

대두에서 오존처리에 의한 몇가지 효소의 활성도 변화

강상재 · 박우철¹⁾ · 김복진²⁾

상주대학교 원예학과 · ¹⁾경북대학교 농화학과 · ²⁾영남대학교 농학과

Ozone-induced Alterations in the Activities of Enzymes in Soybean Leaves

Sang-Jae Kang, Woo-Churl Park¹⁾ and Bok-Jin Kim²⁾ (Dept. of Horticulture, Sangju Nat'l. University, Sangju, 742-711, ¹⁾Dept. of Agri. Chem., Kyungpook National University, Taegu, 702-701, ²⁾Dept. of Agronomy, Youngnam University, Kyungsan, 712-749)

ABSTRACT : This experiment was carried out to investigate the changes of antioxidant enzymes activities in soybean leaves, exposed to 0.2ppm of ozone. We have investigated whether Eunhakong and Samnamkong may scavenge ozone induced activated oxygen species by invoking antioxidant enzymes such as ascorbate peroxidase(APOX), glutathione reductase(GR), monodehydroascorbate reductase(MDHAR), dehydroascorbate reductase(DHAR). Ozone exposure preferentially increased APOX, GR and MDHAR activities, whereas that of DHAR only decreased slowly. When soybean plants were fumigated with 0.2ppm of ozone, the levels of ascorbate and reduced glutathione decreased within a few hours. In eunhakong, which has slightly a strong tolerance to ozone, was found to have higher antioxidants levels than samnamkong. However, there was no remarkable difference two cultivars in the activities of enzymes which protect plant against active oxygen species.

key word : eunhakong, samnamkong, antioxidant enzymes

서론

오존과 같은 植物毒性 誘發性物質이 植物細胞內로 들어 오면 活性酸素가 生成되어 酸化的 損傷을 입게 된다. 오존 耐성과 엽록체에서 H₂O₂ 除去system은 photosystem I → ferredoxin → NADPH → GSH → Ascorbate의 經路를 거치게 된다.¹⁾

오존은 植物의 種, 오존 濃度, 露出時間 等에 따라 葉肉細胞의 漂白化, 斑點形成, 色素의 變化, 壞疽現像 等이 나타난다. 오존은 氣孔을 통하여 葉肉細胞內로 들어가면 그곳에서 재빨리 溶解되어 superoxide anions(O₂⁻), hydroxyl radical(OH[·]), hydrogen peroxide(H₂O₂)와 같은 活性酸素로 변한다.²⁾ 酸化的 防禦機構에는 주로 SOD, catalase, peroxidase와 같은 酵素들이 作用하며 아스코브산, 페놀化合物, 글루타치온과 같은 低分子 物質이 活性酸素 除去劑로서 作用한다.³⁾ Hydroxyl radicals(OH[·])와 superoxide anion(O₂⁻)는 GSH

에 의하여 除去되며 글루타치온은 아스코브산과 함께 과산화수소를 除去하기 위하여 作用한다. 아스코브산은 ascorbate peroxidase(APOX)存在下에 H₂O₂와 反應하여 monodehydroascorbate radical을 生成하고 monodehydroascorbate reductase(MDHAR)에 의해 아스코브산으로 還元된다. Monodehydroascorbate radical은 dehydroascorbate reductase(DHAR)에 의해 dehydroascorbate로 變化함과 동시에 GSSG로 酸化되며 NADPH 存在하에서 glutathione reductase(GR)에 의해 GSH가 再生되는 일련의 과정을 가진다.⁴⁾

本 研究은 作物體에서 오존 誘發性 反應에 대하여 關聯된 抗酸化 酵素의 活性度 變化를 追跡하여 오존 耐性 植物體 開發 可能性을 檢證하기 위한 基礎資料를 얻기 위하여 遂行하였다.

