

효소종류에 따른 대두단백, 카제인, 글루텐, 젤라틴 단백질 가수분해물의 쓴맛과 용해도 특성

김 미 령

신라대학교 바이오식품소재학과

Bitterness and Solubility of Soy Protein, Casein, Gluten, and Gelatin Hydrolysates Treated with Various Enzymes

Mi-Ryung Kim

Dept. of Bio-Food Materials, Silla University, Busan 617-736, Korea

Abstract

To develop commercially available food protein hydrolysates, the effects of different types of enzymes and substrates on bitterness and solubility of partially hydrolyzed food proteins were investigated. Four types of proteins (casein, isolated soy protein (ISP), wheat gluten, and gelatin) and five types of proteolytic enzymes (a microbial alkaline protease (alcalase), a microbial neutral protease (neutrase), papain, bromelain, trypsin) were used. To profile the pattern of hydrolysis, the degree of hydrolysis (DH) were monitored during 180 min of reaction time by pH-stat method. Casein showed the highest susceptibility to hydrolysis for all five proteases compared to those of ISP, gluten, and gelatin. In addition, the bitter intensity and solubility (nitrogen soluble index, NSI) of each protein hydrolysate were compared at DH 10%. Bitterness and solubility of protein hydrolysates were highly affected by DH and the types of enzymes and substrates. At DH=10%, casein hydrolysate by trypsin, ISP and gluten hydrolysates by either bromelain or neutrase, and gelatin hydrolysates by the five proteases tested in this study were highly soluble and less bitter.

Key words: protein hydrolysates, protease, degree of hydrolysis, bitterness, solubility

서 론

단백질은 20여 개의 아미노산들이 펩타이드 결합을 통해 고분자 물질을 이루고 있으며, 다양한 기능성과 필수아미노산의 공급원으로서 식생활에 있어 매우 중요한 역할을 수행하고 있다. 최근 식품산업에서는 이러한 단백질의 가수분해로 얻어지는 아미노산 및 저분자의 펩타이드들이 가지는 가공상의 여러 기능성(용해성, 표면소수성, 유화능, 거품형성능 등)(1,2) 및 생리활성(항암, 항알레르기, 혈압강하, 혈소판응집저해, 칼슘의 체내흡수증진, 소화기능 개선 등)(3-6)이 알려지면서, 단백질 가수분해물을 산업적으로 이용하기 위한 대량 생산에 대한 관심이 집중되고 있다.

일반적으로 단백질의 이용도 증가를 위한 가수분해는 물리적, 화학적 또는 효소적 처리방법에 의해 수행될 수 있다. 이러한 방법 중 산, 알칼리 등에 의한 화학적 가수분해 방법이 주로 이용되어 왔지만, 반응공정에서 생기는 과량의 염생성의 문제(7), 이미 이취의 발생, 함황 아미노산의 손실, 비단백 물질과의 반응, 알칼리 가수분해 시 lysinoalanin 등

의 독성물질의 생성(8), 아미노산의 racemization(9), 단백질 분자의 cross-linking에 의한 소화저해(10) 등의 문제점이 대두되었다. 특히 고농도의 산 가수분해물 시에는 원료 단백질에 포함된 소량의 지방질이 염산과 반응하여 인체에 독성을 가진 것으로 알려진 MCPD(3-chloro-1,2-propanediol)와 DCP(1,3-dichloro-2-propanal)를 생성하게 되어 그 안전성 문제가 대두되기도 하였다(11,12). 이에 반해 효소적 가수분해는 단백질의 영양가는 유지하면서 용해도 증가 및 다양한 기능성 증진에 기여하며(13-15), 그 자체로도 안전성이 부여되는 큰 장점을 가지고 있다(16). 그러나 효소적 가수분해는 고농도의 반응이 어렵고 완전한 가수분해가 이루어지지 않아 단백질 수율이 낮으며, 특히 쓴맛이 생성되는 단점을 가지고 있다.

이에 Fujimaki들은 단백질 가수분해 시 같은 기질이라도 사용되는 효소의 종류에 따라 그 쓴맛 정도가 상이하며, 효소의 선택에 따른 쓴맛 정도가 약한 가수분해물을 제조할 수 있음을 보고하였으며(17), Alder-Nissen은 DH(degree of hydrolysis)의 개념을 이용하여 쓴맛이 형성되기 시작한

다고 보고된 5~10% 정도의 DH에서 가수분해를 종결시켜 쓴맛이 적고 기능이 좋은 단백질 가수분해물을 제조하였다(18). 또한 Lin과 Lee(19)는 효소 가수분해도를 조절하여 회분 함량이 낮은 가수분해물을 제조하였으며, Hong 등(20)은 약산으로 전 처리하여 용해성을 증가시킨 뒤 계속하여 효소가수분해를 통해 용해성이 높고 쓴맛이 낮은 가수분해물을 보고하였다.

단백질 가수분해물의 쓴맛은, 구형 단백질 분자 내에서 소수성 결합에 의해 안으로 감추어져 있던 소수성 아미노산기들이 가수분해에 의해 노출되면서 미뢰와 반응하여 형성되는 것으로 알려져 있다(17,18,21-25). 또한 단백질 가수분해 효소는 단백질 기질에 대한 기질 특이성으로 인해 다양한 형태의 가수분해 산물을 생산할 수 있다. 따라서 쓴맛을 내는 소수성 아미노산기들이 노출되지 않을 정도의 가수분해도를 조절하고 단백질 종류를 달리하여 각종 효소에 대한 가수분해도를 조절한다면 용해성이 높고 쓴맛이 약한 가수분해물을 생산할 수 있게 될 것이다.

