

녹두 발아중 분획한 단백질의 전기영동 패턴의 변화

조 성 환 · 표 광 호

경상대학교 농과대학 식품공학과

Changes in SDS-PAGE Pattern of Mung Bean Grain Proteins during Germination

Sung-Hwan Cho and Kwang-Ho Pyo

Department of Food Science and Technology, College of Agriculture,
Gyongsang National University, Jinju 660-701, Korea

Abstract

Changes of protein contents and amino acid composition and SDS-PAGE pattern of protein of mung bean which were germinated in dark at 25°C for 6 day. The total protein contents gradually decreased during germination and the contents of each fractionative soluble proteins were increased shortly after the soaking of mung bean and gradually decreased during the germination afterwards. SDS-PAGE of albumin fraction showed 18 bands, and during the germination the most of bands were diminished or disappeared. But protein bands at 24,000, 40,000, 45,000, 70,000 dalton position remained until 6th day of germination.

SDS-PAGE of globulin fraction showed 6 discrete bands, and during the germination the protein band at 45,000 dalton position disappeared. But the protein bands at 14,000~25,000 dalton position did not change during the period.

SDS-PAGE of glutelin fraction showed 10 discrete bands, and during the germination the bands of 45,000~70,000 dalton become diminished or disappeared.

But the bands of 30,000, 60,000 dalton did not change throughout the germination period.

서 론

최근의 속주나물의 소비성향은 콩나물과 같이 우리가 섭취할 수 있는 가식부를 크게 하기 위하여 배축부가 짧고 두꺼우며 뿌리가 없고 조직이 연한 속주나물을 요구하는 경향이 다¹⁻³⁾. 그리고 두채의 일반성분, 제조방법, 영양성분에 관한 연구는 1930년대 이후 계속되어 오고 있으며, 녹두를 이용한 속주나물에 관한 연구도 많이 있으나 대부

분이 발아중에 일어나는 무기질 함량의 변화³⁾와 발아중에 발생하는 peroxidase 등의 효소들의 분리와 특성에 관한 것⁴⁾과 저장중에 일어나는 변화를 측정할 것이다^{5,6)}.

녹두는 발아 중에 각종 성분들이 현저하게 변화하는데 Aman⁷⁾은 녹두의 발아중에 탄수화물의 변화와 녹두의 아미노산을 측정하였고, 최와 김⁸⁾은 녹두의 발아중 지방질과 지방산의 조성비를, 이와 홍⁴⁾은 녹두 발아중 lipoxidase의 활성에 대해, 권⁹⁾은 녹두의 발아 과정에서 무기물함량변화에 대해 연구하였으며, Chen과 George⁶⁾ 및 Davis와 Wiese²⁾는 녹두의 저장 중의 변화를 측정하였다.

1989년 4월 10일 접수

Corresponding author : S.H. Cho

그러나 발아기간 중 단백질 분획별 단백질 양상에 관한 연구와 단백질의 아미노산 분석에 관한 연구 결과는 미흡한 상태이다. 이를 위해 녹두단백질을 albumin과 globulin, alkali-soluble protein (glutelin)으로 분획하여 발아 중의 발아시간에 의한 단백질과 아미노산 함량의 변화를 측정하고 발아과정에서 녹두 유효성분 변화에 미치는 영향을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

재료 및 방법

1. 시료의 선택과 처리

본 실험에서 사용한 녹두는 시판되는 경남산으로 저장기간이 약 8개월 정도된 것으로 불순물을 제거하고 일정한 크기로 선별한 것을 사용하여 시료부피의 5~6배의 수도물(수온 $25 \pm 2^\circ\text{C}$)에 15시간 동안 침지시켰다²⁾. 발아는 두류자동재배기(유일정밀)를 사용하여 $25^\circ\text{C} \sim 35^\circ\text{C}$ 로 발아온도를 변화시킬 수 있는 incubator 내에서 행하였으며, 발아기간 중 1일 간격으로 시료를 채취하여 시료의 신장도와 수분함량을 측정하고 채취한 시료를 -60°C 초저온 냉동고에서 동결시켜 동결건조기에서 건조하여 수분함량이 6~15%될 때까지 건조하였다. 건조된 시료를 ball mill에서 60mesh 이하로 분쇄하여 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 의 냉장실에서 보관한 후 실험에 사용하였다.

