

인삼에서 Putrescine 합성에 관련된 효소활성에 관한 연구

조병구 · 조영동
연세대학교 이과대학 생화학과
(1989년 12월 1일 접수)

Studies on Enzyme Activities Responsible for Biosynthesis of Putrescine in Ginseng(*Panax ginseng* C.A. Meyer)

Byung Goo Cho and Young Dong Cho
Department of Biochemistry, College of Science, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea
(Received December 1, 1990)

Abstract □ Specific activities of ADC and ODC from 2-4 year old ones were higher than that from seedlings whereas those activities were not changed significantly from 2 to 4 years. Generally, activity of ADC was predominant compared to that of ODC. Free arginine content in roots was much higher than that of leaves. And arginase specific activity from roots was higher than that of leaves. Cumulative results suggest that putrescine formation from ornithine in roots may be more effective than leaves and contribute to putrescine biosynthesis to some extract.

Keywords □ *Panax ginseng* C.A. Meyer, arginase, ADC, ODC, AIH, polyamines.

서 론

식물에서의 putrescine의 생합성 경로는 arginine이 arginase에 의해 ornithine이 되고 ornithine decarboxylase(ODC)에 의해 ornithine이 putrescine으로 전환되는 경우와 arginine decarboxylase(ADC)에 의해 arginine이 agmatine으로 전환되어 이것이 agmatine iminohydrolase(AIH)에 의해 putrescine으로 되는 두 가지 경로가 있다.¹⁾ 이들 효소는 특히 ADC와 ODC는 식물의 환경과 성장시기 등 여러 가지 생육조건에 의해 그 활성이 변한다고 한다.²⁾ 전보에³⁾ 의하면 인삼 seedling의 경우 ADC의 활성은 보이나 ODC의 활성은 보이지 않았고, 4년근 앞에서는 ADC와 ODC의 활성도가 모두 관찰된 것을 보고

한 바 있다. 따라서 다년생 식물인 인삼의 년근별로 polyamine의 대사가 어떻게 이루어지는지 분명치 않다. 아직 다른 다년생에 대해 여러 해 키우면서 polyamine 대사에 대해 연구한 것은 없는 것 같다. 본 연구서는 인삼을 각 년근별로 또 부위별로 putrescine의 합성에 관여하는 4가지 효소의 활성을 조사하여 putrescine의 합성이 인삼에서는 어떤 경로로 합성되는지를 알아보려고 하였다. 또한 putrescine의 전구체인 free arginine이 뿌리에 다량 존재하는데⁴⁾ 이 사실과 polyamine과의 연관성에 대하여 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

포장에서 재배되는 인삼을 각 년근별로 8월말에 채취하여 실험에 사용하였다. 단, 일년생 인삼은 잎이 다 퍼진 파종 후 1개월 후에 채취하였으므로 뿌

Abbreviations: ADC, arginine decarboxylase; ODC, ornithine decarboxylase; AIH, agmatine iminohydrolase.

리에 대한 조사는 할 수가 없었다.

2. Arginine의 추출 및 정량⁴⁾

인삼을 뿌리와 잎을 따로 분리하여, 냉동건조시킨 뒤 각각 500 mg을 75% ethylalcohol로 30분간 70°C 수조에서 2회 reflux 시켰다. Alcohol 증만을 모아서 40°C에서 evaporation 시킨 후 증류수 5 ml로 정용하여, 그 중 100 μ l를 cellulose T.L.C. (n-BuOH : acetic acid : H₂O = 12 : 3 : 5)에 점적하여 전개시킨 후 proline spot을 제거하고 arginine spot을 긁어 내었다. 이 spot을 증류수로 녹인 후 pH를 9.0로 만들고 시판 arginase (15 unit/ml) 1 ml를 넣은 후 37°C에서 10분간 반응시키고, 10% metaphosphoric acid 1 ml를 가하여 반응을 중지시켰다. 이 반응중지액으로 ornithine을 정량함으로써 arginine의 함량을 구하였다.