材料 및 方法

植物體 生育 및 오존處理

오존처리를 위한 植物體는 小型 플라스틱 포트에 播種하여 일반 耕種法에 따라 30일간 生育시켰다. 오존의 處理는 30일간 一定하게 자란 植物體를 選定하여 상부가 열린 狀態로 오존발생장치(동아제약세라믹 사업부 제작)를 利用하여 各各 對照區(0ppm)와 0.2ppm정도로 5시간까지 燻蒸處理하고 時間별로 잎을 採取하여 급속 凍結시켜 -70℃에서 保管하면서 實驗에 使用하였다.

酵素 活性度 測定

오존의 處理時 抗酸化酵素의 活性도는 분광광도계(UV2, UNICAM사)로 다음과 같이 測定하였으며 蛋白質當 활성도로 나타내었다.

Ascorbate peroxidase(EC1.11.1.11)의 活性도는 5mM의 아스코브산과 10mM의 H₂O₂가 들어있는 反應溶液에 粗酵素液을 넣고 25℃에서 1분간의 吸光度變化(ΔA₂₉₀)를 測定하여 酸化된 아스코브산량을 酵素活性도로 나타내었다.⁷⁾

Monodehydroascorbate reductase(EC 1.6.5.4)의 活性도는 1mM의 NADH와 25mM의 아스코브산이 들어있는 反應溶液에 粗酵素液을 넣고 25℃에서 흡광도 변화(ΔA₃₄₀)를 측정하여 소모된 NADH량을 酵素活性도로 나타내었다.⁸⁾

Dehydroascorbate reductase(EC 1.8.5.1)의 活性도는 10mM의 GSH와 5mM의 dehydroascorbate가 들어있는 反應溶液에 粗酵素液을 添加하여 25℃에서 吸光度變化(ΔA₂₉₀)를 測定하여 生成된 아스코브산량을 酵素活性도로 計算하였다.⁹⁾

Glutathione reductase(EC1.6.4.2)의 活性도變化는 5mM의 GSSG와 2mM의 NADPH가 들어 있는 反應溶液에 粗酵素液을 넣고 25℃에서 NADPH의 소모에 의한 吸光度의 變化(ΔA₃₄₀)를 測定하여 酵素活性도로 나타내었다.⁶⁾

蛋白質 含量은 bovine serum albumin(BSA)을 標準物質로 하여 Bradford法¹⁰⁾에 따라 測定하였다.

電氣泳動

오존처리된 試料의 同位酵素의 活性밴드를 確認하기 위하여 Native PAGE(12.5% 젤)를 Phast system 電氣泳動裝置(Pharmacia Biotech사)를 利用하여 電氣泳動하였다. 활성 밴드의 염색은 Rao等⁶⁾의 方法을 使用하였으며 同一社의 Imagemaster 프로그램 (Imagemaster 1D)으로 活性밴드를 分析하였다.

항산화제의 含量 測定

抗酸化劑인 아스코브산과 還元型 글루타치온의 含量은 Law等¹¹⁾의 方法으로 5% m-인산으로 抽出하여 遠心分離하고 標準物質과 比較하여 含量을 各各 測定하였다.

아스코브산은 2,6-dichlorophenolindophenol과 2% thiourea, 2% 2,4-dinitrophenylhydrazine를 넣고 37℃에서 3시간 反應시켜 冷却하고 여기에 85% 黃酸溶液 1.25ml와 2,4-dinitrophenylhydrazine 0.25ml를 添加하고 30분간 反應시킨 후 520nm에서 測定하였다. 還元型 글루타치온의 測定은 4mM EDTA, 0.6mM 5,5-dithio-2-nitrobenzoic acid, 0.25mM NADPH, 1unit glutathione reductase가 들어 있는 0.1M 磷酸緩衝液(pH 7.5)에서 420nm의 吸光度를 測定하여 標準曲線으로 부터 각각의 含量을 換算하였다.

