

Aspergillus niger CF-34로부터 분리한 대두세포벽분해효소 복합체 중의 Protease의 선택적인 제거

최연배 · 김강성 · 손현수
(주)정·식품 중앙연구소

Selective Removal of Protease from Soybean Cell Wall Degrading Enzyme Complex Isolated from *Aspergillus niger* CF-34

Yeon-bae Choi, Kang-sung Kim and Heon-soo Sohn
Dr. Chung's Food Co., Ltd., Central Research Institute

Abstract

By exposing the complex enzyme solution to alkaline condition, it was possible to remove the protease activity selectively without inactivation of soybean cell wall degrading activity of the crude enzyme complex produced by *Aspergillus niger* CF-34. Optimum reaction conditions were as follow. pH was 9.0 ± 0.1 , temperature was 20°C and reaction time was 30 min with gentle stirring. Over 90% of protease activity could be eliminated while the activities of pectinase, polygalacturonase, xylanase, carboxymethyl cellulase and soybean cell wall degrading enzyme were maintained to 80~100%. Through alkali treatment, it was discovered that the quality and organoleptic properties of soy protein produced by this enzymes were improved because the hydrolysis of protein and formation of bitter peptide were decreased.

Key words: Protease, inactivation, soybean cell wall and soymilk residue.

서 론

대두는 식품, 사료 등의 원료로 오랫동안 사용되고 있는 매우 중요한 농산물이며, 식품생산에 있어서 식용유, 두부, 대두단백질, 두유 및 장류 등의 제조 원료로 사용되고 있다. 대두, 대두박, 비지 등을 원료로 이용하여 두부, 두유, 대두단백질 등을 생산하고자 할 경우 대두단백질의 회수효율을 높이기 위해 물리적, 화학적 및 생물학적인 전처리를 할 수 있다. 생물학적인 방법으로는 대두단백분해효소를 이용하여 대두단백질을 가용화시키거나^(1,2,3), 대두의 세포벽을 분해함으로써 단백질 추출효율을 높이는 방법이 대표적이다^(4,5). 단백질분해효소를 이용하여 단백질의 추출효율을 증대시키고자 할 때 이 효소에 의해 단백질이 분해됨으로서 단백질의 기능성이 변할 수 있고^(6,7,8), 또한 쓴 맛의 peptide가 형성될 수 있다는 단점이 있다^(9,10,11). 식물 세포벽을 분해함으로써 식물체의 유용물질 생산효율을 높이거나, 공정 개선 및 제품 품질 향상을 꾀하려는 시도가 대두 뿐만 아니라 여러 식물체를 대상으로 이루어지고 있다^(12,13,14). 대두세포벽은 일반적인 식물세포벽과 마찬가지로 주로 pectin,

cellulose 그리고 hemicellulose로 구성되어 있으며⁽¹⁵⁾, 따라서 효율적으로 이를 분해하기 위해서는 구성물질을 분해할 수 있는 복합효소가 필요하며 특히 대두의 단백질을 분리하고자 할 때는 조효소액 중에 단백질분해효소의 활성이 적은 것을 사용하여야 품질이 우수한 단백질을 생산할 수가 있다⁽¹⁶⁾. 그러나 이들 산업용 효소 복합체 중에는 일반적으로 세포벽 분해효소 이외에도 다량의 protease가 함유되어 있는 경우가 많다⁽⁴⁾. 이 protease 역시 대두 단백질을 분해시켜 쓴 맛 peptide를 생성시킴으로서 두유 제조시 제품의 관능을 저하시키는 요인으로 작용하기 때문에 이를 선택적으로 제거하는 것은 매우 중요하다. *Aspergillus niger*가 생산하는 protease는 대개 산성 영역에서 최적 활성을 갖는 산성 protease로 잘 알려져 있다⁽¹⁷⁾.

