

Phytase 처리에 의한 폐단백자원의 단백질 용출 및 기능성 변화

천성숙 · 조영제* · 김영활** · 우희섭 · 최 청†

영남대학교 식품가공학과

*상주산업대학교 식품공학과

**대구보건전문대학 임상병리과

Change of Funtional Properties and Extraction of Protein from Abolished Protein Resource by Phytase

Sung-Sook Chun, Young-Je Cho*, Young-Hwal Kim**, Hi-Seob Woo and Chung Choi†

Dept. of Food Science and Technology, Yeungnam University, Gyungsan 712-749, Korea

*Dept. of Food Engineering, Sangju National Polytechnic University, Sangju 742-170, Korea

**Dept. of Clinical Phathology, Daegu Junior Health College, Daegu 702-260, Korea

Abstract

This study was performed to improve extraction of insoluble proteins and to evaluate funtional properties of abolished proteins by the phytase produced by *Asporgillus* sp. The optimum pH, temperature, treatment time and unit of the enzyme for extraction of protein were pH 4.0~5.0, 50°C, 8~10 hrs and 120 units. The foaming capacity and foaming stability of sesame meal protein after enzyme treatment were virtually unchanged as compared to control. The emulsion capacity and emulsion stability of sesame meal protein was higher than control. Oil absorption as well as water absorption capacities of sesame meal protein were higher than control.

Key words: funtional properties, abolished protein, phytase

서 론

식량자원의 한계에 따른 단백질의 부족현상은 곧 현 실화될 것이고, 이러한 문제의 해결차원에서 식물, 미 생물, 해양자원 등에서 식용단백질을 얻기 위한 많은 연구가 이루어져 왔으며, 특히 식물성 단백질 자원 중 대두를 비롯한 땅콩, 면실, 유채, 해바라기 종자 및 참깨 등에 대해 연구가 활발히 이루어지고 있다(1-8). 식물 성 단백질 원료로는 우리 나라에서는 그 생산량이 그다 지 많지 않으나 착유 후 부산물로 얻어지는 참깨박이 가장 유망한 것으로 판단되지만 다른 종자박과는 달리 참깨는 볶은 후에 착유하기 때문에 단백질의 변성과 착 색으로 인해 현재 사료 또는 비료로서만 이용되고 있으 며, 이를 식용화할 경우 단백질자원으로 주목될 것이 며 폐자원 이용면에서 의의가 클 것이다. 그러나 이들 종자식물에는 영양 저해인자로 알려진 phytic acid가 많이 함유되어 있어 이의 제거를 위한 연구가 요구되고 있다. 식물종자 중에 존재하는 phytic acid는 강산성 물

질이며 2가 혹은 3가 등의 금속 이온과 복합체를 만들 어 불용성 화합물이 되기 때문에 무기질의 체내 흡수를 저해하는 중요한 항영양인자로 작용한다(9). 더욱이 단 백질과 결합하여 protein-phytate 복합체를 형성하기 때문에 용해도를 감소시켜 단백질 분해 효소의 작용을 저해하고 단백질 체내흡수를 감소시킨다고 보고된 바 있다(10). 따라서 이들 폐기종실의 단백질이 식품에 이 용되기 위해서는 단백질의 분리효율성을 높이기 위한 phytic acid의 제거가 선행되어야 하며, 아미노산 종류, 분자의 크기와 형태 등의 구조에 의한 내적 요소와 pH, 이온 강도, 점도 등의 외적 요소 등 단백질 자체의 물리 화학적 성질에 영향을 받는다고 알려진(11,12) 용해도, 유화성, 점도, 겔 형성, 열 안정성, 유지 및 수분흡착력 등 기능성 탐색에 관한 연구가 병행되어야 한다.

본 연구에서는 폐단백자원을 활용하는 방도의 하나 로 폐단백질자원으로 부터 불용성 단백질의 분리 효율 성을 높이기 위해 phytase를 이용한 단백질 추출물의 상승을 시도하였으며, 추출단백질의 기능성을 검토하

†To whom all correspondence should be addressed

여 식품에 적용을 위한 기초자료로 활용코자 하였다.

