

## 효소처리에 의한 분리대두 단백질의 부분 가수분해에 관한 연구

이철호 · 김찬식 · 이삼빈

고려대학교 식품공학과

### Studies on the Enzymatic Partial Hydrolysis of Soybean Protein Isolates

Cherl-Ho Lee, Chan-Shick Kim and Sam-Pin Lee

Department of Food Technology, Korea University, Seoul

#### Abstract

A partial hydrolysis of soybean protein isolate was carried out by using pepsin and trypsin. The degree of hydrolysis was evaluated by chemical analysis, viscometric measurements and gel electrophoresis. The functional properties of the hydrolyzates such as flow behavior, emulsion properties and foaming properties were evaluated. A selective hydrolysis of 11S protein fraction by pepsin was observed from the SDS-PAGE electrophoresis. The changes in the molecular weight distribution by different conditions of enzyme hydrolysis were evaluated. The changes in the intrinsic viscosity of the protein hydrolyzate by reaction time were highly correlated to the contents of TCA soluble protein and 0.03 M CaCl<sub>2</sub> soluble nitrogen. The degree of hydrolysis (DH<sub>TCA</sub>, DH<sub>Ca</sub>) were used to evaluate the effect of enzyme treatment on the functional properties of the hydrolyzate. The apparent viscosity and emulsion capacity and stability of the protein solution decreased as DH increased, while the foaming capacity increased linearly with the increasing DH.

#### 서 론

대두 단백질의 이용가치를 높이고 이용도를 증대시키기 위한 여러가지 방법중에서 가장 현실적이고 이용가능성이 큰 방법의 하나가 효소처리에 의하여 단백질을 부분적으로 가수분해하는 방법이다.

효소에 의한 단백질의 부분적 가수분해로 수용성을 증가시키고, 식품의 기능성을 변화시킴으로서 여러가지 용도 개발을 할 수 있는 것이다. 특히 이들 방법들은 단백질음료라든가 아이스크림, 기타 가공 제품에 많은 용도를 가지고 있으며 이러한 가수분해 제품은 여러가지 식품의 성분<sup>(1-3)</sup>으로 사용될 뿐만아니라 약제<sup>(4-8)</sup>에도 널리 사용되고 있다.

최근에 대두 단백질에 효소처리를 함으로서 기능성을 조절하는 많은 응용이 이루어지고 있다. 예를들면

단백질의 용해도를 증가시키기 위하여<sup>(9-12)</sup> 유화형성능을 개량하기 위하여<sup>(13)</sup>, flavor를 향상시키기 위하여<sup>(14)</sup> plastein반응의 기질로 사용하기 위한<sup>(15, 16)</sup> 여러가지 연구결과가 보고되고 있다.

이와같은 단백질을 부분적으로 가수분해 시킴으로서 단백질의 기능성을 조절할 수 있으며 이때 얻어지는 단백질의 가수분해 정도는 가수분해물의 품질과 관계가 있다. 본 연구에서는 탈지대두박으로부터 추출·분리하여 얻어진 분리대두 단백질에 효소(pepsin 및 trypsin)를 처리하여 가수분해시킨후 동결건조한 단백질제품을 만들고 이들 제품의 가수분해 정도를 고유점도측정, 수용성 단백질 및 유리아미노산 농도 측정과 전기영동으로 평가하였다. 또한 가수분해물의 유체변형성과 유화력, 기포형성능력과 같은 식품기능성의 변화를 평가하였다.

재료 및 방법

재료

탈지대두분(defatted soybean flour)은 soya fluff 2000(미국 Centrol Soya제품)을 사용하였다. 대두단백질 가수분해에 사용된 효소는 pepsin(Sigma Chem, Co., prepared from hog stomach mucosa 1:60,000)과 trypsin(Sigma Chem. Co., recrystallized)을 사용하였다.

