

## 녹두발아 중에 생성되는 Indole 화합물에 대하여

李春寧·趙仁鎬\*·金仁洙

서울대학교 농과대학 농화학과

전북대학교 문리과대학 화학과\*

### Some Observations on the Indole Compounds in Mung Bean Sprouts.

(1972. 3. 10. 수리)

C.Y. Lee, I.H. Cho,\* I.S.Kim

Dept. of Agr. Chemistry,  
Seoul National University

\*Dept. of Chemistry  
Cheun Pook University

(Received Mar. 10. 1972)

#### SUMMARY

The naturally occurring indole derivatives in mung bean (*Phaseolus vidissinus*) sprouts were investigated by means of paper and thin layer chromatographic techniques.

The results can be summerized as follows:

1. The mung bean sprouts are richer in free tryptophan than other plant species.
2. Indole ethanol and indole lactic acid were identified.
3. The content of indole ethanol was more than that of indole acetic acid. This result appeared to support the idea that indole ethanol is the storage product of indole acetic acid.

#### 머릿말

1935년 Thimann<sup>(1)</sup>이 *Rhizopus suinus*가 indole acetic acid (IAA)의 생합성에 tryptophan이 요구되며, 중간 대사물질로서 indole pyruvic acid (IpyA)가 존재한다고 제안한 이후 indole화합물의 생합성 및 대사에 관하여 많은 연구가 발표되고 있다.

Tryptophan을 출발 물질로 하는 IAA의 생합성은 일반적으로 IpyA, indole acetaldehyde (IAAld)를 중간산물로 이루어지는 것이 주 경로로 밝혀져 있지만, <sup>(2)</sup> <sup>(3)</sup> <sup>(4)</sup> <sup>(5)</sup> <sup>(6)</sup> <sup>(7)</sup> 그 외에 indole acetamide (IAM), <sup>(8)</sup> tryptamine (TNH<sub>2</sub>) <sup>(9)</sup> indole ethanol (IEtOH) 및 indole lactic acid (ILA) <sup>(10)</sup> <sup>(11)</sup> 등의 중간 대사물질이 미생물에서 발견되었으며, 양배추에서 indole-acetonitrile (IAN) <sup>(10)</sup> <sup>(11)</sup>과 IAM가, 수박, <sup>(12)</sup> 도마도, <sup>(14)</sup> 담배 <sup>(15)</sup>의 발아과 정에서

TNH<sub>2</sub>이, IAA의 전구체로 존재함이 보고되었다. 그런데 근자에 와서 미생물에서는 일찍 tryptophan 대사산물로 알려진 IEtOH와 ILA가 도마도, <sup>(14)</sup> 완두, <sup>(16)</sup> 오이 <sup>(17)</sup> 등 식물체의 발아과정에서 발견되어, IEtOH와 ILA가 tryptophan대사산물로 식물체에도 존재하는가는 관심의 대상이 되고 있다.

본 실험에서는 녹두나물이 비교적 많은 양의 유리 tryptophan을 함유하고 있음을 알아내고, 더 나아가 이 화합물의 대사산물인 indole 유도체의 탐색을 시도하였던 바 IEtOH와 ILA에 대한 약간의 결과를 얻었기에 보고하기로 한다.

#### 실험재료 및 방법

1. 시료, 녹두(*Phaseolus vidissinus*)를 암실에서 7일간 발아시킨 녹두나물을 시료로 하였다.

2. 실험방법

유리아미노산의 추출

아래의 2가지 방법으로 paper chromatography 용 시료를 추출하였다.

에타놀 추출 :

시료 10g을 평량하여 30ml의 70%에타놀과 같이 마쇄하여 상온에서 2시간 동안 진탕한 후 원심분리하는 조작을 3회 반복하여 얻은 에타놀 층을 모두 합하여 -15°C에 보관하였다.

시료를 직접 homogenizer로 마쇄하여 즙액을 취하였다.

Indole화합물의 추출

Rayle방법<sup>(18)</sup>에 준하여 아래와 같이 약간 변경하였다. 즉 시료 300g을 평량하여 mortar로 마쇄한 후 300ml의 에칠에테르를 가하여 1시간 동안 진탕하고, 원심분리하는 조작을 3회 반복하여 얻은 에테르 층을 상온에서 감압 농축한 후 30ml의 80% 에타놀에 녹여 thin layer chromatography용 시료로 하고, 이를 -15°C에 보관하였다.