재료 및 방법

시료 조제

본 실험에 사용한 참깨박은 1996년 10월에 시중에서 구입한 참깨(*Sesamum indicum* L, white)를 세척한 후 영남대학교 식품가공학과 가공 공장에서 볶은 후 압착 방법으로 착유한 다음 부산물인 참깨박을 40 mesh로 분쇄하여 20시간 ethyl ether로 탈지한 후 4°C의 저온실에 보관하면서 사용하였다.

Phytase 조제

대구 및 경북지방의 토양과 부식토를 균원시료로 하여 phytase 생성능이 뛰어난 3균주를 1차 선발하고 3차례 반복실험을 행하여 효소생성능력이 가장 우수한 균주를 선발하였다. 효소생산을 위하여 밀기울 50g에 2% glucose 50ml를 첨가한 밀기울배지에 공시균주의 균사체 및 포자를 5백금이 접종하고, 35°C에서 3일간 배양하였으며, 배양된 밀기울배지에 8배의 0.2M acetate buffer(pH 5.0)를 가하여 균질화시킨 후, 4°C에서 24시간 교반하여 효소를 추출하고, 4,000×g로 30분간 원심분리한 후 상정액을 모아 여과하여 조효소액으로 사용하였다. 효소의 정제는 각 조효소액을 70% 포화황산암모늄으로 염석한 후 0.2M acetate buffer(pH 5.0)로 투석하고, 저온실에서 Sephadex 컬럼을 이용한 gel filtration과, DEAE-cellulose를 이용한 이온교환 크로마토그래피로 정제하였다. 정제한 결과 specific activity가 244.32unit/mg인 효소를 얻었으며 정제된 효소는 동결건조한 후 사용하였다.

Phytase 활성측정

Phytase 활성측정 방법은 p-nitrophenylphosphate를 기질로 하여 Heinonen과 Lahti의 방법(13)에 의하여 실시하였으며, 효소활성은 효소액 1ml가 1분간에 1μmole의 p-nitrophenol(PNP)을 생성하는 것을 1unit로 정하였다.

단백질 정량

Lowry 등(14)의 방법에 의하여 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 단백질량을 측정하였다.

참깨박 용출 최적조건의 결정

참깨박 단백질이 용출되는 최적 조건을 정하기 위하

여 pH(2~12), 온도(20~80°C), 시간(1~11 hr) 및 첨가 효소량(60~900unit)을 달리하여 용출량을 측정하였다. 즉, 효소액작용 전의 참깨박의 단백질 용출량을 대조구로 하고 각 시료 5g을 삼각플라스크에 취한 후 buffer 90ml와 효소액 10ml를 가하여 shaking incubator에서 반응을 시키고 반응이 끝난액을 여과한 후 여액의 총 단백질량을 정량하였다.

단백질 분리, 제조 및 정량

Phytase를 시료에 처리하여 최적 용출조건에서 단백질을 용출하고, 용출된 단백질용액에 70% 황산암모늄을 가해 단백질을 침전시키고 원심분리하여 회수하였으며, 회수된 단백질은 증류수로 48시간 동안 투석하고 동결건조시켜 단백질 시료로 하였다. 단백질의 정량은 Lowry 등(14)의 방법에 의하여 측정하였으며 단백질값은 bovine serum albumin을 사용한 표준곡선에 의하여 환산하였다.

기포형성력 및 안정성

기포형성력은 Wang과 Kinsella(15)의 방법을 이용하였다. 즉, 각 시료 0.5g에 증류수 50ml씩을 가하여 눈금실린더에 취하고 pH를 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 및 11.0으로 조절한 후 균질기로 300×g에서 30초간 기포를 형성시켰다. 기포형성력은 생성된 기포 부피를 나타내었으며, 안정성은 방치시간(0, 10, 20, 30, 60, 120분)에 따른 기포 부피 변화를 나타내었다.