2. 일반성분 분석

시료의 일반성분 분석에서 수분의 정량은 A.O. A.C.의 방법¹⁰⁾에 준하였고, 조단백 정량은 Micro Kjeldahl¹¹⁾법에 준해 측정하였다.

3. 단백질 분획

본 실험의 단백질 분획은 Weber와 Osborene¹²⁾의 방법을 변형시킨 EI-Negoumy 등¹³⁾의 방법을 이용하였으며, 분쇄된 시료를 ethyl ether으로 탈지시킨 다음 단백질 분획시료로 사용하였다.

탈지시료 5g에 40ml의 0.5M NaCl 용액을 가하여 magnetic stirrer로 30분간 4°C 에서 교반하면서 추출한 다음 55,000 rpm에서 30분간 원심 분리하였다¹⁴⁻¹⁸⁾.

이를 3회 반복 후 상정액을 48시간 동안 중류수로 투석시킨 후 4,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상정액을 albumin 분획, 침전물을 globulin

분획으로 하였다. 같은 방법으로 탈지시료 5g에 0.05M borate buffer(pH 10)용액 40ml를 첨가하여 교반기에서 30~120분 동안 20°C 에서 교반하면서 추출한 다음 55,000rpm에서 30분간 원심 분리하였다^{19,20)}.

이들 상정액을 모아 48시간 동안 투석시킨 것을 알카리 가용성 단백질(glutelin) 분획으로 하였다.

4. 단백질 정량

단백질 정량은 Coomassie brilliant²¹⁾법으로 측정하였다. Coomassie blue G-250을 이용하여 단백질표준농도용액을 조제하여 추출한 단백질 용액을 10ml test tube에 0.1ml 취하고 5ml의 protein reagent를 가하여 vortexing하여 완전히 혼합한 다음 2분 후에 Spectronic 20(Bausch & Lomb Co.)로서 595nm에서 흡광도를 측정하였다.

시료 중의 단백질 함량은 0.2~1.0mg/ml 농도의 bovine serum albumin(Bio-Rad protein standard)으로 작성한 표준곡선에서 상대흡광도 결과치와 비교하여 결정하였다^{11,22)}.

5. 전기 영동

전기영동 전개용매는 SDS-Tris-glycine buffer (tris 0.25M, glycine 1.92M, SDS 0.1M, pH8.3)을 사용하였으며, Leammlis discontinuous electrophoresis 방법¹⁵⁾에 따라 stacking gel(12mm) 및 running gel(85mm)의 acrylamide 농도는 각각 2.5, 7.5%의 disc gel(5×85mm)을 사용하였다.

Bromophenol blue (BPB)를 tracer로 하여 2~4 mA/gel의 전류에서 3시간 동안 전기영동하였다^{18,20)}. 전기영동 후 0.05% amido black 10B 용액에서 40분 동안 염색하였으며, 그 후에 10% acetic acid와 10% ethanol이 함유한 용액으로 24시간 이상 탈색하였다^{15,20)}.

6. 아미노산 분석

발아시기별 탈지시료 25mg을 취하여 6N-HCl용액 20ml를 가하여 $110 \pm 10^\circ\text{C}$ 에서 24시간 동안 가수 분해하였다. 이것을 증발 농축하여 HCl 용액을 제거하고 sodium citrate buffer(pH 2.2)로 용해하여 전체 용량을 25ml 되게 한 다음 membrane filter (pore size : $40\mu\text{m}$)로 여과하여 얻은 여액을 취하여 아미노산 자동분석기(LKB 4150)로 분석하였다^{15,24)}.

결과 및 고찰

1. 수분함량의 변화

발아중에 발아시료의 수분함량의 변화를 측정 한 결과는 Fig. 1과 같다.

Fig. 1에 나타난 바와 같이 녹두의 수분함량이 11%서 발아기간 중에 많은 수분을 흡수하여 침지 15시간 후에는 53%, 2일 후에는 68%로 급속히 증가하였고, 발아 3일부터는 76, 82, 88%로 나타나고 발아 6일에는 92%의 수분함량을 나타내었다. 수분함량의 변화는 권³⁾, 박 등⁵⁾의 결과와 비슷하고 권³⁾, 장²⁶⁾의 콩나물의 수분변화량과도 비슷하나 녹두가 더 많은 수분함량을 가지는 것으로 나타났다. 이는 각종 효소 및 기타 성장인자에 의하여 숙주나물이 발아하면서 적근부위의 성장에 의해 많은 수분을 함유하기 때문이라 사료된다.

