

국내산 콩 품종별 *Rhizopus oligosporus* 발효물의 단백질 소화율과 아미노산가

†박혜영 · 김현주 · 서정현* · 최혜선 · 박지영 · 심은영 · 김미정** · 김홍식**
농촌진흥청 국립식량과학원 중부작물부 농업연구사, *농촌진흥청 국립식량과학원 남부작물부 농업연구사,
**농촌진흥청 국립식량과학원 중부작물부 농업연구관

In Vitro Digestibility and Amino Acid Score of *Rhizopus oligosporus* Fermented Products by Domestic Soybean (*Glycine max* L.) Cultivars

†Hye-Young Park, Hyun-Joo Kim, Jung Hyun Seo*, Hye Sun Choi,
Jiyoung Park, Eun-Yeong Sim, Mi Jung Kim** and Hong-Sig Kim**

Junior Researcher, Dept. of Central Area Crop Science, National Institute of Crop Science, RDA, Suwon 16613, Korea

*Junior Researcher, Dept. of Southern Area Crop Science, National Institute of Crop Science, RDA, Miryang 50424, Korea

**Senior Researcher, Dept. of Central Area Crop Science, National Institute of Crop Science, RDA, Suwon 16613, Korea

Abstract

In vitro digestibility and protein digestibility corrected amino acid scores (PDCAAS) were investigated to verify the availability of protein in various *Rhizopus oligosporus* fermented products of domestic soybean (*Glycine max* L.) cultivars. *Danbaegkong* (DBK), *Daepung* (DP), *Daewonkong* (DWK), *Saedanbaek* (SDB), *Seonyu* (SY), and *Cheongja4ho* (CJ4) were used as raw samples, which were fermented using commercially available *Rhizopus oligosporus* for 48 h. All cultivars showed increased crude protein content after fermentation. The crude protein content of DBK and SDB was significantly higher than that of the other samples (55.12% in DBK and 54.22% in SDB) ($p < 0.001$). CJ4 had the highest alanine content of 28.88 mg/g ($p < 0.001$), and no significant difference in cysteine content was detected among the cultivars. In most of the fermented samples, the *in vitro* digestibility was 0.9 or higher, indicating high protein in the fermented samples. However, it is considered that restrictions on digestion are low. In DWK, the amino acid content and PDCAAS, which together indicate protein quality, were 0.917 and 0.855, respectively, confirming that it was the best cultivar to provide the raw material for fermentation. In conclusion *Rhizopus oligosporus* fermented soybean products can be considered a prospective source of protein with high utility value.

Key words: soybean, *Rhizopus oligosporus*, fermentation, PDCAAS, *in vitro* digestibility

서 론

콩(*Glycine max* L.)의 가공은 콩을 오래전부터 재배하여 이
용했던 동북아시아 지역이 가장 발달하였으며, 그 이용 방법
은 역사적, 문화적 배경과 지역에 따라 큰 차이가 있다. 콩의
가공 방법은 원형을 유지하는 방법으로 콩밥, 콩자반, 볶은
콩, 초콩 등이 있으며, 원형을 변화시킨 가공 종류로 마쇄 방

법의 콩가루, 발효 방법의 간장, 된장, 템페(tempeh), 발아 방
법의 콩나물, 추출 방법의 콩기름, 분리 방법의 탈지 대두분,
응고 방법의 두유, 유부 등으로 매우 다양하다(CEKSM
2005). 최근 우리나라의 콩 생산 동향을 살펴보면, 2021년에
110,751톤으로 전년 대비 약 37% 증가하였고, 콩 소비 또한
2020년에 다시 증가하는 경향을 보이고 있으나, 여전히 콩
수입량은 많아 2021년 1,270,000톤에 이르고 있다(Ha BK

† Corresponding author: Hye-Young Park, Junior Researcher, Dept. of Central Area Crop Science, National Institute of Crop Science, RDA, Suwon 16613, Korea. Tel: +82-31-695-0626, Fax: +82-31-695-0609, E-mail: phy0316@korea.kr

2022). 따라서 국산 콩 생산과 이용 확대를 위해 다각적 노력이 필요하다.

콩은 인간의 생명 보전에 필요한 3대 영양소 즉 단백질 40%, 탄수화물 30%, 지방 20%로 구성되어, 일찍이 우리 선조들은 콩의 우수한 영양성을 알고 ‘밭의 고기’라고 불렀다(RDA 2021a). 이러한 콩의 영양적 품질은 가열 또는 발효 가공에 따라 크게 변하여 우수한 기능이 현저히 상승한다고 알려져 있다(CEKSM 2005). 대표적 예로 된장은 구수한 맛과 특유의 향미를 지니며(Kim & Rhee 1993; Yoon 등 2019), 고지방 식이 위해도 경감(Lee & Kim 2002), 면역능(Lee 등 2011), 항암(Park 등 2015), 항비만(Kim J 2017), 항염증(Lim 등 2018), 항산화(Song 등 2019), 항당뇨(Yang 등 2019) 등이 확인되었다. 된장과 유사한 콩 발효식품으로 인도네시아의 tempeh는 *Rhizopus oligosporus*를 증식시켜 메주 형태로 발효시키며, 균사체가 생성되면서 콩의 조직이 단단해져 ‘soybean cake’의 외관을 갖추는 콩 고형 발효물이다(Lee 등 2004). Tempeh도 발효 후 단백질과 알라닌, 프롤린, 메티오닌, 로이신 등의 유리아미노산이 증가하고 비타민 B군도 많아서 영양적으로 매우 우수한 식품으로 알려졌으며(Lee & Park 2006), 뇌질환 개선(Ahmad 등 2014), 면역능(Soka 등 2015), 항산화능(Xiao 등 2016), 비타민 B₁₂(Wolkers-Rooijackers 등 2018) 및 셀레니움(Kurniawati 등 2019)의 영양개선, 항당뇨(Su 등 2021) 등이 최근까지 연구되고 있으나 국산콩 적용의 연구는 많이 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 국산콩의 활용성 증대를 위한 국산콩 원료의 *Rhizopus oligosporus* 발효물을 대상으로 발효·단백 소재 개발을 검토하고자 하였다. 단백질 소재로서 매우 중요한 단백질의 질적·양적 평가를 위하여 *Rhizopus oligosporus* 발효 후 단백질과 아미노산 함량의 변화를 살펴보고, 소화율, 아미노산가를 도출하여 PDCAAS(protein digestibility corrected amino acid score)를 이용한 콩 발효물의 단백질 품질 평가를 실시하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시험재료

