

## 숙시닐화 및 부분가수분해가 대두단백질 분리물의 기능적 특성과 단백질-단백질 상호작용에 미치는 영향

이지원 · 하정욱

경남대학교 식품공학과

### Effects of Succinylation and Partial Proteolysis of Soybean Protein Isolates on Functional Properties and Protein-Protein Interaction

Jee-Won Lee and Jung-Uk Ha

*Dept. of Food Engineering, Kyungnam University, Masan, 630-701, Korea*

#### Abstract

Soybean protein isolates were acylated with succinic anhydride and partially hydrolyzed with trypsin. Chemical modification decreased protein contents of samples and, in amino acid composition, tyrosine was increased comparatively. And lysine was increased remarkably by partial proteolysis. Succinylation and trypsin treatment increased the aqueous solubility and shifted the isoelectric point that showed high pH-dependence of protein solubility. Protein solubility was influenced by salt concentration such as NaCl, CaCl<sub>2</sub>, NaNO<sub>3</sub> and NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Chemical modification increased the absorption of oil and water, emulsification properties and foam capacity, but decreased foam stability, ultraviolet absorbance and bulk density. Protein-protein interaction between soybean protein isolates and beef protein increased the emulsifying activity, emulsifying activity index and foaming properties, but it didn't have any influence on emulsion stability.

#### 서 론

각종 곡물단백질을 육단백질 등의 동물성 단백질과 혼합사용하는 것은 영양적 조성을 개선시키고 제품의 조직과 유화특성 등의 이화학적 성질을 향상시키는데 그 목적이 있다. 특히 단백질이 가지고 있는 용해성, 열응고성, 수분흡수성, 유흡수성, 겔화, 유화성, 기포성 등의 이화학적 특성은 단백질-단백질간의 상호작용에 의존하는 경우가 많다.<sup>1)</sup> 이러한 단백질의 기능적

특성을 개선하기 위한 시도로서 산, 알칼리 또는 효소적 가수분해가 응용된 바 있는데,<sup>2)</sup> 산에 의해서는 지나친 가수분해의 우려가 있고, 휴민화합물의 생성가능성이 있으며, 알칼리 처리시에는 독성물질의 생성가능성이 있기 때문에 식품가공시 적당한 구조와 조직·조성의 향상을 위해서 succinic anhydride 및 acetic anhydride 등의 산 무수물과 펩신, 트립신, 파파인, 피신 또는 세균성 단백질 분해효소 등에 의한 화학적 변형에 주목하게 되었다.<sup>3, 4, 5)</sup> 숙시닐화된 어류단백질 농축물은 유화특성이 향상되고 등전점의 저하를

보였으며,<sup>6)</sup> 어류의 근위섬유단백질을 숙시닐화하거나 효소에 의해 가수분해시켰을 때 분산성, 기포성, 기포안정성 등이 향상되었으며,<sup>7)</sup> Childs와 Park등<sup>8)</sup>에 의해 면실박 단백질의 아셀화 결과 보수성, 유화성, 기포성 등의 향상이 가능하다고 보고되었고, Canella등<sup>9)</sup>, Choi등<sup>10)</sup>은 해바라기단백질 분리물의 숙시닐화에 의해 단백질의 기능적 특성이 향상됨을 보고하였다.

특히 대두단백질은 가공육, 구운식품, 육유사제품, 어린이용 식품, 동물식품 등에 걸쳐 가장 널리 쓰이는 기능적 성분이며, aw 0.6~0.9 사이의 중간수분식품 생산에도 높은 수화력에 의해 기여하는 바가 크다.

일반적으로 succinic anhydride와 같은 디카르복실산의 부수물에 의한 아셀화를 통해 도입된 카르복실기에 의해 음하전량이 증가되고, 정전기적 반발과 단백질 구조 및 해리를 증가시킴으로써 용해성, 수분흡수성, 열안정성, 겔화 및 유화특성과 기포성 등을 증가시키는 것으로 알려져 있다.<sup>11)</sup> 또한 효소에 의한 단백질의 부분적 가수분해는 극성기의 숫자를 증가시킴으로써 친수성과 용해성의 증대에 기여하는 것으로 보고되어 있다.<sup>12)</sup>

본 연구는 대두단백질을 분리한 다음 두 가지 수준의 숙시닐화와 트립신에 의한 부분적 단백질분해물의 기능적 특성변화를 살펴보고, 이들 화학적 변형물과 우육 단백질의 혼합에 따른 기능적 특성의 변화를 고찰해 본 것이다.

## 실험재료 및 방법

### 대두단백질 분리물의 조제

대두단백질 분리물은 Wolf<sup>13)</sup>의 방법을 다소 변형하여 조제하였다. 즉, 대두막 분말을 0.01N NaOH 10배액(pH 8.5)에 가하여 2시간동안 진탕하고, 3,000×g에서 20분간 원심분리하여 상정액 I을 취하고, 잔류물에 증류수를 가하여 같은 조건에서 원심분리하여 얻은 상정액 II와 혼합 후 1N HCl로써 pH 4.0으로 조정후 3,000×g에서 20분간의 원심분리잔류물을 증류수로써 세척하여

48시간동안 증류수로써 부석하고, 동결건조에 의해 조제하였다.

### 숙시닐화

대두단백질 분리물의 숙시닐화는 Groninger<sup>7)</sup>의 방법에 의해 실시하였는데, 대두단백질 분리물의 15%(w/v) 수용액의 pH를 4N NaOH로써 8.0~8.5 수준으로 유지하면서 단백질량에 대해 20%(SA 20) 및 50%(SA 50)에 해당하는 succinic anhydride를 6회에 걸쳐 나누어 첨가하면서 25°C에서 75분간 반응시켰다. 이 반응액을 증류수로써(1:60) 4°C에서 24시간동안 부석시킨 후 동결건조하였다.

### 숙시닐화 수준의 측정

대두단백질 분리물의 숙시닐화 수준은 Paik과 Kim<sup>11)</sup>의 방법에 의해 측정하였다.

