

상추에서 수분 스트레스에 의한 抗酸化 酵素의 活性度 變化

姜 相 載 · 朴 愚 喆

경북대학교 농과대학 농화학과

Changes in the Activities of Anti-Oxidant Enzymes during Water Stress in Lettuce(*Lactuca sativa* L.)

Sang-Jae KANG, Woo-Churl PARK

Dept. of Agricultural, Chemistry, Kyungpook National University

Summary

Plants are exposed to wide range of different stresses. As plants have only limited mechanism for stress avoidance, they require flexible means for adaption to changing environmental conditions.

This study was carried out to reasearch the changes of antioxidant enzymes activities as caused by water stress in four lettuce(*lactuca sativa*) lines

Four lettuce lines exposed to water stress showed premature senescence as evidenced by the consistenent reduction in the content of total soluble protein and total lipid. Water stress also caused decreased activities of superoxide dismutase , catalase, ascorbate peroxidase , but decrease rates were different.

Catalase activity was decreased much more than that of ascorbate peroxidase that suggest catalase reacted with hydrogenperoxide directly not with ascorbate peroxidase

緒 論

植物은 生育하는 동안 스트레스를 받아 活性 酸素種이 增加하여 細胞膜의 分離, 蛋白質 分離, DNA合成 抑制, 光合成 抑制,

葉綠體 破壞등 심각한 生理的 障害를 誘發하며 이 生理的 障害는 식물의 成長과 生産性에 影響을 미치는 重要한 因子이다. 이

被害 發生은 細胞水準에서 酸化의 損傷과 密接한 關聯을 가지고 있다.(Elstner, 1992; Hewitt, 1990; Fidge, 1994; Fenton, 1984; Gardner & Fridorrich, 1991) 生體內에서 活性 酸素 除去 시스템에 關與하는 物質로서 Superoxide dismutase (SOD), Catalase, Ascorbate peroxidase 등이 作用 한다고 알려져 있다.(Alscher & Hess, 1993)

植物은 다른 種과 달리 스트레스를 받게 되어도 安全한 곳으로 移動을 할수 없으므로 스트레스에 대한 適應能力이 다른 生命體보다 높을 것으로 생각되므로 스트레스의 研究에 適合한 材料이다. 本 研究은 스트레스에 대한 植物의 防禦機構를 理解하고 說明하기 위한 基礎資料를 얻기 위하여 隨行한 結果이다.

材料 및 方法

1. 供試作物 및 生育

本 實驗에 使用한 供試土壤은 有機物의 含量이 약 1.4%이며 陽이온 置換容量이 약 3.8인 사질양토 土壤을 使用하였다. 供試品種은 市中에서 購入한 시금치(*Lactuca sativa*)種으로 청치마와 3개 品種을 供試作物로 選定하였다.

均一한 種子를 選定하여 表面殺菌하고 發芽시켜 供試土壤이 채워진 포트에 옮겨심고 一定 期間동안 生育시킨後 生育狀態가 均一한 것을 選定하여 各各 試驗用 處理를 하였다.

2. 수분스트레스의 處理

水分스트레스는 正常的으로 生育하고 있는 供試作物을 選定하여 對照區는 一般 耕種法에 따라 生育시키고 건조처리는 물을 전혀 供給하지 않고 6일간 處理하였으며

담수 처리는 植物體의 줄기가 물에 잠길 때까지 處理하고 10일간 生育 시켰다.

3. 試料의 採取

試料의 採取는 一定한 採取를 目的으로 午後 3시경에 實施하였으며 各各 處理된 供試作物의 잎을 採取하여 分析 目的에 따라 正確하게 稱量하여 液體窒素로 急速 凍結한 後 -80℃에서 保管하면서 實驗에 使用하였다.

4. 抗酸化 酵素의 活性度 測定

2.0g의 試料를 50mM 磷酸 緩衝溶液(pH 7.8)으로 組織을 破碎한 後 12,000rpm에서 遠心分離하여 얻은 上澄液을 酵素活性度 測定用 試料로 하여 다음과 같이 測定하였다.

