

대두 열처리 담금 용액의 특성

윤혜현* · 전은재¹

경희대학교 조리과학과, ¹한남대학교 식품영양학과

Characteristics of Soybean Soaking Water after Heat Treatment

Hye-Hyun Yoon* and Eun-Jae Jeon¹

Department of Culinary Science and Arts, Kyung Hee University

¹Department of Food and Nutrition, Hannam University

Soybeans released proteins when immersed in water at 50~60°C. We investigated the changes in the characteristics of soybean when soaked in water at different temperatures and studied the electrophoretic properties of soy proteins in recommended Korean soybean varieties after heat treatment. Soybean seeds were heated in soaking water at temperatures of 30, 40, 50, 60, 70°C for 90 min, and also from 10 to 150 min at 60°C. The pH value of the water decreased with heating time at 60°C, and the amount of soluble solids increased with temperature and heating time. The protein concentration of the solution increased with temperature and time. From SDS-PAGE of the proteins in soaking water, we detected two new bands of 16 kDa- and 31 kDa-proteins from the Korean soybean varieties on heat treatment.

Key words: soybean, heat treatment, soaking water, heat shock protein (HSP), SDS-PAGE

서 론

대두(*Glycine max* (L.) Merrill)는 동양에서 가장 오래된 작물로 양질의 단백질과 이소플라본의 생리활성 등이 관심을 받는 우수한 식품으로 우리나라 뿐 아니라 전 세계적으로 매년 생산량이 꾸준히 증가하고 있다⁽¹⁾. 대두에 함유된 단백질은 약 35~45%로 globulin이 주된 저장 단백질이며 침강계수에 따라 7S globulin과 11S globulin으로 분리되며⁽²⁾, 7S globulin은 다른 이화학적 특성을 가진 β-conglycinin, γ-conglycinin, basic 7S globulin의 주요 분획으로 나뉜다⁽³⁾. β-Conglycinin은 140~170 kDa의 분자량을 가지며 α'(57 kDa), α(42 kDa), β(42 kDa) 및 γ(약 42 kDa)의 4개 subunit으로 구성된 tetramer이고 γ-conglycinin은 170 kDa의 분자량을 가진 trimer이다^(5,6). Basic 7S globulin은 168 kDa의 분자량을 가지며 고분자량 polypeptide(HI과 HII)(26 kDa)와 저분자량 polypeptide(LI과 LII)(16 kDa)가 disulfide bond로 연결된 4개의 subunits으로 구성되어 있다⁽⁷⁾.

한편, 모든 생물체들은 열 충격을 받으면 열 스트레스로부터 자신을 보호하기 위하여 일련의 단백질들을 합성하게 되

는데 이를 열충격 단백질(heat shock protein, HSP)이라고 한다. 이들은 주로 열이나 압력 기타 환경적 스트레스로부터 세포를 보호하는 역할을 한다고 알려져 있다⁽⁸⁾. 미생물로부터 고등생물까지 열 스트레스에 의한 HSP 합성에 대하여 많이 연구되어 왔는데 세포내의 HSP의 축적은 대체로 열 손상에 대한 방어기작의 필수성분으로 알려져 있다. 대두, 완두콩, 옥수수 및 밀의 HSP에 대한 보고에 의하면 이들 식물은 조직온도가 33°C를 초과하여 증가하면 HSP를 합성하여 온도가 올라감에 따라 그 양이 증가한다고 한다. 대두에서의 열충격 단백질에 대한 연구는 저분자량(25 kDa, 18 kDa)의 HSP에 대해 규명하는 연구보고로 시작되었으며⁽⁹⁾, 대두를 50~60°C에서 물에 침지할 때 많은 양의 basic 7S globulin이 유출되었는데 이 단백질이 heat shock protein의 일종이라는 연구보고가 있었으나⁽¹⁰⁾, 우리나라 대두 품종에 대한 연구는 아직 보고된 바 없다.

