

人參葉燒病에서 酵素活性도의 변화

양덕조 · 김명원* · 최정도** · 이성중

충북대학교 자연과학대학 생물학과

*연세대학교 문리대학 생물학과

**충북대학교 자연과학대학 생화학과

(1989년 4월 24일 접수)

Study on the Enzyme Activity in Leaf-Burning Disease of *Panax ginseng* C.A. Meyer

Deok-Cho Yang, Myong-Won Kim*, Jung-Do Choi** and Sung-Jong Lee

Department of Biology, College of Natural Science, Chungbuk National University, Cheongju 360-763

*Department of Biology, College of Science, Yonsei University, Wonju 220-050, and

**Department of Biochemistry, College of Natural Science,
Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

(Received April 24, 1989)

Abstract □ This study investigated the effects of high light intensity (100 KLux) and high temperature (45 °C, dark) on enzyme (glucose-6-phosphate dehydrogenase, acid phosphatase, catalase, peroxidase, and proteinase) activities and characteristics of *Panax ginseng* C.A. Meyer leaves. Enzyme activity and protein content decreased rapidly under treatment with high light intensity. In *P. ginseng* the thermal stabilities of catalase and peroxidase were high (above 70%), and the coagulation rates of soluble proteins were low (below 17%). Therefore, the decrease in enzyme activity and protein content was not caused by increase in leaf temperature due to the high light intensity, but by increase in proteolytic activities. The photochemical formation rate of superoxide radical (O_2^-) was higher in the *P. ginseng* leaf extracts than in *Solanum nigrum*, and was accelerated by addition of crude saponin to the buffer extracts.

Keywords □ *Panax ginseng* C.A. Meyer, leaf burning disease, thermal stability of enzyme, superoxide

서 론

光量변화에 따른 植物葉의 酵素活性度 변화에 대한 연구는 거의 대부분이 양지식물을 대상으로 광합성에 연관된 酵素들 특히 ribulose-1,5-diphosphate와 phosphoenopyruvate carboxylase 등에 관해 보고되었으며,^{1,2)} 정상 생육조건에서 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-P DH)와 같은 酵素들의 光조절기작(light modulation)

등이 보고되어 있다.^{3,4)} 그러나 人參葉燒病은 생육조건보다 높은 强光에서 유발되기 때문에 光에 의한 보편적인 酵素活性度 변화와는 相異할 것으로 사료된다. 인삼에서 强光에 의한 酵素活性度 변화에 관한 연구는 양 등⁶⁻⁸⁾에 의해 처음 이루어졌는데, 양 등은 photooxidation에 대한 protective system인 superoxide dismutase와 catalase 및 peroxidase가 葉燒病과정 중 强光에 의해 活性도가 급격히 감소하여 인삼 葉燒病의 chlorophyll bleaching 현상이 촉진된다고 보고하였다. 이외에 인삼에서 葉燒病, 즉 强光과 酵素와의 연관성에 관한 연구는 전

本 研究은 1988년도 文敎部 基礎科學 育成 研究費 支援에 의한 것임.

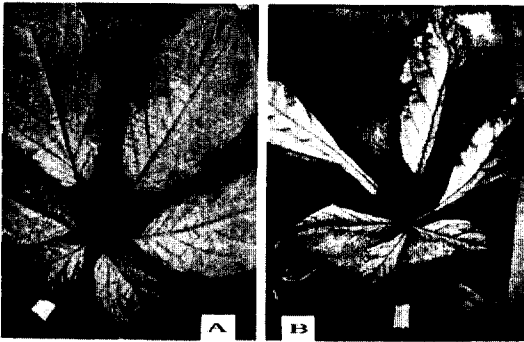


Fig. 1. Leaf-burning disease induced by high light intensity (100 KLux) from *Panax ginseng* C.A. Meyer (A; normal leaf, B; damaged leaf).

무한 실정이다.

