

In vitro에서 메밀 다당분획이 casein 가수분해에 미치는 영향

손흥수 · 이정선* · 라경수** · 광재혁

고려대학교 생물공학연구소, *한림대학교 자연과학연구소,

**대구공업전문대학 식품영양학과

Effects of Buckwheat Polysaccharides on the Digestibility of Casein *in vitro*

Heung-Soo Son, Jung-Sun Lee*, Kyung-Soo Ra** and Jae-Hyock Kwak

Institute of Biotechnology, Korea University

**Institute of Natural Science, Hallym University*

***Department of Food Nutrition, Taegu Technical Junior Collage*

Abstract

This study was conducted to determine the effect of soluble polysaccharides and indigestible polysaccharides on the digestibility of casein *in vitro* and the structure of polysaccharide. The digestibility of casein by trypsin *in vitro* was reduced to 80~89% and 69~99% by high molecular soluble polysaccharide (HMS-P) and low molecular insoluble polysaccharide (LMI-P) prepared from buckwheat, respectively. The digestibility of casein by chymotrypsin was reduced to 63~88% and 71~79% by HMS-P and LMI-P, respectively. But casein digestibility by trypsin and chymotrypsin was slightly reduced by LMS-P. The casein hydrolyzates inhibited by HMS-P gave a main peak in the void volume on Sepadex G-100, but the peak in the total volume was only appeared in case of LMS-P having no inhibitory effect. It was suggested that the HMS-P was consisted of 4-linked and 4,6-dissubstituted glucose from the structural analysis by GC.

Key words: buckwheat, casein digestibility, polysaccharides

서 론

메밀(*Fagopyrum esculentum* Möench)은 혈압 및 혈당조절 효과⁽¹⁾ 뿐만 아니라 고콜레스테롤혈증을 예방할 수 있는 건강식품으로 보고되었으며⁽²⁾, 우리나라에서는 주로 국수류와 부침류로 이용되고 있어 최근 메밀채소의 개발로 이용성의 증대를 꾀하고 있다⁽³⁾. 메밀의 단백질 함량은 11~15%로 일반곡류에 비해 많은 양을 함유하고 있으며, 특히 곡류에는 부족한 필수아미노산인 lysine과 arginine, aspartic acid도 함유하고 있어 아미노산 조성이 우수한 잡곡으로 보고되었다⁽⁴⁾.

그러나 저자 등⁽⁵⁾이 50%(w/w) 메밀 식이를 당뇨쥐에게 급여했을 때, 대조군에 비해 메밀을 섭취한 군들의 변중질소 배설량이 유의적으로 증가되었다. 또한 *in vitro*에서 메밀로부터 추출한 비소화성 다당류 및 가용성 다당류 분획을 α -amylase(기질: starch), trypsin(기질: BApNA), chymotrypsin(기질: GPpNA), lipase(기질: olive oil)와 각각 반응시켰을 때, 분자량 10,000 이상의 가용성 다당 분획에서 trypsin과 chymotrypsin 활성이 α -amylase와

lipase 활성보다 현저하게 저하되었다⁽⁶⁾. 이들 다당류 분획의 추출 조건 및 구성당으로 확인할 때 비소화성 다당류는 crude hemicellulose, alcohol hemicellulose, lignin이었으며 가용성 다당분획은 glucose가 주요한 당인 것으로 확인되었다⁽⁷⁾.

한편, Schneeman⁽⁸⁾은 *in vitro*에서 식이섬유가 효소 활성에 미치는 영향은 식이섬유와 효소의 반응방법 그리고 효소 및 기질의 종류에 따라 다르다고 보고하였다. Morón 등⁽⁹⁾의 보고에서도 비소화성 잔사(indigestible residues)에 의한 trypsin 활성의 저해는 기질로 이용된 casein과 BApNA에 따라 다른 결과를 나타내었다. 따라서 전보⁽⁶⁾에서 보고한 trypsin과 chymotrypsin의 합성기질과 비교하여 단백질인 casein을 기질로 이용하였을 때 가용성 다당이 casein 가수분해에 미치는 영향을 비교하는 한편 이들 가용성 다당을 추출할 때 이용한 α -amylase에 의해 가수분해되지 않은 다당의 구조를 확인하고자 구조를 분석하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 메밀은 경기도 가평군에서 1993

Corresponding author: Jung-Sun Lee, Institute of Natural Science, Hallym University, Chunchoen 200-702, Korea

년에 수확한 것을 구입하였으며 날메밀, 볶은메밀(110°C, 25분), 찢메밀(100°C, 1시간)로 나누어 각각 처리한 후 찢메밀은 실온건조하였다. 각 시료는 분쇄(20 mesh)한 후 사용하였으며, 메밀 시료의 처리조건 및 일반성분은 전보⁷⁾에서와 같다.

