

들깨잎에 함유된 Superoxide Dismutase의 특성 및 항산화 활성 검정

정일민* · 윤성중** · 김정태* · 곽재균* · 성재덕* · 서형수*

Test of Superoxide Dismutase Characteristics and Antioxidant Activity in Perilla Leaves

Ill Min Chung*, Song Joong Yun**, Jung Tae Kim*
Jae Gyun Gwag*, Jae Duck Sung* and Hyung Soo Suh*

ABSTRACT: This study was conducted to investigate the superoxide dismutase (SOD) characteristics and antioxidant activity by nonenzymatic(Fe^{2+} /Ascorbate) and Fe^{3+} -ADP/NADPH method in perilla (*Perilla frutescens* var. *japonica* Hara.) and jaso (*Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo.) leaves. The characteristics were evaluated by the nitro blue tetrazolium reduction method. Perilla leaves contained three or four major SODs depending on the varieties. The inhibitor test indicated that the Perilla leaves contained two Cu/ZnSODs and one or two FeSODs, but Jaso leaves have only Cu/ZnSOD. However, no varietal differences were detected in the Cu/ZnSOD isozyme patterns. FeSODs, however, showed different varietal isozyme patterns through the different combinations of the two FeSOD isozymes. Among MeOH extractes, "milyang 2" showed very strong antioxidant activity. Relatively large differences in the levels of SOD and antioxidant activity detected in the Perilla varieties. There was significantly different in the comparison between perilla leaves and red jaso leaves.

Key words: Superoxide dismutase(SOD), Cu/ZnSODs, FeSOD, Antioxidant activity, Perilla leaves

들깨(*Perilla frutescens* var. *japonica* Hara.)는 꿀풀과에 속하는 1년생 초본으로서 옛부터 재배되어온 유료작물이며 재배지역과 토양에 대한 적응성이 높고 파종기의 이동범위가 넓어서 다른 작물과의 윤작, 혼작과 간작이 가능하여 작부체계상 매우 중요한 작물이다. 또한 들깨의 잎과 종실는 건강식품으로 이용되고 있으며, 최근에는 신선 무공해 채소로서 들깨잎의 이용도가 점차 증

가되고 있고, 들깨 기름은 식용 또는 공업용으로 도 이용가치가 높은 것으로 알려져 있다. 특히 들깨의 종실은 약 60~65%나 되는 리놀렌산(α -linolenic acid)을 함유하고 있는 식물로 알려져 있어서 국내에 자생하거나 재배되고 있는 들깨의 다양한 용도를 개발함과 아울러, 각종 항산화, 항종양 등 유익한 성분을 탐색하고 이를 추출 정제하여 상품화 하는 기술이 개발된다면 들깨의 이용

* 영남농업시험장 (Youngnam Agricultural Experiment Station, R. D. A., Milyang, 627-130, Korea)

** 전북대학교 유전공학연구소 (Institute for Molecular Biology and Genetics, Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea) <95. 5. 8 接受>

가치는 한층 더 높아지게 될 것이다. 그러나 현재 까지 성분분석 및 그 효능에 대한 과학적인 연구 결과 및 다양한 용도개발의 노력은 미흡한 실정이다. 한편 일본에서는 들깨속에 속하는 자소(*Perrilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo.)는 잎과 종실을 발한, 진정, 진통 및 이뇨제로 사용하고 있으며 일본에서는 민간요법으로 식중독 치료제로 쓰이고 항백선균 활성이 있음도 보고되었다¹⁴⁾.

호기적 유기체의 생명 유지에 필수적인 산소는 생명체 내에서 활성화되어 과산화(O_2^- , superoxide)로 전환된 후 이용되며, superoxide는 다시 H_2O_2 , hydroxy radical(-OH), 1O_2 (singlet oxygen)으로 변하며, 이들 활성산소는 생체막의 지질을 과산화시켜 생체막을 변질시킴으로써 효소 불활성, 세포노화, 동맥경화, 당뇨병, 뇌졸중, 발암성 등과도 깊은 관련이 있다고 보고되어 있다^{9,20)}.

