

# Putrescine처리가 절화 카아네이션 'Desio'의 화관 노화에 미치는 영향<sup>1)</sup>

— Ethylene발생, ACC synthase, EFE 활성변화—

손기철·이인국·권혜정

(건국대학교 농과대학 원예학과)

The effect of putrescine on the senescence of petals of cut carnation  
'Desio'—Change of ethylene production and ACC synthase and EFE activities—

Son Ki-Cheol, Lee In-Kuk, Kwon Hye-Jeong

Dept. of Hort., Kon-Kuk Univ. Seoul, 133-701, Korea

## Abstract

Ethylene evolution on the senescence of petals of cut carnation cv. Desio was varied according to the cultural seasons, where 70ul/g·fw/hr of ethylene was produced in Feb. harvest, but only 4.3ul/g·fw/hr in July. Despite that 10mM putrescine treatment on the petals inhibited ethylene production and EFE activity, and delayed the senescence, it rapidly stimulated ACC synthase activity over those of control and 1mM putrescine treatment. In addition, ethylene was produced in the 1mM putrescine treatment even though ACC synthase activity was inhibited. This fact indicates that putrescine has influence on rather EFE than ACC synthase on the biosynthesis of ethylene and the effect of exogenous polyamines on the senescence is varied according to the level of endogenous polyamines in the petals of cut carnation.

## I. 서 론

절화는 관상가치가 절대적이므로 화기의 선도유지와 수명 연장이 가장 중요한 요인이다. 그러므로 가장 효과적인 선도유지 및 절화수명연장 방법은 절화의 노화를 최대한으로 억제하는 물질의 개발일 것이다. 기존의 선도유지 방법에 관한 연구들은 대부분이 STS와 2,5-norbornadiene(NDE)에 의한 에틸렌 작용의 억제와 AOA, AVG에 의한 에틸렌 생합성의 억제, 그리고 그의 물질을 이용하여 세포막의 완전성, 줄기도관의 막힘의 억

제 및 간접적인 에틸렌 발생의 억제 등으로 절화의 수명을 연장시키고 있다<sup>10)</sup>.

에틸렌은 절화 카네이션의 노화를 촉진시키고 sleepiness를 일으켜 현저하게 수명을 단축시키는 물질로 알려져 있다<sup>4)</sup>. 카네이션 꽃의 노화는 생리적으로 에틸렌 생성의 climacteric 발생과 외관적으로 꽃잎이 위조되어 안으로 말려 들어가는 특징들로 판단되어질 수 있다<sup>10)</sup>. 이 경우 카네이션 꽃잎은 화기에서 측정되어지는 에틸렌의 대부분을 차지한다<sup>16)</sup>.

현재의 고등식물에서 에틸렌 생합성 경로는 L-Methionine → S-adenosylmethionine(SAM) → 1-aminocyclo-

<sup>1)</sup> 본 연구는 1993년도 건국대학교 부설 농업자원개발연구소 논문집에 게재되었음(18:97~105).

propane-1-carboxylic acid(ACC)→ethylene순으로 밝혀졌다<sup>2,3,12)</sup>. 그러나 이러한 합성과정에서 polyamine과 ethylene은 중간대사 물질로 SAM를 공유하며, 에틸렌의 노화를 촉진시키는데 비해 polyamine은 노화를 억제한다고 알려져 왔다<sup>14,20)</sup>. Polyamines은 Arginine→Putrescine→Decarboxylated SAM+Putrescine→spermidine→Decarboxylated SAM+Spermidine→Spermine 순으로 합성된다<sup>2,21)</sup>. Polyamine은 spermidine (spd), spermine(spn)과 diamine인 putrescine(put)의 형태로 식물체에 널리 존재하며, 여러가지 작용을 하는 것으로 알려져 있다<sup>21)</sup>. 에틸렌 생합성의 중간물질로 가장 중요한 제한인자인 S-adenosyl methionine(SAM)은 spd와 spm의 생합성의 중간대사물질이기도 하다<sup>2)</sup>. 또한 에틸렌과 polyamine의 물질생산과 더불어 발생된 부산물은 각각의 재회수 경로를 거쳐 초기물질인 methionine을 재생한다<sup>14)</sup>.

지금까지 알려진 바로 polyamine이 식물의 노화에 미치는 영향은 SAM→ACC의 환원억제<sup>9)</sup>와 ACC로부터 에틸렌 발생의 억제<sup>10)</sup>, free radical scavenger로서의 작용<sup>21)</sup>, 노화 저지제(senescence retardants)의 작용<sup>19)</sup>으로 생각되어져 왔다. 그러나 polyamine이 도리어 senescence를 촉발시킨다는 결과도 보고되어졌다<sup>8)</sup>.

그중, Downs and Lovell(1986)<sup>8)</sup>은 절화 카네이션의 보존 용액에 첨가된 put와 spd는 화기의 에틸렌 생성을 더 많게 하고 개화 기간을 감소시켰다고 보고했다. 그러나 최근에 카네이션 화기전체 대신에 화판만을 실험재료로 한 Son and Chae(1993)에 따르면, 외생적 폴리아민의 처리는 명확히 화판의 에틸렌 생성을 억제시키며, 노화를 지연시키는 것으로 나타났다.<sup>22)</sup>

따라서 본 실험은 Son and Chae(1993)의 실험을 좀 더 명확하게 하기 위해서, 외생적 폴리아민 중 가장 효과적인 putrescine을 카네이션 꽃잎에 처리하였을 때 일어나는 에틸렌 생합성 과정의 변화를 살펴보고자 수행되어졌다.

## II. 재료 및 방법

1992년 7월 말경, 김해의 재배농가에서 재배된 카네이

션(*Dianthus caryophyllus* L. cv. Desio)을 수확직후 실험실로 수송한 후 선별하여 증류수에 꽃아 1일 동안 보존한 것을 공시 재료로 사용하였다. 수확 당시 카네이션의 발육 단계는 꽃잎이 줄기와 60°를 이루는 상태로 약 60~70% 개화한 상태였다. 본 실험에 사용된 카네이션은 화판이 줄기와 90° 각도를 이루어 완전히 개화된 꽃의 최외각 화판만을 한 꽃당 4~5개씩 취하여 사용하였다. 꽃잎 채취는 꽃받침을 예리한 칼로 열개하여 화탁을 떼어낸 후 꽃잎을 화탁으로 부터 한장씩 떼어냈다. 각 처리는 각기 다른 화기로 부터 취한 15개의 꽃잎 기부를 보존 용액에 꽃아 조사되어졌다. 보존 용액은 증류수를 대조구로 사용하였으며, 처리구는 putrescine 1mM, 10mM 농도로 하였다. 꽃잎에 대한 보존용액 공급은 처리 용액을 넣은 16×50×2.5cm의 플라스틱 용기에 0.1mm 비닐로 1겹 씌운 후 예리한 칼로 틈을 내어 꽃잎의 기부가 용액에 잘 잠기도록 꽃았다. 처리당 3반복으로 생체중의 변화, 에틸렌 발생, ACC synthase activity, EFE activity, 꽃잎의 단계별 노화 속도를 측정하였다. 각 처리구는 2000 Lux 형광 조명아래 12시간 일장으로 80%의 습도와 22°C의 온도를 유지하였다.

생체중의 변화는 꽃잎 15장의 무게를 한 처리로 하여 매일의 생체중을 초기치에 대한 백분율로 나타내었으며, 에틸렌 발생량의 측정은 꽃잎에 묻은 보존용액을 티슈로 흡수시켜 닦아낸 후 30ml 1회용 주사기에 넣고 입구를 silicon rubber로 막아, 2시간 후 1회용 1ml 주사기로 뽑아 GC(Shimadzu 14A, FID, 2m alumina column)로 측정하였다.

ACC synthase의 활성화는 Yu<sup>23)</sup>와 Abraham<sup>1)</sup>의 방법을 변형하여 사용하였다. 저온에 유지한 막자 사발에 꽃잎 1g과 K-P buffer 9ml를 넣어 분쇄한 후, 4°C에서 10,000rpm으로 20분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액에 K-P buffer를 넣어 10ml로 맞춘 후 ammonium sulfate((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 5.61g으로 용액의 80%로 포화시켜 효소들이 침전되도록 하였으며 4°C에서 30분간 정지시켰다가 원심분리하여 잔사만을 분리하고, K-P buffer로 재포화시켜 2.5ml로 맞추었다. 이것을 column(sephadex G25)에 통과시킨 후 취한 효소원 400uM에 6mM SAM, 50uM PLP, 400mM HEPES를 첨가하여 최종부피를 600ul로 한 다음 이것을 반응 표준 혼합물로

사용하였다. 30°C의 water bath에서 2시간 동안 배양한 후 활성도 측정은 Lizada와 Yang<sup>11)</sup>의 방법에 따라서 GC로 다음과 같이 측정하였다. 반응 혼합물에 200ul의 10mM HgCl<sub>2</sub>, 100ul의 증류수, 100ul의 cold bleach(포화 NaOH:5% NaOCl=1:2, v/v)를 넣어 ACC를 에칠렌으로 전환시켰으며, 5분후에 1회용 1ml 주사기로 1ml의 가스를 뽑아 GC로 측정하였다. ACC synthase의 활성도는 2시간 배양한 반응 효소원에 의한 에칠렌 생성으로 부터 2시간 배양하지 않은 반응 효소원에 의한 에칠렌 생성량을 뺀 값으로 계산하였다.

EFE(ethylene forming enzyme)의 측정은 에칠렌 발생량을 측정할 카네이션 꽃잎을 cork borer(내경 9.2mm) 7절편(약 100mg)을 얻은 후 꽃잎에 상처가 없도록 Petri-dish에 담고 ACC 1mM에 꽃잎의 뒷면이 위로 향하게 하고 꽃잎기리 겹치지 않도록 하여 꽃잎의 밑부분이 용액에 닿도록 침지한 후 30분간 암처리 하였다. 처리 후 filter paper 위에 올려 놓아 용액을 제거하고, 증류수를 흡수시킨 filter paper를 넣은 test tube에 꽃잎이 겹치지 않도록 놓고 마개를 막은 후 90분 동안 25°C에서 배양하였으며, 배양후 1ml 1회용 주사기로 gas sample을 채취하여 GC로 에칠렌량을 측정하였다.

꽃잎의 단계별 노화 속도 측정은 외관상의 변화에 기초를 두고 꽃잎 1장 마다 다음과 같은 노화 단계를 정하여 측정하였다.

I stage: 완전히 개화되었으며 싱싱한 상태

II stage: 꽃잎의 1/4 정도에 in-rolling, 위조, 변색 또는 갈변의 증세가 나타났을 때

III stage: 꽃잎의 1/2 정도에 in-rolling, 위조, 변색 또는 갈변의 증세가 나타났을 때

IV stage: 꽃잎 전체에 in-rolling, 위조, 변색 또는 갈변의 증세가 나타났을 때

V stage: 꽃잎의 대부분이 위조되어 건조한 상태

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 생체중의 변화

대조구의 경우 생체중이 증가하여 측정 3일까지 약

110%의 증가를 보이다가 측정 4일 부터 점차 감소하는 경향을 보였으며 측정 7일에는 약 60%의 감소를 보였다(Fig. 1). Put 1mM의 경우는 측정 2일에 최대로 증가하여 점차로 감소하였으며, 측정 7일에 약 55%의 감소를 보였다. 대조구와 put 1mM의 처리는 생체중 변화에 별차이를 보이지 않는 반면, put 10mM의 처리구는 생체중의 감소가 가장 빨리 나타났으며, 측정 7일에는 75%가 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Downs와 Lovell(1986)의 결과와 일치한다.

