

## 蛋白質의 變化에 依한 食品의 價値의 改善

韓國放送通信大學

安 鍾 健

### I. 緒 論

蛋白質은 구성아미노산의 特性에 의해 그 기능이 結定되기 때문에 구성아미노산의 기능을 변화시키거나 새로운 아미노산을 特定部位에 첨가, 결합하므로써 蛋白質의 기능을 變化시킬 수 있다. 이와 같은 변화는 식품 조리과정이나 生體에서의 이용과정 중에 빈번히 일어난다.

식품단백질의 가공, 조리과정에서의 變化는 주로 가열처리에 의하여 變性, maillard 반응, racemization, disulfide 결합의 형성 등이 일어날 수 있으며, 이는 화학적 변화이다(Fennema, 1985). 식품단백질이 섭취되면 生體 내에서 消化酵素에 의해 分解되어 腸에서 흡수되어 단백질 合成, transamination, phosphorylation, glycosilation, hydroxylation, acylation, methylation 등의 과정을 거쳐 독특한 기능을 수행한다(Whitaker 와 Puigserver, 1982). 이는 大部分 酵素의 變化이다. 이와 같이 蛋白質은 化學, 生物學的 처리에 의해 그 기능이 다양하게 변화할 수 있으며, 이를 目的에 알맞게 조절할 수 있다면 蛋白質의 價値를 더욱 增進시킬 수 있는 것이다. 단백질을 인위적으로 변화시킴으로서 바람직하지 못한 방향으로의 變質을 방지하고 物理的, 機能的 性質을 改善하고 영양적 기능을 증진시킬 수 있다.

### II. 化學的 方法

단백질을 구성하는 아미노산은 化學的으로 活性이 있는 여러가지 기능기를 가지고 있기 때문

에 기능기를 化學적으로 變化시키거나 단백질의 유리아미노기 혹은 유리카르복실기에 아미노산을 化學적으로 결합하여 기능을 變化시킬 수 있다.

#### 1. 機能基의 變化

유리아미노基는 알칼리에서의 親核性이 化學적 變換을 가능케하며 alkyl化가 많이 실시되었고, acyl 化, 환원적 alkyl化에 의해서도 아미노기의 變換이 이루어지며 Acyl化는 acetic anhydride, succinic anhydride 等に 依해서, alkyl化는 haloacetate, arylhalide 等に 의해서 실시될 수 있고 환원적 alkyl化는 sodium borohydride, cyanoborohydride, 혹은 amine boranes 等 환원제의 拮재하에 aldehyde 혹은 ketone에 의해 이루어질 수 있다(Feeney等, 1982). Ovomucoid, lysozyme, ovotransferrin 等이 환원적 alkyl 化에 의해 變換되어 生物學的 機能을 유지하면서 용해성이 增進되었고(Fretheim 等, 1979), acetyl 化, methyl 化, isopropyl 化 cyclopentyl 化 等に 의해 maillard 반응을 方止할 수 있다(Feeney 等, 1982).

Carboxyl 基는 수용성 carbodiimides, trimethyloxoniccm fluoroborate, methyl-HCl에 의해 ester化 될 수 있으며, 수용성 carbodiimide에 의한 반응이 온화한 條件에서 일어날 수 있어 많이 이용된다(Feeney 等, 1982). 물고기의 耐凍性 物質인 glycopeptide의 carboxyl 基의 耐凍기능에의 참여 여부를 조사하기 위하여 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide에 의해 變換된 바 있고(Geoghegan 等, 1980), pepsin을 trimethyloxonium fluoro-

borate에 의해 methyl ester化하여 carboxyl基가 活性이 참여하는 것을 밝힌 바 있다(Patterson과 Knowles, 1972).

Sulfhydryl基는 아미노산의 기능基에서 반응성이 제일 강하며 hydrogen peroxide에 의하여 산화되어 disulfide를 형성하거나 더욱 산화되어 sulfonic acid로 전환되며, sulfenic acid를 형성하기도 한다(Feeney等, 1982).

Disulfide基는 환원되어 sulfhydryl基로 전환되며 이에 2-mercaptoethanol과 dithiothreitol이 利用되며 단백질 구조내부의 효율적인 반응을 위해 변성제가 같이 사용되어야 한다.

Phenol이나 aliphatic hydroxyl基는 N-acetyl imidazole에 의한 ester化, 요오드에 의한 iodination, tetranitromethane에 의한 nitration 등에 의해 변화되며 aliphatic hydroxyl基의 변화가 phenol基의 변화보다 강한 條件을 要求한다(Feeney等, 1982).

Imidazole基는 酵素의 active site에 존재하는 경우가 많다. 이는 요오드화 혹은 질소 부분의 alkyl化에 의해 변화될 수 있으며, ovotransferrin과 사람 혈장의 transferrin이 ethoxyformic anhydride에 의해 alkyl化하여 철을 결합능력을 상실케 한 바 있다(Rogers等, 1977).

Indole基는 일반적으로 단백질 내부에 존재하

며 2-hydroxy nitrobenzyl bromide에 의한 전환, 4-nitrophenyl sulfenyl chloride에 의한 nitrophenyl azide의 結合 등에 의해 변화될 수 있다(Feeney等, 1982).

Guanidino基는 butandione 혹은 1,2-cyclohexandione과 반응하여 vicinal diol구조를 형성하며(Feeney等, 1982), 이 방법에 의하여 ovotransferrin과 사람의 serum transferrin의 Fe 결합자리에 arginine이 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다(Rogers等, 1978).

## 2. 아미노산의 結合

아미노산을 蛋白質에 結合시키며 그 특성을 변화시킬 수 있다. 특히 植物性 蛋白質에 不足한 필수아미노산을 結合시킴으로 영양성을 改善할 수 있다. 아미노산은 단백질의 유리 carboxyl基 혹은 유리 amino基에 結合시킬 수 있다. 化學的 結合法에는 carbodiimide方法, active方法, carboxyanhydride方法 등이 있다.

### 1) Carbodiimide方法

蛋白質의 aspartic acid와 glutamic acid의 유리 carboxyl基를 수용성 carbodiimide를 利用하여 活性化하여 새로운 아미노산의 amino基와 結合시킬 수 있다(Puigserver等, 1982).

Table 1에 보는 바와 같이 carbodiimide는

Table 1. Derivatization of functional group in food protein(Feeney et al, 1982)

Functional group of amino acid	Modification
Amino group	Acylation, Alkylation
Carboxyl group	Esterification
Sulfhydryl group	Dithiobis nitrobenzoic acid Oxydation Alkylation
Disulfide group	Reduction
Phenolic and aliphatic hydroxyl group	Esterification, Iodination Tetranitromethane
Imidazole group	Alkylation, Iodination
Indole group	Nitrophenylazide
Guanidino group	Butandione, Cyclohexanedione

단백질을 O-acylisourea로 전환시키며 단백질의 유리 carboxyl 基를 活性化한다. 형성된 O-acylisourea는 첨가되는 아미노산의 아미노기의 新核的 反應에 의해 상호결합하여 새로운 단백질이 형성된다. 이 경우 O-acylisourea는 원래의 단백질과 amide가 분리되거나 N-acyl-urea가 생성되는 副反應이 일어날 수 있는데, 이는 反應條件을 조절하여 최소화해야 한다. O-acyl-

isourea와 아미노산 혹은 peptide가 結合할 때 부수적으로 生成되는 amide는 透析에 의해 제거될 수 있다. 이 방법에 의하여 대두단백질에 methionine과 tryptophan을 결합시킨 바 있는데 Table 2와 같이 methionine의 함량을 6배, tryptophan의 함량을 11배 이상 증가시킬 수 있었다(Voutsinas와 Nakai, 1979).