유화력 및 유화안정성

유화력은 Wang과 Kinsella 등(15)의 방법으로 측정하였다. 즉, 각 단백질 0.6g에 증류수 10ml씩을 각각 가하여 Vortex mixer로 분산시키고 pH를 3~11까지 조절한 다음 여기에 corn oil 10ml를 첨가하여 Waring blender 20,000×g에서 1분간 분산시켰다. 이때 형성된 emulsion은 두개의 원심관(15ml)에 나누어 넣고, 원심분리하여 유화력을 측정하였다.

$$\text{유화력(\%)} = \frac{\text{유화된 층의 높이}}{\text{시험관 내 총내용물의 높이}} \times 100$$

유화안정성은 유화액을 80°C의 물중탕에서 30분간 가열 후, 15°C로 냉각하여 원심분리한 다음 유화력측정과 동일한 방법으로 측정하였다.

$$\text{유화안정성(\%)} = \frac{\text{가열후 유화된 층의 높이}}{\text{시험관 내 총내용물의 높이}} \times 100$$

유지 및 수분흡착력 측정

유지 및 수분흡착력 측정은 Beuchat(16)의 방법에 의하여 1g의 각 시료에 증류수 또는 corn oil 10ml를 각각 가하여 vortex mixer로 잘 섞고 실온에서 30분간 정지한 다음 3,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상정액의 부피를 1ml 눈금 실린더를 사용하여 측정하였다. 흡착력은 1g의 시료에 흡착된 증류수나 대두유의 부피를 ml수로 나타내었다.

결과 및 고찰

단백질의 용출을 위한 pH의 영향

pH가 효소처리에 의한 참깨박 단백질의 용해도에 미치는 영향을 살펴본 결과 Fig. 1-A에서와 같이 대조구의 경우 참깨박 단백질의 등전점인 pH 5에서 낮은 값을 보이다가 pH가 높아짐에 따라 용해도가 점차 높아져 pH 9와 11의 범위에서 가장 높은 값을 보였으며 효소 처리의 경우 참깨박 단백질의 등전점 부근인 pH 4~5에서도 상당히 높은 용출율을 나타내었으며 이는 phytase 처리 최적 작용 pH 5.0부근인 것과 관련된 것으로 판단되었다. Lee와 Kim(17), Lee 등(18)과 Choi 등(19)은 단백질 용출시 효소의 최적 작용 pH에서 효소의 작용에 의한 용출율이 최대로 증가되었다고 보고하였으며, 본 효소처리에서도 효소의 최적 pH 부근에서 효소에 의한 protein-phytate 결합의 분해가 최대로 발생해 용출율이 증가하는 것으로 나타나 단백질의 용출 패턴이 유사하였다.

단백질의 용출을 위한 온도의 영향

온도의 변화에 따라 효소처리에 의한 참깨박 단백질의 용해성을 살펴본 결과 Fig. 1-B에서와 같이 온도가

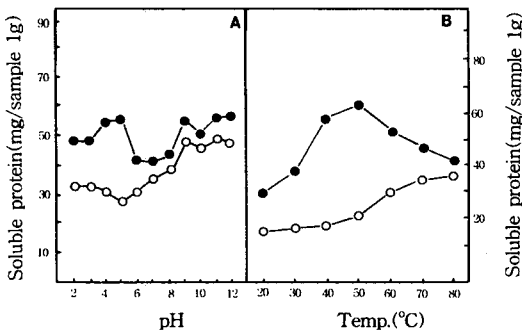


Fig. 1. Effect of pH(A) and temperature(B) on the nitrogenous compounds from sesame meal treated by phytase.

○—○: Control, ●—●: Phytase treatment

높아짐에 따라 용해도가 점차 증가하여 phytase처리의 경우 50°C에서 최대 용출을 나타내었고 70°C에 도달하면서 거의 대조구와 유사한 수준으로 낮아지는 경향이 있었다. 이는 70°C 이상의 고온에서 효소의 활성이 실활되어 효소의 작용이 이루어지지 않은 결과로 판단되었고, Lee 등(18)과 Choi 등(19)은 단백질 용출에서 효소처리 시 최적 작용온도에서 용출율이 증가한다고 보고하였으며, 본 phytase처리시에도 최적 작용 온도에서 용출율이 증가하여 유사한 결과를 나타내었다.

