

## 환경오염지에서 생육하는 사방오리나무의 색소함량 및 항산화능력의 계절변화

한심희<sup>1</sup> · 이재천<sup>1</sup> · 오창영<sup>1</sup> · 김종갑<sup>2</sup> · 김판기<sup>3</sup>

<sup>1</sup>국립산림과학원 산림유전자원부, <sup>2</sup>경상대학교 산림자원학과,

<sup>3</sup>국립상주대학교 산림환경자원학과

(2006년 4월 30일 접수; 2006년 6월 2일 수락)

## Seasonal Changes of Pigment Content and Antioxidant Capacity in Leaves of *Alnus firma* at Polluted Area

Sim-Hee Han<sup>1</sup>, Jae-Cheon Lee<sup>1</sup>, Chang-Young Oh<sup>1</sup>, Jong-Kab Kim<sup>2</sup> and Pan-Gi Kim<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Forest Genetic Resources, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350, Korea

<sup>2</sup>Faculty of Forest Science, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

<sup>3</sup>Department of Forest Resources and Environment, Sangju National University, Sangju 742-711, Korea

(Received April 30, 2006; Accepted June 2, 2006)

### ABSTRACT

To elucidate the relation of leaf development stage to the antioxidative function in leaves of *Alnus firma* Sieb. et Zucc. growing in polluted areas, we investigated seasonal changes of pigment content and antioxidant enzyme activities from January to June. In abandoned mine and industrial complex areas, antioxidant function against stress of trees was changed with leaf expansion, and antioxidant activity in leaves was highest in June. Among antioxidants, carotenoid, SOD and CAT were correlated with seasonal change. Carotenoid and SOD represented a positive correlation but CAT represented a negative correlation with leaf development. APX and CAT, which remove H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, had a complementary function in the antioxidant system. The lowest antioxidant activity was observed in April, and the damage level in leaves, shown as MDA content, was also lowest in April.

**Key words :** *Alnus firma*, Polluted area, Antioxidant, Carotenoid, Leaf development

### I. 서 론

폐광산의 폐석지 토양은 독성이 높은 중금속을 다량 포함하고 있으며(Han *et al.*, 1998; Alvarez *et al.*, 2003), 양분 및 수분이 부족하고, 토성이 거칠다(Hossner and Hons, 1992). 이와 같이 식물의 생장에 부적절한 환경조건은 폐석지에 초기부터 정착하여 살아가는 식물에게는 강한 스트레스 요인이 되며, 심할 경우 생장 저해를 가져온다(Logan, 1992; Han

*et al.*, 2004). 또한 폐석지역은 식물 생산성이 낮으며, 수관 상부의 잎들이 광 저해 현상(photoinhibition)으로 물질생산능력이 감소하기도 한다. 한편 공단지역에서 생장하는 식물은 산업 활동 과정에서 배출되는 아황산가스과 이들로 인해 생성되는 이차오염물질인 오존 등에 항상 노출되어 있다. 이러한 환경 조건하에서 생장하는 수목의 생존을 결정하는 것은 다양한 스트레스 요인을 얼마나 잘 극복하는가에 달려 있다.

식물들은 건조, 고온, 저온, 양분 부족, 독성 중금속 및 대기오염물질과 같은 환경 스트레스를 받았을 때, superoxide( $O_2^{\cdot -}$ ), hydrogen peroxide( $H_2O_2$ ), hydroxyl radical( $OH \cdot$ ), singlet oxygen( $^1O_2$ )과 같이 독성을 나타내는 활성산소를 생성한다. 다행히도 식물들은 독성 활성산소를 제거하는 생화학적 보호 메커니즘을 가지고 있다(Larson, 1988; Foyer *et al.*, 1994). 그러나 식물의 세포 내에서 활성산소의 생성과 제거의 균형이 깨지면 산화적인 손상이 일어나며, 과산화지질의 형성과 세포막 손상이 나타난다(Larson, 1995). 식물은 활성산소를 제거하여 산화 손상으로부터 보호하기 위해서 항산화물질인 ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol, glutathione, phenolics 및 flavonoids의 높은 함량을 요구하며(Schoner and Krause, 1990), 또한 항산화 효소인 catalase(CAT), superoxide dismutase(SOD), ascorbate peroxidase(APX), dehydroascorbate reductase(DHAR) 및 glutathione reductase(GR)의 활성증가를 요구한다(Halliwell, 1987; Bowler *et al.*, 1992). 본 저자들은 중금속과 오존 스트레스에 노출된 몇 가지 수목에서 스트레스에 대한 보상 반응으로 나타나는 보호 시스템으로 항산화 효소들의 활성이 증가하는 것을 확인하였다(Lee *et al.*, 2003a,b; Han *et al.*, 2004). 그러나 항산화 효소의 효율은 스트레스 수준이 너무 높아지면 감소하게 된다(Lee *et al.*, 2002).

