

대두단백질 가수분해물의 쓴맛 펩타이드 구조와 특징

고려대학교 생명공학원 이철호

- 요약 -

단백질의 부분 가수분해는 산성 음료에서의 용해도 증가, 환자들의 소화력과 알리지 내성의 개선, 다른 기능적 특성의 개발 등을 위하여 식품산업에 널리 이용되고 있다. 그러나 우유 단백질이나 대두 단백질과 같은 몇 가지 단백질들은 가수분해에 의하여 강한 쓴맛을 형성한다. 단백질 가수분해물의 쓴맛에 관한 연구는 1950년대 초에 시작되었으며, 여러 가지 원료로부터 쓴맛 물질이 분리되었다. 이들 단백질 가수분해물의 쓴맛 물질은 올리고펩타이드로 알려져 있으며, 펩타이드 분자를 구성하는 소수성 아미노산의 존재와 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 최근에 발달된 분석기술과 생명공학적인 기법으로 *E. coli*에서 생산한 콩 단백질 단일 subunit를 이용하여 효소적 가수분해물의 분자구조를 확인하고자 하였다.

탈지대두박으로부터 11S glycinin과 *E. coli*에서 발현된 proglycinin을 각각 90%, 97%의 정제도로 분리하여 이들 단백질을 trypsin으로 각각 가수분해하였다. 11S glycinin은 효소/기질 비 3%에서 4시간 가수분해에 의해 14.0×10^{-5} M quinine-HCl equivalent의 강한 쓴맛을 나타내었으며, 12%의 가수분해도(DH)를 나타내었다.

대두 단백질의 쓴맛 성분을 확인 위하여 이미 아미노산 서열이 밝혀진 11S glycinin과 proglycinin 가수분해물에서 GP-HPLC, C₁₈ RP-HPLC 등을 통하여 쓴맛 peptide들을 분리하였다. 각각의 분획은 다시 21개의 peptide로 분리되어 그 서열이 결정되었으며 이중 RP와 GI는 이미 알려진 쓴맛 dipeptide였고, LAGNQEQE, SAEFG, NALPE, KLHENIAR, GMIYPG 등이 주된 쓴맛 peptide로 확인되었다. 이들은 11S glycinin의 5개의 subunit중에서 그 위치가 확인되었다. Proglycinin 가수분해물에서도 11S glycinin과 같은 방법으로 7개의 쓴맛 peptide가 분리되었다. 이들은 A_{1a}B_{1b}의 아미노산 서열 중에서 37-42, 103-110, 164-167, 323-327, 367-373의 위치에 분포하고 있었으며, NALKPD, IYPGCPST, SIIDT, HNIGQT, NAMFVPH의 서열을 나타내었다. 분리된 쓴맛 peptide 중에서 가장 쓴 두 분획의 peptide를 합성하여 관능 검사한 결과, NALPE는 매우 쓴맛을 내는 peptide로 확인되었다.

제 1장. 서론

효소 처리에 의한 단백질 가수분해물은 체내 소화 흡수를 용이하게 하는 영양 성분의 공급 이외에도 식품의 첨가물로 이용되어 식품의 기능성을 향상시키거나 맛을 부여하여 기호성을 증진시키는 데 이용된다. 대부분의 식품 단백질이 pH 4 - 5에서 불용성인데 비해, 단백질 가수분해물은 용해성이 뛰어나고 점도가 낮아 공정 작업이 수월하다. 또 기포성과 유화성이 뛰어나며 단백질 원형과는 달리 열에 대한 변성도 적은 장점을 가지고 있어 식품의 기능성 향상에 널리 이용되고 있다³⁾. 또한 식품의 기호성을 향상시키는 역할을 하고 있는데, 단백질 가수분해물의 구성 peptide가 관여하는 맛의 발현에는 aspartic acid와 phenylalanine으로 구성되어 단맛을 내는 aspartame을 대표로 하여 여러 아미노산이 관여하여 짠맛, 신맛, 쓴맛 그리고 구수한 맛을 낸다^{4, 5)}. 최근에는 식품 peptide들이 나타내는 다양한 생리 기능성인 항암성, 항알러지성, 고혈압 저하, 항콜레스테롤성 등의 3차 기능 때문에 그의 이용성은 더욱 증대되고 있다.

그러나 효소 가수분해시에 생성되는 쓴맛은 단백질 가수분해물의 산업화를 제한하는 요인이 되고 있다. 단백질 가수분해물의 쓴맛은 가수분해 과정에서 유리되는 peptide 때문이라는 사실은 오래 전부터 알려져 왔으며, 이들 쓴맛 peptide의 분리와 성분 규명의 대해서 많은 연구가 진행되어 왔다. Matoba and Hata⁶⁾, Fujimaki *et al.*⁷⁾, Wieser and Belitz⁸⁾ 등의 연구자들에 의해 casein, 대두 단백질, 옥수수 zein 등에서 쓴맛 peptide가 분리되고 그 쓴맛 형성 기작에 대해 연구되었다. Wieser and Belitz⁸⁾는 작은 크기의 peptide들의 쓴맛과 소수성과의 정량적인 상관성을 조사하여 보고하였다. 그들은 쓴맛 발현에 필요한 구조적 요인으로 분자내 약 3Å 떨어진 위치에 극성기와 소수성기가 존재한다는 사실을 지적하고, 쓴맛을 내는 필수요건이라고 제안하였다. Matoba and Hata⁹⁾는 소수성 아미노산 잔기에 의해 쓴맛이 인지되며, peptide내의 구성 아미노산들은 서열에 상관없이 독립적으로 쓴맛에 관여한다고 보고하였다. 또한 원래의 구형단백질 분자는 대부분의 소수성기가 소수성 결합에 의해 안으로 감추어져 혀의 미뢰와 반응할 수 없으므로 쓴맛을 나타내지 않으나, 가수분해에 의해 생성된 peptide의 경우, 소수성기가 밖으로 노출되면서 혀의 미뢰와 반응하여 쓴맛을 형성한다고 하였다. Adler-Nissen³⁾도 가수분해도(Degree of Hydrolysis, DH)와 쓴맛과의 관계와 그 형성 기작에 관하여 광범위한 연구를 수행하였으며, 위의 의견에 동의하였다. 또한 casein이나 대두 단백질의 부분 가수분해에서 생성되는 쓴맛은 아미노산이 7 - 20개 결합된 oligopeptide들이 내는 맛이며, 가수분해도를 조정하여 이 크기 이상의 peptide를 생성시켜 쓴맛을 피할 수 있다고 하였다.

Peptide가 쓴맛을 내는 요인에 대해서는 많은 학설이 제창되고 있다. 먼저 Ney¹⁰⁾에 의해 제안된 Q-rule에서는 peptide 전체 분자가 가지고 있는 평균 소수성이 1400 cal/mole 이상이면 쓴맛을 내며 쓴맛의 강도는 소수성에 비례한다고 하였다. 이 rule은 분리된 쓴맛 peptide에 일반적으로 성립되고 있으며 쓴맛 peptide 연구의 중심 이론이 되고 있다. 그러나 예외도 있어 많은 경우에 소수성 하나만으로 설명되지 않고 있다. 즉 평균 소수성 1300 cal/mole 이하의 값을 가지지만 쓴맛을 내는 peptide가 존재하며, 같은 분자로 구성되어 있고 1400 cal/mole 이상을 나타내지만, 고리화, 입체 이성질 아미노산의 치환 등에 의해 쓴맛의 강도가 변하는 경우 등이 발견되고 있다¹¹⁾.

Peptide가 쓴맛을 내는 다른 요인 중의 하나는 쓴맛 아미노산의 존재와 분포이다. 예를 들면 쓴맛을 내는 주요 아미노산의 하나인 leucine은 대부분의 쓴맛 peptide에 존재하며, 대두 단백질의 경우 쓴맛 peptide중 leucine의 함량이 29%를 차지하고 있다. 이 경우 쓴맛 peptide의 C-말단에서의 leucine의 분포는 65%에 해당하며, N-말단에서는 대부분이 arginine과 leucine이었다. 또한 분리된 쓴맛 peptide를 분석해보면 leucine, phenylalanine, valine, isoleucine등의 쓴맛을 내는 소수성 아미노산의 분포가 전체의 약 50%에 해당하는 것으로 나타났다(12). 이들의 영향에 대해서는 Shinoda *et al.*(13, 16), Otagiro *et al.*(14), Nosho *et al.*(15), Ishibashi *et al.*(17) 등에 의해 Leu, Phe, Tyr, Pro등의 소수성 아미노산들이 포함된 합성 peptide의 쓴맛에 대한 연구 등에서 광범위하게 조사되었으며, 이들의 결과에서 C-말단에 소수성 아미노산이 존재하고, N-말단에 염기성 아미노산이 위치할 때 쓴맛이 난다고 보고되었다.

또한 쓴맛을 내는 세 번째 요인은 아미노산의 서열에서 유래되는 공간적 구조 요인이라고 할 수 있다. 이는 일본학자들에 의하여 주로 연구되었는데, 그들은 casein에서 분리한 강한 쓴맛을 가진 peptide를 model peptide로 하여 이와 유사한 구조의 analogue들을 합성하고 쓴맛 peptide의 구조와 맛과의 상관 관계를 연구하였다(18). 주요 쓴맛 peptide인 BPIa(Bitter Peptide I: RGPPFIV)에 대한 연구에서 retro-BPIa와 cyclo-BPIa의 경우는 원래의 BPIa의 쓴맛과 거의 같으며, 이의 공간적 구조를 CD(circular dichroism)를 통해 측정된 결과 서로 비슷한 구조를 보임을 알 수 있었으며, 이때의 중요 요인이 proline이라 생각된다고 하였다(18). 그러나 결국 이와 같은 오랜 연구에도 불구하고 쓴맛 peptide의 원인이 되는 구체적인 구조적 특징 및 쓴맛의 정확한 인식 기작 등은 아직도 밝혀지지 않고 있으며, 소수성 아미노산의 분포, peptide의 소수성, 혹은 쓴맛 peptide가 나타내는 공간적 구조 등이 총체적으로 규명되어야 할 것이다.

본 연구에서는 자체내 유사성이 80% 정도 존재하는 대두 단백질 11S glycinin과 glycinin의 한 subunit A1aB1b를 생산하는 gene을 *E. coli*에 cloning하여 발현시킨 proglycinin(20)을 분리하여 내고, 이들을 모델 단백질로 사용하여 쓴맛을 내는 아미노산의 배열 순서를 밝혀 내고자 한다. 대두 단백질의 한 subunit인 A1aB1b에서 유래하는 쓴맛 peptide들의 아미노산 배열 순서를 알면 이들이 유리되는 수준을 낮출 수 있는 방법이 개발될 수 있을 뿐만 아니라, 쓴맛을 감지하는 인간의 관능적 인지 mechanism을 설명하는 일에도 도움을 줄 수 있을 것이다. 따라서 쓴맛 peptide들의 아미노산 서열규명 및, 구조적 특징과 쓴맛과의 관계 규명이 필요하며, 이를 위해 밝혀진 주요 쓴맛 peptide의 아미노산 서열을 변경, 합성하여 구조 변경에 의한 쓴맛의 변화를 공간적인 3차 구조 분석을 통해 설명하고, 쓴맛의 형성 mechanism을 규명하고자 하였다.

제 2장. 연구 방법 및 이론

1. 실험 재료

1) 탈지 대두박

본 실험에서 사용된 탈지 대두는 (주)광일에서 구입하였고, 일반 성분은 단백질, 탄수화물, 지방, 수분이 각각 57, 20.9, 1.1, 9.8% 였다.

2) Host cell

Host cell은 *E. coli* strain JM105이며 LB 배지에서 배양되었다. Expression plasmid는 pKGA1aB1b-3이며, glycinin A1aB1b subunit 전구체를 encoding하는 cDNA의 N-terminal에서 9 개의 bp가 부족하고 3'-noncoding 부분에 30 bp를 가진 plasmid이다. 이러한 plasmid를 가진 *E. coli*는 일본 Kyoto 대학의 Utsumi와 Kim등(22, 23)에 의해 개발되어 제공받았다.

2. 실험 방법

1) 11S glycinin과 proglycinin의 분리

(1) 11S glycinin의 분리(22, 23)

탈지 대두박과 0.01 M β -mercaptoethanol(ME)을 함유한 0.03 M Tri-HCl (pH 8.0) buffer를 1 : 20의 비로 혼합하여 1 시간 동안 실온에서 교반한 뒤, 4°C, 12,000×g에서 20 분간 원심 분리하여 상등액을 얻고, 이를 2 N HCl을 이용하여 pH 6.4로 조정하였다. 30 분간 교반한 후, 4°C, 12,000×g에서 원심 분리한 침전물을 0.03 M Tris-HCl(pH 6.4) buffer(+0.01 M ME)로 3 번 씻은 다음, standard buffer(0.0325 M K₂HPO₄, 0.0026 M KH₂PO₄, 0.4 M NaCl, 0.01 M ME, 0.02% NaN₃, pH 7.6)에 녹였다. NaCl로 1 M이 되도록 용액 농도를 조정한 후에 Con A-Sepharose 4B affinity chromatography를 실시하였다(Table 1). 여기서 얻어진 11S 분획을 모아 증류수에서 하루동안 투석하였다. SDS-PAGE를 이용하여 분리 정도를 확인하였고, 확인된 시료는 동결 건조하여 -20°C에서 보관하였다.

(2) SDS-PAGE

분리 과정의 확인은 Laemmli(51)의 방법으로 10% sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gel을 사용하였으며, Coomassie brilliant blue G-250으로 염색하였다. 표준 분자량 marker는 myosin(200 kD), phosphorylase(97.4 kD), bovine serum albumin(68 kD), ovalbumin(43 kD), carbonic anhydrase(29 kD), β -lactoglobulin(18.4 kD), lysozyme(14.3 kD)등을 사용하였다. 각 분리 단계의 상대적인 양은 Gel-Pro analyzer(Media Cybernetics, USA)를 이용하여 측정하였다.

Table 1. Condition of ConA-Sepharose 4B affinity chromatography

Column size : 1.5×30 cm
Flow rate : 15.2 ml/h
Temp. : room temp.
Buffer : standard buffer (0.0325 M K ₂ HPO ₄ , 0.0026 M KH ₂ PO ₄ , 1 M NaCl, 0.01 M ME, 0.02% NaN ₃ , pH 7.6)

(3) 단백질 정량

단백질의 농도는 Bradford(52)의 방법으로 결정하였으며, bovine serum albumin을 표준 물질로 사용하였다.

(4) *E. coli*에서 proglycinin의 발현과 확인

① SDS-PAGE를 이용한 확인(20)

Expression plasmid pKGA1aB1b-3를 가진 형질 전환 *E. coli* JM105를 3 ml의 LB배지(100 µg/ml ampicillin)에서 하루동안 키워 활성화시켰으며, 1 l의 LB배지에 활성화된 배양액을 1%가 되도록 가하여 37°C shaking incubator에서 배양하였다. Abs600가 0.3이 되면, 발현을 유도하기 위하여 IPTG를 1 mM의 농도가 되도록 가하였다. 20 시간 배양 후, 배양액은 원심분리로 회수하였다. 회수한 균체는 살균한 1% NaCl용액으로 수세하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 실시하였다. 대조구로 expression plasmid를 가지지 않는 *E. coli* JM105와 IPTG를 첨가하지 않고 배양한 형질 전환 *E. coli* JM105를 SDS-PAGE상에서 발현을 비교하였다.

② Western-blotting을 이용한 proglycinin의 확인

SDS-PAGE상에서 확인된 단백질이 대두의 proglycinin인지를 Howe and Hershey(53)의 방법을 이용한 western-blotting으로 확인하였다. Nitrocellulose membrane 위에 SDS-PAGE gel을 얹고 양쪽으로 filter와 pad로 샌드위치 형태로 만든 후, 900 mA에서 3 시간 transfer buffer로 electroelution 하였다. 이어서 제거된 membrane을 TST buffer(Tris Saline Tween Buffer)에서 1% BSA와 함께 30 분간 정치시킨 뒤, anti-glycinin serum으로 1차 항체 처리 후, alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG(AP)로 2차 항체 처리하였다. NBT(Nitroblue tetrazolium)와 BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)로 구성된 AP development 용액에서 band가 보라색으로 변할 때, 3 차 증류수로 씻어주어 반응을 종결하였다.

③ N-말단 아미노산 서열에 의한 proglycinin의 확인

분리된 단백질이 proglycinin의 아미노산 서열과 일치하는지를 확인하기 위하여, Matsudaira(54)의 방법을 이용한 PVDF(polyvinylidene difluoride)-electroblotting을 실시하였다. SDS-PAGE gel을 PVDF membrane에 100 V에서 1 시간 blotting한 후 membrane을 제거하고 coomassie-blue R-250으로 염색하였다. 건조된 단백질 부위를 멸균된 가위로 잘라내어, 자동화된 gas-phase 아미노산 서열 분석기(Applied Biosystems precise 491)에서 PVDF membrane용 column을 이용하여 분석하였다.

(5) *E. coli*에서 proglycinin의 분리(20)

① 균체 파쇄 및 추출

대량 생산된 배양액을 20 분간 원심 분리하여, 균체를 회수하였다. 이 균체를 6 배의 buffer A(50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 1 mM EDTA, 1.5 mM PMSF)에 녹이고, lysozyme(1 mg/ml)을 가하여 얼음에서 30 분간 정치시켰다. Ultrasonication(Branson Co. sonifier 450)으로 균체를 파쇄한 뒤, 10,000×g, 20 분간 원심 분리하여 균체내 단백질을 추출하였다.

