

메밀 단백질의 전기영동유형 및 아미노산 조성에 관한 연구

이 미 숙·손 경 희

연세대학교 생활과학대학 식품영양학과

Studies on Electrophoretic Pattern and Amino Acids of Buckwheat Protein

Mi Sook Lee and Kyung Hee Sohn

Dept. of Food and Nutrition, Yonsei University

Abstract

1. Amino acid compositions were determined by amino acid analyzer. Through the analysis of these samples, it was found that glutamic acid was the most abundant; glycine, aspartic acid, lysine and threonine were rich; and tryptophan and methionine were the limiting amino acid.

2. Albumins, globulins, gliadins and glutelins were extracted from the Kangwon hull, Kangwon rice buckwheat, and wheat. The relative proportions of protein fractions were 52.45 : 10.14 : 16.61 : 20.80% in Kangwon hull buckwheat, 21.10 : 13.80 : 28.40 : 36.70% in Kangwon rice buckwheat and 6.87 : 1.65 : 42.85 : 48.6% in wheat, in the order of albumins, globulins, gliadins and glutelins.

3. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were performed to identify the subfractions of each protein fraction. The electrophoregrams of PAGE showed that the same fractions of both Kangwon hull buckwheat protein and Kangwon rice buckwheat protein had very similar electrophoretic patterns to each other respectively, but there were significant differences in the patterns between buckwheat proteins and wheat proteins.

I. 서 론

메밀은 가루를 내어 국수를 만들며 묵, 과자, 만두등을 만든다. 뿐만 아니라 쌀과 섞어서 밥을 짓기도 하며 가축의 사료로서 청예배도 하고 어린시기에는 나물로 서도 식용된다¹⁾. 일반적으로 식이 단백질의 영양적인

가치는 구성되는 아미노산의 생물학적 유용성에 의존하는데 메밀의 아미노산 조성은 다른 곡류에 비해 우수해서 필수아미노산 패턴을 비교한 결과 메밀의 단백질은 곡류의 제한 아미노산인 lysine의 함량이 높아 메밀을 곡류에 다량 포함시키면 필수아미노산을 증가시킨다고 한 바 있고²⁾ 메밀과 밀의 단백질에 대한 일련의 비교연구가 외국에서 보고된 바 있다³⁻⁶⁾. 오래전부터 면류, 묵

등으로 이용되어온 메밀에 관한 국외의 연구는 다각적으로 이루어진데 반해 우리나라에서는 rutin 함량분석, 복합분으로서의 역할, 전분의 특성 및 목에 대한 연구가 행해져왔을 뿐이다. 따라서 본 연구에서는 풍부한 단백질의 급원으로서 한국에서 재배되는 메밀의 품종별 아미노산 조성과 각 단백질획분의 분자적인 특성을 밀 단백질과 비교해보았다.

다.

2. 아미노산의 정량

탈지 분말시료 100 mg에 6 N 염산 20 ml를 가하여 105°C에서 24 시간 가수분해 후 감압건조하여 0.2 N 구연산 완충액 (pH2.2) 10 ml에 용해하여 아미노산 분석기 (Waters 712 wisp, Waters 510 HPLC pump, Waters 745B Data module)로 정량하였다.

3. 단백질의 분리

메밀과 비교시료인 밀의 단백질 분리는 Osborne의 방법⁷⁾을 수정하여 Fig. 1과 같이 수용성 단백질 albumin 과 염용성 단백질 globulin 및 에탄올 추출물에서 gliadin과 glutelin을 분리하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1990년 산으로 강원산 결메밀과 강원산 쌀메밀 및 경북산 쌀메밀의 이물질을 제거후 외피를 타게 분쇄기로 마쇄하여 80 mesh 체로 쳐서 냉동고에 보존하여 사용했

