

(第 2 報) 發芽綠豆中の 未知窒素化合物에 關하여

(Part 2) Unknown Nitrogen Compound  
in Germinating Mung Bean.

A ninhydrin positive substance (formed during germination of Mung Bean) which on a 2-dimensional chromatography (BuOH-HAc, and PhOH-NH<sub>2</sub>) gave a spot above glutamic acid was isolated by cutting out the appropriate spot on the paper and extracting the paper with water.

Hydrolysis of this substance with 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> or 3N HCl at 120°C for 15 hours gave the spot of mainly glutamic acid, alanine and very faint of glycine and cysteine on a paper chromatography.

It is suggested that the reaction of  $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl-glycine + L-alanine in the presence of  $\gamma$ -glutamyl transferase  $\rightarrow$   $\gamma$ -glutamyl-alanine + cysteinyl-glycine, takes place in germinated Mung Bean.

緒 論

發芽綠豆의 遊離아미노酸의 二次元 及 圓形페퍼크로마토그래피(paper chromatography)에서 닌히드린(Ninhydrin)에 陽性인 物質 21 個를 檢出하였다 함은 1 報에서 論한바와 같다.

21 個中 3 個의 R<sub>f</sub> 値는 既知 아미노酸들의 R<sub>f</sub> 値와 一致하지 않는 未知物이었으며 그 中의 하나인 第 1 報 그림 2의 A는 發芽前의 綠豆에는 전혀 含有되지 않고 綠豆가 發芽함에 따라 비로소 새로 生成되었다는 것도 이미 報告하였다. 그런데 Virtanen<sup>1)</sup>이 發芽豌豆에서 發見한  $\gamma$ -글루타미알라닌( $\gamma$ -Glutamyl-Alanine)의 크로마토그램(Chromatogram)에서의 位置가 著者들의 크로마토그램에서의 A의 位置와 거의 같기는 하였으나 A의 R<sub>f</sub> 値가 多少 異なり 또  $\gamma$ -글루타미알라닌이 흔히 自然界에 分布되어 있는 것이 아니고 植物體에서는 Virtanen이 처음 發見한 것인 만큼 크로마토그램에서의 斑點의 位置가 近似한 理由만으로 이것들이 同一物質이라고는 말할 수 없을 것이다.

本 實驗에서는 이 A를 抽出 究明하였는데 本質을 完全히 밝혀지는 못하였으나 알려진에 까지만 우선 本報에서 報告하는 바이다.

實 驗

A. 試 料

新穀 綠豆를 1 報에서 論한 것처럼 暗室에서 栽培하

였다. 含水量이 가장 많이 增加하는 3 日째의 發芽綠豆 100 個를 採取하여 種皮를 除去하고 子葉 胚芽部를 함께 mortar로 갈아서 50 ml의 75% 에칠알콜을 붓고 約 2 時間 放置하였다가 30 分間 遠心分離(1500 rpm)하고 上澄液을 徐徐히 蒸發 除去하여 黃褐色의 固形物을 얻었다. 여기에 10 ml의 10% 이소프로필알콜(Isopropyl Alcohol)을 加하고 1 時間 동안 때때로 저어주면서 散置하여 아미노酸을 溶出시킨 다음 遠心分離하고 蒸發시켰다. 다시 3 ml의 蒸溜水를 부어 아미노酸 水溶液을 만들어 試料로 하였다.

B. 未知物의 分離

22×22 cm의 濾紙(Whatman No1)에 그림 1처럼 下邊에서 2 cm 되는 直線上에 血球測定用 마이크로피펫(Micropipett)으로 試料液을 발랐다. 이때에 試料液이 넓이 約 3 mm로 퍼질 程度의 速度로 濾紙의 先端을 鉛筆로 그은 直線을 따라 움직였다. 이것을 微溫에서 乾燥시키고 다시 같은 操作을 되풀이 하므로써 一枚의 濾紙에 0.3 ml 程度의 試料를 取하였다. 이렇게 10 枚의 展開用 濾紙를 만들어 石炭酸:0.1% 암모니아(8:2)를 溶媒로 써서 데시케타(Desiccator)에서 19 cm 展開시켰다. 室溫에서 約 30 時間 溶媒를 完全 乾燥시키고, 이 溶媒에 對한 A의 R<sub>f</sub> 値 0.38 附近을 넓이 2 cm로 옆으로 即 그림 1의 點線을 折랐다. 蒸溜水 100 ml를 5 회에 나누어 이물 10 枚의 濾紙片을 濾液 抽出하여 注意깊게 蒸發 濃縮시켰다. 이 溶液은 石炭酸-암모니아에 對하여 A와 近似한 R<sub>f</sub> 値를 가진 物質