본 연구는 앞서 보고된 양 등^{6,7)}의 “인삼葉燒病에서 색소의 광산화에 관한 연구”에 이어 인삼葉燒病의 생리학적 원인을 구명하기 위하여 葉燒病과 관계가 있을 것으로 사료되는 몇몇 酵素(G-6-P DH, acid phosphatase, peroxidase, catalase, proteinase)의 活性度변화와 그 변화요인을 밝히고자 인삼엽에 내재되어 있는 酵素단백질의 光과 温度에 대한 물리적 특징 및 superoxide radical (O_2^-)의 光화학적 생성물에 대해 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재배조건

본 실험에 사용된 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 한국인삼연구소에서 분양받은 1년생 苗蔘으로서 생체 중이 1.5g인 것을 선별하여 정식하였다. 재배방법은 일반관행법⁹⁾에 준하였고 일부 처리는 전체 광량의 5% 투과광량으로 조절하여 재배하였다. 까마중(*Solanum nigrum*)은 충북대학교 교정에서 채취한 종자를 1주일간 저온처리한 후 파종하여 일반 광량하에서 재배하였다.

2. 酵素의 活性度 측정

酵素액은 각 처리구에서 10개의 엽절편(leaf discs)을 증류수로 2회 세척한 후 8m/ Tris-HCl (0.05 M, pH) buffer를 첨가하여 마쇄한 다음, 12,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 이용하였다.

G-6-P DH(EC 1.1.1.49)의 活性度는 Moto와

Uritani의 방법¹⁰⁾을 이용하였으며, acid phosphatase(EC 3.1.3.2)의 活性度는 Fiske와 Subba Row의 방법^{11,12)}을 다소 수정하여 측정하였다. Peroxidase(EC 1.11.1.7)의 活性度는 Chauce와 Maehly의 방법¹³⁾에 준하여 측정하였으며, catalase(EC 1.11.1.6)는 본 실험실에서 개발한 De-coupling 방법¹⁴⁾으로 측정하였다. Proteinase(EC 3.4.21-24)는 Jameel과 Keddy의 방법¹⁵⁾에 준하여 1.5% bovine hemoglobin(dialyzed at 4°C, for 24 hrs)를 기질로 사용하여 TCA soluble fraction을 280 nm에서 측정, Proteinase activity로 환산하였다. 가용성 단백질의 함량은 Lowry 등의 방법¹⁶⁾에 따라 정량하였고 bovine serum albumin을 standard로 이용하였다.

3. 酵素의 thermal stability와 coagulation rate

인삼엽 5g(생체 중)을 채취하여 증류수로 2회 세척한 후, 0.1 M cystein과 0.005 M EDTA를 함유하는 0.05 M Tris-HCl(pH 7.6) buffer 20ml을 넣고 마쇄하여 8점의 거스로 거른 다음 12,000×g에서 30분간 원심분리하였다. 원심분리하여 얻은 상등액에 ammonium sulfate를 첨가하면서 20-65% 내에 침전되는 酵素단백질을 0.025 M Tris-HCl(pH 7.6) buffer 5ml에 녹인 후 Sephadex G-25 column(2.0×20 cm)을 통과시켜 염류 등을 제거한 酵素단백질을 분리하였다. 분리된 단백질을 각 酵素의 活性度 측정에 이용되는 buffer로 적당량 희석한 후 cap tube에 넣어 45°C water bath에서 1시간 동안 처리하고 25°C에서 15분간 방치한 다음 각 酵素의 活性度を 측정하였다. Coagulation rate는 위의 방법으로 얻은 단백질을 0.05 M Tris-HCl(pH 7.0) buffer를 첨가하여 단백질 농도를 0.5 mg/ml로 맞춘 다음 cap tube에 2ml씩 넣고 100 KLux 자연광하에서와 45°C 암상태에서 1시간 동안 처리한 후 원심분리하여 침전된 단백질의 양을 측정하였다. 대조구는 각각 25°C 암상태 및 일복하의 光量에서 동일한 방법으로 수행하였다.

