

大豆에서 水分스트레스에 의한 抗酸化酵素의 活性度 變化

金兌性 · 姜相載* · 朴愚詰

慶北大學校 農化學科, 尙州大學校 園藝學科*

Changes of antioxidant enzyme activities subjected to water stress in soybean leaves

Tae-Sung KIM · Sang-Jae KANG* · Woo-Churl PARK

Dept of Agricultural Chemistry, Kyungpook Nat'l Univ., Taegu, 702-701

** Dept of Horticulture Sangju Nat'l Univ., Sangju, 742-711*

Abstract

This experiment was carried out to elucidate and study about plant defense mechanism subjected to water stress(drought, flooding). We measured water content, total soluble protein content as stress marker and superoxide dismutase(SOD), catalase (CAT) as antioxidant enzymes subjected to water stress(drought, flooding) and recovery in soybean leaves. The results obtained were as follows:

Two soybean lines(keonolkong, euhakong)leaves exposed to water stress (drought, flooding) showed premature senescence as evidence by the decrease in water content, and total soluble protein content, but those of soybean leaves subjected to water stress recovery for 3 days were recovered. Visual damage was much worse at drought stress than flooding stress and was worse keunolkong than enhakong. The activity of superoxide dismutase, catalase subjected to water stress(drought, flooding)was on the decrease, but degree of decrease was different from a sort of soybean lines, drought and flooding stress.

key words : water stress, superoxide dismutase, catalase

서 론

植物은 環境스트레스를 받으면 生體內에서 酸素가 活性酸素種으로 變換하는 양이 增大되어 細胞膜分解, 蛋白質分解, 脂質의 酸化, DNA 合成抑制, 光合成 抑制, 葉綠體 破壞등 심각한 生理적인 障害를 주며 심할 경우 죽음에 이르게 된다. 環境 스트레스는 植物의 生長과 生産性에 影響을 미치는 중요한 因子로서 이에 의해 發生되는 被害의 상당부분은 細胞水準에서의 酸化的 損傷과 밀접한 관련이 있다 (Hewitt, 1990; Fidger, 1994; Price 와 Henry, 1991; Gardner와 Fridovich, 1991; Imaly와 Linn, 1986). 活性酸素의 除去에 關係하는 物質로는 Catalase를 비롯한 몇가지 酵素와 아스코브산과 같은 抗酸化劑들이 있다(Alscher 와 Hess, 1993). 植物體는 活性 酸素種으로 부터 자신을 보호하기 위하여 일련의 抗酸化 시스템을 構築하는 進化過程을 거치면서 環境에 適應하여 왔다. Asada (1994) 등은 植物體內에서 生成된 活性酸素의 除去시스템의 經路에 대하여 설명하고 있으며 여기에 관련된 酵素로는 superoxide dismutase (SOD) catalase(CAT), glutathione reductase(GR), dehydroascorbate reductase (DHAR), monodehydroascorbate reductase (MDHAR), Ascorbate peroxidase (APOX) 등이 抗酸化物質의 生成과 서로 관련되어 作用한다고 하였다. 최근에는 環境스트레스에 耐性을 가지는 植物體 開發을 위한 研究

가 進行되고 있으며 植物體의 防禦機構를 이해하기 위하여 가뭄(drought)과 침수(flooding) 등의 수분스트레스시 抗酸化酵素의 活性度 變化를 確認하고 耐性 植物體 開發을 위한 基礎 資料를 얻기 위하여 본 實驗을 遂行하였다.

재료 및 방법

1. 生長條件

植物體 生育은 精選한 大豆種子를 70%에 탄올로 表面殺菌하고 發芽시켜 均一하게 發芽된 幼苗를 供試土壤을 채운 포트(1/17000a)에 옮겨서 一般 耕種法에 따라 生育시켰다. 本 實驗에 사용한 土壤은 砂壤土이며 有機物의 含量이 1400(mg/kg)이며 全窒素의 含量이 0.17% 정도이며 그 이화학적 특성은 표 1과 같다.

