



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2010-0034104

(43) 공개일자

2010년04월01일

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2008-0093053

(22) 출원일자

2008년09월23일

심사청구일자

2008년09월23일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

임승택

서울 도봉구 창동 서울가든아파트 106-303

정재연

서울 노원구 월계동 현대아파트 108동 1401호

(74) 대리인

이문섭

전체 청구항 수 : 총 9 항

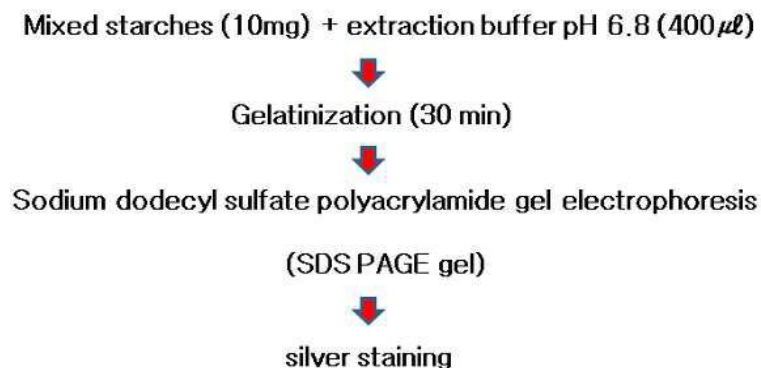
(54) 전분에서 타 전분의 혼입 확인 방법

(57) 요약

본 발명은 전분에서 타 전분의 혼입 확인 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 전분 또는 전분제품에 완충용액을 가한 후 호화시켜 단백질을 추출하는 단계, 및 상기 단백질 추출용액으로부터 전분 종(種) 특이적 단백질을 검출하는 단계를 포함하는 전분 또는 전분제품에서 타 전분의 혼입 여부를 확인하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 전분 또는 전분제품으로부터 소량의 시료를 채취하여 호화시킨 후 이로부터 단백질을 추출하고 분석함으로써 전분에 혼입된 타 전분을 확인할 수 있다. 따라서 전분제품의 원가절감을 위한 타전분의 불법적인 혼입을 확인하거나, 또는 전분원료의 신속한 분석을 필요로 하는 경우에 본 발명의 방법이 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

전분 또는 전분제품에 완충용액을 가한 후 호화시켜 단백질을 추출하는 단계, 및 상기 단백질 추출용액으로부터 전분 종(種) 특이적 단백질을 검출하는 단계를 포함하는 전분 또는 전분제품에서 타 전분의 혼입 여부를 확인하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 전분은 옥수수 전분, 고구마 전분, 감자 전분, 쌀 전분, 보리 전분, 콩 전분, 아마란스 전분, 밀 전분, 사고(sago) 전분, 수수(sorghum) 전분, 쿠즈(kuzukiri) 전분, 동두 전분, 녹두 전분 및 바나나 전분으로 구성된 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 전분의 양은 5 내지 20 mg인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 단백질 검출단계는 SDS-PAGE를 이용하여 단백질을 크기별로 분석하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 SDS-PAGE에 사용되는 겔 농도는 8-12%인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 SDS-PAGE에 투입되는 단백질 추출용액의 양은 10-100 μ l 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 4항에 있어서, 상기 SDS-PAGE를 이용하여 크기별로 분리된 단백질을 은 염색(silver staining)을 이용하여 전분 종(種) 특이단백질을 검출하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 약 32 kDa 및 21kDa의 단백질 밴드들이 검출되면 옥수수 전분이 혼입된 것으로 판단하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 7항에 있어서, 약 60 kDa 이하의 여러 단백질 밴드와 약 95 kDa의 단백질 밴드가 검출되면 감자 전분이 혼입된 것으로 판단하는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 전분에서 타 전분의 혼입 확인 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 전분에 완충용액을 가한 후 호화시켜 단백질을 추출하는 단계, 및 상기 단백질 추출용액으로부터 전분 종(種) 특이적 단백질을 검출하는 단계를 포함하는 전분에서 타 전분의 혼입 여부를 확인하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

식물로부터 유래한 전분은 식품, 섬유, 제지, 제약 등 다양한 제품의 원료로 이용되고 있다. 현재 전 세계적으로 많이 사용되고 있는 전분 원료로는 고구마, 쌀, 옥수수, 감자, 타피오카, 밀 등이다. 하지만 일부전분은 타

전분에 비해 가격이 높아 원가부담을 줄여야 하는 업체 입장에선 값싼 여러 전분을 고가의 전분에 혼입하여 사용하고 있다.

