

한국산 밀가루 단백질의 화학적 조성에 관한 연구(제 1 보). Gliadin 단백질의 아미노산 조성 및 그의 정제

趙 聖 熙 · 金 俊 平*
中央大學校 文理科大學 化學科
*中央大學校 農科大學 食品加工學科

(1977. 1. 6 接受)

Studies on the Chemical Composition of Korean Wheat Flour Proteins (I). Purification of Gliadin Proteins and Amino Acid Composition

Sung Hye Cho and Jun Pyong Kim
Department of Chemistry, Chung Ang University, Seoul, Korea
*Department of Food Technology, Chung Ang University, Seoul, Korea
(Received Jan. 6, 1977)

요 약. 한국산 밀 품종들 중에서 장광의 것을 선정하여 단백질을 추출한 다음 이 단백질의 아미노산 조성과 gliadin 단백질의 정제로 주 gliadin 단백질을 분리하여 본 결과

1. Gliadin 과 glutenin 단백질은 다같이 disc 전기이동상에 5개의 band를 나타내었다.
2. Gliadin 과 glutenin 단백질은 다같이 glutamic acid의 함량이 가장 많았다.
3. Gliadin 과 glutenin 단백질간에 아미노산 조성의 차이는 gliadin이 glutenin 보다 alanine의 함량은 적었으나 proline의 함량은 많았다.
4. 주 gliadin 단백질은 gliadin 단백질을 Sephadex G-150 과 A-25 column으로 정제하여 얻었다.

ABSTRACT. We have investigated the amino acid composition of gliadin and glutenin from wheat flour Jang Kwang variety and have purified the main gliadin protein by Sephadex column. The results were obtained as follows:

1. Five bands of component for both gliadin and glutenin were found in disc electrophoretic gel column
2. The highest content of amino acid in gliadin and glutenin were glutamic acid and alanine was present in comparatively large amounts in glutenin, whereas proline was rich in gliadin
3. Main gliadin protein was purified by Sephadex G-150 and A-25 column chromatography and identified its purity by disc electrophoresis.

서 론

밀가루의 주단백질인 gluten은 주로 gliadin과 glutenin으로 구성되어 있다.

이 gliadin과 glutenin은 점도, 탄성, 응집력 등의 성질에서 상호간의 차이점을 비교할 수 있

다. 일찌기 밀가루 단백질의 화학적 조성을 구명하기 위한 일환으로서, Blinsh¹는 gliadin 단백질의 추출방법을 보고하였다. 그리고 Jones^{2,3}는 경질 밀가루의 gluten에 대한 전기이동상을, Woychick⁴는 gliadin과 glutenin의 S-S 결합을 환원시켜 starch-gel 중에서 이들의 전기이동

상을, Yonezawa⁵와 Kozmina⁶는 gluten 으로부터 pH-이온세기의 방법을 적용하여 glutenin 을 분리하고 starch-gel 중에서 이의 전기이동상을, Fukagawa⁷는 gluten 단백질을 등전점의 알칼리 쪽에서 polyacrylamide-gel의 전기이동상을 각각 관찰하였다. Bilinski⁸는 Blinsh와 Pence⁹의 방법을 인용하여 밀가루 단백질의 추출방법을 보다 광범위하게 다루었고, Finlayson¹⁰은 Bilinski⁸의 방법으로 gliadin 을 추출한 다음 이를 효소로 분해하고 여기서 얻은 5개의 주 peptide에 대한 아미노산의 조성을 비교하였다. 또한 Kanazawa^{11,12}는 0.01M acetic acid 중에서 초원심분리기로 분리한 glutenin의 아미노산 조성 및 glutenin polypeptide의 SH-SS 교환반응에 관하여 연구하였다.

이상의 연구결과에서, 밀가루 단백질의 화학적 조성은 아직도 일반적인 부분만을 추리할 수 밖에 없다. 더욱이 한국산 밀가루의 단백질에 관한 연구는 거의 진행되지 않았다. 이에 저자들¹³은 한국산 밀가루를 품종별로 보아 그들의 disc 전기이동상을 관찰한 결과 품종들간에는 차이가 없음을 확인한 바 있었다. 본 실험에서는 한 품종의 밀가루만을 선정하여 gliadin과 glutenin 단백질을 추출하였다. 그리고 이들의 아미노산 조성과 gliadin 단백질을 Sephadex column으로 정제하여 주 gliadin 단백질을 얻을 수 있었기에 이에 보고하고자 한다.