#### 2. 에칠렌 생성

대조구의 경우 에칠렌의 발생은 측정 3일에서 급속한 증가를 보여 측정 5일에 climacteric 정점에 이른 후 급격히 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 2). 에칠렌 생성의 형태는 다른 연구결과와 같이 위조의 증후로 급속한 증가를 보였으나, 그 양에 있어서는 상당히 상이한 결과를 나타내었다. 카네이션의 품종에 따라 약간의 차이는 있지만 대략 화기의 노화시에는 최고치가 70~80nl/g·FW/hr 정도이나,<sup>8)</sup> 본 실험에서는 대조구에서 단지 4내지 5nl/g·FW/Hr 정도의 에칠렌만이 발생되어졌다. 이러한 결과는 수차의 반복실험에서도 같았다. 따라서 이러한 경향은 이 실험에 사용된 카네이션 '데시오' 품종이 다른 카네이션과는 달리 에칠렌량이 적게 발생하는 품종이거나, 혹은 사용된 카네이션이 고온기에 재배되어졌기 때문에 계절에 따른 화기의 에칠렌 발생량이 다르거나 최악의 경우 실험의 오류일 가능성이 있다. 그러나 Son과 Chae(1993)에 의해 같은 실험실에서 사용된 Desio 품종의 경우(2월 채화) 약 70nl/g·FW/Hr를 나타내었기 때문에 실험상의 오류라고는 볼 수 없다. 따라서 현재로서는 카네이션의 정상적인 재배기가 아닌 고온기에 재배된 카네이션에서는 에칠렌의 발생량이 적은 것으로 추정되어진다. 그러므로 앞으로 계절적인 변화에 따른 카네이션 품종간의 에칠렌 발생량을 조사해 볼 필요성이 있다고 생각되어진다. 그러나 putrescine 농도별 처리를 살펴보면 농도가 높을 수록 에칠렌의 발생을 억제하는 것으로 보인다. Put 1mM의 경우는 2일째 적은 양의 에칠렌이 생성되었던 반면에 10mM의 경우는 4일째에 미량의 에칠렌이 발생되었다. 따라서 적은 양의 에칠렌이 발생됨에

도 불구하고 폴리아민의 처리는 에칠렌의 발생을 명확히 억제한다.

### 3. ACC synthase

모든 처리구는 특징적으로 ACC synthase의 활성화에 두개의 peak를 보였다(Fig. 3). 두번째의 peak는 모두 7일째 나타났으나, 첫번째 peak는 대조구와 put 1mM의 경우는 각각 3일째, put 10mM의 경우는 4일째 나타났다. 이와 같은 사실은 에칠렌의 발생과 ACC synthase의 활성화는 일치하지 않음을 나타내는 것이다. put 10mM 처리구는 4일째 가장 높은 활성을 나타내었으나, 에칠렌 발생은 가장 낮은 것으로 나타났다. 한편, 대조구는 3일째 ACC synthase의 활성이 최대가 될 때 에칠렌의 발생이 촉발되지 시작했다. 한편, 특이한 사실은 put 1mM의 처리구는 ACC synthase의 활성은 가장 낮음에도 불구하고 에칠렌의 발생은 put 10mM 보다 높게 나타났다. 이와 같은 결과는 ACC synthase의 활성화와 에칠렌의 발생이 거의 일치되는 일반적인 결과들과는 상이하다<sup>17)</sup>.

### 4. EFE activity

EFE의 활성화는 대조구와 putrescine 농도별 처리구 모두에서 6일째까지 계속적으로 증가하는 경향을 보였다. 이러한 활성화는 대조구, putrescine 1mM, putrescine 10mM 순으로 높게 나타났으며, 에칠렌 발생 형태와 일치한다(Fig. 4). 이와 같은 사실은 에칠렌의 발생에 있어 ACC synthase가 주 조절효소이지만 궁극적인 에칠렌의 양은 ACC synthase의 활성화보다는 오히려 EFE활성에 영향을 받는 것으로 나타났다.

### 5. 단계별 노화 속도

대조구와 putrescine 농도별 처리구 모두에서 3일까지는 노화가 지연되다가 4일 이후 급격히 노화가 진전되는 경향을 보였으며, 대조구와 put 1mM 처리구는 4출일째에 위조가 시작되었으나, put 10mM 처리구는 4출일 정도가 된 때에 위조가 시작된 것으로 나타났다(Fig. 5).

노화시 폴리아민의 외생적 처리가 카네이션 화판의 노

화에 미치는 영향을 살펴볼 때, 폴리아민은 ACC synthase에 직접적인 영향을 미치는 것으로 보인다. 왜냐하면, 현재의 결과를 살펴볼때 EFE 활성화나 에칠렌의 발생 및 화판노화의 단계는 예상된 결과를 나타내나(Fig. 2, 4, 그리고 5), ACC synthase의 활성화는 전혀 예측치 못한 결과를 나타내었기 때문이다(Fig. 3). 즉, put 10mM의 처리는 분명히 노화를 억제함에도 불구하고 ACC synthase이 활성화는 가장 높은 것으로 나타났다(Fig. 3). 이러한 사실은 에칠렌과 폴리아민이 생합성 과정중 SAM을 공동 전구체로 사용하며 상관관계를 가지는 것은 분명하다<sup>9,14)</sup>. 현재로서는 카네이션 내생의 putrescine에 더불어 외생의 고농도 처리가 1) 폴리아민의 생합성 과정을 억제한 결과로 ACC synthase의 활성이 촉진되어졌거나, 아니면 2) 직접 에칠렌 생합성 과정을 거의 억제하는 것으로 나타났다. 따라서 적정 외생의 폴리아민의 농도만이 ACC synthase의 활성을 억제시키는 것으로 보인다(Fig. 3). 그럼에도 불구하고 이 실험에 사용된 화판은 put 10mM의 농도를 자체적으로 조절할 수 있는 것으로 판단된다. 왜냐하면, ACC synthase의 활성이 비정상적임에도 불구하고 에칠렌의 발생과 노화단계는 정상적이기 때문이다. 즉, 내생적+외생적 put의 농도가 어떤 기준치 이하일 경우는 ACC synthase의 활성을 억제시키고, 기준치 이상이면 오히려 ACC synthase를 촉진시키며, 그 이상이면 현재 명확치는 않으나 EFE 활성화에도 영향을 미쳐 에칠렌의 발생을 촉진시키고 마침내 노화를 촉진시키는 것으로 보인다. 이러한 사실은 카네이션 노화진전은 폴리아민 중 put이 증가하고 spd이 감소함으로 결정되어진다는 최근의 보고와<sup>18)</sup> 절화 카네이션의 보존 용액에 첨가된 10mM의 put와 spd는 화기의 에칠렌 생성을 조기에 촉진시키고 개화기간을 감소시켰다고 보고와,<sup>8)</sup> 카네이션 화판에 10mM의 폴리아민 (put, spd, 그리고 spm)의 처리는 명확히 노화를 지연시켰다는 보고<sup>22)</sup>를 동시에 만족시키는 설명이 되어질 수 있다. 본 실험의 경우 10mM의 put 처리는 위의 극단적인 예의 중간적인 경우가 아닌가 생각되어진다. 결국 다른 외생적 처리농도가 같음에도 불구하고 그 결과가 다른 것은 바로 내생 폴리아민의 농도가 서로 다르기 때문인 것으로 추측되어진다. 즉, 내생 폴리아민의 농도에 따라 외생 폴리아민의 농도가 같을지라도 억제제로 작용할 수

도 있고, 촉진제로 작용할 수도 있다는 것이다.

### 적 요

절화 카네이션 'Desio' 품종의 화관 노화시 발생하는 에틸렌의 발생량은 계절에 따라 달라 2월경 채화된 것은 약 70nl/g·FW/Hr를 나타내었으나, 7월에 채화된 것은 4.3nl/g·FW/Hr에 불과했다. 폴리아민중 put의 10mM

의 처리는 EFE의 활성화와 에틸렌의 발생을 억제시키고 화관의 노화를 지연시켰으나, 대조구나 put 1mM의 처리구에 비해 높은 ACC synthase의 활성을 나타내었다. 한편, 1mM put 처리는 ACC synthase의 활성이 억제됨에도 불구하고 에틸렌이 생성되어졌다. 이러한 사실은 기작이 명확치 않으나 put 처리가 에틸렌 생합성 과정에서 EFE보다 ACC synthase의 활성화에 직접적인 영향을 미치는 것을 나타내며, 내생 폴리아민의 농도에 따라 외생 폴리아민이 카네이션 화관의 미치는 영향이 다름을 나타낸다.

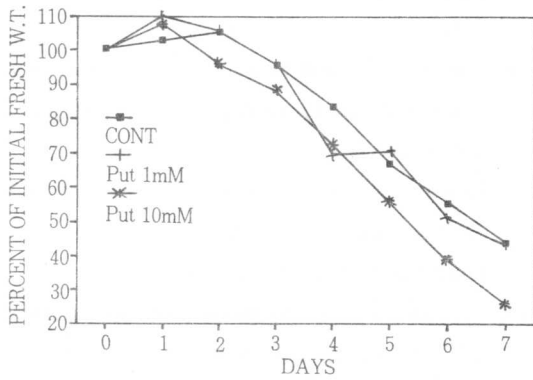


Fig. 1. Relative change in petal fresh weight of cut carnation 'Desio' as affected by putrescine treatment.

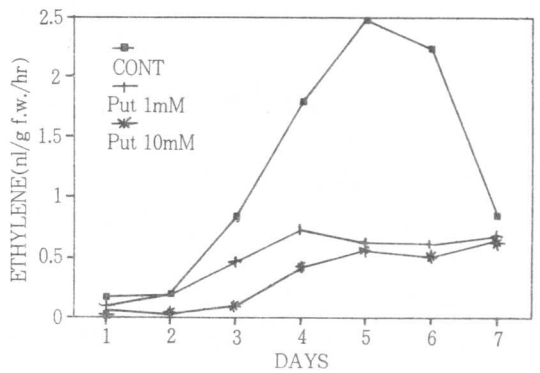


Fig. 2. Ethylene production in the petal of cut carnation 'Desio' as affected by putrescine treatment.

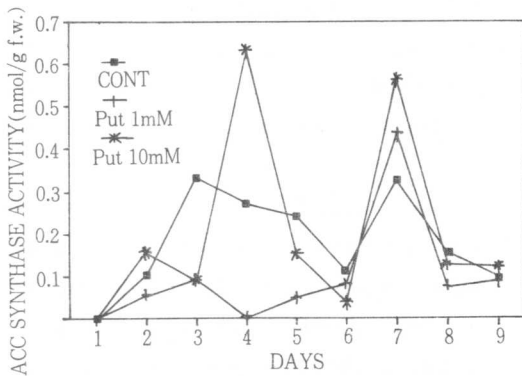


Fig. 3. Changes of ACC synthase activity in the petal of carnation 'Desio'.

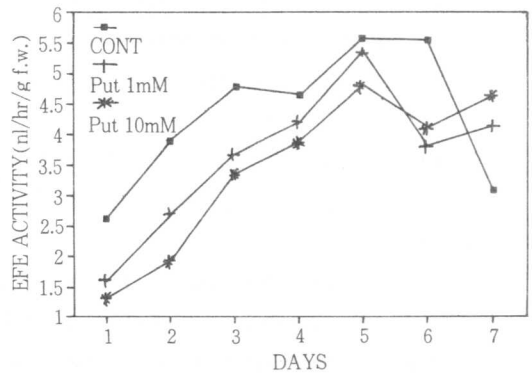


Fig. 4. Changes of EFE activity in the petal of carnation 'Desio'.

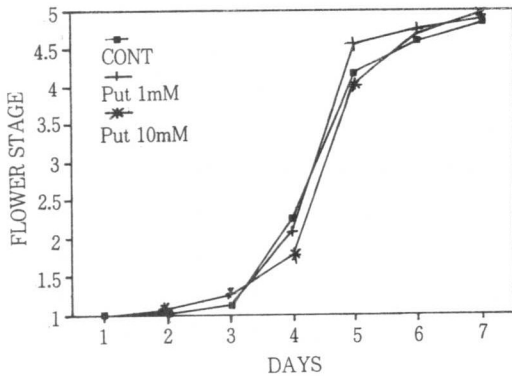


Fig. 5. Changes of developmental stage in the petal of cut carnation 'Desio'.

