

人蔘 葉燒病에서 색소의 광산화작용에 관한 연구

I. Chlorophyll bleaching의 현상학적 연구*

양덕조·유희수·윤재준

충북대학교 자연과학대학 생물학과

(1987년 8월 24일 접수)

Investigation on the Photooxidation of Pigment in Leaf-Burning Disease of *Panax ginseng*

I. Phenomenological observation and analysis on the chlorophyll bleaching phenomenon

Deok Cho Yang, Hi Soo Yoo and Jae Jun Yoon

Department of Biology, College of Natural Science, Chungbuk National University, Chongju 310, Korea

(Received August 24, 1987)

Abstract

This study was investigated and analyzed the side of phenomenological of the chlorophyll bleaching phenomenon on the leaf burning-disease of the Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) leaf. Red light (660-700 nm) was confirmed as one which induced the bleaching phenomenon and blue light (400-500 nm) did not at all. Temperature as environmental factor had not any influence on chlorophyll bleaching phenomenon at all. Therefore, simple burning (thermal damage) hypothesis was perfectly ruled out by the result of this study. And, low pH accelerated chlorophyll bleaching velocity. A primary factor of chlorophyll bleaching phenomenon may be peculiar structural difference of the Ginseng leaf compared with other plant.

서 론

人蔘 (*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 오길피나무과에 속하는 다년생 草本으로, 직사광선을
싫어하는 半陰生색물이다. 또한 人蔘은 他식물과는 달리 매우 특이한 生육습성을 가지고 있으므로 우리나라에서 人蔘재배가 시작된 이래 人蔘재배는 해가림(日覆)下에서 이루어지고 있다.
그런데 현재 사용되는 日覆자재가 벗짚을 이용한 재래적인 방법에 의존하고 있어서 많은 일손을 필요로 하며, 자재의 耐久性도 적어 경제적인 측면에서 볼 때 비실용적인 재배방법인 것이다.

人蔘은 직사태양광선에 장시간 노출되면 잎이 부분적으로 漂白化(bleaching)되기 시작하여

* 본 논문은 1986년도 문교부 학술연구조성비에 의하여 이루어졌음.

결국에는 잎조직이 파괴되고 枯死되는 현상, 즉 葉燒病(leaf burning disease)을 일으킨다는 사실이 널리 알려져 있다. 양과 채¹⁾는 이런 현상의 주요 증상을 chlorophyll의 破壞로 인한 bleaching 현상이라고 하였다. 일반식물에서는 chlorophyll의 分解에 관한研究가 주로 잎의 노화과정에서 이루어지고 있는데²⁻⁵⁾, Wolf⁶⁾는 老化되는 조직에서의 chlorophyll 破壞는 강한 산화력을 지닌 물질에 의하여 一次的으로 chlorophyll b가 破壞된 다음 chlorophyll a도 서서히 分解된다고 하였다. 비슷한 *in vitro* 실험에서 Simpson *et al.*⁷⁾은 light, acid, alkali, oxygen 그리고 heat에 의한 chlorophyll의 分解代謝에 대하여 언급한 바 있으나, *in vivo* 상태에서는 報告된 바가 없다.

일반적으로 자연환경조건에서 chlorophyll의 分解는 老化과정에서 뿐만 아니라, 광역학적반응(photodynamic reaction)인 photooxidation에 의하여 일어날 수 있다⁸⁻¹⁰⁾. *In vitro* 상태에서 chlorophyll의 photooxidation은 가시광선 영역의 광장을 photosensitizer가 광자를 흡수함으로써 시작될 수 있는데, 이때 photosensitizer(chlorophyll, flavin 등)는 빛을 받아 들뜬 상태(excited state)로 전환된 후 주위의 산소분자에 에너지를 전달해서 산소분자는 산화력이 강한 singlet oxygen(¹O₂)으로 전환된다¹¹⁻¹³⁾. 이렇게 생선된 singlet oxygen은 chlorophyll을 破壞시키기에 충분한 산화력을 가지고 있다. 그러나 대부분의 C₃-식물은 오랜 세월이 지나는 동안 적응진화를 통하여 높은 光度의 광선을 효과적으로 차단(반사, 투과, 흡수 등) 할 수 있는 보호메커니즘을 가지고 있음으로 chlorophyll의 photooxidation은 거의 일어나지 않고 있으나, prokaryote에서는 높은 光度에 의한 photooxidation이 발견되고 있다¹⁴⁻¹⁷⁾. 그러나 고등식물(특히 음생식물)에서 높은 光度에 대한 photoinjury triggering mechanism 및 생리적 반응현상에 대한 報告는 전무한 상태이다. 단지 人蔘에서 양과 채에 의해 최초로 葉燒病에서 나타나는 bleaching 현상이 과다한 적색광으로 인한 chlorophyll의 photooxidation에 기인된다고 報告하였다 뿐이다.

