

## 코지균 효소를 이용한 두유박의 단백질 용출

이상민 · 김재욱

서울대학교 식품공학과

**초록 :** 두유박에 함유되어 있는 불용성 형태의 단백질을 *Aspergillus oryzae*가 생산하는 효소를 이용하여 가용성 형태의 단백질로 용출시키기 위하여 효소작용 최적조건으로서 pH, 온도 및 소화시간을 결정한 다음 추출액의 아미노산 조성을 본 결과 두유박 용출을 위한 최적 pH는 7.5, 최적온도는 50 °C이며 12시간의 소화로 70%의 추출율을 보였다. 두유박에서 추출한 수용액의 아미노산 분석결과 methionine, cysteine, lysine 등의 필수아미노산이 두유박으로부터 상당량 분리되었으며 납두를 사용한 추출액보다 코지를 사용한 경우가 더 좋은 결과를 얻을 수 있었다(1991년 12월 5일 접수, 1992년 2월 11일 수리).

두유가공시 부산물로 생기는 두유박을 활용하는 방도의 하나로서 전보<sup>1)</sup>에서는 납두균이 생산하는 효소로 두유박의 단백질을 분해 추출하는 연구를 시도하여 단백질의 분해 용출이 가장 높은 최적조건을 구한 결과 pH 7.5, 45 °C에서 15시간 소화로 약 63%의 단백질을 용출시킬 수 있었다는 결과를 얻었다. 여기서는 두유박을 코지가 생산하는 효소로 분해하여 단백질을 추출하는 연구를 시도하였다.

### 재료 및 방법

#### 재료

사용한 두유박은 전보<sup>1)</sup>에서와 같으며 코지용 균주는 서울대학교 식품공학과에 보관중인 *Aspergillus oryzae*를 사용하였다.

#### 실험방법

##### 1) 배양시간의 결정

###### (1) Koji의 제조

통상의 방법으로 대두를 전보<sup>1)</sup>에서와 같이 처리하여 냉각시킨 것에 미리 수세 건조하여 적갈색으로 볶아서 10 mesh 정도로 분쇄한 소맥에 종국(2%)을 섞은 것을 콩과 같은 양으로 혼합한 후 chopper로 가락을 만들어 27 °C로 유지되는 발효실에서 제국하면서 10시간 간격으로 시료를 채취하여 두유박 분해 효소의 활성도를 측정하였다.

##### (2) 효소액의 조제

삼각 flask에 Koji 20g을 넣고 전보<sup>1)</sup>의 natto 효소액의 조제와 동일한 방법으로 효소액을 얻어 사용하였다.

##### (3) 배양시간에 따른 효소액의 역가 측정

전보<sup>1)</sup>와 동일한 방법으로 측정하였다.

##### 2) 두유박 단백질 용출 최적조건 결정

두유박 단백질이 분해 용출하는 최적조건을 정하기 위하여 pH, 온도 및 시간을 달리하여 전보<sup>1)</sup>와 동일하게 용출 정도를 측정하였다.

##### (1) 온도

(1)에서 정해진 조건으로 pH 7.5에서 6시간 동안 온도를 달리하면서 최적온도를 실험하였다.

##### (2) 소화시간

(1), (2)에서 정해진 최적조건인 pH 7.5, 50 °C의 온도를 소화시간에 따른 총질소 용출율을 실험하였다.

##### 3) 용출액의 성분분석

코지를 사용하여 얻은 용출액의 일반성분과 아미노산 분석을 전보<sup>1)</sup>의 경우와 동일하게 실험하였다.

### 결과 및 고찰

#### Koji 제조중의 효소활성도 변화

Koji를 제조하는 과정에서 두유박의 단백질을 분해하는데 효소의 활성도가 가장 높은 배양시간을 결정하기 위하여 배양시간에 따른 효소액의 상대활성을 측정하는 결과는 Fig. 1과 같다.

Koji의 경우에도 시간이 지남에 따라 활성이 높아져 50시간 배양했을 때 두유박 단백질의 분해에 최고의 활성을 보이나 그 후 시간이 지남에 따라 활성이 급격히 떨어졌다.