結果 및 考察

아스코브산의 含量 變化

低分子의 抗酸化物質인 아스코브산의 含量은 0.2ppm의 오존 처리시에 그림 1과 같이 두 品種 公히 오존처리 時間에 따라 점차 減少하는 傾向을 보이고 있어 활성산소 제거 시스템에 아스코브산이 직접 관련한다는 Tanaka等¹²⁾의 보고와 일치하는 경향이었다. 아스코브산은 오존의 無毒化작

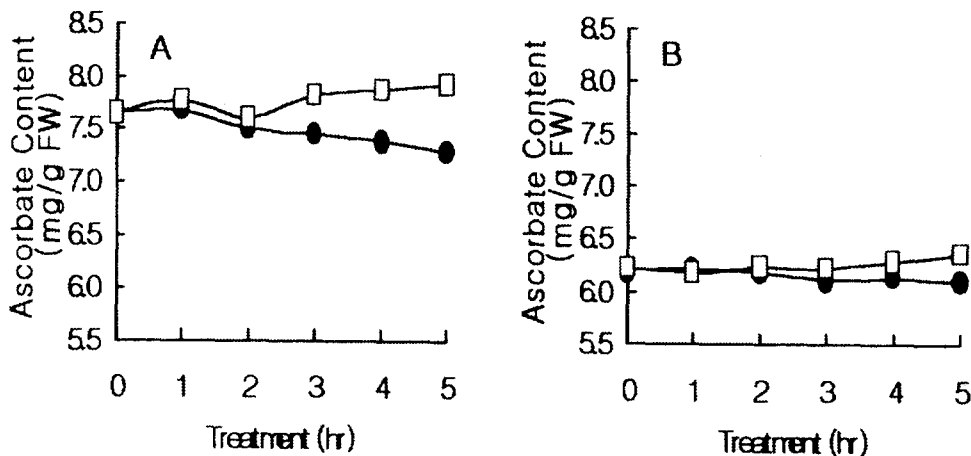


Fig. 1 Ascorbate content of eunhakong(A) and samnamkong(B) exposed to ozone of 0.2ppm for 5hrs. Ozone exposure was initiated when plants were 30d old. □-□ : control; ●-●: 0.2ppm O₃

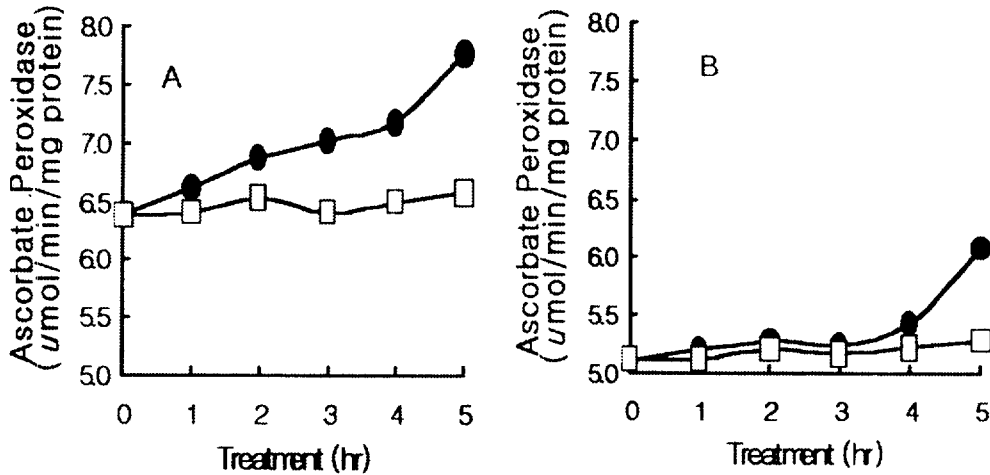


Fig 2 Ascorbate peroxidase activity of eunhakong(A) and samnamkong(B) exposed to ozone of 0.2ppm for 5hrs. Ozone exposure was initiated when plants were 30d old. □-□ : control; ●-●:0.2ppm O₃

용에 관련되어 있으며 酸化된 아스코브산은 光合成係에서 공급되는 還元力과 일련의 항산화물질 제거 시스템에 관련 해 있는 여러 가지 효소작용으로 계속적으로 再生되는 것으로 생각된다. 이는 아스코브산의 재생과정에 關聯된 여러 가지 酵素의 活性과 깊은 關係가 있는 것으로 推定되며, 특히 DHAR의 活性이 減少되므로 해서 APOX에 의해 酸化된 아스코브산의 再生이 完全하지 못한 結果로 推定할 수 있다. Tanaka等¹¹의 報告에 의하면 오존의 처리시에 아스코브산의 含量이 급격하게 減少하여 아스코브산이 오존의 毒性을 제거하는데 關여한다고 하였으며 還元型 글루타치온의 수준과 오존 耐性과도 밀접한 關聯을 가지고 있다고 하였다.