[0003] 아밀로오스와 아밀로펙틴으로 이루어진 전분은 ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase), starch synthase (SS), starch branching enzyme (SBE), 및 debranching enzyme (DBE)의 작용으로 합성되고, 아밀로펙틴은 amyloplast 내 가용성 부위에 들어있는 SS와 SBE 및 DBE에 의하여 전분립으로 정교하게 가공되는 것으로 알려져 있다 [작물과학연구논총 제6권 (Treat. of crop sci.) : 401-429 (2005) Vol.6]. 전분립과 단단히 결합된 starch synthase도 존재하는데, 분자량 기준으로 옥수수는 10-27kDa zein, 32kDa granule-intrinsic protein, 60kDa granule-bound starch synthase (GBSS), 76kDa Starch synthasesI (SSI) 85kDa Starch branching enzyme (SBEIIb) 단백질로 보고된 바 있으며 [Cereal Chem.(2005) 82(6):739-742]. 선행된 연구에 의하면 22kDa, 19kDa인 α (알파)-Zein 단백질을 웨스턴 블로팅(western blotting)을 이용하여 검출하였다 [Plant Physiol. Vol. 134, 2004].

[0004] 따라서, 본 발명자들은 전분 원가의 절감을 위한 타 전분의 불법적인 혼입을 확인하거나 전분원료를 규명하기 위하여, SDS-PAGE 및 은 염색 반응으로 단백질을 분리 검출함으로써 전분 중(種)에 따른 특이적인 단백질을 기준으로 전분의 혼입 및 출처를 확인 할 수 있는 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0005] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 호화된 전분으로부터 추출된 단백질을 분석함으로써 전분에서 타 전분의 혼입 여부를 신속하게 확인하는 방법을 제공하는 데 있다.

과제 해결수단

[0006] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 전분 또는 전분제품에 완충용액을 가한 후 호화시켜 단백질을 추출하는 단계, 및 상기 단백질 추출용액으로부터 전분 중(種) 특이적 단백질을 검출하는 단계를 포함하는 전분에서 타 전분의 혼입 여부를 확인하는 방법을 제공한다.

[0007] 본 발명에서는 전분으로부터 단백질을 추출하기 위해 전분 또는 전분 가공제품을 완충용액에서 호화시킨 후, 단백질을 추출하여 추출된 단백질을 분석함으로써 전분의 혼입 및 출처를 확인하였다.

[0008] 본 발명의 방법에서, 상기 전분은 식물로부터 유래한 전분일 수 있으며 그 종류는 특별히 한정되지 않으나, 바람직하게는 옥수수 전분, 고구마 전분, 감자 전분, 쌀 전분, 보리 전분, 콩 전분, 아마란스 전분, 밀 전분, 사 고(sago) 전분, 수수(sorghum) 전분, 쿠즈(kuzukiri) 전분, 동두 전분, 녹두 전분 및 바나나 전분으로 구성된 군에서 선택된 것을 사용할 수 있다.

[0009] 상기 전분 가공제품을 분석하는 경우에는, 단백질 추출을 용이하게 하기 위해 전분제품(예: 당면)을 으개는 과정 또는 분말화를 수행한 후 완충용액에 호화시켜 단백질을 추출할 수 있다.

[0010] 본 발명의 방법에서 사용되는 전분의 양은, 전분 제품으로부터 단백질을 검출하기 위한 시료로서 적절한 양이 사용될 수 있으나, 바람직하게는 5 내지 20 mg이 사용될 수 있다.

[0011] 구체적으로, 상기과 같이 소량(5-20mg)의 전분만으로도 단백질 검출이 가능하며, 사용되는 완충용액의 양은 전분 사용량에 따라 달라진다. 상기 완충용액은 전분 내 단백질의 결합을 끊어주거나 구조를 변화시켜 추출을 용이하게 하고 2-mercaptoethanol과 sodium dodecyl sulfate(SDS)를 포함할 수 있다. 또한 상기 완충용액은 단백질에 전하(electric charge)를 부여하여 SDS-PAGE Gel에서 효과적으로 단백질을 분석할 수 있게 한다.

[0012] 전분의 양이 많고 완충용액의 양이 적은 경우에는, 호화된 시료의 농도가 높아져 SDS-PAGE 등과 같은 단백질 분석 방법을 사용하는데 어려울 수 있다. 또한 추출된 단백질과 전분의 상 분리를 방지하기 위하여, 전분 호화 과정 중 교반을 시행하는 것이 바람직하다.

[0013] 일반적으로, 전분의 호화란 전분에 물을 붓고 열을 가하면 전분입자는 물을 흡수한 후 팽창하여 70-75℃ 정도가 되면 전분입자가 크게 팽창하고 전체가 점성이 높은 반투명의 콜로이드(colloid) 상태가 되는 것을 의미한다.