Superoxide dismutase(SOD; EC. 1.15.1.1)의 活性度 測定은 50mM 磷酸緩衝溶液에 1mM EDTA, 1mM Xanthine, 100 μM cytochrome C, Xanthine oxidase가 들어 있는 反應溶液에서 Cytochrome C의 還元 阻害率로서 測定하였다(McCord & Fridovich, 1969)

Catalase(EC 1.11.1.6)는 50mM 磷酸緩衝溶液(pH 7.0)에 20mM H₂O₂가 들어 있는 反應溶液에서 H₂O₂ 減少를 測定하였다.(Aebi, 1984)

Ascorbate peroxidase(APOx; EC 1.11.1.11)는 50mM 磷酸緩衝溶液(pH 7.0)에 5mM ascorbic acid, 10mM H₂O₂가 들어 있는 反應 溶液에서 Ascorbate가 酸化된 量을 測定하였다.(Asada, 1993)

5. 總脂質 含量 및 總 水溶性 蛋白質의 含量

植物의 老化를 나타내는 指標로서 總 脂質의 含量은 Folch等(1957)의 方法으로 測定하였으며 總 水溶性 蛋白質의 含量은 Bradford 法으로 測定하였다.

結果 및 考察

1. 수용성 단백질과 총지질의 변화

가) 水溶性 蛋白質 含量의 變化

總 蛋白質의 含量은 植物이 스트레스를 받을 경우 減少되는 標識로서 一般적으로 調查하는 것으로 含量 變化는 그림 1과 같다.

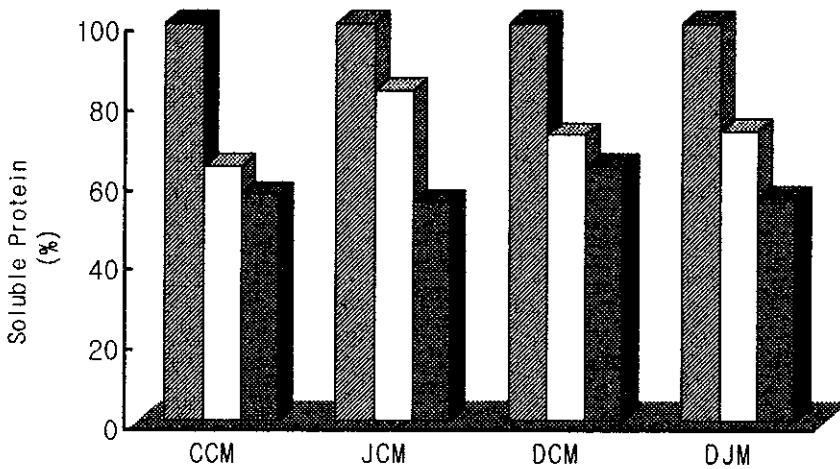


Fig. 1 Effects of water stress on total soluble protein of lettuce senescence
 CCM : Chungchima ; DCM : Ducksumchungchukmyun ; JCM : Juckchima ;
 DJM : Ducksumchungchukmyun ▨ : control □ : drought ▩ : flooding

總 水溶性 蛋白質 含量의 變化는 담수 處理 시 그 減少率이 훨씬 더 크게 나타났다. 스트레스처리시 減少率의 差異는 JCM이 가장 크게 나타났고 DCM이 가장 작았으며 品種間 處理別 總 水溶性 蛋白質의 含量에 큰 差異를 보였다. 蛋白質의 合成은 水分의 影響을 많이 받는 것으로 水分의 過 不足時 아미노 酸이 蛋白質로 合成이 抑制되어 總蛋白質의 含量이 낮아지는 것으로 報告되고 있다 (Stadtman, 1986).

Drought 處理와 Flooding處理시 청치마 (CCM)는 對照區보다 56.7%로 減少하였으며 JCM은 54.7%, DCM은 63.9%, DJM은 56% 정도 對照區보다 減少하였다. Drought처리시 總 水溶性 蛋白質 含量의 變化는 청치마(CCM)는 對照區보다 64.4%로 減少하였으며 JCM은 82.7%, DCM은 72.2%, DJM은 73.3% 對照區보다 각각 減少하였다.

나) 總 脂質의 含量 變化

植物이 스트레스를 받으면 活性酸素種에 의하여 細胞膜 成分을 變化시키는 것으로 알려져 있다 水分 스트레스에 의한 脂質의 含量 變化를 調查한 結果는 그림 2와 같다.

