

Bacillus sp. CW-1121이 생성하는 단백질 분해 효소를 이용한 참깨박 단백질의 용출

최 청* · 천성숙 · 조영제

영남대학교 식품가공학과

초록 : 참깨박에 함유되어 있는 불용성 형태의 단백질을 가용성 형태의 단백질로 용출시키기 위하여 *Bacillus* sp. CW-1121이 생성하는 효소를 작용시켰다. 이때 참깨박의 단백질 용출을 위한 최적 pH는 7.5였으며, 최적 온도는 40°C 였고 최적 조건하에서 2시간의 소화로 약 60%의 용해도를 보였다. 단백질의 용해도는 참깨 단백질이 pH 4.5에서 가장 낮아 등전점을 보였고, pH 3.0과 pH 6.0 이상에서는 크게 증가하였다. 효소처리 참깨박 단백질을 전기영동한 결과 수용성 단백질은 4개, 염용성 단백질은 2개의 밴드가 관찰되었다. 분리 단백질의 아미노산 조성은 수용성 단백질의 경우 serine이 17.24 mg/g, 염용성 단백질은 glutamic acid가 10.77 mg/g, 유리아미노산은 glutamic acid가 6.55 mg/g으로 가장 많이 함유되어 있었으며 특히 필수아미노산의 조성도 상당히 좋은 편이었다(1993년 2월 27일 접수, 1993년 4월 11일 수리).

세계 인구가 계속 증가된다면 세계 식품 수급 특히 단백질의 부족현상은 심각하게 될 것이다. 식품의 단백질 수급, 그리고 영양가를 증가시키기 위한 시도가 여러 연구자에 의해서 진행되고 있다. 현재 단백질 자원으로는 대두를 비롯한 땅콩, 면실, 유채, 해바라기종자 및 참깨 등에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며,¹⁻³⁾ 분리 대두단백 및 농축 대두단백 등은 식품산업에서 단백질의 증량제, 대체제로 널리 이용되고 있는 실정이다.

참깨(*Sesamum indicum* L.)는 지방이 평균 45~63%의 기름을 함유하고 있어 중요한 유지자원으로 이용되고 있으며 착유후 부산물로 얻어지는 참깨박에는 60% 내외의 질이 우수한 높은 함량의 단백질이 포함되어 있고⁴⁻⁶⁾ 함유황아미노산 등이 풍부히 함유되어 있으나 이들 단백질의 기능상태에 대하여는 별로 연구되지 않은 실정이므로 폐기자원으로써 활용방안의 연구, 개발의 여지가 많다고 생각된다. 대두와 옥수수분말에 참깨 단백질의 보충가가 인정되었으며,^{7,8)} 여러가지 종실분말의 제빵 특성이 비교 검토되었다.⁹⁾ de Pouda¹⁰⁾는 육류를 참깨로 대체할 수 있는 수용력을 연구하였는데 관능검사서 육류의 30%까지는 참깨박으로 대체할 수 있으며 식품의 증량제로 이용할 수 있다고 보고하였다.

본 연구에서는 참깨박을 활용하는 방도의 하나로 참깨박의 불용성 단백질을 *Bacillus* sp. CW-1121이 생성

하는 효소를 이용하여 용해도를 높이기 위한 최적조건을 규명하여 추출단백의 조성과 아미노산을 살펴보았다.

재료 및 방법

재료 및 시료조제

본 실험에 사용한 참깨박은 1991년 10월에 시중에서 구입한 참깨(*Sesamum indicum* L. white)를 세척한 후 영남대학교 식품가공학과 가공공장에서 볶은 후 압착법으로 착유한 다음 부산물인 참깨박을 40 mesh로 분쇄하여 20시간 ethyl ether로 탈지한 후 4°C의 저온실에 보관하면서 사용하였다. 이때 일반성분은 AOAC법¹¹⁾에 준하여 실시한 결과 수분 6.03%, 조단백질 32.5%, 조지방 2.95%, 조섬유 24.9%, 회분 14.6%이었다.