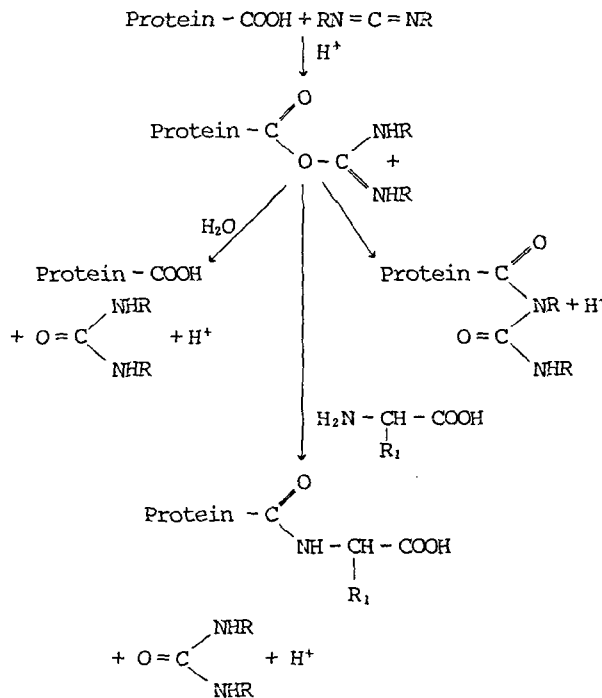


Fig. 1. Covalent attachment of amino acid to protein by carbodiimide method (Puigserver et al, 1982)

Table 2. Covalent attachment of amino acid to soy protein by carbodiimide method (Voutsinas and Nakai, 1979)

Protein	Methionine (grams/16 grams nitrogen)	Tryptophan
Control soy protein	0.94	0.95
Soy protein + L-methionine	5.92	0.9
Soy protein + L-tryptophan	0.83	10.74

## 2) Active ester 方法

이 方法은 단백질의 유리 amino 基인 lysine의  $\epsilon$ -amino 基에 새로운 아미노산을 ester로 전환시키어 活性化한 후에 결합시키는 方法이다 (Puigserver 等, 1982). 結合될 아미노산 혹은 peptide의 아미노基는 첨가되는 아미노산끼리의 結合을 방지하기 위해 t-butylloxycarbonyl 基를 利用하여 blocking 되어야 하고 첨가되는 carboxyl 基는 N-hydroxysucciniamide에 의해 活性化된다. 이와 변형된 아미노산을 active ester (N-hydroxysucciniamide ester of t-butylloxycarbonyl-L-amino acid)라 하며 dimethylformamide에 용해될 수 있기 때문에 dimeth-

ylformamide 存在下에 반응이 실시된다. Active ester는 단백질의 유리 amino 基 뿐만 아니라 단백질에 存在하는 tyrosine의 유리 hydroxyl 基에도 結合하는데 이와 같은 tyrosyl 변형체는 peptide bond가 아니기 때문에 단백질 분해효소에 의해 分解되지 않아 利用性이 없어 분해, 제거시켜야 한다. 이는 pH를 9이상으로 조절하거나 hydroxyamine 0.5 M, pH 8.0의 條件에서 유리, 제거할 수 있다. 아미노산을 蛋白質에 結合시킨 후에 첨가된 아미노산의 아미노基를 blocking 하고 있는 t-butylloxycarbonyl 基를 제거해야 한다. 이는 trifluoroacetic acid에 의해 제거될 수 있다 (Fig. 2).

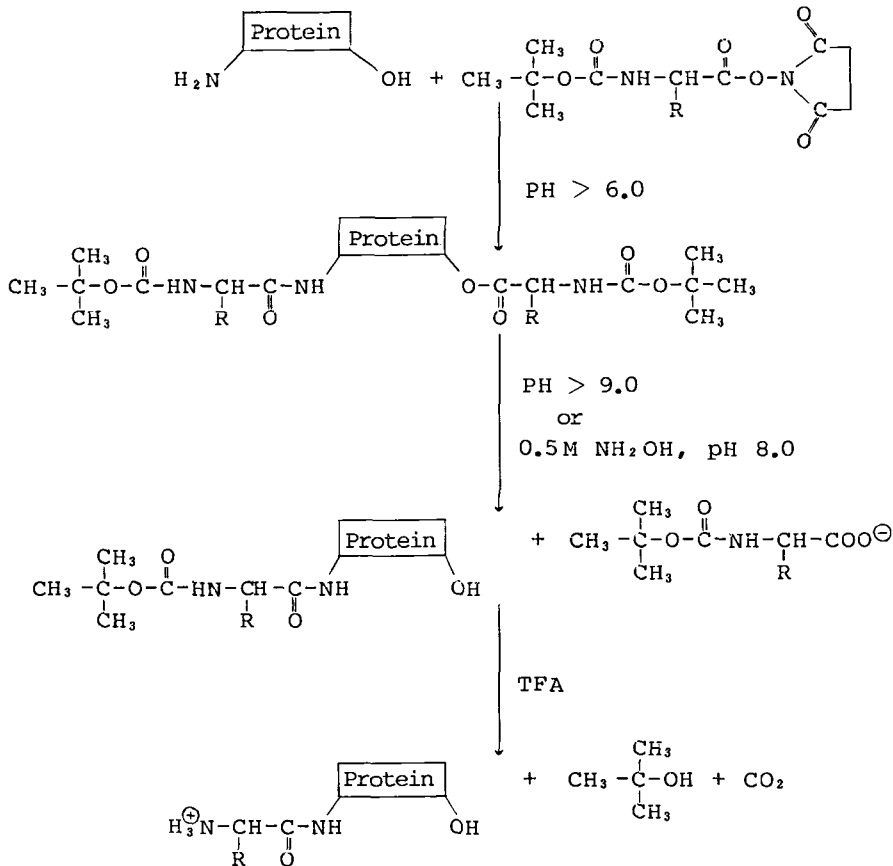


Fig. 2. Covalent attachment of amino acid to protein by active ester method (Whifaker, 1986)

이 方法에 의해 大豆粉과 casein에 methionine 혹은 glycine 이 결합된 바 있다. Table 3 과 Table 4 에 보는 바와 같이 大豆粉의 methionine 함량을 1.6 培(Mathesis 等, 1985), ca-

sein 의 methionine 과 glycine 함량은 각각 3 培, 3.5 培 增加시킬 수 있었다(Puigserver 等, 1979). 그러나, 이 方法은 active ester 를 용해 상태로 하기 위해 利用되는 dimethylform-

Table 3. Essential amino acid composition of soybean flour<sup>a</sup> modified by N-hydroxysuccinimide ester of N-acetyl-L-methionine (Matheis et al, 1985)

amino acid	g of amino acid/ 16 g of N			mg of amino acid/ g of total essential amino acids	
	original soybean flour	control soybean flour	modified soybean flour	original soybean flour	modified soybean flour
Ile	5.0	5.5	5.0		
Leu	7.3	8.1	7.8		
Lys	6.2	6.8	6.3		
Phe	4.9	5.4	5.3		
Tyr	3.6	3.9	3.9		
Cys	1.2	1.2	1.0	30	23
Met	1.4	1.5	2.4	35	56
Thr	4.1	4.6	4.4		
Trp	n.d. <sup>b</sup>	n.d. <sup>b</sup>	n.d. <sup>b</sup>		
Val	5.3	6.1	5.6		
total S- containing amino acids	2.6	2.7	3.4	65	79

<sup>a</sup> Determined on defatted soybean flours.  
<sup>b</sup> Not determined.