본 연구에서는 다양한 기능적 특성을 가지는 단백질 가수분해물의 개발을 위해 casein, 대두분리단백(ISP), wheat gluten, gelatin 등 4종류의 대표적인 동물성 및 식물성 단백질을 대상으로 alcalase, bromelain, neutrase, papain, trypsin 등 상업적으로 활용되고 있는 단백질 가수분해 효소를 이용하여 각 단백질 종류에 따른 효소들의 가수분해 특성을 조사하고, 단백질 기질과 효소의 조합에 의해 생성된 가수분해물의 용해성과 쓴맛에 대해 비교하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용된 단백질은 분리대두단백질(ISP 630 Ralston Purina Co., St. Louis, MO, USA), casein milk (Junsei chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan), wheat gluten (Shany, Sungnam, Korea), gelatin(Shinyo pure chemicals Co. Ltd., Osaka, Japan)을 이용하였다. 효소는 alcalase (Novo Industri, Bagsvaerd, Denmark, serin protease from *Bacillus licheniformis*, activity: 2.4 Anson units/g), bromelain(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, cystein protease from pineapple stem, activity: 1870 units/g solid), papain(Sigma Chemical Co., crude type II, cystein protease from papaya latex, activity: 2.4 BAEE unit/mg solid), neutrase(Novo Industri, metalloprotease from *Bacillus amylo-liquefacience*, activity: 0.5 Anson units/g), trypsin(Sigma Chemical Co., crude type II, serine protease from porcine pancreas, activity: 1130 BAEE unit/m solid)의 5가지 단백질 가수분해 효소를 사용하였다(Table 1).

단백질 가수분해 조건

각 단백질 용액은 6% 수용액으로 제조하였으며, ISP와

wheat gluten인 경우는 거품이 형성되지 않도록 조금씩 물을 첨가하면서 현탁액을 제조하였다. Casein은 1 N NaOH를 사용하여 pH 6.5로 조정하여 가용화하였으며, gelatin의 경우는 가열하여 완전히 투명한 용액으로 제조한 후 50°C로 식힌 후 사용하였다. 각각의 단백질 함량은 Kjeldahl법에 따라 측정하였고, 각 단백질의 수분함량을 고려하여 용액을 제조하였다. 50°C water bath에 10분간 담가두어 열적 평형에 도달하게 하였고, 1 N NaOH를 이용하여 pH 6.5로 조절하였다. 180분 동안 효소 가수분해 반응을 진행시켜 각 단백질에 대해 시간에 따른 효소의 가수분해도를 확인하였으며, 시간을 조정하여 각 단백질의 가수분해도(degree of hydrolysis, DH)를 10%로 조절하여 가수분해물을 제조하였다. 각 가수분해물은 2,000×g에서 20분간 원심분리 하여 그 상등액을 실험에 이용하였다(26,27).

단백분해효소 처리

Alcalase와 neutrase는 증류수로 10%(w/w)가 되도록 희석하여 사용하였고, papain, bromelain, trypsin은 100 mL의 증류수에 녹여 사용하였다. 효소 첨가 전에 단백질 용액을 water bath에서 50°C에 도달하도록 하였고, 각 효소는 기질의 농도에 대한 효소의 역가(activity)가 일정하도록 효소량을 조절(20 AU/kg protein)하여 첨가하였다. 효소반응 끝난 후 효소의 불활성화는 끓는 물에 20분간 가열 처리하여 종결시켰다.

가수분해도의 결정

pH-stat법(28)에 의한 가수분해도는 TITERLAB 91 (Radiometer International Co. Ltd., Copenhagen, Denmark)을 사용하여 측정하였다. 단백질 용액이 담긴 반응조속의 온도가 50°C에 도달하면 1 N NaOH용액을 이용하여 단백질 용액을 pH 6.5로 조절하였다. 효소 용액이 첨가되어 반응이 진행되면, pH meter sensor가 pH 변화를 감지하여, AUTOBURETTE ABU91에 연결된 1 N NaOH용액이 반응속도와 같은 속도로 적정되면서 pH가 일정하게 유지된다. 여기서의 NaOH 소모량이 시간의 함수로서 기록되어 다음과 같은 식으로 DH가 계산되었다(29).

$$\begin{aligned} \text{DH} (\%) &= \frac{\text{가수분해 과정 중 분해된 펩타이드 결합수}}{\text{단백질 총 펩타이드 결합수}} \times 100 \\ &= \frac{h}{ht} \times 100 = B \times nb \times \frac{h}{MP} \times \frac{1}{a} \times \frac{1}{ht} \times 100 \end{aligned}$$

단백질 가수분해도(DH)는 단백질 총 펩타이드 결합수(ht)에 대한 가수분해 과정 중 분해된 펩타이드 결합수(h)의 백분율로 정의된다. h는 hydrolysis equivalent이며, ht와 함께 단백질 g당 milli-equivalent peptide bond(meq/g protein)로 표시된다. ht는 아미노산 조성에서 계산될 수 있는데, 아미노산 잔기의 평균 분자량이 약 125/mole이므로 대부분의 단백질의 경우 ht는 8 meq/g protein 정도가 된다. 정확히는 casein 8.2, ISP 7.8, gluten 8.3, gelatin 11.1(meq/g pro-

tein)로 측정되었다. B는 소모된 염기량(mL), Nb는 적정 염기 용액의 노르말 농도, a는 아미노기의 해리도, MP는 단백질 무게(g)로 정의된다(30).