### 인용 문헌

- 1) Abraham, Y.M., H. Halevy, H. Spiegelstein, and S. Mayak. 1985. The site of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthesis in senescing carnation petals. *Physiol. Plant.* 65:196-202.
- 2) Adams, D.O. and S.F. Yang. 1977. Methionine metabolism in apple tissue. Implication of S-adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Plant Physiol.* 60:892-896.
- 3) Adams, D.O. and S.F. Yang. 1979. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 76:170-174.
- 4) Barden, L.E. and J.J. Hanan. 1972. Effect of ethylene on carnation keeping life. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 97:785-788.
- 5) Boller, T.R., C. Herner, and H. Kende. 1979. Assay for and enzymatic formation of an ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Planta* 145:293-303.
- 6) Borochoy, A. and W.R. Woodson. 1989. Physiology and biochemistry of flower petal senescence. *Hort. Rev.* 11:15-43.
- 7) Brandt, A.S. and W.R. Woodson. 1992. Variation in flower senescence and ethylene biosynthesis among carnations. *HortScience* 27:1100-1102.
- 8) Downs, C.G. and P.H. Lovell. 1986. The effect of spermidine and putrescine on the senescence of cut carnations. *Physiol. Plant.* 66:679-684.
- 9) Even-Chen, Z., A.K. Matto, and R. Goren. 1982. Inhibition of ethylene biosynthesis by aminothoxyvinylglycine and by polyamines shunts label from [3,4-<sup>14</sup>C]methionine into spermidine in aged orange peel discs. *Plant Physiol.* 69:385-388.
- 10) Halevy, A.H. and S. Mayak. 1981. Senescence and postharvest physiology of cut flowers, part 2. *Hortic. Rev.* 3:59-143.
- 11) Lizada, M.C. and S.F. Yang. 1979. A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Anal. Biochem.* 100:140-145.
- 12) Lurssen, K., K. Naumann, and R. Schroder. 1979. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid an intermediate of the ethylene biosynthesis in higher plants. *Z. Pflanzenphysiol.* 92:285-294.
- 13) Manning, K. 1985. The ethylene forming enzyme system in carnation flowers. In *Ethylene and Plant Development* (J.A. Roberts and G.A. Tucker, eds.), pp.83-92. Butterworths. London.
- 14) Miyazaki, J.H. and S.F. Yang. 1987. The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. *Physiol. Plant.* 69:366-370.
- 15) Nichols, R. 1971. Induction of flower senescence and gynoecium development in the carnation (*Dianthus caryophyllus*) by ethylene and 2-chloroethylphosphonic acid. *J. Hort. Sci.* 46:323-332.
- 16) Nichols, R. 1977. Sites of ethylene production in the pollinated and unpollinated senescing carnation (*Dianthus caryophyllus*) in florescence. *Planta* 135:155-159.
- 17) Peiser, G. 1986. Levels of 1-aminocyclopropane-

- ne-1-carboxylic acid(ACC) synthase activity, ACC and ACC-conjugate in cut carnation flowers during senescence. *Acta Hort.* 181:99-104.
- 18) Serrano, M., F. Romojaro, J.L. Cases, and M. Acosta. 1991. Ethylene and polyamine metabolism in climacteric and nonclimacteric carnation flowers. *HortScience* 26:894-896.
- 19) Shin, L-M., R. Kaur-Sawhney, J. Fuhrer, S. Samanta, and A.W. Galston. 1982. Effects of exogenous 1,3-diaminopropane and spermidine on senescence of oat leaves. *Plant Physiol.* 70:1592-1596.
- 20) Slocum, R.D., R. Kaur-Sawhney, and A.W. Galston. 1984. The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 235:283-303.
- 21) Smith, T.A. 1985. Polyamines. *Ann. Rev. Plant Physiol* 36:117-143.
- 22) Son, K.C. and Y. Chae. 1993. Effect of polyamines on the senescence of carnation petals. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 34:75-80.
- 23) Yu. Y.-B., D.O. Adams, and S.F. Yang. 1980. Inhibition of ethylene production by 2,4-dinitrophenol and high temperature. *Plant Physiol.* 66:286-290.
- 20) Slocum, R.D., R. Kaur-Sawhney, and A.W.

# 切花 壽命延長物質 開發을 위한 基礎實驗 I <sup>1,2)</sup>

## EFE 活性和 抗酸化 効果 檢索方法

손기철·고재영

(전국대학교 농과대학 원예학과)

### A basic study for the development of chemicals for prolonging of vase life of cut flowers I

#### Screening methods of EFE activity and antioxidant effect

Son Ki-Cheol, Ko Jae-Young

Dept. of Hort., Coll. of Agri., Kon-Kuk Univ.

### Abstract

These experiments were conducted to develop rapid methods for the measurement of EFE activity and antioxidant effects and to screen chemicals which show inhibition of EFE activity and/or antioxidant effect using the methods. The results are summarized as follows:

- ① The screening methods of chemicals capable of inhibiting EFE activity and/or having antioxidant effects which were developed in this experiment were more rapid and accuracy than evaluation of chemical effects by the direct treatment to vasa solution.
- ② *Allium sativum* extracts, 8-HQS(8-hydroxy quinoline sulfate), n-propylgallate, BHA(butylated hydroxy anisole) and benzoic acid considerably inhibited EFE activity when apple flesh of preclimacteric phase as a reaction material was used.
- ③ 8-HQS, galangin, epicatechin, quercetin, rutin, n-propylgallate, BHT(butylated hydroxytoluene), STS(silver thiosulfate), *Rubus crataegifolius* extracts and benzoic acid showed fairly good antioxidant effect.
- ④ The treatments of 8-HQS, benzoic acid, n-propylgallate were effective in both inhibition of EFE activity and antioxidant effect and the results of this experiment were strongly supported by their physiological phenomena.
- ⑤ Because *Allium sativum* and *Rubus crataegifolius* as natural extracts showed possible capabilities in both inhibition of EFE activity and antioxidant effect, they need to analyse and characterize further.

### I. 서 론

절화는 수확 후 소비자에 이르는 동안 여러가지 스트레스에 의해 수명이 감소되어진다.<sup>24)</sup> 따라서, 일반적으로

봉우리 상태에서 채화되어진 절화의 개화를 촉진시키고, 아울러 선도 및 수명을 연장하기 위해서 여러가지 전처리제 및 보존용액을 적용하는 방법이 시도되어져 왔다.<sup>12)</sup> 현재 우리나라에서 이용되고 있는 절화 수명연장제는 그 종류가 여러가지 있으나 전부가 수입품이다. 따라서 우리

<sup>1)</sup> 본 연구결과와 요약은 1992년도 Hort Abs. 10(2):232-233에 발표되었음.

<sup>2)</sup> 본 연구는 한국원예학회에 제출되어 인쇄중임.(1994, in press)



나라 절화의 특성에 맞는 절화 수명연장제의 국산 수명연장제개발이 필요하며, 또한 현재 이용되는 절화 수명연장제의 주성분인 STS는 중금속으로서 환경 오염 문제를 고려할 때 대체 물질의 개발이 시급한 실정이다.<sup>31)</sup>

절화 선도유지제의 일반적인 구성 성분은 절화의 에너지원을 공급하는 물질<sup>15)</sup>과 미생물을 억제하는 물질,<sup>28)</sup> 식물의 노화를 촉진하는 에칠렌의 발생을 억제하는 물질,<sup>6)</sup> 그리고 수분장해와 pH를 조절하는 물질 등으로 구성되어 있다.<sup>13)</sup> 최근 에칠렌 이의 식물 노화에 큰 영향을 미치는 것으로 생각되는 free radical을 소거하는 물질<sup>16)</sup>도 연구되어지고 있다. 이 중 에너지원으로 sucrose를 사용하고 있으며, 미생물 발생 억제를 위해 aluminum sulfate<sup>1,19)</sup>와 8-HQS<sup>18,25)</sup> 등이 사용되고 있다. 에칠렌의 발생을 억제하는 방법으로는 에칠렌의 생합성 과정을 억제하는 AOA, AVG 등이 사용되고 있으며, 작용을 억제하는 물질로는 STS(silver thiosulfate)가 사용되고 있다<sup>17,32)</sup>. 한편, free radical은 식물 세포막의 파괴와 단백질 및 DNA까지도 파괴할 수 있어 노화에 밀접한 관련이 있는 것으로 밝혀지고 있으며, ACC에서 에칠렌을 발생시키는 과정에도 참여하는 것으로 밝혀지고 있다.<sup>16)</sup> free radical의 소거를 위해 항산화제로서 benzoic acid 등이 선도유지제에 첨가되어지고 있다.<sup>2)</sup>

현재 절화선도유지제를 개발하는 방법은 대부분이 직접 절화에 물질을 처리하여 절화에 미치는 영향을 알아보는 방법을 사용하고 있는데, 이는 시간과 노력이 비교적 많이 소요되며 많은 종류의 물질을 한번에 검색하는 면에서는 부적합한 방법이라 생각된다. 또한 이러한 방법으로는 노화에 결정적 영향을 미치는 세부 단계를 명확히 검색할 수도 없다.

또한 처리시기에 있어서도 기존 절화선도유지제 및 이에 대한 연구는 일반적으로 전처리제(소비자측에서 처리되어지는 선도유지제)에 치중되어져 왔다. 그러나 이러한 처리는 생산자의 경영적인 측면에서는 실질적인 가치가 없는 것이다. 따라서 앞으로는 수확직후에 처리하여 그 효과가 운송, 그리고 소비자에 이르기까지 미치는 전처리제 연구가 시급하다고 사료된다.

본 실험은 1) 절화에 직접 수명연장제를 처리하여 식물의 효과를 검색하는 기존의 방법 대신에 절화에 직접 처리하지 않고 신속, 정확하게 EFE 활성과 free radical

소거능을 검색하는 방법을 개발하고, 2) 이 방법을 통한 물질 검색을 실시하였으며, 3) 절화 선도유지제 개발을 위한 기초실험의 일환으로 실시되어졌다.

## II. 재료 및 방법

### 1. EFE activity 측정방법

Apelbaum 등(1981)과 채(1991)의 방법을 다소 변형하여 시행하였다.<sup>3,10)</sup> Preclimacteric 상태의 사과 과육을 직경 10mm의 cork borer를 이용하여 과육 중앙 부위에서 4~6개의 disc를 취하고, 약 1mm의 두께로 잘라 1g으로 정량하였다. 처리용액(2mM ACC 2.5ml + 증류수 1.5ml)에 처리용액을 1ml를 넣어서 최종 ACC 농도를 1mM로 만든 다음, 지름 5cm, 두께 0.8cm의 plastic petri dish에 넣었다. 이 때 대조구는 처리용액 대신에 동량의 증류수를 사용하였으며, ACC 대조구는 처리용액을 넣지않고 1mM의 ACC 농도로 하였다. 이후 사과 과육을 넣은 후 ACC를 충분히 흡수시키기 위해 30분간 암상태에서 예비배양시켰으며, 배양이 끝난직후 과육에 묻어있는 처리용액을 여과지에 흡수시켜 제거하였다. 이 후 사과 과육을 13ml test tube에 넣고 고무마개로 완전히 밀봉하여 90분간 shaker에서 40rpm으로 배양하였다. 배양 후 1ml의 실린지로 gas sample를 채취하여 gas chromatography(Simadzu 14A, FID, 2m alumina column, 60°C oven temp. 100°C Inj. temp., 120°C det. temp., 30ml/min. flow rate, N<sub>2</sub> carrier gas)를 이용하여 에칠렌을 정량하였고, 이 후 다시 생체중과 시간 경과에 따른 에칠렌 발생량으로서 EFE activity를 계산하였다. 본 실험에서 사용된 재료는 8-hydroxyquinoline sulfate(8-HQS), (-)-epigallocatechin gallate(EGCG), galangin, (-)-epicatechin, quercetin, rutin, n-propylgallate, butylated hydroxyanisole(BHA), butylated hydroxytoluene(BHT), benzoic acid, *Platycodib grandiflorum*(도라지), *Sophora flavescens*(고삼), *Astragalus membranaceus*(황기), *Dystaenia takesimana*(섬바디), *Arctium lappa*(우엉), *Lilium enchantment*(백합), *Sedum sarmentosum*(돌나물), *Coix*

*lachryma-jobi*(울무), *Ixeris dentata*(씀바귀), *Angelica gigas*(당귀)이다.

### 3. 항산화력 측정방법

다수의 천연물 항산화력을 신속, 정확하게 측정하기 위해서 면역학에서 사용되는 화학발광(chemiluminescence)을 변형 이용한 검색방법은 Apelbaum의 방법<sup>3)</sup>을 변형하여 사용되어졌다. 화학 반응시 나오는 에너지가 빛의 형태로 방출되는 화학발광은, luminol과 같은 cyclic diacylhydrazide는 horse radish peroxidase(HRP)의 기질로서 hydroxy peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)의 존재하에 급격히 산화되어진다. 이 때 luminol은 3-aminophthalate로 변하면서 빛을 방출하고 다시 기저상태(ground state)로 전환되어진다. 본 실험은 기질과 enhancer 등을 조합한 kit를 사용하였으며, 발광율은 428nm에서 검출되어졌다. 발광은 1~5분 후 peaks에 도달하고 1시간동안 천천히 파괴되었다. 측정은 Amelite Luminescence Analyser(Amersham, USA)을 사용하였다.