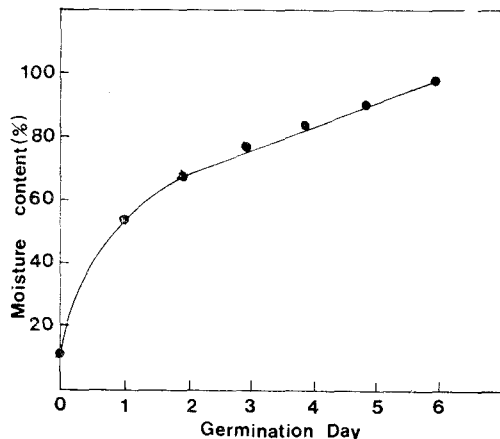


Fig. 1. Change in moisture content of mung bean during germination.

2. 총 단백질함량의 변화

발아과정 중 채취한 시료의 총 단백질함량을 측정 한 결과는 Fig. 2와 같다.

Fig. 2에 나타난 바와 같이 녹두의 총단백질 함량은 원 녹두에는 23.2%이고 발아 3일까지는 20.6%로 조금씩 감소하나 발아 6일에서 10.4%로 까지 감소되는 것을 볼 수 있었다.

숙주나물의 발아 중에 총단백질 함량의 변화는 이⁸⁾, 박⁵⁾ 등의 보고와 같이 감소하나 감소율의 차이가 있으며 이것은 재배방법에 따라 재래식 방법에서는 단백질 함량의 감소가 크게 나타나는 반면에 본 실험에서 이용한 자동재배방법에서는 단

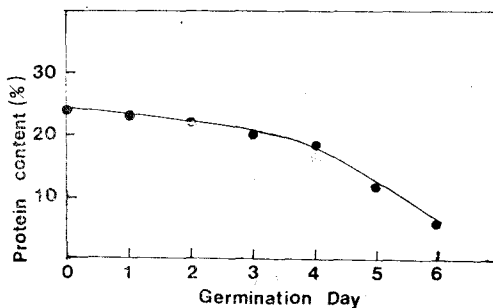


Fig. 2. Change in protein content of mung bean during germination.

백질 함량의 감소차가 작게 나타나고 있었다. 그리고 발아별 단백질함량의 변화는 발아 중에 단백질이 발아기질로 각종 효소에 의해 분해되어 감소 되었다고 사료된다.

3. 온도에 따른 녹두 발근 상태의 변화

발아 중 온도에 따른 두체의 신장도는 Fig. 3과 같으며 이때 신장도는 발아기간 별로 각각 10주씩 random sampling하여 마이크로 캘리퍼스로 cotyledon을 포함한 녹두의 절장길이를 측정 한 값의 평균치이다.

두체의 신장도는 Fig. 3에서 나타난 바와 같이 온도에 따라 크게 차이가 났다. 25°C에서 보면 발

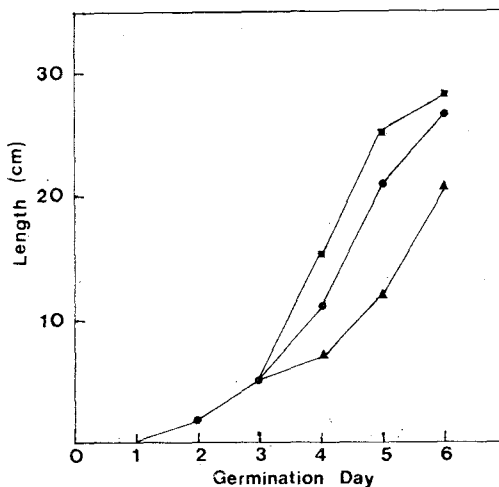


Fig. 3. Change in length of mung bean during germination.

■—■ : at 35°C, ●—● : at 30°C and ▲—▲ : at 25°C.

아 2 일에는 1.5cm이고, 3 일에는 5cm로 서서히 신장하나, 4 일에는 11cm, 5 일에는 21cm, 6 일에는 27cm로 급격히 신장한다.

