

한국산 밀가루 단백질의 화학적 조성에 관한 연구(제 2 보).
주 Gliadin 단백질의 분자량 측정 및 말단아미노산의 검출

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 接授)

Studies on the Chemical Composition of Korean Wheat
Flour Proteins (II). Molecular Weight
of the Main Gliadin Protein and Its Terminal
Amino Acid Determination

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. 장광품종의 밀 gliadin 단백질을 정제하여 주 gliadin 단백질을 얻은 다음 이의 아미노산 조성과 분자량 그리고 N-말단 및 C-말단 아미노산을 조사하여 본 결과

1. 주 gliadin 단백질의 아미노산 조성은 glutamic acid의 함량이 가장 많았다.
2. 주 gliadin 단백질의 분자량은 $60,200 \pm 200$ 이었다.
3. 주 gliadin 단백질의 N-말단 아미노산은 phenylalanine 이었고, C-말단 아미노산은 methionine 이었다.

ABSTRACT. We have investigated for amino acid composition, molecular weight and terminal amino acid of the main gliadin protein which was purified by Sephadex column. The results were obtained as follows:

1. The highest content of amino acid was glutamic acid for the main gliadin protein.
2. The molecular weight was estimated $60,200 \pm 200$ for the main gliadin protein.
3. Identified N-terminal and C-terminal amino acid of the main gliadin protein were phenylalanine and methionine, respectively.

서 론

전보¹⁾에서 gliadin 과 glutenin 간의 아미노산 조성비는 대체로 alanine 과 proline 의 함량에서 뚜렷한 차이를 보여 주었다. 그리고, gliadin 단백질은 Sephadex G-150 과 Sephadex A-25

column 에 의하여 비교적 간단하게 그의 주 gliadin 단백질을 정제할 수 있었다. 본 실험은 전보의 방법으로 주 gliadin 단백질을 정제한 다음 이의 분자량 측정과 N-말단 아미노산 및 C-말단 아미노산이 검출되었기에 이에 보고하고자 한다.

실 험

1. 시 약

(1) Potassium phthalate buffer (pH 6.0): 0.1 M monopotassium phthalate 용액 50 ml와 0.1 M 수산화나트륨용액 45.5 ml를 혼합하여 pH 6.0으로 조절한 다음 *ter*-amyl alcohol 200 ml로 24시간 포화시켰다.

(2) Starch paper: 1% 녹말용액을 거름종이 (Whatman No. 1)에 바르고 40°C에서 건조시킨 다음, 다시 그 위에 formamide와 acetone (2:7)의 혼합용액을 발랐다.

(3) Iodine-azide 용액: 0.01 M 요오드용액과 0.5 M 요오드화칼륨용액을 같은 양으로 혼합한 다음, 다시 이 혼합용액과 같은 양의 0.5 M sodium azide 용액을 가하였다.

(4) 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB)의 정제: Merk 제 일급시약을 2 mmHg에서 감압 증류하였다 (b. p 133°C/2 mmHg).

(5) Pyridine의 정제: Merk 제 일급시약을 고체 수산화칼륨을 넣은 데시케이터 중에서 24시간 건조시킨 다음 116°C에서 증류하였다.

(6) Ethyl acetate의 정제: Fisher 제 일급시약을 77°C에서 증류하였다.

(7) Phenylisothiocyanate (PTC)의 정제: Nakarai 제 일급시약을 12 mmHg에서 감압 증류하였다 (b. p 95°C/12 mmHg).

(8) Formamide의 정제: Fisher 제 일급시약을 1 mmHg에서 감압 증류하였다 (b. p 70.5°C/1 mmHg).

(9) 무수 hydrazine의 합성: Stähler의 방법²에 의하여 80% hydrazine 수화물과 생석회를 구리제품의 플라스크에 넣은 다음 염화칼슘관을 연결한 증류장치를 130~180°C에서 증류하였다.

2. 시료조제

장광품종의 밀가루로부터 얻은 gliadin 단백질을 전보의¹ 방법으로 Sephadex column에 의하여 정제하고 이로써 주 gliadin 단백질을 얻었다.

3. 아미노산의 분석

주 gliadin 단백질의 시료를 6 N 염산으로 105°C에서 22시간 가수분해한 다음 자동아미노

산 분석기 (Hitach KLA-3B)로 분석하였다.

4. 분자량 측정

Stokolsa³의 SDS-polyacrylamide gel 전기이동법에 의하여 주 gliadin 단백질의 분자량을 결정하였다. 이때 polyacrylamide-gel은 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2) 중에서 column (5×100mm) 한개 당 6 mA의 전류를 통하였고, 표준물질은 chymotrypsinogen (25,700), ovalbumin (43,000), leucine amino peptidase (53,000), serum albumin (68,000) 등을 사용하였다.