단백질의 용출을 위한 반응시간의 영향

앞의 최적 pH와 최적 온도에서 반응시간을 달리하여 용해도를 측정한 결과 Fig. 2-A에서와 같이 반응시간의 경과에 따라 용해도가 점차 증가하였으며 반응 초기에는 대조구에 비해 용출률이 증가하다가 phytase처리의 경우 10시간 경과시 부터 증가속도가 완만해지기 시작하였다. Choi 등(19)은 참깨박 단백질에 *Bacillus* sp.의 protease를 처리했을 때 효소처리 시간이 경과할수록 초기 용해성이 증가하다가 증가율이 점차 완만해진다고 보고하였으며, 본 실험의 phytase처리에서도 효소처리 시간별로 phytate 분해에 의한 단백질의 용출이 증가하다가 점차 완만해지는 경향을 나타내었다.

단백질의 용출을 위한 처리효소량의 영향

첨가 효소량에 의한 용출률의 변화를 살펴보기 위하여 phytase를 60에서 900unit까지 첨가하는 효소량을 달리하여 용출 단백질의 양을 측정한 결과 Fig. 2-B에서와 같이 120unit 첨가시까지 용출량이 증가하지만 그 이상의 효소처리에서는 용출량이 변하지 않았다. 이러한 결과는 폐단백질에서 단백질의 용출을 위한 효소처

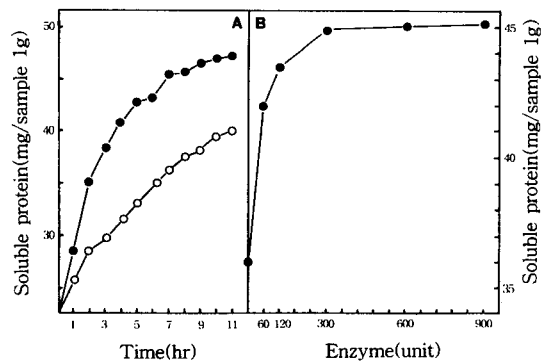


Fig. 2. Effect of extraction time(A) and enzyme concentration(B) on the nitrogenous compounds from sesame meal treated by phytase.

○—○: Control, ●—●: Phytase treatment

리는 어느 한계 처리농도가 있으며 그 이상의 효소처리
는 낭비라고 판단되었다.

이상의 단백질 용출을 위한 조건을 살펴본 결과 최
적 용출조건은 pH 4~5, 50°C에서 120unit 정도의 효소
량으로 8~10시간 처리하였을 때로 판단하였으며, 이
러한 조건에 맞추어 효소처리 단백질을 제조하여 이후
실험에 이용하였다.

효소처리 단백질의 기포 형성력 및 안정성

앞에서의 최적 조건에 따라 효소를 처리하여 단백질을
용출하고, 동결건조한 참깨박 단백질의 기포 형성력을
측정한 결과는 Table 1과 같다. 효소처리 참깨박 단
백은 등전점 부근에서 기포형성력이 최소값을 나타냈
으며 효소처리시 대조구에 비해 기포형성력은 크게 증
가하지 않았다. 또한 기포 안정성은 대조구의 경우 30
분 방치시에 기포 부피가 25~37.5ml까지 떨어졌으며,
phytase처리의 경우도 30분 경과 후 22~43ml 정도의
수준을 유지해 phytase처리가 기포 형성력 및 안정성
에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 판단하였으나,
phytase처리된 가용성의 단백질이 기포형성 동안 air-
water interface에 흡착되어 air droplet를 안정시키는
막을 형성하려고 상호작용을 하여 기포력에 약간의 변
화가 발생한 것이라 판단되며(11), 이때 가용성 단백질
만이 기포형성에 관여할 수 있기 때문에 가용성 단백질
의 농도가 중요하다(11,15). 따라서 phytase 처리에 의
해 가용성 단백질의 농도가 증가하였으며, 이에 따른
기포력의 변화가 온 것으로 추측되었다.