유리 아미산 및 tryptophan의 paper chromatography.

유리 아미노산 분리는 에타놀 추출액과 즙액을 각각 whatman No.1 여지 (20×20cm)로 Sae등<sup>(20)</sup>에 의한 방법으로 각각 6시간씩 2차 전개하였다. 1차 전개용매로는 n-butanol: methyl ketone: water: 28% ammonia (25 : 17 : 7 : 3 v/v)를 2차 전개 용매로는 n-butanol:acetic acid : water (4 : 1 : 5 v/v)을 사용하였고, 발색시약으로 ninhydrin (in ethanol)과 ninhydrin cupric acetate<sup>(21)</sup>을 사용하였다.

Tryptophan의 분리는 에타놀 추출액을 whatman No.1여지로 1차 전개하였다. 전개 용매는 n-butanol:acetic acid : water (4 : 1 : 5v/v)와 isopropanol: 25% ammonia:water (20 : 1 : 2v/v)를 사용하였고 발색시약은 Ehrlich reagent를 사용하였다.

(Ehrlich reagent: p-dimethylaminobenzaldehyde 1g+acetone 90ml+conc-HCl 10ml)

Tryptophan의 정량

Graham등<sup>(22)</sup>에 의한 개량된 Bates의 tryptophan 정량 방법을 사용하였다.

Indole화합물의 thin layer chromatography

Stahl<sup>(23)</sup>의 방법에 의하여 1/30 M-phosphate buffer (pH5.3)로 겔 Silica gel G (E. Merck제품)를 250m $\mu$  두께로 입힌 plate로 1차 전개하였다.

전개용매는 다음의 8가지 system을 사용하였다.

1. Isopropanol-NH<sub>4</sub>OH-H<sub>2</sub>O(8 : 1 : 1 v/v)<sup>(24)</sup>

2. CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>COOH (96%) (95 : 5, v/v)<sup>(25)</sup>

3. Benzene-acetone (90 : 10 v/v)<sup>(26)</sup>

4. n-Butanol-CH<sub>3</sub>COOH-H<sub>2</sub>O(65 : 13 : 22, v/v)<sup>(27)</sup>

5. CHCl<sub>3</sub>-methanol-CH<sub>3</sub>COOH(75 : 20 : 5, v/v)<sup>(28)</sup>

6. CHCl<sub>3</sub>-methanol (93 : 7, v/v)<sup>(29)</sup>

7. Isopropanol-NH<sub>4</sub>OH-H<sub>2</sub>O (10 : 1 : 1, v/v)<sup>(4)</sup>

8. Aqua distilled<sup>(4)</sup>

발색시약은 다음의 4가지를 사용하였다.

1. Van-urk reagent (modified Ehrlich reagent for TLC; p-dimethyl amino benzaldehyde 1g+96%·EtOH 50ml+conc-HCl 50ml)

2. Salkowski reagent(35% HClO<sub>4</sub> 50ml+0.5M-FeCl<sub>3</sub> 1ml)

3. Nitrite (0.5%-NaNO<sub>2</sub> in 35% HClO<sub>4</sub>)

4. Ferri-cyanide (0.5% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 50ml+conc-HNO<sub>3</sub>50ml)

## 결과 및 고찰

### 1. 유리 아미노산 및 tryptophan의 paper chromatography

녹두나물의 에타놀 추출액과 즙액의 유리 아미노산 paper chromatography의 pattern은 비슷하였으며 그 결과는 Fig.1과 같다.

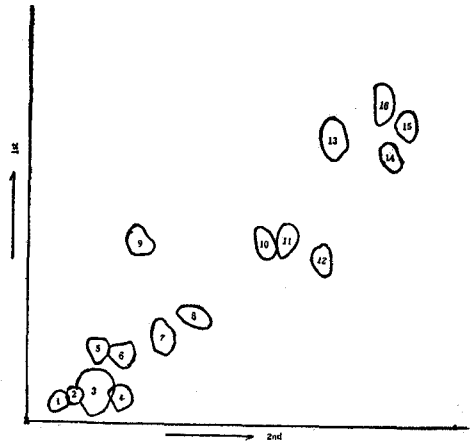


Fig.1. Tow dimensional paper chromatography of the free amino acids from mung bean seedlings;

1. Cystine, 2. Lysine, 3. Asparagine, 4. glycine, 5. histidine, 6. serine, 7. alanine, 8. proline, 9. threonine, 10. tyrosine, 11. valine+methionine, 12. unknown (purple color), 13. tryptophan, 14. phenylalanine, 15. leucine+isoleucine, 16. unknown (yellow color).

