

葉菜類에 含有된 Amino acids에 관한 研究(第一報)

Researches of Amino acids Composition of Protein contained in Edible Vegetables(1)

目 次	
I. 緒 論	
II. 實 驗	
III. 結 論	

春川教育大 韓 玉 洙
Ok Sou, Han

I 緒 論

우리들 生活周邊에는 푸른잎의 食用植物들이 많이 번식하고 또 뿌리나 열매는 食用을 하면서 그 잎은 버리는 예가 많다. 그러나 本論文은 이미 농촌 등지에서는 많이 이용되고 있으나 그 영양에 대해서는 널리 알려져 있지 않은 것을 몇 가지 試料로 擇하여 보았다.

물론 이들 葉菜 등에는 Ascorbic acids와 같은 것이 많이 含有되어 있으리라는 것은 예측할 수 있으나 蛋白質中의 必須 Amino Acids인 Lysine과 Arginine 및 Threonine과 같은 것이 含有되어 있음을 밝히는 것은 重要な 課題라 하겠다.

즉 米穀에는 上記한 生長發育에 多大한 影響을 주는 Lysine과 Arginine 및 Threonine 등이 不足하다는 것은 이미 알려져 있는 事實로서 이와 같은 葉菜 등을 섭취하여 우리들은 영양을 補充하여야 할 것이다.

筆者가 研究한 葉菜들은 호박잎, 고구마잎, 들깨잎, 고춧잎, 명아주잎, 비름잎, 콩잎, 고구마 줄기 등의 8種이었으며, 아직도 筆者의 識見으로서는 上記와 같은 葉菜類들의 文獻 등은 入手하지 못하였다. 그러므로, 이들 蛋白質을 構成하고 있는 Amino acids의 組成을 밝히려고 우선 이 연구에 착수하였다.

實驗은 이들 葉菜들의 脂肪과 色素 등을 Ether로 抽出하여 酸 加水分解하여 얻은 處理試料를 Two Dimensional paper Chromatography method로 展開하여 Ninhydrin 發色으로 Rf值를 測定하였다.

Ⅱ 實 驗

(1) 材 料

下記의 8가지 試料들을 春川周邊에서 收集하여 Oven 속에서 70°C 以下에서 乾燥시킨 후 Motar and Pestle로 粉碎하여 粉末로 만들어서 Desiccator 속에 保管하여 使用하였다.

- ① 박 科 : 호박(南瓜) *Cucurbita moschata* form. Toonas
- ② 메 꽃 科 : 고구마(甘藷) *Ipomoea Batatas* Var. *edulis*
- ③ 꿀 풀 科 : 들깨(荳子) *Perilla frutescens* Var. *japonica*
- ④ 가 지 科 : 고추(辣椒) *Capsicum annuum*
- ⑤ 명아주 科 : 명아주(는장어 ; 藜) *Chenopodium album* Var. *Centrorubrum*
- ⑥ 비 림 科 : 참비름(비름 ; 莧) *Amaranthus mangostanus*
- ⑦ 콩 科 : 콩(대두 ; 大豆) *Glycine max*
- ⑧ 고구마 줄기

(2) 試 料

모든 試藥들은 Analytical grade의 것을 사용하였으며 抽出用 Ether는(日本 昭和エーテル 株式會社製) B.P. 40°C와 Methyl alcohol(キンダ化學株式會社製) B.P. 64.5°C 등의 液體 溶媒들을 再蒸溜하여 사용하였다.

加水分解用 Hydrochloric acid(Hcl)는 (MALL Inckroot Chemical Works製)인 Analytica reagent를 사용하였으며 展開溶媒인 Tertiary Butyl alcohol($(\text{CH}_3)_3\text{—COH}$) (Kanto Chemical Coinc製) B. P. 83°C, phenol($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) (Mallinckrodt Chemical Works製 B.P. 182.6°C n-Butyl alcohol ($\text{CH}_3\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—OH}$) (日本和光純藥工業株式會社製) B.P. 116°C

Acetic acid($\text{CH}_3\text{—COOH}$) (日本 OSAKA 키미다化學株式會社製) B.P. 83°C 등의 溶媒들도 再蒸溜하여 사용하였다.

Spray reagent는 Ninhydrin(Made in Germany E Merck AG, Oarmstad製)를 使用하였다.

Chromatography用 Paper Whatman No.1 Paper(Made in England by W. R. Balston Ltd製)를 使用하였다.

(3) 裝 置

脂肪抽出器는 Soxhlet apparatus,

加水分解裝置는 Spiral Condenser와 Round bottom flask,

展開用 器具는 Pneumatic trough와 Specimim reagent bottle 등 減壓濃縮用 Rotary pump 는 W.M.Welch. Manu fac Turlng Co製 Vacaum pump No. 1410이였으며 發色用 Spray

reagent Dottle 등을 사용하였다.

