

키토산과 글루탐산의 병용처리에 따른 발아현미 중의 수용성 단백질 및 유리 아미노산 함량변화

†오 석 흥 · 이 인 태 · 박 기 범 · 김 병 주
우석대학교 생물공학과
(접수 : 2002. 10. 14., 게재승인 : 2002. 12. 16.)

Changes in the Levels of Water Soluble Protein and Free Amino Acids in Brown Rice Germinated in a Chitosan/Glutamic Acid Solution

Suk-Heung Oh†, In-Tae Lee, Ki-Bum Park, and Byung-Ju Kim
Department of Biotechnology, Woosuk University, Jeonju 565-701, Korea
(Received : 2002. 10. 14., Accepted : 2002. 12. 16.)

The changes in the levels of total soluble protein and some free amino acids were investigated in germinating brown rice. Nongerminated (N) brown rice was germinated for 72 hrs by applying following solutions: 1) distilled water (W), 2) 50 ppm chitosan in 5 mM lactic acid (CL), and 4) 50 ppm chitosan in 5 mM glutamic acid (CG). The level of total soluble protein was higher in the N extract than those of W, CL and CG. Alanine levels were enhanced and aspartic acid levels were decreased significantly in the germinated brown rice, highest increases of alanine were found in the CG germinated brown rice. The levels of serine, decreased during germination in solutions W and CL, were increased significantly by germination in CG solution. The levels of essential amino acids, such as lysine, isoleucine and methionine were also increased significantly by germination in CG solution. Our results show that the germination of brown rice with CG solution can significantly increase the levels of alanine and some other essential amino acids and can restore the serine level.

Key Words : Total soluble protein, free amino acids, brown rice, germination

서 론

쌀은 우리나라 뿐만 아니라 아시아 여러나라에서 주식(主食)으로 사용되고 있는 중요한 농작물이다. 식생활의 서구화로 쌀의 소비가 주춤하고 있는게 사실이지만 최근 쌀에 함유되어 있는 아라비녹실란, 감마-아미노부티르산 등의 면역활성작용, 항암작용, 항동맥경화작용, 혈압상승억제작용, 정신집중 및 기억력강화작용 등의 기능성이 보고되면서 기능성 식품소재로서의 쌀에 대한 관심이 증가하고 있는 추세이다(1,2). 현미는 백미에 비해 식이섬유와 지질, 인, 철, 칼슘 등을 많이 함유하고 있으나 영양소의 소화 흡수율은 낮은 것으로 알려져 있다(3,4). 최근 들어 현미는 각종 음료, 차 등에 첨가되기도 하고 쌀을 띄워 '발아현미'로 만들어 시판하기도 한다. 발아현미는 소화흡수가 좋을 뿐만 아니라 싹이날 때 각종 비타

민, 아라비녹실란, 감마-아미노부티르산 등의 유용성분이 증가하는 것으로 알려져 있다(1,5). 또한 식물 종자의 발아시 phytases의 증가로 피틴산과 칼슘을 비롯한 각종 미네랄이 분리되면서 이들 미네랄의 체내 흡수성도 높아질 수 있는 것으로 알려져 있다(6,7).

최근 본 연구진은 발아현미 제조시 키토산액을 침지액으로 사용하면 감마-아미노부티르산 함량이 증진된 발아현미를 얻을 수 있음을 보고한 바 있다(5). 발아에 필요한 적절한 온도와 습도는 각종 곰팡이들의 생육에도 적당하기 때문에 발아현미의 부패의 원인을 제공해 주기도 하지만 키토산액의 사용은 현미의 발아 과정 중 곰팡이 오염 가능성을 현저하게 낮추어 주었다. 또한 키토산액에서 발아시킨 현미의 경우 감마-아미노부티르산 생성을 촉매하는 글루탐산 탈탄산 효소의 활성이 증진되는 것으로 조사되었다(5).

