

# 韓國產 大豆의 蛋白質에 關한 研究

(第 2 報); 濾紙電氣泳動法에 依한 大豆蛋白質의 分析

서울대학교 農科大學 農化學科

邊時明 · 金載勳 · 李春寧

(1966 年 4 月 11 日 受理)

Studies on the Protein of Korean Soybeans.

Part 2; Paper Electrophoresis of the Proteins of Korean Soybeans.

S.M. Byun, Z.U. Kim, and C.Y. Lee

College of Agriculture, Seoul National University

## SUMMARY

Paper electrophoretic separation of soybean protein using phosphate buffer(pH. 7.6, I. 0.18) was carried out and revealed five components. The ratio of each component extracted with the phosphate buffer was estimated as follows.

Component	I	II	III	IV	V
%(aver.)	14.47	7.22	4.43	71.7	2.18

Also, each component of phosphate buffer extract was identified as:

Component	I	II
Identified	phaseolin	glutelin

III	IV	V
albumin $\alpha$	glycinin	albumin $\beta$

The quantitative determination of the components was performed with twenty five varieties of Korean soybean and turned out to indicate marked difference between the varieties in the ratio of the components.

## I 緒 論

動植物組織을 構成하고 있는 蛋白質은 單一物質로서 存在하는 것이 아니라 여러가지 種類의 蛋白質이 混在 混成되어 있기 때문에 이것들의 分離 確認은 아미노산 패턴을 定할 경우나 蛋白質의 純度를 문제 삼을 때에 重要的 意義를 갖고 있을 뿐 아니라 臨床化學 免疫化學 比較生化學 등에 있어서도 重要對象이 되어 있을 뿐 아니라 工業面에 있어서도 特殊 目的으로 有用한 蛋白質을 抽出 할 必要조차 생겨가고 있다.

植物組織 特別 穀粒의 蛋白質에 대하여서는 古典的인 化學의 方法으로 이미 數種씩 分離되어 있고 더 나아가 物理的 또는 物理化學的인 新方法으로 더 細分되어 가는 추세에 있다.

大豆 蛋白質에 관하여서는 맨처음 Meissl 및 Böcker<sup>(1)</sup>(1883)氏에 의해 연구 되었으며 이어서 Osborne 및 Campbell<sup>(2)</sup>(1898)은 soybean meal을 10% NaCl 溶液으로 抽出 透析하여 分離한 protein fraction을 "Glycinin"이라고 命名하였으나 그후 이 glycinin은 單一成分이 아니라는 것이 여러 研究者에 의하여 밝혀졌다. Muramatsu<sup>(3)</sup>(1920)는 大豆中 6.94%가 질소이며 그중 5.79%가 水溶性이고 0.26%가 saline soluble이며 0.16%가 alkali soluble 이고 0.55%가 殘渣로 되어 있는데 水溶性 劃分中 그 84 part가 globulin, 5.36 part가 albumin, 4.36 part가 proteose이며 globulin은 또 그 78.5%가 glycinin 이고 21.5%가 phaseolin이며 albumin은 legumelin이 78.5%이고 soylegumelin이 21.2%임을 報告하였다. Tadokoro 및 Yoshimura<sup>(4)</sup>(1928) 등은 glyci-

nin A. glycinin B. glutelin. legumelin 의 4成分을 報告하였고 Jones 및 Csonka<sup>(5)</sup>(1932)는 大豆蛋白質을 10% NaCl 溶液으로 抽出하고 이를 硫酸으로 飽和시켜 5가지 fraction을 얻었으며 이중 55%로 飽和시켜 얻은 沈澱物이 Osborne 및 Campbell이 얻은 glycinin 과 거의 同一하다고 했으며 Hartman 및 Cheng<sup>(6)</sup>(1936)은 “purified glycinin”을 製造하여 그 等電點이 pH 5.02 인 것을 報告하였다.

