

배나무 赤星病菌의 柄子滴 成分에 關하여

李 相 榮¹ 金 鍾 鎮²

Studies on the components in pycnial drops of *Gymnosporangium haraeaeum* Sydow

Sang Young Lee¹ Chong Jin Kim²

Summary

By way of paper chromatography, free sugars in pycnial drops of *Gymnosporangium haraeaeum* Sydow were investigated in regard of their biochemical interrelation with free sugars of Chinese juniper and pear leaf.

The free sugar in pycnial drops of *Gymnosporangium haraeaeum* Sydow were identified to only Fructose spot. Free sugars in Chinese juniper leaf were identified to Glucose, Galactose and two unknown spots. Free sugars of another sample in pear leaf were identified to spots of Glucose, Fructose and Galactose. The Arbutin from pear leaf was crystallized and its structure was identified to Glucose and

Hydroquinone. The acetone powder of Emulsin was incubated for 1 hour at 40°C with 0.05 M Arbutin substrate in test tube and purified by general method with the purpose of analysis of its metabolic products. And the paper chromatographic analysis showed it to be Glucose spot.

From the above results, this Fructose in pycnial drops of *Gymnosporangium haraeaeum* Sydow is presumed to be the exchangeable from free sugars in pear leaf or to be the hydrolyzed of β -glycoside (Arbutin)-the metabolic isomerization of Glucose into Fructose by pycnia isomerase.

緒 論

最近 微生物의 分泌物에 關한 有機成分의 發見과 其의 代謝작용에 關한 研究가 廣範하게 進展되고있다. 銹菌의 一種인 배나무赤星病菌(*Gymnosporangium haraeaeum* Sydow)(?)은 異種 寄生性이라는것과 多形性을 示하는 點은 다른 여러 銹菌에 있어서와 같으나 柄子殼世代에 粘質物(以下 柄子滴이라함)을 分泌하는것이 特異하다. 이 甘味있는 分泌物의 成分과 寄主植物인 배나무와 향나무 成分組成들은 이菌의 生理作用과 어떤 密接한 關係가 있음은 알수있다.

故로 本實驗에서는 第一次 段階로서 배나무赤星病菌의 寄主植物의 成分과 菌이 分泌하는 柄子滴의 成分 分析을 目的으로 寄主 植物葉中の free sugar를 paper chromatography로 分析하였고 柄子殼 世代에 分泌하는 柄子滴의 成分中 free sugar를 分析하여 이를 成分의 對照를 통한 生物化學的인 考察과 아울러 Helferich氏가 發表한바있는(3) 배나무葉中の arbutin 成分이 菌의

侵襲을 받았을 때에 加水分解된다는 glucose의 變動을 追究하기 爲하여 arbutin을 結晶化시키고 寄主 自体가 가지고있는 emulsin(4, 6)과 telia中の emulsin을 調製하여 0.05M-arbutin 溶液에 各各培養한다음 產物을 paper chromatography로 分析하여 寄主의 成分과 菌體代謝의 相關關係를 生化學的으로 研究考察하여 몇 가지 結果를 얻었으므로 이에 報告하고자한다.

實驗 方法

1. 試料中の free sugar 分析

本實驗에 使用한 試料는 春川農科大學構內에 있는 향나무(*Juniperus chinensis* L.)와 배나무(*Pyrus simonii* Carr.)를 擇하였고 paper chromatography 材料로서는 Whatmann No. 1紙와 free sugar 分析溶媒로서 n-Butanol : Pyridine : H₂O (6:4:3) (5)와 n-Butanol : Acetic acid : H₂O(4:1:5) (8, 9)를 使用하였고 發色試藥으로는 aniline phthalate (9, 10)를 使用하였다

(1) 향나무 葉中の free sugar

^{1, 2} 春川 農科大學

Chunchon Agricultural College, Chunchon, Korea

健全한 향나무葉 10g을 물로 洗滌하고 微細하게 切斷한 다음 溫alcohol과 물로 遊離糖을 抽出하여 Dowex 50과 Dowex 1(10×3) Column으로 精製하고 (13) 減壓濃縮한 試料을 paper chromatography로 分析하였다

(2) Telia 中の free sugar

Telia를 pincette로 蒐集하여 濾紙를 깐 petri dish 上에서 約12時間 發芽시키고 發芽된 (Fig. I. A 參照) 膠質性 菌體를 homogenated 한 다음 물을 加하여 shaker로 3時間 shaking extraction하여 Dowex 50과 Dowex 1 column으로 精製한다음(8) paper chromatography로 free sugar를 分析하였다.

