

보리단백질의 추출 및 품종간 조성비교

II. 보리단백질의 품종간 조성비교

김 재 욱·김 정 상

서울대학교 농과대학 식품공학과
(1986년 3월 10일 수리)

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

Electrophoretic Pattern of Barley Protein

Ze-Uook Kim and Jung-Sang Kim

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

Abstract

Total protein from 4 barley varieties (Olbori, Young San-bori, Sacheon 6, and Suwon 228) was separated into albumin, globulin, hordein and glutelin fractions by the Osborne method and the modified Osborne method in a previous report. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) for the protein fractions revealed that there was a little difference in the polypeptide composition of each fraction among four varieties. The comparison of hordeins and hordein-Is by polyacrylamide gel electrophoresis at pH 3.0 showed a marked difference among the varieties. Hordein-I contained a high level of glutamic acid and proline and low level of lysine. And there was little difference in amino acid composition of hordein-Is which were extracted from the 4 varieties.

서 론

보리단백질을 여러가지 용매를 이용하여 추출 분획하는데 용매의 종류와 추출방법에 따라 추출율 및 그 조성에 많은 차이가 나므로 前報에서 저자는 추출 온도를 적당히 조절하거나 추출 용매를 적절히 선택함으로써 이전의 방법에 비하여 보리단백질을 최대한도로 추출할 수 있었다¹⁾. 이때까지는 종래의 방법으로 추출한 보리단백질의 분

획에 대하여 전기영동이나 gel filtration 아미노산 분석의 방법으로 품종간의 변이나 보리의 malting 적성등을 판별하는데 이용되어 왔을^{2,3,4,5,6,7)} 뿐 아니라 이것으로 단백질 상호간 유전적 관계나 질소비료의 효과등을 규명하는 데도 응용하기도 하였다^{8,9)}. 본 실험에서 Osborne의 방법¹⁰⁾ 및 이를 변형한 방법을 병용하며 보리단백질을 추출하는 방법을 이용하여 단백질을 분획하고 전기영동 및 아미노산분석으로 품종간 차이를 비교 조사하여 여기에 보고하는 바이다.

* 이 논문은 1985년도 문교부 학술 연구조성비에 의하여 연구되었음.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

단백질 분석용 시료는 전보에서와 같이하여 준비하였다¹⁾. Sodium dodecyl sulfate(SDS, Sigma 회사제품)는 95% ethanol에 정제하여 사용하였으며 분자량 표준 단백질은 Sigma 회사제품 Dalton mark V를 사용하였다.

2. 전기 영동

SDS-PAGE와 polyacrylamide gel 두가지를 사용하였으며 각각의 조건은 다음과 같다. SDS-PAGE는 phosphate buffer(pH 7.1)에서 10% gel을 사용 수행하였다¹¹⁾. 전기영동용 시료는 냉동건조한 단백질을 1% 2-mercaptoethanol과 1% SDS를 함유한 0.01M phosphate buffer(pH 7.1)에 녹여(5mg/ml) 90°C에서 5분간 반응시켜 제조하였으며 이중 30ml를 취하여 gel에 주입한 다음 120mA에서 6시간 전기영동하였다. 염색에는 coomassie brilliant blue R-250을 사용하였으며 염색된 gel은 glacial acetic acid-methanol-염류수(75 : 80 : 875V/V)에 담가 실온에서 하루동안 탈색시켜 나타나는 band를 관찰하였다. Polyacrylamide gel은 4M-urea-acetate buffer(pH 3.0)를 사용하여 7.5% gel을 만든 후 Baxter의 방법에 따라¹²⁾ 수행하였다.

3. 아미노산 분석

냉동건조한 단백질 25mg을 20ml의 6N HCl 용액으로 가수분해한 다음 아미노산 자동분석기(LKB 4150)를 사용하여 아미노산을 분석하였다¹³⁾.

