

두유박 단백질을 이용한 plastein의 합성

이상준 · 박우포* · 문태화 · 김재욱

서울대학교 식품공학과, *마산간호보건전문대학 식품영양과

초록 : 두유박 단백질을 시료로 하여 pepsin을 사용한 가수분해와 plastein 합성의 최적조건을 조사하였다. 가수분해의 최적 기질농도는 3%이었으며, 기질에 대한 최적의 효소 농도는 2%이었고, 최적 pH, 반응온도 및 반응시간은 각각 pH 1.7, 45°C 및 24시간이었다. Plastein 합성 조건으로 기질농도 40%, pH 4.0, 반응온도 45°C, 반응시간 18시간, (효소/기질) 농도 1%를 설정하였다. 생성된 plastein은 반응시간 및 기질농도 별로 전기영동으로 확인하였다(1992년 10월 9일 접수, 1992년 12월 9일 수리).

세계 인구의 빠른 증가는 장래에 식량부족을 유발하게 될 것으로 예상된다. 이러한 문제를 해결하는 방법의 하나로 미개발자원식물, 미생물, 해양에서 식용단백질을 얻기 위해 단세포 단백질, 어류, 식물의 잎, 콩, 면화씨, 평지씨 등에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다. 식물성 단백질 원료로는 대두가 가장 유망하나 우리나라에서는 그 생산량이 적어 많은 양을 외국에서 수입하기 때문에 이것을 직접 이용하는 이외에 두유 가공산업에서 나오는 부산물인 두유박을 이용하면 폐자원 이용면에서 의의가 클 것이다. 두유박은 약 80%의 수분을 가지고 있어 저장성이 낮아 아직까지 식품으로 이용되지 못하고 있으나 그 단백질은 다른 식품단백질에서 부족되기 쉬운 합황 아미노산과 lysine 함량이 비교적 많고 단백질 이용율이 대두, 두부, 두유보다 높아 유용한 단백질 강화원으로서도 의의가 크다.^{1,2)} 식물성 원료에서 얻은 단백질을 이용하는 방법의 하나는 단백질 분해 효소로 처리하여 식품소재로 활용하는 것인데 이것은 식품소재로서의 물성은 우수하나 효소 분해과정에서 생긴 저분자 펩티드에 의한 쓴맛이 문제이다. 대두 단백질 가수분해물의 쓴맛을 제거하는 방법으로 carboxy-peptidase A 등의 exopeptidase로 처리하는 방법이 보고되었으나³⁾ exopeptidase 처리는 단백질 가수분해물의 식품소재로서의 가치를 저하시킬 수 있는 유리 아미노산을 상당량 생성한다.⁴⁾ 이러한 문제점을 극복하는 방안으로 plastein 반응을 활용하는 연구가 이루어졌으며^{5,6)} 또한 특정 아미노산의 도입^{7,8)} 반응 중의 물성 변화^{9,10)} 등에 관한 연구도 보고된 바 있다.

한편 국내에서는 해바라기씨와 같은 종자단백질이나 말쥐치, 정어리 등의 어류단백질의 활용도를 증대시킬 목적으로 plastein 반응을 이용하는데 대한 연구가 보고되었으나,¹¹⁻¹³⁾ 가공폐기물을 효율적으로 활용하기 위한 방안으로 plastein 반응을 이용한 연구보고는 찾아보기 어렵다. 그러므로 본 연구에서는 두유박 단백질을 식품소재로 활용할 수 있는 방법을 모색하기 위하여 펩신을 이용하여 두유박 단백질의 가수분해 조건과 plastein 합성 조건을 구명하고 생성된 plastein의 성상을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

단백질 재료로는 (주) 정식품 신갈공장에서 두유제조시 얻어지는 두유박을 50°C에서 건조한 후 냉장고에 보관하면서 사용하였으며 두유박의 일반성분은 수분 77.82%, 단백질 8.07%, 지방 3.52%, 탄수화물 9.83%, 회분 0.76%이었다.

