

콩나물 製造中 窒素化合物의 變化와 그 營養學的 研究

第六報. 蛋白質의 電氣泳動樣相變化

梁且範 · 朴尙基 · 尹錫權* · 朴 薰**

漢陽大學校 食品營養學科, 同德女子大學*, 韓國人蔘煙草研究所**

(1983년 11월 3일 수리)

Changes of Nitrogen Compounds and Nutritional Evaluation of Soybean Sprout

Part VI. Changes in electrophoretic pattern of protein

Cha-Bum Yang, Sang-Ki Park, Suk-Kwon Yoon* and Hoon Park**

Hanyang University, Dongduck Womans University,* Seoul Korea Ginseng and
Tobacco Research Institute.**

Abstract

Change of protein component in soybean sprout grown at four temperatures was investigated by polyacrylamide gel electrophoresis. Main bands were identified using purified seed globulins. Electrophoretogram showed 5 main bands (a, b, c, d, and p) and 10 minor bands in seed and maximum number (19) of bands (8 main band including 0 and 11 minor) at 4th day after germination in cotyledon. All bands appeared in axis protein but resolution was poor. In cotyledon, a component (most rapidly) and b+c+d component decreased while o+p component and other minor components were increased at 6th day and decreased thereafter. In axis all components increased rapidly, especially in minor components and b+c+d component. High growing temperature accelerated decrease in cotyledon and increase in axis of protein, especially for 11S. The a component was identified as 7S, b+c+d as 11S and o+p as 2S globulin.

緒 論

著者は 前報¹⁾에서 條件을 달리하여 콩나물을 製造하는 過程에서 全窒素, 不溶性蛋白質態窒素, 水溶性蛋白質態窒素 및 水溶性非蛋白質態窒素別로 窒素化合物의 變化를 測定하였다. 여기서 콩나물이 자랄

에 따라 主要貯藏蛋白質인 水溶性蛋白質이 分解되어 상당량이 水溶性非蛋白質態窒素로 變化됨을 알수 있었으나 蛋白質의 主要 구성성분의 變化相은 측정하지 못하였다. 大豆發芽中の 蛋白質 구성성분의 變化에 관한 研究로는 일찍이 近藤金助等²⁾이 1.5N NaCl로 蛋白質을 抽出하여 電氣泳動 pattern 과 主要蛋白質구성성분의 移動度 및 分布를 보았는

데 發芽가 進行됨에 따라서 蛋白質구성성분의 分布가 變化되고 未熟大豆의 것에 유사하여지는 경향을 보인다고 하였으며 또 이들 구성성분 分布의 變化는 發芽함에 따라서 이들 成分이 一部는 分解되어 lower peptides 및 amino酸等으로 分解되고 一部는 分解의 前驅體로서 變性되어 他 구성성분으로 된다고 報告하였다. 그런데 이들의 結果에서는 電氣泳動 pattern上에서 구성성분의 分離가 뚜렷하지 못하였고 各各의 同定도 되어있지 않아 단백질구성성분의 이동도 및 분포의 變化相도 概괄적이었다. Catsimpoalas等은^{3,4)} disc electrophoresis와 disc immunoelectrophoresis로서 大豆發芽中 子葉部의 저장단백질 變化를 보았는데 蛋白質主要 構成成分인 11S는 發芽16日 後에도 存在하는 반면 7S는 9日後에 나타나지 않는다고 하였다. 大豆發芽에 따른 蛋白質 pattern의 變化를 cellulose acetate membrane을 사용하여 電氣泳動한 報告가 있으나⁵⁾ 단백질 구성성분의 分離가 제대로 되어있지 않았다.

本 研究에서는 栽培溫度를 달리하여 콩나물을 製造하는 過程에서 子葉과 胚軸部位別로 단백질 主要構成成分의 變化를 알고자 Disc gel electrophoresis에 依하여 分析하여 보았다.

材料 및 方法

1. 材料 및 試料의 調製

前報¹⁾에서와 같이 콩나물을 溫度를 달리하여 기른것을 期間別로 子葉部와 胚軸部를 채취, -50°C에서 冷凍乾燥시키고 60 mesh로 粉碎하여 그 粉末을 Soxhlet抽出장치에서 ethyl ether로 10시간정도 脫脂하여 試料로 사용하였다.

大豆는 그대로 껍질을 벗기고 粉碎하여 脫脂하였다.