活性 酸素種에 의하여 植物體의 細胞膜의 構成成分인 脂質을 破壞하는 것으로 알려져 있다. Flooding 處理시 CCM은 46%, JCM은 63.2%, DCM은 71.1%,

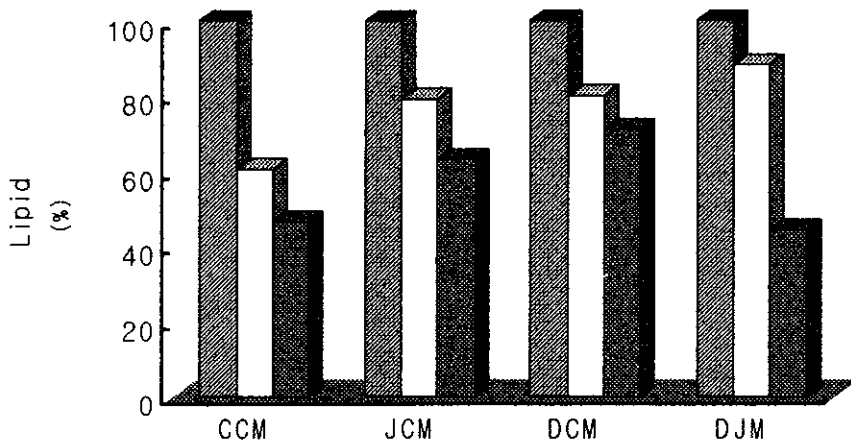


Fig. 2 Effects of water stress on total lipid of lettuce

CCM : Chungchima ; DCM : Ducksumchungchukmyun ; JCM : Juckchima ;
 DJM : Ducksumchungchukmyun ▨ : control □ : drought ▩ : flooding

DJM은 44.4%로 對照區보다 각각 減少하였으 며 그 減少比率은 DJM이 가장 크게 나타났고, CCM, JCM, DCM 順으로 컸다. Drought 處理시 CCM은 60.7%, JCM은 79.4%, DCM은 81%, DJM은 88.1%로 對照區보다 減少하였다. 總 脂質 含量의 減少率은 CCM이 가장 크고, JCM, DCM, DJM 順으로 크게 減少하였다. 스트레스의 處理에 따라 脂質의 減少率은 Flooding 處理時가 Drought 處理시 보다 減少率이 더 크게 나타났으며 DJM 은 減少比率이 가장 컸으며 DCM이 가장 작았다.

2. 酵素의 活性度 變化

스트레스에 의해 生成된 活性 酸素를 除去하는 作用을 하는 抗酸化酵素中の 하나 인 Catalase는 Flooding 處理시 CCM 은 대조구의 38.4%, JCM은 32.5%, DCM은 35.9%, DJM은 34.5%로 急

激한 減少를 보였으며 Drought 처리시는 CCM은 對照區의 35.8%, JCM은 47.9%, DCM은 39.8%, DJM은 37.4%로 減少되었다. 處理間 差異는 JCM이 가장 크게 나타났고 DCM, DJM 에서는 Flooding 처리시 酵素의 活性度 減少가 더 크게 나타났다. CCM은 오히려 Drought처리시 減少率이 더 컸다.

반면, Superoxide Dismutase 의 活性度 變化는 Flooding 처리시 CCM은 對照區의 79.8%, JCM은 78.5%, DCM은 86.8%, DJM은 87%로 각각 減少되었고 Drought처리시 CCM은 81.9%, JCM은 79.6%, DCM은 87.9%, DJM은 89.1%로서 catalase 보다 減少率이 더 작게 나타났다.