Kunihiko Suminokura<sup>(7,8,9,10)</sup>(1939)등은 glycinin, glutelin, phaseolin, albumin  $\alpha$ , albumin $\beta$ 의 5가지 成分을 報告하고 또한 albumin  $\alpha$ 는 Osborne 및 Campbell<sup>(2)</sup>의 legumelin 과, albumin  $\beta$ 는 Muramatsu<sup>(5)</sup>의 soylegumelin 과 同一함을 認定하였다. Briggs 및 Mann<sup>(11)</sup>(1950)은 電氣泳動法을 適用하여 soybean meal의 水浸出物에서 易動도가 다른 7種의 蛋白質成分이 존재함을 발표하였고 아울러 Jones 및 Csonka<sup>(5)</sup> 등이 硫酸으로 沈澱시켜 얻은 fraction이 heterogeneous 함을 밝혔으며 最近에는 超遠心分離器를 이용하여 Naismith<sup>(12)</sup>(1955)와 Briggs 및 Wolf<sup>(13,14)</sup>(1956)등이 大豆蛋白質에 sedimentation constant가 2S, 7S, 11S, 및 15S인 4成分이 있음을 관찰하였고 K. Hasegawa<sup>(15)</sup>(1963)등은 Sephadex G-200 Column Chromatography에 의해 11가지의 成分을 分離하였다. 以外에도 여러 연구자<sup>(16, 17, 18, 19)</sup>들이 大豆蛋白質에 관한 발표를 하고 있다.

以上과 같이 근래에 와서는 機器分析의 活用으로 大豆蛋白質의 劃分이 많이 알려졌지만 아직도 확인되지 않은 것이 많고 또 各劃分의 定量的인 比較도 別로 되어있지 않다.

著者들은 韓國 栽培 大豆 25品種을 대상으로 하여 濾紙電氣泳動法을 實施하고 各蛋白質 패턴의 定性定량을 행하므로써 品種間의 比較를 하여 그 結果를 이에 報告하기로 한다.

## II 實驗方法

### (1) 試料

前報<sup>(20)</sup>에서 사용한 試料와 마찬가지로 1964年度에 생산한 49品種을 서울大學校 農科大學 農學科에서 제공 받아 이중 25品種을 任意로 선택하여 本實驗에 사용하였다. (Table 1)

### (2) 分析方法

#### 1. 試料調製

##### 1) 蛋白質의 抽出 및 窒素回收率

風乾試料 大豆를 Willey mill을 사용하여 20 mesh로 磨碎하고 석유에틸(b.p. 30~60°C)로서 Soxhlet

Table 1 大豆品種

試料番號	品 種 名	試料番號	品 種 名
1	長 端 白 目	14	Shelby
2	白 中 42 號	15	忠 北 黃 1 號
3	灰 色 大 粒	16	全 州 在 來
4	水 原 統 系 9 號	17	浮 石
5	忠 北 白	18	益 山
6	黃 色 中 粒	19	陸 羽 三 號
7	長 端 白 目 8 號	20	密 太
8	金 剛 小 粒	21	玉 造
9	Clark	22	在 來 1 號
10	Merit	23	在 來 20 號
11	Capital	24	훈 에 비 발 콩
12	Gilson	25	金 剛 大 粒
13	Lindarine		

脂肪抽出器에서 脫脂하였다. 脫脂操作은 될수 있는 한 蛋白質의 變性을 막기 위하여 낮은 溫度에서 短時間(3~4時間) 實施하였다. 脫脂 試料는 空氣中에서 乾燥시킨 후 병에 넣어 密封 保管하였다. 脫脂 試料에 대한 窒素, 水分 및 灰分을 常法<sup>(21)</sup>으로 定量하였다. 蛋白質의 抽出<sup>(22)</sup>은 5g의 脫脂 試料에 buffer solution [phosphate buffer<sup>(23,24)</sup>(pH 7.6, I, 0.18) veronal buffer<sup>(20)</sup>(pH 8.6, I, 0.1)] 40ml를 가하여 室溫에서 30분간 浸漬하고 10분간 원심분리(4,500 r.p.m)한 다음 上澄液을 傾瀉하여 Whatman No. 41 濾紙로 여과하고 殘渣에 다시 buffer solution 40 ml를 가하여 浸漬하는 조작을 3회 반복하였다. 여기서 얻은 투명한 여액을 100ml로 채운 후 蛋白質의 變性이 일어나기 전에 바로 電氣泳動을 행하였다. 별도로 抽出液 50ml를 취하여 窒素回收率을 測定하기 위하여 窒素定량을 하였다.

