

## 분리 유채단백의 용해도와 소화율에 미치는 Phytate의 영향

조희경·윤재영\*·이서래  
이화여자대학교 식품영양학과

### Effect of Phytate on the Solubility and Digestibility of Rapeseed Protein Isolate

Hee-Kyung Cho, Jae-Young Yoon\* and Su-Rae Lee  
Department of Food & Nutrition, Ewha Woman's University

#### Abstract

This study was undertaken to investigate the effects of added phytate and pH on the solubility and *in vitro* digestibility of low-phytate rapeseed protein isolate. Phytate content of low-phytate rapeseed protein isolate was 1.5%, as a result of 66% removal from defatted rapeseed flour and the protein: phytate ratio was 58:1. Solubility of rapeseed protein isolate at pH 2.0 and pH 11.5 was much higher than near the isoelectric point, pH 5.0. its solubility was lowered by adding an increased amount of phytate especially at pH 2.0. The inhibitory effect of phytate toward pepsin digestibility of rapeseed protein isolate decreased by the increasing amount of phytate added. It is suggested that the production of low-phytate rapeseed protein isolate is necessary to improve the functionality and nutritional value in order to utilize it as food material.

Key words: phytate, rapeseed protein isolate, solubility, digestibility

#### 서 론

유채(油菜, rape, *Brassica napus* L.)는 신석기시대부터 인도와 중국에서 재배되어 온 유지자원으로서 유채씨(rapeseed)에는 약 40%의 지방질과 20~25%의 단백질이 함유되어 있어 식용유의 급원 뿐만 아니라 단백질 원으로 이용될 수도 있다. 그러나 유채씨에는 영양 저해 인자인 phytate, glucosinolate, erucic acid를 다량 함유하고 있어 식품으로의 직접 이용이 제한되어 왔으나 캐나다에서 1968년 erucic acid와 glucosinolate 함량이 매우 낮은 새로운 품종(canola)을 육종함으로써 식용유 자원으로서의 이용도가 높아졌다<sup>(1)</sup>.

탈지 유채분말(defatted rapeseed flour)은 lysine과 함황 아미노산이 많은 단백질을 40%나 함유하고 있어 식품재료로 이용될 수 있는데 이때 phytate는 단백질의 기능적 및 영양적인 측면에서 큰 문제가 된다<sup>(2)</sup>. 탈지 유채분말에는 5~6%의 phytate를 함유하고 있으며 다른 종자에서의 1~2%에 비해 그 함량이 비교적 많은 편이다. 대부분의 pH에서 (-) 전하를 띠우고 있는 phytate는 cation이나 단백질과 불용성 복합체를 형성하여 생리적 조건에서도 이들 성분의 bioavailability를 낮추며

유채종자에서 그의 제거가 용이하지 않다<sup>(3,4)</sup>.

최근 식품재료중 영양 저해 인자의 제거에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. 그 중 유채단백과 phytate에 관한 것으로 Serraino 등<sup>(5,6)</sup>은 추출용매와 pH를 조절하여 73~88%의 phytate를 제거할 수 있었고 발아에 의해 phytate 함량이 감소된다고 보고하였으며 Tzeng 등<sup>(7)</sup>은 ultrafiltration, diafiltration, ion exchange의 과정을 통해 phytate를 제거한 분리 유채단백을 제조하였다. 우리나라에서는 pH와 추출용매를 달리하였을 때의 phytate 제거효과에 관한 연구<sup>(8)</sup>가 있을 뿐이다.

일반적으로 phytate와 단백질의 복합체는 단백질 소화를 억제하는 것으로 알려져 있는데 국내에서 이에 관련된 것으로는 대두 단백질에 관한 연구<sup>(9)</sup>가 있을뿐 유채 단백질에 관련된 연구는 아직 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구는 phytate 함량이 적은 분리 유채단백을 제조하고 그의 용해도와 소화율에 미치는 pH 및 phytate 첨가의 영향을 살펴보고자 하였다.