본 논문에서는 *Aspergillus niger* CF-34가 생산하는 대두세포벽분해효소(soy-fiber-hydrolase) 복합체에 함유되어 있는 산성 protease를 선택적으로 간단히 제거함으로써 이 효소를 이용하여 산업적으로 대두 단백질을 생산하고자 할 경우 생산효율을 증대시키고, 관능 저하를 억제할 수 있는 연구 결과를 얻어 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용기질 조제

본 연구에서 사용한 비지는 (주)정식품 청주공장에서

Corresponding author: Yeon-bae Choi, Dr. Chung's Food Co., Ltd., 1-25 Song-Jung Dong, Chung Joo, Choong Chung Buk-Do, Korea

생산되는 것을 건조 분쇄하여 사용하였다.

사용균주 및 조효소액 조제

전보의 방법⁽¹⁸⁾에서 선정된 *Aspergillus niger* CF-34 균주를 사용하였다. 5l의 발효조에 배지를 3l 넣고 pH를 5.0으로 조절한 후 121°C에서 30분간 멸균시킨 후 선정된 균주의 포자현탁액을 10⁶ counts/ml이 되도록 집중하여 30°C에서 300 rpm으로 교반하면서 배양하였다. 이때 통기량은 1 vvm이었고, 기포 발생은 실리콘 소포제로 억제하였다. 배지 조성은 3% 비지; 0.8% pectin, 0.3% NaNO₃, 0.1% K₂HPO₄·7H₂O, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.05% KCl, 0.001% FeSO₄·7H₂O이었다. 약 5~6일 정도 배양을 한 후 배양액을 여과지로 여과하여 여액을 조효소액으로 하였다.

효소 활성 측정법

Pectin, polygalacturonic acid, xylan, carboxymethyl cellulose, soy fiber를 0.2 N citrate-phosphate buffer(pH 4.5)에 1% 농도로 조제하여 pectinase, polygalacturonase, xylanase, carboxymethyl cellulase, 대두세포벽분해활성(soy-fiber-ase, SFase)의 활성을 측정하였다. 즉 이 기질 1 ml에 조효소액 0.2 ml을 가하여 50°C에서 30분간 반응시킨 후 반응 정지액(0.5 N NaOH : ethanol=1 : 2) 0.8 ml을 첨가하여 반응을 중단시켜 DNS법⁽¹⁹⁾으로 생성된 환원당을 측정하였다. 1 unit는 1분당 1 μmole의 각각의 monomer을 생성할 수 있는 효소의 양으로 정의하였다.

Protease의 활성은 casein을 0.2 N acetate buffer(pH 3.2)에 1.2% 농도로 조제하여, 이 용액 2.5 ml에 효소액 0.5 ml을 첨가하여 50°C에서 30분간 반응시켰다. 2.5 ml의 0.4 M trichloroacetic acid용액을 가하여 반응을 중지시킨 다음 이 용액을 여과한 후, 상등액 2 ml에 2 ml의 0.55 N의 NaCO₃를 첨가하여 Folin phenol법⁽²⁰⁾으로 측정하였다. 1 unit는 분당 1 μg의 tyrosine을 생산할 수 있는 효소의 양으로 정의하였다.

Protease 불활성화 실험

Aspergillus niger CF-34의 배양에서 얻어진 조효소액을 20°C로 조절하여 서서히 교반하면서 0.5 N NaOH로 pH를 9.0까지 높여 일정 시간 동안 반응을 시킨 후 다시 0.5 N acetic acid를 사용하여 pH를 5.0으로 낮춰 각 효소의 잔존 활성을 측정하였다.

효소를 이용한 비지에서의 단백질 추출

건조시킨 콩 비지를 5%(w/w)가 되도록 조제하여 입자를 분쇄한 후 균질한 슬러리를 만들었다. pH를 4.5로 조절된 슬러리 용액 100 ml에 효소액을 고형분 1g당 1 unit 첨가한 후 교반하면서 50°C에서 반응을 시켰다. 10분 동안 끓여 반응을 중지시킨 후 pH를 7.0으로 중화하여 다시 균질하고 5000g로 20분간 원심분리하였다. 상등액 중 고형분 및 단백질 함량의 증가를 측정함으로써 효소에

의한 단백질 추출 정도를 결정하였다.