본 연구에서는 국내 장려품종 대두를 시료로 열처리에 의해 얻어진 대두 침지액의 특성과 단백질 농도를 조사하고, 전기영동에 의해 대두 단백질의 열 충격에 의한 변화를 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 대두는 장려품종 콩으로 장류용으로 만리(계통명 S-142)와 태광(S-151) 나물용으로 은하(M-19)와 풍

*Corresponding author : Hye-Hyun Yoon, Department of Culinary Science and Arts, Kyung Hee University, 1 Hoegi-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-701, Korea
Tel: 82-2-961-9403
Fax: 82-2-964-2537
E-mail: hhyun@khu.ac.kr

산나물(I-5), 밥밀용으로 검정콩1호(S-155)와 일품검정(M-69)을 충청남도 농업기술원에서 제공받아 사용하였다.

대두의 열처리

콩 시료와 증류수를 1:10(w/v) 비율로 시약병에 담아 항온수조에서 열처리하였다. 여러 온도(30, 40, 50, 60, 70°C)에서 90분 동안 유지하여 온도에 따른 변화를 살펴보고, 60°C에서 시간(10, 30, 60, 90, 120, 150분)에 따라 열처리하였다. 열처리 한 후 콩과 침지액을 분리하여 단백질이 용출된 침지액을 측정시료로 사용하였다.

pH와 가용성고형물

시료 침지액의 pH 변화는 pH meter(8521, Hanna, Singapore)를 사용하였고, 당도는 굴절 당도계(Atago N-1E, Japan)를 사용하여 모두 3회 반복으로 측정하였다.

단백질 정량

침지액의 단백질 함량은 BCA(bicinchoninic acid)방법⁽¹¹⁾에 따라 BCA kit(Sigma Chemical Co., St Louis, USA)를 사용하여 3회 반복으로 562 nm에서 흡광도(Ultrospec 300, Pharmacia Biotech., USA)를 측정하여 구하였다.

전기영동

침지액을 동결 건조한 후 만리와 은하 품종은 10 mg, 검정콩1호는 5 mg을 분취하여 SDS-sample buffer(0.625 M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.5% bromophenol blue) 250 µL과 혼합한 후에 100°C에서 5분간 끓여 변성시켰다. 상온에서 5분간 방치한 다음 15000×g, 2분간 원심분리한 후 상층액을 시료로 사용하였

다. 전기영동은 Laemmli의 방법⁽¹²⁾에 따라 4% stacking gel과 12% separating gel을 이용하였고 만리, 은하는 well당 30 µL를 loading하고 40 mA의 일정한 전류를 걸어 전개하였으며 검정콩1호는 well당 20 µL를 loading하여 30 mA의 일정한 전류를 걸어 전개하였다.

결과 및 고찰

침지액의 pH와 가용성고형물 함량

대두를 다양한 온도와 시간에서 열처리 한 후 침지액만을 분리하여 pH와 가용성 고형물 함량을 측정하였다. Fig. 1은 pH 변화를 나타낸 것으로 온도에 따른 pH의 변화를 나타낸 Fig. 1a를 보면 모든 대두 품종의 열처리 후 침지액의 pH가 온도에 따라 pH 6.30~6.68의 범위에서 변화하는 것을 볼 수 있으며, 40°C에서 모든 대두가 가장 낮은 pH를 보이다가 60°C에서 만리와 은하를 제외하고 가장 높은 pH를 나타내었다. 60°C에서 열처리 시간에 따른 침지액의 pH를 살펴본 결과(Fig. 1b) 검정콩1호와 일품검정을 제외한 모든 대두는 처음의 pH에서 열처리 시간이 증가함에 따라 pH가 감소하였다. Varriano-Marston과 De Omana⁽¹³⁾는 pH의 변화 이유를 세포 성분 중 pectic acid 등의 이온화에 의해 수소 이온이 증가하게 되거나 아미노산 잔기 중 일부의 수소 이온의 해리에 의해 pH가 감소하는 결과를 가져온다고 하였다.

