

스테비아(*Stevia rebaudiana* Bertoni)에 있어서 유사미소중력, 진동 및 저온처리에 의한 항산화 활성 변화

최용상, 정문웅¹, 소용영, 한경식², 여읍동*

전북대학교 자연과학대학 생명과학과, ¹우석대학교 식품과학대학 외식산업조리학과, ²우석대학교 보건복지대학 화장품미용학과

Changes of Antioxidant Enzymes in Stevia Plants under Clinorotation, Shaking, and Low Temperature Stresses

Yongsang Choi, Munyhung Jung¹, Woong-Young Soh, Kyeongsik Han² and Up-Dong Yeo*

Department of Biological Science, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

¹Department of Food Science and Culinary Arts, Woosuk University, Samrye 565-701, Korea

²Department of Beauty and Cosmetics, College of Health and Welfare, Woosuk University, Samrye 565-701, Korea

Abstract - A medicinal herb, *Stevia rebaudiana* Bertoni which is grown under physical stresses such as simulated microgravity, shaking, and low temperature for 4 days, showed fresh weight decrease of 3.6%, 21% and 8.7% compared with the respective control. On control plants, the radical scavenging value of DPPH represented 86% and 55%, respectively in the leaves and stems extracts. Relatively weak antioxidant activities of 22% and 27% were measured respectively in AA (ascorbic acid) and BHA (beta-hydroxyacetic acid) known as synthetic antioxidants. The radical scavenging effect of DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazal) in stevia plants under a simulated microgravity was observed to be consistently higher relative to the control, whereas those effects of shaking and low temperature treatments rapidly increased and then reduced after 6 hours in case of shaking process and 24 hours in case of low temperature treatment, which results had similar levels of scavenging effects to the control. The plants under simulated microgravity showed the highest level of activity with the value of 147% and the shaking and low temperature treatments showed the increases of SOD activity by 121% and 125%, respectively. From the above results, it is clarified that the simulated microgravity is more effective to the antioxidant activity than those of other abiotic stresses.

Key words - Simulated microgravity, DPPH, SOD, Stevia plants

서 언

식물체는 급격한 온도변화, 진동 등 각종 환경스트레스를 받게 되면 생체내 산소는 전자와 반응하여 superoxide anion radical 등의 반응성이 높은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성하게 된다. ROS는 생체의 정상적인 대사과정에서도 어느 정도 발생하지만, 외부스트레스를 받게 되면 과다하게 생성된다. 또한 강한 산화력을 가지고 있어서 생리적으로 중요한 세포막 및 지질과 같이 세포 구성 요소에 유해한 물질의 유도체 생성으로 인한 식

물체 내 대사 작용의 방해(Foyer, 1993; Lee and Lee, 2000; Sim, *et al.*, 2010) 및 산화 스트레스가 유발되며 결국에는 작물의 생산성 감소와 같은 장해를 일으키게 된다(Bowler *et al.*, 1992). 이와 같이 과다한 ROS에 의해 받게 되는 산화 스트레스는 환경변화와 밀접한 관련을 갖게 된다.

토양에 고착생활을 하는 식물체는 다른 생물체보다 환경 스트레스에 대한 환경적응능력이 높다(Kang *et al.*, 2007). 특히 외부스트레스로 인하여 생성된 활성산소종에 대한 다양한 방어기작 중 superoxide dismutase(SOD), peroxidase(POD)와 같은 고분자 항산화물질과 ascorbate, vitamine C등과 같은 저분자 항산화 물질을 포함하는 복합 항산화

*교신저자(E-mail) : y520419@chonbuk.ac.kr

시스템은 산화적 스트레스에 대한 방어기작으로서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 SOD는 환원 산소종(O_2^-)을 과산화수소와 산소로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소로써, SOD에 의해서 유기된 과산화수소는 POD나 catalase(CAT)에 의해서 물 분자와 산소 분자로 분해됨으로써 과다한 활성 산소종에 의한 피해를 감소시키는 것으로 알려져 있다(Salin, 1991; Anderson *et al.*, 1995; Hong, 2009).

저온에 감수성이 있는 식물은 광 저해에 따른 광합성 저해, 엽록소 함량의 감소가 저온에 내성적인 식물에 비해 뚜렷하게 나타나는 것으로 알려져 있다(Wise and Naylor, 1987). 흑종 호박과 상추의 잎을 저온 처리시 대조구보다 높은 SOD 활성을 보인다는 연구결과를 비롯하여(Kang *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2007), 저온 처리된 상추 잎의 엽록소 함량은 대조구에 비해 현저히 감소한다는 결과가 보고되기도 하였다(Kang, 2008).