결과 및 고찰

pH가 protease 불활성화에 미치는 영향

Aspergillus niger CF-34를 비지가 함유된 배지에서 배양을 한 후 조효소액을 회수하여, pH에 대한 효소의 안정성을 측정하던 과정에서 알칼리 영역에서 carbohydrase보다 protease가 훨씬 쉽게 불활성된다는 것을 발견하였다⁽²¹⁾. 따라서 pH 및 온도와 같이 단백질의 안정성에 영향을 주는 인자를 적절히 조절하여 이 조효소액 중에 존재하는 protease를 선택적으로 제거할 수 있었다. pH가 5.0인 조효소액에 0.5N NaOH를 첨가하여 pH를 7.9에서 9.4까지로 조절한 후 약 30분 동안 교반하였다. Acetic acid로 pH를 다시 5.0으로 내린 후 효소의 잔존 활성을 측정하였다. Fig. 1은 알칼리 처리 후 잔존 활성의 정도를 처리를 하지 않았을 때의 활성에 대비하여 상대활성으로 나타낸 그림이다. 즉 pH 8.2에서 9.1까지의 범주에서는 protease의 활성이 pH의 증가에 따라 급격히 감소되어 약 pH 9.0±0.1에서는 알칼리 처리를 하지 않은 조효소액 중의 활성 대비 약 10% 미만의 protease 활성만이 잔존하였다. 이때 대두세포벽분해활성은 초기의 약 90% 정도가 유지되었다. pH 9.0 이상에서는 대두세포벽분해활성이 불활성되는 속도가 증가하여 9.4에서는 초기의 약 80% 이하로 감소되었다. 이는 Adler-Nissen이 보고한 *Aspergillus niger* 유래의 protease가 알칼리 처리에 의해 선택적으로 제거될 수 있다는 내용과 일치하는 결과이었다⁽²²⁾.

처리온도가 protease 불활성화에 미치는 영향

pH가 단백질의 변성에 미치는 영향 및 그 메커니즘에 대해서는 매우 잘 알려져 있으며, 이때 온도와 이온강도 등이 크게 영향을 주는 것으로 밝혀져 있다⁽²³⁾. 따라서

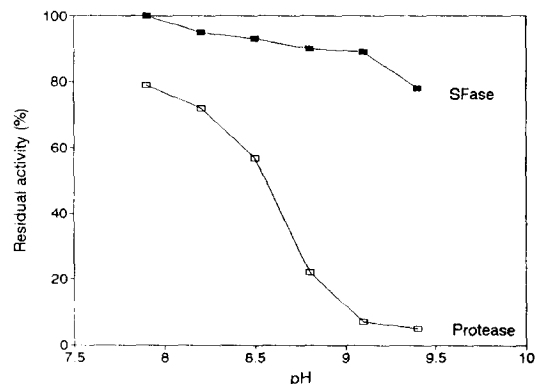


Fig. 1. Effect of pH treatment on the inactivation of protease and SFase obtained from *Aspergillus niger* CF-34 at 20°C

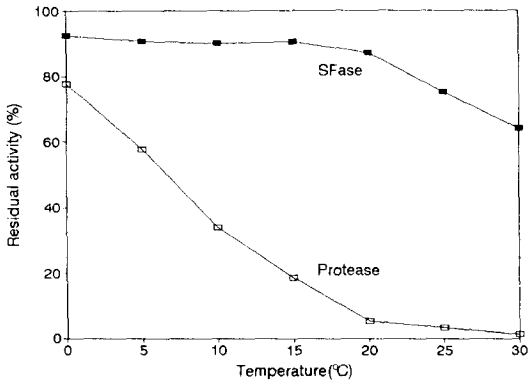


Fig. 2. Effect of temperature on the inactivation of protease and SFase obtained from *Aspergillus niger* CF-34 at pH 9.0±0.1

