

## 아세톤과 DMSO (Dimethylsulfoxide)로 抽出하여 測定한 잣나무 針葉 內 葉綠素 含量 比較

徐金永<sup>1</sup> · 孫堯丸<sup>1\*</sup> · 具珍祐<sup>1</sup> · 魯南賑<sup>1</sup> · 李明鐘<sup>2</sup>

<sup>1</sup>고려대학교 환경생태공학부, <sup>2</sup>강원대학교 산림자원학부

## Extraction and Determination of Chlorophyll Contents of Korean Pine Needles Using Acetone and DMSO (Dimethylsulfoxide)

Keum Young Seo<sup>1</sup>, Yowhan Son<sup>1\*</sup>, Jin Woo Koo<sup>1</sup>,  
Nam Jin Noh<sup>1</sup>, and Myong Jong Yi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Division of Environmental Science and Ecological Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea

<sup>2</sup>College of Forest Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

**요 약:** 참나무류 임분에 자연 발생한 잣나무와 인공 조림된 잣나무 침엽을 80% acetone과 DMSO(Dimethylsulfoxide)로 추출하여 측정된 엽록소 함량을 비교하였다. 80% acetone에 비해 DMSO로 추출한 총 엽록소 함량은 잣나무 침엽의 모든 연령에서 약 4-6배 높은 값을 나타냈다. 또한 DMSO로 추출한 경우 상층 임관을 점유한 인공 조림된 잣나무와 하층에 생육하는 잣나무 간에는 총 엽록소 함량에 차이가 없었으며, 80% acetone으로 추출한 경우에도 역시 두 종류의 잣나무 사이에 연령별 총 엽록소 함량의 차이는 없었다. DMSO로 추출할 경우 자연 발생 잣나무와 인공 조림된 잣나무 침엽 모두 6시간의 추출이 적절한 것으로 판단된다.

**Abstract:** Chlorophyll contents in Korean pine (*Pinus koraiensis*) needles of an advance growth stand and a plantation were compared using 80% acetone and DMSO (dimethylsulfoxide). Total chlorophyll contents in DMSO were 4-6 times higher than those in 80% acetone. There were no significant differences in chlorophyll contents between two stand types in both 80% acetone and DMSO. It appeared that 6 hours in DMSO would be appropriate to successfully extract chlorophyll from Korean pine needles of advance growth and planted trees.

**Key words:** 80% acetone, chlorophyll contents, DMSO, *Pinus koraiensis*

### 서 론

식물체 내 엽록소 분석은 Comar and Zscheile(1942)가 90% acetone을 이용한 다단계 추출법을 개발한 이래 지속적으로 발전되었는데, 특히 Arnon(1949)이 개선한 방법은 실험이 간편하여 고등식물과 녹조류를 대상으로 가장 오래 사용되었다. 그러나 이 방법에서 엽록소 a/b 비를 낮게 추정한다는 지적도 있다(Porra, 2002). 그 후 Talling(1974)은 methanol이 엽록소 추출에 효과적이라고 보고하였고, Lichtenthaler and Wellburn(1983)이 80% acetone

으로 개량된 실험법을 소개하였다. 또한 Shinano *et al.* (1996)은 조류, 지의류, 수생식물, 고등식물 등에서 DMSO (Dimethylsulfoxide)를 사용한 엽록소 추출법이 효율적이라고 보고하였다. Barnes *et al.*(1992)은 추출용매로 acetone을 사용하면 흡광도를 측정하는 과정에서 혼탁이 일어날 수 있으며, 엽 시료를 갈거나 원심분리한 후 곧바로 흡광도를 측정해야 하는 단점이 있다고 하였다. 그러나 DMSO를 사용한 추출법은 이와 같은 단점을 보완하며 엽록소 농도가 극도로 낮은 경우도 측정이 가능하다고 보고하였다. Shinano *et al.*(1996)도 다른 용매에 비해 DMSO는 식물 조직의 물리적 파괴가 없고 측정이 신속 간단하며 추출용매로 안정하다고 하였다.

국외에서 DMSO를 이용한 엽록소 추출법이 널리 사용되고 있으며(Barnes *et al.*, 1992; Shinano *et al.*, 1996;

\*Corresponding author  
E-mail: yson@korea.ac.kr

본 연구는 농림부 농림기술개발사업(과제번호: 203090-03-2-HD110) 지원에 의한 연구 결과의 일부임.

