

밀 배아 단백질중 Albumin과 Globulin의 분리에 관한 연구

호정기 · 김동우 · 신두호 · 조광연

중경공업 전문대학 식품공업과
(1986년 4월 28일 접수)

Studies on the Isolation of Albumin and Globulin from Wheat Germ Protein.

Jeong-Kee Ho, Dong-Woo Kim, Doo-Ho Shin and Kwang-Yun Cho.

Department of Food Technology, Joong Gyung Junior College.

(Received April, 28, 1986)

Abstract

Wheat germ protein was extracted and isolated by a Modified Osborne fractionation method and some properties were investigated.

The results are summarized as follows;

1. Approximate compositions of wheat germ were moisture 10.5%, crude protein 22.8%, crude fat 2.4%, crude ash 3.2%, crude fiber 1.5%, respectively.

2. Nitrogen solubilities on various solvents were the lowest as 45.58% by Osborne method and the highest as 79.49% after sequential extraction of the H₂O, 0.5M-NaCl, 70%-ethanol, 0.1N-NaOH.

3. Isolated proteins yielded albumin, globulin, gliadin and glutelin in the proportion of 20.22: 17.49: 42.58: 19.71, respectively.

4. Spectrophometric chromatograms of isolated protein by Regel-filtration were two peaks in albumin (I; 8.2%, II; 91.8%), one peak in globulin (92.8%), respectively.

5. Disc-PAGE patterns were showed about 14 bands in 0.5M-Cl soluble protein, 3bands in crude albumin, 1band in main albumin, 2bands in crude globulin, one band in main globulin under pH 8.3 buffer system (Ornstein and Davis method).

서 론

곡류단백질에 관한 연구는 Osborne¹⁾이 용매의 용해성에 따라 albumin, globulin, gliadin 및 glutelin의 4가지 단백질군으로 분류한 이래 많은 연구가 이루어져 왔다. 특히 밀(全粒)은 다른 곡류보다 단백질의 함량과 질에 있어서 우수한 곡물로 분식, 제빵공업상 밀가루가 차지하는 위치

는 실로 중요하다.²⁾

밀단백질중 신장성(伸張性)을 갖는 gliadin과 점성(粘性)을 나타내는 glutelin은 추출·분리·정제 및 물리적성질에 대한 여러가지 연구와 보문이 있으나 주단백질인 gliadin은 native한 상태로 정제하기 어렵고 glutelin 역시 정제가 까다롭기 때문에 이들의 특성을 완전히 이해하는데 난점이 있다.

따라서 본 실험은 밀(全粒)중 단백질함량이 높은 부위인 밀배아를 사용하여 종래에 사용되었던 단백질의 추출방법과 일부 변형시킨 몇가지 방법으로 그들의 추출률을 비교하고, 4가지 단백질의 분포와 4가지 단백질중 native한 상태로 정제 가능한 albumin과 globulin을 분리한후 Sephadex G-200과 Sepharose 6B로 Gel-filtration하고 전기영동상을 관찰하여 몇가지 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재 료

시료 밀배아는 1984년 9월 대한제분에서 구입한 시판 밀배아를 50-mesh의 분말로 분쇄한 후 n-hexane을 용매로 24시간 탈지하고 건조시킨 것을 실험용 시료로 하였다.

2. 방 법

(1) 일반성분의 분석

시료중의 일반성분 분석은 AOAC방법³⁾에 따라 실시하였다.

(2) 단백질의 추출

A. Osborne방법^{1,4)}에 의한 추출

Fig. 1. 과 같이 추출용매로서 0.5M-NaCl, 70% ethano[, 0.1N-acetic acid를 사용하여 시료와 용

매의 비율을 1:10(w/v)으로 하고 magnetic stirrer를 사용하여 최저속도로 2시간 추출하였다. 추출 후 5,000 rpm으로 15분간 원심분리 하고 whatman filter paper No.1을 통하여 여과하였으며 위 조작을 3회 반복하고 상등액을 모두모아 단백질량을 측정하였다.

