

알칼리 추출법에 의한 탈지 미강 단백질 추출의 최적 pH 조건

김원 · 정소영 · 홍광원*
동국대학교 식품생명공학과

Optimum pH Condition of Defatted Rice Protein Extraction by Alkaline Method

Won Kim, So-Young Jung, and Kwang-Won Hong*

Department of Food Science and Biotechnology, Dongguk University

Abstract

For efficient extraction of protein from defatted rice bran, the 5 ranges of extraction pH (8, 9, 10, 11 and 12) and the 3 ranges of isoelectric precipitation pH (2, 4 and 6) were used. The protein content, browning reaction, the electrophoresis pattern and the recovery yield of soluble protein at each pH range were compared each other. The recovery yield of soluble protein increased in proportion to extraction pH, but at the same time, browning reaction became more conspicuous. The most amount of protein was recovered at the precipitation pH of 4. The SDS-PAGE patterns of the extracted proteins showed no significant correlations between pH and the protein content, but the highly alkaline condition was more advantageous to extract protein less than 35 kDa. In each pH range, the recovery yield of soluble protein averagely reached 32.5% on the basis of extraction. In result, it was found that combination of extraction pH 10 and precipitation pH 4, which resulted in 37.65% of recovery yield and low level of browning reaction, was the optimum condition for the extraction of protein from defatted rice bran.

Key words: defatted rice bran, protein extraction, alkaline method

서 론

쌀은 세계적으로 가장 많이 생산되고 소비되는 5대 작물 중의 하나이다. 왕겨를 벗겨낸 현미는 백미보다 맛과 소화율이 떨어져서 도정을 하게 된다. 이때 현미를 도정할 때 발생하는 것을 미강이라 하며, 이는 현미의 약 8-10% 정도로, 우리나라에서 연간 약 40-50만 톤 가량의 미강이 부산물로 얻어지고 있다(Chang et al., 2008). 미강에는 지질, 무기질, 섬유질, 비타민 B 복합체 외에도 양질의 단백질을 함유하고 있으나 산패되기 쉬운 단점이 있다. 미강을 식품에 첨가시 식품의 식미를 저하시키고, 저장성을 감소시켜 식품의 이용은 제한되어 왔다(Kim et al., 1997). 따라서 미강은 주로 미강유 추출 후 탈지 미강 형태로 사료에 이용되거나 농업폐기물로 처리되어 왔다.

미강 단백질은 쌀 배유 단백질이나 기타 다른 곡물의 겨

보다 더 높은 라이신 함량을 가지고 있고(Juliano, 1985), 소화율이 90% 이상이기 때문에 알레르기 유발 가능성이 적다(Burks & Helm, 1994). 필수 아미노산의 조성이 우유의 casein과 콩 단백질과 비교해서도 손색이 없어 유아기의 기초건강식품으로써 적합하다고 할 수 있다(Wang et al., 1999). 또한 탈지된 미강 단백질의 가수분해물은 소화관에서 지질가수분해효소의 활성을 억제하거나 지방의 흡수를 지체시켜, 식후의 혈중 중성지방과 LDL-콜레스테롤 수치를 감소 시키고(Tsutsumi et al., 2000) 당뇨병 2형을 예방하는 효과도 있다(Drent et al., 1995).

미강 단백질의 영양적 가치 및 기능성이 뛰어난에도 불구하고 산업적으로 미강 단백질의 추출 기술은 아직 미비한 실정이다. 현재 알칼리 추출법은 미강에서 단백질을 추출하는데 사용되는 방법 중 하나로(Gnanasambandam & Hettiararchy, 1995), 다른 효소적 방법이나 물리적, 화학적 방법보다 그 추출 효율은 낮으나(Shanhu et al., 2002), 추출 비용이 저렴하여 비용대비 추출효율이 비교적 높은 장점을 가지고 있다. 최근 미강단백질의 영양학적 용도와 물성에 관계되는 기능적 용도에 대해서 많은 연구가 진행되고 있지만 미강단백질의 추출효율 및 개선에 대한 연구는 부족한 실정이다. 또한 미강 단백질에서 알칼리 추출시

Corresponding author: Kwang-Won Hong, Department of Food Science and Biotechnology, College of Life Science and Biotechnology, Dongguk University, 26, 3 Pil-dong, Chung-gu, Seoul 100-715, Republic of Korea