인체는 호흡작용 등에 이용되고 남은 활성산소를 제거시켜 주는 효소계 및 물질들을 함유하고 있으며, 그 주요한 작용이 간장에서 일어나고 있다. 그러나 간장이 유독물질로 손상을 입을 경우 간 세포막의 지질이 과산화되며, 내부의 효소계가 파괴됨으로써 혈액 및 조직내의 과산화 지질량이 증가하며, 이 과산화 지질과 활성산소의 연쇄반응으로 기타 조직에 질병을 유발한다고 보고되었다^{9,13)}. 따라서 생체내 자유기(free radical)의 생성을 억제하는 것이 질병예방을 위한 중요한 문제이다.

또한 활성화된 산소, 과산화수소 및 생성된 과산화 지질 등의 제거제(scavenger)로 알려진 superoxide dismutase, peroxidase, catalase 등은 효소활성에 의하여 과산화 지질생성을 효과적으로 억제할 수 있다고도 보고되었으며¹⁶⁾, 여러가지 항산화제를 이용하여 지질 과산화를 억제함으로써 생체를 과산화 지질의 장애로부터 방어할 수도 있다. 특히 노화억제에 대한 연구는 삶의 질과 장수를 추구하는 현대인들의 욕구에 부응하여 많은 흥미를 유발하여 왔다. 이러한 추세에 따라 노화억제에 대한 연구의 일환으로 생체내 자유기(free radical)의 생성을 억제하는 항산화 활성물질에 대한 연구가 수행되어 각종 식물로부터 분리

된 항산화 활성 물질들이 보고되었다¹⁹⁾. 자연의 항산화 효소중의 하나인 superoxide dismutases (SOD; superoxide: superoxide oxidoreductase EC 1.15.1.1)는 세포에 해로운 환원산소종을 과산화수소로 전환시키는 반응 ($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)을 촉매하는 효소이며, SOD에 의해 생성된 H_2O_2 는 peroxidase나 catalase에 의해 무해한 물분자와 산소분자로 전환된다. SOD는 효소분자에 들어 있는 금속효소의 종류에 따라 Cu/ZnSOD, MnSOD 그리고 FeSOD 등의 세가지 종류로 나누어진다^{2,6)}. 고등식물에 있어서 가장 풍부한 SOD는 시토졸 (cytosol)과 플라스티드(plastids)에서 발견되는 Cu/ZnSOD이다. 식물의 SOD활성은 병원균의 침입¹¹⁾, 저온 등이 여러가지 환경적, 화학적 자극에 의하여 증가되는 것으로 알려져 있다^{10,12,16)}.

본 연구는 생체노화의 원인물질로 밝혀진 과산화 지질의 생성 억제 효과 검토를 위해서 비변성 전기영동법과 개량된 SOD활성 염색방법을 사용하여 들깨 및 자소잎 SOD 동위효소의 종류와 품종별 활성과 그들의 항산화 활성을 조사한 것이다.

材料 및 方法

1. 효소의 추출

동계비닐하우스에서 생육시킨 엽실들개의 10품종 및 수집종의 잎을 채취하여 SOD동위효소 분석용 시료로 사용하였다. 잘게 자른 들깨 및 자소 생엽 1g과 효소추출 완충용액 (pH 7.0, 100 mM phosphate, 10 mM ascorbate, 5 mM EDTA) 5ml를 유발에 넣은 후 곱게 갈아서 얻은 조추출액을 15,000g으로 10분간 1회 원심분리하였다. 원심분리하여 얻은 상등액을 탈염완충용액 (50 mM phosphate, pH 7.0, 0.2 mM EDTA)으로 평형시킨후 Sephadex G-25 column을 이용하여 탈염후 효소활성 검정용액을 사용하였다. 효소용액 중의 단백질 함량은 Bradford법을 이용하여 측정하였다⁶⁾.

2. SOD활성 측정

NBT(Nitro Blue Tetrazolium) 환원법을 이용하여 SOD활성을 검정하였다³⁾. 반응용액이 들어 있는 시험관을 25℃의 온도 및 광조절 식물생장상의 광원에 7분간 균일하게 조사시킨 후, 분광광도계를 이용하여 560 nm에서 용액의 흡광도를 측정하였다. SOD활성 정도는 NBT환원저해율로 표시하였다¹⁾.

