Journal of Life Science **2005**, Vol. 15. No. 2. 311~315 ©JLS

제초제 Paraquat의 전자수용 및 방출에 대한 영향

김미림* · 최경호[1]

대구한의대학교 식품조리영양학부, [1]대구가톨릭대학교 식품영양학과

Received March 29, 2005 / Accepted April 20, 2005

Effect of Herbicide Paraquat on Electron Donor and Acceptor. Mi-Lim Kim* and Kyung-Ho Choi[1]. *Faculty of Cuisine & Nutrition, Daegu Haany University, Kyoungsan-si, Kyoungbuk 712-240, Korea, [1]Department of Food Science and Nutrition, Daegu Catholic University, Hayang-eup, Kyoungsan-Kun, Kyoungbuk 713-702, Korea* – When paraquat was added to the bacterial membrane or mitochondrial suspension, the mixture turned dark blue, but the color was disappeared by aeration. The same phenomenon was seen when electrons were supplied to the paraquat. Blue color appeared from near the cathode, and then spreaded to whole transit system. Coloration was accelerated by addition of alkali, but the color was reduced by addition of acid or oxygen. Paraquat exhibited absorption at ultraviolet region by electron tranfer at the concentrations as low as 1.0 mM which did not exert difficulty in showing color reaction. Paraquat caused the increase of the optical density at 340 nm by electron transit, and an aspect of that had a strong resemblance to NADH. The acute toxic action of paraquat seemes to depend on inhibition of energy metabolism cased by paraquat action of electron donor and acceptor.

Key words – Paraquat, electron, donor, acceptor

Paraquat는 비선택성의 속효성 제초제로 생체세포에 대한 독작용은 SOD활성저해에 기인한 지질과산화물의 축적[4,5,8,10,11,12,13,20]에 있으나 그 독작용이 확대 해석되고 있는 바, glutathione과의 복합체 형성[16], paraquat에 의한 collagen의 증가[1], tryptophan에서 niacin으로의 전환율 감소 및 NAD합성저해[22], acetylcholinesterase의 활성저해[23,24] 및 돌연변이 유발[28]등이 보고되고 있으며, paraquat 독성에 대한 면역학적 치료제인 항체 생산에 대한 연구도 행해지고 있다[2,18,21].

Paraquat의 전자전달에 대한 관련성의 연구로는 Liochev [2]등이 paraquat에 의한 전자흐름의 이상을 보고한바 있고, paraquat가 산화 및 환원 복합체를 가속시킨다는 연구[25] 및 paraguat의 전자공여체로서의 작용[9,19] 등의 보고가 있다.

그러나, 이러한 paraquat의 전자전달 매체로서의 성질이 세포내 에너지 대사과정 중 연속된 전자전달계로 구성되어 있는 cytochrome 호흡쇄에 미치는 영향에 대해서는 연구가 미흡하다.

paraquat가 생체내 이화작용에서 생성되는 전자를 흡수한다면 cytochrome 호흡쇄로의 전자의 흐름에 이상을 초래할 수 있을 것이며 이것은 paraquat의 급성독성의 기작으로 이해될 수 있을 것이다.

따라서 본연구는 paraquat의 전자수용 및 방출의 기능을 검토하여 생체내의 전자전달계에 미칠 수 있는 paraquat의 영향을 검토 하였다.

*Corresponding author
Tel : +82-53-819-1593, Fax : +82-53-819-1272
E-mail : mlk8742@dhu.ac.kr

재료 및 방법

Mitochondria 분리

정상의 쥐(sprague-dawley종 수컷 흰쥐)로부터 채취한 간조직을 0.9% saline 용액으로 세척한 후 빙냉한 0.15 M의 KCl 용액에서 잘게 절편한 후 teflon glass homogenizer를 사용하여 10%(w/v)의 간조직 균질액을 만들었다. 이 마쇄 균질액을 600 g에서 10분간 2회 원심분리(4℃, 600×g×10 min)하여 조직의 미마쇄 획분 및 원형질 막 획분을 제거하고 가아제로 여과한 후 2회 원심분리(4℃, 10,000×g×20 min)하여 얻은 침전물을 mitochondria획분으로 하였다. Mitochondria 획분은 ml당 57 mg의 protein을 함유하였다.

