

여러 pH에서 加熱凝固시켜 調製한 綠葉蛋白質의 脂肪酸과 Sterol組成

金 鍾 奎

慶尙大學校 農科大學
(1983년 7월 20일 수리)

Fatty Acid and Sterol Composition of Leaf Protein Coagulated at Different pH.

Jong Kyu Kim

College of Agriculture, Gyeongsang National University, Jinju city
(Received July 20, 1983)

Abstract

This experiment was carried out to investigate the effect of pH at coagulation on fatty acid and sterol composition of green LPC.

Green juice of Italian ryegrass, red clover, oats and alfalfa was adjusted at pH 4, 6, 8 and heated at 85°C for ten minutes. Green LPC was taken from the above green juice.

The results obtained were as follows.

1. Green LPC of Italian ryegrass, oats and alfalfa contained much on the order of linoleic acid, palmitic acid and linolenic acid. Methyl ester of these three fatty acid accounted for 70.4% to 86.2% of total fatty acid methyl ester.

Green LPC of red clover contained much palmitic acid, linoleic acid, and linolenic acid. These three fatty acid methyl ester accounted for 82.5% to 86.2% of total fatty acid methyl ester.

2. Linolenic acid was highest in the green LPC of red clover, oats and alfalfa which was adjusted at pH 8 and heated and coagulated, and next at pH 6, and pH 4, respectively. Linolenic acid was highest in the green LPC of Italian ryegrass which was adjusted at pH 6, next pH 8, and pH 4.
3. Green LPC of red clover and alfalfa contained cholesterol. The all green LPC contained campesterol, stigmasterol and sitosterol.
4. Sterol was highest in the green LPC of Italian ryegrass, red clover and oats which was adjusted at pH 8 and next at pH 4, and pH 6, respectively.

Sterol was highest in the green LPC of alfalfa which was adjusted at pH 8, and next at pH 6, and pH 4, respectively.

序 論

綠汁의 pH를 여러 가지로 해서 加熱凝固시켜 調製한 葉濃縮蛋白質(LPC)의 아미노酸 組成이 달라지고 營養價도 變함은 이미 發表한 바가 있다.¹⁾

LPC에서 蛋白質뿐만 아니라 lipid도 營養의인 면에 關係할 수 있다.

綠葉의 lipid에 대한 연구는 많이 이루어져 있다.²⁻¹¹⁾ 綠葉中에는 lipid가 상당히 많이 含有되어 있으며 L

PC에도 상당 수준 함유하고 脂肪酸으로는 Linolenic acid가 제일 많은 편이며 草種에 따라 20.7%에서 53.7% 범위였다.²⁾

그러나 LPC에 대한 脂肪酸이나 sterol에 대한 연구는 많지 않으며 특히 LPC의 製造條件에 따른 脂肪酸과 sterol 組成變化에 대한 연구는 거의 되어 있지 않다. lipid는 LPC의 品質에 많은 영향을 미치므로 綠汁에서 LPC를 加熱凝固시킬 때 pH에 따

라 lipid의 組成이 어떻게 變하는지를 밝히고져 한다.

材料 및 方法

1. 材料

綠葉蛋白質 (green LPC)의 alfalfa, red clover, Italian ryegrass와 oats를 꽃이 되기 전에 잘라서 이들 무게와 同量의 물을 加해 마쇄하고 musline을 통해 hand-press로 綠汁을 얻었다.

2. 方法

1) 綠葉蛋白質 製造

綠汁은 3部分으로 나누어 다음과 같이 綠葉蛋白質을 調製하였다.

① pH 4에서 凝固된 蛋白質: 綠汁의 pH를 10% HCl로 4~4.5로 조정후 85°C로 加熱해서 調整하였다.

② pH 6에서 凝固된 蛋白質: 綠汁의 pH를 조정치 않고 85°C에서 加熱해서 調整하였다.

③ pH 8에서 凝固된 蛋白質: 綠汁의 pH를 10% NaOH로 8~8.5로 조정후 85°C에서 加熱해서 調整하였다.

Italian ryegrass와 oats의 綠汁은 pH 8~8.5에서는 加熱에 의해 충분히 凝固되지 않아서 이들 綠汁 (1 liter)에 CaCl₂ (Ca: 2.1~2.7g)를 加하고 pH를 8~8.5로 조정 후 加熱했다.

