

방사선 조사가 분리대두단백의 기능적, 구조적 특성에 미치는 영향

오경남 · 이숙영
중앙대학교 식품영양학과

Effects of gamma irradiation on the functional and structural characteristics of soy protein isolates

Kyeung Nam Oh, Sook Young Lee
Department of Food and Nutrition, Chung Ang University

Abstract

The effects of irradiation on the functional and structural characteristics of soy protein isolates were studied. Soymilk was irradiated at 1, 5, and 10kGy, after which soy protein isolates were prepared. The functional properties of soy protein isolates were examined including solubility, emulsion capacity and stability, foam capacity and stability, structural properties as represented by SDS-PAGE pattern, and secondary and tertiary structures. The solubility and emulsion capacity were increased by radiation treatment at 1kGy however the values were adversely affected again as dosage was increased above 5kGy. As irradiation dosage increased, an increase of foaming capacity at 1kGy and a decreasing turnover afterwards were also noted in foaming capacity, although the differences were not statistically significant. The SDS-PAGE pattern showed fragmentation and aggregation of protein molecules as affected by irradiation in proportion to the dosage increase. The results of CD and fluorescence spectroscopy revealed increased aperiodic structure contents with the dosage increase. It was assumed that irradiation dosage from 5 to 10kGy could initiate minimal denaturation of protein in various foods compared to general heat treatment.

Key words : irradiation, soy protein isolates, functional, structural

1. 서 론

식품의 방사선조사는 살균, 살충, 발아억제 및 숙도 조절의 목적으로, 1921년 미국에서 처음으로 제안되어 1950년부터 많은 식품에 이용되고 있다. 그 사용 선량은 주로 Co 60(코발트 60)의 감마선으로 1kGy 미만의 저선량, 1~10kGy의 중선량, 10kGy 이상의 고선량을 실험목적에 맞게 사용하는 것으로 되어 있다. 식품의 방사선조사는 WHO(World Health Organization), IAEA (International Atomic Energy Agency), FAO(Food and Agriculture Organization of the United Nations)와 같은 국제기구에서 인정받아 40여 개국에서 향신료, 곡류, 과채류, 육류, 그리고 해산물 등 50여 개의 식품에 허가되어 있으며, 이

중 28개국에서 상업적으로 조사되고 있다.

식품의 방사선조사는 위생 안전성과 관련하여 많은 연구가 이루어져 왔지만 식품이 가지고 있는 구조적 특성이나 이화학적 특성과 관련한 연구는 미흡하다. 식품을 가공할 때 건조와 가열처리 방법은 식품내 조직의 변화와 비타민, 단백질과 같은 일부 영양소의 파괴를 가져올 수 있고, 화학약품에 의한 처리는 잔류와 독성유발로 인체에 폐해를 끼칠 수 있기 때문에 새로운 대체 기술 즉, 방사선 조사 기술이 주목받고 있다¹⁻⁵⁾.

식품에 대한 방사선조사는 생성된 라디칼 이온은 구성성분과의 상호작용에 의하여 적은 성분 변화를 일으킨다. 즉, 단백질은 방사선조사에 의하여 생산되어진 라디칼과의 반응으로 이화학적, 구조적 성질이 변한다. 단백질은 영양과 함께 다양한 생리적 기능을 가지고 있기 때문에 방사선조사로 인한 단백질의 변화는 잘 살펴볼 필요가 있다. 지금까지 식품의 방사선조사와 관련된 단백질에 대한 연구는 살균과

Corresponding author: Sook Young Lee, Chung Ang University, 72-1 Nae-Ri Daedukmyun, Anseong-Si, Gyeonggi-Do 456-756, Korea
Tel: 82-31-670-3274
Fax:
E-mail: syklee48@hanmail.net

생물학적 변화 중심으로 이루어져 왔는데 단백질의 기능적 구조적 특성은 제품의 가공적성과 생리적 기능성과 밀접한 관련이 있기 때문에 이와 관련된 연구가 필요하다. 또한 방사선조사가 단백질의 분자적 및 이화학적 특성 변화를 유도하고 식품단백질의 기능성에 영향을 준다는 측면을 고려해 볼 때, 식품공정에 다양하게 이용되고 있는 방사선조사에 대한 특성변화를 연구하는 것은 단백질이 주된 식품에 방사선조사의 적용성을 검토하는 데 있어서 매우 의의가 있다고 생각한다. 따라서 콩 단백질의 가공시 열처리에 의한 단백질 변성을 최대한으로 저하시키면서 저장안정성을 증가시킬 수 있는 방사선 조사 식품가공에 매우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

따라서 방사선조사에 의한 단백질의 성질은 수분이 있는 상태에서 조사되면 방사선조사 효과가 더 명확하게 나타나기 때문에 본 연구는 진품콩 두유에 10kGy 이하 선량으로 방사선을 조사하여 두유 가공품을 제조할 때 살균 과정에서 고온 가압 처리 방법을 사용하는 대신 방사선조사 처리로 냉살균 효과를 주고자 하였다. 따라서 진품콩 두유를 제조하고 방사선조사 처리 후 분리대두단백을 추출한 다음 분리대두단백의 용해도, 유화력 그리고 기포력의 기능적 성질과 SDS-PAGE를 통한 단백질 분자량 패턴, 그리고 2차구조 및 3차 구조의 구조적 성질 변화를 살펴 보고 방사선조사의 식품 가공 적성을 검토하였다.

