

發芽가 유채의 질소화합물 분획에 미치는 영향

윤석권 · 조병미 · 김우정*

동덕여자대학 식품영양학과 *세종대학 식품과학과

Effect of Germination on the Fractions of Nitrogenous Component of Rapeseed

Suk Kwon Yoon, Byoung-Mi Cho and Woo-Jung Kim*

Department of Food and Nutrition, Dongduk Women's University, Seoul

*Department of Food Science, King Sejong University, Seoul

Abstract

The changes in protein fractions and its gel electrophoretic pattern of rapeseeds (*Brassica napus* L.) were investigated during germination at 25°C under dark condition. The major protein fraction was found to be albumin (25.0%) and globulin (24.6%). Both fractions were decreased throughout germination, particularly significant for albumin, while prolamine(2.2%) and glutelin (1.8%) showed an initial decrease followed by a slow increase at the later stage of germination. The initial 5-6 peaks of gel electrophoresis were reduced to a few after 45 hours. The absorption spectrum at the range of 400-700 nm showed a significant increase in absorbance for sodium hexametaphosphate (SHMP) extract of rapeseeds. The protein extractability with SHMP was not significantly affected by germination.

서 론

탈지한 유채박은 단백질함량이 약40%이고 lysine 함량이 많아 유용한 단백질 자원이 될수 있음에도 불구하고 glucosinolate를 함유하고 불쾌한맛과 냄새때문에 식품에의 이용은 제한되어왔다.⁽¹⁾

종자의 발아는 성분의 조성에 많은 변화를 초래할뿐만 아니라 색상과 향미에도 변화가 있는 것으로 알려져 있다.^(2,3) 본 실험실에서는 발아가 유채의 일반성분, 아미노산 및 지방산의 변화에 미치는 영향을 보고한바 있다.⁽⁴⁾ 즉 발아초기 30시간까지 단백질, 지방 및 탄수화물은 큰 변화가 없다가 뿌리의 성장이 관찰되면서 건물량의 현저한 감소와 함께 지방의 감소함을 관찰하였다. Rossi-Fanelli 등⁽⁵⁾은 목화씨의 발아중에 단백질 분해 효소의 활성이 높아짐을 보았으며 Ihle⁽⁶⁾는 embryogenesis중에 합성된 단백질분해 효소가 carboxypeptidase임을 규명하여 발아중 단백질 성분의 변화를 일찍부터 조사하였다.

近藤⁽⁷⁾은 대두의 발아가 진행됨에 따라 단백질 구성성분의 분포가 변화되었는데 이는 未熟大豆의 것에 유사하여 지는 것을 관찰하였으며 일부는 분해되어 low peptides 및 아미노산 등으로 분해되고 일부는 타구성

성분으로 변화된다고 하였다. 淺野⁽⁸⁾ 및 양⁽⁹⁾은 대두 발아시 전질소는 약간 감소하고 TCA가용성 질소는 증가하여 전기영동 pattern은 band의 수는 줄어들고 높이는 낮아진다고 하였으며 Cunningham 등⁽¹⁰⁾도 목화씨 발아시 이와 비슷한 결과를 보고하였다. Wu 등⁽¹¹⁾은 oats 발아시 nonprotein-nitrogen, albumin, residue nitrogen은 증가하지만 globulin, protamine은 감소함을 관찰하였고 소맥, 보리, triticale, rye⁽¹²⁾ 및 alfalfa⁽¹³⁾ 등에서도 발아시 단백질의 변화가 보고되었으나 유채에서는 거의 조사된바가 없다.

그리하여 본 실험에서는 유채를 25°C에서 발아시키는 과정중 단백질의 조성 및 전기영동의 pattern 그리고 단백질 추출 용액의 색상변화를 조사하였기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료

유채품종은 1984년 6월에 목포에서 채종한 내한유채로써 전보⁽⁴⁾와 같이 선별, 정선하여 사용하였다.

발아 및 시료의조제

전보와⁽¹⁾ 동일한 방법으로 유체를 25°C에서 1일 4회 주수, 발아시키면서 발아 15, 30, 45 및 60시간에 시료를 채취하여 百粒重 측정용을 제외하고 즉시 40°C에서 열풍건조한 후 Wiley mill을 사용하여 20mesh로 분쇄한 후 냉장고에 보관하면서 분석실험에 사용하였고 백립 중은 발아한 유체 100개를 임의로 선정하여 상기와 같이 열풍건조하여 무게를 측정하였다.