Fig.1에서 보는 바와 같이 tryptophan의 spot는 다른 아미노산에 비하여 큰 편이었는데 ninhydrin-cupric acetate로 발색시켰더니 밝은 녹색을 띤 자색으로 나타났다. 아미노산의 동정에서 ninhydrin-cupric acetate는 각 아미노산 별로 발색되는 색깔이 서로 달라 ninhydrin 보다 좋은 효과를 나타냈다.

Tryptophan의 확인을 위해 에타놀 추출액을 1차 전개하여 Ehrlich 시약으로 발색시켰더니 발색 후 30분 이내에 tryptophan이외에 1개의 보라색 spot와 1개의 노란색 spot가 나타나고, 24시간 경과 후에는 노란색 spot가 2개 더 나타났다. (Fig. 2)

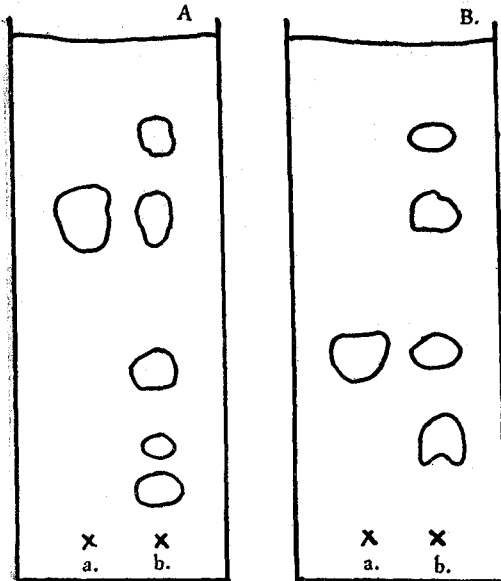


Fig.2. One dimensional paper chromatogram of indole compounds from 70% ethanol extracts of mung bean sprouts; a: tryptophan, b: 70% ethanol extracts. Solvent A: n-butanol-CH<sub>3</sub>COOH-H<sub>2</sub>O(4 : 1 : 5) Solvent B: isopropanol-NH<sub>4</sub>OH-H<sub>2</sub>O(20 : 1 : 2)

이로써 녹두나물에는 tryptophan 이외에 다른 indole화합물이 존재함을 인정하였다.

## 2. Tryptophan의 정량

Graham<sup>(22)</sup>의 방법으로 녹두나물의 유리 tryptophan 및 알카리 가수분해물의 tryptophan 양을 정량한 결과, 녹두나물의 생체중으로 각각 0.013%와 0.027%로서 tryptophan이 비교적 많이 함유되어 있음을 확인 하였다.

## 3. Thin layer chromatography에 의한 indole 화합물의 분리 동정.

녹두나물의 에테르 추출물의 indole 화합물을 TLC와 여러가지 발색시약으로 분리 동정하였다. Indole 화합물의 분리는 각 문헌에 명시된 Rf치와 비교하여 동정하되, 문헌상의 각 Rf치의 실험조건에 따른 신빙도로 검정하기 위한 간접적인 방법으로 본 실험실에서 입수할 수 있는 indole 화합물의 TLC를 행하여 문헌에 명시된 Rf를 확인하였다. 시료의 각 용매에 대한 TLC증 isopropanol-NH<sub>4</sub>OH-H<sub>2</sub>O용매에 대한 결과는 Fig.3과 같고, 또 시료증 각 indole화합물의 Rf치와 문헌상의 Rf치를 비교 표시한 결과는 Fig.4와 같다.