3. SOD활성 염색과 동위효소 식별

Bollag 등의 Native discontinuous polyacrylamide gel을 이용하여 효소용액의 단백질을 분리하였다⁵⁾. 농축겔과 분리겔의 acrylamide 농도는 각각 5%와 10~15%였다. 전기영동 완충용액은 12.5 mM Tris, 95 mM glycine, pH 8.8을 사용하였으며 전기영동 전압과 시간은 분리 gel의 acrylamide 농도에 따라 조절하였다. 전기영동 후 겔내 SOD활성 band는 negative 염색법을 사용하여 검출하였다. 분리겔을 50 mM potassium phosphate, pH 7.0, 0.625 mM NBT-2HCl과 50 mM potassium phosphate, pH 7.0, 0.1 mM EDTA, 30 mM L-methionine, 3 μ M riboflavin에 30분과 20분씩 각각 침지시킨 후, 겔을 lap에 싸서 겔에 뚜렷한 효소활성 band가 나타날 때까지 효소활성 측정에 사용한 식물생장상 내의 광원에 30~60분 동안 반응시켰으며, 금속조효소 종류에 따른 SOD의 종류는 KCN과 H₂O₂에 대한 반응특성에 따라 분류하였다. SOD 활성 저해제는 활성염색용액에 겔을 침지하기 전에 첨가하였다.

4. 항산화 활성 측정

1) 시료조제

동계비닐하우스에서 생육시킨 들깨와 자소의 잎을 채취하여 저온진공냉동 건조기에서 7일 동안 건조시킨 후 분쇄(40-mesh)하여 각 시료를 품종별로 5g씩 채취하여 80% MeOH 100ml로 처리하여 2일간 실온에서 추출하고 20ml로 농축한 후 이 농축액을 항산화 활성 분석용 시료로 사용

하였다.

2) 간 microsome의 분리과정

김 등¹⁵⁾의 방법에서 따라 쥐의 간으로부터 microsome을 분리하였다. Microsome 분획은 adult Sprague-Dawley rat (200~250g)에서 적출된 간을 사용하였다. 간 조직을 절단하여 잘게 자른 후, 그림 1과 같은 방법으로 간을 0.25M sucrose 용액으로 세척하여 4배 용량의 냉각된 Tris-HCl buffer (150mM KCl, 50mM Tris-HCl, pH 7.4)에 넣어 균질화 하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 얻어진 상등액을 사용하였다. 이 상등액을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균질화되지 않은 조직, 절편 및 mitochondria를 제거한 후, 다시 상등액을 취하고 30,000 rpm 1시간 원심분리하여 소량의 pellet를 얻었다. 이 pellet를 Tris-HCl buffer (150mM KCl, 50mM Tris-HCl, pH 7.4)에 단백질 농도가 20mg protein/ml가 되도록 suspension시킨 후 -70℃에 보관하였으며, 사용시 4℃에 녹여 사용하였다.

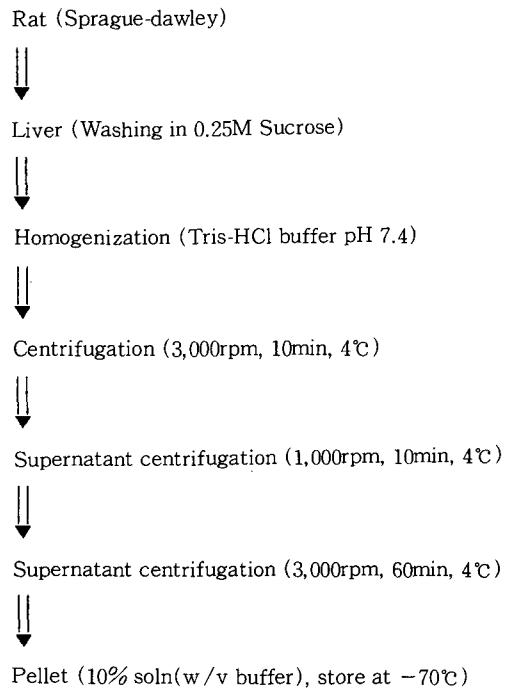


Fig. 1. Preparation procedures of microsome fraction from rat.

3) Fe²⁺/ Ascorbate에 유도된 항산화 활성 조사

지질 과산화 저해활성 검정법으로는 Wong 등²¹⁾의 방법에 따라 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) 1ml, microsome분획 100 μ l, 2mM ascorbate 100 μ l, 0.2mM FeSO₄ 100 μ l, 증류수 600 μ l 및 검체시료 100 μ l를 첨가하여 총량 2ml로 하였다. 이 반응액 2ml를 Bidlack 등⁴⁾의 방법에 따라 잘 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켜 지질 과산화를 유도하고, 3M-trichloroacetic acid와 2.5 N-HCl의 혼합용액 0.5ml를 첨가하여 반응을 중지시킨 후, 1,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 이 상등액 1ml를 취하여 0.67% TBA(thiobarbituric acid) 0.5ml를 첨가하여 끓는 물에 20분간 가열하여 발생시켰다. 냉각 후 533nm에서 흡광도를 측정하였다. 지질 과산화 억제율은 대조군의 흡광도에 대한 저해율(%)로 비교하였다.