(3) 柄子殼世代의 배나무葉中の free sugar

Pycnia가 배나무 葉面에 斑點을 나타내었을때 10g을 細切하여 溫alcohol로 抽出한다음 前記方法과 같이 free sugar를 分析하였다.

(4) 柄子殼世代에 分泌하는 柄子滴中の free sugar 의 分析

柄子殼에서 柄子滴이 가장 旺盛하게 分泌되었을때 (Fig. 1. B 參照) micropipette로 柄子滴을 蒐集하여 遠心分離器(3,000 rpm)로 pycniospore를 分離한다음 supernatant를 Dowex 50과 Dowex 1 column으로 精製하여 減壓濃縮한다음 Paper chromatography로 分析하였다.

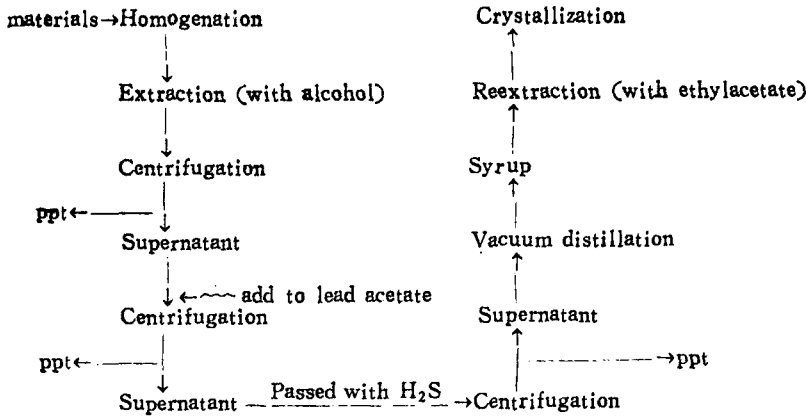
(5) Aecia 世代의 free sugar

Aeciospore의 菌糸가 成長하였을때에 배나무 葉을 細切한다음 前記方法과 같이 free sugar를 分析하였다. (Aeciospore는 Fig. I C 參照). 寄主에 寄生한 배나무 赤尾病菌의 世代別 病症은 Fig. 1과 같다.

2. 試料中の arbutin抽出

향나무葉과 배나무葉 各各 100g을 取하여 Fig. 2와 같은 方法으로 arbutin을 抽出하여 crystallization시킨 結果 Fig 3과 같은 arbutin 結晶 約65mg을 얻었으며 향나무葉에서는 結晶을 얻지 못하였다.

Fig. 2. Extraction and crystallization of Arbutin in the sample leaf.



※Arbutin (β-glycoside mp. 165°C)의 確認

Arbutin 結晶을 ethylacetate로 加溫溶融하고 冷却시켜 再結晶 시킨다음 다음 方法에 準하여 glycoside 印을 確認하였다.

(1) Fehling test

Sample 水溶液에 10% H₂SO₄를 加하여 5~10時間 煮沸放冷하고 Na₂CO₂로 酸을 中和한 液에 Fehling solution을 加하고 加溫하였던바 Cu₂O 沈澱을 얻으므로서 arbutin 中の 還元糖을 確認하였다.

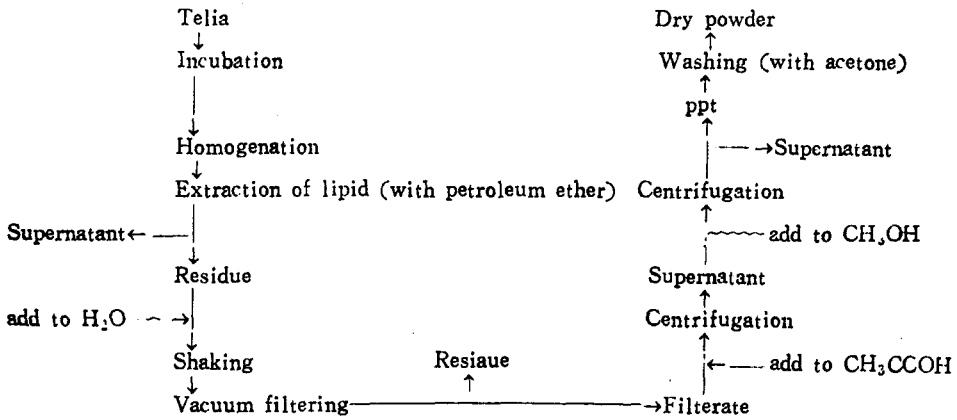
(2) Fig. 2와 같은 Trim and Hill(13)의 方法에 依하여 얻은 crystall은 Phenylhydrazine試藥에 未還元性 이었고 melting point는 165°C였다. (標準物 mp165°C)