B. Modified Osborne방법⁵⁾에 의한 추출

Osborne방법의 단점을 보완하고 추출률을 높이기 위해서 Fig. 2, Fig. 3, 과 같이 0.5M-NaCl, 70%-ethanol, 0.1N-acetic acid이외에 H₂O, 0.1M-Potassium phosphate buffer (containing 0.4M-NaCl, pH 7.0), 0.1N-NaOH, Auc (0.1N-acetic acid, 3M-Urea, 0.01M-cetyltrimethyl ammonium bromide) 등의 용매를 사용하여 추출하였다.^{6~14)}

(3) 조단백질의 정량

추출된 단백질용액중의 조단백질 함량은 Warburg-Christian 단백질 정량법¹⁵⁾으로 실시하였다.

(4) 단백질의 분리

밀배아단백질의 분리는 밀^{6~8,16,17)}, 쌀⁴⁾, 울무쌀⁵⁾등에서 사용하였던 방법은 조합하여 Fig. 4. 와 같은 조작으로 실시하였고 이때 시료와 용매의 비율은 1:5(w/v)로 하여 waring blender에서 1시간 동안 추출한 후 냉장고(4℃)에서 2시간 정치하고 원심분리(10,000rpm, 30min.)하였다.

추출된 단백질용액은 여과후 dialysis sack¹⁸⁾에

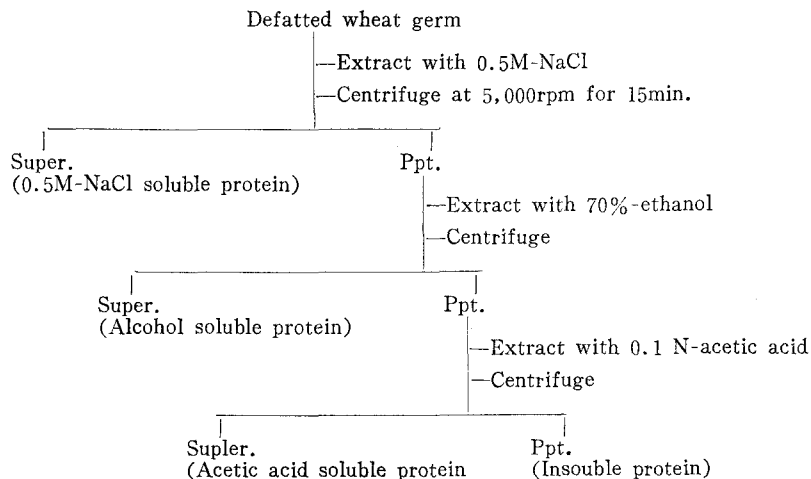


Fig. 1. Extraction of wheat germ protein by Osborne method.

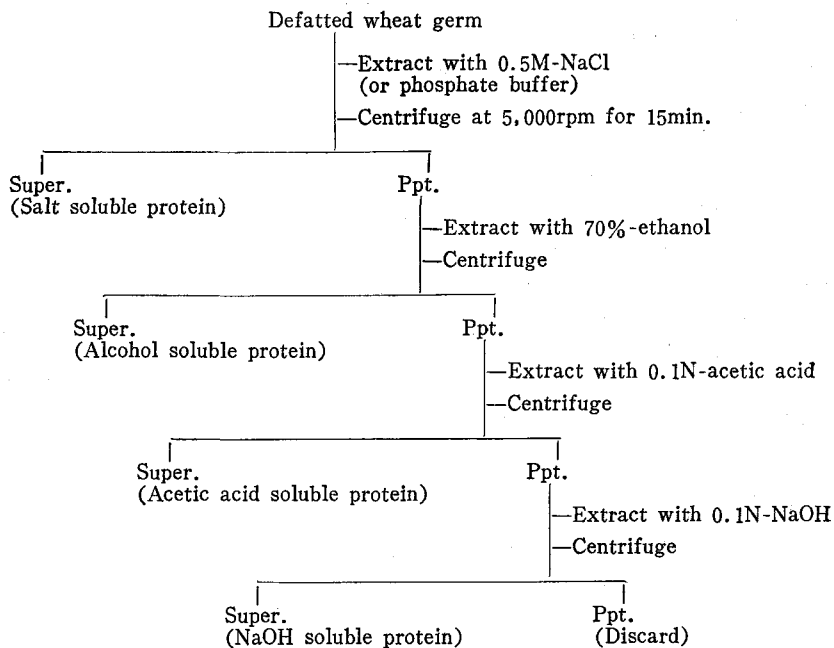
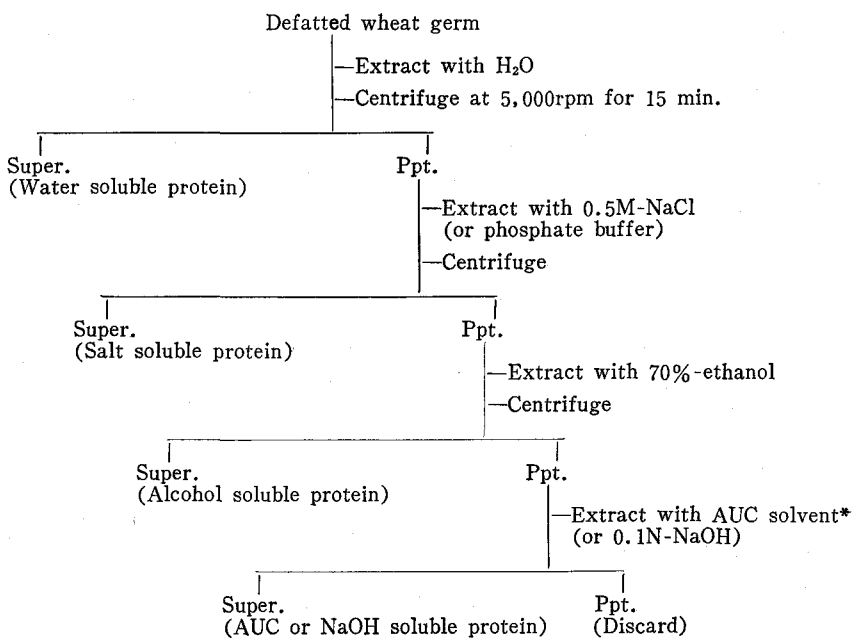