사용균주

균주는 영남대학교 농축산대학 식품가공학과에 보관 중인 *Bacillus* sp. CW-1121(이하 BCW)를 사용하였다.¹²⁾

효소액의 조제

이 등¹²⁾의 보고에 따라 BCW의 효소생산 최적조건에 맞추어 참깨박 1kg을 물을 충분히 가하여 3시간 방치한 후 물을 뺀 것을 15 Lbs에서 40분 동안 가압증자하여

식히고 여기에 TGY media로 37°C 의 incubator에서 30 시간 배양한 starter를 2 ml 접종하여 37°C 로 유지되는 발효실에서 배양하고, 12시간 간격으로 참깨박 분해 효소의 활성도를 측정하였다. 효소액은 배양한 BCW 50g을 삼각 flask에 넣고 증류수 400 ml를 가한 후 5분 정도 진탕하고 실온에서 4시간 정치, 효소를 침출하여 이것을 Toyo filter paper(No. 2)로 여과하여 사용하였다.

참깨박 단백질의 용출 최적조건의 결정

참깨박 단백질이 분해 용출되는 최적조건을 정하기 위하여 pH, 온도 및 시간을 달리하여 용해도를 측정하였다. 먼저 효소액 작용전의 참깨박의 총 질소량을 정량하고 참깨박 5g을 삼각 flask에 취한 후 buffer 60 ml와 효소액 40 ml를 가하여 shaking incubator에서 반응을 시키고 반응이 끝난 액을 여과한 후 그 여액의 총 질소량을 정량하였다. 참깨박의 총 질소량에 대한 효소액 작용 후 용출된 총 질소량의 백분율을 nitrogen solubility로 표시하였으며 대조구는 참깨박에 buffer 액만을 가하여 동일한 방법으로 처리하였다.

pH

시간과 온도를 일정하게 하고 25 mM phosphate HCl buffer(pH 3, 4), 25 mM citric acid-sodium citrate buffer (pH 5, 6), 25 mM phosphate buffer(pH 6.5, 7, 7.5, 8) 및 25 mM boric acid - NaOH buffer(pH 9, 10)를 사용하여 pH만을 달리하면서 상기와 같은 방법으로 37°C 에서 12시간 반응시켜 단백질 분해용출을 위한 최적 pH를 실험하였다.

온도

최적 pH에서 효소를 반응시키되 온도를 달리하면서

상기와 같은 조작으로 최적 온도를 실험하였다.

단백질 분리 및 정량

BCW의 효소처리에 의하여 생성된 참깨박의 단백질을 Bietz 분류법¹³⁾에 따라 Fig. 1에서와 같이 수용성 단백질과 염용해성 단백질로 분리하고, 단백질의 정량은 Lowry 등¹⁴⁾의 방법에 의하여 측정하였으며 단백질값은 bovine serum albumin을 사용한 표준곡선에 의하여 환산하였다.

Protease 활성 측정

효소활성 측정은 Anson-秋源의 방법¹⁵⁻¹⁷⁾에 의하여 실시하였으며, 효소활성은 효소액 1 ml가 1분간에 1 µg의 tyrosine을 생성하는 것을 1 unit로 정하였다.

Polyacrylamide gel electrophoresis

전기영동은 Davis법¹⁸⁾에 의해 7.5% polyacrylamide gel로써 tube당 3 mA로 실온에서 약 4시간 동안 수행하였다. 전기영동후 gel은 1% amido black 10-B로써 염색하고, 7% acetic acid로 탈색하였다.

분자량 측정

BCW를 처리하여 용출된 주단백질의 분자량 측정은 sodium dodesyl sulfate polyacrylamide 전기영동으로 Weber와 Osborn의 방법¹⁹⁾에 따라 실시하며, 전개후 Rm치에 따라 표준곡선을 이용하여 분자량을 측정하였다. 이때 표준품으로는 bovine serum albumin(66000), egg albumin(45000), pepsin(34700), trypsinogen(24000), β-lactoglobulin(18400), lysozyme(14300) (Sigma Co.)을 사용하였다.

