

碩士學位論文

油菜蛋白質의 酵素에 의한 加水分解  
및 機能性 變化에 관한 研究

濟州大學校 大學院

食品工學科



제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

金 忠 熙

1992年 6月

油菜蛋白質의 酵素에 의한 加水分解  
및 機能性 變化에 관한 研究

指導教授 姜 永 周

金 忠 熙

이 論文을 工學碩士學位 論文으로 提出함.

1992年 6月

金忠熙의 工學碩士學位 論文을 認准함.

審査委員長 金 在 河  
委 員 高 榮 煥  
委 員 姜 永 周

濟州大學校 大學院


1992年 6月

---

A Study on Enzymatic Hydrolysis and  
Functionality Changes of Rapeseed Protein

Chung-Hee Kim

(Supervised by professor Yeung-Joo Kang)

 제주대학교 중앙도서관  
A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF ENGINEERING

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1992. 6.

# 目 次

Summary -----	1
記號說明 -----	2
I. 緒 論 -----	3
II. 材料 및 方法 -----	6
1. 材料 -----	6
2. 油菜蛋白質의 製造 -----	6
3. 加水分解 方法 -----	8
1) 加水分解 條件	
2) 加水分解度 測定	
3) 動力學 變數 測定	
4. 加水分解物의 製造 -----	10
5. 加水分解蛋白質의 理化學的 및 機能的 特性 測定 -----	11
1) 加水分解物의 一般成分 組成	
2) UV 스펙트럼 測定	
3) 固有螢光 스펙트럼 測定	
4) 色度測定	
5) 表面疎水性 測定	
6) SDS-PAGE 測定	
7) pH別 溶解度 測定	
8) 粘度 測定	
9) 감습 凝固性	
10) 熱 凝固性	
11) 水分 및 油 吸收性	

12) 거품성	
13) 에멀전 特性	
<b>Ⅲ. 結果 및 考察</b> -----	17
1. 加水分解 條件 -----	17
1) 加水分解 酵素의 選別	
2) 溶媒 및 pH	
3) 溫度 및 酵素의 熱安定性	
4) 酵素濃度 및 基質濃度	
2. 動力學 變數 -----	25
3. 加水分解蛋白質의 理化學的 및 機能的 特性 -----	25
1) 加水分解物의 一般成分 組成	
2) UV 및 固有螢光 스펙트럼	
3) 黃色度 및 表面疎水性	
4) SDS-PAGE 分析	
5) pH別 溶解度	
6) 粘度, 칼슘 및 熱 凝固性, 水分 및 油 吸收性	
7) 거품 및 에멀전 特性	
<b>Ⅳ. 要 約</b> -----	40
<b>參 考 文 獻</b> -----	41
<b>謝 辭</b> -----	45

## Summary

Optimum conditions for enzymatic hydrolysis of purified rapeseed (*Brassica napus* var. *Youngsan*) protein were investigated, and some physico-chemical and functional properties of its hydrolysate were determined.

Pronase showed higher activity in the hydrolysis of rapeseed protein than 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,  $k_m$  values were 3.48% (w/v).

UV and intrinsic fluorescence spectra of the hydrolysate showed the maximum absorption at 274nm and 360nm respectively. Intensity of yellow color decreased in the process of hydrolysis and the surface hydrophobicity decreased up to fourfold. The main bands of hydrolysate by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was observed at 14,000 to 12,000 dalton molecular weight. Solubilities of hydrolyzed protein increased by 10 - 15% compared to those of unhydrolyzed protein at acidic pH. In the hydrolysate, while absorption of both water and oil, foam expansion and emulsion stability were increased, absolute viscosity, heat coagulation, calcium coagulation, foam stability and emulsion activity were decreased.

## 記號說明

A	吸光度(Absorbance)
ANS	1-anilino-8-naphthalene-sulfonic acid
BSA	牛血清알부민(Bovine serum albumin)
DH	加水分解度(Degree of hydrolysis)
[E]	酵素濃度(Enzyme concentration)
$K_m$	Michaelis constant
ME	2-Mercaptoethanol
$M_w$	分子量(Molecular weight)
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
$R_m$	相對移動度(Relative mobility)
[S]	基質濃度(Substrate concentration)
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SHMP	Sodium hexametaphosphate
$S_o$	表面疎水性(Surface hydrophobicity)
TCA	Trichloroacetic acid
Tris	Tris(hydroxymethylamino)methane
UF	限外濾過(Ultrafiltration)
UV	紫外部(Ultraviolet)
YcIE	黃色度



제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

## I. 緒 論

油菜는 제주도 전역과 남해안 일대에서 많이 재배되고 있는 국내 중요한 食用油脂資源 중의 하나이다. 그러나 油菜種實에서 기름을 짜내고 난 후의 油菜粕은 약 43%의 蛋白質을 함유하고 있으나 현재 동물의 飼料나 有機質 肥料로 이용되고 있는 정도에 불과하며, 食品蛋白質로는 이용되지 못하고 있는 실정이다. 그런데 油菜粕蛋白質에는 대부분 油種實 蛋白質의 制限 아미노산인 methionine이 풍부하게 함유되어 있으며, 특히 lysine이 풍부하게 들어있고(El Nockrashy 등, 1975), 아미노산 조성이 油種實 중 가장 우수한 蛋白質이라고(Sosulski, 1973) 알려져 있다. 또한 Sarwar 등(1985)의 油菜粕蛋白質과 다른 여러 蛋白質들을 영양적 품질에 대하여 비교 실험한 결과에 의하면 油菜粕蛋白質은 豆類나 小麥과 같은 植物原料에서 얻어낸 蛋白質보다도 훨씬 우수하며 牛乳蛋白質인 casein과는 그 품질이 거의 같다고 하였다. 또한 食品學的 機能 면에서도 水分 및 油 吸收性, 에멀전특성, 粘度 등에서 大豆蛋白質보다 우수하고(Sosulski, 1983), 여러 종류의 식품을 제조할 수 있는 좋은 기능성을 지니고 있다. 그러나 大豆를 제외한 다른 油種實 蛋白質 특히 油菜蛋白質은 산업적으로 이용되지 못하고 있는데, 그 이유는 인체에 有害한 glucosinolate가 함유되어 있고, 또한 無機質의 흡수를 저해하는 phytate가 많이 함유되어 있기 때문이다(Erdman 등, 1979; Clandinin 등, 1981). 李 등(1990)은 등전침전시킨 蛋白質溶液을 酸洗滌하고 限外濾過(100K Da.) 농축 처리하여 glucosinolate와 phytate를 충분히 제거할 수 있는 油菜蛋白質의 精製方法을 제시하였다.

蛋白質의 機能성은 식품을 가공하고 제조하거나 저장하는 동안에 食品 蛋白質의 역할을 지배하는 특성으로서 식품의 품질에 영향을 미친다(Matil, 1971). 蛋白質의 機能성에 영향을 끼치는 인자로는 물, 이온, pH, 溫度, 酸化還元, 脂肪, 風味, 糖 등이 있다. 이 機能성은 水和性, 分散性, 溶解度, 膨潤, 에멀전, 거품성, 油吸着, 겔화, 附着性, 凝集性, 膜形成 등(Nakai와 Powrie, 1981)을 말



하는데 營養的 價値와는 다른 것으로서 蛋白質의 이용방법에 영향을 미친다.

따라서 蛋白質을 食品素材로 이용하기 위해서는 식품이 가지고 있는 機能性을 적절히 이용해야 할 필요가 있다. 그러나 蛋白質마다 원하는 機能性을 모두 갖춘 경우는 거의 없다. 따라서 여러 機能性 중 가장 유효한 특정한 機能性 만을 원하는 방향으로 도출시키는 機能性 改良 方法에 관한 연구가 활발히 행해지고 있다. 食品蛋白質의 機能性을 변형시키는 방법에는 物理的, 化學的 및 酵素的 修飾이 있다(Pour-El, 1981). 物理的 修飾은 간단하고 저렴하여 산업화에 많이 이용되고 있으나 고도의 機能性 향상은 기대하기 어렵다. 따라서 化學的, 酵素的 修飾이 주로 사용되나 化學的 修飾은 tryptophan, cystein 등의 필수 아미노산의 손실, 또는 lysinoalanine 같은 독성물질의 생성 등의 위험성이 따르기 때문(Desslie와 Cheryan, 1979)에 酵素的 修飾이 주로 연구되고 있으며(Shukla, 1982), 특히 蛋白質酵素를 이용하여 蛋白質의 機能性을 改良하려는 많은 연구가 시도되고 있다.

酵素에 의한 peptide 결합의 加水分解는 carboxyl기나 amino기 같은 極性基의 증가, peptide 사슬의 분자량 감소, 선택적인 분자 배열 등을 일으키는데 이러한 peptide 결합의 분해는 食品蛋白質의 機能性을 변화시킨다(Phillips and Beuchat, 1981). 酵素에 의한 蛋白質의 加水分解는 蛋白質의 수용성과 소화율을 증가시키고, 식품의 機能性을 변화시킴으로써 여러가지로 이용될 수 있다. 특히 이들 방법은 蛋白質 음료라든가 아이스크림, 기타 가공 식품에 많은 용도로 쓰이고 있으며, 이러한 加水分解 製品은 여러가지 식품의 성분으로 사용될 뿐만 아니라 의약품으로도 개발 가능하다(Beddoes와 Steinkeraus, 1976).

일반적으로 酵素 反應은 酵素 形態, 酵素 濃度, 溫度, pH, 反應 時間 등의 반응속도 변수에 의해 영향받는데 大豆蛋白質(Desslie와 Cheryan, 1981 ;Kang, 1984), casein(Bliss와 Huttin, 1977), 어피젤라틴(김 등, 1991) 등에 대해서는 많은 연구가 이루어지고 있으나, 油菜蛋白質을 基質로 한 反應速度에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

油菜蛋白質의 加水分解에 관한 연구로써 Harmansson 등(1974)은 濃縮 油菜蛋白質을 pepsin과 papain으로 加水分解해서 얻어진 加水分解産物은 溶解性, 에멀

전 安定性, 거품 形成能을 증가시켰으며 carboxymethylcellulose 같은 安定劑의 사용은 거품성과 에멀전 安定性を 증가시켰다고 하였다. Lacroix 등(1983)은 pepsin과 trypsin으로 加水分解 후 限外濾過하여 얻어진 低分子量의 加水分解物은 영양가는 casein 보다 높고 蛋白質 소화율은 casein과 별 차이가 없었다고 하였다. Ponnampalam 등(1987)은 아세틸화된 油菜蛋白質을 trypsin과 pepsin으로 加水分解함으로써 加溶性 蛋白質을 70% 이상 증가시켰다고 보고하였으나 국내에서는 이에 대한 연구가 거의 없는 형편이다.

따라서 본 연구에서는 脫脂油菜粕으로부터 李 등(1990)의 방법에 따라 抽出, 精製하여 얻어진 油菜蛋白質을 酵素로 加水分解하기 위한 最適 條件에 대하여 검토하였으며, 이들 最適 條件에서 얻어진 加水分解物의 理化學的 特性 즉 UV 및 固有螢光 스펙트럼, 表面疎水性, 黃色度, SDS-PAGE分析 등을 측정하고, 또한 加水分解物의 機能性 즉 粘度, pH別 溶解度, 熱 및 칼슘 凝固性, 水分 및 油 吸收性, 거품성, 에멀전 特性을 측정하였다.



## II. 材料 및 方法

### 1. 材 料

濟州道에서 생산량이 가장 많은 *Brassica napus*(Youngsan)종을 시중에서 구입하여 精選하고 롤러 粉碎機를 사용하여 약 10mesh로 粉碎한 후 체질과 풍선에 의해서 껍질을 제거하고 실온에서 油菜種實 1Kg에 대하여 n-hexane을 2 l씩 가하여 4일간 脫脂를 4회 반복한 후 日乾하고, 건조된 油菜粕을 다시 60mesh로 粉碎하여 油菜粕粉을 만들어 사용했다.