측정방법은 먼저 시료를 준비한 후 96개의 hole이 있는 well plate에 시료 10 $\mu$ l, HRP를 1:1000으로 희석하여 10 $\mu$ l, 그리고 luminol, hydroxy peroxide와 반응을 조절하기 위해 첨가하는 enhancer가 들어있는 용액 100 $\mu$ l을 혼합한 후에 Amelite 분석기를 이용하여 측정하였다. 각 물질의 항산화력을 나타내는 발광치는 대조구와 상대적으로 비교하여 항산화력 효과를 측정하였다. 본 실험에 사용된 재료는 benzoic acid, BHA, BHT, epicatechin, galangin, 8-HQS, n-propylgallate, quercetin, rutin, silver thiosulfate(STS), *Allium sativum*(마늘), *Angelica gigas*(당귀), *Arctium lappa*(우엉), *Platycodon grandiflorum*(도라지), *Rubus crataegifolius*(산딸기)이다.

## III. 결과 및 고찰

### ① EFE activity 억제효과

여러가지 화합물과 식물추출액에 의한 EFE 활성 억제 효과를 비교한 결과는 (그림 1, 2)와 같다. (그림 1)에

서 무처리(1)에 1mM의 ACC만을 넣은 ACC 대조구는 약 20 $\mu$ l/g·FW/hour의 에틸렌 발생량을 나타내었으나, 마늘 추출액, 8-HQS 1000ppm, n-propylgallate 100ppm과 BHA(butylated hydroxyanisole) 100ppm 등은 약 2~3 $\mu$ l/g·FW/hour의 에틸렌 발생량을 나타내어 EFE 활성 억제 효과가 크게 나타났다. 또한 flavonoids 계통으로 항산화 효과가 있는 것으로 보고된<sup>20)</sup> galangin 100ppm 처리도 약 8 $\mu$ l/g·FW/hour 정도의 에틸렌 발생량을 나타내어 다소 EFE 활성 억제 효과가 있는 것으로 나타났다.

(그림 2)에서 2mM의 ACC가 처리된 ACC 대조구는 약 17 $\mu$ l/g·FW/hour의 에틸렌 발생량을 나타낸 것에 비하여 benzoic acid 500ppm 처리구는 1 $\mu$ l/g·FW/hour 이하의 에틸렌이 발생되어 아주 높은 EFE 활성 효과가 있는 것으로 나타났다. 당귀 추출액은 약 10 $\mu$ l/g·FW/hour의 적은 에틸렌만을 발생시켜 식물 추출액으로서는 마늘과 더불어 가장 억제 효과가 뛰어났다. 그 외 도라지와 우엉 추출액은 약 60~70 $\mu$ l/g·FW/hour의 에틸렌 발생으로 ACC 대조구에 비해 약 1/3의 EFE 활성 억제 효과를 나타내었다.

한편, 선별된 4가지 물질의 농도별 EFE 활성 억제 효과를 알아본 실험에서 8-HQS, 마늘 추출액, benzoic acid 등은 고농도에서 대조구에 비해 약 1/10 정도의 EFE 활성 억제 효과를 나타내었으나, 농도가 파괴될수록 EFE 활성 효과가 감소하는 것으로 나타났다. 또한 에틸렌의 작용 억제제로서 절화 수명연장제에 많이 첨가되어지는 STS는 예상한 것과 같이 EFE 활성억제에는 전혀 영향을 미치지 못했으며, 희석된 농도는 EFE의 활성을 오히려 촉진시키는 것으로 보여진다(그림 3).

### ② 항산화력 효과

(그림 4)에서 보는 바와같이 라디칼 소거능이 있다고 판단되어져 선별된 대부분의 물질이 항산화 효과를 나타내었다. 특히 BHT, BHA, n-propylgallate 등은 일반적으로 항산화제로 식품등에 첨가되어지는 것으로, 본 실험의 결과를 볼 때 사용된 측정방법이 상당히 효과적이며 신속한 방법인 것을 알 수 있다. 또한 위의 물질을 기준으로 다른 추출물들을 비교해 볼 때 quercetin, 8-HQS, galangin, rutin 등도 비교적 높은 항산화력을 갖고 있는 것으로 나타났다.

또한 (그림 5)에서 보는 바와같이 여러가지 화합물과 식물 추출액의 농도에 따른 항산화력을 측정한 결과 8-HQS 1000ppm, STS 4mM, 산딸기 뿌리 추출액 5g/50ml 80% ethanol과 benzoic acid 500ppm 처리구에서 10% 이하의 높은 항산화력 효과를 나타내었으며, 8-HQS와 benzoic acid 처리구는 저농도에서도 비교적 높은 항산화력 효과가 인정되었으나, 산딸기는 2배 희석액까지는 비교적 높은 항산화 효과가 있었으나, 4배 희석액에서는 급격히 항산화력이 떨어지는 것으로 나타났다.

절화의 수명을 연장하고 품질을 증진시키기 위해 보존용액의 사용은 오래전부터 알려져 왔으며,<sup>13)</sup> 현재 우리나라에서도 보존액에 대한 관심이 점차 증가되어 가고 있는 추세이다. 따라서 절화에 직접 처리하여 물질을 검색하는 기존의 방법 대신에 절화에 직접 처리하지 않고 검색할 수 있는 신속하고 정확한 EFE 활성과 free radical 소거능을 검색하는 방법 개발과 이를 이용하여 적절한 절화수명연장제를 구명하는 것은 매우 중요한 바, 본 실험에서 적용된 방법은 다종의 물질을 신속, 정확하게 EFE 활성 및 항산화력(antioxidant effect)을 측정할 수 있는 것으로 판명되었으며, 그 정확성이 매우 뛰어난 것으로 사료된다. EFE 활성을 억제하는 물질로서는 8-HQS, n-propylgallate, BHA, benzoic acid, 마늘 추출액에서 효과가 인정되었고, 항산화 효과로는 8-HQS, n-propylgallate, BHT, benzoic acid, STS, galangin 등의 효과가 인정되었다. 8-HQS가 살균제<sup>25, 26)</sup>로서 효과뿐만 아니라, 카네이션에서는 에칠렌의 발생을 억제하고<sup>22, 30)</sup>, 장미에서는 절단된 부위에서의 에칠렌 발생을 억제하며<sup>27)</sup>, 그리고 항산화효과<sup>15)</sup>가 있다는 보고는 본 실험의 결과와 일치한다. Benzoic 산은 절화의 종류에 따라 효과가 다른 것으로 나타났으며,<sup>5, 29)</sup> 상품화된 Everbloom 용액에 포함되어져 있다.<sup>8)</sup> 대부분의 결과는 benzoate의 활성이 항산화제와 자유 라디칼 소거능,<sup>21)</sup> 에칠렌 발생의 억제,<sup>4)</sup> 그리고 막의 안정화<sup>23)</sup>에 있다는 것은, EFE의 활성억제와 항산화제의 특성을 동시에 지닌 것으로 밝혀진 실험결과와 일치한다. 한편, STS의 경우, 에칠렌 작용 억제제로 사용되어져<sup>7)</sup> 에칠렌 생합성에는 큰 영향을 나타내지 못하는 것으로 나타났으며, 고농도에서는 항산화력이 있어 에칠렌의 발생을 억제하나, 저농도에서는 EFE 활성 억제효과가 없으며, 오히려 에칠렌의 발생이 대조구보다 약간 높

음을 나타냈다. 합성 항산화제로서 식품에 많이 첨가되어지는 BHA와 BHT<sup>9, 14)</sup>는 사과 조직에서 둘다 강한 항산화력을 나타내었으나, EFE억제활성은 BHA가 나은 것으로 밝혀졌다. Apelbaum 등(1981)에 따르면<sup>3)</sup>, n-propylgallate(10mM)는 chemiluminescence에서는 효과가 없는 것으로 보고되었다. 그러나 본 실험의 경우 n-propylgallate 100ppm(ca. 0.47mM)을 사과조직에 처리한 결과 상당한 EFE 활성억제능력이 있는 것으로 나타났다.

Flavonoid에 속하는 EGCG, galangin, rutin, quercetin, epicatechin은 EGCG와 epicatechin을 제외하고는 항산화력이 있는 것으로 나타났으나, 이중 galangin만이 EFE활성 억제효과가 있었다. 한편, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)를 이용한 라디칼 소거활성에서는 매우 뛰어난 것으로 알려진 EGCG가<sup>20)</sup> 본 실험에서는 그다지 좋은 효과를 보이지 않았으며, EFE활성 억제능도 크지 않는 것으로 나타났다.

천연물 중 마늘은 팜유(Palm oil)를 첨가하여 Rancimat방법으로 측정된 실험에서도 상당한 항산화력을 보여,<sup>11)</sup> 실험의 정확성을 뒷받침하고 있다. 한편, 추출물 중 마늘, 산딸기와 같은 천연 추출액이 EFE 활성 억제 효과 뿐 아니라 항산화효과가 있다는 것은 매우 흥미로운 사실로서, 앞으로 분리, 동정 과정을 통하여 정확한 효과 물질을 구명하는 것이 필요하다고 사료되어진다.

그러나 언급된 이러한 물질들이 체내에서 다른 이차적인 작용을 할 수 있는 가능성이 있으며, 또한 식물재료에 따라 그 효과가 다름<sup>13)</sup>을 고려할 때 실질적으로 절화에 직접 적용하는 것에는 다소 차이가 있을 수도 있다고 생각된다. 금후의 실험은 본 실험에서 개발된 신속, 정확한 EFE 활성 측정 및 항산화력 측정방법을 이용하여 다수의 천연물질을 계속적으로 검색함과 동시에 절화수명연장을 위한 직접 실험에 적용되어질 것이다.

본 실험에 사용되어진 galangin, EGCG 그리고 epicatechin을 제공한 태평양화학 연구소의 박수남 박사와 항산화력 측정에 도움을 준 건국대학교 축산공학과 김종배 교수와 홍은경 선생님, 그리고 기기 사용에 협조해 주신 건국대학교 부속 민중병원 검사실에 감사드립니다.

적 요

절화의 수명연장제 개발을 위한 기초실험으로 EFE 활성과 항산화력 효과를 검정하는 방법을 개발하였으며, 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

① EFE 활성과 항산화력 효과 측정방법은 절화에 물질을 직접 처리하여 절화의 수명 및 품질을 규명하는 방법보다 신속하며 정확한 방법이라 사료된다.

② 사과 과육을 사용한 활성 억제 효과는 마늘 추출액, 8-HQS(8-hydroxy quinoline sulfate), n-propylgallate, BHA(butylated hydroxy anisole)와 benzoic acid 등이 비교적 높은 효과를 나타내었다.

③ 항산화력 효과는 8-HQS, galangin, epicatechin, quercetin, rutin, n-propylgallate, BHT, STS, 산딸기 추출액 그리고 benzoic acid 등의 처리에서 나타났다.

④ 8-HQS, benzoic acid, n-propylgallate 처리는 EFE 활성 억제와 항산화력 효과를 동시에 나타내었으며, 현재까지 알려진 활성물질의 생리적 작용과 본 실험결과가 일치한다.

⑤ 마늘과 산딸기의 천연추출물은 항산화효과와 EFE 활성억제 효과가 뛰어나므로 정확한 작용물질의 분리 및 동정이 필요하다.

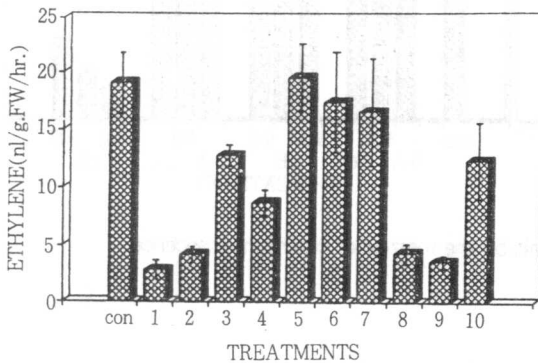


Fig. 1. Comparison of inhibitive effects of EFE activity by the various compounds and plant extracts.

