

보리단백질의 추출 및 품종간 조성비교

I. 보리단백질의 추출

김 정 상 · 김 재 욱

서울대학교 농과대학 식품공학과

(1986년 3월 10일 수리)

An Extraction of Barley Protein and a Comparison of the Protein Composition of Some Barleys

I. Extraction of Barley Protein

Jung-Sang Kim and Ze-Uook Kim

Department of Food Science and Technology, College of Agriculture
Seoul National University, Suwon, Korea

Abstract

Using milled barley of four varieties Olbori, Youngsan-bori, Sacheon 6, and Suwon 228, the barley proteins were fractionated by the Osborne method and the modified Osborne method. Two fractionation methods were compared. There was a steady increase in the amount of nitrogen extracted as NaCl concentration increased, reaching a maximum at 0.5M NaCl and the extraction of nitrogen by 0.5M NaCl reached a maximum at 22°C. Alcohol-soluble fraction was least extracted by 70% (v/v) ethanol at 4°C and most by sequential extraction with 50% (v/v) propan-1-ol alone followed by 50% (v/v) propan-1-ol plus 2% (v/v) 2-mercaptoethanol. Nitrogen was least extracted between pH 4 and 6 and most extracted at higher pH than 10. The modified Osborne fractionation of the protein complex in the four barleys showed that the salt-soluble nitrogen accounted for 21.4% to 24.1%, hordein-I varied from 30.4% to 43.4%, hordein-II varied widely from 9.3% to 19.5% and borate buffer-soluble glutelin content ranged from 17.1% to 23.7%.

緒 論

보리에 들어있는 단백질의 함량과 그 조성은 보리의 영양가와 밀접한 관계가 있을 뿐 아니라

良品種의 選別 및 育種에 중요한 意義를 갖고 있다.¹⁾ 따라서 보리의 단백질을 抽出하고 그것에 대해 조사한 보고는 비교적 많다.^{2,3,4,5)} 보리의 단백질은 albumin, globulin, glutelin 외에 추출이 안된 residue protein으로 나뉘는데 Osborne⁴⁾은

* 이 논문은 1985년 문교부 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

鹽용액으로 albumin과 globlin을, 에탄올 수용액으로는 hordein을 초산수용액으로는 glutelin을 차례로 사용하여 각각 추출 분획하였다. 그러나 이러한 방법으로는 各劃分을 완전히 추출하지 못하므로 이들 단백질의 抽出率을 높이는 열구가 여러 學者들에 의해서 시도되었다. 즉 35% propan-1-ol, 50% propan-1-ol 또는 2-mercaptoethanol을 함유하는 50% propan-1-ol등의 용매를 사용하여 보리의 저장단백질인 hordein의 추출율을 높이기나^{6,7)} 초산용액에 HgCl₂나 계면활성제를 혼합한 용매 또는 2-mercaptoethanol을 함유한 borate buffer등이 glutelin 획분을 추출하기 위해 검토되었다.^{8,9,10)} 현재까지는 이와같은 방법으로 추출한 各劃分에 대하여 電氣泳動이나 아미노산분석등을 시도하여 보리의 품종 및 맥아적성을 판별하거나 단백질 상호간 유전적 관계를 규명하는데 이용되어 왔다.^{11,12,13,14,15)}

본 연구에서는 국내에서 재배되고 있는 대표적인 몇가지 품종의 보리에 대해 그 단백질의 용매에 대한 抽出特性을 조사하고 기존 Osborne 방법을 변형하여 보리단백질의 抽出率을 높이는 방법을 모색하고 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험재료

시료는 1983년 6월 農村振興廳 麥類研究所에서 재배 수확한 걸보리인 올보리, 쌀보리인 영산보리, 맥주보리인 사천 6호, 찰보리인 수원 228호의 4품종을 사용하였으며 영산보리는 77%, 올보리, 사천 6호 및 수원 228호는 67%로 각각 搗精하여 供試하였다. 이들의 일반성분은 Table 1 과 같다.

Table 1. General composition of milled barley (d.b.%)

Variety	Moisture	Protein	Fat	Total Carbohydrate	Ash
Olbori	11.3	12.2	1.5	85.2	1.1
Youngsanbori	12.0	12.0	1.6	85.3	1.1
Sacheon 6	11.9	12.4	1.2	85.6	0.8
Suwon 228	12.2	10.0	1.1	88.0	0.9

2. 실험방법

1) 蛋白質分析用 시료의 調製

搗精한 보리를 60mesh이하로 분쇄한 후 n-butanol과 petroleum ether로 脫脂하여 냉장고에 보관하였다.

