

변형대두 단백질의 기능 특성에 관한 연구

김 영숙 · 황 재관 · 조 은경 · 이 신영* 변 유량
연세대학교 식품공학과 · *강원대학교 발효공학과

Studies on the Functional Properties of Modified Soy Protein Isolate

Young-Sug Kim, Jae-Kwan Hwang, Eun-Kyung Cho,
Shin-Young Lee* and Yu-Ryang Pyun

Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul

*Department of Fermentation Engineering, Kangweon National University, Chuncheon

Abstract

Soy protein isolate was acylated with succinic anhydride and acetic anhydride. The functional properties are markedly improved by acylation of the ϵ -amino groups. Acylation of the available amino groups shifted the isoelectric point from 4.5 to 4.0 and enhanced the solubility between pH 4.0-6.0. In the 0.03M-CaCl₂ solution the solubility of the modified soy protein is much larger than that of the unmodified protein above the isoelectric point. The emulsion properties and foaming properties also improved by the modification and the effects of pH on the properties paralleled its effect on protein solubility. The changes of reduced viscosity with concentration followed Huggin's equation and by modification the intrinsic viscosity of the soy protein increased and the interaction coefficient decreased.

서 론

대두단백질은 우수한 영양성과 기능성을 지닌 중요한 식품소재이다. 그러나 이와 같은 단백질을 식품에 이용할 경우에는 용해도를 비롯하여 유흥특성, 기포특성 등과 같은 기능성이 중요한 역할을 하는 데 이들은 뚜렷한 조건의존성을 나타내므로 그 이용에 크게 제한을 받는다.⁽¹⁾ 따라서 단백질의 기능성을 향상시키는 것은 중요한 과제이다.

단백질의 기능성을 향상시키는 방법으로는 효소처리에 의한 단백질 가수분해 방법과 화학적 방법에 의한 변형방법이 주로 연구되고 있으나, 효소처리 시 쓴맛을 내므로 실제 식품에의 이용에는 화학적 변형에 관한 연구들이 활발히 진행되고 있다. Chen 등⁽²⁾과 Groninger⁽³⁾에 의하면 succinyl화시킴으로써 생선단백질의 유흥특성이 증가하였으며, Canella 등⁽⁴⁾과 Franzen 등⁽⁵⁾은 화학적 변형에 의하여 pH 4.0~6.0의 산성영역에서 단백질의 용해도 및 기포특성을 향상시킬 수 있었다고 보고하

였으며, Grant⁽⁶⁾는 succinyl화에 의하여 밀가루단백질의 점도가 증가되었다고 보고하였다.

본 연구에서는 탈지대두분으로부터 단백질을 분리하여 이를 succinic anhydride와 acetic anhydride로 처리하여 화학적으로 변형시켰을 때 기능성의 변화를 검토하면서 각 특성의 조건의존성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

분리대두단백질은 탈지대두분 100g에 증류수 1l를 가한 후 3N-NaOH로 pH를 8로 조정하여 실온에서 저어주면서 1시간동안 추출하였다. 추출액을 15,000 × g에서 20분간 원심분리하여 얻어진 상등액에 1N-HCl을 첨가하여 pH 4.5로 조정하고, 이를 다시 원심분리하여 얻어진 침전물을 증류수로 2번 세척한 후 증류수에 분산시켜 1N-NaOH를 첨가하면서 pH 7로 조정한 다음 동결건조시켰다.

분리대두단백질의 변형

1. 본 연구는 1984년 한국과학재단 지원연구비에 의하여 수행되었음.

변형대두단백질은 Hoagland의 방법⁽¹¹⁾을 다소 수정하여 제조하였다. 분리대두단백질 30g을 pH 7의 완충액(phosphate buffer, sodium acetate buffer) 1l에 분산시켜 pH7~8을 유지하면서 일정량의 acylating agent(succinic anhydride, acetic anhydride)를 첨가한 뒤 용액의 pH가 일정해지면 1시간 더 교반시킨 다음 1N-HCl을 첨가하여 pH4.0으로 조정하고, 원심분리 및 세척과정을 거친 뒤 증류수에 분산시켜 1N-NaOH를 첨가하면서 pH 7로 조정한 다음 동결건조시켰다.