Fig. 2. Extraction of wheat germ protein by modified Osborne method(I)



*AUC; 0.1 N-acetic acid, 3M-urea, 0.01M-cetyl trimethyl ammonium bromide. (CTAB)

Fig. 3. Extraction of wheat germ protein by modified Osborne method(II).

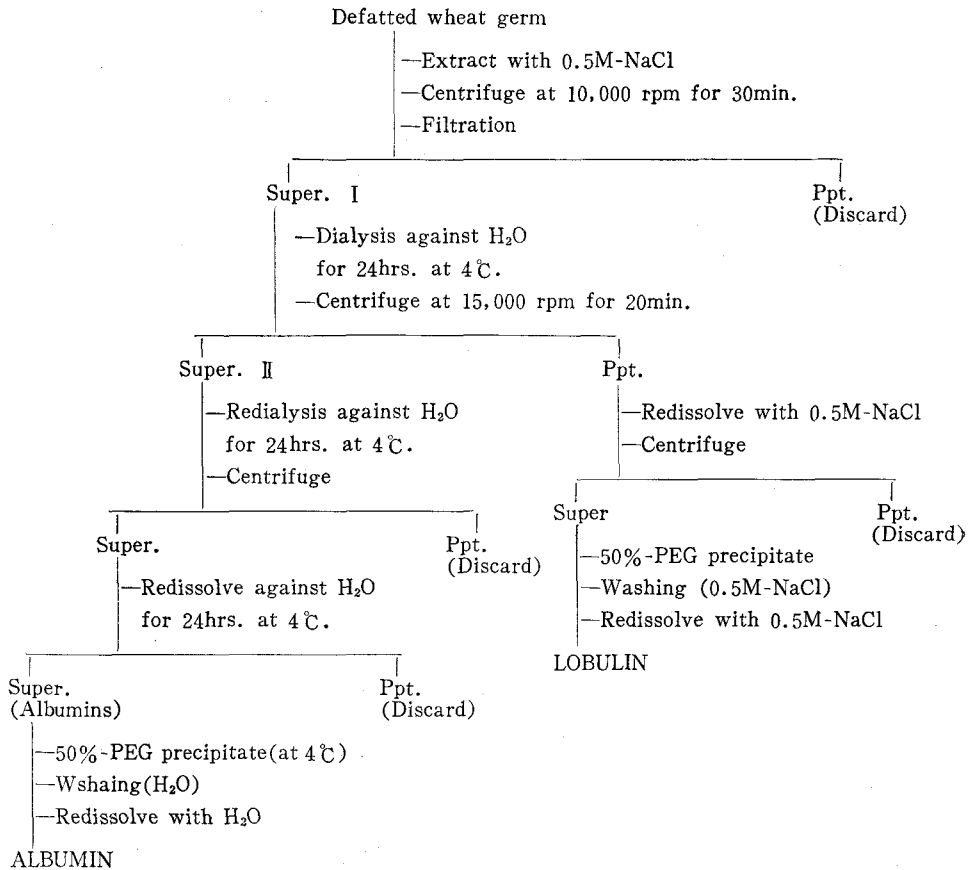


Fig. 4. Isolation procedure of wheat germ albumin and globulin.