Fig. 2a는 열처리 온도에 따른 가용성 고형물 함량의 변화를 살펴본 것으로 50°C 이하에서는 거의 가용성 고형물이 용출되지 않다가 60°C에서 모든 시료에서 용출이 나타났고 70°C에서는 더 증가되었다. 만리, 은하와 풍산나물의 경우 60°C에서 0.9°Brix로 다른 품종에 비해 최고함량을 나타내었고 70°C에서는 은하가 1.3°Brix의 가장 높은 용출량을 나타내었

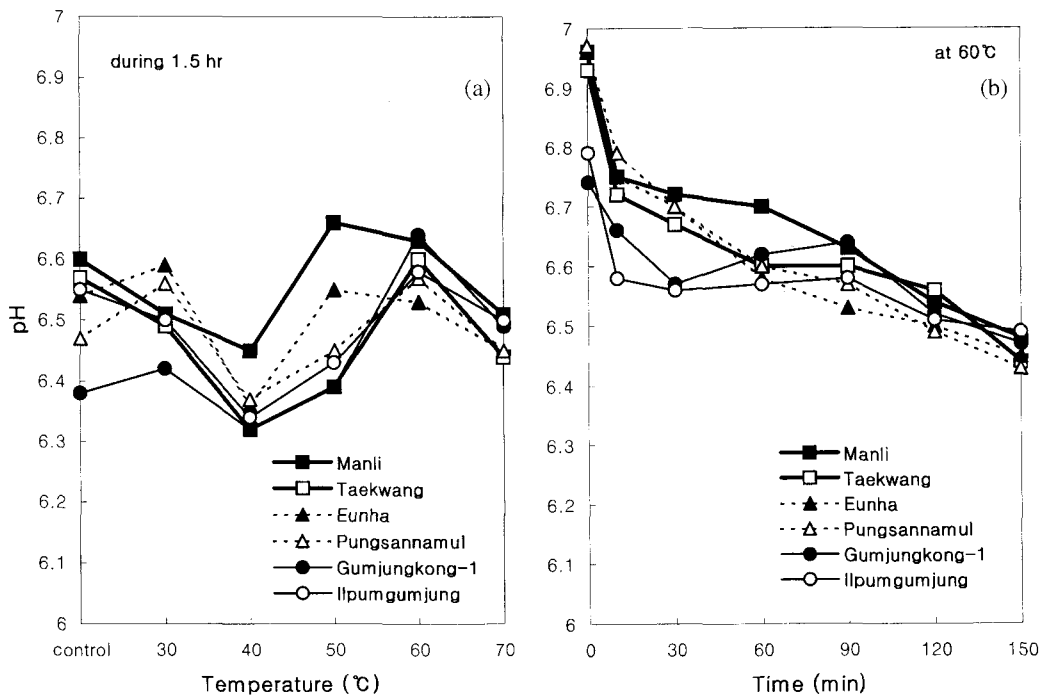


Fig. 1. Changes in pH of soaking water during soaking of soybeans (a) at various temperatures for 1.5 hr (control: 20°C), and (b) for various periods in 60°C water. Errors of the measurements were smaller than symbol size of figure.