변형정도 측정

화학변형의 정도는 Ninhydrin정량법⁽¹²⁾에 의하여 측정하였다.

용해도

단백질 분산액(10%)을 pH2.0~8.5의 범위로 조정한 다음 22,000x에서 20분간 원심분리하고, 얻어진 상등액의 단백질농도를 Lowry법⁽¹³⁾으로 측정하여 초기 단백질농도에 대한 백분율로 나타내었다.

유화특성 측정

2%의 단백질 분산액을 pH2.5~7.0으로 조정하고 분산액:기름을 3:1의 비율로 기름을 첨가한 다음 25°C에서 1분간 균질화시켜 에멀전(emulsion)을 조제한 후, Pearce등의 방법⁽¹⁴⁾에 따라 탁도를 측정하였다. 유화형성 능력은 조제직후의 에멀전의 탁도(T_1)로 나타내었으며 유화안정도는 30분간 방치한 후의 탁도(T_2)를 초기치에 대한 상대치(T_2/T_1)로 나타내었다.

에멀전조제 시 기름입자 표면에서 단백질의 흡착률(adsorption ratio)은 Tornberg의 방법⁽¹⁵⁾에 따라 측정하였다.

기포특성 측정

단백질 분산액을 pH2.5~8.5로 조정하고 일정 속도(1,500rpm)로 30분간 교반시켜 형성된 기포의 부피와 이를 30분간 방치시킨 후 잔존하는 기포의 부피를 각각 기포형성능력 및 기포안정도로 나타내었다.

고유점도 측정

고유점도는 0.2~1%의 단백질용액을 여과지에 통과시킨 후 25°C 항온수조에서 모세관 점도계(Cannon Fenske No. 50)로 측정하였다.

결과 및 고찰

대두단백질의 변형

대두단백질을 succinic anhydride 및 acetic anhydride와 반응시켰을 때 Ninhydrin반응으로 잔존하는 아미노기를 정량하여 구한 변형정도는 Table 1과 같다. Succinic anhydride를 0.1 및 0.23g/g protein으로 첨가했을 때 아미노기의 60.1 및 80.5%가 변형되었고 그 이상의 농도에서는 서서히 증가하여 과량으로 반응시켰을 때 92.3%가 변형되었다. 한편 acetic anhydride 1.3g/g protein으로 과량처리하였을 때에는 82.1%가 변형되었다.

한편 변형에 의한 외관상의 변화는 전반적으로 색이 희어지면서 단위 질량 당 체적이 증가하였고 물에 첨가하였을 때 변형되지 않은 것은 물위에 떠다니는 반면 변형단백질은 순간적으로 수화됨으로써 水面에서의 수和力이 증가하는 경향을 보였다.

용해도

대두단백질의 pH에 따른 용해도를 Fig. 1에 나타내었다. 분리대두단백질의 경우 pH 6 이하에서 용해도가 현저히 감소하면서 등전점인 pH4.5에서 최저가 되고 등전점이하에서는 재용해되었다. 92% succinyl화된 대두단백질을 등전점이 pH 4로 내려가면서 그 이상의 영역, 특히 pH4.5~6.0에서 용해도가 크게 증가하였으며 등전점이하에서는 재용해되지 않았다. 한편 acetylation시킨 대두단백질도 비슷한 변화를 보였으나 pH 4.5~6.0에서의 용해도가 분리대두단백질과 거의 비슷한 값을 가지면서 전반적으로 succinylation에 비하여 용해도의 변화율이 작았다.