단백질 가수분해물의 용해도 측정

용해도 측정은 다음 식에 따라 수용성 질소지수(NSI: nitrogen solubility index)를 구하여 비교하였다(31). 가수분해물의 15 mL을 취하여 증류수를 가하여 30 mL가 되도록 하였으며, 1분간 충분히 혼든 후, 2000×g에서 10분간 원심분리 하여 그 상등액을 취하였다. 가수분해물 및 가수분해물의 상등액 중의 질소 함량은 Kjeldahl 방법으로 측정하였다(32).

$$NSI (\%) = \frac{\text{가수분해물의 상등액 중의 질소 함량}}{\text{가수분해물의 총 질소 함량}} \times 100$$

관능검사

반응이 끝난 각 가수분해물들의 상등액을 모아 단백질과 효소 종류별 쓴맛에 대한 관능 검사를 행하였다. 표준 용액으로 Quinine-HCl의 농도별 용액을 사용하였으며, scoring test를 통해 쓴맛 정도를 비교하였다(26). Quinine-HCl의 농도는 $0.08 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-4}$ M로 농도별 10단계로 조절하여 비슷한 정도의 쓴맛을 내는 표준용액을 찾으려 하였다. 이때 너무 강도가 큰 쓴맛의 경우를 감안하여 각 용액을 2배 희석

하여 비교하였으며, 각 쓴맛은 Quinine-HCl equivalent (Q-HCl eq.)로 표시하였다. 관능검사는 고려대학교 식품공학과 대학원생 6명을 관능검사 요원으로 선발하여 쓴맛에 대한 강도 훈련을 충분히 시킨 후 실시하였다.

결과 및 고찰

4종류 단백질의 가수분해도 비교

Casein, 분리대두 단백질(ISP), wheat gluten, gelatin 등 4종류의 단백질에서 각 단백질 가수분해효소(alcalase, bromelain, neutrase, papain, trypsin)의 종류에 따른 가수분해도를 반응시간의 경과에 따라 비교하였다(Fig. 1). 대부분의 가수분해 반응은 초기 30분 이내에 빠른 가수분해 속도를 나타내었으며, 그 후 완만하고 계속적인 가수분해 양상을 나타내었다. 이러한 전반적인 단백질 가수분해 속도 변화는 가수분해 중 효소와 분해산물간의 높은 친화성으로, 가수분해 되지 않은 단백질의 가수분해가 점점 저해되어 나타나며, 가수분해 모니터링 과정 시 첨가된 염기에 의한 수소 결합 등의 작용으로 효소의 활성이 떨어짐에 의해서도 그 원인을 찾을 수 있을 것이다(33).

180분 반응 후의 가수분해도는 3.6%(trypsin 처리 wheat

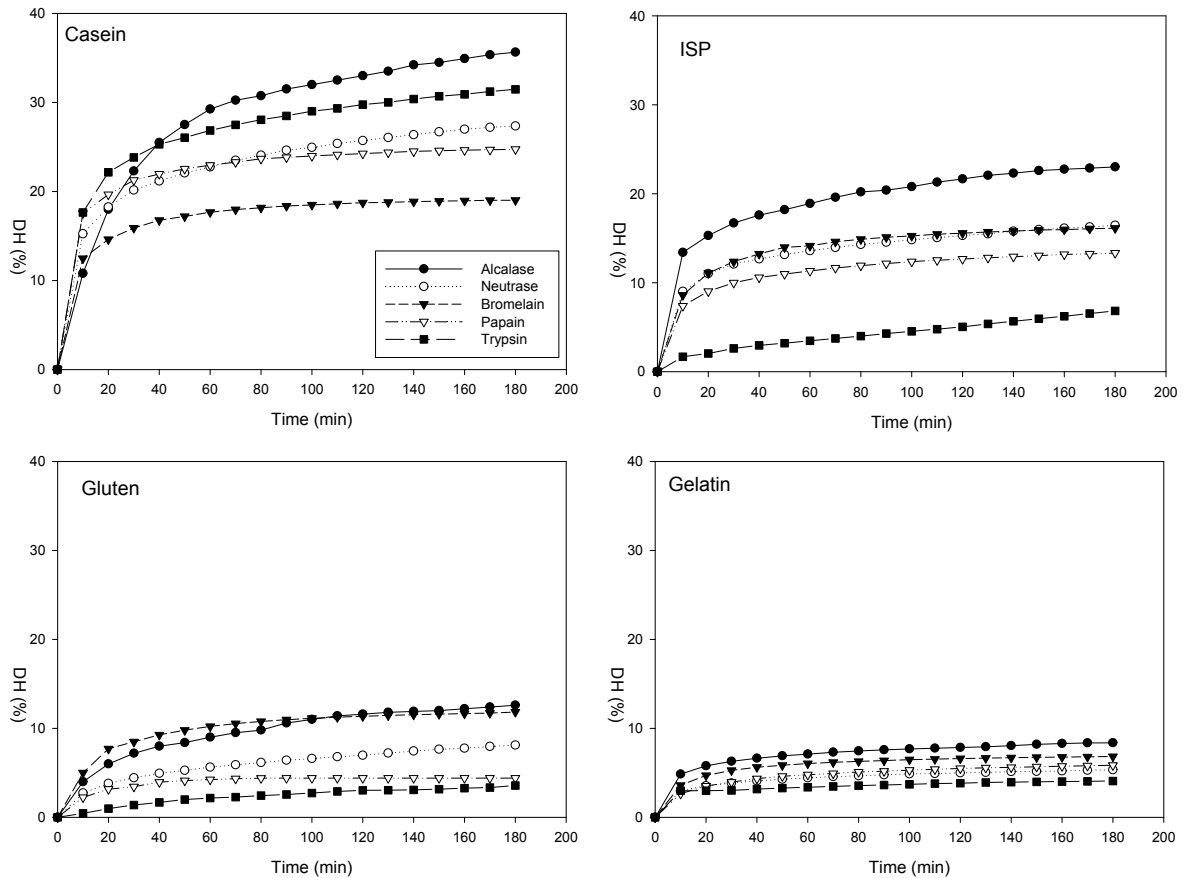


Fig. 1. Enzymatic hydrolysis patterns of casein, ISP, wheat gluten, and gelatin treated with different proteases at 20 AU/kg protein of enzyme/substrate ratio, 50°C, pH 6.5 and 6% substrate concentration by pH-stat method.

gluten 가수분해물)에서 35.64%(alcalase 처리 casein 가수분해물)로 다양한 값을 나타내었다. 각 단백질 종류에 따른 가수분해도는 casein의 경우에 대부분의 효소에서 가장 가수분해도가 높았으며, ISP, wheat gluten, gelatin의 순서를 보였다. Casein의 경우, 24.74%(papain)~35.64%(alcalase) 범위의 가수분해도를 나타내었으며, ISP에서는 6.83%(trypsin)~23.01%(alcalase), wheat gluten은 3.56%(trypsin)~12.6%(alcalase), gelatin은 4.07%(trypsin)~8.37%(alcalase)의 가수분해도를 보였다.