단백질의 분획

단백질은 Wu⁽¹²⁾의 방법에 따라 Fig. 1과 같이 분획하였다. 즉 탈지시료를 증류수(2회), 1M NaCl(2회), 70% ethanol 및 0.005N NaOH로 차례로 추출하여 일정량을 microkjeldahl 법⁽¹³⁾으로 정량하여 각각 albumin

+ 비단백태질소, globulin, prolamin 및 glutelin을 질소량으로 나타냈으며 증류수로 추출한 용액에는 최종농도가 0.8M이 되도록 TCA를 가하여 하룻밤 방치하였다가 원심분리하여 잔사는 albumin, 상등액은 수용성비단백태 질소로 하였다.

SHMP에 의한 단백질추출

Thompson⁽¹⁴⁾의 방법에 따라 탈지시료 5g에 2% sodium hexametaphosphate(SHMP)용액 5ml를 가하여 25°C에서 10분간 교반한 뒤 3N NaOH로써 pH를 7로 조절하였고 다시 25°C에서 30분간 교반하고 1000×g로 20분간 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 잔사에 다시 30ml의 2% SHMP용액을 가하여 상기와 같이

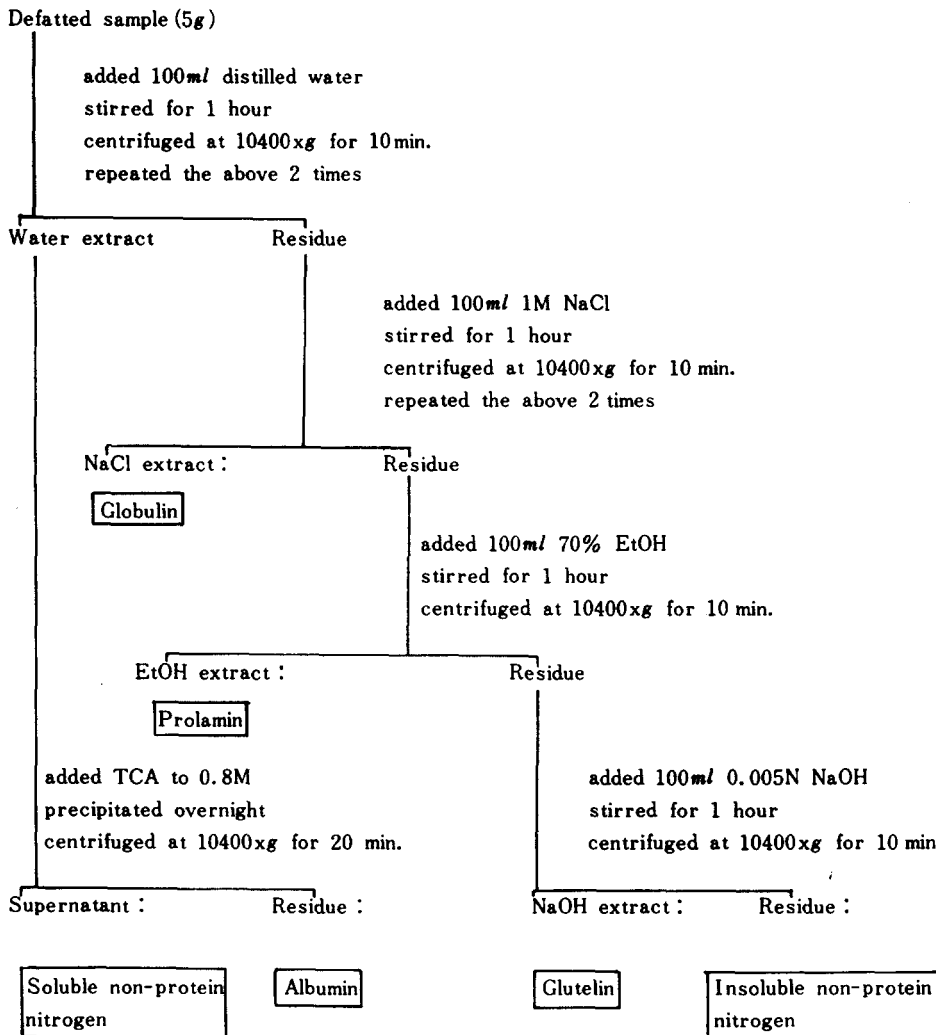


Fig. 1. Flow chart for the extraction of protein from rapeseed

pH를 조절하고 원심분리하여 상등액을 합하고 교반한 후 일정량을 취하여 microkjeldahl법으로 질소량을 정량하였다.