키토산은 인체에 무해한 생분해성 천연고분자 물질로서 그 자체가 항균력을 갖고 있으며(8,9) 식물에 사용할 경우 chitinase의 생성유도작용 등 식물체의 자기보호기능 향상효과가 있는 것으로 알려져 있다(10,11). 또한 키토산은 식품, 화장품 및 의약품 소재로도 사용되고 있으며, 특히 식품 분야에서는 키

† Corresponding Author : Department of Biotechnology, Woosuk University, Jeonju 565-701, Korea
Tel : +82-63-290-1433, Fax: +82-63-291-9312
E-mail : shoh@core.woosuk.ac.kr

토산을 첨가하여 제품의 품질 및 저장성을 증진시키고자 하는 연구가 진행된 바 있다(12). 일반적으로 키토산은 화학적 방법과 효소적 방법에 의해 탈 중합화 되어 chito-oligosaccharides로 만들어 지며 최근에는 유기산을 이용하는 방법이 보고되기도 하였다(13). 또한 분자량이 큰 키토산의 용해도를 높이기 위하여는 초산이나 젖산을 일반적으로 사용한다(12,14).

본 연구에서는 키토산을 용해하기 위하여 일반적으로 사용하는 젖산이나 초산을 사용하는 대신 글루탐산을 사용하여 용해한 후 현미 발아용액으로 사용 하였을 때 발아현미 중의 필수아미노산을 포함하는 일부 아미노산 함량이 현저히 증진됨을 관찰하였기에 이에 대하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 기구

유리아미노산 분석을 위한 HPLC는 Waters제(AccQ·Tag Amino Acid Analysis System) (USA)를 사용하였고, 동결건조기는 Ilshin사 제품(Korea)을 이용하였다. 키토산은 (주)엘키토산코리아(Korea)에서 제공받은 탈 아세틸화도 95% 이상인 고 분자량(30만)의 것을 사용하였고, lactic acid와 glutamic acid는 Sigma제(USA)를, 유리아미노산 표준품은 Pierce제(USA)를 사용하였다. 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbonate (AccQ·Fluor Reagent), acetate-phosphate buffer (AccQ·Tag Eluent A)는 Waters제를 사용하였으며 그의 시약들은 특급제품을 사용하였다.

현미 발아

시판 현미 50 g을 플라스틱 용기에서 적정수분(500 mL)과 25~26°C의 온도조건으로 Incubator에서 발아시켰다. 물발아 구에는 증류수를, chitosan구에는 5 mM lactic acid에 50 ppm 되게 chitosan을 용해하여 사용하였다. Chitosan/glutamic acid 구는 5 mM glutamic acid에 50 ppm되게 chitosan을 용해하여 사용하였다. 발아에 사용한 각 용액들은 12시간 마다 새로이 조제한 각각의 용액으로 교환해 주면서 72시간 동안 발아시켰다. 각 용액에서 발아된 현미를 건져내어 건조한 여과지에서 자연건조 시킨 후 액체질소를 가하여 유발에서 마쇄하였고 파우더는 -80°C에 보관하였다(15).

유리 아미노산 측정

발아현미 중의 유리아미노산 함량 변화를 측정하기 위해 액체질소로 마쇄된 시료 파우더에 메탄올:클로로포름:물(12:5:3)의 혼합액을 가하여 섞어 주었다. 유리아미노산을 포함하는 수용액 층은 원심분리(12,000 x g, 15 min, 4°C)를 통하여 얻었다. 침전물에 클로로포름:물(3:5)의 혼합액을 가하여 남아 있을지도 모르는 아미노산을 2차 추출하였고, 1, 2차 원심분리로부터 얻은 상등액을 합하여 냉동건조하였다. 이어 소량의 물로 용해한 후 0.45 µm PVDF 필터 (Millipore)로 여과하여 분석에 사용하였다. 아미노산의 형광 유도체화를 위해 AccQ·Fluor Reagent를 사용하였으며, 이들 유도체의 분리를 위해 3.9×150 mm AccQ·Tag™ (Nova-Pak™ C₁₈, Waters) column을 사용하였다. Column으로부터 유도체를 용

