

분리 유채단백의 전기영동 패턴에 미치는 Phytate의 영향

조희경·윤재영*·이서래
이화여자대학교 식품영양학과

Effect of Phytate on the Electrophoretic Behavior of Rapeseed Protein Isolate

Hee-Kyung Cho, Jae-Young Yoon* and Su-Rae Lee
Department of Food and Nutrition, Ewha Woman's University

Abstract

This study was undertaken to investigate the effect of pH and phytate level on the solubility of the protein due to binding between phytate and low-phytate rapeseed protein isolate by means of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Results showed that the number of protein bands decreased by the increasing amount of phytate added to the soluble extract at pH 2.0 and 5.0 whereas there was no change at pH 11.5. Among 18 bands of rapeseed proteins at pH 2.0, seven bands (105.8, 52.3, 37.3, 34.8, 26.3, 21.3, 18.4 KDa) were removed by precipitation with 100 mg phytate addition and six bands (78.8, 46.5, 19.4, 16.8, 11.7, 8.5 KDa) further disappeared by 150 mg phytate addition. Among 15 bands at pH 5.0, only four bands disappeared by phytate addition. It is suggested that the functionality of rapeseed protein isolate can be improved by lowering the phytate content.

Key words: phytate binding, rapeseed protein isolate, electrophoresis

서 론

유채씨(rapeseed)에는 약 40%의 지방질과 20~25%의 단백질이 함유되어 있어 식용유 뿐만 아니라 단백질원으로 이용될 수도 있어 중요한 식품재료로 주목받고 있다. 그러나 유채씨에는 영양 저해인자인 phytate, glucosinolate, erucic acid를 다량 함유하고 있어 식품으로의 직접 이용이 제한되어 왔다. 특히 phytate는 cation이나 단백질과 불용성 복합체를 형성하여 생리적 조건에서 이들 성분의 bioavailability를 낮춤으로써 단백질의 기능성 및 무기질의 영양이라는 측면에서 큰 문제가 된다⁽¹⁾.

최근 식품재료 중에 존재하는 phytate의 제거 및 감소에 대한 연구가 국내외에서 많이 이루어지고 있다^(2, 4). 저자들은 phytate 함량이 적은 분리 유채단백을 제조하고 그의 용해도 및 소화율에 미치는 phytate 첨가의 영향을 조사하여 이미 발표한 바 있다⁽⁵⁾.

본 연구는 이에 연속된 실험으로서 전기영동법에 의하여 phytate-protein의 결합패턴을 살펴봄으로써 단백질의 bioavailability와 관련된 문제들을 해명하고자 시도하였다.

재료 및 방법

실험재료

Bovine serum albumin, sodium phytate(옥수수에서 정제)와 전기영동시 사용한 시약들은 미국 Sigma Chemical Co.에서 구입하였으며 전기영동용 표준단백질은 Serva Chemical Co.에서 구입하였다. 기타 분석용 시약들은 특급 또는 일급시약을 사용하였다.

분리 유채단백은 pH에 따른 phytate와 단백질의 용해도 차이를 이용한 low-phytate rapeseed protein isolate로서 전보에서와 같이 제조하였다(phytate 함량 1.5%)⁽⁵⁾.

가용성 단백질의 함량 측정

Lowry 등의 방법⁽⁶⁾에 따라 가용성 단백질의 농도를 측정하였으며 기준 단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

분리 유채단백과 Phytate와의 결합도 측정

pH 2.0, 5.0, 11.5로 조절한 증류수 30 ml에 0.5g의 분리 유채단백을 넣고 pH를 다시 조절한 후 1시간 동안 교반하여 원심분리(13,000×g, 30분)하였다. 그 상정액을 취하여 첨가한 분리 유채단백 1g당 50, 100, 150 mg의 phytate를 각각 첨가한 후 다시 pH를 조절하여 15분 동안 교반하였다. 이것을 원심분리(13,000×g, 30분)하여 불용성 단백질을 제거한 후 상정액을 취하여 단백질

Corresponding author: Su-Rae Lee, Department of Food and Nutrition, Ewha Woman's University, Seodaemun-gu, Seoul 120-750, Korea

*Present address: Department of Food and Nutrition, In-san Junior College, Incheon, Korea

함량을 측정할 다음 전기영동을 실시하였다.