抗酸化 酵素의 活性度 變化

Ascorbate peroxidase(APOX)는 superoxide dismutase에 의해 生成된 過酸化水素를 아스코브산을 電子供與體로 하여 물로 分解시키는 酵素로서 오존의 處理와 같은 環境스트레스를 받았을 때 生成되는 活性酸素種을 除去하는 시스템에 關여하는 酵素이다. 오존처리를 하였을 때 그림 2에서와 같이 APOX의 活性은 은하콩의 경우는 그 活性이 계속해서 漸進的인 增加 傾向을 보였으며, 삼남콩에서는 처리 4시간 이후에 酵素活性이 급격하게 증가하는 傾向을 보여 은하콩이 삼남콩의 경우보다 오존에 대하여 더 敏感하게 反應한다는 사실을 알 수 있었다. 활성산소 제거 시스템에서는 오존에 대한 활성은 먼저 아스코브산이 먼저 직접적인 제거작용을 하는 것으로 보고되고 있고¹², 대두의 잎에서도 아스코브산의 含量이 계속해서 감소하는 傾向을 보이고 있다(그림 1). 組織內的 아스코브산의 濃度가 낮아지면 이를 再生하기 위한 過程을 거치게 되며 대두의 잎에서도 APOX 활성증가로 아스코브산의 濃度가 점차 減少함으로 이를 再生하기 위한 一聯의 酵素作用이 關與할 것이라는

報告¹²들과 一致하였다. Asada등¹²의 報告에 의하면 APOX는 항산화 시스템에서의 역할이 完全하게 밝혀져 있지 않으나 고등식물의 葉肉체와 세포질에 과산화수소의 제거에 중요한 역할을 하므로 오존에 노출된 대두의 잎에서 APOX의 활성증가는 식물체내에서 生成된 활성산소의 제거에 직접 關여함을 추정할 수 있다.

오존의 처리에 의한 APOX 동위효소의 활성 밴드를 확인하기 위하여 비변성 전기영동을 행한 結果는 그림 3과 같다. APOX동위효소는 대조구에서는 4개의 활성밴드가 확인되었으며 0.2ppm의 오존처리시 Rf 0.18위치의 새로운 밴드가 나타났고 0.48위치의 활성밴드가 강하게 나타났다. APOX활성 증가로 monodehydroascorbate(MDA)의 生成이 증가되고 이를 아스코브산으로 再生하는 過程에 關여하는 Monodehydroascorbate reductase(MDAR)는 NADH 存在下에 아스코브산으로 還元시키는 酵素로서 그림 4와 같이 두 品

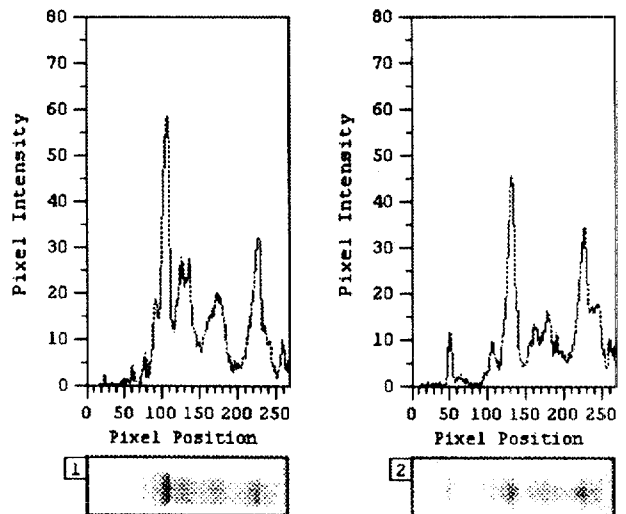


Fig. 3 Ascorbate peroxidase patterns exposed to ozone treated eunhakong leaves. 1:control ; 2: exposed to 0.2ppm of ozone