凝固된 綠葉蛋白質은 여과해서 동결건조했다.

2) 化學的 分析

질소, 조지방, 조섬유, 회분 및 수분은 official method¹²⁾에 의해 측정하였다.

Ca, Mg, K과 Na은 각각의 葉蛋白質을 500°C에서 灰化한 후¹³⁾ atomic absorption spectrophotometer (Nippon Jarrell-ash, AA-80)로 측정하였다.

3) 脂質 抽出 및 檢化合物과 不檢化合物 分離

green LPC 1g당 chloroform-methanol (2:1, V./V.) 20ml를 加해 23°C에서 2시간 동안 浸漬하여 여과하는 조작을 4회 반복하여 脂質을 抽出하고 여액을 진공하에서 evaporate해서 粗脂質을 얻고 粗脂質 1g당 0.5% H₂SO₄ (in ethanol) 10ml를 加해 85~90°C에서 12시간 동안 還流하고 10% KOH로 中和후 10% KOH (in ethanol)를 50ml 加해 90°C에서 1시간 동안 還流하면서 脂質을 加水分解하였다.¹⁴⁾

粗脂質의 加水分解物은 Fig. 1과 같은 方法으로 檢化合物과 不檢化合物을 分離하고 sterol은 不檢化合物을 TLC로 精製后 GLC로 定量하였다.

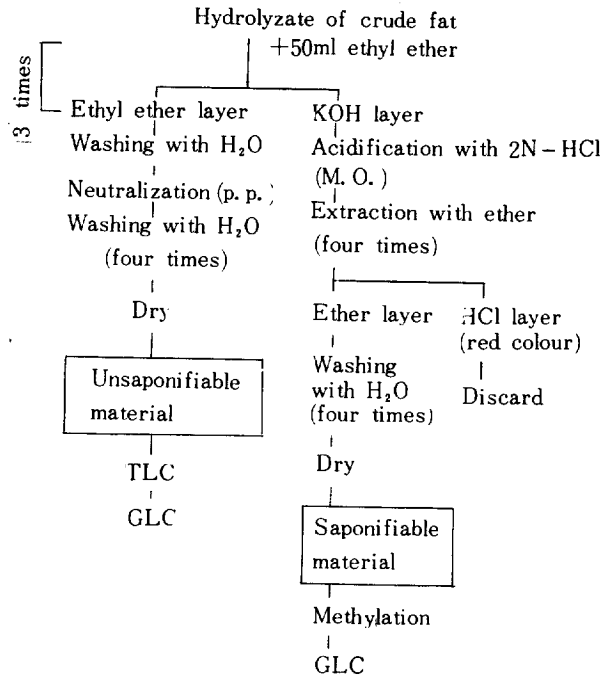


Fig. 1. Separation of saponifiable material and material in crude fat

3. 脂肪酸의 methylation

Shimadzu Co.에서 開發한 方法에 따라서 즉 檢化合物에 1% p-toluene sulfonic acid (in methanol)를 10ml 加하고 70°C water bath에서 30분간 還流하고 ether로 抽出해서 물로 4회 세척한 후 용매를 회수하고 수분을 제거하여 脂肪酸 methyl ester를 얻었다.

4. 脂肪酸 methyl ester 및 Sterol의 分析

脂肪酸 methyl ester와 sterol은 各各 Table 1과 Table 2와 같은 조건으로 GC (Shimadzu 4BM)로 分析하였다.

Table 1. Operating conditions for gas liquid chromatography

Items	Analytic material	
	Fatty acid methyl esters	
Instrument	GLC(Shimadzu 4BM)	
Column	DEGS (15%) glass 2mX3mm ID	
Detector	Flame Ionization Detector	
Colum temp.	180°C	
Detector oven temp.	200°C	
Carrier gas N ₂	60ml/min.	

Table 2. Operating Conditions for Gas Liquid Chromatography

Items	Analytic material
	Sterol analysis
Instrument	GLC (Shimadzu 4BM)
Column	OV-17 (1.5%) glass 2m×3mm ID
Detector	Flame Ionization Detector
Column Temp.	246°C
Detector Oven Temp.	260°C
Carrier Gas N ₂	60ml/min.
H ₂	50ml/min.
Air	1/min.
Chard Speed	5mm/min.