전자수용 및 방출의 반응계

Paraquat 와 NAD의 전자수용 및 방출에 대한 비교실험은 photo cell에 0.1 mA의 전류가 흐르도록 동선전극을 장치하고 반응액에 잔존하는 proton의 흡수제로는 sodium hydroxide를, 전해질로는 silver nitrate를 사용한 반응계로 행하였다.

전자수용반응은 여기에 1.0 mM의 paraquat 혹은 NAD를 넣고 전류를 통하면서 전자수용에 따른 340 nm에서의 흡광도 증가현상을 측정하였으며 전자방출은 동일조건의 photo cell에 1.0 mM의 paraquat를 넣고 전류를 통하여 청색으로 발색시킨 후 proton 및 발생기 산소와 분자상태의 산소는 hydroperoxide에 catalase를 넣어 생성된 산소를 미세관을 통하여 photo cell에 연결시켜 주입하였다. 반응은 U.V.분광광도계(Ultraviolet Spectrophoto- meter. CECIL)로 340 nm 및 660 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

Paraquat의 전자포획 및 방출

Paraquat의 전자포획

Mitochondria를 이용해서 paraquat와의 작용을 검토하는 과정에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

Plate 1의 A에서와 같이 투명한 mitochondria액에 1.0 mM 이상의 paraquat를 첨가한 결과 육안으로도 식별 가능한 청색의 발색현상이 확인되었다. 이러한 발색현상을 해석하기 위해 전극을 설치한 photo cell에 1.0 mM의 paraquat를 넣고 0.1 mA의 전류를 통하는 실험을 행한 결과 사진의 B와 같이 음극으로부터 청색으로 발색되기 시작하여 전반적으로 청색화됨을 관찰할 수 있었다.

Paraquat에 의한 산화-환원반응의 가속화 경향은 mitochondria와 paraquat가 반응해서 청색으로 발색되는 현상으로부터 해석될 수 있는 바, paraquat가 전자를 포획한 결과로 판단되었다. Mitochondria와 paraquat와의 반응에 의한 청색화 현상은 mitochondria에서의 물질대사 과정중 발생된 electron을 paraquat가 포획한 결과로 판단된다.

Paraquat와 NAD^+의 전자포획 비교

농도별 paraquat에 1.5 V의 전류를 10분간 처리한 후 340 nm에서의 흡광도 변화를 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. Paraquat농도가 1.0 mM이하인 경우는 전자포획에 의한 흡광도 증가가 거의 없었으나 1.0 mM이상에서는 전자를 포획하여 흡광도가 직선적으로 증가하였다.

1.0 mM의 NAD와 paraquat에 대한 동일한 통전실험을 행하여 경시적으로 340 nm에서의 흡광도 변화를 비교 측정한 결과는 Fig. 2와 같다.

Paraquat와 NAD^+에 전자를 공급함으로써 수용액 중에 있는 proton을 흡수하여 340 nm에서 흡광도가 증가 하는 현상이 확인 되었으며 그 경향이 두 물질에 있어서 매우 유사하였다. 차이는 NAD^+는 거의 직선적인 증가를 하였으나

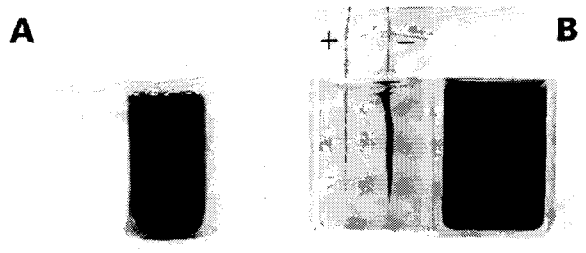

plate 1. Coloring of paraquat by mixing with mitochondria and electron transit.
Paraquat changed into dark blue by mixing with mitochondria suspension in photo A. Same phenomenon appeared by electron transit in photo B and it started at the cathode. Paraquat concentration : 100 mM, Electric source : DC 1.5 volt.

