전통 메주 유래 미생물이 생산하는 효소에 의한 대두단백 분해물의 특성

정낙현* · 신용서** · 김성호*** · 임무현
*가톨릭상지대학 식품영양과, **고려대학교 생명공학원
***경북과학대학 전통식품연구소, 대구대학교 식품 · 생명 · 화학공학부

Characteristics of Soy Protein Hydrolysates with Enzymes Produced by Microorganisms Isolated from Traditional *Meju*

Nack-Hyun Choung*, Yong-Seo Shin**, Seong-Ho Kim*** and Moo-Hyun Yim
*Department of Food & Nutrition, Catholic Sangji College, Andong 760-711, Korea,
**Korea, Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul Korea,
***Traditional Food Institute, Kyungbook Collage of Science, Chilgok 178-851, Korea,
Division of Food, Biological and Chemical Engineering, Taegu University, Kyungsan 712-714, Korea

Abstract

In order to establish the enzymatic hydrolysis system improving of taste and flavor in the preparation of soy protein hydrolysates using the enzymes with excellent hydrolytic ability and different hydrolysis pattern of soy protein, Degree of hydrolysis(DH) and surface hydrophobicity under the optimal conditions of enzyme reaction, hydrolysis patterns by the SDS electrophoresis and sensory evaluation of soy protein hydrolysates by enzyme reactions were investigated.

Four enzyme reactions were highly activated at pH 7.0, 45℃ under the optimal conditions. As result of changes on the pattern of soy-protein hydrolysates by SDS-electrophoresis, high molecular peptides of hydrolysates by No. 5(*Mucor circinelloides* M5) and No. 16(*Bacillus megaterium* B16) enzymes were slowly decrease and 66KD band of these were remained after 3hours reaction. Production of low molecular peptides of hydrolysates by No. 4(*Aspergillus oryzae* M4) and No. 95(*Bacillus subtilis* YG 95) enzymes were remarkably detected during the proceeding reactions.

As results of HPLC analysis, low molecular peptides of 15~70KD were mainly appeared during the proceeding enzyme reactions. And, the more DH was increased, the more SDS-surface hydrophobicity was decreased. Hydrolysates by No. 4 enzyme was not only the highest DH of all hydrolysates, but the strongest bitter taste in a sensory evaluation. Sweat taste among the hydrolysates showed little difference. But, when combinative enzymes were treated, combinative enzyme of No. 4(*Aspergillus oryzae* M4)and No. 16(*Bacillus megaterium* B16) showed the strongest sweat taste.

In conclusion, we assumed that it will be possible to prepare the hydrolysates having functionality when soy-protein were hydrolyzed by these specific enzymes.

Key words : soy-protein hydrolysates, enzymatic hydrolysis, functional soy-protein

서 론

콩류에 많이 들어 있는 단백질은 주로 필수 아미노산을 공급하는 주요 식품으로 이용되어 왔으나 식품 및 의약품들의 기술고도화에 따라 단백질의 효소적 반응 촉매기능과 물성적 식품기능성 그리고 생리활성기능으로서의 가치가 인정되어 새로운 단백질 소재로서의 개발이 시도되고 있다[1].

Corresponding author : Moo-Hyun Yim, Division of Food, Biological and Chemical Engineering, Taegu University, Kyungsan 712-714, Korea
e-mail : mhlim@biho.taegu.ac.kr

대두 단백질의 이용가치와 이용도를 증대시키기 위하여 용해성(solubility), 거품성(whippability), 유화능(emulsification capacity)등의 기능성을 개선 또는 수정(modification)하는 경우가 많고 이를 위하여 물리적, 화학적 또는 효소적 처리에 의한 단백질의 구조적 변화를 일으키고 있다. 단백질을 부분적으로 가수분해시켜 단백질의 기능성을 조절할 수 있으며 단백질의 가수분해 정도는 가수분해물의 품질과 관계가 있다. 즉, 대두단백질의 가수분해물은 분해정도, peptide의 구조, 크기 및 아미노산의 염기배열 등에 따라 기호성 및 기능성이 다르게 나타나고 그 특성 또한 다양하다[2].

단백질의 가수분해 방법 중 산 · 알칼리를 사용한 가수분해가 주로 이용되고 있지만, 반응 생성물의 이미 · 이취 발생,

methionine과 같은 함황 아미노산의 손실, 비단백 물질과의 반응, lysinoalanine과 같은 독성 물질의 형성 등을 초래하여 단백질의 이용을 제한하고 있다[3,4]. 특히, 산 가수분해물에서는 원료단백질에 포함되어 있는 소량의 지방질이 염산과 반응하여 MCPD(3-chloro-1,2-propanediol) 와 DCP(1,3-dichloro-2-propanol) 등과 같은 독성물질을 생성하기도 한다[5,6]. 또한, acetic anhydride를 이용한 acetylation처리[7,8]와 sodium trimetaphosphate를 이용한 phosphorylation처리[9]로 기능성을 증진시키려는 연구가 되어 왔지만,처리 후의 물질이 장내 단백질 분해효소에 의하여 분해되지 않아 산 가수분해와 같이 안정성 문제가 제기 되고 있다. 그에 반해 효소적 가수분해는 용해도를 증가시키는 등의 기능성 증진에 기여할 뿐만 아니라[10], 단백질과 결합되어 있는 n-hexanal 및 n-hexanol 등의 좋지 못한 이취 성분을 유리시키는 장점을 가지고 있으나 쓴맛이 형성되고 수율이 낮다는 단점이 있다[11].

