

완두 유묘중 IAA-amino acid 복합체의 확인

朴 昌 奎* · 朴 魯 東**

(1984년 11월 12일 접수)

Identification of Amino Acid Conjugates of Indole-3-acetic Acid in Etiolated Pea (*Pisum sativum* L.) Shoots

Chang Kyu Park* and Ro-Dong Park**

Abstract

To identify amino acid conjugates of indole-3-acetic acid(IAA) in plants, 23 amino acid conjugates of IAA were synthesized and characterized by UV and IR spectroscopies, and thin-layer and high performance liquid chromatographies.

In etiolated pea (*Pisum sativum* L. var. Sparkle) shoots, aspartic and glutamic acid conjugates of IAA were tentatively identified as metabolites of endogenous IAA by thin-layer and high performance liquid chromatography, and by alkaline hydrolysis of the conjugates.

서 론

완두 幼苗에 부여한 indole-3-acetic acid(IAA)가 ether에 不溶인 indole-3-acetylaspartic acid(IAA-Asp)로 전환됨을 Andreae와 Good이⁽¹⁾ 최초로 밝혀낸 후, 이 IAA 複合體는 여러 식물에서 주로 크로마토키라피의 증거와 정색반응을 근거로 確認되었다.⁽²⁻⁶⁾ 그 후 IAA-아미노산 복합체는 생물시료에 IAA를 부여할 때 여러가지로 생성되는 것으로 알려졌다. Feung 등은⁽²⁾ *Parthenocissus tricuspidata*의 crown gall 조직에 IAA를 부여하여 배양할 때 IAA-Asp 이외에도 IAA-glutamic acid(IAA-Glu), IAA-glycine (IAA-

Gly), IAA-alanine(IAA-Ala) 및 IAA-valine(IAA-val)이 생성됨을 확인하였으며, Purves와 Hollenberg도⁽³⁾ 오이 유묘에서 IAA-ASP와 IAA-Glu의 생성을 확인하였다.

合成 植物生長調節物質을 부여하여 여러 가지 아미노산 복합체를 확인한 예도 많다. 콩에 naphthaleneacetic acid(NAA)를 부여하였을 때 NAA-Asp와 NAA-Glu가 생성됨이 확인되었고⁽⁷⁾ 大豆의 callus 조직에 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)를 처리하여 2,4-D의 alanine, valine, leucine, phenylalanine, tryptophan 복합체의 생성을 확인하였으며,⁽⁸⁾ 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid를 처리하여서도 aspartic acid와 glutamic acid 복합체가 생성됨을 확인하였다.⁽⁹⁾

* 서울대학교 農大 農化學科 (Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Seoul National University, Suwon 170)

** 全南대학교 農大 農化學科 (Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Chonnam National University, Kwangju 500)

이와 같이 外部에서 공급한 IAA와 합성 식물생장조절물질은 대사과정에서 여러가지 아미노산 복합체를 형성함이 확인된데 비하여 *in vivo*에서는 팔⁽¹⁰⁾과 토마트,⁽¹¹⁾ 완두⁽²³⁾ 유묘에서 *Varatrum*과⁽¹³⁾ 대두 종실⁽¹⁴⁾ 등에서 오직 IAA-Asp의 존재만이 확인되어 있을 뿐이다. 그러면 *in vivo*에서 IAA-Asp 이외에 다른 아미노산 복합체의 존재 가능성은 없는가? 외부로부터 투여된 IAA의 대사가 조직내에서 생합성된 IAA의 대사와 어떤 차이가 있는지를 먼저 규명해야 할 것이나 이에 관해 알려진 바가 별로 없다. 그러나 兩者 사이에는 類似한 점이 많을 것이며,⁽¹⁵⁾ 그렇다면 IAA는 *in vivo*에서 여러 아미노산과 복합체를 형성하여 존재할 수 있을 것이다. 그중에서 glutamic acid 복합체가 가장 가능성이 있는 것으로 지적되고 있으나⁽¹⁵⁾ IAA 투여시 IAA-Glu를 생성하는 식물이 광범위하게 조사되어 있지 않으며 *in vivo*에서 아직 확인된 바도 없다.

Cohen⁽¹⁴⁾은 GC-MS를 사용하여 대두 종실에서 IAA-Asp를 확인하고 이를 구성하는 aspartic acid의 입체배치가 L-型이며, 대두 종실에 전체 IAA 함량의 절반에 달하는 10 μmol/kg의 IAA-Asp가 함유되었음을 밝혔다. Law와 Hamilton은⁽¹²⁾ HPLC(high performance liquid chromatography)와 방사선 동위원소 회색법으로 완두파종후 14일차 幼苗줄기에서 IAA-Asp가 생체중당 580~850 pmole/g 함유되어 있음을 보고하였다.

식물체내의 IAA 복합체의 수준이 이와 같이 높으며 그 機能이⁽¹⁶⁾ IAA의 저장형태로, IAA를 과산화적 분해로부터 보호하고, IAA의 수송형태로써 귀리의 경우 종실의 내배유에서 줄기로 수송되며, 유리 IAA의 수준을 적절히 유지하는데, 즉 호르몬의 恒常性을 유지하는데 기여한다는 사실을 상기할 때 식물체에 존재하는 그 화학적 형태를 확인 동정하는 일은 중요하다고 할 것이다.