2. 水分스트레스의 처리 및 회복

均一하게 成長한 植物體를 對照區는 一般 耕種法에 따라 正常的으로 栽培하였고 drought 處理는 물을 전혀 供給하지 않고 5日間 放置하였으며, Flooding 處理는 줄기의 하단부가 물에 잠길 때까지 물을 채워 處理하였다. drought 處理는 거의 萎凋點에 到達하는 期間이 약 5일 程度이었고 flooding 처리는 視覺적으로 判斷할 수 없어서 10日間 各各 處理하여 生育狀態가 均一한 個體를 選拔하여 試料를 採取하였다. Drought 스트레스의 回復은 供試作

Table 1. Physico-chemical properties of the soil

pH (1:5)	O.M. (mg/kg)	T-N (%)	P ₂ O ₅ (mg/kg)	Ex.-Cations(cmol ⁺ /kg)			C.E.C. (cmol+/kg)	Texture
				Ca	K	Mg		
7.4	1400	0.17	211	1.2	1.59	1.46	3.8	Sandy loam

물을 4일간 drought 處理한 후 다시 充分한 양의 水分을 供給하였으며, flooding 스트레스의 回復도 4日間 處理하고 물을 除去시키고 各各 3日間の 回復期를 준 後 試料을 採取하였다.

3. 抗酸化酵素의 活性度 測定

抗酸化酵素의 活性度 測定用 粗酵素液은 다음과 같이 調製하였다. 즉 0.5g의 試料에 20배 부피의 50 mM 磷酸緩衝液(pH 7.0)으로 磨碎 抽出하고 遠心分離하여 上澄液을 酵素活性度 測定用 위한 粗酵素液으로 하였다. 각 酵素의 活性度 測定은 다음과 같은 方法으로 遂行하였다. Superoxide dismutase(SOD; EC 1.15.1.1)는 McCord와 Fridovich(1969)의 方法에 따라 0.1mM Xanthine, 10 μ M cytochrome C, 0.002 unit xanthine oxidase가 들어 있는 反應溶液에 一定量의 酵素抽出液을 넣어 550 nm에서 cytochrome C의 還元阻害率로서 測定하였다.

Catalase(CAT; EC 1.11.1.6)는 Aebi(1984)의 方法으로 20 mM의 H₂O₂가 들어 있는 反應溶液에 一定量의 酵素抽出液을 넣어 240 nm에서 H₂O₂의 濃度減少를 測定하였다.

4. 스트레스 marker의 測定

水分의 含量은 加熱減量法으로 70 °C에서 12 시간 乾燥 후 그 減量을 水分含量으로 하였으며 可溶性 蛋白質의 含量은 Bradford法(Bradford, 1976)으로 bovine serum albumin(BSA)을 標準物質로 하여 595nm에서 測定하였다.

結果 및 考察

1. 스트레스 marker의 含量 變化

水分 스트레스는 植物體의 未成熟 老化를

招來하는 것으로 보고(Yolanda, 1995)되고 있으며, 水分含量과 可溶性 蛋白質 含量 減少가 未成熟 老化의 指標로서 활용된다(Mengal, 1987). 水分 스트레스(drought, flooding)시 植物體 內의 水分含量을 測定한 結果는 그림 1과 같다. 그림 1과 같이 두 處理區 公히 水分含量이 減少하는 傾向을 나타내었다. Drought 處理時, 큰울콩의 경우 時間이 지남에 따라 水分含量이 對照區에 비해 2日, 4日, 5日째에 각각 4.4%, 5.1%, 12.8%씩 減少하였으며 은하콩은 1.3%, 4.2%, 12.1%씩 減少하였다. Flooding 處理의 경우, 큰울콩은 時間이 지남에 따라 水分含量이 對照區에 비해 2日, 4日, 5日, 10日째에 각각 3.8%, 4.0%, 3.7%, 2.2%씩 減少하였으며 은하콩은 2.2%, 3.8%, 3.3%, 2.6%씩 減少하였다.