최근 우주비행사가 장기간에 걸쳐 우주환경에서 임무를 수행할 경우, 이들의 생활을 효과적으로 지원하기 위한 폐쇄환경시스템(closed ecological life support system)에 관한 연구가 진행되고 있다. 우주정거장과 같이 식물 생장의 최적조건을 갖춘 폐쇄환경시스템에서도 10^{-3} ~ 10^{-6} G(G: 중력가속도) 정도의 미소중력 환경요인은 감수해야 될 것이기 때문에 미소중력 스트레스에 의한 영양 생장 및 생식에 커다란 영향을 미치게 될 것이다(Kim, 2005). 이처럼 미소중력환경에서의 식물의 생장에 관한 연구에 앞서서 지상에서의 유사 미소중력 스트레스 환경에서의 식물체의 생육에 관한 연구가 필요하지만, 유사 미소중력하에서 식물의 항산화 활성에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

브라질과 파라과이와 같은 고산지대에서 자생하는 국화와 초본식물인 스테비아는 녹차보다 20배 높은 항산화 활성을 나타내고 있으며(Kim *et al.*, 2010), 다양한 폴리페놀의 함유현상(Park and Kim, 2003)이 확인된 바 있다. 따라서 본 연구는 스테비아의 생장과정에서 나타나는 저온 및 진동스트레스를 비롯한 유사 미소중력과 같은 심한 환경스트레스에 노출될 경우 항산화 활성 변화 및 내성에 대한 이해와 향후 환경스트레스 적응에 관한 문제를 해결할 수 있는 방안을 모색하는데 필요한 기초를 확립하고자 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 스트레스 처리

스테비아(*Stevia rebaudiana* Bertoni) 종자를 버미큘라이트 화분에서 발아시킨 후, 전북 완주군 소양면 일대 노지에서 4개월 재배하여, 지상부로부터 30 ± 3 cm 정도 성장한 식물체를 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 배양실에서 24시간 순화시킨 것을 세 가지 스트레스처리의 재료로 사용하였다. 이들 재료식물들은 $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 광조건 하에서 실험처리를 하였다.

- 1) 유사 미소중력 처리 : $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 온도조건에서 3D-Clinostat(Watanabe Machine Design Associates, Japan)에 탑재하여 120 rpm의 회전 속도로 6시간, 24시간, 48시간, 96시간 처리 재배하였다.
- 2) 진동처리군은 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 온도조건에서 150 rpm의 Shaker(VS-102, Vision Scientific Co., Ltd. Korea)에 탑재하여 6시간, 24시간, 48시간, 96시간 처리 재배하였다.
- 3) 저온 처리는 4°C 의 온도조건에서 Growth Chamber(VS-3DM, Vision Scientific Co., Ltd. Korea) 내에서 6시간, 24시간, 48시간, 96시간 처리 재배하였다. 채취된 시료(잎과 줄기)는, 액체질소를 이용하여 급속 동결시킨 후, 이를 3일 동안 동결건조기(FD-5505, Ilshin Lab Co., Ltd.)를 이용하여 건조시킨 후, 마쇄기(M20, IKA[®], Germany)로 분쇄시켰다. 분쇄된 시료는 -70°C 저온냉동고(MDF-4086S, Sanyo Co. Ltd., Japan)에 냉동 보관하여 에탄올(EtOH) 추출의 재료로 사용하였다.

에탄올 추출 방법

마쇄된 시료 0.2 g을 시험관에 넣고, 5 mL의 EtOH(99.5%)를 가하여 초음파추출기(1010R-DTH, Branson[®])로 30분 동안 추출한 후, 원심분리기(VS-5000N, Vision Scientific Co., Ltd. Korea)로 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 그 잔사(residue)는 전과 동일한 방법으로 2회 반복 추출한 것을 에탄올 추출액(15 mL)으로 하였다. 추출액은 -70°C 의 저온냉동 보관하였으며 이를 항산화 활성 측정의 시료로 사용하였다.