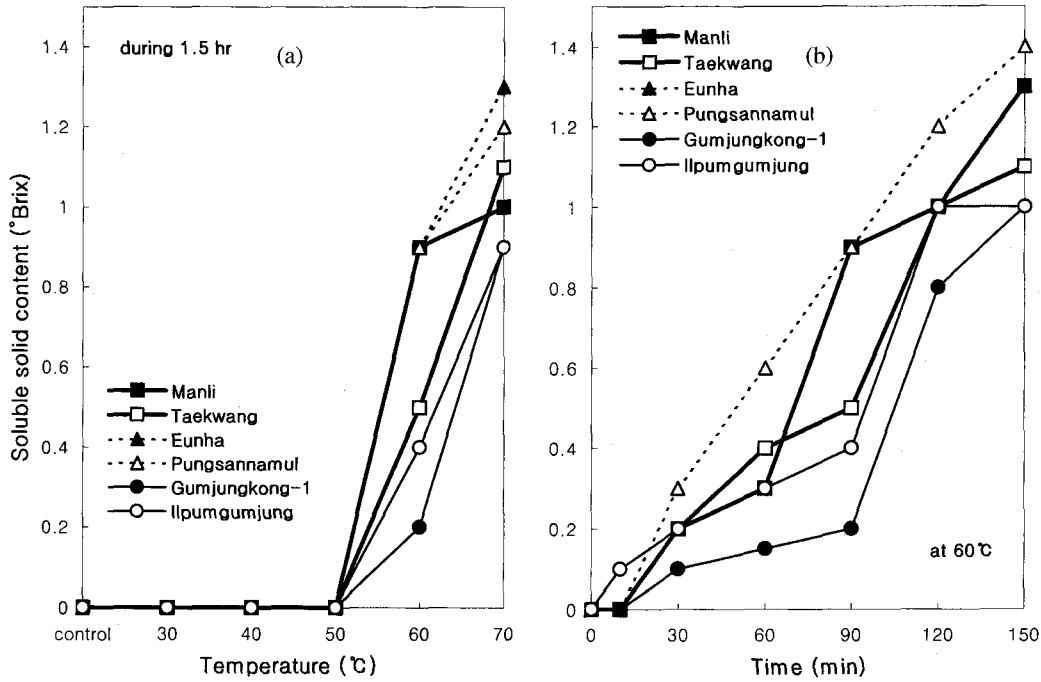


Fig. 2. Changes in soluble solid contents of soaking water during soaking of soybeans (a) at various temperatures for 1.5 hr (control: 20°C), and (b) for various periods in 60°C water. Errors of the measurements were smaller than symbol size of figure.

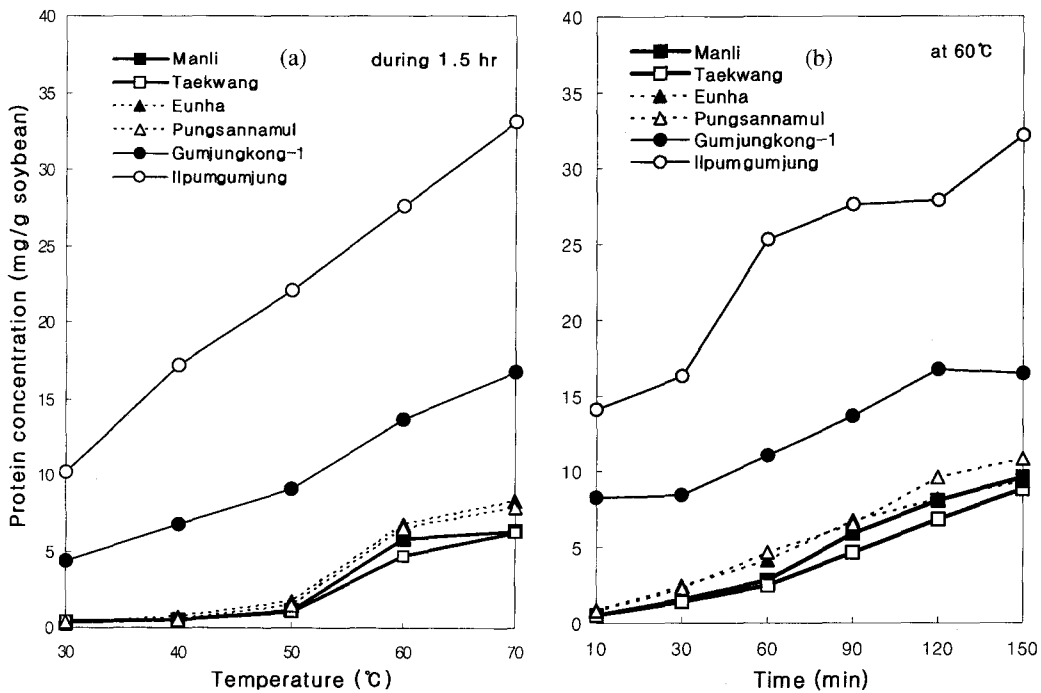


Fig. 3. Changes of protein contents in soaking water during soaking of soybeans (a) at various temperatures for 1.5 hr (control: 20°C), and (b) for various periods in 60°C water. Errors of the measurements were smaller than symbol size of figure.

다. 열처리 시간에 따른 60°C에서의 가용성 고형물 함량은 (Fig. 2b) 풍산나물의 경우 시간에 비례적인 증가경향을 보였으며 다른 대두 품종들은 90~120분에서 가장 큰 당도의 증가를 보였고 이 후에는 완만한 증가율을 보였다. 나물 품종이 가용성 고형물의 용출이 많은 반면 밥밀콩인 검정콩과 일품검정은 상대적으로 낮은 용출정도를 나타내었다.