분리대두 단백질(SPI)은 탈지대두분(230g)에 증류수 2000ml를 첨가한 후 1N NaOH로 pH를 8로 조정하여 실온에서 저어주면서 1.5시간 동안 추출 하였다. 그 추출액을 2000×g에서 20분 동안 원심분리하여 얻어진 상등액에 1N HCl을 첨가하여 pH4.5로 조정한다 다음 정지하였다. 이때에 얻어진 침전물을 증류수로 3번 세척한 후 증류수 1ℓ에 다시 분산시키었다. 분산액은 0.1N NaOH를 첨가하여 pH를 7.0으로 조정한다 음 동결건조시켰다.

대두단백질 7S와 11S분획은 Aoki등<sup>(17)</sup>의 방법에 준하여 제조하였다.

가수분해 정도의 측정

Pepsin가수분해는 8% SPI 1000ml를 1N HCl을 첨가하여 4℃에 10분 혹은 60분 동안 가수분해 시켰다. 그 가수분해물에 5N NaOH를 첨가하여 pH를 7.0으로 조정한다 다음 동결 건조하였다.

Trypsin가수분해는 8% SPI 1000ml에 2N NaOH를 첨가하여 pH를 8로 조정한다 다음 효소:기질의 비율을 1:200이 되도록 trypsin을 첨가하여 4℃에서 30분 혹은 150분 동안 가수분해 시켰다. 그 가수분해물에 5N HCl을 첨가하여 pH를 6.8로 조정한다 후 동결건조 하였다.

Table 1. Changes in the protein solubility of soybean protein isolate by enzyme hydrolysis.

Enzyme treatments	TCA soluble -N (%)	TCA Soluble protein by ninhydrin test mg leucin /g protein	0.03M CaCl <sub>2</sub> soluble-N (%)
SPI (Control)	1.33	0.	4.0
Pepsin, 10min	4.25	7.47	25.95
Pepsin, 60min	16.46	13.11	48.26
Trypsin, 30min	3.49	1.96	9.15
Trypsin, 150min	3.84	4.85	20.63

가. 고유점도 측정

고유점도는 용량 10ml의 Ubbelohode diution viscometer에 의하여 24.9±0.1℃에서 측정하였다. Viscometer의 물의 흐름시간은 225sec였다. 가수분해 용액의 흐름시간은 두번 반복하여 측정하여 평균치로 하였다. 가수분해물은 phosphate완충용액(pH7.0)에 첨가하여 자석 교반기를 저속으로 1시간 동안 교반한 후에 25μm porosity를 가진 체에 통과시켰다. 처음의 점도 측정은 교반후 5분내에 측정하였다. 용매와 용액의 밀도는 25℃에서 50ml pycnometer로 측정하였으며 가수분해의 단백질 농도는 기준물질로서 bovine serum albumin을 사용하여 Lowry방법<sup>(18)</sup>으로 측정하였다. 단백질 용액의 농도에 따른 Reduced viscosity의 변화로부터 단백질의 고유점도( $[\eta] = \frac{\lim_{C \rightarrow 0} \eta_{sp}}{C}$ )를 추정하였다.

나. TCA-가용성 질소측정

단백질의 TCA가용성을 측정하기 위하여, 가수분해물 50mg에 5% Trichloroacetic Acid(TCA) 용액 10ml를 첨가하여 30분 동안 교반하고 실온에서 하룻밤정 치시킨후 12,000×g에서 20분동안 원심분리 하였다. 상등액의 가용성 질소는 micro-Kjeldahl방법<sup>(19)</sup>으로 측정하였다. 가수분해에 의한 TCA-가용성 질소의 양은 시료에 들어있는 총질소 함량의 백분율로 나타냈다.

