

## 납두균 효소를 이용한 두유단백질의 용출

이상민 · 김재욱

서울대학교 식품공학과

**초록:** 두유박에 함유되어 있는 불용성 형태의 단백질을 *Bacillus subtilis* IAM 1071 *natto*가 생산하는 효소를 이용하여 가용성 형태의 단백질로 용출시키기 위하여 효소작용 최적 조건으로서 pH, 온도 및 소화 시간을 결정한 다음 추출액의 아미노산 조성을 분석하였다. 두유박의 단백질 용출을 위한 최적 pH는 7.5였으며 최적온도는 45°C였고 최적조건하에서 15시간의 소화로 63%의 단백질 추출율을 보였다. 추출액의 아미노산은 고르게 분포되었으며, 특히 필수 아미노산의 조성도 상당히 좋은 편이다(1990년 7월 9일 접수, 1990년 12월 22일 수리).

근래에와서 두유공업의 번창으로 그 부산물인 두유박의 양도 증가하고 있다. 두유박은 약 80%의 수분을 가지고있어 저장성이 낮아 아직까지 사람의 식품으로 이용되지 못하고 있다. 두유박의 단백질은 Hackler 등<sup>1)</sup>에 의하면 다른 식품 단백질에서 부족되기 쉬운 황 함유 아미노산과 lysine 함량이 비교적 많아 protein efficiency ratio가 대두, 두부, 두유보다 높은 양질의 단백질로서 유용한 강화원으로 의의가 크다고 한다.

두유박에 대한 연구로는 정등<sup>2)</sup>, 최<sup>3)</sup> 등이 두유박의 건조실험을, 김등<sup>4)</sup>이 용매처리에 의해 건조된 두유박의 이화학적 성질을, 손등<sup>5)</sup>이 건조 두유박과 밀가루 혼합물의 등은 흡습 성질을 연구하였고 최<sup>6)</sup>와 박<sup>7)</sup>은 밀가루에 두유박 가루를 섞은 복합분을 이용한 제면 특성을, 김등<sup>8)</sup>, 김등<sup>9)</sup>은 두유박을 이용한 보리원장, 쌀원장의 제조를 각각 연구한 것들이 있다.

본 연구에서는 두유박을 활용하는 방도의 하나로 두유박의 불용성 단백질을 미생물이 생산하는 효소를 이용하여 분해 추출하는 목적으로 납두균 효소에 의한 단백질의 분해 용출이 가장 높은 최적조건을 규명하고 추출액의 일반 성분과 아미노산을 분석하였기에 여기에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 두유박

주식회사 정식품 신갈공장에서 두유 제조시 부산

물로 얻어지는 두유박을 냉장 저장(약 4°C)하면서 사용하였다. 사용한 두유박의 일반 성분은 수분 78.04%, 조단백질 8.12%, 조지방 3.69%, 탄수화물 9.34%, 회분 0.81%였다.

#### 사용균주

납두균 균주는 서울대학교 농과대학 식품공학과에 보관중인 *Bacillus subtilis* IAM 1071 *natto*를 사용하였다.

#### 배양시간의 결정

*Natto*는 통상의 방법에 따라 시판 대두를 정선하여 물에 담궜다가 물을 뺀 것을 15lbs에서 40분 동안 가압증자하여 식히고 여기에 T. G. Y. media로 37°C의 incubator에서 30시간 배양한 *natto* starter를 1ml 접종하여 42°C로 유지되는 발효실에서 배양하여 제조하였으며, 5시간 간격으로 두유박 분해 효소의 활성도를 측정하였다. 효소액은 배양한 *natto* 50g을 삼각 flask에 넣고 증류수 400ml를 가한 후 2분 정도 진탕하고 실온에서 4시간 정치, 효소를 침출케하여 이것을 Toyo filter paper(No. 2)로 여과, 그 여액을 사용하였으며, 효소액의 역가는 두유박 3g에 pH 7 phosphate buffer 50ml를 넣고 효소액 5ml를 가하여 37°C로 유지되는 shaking incubator에서 1시간 동안 반응시킨 후 Toyo filter paper(No. 2)로 여과하여 그 여액을 macro kjeldahl 법으로 총질소량을 정량하여 최고치를 100으로 하여 상대활성으로 나타내었다.

