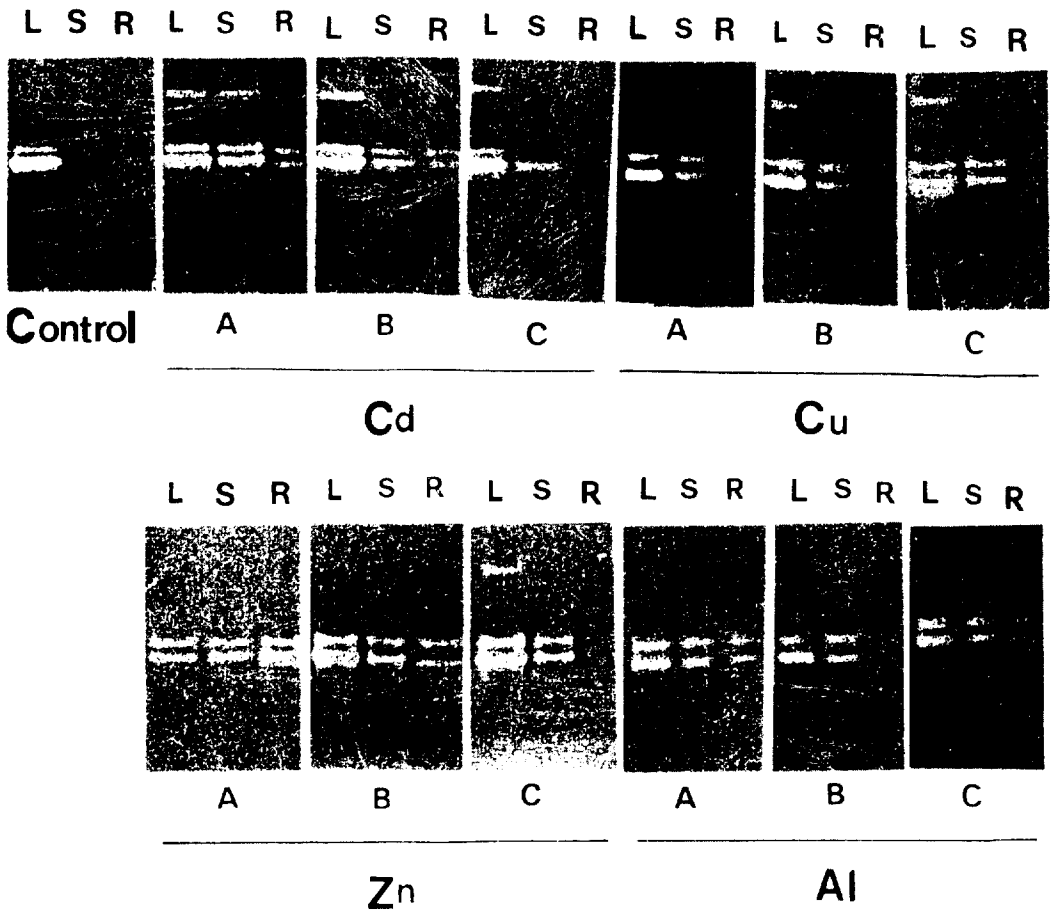


Fig. 4. Changes of SOD isozyme patterns in plant of *Persicaria vulgaris* Webb. et Moq. SOD was detected by nitro blue tetrazolium staining after native PAGE. L : Leaves; S : Stem; R : Root; A : 50ppm; B : 500ppm; C : 5000ppm.

摘 要

중금속(Cd, Cu, Zn, Al)처리하에서 생육시켰을 때 봄여귀(*Persicaria vulgaris* Webb. et Moq)의 부위별 항산화효소활성 및 동위효소 pattern을 조사해 본 결과는 다음과 같다.

1. 잎과 줄기의 SOD활성은 감소되었으나, 뿌리에서는 증가되었다. 특히, Al처리하에서 자란 뿌리는 높은 SOD활성을 나타내었다.
2. Cd, Cu처리하에서 POD활성은 중금속 및 농도간에 일정한 경향을 나타내지 않았고, Zn, Al처리하에서는 억제되었으나, Zn 5000ppm, Al 500ppm하에서 생육시킨 뿌리에서는 높은 활성을 나타내었다.

3. 중금속처리시 CAT활성은 잎에서 감소되었고, 뿌리에서는 농도가 증가할수록 활성이 뚜렷이 높아졌다. 특히, Al처리하에서 자란 뿌리가 가장 높은 활성을 나타내었다.
4. 중금속처리에 따른 동위효소 pattern은 POD의 경우 한 개 band에서 동위효소의 출현없이 강도의 크기 변화만 나타났고, SOD의 동위효소 pattern 변화는 다양하였다.

