

대두의 발효에 따른 α -Galactosidase 활성 및 Stachyose, Raffinose 함량 변화

김정수 · 윤 선
연세대학교 식품영양학과

The Changes of α -galactosidase Activities and Stachyose and Raffinose Contents During Fermentation of Soybeans

Jung-Soo Kim and Sun Yoon
Department of Food and Nutrition, Yonsei University

Abstract

Changes in the contents of stachyose and raffinose were determined during soybean fermentation. α -Galactosidase activities were also monitored in soybean and its fermented products. The stachyose contents were 31.8239 mg/g of soybean, 4.2217 mg/g of Meju, and 2.1184 mg/g of Doenjang. The raffinose contents were 2.6914 mg/g of soybean, 1.7413 mg/g of Meju, and negligible of Doenjang. α -Galactosidase activities was distinct in soybean and Meju. They were 14.5954 units/mg protein of soybean, 13.1489 units/mg protein of Meju, and 1.9157 units/mg protein of Doenjang. The results suggested that the decrease of stachyose and raffinose contents in fermented soy products were due to the α -galactosidase activity.

Key words: Soybeans, Fermentation, Meju, Doenjang, Stachyose, Raffinose, α -Galactosidase

I. 서 론

대두는 농산물 중에서 비교적 높은 지방 함량(17.7%)과 단백질 함량(34.1%)으로 인하여 영양이 풍부한 식품이며 우리나라 국민의 주요한 단백질 급원으로 전체 단백질 섭취의 약 10%를 차지하고 있다¹⁾. 이러한 대두는 古來로부터 된장, 간장, 청국장 등 발효식품 및 두부, 두유, 豆芽菜 등 비발효식품으로 이용되어져 왔다. 장류는 우리나라 국민의 식생활에 없어서는 안 될 중요한 기본 식품으로 오랜 전통과 역사를 지니며 고래로부터 온 국민이 상용해오고 있는 전통 대두발효식품으로²⁾ 전통적으로 채식 위주의 식생활을 영위해온 우리 민족에게는 단백질의 급원으로 가장 중요한 위치를 점유하여 왔다³⁾.

그러나 生 大豆 중에는 여러 가지의 바람직하지 못한 유해성분이 존재하는 것으로 알려져 대두를 식품으로 가공, 이용하고자 할 경우에는 이들 유해성분의 제거를 위한 전처리 과정이 요구되고 있다. 이 중 콩 속에 있는 불소화성 탄수화물인 stachyose와 raffinose는 장내 가스 발생의 주원인이 되고 있다. 이들의 분해효소

인 α -galactosidase(α -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.22)는 인체의 소장과 대장의 상피세포에는 없기 때문에 이들 성분은 소화가 되지 않은 상태로 대장에 도달하게 되고, 대장 내의 혐기성 세균에 의해 분해되어 N₂, CO₂, CH₄ 등의 가스가 발생하기도 하여 복부 팽만감의 원인 물질로 보고되었다^{4,5)}. 그러나 대두 발효식품인 된장은 비 발효식품에 비해 가스 발생 인자로 인한 부작용이 없다. 이는 발효 과정 중 미생물에 의한 α -galactosidase의 생성이 유도되었을 가능성을 시사해주고 있다.

최근 들어 대두 식품의 소비가 크게 증가하고 있는 바, 대두가공식품에서 가스발생이 요인으로 알려진 이들 소탕류의 제거나 그 함량 감소 연구들이 시도되어 왔다. 이들 성분을 제거하는 방법으로는 α -galactosidase의 처리에 의한 분해^{6,7,8,9)}, 발효¹⁰⁾, 한외여과 방법, 침지 및 발아를 시키는 방법¹¹⁾ 등이 있다.

이에 본 연구에서는 대두 발효과정 중 stachyose, raffinose의 함량 변화와 이를 분해하는 효소인 α -galactosidase 활성을 연구하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

콩은 단양 産으로 단양 농협으로부터 구입하였고
메주는 단양으뜸식품에서 제조한 것으로 단양 농협으
로부터 구입하였다. 된장은 일반 가정에서 제조한 것
을 숙성 4개월에 냉동 저장하면서 분석에 사용하였다.
 ρ -Nitrophenyl- α -D-galactopyranoside는 Sigma Co.에서
구입하였다.

2. 수분, 조단백질, 조지방 함량 및 pH, 적정산도 측정

각 시료의 수분 함량, 조단백질, 조지방 함량 및 pH,
적정산도는 상법¹²⁾에 따라 측정하였다.