따라서 本研究에서는 人蔘根의 생육에 막대한 지장을 초래하는 葉燒病에 의한 枯死원인을 현상학적 측면에서 관찰, 분석하여 人蔘 잎에서 chlorophyll의 bleaching 현상이 과다한 태양 에너지에 의한 단순연소현상인지 또는 특정한 광과장에 의하여 나타나는 photoinjury인지를 究明하고자 수행하였다.

재료 및 실험방법

1. 植物 및 栽培條件

本 實驗에서 사용한 人蔘(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 한국인삼연초연구소에서 분양받은 1년생 苗蔘으로서, 苗蔘의 생체중이 1.5g인 것을 선별하여 정식하였으며, 재배방법은 일반 관행법¹⁸⁾에 준하였고 日覆처리는 전체 자연광의 5% 투과량으로 조절하여 재배하였다.

2. 전자파복사선이 chlorophyll bleaching 현상에 미치는 영향

전자파복사선(UV, VL, IR)이 chlorophyll의 광산화작용에 미치는 영향을 조사하기 위하여 영국 Griffin社의 color filter(XGB-400-T)를 이용하였으며, red와 farred filter는 ROHM & HAAS(#2423)의 plex glass를 사용하였다. 광처리는 filter를 사용하여 自然光(100 KLux)하에서 시간별 bleaching 현상을 조사하였으며, 人蔘잎을 cork borer로 직경 1.5 cm 切片을 만들어 media(K-phosphate buffer, 0.1 M pH 6.5)에 띄운 후 광처리하여 chlorophyll 함량을 측정하였다. UV-light 영향은 日本 Toshiba社 GL-15 lamp를 사용하여

1시간 간격으로 6시간 처리한 후, 切片을 85% acetone으로 마쇄하여 chlorophyll 함량을 측정하였다.

3. 温度 및 pH가 chlorophyll의 bleaching 현상에 미치는 영향

溫度가 chlorophyll의 bleaching 현상에 미치는 영향을 조사하기 위하여 암 상태에서 0, 10, 30, 60°C로 각각 5시간 처리한 후 chlorophyll 함량변화를 조사하였다. pH가 chlorophyll의 bleaching 현상에 미치는 영향을 조사하는 실験에서는 人蔘葉을 직경 1.5 cm로 切片하여 Petri dish에 옮긴 다음 K-phosphate buffer를 pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0으로 만들어 각각 주입하였으며, chlorophyll 함량은 2시간 30분 동안 自然光(100 KLux)을 처리하여 측정하였다.

4. Hill-반응을 이용한 葉綠體活性度 檢定

光처리에 따른 염록체活性度 측정은 Hill & Whittinhan¹⁹⁾ 등의 방법을 변형하여 수행하였다. Fig. 1에 제시한 바와 같이 인삼과 까마중(*Solanum nigrum L.*) 잎으로부터 분리시킨 염록체 혼탁액을 1m/ DCPIP(dichloropheno-indo-phenol), 2m/ D.W(distilled water) 그리고 0.1M K-phosphate buffer를 침가하여 光을 10 KLux로 5분간 조사한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 相對活性度를 산출하였다.