II. 실험 방법

1. 식품의 방사선 조사

방사선조사는 국내 방사선조사 허가 선량, WHO/FAO/IAEA 그리고 Codex국제적 합의 규격의 기준사항을 참고하여 조사하였다. 방사선조사는 한국원자력 연구소의 Co 60 감마선 조사 시설(Type IR-79, Nordion International, Ontario, Canada)을 이용하여 시간당 일정한 선량률로 조사하고 총 흡수선량은 ceric cerous dosimeter(Bruker Instruments, Rjeomstettem, Germany)로 확인하였다. 분리대두 단백질 제조를 위한 진품콩 두유의 방사선조사는 가공 적성 확인을 위해 1, 5, 10kGy 선량으로 조사하였다.

2. 분리대두단백의 제조

Saio와 Watanabe⁶⁾의 방법을 약간 수정하여 분리대두단백을 Fig. 1과 같이 제조하였다. 진품콩 200g에 증류수 1.5l를 붓고 4°C에서 12시간 침지시켜 불린 후 두유제조기에 넣고 두유를 만들었다. 제조된 두

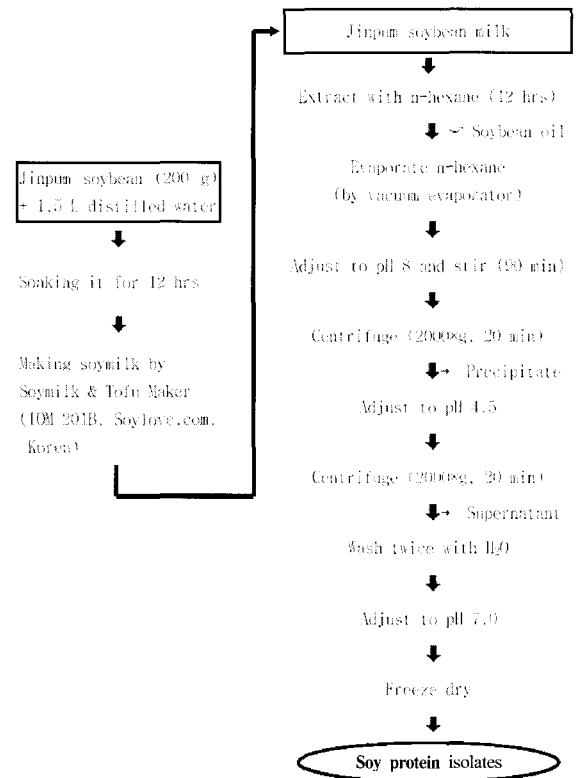


Fig. 1. Preparation of soy protein isolates from Jinpum soybean.

유는 0, 1, 5, 10kGy로 방사선조사하고 분리대두단백을 제조하였다. 분리대두단백의 제조는 진품콩 두유에 지방을 분리시키기 위해서 n-hexane을 첨가하여 교반한 다음 분액 깔대기에서 12시간 방치시킨 후 아래층의 두유를 분리시키고 유기용매를 휘발시켰다. 지방을 용출시킨 진품콩 두유에 6 N NaOH로 pH 8.0으로 맞춘 후 실온(23°C)에서 약 1시간 30분 동안 교반하면서 단백질을 용출시켰다. 이 분산액을 2,000 ×g에서 20분간 원심분리하여 침전물을 얻고 증류수로 두 번 세척한 다음 6 N NaOH로 pH 7.0으로 맞춘 후 동결건조하였다. 동결 건조한 분리대두 단백을 분쇄기에 갈아서 사용하였다. 제조된 분리대두 단백질 시료는 용해도, 유화력, 기포력, 분자량 pattern, 2차 구조, 3차 구조 측정에 사용되었다.

3. 용해도

용해도(solubility)는 Franzen과 Kinsella⁷⁾의 방법을 이용하여 측정하였다. 방사선조사 및 비조사 분리대두단백을 각각 0.3g씩 0.1 N NaOH로 pH 7과 12로 조절하였다. 이것을 60ml씩 원심 분리관에 취하여 6,000×g로 30분간 원심분리한 다음 상층액 1ml에

Buuret 시약 4mL을 혼합하여 30분간 실온에서 방치한 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 용해도는 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{Solubility}(\%) = \frac{\text{Absorbance at pH 7 solution (soluble protein in supernatant)}}{\text{Absorbance at pH 12 solution (Total protein)}} \times 100$$

3. 유화 형성력

유화 형성력(emulsion capacity)은 Swift와 Sulzbacher⁸⁾의 방법을 수정하여 측정하였다. 대두유는 Oil-Red-O (0.1g/l)로 염색하여 사용하고, 착색된 대두유 20mL를 1% 단백질 분산액 25mL(pH 7.0)에 첨가하였다. 그리고 disperser(GTR-1000, EYELA, Japan)를 사용하여 1분 동안 저속으로(300rpm)으로 분산시킨 후 최대 속도(1,000rpm)로 30초 동안 분산하고 10mL/min의 속도로 대두유를 계속 첨가하면서 대두유의 색과 점성의 변화가 생기는 시점까지의 대두유 사용량을 측정하였다. 유화 형성력은 유화에 사용된 대두유의 부피(mL)로 계산하였다.