본 연구에서 콩 시험재료는 국내 육성 품종인 단백질콩(*Glycine max* cv. Danbaegkong, DBK), 대풍(cv. Daepung, DP), 대원콩(cv. Daewonkong, DWK), 새단백(cv. Saedanbaek, SDB), 선유(cv. Seonyu, SY), 청자4호(cv. Cheongja4ho, CJ4)를 사용하였다. 시험재료는 경기도 수원에 소재한 국립식량과학원 중부작물부 시험포장에서 2021년 생산하였다. 모든 시료는 3일간 건조하여 탈곡한 다음 4°C의 저온 저장실에 보관하였고, 원료 시료의 분석은 분쇄기(FM-700SS, Hanil Inc., Wonju,

Korea)로 1분간 분쇄하여 100 mesh의 체로 내린 후 -70°C에 보관하면서 사용하였다.

2. *Rhizopus oligosporus* 콩 발효물 제조

Rhizopus oligosporus 콩 발효물의 제조는 Egonlety & Aworh(2003)와 Azeke 등(2007)의 tempeh 제조법을 참조하였으며, 실험실 환경에 맞춰 랩 스케일 조건으로 수행하였다. 즉, 콩 품종별 50 g을 수세하여 물과 함께 소형 냄비(IH vacuum pot 20, 3003-0083, 2.8 L, 219×380×165 mm, Hapycall Ltd., Seoul, Korea)에 넣고 인덕션 레인지(HC-IH4000, 1800W, Hapycall Ltd., Seoul, Korea)로 140°C에서 30분간 가열하였다. 상온으로 식혀 콩 껍질을 제거하고, 다시 전기보일러(DA-2, Kyung Chang, Seoul, Korea)에서 2시간 고압 증자 후 상온으로 식히며 콩 종자의 겉면을 건조하였다. 시료 무게의 1.5%의 상업용 종균(*Rhizopus oligosporus*; Wira brand ragi tempeh, Jans Enterprises Corp., El Monte, CA, USA)을 콩에 접종한 후, 폴리에틸렌 포장지에 옮겨 담아 직육면체의 모양으로 압축 성형한 후 입구를 밀봉하였다. 종균 성장을 위한 호기적 조건을 부여하기 위하여 면적이 넓은 2개의 면에 멸균 주사기 바늘로 일정 간격의 기공을 만들었으며, 27.5°C에서 68시간 동안 발효 후 콩 발효물을 얻었다. 콩 발효물의 분석은 동결 건조한 발효물을 1분간 분쇄하여 100 mesh의 체로 내린 후 -70°C에 보관하면서 사용하였다.

3. 조단백질 분석

조단백질 함량은 micro-Kjeldahl법에 의하여 시료 0.5 g을 산 분해 후 자동 단백질분석기(Kjeltec 2400 AUT, Foss Tector, Mulgrave, Australia)를 이용하여 분석하였고, 측정된 질소함량에 단백질 환산계수인 5.95를 적용하여 단백질 함량을 도출하였다(Guebel 등 1991; AOAC International 2005).

4. 구성아미노산 분석

구성아미노산 분석은 시료 0.3 g을 뚜껑이 있는 pyrex 시험관에 넣고 6 N HCl 10 mL를 가한 후 N₂ gas를 1분간 불어 넣어 시험관 내부의 가스를 치환한 다음, 드라이 오븐에 넣어 110°C에서 22시간 동안 산 가수분해하였다. 냉각한 시료의 가수분해물을 0.02 N HCl 10 mL에 녹이고, 10배 희석하여 0.22 µm membrane filter(Merck Millipore, Darmstadt, Germany)로 여과하여 아미노산 분석을 위한 시료 전처리를 완료하였다. 분석기기는 아미노산 자동분석기(HITACH L-8800 Amino acid auto analyzer, Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하였고, 이동상은 PH1, PH2, PH3, PH4, PH-RG, R-3, C-1, ninhydrin solution, buffer solution(Fujifilm Wako Pure Chemical, Wako, Japan), 컬럼은 ion exchange column(#2622SC PF

Column, Hitachi, Tokyo, Japan)를 사용하였다. 컬럼과 reaction chamber 온도 조건은 각각 50°C와 135°C이었고, 표준물질 (Amino acid calibration mixture, Ajinomoto-Takara Co., Tokyo, Japan)로 각 아미노산 함량을 산출하였다(Im 등 2016).