2) 蛋白質의 抽出

鹽可溶性 劃分の 抽出: 올보리 품종에 대해 1g의 시료를 원심분리관에 넣고 NaCl 수용액 15ml을 가하여 2시간 교반하여 추출한 다음 원심 분리하여 상등액을 분리하였다. 다시 침전물을 같은 양의 NaCl 수용액과 증류수로 각각 1시간씩 추출하여 얻은 추출액을 합하고 100ml로 하여 窒素定量用으로 사용하였다.

알콜可溶性 劃分の 抽出: 올보리 품종에 대하여 추출용매로 70%(v/v) ethanol, 50%(v/v) propan-1-ol 및 55%(v/v) propan-2-ol 와 이들 각각의 알콜에 2%(v/v) 2-mercaptoethanol(2-ME)을 포함한 것을 並用하여 Shewry등¹⁶⁾의 방법에 따라 추출을 수행하였다. 여기서 전자의 용매로 추출된 획분을 hordein-I 이라고 하고 후자의 용매로 추출한 부분을 hordein-II 라고 하였다. 먼저 시료 20g에 0.5M NaCl 용액 300ml 를 가하여 실온(22°C)에서 교반하면서 열가용성 획분을 추출 제거하고 남은 침전물을 동결건조하였다. 이 가운데 1g을 취하여 원심분리관에 넣고 용매 15ml 를 가하여 현탁시킨 다음 2시간 교반하여 단백질을 추출하였다. 이것을 3000×g에서 원심분리하여 상등액을 분리하고 침전물은 1시간 추출하는 것을 되풀이하여 추출액을 얻고 이것을 먼저의 추출액에 합하고 알콜을 가하여 50ml가 되게 하였다. Hordein-I 을 추출하고 남은 침전물을 2-ME을 함유하는 알콜을 사용하여 위와같은 방법으로 hordein II 를 추출하였다.

pH에 의한 단백질의 抽出效果: Guerra 등¹⁷⁾의 방법에 따라 시료 2g과 증류수 30ml을 원심분리관에 넣고 0.5M HCl 용액과 0.5M NaOH 용액으로 pH를 조절한 다음 실온에서 30분간 추출하였다. 추출액은 다시 pH를 조절한 후 4000×g에서 20분간 원심분리하여 상등액을 분리하였다.

3) 溶媒에 의한 단백질의 分劃

보리단백질의 분획은 Osborne의 방법(Fig. 1)과 이를 變形시킨 방법(Fig. 2)의 두가지로 나누어 수행하였다.

4) 분석방법

질소함량은 microkjeldahl법¹⁸⁾으로 정량하였으며 단백질량은 총질소에서 비단백질소를 제외한 양에 5.83을 곱하여 표시하였다.