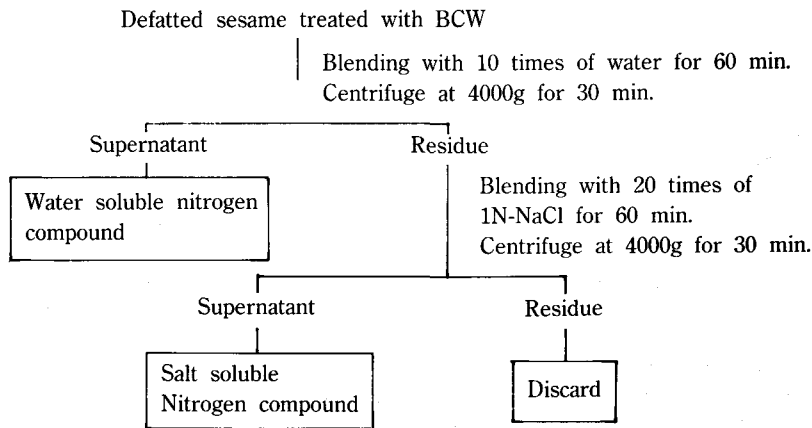


Fig. 1. Flow diagram for preparation of protein isolate from defatted sesame with *Bacillus* sp. CW-1121

아미노산 및 유리아미노산 분석

BCW가 생성하는 효소에 의한 참깨박 단백질의 유리 아미노산 추출방법^{20,21)}은 시료 10 ml를 Ambelite IR-120에 충전시킨 후 흡착된 아미노산을 2N-NH₂OH로 용출시켜 그액을 rotary evaporator에서 농축하여 sodium citrate buffer 1 ml를 가한 후 아미노산 자동분석기로 분석하였다. 수용성 및 염용성 단백질은 6N-HCl을 가하여 밀봉한 후 110°C에서 18시간 가수분해한 뒤 HCl을 감압 증발하여 제거하고 이것을 0.02 M sodium phosphate buffer(pH 8.0)를 가하여 아미노산 자동분석기로 분석하였다.

결과 및 고찰

참깨박 단백질의 분해 용출 최적 조건

1) pH의 영향

pH가 효소 처리에 의한 참깨박 단백질의 용해도에 미치는 영향을 살펴본 결과 Fig. 2에서와 같이 참깨박 단백질의 등전점인 pH 4~5에서 가장 낮은 값을 보이다가 pH가 높아짐에 따라 용해도가 점차 높아져 pH 7~8 범위에서 가장 높은 값을 보이고 알칼리쪽에서는 감소하였는데 처리구와 대조구의 차이로 보아 pH 7.5에서 최고의 분해율을 보임을 알 수 있었다. 이는 효소의 작용 최적 pH와 관련된 것으로 판단되었으며, 이러한 결과는 정²²⁾이 보고한 casein을 기질로한 natto protease의 경우와 유사하였다.

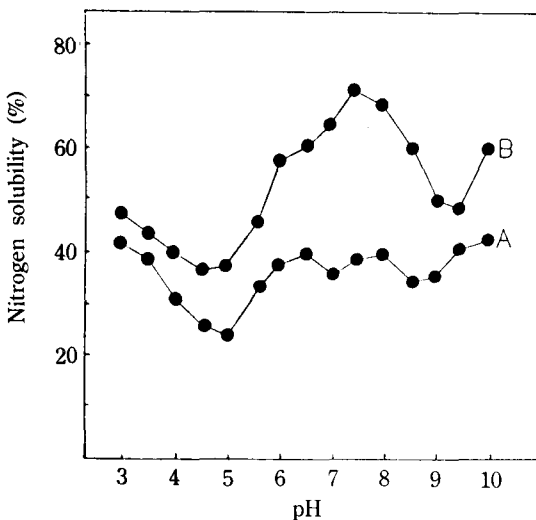


Fig. 2. Effect of pH on the nitrogen solubility from sesame meal residue hydrolyzed by the enzymes from the *Bacillus* sp. CW-1121. A: Control, B: Enzyme treatment.