이 결과에서 같은 효소를 사용하였지만 단백질 종류에 따라 가수분해의 정도는 최고 10배까지 차이가 나타남을 알 수 있었다. 특히 casein의 가수분해도는 매우 높았으며, 이 결과 casein이 다른 단백질들에 비해 효소에 대한 반응성이 매우 크다는 것을 알 수 있었다. Casein은 peptide 내에 많은 수의 proline을 가지고 있으며 분자 내부에 disulfide bridge를 가지지 않아서 대부분 단백질 3차 구조를 이루고 있는 것으로 알려져 있다(34). 이러한 구조적 유연성 때문에 본 실험에서 사용된 모든 효소에 대단히 민감하게 반응한 것으로 사료된다. 효소들에 대한 반응성은 casein, ISP, gluten, gelatin의 순서로 나타났다.

4종류의 단백질에서 효소 종류에 의해 가수분해도 비교

실험에 사용된 각 효소의 특성은 Table 1에 나타내었다. 각 효소의 최적 pH는 대체로 6~8 범위에 있으며 최종 산물의 염 생성량을 최소로 하기 위하여 각 단백질 용액의 초기 pH에 가장 근접하는 pH 6.5를 선택하였다. 효소 종류에 따른 casein의 가수분해도는 alcalase에서 35.64%, trypsin 31.47%, neutrase 27.36%, papain 24.74%, bromelain 19.01%의 순서로 나타났다. Casein에 대해 특히 alcalase와 trypsin의 가수분해도가 높은 결과를 보였다. ISP의 경우에는 alcalase 23.01%, neutrase 16.44%, bromelain 16.11%, papain 13.33%, trypsin 6.83%의 가수분해도를 보였다. Wheat gluten의 180분 후의 가수분해도는 alcalase 12.60%, bromelain 11.83%, neutrase 8.11%, papain 4.40%, trypsin 3.57%의 순서로, gelatin은 alcalase 8.37%, bromelain 6.83%, papain 5.84%, neutrase 5.33%, trypsin 4.07%의 순서를 나타내었다.

모든 단백질에서 alcalase의 가수분해도는 가장 높았으며, neutrase, bromelain, papain의 가수분해도는 비슷한 정도를 보였다. 그러나 trypsin의 경우는, casein에서의 가수분해도

는 31.47%로 매우 높았지만, ISP에서는 6.83%에 불과하였다. 이 결과는 ISP에 포함된 trypsin inhibitor의 영향으로 생각된다. 그 외 wheat gluten과 gelatin에서도 trypsin의 가수분해도는 각 단백질에서 가장 낮은 정도를 나타내었다. 이는 아마도 trypsin 가수분해 최적 온도 조건인 37°C보다 다소 높은 50°C에서 반응이 진행되었기 때문일 것이다.

Shin 등(35)의 연구에 의하면 탈지유에 대한 3시간 효소 가수분해 반응 결과 trypsin이 neutrase에 비해 높은 가수분해도를 나타내었으며, 이는 trypsin이 우유 단백질에 많이 함유되어 있는 lysine과 arginine의 carboxyl group을 연결하는 peptide bond에 강한 특이성을 가지고 있으므로 다른 분해효소보다 가수분해도가 높기 때문이라고 보고하였다(36). Li 등(37)의 참치 tuns spleen에서 분리한 protease 연구에서는 casein-alcalase 비교 실험 결과가 본 연구와 일치함을 확인할 수 있었다.

이와 같은 결과에서 효소의 가수분해도는 단백질 기질에 따라 크게 달라짐을 알 수 있었으며, 같은 기질에서도 효소 종류에 따라 가수분해도에서 많은 차이가 있음을 볼 수 있었다. 이는 단백질의 구조적인 민감성(susceptibility)과 효소의 특이 기질에 대한 반응성의 차이로 생긴다고 볼 수 있다. Kato 등(38)은 α -chymotrypsin과 trypsin의 각 단백질에 대한 반응 속도를 구하여 반응 속도와 단백질 구조의 관계를 규명하였으며, 단백질에 대한 효소의 민감성은 단백질의 구조에 의한다고 보고하였다.

효소 종류에 따른 각 단백질 가수분해물의 용해도 비교

각 단백질 가수분해물의 용해도는 수용성 단백질의 수율 측면에서 매우 중요한 가치를 가진다고 할 수 있다. 앞의 결과(Fig. 1)에서 효소별 각 단백질의 가수분해 패턴을 이용하여, 단백질 내의 소수성 잔기가 노출되기 직전으로 알려진 DH 10%에서 가수분해를 종결하고 그 가수분해물의 용해도를 NSI로 측정하였다. Fig. 2는 4종류의 단백질 가수분해물의 효소별 용해도를 pH 6.5에서 비교한 결과이다. 각 단백질의 가수분해 이전의 NSI는 gelatin 99.8%, casein 52.67%로 매우 높았으며, gelatin의 경우 콜라겐의 전처리 단계에서 이미 수용화 과정을 거쳤으며, casein의 경우도 알칼리 용액을 가하여 가용화 과정이 포함되었다. ISP와 gluten은 각각 22.32%, 4.6%로 그 용해성이 낮은 단백질로 분산형태나 펄이스트 상태로 가수분해 되었다.