전기영동 실험

Laemmli의 방법^(7,8)에 준하여 4°C에서 discontinuous buffer system을 이용한 단백질의 전기영동을 수행하였고 10~20% SDS-polyacrylamide gradient slab gel을 사용하였다. 전기영동 장치로는 vertical electrophoresis unit(LKB 2001-001), power supply(LKB 2301 Macrodrive 1), circulator(LKB 2219 Multitemp thermostatic circulator), densitometer(LKB Ultrascan XL enhanced laser densitometer)를 사용하였다.

전기영동시에는 한 track당 100 µg의 단백질을 loading하였으며 100 V에서 stacking gel을 통과하게 하고 resolving gel은 200 V에서 전개되도록 하였다. Tracking dye가 gel의 하단을 통과하여 빠져나간지 1시간 후에 전류를 중단하고 gel을 꺼냈다. 전개된 gel은 고정용액(3% sulfosalicylic acid, 10% trichloroacetic acid, 20% methanol)에서 30분간 고정시킨 후 3시간 동안 염색용액(0.05% coomassie blue R 250 in destaining solution)에 담그었다. 염색이 완료된 것은 탈색용액(5% acetic acid, 25% methanol)을 여러번 교체하여 주면서 24시간 동안 탈색하였다. 모든 과정은 교반하면서 수행되었으며 탈색이 완료된 gel은 마르지 않도록 증류수를 넣은 비닐 봉지에 밀봉하여 냉장 보관하였다. 전기영동에 의해 분리된 단백질 bands의 color intensity는 densitometer로 측정하였다.

결과 및 고찰

표준 단백질의 전기영동

Polyacrylamide gel 상에서 단백질의 분리는 전하 뿐만 아니라 분자의 크기에 따라 크게 좌우된다. 본 실험에서 분자량 표지로 쓰인 표준 단백질은 Fig. 1과 같이 분자량과 polyacrylamide 농도(%)간에 직선관계를 나타내었으며 전기영동이 순조롭게 진행되고 있음을 말해주고 있다.

분리 유채단백과 phytate와의 결합 패턴

분리 유채단백에서 phytate와 반응하여 침전되는 단백질 성분이 어느 fraction인가를 알아보기 위하여 전기영동방법을 구사하였다. 즉 분리 유채단백의 수용액에서 pH와 phytate 첨가량을 달리하였을 때 phytate에 의하여 침전되지 않고 용해되어 있는 분리 유채단백의 profile을 전기영동에서 나타나는 bands를 통하여 비교, 검토하였다.

우선 phytate 첨가 수준을 결정하기 위해 pH 2.0에서 phytate 첨가량을 4가지로 달리한 후 그 상정액을 전기영동한 결과는 Fig. 2와 같다. Phytate 무첨가군(track 3)과 50 mg phytate 첨가군(track 4)은 band상의 차이가 나타나지 않았으나 100 mg phytate 첨가시(track 5) 분

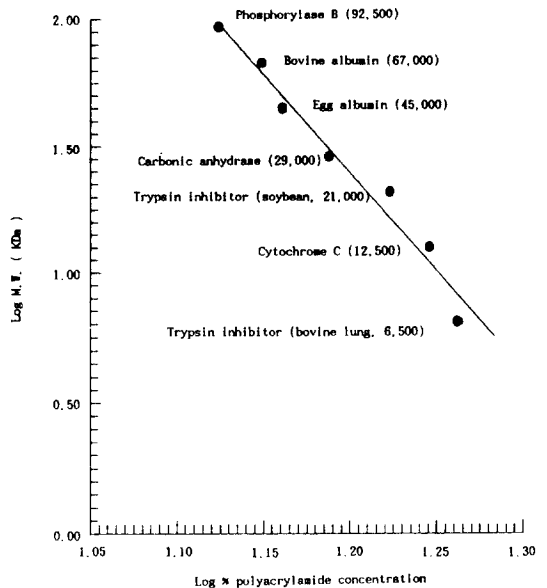


Fig. 1. Calibration curve for polypeptide molecular mass versus polyacrylamide concentration in 10~20% linear gradient slab gel