2) 온도의 영향

온도의 변화에 따라 효소처리에 의한 참깨박 단백질의 용해성을 살펴본 결과 Fig. 3과 같이 온도가 높아짐에 따라 용해도가 점차 증가하여 40°C 부근에서 최고의 용해도를 보였으며 그 이상의 온도에서는 오히려 감소하였다. 이는 효소의 작용온도와 연관이 있는 것으로 판단되었으며 정 등²²⁾의 보고와 비슷하였다.

3) 소화시간에 따른 용해도 변화

앞의 최적 pH와 최적 온도에서 소화시간을 달리하여 용해도를 측정한 결과 Fig. 4와 같이 소화시간 경과에 따라 용해도는 점차 증가하다가 60분 이후부터는 증가 속도가 완만해지기 시작하여, 효소 첨가후 60분까지 효소의 작용이 활발해지다가 시간이 경과함에 따라 효소의 작용이 감소하는 것으로 판단되었다.

효소처리한 참깨박 단백질의 전기영동 패턴

효소처리후 분리된 수용성과 염용성 단백질을 disc gel 전기영동한 결과 Fig. 5와 같이 수용성 단백질은 4개의 밴드, 염용성 단백질은 2개의 밴드를 확인하였다. 김 등²³⁾은 참깨의 단백질을 전기영동한 결과 수용성은 12개, 염용성은 2개의 인접한 고분자 밴드가 나타났다고 보고하였으나, 본 연구에서는 참깨박 단백질이 효소의 작용을 받아 저분자의 단백질이 검출되었으며 식염으로 protease 활성이 저해되는 염용성 단백질보다 수용성 단백질이 더 많은 효소의 작용을 받은 것으로 추측할 수

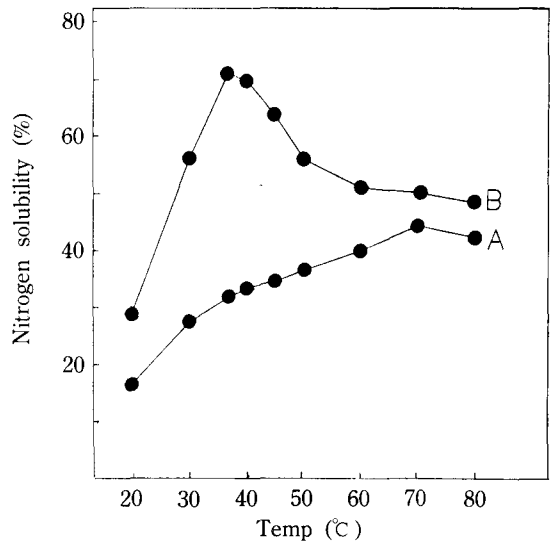


Fig. 3. Effect of temperature on the nitrogen solubility from sesame meal residue hydrolyzed by the enzymes from the *Bacillus* sp. CW-1121. A: Control, B: Enzyme treatment.

있었다.

단백질은 a : 36000, b : 19000으로 측정되었고, 염용성 단백질은 a : 27000, b : 17000으로 측정되었다.

분자량 측정

효소처리된 참깨박 단백질로 Weber와 Osborn의 방법¹⁹⁾에 따라 SDS-PAGE를 행하여 Rm 값에 따라 주단백질의 분자량을 측정한 결과 Fig. 6과 같이 주된 수용성

