KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 33, No. 6, pp. 769~773 (2001)

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

산업폐기물인 비지로부터 식품첨가물로 이용할 수 있는 단백질 가수분해물의 생산

우은열 · 김민정 · 신원선* · 이경애* · 김강성
용인대학교 식품영양학과, *한국식품개발원

Production of Protein Hydrolyzate, that can be used as Food Additives, from Okara

Eun-Yeol Woo, Min-Jung Kim, Weon-Sun Shin*, Kyung-Ae Lee and Kang-Sung, Kim
Department of Food Science and Nutrition, Yongin University
**Korea Food Research Institute*

Protein content of okara and soybean were found to be 37.3% and 42.5%, respectively by micro-Kjeldahl analysis. Solubility of okara protein in phosphate buffer (pH 8) was 10% versus soy protein of 68.4%. Insolubilization of okara protein was mostly due to disulfide bonding between cysteine residues caused by excessive heat treatment during soymilk processing: hydrophobic interactions and hydrogen bondings were involved to lesser extent. Optimum extraction temperature and time were 60°C and 40 min. Typical solubility profile of soy protein disappeared for okara protein though minimum solubility of the protein was around pH 3.0. Treating okara with protease was effective in solubilizing okara protein and solubility increased to 19.2%. Optimum reaction temperature and time were 80°C and 50 min, respectively. Cell wall degrading enzyme did not increase solubility of the protein, however. Through enzymatic reaction okara protein could be effectively solubilized for uses as food ingredient.

Key words: okara protein, soybean, protease, functionality, solubility

서 론

식물성 단백질 및 지방질의 주요한 공급원인 대두는 예로부터 다양한 용도로 우리의 식생활과 밀접한 관계를 가지고 이용되어 왔다. 현대에 이르러서도 식생활의 변화 및 다양화에 따라 그 용도는 더욱 넓어져 왔으며, 아울러 사료원으로도 큰 비중을 차지하고 있어 대두의 수요량은 계속해서 증가하고 있는 추세이다.

우리 나라는 해마다 150만 톤 가량의 대두를 외국으로부터 수입하고 있다. 수입된 대두 가운데 약 30% 가량만이 식품으로 직접 이용되고 나머지 70%는 식용유, 두부 및 두유 등의 2차 가공품 생산에 활용된다. 이들 공장의 가공공정 중 생산되는 부산물인 비지 또는 대두박은 전량 건조되어 동물사료로 사용되고 있다. 그러나 두부 및 두유 공장에서 발생되는 비지는 수분함량이 80% 이상 되므로 이를 단순 건조하는 데에도 막대한 비용이 허비되고 있을 뿐 아니라 일부만이 동물사료로 충당되며 나머지는 폐기 처분되고 있는 실정이어서 환경오염 측면에서도 중대한 문제점을 제기하고 있다.

비지의 영양학적인 측면에서 비지는 대두로부터 수용성 물질이 추출된 상태이기는 하나 상당량의 단백질과 탄수화물을 함유[1-3]하고 있고, 특히 두유비지의 단백질은 다른 식품 단백질에서 부족 되기 쉬운 황함유 아미노산과 lysine의 함량이 비교적 많아 protein efficiency ratio가 대두, 두부 및 두유보다 높아서[4-7] 양질의 단백질로 평가되고 있어 비지의 식품화의 효율적인 활용에 관한 연구가 절실한 실정이다. 그러나 두부 및 두유공정 중에 생산되는 비지는 과도한 전 처리에 의하여 단백질이 변성된 상태이므로 기능적 특성이 상실되어 있어 식품소재로 이용하기 위해서는 용해도를 비롯하여 단백질의 기능성을 증대시키는 기술이 선결되어야 한다.

그러므로 본 연구에서는 열에 의해 단백질이 변성되어 기능적 특성이 상실된 비지단백질의 용해도 및 기능성을 증대시켜 식품소재로 개발하고 urea, SDS, 2-mercaptoethanol 첨가에 의해 비지단백질의 insolubilization mechanism을 알아보고자 하였다.