Table 4. modification of casein by active N-hydroxysuccinimide of glycine and methionine (Puigserver et al, 1979)

protein	amino acid content <sup>a</sup>				free amino groups	
	Lys	Met	Gly	modification, <sup>b</sup> %	no.	modification, %
commercial casein	11.3	4.6	5.6	0	10.1	0
reagent control casein	10.7	4.2	5.0	0	10.4	0
glycylcasein + BOC <sup>c</sup>					1.0	90
- BOC	11.3	4.4	15.4	87	10.3	
methionylcasein + BOC					0.7	93
- BOC	10.5	14.9	5.5	91	10.5	

<sup>a</sup> Number of residues/mol of protein. Average of calculated composition before and after performic acid oxidation (four determinations). <sup>b</sup> Calculation based on 11 lysyl, four methionyl, and five glycyl residues and one amino terminal group per mole control casein (MW 23000). <sup>c</sup> Before and after removal of tert-butyloxycarbonyl group is indicated by +BOC and -BOC, respectively.

amide 가 毒性이 있고, t-butyoxyl 基를 제거하기 위하여 利用하는 trifluoroacetic acid 가 gummy protein 을 형성하는 性質이 있는 短點이 있다.

### 3) Carboxy anhydride 方法

이 方法도 active ester 方法과 마찬가지로 아미노산을 carboxy anhydride 로 전환시켜 단백

질의 amino 基에 結合시키는 方法이다(Puigserver 等, 1982). 結合하고자 하는 아미노산은 tetrahydrofuran, dioxane 과 같은 용매의 存在 下에 phosgen 과 反應하여 carbamyl chloride 로 전환되고 이는 직접 혹은 Isocyanate 를 거쳐 N-carboxy- $\alpha$ -amino acid anhydride 가 된다(Fig. 3).

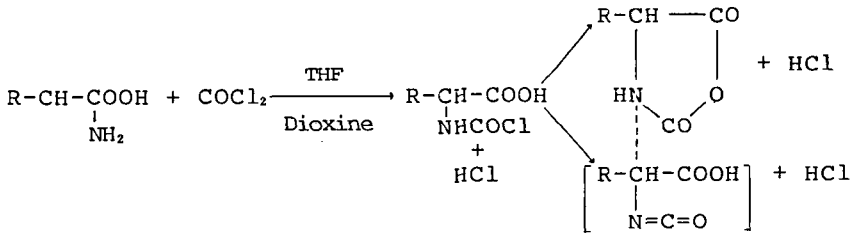


Fig. 3. Preparation of N-carboxy- $\alpha$ -amino acid anhydride (Whifaker, 1986)

이와 같이 해서 형성된 N-carboxy- $\alpha$ -amino acid anhydride 를 단백질의 유리 amino 基에 결합하게 되는데 반응조건에 따라 단계적으로 아미노산을 하나씩 결합시키는 方法과 아미노산을 한꺼번에 polymer 를 형성케 하면서 結合시키는 方法이 있다. 단백질과 N-carboxy- $\alpha$ -amino-anhydride 를 pH 10 의 알카리 條件에서 반응시키면 carbamate intermediate 가 생성되며, 이를 pH 3~4, 20°C 로 유지하면 결핍된 아미노基에 붙어있는 carboxyl 基가 CO<sub>2</sub> 로서 제거되면 유리 amino 基가 生成되어 이에 다른 N-carboxy

- $\alpha$ -amino acid-anhydride 가 결합할 수 있는 상태가 된다. 이와 같이 해서 단계적으로 아미노산을 결합, polymer 를 형성시킴으로써 해서 결합하는 아미노산의 量을 조절할 수 있다(Fig. 4).

그러나, 단백질과 N-carboxy- $\alpha$ -amino acid-anhydride 를 pH 6~7 의 中性에서 반응시키면 단백질에 결합된 아미노산의 amino 基에 있는 carboxyl 基가 자동적으로 CO<sub>2</sub> 로 제거되어 유리 amino 基가 生成됨으로써 계속하여 N-carboxy- $\alpha$ -amino acid-anhydride 가 結合하여 polymer 를 형성한다(Fig. 5).

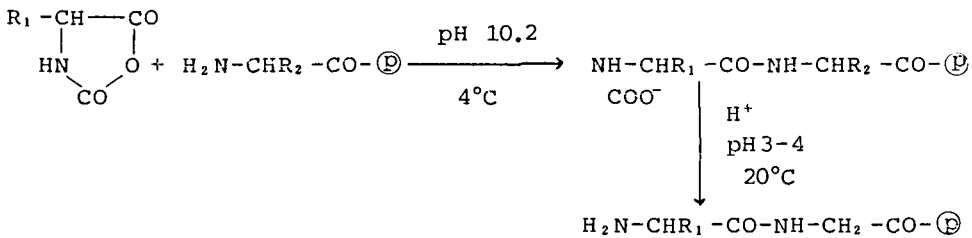


Fig. 4. Stepwise attachment of N-carboxy- $\alpha$ -amino acid anhydride to protein (Puigserver 等, 1982)

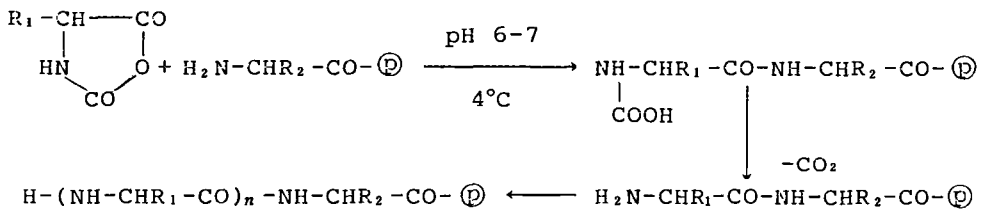


Fig. 5. Polymerization of N-carboxy- $\alpha$ -amino acid anhydride to protein (Whitaker, 1986)

Casein 과  $\beta$ -lactoglobulin 에 methionine 을 단계적으로 혹은 일시에 polymer 를 형성케하여 결합시킨 바 있다. Table 5 에 있는 바와 같이 단계적으로 methionine 을 결합할 경우 단백질의 유리 amino 基를 가지는 lysine 의 대부분에 methionine 이 결합되었으나 일시에 methionine 을 polymer 의 형태로 결합시킬 경우 58% 의 lysine 에 methionine 이 결합되었다. 그러나, methionine 이 결합된 총량은 반응시간, 결합단계의 반복정도 등에 의해 조절할 수 있다 (Puigserver 등, 1982). 이 방법은 4°C 의 낮은 온도에서 실시하여 단백질의 열에 의한 變性を 방지

할 수 있고 반응 효율이 매우 좋으며, 아미노산을 단백질에 polymer 의 형태로 많이 결합시킨 후에 원래의 단백질과 혼합 利用함으로써 영양개선 효과를 볼 수 있다.