4. Superoxide radical(O_2^-)의 光화학적 생성물

Superoxide의 생성물은 Bekina 등의 방법¹⁷⁾에 따라 560 nm에서 nitroblue tetrazolium(NBT)의 환원율로 측정하였다. 측정에 이용된 추출액은

0.5g 생체 중의 인삼엽을 0.05 M Tris-HCl(pH 7.5) buffer와 80% ethanol로 마쇄하고 원심분리한 후 상등액을 4배 희석하여 사용하였으며, 한국인삼연초연구소에서 분양받은 crude saponin(粗saponin)을 $0.8 \times 10^{-2}\%$ (w/v)의 농도로 처리하였다. 반응액은 추출액 5ml와 NBT 용액 2ml, 그리고 methionine(20 mM, electron donor) 1ml를 5,000 KLux의 光度하에서 반응시켜 560 nm에서 15분 간격으로 흡광도를 측정하여 superoxide radical의 생성율을 측정하였으며, 대조구는 암상태에서 동일한 방법으로 수행하였다.

결과 및 고찰

인삼엽을 强光(100 KLux) 및 45°C 암상태에 노출시켜 시간별로 酵素의 活性도를 측정한 결과 두 처리구에서 공히 酵素活性도가 감소하는 경향을 나타냈으나, 특히 高温에 비해 强光에서 3시간 처리시 G-6-P DH는 15%, acid phosphatase는 20%, catalase와 peroxidase는 각각 50%와 35% 정도 현저히 감소하였다(Fig.2).

일반적으로 외부 환경요인에 의한 酵素活性도 감소의 원인으로는 엽온상승으로 인한 酵素의 불활성화, 高光에 의한 세포질내의 pH 감소, proteinase의 活性도 증가로 인한 酵素단백질의 함량감소 및 photochemical reaction의 결과로 생성되는 oxygen radical에 의한 inactivation 등이 알려져 있다.¹⁸⁻²¹⁾ Engelbrecht 등²²⁾은 유사한 실험에서 Nicotina와 Pennisetum의 엽을 50°C로 처리하면 수분내에 황화현상 및 단백질 함량감소가 일어난다고 보고하였는데, 이와 같이 高温에 의한 저해작용의 원인으로는 세포내 구조적 파괴와 대사작용의 억제, 그리고 엽록체와 세포질과의 물질교환장애에 기인한 것이라고 하였다. 인삼葉燒病 과정 중에 일어나는 酵素活性도 감소의 원인을 구명하기 위한 실험으로서 처리시간별 가용성 단백질 함량을 측정한 결과, 高温처리 보다는 强光처리에서 함량감소가 현저히 큰 것으로 확인되었는데(Fig.3), 이러한 결과는 强光에 의한 엽온상승요인 이외에 다른 요인에 의해 단백질 함량감소가 촉진되는 것으로 추측할 수 있다.

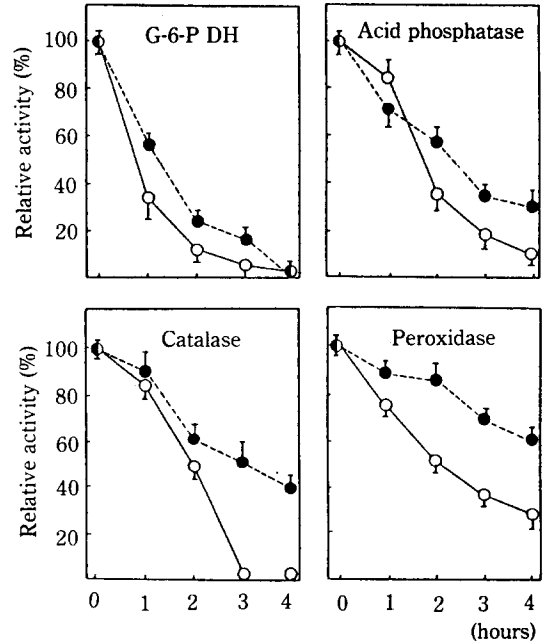


Fig. 2. Effects of high light intensity (100 KLux ○-○) and high temperature (45°C, dark ●-●) on enzyme activities in leaves from *Panax ginseng* C.A. Meyer.