아미노산 조성

BCW가 생성하는 효소의 활성이 4.4 unit/ ml로 가장

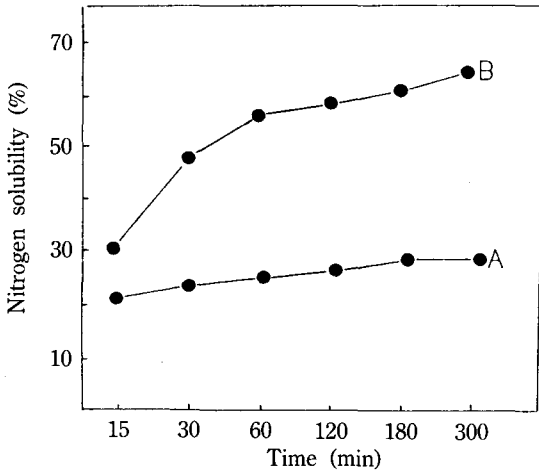


Fig. 4. Extraction of nitrogenous compounds from sesame meal residue as a function of extraction time by the enzymes from the *Bacillus* sp. CW-1121. A: Control, B: Enzyme treatment

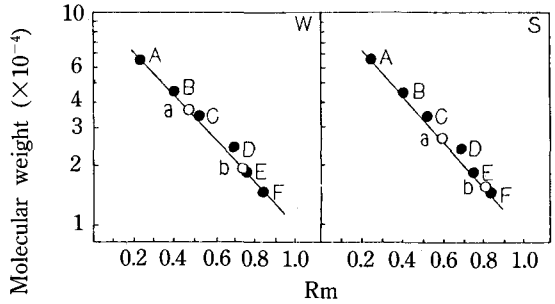


Fig. 6. The calibration curve for the determination of molecular weight of sesame meal protein with *Bacillus* sp. CW-1121. W: water soluble protein, S: salt soluble protein, A: Bovine serum albumin (66000), B: Egg albumin (45000), C: Pepsin (34700), D: Trypsinogen (24000), E: β -Lactoglobulin (18400), F: Lysozyme (14300)

Table 1. Composition of amino acid and free amino acid of sesame meal defatted with *Bacillus* sp. CW-1121

Amino acid	Content (mg/g)		
	WSP	SSP	FA
Aspartic acid	7.97	5.78	2.68
Threonine	3.83	2.37	2.21
Serine	17.24	5.00	1.09
Glutamic acid	14.85	10.77	6.55
Proline	6.78	trace	1.09
Glycine	6.03	3.21	0.92
Alanine	4.82	3.30	1.60
Cystine	trace	trace	trace
Valine	4.99	2.95	1.19
Methionine	6.25	1.10	0.19
Isoleucine	4.72	2.61	0.89
Leucine	6.93	4.23	1.46
Tyrosine	3.02	0.76	0.92
Phenylalanine	5.32	3.27	1.30
Histidine	6.74	3.79	1.51
Lysine	1.56	2.31	0.69
Arginine	16.99	6.26	1.49

WSP, Total water soluble protein; SSP, Total salt soluble protein; FA, free amino acid

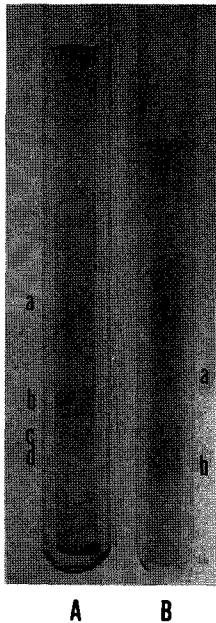


Fig. 5. Polyacrylamide gel electrophoresis of sesame meal protein with *Bacillus* sp. CW-1121. A: Water soluble protein, B: Salt soluble protein

높은 3일째 참깨박의 분리단백 아미노산 조성은 Table 1과 같다. 수용성 단백질의 아미노산 조성은 serine, glutamic acid와 arginine 함량은 각각 17.24, 14.85, 16.99 mg/g으로 가장 많았다. 염용성 단백질의 아미노산 조성은 glutamic acid가 10.77 mg/g으로 함량이 가장 높았으며 유리 아미노산도 glutamic acid의 함량이 가장 많았다. 이와같은 결과는 김 등²³⁾이 참깨박 단백질의 분리 및 조성에 있어서 보고한 수용성 및 염용해성 단백질의 아미노산 조성보다 대부분 그 함량이 높았다. 본 균주의 효소 처리에 의한 참깨박 단백질은 필수 아미노산인 phenylalanine, leucine, arginine 등이 다른 아미노산들보다 그 함량이 많이 포함되어 있어 미생물을 이용한 참깨박 단백질 분해에 있어 큰 의의가 있다고 생각되며, 우수한 단백질원으로 활용이 가능하다고 사료된다.