두유박 가수분해물의 제조

(1) 가수분해율의 측정

두유박에 펩신을 넣어 가수분해한 현탁액에 60% trichloroacetic acid(TCA)를 최종농도가 10% 되도록 첨가하고 12,000×g에서 10분간 원심분리한 다음 상층액 중의 질소를 Kjeldahl법으로 정량하여 10% TCA 가용성 질소량과 총질소량의 백분율로서 가수분해율을 계산하였다.^{12,14)}

(2) 분해조건

반응액의 pH, 온도, 반응시간, 효소농도, 기질농도 등을 달리하고 진탕하면서 반응시킨 후 가수분해율을 측정하였다. 이때 pH는 KCl-HCl 완충용액(pH 1.0, 1.7, 2.0) 또는 citrate-NaOH 완충용액(pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0)을 사용하여 조정하였다.

(3) 가수분해물의 제조

가수분해 최적조건하에서 두유박을 pepsin으로 가수분해시킨 다음 pH 7.0으로 조절하여 50°C 에서 1시간 교반하고, 12,000×g에서 10분간 원심분리한 후 Whatman No.1 여지로 여과하여 그 상층액의 유리지방을 제거하고 동결건조하였다.

Plastein의 합성

두유박 가수분해물을 기질로 사용하여 반응액의 기질농도, pH, 온도, 반응시간, pepsin 농도 등을 달리하여 반응시킨 다음 반응액의 TCA 농도를 10%로 하고 3,000×g에서 15분 동안 원심분리한 후 상층액의 질소량을 Kjeldahl법으로 정량하고 다음 식과 같이 plastein 합성률을 계산하였다.¹⁵⁾

$$\text{Plastein 합성률(\%)} = (\text{총질소} - 10\% \text{ TCA 가용성질소}) \times 100 / \text{총질소}$$

평균 peptide 길이

Kang과 Rice⁹⁾의 방법을 일부 변형하여 가수분해시간 별로 분취한 가수분해물을 원심분리(12,000×g, 10 min)한 다음 상층액 중의 총 가용성 질소와 α-아미노 질소를 정량하여 다음과 같이 평균 펩티드 길이를 산출하였다.

$$\text{평균 펩티드 길이} = (\mu\text{g 가용성질소} / \mu\text{g } \alpha\text{-아미노질소}) \times 100$$

Polyacrylamide gel 전기영동

10% acrylamide(acrylamide : bis-acrylamide=30 : 0.8)의 vertical type slab gel과 0.05 M Tris-0.384 M glycine 완충용액(pH 8.3)을 사용하여 25 mA에서 6시간 동안 전개하고 Coomassie Brilliant Blue R의 0.2% methanol-acetic acid-H₂O(4.5 : 1 : 4.5) 용액으로 염색한 다음 methanol-acetic acid-H₂O(1 : 1 : 8) 용액으로 탈색하였

결과 및 고찰

두유박의 가수분해 조건 결정

Pepsin을 첨가한 두유박 현탁액의 pH를 0.5에서 6.0까지 변화시키면서 가수분해시킨 결과는 Fig. 1과 같다.

pH 1.7까지는 pH가 증가함에 따라 가수분해율이 급격히 높아졌다가 그 후 완만하게 감소하였다.

pH 1.7에서 온도를 30°C 에서 60°C 까지 5°C 간격으로 변화시키면서 가수분해한 결과 Fig. 2와 같이 반응온도에 따른 차이는 크지 않았으나 온도가 상승함에 따라 가수분해율이 점차 증가하여 45°C 에서 가장 높은 가수분해율을 나타내었으며 그 이후에는 감소하였다.