효소처리 단백질의 유화력 측정

효소처리한 참깨박 단백질의 유화력을 pH에 따라서
측정한 결과는 Table 2와 같이 대조구는 38.6~45% 정
도였으며, phytase처리구는 pH 3.0에서 48.3%로 최대
유화력을 나타내었고, 대조구와 효소처리구 모두 등전
점 부근에서 가장 낮았으며 알칼리성으로 갈수록 약간

Table 1. Foaming capacity of protein from defatted se-
same meal with phytase

pH	Foaming capacity(ml)									
	Control					Phytase treatment				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
3	55	50	37.5	25	20	56	52	43	28	22
5	37.5	30	22.5	12.5	7.5	39	34	22	13.5	10
7	47.5	45	25	12	7.5	45.5	43	26.5	13	9.5
9	53	50	25	12.5	10	53	51	33	21.5	12
11	52.5	50	37.5	12.5	10	53	49	38.5	19.5	12

Standing time: A, 0min; B, 10min; C, 30min; D, 60min;
E, 90min

Table 2. Emulsion capacity of protein from defatted se-
same meal with enzyme

pH	Emulsion capacity(%)	
	Control	Phytase treatment
3	42.6	48.3
5	38.6	45.7
7	43.5	46.2
9	45.0	46.1
11	44.2	43.6

씩 증가하였으나 pH에 따른 변화폭은 작았다.

효소처리 단백질의 유화안정성

효소처리 참깨박 단백질의 유화안정성을 살펴보기
위하여 80°C에서 30분간 가열하고 15°C로 식힌 다음 원
심분리하여 유화력을 측정한 결과 Table 3과 같이 유화
안정성의 경우 대조구의 22.6~33.2%에서 phytase처리
구의 41.7~45.8%까지 상당히 증가함을 알 수 있었고,
pH간 차이는 크지 않았다. 이와 같은 결과는 효소의 분
해작용에 의해 단백질의 가용화가 증대되면서 기름과
물 경계면에서 유화를 형성하는데 유용한 펩타이드수
와 극성기가 증가되어 일어난 것으로 판단되었다(11).

효소처리 단백질의 유지 및 수분 흡착력

효소처리 참깨박 단백질의 유지 및 수분 흡착력을
측정한 결과는 Table 4와 같이 유지 흡착력은 대조구의
3.5ml/g에 비해서 phytase처리구가 4.0ml/g로 증가하
였고, 이는 Park 등(20)의 탈지 참깨 단백질의 유지 흡착
력 3.3ml/g 보다 약간 높았다. 이러한 결과는 효소 처리
참깨박 단백질이 입자의 부피가 증가된 fluffy struc-

Table 3. Emulsion stability of protein from defatted se-
same meal with enzyme

pH	Emulsion capacity(%)	
	Control	Phytase treatment
3	33.2	45.8
5	22.6	44.3
7	29.7	42.5
9	31.1	43.4
11	30.0	41.7

Table 4. Oil and water absorption capacity of protein
from defatted sesame meal with enzyme

	Absorption volume(ml/g)	
	Control	Phytase treatment
Oil	3.5	4.0
Water	3.7	3.8

ture를 가지기 때문으로 추측하였다. 수분 흡착력은 대조구의 3.7ml/g에 비해서 phytase 처리구가 3.8ml/g로 큰 변화는 없었다.

이상의 결과로 보아 본 군주가 생산하는 phytase를 폐자원에 처리하였을 때 용출율의 상승이 현저하여 단백질의 분리 수율을 높이는 데 효과가 있었으며, 기능성 면에서는 유효력이 다소 개선될 수 있는 것으로 나타나 폐기 단백질 자원에 처리시 유용하게 이용될 수 있으리라 판단되었다.