*; Wjis method

結果 및 考察

調製된 green LPC의 화학적 조성과 無機物의 組成은 Table 3 과 같다.

粗蛋白質 含量은 pH 6에서 加熱凝固시켜 조제한 green LPC가 제일 많은 편이다. Italian ryegrass leaf protein과 oats leaf protein은 pH 8에서 CaCl₂를 添加하여 85°C로 加熱할 때 비로소 凝固현상이 뚜렷이 나타나는데 이는 이들 葉綠汁에 Ca⁺⁺의 부족에 기인한다. 그러나 CaCl₂의 添加에도 pH 6에서 加熱凝固시켜 調製한 green LPC보다 粗蛋白質量이 상당히 낮다. 이의 큰 이유는 N-free extract와 粗灰分의 含量이 높음에 기인하는 것 같다.

Table 3. Chemical and mineral composition of green leaf protein concentrates

Leaf protein	pH of coagulation	Crude protein	Ether extract	N-free extract	Crude fiber	Crude ash	Ca Mg Na K P				
							— mg/100g dry matter —				
							———— % on dry-weight basis ————				
Alfalfa leaf protein	4	55.04	10.31	30.91	0.39	3.35	540	100	30	1060	240
	6	63.06	12.27	18.70	0.57	5.40	1200	140	30	1150	410
	8	62.65	9.51	18.84	0.40	8.60	2360	250	180 **	1200	1090
Red clover leaf protein	4	56.02	13.31	27.60	0.32	2.75	270	60	50	850	170
	6	57.19	16.00	22.84	0.13	3.84	600	110	60	1020	210
	8	53.57	11.23	26.84	0.13	8.23	1470	250	340 **	1630	660
Italian ryegrass leaf protein	4	54.14	17.06	24.88	0.26	3.66	260	30	70	590	390
	6	60.08	17.06	18.65	0.18	4.03	510	130	50	1160	420
	8	40.46	12.22	27.44	0.18	19.70 *	6600 **	200	230 **	1160	2310
Oats leaf protein	4	53.45	20.10	23.5	0.22	2.68	130	30	180	620	530
	6	53.57	21.27	22.09	0.25	2.82	260	50	140	740	290
	8	46.54	13.66	26.01	0.24	13.55 *	4330 **	200	260 **	730	1930

* Crude ash includes Ca salts originated from the added Ca in green juice.

** A large portion of Ca and Na was originated from the added CaCl₂ and NaOH in the green juice.

ether extract는 pH 8, pH 4, pH 6에서 加熱凝固시켜 調製한 green LPC順으로 含量이 높다.

green LPC의 脂肪酸組成은 Table 4 와 같다. Italian ryegrass, oats 및 alfalfa의 green LPC는 linolenic acid의 含量이 제일 많고 palmitic acid가 그 다음이고 linoleic acid가 세 번째로 含量이 많았다. 이 세 脂肪酸의 methyl ester가 전체의 70.4%에서 86.2%의 범위를 점유했다. red clover의 green LPC는 linolenic acid의 含量이 제일 많고 그 다음이 linoleic acid이고 palmitic acid가 세 번째로 含量이 많으며 이들 세 脂肪酸 methyl ester는 전 脂肪酸 methyl ester의 82.5%에서 86.2% 범위를 점유했다.

pH 8에서 加熱凝固시켜 조제한 red clover, oats 및 alfalfa의 green LPC는 linolenic acid의 含量이 제일 많았고 pH 6, pH 4에서 加熱凝固한 green LPC의 順으로 linolenic acid의 含量이 적었다. 반면, Italian ryegrass의 green LPC는 linolenic acid의 含量이 pH 4, pH 8, pH 6에서 加熱凝固시킨 LPC順으로 많았다.

이렇게 綠汁에서 green LPC를 凝固시킬 때의 pH에 따라 green LPC 中の 脂肪酸의 組成이 달라짐을 알 수 있다.

green LPC 中の 脂肪酸이 營養이나 酸敗 따위의 고려 대상에 따라 green LPC의 調製條件이 달라져야 하리라 본다.

alfalfa leaf meal³⁾에는 linolenic acid의 含量이 제일 많으며 그 다음이 linoleic acid이며 red clover leaf⁴⁾의 triglyceride에는 linoleic acid의 含量이 제일

많고 그 다음이 linolenic acid이고 palmitic acid가 세 번째로 많았다.

