

# 말쥐치육 단백질의 효소적 가수분해물을 이용한 Plastein의 합성 및 그 물성

## 2. Plastein의 일반적 성상과 IR Spectrum

金世權·李應昊\*

釜山水産大學 應用化學科, \*釜山水産大學 食品工學科

(1987년 7월 1일 수리)

# Synthesis and Functional Properties of Plastein from the Enzymatic Hydrolysates of Filefish Protein

## 2. General Properties and IR Spectrum of Plasteins

Se-Kwon KIM and Eung-Ho LEE\*

Department of Applied Chemistry, National Fisheries University of Pusan, Pusan, 608 Korea

\*Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan,  
Pusan, 608 Korea

(Accepted July 1, 1987)

In order to develop a new type of food source for the effective utilization of fish protein, plastein reaction was applied to improve the functional properties of filefish protein.

Plasteins were synthesized from a peptic filefish protein hydrolysate by papain, pepsin,  $\alpha$ -chymotrypsin and protease(from *Streptomyces griceus*) under the optimum conditions of previous paper<sup>19</sup>). Also, L-glutamic acid diethylester and L-leucine ethylester were incorporated into plastein during the plastein reaction by papain. And, General composition, yield, molecular weight, amino acid composition, color and IR spectrum of plasteins were measured.

The protein, ash and lipid content of the plasteins were 72~78%, 7.4~11.8% and 0.3~0.9%, respectively. The yield of plasteins were papain 55.0%, pepsin 47.6%,  $\alpha$ -chymotrypsin 38.3%, protease 23.6%, glutamic acid-incorporated plastein (Glu-plastein) 35.0%, and leucine-incorporated plastein (Leu-plastein) 45.7%. The glutamic acid and leucine content in Glu-plastein and Leu-plastein were 38.7%, 41.7%, respectively, while the contents in the peptic filefish protein hydrolysate were 16.01% and 8.16%, respectively. The amino acid compositions were similar to that of the original filefish muscle protein.

The major molecular weights of the peptic hydrolysate estimated by gel filtration were 2,000 and 310, and those of plasteins were 21,000 and 4,900 for papain, 24,000 for pepsin, 18,500 for  $\alpha$ -chymotrypsin, 6,700 for protease, 24,000 for Glu-plastein and 17,000 for Leu-plastein.

The structural changes in freeze-dried filefish meat, the FPC and hydrolysate were not observed on the IR spectrum. But plasteins showed amide I band in 1,600~1,700 $cm^{-1}$  range and resulted in a strong band in 800~850 $cm^{-1}$ , 700~750 $cm^{-1}$  and 650~700 $cm^{-1}$ . The amide I band of Glu-plastein was wider than those of other plasteins and had also a small band at 1,440 $cm^{-1}$ .

## 서론

Plastein 반응을 유용화할 수 있는 예로서는 plastein 합성과정에서 유리아미노산을 도입하는 것이다. 식품에 아미노산의 보충은 일반적으로 유리아미노산이 첨가되는데 이와 같은 방법으로 보충된 아미노산은 가공 또는 조리 중에 쉽게 손실된다.

Yamashita 등<sup>1)</sup>은 단백질 및 peptide 에 함유아미노산을 보충하기 위한 수단으로서 plastein 반응을 이용하여 cysteine 을 plastein 에 쉽게 도입시키는데 반해 methionine 은 그렇지 못했다고 하였다. 또한 이들은 아미노산을 직접 공유결합으로 도입할 수 있는 일단계 과정을 개발하여 대두단백질에 methionine 을 81.5 molar % 도입시켰다<sup>2)</sup>. Monti 와 Jost<sup>3)</sup>는 대두단백질의 pepsin 가수분해물에 methionine ethylester 를 papain 으로 14.3%가 공유결합된 plastein 을 얻었다고 하였으며, methionine 이 강화된 plastein 은 물에 불용성이라 하였다.

Aso 등<sup>4)</sup>은 zein 에 부족한 lysine, threonine 및 tryptophan 을 도입시킨 plastein 에는 이들 함량이 각각 2.14, 9.24 및 9.71%였으며, 이들 아미노산 함량이 원료 zein 중에는 각각 0.20, 2.40 및 0.38%였다고 보고하였다.

Yamashita 등<sup>5)</sup>과 Arai 등<sup>6)</sup>은 아미노산 ethylester 의 도입은 그 아미노산 측쇄의 소수성에 의존된다고 하였으며, Aso 등<sup>7)</sup>은 esterifying alcohol 의 사슬길이 길면 길수록 소수성도 증가되어 아미노산 ester 의 도입율은 커진다고 하였다. Noar 와 Ship<sup>8)</sup>은 일단계 과정에 의한 아미노산 도입의 소수력과 정전기력에 관한 연구를 한 바 있다.

Yamashita 등<sup>9)</sup>은 대두단백질의 가수분해물에 필수아미노산을 도입한 plastein 과 대두단백질과의 영양성을 검토한 결과, plastein 은 식품으로 이용하는 데 문제가 없다고 하였다.

Edward 와 Ship<sup>10)</sup>은 plastein gel 은 용해된 가수분해물이 효소적 작용에 의해 형성되고, gel 강도는 gel 망상구조를 형성하는 응집력에 의존된다고 하였으며, Sukan 과 Andrew<sup>11)</sup>는 casein plastein 을 가열하면 gel 구조가 수시간내에 완전히 재형성하는 thixotropic gel 의 성질을 갖는 불투명한 제품이 형성된다고 하였다.

Yamashita 등<sup>12)</sup>, Tsai 등<sup>13)</sup> 및 Arai 등<sup>14)</sup>은 gel chromatography 분석법으로 plastein 과 기질의 분자량을 측정 한 결과, plastein 의 분자량은 증가되었다

고 보고한 반면, Hofsten 과 Lalasidis<sup>15)</sup> 및 Sukan 과 Andrew<sup>11)</sup>는 기질과 plastein 의 분자량에는 어떤 차이도 발견하지 못했다고 하였다.