Thomas *et al.*, 1996; Kitaoka and Koike, 2005), 국내에서는 최근 최정호와 정진철(2002), 권기원 등(2003)이 DMSO를 이용하여 엽록소를 추출한 연구 사례가 있으나, 대부분 80% acetone을 사용하고 있다(최현섭과 이은정, 1995; 우수영 등, 1999; 주영특 등, 1999; 김갑태, 2003; 우수영 등, 2004; Lee and Woo, 2000). 한편 DMSO를 사용할 경우 Barnes *et al.*(1992)은 지의류와 고등식물에서 200분 정도는 추출하여야 한다고 하였고, Shinano *et al.*, (1996)은 wheat, field bean, dwarf bamboo, oak 등에서 60분 정도가 적정하다고 하였으며, Thomas *et al.*(1996)은 활엽수, 덩굴식물, 초본류 등에서는 30분의 추출시간이면 충분하다고 하여 적절한 추출시간에 대해서는 연구 결과에 따라 차이가 있다. 본 연구에서는 잣나무 침엽을 대상으로 기존에 일반적으로 사용되고 있는 80% acetone과 DMSO로 추출한 엽록소 함량을 비교하고, DMSO를 용매로 추출시간을 달리할 경우 나타나는 엽록소 함량 차이를 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료

엽록소 분석용 시료는 강원도 춘천시 강원대학교 연습림(37° 47'N, 127° 48'E)의 참나무류 천연 혼효림 내 하층에 인근 잣나무림으로부터 종자가 전파되어 천연 갱신된 4-10년생 16본의 잣나무와 인근의 인공 조립된 66년생 6본의 잣나무에서 채취하였다. 잣나무는 침엽의 연령과 수관 율폐 정도에 따라 그 성질이 다르다는 점을 감안하여 (Smith and Hinckley, 1995), 하층에서 피압된 자연 발생 잣나무 침엽과 인공 조립된 잣나무의 침엽을 구분하여 시료를 채취하고, 시료는 연령별로 분리하였다.

### 2. 엽록소 함량 측정

#### 1) DMSO 추출법

침엽 시료를 길이 2 mm 이내로 잘게 썰고 잎의 중앙부 위 시료 가운데서 20 mg을 정량하여 100% DMSO (Dimethylsulphoxide) 5 ml에 침적시켰다. 이후 항온욕조에서 65°C로 각각 1, 2, 4, 5, 6, 7시간별로 중탕한 뒤, spectrophotometer(Hitachi, U-1100)를 이용하여 665 nm와 648 nm의 파장에서 흡광도를 측정하고, 수식에 대입하여 엽록소 a와 b 그리고 총 엽록소 함량을 구하였다(Barnes *et al.*, 1992).

#### 2) 80% acetone 추출법

침엽 시료 1 g을 채취하여 액체질소와 막자사발을 이용하여 분쇄한 뒤, 80% acetone으로 4°C에서 2시간 동안 침적 후 엽록소를 추출하였다. 이어 상등액을 spectrophotom-

eter(Hitachi, U-1100)를 이용하여 663 nm와 645 nm의 파장에서 흡광도를 측정하고, 수식에 대입하여 엽록소 a와 b 그리고 총 엽록소 함량을 구하였다(Arnon, 1949).

### 3. 통계분석

채취한 잣나무의 종류 및 침엽의 연령과 추출방법별로 엽록소 a와 b 그리고 총 엽록소 함량 등의 차이를 GLM (General Linear Model)을 이용하여 검증하였고, 통계적으로 유의성이 인정된 평균치 간의 차이는 Duncan multiple range test로 분석하였다. 모든 자료는 SAS(2000)를 사용하여 통계 처리하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. DMSO와 acetone으로 추출한 엽록소 함량 비교

인공 조립 잣나무와 자연 발생 잣나무의 침엽을 DMSO 추출법으로 4시간 추출하고 80% acetone으로 추출한 엽록소 a의 함량은 각각 1.24-2.04 mg/g과 0.24-0.30 mg/g, 엽록소 b의 함량은 각각 0.28-0.57 mg/g과 0.16-0.19 mg/g 등으로써 DMSO 추출법에서 엽록소 a는 5.1-7.6배, 엽록소 b는 1.8-3.7배 높은 것으로 나타났다(Table 1). 이러한 결과는 Shinano *et al.*(1996)이 DMSO로 추출하는 것이 80% acetone과 96% ethanol로 추출하는 것보다 엽록소 a 함량이 높다는 보고와 일치하였으나, 엽록소 b의 함량은 50% 이하로 감소하였다는 결과와 차이가 있는 것이다. 또한 DMSO로 추출한 총 엽록소 함량은 1.52-2.61 mg/g으로, Barnes *et al.*(1992)이 *Pinus halepensis*, *P. nigra*, *P. ponderosa*, *Picea abies* 등의 수종을 대상으로 측정한 1.41-1.69 mg/g과 Thomas *et al.*(1996)이 10종의 목본식물에서 측정한 2.82-4.88 mg/g의 범위에 포함되었다. 그러나 80% acetone으로 추출한 총 엽록소 함량은 0.40-0.49 mg/g으로 모든 엽 연령에서 DMSO로 측정한 값의 약 1/2-1/3 정도로 낮게 측정되었다(Table 1).