1. *Allium sativum* extracts
2. 8-HQS 1000ppm
3. EGCG 100ppm
4. Galangin 100ppm
5. Epicatechin 100ppm
6. Quercetin 100ppm
7. Rutin 100ppm
8. n-propylgallate 100ppm
9. BHA 100ppm
10. BHT 100ppm

\* *Allium sativum* extract was extracted with methylene chloride.

After the ethanol was evaporated, a distilled water was added.

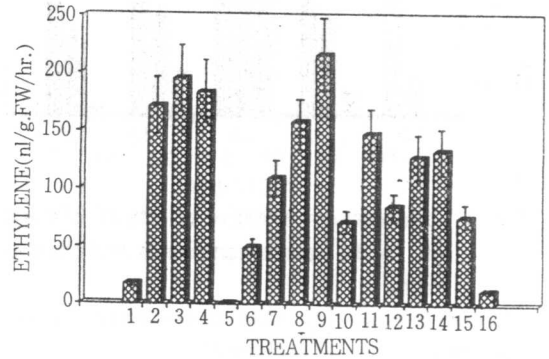


Fig. 2. Comparison of inhibitive effects of EFE activity by the various compounds and plant extracts.

1. Control(DH<sub>2</sub>O)
2. ACC control(2mM ACC 2.5ml+DW 2.5ml)
3. Alginic acid
4. Corrageenan
5. Benzoic acid
6. *Platycodon grandiflorum* extracts
7. *Sophora flavescens* extracts
8. *Astragalus membranaceus* extracts
9. *Dystaenia takes imana* extracts 5.16g/50ml
10. *Arctium lappa* extracts 4.9g/50ml
11. *Lilium enchantment* extracts 6.17g/50ml
12. *Sedum sarmentosum* extracts 5.75g/50ml
13. *Coix lachryma-jobi* extracts 3.8g/50ml
14. *Ixeris dentata* extracts 8.14g/50ml
15. 8-HQS 100ppm
16. *Angelica gigas* extracts 3.8g/50ml

\* 6-14, and 16 were extracted with 80% ethanol. After the ethanol was evaporated, a distilled water was added.

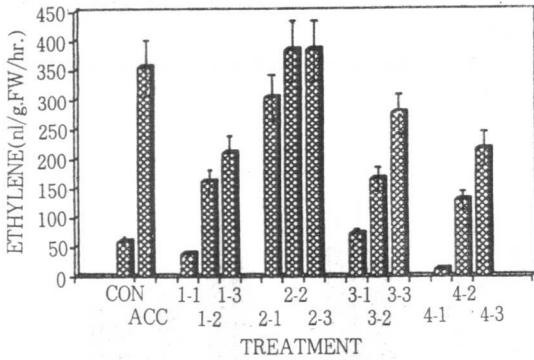


Fig. 3. Comparison of inhibitive effects of EFE activity by the various compounds and plant extracts.

- 1-1. 8-HQS 1000ppm
- 1-2. 500ppm
- 1-3. 250ppm
- 2-1. STS 4mM
- 2-2. 2mM
- 2-3. 1mM
- 3-1. *Allium sativum* extracts 10 dilution
- 3-2. 20 dilution
- 3-3. 40 dilution
- 4-1. Benzoic acid 500ppm
- 4-2. 250ppm
- 4-3. 100ppm

\* Diluted solution of *Allium sativum* extracts used in fig. 1.

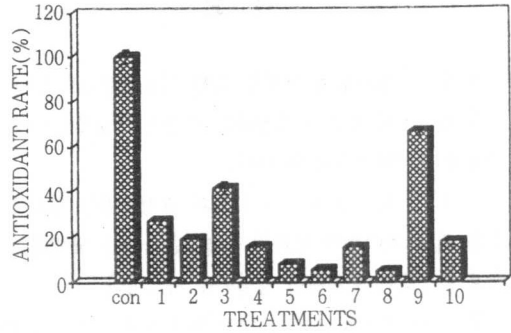


Fig. 4. Comparison of antioxidant effects of various materials by the method of chemiluminescence.

- 1. *Allium sativum* extracts
- 2. 8-HQS 1000ppm
- 3. EGCG 1000ppm
- 4. galangin 1000ppm
- 5. BHA 1000ppm
- 6. BHT 1000ppm
- 7. Rutin 1000ppm
- 8. Quercetin 1000ppm
- 9. Epicatechin 1000ppm
- 10. n-propylgallate 1000ppm

\* *Allium sativum* tissues were extracted with methylene chloride. After the ethanol was evaporated, a distilled water added.

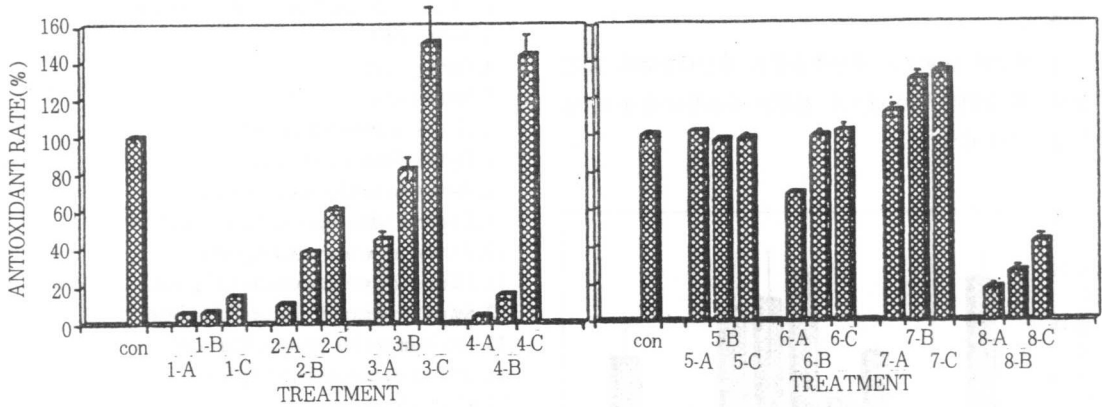


Fig. 5. Comparison of antioxidant effects of various materials by the method of chemiluminescence.

- 1-A. 8-HQS 1000ppm
- 2-A. STS 4mM
- 3-A. *Allium sativum* extracts 10 dilution
- 4-A. *Rubus crataegifolius* extracts 5g/50ml 80% ethanol
- 5-A. *Platycodon grandiflorum* extracts 5g/50ml 80% ethanol
- 6-A. *Angelica gigas* extracts 7.12g/50ml 80% ethanol
- 7-A. *Arctium lappa* extracts 4.9g/50ml 80% ethanol
- 8-A. Benzoic acid 500ppm

B is double dilution of A and C is double dilution of B

\* 3-A, Diluted solution of *Allium sativum* extracts used in fig. 1.

4,5,6,7 were extracted with 80% ethanol.

After the ethanol was evaporated, a distilled water was added.

## 인용 문헌

- 1) Aarts, J.E.T.H. 1957. Over de houdbaarheid van snijbloemen. Meded van de Landbouwhogeschool te Wageningen. 57:1-62.
- 2) Akamine, E.K., and T. Goo. 1975. Vase life extension of anthurium flowers with commercial floral preservatives, chemical compounds and other materials. Flor. rev. 155:14-15.
- 3) Apelbaum, A., A.C. Burgoon, J.D. Anderson, T. Solomos, and M. Lieberman. 1981. Some characteristics of the system converting 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. Plant Physiol. 67:80-84.
- 4) Apelbaum, A., S.Y. Wang, A.C. Burgoon, J.E. Baker, and M. Lieberman. 1981. Inhibition of the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by structural analogs, inhibitors of electron transfer, uncouplers of oxidative phosphorylation, and free radical scavengers. Plant Physiol. 67:74-79.
- 5) Baker, J.E., C.Y. Wang, M. Lieberman, and R. Hardenburg. 1977. Delay of senescence in carnations by a rhizobitoxine analog and sodium benzoate. HorScience. 12:38-39.
- 6) Barden, L.E. and J.J. Hanan. 1972. Effect of ethylene on carnation keeping life. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 97:785-788.
- 7) Beyer, E.M. 1979. Effect of silver ion, carbon dioxide, and oxygen on ethylene action and metabolism. Plant Physiol. 63:169-173.
- 8) Biggs, P.R. 1961. Composition and method for preserving cut flowers. U.S. Patent No. 3, 122, 432.
- 9) Branen, A.L. 1975. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxy anisole and butylated hydroxytoluene. JAOCS. 52, 59.
- 10) 蔡榮. 1991. 무궁화의 火器老化中 ethylene과 polyamines의 相互作用. 建國大學校 大學院, 碩士學位論文.
- 11) Choi, U., D.H. Shin, Y.S. Chang and J.I. Shin. 1992. Screening of natural antioxidant from plant and their antioxidative effect. Korean J. Food Sci. Technol. 24:142-148.
- 12) Halevy, A.H. Kofranek. 1977. Silver treatment of carnation flowers for reducing ethylene damage and extending longevity. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 102:76-77.
- 13) Halevy, A.H. and S. Mayak. 1981. Senescence and postharvest physiology of cut flowers, Part 2. Hort. Rev. 3:59-143.
- 14) Haumann, B.F. 1990. Firms seeking products they can label as 'natural'. Inform, 1, 1002.
- 15) Larsen, F.E. and M. Frolich. 1969. The influence of 8-hydroxyquinoline citrate, N-dimethylamino succinamic acid, and sucrose on respiration and water flow in 'Red Sim' carnations in relation to flower senescence. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 94: 289-291.
- 16) Leshem Y.Y., A.H. Halevy, and C. Frenkel. 1986. Processes and control of plant senescence. Elsevier, Amsterdam. pp 100-116.
- 17) Lieberman, M. 1979. Biosynthesis and action of ethylene. Annu. Rev. Plant Physiol. 30:533-541.
- 18) Marousky, F.J. 1972. Water relations, effects of floral preservatives on bud opening and keeping quality of cut flowers. HorScience. 7:114-116.
- 19) Mayak, S., B. Bravdo, A. Gvilli, and A.H. Halevy. 1973. Improvement of opening of cut gladioli flowers by pretreatment with high sugar concentrations. Scientia Hort. 1:357-365.
- 20) 朴秀男. 1991. 활성산소가 관여하는 생체반응에 미치는 플라보노이드 및 페놀성 화합물의 영향. 서울대학교 대학원, 박사학위 논문
- 21) Parups, E.V. 1984. Free radical and free radical scavenger effects on indole-3-acetic acid levels and ethylene production. Physiol. Plant. 60:149-

153.

- 22) Parups, E.V. and E.A. Peterson. 1973. Inhibition of ethylene production in plant tissues by 8-hydroxyquinoline. *Can. J. Plant Sci.* 53:351-353.
- 23) Paulin, A., M.J. Droillard and J.M. Bureau. 1986. Effect of a free radical scavenger, 3,4,5-trichlorophenol, on ethylene production and on changes in lipids and membrane integrity during senescence of petals of cut carnations(*Dianthus caryophyllus*). *Physiol. Plant.* 67:465-471.
- 24) Paulin, A., F. Kerhardy, and B. Maestri. 1985. Effect of drought and prolonged refrigeration on senescence in cut carnation(*Dianthus caryophyllus*). *Physiol. Plant.* 64:535-540.
- 25) Rogers, M.N. 1973. A historical and critical review of post-harvest physiology research on cut flowers. *HortScience.* 8:189-194.
- 26) Van Doorn, W.G., R.R.J. Perik. 1990. Hydroxyquinoline citrate and low pH prevent vascular blockage in stems of cut rose flowers by reducing the number of bacteria. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115:979-981.
- 27) Van Doorn, W.G., K. Schurer, and Y. de Witte. 1989. Role of endogenous bacteria in vascular blockage of cut rose flowers. *J. Plant Physiol.* 134:375-381.
- 28) Van Doorn, W.G., Y. de Witte, and B.C.H. Waltmann. 1986. Effect of exogenous bacterial concentrations on water relations of cut rose flowers. I. Bacteria in the basin water. *Acta Hort.* 181:459-462.
- 29) Wang, C.Y. and J.E. Baker. 1979. Vase life of cut flowers with rhizobitoxine analogs, sodium benzoate and isopentenyl adenosine. *HortScience.* 14:59-60.
- 30) Wilberg, B. 1973. Physiologische Untersuchungen zum Knicker-Problem als Voraussetzung für die Selektion haltbarer Gerbera-Schnittblumen. *Z. Pflanzenzuchtung* 69:107-114.
- 31) Woltering, E.J., H. Harkema, M.A. Maclaine Pont, and P.C.H. Hollman. 1987. Aminoxyacetic acid: analysis and toxicology. *Acta Horticulturae.* 216:273-280.
- 32) Yang, S.F. 1980. Regulation of ethylene biosynthesis. *HortScience.* 15:238-243.