#### 재료 및 방법

##### 실험재료

유채(*Brassica napus* L.) 종실은 1991년 7월 중순 제주도에서 수확한 것을 구입하였으며 낱알이 고른 것을 선별하여 잘 건조시킨 후 사용하였다. Bovine serum albumin, pepsin(porcine stomach mucosa), sodium phytate(옥수수에서 정제)는 미국 Sigma Chemical Co.에서

Corresponding author: Su-Rae Lee, Department of Food and Nutrition, Ewha Woman's University, Seodaemun-gu, Seoul 120-750, Korea

\*Present Address: Department of Food and Nutrition, Insan Junior College, Incheon, Korea

구입하였으며 기타 분석용 시약들은 특급 또는 일급시약을 사용하였다.

#### 유채시료의 제조

##### 탈지 유채분말(defatted rapeseed flour)

자동 제피기로 유채종실의 종피를 완전히 제거한 다음 분쇄기(HM-18000, 현주 전자)로 분쇄하고 Soxhlet 추출 장치에 의하여 에테르로 탈지하였다. 탈지한 후 다시 분쇄하여 35 mesh체를 통과시켜 탈지 유채분말 시료로 하였다.

##### 분리 유채단백(low-phytate rapeseed protein isolate)

pH에 따른 phytate와 단백질의 용해도 차이를 이용하여<sup>(8)</sup> 다음과 같이 제조하였다. 즉, 탈지 유채분말에 증류수를 1 : 10(w/v)의 비율로 가하여 실온에서 30분간 교반하고 1N NaOH로 pH를 11.5로 조절한 후 다시 한시간 동안 교반하였다. 이 분산액을 원심분리(4,000×g, 30분)하여 상정액을 모은 다음 pH를 5.0으로 조절하여 15분 교반한 후 생성되는 단백질 침전을 원심분리(4,000×g, 30분)하여 회수하였다. 이와 같이 얻어진 침전물은 pH 5.0으로 조절된 세척수로 3회 세척한 후 냉동건조시켰으며 건조된 시료는 25 mesh체를 통과시켜 사용시까지 냉동보관하였다.

#### 화학성분의 분석

수분함량은 상압 가열 건조법으로, 조단백질 함량은 Semimicro-Kjeldahl법으로, 그리고 조지방 함량은 Soxhlet 추출법으로 측정하였다.

시료중의 phytate 함량은 Wheeler 및 Ferrel에 의한 방법<sup>(10)</sup>을 변형하여 측정하였다. 가용성 단백질의 함량은 Lowry 등의 방법<sup>(11)</sup>에 따라 측정하였으며 기준 단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

#### 분리 유채단백의 용해도 측정

##### pH에 따른 용해도 측정

pH를 2.0, 5.0, 11.5로 조절한 증류수 30 ml에 분리 유채단백 0.6g을 넣어 충분히 분산시켰다. 이들 분산액의 pH를 다시 조절하여 1시간 동안 교반하고 원심분리(13,000×g, 30분)한 후 상정액을 취하여 가용성 단백질의 함량을 측정하였다.

##### Phytate 농도에 따른 용해도 측정

pH 2.0, 5.0, 11.5로 조절한 증류수 30 ml에 0.5g의 분리 유채단백을 넣고 pH를 다시 조절한 후 1시간 동안 교반하여 원심분리(13,000×g, 30분)하였다. 그 상정액을 취하여 첨가한 분리 유채단백 1g당 50, 100, 150 mg의 phytate를 각각 첨가한 후 다시 pH를 조절하여 20분 동안 교반하였다. 이것을 원심분리(13,000×g, 30분) 후 상정액을 취하여 단백질 함량을 측정하였다.