*Corresponding author : Kang-Sung Kim, Faculty of Department of Food Science and Nutrition, Yongin University, 117-6, Samga-Dong, Yongin 449-714, Korea
Tel: 82-31-285-8025
Fax: 82-31-330-2886
E-mail: kss@eve.yongin.ac.kr

재료 및 방법

시료준비

본 실험에 사용된 수입메주콩(입도가 80~100 mesh로 분쇄)과 두유 생산 시 부산물로 얻어지는 비지는 정식품에서 제공받아 냉장 보관하여 사용하였다.

일반성분 분석

조단백, 조지방 및 조회분 함량은 A.O.A.C법[8]에 의하여 분석하였다.

시간, 온도, pH에 따른 단백질 추출률 비교

탈지시킨 2.5%의 비지와 soybean flour(대두분) 용액을 시간별(0 min, 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min), 온도별(50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 85°C, 100°C) 그리고 pH별(pH 2, pH 3, pH 4, pH 6, pH 8, pH 10)로 교반하여 원심분리(8000 rpm, 10분간)한 후 2 mL의 상등액을 취하여 시간 및 온도에 따른 단백질의 용해도를 micro-Kjeldahl 법으로 측정하였다.

Urea, SDS, 2-mercaptoethanol 첨가에 의한 단백질 추출률 비교

비지와 soybean flour의 농도가 각각 2.5%인 용액에 urea와 SDS가 0 M, 2 M, 4 M, 6 M, 8 M과 0.4%, 0.6%, 0.8% 1.2% 1.6% 되도록 첨가하여 30°C에서 50분간 교반하여 원심분리(8000 rpm, 10분간)한 후 상등액에 용해된 단백질의 함량을 Biuret 법으로 측정하였다. Disulfide 결합의 영향을 알아보기 위하여 같은 농도의 비지 및 soybean flour 용액에 2-mercaptoethanol을 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M, 0.4 M, 0.5 M, 0.6 M되게 첨가하여 30°C에서 50분간 교반한 후 동일한 방법으로 분석하였다.

효소에 의한 단백질 추출률 비교

2.5%의 비지와 soybean flour 용액에 carbohyderase(Vicozyme L: Novo Nordisk A/S, 2880, Bagsvaerd, Denmark)와 protease(Alcalase 0.6 L: Novo Nordisk A/S, 2880, Bagsvaerd, Denmark)를 각각 첨가하고 각 효소의 최적 조건으로 알려진 pH 5, 45°C와 pH 7.6, 60°C에서 0 min, 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min동안 반응하여 시료를 채취하여 100°C에서 5분간 가열하여 실활 시킨 후 원심분리(8000 rpm, 10분간)하여 상등액에 용해되어 있는 당과 단백질을 phenol sulfuric acid법 과 Biuret법으로 정량하였다. 단백질 분해효소 종류에 따른 비지단백질의 추출률을 비교하기 위하여 Alcalase (pH 7.6, 60°C), trypsin(pH 7.0, 25°C), protease XXIII(pH 7.5, 37°C), protease XV(pH 7.5, 37°C) protease XIX(pH 7.5, 37°C), protease XVIII(pH 3.0, 37°C), pepsin(pH 2.0, 37°C), papain(pH 6.2, 25°C)을 각각 비지의 1%되게 첨가하고 위와 동일한 방법으로 용해된 당과 단백질을 정량하였다.

