

## 들깨 (*Perilla ocimoides* L.) 種子の 蛋白質 分離에 따른 Phytate와 窒素의 溶解度

尹 衡 植 · 李 在 夏

慶北大學校 農科大學 食品工學科

### The Solubility of Nitrogen and Phytate According to the Isolation of Perilla Seed Protein

Hyung-Sik Yoon and Jae-Ha Lee

Department of Food Science and Technology, College of Agriculture,  
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

#### Abstract

Nitrogen and phytate solubility of perilla seed flour were influenced by the following factors: pH, centrifugal force, temperature and the presence of salt. The nitrogen solubility of perilla seed flour was minimum(17.1~18.0%) at the pH range of 4.0~5.0 and maximum(92.3%) at pH 11.0, while phytate solubility was the highest(48.5%) at pH 4.8 and lowest(8.3%) at pH 11.0. The phytic acid content in the extract decreased with an increase in centrifugal force. However, the nitrogen content was not affected by centrifugal force. The solubility of nitrogen and phytate gradually increased as the temperature was increased from 5°C to 60°C. The addition of calcium(0~50mM) at pH 5.0 decreased the phytate solubility, but increased nitrogen solubility. The solubility of nitrogen and phytate of perilla seed protein isolate was gradually increased as pH raised further. The protein and phytate contents of the perilla seed protein isolate were 1.1 and 89.6%, respectively, compared to 5.0 and 60.1% for perilla seed flour.

#### 서 론

식량자원의 확보를 위하여 多方面에서 연구가 검토되어 왔으며, 그중 단백질 자원의 확보 및 개발을 위하여 미생물 단백질의 이용 및 葉蛋白質, 종자단백질 같은 植物性 蛋白質의 확보와 이들 단백질원의 효율적 이용을 위한 연구가 많이 수행되어 왔다<sup>1-3)</sup>. 단백질자원 중 참깨<sup>4)</sup>, 채종<sup>5)</sup>, 면실<sup>6)</sup> 등 유량종실(oilseeds)의 油脂抽出後 분리되는 粕은 단백질 자원으로 그 이용가치가 높은 것으로 평가되고 있으며, 여러 나라에서 단백질 강화식품이나 textured protein food 및 protein beverage 등에 이용되고 있거나 개발단계에 있다<sup>9)</sup>.

Phytic acid(myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis; dihydrogen phosphate)는 단백질이나  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  등과 같은 2價 혹은 3價의 금속 이온들과 상호작용하여 불용성 화합물을 형성함으로써 종자류에 함유되어 있는 단백질 및 무기질의 체내흡수를 저해시킨다고 알려져 있다<sup>7-8)</sup>. 최근 이들 종자로부터 phytic acid를 제거하거나 감소시키기 위한 많은 연구 결과가 보고되어 왔는데, 그중 phytate와 단백질의 용해도 차이를 이용하여 phytate를 제거하는 방법<sup>9)</sup>과 pH를 이용하여 phytate와 단백질의 결합을 해리시키는 방법<sup>10)</sup> 등이 제안되었고, 발아<sup>11)</sup> 및 발효<sup>12)</sup>, ultrafiltration<sup>13)</sup>, 이온교환수지의 이용<sup>14)</sup> 등에 의해 phytate를 제거하거나 감소시키는 보고가 있었다.

한편, 들깨종자의 탈지막에는 40% 이상의 단백

1989년 3월 27일 수리  
Corresponding author: J.H. Lee

질이 함유되어 있어 대두나 참깨 등의 탈지박과 같은 단백질원으로써 충분한 이용가치가 있는 것으로 사료된다. 본 실험에서는 유량종실에서 분리한 단백질의 영양 및 機能性에 영향을 미치는 phytic acid를 제거하기 위해 들깨종자로부터 phytate 함량이 낮은 단백질을 분리하기 위해 pH를 중점으로 하여 단백질과 phytate의 용해도를 조사하였던 바 그 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 실험재료

본 실험에 사용한 들깨종자는 한국산 재래종(대구재래)으로 수확한 지 7개월된 것을 구입하여 재료로 사용하였다.