Table 4. Composition of fatty acid esters from green leaf protein concentrates^a.

Methyl ester ^b	Italian ryegrass			Red clover			Oats			Alfalfa		
	PH 4	PH 6	PH 8	PH 4	PH 6	PH 8	PH 4	PH 6	PH 8	PH 4	PH 6	PH 8
10:0	0.2	0.4	0.4	0.3	0.8	0.2	0.8	0.7	0.0	1.0	1.6	1.3
10:1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
12:0	0.1	0.3	1.0	0.3	0.2	0.3	0.9	0.9	0.1	0.9	1.0	0.8
12:1	0.0	0.3	0.3	0.2	0.1	0.1	0.6	0.4	0.2	1.2	0.3	0.1
14:0	1.9	1.6	2.0	2.3	2.1	2.3	1.5	1.2	1.1	4.5	3.9	3.6
14:1	0.1	0.3	0.1	0.6	0.4	0.5	0.0	0.1	0.0	1.4	1.1	1.2
15:0	0.2	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0	0.8	0.3	0.1	2.2	1.1	1.1
16:0	27.4	24.0	31.4	19.8	18.5	16.4	19.2	19.2	20.3	25.2	26.1	25.0
16:1	4.8	3.7	5.2	3.6	3.9	3.3	3.5	3.2	3.2	4.7	5.0	4.5
17:0	1.6	1.7	2.7	2.6	5.3	2.2	1.2	0.9	1.1	5.0	2.0	2.8
18:0	5.8	4.2	4.3	2.5	1.2	1.7	2.1	1.1	2.3	2.8	3.4	3.2
18:1	4.7	2.7	2.8	4.0	3.3	2.8	4.8	4.2	4.4	4.7	4.0	4.6
18:2	16.0	12.6	8.6	20.1	18.1	19.6	11.2	12.5	11.2	15.5	15.7	14.9
18:3	35.6	47.7	38.8	43.5	45.9	50.2	52.0	53.8	54.7	29.7	33.1	35.2
16:0												
18:2	79.0	84.3	78.8	83.4	82.5	86.2	82.4	85.5	86.2	70.4	74.9	75.1
18:3												

a: Per-cent by weight of each fatty acid ester calculated from area of each peak

b: No. of carbons:No. of double bonds.

Table 5. Composition of sterol from green leaf protein concentrates.

Leaf protein	PH of coagulation	Unsaponifiable material in oil (%)	Cholesterol (Mg %)	Campesterol (Mg %)	Sitosterol (Mg %)	Stigmasterol (Mg %)
Italian ryegrass leaf protein	4	6.4	-	99.3	135.7	-
	6	2.0	-	-	-	-
	8	2.2	-	45.1	65.3	3.4
Red clover leaf protein	4	1.7	22.2	119.6	1558.3	250.5
	6	5.7	3.7	22.0	153.8	23.6
	8	2.3	17.4	134.6	1733.8	208.9
Oats leaf protein	4	3.3	-	-	62.3	28.2
	6	3.3	-	-	-	-
	8	3.0	-	23.2	59.6	2.6
Alfalfa leaf protein	4	1.3	-	-	5.6	8.8
	6	2.6	2.7	31.7	46.5	20.3
	8	2.7	15.9	26.6	197.4	51.5

Hawke⁷에 의하면 rye grass中 脂肪酸은 植物이 서숙하므로써 줄어들고 脂肪酸의 組成이 變한다고 였고 Crombie⁸는 Zea mays에서 Jackson과 Knimmerow⁹는 alfalfa leaf meal에서 같은 경향을 받

걸했다.

한편, 같은 製法으로 製造한 LPC도 草種에 따라 脂肪酸의 組成이 다른데 chenopodium, marrow, rye grass, turnip 및 wheat는 linolenic acid, palm-

itic acid, linoleic acid의 順으로 clover는 linolenic acid, linoleic acid, palmitic acid의 順으로 corn은 palmitic acid, linoleic acid, linolenic acid의 順으로 함량이 적었다.

green LPC中 sterol의 組成은 Table 5와 같다.