단백질의 전기영동

탈지시료에 용매를 증류수, 0.02N NaOH 및 2% SHMP 용액으로 시료 대 용매의 비율 1:20으로 하여 3시간 동안 교반한 후 10400×g로 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 이 상등액은 Lowry 등⁽¹⁴⁾의 방법에 따라 bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Folin phenol 시약으로 발색시켜 750nm에서 흡광도를 측정하여 단백질량을 계산하였다. 상기와 같이 추출한 상등액을 시료로 하여 Davis⁽¹⁵⁾와 Orstein 등⁽¹⁷⁾의 방법에 따라 6cm의 separating gel과 1cm의 stacking gel을 만들어 단백질 추출액을 gel당 단백질량으로 50 μ g씩 stacking gel상부에 주입하고 gel당 2.5mA의 전류로 전기영동하였다. 이때 dye front로는 bromophenol blue를 사용하였으며 naphtol blue black으로 염색하였다. 전기영동이 끝난 gel은 Beckman spectrophotometer (Model 35)를 사용하여 520nm에서 각 band의 흡광도를 측정하였다.

색도측정

색도측정은 2% SHMP용액과 0.02N NaOH용액 5ml에 탈지시료 0.25g을 각각 가하고 1시간 교반한 후 10400×g로 20분간 원심분리하여 침전물을 제거한 상등액을 시료액으로 Beckman spectrophotometer (model 25)를 사용하여 400~700nm에서 흡광도를 scanning하였다.

결과 및 고찰

Table 1. Changes in the contents of protein fractions of 100 rapeseeds during germination (Nmg/100 kernels)

	Germination time (hours)				
	0	15	30	45	60
Total	11.90±0.12*	11.61±0.16	10.70±0.04	10.59±0.02	10.17±0.02
WSNP**	1.10±0.02	1.14±0.02	1.40±0.02	2.36±0.00	2.89±0.04
Albumin	2.98±0.02	2.68±0.02	2.03±0.00	0.74±0.02	0.52±0.06
Globulin	2.93±0.02	2.87±0.02	2.74±0.08	2.76±0.02	2.18±0.00
Prolamine	0.26±0.01	0.22±0.01	0.22±0.02	0.26±0.00	0.29±0.00
Glutelin	0.21±0.00	0.15±0.00	0.13±0.00	0.15±0.00	0.19±0.00
Residue	3.79±0.05	3.80±0.09	3.58±0.00	3.58±0.10	4.00±0.02

* : mean + standard deviation, ** : water soluble non-protein expressed as dry weight basis

단백질의 변화

유채발아중 단백질의 변화를 용해도에 따라 분별정량하여 그 결과를 유채 100개당 Nmg으로 나타내면 Table 1과 같다. 백립중당 전질소는 발아 15, 30, 45 및 60시간에 각각 2.4%, 10.1%, 11% 및 14.6%의 감소가 있었는데 발아시간이 길수록 계속 감소되었으며, 발아 30시간에 특히 질소량의 감소가 큰 것은 발아 30시간에 백립중의 감소가 컸기 때문이라 생각된다. 이러한 질소의 감소는 질소절대량의 손실이며 이와 같은 발아에 따른 질소의 손실은 대두에서와 유사하였다.

발아전 유체의 구성단백질은 albumin과 globulin이 약 40%로써 비교적 많이 함유되어 있었고 prolamine과 glutelin은 각각 2% 정도로 적은 편이었다. 수용성단백질인 albumin은 발아전 전질소의 25.0%를 차지하던 것이 발아 15시간에는 23.1%, 발아 30, 45 및 60시간에는 각각 19.0%, 7.0% 및 5.1%로 현저히 감소되었다. 열용해성 단백질인 globulin은 발아 45시간까지는 완만하게 감소하는 경향을 보이다가 그 이후부터는 급격한 감소를 나타내서 전질소의 24.6%를 차지하던 것이 발아 60시간에는 21.4%로 되었다.