Table 1. Composition of okara and soybean flour

(unit: %, w/w)

Variety	Crude protein	Crude lipid	Ash	Carbohydrate
Okara	37.3	17.9	4.2	40.6
Soybean	42.5	23.2	5.0	29.3

결과 및 고찰

일반성분 분석

비지와 대두의 일반성분을 A.O.A.C 방법으로 분석한 결과는 Table 1과 같다. 대두에는 단백질, 지질, 탄수화물이 각각 20~45%, 15~20%, 25~30% 함유 되어있는 것으로 알려졌다.[9] 본 실험에서 사용된 비지의 조단백 함량은 37.3%로서 대두의 42.5%에 비해 약 5%정도가 적게 나타났다. 비지와 대두의 조지방 함량은 17.9%와 23.2%로 각각 나타났으며 탄수화물은 40.6%와 29.3%로 비지가 상당량 함유하고 있는 것으로 나타났다. 비지의 일반성분 중 조단백, 조지방, 조회분의 함량은 대두와 유사하거나 약간 낮게 나타났지만 비지는 대두에 못지않는 상당량의 단백질과 탄수화물을 함유하고 있는 것으로 나타났다.

시간, 온도, pH에 따른 단백질 추출률 비교

시간에 따른 단백질 추출률을 비교하기 위하여 비지와 대두분 용액의 농도를 각각 2.5%되게 증류수를 가하여 30°C 유지하며 시간에 따라 반응액을 취하여 8000 rpm에서 10분간 원심분리하고 그 상등액을 micro-Kjeldahl법으로 분석하여 단백질의 용해도를 측정하였다. 그 결과는 Fig. 1에서 보여주고 있다. 비지의 초기 단백질 용해도는 6%이였으며 10분~30분 사이에서는 6%~8%, 그리고 40분 이후에서는 10%로 일정한 용해도를 나타내었다. 대두의 시간에 따른 단백질의 용해도를 측정한 결과 초기에는 약 51%를 용해도를 보였고 10분에서 40분까지는 점차로 증가하는 경향을 보였으며, 50분 이후부터는 68.4%의 단백질이 용해되었다. 이러한 결과를 토대로 하여 이후의 모든 추출실험은 50분으로 정하여 수행하였다.

Fig. 2에서는 온도에 따른 단백질의 추출률을 비교하기 위한 결과를 보여주고 있다. 비지의 경우 85°C까지는 낮은 단

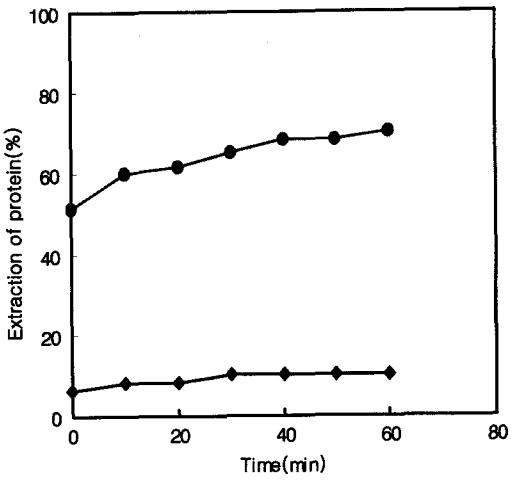

Fig. 1. Effects of extraction time on solubilization of okara and soybean flour

● - ● ; Soybean flour ■ - ■ ; Okara

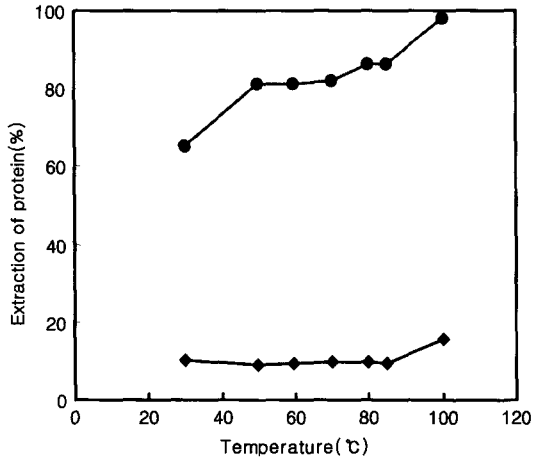

Fig. 2. Effects of incubation temperature on extraction of okara and soybean flour
● - ● ; Soybean flour ■ -■ ; Okara