요 약

폐단백질을 활용하는 방도의 하나로 폐단백질자원에서부터 토양에서 분리한 *Aspergillus* sp. 군주가 생산하는 phytase를 이용하여 불용성 단백질의 분리 효율성을 높였으며 추출 단백질의 기능성을 살펴보았다. 참깨박에 함유되어 있는 불용성 형태의 단백질을 가용성 형태의 단백질로 용출시키기 위한 최적 pH, 최적 온도, 최적 처리시간과 최적 첨가효소량은 4.0~5.0, 50°C, 8~10시간, 120unit였고, 효소처리된 참깨박은 phytase 처리의 경우 대조구에 비해 기포형성력은 크게 증가하지 않았으나 기포안정성은 다소 증가하였다. 참깨박 단백질의 유효력은 다소의 유효력과 안정성의 증가가 관찰되었고, 유지흡착력과 수분흡착력은 대조구에 비해서 높은 값을 나타내었다.

문 헌

- World Conference on Vegetable Food Proteins. Amsterdam, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **56**, 99(1979)
- King, J., Aguirre, C. and De Pablo, S. : Functional properties of lupin protein isolates(Lupinus albus cv Multolupa). *J. Food Sci.*, **50**, 82(1985)
- Yang, C. I. : Studies on the nutritional quality of rape-seed protein isolates. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **12**, 109(1980)
- Choi, C., Cho, Y. J., Son, G. M., Lim, S. I. and Lee, W. J. : Effect of pH and salts on protein and phytate solubility of defatted sesame meal. *J. Resource Development, Yeungnam Univ.*, **8**, 85(1989)
- Nilo, R., Dench, J. E. and Caygill, J. C. : Nitrogen extractability of sesame(*Sesamum indicum* L.) seed and the preparation of two protein isolates. *J. Sci. Food Agric.*, **32**, 565(1981)
- Boloorforooshan, M. and Markakis, P. : Protein supplementation of navy bean with sesame. *J. Food Sci.*, **44**, 390(1979)
- Brito, O. J. and Nunez, N. : Evaluation of sesame flour as a complementary protein source for combinations with soy and corn flours. *J. Food Sci.*, **47**, 457(1982)
- Robert, L. A., Walter, J. W. and Donald, G. : Extraction of soybean meal proteins with salt solutions at pH 4.5. *J. Agric. Food Chem.*, **21**, 251(1973)
- Kim, K. H. and Kim, D. H. : Improved soy food products through food science and nutrition application. *Food Sci. and Ind.*, **29**, 37(1996)
- Chang, C. W. : Study of phytase and fluoride effects in germinating corn seeds. *Cereal Chem.*, **44**, 129(1967)
- Dench, J. E., Nilo Rivas, R. and Caygil, J. C. : Selected functional properties of sesame(*Sesamum indicum* L.) flour and two protein isolates. *J. Sci. Food Agric.*, **32**, 557(1981)
- Quaglia, G. B. and Orban, E. : Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine(*Sardina pilchardus*) protein hydrolysates. *J. Food Sci.*, **55**, 1571(1990)
- Heinonen, J. K. and Lahti, R. J. : A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal. Biochem.*, **113**, 313(1981)
- Lowry, O. H., Rosebrogh, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
- Wang, J. C. and Kinsella, J. E. : Functional properties of novel proteins; alfalfa leaf protein. *J. Food Sci.*, **41**, 286(1976)
- Beuchat, L. R. : Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 71(1981)
- Lee, S. M. and Kim, Z. U. : Extraction of proteins from soymilk residue using the enzymes from *Bacillus subtilis*. *Kor. Agric. Chem. Soc.*, **33**, 282(1990)
- Lee, S. H., Cho, Y. J., Ahn, B. J., Kim, S. and Choi, C. : Optimal conditions for the enzymatic hydrolysis of isolated sesame meal protein. *Kor. Agric. Chem. Soc.*, **38**, 248(1995)
- Choi, C., Chun, S. S. and Cho, Y. J. : Extraction of protein from defatted sesame meal using the enzyme from *Bacillus* sp. CW-1121. *Kor. Agric. Chem. Soc.*, **36**, 121(1993)
- Park, H. S., Ahn, B. and Yang, C. B. : Studies on the functional properties of sesame and perilla protein isolate. *Kor. J. Food Sci. Tech.*, **22**, 350(1990)

(1997년 10월 4일 접수)