② (NH₄)₂SO₄를 이용한 단백질의 분리

추출된 crude extract 단백질은 (NH₄)₂SO₄를 가하여 분획하였다. (NH₄)₂SO₄ 40-65% 포화용

액에서 분획된 단백질을 10,000×g, 20 분간 원심 분리하여 buffer B(35 mM potassium phosphate buffer, pH 7.6, 0.15 M NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol, 0.02% NaN₃)에 용해시켰다. 이 단백질 용액을 buffer B에서 하루동안 투석하였다.

③ 이온 교환 chromatography를 이용한 분리

투석된 단백질을 FPLC(Pharmacia Co.) system을 이용한 Mono Q(HR 5/5) 음이온 교환 chromatography로 분리하였다. 음이온 교환 chromatography의 자세한 조건은 Table 2에 나타내었다. 분획된 단백질 내의 proglycinin 부분은 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다

④ Cryoprecipitation

분획된 proglycinin을 buffer C(6 mM Tris-HCl buffer, pH 6.3, 10 mM 2-mercaptoethanol, 0.02% NaN₃)에서 하루동안 투석하였다. 여기서 생성된 침전물은 10,000×g에서 20 분간 원심 분리하여 buffer D에 녹이고 다시 buffer D(35 mM potassium phosphate buffer, pH 7.6)에서 투석하였다. 최종적으로 분리된 proglycinin은 SDS-PAGE에서 순도를 확인하였다.

Table 2. Condition for ion-exchange chromatography

Apparatus : Pharmacia FPLC system	
Column : Mono Q(HR 5/5) ion exchange column	
Buffer A : 35 mM potassium phosphate buffer(pH 7.6) 0.15 M NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol	
Buffer B : 35 mM potassium phosphate buffer(pH 7.6) 0.5 M NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol	
Flow rate : 1 ml/min	
Gradient condition : time(min) B(%)	
0	0
5	0
25	50
28	100
33	100
38	0
Detector : 280 nm U.V. detector	

2) Trypsin을 이용한 11S glycinin과 proglycinin의 가수분해

(1) 효소 가수분해

11S glycinin 1% 용액을 만든 후, 50℃ 항온 수조상에서 교반하면서 일정 온도에 도달하도록 하였다. Trypsin은 1% 농도가 되도록 증류수에 녹여 제조하였으며, 효소/기질 비(E/S) 0.5%, 1%, 2%, 3%이 되도록 첨가해 4 시간 가수분해하였다. 또한 E/S 3%에서 가수분해시 15 분, 30 분, 1, 2, 3, 4 시간마다 동량의 시료를 취하여 분석하였다. 끓는 물에서 10 분간 처리하여 반응을 종결시켰다. Proglycinin도 11S glycinin 가수분해 조건과 같은 50℃, 4 시간, 효소/기질 비 3%로 하여 가수분해하였다.

(2) 가수분해도 측정

11S glycinin의 효소/기질 비에 따른 가수분해 정도를 pH 7.6, 50℃에서 4 시간 동안 pH-stat방법(5, 6, 94)으로 측정하였다(Table 3). 또한 실제 가수분해 정도는 효소/기질 비 3%에서 매 시간당 가수분해물의 α-amino기를 TNBS법(117)으로 측정하여 비교하였다. 0.15 M

Na₂B₄O₇·10H₂O buffer(pH 9.2) 2 ml, 0.01 M Na₂SO₃ 0.5 ml, 0.1% TNBS 0.2 ml을 시료 0.5 ml에 가하여 37°C 1 시간 반응 후에 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) SDS-PAGE를 이용한 분자량 분포 변화

11S glycinin의 시간에 따른 trypsin에 의한 가수분해 형태를 알아보기 위하여 SDS-PAGE상에서 각 가수분해물의 분자량 분포를 비교하였다. 이때 가수분해물의 전체 분자량 분포를 알기 위하여 수용성 부분과 침전 부분을 합하여 분석하였다. 환원제의 역할을 고려하여 2-mercaptoethanol을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 두 경우를 같이 비교하였다.

Table 3. Operation condition of Titerlab 91 for the determination of degree of hydrolysis

	Condition
Instrument	VIT 90 VIDEO TITRATOR, ABU91 AUTOBURETTE (Titerlab 91, Radiometer, Denmark)
Reactor	25 ml
pH	7.6
Temperature	50°C
Controller gain	0.6
Time constant	0.5
Titrant	0.1N NaOH
Protein concentration	1%

(4) GP-HPLC를 이용한 수용성 부분의 분자량 분포 변화

가수분해물의 수용성 부분의 분자량 분포를 비교하기 위하여 가수분해물을 10,000×g, 5 분간 원심 분리하여 상등액을 취하여 GP(gel permeation)-HPLC를 실시하였다. 분석 조건은 Table 4와 같다. 이때 사용한 분자량 marker는 glycine(75 Da), (glycine)₆ (360 Da), gastrin 1(2,125 Da), aprotinin(6,500 Da), cytochrome c(12,500 Da) 등을 사용하였으며, 이들에 대한 분자량 표준 곡선을 작성하였다. 분자량 분포는 peak 면적의 전체 합에 대한 각 분자량 대 peak의 면적비를 계산하여 비교하였다.

Table 4. Condition of GP(gel permeation)-HPLC

Apparatus : Gilson HPLC system
Column : Superdex peptide column (MW range 100-7,000 Da)
Eluent : 0.25 M NaCl in 0.02 M potassium phosphate buffer (pH 7.2)
Flow rate : 0.25 ml/min
Detector : UV detector at 214 nm
Injection volumn : 100 μ l

(5) 가수분해물의 쓴맛 관능 검사

15 cm 선상에서 비교적 쓴맛 검사가 용이한 최소 감응 농도 (2.4×10^{-5} M) 부근의 농도를 세분하여, threshold value 이하 농도(1.6×10^{-5} M)의 quinine-HCl과 예비 실험에서 시료의 쓴맛이 넘지 않는 범위(6.4×10^{-5} M)의 quinine-HCl을 full scale로 하고, 그 사이를 6 등분한 quinine-HCl 농도($2.4, 3.2, 4.0, 4.8, 5.6 \times 10^{-5}$ M)를 표준 용액으로 제시하였다. 표준 용액 0.5 ml을 취하여 직접 혀 안쪽저점에 spotting하고 30 초간 머금은 후 느껴지는 정도를 선상에 표시

하게 하여 panel을 훈련시켰으며, 각 농도의 표준 용액과 쓴맛과의 관계를 회귀분석으로 정량화하였다 (Fig. 1). 시료는 예비실험을 통해 역가 근처로 3 배 희석하였고, 쓴맛 강도는 표준 용액을 제시한 직후 인지되는 정도를 같은 선상에 표시하게 하였다.

각 시간에 따른 가수분해물의 쓴맛 정도는 Weiffenbach55)에 의한 three-drop method를 이용한 최소 감응 농도(threshold value)를 측정하여 quinine-HCl 농도로 환산하여 나타내었다.

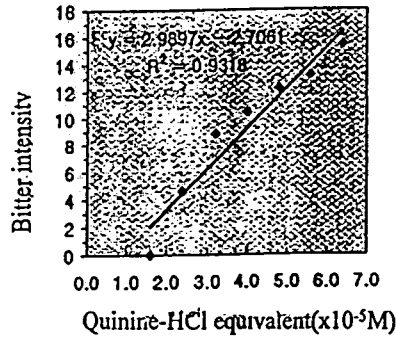


Fig. 1. Relationship of bitter intensity and quinine-HCl equivalent

(6) Peptide의 농도 정량

가수분해물의 단백질 함량은 U.V. 214 nm에서 흡광도를 측정하여 구하였고, 이때의 표준물질은 합성 peptide인 Leu-Lys-Tyr을 사용하였다. Tyrosine의 흡광 계수 ϵ 는 1,346이었다.

(7) Proglycinin의 가수분해 형태 예측

Proglycinin의 경우, 비교적 단순한 system이며 아미노산 서열이 알려져 있으므로, 이를 이용하여 Arg-와 Lys-에서 기질 특이성을 가지는 trypsin64) 처리시 가수분해 형태를 예측할 수 있다. 이로부터 예측된 분자량 분포가 실제 가수분해물의 분포와 비교되었으며, 또한 생성될 수 있는 peptide들의 평균 소수성을 계산하여 Q-rule에 의한 이론적 쓴맛 peptide를 예상하였다. 이때 평균 소수성은 Bigelow and Chanon49)의 방법으로 계산되었다.

3) 쓴맛 peptide의 분리

(1) GP-HPLC를 이용한 분자량에 따른 쓴맛 분획 분리

쓴맛 peptide를 분리하기 위해서 먼저 분자량에 따른 분획이 필요하였으며, pre-packed GPC column과 HPLC를 이용하였다. 관능 검사 및 다음 단계에서의 분석에 영향을 미치지 않도록 하기 위하여 증류수로 elution 하였고, 충분한 양을 확보하기 위하여 여러 번 시행하여 시료를 모았으며, 동결 건조 한 후 -20°C에서 보관하였다. GP-HPLC를 이용한 분획 조건은 Table 5과 같다.

Table 5. Condition for fractionation of hydrolysates using GP-HPLC

Apparatus : Gilson HPLC system
Column : Superdex peptide HR 10/30 (MW range 100-7,000 Da)
Eluent : Distilled water
Flow rate : 0.25 ml/min
Detector : UV detector at 214 nm
Injection volume : 100 μ l

(2) RP-HPLC를 이용한 쓴맛 peptide의 분리

GP-HPLC를 통해 분리된 쓴맛 분획은 다시 분취용 reverse phase C18 column으로 분리되었다. 각 분획은 관능 검사 및 다음의 분석을 위하여 여러 번 실시하여 5분간 단위로 분획하여 pooling하였다. 분리 조건은 Table 6와 같다.

Pooling된 분획들 중에서 선택된 쓴맛 분획들은 다시 analytical column으로 단일한 peak로 분리되었다. 11S glycinin의 경우, 매우 많은 peptide들을 포함하고 있기 때문에 column 조건을 바꾸어 여러 번 분석하였으며, proglycinin 가수분해물의 경우는 첫 번 분석 조건으로 단일 peak로 분석할 수 있었다. 분석용 C18 RP-HPLC 조건들은 Table 7과 Table 8와 같다. 이 때 각 peak의 물리 화학적 상태에 따라 HPLC의 gradient 및 flow rate가 각각 다르게 적용되었다.

Table 6. Preparative condition of bitter fractions using C18 RP-HPLC

Apparatus : Gilson HPLC system	
Column : Supelcosil SPLC-C18 (4.9×250 mm, 150A)	
Eluent : A soln : 0.1% HCl	
B soln : 90% EtOH in 0.1% HCl	
Flow rate : 1 ml/min	
Gradient : time(min)	B(%)
0	0
45	50
50	80
55	0
Injection volume : 100 μ l	
Detector : 214 nm UV	
Fractionation size : 5 ml/tube	

Table 7. The first analytical condition for the isolation of bitter peptides using C18 RP-HPLC

Apparatus : Waters Millenium PDA HPLC system	
Column : Delta pak C18(3.9×150 mm, 100 A)	
Eluent : A : 0.1% HCl	
B : 90% EtOH in 0.1% HCl	
Flow rate : 0.5-0.8 ml/min	
Detector : 214 nm	

Table 8. The second analytical condition for the isolation of bitter peptides using RP-C18 HPLC

Apparatus : Hitachi HPLC system	
Column : TSK ODS 80TM(5 μ m, 4.6×150 mm, Tosho, Tokyo, Japan)	
Eluent : A : 1% EtOH in 0.1% HCl	
B : 70% EtOH in 0.1% HCl	
Flow rate : 0.4-0.7 ml/min	
Gradient : time(min)	B(%)
0	0
50	50
Detector : 214 nm	

(3) 쓴맛 peptide의 관능 검사

쓴맛 peptide 분획의 관능 검사는 quinine-HCl 용액을 표준 용액으로 하여 반복적으로 훈련된 panel들에게 표준 용액의 각 농도별 쓴맛 정도를 15 cm 선상에 표시하게 하였으며, 표준 용액 농도는 1.6, 2.4, 3.2, 4.0, 4.8, 5.6×10^{-5} M으로 하였다. 각각의 농도는 쓰지 않다 : -, 약간 쓰다 : +, 쓰다 : ++, 분명히 쓰다 : +++, 많이 쓰다 : +++++, 아주 많이 쓰다 : ++++++ 로 나타내었다. 제시된 표준 시료와 실제 시료량은 100 μ l로 하였고, 시료 용액을 취하여 혀의 뒤쪽에 직접 spotting하였다. HPLC peptide 분획은 양이 매우 소량이므로, 두 명의 panel로 실험을 진행하였고, 쓴맛 정도에 대한 정확한 인지가 어렵기 때문에 +, - 등으로만 표시하였다.

(4) 쓴맛 peptide의 아미노산 서열 결정

분리된 쓴맛 peptide는 automated amino acid sequencer(Hewlett Packard G1005A protein sequencing system)에 의해 분석되었다. 서열 결정에 필요한 시료의 양은 10-100 pmol 정도이며, sequence column은 미리 column preparation/washing 과정으로 준비하였다. 시료를 loading 하기 전에 L1(MeOH)과 SLS(Sample loading buffer : 2% TFA)로 column을 세척한 후, 시료와 시료 용량의 2-3 배 정도의 SLS를 sequence column에 가하여 peptide를 column에 부착시킨 후, 용액은 완전히 통과시키고 N₂ gas를 이용하여 건조시켰다. 아미노산 서열의 분석 조건은 Table 9에 나타내었다.

(5) 쓴맛 peptide의 분자량 및 평균 소수성

분리되고 서열이 결정된 쓴맛 peptide의 분자량과 평균 소수성이 계산되었다. 분자량은 각 아미노산의 분자량을 기초로 하여 계산하였으며 평균 소수성은 Bigelow and Chanon(109)의 방법으로 계산하였다.

(6) 쓴맛 peptide의 합성

서열이 확인된 각 peptide들은 다시 그 쓴맛 정도의 확인을 위하여 단백질 농도의 측정 및 쓴맛 관능 검사의 재확인 실험을 실시하여 가장 쓴 몇 개의 peptide를 선택하였다. 선택된 쓴맛 peptide는 정확한 관능 평가를 위하여 1 차 구조가 합성되었다. Peptide의 합성은 (주) 세우 테크놀로지((株) サウテイ-テクノロジ-)에 의뢰하였다. 합성된 쓴맛 peptide들은 다시 그 쓴맛 정도가 관능 검사로 확인되었다.

Table 9. Condition of amino acid sequencing

Instrument : Hewlett Packard G1005A protein sequencing system		
Sequence column : Hydrophobic 202-2925k, Hydrophilic : 203-3075k		
Standard amino acid : PTH-amino acid		
Delivery gas: Ar gas		
Program : routine 3.1 and 3.5		
Amino acid identification method : HPLC method		
Column : C18	Gradient	
Temperature : 40°C	Time(min)	%
Flow rate : 0.3 ml/min Buffer	A 0	100
Detection : FPD 269 nm Buffer	B 20	100
Buffer A : 0.1% TFABuffer	C 45	100
Buffer B : 100% Acetonitril		
Buffer C : 80% Acetonitril/20% water		

제 3장. 결과 및 고찰

1. 11S glycinin과 *E. coli*에서 발현된 proglycinin의 분리

1) 탈지 대두박에서 11S glycinin의 분리

먼저 대두 단백질의 7S와 11S등의 구성 단백질들이 SDS-PAGE에 의해 비교, 확인되었다(Fig. 2). Fig. 2의 lane 2에서는 2-mercaptoethanol을 사용하여 분석하였으며, lane 3에서는 2-mercaptoethanol을 사용하지 않았다. Disulfide 결합을 가진 것으로 알려진 11S glycinin의 경우, lane 2에서는 2-mercaptoethanol에 의해 subunit내의 disulfide 결합이 분해되면서 37-42 kD의 분자량을 가진 산성 polypeptide와 17-20 kD의 분자량을 가진 염기성 polypeptide들로 나뉘어지는 것이 확인되었으며, lane 3에서는 두 polypeptide들이 결합된 분자량 56 kD의 주된 band가 확인되었다. 반면 7S β -conglycinin의 76 kD, 72 kD, 53 kD의 α' , α , β subunit들은 2-mercaptoethanol의 유무에 관계없이 양 lane의 같은 위치에서 확인되어 7S 단백질들은 disulfide 결합 없이 분포하는 것을 알 수 있었다. Yamauchi *et al.*(57), Sathe(30)등에 의하면, 그 외의 작은 band에는 7S의 분획으로 sulfur-rich salt-soluble globulin(SRP)이 포함되어 있다고 하였다.

11S glycinin은 Thanh and Shibasaki(22)의 방법에 따라, pH 6.4에서의 7S와 11S와의 용해성의 차이에 의해 분리되었다. 또한 다음 단계로 당이 결합되어 있는 7S의 잔존 분획을 제거하기 위해서, Con A-Sepharose 4B affinity chromatography를 이용하였다. 각 분리 단계별 전기영동상의 형태는 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3의 lane 2는 탈지 대두박의 분포를 나타낸것으로, 7S와 11S glycinin이 다양하게 분포하는 것을 확인할 수 있었다. lane 3은 pH 6.4에서의 cryoprecipitation에 의해 분리된 11S glycinin의 분포를 나타내었다. Acidic과 basic subunit band가 주로 나타나는 것으로 보아, 이 추출 과정에서 대부분 분리된 것으로 보이며, 7S 단백질들은 많은 양이 제거되었음을 확인할 수 있었다. lane 4는 Con A-Sepharose 4B affinity chromatography에서 분리된 11S glycinin을 나타내며, 미량으로 존재했던 7S β -subunit band가 전기영동상에서 전혀 관찰되지 않으므로 affinity chromatography를 통과하면서 완전히 제거된 것으로 보인다. Sathe(30)에 의하면 37 kD의 주된 band는 A1a, A1b, A2, A4의 acidic polypeptide들이며, 그 위의 작은 band는 A3 polypeptide라고 하였다. 또한 20 kD의 주된 band는 B3, B1a, B1b, B2, B4의 basic polypeptide들이며, 명시된 주요 band 이외의 나머지 몇몇의 band는 SRP라고 하였다.