메밀 시료에서 다당 추출 및 분리

Hellendoorn 등¹⁰⁾의 효소적 가수분해 방법을 이용하여 날메밀, 볶은메밀, 찢메밀로부터 각각 비소화성 다당 (crude hemicellulose, alcohol insoluble hemicellulose, residue)을 추출하고, 이 과정에서 얻은 수용성 분획으로부터 가용성 다당류를 분리하였다⁷⁾. 수용성 분획으로부터 원심분리(15000 rpm, 30분)하여 얻은 침전물을 저분자 불용성다당 (Low Molecular Weight Insoluble-Polysaccharide; LMI-P)으로 하였으며, 나머지 수용성 분획은 35 psi 질소 압력하에서 Amicon ultrafiltration kit를 이용하여 분자량 10,000 이상의 고분자 수용성다당(High Molecular Weight Soluble-Polysaccharide; HMS-P)과 분자량 10,000 이하의 저분자 수용성다당(Low Molecular Weight Soluble-Polysaccharide; LMS-P)으로 분리하였다. 위에서 얻은 분획들을 냉동, 건조시킨 후 저분자 불용성다당, 저분자 수용성다당, 고분자 수용성다당을 본 실험의 시료로 사용하였다.

Casein 가수분해율 측정

In vitro에서 기준 단백질인 ANRC casein을 이용하여 Satterlee 등¹¹⁾의 방법에 의해 단백질 가수분해율을 측정하였다. 즉, casein-다당의 혼합비를 1 : 0.5(w/w)로 하여 0.1 M phosphate buffer(pH 7.6) 용액을 가한 후 35 °C에서 20분간 반응시켰다. 이 casein-다당 혼합액에 buffer에 용해된 trypsin과 chymotrypsin 효소액을 가하고 35°C에서 20분간 가수분해 시킨 후 원심분리하여 가수분해물의 단백질 함량을 Lowry 방법¹²⁾으로 측정하였다. 가수분해율은 다당을 첨가하지 않고 casein만을 가수분해 했을 때를 100%로 하여 상대적인 % 비율로 나타내었다.

가수분해물의 Gel filtration

Table 1. Analytical conditions of GC for component sugars

Instrument	Hewlett packard 5890
Detector	Flame ionization detector
Column	SPB-1 capillary Column (0.25 µm film, 30 m × 0.25 mm)
Injector temperature	210°C
Detector temperature	210°C
Carrier gas	He
Carrier gas flow rate	0.9 ml/min

가수분해물의 수용성 상층액 1 ml을 Sephadex G-100 column(1.8×60 cm)에 가하여 phosphate buffer(pH 7.5) 용액으로 용출시켜 UV로 280nm에서 측정하였다.

다당의 구조 분석

다당은 Hakomori방법¹³⁾에 의해 methylation시켰으며, methylation된 polysaccharides를 2M trifluoroacetic acid로 121°C에서 1.5시간 동안 가수분해한 후 가수분해물을 alditol acetate 유도체로 전환시켰다. 전환된 alditol acetate 유도체는 gas chromatography를 이용하여 다당의 구조를 분석하였으며^{14,15)} 분석조건은 Table 1과 같다.

결과 및 고찰

메밀다당 분획이 trypsin에 의한 casein 가수분해율에 미치는 영향

In vitro에서 trypsin에 의한 casein 가수분해율에 메밀다당이 미치는 영향은 Table 2와 같다.

분자량 10,000 이하의 저분자 가용성다당은 casein 가수분해율을 5~7% 감소시켰고, 분자량 10,000 이상의 고분자 가용성다당과 저분자 불용성다당은 각각 80~89%, 69~99% 감소시켰으며, 처리 방법 중 볶은 메밀에 의한 감소율이 가장 크게 나타났다.