반응시간이 가수분해율에 미치는 영향을 조사하기 위

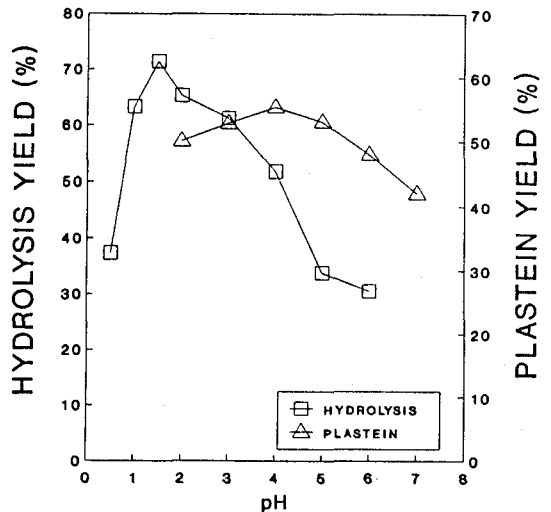


Fig. 1. Effect of pH on hydrolysis of soymilk residue and plastein formation from peptic hydrolysate of soymilk residue.

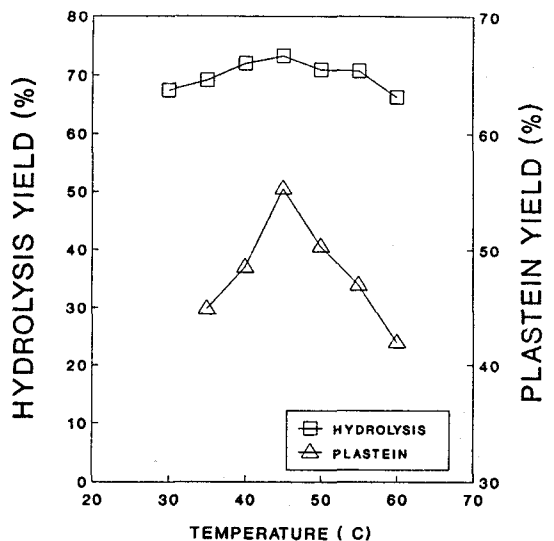


Fig. 2. Effect of temperature on hydrolysis of soymilk residue and plastein formation from peptic hydrolysate of soymilk residue.

하여 pH 1.7, 45°C 에서 시간을 달리하여 가수분해한 결과는 Fig. 3과 같다. 가수분해율은 가수분해시간이 길어짐에 따라 높아졌으나 5시간 이후에는 큰 변화가 없었으며 24시간 동안 가수분해시켰을 때 78.8%였고, 30시간 가수분해시켜도 24시간 가수분해시킨 것보다 1.3% 증가되었을 뿐이었다. 이와같은 경향은 다른 연구에서도 보고된 바 있는데 김과 이¹²⁾는 말쥐치의 마쇄육과 물을 1:1로 혼합하고 pepsin 1%를 가하여 가수분해시켰을 때 24시간 및 48시간 경과후에 각각 73.2%, 76.6%의 가수분해도를 얻었으며, 김 등¹³⁾은 정어리 분말 단백질을 pepsin으로 가수분해했을 때 24시간 및 48시간 경과후의 가수분해도가 78.4% 및 79.6%이었다고 보고하였다.

한편 pH 1.5, 45°C 에서 기질에 대한 pepsin의 첨가량을 달리하고 24시간 가수분해하여 효소농도가 가수분해에 미치는 영향을 조사한 결과 Fig. 4와 같이 pepsin 농도가 증가함에 따라 가수분해율이 증가하여 기질의 2% pepsin을 첨가하였을 때의 가수분해율이 80%이었으나 그 이상의 효소농도에서는 가하는 pepsin양에 비하여 가수분해율이 그다지 증가하지 않았다.

pH 1.5, 45°C 에서 기질의 첨가량을 달리하고 기질의 2% pepsin을 가하여 24시간 가수분해한 결과를 Fig. 5에 나타냈는데, 가수분해율은 3% 기질농도에서 가장 높았으며 그 이상의 범위에서는 기질농도가 증가함에 따라 수율이 점차로 감소하였다.

이상의 결과로부터 두유박 단백질을 pepsin으로 가수분해하기 위한 조건으로 pH 1.7, 반응온도 45°C, 기질농

도 3%, 기질에 대한 효소농도 2%, 반응시간 24시간을 설정하였다.

