

유채단백질의 단백효소에 의한 가수분해 조건

김충희 · 김효선 · 정용현 · 강영주[†]

제주대학교 식품공학과

The Hydrolysis Conditions of Rapeseed Protein by Pronase

Chung-Hee Kim, Hyo-Sun Kim, Yong-Hyun Jung and Yeung-Joo Kang[†]

Dept. of Food Science and Technology, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

Abstract

Optimum conditions for enzymatic hydrolysis of purified rapeseed (*Brassica napus* var. Youngsan) protein were investigated. Pronase showed higher activity in the hydrolysis of rapeseed protein than that of alcalase and neutrase. Preheated treatment of the rapeseed protein decreased the activity of pronase. The degree of hydrolysis of rapeseed protein was greater in distilled water than in phosphate buffer solution. Degree of hydrolysis was reached in steady state after 1 hr. Optimum conditions of the hydrolysis of the rapeseed protein were 40°C in reaction temperature, pH 8.0 in substrate solution, 1/100 (w/w) in the ratio of enzyme to substrate and 1% (w/v) in substrate concentration for pronase, respectively. At the optimum hydrolysis conditions, K_m value was 3.48% (w/v).

Key words : enzymatic hydrolysis, rapeseed protein, pronase

서 론

유채박단백질에는 대부분 유종실 단백질의 제한 아미노산인 methionine이 풍부하게 함유되어 있으며¹⁾, 아미노산 조성이 유종실 중 가장 우수한 단백질이라고 알려져 있다²⁾. 또한 식품학적 기능 면에서도 수분 및 유 흡수성, 에멀전특성, 점도 등에서 대두단백질보다 우수하고³⁾, 여러 종류의 식품을 제조할 수 있는 좋은 기능성을 지니고 있다. 이 등³⁾은 등전침전시킨 단백질 용액을 산세척하고 한외여과(100K Da.) 농축 처리하여 glucosinolate와 phytate를 충분히 제거할 수 있는 유채 단백질의 정제방법을 제시하였다. 그러나 단백질마다 원하는 기능성을 모두 갖춘 경우는 거의 없다. 따라서 여러 기능성 중 가장 유효한 특정한 기능성만을 원하

는 방향으로 도출시키는 기능성 개량 방법에 관한 연구가 활발히 행해지고 있다. 식품단백질의 기능성을 변형시키는 방법에는 물리적, 화학적 및 효소적 수식이 있다⁴⁾. 물리적 수식은 간단하고 저렴하여 산업화에 많이 이용되고 있으나 고도의 기능성 향상은 기대하기 어렵다. 화학적, 효소적 수식이 주로 사용되나 화학적 수식은 tryptophan, cysteine 등의 필수 아미노산의 손실, 또는 lysinoalanine 같은 독성물질의 생성 등의 위험성이 따르기 때문에⁵⁾ 효소적 수식이 주로 연구되고 있으며⁶⁾, 특히 단백효소를 이용하여 단백질의 기능성을 개량하려는 많은 연구가 시도되고 있다. 일반적으로 효소 반응은 효소 형태, 효소 농도, 온도, pH, 반응 시간 등의 반응속도 변수에 의해 영향받는데 대두단백질^{7,8)}, casein⁹⁾, 어피젤라틴¹⁰⁾ 등에 대해서는 많은 연구가 이루어지고 있으나, 국내 유채단백질을 기질로 한 효소수식에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 본 연구

[†]To whom all correspondence should be addressed

에서는 탈지유채박으로부터 이 등³⁾의 방법에 따라 추출, 정제하여 얻어진 유채단백질을 효소로 가수분해하기 위한 최적 조건에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

재료

제주도에서 생산량이 가장 많은 *Brassica napus*(Youngsan)종을 시중에서 구입하여 유채박분을 만들어 시료로 사용했다.