넣어 4°C에서 증류수로 24시간 동안 magnetic stirrer하에서 투석한 후 원심분리(15,000 rpm, 20 min.)하였다. 이때 상등액은 증류수로 재투석시키고 원심분리후 얻은 상등액을 PEG¹⁹⁾(50% Soln.)로 4°C에서 수시간 침전시켜 증류수로 수세한 후 재용해하여 albumin류를 얻었다.

Globulin류는 최초의 침전물을 0.5M-NaCl로 재용해하고 원심분리 후 PEG로 침전, 0.5M-NaCl 용액으로 수세, 재용해하여 얻었다. 그리고 prolamina와 glutelin은 울무쌀의 분리방법에 준하였다.

(5) Albumin과 globulin의 Gel-filtration

A. Sephadex G-200에 의한 Gel-filtration

Fig.4.와 같은 방법으로 분리시킨 albumin과 globulin은 소량의 buffer(albumin; 0.1M-Potassium phosphate buffer, pH 7.6, globulin;

0.1M-potassium phosphate buffer, containing 0.4M-NaCl, pH 7.0)에 재용해시키고 원심분리(15,000 rpm, 10min.)한 후 상등액을 모아 시료로 하였다.

Column(2.3×70m)에 gel을 충전하고 각각의 buffer로 24시간 처리후 2ml의 시료(단백질농도; 2.5%)를 주입하였으며 이때 flow rate는 Automatic fraction collector Tokyo Rikakikai Co. Ltd.)를 사용하여 10ml/hr로 조정하였다. Column을 통과한 유출액은 Spectrophotometer(Bausch & Comb, USA)를 사용하여 UV-280nm에서 각각의 흡광도를 측정하였다.

B. Sepharose 6B에 의한 Regel-filtration

Column(2.5×100cm)에 gel을 충전하고 전처리 후 3ml의 시료(단백질농도; 2.5%)를 주입하였으며 flow rate는 8ml/hr로 조정하였다.

(6) 전기영동

밀배아단백질의 polyacrylamide disc gel electrophoresis(disc-PAGE)는 Ornstein²⁰⁾과 Davis²¹⁾의 방법에 따라 running gel(small pore gel)의 acrylamide 농도를 7.5%로하여 중합시킨후 gel tube 당 50 μ g/50 μ l의 시료를 주입하고 3mA의 전류를 통하여 tris-glycine buffer(pH 8.3)에서 bromophenol blue(BPB)를 marker로 약 120분동안 영동시켰다. 영동후 gel은 0.25%-Coomassie brilliant blue 용액내에서 3시간 염색후 10%-acetic acid-10% methanol용액으로 수일간 탈색후 7%-acetic acid용액에 보존하였다.

결과 및 고찰

1. 일반성분

밀배아의 일반성분 분석과 타작물과의 비교치

는 Table 1.과 같다. 즉 일반성분중 조단백질은 22.8%로 상당히 높았다.

2. 조단백질의 추출

여러가지 방법으로 추출한 탈지 밀배아의 용매별 질소용해도는 Table 2.와 같다

즉 종래의 Osborne방법으로 추출시 추출물이 45.58%로 가장 낮았으며 Modified Osborne 방법은 65~79.5%까지의 추출률을 나타내었고 그중 H₂O, 0.5M-NaCl, 70%-ethanol, 0.1N-NaOH의 순으로 추출한 경우가 79.49%로 가장높게 나타났다.

그러나 70%-ethanol 추출후 잔여분을 total glutelin으로 하고 이 glutelin의 추출에 0.1N-NaOH와 같은 강알카리를 사용하면 추출률은 좋으나 단백질의 비가역적 변성이 심하게 일어날 우려가 있고⁴⁾ 알카리성 buffer만을 사용하면 추

Table 1. Approximate compositions of wheat germ and other crops.