#### 탈지들깨종자박의 조제

들깨종자를 수세·건조한 다음 껍질을 제거하고 *n*-hexane을 가하여 분쇄한 것을 삼각플라스크에 주입하고, 여기에 다시 *n*-hexane(1:20)을 가하여 마개를 하고 24시간 진탕시켜 유지를 추출하였다. 이를 여과하여 용액과 잔사로 분리한 후 잔사를 상온에서 24시간 풍건한 다음 60 mesh sieve를 통과하도록 분쇄시킨 것을 탈지시료로 하였다. 조제한 시료는 실험에 사용할 때까지 밀폐용기에 넣어 1°C에서 보관하였다.

#### 들깨종자 分離蛋白質의 조제

분리단백질의 조제는 Dench의 방법<sup>16)</sup>에 따라 Fig. 1과 같이 하였다. 즉, 탈지시료에 증류수(1:20)를 가한 다음 3.0N NaOH로 pH를 11.0으로 조정하고 magnetic stirrer를 사용하여 상온에서 30분간 교반하였다. 교반한 액은 8,000 rpm에서 15분간 원심분리(Hitachi 20PR-52D, RPR-20-2 rotor)하여 얻은 상등액을 pH 4.8로 조정하여 단백질을 침전시키고, 수세한 다음 pH를 중성으로 하여 동결건조한 것을 분리단백질로 하였다.

#### Phytic acid 정량

Phytic acid의 정량은 Thompson등의 방법<sup>17)</sup>에 따라 시료 일정량에 trichloroacetic acid용액(3% TCA+10% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)을 가하여 30분간 교반한 다음 여과하고, 여액 10ml에 증류수 10ml와 FeCl<sub>3</sub> 용액(2.0g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O+30g TCA/l) 12ml 가한 것을 45분간 끓인 다음 냉각하고 원심 분리하여

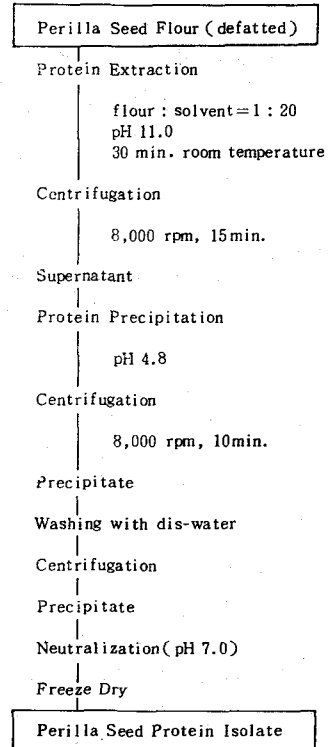


Fig. 1. Flow chart for the preparation of perilla seed protein isolate

얻어진 침전물을 TCA용액(3% TCA+2.5% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)으로 세번 세척하였다. 세척한 침전물은 습식 분해하여 0-phenanthroline method로 Fe를 정량한 다음, phytate 1 mole에 4 mole의 Fe가 결합한다는 분자구조의 이론적 가정하에서 Fe 값에 conversion factor 2.98을 곱한 값으로 phytate의 양을 구하였다.

#### pH의 변화에 따른 용해도 측정

Taha 등의 방법<sup>10)</sup>을 일부 수정하여, 시료와 용매(증류수)의 비율을 1:20(W/V)으로 하고, 3N HCl과 3N NaOH로 pH를 단계적(pH 2.0~12.0)으로 조정한 다음 상온에서 30분간 magnetic stirrer를 사용하여 교반하였다. 추출시 pH를 일정하게 유지시키기 위하여 추출시작 10분 후에 pH를 재조정하였으며, 추출종료 후 pH를 다시 조정하였다. 추출이 끝난 혼합액은 8,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액의 일부를 취하여 micro-Kjeldahl법으로 질소를 정량하고 上記의 방법으로 phytate를 정량하여 시료중의 질소량과 phytate량에 대한 백분율로 용해도를 나타내었다.