**두유박 단백질 용출 최적조건의 결정**

두유박의 단백질이 분해 용출되는 최적조건을 정하기 위하여 pH, 온도 및 시간을 달리하여 용출 정도를 측정하였다. 먼저 효소액 작용전의 두유박의 총질소량을 정량하고 두유박 5g을 삼각 flask에 취한 후 buffer 60ml와 효소액 40ml를 가하여 shaking incubator에서 반응을 시키고 반응이 끝난 액을 여과한 후 그 여액의 총질소량을 정량하여 두유박의 총질소량에 대한 효소액 작용 후 용출된 총질소량의 백분율로 표시하였다. 대조구는 두유박에 buffer액만을 가하여 동일한 방법으로 처리하였다.

(1) pH

시간과 온도를 일정하게 하고 25mM KH phthalate-HCl buffer(pH 3, 4), 25mM citric acid-sodium citrate buffer(pH 5, 6), 25mM phosphate buffer(pH 6.5, 7, 7.5, 8) 및 25mM boric acid-NaOH buffer(pH 9, 10)를 사용하여 pH만을 달리하면서 상기와 같은 방법으로 37°C에서 12시간 반응시켜 단백질 분해용출을 위한 최적 pH를 실험하였다.

(2) 온도

(1)에서 정해진 조건으로 pH 7.5에서 12시간 반응시키되 온도를 달리하면서 먼저와 같은 조작으로 최적온도를 실험하였다.

**용출액의 성분 분석**

(1) 일반성분

일반성분 분석은 A. O. A. C.의 방법<sup>1)</sup>에 따랐다.

(2) 아미노산 분석

용출액의 아미노산 조성을 HPLC를 사용하여 6N-염산 가수분해법<sup>2)</sup>으로 분석하였으며 조작 조건은 Table 1과 같다.

**결과 및 고찰**

**Natto 제조중의 효소 활성도 변화**

Natto를 제조하는 과정에서 두유박의 단백질을 분해하는데 효소의 활성도가 가장 높은 배양시간을 결정하기 위하여 natto의 배양시간에 따른 효소액의 상대활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. Fig.에서와 같이 시간이 지날수록 활성이 높아져 배양 25시간 경과시 최고의 활성을 보였으나 그 이후에는 두유박의 분해 역가가 급격히 떨어졌다. 결국 두유박을 분

Table 1. Chromatographic conditions for amino acid analysis

Instrument	: HPLC PICO-TAG system
Column	: PICO-TAG(150×3.9mm I. D.)
Mobile phase	: 20g sodium acetate 3hydrate and 600μl TEA dissolved to 1l water(pH 6.4) - 60% acetonitrile(47:3)
Flow rate	: 1ml/min
Temperature	: 48°C
Detector	: UV(254nm)

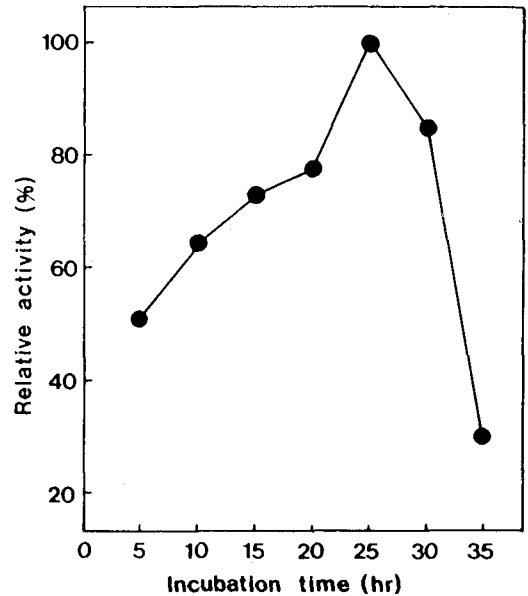


Fig. 1. Changes in relative activity of hydrolyzing enzymes from the natto during incubation

해하는데는 25시간 배양하는 것이 가장 활성도가 높은 효소를 얻을 수 있다.