4. 유화 안정성

유화 안정성(emulsion stability : ES)은 Pearce와 Kinsella⁹⁾의 탁도 측정방법을 이용하여 측정하였다. 1% 대두단백 용액의 pH를 7.0으로 조절한 후 자석 교반기로 10분간 교반한 다음 25mL를 취하여 대두유 0.82mL를 넣고 homogenizer(T25-S1, Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Germany)로 100rpm에서 1분간 교반하였다. 유화의 형성 직후와 30분 후에 0.1mL의 유화액을 취해 0.1% sodium dodecyl sulfate(SDS) 용액으로 1:150이 되게 희석한 다음 500nm에서 흡광도를 측정하여 탁도를 구하고 유화 안정성은 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{ES}(\%) = \frac{T \text{ of emulsion after 30min}}{T \text{ of initial emulsion}} \times 100$$

T : turbidity = 2.303 A/L, A : absorbance,
L : pathlength of cuvette (1cm)

5. 기포 형성력

기포 형성력(foam capacity : FC)은 Poole¹⁰⁾의 방법을 약간 수정하여 측정하였다. 방사선조사 및 비조사 SPI 1% 용액을 pH 7.0으로 조절하여 비커에 20mL씩 취한 후 homogenizer로 8,000rpm에서 4분간 균질화하여 기포를 형성시켰다. 형성된 기포를 메스

실린더에 붓고 30초간 방치한 뒤 기포의 부피 변화를 측정하여 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{FC}(\%) = \frac{\text{Total volume of foam including liquid} - \text{Initial liquid volume}}{\text{Initial liquid volume}} \times 100$$

6. 기포 안정성

기포 안정성(foam stability : FS)은 기포 형성력 측정시와 같은 방법으로 기포를 형성한 후 형성된 기포를 실온에서 30분간 방치한 후 남아있는 기포의 부피를 재어 초기 기포 부피에 대한 남아있는 기포의 부피비로 기포 안정성을 계산하였다.

$$\text{FS}(\%) = \frac{\text{Foam volume after 30 min including liquid}}{\text{Initial foam volume including liquid}} \times 100$$

7. 단백질의 분자량 패턴

단백질 분자량 패턴(SDS-PAGE : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)은 Laemmli¹¹⁾의 방법에 따라 실시하였고, separating의 gel의 acrylamide 농도는 12.5%였고 stacking gel의 acrylamide의 농도는 5%를 사용하였다. 방사선조사 및 비조사된 시료는 0.1g을 평량하고 10mM 인산완충용액(pH 7.0) 10mL를 가하여 용해한 후 10분간 원심분리하였고(11,600 ×g), 이 상등액을 0.45μm microfilter로 여과한 후 sample buffer와 혼합하여 사용하였다. 단백질 농도의 측정에는 Bradford¹²⁾ 방법에 준해서 실시하였으며 비조사 시료, 1kGy, 5kGy, 그리고 10kGy의 단백질 농도는 각각 0.069%, 0.075%, 0.071%, 0.065%였다. 전기영동용 표준 단백질은 Bio-Rad사 제품을 사용하였고 그 내용은 다음과 같다: myosin, 200kDa; β-galactosidase, 116.25kDa; phosphorylase b, 97.4kDa; ovalbumin, 45kDa; babonic anhydrase, 31kDa; soybean trypsin inhibitor, 21.5kDa; lysozyme, 14.1kDa.

8. 단백질의 2차 구조

방사선조사된 진품콩 분리대두단백의 2차 구조의 변화를 확인하기 위해서 Table 1의 조건에 따라 spectropolarimeter(JASCO J-720)를 이용하여 25°C에서 circular dichroism(CD) 연구를 수행하였다. 방사선조사된 분리대두단백은 Far-UV CD에서 최적 농도가 되도록 10mM 인산완충용액(pH 7.0)을 가하여 희석하여 사용하였고 이때의 비조사 시료, 1kGy, 5kGy, 10kGy의 농도는 각각 1.20%, 1.13%, 1.13%, 1.16%였다. CD spectrum은 1mm pathlength cell을 사용하

여 5회 반복하여 측정하였으며, 얻어진 spectrum은 polynomial fitting curve를 이용하여 smoothing한 후 specific ellipticity(deg cm²dgm⁻¹)로 나타냈다. 그리고 2차 구조 함량은 Chang 등¹³⁾ 방법에 따라 Far-UV CD spectrum을 분석하였다.

9. 단백질의 3차 구조

방사선조사된 진품콩 분리대두단백의 3차 구조를 확인하기 위해서 Table 2와 같은 조건으로 형광광도계(Spectrofluoremeter, JASCO-FP 750, Japan)를 사용하여 방사선 조사된 시료를 260nm와 295nm에서 각각 여기(excitation)하고 emission intensity를 측정하였다. 방사선조사된 단백질 시료는 저장 중 생성된 가능성이 있는 불용성 단백질과 불순물을 제거하기 위하여 5분간 원심분리(15,000 ×g)하여 그 상등액을 사용하였으며, 최적의 emission spectrum을 얻기 위한 농도가 되도록 10mM 인산완충용액(pH 7.0)을 가하여 희석하였다. 이때의 비조사 시료, 1kGy, 5kGy, 그리고 10kGy 조사 시료의 농도는 각각 0.32%, 0.33%, 0.34%, 0.32%였다.

6. 통계처리

방사선 조사된 분리대두단백의 기능적 구조적 특성 연구에서 분석된 모든 결과들은 PC-SPSS(version 9.0

for windows)를 사용하여 통계분석하였다. 통계분석은 ANOVA 프로그램의 Tukey's Honestly Significant Difference(HSD) test를 이용하여 유의성을 검증하였다¹⁴⁾.