4) 化學적으로 아미노산이 결합된 변형 단백질의 영양적 기능

化學적으로 아미노산이 결합되어 변형된 단백질은 영양적으로 가치가 있어야 한다. 이는 *in vitro* 에서의 단백질 분해효소에 의한 분해, *in vivo* 에서의 소화, 生物體에 급여했을 때의 영양효율 등으로 판단할 수 있다. 化學적 방법에 의해 형성되는 아미노산과 단백질 간의 결합은  $\alpha$ -

Table 5. Extent of Modification of Proteins by carboxy anhydride method (Puigserver et al, 1982)

Protein	Amino acid content <sup>a</sup>			Free amino groups	
	Lysine	Methionine	Increase in methionine	Number	Modification (%)
Casein	12	5	0	11.4	0
Methionine-casein <sup>b</sup>	12	67	62	4.9	58
Methionine-casein <sup>c</sup>	12	42	37	traces	>95
$\beta$ -Lactoglobulin	15	4	0	14.6	0
Methionine-lactoglobulin <sup>d</sup>	15	57	53	6.1	58
Methionine-lactoglobulin <sup>e</sup>	15	54	50	0	>98

<sup>a</sup> Number of residues/mole of protein

<sup>b</sup> Modified by a single addition of N-carboxymethionine anhydride at pH 6.5.

Molar ratio N-carboxymethionine anhydride:protein amino groups=5:1.

<sup>c</sup> Modified by five successive additions of N-carboxymethionine anhydride at pH 10.2 with a 1.5:1.0 molar ratio each.

<sup>d</sup> As b with a molar ratio of 4:1.

<sup>e</sup> As in c but only four successive additions instead of five.

amino 基와  $\alpha$ -amino 基間의 정상적인 peptide 결합이 아닌 isopeptide 結合이기 때문에 단백질 분해효소에 의한 분해가 저해될 가능성이 있다. carboxy anhydride 方法에 의해 methionine 을 결합시킨 casein 의 단백질 분해효소에 의한 초기 분해율이 매우 나쁘나 isopeptide 결합이 초기 분해율 저하의 직접적인 원인이 아니며 (Table 6), 이는 단백질 구조의 변화에 의한 것으로 추측된다 (Gaertner 와 Puigserver, 1984).

Active ester 方法으로 methionine 을 casein

에 결합했을 때 이 변형된 단백질의 pancreatine 에 의한 최종 분해율은 Table 7에서와 같이 원래의 casein 과 비슷한 바 있다 (Puigserver 등, 1979).

Methionine 을 결합시킨 casein 을 쥐에게 급여했을 때 혈액내의 methionine 의 함량이 casein 에 결합된 methionine 의 비율 이상으로 증가한 바가 있는데 (Table 8), 이는 *in vivo* 에서의 소화는 정상적으로 일어나는 것으로 판단된다. 또, 이러한 casein 을 쥐에게 급여했을 때 pro-

Table 6. Effect of extent of modification on rate of hydrolysis of casein modified with L - methionine (Gaertner and Puigserver, 1984)

Protein	Met	Amino group modification (%)	Average methionyl chain length	Ratio isopeptide/peptide bonds added	Initial rates, %	
					chymo-trypsin	trypsin
Casein (control)	0	0	-	-	100	100
L-Methionyl-casein	12	95	1.1	19	52	53
Poly-L-methionyl-casein	11	35	2.6	0.62	32	34
Poly-L-methionyl-casein	37	60	5.1	0.24	18	14
Poly-L-methionyl-casein	25	95	2.2	0.84	0	11

Table 7. Relative extent of proteolysis of casein containing methionine covalently attached by the active ester method (Puigserver et al, 1979)

substrate	Degree of modification (%)	Relative extent of proteolysis	
		rat bile pancreatin	Bovine pancreatin
Control casein	0	100	100
L-methionyl casein	59	95	90



tein efficiency ratio 가 Table 9에서와 같이 유리 methionine 의 형태로 급여한 경우와 유사하였다(Puigserver 등, 1978). 이와 같은 결과는 공유결합에 의해 결합된 아미노산의 생체에서의 이용은 정상에 가까운 것임을 나타낸다.

식품단백질에 부족한 필수아미노산을 이와 같이 결합시키지 않고 유리상태로 첨가, 혼합하여 쉽게 이용할 수도 있다. 그러나, 유리아미노산의

상태로 첨가했을 때 加工過程中的 유실, 아미노산 機能基 노출에 의한 화학변화, 風味에 대한 좋지 않은 영향 등의 단점이 있다. 이러한 문제가 아미노산을 단백질에 결합하여 利用함으로써 解決될 수 있는 것이다. 그러나, 化學的 方法에 의해 변화된 단백질은 생체에 對한 영향이 면밀히 관찰된 후에 利用되어야 한다.

Table 8. Plasma concentration of some free amino acids in rats fed 10 % protein diets (Puigserver et al, 1978)

Protein	Lys	Thr	Ser	Gly	Met
	μ moles/100ml plasma				
Control casein	101	19	34	32	5
L-methionyl casein <sup>a</sup>	96	17	33	27	39

<sup>a</sup> >90% of the 12 lysyl residue of casein were modified. The methionine content of L-methionyl-casein was 16 moles methionine per mol casein compared to 5 moles methionine per mol casein for the control.

Table 9. Nutritional values of L-methionyl- and N-acetyl-L-methionyl- caseins for rats (Puigserver et al, 1978)

Diet	Weight gain (g)	PER
Control : 10% commercial casein	72.6	2.46
10% commercial casein + 0.2% free L-methionine	106.8	3.15
Control : 5% commercial casein + 5% control casein <sup>c</sup> + 0.2% free L-methionine	66.7	2.97
5% commercial casein + 5% L-methionyl-casein	60.5	2.92

#### 5) 변형된 단백질의 물리적 特性

단백질에 새로운 아미노산이 결합되었기 때문에 物理的 特性이 변화될 가능성이 크다. Table 10에 보는 바와 같이 casein을 alanine, threonine, asparagine, aspartic acid, tryptophan 등을 결합하여 變化시키었을 때 viscosity에는 차이가 없었으나 용해도에 있어서는

aspartic acid, tryptophan을 결합시키었을 때 현저히 감소하였다(Puigserver 등, 1982).

Aspartic acid는 음전하의 아미노산이고 tryptophan은 비극성 아미노산임을 볼 때 아미노산 결합에 의한 변화된 단백질의 物理的 特性의 변화는 아미노산의 生化學的 特性에만 기인하지 않고 여러 요인의 결과임을 추측할 수 있다.