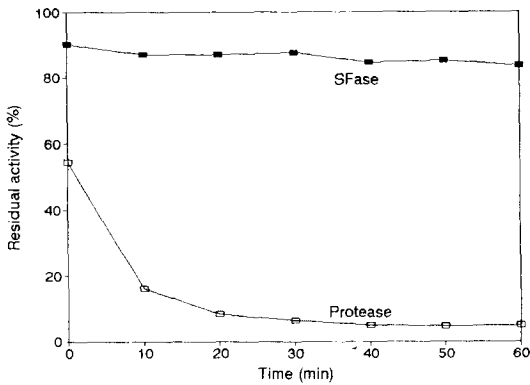


Fig. 3. Effect of treatment time on the inactivation of protease and SFase obtained from *Aspergillus niger* CF-34 under the condition of pH 9.0±0.1 and 20°C

본 연구에서는 조효소의 pH를 9.0±0.1로 조절하여 약 30분간 알칼리 처리할 때, 온도가 protease의 불활성화에 미치는 영향에 대하여 살펴보았다(Fig. 2). Protease는 온도에 대하여 매우 민감하게 반응을 하여 protease의 활성은 온도가 0에서 20°C로 증가할 때 온도의 상승에 비례하여 급격히 감소하였다. 대두세포벽분해효소는 20°C까지는 거의 변화가 없었으나, 그 이상의 온도에서는 역시 온도의 상승과 비례하여 불활성화되었다. 이로써 20°C에서 처리를 할 때 carbohydrase 손실을 가장 적게 하면서 protease만을 선택적으로 제거할 수 있다는 것을 알았다.

처리시간에 따른 protease 불활성화

조효소를 pH 9.0±0.1로 알칼리 처리하는 반응시간에 따른 protease 및 세포벽 분해 효소의 불활성화 정도를 살펴본 결과 Fig. 3와 같이 나타났다. 즉 protease

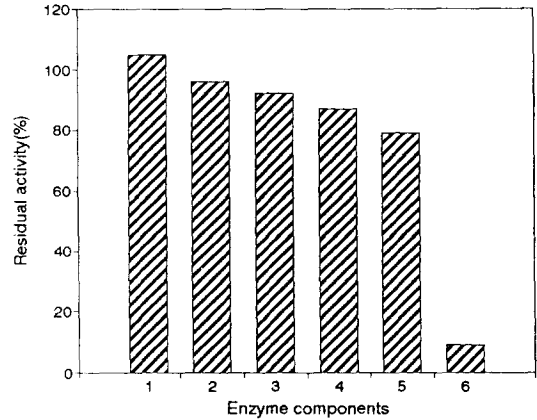


Fig. 4. Residual activity of various enzymes of soybean cell wall degrading enzyme complex treated with alkali under the condition of pH 9.0±0.1 and 20°C for 30 min

1; carboxymethyl cellulase, 2; xylanase, 3; SFase, 4; polygalacturonase, 5; pectinase, 6; protease

활성은 처리시간에 따라 매우 급격히 제거가 되었으며, 약 20분 이후에는 매우 미약하게 protease의 잔존활성이 일정하게 유지되었다. 대두세포벽분해효소는 초기 약 30분 동안은 크게 변화가 없었으나, 그 이후에는 불활성화가 미약하게 일어남을 알 수 있어 처리시간은 약 30분이 적절하였다.

각 효소의 잔존 활성

Fig. 4에서 보는 것과 같이 pH를 9.0±0.1로 조절하고, 20°C에서 약 30분간 처리하였을 때 조효소액 중에 존재하는 각 carbohydrase의 잔존 활성을 구체적으로 살펴보면, 펙틴 분해 활성이 가장 쉽게 불활성화되어 pectinase가 약 80%, polygalacturonase가 약 85% 정도 잔존하였으며, carboxymethyl cellulase가 약 100%의 잔존활성을 보여 이러한 알칼리 처리에 대해 거의 영향을 받지 않았으며, xylanase가 약 95%의 활성을 보여 역시 알칼리에 대해 매우 안정한 것으로 나타났다. 대두세포벽분해효소는 약 90% 정도의 잔존활성을 보였고, 이때 protease는 약 10% 미만의 잔존활성을 보였다. 따라서 이 방법은 *Aspergillus niger* CF-34 유래의 복합 대두세포벽분해효소 중에서 protease 만을 90% 이상 선택적으로 제거할 수 있는 매우 간단한 산업적인 방법이라고 할 수 있었다.