Crops	Moisture	Crude protein	Crude fat	Crude ash	Crude-fiber
Wheat germ	10.5	22.8	2.4	3.2	1.5
Wheat	11.8	12.0	2.9	1.8	0.3
Rice	14.1	6.5	0.4	0.5	0.5
Barley	14.8	10.3	1.9	2.1	0.7
Corn	10.0	9.4	3.6	1.4	1.2
Corn germ	5.9	23.6	1.0	10.0	3.3
Pearl barley	9.8	14.8	6.3	1.3	1.1
Rye germ	15.0	34.6	9.7	4.3	2.7

Table 2. Solvent extraction of proteins from defatted wheat germ.

Total nitrogen extracted (%)

Methods	Solvents	H ₂ O	0.5M-NaCl	0.1M-PBS* (pH 7.0)	70% ethanol	0.1N-Acetic acid	0.1N-NaOH	AUC*	Total nitrogen solubility
Osborne method	—	—	22.14	—	18.09	5.35	—	—	45.58%
Modified Osborne method	—	—	25.42	—	17.39	6.02	23.41	—	72.24%
	18.72	—	15.41	—	16.91	—	28.45	—	79.49
	—	—	26.01	—	14.21	—	25.92	—	66.14
	19.14	—	—	11.85	16.98	—	25.12	—	73.09
	—	—	—	26.42	19.11	—	—	25.98	71.51
Osborne method	—	—	—	25.11	12.97	—	27.42	—	65.5
	20.11	8.42	—	—	12.19	—	—	28.74	69.46

출몰이 낮아진다고 보고된 바 있다.²²⁾ 따라서 이와같은 단점을 보완하기 위해 sodium dodecyl sulfate(SDS)나 β -mercaptoethanol(β -ME)을 포함한 SDS용액, AUC-solvent같은 용매를 사용하여 추출률을 높일 수 있다고 한다.^{7,14,22,23)}

3. 분리단백질의 분포

Fig.4와 같은 방법과 울무쌀의 분리방법으로 분리한 밀배아단백질의 분포 및 타작물과의 비교치는 Table 3과 같다.

Table 3. Protein contents of each fractions from wheat germ as compared to those in other crops.

Proteins Crops	(% of total nitrogen)			
	Albumins	Globulins	Prolamins	Glutelins
Wheat germ	20.22	17.49	42.58	19.71
Rice	8.00	9.50	12.50	70.00
Barley	18.00	14.00	46.00	22.00
Wheat	5.00	10.00	69.00	16.00
Corn	8.80	15.20	34.40	41.60
Peanut	22.80	68.60	5.20	4.40
Sesame seed	16.80	70.90	1.60	10.70

즉, 밀배아단백질은 보리나 밀(全粒)과 같이 gliadin(prolamin)류가 주단백질인 점은 분명하였으나 albumin과 globulin류의 함량은 밀(全粒)보다 매우 높았다.

후 Sepharose 6B로 주분획을 Regel-filtration한 결과는 Fig.5, Fig.6, Fig.7, Fig.8과 같다.

즉, Fig.7, Fig.8과 같이 albumin은 2개의 fraction(I; 8.2%, II; 91.8%)으로 나타났고 globulin은 1개의 fraction으로 나타났다.

4. 분리단백질의 Gel-filtration

Fig.4와 같은 방법으로 분리시킨 albumin과 globulin을 Sephadex G-200으로 gel-filtration 한

5. 전기영동상

Fig.4와 같이 분리된 단백질과 Regel-filtration

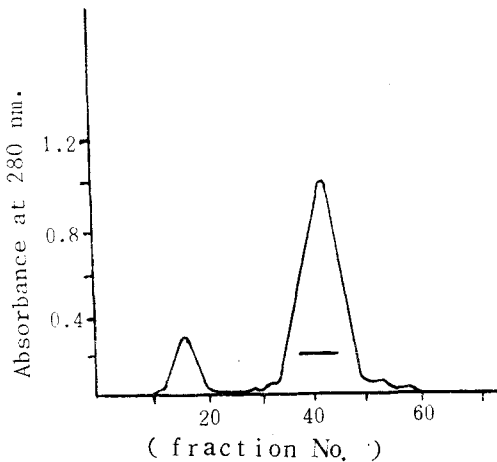


Fig. 5. Chromatography of wheat germ albumin Sephadex G-200 column (2.3×70cm).