유채단백질의 제조

일반적인 단백질의 추출, 정제공정은 이 등³⁾의 방법에 따라 실시했다. 유채박 50g을 1% sodium hexametaphosphate(SHMP)용매 1 L에 넣어서 1시간 동안 1차 추출하고 원심분리(10,000 × g, 20분, 2°C)한 후 상등액을 얻었으며, 잔사는 다시 추출용매 500ml에 녹여서 30분 동안 2차 추출 후 원심분리하여 얻은 상등액을 1차 추출에서 얻은 상등액과 합하여 등침전시킨 후 단백질을 1회 산세척하고 이것을 증류수에 녹여 500ml로 만들고 중화한 후 한외여과(100K Da. cut-off) 농축처리한 것을 동결건조하였다.

가수분해 조건

가수분해의 최적 조건을 정하기 위해 효소, 용매, pH, 온도, 효소 농도, 기질 농도 등을 달리하고 일정시간 전탕반응 시킨 후 가수분해도를 측정하였다(Table 1).

효소의 선정 : 예비실험을 통하여 여러 종류의 단백효소를 검토하였으나 저가이면서 산업적으로 이용 가능한 pronase(Calbiochem., B grade, CA, USA), Al-

calase(Novo, 2.4AU/g, Denmark), neutrase(Novo, 1.5AU/g, Denmark)에 대하여 casein(Sigma Chemical Co.), egg albumin(Hayashi Pure Chemical Industries, Ltd., Japan) 및 유채단백질을 기질로 하여 기질에 대한 효소활성을 다음과 같이 측정하였다. 또한 기질에 대한 열변성 효과를 보기 위하여 가열처리한 것과 안한 것을 비교하였다. 기질 2g을 sodium azide 0.01%를 포함하는 0.01M sodium phosphate-citric acid 완충액(pH 7.0) 200ml에 녹이고 수조상에서 100°C, 30분간 가열 또는 그대로 용해시킨 용액 3ml를 시험관에 넣고 40°C의 수조상에서 10분간 평형을 유지한 후 효소와 기질의 비가 1 : 100(w/w)이 되도록 효소를 가하여 30분간 가수분해하였다. 가수분해물에 20% TCA 용액 3ml를 가하여 30분간 실온에서 방치한 후 Whatman No. 2 여과지를 사용하여 여과하고 이 상등액을 280nm에서 흡광도를 측정하여 효소 활성을 다음과 같은 식에 의하여 계산하였다¹⁾.

$$\text{Units/mg enzyme} = \frac{(\text{Sample A}_{280} - \text{Control A}_{280}) \times 1000}{30 \text{ min} \times \text{mg Enzyme}}$$

용매 및 pH : 완충액과 증류수의 차이점을 보기 위하여 유채단백질 2g을 200ml의 0.01M sodium phosphate-citric acid(pH 7.0) 또는 증류수에 녹여 효소와 기질의 비를 1:100(w/w)이 되도록하고 40°C에서 30분간격으로 반응시간을 달리하며 가수분해도를 측정하였고, pH는 증류수를 용매로 사용하여 pH를 달리하며 40°C에서 1시간 반응시켜 가수분해도를 측정하였다.

온도 및 효소의 열안정성 : 온도는 pH 8.0에서 5°C 간격으로 1시간 반응시킨 후 가수분해도를 측정하였다. 또한 회분식으로 장시간 반응시 효소의 열안정성을 측정하였다. 즉 반응기에 pronase 효소액(2mg/ml) 200ml를 가하여 40°C, pH 8.0으로 조절한 다음 반응기로부터 효소액을 시간별로 0.15ml를 분취하여 pH 8.0으로 조절된 1% 유채단백질 3ml와 혼합하여 30분 동안 실온에서 가수분해시킨 후 가수분해도를 측정하였다.

효소 및 기질 농도 : 효소 및 기질 농도의 최적 조건을 알아보기 위하여 증류수를 용매로 하여 pH 8.0, 40°C에서 효소와 기질의 비를 1:50, 1:100, 1:133, 1:200, 1:400(w/w)로 변화시키면서 1시간 반응시켜 가수분해도를 측정하였고, 기질 농도는 0.5%(w/v) 간격으로 기질 농도를 달리하여 1시간 반응시켜 가수분해도

Table 1. Reaction conditions for enzymatic hydrolysis of the rapeseed protein

Enzyme	Pronase, Alcalase, Neutrase
Solvents	Distilled water, phosphate buffer
pH	5.5, 6.5, 7.5, 8.0, 8.5, 9.5
Enzyme concentration (mg/ml)	2
Incubation temperature (°C)	25, 30, 35, 40, 45, 50, 55
[E] / [S] (w/w)	1/50, 1/100, 1/133, 1/200, 1/400
Substrate concentration (% w/v)	0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5

를 측정하였다.