(3) Glucose와 hydroquinone의 identificaton은 10% - H₂SO₄로 arbutin 溶液을 加水分解시킨다음 Na₂CO₃로 中和하고 Dowex 50과 Dowex 1 column으로 精製하여 paper chromatography로 glucose와 hydroquinon(1)의 spot를 確認하였다. 이에 關한 chromatogram은 Fig. 4와 Fig5와 같다

3. Emulsin 調製

Arbutin을 加水分解 시키는 Emulsin(β-glycosidase)을 telia및 배나무葉에서 Fig. 6과 같은 方法으로 抽出한다음 methanol로 沈澱시키고 沈澱物을 acetone으로 數回洗滌하여 powder로 만들어 粗酵素로 使用하였다. (4, 6).

Fig. 6. Preparation of Emulsin in telia (by extracted with H₂O.)



4. Incubation

Emulsin의 Powder를 0.05M arbutin 溶液에 0.1%量 되게 넣고 Table 1 과같이 操作하여 40°C에서 1時間 培養한다음 反應 Tube에 N-HClO₄ 1ml를 加하여 酵素 反應을 停止시켜 沈澱物을 濾別한後 生成物中の free sugar를 paper chromatography로 分析하였다.

Table 1. Reaction system of Emulsin in Arbutin solution.

Tube No.	1	2	3	4	5	6
Substrates						
0.1M phosphate buffer	ml 1.0	ml 1.0	ml 1.0	ml 1.0	ml 1.0	ml 1.0
0.05M Glycoside	1.0	1.0	1.0	—	—	—
Enzyme A	—	—	1.0	—	—	1.0
Enzyme B	—	1.0	—	—	1.0	—
Enzyme C	1.0	—	—	1.0	—	—
H ₂ O	—	—	—	1.0	1.0	1.0

Total Vol. 3ml

- ※ Note : Incubated temp 40°C
- Incubated time...1hr
- Enzyme A.....young pear leaf
- Enzyme B.....telia
- Enzyme C.....old pear leaf

實驗結果 및 考察

Fig 7 에서 보는바와같이 향나무葉中の free sugar 는 galactose의 spot dimension이 가장 크고 그外 glucose의 spot와 Rf值가 極히 높은 未知物質 1個와 Rf值가 낮은 未知物質 1個가 나타났다.

Petri dish에서 發芽시킨 Telia 中の free sugar 는 Fig. 8에서 보는 바와같이 比較的 많은 種類의 free sugar 가 確認되었으며 glucose 및 galactose는 향나무葉中の free sugar와 같으며 그外 mannose, fructose, xylose 의 spot를 確認할수 있었다.

배나무 幼葉中の free sugar를 ethanol 및 methanol로 抽出한 試料의 paper chromatogram은 Fig. 9와 같으며 두가지 solvent가 共に glucose의 spot dimension을 크게 나타냈고 그外 fructose의 spot를 identification할수 있었다. 또한 ethanol의 triple developing에 있어서는 Rf值가 낮은 rhamnose와 galactose의 spot도 痕跡으로 나타났다.

柄子殼世代에 分泌하는 柄子滴中の free sugar는 Fig. 10에서 보는 바와같이 fructose의 spot만이 確認되었다.

2枚의 濾過紙에 같은 方法으로 spotting하여 一重展開시킨 chromatogram에서 같은 結果를 보여주고 있으며 이들은 ion交換 column으로 精製한것이나 精製하지 않은 것이나 Fig. 11에서 보는 바와같이 fructose의 spot만이 確認됨으로서 柄子滴中の free sugar는 fructose의 單一物質임을 알수있다.