항산화 활성 측정

전자공여능(EDA)의 측정

각 추출물의 항산화 활성은 DPPH free radical 소거법에 의한 전자공여능(electron donating abilities, EDA)으로 평가하였다. 에탄올에 용해된 0.15 mM DPPH(2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl; D9132, Sigma, USA) 용액 1 mL에 에탄올로 6배 희석한 추출액 135 μ L를 혼합한 다음, 에탄올을 이용하여 총 용적을 6 mL로 조정, 잘 혼합시킨 후, 37°C의 항온수조에서 30분간 반응시켰다. 그 반응용액의 흡광도를 UV-Visible 분광기(Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech England)의 517 nm에서 측정하여, 전자공여능을 측정하였다. 대조구로는 1 mM의 BHA(Butylated Hydroxyanisole; B1253, Sigma, USA)와 ascorbic acid (L-ascorbic acid; A0278, Sigma, China)를 사용하였다. 측정된 DPPH radical 소거능을 다음 계산식에 의하여 전자공여능(electron donating activity, EDA)으로 나타내었다.

$$\text{Electron donating activity(EDA, \%)} = (1-A/B) \times 100$$

A : 시료 첨가군의 흡광

B : 대조군의 흡광

Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

각 추출물의 SOD 유사활성 측정은 Marsden(1958)의 방법에 따라 과산화수소(H₂O₂)로 전환 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하여 SOD 유사활성을 평가하였다. 추출물 시료 0.2 mL에 50 mM EDTA in tris-HCl buffer(pH 8.5) 3 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 가하여, 25°C에서 10분간 방치한 후, 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 정지시킨 후 반응액 중 산화된 pyrogallol의 생성량을 UV-Visible 분광기를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 SOD 유사활성은 다음 계산식에 의하여 나타내었다.

$$\text{SOD-liked activity(\%)} = (1-A/B) \times 100$$

A : 시료 첨가군의 흡광

B : 대조군의 흡광

엽록소합량 측정

총 엽록소합량 측정은 96시간 유사 미소중력 스트레스를 처리한 스테비아 식물체의 잎을 수확하여, 동결 건조 후 마쇄된 시료 0.2 g(d.m)을 100% acetone 5 mL를 가하여

혼합한 후, 2,000 rpm으로 10분 원심분리하여 얻은 상등 추출액의 흡광도를 UV-Visible 분광기(Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, England)를 이용하여 470, 664 및 648 nm에서 측정하여 Wellburn(1994)의 방법에 따라 계산하였다.

통계처리

모든 실험결과는 3회 반복 수행하여 얻었으며, SAS 패키지프로그램의 LSD(least significant difference) 검정으로 유의성을 확인하였다.

결과 및 고찰

스트레스에 의한 스테비아 생체중의 변화

생육에 적당한 온도(22°C)와 습도조건(70%)으로 관리한 대조구의 생체중은 증가한데 반하여, 저온, 진동 그리고 유사 미소중력스트레스에 노출된 스테비아 식물체의 생체중은 감소하는 경향을 보였다(Fig. 1). 대조구의 생체중은 실험개시 할 때 32.19 g에서 96시간 후에 36.89 g으로 14%가 증가한 반면, 저온과 진동 처리에서는 대조구 대비 3.6%와 2.1%의 감소를 보였으며, 유사 미소중력 처리구에서는 8.7% 현저히 감소하였다. 부위별 생체중 감소비율은 대조구에 비해 저온 및 진동처리된 잎에서는 2.1%, 5%가 감소한 반면, 줄기에서는 2.1%, 0.8%가 감소하였다. 이는 저온 환경스트레스 처리에 따른 토마토 유묘의 생체중 감소에

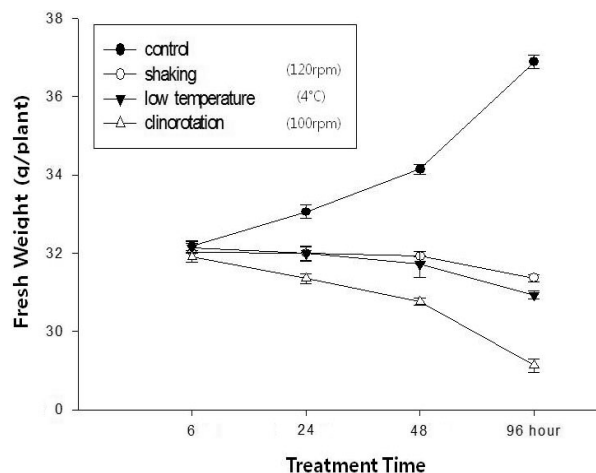


Fig. 1. Changes in the fresh weight of stevia after cold, shaking, and clinorotation stresses treatment. Vertical bar represent SE (n=3).