4) Fe³⁺ADP/ NADPH에 의해 유도된 항산화 활성 조사

Pederson 등¹⁷⁾의 방법에 따라 0.2mM FeCl₃ 100 μ l, 2mM ascorbate 100 μ l, 50mM Tris-HCl, buffer (pH 7.5) 1ml, 증류수 600 μ l, microsome 분획 100 μ l, 0.4mM ADP(adenosine-5-diphosphate), 0.4mM NADPH(β -nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate) 및 시료 100 μ l를 첨가하여 총량 2ml로 하였다. 이 반응액 2ml를 Bidlack 등⁴⁾의 방법에 따라 Fe²⁺/Ascorbate에서 같이 반응시킨 후 533nm에서 흡광도를 측정하였다. 지질 과산화 억제율은 대조군의 흡광도에 대한 저해율(%)로 비교하였다.

結果 및 考察

SOD 특이적 활성저해제인 KCN과 H₂O₂를 사용하여 들깨잎 및 자소잎의 SOD의 종류를 조사하였던 바 들깨잎은 Cu/ZnSOD, FeSOD을, 자소잎은 Cu/ZnSOD는 포함하고 있으나 FeSOD는 포함하지 않은 것으로 나타났다 (그림 2).

SOD는 금속조효소를 함유하고 있으며 금속조효소에 따라 KCN과 H₂O₂에 대한 품종간 반응특성이 다른 것으로 알려져 있다^{8,13)}. 즉, 들깨잎과 자소잎의 Cu/ZnSOD는 H₂O₂에 모두 활성이 저해되고, 들깨잎의 FeSOD는 H₂O₂에 의해서만 활성이 저해되었다. 자소잎의 경우 분자량이 상대적으로 작은 두개의 Cu/ZnSOD는 KCN과 H₂O₂에 의해 모두 활성이 저해되었으나 들깨잎의 FeSOD는 KCN에 의해서는 활성이 저해되지 않았다. KCN과 H₂O₂에 모두 저항성을 나타내는 SOD는 존재하지 않았다. 따라서 들깨잎 SOD에는 분자량이 상대적으로 작은 두개의 Cu/ZnSOD와 분자량이 큰 FeSOD는 존재하나, 자소잎에는 FeSOD는 존재하지 않는 것으로 생각된다. H₂O₂에 의한 활성저해 정도는 FeSOD가 Cu/ZnSOD보다 더 낮았으나, FeSOD도 최저 1.5mM H₂O₂에 의해서도 활성이 현저히 억제되었다.

고등식물은 그의 다양성에 비하여 Cu/ZnSOD보다 FeSOD를 함유하고 있는 경우가 드문 것으로 알려져 있으나, 들깨는 Cu/ZnSOD와 FeSOD를 가지며 MnSOD는 가지고 있지 않는 점으로 보아 SOD체계는 유채, 양배추, 무우 등과

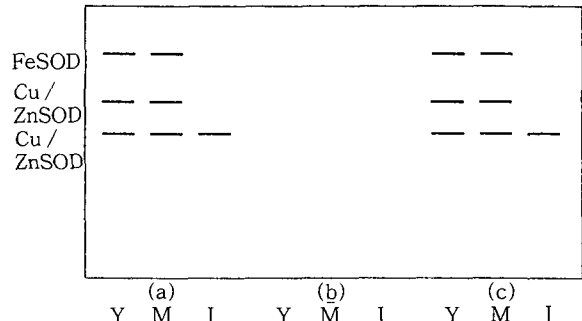


Fig. 2. SODs characteristics of Yiobsildlggae (Y), Milyang 1(M), and Red jaso (J) leaves extracts. Cells were incubated in the SOD activity staining solutions containing either 2mM KCN (a) or 1.5mM H₂O₂ (b) and without the inhibitors (c). Each samples (50 μ g) or total protein were electrophoresed in nondenaturation polyacrylamide gels. Acrylamide concentrations of the stacking and separating gels were 5 and 15%, respectively.