豆科 식물인 red clover 및 alfalfa의 green LPC가 비교적 sterol이 많으며 일반적으로 pH 6, pH 4, pH 8에서 加熱凝固시켜 調製한 green LPC順으로 含量이 많았다.

alfalfa green LPC는 pH 4, pH 6, pH 8에서 加熱凝固시켜 調製한 LPC順으로 sterol의 含量이 많았다.

red clover와 alfalfa의 green LPC는 cholesterol이 存在함이 특이적이다.

red clover, oats 및 alfalfa의 green LPC는 campesterol, stigmaterol, sitosterol의 順으로 含量이 많았다. Italian ryegrass의 green LPC는 stigmaterol, campesterol, sitosterol의 順으로 含量이 많았다.

要 約

凝固時 pH에 따라 green LPC中の 脂肪酸과 sterol의 組成이 어떻게 달라지는지를 알아보고져 Italian ryegrass, red clover, oats 및 alfalfa의 綠汁을 pH 4, 6, 8로 조정하여 加熱凝固시켜 green LPC를 만들어 실험한 結果는 다음과 같다.

1. Italian ryegrass, oats 및 alfalfa의 green LPC는 linoleic acid, palmitic acid, linolenic acid의 順으로 含量이 점점 많았고 이 세 脂肪酸 methyl ester가 全体脂肪酸 methyl ester의 70.4%에서 86.2%를 점유했다.

red clover의 green LPC는 palmitic acid, linoleic acid, linolenic acid의 順으로 含量이 많았고 이 세 脂肪酸 methyl ester는 全体脂肪酸 methyl ester의 82.5%에서 86.2% 범위였다.

2. red clover, oats 및 alfalfa의 green LPC는 pH 4, pH 6, pH 8에서 加熱凝固한 LPC順으로 linolenic acid의 含量이 점점 많았다. Italian ryeg

grass의 green LPC는 pH 4, pH 8, pH 6에서 加熱凝固시킨 LPC順으로 linolenic acid의 含量이 점점 많았다.

3. red clover와 alfalfa의 green LPC에서 cholesterol이 檢出되었다. 모든 green LPC에서 campesterol, stigmaterol, sitosterol이 檢出되었다.

4. 일반적으로 pH 6, pH 4, pH 8에서 加熱凝固시켜 調製한 green LPC順으로 sterol의 含量이 점점 많았다. 다만 alfalfa green LPC는 pH 4, pH 6, pH 8에서 加熱凝固시켜 調製한 LPC順으로 sterol의 含量이 점점 많았다.

参 考 文 獻

- Horigome, T., Kim J. K., and Uchida, S.: *J. of Nutritional Science and Vitaminology in press* (1983).
- Lima, I. H., Richardson, T., Stahmann, M. A.: *J. Agr. Food Chem.*, **13**(2), 143 (1965)
- Jackson, A. H., Kummerow, F. A.: *J. Am. Oil Chemists Soc.*, **26**, 26 (1949)
- Weenink, R. O.: *Biochem. J.*, **82**, 523 (1962)
- Burnett, M. C., Lohmar, R. L.: *J. Agr. Food Chem.*, **7**(6), 436 (1959)
- Garton, G. A.: *Nature (London)*, **187**, 511 (1960)
- Hawke, J. C.: *J. Dairy Res.*, **30**, 67 (1963)
- Crombie, W. M.: *J. Exptl. Botany*, **9**(26), 254 (1958)
- Debuch, V. H.: *Z. Naturforsch.*, **9**, 561 (1961)
- Nagy, S., Nordby, H. E., Telek, L.: *J. Agr. Food Chem.*, **26**(3), 701 (1978)
- Betschart, A. A., Kinsella, J. E.: *J. Food Sci.*, **40**, 271 (1975)
- Horowitz, W.: *Methods of analysis - A. O. A. C.* (Washington, D. C.) (1975)
- Kanomata, K., Yamaoka, Y., Harada, A. and Tajima, K.: *Shokuhin no Kikubunseki*, (Korin Shohin, Tokyo), 813 (1971)
- Weenink, R. O.: *J. Sci. Food Agr.*, **12**, 34 (1961)
- 日本油化学協会: 基準油脂試驗分析, 63 (1970)