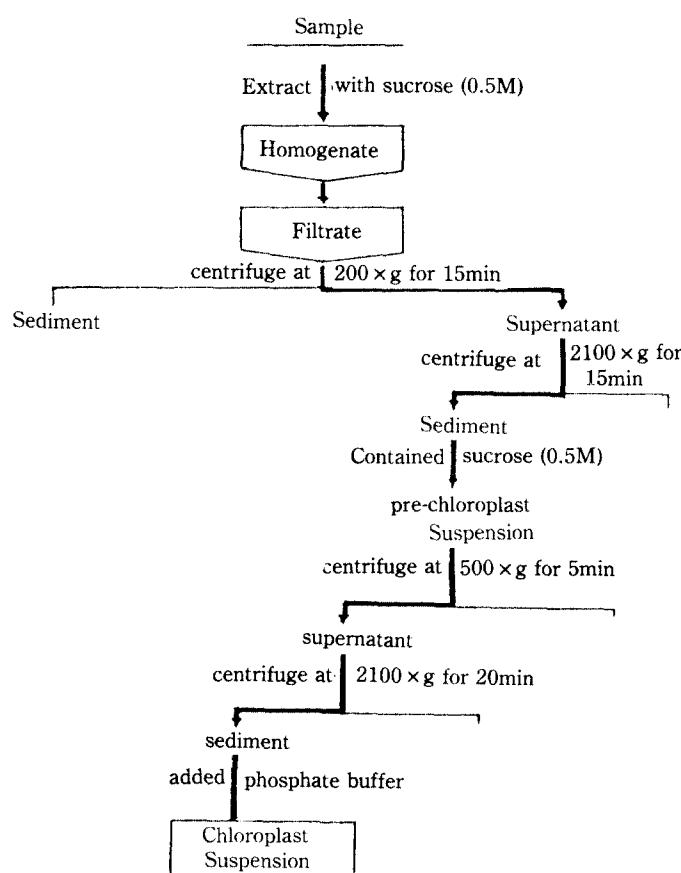


Fig. 1. Schematic flow chart describing the major step of chloroplast isolation.

5. Chlorophyll 및 carotenoid 함량 측정

Chlorophyll 및 carotenoid 함량 측정은 Robbeloen's²⁰⁾ 방법으로 하였다.

$$\text{Chlorophyll a} = 10.3 \times E_{663} - 0.918 \times E_{644}$$

$$\text{Chlorophyll b} = 19.7 \times E_{644} - 3.870 \times E_{663}$$

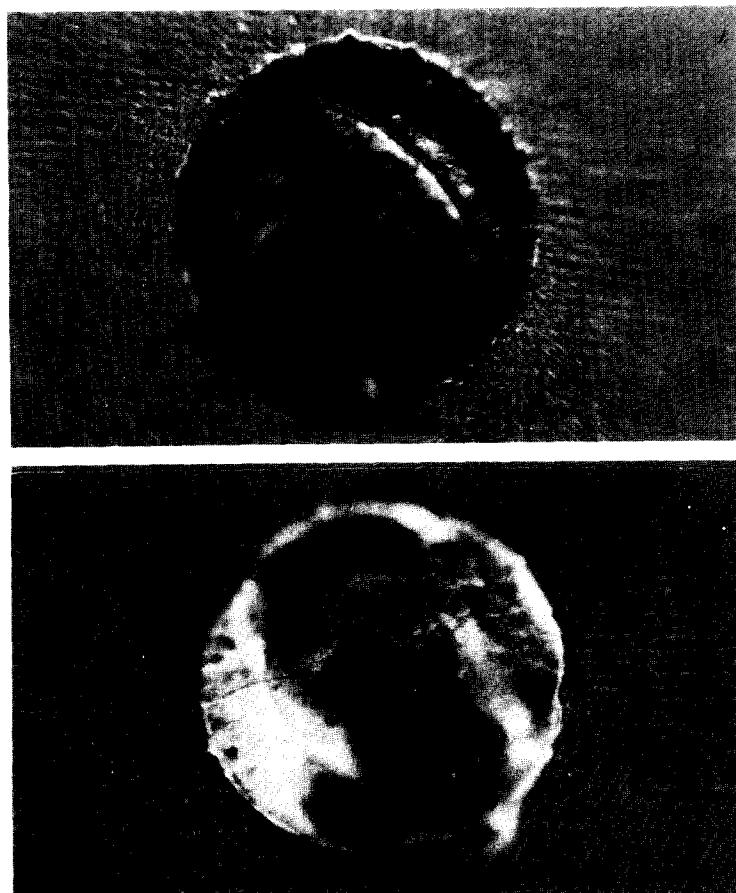
$$\begin{aligned}\text{Carotenoid } E_{652} \text{ Chl. (a+b)} &= 4.74 \times E_{452.5} - 0.226 \times \text{Chl. (a+b)} \\ &= E_{652} \times \text{Chl. (a+b)} \times d = E_{652} / 34.5\end{aligned}$$

흡수스펙트럼 측정은 Shimadzu UV-Vis Recording Spectrophotometer(UV-240)을 이용하였다.

결과 및 고찰

1. 葉燒病의 증상과 엽록소 分解

人蔘을 관행의 日覆下에서 재배하면 葉燒病이 유발되지 않는다. 그러나 人蔘잎이 自然光을 받으면 몇시간 이내에 bleaching 현상이 일어난다(Fig. 2). 葉燒病의 주요증상은 Fig. 2에서 잘 제시해 주듯이 人蔘잎의 bleaching 현상이다. 따라서 인위적으로 葉燒病을 유발시킨 다음 pigment system의 흡수스펙트럼을 조사하였던 바, chlorophyll의 흡수스펙트럼도 현저히 감소하는 경향이었다(Fig. 3).