Plastein 반응은 주로 단백질 가수분해물의 쓴맛을 감소시키거나<sup>16)~18)</sup>, 균형있는 단백질 강화식품을 생산하기 위해 필수아미노산 도입에 관한 연구보고<sup>2)~4)</sup>는 많지만 어육단백질의 기능성 개선(機能性改善)에 plastein 반응을 이용한 연구보고는 찾아볼 수 없다.

본 연구에서는 말쥐치육 단백질의 pepsin 가수분해물로부터 papain, pepsin,  $\alpha$ -chymotrypsin 및 protease 를 이용하여 합성한 plastein 과 이들의 물성을 개량하기 위해 papain 으로 plastein 합성시 유리 glutamic acid 및 leucine 을 도입시킨 plastein 의 일반성분, 수율, 아미노산 조성, 분자량, 색조 및 IR spectrum 을 측정하여 비교 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 가수분해물의 조제

전보<sup>19)</sup>의 방법에 따라 말쥐치 마쇄육 16 kg 에 물 13 l 을 가하여 균질화한 다음 2 N HCl 과 물을 가하여 pH 2.0 으로 조절하였다. 이 때 pepsin 16 g 을 소량의 물에 용해시킨 후 효소와 기질의 비가 1:100 이 되도록 기질용액에 서서히 가하여 40°C 의 진탕항온수조(60 strokes/min, Philip harris limited Model SS 40)에서 24시간 가수분해하였다. 가수분해 후 1N NaOH 로 pH 7.0 으로 조절하였으며, 또한 잔존해 있는 pepsin 을 불활성화하기 위해 2시간동안 실온에서 교반하였다.

가수분해물은 12,000 g 에서 10분간 원심분리하였으며, 그 상층액의 유리지방을 제거하기 위해 Whatman No.1 여지로 여과한 후 동결건조(DURA-DRY corrossion resistant Freezer-Dryer, F.T.S. System Inc.)하였다. 동결건조된 가수분해물은 용기에 넣어 밀폐하여 5°C 에 저장하여 두고 실험에 사용하였다.

### 2. Plastein 합성

말쥐치육 단백질의 pepsin 가수분해물을 기질로 하여 전보<sup>19)</sup>의 plastein 합성 최적조건에 따라 pH는 pepsin 의 경우 4,  $\alpha$ -chymotrypsin 7, papain 과 protease 는 6으로 조절하였으며, 기질농도 40%(papain 의 경우만 50%), 첨가효소농도 1%로 하여 50°C 에서 24시간 진탕항온수조(Philip harris limited Model

SS 40)에서 반응시켜 plastein을 합성하였다. 이 때 20% TCA 용액을 동광 가한 다음 plastein을 침전시키기 위하여 유리병으로 교반한 후 원심분리(5000 rpm, 15 min)하였다. TCA 반응분을 위하여 동결건조한 후 5°C에 저장하여 두고 실험에 사용하였다.

이 때 첨가된 효소는 pepsin (1:10,000 Nakarai Chemicals Co.),  $\alpha$ -chymotrypsin(51 unit/mg solid, from Bovin pancreas type II, Sigma), papain (19 unit/mg solid, from papaya latex, Sigma), protease (5.6 unit/mg solid, from *Streptomyces griseus*, Sigma)였으며, pH는 2 N HCl로 조절하였다.

### 3. 아미노산 도입 plastein 합성

Plastein 반응에 의한 L-glutamic acid 및 L-leucine의 도입은 Yamashita 등의 일단계법을 이용하였다. 즉 동결건조된 가수분해물 20 g씩을 각각 100 ml beaker에 취하고, 여기에 증류수 10 ml씩을 가하여 교반한 다음, L-glutamic acid 및 L-leucine 10 g씩을 증류수에 용해시켜 0.1 N HCl 및 0.1 N NaOH로 pH를 맞추어 가며 혼합하면서 다시 pH를 조절하였다. 여기에 papain 300 mg을 0.01 M L-cysteine에 녹인 것을 주입하여 pH를 6으로 맞추었다. 여기서 기질 농도는 50%가 되도록 조절하였으며 50°C에서 24시간 반응시켰다. 반응 후 즉시 10배의 0.2 N NaOH로 처리한 후 세로판 주머니로 5°C에서 3일간 투석한 다음 동결건조하였다.

이 때 사용된 아미노산은 L-glutamic acid diethyl-ester HCl (Sigma Co.), L-leucine ethylester HCl (Nakarai Chemical Co.) 및 cysteine(Fluka Garantie)였으며, 합성효소로서는 papain(19 unit/mg solid, Sigma Co.)을 사용하였다.

### 4. 일반성분 및 아미노산의 정량

수분은 상압건조법, 지방은 Soxhlet 법, 회분은 건식회화법, 그리고 단백질은 Semi-micro Kjeldahl법으로 측정하였다.

아미노산조성 분석은 각 시료 0.05 g을 정확히 달아 ampou에 넣고 6N HCl 2 ml를 가하여 진공밀봉한 다음 110°C sand bath에서 24시간 가수분해시켰다. 가수분해된 시료는 rotary evaporator로써 염산을 제거한 후 구연산 완충액(pH 2.2)으로 25 ml로 정용하여 아미노산 자동분석계(LKB 4150- $\alpha$ 형)로서 분석정량하였다.

그리고 tryptophan 함량은 Spies와 Chamber<sup>20)</sup>의

방법으로, Cysteine 함량은 Pieniazek 등<sup>21)</sup>의 방법에 따라 정량하였다.

### 5. Gel 여과에 의한 분자량 측정

가수분해물의 gel 여과는 Yuen<sup>22)</sup> 및 Zerwekh<sup>23)</sup>에 준해서 행하였다. 즉 동결건조한 가수분해물 0.1 g을 2 ml의 50% 초산용액에 용해시킨 후, 50% 초산으로 평형화된 Sephadex G-25 column(2×95 cm)으로 gel 여과하였으며, 용리액의 단백질농도는 분광광도계(Shimadzu UV-140-02)로서 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분자량 측정에 사용한 표준물질은 lysine (MW 146), penta alanine (MW 445), glamicidin D (MW 2000) 및 insulin (MW 5700)이며 각 표준물질 0.01 g씩을 각각 0.5 ml의 50% 초산용액에 용해시킨 후에 ninhydrin 정색반응에 의해 표준물질을 검지하였으며, 분자량 측정용 표준곡선은 Andrew<sup>24)</sup>의 방법에 따라 작성하였다.