가수분해도의 측정

유채단백질 용액에 효소를 넣어서 분해시킨 가수분해물 3ml를 95°C의 물중탕에서 5분간 열처리하여 효소를 불활성화시킨 다음 20% TCA용액 3ml를 가하여 실온에서 30분 방치시키고 원심분리(4,000rpm, 10분)한 후 상등액의 가용성 단백질량을 micro-biuret 방법으로 측정하였다¹²⁾. 가수분해도는 다음과 같이 나타내었다.

$$\text{가수분해도} = \frac{\text{가용성 단백질}}{\text{총단백질}} \times 100$$

이 때 가용성단백질은 10% TCA용액에 침전하지 않는 단백질로 하였다.

동역학 변수의 측정

유채단백질 용액(0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5%)에 효소와 기질의 비가 1 : 100 (w/w)이 되도록 효소를 가하여 pH 8.0, 40°C에서 10분간 가수분해시켜 효소활성을 측정하였다. 초기 반응속도는 분당 280nm에서의 흡광도의 증가로 나타내었고, Km은 초기 반응속도와 기질농도를 사용하여 Lineweaver-Burk plot를 작도하여 계산하였다¹³⁾.

결과 및 고찰

가수분해 효소의 선별

단백질 가수분해 효소 즉, pronase, alcalase, neutrase의 casein, 유채단백질, egg albumin에 대한 효소활성도는 Table 2에 나타내었다. 유채단백질의 가수분해 활성은 조사된 모든 효소에 대하여 casein보다는 낮았으나 egg albumin보다는 높았다. 효소별로는 pronase가 사용된 모든 기질단백질에 대해 가장 높은 활

성을 나타내었다. 또한 열처리된 기질단백질을 가수분해하였을 때 casein과 egg albumin에 대해서는 효소활성도가 증가되었다. 그러나 유채단백질인 경우에는 오히려 감소하여 열처리안된 유채단백질에 대하여 pronase의 활성도는 155units/mg이고 열처리된 경우는 98units/mg이었다. 따라서 유채단백질의 가수분해는 열처리를 안한 상태에서 pronase로 가수분해하였을 때가 최적이다. 일반적으로 열변성된 단백질은 가수분해효소와 친화력이 증가하여 가수분해도가 증가하는 것으로 보고되고 있으며¹⁴⁾, 대두단백질의 경우 pronase에 의한 가수분해에서 열처리된 단백질이 2배 이상 가수분해도가 증가하는 것으로 보고되고 있다¹⁵⁾. 그러나 pronase에 의한 유채단백질의 가수분해에서 pronase의 활성은 가열처리하지 않을 때가 60% 이상 증가하고 있다. 이는 유채단백질이 다른 단백질 즉 egg albumin 또는 casein과는 달리 저분자량단백질로 구성되어 있으며 정제과정에서 원래 함유하고 있을 것으로 예상되는 효소저해제가 제거되었기 때문이라고 볼 수 있다. 유채단백질을 가열처리하면 응집 현상이 관찰되었는데 이러한 유채단백질의 응집이 효소활성을 감소시킨 것으로 생각된다. 그러나 alcalase 및 neutrase로 가수분해할 경우에 열처리된 것이 약간 증가하는 결과에서 이는 유채단백질의 이화학적 특성이라기 보다는 pronase와 열변성된 유채단백질 사이에 관여하는 기질 특이성에 따른 것으로 생각할 수 있다.