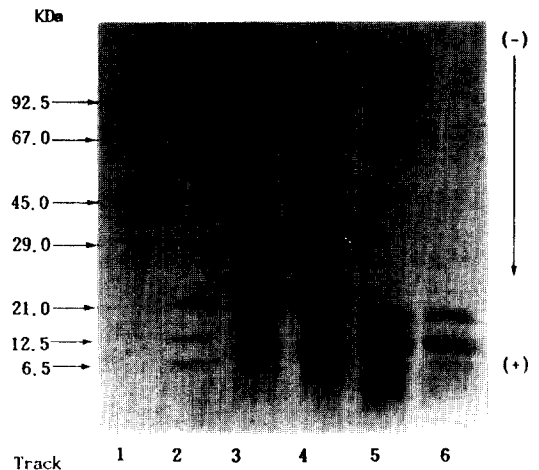


Fig. 2. SDS-PAGE profiles of rapeseed protein isolate soluble at pH 2

Tracks 1, 2, standard M.W. markers; 3, no phytate; 4, 50 mg phytate; 5, 100 mg phytate; 6, 150 mg phytate

자량 21,000 이상인 단백질 band가 거의 사라진 것을 볼 수 있었다. 그대신 상정액에서는 분자량이 6,500~12,900인 단백질의 농도가 증가한 것을 볼 수 있었는데 이것은 phytate가 분자량이 큰 단백질과 쉽게 결합하여 친수성을 감소시키고 결국 불용성 복합체를 형성하여 침전이 되어 버린 결과로 판단된다. 한편 분자량이 작은 단백질들은 phytate와 결합은 되지만 침전되지 못하고 상정액에 남아있는 것이 아닌가 생각된다. 결국 단백질과

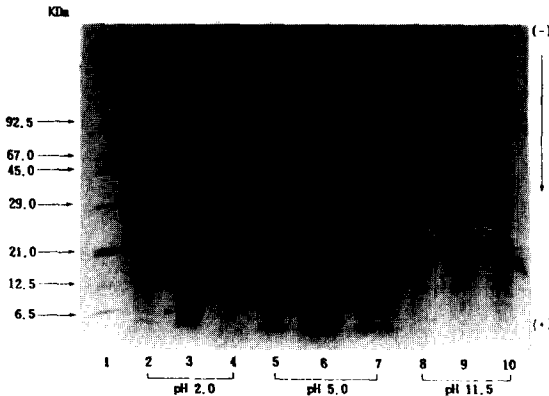


Fig. 3. SDS-PAGE profiles of rapeseed protein isolate soluble at various pH levels

Tracks 1, standard molecular weight markers; 2, 5, 8, no phytate; 3, 6, 9, 100 mg phytate; 4, 7, 10, 150 mg phytate

phytate 사이에서는 association-dissociation이 쉽게 일어나기 때문에 위와 같은 현상이 관찰되는 것으로 판단된다.