DMSO와 80% acetone으로 추출한 결과, 자연 발생 잣나무와 인공 조립 잣나무 침엽간의 연령별 총 엽록소 함량은 DMSO로 추출한 1년생 침엽에서만 인공 조립 잣나무가 자연 발생 잣나무 침엽에 비해 높았을 뿐, 모두 통계적인 차이를 보이지 않았다( $p > 0.05$ ). 또한 DMSO에 의한 총 엽록소 함량은 연령에 따라 증가하는 경향을 나타냈지만 당년생을 제외하고 연령별 차이가 통계적으로 유의하지 않았다. 80% acetone에 의한 총 엽록소 함량도 당년생에서 2년생까지는 증가하였으나 3년생부터는 약간 감소하였으며 엽 연령에 따른 차이의 통계적 유의성은 없었다(Table 1). 당년생 침엽의 엽록소 함량이 가장 낮은 이유는 1년생과 2년생에 비해 상대적으로 엽육 조직의 발달이 미약하기 때문으로 볼 수 있다(주영특 등, 1999).



**Table 2. Mean chlorophyll contents of Korean pine needles in DMSO.**

Extraction time (hour)	Advance growth stand (n=62)				Plantation (n=21)			
	chl a	chl b	Total chl	chl a/b	chl a	chl b	Total chl	chl a/b
1	1.44 <sup>c</sup> (0.04)	0.39 <sup>d</sup> (0.01)	1.82 <sup>c</sup> (0.05)	3.79 <sup>a</sup> (0.06)	1.62 <sup>a</sup> (0.09)	0.39 <sup>b</sup> (0.02)	2.01 <sup>a</sup> (0.12)	4.20 <sup>a</sup> (0.08)
2	1.57 <sup>b</sup> (0.04)	0.42 <sup>cd</sup> (0.01)	1.99 <sup>b</sup> (0.05)	3.78 <sup>a</sup> (0.06)	1.69 <sup>a</sup> (0.10)	0.42 <sup>ab</sup> (0.03)	2.10 <sup>a</sup> (0.13)	4.12 <sup>ab</sup> (0.09)
4	1.62 <sup>ab</sup> (0.04)	0.46 <sup>bc</sup> (0.02)	2.08 <sup>ab</sup> (0.06)	3.59 <sup>b</sup> (0.06)	1.77 <sup>a</sup> (0.10)	0.46 <sup>ab</sup> (0.03)	2.23 <sup>a</sup> (0.12)	3.91 <sup>bc</sup> (0.09)
5	1.67 <sup>ab</sup> (0.04)	0.48 <sup>ab</sup> (0.02)	2.14 <sup>ab</sup> (0.06)	3.58 <sup>b</sup> (0.06)	1.76 <sup>a</sup> (0.09)	0.47 <sup>ab</sup> (0.03)	2.23 <sup>a</sup> (0.12)	3.87 <sup>bc</sup> (0.09)
6	1.71 <sup>a</sup> (0.05)	0.50 <sup>ab</sup> (0.02)	2.21 <sup>a</sup> (0.06)	3.52 <sup>bc</sup> (0.06)	1.81 <sup>a</sup> (0.10)	0.48 <sup>a</sup> (0.03)	2.29 <sup>a</sup> (0.13)	3.84 <sup>cd</sup> (0.10)
7	1.71 <sup>a</sup> (0.05)	0.52 <sup>a</sup> (0.02)	2.23 <sup>a</sup> (0.07)	3.37 <sup>c</sup> (0.05)	1.76 <sup>a</sup> (0.09)	0.50 <sup>a</sup> (0.03)	2.26 <sup>a</sup> (0.12)	3.60 <sup>d</sup> (0.09)

Means followed by the same letter within a column do not differ significantly at  $p < 0.05$ .

