

페퍼크로마토그래피에 의한 發芽綠豆의 遊離아미노酸代謝의 研究  
(第 1 報~第 2 報)

(第 1 報) 綠豆發芽에 따르는 遊離아미노酸 及 아미드의 變動에 關하여

金 泰 麟\* 宋 暢 源\*\*

(1959. 7. 5. 受理)

Studies on the Free Amino Acids Metabolism in Germinating  
Mung Bean by Paper Chromatography. (Part 1~2)

(Part 1). Variation of free Amino acids and Amides contents  
in germinating Mung Bean.

By Tae Rin Kim and Chang Won Song

Department of Chemistry, Korea University

Ethanol extracts of Mung Bean seeds and seedlings were analysed by 2-dimensional and circular paper partition chromatography for Nitrogen compounds as a part of the study on the Amino acids metabolism.

In the seeds, 18 ninhydrin positive substances were present, before germination, but the number increased to 21 after germination.

There were 3 unknown substances and one of it formed newly after germination.

After 2-days germination, the amount of amides, such as Asparagine and Glutamine, were increased very large which were very small amount before it. Those were accumulated more in dark place than in light and the amount of Asparagine were more than that of Glutamine.

Through the germination, there were large amount of Glutamic acid, Aspartic acid and Alanine which seems to be concerned in transamination reaction in seedlings.

Valine, Leucine, and Phenylalanine increased to considerable amount after germination. This is very remarkable fact as those Amino acids were reported to be concerned in transamination reaction recently.

$\gamma$ -amino butyric acid was detected in both Cotyledon and Embryo through the germination.

It seemed that there is no any Nitrogen Metabolism in the unbroken seed even if it is preserved very long period.

議 論

一般的으로 種子가 發芽하고 幼植物이 生長함에 따라 種子中の 아미노酸의 配定에 많은 變動이 일어난다는 것은 이미 오래전에 알려진 事實이다. 페퍼크로마

토크로마피(Paper Chromatography)에 의한 이 方面의 研究는 Ganguli<sup>1)</sup>의 報告에 關한 것과 Virtanen<sup>2)</sup>等과 白川<sup>3)</sup>等의 豌豆에 關한 것이 있는데 發芽 豌豆中에서 Virtanen 等이 檢出한 호모세린(Homoserine),  $\gamma$ -글루탐일-알라닌( $\gamma$ -Glutamyl-Alanine)을 白川等은 檢出하지 못하고 있다. 綠豆에 關한 이 方面의 研究는 아

\*高麗大學校 化學科

\*\*Dept. of Biochemistry, Univ. of Iowa, Iowa, U.S.A.

직 報告된 바 없다. 著者들은 綠豆의 遊離아미노酸代謝의 研究의 一部로서 二次元 페퍼크로마토그래피와 圓形 페퍼크로마토그래피를 利用하여 發芽에 따르는 綠豆의 遊離아미노酸 及 아미드의 變動을 定性的으로 調査하였다.

實 驗

[A] 試料: 試料의 栽培: 크기가 均一한 新穀 綠豆를 골라서 發芽 途中의 腐敗를 防止하기 爲하여 0.01% HgCl<sub>2</sub> 水溶液에 5分間 處理한 다음 蒸溜水로 잘 씻은 후 蒸溜水에 約 6時間 담겨 불려 가지고 5枚의 濾紙를 깔은 1ℓ 비커에 播種하고 朝夕으로 두번 一定量씩 給水하면서 溫度 20~25°C에서 發芽시켰다. 물에 담근지 約 10時間만에 胚軸이 種皮를 뚫고 나왔으며 約 4日後에는 根毛가 나고 9日頃 부터는 下根部가 褐色으로 變하여 죽기 始作하였다.