Table 10. *Physical properties of some modified caseins* ( Puigserver et al, 1982)

Protein	Amino group modification (%)	Relative viscosity	Relative solubility	Relative fluorescence
Casein (control)	0	1.00	1.00	1.00
L-Alanyl-casein	88	1.01	1.04	1.02
L-Methionyl-casein	89	-	-	1.02
L-Threonyl-casein	~80	-	1.02	-
L-Asparaginyll-casein	~80	-	1.00	-
L-Aspartyl-casein	83	1.05	0.85	0.68
L-Tryptophyl-casein	92	0.99	0.47	0.58

### III. 酵素的 方法

化學的으로 단백질을 變化시키는 方法은 사용 試藥의 食品內의 잔존, 生成된 物質의 有害可 能性 等 때문에 生체에 對한 영향이 면밀하게 觀 찰된 後에 利用해야 한다. 그러나, 酵素를 利用 할 경우 該 반응이 生物的 체계와 유사하여 위험 성이 덜하다. 이와 같은 酵素的 方法에는 단백질 가수분해, plastein 반응, 비가수분해적 변화 等이 있다.

#### 1. 단백질의 가수분해

치이즈의 rennin에 의한 제조, 숙성과정 중의 단백질 분해에 의한 맛의 형성 등은 牛乳蛋白質의 효소적 분해에 의한 단백질 변화의 대표적인 예이다. 고기의 軟度를 增進시키기 위한 단백질 분해효소에 의한 가수분해는 매우 오래전부터 시도되었다. 이에 는 papain, ficin, bromeline 이

利用되었으며, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae* 등의 미생물로부터 生産된 蛋白質 分解 酵素도 고기의 軟度增進에 시도되었다(Bernholdt, 1975). 효소에 의한 고기 蛋白質의 分解는 軟度增進 뿐만 아니라 골발후에 뼈에 붙어 있는 殘肉을 분해 제거하는데에 이용될 수 있다(Behnke 等, 1984). 또, 고기단백질을 部分分解함으로써 乳化能力이 개선될 수 있으며( Smith와 Brekke, 1984), 일반적으로 고기단백질을 분해하였을 때 쓴맛은 형성되지 않는다(Ney, 1972).

맥주를 냉장보관할 때에 침전물이 형성되는 것 을 papain 으로 분해하여 해결할 수 있고, 맥주 원료의 질소 함량을 증가하기 위해 *Bacillus subtilis* 의 중성 단백질 분해효소를 사용한 바 있다(Godfrey, 1983). 제과제빵에 이용하는 밀 의 단백질인 gluten 을 반죽에서 부드럽지 못한 때 이를 *Aspergillus oryzae* 의 蛋白質 分解酵素 로 분해하여 부드러운 조직으로 전환할 수 있다(Lyons, 1982). 대두단백질을 분해하여 나쁜맛 을 감소시킬 수 있으며(Williams, 1974), 용해 성을 증가시켜 액상 음료에 첨가 이용할 수 있다(Puski, 1974).

Table 11. Proteolytic modification

Food	Purpose
Cheese	Curd formation
	Flavor development
Meat	Tenderization
Brewing	Chillproofing
Wine	Clarification
Baked goods	Improvement in texture
Soy bean	Solubility
	Separation of beany off flavor

#### 2. Plastein의 형성

단백질을 효소로 분해한 후에 형성된 peptide 들은 동일한 酵素 존재하에 일정한 조건에서 재 조합할 수 있다(Whitaker 과 Puigserver, 1982). 단백질 을 추출한 후에 번성시키어 3차구조를 변 화시키어 구조의 内部까지 노출되게 한 後에 단 백질 분해효소로서 부분분해한다. 이를 고품분

35% 정도로 농축하여 동일한 단백질 분해효소 존재하에 일정한 조건에서 방치하면 peptide 들 간에 새로운 조합이 형성되면서 새로운蛋白質이 만들어진다(Fig. 6).

이 과정에서 단백질이 분해되면 단백질 内部에 存在하던 바람직하지 않은 物質이 떨어져 나갈 수 있고, 분해물을 여과, 혹은 원심분리하면 분자량이 적은 불순물과 peptide 를 제거할 수 있다. 또, peptide 의 再組合이 형성될 때 아미노산을 첨가할 수도 있다. 이와 같은 새로운 peptide 의 형성은 蛋白質과 酵素가 反應하여 peptide 가 분리되고 다른 peptide 는 효소와 복합체를 형성할 상태로 존재한다. 水分 함량이 많으면 peptide 와 효소의 복합체에서 효소가 분리되나 水分 함량이 적을 때에는 다른 peptide 혹은 새로운 아미노산이 결합하면서 효소가 분리된다(Fig. 7). 이는 基質의 농도가 높고 단백질이 分解됨에 따라 内部의 소수성 아미노산이 노출됨으로 해서 소수성 힘에 의해 peptide 들 間에 상호결합이 이루어지며 peptide 혹은 아미노산이 acyl enzyme intermediate 에 친핵적으로 접근함으로써 새로운 형태의 단백질인 plastein 이 만들어진다(Whitaker 와 Puigserver, 1982). 이러한 plastein 의 형성은 근본적으로 transpeptidation 에 의해 이루어지는 것으로 판단되고 있다(Fruton, 1982).

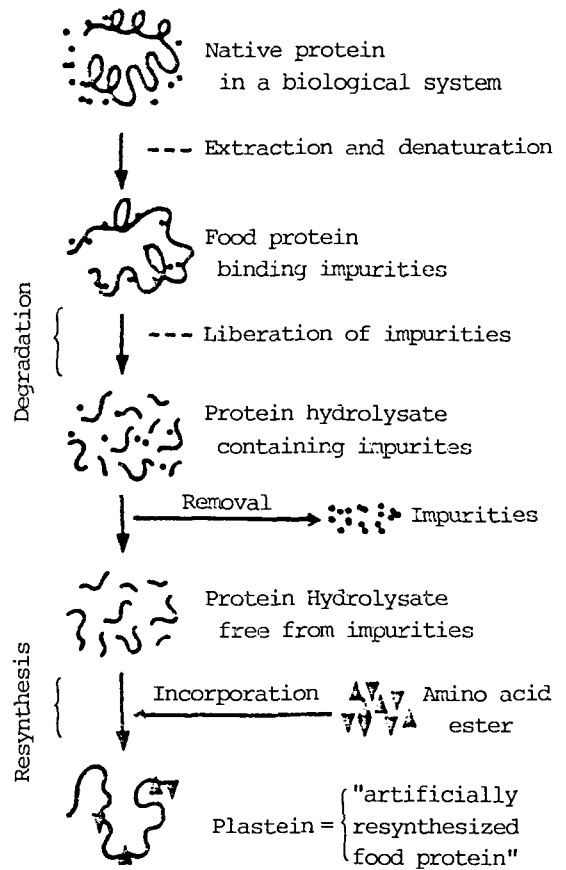


Fig. 6. Plastein reaction (Fujimaki et al, 1977)

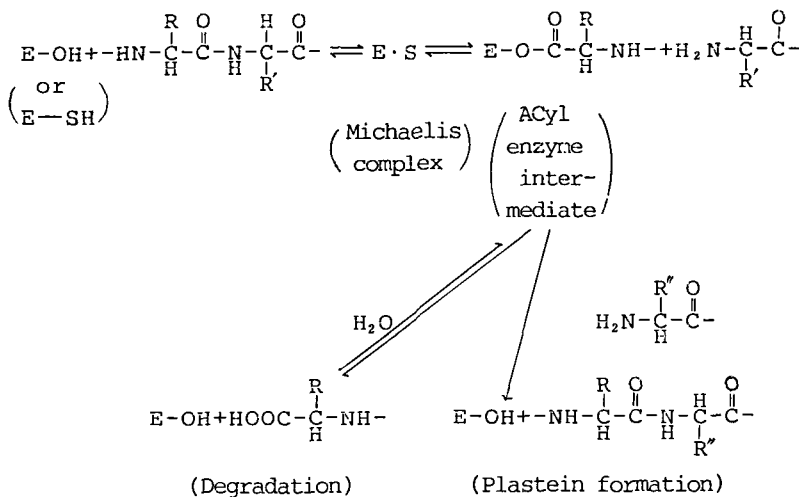


Fig. 7. Mechanism of plastein reaction (Whitaker and Puigserver, 1982)