단백질 농도

장려품종 대두를 온도와 시간에 따라 열처리를 달리한 후 침지액의 단백질 농도 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 검정콩1호와 일품검정을 제외한 네 가지 대두시료들은 50°C까지 완만한 증가를 나타내다가 60°C에서 약 5배 정도로 단백질함량이 갑자기 증가하여 태광 4.66, 만리 5.85, 풍산나물 6.64,

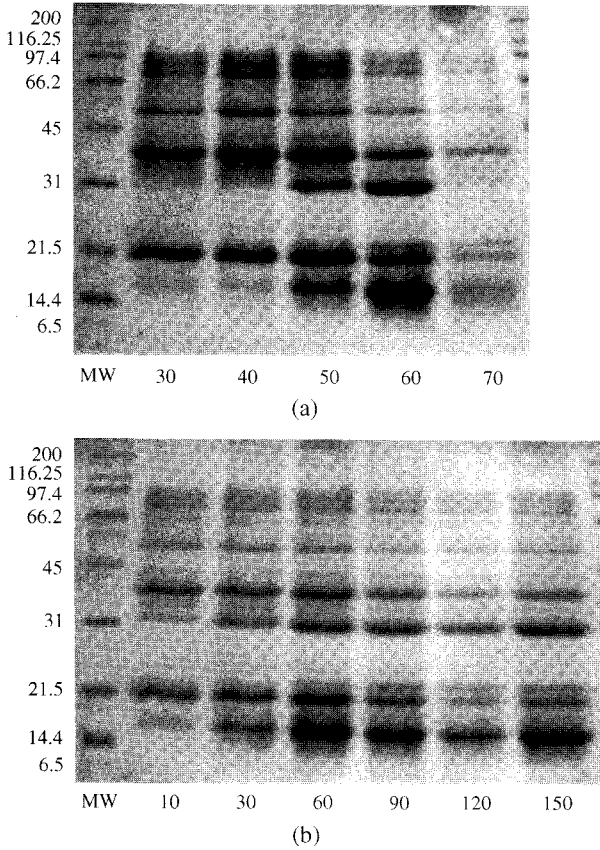


Fig. 4. SDS-PAGE of proteins released from soybean var. *Gumjungkong-1* during soaking (a) at temperatures of 30, 40, 50, 60 and 70°C for 1.5 hr, and (b) in 60°C water for various periods from 10 min to 150 min.

은하 6.76 mg/g의 단백질 농도를 나타내었으며 70°C에서도 60°C와 비슷한 단백질 농도를 나타내었다. 검정콩1호와 일품검정은 다른 품종들에 비해 단백질 용출량이 월등히 많아 30°C에서 90분 후에 각각 4.36과 10.18 mg/g을 나타내었고 열처리 온도에 따라 비례적으로 증가하여 70°C에서 90분 후에는 일품검정이 33.10 mg/g으로 최고의 용출량을 나타내었고, 검정콩1호는 대두 1g당 16.76 mg의 단백질 용출량을 나타내었다(Fig. 3a). 60°C에서 열처리 시간을 달리하였을 때 모든 대두에서 60분 이후부터 단백질의 용출량이 증가하기 시작하였으며 일품검정은 검정콩1호의 2배 정도의 용출량을 나타내었다(Fig. 3b). 10분 후에 만리는 0.49, 태광 0.50, 은하 0.86, 풍산나물 0.78, 검정콩 1호 8.26, 일품검정 14.09 mg/g의 용출량을 나타내었다가 90분 후에는 만리 5.92, 태광 4.66, 은하 6.76, 풍산나물 6.54, 검정콩1호 13.67 및 일품검정 27.61 mg/g으로 증가하였다. 열처리 시간에 관계없이 장류용 품종 < 나물용 품종 < 밥밑용 품종의 순서로 단백질 용출량이 많음을 알 수 있어 가장 가용성 고형물 용출량이 적었던 밥밑용의 검정콩 두 가지가 가장 높은 단백질 용출량을 나타내었다. 이 등⁽¹⁴⁾의 연구보고에 의하면 대두의 침지시간과 침지온도에 따라 단백질 변화를 살펴본 결과, 30°C와 50°C에서 2시간 침지한 경우 약 4 mg/g에서 7~8 mg/g으로 단백질 용출량이 증가하였는데 이 수치는 본 실험의 검정콩1호와 비슷하였으며 침지시간과 침지온도가 증가할수록 용출