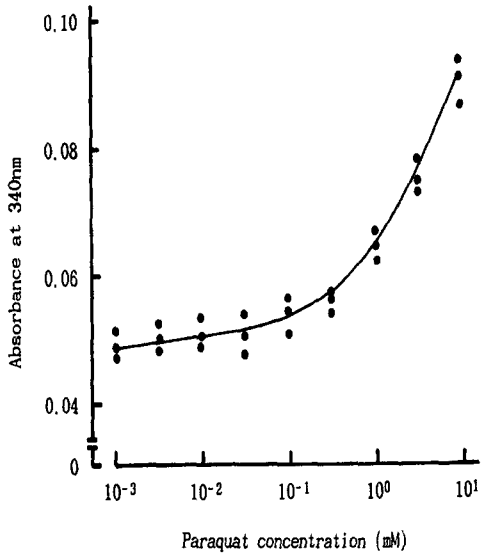

Fig. 1. Relationship between optical density increase and paraquat concentration by electron transit.
Electrons were supplied for 10 minutes to aqueous paraquat solutions by using an electric cell.

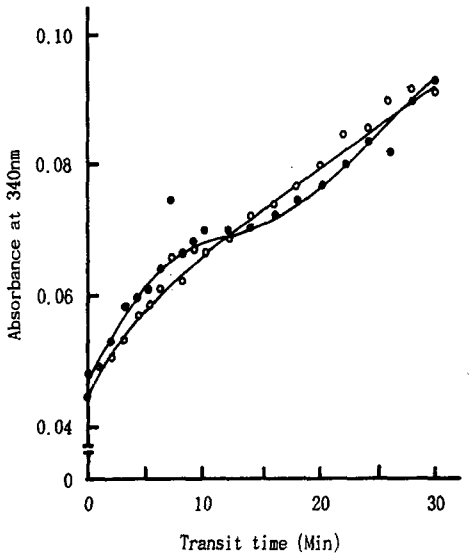

Fig. 2. Electron absorption and optical density increase of NAD+ and paraquat by electron transit.
Electrons were supplied to 1.0 mM NAD+ and paraquat in an electric cell. The cell used DC 1.5 volt as electron source, copper thread as electrodes, 0.2 mM AgNO3 as electron carrier and 2.0 mM NaOH as proton absorber. Both electrode had 1.0 cm distance. Symbols are O-O : for NAD+ and ●-● : for paraquat.

paraquat는 통전 후 약 12분경에 변곡점을 가지는 증가를 볼 수 있었다. 이것은 NAD가 electron을 받아들일 수 있는 Nitrogen+이온이 한 개인데 비하여 paraquat는 2개가 존재하기 때문인 것으로 판단된다.

Paraquat의 electron포획은 paraquat의 식물에 대한 제초

효과가 광합성에 의해 생성되는 electron을 paraquat가 흡수함으로서 시발된다는 것과 Liochev[22]등 과 Simon[22]등이 paraquat에 의한 redox-cycle의 activation을 보고한 바와 일치되는 결과이다.

또한 Paraquat와 NAD가 전자를 포획함에 있어서 서로 경쟁적인 관계라고 판단되며, 만약 paraquat가 전자를 포획만하고 다른 물질에 넘겨줄 수 없다면 NAD(H)의 산화 및 환원반응 중 어느 한쪽은 가속되나 다른 한쪽은 가속되지 않을 가능성이 있다. 그러나 두 반응 모두 가속된 결과로 봐서 electron을 포획한 다음 다른 물질에 넘겨줄 수도 있다고 판단되며 Frank[7]도 paraquat의 전자포획과 방출에 대한 가능성을 언급하였다.