Lin등[12]은 효소적 가수분해시 생성되는 쓴맛 peptide(Arg-Leu, Arg- Leu-Leu, Leu-Lys)를 감소시킴으로써 기능성이 향상된 단백질을 제조하였으며, 특히 효소 가수분해를 조절하여 회분 함량이 낮은 단백질을 제조하였다. 이와 같이 산 가수분해는 필수아미노산의 손실과 glycerol 또는 fatty acid ester와 반응하여 독성 물질을 생성하는 반면, 효소적 가수분해는 화학적 방법에 비해 기질특이성이 크고 품질이 개선된 제품의 생산이 가능하며[13,14], 영양가의 손실을 방지할 수 있으며, 저농도로서도 사용 가능하고 그 자체에 안전성이 부여되기 때문에 단백질 분해효소를 이용한 변형법이 널리 사용되고 있다. 대두단백질의 효소적 가수분해물인 대두 peptide의 특성은 흡수가 빠르고 위장에 부담을 주지 않으면서 단백질 영양을 경구 섭취할 수 있다는 장점으로 인하여 최근에는 기술개선이 이루어지고 있다[15,16]. 그러나 대두단백에 대한 분해효소의 다양성과 분해양상에 대한 적절한 연구는 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 다양한 특성을 갖는 단백질 분해물의 개발을 위하여 전보[17-19]의 전통 메주로부터 분리·동정된 곰팡이와 세균의 단백 분해효소를 이용하여 대두단백질의 효소적 가수분해물을 제조하고 각 효소의 반응조건에 따른 단백질의 분해양상, 가수분해도와 표면소수도 등을 측정하여 분해특성을 조사하였다. 또한 효소들의 조합에 의한 대두단백질의 분해양상과 관능검사 등을 통한 기호도 등을 비교, 조사하였다.

재료 및 방법

조효소의 조제

2종의 세균 *Bacillus megaterium* B16과 *Bacillus subtilis* YG 95[17]는 배양액을 원심분리한 후, 안정제로서 $CaCl_2$와 Na_2PO_4 혼합물을 5%(V/V)를 첨가하고, 재차 원심분리(5,000RPM, 10min, 5℃)하여, 그 상징액을 membrane filter로 농축하고 알코올로 침전시켜서 동결건조(Bondiro, FD5512, Korea)한 후 조효소 No. 16, No. 95로 각각 사용하였다. 또한 2종의 곰팡이 *Aspergillus oryzae* M4와 *Mucor circinelloides* M5[17]는 밀기울에 접종하여 만든 koji에 3배의 물을 첨가하여 30℃에서 3시간 추출하고 2회 세척한 후 여과·원심 분리하여, 세균 배양액의 처리방법과 동일하게 조제하여 조효소 No. 4와 No. 5로 각각 사용하였다.

단백질의 정량과 protease activity활성 측정

효소와 분해물의 단백질의 양은 Lowry법[20]에 따라 3회 반복 측정하였고, bovine serum albumine(BSA)을 표준물질로 사용하여 단백질 함량을 계산하였다.

효소활성은 Anson방법[21]을 변형시켜 측정하였다. 즉, 효소용액 1㎖에 50mM Tris-HCl buffer(pH 6.0)에 녹인 3% SPI 기질용액 3㎖를 가한 후, 30℃에서 30분간 반응시키고 0.4M-TCA(trichloroacetic acid) 3㎖를 첨가하여 반응을 정지시키고, 실온에서 30분간 정치하였다가 원심분리(5000rpm, 10min, 5℃)한 후, 그 상징액에 0.4M Na_2CO_3 5㎖와 1N Folin reagent 0.5㎖를 넣고 30분간 발색시킨 후 spectrophotometer (UV-1201, Shimadzu Co, Japan) 660㎚에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 30℃에서 1분 동안에 1㎍/㎖의 tyrosine을 유리시키는 효소량을 1unit로 하였다.

단백질의 가수분해물 조제

3% SPI 용액을 적정 pH buffer에 녹여 효소와 기질(1 : 3)을 혼합하여 최적조건에서 시간별로 반응시킨 후, 100℃의 수조에서 10분간 처리하여 반응·정지한 후, 원심분리(8,000rpm, 10min, 5℃)하여 그 상징액을 실험에 사용하였다.

전기영동

분해물의 단백질 분해 양상은 효소(5㎎/㎖) 1㎖에 3% SPI 3㎖를 혼합하여 효소의 적정온도, 적정 pH에서 시간별로 반응시킨 분해산물을 buffer와 반응시킨 것을 시료로 하여 10% polyacrylamide gel을 조제하여 SDS-전기영동법[22]으로 비교·분석하고 coomassie blue R-250으로 염색, 탈색하여 band를 확인하였다. 표준단백질로는 Sigma사의 β-galactosidase (116,000dalton), phosphorylase(97,400dalton), BSA(66,000dalton), egg albumin(45,000dalton), carbonic anhydrase(29,000dalton)를 사용하였다.

pH-drop method

상대적 효소활성도의 비교평가에는 Hsu등[23]의 in vitro 단백질 소화율 추정방법에서 변형된 pH-drop method[24]를 이용

하였다. 즉, 50℃로 유지된 항온수조에서 3% SPI(pH 8.0) 30 mℓ에 효소액(5mg/mℓ, pH 8.0) 10mℓ를 혼합하고, 혼합 순간부터 pH를 매 2분 간격으로 1시간동안 pH변화를 기록하였다.

가수분해도(DH, Degree of hydrolysis)

가수분해도는 가수분해 과정 중 유리되는 peptide결합의 %로 정의하였다.

즉,

$$DH = \frac{\text{분해된 peptide결합수}}{\text{총 peptide결합수}} \times 100 = \frac{h}{h_{tot}} \times 100$$

h : 가수분해과정 중 분해되는 peptide 결합의 수 (hydrolysis equivalent)

h_{tot} : 단백질 내 전체 peptide 결합의 수 (equivalents/kg protein , meqv/g protein)

이때, h_{tot}의 경우 강산, 고온 조건에서 peptide 결합을 완전히 파괴하여 측정할 수 있는 값이며, 대두단백질의 h_{tot}값은 7.8 meqv/g protein이다[25].

Ninhydrin 반응에 의한 가수분해도의 측정

분해된 peptide 결합수 h값은 modified ninhydrin방법[26,27]으로 결정하였다. 즉, ninhydrin 2g과 hydrindantin dihydrate 0.3g을 4M lithium acetate buffer(pH 5.2) 75mℓ와 dimethylsulfoxide (DMSO) 25mℓ에 녹여 제조한 ninhydrin solution 2mℓ와 시료액 2mℓ를 혼합하여 100℃, 30분간 반응 후, 냉각하고 50% ethanol 6mℓ를 혼합시켜 5,000rpm으로 원심 분리하여 불용성 물질을 제거한 후, 570㎚에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 leucine solution(Sigma Co.)을 사용하였다.

SDS 표면소수도법

시료 가수분해물과 1% SDS 용액을 5 : 1로 혼합하여 24시간 동안 투석한 용액 0.5mℓ를 chloroform 5mℓ에 넣어 강하게 교반한 후, 2.5mM methylene blue 용액 2mℓ를 넣고 voltex하고 10분간 방치한 후, chloroform층의 흡광도를 650㎚에서 측정하여 SDS농도를 구하였다[28]. 표면소수도는 peptide에 결합하는 SDS의 농도를 ㎍량으로 표시하였다.