III. 결과 및 고찰

1. 용해도

방사선조사가 분리대두단백의 용해도에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 진품콩 두유에 0, 1, 5, 그리고 10kGy의 방사선을 조사하고 분리대두단백을 제조한 후 용해도를 측정, 비교하였다. 비조사 시료의 용해도는 73.54%, 1kGy조사 시료의 용해도는 73.87%로 비조사 시료의 용해도보다 조금 더 높은 반면, 5kGy와 10kGy 조사 시료의 용해도는 각각 72.79%와 68.75%로 비조사 시료에 비해서 용해도가 더 낮았으며 조사 선량이 증가할수록 용해도가 감소하는 경향을 보였다. 방사선조사에 대한 용해도의 통계적 유의성을 살펴본 결과(Table 3), 비조사 시료와 1kGy, 5kGy 조사시료 간에는 유의적인 차이는 없었다(p<0.05). Kempner¹⁵⁾는 단백질이 방사선조사되면 저분자량의 단백질이 과다하게 생성되어 이들 단백질 간에 중합을 형성하고 용해도가 떨어진다고 하였다. Hafez 등¹⁶⁾은 10~100kGy의 방사선 흡수 선량 범위

Table 1. Experimental condition for circular dichroism study

Instrument	JASCO J-715 Spectropolarimeter(Japan)
Flow rate	2kgf/cm ² (N ₂ gas)
Path length	1mm
Step resolution	0.2 or 0.5nm/sec
Scan speed	50nm/min
Accumulation	5
Response	1sec
Sensitivity	50mdeg

Table 2. Experimental condition for fluorescence spectroscopy

Instrument	Spectrofluoremeter(JASCO-FP 750, Japan)
Measurement mode	Emission spectrum
Pathlength	10mm
Response	Fast
Sensitivity	Medium
Excitation wavelength	280nm or 295nm
Emission wavelength	300~400nm
Scan speed	125nm/min
Number of cycle	5cycle

Table 3. Functional properties of soy protein isolates irradiated at various doses

Irradiation dose (kGy)	Functional properties				
	Solubility(%)	Emulsion capacity(ml)	Emulsion stability(%)	Foam capacity(%)	Foam stability(%)
0	73.54 ^a ± 0.68	211.25 ^a ± 1.49	92.12 ^a ± 0.58	34.12 ^a ± 2.72	93.68 ^a ± 0.59
1	73.87 ^a ± 0.74	216.50 ^a ± 2.72	90.74 ^a ± 0.41	38.62 ^a ± 5.41	92.06 ^a ± 0.25
5	72.79 ^a ± 0.75	209.75 ^{ab} ± 2.06	91.86 ^a ± 0.27	36.52 ^a ± 3.32	92.44 ^a ± 0.29
10	68.75 ^b ± 0.97	203.75 ^b ± 1.31	92.39 ^a ± 0.51	35.62 ^a ± 2.78	92.50 ^a ± 0.74
F-value	8.799 ^{**}	8.849 ^{**}	3.101	0.254	1.859

* Mean ± standard error, ** p<0.01

a,b) Mean with different superscripts in the same column differ significantly (p<0.05).

에서 대두 단백질의 총 질소 함량에는 변화가 없으나 단백질 용해도는 흡수선량이 증가함에 따라 직선적으로 감소한다고 보고하였다. 본 연구에서는 1kGy 조사 시료는 비조사시료에 비해서 방사선조사에 의한 단일 분자의 증가로 용해도가 다소 증가하는 경향을 보였지만 비조사 시료와 유의적인 차이가 없었고, 5kGy와 10kGy 조사 시료는 단백질 분자의 지나친 분해로 단일 분자간의 중합을 형성하고 분자량이 더 커지면서 소수성에 대한 친수성 잔기의 비율이 감소되면서 용해도가 저하하는 경향을 보여 위의 연구들과 같은 결과를 나타냈다. 따라서 5kGy 조사 선량까지는 단백질의 용해도를 다소 증가시키거나 저하시키지 않는 것으로 나타났으므로 방사선조사의 이용이 안전한 수준으로 사용될 수 있는 것으로 사료되었다.

2. 유화 형성력 및 유화 안정성

진품콩 단백질의 방사선에 대한 유화력 특성을 살펴보기 위해서 분리대두단백을 제조하고 유화 형성력과 유화 안정성을 살펴보았다. 용해도 결과와 유사하게 1kGy 조사 시료의 유화 형성력이 비조사 시료의 유화 형성력보다 더 높았고 5kGy 조사 시료와 10kGy 조사 시료는 비조사 시료에 비해서 더 낮았으며 조사선량이 증가할수록 감소하는 경향을 보였다. 통계적인 유의성을 살펴본 결과(Table 3), 비조사 시료와 1kGy, 5kGy 조사 시료 간에는 유의적인 차이는 없었고($p>0.05$) 10kGy 조사 시료는 비조사 시료와 1kGy 조사 시료와는 차이를 보이면서($p<0.05$) 유화형성력이 매우 낮은 것으로 나타났다. 유화력은 일정한 크기의 peptide가 있으면 유화 형성력이 좋아진다¹⁷⁾. 또한, 유화력은 peptide 크기뿐만 아니라 peptide의 화학적, 구조적 특성에 의해서도 영향을 받는데 단백질의 부분적 분해는 물-기름 계면에서 유화에 참여할 수 있는 peptide 수를 증가시키고 단백질 내부에 있는 소수성 잔기들을 노출시켜 hydrophilic-lipophilic balance를 높여줌으로써 유화력을 향상시킬 수 있다. Franzen 등¹⁸⁾은 단백질의 유화력과 용해도의 변화에 대한 직접적인 관계를 보고하였지만 항상 일치하는 경향을 보이지 않는다고 하였다. 본 연구에서 1kGy 조사 시료는 단백질의 단일 분자화로 유화에 참여할 수 있는 peptide 수를 증가시켜 유화력이 좋아진 반면, 5kGy와 10kGy 조사 시료는 지나친 분해로 중합을 형성하여 구형단백질이 증가함으로써 유화를 형성하는 잔기들의 면적을 최소화하여 유화력이 저하된 것으로 보였다.