試料液의 抽出: 一定時間마다 發芽綠豆 100個씩을 採取하여 子葉部(Cotyledon)과 胚芽部(Embryo)로 二分하여 이들을 各各 모터(mortar)로 갈고 75% 에칠알콜 30 ml을 加한 다음 때때로 저어 주면서 2時間 放置後 遠心分離하였다. 上澄液을 濃縮 乾固시키고 이것을 少量의 蒸溜水로 溶解한 다음 遠心分離하여 上澄液을 試料液으로 使用하였다. 물에 불리지 않은 新穀 綠豆와 1年間 貯藏한 舊穀 綠豆 그리고 1年間 密閉容器中에서 貯藏한 綠豆 粉末을 亦是 上記와 同一한 方法으로 試料液을 만들었다. 또 蛋白質構成 아미노酸과 遊離아미노酸의 差를 알기 爲하여 新穀 綠豆粉末을 유리 封管中에서 6N 鹽酸으로 120°C로 24時間 加熱 加水分解後 鹽酸을 除去하고 水溶液을 만들어 試料로 使用하였다.

[B] 裝置 및 溶媒: 二次元法에서는 desiicator에서 展開시켰는데 濾紙는 22×22 cm의 Whatman No. 1을 溶媒는 石炭酸: 0.1% 암모니아 (8:2)와 부틸알콜: 氷醋酸: 물 (4:1:5) 上層液을 使用하였다. 圓形法에서는 Zimmermann, Nehrung<sup>1)</sup>의 方法에 依해 그림 1 처럼 desiicator를 利用하였으며 濾紙는 直徑 30 cm의 東洋濾紙 No. 5를 使用하였고 부틸알콜: 石炭酸: 氷醋酸: 물 (20:20:8:40)을 溶媒로 使用하였다.

[C] 显色: 닌히드린(Ninhydrin)反應, I<sub>2</sub> 反應<sup>2)</sup>, KMnO<sub>4</sub> 反應<sup>3)</sup>, 이사틴(Isatin)反應<sup>4)</sup>, 坂口反應을 썼으며 닌히드린으로 發色시킨 크로마토그램(Chromatogram)은 銅錯鹽<sup>5)</sup>으로 만들어 褐色을 防止하였다.

結果 및 考察

標準아미노酸의 R<sub>f</sub> 值과의 比較 그리고 色調等으로

各種 遊離아미노酸 及 아미드를 判定하였는데 그림 2는 2日間 暗室에서 發芽시킨 綠豆의 胚芽部 抽出物의 크로마토그램이다. 表 I은 暗室에서 發芽시킨 것의 子葉, II는 胚芽部, III은 光線下에서의 子葉, IV는 胚芽部의 各 遊離아미노酸 及 아미드의 發芽時間에 따르는 量變化의 比較表이다.

結果의 概要는 다음과 같다.

(1) 發芽前에는 닌히드린 陽性的 物質이 19個 있었는데 發芽後에는 21個로 增加하였다.

(2) 發芽함에 따라 各 遊離아미노酸의 量은 大體의 으로 增加하였다가 約 5日頃부터는 減少하는 傾向이 있었다.

(3) 아미드(Amide)는 發芽前에는 매우 적었는데 發芽함에 따라 많이 增加하였으며 光線下에서보다 暗室에서 發芽시킨 것에 더 많은 것 같았고 아스파라긴(Asparagine)이 그루타민(Glutamine)보다 더 많았다. 蓄積된 아스파라긴은 綠豆가 죽을 때까지 減少되는 것을 볼수 없었으나 그루타민은 暗室에서는 發芽後 約 6日頃부터 減少하였는데 이 現象은 子葉에서 甚한 것 같았다. 幼植物의 貯藏養分이 極度로 缺乏될 때 아스파라긴은 아스파라기네이스(Asparaginase)에 依해 아스파라긴酸과 암모니아로 分解된다고 Vickery<sup>6)</sup> 등은 報告하고 있는데 그루타민이 消失되는 것을 보면 綠豆에서는 그루타민이 그루타민네이스에 依해 그루타민酸과 암모니아로 分解되는 것 같다. 아미드 加水分解酵素인 아미네이스(Amidase)에는 아스파라기네이스와 그루타민네이스의 2種이 있는 것 같다는 Bonner<sup>10)</sup>의 說과 一致하는 것으로 生覺된다.