이것으로 미루어 보아 배나무葉中에 存在하는 遊離狀態의 fructose가 直接 分泌된다고 보다는 오히려 遊離狀態의 glucose 등이 pycna에 利用된 다음 菌體內에 있는 hexose isomerase에 依하여 一段 isomerization된 다음 分泌되는 產物이라 推定되며 Fig. 8에서 본바와 같이 telia中에 있는 free sugar와 相關성이 있는것으로 보인다. 한편으로는 前記한 arbutin이 外部의으로 傷害를 받았을때 自己酵素인 emulsin에 依하여 分解된 다음 亦是 菌體內의 isomerase의 作用을 받아 fructose로 變化된것으로 生覺된다. 이와같은 柄子滴中の 成分에

關하여는 일찍이 Rathay (1883)(11)가 西洋배나무葉이나 幼果上에 形成되는 *Gymnosporangium sabiniae*의 柄子滴中에 glucose와 fructose가 含有되어 있음을 報告한바 있고 Howard (1929)(7)는 *Cronartium ribicola*에 依한 유럽白松의 幹枝上의 病患部에서 漏出하는 柄子滴의 甘味는 그것에 含有되어 있는 glucose 때문이라 하였으며 服部와 中原(1948)(2) 등은 *Cronartium quercuum*에 依한 黑松 幹枝上의 菌癭에서 分泌되는 柄子滴에 fructose와 glucose가 含有되어 있음을 밝혔고 이中 fructose 含量이 77%나 된다고 하였다. 그러나 本實驗에서 얻어진 結果로서 배나무葉上의 *Gymnosporangium harae*anum Sydow의 *Pycnia*世代에 分泌하는 柄子滴中에 fructose만이 確認되었다는것은 菌의 相異한 代謝結果라 볼수있다.

또한가지 興味있는 事實은 Rice(1927)(12)가 *Chrysonyxa pirolata*의 夏孢子堆 形成에 있어서 罹病組織 内部에 澱粉이 多量으로 蓄積되지만 冬孢子 形成이 始作하여 約 2週間後에는 澱粉이 消耗된다고 하였다. 一般적으로 銹菌의 發育 初期에는 寄主 組織 内部에 炭水化合物이 多量 蓄積되지만 發育이 끝날무렵 即 冬孢子 形成期에 急激히 消耗된다는 事實은 菌體가 炭水化合物을 많이 必要로 하기 때문이라 볼수있으며 이는 *Pycnia* 世代에 分泌하는 柄子滴中 free sugar가 多量 含有되어있다는 事實과 또한 이들의 變化를 成長時期別로 chromatogram上의 spot dimension을 比較하여본 結果는 Fig 7과 같다. 이에 關한 定量的 實驗은 第2報로 미룬다.

0.05M arbutin 溶液에 Emulsin solution을 培養하여 그生成物을 分析한 結果 Fig. 8에서 보는 바와같이 代謝產物로서 glucose의 spot가 顯著하게 나타났으며 이로 미루어보아 寄主葉中의 Emulsin이 arbutin을 加水 分解하여 glucose를 遊離시킨다는것은 既報告(4.6)와 같으며 한가지 새로운 事實은 菌體(Telia)에서 만든 Emulsin에도 亦是 arbutin을 分解시키는 β -glucosidase가 存在하는것으로 生覺된다.

摘 要

배나무 赤星病菌의 柄子殼世代에 分泌하는 柄子滴 成分中 free sugar를 中心으로 寄主葉中의 free sugar와 의 相關關係를 生化學的으로 研究 考察하여 아래와 같은 結果를 얻었다.

1. 柄子殼世代에 分泌하는 柄子滴 成分中 free sugar를 paper chromatography로 分析한 結果 fructose만이 確認되었다.

2. 寄主 향나무葉中의 free sugar는 galactose와 glucose 및 未知物質 2種임을 確認하였다.

3. 寄主 배나무葉中의 free sugar로는 glucose, fructose 및 galactose를 確認하였다.

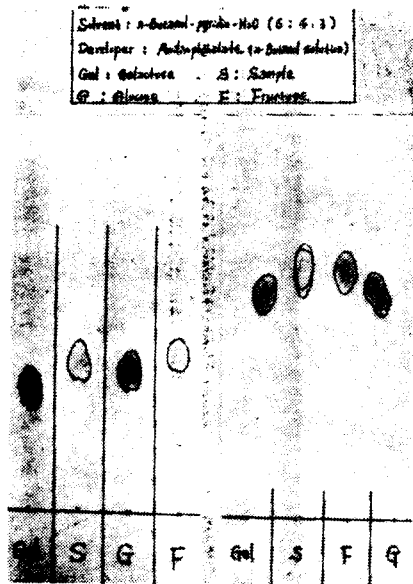
4. 배나무葉中의 arbutin을 結晶化하고 그 構造를 一般的方法과 paper chromatography로 分析하여 glucose와 hydroquinone의 結合體임을 確認하였다.

5. 0.05 M arbutin 溶液에 Emulsin을 調製하여 培養한 結果 分解 生成物로서 glucose를 確認하였고 이들 Emulsin은 모두 β -glycosidase를 含有하고 있음이 認定되었다.