HPLC 에 의한 peptide 측정

HPLC에 의한 단백질 가수분해물의 분해 pattern은 protein column I-60 (P/N 85250, T/N T21871, USA)으로 0.1M phosphate buffer를 이동상으로 사용하여 UV Detector 280nm에서 분석하였다. 분자량은 BSA(66,000 dalton), ovalbumin (43,000 dalton), myoglobin(17,600 dalton), lysozyme (13,700 dalton)등의 표준물질 peak와 비교하여 추정하였다.

관능검사

관능검사는 각 균주가 생산하는 4개의 효소(No. 16, No. 95, No. 4, No. 5)와 각 효소를 1 : 1로 혼합한 효소 6개 등, 총 10개의 효소를 증류수에 녹인 기질과 혼합(효소 : 기질 = 1 : 3)반응시켜 원심 분리한 후, 그 상징액을 시료로 하여 냄새(odor)와 맛(taste)을 대상으로 검사하였고, 맛은 단맛(sweet taste), 쓴맛(bitter taste), 감칠맛(savor taste)을 중점적으로 검사하였다. 관능검사를 해 본 경험이 있는 학생을 panel 요원으로 정하여 가장 좋은 경우를 1, 그 다음의 것을 2 등의 방법으로 순위를 정하는 단순순위검사를 3회 실시하였고 결과의 분석은 Larmond등[29]의 유의성 검정표를 사용했다.

결과 및 고찰

효소의 반응 최적 pH

선택된 4개의 균주(*Bacillus megaterium* B16, *Bacillus subtilis* YG 95, *Aspergillus oryzae* M4, *Mucor circinelloides* M5)[17-19]가 생산하는 효소 No. 16, N0. 95, No. 4, No. 5의 반응 최적 pH을 조사하기 위해 3% SPI를 함유한 완충용액을 pH 4에서 pH 10까지 각각 조제한 후 각 용액 3mℓ에 효소액 1mℓ를 가한 후 30℃에서 30분간 반응하여 측정한 결과는 Fig. 1과 같다.

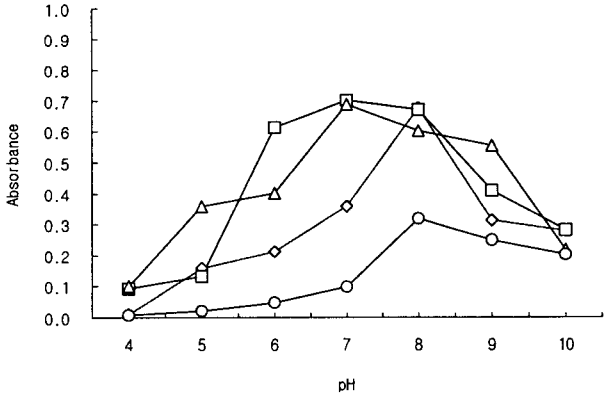

Fig. 1. Changes of various enzyme activities at different pH.
(◇-◇:No.16, □-□:No.95, △-△:No.4, ○-○:No.5)
The reaction was carried out using 3% SPI as a substrate at 30℃ for 30min at each of pH using acetate buffer(pH 4-6) and Tris-HCl buffer(pH 7-10).

세균이 생산하는 효소의 최적 pH는 7(No. 95)과 8(No. 16)으로 중성영역으로 나타나 일반적인 세균의 효소 반응영역과 유사하였으나, 심[30]과 김[31]등의 *Bacillus* sp. 가 생산하는 알카리성 protease의 최적 pH 12 와 pH 10이라는 보고와는 상이한 결과를 보였다. Mold 효소 No. 4와 No. 5도 세균 효

소와 마찬가지로 반응 최적 pH 7.0(No. 4)과 pH 8.0(No. 5)으로 나타나 Mold 균종이 생산하는 protease에 관한 연구와 비교할 때 천등[32]의 *Asp.* sp.의 최적 pH와 최등[33]의 *S. brevicaulis*가 생성하는 protease의 반응 최적 pH 9.0과는 상이한 결과를 보였다.

효소반응 최적 온도

효소의 반응 최적온도를 알아보기 위해서 기질 3㎖에 효소액 1㎖를 가한 후 25℃에서 65℃까지 10℃간격으로 하여 30분간 반응시킨 결과는 Fig. 2와 같다. 4종균의 효소 모두가 45℃에서 가장 높은 활성을 나타내었다.

Mold에 속하는 균주중 최등[33]의 *Scopulariopsis brevicaulis*가 생성하는 protease와 차등[34]의 *Asp. funigatus*의 alkaline protease의 효소활성 최적온도가 50℃라고 보고한 것과는 유사하였으나 이들 4가지 균의 효소는 온도에 대해서는 급격한 변화가 보이지 않았으며, 김등[35] 천등[32]의 보고와 최[33]등의 보고와 같이 50℃까지 활성이 높아지다가 60℃에서 활성이 급격히 저하되는 현상은 나타나지 않았다.

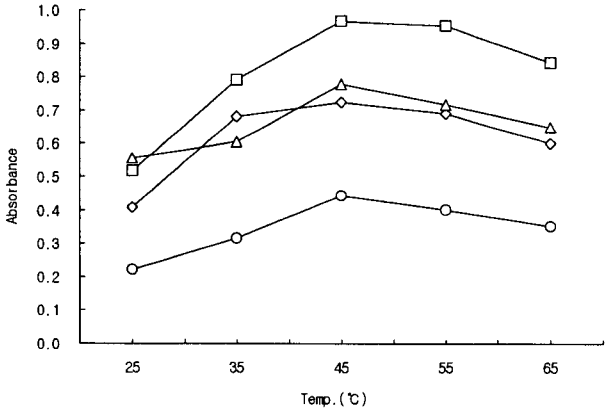

Fig. 2. Changes of various enzyme activities at different temperature.

(◇-◇:No.16, □-□:No.95, △-△:No.4, ○-○:No.5)
The reaction was carried out using 3% SPI as a substrate for 30min at pH 7(No. 95, 4), pH 8(No. 16, 5). The temp. was set between 25-65℃ per 10℃.