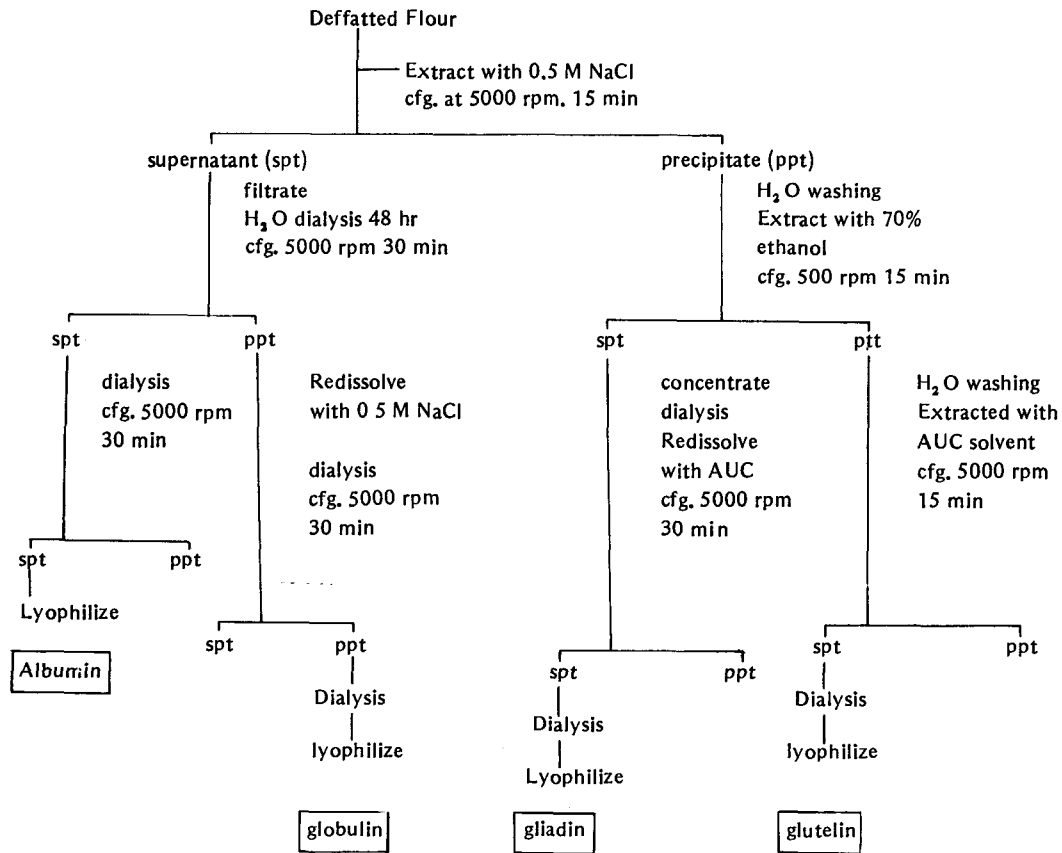


Fig. 1. Schematic Representation of Protein Fractionation of Buckwheats and Wheat Flour.

4. 단백질 분획의 전기영동

1) Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

메틸과 밀단백질의 polyacrylamide gel electrophoresis는 염기성 완충용액에서 Ornstein⁸⁾과 Davis⁹⁾의 방법에 따라 pH 8.3에서 전기영동을 실시하였고, 산성 완충용액에서는 Reisfeld¹⁰⁾의 방법에 따라 pH 4.5에서 실시하였으며 gel 및 완충용액 준비방법은 Table 1, 2와 같다. 즉 pyrex tube (10 cm, 내경 5 mm)에 8 cm의 resolving gel과 0.7 cm의 stacking gel을 채워 전기영동조에 고정하고 희석한 stacking gel buffer 용액에 시료를 녹여 염기성에서는 bromophenol blue 용액을 tracking dye로 glycerol을 가해 주입하고 산성에서는 methylene blue 용액과 sucrose를 가해 시료 한개당 3mA의 전류를 통하여 전기영동시켰다. 영동이 끝난 gel은 coomassie brilliant blue 용액에서 하룻밤동안 염색시킨 후 10% Acetic acid 용액으로 수일간 탈색시킨 다음 보존하였다.