### 2. 濾紙電氣泳動法에 의한 蛋白質의 分析

#### a. 濾紙電氣泳動

泳動裝置 : horizontal type<sup>(25)</sup>

Buffer Solution;

① phosphate buffer<sup>(23,24)</sup>(pH 7.6, I, 0.18)

② veronal buffer<sup>(20)</sup>(pH 8.6, I, 0.1)

濾紙;

Whatman No. 1 濾紙

上記 方法으로 抽出한 蛋白質溶液(約 8mg N/ml of buffer solution) 500入 程度를 濾紙片(7×20cm)의 cathode附近에 band spotting하고 室溫에서 voltage gradient 5volt/cm로 20時間 展開시킨 후 꺼내어 105°C에서 15分間 乾燥시키고 Amidoblack 10 B液\*으로 30分間 染色시키고 methanol: acetic

acid(9:1)로 脫色시켰다. Amidoblack 10 B 로 發色시킨 濾紙를 濾紙吸光度計(Spinco model R.B. Analytrol)의  $1\frac{1}{2} \times 30\text{mm}$  slit 를 사용하여 濃度曲線으로 表示하고 面積을 積分計算하여 各成分의 含量比를 求하였다.

\* Amidoblack 10 B 液

- ① Amidoblack 10 B      1.0g
- ② methanol                100ml
- ③ acetic acid              20ml
- ④ distilled water         80ml

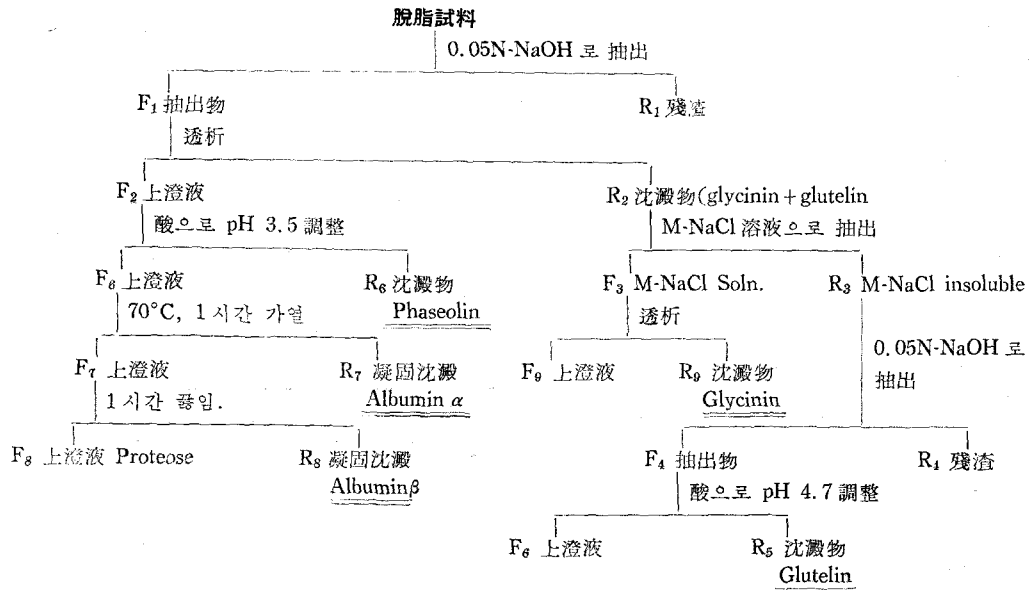
b. glycinin, glutelin, phaseolin, legumelin, soy-legumelin 의 純粹分離 및 其의 電氣泳動,