유사한 것으로 생각되며, 자소잎은 Cu/ZnSOD만을 함유하고 있는 점으로 보아서 자소는 고구마와 고등진핵생물의 SOD체계와 유사한 것으로 생각되었다.

현재 밀양지방에서 재배되고 있는 들깨잎의 SOD의 품종적 특성을 조사한 바, 두개의 Cu/ZnSOD는 실험에 사용한 모든 잎들께 품종에서 존재하였으며, FeSOD는 두개의 동위효소가 품종에 따라 다른 조합으로 존재하여, 잎들개의 SOD의 유전적 다양성은 비교적 단순한 것으로 생각되었다. 잎들개의 품종에는 FeSOD1, FeSOD2중 하나를 가지고 있는 품종(그림 3; 3, 9, 10)과 두 FeSOD를 모두 가지고 있는 품종(그림 3; 1, 2, 4, 6, 7, 8)이 모두 존재하였다. 따라서 들깨잎 SOD중 종 특이적인 것은 존재하지 않는 것으로 생각된다.

또한 잎들개의 분류도 잎의 형태적 특성등을 고려하여 실시되어 왔기 때문에 기존품종의 유전적 순도는 높지 않을 것으로 생각된다. 따라서 체계적인 육종사업에 의한 관리가 이루어지기 전에 종

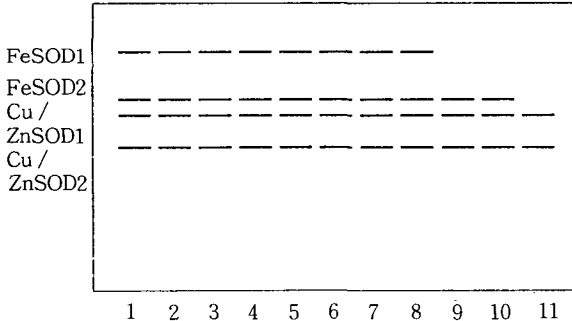


Fig. 3. SODs of perilla varieties and red jaso. Total protein samples (50 μ g) of perilla leaf extracts were separated in nondenaturing polyacrylamid gels and SOD activity was stained by incubating the gel in the staining solutions and illuminating the gel under the light source as indicated in Material and Methods. Acryamide concentration of the separating gel was 10%. Varieties were 1; Sangnam-1, 2; Yeobsildlggae, 3; Gupo-3, 4; Milyang 2, 5; Milyang 1, 6; Gimhae-4, 7; Gupo-2, 8; Pusan-1, 9; Bossamdlggae, 10; Gimgae-5, 11; Red jaso.

간 유전물질교환이 빈번히 이루어졌을 가능성이 높다. 들깨잎의 SOD활성정도는 품종에 따라 큰 차이가 있었다(그림 4). 밀양 2호가 가장 높은 SOD활성을 나타내었으며(36.8%), 엽실들께, 밀양1호, 구포-2, 부산-1 등도 비교적 높은 활성을 나타내었다. 자소는 SOD활성 정도가 20.6%로서 가장 낮은 활성을 보였다. 이러한 것은 자소잎은 단지 Cu/ZnSOD만을 함유한 것과 관련이 있을 것으로 생각된다.

한편 들깨와 자소잎을 80% MeOH로 추출하여 얻은 추출물을 비효소적 방법인 Fe²⁺ascorbate첨가 및 Fe³⁺-ADP/NADPH첨가에 의해 유도된 지질 과산화의 억제에 미치는 영향을 조사한 결과 실험에 사용된 공시재료가 모두 항산화 활성을 가지고 있는 것으로 확인되었다(표 1). 이는 식물체에는 수식종류의 phenolic 화합물이 함유되어 있고, 이중 많은 종류의 flavonoid 화합물이 항산화 활성에 관여하기 때문으로 생각된다. 들깨잎의 항산화 활성 정도는 품종에 따라 통계적인 차이가 있었다(표 1). 공시재료중 가장 강한 항산화 활성을 보인 품종은 밀양 2호(52.3%)를 비롯하여 밀양 1호(47.6%), 엽실들께(43.1%), 부산-1(41.1%) 등이었다. 한편 Fe³⁺-

