

대두 종자의 유근생장시 Ferulic Acid가 Polyamine 함량과 효소활성에 미치는 영향

김용옥 · 조영동* · 이호준

건국대학교 생물학과, 연세대학교 생화학과*

Effect of Ferulic Acid on Polyamine Titters and Enzyme Activities during the Radicle Growth of *Glycine max*

Kim, Yong-Ok, Young-Dong Cho* and Ho-Joon Lee

Department of Biology, Kon-Kuk University

Department of Biochemistry, Yonsei University*

ABSTRACT

Changes in polyamine titters and enzyme activities during radicle growth of *Glycine max* were studied in order to investigate the effect of ferulic acid in regulation of polyamine biosynthesis. Among eight compounds used, gallic acid stimulated the radicle growth and ferulic acid inhibited it significantly. During the radicle growth of *Glycine max*, the content of putrescine was shown the highest level at the second day, while at the fourth day spermidine was the highest and spermine followed. Ornithine decarboxylase (ODC, EC 4.1.1.17) seems to be responsible for biosynthesis of putrescine. As the concentration of ferulic acid (0.001, 0.01, 0.1 mM) treated increased, the content of spermine was gradually enhanced and putrescine was increased at 0.001~0.01 mM, decreased after 0.1 mM concentration but spermidine was not affected. Ferulic acid elevated ODC and S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC, EC 4.1.1.50) activity. ODC activity was increased more than 120% and SAMDC activity was increased about 50% more than that of the control. Diamine oxidase (DAO EC, 1.4.3.6) activities was decreased more than 50% and arginine decarboxylase (ADC, EC 4.1.1.19) activity was enhanced about 20% at low concentration, decreased after then.

Key words: Ferulic acid, *Glycine max*, Polyamine, Radicle growth

서 론

Phenolic compound는 식물에서 종내, 종간의 상호작용을 중재하는 allelopathy(타감작용) 현상의 주원인 물질이다 (Chou and Waller 1982). Allelochemicals는 식물체의 기본 대사과정

이외의 2차대사산물로 (Whittaker and Feeny 1971) phenolic compound, terpenoid, flavonoid, alkaloid 등이 있는데, 이들 중 phenolic compound가 식물체내에서 가장 많이 존재하고 천연생장억제제로서 물질대사의 조절에 관여한다 (Kim 1993, Rietveld 1983). 이러한 phenolic compound의 작용기작은 매우 다양하여 종자의 발아와 유근생장, 세포분열 및 세포막의 기능, 단백질 합성, 호흡, 효소활성 (Bhowmik and Doll 1984, Del Moral 1972, Duke *et al.* 1987) 등의 억제로 식물의 생장에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

한편, polyamine은 모든 생물에서 발견되는 천연물질로 식물호르몬과 유사한 작용기작을 가지고 있으며 polyamine류로는 amine기가 두개인 putrescine과 세개인 spermidine, 그리고 네개인 spermine으로 구분된다 (Cohen 1971). 식물에서 polyamine은 세포의 생장, 분화, 분열, 뿌리와 꽃의 형성 등을 발달시키고 촉진시키는 생리적인 대사과정에 관여한다 (Kaur-Sawhney *et al.* 1988, Sanjeev *et al.* 1989, Smith 1985, 1990, Valeria *et al.* 1990). 이러한 대사과정에 관여하는 주효소로는 arginine decarboxylase (ADC, EC 4.1.1.19)와 ornithine decarboxylase (ODC, EC 4.1.1.17) 그리고 S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC, EC 4.1.1.50)가 있다 (Smith 1985). 발아 초기의 유근생장이나 생장속도가 빠른 조직에서 polyamine의 함량이 높고 ADC와 ODC의 합성 및 활성이 증가하여 (Cohen *et al.* 1982) putrescine은 발아초기 단계에서 함량이 급격히 증가하고 또한 영양의 결핍과, 산 및 osmotic stress에 의해 세포내에 축적된다 (Goren *et al.* 1982). ADC의 활성은 putrescine의 함량이 증가할 때와 같이 외부 stress에 의하여 증가하지만 ODC는 stress에 민감하지 않고 polyamine 합성에 관여한다 (Bagni 1989, Fobert and Webb 1988). 이와같이 phenolic compound와 polyamine은 식물의 생장에서 서로 상반되는 생리효과를 나타내고 있지만 polyamine은 phenolic compound와 결합하여 식물의 분화에 관여하는데, 특히 hydroxycinnamic acid와 결합하여 꽃눈형성을 촉진한다는 보고가 있으며, allelochemicals의 하나인 alkaloid는 ornithine으로부터 유도된다 (Martin-Tanguy 1985). Polyamine의 생장 촉진과 phenolic compound의 생장 억제의 작용에도 불구하고 polyamine은 식물체내에서 다른 물질과의 amide결합에 의해 phenolic compound를 형성하여 세포내 대사를 조절하고 있지만 이들 상호간에 정확한 기능이나 작용기작에 대한 연구가 아직 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구는 대두의 유근생장 초기에 8종의 phenolic compound를 처리하여 가장 억제효과가 큰 ferulic acid를 선택하여 종자내의 polyamine이 유식물 생장에서 ferulic acid의 영향하에 polyamine의 대사가 어떻게 조절되는가를 polyamine 함량과 그에 관련된 효소의 활성을 측정함으로써 알아보았다.