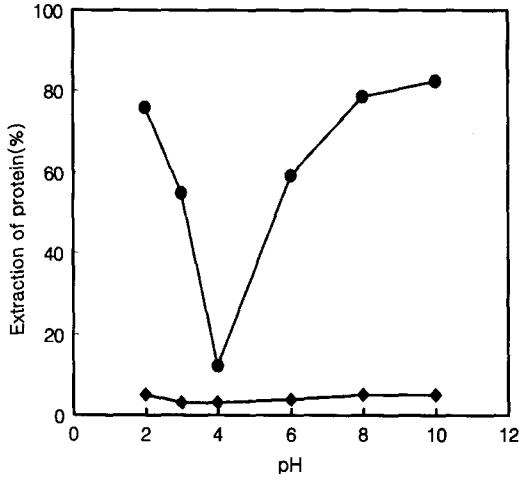

Fig. 3. pH profile of okara and soybean flour
● - ● ; Soybean flour ■ -■ ; Okara

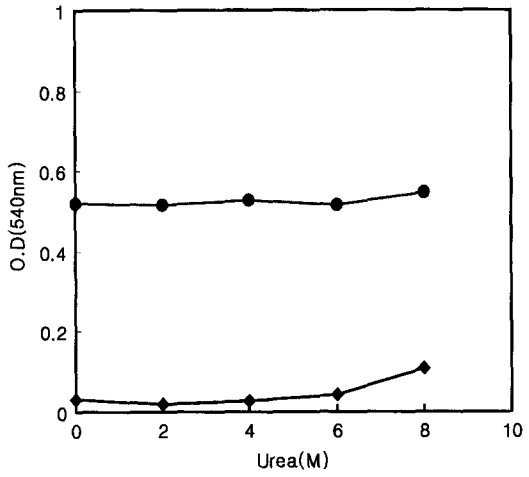

Fig. 4. Effects of urea concentration on extraction of okara and soybean flour
● - ● ; Soybean flour ■ -■ ; Okara

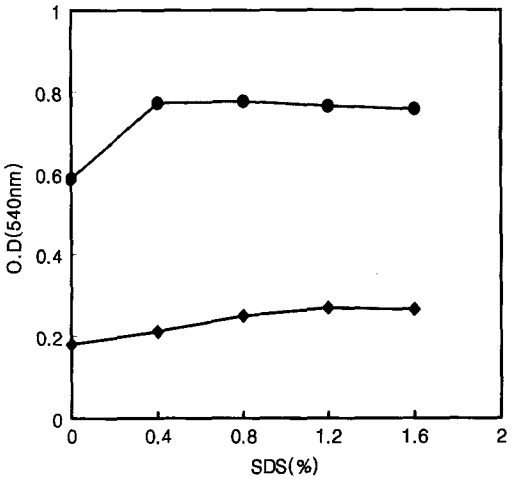

Fig. 5. Effects of SDS concentration on extraction of okara and soybean flour
● - ● ; Soybean flour ■ -■ ; Okara

백질 용해도(9.3%)를 보이다가 85°C 이후에서는 약간 증가하는 현상을 보였다. 대두의 경우 50°C까지 단백질의 용해도가(81.3%) 급격하게 증가하였고 50°C~80°C에서는 단백질 용해도의 증가는 완만하였으나, 85°C 이후에서는 용해도 증가가 다시 급격히 일어났다. 비지의 낮은 단백질 용해도는 비지생산공정 중의 과도한 열처리 및 생산공정 중 수용성 단백질의 기 제거 등에 기인하는 것으로 사료된다.

pH에 따른 비지와 대두의 단백질 추출률을 비교한 결과는 Fig. 3에서 보여주고 있다. 비지는 pH 2와 pH 8에서 약 5%의 단백질 용해도를 보였고 pH 3에서는 2.9%의 낮은 용해도를 보였다. 대두는 pH 2와 pH 8에서 가장 높은 단백질 용해도를 보였으며 pH 4에서는 11.8%의 낮은 용해도를 보였다. Fig. 3에서 비지와 대두단백질의 용해도는 pH 3과 pH 4에서 가장 낮게 나타났다.