2) Sodium dodesyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoreses (SDS-PAGE)

Laemmli의 방법¹¹⁾에 따라 SDS-PAGE를 실시하였으며 gel 준비방법은 Table 3과 같다. 즉 각 시료 단백질 용액은 10% 2-mercaptoethanol, 4% SDS와 0.125 M Tris-HCl buffer (pH 6.8)농도의 용매 1 ml에 녹인 후 끓는 수조에서 5분간 가열한 뒤 tracking dye는 bromophenol blue를 이용해서 주입하고 Tris-glycine

Table 1. Buffers for Non-Dissociating Discontinuous System

High pH discontinuous	
Stackes at pH 8.3, seperates at pH 9.5	
Stacking gel buffer	0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) ^a
Resolving gel buffer	1 M Tris-HCl (pH 9.1) ^b
Reservoir buffer	Tris-glycine (pH 8.3) ^c
Low pH discontinuous	
Stackes at pH 5.0, seperates at pH 3.8	
Stacking gel buffer	acetic acid-KOH (pH 6.8) ^d
Resolving gel buffer	acetic acid-KOH (pH 4.3) ^e
Reservoir buffer	acetic acid-alanine (pH 4.5) ^f

* a. 0.5 M Tris HCl (pH 6.8) : 3.03 g Tris-dissolve in D.D.W., bring pH down to 6.8 with conc HCl, add D.D.W. to 50 ml.

* b. 1 M Tris HCl (pH 9.1) : 24.22 g tris-dissolve in D.D.W., bring pH down to 9.1 with conc. HCl, add D.D.W. to 200 ml.

* c. Tris-glycine (pH 8.3) : 12 g Trisma base + 57.6 g Glycine bring to 4 liters with D.D.W.

* d. Acetic acid-KOH (pH 6.8) : 4.8 ml 1 M KOH + 0.29 ml acetic acid to 10 ml with D.D.W.

* e. Acetic acid-KOH (pH 4.3) : 4.8 ml 1 M KOH + 1.72 ml acetic acid to 10 ml D.D.W.

* f. Acetic acid-alanine (pH 4.5) : 31.2 g alanine + 8.0 ml acetic acid to 1 liter with D.D.W.

Table 2. Recipe for Polyacrylamide Gel Preparation Using Non-Dissociating Discontinuous Buffer Systems (unit : ml)

Stock solutions	Stacking gel		Resolving gel (7.5%)	
	Acidic	Basic	Acidic	Basic
Acrylamide/bis (33.05/0.3) ^a	—	—	9.0	9.0
Acrylamide/bis (30/0.44) ^b	1.3	1.3	—	—
Stacking gel buffer stock ^c	2.5	2.5	—	—
Resolving gel buffer stock ^d	—	—	15.2	15.2
D.D.W.	5.6	6.2	14.2	14.6
3% Ammonium persulfate ^e	0.4	0.1	1.5	1.0
TEMED	0.06	0.01	0.2	0.02

a. acrylamide/bis (33.05/0.3%) : 83.75g Acrylamide + 0.75g bis-bring to 250 ml with D.D.W.

b. Acrylamide/bis (30/0.44%) : 7.5g Acrylamide + 0.11g bis-bring to 25 ml with D.D.W.

c, d. see Table 1.

e. 매일 fresh하게 조제함

Table 3. Rescipe for Gel Preparation Using the SDS-Discontinuous Buffer System (unit : ml)

Stock solutions	Stacking gel	Resolving gel
Acrylamide/bis (33.5/0.3) ^a	—	12
Acrylamide/bis (30/0.44) ^a	1.3	—
1 M Tris-HCl pH 9.1 ^b	—	15.2
0.5 M Tris-HCl pH 6.8 ^b	2.5	—
D.D.W.	6.1	11.2
10% SDS	0.1	0.4
3% Ammonium persulfate ^c	0.1	1.0
TEMED	0.01	0.02

a. see Table 2.

b. see Table 1.

c. 매일 fresh하게 조제함

* reservoir buffer stock : 48 g Trisma base + 230.4 g glycine + 16 g SDS - bring to 4 liters with D.D.W.

buffer (pH 8.3)을 reservoir buffer로 전기영동시켰다. 또한 상기와 같은 방법으로 고정 염색하여 탈색 보존하였고 이때 분자량 특정용 표준물질은 Ribonuclease A (MW 13,700), Carbonic anhydrase (MW 29,000), Ovalbumin (MW 43,000), Bovine serum albumin

(MW 67,000)을 이용했다.