이와 같은 plastein을 만들므로 해서 대두단백질 분해물의 쓴맛을 제거할 수 있고(Fujimaki 등, 1970), 영양적으로 부족한 아미노산을 보강할 수도 있고 기능적, 物理的 特性을 변화시킬 가능성도 있다(Watanabe와 Arai, 1982). Gelatin 분해물에 leucine alkyl ester(Watanabe 등, 1981) 혹은 n-hexyl ester(Watanabe 등, 1982)를 plastein 반응에 의해 결합하였을 때 表面活性이 增加한 바 있으며 peptide에 C<sub>12</sub> 이상의 alkyl ester를 결합했을 때 乳化機能(Shimada 등, 1982)과 耐凍濟(Arai 등, 1984)로서의 기능이 좋았다.

### 3. 아미노산의 결합

효소에 의해 아미노산을 蛋白質에 결합시킬 수 있다. Transglutaminase는 혈액에서 fibrin끼리 결합시키어 상처가 났을 때 지혈작용에 기여하는 효소이나 식품단백질에 아미노산을 결합시

키는데 使用할 수 있다. 단백질의 glutamine에 L-amino acid ethyl ester가 transglutaminase에 의해 결합하여 Fig. 8과 같이 isopeptide 결합이 형성될 수 있으며, 첨가된 아미노산에 결합되어 있는 ethyl alcohol은 pH를 8~9로 유지시킴으로 제거될 수 있다(Whitaker, 1986). 이와 같은 방법으로 casein과 대두단백질에 methionine을 결합시키어 methionine의 함량을 2~3배 增加시킬 수 있었고 gluten에 lysine을 결합하여 lysine의 含量을 5배 增加한 바 있으며(Ikura 등, 1981), 대두단백질의 7S 단백질과 11S 단백질을 연결시키기도 했다(Ikura 등, 1980b). Disulfide 결합을 가지고 있는 단백질에 sulfhydryl 基를 가지는 cysteine을 protein disulfide isomerase 혹은 protein disulfide reductase에 의해 교환, 결합시킬 수 있다(Whitaker, 1986).

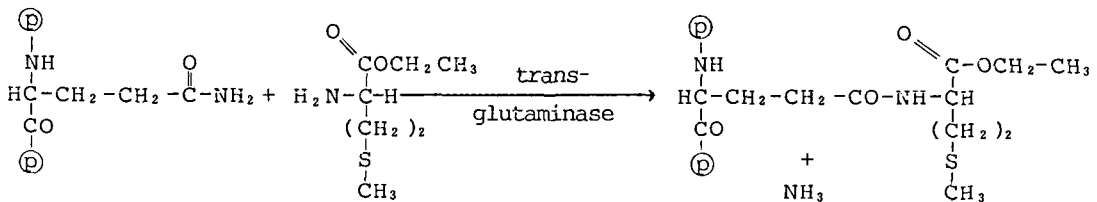


Fig. 8. Attachment of amino acid to protein by transglutaminase (Whitaker, 1986)

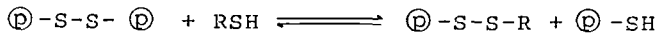


Fig. 9. sulfhydryl - disulfide interchange reaction (Whitaker, 1986)

### 4. 기타

불포화지방산이 lipoxygenase에 의해 fatty acid hydroxy free radical이 형성되면 이에 의해 단백질에 있는 cysteine이 sulfhydryl 基가 free radical로 전환되고 이렇게 해서 형성된 2개의 sulfhydryl free radical이 disulfide를 형성하면서 결합하게 된다(Whitaker, 1977). 이와 같이 반응에 의해 밀가루 반죽의 조직이 改善될 수 있다(Frazier 등, 1973). 단백질의 hydroxyl 基, imidazole 基, guanidine 基, E-ami-

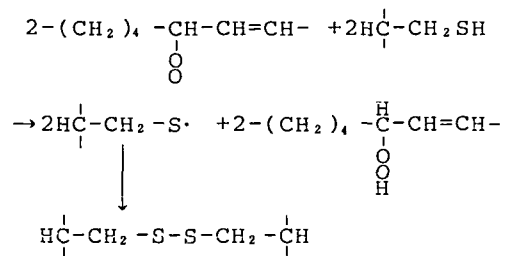


Fig. 10. Lipoxygenase catalyzed cross linkage (Whitaker, 1977)

no 基를 인산화 할 수 있으며 proline, lysine 등을 hydroxyl 化하여 단백질을 변화시킬 수 있다(Whitaker, 1977). 또한, 食品蛋白質이合成되는 生物體의 유전자를 再組合하여 단백질의 1차구조를 변화시키어 식품단백질의 기능을 장차 改善할 수 있을 것이다.

#### IV. 牛乳단백질의 變化

牛乳蛋白質은 영양적으로 매우 우수한 蛋白質이나 서구에서 重要한 食品蛋白質으로 인정되어 왔기 때문에 영양적, 물리적 特性을 더욱 改善하고자 하는 시도가 계속되어 왔으며 이와 같은 牛乳蛋白質의 變化는 식품단백질의 變化에 對한 체계적인 研究 이전부터 利用되어 왔다. Rennet에 의한 치즈는 酵素의 變化의 대표적인 예이며, 酸 casein의 製造는 化學的 變化에 屬한다. 지금은 利用되고 있지 않으나 casein은 利用한 paper coating, casein-플, plastic casein의 製造 등도 化學적 變化의 一種이다. 牛乳蛋白質은 인산화, alkyl 化, 이온물질의 結合, 아미노산의 結合 등 化學的 方法을 利用하여 變化가 시도되었다. casein을 인산화(Matheis等, 1983), alkyl 化(Sen等, 1981) 했을 때 水分吸收力이 增加하였다. Alkyl 化에 의해 casein의 乳化能力이 增進되었으나(Sen等, 1981), 인산화에 의해서는 惡化되었고(Mathesis等, 1983),  $\beta$ -lactoglobulin의 경우는 인산화에 의해 乳化能力이 매우 改善된 바 있다(Woo와 Richardson, 1983). Casein의 용해도는 formaldehyde와 acetone으로 alkyl 化 했을 때에는 增加하고 n-butylaldehyde, cyclopentanone, benzaldehyde로 alkyl 化 했을 때에는 감소했다(Sen等, 1981). Methionine을 polymer로 casein에 結合하였을 때 용해도가 低下하였다(Gaertner와 Puigserver, 1984). Casein(Matheis等, 1983)과  $\beta$ -lactoglobulin(Woo와 Richardson, 1983)을 인산화 했을 때에 粘度가 增加한 바 있다. Casein이 poly-L-lysine과 같은 陽이온성 物質과 결합했을 때에는 rennet에 의한 응고시간이 減少하였고, poly-L-glutamate와 같은 음이온성 物質이 결합했을 때에는 rennet에 의한 응고시간이 延長된 바 있으며(Marshall과 Green,

1980), 이는 치즈 조식을 調節할 수 있는 方法이 될 수 있다.