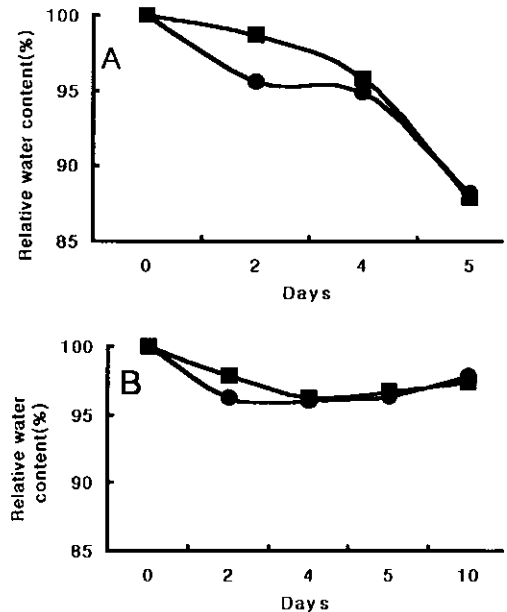


Fig. 1. Relative water content subjected to water stress (drought : A; flooding: B) in keonolkong(●) and eunhakong(■)

期間別 스트레스 處理시 drought의 경우는 시간이 지남에 따라 可視的인 被害가 나타났고 flooding의 경우 可視的인 被害는 크게 나타나지 않았지만 水分含量이 減少하였으며 그 감소정도는 4일을 起點으로 하여 점점 回復되는 傾向을 보였다.

이와 같은 結果로 水分 스트레스 處理時 공히 水分含量이 減少하는 傾向을 나타내어 수분 스트레스가 植物의 水分含量에 影響을 미치는 것을 알 수 있었다. 또한, 큰올콩의 수분 감소가 은하콩에 비해 더 컸고, 視覺的인 피해도 크게 나타났는데 이것은 큰올콩이 은하콩에 비해 넓고 큰 잎을 가진 品種差異 때문이라 판단된다.

可溶性 蛋白質 含量 變化는 그림 2에서 나타난 바와 같이 對照區에서는 生長함에 따라

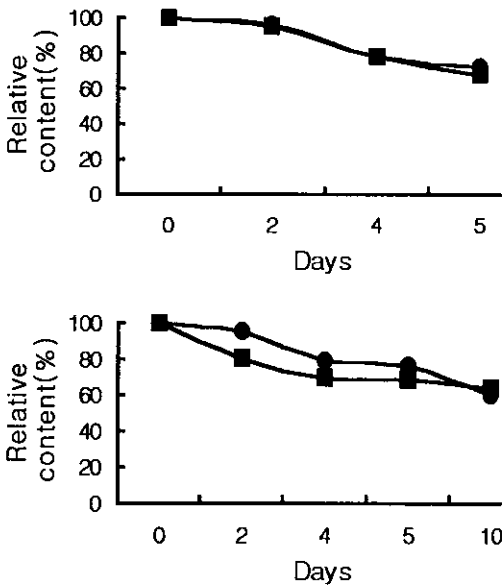


Fig. 2. Relative soluble protein content subjected to water stress (drought : A; flooding: B) in keonolkong(●) and eunhakong(■)

蛋白質의 양이 增加하였으나, drought 處理시에는 두 品種이 공히 시간이 지남에 따라 減少하였다. flooding 處理시 은하콩의 경우 蛋白質의 양이 초기에(2일째) 크게 減少하였으나 시간이 지남에 따라 回復되는 傾向을 보였다. 또한 그 減少程度는 drought處理時 큰올콩은 對照區에 비해 2日, 4日, 5日째 各各 3.8%, 23.3%, 27.3%가 減少하였으며 은하콩의 경우 對照區에 비해 4.4%, 21.6%, 32.6%가 減少하였다. Flooding處理시 큰올콩의 경우 對照區에 비해 2日, 4日, 5日, 10日째 各各 5.0%, 20.7%, 24.0%, 39.7%가 減少하였으며 은하콩의 境遇에는 19.7%, 30.8%, 31.4%, 36.4%로 減少하였다. 水分 스트레스(drought, flooding)시 두 品種 공히 對照區에 비해 可溶性 蛋白質 含量이 減少하였다.