Tel: +82-2-2260-3369; Fax: +82-2-2260-3369

E-mail: hkwon@dongguk.edu

Received January 12, 2011; revised April 05, 2011; accepted April 05, 2011

사용되는 용출 pH와 침전 pH는 각각의 연구 논문마다 차이가 있으며 추출되는 단백질의 종류와 양이 다르다(Jiamyangyuen et al., 2005; Kumagai et al., 2006; Cao et al., 2009; Pinciroli et al., 2009). 따라서 추출 방법에 따라 회수한 단백질의 소화흡수가 용이한 정도나 필수아미노산의 함량에 따른 영양학적 가치의 차이가 날 수 있다. 그러므로 본 연구에서는 알칼리 사용에 따른 galbano를 최소화하고 영양적으로 우수한 미강 단백질을 보다 효율적으로 추출하기 위하여 여러 구간의 용출 pH를 이용하여 단백질을 추출하고 여러 구간의 침전 pH를 사용하여 단백질을 침전시켰다. 또한 사용한 각 pH에 따라 회수된 단백질들의 양, galbano, 추출효율, 단백질의 전기영동 패턴을 분석하여 알칼리 추출의 최적 pH 조건을 조사하였다.

재료 및 방법

미강 단백질의 알칼리 추출

탈지 미강은 중국에서 생산된 쌀의 건조 미강으로, CJ제일제당 공장에서 생산된 것을 사용하였다. 시료는 분쇄기로 분쇄한 후 4°C에서 보관하며 사용하였다. 알칼리 추출 미강 단백질은 Gnanasambandam과 Hettiarachchy(1995)의 방법을 변형하여 추출하였다. 용출 pH에 따른 단백질 추출 정도를 비교하기 위해 본 실험에서는 각각의 샘플을 pH 8, 9, 10, 11 및 12로 나누어 용출 하였다. 먼저 비이커에 각 샘플들과 중량대비 1:8(w/v)의 멸균증류수를 넣고 60 분간 교반한 다음, 1에서 5N 범위의 NaOH를 천천히 주입하여 각각의 샘플을 pH 8, 9, 10, 11 및 12로 일정하게 유지시켰다. 상온에서 60 분간 단백질을 용출 시킨 후, 13000 rpm에서 30 분간 원심분리(Sorvall[®] RC 5C Plus Centrifuge, MD, USA)하여 상등액을 취하였다.

알칼리 추출 단백질의 등전점 침전

다양한 pH로 알칼리 추출한 각 미강단백질 분획에 대해 등전점 침전 pH에 따른 단백질의 추출 정도를 비교하기 위해서, 각 시료를 용출 pH당 중량대비 1:1:1(w/w/w) 세 개의 시료로 나누어 상온에서 1에서 3N 범위의 HCl 용액을 이용하여 pH를 2, 4 및 6으로 조정하여 30 분 동안 반응시켜 단백질을 침전시킨다. 각 샘플들을 13000 rpm에서 30 분간 원심분리하여 침전 단백질을 얻었다. 얻어진 단백질 침전물의 중량대비 1:2(w/v)의 멸균증류수를 가하여 수세를 한 후, 재차 원심분리를 통하여 얻은 침전물에 멸균증류수를 5 mL 가하여 Homogenizer(Tissue Tearor, Biospec Products, Bartlesville, OK, USA)로 충분히 균질화 시켰다. 균질화된 단백질 수용액의 pH를 7.0으로 중화시키고, 각 샘플에 Protease inhibitor(Protease Inhibitor Cocktail Set I, Calbiochem, CA, USA)를 1%(v/v) 첨가하여 4°C에서 보관하며 사용하였다.

용출 pH에 따른 galbano 측정

용출 pH에 따른 galbano의 정도를 알아보기 위해, 용출하여 얻은 단백질 수용액의 흡광도를 분광광도계를 이용하여 420 nm 에서 측정하였다(Song et al., 1966). 각 샘플들에 16% (w/v) sodium dodecyl sulfate(SDS)를 첨가하여 단백질 응집으로 인한 과량의 산란을 최소화 하여 측정하였고, 대조구는 멸균증류수에 16% SDS(v/v)를 첨가하여 사용하였다.