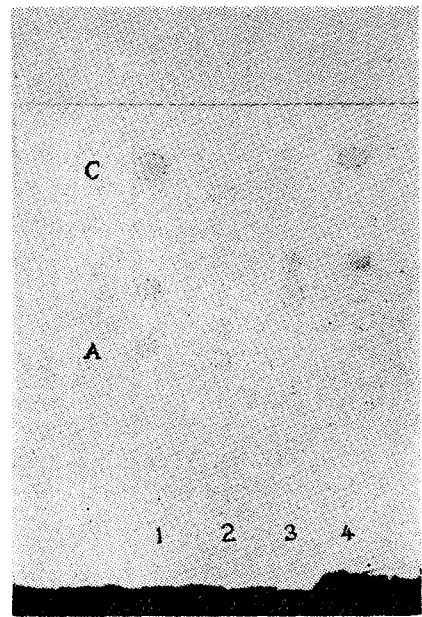


Fig. 3. Thin layer chromatogram of ether extracts in mung bean sprouts and standard substances, using isopropanol-NH<sub>4</sub>OH-H<sub>2</sub>O (80 : 10 : 10) solvent system; 1-A: tryptophan, 1-B: indole propionic acid, 1-C: indole acetonitrile, 2: ether extracts of mung bean sprouts, 3-A: indole acetic acid, 3-B: tryptamine, 3-C: indole acetaldehyde, 4-A: anthranilic acid, 4-B: indole butyric acid, 4-C: indole.

solvent	isopropanol- NH <sub>4</sub> OH-H <sub>2</sub> O, 80+10+10	CHCl <sub>3</sub> - CH <sub>3</sub> COOH, 95+5	benzene-acetone, 90+10	n-butanol- CH <sub>3</sub> COOH-H <sub>2</sub> O, 65+13+12	CHCl <sub>3</sub> -methanol- CH <sub>3</sub> COOH, 75+20+5	CHCl <sub>3</sub> -methanol, 93+7	isopropanol NH <sub>4</sub> OH-H <sub>2</sub> O, 10+1+1	aqua distilled
ref.	24	25	26	27	28	29	4.	4.
1								
Rf values	a. b.	a. b.	a. b.	a. b.	a. b.	a. b.	a. b.	a. b.

Fig. 4. Thin layer chromatographic separation of indole derivatives of ether extracts in mung bean sprouts on silica gel G; comparison of Rf values of mung bean factors and references.

a: mung bean factors, b: references. Try: tryptophan, IEtOH: indole-3-ethanol, ILA: indole-3-lactic acid, 1. indole-3-acetic acid, 2. indole-3-carboxylic acid, 3. indole-3-aldehyde, 4. indole-3-acetonitrile, 5. indole-3-acetamide, 6. indole-3-acetaldehyde, 7. indole-3-butyric acid, 8. indole-3-propionic acid, 9. tryptamine, 10. indole.

Fig. 4의 결과에서 녹두나물의 indole 화합물은 tryptophan, IEtOH, ILA로 추정된다.

이들 indole 화합물의 발색시약에 대한 변화는 Van-Urks시약에 대하여 Stahl<sup>(23)</sup>의 문헌 상에는 green-blue (tryptophan), grey-yellow (IEtOH), blue (ILA)이나, Stowe<sup>(34)</sup>에 의하면 모두 purple이라고 한다. 본 실험에서는 purple(tryptophan)과 grey-violet (IEtOH), 그리고 ILA로 추정되는 부분은 발색 후 처음에는 pink-violet이며 이어 곧

grey-blue로 변화되는 특색을 갖고 있다. 이와 같은 근소한 색깔의 차이는 전개용매에 따른 변화로 간주된다. <sup>(34)</sup>

Salkowski시약에는 brown-orange (tryptophan)와 grey-yellow (IEtOH, ILA)로 발색되었다. 그리고 IEtOH로 추정되는 부분은 nitrite에 yellow-orange 색을 ferri-cyanide에 brownpink색을 나타내었다.

이상과 같은 결과로써 녹두나물의 에테르 추출

물에는 indole화합물로서 tryptophan과 IEtOH가 존재하고 ILA로 추정되는 물질이 존재함을 알았다. 이 외에도 흔적으로 나타나는 IAA와 미지의 두세가지 indole화합물이 존재하였다.

Tryptophan에서 IAA 생합성의 경로는 미생물과 식물체 양면에서 많은 연구가 되어 왔는데 현재까지 밝혀진 경로를 종합하면 Fig. 5와 같다.

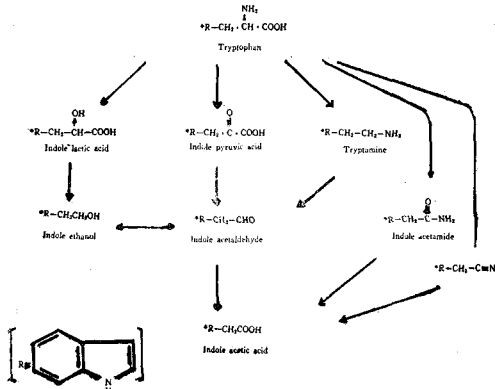


Fig. 5. Summary of possible pathways in the biosynthesis of indole-3-acetic acid from tryptophan.