비지로부터 대두 단백질 추출

Protease의 활성이 각각 1600 unit/ml인 조효소액과 150 unit/ml인 알칼리 처리 효소액을 이용하여 두유 또는 두부 제조시 부산물로 발생하는 비지 중에 함유되어 있는 대두 단백질 추출 실험을 수행한 결과 Fig. 5와 같이

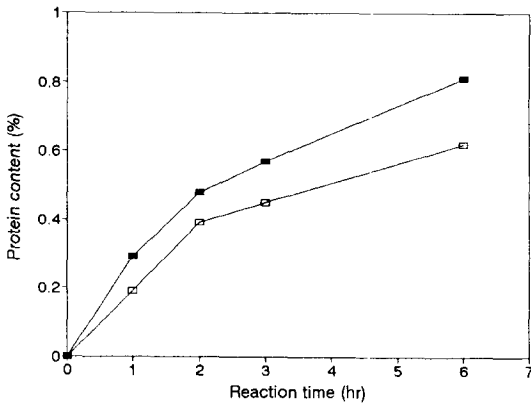


Fig. 5. Extraction of soy protein from soymilk residue with a crude enzyme (■-■) and a alkali-treated enzyme (□-□) at 50°C and pH 4.5

The protease activity of crude and alkali-treated enzyme was 1600 unit/ml and 150 unit/ml, respectively

반응시간에 따라 단백질의 추출이 증가함을 알 수 있었다. 그러나 알칼리로 처리한 효소액을 사용할 경우 단백질의 추출정도가 감소하였는데, 이는 알칼리 처리에 의해 대두세포벽분해활성과 protease의 활성이 감소되었기 때문인 것으로 사료된다. 이 때 생산된 두 가지의 대두 유액의 총고형분 함량을 동일하게 조절한 후 숙련된 관능요원 20명을 상대로 관능검사를 실시하였다. 그 결과 protease 활성을 제거시킨 효소를 사용하였을 때 생산된 유액의 쓴 맛이 유의적으로 감소되었음을 구별할 수가 있었고, 선호도도 우수하게 나타났다. 이로서 조효소액에 알칼리를 처리하면 조효소액의 단백질 추출능은 비록 감소하였지만, 생산된 단백질에서 쓴 맛 성분의 생성을 억제할 수가 있어 전체적으로 우수한 관능을 갖는 제품을 생산할 수 있었다.

요 약

Aspergillus niger CF-34가 생산하는 대두세포벽분해 효소 복합액을 알칼리로 처리하여 조효소액 중에 함유된 protease만을 선택적으로 제거할 수 있었다. 조효소액을 알칼리로 처리하였을 때 세포벽분해활성에는 영향을 적게 주고, 대두 단백질을 분해시켜 쓴 맛의 peptide를 생성하는 protease만을 선택적으로 불활성화시킬 수 있었다. 조효소액의 pH를 9.0±0.1로 조절하여 20°C에서 약 30분 동안 서서히 교반한 후 다시 pH를 5.0로 조절하는 것이 최적 조건이었다. 이때 조효소액 중 protease 활성은 초기의 약 10% 미만으로 감소하였으며, 각 효소의 잔존 활성을 살펴보면 pectinase는 약 80%, polygalacturonase는 약 85%, xylanase는 약 95%, carboxymethyl cellulase는 약 100% 정도이었고, 대두세포벽분해

활성은 초기의 약 90% 정도 유지할 수 있어 protease만이 선택적으로 제거되었다. 이렇게 처리된 효소액을 사용하여 비지 중의 대두 단백질을 추출할 경우 생산효율은 비록 감소하였지만, 대두단백질의 분해를 막고, 쓴맛 생성을 억제하여 품질 및 관능적으로 우수한 제품을 생산할 수 있었다.

감사의 말

본 연구는 1992년 과학기술처의 특정연구개발사업과 제로 수행된 연구 내용의 일부입니다. 깊이 감사를 드립니다.