Plastein의 gel 여과는 동결건조한 plastein 0.1 g을 2 ml의 50% 초산용액에 용해시킨 후 가수분해물과 동일한 방법<sup>23), 24)</sup>으로 Sephadex G-50 column(2×95 cm)으로 gel 여과하였으며, 단백질농도는 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분자량 측정에 사용한 표준물질은 glamicidin D(MW 2,000), insulin (MW 5,700), cytochrome C(MW 12,400) 및 carbonic anhydrase(MW 29,000)였다. 0.01 g의 glamicidin D를 2 ml의 50% 초산용액에 용해시켜 gel 여과한 후 용리액을 ninhydrin 정색반응에 의하여 검지하였으며, 그 밖의 표준물질인 insulin, cytochrome C 및 carbonic anhydrase는 각각 0.01 g씩을 1 ml의 0.1M 식염을 함유한 0.01 M 인산염 완충액(pH 7.0)으로 용해시켜 동일한 완충액으로 용리시킨 후에 280 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 표준물질을 검지하였으며, 분자량 측정용 표준곡선은 Andrew<sup>24)</sup>의 방법에 따라 작성하였다.

### 6. 색조 측정

색차계(일본전색: model ND-1001 DP)를 사용하여 제품의 색조에 대한 L 값(명도), a 값(갈색도), b 값(황색도) 및  $\Delta E$ (갈변도)를 측정하였다.

### 7. IR spectrum 분석

동결건조한 분말시료를 만들어 KBr를 대조구로 하여 IR spectrum(Perkin Elmer 1330)을 측정하였다. KBr cell은 KBr 분말을 130°C에서 24시간 가

열건조한 후 desiccator 에서 방냉시킨 다음 KBr 200 mg 과 시료 3 mg 을 잘 혼합한 후 10분간 700 kg/cm<sup>2</sup> 의 압력하에서 성형하였다.

결과 및 고찰

1. 제품의 일반성분, 수율 및 아미노산조성

Plastein 제품의 일반성분은 Table 1과 같다. 단백질함량은 plastein 제품에 따라 큰 차이는 없었으나 protease 가 72.4%로 다소 낮았으며, 지방함량도 거의 비슷하였으나 glutamic acid 및 leucine 을 도입시킨 plastein 이 다른 제품에 비해 2배정도 많은 함량이었다. 회분함량은 pepsin 가수분해물이 19.3%로 매우 높았으며, plastein 제품의 경우도 7.4~11.8로 비교적 높은 함량을 나타내었으나 아미노산이 도입된 plastein 의 회분함량은 모두 낮은 편이었다. 이와 같이 plastein 제품에 회분함량이 높은 것은 침전된 회분에 들어 있는 삼염화아세트산 또는 그 이외의 복합염에 기인되는 것으로 생각된다.

Table 1. Chemical composition of freeze-dried peptic hydrolysate, FPC and plastein

Product	Moisture	Protein	Lipid	Ash
Peptic hydrolysate	4.6	72.8	2.4	19.3
FPC	7.2	81.3	0.1	6.4
Pepsin plastein	12.9	76.0	0.4	7.4
$\alpha$ -chymotrypsin plastein	10.3	77.7	0.4	8.9
Papain plastein	9.1	76.4	0.3	11.2
Protease plastein	14.7	72.4	0.4	11.8
Glu-papain plastein	12.4	79.0	0.8	3.9
Leu-papain plastein	13.8	78.6	0.9	4.1

수율은 Table 2에 나타난 바와 같이 papain plastein 이 55.0%로 가장 높았으며, 다음이 pepsin plastein 47.6%,  $\alpha$ -chymotrypsin 38.3%였고, protease plastein 이 23.6%로 가장 낮았으며, leucine 이 도입된 제품의 수율은 45.7%로 glutamic acid 가 도입된 제품의 35%보다 높았다. Montecalvo 등<sup>25)</sup>은 가자미 분말단백질의 plastein 합성시 pepsin 및  $\alpha$ -chymotrypsin plastein 의 수율은 각각 46.0 및 40.5%였다고 보고하였으며, Onoue 와 Riddle<sup>26)</sup>은 어류폐기물의 pepsin 가수분해물을 기질로 하여 합성효소로 pH 5에서 합성반응시킨 결과, plastein 수율이 35%였다고 보고한 바 있다. Edward 와 Ship<sup>1)</sup>은 상업적 egg albumin 의 pepsin 가수분해물로부터  $\alpha$ -chymotrypsin 23% 및 papain 10%를 합성효소로 사용하여 plastein

Table 2. Percent yield of plastein reaction products using 10% TCA as precipitating agents

Product	Amount Protein		Protein Yield	
	(g)	(%)	(g)	(%) <sup>a</sup>
Pepsin plastein	19.0	76.0	14.5	47.6
$\alpha$ -Chymotrypsin plastein	15.3	77.7	11.9	38.3
Papain plastein	22.0	76.4	16.8	55.0
Protease plastein	9.5	72.4	6.9	23.6
Glu-papain plastein	10.5	79.3	8.4	35.0 <sup>b</sup>
Leu-papain plastein	13.7	78.6	10.7	45.7 <sup>b</sup>

a : % yields were calculated from a starting quantity of 40 g hydrolysate

b : % yields were calculated from a starting quantities of 20 g hydrolysate and 10 g amino acids

수율을 조사한 결과, 30%의 수율을 얻었다고 하였다. 본 연구결과에서는 papain 과 pepsin 이 plastein 합성효소로 적합하다고 생각되었다.

원료어, FPC, 가수분해물 및 plastein 제품의 아미노산조성은 Table 3과 같다. 원료어와 FPC 간에는 아미노산 함량은 비슷하였으나, 가수분해물의 경우는 원료어에 비하여 glutamic acid 가 차지하는 함량이 다소 높았으나 arginine 및 histidine 함량은 오히려 낮았다. 그러나 전체적인 아미노산 조성간의 함량에는 큰 차이가 없었다. 4종의 효소로 합성한 plastein 제품의 경우는 protease plastein 의 아미노산 조성 중 다른 plastein 제품에 비하여 leucine 함량이 적었으나 tyrosine 함량은 오히려 많았으며, papain plastein 에 있어서는 arginine 함량이 다른 plastein 제품에 비하여 낮았다. 그러나 4종류 plastein 제품간에는 아미노산 조성에 있어서 큰 차이가 없었다.