이와 같은 여러가지 대사경로 중 IEtOH와 ILA가 *Agrobacterium tumefaciens*,<sup>(8)</sup> *Diplodia natalensis*<sup>(9)</sup>, *Acetobacterium xylinum*<sup>(3)</sup>과 같은 미생물에서 tryptophan대사 물질로 동시에 나타남을 밝혔는데 식물체에서는 1961년 Libbert와 Brun<sup>(16)</sup>이 완두 발아과정에서 추출한 효소를 tryptophan과 같이 배양할 때 IEtOH가 생성되는 것을 확인하고, 1964년 Wightman<sup>(14)</sup>이 도마도의 발아과정에서 tryptophan 또는 ILA를 가하여 주면 IEtOH와 IAA가 생성되는 것을 확인하였다. 즉 IAA가 탈탄산화되어 IEtOH가 되고, 골 산화되어 ILA가 생성되는 것을 확인함으로써 tryptophan에서 IEtOH와 ILA를 거쳐 IAA가 생성되는 대사경로가 식물체에도 존재할 것임을 제안하였다. 1967년에는 Rayle과 Purves<sup>(17)</sup>가 오이씨의 발아과정 중 생체 내에서 IEtOH를 분리하고, 동시에 ILA의 분리를 시도하였으나 실패에 그쳤다.

그러나 1968년 Wightman과 Cohen<sup>(6)</sup>은 녹두 발아과정에서 추출한 효소를 사용하여 tryptophan이 ILA, IPyA, IAAld로, IAAld가 IEtOH와 IAA로 전화되는 것을 확인함으로써 다시 식물체에도 ILA와 IEtOH가 존재할 것임을 시사하였다.

그 외에도 수박<sup>(13)</sup> 담배<sup>(15)</sup> 등의 발아과정에서

IEtOH가 tryptophan의 대사물질로 밝혀졌는데 IEtOH 생성의 주 경로는 tryptophan에서 IPyA, IAAld를 거쳐 IEtOH로 되는 경로가 인정되고 있으나 TNH<sub>2</sub>를 거쳐서 IEtOH로 되는 경로<sup>(32)</sup>도 있으며, 또 위에서 언급한 바와 같이 ILA를 중간산물로 하여 IEtOH가 생성되는 경로가 미생물에서는 존재하지만 식물체에도 존재하는 것인가는 관심의 대상이 되고있다<sup>(14)</sup> 녹두나물의 생체 내에서 indole화합물의 분리를 시도한 본 실험에서 비교적 많은 양의 tryptophan과 IEtOH를 분리 증명하고, ILA로 추정되는 물질과 흔적으로 나타나는 IAA를 확인하였는바 Wightman과 Cohen<sup>(6)</sup>의 연구결과에 비추어 보아 이들 화합물이 녹두나물에서 tryptophan으로부터 유래하는 대사산물로 추정할 수 있다.

본 실험에서 IEtOH가 IAA보다 많은 양으로 나타나는 것은 녹두나물에서 tryptophan대사를 연구한 효소실험 결과<sup>(6)</sup>와 일치하고 있다. 즉 IAA가 식물 생체 내에서 성장 조절제의 역할을 하지만 그 양이 과다하면 식물체에 대하여 독성을 나타내므로 IAA-aspartate,<sup>(35)</sup> IAA-glucose,<sup>(36)</sup> IAA-lysine<sup>(33)</sup> 등의 복합체를 형성하여 그 독성을 감소시키기도 하지만 IEtOH의 생성도 한 방편으로 생각된다.<sup>(32)</sup> 즉 IEtOH는 tryptophan에서 IAA생합성 대사물질 중 다른 화합물보다 안전할 뿐만 아니라 IAA와는 달리 식물체 내에 고 농도로 존재하여도 독성이 없으며, 또 IAA가 요구될 때 쉽게 IAA로 전화될 수 있기 때문에 저장물질이나 최종산물로서 유리할 것이다.