효소 가수분해 후의 용해도는 각 단백질 종류의 특성에

Table 1. Characteristics of the proteolytic enzymes

Enzyme	Optimum pH	Optimum temp. (°C)	Specificity	Activity (AU/g) ¹⁾
Alcalase	6~10	50~60	Broad (especially hydrophobic-COOH)	2.4
Bromelain	5~8	50~60	Broad (especially Lys-, Arg-, Phe-, Tyr-COOH)	1.37
Papain	5~9	55~65	Broad (especially Phe-COOH)	2.07
Neutrase	5.5~7.5	45~55	Broad (especially Leu-, Phe-HN ₂)	0.5
Trypsin	7~9	37	Lys-, Arg-COOH	2.58

¹⁾AU: Anson Unit (42).

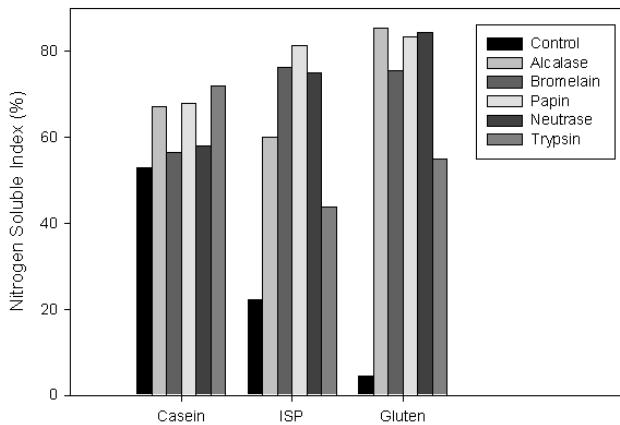


Fig. 2. Solubility of casein, ISP, and wheat gluten hydrolysates treated with different proteases at DH 10%.

따라 차이가 나타났으며, DH 6%까지의 gelatin NSI는 99.8% 정도로 단백질 분해 효소에 관계없이 거의가 가용성이었다(data not shown). Casein의 경우 원래 52.67%의 NSI에서 alcalase, papain, trypsin 가수분해물이 약 70% 정도, bromelain과 neutrase 가수분해물 약 55~60%로 그 증가율이 그다지 높지 않았다. Monti와 Jost(36)는 trypsin, papain, neutrase의 효소를 이용한 열변성 치즈 단백질의 용해성 연구에서 이와 비슷한 결과를 보고하였다. NSI 22.32%의 ISP는 papain, bromelain, neutrase 가수분해물의 경우 용해도가 약 80%였으며, alcalase 60%, trypsin 43.7% 정도로 가용화 부분의 많은 양이 증가하였다. Gluten은 4.6%의 용해성으로 거의 불용성인 단백질로서 가수분해에 의해 가장 높은 용해도를 나타내었다. alcalase 처리 가수분해물이 85.5%, neutrase 84.4%, papain 83.3%, bromelain 75.5%였다. 그러나 trypsin 처리군은 55%에 불과하였다. Kong 등(39)은 wheat gluten의 효소가수분해물의 기능적 특성연구 결과에서, pH 6.5의 조건에서 alcalase와 trypsin 가수분해물이 DH 10%에서 약 70%에 이르는 용해도를 확인하고 본 연구 결과와 비슷한 경향을 보고하였다.

효소 종류에 따른 각 단백질 가수분해물의 쓴맛 비교

단백질내의 소수성 잔기가 노출되기 직전으로 알려진 가수분해도(DH 10%)를 기준으로, 각 단백질에서 효소별 동일한 가수분해도로 가수분해 시켰을 때, 효소에 따른 가수분해물들의 쓴맛이 Fig. 3에서 비교되었다. 원래 쓰지 않던 대부분의 단백질이 가수분해로 최소감미농도(recognition threshold: 2.4×10^{-5} M Q-HCl eq.) 이상의 쓴맛을 나타내었다. 전체적으로 casein 가수분해물의 쓴맛 정도는 매우 강하였으며, gluten 가수분해물은 쓴맛 정도가 약하였다.

Casein 가수분해물의 쓴맛 정도는 $4.65 \sim 9.12 \times 10^{-5}$ M Q-HCl eq. 정도로 매우 쓴 정도를 나타내었다. 특히 papain의 경우 가장 큰 쓴맛을 나타내었으며(9.12×10^{-5} M Q-HCl eq.), alcalase(8×10^{-5} M Q-HCl eq.), neutrase(7.34×10^{-5} M

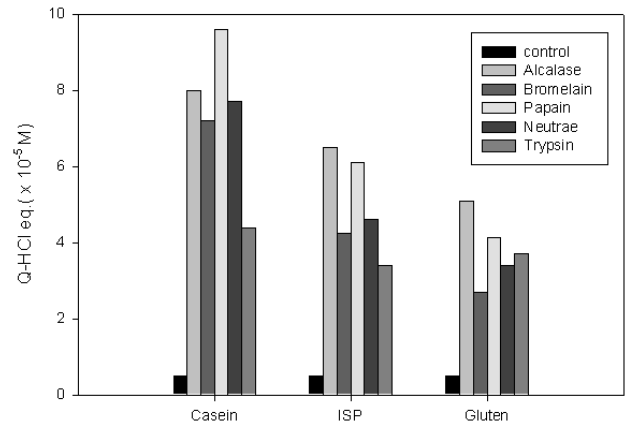


Fig. 3. Bitterness of casein, ISP, and wheat gluten hydrolysates hydrolyzed with different proteases to DH 10%.