또한 paraquat의 전자포획 및 방출기능을 이용하여 Klier 등[16]은 paraquat의 독성에 영향을 받지 않은 일부 균주를 이용하여 electrochemical cell에서 paraquat (methyl viologen: MV^+)와 수소를 공급하여 dihydrooxazine의 N-O bond를 환원적으로 절단하여 amino cyclitol을 합성하는 방법이 화학합성법 보다 효과적임을 보고하였으며 Braun 등[3], Thanos 등[26] 및 Tidswell 등[27]도 paraquat 내성의 혐기적 세균 (*Clostridium*)을 이용하여 유사한 결과를 보고하였다.

Paraquat의 전자포획 및 방출

Paraquat에 전자를 넣고 전류를 통하여 발색되는 전자포획 현상을 청색의 특이 흡광파장인 660 nm에서 timer scanning하여 추적한 결과는 Fig. 3과 같다.

Fig. 3 A의 경우 paraquat만 넣고 전류를 흘린 결과 초기 5~10분 사이에 대단히 심한 흡광도 변화를 볼 수 있으며 이후 비교적 안정되는 경향이었다. 이러한 초기의 흡광도 변화의 원인이 paraquat이외의 친 전자성 물질의 공존에 의한, paraquat와의 전자포획의 투쟁에 의한 결과로 판단하고 NaOH를 반응 초기에 첨가하여 친 전자성 물질을 제거한 결과 Fig. 3 B에서와 같이 초기의 불안정한 흡광도 변화는 없어지고 직선적인 흡광도 증가 현상을 볼 수 있었다.

이러한 현상은 paraquat가 음극으로부터 직접 전자를 받아 간다는 Plate 1과 일치되는 결과이다. 그리고 NAD(H)산화 및 환원에 대한 효소반응의 결과에서 paraquat에 의한 가속화 현상이 paraquat가 전자를 포획할 뿐만 아니라 다른 물질에 전자를 공급할 수도 있다는 판단아래 B의 ↓지점에서 proton을 첨가한 결과 첨가직후부터 격렬한 수소gas발생과 함께 흡광도가 일직선으로 감소하는 것을 볼 수 있었다. 이 결과로부터 paraquat는 전자를 포획할 뿐만 아니라 다른 물질에 전자를 넘겨줄 수도 있다는 것이 확인되었다.

또한 paraquat의 독성이 산소 의존성이라는 점에서 paraquat가 산소에 직접 전자를 넘겨줄 수 있는지를 확인하기 위한 실험의 결과는 Fig. 4와 같다. 전자를 공급하여 청색으로 발색된 paraquat에 발생기 산소 및 분자상태의 산소를 공급한 결과 두 경우 모두 급격한 흡광도 감소현상을 볼 수 있었다. 이상의 결과로 부터 paraquat는 전자를 포획할 뿐만 아니라 수소 및 산소에 전자를 넘겨줄 수 있음이 확인되었다.

효소를 매개로 하지 않은 경우에도 paraquat와 NADH간에 전자포획을 위한 경쟁적 반응이 일어날 수 있다는 가능성이 Fig. 5의 결과로부터 제시되었다. 즉 NADH와 paraquat의 혼합액에서 불안정하고 불규칙한 흡광도 변화가 확인 되

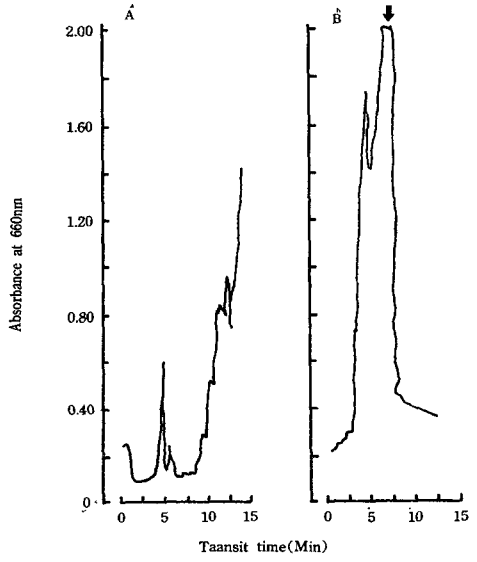

Fig. 3. Paraquat action as a spontaneous electron acceptor and donor.
Electron was supplied to the paraquat in Fig. A and B. Especially in photo B, an alkaline paraquat solution was used. Hydrochloride (0.1 M, 0.1 ml) was added at the arrowed time.