# 절화수명연장물질 개발을 위한 기초실험 II<sup>1,2)</sup>

EFE 혹은 그외 에틸렌 생합성 효소 활성 억제효과의 동시 검색방법 개발 및 적용

손기철·이인국·고재영

(전국대학교 농과대학 원예학과)

The basic study for the development of chemicals for prolonging of vase life of cut flowers II

Rapid method for screening the inhibitive effect of EFE or other ethylene biosynthetic enzymes' activity and their application

Son Ki-Cheol, Lee In-Kuk, Ko Jae-Young

Dept. of Hort., Kon-Kuk Univ.

## Abstract

These experiments were conducted to develop rapid method for screening chemical which is responsible for the inhibitory effects of EFE activity or other ethylene biosynthetic enzymes' activities, and to investigate the effects of preservative solution containing the chemicals for prolonging of vase life of cut flowers. This method was based upon relative comparison between control and control plus chemical, and between ACC control and ACC control plus chemical.

Addition of AOA and AVG known as ACC synthase inhibitor severely reduced ethylene production as compared to that of DW control but not as compared to that of ACC control. This fact clearly indicated that AOA and AVG react as ACC synthase inhibitors and therefore the method is very efficient and useful in chemical screening. Aspirin and 2,4-DNP, and polar fraction of *Allium sativum* were very effective in inhibition of EFE activity. On the other hand, procain and angelica were a little bit effective in inhibition of ethylene biosynthetic enzymes except EFE. Although DCPTA, DNP, and Ge were not involved in inhibition of ethylene biosynthetic enzymes except EFE. Although DCPA, DNP, and Ge were not involved in inhibition of ethylene biosynthetic enzymes, they delayed the senescence by maintaining water uptake continuously. Specially, DNP did not increase the longevity of cut carnation despite that it had inhibitory effect of EFE activity and maintained water uptake.

## I. 서 론

에틸렌은 식물노화를 촉발시키는 호르몬으로서, 노화시 내생적으로 발생된 에틸렌에 의한 전형적인 증상과 외생

적인 에틸렌에 대한 반응은 발육단계에 따라 매우 다양하며,<sup>13)</sup> 같은 종내에서도 그 반응이 다르다.<sup>3,25)</sup> 한편, 노화 중인 climacteric 꽃잎에서의 에틸렌 생성은 자가촉매적이며, 이러한 에틸렌의 발생은 ACC synthase와 EFE (ethylene forming enzyme) 활성이 증가된 결과이다.<sup>6)</sup>

<sup>1)</sup> 본 연구결과의 요약은 1993년도 Hort. Abs. 11(1):294-295에 발표되었음.

<sup>2)</sup> 본 연구는 한국원예학회에 제출되어 인쇄중임(1994, in press)



또한 최근에 에칠렌의 자가촉매적 발생도 유전자의 발현에 의한 de novo 합성에 의해서 일어난다는 것이 밝혀졌다.<sup>28, 29)</sup>

에칠렌의 생합성 경로는 Adams와 Yang<sup>2)</sup>에 의해서 methionine→S-adenosyl methionine(SAM)→1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid(ACC)→ethylene 순으로 발생되어지는 것이 밝혀졌으며, 많은 조직에 있어서 속도제한 단계는 SAM으로부터 ACC로 전환되어지는 ACC synthase에 의한 것으로 알려졌다.<sup>31)</sup> 카네이션 꽃 잎 노화시 에칠렌의 증가는 ACC 농도와 ACC synthase 활성 증가와 동반되어진다.<sup>23)</sup> 한편 EFE의 활성은 preclimacteric 상태에서는 최소이나 climacteric 상태로 진행됨에 따라 증가하는 것으로 나타났다.<sup>20, 21)</sup> 이러한 사실은 에칠렌 발생에 관련된 모든 효소가 preclimacteric 시기에는 활성이 최소이나, 조직이 climacteric 시기로 이행됨에 따라 활성이 급격히 증가함을 보여주는 것이다. 그러나 이러한 결과는 현재로서는 climacteric 화기에 속하는 카네이션에 적용되어지며, *Hibiscus*,<sup>30)</sup> *Ipomoea*<sup>17)</sup>와 같은 단명화에서는 preclimacteric 상태에서도 과실의 조직과 마찬가지로 EFE의 활성이 높은 것으로 알려져 있다.

에칠렌의 생합성 과정이 밝혀진 후에는 에칠렌의 합성을 억제하기 위한 여러가지 수단들이 제안되어졌으며, 그 중에서도 율속효소인 ACC synthase와 EFE를 억제하기 위한 억제제가 개발되어 폭넓게 사용되어지고 있다.<sup>13)</sup> ACC의 생합성을 저해하는 것으로는 aminooxyacetic acid(AOA)나 aminoethoxy vinyl glycine(AVG)과 같은 pyridoxal phosphate 효소 저해제가 많이 사용되어지고 있으며,<sup>5)</sup> 절화 카네이션에 처리시, 에칠렌의 생성과 호흡율의 증가를 억제하고, 용기내 절화수명을 연장시키는 것으로 보고되었다.<sup>12)</sup>

EFE의 활성에 대한 대부분의 연구는 *in vivo* 실험을 통하여 발달하였는데, 실험에서는 전구체인 ACC가 생체 조직에 주입되어진 후 에칠렌 생성량이 측정되어졌다. 이러한 연구결과로 EFE는  $ACC + 1/2O_2 \rightarrow C_2H_4 + HCN + CO_2 + H_2O$ 의 반응을 촉매하며,<sup>24)</sup> 또한 생체내 EFE 활성은 1~28°C 범위에서는 지속적으로 온도에 의존되어지며,<sup>7)</sup> O<sub>2</sub>의 존재를 필요로 한다는 것이 밝혀졌다.<sup>17)</sup> EFE는 지금까지 세포막과 관련되어진 효소로 생각되어져 왔

으며,<sup>1)</sup> *in vitro* 상에서 분석하기 위한 수많은 연구가 시도되었지만, 아직도 생체 환경하에서와 생체밖에서의 EFE활성은 서로 일치되지 않는 점들이 많아 아직도 풀리지 않는 문제로 남아 있다. 그러나 근래의 연구에 따르면 EFE는 대부분이 세포질에 존재하며, 적은 부분만이 막과 관련되어져 있으며, Fe<sup>+2</sup>와 ascorbate를 필요로 하므로 일종의 가수분해 효소(hydroxylase)로 주장되어진다.<sup>11, 26)</sup> EFE의 활성 억제제로서는 막의 안정화를 유지하는 물질과 자유 라디칼 소거능을 가진 항산화제가 많이 사용되어지고 있다.<sup>5, 9, 22)</sup>

절화 수명연장을 위한 대부분의 물질 실험은 대체로 절화가 담긴 보존용액에 직접 처리함으로써 그 효과를 검증하는데, 많은 종류의 물질로부터 노화억제에 효과적인 물질을 검색하는데는 상당히 비효율적인 방법이다. 최근 ACC에서 ethylene으로의 전환효소인 EFE의 활성 억제제와 여기에 관여하는 free radical을 소거시키는 항산화제의 탐색방법을 보고한 바,<sup>16)</sup> 본 실험에서는 미지의 물질을 투여하였을 경우 EFE활성 억제효과 뿐만 아니라 동시에 ACC synthase를 포함한 에칠렌 생합성에 직간적으로 관련된 효소들의 활성억제능(정량 분석 방법이 아닌 상대 비교로)을 손쉽게 측정하는 방법을 개발하여, 천연추출물을 포함한 다량의 물질로부터 에칠렌의 합성을 억제하는 물질을 신속하게 검증하여 절화의 수명연장제 개발에 적용하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1) EFE 혹은 그외 에칠렌 생합성 효소 활성 억제효과의 측정

EFE 혹은 그외 에칠렌 생합성 효소 활성 억제효과의 측정은 EFE 측정을 기본으로 하여 실시되어졌으며, EFE의 측정방법은 Apelbaum등<sup>4)</sup>의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. Postclimacteric 상태의 사과 과육을 약 1mm 두께, 지름 9.2mm의 disc로 1g(절편 5~6개)을 취하여 완충용액(600mM의 sorbitol과 10mM의 Mes buffer pH 6.0 3ml)이 들어 있는 petri-dish에 넣어 30분간 암배양한 후 test tube에 사과 절편을 넣고 밀봉하여, 40rpm으로 진탕배양하며 90분, 360분에 각각

1mM의 실린지로 gas sample을 채취하여 Gas Chromatograph(Simadzu 14A, FID, 2m alumina column, 60°C oven temp., 100°C Inj. temp., 30ml/min. flow rate, N<sub>2</sub> carrier gas)를 이용하여 에칠렌을 측정하였다. 이상이 DW 대조구(완충용액만 처리)이고, 완충용액에 ACC 0.1mM를 첨가한 것을 ACC 대조구(기질로서 ACC 처리)로 하였다. 이 두 대조구에 검색하고자 하는 물질을 첨가후 생체중과 시간경과에 따른 에칠렌 발생량을 EFE activity로 계산하여 대조구의 백분율로 환산하여 상대 비교하였다.

에칠렌 생합성과정 중 ACC synthase의 보조인자인 PLP(pyridoxal 5-phosphate)의 작용을 억제하는 것으로 알려진 NaBH<sub>4</sub> (1mM),<sup>26)</sup> methionine에서 ACC 그리고 에칠렌으로 전환과 SAM의 합성을 억제하는 것으로 알려진 2,4-dinitrophenol(2,4-DNP; 0.1mM),<sup>32)</sup> 생장 활성물질이며 carotenoid의 생합성을 촉진하는 tertiary amine 계통의 2-(3,4-dichlorophenoxy)triethylamine (DCPTA; 1ppm),<sup>14)</sup> 산소촉매제로 알려진 유기게르마늄(Germanium; 5ppm), calmodulin의 길항자로 국소마취제로 사용되어지는 procain<sup>10)</sup> 등의 효과가 조사되어졌다. 천연추출물의 검정을 위해서는 고와 손<sup>16)</sup>에 의해서 에칠렌의 생합성을 억제하는 것이라고 추정된 산딸기 뿌리(*Rubus crataegifolius* Bunge), 영지버섯(*Ganoderma lucidum* Karst), 당귀(*Angelica gigas* Nakai), 마늘(*Allium sativum* Linne)을 선택하였으며, 막자사발과 믹서로 분쇄하여 methylchloride로 용출시켜 Evaporator로 methylchloride를 증발시킨 다음 동량의 증류수를 첨가하였다. 증류수에 hexane을 첨가하여 polar층과 non-polar층으로 분획하여 천연추출물 원액을 만들었다.

2) 적용실험

공시재료로 강남 꽃상가에서 구입한 카네이션 적색계 'Desio' 품종을 사용하였다. 카네이션은 봉우리상태(개화 단계 1)의 규격이 동일한 것을 화경 30cm에서 수중 절단하여 자른 후 용기내 3송이씩 넣어 완전 임의배치법으로 3반복하였다.

처리용액으로는 에너지 급원으로 sucrose(3%)와 살균제로 8-HQS(200ppm)를 기본용액으로 하였으며, NaBH<sub>4</sub>(1mM), 2,4-DNP(0.1mM), DCPTA(1ppm), 유기게르마늄(Germanium; 5ppm)을 첨가하여 사용하

였다.

전 실험은 온도 22~24°C, 습도 50%, 광도는 30μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>로 형광등과 백열등을 혼합한 12시간씩 광주기를 준 환경제어실에서 행하여 졌으며, 측정은 매일 18시에 생체중, 화경, 보존용액 흡수량 및 개화단계를 측정하였다. 화경은 최대의 지름과 최소의 지름을 산술평균하여 나타내었으며, 생체중, 화경은 초기치의 백분율로 환산하였다. 화기의 개화 단계를 1단계:봉우리 상태, 2단계:꽃잎의 형태가 줄기와 45° 벌어진 상태, 3단계:꽃잎의 형태가 줄기와 90° 벌어진 상태, 4단계:꽃잎의 형태가 줄기와 120° 벌어진 상태, 5단계:꽃잎의 형태가 줄기와 다시 90°로 전환되는 상태, 팽압소실 시작하는 단계, 6단계:완전 팽압소실과 위조(건조) 상태로 나타내었다.