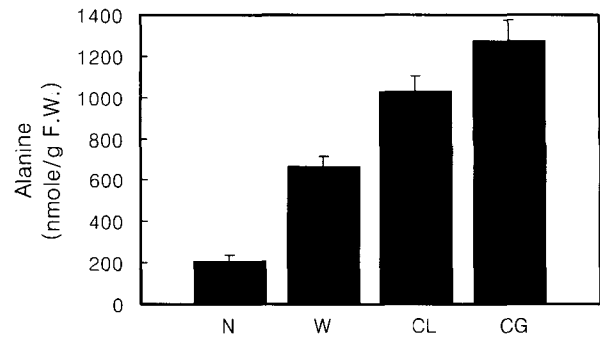


Figure 1. Increase in the levels of Ala by the germination of brown rice in chitosan/glutamic acid solution. N, nongerminated brown rice; W, brown rice germinated in water; CL, germinated brown rice in 50 ppm chitosan in 5 mM lactic acid; CG, germinated brown rice in 50 ppm chitosan in 5 mM glutamic acid. Values are standardized to fresh weight. The data represent the mean of three determinations with standard deviation of the mean.

출시키기 위해서는 AccQ·Tag Eluent A와 60% acetonitrile을 98:2의 비율로 분당 1 ml의 유속으로 흘려 주었다. 아미노산 함량은 표준 아미노산의 분석결과와 비교하여 산출하였다(15).

기타 분석

모든 실험결과는 평균±표준편차로 표시하였다. 현미 중의 수용성 단백질 함량은 액체질소로 마쇄된 파우더에 시트르산-인산완충액(0.02 M citric acid-0.04 M Na₂HPO₄, pH 6.8, 1 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride)을 가하여 추출물을 얻은 후 추출액 중의 단백질 함량을 감마-글로블린을 표준단백질로 사용하여 Bradford법(16)으로 측정하였다. 총 유리아미노산 함량은 분석된 각각의 유리아미노산 함량을 합하여 산출하였다.

결 과

발아처리 조건별 Alanine 함량 변화

각 처리조건에서의 alanine (Ala) 함량 변화는 Figure 1과 같다. Ala은 발아와 함께 물발아구에서 시료 g당 약 3배의 증가를 보였고, CL구와 CG구에서는 시료 g당 약 6배 증가한 것으로 조사되었다.

발아처리 조건별 Aspartic acid 함량 변화

각 처리조건에서의 aspartic acid (Asp) 함량변화는 Figure 2와 같다. Figure 2에서 보는 바와 같이 Asp는 현미 발아와 함께 W구에서 시료 g당 약 8배 감소를 보였고, CL구에서는 시료 g당 약 7배의 감소를 보였다. 또한 CG구에서도 그 감소가 뚜렷하여 시료 g당 12배의 감소를 보였다.

발아처리 조건별 Lysine 함량 변화

각 처리조건에서의 lysine (Lys) 함량변화는 Figure 3와 같다. 발아하지 않은 현미에 비해서 W구와 CL구에서는 시료 g당 각각 약 2배와 3배 이상의 증가를 보였다. 또한 CG구에서는 Lys의 함량이 4배 증진된 것으로 나타났다.

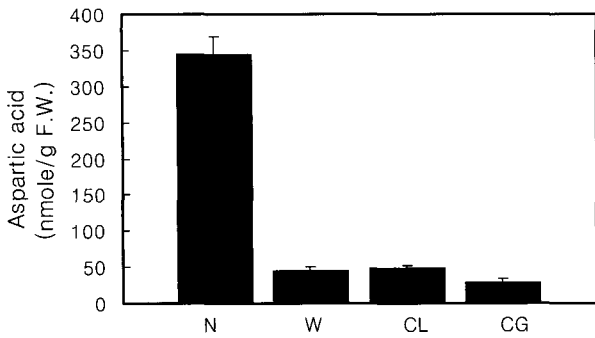


Figure 2. Decrease in the levels of Asp by the germination of brown rice in several solutions. N, nongerminated brown rice; W, brown rice germinated in water; CL, germinated brown rice in 50 ppm chitosan in 5 mM lactic acid; CG, germinated brown rice in 50 ppm chitosan in 5 mM glutamic acid. Values are standardized to fresh weight. The data represent the mean of three determinations with standard deviation of the mean.