(4) 그루타민酸과 아스파라긴酸은 發芽前부터 죽을 때 까지 子葉에서는 그루타민酸이 많았고 胚芽部에서는 아스파라긴酸이 많았다. 이 逆關係는 光線下에서 더 甚한것 같다.

(5) 子葉에서 시스틴(Cystine)과 시스테인(Cysteine)이 微量 檢出되었는데 3日제 부터는 거의 消滅하여 버린것 같다.

(6) 세린(Serine)은 차차 增加하여 3, 4日頃에는 아스파라긴酸이나 그루타민酸과 거의 同量이 되었다가 減少하였다.

(7) 그리신(Glycine)의 量이 初期에는 세린과 비슷하다가 增加함이 없이 減少하였는데 暗室에서는 그렇지 않았으나 光線下에서는 처음 2日間 胚芽部에 比하여 子葉에 매우 적게 存在하고 있다.

(8) 알기닌(Arginine), 티로신(Tyrosine), 프로린

(Proline), 라이신(Lysine)이 檢出되었는데 알기닌, 키로신, 푸로린은 차차 減少하는 傾向이 있었으며 라이신의 量에는 變化가 없는 것 같다.

(9) 트레오닌(Threonine)은 初期에는 極히 微量이었다가 發芽함에 따라 많이 增加하였는데 暗室에서 發芽한 것이 光線下에서 보다 훨씬 많았으며 4日頃에는 그루타민酸的 量에 가까운 만큼 많이 生成되는 것 같다.

(10) 알라닌(Alanine)은 처음에는 少量이었다가 2日째 부터 急激한 增加를 하였는데 胚芽部보다 子葉에 많았다. 이 增加는 이미 報告되어 있는 것 처럼<sup>11)</sup> 蛋白質 代謝作用에서 알라닌이 그루타민酸, 아스파라긴酸과 트랜스아미네이션(Transamination)을 함께 起因한 것으로 본다.

(11) 發芽前에는 存在가 疑心스러운 만큼 微量이든 바린(Valine), 로이신(Leucine), 페닐알라닌(Phenylalanine)이 多量으로 增加하였다. 發芽前과 後의 綠豆加水分解物中の 이 아미노酸들의 量을 比較하여 볼때 單純히 貯藏蛋白質의 分解에 依하여서만 생긴 것이 아니고 새로 合成되는 것 같은데 바린, 로이신, 페닐알라닌 모두가 植物體內에서 트랜스아미네이션에 依해 生成될 수 있다는 報告와 一致하는 것 같다.

(12) 그림 2의 13番의 物質은 確認은 하지 않았으나 R<sub>f</sub> 值 그리고 豌豆에서도 그 存在가 證明된 것 등으로 미루워 보아  $\gamma$ -아미노酪酸( $\gamma$ -Amino butyric acid)인 것 같다. 이것은 發芽前에는 極微量이 있었는데 1日後 부터는 相當히 많이 生成되었으며 光線下에서보다 暗室에서 그리고 胚芽部 보다 子葉에 더 많았다.

(13) Fig 2의 A, B, C, 의 3個의 未知物이 檢出되었는데 이들은 다투드린에 依해 靑紫色으로 顯色하였으며 發芽함에 따라 含量 變化가 있었다. 卽 A는 發芽前에는 全히 없었는데 1日後에 微量이 生成된 것을 알 수 있었으며 3日째 最高量이 되었다가 減少하였는데 子葉이 胚芽部 보다 多量인 것 같았다. 暗室에서는 綠豆가 죽을 때까지 微量이나마 있었는데 光線下에서 胚芽部에서는 5日後 부터는 完全히 消滅하여 버리는 것 같다.