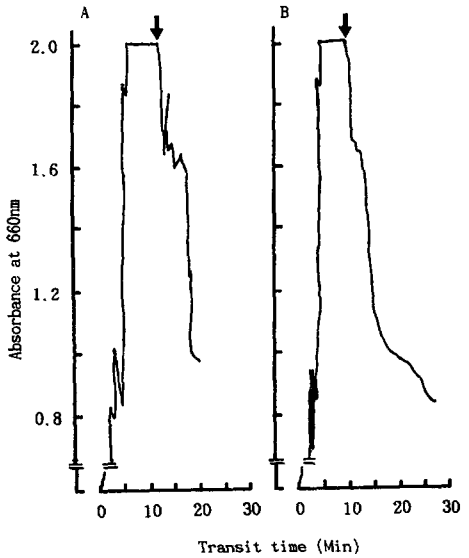

Fig. 4. Paraquat action as an electron donor to oxygen.
During electron transit to alkaline paraquat solution, hydrogen peroxide and molecular oxygen was added at the arrowed time in Fig. A and B, respectively.

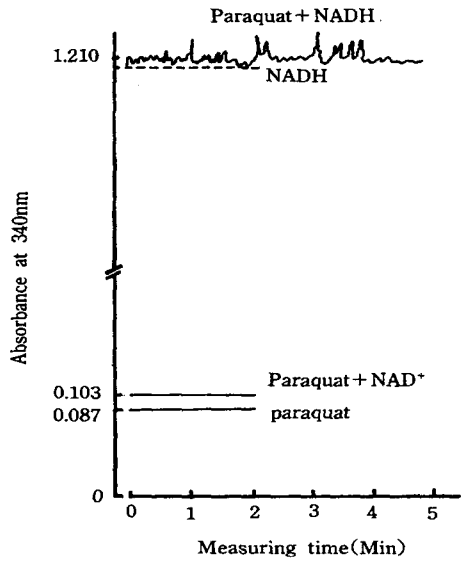

Fig. 5. Turbidometric behavior of paraquat-NADH mixture
Reaction mixture was composed of NADH (10 mM) and paraquat (1.0 mM) in glycine buffer.

었으며 이는 NADH와 paraquat간에 전자가 직접 출입된다는 것을 단정적으로 결론 지을수는 없으나 NADH와 paraquat 사이에는 경쟁적인 반응이 일어나고 있는 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합하면 Paraquat가 생체내의 catabolic pathway에서 생성된 전자를 포획하여 산화형의 Paraquat가 환원형으로 바뀌어 660 nm에서 높은 흡광도를 나타내는 구조가 되며, 이는 cyctochrome호흡쇄를 거치지 않고 산소 등에 직접 electron을 넘겨주고 자신은 다시 electron을 받을 수 있는 산화형이 될 수 있는 것으로 판단된다. 산소에 electron을 넘겨줌으로써 superoxide radical들이 다량 생성되고 정상적인 상태에서는 SOD에 의하여 superoxide radical들이 처리되어지나 paraquat에 의해 SOD가 직접적인 저해를 받음[15]으로써 superoxide radical들이 해독작용을 받지 못하고 막의 불포화 지질에 작용하여 지질 과산화물을 축적[14]함으로써 독작용을 나타내는 것으로 추정된다. 그러나 지질 과산화물이 만들어져 생체가 사멸하기까지는 상당한 시간을 요할 것이다. 그러나 paraquat가 산화환원반응에서 포획한 전자를 산소와 같은 물질에 직접 넘겨줌으로서 cytochrome 호흡쇄로의 단계별 전자전달계가 차단된다면 산화적 인산화가 저해되어 생물체에 있어서 SOD 활성저해 이전의 paraquat에 의한 급성독성으로 나타날 것이라 판단된다.