3. α -Galactosidase 활성 측정

시료 20 g씩 취하고 0.2 M 인산완충액(pH 7.0) 200
ml를 첨가하여 밀봉한 후 실온에서 4시간 진탕 추출
하였다. 8,000 rpm에서 30분간 원심분리 후 상층액을
취하여 60% ammonium sulfate를 서서히 첨가하여 단
백질을 침전시켰다. 24시간 방치 후 10,000 rpm에서
40분간 원심분리하여 얻은 침전물을 20 ml의 완충액
으로 다시 녹인 후 8,000 rpm에서 30분간 원심분리하
여 침전물을 제거하였다. 원심분리한 시료의 상층액
을 취하여 투석하였다. 염이 제거된 효소액을 실험에
사용하였다.

α -Galactosidase의 활성은 박 등¹³⁾의 방법을 변형하여
측정하였다. 효소액은 40°C 수조에서 5분간 미리 활성
화시켰다. 10 mM ρ -nitrophenyl- α -D-galactopyranoside
(PNPG, Sigma Co.)를 함유한 0.2 M 인산완충액(pH 7.0)
0.1 ml에 40°C에서 효소액을 0.1 ml 가하여 10분간 반
응시킨 후 0.5 M Na₂CO₃ 용액 1 ml로 반응을 중지시
켰다. 유리된 ρ -nitrophenol의 양을 400 nm에서 측정
하였다. 효소 활성 1단위는 반응시간 분당 PNPG로부터
 ρ -nitrophenol 1 μ mole을 생성하는 효소의 양으로
정의하였다. 단백질 정량은 Bradford법에 기초한 Bio-
Rad Protein Assay kit를 사용하였다.

4. pH 변화에 따른 α -galactosidase 활성 측정

기질의 pH를 3.5~11.0까지 변화시키면서 pH에 따
른 α -galactosidase 활성을 측정하였다. pH 3.5~5.5의
기질 용액은 0.2 M acetate 완충액으로, pH 6.0~8.0의
기질 용액은 0.2 M 인산완충액으로, pH 11.0의 기질
용액은 0.2 M NaHCO₃ 완충액으로 제조하였다. 반응
온도는 40°C로 고정하였다.

5. 온도 변화에 따른 α -galactosidase 활성 측정

온도 변화에 따른 α -galactosidase 활성은 위와 같은

Table 1. Instrumental conditions for free sugars analysis by HPLC

| Items | Conditions |
|--------------|--|
| Instrument | Waters 600E, Waters Co., U.S.A. |
| Column | Sugar-Pak™ 1 column, 6.5 mm × 300 mm, Waters Co., U.S.A. |
| Detector | RI Detector(Waters 410), Waters Co., U.S.A. |
| Temp. | 75°C |
| Mobile phase | 100% Milli-Q-water(3rd DW) |
| Flow rate | 0.4 ml/min |

방법으로 측정하였으며 pre-incubation과 반응 온도는
각각 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C로 달리 하여
측정하였다. 반응 pH는 7.0으로 고정하였다.

6. Stachyose, raffinose의 정량

시료 1 g을 취하여 중류수로 100 ml 정용하여 3시간
동안 진탕추출한 후 0.2 μ m syringe filter(PVDF)로 여
과한 뒤 여액을 HPLC를 이용하여 Table 1과 같은 조
건으로 분석하였다.

7. 통계처리

각 실험의 결과는 3회 반복실험을 통하여 얻었다.
각 검사결과는 분산분석과 던컨의 다중범위 시험법
(Duncan's multiple range test)으로 유의성을 검증하였
다. 모든 분석은 SPSS를 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 수분, 조단백질, 조지방 함량 및 pH, 적정 산도

각 시료의 수분, 조단백질, 조지방, pH, 적정 산도의
결과는 Table 2에 나타내었다.

수분 함량은 콩 13.25%, 메주 12.42%, 된장 58.8%로
나타났다. 조단백질은 건조물에 대한 비율로 콩 9.89%,

Table 2. Moisture, crude protein, crude fat, pH, and titratable acidity of soybeans, Meju, and Doenjang

| | Soybeans | Meju | Doenjang |
|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Water (g/100 g weight) | 13.25±0.07 ^a | 12.42±0.11 ^a | 58.80±0.01 ^b |
| Crude protein (g/100 g dry weight) | 9.89±0.14 ^a | 13.98±0.29 ^a | 7.34±0.68 ^b |
| Crude fat (g/100 g dry weight) | 16.51±0.44 ^a | 21.78±1.22 ^a | 14.73±0.55 ^a |
| pH | 6.61±0.00 ^a | 6.73±0.01 ^a | 4.97±0.01 ^b |
| Titratable activity (mL) | 16.73±0.31 ^a | 24.33±2.39 ^a | 31.60±0.92 ^a |

1) In each column, different alphabets in superscript show statistically significant difference ($p<0.05$).