본연구는 *in vivo* IAA의 아미노산 복합체의 확인을 위하여 완두 幼苗를 재료로 삼아 수행되었다.

재료 및 방법

1. 식물의 재배

시중에서 구입한 완두(*Pisum sativum* L. var. Sparke) 종자를 2.5% NaOCl 용액에 10분간 담가 소독하고 12시간 浸種한 후 催芽시켜 vermiculite 苗箱에 심었다. 암실조건하에 25°C 항온기에서 6~10일간 재배하고 地上部만을 취하여 시료로 사용하였다.

2. 시 약

1) 유기시약

유기용매로는 EP級 또는 GR級の 關東化學(일본) 또는 和光純藥(일본) 製品를 정제없이 사용하였으며, ethyl ether만은 사용 직전에 동일 용적의 재증류수로 씻어 epoxide를 제거하였다. Dicyclohexylcarbodiimide와 tetramethyl guanidine은 東京化成(일본)에서, p-nitrophenol은 關東化學에서 구입하였다.

2) 무기시약

HCl, H₂SO₄, Na₂SO₄, NH₄OH, NaOH, NaOCl, (NH₄)₂SO₄, Ba(OH)₂·8H₂O 등은 EP級 또는 GR級の 關東化學 또는 和光純藥 제품을 사용하였다.

3) 표준시약

(1) 표준 인돌 화합물: 본실험에 사용된 표준 인돌 화합물은 (Table 3 참조) 모두 Sigma社(미국)로부터 구입하였다.

(2) 표준 L-아미노산: 23종의 L-아미노산은 Sigma社, Merk社(독일), 和光純藥, 林純藥(일본), 關東化學, 米山藥品(일본) 및 Matheson Coleman & Bell社(미국)의 제품이었다.

4) 크로마토그래피 재료와 發色試藥: 인돌화합물을 분리하기 위한 TLC(thin-layer chromatography)와 컬럼 크로마토그래피에는 각각 TLC용과 컬럼 크로마토그래피용의 실리카 겔(和光純藥 製品)을 사용하였고 또 Sep-Pak C₁₈(Waters Associates, 미국)도⁽³⁾ 함께 응용하였다.

Table 1. Solvent system for thin-layer chromatography

No.	Solvents	Composition(v/v)
1	Ethylacetate-isopropanol-water	65+24+11
2	Chloroform-methanol-water	85+14+1
3	n-Butanol-acetic acid-water	65+13+22
4	Isopropanol-ammonia-water	80+10+10
5	Chloroform-ethylacetate-formic acid	35+55+10
6	Ethanol-water	70+30
7	n-Butanol-ethanol-water	10+10+10
8	sec-Butanol-ammonia-water	80+5+10
9	Ethanol-ammonia	70+30
10	Chloroform-methanol-ammonia	40+40+20

실리카 겔을 입힌 TLC板(250 μm)은 120°C에서 충분히 활성화시킨 다음 테시케이타 내에서 냉각 보관하였으며, TLC에 사용된 용매계는 Table 1과 같았다. TLC에서 인돌 화합물의 확인에 사용된 발색시약은⁽¹⁷⁾ Salkowski시약, van Urk시약, DMACA(4-dimethylaminocinnamaldehyde)시약, Prochazka시약, Ehmann시약⁽¹⁸⁾ 그리고 ninhydrin 시약이었다.

HPLC에는 μ Bondapak C₁₈ 컬럼(내경 3.9 mm×길이 300 mm)을 이용하였으며, methanol: 0.02M acetate buffer (pH 4.0) (1: 10, v/v) 混合液을 용출용매로 분당 0.8 ml의 流速으로 용출시켰다. HPLC 용출용매의 조제를 위하여는 HPLC용의 증류수와 methanol, GR級の acetic acid와 sodium acetate를 사용하였다.

3. 사용기기

1) UV-Vis Spectrophotometer : Shimadzu MPS 5000(Shimadzu seishakusho, 일본)

2) IR Spectrophotometer : JASCO A302 Grating IR Spectrophotometer(日本分光工業株式會社, 일본)

3) HPLC : Waters Associates ALC/GPC 244 HPLC equipped with the Model 6000A solvent delivery system and Model 440 Absorbance detector set at 280 nm(Water Associates, 미국).

4) TLC system : Mitamura Riken Gokyo製(일본)

4. IAA-아미노산 복합체의 합성⁽¹⁹⁾

1) IAA의 p-nitrophenyl ester(IAA-PNP)의 합성
IAA 11.6 g과 p-nitrophenol 9.5 g을 ethyl acetate 250 ml에 녹이고 이를 5°C로 냉각하였다. Dicyclohexylcarbodiimide 13.7 g을 녹인 ethylacetate 50 ml를 위 混合液에 가하고 5°C에서 1시간 그리고 실온에서 1시간 저어주었다. 이때 생성된 dicyclohexylurea는 걸러서 제거하고 濃液을 50 ml로 농축한 다음 냉각 여과하였다. 잔여용액을 감압하에서 제거시켜 노란색의 IAA PNP를 얻었으며 이를 ethylacetate와 petroleum ether 混合溶媒에서 재결정하였다.