B는 A와는 달리 發芽前에 相當히 多量 含有되고 있다가 減少하였는데 子葉에 많았으며 光線下에서 減少가 빠른 듯 하다. C는 B처럼 發芽前에 存在하다가 減少하였는데 子葉과 胚芽部の 含量差는 別로 없는

것 같았으며 光線下의 胚芽部에서 먼저 消滅하였다.

(14) 1年前의 舊穀綠豆의 遊離아미노酸의 分布와 新穀綠豆와는 同一 하였으나 粉末로서 1年間 保全한 것의 分布에는 약간의 差異가 있었다. 이것은 一般的으로 植物種子는 그 組織이 破壞되지 않고 保存될 때 窒素化合物의 代謝作用이 없음을 意味할 것이다.

窒素化合物 代謝作用의 研究에 많이 쓰이는 發芽豌豆에서는 Vitanen<sup>12)</sup>은 11個 白川<sup>13)</sup>은 10個의 遊離아미노酸을 檢出하였으며 Ganguli<sup>14)</sup>는 發芽豌豆에서 12個를 檢出하였는데 以上에서 論한 것 처럼 本實驗에서는 發芽綠豆에서 21個를 檢出할 수 있었다. Virtanen<sup>12)-(15)</sup>은 綠豆植物에서 數種의 新 아미노酸을 確認하였는데 種皮가 綠色인 綠豆에서 未知의 物質 3個가 檢出되는 것과는 어떤 關係가 있는지 좀더 있는 일이며 綠豆에서 앞으로 究明되어야 할 問題가 많은 것 같다.

### 要 約

(1) 發芽中の 綠豆에서 遊離狀態의 다투드린 陽性의 物質 21個를 檢出하였으며 그 중 3個의 本質은 確認하지 못하였다. 그 중의 하나인 그루타민酸 附近에 나타난 未知物은 發芽前에는 全히 없거나 極微量이었다가 生成되는 것 같다.

(2) 아스파라긴, 그루타민 두 아미드가 檢出되었는데 暗室에서 發芽한 것이 더 많았으며 아스파라긴이 그루타민 보다 많았다.

(3) 相互間 트랜스아미네이션의 關係에 있는 그루타민酸, 아스파라긴酸, 알라닌이 많이 있었는데 前二者는 發芽過程을 通하여 其의 含量의 變化는 없는 것 같으나 알라닌은 初期에는 少量이 있었다가 많이 增加하였다.

(4) 바린, 로이신, 페닐알라닌이 많이 生成되는 듯 하다.

(5)  $\gamma$ -아미노酪酸이 檢出되었다.

(6) 組織이 破壞되지 않고 保存되는 植物種子에서는 相當한 期間 窒素化合物의 代謝는 없는 듯하다.

(本論文은 4290年度 大韓化學會 年會에서 發表한 것임)

本研究를 物心兩面으로 援助하여 주신 高大化學敎室 韓萬選敎授 그리고 여러 先生님들에게 깊은 感謝의 뜻을 表합니다.

TABLE 1. Free Amino Acids Present in Cotyledon of Mung Bean during Germination in the Dark

	Period of Germination in days									Powder. 1 year
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
Aspartic acid	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#
Glutamic acid	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#
Cystine	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Cysteine	+	+	+	-	-	-	-	-	-	±
Serine	#	#	#	#	#	#	#	#	#	+
Glycine	+	+	+	+	+	+	±	±	±	+
Asparagine	+	+	#	#	#	#	#	#	#	+
Lysine	#	#	#	#	+	+	+	+	+	+
Threonine	±	+	+	+	#	#	#	+	+	±
Alanine	#	#	#	#	#	#	#	#	#	+
Arginine	#	#	#	#	#	+	+	±	±	+
Glutamine	±	#	#	#	#	#	#	+	+	+
Tyrosine	±	±	+	+	+	+	±	±	±	±
Proline	+	+	+	+	±	±	-	-	-	+
γ-Amino butyric acid	±	+	+	+	+	+	+	+	+	±
Valine	+	#	#	#	#	#	#	#	#	+
Phenylalanine	-	±	+	+	#	#	#	#	#	±
Leucine	+	+	#	#	#	#	#	#	#	+
Unknown A	-	+	#	#	#	#	+	±	-	-
Unknown B	#	#	#	#	#	#	#	+	+	#
Unknown C	+	+	+	+	+	+	+	±	-	+