인 용 문 헌

1. Alscher R.G., Hess J.L. 1993. Antioxidants in higher plants. CRC Press, Boca Taton, 1-174.
2. Antje B., Ahmed A.M., Marina A., Andreas B., Karl J.D. 1996. Heavy metal induced

- changes in peroxidase activity in leaves, roots and cell suspension cultures of *Hotdeun vulgare* L. Plant peroxidases: Biochemistry and physiology, C. Obinger, U. Burner, R. Ebermann, C. Penel, H. Greppin, eds.: 374-379.
3. Asami, S. Akazawa, T. 1978. Phytooxidation damage in photosynthetic activities of *chromatium vinosum*. Plant Physiol. 62: 981.
 4. Bowler, C., M.V. Montagu, and D. Inzé. 1992. Superoxide dismutase and peroxidase activities in root tips of soybean(*Glycinemay*). Physiol. Plant. 83: 463-468.
 5. Bowks, D.J. 1990. Defence-related proteins in higher plants. Ann. Rev. Biochem. 59: 873-907.
 6. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
 7. Brennan, T., Anderson. L.E. 1980. Inhibition by catalase of darkmediated glucose-6-phosphate dehydrogenase activation in pea chloroplasts. Plant Physiol. 66: 815.
 8. Cadenas, E. 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. Ann. Rev. Biochem. 58: 79.
 9. Charles, S.A. and Halliwell, B. 1980. Effects of hydrogen peroxide on spinac(*spinacia oleraceae*) chloroplast fructose-bisphosphate. Biochem. J. 189: 373.
 10. Elstner, E.F. 1982. Oxygen activation and oxygen toxicity. Ann. Rev. Plant Physiol. 33: 73-96.
 11. Endress, A.G., Suarez S.J., Taylor, O.C. 1980. Peroxidase activity in plant leaves exposed to gaseous HCl of Ozone. Environ Pollut. 22: 47-58.
 12. Henning, D. Nielsen, K. 1987. Peroxidase-labelled monoclnal antibodies for use in enzyme-immunoassay. J. Immunoassay. 8: 297-308.
 13. 정일민 · 윤성중 · 김정태 · 광재균 · 성재덕 · 서형수. 1995. 들깨잎에 함유된 Superoxide Dismutase의 특성 및 항산화활성 검정. 한국작물학회지. 40(4): 504-511.
 14. 姜炳華 · 沈相仁. 1995. 雜草種에 대한 Paraquat 毒性: 耐性種과 感受性 種間의 反應差異. 한국잡초학회지. 15(3): 224-231.
 15. 광상수 · 김수경 · 정경희 · 유순희 · 박일현 · 유장렬. 1994. 고구마(*Ipomoea batatas*)현탁 배양에서 배지조성 및 세포집중량의 적정화에 의한 Peroxidase 생산성 향상. 식물조직배양학회지. 21(2): 91-97.
 16. Matkovics, B., R. Novak, H.D. Hanh, L. Szabo, S.I. Varga and G.Z. Zalesua. 1977. A comparative study of some more important experimental animal peroxide metabolism enzymes. Comp. Biochem. Physiol. 56: 31-58.
 17. McCord, J.M., Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyuprein(Hemocuprein). J. Biol. Chem. 244: 6049-6055.
 18. Mehdy, M.C. 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. Plant Physiol. 105: 467-472.
 19. Miller, A.R., Kelley, T.J. 1989. Mechanical stress stimulates peroxidase activity in cucumber fruit. Hortscience. 24: 650-652.
 20. 남민희 · 박우철. 1995. Brassic속 작물 유묘에서 생장억제제 Uniconazole처리에 따른 생화학적 변화. 한국농화학회지. 38(3): 202-206.
 21. Salin, M.L. 1987. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. Physiol. Plant. 72: 681-689.
 22. Scandalios, J.G. 1983. Oxygen stress and Superoxide dismutase. Plant Physiol. 101: 7-12.
 23. Schobert, B. Elstner, E.F. 1980. Production of hexanal and ethane by *phaeodactylum tricornutum* and its correlation to fattyacid oxidation and bleaching of photosynthetic

- pigments. *Plant Physiol.* 66: 215.
24. Simic, M.G. and M. Karel. 1980. Autooxidation in food and biological systems; Natural antioxidants. Plenum Press, NY. 261-282.
25. 沈相仁·姜炳華. 1993. 環境汚染에 의한 酸化스트레스와 植物體의 防禦機作. *한국환경농학회지*. 12(3): 264-280.
26. Van Rensen, J.J.S. 1975. Lipid peroxidation and chlorophyll destruction caused by diquat during photosynthesis in *scenedesmus*. *Physiol. Plant.* 33: 42.
27. Whitehouse, D.G., Ludwig. L.J. and Walker, D.A. 1971. Participation of the Mehler reaction and catalase in the oxygen exchange of chloroplast preparations. *J. Exp. Bot.* 22: 772.
28. 유순희·김석원·심상호·유장렬·곽상수. 1996. Superoxide Dismutase 고생산 식물배양 세포주의 선발 및 Isoenzyme 분석. *식물조직배양학회지*. 23(2): 103-106.