2) IAA-아미노산의 합성

아미노산 25 mmole과 tetramethylguanidine 50 mmole을 50% methanol 10 ml에 녹이고 여기에 잘게 부순 IAA-PNP 25 mmole을 가하고 48시간 동안 천천히 저어서 녹였다. 증류수 50 ml를 여기에 가하고 ethylether 50 ml씩으로 2회 추출해내고, 수용층을 진한 HCl로 pH 5로 조절한 다음 ethylether 50 ml씩으로 3회 추출하였다. 수용층의 pH를 1로 조절하고 n-butanol 40 ml와 10 ml로 추출해내고 유기용매층을 증류수 15 ml씩으로 4회 씻어주었다. β -alanine과 arginine, asparagine, glutamine, glutamic acid, glycine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, tyrosine, valine의 IAA 복합체는 n-butanol층을 감압 농축하여 결정화하였으며, 나머지 alanine과 aspartic acid, cysteine, cystine, histidine, hydroxyproline, lysine, proline, serine, threonine, tryptophan의 IAA 복합체는 n-butanol층을 TLC한 다음 80% ethanol로 추출하고 감압하

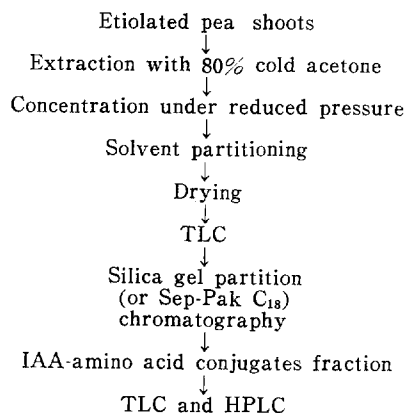


Fig. 1. Procedures for qualitative analysis of IAA-amino acid conjugates in etiolated pea shoots

에서 농축하였다.

이들 합성품에 대하여 UV spectrum과 IR spectrum, TLC와 HPLC에서의 크로마토그래피 성질 및 純度를 조사하였다.

5. 완두 유묘중 IAA-아미노산 복합체의 확인

1) 추출과정

암실재배한 완두 유묘의 줄기 20 g에다 80% 냉아세톤 200 ml를 가하고 Waring blender로 고속으로 1분간 갈아서 24시간 4°C의 냉장고에 두어 추출하였다. 이를 여과하고 殘渣를 냉아세톤 10 ml로 씻어내었다. 여액을 회전진공농축기에서 농축하여 아세톤을 제거하고 (NH₄)₂SO₄를 가하여 단백질을 침전시켰다. 여과액을 chloroform 40 ml씩으로 3회 추출해낸 다음 2.5 N HCl 용액으로 pH를 1.5로 조절하고 n-butanol 40 ml씩으로 3회 추출하였다. 유기용매층을 모아 증류수 100 ml로 씻고 Na₂SO₄로 건조시킨 다음 회전진공농축기에서 농축시켰다.

2) 정제와 확인

Fig. 1은 시료중의 IAA-아미노산 복합체의 동정 과정을 나타내고 있다. 농축된 시료는 TLC 분리후 Magnus 등의 방법을⁽²⁰⁾ 약간 바꾸어 정제하였다. 즉, 실리카 겔 3.8 g을 benzene : methanol(20 : 1, v/v) 혼합용매에 풀어 유리관(내경 1.0 cm×길이 30 cm)에다 채우고 시료를 가한 다음 같은 混合溶媒 45 ml(F1 fraction)와 benzene : methanol(15 : 1, v/v) 25 ml(F2 fraction), methanol 35 ml(F3 fraction)로 차례로 용출시켜 分割하였다.

또한 미리 활성화시킨 Sep-Pak C₁₈에다⁽²¹⁾ 20%의 methanol에 녹인 시료를 주입하여 증류수로 충분히 씻

어내린 다음 20% methanol 용액 1.5 ml로 용출시켜 정제하였다. 이와 같이 정제한 시료를 감압 농축시킨 다음 TLC와 HPLC에 의하여 IAA-아미노산 복합체를 동정하였다.

IAA-아미노산 복합체의加水分解에 의한 확인은 다음과 같이 행하였다. ^(1,10) 실리카 젤 컬럼 크로마토그라피에서 얻은 F3 分劃을 농축시키고 여기에 Ba(OH)₂·8H₂O 65 mg과 증류수 1 ml를 가하고 마개를 잘한 다음 120°C에서 6시간 가열하였다. 반응 종료후에 2N H₂SO₄를 가하여 pH를 2~3으로 조절하고 잠시 가열하여 원심 분리시켜 BaSO₄를 제거하였다. 상등액을 ethylether 3 ml씩으로 3회 추출하고 농축하여 TLC로 IAA를 확인하였으며, 수용층도 농축하여 TLC에 접적하여 용매계 9와 10에서 전개시키고 아미노산을 확인하였다.

결과 및 고찰

1. IAA-아미노산 복합체의 합성

IAA의 p-nitrophenyl ester를 합성하여 노란색의 결정 (mp 100~103°C)을 얻었으며 ⁽¹⁹⁾ 이를 ethylacetate와 petroleum ether의 혼합용매에서 재결정하였다(收率 85%, mp 104~105°C).