### 트립신 가수분해물의 조제

트립신 가수분해물은 Kabirullah와 Wills<sup>15)</sup>의 방법을 다소 변형하여 조제하였다. 즉, 0.01N tris buffer(pH 7.6) 71ml에 트립신 52mg을 녹인 효소 용액에 대두단백질 분리물 5g을 34ml의 증류수에 녹인 액을 첨가하여 pH 8.0으로 조정하고 40°C에서 15분간 반응시켰다. 이 액을 75°C에서 10분간 가열처리하여 효소를 불활성화시키고 얼음물로써 냉각한 다음 48시간에 걸쳐 증류수로써(1:60) 부석시킨 후 동결건조하였다.

### 우육 단백질시료의 조제

Kabirullah와 Wills<sup>16)</sup>의 방법을 다소 변형하여 우육 단백질시료를 조제하였다. 즉, 한우육중 허벅다리코기를 도살후 3일내의 것으로 구입하여 3%(w/v) NaCl 용액에 1%량을 첨가하여 10,000×g에서 2분간 균질하여 조제하고, pH를 6.5로 조정하여 사용하였다.

### 단백질 용해성의 측정

조제된 시료들의 단백질 용해성은 Franzen과 Kinsella등<sup>17)</sup>의 방법에 의해 측정하였다. 1%(w/

v) 단백질 수용액의 pH를 2N HCl 또는 2N NaOH로써 각각 3~11범위에서 단계적으로 조정하여 20°C에서 1시간동안 진탕한 다음 27,000×g에서 30분간 원심분리하여 상정액의 단백질 농도를 Biuret법<sup>18)</sup>에 의해 구해 용해성을 계산하였다.

한편 이온강도별 염류의 첨가에 따른 단백질 용해성의 변화를 보기 위하여 NaCl, CaCl<sub>2</sub>, NaNO<sub>3</sub> 및 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 등의 0.05M 및 0.5M 용액으로 1% 단백질용액을 조제한 다음 같은 방법으로 염류별 이온강도에 따른 용해성을 측정하였다.

#### 유화활성 및 유화안정성의 측정

유화활성 및 유화안정성은 Yatsumatsu 등<sup>19)</sup>의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 증류수 20ml에 시료단백질 1.5g씩을 용해하고, 2N HCl 또는 2N NaOH로써 pH 3~11 범위에서 단계적으로 조정한다 다음 대두유 20ml씩을 첨가하여 15,000×g에서 3분간 Waring Blendor로써 유화시키고 원심분리관에 옮겨 1,300×g에서 5분간 원심분리하여 다음 식에 의해 유화활성을 구하였다.

$$\text{Emulsion activity}(\%) = \frac{\text{height of emulsified layer}}{\text{height of total contents}} \times 100$$

한편 유화안정성은 단백질 용액을 같은 방법으로 조제하여 80°C에서 30분간 가열처리한 다음 유화활성 측정시와 같은 절차에 의해 구하였다.

$$\text{Emulsion stability}(\%) = \frac{\text{height of emulsified layer}}{\text{height of total contents}} \times 100$$

#### 유화활성지수의 측정

유화활성지수는 Pearce와 Kinsella<sup>20)</sup>의 방법에 의해 구하였다. 즉, 단백질 용액(1.3mg/ml) 30ml에 대두유 10ml( $\phi = 0.25$ )을 가한 후 15,000×g에서 30초간 균질하고, 균질액 1ml씩을 0.1M NaCl(0.1% SDS함유, pH 7.0)로 250배 희석하여 500nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식에 의하여 유화활성지수를 구하였다.

$$\text{EAI} = 2T / \phi C$$

T = 투광율

C = 단백질 농도

$\phi$  = 체적분율

또한 90°C에서 1시간동안 가열처리한 시료의 유화활성지수는 앞서와 같은 방법에 의해 균질하여 0.1% SDS용액으로 1,000배 희석하여 500nm에서의 흡광도에 의해 구하였다.

#### 기포력과 기포안정성의 측정

Hsu 등<sup>21)</sup>의 방법을 다소 변형하여 측정하였는데, 시료단백질 용액 50ml(30mg/ml, pH 6.5)을 20°C에서 3.5분간 Waring Blendor로써 거품을 일게한 다음 기포력을 구하고, 30°C에서 20분간 방치한 후 기포안정성을 구하였다.

Foam capacity(%) =

$$\frac{\text{volume after whipping} - \text{volume before whipping}}{\text{volume before whipping}} \times 100$$

Liquid leakage(%) =

$$\frac{\text{ml liquid released from foam}}{\text{ml initial volume before whipping}} \times 100$$

#### 수분 및 유출수성의 측정

Beuchat<sup>22)</sup>의 방법과 유사하게 수분 및 유출수성을 측정하였는데, 증류수 또는 대두유 100ml씩에 시료단백질 2g씩을 가하여 24°C에서 30분간 진탕한 다음 15,000×g에서 15분간 원심분리하여 상정액의 양해 의해 각각 구하였다.

#### 용적밀도의 측정

용적밀도는 Wang과 Kinsella 등<sup>23)</sup>의 방법에 의하여 g/ml단위로 측정하였다.

#### 자외선 흡광도의 측정

자외선 흡광도는 Freifelder<sup>24)</sup>의 방법에 의해 측정하였는데, 20mM 인산염 완충액(0.6M KCl 함유, pH 6.0)의 단백질 용액(0.5mg/ml)을 조제하여 30°C에서 280nm에서의 자외선 흡광도를 측정하였다.

**화학적 분석**

시료들의 단백질 함량은 micro-Kjeldahl 법<sup>25)</sup>에 의하여 정량하였고, 상징액 등의 단백질 농도는 소혈청알부민을 표준물질로 하여 Biuret법<sup>18)</sup>에 의해 측정하였다.

시료의 아미노산 함량은 Gehrke등<sup>26)</sup>의 산분해법에 의해 시료단백질을 전처리한 다음 N-TFA n-butyl ester로 변형하여<sup>27)</sup> 다음과 같은 조건에 의하여 분석하였다.