III. 결과 및 고찰

1. 아미노산

단백질 영양적인 질의 평가는 그 아미노산 조성을 통해 알아볼 수 있는바 3종류 시료의 아미노산 조성은 Table 4와 같다. 시료 모두 glutamic acid의 함량이 가장 많았고 glycine, aspartic acid, lysine, threonine의 순으로 특정산지나 품종에는 무관하게 일관성 있는 아미노산 조성을 보였으며 경북 쌀메밀의 아미노산 함유율이 가장 높았고 그 다음은 강원 곁메밀, 강원 쌀메밀의 순으로 나타났다. 메밀의 아미노산 조성에 관한 연구에서 Pomeranz와 Robbins등²⁾은 곡류보다 lysine 함량이 6.1%로 높고 glutamic acid와 proline은 낮으며 arginine, aspartic acid의 함량은 더 높다고 했다.

Pomeranz 등은³⁾은 메밀이 성숙되는 동안 아미노산 조성을 비교했는데 메밀은 곡류의 저장단백질의 중요성분인 glutamic acid가 적고 곡류의 제한 아미노산인 lysine의 함량이 높아 곡류단백질에 대한 보강효과가 특출하다고 했으며 재배한 메밀은 야생종보다 lysine 함량

Table 4. Amino Acid Composition of Buckwheat

Unit : % (mg/100g)

Sample Amino acid	A	B	C
Aspartic acid	0.011 (1100)	0.009 (900)	0.008 (800)
Glutamic acid	0.020 (2000)	0.017 (1700)	0.014 (1400)
Serine	0.004 (400)	0.003 (300)	0.003 (300)
Histidine	0.004 (400)	0.003 (300)	0.003 (300)
Glycine	0.011 (1100)	0.009 (900)	0.008 (800)
Threonine	0.007 (700)	0.006 (600)	0.005 (500)
Arginine	0.004 (400)	0.003 (300)	0.003 (300)
Alanine	0.005 (500)	0.004 (400)	0.004 (400)
Tyrosine	0.003 (300)	0.002 (200)	0.002 (200)
Methionine	0.001 (100)	0.001 (100)	--
Valine	0.004 (400)	0.004 (400)	0.003 (300)
Tryptophan	—	—	—
Phenylalanine	0.005 (500)	0.004 (400)	0.003 (300)
Isoleucine	0.003 (300)	0.003 (300)	0.002 (200)
Leucine	0.006 (600)	0.005 (500)	0.005 (500)
Lysine	0.007 (700)	0.007 (700)	0.006 (600)

A : Kyungbuk rice buckwheat,

B : Kangwon hull buckwheat,

C : Kangwon rice buckwheat

이 더 높다고 했다. 그러나 본 실험에서는 glutamic acid와 lysine 함량이 다른 아미노산에 비해 모두 높은 것으로 나타났다.

2. 단백질 분리

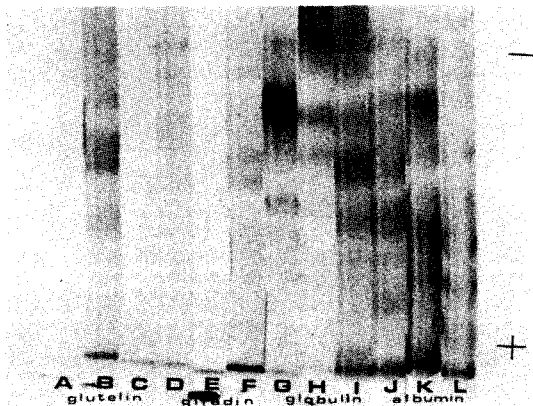
강원 겉메밀, 강원 쌀메밀 및 비교시료로 밀의 단백질을 분리한 비율은 Table 5와 같다. 단백질의 추출율은

Table 5. Protein Solubility Fractions of Buckwheats and Wheat Flour (unit : %)

Sample Fraction	B	C	D
Albumin	52.45	21.10	6.87
Globulin	10.14	13.80	1.65
Gliadin	16.61	28.40	42.85
Glutelin	20.80	36.70	48.64