35°C에서는 더욱더 큰 폭으로 증가하나 배축부가 가늘게 나타나고, 25°C에서는 작은 폭으로 증가하나 배축부가 두터워지고 뿌리 부분이 크게 신장했다. 본 실험에서 사용된 시료는 25°C에서 성장된 것을 이용하였다. 일반적으로 재배하는 발아 온도는 25°C이며, 25°C에서 신장율을 보면 권³⁾, 이와 정²⁾의 콩나물 신장도와 비슷하나 숙주나물의 신장도가 약간 적었다. 권³⁾의 숙주나물의 신장도와 비교하면 약간의 차이가 있는데 이 약간의 차이는 재래식 방법과 본 실험에서 사용된 자동 재배법의 차이로 간주할 수 있었다.

4. 분획별 단백질 함량의 변화

원녹두의 100g당 분획별 단백질의 함량의 변화는 Table 1에 나타나 있다.

분획별 단백질 함량은 glutelin이 1.88g(50.5%)으로 제일 많았고 globulin이 1.54g(41.4%)이었고 albumin이 0.26g(7.5%)으로 적게 나타났다.

Khoi와 Dien¹⁾의 보고에서 쌀과 옥수수의 분획별 단백질 조성비를 살펴보면 쌀의 경우 albumin이 7.0% globulin이 10.6% glutelin은 41.0%로 곡물단백질의 조성비 순서로는 glutelin, globulin, albumin순으로 나타났으며 녹두의 단백질 함량과 같은 순서이다.

Albumin은 0.21g에서 침지후 0.26g, 발아 2 일

Table 1. Change in each protein fraction contents of mung bean during germination(g/100g)

Days	Germination periods (days)						
	0	1	2	3	4	5	6
Albumin	0.21	0.26	0.28	0.19	0.13	0.12	0.10
Globulin	1.40	1.54	1.48	1.26	1.11	1.05	0.93
Glutelin	1.76	1.83	1.88	1.62	1.54	1.35	1.30

0.28g으로 증가하였다가 차츰 감소하여 발아 6 일에는 0.10g으로 나타났다. Globulin은 1.40g에서 침지 후에 1.54g으로 단백질량이 증가했다가 차츰 감소하여 0.93g으로 나타났다. Glutelin은 녹두에서 가장 많은 량을 차지하며 1.76g에서 침지후 1.88g으로 증가하다가 발아 6 일에는 감소하여 1.30g으로 나타났다.

이와 같이 침지처리 후 단백질의 감소를 초래하는 것은 용해도 변화에서 유래되는 것으로 생각된다.

5. Albumin 단백질의 전기영동 패턴

Albumin의 전기영동 band들은 M.W. 24,000보다 작은 것에서 부터 66,000보다 큰 것에 이르기 까지 약 14개의 band를 Fig. 4에서 보여주고 있었고 침지후의 band 패턴에서 보면 미소한 band 4개가 늘어나 18개의 분리된 band를 보였다.

발아중에 없어지는 band들도 있고 발아 6 일까지 존재하는 band들도 있었는데 주 분리대는 M.W.가 16,000, 24,000, 43,000, 50,000 70,000인 5개로 나타났는데 이들은 발아 6 일까지 존재하는 것을 보여주었다.

박등⁵⁾의 보고에 의하면 19개의 band를 보여 본

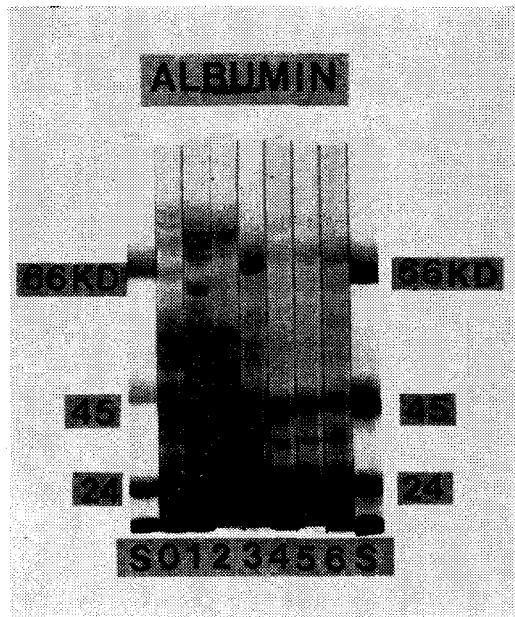


Fig. 4. SDS-PAGE pattern of albumin from mung bean during germination. S : M.W. Standard, 0 : Mung bean, 1 : Soaking and 2~6 : Germination days.