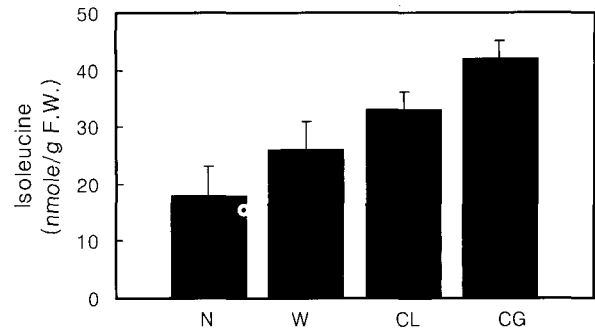


Figure 4. Increase in the level of Ile by the germination of brown rice in chitosan/glutamic acid solution. N, nongerminated brown rice; W, brown rice germinated in water; CL, germinated brown rice in 50 ppm chitosan in 5 mM lactic acid; CG, germinated brown rice in 50 ppm chitosan in 5 mM glutamic acid. Values are standardized to fresh weight. The data represent the mean of three determinations with standard deviation of the mean.

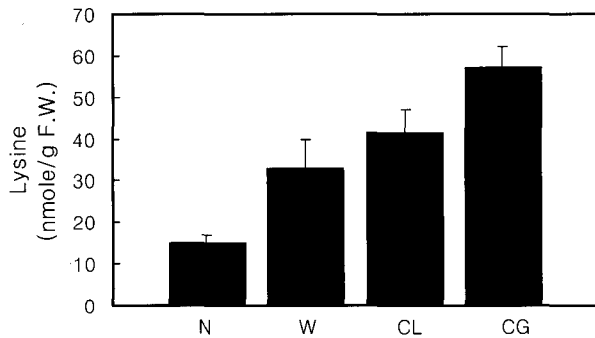


Figure 3. Increase in the level of Lys by the germination of brown rice in chitosan/glutamic acid solution. N, nongerminated brown rice; W, brown rice germinated in water; CL, germinated brown rice in 50 ppm chitosan in 5 mM lactic acid; CG, germinated brown rice in 50 ppm chitosan in 5 mM glutamic acid. Values are standardized to fresh weight. The data represent the mean of three determinations with standard deviation of the mean.

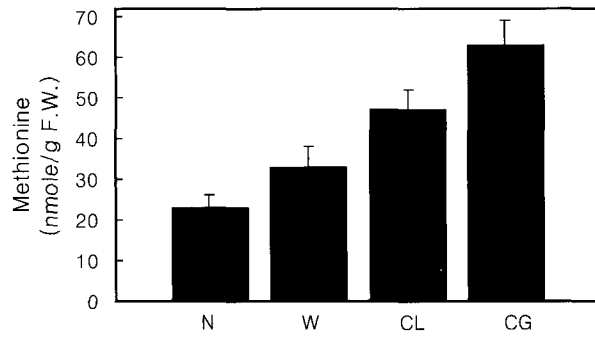


Figure 5. Increase in the level of Met by the germination of brown rice in chitosan/glutamic acid solution. N, nongerminated brown rice; W, brown rice germinated in water; CL, germinated brown rice in 50 ppm chitosan in 5 mM lactic acid; CG, germinated brown rice in 50 ppm chitosan in 5 mM glutamic acid. Values are standardized to fresh weight. The data represent the mean of three determinations with standard deviation of the mean.

발아처리 조건별 isoleucine 함량 변화

각 처리조건에서의 isoleucine (Ile) 함량변화는 Figure 4와 같다. 발아하지 않은 현미에 비해서 W구와 CL구에서는 시료 g당 각각 약 1.5배와 2배의 증가를 보였다. 또한 CG구에서는 Ile의 함량이 더욱 증진된 것으로 나타났다.

발아처리 조건별 methionine 함량 변화

각 처리조건에서의 methionine (Met) 함량변화는 Figure 5와 같다. 발아하지 않은 현미에 비해서 CL구에서는 시료 g당 각각 약 2배의 증가를 보였다. 또한 CG구에서는 약 3배 증진된 것으로 나타났다.

발아처리 조건별 serine 함량 변화

각 처리조건에서의 serine (Ser) 함량변화는 Figure 6와 같다. 발아하지 않은 현미에 비해서 W구와 CL구에서는 시료 g당 각각 약 2배 이상의 감소를 보였다. 그러나 CG구에서는 Ser의 함량이 발아 이전의 수준 만큼 증진된 것으로 나타났다.