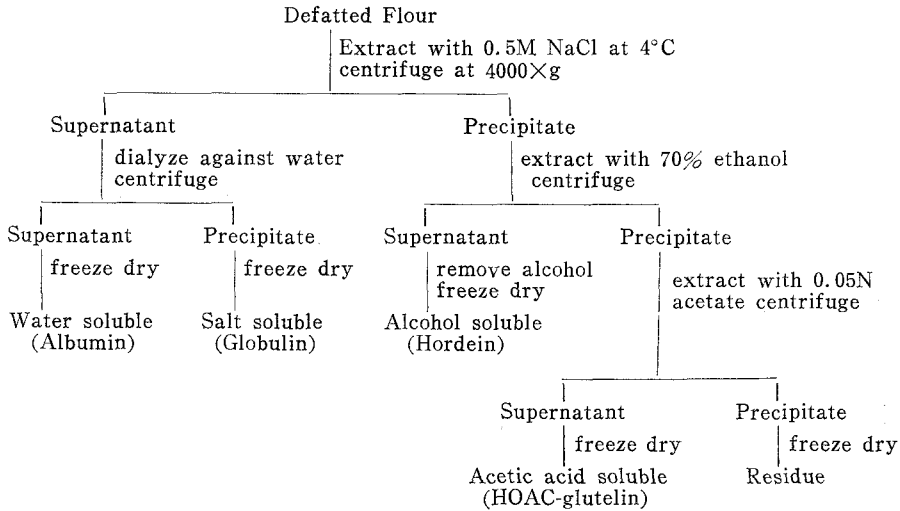


Fig. 1. Flow diagram of the Osborne fractionation

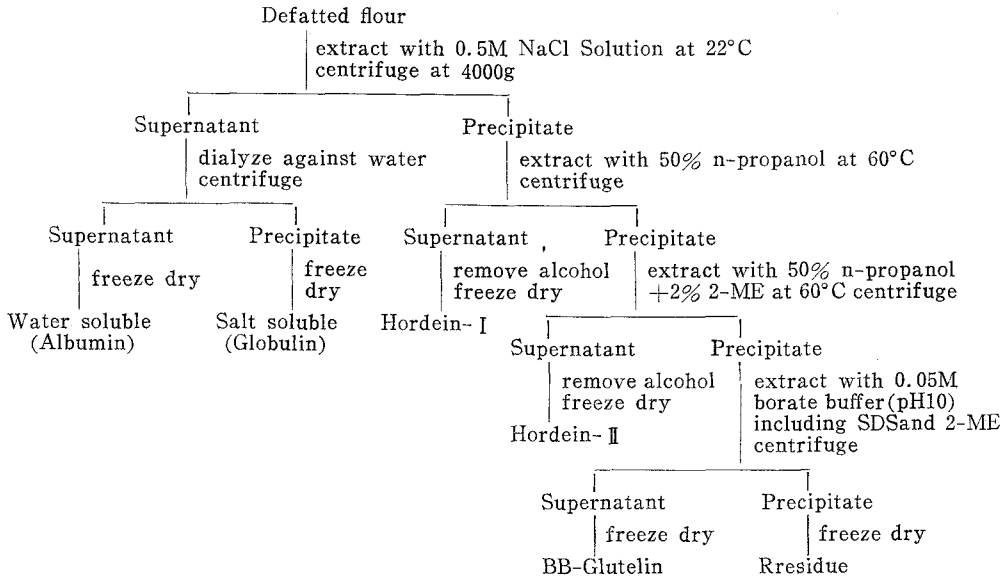


Fig. 2. Flow diagram of modified Osborne fractionation

결과 및 고찰

1. 염 가용성 단백질의 추출

탈지한 울보리 분말로 부터 염가용성 단백질을 추출한 경우 NaCl농도의 효과는 Fig. 3 과 같다. 즉 NaCl의 농도가 0.01M일 때 전체질소의 12.6%가 추출되었으며 0.25M까지 추출율이 증가하다가 그 이후에는 거의 일정한 추출율을 보였다. 그리고 NaCl의 농도가 1M 이상이 되면 추출율이 낮아

지는때 이것은 Saltingout 현상 때문인 것으로 생각된다.¹⁹⁾

한편 염가용성 단백질의 추출율에 대한 용매온도의 영향을 보면 Fig. 4와 같다. 즉, 4°C에서는 전체질소가운데 19.2%, 40°C에서는 19.0%, 60°C에서는 18.8%, 그리고 실온에서는 전체질소의 21.9%가 추출되어 염가용성 단백질은 실온에서 추출율이 높음을 알 수 있었다. 이 결과는 밀가루의 염가용성 단백질의 경우 4°C에서 추출율이 가장 높다고한 모코¹⁹⁾와는 약간 차이가 나는데 이것은

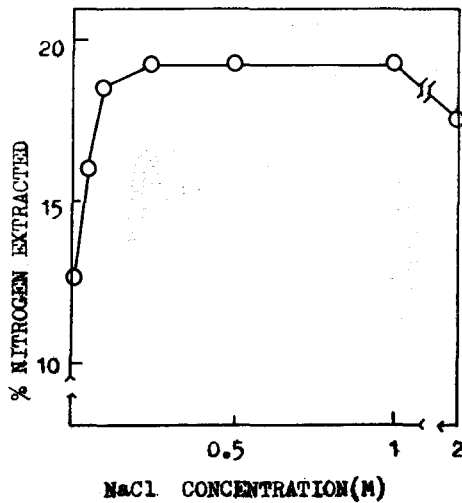


Fig. 3. Extraction of nitrogen from defatted barley flour (var. Olbori) by aqueous solutions of differing molarity at 4°C. Milled and defatted grain (1g) was magnetically stirred successively with 2×15ml NaCl solution followed by 1×ml water.