관한 연구결과와 유사하였다(Kang *et al.* 2007). 그러나 유사 미소중력 처리군의 경우 잎과 줄기 모두 대조구 대비 8.7%의 감소비율을 보여줌으로써, 스테비아는 저온 및 진동 스트레스보다는 유사미소중력에 더 많은 스트레스를 받고 있으며, 줄기 성장보다는 잎의 생장이 더 큰 영향을 받는 것을 알 수 있었다.

스트레스 처리에 의한 항산화 활성 변화

식물체내 산화과정에서 나타난 free radical의 일종인 EDA를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. EDA는 스테비아의 잎에서 가장 높게 나타났고 줄기의 EDA에서는 55%로 잎(86%)보다 31% 가량 낮은 EDA를 보여주었다. 그러므로 잎은 천연 항산화제인 ascorbic acid(22%)의 3.9배, 합성 항산화제인 BHA(27%) 보다 3.2배 높았다. 이상의 실험 결과는 큰 엉겅퀴의 경우 잎에서 DPPH radical 소거활성이 가장 높았다(Chon *et al.*, 2006)는 결과와 비슷하였다.

대부분의 식물에서 유래된 황산화성 물질들은 phenol류의 화합물로 알려져있다(Park and Jung, 2005). 본 연구에서 EDA가 우수한 스테비아 또한 phenol류의 화합물의 함량이 많았으므로, phenol류의 물질에 의하여 radical 소거능이 높아진 것으로 생각된다. 스테비아 추출물에서 70% 이상의 높은 항산화 활성을 보인다는 연구결과(Kim *et al.*, 2010)와 본 연구를 통하여 EDA가 우수한 것으로 밝혀진 스테비아는 항산화 물질 뿐만 아니라, 스테비오사이드와 같이 다양한 물질을 함유하고 있어서 천연항산화성 식

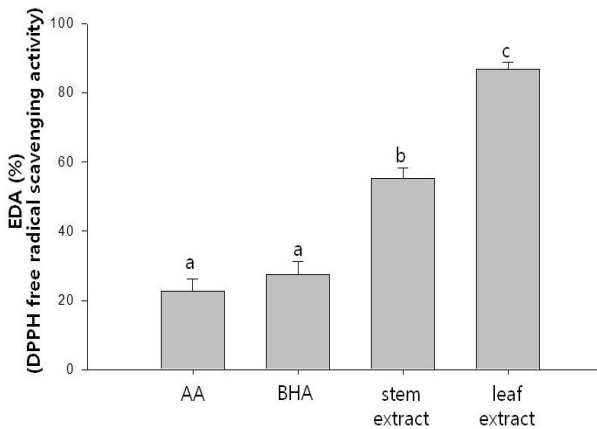


Fig. 2. DPPH free radical scavenging activity (EDA) of AA, BHA, stem and leaf extracts of stevia plants. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at 5% level.

물재료로 활용할 가치가 매우 높을 것으로 사료된다.

유사 미소중력과 같은 산화적 스트레스가 진행되는 동안 스테비아의 EDA는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 스테비아에 산화적 스트레스가 가해진 실험군의 경우 그렇지 않은 대조구에 비해 진동처리에서 132%, 저온처리에서 154% 그리고 유사 미소중력처리에서 163%로 EDA가 분명히 증가함을 확인할 수 있었다. 그러나 진동처리는 6시간(104%), 저온 처리시에는 24시간(102%) 이후부터 낮아져서 대조구와 유사한 소거능을 보여주었다. 다만 유사 미소중력 처리군의 경우에는 96시간(130%) 이후에도 계속해서 대조구보다 높은 EDA를 보여주었다. 이와 같은 결과는 산화 스트레스에 의한 EDA 역시 생체중 변화량과 마찬가지로, 저온 및 진동보다는 유사미소중력과 같은 특수한 스트레스에 더 큰 영향을 받는 것으로 판단되었다.