용매 및 pH

유채단백질을 0.01M sodium phosphate-citric acid 완충액과 증류수에 각각 용해시키고 시간을 달리하여 가수분해한 결과는 Fig. 1과 같다. 가수분해 시간에 따른 가수분해도는 초기 1시간까지는 가수분해도가 급격히 증가한 반면 1시간 이후에는 거의 완만해지고 있는데 이러한 결과는 예비 실험을 통해서 본 가수분해 시간에 따른 pH 변화와 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다. 즉, 증류수를 용매로 한 가수분해에서 가수분

Table 2. Enzyme activities on the hydrolysis of unheated and preheated food proteins with commercial proteases

(Units/mg)

	Preheated			Unheated		
	Casein	Egg albumin	Rapeseed	Casein	Egg albumin	Rapeseed
Pronase	204	67	98	199	9.8	155
Alcalase	61	25	55	58	5.1	38
Neutrase	78	30	33	66	5.0	24

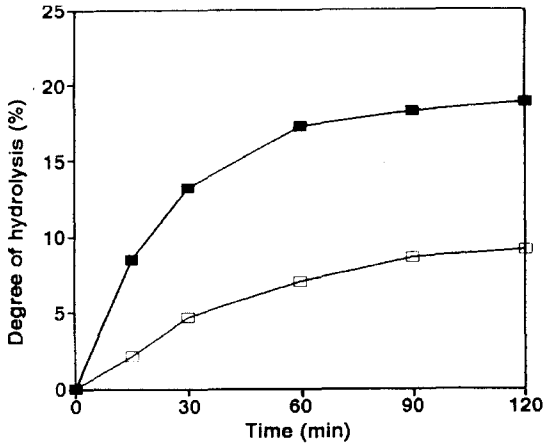


Fig. 1. Effect of solvents on the hydrolysis of rapeseed protein at 40°C, [E] = 2mg/ml, [E] / [S] = 1/100. (—■— distilled water —□— phosphate buffer)

해 시간의 증가와 더불어 1시간까지는 pH가 7.5에서 6.8까지 급격히 감소한 반면 1시간 이후에는 완만하였다. 용매에 따라서는 완충액보다는 증류수를 사용할 때가 최고 2배까지 높은 가수분해도를 나타내었다. 이는 pronase에 의한 유채단백질의 가수분해 과정에서 염류의 존재는 가수분해 반응에 저해요소로 작용한다고 볼 수 있다. 따라서 sodium phosphate-citric acid 완충액을 사용할 경우 가수분해 후에는 과잉의 염을 가수분해물로부터 제거하는 공정이 필요하므로 증류수를 용매로 사용하여 일정 pH를 유지하도록 하는 것이 산업적 이용을 위해서도 좋을 것으로 판단된다.

유채단백질을 pH를 달리하여 가수분해시킨 결과는 Fig. 2와 같다. Pronase는 최적 pH가 중성(pH 7.0)으로

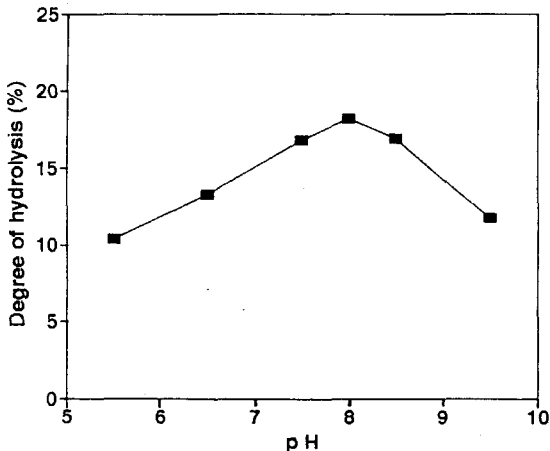


Fig. 2. Effect of pH on the hydrolysis of rapeseed protein at 40°C, [E] = 2mg/ml, [E] / [S] = 1/100.

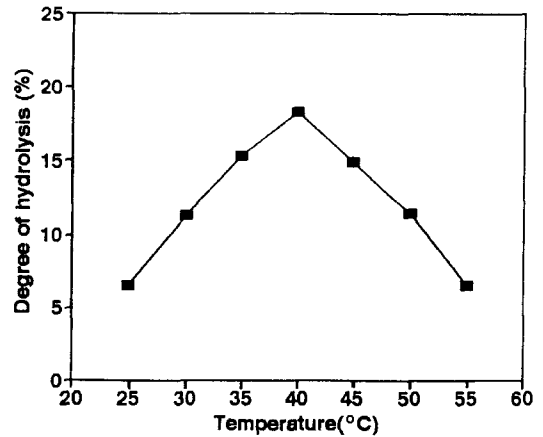


Fig. 3. Effect of temperature on the hydrolysis of rapeseed protein at pH 8.0, [E] = 2mg/ml, [E] / [S] = 1/100.