실 험

1. 시 약. (1) Phosphate buffer (pH 8.0): 0.3 M sodium phosphate (dibasic) 용액과 0.3 M sodium phosphate (monobasic) 용액을 16:1로 혼합하고 pH 8.0으로 하였다.

(2) Sodium barbitone buffer (pH 8.7): 30g의 sodium barbitone과 19.5g의 sodium acetate를 0.1 N 염산 205 ml에 용해하고 pH 8.7로 하였다.

(3) Bromophenol blue (BPB): 0.05 g의 BPB와 1g의 염화수은(I)을 진한 acetic acid 2 ml에 녹이고 증류수로 전량이 100 ml가 되도록 하였다.

2. 시료조제. 시료는 전보¹³의 품종들 중에서 조단백질의 함량이 비교적 많았던 장광의 밀가루만을 택하고 Bilinski의 방법⁸으로 gliadin과 glutenin 단백질을 추출하였다.

3. 분 석. 아미노산 분석은 일정량의 시료에 6N 염산을 가하여 진공으로 봉하고 105°C에서 22시간 가수분해를 한 다음 자동아미노산분석기(Hitach KLA-3B)를 사용하였다.

Disc 전기이동은 Reisfeld의 방법¹⁴에 따라 0.37 M glycine citrate buffer (pH 4.0) 중에서 전개하였다. 이때 column(6×80 mm) 한개당 4~5mA의 전류를 통하였다. 그리고 거름종이 전기이동은 거름종이(Whatman No.1)에 시료를 점적한 다음 sodium barbitone buffer (pH 8.7) 중에서 7 mA의 전류를 통하여 전개하였다.

4. Gliadin 단백질의 정제¹⁵⁻¹⁸. Sephadex는 G-150과 A-25를 사용하였고 이를 충진한 column(1.5×50 cm)은 먼저 전기용매인 phosphate buffer(pH 8.0)로 전처리물 하였다. 일정량의 시료를 주입한 다음 이의 유출액은 automatic fraction collector로 4 ml씩 받았다. 그리고 각 유출액들은 분광광도계(Shimadzu MPS-50L)로 280 mμ에서 흡광도를 측정하였고, 이로서 fraction들을 설정하였다. 설정된 각 fraction들의 단백질 시료는 투석하여 염을 모두 제거하고 50°C에서 진공 농축한 다음 이를 다음의 정제 시료로, 또는 거름종이 전기이동의 시료용으로 각각 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 전기이동상 및 아미노산의 조성. Fig. 1에서, gliadin과 glutenin 단백질의 전기이동상은 다같이 pH 4.0에서 5개의 band를 나타낸다. 그리고 Table 1의 아미노산 조성에서, gliadin은 glutamic acid의 함량이 20.16 mg%이고, glutenin은 이의 함량이 19.95 mg%이다. 따라서 이들은 모두 glutamic acid의 함량이 가장 많다. 또한 gliadin과 glutenin간의 비교는 alanine과 proline의 함량에서 비교적 현저한 차이를 나타낸다. 즉 alanine의 함량은 gliadin이 2.06 mg%이고, glutenin이 4.98 mg%이다. 그리고

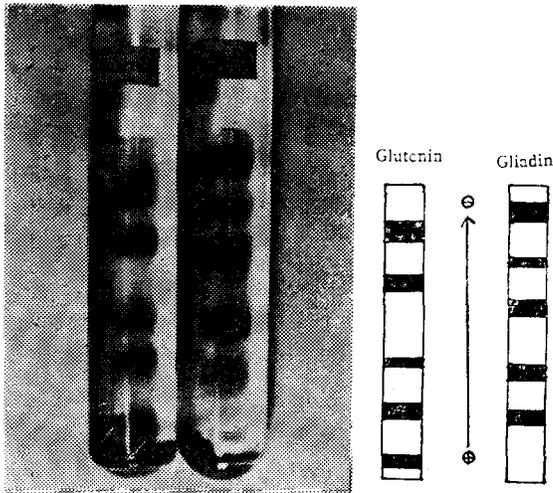


Fig. 1. Electrophoretic patterns of gliadin (7.5% acrylamide) and glutenin (4.5% acrylamide) developed in glycine citrate buffer (pH 4.0).