한편 가수분해시간에 따라 측정된 평균 peptide 길이는 Fig. 6에 나타난 바와 같이 반응시간이 길어짐에 따라 감소하여 1시간 가수분해한 가수분해물의 평균 peptide 길이는 9.5 아미노산 잔기였으나 20시간 이후에는 6.6 아미노산 잔기를 나타내었다. 평균 펩티드 길이는 유리

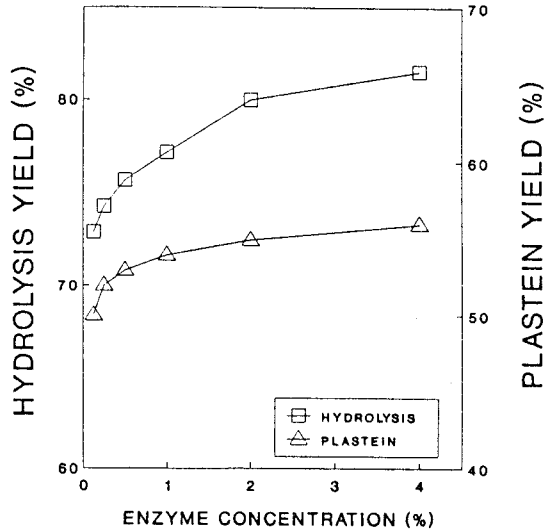


Fig. 4. Effect of enzyme concentration on hydrolysis of soymilk residue and plastein formation from peptic hydrolysate of soymilk residue.

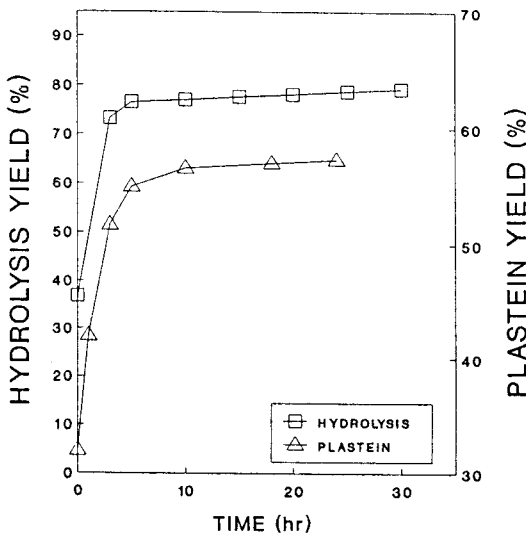


Fig. 3. Effect of time on hydrolysis of soymilk residue and plastein formation from peptic hydrolysate of soymilk residue.

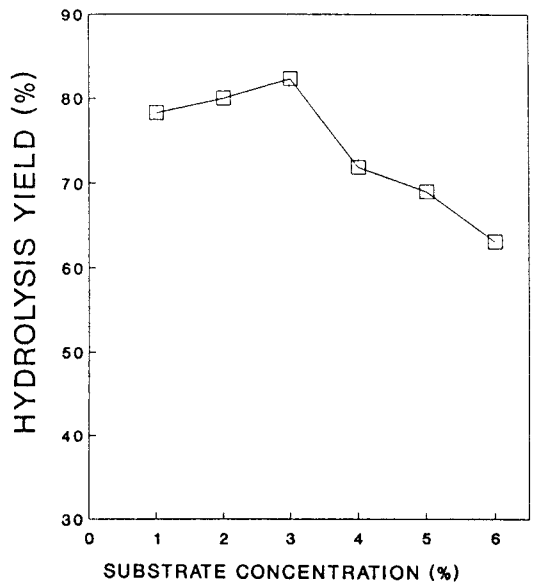


Fig. 5. Effect of substrate concentration on hydrolysis of soymilk residue.