알려졌는데 유채단백질에서는 약알칼리성인 pH 8.0에서 최적이었다고 이것은 Dasslie와 Cheryan⁷⁾의 대두단백질에서의 최적 pH는 8.0이라고 보고한 것과 비슷한 결과이나 김 등¹⁰⁾의 대구피에서의 pH 6.0과는 차이를 나타내었다. 따라서 효소활성을 나타내는 pH값은 기질에 따라 다소 차이가 있는 것으로 보인다.

온도 및 효소의 열안정성

Fig. 3은 pH 8.0에서 온도를 달리하며 가수분해한 결과이다. 온도가 상승함에 따라 가수분해도는 증가하여 40°C에서 가장 높은 가수분해도를 나타내었고 그 이상에서는 감소하였다. 이것은 대두단백질에서의 Kang⁸⁾의 40°C와는 비슷하나 Dasslie와 Cheryan⁷⁾의

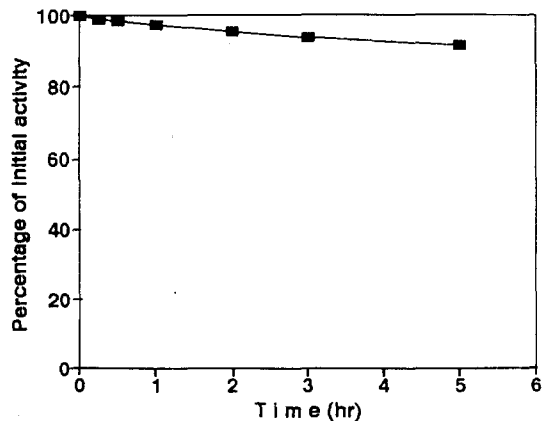


Fig. 4. Heat stability of pronase activity on rapeseed protein at 40°C.

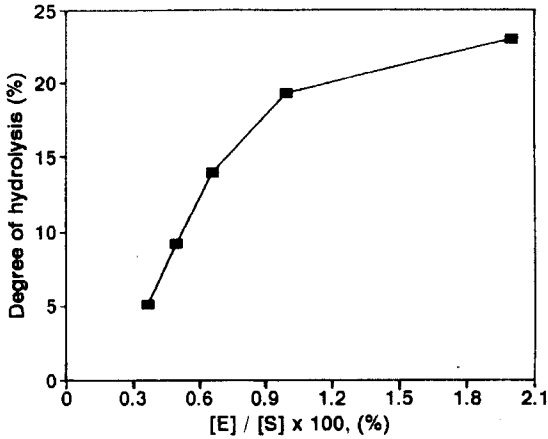


Fig. 5. Effect of enzyme concentration on the hydrolysis of rapeseed protein at 40°C, pH 8.0, [S] = 1% (w/v).

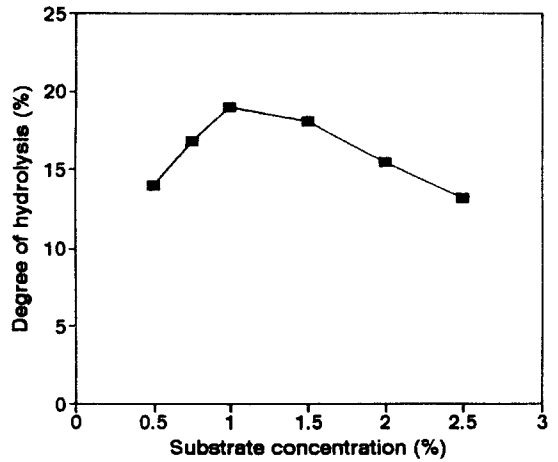


Fig. 6. Effect of substrate concentration on the hydrolysis of rapeseed protein at 40°C, pH 8.0, [E] = 2mg/ml, [E] / [S] = 1/100.