5. 단백질 품질 분석

콩 발효물의 단백질 소화 관련한 품질분석은 protein digestibility assay kit(K-PDCAAS, Megazyme, Chicago, IL, USA)를 이용하여 분석하였다. 분쇄한 시료 500 mg와 0.06 N HCl 19 mL를 50 mL 원심 분리 튜브에 넣고 shaking incubator (DS-310F, Dasol science Ltd., Hwaseong, Korea) 37°C에서 300 rpm으로 30분간 shaking한 다음, pepsin solution 1 mL를 가하여 완전히 섞어준 후 다시 37°C에서 300 rpm으로 60분간 shaking 하였다. Pepsin 반응 후 1.0 M tris buffer 2 mL를 가하여 pH 7.4로 맞춘 후 충분히 섞어주었다. 여기에 trypsin/chymotrypsin 효소혼합액 200 µL를 가하여 완전하게 섞어준 후 37°C에서 300 rpm으로 4시간 동안 shaking 하였고, 효소반응 후 100°C의 항온수조에 10분간 처리 후 상온에서 20분간 식혀 주었다. 식힌 반응액 4 mL에 40% TCA용액 1 mL를 가하여 완전히 섞어 준 후 4°C에서 16시간 방치하였다. 1.5 mL의 TCA 처리 반응액을 15,000×g에서 10분간 원심분리한 후 상등액 100 µL를 취하여 sodium acetate buffer(50 mM, pH 5.5) 900 µL와 혼합하여 최종 반응의 시료로 하였다. 시료 100 µL를 96-well microplate에 넣고 2% ninhydrin 용액 50 µL를 가한 후 호일로 plate를 덮은 후 70°C, 35분간 100 rpm으로 반응시킨 후 10분간 실온에서 방냉 하였다. 마지막 단계로 50% 에탄올을 0.15 mL 가한 후 분광광도계(EPOCH2, Bio Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Megazyme사에서 제시한 Mega-Calc(Megazyme 2019)에 시료, L-glycine standards, blank 및 control sample의 흡광도 값, 각 시료의 수분, 단백질, 아미노산 조성을 대입하여 *in vitro* digestibility, 아미노산가(amino acid score), 제1제한 아미노산(first limiting amino acid), 단백질 소화율 보정 아미노산가(PDCAAS, protein digestibility corrected amino acid score)를 산출하였다(Plank DW 2017).

6. 통계분석

실험결과와 통계분석은 SPSS 프로그램(Statistical Package for Social Science, version 12, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 본 시험에서 얻어진 반복 값에 따른 평균과 표준편차를 산출하였고, 콩과 콩 발효물 내의 품종 간 유의성 검정은 일원 분산분석(one-way ANOVA)과 다중범위 검정법(Duncan's multiple range test)을 독립적으로 수행하여 결과를 도출하였다. 동일한 품종 내의 콩과 콩 발효물(발효전·후)

의 유의성 검정은 독립표본 *t*-test로 분석하였고 얻어진 *t*값 및 *p*값 수준을 **로 제시하였다.

결과 및 고찰

1. 원료 콩 및 *Rhizopus oligosporus* 콩 발효물의 조단백질 함량

본 연구에서는 콩을 이용한 *Rhizopus oligosporus* 발효물의 식물성 단백 소재로의 활용성을 검토하고자 하였다. 이를 위하여 국내 육종된 콩 6개 품종의 원료 콩과 콩 발효물의 조단백질 함량을 분석하였으며 그 결과는 Fig. 1과 같다. 단백질 함량은 원료 콩과 콩 발효물의 명확한 비교를 위하여 수분 보정 값을 이용하였고, 일원 분산분석과 독립표본 *t*-test를 활용하였다. 원료 콩의 단백질 함량은 38.14~46.16% 범위에서 단백질이 가장 높았고, 그다음으로 새단백이 44.06%를 나타냈다($p<0.001$). 콩 발효물의 단백질 함량은 46.79~55.12% 범위에서 원료 콩과 동일하게 단백질이 가장 높았고, 그다음 새단백이 54.22%를 나타내어($p<0.001$) 발효 후의 단백질 함량은 원료 콩 품종이 갖는 단백질 함량에 기인할 것으로 사료 된다. 한편 원료 콩과 콩 발효물의 단백질 함량은 단백질($p<0.01$)을 제외한 모든 품종에서 매우 높은 유의적 차이를 나타냈다($p<0.001$). 발효 후 원료 콩의 단백질 증가율이 선유 25.46%, 대원콩 24.72%, 대풍 24.31%를 나타냄에 따라 원료 콩의 단백질 함량 하위그룹 'd'의 3개 품종이 발효에 의한 단백질 함량 증대 효과는 높았다. 이는 원료 콩에 함유된

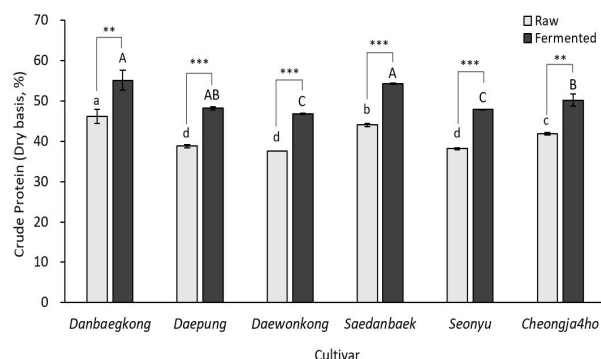


Fig. 1. Crude protein contents of raw and fermented soybean by various cultivars. All results are expressed as mean±standard deviation (n=3). Mean with different letters within the same columns are significantly different from each other at $p<0.001$ by Duncan's multiple range test. The symbols indicate significant difference at * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ between crude protein by independent-samples *t*-test.

protease inhibitor 또는 trypsin inhibitor 등이 열처리를 포함하는 발효과정 중 불활성화 되고 *Rhizopus oligosporus* 증식에 따라 질소화합물이 증가한 것에 영향을 받았을 것으로 생각한다(Egounlety & Aworh 2003; CEKSM 2005).

관련 연구로 Jeong 등(2019)은 최근 경기지역에서 육종된 품종을 포함하여 6종의 단백질 함량을 제시하였는데, 수분 보정된 단백질 함량이 35.54~39.89%를 나타내어 본 연구 결과보다 낮은 범위를 나타냈으며, 본 연구와 중복된 품종인 대원콩은 35.54%로 유사하였고, Shin 등(2019)의 연구에서도 중복된 품종 새단백의 유사한 수준을 확인할 수 있었다. 또한 Kim 등(1990)은 국내 재배 장려품종 19종의 단백질 함량을 37.42~44.37%로 보고하였는데, 콩 품종에 따라 큰 차이를 보였다. *Rhizopus oligosporus* 콩 발효물의 단백질 함량 관련하여 'tempeh' 연구를 살펴보았다. Park & Yoon(1983)은 tempeh의 phytic acid 연구에서 soybean과 tempeh의 단백질 함량이 각각 50.88%와 52.69%임을 제시하였고, Huang 등(2019)의 연구에서는 soybean 41%, tempeh 43%로 나타났는데 두 연구의 결과값은 모두 건물중으로 큰 차이를 나타냈다. 본 연구의 6개 품종의 결과와 비교 시 콩 원료와 콩 발효물의 단백질 함량 범위에서 크게 벗어나지 않았으나, *Rhizopus oligosporus* 발효 후 단백질 증가율은 본 연구 결과가 매우 높은 수준임을 확인할 수 있었다. 식물성 단백 소재 개발에 기본조건인 고단백 특성을 도출하기 위해 원료의 종류나 품종의 선택은 매우 중요하며, 이를 위하여 원료의 단백질 수준이나 발효에 의한 단백질 증가율의 특성이 확인되어야 할 것이다.