[方法 1]<sup>(2,4,6)</sup>; 脫脂大豆粉 5g 을 取하여 여기에 10% NaCl 溶液 40ml 를 가한 후 30분간 실온에서 振盪한 다음 10분간 4,500 r.p.m. 으로 원심분리하여 여과한다. 殘渣에 다시 NaCl 溶液 40ml 를

가하여 振盪하는 操作을 3회 반복하고 여액을 합쳐 100ml 로 채운다. 여기에서 얻은 透明한 鹽抽出液을 cellophan 의 半透膜에 넣고 toluol 2~3 방울을 넣어 流水에서 4일간 透析시켰다. 沈澱된 蛋白質을 원심분리하고 이 沈澱物에 다시 NaCl 溶液을 가하여 용해시키고 이를 透析시켜 원심분리하는 操作을 하여 얻은 沈澱物에 無水에 타놀과 에틸을 가하여 보통 방법으로 건조시켜 glycinin 과 phaseolin 을 얻었다. 透析시킨 여액은 硫酸으로 沈澱시켜 albumin 을 얻었다. glutelin 은 NaCl 溶液으로 抽出하고 남은 殘渣에 0.2% NaOH 溶液을 가하여 抽出하고 透析시켜 製造하였다.

[方法 2]<sup>(7,8,9,10,27)</sup>

다음 表와 같은 操作으로 大豆 蛋白質을 系統分離하였다.



c. 各成分의 同定

濾紙에 易動度가 相異하게 나타난 pattern 을 同定하기 위해 上記 [方法 1] 및 [方法 2]의 두 方法에 의해 純粹分離한 glycinin, glutelin, phaseolin albumin α (legumelin), albumin β (soylegumelin)를 試料와 同時에 濾紙電氣泳動을 시행하여 易動度와 그 位置를 比較함으로써 各劃分을 同定하였다.

III 結果 및 考察

(1) 脫脂大豆의 成分 및 窒素回收率

脫脂大豆의 各試料에 대한 水分, 窒素, 灰分의 分析値는 Table 2 와 같다.

이 結果를 보면 水分含量이 比較的 높은데 이것은 抽出溶媒를 回收하여 사용한 경우이다. 이러한 試料에 있어서는 Table 3 에서 보는 바와 같이 窒素回收率이 낮은 이유도 抽出時 水分增加로 인한 蛋白質의 變性에 의한 것으로 생각된다. phosphate buffer 에 의한 抽出液의 窒素回收率은 Table 3 과 같다.

Table 2. 脫脂大豆의 分析表

試料番號	水分 %	窒素 %	灰分 %	試料番號	水分 %	窒素 %	灰分 %
1	11.36	8.15	5.91	15	9.68	7.66	6.32
2	9.75	9.30	5.36	16	10.89	8.01	5.73
3	11.35	7.93	6.05	17	11.04	7.88	5.56
4	9.46	8.04	6.38	18	11.72	7.30	5.91
5	10.06	7.93	6.19	19	10.16	7.16	5.86
6	10.97	7.52	5.77	20	9.87	7.79	5.74
7	9.82	8.59	5.85	21	8.45	8.06	5.86
8	9.59	8.56	6.02	22	11.46	7.99	5.24
9	10.96	7.60	5.65	23	9.41	7.85	5.57
10	9.71	7.79	5.94	24	9.84	7.24	6.03
11	9.26	7.68	5.67	25	11.50	8.31	5.75
12	10.13	7.68	5.53	平均	10.62	7.89	5.86
13	9.64	7.22	6.17	最高	11.72	9.30	6.38
14	9.49	7.59	6.16	最低	8.45	7.16	5.24