미강 단백질의 정량

총 알칼리 용출 단백질과 등전점 침전 단백질은 Advanced Protein Assay Reagent ADV01(Cytoskeleton, Denver, CO, USA)을 사용하여 정량 하였다(Bradford, 1976). 검정곡선은 bovine serum albumin을 표준시료로 사용하여 작성하였다.

미강 단백질의 전기 영동

미강 단백질 분석은 용출 pH와 침전 pH에 따른 각각의 단백질 수용액을 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)로 분리하여 비교 분석하였다. 각 pH조건에 따라 추출한 단백질 용액을 2 배 농도의 sample buffer(125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% glycerol, 2% β -mecaptoethanol, 0.04% bromophenol blue, 4% SDS)와 1:1(v/v)로 섞은 후 끓는 물에서 5 분간 중탕 가열하였다. 각 샘플을 10% separating gel과 2% stacking gel에 주입하여 running buffer(0.025 M Tris-HCl, pH 8.3, 0.192 M glycine, 0.1% SDS)으로 100 V에서 90분간 Bio-Rad Mini PROTEIN 3 system(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)으로 전개 하였다. 분자량 marker로는 Pre-stained Protein Size Marker(Broad-range dual color, DokDo-Mark, Daejeon, Korea)를 사용하였다. 전기영동 후에 gel은 Coomassie R250 staining solution(1 g Brilliant R250, 450 mL methanol, 100 mL acetic acid, 450 mL DW)으로 1 시간 동안 염색 후 destaining solution(450 mL methanol, 100 mL acetic acid, 450 mL DW)으로 3시간 동안 탈색하여 분석하였다.

결과 및 고찰

알칼리 용출 pH가 단백질 추출에 미치는 영향

알칼리 추출시 pH 변화에 의한 단백질 추출 함량의 변화를 살펴보기 위해 각 시료를 pH 8, 9, 10, 11 및 12로 나누어 용출하고 단백질을 정량 하였다. 용출 pH가 증가할수록 단백질의 용출량이 증가 하였으며 pH 12에서 용출량은 상대적으로 다른 pH보다 급격히 증가하였다(Fig. 1). 그러나 용출 pH가 증가할수록 galbano가 증가하는 경향을 나타냈으며, pH 10 이후부터는 미강으로부터 용출된 단백질이 매우 진한 갈색을 나타내기 시작했다. Ajandouz등(2001)의 연구에 따르면 높은 알칼리 조건은 포도당 및 과당과 필수 아미노산인 lysine과의 glycosylamine 반응을 촉진시켜 비

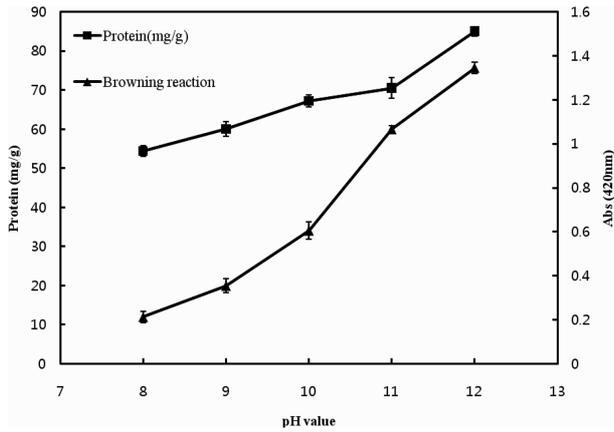


Fig. 1. Amount of precipitated protein (■, mg/g) and intensity of browning reaction (▲) at different extraction pH.

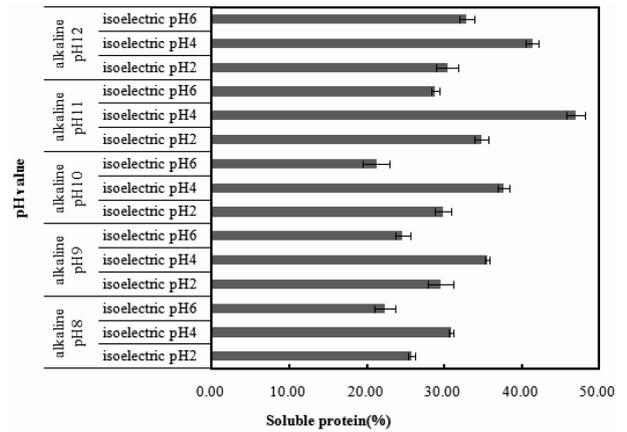


Fig. 2. Recovery yield of protein at the different combination of extraction pH and precipitation pH.