패턴과 거의 일치하는 것으로 나타났고 발아 중에 일어나는 band들의 변화도 비슷한 경향을 나타내었다.

발아중에 단백질량의 변화는 침지, 발아 2일까지는 차이가 별로 없었고, 발아 3일부터 albumin이 물에 의하여 유실되고 이용되기 때문에 급격한 감소를 보이며 발아 4일부터는 작은 감소를 보이고 있었다. 이와 같이 각 단백질의 band수와 농도가 작아짐에 따라 albumin 함량이 적어짐을 알 수 있었다. 그러므로 발아시간에 의한 숙주나물 신장도의 비교에서 우리가 섭취할 수 있는 최적 조건인 발아 4일에서 보면 albumin이 많이 감소된 것을 알 수 있었다.

6. Globulin 단백질 전기영동 패턴

녹두의 globulin은 M.W. 24,000보다 작은 것에서 66,000 보다 큰 것에 이르기까지 6개의 band를 Fig. 5에서 보여 주고 있다.

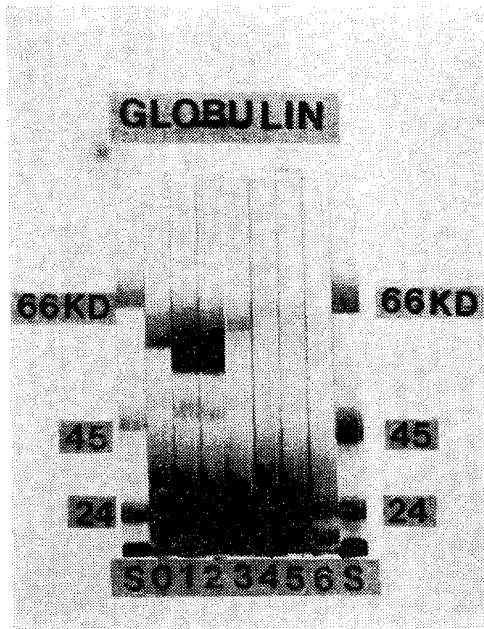


Fig. 5. SDS-PAGE pattern of globulin from mung bean during germination.
S : M.W. Standard, 0 : Mung bean,
1 : Soaking and 2~6 : Germination days.

김등²⁹⁾의 대두의 globulin은 전기영동 band수가 7 개로 나타나 있고 보리³⁰⁾ globulin의 경우에도 녹두에서와 같이 분자량이 65,000 이하에 major band가 나타나고 있다. 총 6개의 band 중에 주

분리대는 3 개로서 M.W.가 55,000, 48,000 또한 globulin이 물에 용해되어 추출율이 높아졌다고 생각되어진다.

발아중 globulin 함량의 변화는 침지, 발아 2일까지는 차이가 별로 없고, 발아가 시작됨에 따라 발아기질로 이용되기 때문에 globulin 함량이 감소되는 것을 볼 수 있으며 분자량이 작은 단백질인 16,000, 24,000는 발아 6일까지 많은 양이 남아 있다.

높은 분자량을 가지는 주 분리대 46,000, 53,000는 발아기질로 분해되어 발아 4일부터 소멸되는 것을 알 수 있었다. Globulin은 저장단백질로써 전채단백질에서 많은량은 차지하고 있고 발아시간에의 한 숙주나물의 품질에 상당한 영향을 준다고 하였다. 이와 같이 발아 3일에서 4일까지의 단백질 변화가 크고 발아 4일에서 6일까지의 변화가 작기 때문에 발아시간에 의한 우리가 섭취하는 숙주나물의 최적인 발아 4일에는 globulin의 많은 감소가 있었다는 것을 알 수 있었다.

7. Glutelin 단백질 전기영동 패턴

Alkali soluble protein인 glutelin에서 전기영동 양상은 M.W.가 24,000보다 작은 것에서부터 66,000 이상되는 10개의 band로 Fig. 6에서 보여주고 있다.

