

분리녹두단백질의 화학적 조성에 관한 연구

계인숙, 전영수, 최홍식

부산대학교 식품영양학과

Chemical Properties of Mungbean Protein Isolates

In-Sug Kye, Yeong-Soo Jun and Hong-Sik Cheigh

Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Pusan, 609-735, Korea

Abstract

This study was investigated to determine the amino acid content, fractionation and gel electrophoresis pattern of mungbean protein isolates(MPI), which were prepared from defatted mungbean flour(DMBF) of sunhwa-nogdu(SH) and conventional(C) mungbean varieties. MPI have particularly high content of lysine and low sulfur containing amino acids, even though amino acid pattern of mungbean flour and its protein isolate were found to be similar. And, there was no significant difference in the amino acid composition between SH and C varieties. Further fractionation of MPI by solubility method and electrophoresis procedure was demonstrated that the fractions, such as albumin, globulin, glutelin and residue from MPI showed 6~10 bands in SDS/PAGE pattern. And also the most of each protein fractions had lower molecular weight than 68,000 daltons and distributed more in the molecular weight range 43,000~68,000 daltons.

서 론

녹두(綠豆: mungbean; *Vigna radiata* (L.) Wilzek)로부터 만들어진 분리녹두단백(mungbean protein isolate: MPI)의 식품 기능적 특성에 관해서는 이미 전보¹⁾에서 보고한 바와 같이, MPI는 분리대두단백에 준하는 식품 기능적 특성을 가지며, 독특한 용해성, gel형성 및 foamability 특성을 지니고 있었다. 또한, 녹두단백질을 초원심분리할 때 5S, 11S, 15S획분중 11S획분이 80%를 차지하고 있었으며, 아미노산 분석을 행한 결과 lysine의 함량은 높은 반면, 함황 아미노산의 함량이 낮아 제1 제한 아미노산이 methionine으로 보고되었다²⁾

한편, 종래의 이와 관련된 많은 연구들은⁴⁻¹⁰⁾ 주로 대두에 집중되어 있고 특히, 한국산 녹두 품종들로

부터 얻어진 MPI들의 아미노산 조성, 전기영동 패턴 및 그 화학적 특성에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 전보에 이어 분리녹두단백에 대한 구성 아미노산 분석, 용해도에 의한 분획, 분획된 단백질의 전기영동 패턴등을 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 녹두는 신품종 “善化綠豆”와 청도산 조선녹두(재래종; 품종 미확인)이며 이들을 전보에서 제시된 방법에 따라 녹두가루(mungbean flour: MBF) 및 MPI로 조제하여 사용하였다.¹⁾