**Analysis condition :**

Column ; Dual column

3mm×2m Stainless steel

**Column 1**

Liquid phase ; 1% NPGS+0.5% SE 30+0.5% OV-17

Supporting material ; Chromosorb P HP 100/120 mesh

GC ; Hitachi 163 model

Flow rate of carrier gas ; N<sub>2</sub> 75ml/min

H<sub>2</sub> ; 1.5kg/cm<sup>2</sup>

Air ; 1kg/cm<sup>2</sup>

Temperature programming ; 2°C/min

Initial temperature ; 85°C

Final temperature ; 230°C

**Column 2**

Liquid phase ; 3.4% OV-17+3.0% SE 30

Supporting material ; Chromosorb W HP 100/120 mesh

GC ; Hitachi 163 model

Flow rate of carrier gas ; N<sub>2</sub> 60ml/min

H<sub>2</sub> ; 1.5kg/cm<sup>2</sup>

Air ; 1kg/cm<sup>2</sup>

Temperature programing ; 5°C/min

Initial temperature ; 85°C

Final temperature ; 275°C

Detector ; FID

Detector temperature ; 260°C

Injection port temperature ; 245°C

Attenuation ; 1024

Range ; 10

**실험결과 및 고찰**

**단백질 및 아미노산 조성**

조제된 시료 중 변형되지 않은 시료의 단백질 함량은 76.21%였으며, 변형된 시료는 SA 20이 62.94%, SA 50이 41.71%, 트립신 처리시료가 68.75%로서 특히 숙시닐화 수준이 증가함에 따라서 단백질 함량은 변형되지 않은 시료에 비해 상당히 감소하는 경향을 Table 1에서 알 수 있다. 이것은 숙시닐화로 인하여 분자량의 증가가 동반되고 단백질 구조 중에 숙시닐기가 첨가됨으로써 회석효과가 나타났기 때문으로 생각된다.<sup>28)</sup> 한편 트립신 처리시에는 7.5% 정도의 감소를 보였는데 이것은 트립신의 부분가수분해에 기인된 것으로 볼 수 있다.

아미노산의 함량변동은 Table 2에 나타내었는데, 숙시닐화의 경우 isoleucine, glycine, leucine, serine, proline 등은 SA 20 및 SA 50에서 다소 감소하는 경향을 나타내는데 비해 tyrosine과 lysine은 다소 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 트립신 처리시에는 숙시닐화에 비해 lysine의 증가율이 현저하였다.

Table 1. Protein content of samples

Soybean protein isolates	Protein content <sup>a)</sup> (%)
Unmodified	76.21
SA 20	62.94
SA 50	41.71
Trypsin treated	68.75

a) Values are the average of three determinations.

Table 2. Amino acid content of unmodified and modified soybean protein isolates

Amino acid*	Unmodified	Succinylated %		Trypsin treated
		20	50	
Tyrosine	6.4	21.9	9.0	3.6
Alanine	4.0	4.5	4.0	3.5
Valine	3.9	3.9	3.7	3.4
Threonine	3.3	3.6	3.0	2.9
Isoleucine	4.5	3.7	4.0	4.1
Glycine	3.7	3.0	3.6	3.4
Leucine	9.2	7.1	7.8	6.8
Serine	5.7	4.0	3.6	4.9
Proline	6.5	4.3	6.0	5.8
Aspartic acid	14.6	10.7	13.9	13.3
Phenylalanine	5.5	4.0	5.1	4.3
Glutamic acid	24.6	19.0	27.0	22.9
Lysine	9.1	10.3	9.3	21.1

\* Tryptophan and arginine were not analysed.

Values are the average of at least three determinations.

#### 숙시닐화의 수준

조제시료의 숙시닐화 수준은 SA 20이 83%, SA 50이 96%로서 succinic anhydride의 첨가량이 늘어날수록 증가하는 경향을 띠었는데, 이러한 결과는 Franzen 등<sup>10)</sup>의 보고와 거의 비슷한 경향으로 생각된다. 여기에 유리아미노기에 대한 숙시닐화는 산부수물의 첨가수준과 거의 비례적인 관계가 있음을 알 수 있고, 비교적 낮은 pK와 반응의 공간이용성 때문에 주로 lysine의  $\epsilon$ -amion기 자리에서 우선적으로 숙시닐화가 일어나는 것으로 알려져 있다.

#### 단백질의 용해성

대두단백질 분리물의 용해성은 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 등전점(pH 4.5) 보다 낮은 영역에서 높은 pH 영역에 비해 비교적 낮은 용해성을 나타내었는데, SA 20이 SA 50이나 트립신 처리시료에 비해 약간 높은 용해성을 나타내었다. pH 4~5사이에서는 최저의 용해성을 나타내었는데, 처리간에 현저한 차이는 보이지 않았으나 숙시

닐화의 수준이 증가할수록 다소 높은 용해성을 나타내었으며, 특히 pH 5-7 범위에서 숙시닐화 수준의 증가와 더불어 용해성이 현저하게 증가하는 경향을 띠었다. pH 7이상에서는 용해성의 증가율이 상당히 둔화되었다.

트립신처리시에는 알칼리영역에서 SA 20과 비

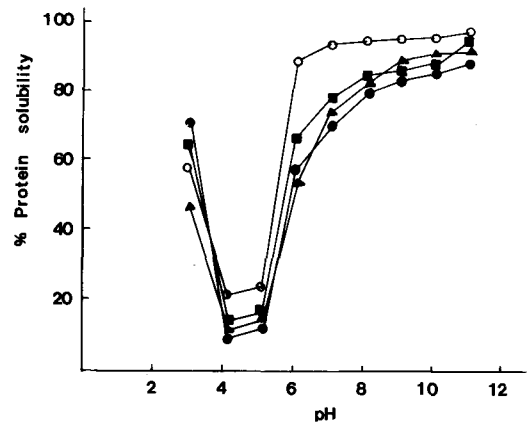


Fig. 1 Solubility profile for unmodified and modified soybean protein isolates. Symbols : (●) unmodified ; (■) SA 20 ; (○) SA 50 ; (▲) trypsin treated

스한 용해성을 나타내는 경우를 제외한 나머지 pH범위에서 다소 용해성이 저하되었는데, 이것은 효소 불활성화를 위한 가열처리에 기인된 것으로 생각된다.

pH 5-7범위에서 용해성이 크게 증가되는 것은 숙시닐화에 의해 단백질의 음하전이 증가되고, 중성 숙시닐기에 의해 lysine의 ε-부분이 치환됨에 따라 염기성 아미노산에 인접한 펩티드결합의 개열에 의해 단백질 복합체가 해리됨으로써 보다 하전된 극성기가 주변의 물에 노출되기 때문인 것으로 보인다.