III. 결과 및 고찰

본 실험은 사과 절편을 이용한 EFE의 활성측정을 기본으로 하는 것으로, 완충용액을 넣은 DW 처리구에서 발생된 에칠렌은 사과 자체의 EFE, ACC synthase 그리고 SAM synthetase를 포함한 에칠렌 생합성 효소들의 활성에 의해서 생합성된 것이다. 한편, 기질원으로, ACC를 첨가시키면 ACC synthase를 포함한 다른 에칠렌 생합성 효소의 작용보다는 대부분이 EFE 단독작용에 의해서 ethylene이 발생되어질 것이다(그림 1). 이 경우, 어떤 물질을 첨가하였을 시, DW 하에서 에칠렌 생성을 강하게 억제하나 ACC 처리하에서는 거의 억제작용을 하지 못한다면 이 물질은 ACC synthase를 포함한 다른 에칠렌 생합성 효소들의 억제에 관계하는 물질일 것이다. 그러나 DW와 ACC 처리구 모두를 억제시킨다면 이 물질은 EFE 활성억제에 관여하는 물질일 것이다. 한편, 그림 2에서 보듯이 90분 배양 후에는 DW 대조구와 ACC 대조구의 에칠렌 생성이 일정한 것으로 나타났으며, ACC 대조구의 에칠렌 발생량은 Apelbaum 등<sup>4)</sup>의 2.6nmol/g·h에 비해 약 두배 정도인 3.3~4.5nmol/g·h을 보였다. 이는 사과의 숙성정도에 기인된 것으로 보인다. 한편, ACC 대조구는 DW의 대조구에 비해 두배 정도의 에칠렌 발생량을 나타냈다(그림 2). 360분 후에

ACC 처리구에서 에칠렌 생성의 감소경향은 기질로 첨가된 ACC가 소모되어져 에칠렌 발생량이 감소되어지는 것으로 판단되어진다.

1) EFE 혹은 그의 에칠렌 생합성 효소의 활성 억제효과:

ACC synthase 억제제인 AVG와 AOA<sup>5,17)</sup>의 첨가는 본 실험의 가설에 합당하게 DW 대조구에 비해 90분 배양 후 에칠렌의 발생은 각각 11, 44%로 에칠렌의 생합성이 억제되었다. 그러나 기질로 ACC를 첨가한 처리구에서는 EFE의 효율적인 억제를 하지 못하여 ACC 대조구와 거의 같은 수준의 91%와 87%의 에칠렌 발생량을 보였다. 한편, 360분을 배양한 후에도 AOA와 AVG 모두 같은 경향을 보였다(표 1). 한편, 사과와 절편에서는 AOA에 비해 AVG의 ACC synthase의 억제효과가 좋은 것으로 나타났다. 이와 같은 결과를 현재까지 알려진 AOA와 AVG의 특성 및 에칠렌 억제효과<sup>31)</sup>와 비교할 때 본 실험의 방법이 상당한 정확성을 가진 것을 뒷받침하고 있다. Aspirin의 첨가는 DW 대조구와 ACC 대조구에 비해 모두 억제되어졌다(표 2). Salicylic acid (SA)는 배(pear)의 세포배양에서 ACC가 에칠렌으로의 전환을 억제하며<sup>19)</sup> 에칠렌 억제작용에 있어 aspirin은 salicylic acid와 가장 비슷한 효과를 나타낸다.<sup>18)</sup> 또한 SA는 benzoic acid로 부터 합성되어지는 매우 유사한 물질이며,<sup>8)</sup> benzoic acid는 항산화제로 작용한다.<sup>5)</sup> 이러한 사실로 볼때 아직까지 정확하게 알려지지 않는 aspirin의 효과는 EFE를 억제하는 것으로 보인다. 2,4-DNP는 산화적 인산화의 uncoupler로 작용하며, 50 $\mu$ mol이하의 저농도에서는 ACC에서 에칠렌의 전환을 억제하며, 100 $\mu$ mol 이상의 고농도에서는 methionine에서 SAM의 전환을 억제한다고<sup>32)</sup> 하나 그 기작에 관해서는 아직 명확치 않다. 100 $\mu$ mol의 DNP가 사용된 본 실험의 경우에는 DW 대조구와 ACC 대조구 모두에 비해 약 70%가 억제되는 경향을 보여, EFE의 활성이 억제된 것으로 보인다. 그러나 pyridoxal phosphate(PLP)에 의존적인 효소를(예로써, ACC synthase) 불활성화시키는 NaBH<sub>4</sub>는 사과절편 조직에서 별다른 효과가 없는 것으로 나타났다. 또한 procain은 약간의 EFE의 에칠렌 합성효소의 억제효과가 있는 것으로 보이나 DCPTA와 germanium은 에칠렌 생합성 억제에 별다른 효과가 없었으며,

DCPTA의 경우는 오히려 촉진하는 것으로 나타났다(표 2).

천연추출물 중 마늘은 극성 추출액이 EFE활성을 억제하는 것으로 나타났다. 또한 *Angelica*의 극성 분획은 EFE를 제외한 에칠렌 생합성 효소의 활성을 약간 억제시키는 것으로 보인다. 그러나 그 효과는 AOA나 AVG에 미치지 못한다. 그 외 산딸기 뿌리, 영지버섯, 당귀 추출액들은 분획에 상관없이 에칠렌 생합성 과정을 억제하지 못하는 것으로 나타났다(표 3).

2) 적용시험:

처리된 각각의 물질은 기본용액에 단독으로 처리되었을 경우 개화단계 5를 노화시점으로 하여 DCPTA와 Ge 처리구는 대조구의 11일에 비해 3~4일 정도의 수명 연장효과를 나타내었다(그림 3). 그러나 이 경우, DCPTA는 화경이 12일째 300% 정도 증가한 반면, Ge는 250% 정도로 증가하였다(그림 4). 한편, NaBH<sub>4</sub>는 대조구보다 단지 1일정도 수명을 연장하였으나, 화기열림에 특이적 효과를 나타내 3일째 초기 화경의 3배로 증가하여 그 상태가 tip-burning이 일어날때까지 지속되었다. 한편, 대조구의 경우는 7일째 최대치인 200% 정도 증가하였으며 노화가 시작된 11일 이후에는 급격히 감소되어졌다(그림 4). 대조구의 경우 4일째부터 생체중이 감소되어지는 반면, DCPTA, DNP, 그리고 Ge는 화기가 위조되는 시점에도 생체중이 증가하는 현상을 보였다(그림 5). DNP의 경우는 용액 흡수량이 보존기간내 초기치보다 항상 높은 것으로 나타났으며, 실질적인 용액 흡수량은 DCPTA에서 가장 높았다. 또한 NaBH<sub>4</sub>와 DCPTA는 수분흡수량이 시간이 경과함에 따라 증감의 고저 감소되어지는 일반적인 경향과는<sup>13)</sup> 달리 노화전까지 증감의 고저폭이 넓어졌다(그림 6). 이와같은 사실은 DCPTA, DNP, 그리고 Ge는 에칠렌 생합성 효소들은 억제하기 보다는 오히려 수분전도율(수분흡수율)을 계속적으로 유지시킴으로서 절화의 수명연장에 영향을 미치는 것으로 보인다.

AVG와 AOA 그리고 이미 알려진 다른 물질의 특성상(표 1와 2), 본 실험에 사용되어진 방법은 EFE 혹은 그의 에칠렌 생합성 억제 물질을 검색하는데 상당히 효과적인 것으로 밝혀졌다. 그러나 EFE와 그의 다른 생합성 효소의 활성을 동시에 억제하는 것에 대해서는 분간하

기 어렵다. 한편, 적용실험의 결과, 에틸렌 생합성의 억제만이 절화의 수명연장에 직접적인 영향을 미치는 것은 아니라는 사실이 명확하다. 예로써, DCPTA와 Ge은 에틸렌의 생합성 경로를 억제하지 않았지만, 카네이션 절화의 수명을 연장시키는 것으로 나타났다. 이것은 에틸렌 발생 억제 외에 세포막의 안정화, 수분균형의 유지, 수분흡수량의 증가(수분 전도율의 유지) 등의 다른 과정을 통하여 절화의 선도유지에 영향을 미치는 것으로 보여진다.<sup>13)</sup> DNP는 EFE의 활성억제(표 2)와 더불어 수분흡수율의 유지(그림 5와 6)에도 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이와같은 사실은 본 실험에 사용된 방법으로 단지 검색된 물질이 에틸렌의 생합성에 어떠한 영향을 미치는가에 대해서만 판단할 수 있을 뿐이지, 그 물질이 절화의 수명연장에 어떠한 영향을 미칠것인가에 대해서는 알 수 없다.

**적 요**

EFE의 활성 측정을 기본으로 하여 에틸렌 생합성 효소를 억제시키는 것으로 판단되어지는 물질을 DW 및 ACC 대조구와 상대적 비교로 EFE의 활성 혹은 그 외 다른 에틸렌 효소들의 활성억제능력을 측정하는 방법을 개발하여 물질을 조사하고, 절화 카네이션으로 절화수명 적용실험을 행하였다. ACC synthase의 활성을 억제하는 AOA와 AVG 두 물질의 실험결과 본 실험에 사용된 방법은 매우 신속하고 정확한 것으로 밝혀졌다. Acetyl salicylic acid(aspirin)과 2,4-dinitrophenol(DNP), 그리고 마늘의 극성분획은 EFE 억제효과가 있는 반면, procain과 angelica는 EFE의 다른 에틸렌 생합성 효소의 활성을 약간 억제하는 것으로 나타났다. DCPTA와 DNP 그리고 Ge은 에틸렌의 생합성 효소들의 억제효과는 없지만 카네이션의 수분흡수량 유지에 영향을 미침으로 절화의 수명연장 효과를 나타냈다. 한편, DNP는 EFE 활성억제 및 수분흡수율 유지에 영향을 미치나 절화의 수명연장 효과는 없는 것으로 나타났다.

Table 1. Inhibitive effect of ethylene biosynthesis of AVG and AOA known by inhibitor of ACC synthase activity.

Inhibitor	Incubated Time	Ethylene Production	
		% DW control <sup>a</sup> ±SE	% ACC control <sup>a</sup> ±SE
AVG 0.1mM	90min	11±1.9	91±2.3
	360min	12±2.6	54±3.2
AOA 1.0mM	90min	44±4.6	87±2.8
	360min	33±5.1	77±3.2

<sup>a</sup>Absolute values for C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> production in DW treated controls(sorbitol 600mM and Mes buffer 10mM, pH 6.0) were 1.12nmol/g·h(90min) and 0.95nmol/g·h(360min).

<sup>a</sup>Absolute values for C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> production in ACC treated controls(sorbitol 600mM, Mes buffer 10mM, pH 6.0 and ACC 0.1mM) were 4.5nmol/g·h(90min) and 3.0nmol/g·h(360min).

**Table 2.** Effect of promising chemicals on the inhibition of EFE or other enzymes in ethylene biosynthesis, evaluated by the ethylene production in apple tissue slice.

Inhibitor	Incubated Time	Ethylene Production	
		% DW control <sup>†</sup> ±SE	% ACC control <sup>†</sup> ±SE
2,4-DNP 0.1mM	90min	30±1.1	30±3.9
	360min	33±0.2	57±3.9
NaBH <sub>4</sub> 1.0mM	90min	93±5.8	105±3.6
	360min	98±7.0	86±2.5
Aspirin 1.0mM	90min	40±8.1	17±0.2
	360min	43±0.8	23±0.4
DCPTA 1ppm	90min	111±10.9	103±4.0
	360min	115±13.9	82±0.9
Procatin 1.0mM	90min	64±1.2	84±5.3
	360min	74±2.1	80±6.1
Germanium 5ppm	90min	89±5.5	97±2.5
	360min	87±6.3	93±5.6

<sup>†</sup>Absolute values for C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> production in DW treated controls(sorbitol 600mM and Mes buffer 10mM, pH 6.0) were 1.12nmol/g·h(90min) and 0.95nmol/g·h(360min).

<sup>‡</sup>Absolute values for C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> production in ACC treated controls(sorbitol 600mM, Mes buffer 10mM, pH 6.0 and ACC 0.1mM) were 4.5nmol/g·h(90min) and 3.0nmol/g·h(360min).