### 2. 油菜蛋白質의 製造

油菜蛋白質의 抽出, 精製는 李 등(1990)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 油菜粕粉 50g을 1% SHMP 溶媒(pH 8.0) 1 l에 넣어서 잘 저어주면서 1시간 동안 1차 추출하고, 2°C, 10,000 x g에서 20분 동안 원심분리하였고, 2차 추출은 1차 추출 잔사를 1% SHMP 溶媒 500ml에 다시 잘 현탁하면서 30분 동안 추출하고 2°C, 10,000 x g에서 20분간 원심분리하여 얻은 1, 2차 상등액을 합하여(1,500ml) 2N HCl 용액으로 pH 3.5로 등전점 침전시킨 후 원심분리(2°C, 10,000 x g, 20분)하였고, 침전 단백질을 150ml 증류수(pH 3.5)에 넣고 Ultra-Turrax homogenizer (KarlKolb, West Germany)를 사용하여 10,000rpm에서 약 2분동안 완전히 현탁시킨 후 다시 원심분리 (2°C, 10,000 x g, 20분)하였다. 침전된 단백질을 증류수 (500ml)에 잘 현탁한 후 1N NaOH용액으로 pH 7.5로 조정한 후 限外濾過(100K Da.) 농축하고 동결건조하였다(Fig. 1).

精製工程에서 限外濾過 濃縮에 사용된 限外濾過機는 Pellicon Lab Casset System(Japan Millipore, Tokyo)을 사용하여 주로 濃縮式으로 운용하였고, Pellicon膜(membrane)은 公稱 分子量限界(nominal molecular weight cut-off) 100K Da. 膜을 사용했으며, 濾過面積은 240cm<sup>2</sup>(60cm<sup>2</sup> x 4)로 일정하게 하였고, 濾過壓力은 出口壓力이 2kg/cm<sup>2</sup>이 되도록 조절하여 1회 限外濾過 濃縮 시간은 단백질 용액의 부피가 50% 감소할 때까지 실시하였다.

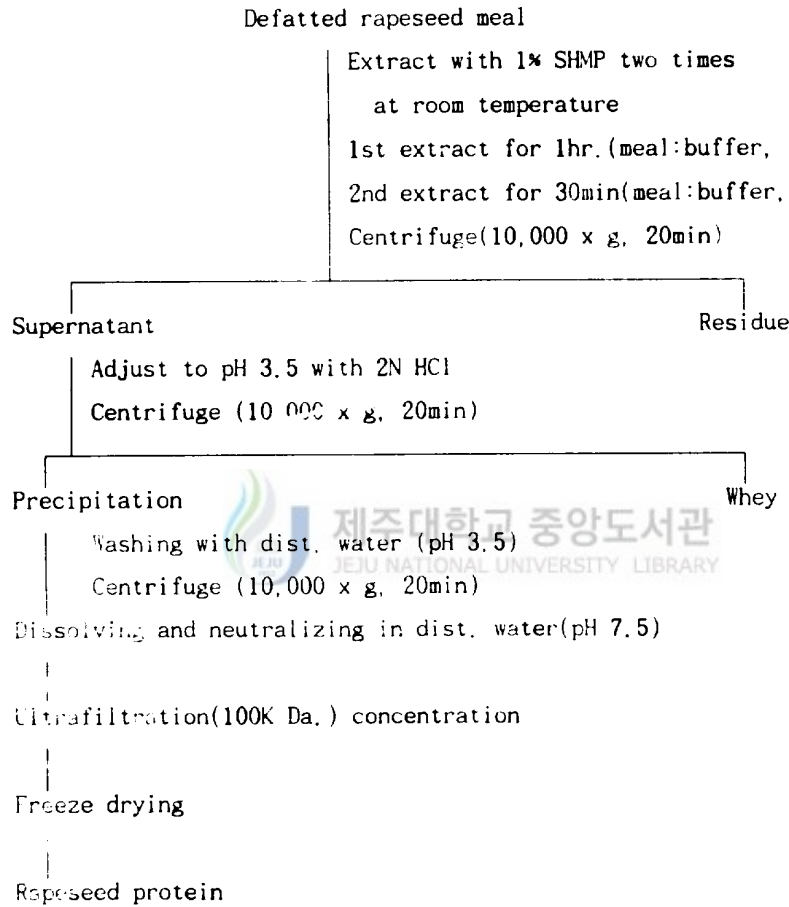


Fig. 1. Preparation of rapeseed protein.

### 3. 加水分解 方法

#### 1) 加水分解 條件

加水分解의 最適 條件을 정하기 위해 酵素, 溶媒, pH, 溫度, 酵素 濃度, 基質 濃度 등을 달리하고 일정시간 진탕반응 시킨 후 加水分解度를 측정하였다 (Table 1).

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

(1) 酵素의 선정: 예비실험을 통하여 여러 종류의 蛋白酵素를 검토하였으나 低價이면서 산업적으로 이용 가능한 Pronase(Calbiochem, B grade, CA, U.S.A), Alcalase(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 油菜蛋白質을 基質로하여 基質에 대한 酵素活性을 다음과 같이 측정하였다. 또한 基質에 대한 熱變性 효과를 보기 위하여 加熱處理한 것과 안한 것을 비교하였다. 基質 2g을 sodium azide 0.01%를 포함하는 0.01M sodium phosphate-citric acid 緩衝液(pH 7.0) 200ml에 녹이고 수조상에서 100

℃, 30분간 가열 또는 그대로 용해시킨 용액 3ml를 시험관에 넣고 40℃의 수조상에서 10분간 평형을 유지한 후 酵素와 基質의 比가 1:100(w/w)이 되도록 酵素를 가하여 30분간 加水分解하였다. 加水分解物에 20% TCA 용액 3ml를 가하여 30분간 실온에서 방치한 후 Whatman No. 2 여과지를 사용하여 여과하고 이 상등액을 280nm에서 吸光度를 측정하여 酵素 活性을 다음과 같은 식에 의하여 계산하였다 (Cunningham, 1977)

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

(2) 溶媒 및 pH: 緩衝液과 蒸溜水의 차이점을 보기 위하여 油菜蛋白質 2g을 200ml의 0.01M sodium phosphate-citric acid (pH 7.0) 또는 蒸溜水에 녹여 酵素와 基質의 比를 1:100(w/w)이 되도록하고 40℃에서 30분 간격으로 반응시간을 달리하며 加水分解度を 측정하였고, pH는 蒸溜水를 溶媒로 사용하여 pH를 달리하며 40℃에서 1시간 반응시켜 加水分解度を 측정하였다.

(3) 溫度 및 酵素의 熱安定性: 溫度는 pH 8.0에서 5℃ 간격으로 1시간 반응시킨 후 加水分解度を 측정하였다. 또한 회분식으로 장시간 반응시 酵素의 熱安定性を 측정하였다. 즉 반응기에 Pronase 酵素液(2mg/ml) 200ml를 가하여 40℃, pH 8.0으로 조절한 다음 반응기로부터 酵素液을 시간별로 0.15ml를 분취하여 pH 8.0으로 조절된 1% 油菜蛋白質 3ml와 혼합하여 30분 동안 실온에서 加水分解시킨 후 加水分解度を 측정하였다.

(4) 酵素 및 基質 濃度: 酵素 및 基質 濃度の 최적 조건을 알아보기 위하여 증류수를 溶媒로 하여 pH 8.0, 40℃에서 酵素와 基質의 比를 1:50, 1:100, 1:133, 1:200, 1:400(w/w)로 변화시키면서 1시간 반응시켜 加水分解度を 측정하였고, 基質 濃度は 0.5%(w/v) 간격으로 基質 濃度を 달리하여 1시간 반응시켜 加水分解度を 측정하였다.

## 2) 加水分解度の 측정

油菜蛋白質 용액에 酵素를 넣어서 分解시킨 加水分解物 3ml를 95°C의 물증탕에서 5분간 熱處理하여 酵素를 不活性化시킨 다음 20% TCA용액 3ml를 가하여 실온에서 30분 방치시키고 원심분리(4,000rpm, 10분)한 후 상등액의 加溶性蛋白質量을 micro-biuret 방법으로 측정하였다(Itzhaki와 Gill, 1964). 加水分解도는 다음과 같이 나타내었다.

$$\text{加水分解度} = \frac{\text{加溶性蛋白質}}{\text{總蛋白質}} \times 100$$

이 때 加溶性蛋白質은 10% TCA용액에 沈澱하지 않는 蛋白質로 하였다.

## 3) 動力學 變數의 측정

油菜蛋白質 용액(0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5%)에 酵素와 基質의 比가 1 : 100 (w/w)이 되도록 酵素를 가하여 pH 8.0, 40°C에서 10분간 加水分解시켜 酵素活性를 측정하였다. 初期 反應速度는 分當 280nm에서의 吸光度의 증가로 나타내었고,  $K_m$ 은 初期 反應速度와 基質濃度를 사용하여 Lineweaver-Burk plot를 作圖하여 계산하였다(Lineweaver와 Burk, 1934).

## 4. 加水分解物の 제조

抽出, 精製된 油菜蛋白質 10g을 1 l의 증류수에 녹이고 1N NaOH를 가하여 pH 8.0으로 조정하고 40°C의 항온수조에서 20분간 평형을 유지하였다. 이 때

Pronase 용액 (2mg/ml)을 酵素와 基質의 比가 1 : 100이 되도록 基質溶液에 가한 후 pH 8.0과 40°C를 유지하면서 1시간 加水分解한 후 동결건조하여 加水分解物로 사용하였다.

## 5. 加水分解蛋白質의 理化學的 및 機能的 特性 측정

### 1) 加水分解物의 成分造成

水分, 脂肪, 蛋白質 含量은 AOAC 방법(AOAC, 1980)에 따라 실시하였다.

### 2) UV 스펙트럼 측정

試料蛋白質 0.2g을 평량하여 삼각 플라스크에 넣고 0.1M sodium phosphate-citrate 緩衝液(pH 8.0) 20ml를 가하여 녹여서 1% 단백질 용액을 만들고 이를 다시 10배로 희석하고 여과지(No. 2, Toyo)로 여과한 여액을 Linikon 860 spectrophotometer(Kantron)을 사용하여 250nm에서 400nm까지 吸光度를 측정하였다.

### 3) 固有螢光 스펙트럼 측정(Intrinsic fluorescence spectrum)

試料 蛋白質 0.2g을 평량하여 0.1M sodium phosphate-citrate 緩衝液(pH 8.0) 20ml를 가하여 잘 녹이고 이 용액을 다시 10배로 희석하여 여과지 (No 2, Toyo)로 여과한 여과액을 fluorospectrometer(Perkin-Elmer Ltd. LS-5)를 사용하여 280nm에서 들뜨게 하여 300nm에서 400nm까지의 固有螢光값을 측정하였다.

### 4) 色度 측정

동결건조된 試料 蛋白質을 粉末상태 그대로 유리 측정용기에 넣어서 색차계(Model TC-1, Tokyo Denshoku Co. LTD)를 사용하여 黃色度(YCIE)를 측정하였다.



#### 5) 表面疎水性(Surface hydrophobicity, $S_o$ ) 측정

Toro-vazquez와 Rengenstein(1989) 방법에 따라 試料蛋白質 0.2g을 평량하여 0.1M sodium phosphate-citrate 緩衝液(pH 8.0) 20ml에 녹이고 이 용액을 다시 10배로 희석하여 0.1% 단백질 용액을 만들어서 여과지(No. 2, Toyo)로 여과한 여액을 micro-biuret 방법(Fig. 2)으로 단백질 농도를 0.125mg/ml 되게 조정하고 다음 8mM의 ANS(1-anilino-8-naph-thalenesulfonate) 40 $\mu$ l를 가하여 375nm에서 들뜬상태로 하고 다음 470nm에서 단백질량(0.025 - 0.125mg)을 변화시키며 相對螢光값을 측정하고 直線回歸 方程式(Linear regression equation)에 의해서 직선의 방정식을 구하고 그 기울기에 의해  $S_o$  값을 구하였다.