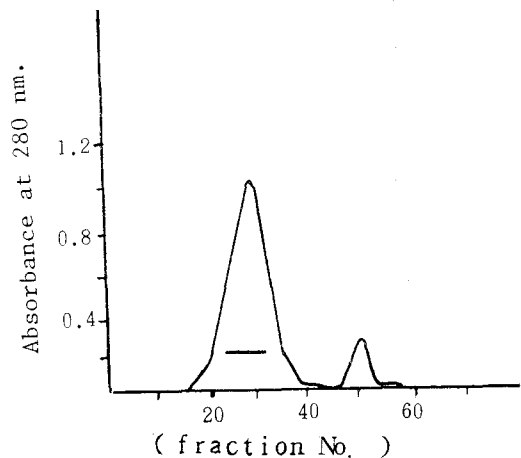


Fig. 6. Chromatography of wheat germ globulin on Sephadex G-200 column (2.3×70cm).

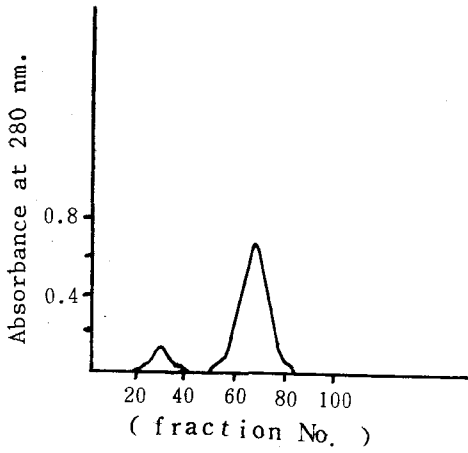


Fig. 7. Rechromatography of the underlined part in Fig. 5. on Sepharose 6B column (2.5x100cm).

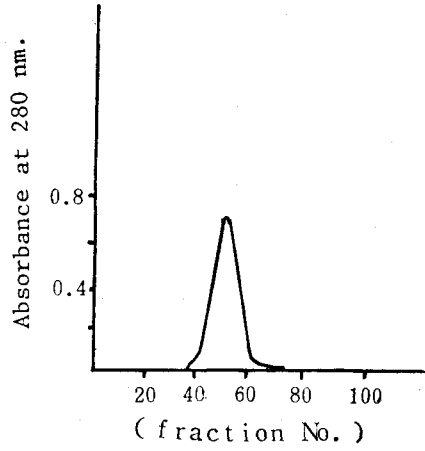


Fig. 8. Rechromatography of the underlined part in Fig. 6. on Sepharose 6B column (2.5x100cm).

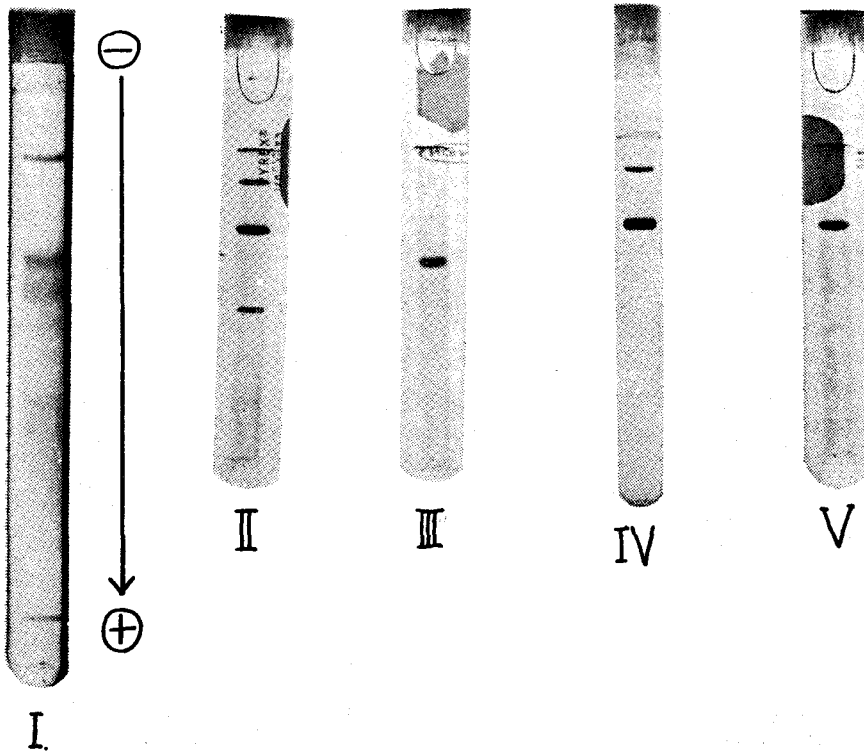


Fig. 9. Electrophoretic patterns of albumin and globulin by Ornstein and Davis buffer system (pH 8.3).