아미노산 질소의 함량과 반비례하며, 단백질의 조성에 따라 차이가 있으나 plastein 합성에는 5~6 아미노산 잔기가 적합한 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾

Plastein 합성 최적조건의 결정

효소농도, 기질농도, 반응온도 및 반응시간을 일정하게 하고 pH만을 변화시키면서 반응시켰을 때의 plastein 합성률을 Fig. 1에 나타내었다. Plastein 합성률은 pH가 높아짐에 따라 증가하여 pH 4에서 최대값을 보여 plastein 합성의 최적 pH는 가수분해의 최적 pH(1.7)와 상당히 달랐다. 이와 같은 합성 최적 pH와 가수분해 최적 pH와의 차이는 여러 연구에서 보고된 바 있는데 Yamashita 등¹⁸⁾은 대두를 이용한 plastein 합성에서 가수분해반응의 최적 pH 및 합성에 사용한 효소의 종류에 관계없이 합성반응의 최적 pH는 4~6으로 보고한 바 있다. 또한 김과 이¹²⁾는 말쥐치육 가수분해물로부터 pepsin을 이용한 plastein 합성시 최적 pH는 4.0이었고 가수분해의 최적 pH와 plastein 합성반응의 최적 pH는 서로 달랐다고 보고하였다.

한편 pH, 효소농도, 반응온도 및 반응시간을 일정하게 하고(4.0, 1%, 40°C, 3시간) 기질농도만을 달리하여 반응시킨 다음 plastein 합성률을 측정한 결과는 Fig. 7과 같다. Plastein 합성에는 기질농도가 최소 20~30% 이상이어야 하며 최적 기질농도는 단백질의 조성과 사용 효소에 따라 상이하다는 것이 알려져 있는데^{4,10,18)} 본

실험에서 사용한 두유박 단백질의 pepsin 가수분해물은 기질농도가 40%일 때 pepsin을 사용한 plastein 합성률이 가장 큰 것으로 나타났다.

반응온도가 plastein 합성물에 미치는 영향을 조사하기 위해 pH, 기질농도의 최적조건(4.0, 40%)하에서 효소농도와 반응시간을 일정하게 하고(1%, 3시간) 온도를 10°C 간격으로 변화시키면서 반응시킨 결과 45°C 까지는 plastein 생성량이 증가하였으나 그 이상의 온도에서는 점차 감소하는 경향을 보였다(Fig. 2). Sukan과 Andrew¹⁹⁾는 카제인 및 탈지유의 가수분해물로부터 plastein을 합성하였을 때 최적 온도 및 반응시간은 37°C, 24시간 또는 50°C에서 4~6시간이었다고 보고한 바 있다.

pH, 기질농도, 반응온도를 앞의 최적조건에 맞추고 시간을 달리하면서 반응시킨 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Plastein 생성량은 반응 5시간까지는 급격히 증가하였으나, 그 이후에는 증가율이 둔화되어 10시간, 18시간, 24시간 반응시 각각 56.6, 57.0, 57.3%의 생성량을 보였다.

그리고 pH, 기질농도, 반응온도와 반응시간을 일정하게 하고 효소농도만을 달리하며 반응시켰을 때의 plastein 생성량은 Fig. 4에 나타낸 바와 같이 효소농도 1%까지는 생성량이 급격히 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 큰 증가가 없었다.

이상의 결과로부터 두유박 가수분해물을 사용하여 plastein을 합성하기 위한 조건은 pH 4.0, 기질농도 40%, 반응온도 45°C, 반응시간 18시간, 효소농도 1%로 결정

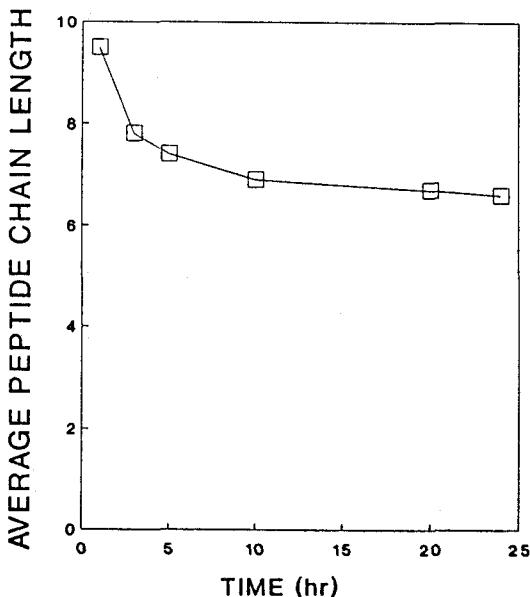


Fig. 6. Changes in average peptide chain length during hydrolysis of soymilk residue.