#### 6) SDS-PAGE 分析

SDS - PAGE(sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)는 Kang(1984)의 방법에 따라 겔 규격은 130 x 1 x 120(mm, W x D x H)이며, slap 겔을 만들어 실험하였다. 겔의 最終濃度는 13% acrylamide 겔로서 전개 길이는 100mm이며 전개 緩衝液의 pH는 6.8로 조정하였다. 試料量은 50 $\mu$ l이며 시료당 6mA의 전류를 사용하여 8시간 동안 실온에서 전개하였다. 전개된 겔은 0.25% coomassie brilliant blue R-250을 사용하여 12시간동안 염색시켰으며, 탈색은 혼합액(메탄올:중류수:초산: 2:2:1, v/v)을 사용하여 실시하였다. Gel scanning은 吸光度 550nm에서 Dual-Wavelength Flying-Spot Scanner(Shimadzu)를 사용하여 相對移動度( $R_m$ )에 따라 分子量을 측정하였다. 또한 分子量을 측정하기 위하여 Molecular Weight Marker(Fluka AG Chemische Faborik CH-9490 Buchs, Mw. 45,000 - 14,300)을 사용하였다.

#### 7) pH別 溶解度

試料蛋白質 0.5g을 50ml의 중류수에 녹여서 이 용액을 1N NaOH로 pH 10.0으로 조정하고 다음 2N HCl를 가지고 용액의 pH를 9에서 2까지 재조정하였다. 이 용액을 pH 별로 2ml씩 취하여 시험관에 넣고 10,000 x g 에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 micro-biuret 방법으로 측정하였다. 蛋白質 溶解度 곡선은 pH

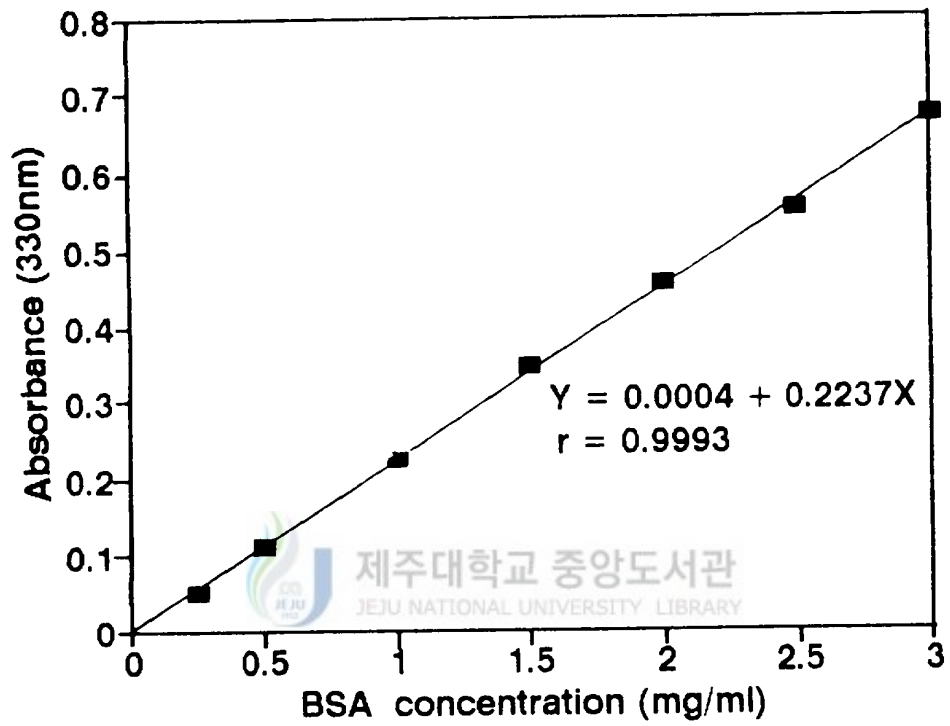


Fig. 2. Standard curve for protein determination by micro-biuret method.

10에서의 溶解度를 100%로 하여 pH에 대한 蛋白質 溶解度를 나타냈다.

#### 8) 粘度 측정

試料 蛋白質 1.0g을 평량하여 비이커에 넣고 증류수 100ml를 가하여 1% 단백질 용액을 만들어서 20°C에서 Ostwald 型(Kimax, No. 50) 粘度計를 사용하여 試料 蛋白質의 絕對粘度를 측정하였다. 絕對粘度는 다음과 같은 식에 의하여 나타내었다.

$$\eta_2(\text{centipoise}) = \eta_1 \times \frac{\rho_2 \times t_2}{\rho_1 \times t_1}$$

$\eta_1$  : 純粹한 물의 絕對粘度(20°C)       $\eta_2$  : 試料의 絕對粘度

$\rho_1$  : 純粹한 물의 密度                       $\rho_2$  : 試料의 密度

$t_1$  : 純粹한 물의 落下時間                 $t_2$  : 試料의 落下時間

#### 9) 칼슘 凝固性

칼슘 凝固性은 Kang 등(1988)방법에 따라 試料 蛋白質 0.2g을 20ml의 증류수에 녹여 이 용액 5ml을 취하여 60%의  $\text{CaCl}_2(\text{w/v})$  0.08ml를 가하여 vortex mixer로 잘 섞고 4,000 x g에서 20분간 원심분리하여 상등액 중의 단백질 함량을 micro-biuret 방법으로 측정하였다.

#### 10) 熱 凝固性

Kramer와 Kwee(1977)방법에 따라 試料 蛋白質을 0.5g을 50ml의 증류수에 녹여서 이 용액 10ml을 취하여 시험관에 넣고 20분간 물중탕(100°C)에서 가열하여 상온에서 식힌 후 이 용액을 3,000 x g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액 중의 단백질 함량을 micro-biuret 방법으로 측정하였다.

#### 11) 水分 및 油 吸收力

水分 吸收力은 Conway unit (WITEG)를 사용하여 내경에 試料 蛋白質 50mg

을 넣고 외경에 증류수를 넣어 밀폐하여 상온에서 2시간 동안 정치한 후 試料에 흡착된 水分의 量을 측정하였다. 水分 吸收力은 1.0g의 試料에 흡착된 水分의 量을 g수로 나타내었다.

油 吸收力은 Sathe(1981)등의 방법에 의하여 1.0g의 試料에 옥수수기름 10ml를 각각 가하여 vortexing mixer로 잘 섞고, 실온에서 30분간 정치한 다음 4,000 x g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액의 부피를 10ml 눈금 실린더를 사용하여 측정하였다. 油 吸收力은 1.0g의 試料에 흡착된 옥수수기름의 부피를 ml수로 나타내었다.

## 12) 거품성

Hsu 등(1977)의 방법에 따라 試料 蛋白質 0.5g을 50ml의 증류수에 녹여 이 용액 20ml를 취하여 Ultra-Turrax homogenizer(KarlKolb, West Germany)로 10,000rpm에서 약 30초 동안 잘 현탁한 후 즉시 100ml 눈금 메스실린더에 넣어서 그 부피를 측정하고 실온에서 1시간 방치한 후 거품용액의 부피를 측정하여 거품 安定性으로 나타내었다.

$$\text{거품 形成能 (\%) = } \frac{\text{거품형성 후의 부피(ml)} - \text{거품형성 전의 부피(ml)}}{\text{거품형성 전의 부피(ml)}} \times 100$$

$$\text{거품 安定性 (\%) = } \frac{\text{1시간 후의 거품 부피(ml)}}{\text{최초의 거품 부피(ml)}} \times 100$$

## 13) 에멀전 特性

Pearce와 Kinsella(1978) 방법에 따라 에멀전 活性指數 (emulsion activity index)를, 에멀전 安定性(emulsion stability)과 에멀전 熱安定性(emulsion heat stability)은 Haque와 Kinsella(1988)의 방법에 준하여 측정하였다. 試料 蛋白質 0.2g을 0.01M sodium phosphate-citrate 緩衝液(pH 8.0) 20ml에 녹이고 이 용액

12ml을 취하여 비이커에 넣고 8ml의 옥수수기름을 가하여 Ultra-Turrax homogenizer(KarlKolb, West Germany)로 10,000rpm에서 20초 동안 잘 현탁한 후 이 용액 50 $\mu$ l를 취하여 시험관에 넣고 0.1% SDS용액 4.95ml를 가한 후 600nm에서 吸光度를 측정하여 다음의 表面積으로 표시하였다.

$$\text{表面積}(\text{m}^2/\text{g protein}) = \frac{2(2.303 A)}{\Phi C} \times 100 \times 10^{-4}$$

A = 600nm 吸光度,  $\Phi$  = 體積分率(옥수수기름:總液, v/v), C = 蛋白質濃度

에멀전 安定性은 위와 같은 방법으로하여 잘 현탁한 후 이 용액 5ml를 취하여 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 하층액에서 30 $\mu$ l 취하고 여기에 0.1% SDS 용액 2.97ml를 가하여 600nm에서 吸光度를 측정하였으며 에멀전 熱安定性은 에멀전 현탁액 5ml를 취하여 80°C에서 30분간 가열한 다음 실온에서 방냉한 후 3,000rpm에서 5분 동안 원심분리를 행한 후 하층액에서 30 $\mu$ l를 취하고 0.1% SDS용액 2.97ml를 가하여 600nm에서 吸光度를 측정한 후 表面積으로 표시하였다.



#### 14) 資料 提示

모든 실험들은 2회 내지 3회 반복 실시했으며, 제시된 資料는 이들 반복하여 얻어진 분석들을 平均한 것들이다.

## Ⅲ. 結果 및 考察

### 1. 加水分解 조건

#### 1) 加水分解 酵素의 選別

蛋白質 加水分解 酵素 즉, Pronase, Alcalase, Neutrase의 casein, 油菜蛋白質, egg albumin에 대한 酵素活性度는 Table 2에 나타내었다. 油菜蛋白質의 加水分解 活性은 조사된 모든 酵素에 대하여 casein보다는 낮았으나 egg albumin보다는 높았다. 酵素別로는 Pronase가 사용된 모든 基質蛋白質에 대해 가장 높은 活性을 나타내었다. 또한 熱處理된 基質蛋白質을 加水分解하였을 때 casein과 egg albumin에 대해서는 酵素活性도가 증가되었다. 그러나 油菜蛋白質인 경우에는 오히려 감소하여 熱處理 안된 油菜蛋白質에 대하여 Pronase의 활성도는 155 Units/mg이고 熱處理된 경우는 98 Units/mg이었다. 따라서 油菜蛋白質의 加水分解는 熱處理를 안한 상태에서 Pronase로 가수분해하였을 때가 최적이다. 일반적으로 熱變性된 蛋白質은 加水分解 酵素와 親和力이 증가하여 加水分解도가 증가하는 것으로 보고되고 있으며(Alder-Nissen, 1976), 특히 大豆蛋白質의 경우 Pronase에 의한 加水分解에서 熱處理된 蛋白質이 2배 이상 加水分解도가 증가하는 것으로 보고되고 있다(Kang, 1984). 그러나 본 실험의 결과에서는 반대의 결과가 얻어지고 있다. 즉 Pronase에 의한 油菜蛋白質의 加水分解에서 Pronase의 活性은 加熱處理하지 않을 때가 60% 이상 증가하고 있다. 이는 油菜蛋白質이 다른 蛋白質 즉 egg albumin 또는 casein과는 달리 低分子量蛋白質로 구성되어 있으며 精製過程에서 원래 함유하고 있을 것으로 예상되는 酵素阻害劑가 제거되었기 때문이라고 볼 수 있다. 또한 油菜蛋白質을 加熱處理하면 관능적으로 응집 현상이 관찰되었는데 이러한 油菜蛋白質의 응집이 酵素活性을 감소시킨 것으로 생각된다. 그러나 Alcalase 및 Neutrase로 加水分解할 경우에 熱處理된 것이 약간 증가하는 결과에서 이는 油菜蛋白質의 理化學的 特性이라기 보다는 Pronase와 油

菜蛋白質 사이에 관여하는 基質 特異性 또는 加熱處理에 따른 油菜蛋白質의 熱變性에 따른 것으로 생각할 수 있다.