Q-HCl eq.), bromelain(6.88×10^{-5} M Q-HCl eq.)으로 처리하였을 때도 비교적 매우 강한 쓴맛을 나타내었다. 그러나 이에 비해 trypsin 가수분해물은 쓴맛 정도가 최소감미농도 이상이었던, 쓴맛 정도가 비교적 약하였다(4.54×10^{-5} M Q-HCl eq.). 용해도 결과와 비교 시 trypsin 가수분해물은 casein에 있어 쓴맛이 약하고 용해도가 높아 가장 적당한 가수분해물로 판단되었다.

ISP의 경우는 alcalase와 papain 처리에서 가장 쓴맛 정도가 강하였고(각각 6.16×10^{-5} M, 6×10^{-5} M Q-HCl eq.), neutrase, bromelain(각각 4.25×10^{-5} M, 4.60×10^{-5} M Q-HCl eq.) 순이었다. 특히 bromelain과 neutrase의 경우는 쓴맛이 그리 강하지 않는 반면, 용해성은 높아서 쓴맛이 적고 용해성은 높은 우수한 효소 반응을 나타내었다.

Gluten의 경우는 alcalase와 papain에서 쓴맛 정도가 높았으며(각각 4.62×10^{-5} M, 4.14×10^{-5} M Q-HCl eq.), 다른 단백질과는 달리 trypsin 가수분해물(2.8×10^{-5} M Q-HCl eq.)이 bromelain, neutrase와 비슷한 쓴맛 정도(각각 2.4×10^{-5} M, 2.74×10^{-5} M Q-HCl eq.)를 나타내었다. 특히 bromelain과 neutrase 가수분해물은 거의 쓴맛을 나타내지 않았으며, 용해성이 우수한 단백질 가수분해물이었다. Gelatin은 앞서 가수분해 패턴 비교에서와 같이, DH 10%까지 이르지 못하므로 최고 수준의 DH 6% 수준에서 행해졌으며, 그 결과 모든 효소 가수분해물의 쓴맛은 최소감미농도 이하였다.

이 결과는 효소에 의한 가수분해도의 조절과 효소종류의 선별을 통해 쓴맛 정도를 조절할 수 있음을 잘 보여주고 있다. Adler-Nissen(30)은 DH를 조절함으로써 쓴맛을 조절할 수 있음을 보고하였고 Sullivan 등(40)도 치즈의 쓴맛 연구에서 분해 효소의 활성을 조절함으로써 쓴맛 정도를 통제할 수 있음을 보고하였다.

단백질 가수분해물의 쓴맛

단백질 농도와 쓴맛의 관계에서, 각 단백질은 같은 정도로 가수분해 되었지만 단백질 함량 측정 결과는 서로 상이하였

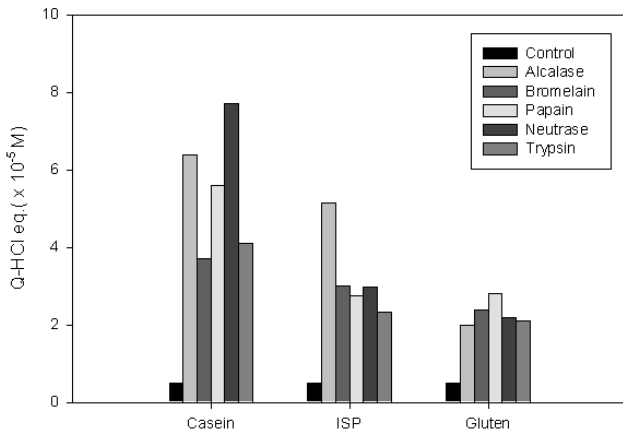


Fig. 4. Bitterness at 0.5% concentration of casein, ISP, and wheat gluten hydrolysates hydrolyzed with different proteases to DH 10%.

으므로 같은 농도에서 쓴맛을 비교할 필요가 있었다. 단백질 가수분해도가 같다는 것은 가수분해된 평균 펩타이드의 크기가 비슷하다는 의미이며, 단백질 농도가 일정하다는 의미는 아니다. 따라서 각 단백질 가수분해물의 농도를 같은 0.5%로 조절하여 관능검사를 행하였다(Fig. 4).

0.5% 단백질 농도에서의 관능검사는 원래 농도보다 낮은 농도에서 행하게 되므로 쓴맛 정도가 전체적으로 떨어지는 경향을 나타내었다. Casein의 경우 여전히 쓴맛 정도는 강하였지만 전체적으로 쓴맛 정도가 낮아졌다. 특히 bromelain 가수분해물은 쓴맛 정도가 절반 수준으로 감소하였다(3.54×10^{-5} M Q-HCl eq.). 반면 trypsin 가수분해물에서의 쓴맛 정도는 거의 변화가 없었다(4.65×10^{-5} M Q-HCl eq.).

ISP의 경우는 가장 강한 쓴맛 정도를 나타내었던 alcalase 가수분해물의 쓴맛 정도는 약간 감소하였지만, 쓴맛의 정도가 비교적 강하여 alcalase와 비슷한 정도의 쓴맛을 나타내었던 papain 가수분해물의 쓴맛 정도는 인지되지 않았으며 나머지 bromelain, neutrase 가수분해물들도 최소감미량 이하였다(각각 1.6×10^{-5} M Q-HCl eq.). 그러나 trypsin 가수분해물의 쓴맛은 거의 변화가 없었다(3.4×10^{-5} M Q-HCl eq.). 대두단백질의 bromelain 가수분해물은 특히 혈압강화 효과가 높다고 보고되고 있다(41).

Gluten의 경우는 모든 효소 가수분해물이 거의 최소감미농도 수준으로 감소하는 결과를 보였다. Casein과 ISP에서 강한 쓴맛을 생성한 alcalase는 gluten 가수분해물에서는 그 농도가 감소함에 따라 급격히 쓴맛 정도가 감소하여 최소감미농도 수준으로 거의 쓰지 않는 결과를 나타내었다.