Table 3. 窒素回收率

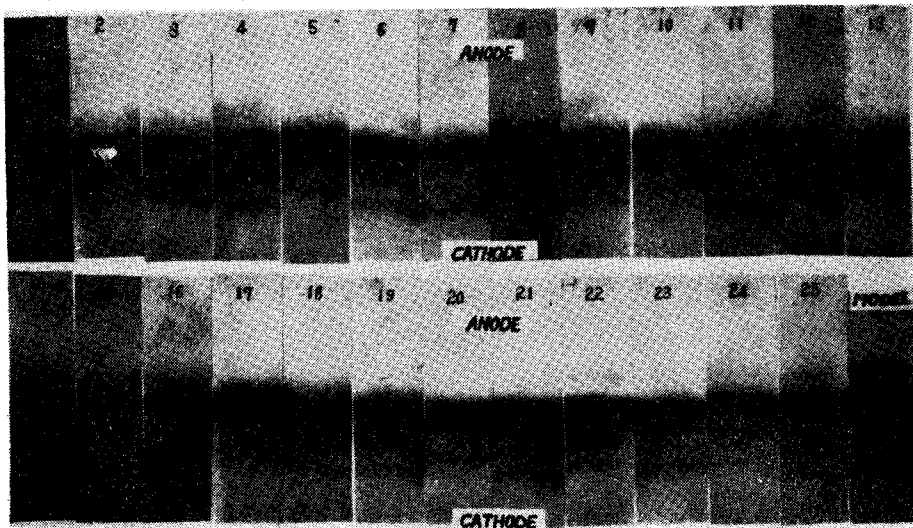
試料番號	試料	窒素回收率	試料番號	試料	窒素回收率	試料番號	試料	窒素回收率
1	長端白目	80.24	10	Merit	87.75	19	陸羽 3 號	80.43
2	白中 42 號	90.25	11	Capital	87.25	20	密 太	81.25
3	灰色大粒	82.01	12	Gilson	82.50	21	옥 조	84.50
4	水原系統 9 號	86.00	13	Lindarine	85.74	22	在來 1 號	84.50
5	忠北白	83.45	14	Shelby	89.58	23	在來 20 號	86.00
6	黃色中粒	81.25	15	忠北黃 1 號	91.17	24	홀애비 밤콩	88.50
7	長端白目 8 號	86.50	16	全州在來	82.07	25	金剛大粒	83.25
8	金剛小粒	84.00	17	浮石	80.55			84.52
9	Clark	81.00	18	益山	84.50			91.17
								80.24

(2) 濾紙電氣泳動法에 의한 蛋白質分析.

紙電氣泳動法으로 分析하여 얻은 패턴과 이를 濃度

脫脂大豆를 phosphate buffer 로 抽出한 抽出液을 濾

曲線으로 表示한 結果는 Fig. 1 과 같다.



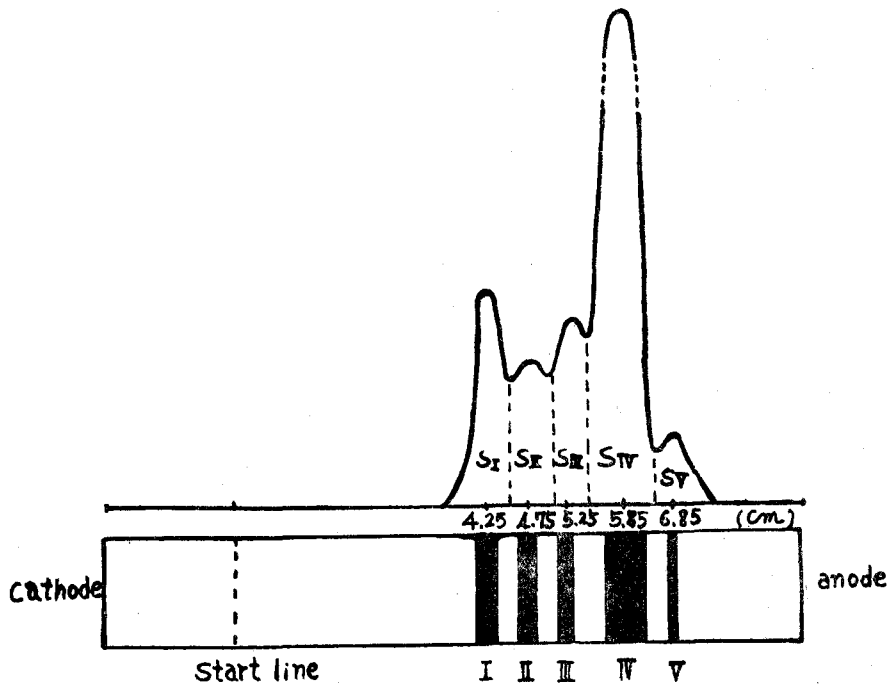


Fig. 1 大豆蛋白質의 phosphate buffer extract 의 paper electrophoretogram 및 그의 濃度曲線

veronal buffer로 展開시킨 結果는 오히려 phosphate buffer로 실시한 것에 비하여 分離가 좋지 않아 3種의 pattern 밖에 나타나지 않으므로 이후는 phosphate buffer 만을 사용하였다. 品種間에는 별 差異없이 5