유화 안정성은 비조사 시료에 비해 1kGy 조사 시료의 안정성이 낮은 경향을 보였지만 유의적인 차이는 없었고(Table 3), 5kGy와 10kGy 조사시료의 유화 안정성은 1kGy 조사 시료에 비해서 다소 높고 조사 선량이 증가할수록 높은 경향을 보였지만 유의적인 차이는 없었다($p>0.05$). 유화안정성은 peptide 길이가 지나치게 짧아지면 유화를 형성하고 있는 구형이 쉽게 깨어져서 기름방울을 둘러싸는 유화막이 얇아지고 경계면에서의 consistency가 낮아지므로 저하된다¹⁹⁾. 또한 유화 안정성은 구형 단백질 사이에 반발력이 친화력보다 큰 경우에 유지되는데, 두 상 (phase) 사이에 계면장력(interfacial tension), 경계면에 흡착된 필름의 특성, 구형 단백질의 전기적 전하의 크기, 구형 단백질의 크기와 표면/부피비율, 분산되어지는 것과 분산매의 무게/부피 비율, 분산상의 점도 등에 의해 영향을 받는다²⁰⁾. 본 연구의 1kGy 조사 시료는 방사선에 의해 단백질 분자 길이가 짧아지면서 유화를 안정시키기엔 불안정하였으며 5kGy와 10kGy 조사 시료는 방사선조사에 의해 끊어진 분자들이 중합을 하여 구형단백질을 형성하고 조사 선량이 증가할수록 구형 단백질 크기가 커지면서 형성된 유화를 더 안정시켜 선행 연구들이 본 연구의 결과를 뒷받침하고 있다.

3. 기포 형성력 및 기포 안정성

방사선조사에 의한 분리대두단백의 기포력 특성을 살펴보기 위해 진품 콩 두유에 방사선을 조사하고 분리대두단백을 제조하여 기포 형성력 및 기포 안정성을 측정하였다. 비조사 시료의 기포 형성력은 34.12%이고 1, 5, 10kGy를 조사한 시료의 기포 형성력은 각각 38.62%, 36.52%, 35.62%로 비조사 시료에 비해 조사 시료들의 기포 형성력이 다소 높은 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었고(Table 3, $p>0.05$), 조사 선량간에는 조사 선량이 증가할수록 기포 형성력이 감소하는 경향을 보였다.

기포 안정성은 비조사 시료에 비해서 1kGy 조사 시료의 기포안정성이 매우 낮았고, 조사 선량간에는 선량이 증가할수록 커지는 경향을 보였지만 유의적 차이는 없었다(Table 3, $p>0.05$). 기포성은 표면 통기를 조절하고 미세한 기포를 형성하는 작은 분자량의 peptide가 많을수록 기포성은 좋아지지만 단백질 분자량이 지나치게 작아지면 오히려 기포성이 저하된다²¹⁾. 기포 안정성은 기포 형성력과 반대로 분자량이 커질수록 향상되고 분자량이 작으면 저하된다. 본 연구에서 1kGy 조사 시료는 방사선에 의해 작은 분

자량의 단백질이 형성되어 기포성은 좋아진 반면 기포 안정성은 저하되었고, 5kGy와 10kGy 조사 시료는 작아진 분자량의 단백질간에 중합을 형성하여 구형 단백질을 만들고 분자량이 커져서 기포 안정성이 증가된 것으로 사료된다.

4. 단백질의 분자량 패턴

방사선조사에 의한 분리대두단백의 분자량 패턴 변화를 연구하기 위하여 SDS-PAGE를 이용하였고, subunit 분자량 분포의 변화를 측정하였다. 0, 1, 5, 그리고 10kGy의 흡수선량으로 방사선 조사된 분리대두단백을 SDS-PAGE로 확인해 본 결과, 방사선조사에 의하여 단백질의 절단 및 중합이 일어났음을 보여주었다(Fig. 2). 분리대두단백의 주요 subunit은 7개로 나타났는데, 2S의 trypsin inhibitor (21,500Da)와 enzyme(15,000~60,000Da)들이었다. 진품콩은 lipoxygenase가 결핍된 콩으로 100,000Da 부분의 band가 완벽하게 없는 것으로 나타났으며 비조사 시료와 1kGy 조사 시료의 분자량 패턴은 유사하게 나타났다. 5kGy와 10kGy 조사 시료는 subunit band의 굵기가 감소되거나 사라졌으며 단백질이 중합된 형태를 나타내는 거대 분자량의 새로운 단백질을 나타냈다(2,050,000Da 이상). Filali 등²²⁾은 방사선에 의한 단백질 손상 형태는 절단과 중합 두가지로 나타나고 조사 선량이 높을수록 중합된 단백질을 보인다고 하였다. Krumhar와 Berry²³⁾는 단백질 농도를 달리하고 방사선조사에 의한 영향을 살펴본 결과,