2. 抗酸化酵素 活性 變化

Superoxide dismutase(SOD)는 O_2^- 를 H_2O_2 와 O_2 로 轉移시키는 酵素로서 그림 3에서 보는 바와 같이 SOD의 活性은 對照區에 비해 큰올콩의 境遇에는 生長함에 따라 그 活性이 漸次增加하였으며 은하콩의 境遇에는 初期에는(2日째) 增加하는 傾向을 보이다가 一定水準을 維持하였다.

Drought처리의 경우 두 品種 모두 초기 2일째는 酵素活性이 크게 減少(큰올콩 48.5%, 은하콩 36.3%)하였다가 4일째는 酵素活性이 回復(큰올콩 26.6% 은하콩 14.4%)되었다가 5일째는 다시 減少(큰올콩 36.4% 은하콩 45.9%)되었다. Flooding처리의 경우 두 品種 모두 酵素活性이 減少하는 경향이 나타났으며 2일째는 큰올콩 36.4%, 은하콩 3.8% 4일째는 큰올콩 37.3%, 은하콩 4.5% 5일째는 큰올콩 47.5% 은하콩 19.3% 10일째는 큰올콩 50.0% 은

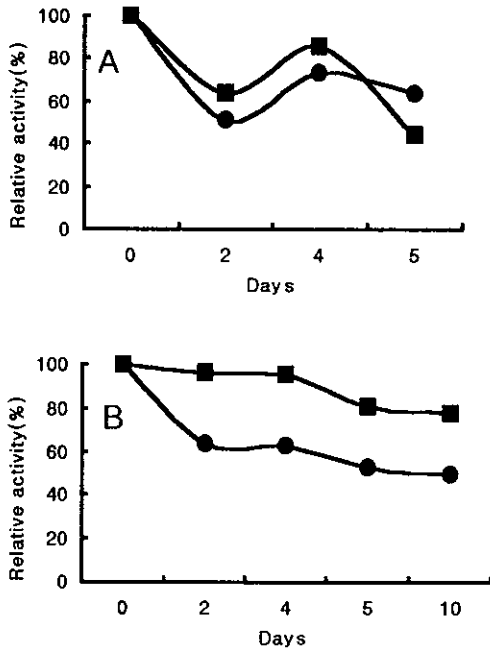


Fig. 3. Relative activity of superoxide dismutase subjected to water stress (drought : A; flooding: B) in keonolkong (●) and eunhakong(■)

하콩 22.6 % 감소하였다. 특히, 은하콩에 비해 큰울콩에서 酵素活性의 減少가 더 크게 나타났는데 이는 品種間의 差異인 것으로 생각된다. SOD는 水分 스트레스時에 處理別, 品種間, 期間別로 酵素活性의 差異는 있었지만 대조구에 비해 酵素活性이 減少하는 傾向이었다. Catalase(CAT)는 H₂O₂를 산소와 물로 觸媒시키는 酵素로서 그림 4에서 보는 바와 같이 drought와 flooding 處理時 모두 酵素活性이 급격히 減少했지만, 處理初期(2일째)에 (flooding 처리시 큰울콩 62.4%, 은하콩 62.7% 減少, drought 處理時 큰울콩 13.7%, 은하콩 25.5% 減少) 酵素 活性이 크게 감소하였다. 이것은 Jose 등(1994)과 Yolanda 등(1995)에 의해 보고된 바와 비슷한 결과를 나타내었으며 스트