이러한 결과에서 casein은 alcalase와 neutrase에 의해, ISP는 alcalase, trypsin에 의해, 농도에 관계없이 강한 쓴맛을 나타내어 가수분해 반응 후 생성된 펩타이드의 조성에서 그 쓴맛이 지배되는 것으로 예측되었다. 반면, gluten의 경우는 alcalase와 neutrase에 의한 펩타이드의 생성이 쓴맛에서 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이는 단백질 종류

별 구조적 차이에 의한 것으로 사료된다. 즉 단백질 N-말단의 소수성 부분의 절단에 관여하는 alcalase 및 neutrase의 경우 casein과 ISP에서 소수성 잔기가 많이 노출된 소수성 펩타이드를 생성하며, 따라서 쓴맛의 정도도 증가할 것이다. 반대로 gluten의 경우, 단백질 구조적 특성상, 노출되는 소수성 부위가 그다지 많지 않는 펩타이드가 생성되어 쓴맛이 강하지 않는 것으로 사료된다. Casein, ISP, gluten 3종류의 단백질에서 papain과 bromelain 가수분해물의 약한 쓴맛의 정도는 가수분해물의 농도에 의한 효과로 나타났다. 즉 쓴맛의 강도가 약한 펩타이드는 함량이 높은 경우 쓰고 그 농도가 감소 시에는 쓴맛의 정도도 감소하는 것으로 생각된다. trypsin의 경우는 특이하게도 모든 단백질에서 그다지 강한 쓴맛을 나타내지는 않았지만, 단백질 농도가 감소하여도 쓴맛의 정도가 감소하지 않고 비슷한 정도로 유지되었다. 즉 농도에 상관없이, alcalase에 의해 생성된 쓴맛 펩타이드보다는 약하지만 다소 강한 쓴맛 펩타이드의 존재를 가지고 있음을 나타낸다.

이러한 결과에서, 단백질 가수분해물은 단백질 1차 구조(아미노산 서열)의 특성과 혹은 동일 농도, 동일 기질에서 효소의 기질 특이성에 의해 다른 특성을 나타냄을 알 수 있었다. 즉, 소수성 부위가 큰 단백질에서 소수성 펩타이드를 주로 가수분해하는 효소에 의해 생성된 가수분해물은 같은 농도에서 강한 쓴맛을 나타내었고, 소수성 부위가 작은 단백질에서 주로 친수성 결합부위를 가수분해하는 가수분해물들의 쓴맛은 비교적 약하였다. 따라서 가수분해도를 조절하여 일정한 크기의 펩타이드를 생성하되, 용해성이 높으면서, 소수성 부위의 노출 정도가 심하지 않도록 단백질 기질과 효소를 조합한다면 쓴맛이 약한 단백질 가수분해물을 생산할 수 있을 것이다.

요 약

다양한 기능적 특성을 가지는 단백질 가수분해물의 개발을 위하여, casein, ISP, wheat gluten, gelatin의 4종류 단백질 기질을 alcalase, bromelain, papain, neutrase, trypsin 등의 효소를 이용하여 가수분해물을 제조하였다. 각 단백질에 대한 효소 분해과정을 확인하기 위하여 pH-stat 방법을 이용하여 시간에 따른 단백질 가수분해도(DH)를 측정하였고, 단백질 종류와 효소 종류에 의한 쓴맛 정도와 단백질 가수분해물의 용해성을 검토하고자 DH 10%에서 가수분해를 종결짓고, pH 6.5에서 각각의 용해성과 쓴맛을 NSI(nitrogen soluble index) 측정과 관능검사로 비교하였다. 시간에 따른 가수분해도는 단백질에 따라 다양하게 나타났으며, Casein, ISP, wheat gluten, gelatin의 순으로 높게 나타났다. 모든 단백질에서 alcalase의 가수분해도가 가장 높았으며, neutrase, bromelain, papain의 가수분해도는 비슷한 정도를 보였다. 그러나 trypsin의 경우는 casein에서는 매우 높았지만,

ISP에서는 가장 낮았다. DH 10%에서 casein은 trypsin 가수분해물이, ISP와 gluten은 bromelain과 neutrase 가수분해물이, gelatin의 경우 사용된 모든 효소 가수분해물이 쓴맛이 약하고 용해도가 높아 좋은 기질-효소 조합으로 선택될 수 있었다. 따라서 쓴맛이 적고 용해도가 높은 단백질 가수분해물은 가수분해도의 조절과 단백질과 효소 조합의 선택, 단백질 가수분해물의 농도 조절 등으로 얻을 수 있었다.