환경 스트레스에 노출된 상태에서 성장하는 수목의 동이는 동아 형성 시기의 정보는 물론 이듬해의·생장 정보도 포함하고 있다. 이러한 동아속의 조직은 겨울 동안 인편에 의해 보호를 받지만, 잎 발달 초기에는 저온 스트레스 및 강한 빛과 같은 다양한 환경 스트레스에 노출되어 손상을 받기 쉽다(Jiang *et al.*, 2005). 이러한 환경조건에서 잎의 발달을 성공적으로 완성하는 것은 식물의 생존과 직결된다. 따라서 우리는 각종 스트레스 요인들이 존재하는 오염지역의 수목이 잎 발달 초기 단계에 어떻게 스트레스를 극복하는지 밝히고자 하였다. 또한 잎 발달 단계 중 스트레스 극복 기구는 언제 완성되며, 스트레스 요인에 따른 스트레스 극복 기구의 차이는 무엇인지를 알아보려고 하였다. 이 목적을 위하여, 서로 다른 스트레스 요인이 존재하는 오염지역의 수목을 대상으로 동아에서부터 잎이 완전히 성숙되는 시기까지 잎 내 색소, 항산화 효소 활성 및 활성산소 소거능력을 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 2.1. 연구대상지 및 공시재료

연구대상지는 최근 오염물질의 주변 농경지 확산으로 인해 사회적 문제를 야기했던 폐금속광산지역(경남 고성군 삼산면 병산리)과 석유화학공단지역(울산광역시 울주군 온산읍 당월리)을 선정하였으며, 공시재료는 광구 주변의 폐석 더미와 공단 인근 산림에서 생장하고 있는 사방오리나무(*Alnus firma* Sieb. et Zucc.)로 하였다. 대조지역은 폐광지역에서 3 km 정도 떨어진 도로변과 공단지역으로부터 약 4 km 떨어진 산림으로 선정하였다. 각 대상지역에서 자생하는 사방오리나무를 각각 5개체씩 선정하였다. 폐금속광산지역에서 선정한 오리나무는 수고가 5.4 m, 직경이 8.2 cm이고, 대조구의 선정목은 수고 5.8 m, 직경 8.7 cm이다. 그리고 석유화학공단지역은 수고가 10.9 m, 직경이 23.4 cm이고, 대조구의 선정목은 수고 8.4 m, 직경 17.1 cm이다. 이들 선정목에서 동아를 1월 4일에 채취하고, 4월 1일과 6월 1일에는 잎을 채취하여 색소 함량, 효소 활성 및 활성 산소 소거 능력을 측정하는데 사용하였다.

### 2.2. 엽록소 및 카로테노이드 분석

잎 내 색소 함량의 측정을 위하여, 1월에 채취한 동아는 인편을 제거한 후 그 속의 어린잎을 사용하였으며, 4월과 6월에 채취한 잎은 그대로 사용하였다. 측정법은 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 이용하여 추출하는 Hiscox and Israelstam(1979)의 방법을 사용하였다. DMSO 10 ml에 0.1 g의 신선한 잎을 넣고, 70°C의 항온 수조에서 2시간 동안 유지하여 색소를 추출하였다. 추출액의 흡광도는 470, 645, 663 nm에서 측정하였다.

### 2.3. 항산화효소 활성 분석

채취된 잎 0.5 g은 50 mM phosphate buffer (pH7.0), 10 mM ascorbic acid(AsA)와 1.0%(w/v) polyvinylpyrrolidone(PVP) 혼합액 5 mL를 넣고 균질화시킨 후, 20,000×g에서 30분 동안 원심분리한 후 상등액을 효소 활성 분석에 사용한다. SOD 활성은 nitro blue tetrazolium(NBT)-환원법을 이용하였으며, 분광광도계로 530 nm에서 120초 동안의 흡광도 증가를 측정하였다(Beauchamp and Fridovich, 1971). 활성은 Asada

et al.(1974)의 V/v-1의 식에 의해서 계산하였다. V와 v는 각각 SOD가 없을 때와 존재할 때, NBT의 환원 속도를 나타낸다. GR 활성은 Carlberg and Mannervik (1985)의 분석법을 따랐으며, 0.2 M potassium phosphate buffer(pH 7.0), 20 mM GSSG 및 2 mM NADPH의 반응액에 0.2 mL 효소 추출액을 첨가하고 340 nm에서 5분 동안의 흡광도 감소 비율을 측정함으로써 결정하였다. APX 활성은 Nakano and Asada (1981)의 방법에 의해 결정되었다. 분석은 50 mM phosphate buffer(pH 7.0), 0.5 mM AsA, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 0.1 ml 효소 추출액을 포함하는 반응혼합물 안에서 수행하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 첨가 후, 290 nm에서 1분 동안 흡광도의 변화를 이용하였다. CAT 활성 분석을 위하여 효소 추출액 30 $\mu$ l와 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500  $\mu$ l를 혼합하여 1분간 실온에서 반응시킨 후, 500  $\mu$ l sodium azide로 반응을 멈추었다. 다시 반응액 20  $\mu$ l와 HRP/Chromogen 2 ml를 첨가하고 10분 후에 520 nm에서 흡광도를 측정하였다(Fossati et al., 1980).

#### 2.4. 항산화 능력 및 MDA 함량 측정

항산화 능력의 평가를 위하여 채취된 잎은 즉시 동결 건조한 후 분말로 만들었다. 건조 시료 0.1 g에 메탄올 1 ml를 첨가하여 24°C에서 24시간 동안 추출한 후, 395 $\times$ g에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거하고, 다시 증류수 1 ml를 첨가하여 추출과정을 반복한 후, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical의 소거를 기초로 한 Brand-Williams(1995)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 2 ml 추출액과 2 ml DPPH 용액을 잘 혼합한 후, 1시간 동안 24°C에서 반응시키고, 222 $\times$ g에서 5분간 원심분리하였다. 상등액은 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH radical 소거율을 계산하였다.