**두유박 단백질의 분해 용출 최적조건**

두유박 단백질의 분해 용출정도에 영향을 미치는 효소로서 pH, 온도 및 소화 시간에 따른 총질소 용출율을 조사하였다. 37°C에서 12시간 동안 pH를 바꾸어 가면서 두유박 단백질의 용출율을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 즉, 콩으로 만들어진 natto의 경우 pH가 높아짐에 따라 용출율이 점차 높아져 pH 7~8범

위에서 가장 높은 값을 보이고 알카리쪽에서는 감소하였는데 처리구와 대조구의 차이로 보아 pH 7.0에서 최고의 분해율을 보임을 알 수 있었다. 이는 정<sup>13)</sup>이 보고한 casein을 기질로 할 경우의 *natto* protease의 적용곡선과 거의 일치한다.

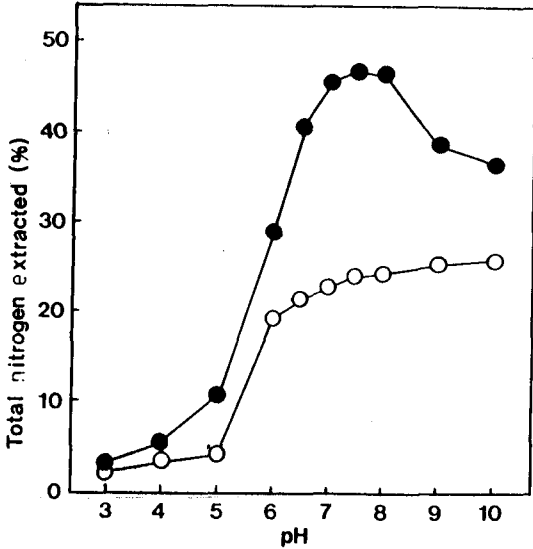


Fig. 2. Effect of pH on the extractability of total nitrogen from soymilk residue hydrolyzed by the enzymes from the *natto*.

○—○ : Control. The reaction was done at 37°C for 12hrs.

또한 pH에 따른 대조구의 총질소 용출율은 콩 단백질의 추출율과 비슷한 양상을 보여 콩 단백질의 등전점 범위인 pH 3~5에서 낮은 값을 보이다가 pH가 6.5이상일 때 높은 추출율을 보여 Wolf와 Briggs<sup>14)</sup>와 Catsimpoalas<sup>15)</sup>의 보고와 일치하였다. 두유박의 단백질 분해 용출에 최적한 온도를 얻기 위하여 온도를 변화시키면서 반응시켰을 경우의 총질소 용출율을 측정 한 결과는 Fig. 3과 같다. 즉, 온도가 높아짐에 따라 점차 증가하여 45°C에서 최고의 용출율을 보였으나 그 이상으로 온도가 올라가면 오히려 감소하여 정<sup>13)</sup>의 보고와 일치하는 경향을 보였다. 앞서 pH와 온도에 대한 최적 조건으로 소화시간을 달리하여 총질소 용출율을 측정 한 결과는 Fig. 4와 같다. 즉, *natto*를 사용한 경우 소화시간 경과에 따라 총질소 용출율은 점차 증가하다가 15시간에 이르러 약 63%로 가장 높았고 그 이후로는 별다른 변화를 보이지 않았다.

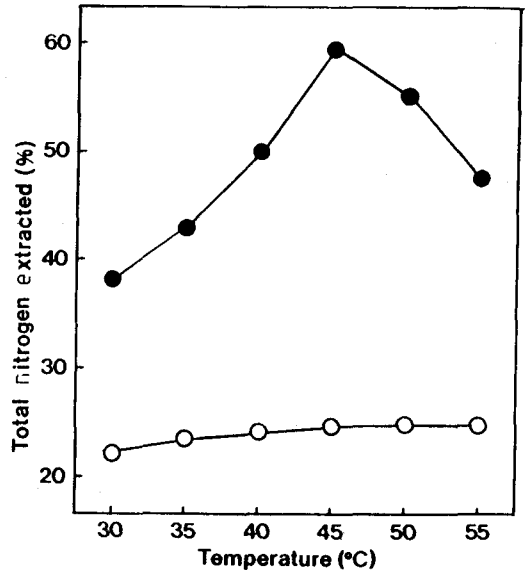


Fig. 3. Effect of temperature on the extractability of total nitrogen from soymilk residue hydrolyzed by the enzymes from the *natto*.