결과 및 고찰

1. 단백질획분의 전기영동 pattern

1) 품종별 Osborne획분의 SDS-PAGE pattern 비교 : Osborne의 방법으로 분획한 albumin과 globulin의 전기영동 pattern은 Fig. 1과 같다. 즉, albumin은 주로 분자량이 11,000과 60,000인 band로 구성되어 있으며 43,000, 40,000, 30,000의 분자량을 갖는 band들도 네품종 모두 존재하였으나 23,000인 band는 올보리에서만 나타나지 않았다. Globulin획분의 주요 band는 분자량이 50,000, 36,000, 18,500, 10,000였는데 이들

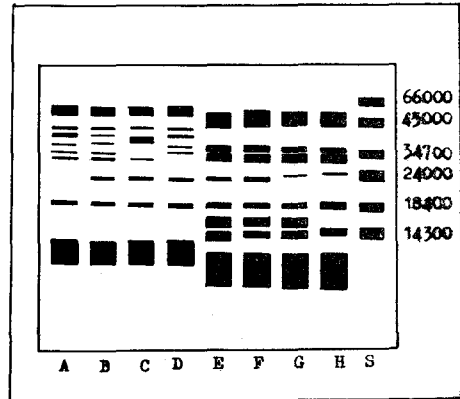


Fig. 1. SDS-PAGE electrophoretograms of reduced albumin and globulin from the fractionation at pH 7.1 : A, Olbori (albumin); B, Youngsanbori (albumin); C, Sacheon 6 (albumin); D, Suwon 228 (albumin); E, Olbori (globulin); F, Youngsanbori (globulin); G, Sacheon 6 (globulin); H, Suwon 228 (globulin); S, Molecular weight maker.

품종사이에 약간의 차이가 있는 것을 볼 수 있다. Rhodes등은⁴⁾ 일반품종의 보리와 lysine함량이 높은 보리의 염가용성단백질을 비교하여 전자의 albumin은 주로 분자량이 60,500과 16,000인 subunit로 이뤄진 반면 후자에서는 10,500의 band가 주요한 구성 polypeptide임을 보고하였다. El-Negeumy등도²⁾ 몇가지 품종의 보리에서 얻은 염가용성획분을 전기영동시킨 결과 분자량이 60,000, 45,000, 12,000인 band가 주요 polypeptide를 이룬다고 보고하였는데 본 실험결과도 이들 보고와 대체로 일치하고 있다. 그리고 hordein과 glutelin에 대한 전기영동 pattern은 Fig. 2와 같다. 즉, hordein은 주로 분자량이 27,000~60,000 사이의 polypeptide로 이뤄져 있는 것으로 나타났는데 이 결과는 EL-Negoumy 등이²⁾ hordein의 주요한 polypeptide 성분은 분자량이 47,000, 50,000, 62,000이라는 보고와 대체로 일치하고 있다. 그러나 올보리와 수원 228호에는 분자량이 60,000인 band가 존재하였으나 영산보리와 사천6호에는 존재하지 않았다. Fig. 2에서는 glutelin의 분자량은 10,000~50,000사이의 polypeptide로 구성된 것으로 나타났는데 품종간에 현저한 차이를 보이고 있다. 즉, 올보리의 경우 10,000 정도의 분자량을 갖는 band가 관찰되었는데 이것은 globulin 분획

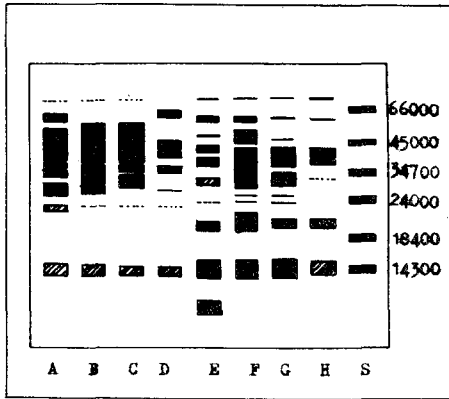


Fig. 2. SDS-PAGE electrophoretograms of reduced hordein and HOAc-glutelin from the Osborne at pH 7.1 : A, Olbori (hordein); B, Youngsanbori (hordein); C, Sacheon 6 (hordein); D, Suwon 228 (hordein); E, Olbori (HOAc-glutelin); F, Youngsanbori (HOAc-glutelin); G, Sacheon 6 (HOAc-glutelin); H, Suwon 228 (HOAc-glutelin).

에서 온 것이 아닌가 생각되며 분자량이 커서 gel 을 통과하지 못하는 부분이 상당히 존재하는 것으로 나타나고 있다.