Ascorbate Peroxidase 活性度는 DCM이 對照區의 72%로서 가장 큰 減少를 보였

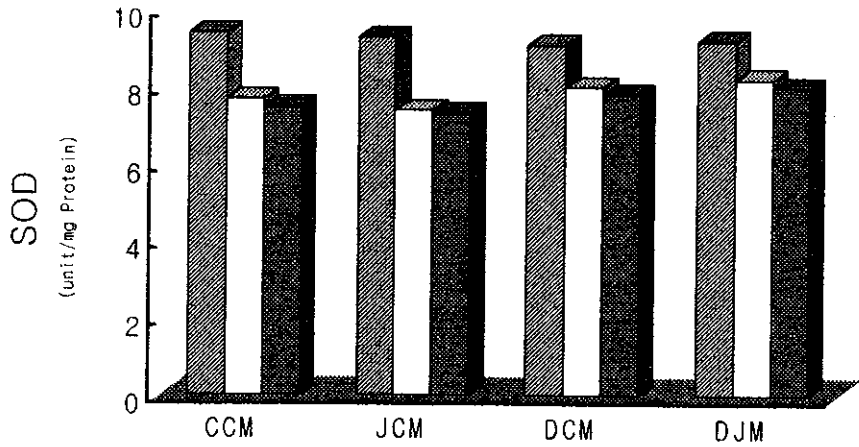


Fig. 3 SOD activity of lettuce leaves as caused by water stress
 CCM : Chungchima ; DCM : Ducksumchungchukmyun ; JCM : Juckchima ;
 DJM : Ducksumchungchukmyun ▨ : control □ : drought ▩ : flooding

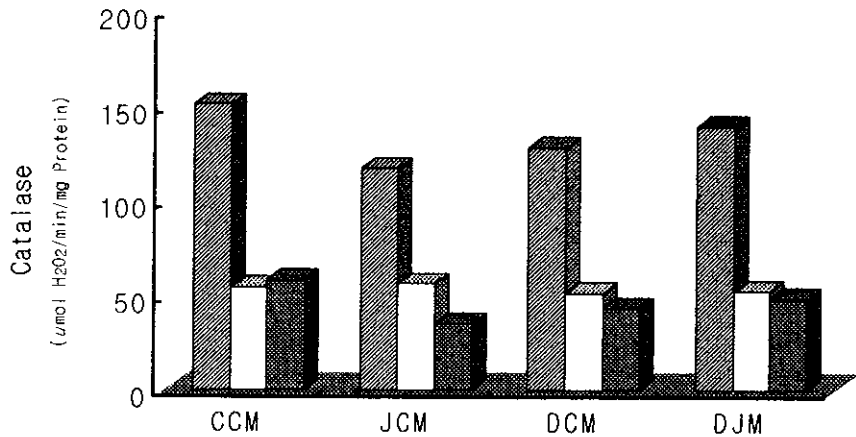


Fig. 4 Catalase activity of lettuce leaves as caused by water stress
 CCM : Chungchima ; DCM : Ducksumchungchukmyun ; JCM : Juckchima ;
 DJM : Ducksumchungchukmyun ▨ : control □ : drought ▩ : flooding

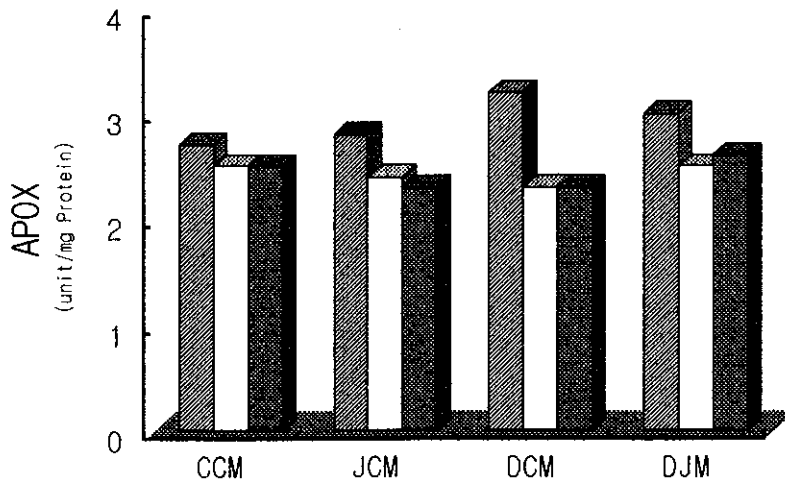


Fig. 5 APOX activity of lettuce leaves caused by water stress
 CCM : Chungchima ; DCM : Ducksumchungchukmyun ; JCM : Juckchima ;
 DJM : Ducksumchungchukmyun ▨ : control □ : drought ▩ : flooding