Glutamic acid 를 도입시킨 제품은 glutamic acid 함량이 38.72%로서 대조구인 papain plastein 의 13.98%에 비하여 월등히 높았다. Leucine 을 도입시킨 제품의 경우도 leucine 함량이 41.7%로 대조구인 papain plastein 의 10.05%에 비하여 월등히 높았다. Yamashita 등<sup>27)</sup>은 대두단백질에 glutamic acid 를 도입시킨 결과, L-Glu- $\alpha$ ,  $\gamma$ -OEt<sub>2</sub> 41.93%, L-Glu- $\alpha$ -OEt<sub>2</sub> 32.18% 및 유리 L-glutamic acid 25.00%가 도입되었다고 보고한 바 있다.

2. 분자량

1) 가수분해물의 분자량

동결건조된 가수분해물 0.1 g 을 50%초산으로 용해시켜 동일한 용액으로 Sephadex G-25 column 에

Table 2. Amino acid composition of raw fish, FPC, peptic hydrolysate and plastein products. (g-A. A./16 g-N)

Amino acid	Raw fish	FPC	Peptic hydrolysate	Plastein Products					
				Pepsin	$\alpha$ -Chymotrypsin	Protease	Papain	Glu-papain	Leu-papain
Cys	1.27	1.64	1.06	0.89	0.94	1.16	1.05	0.86	0.85
Asp	9.32	9.60	9.98	7.09	7.54	7.61	8.72	4.40	3.70
Thr	3.85	3.65	3.98	2.83	2.96	3.42	2.28	2.21	2.23
Ser	3.36	3.01	3.42	2.12	2.01	2.75	3.44	1.66	1.63
Glu	13.95	14.19	16.02	11.65	11.99	11.66	13.98	38.72	6.34
Pro	2.05	2.18	2.08	2.07	2.39	1.90	2.67	1.33	1.69
Gly	4.26	4.46	4.58	3.73	3.88	3.73	4.36	2.25	1.99
Ala	4.12	4.10	4.30	3.34	3.84	3.45	4.08	2.65	2.60
Val	5.44	5.45	4.92	5.66	6.65	5.23	6.30	4.67	3.60
Met	3.73	3.06	3.17	2.91	4.00	3.30	3.55	1.85	1.93
Ile	5.47	5.62	4.97	6.09	7.38	6.17	7.37	4.55	5.61
Leu	8.56	8.98	8.66	9.38	10.43	7.72	10.05	6.62	41.70
Tyr	3.00	2.98	2.41	2.17	2.94	8.88	2.73	2.20	2.07
Phe	4.17	4.06	3.51	3.87	4.75	3.85	4.64	2.67	2.36
His	9.08	6.91	7.59	7.88	8.06	8.35	6.69	4.67	6.75
Trp	1.32	1.10	0.97	1.60	1.47	0.85	1.81	1.01	0.49
Lys	12.54	12.89	10.60	12.83	10.51	12.27	10.51	8.76	7.84
NH <sub>3</sub>	2.02	2.28	1.72	3.08	2.65	3.03	2.24	1.59	1.39
Arg	7.96	8.64	5.18	8.46	7.24	8.36	4.12	6.50	5.68

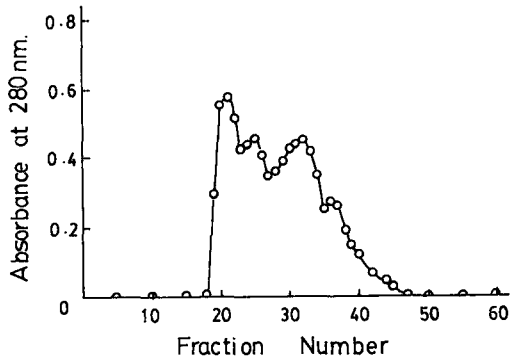


Fig. 1. Gel filtration of hydrolysate of filefish muscle on a Sephadex G-25 column(2×95 cm). Eluent : 50% acetic acid, Flow rate : 60ml/hr, Fraction volume : 5ml.

의하여 gel 여과한 크로마토그램을 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 분자량 2,000 및 310의 peptide성 분자가 주종을 이루고 있으며, 이외에도 분자량 1,600 및 유리아미노산 형태로 추정되는 분자량 120의 물질들이 소량 함유된 것으로 나타났다. Tsai 등<sup>28)</sup>은 gel 여과법으로 대두단백질의 가수분해물의 분자량을 측정한 결과, 4개의 획분이 얻어졌으며 분자량이 685 및 1,043인 획분이 대부분을 차지하고 있었고, 이외의 polypeptide 획분과 유리아미노산 획분도 소량 존재하였다고 보고하였으며,

Sukan과 Andrews<sup>29)</sup>는 카제인과 분말 skim-milk의 가수분해물의 분자량이 400과 800 사이에서 가장 plastein 수율이 높았다고 보고한 바 있다.

## 2) Plastein의 분자량

동결건조한 plastein 제품 0.1 g을 Sephadex G-50 column으로 gel 여과한 크로마토그램을 Fig. 2 및 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 말

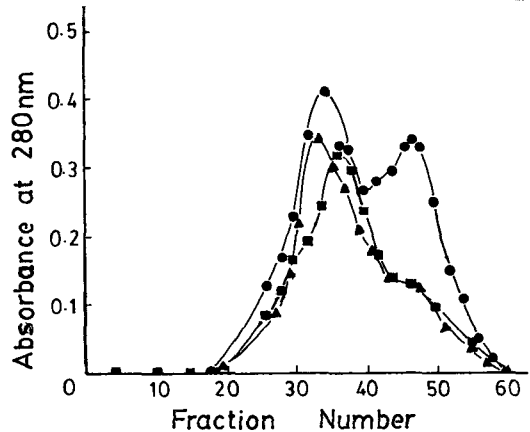


Fig. 2. Gel filtration of papain plastein(●), Glu-papain plastein(▲) and Leu-papain plastein(■), on a Sephadex G-50 column(2×95cm). Eluent : 50% acetic acid, Flow rate : 40ml/hr, Fraction volume : 5ml.