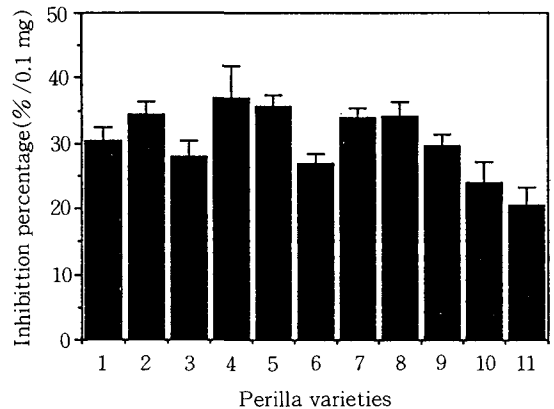


Fig. 4. Percentage of SOD activity inhibition in perilla varieties and red jaso. Varieties were 1; Sangnam-1, 2; Yeobsildlggae, 3; Gupo-3, 4; Milyang 2, 5; Milyang 1, 6; Gimhae-4, 7; Gupo-2, 8; Pusan-1, 9; Bossamdlggae, 10; Kimhae-5, 11; Red jaso.

Table 1. Antioxidant activities of the MeOH extracts induced by Fe²⁺/ascorbate and Fe³⁺-ADP/NADPH

MeOH Extracts	Fe ²⁺ /ascorbate	Fe ³⁺ -ADP/NADPH
Inhibition (%).....	
Sangnam-1	33.2	59.4
Yeobsildlggae	43.1	66.0
Gupo-3	27.6	56.6
Milyang 2	52.3	78.4
Milyang 1	47.6	67.7
Gimhae-4	25.8	54.4
Gupo-2	35.7	62.8
Pusan-1	41.1	65.0
Bossamdlggae	31.3	58.4
Kimgae-5	23.7	36.2
Red jaso	14.5	24.4
CV(%)	4.9	3.0
LSD (0.05%)	3.7	3.8

ADP/NADPH첨가에 의해서도 Fe²⁺/ascorbate첨가에서와 같은 품종순서로 활성 정도가 강하나, 그 정도는 Fe²⁺/ascorbate첨가보다 모두 강한 활성을 보였다. 자소잎의 경우는 이 두가지 첨가 방법에 의한 활성 정도는 14.5, 24.4%로서 공시재료중 가장 낮아서 들깨잎과는 뚜렷이 구별되었다. 따라서 밀양 1호, 밀양 2호, 엽실들깨, 부산-1 등은 고항산화물질 품종육성을 위한 기본재료로 이용 가능성이 충분한 것으로 생각된다.

SOD활성 정도와 Fe²⁺/ascorbate, Fe³⁺-ADP/NADPH첨가제 처리와의 상관관계에서는 고도의 정의 상관관계 ($r=0.9220$, $r=0.8975$)가 되어 SOD활성 정도가 높은 경우 항산화 활성이 높은 것으로 생각되나 두 첨가제 처리 방법간에도 유의성이 인정되어 항산화 활성 정도를 평가할 때 첨가제 처리에 주의가 요망된다.

들깨는 비교적 기후에 대한 적응범위가 넓어 우리나라 어느 곳에서나 재배가 가능하나 겨울철 동계시설 재배시 기온저하에 따른 저온장해를 받는 경우가 흔하여 내재해성 품종 육성의 필요성이 제기되어 왔다. SOD가 각종 생리장애에 대한 내성의 생화학적 토대를 제공하고 있음이 입증되고 있으므로 내재해성 품종 육성을 위한 연구의

일환으로 들깨잎 유전자원에 대한 SOD, Catalase, Peroxidase 등 내재해관련 효소와 세포수준에서의 항산화 활성 평가 및 항산화 성분의 추출, 정제하여 천연항산화제, 의약품으로 이용 가능성에 대한 더욱 상세한 연구가 요망된다.

