

## 콩 발아시의 糖의 代謝에 關한 研究(I)

### (Nucleotide 糖의 分離)

成均館大學校 文理科大學 化學科

金澤泳·申鉉濟\*

(1966. 5. 18 受理)

### Study on Sugar metabolism in Soybean Germination [I]

#### (Isolation of Nucleotide Sugars)

by

Taik Yung Kim and Hyun Jae Shin\*

Dept. of Chemistry, The College of Sciences and Engineering

Sung Kyun Kwan University

(Received, May 18, 1966.)

#### Abstract

Nucleotide galactose and glucose have been isolated during the soybean germination. Techniques for identification depends upon chromatography after elution the absorbed charcoal fraction with ethanol ammonia or 1/10N HCl.

#### I. 緒 論

Nucleotide 糖은 一般的으로 糖磷酸 에스테르에서 Pyrophosphorylase 에 依하여 만들어 지는데, Nucleotide 糖이 또 에피메리화 反應(epimerization)과 脫水素化 反應에 依한 Epimerase 反應으로 다른 Nucleotide 糖으로 變化하기도 하고 或은 糖磷酸 에스테르가 어떤 Uridine Nucleotide 糖의 Uridine I 磷酸基를 받는 受容體(accepter)로서 作用하는 Uridyl Transferase 로서 새로운 Nucleotide 糖이 만들어 지기도 한다.

Nucleotide 糖으로서의 UDPG 가 酵母에서 처음으로 發見<sup>(1)</sup>된 以後로 그 決定的인 構造는 化學 合成으로 確 定되었다. <sup>(2), (3)</sup> 이 UDPG 는 모든 生體內에서 즉 酵母 <sup>(1), (2), (3), (4)</sup>, 動物 組織<sup>(5), (6)</sup>, 癌 組織<sup>(7), (8), (9)</sup>, 植物<sup>(10)</sup>, <sup>(11)</sup> 및 곰팡이<sup>(12)</sup> 등에서 發見되었다. 이 UDPG 의 發 見에 뒤이어 많은 UDP 糖들이 발견되었고, 다시 다른 Nucleotide 糖들도 알려져 오늘날 數十種을 헤아리게 되었다.

本 실험에 있어서는 콩이 Galactose 를 가진 Stachyose 를 包含하고 있고, 이것이 發芽시에 急激히 減少되는 사실로 미루어, 먼저 Nucleotide 糖의 分離를 試圖하여, Nucleotide glucose 와 Nucleotide galactose 의 分離에 成功하여 이에 報告하는 바이다.

#### II. 實 驗

1. 材料; 다른 콩 10g 을 달아 12時間동안 水沈시키고 물에 부른 콩을 물기 많은 가아제(큰 샪에 유리 판을 잘라서 그 밑바닥에 깔고 그 위에 木綿 가아제로 덮어 싸우고 물을 넣어 가아제가 恒常 젖어있게 함.)에

\*\*UDPG : Uridine-5'-diphosphoglucose  
UDPGal: Uridine-5'-diphosphogalactose  
CDPG : Cytidine-5'-diphosphoglucose  
CDPGal: Cytidine-5'-diphosphogalactose  
GDPG : Guanidine-5'-diphosphoglucose  
GDPGal: Guanidine-5'-diphosphogalactose  
TDPG : Tymidine 5' diphosphoglucose  
TDPGal: Tymidine 5' diphosphogalactose  
G : Glucose  
Gal. : Galactose

\*成均館大學校 講師, 現在 宇盛化學工業株式會社 勤務

놓고 室溫에서 24時間 경과 後 씩이 1~1.5cm 정도 아래게 한다.

2. Nucleotide 糖의 分離: 發芽된 콩을 비이커에 넣어서 끓는 물 냄비 속에서 約 10分간 끓여 酵素反應을 不活性化시키고 mortar에 少量의 물과 같이 넣은 다음 곱게 粉碎하여 100,000×g로 30分間 遠心分離하던 上層에 淡黃色的의 液과 下層에 粗雜한 白色의 結核한 比지層이 생긴다. Charcoal을 물에 suspension시킨 液 (50mg/ml. H<sub>2</sub>O) 40ml에 이 上層液을 넣어 잘 흔들고, 5分간 放置한 後에 다시 遠心分離 (10,000×g)하여 下層의 Charcoal層을 分離하고 20ml의 물로 3回 洗는다. 이 charcoal에 암모니아性 알코올 溶液<sup>(13), (14), (15)</sup> (50% EtOH : 0.15% NH<sub>4</sub>OH) 40ml를 加하여 잘 흔든 다음 charcoal分을 除去하고 이 溶液을 desicator에 넣어 減壓 乾固시킨다.