스트레스에 의한 조직의 손상 정도를 알아보기 위하여 측정된 malondialdehyde(MDA) 함량은 Heath and Parker(1968)의 방법을 따랐다. 신선한 잎 0.1 g에 62.5 mM phosphate buffer(pH 7.8)를 넣고 균질화시킨 후, 12,000 $\times$ g에서 20분간 원심분리하였다. 추출액 1 ml와 0.5% 2-thiobarbituric acid 1 ml를 첨가하고, 15분간 가열한 후 빠르게 냉각시켰다. 흡광도는 532 nm와 600 nm에서 측정하여 MDA 함량을 결정하였다.

**Table 1.** Seasonal changes of chlorophyll content in the leaves of *Alnus firma* growing in abandoned mine tailings and industrial complex area

Area	Month	Chl. a	Chl. b	Chl. a+b	Chl. a/b	
		mg/g				
Abandoned mine	Control	Jan.	0.41 $\pm$ 0.07	0.40 $\pm$ 0.09	0.81 $\pm$ 0.15	1.06 $\pm$ 0.20
		Apr.	0.78 $\pm$ 0.17	0.27 $\pm$ 0.09	1.05 $\pm$ 0.25	2.99 $\pm$ 0.65
		Jun.	2.22 $\pm$ 0.29	0.70 $\pm$ 0.11	2.91 $\pm$ 0.38	3.23 $\pm$ 0.41
	Tailings	Jan.	0.45 $\pm$ 0.08	0.20 $\pm$ 0.12	0.95 $\pm$ 0.19	0.93 $\pm$ 0.16
		Apr.	0.71 $\pm$ 0.15	0.29 $\pm$ 0.08	0.99 $\pm$ 0.19	2.57 $\pm$ 0.80
		Jun.	1.73 $\pm$ 0.43	0.97 $\pm$ 0.37	2.71 $\pm$ 0.76	1.96 $\pm$ 0.65
	Model	***	***	***	***	
	Area	**	n.s.	n.s.	*	
	Month	***	***	***	***	
Industrial complex	Control	Jan.	0.38 $\pm$ 0.05	0.54 $\pm$ 0.12	0.92 $\pm$ 0.16	0.71 $\pm$ 0.09
		Apr.	0.51 $\pm$ 0.09	0.38 $\pm$ 0.04	0.88 $\pm$ 0.11	1.35 $\pm$ 0.26
		Jun.	2.26 $\pm$ 0.53	0.60 $\pm$ 0.14	2.86 $\pm$ 0.67	3.77 $\pm$ 0.26
	Polluted	Jan.	0.45 $\pm$ 0.10	0.55 $\pm$ 0.14	1.00 $\pm$ 0.24	0.81 $\pm$ 0.07
		Apr.	0.57 $\pm$ 0.21	0.26 $\pm$ 0.05	0.83 $\pm$ 0.22	2.26 $\pm$ 1.00
		Jun.	2.33 $\pm$ 0.84	0.63 $\pm$ 0.22	2.96 $\pm$ 1.06	3.70 $\pm$ 0.32
	Model	***	***	***	***	
	Area	n.s.	n.s.	n.s.	*	
	Month	***	***	***	***	

Each data represents mean of five replicates  $\pm$  standard deviation. \*\*\*, \*\*, and \*significant at  $P \leq 0.001$ , 0.01, and 0.05; n.s.: not significant

### III. 결 과

#### 3.1. 색소 함량의 변화

폐금속광산과 공단지역에서 자생하는 사망오리나무의 잎을 대상으로, 엽 발달에 따른 수목의 활력 변화를 평가하기 위하여, 잎 내 엽록소 함량을 측정된 결과, 두 지역 모두 계절에 따라 큰 변화를 보여 주었다(Table 1). 특히 오염지역 수목의 잎 내 엽록소 함량은 대조구와 차이를 나타냈고, 측정 계절에 따라 차이가 있었다.

폐석지역과 공단지역 수목의 잎 내 엽록소 $a$ 는 잎 발달이 진행되면서 증가하였으며, 6월의 엽록소 함량

은 4월의 엽록소 함량보다 2배에서 4배까지 증가하였다. 그러나 엽록소 $b$  함량은 4월에 1월보다 감소하였다가 6월에 다시 증가하였다. 엽록소 $a$ 와  $b$ 의 비( $a/b$ )는 폐석지역을 제외한 모든 지역에서 잎 발달과 함께 증가하였다. 폐석지역의 경우, 4월까지의 엽록소 $a/b$ 가 증가하였으나, 6월에는 4월보다 감소하였다. 이러한 결과는 폐석지역 수목의 잎 내 엽록소 $a$  함량 증가 폭이 다른 지역의 증가 폭에 비해 크지 않았고, 반대로 엽록소 $b$ 의 증가폭은 다른 지역의 증가 폭보다 더 컸기 때문이다. 또한 폐석지역 수목의 엽록소 $a$  함량은 다른 지역과는 달리 6월 측정값이 대조구보다 22% 정도 낮게 나타났다. 이것은 폐석지역 수목이 다른 지역보