摘 要

SOD(superoxide dismutase)는 유해 활성산소에 의한 생리적 장애를 방지하는 방어기작의 한 구성요소이다. 들깨잎 SOD의 특성을 알아보기 위한 NBT(nitro blue tetrazolium) 환원법을 이용하여 들깨와 자소잎의 SOD동위효소의 종류와 활성 및 이들의 항산화 활성을 Fe²⁺/ascorbate, Fe³⁺-ADP/NADPH첨가제를 처리하여 조사하였다. 들깨잎에는 품종에 따라 3~4개의 주요 SOD동위효소가 있었다. SOD는 함유하고 있는 금속조효소에 따라 3종류로 분류되는데, 들깨잎에는 두개의 Cu/ZnSOD와 두개의 FeSOD를 함유하고 있었으나, 자소잎은 단지 Cu/ZnSOD만을 함유하고 있었다. Cu/ZnSOD는 들깨 품종에 따른 차이가 없었으나, FeSOD는 분자량이 다른 두개의 FeSOD동위효소의 존재 양상이 품종에 따라 차이를 나타내었으며, SOD활성 및 항산화 활성도 품종에 따라 비교적 큰 차이를 보였다. 비효소적인 Fe²⁺ascorbate첨가 및 Fe³⁺-ADP/NADPH첨가에 의해 유도된 지질 과산화의 억제에 미치는 영향을 조사한 결과 공시재료중 밀양 2호가 가장 강한 항산화 활성을 가지고 있는 것으로 확인되었다. 자소잎의 경우는 SOD활성과 유사하게 항산화 활성 정도 가장 낮아서 들깨잎과는 뚜렷이 구별되었다.

引用文獻

1. Asada, K., M. Takahashi, and M. Nagate. 1974. Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. *Agr. Biol. Chem.* 38: 471-473.

2. Bannister, J.V., W.H. Bannister and G. Rotilio. 1987. Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22: 111-180.
3. Beyer, W.F.Jr. and I. Fridovich. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity : some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 161: 559-566.
4. Bidlack, W.R. and A.L. Tapper. 1973. *Lipids.* 8: 177.
5. Bollag, D.M. and S.J. Edelman. 1991. *Protein Methods*, Wiley-Liss, New York.
6. Bowler, C., M. Van Montagu, and D. Inze. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 43: 83-116.
7. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
8. Bridges, S.M. and M.L. Salin. 1981. Distribution of iron-containing superoxide dismutase in vascular plants. *Plant Physiol.* 68: 275-278.
9. Chance, B., H. Sies and A. Boveris. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59: 527-547.
10. Clare, D.A., H.D. Rabinowitch, and I. Fridovich. 1984. Superoxide dismutase and chilling injury in *Chorella ellipioidea*. *Arch. Biochem. Biophys.* 231: 158-163.
11. Doke, N. 1983. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiol. Mol. Plant Physiol.* 23: 345-357.
12. Fridovich, I. 1986. Superoxide dismutases. *Adv. Enzymol.* 58: 61-97.
13. Hammond, B., A. Kontos, and M.L. Hess. 1985. Oxygen radicals in the adult respiratory distress syndrome, in myocardial ischemia and reperfusion injury, and in cerebral vascular damage. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 63: 173-187.
14. Honda, G., K. Koga, Y. Koezuka and M. Tabata. 1984. Antidermatophytic compounds of *Perilla frutescens* Britton var. *crispa* Decne. *Shoyakugaku Zasshi.* 38(1) : 127-130.
15. 김찬길, 김만옥, 손현주, 위재준, 허정남. 1990. 고려인삼의 활성성분 분리 및 각국삼 비교. 한국인삼연구초연연구소, 인삼연구보고서 (효능분야), 157-195.
16. Matkovic, B., R. Novak, H.D. Hanh, L. Szabo, S. I. Varga and G.Z. Zalesna. 1977. A comparative study of some more important experimental animal peroxide metabolism enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 56: 31-58.
17. Pederson, T.C. and S.D. Aust. 1975. The mechanism of liver microsomal lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Acta.* 385: 232-241
18. Peri-Treves, R., E. Galun. 1991. The tomato Cu/Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant Mol. Biol.* 17: 745-760.
19. Simic, M.G. and M. Karel. 1980. *Auto-oxidation in food and biological systems; Natural antioxidants.* Plenum Press, NY. 261-282.
20. Steinman, H.M. and B. Ely. 1990. Copper-zinc superoxide dismutase of *Caulobacter crescentus* : cloning sequencing, and mapping of the gene and periplasmic location of the enzyme. *J. Bac-*

teriol. 172: 2901-2910.

21. Wong, S.F., B Holliwell, R. Richmond and W.R. Skowroneck. 1981. The role of superoxide and hydroxyl radicals in the

degradation of hyaluronic acid induced by metal ions and ascorbic acid. *J. Inorganic Biochemistry*. 14: 127-134.