위의 결과에 의하여, 3가지의 다른 pH 영역에서 phytate 무첨가군, 100 mg 첨가군, 150 mg 첨가군의 상징액을 전기영동한 결과는 Fig. 3과 같다. 이들의 전기영동 패턴을 정량적으로 비교하기 위하여 densitometer로 분석하였는 바 pH 2.0에서의 결과는 Fig. 4와 같고 나타난 peak들의 농도는 Table 1에 제시하였다. 같은 분자량을 가지는 단백질 peak는 같은 번호로 표시하였으며 없어진 번호는 사라진 peak를 의미한다.

pH 2.0에서는 모두 18개의 bands가 나타났는데 100 mg phytate 첨가에 의하여 7개의 bands(105.8, 52.3, 37.3, 34.8, 26.3, 21.3, 18.4 KDa)가 사라졌으며(track 3), 150 mg phytate 첨가시에는 6개의 bands(78.8, 46.5, 19.4, 16.8, 11.7, 8.5 KDa)가 사라졌다(track 4).

pH 5.0에서는 단백질의 용해도가 매우 낮았으며 이들의 전기영동 결과는 track 5, 6, 7에 나타나 있다. Track 5(no phytate)의 band는 비교적 분리능이 좋았으며 pH 2.0에서 보다는 단조로운 양상을 보였다. Phytate를 100 mg(track 6), 150 mg(track 7) 첨가시킨 경우 track 5인 phytate 무첨가군의 4개 band(34.8, 21.3, 18.4, 16.8 KDa)가 나타나지 않았다. 그러나 track 6, 7 사이에는 band의 차이가 나타나지 않은 것으로 보아 phytate 첨가량에 영향을 받지 않음을 알 수 있었다. 그리고 pH 5.0에서는 pH 2.0과 pH 11.5에서 나타나지 않았던 40.4 KDa의 단백질 band가 있는 것이 특징이었다.

pH 11.5(track 8, 9, 10)에서는 phytate 첨가량의 증가에 따른 단백질 band의 변화가 없었으며 이들의 band는 track 2(pH 2.0)와 비슷하였다.

본 실험결과 pH 2.0에서 phytate 첨가량이 다를 때 de-

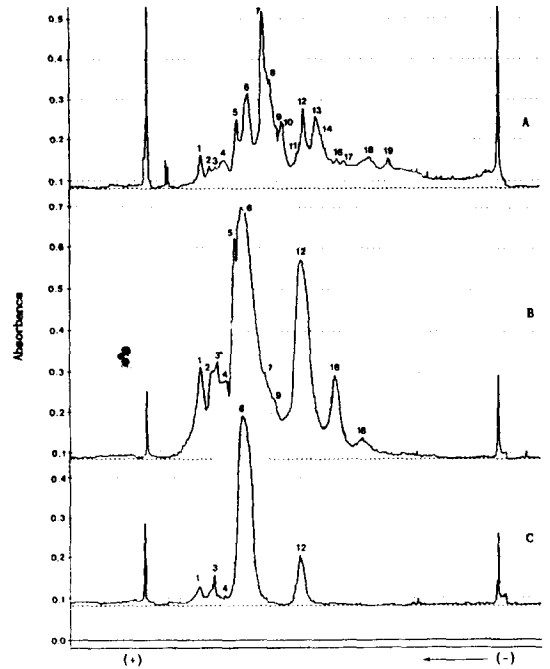


Fig. 4. Densitograms of rapeseed protein isolate at pH 2.0 as stained by coomassie blue after SDS-PAGE
A, no phytate; B, 100 mg phytate; C, 150 mg phytate

nsitogram의 peak수와 높이가 확실하게 변하는 것으로 보아 phytate가 특히 잘 결합하는 단백질 fraction이 존재하며 각 단백질은 phytate 농도에 따라 선택적으로 결합하는 성질이 있는 것으로 생각된다. 특히 분자량 13.3 KDa인 6번 peak의 상대적인 단백질 농도는 급격히 변화되었다. Phytate 무첨가군의 경우 6번(13.3 KDa), 7번(16.8 KDa) peak가 주요 단백질 부분인 것을 알 수 있었고 100 mg phytate 첨가시 6번(13.3 KDa), 12번(28.7 KDa) peak가 각각 34.8%, 25.5%로써 전체단백질의 2/3를 차지하였다. 또 150 mg phytate를 첨가한 경우에는 6번 peak가 71.3%를 차지하고 있었다.