다. Ninhydrin test

상등액중의 가용성 단백질 함량은 ninhydrin test<sup>(16)</sup>로 측정하였다. TCA처리 상등액 1ml와 ninhydrin용액(75ml ninhydrin용액+25ml 4N sodium acetate buffer 혼합액) 1ml cap tube에 가하여 충분히 혼합하고 끓는 항온수조에서 15분간 가열시킨 후 냉각수로 냉각시켰다. 50% ethanol용액 5ml를 각각 tube에 첨가한후 남아있는 hydrindantin이 공기에서 산화되도록 30~60초동안 격렬하게 혼합시켰다. 각 용액의 흡광도는 570nm에서 측정하였다.

라. 0.03M CaCl<sub>2</sub>-가용성 질소측정

0.03M CaCl<sub>2</sub> 가용성 질소 함량은 다음과 같이 측정하였다. 시료 3g에 증류수 90ml를 첨가하여 30분동안 혼합시킨 후 CaCl<sub>2</sub> 0.33g을 첨가하였다. pH를 7.0으로 재 조정한다후에 다시 30분 동안 흔들어 준 후 증류수로 10ml까지 채웠다. 혼합용액 일부분을 취하여 총질소를 정량하고 나머지는 1300×g에서 10분동안 원심분

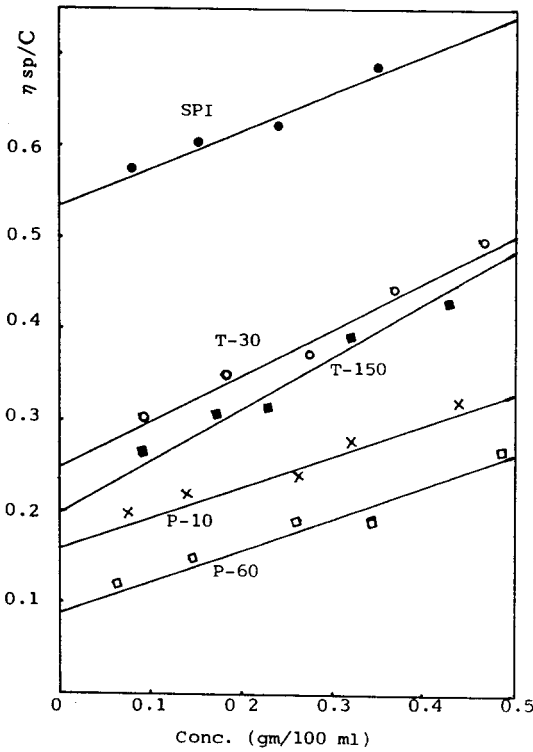


Fig. 1. Reduced viscosity vs. concentration of proteolytic hydrolysates dispersed in phosphate buffer (pH 7.0) (P: pepsin, T: trypsin, 10, 30, 60, 150, :enzyme reaction time)

리하여 그 상등액 중의 질소를 정량하였다. 총질소 농도에 대하여 원심분리 후 상등액에 남아 있는 질소농도의 백분율을 0.03M CaCl<sub>2</sub> 가용성 질소함량으로 하였다.

S. D. S. -P. A. G. 전기영동

가수분해물의 subunit에 대한 전기영동 패턴은 Weber와 Osborn방법<sup>20</sup>에 의해 평가하였다. 시료 6mg을 sodium dodecyl sulfate(S. D. S.)와 β-mercaptoethanol이 각각 0.02% 포함된 0.01M sodium phosphate완충용액 (pH7.0) 10ml에 용해시킨 후 50℃에서 24시간 보관시킨 후 그 용액을 전기영동에 사용하였다. SDS-Polyacrylamide gel (0.6×12cm, 7.5% monomer concentration)에 시료 1ml을 장입시킨 후8mA에서 7시간 전기영동을 진행시켰다. 전개에 사용된 완충액은 phosphate완충액 (0.02M, pH7.2) 이었으며 전개후 gel의 염색은 comassie brilliant blue로, 탈색은 methanol이 포함된 10%초산용액 (10 : 1, v/v) 으로 하였다.