#### 분리 유채단백의 소화율 측정

Mauron 등의 pepsin에 의한 단백질 소화법<sup>(12)</sup>을 변

형하여 다음과 같이 측정하였다. 즉, 분리 유채단백 0.5 g에 6N HCl을 사용하여 pH 2.0으로 조절한 증류수 30 ml를 넣어 5분간 분산시킨 후 1 ml 증류수에 0, 25, 50, 75 mg의 sodium phytate를 각각 녹인 용액을 첨가하여 잘 혼합하고 pH 2.0으로 다시 조절하였다. 이 현탁액을 30분간 교반한 후 1 ml 증류수에 25 mg의 pepsin을 녹인 효소용액을 각각 첨가하였다. 1분간 흔들어서 분산시킨 후 투석관(dialysis tubing, M.W.>12,000)에 넣고 pH 2로 조절한 증류수 250 ml가 들어 있는 삼각플라스크에 넣었다. 이것을 37°C로 유지시킨 shaking water bath에서 24시간 동안 진탕하면서 pepsin에 의한 가수분해가 일어나도록 하였다. 1, 2, 4, 6, 8, 16, 24시간이 지난 후 투석외액을 각각 1 ml씩 취하여 Lowry 등의 방법으로 단백질 가수분해물의 농도를 측정하여 이 결과로부터 pepsin 소화율을 계산하였다.

한편, 4시간 후와 24시간 후에는 투석관 내액을 원심분리(13,000×g, 30분)하여 상정액을 보존하고 침전물은 pH 2.0으로 조절한 증류수로 3회 세척한 후 pH를 11.5로 조절한 증류수 2 ml에 녹였다. 이 용액의 pH를 11.5로 다시 조절하여 완전히 녹은 것을 확인하고 투석관에 넣어 pH 11.5로 조절한 5 l의 증류수에 대하여 24시간 동안 투석을 계속하였다. 투석 후 내액을 다시 원심분리(13,000×g, 30분)하여 상정액을 보존하였다. 상정액들은 Lowry 등의 방법에 따라 가용성 단백질의 함량을 측정하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 탈지 유채분말과 분리 유채단백의 화학성분

유채 종실(수분 5.8%, 조지방 42.6%, 조단백질 19.4%, phytate 3.0%)을 제피, 탈지하여 탈지 유채분말(defatted rapeseed flour)을 얻었고 이로부터 pH에 따른 단백질과 phytate의 용해도 차이를 이용하여 분리 유채단백(rapeseed protein isolate)을 제조하였으며 그들의 화학성분은 Table 1과 같다.

탈지 유채분말의 단백질 함량은 43.1%로서 이미 보고된 40~45%와 비슷한 수준이었으나<sup>(12)</sup> 탈지 대두분의 50~55% 보다는 낮았다<sup>(1)</sup>. 분리 유채단백의 단백질 함량은 86.7%로서 건물기준으로는 90.4%이었으며, 단백질

Table 1. Composition of defatted flour and protein isolate from rapeseed

Constituent	Defatted flour	Protein isolate
Moisture(%)	13.6	4.1
Crude protein(%)	43.1	86.7
Crude fat(%)	1.7	—
Phytate(%)	4.4	1.5
Carbohydrate & minerals by difference(%)	37.2	7.7
Protein: phytate ratio	10 : 1	58 : 1

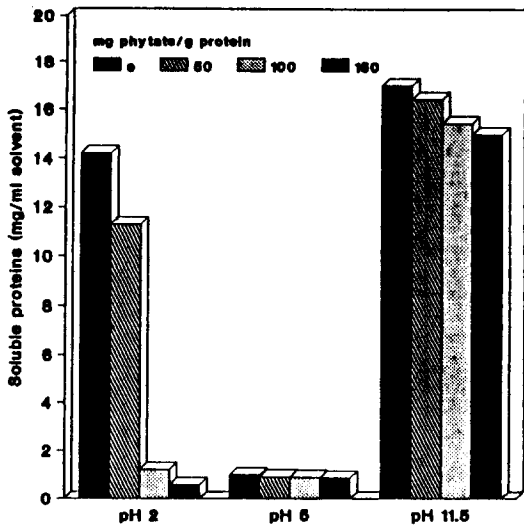


Fig. 1. Effect of pH and added phytate on the solubility of rapeseed protein isolate