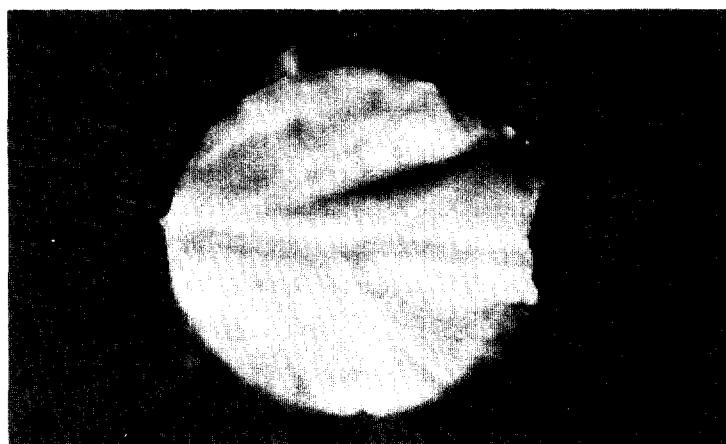


Fig. 2. Patterns of chlorophylls-bleaching on the treatment of solar radiation in *Panax ginseng* C.A. Meyer (A, intact leaf disk; B, starting of bleaching in leaf disk; C, perfect bleaching in leaf disk).

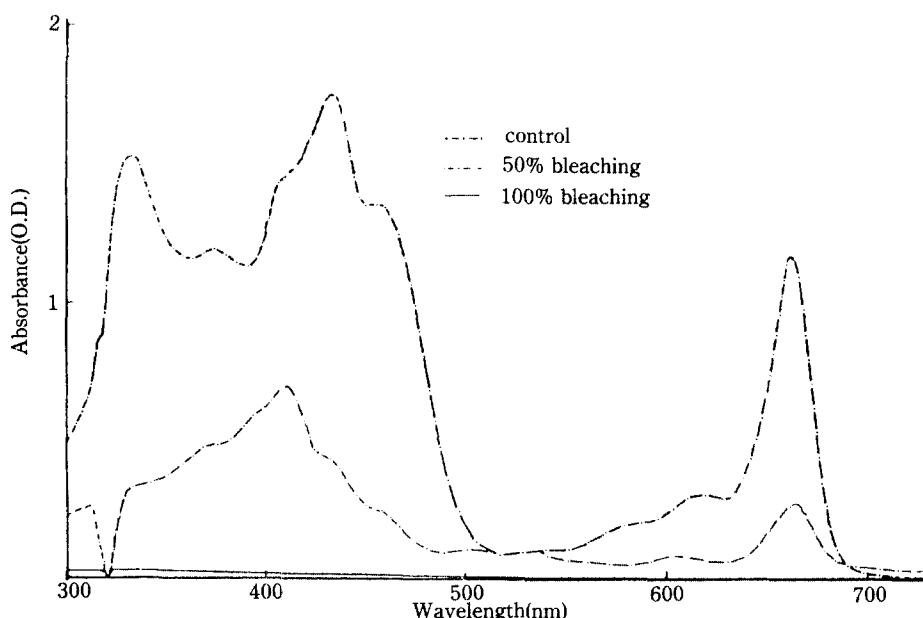


Fig. 3. Absorption spectra of chlorophyll according to degree of bleaching.

2. 光波長이 chlorophyll의 光酸化에 미치는 영향

태양광선 중 어떤 특정 전자파복사선 영역의 광선이 葉燒病을 유발시킬 것으로 사료되어 filter system을 이용하여 自然光을 分光시켜 파장별 피해율을 조사하였던 바, 적색 filter system (600~700 nm)과 황색 filter system (500~700 nm)에 의하여 투과된 광파가 chlorophyll을 광산화 시킴으로써 bleaching 현상이 유발되었으며, farred (700 nm~)에서는 전혀 bleaching 현상이 유도되지 않았고 단지 thermal energy에 의해 일의 수분이 증발되어 녹색 그 자체로 말라 枯死되었다 (Fig. 4). Fig. 5는 filter system을 이용하여 自然光을 分光照射시켜 얻은 각 광 파장별 chlorophyll 및 carotenoid 함량변화를 제시하였다. Yellow filter

system(500~700 nm)에서는 total chlorophyll 함량이 0.61 mg/g·fr. wt.로 대조구 4.40 mg/g·fr. wt.보다 현저히 낮은 함량을 나타냈으며, red filter system(600~700 nm)에서는 1.06 mg/g·fr. wt.로 대조구보다 약 76% 감소하였다. Chlorophyll의 광산화 현상은 blue filter system(400~500 nm)에서 역제율이 가장 높은 것으로 확인되었다. 또한 chlorophyll의 광파해 현상과 관련된 매우 특이한 사실은 chlorophyll b보다 chlorophyll a의 감소율이 월등히 높다는 것이다. 예컨대, yellow 및 red filter system에서의 chlorophyll a: chlorophyll b-ratio는 각각 0.5, 0.8이었다.