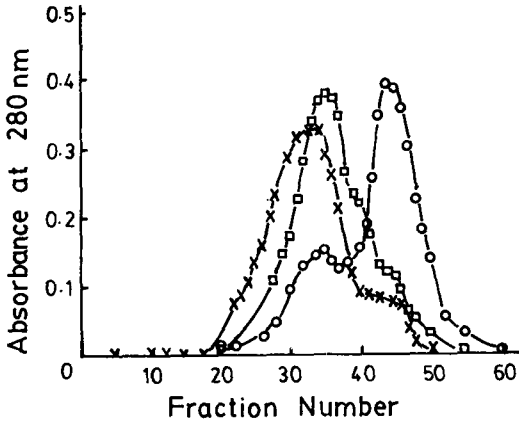


Fig. 3. Gel filtration of pepsin plastein(x), protease plastein(o) and  $\alpha$ -chymotrypsin plastein( $\square$ ) on a Sephadex G-50 column(2 $\times$ 95 cm). Eluent: 50%acetic acid, Flow rate: 40 ml/hr, Fraction volume: 5 ml.

취취육 단백질의 pepsin 가수분해물을 papain 으로 합성한 plastein 은 분자량이 21,000 및 4,900인 합성 단백질이 주종을 이루고 있었으나, glutamic acid 가 도입된 Glu-plastein 은 분자량이 24,000으로 papain plastein 의 분자량 보다 컸다. 이같은 결과는 glutamic acid 의 도입으로 carboxyl 잔기에 의한 이온결합의 형성으로 인해 고분자량인 24,000의 단백질이 형성된 것으로 추정되었다. 그러나 papain 으로 합성 시 leucine 을 도입시킨 plastein 은 분자량이 17,000 과 4,900의 두획분이 나타나 오히려 papain plastein 의 분자량 보다 작았다. 한편 Fig. 3에 나타난 바와 같이 pepsin plastein 의 분자량이 24,000의 단백질이 대부분 이었으며 소량인 분자량 4,900의 저분자량인 단백질이 합성되어 Glu-plastein 의 분자량과 같았다.  $\alpha$ -chymotrypsin plastein 은 분자량이 18,500인 단백질이 주종을 이루고 있었으며 분자량이 11,000 및 6,700인 단백질이 소량 존재하였다. Protease 로 합성한 plastein 은 앞의 경우와 달리 분자량 18,500인 단백질이 소량 분포하고 있었으나 분자량 6,700의 저분자 단백질을 다량 함유하고 있는 것이 특징이었다. 이와 같은 결과는 전보<sup>19)</sup>의 plastein 합성에 protease 는 적합하지 않다는 결과를 뒷받침해 주고 있다. Yamashita 등<sup>20)</sup>은 평균분자량이 1,550인 대두단백질의 pepsin 가수분해물로 만든 plastein 제품의 분자량은 5,490이었다고 보고하였으나, Tsai 등<sup>13)</sup>은 분자량이 1,043인 대두단백질의 pepsin 가수분해물로 합성한 plastein 의 분자량은 약 25,000였다고 보고하였다. Edward 와 Shippe<sup>10)</sup>는 pepsin 으로 egg albumin 을 가수분해시킨 가수분해물의 분자량은 6,500~10,

500 범위였으며, 이것으로 합성한 pepsin plastein 의 분자량은 35,000 및 11,000이었고,  $\alpha$ -chymotrypsin plastein 의 경우는 분자량이 25,000, 13,000 및 11,000이었다고 보고하였으며, Hofsten 과 Lalasidis<sup>15)</sup>는 plastein 은 물과 buffer 용액에 용해도가 낮기 때문에 분자량 측정에 많은 차이가 있다고 지적하였다.

### 3. 제품의 색조

각 제품의 색조를 적시색차계를 사용하여 명도(L), 적색도(a), 황색도(b) 및 갈변도( $\Delta E$ )값을 측정된 결과는 Table 4와 같다. 명도 L값은 전반적으로 높은 값이었고, pepsin plastein 과 Glu-papain plastein 이 90.6으로 가장 높아 순백색에 가까웠고, 가수분해물 및 FPC 는 각각 78.6, 72.5로 비교적 낮은 값을 나타내었다. 적색도 a 값은 FPC 가 1.0으로 약간 높았고, plastein 제품의 경우는 0 $\pm$ 0.02 범위의 값으로 거의 비슷하였다. 반면에 황색도 b 값과 갈변도를 나타내는  $\Delta E$  값은 다른 제품에 비해 pepsin 가수분해물과 FPC 가 높은 값을 나타낸 것이 특징이었다. 그러나 제품의 색조에 있어서 현저한 차이는 볼 수 없었다.

Table 4. Color value of peptic hydrolysate, FPC and plastein products

Product	Color value			
	L	a	b	$\Delta E$
Peptic hydrolysate	78.6	-0.1	17.8	20.0
FPC	72.5	1.0	15.1	22.7
Plastein products				
Pepsin plastein	90.6	-0.2	6.5	4.0
$\alpha$ -Chymotrypsin plastein	88.9	0.0	7.7	5.7
Papain plastein	86.3	-0.2	9.4	8.5
Protease plastein	86.2	0.0	10.7	9.6
Glu-papain plastein	90.6	-0.2	6.5	4.0
Leu-papain plastein	89.9	-0.1	6.7	4.3

### 4. IR spectrum

Fig. 4는 단백질 구조의 특징적인 기능기 및 구조 전이를 정성적으로 판단하기 위하여 가수분해물, 동결건조한 어육 및 FPC의 IR spectrum 을 비교하여 나타낸 것이다. Fig. 4에서 알 수 있듯이 어육은 1,650  $cm^{-1}$ 에서 비교적 강한 흡수띠를 가지고 있었으며, FPC 와 가수분해물은 약하기는 하나 동일한 파장영역에서 어육과 일치하는 흡수띠를 나타내고 있었다. 이 같은 결과로 미루어 IR spectrum 상에서는 FPC 및 가수분해물의 특징적인 잔기의 노출과 화학결합의