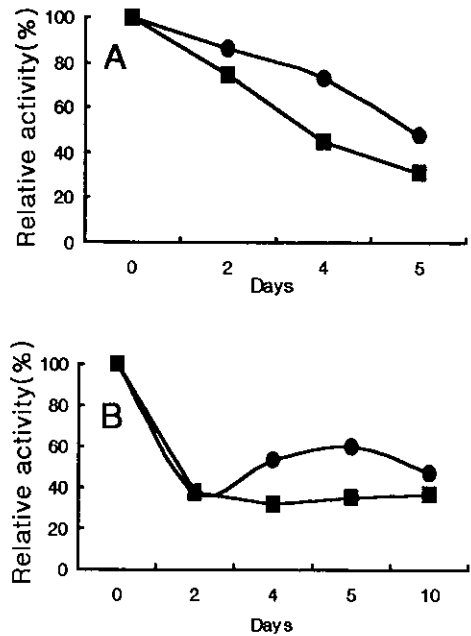


Fig. 4. Relative activity of catalase subjected to water stress (drought : A; flooding: B) in keonolkong(●) and eunhakong(■)

레스 處理時 生體內의 H₂O₂存在量을 調査하였을 때 對照區에 비해 減少하였다. 또한 이것을 分解하는 catalase나 ascorbate peroxidase의 活性이 減少하였으므로 H₂O₂는 生體內에 蓄積되지 않아 이들 酵素에 의해 分解된 것으로 생각된다.

Drought처리의 경우 두 品種 공히 時間이 지남에 따라 catalase의 活性이 계속 감소되었는데, 큰울콩의 경우 對照區에 비해 2일, 4일, 5일째 各各 13.7%, 26.7%, 52.1% 減少하였고 은하콩의 경우 22.5%, 55.0%, 69.0% 減少하였다. Flooding처리의 경우 4일 이후부터는 CAT活性에 큰 변화가 없었다. 減少程度는 큰울콩의 경우 對照區에 비해 2日, 4日, 5日, 10日째 各各 62.4%, 46.5%, 39.9%, 52.6% 減

少하였고 은하콩의 경우 62.7%, 67.9%, 64.8%, 63.1% 減少 하였다.

4. 수분스트레스의 回復時 抗酸化酵素 活性變化

Superoxide dismutase(SOD)의 活性은 drought 處理時 對照區에 비해 큰올콩 31.0% 減少, 은하콩 38.8% 減少하였으며, flooding 處理時 큰올콩 23.1% 減少, 은하콩 54.4% 減少를 나타내었는데 이것은 回復時 모두 回復되었다(그림 5). 이와 같은 結果는 Yolanda (1995)가 報告한 것과 비슷한 傾向을 나타내었으며 水分 스트레스下에서는 植物體內的 水分含量이 減少됨에 따라 蛋白質 生成량과 일반적인 酵素의 生成량이 減少하게 되므로 SOD의 活性度 減少되는 것으로 推測된다.

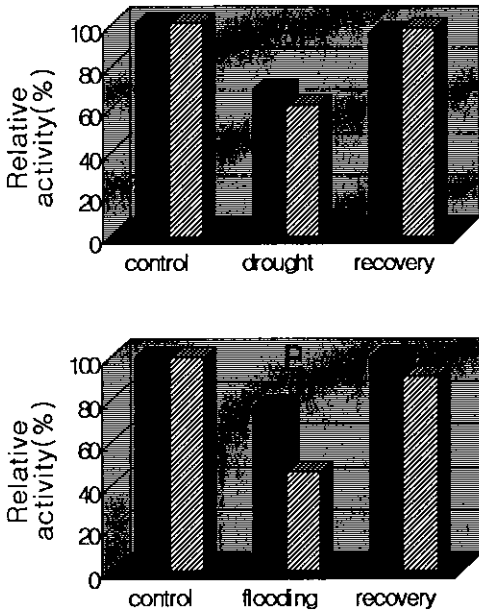


Fig. 5. Relative activity of superoxide dismutase subjected to water stress recovery (drought : A; flooding: B) in keonolkong(■) and eunhakong(▨)

Catalase(CAT) 酵素活性은 drought 處理時 對照區에 비해 큰올콩은 30.9% 減少하였고 은하콩 56.8% 減少하는 結果를 나타내었으며 flooding 處理時는 큰올콩이 46.7% 減少하고 은하콩이 37.5% 減少를 나타내었는데 이것은 스트레스의 回復時 모두 回復되는 結果를 나타내었다(그림 6). 이와 같은 結果는 SOD, CAT 등의 酵素에서도 그 活性이 減少되었고 回復時는 다시 酵素活性이 回復되었는데 이것은 植物體內的 水分含量과 蛋白質含量, 抗酸化物質含量과도 밀접한 관련이 있는 것으로 생각된다.