또한, Fig.3에서는 인삼엽에 내재되어 있는 酵素단백질의 함량감소가 단순히 응집도(coagulation rate)와 같은 단백질자체의 물리적인 요인에 의해 유발되지 않는다는 사실을 뒷받침해 준다. 인삼葉燒病에서 catalase와 peroxidase는 强光에 의해 급격한 活性도 감소를 나타내는데, 세포내에서는 산화력이 강한 hydrogen peroxide를 제거하는 두 酵素는 Fig.4와 같이 높은 thermal stability를 갖고 있음에도 불구하고 특히 强光에 의해 活性도가 급격히 감소하는 것으로 볼 때(Fig.2), 光에 의한 2차적인 엽온상승과는 무관하다는 사실을 증명해주고 있다.

따라서, 인삼에 있어서 강광처리에 따른 酵素活性도 감소는 엽온상승에 의한 온도 효과가 아니라 酵素단백질의 급격한 함량감소가 주요원인으로 생각되는 바, 정상엽(normal leaf)에 내재되어 있는 단백질 분해 酵素의 活性도를 pH와 온도에 따라 조사한 결과는 Table 1과 같다.

Proteinase의 活性도 분석에는 양지식물인 *S. nigrum*을 비교 실험재료로 이용하였는데, 온도증

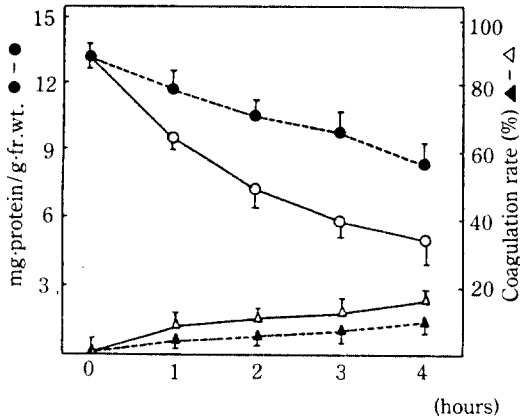


Fig. 3. Effects of high light intensity (○-○) and high temperature (●-●) on the content of total soluble protein and the coagulation of partially purified enzyme protein in leaves from *Panax ginseng* C.A. Meyer.

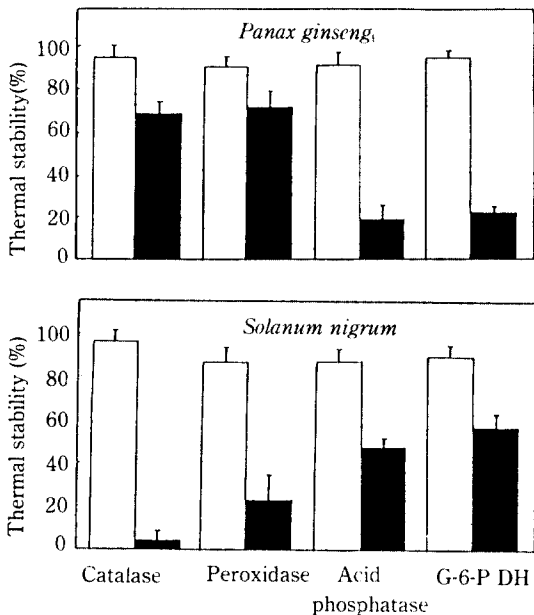


Fig. 4. Thermal stabilities of four enzymes in leaves from *Panax ginseng* and *Solanum nigrum* (□; at 25°C for 1 hr, ■; at 45°C for 1 hr).