각종 스트레스에 의한 활성 산소종의 생성과 산화스트레스에 대한 연구는 토마토(Walker and McKersie, 1993), 오이(Wise and Naylor, 1987), 옥수수(Prasad *et al.*, 1994; Anderson *et al.*, 1995) 등에서 보고되었는데, 과산화수소나 환원 산소종의 급격한 증가가 산화 스트레스의 주된 요인으로 작용한다는 보고가 있었다(Kang *et al.*, 2003). 본 연구 결과에서도 산화적 스트레스 처리와 더불어 급격하게 증가하는 EDA는, 활성 산소종에 의한 산화스트레스가 재료 작물인 스테비아의 생리적 장애를 유발시키는 원인 중의 하나 일 것으로 생각된다. 그러나 유사 미소중력 스트레스에서 나타난 EDA는 진동 및 저온에 비해

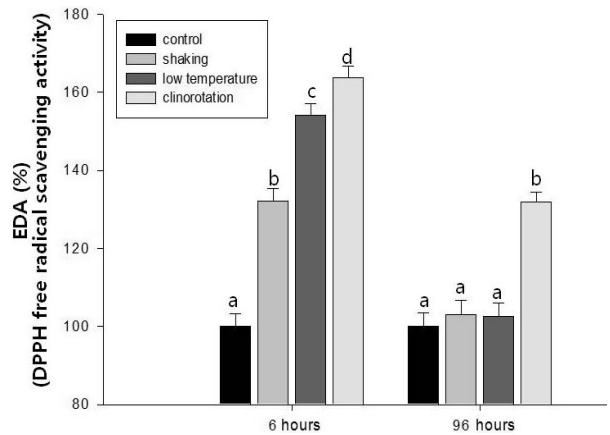


Fig. 3. Changes in EDA in the stevia leaves extracts by clinorotation, cold, and shaking stresses. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at 5% level.

훨씬 높은 수준으로 관찰되었다는 점은, 재료 작물인 스테비아가 진동 및 저온과 달리 유사 미소중력 환경에 대해 내성을 증진시키는 데 큰 역할을 했을 것으로 생각되어진다. 따라서 우주의 미소중력 환경에서 EDA가 얼마나 높게 나타나는가에 따라 산화 스트레스에 대한 식물체 내성을 증진시키고 우주환경에 적응하는데 밀접한 관련성이 있을 것으로 사료된다.

스트레스 처리에 의한 스테비아 잎의 SOD 유사활성 변화

자연의 항산화효소중의 하나인 superoxide dismutase (SOD)는 30KDa 이상의 분자량을 가진 단백질로서 체내에 쉽게 흡수되지 못하고 체외로 배출되며(Donnely *et al.*, 1989; Kim *et al.*, 1995), 열과 pH에 불안정한 특성(Korycka *et al.*, 1979)으로 인하여, SOD와 유사한 활성을 가지면서 SOD의 단점을 보완할 수 있는 SOD 유사활성 물질을 찾는 연구가 활발히 진행되고 있다(McKersie *et al.*, 1993; Bowler *et al.*, 1994; Lim *et al.*, 2004). 따라서 스테비아 추출물의 superoxide(O₂⁻) 산화억제작용을 알아보기 위해 superoxide와 반응하여 갈변물질을 나타내는 pyrogallol 자동산화반응을 측정하여 SOD 유사활성을 측정하였다(Marsden, 1958).

Fig. 4는 스테비아를 환경스트레스(저온, 진동, 미소중력)에 노출시킨 다음 에탄올 추출물의 SOD 유사활성을 측정 한 것으로 대부분의 농도 범위에서 대조구보다는 높은 SOD 유사활성을 보여주고 있었다. 저온 및 진동 스트레스에 96시간 노출된 실험군의 SOD 유사활성의 경우 대조구에 비하여 각각 125%, 121%가 증가한데 반하여, 유사 미소중력 처리구에서 가장 높은 147%가 증가함으로써, SOD 유사활성 역시 유사 미소중력 처리구에서 저온 및 진동처리 시 보다 17~21% 이상의 활성 증진을 확인할 수 있었다.

각종 불량 환경으로부터 인해 과다 생성된 SOD는 식물체내의 대사작용을 억제시키면서 과산화 수소와 물로 전환시키는 효소이며 환원 산소종에 대한 중요한 방어기작으로 알려져 있다. 이와 같은 SOD의 활성 증가를 통하여 저온과 건조를 포함한 불량 환경에 대한 내성 증진현상은 많은 원예작물에서 보고되었다(Shen *et al.*, 1999; Walker and McKersie, 1993; Wang, 1996). 특히 오이와 벼를 이용한 연구 결과에서 항산화 효소의 활성 증가와 저온에 대한 내성은 정의 상관이 있다는 사실이 확인되었으며(Saruyama and Tanida, 1995; Shen *et al.*, 1999), 이처럼 불량 환경