요 약

Pparaquat의 전자수용 및 방출에 대한 작용을 검토한 결과는 다음과 같다. Rat mitocondria 분산액에 paraquat를 첨가하였을 때 반응액이 청색으로 변색되었으며 Aluminium 箔 또는 銅전극을 장치한 photo cell중에서 paraquat에 전류를 통한 경우에도 음극에서부터 청색으로 변색되기 시작하여 660 nm에서 높은 흡광도를 나타내었다. 이 착색반응은 반응액에 산소를 첨가함으로서 탈색되었다. Paraquat에 H^+을 첨가하고 전류를 통한 결과 340 nm에서의 흡광도가 증가되었으며 경시적인 흡광도 증가의 모양은 NAD^+에 전류를 통한 경우와 거의 일치하였다.

이상의 결과로부터 paraquat가 전자를 수용 또는 방출할 수 있음이 확인되었고 이러한 paraquat의 작용이 생체내에 이화작용에서 생성되는 전자를 포획하고 산소에 직접 넘겨줌으로써 cytochrome 호흡쇄로의 단계별 전자전달계가 차단되어 급성독성을 일으키는 요인으로 추정된다.

참 고 문 헌

1. Bhatnagar, R. S. and Hussaim, M. Z. 1979. Involvement of superoxide in the paraquat-induced enhancement of lung collagen synthesis in organ culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **819**, 71-76.
2. Bowles, M.R., Mulbern, T. D., Gordon, R. B., Inglis, H. R., Sharpe, I. A., Cogill, J. L. and Pond, S. M. 1997. Herbicide-specific single chain antibody engineering for use in poisoning therapy. *J. Biochem.* **122(1)**, 101-108.
3. Thanos I. C. G. and Simon, H. 1987. Electro-enzymic viologen-mediated streospecefic reduction of 2-enoates with free and immobilized enoate reductase on cellulose filters or modified carbon electrodes. *J. Biotechnol.* **6(1)**, 13-29.
4. Bus, J. S. Aust, S. D. and Gibson, J. E. 1975. A possible mechanism for paraquat toxicity. *Res. Commun. Pathol. Pharmacol.* **31**, 31-38.
5. Chun, J. C., Ma, S. Y., Kim, S. E. and Lee, H. J 1997. Physiological responses of *Rhehmannia glutinosa* to paraquat and its tolerance mechanism. *Pestic. Biochem. Physiol.* **59**, 51-63.
6. Cserhati, T. and Valko, K. 1991. Interaction of diquat and paraquat with glutathione studied by means of charge-transfer chromatography. *J. Liq. Chromatogry.* **14(20)**, 3657-3671.
7. Frank,D. M. F., Arora, P. K.,Blumer,J. L. and Sayre, L. M. 1987. Model study on the bioreduction of paraquat, Mpp^+, and analogs. evidence against a "Redox cycling" mechanism in mptp neurotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. commun.* **147(3)**, 1095-1104.
8. Fuerst, E. P. and Vaughn, K. C. 1990. Mechanisms of paraquat resistance. *Weed Technol.* **4**, 150-156.
9. Günther, H., Neumann, S. and Simon, H. 1987. 2-Oxocarboxylate reductase from proteus specids and its use for the pre[aration of (2r)-hydroxy acids. *J. Biotechnol.* **5(1)**, 53-65.
10. Halliwell, B. 1978. Biochemical mechani는 accounting for toxic action of oxygen on living organisms : the sky role of superoxide dismutase. *Cell Biol. Int. Rep.* **2**, 113-128.
11. Harvey, B. M. R. and Harper, D. B. 1978. Mechanism of paraquat tolerance in perenial ryegrass : I .uptake, metabolism and translocation of paraquat. *Plant Cell Environ.* **1**,

203-209.