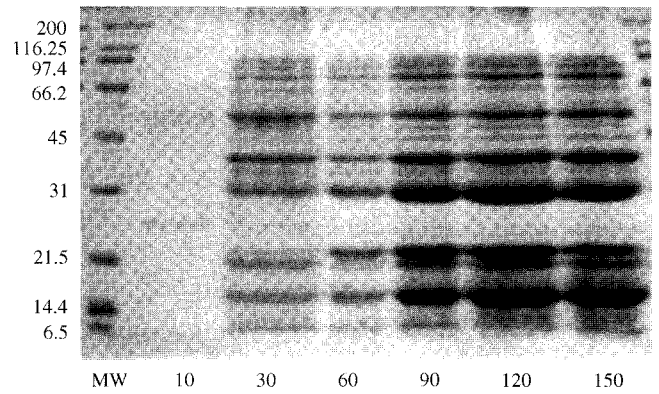


Fig. 5. SDS-PAGE of proteins released from soybean var. *Manli* during soaking in 60°C water for various periods from 10 min to 150 min.

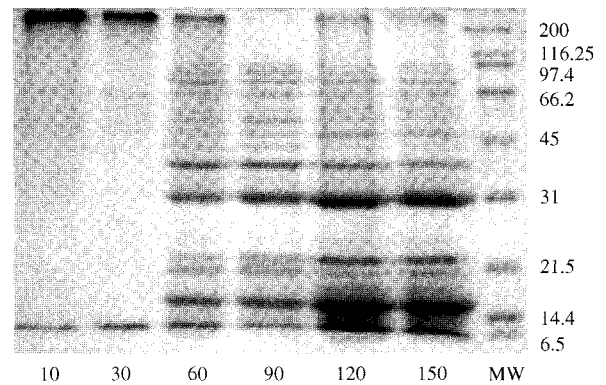


Fig. 6. SDS-PAGE of proteins released from soybean var. *Eunha* during soaking in 60°C water for various periods from 10 min to 150 min.

량이 증가하는 유사한 경향을 나타내었다.

대두 단백질의 전기영동 특성

장려품종 대두 세 가지를 온도와 시간에 따라 열처리한 다음, 침지액을 분리하여 동결건조한 후 전기영동을 통해 단백질 변화를 조사한 결과는 Fig. 4(검정콩 1호), Fig. 5(만리), Fig. 6(은하)과 같았다. SDS-PAGE 표준 분자량 단백질로는 myosin(200 kDa), β -galactosidase(116.25 kDa), phosphorylase b(97.4 kDa), bovine serum albumin(66.2 kDa), ovalbumin(45 kDa), carbonic anhydrase(31 kDa), soybean trypsin inhibitor(21.5 kDa), lysozyme(14.4 kDa)과 aprotini(6.5 kDa)을 사용하였다. 대두 단백질의 SDS-PAGE 결과는 Kagawa 등⁽¹⁵⁾, 박 등⁽¹⁶⁾ 및 김 등⁽¹⁷⁾의 결과를 종합하면, 7S globulin은 β -conglycinin(α -72.4 kDa, α' -83.2 kDa, β -50.2 kDa), γ -conglycinin과 basic 7S globulin(HMWS: 32.2 kDa, LMWS: 18.2 kDa)으로 분리되며, 11S globulin(glycinin)의 경우 acidic polypeptide(36.7 kDa)와 basic polypeptide(21.7 kDa)로 분리되었다. 본 연구 결과의 경우(Fig. 4~6), 전체적인 단백질의 분자량을 살펴보면 대략 81.8~85.7, 70.9~74, 51~52.9, 38~40, 29.8~31, 21.9~22.4, 20~20.7, 15.3~17 kDa에서 분리대가 나타났고 큰 것부터 차례대로 α , α' , β 의 conglycinin, glycinin의 acidic polypeptide, basic 7S globulin의

HMWS, unknown, basic polypeptide(glycinin), LMWS(basic 7S globulin)으로 추정할 수 있다. Petruccelli와 Anon⁽¹⁸⁾ 연구의 분리대두단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과 분획으로 나타난 단백질의 분자량이 본 실험과 비슷함을 알 수 있었다.