○—○ : Control. The reaction was done at pH 7.5 for 12hrs.

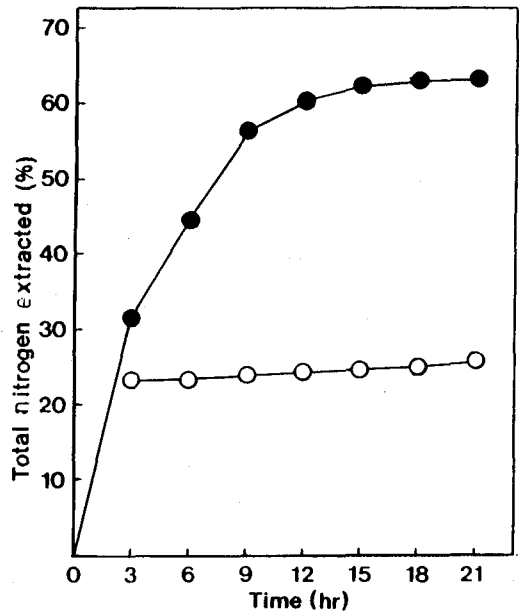


Fig. 4. Time course of extractability of total nitrogen from soymilk residue hydrolyzed by the enzymes from the *natto*.

○—○ : Control. The reaction was done at pH 7.5 and 45°C.

**용출액의 성분**

*Natto*에서 얻은 효소액을 이용하여 두유박 분해의 최적 조건에서 소화시켜 얻은 용출액의 일반 성분은 Table 2와 같다. 시료 두유박에 *natto* 효소액을 처리한 용출액의 chromatogram은 Fig. 5와 같고, 이들의 아미노산 조성은 Table 3과 같다. 우선 함유량 필수아미노산인 methionine과 cysteine의 함량은 두유박으로부터 순수하게 분해된 양으로 볼 때 두유박에 본래 함유되어 있는 양의 절반가량이 용출되었으며 기타 필수아미노산에 있어서도 고른 분포를 보였다.

이상의 결과에서 보면 두유박으로부터의 총질소 용출율에 있어서 약 63%로 상당히 높은값을 보였으며 추출액의 필수아미노산도 비교적 고른 조성을 보여 미생물을 이용한 두유박의 단백질 분해에 있어 큰 의의가 있다고 생각된다.

Table 2. Proximate chemical composition of extract (%)

Sample	Moisture	Crude protein	Carbohydrate	Ash
N*	99.23	0.38	0.10	0.29

N\* : Extract from soymilk residue hydrolyzed by *natto* enzymes

Table 3. Amino acid composition of soymilk residue, *natto* enzyme solution and enzyme extracts

Amino acid (AA)	SR	NB	N
	(mg AA/5g SR)	(mg AA/40mlsofn)	(mg AA/100mlsofn)
Asp	43.72	2.37	23.90
Glu	57.91	5.01	45.97
Ser	21.75	0.77	9.74
Gly	20.53	0.78	8.97
His	10.97	0.42	4.98
Arg	21.50	1.05	7.90
Thr	17.79	0.55	11.91
Ala	21.19	0.59	8.53
Pro	32.07	1.18	12.25
Tyr	11.03	0.45	7.81
Val	30.26	0.42	11.15
Met	4.91	0.20	2.37
Cys	3.20	0.16	1.81
Ile	16.79	0.52	9.11
Leu	31.60	0.78	16.77
Phe	12.43	0.81	13.01
Lys	23.30	1.62	16.94
NH <sub>3</sub>	14.04	1.19	8.27

SR : Soymilk residue, N : Extract from soymilk residue hydrolyzed by *natto* enzyme, NB : Enzyme solution from the *natto*.