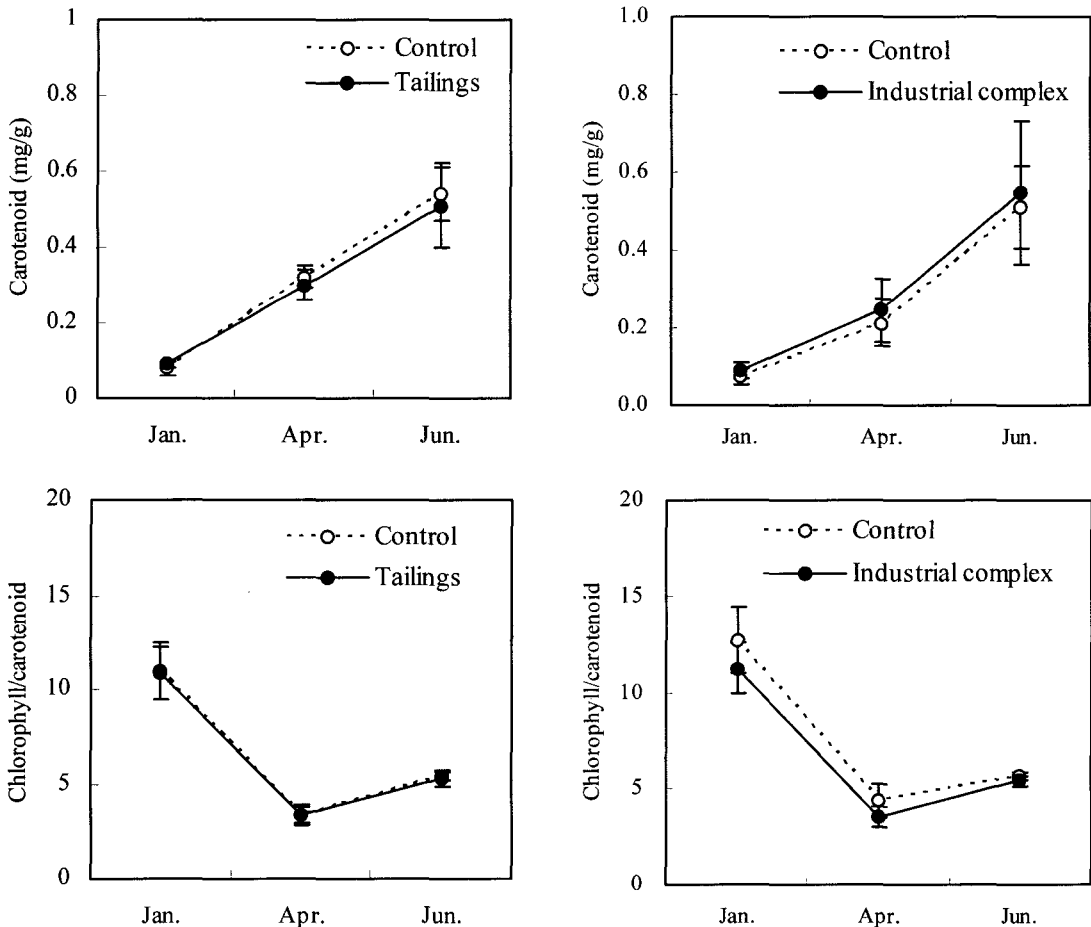


Fig. 1. Seasonal changes of carotenoid and the ratio of chlorophyll to carotenoid in the leaves of *Alnus firma* growing in abandoned mine tailings and industrial complex area. Each data point represents mean of five replicates  $\pm$  standard deviation. Carotenoid: control-tailings  $P=0.161^{n.s.}$ , control-industrial complex  $P=0.262^{n.s.}$ ; Jan.-Apr.-Jun.  $P=0.0001^{***}$  (in tailings),  $P=0.0001^{***}$  (in industrial complex); Chlorophyll/Carotenoid: control-tailings  $P=0.869^{n.s.}$ , control-industrial complex  $P=0.004^{**}$ ; Jan.-Apr.-Jun.  $P=0.0001^{***}$  (in tailings),  $P=0.0001^{***}$  (in industrial complex),  $^{***}$ , and  $^{**}$  significant at  $P \leq 0.001$  and  $0.01$ ;  $^{n.s.}$  not significant.

다 더 많은 스트레스를 받아 엽록소 $a$ 의 합성이 줄었음을 의미한다.

사방오리나무의 카로테노이드 함량은 두 지역 모두 잎 발달과 함께 증가하였으며, 대조구와 오염지역간의 차이는 크지 않았다(Fig. 1). 한편 잎 내 엽록소 함량과 카로테노이드 함량의 비는 1월에 가장 높게 나타났으며, 4월까지 크게 감소하다가 6월에 다시 상승하였으나 1월의 값보다는 낮았다. 이와 같이 4월과 6월에 엽록소 함량과 카로테노이드 함량이 비가 낮게 나타난 것은 두 지역 모두 엽록소 함량의 증가 폭이 카로테노이드의 증가 폭보다 작았기 때문이다. 즉 폐석지역과 공단지역의 4월 총 엽록소 함량은 0.99 mg/g와 0.83 mg/g으로 1월과 큰 차이가 없었으나, 4월의 카로테노이드 함량은 1월보다 2배 이상 증가하였다.

### 3.2. 항산화 효소의 활성 변화

항산화효소의 활성은 효소 종류, 지역 및 시기에 따라 다양한 반응을 나타냈다(Table 2).