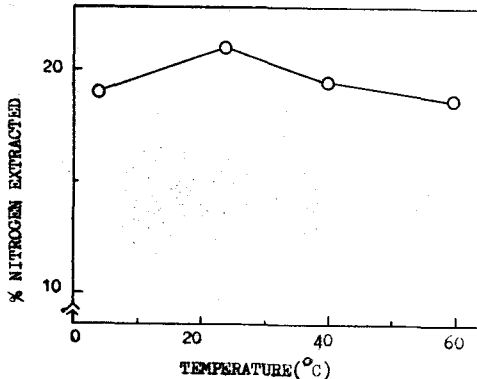


Fig. 4. Effect of temperature on the extraction of nitrogen by 0.5M NaCl.

시료의 종류 및 추출조건의 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

2. 알콜 가용성 단백질의 추출

보리단백질중 알콜가용성획분의 추출율에 대한 추출용매 및 추출온도의 영향을 보면 Table 2와 같다. 이 결과에서 보듯이 hordein-I은 추출용매로서 70%(v/v) ethanol에서 가장 낮은 추출율을 보였으며 50%(v/v) propan-1-ol이 추출율이 가

Table 2. The extraction of hordein in alcohol water mixtures

Solvent	% total N ^a		
	Hordein-I	Hordein-II	Hordein-I + Hordein-II
4°C 70% ethanol	26.6	20.0	46.6
50% propan-1-ol	35.6	13.1	48.7
55% propan-2-ol	31.5	21.9	53.4
22°C 70% ethanol	28.1	24.0	52.1
50% propan-1-ol	37.0	22.2	59.2
55% propan-2-ol	31.6	25.7	57.3
60°C 70% ethanol	36.8	24.6	61.4
50% propan-1-ol	52.0	21.3	73.3
55% propan-2-ol	37.6	25.5	63.1

^aIt is expressed as the percentage of the total nitrogen in the lyophilized residue remaining after the extraction of salt soluble protein.

장 높았다. 전체 알콜가용성 단백질(hordein-I + horden-II)의 추출은 4°C에서는 55% propan-2-ol이 가장 효과적이었으나 그밖의 온도범위에서는 50% propan-1-ol이 추출율이 높은 것으로 나타났다. 이것은 hordein-I의 추출용매로서 ethanol이나 propan-2-ol 보다 propan-1-ol이 추출효과가 높다고한 보고들^{6,7,19)} 일치하고 있다. 또한 Shewry등은¹⁶⁾ reducing agent를 사용함으로써 hordein의 추출율을 높일 수 있다고 하였는데, 알콜의 농도보다는 알콜의 종류 및 추출온도에 의해 추출율이 크게 영향을 받음을 보고 했는데 이들의 결과와 본 실험의 결과와는 대체로 일치하는 경향이 있다. 이와같이 hordein은 적당한 농도의 propan-1-ol을 사용하여 실온보다는 높은 온도에서 추출하되 reducing agent를 첨가하는 것이 추출율을 높이는 데 효과적임을 알 수 있다, Osborne의 방법에서와 같이 hordein을 추출하기 위해 ethanol을 사용할 경우 알콜가용성 부분의 완전한 추출이 이뤄지지 못하므로 hordein 전체의 특성을 밝히는 데는 propan-1-ol이 효과적인 것으로 볼 수 있다.

3. 단백질의 溶解度에 대한 pH의 영향

보리분말 시료에 대하여 pH를 달리하면서 겔소를 추출하여 그 함량을 全窒素에 대한 百分率로

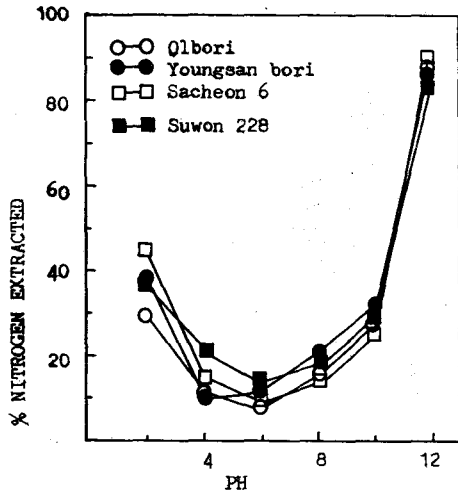


Fig. 5. Nitrogen solubility profiles of barley meals in aqueous solution at various pHs.