Table 1. Amino acid composition of gliadin and glutenin.

Amino acid(mg%)	Protein	
	Gliadin	Glutenin
Lysine	0.28	0.65
Histidine	4.13	4.07
Arginine	3.73	4.02
Glycine	5.28	4.97
Alanine	2.06	4.98
Valine	2.06	2.56
Methionine	4.65	4.08
Isoleucine	5.92	6.34
Leucine	8.04	7.93
Glutamic acid	20.16	19.95
Aspartic acid	1.75	2.08
Proline	15.63	12.47
Serine	1.72	1.84
Tyrosine	2.04	1.92
Phenylalanine	3.14	3.50
Cystine	0.23	0.18

proline의 함량은 gliadin이 15.63 mg%이고 glutenin이 12.47 mg%이다.

2. Gliadin 단백질의 정제. Fig. 2에서 gliadin 단백질을 Sephadex G-150 column으로 정제할 때 이의 fraction들은 대략 4개로 나눌 수 있다.

이 중에서 F₃ fraction이 주축을 이루고 이의 수득률은 75.4%이다. 또한 F₃ fraction의 전기 이동상은 Fig. 3에서 음극쪽으로 이동된 pattern과 전혀 이동되지 않은 pattern으로 구분된다.

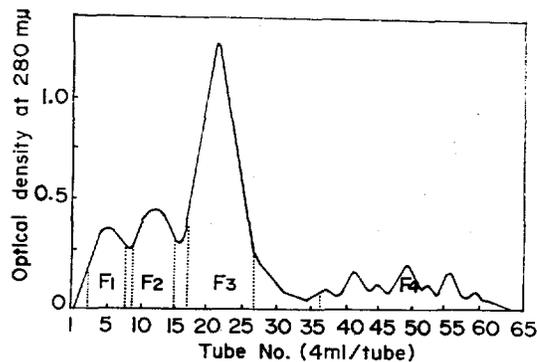


Fig. 2. Elution curve of the gliadin proteins with phosphate buffer (pH 8.0) by Sephadex G-150 column (1.5×50).

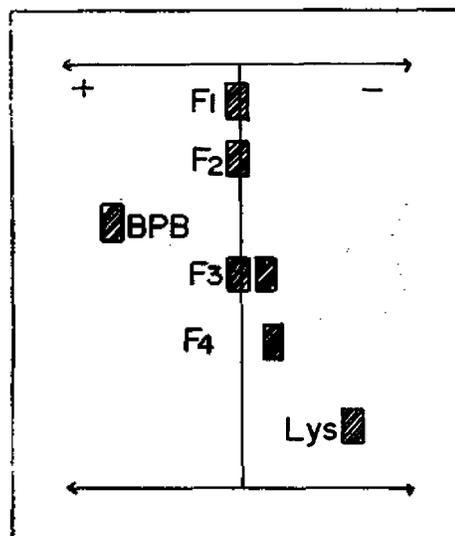


Fig. 3. Paper electrophoretic pattern of gliadin proteins separated by Sephadex G-150 column in sodium barbitone buffer (pH 8.7): 8 hrs, 7 mA, 350 V.

F₃ fraction 만을 다시 Sephadex A-25 column 으
로 재정제 할 때 이의 fraction 들은 Fig. 4 와
같이 3 개로 나눌 수 있다.