효소적 갈변화를 증가시킨다고 보고 하고 있으며, 특히 필수아미노산인 lysine은 glycolysine으로 변형 되어 체내 단백질의 흡수량을 감소시킨다고 하였다. 그리고 높은 알칼리 용출 조건은 lysinoalanine과 같은 잠재독소물질을 생성시킬 수 있으며, 섬유질과 같은 다른 성분들도 함께 용출 되어 단백질의 품질을 떨어뜨린다(Wang et al., 1999). 따라서 미강 단백질의 알칼리 용출 pH는 갈변화가 본격적으로 증가하기 이전 구간인 pH 9-10이 적절한 것으로 보인다.

등전점 침전 단백질의 함량 측정

pH 8, 9, 10, 11 및 12 에서 용출시킨 각각의 시료를 분획당 세가지로 나누어 pH 2, 4 및 6 에서 등전점 침전으로 단백질을 회수하였다. 회수한 단백질을 세척 후 멸균 증류수에 균질화 시킨 미강 단백질 수용액의 최종 단백질 함

량을 측정하여 용출 단백질 대비 수용성 단백질의 비율을 표시하였다(Fig. 2). 각각의 용출 pH 에서 침전 pH 가 4 일 때가 가장 많은 수용성 단백질을 회수할 수 있었다. 미강단백질의 주요 구성단백질인 albumin(37%), globulin (36%), glutelin(22%), prolamin(5%)의 등전점이 pH 4.1-4.6 의 범위이므로 용해도는 pH 가 4 일 때 가장 낮고 단백질들의 소수성 결합이 강해 등전점 침전이 가장 많이 일어난다(Wang et al., 1999). 따라서 미강단백질의 회수율은 용출 pH에 상관없이 침전 pH 가 4 일 때 가장 높은 것을 확인할 수 있었다. 전체적으로 침전 pH 4에서의 수용성 단백질의 회수율은 31-47% 로 각 용출 pH에 따라 16% 정도의 회수율 차이를 나타냈다. pH 6에서의 침전된 단백질의 수용성 단백질은 대부분의 용출 pH에서 가장 낮았다.

Fig. 3은 세 종류의 침전 pH에서 침전된 단백질과 그 상

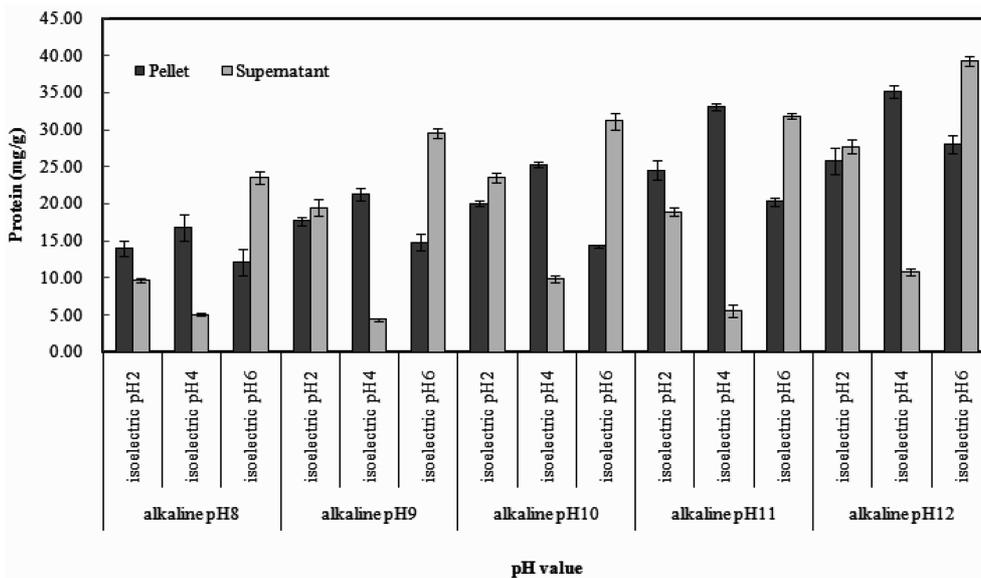


Fig. 3. Comparison of the amounts of precipitated protein and remaining soluble protein after isoelectric precipitation step at different pH.