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

(Units/mg)

	Preheated			Unheated		
	Casein	Eggalbumin	Rapeseed	Casein	Eggalbumin	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

## 2) 溶媒 및 pH

油菜蛋白質을 0.01M sodium phosphate-citric acid 緩衝液과 蒸溜水에 각각 용해시키고 시간을 달리하여 加水分解한 결과는 Fig. 3과 같다. 加水分解 시간에 따른 加水分解度는 초기 1시간까지는 加水分解度가 급격히 증가한 반면 1시간 이후에는 거의 완만해지고 있는데 이러한 결과는 예비 실험을 통해서 본 加水分解 시간에 따른 pH 변화와 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다. 즉, 蒸溜水を 溶媒로 한 加水分解에서 加水分解 시간의 증가와 더불어 1시간까지는 pH가 7.5에서 6.8까지 급격히 감소한 반면 1시간 이후에는 완만하였다. 溶媒에 따라서는 緩衝液보다는 蒸溜水を 사용할 때가 최고 2배까지 높은 加水分解度를 나타내었다. 이는 Pronase에 의한 油菜蛋白質의 加水分解 과정에서 鹽類의 존재는 加水分解反應에 阻害要素로 작용한다고 볼 수 있다. 따라서 sodium phosphate-citric acid 緩衝液을 사용할 경우 加水分解 후에는 과잉의 鹽을 加水分解物로부터 제거

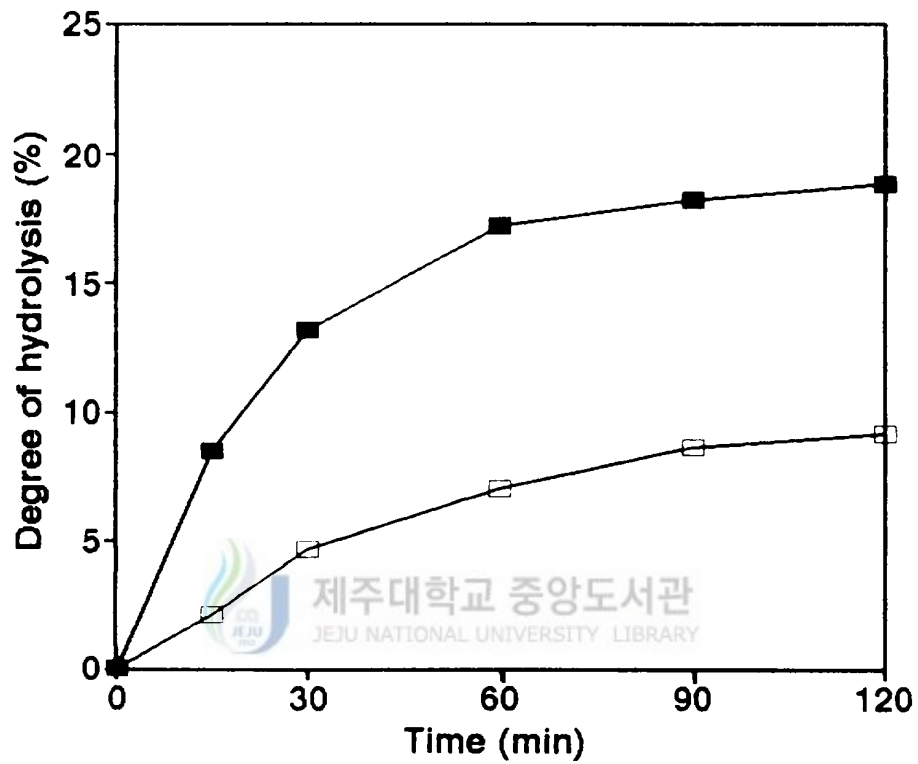


Fig. 3. Effect of solvents on the hydrolysis of rapeseed protein at 40 °C, [E] = 2mg/ml, [E]/[S] = 1/100.  
 (—■— distilled water    —□— phosphate buffer)



하는 공정이 필요하므로 蒸溜水를 溶媒로 사용하여 일정 pH를 유지하도록 하는 것이 산업적 이용을 위해서도 좋을 것으로 판단된다.

油菜蛋白質을 pH를 달리하여 加水分解시킨 결과는 Fig. 4와 같다. Pronase는 최적 pH가 중성(pH 7.0)으로 알려졌는데 油菜蛋白質에서는 약알칼리성인 pH 8.0에서 최적이었다고 이것은 Dasslie와 Cheryan(1981)의 大豆蛋白質에서의 최적 pH는 8.0이라고 보고한 것과 비슷한 결과이나 김 등(1991)의 대구皮에서의 pH 6.0과는 차이를 나타내었다. 따라서 酵素活性을 나타내는 pH값은 基質에 따라 다소 차이가 있는 것으로 보인다.

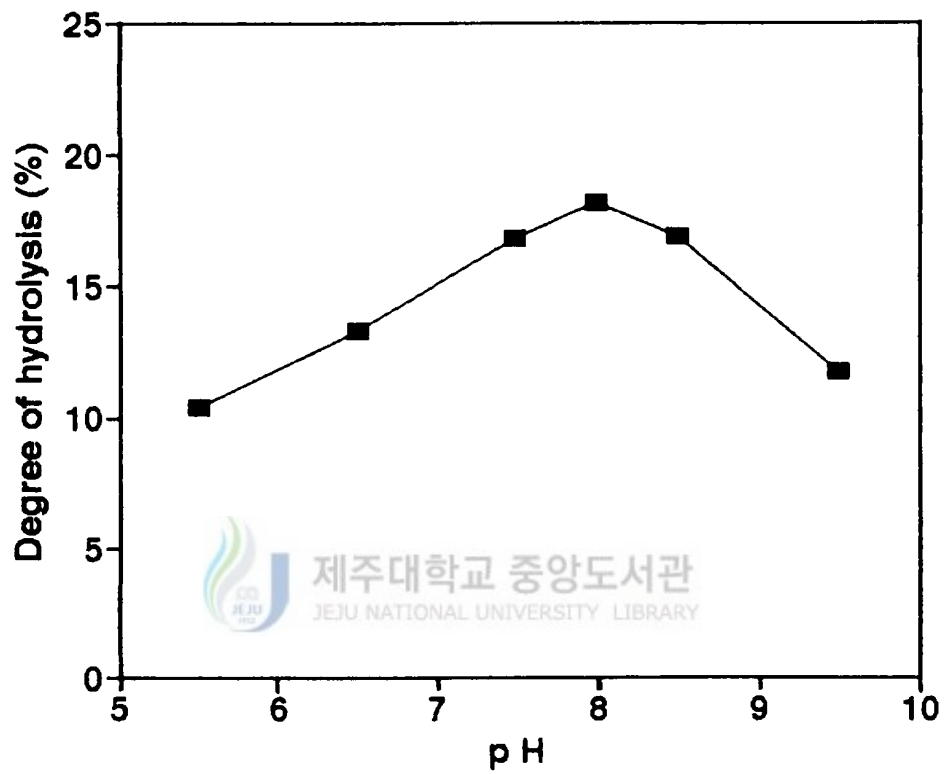
### 3) 溫度 및 酵素의 熱安定性

Fig. 5는 pH 8.0에서 溫度를 달리하며 加水分解한 결과이다. 온도가 상승함에 따라 加水分解度는 증가하여 40°C에서 가장 높은 加水分解度를 나타내었고 그 이상에서는 감소하였다. 이것은 大豆蛋白質에서의 Kang(1984)의 40°C와는 비슷하나 Dasslie와 Cheryan(1981)의 50°C, 대구皮에서의 김 등(1991)의 50°C 보다는 낮은 온도를 얻었다.

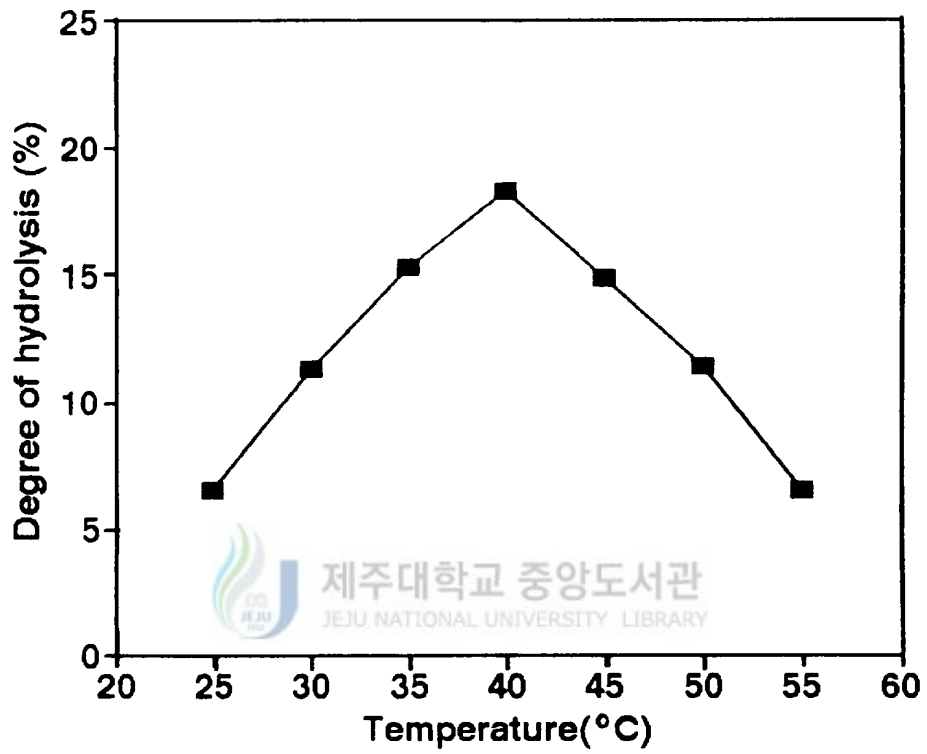
회분식으로 장시간 반응시의 酵素의 熱安定性を 측정하기 위하여 pH 8.0, 40°C에서 시간변화에 따른 酵素活性을 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. 油菜蛋白質의 Pronase 加水分解에서 최적조건이라 생각되는 40°C에서는 시간의 변화에 따라 Pronase 活性은 약간씩 감소하였으나, 3시간 이후는 거의 완만해졌으며 이때 酵素活性은 92%를 나타내었다.

### 4) 酵素 濃度 및 基質 濃度

Pronase를 첨가한 油菜蛋白質을 pH 8.0, 40°C에서 基質에 대한 Pronase 添加比率를 달리하여 1시간 加水分解시킨 결과는 Fig. 7과 같다. Pronase 濃度가 증가함에 따라 전체적으로 加水分解가 급격히 진행되어 基質量의 1%에 해당하는 Pronase를 가할 때까지는 加水分解度가 현저히 증가되었으며 1% 이후에는 증가하는 Pronase 양에 비하여 加水分解度가 그다지 증가하지 않았다. 따라서 경제성면에서도 酵素 Pronase와 油菜蛋白質과의 比는 1:100이 적당하다고 판단된다.