50°C, 대구피에서의 김 등¹⁰⁾의 50°C 보다는 낮은 온도를 얻었다.

회분식으로 장시간 반응시의 효소의 열안정성을 측정하기 위하여 pH 8.0, 40°C에서 시간변화에 따른 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 유채단백질의 pronase 가수분해에서 최적조건이라 생각되는 40°C에서는 시간의 변화에 따라 pronase 활성은 약간씩 감소하였으나, 3시간 이후는 거의 완만해졌으며 이때 효소활성은 92%를 나타내었다.

효소 농도 및 기질 농도

Pronase를 첨가한 유채단백질을 pH 8.0, 40°C에서 기질에 대한 pronase 첨가 비율을 달리하여 1시간 가수분해시킨 결과는 Fig. 5와 같다. Pronase 농도가 증가함에 따라 전체적으로 가수분해가 급격히 진행되어 기질량의 1%에 해당하는 pronase를 가할 때까지는 가수분해도가 현저히 증가되었으며 1% 이후에는 증가하는 pronase 양에 비하여 가수분해도가 그다지 증가하지 않았다. 따라서 경제성면에서도 효소 pronase와 유채단백질과의 비는 1 : 100이 적당하다고 판단된다.

pH 8.0, 40°C에서 기질의 첨가량을 달리하고 기질의 1%에 상당하는 pronase를 가하여 1시간 가수분해시킨 결과는 Fig. 6과 같다. 1% 기질 농도에서 최대의 가수분해도를 나타내었고 기질 농도가 증가함에 따라 가수분해도가 점차로 감소하였다. 1% 이상에서 가수분해도의 감소는 기질 자체가 저해제 역할을 하는 것으로 판단되는데, 이러한 기질 저해는 단백질 가수분

해에서 일반적으로 일어나는 현상이다.

동역학 변수의 측정

유채단백질의 기질 농도에 따른 초기 반응속도를 Fig. 7에 나타내었다. 초기 반응속도는 초기 10분 반응에서 거의 직선적으로 증가하였기 때문에 10분 반응시킨 후 280nm에서 흡광도를 측정하고 분당 흡광도의 증가로 나타내었으며 기질 농도가 증가할수록 급속히 증가하여 기질 농도가 1.5%(w/v)일 때 최고 속도를 나타내었다. 이후 기질 농도의 증가와 더불어 차츰 감소하는 경향을 나타내었다.

이 자료를 바탕으로 Fig. 8에 Lineweaver-Burk plot를

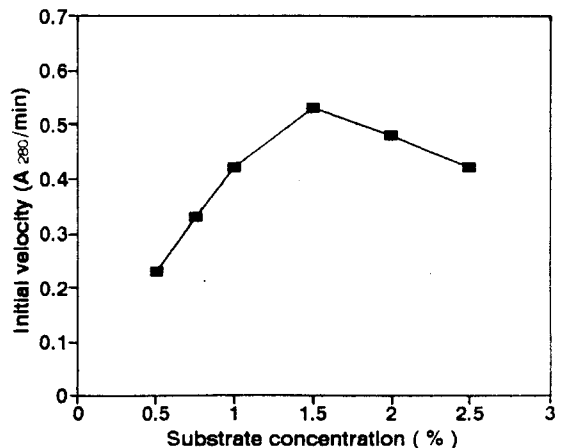


Fig. 7. Initial velocity on the hydrolysis of rapeseed protein at 40°C, pH 8.0, [E] / [S] = 1/100.

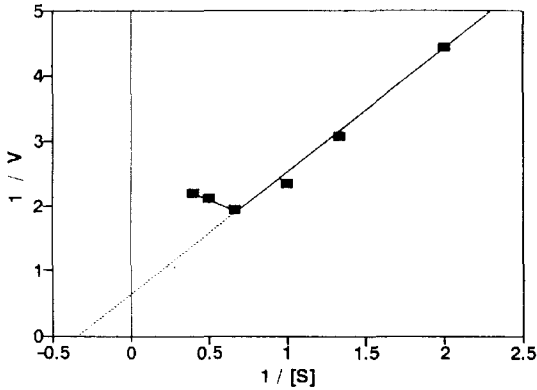


Fig. 8. Lineweaver-Burk plot on the hydrolysis of rapeseed protein.