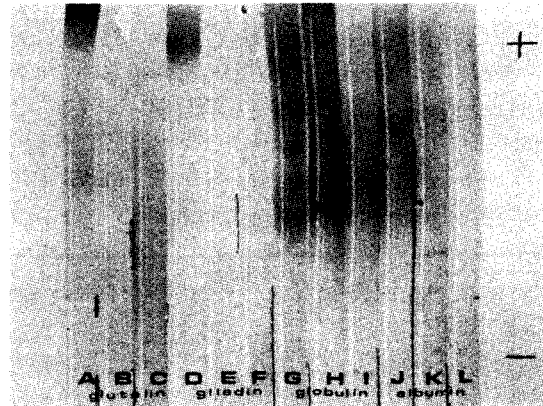
B : Kangwon hull buckwheat
 C : Kangwon rice buckwheat
 D : Wheat flour

강원 겉메밀이 16.22%, 강원 쌀메밀이 22.71%, 밀의 경우 27%로 비교적 높은 추출율을 보였다. Bietz등¹²⁾은 단백질의 추출은 용매들이 사용된 순서, 추출방법의 강도 및 추출시료의 처음상태에 따라 달라진다고 한 바 있다. 강원 겉메밀의 albumin, globulin, gliadin 및 glutelin의 비율은 각각 52.45 : 10.14 : 16.61 : 20.80%였으며 강원 쌀메밀은 21.10 : 13.80 : 28.40 : 36.70%로 나타났고, 밀의 경우는 6.87 : 1.65 : 42.85 : 48.64%로 나타나 세시료 간의 격차가 크게 나타났다. 메밀은 품종에 따라 겉메밀은 albumin의 함량이 가장 높았고 쌀메밀은 glutelin의 함유율이 높아 비율에 있어서는 상당한 차이가 있었지만 전체적인 경향은 밀단백질과 유사하게 나타났으며 각획분의 추출온도 추출시간, 그의 시료의 탈지방방법등이 변수로 작용하였을 것으로 사료되었다. 한편 Skerritt⁵⁾, Hiller¹³⁾ Pomeranz¹⁴⁾등 메밀의 중요 단백질을 globulin이라 한 바 있다. 곡류의 단백질 조성에 관한 보고에서 울무쌀의 경우는 albumin:globulin:gliadin:glutelin이 17.4 :



- A: Wheat glutelin
- B: Kangwon rice buckwheat glutelin
- C: Kangwon hull buckwheat glutelin
- D: Wheat gliadin
- E: kangwon rice buckwheat gliadin
- F: Kangwon hull buckwheat gliadin
- G: Wheat globulin
- H: Kangwon rice buckwheat globulin
- I: Kangwon hull buckwheat globulin
- J: Wheat albumin
- K: Kangwon rice buckwheat albumin
- L: Kangwon hull buckwheat albumin

Fig. 2. Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Buckwheats and Wheat Proteins at High pH System.



- A: Wheat glutelin
- B: Kangwon rice buckwheat glutelin
- C: Kangwon hull buckwheat glutelin
- D: Wheat gliadin
- E: kangwon rice buckwheat gliadin
- F: Kangwon hull buckwheat gliadin
- G: Wheat globulin
- H: Kangwon rice buckwheat globulin
- I: Kangwon hull buckwheat globulin
- J: Wheat albumin
- K: Kangwon rice buckwheat albumin
- L: Kangwon hull buckwheat albumin

Fig. 3. Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Buckwheats and Wheat Proteins at Low pH System.

19.6 : 55.2 : 7.7%였으며 현미엮주는 12.6 : 62.2 : 4.2 : 21.0%였고 이때 비교 시료로 사용한 쌀은 각각 14.2 : 57.4 : 0.71 : 27.8%였다¹⁵⁾. 또한 이등은¹⁶⁾ 현미와 백미 모두에서 glutelin이 가장 많았고 그 다음은 globulin이며 albumin과 prolamin은 함량이 가장 낮았다.

