

녹두 발아 阻害物質의 理化學的 性質

金 光 顯

東義大學校 自然科學大學 生物學科
(1984년 12월 3일 접수)

Physico-chemical Characteristics of the Inhibitory Substance on the Germination of Mung Bean

Kwang-Hyeon Kim

Department of Biology, College of Natural Sciences, Dongeui University, Pusan, Korea
(Received December 3, 1984)

Abstract

The inhibitory substance on the growth of mung bean seedling was amorphous crystal that had a single spot on silica gel thin layer chromatography under ultra-violet irradiation in dark room. The Rf value was 0.85 in *n*-butanol-acetic acid-formic acid-water(15:12:3:10) system, and 0.92 in *n*-butanol-acetic acid-water(4:1:5) system, respectively.

Biochemical reaction of the inhibitor was negative to FeCl_3 , pyrimidine, ninhydrine, folin, fehling, Salkowski and Ehrlich reaction, but the inhibitor had a blue fluorescence from irradiation of ultra-violet rays and had maximum absorption at 252nm on UV spectrum. On IR spectrum, the peaks of the inhibitor appeared at 3300~3500, 2900~3000, 1600~1700, and 1400 cm^{-1} .

The strain tested was identified to be similar *Streptomyces luteogriseus* by morphological and physiological characteristics.

I. 서 론

균을 동정한 결과를 기술하였다.

오늘날 수많은 미생물 유래의 식물발아 생장억제 물질에 관한 구조가 알려져 있으며,^{1~7)} 이들의 산업적인 이용가치와 농업생산면에서의 그 중요성이 점차 인정되고 있어, 많은 관심을 기울여 왔다. 이들 물질중에는 실제로 고등식물에 주요한 auxin^{8,9)}, gibberelline⁹⁾ 및 cytokinin^{9,10)} 등 식물 hormone류 이 외에도 식물성장과 발아를 촉진시키는 물질도 알려져 있다.^{11,12)} 따라서 전보¹³⁾에서 발표된 녹두발아 저해물질의 구조해명을 위한 기초연구로서 저해물질의 이화학적 성질을 조사하고 또한 저해물질을 생산하는

II. 재료 및 방법

1. 생화학적 정성반응

FeCl_3 반응¹⁴⁾, ninhydrine반응¹⁵⁾, foline반응¹⁶⁾, Salkowski 및 Ehrlich반응¹⁷⁾, fehling반응¹⁸⁾, pyrimidine반응¹⁹⁾ 및 형광반응이 검토되었으며 형광반응은 silica gel plate 상에 시료를 spot한 후 암실에서 자외선 조사를 행하였다.

2. Thin Layer Chromatography(TLC)

천보¹³⁾에서 기술한 방법으로 정제된 저해물질을 silica gel plate상에 spot한 후 전개하여 암실에서 자외선 조사로 spot를 확인하였다.

3. 균의 등정

Bergey's manual²⁰⁾ 및 Nonomura²¹⁾의 방법을 기초로 균의 형태, 생리 및 생화학적 성질과 그 배양상의 특성을 조사 비교하였다.

4. 기 구

UV spectrum은 Shimadzu UV-200 spectro photometer를 사용하였으며, IR spectrum은 Beckman acculab 4 type을 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 생화학적 정성반응

저해물질 1mg을 증류수 1ml에 용해하여 각각의 반응기를 확인하였으나, Table 1에서와 같이 형광반응 이외는 negative로 나타났다.

Table 1. Biochemical reaction of the inhibitory substance

Reactions	Results
FeCl ₃	-
Pyrimidine	-
Ninhydrine	-
Folin	-
Fehling	-
Salkowski	-
Ehrlich	-
Fluorescence	+

Symbols: +, positive; -, negative.

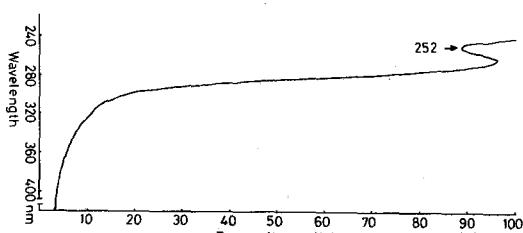


Fig. 1. The UV spectrum of the inhibitory substance.