Landry 등¹⁹⁾이 보고한 보리 glutelin도 주 band가 M.W. 25,700~100,000 사이에 있어 본 실험의 band들과 유사함을 보여 주고 있다. 이들 10개의 band 중에 major band는 5 개로서 M.W.가 22,000, 28,000, 46,000, 50,000, 68,000이었으며, 46,000과 68,000에 위치한 band는 발아 3일부터 분해되어 보이지 않는다.

발아중 glutelin의 함량변화는 침지, 발아 2일까지는 큰 변화가 없고 발아가 시작됨에 따라 발아 기질로 이용되어 분해되었기 때문에 glutelin함량이 감소되었다고 생각된다. 그리고 glutelin은 발아 6일 후에는 대부분의 band들이 남아 있어 albumin과 globulin보다는 발아 후기까지 잔류하는 단백질함량이 많았다.

Fig. 6에서 보는 바와 같이 발아 3일부터는 glutelin의 감소가 크게 일어나고 있었다. 그러므로 발아시간에 의한 숙주나물의 신장도 비교에서 최적조건인 발아 4일에서 glutelin 함량이 많이 감소되지 않고 상당히 많은 양이 남아 있는 것을 알 수 있었다.

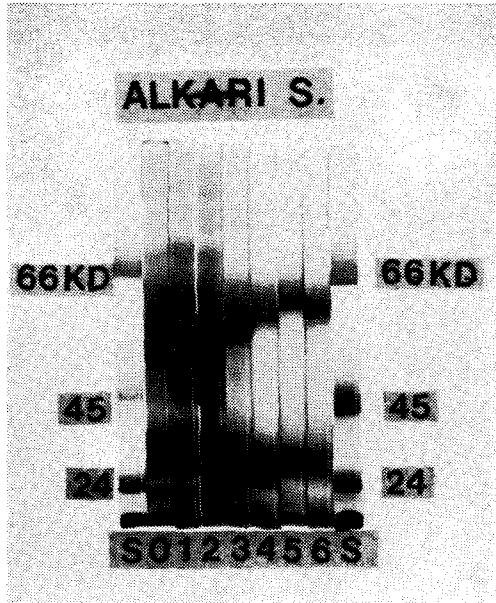


Fig. 6. SDS-PAGE pattern of glutelin from mung bean during germination.

S : M.W. Standard, 0 : Mung bean, 1 : Soaking and 2~6 : Germination days.

8. 발아중 아미노산 분석

발아중 아미노산조성의 변화 결과를 Table 2에 나타내었다.

녹두는 산성아미노산인 Asp, Glu의 양이 13.5%, 13.4%로 다른 것에 비해 상당히 높은 양을 함유하였고, 염기성 아미노산인 Arg, Lys는 5.3%, 6.2% 정도 함유하였으며, 중성아미노산인 Gly, Ala, Thr, Val, Ile, Leu는 3.9~6.7% 정도 함유하였다. 함황아미노산인 Cys, Met는 0.3~2.4%로 적게 함유하였고, 방향족 아미노산인 Phe, Tyr은 2.2%, 4.5% 정도로 낮은 편이며, 복소환 아미노산인 Pro, His은 5.9%, 4.5% 정도 함유하고 있었다.

발아중 아미노산의 변화는 산성 아미노산인 Glu는 13.4%에서 10.0%으로 감소하였고, 염기성 아미노산은 발아중에 증가하는 것으로 나타났으며, 중성아미노산들은 조금 증가하거나 감소하는 경향이었고, 함황아미노산은 감소하는 경향을 나타내었으며, 방향족 아미노산과 복소환 아미노산은 변화가 크게 일어나지 않는 것으로 나타났다.

Table 2. Change in amino acid content of mung bean during germination

(Unit : %)

Amino acids	Germination period(days)		
	0	3	6
Aspartic acid	13.5	11.0	17.8
Threonine	3.9	4.0	4.2
Serine	6.7	6.7	6.2
Glutamic acid	13.4	15.4	10.0
Proline	5.9	7.0	5.0
Alanine	6.2	6.2	6.5
Cysteine	0.3	0.1	0.3
Valine	6.4	5.9	7.1
Methionine	2.3	1.8	1.5
Isoleucine	4.6	4.2	4.5
Leucine	7.8	7.9	7.2
Tyrosine	2.2	2.3	3.3
Phenylalanine	4.5	4.6	4.4
Histidine	4.5	3.7	4.5
Lysine	6.2	6.9	6.5
Arginine	5.3	5.7	5.6

초 록

숙주나물의 수분함량, 신장도, 질소함량 및 각 단백질 분획들의 전기영동 패턴과 아미노산조성을 비교 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

숙주나물의 신장도는 재배방법에 의해 약간 달라질 수 있으나 온도가 높을수록 신장도는 커지고 온도가 낮으면 신장도는 작아지나 우리가 섭취할 수 있는 가식부는 크게 나타난다.