문 헌

- 김재옥, 조무제, 김상순, 이춘영 : 미생물을 이용한 대두 단백질 분해 이용 연구. 한국농화학회지, 12, 19 (1969)
- 이상민, 김재옥 : 납두균 효소를 이용한 두유박 단백질의 용출. 한국농화학회지, 33, 282 (1990)
- 이상민, 김재옥 : 코오지균 효소를 이용한 두유박의 단백질용출. 한국농화학회지, 35, 64 (1992)
- Eriksen, S.: Application of enzymes in soymilk production to improve yield. *J. Food Sci.*, 48, 445 (1983)
- Olsen, H.S. and Nissen, J.A.: Industrial production and applications of a soluble enzymatic hydrolyzate of soya protein. *Process Biochemistry*, 14, 6 (1979)
- 강영주, 이기춘, 박영호 : 대두 7S 및 11S 단백질의 기능성에 대한 효소적 가수 분해의 효과. 한국식품과학회지, 20, 344 (1988)
- Fukushima, D.: Studies on soybean proteins. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 23, 15 (1959)
- Nissen, J.A., Eriksen, S. and Olsen, H.S.: Improvement of the functionality of vegetable proteins by controlled enzymatic hydrolysis. *Qual. Plant Plant Food Hum. Nutr.*, 32, 411 (1983)
- Nissen, J.A.: Control of the proteolytic and the level of bitterness in protein hydrolysis processes. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 34B, 215 (1984)
- Arai, A., Yamashita, M., Kato, H. and Fujimaki, M.: Applying proteolytic enzymes on soybean. *Agr. Biol. Chem.*, 34, 729 (1970)
- Nielsen, S.S.: Degradation of bean proteins by endogenous and exogenous protease. *Cereal Chem.*, 65, 435 (1988)
- Sharma, A. and Joseph, R.: Studies on the application of plant cell wall degrading enzymes from *Aspergillus terreus* and *Neurospora crassa*. *Biotechnol. Lett.*, 5, 481 (1983)
- Myoshi, H.: Some properties of partially purified enzyme related to maceration of brined turnip in Miso-zuke. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 29, 571 (1982)
- Loginova, L.G., Tsaplina, I.A., Khraptsova, G.I. and Guzhova, E.P.: Degradation of leaf tissue under the action of microbial enzymes. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*, 16, 848 (1980)
- Kikuchi, T., Ishii, S., Fukushima, D. and Yokotsuka,

- T.: Food-chemical studies on soybean polysaccharides. part I. chemical and physical properties of soybean cell wall polysaccharides and their changes during cooking. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **45**, 228 (1971)
16. Kikuchi, T., Ishii, S., Fukushima, D. and Yokotsuka, T.: Food-chemical studies on soybean polysaccharides. Part II. Enzymatic degradation of soybean cell wall polysaccharides by *Aspergillus sojae*. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **45**, 235 (1971)
17. Loffler, A.: Proteolytic enzymes sources and applications. *Food Technol.*, **40**, 63 (1986)
18. 김강성, 이상화, 박은하, 김진국, 최연배, 손현수: *Aspergillus niger* CF-34로 부터 분리한 두부 또는 두유비지 가용화 복합효소의 특성. 한국식품과학회지, **26**, 490 (1994)
19. Miller, G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959)
20. Chopra, A.K. and Mathur, D.K.: Factors affecting protease production by *Bacillus stearothermophilus* RM-67. *J. Food Prot.*, **46**, 1020 (1983)
21. 최연배, 김강성, 이균희, 손현수: 고체배양에 의한 *Aspergillus niger* CF-34의 콩세포벽분해효소의 생산. 한국콩연구회지, **11**, 33 (1994)
22. Adler-Nissen, J.L.: SPS, SPS-ase and method for producing SPS-ase. *US Patent*, 4,478,939 (1983)
23. Kilara, A. and Sharkasi, T.Y.: Effects of temperature on food proteins and its implications on functional properties. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **23**, 323 (1986)

(1995년 2월 6일 접수)