化學的 變化에 의해 營養的 價値가 改善된 報告는 없다. 그러나, methionine을 casein에 결합하여 위에 급여했을 때 유리 methionine을 급여했을 때와 유사한 영양적 가치를 보여준 바 있다(Puigserver等, 1978), 유리아미노산 食品에 添加했을 때의 단점을 解決할 수 있는 可能性을 보여주었다. 牛乳蛋白質을 효소적으로 變化시킴으로써 機能를 改善할 수 있다. Casein curd를 蛋白質 分解酵素로 分解하여 치즈의 용융성을 改善할 수 있었고(Lazaridis等, 1981), sodium caseinate를 分解하여 粘度를 減少시키어 분무 건조시 粘性에 의한 어려움을 해결하기 위한 시도가 있었다(Hooker等, 1982). 유청 단백질은 部分分解하여 용해도를 增進하였다(Jost와 Montini, 1977). Lactalbumin을 효소를 分解하여 完全히 소화할 수 있는 환자용 食品을 만들 수 있다(Chiang等, 1982). Casein을 단백질 분해 효소로 分解한 경우 쓴맛의 peptide가 형성되는데 이를 exopeptidase, endopeptidase로 分解하여 解決할 수 있다(Clegg等, 1974). Casein에 수용성 콩단백질을 peroxidase에 의해 結合시킨 바 있다(Matheis와 Whitaker, 1984). transglutaminase를 利用하여  $\alpha_s$ -casein,  $\beta$ -casein을 각각 polymer로 전환시켰을 때  $Ca^{++}$ 에 對한 安定성이 增進되었고  $\beta$ -casein의 k-casein에 의한 安定성이 改善되었다(Ikura等, 1980a). Na-caseinate와 탈지유의 단백질을 단백질 분해효소로서 分解한 후에 再結合시키어 plastein을 만들 바 있는데(Sukan과 Andrews, 1982), 이는 乳蛋白質과 特性이 전혀 다른 새로운 機能의 단백질을 만들 수 있는 可能性을 시사한다.

$\beta$ -casein,  $\alpha_{s1}$ -casein,  $\beta$ -lactoglobulin분해 물로부터 opioid agonist peptide가 k-casein분해물로부터 opioid antagonist peptide가 發見되어(Yoshikawa等, 1986), 乳蛋白質의 生物學的 機能에 對한 새로운 可能性을 보여주었다.

#### V. 結 論

蛋白質의 物理的 化學的, 營養的 등의 모든 특

성은蛋白質을 구성하는 아미노산에 의해 결정되기 때문에 아미노산을 化學的으로 변화시킨다거나 酵素的으로 分解, 結合하면 特性和 價値가 변화된다. 이와 같은 化學的, 酵素的 方法에 의해 변화된 단백질의 特性和 價値는 예측할 수 없으나 無限한 可能性을 가지고 있다. 일반적으로 化學的 方法에 의한 변화는 化學반응 시약의 잔유물, 生産된 産物의 人體에 對한 영향, 소비자들의 化學的 處理에 對한 심리적인 부담 등으로 인하여 食品으로 利用하기 前에 人體의 영향에 對한 철저한 研究가 요구된다. 그러나, 효소적 方法은 生物體內에서 일어나는 현상과 유사하여 효소적 方法이 肯定的인 方法으로 인정되고 있다.

牛乳蛋白質은 다른 食品蛋白質에 比하여 구조, 特性이 많이 研究되어 이와 같은 蛋白質 變化에 의한 價値增進을 위한 정보가 많다. 牛乳의 特性 및 加工에 있어 단백질과 관련이 있는分野는 모두 研究의 對象이 될 수 있으며, 특히 牛乳蛋白質의 分解物에서 opioid agonist peptide, opioid antagonist peptide 등 生物學的 機能을 가지는 物質이 發見된 것은 牛乳蛋白質의 잠재하는 새로운 價値의 可能性을 시사한다. 이와 같은 蛋白質의 직접적인 변화에 의한 가치변화 外에 食品産業에 利用되는 酵素의 機能을 改善하여 간접적으로 利用할 수 있다.

## VI. 引用文獻

1. Arai, S., M.Watanabe, and R.F.Tsuji. 1984. Enzymatically modified gelatin as an antifreeze protein. *Agri.Biol.Chem.* 48;2173-2175.
2. Behnke, U., E.Ackermann, and H.Ruttloff 1984. Herstellung und Nutzung enzymatischer proteinhydrolysate aus Knochenschrotresten mechanischer Knochenentfleischanlagen. 1.Mitt. Untersuchungen zur enzymatischen hydrolyse von Rinderknochenschrot. *Nahrung.* 28;397-407.
3. Bernholdt, H.F.1975. Meat and other proteinaceous foods. In "Enzymes in food processing". G.Reed ed. pp.473. Academic Press. London.
4. Chiang, J.P., B.L.Illingworth - Asmus, and M.Sternberg.1982. Method for the Preparation of a protein hydrozate from whey protein. *Eur.Pat.Appl.* 0,065,663.
5. Clegg, K.M., G.Smith, and A.L.Walker. 1974. Production of enzymic hydrolyzate of casein on a Kilogram scale. *J. Food.Technol.* 9;425-431.
6. Feeney, R.E., R.B.Yamaski, and K.F. Geoghegan.1982. Chemical modification of proteins; An overview. *Adv.Chem. Ser.* 198;3-55.
7. Fennema, O.1985. Chemical changes in food during processing; An overview. In "Chemical changes in food during processing". T.Richardson, and J.W.Finley ed. PP.1. Avi Publishing Company.Inc. Westport Connecticut.
8. Frazier, P.T., F.A.Leigh-Dugmore.N.W. R.Daniels, P.W.R.Eggitt, and J.B.M. Coppock.1973. The effect of lipoxygenase action on the mechanical development of wheat flour doughs. *J.Sci.Food Agric.* 24;421-436.
9. Fretheim, K., S.Iwai, and R.E.Feeney. 1979. Extensive modification of protein amino groups by reductive addition of different sized substituents. *Int.J. Pept.Protein Res.* 14;451-456.
10. Fruction, J.S.1982. Proteinase-catalyzed synthesis of peptide bonds. In "Advances in Enzymology". A.Meister ed., 239. John Wiley and Sons. Co., New York.
11. Fujimaki, M., M.Yamashita, S.Arai, and H.Kato.1970. enzymatic modification of proteins in foodstuffs. Part 1. Enzymatic proteolysis and plastein synthesis application for preparing bland protein-like substances. *Agri.*