Urea, SDS, 2-mercaptoethanol 의 단백질 용해도에 미치는 영향

Urea, SDS, 2-mercaptoethanol을 이용하여 단백질의 용해도를 비교함으로써 단백질분자들 사이에 관여하는 분자 상호간의 힘을(수소결합, 소수성결합, 공유결합 그리고 정전기적 상호작용) 결정할 수 있다[10-13]. 수소결합이 대두단백질과 비지단백질의 용해도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 urea의 농도에 따라 단백질 추출률을 비교하였다. 농도를 달리한 urea 용액에 비지와 대두를 2.5%되도록 용해시키고 30°C에서 50분간 교반시킨 후 반응액을 8000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액에 용해된 단백질을 Biuret법으로 측정하였다. 그 실험결과는 Fig. 4에서 보여주고 있다. 비지는 6 M 이하 urea의 농도에서는 일정한 단백질 용해도를 나타냈으며 6 M~8 M의 urea 농도에서는 완만한 용해도 증가를 나타내었다. 대두단백질 역시 비지단백질과 유사한 용해도를 보였다. 따라서 대두단백질과 비지단백질에는 수소결합이 단백질의 불용화에 큰 역할을 하지 않는 것으로 판단된다.

소수성 결합에 대한 분자들의 상호작용을 알아보기 위해 SDS(sodium dodecyl sulfate)을 사용하여 단백질의 용해도를 비교한 결과는 Fig. 5에서 보여주고 있다. 비지의 경우 단백

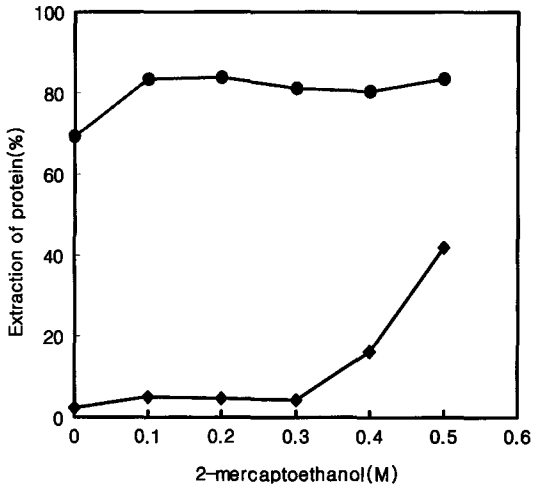

Fig. 6. Effects of 2-mercaptoethanol concentration on extraction of okara and soybean flour
● - ● ; Soybean flour ■ -■ ; Okara

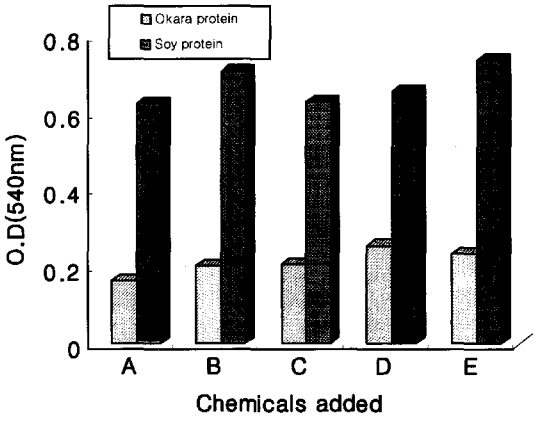

Fig. 7. Effects of some chemical addition on extraction of okara and soybean flour
A: Okara & soybean flour, B: Urea 6 M+SDS 0.4%, C: Urea 6 M+SDS 0.4%+2-mercaptoethanol 0.2 M, D: Urea 6 M+SDS 0.4%+2-mercaptoethanol 0.5 M E: Urea 6 M+2-mercaptoethanol 0.2 M