IAA-PNP ester를 중간 原料로 peptide 합성시약 dicyclohexylcarbodiimide를 이용하여 IAA-아미노산 복합체를 합성하였다. 각 아미노산 복합체의 합성수율

Table 2. Colours of amino acid conjugates of IAA on silica gel layers

Reagents	Colour
Salkowski	Violet
van Urk	Violet
Prochazka	Brown-yellow
DMACA	Pink-violet
Ehmann	Blue

Table 3. Rf values¹⁾ of amino acid conjugates of IAA

Conjugate	Solvent system							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Ala	18	00	70	55	53	78	66	21
β-Ala	19	05	73	49	49	74	64	21
Arg	05	00	36	25	02	76	66	33
Asn	10	00	46	45	28	76	66	33
Asp	10	03	58	20	34	63	54	15

Cys ²⁾	05	28	28	00	69			
	22	00~13	58	38	38	75	64	13
	32		76	58	59	85		
Cys'	02	00	30	29	03	68	63	04
Glu	01	00	66	26	40	69	59	07
Gln	09	00	48	45	27	76	63	15
Gly	13	00	58	51	46	74	63	19
His	50	00	32	42	03	72	60	15
Hyp	10	00	58	47	32	74	64	28
Ile	24	09	77	57	58	76	63	34
Leu	25	08	76	48	56	75	66	34
Lys ²⁾	09	00	34	30	02	64		
	20	00	70	65	44	78	60	21
Met	21	03	70	57	53	76	63	34
Phe	26	07	89	56	55	76	72	28
Pro	14	07	64	46	48	74	62	21
Ser	13	01	57	47	33	76	63	20
Thr	16	01	60	46	40	75	63	21
Trp	24	02	77	53	53	75	63	34
Tyr	20	00	82	50	51	77	63	30
Val	19	08	76	57	51	77	63	33
IAA	36	12	82	46	64	76	67	32

- 1) $hRf = \frac{\text{distance of spot centre from start point}}{\text{distance of solvent front from start point}} \times 100$
 2) Multiple values for IAA-Cys and -Lys.

Table 4. Relative retention time of amino acid conjugates of IAA with C₁₈ HPLC

Conjugate	RRT ^{1,2,3)}	Conjugate	RRT ^{1,2,3)}
Ala	0.61	Hyp	0.41
β-Ala	0.74	Ile	1.00
Arg	1.01	Leu	1.05
Asn	0.32	Lys ⁴⁾	0.61
Asp	0.35		0.30
Cys ⁴⁾	0.32	Met	0.96
	0.35	Phe	1.00
	1.07	Pro	1.64
Cys' ⁴⁾	0.36	Ser	0.36
	0.84	Thr	0.52
Glu	0.47	Trp	1.02
Gln	0.38	Tyr	1.00
Gly	0.33	Val	1.01
His	0.50	IAA-PNP	0.71

- 1) RRT refers to relative retention time
 2) $RRT = \frac{\text{Retention time(conjugate)}}{\text{Retention time(IAA)}}$
 3) Absolute retention time of IAA=21.7 min.
 4) Multiple values for IAA-Lys, -Cys and -Cys'

은 10~30% 범위로 비교적 낮은 편이었는데, 이는 합성반응 후의 정제과정에서 손실이 큰 때문으로 나타났다. 즉, 수용층을 pH 1로 조절한 다음 n-butanol로 추출하고 남은 물층과, n-butanol 층을 씻어낸 물층에 IAA-아미노산이 상당히 들어있음을 TLC로 확인할 수 있었다.⁽¹⁹⁾

합성 정제한 IAA 복합체에 대하여 TLC와 HPLC로 純度와 크로마토그래피성질을 조사하였던 바, 일부 합성품에는 IAA-PNP와 IAA가 미량 함유되기도 하였다. 각 발색시약에 대하여 IAA 복합체들은 서로 동일한 색깔을 보여주었는데 그 정색반응을 Table 2에 실었다. Table 3에 아미노산 복합체들의 8가지 용매계에서 hRf值(Rf值×100)을 나타내었다. 용매계 2는 여러 IAA 유도체들로부터 보다 分子量이 큰 IAA-아미노산 복합체를 분리시키는데 유용하게 이용될 수 있었다.

Table 4에는 HPLC에서 각각의 relative retention time을 나타냈다. Cysteine과 lysine 複合體가 HPLC와 TLC 상에서 각각 3종과 2종의 多成分으로 분리되었고 cystine 복합체는 HPLC에서만 2성분으로 분리되었다.⁽²¹⁾ HPLC에서 methanol : acetate 완충액(1 : 10, v/v)만을 용출용매로 사용하여서는 23종 아미노산 복합체들을 서로 만족스럽게 분리시키는 것은 어려웠으나, IAA와 IAA-Asp, IAA-Glu, IAA-Lys 등을 확인하는 데는 충분하였다(Fig. 5).