C₃-식물과 C₄-식물에 장애를 일으키는 UV-light는 chlorophyll 및 carotenoid 함량변화에 거의 영향을 미치지 않았다(Fig. 6). 이런 현상은 아마도 人參의 花青色素에 활용되어 있는 phenol류 및 saponin과 같은 물질이 보호작용을 해주기 때문인 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 葉燒病의 초기증상인 "bleaching" 현상은 chlorophyll이 自然光을 흡수하는 과정역인 660~760 nm의 빛을 과잉흡수함으로써 유발된다고 추리되는데, 이것은 양파 채의 결과와 일치하였다. 따라서 응용학적 측면에서 고찰한다면, 葉燒病 망지대책으로 blue filter system 개발이 촉구된다.

3. 溫度 및 pH가 chlorophyll의 bleaching 현상에 미치는 영향

人參잎을 Petri dish에 조작하여 암 상태에서 40~60°C까지 온도를 증가시켜도 chlorophyll의 bleaching 현상을 나타나지 않았다. Lab. 조건에서 항온수조를 이용하여 온도차리별 chlorophyll 함량을 조사하였던 바 control로 정한 25°C에서는 chlorophyll 함량이 4.20 mg/g·fr. wt.었으며 30°C에서 5시간 처리구에서는 3.94 mg/g·fr. wt., 그리고 60°C에 5시간 처리구에서는 3.30 mg/g·fr. wt.로 다소 감소하는 경향이었으나, 대조구와 비교해서 통계학적 유의성이 인정되지 않았다. Carotenoid 함량 역시 60°C에서 5시간 처리구에 서만 다소 감소하

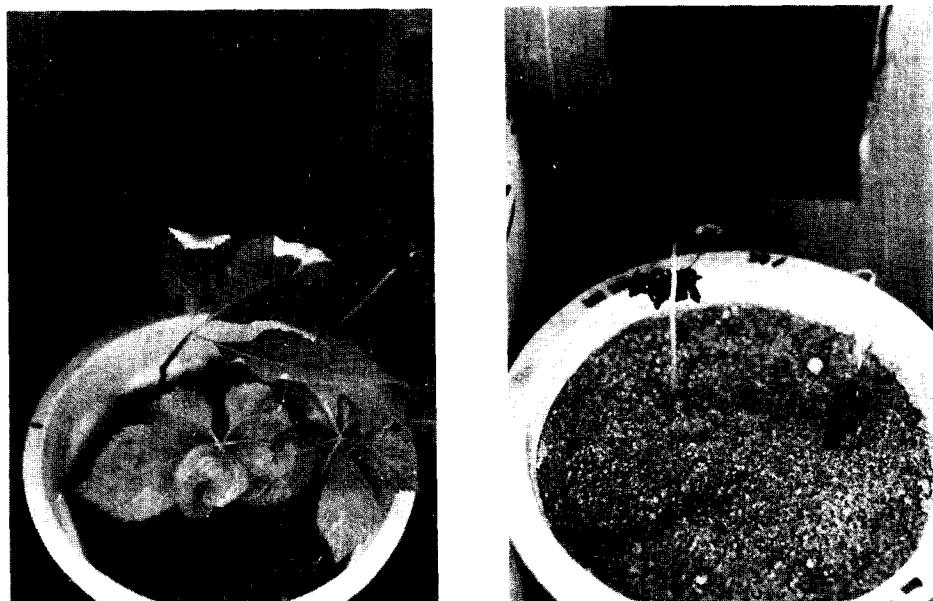


Fig. 4. Effects of ginseng leaf damage on the treatment of red and far-red light (a, treatment of red light; b, treatment of far-red light).