**Fig. 4.** Effect of pH on the hydrolysis of rapeseed protein at 40°C, [E] = 2mg/ml, [E]/[S] = 1/100.



**Fig. 5. Effect of temperature on the hydrolysis of rapeseed protein at pH 8.0, [E] = 2mg/ml, [E]/[S] = 1/100.**

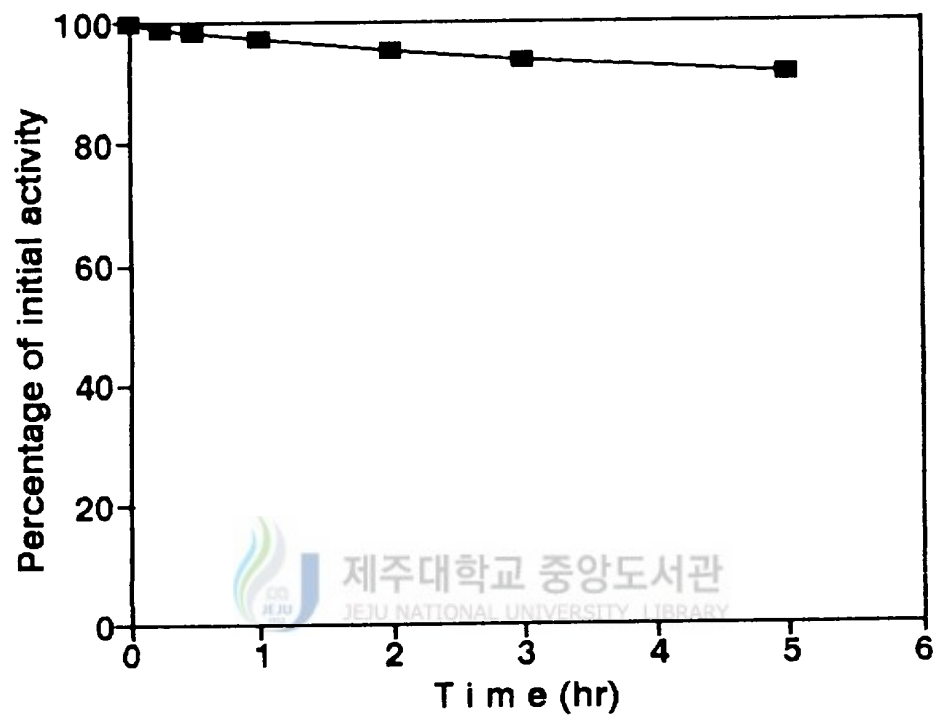


Fig. 6. Heat stability of Pronase activity on rapeseed protein at 40°C.

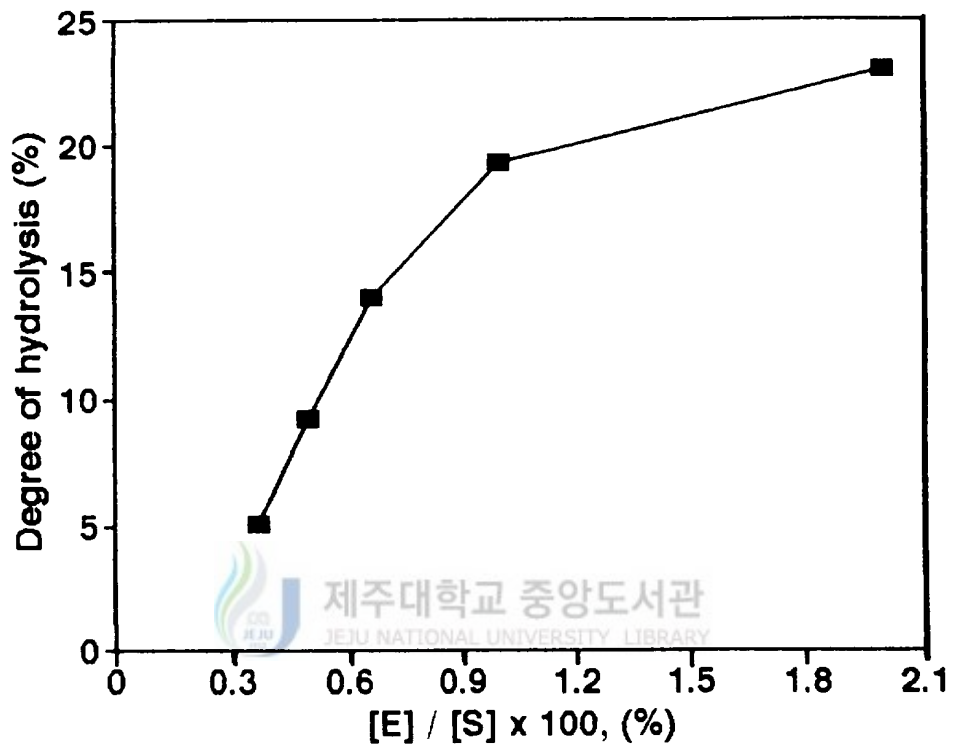


Fig. 7. Effect of enzyme concentration on the hydrolysis of rapeseed protein at 40 °C, pH 8.0, [S]=1%(w/v).

pH 8.0, 40°C에서 基質의 첨가량을 달리하고 基質의 1%에 상당하는 Pronase를 가하여 1시간 加水分解시킨 결과는 Fig. 8과 같다. 1% 基質 濃度에서 최대의 加水分解度를 나타내었고 基質 濃度가 증가함에 따라 加水分解度가 점차로 감소하였다. 1% 이상에서 加水分解度の 감소는 基質 自體가 阻害劑 역할을 하는 것으로 판단되는데, 이러한 基質 阻害는 蛋白質 加水分解에서 일반적으로 일어나는 현상이다.

## 2. 動力學 變數의 測定

油菜蛋白質의 基質 濃度에 따른 초기 반응속도를 Fig. 9에 나타내었다. 초기 반응속도는 초기 10분 반응에서 거의 직선적으로 증가하였기 때문에 10분 반응시킨 후 280nm에서 吸光度를 측정하고 分當 吸光度의 증가로 나타내었으며 基質 濃度가 증가할수록 급속히 증가하여 基質 濃度가 1.5%(w/v)일 때 최고 속도를 나타내었다. 이후 基質 濃度の 증가와 더불어 차츰 감소하는 경향을 나타내었다.

이 자료를 바탕으로 Fig. 10에 Lineweaver-Burk plot를 나타내었다. 여기서  $k_m$ 은 3.48%(w/v)를 얻었는데, 이것은 Pronase를 첨가한 casein(Bliss 와 Hultin: 1977) 1.67%, 大豆蛋白質(Dasslie와 Cheryan:1981) 0.75%, 대구皮(김 등, 1991) 1.01% 보다는 높다.  $k_m$ 의 낮은 값은 基質에 대한 酵素의 親和力이 높음을 나타내는데 油菜蛋白質은 casein, 大豆蛋白質, 대구皮보다는 Pronase에 대한 親和力이 낮은 것으로 판단된다.

## 3. 加水分解蛋白質의 理化學的 및 機能的 特性

### 1) 加水分解物의 一般成分 組成

1% 精製蛋白質을 pH 8.0, 40°C를 유지하면서 酵素 對 基質의 比를 1:100으로 가하여 회분식으로 1시간 加水分解하여 얻어진 加水分解物의 一般 成分組成은

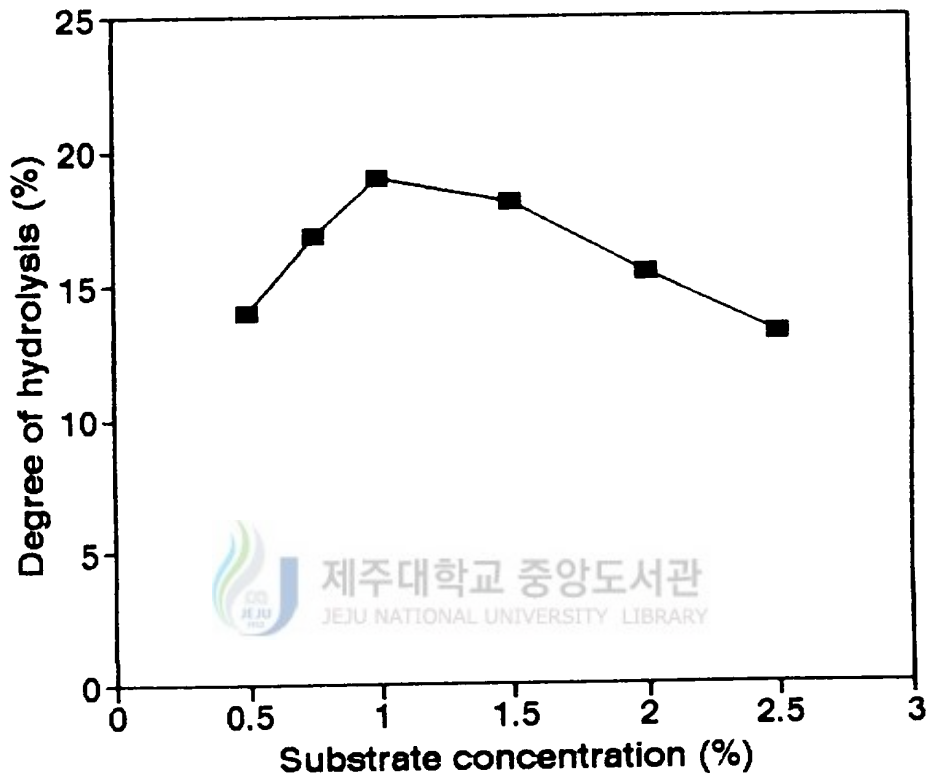


Fig. 8. Effect of substrate concentration on the hydrolysis of rapeseed protein at 40 °C, pH 8.0, [E] = 2mg/ml, [E]/[S] = 1/100.

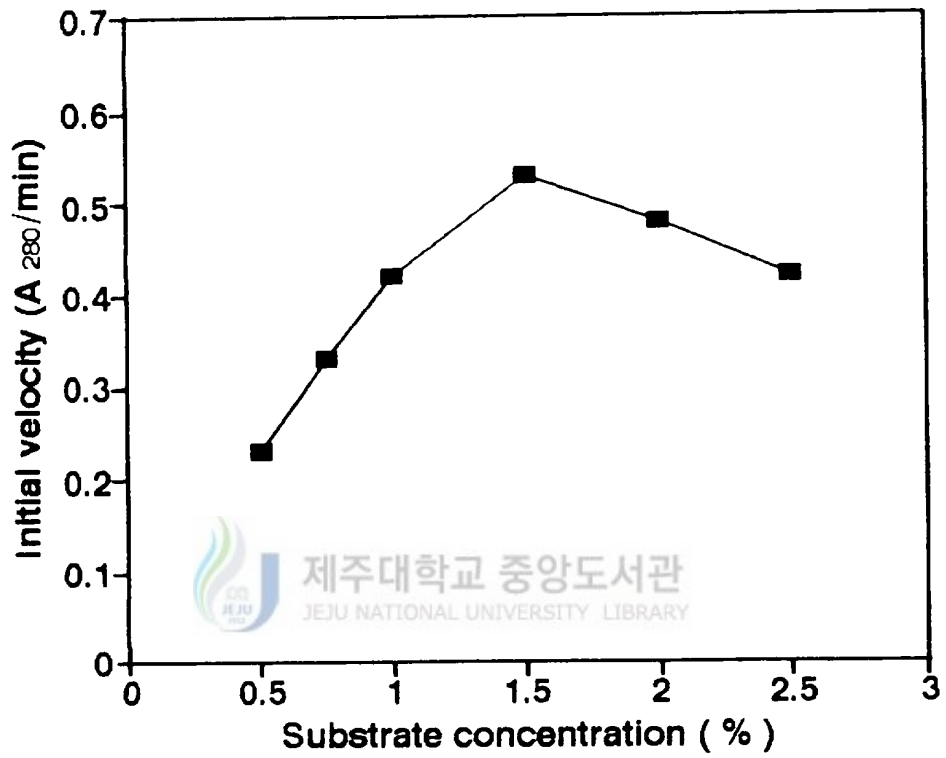


Fig. 9. Initial velocity on the hydrolysis of rapeseed protein at 40°C, pH 8.0, [E]/[S] = 1/100.