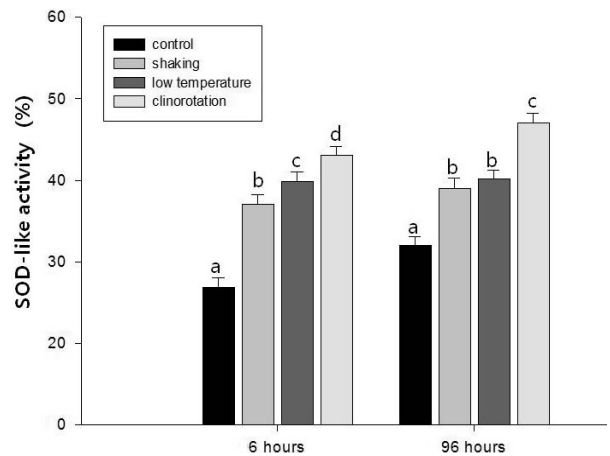


Fig. 4. Changes in SOD-like activity in the stevia leaves extracts by clinorotation, cold, and shaking stresses. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at 5% level.

에서 SOD의 발현이 일어난다는 사실로부터 환원 산소종으로 인한 장해를 줄일 수 있다는 가능성이 보고되고 각종 생리 장애에서 내성증진도 확인된 바 있다(Bowler *et al.*, 1994; McKersie *et al.*, 1993)

본 실험의 결과 저온 처리와 더불어 급격히 증가한 스테비아의 SOD 활성은 저온 스트레스에 의해 생성된 환원 산소종을 제거하여 정상적인 대사 작용을 유도함으로써, 저온내성을 증진시키는데 큰 역할을 했을 것으로 판단된다. 이를 토대로 유사 미소중력 스트레스에서 SOD 활성이 지속적으로 높게 유지된 것은 유사 미소중력 환경에 대한 내성과 관계가 있을 것으로 판단된다.

EDA와 SOD 소거능에 있어서 총 엽록소 함량에 따른 회귀

유사 미소중력 스트레스에 노출된 스테비아의 총 엽록소 함량에 따른 EDA(Fig. 5)와 SOD 소거능(Fig. 6)의 회귀관계를 나타낸 결과는 다음과 같다.

에탄올 추출물의 총 엽록소 함량의 증가에 따른, EDA (Fig. 5)와 SOD 유사활성(Fig. 6)의 회귀관계는, 총 엽록소 함량이 증가하면 EDA와 SOD 활성은 고도로 유의한 회귀직선($Y=14.82X-0.58$, $Y=7.49X+7.9$)을 보여주었고, 두 항목 다 같이 높은 결정계수($r^2=0.98$)를 나타내었다. 이와 같은 결과는 항산화 효소는 엽록체에 존재할 것임을 시사한다(Miyake, 2010). 따라서 스테비아 식물체는 유사 미소중력 환경에 대한 적응성 획득을 위하여 총 엽록소 함량

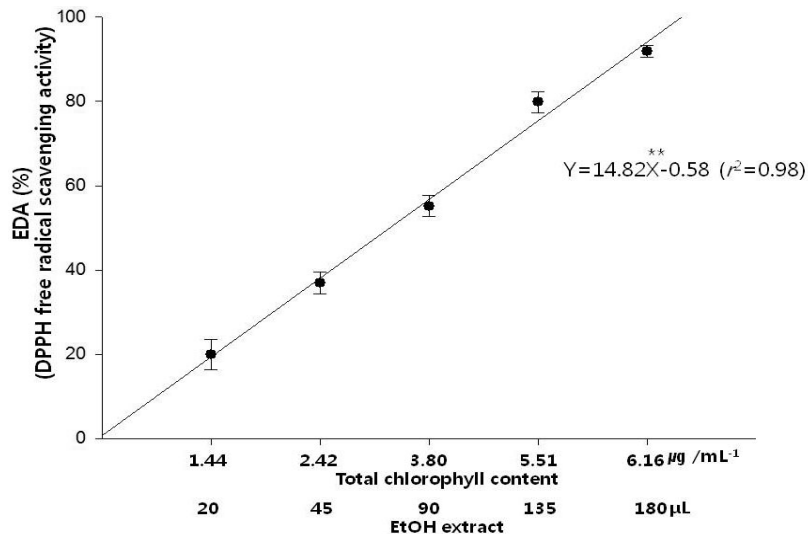


Fig. 5. A regression between EDA and total chlorophyll content in the stevia leaves extract under a simulated microgravity stress. Vertical bar represent SE (n=3). (***) represents significance at 1% level.