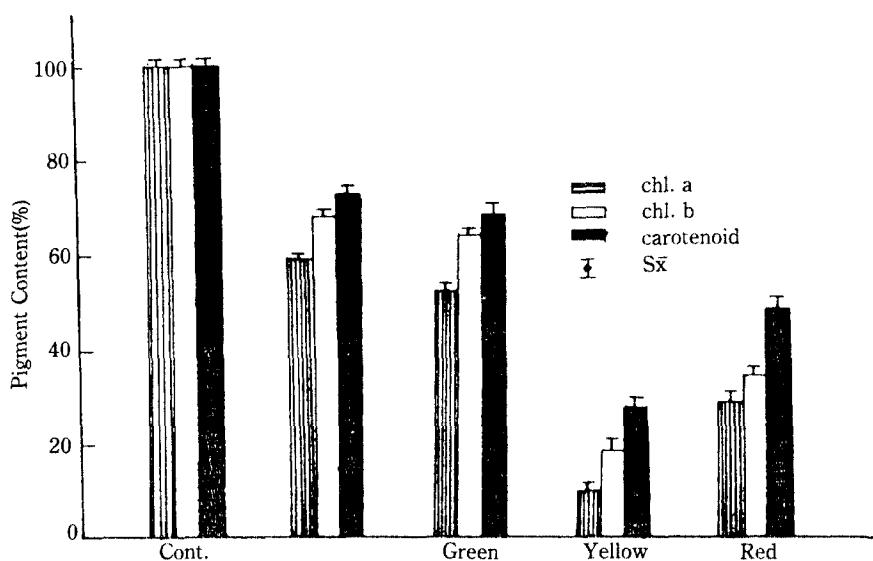


Fig. 5. Changes of chlorophyll a, b and carotenoid content in treatment color filter (10% chl. a, 0.26, 10% chl. b, 0.16; carotenoid 10%, 0.18; unit, mg/g. fr. wt.; light intensity, 10KLux; treatment time, 8hrs; S_x, standard error).

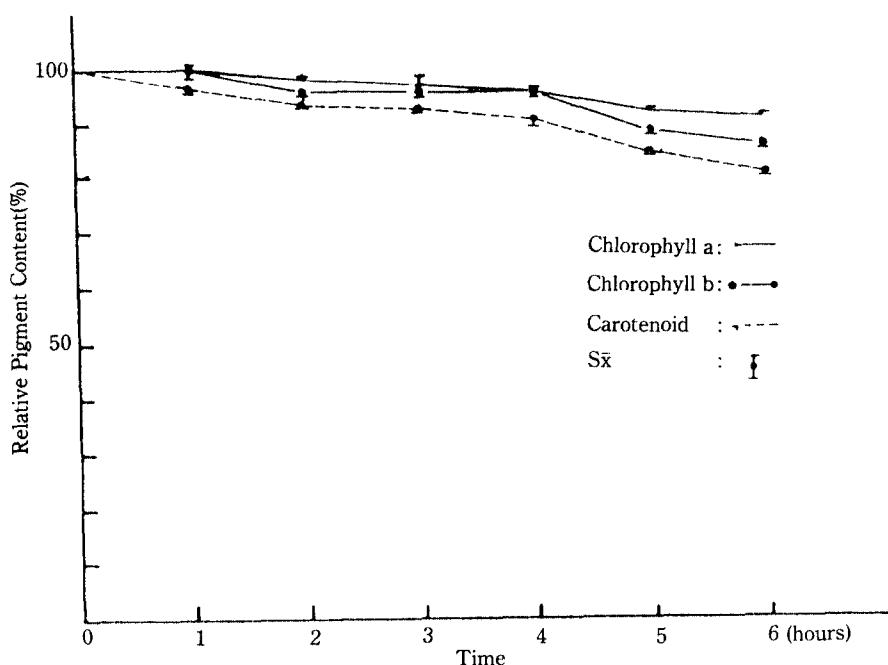


Fig. 6. Changes in chlorophyll a, b and carotenoid contents in treatment of UV-light (chl. a 10%, 0.27; chl. b 10%, 0.16; carotenoid 10%, 0.21; unit, mg/g. fr. wt.; S_x, standard error).

Table 1. Changes in chlorophyll a, b and carotenoid contents and a/b ratio in treatment of temperatures

temp. (°C)	Pigment content (mg/g.fr.wt.)				
	chl.t	chl.a	chl.b	a/b	carotenoid
cont.	4.20	2.58 ± 0.10	1.62 ± 0.11	1.6	2.02 ± 0.17
0	4.06	2.50 ± 0.07	1.56 ± 0.16	1.6	1.90 ± 0.04
10	4.00	2.46 ± 0.18	1.54 ± 0.12	1.6	1.92 ± 0.11
30	3.94	2.44 ± 0.20	1.50 ± 0.12	1.6	1.94 ± 0.07
60	3.30	2.00 ± 0.25	1.30 ± 0.20	1.5	1.56 ± 0.22

cont.: before treatment of temperature

는 경향이었다(Table 1).

pH 값이 낮으면 낮을수록 人蔘葉의 bleaching 현상을 유발하는 속도가 현저히 증가하였다. Table 2에서 잘 나타나듯이 phosphate buffer의 pH가 6.50인 대조구(암상태)에서는 chlorophyll 함량이 3.8 mg/g·fr. wt.였던 것이 自然光처리에 의해 pH 8.0에서 3.78, pH 6.0에서는 0.06으로 감소율이 매우 급격하였다. 또한 carotenoid 함량변화도 chlorophyll 함량 pattern과 비슷한 양상을 나타냈다.