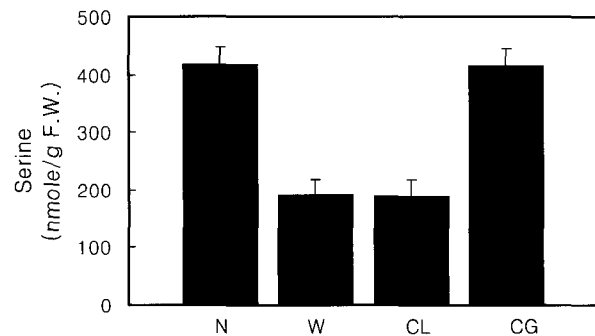


Figure 6. Changes in the levels of Ser by the germination of brown rice in several solutions. N, nongerminated brown rice; W, brown rice germinated in water; CL, germinated brown rice in 50 ppm chitosan in 5 mM lactic acid; CG, germinated brown rice in 50 ppm chitosan in 5 mM glutamic acid. Values are standardized to fresh weight. The data represent the mean of three determinations with standard deviation of the mean.

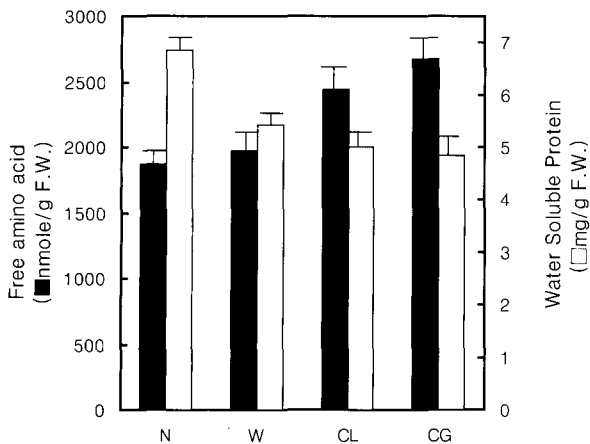


Figure 7. Changes in the levels of total soluble protein and free amino acid by the germination of brown rice in several solutions. N, nongerminated brown rice; W, brown rice germinated in water; CL, germinated brown rice in 50 ppm chitosan in 5 mM lactic acid; CG, germinated brown rice in 50 ppm chitosan in 5 mM glutamic acid. Values are standardized to fresh weight. The data represent the mean of three determinations with standard deviation of the mean.

발아처리 조건별 total soluble protein 및 총 유리아미노산 함량 변화

각 처리조건별 total soluble protein(TSP) 및 유리아미노산의 함량변화는 Figure 7과 같다. 발아하지 않은 현미 중의 TSP 함량은 발아한 현미 중의 TSP에 비하여 약 1.4배 높았으며 유리아미노산 함량은 CL구와 CG구에서 높게 나타났다.

고찰

발아현미 생산을 위해 키토산을 글루탐산에 용해한 후 침지액으로 사용함으로써 침지액으로 물을 사용한 경우에 비하여 Ala, Ser, Lys, Ile, Met 등의 아미노산 함량이 현저하게 증진됨을 발견하였다.

식물체가 혐기상태, 저온, 기계적인 자극과 같은 환경적인 스트레스 조건에 처하게 되는 경우에도 Ala의 증진과 더불어 Asp의 현저한 감소가 관찰된다(17,18). Asp는 glutamate가 부족하면 α -ketoglutarate와 반응하여 glutamate와 oxaloacetate로 변하고 glutamate는 pyruvate와 반응하여 Ala으로 전환되는 경로(17)를 통하는 것으로 예측된다. 그러나 글루탐산용액에 키토산을 용해하여 사용하면 글루탐산이 보강되는 효과가 있기 때문에 Ala의 함량증진에 글루탐산이 많이 쓰이고 Asp는 다른 아미노산의 형성에 사용될 것이다. 예를들면 식물과 박테리아에 있어 Lys, Ile, Met의 생합성은 Asp로부터 출발하여 일어나는 것으로 알려진 바 있어(19) 급격히 감소한 Asp의 일부가 이들 아미노산으로 전환되었을 가능성이 있다. 실제적으로 필수아미노산 중 Lys, Ile, Met이 다른 필수아미노산에 비하여 CG구에서 특히 많은 증가를 보인 결과(Figure 3, Figure 4, Figure 5)는 이와같은 견해를 뒷받침해 주고 있다.