2. 7S와 11S globulin의 調製

李동⁶⁾ 및 Wolf et. al.⁷⁾의 方法에 準하여 실시하였다. trypsin inhibitor(2S)는 標準品(Merck사제품)을 使用하였다.

3. 蛋白質의 抽出 및 定量

脫脂試料 100mg을 冷却시킨 乳鉢에 넣고 10 ml의 표준완충액(32.5mM K₂HPO₄, 2.6mM KH₂PO₄, 400mM NaCl, pH 7.6, 이온強度 0.5, 10mM 2-

mercaptoethanol)을 加해 30分間진탕, 원심분리(10'g, 30分, 0°C)하여 상등액을 사용하였다.⁸⁾ 蛋白質의 定量은 抽出된 蛋白質을 Lowry等⁹⁾의 方法에 의해 bovine serum albumin을 표준으로 하고 Folin phenol reagent로 發色시켜 540nm에서 吸光度의 測定으로하였다.

4. 電氣泳動

Davis⁸⁾의 方法에 따라서 다음과 같이 行하였다. 100×5mm의 pyrex tube에 80mm길이의 running gel (pH 8.9, 7.5% acrylamide w/v)과 10mm길이의 spacer gel(pH 6.7, 2.5% acrylamide w/v)을 만들어 上泳動槽에 수직으로 固定시키고 上, 下泳動槽에 tris-glycine buffer (pH 8.3)를 채운 후 sucrose를 3% 함유시킨 蛋白質抽出液을 gel當 蛋白質量으로 100μg씩 spacer gel上部에 注入하고 上泳動槽에 음극, 下泳動槽에 양극을 連結하여 冷凍機(-5°C)內에서 gel當 2.5mA의 電流로 電氣泳動하였다.

이때 dye front로는 bromo phenol blue (BPB)를 사용하였다. 電氣泳動時間은 보통 3시간 정도였다. 電氣泳動이 끝난 gel은 곧 7% acetic acid용액에 녹인 0.1% naphthol blue black용액으로 45분간 염색한후 7% acetic acid용액으로 脫色시켰다. 脫色이 끝난 gel은 各 band의 B.P.B.에 對한 相對的移動度(R_m value)를 求하였고 또 densitometer (Densitrol MDU-33C, Toyo Inc.)로 0.2×2mm slit를 사용하여 620nm에서 scanning하였다 各 peak에 해당하는 단백질 분획의 含量은 粒當 蛋白質含量에 各peak의 面積比를 곱하여 얻었다.

結果 및 考察

콩나물이 25°C에서 자라는 일차별로 蛋白質構成成分의 變化를 7.5% poly acrylamide gel에 電氣泳動한 것은 그림 1과 같다. 原料大豆에서는 5개의 큰 band (a, b, c, d 및 p) 기타 10개의 작은 band로 모두 15개를 보이나 2日째에는 미소 band가 5개로 줄어들고 4日째에서는 主 band가 하나 없어지고 다시 7개(o band를 포함)나타나 미소 band가 8개가 되어 모두 19개의 最高 band數를 보인다. p band는 줄어들고 앞에 o band가 나타났다. 原料大豆蛋白質에서 抽出한 7S와 11S globulin과 2S인 trypsin inhibitor 標品을 同一한 條件으로 전기泳動한것은 그림 1과 같다. 이들 표준 단백질의

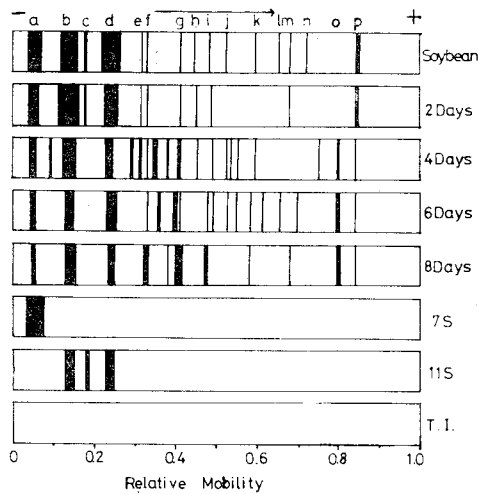


Fig. 1. Disc polyacrylamide gel electrophoretic patterns of protein from soybean seeds, cotyledon of soybean sprouts(2, 4, 6 and 8 days during soybean germination at 25°C), 7S, 11S and trypsin inhibitor.

전기영동 densitogram과 콩나물 발아중의 그것은 그림 2와 같다.