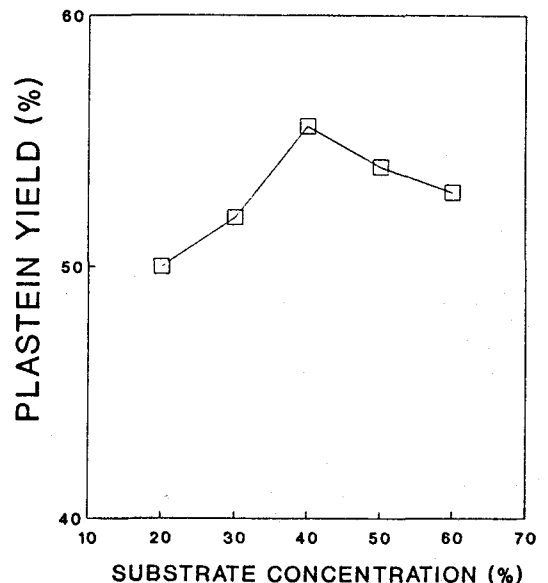
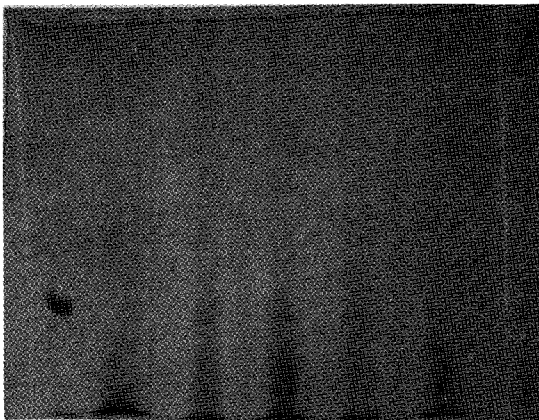


Fig. 7. Effect of substrate concentration on plastein formation from peptic hydrolysate of soymilk residue.

하였다.

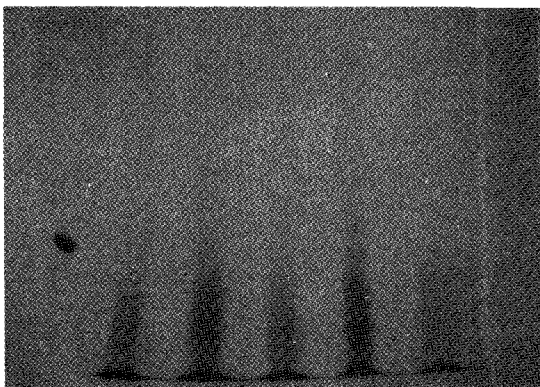
Plastein의 성상

두유박 단백질의 가수분해물을 사용한 plastein 반응에서 반응시간별로 일정량의 시료를 취해 전기영동한 결과를 Fig. 8에 나타냈다. Plastein 반응이 진행됨에 따라 가수분해물에는 나타나지 않은 band들이 나타나기 시작하는데 이러한 band들은 반응시간의 경과에 따라 가수분해물을 구성하고 있던 펩티드와 아미노산들이 축합 반응을 통해 새로운 펩티드 결합을 형성하거나 소수성 결합을 함으로써 plastein 반응산물을 생성하였음을 보이고 있다.^{14,20)}



A B C D E F

Fig. 8. Electropherogram of (A) pepsin, (B) hydrolysate of soymilk residue, (C) 3 hr plastein, (D) 5 hr plastein, (E) 10 hr plastein and (F) 18 hr plastein.



A B C D E F

Fig. 9. Electrophoretic patterns of (A) pepsin, (B) 10 % substrate, (C) 20% substrate, (D) 30% substrate, (E) 40% substrate and (F) 50% substrate.