재료 및 방법

리기다소나무의 수용액 추출

리기다소나무의 잎 200 g에 증류수 1,000 ml를 넣어 80℃에서 48시간 동안 진탕 추출한 다음 15,000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 (Centrikon T-1045, Kontron Co.) 그 상층액을 4℃ 냉장고에 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

대두의 발아와 유근생장

균일한 크기의 대두 (*Glycine max*) 종자를 선택하여 1% sodium hypochlorite 용액에서 2분

간 소독한 후 증류수로 3~5회 세척하여 petri-dish (직경 150 mm)에 30립씩 파종하였다. 이 발아실험은 28°C incubator (Hotpack, U.S.A) 암소에서 4회 반복하였다. 8종의 phenolic compound (protocatechuic acid, vanillic acid, ρ -coumaric acid, ferulic acid, gallic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, cinnamic acid: Sigma Chemical Co., U.S.A)를 0.1, 1 mM 농도로 조절하여 대두 종자의 유근에 처리한 후 6일간 발아실험을 실시하였으며 10개체씩 선발하여 유근생장의 길이를 mm 단위까지 측정하였다.

Polyamine 추출 및 정량

대두의 유근생장 실험에서 phenolic compound중 ferulic acid가 발아에 있어서 억제효과가 가장 크게 나타났으므로 ferulic acid를 0.001, 0.01, 0.1 mM 로 농도를 조절하고 대조구로는 증류수를 첨가하여 6일간 발아 실험을 실시하면서 매일 유근을 선발하여 polyamine 정량의 시료로 사용하였다. Polyamine 추출 및 정량은 Goren 등 (1982)의 방법을 변형하여 4°C에서 실시하였다. 시료 1g에 5% perchloric acid 2 ml를 가하여 막자사발을 이용하여 파쇄한 다음 12,000 × g로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 시료원으로 사용하였다. 정량은 시료원 100 μ l에 dansyl chloride (5 mg/ml in acetone) 200 μ l와 포화된 Na₂CO₃ 100 μ l를 첨가한 후 잘 섞어 25°C 암조건 하에서 16시간 dansylation시켰다. 반응한 시료에 50 μ l proline (100 mg/ml)을 첨가하여 상온에서 30분간 암 처리한 후 반응하지 않은 dansylchloride를 제거하였다. Dansylpolyamine은 300 μ l 벤젠으로 추출하여 200 μ l를 Silica gel 60 plate에 점적하였다. 전개는 chloroform : triethylamine (25 : 2 v/v)으로 구성된 전개용매로 수행하였다. Plate에 나타난 dansylpolyamine band를 자외선으로 표준 시료와 비교하여 긁어낸 후 test tube에 넣고 ethylacetate로 용출시켜 excitation : 360 nm, emission : 500 nm로 형광강도를 측정하였다.

효소의 활성측정

1) 효소원의 제조

1 mM pyridoxal phosphate, 4 mM dithiothreitol, 5 mM ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA)가 포함된 50 mM potassium phosphate 완충용액 (pH 7.5)을 이용하여 시료를 균질화시킨 후 12,000 × g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 효소원으로 사용하였다.