Fig. 2는 IAA-PNP와 IAA-Glu의 IR spectrum이다.⁽²²⁾ IAA-PNP는 3400 cm⁻¹에서 N-H stretching에 의한 吸收를, 1770 cm⁻¹에서 carbonyl C=O의 stretching에 의한 吸收를, 1520과 1340 cm⁻¹에서 각각 NO₂ group의 비대칭과 대칭 stretching에 의한 吸收를 보여주고 있다. IAA-Glu는 3410 cm⁻¹에서 N-H stretc-

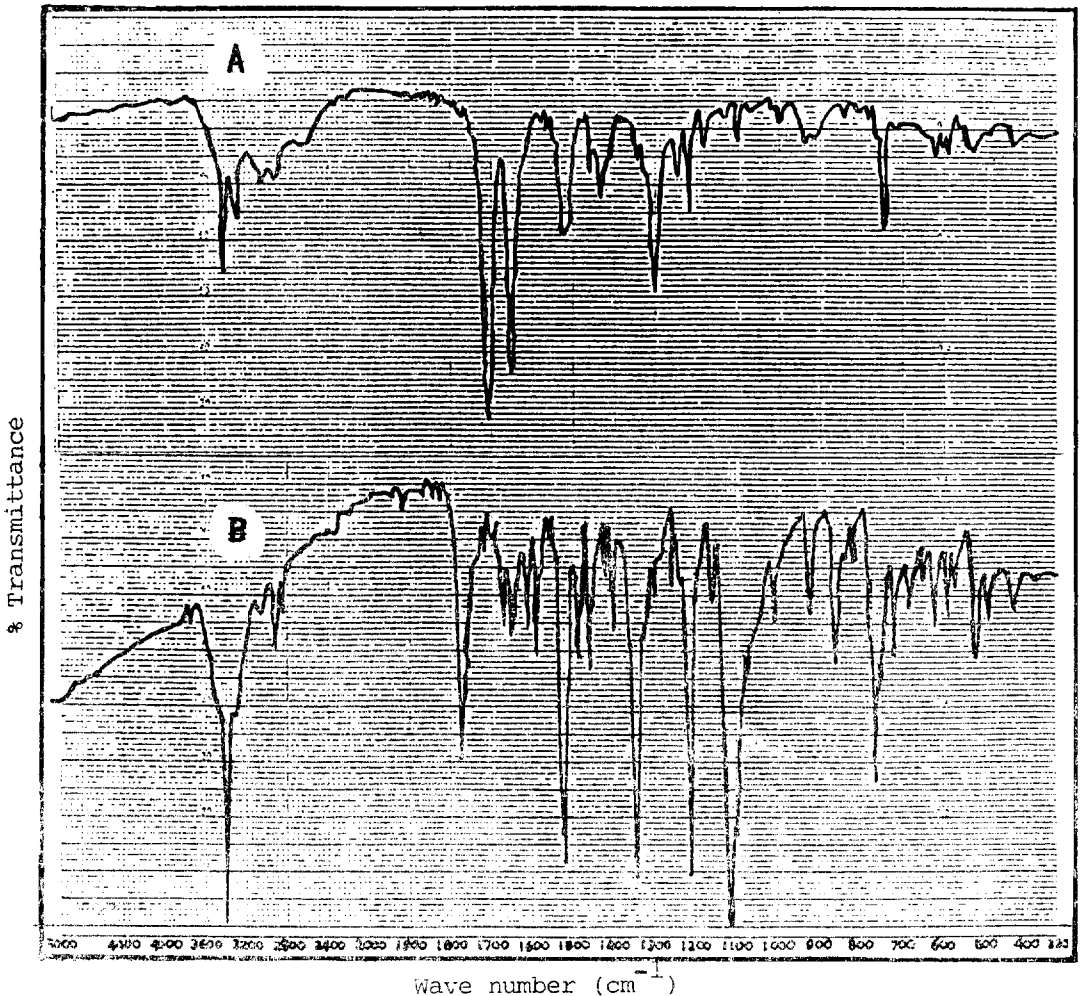


Fig. 2. IR spectra of IAA-glutamic acid(A) and IAA-PNP(B)

Table 5. Fractionation of IAA derivatives on silica gel column chromatography

Fraction	Compounds eluted ¹⁾
1	Indole-3-acetamide, indole-3-carboxylic acid, indole-3-aldehyde, indole-3-glyoxylamide, indole-3-glyoxylic acid, indole-3-acetone, indole-3-pyruvic acid, indole-3-methanol, indole-3-ethanol, oxindole, isatin, 2-methyl-indole, 3-methyl-indole, 5-methyl-indole, 7-methyl-indole, indole-3-propionic acid, IAA
2	Indole-3-acetamide (tail), indole, indole-3-acrylic acid
3	Indole-3-acetaldehyde, indole-3-lactic acid, tryptophan, indole-3-acetyl aspartic acid, indole-3-acetyl glutamic acid, (IAA-sugars)

1) Groups of derivatives eluted together in each of three fractions were identified by C₁₈ HPLC.

hing에 의한 吸收를, 1710 cm⁻¹에서 carbonyl C=O의

stretching에 의한 吸收를, 1655와 1430 cm⁻¹에서 $\begin{matrix} O \\ || \\ C-O \end{matrix}$

의 stretching에 의한 吸收를, 1520 cm⁻¹에서 $\begin{matrix} O \\ || \\ C-NH- \end{matrix}$ (trans)에 의한 吸收를 보여주고 있으며, 또 1455 cm⁻¹에서 CH₂ bending에 의한 吸收도 나타내고 있다.