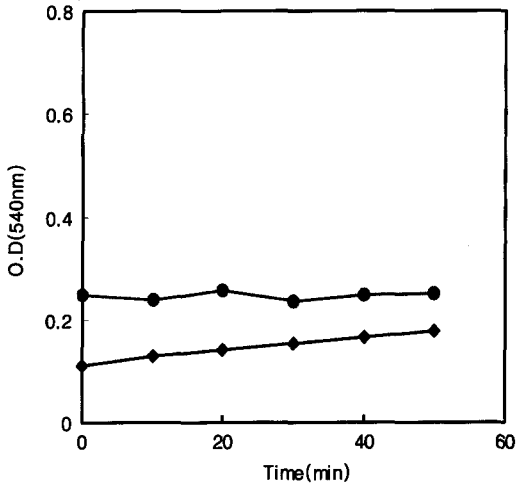

Fig. 8. Effects of carbohydrase (Viscozyme L) treatment on extraction of okara and soybean flour protein
● - ● ; Soybean flour ■ -■ ; Okara

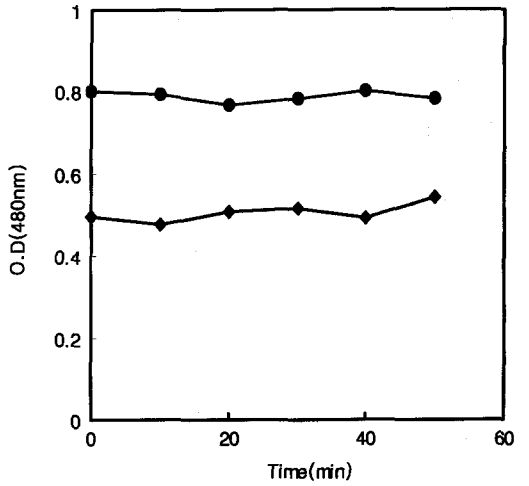

Fig. 9. Effects of carbohydrase (Viscozyme L) treatment on slolubiluzation of okara and soybean flour carbohydrate
● - ● ; Soybean flour ■ -■ ; Okara

질의 용해도는 SDS 농도가 증가함에 따라 완만하게 증가하는 현상을 나타냈으며, 대두단백질의 경우 0.4% SDS농도까지는 급격하게 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 용해도가 변화하지 않았다.

이황화결합의 비지단백질에 대한 불용화 영향을 보기 위하여 2-mercaptoethanol 농도에 따라 단백질의 용해도를 비교하였다. 그 실험의 결과는 Fig. 6에서 보여주고 있다. 비지는 0.1 M 농도의 2-mercaptoethanol에서 단백질의 용해도가 증가함을 보였고, 0.2 M~0.3 M 농도에서는 변화를 보이지 않았으나 0.3 M 이후에서는 다시 급격한 용해도의 증가현상을 보였다. 대두단백질의 용해도는 0.1 M 이하의 환원제 농도에서는 완만한 증가를 보였으나 0.1 M 이상의 2-mercaptoethanol 농도에서는 변하지 아니하였다. 이상의 결과로부터 비지단백질의 insolubilization은 disulfide 결합에 기인하며 수소결합과 소수성결합의 기여도는 미미한 수준으로 사료된다.

Fig. 7은 urea, SDS 2-mercaptoethanol을 조합하여 단백질의 용해도를 비교한 결과이다. 이 실험의 결과에서 비지단백질과 대두단백질은 urea, SDS 2-mercaptoethanol 이 모두 용해된 용액에서 최대의 용해도를 보여주는 경향을 나타났다.