말쥐치육 단백질의 효소적 가수분해물을 이용한 Plastein의 합성 및 그 물성

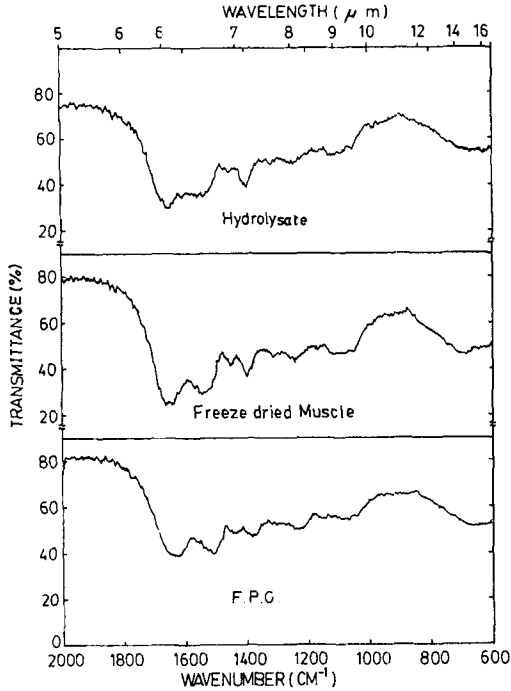


Fig. 4. The infrared spectrum of peptic hydrolysate, freeze-dried muscle and F.P.C.

재배열에 따른 구조변화를 관찰하기는 어려웠다. 그러나 말쥐치육 단백질의 pepsin 가수분해물을 이용하여 pepsin, papain, protease 및  $\alpha$ -chymotrypsin 으로 합성한 plasteins의 IR spectrum을 측정할 경우 (Fig. 5)는 어육과 동일한 파장영역인  $1,600\sim 1,700\text{ cm}^{-1}$ 에서 강한 흡수띠를 가진 amide I 띠가 나타났으며, 특히  $800\sim 850\text{ cm}^{-1}$ ,  $700\sim 750\text{ cm}^{-1}$  및  $650\sim 700\text{ cm}^{-1}$ 에서 강한 흡수띠가 새로이 생성되는 것을 확인하였다.

이같은 실험결과는 어육단백질이 가수분해됨에 따라  $\alpha$ -나선구조 및  $\beta$ -나선구조가 풀림과 동시에 무작위 구조 및 peptide의 생성이 증가하기 때문인 것으로 판단된다. 또한 이와 같은 흡수띠가 protease로 합성시킨 plastein의 경우는 강하지 않은 것으로 미루어 보아 protease는 pepsin, papain 및  $\alpha$ -chymotrypsin에 비하여 plastein 합성이 약하기 때문이라 판단되었는데, 이같은 결과는 protease plastein이 분자량이 가장 작은 것으로 미루어 알 수 있었다.

이와 관련하여 Jeneks<sup>31)</sup>는 IR spectrum 상에 나타나는 amide I, II 및 V mode는 polypeptide와 단백질구조 분석에 이용할 수 있으며, 특히  $\alpha$ -나선구조는  $600\text{ cm}^{-1}$ 에서,  $\beta$ -나선구조는  $700\text{ cm}^{-1}$ 에서 무작위적인 풀림구조는  $650\text{ cm}^{-1}$ 에서 각각 강력한 흡수

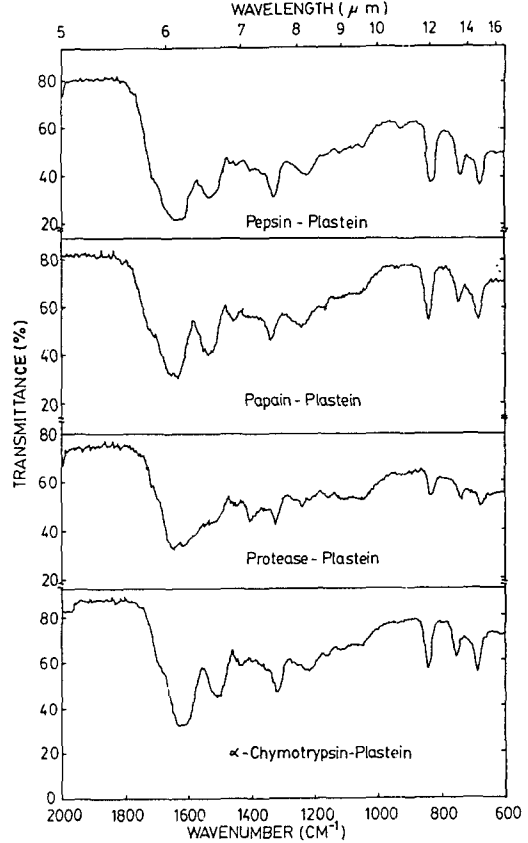


Fig. 5. The infrared spectrum of pepsin-plastein, papain-plastein, protease plastein and  $\alpha$ -chymotrypsin plastein.

띠를 생성한다고 보고하였다. 또한 Timaseff<sup>32)</sup>는 IR spectrum 상에 나타난  $1,630\text{ cm}^{-1}\sim 1,530\text{ cm}^{-1}$ 에서의 강한 흡수띠는 polypeptide와 단백질의  $\beta$ -구조상의 특징이며,  $1,650\text{ cm}^{-1}$ 와  $1,685\text{ cm}^{-1}$ 의 약한 흡수띠는 소량의  $\alpha$ -나선구조 및 역평형인 sheet 구조와 관련된다고 보고하였다.