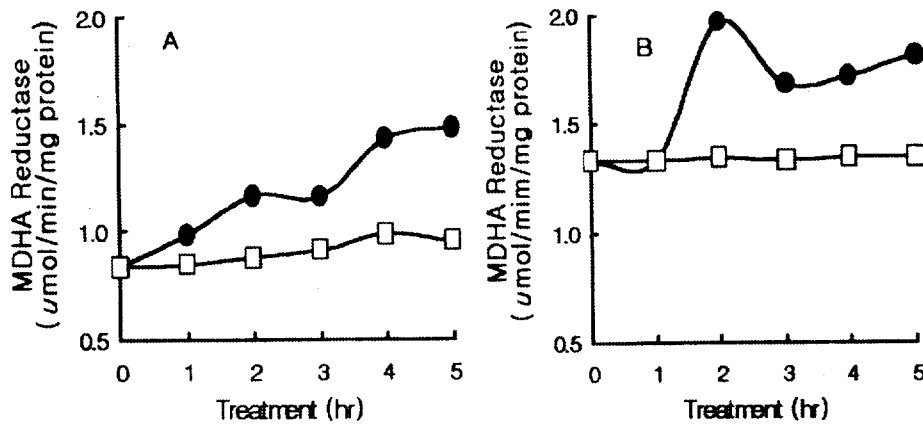


Fig 4 Monodehydroascorbate reductase activity of eunhakong(A) and samnamkong(B) exposed to ozone of 0.2ppm for 5hrs. Ozone exposure was initiated when plants were 30d old. □-□ : control; ●-●:0.2ppm O₃

種 공히 약간 그 활성이 증가하는 傾向을 보이고 있다. 삼 남콩의 境遇가 은하콩의 경우보다 2時間까지의 活性增加率 이 더 컸으며 그 以後에는 緩慢한 增加를 보이고 있다. 은 하콩은 처리 2시간 까지는 漸進的인 증가를 보이다가 다시 4시간처리 이후에 계속적으로 增加하는 경향을 보였다. 삼 남콩의 경우는 처리 2시간에 급격한 增加를 보이다가 그 이후에는 緩慢한 증가를 보여 은하콩과 삼남콩간에 오존에 대한 感受性이 각각 다르며 삼남콩의 경우가 대체적으로 높은 활성을 보였다.

이 結果는 처리 2時間 까지의 아스코브산의 含量 變化는 거의 일어나지 않다가 2시간 이후부터 서서히 減少하는 傾向(그림 1참조)을 보이고 있으며 이는 APOX의 活性의 增加로 因하여 아스코브산의 含量이 줄어들기 때문이라고 판단되며 MDHAR의 작용으로 아스코브산의 재생이 완전 하게 이루어지지 못하고 있다고 생각된다. 이를 補充해 주기 爲하여 MDHAR와 연속된 작용으로 NADH가 정상적 으로 공급되는 조건에서 DHAR가 작용하여 아스코브산으 로 재생되는 과정이 연속적으로 일어날 것이라 추정할 수

있다.

Dehydroascorbate reductase(DHAR)는 DHA를 아스코브酸으 로 還元시켜주는 酵素로서 그 變化는 그림 5와 같다. 오존 의 處理時에 DHAR의 活性은 오존을 처리하지 않은 대조 구보다 그 活性이 漸次 減少하는 傾向을 보이고 있다. 이 는 소모된 아스코브酸을 補充해 주는 一聯의 연속過程의 활성산소 제거시스템에 參與하기는 하나 實際 스트레스의 處理時에 阻害作用을 받는 것이 아닌가 생각된다. 이 결과 는 오존의 처리시 일정기간 동안은 광합성작용에 障碍를 받게되어 NADPH가 정상적으로 공급되지 못하기 때문으 로 생각된다.