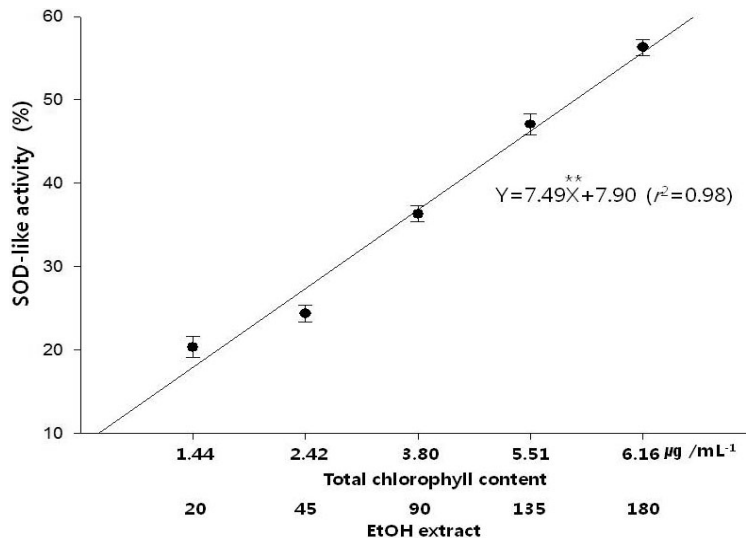


Fig. 6. A regression between SOD like activity and total chlorophyll content in the stevia leaves extract under a simulated microgravity stress.

Vertical bar represent SE (n=3). (***) represents significance at 1% level.

과 EDA와 SOD 활성과 같은 저항 메커니즘을 동시에 공유하는 것으로 추정된다.

적 요

유사미소중력, 진동 그리고 저온과 같은 물리적 스트레스 하에서 4일간 자란 약용식물인 스테비아(*Stevia rebaudiana* Bertoni)는 대조구에 비해 3.6%, 21% 그리고 8.7%의 생체

중량의 감소를 보였다. 합성 항산화물질인 AA(ascorbic acid)와 BHA(beta-hydroxyacetic acid)는 비교적 약한 22%와 27%의 항산화 활성을 보였다. 유사미소중력하에서 스테비아의 DPPH(2,2-diphenyl-1-picryl hydrazal)의 음이온 소거효과는 대조구보다 지속적으로 더 높게 나타났으나, 진동과 저온처리의 처리효과는 급히 증가했다가 진동의 경우는 6시간 후에 감소되고 저온처리의 경우는 24시간 후에 대조구 수준으로 감소되었다. 유사미소중력하에서

SOD활성은 대조구에 비해 147%, 진동과 저온처리는 각각 121%와 125%로 증가를 보였다. 이상의 결과로부터 유사미소중력스트레스는 다른 스트레스보다 스테비아의 항산화 활성에 더 효과적인 영향을 미치는 것이 분명해졌다.