11S glycinin의 분리 단계별 수율과 정제도는 Table 11에 정리하여 나타내었다. Table 11에서와 같이 탈지 대두박 단백질의 추출에서는 11S glycinin은 37.8%의 정제도로 분리될 수 있었으며, pH 6.4, 4°C 조건에서 cryoprecipitation된 glycinin은 89%의 정제도를 보여 이 단계에서의 분리 효율이 매우 높은 것을 알 수 있었다. 마지막 단계로 affinity chromatography를 통해 얻은 11S glycinin은, 미량 존재하던 7S가 제거됨으로서 90%의 정제도, 27.6% 수율로 분리될 수 있었다.

Table 11. Purity and yield of 11S glycinin on purification step

Purification step	Total protein(g)	Purity (%)	Soybean 11S glycinin(g)	Yield(%)
Defatted soy flour	20.27	37.8	7.66	100
Cryoprecipitation at pH 6.4	5.00	89.2	4.46	58.2
Con-A affinity chromatography	2.34	90.3	2.11	27.6

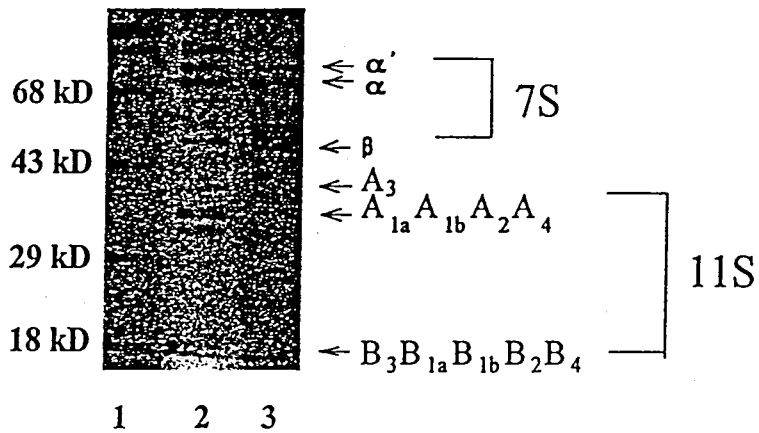


Fig. 2. Electrophoretogram of soybean protein composition using with SDS-PAGE

- 1 : Molecular weight marker,
- 2 : Defatted soy bean flour with 2-mercaptoethanol(2-ME),
- 3 : Defatted soy bean flour without 2-mercaptoethanol(2-ME)

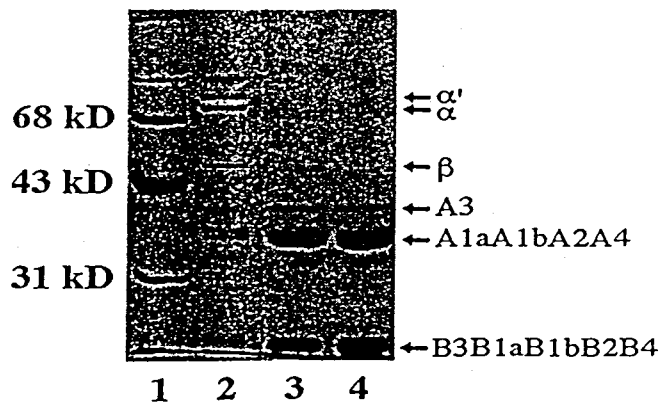


Fig. 3. SDS-PAGE electrophoretogram of 11S glycinin purification

- 1 : Molecular weight marker,
- 2 : Defatted soy flour Extract,
- 3 : pH 6.4. Precipitated 11S rich fraction,

2) *E. coli*에서 발현된 proglycinin의 분리(1) *E. coli*에서 proglycinin의 발현 확인

① SDS-PAGE를 이용한 proglycinin의 발현 확인

Expression plasmid를 가진 *E. coli*에서 대두 단백질 proglycinin의 발현이 성공적으로 이루어졌는지에 대한 확인 실험이 SDS-PAGE를 이용하여 실시하였다. Fig. 4의 lane 3과 4는 glycinin 유전자 pKA1aB1b를 함유하고 있는 형질 전환된 *E. coli* JM105이고, lane 5는 대조구로서 형질 전환되지 않은 JM105의 결과이다. 이때 lane 3은 IPTG(Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)를 첨가하지 않아 발현이 유도되지 않은 경우이고, lane 4는 IPTG 첨가에 의해 발현이 유도된 것으로, lane 4에서만 분명한 band가 관찰되어 proglycinin의 발현이 확인되었다. 이는 예측된 분자량과 일치하였으며, 김29)의 결과와도 정확하게 일치하였다. Staswick70)등은 A1a와 결합하는 basic subunit를 B2라 보고하였으며, Utsumi등26)은 A1aB1b라고 하였다. 따라서 Nigoro등37)은 이 조합을 A1aBx라 명명하여 일반적으로 사용되고 있다. Utsumi등25)은 이러한 현상을 대두 품종의 차이이거나 A1aB2 조합이 존재하지 않을 가능성이 있다고 하였다.

② Western-blotting을 이용한 proglycinin의 발현 확인

Western-blotting을 이용한 proglycinin의 확인은 Fig. 4의 lane 6에서와 같이, *E. coli*에서 생산된 proglycinin이 glycinin의 면역항체와 반응하여 단일band를 나타낸 것으로 확인할 수 있었다. 따라서 이 band는 *E. coli*의 구성 단백질이 아닌 대두의 고유한 단백질을 확인할 수 있었다.

Table 12. Comparison of N-terminal amino acid sequence of purified proglycinin and Utsumi's result27)

Amino acid sequence	
Predicted amino acid sequence from cDNA	-Phe-Ser-Ser-Arg-Glu-Gln-Pro-Gln-Gln-
Utsumi's pKA1aB1b-3	Met-(X)-Glu-Gln-Pro-Gln-Gln-
Purified proglycinin	Met-Arg-Glu-Gln-Pro-Gln-Gln-

③ N-말단 아미노산 서열에 의한 proglycinin의 확인

마지막으로 분리된 단백질이 glycinin subunit A1aB1b 아미노산 서열과 일치하는지 확인하기 위하여 분리 단백질의 N-말단부분의 아미노산 서열이 결정되었다. PVDF (polyvinylidene difluoride)-membrane을 이용한 N-말단의 7 번째까지의 아미노산 서열을 분석한 결과를 Table 12에 나타내었으며, Utsumi27)에 의해 보고된 proglycinin A1aB1b-3의 N-말단의 서열과 비교한 결과, 정확하게 일치하였다. 이는 A1aB1b에서 signal sequence가 제거되고 남은 acidic subunit에서 9 개의 염기쌍, 즉 3 개의 아미노산이 제거되고, serine 잔기 대신 methionine으로 대체된 결과를 보였다. 이와 같은 확인 작업으로 proglycinin의 발현은 매우 성공적이었으며, 다음 단계에서 proglycinin을 분리 정제하였다.

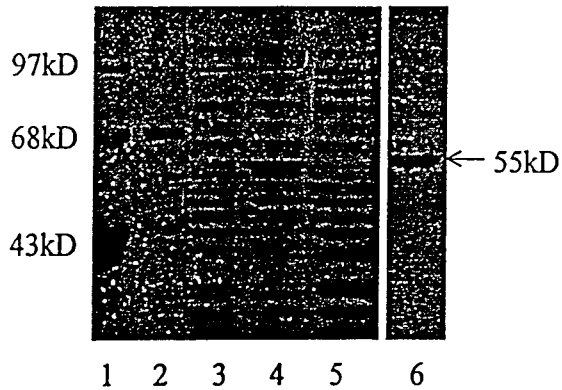


Fig. 4. High-level expression and immuno-detection of proglycinin

- 1 : Molecular weight marker,
- 2 : Bovine serum albumin,
- 3 : *E. coli* JM105 having pKA1aB1b-3 non-induced with IPTG,
- 4 : *E. coli* JM105 having pKA1aB1b-3 induced with IPTG,
- 5 : *E. coli* JM105 without pKA1aB1b-3,
- 6 : Western-blotting analysis of proglycinin

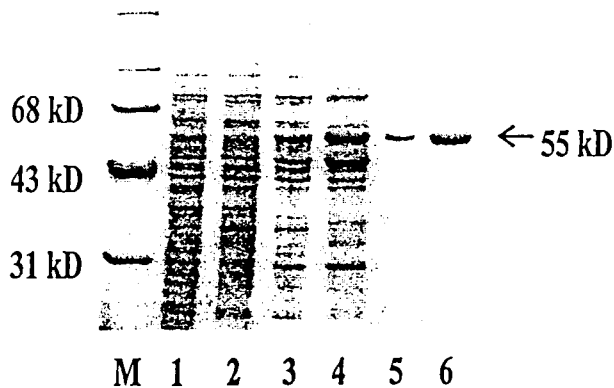


Fig. 5. SDS-PAGE electrophoretogram of proglycinin purification

- M : Molecular weight marker,
- 1 : *E. coli* JM105 without pKA1aB1b-3
- 2 : IPTG-non induced *E. coli* JM105 with pKA1aB1b-3,
- 3 : IPTG-induced *E. coli* JM105,
- 4 : Fraction with 40-65% of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
- 5 : Fraction from ion exchange chromatographic separation,
- 6 : Cryoprecipitated proglycinin

Table 13. Purity and yield of proglycinin expressed in *E. coli* on purification step

Purification step	Total protein(mg)	Proglycinin purity(%)	Proglycinin amount(mg)	Yield (%)
Crude cell	614.32	12.5	76.79	100
45-65% (NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	218.02	25.0	54.50	70.97
Ion exchange chromatography	28.12	60.6	17.03	22.18
Cryoprecipitation	4.68	97.1	4.54	5.92

(2) *E. coli*에서 proglycinin의 분리 정제

*E. coli*에서 발현 및 확인된 proglycinin은 pH 6.4에서 cryoprecipitation 되는 대두 단백질의 독특한 성질을 이용하여 비교적 간단히 분리될 수 있었다. Fig. 5에서 proglycinin의 분리 단계별 정제 정도를 SDS-PAGE상에 나타내었으며, 이들의 수율과 순도는 Table 13에 정리하였다. *E. coli*에서 추출된 단백질은 (NH₄)₂SO₄ 분획에 의해, 25%의 정제도와 71%의 수율을 나타내었다. 다음 단계에서 Mono-Q 이온 교환 chromatography를 통과한 proglycinin은 61%의 정제도, 22%의 수율을 보였다. 마지막 cryoprecipitation후에는 97%의 매우 높은 정제도로 분리될 수 있었으나 수율은 약 6% 정도로 낮았다. Proglycinin의 분리에서는 환원제의 처리에 의해 11S glycinin과 같이 acidic과 basic subunit로 분리되지 않았는데, 이는 11S glycinin의 합성 mechanism에서 보듯이 proglycinin이 아직 산성과 염기성의 subunit로 나누어지지 않고, disulfide 결합이 형성되지 않은 상태이기 때문으로 사료된다. 김29)은 *E. coli*에서 발현된 A1aB1b-3의 proglycinin이 acidic과 basic polypeptide로 나뉘지 않은 homo trimer라 보고하였다.

2. Trypsin을 이용한 11S glycinin과 proglycinin의 가수분해

1) 11S glycinin의 trypsin 가수분해에 의한 쓴맛 형성 실험

대두 단백질의 가수분해 결과, 아주 강한 쓴맛을 형성하며, 각 가수분해 조건에 따른 쓴맛 조건 등이 김2) 40) 김38) 홍39) 등의 연구에서 잘 보고되고 있다. 그러나 이러한 대두 단백질의 쓴맛이 11S glycinin에서 유래했는지에 대한 보고는 아직 없다. 11S glycinin은 β -conglycinin과 함께 대두 단백질의 70% 이상을 차지하고 있으며, 51% 정도가 glycinin이라고 보고되고 있다 21). 그러나 Kim *et al*41)은 alcalase, α -chymotrypsin, trypsin의 가수분해 결과 7S 단백질이 주로 분해되며, 상대적으로 11S 단백질은 잘 분해되지 않는다고 보고하였다. 따라서 대두 단백질의 주된 부분인 11S glycinin에서 trypsin 가수분해로 쓴맛이 형성되는지를 확인할 필요가 있었다.

분리된 대두 11S glycinin의 1% 용액을 0.5, 1, 2, 3%의 효소/기질 비로 변화시키면서 가수분해를 하였으며, 각 가수분해물의 상등액을 취하여 관능 검사를 실시하였다. 쓴맛의 관능검사는 쓴맛의 후미 지속 시간이 길고, 너무 높은 농도의 쓴맛 범위에서는 쓴맛의 정도를 잘 식별하지 못한다는 큰 어려움을 가지고 있다. 그러므로 본 실험에서는 먼저 예비 실험을 통해 각 가수분해물이 쓴맛을 가지는지를 확인한 후에, 최소 감응 농도 부근의 저 농도로 회색하여 쓴맛 정도

Table 14. Sensory bitterness of soybean protein 11S glycinin hydrolysates and quinine-HCl equivalent

E/S ratio(%)	Sensory bitter intensity ^a (cm)	Quinine-HCl equiv. ^b
0.5	6.9±3.99	9.6×10 ⁻⁵ M
1	7.12±2.68	9.9×10 ⁻⁵ M
2	10.32±2.97	13.1×10 ⁻⁵ M
3	11.58±2.10	14.3×10 ⁻⁵ M

a : Distances in 15 cm line

b : 3 Times values of concentration evaluated in sensory test

를 측정하였다. 각 가수분해물을 3 배씩 같은 정도로 희석하여 15 cm 선상에 쓴맛 강도를 표시하게 하였으며, 쓴맛 정도는 quinine-HCl의 농도로 환산하여 나타내었다(Table 15). 이 결과 각 가수분해물의 쓴맛은 9 - 15×10⁻⁵ M quinine-HCl equivalent 정도의 매우 쓴맛을 나타내었다. 특히 효소/기질 비 3%에서는 14×10⁻⁵ M quinine-HCl equivalent 정도로 강한 쓴맛을 나타내었다. 따라서 trypsin 가수분해에 의한 대두 11S glycinin에서 강한 쓴맛이 형성됨을 알 수 있었다.

2) 11S glycinin의 가수분해 형태 비교

(1) 가수분해 정도(DH) 측정

효소/기질 비에 따른 11S glycinin의 가수분해 정도(degree of hydrolysis : DH)의 비교는 pH-stat법에 의해 측정되었다(Fig. 6). 효소/기질 비 0.5%에서는 약 4%에 이르는 가수분해 정도를 나타내었으며, 1%에서는 약 6%의 가수분해 정도를 나타내었다. 효소/기질 비 2%에서는 약 8%의 가수분해 정도를, 3%의 효소/기질 비에서는 약 12%에 이르는 가수분해 정도를 나타내어 기질에 대한 효소 첨가량이 증가할수록 가수분해 정도가 증가함을 확인할 수 있었다. 김 1)에 의하면 분리 대두 단백질의 trypsin 가수분해물의 가수분해 정도는 시간에 따라 거의 직선적으로 증가하며, 효소량이 증가할수록 가수분해 정도도 증가한다고 보고하였으며, 본 결과는 이러한 김1)의 결과와 거의 일치하였다. 따라서 효소 첨가량이 높아질수록, 가수분해 정도가 커지며, 11S glycinin에서 쓴맛 가수분해물의 양도 증가함을 알 수 있었다. 이 결과에서 11S glycinin 가수분해 실험은 쓴맛이 가장 강했던 효소/기질 비 3%에서 시행되었다. 그 외 가수분해 온도 조건과 기질의 농도, pH 등의 가수분해 조건은 실험의 목적에 의해 설정되었다. 즉 관능 검사를 기본으로 하였으므로, pH 조절 없이 증류수에서 행하였으며, 4 시간 동안의 미생물 증식을 억제하기 위하여 다소 높은 온도인 50℃를 설정하였다.

11S glycinin의 시간에 따른 가수분해 정도는 pH-stat법과 실제 가수분해에 의해 유리된 α -아미노기를 정량하여 비교하였다. pH-stat법에 의한 trypsin의 가수분해 정도는 가수분해 시작에서 약 1 시간 이내에 급격하게 가수분해가 진행되어 DH 8%까지 직선적으로 증가하였으며, 이 이후부터는 서서히 증가하여 최종적으로 DH 12%에 도달하였다. 이는 TNBS법에 의한 N-말단 α -amino기가 유리되는 형태와 거의 비슷하였다(Fig. 7). N-말단의 α -amino기의 농도는 초기 0.7 mM에서 15 분 가수분해 후에 4.1 mM로 급격히 증가하였으며, 1 시간 이내에 6 mM수준으로 증가하였다. 이 이후 4 시간까지 7.1 mM로 완만하게 증가하였다. 따라서 11S glycinin은 시간에 따라 가수분해 정도가 증가하며, 그 형태는 1 시간 이내에 급격하게 가수분해되었다가, 그 이후에는 완만하게 증가함을 알 수 있었다.