메밀다당 분획이 chymotrypsin에 의한 casein 가수분해율에 미치는 영향

In vitro에서 chymotrypsin에 의한 casein 가수분해율

Table 2. Effects of buckwheat(BW) polysaccharides on the digestibility of casein by trypsin in vitro

Poly-saccharides	Reduction of digestibility (%)		
	Raw BW	Roast BW	Steamed BW
LMI-P ¹⁾	68.9	98.5	88.8
HMS-P ²⁾	86.5	88.6	79.7
LMS-P ³⁾	6.9	6.4	5.0

¹⁾ Low molecular weight insoluble-polysaccharide

²⁾ High molecular weight soluble-polysaccharide

³⁾ Low molecular weight soluble-polysaccharide

Table 3. Effects of buckwheat(BW) polysaccharides on the digestibility of casein by chymotrypsin in vitro

Poly-saccharides	Reduction of digestibility (%)		
	Raw BW	Roast BW	Steamed BW
LMI-P ¹⁾	71.2	79.1	78.9
HMS-P ²⁾	62.9	87.5	80.7
LMS-P ³⁾	2.4	3.4	5.0

¹⁾ Low molecular weight insoluble-polysaccharide

²⁾ High molecular weight soluble-polysaccharide

³⁾ Low molecular weight soluble-polysaccharide

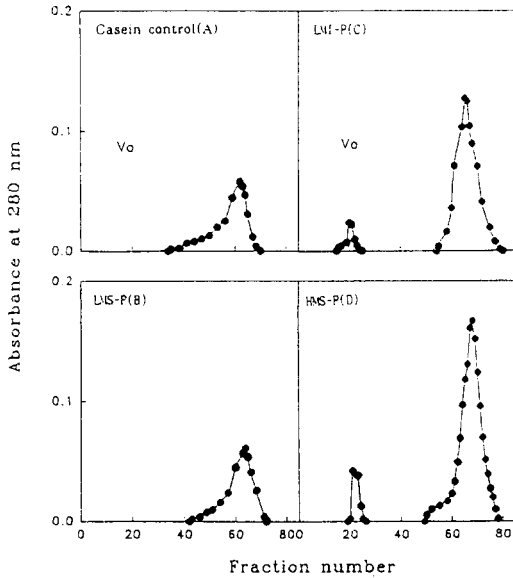


Fig. 1. Gel filtration on Sephadex G-100 of casein hydrolyzates by trypsin after preincubation of casein-buckwheat polysaccharide mixture

- (A) Casein control
- (B) Low molecular weight soluble-polysaccharide
- (C) Low molecular weight insoluble-polysaccharide
- (D) High molecular weight soluble-polysaccharide

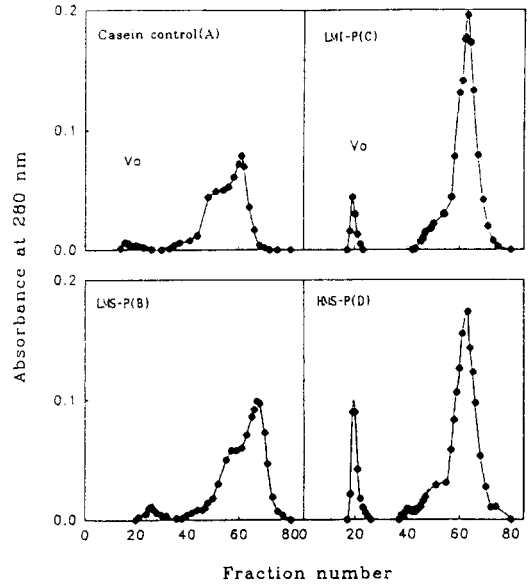


Fig. 2. Gel filtration on Sephadex G-100 of casein hydrolyzates by chymotrypsin after preincubation of casein-buckwheat polysaccharide mixture

- (A) Casein control
- (B) Low molecular weight soluble-polysaccharide
- (C) Low molecular weight insoluble-polysaccharide
- (D) High molecular weight soluble-polysaccharide

에 메밀다당이 미치는 영향은 Table 3과 같다.