결과 및 고찰

일반성분 및 phytate 함량

들깨종자의 탈지박 및 분리단백질의 일반성분과 phytate 함량은 Table 1에 나타낸 바와 같다. 탈지박에서 粗蛋白質의 함량은 60.1%로서 참깨(60.22%)<sup>18)</sup>, 면실(61.3%)<sup>19)</sup> 등과는 유사한 함량이었으나 채종(45.4%) 보다는 높은 함량을 나타내었으며, phytate의 함량은 5.0%로서 참깨(5.2%)<sup>21)</sup>와는 함량이 유사하였으나 팥콩(1.7%)<sup>21)</sup> 보다는 높은 수치였다. 분리단백질에서 조단백질의 함량은 89.6%, phytate의 함량은 1.1%였는데 이는 단백질의 분리방법에 따라 다소 차이가 생기는 것으로 보고되고 있는데 de Rham과 Jost<sup>22)</sup>의 경우, 탈지대두로부터 pH8.2에서 추출한 대두단백질을 pH 4.5로 단백질을 침전시켰을때 단백질과 phytate의 함량은 각각 86%와 1.84%였는데 같은 조건에서 pH 5.5로 침전시켰을때는 각각 93%와 0.6%였다고 보고하였다.

Table 1. Proximate composition of perilla seed flour and protein isolate

Component	Flour	Protein ioslate
Moisture(%)	7.23	5.2
Crude protein(%)	60.1	89.6
Crude fat(%)	0.6	—
Crude ash(%)	6.5	2.6
Phytate(%)	5.0	1.1

Conversion factor of N×6.25 was used to obtain percent protein value.

질소와 phytate의 용해도에 미치는 pH의 영향

탈지들깨종자박으로부터 보다 낮은 함량의 phytate와 많은 양의 단백질을 가지는 분리단백질을 조제하기 위한 최적 pH를 구하기 위해 추출용매의 pH 변화에 따른 질소와 phytate의 용해도를 측정할 결과는 Fig. 2와 같다.

질소의 용해도는 pH 4.0~5.0에서 17.1%~18.0%의 용해도로 가장 낮았으며, 이 이상의 pH 범위에서는 용해도가 급격히 증가하여 pH 11.0에서는 92.3%로 가장 높은 용해도를 나타내었는데, 이는 Gheyasuddin 등<sup>23)</sup>이 보고한 해바라기종자의 질소 용해도경향과 유사하였다. Phytate의 용해도는 pH 5.0에서 48.5%로 최고 용해도를 나타내었으며 이보다 pH가 높거나 낮을수록 현저히 감소

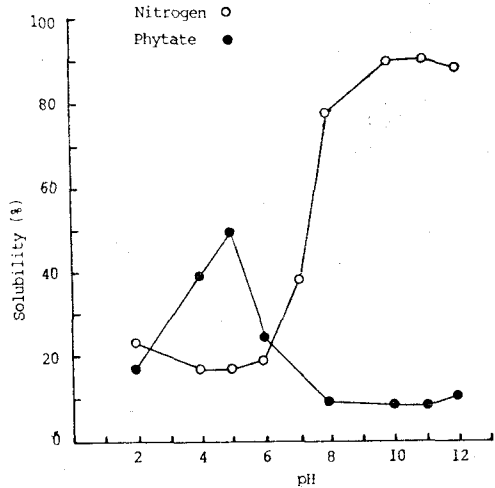


Fig. 2. Influence of pH on the solubility of nitrogen and phytate of perilla seed flour

하였는데 pH 11.0에서는 8.3%까지 떨어져 최저 용해수준을 나타내었으며 질소와 phytate의 용해도 차이도 가장 크게 나타났다. 이같은 phytate의 용해도 경향은 Hartman<sup>24)</sup>이 보고한 대두에서의 결과와 유사하였지만 Hartman의 경우 pH 10.0에서 높은 용해도를 보여 본 실험의 들깨종자와는 다소 다른 결과를 나타내었다. 알칼리성 pH 영역에서 탈지들깨종자박의 낮은 phytate 용해도는 시료 중에 존재하는 금속이온들에 의해 phytate-mineral 또는 protein-mineral-phytate complex의 형성에 기인하는 것으로 사료되었다. Serraino와 Thompson<sup>24)</sup>의 보고에 의하면 알칼리성 pH영역에서 phytate와 단백질은 모두 음전하를 띄게 되며 phytate와 단백질이 결합하기 위해서는 intermedicator로써 多價의 양이온을 요구하고 Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> 등과 같은 금속이온의 양은 phytate와 단백질의 결합에 큰 영향을 미친다고 하였다.

