

Gel filtration에 의한 콩나물 製造中 蛋白質의 變化調查

梁且範 · 朴尚基 · 尹錫權*

漢陽大學校 食品營養學科 · * 同德女子大學

Changes of Protein During Growth of Soybean Sprout

Cha-Bum Yang, Sang-Ki Park and Suk-Kwon Yoon*

Department of Food and Nutrition, Hanyang University, Seoul

* Dongduck Womans University

Abstract

Gel filtration of water soluble protein of soybean and cotyledon of sprout at various growth stages by using Sephadex G-200 showed 5 fractions (A,B,C,D and E). According to gel filtration and disc gel electrophoresis, fraction B,C and D were identified as 11S,7S and 2S, respectively. Fraction A was turbid substance and fraction E showed 1 peak. During growth of sprout 7S decreased firstly, 2S secondly and 11S lastly in cotyledon. Fraction A increased until 6th day and decreased thereafter while E increased throughout the growth. In axis only two fractions (11S+7S and E) were showed, and 11S+7S fraction was little changed and fraction E increased slightly with the growth.

序 論

前報¹⁾에서 콩나물을 온도를 달리하여 길렀을때 子葉과 胚軸의 蛋白質의 變化를 disc gel electrophoresis 로 調査한 결과 시일이 경과함에 따라 子葉에서는 감소하고 胚軸에서는 증가하였다. 子葉에 있는 蛋白質構成成分이 胚軸에서 모두 나타났으나 胚軸의 band分離는 子葉과 같이 鮮明하지 못하였다. 따라서 본 연구에서는 gel filtration에 의하여 콩나물의 성장중 子葉 및 胚軸의 蛋白質의 變化를 調査하고자 하였다.

材料 및 方法

材料 및 試料의 調製

大豆를 25℃에서 發芽시켜 2, 4, 6 및 8일에 채취하여 子葉部와 胚軸部로 나누고 -50℃에서 冷凍乾燥시켰다. 60mesh 粉末을 만들어 ethyl ether로 soxhlet에서 10시간 脫脂하여 試料로 사용하였다.

7S 및 11S의 調製

7S는 李 등²⁾에 따라, 11S는 Wolf et al.³⁾에 준하

여 실시하였으며 2S는 표준품(Merk社)을 사용하였다.

Gel Filtration Fractionation

Hasegawa 등⁴⁾의 方法을 變形하여 다음과 같이 실시하였다. 즉 脫脂試料 1g에 물 5ml를 加하여 1時間 동안 攪拌한 후 10,000×G에서 30分間 冷凍遠心分離하고 그 上澄液을 取하여 標準緩衝液(32.5mM K₂HPO₄, 2.6mM KH₂PO₄, 400mM NaCl, pH7.6 이온強度 0.5, 10mM 2-Mercaptoethanol)으로 平衡시킨 Sephadex G-200 column (3×180cm)의 上部에 넣고 標準緩衝液으로 溶出시켰다. 이때 溶出速度는 시간당 15ml이었으며 5ml씩의 分割으로 받았다. 그 溶出液은 UV spectrophotometer로서 280nm에서 吸光度를 측정하여 各 fraction의 面積을 求하였다. 各 peak를 이룬 分割들을 모아서 0~4℃에서 증류수로 72시간 透析하여 얻은 蛋白質沈澱物을 冷凍乾燥하여 各 peak의 電氣泳動分析用試料로 사용하였다.

電氣泳動

Davis⁵⁾의 方法에 따라서 前報¹⁾와 같이 행하였다.

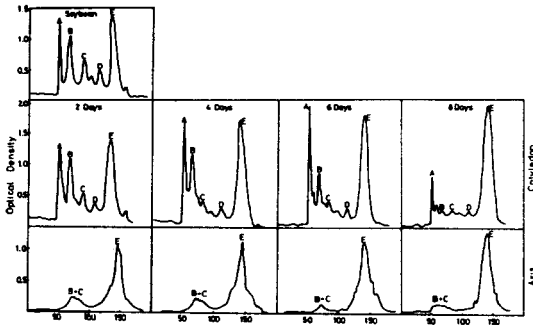


Fig. 1. Fractionation on Sephadex G-200 of protein extracted from soybean, cotyledon and axis at various growing stages
 Protein was extracted with water and eluted with phosphate buffer (pH 7.6)

結果 및 考察

25°C에서 大豆가 發芽함에 따라 일자별로 취한 蛋白質을 물로 抽出하여 Sephadex G-200 column에 의하여 fraction해 보면 그림 1과 같다. 原料大豆와 子葉中에서는 5개의 fraction (A, B, C, D 및 E)로 分離되어 지고 胚軸部에서는 2개의 fraction (B+C 와E) 으로 分離되었다. 이들 各 fraction의 分離程度를 알기 위해 大豆蛋白質에서 순수분리해서 얻은 7S와 11S globulin 및 2S인 trypsin inhibitor (순수시약품, Merck社)를 같은 方法으로 gel filtration하면 그림 2와 같았다. 즉 11S는 그림 1의 fraction B에 해당하며, 7S는 fraction C, 2S는 fraction D에 해당됨을 알 수 있었다. Obara 등^(*)은 大豆에서 초원심분리의 sedimentation analysis에서 fraction B 內에 많은量的의 11S components가 함유된다고 하였으며, fraction C와 D는 各各 7S와 2S의 single peak를 함유한다고 하여 본 실험결