Kabirullah 등<sup>16)</sup>은 해바라기씨 단백질의 숙시닐화에 의해 등전점이 pH 4-5에서 pH 3-4로 변이되는 현상이 나타남을 보고하였으며, 특히 pH 1-2 및 pH 5-8 범위에서 용해성이 더욱 증가된다고 보고하였다. Messinger 등<sup>20)</sup>은 옥수수 배아 단백질추출물을 숙시닐화했을 때 대조시료와 SA 25 사이 및 SA 50과 SA 75 사이의 단백질 용해성은 큰 차이를 나타내지 않았으나, SA 50 및 SA 75는 대조시료 및 SA 25에 비해 현저하게 높은 용해성을 나타내었으며(95.6~99.7%), 트립신 처리시에는 가열처리 때문에 용해성이 현저하게 저하되었다고 보고하였는데 이것은 위의 실험결과와 큰 차이를 나타내는 것은 아닌 것으로 생각된다.<sup>6, 15)</sup> 또한 낙화생 단백질의 숙시닐화에 의해 pH 4-5 범위의 등전점에서 단백질의 용해

성이 증가되었다는 보고나 등전점보다 낮은 pH 범위에서는 숙시닐화에 의해서도 용해성의 감소 경향이 나타나고, pH 6-7 영역에서 용해성이 현저하게 증가한다는 보고 등<sup>22)</sup>과 비교적 일치되는 결과임을 알 수 있다. 또한 어류단백질의 숙시닐화에 의해 등전점보다 낮은 pH영역에서 용해성이 감소한다는 보고<sup>20)</sup>와도 거의 비슷한 결과를 나타내었으나, 연맥단백질의 숙시닐화는 등전점보다 낮은 pH에서 단백질의 용해성을 증가시켰다는 보고<sup>31)</sup>와는 다소 차이를 나타내었다.

몇가지 염류의 용해성에 미치는 영향을 측정할 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다.

NaCl, CaCl<sub>2</sub>, NaNO<sub>3</sub> 및 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 등에 의한 용해성은 대체로 염류의 농도가 높을수록 용해성은 떨어지는 것으로 나타났으나, SA 50의 경우 NaCl 및 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>에 대해서는 약간 증가되었고, 트립신처리시료는 CaCl<sub>2</sub>에 대해 다소 증가되는 경향을 나타내었는데, 이 결과는 Gheyasuddin 등<sup>32)</sup>의 NaCl 및 CaCl<sub>2</sub>의 농도변화에 따른 용해성의 변화에 대한 보고와 거의 비슷한 경향을 나타내는 것이다. NaCl에 대한 용해성은 SA 20이 가장 높았고, SA 50이 트립신처리시료에 비해 다소 낮은 용해성을 나타내었으며, CaCl<sub>2</sub>처리시에는 거의 모든 시료용액에서 침전현상을 보일만큼 용해상태가 극히 불량하였으며, NaNO<sub>3</sub> 및 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>에 대한 용해성은 NaCl처리시와 거의 비슷한

Table 3. Effect of salt concentration on protein solubility of unmodified and modified soybean protein isolates

Salt	Concentration(M)	Absorbance*			
		Unmodified	SA 20	SA 50	Trypsin treated
NaCl	0.05	0.012	0.646	0.255	0.373
	0.5	0.174	0.491	0.266	0.338
CaCl <sub>2</sub>	0.05	0.079	0.524	0.187	0.074
	0.5	0.036	0.186	0.085	0.217
NaNO <sub>3</sub>	0.05	0.011	0.594	0.252	0.268
	0.5	0.188	0.456	0.234	0.265
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05	0.027	0.564	0.250	0.420
	0.5	0.188	0.121	0.257	0.381

\* Absorbance values are the average of the duplicate determinations at 540nm.

경향을 나타내었다.

유화활성의 변화

Fig. 2에 나타낸 바와 같이 화학적 변형의 유화활성에 미치는 영향은 등전점이하의 낮은 pH에서는 큰 차이를 보이지 않았으나, pH 5 이상에서는 미변형시료에 비해 숙시닐화 및 트립신 처리가 유화활성을 크게 증가시키는 것으로 나타났다. 즉, SA 50은 SA 20에 비해 다소 높은 유화활성을 나타내었고, 트립신처리시료는 미처리시료에 비해서는 다소 높은 유화활성을 나타내었으나, 숙시닐화에 비해서는 낮은 수준이었고, 숙시닐화는 pH 4-7사이에서 유화활성 증가율을 상승시키는 효과가 있었다.

일반적으로 단백질 분자의 소수기들은 lipid interface와 결합하고, 극성 및 이온성원자단은 aqueous phase로 향하기 때문에 숙시닐화에 의해 유화활성이 증가되는 것은 단백질의 구조를 개열시키고 카르복실기가 단백질 분자와 에멀전의 aqueous phase 사이의 상호작용을 증가시키는데 그 원인이 있는 것으로 보인다. pH 5.0 이상에서 숙시닐화에 의해 미처리시료에 비해 유화활성의 증진효과가 현저한 것은 용해성의 증가와 더불어 변형된 단백질의 구조가 다소 이완되어 interfacial

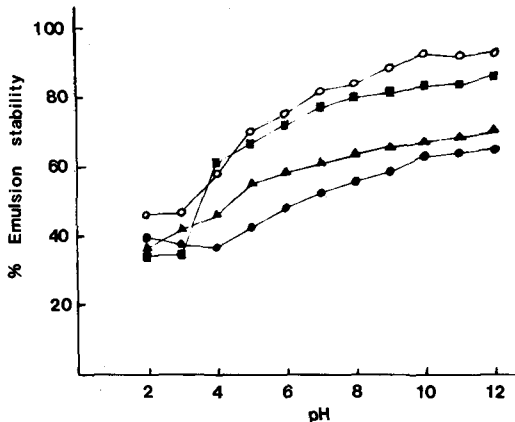


Fig. 2 Effect of pH on the emulsifying activity of unmodified and modified soybean protein isolates. Symbols : (●) unmodified ; (■) SA 20 ; (○) SA 50 ; (▲) trypsin treated

film간의 확산을 촉진함으로써 재배치가 일어난 때문으로 보이며<sup>8, 17, 33)</sup> 높은 pH에서 유화활성의 증가율이 다소 둔화된 것은 숙시닐화된 폴리펩티드간의 정전기적 반발력이 현저하게 늘어난데 기인한 것으로 생각된다.