효소반응시간

각 균종별 효소의 최적 pH인 7.0(No. 95, 4)과 8.0(No. 16, No. 5)에서 반응온도 45℃에서 각각 protease 활성을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 시간이 경과할 수록 활성은 점차 증가하여 2시간까지는 급격히 증가하였고, 그 이후로는 완만한 증가를 나타내었다. 상대적으로 *Bacillus subtilis* YG 95효소인 No. 95와 *Aspergillus oryzae* M4 효소 No. 4의 효소활성이 *Bacillus megaterium* B16과 *Mucor circinelloides* M5의 효소 No. 16과 No. 5보다 높게 나타났다.

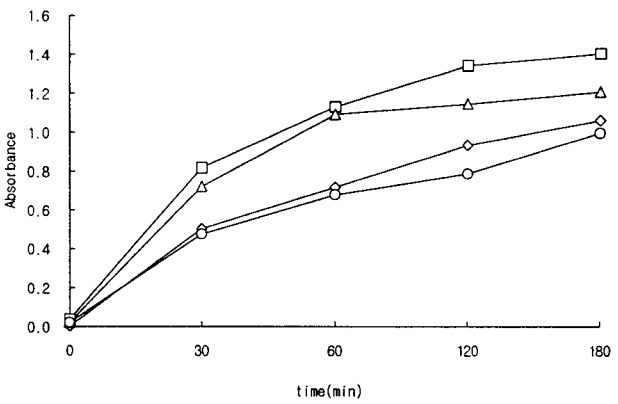

Fig. 3. Periodical changes of various enzyme activity at different reaction time.

(◇-◇:No.16, □-□:No.95, △-△:No.4, ○-○:No.5)
The reaction was carried out at 45℃, pH 7(No. 95, 4), pH 8(No. 16, 5) with 3% SPI as a substrate.

반응시간 경과에 따른 단백질의 분해pattern

반응시간별로 단백질 가수분해정도를 알아보기 위하여 각 효소의 반응 분해물을 SDS 전기영동 한 결과는 Fig. 4와 같다. 분해 pattern의 결과, No. 16(Fig. 4-a)과 No. 5(Fig. 4-d)가 비슷한 형태를 보였고, No. 95(Fig. 4-b)와 No. 4(Fig. 4-c)의 양상이 비슷하게 나타났다. No. 16의 반응 1시간에서 3시간째까지 나타났던 45KD 전후 2개의 단백질 band가 No.

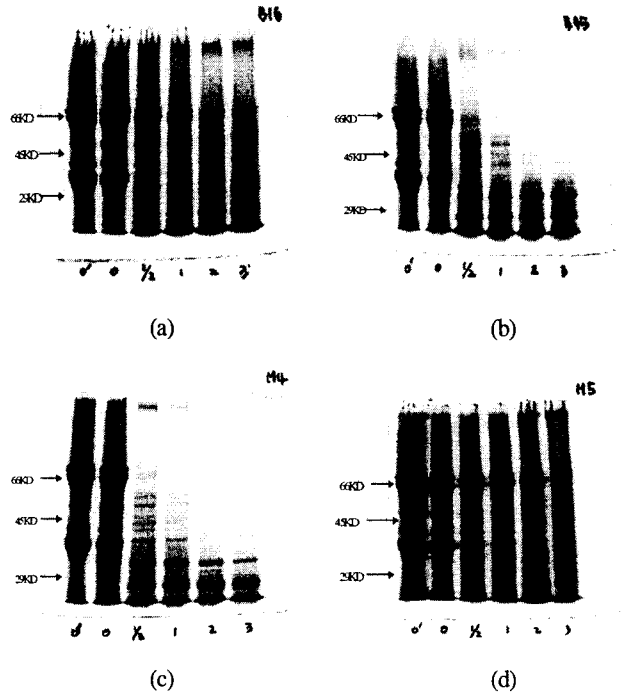

Fig. 4. Electrophoretic patterns of soy-protein hydrolyzates by enzyme No. 16(a), 95(b), 4(c), 5(d).

0' : control, 0 : 0min, 1/2 : 30min, 1 : 60min, 2 : 120min, 3 : 180min

5에서는 반응 2시간 이후에는 거의 나타나지 않았다. 대조군에서 나타난 위쪽 부분의 66KD band는 효소반응이 3시간 진행되어도 흐려지거나 양이 감소하여 band가 얇아지는 변화만 보였을 뿐, 시간이 지나도 band로 남아 있었다(Fig. 4-a, d). 반면에 No. 95와 No. 4는 대조군과 비교하였을 때, 대조군에서 보이던 분자량 66KD의 단백질 band와 35KD-40KD사이의 굵은 단백질 band가 30분만에 효소에 의해 분해되어 gel상에 윗 부분의 band는 거의 나타나지 않고, 29KD 부근에 2개의 새로운 band들이 나타났다(Fig. 4-b, c). 따라서, *Aspergillus oryzae* M4의 No. 4 효소와 *Bacillus subtilis* YG 95의 No. 95의 효소가 *Bacillus megaterium* B16의 No. 16효소와 *Mucor circinelloides* M5의 No. 5효소에 비해 동일 조건에서의 대두단백 분해활성이 우수한 것으로 사료된다.

pH-drop method를 이용한 효소의 상대적 활성조사

효소에 의해 단백질의 가수분해가 일어나면 아미노산의 carboxyl기가 노출되어 용액의 pH가 떨어지게 된다[23]. 따라서, pH변화 정도에 따라 효소의 상대적 활성을 반응 후 60분간 pH의 변화를 조사하여 비교한 결과는 Fig. 5와 같다.

효소첨가 후, 30분까지는 pH의 저하가 0.3/min이상이었고, 30분 후는 완만한 변화를 보였다. 최종적인 pH변화는 No. 16은 7.45, No. 95는 7.40, No. 4는 7.28, No. 5는 7.47으로 나타났다. 따라서 *Bacillus subtilis* YG 95의 효소 No. 95와 *Aspergillus oryzae* M4의 효소 No. 4가 *Bacillus megaterium* B16의 효소 No. 16과 *Mucor circinelloides* M5의 No. 5 효소보다는 활성이 상대적으로 높게 나타났다.