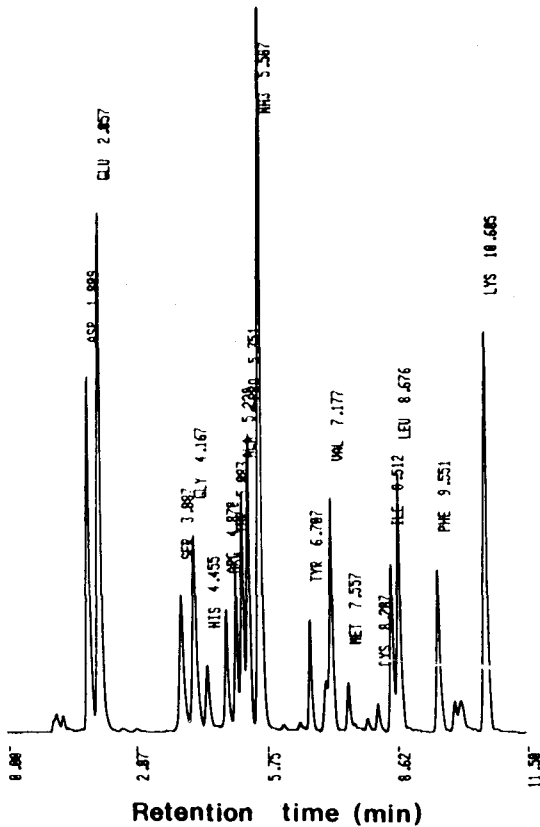


Fig. 5. HPLC chromatogram of the extract from soymilk residue hydrolyzed by *natto* enzymes

**참 고 문 헌**

- Hackler, L. R., Hand, D. B., Steinkraus, K. H. and Van Buren, J. P. : Nutrition, 80 : 205(1963)
- Hackler, L. R., Stillings, B. R. and Ploimeni, R. J. : Cereal Chem., 44 : 638(1976)
- 정성수, 장호남, 박무영 : 한국식품과학회지, 10 : 1(1978)
- 최상용 : 고려대학교 대학원 석사학위 논문(1982)

- |   |   |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>5. 김우정, 김동희, 오훈일 : 한국식품과학회지, 16 : 261(1984)</li> <li>6. 손정우, 김우정, 김상순 : 한국식품과학회지, 17 : 101(1985)</li> <li>7. 최준봉 : 서울대학교대학원 석사학위논문(1986)</li> <li>8. 박우포 : 서울대학교대학원 석사학위논문(1987)</li> <li>9. 김재욱, 허병석, 박우포 : 한국농화학회지, 32 (2) : 91(1989)</li> <li>10. 김재욱, 최준봉, 방찬식 : 한국농화학회지, 32 (2) : 98(1989)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>11. Official Methods of Analysis : A. O. A. C., 14th ed. (1984)</li> <li>12. Joslyn, M. A. : Methods of food analysis, 2nd ed, Academic Press</li> <li>13. 정태석 : 과연회보, 1 : 19(1956)</li> <li>14. Wolf W. J. and Briggs, D. R. : Arch. Biophys., 76 : 377(1959)</li> <li>15. Catsimpoalas, N., Campbell, T. G. and Meter, E. W. : Arch. Biochem. Biophys., 131 : 577(1969)</li> </ul> |
|---|---|

Extraction of proteins from soymilk residue using the enzymes from *Bacillus subtilis*

Sang-Min Lee and Ze-Uook Kim(Dept. of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon, Korea)

**Summary :** To extract insoluble proteins of soymilk residue by microorganism, the soymilk residue was treated with crude enzyme solution from *Bacillus subtilis* IAM 1071 *natto*. Optimum conditions of pH, temperature, and digestion time were determined, and amino acid composition of the extract was obtained at 45°C. Under optimum conditions, the extractability with *natto* reached to 65% in 15hrs. The contents of essential amino acids of extract were high and specially, S-containing amino acids including methonine and cysteine and lysine content were high.

KW food page