Weber 변법에 의한 숙주나물의 분획별 단백질 함량은 glutelin량이 가장 많고 globulin, albumin 순이었다. 발아중에 추출율의 차이는 있었으며 대체로 단백질량은 감소하는 것으로 나타났다.

단백질 분획들을 전기영동하여 관찰한 결과 모든 녹두단백질들이 발아기질로 이용되어 발아기간이 늘어날수록 단백질량의 감소를 확인할 수 있었으며, 발아시간에 의한 숙주나물의 신장도와 단백질변화를 비교해 볼 때 상품질 가치로서는 발아 4일이 최적조건임을 알 수 있었다.

아미노산 조성은 Asp, Glu을 월등히 많이 함유하였으며, 전반적으로 발아가 진행됨에 따라 산성 아미노산은 감소하고 염기성 아미노산은 증가하는

경향을 나타냈으며 다른 아미노산들은 발아중 유의할 만한 변화는 없었다.

참고 문헌

1. 최갑성, 김재욱 : 한국식품과학회지, 18(2) : 163(1985)
2. D.R. Davis and K.F. Wiese: J. Food Sci., 45 : 428(1981)
3. 권영은 : 숙명여자대학교 대학원 식품영양학과 학위논문(1983)
4. 이상갑, 홍종욱 : 한국농화학회지, 26(3) : 151 (1986)
5. 박동진, 조숙자, 신용철 : 한국식품과학회지, 18(2) : 263(1986)
6. T.S. Chen and W.L. George.: J. Food Sci., 46 : 428(1981)
7. Per Aman: J. Sci. Food Agric., 30 : 869(1979)
8. 이희수 : 충남대학교 대학원 식품가공학과 학위논문(1985)
9. 전태승, 이상갑 : 한국농화학회지, 26(3) : 151 (1983)
10. Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists: 13th, Washington, D.C. Method. 14 : 602(1980)
11. P.S. Misra and E.T. Mertz.: Cereal Chem., 53(5) : 705(1976)
12. Weber, K. and Osborene, M.: J. Biol. Chem., 244(26) : 4406(1969)
13. El-Negoumy, A.M. et al.: Cereal Chem., 54 (2) : 333(1977)
14. A. Brandit: Cereal Chem., 53(6) : 890(1976)
15. Jaques Landry et al.: J. Agric. Food Chem., 31 : 1317(1983)
16. J. Inversen and B. Koie.: Phytochemistry, 12 : 73(1973)
17. J.W. Paulis and J.S. Wall.: Cereal Chem., 56(1) : 20(1979)
18. Marjorie Byer, Benjamin J. Mifflin and Susan J. Smith.: J. Sci. Food Agric., 34 : 447(1983)
19. Bui Huy Khoi and Le Doan Dien: J. Sci. Food Agric., 39 : 137(1987)
20. R.A. Orth and W. Bushuk.: Cereal Chem., 50 : 191(1973)
21. Bradford, M.M.: Analytical Biochemistry, 72 : 248(1976)
22. Danji Fukushima: Cereal Chem., 45(3) : 203 (1968)
23. T. Iwasaki et al.: Cereal Chem., 59(3) : 192(1982)
24. J.W. Paulis and J.S. Wall: Cereal Chem., 46 : 433(1969)
25. V.W. Padhye and D.K. Salunkhe: Cereal Chem., 56(5) : 389(1979)
26. 장봉기 : 조선대학교 대학원 식품영양학과 학위논문(1983)
27. 이상효, 정동효 : 한국농화학회지, 25(2) : 75 (1982)
28. Anthony P. Rhodes and Anthony A. Gill: J. Sci Food Agric., 31 : 467(1980)
29. 김종균, 김성곤, 이준식 : 한국식품과학회지, 20(2) : 263(1988)
30. Peter R. Shewry and J. Richard S. Ellis: J. Sci. Food Agric., 29 : 263(1978)