나타낸 결과는 Fig. 5와 같다. 즉, pH 6을 기준으로 그 이하 또는 그 이상이 되면 단백질의 용해도는 증가하였으며 pH 4~6에서 용해도가 가장 낮았다. 한편 El-Negoumy 등²⁰⁾은 pH 2에서 보리 단백질의 용해도가 가장 낮으며 pH가 증가할수록 용해도도 증가한다고 하였는데 이는 본실험의 결과와 대체로 같은 경향이나 최저 용해도를 나타내는 pH가 다소 다르다. 이것은 사용한 시료의

품종간 차이에 기인하는 것으로 생각된다. 한편 pH 10 이상에서 추출율이 급격히 올라가는 것은 β -elimination 反應에 의해 단백질의 cystinyl 基가 파괴되면서 단백질구조가 변화한다²⁰⁾ 그 원인이 있는 것으로 생각할 수 있다.

4. 보리단백질의 分割

보리단백질을 용매에 대한 용해도 차이에 의해 Osborne 방법 및 이를 變形한 방법으로 분획한 결과는 Table 3 및 4와 같다. Osborne의 방법으로 분획하였을 때는 용매에 의해 추출되지 않은 부분이 많았으며 용매에 가용성인 부분 가운데 hordein이 가장 높은 비율로 존재하였다. 다음으로 염가용성 부분의 비율이 높았고 HOAc-glutelin이 가장 적은 부분을 이루고 있는 것으로 나타났다.

한편 용매에 의한 추출율을 높이기 위해 Osborne의 방법을 變形하여 분획한 결과 Osborne의 방법으로는 용해되지 않았던 단백질을 대부분 용출시킬 수 있었다. Table 4에서 보듯이 hordein 획분이 크게 증가되었으며 이것으로 Osborne의 방법으로 분획했을 때 용출되지 않았던 단백질은 주로 hordein이었던 것으로 추정되며 특히 hordein-II는 2-ME을 첨가함으로써 추출을 방해하고 있던 disulfide bond가 開裂되어 추출된 것으로 생각된다. Osborne의 분획방법에서와 같이 변형된 방법으로 분획했을 때 hordein 함량이 가장 높았으며

Table 3. Nitrogen distribution of Osborne fractions

Variety	Salt-soluble proteins	Hordein	HOAc glutelin	Residue	Total N recovered
Olbori	16.0	19.1	9.8	52.4	97.3
Youngsanbori	22.7	25.2	12.8	30.9	91.6
Sacheon 6	19.5	19.3	7.4	52.9	99.1
Suwon 228	20.8	23.3	6.4	46.1	96.6

* N in each fraction is expressed as a percentage of total protein

Table 4. Nitrogen distribution of the modified Osborne fractions

Variety	Salt-soluble proteins	Hordein- I	Hordein- II	BB-glutelin	Residue	Total N recovered
Olbori	21.9	33.8	19.5	19.8	4.8	99.8
Youngsanbori	23.8	43.4	9.3	19.0	4.5	100.0
Sacheon 6	21.4	40.7	15.4	17.1	4.9	99.5
Suwon 228	24.1	30.4	15.6	23.7	3.6	97.4

* N in each fraction is expressed as a percentage of total protein.

염가용성 획분, borate-buffer 가용성 획분順으로 그 함량이 낮았다.

한편 분획방법을 변형함으로써 염가용성 획분이 1.1~5.9% 증가되었으며 hordein은 25.7~36.8% 증가되었고 glutelin의 함량은 7.4~17.3% 더 증가하였다. 또한 염가용성 단백질 hordein: glutelin의 비율도 Osborne의 방법으로 분획했을 때에 비하여 현저하게 다르며 울보리품종의 경우 0.36 : 0.43 : 0.21에서 0.23 : 0.56 : 0.21로, 영산보리는 0.37 : 0.42 : 0.21에서 0.26 : 0.55 : 0.20으로, 사천 6호는 0.42 : 0.42 : 0.16에서 0.23 : 0.59 : 0.18로, 수원 228호는 0.41 : 0.46 : 0.13에서 0.26 : 0.49 : 0.17로 각각 변하여 hordein의 비율이 높아지고 상대적으로 염가용성부분의 비율이 낮아졌다.