다른 아미노산 중 현저한 함량변화를 보인 것은 Ser이다. 물발아(W구)와 키토산을 젖산에 녹인 후 침지액으로 사용한 CL구 발아에서 감소하던 Ser이 키토산을 글루탐산에 녹인 후 침지액으로 사용한 CG구에서 발아이전의 수준 이상으로

회복된 점은 매우 흥미롭다(Figure 6). 첨가된 Glu를 포함하여 현미 중의 일부 Glu의 아미노기가 3-phosphohydroxypyruvate에 전달되어 3-phosphoserine이 된 후 Ser으로 전환되는 경로(20)에 따라 Ser 함량이 증진된 것으로 판단된다(15). 현미의 CG 침지액 및 글루탐산액에서의 발아에 의해 증진되는 Ser의 대사적 출발과 운명물질에 대한 체계적인 연구는 매우 흥미로운 것이라 여겨진다(15).

현미 발아과정에 있어 총 단백질의 함량(total soluble protein, TSP) 감소는 유리아미노산 함량 증진과 연결되어 있음을 암시한다. Figure 7에서 보는 바와 같이 발아에 의해서 TSP의 함량은 감소되었으며 전체 유리 아미노산의 함량은 증진되는 것으로 조사되었다. 다른 연구의 경우, 72시간 발아시킨 볏씨의 경우 혐기적 조건을 가하면 총 단백질의 함량은 감소하는 반면 유리 아미노산의 함량은 증진되는 것으로 조사된 바 있다(21). 또한 호기적인 조건에서도 단백질 합성억제제인 cyclohexamide를 가하면 단백질 함량 감소와 함께 유리아미노산의 함량이 현저히 증진되는 것으로 조사되었다(21). 이들 결과들은 볏씨와 현미가 발아하여 성장하는 초기과정 중에 각종 환경적인 요인을 만나면 저장된 단백질을 분해하거나 새로운 단백질 합성을 지연시켜 아미노산 pool에 영향을 줘서 특정 아미노산의 함량을 증진시킴을 보여주는 것이다. 또한 현미가 발아되면서 단백질 함량이 어느정도 감소하고 유리아미노산 함량이 증진되는 것은 밥맛과 영양소의 소화흡수율을 증진시킬 수 있음을 암시해 주는 것이다(4).

요약

발아현미를 생산하기 위하여 현미를 물에 침지, 키토산을 젖산에 용해하여 침지, 키토산을 글루탐산에 용해하여 침지하였으며, 발아시키지 않은 현미와 아미노산 및 총 단백질 함량을 비교 분석하였다. 키토산을 50 ppm 되게 5 mM glutamic acid에 용해하여 침지액으로 사용한 경우 가장 높은 alanine, serine, lysine, isoleucine, methionine 함량의 증진과 총 유리아미노산 함량의 증진을 보였다. 또한 total soluble protein의 함량은 발아하지 않은 현미에 비하여 발아한 현미가 모두 낮았다. 특히 CG구는 물발아나 CL 발아시 현저히 감소되던 serine의 함량을 오히려 증진시켰다. 모든 발아구에서 aspartic acid 함량은 현저히 감소하였다. 이는 발아 과정에 의해 aspartic acid가 alanine, lysine, isoleucine, methionine 등으로 전환된 것에 기인된 것이라 여겨진다. 이상의 결과를 종합하면 현미발아시 키토산을 글루탐산에 용해하여 침지액으로 사용하면 유용한 아미노산인 alanine, serine 및 필수아미노산인 lysine, isoleucine, methionine 함량을 현저히 증진시킬 수 있어 영양성이 보강된 발아현미를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