2) ADC(arginine decarboxylase)와 ODC(ornithine decarboxylase)의 활성 측정

Arginine decarboxylase와 ornithine decarboxylase의 활성은 Altman (1982)의 방법을 변형하여 사용하였다. 반응은 Warburg flask안의 outer well에 12.5 mM potassium phosphate (pH 7.5), 65 μ M pyridoxal-5-phosphate, 125 μ M EDTA, 125 μ M DTT와 20 μ M L-[U-¹⁴C] arginine (0.1 μ Ci) 또는 100 μ M L-[1-¹⁴C] ornithine (0.1 μ Ci)을 포함하는 반응액에 효소원을 넣어 총 부피가 500 μ l가 되게 한 뒤, center well에는 50 μ l의 hyamine (methylbenzethonium hydroxide)을 묻힌 Whatmann No. 3 여과지를 넣은 후 parafilm으로 밀봉하고 37°C에서 1시간 동안 incubation 하였다. 반응 후 5% perchloric acid (PCA) 200 μ l를 주사기로 주입시켜 반응을 정지시키고 ornithine 이나 arginine으로부터 방출된 ¹⁴CO₂가 hyamine에 흡수되도록 한 후 center well에 있는 여과지를 꺼내 5 ml의 방사능 측정용액에 넣어 liquid scintillation counter (Packard)로 cpm값을 측정하였다. 효소의 1 unit는 1 시간에 1 nmole ¹⁴CO₂를 생성하는 효소의

양으로 정하였다.

3) SAMDC(S-adenosylmethionine decarboxylase)의 활성 측정

SAMDC의 활성 측정은 Choi와 Cho (1994)의 방법을 사용하였다. Warburg flask의 outer well에는 효소액과 15 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 mM EDTA가 포함된 25 mM Tris buffer (pH 7.6)의 반응용액, 그리고 0.1 μ Ci [carboxyl-¹⁴C] SAM (55 mCi /mmole)을 넣어 전체 부피가 500 μ l가 되도록 하였다. Center well에는 Whatmann No. 3 paper (1.5 \times 1.5cm)를 놓고 2 N KOH 50 μ l를 넣어 여과지가 충분히 젖게 하였으며 이 이후의 과정은 ADC와 ODC의 활성측정과 동일하게 하였다.

결과 및 고찰

대두의 유근생장시 phenolic compound의 영향

8종의 phenolic compound를 0.1과 1 mM로 농도를 조절하여 대두의 유근생장 초기에 처리한 결과, 대조구에 비하여 전반적으로 유근생장의 억제가 나타났으나 gallic acid는 대조구에 비하여 1.5배 이상의 촉진효과가 있었고 caffeic acid는 대조구와 비슷하거나 약간의 촉진효과가 있었다. Coumaric acid는 1 mM 농도에서는 약간의 촉진효과가 있었으나 0.1 mM에서는 50%이상 오히려 억제현상이 있었다. 유근생장의 억제는 vanillic acid, ferulic acid, chlorogenic acid, protocatechuic acid, cinnamic acid의 각 농도에서 나타났으며 가장 억제효과가 큰 것은 ferulic acid로 약 80% 억제되었다 (Fig. 1). Phenolic compound의 농도가 증가함에 따라 유근생장이 억제된다는 보고 (Kim *et al.* 1990, Rietveld 1983)가 있으나 본 실험에서 gallic acid와 caffeic acid를 제외한 6종은 대부분 각 농도에서 유근생장이 억제되었고 *p*-coumaric acid는 0.1 mM에서 더욱 억제되었다. Osborn 등 (1988)과 Duke 등 (1987)은 phenolic compound에 의한 식물생장의 억제효과를 이용하여 잡초의 생물학적 방제를 위한 제초제로서의 개발이 활용가치가 높다고 하였다.

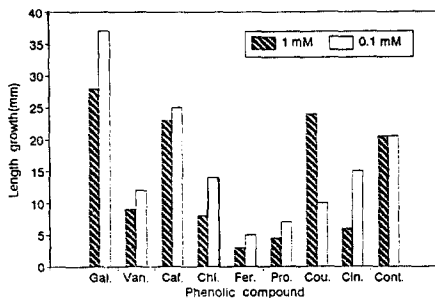


Fig. 1. Comparison of radicle growth at 3 days after sowing *Glycine max* at 0.1 mM and 1 mM concentration of phenolic compounds. Gal, gallic acid; Van, vanillic acid; Caf, caffeic acid; Chl, chlorogenic acid; Fer, ferulic acid; Pro, protocatechuic acid; Cou, *p*-coumaric acid; Cont, Control.