[0014] 본 발명에서는 상기 전분을 물이 아닌 완충용액과 함께 70-100℃의 온도로 20-60 분간 가열하면, 분자들이 규칙적으로 배열된 미셀(micell)구조 사이에 용액이 침투, 전분이 팽윤(swelling)하여 전분 입자가 붕괴되고, 이로

인하여 미셀구조가 파괴되면서 전분 내부에 존재하는 단백질이 용출된다. 이렇게 하면 단백질 함량이 적은 전분 종(種)도 소량(약 10mg)으로부터 단백질을 추출할 수 있으며, 본 발명에서는 2 ng의 단백질까지도 검출할 수 있는 은 염색(silver staining)을 활용함으로써, 경제적이며 효율적인 분석을 할 수 있음을 확인하였다. 또한 상기 단백질을 분석하는 다른 방법으로 종(種) 특이적 단백질에 항체(antibody)를 활용하여 웨스턴 블로팅(western blotting)을 적용할 수도 있다.

- [0015] 본 발명의 방법에서, 상기 단백질 검출단계는 SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate poly acrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 단백질을 크기별로 분석하는 것이 바람직하다.
- [0016] 또한, 상기 SDS-PAGE에 사용되는 겔 농도는 8-12%가 적당하고, 상기 SDS-PAGE에 투입되는 단백질 추출용액의 양은 20-100 μ l 가 바람직하다.
- [0017] 본 발명에서, 상기 SDS-PAGE를 이용하여 크기별로 분리된 단백질을 은 염색(silver staining)을 이용하여 전분 종(種) 특이단백질을 검출하는 것을 특징으로 한다.
- [0018] 상기 단백질 검출단계에서, 단백질 추출용액은 전분 호화 후 전분 및 비 단백질 물질을 제거한 순수 단백질 추출용액일 수 있으나, 전분을 호화시킨 후 다른 성분을 제거하지 않은 서스펜션 상태(suspension) 즉, 추출된 단백질 및 전분이 같이 공유하고 있는 용액이 바람직하며, 이를 SDS-PAGE 겔에서 분석하면 간편하고 신속하게 결과를 얻을 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 이러한 단백질 추출용액을 이용하여 타 전분 혼입 여부를 충분히 확인할 수 있음을 증명하였다.
- [0019] 또한 상기 단백질 검출단계에서, SDS-PAGE를 위한 단백질 추출용액의 사용량은 전분 내 단백질 함량 및 전분 출처에 따라 달라진다. SDS-PAGE를 활용하여 단백질 크기를 분석할 때 단백질 추출 용액의 양은 10-100 μ l가 적당하며, 사용량이 10 μ l 보다 적어 단백질 농도가 적으면 은 염색이라도 단백질 밴드를 뚜렷이 확인하기 어려울 수 있고, 100 μ l 이상일 경우에는 단백질 밴드가 너무 진해져 타 전분의 특이적인 단백질 밴드와 겹쳐지므로 분석하기 어렵게 된다.
- [0020] 또한 상기 검출단계에서, 특이적으로 발현되는 약 32 kDa 및 21kDa 단백질 밴드가 검출되면 옥수수 전분이 혼입된 것으로 판단하고, 약 60 kDa 이하의 여러 단백질 밴드와 약 95 kDa의 단백질 밴드가 검출되면 감자 전분이 혼입된 것으로 판단하는 것을 특징으로 한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.
- [0022] **실시예 1. 전분에서 타 전분 혼입을 확인하기 위한 SDS-PAGE 단백질 분석**
- [0023] 1) 전분 및 제조한 당면에서 단백질 추출 단계
- [0024] 고구마 전분 (Jiangsu jinwu general foods company, China), 옥수수 전분 (Samyang Genex Company, Korea), 감자 전분 (Avebe veendam, Germany), 쌀 전분 (Odae rice, Korea에서 얻은 생쌀을 alkaline 침지법으로 추출한 것)을 사용하였다.
- [0025] 고구마 및 쌀 전분을 기준으로 타 전분이 혼합된 혼합전분과, 혼합전분으로 제조된 당면에서 타 전분의 유입을 확인하고자, 소량(10 mg)의 전분 및 당면을 1.5 ml 원심분리용 튜브(centrifuge tube) 안에서 완충용액(2% 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 10% glycerol, 66mM Tris-cl) (pH 6.8) 약 400 μ l 을 가한 후 끓는 물에서 증탕으로 약 30분 동안 호화시켰다 (도 1 참조).
- [0026] 2) SDS-PAGE의 은 염색(silver staining)을 이용한 단백질 분석 단계
- [0027] SDS-PAGE (Mini-vertical gel electrophoresis; Hoefer SE-520) 겔에 단백질 추출용액 40-50 μ l를 투입하여 서브유닛(subunits) 별로 단백질을 분리한 후, 은 염색을 활용하여 단백질 밴드를 분석하였다. 은 염색 과정은 간단하게 설명하면 다음과 같다.
- [0028] 상기 분석된 SDS-PAGE Gel을 3차 증류수로 세척한 후, 플라스틱 용기에서 fix solution (40% ethanol, 10% acetic acid)에 하루정도 shaking하며 해 줍니다. fix solution을 버린 후 50% 에탄올(fix solution을 세척하는 단계)로 30분 동안 shaking 하며 세척을 3회 시행한다. 이 후 sodium thiosulfate pentra-hydrate 용액(단백질 밴드를 sensitive 하게 하는 단계)에서 2분 shaking 해준다. 2분 경과 후, sodium thiosulfate pentra-