要 約

水分 스트레스에 의한 植物體의 防禦機構와 關聯된 superoxide dismutase와 catalase의 活

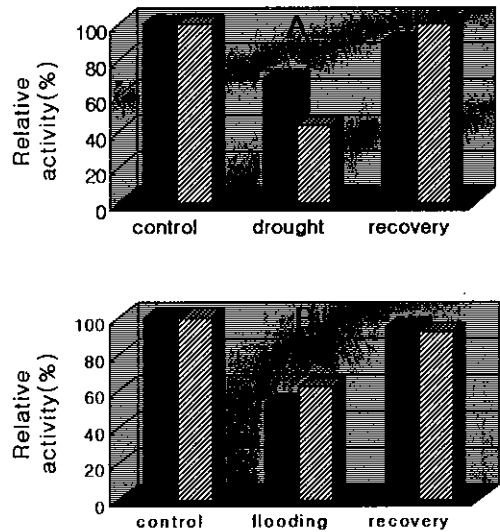


Fig. 6. Relative activity of catalase subjected to water stress recovery (drought : A; flooding: B) in keonolkong(■) and eunhakong(▨)

性度變化를 調査한 結果는 다음과 같다.

水分 스트레스(drought, flooding) 處理時 큰올콩과 은하콩 모두 水分 含量과 可溶性 蛋白質 含量이 減少하여 未成熟 老化를 나타내었다. 可視的인 被害는 drought 處理時가 flooding 處理에 비해 크게 나타났고 큰올콩이 은하콩에 비해 크게 나타났다. superoxide dismutase의 活性은 drought處理時 2日째에 急激한 減少를 보이다가 回復되고 다시 減少하는 傾向을 보였으며 flooding處理時는 處理期間에 따라 漸次 減少하였고 큰올콩의 減少程度가 더 크게 나타났다. catalase의 活性은 drought處理時는 減少하는 傾向이었으나 flooding處理時 2日째에 急激한 減少를 나타낸 후 一定하게 維持되는 傾向을 보였다. 水分스트레스 處理後 3日間の 回復期를 주었을 때 두 酵素의 活性은 漸次 回復되었다.

參 考 文 獻

1. Aebi, H (1984) Catalase in vitro. Methods in Enzymol., 105: 121~126
2. Alscher, R. G., J. L. Hess(1993) Antioxidants in higher plants. CRC Press, Boca, Raton FL. pp. 136~174
3. Asada, K.(1984) Chloroplast : formation of active oxygen and its scavenging. Methods in Enzymol., 105: 422~429
4. Bradford, M. M.(1976) A rapid and

- sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principles of protein dye-binding. Anal. Biochem., 72: 248~254
5. Gardner, P. R and I. Fridovich(1991) Superoxide sensitivity of *Escherichia coli*. 6-phosphogluconate dehydratase. J. Biol. Chem., 266: 1478~1483
6. Hewitt, N., G. Kok and R. Fall(1990) Hydroperoxide in plants exposed to ozone mediates air pollution damage to alkene emitters. nature 344: 56~58
7. Imlay, J. A. and S. Linn(1986) DNA damage and oxygen radical toxicity. Science, 240: 1302~1309
8. McCord, J. M. and I. Fridovich(1969) Superoxide dismutase, An Enzymic function for erythrocyte(hemocuprein). J. Biol. Chem., 244: 6049~6055
9. Price, A. and A. Hendry(1991) Iron-catalysed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. Plant Cell Environ., 14: 477~484
10. Yolanda G., I. O. Inaki, R. E. Pedro and B. Manuel(1995) Antioxidant defenses against activated oxygen in pea nodules subjected to water stresses. Plant Physiol., 103 :753~759