12. Harvey, B. M. R. and Harper, D. B. 1978. Mechanism of paraquat tolerance in perenial ryegrass : II. role of superoxide dismutase, catalase and peroxidase. *Plant Cell Environ.* **1**, 211-215.
13. Hassan, H. and Fridovich, I. 1978. Superoxide radical and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquaton *E. coli. J. Biol. chem.* **253**, 8143-8148.
14. Kim, C. S. and Choi, K. H. 1991. Effect of paraquat treatment on fatty acid compasition of menbrane lipids of *Bacillus megaterium* and *Saccharomyces cerevisiae. Hyosung j. Appl. Sci.* 53-61.
15. Kim, M. L. and Choi, K. H. 1994. Inhibitory action of the paraquat on Superoxide dismutase of *Escherichia coli. J. Korean Soc. Food Nutr.* **23(5)**, 849-855.
16. Klier, K., Kresze, G., Werbitzky, O. and Simon, H. 1987. The microbial redutive splitting of the N-O vond of dihydrooxazines; An alternative to the chemical reduction. *Tetrahedron letters.* **28(24)**, 2677-2680.
17. Liochev, S. and Fridovich, I. 1986. Vanate-stimulated oxidation of NAD(P)H by biomembrane is a superoxid e-initiated radical chain reaction, *Arch. Biochem. Biophys.* **250**, 139-145.
18. Murray, K., Gull, K. and Dickson, A. J. 1995. Dichloroactate increases cell and product yields in hybridoma batchcultures improved production of anti-paraquat monoclonal antibody. *Biochem. Soc. Trans.* **23(4)**, 585s.
19. Neumann, S., Güter. and Simon, H. 1984. On a Non-pyridine nucleotide-dependent 2-oxo acid reducrase with extremely broad substrate specificity. *Eur. Congr. Biotechnol.* **1**, 377-382.
20. Norman, M. A. and Fuerst, E. P. 1997. Interactions of cations with paraquat in leaf sections of resistant and sensitive biotypes of Conyza bonariensis. *Pestic. Biochem. Physiol.* **57**, 181-191.
21. Qi, Y. M., Greenfield, P. F. and Reid, S 1996. Evaluation of a simple protein-free medium that supports high levels of monoclonal antibody production. *Cytotechnol.* **21(2),** 95-109.
22. Shibata, K. and Iwai, K. 1988. Effect of dietary paraquat on the enzyme activies involved in tryptophan-niacin metabolism in rats. *Agric. Biol. Chem.* **50(1)**, 255-256.
23. Shinohara, T. and Seto, Y. 1986. In vitro inhibition of acetylchlinesterase by paraquat. *Agric. Biol. Chem.* **50(1)**, 255-256.
24. Shinohara, T. and Seto, Y. 1987. Inhibitory effects of paraquat and its related compound on the acetylcholinesterase activies of human erythrocytes. *Agric. Biol. Chem.* **51(8)**, 2131-2138.
25. Simon, H., Bader, J., Güther, H., Neumann, S. and Thanos, J. 1984. Biohydrogenation and electromicrobial and electronenzymatic reduction methods for the preparation of chiral compounds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **9**, 171-185.
26. Thanos I. C. G. and Simon, H. 1987. Electro-enzymic viologen-mediated streospecefic reduction of 2-enoates with free and immobilized enoate reductase on cellulose filters or modified carbon electrodes. *J. Biotechnol.* **6(1),** 13-29.
27. Tidswell, E. C., Thompson, A. N. and Gareth Morris, J. 1991. Selection in chemostat culture of a mutant strain of *Clostridium thiobutyricm* improved in its reduction of ketones, *J. Microbiol.* **35**, 317-322.
28. Vaishampayan, A. 1985. Muta genicity of bipyridilium salts in a N_2-fixing cyanobacterium. *Microbios.* **43**, 53-65.