(2) SDS-PAGE에 의한 분자량의 분포 변화

11S glycinin 가수분해물의 시간에 따른 전체 분자량 분포 변화는 SDS-PAGE를 이용하여 비교되었다. 각 시간에 따른 가수분해물의 분자량 분포 형태를 Fig. 8에 나타내었다. 이때 각 가수분해물의 변화 과정을 좀더 상세히 알기 위하여 2-mercaptoethanol을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우를 함께 비교하였다. A는 2-mercaptoethanol을 첨가하여 분석한 경우이며, B는 첨가하지 않은 경우의 시간에 따른 분자량 분포 변화 형태를 나타내었다. A의 경우에는 2-mercaptoethanol이 첨가되어 두 subunit로 분리된 11S glycinin은 15 분 이내에 대부분의 acidic subunit이 가수분해되어 1 시간이 지나면서 이 subunit는 거의 남아 있지 않음을 확인할 수 있었다. 그러나 basic subunit의 경우는 초기에 비해 약간 감소하였고, 4 시간 가수분해 동안 그 분자량 대를 거의 그대로 유지하고 있었다. 반면 분자량 21 kD 이하의 peptide 부분은 15 분 가수분해로 급격히 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 21 kD 부근의 peptide부분은 1 시간이 경과한 후에 더 작은 분자량으로 가수분해되어 사라졌다. 또 B에서 보는 바와 같이, 56 kD 정도를 나타내는 11S glycinin은 가수분해 15 분 후에 많은 부분이 가수분해되어 40 kD과 30 kD의 분자량대가 대부분을 차지하였고, 30 분 후에는 56 kD glycinin은 거의 분해되어 사라졌다. 약 31 kD 정도의 분자량 대와 40 kD 정도의 희미한 band는 4 시간 가수분해 동안 계속 유지되었으며, 이는 A에서 보는 바와 같이 basic subunit와 함께 아직 가수분해되지 않고 남아있을 acidic subunit의 일부분이라고 사료된다. 또한 가수분해 15 분 동안 20 - 30 kD사이의 peptide들이 많은 양 생성되었으며, 이들은 가수분해 시간이 경과함에 따라 다시 사라지는 것을 볼 수 있었다. 이는 아마도 가수분해에 의해 더 작은 분자량의 peptide로 변화했을 것으로 사료된다. 따라서 trypsin에 의한 11S glycinin의 가수분해는 주로 acidic subunit에서 일어나며, 이들의 acidic subunit들의 가수분해 분획에서 주로 저분자량의 peptide가 유래됨을 알 수 있었다. 또한 앞의 가수분해 정도와 N-말단의 α -amino기가 1 시간 이내에 급격히 증가하는 것은 이들 고분자량의 acidic subunit의 가수분해 결과이며, 1 시간 이후의 완만한 증가는 acidic subunit에서 유래된 비교적 저분자량대의 peptide들이 더욱 가수분해되어 생기는 형태임을 알 수 있었다. Kang *et al.*(42)은 7S와 11S 대두 단백질 가수 분해 연구에서 trypsin은 주로 acidic subunit에 영향을 미치며, basic subunit에 대해서는 그 구조적인 단단함(compactness)과 상대적으로 큰 소수성 때문에 영향이 적다고 하였다. 본 실험의 결과에서 이러한 basic subunit에 의한 trypsin의 작용은 거의 같은 경향을 나타내었다. Argos *et al.*(24)은 acidic subunit에 있는 hypervariable region(HVR)을 보고하였으며, 이 부분에 대한 효소 작용의 용이함을 보고하였다.

(3) GP-HPLC에 의한 수용성 부분의 분자량 분포 변화

전기 영동상에서 전체 단백질의 가수분해 경향을 비교할 수 있었지만 실제 많이 이용되는 수용성 부분의 분자량 분포와 이들의 가수분해 형태에 대해서는 자세히 알 수 없었다. 따라서 GP-HPLC를 이용하여 시간에 따른 수용성 가수분해물의 분자량 분포를 측정하였으며, 이를 Table 15에서 비교하였다. 이 결과에 의하면 가수분해 초기 단계에서 12 kD 이상의 수용성 고분자량 peptide들은 거의 가수분해되어, 15 분, 19.13%에 달하던 분포가 1 시간이 경과한 후 1.84%, 4 시간 경과 후에는 0.19%로 대부분 가수분해되었다. 6500-12500 Da의 분자량을 차지하는 분획들도 초기 31.78%에서 1 시간 가수분해 후에 16.45%로 감소하였으며, 4 시간 가수분해 후에는 10.4%로 감소하였다. 분자량 2100-6500 Da사이의 분포는 대체로 20% 정도로 유지되었다. 반면 분자량 360-2100 Da 사이의 분포는 시간에 따라 증가하여 4 시간이 경과한 후에는 33.86%에 해당하는 분포를 나타내었다. 또한 360 Da이하의 저분자량 di-, tri-peptide들, 유리아미노산 분획은 1 시간 경과한 후부터 30%이상의 분포를 나타내었으며, 4 시간 후에는 37.58%의 분포를 보였다. 즉 6500 Da 이상의 비교적 고분자량대의 수용성 glycinin은 대부분 1 시간 이내에 가수분해되어 2100 Da 이하의 저분자량 peptide나 유리 아미노산으로 변화하였으며, 이는 앞의

SDS-PAGE 경향과 거의 일치하였다. 따라서 11S glycinin의 acidic subunit가 가수분해되고 이들이 시간이 지남에 따라 더욱 작은 단위의 peptide로 가수분해된다는 것을 확인할 수 있었다.

(4) 가수분해 시간에 따른 가수분해물의 쓴맛 형성 과정

가수분해 시간에 따른 11S glycinin 가수분해물의 쓴맛 형성 과정을 파악하기 위하여 시간에 따른 각 가수분해물의 쓴맛 정도를 비교하였다. 이때 각 가수분해물의 쓴맛 최소 감응 농도를 측정하여 0.01%에서의 회색배수를 quinine-HCl로 환산하여 쓴맛의 강도로 나타내었다. 가수분해되기 전에는 최소 감응 농도 이하에서 전혀 쓰지 않았던 11S glycinin 수용액은 15 분 동안의 가수분해에 의해 급격히 쓴맛이 증가하였고, 이 이후에는 완만하게 증가하는 추세를 보였다 (Fig. 9). 이 결과를 앞의 GP-HPLC에 의한 가수분해물의 분자량 분포와 비교해 보면 가수분해에 의해 생성되는 360-2100 Da 분자량 분포와 쓴맛 증가 추세는 거의 비슷하였다. 즉 약 1 시간 이내에 360-2100 Da의 분자량 부분은 급격하게 증가하였으며, 이에 대한 쓴맛의 경향도 이 시간에서 급격히 증가하였다. 이들의 상관 관계를 Fig. 10에 나타내었다.

Table 15. Molecular weight distribution of 11S glycinin hydrolysates at different hydrolysis time

Range of molecular weight(Da)	Hydrolysis time(min)/Distribution(%)					
	15	30	60	120	180	240
12,500-	19.13	11.95	1.84	0.66	0.28	0.19
6,500-12,500	31.78	27.88	16.45	14.44	10.96	10.40
2,100-6,500	20.60	22.51	19.48	23.61	19.53	17.97
360-2,100	19.67	24.45	26.64	30.19	32.40	33.86
-360	8.81	13.21	35.58	31.11	36.83	37.58

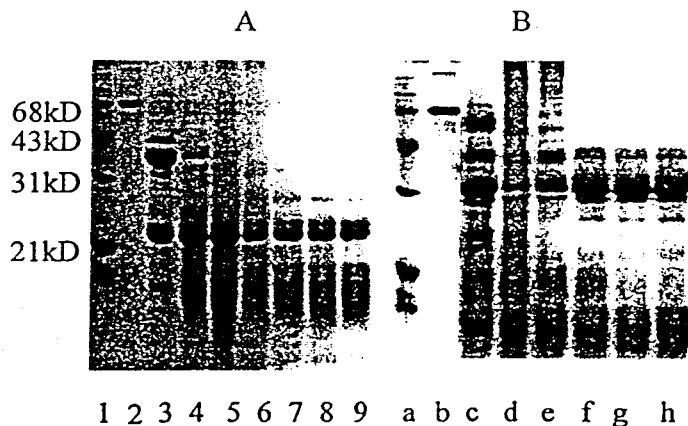


Fig. 8. The molecular weight distribution of 11S glycinin hydrolysates using with SDS-PAGE at different hydrolysis time.

A is usual analysis with 2-mercaptoethanol and B is without 2-mercaptoethanol. 1, a : Molecular weight marker, 2, b : BSA, 3 : 11S glycinin, 4, c : 15min hydrolysis, 5, d : 30min hydrolysis, 6, e : 1hr hydrolysis, 7, f : 2hr hydrolysis, 8, g : 3hr hydrolysis, 9, h : 4hr hydrolysis

95% 유의 수준에서 상관계수 0.76의 상관성을 보였으며, 따라서 그들이 보인 경향은 거의 비슷하다는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 acidic subunit가 가수분해되면서 단백질내의 숨겨진 소수성 부분이 노출되어 쓴맛 peptide가 형성되며, 이러한 쓴맛 peptide들이 이후 더 작은 분자량으로 가수분해되면서 쓴맛의 정도는 더욱 증가하는 것으로 사료된다.

Fujimaki *et al.*(71)은 대두 단백질의 pepsin 가수분해물에 대한 쓴맛의 연구에서 1 시간 가수분해 후에 약한 쓴맛이 형성되었으며, 3 시간 후에는 보통의 쓴맛이 그리고 6 시간 후에 강한 쓴맛을, 24 시간 후에는 아주 강한 쓴맛을 낸다고 보고하였다. 또한 홍(39)은 alcalase에 의한 분리 대두 단백질이 3시간 가수분해 후에 아주 쓴맛을 나타낸다고 하였다.

3) Proglycinin의 효소 가수분해

Proglycinin은 그 아미노산 서열이 밝혀진 순수 단백질로서 이의 아미노산 서열과 단백질 가수분해 효소와의 관계에서 많은 결과를 얻을 수 있을 것이다. 알려진 proglycinin의 아미노산 서열은 Fig. 11과 같으며, 19 개의 signal sequence와 이 이후 20-306 번까지의 acidic subunit, 311-490 번까지의 basic subunit의 서열을 알 수 있었다. 또한 269-310 번까지의 hypervariable region을 확인할 수 있었다. 따라서 서열이 밝혀진 순수 단백질로서 trypsin의 기질 특이성에 의해 가수분해시 생성될 수 있는 peptide의 종류 및 proglycinin의 가수분해 결과 생성되는 예측되는 peptide의 분자량 분포를 예측할 수 있었다. Trypsin의 경우 Arg-, Lys-에 대한 기질 특이성을 가지고 있으며, 이를 기준으로 약 50 여개의 peptide가 예측되었다(Table 16). 이 중 소수성 1400 cal/mol 이상을 나타내는 5 개의 peptide를 찾을 수 있었으며, 대부분 2000 Da이하의 저분자량이었다(Table 17). 이는 차후에 분리된 peptide와 비교될 것이다. Proglycinin의 가수분해 결과 생성되는 peptide의 분자량 분포를 Table 18에 나타내었으며 이의 분자량 분포와 예측된 결과가 비교되었다. 이 결과 trypsin에 의해 분리될 것으로 예측된 분자량 분포와 거의 비슷한 정도로 가수분해 되었음을 알 수 있었다. 두 경우 모두 대부분의 peptide가 충분히 가수분해 되었고, 2000 Da 이하의 분자량이 약 90% 정도이었다.

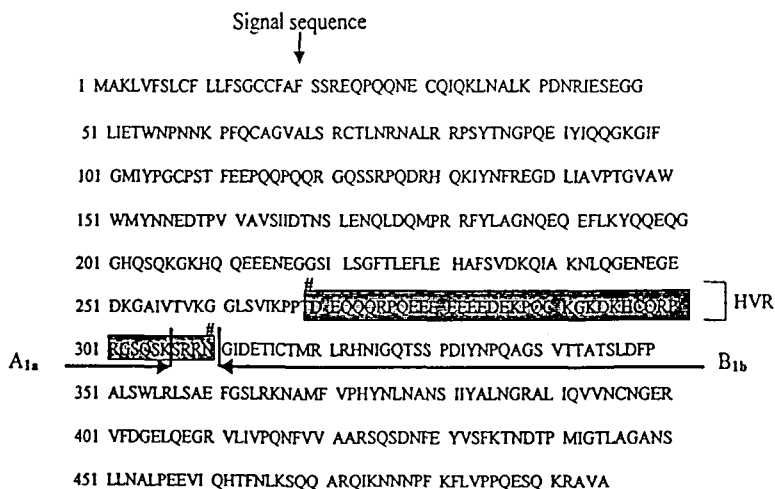


Fig. 11. Alignment of derived glycinin subunit A1aB1b

: Hypervariable region, A1a : 20-306, B1b : 311-495

Table 16. Peptide fractions by a full tryptic hydrolysis as estimated from the primary structure of proglycinin

	Peptide fraction	Hydrophobicity (cal/mol)
1	MR	1015
2	EQPQQNECQIQK	538
3	LNALK	1074
4	PDNR	965
5	IESEGGLIETWNPNNK	1098
6	PFQCAGVALSR	1045
7	CTLNR	716
8	NALR	968
9	R	730
10	PSYTNQPQEIIYIQQGK	1191
11	GIFGMIYPGCPSTFEEPQQPQQR	1205
12	GQSSR	142
13	PQDR	943
14	HQK	467
15	IYNFR	1842
16	EGDLIAVPTGVAAWWMYNNEDTPVVAVSIDTNSLEN QLDQMPR	1212
17	R	730
18	FYLAGNQEQEFLK	1099
19	YQEQGGHQSQK	372
20	GK	750
21	HQQEEENEGGSILSGFTLEFLEHAFSVDK	907
22	QIAK	1275
23	NLQGENEGE DK	545
24	GAIIVTVK	1289
25	GGLSVIK	1231
26	PPTDEQQQR	796
27	PQEEEEEEDEK	675
28	PQCK	1000
29	GK	750
30	DK	1020
31	HCQR	158
32	PR	1665
33	GSQSK	296
34	SR	385
35	R	730
36	NGIDETICTMR	994
37	LR	1575
38	HNIGQTSSPDIYNPQAGSVTTATSLDFPALSCLR	1087
39	LSAE FGSLR	958
40	K	1500
41	NAMFVPHYNLNANSIITYALNGR	1258
42	ALIQVVNCNGER	888
43	VFDGELQEGR	838
44	VLIVPQNFVVAAR	1499
45	SQSDNFEYVSFK	974
46	TNDTPMIGTLAGANSLLNALPEEVIQHTFNLK	1121
47	SQQAR	260
48	QIK	1457
49	NNNPFK	1141
50	FLVPPQESQK	1385
51	R	730
52	AVA	1050

Table 17. Theoretical peptide fractions of proglycinin tryptic hydrolysate exceeding the average hydrophobicity over 1400 cal/mole as estimated from the primary structure of proglycinin

Positions in proglycinin	Peptide fraction	Molecular weight(Da)	Average hydrophobicity (cal/mole)
112-116(15)	IYNFR	783	1842
281-282(32)	PR	289	1665
302-303(37)	LR	305	1535
393-405(44)	VLIVPQNFVVAAR	1640	1498.5
454-456(48)	QIK	423	1456.7

() : The number in parenthesis indicates the serial number of peptides theoretically possible by a full tryptic hydrolysates

Table 18. Comparison of GPC molecular weight distribution of proglycinin hydrolysates with the theoretical distribution of peptide fractions by tryptic hydrolysis as estimated from the primary structure of proglycinin

Molecular size by the number of amino acid unit	Estimated M.W.(Da) range	Theoretical distribution of the peptide estimated(%)	GPC measured distribution(%) of proglycinin
60-114	6,500-12,500	-	0.46
21-59	2,100-6,500	11.54	7.75
4-20	360-2,100	59.61	53.96
1-3	-360	28.85	36.67

3. 11S glycinin과 proglycinin 가수분해물에서 쓴맛 peptide의 분리

1) 11S glycinin 가수분해물에서의 쓴맛 peptide의 분리

(1) GP-HPLC를 이용한 쓴맛 분획의 분리

GP-HPLC를 이용하여 11S glycinin 가수분해물을 Fig. 12에 나타낸 바와 같이 분획하였다. 분리 정도에 따라 8 개로 분획하여, 각 분획에 대한 쓴맛 정도와 예상되는 분자량 분포를 Table 19에 나타내었다. 각 분획의 쓴맛 정도는 최소 감응 농도 근처에서 시험되도록 0.01% 농도로 조절하였다. 각 분획에 대한 관능 검사 결과, F1과 F2에서는 쓴맛을 나타내지 않았으며 2×10^{-5} M quinine-HCl equivalent에 해당하는 최소 감응 농도 이하의 값을 나타내었다. 이 분획의 평균 분자량 분포는 6,500 Da 이상으로 다소 크기가 큰 peptide들이었다. 그러나 분획 F2에서 F8까지는 비교적 비슷한 정도의 쓴맛을 나타내었다. 15 cm 선상에서 나타나는 쓴맛 강도는 대략 6-8 사이이며, 이러한 결과는 $3.08-3.50 \times 10^{-5}$ M quinine-HCl equivalent에 해당된다. 이들의 분자량은 6,500 Da 이하를 나타내며, F7, F8 분획은 75 Da 이하의 유리 아미노산이나 암모니아 등으로 peptide가 아닐 것으로 추정된다. 따라서 쓴맛을 나타내는 peptide 분획은 분자량 75 - 6,500 Da 사이에 존재하며, 비교적 다양한 분포로 이루어진 것으로 추측된다.