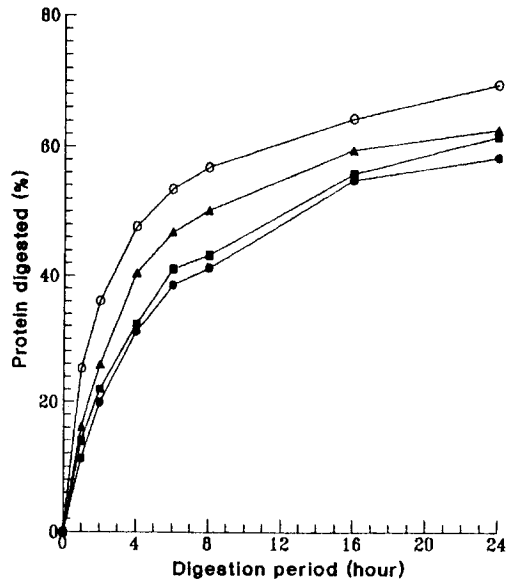


Fig. 2. Effect of phytate on the pepsin digestion of rapeseed protein isolate

함량이 90% 이상인 것을 분리 단백질(protein isolate)으로 취급하고 있으므로 본 실험에서의 제품은 분리 유채단백으로 간주할 수 있다.

탈지 유채분말의 phytate 함량은 4.4%로서 참깨박 5.2%, 들깨박 4.1%와는 비슷한 수준이나 대두박 1.4%, 땅콩박 1.7% 보다는 훨씬 많았다<sup>(13)</sup>. 분리 유채단백의 경우에는 1.5%로서 그 함량이 크게 감소하였다. 이 값은 Liu<sup>(2)</sup>가 pH 2.5에서 sodium hexametaphosphate로 추출한 분리 유채단백중의 1.3%와 비슷한 수준이었으며, Thompson 등<sup>(14)</sup>이 중류수로 pH 8.5에서 추출한 유채단백의 2.2% 보다는 낮았다. pH와 사용 용매에 따라 단백질과 phytate의 용해도가 달라진다는 허 등<sup>(8)</sup>의 연구결과로 미루어 볼 때 제품중 phytate 함량의 차이는 pH와 추출용매가 다르기 때문으로 생각된다. 본 실험에서는 탈지 유채분말에 존재하던 phytate의 2/3가 유채단백의 분리 과정중 제거되었다. 즉, pH 11.5에서는 phytate의 용해도가 낮고 단백질의 용해도가 높은 점을 이용하여 단백질을 추출해 낸 후 phytate의 용해도가 높고 단백질의 용해도가 낮은 pH 5.0에서 단백질을 침전시킴으로써 가능한 한 phytate의 함량이 낮은 제품을 얻을 수 있었다. 이 때 알칼리성인 pH 11.5에서 단백질은 매우 높은 음전하를 띠우게 되어 phytate와 단백질의 결합이 파괴되고 한편 phytate 성분은 낮은 용해도로 인하여 침전되어 결국에는 phytate 함량이 낮은 분리단백이 얻어지는 것으로 생각된다.

본 실험에서 탈지 유채분말로부터 얻어진 분리 유채단백의 수율(g solids rapeseed protein isolate/100g defatted rapeseed flour)은 8.5%로 나타났으며 이것을 순 단백질로 환산하면 17%의 회수율이 되는데 원심분리상의 문제로 인하여 수율이 매우 낮았던 것으로 생각된다.

Protein : phytate ratio는 탈지 유채분말과 분리 유채단백에서 각각 10 : 1 및 58 : 1로 나타났다. Serraino 등<sup>(5)</sup>의 결과인 7 : 1, 87 : 1과 비교할 때 phytate 제거율이 조금 낮은 수준을 나타냈는 바 그들의 실험에서는 phytase 처리 후 투석하여 분리 유채단백을 제조하였기 때문에 phytate 제거율이 더 높았던 것으로 생각된다.