hydrate 용액을 버리고, 3차 증류수로 30초 동안 shaking 하며 3회 세척한다. 이 후 silver nitrate (SIGMA)로 만든 silver staining solution을 30분 반응시킨다. 30분 경과 후, silver staining solution을 버리고, 3차 증류수로 30초 동안 shaking하며 세척한 후 sodium carbonate (SIGMA)용액으로 반응(develop 단계)시켜 단백질 밴드 패턴을 확인한다. 밴드 패턴을 확인한 후, sodium carbonate 용액을 버리고, 다시 fix solution을 30분 정도 담그고 SDS-PAGE Gel에 나타난 밴드를 고정 시켜준다.

[0029] 시험예 1. 혼합전분에서 타 전분의 유입 여부 분석결과

[0030] 도 3은 고구마 전분을 기준으로 옥수수 전분 및 감자 전분이 혼합된 혼합전분을 10% 함량인 SDS-PAGE를 이용하여 분석한 결과이다. 도 3a는 대조군으로서 옥수수, 고구마, 감자 전분의 SDS-PAGE 결과이고, 도 3b는 혼합전분 즉, 고구마/옥수수 (혼합비 1:1), 고구마/감자 (1:1), 고구마/옥수수/감자 (1:1:1)의 SDS-PAGE 결과이다.

[0031] 분석결과 도 3b에서와 같이, 고구마 전분에 옥수수 전분이 혼합된 경우, 도 3a의 대조군에서 나타나는 옥수수 단백질 밴드와 동일한 옥수수 특이적인 약 32 kDa 및 21 kDa의 단백질 밴드를 확인할 수 있었으며, 이로써 옥수수 전분이 혼입되었음을 판단할 수 있었다. 또한 감자 전분이 혼합된 경우, 대조군에서 나타나는 감자 단백질 밴드와 동일한 감자 특이적인 60 kDa 이하에서의 여러 밴드(도 3a 참조)와 약 95 kDa에서 단일 밴드를 확인할 수 있었으며, 이로써 감자 전분이 혼입되었음을 판단할 수 있었다.

[0032] 도 4는 고구마 전분, 옥수수 전분 및 감자 전분을 혼합하여 제조한 당면(도 2 참조)을 10% 함량인 SDS-PAGE를 이용하여 분석한 결과이다. 도 4a는 대조군으로서 옥수수, 고구마, 감자 전분으로 제조된 당면의 SDS-PAGE 결과이고, 도 4b는 혼합전분 즉, 고구마/옥수수 (혼합비 1:1), 고구마/감자 (1:1), 고구마/옥수수/감자 (1:1:1)로 제조된 당면의 SDS-PAGE 결과이다.

[0033] 분석결과, 상기 도 3의 결과와 마찬가지로 혼합전분으로 제조된 당면에서 옥수수 특이적인 단백질 밴드와 감자 특이적인 단백질 밴드를 각각 확인할 수 있었으며, 이로써 옥수수 및 감자전분이 혼입되었음을 판단할 수 있었다.

[0034] 도 5는 쌀 전분을 기준으로 옥수수 전분 및 감자 전분을 혼합하여 제조한 당면을 10% 함량인 SDS-PAGE를 이용하여 분석한 결과이다. 도 5a는 대조군으로서 쌀, 옥수수, 감자 전분으로 제조한 당면의 SDS-PAGE 결과이고, 도 5b는 혼합전분 즉, 쌀/옥수수 (혼합비 1:1), 쌀/감자 (1:1), 쌀/옥수수/감자 (1:1:1)로 제조한 당면의 SDS-PAGE 결과이다.

[0035] 분석결과, 쌀 전분에 옥수수 전분을 혼합하여 제조한 당면의 경우에도 도 3, 4와 마찬가지로, 도 5a의 대조군에서 나타나는 옥수수 전분 단백질 밴드 및 감자 전분 단백질 밴드와 동일한 특이적인 단백질 밴드를 확인할 수 있었다.

[0036] 시험예 2. 혼합전분에서 타 전분의 혼입 농도에 따른 분석결과

[0037] 상기 시험예 1에서 확인된, 10% 함량인 SDS-PAGE의 종(種) 특이적 단백질 밴드(32 kDa 및 21 kDa의 옥수수 밴드와, 60 kDa 이하 및 95 kDa의 감자 밴드)를 증명하고자, 각 종(種)마다 추출한 단백질 용액을 농도별(5:1, 3:1, 1:1, 1:3 및 1:5)로 섞고 SDS-PAGE의 함량을 달리하여 밴드를 분석하였다.