SOD는 잎 발달이 진행되면서 활성이 크게 증가하였으나, 오염지역과 대조구와의 차이는 크지 않았다. 비록 폐석지역의 1월 SOD 활성과 공단지역의 4월

SOD 활성이 대조지역보다 높았지만, 대체로 폐석지역과 공단지역의 잎 내 SOD 활성은 대조지역보다 낮았다. APX는 지역간 변화가 크게 나타났는데, 폐광지역의 경우, 대조지역의 APX 활성은 잎 발달과 함께 증가한 반면, 폐석지역의 APX 활성은 대조구와는 달리 4월부터 감소하였다. 또한 폐석지역의 APX 활성은 전 측정기간에 걸쳐 대조지역 보다 낮았다. 한편 공단지역의 APX 활성은 대조구와 오염지역 모두 4월에 가장 낮은 값을 나타냈다. 그러나 폐광지역과는 달리 오염지역에서는 4월과 6월의 APX 활성이 대조지역보다 높았다. GR 활성은 폐광지역의 대조구에서는 잎 발달과 함께 증가하였으며, 폐석지역에서는 4월에 약간 감소한 후, 6월에 다시 증가하였다. 그러나 공단지역에서는 대조지역과 오염지역 모두 4월에 GR 활성이 감소하였고 6월에는 다시 상승하였으나, 1월보다는 낮은 값을 보였다. CAT 활성은 모든 지역에서 SOD 활성과는 반대로 잎 발달과 함께 감소하였으며, 특히 6월에 급격한 감소를 나타냈다. 한편 폐광지역에서의 CAT 활성은 대조지역보다 높았으나, 공단지역에서는 대조지역과 오염지역간에 CAT 활성 차이가 없었다.

**Table 2.** Seasonal changes of antioxidant enzyme activities in the leaves of *Alnus firma* growing in abandoned mine tailings and industrial complex area

Area	Month	SOD (unit/g)	APX (mmol/g)	GR (nmol/g)	CAT (unit/g)	
Abandoned mine	Control	Jan.	298 ± 670	1.27 ± 0.54	107 ± 13	2487 ± 433
		Apr.	1786 ± 639	1.40 ± 0.99	129 ± 33	2392 ± 475
		Jun.	6986 ± 568	2.38 ± 0.97	254 ± 22	528 ± 660
	Tailings	Jan.	432 ± 171	1.14 ± 0.52	142 ± 53	2795 ± 632
		Apr.	885 ± 388	0.77 ± 0.35	131 ± 31	2418 ± 450
		Jun.	4033 ± 881	0.70 ± 0.46	181 ± 48	559 ± 108
Model Area		***	*	***	***	
Month		***	**	n.s.	n.s.	
		***	n.s.	***	***	
Industrial complex	Control	Jan.	506 ± 105	1.07 ± 0.55	170 ± 56	2822 ± 515
		Apr.	1274 ± 195	0.53 ± 0.22	129 ± 20	2116 ± 700
		Jun.	2676 ± 299	1.18 ± 0.51	158 ± 21	873 ± 940
	Polluted	Jan.	477 ± 165	0.89 ± 0.51	163 ± 32	2447 ± 366
		Apr.	1667 ± 696	0.76 ± 0.45	124 ± 27	2124 ± 107
		Jun.	2258 ± 301	1.42 ± 0.71	147 ± 28	894 ± 212
Model Area		***	n.s.	n.s.	***	
Month		n.s.	n.s.	n.s.	*	
		***	*	*	***	

Each data represents mean of five replicates ± standard deviation. \*\*\*, \*\*, and \*significant at  $P \leq 0.001$ , 0.01, and 0.05; n.s.: not significant

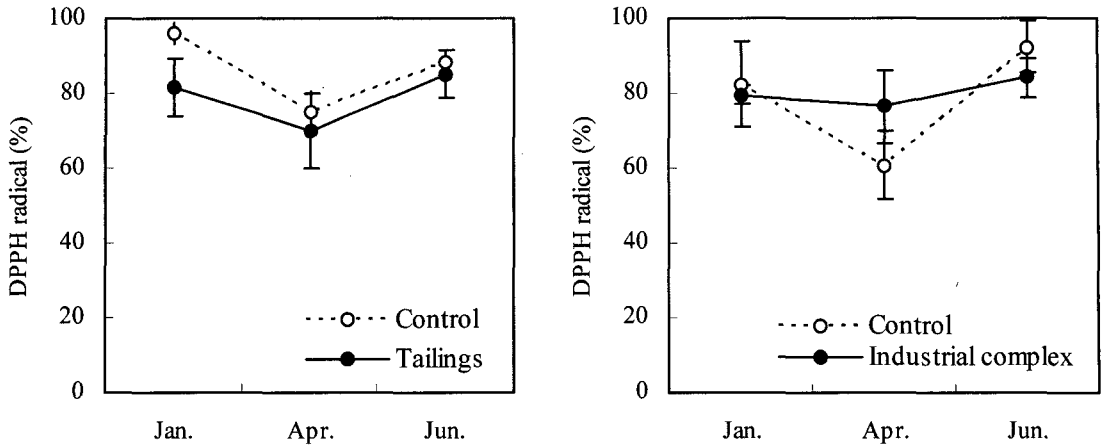


Fig. 2. Seasonal changes of antioxidant capacity in the leaves of *Alnus firma* growing in abandoned mine tailings and industrial complex area. Each data point represents mean of five replicates  $\pm$  standard deviation. Control-Tailings  $P=0.007^{**}$ , Control-Industrial complex  $P=0.338^{n.s.}$ ; Jan.-Apr.-Jun.  $P=0.0001^{***}$ (in tailings),  $P=0.0002^{***}$ (in industrial complex), \*\*\* and \*\* significant at  $P \leq 0.001$  and  $0.01$ ;  $n.s.$  not significant.