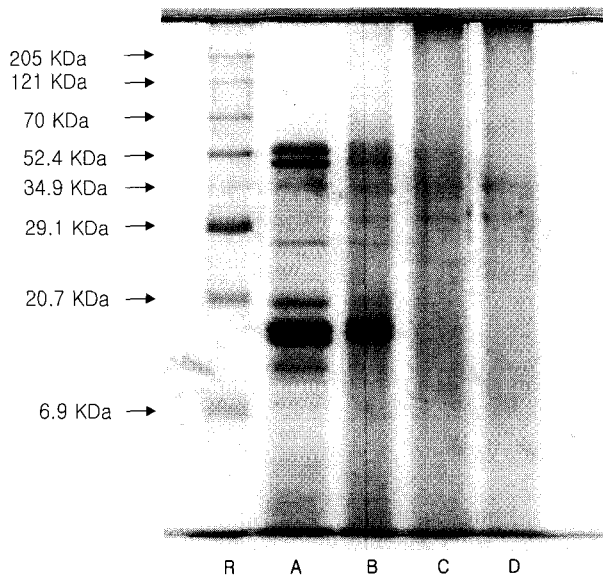


Fig. 2. SDS-PAGE pattern of soy protein isolates irradiated at various doses. Reference protein, R; unirradiated, A; irradiated at 1kGy, B; 5kGy, C; 10kGy, D

방사선조사시 낮은 농도에서 단백질의 파괴가 크며 높은 농도에서는 단백질의 파괴가 억제되고, 방사선 조사 선량이 증가할수록 절단된 단백질이 중합되어 고분자량의 subunit band를 보인다고 하였다. 본 연구에서도 진품콩 단백질의 분자량 패턴이 조사 선량이 증가할수록 단백질의 변화가 커지고 중합에 의한 고분자량 subunit band를 보여 위 연구결과와 일치하는 것으로 나타났다. Byun 등²⁴⁾은 dried soya bean을 이용하여 20kGy까지 조사한 결과 subunit molecular weight pattern상 변화가 없었던 것과 일치하였다. 이러한 결과는 수용액 또는 수분을 많이 함유한 경우보다 건조된 분말 형태의 경우가 방사선에 의한 단백질 손상이 적음을 나타내었고 콩단백을 상업적으로 조사할 경우 안전성이 입증된 10kGy까지는 분자량 분포에 큰 영향을 받지 않음을 시사하였다. 건조상태의 단백질이 액상상태보다 방사선조사에 의한 손상이 보다 적은 것은 단백질 분자 주변에 존재하는 물 분자의 방사선 분해 산물이 더 적게 생산되었고, 따라서 방사선의 간접적인 효과가 줄어들어서 단백질 손상이 적은 것으로 해석되었다.

5. 단백질의 2차 구조

방사선조사가 분리대두단백의 2차 구조의 변화에 미치는 영향을 검토하기 위하여 CD연구를 수행하였다. 진품콩 SPI의 Far UV CD spectrum은 Fig. 3과 같다. 방사선조사에 의한 분리대두단백의 CD spectrum은 조사선량이 증가할수록 203nm 에서 negative minimum ellipticity 값이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 3). 203nm에서 aperiodic structure를 나타내는 negative ellipticity 값은 random coil 함량을 나타내는 것으로

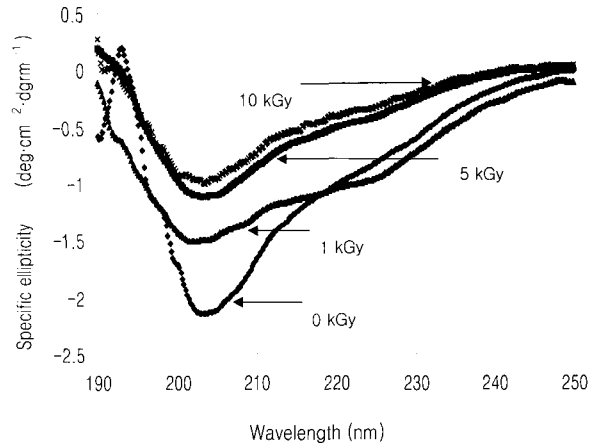


Fig. 3. Circular dichroism spectra of soy protein isolates irradiated at various doses

보여진다. 이 결과를 좀 더 자세히 살펴보기 위해서 2차 구조 함량을 Chang 등¹²⁾의 방법에 따라 측정하였다. 진품콩 분리대두단백의 2차 구조 함량은 비조사 시료의 경우 α -helix가 1.7%, β -sheet 함량이 57.9%, β -turn 함량이 3.3% 그리고 random coil 함량이 37.1%로 측정되었다. 조사 시료는 방사선조사 선량이 증가할수록 α -helix 함량은 감소하는 반면 β -sheet의 함량은 거의 유사하였으며 β -turn 함량은 모두 0%였고, random coil의 함량이 점차 증가하는 경향을 보였다(Table 4). 이 결과는 콩 단백질에 방사선을 조사하면 단백질의 구조적 변화가 일어나는데 aperiodic structure의 함량의 증가 등 구조적으로 보다 불안정한 상태로 변하는 것을 보여준다. 이러한 2차 구조의 변화는 단백질의 기능적 성질의 변화도 가져올 수 있음을 유추할 수 있다. Kume 등²⁵⁾은 bovine serum albumin과 ovalbumin에 방사선을 조사하였을 때 2차 구조의 함량의 변화를 보고한 바 있으며 특히 소수성 아미노산 잔기는 방사선조사에 의하여 쉽게 파괴된다고 보고하였다.