DMSO로 추출하였을 때, 자연 발생 잣나무와 인공 조림 잣나무의 당년생 침엽에서 엽록소 a/b 비는 각각 4.03과 4.42로 가장 높았고 1년생부터는 감소하였으나 1년생 이상 침엽간 통계적인 차이는 없었다. 그러나 DMSO를 이용한 Barnes *et al.*(1992)의 1.47-2.87과 Thomas *et al.*(1996)의 2.58-5.16의 측정 범위보다는 높게 나타났다. 80% acetone으로 추출한 경우, 자연 발생 잣나무와 인공 조림 잣나무의 엽록소 a/b 비는 각각 1.53-1.67과 1.53-1.73 등으로, 시료 간에 통계적인 차이를 보이지 않았으며 침엽 연령별 차이도 없었다(Table 1).

한편, 기존의 연구에서 양엽이 음엽에 비해 엽록소 a/b 비가 높다는 결과가 보고된 바 있다(Thomas *et al.*, 1996; Kitajima and Hogan, 2003). 따라서 개방된 곳에 비해 산림 내 울폐된 곳의 앞에서 낮은 엽록소 a/b 비를 갖게 되며, 본 연구에서 자연 발생 잣나무의 침엽이 음엽의 특성을 가지는 것으로 가정할 수 있다. 그러나 DMSO로 엽록소를 추출한 결과, 인공 조림 잣나무와 자연 발생 잣나무 침엽 간에는 엽록소 a/b 비의 차이가 없었으며, 80% acetone으로 추출한 경우도 두 시료간 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 1). 이는 주영특 등(1999)이 잣나무 임관 하부와 낙엽송 임분 아래 피압받고 있는 잣나무에서 채취한 침엽의 총 엽록소 함량이 각각 1.88 mg/g과 1.80 mg/g으로 차이를 보이지 않았다는 기존 연구와 유사한 것이다.

## 2. DMSO를 이용한 추출시간별 엽록소 함량

DMSO를 용매로 추출시간을 달리하여 엽록소를 추출한 결과, 자연 발생 잣나무와 인공 조림 잣나무 침엽에서 엽록소 a와 b 그리고 총엽록소 함량, 엽록소 a/b 비 등이 시간에 따라 차이가 있는 것으로 나타났다. 자연 발생 잣나무 침엽의 경우는 엽록소 a의 함량은 4시간, 엽록소 b의 함량은 5시간, 총 엽록소 함량은 4시간 그리고 엽록소 a/

b 비는 6시간이 경과한 후부터 추출시간에 따른 차이가 나타나지 않았다. 또한 인공 조림 잣나무 침엽의 경우도 엽록소 a의 함량은 1시간, 엽록소 b의 함량은 2시간, 총 엽록소 함량은 1시간 그리고 엽록소 a/b 비는 6시간이 경과한 후부터 추출시간에 따른 차이가 나타나지 않았다. 따라서 자연 발생 잣나무와 인공 조림된 잣나무 침엽의 엽록소 a와 b, 총 엽록소 함량과 엽록소 a/b 비 등을 종합적으로 고려할 때, 엽록소 추출시간은 6시간이 경과한 이후부터는 안정적인 것으로 판단된다. 이는 최정호와 정진철(2002)이 무궁화를, 권기원 등(2003)은 참나무류를 대상으로 DMSO 추출법을 이용해 엽조직의 녹색이 완전히 빠지는 6-7시간까지 엽록소를 추출하였다는 국내 연구 결과와 유사한 것이다. 그러나 Shinano *et al.*(1996)가 보고한 최소한 60분, Thomas *et al.*(1996)이 보고한 30분 등의 국외 연구 결과와는 차이가 있는 것이다. 또한 Barnes *et al.*(1992)이 *Picea abies* 당년생 침엽에서 DMSO의 엽록소 추출시간이 160분까지는 충분치 못하므로 유의한 차이가 없는 200분까지는 추출해야 된다는 결과보다도 긴 것이다. 이같이 추출 시간에 따라 엽록소 함량에 차이가 있는 것은 시료의 두께와 형태에 기인한 것으로 대상 시료에 따라 적절한 엽록소 추출 시간이 달리 적용되어야 할 것이다(Barnes *et al.*, 1992; Shinano *et al.*, 1996). 또한 본 실험에서 사용된 시료는 추출 4시간 후부터 생엽의 녹색이 탈색되는 현상을 보였고, 6시간 이후부터 엽록소 함량의 변화가 통계적으로 유의하지 않는 것으로 나타났다. 따라서 DMSO에 의한 추출 실험 도중 가시적인 탈색이 완전히 일어났다고 하여 모든 엽록소가 완전히 추출되었다고 판단하기는 어려운 것으로 사료된다.