Trypsin에서와 같이 저분자 가용성 다당은 chymotrypsin에 의한 casein 가수분해율을 2~5% 감소시켰으나 고분자 가용성다당과 저분자 불용성다당은 각각 63~88%, 71~79% 감소시켰고, 붉은메밀로부터 추출한 다당의 감소율이 날메밀이나 전메밀보다 큰 것으로 나타났다. Acton 등⁽¹⁶⁾의 보고에 의하면 메밀에서 추출한 다당이 trypsin에 의한 casein 가수분해율에 미치는 영향은 cellulose, lignin, pectin 등과 같은 정제된 식이섬유나 wheat bran, 두류(Great northern bean)에서 추출한 비소화성 다당이 미치는 영향보다 크게 나타났다.

Casein 가수분해물의 gel filtration

다당분획에 의한 casein 가수분해율은 메밀의 처리방법에 따라 다르게 나타났으며, 이 중 붉은메밀에서 가장 크게 감소되었다. 따라서 붉은메밀의 다당을 casein에 첨가하고 trypsin과 chymotrypsin 효소와 각각 반응시킨 후 Sephadex G-100 column chromatography에 의해 casein 분해양상을 확인하였다.

Casein과 다당의 혼합액을 trypsin으로 가수분해한 후 가수분해물을 gel filtration한 결과는 Fig. 1과 같다.

다당을 첨가하지 않고 casein만을 가수분해했을 때 가수분해 양상은 Fig. 1의 A와 같이 total volume에서 1개의 peak로 나타났다. Trypsin의 활성감소가 가장 적

었던 저분자 가용성 다당을 casein과 혼합시켜 가수분해한 후 가수분해물을 gel filtration 했을 경우에는 Fig. 1의 B에서 보는 바와 같이 total volume에서 1개의 peak가 나타나 저분자 가용성 다당은 casein 가수분해에 영향을 미치지 않았다. 그러나 저분자 불용성 다당(C)과 고분자 가용성 다당(D)의 경우 고분자량의 가용성 peptide peak가 void volume에서 용출되어 기준 단백질인 casein만을 가수분해시켰을 때와는 다른 양상을 보였다. 이와 같이 고분자량의 peptide가 용출된 것은 메밀 다당분획이 casein과 결합되어 trypsin과 반응할수 있는 기질의 양을 상대적으로 감소시켰기 때문인 것으로 사료된다. Ikeda 등⁽¹⁷⁾은 pectin을 hemoglobin(기질 단백질)과 반응시킨 후 trypsin과 chymotrypsin으로 pectin-hemoglobin 혼합액을 가수분해시켜 gel filtration했을 때, pectin이 hemoglobin과 결합되어 가수분해가 억제된 것으로 보고하였다. 저분자 불용성 다당(C)과 고분자 가용성 다당(D)이 chymotrypsin의 casein 가수분해에 미치는 영향은 Fig. 2에서 보는 것과 같이 trypsin과 유사한 결과를 나타내었다.

다당의 구조분석

Casein 가수분해율을 가장 많이 감소시킨 붉은메밀의 고분자 가용성 다당의 구조를 확인한 결과는 Table 4와 같다.

Table 4. Structural analysis of high molecular weight soluble polysaccharides (Mol %)

Methylated alditol acetate derivatives	Buckwheat			Linkages
	Raw	Roast	Steamed	
2,3,4,6-tetra-OMe-Glc	14.0	24.0	19.3	Glc ¹ →
2,3,6-tri-OMe-Glc	65.0	62.2	63.7	→ ⁴ Glc ¹ →
2,3-di-OMe-Glc	21.0	13.8	17.0	→ ⁶ Glc ¹ →

고분자 가용성 다당의 주요 구성당은 glucose로 보고 되었으며⁽⁷⁾, 다당의 구조는 1,4결합을 나타내는 2,3,6-tri-OMe-Glc가 62~65 Mol%, 1,6결합을 나타내는 2,3-di-OMe-Glc가 14~21 Mol%, 단일 glucose를 나타내는 2,3,4,6-tetra-OMe-Glc가 14~24%이었다. 고분자 가용성 다당은 주로 1,4결합 glucose와 소량의 1,6결합 glucose 및 단일 glucose로 구성되어 있는 것으로 나타났다. 1,4결합과 1,6결합이 α-형태인지 α-형태인지를 확인하기 위해서는 더 많은 연구가 진행되어야 하나, 본 실험의 고분자 가용성 다당에서 확인된 1,4결합과 1,6결합의 다당은 α-형태인 것으로 사료된다. 왜냐하면 다당분획은 추출과정에서 α-amylase에 의해서 전분을 가수분해시켜 얻은 것이기 때문에 β-형태인 cellulose는 α-amylase에 의해 가수분해되지 않아 가용성 다당 분획으로 유입되기 어려워 불용성인 비소화성 잔사 분획에 포함되어 있을 것으로 생각된다.