식품 기능성의 측정

점도측정은 대두단백 가수분해물의 현탁액을 1시간 동안 magnetic stirrer로 교반시킨 후 Brookfield synchroelectric cylindrical viscometer-model LVT를 사용하여 25℃에서 측정하였다. 유화형성능력 (emulsifying capacity, EC)과 유화안정도 (emulsifying stability, ES)는 Swift등의 방법과 Acton and Saffle방법을 변형한 이등<sup>21</sup>의 방법에 따라 측정하였다.

기포형성능 (foaming capacity)과 기포안정도 (foaming stability)는 Sathe등의 방법을 변형한 김의 방법<sup>22</sup>에 따라 측정하였다.

결과 및 고찰

가수분해 정도의 평가

1. 수용성 단백질 함량

효소처리 조건에 따른 분리 대두단백질의 가수분해 정도를 판정하기 위하여 여러가지 방법으로 가용성 단백질 량을 측정한 결과는 표 1과 같다. TCA 가용성질소의 양은 원료 분리대두단백질에는 1.33%의 아주 낮은 함량이었으나 Pepsin으로 10분과 60분간 가수분해 함으로서 4.25%와 16.46%로 각각 증가하였다. Trypsin에 의한 가수분해 정도는 비교적 낮게 나타났으며 30분과 150분 처리에서 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

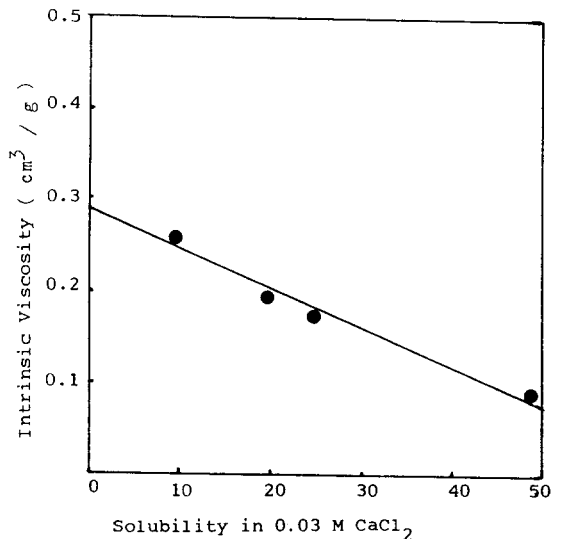
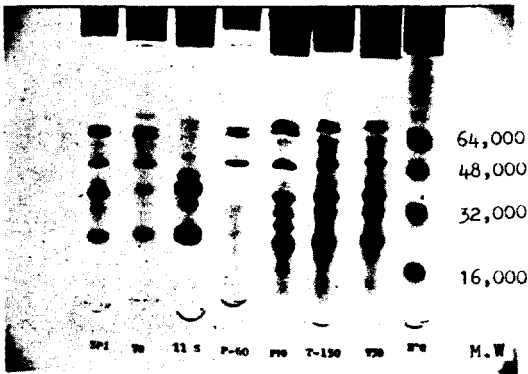


Fig. 2. Plot of relationship between solubility in 0.03 M CaCl<sub>2</sub> and intrinsic viscosity of soybean protein hydrolyzates



**Fig. 3. Electrophoretic patterns of various soybean protein hydrolysates determined by S. D. S-P. A. G. electrophoresis**

(SPI: Soybean Protein isolate, 7S: soybean protein 7S fraction, 11S: soybean protein 11S fraction, P-60: SPI treated with pepsin for 60 min, P-10: SPI treated with pepsin for 10 min, T-150: SPI treated with trypsin for 150 min, T-30: SPI treated with trypsin for 30 min, HG: cross-linked hemoglobin of known molecular weight)

한편 ninhydrin test에 의한 TCA가용성 단백질 량을 보면 역시 pepsin(1.0%) 처리가 trypsin(0.5%) 처리보다 가수분해 속도가 컸으며 trypsin의 경우 30분 처리보다 150분 처리가 2.5배 정도의 큰 가용성 단백질 함량을 나타내었다.