Fig. 2에 나타낸 바와 같이 탈지들깨종자박은 pH 11.0에서 상당량 phytate가 침전되는 반면 단백질은 많이 용해되어 나온다는 성질과 pH 4.8에서의 높은 phytate 용해도와 낮은 단백질 용해도를 이용하여 pH 11.0에서 추출하고 pH 4.8에서 침전시켰을때 상당량의 phytate가 제거된 분리단백질을 얻을 수 있다고 하였다.

원심력의 영향

원심력이 pH 11.0에서 추출한 추출액 중의 질소와 phytate량 그리고 추출액의 混濁度(turbidity)

에 미치는 영향을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 원심력의 증가에 따라 질소량의 변화는 거의 없었으나 phytate의 양은 현저히 감소하여 5,000 rpm에서는 11.6%, 8,000 rpm 이상에서는 8.3%의 일정수준을 나타내었다. 추출액을 증류수로 10배 희석하여 730nm에서 투광도를 측정된 결과, 원심력이 커짐에 따라 투광도가 증가하였는데 이는 대두 단백질 추출물의 혼탁도가 phytic acid의 존재와 관계한다는 Saio 등<sup>25)</sup>의 보고와 거의 일치하였다.

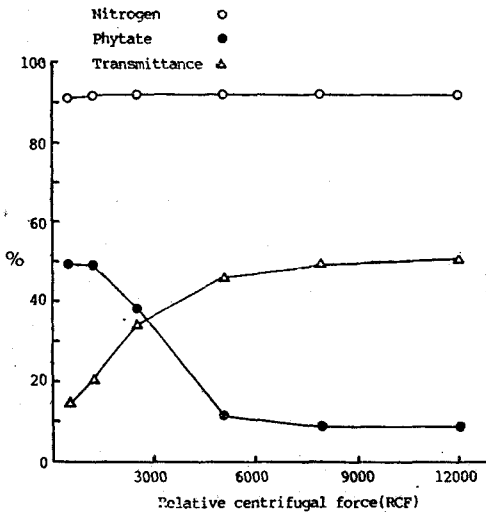


Fig. 3. Influence of the speed of centrifugation on amount(% of total) of nitrogen and phytate found in extract solutions obtained by extracting perilla seed flour at pH 11.0, and on the transmittance at 730nm of the extracts diluted tenfold with distilled water

추출온도의 영향

추출온도가 탈지들깨종자박의 질소 및 phytate의 용해도에 미치는 영향은 Table 2에 나타낸 바

Table 2. Influence of temperature on the solubility of nitrogen and phytate from perilla seed flour(pH 11.0)

Temp. °C	Solubility, %	
	Nitrogen	Phytate
5	85.0	7.5
10	89.1	8.0
20	92.3	8.3
30	92.5	8.5
45	93.7	9.0
60	92.0	10.3

와 같이 추출온도의 상승(5~60°C)에 따라 질소와 phytate의 용해도는 모두 증가하였으나 그 증가폭은 미미하였다. 질소의 경우 45°C에서 93.7%로 최고용해도를 나타낸 후 60°C에서는 용해도가 감소하였는데 이는 단백질의 응고에 기인하는 것으로 사료된다<sup>23)</sup>.

低 Ca<sup>2+</sup>이온의 영향

pH 5.0에서 Ca<sup>2+</sup>이온의 농도가 탈지들깨종자박의 질소 및 phytate의 용해도에 미치는 영향을 조사하기 위해 CaCl<sub>2</sub>의 농도를 5mM, 10mM, 20mM, 30mM 및 50mM로 하여 용해도를 측정된 결과(Fig. 4), CaCl<sub>2</sub>를 첨가하지 않았을때는 48.5%이던 phytate의 용해도가 20mM CaCl<sub>2</sub>에서는 23.5%, 50mM CaCl<sub>2</sub>에서는 대부분의 phytate가 불용성이었다. 질소의 용해도는 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하지 않았을때 18.0%이었으며, CaCl<sub>2</sub>의 농도가 높아짐에 따라 질소의 용해도가 증가하여 50mM CaCl<sub>2</sub>에서는 28.6%의 용해도를 나타내었는데 이는 Gillberg와 Törnell<sup>26)</sup>이 보고한 채종단백질에서의 결과와 유사한 경향을 보였다. 한편 Serraino와 Thompson<sup>27)</sup>은 산성 pH 영역에서 phytic acid가 음전하를 가질때 단백질은 양전하를 띄게되어 protein-phytate의 복합체가 형성되는데, 이때 많은 Ca<sup>2+</sup>이온의 존재는 단백질의 양이온 group과 경쟁하여 phytate와 단백질의 결합을 해리시킨다고 보고하였다.