種의 fraction 으로 나타나지만 濃度曲線에 있어서 는 各 fraction 이 全蛋白質量에 대하여 차지하는 含量比는 品種間에 差異가 커서 그 結果는 Table 4 와 같다.

Table 4. 各 fraction 의 含量比

fraction 試料番號	I %	II %	III %	IV %	V %	合 %	試料番號	I %	II %	III %	IV %	V %	合 %
1	12.59	7.87	4.94	72.17	2.42	100	15	13.96	6.21	6.50	69.52	3.81	100
2	16.45	6.79	3.49	71.23	2.03	"	16	11.28	6.85	3.62	75.71	2.54	"
3	15.51	8.81	5.31	67.31	2.06	"	17	13.85	9.84	5.62	68.17	2.52	"
4	14.45	4.73	3.82	74.82	2.18	"	18	11.40	6.47	4.22	75.40	2.51	"
5	16.66	8.80	4.42	68.05	2.07	"	19	11.50	8.99	6.12	71.55	1.84	"
6	12.87	9.50	4.88	72.83	1.92	"	20	13.48	7.57	6.16	69.30	2.99	"
7	15.14	4.19	3.19	76.19	2.38	"	21	14.92	9.89	5.34	67.94	1.91	"
8	18.20	9.99	7.31	62.43	2.07	"	22	11.77	8.64	5.35	71.97	2.27	"
9	14.61	4.61	3.29	75.49	2.14	"	23	19.43	8.08	5.62	63.94	2.93	"
10	16.74	5.23	3.01	73.38	1.64	"	24	15.49	3.82	2.98	76.46	1.25	"
11	19.01	6.55	4.61	68.18	1.65	"	25	13.89	7.42	5.62	71.17	1.90	"
12	13.55	6.38	3.08	77.48	2.51	"	平均	14.47	7.22	4.43	71.70	2.18	
13	12.91	6.94	2.94	75.44	1.97	"	最高	19.43	9.99	7.31	77.48	3.81	
14	12.28	6.18	3.24	76.52	1.78	"	最低	11.28	3.82	2.94	62.43	1.25	

S. Area of each fraction.

$$S_I + S_{II} + S_{III} + S_{IV} + S_V = S_T$$

$$\% \text{ of } S_I = \frac{S_I}{S_T} \times 100$$

$$\% \text{ of } S_{II} = \frac{S_{II}}{S_T} \times 100$$

$$\% \text{ of } S_{IV} = \frac{S_{IV}}{S_T} \times 100$$

$$\% \text{ of } S_{III} = \frac{S_{III}}{S_T} \times 100$$

$$\% \text{ of } S_V = \frac{S_V}{S_T} \times 100$$

이 結果에서 glycinin 과 phaseolin 을 합한 globulin 의 含率이 櫻井芳人<sup>(28)</sup> 氏가 發表한 84%보다 약간 높은 86%를 보이나 櫻井芳人氏는 proteose 를 함유시켰기 때문에 含率이 약간 낮아진 것으로 생각된다. Fig. 1에서 各成分의 記號를 出發點에서

부터 I, II, III, IV, V 로 표시했으며 이들의 mobility (易動度)와 實驗 (2)-2-b [方法 1] 및 [方法 2]에서 얻은 glycinin, phaseolin, glutelin, albumin  $\alpha$  (legumelin)<sup>(7,8,9,10)</sup>, albumin  $\beta$ (soylegumelin)<sup>(7,8,9,10)</sup>의 易動도를 계산한 結果는 Table 5 와 같다.