3. Nucleotide 糖의 確認: a) 實 驗에서 乾固된 物을 少量의 물에 녹혀 n-butylalcohol-aceticacid-water(5:1:4)의 溶媒를 使用하여 paperchromatography를 한 다음 U. V. lamp로 그 位置를 確認하고 그 部分을 가위로 切내어 0.1N 염산 20cc. 물 加하고 15分간 끓인다. 이 液을 Dowex 50 (2×10)관과 Dowex 1(2×15)관을 통과시킨 後 n-butanol-pyridine-benzene-H<sub>2</sub>O(5:3:1:3) 溶媒를 使用하여 paperchromatography를 한 다음 分離된 斑點을 silver nitrate 試藥<sup>(16)</sup>으로 確認한다. b) 2. 實驗에서 얻어지는 charcoal分을 암모니아性 알코올 溶液으로 抽出하지 않고, 직접 3. a) 方法으로 0.1N HCl로 加水分解시키고 deionize시킨 다음 paperchromatography를 하여도 역시 糖의 分離는 잘 되며 3a)의 結果와 잘 一致한다.

### III. 結果 및 考察

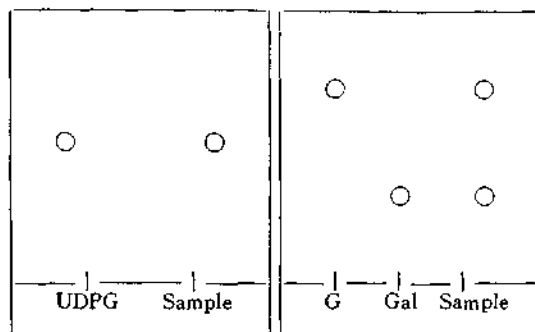


Fig. I The chromatogram of nucleotide sugars detected by U. V. lamp  
Paper: Whatman No. 1.  
Solvent: n-butylalcohol:  
Aceticacid: H<sub>2</sub>O (5:1:4)

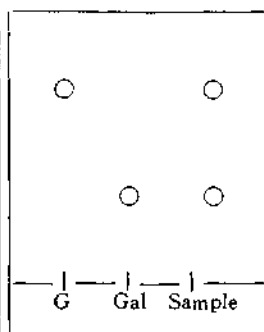


Fig. II The chromatogram of Nucleotide sugars after Hydrolysis  
Paper: Whatman No. 1.  
Solvent: n-Butanol:  
Pyridine: Benzene:H<sub>2</sub>O  
(5:3:1:3)  
Spray: Silver Nitrate試藥

이 實驗에서 分離된 Nucleo 糖은, Fig. I, Fig. II에서 보는 바와 같이 Nucleotide glucose와 Nucleotide galactose임이 분명하다. Nucleotide glucose는 生物界에 널리 알려져 있어 豫測한 바이지만 Nucleotide Galactose는 UDPGal의 形態로 酵母<sup>(17)</sup>, 박테리아<sup>(18)</sup> 및 植物種子<sup>(19)</sup> 등에서 發見되었고, 이들이 高等植物體 內에서 Pyrophosphorylase<sup>(20)</sup>, Uridyl Transferase<sup>(21)</sup> 및 4-Epimerase<sup>(22)</sup> 등의 酵素反應으로 生成됨이 밝혀졌다.

그 밖의 GDPGal은 海藻, 乳線 및 牛乳 等에서는 分離되었으나 大豆에서는 分離도 되지 않았고 또 酵素反應도 研究가 되어 있지 않다. CDPG는 分離는 안 되었으나 Salmonella Paratyphi<sup>(23)</sup>에서 Pyrophosphorylase 反應으로 生成됨이 밝혀졌고 CDPGal은 全然 發見되어 있지 않다. 또한 TDPG와 TDPGal은 生體에서 分離는 안되었으나 bacteria<sup>(23), (24), (25)</sup>나 植物의 種子<sup>(24), (26)</sup> 속에서 Pyrophosphorylase에 依하여 生成됨이 알려져 있고 Deoxy-UDPG와 Deoxy-UDPGal도 植物의 種子 속에서 Pyrophosphorylase로 生成됨이 알려졌다<sup>(26)</sup>.