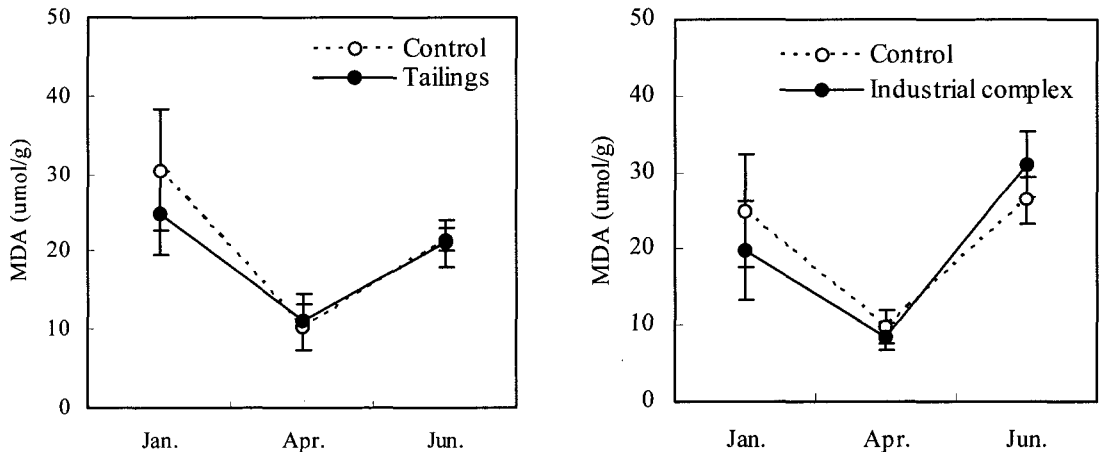


Fig. 3. Seasonal changes of MDA content in the leaves of *Alnus firma* growing in abandoned mine tailings and industrial complex area. Each data point represents mean of five replicates  $\pm$  standard deviation. Control-Tailings  $P=0.120^{n.s.}$ , Control-Industrial complex  $P=0.307^{n.s.}$ ; Jan.-Apr.-Jun.  $P=0.0001^{***}$ (in tailings),  $P=0.0001^{***}$ (in industrial complex), \*\*\* significant at  $P \leq 0.001$ ,  $n.s.$  not significant.

### 3.3. 항산화 능력 및 MDA 함량 측정

사방오리나무의 잎 내 항산화 능력은 활성산소인 DPPH radical의 소거율을 기준으로 판단하였다. 폐광 지역의 활성산소 소거율은 1월에 가장 높고, 4월에는 감소하였다가 다시 6월에는 증가하였다. 활성산소 소거율은 전 기간에 걸쳐 폐석지역이 대조지역보다 낮았다(Fig. 2). 공단지역의 활성산소 소거율은 폐광지역과 마찬가지로 4월에 가장 낮았으며, 6월에 가장 높게 나타났다. 그러나 오염지역에서의 활성산소 변화는 잎 발달에 따라 큰 차이를 나타내지 않았다. 한편 4월의

활성산소 소거율은 오염지역이 대조지역보다 높게 나타나 1월과 6월의 결과와는 대조를 보였다.

스트레스로 인한 잎의 피해 수준은 MDA 함량을 측정하여 결정하였다. 폐광지역에서 MDA 함량은 4월에 가장 낮게 나타났으며, 1월과 6월에는 높은 MDA 수준을 유지하였다(Fig. 3). 폐석지역의 MDA 함량은 1월에 대조지역보다 낮게 나타났으며, 4월과 6월에는 차이 없었다. 한편 공단지역에서는 폐광지역과 마찬가지로 4월에 가장 낮은 MDA 함량을 나타냈으며, 1월의 MDA 함량은 오염지역이 대조구보다 낮았고, 6월

의 MDA 함량은 반대로 오염지역이 대조지역보다 높았다.

#### IV. 고 찰

수목의 환경 스트레스에 대한 반응은 스트레스 종류 및 강도, 잎의 발달단계에 따라서 다양하게 나타나며 (Prochazkova et al., 2001; Jung, 2004), 스트레스에 대한 적절한 저항 및 방어는 식물이 가지고 있는 항산화 관련 메커니즘의 총체적인 결과로 나타난다. 폐광지역내 폐석지는 매우 부족한 영양 상태를 나타내며, 독성이 높은 중금속 등 다양한 스트레스 요인들이 존재한다(Hossner and Hons, 1992; Han et al., 1998; Alvarez et al., 2003). 이런 환경에서 성장하는 식물은 이용 가능한 최소한의 에너지를 사용하여 스트레스를 견뎌내야 한다.