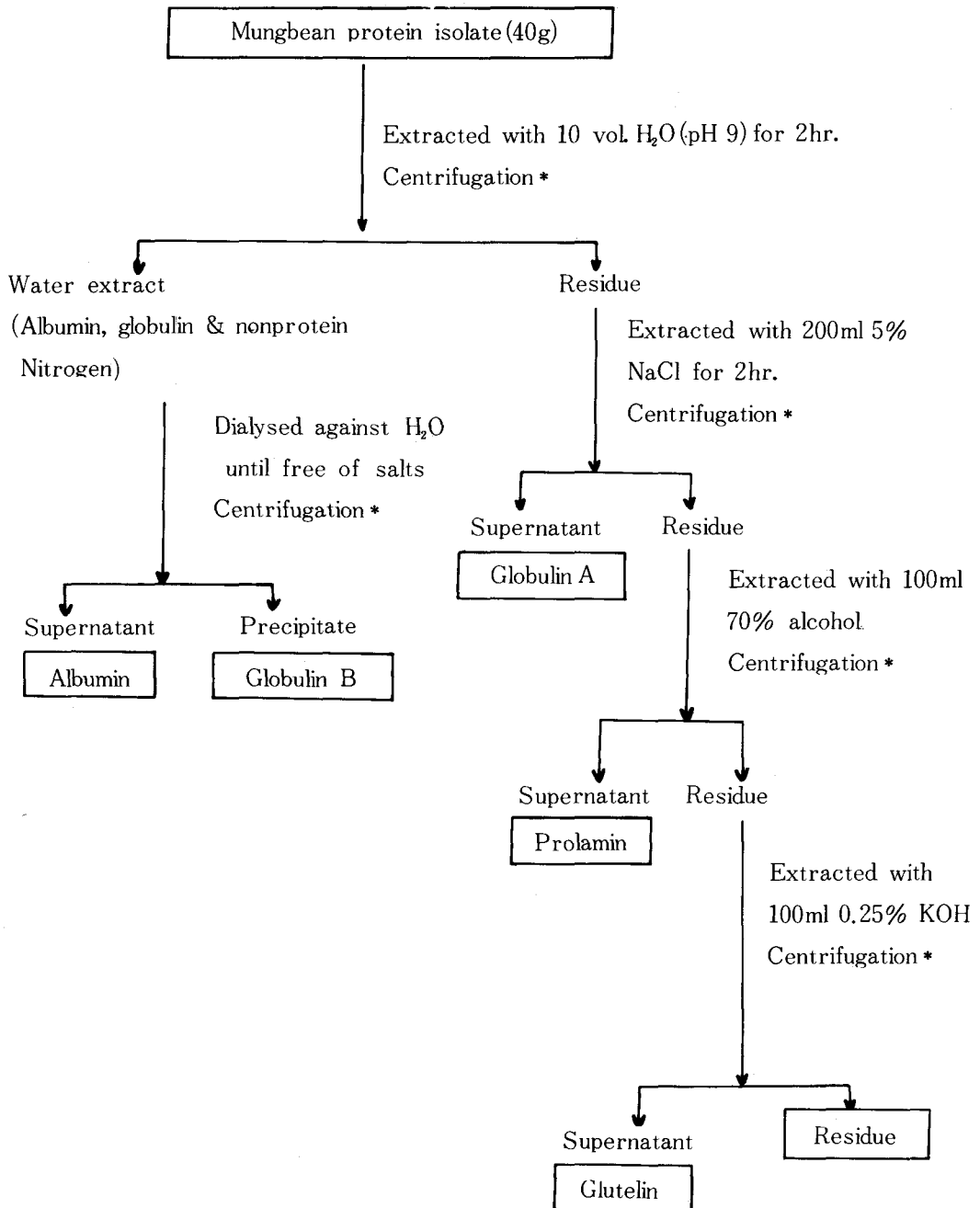


Fig. 1. Procedure for the fractionation of proteins in mungbean protein isolate.

*Centrifugation (2,500 r.p.m., 20min.)

구성 아미노산의 정량

녹두가루와 분리녹두단백의 건조시료 50mg을 산 가수분해하여 Moore 등의 방법에 의하여 실시하되¹¹⁾ 주어진 분석조건으로, 아미노산 자동분석기(L. K. B. Biochrome 4150 amino acid analyzer, L. K. B. Ltd., Cambridge, England)로서 분석하였으며¹²⁾, 아미노산을 동정하기 위해 표준 아미노산(L. K. B. Ltd., Cambridge, England)을 사용하였다.

분획 및 전기영동 패턴

1) 단백질의 분획

이미 만들어진 분리녹두단백을 Fig. 1의 방법에 의하여 albumin, albumin, glutelin, residue 등을 분획하였고, albumin과 globulin은 다시 정제하였다¹⁰⁾.

2) 전기영동 패턴

앞에서 얻어진 분획물을 전기영동 시료로 하여 다음의 과정을 거쳐 행하였다. 먼저 각 시료에 grinding buffer (pH 7.8, 50mM tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.1mM EDTA)를 넣고 충분히 마쇄한 다음 homogenization과 sonication을 행하여 단백질을 충분히 용출시켜 미리 시료를 조제 하였으며, prolamin, glutelin, residue는 이 과정을 생략하였다. 준비된 시료는 원심분리(3,000 r.p.m.에서 30min., 10,000 r.p.m.에서 1hr.)하여 상장액 중 가운데 층에서 필요량을 취한 후, 추출액과 동량의 sample extraction buffer를 넣고 100°C에서 2min.간 증탕시켜 단백질을 변성시킨 후 이를 최종시료로 사용하였으며, sample solution 40 μ l에는 시료 40 μ g과 sodium dodecyl sulfate 1%, sucrose 2.5%, 0.125M sample buffer (tris-HCl, pH 6.8), 5% mercaptoethanol, 0.02% bromophenol blue를 함유하도록 조정하였다.

Sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis(SDS/PAGE)는 대체로 Laemmli¹³⁾의 방법에 준하였고, 전기영동후 0.1% coomassie brilliant blue R 250(증류수 : methanol : acetic acid = 5 : 5 : 2의 비율로 섞어진 혼합용액으로 만들)에서 3~4hr. 동안 shaking하면서 염색시켰다. 염색 후 methanol : acetic acid : 증류수 = 3 : 1 : 6의 비율로 만들어진 용액으로 gel을 하룻밤동안 탈색시킨 후,

7% acetic acid에 저장하여, densitometer(LKB 2202 Ultrascan Laser Densitomer, England)에 걸쳐 633nm에서 peak를 관찰하였다. 또한, 각 획분의 분자량을 측정하기 위해 lysozyme(M.W. ; 14, 333), carbonic anhydrase(M.W. ; 29,000), ovalbumin (M. W. ; 43,000), bovine serum albumin(M. W. ; 69,000) (Sigma Chemical Co., U. S. A)의 marker protein을 사용하였으며, 이들로부터 얻어진 표준 곡선은 Fig. 2와 같았다.

결과 및 고찰

구성 아미노산의 조성

녹두가루(MBF)와 분리녹두단백(MPI)의 구성아미노산조성에 대한 분석 결과는 Table 1과 같이 21~24개의 아미노산이 동정되었다. 그 가운데 glutamic acid의 함량이 가장 높게 나타났으며, cystine, methionine 등의 함량은 낮았으며, 특히 methionine의 함량이 상대적으로 적었다.

Evans 및 Bandemer¹⁴⁾와 Coffman 및 Garcia¹⁵⁾ 그리고 津坂伸幸 등^{2,3)}의 연구결과와는 본 연구결과와 유사한 구성을 가지며, 대부분의 아미노산은 MPI

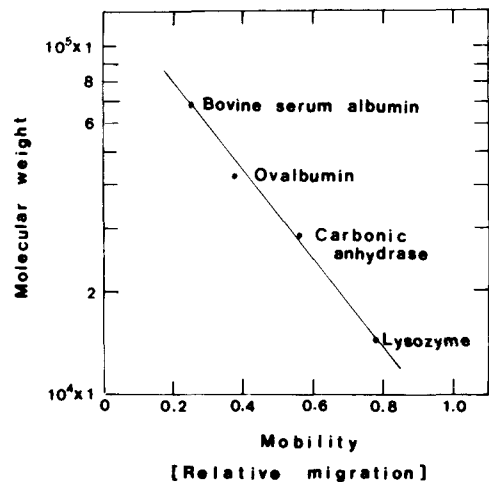


Fig. 2. Relation between the molecular weight of marker proteins and their mobilities.

Table 1. Contents of amino acids in MBF and MPI* (% in total amino acids)

Amino acids	Flour		Isolate	
	MBF-SH	MBF-C	MPI-SH	MPI-C
Aspartic acid	10.06	11.20	9.55	10.95
Threonine	4.17	4.10	3.45	3.49
Serine	6.38	6.70	6.71	7.08
Glutamic acid	17.92	17.95	17.59	19.01
Proline	3.56	0.85	4.16	0.65
Glycine	3.74	5.13	4.07	4.70
Alanine	4.04	4.42	3.71	4.05
Valine	5.15	4.63	4.62	4.34
Cystine + Cysteine	1.10	1.76	2.18	0.99
Methionine	0.85	0.98	1.37	0.95
Isoleucine	4.60	3.91	3.77	3.58
Leucine	9.15	9.10	9.29	9.63
Tyrosine	3.56	3.45	4.05	3.87
Phenylalanine	5.77	6.24	6.01	6.50
Ammonia	0.85	0.85	0.81	0.85
Lysine	8.34	7.74	7.34	7.62
Histidine	2.83	2.79	2.99	2.88
Arginine	7.92	8.40	8.33	8.86

* MBF(Mungbean flour), MPI(Mungbean protein isolate), SH(Sunhwa-nogdu), C(Conventional variety)

경우가 MBF보다는 그 양이 많지만 그 구성은 차이가 거의 없었다. 다만 MBF-SH(선화녹두)에서는 taurine, phosphoethanolamine 등이, MPI-SH에서는 검출되지 않았고, MBF-SH(재래종)에서 미검출된 phosphoethanolamine, γ -amino butyric acid, ethanolamine이 MPI-C에서는 검출되지 않았고, MBF-C에서 미검출된 α -amino butyric acid가 MPI-C에서는 검출되었다.