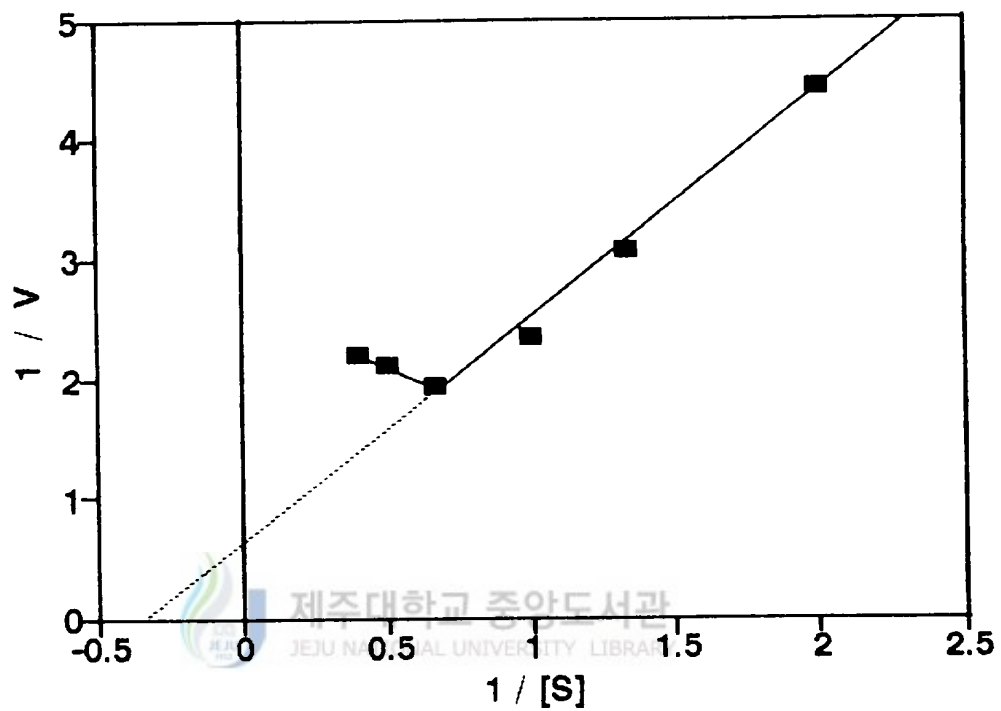


Fig. 10. Lineweaver-Burk plot on the hydrolysis of rapeseed protein. : [S], concentration of rapeseed protein(%); V, hydrolysis velocity(increase of  $A_{280}$  /min).

Table 3과 같다. 加水分解物의 단백질함량과 지방함량은 각각 74.9%, 0.2%로 나타났으며 회분함량은 14.4%로 加水分解하지 않은 精製蛋白質(이하 對照句, control로 표기)에 비하여 약간 증가하였는데 이러한 결과는 加水分解時 pH조절을 위한 알카리의 첨가가 회분함량을 증가시킨 것으로 생각된다.

Table 3. Chemical composition of rapeseed protein and its hydrolysate. (%)

	control	hydrolysate
Moisture	7.7	2.9
Crude protein	71.8	74.9
Crude fat	0.5	0.2
Carbohydrate <sup>a)</sup>	6.6	7.6
Ash	13.4	14.4

a) By difference.



2) UV 및 固有螢光 스펙트럼

蛋白質의 UV 및 固有螢光 스펙트럼은 構造아미노산 중에서 tyrosine, phenylalaine, tryptophan에 의하여 이루어지며, 이들 아미노산들의 함량뿐만 아니라 蛋白質의 입체구조와도 깊은 관계가 있다고 알려져 있다(Schmid, 1989). Fig. 11에서 UV 스펙트럼을 나타내었는데 對照句가 279nm, 加水分解物은 274nm 부근에서 최대흡수를 나타내어 加水分解에 따른 약간의 blue shift가 나타났으나 전체적으로는 큰 차가 없는 전형적인 蛋白質 스펙트럼을 나타내고 있으며, 스펙트럼에서 吸光度의 차이는 試料에서 蛋白質 함량의 차이에 의하여 이루어진 것으로 생각된다.

Fig. 12은 試料 蛋白質의 固有螢光 스펙트럼이며 對照句가 345nm 부근에서

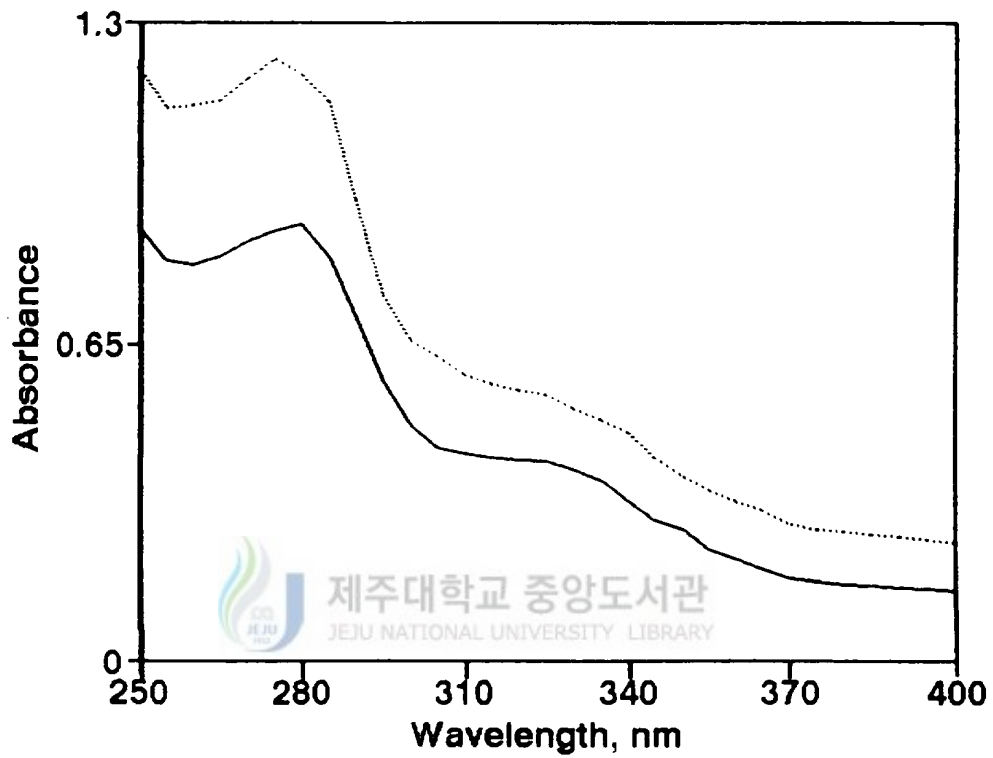


Fig. 11. UV spectra of rapeseed protein and its hydrolysate. Spectra were recorded using 1 mg/ml protein concentration. ( — control      ..... hydrolysate )

peak를 보인 반면 加水分解物은 360nm에서 peak가 나타나고 있으며 對照句에 비하여 加水分解物의 相對螢光값이 약간 높게 나타나고 있다. 이와 같은 固有螢光 스펙트럼의 peak는 주로 tryptophan잔기에 의하여 나타나는 것(Kella 등, 1988)으로 본 실험에서는 加水分解로 인하여 蛋白質의 構造가 달라지고, 분자내에 가리워져 있던 tryptophan 殘基가 보다 많이 노출되고 또한 그 양이 상대적으로 증가된 결과에 따라 固有螢光값이 크게 나타난 것으로 생각된다.

### 3) 黃色度 및 表面疎水性

Table 4는 試料 蛋白質의 黃色度 및 表面疎水性을 나타낸 것으로 油菜蛋白質의 着色度는 주로 황색성분인데 對照句가 50.65인 반면 加水分解物은 36.25로 약간 감소되었다. 실제로 관능적으로 판단되는 加水分解物의 색소는 정제된 油菜蛋白質보다 밝은 황색 계통으로 변화되었다. 이러한 결과로 보았을 때 Pronase 加水分解로 인하여 着色 성분이 감소라기 보다는 蛋白質과 결합되어 있던 着色 성분이 분리되어 着色度の 변화가 일어난 것으로 추정된다. 좀 더 黃色度を 감소시키기 위해서는 황색성분에 관한 기초적인 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

表面疎水性은 蛋白質分子들이 표면에 나타나는 疎水性基들이 量으로 나타나는데 加水分解物은 9.7로 對照句(35.7)에 비하여 4배 정도 감소하였다. 表面疎水性은 蛋白質의 용액 중에서 疎水性物質과의 결합능력(Kinsela, 1982)을 나타내는 것으로 본 실험 결과는 加水分解로 인하여 疎水性基가 크게 감소하였는데 Phillis와 Beuchat(1981)은 蛋白質의 酵素 加水分解는 加水分解物의 親水性基의 노출을 증가시킨다고 보고하고 있는데 본 연구의 결과는 油菜蛋白質의 Pronase 加水分解로 親水性基의 노출정도가 疎水性基의 노출보다 상대적으로 크게 증가하여 疎水性基 노출이 감소한 것으로 나타났거나 아니면 表面 疎水性基 노출이 감소한 것인지는 peptide 조성 등의 연구가 더 필요한 것으로 생각된다.

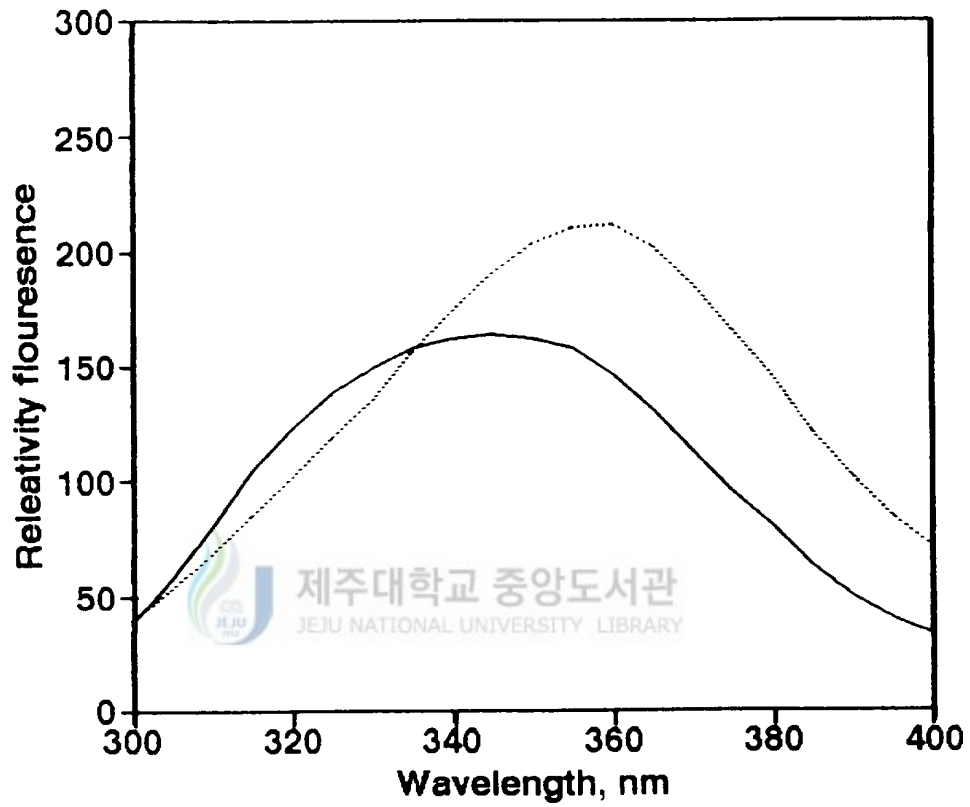


Fig. 12. Intrinsic fluorescence spectra of rapeseed protein and its hydrolysate. Protein solutions were excited at 280 nm using a 5 nm bandwidth. ( — control  
 ..... hydrolysate )

Table 4. Color( $Y_{CIE}$ ) and hydrophobicities of rapeseed protein and its hydrolysate.

	control	hydrolysate
$Y_{CIE}$	50.65	36.25
So	35.7	9.7

4) SDS-PAGE 분석

試料 蛋白質의 SDS-PAGE 분석 결과는 Fig. 13과 같다. 相對移動度( $R_m$ )에 따라 標準蛋白質과 비교된 分子量에서 對照句는 상당부분이  $2.3 - 1.9 \times 10^4$  dalton의 분자량을 가진 band로 구성된 것으로 나타났고 이외에  $3.5 - 3.1 \times 10^4$  dalton을 가진 band가 분석되었으며 加水分解物은 高分子量 band가 감소하면서 대부분  $1.4 - 1.2 \times 10^4$  dalton의 분자량을 가진 band가 나타났다. 이러한 加水分解物의 低分子量 band는 油菜蛋白質의 기능적 특성을 변화시킬 것으로 생각된다.