#### 분리 유채단백의 용해도

단백질의 기능적 특성인 용해도를 pH와 phytate 첨가량을 달리하여 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. Phytate를 첨가하지 않고 pH 2.0, 5.0, 11.5의 영역에서 용해도를 측정된 결과 pH 5.0에서는 1 mg/ml의 용해도를 보여 가장 낮았으며 pH 2.0에서는 14 mg/ml, pH 11.5에서는 17 mg/ml의 용해도를 나타내었다. 단백질 추출시의 pH인 11.5에서는 많은 단백질이 용해되었으며 pH 5.0에서는 단백질이 거의 용해되지 않았다. 이와 같은 현상은 유채단백질의 등전점과 밀접한 관계가 있는 것으로 판단된다<sup>(7,8)</sup>.

Phytate 첨가량을 달리하였을 때 분리 유채단백의 용해도는 pH 5.0과 pH 11.5에서는 그 첨가량에 따른 변화가 미약하였으나 pH 2.0에서는 그 변화가 뚜렷하였다. 즉, pH 2.0에서의 용해도 측정시 50 mg phytate 첨가시에는 용해도 변화가 크지 않았으나 100 mg 이상에서는 용해도가 갑자기 감소하는 경향을 나타내었다. 한편 pH 11.5에서는 단백질과 phytate 분자가 모두 음전하를 띠우게 되므로 전기적 반발로 인하여 결합력이 떨어지게 되고, 따라서 불용성 침전을 형성하지 못하므로 phytate가 분산되어 있는 단백질에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

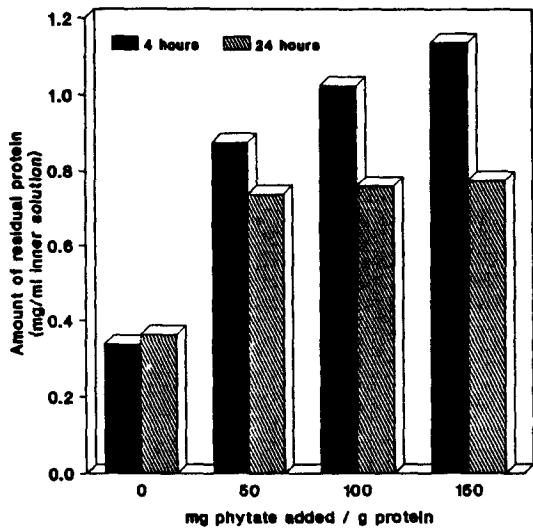


Fig. 3. Effect of phytate on the digestibility of soluble proteins inside the dialysis sack

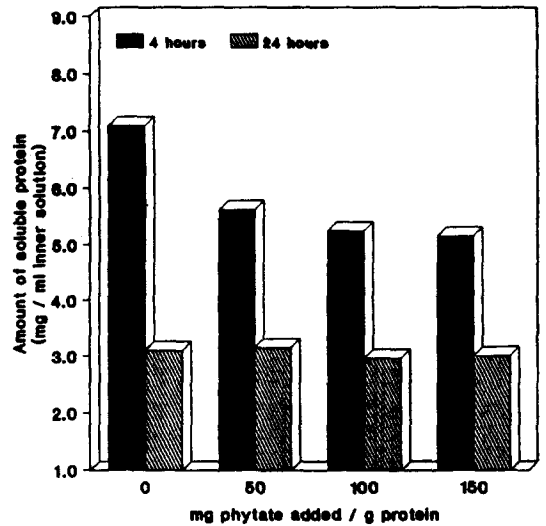


Fig. 4. Effect of phytate on the digestibility of precipitated proteins inside the dialysis sack

분리 유채단백의 소화율에 미치는 phytate의 영향

분리 유채단백을 pepsin으로 소화시킬 때 투석막을 통과한 외액중의 분해산물 농도를 측정할 결과로부터 계산한 소화율에 대하여 phytate가 미치는 영향을 보면 Fig. 2와 같다.

첨가된 phytate 양이 증가할수록 유채 단백질의 소화율은 감소하였는데 그 영향은 소화시간의 초기(1시간)에 가장 크게 나타났고 소화시간이 길어짐에 따라 그 영향은 적게 나타났다. 한시간 경과 후의 소화율을 phytate 무첨가군과 비교하여 보면 단백질 1g당 phytate 첨가량이 50 mg의 경우는 36%, 100 mg의 경우는 45%, 150 mg의 경우는 56% 감소한 것으로 나타났다. 이 차이는 소화시간이 연장되면서 점차 작아지는 경향을 보여 24시간 후에는 각각 10, 12, 16%만 감소하여 이들간에는 큰 차이를 나타내지 않았으나 phytate 무첨가군에 비해서는 소화율이 역시 떨어지는 것을 알 수 있었다.