2. 원료 콩 및 *Rhizopus oligosporus* 콩 발효물의 구성아미노산 함량

원료 선택에 따른 *Rhizopus oligosporus* 콩 발효물의 단백질 소화율과 아미노산이 차이를 살펴보기 위하여 구성아미노산 함량을 분석하였고, 발효에 의한 변화를 살펴보고자 원료 콩의 구성아미노산도 함께 분석하여 그 결과를 Table 1에 나타냈다. 단백질을 구성하는 아미노산은 약 20여종으로 물과 작용하는 능력에 따라 비극성-중성, 극성-중성, 산성, 염기성의 아미노산으로 분류하며, 체내 합성 가능 여부에 따라 필수 아미노산과 비 필수아미노산으로 분류하기도 한다(Lee 등 2014). 본 연구의 구성아미노산 분석은 Asp, Ser, Glu, Gly, Ala, Cys, Tyr, Pro, Thr, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Lys, His, Arg, 17종을 대상으로 하였고, 각 아미노산에 대해 독립적으로 원료 콩과 콩 발효물 각 그룹 내 6개 품종의 유의성 차이를 영문알파벳으로 나타냈다. 또한 각 품종 내에서 원료 콩과 콩 발효물의 아미노산 차이는 t 값과 *^{*}로 유의수준을 제시하였다. 콩 발효물에서 가장 높은 함량 범위를 나타낸 아미노산은 Glu로 88.55~114.25 mg/g이었으며($p < 0.001$), 그 다음이 Asp

49.05~61.48 mg/g이었으며($p < 0.001$), 원료 콩에서도 Glu와 Asp가 77.12~90.23 mg/g($p < 0.001$)와 47.25~55.26 mg/g($p < 0.001$)로 높았다. 품종 간 유의적 차이에서 단백질과 새단백은 Ala 외 대부분의 아미노산에서 유의적으로 높았고, 원료 콩의 Pro와 콩 발효물의 Cys는 품종 간 유의적 차이가 없었다. 원료 콩과 콩 발효물의 유의성을 통해 발효 전·후의 차이를 살펴본 결과, 단백질과 새단백은 모든 아미노산에서 원료 콩과 비교하여 콩 발효물이 유의적으로 높은 함량을 나타냈다. 한편 선유는 Ala, Cys, Tyr, Thr, Val, Phe, Lys, His에서 콩 발효물이 유의적으로 높은 함량을 나타냈으나, 그 외 9종의 아미노산은 원료 콩과 콩 발효물의 유의적 차이가 없었고, 대원콩의 Cys, Pro, Ile, Arg와 대풍의 Pro에서도 유의적 차이를 나타내지 않았다. 17종 아미노산의 총합인 TAA(total amino acid, mg/g)는 원료 콩에서 단백질(449.91) > 새단백(423.54), 선유(397.63), 청자4호(394.34) > 대풍(389.32), 대원콩(388.20)이었으나($p < 0.001$), 콩 발효물에서 단백질(521.18), 새단백(517.72) > 청자4호(473.45), 대풍(463.81) > 대원콩(433.81), 선유(423.67)로 나타나($p < 0.001$), 원료 콩과 콩 발효물에서 품종 간 유사한 경향을 확인할 수 있었다.

콩의 아미노산을 살펴본 Kim 등(2012)의 연구에서 대두와 서리태의 아미노산 조성이 매우 유사하였고, 대두와 서리태보다 대부분 낮은 아미노산 함량을 나타냈던 작두콩이 His에서 9.2%를 나타내 대두 3.0%, 서리태 2.9% 보다 월등히 높았다. 한편 7종의 시중유통 콩을 대상으로 한 Moon 등(2011) 연구와 18종의 장려품종을 대상으로 한 Kim 등(1990)의 연구결과를 더하여 세 가지 연구에서 다양한 종류와 콩 품종의 구성아미노산 중 Glu와 Asp가 가장 높은 조성을 나타냈고, 낮은 조성은 Met와 Cys로 공통된 결과를 나타냈으며 본 연구결과와 일치하였다. *Rhizopus oligosporus* 콩 발효물의 아미노산을 살펴본 연구에서 Stillings & Hackler(1965)는 원료 대두로부터 각 발효시간에 따른 tempeh의 아미노산 조성이 크게 변화되지 않으며, 필수아미노산 index도 24시간 발효 후에 변화가 없었다고 보고하였다. Murata 등(1967)은 22시간 발효한 tempeh 아미노산 조성이 Stillings & Hackler(1965)와 유사한 경향을 나타냈고, 아미노산 함량은 발효시간 경과에 따라 증가하여 48~72시간에 가장 높았고, 그 중 alanine은 원료와 비교하여 48시간 발효시 85배의 함량 증가를 보고하였다. Gunawan-Puteri 등(2015)은 발효기간의 연장이나 건조방법에 따라 Glu를 증대시킬 수 있어 조미료로의 활용성을 제시하였는데, 이러한 선행연구에 본 연구결과를 반영하여 아미노산 조성이나 아미노산 함유량이 우수한 원료를 선택하여 목표한 아미노산을 증대시킬 수 있는 공정개발이 더해진다면 *Rhizopus oligosporus* 콩 발효물은 단백질소재로서 우수한 조미소재로의 활용가치를 더 높일 수 있을 것으로 사료된다.