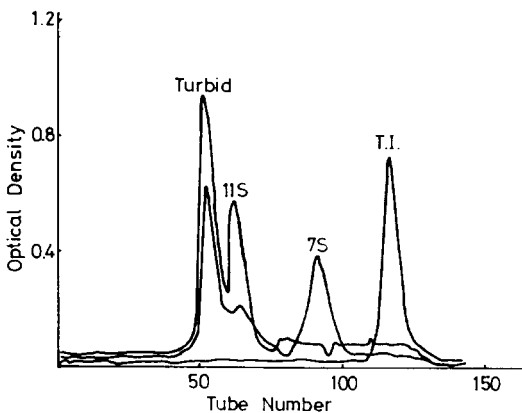


Fig. 2. Gel filtration profile at 280 nm on Sephadex G-200 of 7S, 11S globulin and trypsin inhibitor (T. I.) (2S)

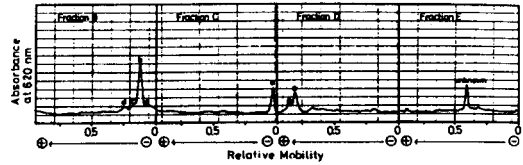


Fig. 3. Densitometric tracings of disc polyacrylamide gel electrophoresis patterns of each fraction protein by gel filtration of soybean sprout

Fraction B is 11S, C 7S, D 2S and E low molecular nitrogen compound

과와 일치하였다.

各 fraction들이 갖는 蛋白質 components를 규명하기 위하여 A, B, C, D 및 E fraction들을 증류수로 4°C에서 72시간이상 透析한후 冷凍乾燥한 것을 polyacrylamide disc gel electrophoresis 한 結果는 그림 3과 같다.

Fraction A는 electrophoresis上에서 band가 존재하지 않았으며 turbidity를 보여 Haegawa 등^(*)과 Obara 등^(*)에 의하여 얻어진 첫 peak에 해당되었다. Fraction B의 電氣泳動樣相은 前報^(*)의 11S의 그것과 일치하여 b band가 뚜렷하였고, c 및 d band는 minor peak를 이루었으나 아주 少量의 7S에 해당하는 작은 peak(그림 3의 a band)를 함유하고 있었다. Fraction C는 前報^(*)의 7S(a band)의 그것과 일치하였으며 fraction D는 2S의 그것에서 보인 p band 외에 o band를 더 보았다. Obara 등^(*)은 水抽出大豆 蛋白質內에서 모든 trypsin inhibitor activity는 fraction D에서 발견된다고 보고하여 p band 외에 o band도 trypsin inhibitor일 것으로 보이며 본 실험에서의 標品 2S는 o band가 없는 단일 p band만의 trypsin inhibitor로 보인다. 2S가 1개의 sulfinit로 보고되었으나^(*) 본 실험과는 전기영동 조건이 달랐다. 본 실험조건과 동일한 조건에서 gel filtration분획의 전기영동 보문이 없으므로 o band에 관하여 2S의 여부를 단정하기는 어렵다. Fraction E의 전기영동상은 Rm值가 7S(fraction C)와 2S(fraction D)사이에 1peak로 크게 나타났다. Gel filtration은 分子量의 크기에 따라 fraction되므로 fraction E는 分子量이 2S보다 작은 低級의 蛋白質로서 發芽中 蛋白質 電氣泳動上의 變化^(*)에서 e~n사이의 蛋白質에 해당되며 여러 peak로 나타나지 않는 것은 gel filtration과정에서 소실된 것으로 보인다. Ofara 등^(*)은 fraction E가 phenol Lowry法으로 검정하여 단백질이 아니라고 하였으나 본 실험에서는 확인하지 못하였다. Obara 등^(*)의 결과에 의하면 본 실험의 전기영동상의 peak를 非蛋白質系物質로서 同定할 필요가 있을 것이다. 그림 1에서 fraction E가 다른 fraction에 비해