평균 소화율로 볼 때 단백질 1g당 100, 150 mg phytate 첨가군은 phytate 무첨가군에 비하여 30% 정도 감소하였으며 50 mg phytate 첨가군은 17% 정도 떨어졌다.

Carnovale 등<sup>(15)</sup>은 faba bean과 pea의 단백질을 소화시킬 때 phytate 함량을 증가시키면 소화율이 감소된다고 하였고, 분리 대두단백의 소화율에 관한 연구<sup>(16)</sup>에서 정제되지 않은 단백질보다는 phytate나 phenolics의 함량을 감소시킨 분리 단백질이 더 잘 소화되었으며 Knuckles 등<sup>(17)</sup>도 높은 phytate 수준에서 casein과 bovine serum albumin의 소화율이 각각 14, 7%씩 감소된다고 보고하였다. 이러한 실험결과는 phytate가 단백질과 불용성 복합체를 형성함으로써 효소작용이 저해되므로 phytate가 단백질 소화에 부정적으로 작용한다는 것을 말해주는 것이다.

본 실험에서도 역시 phytate의 첨가로 인하여 단백질이 불용성 복합체를 형성하여 단백질형태의 변화가 일어나므로 효소적 분해가 어려워진 것으로 생각된다. 즉, phytate 첨가량이 증가하면 불용성 복합체의 형성이 많아지게 되고 결국 소화율은 떨어지게 된다. 그러나 시간이 경과되면 느린 속도이지만 복합체에도 효소가 작용하므로 24시간 경과 후에는 그 차이가 줄어드는 것으로 생각된다.

분리 유채단백을 pepsin으로 4시간과 24시간 소화시킨 후에 투석되지 못하고 남아있는 투석막 내액을 원심분리하여 상징액과 침전으로 분리한 다음 이들을 분석하였다.

투석막 내액의 상징액에 존재하는 분자량 12,000 이상으로 추정되는 수용성 단백질의 농도는 Fig. 3과 같다. Phytate 무첨가군의 단백질 함량이 phytate 첨가군에 비하여 4시간 경과 후에는 25~35% 더 많았으나 24시간 소화 후에는 그 함량이 거의 비슷한 수준을 나타내었다. 즉, 불용성 침전을 형성하지 않은 수용성 단백질은 일정시간 동안 거의 비슷하게 효소작용을 받아 분해되어 가는 것으로 생각된다.

투석내액 중의 침전물은 다시 pH를 11.5로 조절하여 완전히 녹인 후 투석하여 유리된 phytate를 제거시킨 다음 단백질 농도를 분석한 결과는 Fig. 4와 같다. 즉, 침전된 단백질 함량은 phytate 첨가량이 증가할수록 많아졌으며 이것은 단백질이 phytate와 불용성 복합체를 형성한다는 사실을 말해준다. 그리고 4시간 소화 후에 비하여 24시간이 지난 후의 단백질 함량이 더 감소한 것을 알 수 있었는데 이는 느리기는 하지만 불용성 복합체에도 효소가 작용하는 것으로 생각할 수 있다. 그

러나 인체내에서의 소화시간을 고려한다면 역시 단백질과 phytate와의 복합체는 소화되지 않는다고 보아도 좋을 것이다.

## 요 약

식물성 식품중의 영양 저해 인자로 알려진 phytate를 제거한 분리 유채단백(low-phytate rapeseed protein isolate)을 제조하여 pH 및 phytate 첨가량이 이들 분리 유채단백의 용해성과 소화율에 미치는 영향을 살펴보았다.