본 실험에서 casein의 가수분해율을 현저하게 감소시킨 고분자 가용성 다당의 구조는 주로 1,4결합의 glucose로 메밀전분의 가수분해물이었다. 또한 casein의 가수분해율을 저해하지 않았던 저분자 수용성 다당분획도 그 구조는 확인되지 않았지만 주요 구성당은 glucose로써 고분자 가용성 다당분획과 같이 전분의 가수분해 산물로 사료된다. 고분자 가용성 다당 분획에 단당류인 glucose 뿐만 아니라 1,4결합의 glucose가 함유되어 있는 것은 α-amylase에 의해서 메밀전분이 완전히 가수분해되지 않았기 때문이다. 또한 전분과 glucose는 casein과 반응하여 casein의 가수분해율을 저해하지 않았다는 보고⁽⁹⁾를 고려해 볼 때, 고분자 가용성 다당분획의 첨가에 의한 casein 가수분해율의 감소는 다당에 의한 영향이라기 보다는 분자량 10,000 이상인 가용성 물질 때문인 것으로 추측된다.

메밀의 성분 중에서 casein 가수분해율을 감소시킬 수 있는 물질로 탄닌 및 trypsin inhibitor를 들 수 있다⁽¹⁸⁾. 그러나 본 실험에서는 메밀 다당을 분리하는 과정에서 시료를 121°C에서 20분간 고압가열하였기 때문에⁽⁷⁾ trypsin inhibitor가 불활성화되어 trypsin inhibitor에 의한 영향은 거의 없을 것으로 여겨지며 따라서 메밀성분 중 탄닌이 casein 가수분해율을 저해시켰을 것으로 생각된다. 대부분의 많은 식물성 식품은 탄닌을 함유하고 있으며, Durkee⁽¹⁹⁾에 의하면 메밀의 탄닌은 다른 곡류와는 달리 분자량이 큰 수용성의 축합형 탄닌이라고 보고하

였다. 또한 Tamir 등⁽²⁰⁾의 보고에 의하면 고분자량 polyphenol 화합물인 탄닌은 단백질과 결합하는 것으로 알려져 있으며, Glick 등⁽²¹⁾은 탄닌의 종류에 따라 단백질과의 결합 정도에는 차이가 있어 구주콩나무(carob)로부터 추출된 탄닌의 경우에 casein과 60~70% 결합하여 단백질의 소화와 흡수를 저해한다고 보고하기도 하였다.

요 약

본 실험에서는 메밀에서 추출한 다당분획이 *in vitro*에서 casein 가수분해에 미치는 영향을 관찰하였다. 처리방법(날것, 볶은것, 찐것)을 달리한 메밀로부터 추출한 다당중 분자량 10,000 이상의 고분자 가용성다당(HMS-P)과 저분자 불용성다당(LMI-P)이 *in vitro*에서 trypsin에 의한 casein의 가수분해율을 각각 80~89%, 69~99% 감소시켰으며, 분자량 10,000 이하의 저분자 가용성다당(LMS-P)은 5~7% 감소시켰다. Chymotrypsin에 의한 가수분해율은 고분자 가용성다당(HMS-P)과 저분자 불용성다당에서 각각 63~88%, 71~79%이었으며 저분자 가용성다당은 2~5% 였다.

Casein 가수분해율을 현저히 감소시킨 볶은 메밀로부터 추출한 다당을 casein과 혼합하여 trypsin과 chymotrypsin으로 각각 가수분해시킨 후 가수분해산물을 Sephadex G-100 column에 통과시켰다. Casein만 가수분해시켰을 때와 저분자 가용성다당(LMS-P)을 첨가했을 때에 가수분해물은 total volume에서 1개의 peak가 용출되었으나 고분자 가용성다당(HMS-P)과 저분자 불용성다당(LMI-P)에서는 void volume에서 고분자량의 peptide peak가 1개 더 용출되었다.