Fig. 6은 가수분해물을 이용하여 papain으로 plastein 합성시 glutamic acid와 leucine을 각각 도입시킨 plasteins의 구조적인 변화를 IR spectrum으로 측정할 것이다. Glutamic acid가 도입된 plastein의 경우 단백질의 특징적인 amide I의 흡수띠가 넓게 퍼진 반면,  $1,440\text{ cm}^{-1}$ 에서의 작은 흡수띠가 분명하게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 이같은 결과는 glutamic acid 첨가에 따른 carboxylate ion의 특징적인 흡수파장 때문인 것으로 판단된다. 한편 지방족 아미노산인 leucine을 도입시킨 plastein은 leucine 도입에 의한 특징적인 흡수띠의 변화는 나타나지 않은 것으로 미루어 IR spectrum 만으로 leucine 도입

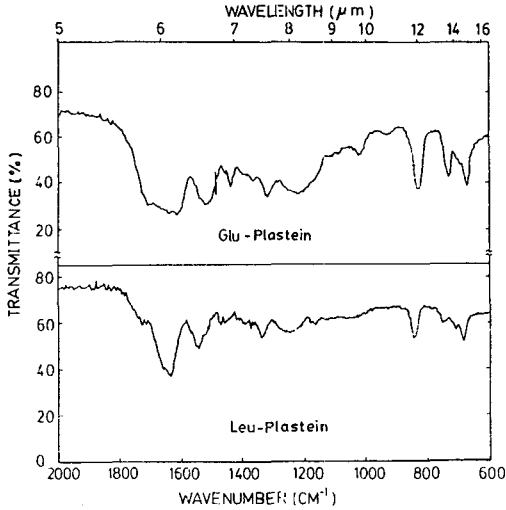


Fig. 6. The infrared spectrum of Glu-papain plastein and Leu-papain plastein.

에 의한 구조변화를 판단할 수 없었다.

Jeneks<sup>31)</sup>는 알칼리 첨가시 carboxylate ion의 흡수띠가 일어날 경우  $1,410\text{ cm}^{-1}$  부근에서 흡수띠가 생성되며, 이 때 흡수띠의 강도는 단백질의 carboxylate 함량과 관계가 있다고 보고하였으며, Yamashita 등<sup>30)</sup>은 plastein 형성에 있어서 IR spectrum에 의한 peptide 결합형성의 존재를 확인한 결과  $1,575\text{ cm}^{-1}$ 에서 이온화된 carboxyl기가 감소되었으나,  $1,450\text{ cm}^{-1}$ 에서는 deuterated amide가 증가하였는데, 이같은 결과는 plastein 반응초기에서도 일어났다고 하였다.

### 요 약

Papain, pepsin,  $\alpha$ -chymotrypsin 및 protease을 이용하여 말린 콩 단백질의 pepsin 가수분해물로 부터 합성한 plastein과 유리 glutamic acid 및 leucine을 도입시킨 plastein의 일반성분, 아미노산조성, 분자량, 색조 및 IR spectrum을 측정하여 비교 검토한 결과를 요약하면 다음과 같다.

Plastein의 단백질함량은 76.4~79.0%였으나 protease plastein만이 72.4%로 다소 낮았으며, 회분함량은 7.4~11.8%로 Glu-papain plastein과 Leu-papain plastein의 3.9% 및 4.1%보다 높았고, 지방함량은 0.3~0.9% 범위였다.

수율은 papain plastein이 55%로 가장 높았고, pepsin plastein,  $\alpha$ -chymotrypsin 및 protease plastein은 각각 47.6%, 38.3%, 23.6%였으며, Glu-

papain plastein과 Leu-papain plastein은 각각 35.0%, 45.7%였다.

Plastein 종류에 따른 아미노산조성에는 큰 차이는 없었으며, Glu-papain plastein과 Leu-papain plastein의 glutamic acid 및 leucine 함량은 각각 38.7%, 41.7%였으나 대조구인 papain plastein에서는 이들의 함량이 14.0%, 10.1%에 불과하였다.

Gel 여과법에 의한 가수분해물의 분자량은 2,000 및 310인 것이 주종을 이루었으나 이외에도 분자량이 1,600 및 120인 회분도 존재하였다. Plastein의 분자량은 papain plastein이 21,000 및 4,900였으며, pepsin plastein 24,000,  $\alpha$ -chymotrypsin plastein 18,500, protease plastein 6,700, Glu-papain plastein 24,000, Leu-papain plastein은 17,000이었다.

IR spectrum상에서는 동결건조육, FPC 및 가수분해물간에 거의 차이가 없었다. 그러나 plastein의 경우는 이들과 달리  $800\sim 850\text{ cm}^{-1}$ ,  $700\sim 750\text{ cm}^{-1}$  및  $650\sim 700\text{ cm}^{-1}$ 에서 강한 흡수띠가 나타났지만 protease plastein만이 흡수띠가 비교적 약하였다. Glu-papain plastein은 amide I의 흡수띠가 넓게 퍼진 반면에  $1,440\text{ cm}^{-1}$ 에서 새로운 흡수띠가 나타났다. 그러나 Leu-papain plastein의 경우는 특징적인 흡수띠가 나타나지 않았다.

### 문 헌

- 1) Yamashita, M., S. Arai, S.J. Tsai and M. Fujimaki. 1971. Plastein reaction as a method for enriching the sulfur-containing amino acid level of soybean protein. *J. Agr. Food Chem.* 19, 1151-1154.
- 2) Yamashita, M., S. Arai, Y. Imaizumi, Y. Amanoland and M. Fujimaki. 1979. A one-step process for incorporation of *L*-methionine into soy protein by treatment with papain. *J. Agr. Food Chem.* 27(1), 52-56.
- 3) Monti, J. and R. Jost. 1979. Papain-catalyzed synthesis of methionine enriched soy plastein average chain length of the plastein peptides. *J. Agr. Food Chem.* 27(6), 1281-1285.
- 4) Aso, K., M. Yamashita, S. Arai and M. Fujimaki. 1974. Tryptophan-, Threonine-, and Lysine-enriched plasteins from zein. *Agr. Biol. Chem.* 38(3), 679-680.
- 5) Yamashita, M., S. Arai and M. Fujimaki. 19