변형에 의한 이와 같은 변화는 acylation 반응으로 단백질분자내의 정전기적 상호작용에 변화를 가져오기 때문이다. 즉, succinylation에서는 (+)이온의 아미노기가 (-)이온인 카복실 group으로 치환되면서 분자내의 정전기적 반발력을 형성하고 따라서 분자들이 unfolding되면서 용해도가 증가하는 것으로 생각된다.⁽¹⁶⁾ Acetylation에서는 (+)이온이 소수성기인 중성의 아세틸 group으로 치환되므로, 분자내의 정전기적 인력은

Table 1. Extent of chemical modification

Quantity of acylation agents (g anhydride/g protein)	Percent of acylated amino acid
Succinic anhydride	
0.10	60.1
0.23	80.5
0.50	86.5
1.00	92.3
Acetic anhydride	
1.30	82.1

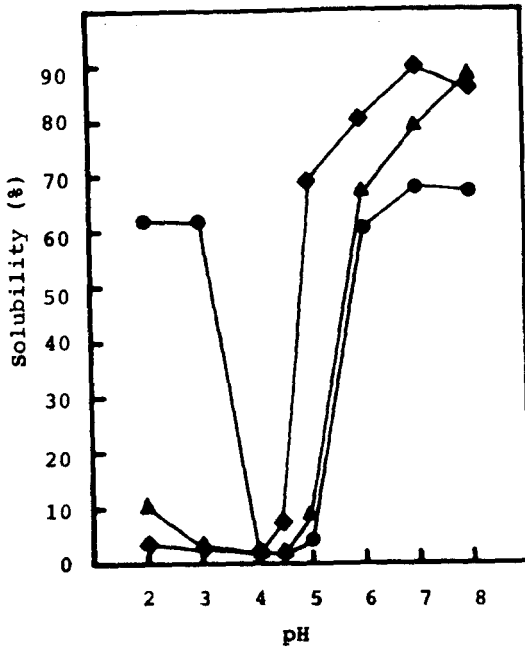


Fig. 1. Solubility of native (●), succinylated (◆), acetylated (▲) soyprotein isolates as a function of pH

감소하지만 succinylation과 같이 (-)이온에 의한 반발력이 형성되지 않으므로 용해도의 증가율이 크지 못하다. Barman 등⁽¹⁶⁾은 acetyl화된 대두단백질의 pH 5-7에서의 용해도 증가는 분자내의 인력 감소때문으로 보고하였으나, Rahma 등⁽¹⁴⁾은 cottonseed flour를 acetylation시켰을 때 73%이상의 변형에서는 오히려 용해도가 감소하였으며 이를 소수성기의 도입으로 해석하였다. 이같이 상반되는 결과를 미루어 볼 때 단백질의 용해도는 분자내의 전하외에도 분자의 크기 및 배치 등의 영향도 받는 것으로 생각된다.

Succinylation 정도를 달리 하였을 때 pH에 따른 용해도 분포는 Fig. 1과 동일한 경향을 보이면서 변형 정도가 작을수록 용해도의 증가율이 낮았으며, 이를 succinylation 정도에 따라 나타내면 Fig. 2와 같다. 등전점을 기점으로 하여 그 이하의 영역에서는 변형 정도가 증가할수록 용해도가 감소하는 반면, 등전점 이상에서는 계속 증가하고 있으며 특히 pH 5에서는 거의 직선적으로 급격히 증가됨을 알 수 있다.

대두단백질의 용해도에 대한 Ca^{2+} 의 영향을 조사하기 위해 0.03M- $CaCl_2$ 용액에서 용해도를 측정된 결과 Fig. 3과 같았다. 등전점 이상의 영역에서는 전반적으로 증가하여 pH 7의 경우 분리대두단백질과 acetylation 및 succinylation시킨 단백질의 용해도가 각각 15%, 36% 및 70%로 Ca^{2+} 에 의하여 감소된 용해도는 변형에 의하

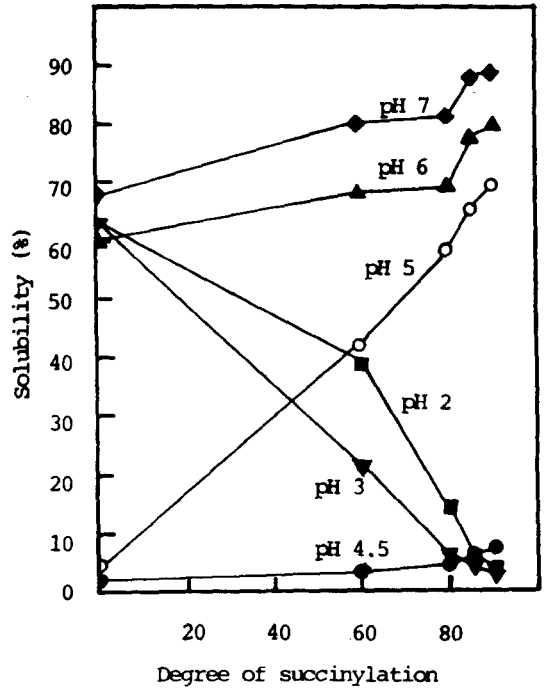


Fig. 2. Effect of degree of succinylation on the solubility of soy protein at various pH