MacMillan²¹⁾은 밀에서 高光度가 세포액의 pH를 낮추어 주며, 이로 인하여 Fe의 전류가 억제되어 잎의 황화현상이 유발된다고 하였다. 철분은 식물세포에서 햄의 보결성분으로 cytochrome, cytochrome oxidase, peroxidase 등의 효소에 결합되어 있으며, 광합성의 redox system인 ferredoxin에 결합되어 있고, chlorophyll 합성에 중요한 역할을 한다. Hager²²⁾는 옥수수잎의 thylakoid membrane에서 高光度를 받으면 pH값 7.0이 H⁺-ion의 유입으로 인하여 pH 5.0으로 낮아진다고 하였다. 따라서 高光度하에서 낮은 pH는 chlorophyll 산화작용을 촉진해줄 뿐 아니라 광산화작용과 관련된 효소 catalase(최적 pH 7.0) activity에 영향을 주어 H₂O₂의 축적을 촉진하는 것으로 사료된다.

4. 自然光이 葉綠體活性度에 미치는 영향

人蔘에서의 bleaching 현상이 단순한 엽록체 구조 때문인지, 또는 잎의 구조적 차이 때문인지를 확인하고자 엽록체를抽出하여 *in vitro* 상태에서 Hill-반응을 측정하였던 바, Fig. 7에 제시했듯이 自然光을 100 KLux 처리한 후 人蔘葉에서의 엽록체 활성도는 처리시간 10분까지는 큰 변화가 없었으나, 그 후로부터는 급속하게 감소하는 경향이었다. 광량에 대한 음자식불

Table 2. Changes of chlorophyll a, b and carotenoid contents and a/b ratio in pH gradient

Media (pH)	Pigment content (mg/g.fr.wt.)				
	chl.t	chl.a	chl.b	a/b	carotenoid
control	3.86	2.40 ± 0.09	1.46 ± 0.10	1.64	2.00 ± 0.17
6.0	0.06	0.02 ± 0.04	0.04 ± 0.07	0.50	0.02 ± 0.01
6.5	1.00	0.46 ± 0.06	0.54 ± 0.04	0.85	0.64 ± 0.03
7.0	1.76	0.96 ± 0.16	0.80 ± 0.08	1.20	1.02 ± 0.14
7.5	2.64	1.48 ± 0.00	0.96 ± 0.00	1.54	1.20 ± 0.00
8.0	3.78	2.34 ± 0.13	1.44 ± 0.11	1.64	1.72 ± 0.08

Control: dark condition; Chl. t: total chlorophyll

과 양지식물의 엽록체 활성도를 비교하고자 까마중의 엽록체 활성도를 추정한 결과는 人參과 같은 양상을 나타내었다.

따라서 본 실험에서 확인된 결과를 종합해 볼 때, 인삼은 일반 양지 C₃-식물 보다 표피세포가 비교적 얇고, 함유성분이 다양하지 않으며, 특히 책상조직이 잘 발달되지 않은²³⁾ 독특한 잎의 형태, 구조학적 차이에 의해 chlorophyll의 bleaching 현상 유발을 가임종 촉진시켜 주고 있다 고 사료된다.