분리 유채단백의 phytate 함량은 1.5%로서 탈지 유채분말보다 66%가 감소되었으며 protein : phytate ratio는 58 : 1이었다. 분리 유채단백의 용해도는 pH 2.0과 pH 11.5에서는 매우 높았으나 pH 5.0에서는 매우 낮았다. 그 용해도에 미치는 phytate 첨가량의 영향을 보면 pH 5.0과 pH 11.5에서는 별 차이가 없었으나 pH 2.0에서는 phytate 첨가량이 많을수록 그 용해도가 감소하였다. 분리 유채단백의 pepsin 소화율에 미치는 phytate의 저해적 영향은 phytate 함량이 증가할수록 더 커졌다. 소화기간 초기에는 그 영향이 매우 컸으나 소화시간이 길어짐에 따라 그 영향은 점점 감소되었으며 평균소화율은 24%가 감소하였다.

따라서 유채단백을 식품소재로 이용하기 위해서는 phytate 함량이 낮은 제품을 제조함으로써 그의 기능성과 영양가를 향상시킬 수 있을 것이다.

## 문 헌

1. Daun, J.K.: Composition and use of canola seed, oil, and meal. *Cereal Foods World*, **29**, 291(1984)
2. Liu, R.F.K., Thompson, L.U. and Jones, J.D.: Yield and nutritive value of rapeseed protein concentrate. *J. Food Sci.*, **47**, 977(1982)
3. Serraino, M.R., Thompson, L.U., Savoie, L. and Parent, G.: Effect of phytic acid on the *in-vitro* rate of digestibility of rapeseed protein and amino acids. *J. Food Sci.*, **50**, 1689(1985)
4. Reddy, N.R. and Salunkhe, D.K.: Interactions between phytate, protein, and minerals in whey fractions of

- black gram. *J. Food Sci.*, **46**, 564(1981)
5. Serraino, M.R. and Thompson, L.U.: Removal of phytic acid and protein-phytic acid interactions in rapeseed. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 38(1984)
6. Thompson, L.U. and Serraino, M.R.: Effect of germination on phytic acid, protein and fat content of rapeseed. *J. Food Sci.*, **50**, 1200(1985)
7. Tzeng, Y., Diosady, L.L. and Rubin, L.J.: Preparation of rapeseed protein isolate by sodium hexametaphosphate extraction, ultrafiltration, diafiltration, and ion-exchange. *J. Food Sci.*, **53**, 1537(1988)
8. 허채옥, 양차범: 한국산 평지 종실 단백질의 phytate 제거에 관한 연구. 제 1보. 평지 종실 단백질과 phytate의 용해도에 대한 pH와 염류의 영향. *한국농화학회지*, **29**, 212(1986)
9. 조희환, 윤재영, 이서래: 분리 대두단백의 용해도와 소화율에 미치는 phytate의 영향. *한국식품과학회지*, **23**, 286(1991)
10. Wheeler, E.L. and Ferrel, R.E.: A method for phytic acid determination in wheat and wheat fractions. *Cereal Chem.*, **48**, 312(1971)
11. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 256(1951)
12. Mauron, J., Mattu, F., Bujard, E. and Egli, R.H.: The availability of lysine, methionine and tryptophan in condensed milk and milk powder. *in vitro* digestion studies. *Arch. Biochem. Biophys.*, **59**, 433(1955)
13. Cheryan, M.: Phytic acid interactions in food systems. *CRC Critical Review Food Sci. Nutr.*, **13**, 297(1980)
14. 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)
15. Carnovale, E., Lugaro, E. and Lombardi-boccia, C.: Phytic acid in faba bean and pea: Effect on protein availability. *Cereal Chem.*, **65**, 114(1988)
16. Ritter, M.A., Morr, C.V. and Thomas, R.L.: *In vitro* digestibility of phytate-reduced and phenolics-reduced soy protein isolates. *J. Food Sci.*, **52**, 325(1987)
17. Knuckles, B.E., Kuzmicky, D.D. and Betschart, A.A.: Effect of phytate and partially hydrolyzed phytate on *in vitro* protein digestibility. *J. Food Sci.*, **50**, 1080(1985)

(1992년 2월 29일 접수)