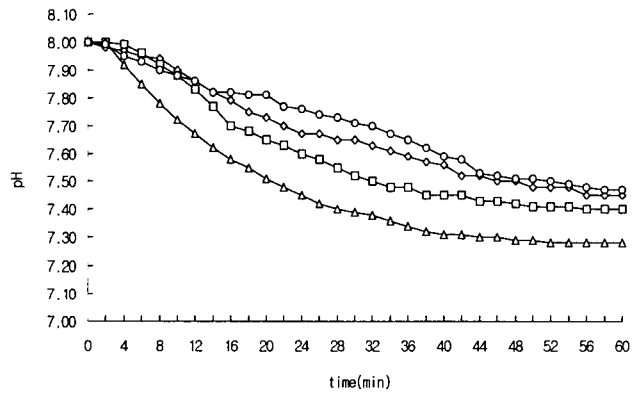

Fig. 5. Comparision of relative activity by pH changes of various enzyme.

(◇-◇:No.16, □-□:No.95, △-△:No.4, ○-○:No.5)
Measured condition was solved 3% SPI in Tris-HCl buffer (pH 8.0) at 50℃

효소활성과 가수분해도(Degree of hydrolysis)

3% SPI를 기질로 사용하여 효소반응시간에 따른 단백질의 가수분해도(DH)를 측정한 결과는 Fig. 6과 같다.

No. 16과 No. 5는 3시간 경과 후에도 SPI의 DH가 2.65%와 3.29% 정도의 완만한 가수분해 결과를 나타내었다. No. 5는 효소반응 후 남아있는 단백 함량(Table 1) 또한 다른 균주보다 더 많은 것으로 나타나 효소활성이나 가수분해도가 저조한 것을 확인할 수 있었다. No. 95는 6.21%로 No. 16과 No. 5보다는 높았지만 4균주의 효소 중에서는 No. 4가 가장 높은 가수분해도를 나타내었다. 2시간 경과후 No. 95와 No. 4는 6.00%과 6.46%으로 급격히 증가하였으나 3시간 경과 후 No. 95는 6.21%로 2시간 후의 DH와 큰 차이 없이 완만하게 증가하였고, No. 4는 9.52%로 2시간대에 비해 약 3% 이상 증가하였으며, 반응시간에 따라 계속 증가하였다. 이와 같은 결과로 볼 때 가수분해도(DH)에 비례하여 가수분해된 단백질의 용해도가 증가한다는 Kim등[2]의 보고를 참고하면 본 연구에서는 DH가 가장 큰 No. 4(*Aspergillus oryzae* M4)의 가수분해물의 용해성이 가장 클 것으로 사료된다.

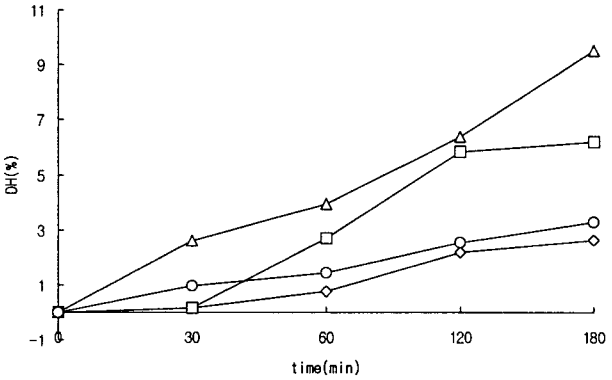

Fig. 6. Changes on the DH(Degree of hydrolysis) after various enzyme reactions.

(◇-◇:No.16, □-□:No.95, △-△:No.4, ○-○:No.5)

Table 1. The results of sensory evaluation for soy-protein hydrolysates by enzymes and combinative enzymes.

Sensory	Enzyme No.				Enzyme combination sample*					
	16	95	4	5	1	2	3	4	5	6
Flavor	28±0.9	20±1.3	31±1.7	21±0.4	16±1.1	44±0.7	32±0.7	47±1.3	36±1.0	35±0.9
Sweet taste	26±1.2	28±0.7	26±1.5	24±1.2	32±0.6	26±1.3	34±0.9	41±1.5	43±1.2	34±0.5
Savor taste	20±1.0	28±0.9	28±0.4	24±1.5	23±0.8	35±1.0	34±1.2	46±1.1	33±0.8	39±1.3
Bitter taste	36±1.4	18±2.0	21±1.5	24±0.7	40±1.3	30±0.6	46±0.3	23±0.7	42±0.5	29±1.0

*Enzyme combination sample ;
1: No.16 + No.95 2: No.16 + No.4 3: No.16 + No.5
4: No.95 + No.4 5: No.95 + No.5 6: No.4 + No.5
Ratio of combinative enzyme was one against one.
Enzyme reactions was carried out for 3hours at 45℃.

단백질의 표면소수도

단백질은 일정이상 가수분해되면 아주 쓴맛을 나타난다. 특히 단백질 자체의 소수성이 높은 단백질을 가수분해할 때, 분해물이 더욱 쓴맛을 나타내는 것으로 알려져 있다[36].

따라서 표면 소수도가 낮은 분해물일수록 쓴맛이 적은 단백 분해생산물을 얻을 수 있을 것으로 보여져 이들 4균주들이 생산한 효소에 의해서 각각 생산된 대두단백 분해물의 표면 소수도를 측정한 결과를 Fig. 7에 나타내었다.

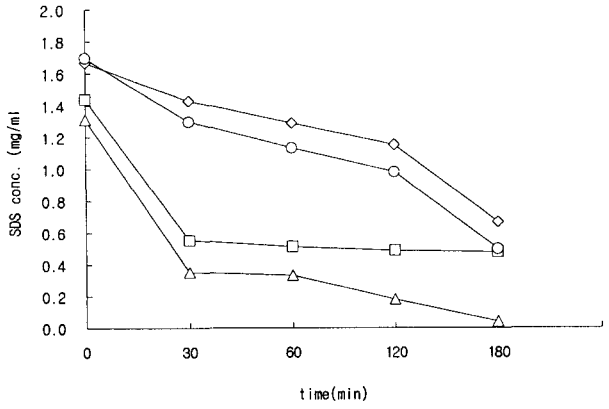

Fig. 7. Changes on the SDS surface hydrophobicity of protein and peptide fractions after various enzyme reactions.
(◇-◇:No.16, □-□:No.95, △-△:No.4, ○-○:No.5)

No. 16은 최초에 1.67㎎/㎖에서 2시간 후에 1.38㎎/㎖으로 0.29㎎/㎖정도 감소하여 서서히 감소하였으나, 3시간 후에는 0.67㎎/㎖로 1.0㎎/㎖로 감소하여, 2시간 이후부터 감소치가 크게 나타났다. 반면에, No. 95는 초기에 1.44㎎/㎖에서 30분 후에 0.55㎎/㎖로 0.89㎎/㎖가 급격히 감소한 이후 3시간까지는 별 차이가 없었다. No. 4도 No. 95와 같이 30분 후에 1.31㎎/㎖에서 0.35㎎/㎖로 0.96㎎/㎖정도로감소하였으며, No. 5는 No. 16과 같이 1.70㎎/㎖에서 0.50㎎/㎖으로 3시간이 지난 후에 그 값의 차이가 나타났다.