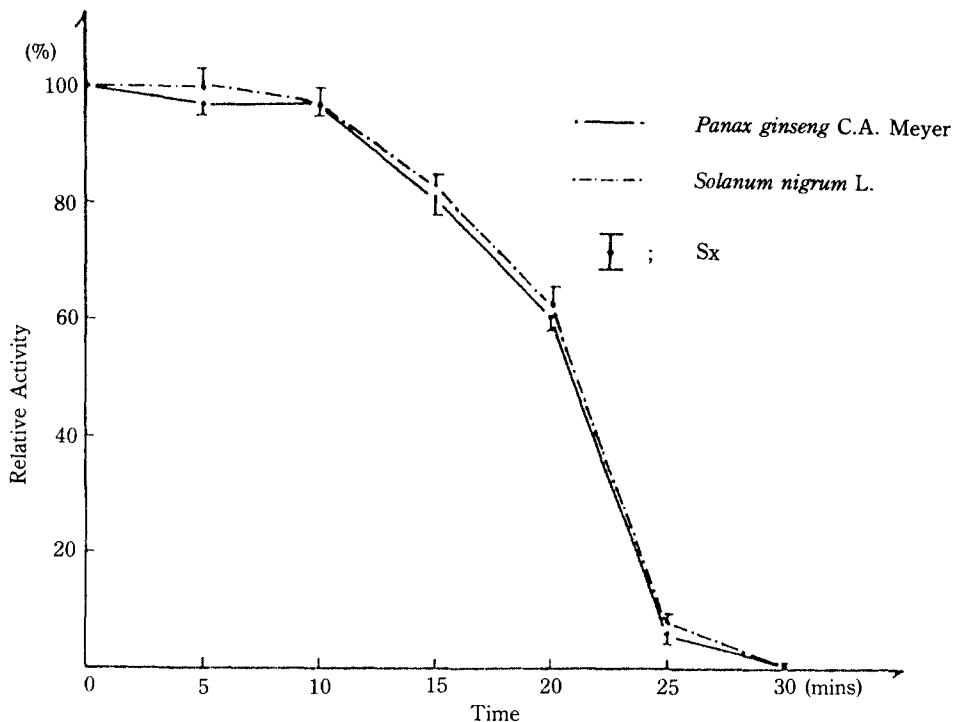


Fig. 7. Detection of relative chloroplast activity after light treatment (*P. ginseng* chl. activity 10%; 0.036, *S. nigrum* chl. viability 10%; 0.036).

요약

人參(*Panax ginseng* C.A. Meyer) 萩燒病에 대한 桃紅원인을 현상학적 측면에서 관찰, 분석한 결과 chlorophyll의 bleaching 현상은 적색광(660~700 nm)에서 일어났으며, 청색광(400~500 nm)에서는 광산화에 의한 bleaching 현상이 일어나지 않았다.

葉燒病에 의한 桃紅원인으로 대두되었던 환경요인 “溫度”는 chlorophyll의 bleaching 현상에 전혀 영향을 미치지 않았다. 따라서 단순연소(simple burning) 혹은 本實驗을 통해 배제되었으며, 낮은 pH는 chlorophyll의 bleaching 속도를 가속화시켜 주었다.

葉燒病에서 chlorophyll의 bleaching 현상을 유발시키는 1차적 요인은 人參의 독특한 구조학적 차이에 의한 것이라졌다.

인용문헌

1. 양덕조, 채쾌 : 산학협동재단 연구결과 보고서 (1983).
2. Jen, J.J., and Mackinney, G.: *Photochem. Photobiol.* **11**, 297 (1970 a).
3. Jen, J.J., and Mack: G.: *Photochem. Photobiol.* **11**, 303 (1970 b).
4. Ellsworth, R.K., Tsuk, . and Pierre, L.A.: *Photosynthetica* **10**, 312 (1976).
5. Holden, M.: *J. Sci. Food Agr.*, 1427 (1974).
6. Wolf, F.T.: *Am. J. Bot.* **43**, 714 (1956).
7. Simpson, K.J., Lee, T.C., Odriguez, D.A.R. and Chichester, C.O.: *Chemistry and biochemistry of plant pigments*, Academic press, London-New York p.780 (1976).
8. Imamura, M. and Shimizu, S.: *Plant Cell Physiol.* **15**, 187 (1974).
9. Kok de L. van Hasselt, P.R. and Kuiper, P.J.C.: *Physiol. Plant.* **43**, 7 (1978).
10. Peiser, G.D., S.D. and Yang, S.F.: *Phytochemistry*, **17**, 79 (1978).
11. Foot, C.S.: *Free radicals in biology*, Academic press, New York, p.85 (1976).
12. Krinsky, N.I.: *Trends Biochem. Sci.* **2**, 35 (1977).
13. Foot, C.S.: *Biochemical and clinical aspects of oxygen*, Academic press, New York p.85 (1976).
14. Lesc, S.A., Lorenzen, J.R. and Ts'o, P.O.P.: *Biochemistry*, **19**, 3023 (1980).
15. Abelivich, A., Kellenberg, D. and Suilo, M.: *Photochem. Photobiol.* **19**, 379 (1974).
16. Elstner, E.F., and Pils, I.: *Z. Naturforsch. Teil C* **34**, 1040 (1979).
17. Elstner, E.F., and Osswald, W.: *Z. Naturforsch. Teil C* **35**, 129 (1980).
18. 김득중 : 인삼재배, 일한 도서출판사, 서울, p.47(1973).
19. Hill, R., and Whittingham, C.P.: *Photosynthesis*, John Wiley & Sons, Inc., New York, (1955).
20. Roebelen, A.: *Experiments zur stoffwechsel-physiologie der pflanzen*, Georg Thieme Verlag – Stuttgart (1976).
21. Mecmillan, H.G.: Cause of sunscald of beans, *Phytopath.* **13**, 376 (1973).
22. Hager, A.: *Pigments in plants*, Gustav Fischer Verlag-Stuttgart-New York, 57 (1980).