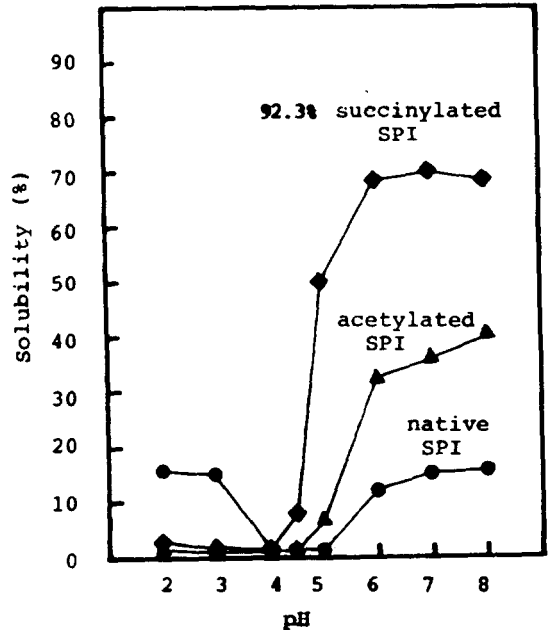


Fig. 3. Solubility of soy protein isolates in 0.03 M- $CaCl_2$ solution as a function of pH

여 4 배이상으로 증가시킬 수 있었다.

유화 특성

pH와 변형에 따른 대두 단백질의 유화형성능력 및

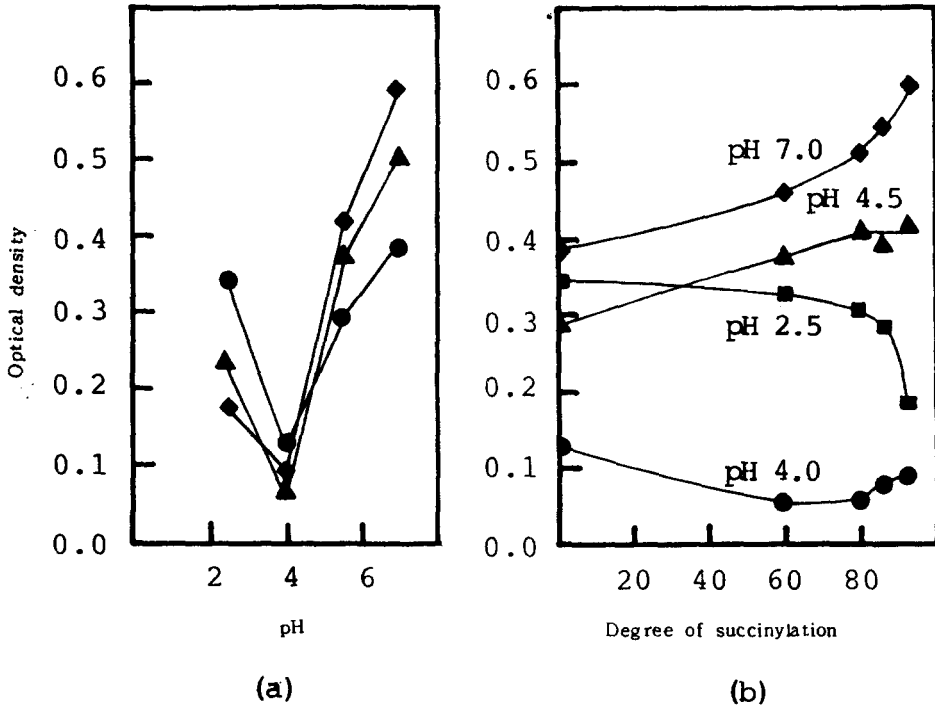


Fig. 4. Emulsification activity of soy protein isolates (a) at various pH (●; native, ▲; 82.1% acetylated, ◆; 92.3% succinylated) and (b) with degree of succinylation