(4) 實驗方法

① 試料의 處理

① a) 抽出

各種 葉菜의 乾燥試料들을 Soxhlet 裝置의 圓筒濾過紙에 넣고 溶媒 Ether : Methyl alcohol (1 : 3)의 比率로 만들어 5時間 抽出하여 脂肪과 色素 등을 完全除去하여 室內에서 放置하여 건조하였다.

① b) 酸加水分解⁶⁾

脫脂 乾燥한 葉菜粉末들을 500g씩을 精確하게 秤量하여 Spiral condenser를 Connection 한 250ml의 Round bottom flask 속에 넣고 6N-HCl 150ml를 加하고 Boiling Chips를 2, 3개 넣어서 110°C의 溫度의 Wire gauze 위에서 24時間 加熱 還流하여 分解液을 Claisen flask에 옮겨서 Filter paper로 거르고 濃縮後 倍量의 蒸溜水를 加하여 되풀이하는 操作을 5회씩 하여 HCl을 完全히 除去하고 그 液이 15cc되게 濃縮하여 Paper Chromatography에 Spotting할 Sample을 얻어서 냉장고에 保存하여 사용하였다.

② Paper Chromatography法에 의한 分離法

② a) Paper의 精製⁵⁾

蒸溜水를 넣은 큰 水槽에 Whatman No. 1 Paper全紙를 넣고 密閉시켜 展開한 후 乾燥시켜 不純物을 除去하여 25cm×25cm의 正方形으로 切斷하여 사용하였다.

② b) Spotting

切斷한 Paper의 下端에서 約 2cm 되는 곳에 縱橫方向으로 鉛筆로 Line을 긋고 그 交叉되는 곳에 Glass capillary tube를 使用하여 處理된 Sample을 Spotting하는 것을 2, 3회 Heater 위에서 퍼지는 것을 防止하면서 少量을 되풀이하여 건조하였다.

② c) 展開^{2) 3) 5) 7) 8)}

1% Standard Amino Acids용액을 각각 調製하여 그 1cc씩을 正確하게 混合하여 前記 切斷한 Paper의 交叉된 點에 Capillary glass tube를 File로 直角으로 切斷하여 Standard Sample을 Spotting하였으며, 또 처리된 Sample 등을 같은 方法으로 Spotting하여 乾燥하고 一次元 展開溶媒인 (a) Tert-Butyl Alcohol : H₂O : HCOOH(695 : 295 : 10v/v) 또는 (b)n-Butyl alcohol : HAC : H₂O(40 : 10 : 50)의 上澄液을 Chamber 속에 넣고 Paper를 담그고 세워두고 뚜껑을 닫아두고 上昇法으로 滲透시켰다.

Chamber는 大型 標本병을 使用하였으며 Paper가 끝까지 滲透되기까지는 (a) 溶媒에서는 約 18時間, (b) 溶媒에서는 約 8時間이 所要되었다.

滲透된 Paper는 Chamber에서 꺼내어서 긴 Glass tube에 걸치고 完全히 Solvent를 날려 보낸 다음 二次元 展開를 하였다.

二次元展開의 溶媒 등은 前記 (a)는 Phenol : H₂O : NH₃(Phenol : H₂O(775 : 215)의 Stock solution 94ml에 NH₄OH용액 1ml를 加하여 혼든다)를 (b)는 물飽和 Phenol(H₂O : Phenol (20 : 80)의 上澄液) 등을 사용하여 각각 다른 Chamber 속에 넣고 上昇시키고 滲透가 끝나기 까지의 時間은 (a)'는 8C간 (b)'는 9시간 所要되었다.

滲透된 Parper는 Chamber에서 꺼내서 또 前記와 같이 긴 Glass tube로 걸쳐서 完全 風乾 하여 Solvent의 냄새가 없게 하여 調製해 놓은 0.1% Ninhydin溶液을 Spray reagent battle 에 넣고 Spray 후 60°~70°C의 Oven 속에서 約5分間 加溫하여 發色되는 것으로 Standard Amino Acids의 Rf値와 各 葉菜中の Amino Acids 등의 Rf Value를 比較 對照하여 各種 葉菜中の Amino Acids 등을 확인하였으며, 그 Fig와 Table 등은 다음과 같다.