3. *Rhizopus oligosporus* 콩 발효물의 단백질 품질 특성

Rhizopus oligosporus 콩 발효물을 3가지 단백질 소화효소로 처리하여 생성된 아미노산 함량을 분석하고, 여기에 각 시료의 수분 및 단백질 함량, 아미노산 조성을 반영하여 *in vitro* digestibility, amino acid score, 제1제한 아미노산, PDCAAS를 도출하였으며 그 결과는 Table 2와 같다. 원료 품종을 달리하는 콩 발효물 6종의 *in vitro* digestibility은 모두 0.9 이상이었고, 원료 품종에 따른 유의적 차이도 확인하였다($p < 0.01$). 이 중 단백질과 새단백은 각각 0.975와 0.965로 매우 높게 나타났는데, 단백질 소화효소의 기질이 되는 단백질 함량(Fig. 1)과 단백질을 구성하는 아미노산(Table 1)의 조성에 영향을 받았을 것으로 사료된다. Amino acid score는 1973년 국제연합 식량농업기구(FAO)와 세계 보건기구(WHO)의 합동 특별전문위원회에서 사람의 일일 단백질 필요량을 표시할 때 사용한 단백질 영양 평가를 위하여 설정하였으며(Kang YH 2014), 식품 단백질의 제1제한 아미노산량을 기준 아미노산 패턴에서의 동일한 아미노산량으로 나누어 표시하며 단백질의 품질을 평가하는 지표로 이용한다(KoSFoST 1998). 본 연구에서 분석하지 못한 Trp는 국가식품성분표의 tempeh 아미노산 함량을 참조하여 수분 보정 후 이용하였으며(RDA 2021b), 분석한 17종의 아미노산 함량과 함께 비교한 결과, 콩 발효물 6종의 제1제한 아미노산은 모두 Trp로 확인되었다. Amino acid score는 도출된 제1제한 아미노산인 Trp 함량에 따라 기준 아미노산 패턴의 Trp 함량으로 도출하였다. 참조한 Trp 값으로 원료 품종별 콩 발효물의 수분 함량에 따른 Trp 값을 환산하여 amino acid score를 도출하였고 0.769~0.907의 범위 내에서 대원콩이 가장 높았고 단백질이 가장 낮았다. 한편 PDCAAS(protein digestibility corrected amino acid score)는 사람이 필요한 아미노산과 소화하는 능력 모두에 기초하여 단백질의 품질을 평가하는 방법으로 1993년 미

국 식품의약국(FDA)과 FAO, WHO에 의하여 채택되었다(WIKIPEDIA 2001). 값의 범위는 0~1이며 높을수록 고품질의 단백질로 평가하는데, PDCAAS가 1.0인 것으로 카제인, 계란, 대두단백질, 우유 등이 있다. 콩 발효물의 PDCAAS는 원료 품종에 따른 유의적 차이를 나타냈으며, 대원콩 0.855, 대풍 0.835, 선유 0.830, 청자4호 0.815로 대부분 0.8 이상으로 *Rhizopus oligosporus* 콩 발효물은 식물성 유래 고품질의 단백질을 함유하는 것으로 나타났으며 단백질소재로서 활용가치가 높을 것으로 사료된다.

본 연구 유사하게 병아리 콩(chickpea)을 원료로 발효물을 제조한 Angulo-Bejarano 등(2008)의 연구에서 발효 후 필수 아미노산과 함황아미노산(Met+Cys), 방향족아미노산(Phe+Tyr) 등이 증가하였고 Trp는 감소하여 본 연구와 동일하게 제한 아미노산으로 확인되었다. 또한 *in vitro* digestibility는 83.2%로 soybean 6품종과 비교하여 낮았으나, PDCAAS가 0.92로 본 연구에서 가장 높았던 대원콩 보다 약간 높은 수준을 나타냈다. 한편 Cuevas-Rodríguez 등(2006)은 quality protein maize (QPM)을 원료로 *R. oligosporus* 발효하였을 때 원료의 PDCAAS 0.55가 발효 후 본 연구의 선유와 유사하게 0.83으로 현격한 증가를 나타냈으며 제1제한 아미노산은 콩 발효물과 동일하게 Trp이었다. *Rhizopus oligosporus* 발효는 작물의 종류 및 품종에 따라 단백질 품질에 차이를 나타냄으로써 우수 단백질소재 개발을 위하여 적합한 작물과 품종의 원료 선택이 필요하다고 사료된다.

4. *Rhizopus oligosporus* 콩 발효물의 단백질 품질 특성 및 필수 아미노산의 상관관계

Rhizopus oligosporus 콩 발효물의 amino acid score와 *in vitro* digestibility 및 PDCAAS와의 상관관계는 Fig. 2와 같다. Amino acid score와 *in vitro* digestibility는 직선식 $y = -3.2515$

Table 2. Protein quality of fermented soybean with *Rhizopus oligosporus* by various cultivars

Cultivars	<i>In vitro</i> digestibility	Amino acid score	First limiting amino acid	PDCAAS ¹⁾
Danbaegkong	0.975±0.007 ^{a2)3)}	0.769	L-Tryptophan	0.755±0.007 ^d
Daepung	0.950±0.000 ^{cd}	0.882	L-Tryptophan	0.835±0.007 ^b
Daewonkong	0.940±0.000 ^{de}	0.907	L-Tryptophan	0.855±0.007 ^a
Saedanbaek	0.965±0.007 ^{ab}	0.787	L-Tryptophan	0.760±0.000 ^d
Seonyu	0.935±0.007 ^c	0.888	L-Tryptophan	0.830±0.000 ^b
Cheongja4ho	0.960±0.000 ^{bc}	0.848	L-Tryptophan	0.815±0.007 ^c

¹⁾ PDCAAS: Protein digestibility corrected amino acid score.

²⁾ All results are expressed as mean±standard deviation (n=2).