인용문헌

- Anderson, M.D., T.K. Prasad and C.R. Stewart. 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol.* 109:1247-1257.
- Bowler, C., M. M. Van and D. Inze. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Plant Mol. Biol.* 43:83-116.
- Bowler, C., W. Van Camp, M. Can Montagu and D. Inze. 1994. Superoxide dismutase in plants. *CRC. Rev. Plant Sci.* 13: 199-218.
- Chon S.U., H.O. Boo and S.Y. Lee. 2006. Assessment on in vitro antioxidant properties of common thistle (*Cirsium pendulum* Fisch.) plant parts. *Korean J. Med. Crop Sci.* 14: 82-86.
- Donnelly, J.K., K.M. McLellan, J.L. Walker and D.S. Robinson. 1989. Superoxide dismutase in foods. A review. *Food Chem.* 33:243-270.
- Foyer, C.H. 1993. Ascorbic acid, *In* G. Alscher and J.L. Hess (eds.). *Antioxidants in higher plants.* CRC Press, Boca Raton, FL, USA. pp. 31-58.
- Hong, S.C., J.B. Jeong, G.H. Park, J.S. Kim, E.W. Seo and H.J. Jeong. 2009. Anti-oxidant Effect of *Agastache rugosa* on oxidative damage induced by H₂O₂ in NIH 3T3 cell. *Korean J. Plant Res.* 12:498-505.
- Kang N.J., J.K. Kwon, H.C. Rhee, H.B. Jeong and H.T. Kim. 2003. Antioxidant enzymes as defense mechanism against oxidative stress induced by chilling in *Cucurbita ficifolia* leaves. *J. Korean Soc. Hort. Sci.* 44:605-610 (in Korean).
- Kang, N.J., M.W. Cho, H.C. Rhee, Y.H. Choi and Y.C. Um. 2007. Differential responses of antioxidant enzymes on chilling and drought stress in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum* L.). *J. Bio-Environ. Control* 16:121-129 (in Korean).
- Kang, S.J. 2008. Response of ascorbate peroxidase and dehydroascorbate reductase in lettuce (*Lactuca sativa* L.) leaves exposed to cold stress. *J. Life Sci.* 18:1705-1711.
- Kim, J.H., N.K. Sung, S.K. Kwon, P.M. Jung, J.I. Choi, Y.H. Yoon, B.S. Son, T.Y. Yoon, H.J. Kee and J.W. Lee. 2010. Antioxidant activity of stevia leaf extracts prepared by various extraction methods. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39:313-318 (in Korean).
- Kim S.J., D.S. Han, K.D. Moon and J.S. Rhee. 1995. Measurement of superoxide dismutase-like activity of natural antioxidants. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59:822-826 (in Korean).
- Kim Y.H. 2005. Engineering approach to crop production in space. *J. Bio-Environ. Control.* 14:218-231 (in Korean).
- Korycka-Dahl M. T., T. Richardson and C.L. Hicks . 1979. Superoxide dismutase activity in bovine milk serum. *J. Food Protein* 42:867-871.
- Lee D.H. and C.B. Lee. 2000. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Sci.* 159:75-85 (in Korean).
- Lim J.A., Y.S. Na and S.H. Baek. 2004. Antioxidative activity and nitrite scavenging ability of ethanol extract from *Phyllostachys bambusoides*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36:306-310 (in Korean).
- Marsden S. B. 1958, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200.
- McKersie, B.D., Y.R. Chen, M. de Beus, S.R. Bowler, D. Inze, K. Halluin and J. Botterman. 1993. Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 103:1155-1163.
- Park G.H and K.M. Kim. 2003. Factors affecting plant regeneration in the culture of different explants of stevia (*Stebia rebaudiana* Bertoni). *Korean J. Plant Biotech.* 30: 151-154 (in Korean).
- Park S.I. and D.W. Jung. 2005. Effect of green tea powder on the growth inhibition of oral bacteria in yoghurt. *Korean J. Soc. Food Sci. Anim. Res.* 4:500-506 (in Korean).
- Prasad, T.K., M.D. Anderson, B.A. Martin and C.R. Stewart. 1994. Evidence for chilling induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6:65-74.
- Salin, M.L. 1991. Chloroplast and mitochondrial mechanism for protection against oxygen toxicity. *Free Radic. Res. Commun.* 12-13:851-858.
- Saruyama, H. and M. Tanida. 1995. Effect of chilling on activated oxygen-scavenging enzymes in low temperature-sensitive and tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.* 109:105-113.

- Shen, W., K. Nada and S. Tachibana. 1999. Effect of cold treatment on enzymic and nonenzymic antioxidant activities in leaves of chilling-tolerant and chilling-sensitive cucumber cultivars. *J. Japanese Soc. Hort. Sci.* 68:967-973.
- Sim, J.S., J.B. Jeong, J.H. Lee, Y.J. Cha and H.J. Jeong. 2010. Inhibitory effect of the phenolic compounds from apples against oxidative damage and inflammation. *Korean J. Plant Res.* 23:487-497 (in Korean).
- Walker, M.A. and B.D. McKersie. 1993. Role of the ascorbate-glutathione antioxidant system in chilling resistance of tomato. *J. Plant Physiol.* 141:234-239.
- Wang, C.Y. 1996. Temperature preconditioning affects ascorbate antioxidant system in chilled zucchini squash. *Postharvest Biol. Technol.* 8:29-36.
- Wellburn, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoidss, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144:307-313.
- Wise, R., A. W. Naylor. 1987. Chilling enhanced photooxidation. Evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. *Plant Physiol.* 83:278-282.
- (접수일 2011.1.4; 수정일 2011.1.14; 채택일 2011.1.28)