Hill et al¹⁰⁾과 추들⁶⁾의 방법에 따라 전기영동에서 보인 주band들을 표준단백질의 그것과 비교해 보면 a band (Rm 0.08)는 7S, b band (Rm, 0.14), c band (Rm, 0.18) 및 d band (Rm, 0.24)는 11S, o band (Rm, 0.79) 및 p band (Rm, 0.81)는 2S globulin으로推定되며 이들이 대두저장 단백질의 주획분들이다.

本實驗에 使用한 品種유래를 大豆品種 11개의 蛋白質類型別分類¹¹⁾를 참조하여보면 a band가 b band보다 커서 b/a가 0.8정도였으며 2S로 同定된 2개의 peak (o와 p)중 Rm值가 큰 p band를 갖고 있는 類型 G에 가까웠다. 이들 貯藏蛋白質의 分劃들이 發芽에 따라서는 主 peak가 더 작은 조각으로 쪼개지며 分解 및 轉移가 일어나 陽極으로 빨리 移動됨을 알 수 있는데 peak의 pattern이 명확하지 않고 퍼져보인다.

이를 densitogram으로 보았을 경우(그림 2) 15°C 경우에는 4일이후, 20°C 이상의 온도에서는 2일이후부터 각 peak들이 뾰족하지 않고 둥그스런 모양을 보이고 있는데 이는 發芽가 進行됨에 따라 단백질이 분해되어 電荷狀態가 유사한 것들로 되기 때문이라 볼 수 있다.¹²⁾

部位別로 보면 子葉部에서는 대체로 어느 溫度

에서나 發芽가 進行됨에 따라서 7S globulin이라推定되는 a band가 가장먼저 그 다음에 11S globulin이라推定되는 b, c 및 d band들이 줄어들어 分解 및 轉換를 보여 주고 있다.

2S와 trypsin inhibitor로推定되는 o나 p band는 初期에는 p band만이 나타났으며 그後 發芽가 進行됨에 따라 4日째 以後에서 o band가 나타났으며 經時的으로 차차 커졌다. 이는 p band가 分解되어 o band로 되던지 혹은 7S와 11S의 主band들이 분해되어 o band化될 가능성을 시사하고 있다.¹³⁾ 또한 大體로 量이 적은 e부터 n의 band(아직 未同定 band)들은 發芽 過程中에 主band인 a, b, c 및 d band들이 감소하면서 증가하는 것들이 있고 없어지는 것도 있으며 이들 부근에 새로운 band가 생기기도 하였다.

發芽後期에는 차차 band수가 減少되었다. 胚軸의 경우는 子葉에서와 같은 Rm值를 갖는 peak들이 모두 存在하였으며 또한 分子量이 작은 e부터 n의 band 含量도 子葉中에서 보다 높은 比率로 나타내고 있음을 볼 수 있었다. 이는 發芽에 따라서 子葉의 貯藏蛋白質이 低級 peptide, amide 및 아미노산등으로 分解되어 胚軸으로 移動되고 이들을 原料로 하여 胚軸의 뿌리끝쪽 生長部에서 새로운 蛋白質의 合成이 빨리 行하여 저서 子葉部에서와 다른 蛋白質構成成分이 생겼다고 볼 수 있다. 그래서 胚軸部の 경우 子葉에서와 같은 Rm 值를 갖는 peak들이라도 子葉中의 蛋白質과는 다른 새로운 蛋白質이지만 편의상 그 分劃을 子葉에서와 같이 a, b, c, d 그리고 e부터 n의 band라고 이름을 붙였다. 또한 胚軸部에서는 大體的으로 子葉에 比較해서 分리가 덜되어 명확하지 않는 peak를 이루고 있었다.

栽培溫度別 大豆發芽에 따른 主要各 band의 面積比에 各時期別의 乾物蛋白質量을 곱해서 얻은 粒(seed)當 主要分劃들의 變化를 部位別로 보면 표 1 및 그림 3과 같다. 먼저 子葉部에서 보면 a band는 發芽에 따라 15°C에서는 2일까지 완만하게 그 以後부터는 急激히 減少되는 경향이었고 그 以上の 溫度에서는 初期부터 계속 急激하게 減少되었으나 b band는 15°C에서는 經時的으로 계속 약간씩 增加를 보였으며 20°C에서는 4일까지, 25°C에서는 2일까지 增加를 보이다가 그 以後에 감소를 보이며 30°C에서는 初期부터 계속적으로 減少를 보이었다. 이는 溫度가 높아짐에 따라서 기준단백질의 分解와 새로운 단백질의 생성이 더 빨