밥밀용 검은콩인 검정콩 1호의 경우 30~70°C에서 90분 동안 열처리한 후 침지액에 용출된 단백질을 분리한 결과 Fig. 4a에서 볼 수 있듯이 온도의 증가에 따라 새로운 단백질 분리대가 나타남을 알 수 있다. 30°C의 pattern은 열처리를 하지 않고 상온에서 90분 침지한 후의 대두단백질의 전기영동 결과(data 미제시)와 차이가 없어서 이 결과를 열처리 전의 결과로 볼 때, 이에 비해 50°C와 60°C 열처리 시료는 새로운 2개(31.1, 16.4 kDa) 단백질 분획이 두드러지게 나타났음을 관찰할 수 있었다(70°C 시료는 단백질 농도가 너무 높아 10배 희석하여 주입한 결과임). Kagawa 등⁽³⁾은 대두를 60°C에서 2시간 열처리한 후 전기영동한 결과 전체 대두의 약 3%를 차지하던 basic 7S globulin이 열처리 후에 5%까지 증가하여 열처리 동안 새로운 단백질이 합성되었다고 보고하였고. 또한 Hirano 등⁽¹⁹⁾은 60°C에서 여러 가지 두류를 열처리한 결과 대두에서 basic 7S globulin에 속하는 단백질인 Bg 27000(27 kDa)과 Bg 16000(16 kDa)를 분리하여 아미노산 조성과 배열순서를 분석하여 열처리에 의해 새로이 합성되어 용출된 열충격 단백질(heat shock protein, HSP)의 일종임을 보고하였다. 60°C에서 열처리 시간을 증가시키면서 용출되는 대두단백질을 분리한 결과(Fig. 4b) 시간이 증가함에 따라 2개(31.1, 16.4 kDa)의 새로운 단백질이 다른 단백질 보다 더 뚜렷하게 증가하는 것을 볼 수 있다.

장류용 품종인 만리의 결과(Fig. 5)에서도 온도에 따라 약 16 kDa와 31 kDa 분자량의 단백질이 증가하였으며 60°C에서 시간에 따른 단백질 용출 결과를 살펴보면 30분 이후부터 전체 용출단백질양이 급격하게 증가하며 특히 16, 22, 31 kDa 분자량의 단백질이 다른 단백질보다 더 많이 증가하였음을 알 수 있다. Fig. 6은 나물콩 품종인 은하의 전기영동 결과로 60°C에서 60분 이후 단백질 분리대가 뚜렷하게 나타나기 시작하여 열처리 시간이 증가할수록 약 16 kDa와 31 kDa의 단백질이 많이 증가됨을 볼 수 있다. 실험 방법에서 서술하였듯이 전기영동에 주입된 시료는 온도와 시간에 따라 열처리 한 후 침지액을 동결건조하여 분말의 일정량을 SDS-PAGE sample buffer에 녹여 주입한 것으로 단백질 외에 다른 가용성 화합물도 건조시료에 함유되어 있을 것이므로 각 시료마다 단백질양이 같지는 않으며 용출되는 단백질양이 많을수록 분리대가 진해지는 것으로 세 가지 품종 모두에서 온도가 70°C까지 증가함에 따라, 그리고 60°C에서 열처리 시간이 증가함에 따라 전체 단백질 용출양이 증가하였고, 특히 약 16 kDa와 31 kDa 크기의 단백질이 증가하였음을 알 수 있었다.

요 약

열처리에 의한 대두 단백질의 용출 변화를 조사하기 위하여 만리, 태광, 은하, 풍산나물, 검정콩 1호와 일품검정의 6 가지 장류품종 대두를 온도와 시간에 따라 열처리를 달리하여 침지액의 pH와 가용성 고형물함량과 단백질 특성을 살펴