³⁾ Mean with different letters within a-columns (*in vitro* digestibility, $p < 0.01$; PDCAAS, $p < 0.001$) are significantly different from each other by Duncan's multiple range test.

⁴⁾ The tryptophan content used to derive the results was used as reference data (RDA 2021b).

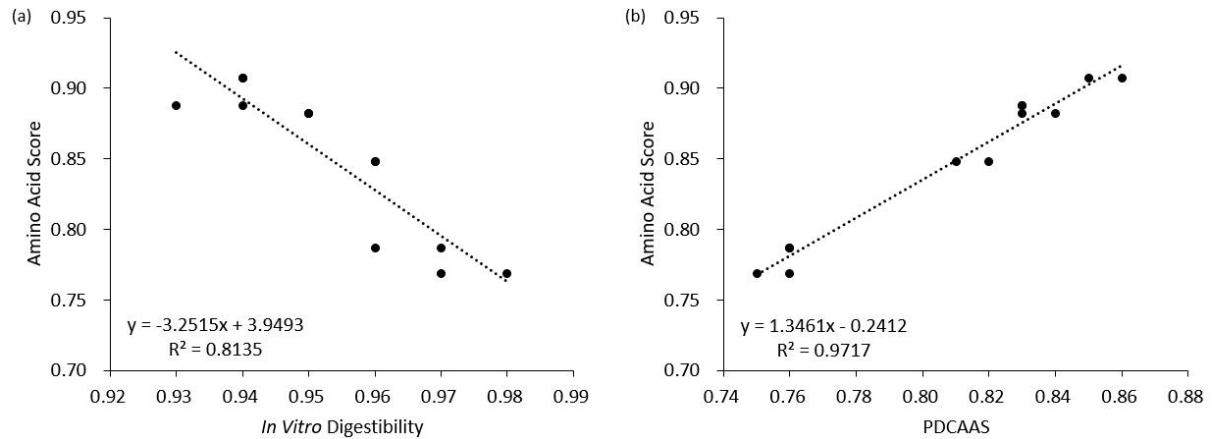


Fig. 2. Relationship between amino acid score, *in vitro* digestibility, and PDCAAS in fermented soybean by various cultivars. Analysis using Pearson correlation coefficient at $p < 0.01$. PDCAAS: Protein digestibility corrected amino acid score.

X+3.9493($r = -0.9019^{***}$, Table 3)으로 음의 상관을 나타냈다. 이것은 콩 발효물의 제1제한 아미노산의 함량이 기준 아미노산 패턴의 해당 아미노산 함량과의 차이가 감소함에 따라 amino acid score가 증가하고, 이에 따라 제1제한 아미노산보다 높은 수준의 다른 아미노산 함량 증가로 *in vitro* digestibility가 증가했을 것으로 사료된다. 또한 amino acid score와 PDCAAS는 양의 상관($r = 0.9858^{***}$)을 나타내어 앞서 제시한 amino acid score와 *in vitro* digestibility의 상반된 결과를 나타냈다. 즉, PDCAAS는 아미노산 조성에 따른 소화율을 적용한 값으로 amino acid score가 증가할수록 PDCAAS가 증가하는

것으로 나타났다. 다만 PDCAAS 관련 연구에서 Schaafsma G(2005)가 제시한 아미노산가 도출을 위한 참조패턴의 불확실성, 100% 초과 수치에 대한 조정, 단백질과 아미노산 소화 효과에 대한 불일치, 가공의 영향 등에 따른 제한점과, 실제 PDCAAS, RPER(relative protein efficiency ratio), RNPR(relative net protein ratio), TPD(true protein digestibility) 값의 차이를 통해 대상 식품에 따라서 단백질 품질을 나타내는 다양한 기준의 검토가 필요하다고 사료된다.

조단백질 함량을 포함한 단백질 관련 특성과 8개의 필수 아미노산의 상관관계를 살펴보았으며, 그 결과는 Table 3과

Table 3. Correlation coefficients among protein quality characteristics and essential amino acid of fermented soybean with *Rhizopus oligosporus* by various cultivars

	Crude protein	<i>In vitro</i> digestibility	Amino acid score	PDCAAS ¹⁾
Crude protein	1.0000	-	-	-
<i>In vitro</i> digestibility	0.9106 ^{***2)}	1.0000	-	-
Amino acid score	-0.9499 ^{***}	-0.9019 ^{***}	1.0000	-
PDCAAS	-0.9196 ^{***}	-0.8386 ^{***}	0.9858 ^{***}	1.0000
Essential amino acid	0.8288 ^{***}	0.8498 ^{***}	-0.8926 ^{***}	-0.8742 ^{***}
Threonine	0.8139 ^{***}	0.8633 ^{***}	-0.8597 ^{***}	-0.8243 ^{**}
Valine	0.7318 ^{***}	0.7682 ^{**}	-0.8067 ^{**}	-0.7841 ^{**}
Methionin	0.8923 ^{***}	0.9106 ^{***}	-0.9451 ^{***}	-0.8977 ^{***}
Isoleucine	0.6664 ^{**}	0.6713 [*]	-0.7674 [*]	-0.7883 ^{**}
Leucine	0.8298 ^{***}	0.8734 ^{***}	-0.8829 ^{***}	-0.8563 ^{***}
Phenylalanine	0.8357 ^{***}	0.8592 ^{***}	-0.9270 ^{***}	-0.9159 ^{***}
Lysine	0.8677 ^{***}	0.8555 ^{***}	-0.9073 ^{***}	-0.8873 ^{***}
Tryptophan	0.1713	0.0797	-0.1690	-0.2183

¹⁾ PDCAAS: Protein digestibility corrected amino acid score.

²⁾ Significant at ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$.