본 실험에서 추정된 ILA는 Wightman<sup>(14)</sup>이 제안한 바와 같이 tryptophan에서 ILA를 거쳐 IEtOH로 되는 대사과정이 식물체에도 존재할 가능성을 시사해 주는 것이다.

## REFERENCES

1. Thimann, K.V., F. Biol. Chem. **109**, 279 (1935)
2. Winter, A., Arch. Biochem. Biophys. **106**, 131 (1964)
3. Larsen, P., A. Harbo, S. Klungsöyr and T. Aasheim, Plant Physiol. **15**, 552. (1962)
4. Libbert, E., E. Fischer, A. Drawert and R. Schröder Physiol. Plant. **23**, 278 (1970)
5. Wightman, F. and D. Cohen, Biochem. Physiol. Plant Growth Substances (F. Wightman and G. Setterfield ed. 1968) Ottawa,

6. Magie, A.R., E.E. Wilson and T. Kosuge, *Science*, **141**, 1281 (1963)
7. Parley, J.E. and B.B. Stowe, *Biochem. J.*, **100**, 169. (1966)
8. Karper, J.M. and H. Veldstra, *Biochem. Biophys. Acta*, **30**, 401 (1958)
9. Bailey, G.B., A.C. Gentile, *Plant Physiol.*, **37**, 439 (1962)
10. Wightman, F., *Can. F. Bot.*, **40**, 689 (1962)
11. Jones, E.R.H., G.B. Henbest, G.F. Smith and J. A. Bentley, *Nature*, **169**, 485 (1952)
12. Riddle, V.M. and M. Mazelis, *Plant Physiol.*, **40**, 481 (1965)
13. Dannenburg, W.N. and J.L. Livermann, *Plant. Physiol.*, **32**, 263 (1957)
14. Wightman, F., Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, pp191-211 (1964)
15. Phelps, R.H. and L. Sequeira, *Plant Physiol.*, **42**, 1161 (1967)
16. Libbert, E. and K. Brunn, *Naturwiss*, **48**, 741 (1961)
17. Rayle, D.L. and W.K. Purves, *Plant Physiol.*, **42** 520 (1967)
18. *Ibid* **42**, 1091 (1967)
19. Lawrence, J.E., K.M. Day and J.E. Stephenson, *Plant Physiol.*, **34**, 668 (1958)
20. Sae, S.W. and B.A. Cunningham, *J. Chem. Edu.*, **48**, 275 (1971)
21. Moffat, E.D. and R.I. Lytle, *Anal. Chem.*, **31**, 926
22. Graham, C.E., E.P. Smith, S.W. Hier and D. Klein *J. Biol. Chem.*, **167**, 711. (1947)
23. Stahl, E., *Thin Layer Chromatography*, New York, pp 477. (1969)
24. Stowe, B.B. and K.V. Thimann, *Arch. Biochem. Biophys.*, **51**, 499 (1954)
25. Cotte, I., M. Chetaille, J. Poulet and I. Christianses, *J. Chromatog.*, **19**, 312 (1965)
26. Eich, E. and H. Rochelmeyer, *Pharm. Acta. Helv.* **41**, 109 (1966)
27. Opienska-Blauth, J., H. Krackowski, H. Brzuszkiewicz. and Z. Aahorske, *J. Chromatog.*, **17**, 288 (1965)
28. Diamantstein, T. and H. Ehrhart Hoppe-Seyler *A. Physiol. Chem.*, **326**, 131 (1961)
29. MCISAAC, W.M., G. Farrell, R.G. Taborsky and A.N. Taylor, *Science*, **148**, 102 (1965)
30. Libbert, I., S. Wichner, E. Kuerst, W. Kaiser, R. Kunert, A. Maniske, R. Manteuffel, E. Riecke and R. Schröder, *Biocem. Physiol. Plant Growth Substances* (F. Wightman and G. Setterfielded. 1968) Ottwa, pp213.
31. Phelps, R.H. and L. Sequera, *Ibid.*, pp 197
32. Rayle, D.L. and W.K. Purves, *Ibid.*, pp 153.
33. Hutzinger, O. and T. Kosuga, *Ibid.*, pp183.
34. Stoe, B.B. and K.V. Thimann, *Arch. Biochem. Biophys.*, **51**, 499 (1954)
35. Kendall, J.H. and C.K. Park., *Ann. Bot.*, **35**, 565 (1971)
36. Zenk, M.H., *Nature*, **191**, 493. (1961)