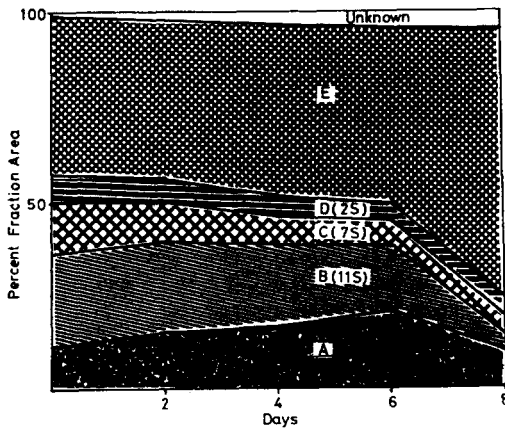


Fig. 4. Changes in percent fraction area gel filtration from soybean and cotyledon of sprouts during growth
Fraction A is turbid substance, B 11S, C 7S, D 2S and E low molecular nitrogen compound

상당히 컸음에도 그림 3의 전기영동에서 적게 나타난 것은 전기영동전 투석에 의해서 많은 부분이 빠져나간 것으로 보아서 대부분이 저級の peptide, 아미노산 및 遊離核酸 등이 함유된다고 볼 수 있다. Obara 등¹³⁾은 fraction A와 E는 많은 量의 ribose를 含有하고 反面에 fraction B는 적은 量의 ribose를 함유하며 fraction E는 free nucleic acid를 함유한다고 報告한바 있다.

大豆發芽에 따른 이들 fraction의 變化를 보면(그림 1과 4) 子葉의 경우 2일에 7S와 2S가 먼저 줄어들고 E fraction은 약간 증가되며 4일째 가서는 7S와 더불어 11S가 감소하고 E fraction은 더욱 增加되며 6일째 가서는 11S가 크게 줄어들고 8일째 가서는 11S, 7S 및 2S는 含量이 거의 비슷할 정도로 적은 量으로 나타났고 결국 E fraction으로 轉換되었음을 보이었다.

이상에서 보면 子葉에서는 7S가 먼저 그 以後에 11S가 分解됨을 볼 수 있었는데 이는 disc electrophoresis했을 때의 peak의 變化樣相¹⁴⁾과 一致하였으며 또한 7S가 먼저 감소한다는 Catsimpoalas *et al.*¹⁵⁾의 免疾化學的 分析結果와도 一致하였다. 그러나 胚軸에서는 fraction A와 2S를 볼 수 없는것이 子葉과 다른 특징이었으며 11S와 7S의 分離가 뚜렷히 나타나지 않았다. 이는 7S component와 11S component 사이의 可迷의 鮮離性的 component-system¹⁶⁾으로 發芽過程中 蛋白質이 合成되는 過程을 뜻하기도 한다. 發芽에 따른 胚軸部中 變化는 11S+7S는 약간씩 감소되는듯 하나 큰 傾向이 없었고, E fraction은 계속 증가되는 樣相을 보이었다. 이는 disc electrophoresis

하였을 時¹⁷⁾ 7S인 a band와 11S인 b+c+d band가 增加되는 傾向과는 달라 앞으로 더 검토되어 저야 할 것으로 생각된다.

要 約

大豆와 大豆의 發芽過程別 水抽出蛋白質을 Sephadex G-200에 의해서 gel filtration으로 分割한 결과 子葉部에서는 5개의 분획(A, B, C, D 및 E)이 얻어졌고 標品の gel filtration과 disc gel electrophoresis로서 그中 A분획이 혼탁물질, B가 11S, C가 7S, D가 2S로 同定되었으며 E는 전기영동상에 1 peak를 보였다. 發芽에 따른 이들 分割의 變化는 子葉部에서는 7S가 먼저 감소되고 2S가 그 다음이며 11S가 맨나중에 감소되었다. A分割은 6일까지 증가되다가 감소를 보이고 E分割은 계속 증가추세를 보이었다. 胚軸에서는 단지 2개의 分割이 나타났고 그 하나는 B+C(11S+7S)의 혼합물이었고 다른 하나는 E分割이었다. 發芽에 따라서 11S+7S 分割은 큰 變化가 없었고 E 分割은 약간의 증가를 보였다.

문 헌

1. 梁且範, 朴尚基, 尹錫權, 朴薰: 韓國農化學會誌, 27, 129 (1984)
2. 李春寧, 金仁洙, 曹道鉉: 韓國生化學會誌, 9, 129 (1976)
3. Wolf, W. J., Barcock, G. E, and Smith, A. K.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 99, 265 (1962)
4. Hasegawa, K., Kusano, T. and Mitsuda, H.: *Agr. Biol. Chem.*, 27, 878 (1963)
5. Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404 (1964)
6. Obara, T. and Kimura, M.: *J. Food Sci.*, 32, 531 (1967)
7. 李春寧, 金仁洙, 金秀彦: 서울大農學研究, 2(1), 237 (1977)
8. Catsimpoalas, N. Campbell, T. G. and Meyer, E. W.: *Plant Physiol.*, 43, 799 (1968)
9. Catsimpoalas, N., Ekenstam, C., Rogers, D. A. and Meyer, E. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, 168, 122 (1968)
10. 近藤金助, 森茂樹, 加島岸一: 京都大學食糧研究所報告, 15, 49 (1954)

(1984년 11월 1일 접수)