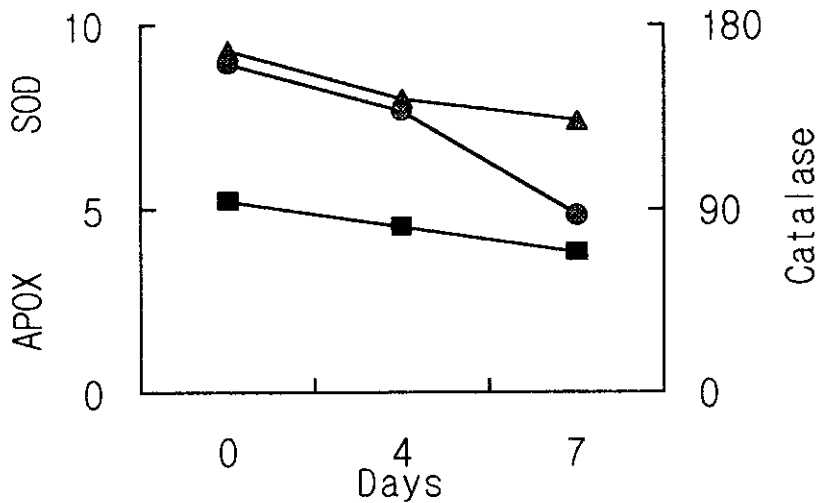


Fig. 6 Antioxidant enzymes activity of lettuce leaves caused by water stress(Drought). ▲▲ : SOD ; ●● : Catalase ; ■■ : APOX

으며 그 다음으로 DJM이 각각 86.7%, 83.3%로 JCM이 82.1%, 85.7%로 CCM이 가장 작은 減少率을 보였다.

Drought 處理 期間別 抗酸化酵素의 變化를 調査한 結果는 그림 4와 같다. 각종 酵素의 活性度 變化는 대체적으로 處理期間이 길어질수록 減少하는 傾向을 보였으며 특히 Catalase의 活性도가 4일째 이후 가장 급격하게 減少하였고 다른 酵素의 活性도는 완만한 減少를 보였다.

摘 要

4種의 상처를 供試作物로 하여 水分 스트레스에 露出을 시켰을 때 總 蛋白質의 含量은 Flooding 처리시 그 減少率이 더 크게 나타났으며 減少率은 JCM이 가장 컸고, DCM이 가장 작았으며 品種間 각 處理別 差異가 크게 나타났다. 總 脂質의 含量은 減少率이 CCM이 가장 컸고 JCM, DCM, DJM順으로 減少하였다.

抗酸化酵素인 Superoxide Dismutase (SOD)는, Catalase, Ascorbate Peroxidase의 活性도는 전체적으로 減少하였으며 그 減少率은 Catalase의 경우 처리별 JCM이 가장 크게 나타났고 DCM, DJM에서는 Flooding 처리시 효소의 활성화도 변화가 더 크게 나타났다.

Catalase의 活性度 變化가 Ascorbate peroxidase의 活性度 보다 減少率이 더 크게 나타나 이는 Catalase가 Ascorbate peroxidase 보다 過酸化水素와 더 直接的으로 反應을 함을 나타낸다.

Drought 處理期間別 酵素의 活性도는 生育時間이 길어질수록 減少하는 傾向이었으며 Catalase의 活性도가 4일째 이후 가장 급격하게 減少하였다.

參 考 文 獻

1. Aebi H.(1984) Catalase in vitro, *Methods in Enzymol.*, 105 : 121~126
2. Allen R. D.(1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants, *Plant Physiol.*, 107 : 1047~1054
3. Asada K.(1984) Chloroplasts : formation of active oxygen and its scavenging, *Methods in Enzymol.*, 105 : 422~429
4. Igor B., Afanas'ev, D. SC(1989) Superoxide ion : chemistry and biological implications CRC press, Florida, pp 197~218
5. Scandalis, J.(1993) Oxygen stress and superoxide dismutases, *Plant Physiol.*, 101 : 7~12
6. Stadtman E. R.(1992) Protein oxidation and aging, *Science* 257 : 1220~1224
7. Wayne F. and Beyer Jr.(1987) Assay for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions, *Anal. Biochem.*, 161 : 559~566
8. Yolanda G.(1995) Antioxidant defenses against activated oxygen in pea nodules subjected to water stress, *Plant Physiol.*, 108 : 753~759