0.03% CaCl<sub>2</sub> 가용성 질소는 가수분해 정도에 따라 더욱 민감하게 변화하여 pepsin으로 10분 및 60분간 가수분해 시킴으로써 최초 4% 수준의 수용성 단백질 함량에 25.95% 및 48.26%로 증가하였으며 trypsin의 경우에도 30분 및 150분 처리로서 9.15% 및 20.63%로 증가한 것으로 나타났다.

**2. 고유점도**

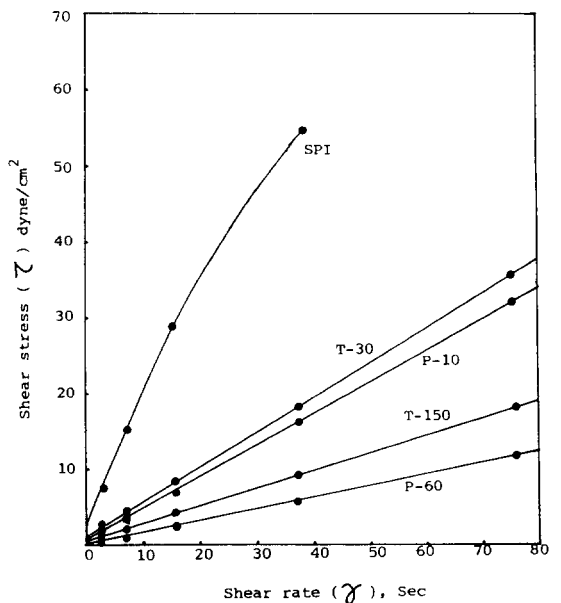
그림 1은 분리대두 단백질과 그 효소 가수분해물의 농도에 따른 reduced viscosity변화를 나타내는 것이다. 분리대두 단백질의 고유점도는 0.54 dl/g이었으며 효소에 의한 가수분해가 진행됨에 따라 고유점도가 감소됨을 알 수 있었다. 고유점도는 분산질의 분자량 및 기하학적 분자구조(혹은 입자구조)와 깊은 관계가 있으며 분자량이 작을수록 또한 구조가 구형에 가까울수록 고유점도는 작아짐으로 본실험에서 관찰된 현상은 효소적 가수분해에 의하여 단백질 polypeptide chain

이 절단됨으로서 결과된 것으로 해석된다. 효소적 가수분해에 의한 고유점도의 변화현상은 ninhydrin test에 의한 TCA가용성 단백질 함량의 변화 및 0.03M CaCl<sub>2</sub> 가용성 질소함량의 변화와 대단히 유사한 양상으로 나타났다.

그림 2는 이들 화학적 방법에 의한 가수분해 정도의 측정결과와 수동력학적 방법에 의한 측정결과와 상관관계를 표시한 것으로 대단히 잘 일치 하였으며 특히 0.03M CaCl<sub>2</sub> 가용성 단백질 함량 변화는 분리대두 단백질의 효소적 가수분해 정도를 나타내는 좋은 방법으로 생각된다.

**3. 전기영동 패턴**

그림 3은 원료 분리대두단백질, 대두단백질 7S분획 11S분획 및 효소적 가수분해 물질들의 전기영동 패턴을 비교한 것이다. Pepsin으로 10분간 처리했을때 7S분획은 그대로 있으나 11S분획이 일부 가수분해 되어 밴드가 흐려지기 시작하고 60분 처리에서는 11S분획이 완전히 소멸되어 나타나지 않았다. 한편 trypsin 처리에서는 7S 및 11S가 모두 영향을 받아 처리 시간이 경과함에 따라 모든 밴드가 같은 수준으로 점차 흐려지는 것을 볼 수 있다.