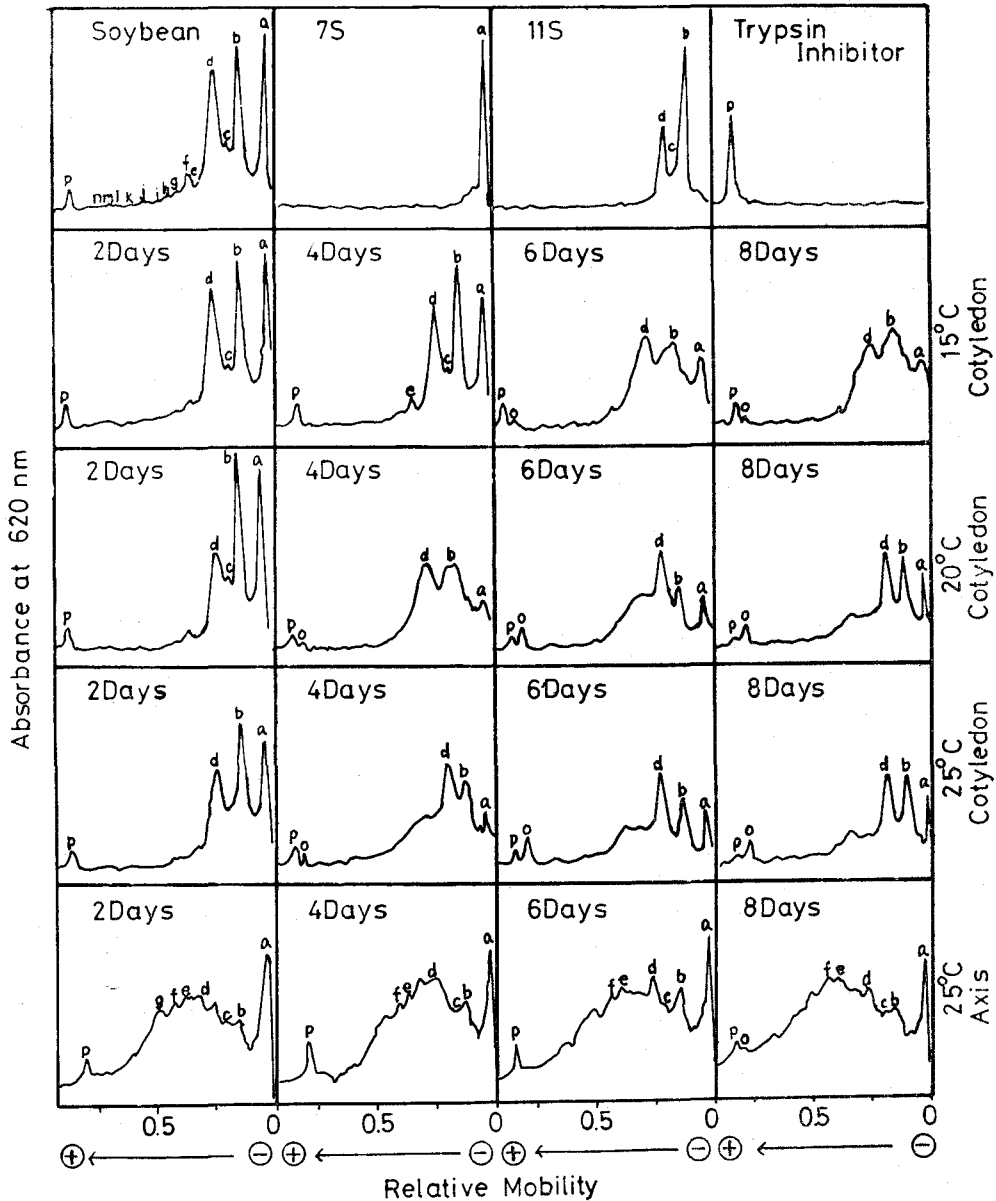


Fig. 2. Densitometric tracings of disc polyacrylamide gel electrophoretic pattern of proteins from soybean seeds, cotyledons and axis at various growing stages and temperatures, 7S, 11S, and trypsin inhibitor.

라짐을 의미한다.