보았다. 60°C에서 90분 동안 열처리 후 침지액의 pH는 열처리 전보다 높았으며 60°C에서 열처리 시간이 증가함에 따라 pH는 감소하였다. 침지액의 가용성고형물 함량은 열처리 온도에 따라서 50°C 이후 급격한 증가를 보였으며, 열처리 시간에 따라서 용출량의 증가를 보였다. 다른 대두에 비해 풍산나물과 은하의 경우 시간에 따라 비례적인 증가경향을 보였으며 검정콩 1호와 일품검정은 낮은 당도를 나타내었다. 단백질함량은 열처리 온도와 시간이 증가함에 따라 증가하였는데 검정콩1호와 일품검정은 다른 대두에 비해 각각 2배와 4배 정도 높은 단백질 농도를 나타내었다. 검정콩1호, 만리 및 은하 품종의 SDS-PAGE 특성은 모든 대두에서 비슷한 분리대를 보였다. 열처리 온도가 증가함에 따라 전체적으로 단백질 용출량이 증가하였고, 50°C 및 60°C에서 대략 31 kDa와 16 kDa의 새로운 단백질이 뚜렷하게 증가하였다. 열처리 시간이 증가함에 따라서도 단백질 용출량은 증가하였고 새로운 단백질 분획은 다른 단백질 보다 용출량이 더 증가하였다. 선행연구와의 비교로 열처리에 의해 나타난 31 kDa와 16 kDa의 단백질은 장류품종 대두에서 합성된 열충격 단백질(heat shock protein, HSP)이 용출된 것으로 판단하였다.

문 헌

1. Liu, K. Expanding soybean food utilization. *Food Technol.* 54: 46-58 (2000)
2. Chung, D.H. *Science of Soybean*. Daekwang-Seolim, Seoul, Korea (1999)
3. Derbyshire, E., Wright, D.J. and Boulter, D. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry* 15: 3-10 (1976)
4. Hirano, H., Kagawa, H., Kamata, Y. and Yamauchi, F. Structural homology among the major 7S globulin subunits of soybean seed storage proteins. *Phytochemistry* 26: 41-45 (1987)
5. Thanh, V.H. and Shibasaki, K. Beta-conglycinin from soybean proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 490: 370-384 (1977)
6. Sato, W., Kamata, Y., Fukuda, M. and Yamauchi, F. Improved isolation method and some properties of soybean gamma-conglycinin. *Phytochemistry* 23: 1523-1527 (1984)
7. Yamauchi, F., Sato, K. and Yamauchi, T. Isolation and partial characterization of a salt extractable globulin from soybean seeds. *Agric. Biol. Chem.* 48: 645-649 (1984)
8. Vierling, E. The roles of heat shock proteins in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.* 42: 579-620 (1991)
9. Mansfield, M.A. and Key, J.L. Synthesis of the low molecular weight heat shock proteins in plants. *Plant Physiol.* 84: 1007-1017 (1987)
10. Jinn, T.L., Yeh, Y.C., Chen, Y.M. and Lin, C.Y. Stabilization of soluble proteins in vitro by heat shock proteins-enriched ammonium sulfate fraction from soybean seedlings. *Plant Cell Physiol.* 30: 463-469 (1989)
11. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Malia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, F.H., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85 (1985)
12. Laemli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970)
13. Varriano-Marston and De Omana, E. Effects of sodium salt solutions on the chemical composition and morphology of black beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Sci.* 44: 531-537 (1979)
14. Lee, Y.H., Jung, H.O. and Rhee, C.O. Solids loss with water uptake during soaking of soybeans. *Korean J. Food Sci. Technol.* 19: 492-498 (1987)
15. Kagawa, H., Hirano, H., Tomotake, M. and Kikuchi, F. A seed

- protein induced by heat treatment in soybean (*Glycine max (L.)*).
Food Chem. 48: 159-163 (1993)
16. Park, Y.G., Park, B.D. and Choi, K.S. Changes in ultrastructure of tissues, characteristics of protein and soybean curd yield with increased soaking time during soybean curd processing. J. Korean Soc. Food Nutr. 14: 381-386 (1985)
17. Kim, J.G., Kim, S.K. and Lee J.S. Fatty acid composition and electrophoretic patterns of protein of Korean soybeans. Korean J. Food Sci. Technol. 20: 263-271 (1988)
18. Petrucci, S. and Aon, M.C. pH-induced modifications in the thermal stability of soybean protein isolates. J. Agric. Food Chem. 44: 3005-3009 (1996)
19. Hirano, H., Kagawa H. and Okubo, K. Characterization of proteins released from legume seeds in hot water. Phytochemistry 31: 731-735 (1992)

(2003년 8월 3일 접수; 2003년 9월 15일 채택)