**Fig. 4. Flow curves of various soybean protein hydrolysates(2%) dispersed in water (Sample legend as Fig. 3)**

**Table 2. Changes in the apparent viscosity at shear rate 7.34 sec<sup>-1</sup> of various soybean protein hydrolysates dispersed in water**

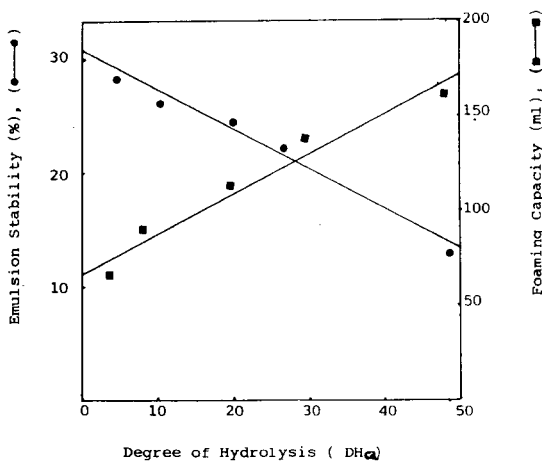
Samples (4%)	Apparent viscosity (cp)
SPI (Control)	260
Pepsin, 10min	31
Pepsin, 60min	2
Trypsin, 30min	43
Trypsin, 150min	5

그림 3의 가장 우측의 HG gel은 cross-linked hemoglobin 표준분자량 시료의 전기영동 패턴으로 이것으로 부터 각 단백질 가수분해물의 분자량 구성을 유추할 수 있다. 전기영동 패턴에서 나타난 결과는 고유점도 및 가용성 단백질 함량 변화와 대단히 잘 일치하는 것으로 pepsin 60분 처리구가 가수분해 정도가 크고 그 다음 pepsin 10분, trypsin 150분 그리고 trypsin 30분이 가장 낮은 순서로 평가될수 있었다.

이상의 실험결과를 종합하여 볼때 측정이 가장 용이하고 가수분해 정도를 민감하게 나타내는 지표로서 총 질소에 대한 0.03M CaCl<sub>2</sub> 가용성 질소함량의 백분율(DH<sub>Ca</sub>)과 ninhydrin test에 의한 TCA 가용성 단백질의 백분율(DH<sub>TCA</sub>)을 각각 가수분해도(degree of hydrolysis)로 설정하고 다음과 같이 정의하였다.

$$DH_{Ca} = \frac{g \text{ Soluble in } 0.03M \text{ CaCl}_2}{g \text{ Total N}} \times 100$$

$$DH_{TCA} = \frac{\text{TCA Soluble protein by ninhydrin test}}{\text{Total protein}} \times 100$$



**Fig. 5. Plot of DH<sub>Ca</sub>(solubility in 0.03 M CaCl<sub>2</sub>) vs. emulsion stability and foaming capacity of various soybean protein hydrolysates**