[0038] 도 6에서, 옥수수 특이적인 단백질인 약 32 kDa 및 21 kDa의 밴드를 증명하고자 약 15 kDa에서 60 kDa까지의 단백질을 구분할 수 있는 12% 함량인 SDS-PAGE를 사용하여 분석하였다. 분석결과, 고구마 및 옥수수 전분에서 얻은 단백질 추출 용액(10 μ l)을 농도별로 혼합한 경우, 도 6a의 대조군에 나타난 옥수수 밴드들과 도 6b의 혼합 비율에 따른 단백질 밴드가 서로 일치함을 확인하였다.

[0039] 도 7에서, 감자 전분의 특이적 단백질인 약 60 kDa 이하에서 형성된 밴드를 증명하고자 12% 함량인 SDS-PAGE를 이용하여 고구마 전분과 감자 전분에서 얻은 단백질 추출 용액(10 μ l)을 농도별로 섞어 관찰한 결과, 도 7a의 대조군에 나타난 감자밴드(95kDa)와 도 7b의 혼합비율에 따른 단백질 밴드가 서로 일치하며, 도 3, 4 및 5에서의 대조군인 감자 단백질 밴드 약 60Kda 이하의 밴드들, 그리고 특이적으로 큰 약 95KDa 밴드를 확인하였다.

[0040] 도 8에서, 도 3, 4 및 5에서의 감자 대조군에서 나타난 특이적으로 높은 약 95 kDa의 단백질 사이즈를 증명하고자, 30 내지 130 kDa까지의 단백질 크기를 구분할 수 있는 8% 함량인 SDS-PAGE를 이용하여 나타난 결과, 대조군인 감자 단백질 밴드 및 혼합전분에서 나타나는 밴드는 도 3, 4 및 5에서의 대조군인 감자 단백질 밴드와 동일한 약 95 kDa 크기임을 확인하였다.

[0041] 상기 분석 결과들의 SDS-PAGE 상의 사진에서, 각 사진에서 나타나는 밴드 색깔 및 단백질이 내려간 크기의 미세

한 차이는 SDS-PAGE의 함량(%) 및 그에 따른 은 염색 반응시간의 차이로 인한 것으로 판단된다.

산업이용 가능성

[0042] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 전분을 호화시킨 후 이로부터 단백질을 추출하고 분석함으로써 전분에 혼입된 타 전분을 신속하게 확인할 수 있다. 따라서 본 발명의 방법은 전분제품에서 불법적인 타전분의 혼입, 전분원료의 분석 등 다양한 식품분야에 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 본 발명에 따른 타 전분 혼입 확인방법을 도식화한 것이다.

[0044] 도 2는 본 발명의 실험예에 사용된 당면의 제조방법을 도식화한 것이다.

[0045] 도 3은 고구마 전분을 기준으로 옥수수 전분 및 감자 전분이 혼합된 혼합전분을 10% 함량인 SDS-PAGE를 이용하여 분석한 결과이다.

[0046] 도 4는 고구마 전분, 옥수수 전분 및 감자 전분을 혼합하여 제조한 당면을 10% 함량인 SDS-PAGE를 이용하여 분석한 결과이다.

[0047] 도 5는 쌀 전분을 기준으로 옥수수 전분 및 감자 전분을 혼합하여 제조한 당면을 10% 함량인 SDS-PAGE를 이용하여 분석한 결과이다.

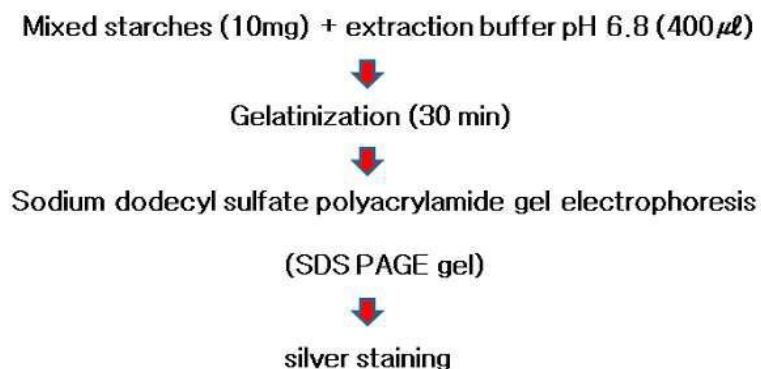
[0048] 도 6은 고구마 전분과 옥수수 전분에서 각각 추출한 단백질 용액을 농도별로 혼합한 후 12% SDS-PAGE 분석한 결과이다.

[0049] 도 7은 고구마 전분과 감자 전분에서 각각 추출한 단백질 용액을 농도별로 혼합한 후 12% SDS-PAGE 분석한 결과이다.