메주 13.98%, 된장 7.34%였고 조지방은 콩 16.51%, 메주 21.78%, 된장 14.63%로 모든 군에서 유의적인 차이를 보였다($p<0.05$).

pH는 된장에서 4.97로 콩, 메주 보다 낮았는데 이는 단백질의 가수분해에 의한 아미노산의 생성이나 유기 산의 생성 및 젖산균의 작용에 의한 젖산 생성 때문으로 보인다. 따라서 적정산도는 된장으로 갈수록 높게 나타났다.

2. α -Galactosidase 활성

α -Galactosidase 활성은 콩 14.5954 units/mg protein, 메주 13.1489 units/mg protein으로 차이가 없었다(Table 3). 그러나 된장에서는 α -galactosidase 활성이 1.9157 units/mg protein으로 콩과 메주보다 유의적으로 낮았다($p<0.05$). 이는 본 실험에서 사용한 시료가 숙성된 된장으로서 숙성 과정에서 기질인 stachyose, raffinose가 소실됨에 따라 숙성된 된장에서의 미생물로부터 분비되는 α -galactosidase 활성이 낮게 나타난 것으로 추정된다. 그러므로 된장의 숙성 기간에 따른 α -galactosidase 활성에 대한 연구가 필요하다고 사료된다. 금 등¹⁴⁾에 의하면 대두 발아 과정 중 α -galactosidase 활성을 조사한 결과 침지 120시간에 가장 높은 활성을 보인 후 감소하였는데 이는 기질인 stachyose와 raffinose가 소실된 시점이었다. 그러나 콩, 메주, 된장에서 α -galactosidase의 존재 및 활성을 비교 연구한 논문이 아직 없으므로 본 실험의 결과를 비교할 수가 없었다.

3. pH 변화에 따른 α -galactosidase 활성

pH 변화에 따른 α -galactosidase 활성 변화를 조사한 결과, 콩, 메주, 된장 모두 pH 7.0~7.5에서 가장 높은 α -galactosidase 활성을 보였다(Fig. 1). 그러나 콩, 메주의 α -galactosidase pH profile은 약간의 차이를 보였다. 이는 콩의 α -galactosidase와 메주의 미생물 α -galactosidase가 isoenzymes일 가능성을 보여주고 있다. 금 등¹⁴⁾은 대두 α -galactosidase 최적 pH가 6.0이라고 보고하였고, 여 등¹⁵⁾은 *Bifidobacterium* sp. Int-57 α -galactosidase의 효소 특성 연구에서 pH 7.6이 최적 pH라고 보고하였다.

Table 3. α -Galactosidase activity of soybeans, Meju, and Doenjang (Units/mg protein)

| | Soybeans | Meju | Doenjang |
|---------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Enz. activity | 14.5954±0.01 ^c | 13.1489±0.09 ^a | 1.9157±0.01 ^b |

1) In each column, different alphabets in superscript show statistically significant difference ($p<0.05$).

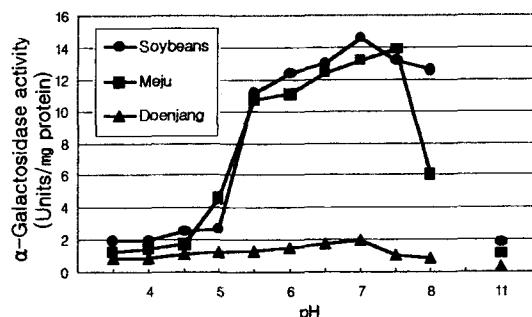


Fig. 1. Effect of pH on α -galactosidase activity.

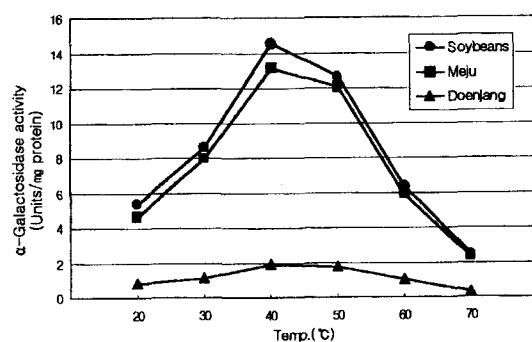


Fig. 2. Effect of temperature on α -galactosidase activity.

4. 온도 변화에 따른 α -galactosidase 활성

온도 변화에 따른 α -galactosidase 활성 결과는 Table 5에 나타낸 바와 같다. 40°C에서 가장 높았고(콩 14.5954 units/mg protein, 메주 13.1489 units/mg protein, 된장 1.9157 units/mg protein), 50°C에서도 비슷한 양상을 보였으나 30°C 이하와 60°C 이상에서는 효소 활성이 감소하였다.