Table 5. 各成分의 mobility( $\text{cm}^2\text{volt}^{-1}\text{sec}^{-1} \times 10^{-5}$ )

Component	I	II	III	IV	V	glycinin	phaseolin	glutelin	albumin $\alpha$	albumin $\beta$	legumelin	soylegumelin
mobility	1.18	1.32	1.46	1.63	1.91	1.63	1.18	1.32	1.46	1.91	1.46	1.91

各成分의 同定은 Table 5의 易動도와 아울러 試料에서 얻은 抽出液과 함께 實驗 (2)-2-b에서 系統分離한 蛋白質을 同時에 電氣泳動을 시켜서 濾紙

에 나타난 pattern의 位置를 比較하여 同定하였으며 그 結果는 Fig. 2와 같다.

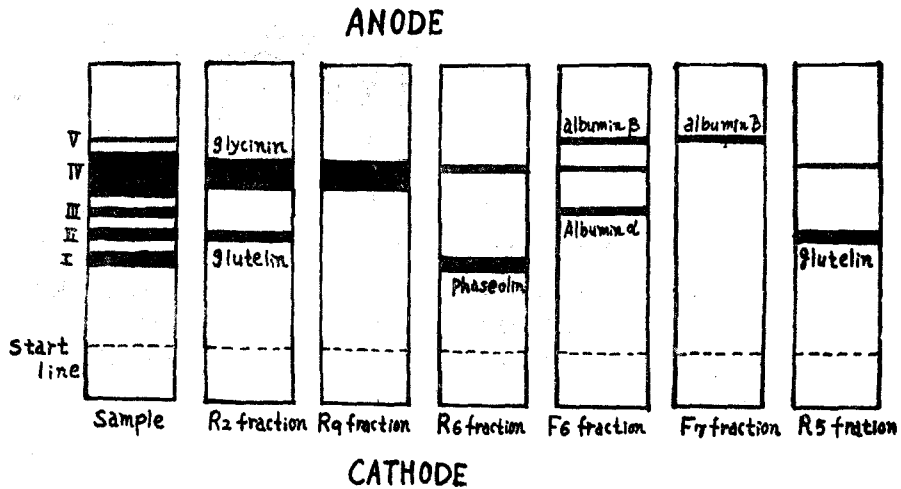


Fig. 2. Paper electrophoretograms of soybean protein and each of its single isolated proteins; Electrophoresis was conducted at 22~25°C (room temp.) at a constant current 15m Amp., voltage gradient 5 volts/cm for 15-20 hours.

앞의 Fig. 2에서 R<sub>5</sub>와 R<sub>6</sub> 및 F<sub>6</sub>에서 예상한 결과보다 pattern이 하나씩 더 나타난 것은 그 位置와 易動도로 보아 glycinin에 해당하는 것인데 이는

系統分離時 不純物로 殘留한 glycinin에 의해 나타난 結果로 생각된다. 以上の 結果를 종합하여 各成分을 同定한 結果는 Table 6과 같다.

Table 6. 各成分의 同定 結果

sample component	I	II	III	IV	V
identified	phaseolin	glutelin	albumin $\alpha$ (legumelin)	glycinin	albumin $\beta$ (soylegumelin)
mobility( $\text{cm}^2\text{volt}^{-1}\text{sec}^{-1} \times 10^{-5}$ )	1.18	1.32	1.46	1.63	1.91

Table 4와 Table 6에서 韓國 栽培 大豆 25品種 間의 各劃分 含量比를 알 수 있는데 뚜렷한 品種間 差異를 나타내고 있다. 이들의 差異를 大豆의 形態

生態, 成熟, 遺傳 등 各面과 연결시킬 수 있다면 매우 흥미있는 結果를 덧붙여 얻을 수 있을 것인데 유감히도 各試料에 대한 이 方面의 資料를 충분히 얻지

못하여 將次의 宿題로 남겨 둘까 한다.