2) 변형된 Osborne 분획방법에 따른 품종별 전기영동 pattern의 비교 : Osborne의 방법을 변형하여¹³⁾ 네 품종의 보리단백질을 분획하여 얻어진 자 단백질을 전기영동한 결과는 Fig. 3, 4 및 5와 같다. 이 결과에서 albumin의 경우는 Osborne의 방법에 의하여 분획했을 때에 비하여 전기영동 pattern의 차이가 거의 없으나 globulin은 Osborne의 분획방법에서와는 달리 분자량 70,000 이상의 polypeptide 들이 관찰되었다. 즉, Hordein-I 은 5~7개의 band가 관찰되었는데 이것은 주로 분자량이 30,000~45,000인 subunit로 이뤄져 있는 것으로 나타났다. 그리고 울보리와 수원 228호의 경우는 분자량이 34,000과 55,000의 minor band가 나타난 반면 영산보리와 사천 6호에서는 나타나지 않았다. 이와같은 결과는 Osborne의 방법에 의해 분획했을때와는 매우 다른 결과로서 이것은 추출 방법의 차이에서 오는 것으로 생각되나 더 연구할 문제이다. 한편, Hordein-II는 분자량 40,000의 subunit가 주요한 band로 나타났으며 품종간 큰차이는 관찰되지 않았다. Shewry등은¹⁴⁾ hordein을 전기영동에 의해 두개의 group으로 나누어 하

나는 분자량 60,000 이상의 polypeptide 들로서 60% (V/V) ethanol에 의해 쉽게 용출되나 나머지 분자량 30,000~50,000 사이의 polypeptide 들은 2-mercaptoethanol을 함유하는 50% propan-1-ol에 의해서만 추출이 가능함을 보고하였다. 본 실

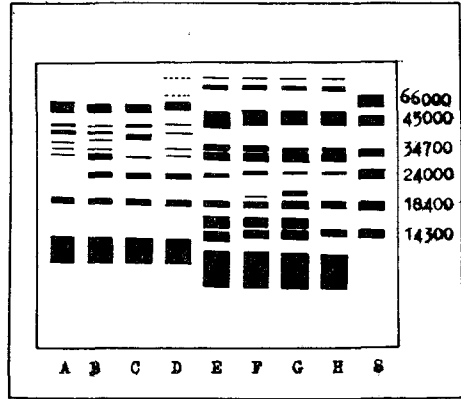


Fig. 3. SDS-PAGE electrophoretograms of reduced albumin and globulin from the modified Osborne fractionation at pH 7.1 : A, Olbori (albumin); B, Youngsanbori (albumin); C, Sacheon 6 (albumin); D, Suwon 228 (albumin); E, Olbori (globulin); F, Youngsanbori (globulin); G, Sacheon 6 (globulin); H, Suwon 228 (globulin).

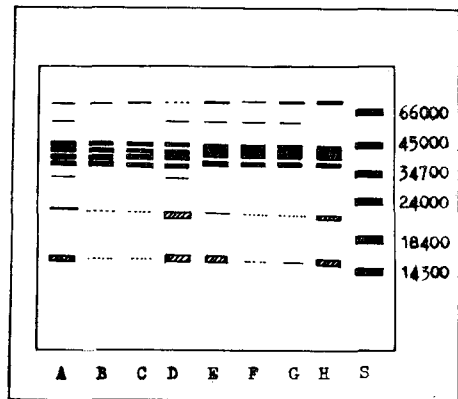


Fig. 4. SDS-PAGE electrophoretograms of reduced hordein-I and hordein-II from the modified Osborne fractionation at pH 7.1 : A, Olbori (hordein-I); B, Youngsanbori (hordein-I); C, Sacheon 6 (hordein-I); D, Suwon 228 (hordein-I); E, Olbori (hordein-II); F, Youngsanbori (hordein-II); G, Sacheon 6 (hordein-II); H, Suwon 228 (hordein-II).