유화안정성의 변화

화학적 변형에 따른 유화안정성의 변화는 Fig. 3에 나타낸 바와 같다. 유화안정성의 변화경향도 유화활성의 경우와 마찬가지로 SA 50이 SA 20에 비해 다소 높은 편이었으며, 트립신처리시료에도 SA 20보다는 다소 낮은 유화안정성을 나타내었다. 낮은 pH범위에서의 유화안정성은 유화활성과는 달리 다소 차이를 보였으며, pH 6까지는 유화안정성이 대체로 증가하는 경향을 보였으나 pH가 증가할수록 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 트립신처리시 유화활성의 증가에 비해 유화안정성이 높은 pH범위에서 다소 떨어지는 것은 효소처리에 따른 부분가수분해에 의해 oil-water interface에 이용될 수 있는 펩티드 분자의 숫자를 증가시키고 작은 구형 폴리펩티드로 변화되기 때문으로 생각된다.<sup>34, 35)</sup>

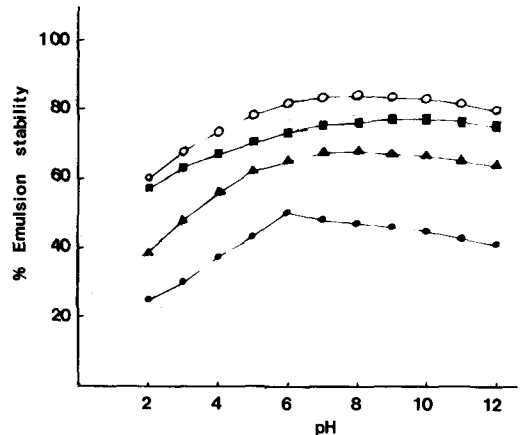


Fig. 3 Effect of pH on the emulsion stability of unmodified and modified soybean protein isolates. Symbols : (●) unmodified ; (■) SA 20 ; (○) SA 50 ; (▲) trypsin treated

**유화활성지수의 변화**

유화활성지수(EAI)의 측정결과를 Table 4와 같은데, 대조시료의 값이 0.50인데 비해 SA 20과 SA 50의 EAI는 각각 3.47 및 5.87로서 숙시닐화의 수준이 높아질수록 EAI가 증가하는 경향을 띠고 있으며, 트립신처리시의 EAI는 3.36으로서 미처리시료에 비해서는 높은 값을 나타내었으나 숙시닐화에 비해 유화활성지수에 미치는 영향은 다소 미약한 편이었다.

EAI는 광산란에 따른 Mie이론에 근거하여 흠광도와 예멸전의 표면적간에는 일정한 관계가 성립된다는데<sup>36)</sup> 근거를 둔 것으로 단백질의 용해성과 표면변성에 대한 저항성과 관련이 있는 것으로 보인다. Pearce와 Kinslla 등<sup>30)</sup>은 효모단백질을 62% 및 80% 수준으로 숙시닐화했을 때 pH 6.5~8.0사이에서 숙시닐화의 수준이 높을수록 pH값의 증가에 따라 EAI가 증가한다고 보고한 바 있으며, 대두단백질 분리물에서도 그 효과는 효모단백질에 미치지지는 않지만 EAI의 증가경향은 숙시닐화와 상승적인 관계가 있다고 한 보고와 거의 비슷한 결과를 나타내었다. Ma<sup>31)</sup>는 연맥단

백질의 숙시닐화는 EAI의 증가효과를 가져왔으며, 변형수준이 높을수록 효과적이었다고 보고한 바 있다. 트립신처리시 숙시닐화에 비해 낮은 EAI를 나타내는 것은 트립신처리 그 자체에 원인이 있는 것이 아니라 효소 불활성화단계를 거치는 열처리에 기인된 것으로 보인다.<sup>15, 35, 37)</sup>

또한 90°C에서 1시간동안 가열처리했을 때 시료들의 EAI 변화경향을 Table 4에서 보면 미변형시료의 경우 열처리하지 않았을 때의 안정성에 비해 55% 정도 감소되었으며, SA 20과 SA 50 및 트립신처리시료의 경우에도 현저한 감소현상을 나타내었으나 화학적 변형간의 차이는 열처리하지 않았을 때와 변동이 없었다.

**기포성 및 기포안정성의 변화**

숙시닐화 및 트립신처리에 따른 기포특성들의 변화는 Table 5에 나타낸 바와 같다. 기포성은 미변형시료의 53%에 비해 숙시닐화의 수준이 증대될수록 SA 20이 60%, SA 50이 80%로서 향상되는 경향을 나타내었고, 트립신처리시에는 97%로서 효소처리가 기포성의 향상에 크게 기여할 수 있음을 시사하는 것으로 보인다. 기포

**Table 4. Effect of chemical modification on emulsifying activity index(EAI)**

Soybean protein isolates	Emulsifying activity index*	
	Unheated	Heated
Unmodified	0.50	0.23
SA 20	3.47	0.68
SA 50	5.87	0.85
Trypsin treated	3.36	0.76

\* Values are the average of at least three determinations.

**Table 5. Foaming properties of unmodified and modified soybean protein isolates<sup>a)</sup>**

Soybean protein isolates	Foam capacity(%) <sup>a)</sup>	Foam stability(%) <sup>a)</sup>
Unmodified	53± 2	78± 2
SA 20	60± 3	62± 2
SA 50	80± 3	60± 3
Trypsin treated	97± 6	46± 2

a) Average of duplicate determinations± S. D.



안정성은 미변형시료가 78%인데 비해 SA 20, SA 50 및 트립신처리시료는 각각 62%, 60% 및 46%로서 숙시닐처리시에는 다소 높은 기포안정성을 보였으나 트립신처리시에는 다소 저하되는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 완두콩의 숙시닐화 결과 낮은 수준에서는 기포성이 향상되나 과도한 숙시닐화는 단백질분자간의 반발력을 증가시키므로써 기포안정성을 다소 떨어뜨린다는 Johnson 등<sup>38)</sup>의 보고와 연맥단백질의 숙시닐화에서도 기포성은 증가되나 기포안정성은 다소 감소한다는 보고<sup>36)</sup>등과 일치되는 경향이라고 볼 수 있다. 즉, 과도한 숙시닐화는 단백질의 용해성을 증가시키지만 변형된 단백질간의 응집상호작용을 감소시키거나 표면막의 강도를 줄이기 때문에 기포안정성이 다소 감소되는 것으로 보인다.