이와 같이 *Bacillus subtilis* YG 95와 *Aspergillus oryzae* M4가 생산한 No. 95 효소와 No. 4효소는 대두단백을 30분만에 상당히 빠르게 분해되었으나, *Bacillus megaterium* B16과 *Mucor circinelloides* M5가 생산한 No. 16효소와 No. 5효소는 3시간 경과 후까지 서서히 분해되었다. 따라서 이들 No. 16 효소와 No. 5는 peptide가 아미노산으로 서서히 분해되기 때문에 SDS와의 결합력이 낮은 것으로 사료된다. Han 등[37]은 대두단백질의 경우는 ANS법 표면소수도가 높고 SDS법 표면소수도는 낮게 나타났다고 보고하였다.

단백질 가수분해물의 분자량 측정

각 효소가 분해한 단백질 가수분해물을 HPLC로 분석한 결과는 Fig. 8과 같다. 대조군(0hr)에서는 분자량이 300KD 이상으로 추정되는 peak만 나타났으나 3시간 가수분해한 반응물에서는 66KD전 후 peak가 나타났다. 이는 단백질의 효소적 가수분해로 인해 분자량이 적어지기 때문으로 대두단백질이 분해됨은 전기영동분석 결과로도 유추할 수 있었다. 다만 No. 16은 다른 효소와 상이하게 대조군에서 나타나는 300KD 전후의 peak가 남아있었고, 66KD 전후의 peak가 거의 나타나지 않았다. 이와 같은 결과는 가수분해도의 결과(Fig. 6)에서도 나타난 바와 같이 No. 16의 효소활성이 낮아 단백질이 3시간 이후에도 가수분해가 미비하고, 분해된 peptide도 아주 적은 양이기 때문이라 생각되어 진다.

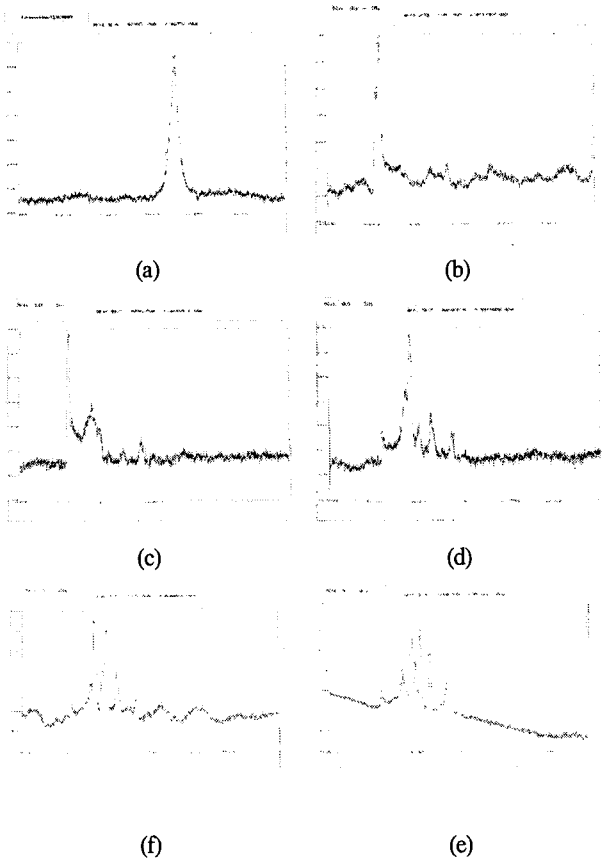

Fig. 8. HPLC patterns of soy protein hydrolysate by enzymes
(a) Lysozyme(13KD) (b) control(0hr) (c) No. 16
(d) No. 95 (e) No. 4 (f) No. 5
The reaction was carried out for 3hr at 45℃ with 3% SPI solution as a substrate.

각 효소들을 조합·반응시켜 나온 가수분해물을 HPLC로 분석한 결과는 Fig. 9와 같다. 대조군에서 나타난 300KD 전후의 peak는 존재하지 않았고 대체적으로 10-70KD사이에 여러 peak가 나타났다. 이는 peptide결합을 가수분해하여 긴 polypeptide 사슬을 보다 작은 분자량의 peptide 혼합물로 분해하기 때문이라 생각된다. Peak의 형태를 보면 No. 4와 조합된 효소로서 분해된 대두단백질 분해물의 경우(fig. 9 - b, d, f)의 peak가 비슷한 양상이 나타났고, No. 5와 조합한 효소로서 분해된 경우가 유사한 pattern(fig. 9 - c, e)이 나타났다.

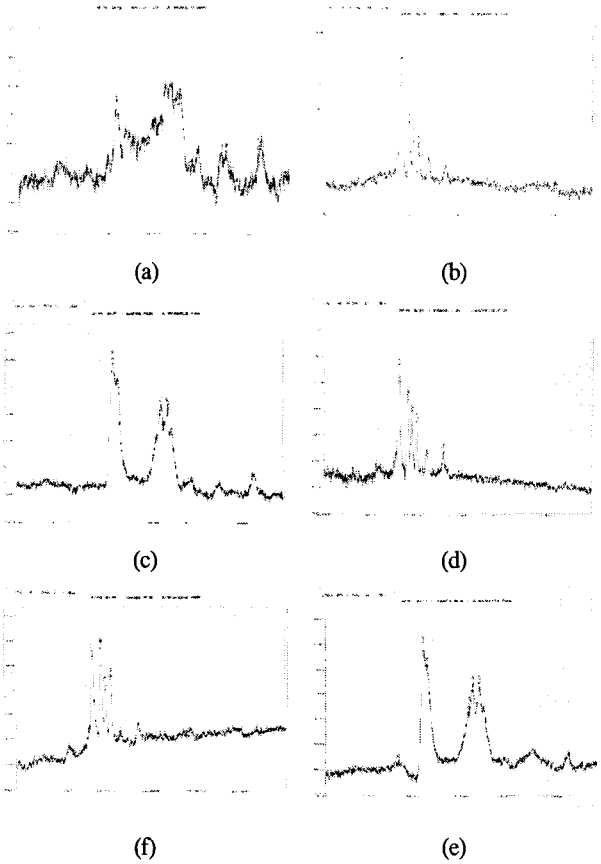

Fig. 9 HPLC patters of hydrolysates by combinative enzymes
(a) No. 16 + No. 95 (b) No. 16 + No. 4 (c) No. 16 + No. 5
(d) No. 95 + No. 4 (e) No. 95 + No. 5 (f) No. 4 + No. 5
The reaction was carried out for 3hr at 45℃ with combinative enzyme(rate=1:1)