한편, 분리녹두단백의 아미노산 조성은 분리대두 단백질의 아미노산 조성과 많은 유사성을 볼 수 있으며, 이와같은 두류 단백질에서 부족되고 있는 함황 아미노산을 영양학적으로 보완하기 위해 효소적 변형에 의한 methionine의 도입도 고려하고 있다¹⁶⁾.

분획 및 전기영동 패턴

1) 단백질의 분획

분리녹두단백질을 용해도에 의한 분획정량을 행한 결과 Table 2와 같았다. 거의 87.6~92.9%가 수용성

단백질이었으며, 그 비율은 MPI-C에 비해 MPI-SH에서 높게 나타났다. 이에 반해 prolamin, glutelin, residue 부분은 MPI-C에서 0.25, 1.13, 10.74%로 MPI-SH의 0.21, 0.91, 5.63%에 비해 높게 나타났으며, 전체의 각 분획 중 70% alcohol soluble인 prolamin이 가장 적게 나타났다.

2) 분획단백질의 전기영동 패턴

분획된 단백질을 다시 8~12% gradient acrylamide gel로 분획된 결과 Fig. 3, Fig. 4(전형적인 전기영동 패턴의 한 예)와 같으며, 이들 분획에 있어서의 band No.와 그들의 상대적 이동도에 따른 분자량은 Table 3과 같았다. MPI에 있어서는 MPI-SH에서 9개, MPI-C에서는 10개의 band를 나타내고 있으며, albumin, globulin의 경우는 MPI-SH에서 MPI-C에 비해 2~3개 더 많은 band를, glutelin, residue에 있어서는 MPI-C에서 각각 1개 더 많은 band를 나타내었다.

Table 2. Fractionation and relative composition of the proteins in MPI*

Fractions	Relative composition(%)	
	MPI-SH	MPI-C
Water soluble protein	92.91	87.62
Albumin and globulin	89.59	86.43
Non protein-N	2.32	1.19
70% alcohol solubles(Prolamin)	0.21	0.25
0.25% KOH solubles(Glutelin)	0.91	1.13
Total soluble protein	94.03	89.00
Residue(Insoluble)	5.63	10.74
Total	99.66	99.74

*MPI(Mungbean protein isolate), SH(Sunhwa-nogdu) C(Conventional variety)