Smith 등⁽⁹⁾은 phytate를 산성에서 침전시킨 대두 단백질에 첨가할 때 전기영동 패턴에 변화가 있었다고 하였으며 Juliano 등⁽¹⁰⁾은 5 M acetic acid로 brown rice protein을 추출하여 전기영동한 결과 백미의 주요 단백질인 glutelin band가 없어진 것을 확인하였고 쌀겨에 있는 phytate가 glutelin과 선택적으로 결합한 것으로 판단하였다. 분리 유체단백의 경우도 이와 마찬가지로 생각되므로 분리 유체단백을 용해도에 따라 분별한 후 전기영동을 통하여 이들 단백질의 특성을 규명해 보는 계속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

pH 5.0에서의 densitogram을 살펴보면 pH 2.0에서의 phytate 무첨가군과 비교하여 주로 13.3 KDa 이하의 단백질이 주요 peak를 이루고 있음을 알 수 있었다. 이들

Table 1. Relative concentration of protein bands separated by SDS-PAGE for the soluble fractions of rapeseed protein isolate obtained at various pH and phytate levels

Peak number	M.W. (KDa)	% Relative concn at different pH & phytate levels						
		pH 2.0			pH 5.0			pH 11.5
		0 mg	100 mg	150 mg	0 mg	100 mg	150 mg	0,100,150 mg
1	7.7	4.4	6.2	4.6	18.5	8.7	13.6	1.8
2	8.5	2.6	3.4	—	7.6	4.0	4.4	0.9
3	9.1	1.9	3.2	5.1	5.3	3.1	5.1	1.1
4	10.0	2.4	3.3	1.3	8.3	2.3	5.7	2.4
5	11.7	4.9	7.6	—	10.8	13.2	12.3	3.8
6	13.3	10.5	34.8	71.3	38.7	55.1	49.0	4.8
7	16.8	17.9	2.1	—	1.4	—	—	23.7
8	18.4	7.2	—	—	0.8	—	—	10.9
9	19.4	2.4	2.0	—	0.8	2.1	1.7	2.2
10	21.3	5.9	—	—	1.0	—	—	8.4
11	26.3	4.4	—	—	—	—	—	2.9
12	28.7	7.4	25.5	17.6	2.1	5.7	3.4	5.3
13	34.8	6.6	—	—	1.3	—	—	8.2
14	37.3	4.0	—	—	1.3	1.0	1.2	6.3
15	40.4	—	—	—	1.9	4.4	2.9	—
16	46.5	4.8	10.2	—	0.3	0.5	0.5	5.0
17	52.3	2.3	—	—	—	—	—	2.4
18	78.8	6.0	1.8	—	—	—	—	6.4
19	105.8	4.4	—	—	—	—	—	3.7
Total		100.0	100.1	99.9	100.1	100.1	99.8	100.2

band는 pH 2.0에서 100 mg의 phytate를 첨가했을 때의 peak와 양상이 비슷하였으며 28 KDa 이상의 단백질 peak는 더 뚜렷하게 구분되었다. pH 5.0 대조군(no phytate)의 peak는 모두 15개인데 이중 7번, 8번, 10번, 13번의 peak가 100 mg과 150 mg의 phytate를 첨가할 때 모두 나타나지 않았다. pH 5.0에서의 주요 단백질 peak는 5번(11.7 KDa), 6번(13.3 KDa)으로써 50~70%를 차지하고 있었다. 그리고 pH 2.0 대조군에서 그 농도가 가장 높았던 16.8 KDa의 단백질이 pH 5.0에서는 1.4%에 불과했으며 phytate 첨가시에는 나타나지 않았다.

pH 11.5에서는 peak간의 변화가 거의 없었는데 이 pH에서는 phytate의 용해도가 낮아서 가용성 단백질과 접촉하기 어려울 뿐만 아니라 높은 알칼리성 pH에서 단백질 분자의 양전하 수가 감소되어 phytate-protein 복합체가 불안정하게 되므로 단백질의 침전이 생기지 않을 것으로 생각된다. 이 때의 주요 단백질 peak는 7번(16.8 KDa), 8번(18.4 KDa)이었다.