Yolanda등¹³⁾과 Rao등⁶⁾의 報告에 의하면 生成된 過酸化水 素는 먼저 Ascorbate peroxidase의 作用을 받아 組織內의 아스코브酸을 酸化시켜서 물로 變하는 過程을 거치는데 이 때 生成된 MDA는 monodehydroascorbate reductase의 作用으 로 아스코브산으로 환원된다. 이 때 生成된 DHA는 DHA reductase의 作用으로 다시 아스코브酸을 再生하는 一聯의 過程을 거친다고 한다. 그러나 APOX의 活性이 增加하지

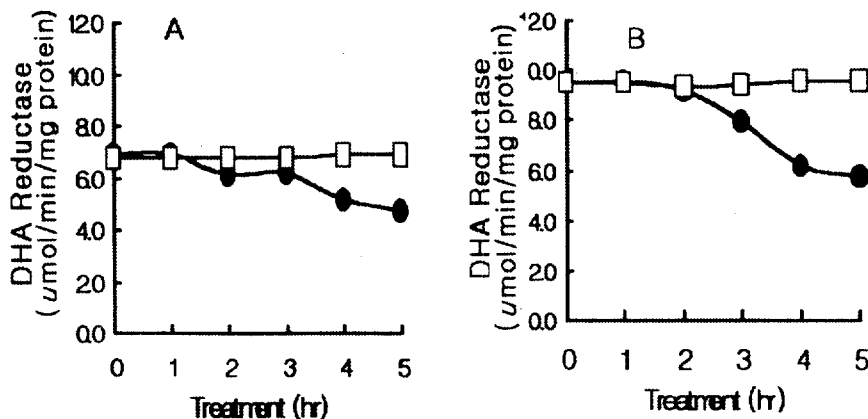


Fig 5 Dehydroascorbate reductase activity of eunhakong(A) and samnamkong(B) exposed to ozone of 0.2ppm for 5hrs. Ozone exposure was initiated when plants were 30d old. □-□ : control; ●-●:0.2ppm O₃

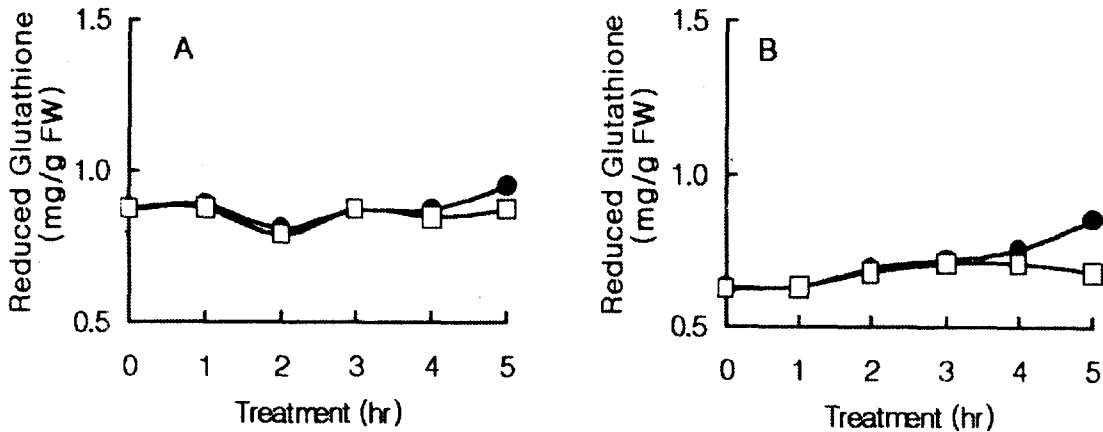


Fig. 6 Reduced Glutathione content of eunhakong(A) and samnamkong(B) exposed to ozone of 0.2ppm for 5hrs. Ozone exposure was initiated when plants were 30d old. □-□ : control; ●-●:0.2ppm O₃

만 DHAR의 활성은 오히려 감소하는 결과를 보이고 있다. 이는 활성산소 제거 시스템에서 APOX의 작용으로 생성된 MDHA가 DHA로 환원되기 전에 MDHA reductase에 의해 주로 재생되는 것이 아닌가 생각되며 DHA reductase는 Glutathione reductase와 더 밀접한 연속 과정을 거치는 것이 아닌가 생각되어 글루타치온의 함량과 GR의 활성을 측정하였다.