3. Ornithine의 정량⁵⁾

0.5 ml의 위의 반응중지액에 1.5 ml의 glacial acid와 0.5 ml의 ninhydrin 용액을 첨가하여 빛이 차단된 90°C 수조에서 60분간 발색시켜, 냉암소에서 식힌 후 515 nm에서 그 흡광도를 측정하여 함량을 조사하였다. 이 때 ninhydrin 용액의 조성은 glacial acetic acid : conc. phosphoric acid : D.W. = 3 : 1 : 1이며, 최종용액에 ninhydrin이 ml당 25 mg이 되게 하였다.

4. Arginase 활성도 측정⁶⁾

인삼을 생중당 4배의 grinding medium으로 4°C에서 막자사발로 간뒤 20,000×g에서 원심분리를 30분간 하였다. 이 때 grinding medium의 조성은 0.1 M Tris-maleate buffer (pH 7.0)에 1 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoethanol, 1% Triton X-100이며, 잎의 경우 PVPP가 2%되게 따로 첨가하였다. 활성도의 측정은 0.1 ml의 50 mM NaHCO buffer (pH 9.0), 0.1 ml의 1 mM DTT, 0.1 ml의 1 mM MnCl₂을 혼합한 후에 0.1 ml의 효소원을 넣고 증류수로 0.9 ml을 맞춘 뒤 37°C에서 15분간 활성화시키고 0.1 ml의 60 mM arginine (pH 9.0)을 넣어 20분간 반응을 시켰다. 20분간 반응중지액의 ornithine을 정량함으로써 arginase의 활성을 조사하였다.

5. ADC, ODC 활성도 측정

진보와 같은 방법으로 측정하였다.

6. Agmatine iminohydrolase 활성도 측정⁹⁾

5 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 mM, EDTA, 6% glycerol이 포함된 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) 8 ml에 인삼시료 4 g을 4°C하에서 막자사발로 간뒤 20,000×g에서 20분간 원심분리하고, 그 상층액을 효소원으로 하였다. 효소의 활성은 warburg flask의 center well에 0.01 N HCl 2 ml을 넣고 outer well에는 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5), 15 mM agmatine sulfate, 1 mg chloramphenicol, 1 mg streptomycin sulfate을 넣고 다시 최종적으로 효소원을 넣어 부피가 2 ml가 되게 한뒤 37°C에서 20 rpm으로 흔들며 주면서 2시간 동안 반응시켰고, saturated NaCO₃ 1 ml를 넣어 반응을 중단한 뒤 다시 30분간 생성된 NH₄⁺를 포집하였다. Center well의 HCl을 시험관에 넣고 nessler 시약 0.5 ml를 가한 뒤 15분 뒤에 425 nm에서 흡광도를 재었다.

결과 및 고찰

1. 각 년근별 ADC와 ODC 활성도 비교

Table 1은 인삼잎에서 년근별로 ADC와 ODC의 활성도를 조사한 것이다. 우선 ADC의 경우 년근별 specific activity가 seedling보다 2-4년근에서 높다. 한편 ODC의 경우에는 그 specific activity가 seedling에 비해 2년근에서는 5배, 3년근에서는 7배, 그리고 4년근에서는 3배 정도 증가하고 있다. ADC/ODC의 비는 seedling의 경우 10%, 2, 3년근에서는 각각 20, 30%이며 4년근의

Table 1. Time course of arginine and ornithine decarboxylase activities in ginseng leaf

	Seedlings	2 years	3 years	4 years
a ADC	2.23	5.44	5.60	7.80
ODC	0.23	1.13	1.60	0.70
ODC/ADC	0.10	0.21	0.29	0.09
b ADC	109.8	274.2	279.8	256.7
ODC	11.3	60.2	80.7	23.8
ODC/ADC	0.1	0.22	0.29	0.09

¹⁴CO₂ was liberated by arginine and ornithine decarboxylase from ¹⁴C-labeled arginine and ¹⁴C-labeled ornithine, respectively. Both enzyme activities were expressed in terms of nmole ¹⁴CO₂/hr/mg protein (a) and nmol ¹⁴CO₂/hr/g.fwt(b), respectively.