가에 따른 活性度 증가는 인삼에서 현저히 높았으며 특히 45°C에서 acid proteinase의 活性度 증가를 관찰하였다. 일반적으로 정상엽에 내재되어 있는 proteinase는 시간당 조직내 전체 단백질의 4% 정도로 분해할 수 있으며,¹⁹⁾ 50°C까지 活性度가 증가

Table 1. Differences of proteinase activities by pH and temperature variations in normal leaves from *Panax ginseng* and *Solanum nigrum*

pH Tem.	E ₂₈₀ /g.fr.wt.			
	<i>P. ginseng</i>		<i>S. nigrum</i>	
25 °C	4.5	7.5	4.5	7.5
45 °C	0.84 ± 0.16	2.88 ± 0.35	—	1.58 ± 0.19

*; no detected, ±; standard error

한다고 알려져 있다. 그러나 인삼의 경우 葉燒病 과정에서 노출 4시간 후에는 가용성 단백질의 약 65%가량이 분해되는 것으로 미루어 볼 때, 정상엽에 inactivation 상태로 내재 (compartmentation)되어 있는 acid 및 neutral proteinase의 함량이 타 식물에 비해 비교적 많을 것으로 사료된다.

Table 2에서는 정상식물의 chloroplast에서 photogeneration되는 superoxide(O₂⁻)의 생산능력을 buffer와 ethanol(80%) extracts로 분리하여 光화학적 생성물을 측정하여 결과를 제시하였다. 이 결과에 따르면 인삼이 양치식물인 *S. nigrum*보다 superoxide의 光화학적 생성물이 buffer extracts에서 매우 높은 것으로 확인되었다. 양 등²⁰⁾은 인삼 葉燒病에서 chlorophyll bleaching 현상이 singlet oxygen과 hydrogen peroxide에 의한 photooxidation이라고 보고하였는데, 이 과정에서 타 식물에 비해 다량으로 생산되는 superoxide와 pigment system의 photolesion 사이의 깊은 관계가 있음을 추측할 수 있다. 또한 특징 酵素의 活性度 감소에 이러한 active oxygen radical이 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다.

Fig.5는 인삼엽의 내성성분인 saponin이 superoxide의 光화학적 생성물에 미치는 영향을 조사한 결과로서, saponin은 항산화작용을 촉진하는 것으로 잘 알려져 있고 人參 葉燒病이 photooxidation임을 감안할 때 葉燒病에 대한 억제인자로서 작용할 가능성을 두고 조사하였던 바, saponin 첨가시, superoxide의 생성물이 증가함을 보여주고 있다. 이러한 결과는 葉燒病 과정에서 native한 saponin이 active oxygen radical의 photogeneration을 촉진하는 것으로 생각할 수 있는데, 어떠한 메커니즘에 의하여 leaf ginsenoside가 이러한 현상을 촉

Table 2. Photochemical formation rates of superoxide radicals (O_2^-) in ethanol and buffer extracts from *Panax ginseng* and *Solanum nigrum* leaves (ethanol; 80%, buffer; 0.05M Tris-HCl, pH 7.5).

	E ₅₆₀ /g-fr.wt.	
	<i>P. ginseng</i>	<i>S. nigrum</i>
Ethanol extracts	0.97 ± 0.03	0.52 ± 0.02
Buffer extracts	1.05 ± 0.04	0.14 ± 0.01

± : standard error

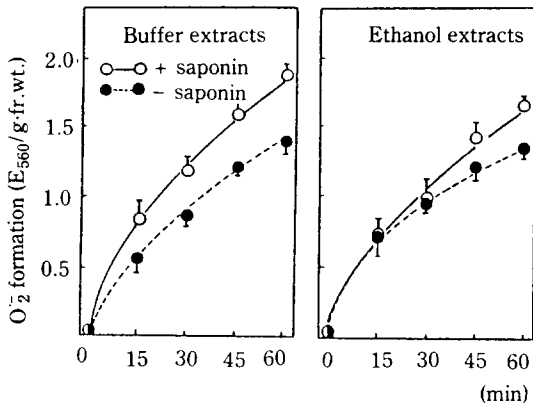


Fig. 5. Effects of saponin ($0.8 \times 10^{-2}\%$) on the photochemical formation of superoxide radical (O_2^-) in ethanol and buffer extracts from *Panax ginseng* leaves.