2. Thin Layer Chromatography

저해물질 수용액을 silica gel plate상에 spot하고 n-butanol: acetic acid: formic acid: water=15: 12: 3: 10(v/v/v/v)과 n-butanol: acetic acid: water=4: 1: 5(v/v/v)를 용매로 전개시킨 후 암실에서 자선을 조사한 결과 청색의 단일 spot를 확인하였으며 Table 2에서와 같이 Rf치는 각각 0.85와 0.92였다.

Table 2. Thin layer chromatography of the inhibitory substance

Solvent Systems	Rf values
BuOH-HOAc-formic acid-water (15: 12: 3: 10)	0.85
BuOH-HOAc-water (4: 1: 5)	0.92

One fluorescent spot had on silica gel plate by ultra-violet irradiation.

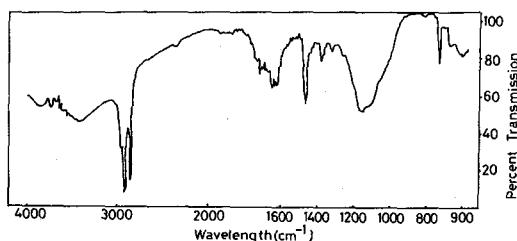


Fig. 2. The IR spectrum of the inhibitory substance.

3. UV spectrum

저해물질 1mg을 증류수 10ml에 용해하여 UV spectrum을 측정한 결과 Fig. 1에서와 같이 λH_2O_{max} 은 252 nm였다.

4. IR spectrum

저해물질 5mg을 KBr disk로 만들어 Nernst Glower Source를 사용하여 시료의 IR spectrum을 측정한 결과 Fig. 2와 같이 3300~3500, 2900~3000, 1600~1700 및 1400cm⁻¹의 peak가 인정되었다.

5. 균의 형태학적 관찰

본 균주 At-445를 glucose-asparagine agar, yeast extract-malt extract agar 등의 평판 및 사면배지에서 14일간 배양한 것을 광학현미경으로 spore chain을 조사한 결과 spiral 형(Fig. 3)이었으며, 주사형 전

자현 미경으로 spore surface 를 관찰한 결과 smooth type 이었다.

Oat meal agar, inorganic salts-starch agar, glycerol-asparagine agar 의 평판 및 사면과 potato plug 배지에서 군을 배양하여 조사한 결과 포자가 착색된 aerial mass color는 회색을 나타내었고, reverse side color 및 melanoid pigment 이외의 soluble pigment 는 brown 이었다. 또한 peptone-yeast extract iron agar, tyrosine agar 의 사면 및 potato plug 배지에서 2일째부터 melanoid 색소를 약하게 생성하였다.



Fig. 3. Morphology of *Streptomyces* sp. AT-445.

6. 군의 생리 및 생화학적 특성

본 군의 생리 및 생화학적 특성을 보면 전분, ge-

Table 3. Identification of the microorganism

	<i>Streptomyces luteogriseus</i>	Test strain AT-445
Aerial mass color	grey	grey
Melanoid pigment	positive	positive
Soluble pigment	positive	positive
Reverse side pigment	positive	positive
Spore chain	spira	spira
Spore surface	smooth type	smooth type
NaCl tolerance	≥7%, but <10%	≥5%, but <6%
D-glucose	+	+
D-xylose	+	+
L-arabinose	+	+
L-rhamnose	+	+
D-fructose	+	+
D-galactose	+	+
Raffinose	+	+
D-mannitol	+	+
i-inositol	+	+
Salicin	+	+
Sucrose	+	+

Symbol: +, utilized.