글루타치온의 함량 변화는 그림 6과 같이 두品種 공히 對照區와 差異를 나타내지 않았으며 4時間以後에 약간 그 함량이 증가하는 傾向을 보였다. 이 결과는 GR의 활성과 密接한 關係가 있을 것으로 推定되며, GR은 처리 3時間以後에 그 활성이 증가하는 傾向을 보이고 있으나 글루타치온의 함량은 그다지 큰 變化를 보이지 않으므로 역시 항산화작용에 관련되어 있는 것이 아닌가 사료된다.

글루타치온 還元酵素는 光合成 過程에서 생성되는 NADPH의 存在下에서 글루타치온을 還元시키는 酵素이며, NADPH의 存在量에 影響을 받는 酵素로서 오존의 處理시

에 活性度의 變化는 그림 7과 같다.

그림 7에 나타난 바와 같이 0.2ppm의 濃度를 處理하였을 때 은하공의 境遇는 處理 3時間 程度까지는 緩慢한 活性을 보이다가 3시간 以後부터는 急激하게 增加하는 傾向을 보였다. 삼남공의 境遇에는 處理 2時間 以後부터 緩慢한 증가를 보이고 있어 品種間 感受性의 差異로 因하여 酵素活性의 程度에도 약간의 差異를 보이고 있다.

Edward等¹⁴⁾에 의하면 글루타치온 還元酵素는 分子量이 약 55kD程度이고, 주로 葉綠體에 存在한다고 한다. 이는 光合成 作用으로부터 NADPH를 傳達받아 글루타치온을 還元시키는 效率을 增大하기 위한 것으로 光合成過程 中 發生되는 酸化的 損傷을 防止하는 것으로 이미 알려져 있는 事實이다.¹⁵⁾ 또한 글루타치온 還元酵素는 除草劑의 약한 致死濃度¹⁶⁾, 오존¹⁾과 같은 氣體酸化 物質의 存在시 發生되는 酸化的 損傷을 防止하는 役割을 한다고 알려져 있다.

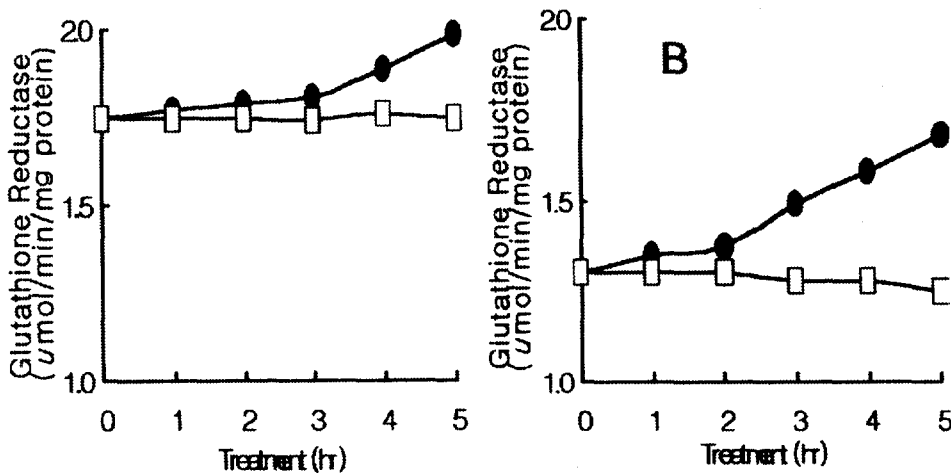


Fig. 7 Glutathione reductase activity of eunhakong(A) and samnamkong(B) exposed to ozone of 0.2ppm for 5hrs. Ozone exposure was initiated when plants were 30d old. □-□ : control; ●-●:0.2ppm O₃

요 약

오존의 처리에 의한 식물체의 항산화 제거 시스템에 관여하는 항산화효소의 활성도 변화를 조사한 결과는 다음과 같다.