이 결과는 쓴맛을 내는 peptide의 분자량대가 6,000 Da 이하라는 Ney10)의 연구와 비슷한 경향을 보였다. Hamilton *et al.*31)은 쓴맛 peptide들이 대략 2,500 Da이라고 하였으며, Guigoz *et al.*44)은 3,000 Da 이하라고 하였다. 김등2)에 의하면 분자량 2,400-3,500 Da 사이에 존재하는 peptide가 쓴맛을 많이 형성한다고 하였으며, Aubes-Dufau *et al.*33)은 hemoglobin 가수분해물의 쓴맛 peptide 분리 연구에서 분자량 500-5,000 Da 범위에서 주로 쓴맛이 나타난다고 하였다. 또한 Lee *et al.*43)의 연구에 의하면, 치즈의 수용성 질소 화합물을 GPC 분리하여 관능 검사한 결과 분자량 500-3000 Da에서 가장 쓴맛이 강하다고 하였다.

이들 분획 중에서 쓴맛 peptide를 분리하기 위하여 비교적 쓴맛이 강했던 두 분획 F3과 F5를 선택하였으며, 이들의 쓴맛 강도는 6.78과 7.77로 각각 3.17×10^{-5} M, 3.5×10^{-5} M quinine-HCl equivalent를 나타내었다. 이들의 대략적인 분자량 분포는 350-1,300, 2,100-6,500 Da으로 예상되었다.

(2) C18 RP-HPLC를 이용한 쓴맛 peptide 분리

쓴맛 분획으로 선택된 11S glycinin의 F3와 F5 분획은 prep-C18 Reverse phase-HPLC에서 더욱 분리되었다. HPLC에서 분리된 peptide들은 5 분씩 7 개의 분획으로 나누어 관능 검사되었으며, 이 결과 쓴맛이 강했던 F3에서 2 개(F3f3, F3f4), F5에서 1 개(F5f5)의 쓴맛 분획을 얻을 수 있었다(Fig. 13, Fig. 14).

Prep용 C18 RP-HPLC에서 분취된 쓴맛 분획 F3f3, F3f4, F5f5들은 다시 analytical column에서 단일 분획으로 분리되어 각 분획에 대한 관능검사가 실시되었다. 이때의 분석 조건은 각 분획물의 물리, 화학적 특징에 따라 gradient, flow rate등을 달리하였다. F3f3, F3f4, F5f5에서 분리된 다양한 peptide들은 각 분획마다 쓴맛이 관능 검사되었고, 이들 중 쓴맛이 강했던 분획이 Fig. 15, Fig. 16, Fig. 17에 각각 표시되었다. F3f3에서 분리된 23 개의 peptide 분획 중에서 F3f3-2와 F3f3-13이 쓴맛을 나타내었다. 특히 분획 F3f3-2는 reverse phase column상에서 비교적 친수성 부분인 retention time, 2분 정도에서 분리되어 아주 강한 쓴맛을 나타내었다. 이 두 분획에 대한 재분석을 행한 결과, 각 peptide 분획은 몇 개의 단일 peptide로 분리될 수 있었다. F3f3-1의 경우에는 flow through 부분을 통과한 직후인 5.9 분에 단일 peak로 분리될 수 있었다. F3f3-13은 주된 3 개의 peak 이외에 몇 개의 minor peak가 함께 분리되었다. 이들은 대부분 물리 화학적인 성질이 거의 비슷하여 26-32 분 사이에서 나타났었다(Fig. 15). F3f4 분획에 대해서는 Fig. 16에 나타난 것과 같이 22 개의 peptide 분획중에서 F3f4-11과 F3f4-17 분획에서 쓴맛을 나타내었으며, F3f4-11 분획은 특히 강한 쓴맛을 나타내었다. 이들 두 분획에 대한 재분석에서 F3f4-11 분획은 F3f4-13과 같이 2 개의 주된 peak와 몇 개의 minor peak가 분리되었다. 그러나 F3f4-17분획은 3 개의 단일 peak로 분리될 수 있었다. F5f5 분획의 결과는 Fig. 17과 같으며 20 개의 peptide 분획 중에서 F5f5-1과 F5f5-16에서 쓴맛을 나타내었다. 이 결과에서 F5f5-1은 1 개의 단일 peak를 분리될 수 있었으며 F5f5-16 분획에서는 1 개의 주된 peak와 minor peak들로 구성된 것을 확인할 수 있었다.

분리된 각 peptide들은 농도는 낮으나, 순수하게 분리된 상태이므로 이들의 관능검사가 가능하였다. 쓴맛 peptide의 분리 연구는 오래 전부터 진행되어 왔으며, 특히 치즈의 쓴맛 연구와 더불어 분석법에 대한 연구도 함께 발전해 왔다. 여러 가지 추출법45)과 더불어 GPC31), 전기영동법, ion exchange chromatography46), HPLC등의 방법에 의해 쓴맛 peptide들이 분리되어 왔다. 이 중에서 특히 reverse phase HPLC를 이용한 분리 방법은 Champion *et al.*47)등이 시작한 이후부터 최근까지 가장 강력한 분리 기술로 이용되고 있다48).

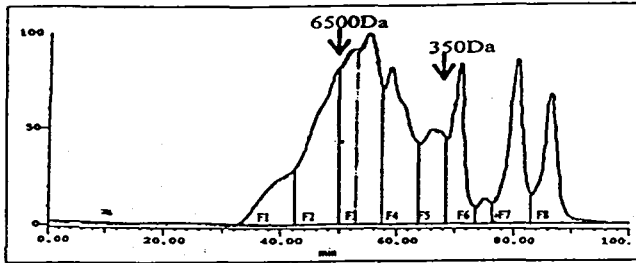


Fig. 12. Elution profile of tryptic digests of 11S glycinin on a Superdex peptide column

Fraction 1-8 were collected. Flow rate was 0.25 ml/min and injection volume was 100 μ l. Mobile phase was distilled water.

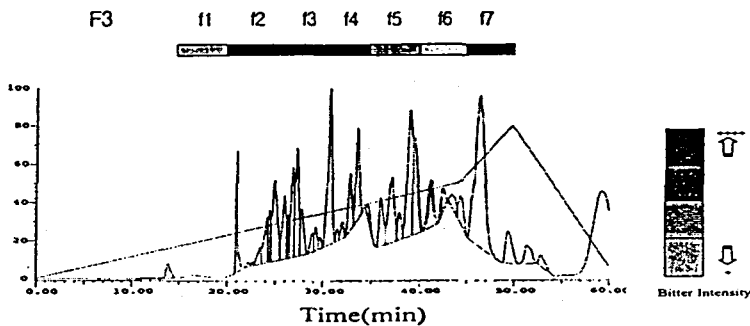


Fig. 13. Fractionation of F3 on the prep-C18 reverse phase chromatography and bitter intensity of each fraction.

The separation of F3 on the prep-Supelcosil C18 column. Fraction f1-f7 were collected and sensory evaluated. Flow rate was 1 ml/min. The fraction were eluted at room temp. with 90% EtOH containing 0.1% HCl.

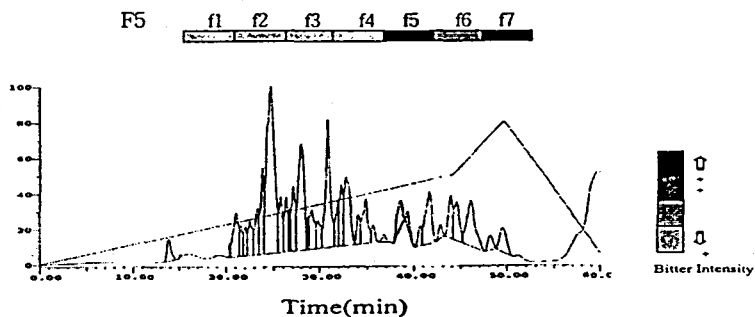


Fig. 14. Fractionation of F5 on the prep-C18 reverse phase chromatography and bitter intensity of each fraction.

The separation of F5 on the prep-Supelcosil C18 column. Fraction f1-f7 were collected and sensory evaluated. Flow rate was 1 ml/min. The fraction were eluted at room temp. with 90% EtOH containing 0.1% HCl.

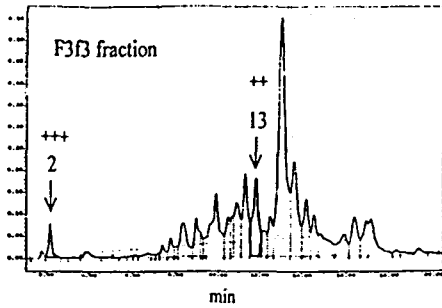
Table 19. Sensory bitter intensity, quinine-HCl equivalent and the estimated average molecular weight of GPC fractions of soybean 11S protein hydrolysates

	No. of pooling fraction	Bitter Intensity	Quinin-HCl eqiv. (M)	Estimated M.W. (Da)
F1	28-43	3.12	1.95×10^{-3}	12,500 -
F2	44-51	3.72	2.15×10^{-3}	6,500-12,500
F3	52-59	6.78	3.17×10^{-3}	2,126-6,500
F4	60-65	6.50	3.08×10^{-3}	1,348-2,100
F5	66-69	7.77	3.50×10^{-3}	350-1,348
F6	70-79	6.46	3.06×10^{-3}	75-350
F7	80-87	6.72	3.15×10^{-3}	
F8	88-93	7.49	3.45×10^{-3}	

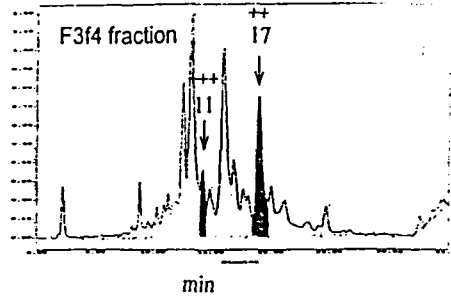
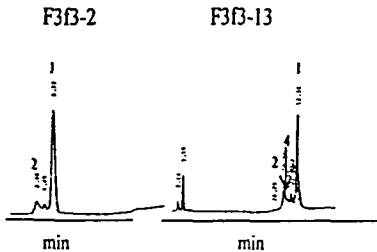
(3) 쓴맛 peptide의 아미노산 서열 결정

단일 peak에서 분리된 peptide들의 아미노산 서열이 각각 결정되어 Table 20 에 나타내었다. 먼저 F3f3-2 분획의 주된 peak는 Arg-Pro(RP)으로 결정되었다. 특이하게도 이 쓴맛 peptide는 이미 합성 peptide를 이용한 쓴맛 연구에서 쓴맛 peptide로 알려져 있으며 threshold value가 0.8 mM이라고 보고되었다(16). 또한 강한 쓴맛 peptide로 알려진 RPFF의 쓴맛 unit로 보고되고 있는 서열, RP와 일치하였다(14). F3f3-13에서는 주된 peptide 서열이 Leu-Ala-Gly-Asn-Gln-Glu-Gln-Glu(LAGNQEQE)와 Asn-Leu-Gln-Gly(NL QG)이었다. 또한 그 외 minor 분획도 분석되었으며, 이중 Gly-Ile(GI)도 이미 분리되어 보고된 쓴맛 dipeptide였다. 매우 강한 쓴맛을 보인 F3f4에서는 매우 다양한 peptide들로 구성되어 있어, 이 중 쓴맛을 내는 peptide를 분별하기가 매우 힘들었다.

특히 주된 분획으로 나타난 첫 번째 peak는 여러 개의 minor peak를 함유하고 있어 단일 peak를 분리하기가 매우 힘들었다. 그들은 Ser-Ala-Glu-Phe-Gly(SAEFG) 혹은 Ser-Asp-Asn-Phe(SDNF)의 서열이 주된 peak라고 판단되었다. 또한 매우 acidic한 peptide인 Glu-Gln-Gly-Gly-Glu-Gln-Gly(EQGGEQG)도 함께 함유되어 있었다. 그러나 f3f4-17에서는 3가지 peak가 분리되었으며 이들의 아미노산 서열도 비교적 쉽게 분석되었다. 이들의 서열은 Asn-Ala-Leu-Pro-Glu(NALPE), Asn-Asn-Glu-Asp-Thr(NNEDT), Ala-Gly-Asn-Pro-Asp-Ile-Glu-His-Pro-Glu(AGNPDIE HPE), Gly-Asn-Pro-Asp-Ile-Glu-His-Pro(GNPDIEHP)으로 밝혀졌다. 이중 GNPDIEHP은 AGNPDIEHPE의 부분 구조로 같은 peptide에서 유래하였음을 알 수 있었다. F5f5-1의 분획은 Lys-Leu-His-Glu-Asn-Ile-Ala-Arg (KLHENIAR)의 서열을 가지고 있었으며 F5f5-16에서 분리된 peptide는 각각 Gly-Met-Ile-Tyr-Pro-Gly(GMIYPG), Tyr-Gln-Gly-Asn-Ser(YQGNS), Ile-Gly-Thr-Leu-Ala-Gly-Ala(IGTLAGA), Asn-Phe-Asn-Asn-Gln-Leu-Asp-Gln-Thr-Pro-Arg(NFNNQLDQTPR)의 서열을 가지고 있었다. 이들 쓴맛 peptide의 subunit상에서 분포를 Fig. 18에 나타내었다. Nielsen(19)등은 glycinin의 각 subunit의 gene의 특징을 보고하였으며, 여기서 Gy1, Gy2, Gy3, Gy4, Gy5 gene에 대응하는 각 subunit를 G1(A1aB2), G2(A2B1a), G3(A1bB1b), G4(A5A4B3), G5(A3B4)라고 보고하였으며, 나중에 G1에 대한 subunit는 A1aBx로 수정되었다(37). 이러한 알려진 각 subunit의 아미노산 서열에서의 비교를 통해 각 쓴맛 peptide의 위치가 파악될 수 있었다. 비교적 유사성이 많은 G1, G2, G3에서 비슷한 peptide가 많이 유리되었다. 또한 G5에서도 비교적 많은 쓴맛 peptide가 분포하고 있었다. 이 결과에서 알 수 있는 것은 앞서 가수분해물의 전기영동상의 형태 비교에서 예측한 바와 같이, 분리된 대부분의 쓴맛 peptide는 11S glycinin subunit들의 acidic subunit에 존재하는 peptide들이었다.



bitter peptides from F3f3 fraction



bitter peptides from F3f4 fraction

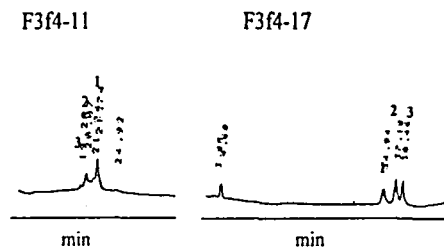


Fig. 15. The purification of bitter peptides from F3f3 using analytical C₁₈ RP-HPLC

The first analysis RP-C₁₈ column was Delta-pack C(3.9×150mm) and flow rate was 0.8 ml/min. The second column was TSK-ODS 80TM(4.6×150mm) and flow rate was 0.5 ml/min

Fig. 16. The purification of bitter peptides from F3f4 using analytical C₁₈ RP-HPLC

The first analysis RP-C₁₈ column was Delta-pack C(3.9×150mm) and flow rate was 0.8 ml/min. The second column was TSK-ODS 80TM(4.6×150mm) and flow rate was 0.7 ml/min

그러나 SAEFG, SDNF, NALPE, ITLAGA, YQGNS, KLHENIAR 등은 basic subunit 부분에서 유래한 것으로 나타났다. 따라서 이러한 가수분해 결과에서 acidic subunit가 대부분 가수분해되거나 basic subunit 부분에서도 일부 가수분해되어 peptide를 유리하는 것으로 생각된다. 쓴맛 peptide도 많은 부분에서 고루 분포하였으며 특별히 acidic subunit 부분에서 많은 쓴맛 peptide가 유리되었다. 그러나 glycinin의 hypervariable region(HVR)에 해당하는 부분에서는 쓴맛 peptide가 유리되지 않았다.