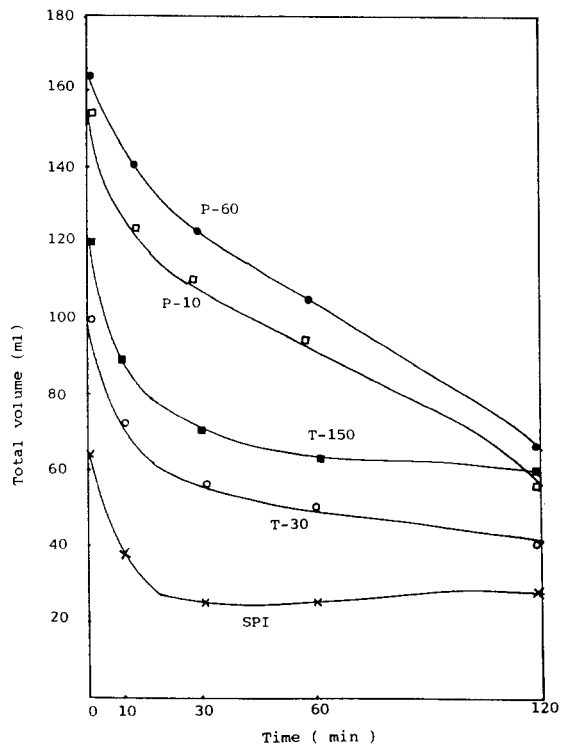
**가수분해물의 식품기능성**

**1. 유동특성**

그림 4는 분리대두단백질과 효소처리에 의하여 얻어진 2% 용액의 충밀림 속도(shear rate)에 따른 충밀림 변형력(shear stress)의 변화를 나타내는 도표이다. 분리대두단백질 2% 용액은 약간의 pseudoplastic 유동특성을 나타내며, 효소처리된 가수분해물은 대부분 Newtonian 유동특성을 보이고 있다. 한편 4% 용액에서는 분리대두단백질은 심한 pseudoplastic 유동특성을 나타내었으나 가수분해물에서는 역시 Newtonian 유동특성을 나타내었다. 표 2는 4% 단백질 용액의 겔보기점도(shear rate 7.34sec<sup>-1</sup>)를 비교한 결과로서 원료 분리대두단백질은 260cP로 가장 높은 값을 나타내고 있으며 가수분해 정도가 진행됨에 따라 그 값은 크게 떨어지는 경향을 나타내고 있다.

**2. 유화형성 능력**

표 3은 대두단백질의 효소적 가수분해 정도에 따른 유화형성능력(EC)과 유화안정도(ES)의 변화를 비교한 것으로 유화형성능력 및 유화안정도는 가수분해 정



**Fig. 6. Foaming capacity and stability of soybean protein hydrolysates in water (Sample legend : Same as in Fig. 3)**

**Table 3. Emulsion capacity and emulsion stability of the enzymatic hydrolysates of soybean protein isolate**

Samples	ml of oil emulsified	Emulsion capacity (%)	Emulsion Saability (%)
SPI (Control)	13.3	67.7	29.6
Pepsin, 10min	132.0	66.0	24.4
Pepsin, 60min	105.6	52.8	14.5
Trypsin, 30min	121.6	60.8	26.6
Trypsin, 150min	117.0	58.5	25.4

도가 클수록 감소하였으며 특히 유화안정도는 단백질의 가수분해도(DH<sub>Ca</sub>)와 직선적인 역 상관관계를 나타내었다(그림 5).

### 3. 기포형성능력

그림 6은 원료 분리대두단백질과 효소적 가수분해물의 기포형성능력과 기포 안정도를 보여주는 것으로서 기포형성능력은 가수분해 정도가 진행될수록 기포용적은 증가하여 원료 분리대두단백질의 63ml 기포용적에서 pepsin 60분 처리로 170ml 정도로 증가하였다. 그러나 기포안정도는 가수분해가 많이 될수록 큰폭으로 떨어져 pepsin 60분 처리구의 경우 기포형성 120분 후에는 trypsin 150분 처리구와 유사하게 되었다. 그러나 이 경우에도 분리대두단백질 보다는 2배 이상의 기포용적을 유지할 수 있었다. 이러한 결과는 대두단백질의 효소적 가수분해는 유화능력은 감소시키나 기포형성능력을 크게 증가시키는 것으로 판단된다(그림 6).