以上 結果에서 보는 바와같이 柄子滴中의 fructose는 배나무葉中에 있는 free sugar 및 glycoside인 arbutin이 Emulsin에 依하여 分解되어 glucose로 變化된다음 菌體內의 isomerase에 依하여 isomerization된것이라 推測된다.

引用 文 獻

- 1) Evans, R. A., W. H. Parr, and E. C. Evans. (1949): *Nature*. 164: 674.
- 2) 服部 淨夫, 中原 清士 (1948): *植維* 51: 31-38
- 3) Helferich, B. (1932): *J. Physiol. Chem.* 208: 91
- 4) 稻垣 勳 (1961): *植物化學*. 醫齒藥出版株式會社. 113
- 5) John, H. P. and W. S. Eldon (1961): *J. Biol. Chem.* 236: 1780.
- 6) 刈米 達夫 (1960): *植物成分化學*, 南山堂, 75-77
- 7) Hiratsuka, N. (1955): *Uredinological Studies*. Kasai Publishing Co. 18.
- 8) Partridge, S. M (1946): *Nature*. 158: 270.
- 9) Partridge, S. M. (1948): *Biochem. J.* 42: 238.
- 10) Paradini, A. C. and L. F. Leloir (1952): *Biochem. J.* 51: 426.
- 11) Rathay E. (1883): *Denkschr. K. Akad. Wiss. Wien. Abt. 2. XLVI*: 1-51.
- 12) Rice, M. A. (1927): *Bull. Torrey Bot. Club.* LIV: 63-153.
- 13) Trim and Hill. (1951): *Biochem. J.* 50: 310.



↑ Fig. 10



↑ Fig. 9

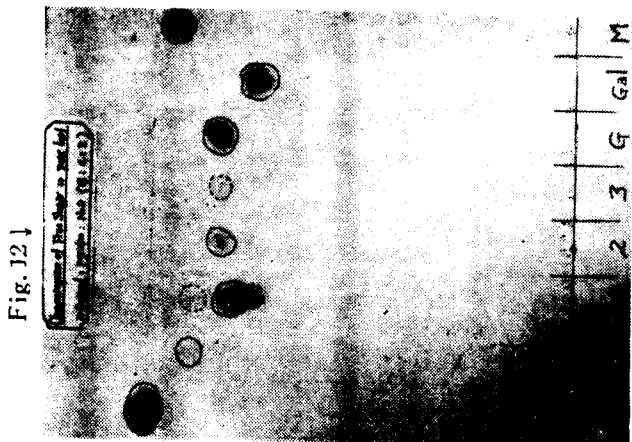


Fig. 12 ↓

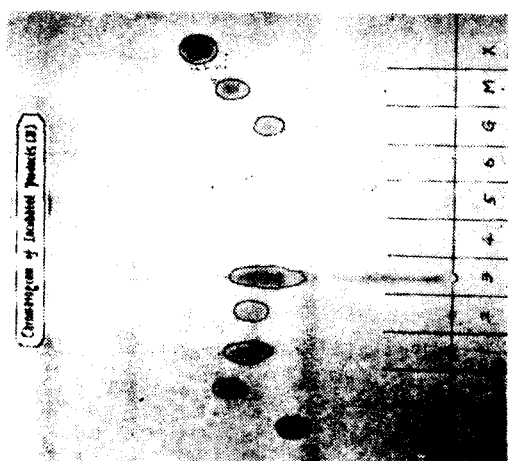
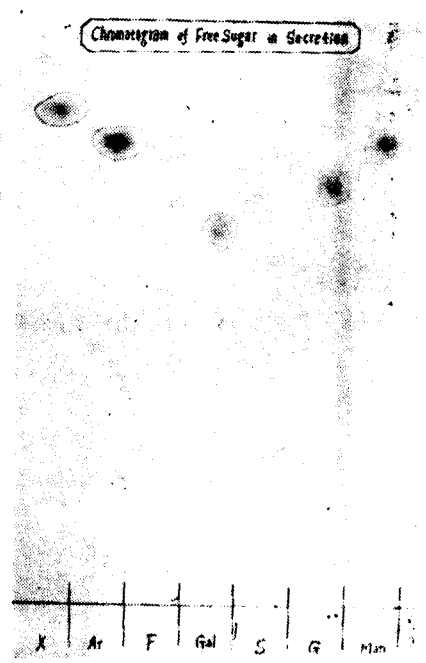


Fig. 13 ↓



↑ Fig. 11