[S], concentration of rapeseed protein (%); V, hydrolysis velocity (increase of A₂₈₀ / min).

나타내었다. 여기서 Km은 3.48%(w/v)를 얻었는데, 이것은 pronase를 첨가한 casein⁹⁾ 1.67%, 대두단백질⁷⁾ 0.75%, 대구피¹⁰⁾ 1.01% 보다는 높다. Km의 낮은 값은 기질에 대한 효소의 친화력이 높음을 나타내는데 유채단백질은 casein, 대두단백질, 대구피보다는 pronase에 대한 친화력이 낮은 것으로 판단된다.

요 약

탈지유채박(*Brassica napus* var. Youngsan)으로부터 추출, 정제하여 얻어진 유채단백질을 효소로 가수분해하기 위한 최적조건에 대하여 검토하였다. Pronase가 유채단백질에서 alcalase, neutrase보다 높은 활성을 나타내었고, 유채단백질의 가열처리는 pronase의 활성을 감소시켰다. 또한 유채단백질의 가수분해도는 완충액 보다는 증류수에서 더 높은 결과를 얻었다. 시간별로는 1시간까지는 급속히 반응이 일어나나 그 이후는 완만해졌다. Pronase에 의한 유채단백질의 가수분해 최적조건은 40°C와 pH 8.0이었고 효소 대 기질의 비와 기질 농도는 각각 1/100(w/w), 1%(w/v)이었다. 이와 같은 조건하에서 Km은 3.48%(w/v)를 얻었다.

문 헌

1. El Nocrashy, A. S., Kiewitt, M., Mangold, H. K. and Mukhejee, K. D. : Nutritive value of rapeseed meals and rapeseed protein isolate. *Nutr. Metab.*, **19**, 145 (1975)
2. Sosulski, F. W., Humbert, E. S., Bui, K. and Jones, J. D. : Functional properties of rapeseed flour concentrates and isolate. *J. Food Sci.*, **41**, 1349(1979)
3. 이장순, 강동섭, 강영주 : 유채박 단백질의 추출 및 정제에 관한 연구. *한국식품과학회지*, **22**, 780(1990)
4. Pour-El, A. : Protein functionality : Classification, definition and methodology. In "Protein functionality in foods" Cherry, J. P. (ed.), ACS Sym. Ser. 147. Amer. Chem. Soc., Washington, D. C., p.1(1981)
5. Desslie, W. D. and Cheryan, M. : Enzyme modified proteins : A new generation of functional food ingredients. *Illinois Res.*, **21**, 10(1979)
6. Shukla, T. P. : Chemical modification of food proteins. In "Food protein deterioration", Cherry, J. P. (ed.), ACS Sym. Ser. 206., Amer. Chem. Soc., Washington, D. C., p.275(1982)
7. Desslie, W. D. and Cheryan, M. : Continuous enzymatic modification of proteins in an ultrafiltration reactor. *J. Food Sci.*, **46**, 1035(1981)
8. Kang, Y. J. : Enzymatic modification of soy proteins: Effect of functional properties of soy isolate upon proteolytic hydrolysis. *Kor. J. Food Sci. Tech.*, **19**, 211 (1984)
9. Bliss, F. M. and Hultin, H. O. : Enzyme inactivation by an immobilized protease in a plug flow reactor. *J. Food Sci.*, **42**, 425(1977)
10. 김세권, 양현필, 이승호 : 어피의 효소적 가수분해물을 이용한 천연 조미료의 개발. *한국생물공학회지*, **6**, 327(1991)
11. Cunningham, S. D. : Enzymatic modification of cottonseed proteins. *Ph. D. Dissertation*, Texas A & M Univ., College Station, TX(1977)
12. Itzhaki, R. E. and Gill, D. M. : A micro-biuret method for estimating proteins. *Anal. Biochem.*, **9**, 401(1964)
13. Lineweaver, H. and Burk, D. : The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658(1934)
14. Alder-Nissen, J. : Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 1090 (1976)

(1992년 6월 22일 접수)