Townsend<sup>39)</sup>, Thompson 등<sup>40)</sup>은 옥수수 배아단백질 분리물의 숙시닐화에 의해 초기의 기포성은 증가하나 기포안정성에 대해서는 숙시닐화 수준의 증가가 별다른 효과가 없다고 보고하고, 순하전의 증가로 기포피막의 단백질-단백질 상호작용을 방해하기 때문에 기포안정성이 저하되는 것이라고 설명했다. Kinsella<sup>43)</sup>는 숙시닐화에 의해 대두단백질은 기포성의 증가를 보였으나, 평지씨 단백질분리물과 치즈 유청단백질 농축물<sup>44)</sup> 및 락트알부민<sup>45)</sup>등의 경우에는 기포성의 감소를 나타낸 결과를 비추어 볼 때, 단백질의 종류와 처리조건에 따라 기포성에 대한 효과는 다르게 나타나는 것으로 보인다. 트립신처리시 비교적 효과적인 기포안정성을 보인 것은 전술한 바와 같은 하전의 증가를 동반하지 않기 때문에 유화특성에 미치는 효과와는 다소 차이를 보이는 것으로 Mes-

singer 등<sup>29)</sup>의 보고와 일치하는 결과를 얻었다.

#### 수분흡수성 및 유흡수성의 변화

수분흡수성은 Table 6에 나타낸 바와 같이 미변형시료가 4.82ml/g인데 비해 SA 20이 6.96ml/g, SA 50이 7.24ml/g 및 트립신처리시료는 7.05ml/g로서 화학적 변형에 의해 대체로 증가하는 경향을 띠었다. 이것은 숙시닐화 및 트립신처리에 의해 단백질 분자가 해리됨으로써 수분결합자리가 증가된데 그 원인이 있는 것으로 보이며, SA 50의 경우가 가장 현저한 증가경향을 나타내었다.

유흡수성도 미변형시료가 5.43ml/g인데 비해 SA 20 및 SA 50이 각각 6.24ml/g 및 7.54ml/g로서 숙시닐화에 의해 15~38% 정도의 증가율을 나타내었고, 트립신 처리시에는 6.12ml/g로서 숙시닐화보다는 다소 낮은 증가율을 나타내었다. 이러한 결과는 옥수수배아 단백질분리물의 숙시닐화에 의해서 수분흡수성이 증가되었다는 Messenger<sup>29)</sup>의 보고와 일치하며, 트립신처리시 수분흡수성은 해바라기 단백질의 경우에는 증가하였다는 Kabirullah의 보고<sup>15)</sup>와는 일치하나, 낙화생 단백질의 경우에는 감소하였다는 Beuchat<sup>42)</sup>의 보고와는 차이를 보이는 것으로, 이것은 단백질의 종류, 처리조건의 차이, 실험방법 등의 차이에 기인한 것으로 생각된다.

#### 용적밀도의 변화

미변형시료의 용적밀도는 0.92g/ml인데 비해 숙시닐화에 의해서는 용적밀도가 크게 감소하여 부피의 팽창현상이 현저하였으며 트립신처리시료는 숙시닐화에 비해 비체적의 증가가 훨씬 저

Table 6. Absorption of water and fat by unmodified and modified soybean protein isolates<sup>a)</sup>

Soybean protein isolates	Water (ml/g sample)	Fat (ml/g sample)
Unmodified	4.82±0.03	5.43±0.06
SA 20	6.96±0.01	6.24±0.01
SA 50	7.24±0.06	7.54±0.03
Trypsin treated	7.05±0.03	6.12±0.04

a) Average of duplicate determinations±S. D.

Table 7. Bulk density of unmodified and modified soybean protein isolates

Soybean protein isolates	Bulk density (g/ml)
Unmodified	0.92± 0.02
SA 20	0.63± 0.01
SA 50	0.58± 0.02
Trypsin treated	0.73± 0.03

Table 8. Ultraviolet absorbance of unmodified and modified soybean protein isolates at 280nm

Soybean protein isolates	UV absorbance
Unmodified	0.932
SA 20	0.813
SA 50	0.762
Trypsin treated	0.865

Table 9. Effect of protein-protein interaction between soybean protein isolates and meat protein on emulsification properties

Emulsification property	Protein	Ratio soybean protein : meat protein					
		0 : 100	20 : 80	40 : 60	60 : 40	80 : 20	100 : 0
EA (%)	Unmodified	69	72	74	71	74	75
	SA 20	69	74	78	82	79	79
	SA 50	69	76	82	87	84	83
	Trypsin treated	69	74	76	85	83	82
ES (%)	Unmodified	64	67	65	66	64	65
	SA 20	64	69	68	67	66	68
	SA 50	64	64	64	66	65	65
	Trypsin treated	64	59	62	63	60	60

조하였다.

자외선 흡광도의 변화

단백질 시료들의 280nm에서의 흡광도를 비교해보면 Table 8과 같다. 자외선 흡광도의 증감은 주로 tyrosine의 이온화를 반영하는 것으로<sup>24)</sup> 내부의 tyrosine이 극성조건에 노출되었음을 의미한다. 따라서 트립신처리시 흡광도 감소는 현저하지 않았으나, 숙시닐화에 의해서 흡광도가 다소 감소된 것은 초기에 내부의 방향족 비극성기들이 숙시닐화가 진전됨에 따라 aqueous phase로 노

출되었음을 나타내는 것이다.