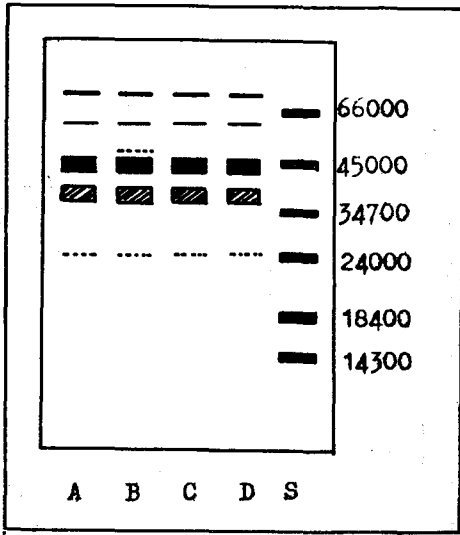


Fig. 5. SDS-PAGE electrophoretograms of reduced BB-glutelin from the modified Osborne fractionation at pH 7.1: A, Olbori; B, Youngsanbori; C, Sacheon 6; D, Suwon 228.

협결과에서 60% ethanol에 가용성인 hordein의 subunit가 50% propan-1-ol에 의해 추출된 subunit 보다 분자량이 큰것과 이 결과를 비교해 볼 때 어느정도 유사성이 인정되나 전기영동방법상의 차이로 인하여 상호비교하는 것은 어렵다.

한편, borate buffer (pH 10)에 가용성인 단백질은 acetic acid 가용성 glutelin과는 달리 gel을 거의 통과하지 못하였으며 품종간 차이도 거의 관찰되지 않았다.

3) Hordein 및 hordein-I의 품종별 비교: 60% ethanol에 가용성획분(hordein)과 50% propan-1-ol에 가용성획분(hordein-I)을 산성조건하에서 전기영동한 결과는 Fig. 6과 같다. 이 결과에서 총 14개의 band가 관찰되었으며 품종간 많은 차이를 나타냈다. 예를들어 hordein의 경우 영산보리에서는 band 8, 9가 관찰되지 않았으며 사천6호에서는 band 5가 나타나지 않았다. 이와같이 hordein에 의해 네가지 품종을 구분할 수 있었다. 한편 hordein-I은 hordein 보다도 품종간 차이가 더 크게 나타났다. 즉, 영산보리 및 사천 6호의 경우 band 9 이상은 전혀 관찰되지 않았으며 사천 6호는 band 3, 4가 나타나지 않아 영산보리와 구분이 쉽게 되었다. 한편, 수원 228호는 band 4, 6, 7, 8이 관찰되지 않아 울보리와 구분이 가능

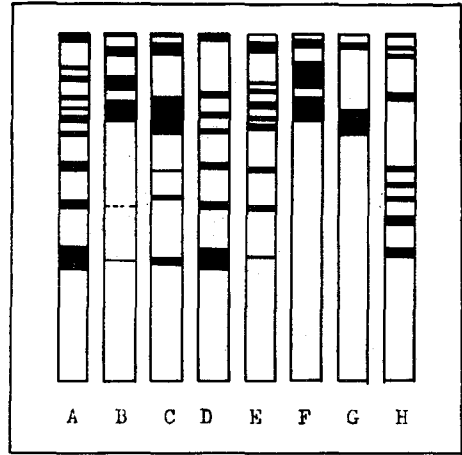


Fig. 6. Acid polyacrylamide gel electrophoretograms of hordein and hordein-I from grain of different barley varieties; A, Olbori (hordein); B, Youngsanbori (hordein); C, Sacheon 6 (hordein); D, Suwon 228 (hordein); E, Olbori (hordein-I); F, Youngsanbori (hordein-I); G, Sacheon 6 (hordein-I); H, Suwon 228 (hordein-I).

하였다. 이와같이 산성조건하에서 전기영동을 시키면 품종간의 차이를 구분할 수 있었으며 품종상호간 유전적 관계를 밝힐 수 있는 가능성을 볼 수 있었다.