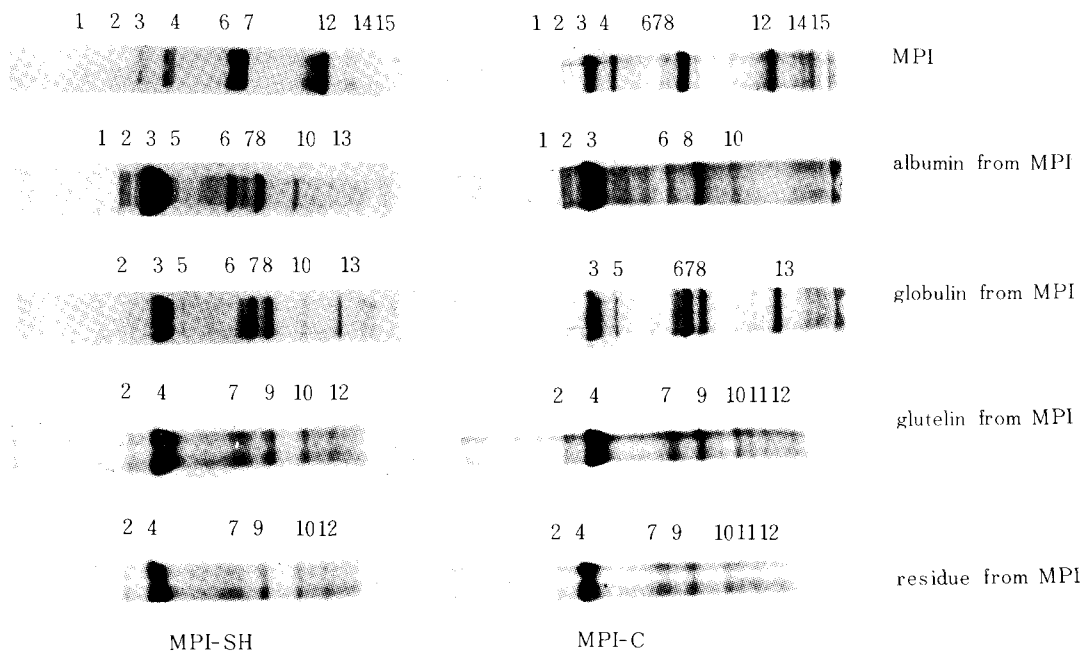


Fig. 3. The SDS/PAGE patterns.

MPI(Mungbean protein isolate), SH(Sunhwa-nogdu), C(Conventional variety)

본 연구결과는 강과 이¹⁰⁾의 연구와 비교하여 albumin의 band 수는 MPI-C에서는 적게 나타났지만, globulin에서는 MPI-SH에서는 8개, MPI-C에서는 6개로 더 많은 band 수를 나타내었다. 대체로 본 연구에 의한 band는 전체적으로 43,000~68,000 dalton 사이에 집중하는 경향을 보여주며, 70% alcohol soluble인 prolamin은 분획결과 MPI-SH에서는 0.21%, MPI-C에서는 0.25% 포함되어 있었다.

요 약

선화녹두(sunhwa-nogdu; SH)와 재래종 녹두(conventional variety; C) 2품종의 분리녹두단백(mungbean protein isolate: MPI)을 제조하여, 이들의 아미노산 조성 그리고 용해도에 의한 단백질의 분획 및 분획된 단백질의 전기영동 패턴을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 즉, MPI의 아미노산

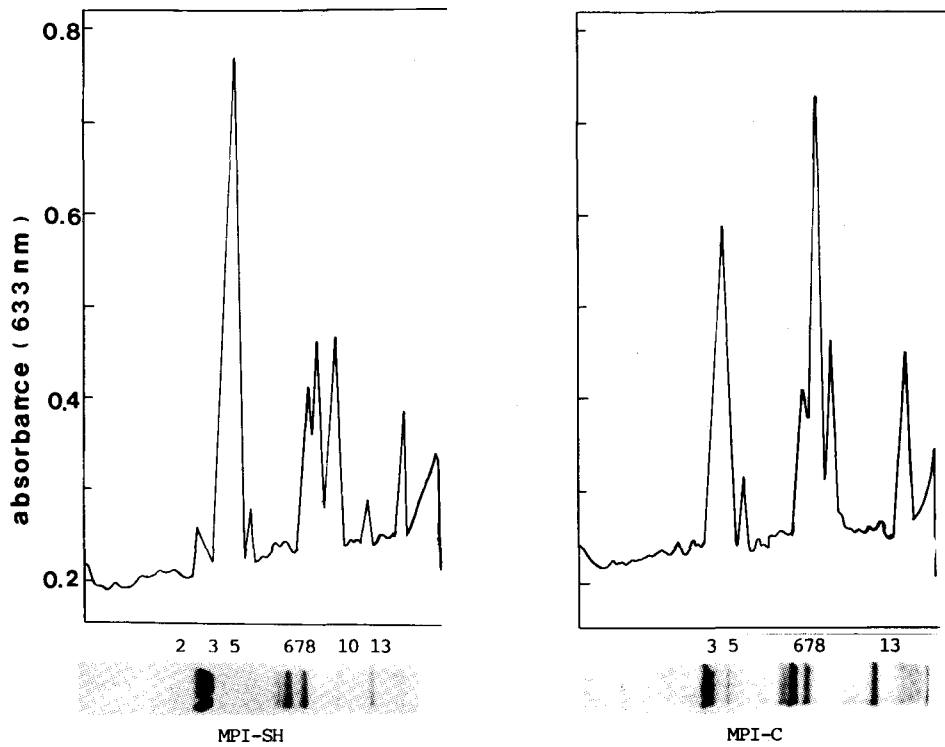


Fig. 4. The typical SDS/PAGE pattern of globulin from MPI.
MPI (Mungdean protein isolate), SH (Sunhwa-nogdu), C (Conventional variety).