등액에 남아있는 단백질의 함량을 비교한 도표이다. 이 표에서 pH 4의 상등액에 남아있는 단백질의 양이 다른 pH에 비해 가장 적은 것을 알 수 있었으나 회수한 단백질의 약 15-30%가 상등액에 여전히 남아 있었다. 그리고 pH 6에서는 침전된 단백질보다 상등액에 남아 있는 양이 더 많은 것을 알 수 있었다. 비록 용출 pH 11과 침전 pH 4에서 수용성 단백질 회수율이 46.95% 로 가장 높았으나 심한 갈변화로 인해 최적 조건으로 바람직하지 않다. 따라서 알칼리를 이용한 미강단백질의 추출의 최적 pH 조건은 37.65%의 회수율을 나타낸 용출 pH 10과 침전 pH 4로 볼 수 있었다.

미강단백질의 전기영동 패턴의 변화

일반적으로 쌀 단백질을 SDS-PAGE할 경우 albumin의 주요 polypeptides는 18-20 kDa, globulin은 15, 25.5 및 200 kDa 이상을, glutelin은 30-39 kDa의 acidic subunit와 19-25 kDa의 basic subunit 또는 이 두 subunit의 전구체로 57 kDa의 위치에 나타난다(Borghet et al., 2006).

여러 용출 pH로 침전시킨 미강 단백질을 SDS-PAGE로 분리한 결과 주요 단백질의 분자량은 대략 50-60 kDa과 30~35 kDa, 25 kDa 이하의 세가지 영역으로 나타났다(Fig. 4). 앞에서 언급한 바와 같이 용출 pH가 증가할수록 단백질의 함량이 높아졌던 결과로 인해, 보다 다양한 단백질의 용출을 예상 하였으나, 주요 단백질의 변화는 거의 없었다. 하지만 용출 pH가 증가 할수록 35 kDa 이하에서 새로운 단백질 밴드가 나타나기 시작하여 저분자량의 단백질 추출에 좀 더 용이한 것으로 보인다. Fig. 5는 서로 다른 등전점 침전 pH의 사용에 따라 회수된 미강단백질의 SDS-PAGE 결과를 나타냈다. 침전 pH 4는 pH 2나 pH 6 보다 더 많은 양의 단백질을 침전 시킨다는 것을 확인하였으며 Fig. 2와 3의 단백질 정량 결과와도 일치 하였다. 또한 침전된 단백

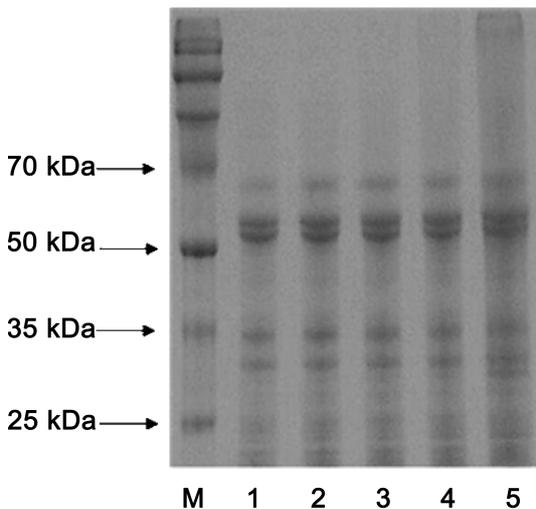


Fig. 4. SDS-PAGE pattern of the proteins extracted at different extraction pH. M, size marker; lane 1, pH 8, lane 2, pH 9; lane 3, pH 10; lane 4, pH 11; lane 5, pH 12.