## 결론

DMSO와 80% acetone으로 추출한 잣나무 침엽의 엽록

소 함량을 비교한 결과 모든 침엽 연령에서 DMSO로 추출한 값이 약 4-6배 높게 나타났다. 그러나 DMSO로 추출한 경우 엽록소 함량은 1년생 침엽에서만 인공 조림 잣나무가 자연 발생 잣나무 침엽에 비해 높았을 뿐, 나머지는 통계적인 차이를 보이지 않았다. DMSO 추출법으로 1, 2, 4, 5, 6, 7시간별로 자연 발생 잣나무와 인공 조림된 잣나무 침엽을 추출한 결과 엽록소 a와 b 그리고 총 엽록소 함량이 차이를 보였으며 엽록소 a/b 비는 추출시간이 6시간을 경과하면서부터는 유의한 차이를 보이지 않았다.

### 인용문헌

1. 권기원, 최정호, 송호경, 강병식. 2003. 임분내 광환경의 차이에 따른 주요 참나무 수종의 성장과 엽록소 함량 변화에 관한 연구. *임산에너지* 22(3): 20-28.
2. 김갑태. 2003. 생육장소에 따른 더덕(*Codonopsis lanceolata*)의 성장, 광합성을 및 엽록소 함량 조사 연구. *한국임학회지* 92(1): 27-32.
3. 우수영, 이동섭, 권오규. 1999. 인공 피음처리에 따른 전나무의 성장과 엽록소 함량변화에 관한 연구. *한국농림기상학회지* 1(2): 97-102.
4. 우수영, 이성환, 권기원, 이재천. 2004. 가중나무, 튜립나무, 양버즘나무 묘목을 오존에 노출 시켰을 때 엽록소 함량과 Glutathione Reductase 활성변화. *한국임학회지* 93(7): 423-427.
5. 주영득, 김영채, 정동준, 김홍률. 1999. 경기도 광주지역 잣나무 침엽의 분광특성에 관한 연구. *한국농림기상학회지* 1(2): 103-109.
6. 최정호, 정진철. 2002. 생육시기에 따른 무궁화 몇 품종의 엽록소 함량 변화. *원광대학교 생명자원과학연구* 24: 28-34.
7. 최현섭, 이은정. 1995. 단풍나무속 식물 사종에 대한 엽록소함량과 광합성율의 계절적 변화. *한국생태학회지* 18(1): 137-146.
8. Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenol-oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1-15.
9. Barnes, J.D., Balaguer, L., Manrique, E., Elvira, S. and Davison, A.W. 1992. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 32(2): 85-100.
10. Comar, C.L. and Zscheile, F.P. 1942. Analyse of plant extracts for chlorophyll a and b by a photoelectric spectrometric method. *Plant Physiology* 17: 198-209.
11. Kitajima, K. and Hogan, K.P. 2003. Increases of chlorophyll a/b ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation and high light. *Plant, Cell and Environment* 26: 857-865.
12. Kitaoka, S. and Koike, T. 2005. Seasonal and yearly variations in light use and nitrogen use by seedlings of four deciduous broad-leaved tree species invading larch plantations. *Tree Physiology* 25: 467-475.
13. Lee, D.S. and Woo, S.Y. 2000. Effects of light environment on growth and chlorophyll contents of *Pinus strobus* seedlings. *Korean Journal of Agricultural and Forest Meteorology* 2: 198-200.
14. Lichtenthaler, H.K. and Wellburn, A.R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11: 591-592.
15. Porra, R.J. 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Phytosynthesis Research* 73: 149-156.
16. SAS. 2000. SAT/STAT User's Guide. Release 8.1 edition. SAS Institute. Cary, North Carolina, U.S.A.
17. Shinano, T., Lei, T.T., Kawamukai, T., Inoue, M.T., Koike, T. and Tadano, T. 1996. Dimethylsulfoxide method for the extraction of chlorophylls a and b from the leaves of wheat, field bean, dwarf bamboo, and oak. *Photosynthetica* 32(3): 409-415.
18. Smith, W.K. and Hinckley, T.M. 1995. *Ecophysiology of Coniferous Forests*. Academic Press, U.S.A. pp. 338.
19. Talling, J.F. 1974. General outline of spectrophotometric methods. pp. 22-25. In: *A Manual on Methods for Measuring Primary Production in Aquatic Environments*. Blackwell Science Publishment. London, U.K.
20. Thomas, T., Lei, R.T., Kitao, M. and Koike, T. 1996. Functional relationship between chlorophyll content and leaf reflectance, and light-capturing efficiency of Japanese forest species. *Physiologia Plantarum* 96: 411-418.

(2005년 5월 25일 접수; 2005년 6월 15일 채택)