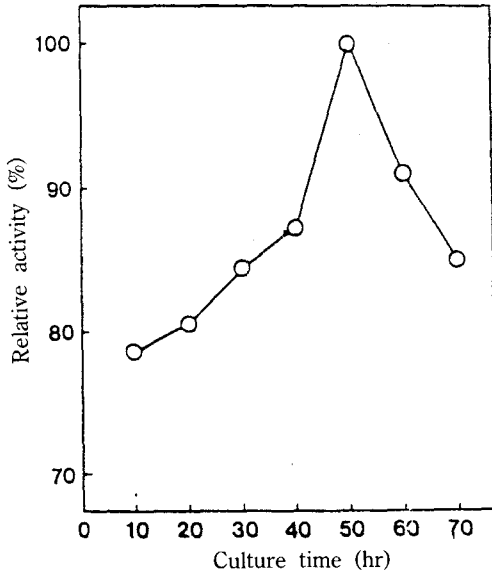


Fig. 1. Changes of relative activity of hydrolyzing enzymes from the Koji by culture time.

결국 두유박을 분리하는데는 Koji의 경우 50시간 배양하는 것이 가장 활성도가 높은 효소를 얻을 수 있다.

**두유박 단백질의 분해용출 최적 조건**

두유박 단백질의 분해 용출 정도에 영향을 미치는 요소로서 pH, 온도, 소화시간에 따른 총질소 용출율을 실험하였다.

**1) pH**

두유박의 단백질 분해용출 최적 pH를 얻기 위하여 pH를 변화시키면서 반응시켰을 경우와 총질소 용출율을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다.

즉, 콩과 밀의 배합비를 1 : 1로 한 Koji의 경우는 pH 7.5에서 최고의 용출율을 나타냈으나 처리구와 대조구의 차이로 보아 pH 5.0에서 최고의 분해율을 보였다. 이것은 밀을 많이 배합할수록 산성 및 중성측의 protease 역가가 일반적으로 강해지는 반면에 알칼리측의 역가는 점차 약해진다는 蔭山,<sup>2)</sup> 松島,<sup>3)</sup> 그리고 김 등<sup>4)</sup>의 보고와 일치하였다.

**2) 온도**

두유박의 단백질분해 용출에 최적한 온도를 얻기 위하여 온도를 변화시키면서 반응시켰을 경우의 총질소 용출율을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다.

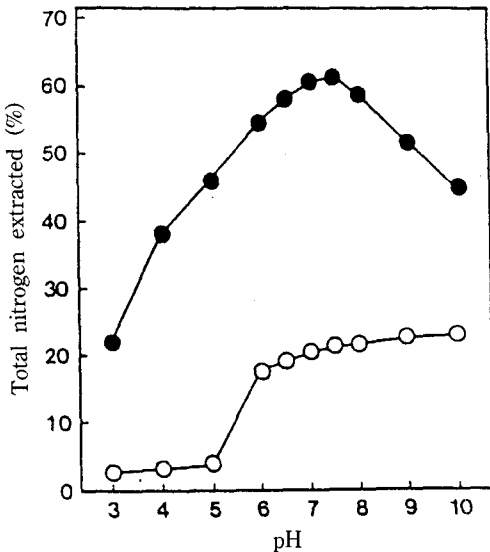


Fig. 2. Effect pH on the extractability of total nitrogen from soymilk residue hydrolyzed by the enzymes from the Koji.

The reaction was done at 15°C for 6 hrs.

○—○ : Control, ●—● : Koji enzyme

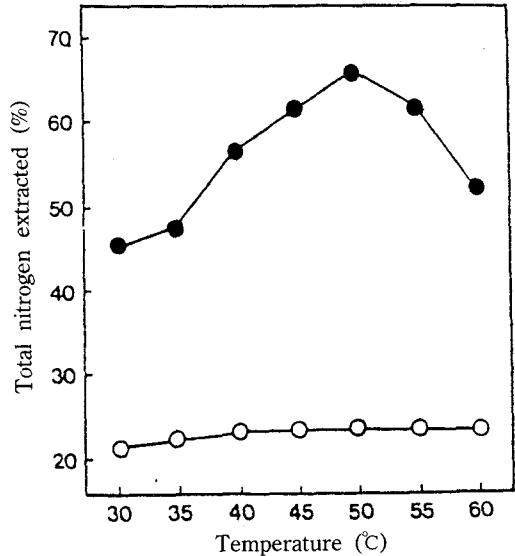


Fig. 3. Effect of temperature on the extractability of total nitrogen from soymilk residue hydrolyzed by the enzymes from the Koji.