유근생장시 polyamine정량 및 효소의 활성

대두종자 파종 후 6일간의 polyamine 함량은 2일째에 putrescine이 최고의 함량을 나타냈으며 시간이 경과됨에 따라 감소하였다. 또한 spermidine은 4일째에 최고의 함량을 나타냈고, spermine은 2, 3, 4일에 약간 높았으나 전반적으로 큰 변화없이 비슷하였다 (Fig. 2). 벼, 완두 종자에서도 발아초기에 putrescine > spermidine > spermine의 순으로 putrescine의 함량이 나타났으며 (Sen *et al.* 1981) 또한 putrescine이 활발한 세포분열과 밀접한 관계가 있고 (Kaur-Sawney *et al.* 1988) polyamine은 유근생장 초기에 중요한 인자로 작용하므로 (Cohen *et al.* 1982, Smith 1985) 세포분열

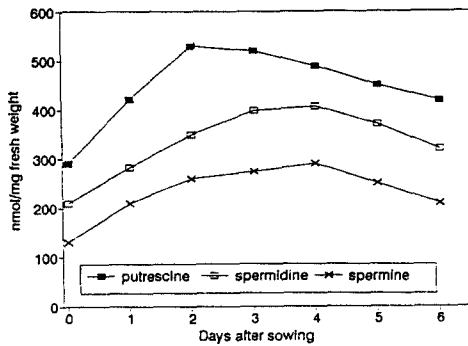


Fig. 2. Polyamine content during 6 days after sowing *Glycine max*.

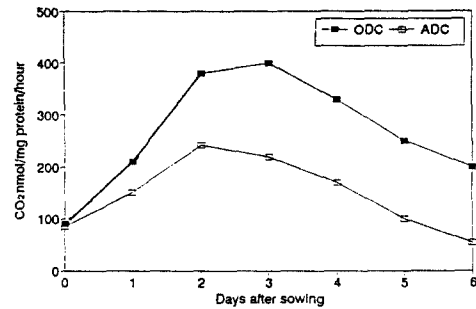


Fig. 3. Comparison of the activities of ODC and ADC during 6 days after sowing *Glycine max*.

이 활발한 시기에 polyamine 함량이 최고치를 나타낸 것으로 생각된다. Putrescine 합성에 관여하는 ADC와 ODC의 활성은 발아 후 2일과 3일에 가장 높았으며 그후 감소하였고 유근성장 전반에 걸쳐 ODC의 활성이 ADC보다 2배 정도 증가하였으므로 (Fig. 3) ODC의 활성은 ADC의 활성보다 2일째에 2배정도 높으므로 putrescine 합성은 ODC pathway를 이용하는 것을 알 수 있었다.

Ferulic acid 처리시 polyamine의 함량과 효소의 활성

Phenolic compound 중 가장 억제효과가 큰 ferulic acid를 0.001, 0.01, 0.1 mM로 처리한 다음 3일에 유근을 선발하여 polyamine 함량과 그에 관련된 효소의 활성을 측정하였다. Ferulic acid의 농도가 증가함에 따라 spermine은 비례적으로 20%로 증가하였으며 spermidine은 큰 차이가 없었으나 putrescine은 0.001 mM과 0.01 mM에서 함량이 증가하였다가 0.1 mM의 농도에 서는 감소하였다 (Fig. 4). Phenolic compound는 산성 pH를 나타내고 있으며 유근생장을 억제하지만 polyamine 중 putrescine 함량은 저농도에 서 증가하였다. 즉 putrescine은 영양분 결핍, 그리고 acid stress, osmotic stress, 고농도의 염분 stress에 의하여 증가된다는 보고 (Young and Galston 1983, Shen and Galston 1985)와 같이 ferulic acid는 유근생장의 stress로 작용하여 putrescine의 함량을 저농도에서 증가시키고 농도가 증가함에 따라 생중량의 감소 그리고 유근생장의 억제와 더불어 putrescine의 함량이 감소된다는 것을 유추할 수 있다. 한편 ferulic acid 처리시 3일째 유근의 생중량

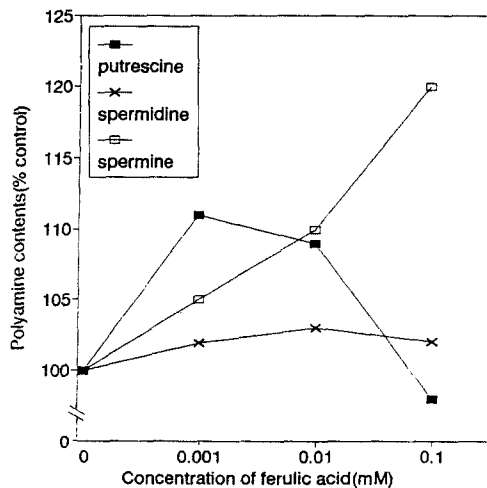


Fig. 4. Effect of various concentrations of ferulic acid on polyamine content at 3 days after sowing *Glycine max*.