低分子의 抗酸化物質인 아스코브산은 은하공과 삼남콩 공히 오존의 露出時間이 길어질수록 서서히 減少하는 傾向을 보였으며 還元形 글루타치온의 含量變化는 은하공에서는 거의 증가가 없었으나 삼남콩의 경우는 오존처리 1시간 以後부터 상당한 增加가 있었다. Ascorbate peroxidase의 活性度는 은하공에서는 오존처리 初期부터 서서히 增加하는 傾向을 보였으나 삼남콩의 경우는 처리 4시간 以後에 급격하게 증가하는 傾向을 보였다. Glutathione reductase 活性度는 은하공은 오존처리 3시간까지는 서서히 增加하다가 그 以後에 急激하게 增加하는 傾向이었으며, 삼남콩은 活性增加가 뚜렷하지 않았다. Dehydroascorbate reductase의 活性度는 두 品種 공히 오존처리시 對照區보다 活性이 낮게 나타났으며 처리 3시간 以後부터 活性이 크게 減少하였다.

Monodehydroascorbate reductase는 두 品種 공히 처리초기부터 活性增加가 뚜렷하게 나타났다. 삼남콩의 경우에는 2시간 處理시 急激한 增加를 보이다가 一定하게 維持되는 傾向을 나타내었다. 은하공의 Ascorbate peroxidase 同位酵素의 패턴변화는 0.2ppm의 오존의 處理시 5개의 활성 밴드가 확인되었고 Rf 0.18위치의 밴드가 새로 형성되었으며 Rf 0.38의 밴드가 약해지며 0.48위치의 활성 밴드가 강하게 나타났다.

참 고 문 헌

1. Tanaka, K., Y. Suda, N. Kondo and K. Sugahara(1985) O₃ tolerance and the Ascorbate-dependent H₂O₂ decomposing system in chloroplast. *Plant Cell Physiol.*, 26: 425~1431
2. Grimes, H.D., Perkins L.K. and Boss W.F.(1983) Ozone degrades into hydroxyl radical under physiological conditions. A spin trapping study. *Plant Physiol.*, 72:1016~1020
3. Kanofsky J.R. and Sima P(1991). Singlet oxygen production from the reactios of ozone with biological molecules. *J. Biol. Chem.*, 266:9039~9042
4. Bowler C., Van Montagu M. and Inze D(1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 43: 83~116
5. Alscher R.G. and Hess J.L., eds(1993). Antioxidants in higher plants, CRC Press, Boca Raton, FL.
6. Rao, M.V., G. Paliyath and D. P. Ormrod(1996). Ultraviolet B and ozone induced biochemical changes antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 110: 125 ~ 136
7. Asada, K(1984). Chloroplast : formation of active oxygen and its scavenging. *Methods in Enzymol.*, 105 :422~429
8. Dalton D. A. L. Langeberg, and N.C. Treneman(1993). Correlations between the ascorbate-glutathione pathway and effectiveness in legume root nodules. *Physiol. Plant* 87 : 365 ~370
9. Nakano Y. and K. Asada(1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant Cell Physiol.*, 22 : 867 ~ 880
10. 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
11. Law, M. Y., S. A. Charles and B. Halliwell(1983). Glutathione and ascorbic acid in spinach chloroplasts. *Biochem. J.* 210 : 899~903
12. Asada, K(1992). Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant* 85: 235 ~241
13. 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
14. Edward, E. A., S. Rawsthorne and P. M. Mullineaux(1990). Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea(*Pisum sativum* L.) *Planta* 180: 278~284
15. Foyer, C. and B. Halliwell(1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast : a proposed role in ascorbate metabolism. *Planta* 133 : 21 ~ 25
16. Knuert, K. J. and A.D. Dodge(1984). Herbicide induced radical damage and antioxidant systems, In Target sites of herbicide action. Boger, P.H. Sandmann, H. eds. CRC press, Boca Raton Fla., USA