5) pH別 溶解度

試料 蛋白質의 pH別 溶解度は Fig. 14와 같다. pH가 감소함에 따라 溶解度は 감소하여 pH 3에서 對照句와 加水分解物이 각각 15%, 24%로 최소치를 나타내었고 알칼리부근에서는 거의 비슷한 溶解度を 나타내었다. 加水分解物은 對照句에 비하여 산성부근에서 10 - 15% 정도 높은 溶解度を 나타내었는데 이것은 Pronase 加水分解로 인하여 carboxyl기나 amino기 같은 極性殘基의 증가에 따른 것으로 판단된다.

6) 粘度, 칼슘 및 熱 凝固性, 水分 및 油 吸收性

Table 5은 絕對粘度(Absolute viscosity)를 나타낸 것으로서 對照句가

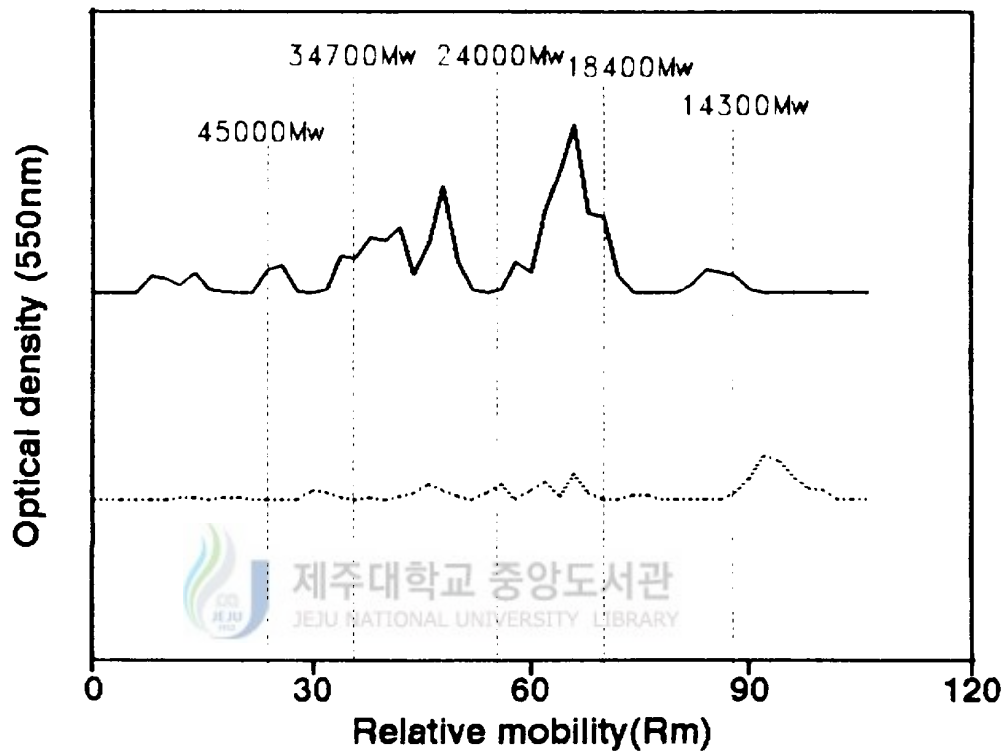


Fig. 13. Molecular weight distribution of rapeseed protein and its hydrolysate by electrophoresis chromatography. (— control      ..... hydrolysate)

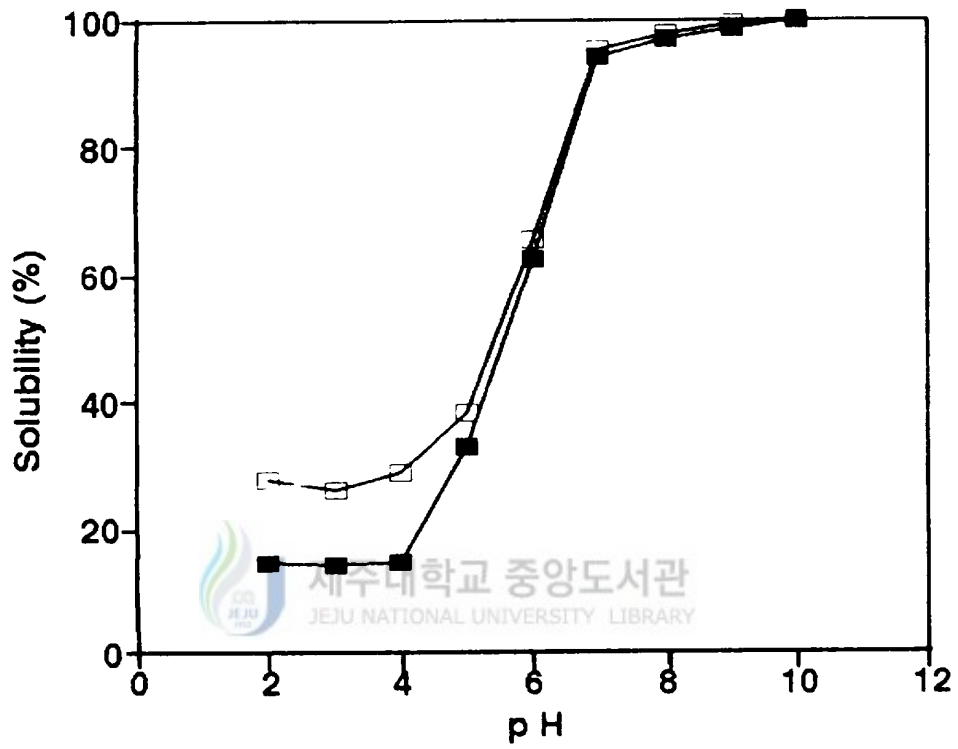


Fig. 14. pH-Solubility of rapeseed protein and its hydrolysate. (—■— control —□— hydrolysate )



1.096 centipoise인 반면 加水分解物은 1.038 centipoise로 감소함을 나타내었다. 粘度는 蛋白質의 수용성 상태에서 流體力學的인 성질을 나타내는 것으로, 粘度의 변화는 蛋白質의 立體構造 및 水和力의 변화에 기인하는 것이다(kella 등, 1988). 粘度는 분산질의 분자량과 깊은 관계가 있으며 분자량이 작을수록 또한 구조가 구형에 가까울수록 粘度는 작아짐으로 본 실험에서 관찰된 현상은 酵素的 加水分解에 의하여 蛋白質의 polypeptide chain이 분해됨으로써 기인한 것으로 해석된다.

칼슘 凝固性은 對照句가 72%인 반면 加水分解物은 55%로 감소함을 나타내었다. Rackis(1977)는 蛋白質의 酵素的 加水分解는 일반적으로 칼슘 凝固性을 감소시키고 水分 吸收力과 거품성을 증가시킨다고 보고하고 있다. 油菜蛋白質의 Pronase 加水分解物은 칼슘 凝固性이 감소하였는데 이러한 칼슘 凝固性은 낙농대 용식품(imitation dairy products)제조에서 영양적 가치를 향상시키기 위하여 칼슘을 첨가할 때 중요하다.

熱 凝固性은 對照句가 7.2%인데 반해 加水分解物은 4.8%로 감소하였다. 蛋白質의 熱 凝固는 pH, 이온강도, 加熱溫度, S-S결합 함량 등 여러가지 요인에 의해 영향을 받는다(Kinsella와 Shetty, 1979). Machiko(1984)는 蛋白質의 熱 凝固는 疎水性과 관계있다고 보고하였는데, 본 연구에서는 油菜蛋白質이 Pronase 加水分解로 인하여 表面 疎水性(Table 4)이 감소함에 따라 熱 凝固性도 감소함을 나타내고 있다. 油菜蛋白質의 Pronase 加水分解로 熱 凝固性이 감소한 것은 熱處理飲料用 蛋白質로 機能性이 좋은 것으로 생각된다.

水分 吸收力은 對照句의 0.36 g water/g protein에 비하여 加水分解物은 0.52 g water/g protein으로 증가하였다. 이것은 加水分解로 인한 極性殘基의 증가로 水分 吸收力이 증가한 것으로 생각되며 Desslie와 Cheryan(1988)의 보고에 따르면 水分 吸收力은 極性 아미노산의 양과 비례한다고 하였고 Beuchat 등(1975)은 加水分解로 인하여 carboxy group, amino group같은 極性基의 증가가 水分 吸收力을 증가시킨다고 보고하였다. 蛋白質의 水分 吸收力에 영향을 미치는 인자는 여러가지인데 pH, ion 濃度 및 蛋白質의 種類, 아미노산의 組成, 탄수화물의 존재, 加工工程 등에 의하여 크게 달라진다고 하였다(Hermansson, 1973).

油 吸收力은 對照句가 7.46 ml oil/g protein인 반면 加水分解物은 9.75 ml oil/g protein으로 油菜蛋白質의 Pronase 加水分解는 油 吸收力을 증가시키는 것으로 나타났다(Table 5). 油 吸收性은 表面 疎水性과 에멀전 특성과도 관계가 있는데 본 실험에서는 加水分解로 인하여 表面 疎水性(Table 4)이 감소하였다는 결과와는 일치하지 않았다. Hutton 등(1981)은 植物 蛋白質의 油 吸收力은 溫度, 粒子 크기, 蛋白質의 變性 정도에 영향을 받는다고 보고하였는데 본 실험의 결과에서 加水分解物의 油 吸收力이 증가하는 Pronase 加水分解로 低 peptide를 얻어 油 吸收力이 증가한 것으로 생각된다. 油 吸收力에 대한 기작은 다른 기능성들에 비해 많이 연구되어 있지 않아서 충분한 설명을 할 수 없지만 Kinsella (1979)등은 油를 물리적으로 포획하는 기작을 油吸收라고 설명하고 있다. 이런 油 吸收力은 식품에 있어서 향미를 보존해 주고 입속에서의 감촉을 좋게 해주는 식품의 機能性 중의 하나이다.

Table 5. Absolute viscosity, calcium precipitation, water and oil absorption of rapeseed protein and its hydrolysate.

	control	hydrolysate
Viscosity(centipoise)	1.096	1.038
Calcium precipitation(%)	71.9	54.9
Heat coagulation (%)	7.2	4.8
Water absorption(g-water/g-protein)	0.36	0.52
Oil absorption(ml-oil/g-protein)	7.46	9.75

#### 7) 거품성 및 에멀전 특성

Table 6은 試料 蛋白質의 거품성을 보여주는 것으로서 對照句는 50%의 거

품 膨脹性을 나타내었고 酵素處理로 66%로 증가하였는데 이것은 對照句에 비하여 16% 증가한 것으로 이러한 결과는 pepsin, papain 加水分解物은 거품성을 증가시켰다는 Harmansson 등(1974)의 보고와도 일치하는 결과를 얻었다. 거품 安定性에 있어서는 對照句가 72%였으나 加水分解物은 69%로 對照句에 비하여 낮은 安定性을 나타내었다. 이러한 결과는 油菜蛋白質은 Pronase 加水分解로 상대적으로 親水性基가 증가(Table 4)하여 安定性이 감소하는 것으로 생각된다. 또한 高粘度에서 거품 安定性이 높는데 본 실험에서는 加水分解物의 粘度의 감소(Table 5)와 더불어 거품 安定性이 감소하는 결과를 얻었다. 기포형성 동안 蛋白質 分子는 air-water interface에 흡착되고 air droplet을 안정시키는 膜을 형성하려고 상호작용을 한다. 이 때 加溶性蛋白質만이 기포형성에 관여할 수 있기 때문에 加溶性蛋白質의 濃度가 중요하다. 기포의 安定性은 protein-protein과 protein-water interface의 상대적 크기에 의해 좌우되며, 이것은 蛋白質 分子상의 전하 정도와 그것의 ionic environment에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Kinsella, 1976). 또한 이러한 거품성에 영향을 미치는 인자로는 거품형성 시간, 蛋白質 濃度, pH와 添加物(鹽, 糖, 香辛料, 脂肪 등)에 영향을 받으며 기포 形成能은 溶解度와 깊은 상관관계를 가지나 安定性은 상관관계를 갖지 않는다는 보고도 있다(Kinsella, 1976).