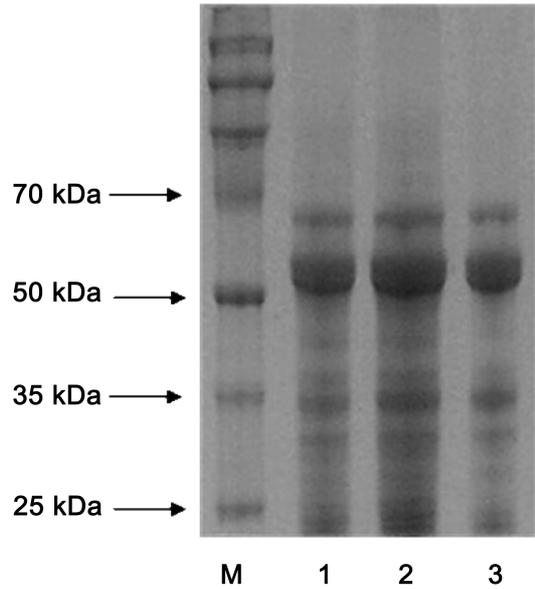


Fig. 5. SDS-PAGE pattern of the proteins precipitated at different precipitation pH. M, size marker; lane 1, pH 2, lane 2, pH 4; lane 3, pH 6.

질 중 glutelin 전구체인 57 kDa의 단백질이 대부분을 차지 하고 30-35 kDa의 glutelin acidic subunit 과 19-25 kDa의 glutelin basic subunit이 일부 용출된 것으로 보인다. 한편 용출 pH로 13, 침전 pH로 6을 사용한 경우(Cao et al., 2009)와 용출 pH로 8.5 침전 pH로 4.1을 사용한 경우 (Kumagai et al., 2006) 침전된 단백질이 주로 glutelin의 acidic subunit과 basic subunit이고 glutelin 전구체 및 10-16 kDa의 prolamins이 일부 차지하는 결과를 보였다. 따라서 본 실험조건하에서 glutelin 전구체 및 glutelin subunit들이 침전된 단백질의 대부분을 차지하고 glutelin이 소화가 잘 되고 필수아미노산인 lysine의 함량이 높아 영양적으로 매우 유리하다는 점에서 바람직한 추출조건으로 보인다(Ogawa et al., 1987; Resurreccion et al., 1993; Siddiqui et al., 2010).

본 연구를 통해 알칼리 추출법의 적정 pH는 용출 pH는 10, 침전 pH는 4 일 때가 추출효율이 가장 높은 것으로 나타났다. 이 구간에서의 수용성 단백질의 회수율은 37.65%였으며, 침전되지 않은 단백질 또한 상등액에 많은 양 존재하고 있다는 것을 알 수 있었다. 미강단백질의 분리는 과도한 단백질간의 응집으로 인한 낮은 용해도와(Hamada, 1995), 단백질과 결합할 수 있는 phytate(1.7%)와 섬유소(12%)의 높은 함량으로 인해 다른 구성체들로부터 단백질의 분리가 매우 어렵다(Juliano, 1985). 이처럼 미강단백질은 그 구조적 복잡성 때문에 알칼리를 이용한 추출만으로는 추출효율의 한계가 있는 것으로 보여진다. 따라서 앞으로의 연구는 미강단백질 추출효율을 높이기 위하여 기존의 알칼리 추출법에 열 또는 초음파 등을 이용한 물리적 처리와 amylase, phytase, protease와 같은 효소처리를 사용하는 방법 등을 접목시켜 보다 추출효율을 높이는 방향으로 진행되

어야 할 것으로 보인다.

요 약

알칼리를 이용하여 탈지미강에서 단백질을 추출하기 위해 용출 pH(8, 9, 10, 11, 12) 5개 구간과 등전점 침전 pH(2, 4, 6) 3개 구간을 설정하고 각 pH 구간에서의 회수된 단백질 함량과 갈변, 전기영동 패턴 및 최종 수용성 단백질의 회수율을 비교 확인하였다. 용출 pH가 증가할수록 수용성 단백질의 회수율은 증가하였으나 동시에 갈변현상도 증가하였다. 등전점 침전 pH는 4에서 가장 많은 단백질을 회수할 수 있었다. SDS-PAGE 결과, 사용한 pH에 따라 추출된 단백질의 주요 패턴은 뚜렷한 차이가 없었으나, 높은 알칼리조건이 35 kDa 이하의 단백질 추출에 좀 더 용이하였다. 각 pH 구간별 용출 대비 수용성 단백질 회수율은 평균 31.5% 이었다. 용출 pH 11 및 침전 pH 4 구간에서 46.95%의 가장 높은 회수율을 나타냈으나 갈변이 급격히 증가하였다. 따라서 37.65%의 회수율을 나타낸 용출 pH 10 과 침전 pH 4 구간이 미강 단백질의 최적 추출조건임을 확인하였다.