5. N-말단 아미노산의 검출

(1) DNP법⁴⁻⁸: 주 gliadin 단백질 시료에 FDNB를 가하여 DNP 화를 시키고 여기에 다시 6 N 염산을 가하여 105°C에서 3시간 가수분해를 하였다. 이를 에테르로 추출하여 DNP-아미노산을 얻은 다음, Mill 장치⁹로 정제하였다. Paperchromatography는 potassium phthalate buffer (pH 6.0)와 phosphate buffer (pH 6.0) 중에서 각각 전개시켰다.

(2) PTC법¹⁰⁻¹⁶: 시료에 PTC를 가하여 PTC 화를 시킨 다음, 벤젠을 가하여 물층과 분리하여 물층의 것을 건조시킨 후 여기에 35% 염산과 진한 acetic acid (1:5)의 혼합용액을 가하고 실온에서 16시간 방치하여 고리화 시켰다. 이를 ethyl acetate로 추출하여 PTH-아미노산을 얻었다. PTH-아미노산을 아세톤에 녹여 starch paper에 일정량의 시료와 표준 PTH-아미노산을 점적한 다음 formamide로 포화시킨 butyl acetate 용액 중에서 전개시켰다. 그리고 iodine-azide 용액으로 처리하여 미지 PTH-아미노산의 위치를 확인하였다.

6. C-말단 아미노산의 검출

(1) Hydrazine 분해법¹⁷⁻¹⁸: 염화칼슘관이 부착된 증류장치의 플라스크 속에 주 gliadin 단백질의 시료와 무수 hydrazine을 넣고 100°C에서 8시간 가열하였다. 이를 증류수에 녹이고 benzaldehyde로 세척한 다음 수용액층으로부터 C-말단아미노산을 얻었다. 그리고, 이 C-말단아미노산의 일정량에 FDNB (2% sodium bicarbonate 함유)를 가한 다음, 실온에서 2시간 방치하였다. 이를 2 N 염산으로 pH 2.0에 맞추고

ethyl acetate 로 추출하여 DNP-아미노산을 얻었다. 이 DNP-아미노산은 Mill 장치로 정제한 다음 먼저의 DNP법과 같이 paperchromatography 를 행하였다.

(2) DNP-아미노산에서 자유아미노산의 전환: 먼저의 hydrazine 분해법으로 전개된 DNP-아미노산을 증류수로 용출시켜 실온에서 진공 건조시켰다. 여기에 28% 암모니아수를 가하여 붓하고 105°C에서 2시간 가열하였다. 그리고 다시 실온에서 진공 건조시킨 다음 증류수에 녹여 2N 염산으로 pH 2.0에 맞추었고 이어서 에테르로 세척하여 자유아미노산을 얻었다. 이의 확인은 일차원 paperchromatography 에 의해 전개한 다음 ninhydrin 으로 발색하여 표준아미노산과 비교 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 주 Gliadin 단백질의 아미노산 조성.

Table 1에서 glutamic acid는 11.53 μmole로 가장 많고, lysine은 0.36 μmole로 가장 적다. 주 gliadin 단백질의 아미노산조성비는 전보¹의 gliadin 단백질의 것과 비교하여 볼 때 대체로 비슷하게 분포되어 있다.

2. 주 Gliadin 단백질의 분자량. Fig. 1에서 표준물질과의 비교로 얻어진 주 gliadin 단백질의 분자량은 약 60,200±200이다.

Table 1. Amino acid composition on the main protein in gliadin.

Amino acid	Amount (μ mole)	Amino acid	Amount (μ mole)
Lysine	0.36	Leucine	1.85
Histidine	1.19	Glutamic Acid	11.53
Arginine	1.04	Aspartic Acid	0.64
Glycine	1.20	Proline	5.39
Alanine	1.15	Serine	0.97
Valine	0.96	Tyrosine	1.00
Methionine	1.15	Phenylalanine	0.73
Isoleucine	1.71	Cystine	0.12

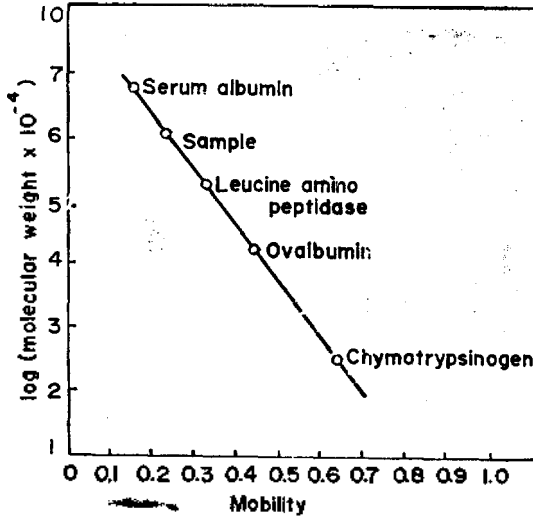


Fig. 1. Determination of the molecular weight of purified main gliadin by compared with other known molecular weight of proteins.