The reaction was done at pH 7.5 for 6 hrs.

○—○ : Control, ●—● : Koji enzyme

즉, 온도가 올라감에 따라 용출율의 완만한 증가를 보이다가 50 °C에서 최고를 보였으나 그 이후로는 감소하였다.

3) 소화시간

앞서 실험한 pH와 온도에 대한 최적조건으로 소화시간을 달리하여 총질소 용출율을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다.

Koji를 사용한 경우도 역시 소화시간 결과에 따라 용출율은 증가하나, 3시간 소화로 전체 총질소 용출율의 3/4 이상이 용출 가능하였으며 그 이후 약간의 증가를 보여 12시간 이르러 약 70%까지 용출되어 최고치를 보였으며 그 이후에는 별다른 변화가 없었다.

용출액의 성분

1) 일반성분

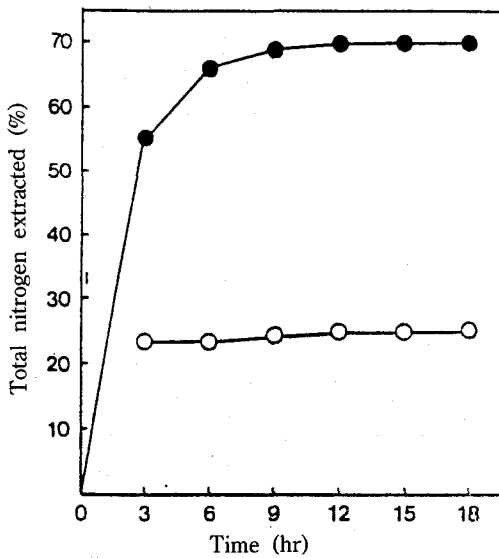


Fig. 4. Time course of extractability of total nitrogen from soymilk residue hydrolyzed by the enzymes from the Koji.

The reaction was done at pH 7.5, 50 °C.

○—○ : Control, ●—● : Koji enzyme

Table 1. Proximate chemical composition of extract (%)

Sample	Moisture	Crude protein	Carbohydrate	Ash
K	99.15	0.43	0.12	0.30

K : Extract from soymilk residue hydrolyzed by Koji enzymes

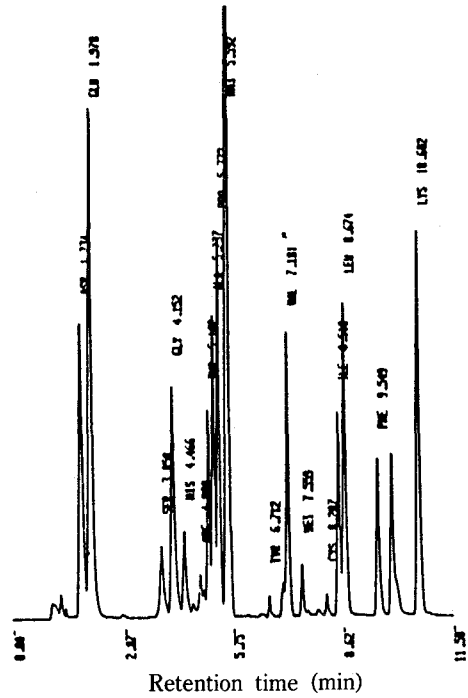


Fig. 5. HPLC chromatogram of the extract from soy-milk residue hydrolyzed by Koji protease.

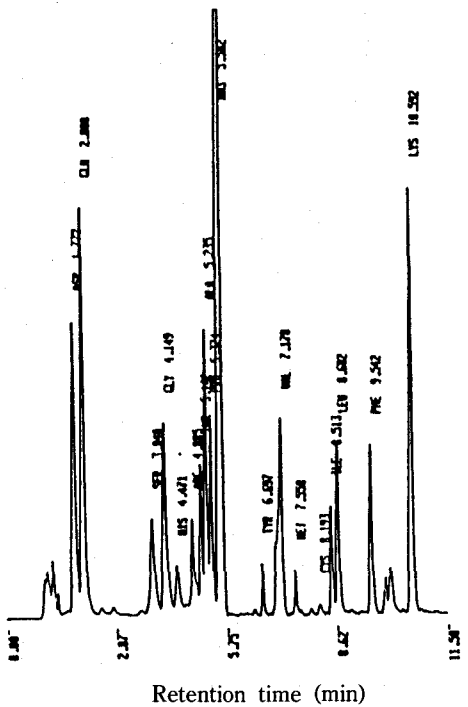


Fig. 6. HPLC chromatogram of enzyme solution from the Koji.