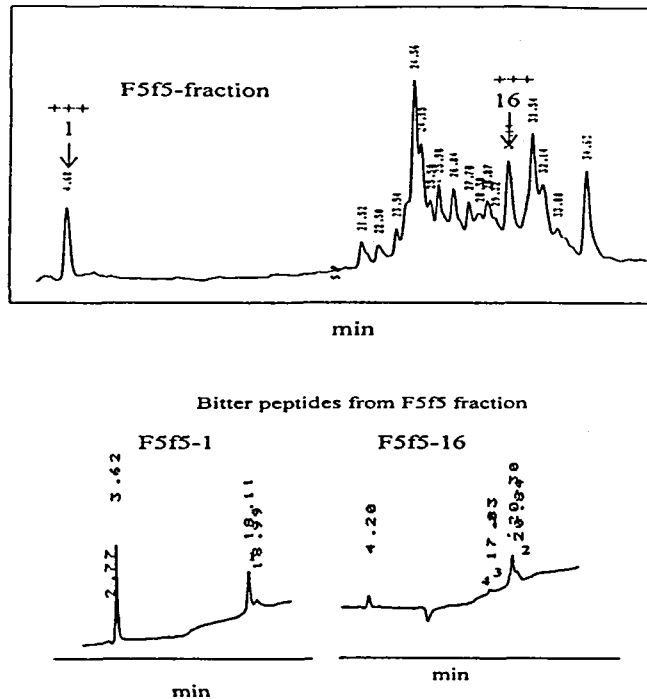


Fig. 17. The purification of bitter peptides from F5f5 using analytical RP-C18 HPLC

The first analysis RP-C18 column was Delta-pack C(3.9×150mm) and flow rate was 0.5 ml/min. The second column was TSK-ODS 80TM(4.6×150mm) and flow rate was 0.7 ml/min

(4) 11S glycinin에서 분리된 쓴맛 peptide의 분자량과 소수성

11S glycinin에서 유래된 쓴맛 분획의 peptide들은 분자량 200 Da에서 1,400 Da까지 다양한 분포를 나타내었으며, 이때의 아미노산 잔기의 수는 2 - 12 개 정도였다(Table 21). 이는 앞의 GP-HPLC에서 예측한 F5의 분자량 분포와 잘 일치하였다. 그러나 F3 분획에서와 같이 2,100 - 6,500 Da 사이의 값을 나타내는 peptide들은 분리되지 않았다. 이는 GP-HPLC에 의한 분리 정도가 비교적 넓은 범위까지 포함하고 있기 때문에 분자량 200-1,400 Da의 peptide들도 일부 함유되었으리라 사료되며 따라서 쓴맛 peptide의 분자량 범위는 약 1,400 Da 이하임을 알 수 있다. 분획별로 분리되고 확인된 쓴맛 peptide의 평균 소수성은 Bigelow and Channon(49)의 결과로 계산되었다. 이들 각 peptide들은 reverse phase HPLC상에서 비슷한 부분에서 분리된 peptide들이지만 평균 소수성은 매우 다양한 값을 나타내고 있었다.

주로 dipeptide들은 높은 소수성을 나타내었다. 특히 RP의 경우는 1,670 cal/mole로 가장 높은 값을 나타내었으며, GI의 경우는 1,475 cal/mole이었다. 또한 F5f5-16의 GMIYPG의 소수성도 1,525 cal/mole로 매우 높은 값을 나타내었다. 그러나 그 이외의 대부분의 peptide들은 1,400 cal/mole 이하의 낮은 소수성도를 보였다.

Table 20. Amino acid sequences of bitter peptides isolated from 11S glycinin hydrolysates

Fraction No	Peak No	Amino acid sequence
F3f3-1	1	Arg-Pro
	2	Gly-Tyr
F3f3-13	1	Leu-Ala-Gly-Asn-Gln-Glu-Gln-Glu
	2	Asn-Leu-Gln-Gly
	3	Gly-Ile
	4	Glu-Gln-Pro-Gln-Gln-Asn-Glu
F3f4-11		Ser-Asp-Asn-Phe
	1	Ser-Ala-Glu-Phe-Gly
		Glu-Gln-Gly-Gly-Glu-Gln-Gly
	2	Asn-Ala-Leu-Glu-Pro-Asp-His-Arg-Val-Glu
	Ala-Leu-Glu-Pro-Asp-His-Arg	
	3	Gly-Lys-His-Gln-Gln-Glu-Glu-Glu-Asn-Glu-Gly-Gly
F3f4-17	1	Ala-Gly-Asn-Pro-Asp-Ile-Glu-His-Pro-Glu
		Gly-Asn-Pro-Asp-Ile-Glu-His-Pro
	2	Asn-Ala-Leu-Pro-Glu
	3	Asn-Asn-Glu-Asp-Thr
F5f5-1	1	Lys-Leu-His-Glu-Asn-Ile-Ala-Arg
F5f5-16	1	Gly-Met-Ile-Tyr-Pro-Gly
	2	Tyr-Glu-Gly-Asn-Ser
	3	Ile-Gly-Thr-Leu-Ala-Gly-Ala
	4	Asn-Phe-Asn-Asn-Gln-Leu-Asp-Gln-Thr-Pro-Arg

Table 21. Bitter peptides from 11S glycinin hydrolysates

Fraction No	Amino Acid Sequence	M.W. (Da)	Hydrophobicity (cal/mol)	Hydrophobic residue
F3f3-2	RP	271	167	2/2
	GY	238	1150	1/2
F3f3-13	LAGNQEQE	887	287.5	1/8
	NLQG	430	450	1/4
	GI	188	1475	1/2
	EQPQQNE	871	371.4	1/7
F3f4-11	SDNF	481	550	1/4
	SAEFG	509	540	1/5
	EQGGEQG	703	0	0/7
	ALEPDHR	836	878.6	2/7
	NALEPDHRVE	1178	765	2/7
	GKHQQEEENEGG	1340	166.5	0/12
F3f4-17	AGNPDIEHPE	1077	915	4/10
	GNPDIEHP	877	1003	3/8
	NALPE	542	980	3/5
	NNEDT	591	80	1/5
F5f5-1	KLHENIAR	979	1000	3/8
F5f5-16	GMIYPG	636	1525	3/6
	YQGNS	567	400	1/5
	IGTLAGA	601	878.6	3/7
	NFNNQLDQTPR	1345	731.8	4/11

(5) 분리된 쓴맛 peptide의 합성

분리된 쓴맛 peptide 중에서 가장 쓴맛이 강했던 두 개의 분획, F3f4-11 과 F3f4-17 중의 쓴맛 peak에서 주된 peak라고 사료되는 SDNF, SAEFG와 NALPE를 선택하여 화학적으로 합성하였다. 그러나 RP는 이미 알려진 쓴맛 peptide이므로 합성에서 제외되었다. 합성된 두 peptide는, 분리되어 다시 쓴맛이 확인된 농도와 비슷한 농도로 제조하여 쓴맛 관능 검사를 행하였다. 이 결과 F3f4-11에서 주된 peptide로 사료되는 SDNF는 약한 신맛을 나타내었으며, SAEFG는 다소 약한 쓴맛을 나타내었다(Table 22). 따라서 아마도 이 분획의 강한 쓴맛은 minor peak에 의한 쓴맛이라고 사료된다. 그러나 분리 단계에서 한 개의 단일 peak로 분리된 F3f4-17의 NALPE는 합성 peptide에서도 매우 쓴맛을 나타내는 peptide였으며, 후미가 강하여 시간이 지날수록 그 쓴맛의 강도가 증가하는 특징을 보였다.

Table 22. Comparison of bitterness between bitter fractions and synthetic peptides

Fraction	Amino acid sequence	Conc. (mg/ml)	Bitter Intensity	Synthetic Peptide	Conc. (mg/ml)	Bitter intensity
F3f4-11-1	SDNF	0.0517	+++	SDNF	0.0625	sour
	SAEFG			0.1868	+	
	EQGGEQG			0.1380	sour	
F3f4-17-2	NALPE	0.0477	++	NALPE	0.0625	(+)->(++)
					0.1	++ -> +++

2) Proglycinin hydrolysates의 쓴맛 peptide의 분리

(1) Proglycinin의 쓴맛 peptide의 분리

Proglycinin 가수분해물의 쓴맛 peptide의 분리는 11S glycinin과 같은 조건으로 행하였다. GP-HPLC에 의한 분획은 Fig. 19와 같으며 이에 대한 관능검사의 결과는 Table 23에 나타내었다. 11S glycinin에서와 비슷하게 분자량이 큰 분획인 pF1, pF2에서는 쓴맛을 나타내지 않았고, pF3에서는 약한 쓴맛 정도만을 나타내었다. 또한 pF4 분획과 pF7 분획에서 강한 쓴맛을 나타내었으며, pF5, pF6에서도 전반적으로 쓴맛이 나타났다. 그러나 pF8에서는 쓴맛이 나타나지 않았다. 쓴맛 강도가 가장 높은 pF4와 pF7 분획에서, pF4의 분자량 대는 약 1,300-2,100 Da 사이를 나타내었으며, pF7의 분획은 아미노산 단계나 그 이하의 부산물일 것으로 추정되었다. 따라서 pF4 분획에서의 쓴맛 peptide가 중심으로 분석되었다. pF4 분획을 분취용 C18 RP-HPLC를 이용하여 분리한 결과와 쓴맛 강도를 Fig. 20에 나타내었다. 쓴 분획으로 나타난 pF4-22, 45, 50 분획이 분석용 RP-HPLC에 의해 다시 분석되었다. 이 결과 pF4-22는 column에 부착되지 않고 흘러내리는 부분이 상당히 많았으며, 이 이후 몇 가지 peak로 분리되었다. pF4-45는 많은 peak로 분리되었으며, pF4-50의 경우는 비교적 단일 peak로 분리될 수 있었다. 이들은 11S glycinin의 가수분해물 보다 비교적 단순한 과정으로 분리되었으며, 이로서 아미노산 서열 분석이 가능하였다.

(2) Proglycinin 가수분해물의 쓴맛 peptide의 아미노산 서열 결정

pF4에서 분리된 쓴맛 peptide들은 각각 그 아미노산 서열이 결정되었으며, 그 결과를 Table 24에 나타내었다. pF4-22 분획에서 분리된 peptide들은 주된 peak에서 Asn-Ala-Leu-Lys-Pro-Asp(NALKPD)를 나타내었으며, minor peak는 His-Asn-Ile-Gly-Gln-Thr(HNIGQT)로 확인되었다. 두 peptide의 특징은 비교적 친수성 부분에서 분리되어 비교적 소수성의 값이 낮았다. pF4-45 분획에서 분리된 주된 peak는 Ile-Tyr-Pro-Gly-Cys-

Pro-Ser-Thr(IYPGCPST)이며 이의 fragment인 Ile-Tyr-Pro-Gly-Cys-Pro (IYPGCP)와 Ser-Ile-Ile-Asp-Thr(SIIDT)도 같이 확인되었다.

pF4-50 분획에서는 주된 peak로 Asn-Ala-Met-Phe-Val-Pro-His(NAMFVPH)가 분리되었으며 이의 fragment Asn-Ala-Met-Phe-Val(NAMFV)이 minor peak로 분리되었다. pF4-45와 pF4-50에서 분리된 각 peptide들은 비교적 소수성 정도가 높아서 IYPGCPST와 NAMFVPH는 각각 1,443 cal/mol, 1,570 cal/mol의 값을 나타내었다. 이들의 분자량은 대부분이 500-1,000 Da 사이에 존재하였다. 또한 이들의 서열을 proglycinin의 1차 구조에서 찾은 결과 매우 잘 일치하는 특징을 보여 주었다.(Fig 21, Table 25) 이들은 proglycinin내에서 37 - 42, 103 - 110, 164 - 167, 323 - 327, 367 - 373, 367 - 371번째 위치에 존재하였다. 아미노산 서열과 trypsin 가수분해 결과 생성될 것으로 예측된 peptide와의 비교를 보면, 예측된 peptide fraction 3, 4, 11, 16, 38, 41의 일부분인 쓴맛 peptide들이 발견되었으며, peptide fraction 38과 41에서 보는 바와 같이 trypsin에 의해 분해된 부분이 더 작은 peptide로 분해되었음을 알 수 있었다. 이는 아마도 trypsin에 포함되어 있는 소량의 다른 protease의 작용에 의한 것으로 사료된다. 또한 매우 특이한 결과는 proglycinin에서 분리한 IYPGCPST와 NALKPD는 11S glycinin에서 유래한 쓴맛 peptide, NALEPDHRVE와 GMIYPG와 아미노산 서열의 위치가 거의 일치하거나 겹치는 결과를 보였다. 즉 NALKPD는 11S glycinin의 G5 subunit의 NALEPDHRVE와 같은 위치에서 발견될 수 있었으며, IYPGCPST는 GMIYPG와 IYPG 부분이 같음을 알 수 있었다. 또한 HNIGQT는 G4, G5 subunit의 KLHENIAR와 같은 위치에서 발견되었다(Fig. 18). 또한 NALKPD는 쓴맛 peptide로 밝혀진 NALPE와 비슷한 구상을 이루고 있었다. 따라서 proglycinin을 이용하여 이 단백질의 쓴맛 형성부위를 찾는다는 취지에 매우 잘 적용되었으며, 이를 이용하여 각 아미노산 서열을 조절하여 쓴맛 발현을 조절할 가능성을 보였다.

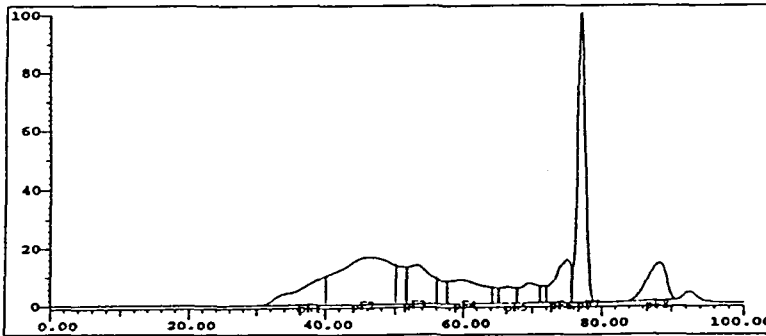


Fig. 19. Elution profile of tryptic digests of proglycinin on a Superdex peptide column

Fraction 1-8 were collected. Flow rate was 0.25 ml/min and injection volume was 100 μ l. Mobile phase was distilled water.

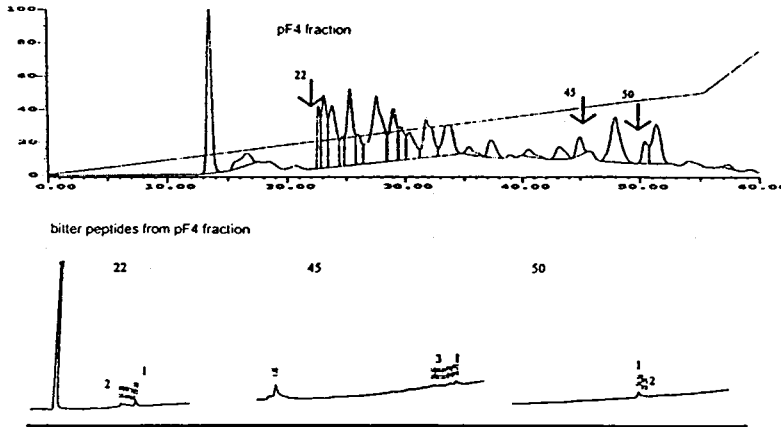


Fig. 20. The purification of bitter peptides from pF4 using with C₁₈ RP-HPLC

The separation of pF4 on the prep-supelcosil C₁₈ column. Flow rate was 1 ml/min. The second column was analytical C₁₈ TSK-ODS 80TM(4.6×150mm) and flow rate was 0.5 ml/min

Table 23. Sensory bitterness and estimated average molecular weight of GPC fractions of proglycinin hydrolysates

Fraction	Pooling No.	Bitter Intensity	Molecular weight
pF1	30-39	-	12500-
pF2	40-49	-	6500-12500
pF3	50-55	+	2100-6500
pF4	56-63	+++	1345-2100
pF5	64-71	++	350-1345
pF6	72-75	++	75-350
pF7	76-79	+++	
pF8	80-100	-	

Table 24. Amino acid sequence and characteristics of bitter peptides isolated from proglycinin hydrolysates

Fraction	Peak No.	Amino acid sequence	M.W.(Da)	Hydrophobicity (cal/mol)	Hydrophobic residue
pF4-22	1	NALKPD	745	1067	3/6
	2	HNIGQT	758	642	2/6
pF4-45	1	IYPGCPST	962	1443	5/8
	2	IYPGCP	760	1908	4/6
	3	SIID	470	1200	2/4
pF4-50	1	NAMFVPH	972	1570	4/7
	2	NAMFV	702	1160	2/5

(3) Proglycinin에서 분리된 쓴맛 peptide의 특징

분리된 쓴맛 peptide의 구성 아미노산 분포를 살펴보면 소수성 아미노산과 염기성 및 산성, 극성기를 가진 아미노산의 분포가 다양하게 존재함을 알 수 있었다. 그러나 IIS glycinin에서와는 달리 proglycinin 가수분해 결과 유리된 쓴맛 peptide들의 경우에는 다소 소수성 아미노산의 분포가 높으며 그 분포에 따라 쓴맛 정도도 증가하는 형태를 보였다. 또한 분리된 peptide에서의 소수성 아미노산의 위치는 대부분 peptide의 중심이나

C-말단 부근에서 위치하고 있었다. 비교적 쓴맛이 강했던 부분의 특징을 비교해 보면 분자 내에 Leu, Pro, Phe 등의 소수성 아미노산이 차지하는 비율이 높으며, 따라서 분자의 소수성도 비교적 강한 편이었다.

```

1 MAKLVFSLCF LLFSGCCFAF SSREQPQNE CQIQKLNALKPDDNRIESEGG
51 LIETWNPNNK PFQCAGVALS RCTLNRNALR RPSYTNQPQE IYIQQKGIF
101 GMYYPGCPSTFEEPQQPQR GQSSRPQDRH QKIYNFREGD LIAVPTGVAW
151 WMYNNEDTPV VAVSIIDTNS LENQLDQMPR RFYLAGNQE EFLKYQQEQG
201 GHQSQKKGK HQEEENEGGSI LSGFTLEFLE HAFSVDKQIA KNLQGENEGE
251 DKGAVTVKGLSVIKPPTD EQQRPQEEE EEEDEKPC KGDKHKCQRP
301 RGSQSKSRRN GIDETICTMR LRHNIGQTSS PDIYNPQAGS VTTATSLDFP
351 ALSWLRLSAE FGSLRKNNAMFVPHHYNLNANS IYALNGRAL IQVVNCNGER
401 VFDGELQEGR VLVIPQNFVV AARSQSDNFE YVSFKTNDTP MIGTLAGANS
451 LLNALPEEVI QHTFNLKSQQ ARQIKNNNPF KFLVPPQESQ KRAVA

```

Fig. 21. Amino acid sequence of proglycinin AlaB1b subunit and the position of bitter peptides

Table 25. Comparison of bitter peptides from proglycinin in the estimated peptide fraction

	Peptide fraction estimated	Bitter peptide isolated
3	<i>LNALK</i>	NALKPD
4	<i>PDNR</i>	
11	<i>GIFGMIYPGCPSTFEEPQQPQR</i>	IYPGCPST
16	<i>EGDLIAVPTGVAWWMYNNEDTPVVAVSIIDTNSLENQLDQMPR</i>	SIIDT
38	<i>HNIGQTSSPDIYNPQAGSVTTATSLDFPALSCLR</i>	HNIGQ
41	<i>NAMFVPHYNLNANSIYALNGR</i>	NAMFVPH

3) 분리된 쓴맛 peptide의 특징 고찰

대두 단백질의 쓴맛을 나타내는 peptide를 분리한 예는 Fujimaki(71), Arai(72), Yamashita(73), 등과 최근의 Kukman(32) 등의 연구 결과가 있으며, 그들은 각기 다른 아미노산 서열을 가진 쓴맛 peptide를 분리하였다. Fujimaki *et al.*(32)은 대두 단백질의 pepsin 가수분해물에서 7 가지의 쓴맛 peptide를 분리하였으며 이들은 2 - 4 개의 아미노산으로 구성된 비교적 저 분자량의 peptide였다. 이들은 C-말단과 N-말단에 각각 Leu이 존재하는 특징을 보였다. 또한 Yamashita *et al.*(73)은 ninhydrin negative bitter peptide들을 분리하고 이들이 pyrrolidone carboxylic acid에

연결된 peptide임을 보고하였다. 또한 Arai *et al.*(72)은 Nondialyzable bitter peptide에서 분자량 2,600 Da 정도의 tetracos bitter peptide를 분리하였다. 이러한 oligopeptide에서 C-말단의 YFL의 서열이 쓴맛을 내는 중심부위라고 보고하였다. Kukman *et al.*(32)은 HPLC를 이용한 연구에서 대두 단백질에서 비교적 소수성이 높은 14 개의 저 분자량 쓴맛 peptide를 분리하였다. 그러나 이러한 결과에서 어떠한 공통점을 찾아내지는 못하였다.