3. 단백질 분획의 전기영동

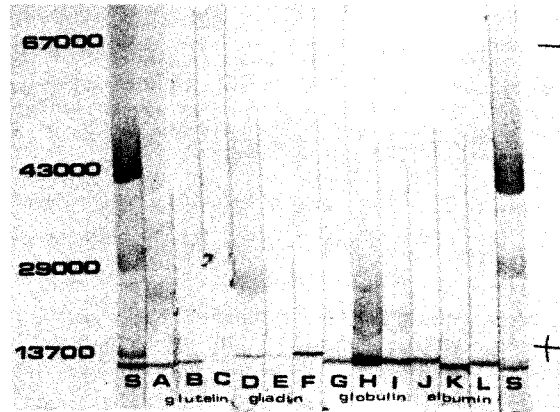
1) Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

엮기성 완충용액과 산성완충용액에서 전기영동을 실시했을때 강원 갈메밀과 쌀메밀 및 비교시료로 밀에서 분리된 단백질들의 전기영동상 Fig. 2, 3과 같다. 세시료 모두 산성 pH 조건에서 보다 엮기성 pH 조건에서 더 많은 단백질이 분리되었는데 albumin, globulin은 엮기성 pH에서 몇가지 단백질이 분리되었고 우¹⁵⁾에 의하면 gliadin의 경우 stacking gel로 내려오면서 소수성으로 인해 단백질들끼리 응집되므로 urea나 non-ionic detergent를 포함한 용매를 사용해야 할 것이라고 한 바 있는데 강원 쌀메밀의 경우 엮기성 pH에서 조차도 분리가 일어나지 않았다. 울무의 glutelin은 산성 pH 조건에서만 분리가 일어났다고 보고했으며¹⁵⁾ 메밀의 glutelin은 엮기성에서, 밀의 glutelin은 산성 pH에서만 분리가 일어났다.

2) Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

세시료 단백질 분획을 SDS-PAGE로 분석한 결과는 Fig. 4와 같다. Albumin의 경우 강원 쌀메밀은 subunit의 분자량이 43,000 부근에서 단일띠가 분리되었으며 globulin은 albumin보다 분리가 명확하게 일어났는데 강원 갈메밀과 쌀메밀이 아주 유사하게 분자량 13,700~29,000 사이에 subunit가 6~7개의 band로 분리되었고 밀의 gliadin의 경우 분자량 20,000~50,000 사이에 4~5개의 band가 분리되었고 glutelin 역시 메밀보다는 밀에서 분리가 더 잘 일어나서 13,000~67,000 사이에 10~11개의 subunit이 분리되었다.

강원 갈메밀과 쌀메밀의 단백질은 전기영동적 단백질 조성이 매우 유사해서 비교적 낮은 분자량 범위에 나타났으며 밀의 경우는 분획 단백질의 거의 50%를 차지하는 glutelin의 패턴을 볼 때 비교적 넓은 분자량 범위에 분포되어 Skerritt⁵⁾의 보고와 일치했다.



S: Protein size marker → ribonuclease A (13700), carbonic anhydrase (29000), ovalbumin (43000), bovine serum albumin (67000)

A: Wheat glutelin
B: Kangwon rice buckwheat glutelin
C: Kangwon hull buckwheat glutelin
D: Wheat gliadin
E: kangwon rice buckwheat gliadin
F: Kangwon hull buckwheat gliadin
G: Wheat globulin
H: Kangwon rice buckwheat globulin
I: Kangwon hull buckwheat globulin
J: Wheat albumin
K: Kangwon rice buckwheat albumin
L: Kangwon hull buckwheat albumin

Fig. 4. SDS-PAGE of Korean Buckweats and Wheat Proteins.

IV. 결론 및 제언

메밀의 아미노산 조성은 품종이나 산지에 관계없이 glutamic acid가 가장 많았고 glycine과 aspartic acid, lysine, threonine의 순으로 많았다. 경북 쌀메밀의 아미노산 함유율이 가장 높았고 그 다음은 강원 갈메밀, 강원 쌀메밀순이었다. 분획 단백질의 분포는 강원 갈메밀의 경우 albumin, globulin, gliadin 및 glutelin의 비율이 52.45 : 10.14 : 16.61 : 20.80%였고 강원 쌀메밀은 21.10 : 13.80 : 28.40 : 36.70였으며 밀의 경우는 6.87 : 1.65 : 42.85 : 48.64%로 세시료간의 격차가 크게 나타났다.