latin 및 casein에 대한 분해 능이 있었으며 catalase 가 생성되었고, 1.5 μg/ml 농도의 streptomycin 이 함유된 배지에서도 생육이 강하게 저해되었다. 또한 5% NaCl 을 가한 배지에서는 겨우 생육이 가능하였으나, 6% 이상의 NaCl 을 가한 배지에서는 전혀 그 생육을 관찰할 수 없었다. 본 군의 탄수화물 이용성을 검토하기 위해 기초배지에 각 탄수화물의 농도를 1% 되게 첨가한 결과 본 군이 모든 당을 이용할 수 있었다. 따라서 본 군은 호기성균이며 포자는 기균사에 연쇄상으로 연결되어 있으므로 *Streptomyces* 속이었다. 또한 본 군의 형태학적 관찰 및 배양상의 특성과 아울러 본 군의 생리 및 생화학적 특성을 종합하여 Bergey's manual²⁰⁾과 strain key²¹⁾로부터 이와 비슷한 성질을 가진 군을 서로 비교해보면 *Streptomyces luteogriseus* 또는 그 유연균이라고 사료된다 (Table 3).

IV. 요 약

녹두 종자 발아억제물질을 생산하는 군을 동정한 결과 *Streptomyces luteogriseus*로 판정 되었으며, 본 저해물질의 순도점정을 위해 silica gel thin layer chromatography를 행한 결과 BuOH-HOAc-formic acid-water(15 : 12 : 3 : 10)와 BuOH-HOAc-water(4 : 1 : 5)의 용매계에서 각 Rf 치는 0.85 와 0.92 의 단일 spot 가 확인되었다. 또한 본 저해물질의 주요 radical 을 조사해 본 결과 phenol 기, pyrimidine 기, amino 기, 환원당 및 auxin 은 함유되지 않았으며 단지 UV조사에 의해 형광을 나타내었다.

본 저해물질의 UV spectrum 은 $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}} = 252$ 였으며, IR spectrum 에서는 3300~3500, 2900~3000, 1600 ~1700 및 1400cm⁽⁻¹⁾의 peak 가 인정되었다.

References

- 1) Raistrick, H., C. E. Strickings, and R. Thomas: *Biochem. J.*, **55**, 421 (1953)
- 2) Stoll, C., J. Renz, and E. Gäuman: *Phytopath. Z.*, **29**, 388 (1957)
- 3) Roy, W.C.: *Plant Physiol.*, **36**, 37(1961)
- 4) Burrows, B. F., and W.B. Turner: *Nature*, **207**, 998(1969)
- 5) Canoica, L., A. Fiechli, M.G. Kienle, and A. Scala: *Tetrahedron Lett.*, **45**, 3977(1968)
- 6) Shigeo, I., N. Shigeo, and O. Shigenobu: *Te-*

- trahedron Lett.*, **45**, 3977(1960)
- 7) Strobel, G. A : *Plant Physiol.*, **42**, 1433 (1967)
- 8) Epstein, E., and P. G. Miles: *Plant Physiol.*, **42**, 911(1967)
- 9) Barea, J.M., and M.E. Brown: *J. Appl. Bact.*, **37**, 583(1974)
- 10) Crafts, C.B., and C.D. Miller: *Plant Physiol.*, **54**, 586(1974)
- 11) Koaze, Y.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **21**, 197(1957)
- 12) Koaze, Y.: *Bull. Agr. Chem. Soc.*, **22**, 91 (1958)
- 13) Kim, K.H., and J. H. Seu: *Kor. J. Appl. Microbiol., Bioeng.*, **11**, (2), 81(1983)
- 14) 東京大學 農學部 農藝化學教室編: 實驗農藝化學 第3版, 朝倉書店, 2(1978)
- 15) 菅原潔, 副島正美: 生物化學實驗法 7; 蛋白質の定量法 第2版, 學會出版センター, 174(1979)
- 16) AOAC: In "Official Methods of Analysis", 13ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C. (1980)
- 17) Meudt, W.J., and T.P. Gaines: *Plant Physiol.* **42**, 1935(1967)
- 18) 京都大學 農學部 農藝化學教室編: 農藝化學實驗書 第2卷, 產業圖書, 680 (1973)
- 19) Feigl, F.: In "Spot tests in organic analysis (6th ed.)", Elsevier Publish Co., 235 (1960)
- 20) Buchanan, R. E., and N. E. Gibbons: In "Bergey's Manual Determinative Bacteriology", (8th ed.), Williams and Wilkins Co., 747-829(1974)
- 21) Nonomura, H.: *J. Ferment. Technol.*, **52**, 78 (1974)