문헌

- Sosulski FW, McCleary CW, Soliman FS. 1972. Diffusion extraction of chlorogenic acid from sunflower kernels. *J Food Sci* 37: 253-256.
- Lee CH. 1992. Application and development of protein resource. *Food and Industry* 25: 93-95.
- Ariyoshi Y. 1993. Angiotensin converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trends Food Sci Technol* 4: 139-144.
- Yamamoto N. 1997. Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Biopolymers* 43: 129-134.
- Mesli H. 1997. Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: potential nutraceutical for food pharmaceutical applications. *Livest Prod Sci* 50: 125-138.
- Son YS, Kwon TW. 2000. Hypocholesterolemic effect of soybean and soy products. *Food Industry and Nutrition* 5: 36-41.
- Deeslie WD, Cheryan M. 1981. Continuous enzymatic modification of protein in an ultrafiltration reactor. *J Food Sci* 46: 1035-1042.
- Finley JW, Wheeler EL, Walker Jr HG, Finlayson AJ. 1982. Effect of cystine oxidation on lysinolalanine formation in proteins. *J Agric Food Chem* 30: 818-820.
- DeGroot AP, Slump P. 1969. Effects of severe alkali treatment of proteins on amino acid composition and nutritive value. *J Nutr* 98: 45-56.
- Provencal MMP, Cug JLL, Cheftel JC. 1975. Chemical and nutritional modification of sunflower proteins due to alkaline processing. Formation of amino acids crosslinks and isomerization of lysine residue. *J Agric Food Chem* 23: 938-943.
- Velisek J, Davidek T, Davidek J, Hamburg A. 1991. 3-chloro-1,2-propanediol derived amino alcohol in protein hydrolysates. *J Food Sci* 56: 136-138.
- Davidek T, Davidek J, Velisek J, Kubelka V, Viden I. 1991. 3-chloro-1,2-propanediol derived amino alcohol in protein hydrolysates. *J Food Sci* 56: 139-142.
- Roland JF, Mattis DL, Kiang S, Alm WL. 1978. Hydrophobic chromatography: debittering protein hydrolysates. *J Food Sci* 43: 1491-1493.
- Lee CH, Kim SK. 1987. Effects of protein hydrophobicity on the surfactant properties of food proteins. *Food Hydro-colloid* 1: 283-289.
- Adler-Nissen J. 1976. Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *J Agric Food Chem* 24: 1090-1093.
- Lee CH, Kim CS, Lee SP. 1984. Studies on the enzymatic partial hydrolysis of soybean protein isolates. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 16: 135-141.
- Fujimaki M, Kato H, Arai S, Tamaki E. 1968. Applying proteolytic enzymes on soybean I. Proteolytic enzyme treatment of soybean protein and its effect on the flavor. *Food Tech* 22: 68-77.
- Adler-Nissen J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J Agric Food Chem* 27: 1256-1262.
- Lin CF, Lee CR. 1987. Preparing protein for hydrolysis and product. *US Patent* 4,636,388.
- Hong YS, Lee CH, Lee KY. 1998. Effect of weak acid pretreatment on the enzymic hydrolysis against wheat gluten of high concentration. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 1110-1116.
- Murray TK, Baker BE. 1952. Studies on protein hydrolysis I. Preliminary bervation on the taste of enzymatic protein hydrolyzates. *J Sci Food Agric* 3: 470-475.
- Matoba T, Hata H. 1972. Relationship between bitterness of peptides and their chemical structures. *Agric Biol Chem* 36: 1423-1431.
- Fujimaki M, Kato M, Arai S, Tamaki E. 1970. Applying proteolytic enzymes on soybean 3. Diffusible bitter peptides and free amino acids in peptic hydrolyzates of soybean protein. *J Food Sci* 35: 215-218.
- Kirimura J, Shmizu A, Kimizuka A, Ninomiya T, Katsuya N. 1973. The contribution of peptides and amino acids to the taste of food stuffs. *J Agric Food Chem* 17: 689-695.
- Ney KH. 1973. Bitterness of peptide: amino acid composition and chain length. *ACS Symp Ser* 115: 149-173.
- Kim CH, Kim MR, Lee CH. 1992. Effect of type of enzyme on the bitterness of partial hydrolysates of soybean protein. *Foods and Biotechnol* 1: 79-84.
- Kim CH, Kim MR, Lee CH. 1997. The bitterness of the enzymatic hydrolysate of soybean protein and the amino acid composition of the UF filtrate. *Foods and Biotechnol* 6: 244-249.
- Jacobsen CF, Leonis J, Linderstrom-Lang K, Ottensen M. 1957. The pH-stat and its use in biochemistry. In *Method of Biochemical Analysis*. Interscience Publishers Inc., New York, USA. Vol 4, p 171-209.
- Adler-Nissen J. 1986. *Enzymatic hydrolysis of proteins food proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, London and New York. p 132.
- Adler-Nissen J. 1984. Control of the proteolytic reaction and of the level of bitterness in protein hydrolysis processes. *J Chem Tech Biotechnol* 24B: 215-222.
- AOAC. 1980. *Official methods of analysis*. 13th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA. Method 2.049.
- AACC. 1983. Approved methods of Analysis, Crude protein-Improved Kjeldahl Methods, American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, USA. Method 46-10.
- Stryer L. 1988. *Biochemistry*. 3rd ed. WH Freeman and Co., New York, USA. p 178-180.
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Casein>
- Shin HS, Kim SB, Lim JW. 2002. Comparative study of proteolytic activities of some commercial milk clotting enzymes on bovine skim. *J Animal Sci Technol* 44: 801-808.
- Monti JC, Jost R. 1978. Enzymatic solubilization of heat-denatured cheese whey protein. *J Dairy Sci* 61: 1233-1237.
- Li ZY, Youravong W, H-Kittikun A. 2010. Protein hydrolysis by protease isolated from tuna spleen by membrane filtration: comparative study with commercial protease. *LWT-Food Sci Technol* 43: 166-172.
- Kato A, Komatsu K, Fujimoto K. 1985. Relationship between surface functional properties and flexibility of proteins detected by the protease susceptibility. *J Agric Food Chem* 3: 931-934.
- Kong X, Zhou H, Qian H. 2006. Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. *Food*

- Chem* 101: 615-620.
40. Sullivan JJ, Lynette M, Rood JI, Jago GR. 1973. The enzymic degradation of bitter peptides by starter Streptococci. *Aust J Dairy Technol* 28: 20-26.
41. Suh HJ, Kim YS, Chung SH, Kim YS, Lee SD. 1996. Functionality and inhibitory effect of soybean hydrolysate on angiotensin converting enzyme. *Korean J Food & Nutr* 9: 167-175.
42. Novo Industri A/S. 1978. Anson hemoglobin method for determination of bacterial protease activity. AF 4.2/5, Novo Industri A/S, Bagsvaerd, Denmark.

(2010년 1월 14일 접수; 2010년 1월 22일 채택)