Table 2. Emulsion stability of native and modified soy protein isolates at various pH (unit; %)

	pH 2.5		pH 4.0		pH 5.5		pH 7.0	
	ES ₁	ES ₂	ES ₁	ES ₂	ES ₁	ES ₂	ES ₁	ES ₂
Native	86.1	73.4	0.8	0.0	88.1	46.1	77.5	67.2
82.1%	83.3	62.5	2.8	2.8	64.9	62.1	80.1	70.0
60.1% succinylated	89.2	73.8	3.4	0.0	89.2	71.6	93.3	80.0
80.5% "	89.7	67.4	3.4	0.0	95.1	66.7	96.0	82.0
86.5% "	90.5	60.4	2.4	1.2	95.9	71.9	92.5	83.3
92.3% "	84.4	54.3	0.0	0.0	95.6	60.0	88.1	83.1

ES₁; 30min-standing at room temperature

ES₂; 30min-heating in 100°C water bath

유화안정도를 Fig. 4와 Table 2에 나타내었다. pH에 따른 유화형성 능력을 Fig. 4의 (a)에서 살펴보면 용해도에서와 같은 경향으로 등전점 이상 특히 pH 5.5-7.0의 영역에서 변형으로 인하여 유화형성능력은 크게 증가하였으며, acetylation보다는 succinylation의 경우 더 우수하였다. Succinylation 정도를 달리하였을 때 각 pH에서의 유화형성능력은 Fig. 4의 (b)에 나타내었으며 용해도 분포와 비교하여 볼때 경향은 비슷하면서도 pH 5의 경우 변형정도가 증가함에 따라 용해도가 급격히 증가한 반면 유화형성능력은 비교적 완만히 증가하다가 80% 이상에서는 거의 일정값을 가졌다.

한편 유화안정도를 Table 2에서 보면, acetylation의 경우에는 등전점 이상의 pH 영역에서 변형에 의하여 용해도 및 유화형성능력의 증가에도 불구하고 유화안정도는 전반적으로 감소하는 경향을 보였다. Succinylation의 경우에는 용해도가 급격히 증가한 pH 5.5-7.0의 영역에서는 변형정도가 증가함에 따라 유화안정도도 현저히 증가하였으나 변형정도 80% 이상에서는 더 이상 증가하지 않고 오히려 다소 감소하였으며, 등전점 이하의 산성영역에서는 변형에 의한 용해도의 급격한 감소에도 불구하고 높은 유화안정도를 보였다.

Chen 등⁽⁴⁾이나 Franzen 등⁽⁵⁾의 연구에서는 변형에 의

한 단백질의 유화특성 변화는 용해도와 같은 경향을 보였으며, Canella등도 용해도와 유화특성 사이의 직접적인 관계를 보고하고 있다.

그러나 Aoki등⁽¹⁷⁾은 대두 단백질을 acetylation 시켰을 때 pH 4.5의 등전점 부근에서 용해도는 감소하지만 유화특성은 감소하지 않고 산성 영역에서 알카리 영역으로 향해 계속 증가하는 경향을 나타냈다고 보고하였는데, 본 연구의 결과와 더불어 고찰해 볼 때 단백질의 용해도와 유화특성 사이에는 깊은 관련이 있지만 반드시 일치하지는 않으며 용해도 외의 또 다른 인자들이 관련된다고 생각한다.

기름입자 표면에서 단백질의 흡착률은 Table 3와 같다. 변형에 따라 단백질의 흡착률은 점점 증가하였는데, 이는 변형에 의하여 단백질분자들이 unfolding되면서 소수성 group들이 노출되어 oil과의 친화력이 증가하였기 때문이며, 이러한 결과가 유화특성을 향상시켰음을 알 수 있다.