#### IV. 要 約

韓國 栽培 大豆 25 品種을 선택하여 各 品種의 蛋白質 패턴을 濾紙電氣泳動法으로 시행하여 品種間의 差異를 比較해 보았다. 이 方法으로 5 種의 蛋白質을 分離할 수 있었으며 各 品種間의 定量的인 含量率 差를 찾아 볼 수 있었다. 各 蛋白質 成分間의 平均

含量比는 다음과 같다.

I	14.47%
II	7.22%
III	4.43%
IV	71.70%
V	2.18%

上記 各成分을 同定하여 본 結果는 다음과 같다.

Component	I	II	III	IV	V
identified	phaseolin	glutelin	albumin $\alpha$	glycinin	albumin $\beta$

#### V. 引用文獻

- 1) E. Meissl, and F. Böcker, *Monatsh*, **4**, 349—368 (1883); *Sitzber. Akad. Wiss. Wien, Math-Naturw. Klasse, Abt. 1*, **87**, 372—391 (1883)
- 2) T.B. Osborne, and G.F. Campbell, *J. Am. Chem. Soc.*, **20**, 419—428 (1898)
- 3) S. Muramatsu, *J. Tokyo. Chem. Soc.*, **41**, 311—354 (1920)
- 4) T. Tadokoro, and K. Yoshimura, *J. Faculty Agr. Hokkaido Imp. Univ.*, **20**, 355—362 (1928)
- 5) D.B. Jones, and F.A. Csonka, *J. Biol. Chem.*, **97** XXIX~XXX(1932); *Proc. Am. Soc. Bio. Chemists*, **26**, 29—30 (1932)
- 6) R.J. Hartman and L.T. Cheng, *J. Chinese Chem. Soc.*, **4**, 152—156 (1936)
- 7) K. Suminokura, *J. Agr. Chem. Soc., Japan*, **15A**, 132—142 (1939)
- 8) K. Suminokura, *idid.*, **18**, 129—135(1842)
- 9) K. Suminokura, and N. Hosoi, *idid.*, **19**, 213—214 (1943)
- 10) K. Kono, S. Mori, and M. Kajima, *Bull. Research. Inst. Food. Sci., Kyoto Univ.*, No 11, 1—23 (1953)
- 11) D.R. Briggs and R.L. Mann, *Cereal Chem*, **27**, 243 (1950)
- 12) W.E.P. Naismith, Jr. *Biochim. et. Biophys. Acta.*, **16**, 203 (1955)
- 13) W.J. Wolf and D.R. Briggs, *Arch. Biochem. Biophys.*, **63**, 40(1950)
- 14) D.R. Briggs and W.J. Wolf, *ibid.*, **72**, 127(1957)
- 15) K. Hasegawa, T. Kusano, and H. Mitsuda, *Agr. Biol. Chem. Japan*, **27**, (12), 878—880 (1963)
- 16) W.J. Wolf, and D.R. Briggs, *Arch. Biochem. Biophys.* **76**, 377 (1958)
- 17) W.J. Wolf, G.E. Babcock, and A.K. Smith, *ibid* **99**, 265—274 (1962)
- 18) D.R. Briggs, *Cereal Chem.*, **40**, 450—450(1963)
- 19) A.K. Smith, and J.J. Rackis, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 633(1957)
- 20) 金載勳·邊時明 本誌, **7**, 79 (1966)
- 21) 中村一郎, 榮養學實驗書, 朝倉書店, (1955)
- 22) A.K. Smith, S.J. Circle, and G.H. Brother, *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 1316—1320 (1935)
- 23) J.W. Lyttleton, *Biochem. J.*, **61**, 70 (1956)
- 24) Benjamin et al, *Laboratory manual of Biochemistry*, 5th edition. 154 (1960)
- 25) R.J. Block, E.L. Durrum, and G.A. Zweig, *Manual of paper chromatography and paper electrophoresis* (1955) Academic press, New York.
- 26) H.G. Kunkel, *Methods Biochem. Anal.* **1**, 141 (1954)
- 27) 角倉邦彦, 日本農藝化學會誌, **18**, 129(1942)
- 28) 櫻井芳人, 食糧學 **172** (1958)