Table 1. Comparison of fresh weight of radicle and the activities of ADC, ODC, DAO and SAMDC at various concentrations of ferulic acid at 3 days after sowing *Glycine max*

Concentration of ferulic acid (mM)	Fresh weight of radicle (mg /Petri-dish)	Relative activity (%)			
		ADC	ODC	SAMDC	DAO
0.000	0.18	100	100	100	100
0.001	0.30	125	136	110	85
0.010	0.25	112	172	158	72
0.100	0.10	70	231	179	46

은 0.001 mM과 0.01 mM에서는 증가하였고 0.1 mM의 농도에서는 대조구보다 감소하였으며 polyamine 합성에 관여하는 효소의 활성은 ferulic acid의 농도가 증가함에 따라 ADC와 DAO의 활성이 감소하였는데 ADC는 저농도에서 증가하고 0.1 mM의 농도에서는 감소하였다 (Table 1). 또한 ADC는 putrescine의 함량과 생중량의 변화와 같은 경향을 나타내므로 (Fig. 4) ADC가 세포의 성장과 분화에 관여함을 추측할 수 있다. 세포가 stress를 받을 때, 즉 낮은 pH나 염분의 자극, K⁺, Mg²⁺의 결핍 등에 의하여 ADC의 활성이 증가한다고 하였으므로 (Smith 1985) 본 실험의 ferulic acid도 대두의 유근생장에 있어서 stress로 작용하여 저농도에서 ADC의 활성을 증가시키고 고농도에서 활성의 감소와 더불어 유근생장이 억제된 것으로 볼 수 있다. 한편 ODC의 활성은 그와는 대조적으로 농도 증가에 따라 120% 정도 증가하였고 SAMDC의 활성은 50% 정도 증가하는 양상을 보였는데 (Table 1) 이러한 ODC활성의 증가는 ferulic acid의 고농도에 의하여 ADC 활성과 putrescine의 함량이 감소하므로 세포내의 putrescine의 함량을 유지하기 위하여 ODC의 활성이 증가되는 상호 보완적인 조절이 유도되었다고 생각한다.

적 요

대두 종자의 유근생장에 ferulic acid를 처리하여 유식물내의 polyamine대사에 관여하는 putrescine, spermidine, spermine의 함량과 ADC, ODC, DAO, SAMDC의 효소활성을 조사하였다. 유근생장에 8종의 phenolic compound를 처리한 결과, 대조구에 비하여 gallic acid는 촉진 효과를 보였고 ferulic acid는 가장 현저한 유근생장의 억제를 나타냈다. 대두종자의 유근생장에서 polyamine의 함량은 2일째에 putrescine이 가장 높았고 그 다음 4일에 spermidine, spermine의 순이었으며 putrescine의 합성은 ODC pathway를 이용하였다. Ferulic acid의 농도가 증가함에 따라 spermine의 함량은 비례적으로 증가하였고, putrescine은 0.001과 0.01 mM에서 증가하다가 0.1 mM에서 감소하였으나 spermidine은 거의 영향이 없었다. 효소의 활성은 ODC와 SAMDC의 활성이 증가하였는데 ODC의 활성은 120% 이상, SAMDC의 활성은 50%의 증가를 보였고, DAO와 ADC의 활성은 감소하였는데 DAO는 50% 이상의 감소를, ADC는 낮은 농도에서 20%정도 증가하다가 0.1 mM부터 감소하기 시작했다.