기포특성

1% 용액에서 변형대두단백질의 pH에 따른 기포형성능력 및 기포안정도는 Fig. 5과 같다. 등전점이하에서의 기포형성능력은 변형에 의하여 감소하였지만 등전점이상에서는 증가하였으며, 특히 succinylation시킨 경우 pH 4에서의 낮은 기포형성능력이 pH 4.5 이상에서 현저히 증가하였다. 결국 공기와 액체의 계면에서 단백질의 활성에 의해서 나타나는 기포형성도 유화특성과 같이 용해도와 관련이 있음을 알 수 있다. 한편 기포안정도는 기포형성능력처럼 큰 변화는 없었으나 비슷한 경향을 보였다.

Fig. 6은 기포특성에 대한 단백질농도의 영향으로서, 농도가 증가할수록 전반적으로 기포특성이 증가하면서 분리대두단백질에 비하여 변형단백질이 항상 높은 값을 가졌다.

고유점도

분리대두단백질 및 변형대두단백질에 대하여 농도에 따른 환원점도(η_{sp}/C)를 도식한 결과 모두 직선을 나

Table 3. Adsorption ratio of soy protein isolates

Soy isolates	Adsorption ratio (%)
Native SPI	2.25
60.1% succinylated SPI	4.01
80.5% succinylated SPI	5.38
86.5% succinylated SPI	7.82
92.3% succinylated SPI	12.77
82.1% acetylated SPI	5.40

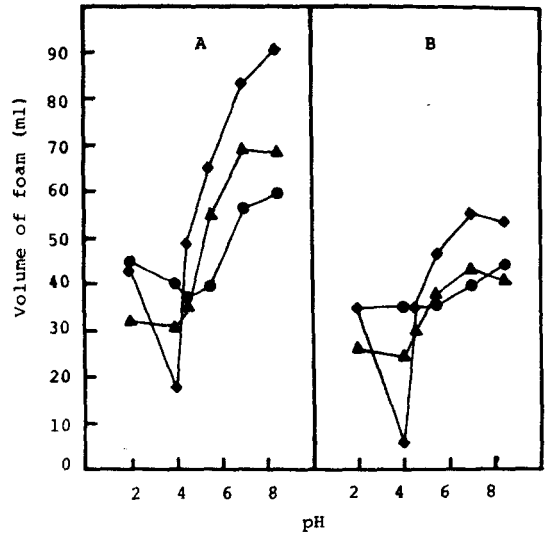


Fig. 5. Foaming capacity (A) and foam stability (B) of native (●), 92.3% succinylated (◆) acetylated (▲) soy protein isolates at various pH

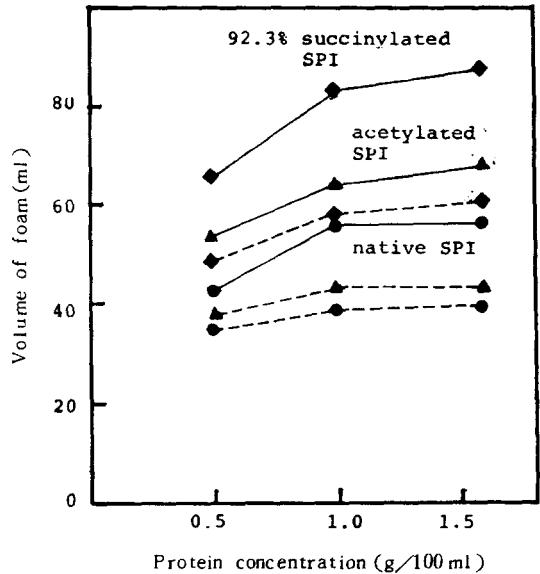


Fig. 6. Effect of protein concentration on foaming capacity (dashed line) and foam stability (dotted line)

타내었으며, 따라서 다음의 Huggin식⁽¹⁸⁾을 따르고 있음을 알 수 있었다.

$$\eta_{sp}/C = [\eta] + K[\eta]^2 C$$

여기서 $[\eta]$ 와 K는 각각 고유점도와 interaction coefficient로서 각 시료에 대한 값들은 Table 4에 나타내었다. Succinylation시킨 경우 변형정도가 증가할수록 $[\eta]$ 값이 증가하였으며 acetylation의 경우도 증가하였지만 succinylation에 비하여 낮은 값을 나타내었다.