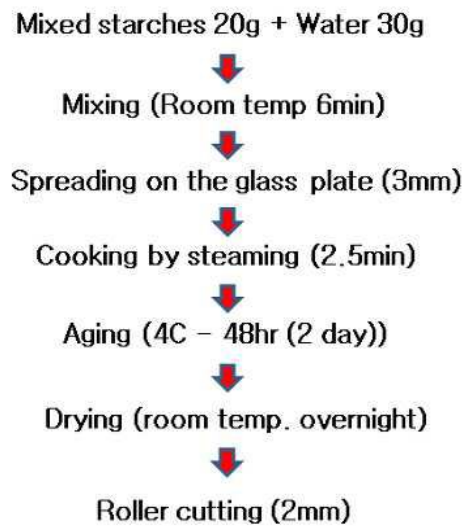
[0050] 도 8은 고구마 전분과 감자 전분에서 각각 추출한 단백질 용액을 농도별로 혼합한 후 8% SDS-PAGE 분석한 결과이다.

도면

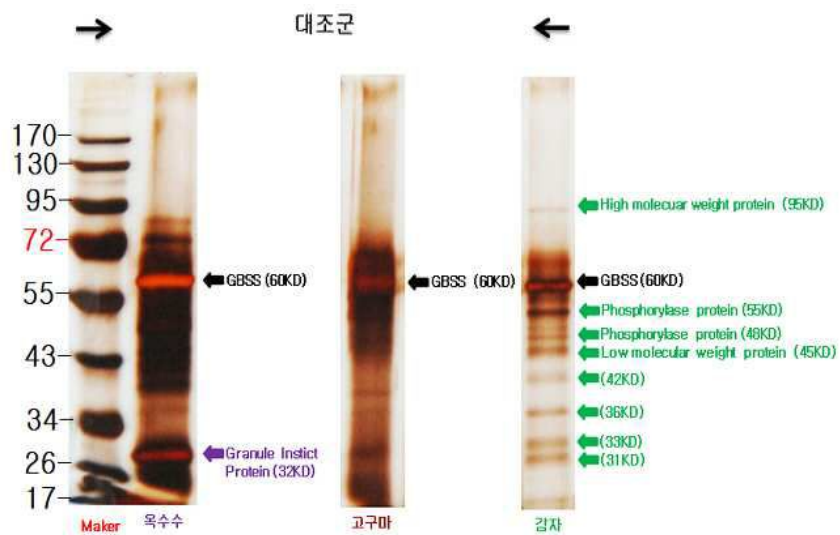
도면1



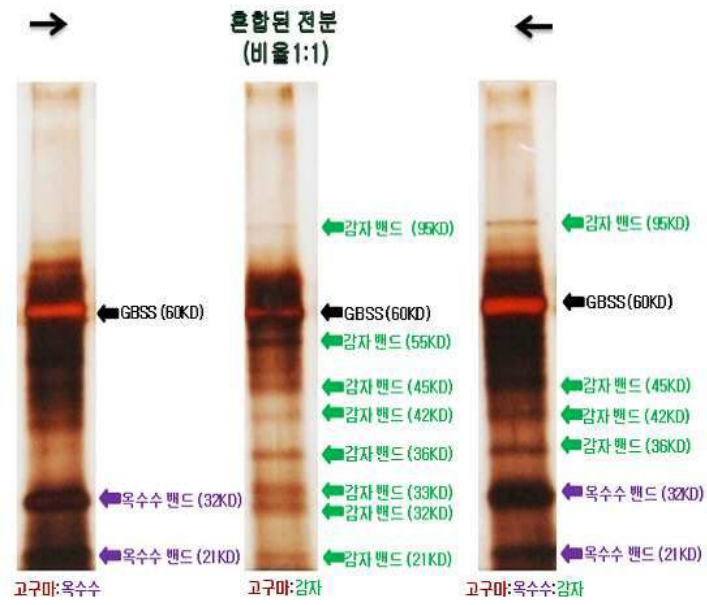
도면2