Table 2. Amino acid composition of soymilk residue, extracts and enzyme solutions

	SR (mg a.a./ 5g SR)	K (mg a.a./ 100 ml soln)	KB (mg a.a./ 10 ml soln)
Asp	43.72	26.60	2.68
Glu	57.91	58.14	4.35
Ser	21.75	6.37	0.98
Gly	20.53	13.60	1.16
His	10.97	7.79	0.45
Arg	21.50	1.43	0.72
Thr	17.79	11.30	0.79
Ala	21.19	13.04	1.35
Pro	32.07	18.98	0.86
Tyr	11.03	1.38	0.33
Val	30.26	18.06	2.46
Met	4.91	2.87	0.24
Cys	3.20	1.15	0.10
Ile	16.79	12.52	0.75
Leu	31.60	22.18	1.49
Phe	12.43	14.07	1.46
Lys	23.30	19.31	1.98
NH	14.04	11.75	2.60

SR : Soymilk residue, K : Extract from soymilk residue hydrolyzed by Koji protease, KB : Enzymes solution from the Koji

Koji에서 얻은 효소액을 이용하여 두유박 분해의 최적조건에서 소화시켜 얻은 용출액의 일반성분은 Table 1과 같다.

#### 2) 아미노산 조성

Koji 효소액을 처리한 용출액 및 효소액의 아미노산 조성의 chromatogram으로부터 각각의 아미노산 조성을 분석 계산한 결과는 Table 2와 같다.

Koji를 사용한 경우도 필수아미노산의 조성에 있어서 두유박으로부터 고른 분해를 보였으며 전보<sup>1)</sup>의 natto를 사용했을 때와 비교해 보면 우선 함유량 필수 아미노산인 methionine의 함량에 있어 두유박으로부터 순수하게 분해된 양으로 볼 때 natto로부터의 추출액보다 Koji로부터의 추출액이 다소 높았으며 cysteine의 함량은 Koji의 경우보다 natto의 경우가 더 높았다.

Methionine과 같은 보족효과를 나타내는 cysteine을 합쳐 계산할 경우 natto로부터의 추출액이 추출액 100 ml당, 3.82 mg 임에 비해 Koji로부터의 추출액은 4.04 mg으로 전자에 비해 다소 높은 값을 나타냈다.

Lysine의 함량에 있어서도 순수 분해량을 살펴보면 natto로부터의 추출액의 15.3 mg 정도에 비해 Koji로부터의 추출액은 약 17.3 mg을 보여 함유량 아미노산과 lysine 함량의 양자를 모두 고려할 때 natto로부터의 추출액보다 Koji의 경우가 다소 유리함을 알 수 있었다.

이상의 결과에서 보면 두유박으로부터의 총질소 용출율에 있어서 natto의 63%보다 Koji의 경우가 70%로서 더 높은 값을 보였고 추출액의 아미노산 조성에 있어서도 natto보다 Koji가 필수아미노산의 함량에 있어서 더 높은 값을 보여 두유박으로부터 단백질을 추출해내고자 할 때 natto보다는 Koji를 사용하는 것이 다소 유리하다고 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. 김재욱, 이상민 : 한국농화학회지, 33 : 282(1990)
2. 蔭山, 杉田 : 일본발효공학잡지, 23 : 109(1955)
3. 松島 : 일본발효공학잡지, 36 : 414(1958)
4. 김용휘, 김재욱 : 한국농화학회지, 4 : 17(1963)

### Extraction of proteins from soymilk residue using the enzymes from *Aspergillus oryzae*

Sang-Min Lee and Ze-Uook Kim (Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea)

**Abstract** : To extract insoluble proteins of soymilk residue by microorganism, the soymilk residue was treated with crude enzyme solution from *Aspergillus oryzae*. Optimum conditions of pH, temperature and digestion time were determined, and amino acid composition of the extract was analyzed. The optimum pH for the extraction was 7.5, and the maximum extraction was obtained at 50 °C. Under optimum conditions, the extractability with Koji reached to 70% in 12 hrs. The content of essential amino acids of extract was generally high and the composition of essential amino acid was good.