IAA-PNP나 IAA-Glu의 UV spectrum은 IAA의 그것과 흡사하였으며⁽¹⁹⁾ 파장 280 nm에서 methanol 중 IAA-PNP의 吸收係數는 IAA의 吸收係數 5150 cm⁻¹M⁻¹ 보다 2.6배나 큰 값이었으나 IAA-Glu의 그것은 IAA 보다 약간 큰 6150 cm⁻¹M⁻¹이었다.

2. 완두 유묘중 IAA-아미노산의 확인

완두 줄기의 아세톤 추출물의 酸性分劃을 n-butanol 층에 모아 농축시키면 생체 8.5g 당 2 mg 안팎의 crude extract를 얻을 수 있었다. 이를 TLC, 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 그리고 Sep-Pak C₁₈ 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다(Fig. 1).

실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에서 표준 인돌 화합물들은 Table 5와 같이 3個群으로 나누어져 용출되었다. IAA는 F1 分劃에, IAA-아미노산 복합체들은 F3 分劃에 각각 용출되었다. 신호를 용매계 2에서 TLC한 다음 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피하여 IAA-아미노산 分劃을 모으고 다시 TLC하여 IAA-Asp와 IAA-Glu를 확인할 수 있었다(Fig. 3). 그들은 인돌 발색시약에 대하여 표준화합물과 동일하게 발색되었으며, TLC에서 발색의 강도로부터 판단한 결과 두 복합체는 그 수량에서 대등해보였다.

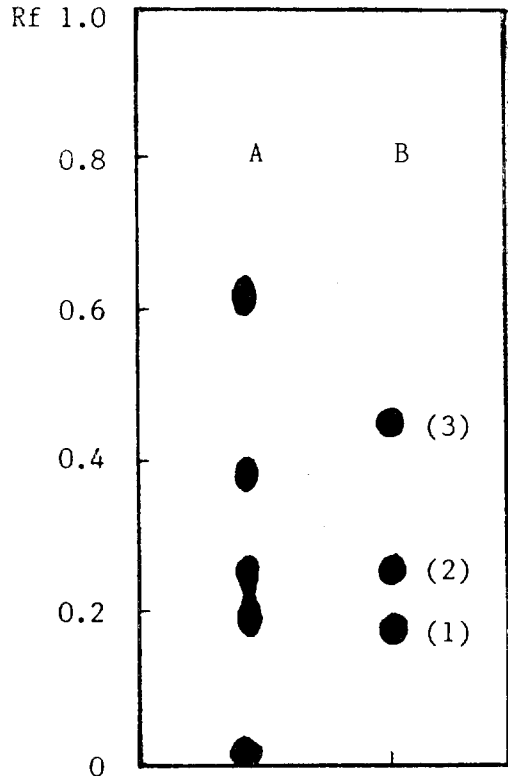


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of pea extract with solvent system 4 after silica gel partition chromatography (A) pea extract: (B) authentic standards; (1) IAA-Asp, (2) IAA-Glu, (3) IAA

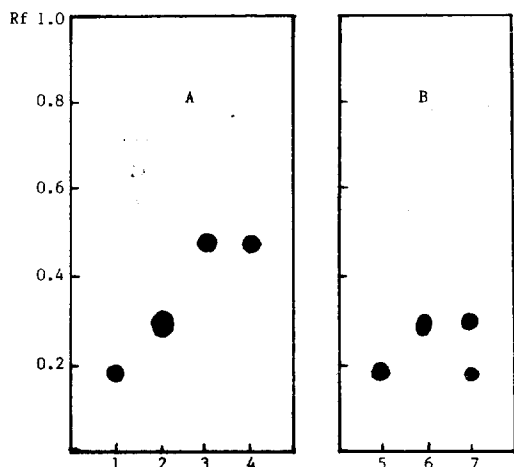


Fig. 4. Thin-layer chromatograms of hydrolyzates of pea seedlings

(A) was developed in solvent system 4 and sprayed with Ehmann reagent. (B) was developed in solvent system 9 and sprayed with ninhydrin. (1) IAA-Asp; (2) IAA-Glu; (3) IAA; (4) acidic ether fraction of plant hydrolyzates; (5) Asp; (6) Glu; (7) aqueous fraction of plant hydrolyzates

IAA-아미노산 分割을 모아 Ba(OH)₂로 알칼리 가수 분해시킨 다음 그 分解產物 즉 IAA 복합체의 母化合物을 TLC한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. ethylether 층에서 IAA를, 물층에서 aspartic acid와 glutamic acid를 확인하였다. 이들은 IAA-Asp와 IAA-Glu를 구성하는 母化合物이다. ethylether 층은 인돌 발색시약으로, 물층은 닌히드린 시약으로 발색시켰다.