본 실험의 결과 분리된 쓴맛 peptide들을 대두 단백질에서 이미 알려진 쓴맛 peptide들의 경우 (Table 26)와 비교한 결과, 약간의 차이점을 발견할 수 있었다. 즉 본 실험의 결과 분리된 쓴맛 peptide들의 소수성은 그다지 높지 않으며, 이들이 가지고 있는 소수성 아미노산의 수도 그다지 많지 않았다. 그러나 알려진 대부분의 쓴맛 peptide는 그 소수성 정도가 대단히 높으며, 특히 Kukman *et al.*(32)의 쓴맛 peptide는 전부 1,400 cal/mole 이상의 높은 값을 보이고 있다. 그러나 이 결과는 소수성 계산 방법이 다르기 때문에 나타난 결과이며 Tanford(50)의 방법에 의해 계산되었다. 그러나 소수성의 계산 방법은 Tanford 이후에 많은 연구가 있었으며, 최근에는 주로 Bigelow *et al.*(49)의 방법에 의해 계산되고 있다(3). Bigelow *et al.*의 방법에 의하면 Kukman *et al.*의 결과는 다소 다르게 나타난다. 즉 분리된 14개의 peptide들 중에서 4개의 쓴맛 peptide들은 1,400 cal/mole을 넘지 않는 결과를 보였다. 또한 Fujimaki *et al.*의 결과에 의한 소수성 정도도 그다지 높지 않았다. 그러나 최근까지 분리되어 보고된 많은 쓴맛 peptide들은 소수성 정도와 그 쓴맛 정도가 상관성을 가진다고 보고되고 있으며, 소수성 아미노산의 분포도 높은 것으로 알려져 있다. 이러한 차이는 어디에서 오는 것일까? 기존에 알려진 쓴맛 peptide의 분리 과정을 살펴보면 대부분의 쓴맛 peptide가 소수성 아미노산을 많이 함유하고 있으며, 이들이 Q-rule을 따른다는 근거 하에서 methanol이나 butanol추출 과정을 거쳐 쓴맛 peptide를 분리한 경우가 대부분이므로 이들의 소수성이 당연히 높다고 할 수 있다. 하지만 본 실험에서는 물 추출과 GPC에 의한 분자량 cut off에 의한 분획으로 시작하였으며 이러한 용매 추출 과정을 거치지 않은 상태에서 분리하였다. 따라서 소수성의 정도는 매우 다양하며 용매 추출 결과와 다소 다른 결과를 보였다. Fujimaki *et al.*(17)의 분리 과정을 보면 본 실험과 비슷하게 물 추출과 GPC에 의해 쓴맛 분획을 나누어 peptide를 분리하였으며, 이 결과로 분리된 쓴맛 peptide들은 소수성이 그다지 높지 않았다. 분리된 8 개의 peptide들 중에서 5 개의 peptide가 소수성 1,400 cal/mole 이하의 값을 나타내어 본 실험과 유사한 경향을 보였다. 1,400 cal/mole의 기준은 Ney(10)의 Q-rule에 근거를 둔 것으로 이에 대한 경향은 원료 단백질의 전체 아미노산들의 평균 소수성뿐만 아니라, peptide이 평균 소수성에도 적용되고 있으며, 쓴맛 peptide 연구의 중심이론이 되어 왔다. 그러나 본 실험 결과와 Fujimaki *et al.*에 의해 분리된 대두 단백질 가수분해물에서의 쓴맛 peptide들은 이 이론에 그다지 적용되지 않는 듯하다. 또한 dipiperazine, 이성질체등의 쓴맛에 대한 연구(11)에서와 같이, 같은 아미노산 서열에서 입체 구조와의 차이에서 고리화된 peptide와 선형의 peptide에서의 쓴맛 강도의 변화 등은 소수성에 의한 쓴맛 예측이 꼭 적용되는 바는 아니라고 사료된다.

쓴맛 peptide내에서의 소수성 혹은 쓴맛 아미노산의 위치를 비교해 보면, 알려진 바와 같이 쓴맛 아미노산은 Ile, Leu, Phe, Tyr, Try등이며 이들은 대부분 소수성 아미노산의 형태이다. 또한 Arg, His, Pro, Val등도 약하지만 쓴맛을 나타내는 아미노산들이다. 그러나 분리된 peptide의 위치에서의 공통점은 거의 없었으며, 단지 쓴맛 peptide내에서 이들 아미노산들이 반드시 필요하다는 사실만을 알 수 있었다. 따라서 peptide가 쓴맛을 내는 요인에 대한 다음 단계의 실험으로 그들이 가지는 공간적 구조 특성을 합성 peptide를 이용하여 분석하였다.

Table 26. Bitter peptides isolated from soybean protein by Fujimaki *et al.*(17) and Kukman *et al.*(32)

Bitter peptide of Fujimaki ^{16,18,19)}	Hydrophobicity (cal/mole) by Bigelow <i>et al.</i> (49)	Bitter peptide of Kukman(32)	Hydrophobicity (cal/mole)	
			Tanford(50)	Bigelow(49)
RL	1275	FLS	1460	1333
RLL	1450	LLPH	1990	1675
GL	900	LVGY	1750	1400
LK	1650	IYIG	2340	2050
LF	2150	VYDV	1700	1325
FIQGV	1390	SVIY	1900	1613
SKGL	750	VYFV	2230	1475
FLIQGV	1267	ISII	2210	1975
Pyrrolidone carboxylE-GSAIFVL	-	VVLY	2170	1775
		DIF	2050	1817
F-(R, D2, E2, G, I, L, K2, P, S, T)-W- (A, R, D, G, V)-QYFL	-	GYPVV	1770	1580
		YVVL	2170	1775
		SGFTL	1600	880
		YSNLNFL	1440	966.7

4. NALPE를 이용한 쓴맛 peptide의 구조적 특징연구

1) NALPE의 분자적 구조 특징

대두 단백질 11S glycinin에서 분리된 쓴맛 peptide인 Asn-Ala-Leu-Pro-Glu (NALPE)는 분자량 512 Da의 작은 peptide이고, 분자 내부에 쓴맛 peptide에서 가장 많은 분포를 보이는 소수성 아미노산인 leucine과 proline을 가지고 있다. 그러나 이 peptide의 N-말단과 C-말단에서의 아미노산 형태는 보고된 쓴맛 peptide들과는 달리 염기성 아미노산이나, 소수성 아미노산의 특징은 보이지 않고 있다. 또한 소수성도 980 cal/mol로 Ney(24)의 Q-rule에 의해 제창된 1,400 cal/mol에 비해 매우 낮았다. 이 peptide의 화학적 구조는 Fig. 22에 나타내었다. N-말단의 asparagine은 전하를 띄지 않은 극성의 아미노산이며, alanine, leucine, proline은 비극성의 아미노산으로서 서로 인접해 있으면서 소수성 부위를 형성할 것으로 생각된다. 특히 leucine은 대단히 소수성이 큰 아미노산이며, 많은 쓴맛 peptide에서 관찰되고 있다. Fujimaki *et al.*(17)이 분리한 쓴맛 peptide들에서는 이러한 leucine의 분포가 매우 중요한 부분을 차지하였다. 그들은 분리된 모든 leucine을 포함한 peptide들이 쓴맛을 나타내었으며, 특히 leucine이 peptide의 끝 부분에 위치할 때 쓴맛이 강해진다고 보고하였다. Leucine을 포함한 peptide의 쓴맛에 대한 Ishibashi *et al.*의 연구(17)에서도 많은 사실이 보고되었다. Leucine은 아미노산에서는 약한 쓴맛을 가지고 있지만 Leu-Leu의 dipeptide가 되면 그 쓴맛은 2 배로 강해지며, leucine 잔기가 하나씩 늘 때마다 2 배씩 증가함을 관찰하였다. 또한 leucine을 C-말단으로 하고 N-말단에서 glycine의 잔기가 하나씩 늘 때마다 쓴맛의 강도는 2 배씩 증가하였다. 결국 C-말단에 leucine이 존재 할 때 아미노산 수가 하나씩 늘 때마다 쓴맛의 강도가 증가함을 알 수 있었다. Leucine이 NALPE와 같이 5 개의 아미노산으로 구성된 peptide에서 3 번째 위치를 차지하는 Gly-Gly-Leu-Gly-Gly의 경우 그다지 쓰지 않았고 glycine이 제거된 Gly-Gly-Leu의 경우도 맛의 강도가 거의 변하지 않았으

며, Gly-Gly-Leu-Gly의 경우 쓴맛은 더욱 감소하였다. 이들 결과에 의하면 leucine의 위치가 쓴맛 형성에 중요하며, peptide내에서 중앙에 위치하는 것은 그다지 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 그러나 본 연구에서는 leucine이 C-말단에 존재하지 않으며 강한 쓴맛을 내는 peptide의 중앙에 위치하고 있다. 따라서 쓴맛은 아마도 peptide내에서의 위치보다는 인접하고 있는 아미노산들이 함께 참가하는 공간적 구조에서 오는 영향인 듯 하다. Proline은 단백질 구조에서 folding의 역할을 담당하는 주요한 아미노산으로 쓴맛 peptide에서도 그 역할이 보고되고 있다. Ishibashi *et al.*(14)은 proline과 glycine을 이용한 합성 tripeptide에서 Gly-Pro-Gly의 경우 최소 감응 농도 20 mM에 비해 Gly-Gly-Pro의 경우 9.5 mM, Pro-Gly-Gly의 경우 4.5 mM로 그 쓴맛의 정도가 proline의 위치에 따라 변하는 것을 보고하였으며, 중앙에 위치할 경우 가장 쓰지 않는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 phenylalanine과 tyrosine등으로 구성된 Pro-Phe-Pro, Phe-Pro-Phe, Tyr-Pro-Phe등의 peptide들은 그 최소 감응 농도가 각각 0.4 mM, 0.4 mM, 0.3 mM로 매우 강한 쓴맛을 내는 것을 보고하였고, 특히 Phe-Pro-Phe, Tyr-Pro-Phe은 중앙의 proline잔기의 folding에 의해 두 아미노산의 소수성의 잔기들이 인접하면서 생기는 구조적 효과로 쓴맛을 낸다고 하였다. 또한 Pro-Phe-Pro의 경우는 proline의 잔기와 phenylalanine의 소수성 잔기 한 쌍이 쓴맛 발현에 작용하는 것으로 보고하였다. 따라서 proline은 소수성 방향족 잔기를 공여할 뿐 아니라 구조적으로 folding에 관여하고 있어 쓴맛 발현에 중요한 역할을 담당하고 있으리라 사료된다. C-말단에 존재하는 glutamic acid의 경우는 쓴맛 발현에 있어 매우 드문 경우로 이 쓴맛 peptide에서의 역할이 주목된다. Ishibashi *et al.*(17)에 의하면 Leu-Glu·HCl의 경우 신맛을 나타낸다고 보고하였으며, Shinoda *et al.*(16)에 의하면 Phe-Phe-Pro-Glu의 경우 threshold value가 1.75 mM에서 proline이 glutamic acid로 바뀐 Phe-Phe-Glu-Glu의 경우, 쓴맛이 사라져 쓴맛의 억제 효과를 볼 수 있었다고 보고하였다. Ishibashi *et al.*(74)은 Val-Glu의 경우 쓴맛과 우마미, 신맛이 혼재한 상태를 보고하였다. 따라서 C-말단에서의 glutamic acid의 역할은 주변의 아미노산에 의해 많은 변화를 가지는 것으로 나타났다. 그러므로 NALPE가 나타내는 쓴맛은 각 아미노산의 서열에 의해 나타나는 3 차원상의 구조적 특징에서 유래한 것으로 사료된다.

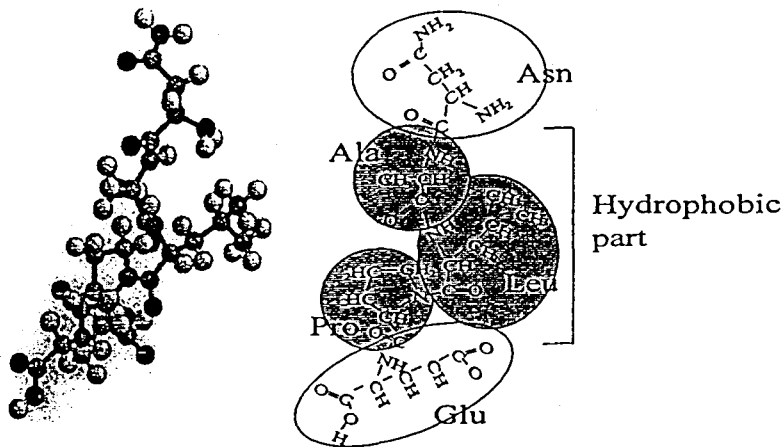


Fig. 28. Computer simulated chemical structure of NALPE, bitter peptide isolated from soybean 11S glycinin

제 4장. 결론

11S glycinin이 SDS-PAGE에 의해 acidic subunit와 basic subunit를 확인되었으며, 탈지 대두 박에서 90%의 정제도로 분리되었다. *E.coli*에서 발현된 proglycinin은 SDS-PAGE, western blotting analysis와 N-말단의 아미노산 서열 분석 등으로 확인되었으며, 97%의 정제도로 분리되었다. 이들 단백질은 trypsin으로 각각 가수분해되었다. 11S glycinin은 효소/기질 비 3%에서 4 시간 가수분해에 의해 14.0×10^{-5} M quinine-HCl equivalent의 강한 쓴맛을 나타내었으며, 12%의 가수분해도(DH)를 나타내었다. 이 가수분해도(DH)는 TNBS법에 의한 α -amino 질소의 형성 정도와 비슷한 형태로 1 시간 내에 급격히 가수분해되었으며 그 이후는 완만한 증가를 보였다. 그러나 시간이 지날수록 α -amino 질소는 pH-stat에 의한 가수분해도에 비해 완만한 증가 정도를 보였다. 11S glycinin의 가수분해시의 분자량 분포 변화는 1시간 이내에 주로 11S glycinin의 acidic subunit가 가수분해되어 저 분자량의 peptide를 형성하였으며, 수용성 부분에서 2,100 Da 이하의 저 분자량의 peptide가 4시간 가수분해에 의해 약 70%를 차지하였다. 또한 가수분해 1 시간이 지나면서 쓴맛 정도도 급격히 증가하였으며 이후 완만하게 증가하였다. 쓴맛의 정도와 360-2100 dalton 범위의 peptide들의 분자량 분포 사이에서 약 76%의 상관 관계가 있는 것으로 나타났으며, 따라서 쓴맛 peptide는 대략적인 분자량이 2,100 Da 이하 크기에서 쓴맛을 나타내는 것으로 예상되었다. Proglycinin의 trypsin 가수분해에 의해 예측되는 peptide는 약 50 여 개이며 예측되는 분자량 분포는 실제 가수분해에 의한 결과와 거의 비슷하였다. 대두 단백질의 쓴맛 성분을 확인 위하여 이미 아미노산 서열이 밝혀진 11S glycinin과 proglycinin 가수분해물에서 GP-HPLC, C₁₈ RP-HPLC 등을 통하여 쓴맛 peptide들을 분리하였다. 11S glycinin 가수분해물에서 GP-HPLC에 의한 분획 F3과 F5에서 3개의 분획, F3f3, F3f4, F5f5를 분취용 C₁₈ RP-HPLC를 통해 분리할 수 있었다. 각각의 분획은 다시 21개의 peptide로 분리되어 그 서열이 결정되었다. 이중 RP와 GI는 이미 알려진 쓴맛 dipeptide였으며, LAGNQEQE, SAEFG, NALPE, KLHENIAR, GMIYPG 등이 주된 쓴맛 peptide로 확인되었다. 이들은 11S glycinin의 5개의 subunit중에서 그 위치가 확인되었다. Proglycinin 가수분해물에서도 11S glycinin과 같은 방법으로 7개의 쓴맛 peptide가 분리되었다. 이들은 A_{1a}B_{1b}의 아미노산 서열 중에서 37-42, 103-110, 164-167, 323-327, 367-373의 위치에 분포하고 있었으며, NALKPD, IYPGCPST, SIIDT, HNIGQT, NAMFVPH의 서열을 나타내었다. Proglycinin에서 분리된 NALKPD는 11S glycinin의 한 subunit G5(A3B4)에서 분리된 NALPDPHRVE와 아미노산 서열의 위치가 동일하였으며, IYPGCPST는 11S glycinin에서 쓴맛으로 분리된 GMIYPG와 일부 서열에서 일치하는 결과를 보였다. 분리된 쓴맛 peptide는 분자량 200-1,400 Da 정도였으며, 이들이 나타내는 소수성은 그다지 높지 않았다. 또한 쓴맛 아미노산이나 소수성 아미노산의 분포도 그다지 높지 않았다. 따라서 peptide의 쓴맛은 그 분자 자체의 소수성도나 소수성 아미노산의 분포 및 위치에 의한 영향이라기 보다는 그들이 나타내는 공간적 구조에 의한 영향이라고 사료되었다. 그러나 peptide내의 소수성 아미노산은 필수적으로 존재하여야 하며, 이들의 증가에 의해 쓴맛 증가 경향도 보였다.