같다. 조단백질은 *in vitro* digestibility와 양의 상관($r=0.9858^{***}$), amino acid score($r=-0.9499^{***}$) 및 PDCAAS($r=-0.9196^{***}$)와 음의 상관을 나타냈다. 한편 필수아미노산 중 콩 발효물의 제1제한 아미노산인 Trp를 제외한 7개의 아미노산 모두 *in vitro* digestibility와 양의 상관($0.6713 \leq r \leq 0.9106$)을 나타냈고, amino acid score($-0.9451 \leq r \leq -0.7674$) 및 PDCAAS($-0.9159 \leq r \leq -0.7841$)와 음의 상관을 나타냈다. PDCAAS와 높은 음의 상관을 나타냈던 Phe, Met, Lys은 제1제한 아미노산인 Trp와 함께 콩 발효물의 품질을 결정짓는 매우 중요한 아미노산으로 사료된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 국내산 콩을 이용한 *Rhizopus oligosporus* 발효물의 단백질 소화율과 아미노산가를 살펴보고, 원료 품종에 따른 단백질 소화율과 아미노산가를 살펴보았다. 원료 시료는 단백콩, 대풍, 대원콩, 새단백, 선유, 청자4호를 사용하였고, 발효 시료는 상업용 *Rhizopus oligosporus*로 48시간 발효하여 제조한 것을 사용하였다. 모든 품종은 발효 후 조단백질 함량이 증가하였고, 그 중 단백콩과 새단백의 조단백질 함량은 각각 55.12%, 54.22%로 매우 높았다($p<0.001$). 조단백질 함량이 높았던 단백콩과 새단백이 발효 후 아미노산 대부분에서 높은 함량을 나타냈으나, 알라닌은 청자4호가 28.88 mg/g으로 가장 높았고($p<0.001$), 시스테인은 품종 간 유의적 차이를 보이지 않았다. 모든 발효 시료의 제1제한 아미노산은 트립토판으로 확인되었고, 단백질 소화율이 0.9 이상을 나타내어 *Rhizopus oligosporus* 콩 발효물은 높은 단백질을 보유하지만, 소화로 인한 영양소의 활성은 우수하였다. 한편 아미노산가와 단백질 소화율 보정 아미노산가(PDCAAS, protein digestibility corrected amino acid score)는 대원콩이 각각 0.907, 0.855를 나타내어 가장 우수한 단백질 품질을 갖는 원료 품종을 확인하였다. 본 연구에서 *Rhizopus oligosporus* 콩 발효물의 높은 단백질 함량과 유래한 단백질의 고품질을 확인하였고, 이에 따라 단백질 소재로서 활용 가치가 높을 것으로 기대한다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 국립식량과학원 연구개발 과제(PJ01608903)의 지원으로 이루어진 것임.

References

Ahmad A, Ramasamy K, Jaafar SM, Majeed ABA, Mani V. 2014. Total isoflavones from soybean and tempeh reversed

- scopolamine-induced amnesia, improved cholinergic activities and reduced neuroinflammation in brain. *Food Chem Toxicol* 65:120-128
- Angulo-Bejarano PI, Verdugo-Montoya NM, Cuevas-Rodríguez EO, Milán-Carrillo J, Mora-Escobedo R, Lopez-Valenzuela JA, Garzón-Tiznado JA, Reyes-Moreno C. 2008. Tempeh flour from chickpea (*Cicer arietinum* L.) nutritional and physicochemical properties. *Food Chem* 106:106-112
- AOAC International. 2005. Official Method of Analysis of AOAC International. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists
- Azeke MA, Fretzdorff B, Buening-Pfaue H, Betsche T. 2007. Comparative effect of boiling and solid substrate fermentation using the tempeh fungus (*Rhizopus oligosporus*) on the flatulence potential of African yambean (*Sphenostylis stenocarpa* L.) seeds. *Food Chem* 103:1420-1425
- Committee for the Establishment of a Korean Soybean Museum [CEKSM]. 2005. Soybean. pp.217-220. Korea University Press
- Cuevas-Rodríguez EO, Verdugo-Montoya NM, Angulo-Bejarano PI, Milán-Carrillo J, Mora-Escobedo R, Bello-Pérez LA, Garzón-Tiznado JA, Reyes-Moreno C. 2006. Nutritional properties of tempeh flour from quality protein maize (*Zea mays* L.). *LWT Food Sci Technol* 39:1072-1079
- Egounlety M, Aworh OC. 2003. Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine max* Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa* Harms). *J Food Eng* 56:249-254
- Guebel DV, Nudel BC, Giulietti AM. 1991. A simple and rapid micro-Kjeldahl method for total nitrogen analysis. *Biotechnol Tech* 5:427-430
- Gunawan-Puteri MDPT, Hassanein TR, Prabawati EK, Wijaya CH, Mutukumira AN. 2015. Sensory characteristics of seasoning powders from overripe tempeh, a solid state fermented soybean. *Procedia Chem* 14:263-269
- Ha BK. 2022. Recent soybean industry trends. *Soybean Ind Inf* 5:4-15
- Huang L, Huang Z, Zhang Y, Zhou S, Hu W, Dong M. 2019. Impact of tempeh flour on the rheology of wheat flour dough and bread staling. *LWT* 111:694-702
- Im JY, Kim SC, Kim S, Choi Y, Yang MR, Cho IH, Kim HR. 2016. Protein and amino-acid contents in *Backtae*, *Seoritae*,