물 卽 A, 그루타민酸(Grutamic Acid), 그리신(Glycine), 세린(Serine), 아스파라긴(Asparagine)와 混合溶液일 것이다. 다음 역시 처음과 같은 方法으로 그림 2 처럼 3 枚의 濾紙에 下邊에서 2cm 되는 直線上에 上記의 抽出液을 바르고 이것으로부터 2cm 떨어진 兩測의 點에 各各 같은 試料를 取하고 부질알콜:水醋酸:물(4:1:5)의 上部液을 溶媒로 하여 19cm 展開하였다. 室溫에서 15時間 乾燥시키고 分離度를 높이기 爲하여 上記의 溶媒로 처음과 같은 方向으로 展開를 2回 反覆하였다. 이렇게 展開가 끝난 濾紙의 溶媒를 乾燥한 다음 그림 2 처럼 縱點線을 따라 兩測을 잘라서 0.2% 닌히드린(Ninhydrin)의 靑질알콜 溶液을 뿌려 100°C로 五分間 加熱 發色하여 A의 位置를 찾아냈다. 다음 中央의 넓은 濾紙에서 이 發色部分에 對應하는 部分을 넓이 2cm 로 옆으로 잘라냈다.

이것들을 처음과 마찬가지로 50ml의 蒸溜水를 五回로 나누어 沸騰 抽出하고 2ml로 濃縮하였다. 이 中의 一部를 一次 溶媒 石炭酸:0.1% 암모니아(8:2), 二次 溶媒 부질알콜:水醋酸:물(4:1:5)를 써서 二次元 展開한 크로마토그램(Chromatogram)이 그림 3이다. 여기서 보는 것처럼 抽出溶液 中에는 少量이나마 未知物 A가 相當히 濃縮되어 있고, 그루타민酸이 極微量 混合되어 있음을 알 수 있다.

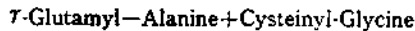
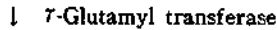
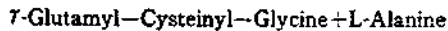
C. 未知物의 性質 및 考察

(1) 22×22cm의 濾紙 下邊에서 2cm 되는 곳에 3cm 간격으로 試料液을 取해서 부질알콜:水醋酸:물(4:1:5)로 展開한 後 乾燥하여 試料를 取한 곳을 따라 濾紙를 길이로 切斷하여 各 紙片에 對하여 實驗한 結果 이 未知物은 坂口反應<sup>2)</sup>, KMnO<sub>4</sub>反應<sup>3)</sup>에 陰性이었고 I<sub>2</sub>反應<sup>4)</sup>과 이사틴(Isatin)反應<sup>5)</sup>에 陽性이었다.

(2) 抽出溶液을 2개의 直徑 1.5cm, 길이 15cm의 유리管에 1ml씩 넣고 1個에는 6N 鹽酸 1ml를, 다른 1個에는 4N 硫酸 1ml를 넣었다. 卽 3N의 鹽酸 溶液과 2N의 硫酸溶液이 되게 하고 유리管을 封하고 120°C로 15時間 加熱하여 加水分解시켰다. 加水分解가 끝난 後, 硫酸 加水分解物에는 Ba(OH)<sub>2</sub>을 加하고 生成된 BaSO<sub>4</sub>를 遠心分離하므로써 硫酸을 除去하였다. 鹽酸 加水分解物은 蒸發집시에서 蒸溜水를 加하고 徐徐히 加熱 蒸發시킨 다음 다시 蒸溜水를 加하고 蒸發시키는 操作을 7~8回 反覆하므로써 鹽酸을 거의 完全히 除去하였다. 이렇게 하여 만든 試料들을 二次元 으로 展開하였는데, 鹽酸 加水分解와 硫酸 加水分解는 結果가 같았으며, 그림 4가 이것의 크로마토그램

(Chromatogram)이다. 加水分解前의 크로마토그램 그림 3과 比較하여 볼 때 A는 加水分解에 依하여 減少하기는 하였으나 少量 남아 있으며 그루타민酸의 斑點이 強하여졌고 아라닌(Alanine)의 斑點이 새로 나타났으며 그리신(glycine)과 시스테인(Cysteine)의 R<sub>f</sub> 值와 一致하는 곳에 弱한 斑點이 나타났다. 卽 未知物 A는 그루타민酸, 아라닌, 그리고 微量의 구리신, 시스테인으로 構成되어 있는 物質인 듯하다. Virtanen<sup>1)</sup>이 發芽豌豆에서 抽出하고 研究한 結果 γ-그루타밀아라닌이라고 規定한 物質은 加水分解에서 少量의 그리신도 檢出된다고 報告되고 있다.

그리하여 그는 論하기를 그리신이 나타나는 原因은 그 未知物은 γ-그루타밀아라닌에 微量의 γ-그루타밀-그리신(γ-Glutamyl-Glycine)이 混合되어 있는 듯하다고 하였다. 그리고 Hird와 Springell<sup>6)</sup>이 腎臟에서 發見한 다음과 같은 反應이 豌豆에서도 일어나는 것 같다고 말하였다.