Fig. 5는 시료추출물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (Fig. 5B) 또는 Sep-Pak C₁₈ 크로마토그래피한 (Fig. 5C)것을 HPLC하여 얻은 크로마토그램으로 표준 IAA-Asp와 IAA-Glu의 retention time과 일치하는 peak를 확인할 수 있었다. 부분 정제된 시료에서 IAA-Asp와 IAA-Glu로 인정되는 물질이 다른 간섭물질로부터 단축할만하게 분리되지는 않았지만 그 存在를 정성적으로 확인하는 데는 HPLC의 적용이 유용하였다.

다수의 생물시료에서 투여한 IAA가 IAA-Glu로 전환된다는 점은 *in vivo* IAA-Glu의 存在 可能性을 여전히 제시하는 것이었는데도, (15) 완두 유묘에서 IAA-Glu의 확인은 이것이 처음 있는 일이다. 그러면 왜 IAA-Glu는 *in vivo*에서 아직까지 동정되지 아니하였을까? 이는 많은 경우 컬럼 크로마토그래피나 TLC에서 IAA-Asp와 IAA-Glu는 서로 잘 분리되지 아니하며 (Table 3), 여러가지 발색시약과의 정색반응이 서로

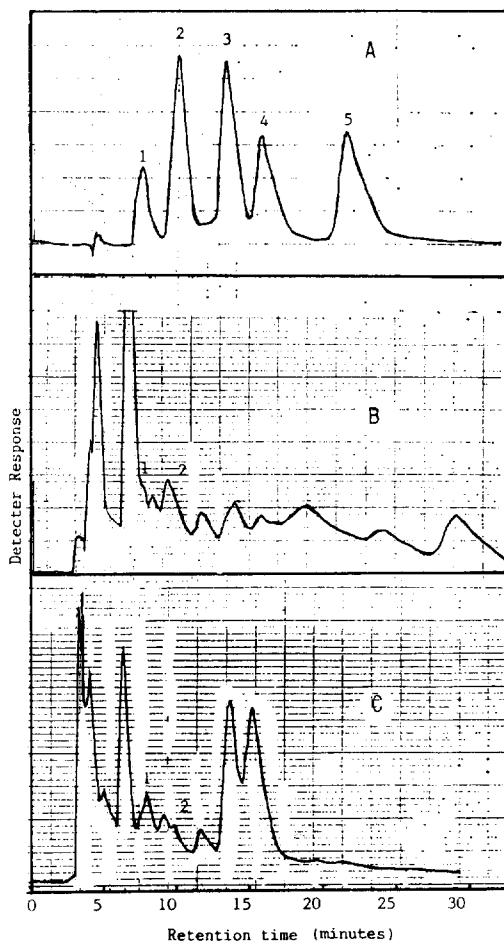


Fig. 5. HPLC of amino acid conjugates of IAA
 A : IAA-Asp(1), IAA-Glu(2), IAA-Lys(3), IAA-PNP(4), IAA-Trp(5) (standard)
 B : Pea extract partially purified by silica gel partition column chromatography
 C : Pea extract partially purified by Sep-Pak C₁₈ chromatography

다르지 아니하고 (Table 2), 가수분해 후에 母化合物의 分離에 충분한 용매계의 선택에 깊은 주의를 하지 않았던 (10,15) 때문으로 생각된다. 또 식물의 생육 단계에 따라 식물생장 호르몬의 質과 量은 변화하므로 IAA-Asp와 IAA-Glu의 細胞內에서의 대사 pattern이 서로 다르다면 어느 한 쪽만이 검출될 수도 있을 것이다. IAA-아미노산의 가수분해 정도는 복합체를 구성하는 아미노산의 종류에 따라 다르며 IAA-아미노산의 生物活性는 대부분이 그 가수분해의 결과 생성되는 유리 IAA에 기인한다는 보고와 (23,24) 외부에서 IAA를 투여하였을 때 먼저 IAA-Glu가 최대수준에 도달하고 다음에 IAA-Asp가 점점 증가하였다는 보고는 (5) 그들의 대

사 양상이 다소 다르다는 것을 제시하는 것이다.

IAA-Glu의 완전한 同定을 위해서는 GC-MS 또는 MS 로 그 分子量을 測定하는 일과 IR spectrum의 비교 확인, 그리고 IAA-Glu를 구성하는 glutamic acid의 입체배치의 확인이 남아있다. 본 실험에서는 표준품으로 IAA-Glu를 사용하였으나, D 또는 L형 여부는 분명치 않다. 만약 IAA-L-Glu와 IAA-D-Glu의 크로마토그래피 성질이 아주 비슷하다면 확인된 IAA-Glu 복합체는 IAA-D-Glu 또는 IAA-D-L-Glu일 가능성은 있게 된다. 그러나 Cohen은⁽¹⁴⁾ IAA-Asp가 L-型임을 해명한 바 있으며, 식물체에 L-型의 아미노산이 대부분이라는 점을 고려한다면 여기서 확인된 IAA-Glu는 IAA-L-Glu일 것으로 판단되었다.

요 약

식물체중의 IAA-아미노산 복합체를 확인하기 위하여 23종의 IAA-아미노산 복합체를 합성하여 이들의 UV와 IR spectra, TLC, HPLC 그리고 가수분해등 화학적 증거를 토대로, 암실재배한 완두 유묘의 줄기에서 IAA-Asp와 IAA-Glu를 잠정적으로 동정하였다. IAA-Asp는 식물체에서 IAA의 대사산물로 이미 확인된 化合物이지만 IAA-Glu는 아직 확인되지 않고 있다.