이러한 사실은 조건과 양상에 따라 서로 會合이 가능한 7S와 11S의 特性 때문인 것으로 推定된다. c band는 15°C 경우만 經時的으로 약간적 減少되는 경향이나 큰 變化없이 少量씩 存在하였으며 20°C以上에서는 2日까지만 少量나타나고 그 以後부터 나타나지 않았다. d band는 大體로 發芽에 따

라 完만하게 減少를 보이고 溫度가 높을수록 더 많이 減少되었다. 11S라 推定되는 b+c+d band의 경우는 b band의 影響을 많이 받아 낮은 溫度에서는 完만하게 계속 감소를 보이었고 온도가 높을수록 急激하게 減少되었다. (그림 3)

高溫條件에서 a蛋白質量보다 b+c+d蛋白質量이 더 빨리 감소하는 경향(표 1, 그림 3)은 7S

Table 1. Distribution of main protein components in soybean and soybean sprouts after polyacrylamide gel electrophoresis at various growing stages and temperatures

Sample			Distribution of main component (protein mg/seed)			
			11S (b+c+d)	7S(a)	2S(o+p)	Other(e~n)
Soybean			24.36	11.51	0.77	3.29
Cotyledon	15°C	2 days	22.91	10.75	0.61	2.03
		4 "	21.10	7.22	0.61	2.53
		6 "	20.90	4.45	0.86	2.74
		8 "	18.71	3.97	0.83	2.49
	20°C	2 "	22.42	9.43	0.89	2.06
		4 "	20.39	5.64	0.91	2.86
		6 "	10.73	3.34	1.06	9.73
		8 "	10.70	2.76	0.97	5.87
	25°C	2 "	22.40	7.81	0.82	2.57
		4 "	14.49	3.85	0.91	8.96
		6 "	10.45	2.24	1.14	7.17
		8 "	9.31	1.67	0.79	4.73
	30°C	2 "	16.43	7.03	0.80	6.38
		4 "	12.46	4.01	0.85	7.79
		6 "	8.65	3.44	0.93	5.38
		8 "	4.30	5.05	0.76	3.79
Axis	15°C	2 "	0.86	0.42	0.02	0.70
		4 "	2.03	0.57	0.09	1.21
		6 "	3.58	0.77	0.12	3.47
		8 "	3.98	0.86	0.14	5.71
	25°C	2 "	1.02	0.30	0.03	0.95
		4 "	2.44	1.19	0.03	3.03
		6 "	4.11	1.80	0.12	5.38
		8 "	4.90	2.03	0.26	7.82

보다도 11S가 먼저 감소한다는 淺野三夫等¹²⁾의 報告와 一致한다. 7S가 먼저 빨리 감소한다고 하는 Catsimpoalas et al^{3,4)}의 결과는 低溫條件에서 수행한 결과와 유사하므로 이들간 상반된 결과는 온도와 관련 제검토 해야 할 것이다.

e부터 n의 band는 15°C, 20°C에서는 初期 2일까지 약간의 감소를 보이고 그 이후 6일까지 增加되다가 그 이후 약간의 減少를 일으키고 25°C와 30°C의 경우는 4일까지 增加되다가 그 이후 減少를 일으켰다. 이는 發芽初期에는 分解가 別로 일어나지 않다가 그 이후에 많은 分解가 일어났다고 볼

수 있으며 發芽後期에 減少됨은 e부터 n까지의 band가 electrophoresis에서 검출될 수 없는 더 작은蛋白質이나 peptide形態로 되어가서 損失되어 지지 않았나 생각된다. o+p band는 6일까지 미세한 증가를 보이다가 그後 감소를 보이거나 全體의으로 別다른 變化가 없이 少量으로 完滿하게 나타났다. 胚軸部에서 나타나는 分割을 보면 a band는 15°C에서는 完滿하게 그 이상의 溫度에서는 더 크게 增加量을 보이었다. b+c band는 둘다 發芽에 따라 미미하게 增加를 보이며 재배온도가 높을수록 더 크게 增加되었다. d band는 發芽에 따라 더 급

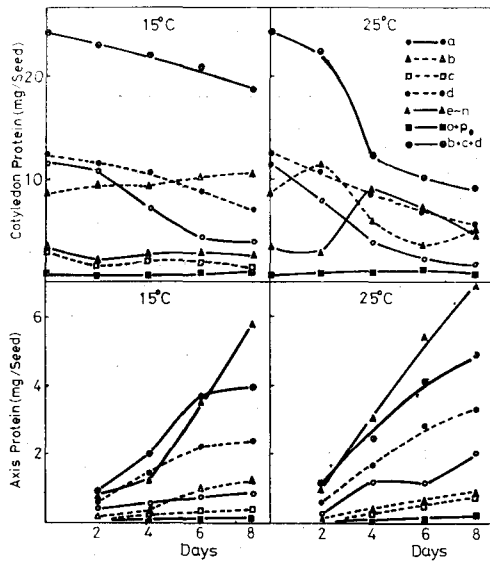


Fig. 3. Changes in the main protein component of soybean sprouts at various growing stages and temperatures.