±=Very Small +=Small #=middle #=#=large #=#=Very large

TABLE 2. Free Amino Acids present in Embryo of Mung Bean during Germination in the Dark

	Period of Germination in Days							Hyd. (HCl)
	2	3	4	5	6	7	8	
Aspartic acid	#	#	+	+	#	#	#	#
Glutamic acid	#	#	#	#	#	#	#	#
Cystine	-	-	-	-	-	-	-	-
Cysteine	±	-	-	-	-	-	-	+
Serine	#	#	#	#	#	#	#	#
Glycine	#	#	+	+	+	+	+	#
Asparagine	#	#	#	#	#	#	#	-
Lysine	#	#	#	#	#	#	#	#
Threonine	#	#	#	#	#	#	#	+
Alanine	#	#	#	#	#	#	+	#
Arginine	#	#	+	+	+	+	+	#
Glutamine	#	#	#	#	#	#	+	-
Tyrosine	#	#	#	#	#	#	#	+
Proline	+	+	±	-	-	-	-	+
γ-Amino butyric acid	#	+	+	±	-	-	-	+
Valine	#	#	#	#	#	#	#	#
Phenylalanine	#	#	#	#	#	#	#	#
Leucine	#	#	#	#	#	#	#	#
unknown A	+	+	#	#	#	#	+	-
Unknown B	#	#	+	+	±	±	-	-
Unknown C	+	+	+	±	±	-	-	±

TABLE 3. Free Amino Acids present in Cotyledon of Mung Bean during Germination in the Light

	Period of Germination in Days							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Aspartic acid	+	+	+	+	+	+	+	+
Glutamic acid	+	+	+	+	+	+	+	+
Cystine	+	±	-	-	-	-	-	-
Cysteine	+	+	-	-	-	-	-	-
Serine	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycine	±	±	+	+	+	+	+	+
Asparagine	+	+	+	+	+	+	+	+
Lysine	+	+	+	+	+	+	+	±
Threonine	+	+	+	+	+	+	±	±
Alanine	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+
Glutamine	+	+	+	+	+	+	+	+
Tyrosine	+	+	+	+	+	+	+	+
Proline	+	+	+	+	±	-	-	-
γ-Amino butyric acid	+	+	+	+	+	+	+	+
Valine	+	+	+	+	+	+	+	+
Phenylalanine	-	±	±	+	+	+	+	+
Leucine	+	+	+	+	+	+	+	+
Unknown A	+	+	+	+	±	±	-	-
Unknown B	+	+	+	+	+	±	-	-
Unknown C	+	+	+	+	+	±	±	±

TABLE 4. Free Amino Acids present in Embryo of Mung Bean during Germination in the Light

	Period of Germination in days						
	2	3	4	5	6	7	8
Aspartic acid	+	+	+	+	+	+	+
Glutamic acid	+	+	+	+	+	+	+
Cystine	-	-	-	-	-	-	-
Cysteine	-	-	-	-	-	-	-
Serine	+	+	+	+	+	+	+
Glycine	+	+	+	+	+	+	+
Asparagine	+	+	+	+	+	+	+
Lysine	+	+	+	+	+	+	+
Threonine	+	+	+	+	+	+	+
Alanine	+	+	+	+	+	+	+
Arginine	+	+	+	+	±	-	-
Glutamine	+	+	+	+	+	+	+
Tyrosine	+	+	+	+	+	+	+
Proline	+	+	+	±	-	-	-
γ-Amino butyric acid	+	+	+	+	+	±	±
Valine	+	+	+	+	+	+	+
Phenylalanine	±	±	+	+	+	+	+
Leucine	+	+	+	+	+	+	+
Unknown A	+	+	±	±	-	-	-
Unknown B	+	+	+	+	±	-	-
Unknow C	+	+	+	-	-	-	-