2. 품종별 hordein-I의 아미노산 조성 비교

네 품종의 보리로 부터 분획한 hordein-I의 아미노산조성은 Table 1과 같다. 즉 전체적으로 glutamic acid와 proline의 함량이 전체 아미노산의 50% 이상을 이루고 있으며 보리의 제한 아미노산으로 알려져 있는 lys. 함량은 1% 이하로 매우 낮았다. Rhodes 등은 일반품종에 비해 lys. 함량이 높은 품종은 albumin fraction의 lys. 함량이 매우 높다고 하였으며 El-Negoumy 등은 lys. 함량이 높은 품종은 열가용성획분중 asp., lys., val. 함량이 높고 tyr., glu., cystine/2가 낮음을 보고한바 있어 품종에 따라 아미노산조성이 약간씩 다를 수 있음을 보여주었다. 한편, hordein fraction은 추출방법에 따라 아미노산 조성차이가 있을 수 있는데 추출용매로 ethanol을 사용한 경우보다 propan-1-ol을 사용한 경우가 lys. 및 합유황 아미노산의 함량이 높게 나타나는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 propan-1-ol에 의해 추출된 hordein-I의 아미노산조성을 이용하여 품

종간 차이를 보고하였으나 거의 차이를 볼 수 없었다.

성은 glutamic acid와 proline 함량이 높았으나 품종간의 아미노산조성차이는 거의 볼 수 없었다.

Table 1. Amino acid composition of hordein-I fractions

Amino acid*	Hordein-I (50% propan-1-ol alcol soluble)			
	Olbori	Young-sanbori	Sacheon 6	Suwon 228
Asp	1.7	1.7	1.6	1.6
Thr	2.0	2.1	2.1	2.0
Ser	4.0	3.9	4.6	4.0
Glu	30.8	31.7	30.6	31.4
Pro	20.5	20.6	19.8	19.1
Gly	2.3	1.8	2.1	2.2
Ala	2.3	2.0	2.5	2.3
Val	3.9	3.5	4.4	4.0
Ile	3.7	3.8	4.0	3.7
Leu	6.3	6.1	6.2	6.3
Tyr	2.6	2.5	2.6	2.5
Phe	6.4	6.6	5.9	6.0
His	1.7	1.8	1.9	1.7
Lys	0.9	0.5	0.6	0.9
NH ₃	9.4	10.0	9.5	10.7
Arg	1.5	1.4	1.7	1.4

* Results are expressed as μ mole percent.

초 록

네 품종의 보리(올보리, 영산보리, 사천 6호, 수원 228호)로부터 Osborne의 방법과 이것을 변형한 전보의 방법으로 단백질을 분획하여 albumin, globulin, hordein 및 glutelin 회분을 얻어 이들 각 회분들을 SDS-PAGE로 분석한 결과 품종간 polypeptide 조성차이를 관찰할 수 있었으며 특히 hordein과 hordein-I을 pH 3에서 PAGE를 수행하였을 때 각 품종사이의 pattern에 명확한 차이를 볼 수 있었다. 한편, hordein-I의 아미노산조

참 고 문 헌

1. 金正象, 金載勗 : 韓國農化學會誌 29(1) : 51 (1986).
2. El-Negoumy, A.M., Newman, C.W. and Moss, B.R.: Cereal Chem. 56(5) : 468(1979).
3. Mesrob, B.K., Kancheva, V.: J. Chromatog. 46 : 94(1970).
4. Rhodes, A.P., Gill, A.A.: J. Sci. Food Agric. 31 : 467(1980).
5. Riggs, T.J., Sanada, M., Morgan, A.C. and Smith, D.B. J. Sci. Food Agric. 34 : 576 (1983).
6. Shewry, P.R., Pratt, H.M. and Mifflin, B.J.: Sci. Food Agric. 29 : 587(1978).
7. Shewry, P.R., Richard, J., Ellis, S., Pratt, H.M. and Mifflin, B.J. J. Sci. Food Agric. 29 : 433(1978).
8. Kirkman, M.A., Shewry, P.R. and Mifflin, B.J.: J. Sci. Food Agric. 33 : 115(1983).
9. Shewry, P.R., Pratt, H.M., Finch, R.A. and Mifflin, B.J.: Heredity 40(3) : 463(1978).
10. Osborne, T.B.: The Vegetable Proteins, 2nd Ed, Longman, Gree and Co. London (1924).
11. Weber, K. and Osborn M.: J. Biol. Chem. 244(16) : 4406(1969).
12. Baxter, E.D.: J. Inst. Brew. 82 : 203(1976).
13. Joslyn, M.A.: Methods in Food Analysis. Academic press, New York(1970).
14. Shewry, P.R., Field, J.M., Kirkman, M.A., Faulks, A.T. and Mifflin, B.J.: J. Exp. Bot. 31(121) : 393(1980).