激하게 增加를 보이는데 溫度가 높을수록 그 增加量은 더 컸다. 또한 11S라 추정되는 b+c+d band는 6일까지 急激하게 增加되다가 그 이후부터 완만하게 增加되었다. 未同定한 e부터 n까지의 band는 역시 發芽에 따라서 15°C에서는 4일까지 완만하게 增加되다가 그 이상의 온도에서는 初期부터 急激하게 增加되었다. o+p band는 미미한 增加를 보이거나 全體적으로 큰 變化없이 少量으로 나타났다. 이상에서 보면 胚軸部에서는 子葉에서 分解되어 온 많은 低級의 peptide나 아미노酸들에 의해서 새로운 蛋白質의 合成이 빨리 일어나서 子葉의 蛋白質構成成分과는 다른 새로운 a,b,c,d 및 e부터 n까지의 band들이 빨리 生成되어짐을 알 수 있으며 1) 溫度가 높을수록 더 빨리 合成되어짐을 알 수 있다. 그리고 胚軸部에서의 蛋白質合成은 分子量이 작은 e부터 n까지의 band들이 먼저 생기는 것이 아닌가 생각된다.

摘 要

콩나물을 온도별로 길러 성장과정별 단백질조성을 7.5% polyacryl amide gel 전기영동법으로 조사하고 조제표준단백질의 그것으로 동정하였다. 원료大豆에서는 主 band 5개 (a,b,c,d 및 p)와 미

소 band 10개가 나타났고 4日子葉에서는 8개의 主 band와 (o band포함)와 11개 미소 band로 최고 band數를 보였다. 胚軸에서는 子葉에서 發見되는 band들이 모두 나타났으나 分離가 선명치 못하였다. 생육이 경과함에 따라 子葉에서는 a band가 먼저, b,c,d band가 다음으로 감소해 갔으며 미소 band o+p는 6일까지 증가하다 그후 감소하였다. 胚軸에서는 모든 band가 계속증가하였는데 미소 band와 b+c+d가 증가속도가 컸다. a band는 7S, b+c+d는 11S, o+p는 2S globulin으로 동정되었다. 생육온도가 높아짐에 따라 子葉에서의 감소와 胚軸에서의 증가속도가 빨라졌으며 7S보다 11S가 촉진되었다.

引用 文 獻

1. 梁且範, 金載勳: 韓國農化學會誌 23 : 7(1980)
2. 近藤金助, 森茂樹, 加島守一: 京都大學食糧科學研究所報告 15 : 49(1954).
3. Catsimpoalas, N. Campbell, T.G. and Meyer, E.W.: Plant Physiol 43 : 799(1968).
4. Catsimpoalas, N. Ekenstam, C. Rogers, D.A. and Meyer, E.W.: Biochim. Biophys. Acta, 168 : 122(1968).
5. 孫惠淑·朴正降·李盛雨: 韓國農化學會誌20 : 182(1977).
6. 李春寧·金仁洙·曹道鉉: 한국생화학회지 9 : 129(1976).
7. Wolf, W.J. Babcock, G.E. and Smith, A.K.: Arch. Biochem. Biophys, 99 : 265(1962).
8. Davis, B.J.: Ann. N.Y. Acad. Sci, 121 : 404 (1964)
9. Lowry, O.H. Rosebrough, N.J. Farr, A.L. and Randal R.J.: J. Biol. Chem. 193 : 265 (1951).
10. Hill, J.E. and Breidenbach, R.W. Plant Physiol 53 : 742(1974).
11. 李宗錫: 韓國作物學會誌 22 : 1(1977).
12. 淺野三夫, 紫崎一雄: 日本食品工業學會誌20 : 126(1973).
13. Koshiyama, I.: Agr. Biol. Chem. 32 : 879(1968).
14. Daussant, J. Neucere, N.J. and Conkerton, E.J.: Plant Physiol. 44 : 480(1969).