한편 알코올용해성 단백질인 prolamine과 NaOH 용해성 단백질인 glutelin은 발아전 유체에서 각각 2.2% 및 1.8%이었는데 이들 단백질은 발아 30시간까지 약간 감소하는 경향을 보이다가 발아 60시간에는 약간 증가되었으나 큰 변화는 아니었다.

수용성비단백태 질소(WSNP)는 발아전 유체에는 9.2%이었으나 발아함에 따라 점점 증가하여 발아 60시간에는 28.4%로 약 3배가 증가되었다. 이와 같은 유체의 WSNP 증가는 대두의 발아때와 유사하며 이는 발아에 따라 저장단백질이 저급의 peptides, 아미노산, 암모니아 및 urea 등으로 변화한 결과라 할 수 있다.

이상의 결과로 유채단백질은 albumin과 globulin이 주 단백질이며 albumin이 발아중에 일차적으로 분해, 이용됨을 보여주고 있다. 이는 Wu등⁽¹¹⁾이 보고한 oats 발아실험 즉, oats 주단백질인 globulin이 발아시 제일 많이 감소되고 이차적으로 prolamine이 감소한다는 보고와는 다른 양상을 보여주었으나 Dalby등⁽¹²⁾의 밀, triticale 및 rye에서의 변화와는 거의 같은 경향을 보였다. 따라서 발아중 일차적으로 이용되는 단백질의 종류는 식물의 종류에 따라서 다를 수 있다.

SHMP 추출단백질의 변화

유채의 단백질을 발아시간별로 2%SHMP로 추출하여 건물량 기준으로 발아유채100개당 Nmg으로 나타내면 Table 2와 같다. SHMP 추출 질소의 양은 발아시간이 길수록 서서히 감소하였으나 발아시간별 시료의 전질소와 SHMP추출질소의 비는 53.5내지 54.5%의 추출율을 나타내어 크게 차이가 없었다. 그러므로 발아시간이 길수록 SHMP추출질소의 양이 감소하는 것은 발아에 따른 백립중의 감소에 기인하는 것으로 여겨진다. Thompson등⁽¹⁴⁾의 실험에서는 유채의 SHMP 추출율은 97%를 보여 본실험과 큰 차이가 있었는데 이는 Thompson등의 실험에서는 종피를 제거한 시료를 사용하였고 본실험에서는 전유채종자를 사용하였기 때문인 것으로 생각된다.

전기영동pattern의 변화

유채의 발아에 따른 단백질 pattern의 변화를 알기 위하여 H₂O, 0.02N NaOH 및 2% SHMP 추출액을 7.5% polyacrylamide gel에 전기 영동하여 densitometer로 측정한 결과는 Fig. 2과 같다. 발아전 유채를 H₂O로 추출한 단백질은 Rm치가 작은 2개의 큰 peak와 4개의 작은peak를 보였으나 NaOH와 SHMP로 추출한것은 H₂O로 추출할때의 Rm치가 작은 2개의 큰 peak의 거리가 더욱 가까워졌으나 작은peak는 Rm치가 약간 달라졌을뿐 4개가 육안으로 인식되었다.

Table 2. Changes in the SHMP extractable protein of 100 rapeseeds during germination at 25°C

Germination time (hours)	Nmg/100kernels	Ratiotototal N
0	6.37±0.24	53.5
15	6.30±0.19	54.3
30	5.70±0.18	53.3
45	5.68±0.04	53.6
60	5.54±0.18	54.5

expressed as dry weight basis

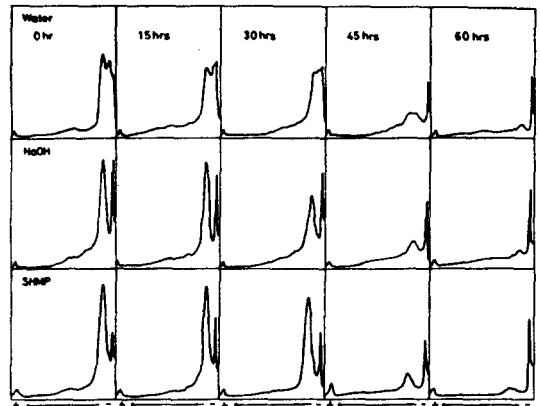


Fig. 2. Changes in densitometric patterns of polyacrylamide gel electrophoresis of rapeseed protein during germination at 25°C