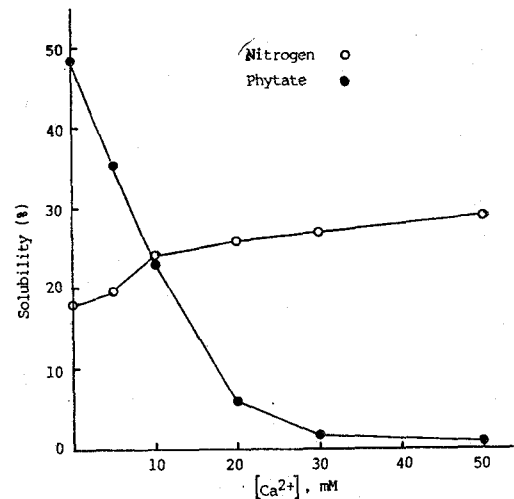


Fig. 4. Influence of CaCl<sub>2</sub> concentration on solubility of nitrogen and phytate of perilla seed flour(pH 5.0)

**pH 변화에 따른 분리단백질의 질소 및 phytate의 용해도**

단백질의 여러 機能性 중 용해도는 매우 중요한 요소로서 NSI(nitrogen solubility index)는 분리단백질을 식품에 응용할때 여러 기능성의 지표로써 사용되기도 한다<sup>27)</sup>. 들깨종자 분리단백질의 질소 및 phytate의 용해도를 pH의 변화에 따라 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. 질소의 용해도는 pH 5.0에서 3.3%로 최저였으며 pH의 상승에 따라 용해도가 증가하여 pH 11.0에서는 93.6%의 용해도를 나타내었다. Phytate의 용해도 역시 pH의 상승에 따라 용해도가 증가하였는데 pH 4.0에서 0.4%였으며, pH 11.0에서는 85.8%의 용해도를 나타내었다. 이같은 들깨종자 분리단백질의 질소 및 phytate의 용해도는 de Rham과 Jost<sup>22)</sup>가 보고한 대두분리 단백질의 용해도 경향과 유사한 결과였다.

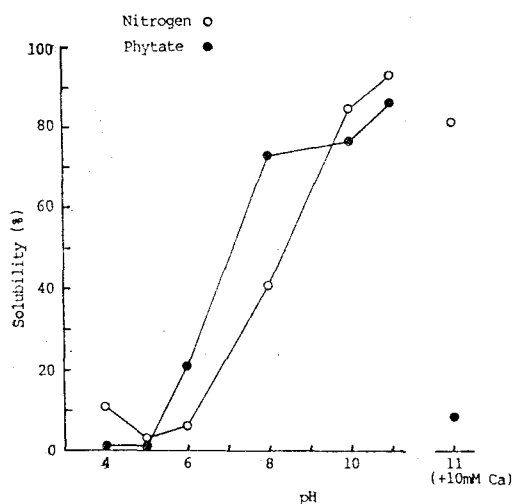


Fig. 5. Influence of pH on the solubility of nitrogen and phytate of perilla seed protein isolate

pH 11.0에서 10mM CaCl<sub>2</sub>의 첨가는 phytate의 용해도를 9.8%로 크게 감소시켰는데 이는 Ca<sup>2+</sup>이온이 가용성 phytate와 결합하여 phytate-Ca 또는 phytate-Ca-protein complex가 형성되어 용해도가 감소한 것으로 사료된다<sup>7,14)</sup>.