Table 2. Time course of arginine and ornithine decarboxylase activities in ginseng root

	Seedlings	2 years	3 years	4 years
a ADC	N.T.	5.07	3.69	4.65
ODC	N.T.	0.50	0.46	0.32
ADC/ODC		0.10	0.12	0.07
b ADC	N.T.	56.1	42.9	63.9
ODC	N.T.	5.53	5.41	4.47
ADC/ODC		0.10	0.12	0.07

$^{14}\text{CO}_2$ was liberated by arginine and ornithine decarboxylase from ^{14}C -labeled arginine and ^{14}C -labeled ornithine, respectively. Both enzyme activities were expressed in terms of nmole $^{14}\text{CO}_2$ /hr/mg protein (a) and nmole $^{14}\text{CO}_2$ /hr/g.fwt (b), respectively. N.T.: not tested.

경우는 10%로 seedling의 경우 putrescine 합성경로는 전체 1% 정도가 ornithine을 경유하고, 고년근으로 갈수록 그 관여율이 커지는 것 같다. 한편 fresh weight 당 년근별 ADC와 ODC의 활성도 변화는 specific activity의 경우와 비슷하였다.

Table 2는 뿌리의 경우인데 일과는 달리 ADC나 ODC의 활성도 변화가 년근별로 일정한 경향을 찾을 수가 없었다. Table 1과 2를 종합하여 보면, ADC의 specific activity는 잎이 뿌리에 비해 2년근은 같았고 3년근은 1.5배, 4년근은 1.6배 정도로 컸으나, 단위조직무게당 활성도비는 2, 3 그리고 4년근이 각각 4.8배, 6.5배 그리고 4배 정도로 더 컸다. 이것은 잎이 뿌리보다 단위시간당 빠른 성장을 보이는 사실과 빠른 성장을 위해 활발한 대사가 요구되는 것과 polyamine이 식물의 빠른 성장시 많이 요구된다는 사실과 연관시킬 수 있겠다.

2. 각 년근별 arginine 함량과 arginase 활성도 조사

Table 3은 각 년근별 arginase와 ADC의 기질인 arginine과 ODC의 기질인 ornithine의 함량을 조사한 것이다. 아주 특징적으로 뿌리가 잎보다 arginine이 10배에서 100배 정도 많다. Free ornithine의 양은 잎이나 뿌리에서 별 차이를 보이지 않고 있다. 그러나 seedling의 경우 ornithine의 함량이 아주 작았다. Table 4는 arginine를 ornithine과 urea로 전환시켜주는 arginase 활성도를 조사하는 것인데, 단위조직무게당 활성도에서는 고년근의 3% 내지 6% 정도로 아주 적었다. Table 3과 4를 종합하여 보면 seedling의 경우

Table 3. Time course of arginine and ornithine content in ginseng leaf and root

	Seedlings	2 years	3 years	4 years
leaves arginine	0.43	0.54	0.32	0.32
ornithine	0.10	0.28	0.50	0.56
roots arginine	N.T.	20.2	30.6	24.0
ornithine	N.T.	0.34	0.44	0.38

Both contents in the leaf and root were expressed in terms of mg/g.dw. N.T.: not tested.

Table 4. Time course of arginase activity in ginseng leaf and root

	Seedlings	2 years	3 years	4 years
leaves a	0.075	0.63	0.89	1.71
b	1.5	23.6	28.9	45.3
roots a	N.T.	1.66	3.01	2.56
b	N.T.	19.9	45.2	48.7

Ornithine was liberated by arginase from arginine. Enzyme activity was expressed in terms of ug ornithine/hr/mg protein (a) and ug ornithine/hr/g.fwt (b), respectively. N.T.: not tested.