감사

이 논문은 과학기술부·한국과학재단 지정·전라북도 지원 지역협력연구센터인 전북대학교 바이오식품 소재 개발 및 산업화 연구센터의 연구비 지원에 의해 연구되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Nakagawa, K. and A. Onoto (1996), Accumulation of γ -aminobutyric acid(GABA) in the rice germ, *Shokuhin and Kaihatsu* **31**, 43-46.
2. Autio, K. (1996), Functional aspects of cereal cell wall polysaccharides, In *Carbohydrate in Food*, A. C. Eliasson, Ed., p227-266, Marcel Dekker, New York.
3. Cho, S. H. (1998), Brown Rice, In *Miraculous Diets*, S. C. Baek Ed., p281-290, Ilyo-Shinmoon Publishing Co.
4. Lee, M. H. and J. C., Shin (1996), New Techniques for the Cultivation of Quality Rice, In *Rediscovering Korea Rice and Development Direction*, L. K., Park and J. C. Shin Eds., Proc. Korean Society of Rice Research Conference 1996, Seoul., pp239-263.
5. Oh, S. H. and W. G. Choi (2000), Production of the quality germinated brown rices containing high γ -aminobutyric acid by chitosan application, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 615-620.
6. Bartnick, M. and J. Szafranska (1987), Change in phytate content and phytase during the germination of some cereals, *J. Cereal Sci.* **5**, 23-28.
7. Laboure, A. M., J. Gangnon, and A. M. Lescure (1993), Purification and characterization of a phytase (*myo*-inositol-hexakisphosphate phospho-hydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedlings during germination, *Biochem. J.* **295**, 413-419.
8. Kim, S. K. (1997), What is Chitin · Chitosan? In *Chitin · Chitosan: Basic and Pharmacology*, H. Y. Lee Ed., p17-20, Ihwa Culture Publishing Co.
9. Lee, S. J., J. Y. Uhm, and Y. H. Lee (1996), Effect of chitosan on the growth of *Botryosphaeria dothidea*, the casual fungus of apple white rot, *Kor. J. Appl. Microbial. Biotechnol.* **24**, 261-267.
10. Hirano, S., T. Yamamoto, M. Hayashi, T. Nishida, and H. Inui (1990), Chitinase activity in seeds coated with chitosan derivatives, *Agri. Biol. Chem.* **54**, 2719-2720.
11. Roby, D., A. Gadelle, and A. Toppan (1987), Chitin oligosaccharides as elicitors of chitinase activity in melon plants, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **143**, 885-892.
12. Lee, H. Y., S. M. Kim, J. Y. Kim, S. K. Youn, J. S. Choi, S. M. Park, and D. H. Ahn (2002), Changes of quality characteristics on the bread added chitosan, *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**, 449-453.
13. Choi, G. J., H. S. Kim, S. J. Sim, Y. D. Kim, K. J. Woo, and Y. S. Cho (1999), Hydrolytic depolymerization of chitosan using organic acids to oligo-chitosaccharides, *J. Chitin. Chitosan.* **4**, 90-95.
14. Hadwiger, L. A. and J. M. Beckman (1980), Chitosan as a component of pea-*Fusarium solani* interactions, *Plant Physiol.* **66**, 205-211.
15. Oh, S. H., S. H. Kim, Y. J. Moon, and W. G. Choi (2002), Changes in the levels of γ -aminobutyric acid and some amino acids by application of a glutamic acid solution for the germination of brown rices, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 49-53.
16. Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
17. Streeter, J. G. and J. F. Thompson (1972), Anaerobic accumulation of γ -aminobutyric acid and alanine in radish leaves (*Raphanus sativus* L.), *Plant Physiol.* **49**, 572-578.
18. Wallace, W., J. Secor, and L. E. Schrader (1984), Rapid accumulation of γ -aminobutyric acid and alanine in soybean leaves in response to an abrupt transfer to lower temperature, darkness, or mechanical manipulation, *Plant Physiol.* **75**, 170-175.
19. Heldt, H. W. (1996), *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, p.264, Oxford Univ. Press Inc., New York.
20. Lehninger, A. L., L. N. David, and M. C. Michael (1993), *Principles of Biochemistry*, 2nd ed., p746, Worth Publishers, New York.
21. Aurisano, N., A. Bertani, and R. Reggiani (1995), Anaerobic accumulation of 4-aminobutyrate in rice seedlings; causes and significance. *Phytochem.* **38**, 1147-1150.