한편 pH, 반응온도, 반응시간 및 효소농도를 일정하게 하고 기질농도만을 달리하여 반응시킴으로써 기질농도에 따른 plastein의 성상변화를 전기영동으로 조사한 결과는 Fig. 9와 같다. 기질농도 10%, 20% 및 30%에서는 한 두개의 band만 관찰되었으나 40%에서는 6개의 band가 관찰되어 plastein 합성률이 큰 기질농도에서 고분자량 화합물이 생성되었음을 나타내었다.

참 고 문 헌

1. Hackler, L. R., Hand, D. B., Steinkraus, K. H. and Van Buren, J. P.: J. Nutrition, 80 : 205(1963)
2. Hackler, L. R., Stillings, B. R. and Polimeni, R. J.: Cereal Chem., 44 : 638(1967)
3. Fujimaki, M., Yamashita, M., Okazawa, Y. and Arai, S.: J. Food Sci., 35 : 215(1970)
4. Eriksen, S. and Fagerson, I. S.: J. Food Sci., 41 : 490(1976)
5. Fujimaki, M., Yamashita, M., Arai, S. and Kato, H.: Agr. Bio. Chem., 34 : 483(1970)
6. Fujimaki, M., Yamashita, M., Arai, S. and Kato, H.: J. Agric. Food Chem., 34 : 1325(1970)
7. Yamashita, M., Arai, S., Tsai, S. and Fujimaki, M.: Agr. Biol. Chem., 34 : 1593(1970)
8. Arai, S., Aso, K., Yamashita, M. and Fujimaki, M.: Cereal Chem., 51 : 145(1974)
9. Tsai, S.-J., Yamashita, M., Arai, S. and Fujimaki, M.: Agr. Biol. Chem., 36 : 1045(1972)
10. Hofsten, B. V. and Lalasidis, G.: J. Agric. Food Chem., 24 : 460(1976)
11. 노재문, 김재욱: 한국농화학회지, 34 : 1(1991)
12. 김세권, 이용호: 한국수산학회지, 20 : 282(1987)
13. 김세권, 광동채, 조덕재, 이용호: 한국영양식량학회지, 17 : 233(1988)
14. Edwards, J. H. and Shipe, W. F.: J. Food Sci., 43 : 1215(1978)
15. Arai, S., Yamashita, M., Aso, K. and Fujimaki, M.: J. Food Sci., 40 : 342(1975)
16. Kang, C. K. and Rice, E. E.: J. Food Sci., 35 : 563 (1970)
17. Determann, H., Bonhard, K., Koehler, R. and Wieland, T.: In 'Food Proteins', Feeney, R. W. and Whitaker, J. R.(ed), Advances in Chemistry Series 160, p. 157, American Chemical Society, Washington, D.C.(1977)
18. Yamashita, M., Tsai, S.-J., Arai, S., Kato, H. and Fujimaki, M.: Agr. Biol. Chem., 35 : 86(1971)
19. Sukan, G. and Andrew, A. T.: J. Dairy Res., 49 : 265 (1982)

20. Monti, J. C. and Jost, R.: J. Agric. Food Chem., 27 : 1281(1979)

Preparation of plastein product from soymilk residue protein

Sang-Joon Lee, Woo-Po Park*, Tae-Wha Moon and Ze-Uook Kim (Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea, *Department of Food and Nutrition, Masan Nursing & Health Junior College, Masan 634-800, Korea)

Abstract : Pepsin-catalyzed hydrolysis and plastein reaction were carried out to prepare plastein product from soymilk residue protein. Conditions required for optimal hydrolysis of soymilk residue protein and subsequent plastein production were investigated. The optimum substrate concentration, enzyme-substrate ratio, pH, reaction temperature and incubation time for hydrolysis were 3%, 1/50, 1.7, 45°C and 24 hours, respectively. Plastein formation from peptic hydrolysate of soymilk residue protein was most effective at substrate concentration of 40%, pH 4 and 45°C. Reaction time of 18 hours and enzyme-substrate ratio of 1/100 were selected for plastein production. Electrophoresis of the products revealed that protein-like substances of high molecular weight were produced from the plastein reaction.