그러나 그는 시스테인(Cysteine)을 檢出하지 못하였는데 A의 加水分解物에서는 微量이나마 시스테인이 確認되었다. 따라서 이 綠豆의 A와 豌豆의 γ-그루타밀-아라닌은 다른 物質인지 또는 同一物質인데 實驗 착오에 依해서 上記의 差異가 생긴 것인지의 如否는 遠斷키 困難하나 Vitanen은 上記의 反應이 存在한다 하면서 시스테인을 檢出하지 못한것은 모순일 것이다. 如何론 이 A는 그루타민酸, 아라닌, 그리고 微量의 그리신, 시스테인을 包含하고 있는 物質인데 어떤 形態로써 結合되어 있는지는 本 實驗만 으로는 알 수 없으나 上記의 Hird & Springell의 反應이 綠豆에도 存在하는 것은 確實한 것 같다.

要 約

(1) 發芽綠豆中의 未知物 A는 그루타민酸, 아라닌, 그리고 微量의 그리신, 시스테인으로 構成된 物質인 듯하다.

(2) γ-그루타밀 트란스화레이스(γ-Glutamyl transferase)에 依한 腎臟中에서의 Hird & Springell 反應이 發芽綠豆에서도 存在하는 것 같다.

本 研究를 物心兩面으로 援助하여 주신 高大 化學教室 韓萬運教授를 비롯하여 여러 先生님들, 그리고 文獻調查를 도와 주신 Yale 大學의 金 炳萬兄에게 깊은 感謝의 뜻을 表합니다.

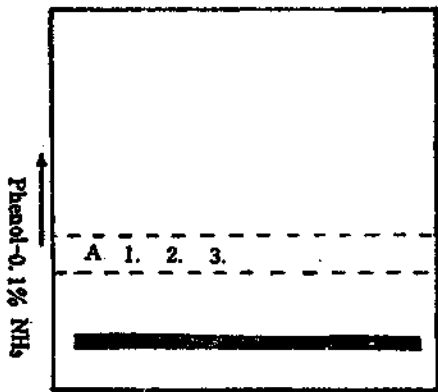


Fig 1.

(A) Unknown (1) Glutamic acid (2) Serine & Glycine (3) Asparagine

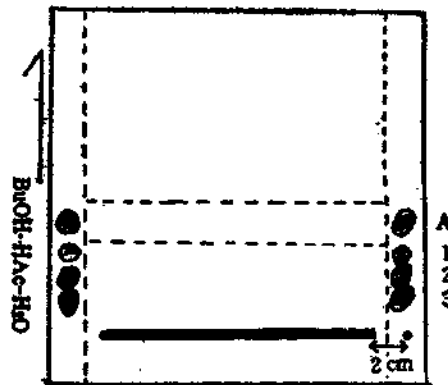


Fig 2.

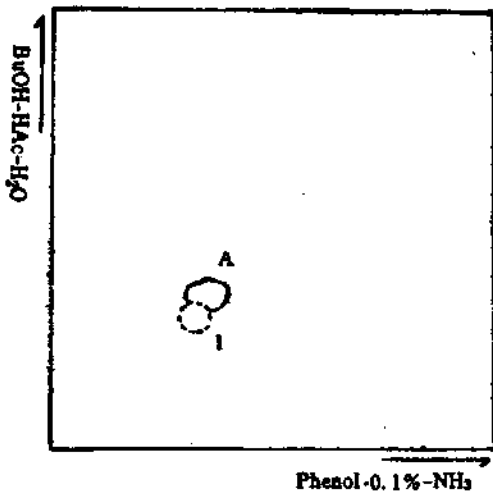


Fig 3.

2-dimensional Paper Chromatography of Unknown A.

(A) Unknown (1) Glutamic acid (2) Cysteine (3) Glycine (4) Alanine

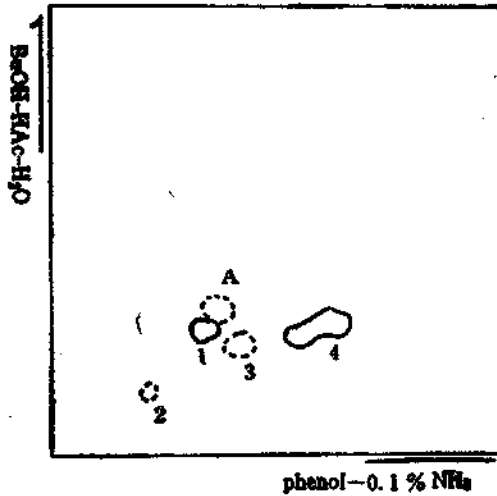


Fig 4.

2-dimensional paper chromatography of HCl hydrolyzed of unknown A.

引用文献

(1) Virtanen, A.I. *Acta Chem. Scand.*, 8, 1089(1954)  
 (2) Acher, R., Crocker, C.: *Biochem. Biophys. Acta.*, 9, 704(1952)

(3) Dalgliesh, C.E.: *Nature*, 166, 1076(1950)  
 (4) Beonte, G.: *Nature*, 163, 651(1949)  
 (5) Saiter, A., Oreskes, I.: *Science*, 119, 124(1954)  
 (6) Hird, F.J.R. & Springell, P. H.: *Biochem. J.*, 56, 417(1954)