## 요 약

탈지 대두박으로 부터 추출·분리하여 얻어진 분리대두 단백질에 효소(pepsin 및 trypsin)를 처리하여 부분적 단백질 가수분해물을 만들고 이들 제품의 가수분해 정도를 고유점도 측정, 수용성 단백질 및 유리아미노산 농도 측정과 전기영동등으로 평가하였으며 가수분해물의 유체변형성과 식품기능성의 변화를 평가하였다. 가수분해물의 고유점도는 사용된 효소의 종류와 처리시간에 따라 변화하였으며 가수분해에 의한 수용성 단백질의 농도 변화와 일반적으로 역비례 하였다. 0.03 M CaCl<sub>2</sub> 용액에서의 용해도와 ninhydrin test에 의한 TCA가용성 단백질 함량은 고유점도의 변화와 밀접한 상관관계를 나타내었으므로 가수분해 정도를 나타내는 지표로 사용될 수 있었다. S. D. S. - P. A. G. 전기영동

패턴은 사용한 효소와 처리시간에 따라 다른 형태를 나타냈으며 pepsin처리에 있어서는 가수분해 정도가 증가함에 따라 주로 11S분획이 선택적으로 분해되었으며 trypsin처리에 있어서는 7S와 11S 모두 영향을 받았다. 가수분해물의 흐름형태는 4%용액에서 거의 Newtonian유체형태를 나타내었으며 apparent viscosity는 가수분해 정도가 증가함에 따라 감소하였다. 유화용량 및 유화안정도는 SPI보다 모두 낮은 값을 나타냈으며 같은 효소처리인 경우 가수분해 정도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 기포형성은 SPI보다 현저하게 증가하였으나 기포안정도는 가수분해 정도가 증가함에 따라 급격하게 감소하는 경향을 나타내었다.

## 문 헌

1. Turner, J. R.: *U. S. Patent* 2,489,208(1969)
2. Gunther, R. C.: *Canadian Patent* 905742 (1972)
3. Pour-El, A., and Swenson, T. C.: *U. S. Patent* 3,713,843(1973)
4. Puski, G.: *Cereal Chem.*, **52**, 655(1975)
5. Beddows, C. G., Ismail, M., and Steinkeraus, K. H.: *J. Food Tech.*, **11**, 379(1976)
6. Clegg, K. M., and McMillan, A. L.: *J. Food Tech.*, **9**, 21(1974)
7. Clegg, K. M., Smith, G., and Walker, A. L.: *J. Food Tech.*, **9**, 425(1974)
8. Yamashita, M., Arai, S., and Fujimaki, M.: *J. Food Sci.*, **41**, 1029(1976)
9. Sekul, A. A., and Ory, R. L.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **54**, 32(1977)
10. Archer, M. C., Ragnarsson, J. O., Tannenbaum, S. R., and Wang, D. I. C.: *Biotecnol Bioeng.*, **15**, 181(1973)
11. Hevia, P., Whitaker, J. R., and Olcott, H. S.: *J. Agr. Food Chem.*, **24**, 383(1976)
12. Hoer, R. A., Frederiksen, C. W., and Hawley, R. L.: *U. S. Patent* 3,694,221(1972)
13. Du Bois, M. W.: *J. Food Sci.*, **37**, 27 (1972)
14. Fujimaki, M., Kato, H., Arai, S., and Tamaki, E.: *Food Tech.*, **22**, 889(1968)

15. Fujimaki, M., Yamashita, M., Arai, S., and Kato, H.: *Agr. Biol. Chem.*, (Tokyo), **34**, 1325 (1970)
  16. Hsieh, S. T.: *Ph. D. Thesis*, Department of Nutrition & Food Science M. I. T. (1978)
  17. Aoki, H., Taneyama, O., and Inami, M.: *J. Food Sci.*, **45**, 534 (1980)
  18. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193** 265 (1951)
  1. AC: *Methods of Analysis*, 13th edition, 858 (1980)
  20. Webber, K., and Osborn, M.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969)
  21. 이철호, 김학량, 양한철, 이명원, 배종찬: 한국식품과학회지, **14**, 49 (1982)
  22. Kim, H. R.: *M. S. Degree Thesis*, Department of Food Tech., Korea University (1982)
- 
- (1984년 3월 28일 접수)