試料 蛋白質에 대한 에멀전 活性指數, 에멀전 安定性, 에멀전 熱安定性을 측정한 결과는 Table 7과 같다. 에멀전 活性指數는 對照句가 11.89m<sup>2</sup>/g에 비하여 加水分解物은 11.85m<sup>2</sup>/g으로 거의 비슷하였으며, 에멀전 安定性 및 에멀전 熱安定性에 있어서는 0.49m<sup>2</sup>/g, 0.41m<sup>2</sup>/g으로 對照句에 비해 약간 증가하였는데 Harmansson 등(1974)의 pepsin, papain 加水分解物은 에멀전 安定性을 증가시켰다는 보고와는 일치하는 결과를 얻었다. Kuehler(1974)은 加水分解物의 分子 크기가 에멀전 특성을 변화시킨다고 하였고 Sathe 등(1981)은 親水基와 親油基의 平衡, 蛋白質의 濃度, pH 등이 에멀전에 영향을 미친다고 하였으며, Harmansson 등(1974)은 carboxymethylcellulose 같은 安定劑의 사용은 油菜蛋白質의 에멀전 安定性을 10배 이상 증가시켰다고 보고하고 있다. 蛋白質의 에멀전은 많은 용인 즉 機械設計, 기름의 添加速度, 溫度, pH, 蛋白質의 形態, 溶解度 및 濃度, 사용

되는 기름의 種類, 鹽類, 糖類 그리고 水分含量 등에 의해서 영향을 받는다고 알려져 있다(Saffle, 1968).

Table 6. Foaming and emulsion properties of rapeseed protein and its hydrolysate.

	control	hydrolysate
<u>Foaming</u>		
Foaming expansion(%)	50	66
Foaming stability(%)	72	69
<u>Emulsion</u>		
Emulsion activity index(m <sup>2</sup> /g)	11.89	11.85
Emulsion stability(m <sup>2</sup> /g)	0.29	0.49
Emulsion heat stability(m <sup>2</sup> /g)	0.26	0.41



## Ⅳ. 要 約

脫脂油菜粕(*Brassica napus* var Youngsan)으로부터 抽出, 精製하여 얻어진 油菜蛋白質을 酵素로 加水分解하기 위한 最適條件에 대하여 검토하였고, 加水分解物의 理化學的 및 機能的 特性을 조사하였다.

Pronase가 油菜蛋白質에서 Alcalase, Neutrase보다 높은 活性을 나타내었고, 油菜蛋白質의 加熱處理는 Pronase의 활성을 감소시켰다. 또한 油菜蛋白質의 加水分解度는 緩衝液보다는 蒸溜水에서 더 높은 결과를 얻었다. 時間別로는 1시간까지는 급속히 반응이 일어나나 그 이후는 완만해졌다. Pronase에 의한 油菜蛋白質의 加水分解 最適조건은 40°C와 pH 8.0이었고 酵素 對 基質의 比와 基質 濃度는 각각 1/100(w/w), 1%(w/v)이었다. 이와 같은 조건하에서  $k_m$ 은 3.48%(w/v)를 얻었다.

加水分解物의 UV 및 固有螢光 스펙트럼은 각각 274nm, 360nm에서 최대치를 나타내었다. 黃色度는 약간 감소한 반면 表面 疎水性은 약 4배 감소하였다. SDS-PAGE 분석 결과 상당부분이  $1.4 - 1.2 \times 10^4$  dalton의 分子量을 가진 band로 나타났으며, pH別 溶解度는 酸性부근에서 10 - 15%정도 증가하였고, 水分 및 油 吸收性, 거품 膨脹性, 에멀전 安定性은 증가한 반면 絶對 粘度, 熱 및 칼슘 凝固性, 거품 安定性, 에멀전 活性指數는 감소하였다.

## 參考文獻

- Alder-Nissen, J. 1976. Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *J. Agric. Food Chem.*, 24. 1090-1098.
- A.O.A.C. 1988. "Official Methods of Analysis", 13th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- Beuchat, L.R., J.P. Cherry and M.R. Quinn. 1975. Physicochemical properties of peannat flour as affected by proteolysis. *J. Agric. Food Chem.*, 23. 616-623.
- Bliss, F. M. and H.O. Hultin. 1977. Enzyme inactivation by an immobilized protease in a plug flow reactor. *J. Food Sci.*, 42. 425-431.
- Clandinin, D.R. and A.R. Robblee. 1981. Rapeseed meal in animal nutrition : 2 Nonuminant animals. *J. AOCS.*, 682-686.
- Desslie, W.D. and M. Cheryan. 1979. Enzyme modified proteins: A new generation of functional food ingredients. *Illinois Res.*, 21(3). 10-17.
- Desslie, W.D. and M. Cheryan. 1981. Continuous enzymatic modification of proteins in an ultrafiltration reactor. *J. Food Sci.*, 46. 1035-1042.
- Desslie, W.D. and M. Cheryan. 1988. Functional properties of soy protein hydrolysates from a continuous ultrafiltration reactor. *J. Agric. Food Chem.*, 36. 26-31.
- El Nocrashy, A.S., M. Kiewitt, H.K. Mangold and K.D. Mukhejee. 1975. Nutritive value of rapeseed meals and rapeseed protein isolate. *Nutr. Metab.*, 19. 145-152.
- Erdman, J.W. 1979. Oilseed Phytates : Nutritional implications. *Am. Oil. Chem. Soc.*, 56. 736-741.
- Haque, Z.H. and J.E. Kinsella. 1988. Emulsifying properties of food proteins : Bovine serum albumin. *J. Food Sci.*, 53. 416-422.

- Hermansson, A.M. 1973. Determination of functional properties of protein foods. In proteins in human nutrition. Acad. Press, N. Y.
- Hermansson, A.M. 1974. Functional properties of proteins for foods flow properties. *J. Texture studies*. In press.
- Hsu, J.S.L. and C.V. Morr. 1982. Removal of phenolic compounds from soy protein extracts using activated carbon. *J. Food Sci.*, 47, 933-940.
- Hutton, C.W. and A.M. Cambell. 1981. Water and fat adsorption, pp.275-298. In Protein functionality in foods(ed.Cherry, J.P.). ACS sym. 147. Amer. Chem. Soc., Washington, D.C.
- Itzhaki, R.E. and D.M. Gill. 1964. A micro-biuret method for estimating proteins. *Anal. Biochem.*, 9, 401-410.
- Kang, Y.J. 1984. Enzymatic modification of soy proteins: Effect of functional properties of soy isolate upon proteolytic hydrolysis. *Kor. J. Food Sci. Tech.*, 19(2). 211-217.
- Kang, Y.J., K.C. Rhee and Y H. Park. 1988. Hydrolysis of 7S and 11S soy proteins by commercial protease. *Kor. J. Food Sci. Tech.*, 20(3). 338-343.
- Kella, N.K.D., Y.J. Kang and J.E. Kinsella. 1988. Effect of oxidative sulfidolysis of disulfide bond of bovin serum albumin on its structural properties: A physicochemical study. *J. Protein Chem.*, 7, 535-548.
- 김세권, 양현필, 이승호. 1991. 어피의 효소적 가수분해물을 이용한 천연 조미료의 개발. *한국생물공학회지*. 6(4). 327-336.
- Kinsella, J.E. 1976. Functional properties of protein in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 7(3). 219-228.
- Kinsella, J.E., and K.J. Shetty. 1979. Chemical modification for improving functional properties of plant and yeast proteins. pp.37- 65. In Functionality and protein structure(ed. Akiva Pour-EL). ACS Symp. Ser., 92.

- Kinsella, J.E. 1982. Relationship properties of Food proteins. pp.51-103. In Food proteins(ed. Fox, P.F. and J.J. Condon). Applied Sci. Publishers). New York.
- Kramer, A. and W.H. Kwee. 1977. Functional and nutritional properties of tomato protein concentrates. *J. Food Sci.*, 42. 207-211.
- Lacroix, M., J. Amiot and G.J. Brisson. 1983. Hydrolysis and ultrafiltration treatment to improve the nutritive value of rapeseed proteins. *J. Food Sci.*, 48. 1644-1645.
- Lawrie, R.A. 1973. Protein as human food. pp.365-372. The AVI publishing Co. Ltd., Westport Connecticut.
- 이장순, 강동섭, 강영주. 1990. 유채박 단백질의 추출 및 정제에 관한 연구. *한국식품과학회지*. 22. 780-785.
- Lineweaver, H. and D. Burk. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56. 658-666.
- Machiko, M. and S.Matsushita. 1984. Improvement of water absorption of soybean protein by treatment with bromelain. *J. Agric. Food Chem.*, 32. 486-490.
- Matil, K.F. 1971. The functional requirements of proteins for foods. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 48. 477-480.
- Nakai, S. and W.D. Powrie. 1981. Modification of proteins for functional and nutritional improvements. pp. 217-242. In Cereals a renewable resource, theory and practice(ed. Pomeranz, Y. and L. Munck). Am. Assoc. Cereal Chem., St. Paul, Minnesota.
- Pearce, K.N. and J.E. Kinsella. 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.*, 26. 716-723.
- Phillips, R.D. and L.R. Beuchat. 1981. Enzyme modification of proteins. pp. 275-298. In Protein functionality in foods(ed. Cherry, J.P.). ACS Sym.



- Ser. 147. Amer. Chem. Soc., Washington, D. C.
- Ponnampalan, R., M.A. Vijayalakshmi, L. Lemieux and J. Amiot. 1987. Effect of acetylation on composition of phenolic acids and proteolysis of rapeseed flour. *J. Food Sci.*, 52(6). 1552-1594.
- Pour-El, A. 1981. Protein functionality: Classification, definition and methodology. pp. 1-19. In Protein functionality in foods(ed. Cherry, J. P.). ACS Sym. Ser. 147. Amer. Chem. Soc., Washington, D.C.
- Rackis, J.J. 1977. Enzyme in soybeans processing and quality control. pp. 244-265. In Enzymes in food and beverage processing(ed. Org, R.L. and A.S.St. Angelo). ACS Sym. Ser. 47, Amer. Chem. Soc., Washington, D.C.
- Saffle, R.L. 1968. Meat emulsions. *Adv. Food Res.*, 16. 105-116.
- Sathe, S.K. and D.K. Salunkhe. 1981. Functional properties of the Great Northern Bean ( *Phaseolus Vulgaris* L.) proteins : Emulsion, foaming, viscosity and gelation properties. *J. Food Sci.*, 46. 71-79.
- Schmid, F.X. 1989. Spectral method of characterizing protein conformation and conformational changes. pp.251-276. In Protein structure(ed. Creighton, T.E. ). IRL Press.
- Shukla, T.P. 1982. Chemical modification of food proteins. pp.275-300. In Food protein deterioration(ed. Cherry, J.P. ). ACS Sym. Ser. 206. Amer. Chem. Soc., Washington, D. C.
- Sosulski, F.W. 1983. Rapeseed protein for food use. pp. 109-132. In Development in food protein-2(ed. Hudson, R.J. ). Elsevier Applied Science, New York, U.S.A.
- Toro-vazquez, J.F. and J.M. Rengenstein. 1989. Physicochemical parameters of protein additives and their emulsifying properties. *J. Food Sci.*, 54. 1177-1185.

## 謝 辭

本 研究를 위하여 깊은 激勵와 사랑으로 指導하여 주신 姜永周 指導教授님께 깊은 感謝를 드리며, 論文審査 過程에서 많은 助言과 激勵을 주신 金在河 教授님, 高榮煥 教授님, 그리고 여러 면에서 가르침을 주신 宋大鎭 教授님, 河礎桓 教授님, 任尙彬 教授님과 美國 코넬大學에서 研修 중인 金洙賢 教授님께 感謝드립니다.

또한 주위에서 物心兩面으로 도움을 주신 姜東燮 先生님, 金昌龍 先生님, 吳明哲 先生님, 그리고 생활을 같이하며 성원과 도움을 주신 여러 선배님과 후배님들, 친구, 주위 분들께도 感謝드립니다.

그리고 오늘이 있기까지 激勵을 아끼지 않으시던 작은 아버님, 형님들, 형수님, 동생, 친지 어르신들께 고마움을 전합니다.

끝으로 항상 念慮와 사랑으로 이끌어 주신 어머님께 이 論文을 回甲 선물로 드립니다.