- Biol.Chem. 34;1325-1332.
12. Fujimaki, M., S.Arai, and M.Yamashita. 1977. Enzymatic protein degradation and resynthesis for protein improvement. *Adv.Chem.Ser.* 160;156-184.
  13. Gaertner, H.F., and A.J.Puigserver. 1984. Covalent attachment of poly (L-methionine) to food proteins for nutritional and functional improvement. *J.Agric.Food chem.* 32(6);1371-1376.
  14. Geoghegan, K.F., D.T.Osuga, A.I.Ahmed. Y.Yeh, and R.E.Feeney. 1980. Antifreeze glycoprotein polar fish. Structural requirements for function of glycopeptide 8. *J.Biol.Chem.* 255;663-667.
  15. Godfrey, T. 1983. Brewing. In "Industrial enzymology. The application of enzymes in industry". T.Godfrey, and J.Reichert ed. pp.221. MacMillan. London.
  16. Hooker, P.H., P.A.Munro, and G.M.O'Meara. 1982. Reduction of the viscosity of sodium caseinate solutions by enzymic hydrolysis. *N.Z.J.Dairy Sci. Technol.* 17;35-40.
  17. Ikura, K., M.Yoshikawa, R.Sasaki, and H.Chiba. 1981. Incorporation of amino acids into food proteins by transglutaminase. *Agric.Biol.Chem.* 45;2587-2592.
  18. Ikura, K., T.Kometani, M.Yoshikawa, R.Sasaki, and H.Chiba. 1980a. Crosslinking of casein components by transglutaminase. *Agric.Biol.Chem.* 44(7); 1567-1573.
  19. Ikura, K., T.Kometani, R.Sasaki, and H.Chiba. 1980b. Crosslinking of soybean 7s and 11s proteins by transglutaminase. *Agric.Biol.Chem.* 44;2979-2984.
  20. Jost, R., and J.C.Monti. 1977. Partial enzymatic hydrolysis of whey protein by trypsin. *J.Dairy Sci.* 60;1387-1393.
  21. Lazaridis, H.N., J.R.Rosenau, and R.R.Manhoney. 1981. Enzymatic control of meltability in a direct acidified cheese product. *J.Food Sci.* 46;332-339.
  22. Lyons, T.P. 1982. Proteinase enzymes relevant to the baking industry. *Biochem.Sco.Trans.* 10;287-290.
  23. Marshall, R.J., and M.L.Green. 1980. The effect of the chemical structure of additives on the coagulation on casein micelle suspensions by rennet. *J.Dairy Res.* 47;359-369.
  24. Matheis, G., L.C.Sen, A.J.Clifford, and J.R.Whitaker. 1985. Attachment of N-acetyl-L-methionine into whole soybeans and the nutritional consequences for the rat. *J.Agric.Food Chem.* 33;39-44.
  25. Matheis, G., M.N.Penner, R.E.Feeney, and J.R.Whitaker. 1983. Phosphorylation of casein and lysozyme by phosphorous oxychloride. 31;379-387.
  26. Matheis, G., and J.R.Whitaker. 1984. Peroxidase catalyzed cross linking of proteins. *J.Protein Chem.* 3(1);35-48.
  27. Ney, K.H. 1972. Aminosäure-Zusammensetzung von Proteinen und Bitterkeit ihrer Peptide. *Z.Lebensm. Untersuch. Forsch.* 149;321-323.
  28. Paterson, A.K., and J.R.Knowles. 1972. The number of catalytically essential carboxyl groups in pepsin. *Eur. J. Biochem.* 31;510-517.
  29. Puigserver, A.J., H.F.Gaertner, L.C.Sen, R.E.Feeney, and J.R.Whitaker. 1982. Covalent attachment of essential amino acids to proteins by chemical methods; Nutritional and functional significance. *Adv.Chem.Ser.* 149-167.
  30. Puigserver, A.J., L.C.Sen, A.J.Clifford, R.E.Feeney, and J.R.Whitaker. 1978. A method for improving the nutritional value of food proteins; covalent attachment of amino acids. In "nutritional improvement of food and feed proteins". M.Friedman ed., pp.587. Plenum Publ. Corp. New York.
  31. Puigserver, A.J., L.C.Sen, A.J.Clifford, R.E.Feeney, and J.R.Whitaker. 1979. Covalent attachment of amino acids to casein. 2. Bioavailability of methionine and N-acetyl-methionine covalently linked to casein. *J.Agric. Food Chem.* 27;1206-1293.
  32. Puski, G. 1974. Proteinaceous material for beverage use and method. US Patent 3,843,802.
  33. Richardson, T. 1985. Controlling acyl

- transfer reactions of hydrolases to alter food constituents. In "Chemical changes in food during processing". T. Richardson, and J.W.Finlnley ed., pp. 219. AVI Publishing Company. INC. Westport, Connecticut.
34. Rogers, T.B., R.A.Gold, and R.E.Feeney. 1977. Ethoxyformylation and photooxidation of histidines in transferrins. *Biochemistry*. 16;2299-2305.
  35. Rogers, T.B., T.Borresen, and R.E.Feeney. 1978. Chemical modification of the arginines in transferrins. *Biochemistry*. 17;1105-1109.
  36. Sen, L.C., H.S.Lee, R.E.Feeney, and J.R.Whitaker. 1981. In vitro digestibility and functional properties of chemically modified casein. *J.Agric. and Food Chem.* 29;348-354.
  37. Shimada, A., E.Yazawa, and S.Arai. 1982. Preparation of proteinaceous surfactants by enzymatic modification and evaluation of their functional properties in a concentrated emulsion system. *Agric.Biol.Chem.* 46;173-182.
  38. Smith, D.M., and C.J.Brekke. 1984. Functional properties of enzymatically modified beef heart protein. *J.Food Sci.* 49;1525-1528.
  39. Sukan, G., and A.T.Andrews. 1982. Application of the plastein to reactivation caseins and to skim milk powder. I. protein hydrosis and plastein formation. *J.Diary Res.* 49;265-278.
  40. Voutsinsa, L.P., and S.Nakai. 1979. Covalent binding of methionine and tryptophan to soy protein. *J.Food Sci.*
  41. Watanabe, M., H.Toyokawa, A. Shimada, and S.Arai. 1981. Proteinaceous surfactants produced from gelatin by enzymatic modification ; Evaluation for their functionality. *J.Food Sci.* 46; 1467-1469.
  42. Watanabe, M., N.Fujii, and S.Arai. 1982. Characterization of foam and emulsion stabilizing functions of enzymatically modified proteins with surfactancy. *Agric.Biol.Chem.* 46;1587-1592.
  43. Watanabe, M., and S.Arai. 1982. Proteinaceous surfactants prepared by covalent attachment of L-leucine-n-alkyl esters in food proteins by modification with papain. *Adv.Chem.Ser.* 198; 199-221.
  44. Whitaker, J.R. 1977. Enzymatic modification of proteins applicable to foods. *Adv.Chem.Ser.* 160;95-155.
  45. Whitaker, J.R. 1986. Covalent attachment of essential amino acid to proteins to improve their nutritional and functional properties. In "Protein tailoring for food and medical uses". R.E.Feeney, and J.R.Whitaker ed. pp. 41. Marcel Dekker, INC. New York.
  46. Whitaker, J.R. and A.J.Puigserver. 1982. Fundamentals and applications of enzymatic modifications of proteins ; An overview. *Adv.Chem.Ser.* 198;57-87.
  47. Williams, W. 1974. Bland soy protein. US patent. 3,852,480.
  48. Woo, S.L., and T.Richardson. 1983. Functional properties of phosphorylated -lactoglobulin. *J.Diary Sci.* 66;984-987.
  49. Yoshikawa, M., F.Tani, T.Woshimura and H.Chiba. 1986. Opioid prptides from milk proteins. *Agric.Biol.Chem.* 50(9); 2419-2421.