발아함에 따라 15시간까지는 큰변화가 없었으나 발아가 시작되는 30시간에는 각peak들이 뾰족하지않고 둥그스런 모양을 보였으며 더 발아가 진행됨에 따라 peak의 수는 작아지고 peak의 높이도 낮아졌다. 즉 gel 상의 band는 발아가 진행될수록 분산되고 45시간에는 주band를 구별할 수 없을 정도로 넓게 분산되었고 또한 Rm치가 작은 큰band는 "+"쪽으로 이동하여 Rm치가 커졌으며 분명한 band가 아니라 회미하고 넓은band를 보였는데 이와같은 현상은 발아중에 생성되는 단백질 분해 효소의 작용때문이라 추정된다.

Rossi-Fanelli등⁽¹⁵⁾은 목화씨발아중에 단백질 분해 효소의 활성을 보고하였고 Ihle⁽⁹⁾는 목화씨단백질 분해 효소의 생합성은 embryogenesis중에 합성된 mRNA의 지령에 의해서 이루어지며 이 효소는 carboxypeptidase라고 하였는데 유채에서도 이와 비슷한 효소들의 생합성과 활성에 의해서 전기영동의 peak높이가 낮아지고 수도 작아지며 수용성비단백태 질소의 양이 증가되는 것으로 여겨진다. 또한 band가 회미해지고 넓어지는 것은 단백질이 분해되어 전하상태가 유사한 것들로 분해되기 때문이라 할 수 있으며⁽¹⁶⁾ 단백질양으로는 같은 양을 주입했지만 특히 45시간 이후에는 bands가 작아지고 peak높이도 낮아지는 것은 발아함에 따라 전기영동으로 검출될수 없는 더 작은peptide 형태로 분해되어 손실된 것으로 생각된다.

단백질 추출용액의 색도

발아단계별 유채박을 증류수, 2% SHMP 용액 및 0.02N NaOH용액으로 추출한 단백질용액의 색도를 spectrophotometer를 사용하여 측정하였다. 증류수, NaOH 및 SHMP용액간의 차이는 거의 없었으므로 SHMP

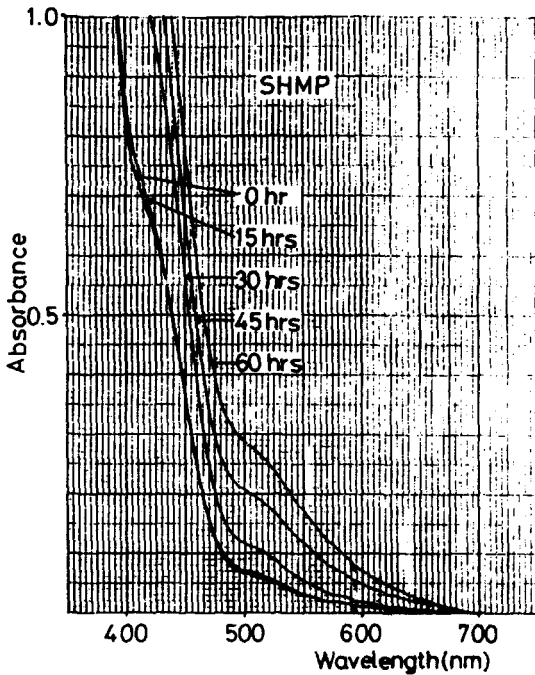


Fig. 3. Spectral absorbance curves of SHMP extracted protein solutions of rapeseed and germinated rapeseed.