단백질-단백질 상호작용에 의한 변화

대두단백질 분리물과 우육단백질을 일정한 비율로 혼합하였을 때 유화활성 및 유화안정성에 미치는 영향은 Table 9에 나타난 바와 같이 우선 유화활성은 육단백질과의 혼합에 의해 다소 증가되는 경향을 보였는데, 변형되지 않은 대두단백질 분리물은 큰 변동을 보이지 않은 반면에 숙시닐화 및 트립신처리에 의해서는 육단백질과의 상호작용이 상승적 작용을 나타냄을 알 수

있다. 숙시닐화의 경우 대두단백질 분리물 60% 정도의 혼합시 비교적 효과적이었으며, 트립신 처리시료는 60~80 혼합시 다소 높은 유화활성을 나타내었으나 전처리간에 큰 차이는 보이지 않았다. 유화안정성은 SA 20 혼합시 약간의 증가를 나타낸 반면에 미변형시료와 SA 50의 경우는 거의 비슷한 수준이었으나, 트립신처리시료는 유화안정성을 다소 저하시키는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 Kabirullah와 Wills 등<sup>15)</sup>이 숙시닐화 또는 아세틸화시킨 해바라기씨 단백질에 대한 육단백질과의 혼합실험에서 유화활성은 혼합비율간에 큰 차이를 보이지 않았다는 보고와는 다소 다른 결과였으나, 유화안정성은 혼합비율의 증가와 더불어 다소 감소한다는 보고와는 거의 일치하는 것이었다.

한편 유화활성지수는 Table 10에서 보는 바와 같이 숙시닐화의 수준이 증가함에 따라 대체로

증가하는 효과를 나타내었는데, 미변형대두단백질 분리물은 별다른 증진효과를 기대할 수 없었으나, 트립신처리시료는 높은 혼합비를 제외하고서는 숙시닐화에 비해 다소 낮은 유화활성지수를 나타낸 것은 전술한 바와 같이 트립신처리 그 자체에 원인이 있다기 보다는 효소불활성화 단계를 거치는 열처리에 기인된 것으로 보인다<sup>4)</sup>.

또한 대두단백질 분리물과 우육단백질의 혼합에 따른 기포성 및 기포안정성에 대한 영향은 Table 11과 같은데, 숙시닐화 또는 트립신처리에 의해 기포성은 유화활성 및 유화활성지수와 마찬가지로 다소 증가되었으며 특히 SA 50의 경우가 약간 높은 증가효과를 보여 주었다. 기포안정성은 화학적 변형이 큰 영향을 끼치지 않음을 나타내었는데, 이러한 결과는 연맥단백질의 숙시닐화에 의해 기포성은 증가하나 기포안정성은 다소 감소한다는 Ma<sup>31)</sup>의 보고와 거의 비슷한 경향을 나

Table 10. Effect of protein-protein interaction between soybean protein isolates and meat protein on emulsifying activity index

Protein	Ratio soybean protein : meat protein					
	0 : 100	20 : 80	40 : 60	60 : 40	80 : 20	100 : 0
Unmodified	1.8	1.55	1.59	1.54	1.62	1.64
SA 20	1.8	3.14	2.29	4.24	5.32	5.46
SA 50	1.8	3.20	3.60	4.80	5.10	5.13
Trypsin treated	1.8	2.76	2.93	3.16	4.38	4.27

Table 11. Effect of protein-protein interaction between soybean protein isolates and meat protein on foaming capacity and foam stability

Foaming property	Protein	Ratio soybean protein : meat protein					
		0 : 100	20 : 80	40 : 60	60 : 40	80 : 20	100 : 0
EC (%)	Unmodified	65	67	69	68	71	68
	SA 20	65	78	79	82	86	81
	SA 50	65	79	82	84	87	86
	Trypsin treated	65	70	76	78	79	75
FS (%)	Unmodified	71	62	67	69	68	76
	SA 20	71	61	63	65	67	64
	SA 50	71	66	65	64	66	62
	Trypsin treated	71	66	61	63	64	62

타내는 것이라 할 수 있다.

### 요 약

숙시닐화 또는 트립신처리에 의한 대두단백질 분리물의 화학적 변형은 단백질의 함량을 감소시키는 것으로 나타났고, 아미노산 조성에서 tyrosine의 증가가 현저하였으나 lysine은 트립신처리시에만 크게 증가하였다. 화학적 변형은 단백질의 용해성을 증가시키고 pH의존성이 뚜렷하여 등전점 변이시키는 효과를 나타내었다. 단백질의 용해성은 염류의 농도증가에 의해 감소하는 경향을 나타내었으며, 화학적 변형은 유흡수성과 수분흡수성, 유화특성 및 기포성 등을 증가시키는 반면에 기포안정성을 다소 저하시키고 자외선 흡광도와 용적밀도를 감소시켰다. 한편 대두단백질 분리물과 우유단백질의 혼합에 따른 상호작용에 의해서는 유화활성, 유화활성지수 및 기포성의 증가를 가져왔으나 유화안정성에 대해서는 현저한 효과가 나타나지 않았다.

### 문 헌

1. Kinsella, J. E. : Functional properties in food : *A survey Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 7, 219(1976)
2. Burrows, V., Greene, A., Korol, M., Melnychyn, P., Pearson, G., and Sibbald, S. : "*Food Protein from Grains and Oilseeds-A Development Study Projected to 1980*," Office of the Minister Responsible for the Canadian Wheat Board, House of Commons, Ottawa(1972)
3. Adler-Nissen, J. : Enzymatic hydrolysis of food proteins. *Process Biochem.* 12, 18(1977)
4. Pomeranz, Y. : Proteins : general Ch. 5 In "*Functional Properties of Food Components*," B. S. Schweigert, J. Hawthorn and F. G. Stewart(Ed.). Academic Press Inc., Orlando, FL 155(1985)
5. Feeney, R. E., Yamasaki, R. B., and Geoghegan, K. F. : Chemical modification of proteins : An overview, In "*Modification of Proteins : Food, Nutritional and Pharmacological Aspects*,"(Ed.) Feeney, R. E. and Whitaker,