관능검사

각각의 효소에 의해 분해된 분해물과 효소들의 조합에 의한 분해물에 대한 관능검사의 결과는 Table 1과 같다. 단순순위검사 결과 단맛, 감칠맛, 냄새에서는 유의성이 인정되지 않았고, 쓴맛에서만 5% 유의수준에서 유의한 결과를 보였다. 단백질은 어느 정도 이상으로 가수분해하면 쓴맛을 나타낸다고 알려져 있다[36]. 단일 효소로 가수분해했을 경우 *Aspergillus oryzae* M4가 생산한 No. 4가 가장 강한 쓴맛을 나타냈지만 *Bacillus subtilis* YG 95의 No. 95와는 별 차이가 나타나지 않았다. 효소를 조합한 경우에도 No. 4와 No. 95를 조합한 경우가 쓴맛이 가장 크게 나타났다. 그리고 조합한 6가지 경우를 비교했을 때, No. 4가 포함되어 있는 경우의 조합이 대체로 강한 쓴맛을 나타내어 No. 4가 생산하는 효소가 일정이상으로 단백분해가 진행되거나 소수성이 강한 peptide부분을 가수분해한다고 생각되어 진다.

단맛의 경우에는 시료들간의 유의 적인 차이가 나타나지는 않았지만, 효소조합에서는 *Bacillus megaterium* B16의 No. 16과 *Aspergillus oryzae* M4의 No. 4가 생산한 분해산물이 강한 단맛을 나타내었다.

요 약

대두단백 가수분해 산물의 맛과 향을 개선하기 위해 효소에 의한 가수분해 system을 확립하기 위하여 단백질 가수분해 패턴이 서로 다른 효소로 생산된 단백 분해산물의 가수분해도와 표면 소수도 등을 측정하였다. 이들 분해물의 pattern을 SDS 전기영동으로 조사하였고, 효소반응에 의한 단백질 분해물의 관능검사를 실시하였다. 각 균주가 생산한 단백질 분해효소의 pH 변화에 따른 효소의 활성은 No. 16 효소(*Bacillus megaterium* B16)와 No. 4효소(*Aspergillus oryzae* M4)는 pH 7.0에서 No. 95효소(*Bacillus subtilis* YG 95)와 No. 5효소(*Mucor circinelloides* M5)는 8.0에서 가장 높은 효소반응 활성을 보였다. 또한 반응온도에 따른 효소활성의 크기는 4가지 효소 모두 45℃에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 대두단백질 분해물의 SDS 전기영동 pattern변화에서, *Bacillus megaterium* B16과 *Mucor circinelloides* M5의 효소(No. 16, No. 5)는 반응 후 분자량이 비교적 큰 peptide가 많이 생성되었으며, 효소반응 3시간 경과 후에도 분자량 66KD의 peptide를 확인할 수 있었다. 반면에 *Bacillus subtilis* YG 95와 *Aspergillus oryzae* M4의 효소(No. 95, No. 4)는 분자량 15KD~45KD 미만의 작은 분자량의 peptide 물질이 주로 생성되었으며, 반응 2시간 경과후에는 30KD 미만의 저분자 Peptide가 주로 생성되었다. 이와 같은 결과는 HPLC 분석 결과와 일치하였다. 가수분해가 진행됨에 따라서 SDS 표면소수도가 크게 저하되었으며, *Aspergillus oryzae* M4 효소의 분해물의 가수분해도가 가장 높았다. 관능검사 결과, No. 4(*Aspergillus oryzae* M4)와 No. 95(*Bacillus subtilis* YG 95) 가 강한 쓴맛을 나타내었다. 각각의 효소들을 조합해서 분해한 단백 분해물을 관능검사한 결과, *Aspergillus oryzae* M4 효소와 조합된 것의 대두단백질 분해물이 비교적 강한 쓴맛을 나타내었다. 분해물의 단맛은 시료별로 큰 차이가 나타나지 않았으나 *Bacillus megaterium* B16과 *Aspergillus oryzae* M4를 조합하였을 때 상대적으로 단맛의 정도가 높게 나타났다. 따라서 이와 같은 효소특성을 이용하여 대두단백질을 가수분해를 하였을 때 다양한 단백질 분해물의 제조에 이용이 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 한국과학재단 특정기초연구비(96-04-02-05-01-3)지원으로 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Lee, C.H. (1992) Application and development of protein