6. 단백질의 3차 구조

방사선조사가 분리대두단백의 3차 구조에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 형광광도계(Spectrofluorometer)를 사용하여 분석하였다. 방사선조사된 시료와 비조사 시료는 280nm에서 여기(excitation)하고 emission intensity를 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 분리대두 단백을 280nm에서 여기하였을 때 얻어진 fluorescence emission spectrum은 흡수선량이 증가할수록 maximum intensity값이 증가하는 것으로 나타났다. 이는 방사선조사에 의해 진품 콩단백이 분해되었고 이의 분해 산물과 형광물질이 반응하였기 때문인데, 방사선조사 선량이 증가할수록 maximum intensity의 값이 증가한 것은 조사 선량 의존적으로 단백질 분해 산물이 더 많았기 때문이다. 비조사 시료와 1, 5, 10kGy 조사 시료의 maximum intensity의 값은 각각 295.69, 357.85, 377.69 그리고 399.48이었다. 또한 maximum fluorescence emission intensity를 나타내는 자외선 파

장도 각각 406, 406.5, 407.5, 408nm로 방사선조사 선량이 증가할수록 긴 파장쪽(red shift)으로 이동되는 것으로 나타났다. 또한 280nm에서 500nm 파장에서 비조사 시료 및 조사 시료의 분포 곡선은 조사 선량이 증가할수록 폭이 좁아지는 경향을 보여 제한된 파장에서 형광반응이 많이 일어남을 알 수 있었다. 분리대두단백의 방사선조사에 의한 fluorescence emission intensity의 변화가 분명하게 나타났으며 특히 방사선조사 선량이 증가할수록 maximum emission intensity가 증가하였고, 이때의 자외선 파장도 red shift되는 경향을 보여서 3차 구조가 확실히 변하였음을 보여주었다. 280nm 자외선 파장은 단백질의 tryptophan과 tyrosine이 흡수되는 파장이며, 단백질의 fluorescence emission spectrum의 변화는 tryptophan과 tyrosine의 주변 환경의 변화를 반영한다²⁶⁾. 또한 방사선조사가 단백질을 이루고 있는 tryptophan과 tyrosine 잔기와 같은 방향성 아미노산 잔기의 변화를 보여주는 것으로 방사선조사에 의한 단백질의 hydrophobic group 들의 구조 변화 등 3차 구조에 있어서 변화를 시사하는 것이다. 따라서 이러한 구조적 변화는 다른 문헌^{27,28)}에서도 보고되었듯이 단백질의 기능적 성질 변화에도 영향을 끼칠 것으로 생각된다. 본 연구에서 용해도, 유화력, 기포력의 기능적 성질을 검토한 결과, 용해도와 유화력의 경우 10kGy 조사에 의해 기능성이 감소하였으나 기포력의 경우는 방사선조사 선량이 증가할수록 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이를 보이지 않았으므로 10kGy 방사선조사 선량까지는 기능성에 큰 변화를 주지 않고 식품 가공에 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

Table 4. Estimation of secondary structure contents of soy protein isolates (%)

Irradiation dose(kGy)	α -helix	β -sheet	β -turn	Random coil
0	1.7	57.9	3.3	37.1
1	1.6	59.8	0	38.6
5	1.2	59.2	0	39.6
10	0.3	59.9	0	39.8

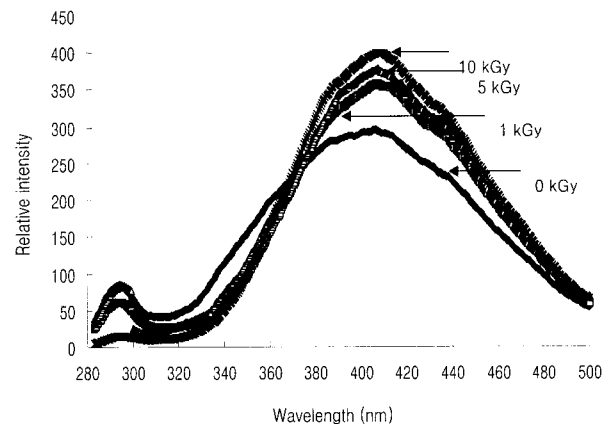


Fig. 4. Fluorescence emission spectra of soy protein isolates irradiated at various doses.

IV. 결론 및 요약

방사선조사가 분리대두단백의 기능적 및 구조적 특성에 미치는 영향을 살펴보기 위해서 진품콩 두유에 10kGy 이하 선량으로 조사하고 분리대두 단백을 제조하여 이의 용해도, 유화력, 기포력, SDS-PAGE pattern, 2차 구조, 그리고 3차 구조를 확인하였다. 방사선조사에 의한 분리대두단백의 용해도와 유화 형성력은 1kGy 방사선조사 시료의 경우 향상된 것으로 나타났고 5kGy이상 선량에서는 선량이 증가할수록 유의적으로 감소하는 경향을 보였다. 기포 형성력도 1kGy 조사 시료에서 다소 증가하고 조사 선량이 증가할수록 감소하는 경향을 보였으나 모든 시료간에 유의적인 차이는 없었다. 기포 안정성은 1kGy 조사 시료에서 가장 낮았으며 조사 선량이 증가할수록 다소 증가하는 경향을 보였다. 방사선조사에 의한 분리대두의 분자량 패턴은 조사 선량이 증가할수록 subunit band의 굵기가 감소되거나 사라졌으며 단백질이 중합된 형태를 나타내는 거대 분자량의 새로운 단백질을 나타냈다. 2차 구조와 3차 구조는 방사선조사에 의해서 단백질의 불규칙적 구조의 증가 등보다 불안정한 구조를 나타냈다. 분리대두단백의 방사선조사는 열처리시 발생 가능한 단백질 변성을 극소화시키면서 저장안정성을 증가시킴으로써 일반적으로 안전하다고 보는 10kGy 조사 선량까지는 식품 가공에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

2003년도 중앙대학교 학술연구비 지원으로 본 연구가 수행되었으니 이에 감사드립니다.