5. Stachyose, raffinose의 함량

Stachyose 함량은 콩 31.8239 mg/g, 메주 4.2217 mg/g, 숙성된 된장 2.1184 mg/g으로 나타나 대두 발효 과정에 따라 감소하였다. Raffinose 함량도 콩 2.6914 mg/g, 메주 1.7413 mg/g이었고 숙성된 된장에서는 미량으로 나타나 대두 발효 과정에 따라 감소하였다(Table 4). 발효 과정 중 stachyose와 raffinose의 함량 감소는 미생물로부터 분비되는 α -galactosidase에 의한 것으로 추정된다.

IV. 요약

본 연구는 콩이 발효에 의해 메주, 된장으로 가공되면서 장내 가스 발생 인자인 stachyose, raffinose의 함량

Table 4. Stachyose, raffinose and other free sugars contents of soybeans, Meju, and Doenjang (mg/g dry basis)

| | Soybeans | Meju | Doenjang |
|-----------|--------------|--------------|--------------|
| Stachyose | 31.8239 | 4.2217 | 2.1184 |
| Raffinose | 2.6914 | 1.7413 | Trace |
| Glucose | 8.8768 | 9.2708 | 0.5985 |
| Galactose | 2.0233 | 6.5750 | 2.1510 |
| Fructose | 6.8765 | 9.1206 | 4.3869 |
| Sucrose | 51.2420 | 4.1626 | 2.0937 |
| Maltose | Not detected | Not detected | Not detected |
| Lactose | Not detected | Trace | Not detected |

변화와 α -galactosidase의 활성 변화를 살펴보기 위하여 수행되었다. Stachyose, raffinose는 각각 콩 31.8239 mg/g, 2.6914 mg/g, 메주 4.2217 mg/g, 1.7413 mg/g, 숙성 된장 2.1184 mg/g, trace로 나타나 대두 발효 과정에 따라 감소하였다. α -Galactosidase 활성은 콩 14.5954 units/mg protein, 메주 13.1489 units/mg protein으로 차이가 적었으나 된장에서는 1.9157 units/mg protein으로 나타나 현격한 감소 양상을 보였다.

감사의 글

본 연구는 연세대학교 1998학년도 교내연구비지원에 의한 연구의 일부로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 한국농촌경제연구원, 1996년도 식품수급표, 한국농촌경제연구원 (1997).
2. 유해열: 장류의 제조 기술, 식품과학과 산업, 22(4): 8 (1989).
3. 이홍석: 콩: 유전육종 및 재배생리, 서울대학교 출판부 (1994).
4. Reddy, N.R., Salunkhe, D.K. and Aharma, R.P.: Flatulence in rats following ingestion of cooked and germinated black and a fermented product of black gram and rice blend, *J. Food Sci.*, 45: 1161 (1980).
5. Steggerda, F.R., Richards, E.A. and Rackis, J.J.: Effects of various soybean products on flatulence in the adult man, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 121: 1235 (1968).
6. Smiley, K.L., Hensley, D.E. and Gasdorf, H.J.: α -Galactosidase production and use in a hollow fiber reactor, *Appl. Environm. Microbiol.*, 41: 615 (1976).
7. Sugimoto, H. and van Buren, J.M.: Removal of oligosaccharides from soymilk by an enzyme from *Aspergillus saitoi*, *J. Food Sci.*, 35: 655 (1970).
8. Thananunkul, D., Tanaka, M., Chichester, C.O. and Lee, T.C.: Degradation of raffinose and stachyose in soybean milk by a α -galactosidase from *Mortierella vinacea*. Entrapment of α -galactosidase within polyacrylamide gel, *J. Food Sci.*, 41: 173 (1976).
9. McGhee, J.E., Silman, R. and Bagley, E.B.: Production of α -galactosidase from *Aspergillus awamori*: Properties and action on ρ -nitrophenyl- α -D-galactopyranoside and galacto oligosaccharides of soy milk, *J. Food Sci.*, 39: 1018 (1974).
10. Mital, B.K., Steinkraus, K.H. and Naylor, H.B.: Growth of lactic acid bacteria in soymilk, *J. Food Sci.*, 39: 1018 (1974).
11. Kim, W.J., Smith, C.J.B. and Nakayama, T.O.M.: The removal of oligosaccharides from soybeans, *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 6: 201 (1973).
12. 유주현: 양조식품분석법, 식품공학 실험 I, 탐구당 (1994).
13. 박현국, 강동현, 윤석환, 이계호, 이세경, 지근억: 한국인으로부터 분리된 *Bifidobacterium* sp.의 효소 pattern, *한국산업미생물학회지*, 20: 647 (1991).
14. 금종화, 오만진, 김성렬: 대두 α -galactosidase의 정체 및 성질, *한국농화학회지*, 34(3): 249-257 (1991).
15. 여나임, 이세경, 지근억: *Bifidobacterium* sp. Int-57 α -galactosidase의 효소 특성, *한국식품과학회지*, 25(6): 689 (1993).

(1998년 10월 20일 접수)