References

1. Andreae, W. A. and Good, N. E. (1955) : The formation of indoleacetyl aspartic acid in pea seedlings, *Plant Physiol.*, **30**, 380.
2. Feung, C. S., Hamilton, R. H. and Mumma, R. O. (1977) : Metabolism of indole-3-acetic acid. IV. Biological properties of amino acid conjugates, *Plant Physiol.*, **59**, 91.
3. Purves, W. K. and Hollenberg, S. M. (1982) : Metabolism of exogenous indole acetic acid to its amide conjugates in *Cucumis sativus* L., *Plant Physiol.*, **70**, 283.
4. Riov, J. and Gottlieb, H. E. (1980) : Metabolism of auxin in pine tissues: Indole-3-acetic acid conjugation, *Physiol. Plant.*, **50**, 347.
5. Goren, R., Bukovac, M. J. and Flore, J. A. (1974) : Mechanism of indole-3-acetic acid conjugation. No induction by ethylene, *Plant Physiol.*, **53**, 164.
6. Venis, M. A. (1972) : Auxin-induced conjugation system in peas, *Plant Physiol.*, **49**, 24.
7. Brenner, M. L. and Tonkinson, T. R. C. (1974) : Extraction and identification of L-N-[(1-naphthyl) acetyl] glutamic acid, a major product of naphthalene acetic acid metabolism in *Mechanism of Regulation of Plant Growth*, Bulletin 12, (Bioleski, R.L., Ferguson, A.R. and Cresswell, M.M., ed.), pp.759~64, Wellington, New Zealand.
8. Feung, C. S., Hamilton, R. H. and Mumma, R. O. (1973) : Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. V. Identification of metabolites in soybean callus tissue cultures, *J. Agric. Food Chem.*, **21**, 637.
9. Arjmand, M., Hamilton, R. H. and Mumma, R. O. (1978) : Metabolism of 2,4,5-trichloro-phenoxyacetic acid. Evidence for amino acid conjugates in soybean callus tissue. *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 1125.
10. Tillberg, E. (1974) : Occurrence of endogenous indole-3-acetyl-aspartic acid in light and dark-grown bean seedlings (*Phaseolus vulgaris*), *Physiol. Plant*, **31**, 271.
11. Row, V. V., Sanford, W. W. and Hitchcock, A. E. (1961) : Indole-3-acetyl-D,L-aspartic acid as a naturally-occurring indole compound in tomato seedlings, *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **21**, 1.
12. Law, D. M. and Hamilton, R. H. (1982) : A rapid isotope dilution method for analysis of indole-3-acetic acid and indole acetyl aspartic acid from small amounts of plant tissue, *Biochem. Biophys. Resear. Comm.*, **106**, 1035.
13. Olney, H. O. (1968) : Growth substances from *Ve ratrum tenuipetalum*, *Plant Physiol.*, **43**, 293.
14. Cohen, J. D. (1982) : Identification and quantitative analysis of indole-3-acetyl-L-aspartate from seeds of *Glycine max* L., *Plant Physiol.*, **70**, 749.
15. Cohen, J. D. and Bandurski, R. S. (1982) : Chemistry and physiology of the bound auxins, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **33**, 403.
16. Corcuera, L. J. and Bandurski, R. S. (1982) : Biosynthesis of IAA-myo-inositol arabinoside in kernels of *Zea may* L., *Plant Physiol.*, **70**, 1664.
17. Kress, K. G., Heusser, D. and Wimmer, H.

- (1969) : Spray reagents in *Thin-layer Chromatography: A Laboratory Handbook*, (Stahl, E. ed.), pp. 854~905, Springer, Berlin.
18. Ehmann, A. (1977) : The van Urk-Salkowski reagent—A sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives, *J. Chromatogr.*, **132**, 267.
19. Mollan, R. C., Donnelly, D. M. X. and Harmey, M. A. (1972) : Synthesis of indole-3-acetyl aspartic acid, *Phytochemistry*, **11**, 1485.
20. Magnus, V., Simaga, S., Iskric, S. and Kveder, S. (1982) : Metabolism of tryptophan, indole-3-acetic acid, and related compounds in parasitic plants from the Genus *Orobancha*, *Plant Physiol.*, **69**, 853.
21. Holland, S. M., Chappell, T. G. and Purves, W. K. (1981) : High performance liquid chromatography of amino acid conjugates of indole-3-acetic acid. *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 1173.
22. Pouchert, C. J. (1981) : *The Aldrich Library of Infrared Spectra* (edition III), Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin.
23. Hangarter, R. P. and Good, N. E. (1981) : Evidence that IAA conjugates are slow-releasing sources of free IAA in plant tissues, *Plant Physiol.*, **68**, 1424.
24. Bialek, K., Meudt, W. J. and Cohen, J. D. (1983) : IAA and IAA-conjugates applied to bean stem sections. IAA content and the growth response, *Plant Physiol.*, **73**, 130.