- I. 0.5M-NaCl soluble protein (Total)
- II. Crude albumin
- III. Column eluted albumin
- IV. Crude globulin
- V. Column eluted globulin

하여 얻은 각각의 fraction을 전기영동한 결과는 Fig. 9와 같다.

즉, 0.5M-NaCl soluble protein은 약 14개의 band로, albumin은 crude가 4개, main fraction은 1개의 균일한 band로 globulin은 crude가 2개 main fraction의 경우가 1개의 균일한 band로 각각 나타났다.

요 약

밀배아단백질은 Modified Osborne방법에 의해 추출·분리하여 그의 몇가지 특성을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 밀배아의 일반성분 분석중 조단백질 함량은 22.8%로 나타났다.

2. 여러 용매에 의한 단백질 용해도는 종래의 Osborne방법이 45.58%로 가장 낮았고 H₂O, 0.5M-NaCl, 70% ethanol, 0.1N-NaOH의 순으로 추출한 경우가 79.49%로 가장 높았다.

3. 분리단백질의 분포는 albumin이 20.22% globulin이 17.49%, gliadin이 42.58%, glutelin이 19.71% 이었다.

4. Regel-filtration에 의해 분리된 단백질의 Chromatogram은 albumin이 2개의 peak(I; 8.2% II; 91.8%)로 나타났으며 globulin은 1개의 peak로 나타났다.

5. Ornstein과 Davis의 방법(pH 8.3)으로 전기영동한 결과 0.5M-NaCl soluble protein은 약 14개의 band로, albumin은 crude가 3개 main albumin이 1개의 균일한 band로 나타났으며 globulin은 crude가 2개의 band, main globulin은 1개의 균일한 band로 나타났다.

참 고 문 헌

- Osborne, T.B.: The vegetable proteins, 2nd. Longman, Gree and Co. London(1924)
- 조성희, 김준영: 중앙대학교 논문집, **19**, 275(1974)
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC): 13th. ed., Washington D.C. (1980)
- 김수일·조도현: 韓國農化學會誌 **9**(3), 221 (1977)
- 호정기: 중앙대학교 대학원 석사학위 논문 (1984)
- Singh, U. and Sastry, L.V.S.: *Cereal chem.* **54**(1), 1.(1977)
- Meredith, O.B. and Wren, J.J.: *Cereal chem.* **43**, 169(1966)
- Tanaka, K. and Bushuk, W.: *Cereal chem.* **49**(3), 247(1972)
- Danno, G. and Nataka, M.: *Agri. Biol. chem.*, **38**(10), 1947(1974)
- Orth, R.A. and Bushuk, W.: *Cereal chem.*, **50**(1), 106(1973)
- Preston, K.R. and Woodburg, W.: *Cereal chem.*, **53**(2), 180~190(1976)
- Padhye, V.W. and Salunkhe, D.K.: *Cereal hem.*, **56**(5), 389(1979)
- 團野源一: *New Food industry*, **24**(10), 61 (1983)
- 團野源一: *New Food Industry* **24**(11), 61 (1983)
- Cooper, T.G.: Tools of Biochemistry, Wiley Co., 398(1977)
- Jones, R.W. and Taylor, N.W.: *Arch. of Biochem. and Biophys.*, **84**, 363(1959)
- Kasarda, D.D.: *Advanced in Cereal Sci. and Tech.*, **1**(4), 158(1976)
- Cooper, T.G.: The Tools of Biochemistry, wiley Co. 378(1977)
- Polson, G.M., Potyieter, J. and Largier, F.: *Biochem. Biophys. Acta*, **82**, 463(1964)
- Ornstein, L.: *Ann. N.Y. Acad. of Sci.*, **121**, 321(1964)
- Davis, J.: *Ann. N.Y. Acad. of Sci.*, **121**, 404(1964)
- Juliano, B.O. and Boulter, D.: *Phytochem.* **15**, 1601(1976)
- Simmond, D.H. and Orth, R.A.: Industrial uses of Cereals, Ed. Amer. Assoc. *Cereal chen.* **51**, (1977)