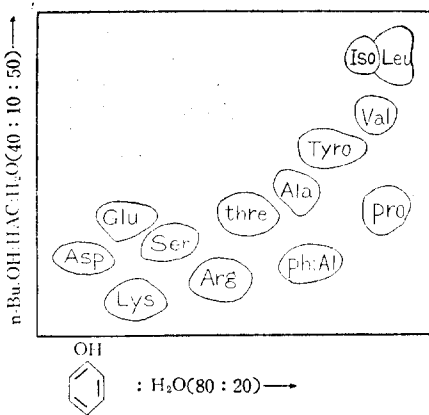


Fig 1

Separation Standard Aminoacids by two dimensional method

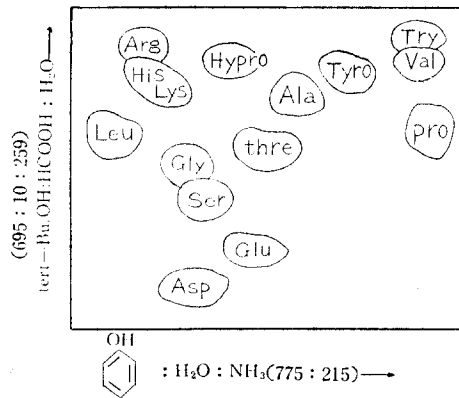


Fig 2

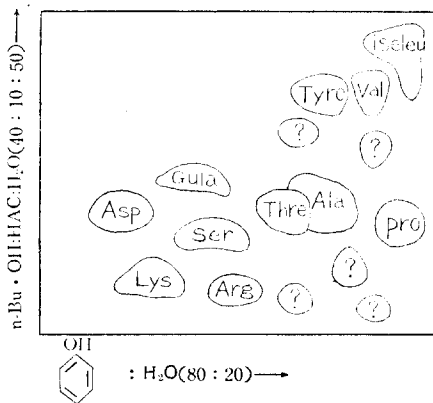


Fig 3

Separation of hydrolyzed Aminoacids of Edible Vegetables by two dimensional paper chromatography (Perilla frutescenes Var japonica)

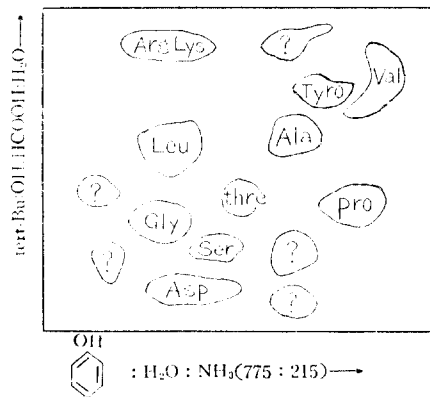


Fig 4

葉菜類에 含有된 Amino acids에 관한 研究

Table 1

Name of Amino acids	Rf Value of Standard Aminoacids		The Rf Value of Samples							Rf Value of Standard Aminoacids		
	One dimensional solvent N-BUOH:HAC:H ₂ O (40:10:50)	Two dimensional solvent Phenol:H ₂ O (80:20)	콩 잎	깨 잎	명 아 주	호 박 잎	비 름	고 구 마 잎	고 춧 잎	고 구 마 줄 기	One dimensional solvent tert BUOH:H ₂ C OOH:H ₂ O (695:10:259)	Two dimensional solvent Phenol:H ₂ O (775:215)
Asp	0.19	0.19	+	+	+	+	+	+	+	+	0.29	0.37
Lys	0.11	0.29	+	+	+	+	+	+	+	+	-0.51	0.3
Glu	0.25	0.3	+	+	+	+	+	+	+	+	0.27	0.49
Ser	0.19	0.35	+	+	+	+	+	+	+	+	0.38	0.38
Arg	0.13	0.43	+	+	+	+	+	+	+	+	0.74	0.33
Thre	0.24	0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	0.51	0.45
Ala	0.15	0.6	+	+	+	+	+	+	+	+	9.63	0.51
Tyro	0.43	0.66	+	+	+	+	+	-	+	-	0.66	0.61
Val	0.49	0.78	+	+	+	+	+	+	+	+	0.79	0.72
Leu	0.69	0.9	+	+	+	+	+	+	+	+	0.59	0.27
Isoleu	0.69	0.9	+	+	+	+	+	+	+	+	0.59	0.27
Pro	0.38	0.95	+	+	+	+	+	+	+	+	0.88	0.88
				??	?	?		?	?	?		
				??	?			?		?		
				??				?		?		

Ⅲ 結 論

(1) 二次元 展開로 Paper Chromatographic method에 의한 Amino acids의 分離는 Aspartic acid, Glutamic acid, Serine, threonine, Alanine, Leucine, Lysine, Arginine, Isoleucine, Valine, Tyrosine and Proline 등이 檢出되었다.

(2) 특히 8種의 試藥中에는 Arginine, Lysine 및 Threonine과 같은 必須 Aminoacids가 모두 나타났으며, 특히 들깨잎 中에는 未知의 斑點들이 모든 葉菜中에 가장 많이 나타났다는 事實은 注目할 만한 일이다.

▶ 參考文獻

- (1) 科研彙報 第3輯 第1卷, p. 84, 李泰寧·李圭晟
- (2) Consden, Cordon & Martin Biochem
- (3) 薄層クロストグラフィー基礎と應用 p. 152
- (4) Chromatography, 佐竹一夫
- (5) 春川教育大學學報 第4輯, p.155, 李用華
- (6) 實驗農藝化學 下卷, p.418, 東京大學農學部
- (7) Block Zweich and Durrum, Paper Chromatography Electrophoresis
- (8) Friedrich Cramer, Papierchromatographie