본 연구대상지인 폐석지역 토양은 비교적 낮은 영양 상태를 나타내는데, 이것은 사망오리나무의 잎 내 낮은 엽록소 함량으로부터 추정할 수 있다. 특히 생장이 왕성하게 시작되는 6월에 엽록소 *a*의 함량이 대조지역보다 뚜렷하게 낮게 나타난 것은 질소원의 부족으로 엽록소 함성이 적었음을 의미한다. 잎 내 엽록소 함량은 질소 농도를 간접적으로 반영할 수 있는데, 최근 잎 내 엽록소 함량을 비파괴적인 기술을 이용하여 측정하고 이를 이용하여 질소 상태를 추정한 연구 결과들이 보고된 바 있다(Zhao et al., 2005; Cartelat et al., 2005). 한편 공단지역에서는 대조지역과 오염지역의 엽록소 함량 차이가 뚜렷하지 않다(Table 1). 이러한 결과는 토양 환경 조건이 유사한 공단지역에서 대조지역까지 대기오염물질이 영향을 미치고 있기 때문인 것으로 추정된다. 이러한 결과는 4월의 엽록소 *b* 함량이 대조지역과 오염지역에서 모두 1월보다 감소한 것으로 알 수 있는데, 이것은 잎의 초기 발달 단계에서 엽록소 *b*의 함성이 오염물질에 의해 저해되었기 때문인 것으로 판단된다.

카로테노이드는 엽록소 보조역할 뿐만 아니라 항산화 기능도 함께 가지고 있다(Siefermann-Harms, 1987; Minkov et al., 1999). 폐광지역과 공단지역의 잎 내 카로테노이드 함량은 모두 잎 발달과 함께 증가하는데, 이것은 스트레스에 민감한 엽록소보다 안정적인 특성을 보여 준다(Fig. 1). 즉 엽록소는 잎 발달 과정에서 환경 스트레스의 영향으로 폐석지역에서 함량이 낮게

나타나거나, 공단지역에서 4월에 엽록소의 함성이 저해되는 결과를 나타내지만, 카로테노이드는 잎 발달과 함께 엽록소 보조색소로서의 역할과 항산화 기능을 증가시키는 것으로 판단된다.

환경 스트레스를 받은 식물에서 생성되는 대부분의 활성 산소 제거는 항산화 효소들이 직접 관여한다. 이러한 항산화 효소들은 유기적인 관계를 가지고 있으며, 스트레스의 강도에 따라서 활성이 다르게 나타난다 (Foyer et al., 1994). 본 연구 결과에서 SOD, APX 및 GR 활성은 1월에 낮게 나타났으며, CAT의 활성 저하는 폐광지역의 대조지역에서 뚜렷하게 나타났다. 그러나 Fig. 2에서 보는 바와 같이 1월의 동아 속에 존재하는 잎들의 자체 항산화 능력은 매우 높은 특성을 가진다. 그럼에도 불구하고 1월에 항산화효소의 활성이 낮은 것은 저온에 의한 활성 저하 때문인 것으로 판단된다. 이러한 항산화 효소의 활성 저하는 활성 산소에 의한 세포막의 손상을 증가시키는 결과를 가져왔다(Fig. 3). 한편 폐석지역내 수목의 잎에서 나타나는 효소 활성 반응은 대조지역과는 다르다. 즉 SOD와 GR은 대조지역과 마찬가지로 6월의 항산화 기능을 좌우하지만, APX와 CAT는 1월의 항산화 기능을 담당하는 것으로 나타났다. 한편 4월에는 Fig. 3에서와 같이 잎 내 피해 수준도 가장 낮게 나타나는데, 이것은 항산화 효소들의 보호 기능 때문이라기보다 잎 발달 초기에 오염물질에 대한 노출이 상대적으로 적었기 때문인 것으로 판단된다.

공단지역에서의 항산화 효소의 활성 변화도 폐광지역과 유사한 양상을 나타냈다. 즉 SOD는 잎 발달과 함께 활성이 증가하는 효소로, CAT는 SOD와 달리 잎 발달과 함께 활성이 감소하는 효소로 나타났다. 한편 APX와 GR의 활성은 폐광지역과 마찬가지로 4월에 가장 낮게 나타났고, 피해 수준 또한 낮게 나타나, 스트레스에 대한 노출 정도가 가장 적은 시기임을 보여 주었다.

위의 결과들을 종합해 보면, 오염지역 수목의 스트레스에 대한 항산화 기능은 잎 발달과 함께 달라지며, 스트레스에 대한 항산화 기능은 시간이 지남에 따라 활성화된다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 폐광지역과 공단지역간에 차이가 없었다. 또한 항산화 과정에서 가장 민감하게 작용하는 항산화 물질은 카로테노이드와 SOD이며, 이들은 잎 발달과 함께 함량과 활성이 증가한다. 또한 SOD의 작용에 의해 생성된

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 제거하는데 관여하는 APX와 CAT는 항산화 과정에서 상호 보완적 관계로 존재한다.

## 적 요

오염물질에 노출된 수목에서 잎의 발달 단계와 항산화 기능의 관계를 구명하기 위하여, 1월부터 6월까지 색소 함량과 항산화 활성의 변화를 조사하였다. 폐광 지역과 공단지역내 수목의 스트레스에 대한 항산화 기능은 잎 발달과 함께 변화하며, 6월에 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다. 항산화 물질 중 계절 변화와 상관관계를 나타내는 것은 카로테노이드, SOD 및 CAT였으나, 카로테노이드와 SOD는 정(+)의 상관관계를 나타냈고, CAT는 부(-)의 상관관계를 보였다. 또한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 제거하는 데 관여하는 APX와 CAT는 상호 보완적인 관계를 나타냈다. 가장 낮은 항산화 활성을 나타내는 시기는 4월이었으며, 이 시기에는 스트레스로 인해 피해 수준도 낮았다.