Literature cited

1. Kwon, JH : Utilization of irradiation for Foods. Food Science and Industry, 93, 77-85, 1988
2. Kwon, YJ, Hue, EY, Kwo, JH and Byun, MW : Current quarantine for import and export agricultures and future prospect of gamma irradiation technology. Food Science and Industry, 32, 80-90, 1999
3. Byun, MW : Usage and future aspect of gamma irradiation technology in food industry. Food Science and Industry, 30, 89-100, 1997
4. Yang, JS : Detection methods for irradiation foods among food stuffs. Food Science and Industry, 30, 121-130, 1997

5. Han, UK : Direction of food irradiation. Food technology, 141, 27-50, 1997
6. Saio, K and Watanabe, T : Food use of soybean 7S and 11S protein : Extraction and functional properties of their fractions. *J. Food Sci.*, 38(2), 1139-1143, 1973
7. Franzen, KL and Kinsella, JE : Functional properties of succinylated and acetylated soy protein, *J. Agric. Food Chem.*, 24, 788-793, 1976
8. Swift, C and Sulzbacher, W : Committed meat emulsions factors affecting meat proteins as emulsion stabilizer. *J. Food Technol.*, 17(2), 224-228, 1963
9. Pearce, KN and Kinsella, JK : Emulsifying properties of proteins evaluation of a turbidmetric technique. *J. Agric. Food Chem.*, 26, 716-720, 1978
10. Poole, S : The foam enhancing properties of baxis biopolymers. *J. Food Sci. Technol.*, 24, 121-137, 1989
11. Lamml, UK : Cleavages of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-275, 1970
12. Bradford, MM : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254, 1976
13. Chang, CT, Wu, CC and Yang, JT : Circular dichroic analysis of protein conformation : Inclusion of β -turns, *Anal. Biochem*, 91, 13-21, 1978
14. Kang, BS and Kim, GS : SPSS win for statistic analysis. Academy, Koryeo information industry, 1998
15. Kempner, ES : Damage to proteins due to the direct action of ionizing radiation. *Quarterly Reviews of Biophysics.*, 26, 27-48, 1993
16. Hafez, YS, Mohamed, A, Singh, G and Hewey, FM : Effect of gamma irradiation on proteins and fatty acids of soybean, *J. Food Sci.*, 50, 1271-1274, 1985
17. Kimball, ME, Hsien, DST and Rha, C : Chymotrypsin hydrolysis of soybean protein, *J. Agric, Food Chem.*, 29(4), 872-876, 1981
18. Franzen, KL and Kinsella, JE : Functional properties of succinylated and acetylated soy protein, *J. Agric. Food Chem.*, 24, 788-793, 1976
19. Pearce, KN and Kinsella, JK : Emulsifying properties of proteins evaluation of a turbidmetric technique. *J. Agric. Food Chem.*, 26, 716-720, 1978
20. Quaglia, GB and Orban, E : Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine protein hydrolysis, *J. Food Sci.*, 55, 1571-1577, 1990
21. Kim, SH : Research of yogurt manufacture using milk and cereals. Duksung Women's University, Doctoral Thesis, 1992
22. Filali-MA, Audette, M, St-Louis, M, Thauvette, L, Denoroy, L, Penin, F, Chen, X, Rouleau, N, Le, J-P, Rossier, J, Potier, M and Le Maire, M : Lysozyme fragmentation induced by γ -radiolysis. *Int. J. Radiat. Biol.*, 72, 63-70, 1997
23. Krumhar, KC and Berry, JW : Effect of antioxidant and conditions on solubility of irradiated food proteins in

- aqueous solutions. *J. Food Sci.*, 55, 1127-1132, 1990
24. Byun, MW, Kang, IJ, Hayashi, Y, Matsumura, Y and Mori, T : Effect of γ -irradiation on soya bean proteins. *J. Sci. Food Agric.* 66, 55-60, 1994
25. Kume, T and Matsuda, T : Changes in structural and antigenic properties of proteins by radiation. *Radiat. Phys. Chem.*, 47, 225-231, 1995
26. Zhang, F, Thottanayil, M, Martin, DL and Chen, CH : Conformational alteration in serum albumin as a carrier for pyridoxal phosphate : A distinction from pyridoxal phosphate-dependent glutamate decarboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 364, 195-202, 1999
27. Simic, MG : Radiation chemistry of amino acids and peptides in aqueous solution. *J. Agric Food Chem.*, 26, 6-14, 1978
28. Yang, JS : Radiation effects on characteristics of radiation-copolymerized methacryloyl-L-alanine methylester-co-2-hydroxy propyl methacrylate hydrogel and biochemical properties of ovomucoid. Ph.D thesis, KAIST, KOREA, 1996

(2004년 5월 14일 접수, 2004년 5월 20일 채택)