인용문헌

- Altman, A. 1982. Retardation of radish leaf senescence by polyamines. *Physiol. Plant.* 54:189-193

- Bagni, N. 1989. Polyamines in plant growth and development. In U. Bachrach and V.M. Heimer (eds.), *The Physiology of Polyamines*, Vol II. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 107-120.
- Bhowmik, P.C. and J.D. Doll. 1984. Allelopathic effects of annual weed residues growth and nutrient uptake of corn and soybeans. *Agron. J.* 76:383-388.
- Chio, Y.S. and Y.D. Cho. 1994. A new-S-adenoylmethionine decarboxylase from soybean axes. *Biochem. et Biophys. Acta.* 1201:466-472
- Chou, C.H. and G.R. Waller. 1982. Isolation and identification by mass spectrometry of phytotoxins in *Coffea arabica*. *Bot. Bull. Acad. Sin. (Taipei)* 2:25-34.
- Cohen, S.S. 1971. *Introduction to the polyamines*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Cohen, E., S. Arad., Y. Heimer and Y. Mizrahi. 1982. Participation of ornithine decarboxylase in early stage of tomato fruit development. *Plant Physiol.* 70:540-543.
- Del Moral, R. 1972. On the variability of chlorogenic acid concentration. *Oecologia* 9:289-300.
- Duke, S.O., K.C. Vaughn, E.D. Croon, Jr. and H.N. Elsohly. 1987. Artemisin, a constituent of annual wormwood (*Artemisia annua*) is a selective phytotoxin. *Weed Sci.* 35:499-505.
- Fobert, P.P. and D.T. Webb. 1988. Effect of polyamines, polyamine precursors, and polyamine biosynthetic inhibitors on somatic embryogenesis from egg plant (*Solanum melongena*) cotyledons. *Can. J. Bot.* 66:1734-1742.
- Goren, R., N. Palavan, H. Flores and A.W. Galston. 1982. Changes in polyamine titer in etiolated pea-radicles following red-light treatment. *Plant Cell Physiol.* 23:19-16.
- Kaur-Sawhney, R., A.F. Tiburcio and A.W. Galston. 1988. Spermidine and flowerbud differentiation in thin-layer explants of tobacco. *Planta* 173:282-284.
- Kim, Y.O., S.H. Kim., H.J. Lee and M.Y. Eun. 1990. Allelopathic effects of leaf extract of *Pinus rigida* Mill. on the seed germination of *Raphanus sativus* var. *hortensis* for. *acanthiformis* Makino. *Korean J. Ecol.* 13:75-82.
- Kim, Y.O. 1993. Effects of allelochemicals from *Pinus rigida* on the seed germination, cell structure, and isozyme band patterns of some plants. Ph.D. Thesis, Kon-Kuk Univ., Seoul. 88p.
- Martin-Tanguy, J. 1985. The occurrence and possible function of hydroxycinnamoyl acid amides in plants. *Plant Growth Regulation* 3:381-399.
- Osborn, T.C., D.C. Alexander, S.S.M. Sun, C. Cardona and F.A. Bliss. 1988. Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. *Science* 240:207-210.
- Rietveld, W.J. 1983. Allelopathic effects of juglone on germination and growth of several herbaceous and woody species. *J. Chem. Ecol.* 9:295-308.
- Sanjeev, J., G. Zon and M. Sundaralingan. 1989. Base only binding of spermine in the deep groove of the A-DNA octamer d (GTGTACAC). *Biochemistry* 28:2360-2364.
- Sen, K., M.M. Choudhuri and B. Ghosh. 1981. Changes in polyamine contents during de-

- velopment and germination of rice seeds. *Phytochemistry* 20:631-633.
- Shen, H. and A.W. Galston, 1985. Correlations between polyamine ratios and growth patterns in radicle roots. *Plant Growth Regulation* 3:353-363.
- Smith, T.A. 1985. Polyamines in Plants. *In* A.W. Galston and T.A. Smith (eds.), *Polyamines in Plants*. Martinus Nijhoff, Dr. Junk, W. Dordrecht, Boston, Lancaster. pp. 7-21.
- Smith, T.A. 1990. Plant polyamines metabolism and function. *In* H.E. Flores, R. N. Arteca and J.C. Shannon (eds.), *Polyamines and Ethylene Biochemistry, Physiology and Interactions*. The American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD. pp. 1-23.
- Valeria, S., P. Torrigiani and N. Bagni. 1990. Distribution of diamine oxidase activity and polyamine pattern in bean and soybean radicle at different stages of germination. *Physiol. Plant.* 80:515-519.
- Whittaker, R.H. and P.P. Feeny. 1971. Allelochemicals: Chemical interactions between species. *Science* 171:757-770.
- Young, N.D. and A.W. Galston. 1983. Putrescine and acid stress. *Plant Physiol.* 71: 767-771.

(1996년 8월 14일 접수)