## REFERENCES

- Alvarez, E., M. L. Fernandez Marcos, C. Vaamonde, and M. J. Fernandez-Sanjurjo, 2003: Heavy metals in the dump of an abandoned mine in Galicia (NW Spain) and in the spontaneously occurring vegetation. *The Science of The Total Environment* **313**, 185-197.
- Asada, K., M. Takahashi, and M. Nagate, 1974: Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. *Agricultural Biological Chemistry* **38**, 471-473.
- Beauchamp, C., and I. Fridovich, 1971: Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**, 276-297.
- Bowler, C., M. van Montagu, and D. Inze, 1992: Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**, 83-116.
- Brand-Williams W., 1995: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science Technology* **28**, 25-30.
- Carlberg, I., and B. Mannervik, 1985: Glutathione reductase. *Methods in Enzymology* **113**, 485-490.
- Cartelat, A., Z. G. Cerovic, Y. Goulas, S. Meyer, C. Lelarge, J. L. Prioul, A. Barbottin, M. H. Jeuffroy, P. Gate, G. Agati, and I. Moya, 2005: Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research* **91**, 35-49.
- Fossati P, L. Prencipe, and G. Berti, 1980: Use of 3,5-dichloro-2-hydroxy benzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *The Clinical Chemistry Methodology* **26**, 227-231.
- Foyer, C. H., M. Lelandais, and K. J. Kunert, 1994: Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum* **92**, 696-717.
- Halliwell B., 1987: Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. *Chemistry and Physics of Lipids* **44**, 327-340.
- Han, S.-H., J.-O. Hyun, K.-J. Lee, and D.-H. Cho, 1998: Accumulation of heavy metals(Cd, Cu, Zn, and Pb) in five tree species in relation to contamination of soil near two closed zinc-mining sites. *Jour. Korean For. Soc.* **87**, 466-474.
- Han, S.-H., J.-C. Lee, S.-S. Jang and P.-G. Kim, 2004: Composted sewage sludge can improve the physiological properties of *Betula schmidtii* grown in tailings. *Journal of Plant Biology* **47**: 99-04.
- Heath, R. L., and L. Parker, 1968: Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **125**, 189-198.
- Hiscox, J. D., and G. F. Israelstam, 1979: A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany* **57**, 1332-1334.
- Hossner, L. R., and F. M. Hons, 1992: Reclamation of mine tailings. *Advances in Soil Science*. Vol. 17. (Eds.) B.A. Stewart. Springer-Verlag, New York, 311-348.
- Jiang, C. D., P. M. Li, H. Y. Gao, Q. Zou, G. M. Jiang, and L. H. Li, 2005: Enhanced photoprotection at the early stages of leaf expansion in field-grown soybean plants. *Plant Science* **168**, 911-919.
- Jung S., 2004: Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. *Plant Science* **166**, 459-466.
- Larson R. A., 1988: The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* **27**, 969-978.
- Larson R. A., 1995: Defenses against oxidative stress. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **29**, 175-186.
- Lee, J.-C., S.-H. Han, S.-S. Jang, K.-J. Cho, and Y.-Y. Kim, 2002: Effects of ozone uptake rate on photosynthesis and antioxidant activity in the leaves of *Betula* species. *Korean Journal of Agricultural and Forest Meteorology* **4**, 72-79.
- Lee, J.-C., S.-H. Han, P.-G. Kim, S.-S. Jang, and S.-Y. Woo, 2003a: Growth, physiological responses and ozone uptake of five *Betula* species exposed to ozone. *Korean Journal of Ecology* **26**, 165-172.
- Lee, J.-C., S.-H. Han, S.-S. Jang, P.-G. Kim, J.-S. Hur, and K.-J. Yum, 2003b: Physiological tolerance of native tree species in abandoned coal mine spoils. *Korean Journal of Agricultural and Forest Meteorology* **5**, 172-178.
- Logan, T. J., 1992, Chemical degradation of soil. *Advances*



- in Soil Science*. Vol. 17. (Eds.) Stewart B. A., Springer-Verlag, New York, 13-35.
- Minkov, I. N., G. T. Jahoubjan, I. D. Denev, and V. T. Toneva, 1999, *Photooxidative stress in higher plants. Handbook of Plant and Crop Stress*, 2nd edition. (Eds.) M. Pessrakli, Marcel Decker, New York, Basel. 499-525.
- Nakano, Y., and K. Asada, 1981: Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* **22**, 867-880.
- Prochazkova, D., R. K. Sairam, G. C. Srivastava, and D. V. Singh, 2001: Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science* **161**, 765-771.
- Schoner, S., and G. H. Krause, 1990: Protective systems against active oxygen species in spinach: response to cold acclimation in excess light. *Planta* **180**, 383-389.
- Siefermann-Harms D., 1987: The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiologia Plantarum* **69**, 561- 568.
- Zhao, D., K. R. Reddy, V. G. Kakani, and V. R. Reddy, 2005: Nitrogen deficiency effects on plant growth, leaf photosynthesis, and hyperspectral reflectance properties of sorghum. *European Journal of Agronomy* **22**, 391-403.