ODC의 기질인 ornithine의 함량이 아주 적어서 ODC의 활성이 적고, ornithine 함량의 적음은 arginase의 활성이 적음에서 기인되며 이것은 다시 seedling에 free arginine이 적기 때문인 것 같다. 뿌리에서는 잎보다 arginase의 specific activity나 단위조직무게당 활성도가 큰데, 이는 뿌리에 free arginine의 함량이 잎보다 많기 때문인 것 같다. 그러나 뿌리에서 free arginine이 많은 것이 polyamine의 생성과 큰 연관성은 없는 것 같다. 아직 free arginine이 많은 이유는 지금 알 수는 없지만, 질소를 저장하는 역할을 하는 것이 아닌가 한다.

3. 각 년근별 agmatine iminohydrolase 활성도 조사

Table 5는 각 년근별로 agmatine을 putrescine으로 전환시키는 agmatine iminohydrolase의 활성도를 조사한 것인데 각 년근별로는 별 차이를 보이지 않고 있다. 다만 앞에서는 단위조직무게당 활성도가, 뿌리에서는 specific activity가 각각 큰 것을 알 수 있다. 이 역시 잎이 뿌리보다 단위시간당 빠른 성장을 보이고 있어, 활발한 대사활동이

Table 5. Time course of agmatine iminohyrolase activity in ginseng leaf and root

		Seedlings	2 years	3 years	4 years
leaves	a	4.1	5.4	4.6	16.5
	b	152.1	256.5	165.0	205.2
roots	a	N.T.	10.9	11.9	10.1
	b	N.T.	107.1	114.7	137.7

Ammonia was liberated by agmatine iminohyrolase from agmatine. Enzyme activity was expressed in terms of nmole ammonia/hr/mg protein (a) and nmole ammonia/hr/g.fwt (b), respectively. N.T.; not tested.

Table 6. Time Course of polyamine content in ginseng leaf and root

		Seedlings	3 years	3 years	4 years
leaves	putrescine	30.2	20.3	9.9	11.7
	spermidine	11.4	16.9	34.7	35.3
	spermine	2.6	12.6	15.7	13.4
roots	putrescine	N.T.	7.3	10.5	7.9
	spermidine	N.T.	7.0	9.7	8.3
	spermine	N.T.	6.0	5.8	5.8

Contents were expressed in terms of nmole/g.fwt. N.T.: not tested.

이루어짐을 알 수 있다.

4. 각 년근별 polyamine 함량조사

Table 6은 각 년근별 polyamine 함량을 본 것

인데, 잎이 뿌리에서보다 그 함량이 많은데, 이는 ADC와 ODC 그리고 agmatine iminohyrolase의 단위조직당 활성도가 잎에서 뿌리보다 크기 때문이다. 그래서 잎이 뿌리보다 단위시간당 생육이 더 활발한 것 같다. 년근별 잎 간의 비교에서 seedling과 2년생 잎에선 주된 polyamine이 putrescine이며 3, 4년근에서는 spermidine이며, data화하지는 않았지만 5, 6년근에서는 spermine이 주된 polyamine이었다. 뿌리의 경우, 3가지 polyamine이 거의 비슷한 함량을 보이고 있다. 이로써, 적어도 잎에서는 고년근으로 갈수록 더 다양한 polyamine의 성장에 요구되는 것 같다.

인용문헌

1. Dachrach, U.: Function of naturally occurring polyamine, Academic Press.
2. Bagni, N., Barbieri, P. and Torrigiani, P.: *J. Plant Growth Regul.* **2**, 177 (1983).
3. 조병구, 조영동: *고려인삼학회지* **13**, 19(1969).
4. 황종규, 양희철: *인삼문헌특집* **5**, 92(1974).
5. Roubclakis, K.A. and Kliever, W.M.: *Plant Physiol.* **62**, 344 (1978).
6. Polacoo, J.C.: *Plant Physiol.*, **58**, 350 (1976).
7. Hiroshi, Y. and Suzuki, Y.: *Plant Physiol.*, **67**, 697 (1981).