이상의 결과로 미루어 볼때 pH 2.0과 pH 11.5에서는 분리 유채단백으로부터 거의 모든 단백질이 용해되어 나왔다고 볼 수 있으며 분자량이 7,700~105,800에 이르는 18개의 band로 분리되었다. 반면 pH 5.0에서는 분자량이 큰 단백질이 용해되어 나오지 못하고 7,700~50,000의 분자량을 지닌 15개의 band만이 분리되었다. 그리고 모든 track에서 13,300 이하의 단백질은 phytate 첨가에 의하여 별로 변화되지 않은 것으로 보아 이들은

다른 단백질에 비하여 용해도가 높을 뿐만 아니라 phytate와도 잘 결합하지 않는 특성을 지니고 있는 것으로 생각된다. 다시 말하면 phytate는 분자량 15,000 이상의 단백질과 산성조건하에서 잘 결합하여 불용성 복합체가 되는 것으로 판단된다.

요 약

영양 저해인자로 알려진 phytate를 제거한 분리 유채 단백질(low-phytate rapeseed protein isolate)을 제조하여 유채단백질과 phytate와의 결합양상에 미치는 pH 및 phytate 첨가량의 영향을 알아보기 위하여 SDS-polyacrylamide gel 전기영동법을 수행하였다. 가용화된 분리 유채단백은 pH 2.0과 pH 5.0에서 phytate 첨가량이 증가할수록 가용성 단백질 band의 수가 감소하였으며 pH 11.5에서는 band의 변화가 없었다. pH 2.0에서 대조군의 18개 band중 7개의 band(105.8, 52.3, 37.3, 34.8, 26.3, 21.3, 18.4 KDa)가 100 mg phytate 첨가시 침전되었으며 150 mg 첨가시에는 6개의 band(78.8, 46.5, 19.4, 16.8, 11.7, 8.5 KDa)가 더 사라졌다. pH 5.0에서는 대조군과 비교하여 15개의 band중 4개의 band(34.8, 21.3, 18.4, 16.8 KDa)만이 phytate 첨가시 침전되었다. 따라서 유채단백을 식품소재로 이용하기 위해서는 phytate 함량을 낮춤으로써 그의 기능성을 향상시킬 수 있을 것이다.

문 헌

1. Serraino, M.R., Thompson, L.U., Savoie, L. and Parent, G.: Effect of phytic acid on the *in-vitro* rate of digestibility of rapeseed protein and amino acids. *J. Food Sci.*, **50**, 1689(1985)
2. Serraino, M.R. and Thompson, L.U.: Removal of phytic acid and protein-phytic acid interactions in rapeseed. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 38(1984)
3. Thompson, L.U. and Serraino, M.R.: Effect of germination on phytic acid, protein and fat content of rapeseed. *J. Food Sci.*, **50**, 1200(1985)
4. 허채옥, 양차범: 한국산 평지 종실 단백질의 phytate 제거에 관한 연구(제 1보) 평지 종실단백질과 phytate의 용해도에 대한 pH와 염류의 영향. 한국농화학회지, **29**, 212(1986)
5. 조희경, 윤재영, 이서래: 분리 유채단백의 용해도와 소화율에 미치는 phytate의 영향. 한국식품과학회지, **24**, 279(1992)
6. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 256(1951)
7. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, **227**, 680(1970)
8. O'Farrell, P.H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 4007(1975)
9. Smith, A.K. and Rackis, J.J.: Phytin elimination in soybean protein isolation. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 633 (1957)
10. Juliano, B.O., Hussain, A., Resurreccion, A.P. and Bushuk, W.: Interference of phytate with extraction of protein from brown rice using 5 M acetic acid. *Cereal Chem.*, **68**, 317(1991)

(1992년 4월 4일 접수)