Table 4. The values of intrinsic viscosity and interaction coefficient of soy protein isolates at pH 7.0

Protein	Intrinsic viscosity (100ml/g)	Interaction coefficient
Native SPI	0.1443	4.8549
60.1% succinylated SPI	1.0160	-0.0069
80.5% succinylated SPI	1.1637	-0.1671
86.5% succinylated SPI	1.3450	-0.1797
92.3% succinylated SPI	1.6550	-0.1976
82.1% acetylated SPI	0.5553	0.3306

이와 같이 $[\eta]$ 값이 증가한다는 것은 분자들의 unfolding 및 팽창으로 hydrodynamic volume 이 증가한 것을 의미하며,⁽¹⁰⁾ Carpenter 등⁽¹⁰⁾은 단백질의 분자반경과 유화능력 사이에 상당한 상관관계가 있음을 보고 하였는 바, 변형에 의한 유화력의 향상은 hydrodynamic volume의 증가와도 상관이 있을 것으로 사려된다. 한편 변형에 의하여 K 값은 감소하면서 succinylation의 경우는 음의 값을, acetylation의 경우는 거의 0에 가까운 값을 나타내었다. K 값은 단백질분자내의 인력을 의미하므로⁽¹⁰⁾ 결국 succinylation에서는 (-) 이온의 도입으로 반발력이 생겼으며 acetylation에서는 (+) 이온의 감소로 분자내의 인력이 감소되었다는 것을 알 수 있다.

요 약

분리대두단백질을 succinic anhydride 및 acetic anhydride와 반응시켜 화학적으로 변형시켜 기능성을 조사한 결과, 대두단백질의 등전점이 pH4.5에서 4.0으로 내려가면서 등전점 이상의 영역, 특히 pH4.0-6.0 영역에서 용해도가 크게 증가하였다. Ca^{2+} 이 존재할 때 용해도는 변형시킨 경우 분리대두단백질에 비하여 4 배 이상으로 증가하였다. 유화특성 및 기포특성 또한 크게 향상되는 결과를 보였다. 대두단백질의 고유점도를 측정된 결과 변형에 의하여 전반적으로 증가하였으며 피석용액으로부터 추정되는 입자간의 interaction coefficient는 감소하였다.

문 헌

1. Kinsella, J. E. : *J. Am. Oil Chemist' Soc.*, **56**, 242 (1979)
2. Hermansson, A. M. : *J. Am. Oil Chemist' Soc.*, **56**, 272 (1979)
3. Puski, G. : *Cereal Chem.*, **52**, 655 (1975)
4. Beuchat, L. R. : *Lebensm-Wiss. u.-Technol.*, **10**, 78 (1977)
5. Jens, A. N. : *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 1090 (1976)
6. Chen, L., Richardson, T., and Amundson, C. M. : *J. Milk Food Technol.*, **38**, 89 (1975)
7. Groninger, H. : *J. Agric. Food Chem.*, **21**, 978 (1973)
8. Canella, M., Castritta, G., and Bermardi, A. : *Lebensm-Wiss. u.-Technol.*, **12**, 95 (1979)
9. Franzen, K.L. and Kinsella, J. E. : *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 788 (1976)
10. Grant, D. : *Cereal Chem.*, **50**, 417 (1973)
11. Hoagland, P. : *J. Dairy Sci.*, **49**, 783 (1966)
12. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, P. J. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
13. Pearce, K. N. and Kinsella, J. E. : *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 716 (1978)
14. Tornberg, E. and Hermansson, A. M. : *J. Food Sci.*, **42**, 468 (1977)
15. Rahma, E. H. and Rao, M. S. N. : *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 352 (1983)
16. Barman, B. G., Hansen, J. R., and Mossey, A.R. : *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 638 (1977)
17. Aoki, H., Orimo, N., Shimazu, R., and Wakabayashi, K. : *Nippon Shokushin Gakkashi*, **25**, 668 (1978)
18. Huggin, M. S. : *J. Am. Chem. Soc.*, **64**, 2716 (1942)
19. Carpenter, J. A. and Saffle, R. L. : *Food Technol.*, **19**, 111 (1965)
20. Bartorics, A. and Mork, H. : *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 1902 (1943)

(1985년 7월 19일 접수)