효소첨가에 의한 단백질 추출률 비교

대두에 함유되어 있는 대부분의 단백질은 탄수화물과 결합되어 있는 상태로 존재하는 경우가 많으며 따라서 추출의 효율을 높이기 위해 탄수화물 분해효소의[14-17] 일종이며 cellulase를 포함한 복합 탄수화물 분해효소인 Viscozyme을 사용하여 비지와 대두의 단백질 추출률에 관한 영향을 조사하였다. 비지와 대두를 2.5% 되도록 phosphate buffer(pH 5)를 가하여 Viscozyme을 (시료량의 1%) 첨가한 후, 45°C(최적온도)로 유지하며 시간에 따라 각각의 반응액을 일정량 취하여 5분간 끓는 물에서 효소를 실활 한 후 8000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 Biuret법과 phenol sulfuric 법으로 단백질(Fig. 8)과 당(Fig. 9)을 분석하였다. 적절한 탄

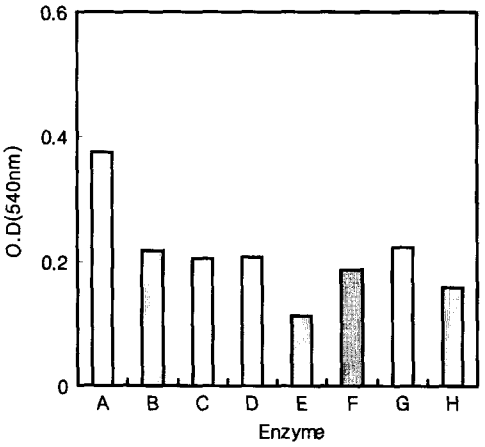

Fig. 10. Effects of protease on solubilization of okara
A: Alcalase B: Trypsin C: Protease XXIII D: Protease XV E: Protease XIX F: Protease XVIII G: Pepsin H: Papain

수화물 분해효소가 단백질분해효소의 용이하게 하는 것으로 밝혀졌지만[18] 본 실험에서는 미세한 영향을 보였고 단백질 용해도 향상에 크게 기여하지 못하였다.

Protease에 의한 단백질 추출률 비교

비지의 protease에 의한 단백질 추출률을 비교하기 위해 Alcalase, trypsin, protease XXIII, protease XV, protease XIX, proteaseXVIII, pepsin, papain을 각각의 최적온도와 pH을 조절하여 단백질 용해도를 비교 분석하였다. 실험의 결과는 Fig 10에서 보여주고 있다. 비지단백질은 Alcalase 첨가시 3.6%로 가장 높은 단백질 용해도가 나타냈으며, protease XIX 첨가 시 0.6%의 단백질 추출률을 보이며 가장 낮은 단백질 용해도를 나타내었다. 이 실험의 결과로 protease에 의한 반응에 있어서 높은 단백질의 용해도를 보여주는 것은 Alcalase인 것으로 밝혀주고 있다.

요 약

두유에서 발생되는 비지와 대두의 일반성분과 단백질의 추출률을 비교하기 위해 시간, 온도, pH별로 분석하였고, 단백질 분자들 사이의 상호작용에 관여하는 물질 urea, SDS, 2-mercaptoethanol를 사용하여 비지단백질의 insolubilization mechamism을 조사하였다. 또한 enzyme modification으로 기능성을 향상시켜 식품소재로서의 이용 가능성에 대해 분석하였다. 비지와 대두는 각각 37.3%, 42.5%의 단백질을 함유하고 있으며 비지는 생산공정 중의 과도한 열처리에 의하여 극히 낮은 용해도를 나타냈다. 비지단백질의 낮은 용해도는 주로 disulfide bonding에 의한 cross linking에 기인하는 것으로 밝혀졌다. 비지단백질과 대두단백질은 pH 3, pH 4에서 가장 낮은 용해도를 보였다. Carbohydrase와 protease를 첨가하여 단백질의 추출률을 비교한 결과는 비지와 대두는 carbohydrase에서 미세한 반응을 보여 단백질의 용해도에 큰 영향을 주지 못하였으나 여러 protease 가운데 Alcalase는 비지 단백질의 용해도를 급격히 증가시켰다.