**요 약**

탈지들깨종자박의 질소용해도는 pH 4.0~5.0에서 최저수준을 보였으며, pH 11.0에서는 92.3%로

최고용해도를 나타내었다. Phytate의 용해도는 pH 4.8에서 최고수준을 나타내었으며 pH 8.0~11.0에서는 9.4~8.3%로 낮은 값을 나타내었다. 원심력이 추출액 중의 질소량의 변화에 미치는 영향은 미미하였으나 phytate의 양과 혼탁도는 원심력의 증가에 따라 감소하다가 8,000 rpm 이상에서 거의 일정수준을 유지하였다. 추출온도의 상승(5~60°C)에 따라 종자박의 질소 및 phytate의 용해도는 증가하였으나 증가폭은 미미하였다. pH 5.0에서 CaCl<sub>2</sub>의 첨가는 phytate의 용해도를 크게 감소시켰는데 50mM CaCl<sub>2</sub> 용액에서는 거의 0%에 가까운 용해도를 나타내었다. 들깨종자 분리단백질의 질소 및 phytate의 용해도는 pH의 상승에 따라 모두 증가하는 경향을 보였다. 그러나 pH 11.0에서 10mM CaCl<sub>2</sub> 첨가는 phytate의 용해도를 80.5%에서 약 10%로 감소시켰다. 탈지들깨종자박의 조단백질과 phytate 함량은 각각 60.1%와 5.0%였으며, 분리단백질은 각각 89.6%와 1.1%였다.

**참 고 문 헌**

1. Cooney, C.L., Chokyun, R. and Tannenbaum S.R.: Adv. Food Res., 26 : 1(1980)
2. Beschart, A.A.: J. Food Sci., 39 : 1110(1974)
3. Natarajan, K.R.: Adv. Food Res., 26 : 215 (1980)
4. Rivas, N., Dench, J.E. and Caygill, J.C.: J. Food Sci., 32 : 565(1981)
5. Thompson, L.V., Liu, R.F.K. and Jones, J.D.: J. Food Sci., 47 : 1175(1982)
6. Rahma, E.H. and Narasinga Rao, M.S.: J. Agr. Food Chem., 31 : 325(1983)
7. Reddy, N.R., Sathe, S.K. and Salunkhe, D. K.: Adv. Food Res., 28 : 1(1982)
8. Thompson, L.V. and Serraino, M.R.: J. Agr. Food Chem., 34 : 468(1986)
9. Hartman, G.H. Jr.: J. Am. Oil Chem. Soc., 56 : 731(1979)
10. Taha, F.S., Fahmy, M. and Sadek, M.A.: J. Agr. Food Chem., 35 : 289(1987)
11. Michael Eskin, N.A. and Wiebe, S.: J. Food Sci., 48 : 270(1983)
12. Tangkongchitr, V., Seib, P.A. and Hosney, R.C.: Cereal Chem., 58(3) : 229(1981)

13. Okubo, K., Waldrop, A.B., Lacobucci, G.A. and Myers, D.V.: Cereal Chem., 52 : 263 (1975)
14. Brooks, J.R. and Moor, C.V.: J. Food Sci., 47 : 1280(1982)
15. Dev, D.K. and Mukherjee, K.D.: J. Agr. Food Chem., 34 : 775(1986)
16. Dench, J.E.: J. Sci. Food Agr., 33 : 173 (1982)
17. Thompson, D.B. and Erdman, J.W. Jr.: J. Food Sci., 47 : 513(1982)
18. Johnson, L.A., Suleiman, T.M. and Lusas, E.W.: J. Am. Oil Chem. Soc., 56 : 463(1979)
19. 김준평, 김창중, 남정희 : 한국식품과학회지, 9(3) : 211(1977)
20. 양창일, 고정삼, 김계식 : 한국식품과학회지, 10(2) : 162(1978)
21. Erdman, J.W. Jr.: J. Am. Oil Chem. Soc., 56 : 736(1979)
22. De Rham, O. and Jost, T.: J. Food Sci., 44 : 596(1979)
23. Gheyasuddin, S., Cater, C.M. and Mat, K. F.: J. Food Sci., 35 : 453(1970)
24. Serraino, N.R. and Thompson, L.V.: J. Agr. Food Chem., 32 : 38(1984)
25. Saio, K., Koyama, E. and Watanabe T.: Agr. Biol. Chem., 31 : 1195(1967)
26. Gillberg, L. and Törnell, B.: J. Food Sci., 41 : 1063(1976)
27. Kinsella, J.E.: J. Oil Chem. Soc., 56 : 242 (1979)