로 추출한 용액의 spectrogram을 표시한 결과는 Fig. 3과 같다. 발아전 유채와 15시간 발아후 단백질용액의 흡광도는 거의 차이가 없으나 30시간부터는 발아가 진행될수록 전파장에서 흡광도가 증가되었다. 특히 500nm 부근에서 가장 차이가 커 녹색내지 청색계통의 색이 진해진것을 알수 있었다. 이러한 색상의 변화는 chlorophyll을 비롯하여 pheophytin, carotenoid, neolutin의 변화와 유지추출도중 인지질의 가수분해 및 산화에 의해서 생성된 melanophospholipid에 의하여 일어난 색의 변화⁽¹⁴⁾라고 하였으며 이들 색소는 주로 종피에서 전래된다고 보고하였다.⁽¹⁵⁾

유채박에서 단백질을 추출할때 단백질은 갈색내지는 녹색으로 착색되어 유채단백질의 활용에 제한요소로 알려져있어 이를 밀가루반죽에 6%정도 첨가하였을때 빵의 색이 어두워져 빵의 품질이 저하되었다고 한다.⁽¹⁶⁾

따라서 유채의 발아는 탈지유채박의 이용을 위하여 유채단백질 및 색상의 변화 그리고 탈지유채박의 관능적 향미의 변화에서 발아시간의 선택이 중요하여 이러한 관점에서 앞으로의 연구가 계속 요망된다고 사료된다.

요 약

내한유채를 25℃에서 발아시키는동안 질소화합물, 전

기영동pattern 및 색도의 변화를 조사하였다.

1. 유채의 단백질은 수용성비단백태 질소가 9.3%, albumin이 25.1%, globulin이 24.7%, prolamine이 2.2%, glutelin이 1.7%였는데 발아에 의하여 수용성비단백태 질소는 증가하였으나 albumin과 globulin은 감소하였고 prolamine과 glutelin은 발아초기에는 감소하다가 그 이후는 증가하였다.

2. 2% SHMP에 의해 추출되는 유채단백질은 발아 시간에 관계없이 53.5~54.5의 추출율을 나타냈다.

3. 유채단백질을 7.5% polyacrylamide gel로써 전기영동한 결과는 2개의 큰peak와 2개의 작은peak를 보이던 것이 발아30시간에는 각peak의 모양이 둥그스럼해지고, 발아45시간 이후에는 큰peak 1개만이 둥근 모양으로 나타났다.

4. 유채발아중 단백질추출액의 색도는 400~700nm의 전파장에서 흡광도가 증가하였으며 특히 500nm에서 현저하였다.

문 헌

- Mukherjee, K. D., Afzalpurkar, A. B. and EinNokkrashy, A. S. : *Fette Seifen Anstrichmittel*, **78**, 306 (1976)
- 김우정 : *식품과학*, **17**, 4 (1984)
- Cunningham, S. D., Cater, C. M. and Mattil, K. F. : *J. Food Sci.*, **43**, 102 (1978)
- 조병미 : 동덕여자대학 석사논문(1985)
- Rossi-Fanelli, A., Cavallini, D., Modovi, B., Wolf, A. M., Scioscia-Santor, A. and Riva, F. : *Arch Biochem. Biophys.*, **110**, 85 (1965)
- Ihle, J. N. and Dure, L. S. : *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **36**, 705 (1969)
- 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)
- 淺野三夫, 柴崎一雄 : *日本食品工業學會誌*, **20**, 126 (1973)
- 양차범 : 서울대학교 대학원 박사학위논문(1979)
- Wu, Y. V. : *Cereal Chem.*, **60**, 418 (1983)
- Dalby, A. and Tsai, C. Y. : *Cereal Chem.*, **53**, 222 (1976)
- Hamilton, M. J. and Vanderstop, J. : *J. Food Sci.*, **44**, 443 (1979)
- AOAC : *Official Methods of Analysis*, 11th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D. C. (1970)

14. Thompson, L. U., Allum-Poon, P. and Procope, C. : *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 9, 15 (1976)
15. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Rianial, R. J. : *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)
16. Davis, B. J. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404 (1964)
17. Ornstein, L. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 321 (1964)
18. Keshavarz, E., Cheung, R. K. M., Lui, R. C. M. and Nakai, S. : *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 10, 73 (1977)
19. Appleqvist, L. A. : *JAOCS*, 48, 851 (1971)
20. Kodagoda, L. P., Nakai, S. and Powrie, W. D. ; *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 6, 266 (1973)
(1985년 7월 1일 접수)