resource, Food Science and Industry, 25, 93-95
2. Kim, S.Y., Park, P.S. W. and Rhee, K.C. (1990) Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate, J. Agric. Food Chem., 38, 651-664
3. Deeslie, W.D. and Cheryan, M. (1981) Continuous enzymatic modification of protein in an ultrafiltration reactor, J. Food Sci., 46, 1035-1042.
4. Finley, J.W., Wheeler, E.L., Walker, Jr.H.G., Finlayson, A.J. (1982) Effect of cystine oxidation on lysinoalanine formation in protein, J. Agric. Food Chem., 30, 818-820.
5. Velisek, J., Davidek, T., Davidek, J. and Hamburg, A. (1991) 3-chloro-1,2-propanediol derived amino alcohol in protein hydrolysates, J. Food Sci. 56, 136-138.
6. Davidek, T., Davidek, J., Velisek, J., Kubelka, V. and Viden, I. (1991) 3-chloro-1,2-propanediol derived amino acids in protein hydrolysates, J. Food Sci. 56, 139-142.
7. Franzen, K.L. and Kinsella, J.E. (1976) Functional properties of succinylated and acetylated soy protein, J. Agric. Food Chem., 24, 788-795
8. Kim, K.S. and Rhee, J.S. (1989) Effect of acetylation on conformation of glycinin, Kor. J. Food Sci. Technol., 21, 714-720.
9. Kim, N.S., Kwon, D.Y. and Nam, Y.J. (1988) Effects of phosphorylation and acetylation on functional properties and structure of soy protein, Kor. J. Food Sci. Technol., 20, 625-630.
10. Noe, F.F., Faith, W.T. (1973) Enzyme protein solubilization (to Rhom and Haas Companyy, USE), US Patent, No. 3,761,353.
11. Yamashita, M., Arai, S. and Fujimaki, M., 1969, Applying proteolytic enzymes on soybean, Ⅳ. A ninhydrin-negative bitter peptide in peptic hyrolysate of soybean protein, J. Agric. Biol. Chem., 33, 321-330.
12. Lin, C.F., Lee, C.R. (1987) Preparing protein for hydrolysis and product, US Patent, No. 4,636,388.
13. Pommer, K. (1995) New proteolytic enzyme for the production of savory ingredients, Cereal Foods World, 40, p745.
14. Lee, C.H., Kim, C.S. and Lee, S.P. (1984) Studies on the enzymatic partial hydrolysis of soybean protein isolates, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 16, 135-141.
15. Chae, H.J., In, M.J. and Kim, M.H. (1997) Optimization of enzymatic treatment for the production of hydrolyzed vegetable protein, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 29, 1125-1130.
16. Lahl, W.J. and Braun, S.D. (1994) Enzymatic production of protein hydrolysates for food use, Food Technol, 48, 68-71.
17. Kang, M.J., Kim, S.H., Joo, H.K., Lee, G.S and Yim, M.H. (2000) Isolation and identification of Microorganisms producing the soy protein hydrolyzing Enzyme, from the traditional Me-ju, J. Korean Agricu. Chem. Biotechnol. Soc. 43, 86-94.
18. Yim, M.H. and Lee, J.H. (2000) Functional Properties of Fractionated Soy Protein Isolates by Proteases from Me-ju, Food Sci. Biotechnol. 9, 253-257.
19. Byun, Y.G. Kim, S.H. Joo, H.K. Lee G.S. and Yim, M.H. (1998) Isolation and Identification of Protease Producing Bacteria, Bacillus subtilis YG-95 from the Traditional Me-ju and Its production Conditions, Agricultural Chemistry and Biotechnology, 41, 342-348.
20. Lowry, O.H., Rosebrogh, N.J., Farr, A.L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reasgent, J. Biol. Chem., 193, 265-271.
21. Anson, M.L. (1938) The estimation of pepsin, papain and cathepsin with hemoglobin, J. Gen. Physio., 22, 79-95.
22. Bollag, D.M., Rozycki, M.D. and Edelstein S.J. (1996) In Protein methods, Chapter 5. Gel electrophoresis under denaturing conditions, A John Wiley and Sons Publication, USA.
23. Hsu, H.W., Vavak, D.L., Sattetlee, L.D. and Miller A. (1977) A multienzyme technique for estimating protein gestibility. J. Food Sci., 42. 1269-1272
24. Mannheim, A and Cheryan, M. (1990) Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor, J. Food Sci., 55, 381-384.
25. Adler-Nissen, J. (1986) In Enzymic Hydrolysis of Food Proteins, Chapter 2. Some fundamental aspects of food protein hydrolysis, Elsevier Applied Science Publishers, London and New York.
26. Friedman, M., Pang, J. and Smith, G.A. (1984) Ninhydrin reactive lysine in food proteins, J. Food Sci., 49, 10-15.
27. Pearce, K.N., Karahalios, D. and Friedman, M. (1988) Ninhydrin assay for proteolysis in ripening cheese, J. Food Sci., 53, 432-438.
28. Kato, A., Matsuda, T., Matsudomi, N. and Kobayashi, K. (1984) Determination of protein hydrophobicity using a sodium dodecyl sulfate binding method. J. Agric. Food Chem., 32, 284-290.
29. Larmond, E. (1973) Methods for sensory evaluation of food, Canada Department of Agriculture, Ottawa, Canada.
30. Shim, C.W., Jeong, K.S., Shin W.C. and Yu J.H. (1994) Effect of pH on the production and characteristics of protease by Bacillus sp. SH-8 and Bacillus sp. SH-8M, Kor. J. Appl. Microbiol Biotechnol., 22, 59-64.

31. Kim, T.H., Park, S.H., Lee, D.S., Kwon, T.K., Kim J.K. and Hong, S.D. (1990) Properties of alkaline protease produced by an alkalophillic Bacillus sp., Kor. J. Appl. Microbiol Biotechnol., 18, 159-164.
32. Chun, S.S., Cho, Y.J., Son, G.M., Choi, H.J. and Choi, C. (1998) Change of funtional properties and extraction of protein from abolished protein resource by protease, J. Korean Agricu. Chem. Biotechnol. Soc. 41, 13-17.
33. Choi, C., Choi, K.S., Kim, S., Lee, S.H., Son J.H., Choi, H.J., Lee, S.S., and Ahn, B.J. (1997) Characteristics and action pattern of protease from Scopulariopsis brevicaulis in korean traditional meju, Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnology, 25, 56-61.
34. Cha, W.S., Cho, Y.J., and Choi, C. (1989) Production and purification of alkaline protease by Aspergillus fumigatus. J. Kor. Soc. Food Nutr., 18, 279-286.
35. Kim, T.H., Park, S.H., Lee, D.S., Kwon, T.K., Kim, J.K. and Hong, S.D. (1990) Properties of alkaline protease produced by an alkalophillic Bacillus sp., Kor. J. Appl. Microbiol Biotechnol., 18(2), 159-164.
36. Yeom, H.W., Kim, K.S., and Rhee, S.J. (1994) Soy-protein hydrolysate debittering by lysine-acetylation, J. Food Sci., 59, 1123-1126.
37. Han, E.S., Lee, H.J. and Shon, D.H. (1993) Effect of surface hydrophobicity of soybean peptide on the concentration of serum cholesterol and fecal steroid excretion in rats, Kor. J. Food Sci. Technol., 25, 571-575.

(접수 2002년 12월 12일, 채택 2002년 12월 29일)