- J. R., *Adv. Chem. Series 198*, American Chemical Society, Washington, DC.3(1982)
6. Chefftel, J. C., Cuq, J. L., and Lorient, D. : Amino acids, peptides and proteins. Ch. 5. In "*Food Chemistry*," O. R. Fennema(Ed.) Marcel Dekker, New York 245(1985)
7. Groninger, H. S. Jr. : Preparation and properties of succinylated fish myofibrillar protein. *J. Agric. Food Chem.* 21, 978(1973)
8. Childs, E. A. and Park, K. K. : Functional properties of acylated glandless cottonseed flour. *J. Food Sci.*, 41, 713(1976)
9. Canella, M., Castriotta, G., and Bernardi, A. : Functional and physicochemical properties of succinylated and acetylated sunflower protein. *Lebensm. Wiss. u.-Technol.*, 12, 95(1979)
10. Choi, Y. R., Lusas, E. W., and Rhee, K. C. : Succinylation of cottonseed flour : Effect on the functional properties of protein isolates prepared from modified flour. *J. Food Sci.*, 46, 954(1981)
11. Kim, S. H. and Kinsella, J. E. : Effects of progressive succinylation on some molecular properties of soy glycinin. *Cereal Chem.*, 63, 342(1986)
12. Phillips, R. D. and Beuchat, L. R. : Enzyme modification of proteins. Ch. 13. In "*Protein Functionality in Foods*," J. P. Cherry(Ed.). Am. Chem. Soc., Washington, DC. 275(1981)
13. Wolf, W. J. : Soybean proteins : Their functional, chemical, and physical properties. *J. Agric. Food Chem.*, 18, 969(1970)
14. Paik, W. and Kim, J. : Effect of methylation on susceptibility of proteins to proteolytic enzymes. *Biochem.*, 11, 2589(1972)
15. Kabirullah, M. and Wills, R. B. H. : Functional properties of sunflower protein following partial hydrolysis with proteases. *Lebensm. Wiss. u.-Technol.*, 14, 232(1981)
16. Kabirullah, M. and Wills, R. B. H. : Functional properties of acetylated and succinylated sunflower protein isolate. *J. Food Technol.*, 17, 235(1982)
17. Franzen, K. L. and Kinsella, J. E. : Functional properties of succinylated and acetylated soy protein. *J. Agric. Food Chem.*, 24, 788(1976)
18. Gornall, A. G., Bardwill, C. T., and David, M. M. : Determination of serum protein by means of the Biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177, 751(1949)
19. Yatsumatsu, K., Seada, K., Wada, T., and Ishu.

- K. : Utilization of soybean products in fish paste products. *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 737(1972)
20. Pearce, K. N. and Kinsella, J. E. : Emulsifying properties of proteins ; evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 716(1978)
  21. Hsu, H. W., Vavak, D. L., Satterlee, L. S., and Miller, G. A. : A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J. Food Sci.*, **42**, 1269(1977)
  22. Beuchat, L. R. : Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour. *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 258(1977)
  23. Wang, J. C. and Kinsella, J. E. : Functional properties of novel proteins. Alfalfa leaf protein. *J. Food Sci.*, **41**, 286(1976)
  24. Freifelder, D. : *Physical Biochemistry*. W. H. Freeman. San Francisco(1982)
  25. A. O. A. C. : "Official Methods of Analysis," 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. (1984)
  26. Gehrke, C. W., Wall, L. L., Absheer, J. S., Kaiser, F. E., and Zumwalt, R. W. : Sample separation for chromatography of amino acids : Acid hydrolysis of proteins. In "Amino Acid Analysis by Gas Chromatography," Zumwalt, R. W., Kuo, K. C. T., and Gehrke, C. W. (Ed.), CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida, 1, 2 (1987)
  27. Gehrke, C. W., Kaiser, F. E., Kuo, K. C. T. and Zumwalt, R. W. : Gas-liquid chromatography of amino acids as the N-TFA n-butyl esters. In "Amino Acid Analysis by Gas Chromatography" Zumwalt, R. W., Kuo, K. C. T. and Gehrke, C. W. (Ed.), CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1, 31(1987)
  28. Catsimpoalas, N., Kenney, J. A., Meyer, E. W., and Szuhaj, B. F. : Molecular weight and amino composition of glycinin subunits. *J. Sci. Food Agric.*, **22**, 448(1971)
  29. Messinger, J. K., Rupnow, J. H., Zeece, M. G., and Anderson, R. L. : Effect of partial proteolysis and succinylation on functionality of corn germ protein isolate. *J. Food Sci.*, **52**, 1620 (1987)
  30. Chen, L. F., Richardson, T., and Amundson, C. H. : Some functional properties of succinylated proteins from fish protein concentrate. *J. Milk Food Technol.*, **38**, 89(1975)
  31. Ma, C. Y. : Functional properties of acylated oat protein. *J. Food Sci.*, **49**, 1128(1984)
  32. Gheyasuddin, S., Cater, C. M., and Mattil, K. F. : Effect of several variables on the extractability of sunflower seed proteins. *J. Food Sci.*, **35**, 453(1970)
  33. Kinsella, J. E. and Shetty, K. J. : Chemical modification for improving functional properties of plant and yeast proteins. In "Functionality and Protein Structure," ACS Symposium Series No. 92 Amer. Chem. Soc., Washington, DC. 73(1979)
  34. Puski, G. : Modification of functional properties of soy proteins by proteolytic enzyme treatment. *Cereal Chem.*, **52**, 655(1975)
  35. Zakaria, F. and McFeeters, R. F. : Improvement of the emulsification properties of soy protein by limited pepsin hydrolysis. *Lebensm. Wiss. u.-Technol.*, **11**, 42(1978)
  36. Kerker, M. : "The Scattering of Light and Other Electromagnetic Radiation," Academic Press, London(1969)
  37. Paulson, A. T., Tung, M. A., Garland, M. R., and Nakai, S. : Functionality of modified plant proteins in model food systems. *Ca. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **17**, 202(1984)
  38. Johnson, E. A. and Brekke, C. J. : Functional properties of acylated pea protein isolates. *J. Food Sci.*, **48**, 722(1983)
  39. Townsend, A. and Nakai, S. : Relationship between hydrophobicity and foaming characteristics of food proteins. *J. Food Sci.*, **48**, 588 (1983)
  40. Thompson, L. U. and Cho, Y. S. : Chemical composition and functional properties of acylated low phytate rapeseed protein isolate. *J. Food Sci.*, **49**, 1584(1984)
  41. Nakai, S., and Li-Chan, E. : Structure modification and functionality of whey proteins : quantitative structure-activity relationship approach. *J. Dairy Sci.*, **68**, 2763(1985)
  42. Beuchat, L. R., Cherry, J. P., and Quinn, M. R. : Physicochemical properties of peanut flour as affected by proteolysis. *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 616(1975)

(Received October 13, 1989)