이와 같이 Nucleotide 糖은 生體 內에서 酵素反應으로 만들어지며, 糖의 相互 轉換에 關係할 뿐만 아니라 單糖類를 서로 結合시켜 麥糖類를 合成하며 活發한 代謝過程에 關係하게 되는 것이다. 그러나 앞서 말한 Uridyl transferase는 Galactokinase의 活性度가 없는 E. Coli K12 突然變異體에서 分離 精製까지는 되었지만<sup>(27)</sup>, 大體히 보기 힘든 酵素이며, 따라서 本 實驗에서 얻어지는 Nucleotide Galactose는 Nucleotide Glucose에서부터 Epimerase 反應에 依하여 生成되었을 可能性이 가장 크며, 혹시 Galactokinase의 活性度가 크다면 Pyrophosphorylase에 依하여 生成될 수도 있음을 暗示한다.

### 參 考 文 獻

- 1) Caputto, R., Leloir, L. F., Cardini, C. E., and Paladini, A. C., *J. Biol. Chem.*, **184** 333 (1950).
- 2) Kerner, G. W., Todd, A. R., and Webb, R. F., *J. Chem. Soc.* 2843 (1954).
- 3) Moffat, J. G., and Khorana, H. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 3756 (1958).
- 4) Cardini, C. E., Paladini, A. C., Caputto, R., and Leloir, L. F., *Nature*, **125**, 191 (1950).
- 5) Hurlbert, R. B., and Potter, V., *J. Biol. Chem.*, **209**, 1, (1954).
- 6) Smith, E. E. B., and Mills, G. T. *Biochim. et Biophys. Acta*, **13**, 386 (1954).
- 7) Schmitz, H., *Naturwissensch.*, **41**, 120 (1954).

- 8) Schmitz, H., Potter, V.T., Hurlbert, R.B., and White, D.H., *Cancer Res.*, **14**, 58 (1954).
  - 9) Schmitz, H., Hert, W., and Ried, H., *Ztschr. F. Krebsforsch.*, **60**, 301, (1955).
  - 10) Buchanan, J.G., Lynch, V.H., Benson, A.A., Bradley, D.F., and Calvin, M., *J. Biol. Chem.* **203**, 935 (1953).
  - 11) Norris, L., Norris, R.E., and Calvin, M., *J. Exptl. Botany*, **6**, 64 (1955).
  - 12) Ballio, A., Casinovi, C., and Serlupi-Crescenzi, G., *Biochim. et Biophys. Acta*, **20**, 414 (1956).
  - 13) Nilsson: *Acta Chem., Scand.*, **11**, 1003, (1957).
  - 14) Pontis and Leloir; *Biochim. et Biophys. Acta*, **26**, 146 (1957).
  - 15) Crane, R., *Science* **127**, 285 (1958).
  - 17) Trevelyan, W.E. and Harrison, S.S., *Biochem. J.* **50**, 298, 303 (1952).
  - 17) G. T. Mills, E. E. B. Smith and A. C. Lochhead, *Biochemica, et Biophys. Acta.*, **25**, 521 (1957).
  - 18) H. Nikaïdo, *Biochim. et Biophys. Acta*, **48**, 460 (1962). H. Wiesmeyer and E. Jordan, *Anal. yt. Biochem.*, **2**, 281 (1961).
  - 19) V. Ginsburg, P.K. Stumpf and W.Z. Hassid, *J. Biol. Chem* **223** 977 (1956).
  - 20) E. F. Neufeld, V. Ginsburg, E.W. Putman, D. Fanshier and W.Z. Hassid; *Arch. Biochem. Biophys.*, **69**, 602 (1957).
  - 21) J.H. Pazur and M. Shadexsharaswamy. *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **5**, 130 (1961).
  - 22) V. Ginsburg, P.J. O'Brien and C. W. Hall *Biochem. Biophys. Research Commun.* **7**, 1 (1962).
  - 23) S. Kornfeld and L. Glaser *J. Biol. Chem.*, **236**, 1791 (1961).
  - 24) J. H. Pazur and E. W. Shuey, *J. Biol. Chem.*, **236**, 1780 (1961).
  - 25) J. H. Pazur, K. Kleppe and A. Cepure. *Biochem. Biophys. Research. Commun.*, **7**, 157 (1962).
  - 26) E. F. Neufeld, *Biochem. Biophys. Research. Commun.*, **7**, 157 (1962).
  - 27) Kurahashi, K., and Sugimura, A., *J. Biol. Chem.*, **235**, 940 (1960).
-