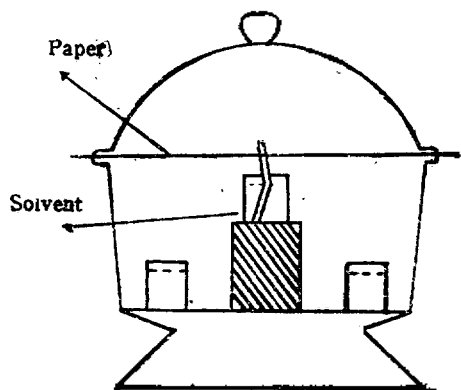


Fig. 1  
Aparatus for Circular Paper Chromatography

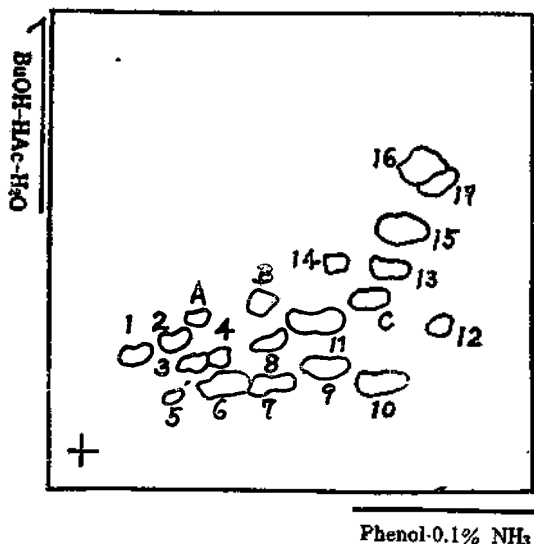


Fig. 2  
2-dimensional paper Chromatogram of Nitrogen compounds present in Embryo of Mung Bean after germination of 2 days at dark place  
1) Aspartic acid. 2) Glutamic acid. 3) Serine.  
4) Glycine. 5) Cysteine. 6) Asparagine.  
7) Lysine. 8) Threonine. 9) Glutamine.  
10) Arginine. 11) Alanine. 12) Proline.  
13)  $\gamma$ -amino butyric acid. 14) Valine. 15) Leucine  
16) Phenylalanine. A) B) C) Unknown.

引用文献

(1) Ganguli, N.C.: *Naturwiss.*, 40, 624 (1954)  
 (2) Virtanen, A.I.: *Acta. Chem. Scand.*, 8, 1085 (1954)  
 (3) 白川: *日農化.*, 30, 158 (昭和 31)  
 (4) Zimmerman, C.T.: *Angew. Chem.*, 63, 556 (1951)  
 (5) Beonte, G.: *Nature*, 163, 651 (1949)  
 (6) Dalgiesh, C.E.: *Nature*, 166, 1076 (1950)  
 (7) Saifer, A., Oreskes, I.: *Science*, 119, 124 (1954)  
 (8) 百淑: *有機定性分析* P. 114 (1957)  
 (9) Vickery, H.B., Pucher, G.W.: *J. Biol. Chem.*, 150, 197 (1943)  
 (10) Bonner: *Plant Biochem. Sec.* 4  
 (11) Braunstein, A.E., Kritzmann, M.G.: *Enzymologia*, 2, 129 (1937)  
 (12) Virtanen, A.I.: *Acta Chem. Scand.*, 8, 358 (1954)  
 (13) Virtanen, A.I.: *Acta Chem. Scand.*, 8, 1086 (1954)  
 (14) Virtanen, A.I.: *Acta Chem. Scand.*, 8, 1089 (1954)  
 (15) Virtanen, A.I.: *Acta Chem. Scand.*, 8, 1290 (1954)