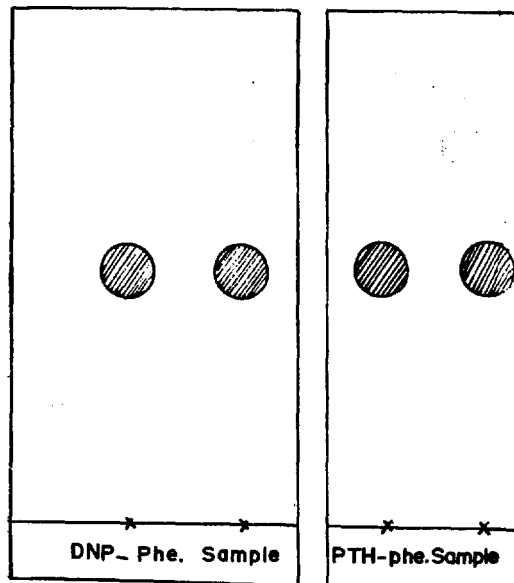


Fig. 2. Determination of the N-terminal amino acid on a paper chromatography.

3. N-말단 아미노산과 C-말단 아미노산. 시료의 Rf 값을 표준아미노산의 것들과 비교하고, 이로서 얻은 결과는 Fig. 2와 Fig. 3와 같다.

Fig. 2에서는 N-말단 아미노산이 phenylalanine으로 확인되고, Fig. 3에서는 C-말단 아미노산이...

노산이 methionine 으로 확인된다.

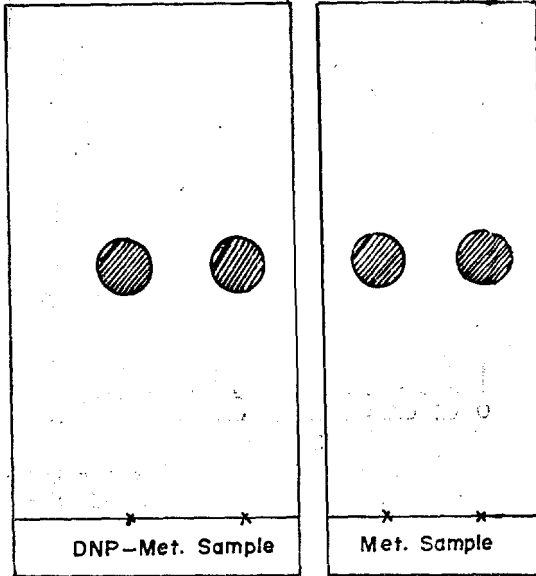


Fig. 3. Determination of the C-terminal amino acid on a paper chromatography.

인용문헌

1. 趙聖熙, 金俊平, 대한화학회지, 21, 210 (1977).
2. A. Stähler, *Ber.*, 42, 3018 (1909).
3. J. J. Stokolsa and H. W. Latz, *J. Biochem. Biophys Res Commun.*, 58, 74 (1974).
4. F. Sanger, *Biochem. J.*, 39, 507 (1945).
5. A. L. Levy, *Nature*, 174, 126 (1954).
6. A. L. Levy and C. H. Li, *J. Biol. Chem.*, 213, 487 (1955).
7. G. L. Mills, *Biochem. J.*, 50, 707 (1952).
8. H. S. Rhinesmith and W. A. Schroeder, *J. Amer. Chem. Soc.*, 76, 609 (1957).
9. G. L. Mills, *Biochim. Biophys. Acta*, 14, 274 (1954).
10. P. Edman, *Arch. Biochem., Biophys.* 22, 475 (1949).
11. P. Edman, *Acta Chem. Scand.*, 4, 277 (1950).
12. V. M. Ingram, *J. Chem. Soc.*, 3717 (1953).
13. A. L. Levy and D. Chung, *Biochim. Biophys. Acta*, 17, 454 (1955).
14. P. Edman and K. Lauber, *Acta Chem. Scand.*, 10, 466 (1955).
15. J. Sjöquist, *Acta Chem. Scand.*, 7, 447 (1953).
16. J. Sjöquist, *Biochim. Biophys. Acta*, 41, 20 (1960).
17. J. H. Bradbury, *Nature*, 178, 912 (1956).
18. S. Akabori and K. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 29, 507 (1956).
19. S. Akabori and K. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 25, 214 (1952).
20. S. Akabori and K. Ohno, *Proc. Japan Acad.*, 29, 561 (1953).
21. G. Braunitzer, *Ber.*, 88, 2025 (1955).