이 중에서 Fm fraction 이 주축을 이루고 이의
수득률은 92 % 이다. 그리고 Fm fraction 의
전기이동상은 Fig. 5 와 6 에서 다같이 1 개의

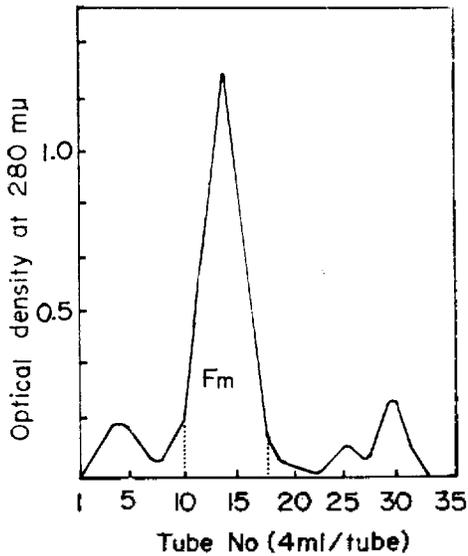


Fig. 4. Elution curve of the F₃ fraction in phosphate buffer (pH 8.0) by Sephadex A-25 column (1.5×50).

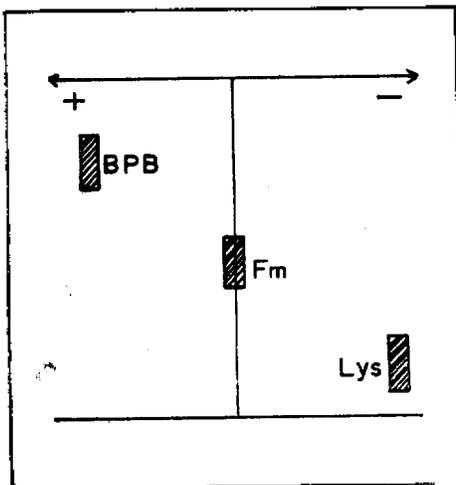


Fig. 5. Paper electrophoretic pattern of main gliadin purified by Sephadex A-25 column. Sodium barbitione buffer (pH 8.7): 8 hrs, 7 mA, 350V.

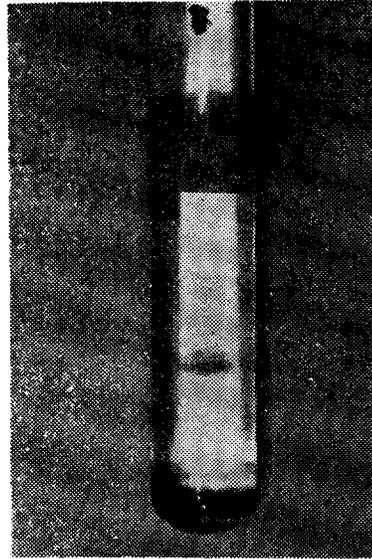


Fig. 6. Electrophoretic pattern of main gliadin purified by Sephadex A-25 column developed in glycine citrate buffer (pH 4.0) and phosphate buffer (pH 5.3).

band 만이 나타나, 단일물질임을 확인할 수 있
었다.

인용문헌

1. M. J. Blinsh and R. M. Sandstedt, *Cereal Chem.*, **3**, 144 (1926).
2. R. W. Jones and N. W. Taylor, *Arch. Biochem. Biophys.*, **84**, 368 (1959).
3. R. W. Jones and G. E. Babcock, *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 483 (1961).
4. J. H. Woychik and F. R. Huebner, *Arch. Biochem. Biophys.*, **105**, 151 (1964).
5. D. Yonezawa and T. Miwa, *Bull. Univ. of Osaka Pref.*, **24**, 13 (1972).
6. N. P. Kozmina and N. V. Tvorogova, *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, **9**, 318 (1973).
7. K. Fukagawa and T. Toyomasu, *Bull. Univ. Osaka Pref. Ser. B.*, **24**, 12 (1972).
8. E. Bilinski and W. B. Mcconell, *Cereal Chem.*, **35**, 66 (1958).
9. J. W. Pence and A. H. Elder, *Cereal Chem.*, **30**, 275 (1953).

10. A. J. Finlayson, *Canadian J. Biochem.*, **42**, 1133 (1964).
11. H. Kanazawa and D. Yonezawa, *日農化*, **48**, 113 (1974).
12. H. Kanazawa and Yonezawa, *日農化*, **48**, 245 (1974).
13. 조성희, 김준영, *중대논문집*, **19**, 275 (1974)
14. R. A. Reisfeld, *U. J. Lewis Nature*, **195**, 281 (1962).