Table 3. Molecular weights of protein subunits*

Band No.	Relative mobility	Molecular weight
1	0.253	67,197
2	0.272	65,290
3	0.302	62,279
4	0.319	60,572
5	0.367	55,754
6	0.498	42,605
7	0.525	39,895
8	0.554	37,988
9	0.580	34,375
10	0.650	27,349
11	0.666	25,743
12	0.708	21,527
13	0.724	19,921
14	0.767	15,605
15	0.777	14,601

* See Fig. 3 and Fig. 4.

조성을 보면 MPI-SH, MPI-C 둘 다 glutamic acid, aspartic acid의 함량이 높게 나타났으며, 함황아미노산의 함량은 낮게 나타났다. 한편 MPI의 아미노산 조성은 원시료인 MBF와 거의 유사함을 나타내었고, 두 품종간에도 큰 차이가 없었다. 그리고 MPI를 용해도에 의하여 분별정량 했을 때 87.6~92.9%가 수용성 성분이었으며, prolamin, glutelin, residue는 MPI-C에서 0.25, 1.13, 10.74%로 MPI-SH의 0.25, 0.91, 5.63%에 비해 각각 높게 나타났다. 또한, 전분획의 전기영동 패턴을 살펴본 결과 6~10개의 band를 나타내며 43,000~68,000 dalton 범위의 분자량에 집중하는 경향을 나타내었다.

문헌

1. 계인숙, 전영수, 최홍식 : 분리녹두단백의 식품 기능적 특성에 관한 연구, 한국영양식량학회지, **18**, 300(1989)
2. 津坂伸幸, 河原崎靖, 谷口宕吉 : 緑豆に關する食品化學的研究, (I) 緑豆 タソバワ質の分離, 精製, 明治大學 農學部 研究報告, **62**, 69(1984)
3. 津坂伸幸, 河原崎靖, 谷口宕吉 : 緑豆に關する食品化學的研究, (II) アミノ酸 組成および化學的性質, 明治大學 農學部 研究報告, **67**, 51(1984)
4. Kapoor, A. C. and Gupta, Y. P. : Chemical evaluation and electrophoretic pattern of soy proteins, *J. of Food Sci.*, **42**, 1558(1977)
5. *Kapoor, A. C. and Gupta, Y. P. : Changes in proteins and amino acids in developing soybean seed and effect of phosphorus nutrition, *J. of Sci. Food Agr.*, **28**, 113(1977)
6. Catsimpoalas, N., Campbell, T. G. and Meyer, E. W. : Immunochemical study of changes in revers proteins of germinating soybean seed, *Plant Physiol.*, **43**, 799(1968)
7. Tombs, M. P. : Proteins bodies of the soybean, *Plant Physiol.*, **42**, 797(1967)
8. Puski, G. and Melnychyn, P. : Starch gel electrophoresis of soybean globulins, *Cereal Chem.*, **45**, 192(1968)
9. Neucere, N. J. : Effect of heat on peanut proteins I. Solubility properties and immunochemical-electrophoretic modifications, *J. of Agric. Food Chem.*, **20**, 252(1972)
10. 강명희, 이서래 : 한국산 두류중 단백질의 분별 및 전기영동 패턴, 한국식품과학회지, **10**, 415(1978)
11. Moore, S., Spackman, D. H. and Stain, W. H. : Automatic recording of the amino acid, *Anal. Chem.*, **20**, 30(1958)
12. L. K. B. Biochrome 4150 amino acid analyzer manual, L. K. B. Ltd., Cambridge, England (1984)
13. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T, *Nature*, **227**, 680(1970)
14. Evans, R. J. and Bandemer, S.L. : Nutritive value of legume seed proteins, *J. of Agric. Food Chem.*, **15**, 439(1967)
15. Coffman, C. W. and Garcia, V. V. : The 1st international mungbean symposium, AVRDC, Taiwan, **69**(1978)
16. Yamashita, M., Arai, S., Tsai, S. T. and Fujimaki, M. : Plastein reaction as a method for enhancing amino acid level of soy protein, *J. of Food Chem.*, **19**, 1151(1971)

(Received August 14, 1989)