- Huktae*, and *Seomoktae* soybeans with different cooking methods. *Korean J Food Cookery Sci* 32:567-574
- Jeong HK, Lee DH, Seo JS, Won SY, Kang HY, Chi JH. 2019. Changes in the characteristics and isoflavone content of soybean on different varieties and processing methods. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 48:245-252
- Kang YH. 2014. Encyclopedia of Life Science. Available from <https://terms.naver.com/entry.naver?docId=436546&cid=60261&categoryId=60261> [cited 4 October 2022]
- Kim DM, Jin JS, Kim KH. 1990. Morphological characteristics and proximate compositions of the recommended soybean varieties in Korea. *Korean J Food Sci Technol* 22:398-404
- Kim J. 2017. Anti-obesity effects of black soybean doenjang in C57BL/6 mice. *J Life Sci* 27:1486-1493
- Kim JP, Yang YS, Kim JH, Lee HH, Kim ES, Moon YW, Kim JY, Chung JK. 2012. Chemical properties and DPPH radical scavenging ability of sword bean (*Canavalia gladiata*) extract. *Korean J Food Sci Technol* 44:441-446
- Kim MJ, Rhee HS. 1993. Studies on the changes of taste compounds during soy paste fermentation (III). *Korean J Soc Food Sci* 9:261-265
- Korean Society of Food Science and Technology [KoSFoST]. 1998. Encyclopedia of Food Science and Technology. Available from <https://terms.naver.com/entry.naver?docId=295047&cid=60262&categoryId=60262> [cited 4 October 2022]
- Kurniawati S, Lestiani DD, Damastuti E, Santoso M. 2019. The selenium content of tempeh in Indonesia and its potential contribution to the dietary selenium requirements for adults. *J Food Compos Anal* 82:103222
- Lee CH, Youn Y, Song GS, Kim YS. 2011. Immunostimulatory effects of traditional doenjang. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40:1227-1234
- Lee HC, Park IS. 2006. Fermented Food Science. pp.351-358. Shinkwang
- Lee HJ, Moon TH, Noh BS, Chang PS, Baek HH, Lee KK, Kim SJ, Yoo SH, Lee GW. 2014. Food Chemistry. pp.190-193. Soohaksa
- Lee IK, Kim JG. 2002. Effects of dietary supplementation of Korean soybean paste (doen-jang) on the lipid metabolism in rats fed a high fat and/or a high cholesterol diet. *J Korean Public Health Assoc* 28:282-305
- Lee SP, Koh KH, Yang JY, Oh SH, Kim JK. 2004. Fermented Food Science. pp. 291-292. Hyoil Munhwasa
- Lim HJ, Kim HY, Lee JM, Kim HJ. 2018. The anti-inflammatory influence of fermented soy products containing a fermented *Rhus verniciflua* extract on lipopolysaccharide (LPS)-treated RAW 264.7 cells. *Korean J Food Sci Technol* 50:642-652
- Megazyme. 2019. Mega-Calculator™ data calculator protein digestibility assay (K-PDCAAS)-Instructions. Available from https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=https%3A%2F%2Fwww.megazyme.com%2Fdocuments%2FData_Calculator%2FK-PDCAAS_CALC.xlsx&wdOrigin=BROWSELINK [cited 29 October 2022]
- Moon HK, Lee SW, Moon JN, Kim DH, Yoon WJ, Kim GY. 2011. Quality characteristics of various beans in distribution. *J East Asian Soc Diet Life* 21:215-221
- Murata K, Ikehata H, Miyamoto T. 1967. Studies on the nutritional value of tempeh. *J Food Sci* 32:580-586
- Park ES, Lee JY, Park KY. 2015. Anticancer effects of black soybean doenjang in HT-29 human colon cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44:1270-1278
- Park ES, Yoon S. 1983. The changes of phytic acid content and its interactions with protein and minerals in the preparation of tempeh. *Korean J Nutr* 16:281-286
- Plank DW. 2017. *In vitro* method for estimating *in vivo* protein digestibility. US Patent 9,738,920
- Rural Development Administration [RDA]. 2021a. Agricultural Technology Guide 116 Soybean. pp.90-101. *Rural Development Administration* Report No. 11-1390000-004496-14
- Rural Development Administration [RDA]. 2021b. Korean Food Composition Table. Available from <http://koreanfood.rda.go.kr/kfi/ft/ftFoodSrch/list?menuId=PS03563> [cited 27 September 2022]
- Schaafsma G. 2005. The protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS)—A concept for describing protein quality in foods and food ingredients: A critical review. *J AOAC Int* 88:988-994
- Shin DS, Choi ID, Lee SK, Park JY, Kim NG, Park CH, Choi HS. 2019. Properties of amino acid and volatile flavor compounds of fermented soybean products by soybean cultivar. *Korean J Food Nutr* 32:434-441
- Soka S, Suwanto A, Rusmana I, Sajuthi D, Iskandriati D, Jessica K. 2015. Analysis of intestinal mucosal immunoglobulin A in sprague dawley rats supplemented with tempeh. *HAYATI J Biosci* 22:48-52
- Song YE, Han HA, Lee SY, Shin SH, Choi SR, Kim SY. 2019. Quality characteristics and antioxidant activity of regional

- traditional soybean pastes (deonjang) in Jeonbuk province. *Korean J Food Nutr* 32:598-610
- Stillings BR, Hackler LR. 1965. Amino acid studies on the effect of fermentation time and heat processing of tempeh. *J Food Sci* 30:1043-1048
- Su HK, Tsai MH, Chao HR, Wu ML, Lu JH. 2021. Data on effect of tempeh fermentation on patients with type II diabetes. *Data Brief* 38:107310
- Wikipedia. 2001. Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score. Available from https://en.wikipedia.org/wiki/Protein_Digestibility_Corrected_Amino_Acid_Score [cited 5 October 2022]
- Wolkers-Rooijackers JCM, Endika MF, Smid EJ. 2018. Enhancing vitamin B₁₂ in lupin tempeh by *in situ* fortification. *LWT* 96:513-518
- Xiao Y, Fan J, Chen Y, Rui X, Zhang Q, Dong M. 2016. Enhanced total phenolic and isoflavone aglycone content, antioxidant activity and DNA damage protection of soybeans processed by solid state fermentation with *Rhizopus oligosporus* RT-3. *RSC Adv* 6:29741-29756
- Yang HJ, Kim MJ, Hong SP. 2019. Anti-diabetic effect of ganjang and doenjang in different aging periods. *Korean J Food Preserv* 26:300-307
- Yoon HS, Lee SH, Kang HJ, Eom HJ, Kim Y. 2019. Physicochemical and flavor characteristics of doenjang in Chungbuk provinces during fermentation. *Korean J Food Nutr* 32:687-695
-
- Received 11 October, 2022
Revised 30 October, 2022
Accepted 08 November, 2022