초 록

우리나라에서 재배되는 보리의 단백질추출율을 높여서 품종간 단백질조성을 비교하기 위하여 울보리, 영산보리, 사천 6호, 수원 228호를 시료로 하여 Osborne의 방법 및 이를 변형한 방법에 의해 분획하고 이들 방법을 비교 평가하였다. 염가용성획분은 NaCl의 농도가 증가함에 따라 추출율이 증가하여 0.5M에서 가장 높은 추출율을 보였으며, NaCl의 농도를 0.5M로 고정하고 추출온도를 변화시켜서 추출했을 때, 실온(22°C)에서 추출율이 가장 높았다. 한편 알콜가용성획분은 70% ethanol에 의해 가장 적게 추출되었으며 60°C에서 50% propan-1-ol과 2% 2-ME을 함유한 50% propan-1-ol을 사용하여 연속추출을 하였을 때 가장 높은 추출율을 보였다. 단백질추출율에 대한 pH의 영향을 관찰한 결과 pH 4~6에서 추출율이 가장 낮았으며 pH가 10 이상이 되면 대부분의 단백질이 용출되었다. 변형된 Osborne의 방법으로 보리단백질을 분획한 결과 염가용성 획분은 전 질소의 21.4~24.1%를 차지하였고 hordein은 30.4~43.4%, hordein-II는 9.3~19.5%, 그리고 borate buffer 가용성 glutelin은 17.1~23.7%를 각각 차지하는 높은 추출율을 나타냈다.

References

1. Bietz, J.A.: Cereal Food world 24(5) : 199

(1979).

2. Chen, C.H. and Bushuk, W.: Can. J. Plant Sci 50 : 9(1970).

3. Pence, J.W., Weinstein, N.E. and Mecham, D.K.: Cereal Chem. 31 : 29(1954).

4. Osborne, J.B.: The vegetable proteins, xns Ed, Longman, gree and co. London(1924).

5. El-Negoumy, A.M., Newman, C.W. and Moss, B.R.: Cereal Chem. 56(5) : 468(1979).

6. Lauriere, M., Charbonnier, L., et Mosse, J.: Biochimie 58 : 1235(1976).

7. Laundry, J., Moureax, T., Huet, J.C.: Physiol. Veg. 10 : 281(1972).

8. Mecham, D.K., Cole, E.W., and NG, H.: Cereal chem. 49 : 62(1972).

9. Orth, R.A. and Bushuk, W.: Cereal Chem. 50 : 106(1973).

10. Shewry, P.R., Hill, J.M., Pratt, H.M., Leggatt, M.M. and Mifflin, B.J.: J. Exp. Bot. 29(110) : 677(1978).

11. Mesrob, B.K. and Kancheva, V.: J. Chromatog. 46 : 94(1970).

12. Rhodes, A.P., Gill, A.A.: J. Sci. Food Agric. 31 : 467(1980).

13. Riggs, T.J., Sanada, M., Morgan, A.C. and Smith, D. B.: J. Sci. Food Agric. 34 : 576 (1983).

14. Shewry, P.R., Pratt H.M. and Mifflin, B.J.: J. Sci. Food Agric. 29 : 587(1978).

15. Shewry, P.R., Richard, J., Ellis, S., Pratt, H.M. and Mifflin, B.J.: J. Sci. Food Agric. 29 : 433(1978).

16. Shewry, P.R., Field, J.M., Kirkman, M.A., Faulks, A.T. and Mifflin, B.J.: J. Exp. Bot. 31(121) : 393(1980).

17. Guerra, M.J., Park, Y.K.: JAOCS 52 : 73 (1975).

18. A.O.A.C.: Method of Analpis of the A.O. A.D., 13rd ed., p.858(1980).

19. Byers, M., Mifflin, B.J. and Smith, S.J.: J. Sci. Food Agric. 34 : 447(1983).

20. El-Negoumy, A.M., Newman, C.W. and Moss, B.R.: Cereal Chem. 60(6) : 429(1983)