감사의 글

이 연구는 1992년도 한국과학재단의 연구비 지원에 의한 결과의 일부로 이에 감사드립니다. 과제번호 : 921-1500-021-1

참 고 문 헌

- World Conference on Vegatable Food Proteins, Amsterdam, 1987. J. Am. Oil. Chem. Soc., 56 : 99 (1979)
- King, J., Agurre, C. and de Pablo, S.: J. Food Sci., 50 : 82(1985)
- Yang, C. I.: Korean J. Food Sci. Technol., 12(2) : 109(1980)
- 신효선: 한국식품과학회지, 5(2) : 113(1973)
- 김준평, 심우만, 김종익: 한국농화학회지, 23(1) : 14 (1980)
- Lyon, C. K.: J. Am. Oil. Chem. Soc., 49 : 245(1972)
- Barito, R. J. and Nunez, N.: J. Food Sci., 47 : 457 (1982)
- Evans, R. J. and Brandemer, S. L.: Cereal Chem., 44(5): 417(1967)
- Ropney, L. W., Gustason, C. B., Clark, S. P. and Cater, C. M.: J. Food Sci., 37 : 14(1972)
- de Pauda, M. R.: J. Food Sci., 48 : 1145(1983)
- A.O.A.C.: Official Method of Analysis, 13th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C. (1980)
- 이우재, 손규목, 최 청: 한국영양식량학회, 20(4): 387(1991)
- Bietz, J. A.: Cereal Foods World, 24 : 199(1979)
- Lowry, C. H. and Rosebrongh, N. J.: J. Biol. Chem., 193 : 265(1951)
- Anson, M. L.: J. Gen. Physiol., 22 : 79(1938)
- 秋源文二: 赤堀編, 酵素研究法, 第二卷, p. 240, 朝食書占, 日本(1956)
- 秋源文二: 江上編, 標準生化學, 實驗書, p. 207, 文光堂, 日本(1953)
- Davis, B. J.: Ann. New York Acad. Sci. 121 : 404 (1964)
- Weber, K. and Osborn, M.: J. Biol. Chem., 244 : 4406(1969)
- 實驗農藝化學 第三版: 東京大學 農藝化學室, 朝食書店, 日本(1978)
- 泰忠夫, 林力丸: アミノ酸, タンハク質の分析, 講談社, 東京(1971)
- 정태석: 과연취보, 1 : 19(1956)
- 김준평, 심우만, 김종익: 한국농화학회지, 23 : 14(1980)

Extraction of protein from defatted sesame meal using the enzyme from *Bacillus* sp. CW-1121

C. Choi*, S. S. Chun and Y. J. Cho (Dep. of Food Sci. & Technol. Yeungnam University, Gyongsan, 712-749, Korea)

Abstract : To extract insoluble proteins of sesame meal residue by using microorganism, the sesame meal residue was treated with crude enzyme solution from *Bacillus* sp. CW-1121. It was found that the solubility reached to maximum at pH 7.5, 45°C. Under optimum condition, the nitrogen solubility with the enzyme solution from *Bacillus* sp. CW-1121 reached to 60% in 2 hours. Nitrogen solubility of protein from sesame meal showed minimum value at pH 4.5 and significantly increased above pH 6.0. When the protein from sesame meal extracted with *Bacillus* sp. CW-1121 was subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, water soluble protein was showed 4 bands and salt soluble protein was showed 2 bands. The amino acid composition of water soluble protein, salt soluble protein and free amino acid indicated relatively high contents of serine (17.24 mg/g), glutamic acid (10.77 mg/g) and glutamic acid (6.55 mg/g). Specially, the contents of essential amino acids were high.