감사의 글

이 논문은 1999년도 한국학술진흥재단의 연구비에 의하여 지원되었으며 (KRF-99-003-G00081G6001) 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Lee, G.J. Changes in carbohydrate composition during the fermentation of soybean curd residue with enzymes. Korean Biochem. J. 17(1): 44-50 (1984)
2. Bourne, M.C., Clemente, M.G. and Banzon, J. Survey of suitablility of thirty cultivars of soybeans for soymilk manufacture. J. Food Sci. 41: 1204-1208 (1976)
3. Chung S.S., Chang H.N. and Park M.Y. Dehydration of soybean residue by hot-air in conjunction with filter pressing. Korean J. Food Sci. Technol. 10(1): 1-7 (1978)
4. Hackler, L.R., Hand D.B., Steinkraus, K.H. and Van Buren, J.P. A comparison of nutritional value of protein from several soybean fractions. Nutrition. 80: 205-210 (1963)
5. Hackler, L.R., Stillings, B.R. and Ploimeni, B.J. Correlation of amino acid indexs with nutritional quality of several soybean fraction. Cereal Chem. 44: 638-644 (1973)
6. Kim, K.S., Park, E.H., Bae, C.Y. and Kim, K.C. Solubilization of tofu-residue using multienzyme derived from *Aspergillus niger* CF-34. Korean J. Food Sci. Technol. 26(5): 484-489 (1994)
7. Kim, K.S. and Sohn, H.S. Characterization of tofu-residue hydrolyzing carbohydrase isolated from *Aspergillus niger* CF-34. Korean J. Food Sci. Technol. 26(5): 490-495 (1994)
8. A.O.A.C Association of Official Analytical Chemists. 15th ed. Washington D.C. (1990)
9. Keshun, L. Soybeans: Chemistry, technology and utilization p. 25~113. chapman & Hall (1997)
10. Kim, K.S., Yang, E.K. and Rhee, K.C. Effects of chemical modification on adhesive properties of glue formulated with soy flour. Food Sci. Biotechnol. 7: 35-39 (1998)
11. Kim, K.S., Park, S.K., Jang, E.G., Lee, H.O., Lee, S.Y., Ha, J.H., Kang, S.T. and Rhee, K.C. Binding of wood with soy flour formulation. Food Sci. Biotechnol. 6: 162-166 (1997)
12. Choi, Y.R., Lusas, E.W. and Rhea, K.D. Succinylation of cottonseed flour: Effect on functional properties of protein isolates prepared from modified flour. J. Food Sci. 46: 954-955 (1981)
13. Sung, H.Y., Chen, H.J., Liu, T.Y. and Su, J.C. Improvement of the functionalities of soy protein isolate through chemical phosphorylation. J. Food Sci. 48: 716-721 (1983)
14. Adler-Nissen, J. Enzymatic Hydrolysis of Food proteins, Elsevier Applied Science Publisher, New York, p. 1 (1986)
15. Tanimoto, S,Y. and Kinsella, J. E. Enzymatic modification of proteins: Effects of transglutaminase cross-linking on some physical properties of β-lactogolbulin. J. Agric. Food. Chem. 36: 281-286 (1988)
16. Kim, C.H. The bitterness of the enzymatic hydrolyzate of soy bean protein and the amino acid composition of UF filtrate. Food Sci. Biotechnol. 6: 244-247 (1997)
17. Kim, C.H., Kim, M.R. and Lee, C.H. Effect of type of enzyme on the bitterness of partial hydrolyzates of soybean. Food Sci. Biotechnol. 1: 79-83 (1992)
18. Chae, H.J., In, M.J. and Kim, M.H. Optimization of enzymatic treatment for the production of hydrolyzed vegetable protein. Korean J. Food Sci. Technol. 29(6): 1125-1130 (1997)

(2001년 5월 22일 접수)