단백질 분획들을 분석한 결과에서 강원 갈메밀과 강원 쌀메밀에서 분리된 단백질은 대체로 비슷한 경향을 나타

내면서 분리되었고 산성 pH 조건에서보다 염기성 pH 조건에서 전기영동적 분리가 더 잘 일어났다. 단백질 분획을 SDS-PAGE를 실시한 결과 강원 결메밀과 쌀메밀의 단백질은 전기영동적 단백질 조성이 매우 유사해서 비교적 낮은 분자량 범위에 나타났으며 밀의 경우는 분획단백질의 거의 50%를 차지하는 glutelin의 패턴을 볼 때 비교적 메밀보다 넓은 분자량 범위에 분포되어 메밀과 밀의 단백질은 분자적 유사성이 없었다.

이상의 결과에서 한국산 메밀의 풍부한 단백질은 다른 곡류와 혼합되어 쓰일때 lysine을 제공하는 효과가 있을 것으로 사료되며 밀단백질과의 분자적인 상이점으로 인해 앞으로 메밀의 식품으로서의 이용도를 좌우하는 단백질의 기능성에 대한 연구와 식품학적 기능성 보완제에 관한 연구가 더 필요하다고 본다.

참 고 문 헌

- 1) 李段雄, 최신보통작물, 서정출판사, p 230, 1972.
- 2) Pomeranz, Y. and Robbins, G.S., Amino acid composition of buckwheat, *J. Agric. Food Chem.*, **20**:270-274, 1972.
- 3) Robbins, G.S., Pomeranz, Y. and Briggie, L.W., Amino acid composition of oat groats, *J. Agric. Food Chem.*, **19**:536, 1971.
- 4) Taketomi SoDA, et al, Properties of buckwheat proteins from the standpoint of food processing, *Nippon Shokhin Kogyo Gakkaishi*, **28**(6):297-302, 1981.
- 5) Skerritt, J.H., Molecular composition of alcohol-soluble wheat and buckwheat proteins, *Cereal Chem.*, **63**(4):365-369, 1985.
- 6) Pomeranz, Y., Proteins and amino acids of barley, oats and buckwheat, p13-78. In *Protein Nutritional Quality of Food and Feeds, Part2*. Ed. by Mendel Friedmann, Marcel Dek Inc.:New York, NY, 1975.
- 7) Osborn, T.B., *The vegetable proteins*, 2nd ed., Longman, Green and Co., London, 1924.
- 8) Ornstein, L., Disc electrophoresis, 1. Background and theory, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**:321, 1964.
- 9) Davis, B.J., Disc electrophoresis, 2. Method and application to human serum proteins, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**:404, 1964.
- 10) Reisfeld, R.A., Lewis, V.J. and Williams, D.E., Disc electrophoresis of Basic proteins and peptides on polyacrylamide gels, *Nature (London)*, **195**-282, 1962.
- 11) Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T, *Nature (London)*, **227**-680, 1970.
- 12) Bietz, J.A. and Wall, J.S., The effect of various extractants on the subunit composition and associations of wheat glutelin, *Cereal Chem.*, **52**:1465, 1975.
- 13) Hiller, A., Mldecki, H. and Tomczyk, M., Preliminary characterization of proteins of buckwheat grain by extraction with selected solvents and molecular filtration on sephadex G-75 Gel, *Bromatol. Chem. Toksykol.*, **8**:205, 1975.
- 14) Pomeranz, Y., Buckwheat: structure, composition and utilization, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **19**-213, 1983.
- 15) 우자원, 울무와 열주의 단백질, 지방 및 식이섬유의 이화학적 특성에 관한 연구, 연세대학교 대학원 박사학위논문, 1989.
- 16) 이춘녕, 김성곤, 쌀 단백질 : 그의 조성, 구조, 소재와 생합성, *한국농화학회지*, **20**(1):156, 1977.