참고문헌

- Ajandouz EH, Tchiakpe LS, Ore FD, Benajiba A, Puigserver A. 2001. Effects of pH on caramelization and maillard reaction kinetics in fructose lysine model systems. *J. Food Sci.* 66: 926-931.
- Betchart AA, Fong RY, Saunders RM. 1985. Rice by products: Comparative extraction and precipitation of nitrogen from U.S. and Spanish bran protein concentrates. *J. Food Sci.* 54: 142-145.
- Borghet AVD, Vandeputte GE, Derycke V, Brijs K, Daenen G, Delcour JA. 2006. Extractability and chromatographic separation of rice endosperm proteins. *J. Cereal Sci.* 44: 68-74.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Burks AW, Helm RM. 1996. Hypoallergenicity of rice protein. *Cereal Foods World.* 41:839-843
- Cao X, Wen H, Li C, Gu Z. 2009. Differences in functional properties and biochemical characteristics of congenetic rice proteins. *J. Cereal Sci.* 50: 184-189.
- Chang KH, Byun GI, Park SH, Kang WW. 2008. Dough properties and bread qualities of wheat flour supplemented with rice bran. *Korean J. Food Preserv.* 15: 209-213.
- Drent ML, Larsson I, William-Olsson T, Quaade F, Czubyko F, von Bergmann K, Strobe W, Snowstorm L, van deer Vein EA. 1995. A lipase inhibitor, in the treatment of human obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 19: 221-226.
- Gnanasambandam R, Hettiarachchy NS. 1995. Protein concentrates from unstabilized rice bran: Preparation and properties. *J. Food Sci.* 60: 1066-1069.
- Hamada J. 1995. Protease solubilization of proteins in rice bran. Presented at the IFT Annual Meeting, Anaheim, CA, Abstract No. 68A-55.
- Jiamyangyuen S, Srijesdaruk V, Harper WJ. 2005. Extraction of rice bran protein concentrate and its application in bread. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 27: 55-64.
- Juliano BO. 1985. Rice Bran. In: *Rice Chemistry and Technology*. American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN, USA, pp.647-687.
- Kim YS, Ha TY, Lee SH, Lee HY. 1997. Properties of dietary fiber extract from rice bran and application in bread-making. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 502-508.
- Kumagai T, Kawamura H, Fuse T, Watanabe T, Saito Y, Masumura T, Watanabe R, Kadowaki M. 2006. Production of rice protein by alkaline extraction improves its digestibility. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 52: 467-472.
- Ogawa M, Kumamaru T, Satoh H, Iwata N, Omura T, Kasai Z, Tanaka K. 1987. Purification of protein body-I of rice seed and its polypeptide composition. *Plant Cell Physiol.* 28: 1517-1527.
- Pincirolu M, Vidal AA, Añón MC, Martínez EN. 2009. Comparison between protein functional properties of two rice cultivars. *LWT - Food Sci. Technol.* 42: 1605-1610.
- Resurreccion AP, Li X, Okita TW, Juliano BO. 1993. Characterization of poorly digested protein of cooked rice protein bodies. *Cereal Chem.* 70: 101-104.
- Saunders RM. 1990. The properties of rice bran as a foodstuff. *Cereal Foods World.* 35: 632-635.
- Siddiqui SU, Kumaru T, Satoh H. 2010. Pakistan rice genetic resources-III: SDS-PAGE diversity profile of glutelins (seed storage protein). *Pak. J. Bot.* 42: 2523-2530.
- Song PS, Chichester CO, Stadman FH. 1966. Kinetic behavior and mechanism of inhibition in the Maillard reaction between D-glucose and glycine. *J. Food Sci.* 31: 906-913.
- Tang S, Hettiarachchy NS, Shellhammer TH. 2002. Protein extraction from heat-stabilized defatted rice bran: 1. Physical processing and enzyme treatments. *J. Agric. Food Chem.* 50: 7444-7448.
- Tsutsumi K, Kawauchi Y, Kondo Y, Inoue Y, Koshitani O, Kohri H. 2000. Water extract of defatted rice bran suppresses visceral fat accumulation in rats. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1653-1656.
- Wang M, Hettiarachchy NS, Qi M, Burks W, Siebenmorgen T. 1999. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* 47: 411-416.