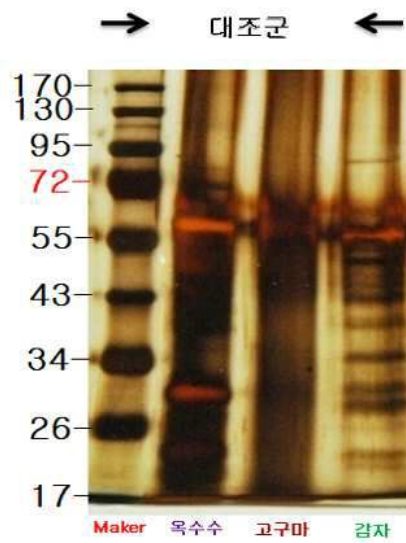
도면3a



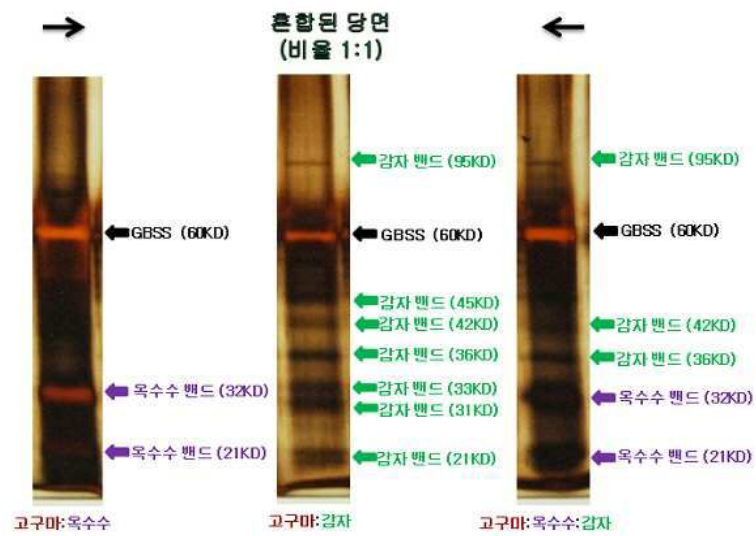
도면3b



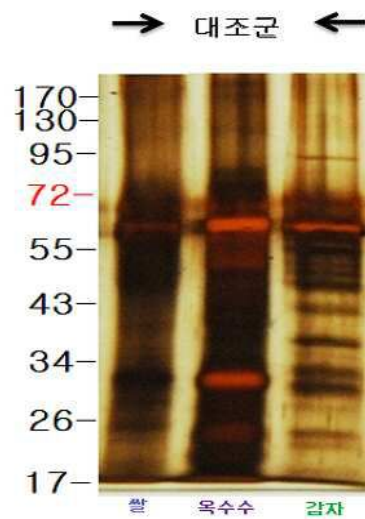
도면4a



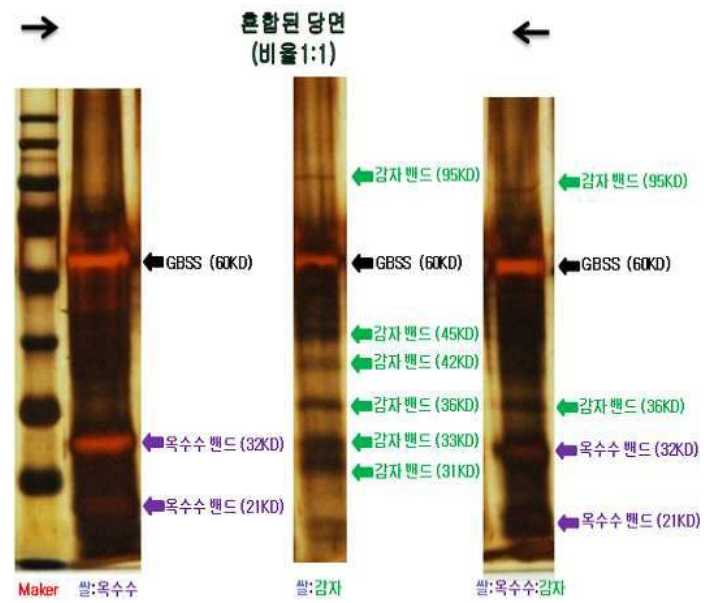
도면4b



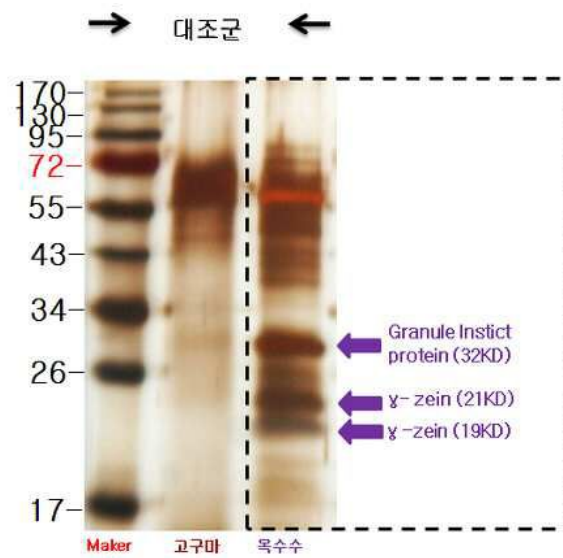