Casein 가수분해를 억제하는 고분자 가용성다당(HMS-P)의 구조를 분석한 결과 주로 1,4결합의 glucose로 구성되어 있으며 소량의 1,6결합의 glucose와 단일 glucose도 함유되어 있었다. 따라서 메밀로부터 추출한 고분자 가용성다당분획에 의한 casein 가수분해율의 감소는 다당에 의한 것이라기 보다는 분자량 10,000 이상의 수용성물질에 의한 것으로 추측된다.

문 헌

1. 최 먼, 김중대, 박경숙, 오상용, 이상영: 메밀보충 급여가 백서의 혈당 및 혈압에 미치는 영향. 한국영양식량학회지, 20, 300 (1991)
2. 이윤형, 신용목, 이재은, 최용순, 이상영: 식물 추출물로부터 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase의 활성저해제 탐색. 생물공학회지, 6, 55 (1990)
3. 최병한: 메밀의 특수성분들. 농촌생활과학, 13, 53 (1992)
4. Pomeranz, Y. and Robbins, G.S.: Amino acid composition of buckwheat. *J. Agr. Food Chem.*, 20, 270 (1972)
5. 이정선, 손홍수, 맹영선, 장유경, 주진순: 메밀급여가 streptozotocin 유발 당뇨병 쥐의 장가무게 및 당질과 지질

- 대사에 미치는 영향. 한국영양학회지, 27, 819 (1994)
6. 이정선, 라경수, 손홍수: *In vitro*에서 메틸다당이 소화 효소 활성에 미치는 영향. 한국식품과학회 제 51차 학술발표회초록 (1995)
 7. 이정선, 라경수, 손홍수: 메밀로부터 다당추출과 성분당 분석. 한국식품과학회 제 51차 학술발표회초록 (1995)
 8. Schneeman, B.O. and Gallaher, D.: Effects of dietary fiber on digestive enzymes. In *CRC handbook of dietary fiber in human nutrition*. Spiller, G. A., 2nd ed., CRC press Tokyo, p.377 (1993)
 9. Morón, D., Mellto, C. and Tovar, J.: Effect of indigestible residue from foodstuffs on trypsin and pancreatic α -amylase activity *in vitro*. *J. Sci. Food Agri.*, 47, 171 (1989)
 10. Hellendoorn, E.W., Hoordhoff, M.G. and Slagman, J.: Enzymatic determination of the indigestible residue (dietary fiber) content of human food. *J. Sci. Food Agri.*, 26, 1461 (1975)
 11. Satterlee, L.D., Marshall, H.F. and Tennyson, J.M.: Measuring protein quality. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56, 103 (1979)
 12. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)
 13. Hakomori, S.J.: A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulphonyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *Biochem.*, 55, 205 (1964)
 14. Albersheim, P., Nevins, D.J., English, P.D. and Karr, A.: A new method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.*, 5, 340 (1967)
 15. Jones, T.M. and Albersheim, P.: A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiol.*, 49, 926 (1972)
 16. Acton, J.C., Breyer, L. and Satterlee, L.D.: Effect of dietary fiber constituents on the *in vitro* digestibility of casein. *J. Food Sci.*, 47, 556 (1982)
 17. Ikeda, K. and Kusano, T.: *In vitro* inhibition of digestive enzymes by indigestible polysaccharides. *Cereal Chem.*, 60, 260 (1983)
 18. Ikeda, K., Sakaguchi, T., Kusano, T. and Yasumoto, K.: Endogenous factors affecting protein digestibility in buckwheat. *Cereal Chem.*, 68, 424 (1991)
 19. Durkee, A.B.: Polyphenols of the bran-aleurone fraction of buckwheat seed (*Fagopyrum sagittatum*, Gilib). *J. Agric. Food Chem.*, 25, 286 (1977)
 20. Tamir, M. and Alumot, E.: Inhibition of digestive enzymes by condensed tannins from green and ripe carobs. *J. Sci. Food Agri.*, 20, 199 (1969)
 21. Glick, Z. and Joslyn, M.A.: Effects of tannic acid and related compounds on the absorption and utilization of proteins in the rat. *J. Nutr.*, 100, 516 (1970)

(1995년 7월 10일 접수)