76. Plastein reaction for food protein improvement. *J. Agr. Food Chem.* 24(6), 1100—1104.
- 6) Arai, S., M. Yamashita and M. Fujimaki. 1976. Enzymatic modification for improving nutritional qualities and acceptability of protein extracted from photosynthetic microorganisms *Spirulina maxima* and *Rhodospseudomonas capsulata*s. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 22(2), 447—451.
- 7) Aso, K., M. Yamashita, S. Arai, J. Suzuki and M. Fujimaki. 1977. Specificity for incorporation of  $\alpha$ -Amino acid esters during the plastein reaction by papain. *J. Agr. Food Chem.* 25(5), 1138—1141.
- 8) Noar, S.R. and W.F. Shipe. 1984. A study of the forces involved in the incorporation of *L*-Methionine into soy protein by the one-step plastein-like process. *J. Food Sci.* 49(4), 1316—1317.
- 9) Yamashita, M., S. Arai, M. Gonda, H. Kato and M. Fujimaki. 1970. Enzymatic modification of proteins in foodstuffs pt. II. Nutritive properties of soy plastein and its bio-utility evaluation in rats. *Agr. Biol. Chem.* 34(9), 1333—1337.
- 10) Edwards, J.H. and W.F. Shipe. 1978. Characterization of plastein reaction products formed by pepsin,  $\alpha$ -chymotrypsin and papain treatment of egg albumin hydrolysates. *J. Food Sci.* 43(5), 1215—1218.
- 11) Sukan, G. and A.T. Andrews. 1982. Application of the plastein reaction to caseins and to skim-milk powder. II. Chemical and physical properties of the plasteins and the mechanism of plastein formation. *J. of Dairy Res.* 49(2), 279—293.
- 12) Yamashita, M., S. Arai, S. Kokubo, K. Aso and M. Fujimaki. 1974. A plastein with an extremely high amount of glutamic acid. *Agr. Biol. Chem.* 38(6), 1269—1271.
- 13) Tsai, S.J., M. Yamashita, S. Arai and M. Fujimaki. 1974. Polyacrylamide gel electrophoresis of plasteins. *Agr. Biol. Chem.* 38(3), 641—644.
- 14) Fujimaki, M., K. Utaka, M. Yamashita and S. Arai. 1973. Production of higher quality plastein from a crude single-cell protein. *Agr. Biol. Chem.* 38(3), 679—680.
- 15) Hofsten, B. and G. Lalasidis. 1976. Protease catalyzed formation of plastein products and some of their properties. *J. Agr. Food Chem.* 24(3), 460—465.
- 16) Arai, S., M. Yamashita and M. Fujimaki. 1975. Plastein reaction and its applications. *Cereal Food World* 20(2), 107—112.
- 17) Yamashita, M., S. Arai, J. Matsuyama, H. Kato and M. Fujimaki. 1970. Enzymatic modification of protein in food stuffs. Part. IV. Bitter dipeptides as plastein-building blocks debittering of peptic proteolyzate with  $\alpha$ -chymotrypsin. *Agr. Biol. Chem.* 34(10), 1492—1500.
- 18) Savangikar, V.A. and R.N. Joshi. 1979. Modification of leaf protein concentrate by the use of plastein reaction. *J. Sci. Food Agr.* 30(5), 899—904.
- 19) Kim, S.K. and E.H. Lee. 1987. Synthesis and functional properties of plasteins from the enzymatic hydrolysates of filefish protein. 1. The conditions of protein hydrolysis and plastein synthesis from peptic hydrolysate. *Bull. Korean Fish. Sci.* 20(4), 282—262.
- 20) Spices, J.R. and D.C. Chamber. 1948. Chemical determination of tryptophan. Study of color forming reactions of tryptophan *p*-dimethylaminobenzaldehyde and sodium nitrate in sulfuric acid solution. *Anal. Chem.* 20(1), 30—39.
- 21) Pieniazek, D., Z. Grabarek and M. Rakowska. 1975. Quantitative determination of the content of available methionine and cysteine in food proteins. *Nutr. Metabol.* 18(1), 16—22.
- 22) Yuen, P. 1978. Studies on removal characterization of bitter compounds in pepsin-hydrolyzed fish protein. Master's thesis. University of Washington, 81—83.
- 23) Zerwekh, M.A. 1976. Molecular weight distribution of peptides from proteolytic hydrolysates of fish waste. Master's thesis, University

- of Washington, 65—71.
- 24) Andrews, p. 1964. Estimation of the molecular weight of proteins by Sephadex gel filtration. *Biochem. J.* 91(2), 222—233.
- 25) Montecalvo, J. Jr., S.M. Constantinides and C.S.T. Yang. 1984. Enzymatic modification of fish frame protein isolate, *J. Food Sci.* 49 (5), 1305—1309.
- 26) Onoue, M. and L.M. Riddle. 1973. Use of plastein reaction in recovering protein from fish waste. *J. Fish. Res. Board(Canada)* 30, 1745—1747.
- 27) Yamashita, M., S. Arai, S. Kokubo, K. Aso and M. Fujimaki. 1975. Synthesis and characterization of a glutamic acid enriched plastein with greater solubility. *Agr. Food Chem.* 23 (1), 27—30.
- 28) Tsai, S.J., N. Yamashita, S. Arai and M. Fujimaki. 1972. Effect of substrate concentration of plastein productivity and some rheological properties of the products. *Agr. Biol. Chem.* 36(4), 1045—1049.
- 29) Sukan, G. and A.T. Andrew. 1982. Application of the plastein reaction to caseins and to skim-milk powder. I. Protein hydrolysis and plastein formation. *J. of Dairy Res.* 49(2), 265—278.
- 30) Yamashita, M., S. Arai, J. Matsuyama, M. Gonda, H. Kato and M. Fujimaki. 1970. Enzymatic modification of proteins in food-stuffs. Part III. Phenomenal survey on  $\alpha$ -chymotrypsin plastein synthesis from peptic hydrolyzate of soy protein. *Agr. Biol. Chem.* 34 (9), 1484—1491.
- 31) Jeneks, W.P. 1963. In *methods in enzymology*. Colowick, S.P. and N.O. Kaplan (ed), Infrared measurements in aqueous media, Vol.6, 914—928. Academic Press, London.
- 32) Timasheff, S.N. and H. Susi. 1966. Infrared investigation of the secondary structure of  $\alpha$ -lactoglobulin. *J. Biol. Chem.* 24(1), 249—251.