제 5장. 참고 문헌

- (1) 서 형주, 명태육 Pronase 가수분해물의 고미 제거에 관한 연구., 고려대 식품공학과 박사논문, 1992
- (2) 김 창현, 단백질분해효소 종류에 따른 분리대두단백 가수분해물의 쓴맛에 관한 연구., 고려대 식품공학과 석사학위 논문, 1992
- (3) Adler-Nissen, J., *Enzymatic hydrolysis of proteins.*, Elsevier Applied Science publisher, London and New York, 1986
- (4) 이 형주, 아미노산과 그 유도체의 맛과 특성., *식품과학*, 19, 13 1986
- (5) 岡井秀雄, Promotion of development of new tasty peptides, *食品と開發*, 23(5), 28-33, 1988
- (6) Matoba, T., Hayashi, R. and Hata, T., Isolation of bitter peptides from tryptic hydrolyzate of casein and their chemical structure., *Agric Biol. Chem.*, 34(8) 1235-1243, 1970
- (7) Fujimaki, M., Kato, H., Arai, S. and Tamaki, E., Applying proteolytic enzymes on soybean. I. Proteolytic enzyme treatment of soybean protein and its effect on the flavor., *Food Technol.*, 22, 968, 1968
- (8) Wieser, H. and Belitz, H. D., Bitter peptide aus dem maisprotein zein durch hydrolyse mit pepsin., *Z. Lebensm.-Untersuch Forsch.*, 159, 329-336 1975
- (9) Matoba, T. and Hata, T., Relationship between bitterness of peptides and their chemical structures., *Agric Biol. Chem.* 36(8), 1423-1431, 1972,
- (10) Ney, K.H., Voraussage der Bitterkeit von Peptiden aus deren Aminosäurezusammensetzung, *Z. Lebensm. Untersuch Forsch.*, 147, 64-71, 1971
- (11) Shiba, T., Uratani, H., Kubota I. and Sumi, Y., Some aspects of the relationship between the structure of a bitter diketopiperazine and its receptor, *Biopolymers.*, 20, 1985-1987, 1981
- (12) Marshall, W.E., Bitterness in soy and methods for its removal, In *Developments in food science* 25, bitterness in foods and beverages, Rouseff, R.L. (ed.). p.275. Elsevier Science Publishers, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo, 1990
- (13) Shinoda, I., Noshio, Y., Otagiri, K., Okai, H. and Fukui, S., Bitterness of diastereomers of a hexapeptide(Arg-Arg-Pro-Pro-Phe-Phe) containing D-phenylalanine in place of L-phenylalanine., *Agric Biol. Chem.*, 50(7), 1785-1790, 1986
- (14) Otagiro, K., Noshio, Y., Shinoda, I., Fukui, H. and Okai, H., Studies on a model of bitter peptides including arginine, proline and phenylalanine residues. I. Bitter taste of di- and tripeptides, and bitterness increase of the model peptides by extension of the peptide chain., *Agric Biol. Chem.*, 49(4), 1029-1026, 1985
- (15) Noshio, Y., Otagiri, K., Shinoda, I. and Okai, H., Studies on a model of bitter peptides including arginine, proline and phenylalanine residues. II. Bitterness behavior of a tetrapeptide(Arg-Pro-Phe-Phe) and its derivatives., *Agric Biol. Chem.*, 49(6), 1829-1837, 1985
- (16) Shinoda, I., Noshio, Y., Kouge, K., Ishibashi, N., Okai, H., Tatsumi, K. and Kikuchi, E., Variation in bitterness potency when introducing Gly-Gly residue into bitter peptides., *Agric Biol. Chem.*, 51(8), 2103-2110, 1987
- (17) Ishibashi, N., Arita, Y., Kanehisa, H., Kouge, K., Okai, H. and Fukui, S. Bitterness of Leucine-containing peptides., *Agric Biol. Chem.*, 51(9), 2389-2394, 1987
- (18) Fukui, H., Kanehisa, H., Ishibashi, N., Miyake, I. and Okai, H., Studies of bitter peptides from casein hydrolyzate. I. Synthesis of bitter peptides BPIa corresponding to Arg-Gly-Pro-Pro-Phe-Ile-Val from casein hydrolyzate by alkaline protease of *Bacillus subtilis*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 56, 766-769, 1983
- (19) Nielsen, N. C., Dickinson, C. D., Cho, T. J., Thanh, V.H., Scallon, B. J., Fischer, R. L., Sims, T. L., Drews, G. N. and Goldberg, R. B., Characterization of the glycinin gene family in soybean., *The Plant Cell*, 1, 313-328, March, 1989

- (20) Kim, C. S., Studies on high-level expression and functional properties of soybean glycinin from microorganisms., D.S. Degree of Thesis, Kyoto University, 1991
- (21) Murphy, P. A. and Resurreccion, A., Varietal and environmental differences in soybean glycinin and β -conglycinin content., *J. Agric. Food Chem.* 32, 911-915, 1984
- (22) Thanh, V. H. and Shibasaki, K., Major proteins of seeds. A straightforward fractionation and their characterization., *J. Agric. Food Chem.* 24(6), 1117-1121, 1976
- (23) Kitamura, K., Okubo, K. and Shibasaki, K., The purification of soybean 11S globulin with ConA-sepharose 4B and Sepharose 6B., *Agric. Biol. Chem.*, 38(5) 1083-1086, 1974
- (24) Argos, P., Narayana, S.V.L. and Nielsen, N.C., Structural similarity between legumin and vicillin storage proteins from legumes., *EMBO J.*, 4, 1111-1117, 1985
- (25) Utsumi, S., Kohno, M., Mori, T. and Kito, M., An alternate cDNA encoding glycinin A₁B_x subunit., *J. Agric. Food Chem.*, 35, 210-214, 1987
- (26) Utsumi, S., Sato, T., Kim, C.S. and Kito, M., Processing of preproglycinin expressed from cDNA-encoding A₁B₁₆ subunit in *Saccharomyces cerevisiae*., *FEBS letter*, 233(2), 273-276, 1988
- (27) Utsumi, S., Kim, C.S., Sato, T. and Kito, M., Signal sequence of preproglycinin affects production of the expressed protein in *Escherichia coli*., *Gene*, 71, 349-358, 1988
- (28) Kim, C.S., Kamiya, S., Sato, T., Utsumi, S. and Kito, M., Improvement of nutritional value and functional properties of soybean glycinin by protein engineering., *Protein Engineering*, 3(8), 725-731, 1990
- (29) Kim, C.S., Kamiya, S., Sato, T., Kanamori, J., Utsumi, S. and Kito, M., High-level expression, purification and functional properties of soybean glycinin from *Escherichia coli*., *Agric. Biol. Chem.*, 54(6), 1543-1550, 1990
- (30) Sathe, S. K., Isolation and characterization of the protein that co-purifies with soybean(Glycinin max L.) glycinin., *J. Food Biochem.*, 15, 33-49, 1991
- (31) Hamilton, J. S., Hill, R. D. and Leeuwen, H. V. A., A bitter peptide from cheddar cheese., *Agric. Biol. Chem.*, 38(2), 375-379, 1974
- (32) Kukman, I. L., Zelenik, M. and Abram, V., Isolation of low-molecular -mass hydrophobic bitter peptides in soybean protein hydrolysates by reversed-phase high-performance liquid chromatography., *J. Chromatography A*, 704, 113-120, 1995
- (33) Aubes-Dufau, I., Capdevielle, J., Seris, J. L. and Combes, D., Bitter peptide from hemoglobin hydrolysate : isolation and characterization., *FEBS letters*, 364, 115-119, 1995
- (34) Shallenberger, R. S. and Acree, T. E., Molecular theory of sweet taste, *Nature*, 216, 480-482, 1969
- (35) Ishibashi, N., Kouge, K., Shinoda, I., Kanehisa, H. and Okai, H., A mechanism for bitter taste sensibility in peptides., *Agric. Biol. Chem.*, 52(3) 819-827, 1988
- (36) Tamura, M., Shinoda, I., Okai, H. and Stammer, C. H., Structural correlation between some amides and taste receptor model., *J. Agric. Food Chem.*, 37, 737-740, 1989
- (37) Nigoro, T., Monma, T. and Fukazawa, C., cDNA clone encoding a glycinin A₁ subunit precursor of soybean., *Nucleic Acids Res.*, 13, 6719-6732, 1985
- (38) 김 미령, 단백질과 단백질분해효소의 종류에 따른 산 가용성 단백질 가수분해물의 쓴맛과 소수성에 관한 연구., 고려대 식품공학과 석사학위 논문, 1993
- (39) 홍 영식, 소맥 글루텐의 산과 효소에 의한 병합 가수분해 시스템에 관한 연구., 고려대 식품공학과 석사학위 논문, 1997

- (40) Kim, C. H., Kim, M. R. and Lee, C. H., Effect of type of enzyme on bitterness of partial hydrolysates of soybean proteins., *Food and Biotechnology*, 1(2), 79-84, 1992
- (41) Kim, S. Y., Park, P. W. and Rhee, K. C., Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate., *J. Agric Food Chem.*, 33, 651, 1990
- (42) Kang, Y. J., Rhee, K. C., Park, Y. H., Hydrolysis of 7S and 11S soy proteins by commercial proteases., *Korean J. Food Sci. Technol.*, 20(3), 338-343, 1988
- (43) Lee K. D. and Warthesen, J. J., Preparative methods of isolating bitter peptides from cheddar cheese., *J. Agric Food Chem.*, 44, 1058-1063, 1996
- (44) Guigoz, Y. and Solms, J., Bitter peptides, occurrence and structure., *Chem Senses Flavor*, 2, 71, 1976
- (45) Harwalkar, V. R. and Elliott, J., Isolation of bitter and astringent fractions from cheddar cheese., *J. Dairy Sci.*, 54(1) 8-11, 1970
- (46) Richardson, R. C. and Creamer, L. K., Casein proteolysis and bitter peptides in Cheddar cheese., *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 8, 46-51, 1973
- (47) Champion, H. M. and Stanley, D. W., HPLC separation of bitter peptides from cheddar cheese., *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 15(4), 283-288, 1982
- (48) Lemieux, L. and Amiot, J., Application of reverse phase high performance liquid chromatography to the separation of peptides from phosphorylated and dephosphorylated casein hydrolysates., *J. Chromatography*, 473, 189-206, 1989
- (49) Bigelow, C. C. and Channon, M., Hydrophobicity of amino acids and proteins. In : Hand book of biochemistry and molecular biology(Fasman, G. D., ed.), CRC Press, Cleveland, 3rd ed., vol. 1, p209-243, 1976
- (50) Tanford, C., Contribution of hydrophobic interactions to the stability of the globular conformation of proteins., *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 4240-4247, 1962
- (51) Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4., *Nature*, 227, 680-685
- (52) Bradford, M. M., 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, 1976
- (53) Howe and Hershey, *J. Bio. Chem.*, 256, 12836- , 1980
- (54) Matsudaira, P., Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted on to polyvinylidene difluoride membranes., *J. Bio. Chem.*, 262, 10035-10038, 1987
- (55) Weiffenbach, J. M., Wolf, R. O., Benheim A. E., and Folio, C. J., Taste threshold assessment : a note on quality specific differences between methods., *Chem Senses.*, 18(2), 151-159, 1983
- (56) Okuyama, T., Kasai, H., Protein determination by TNBS method., 蛋白質, 核酸, 酵素, 18(13), 1153-1159, 1973
- (57) Ribadeau, D., Brignon, G., Grosclaude, F. and Mercier, J. C., Structure primaire de la casein β bovine : sequence complete., *Eur. J. Biochem.*, 25, 505, 1972
- (58) Gardner, J. Correlation of bitterness thresholds of amino acids and peptides with molecular connectivity., *J. Sci. Food Agric.*, 31, 23-30, 1980
- (59) Brieskern, C. H., Physiological and therapeutical aspects of bitter compounds. In Developments in food science 25, bitterness in foods and beverages, Rouseff, R.L. (ed.). p.15. Elsevier Science Publishers, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo, 1990
- (60) Maga, J. A., Compound structure versus bitter taste. In Developments in food science 25, bitterness in foods and beverages, Rouseff, R.L. (ed.). p.35. Elsevier Science Publishers,

Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo, 1990

- (61) Benedetti, E., Gavuzzo, E., Santini, A., Kent, D.R., Zhu, Y., Zhu, Q., Mahr, C. and Goodman, M., Sweet and bitter taste : structure and conformations of two aspartame dipeptide analogues., *J. Peptide Sci.*, 1, 349-359, 1995
- (62) Kubo, I., Structural basis for bitterness based on Rabdosia Diterpenes., *Physiology & Behavior*, 56(6), 1203-1207, 1994
- (63) Noriyuki K. and Kurihara, K., Mechanism of bitter peptide taste reception : Interaction of bitter compound with monolayers of lipids from bovine circumvallate papillae., *Biochem Biophys. ACTA*, 288, 22-26, 1972
- (64) Aitken, A., Geisow, M. J., Findlay, J. B. C., Holmes, C. and Yarwood, A., Peptide preparation and characterization., In protein sequencing, a practical approach.(ed. by Findlay J. B. C. and Geisow, M. J.) p.58, OIRL press at Oxford university press, 1989
- (65) Henkin, R. I., Gill, J. R., Jr. and Bartter, F. C., Studies on taste thresholds in normal man and patients with adrenal cortical insufficiency, the role of adrenal cortical steroids and serum sodium concentration, *J. Clin. Invest.*, 42, 727-735, 1963
- (66) 蛋白質-構造, 機能, 進化, 大井龍夫, 化學同人
- (67) Kyte, J., Structure in protein chemistry, Garland publishing, Inc. New York and London, p.256-257, 1995
- (68) Ohyama, S., Ishibashi, N., Tamura, M., Nishizaki, H. and Okai, H. Synthesis of bitter peptides composed of aspartic acid and glutamic acid., *Agric. Biol. Chem.*, 52(3), 871-872, 1988
- (69) Kanehisa, H., Miyake, I., Okai, H., Aoyagi, H. and Izumiya, N., Studies of bitter peptides from casein hydrolyzate. X. Synthesis and bitter taste of H-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Val-OH corresponding to C-terminal portion of β -casein., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 57(1), 819-822, 1984
- (70) Staswick, P. E., Hermodson, M. A. and Nielsen, N. C., Identification of the acidic and basic subunit complexes of glycinin., *J. Biol. Chem.*, 256(16), 8752-8755, 1981
- (71) Fujimaki, M., Yamashita, M., Okazawa, Y. and Arai, S., Applying proteolytic enzymes on soybean. 3. Diffusible bitter peptides and free amino acids in peptic hydrolyzate of soybean protein., *J. Food Sci.*, 35, 215-218, 1970
- (72) Arai, S., Yamashita, M., Kato, H. and Fujimaki, M., Applying proteolytic enzymes on soybean. Part V. A nondialyzable bitter peptide in peptic hydrolyzate of soybean protein and its bitterness in relation to the chemical structure., *Agric. Biol. Chem.*, 34(5), 729-738, 1970
- (73) Yamashita, M., Arai, S. and Fujimaki, M., Applying proteolytic enzymes on soybean. Part IV. A ninhydrin-negative bitter peptide in peptic hydrolyzate of soybean protein., *Agric. Biol. Chem.*, 33(3), 321-330, 1969

감사의 글

이 연구는 한국과학재단 특정기초연구(KOSEF 과제번호 96-0420-0501-3)의 일환으로 수행된 것이며 김미령 박사의 학위논문의 일부이다.