진시킬 수 있는지에 대하여서는 이어지는 연구에서 수행되어 질 것이다.

요 약

인삼엽(人蔘葉)을 强光(100 KLux) 및 高温(45 °C, 암상태)에 처리하여 酵素(glucose-6-phosphate dehydrogenase, acid phosphatase, catalase, peroxidase)의 活性도를 조사한 결과 두 처리구에서 공히 감소하는 경향이었으나, 특히 强光에서 活性도가 현저히 감소하였다. 이와 같은 活性도 감소는 酵素의 thermal stability나 coagulation 등과 같은 光에 의한 2차적인 엽온상승 효과에 따른 inactivation이 아니며, proteolytic activity 증가로 인한 酵素단백질의 함량감소로 확인되었다. 인삼엽에서 proteolytic activity가 强光에 의해 급속히 증가하는 것으로 보아 정상엽(normal leaf)에 inactive 상태로 내재(compartmentation)되어 있

는 proteinase가 타 식물에 비해 많은 것으로 사료된다. 또한 chlorophyll bleaching과 酵素의 inactivation을 유발시킬 수 있는 superoxide radical(O_2^-)의 광화학적 생성율이 비교식물(*Solanum nigrum*)보다 높게 나타나고 crude saponin이 superoxide의 생성율을 촉진하는 것으로 보아 superoxide에 의한 pigment system의 光산화율이 타 식물에 비해 높을 것으로 사료된다.

인용문헌

1. Boardman, N.K.: *Ann. Rev. Plant Physiol.* **28**, 355 (1977).
2. Malkin, S. and Fork, D.C.: *Plant Physiol.* **67**, 580 (1981).
3. Anderson, L.E. and Duggan, J.X.: *Plant Physiol.* **28**, 135 (1976).
4. Alkamba, L.M. and Anderson, L.E.: *Plant Physiol.* **67**, 197 (1981).
5. Brennan, T. and Anderson, L.E.: *Plant Physiol.* **66**, 815 (1980).
6. 양덕조, 유희수, 윤재준 : 고려인삼학회지, **11**(2), 91(1987).
7. 양덕조, 유희수, 윤재준 : 고려인삼학회지, **11**(2), 101(1987).
8. 양덕조, 김명식, 이성중 : 고려인삼학회지, **11**(1), 24(1987).
9. 김득중 : 인삼재배, 일한도서출판사, 47(1973).
10. Muto, S. and Utritani, I.: *Plant & Cell Physiol.* **11**, 767 (1970).
11. Yamaya, T., Tanigawa, M., Kanno, H. and Matsumoto, H.: *Plant & Cell Physiol.* **23**, 175 (1982).
12. Lawrence, G.L. and Etten, R.L.V.: *Arch. Biochem. Biophys.* **206**, 122 (1981).
13. Chance, B. and Maehly, A.C.: *Methods in Enzymol.* **2**, 764 (1955).
14. 양덕조, 채래, 윤재준, 이성중, 이애라 : 고려인삼학회지, **9**, 154(1985).
15. Jameel, S., Keddy, V.M., Rhodes, W.G. and McFadden, B.A.: *Plant Physiol* **76**, 730 (1984).
16. Lowry, O.H., Rosebrough, H.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.* 193 (1951).
17. Bekina, R.M., V.A. Shuvanov, Lysenko, G.G. Moshentseva, R.J.: *J. Biol. Chem.* 193 (1951).

18. Aldelusi, S.A. and Lawanson, A.O.: *J. Agric. Sci.* **91**, 349 (1978).
19. Thomas, H. and Stoddart, J.L.: *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**, 83 (1980).
20. Thomas, H. and Stoddart, J.L.: *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**, 83 (1980).
21. Allen, J.F.: *Superoxide and photosynthetic reduction of oxygen*, Academic Press, 417 (1977).
22. Engelbrecht, L. and Mothes, K.: *Flora*, **154**, 279 (1964).