**Table 3.** Effect of natural extracts on the inhibition of EFE or other enzymes in ethylene biosynthesis, evaluated by the ethylene production in apple tissue slice.

Inhibitor	Polarity <sup>†</sup>	Incubated Time	Ethylene production	
			% DW control <sup>†</sup> ±SE	% ACC control <sup>†</sup> ±SE
<i>Ganoderma lucidum</i> Karst. (×100)	Non-Polar	90min	117±3.8	92±2.6
		360min	104±2.1	88±5.4
	Polar	90min	91±0.9	93±2.2
		360min	74±2.5	91±1.3
<i>Rubus crataegifolius</i> Bunge (×100)	Non-Polar	90min	100±6.0	87±4.2
		360min	100±3.8	105±1.2
	Polar	90min	95±4.3	119±3.0
		360min	130±7.4	105±6.2
<i>Allium sativum</i> Linne (×100)	Non-Polar	90min	70±7.5	58±7.0
		360min	117±4.1	71±1.7
	Polar	90min	51±5.6	49±1.2
		360min	89±6.6	77±3.2
<i>Angelica gigas</i> Nakai (×100)	Non-Polar	90min	83±4.9	93±2.6
		360min	80±5.1	97±3.3
	Polar	90min	68±5.0	81±2.6
		360min	56±8.9	80±4.3

<sup>†</sup>Non-polar:Separated with hexane, Polar:Separated with DH<sub>2</sub>O.

<sup>‡</sup>Absolute values for C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> production in DW treated controls(sorbitol 600mM and Mes buffer 10mM, pH 6.0) were 1.12nmol/g·h(90min) and 0.95nmol/g·h(360min).

<sup>§</sup>Absolute values for C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> production in ACC treated controls(sorbitol 600mM, Mes buffer 10mM, pH 6.0 and ACC 0.1mM) were 4.5nmol/g·h(90min) and 3.0nmol/g·h(360min).

Pathway of ethylene biosynthesis	Inhibitive position	Ethylene Production		Result
		DW+inhib.	ACC+inhib.	
Methionine				
SAM synthetase	(1) enzymes	low <sup>z</sup>	high <sup>y</sup>	→ (1) may be inhibited
SAM				
ACC synthase				
ACC				
EFE(2)	EFE	low	low	→ (2) may be inhibited
Ethylene				

<sup>z</sup> % of DW control within column

<sup>y</sup> % of ACC control within column

Fig. 1. Illustration of screening method of chemicals capable of inhibiting EFE or other ethylene biosynthetic enzymes' activities.

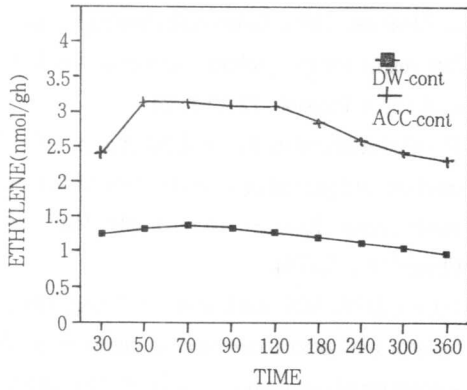


Fig. 2. Time course of ethylene production in DW-control and ACC-control.

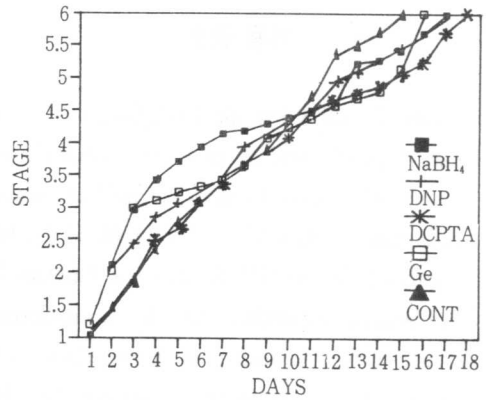


Fig. 3. Changes in flower stage of cut carnation 'Desio' kept in preservative solution during vaselife.

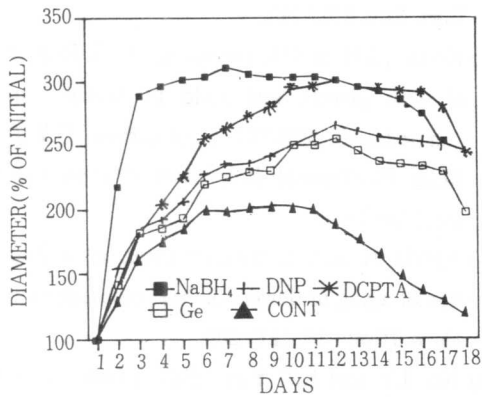


Fig. 4. Changes in flower diameter of cut carnation 'Desio' kept in preservative solution during vaselife.

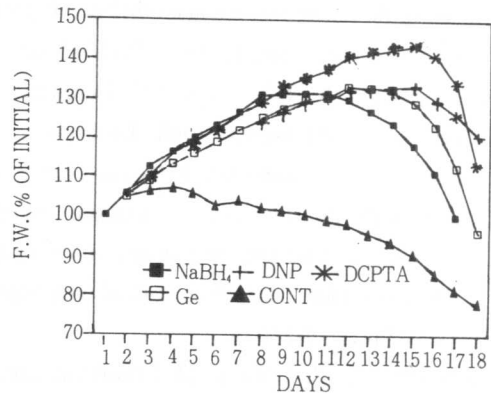


Fig. 5. Changes in fresh weight of cut carnation 'Desio' kept in preservative solution during vaselife.

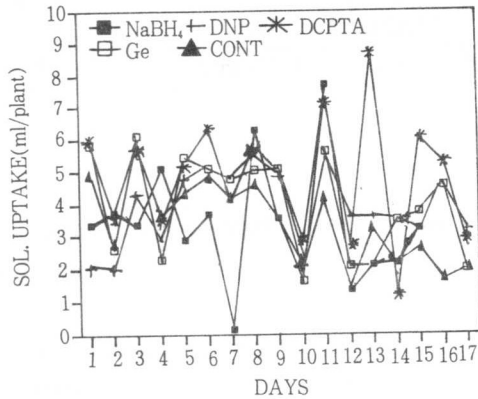


Fig. 6. Change in solution uptake of cut carnation 'Desio' kept in preservative solution during vase life.

### 인용 문헌

- 1) Adam, Z. and S. Mayak. 1984. Solubilization and partial purification of an enzyme converting 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in carnation petals. *Plant Physiol.* 80:1045-1047.
- 2) Adams, D.O. and S.F. Yang. 1979. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 76:170-174.
- 3) Amanda, S.B. and W.R. Woodson. 1992. Variation in flower senescence and ethylene biosynthesis among carnations. *HortSci.* 27:1100-1102.
- 4) Apelbaum, A., S.Y. Wang, A.C. Burgoon, J.E. Baker, and M. Liberman. 1981. Inhibition of the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by structural analogs, inhibitors of electron transfer, uncouplers of oxidative phosphorylation, and free radical scavengers. *Plant Physiol.* 67:74-79.
- 5) Baker, J.E., C.Y. Wang, M. Liberman, and R. Hardenburg. 1977. Delay of senescence in carnation by a rhizobitoxine analog and sodium benzoate. *Hortscience* 12:38-39.
- 6) Borochoy, A. and W.R. Woodson. 1989. Physiology and biochemistry of flower petal senescence. *Hort Rev.* 11:15-43.
- 7) Borochoy, A., H. Itzhaki and H. Spiegelstein. 1985. Effect of temperature on ethylene biosynthesis in carnation petals. *Plant Growth Regul.* 3:159-166.
- 8) Chadha, K.C. and S.A. Brown. 1974. Biosynthesis of phenolic acids in tomato plants infected with *Agrobacterium tumefaciens*. *Can. J. Bot.* 52:2041-2046.
- 9) Drolet, G. E.B. Dumbroff, R.L. Legge, and J.E. Thompson. 1986. Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry* 25:367-371.
- 10) Eliot, D.C., S.M. Batchelor, R.A. Cosoor, and N. C. Mosinos. 1983. Calmodulin-binding drugs affect responses to cytokinin, auxin and gibberellic acid. *Plant Physiol.*, 72:219-224.
- 11) Fernández-Maculet, J.C. and S.F. Yang. 1992. Extraction and partial characterization of the Ethylene-Forming Enzyme from apple fruit. *Plant Physiol* 99:751-754.
- 12) Fujino, D.W., M.S. Reid, and S.F. Yang. 1980. Effects of aminooxyacetic acid on postharvest characteristics of carnation. *Acta Hort.* 113:59-64.
- 13) Halevy, A.H. and S. Mayak. 1981. Senescence and postharvest physiology of cut flowers. part 2. *Hort. Rev.* 3:59-143.
- 14) Keithly, J.H. and H. Yokoyama. 1991. Regulation of crop growth and yield by tertiary amine bioregulators. 223-246 In: Gausman, H.W.(ed.) *Plant Biochemical Regulators*. Marcel Dekker, Inc. New York
- 15) Kende, H. and B. Baumgartener. 1974. Regulation of aging in flowers of *Ipomoea tricolor* by ethylene. *Planta* 116:279-289.
- 16) Ko, J.Y. and K.C. Son. 1992. A basic study for the development of chemicals for prolonging of vase life of cut flowers I. Screening methods of

- EFE activity and antioxidant effect. J. Kor. Soc. Hort. Sci.(Abs) 10(2):232-233.
- 17) Konze, J.R., J.F. Jones, T.Boller, and H.Kende. 1980. Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid on the production of ethylene in senescing flowers in *Ipomoea tricolor* Cav. Plant Physiol. 66:566-571.
- 18) Leslie, C.A. and R.J. Romani. 1988. Inhibition of ethylene biosynthesis by salicylic acid. Plant Physiol. 88:833-837.
- 19) Leslie, C.A., and R.J. Romani. 1988. Salicylic acid: a new inhibitor of ethylene biosynthesis. Plant Cell Rep. 5:144-146.
- 20) Manning, K. 1985. The ethylene forming enzyme system in carnation flowers. In: J.A. Roberts and G.A. Tucker (eds.). Ethylene and plant development. Butterworths. Boston. pp.83-92.
- 21) Mor, Y. and M.S. Reid. 1980. Isolated petals. A useful system for studying flower senescence. Acta Hort. 143:19-25.
- 22) Paulin, A. and C. vanneste. 1986. Effect of drought on the lipidic fraction during the senescence in cut carnation (*Dianthus caryophyllus* L. cv. Ember) (in French) C. R. Acad. Sci. Paris 302:157-160.
- 23) Peiser, G. 1986b. Levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase activity, ACC and ACC-conjugate in cut carnation flowers during senescence. Acta Hort. 181:99-104.
- 24) peiser, G., T.T. Wang, N.E. Hoffmann, S.F. Yang, H.W. Liu, and C.T. Walsh. 1984. Formation of cyanide from carbon 1 of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid during its conversion to ethylene. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 81:3059-3063.
- 25) Reid, M.S., R.Y. Evans, and L.L. Dodge. 1989. Ethylene and silver thiosulfate influence opening of cut rose flowers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 114: 436-440.
- 26) Satoh, S. and S.F. Yang. 1988. S-adenosylmethionine-dependent inactivation and radiolabeling of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase synthase isolated from tomato fruits. Plant Physiol. 88:109-114.
- 27) Verwerdis, P., P. John. 1991. Complete recovery *in vitro* of ethylene-forming enzyme activity. Phytochemistry 30:725-727.
- 28) Woodson, W.R., K.Y. Park, A. Drory, P.B. Larsen, and H. Wang. 1992. Expression of ethylene biosynthetic pathway transcripts in senescing carnation flowers. Plant Physiol. 99:526-532.
- 29) Woodson, W.R., and K.A. Lawton. 1988. Ethylene-induced gene expression in carnation petals. Relationship to autocatalytic ethylene production and senescence. Plant Physiol. 87:498-503.
- 30) Woodson, W.R., S.H. Hanchey, and D.N. Chisolm. 1985. Role of ethylene in the senescence of isolated hibiscus petals. Plant Physiol. 79:679-683.
- 31) Yang, S.F. and N.E. Hoffmann. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Annu. Rev. Plant. Physiol. 35:155-189.
- 32) Yu, Y.B., O.A. Douglas, and S.F. Yang. 1980. Inhibition of ethylene production by 2,4-dinitrophenol and high temperature. Plant Physiol. 66:286-290.