도면5a



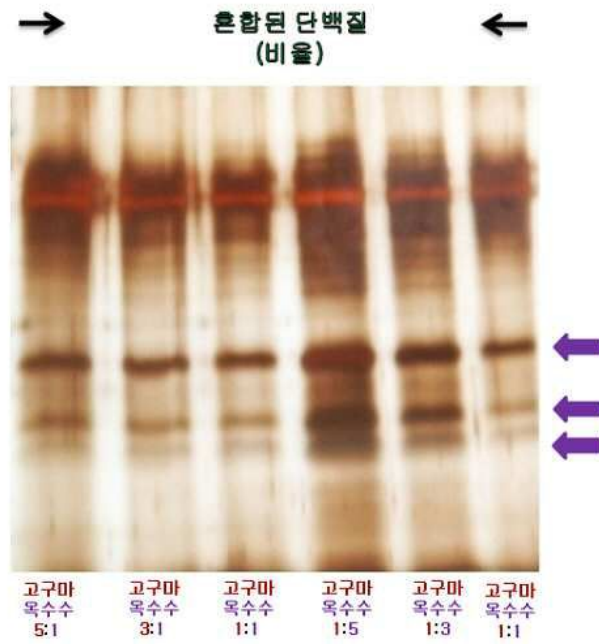
도면5b



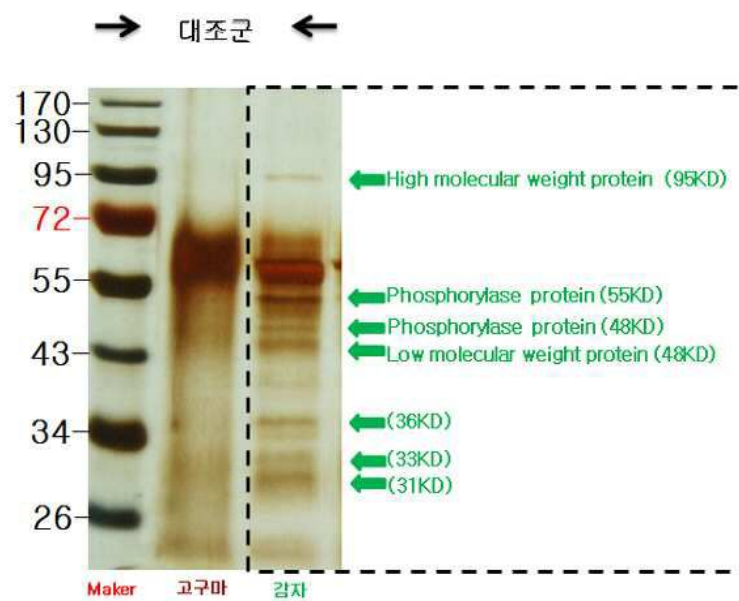
도면6a



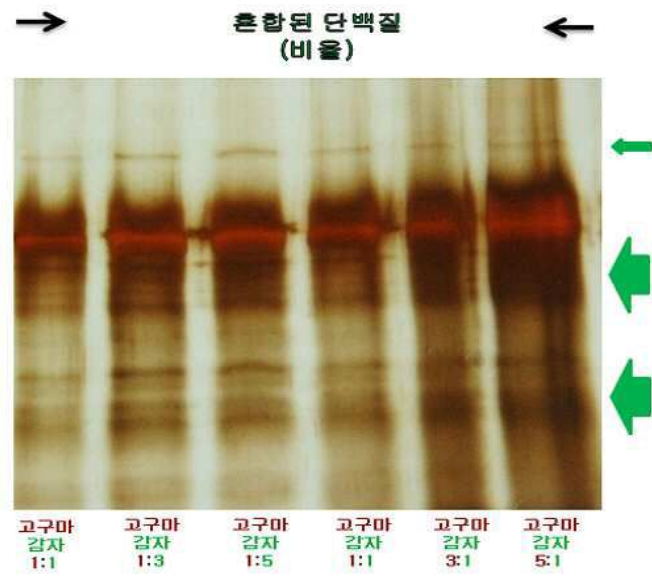
도면6b



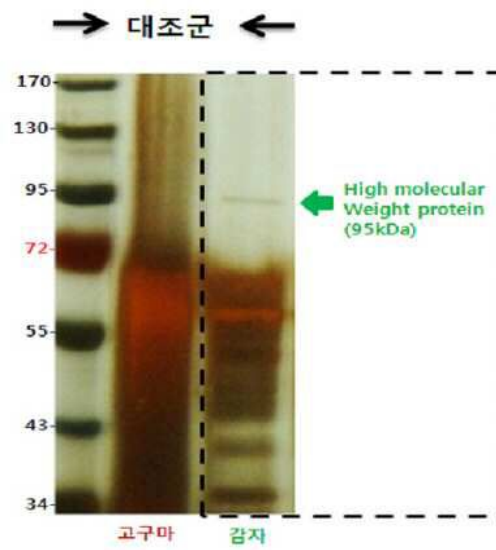
도면7a



도면7b



도면8a



도면8b

