

단백소재 첨가물로서의 효소분해 대두 단백질의 특성

채희정* · 인만진 · 김민홍

(주)미원 중앙연구소

초 록 : 단백질 분해효소를 이용하여 대두 단백질 가수분해물을 제조하여 물리화학적 특성과 응용 가능성을 조사하였다. 단백질 함량이 60%이고, 가수분해도가 50%인 탈지대두박 분해물은 조미 소재의 기본 베이스로 사용하기에 적합하였고 이를 마일러드 반응시키고 조미하여 풍미를 향상시킨 가수분해물은 효소분해 간장 및 복합조미료의 원료로 사용 가능하였다. 대두분리단백의 가수분해물은 단백질 함량이 85%이며 평균 분자량이 250내외로서 환자식, 유아식, 스포츠 영양 등의 저알러지 단백질원으로 적합하였다. 효소분해HVP의 염 함량은 2%이내로서 다른 원료와의 배합 사용량에 제한을 주지 않으면서 고 단백질 제품의 개발을 용이하게 하였다. 대두박 분해의 부산물로 30%의 단백질 함량과 21%의 섬유소를 갖는 부산물이 생성되었으며 이는 식이섬유원, 보습제 또는 증량제로서의 응용 가능성이 있었다.(1997년 6월 11일 접수, 1997년 7월 24일 수리)

서 론

일반적으로 혼합간장, 소스류 등 가공식품의 원료 및 첨가물로 널리 사용되는 가수분해 식물성 단백질(hydrolyzed vegetable protein, HVP)은 탈지대두를 산으로 가수분해하여 맛은 강하나 산분해 과정에서 바람직하지 못한 부산물이 형성되고 중화과정에서 다량의 염(salt)이 형성되는 단점이 있다. 또한 탈지 대두박에 함유된 여러 가지 물질들이 고온, 강산의 조건에서 상호 반응하여 많은 불순물을 만드는 것으로 알려져 있다. 그 중에는 탈지 대두박에 잔류하는 글리세린이 염산과 반응하여 생성되며 발암 물질로 유해성 논란이 있는 3-chloro-1,2-propanediol (MCPD)과 1,3-dichloro-2-propanol (DCP)도 포함되어 있다.¹⁾ 양조간장은 이와 같은 불순물이 없는 대신 미생물 발효에 의한 장기간의 숙성 과정과 이에 필요한 부대 설비를 필요로 하는 단점을 갖고 있다. 최근 들어 산분해 HVP의 유해 논쟁이 일어나면서 기존의 산분해 HVP내의 MCPD와 DCP의 함량을 줄이기 위한 연구 및 산분해법 대신 효소분해법을 이용하여 HVP를 제조하는 방법에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.^{2,3)}

식물성 단백질에 효소를 사용하여 분해하는 방법은 이미 많이 알려져 있으나^{4,5)} 대부분 발효 배지의 제조⁶⁾ 또는 저알러지의 단백질 소재의 개발⁷⁾과 관련되어 있고 조미료나 간장의 제조를 위한 예는 매우 드물다. 식품에 특별한 영양 손실 없이 우수한 functional property를 부여하기 위해 식품 단백질에 단백질 분해효소를 작용시키기도 한다.^{8,9)} 이러한 효소분해법에 의해 제조되는 효소분해 HVP(enzymatically hydrolyzed vegetable protein: eHVP)는 기존 산분해 HVP에 비하여 간장 특유의 풍미가 약하고 낮

은 가수분해도로 말미암아 제품의 침전 및 쓴 맛이 생기는 단점이 있다. 이러한 효소분해법의 단점을 보완하여 유리 아미노산의 함량이 높으며 쓴 맛이 덜한 효소분해HVP가 개발된 바 있으며¹⁰⁾ 본 연구에서는 이러한 효소분해HVP의 이화학적 특성 분석을 통해 식품첨가물로서의 응용 가능성을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

단백질 원료 및 재료

가수분해에 사용된 단백질 원료로서 탈지대두박(defatted soy flake)과 분리대두단백(isolated soy protein, ISP)은 각각 동방유량(한국) 및 Purina(St. Louise, MO, USA)로부터 구하였고 단백질 분해효소는 Novosa(Denmark)의 *Bacillus licheniformis* 유래의 Alcalase와 *Aspergillus oryzae* 유래의 Flavourzyme을 사용하였다. HPLC 및 GPC 분석 용매(acetonitrile, methanol)는 Merck사(Darmstadt, Germany)로부터 구입사용하였으며, 마일러드 반응 및 조미에 사용한 시약들은 식품 등급으로, 기타의 시약들은 시약 특급 혹은 일급의 것으로 사용하였다.

가수분해물의 제조

단백질의 가수분해는 임 등¹⁰⁾의 방법에 의해 실시하였다(Fig.1). 단백질 원료인 탈지 대두박(단백질 함량, 45%) 15 kg을 1 mm의 체(screen)를 장착한 Alpine 250 miller(Alpine Augsburg, Germany)로 분쇄한 다음 135 kg의 수도수에 현탁시켰다. Hydrolysate II의 경우에는 ISP(단백질 함량, 95%)가 분말 형태로 공급되므로 별도의 분쇄 과정 없이 동일한 중량비(1:9)로 수도수에 현탁하였다. 현탁된 단백

찾는말 : soybean, soy protein hydrolysate, hydrolyzed vegetable protein, physicochemical properties

*연락처

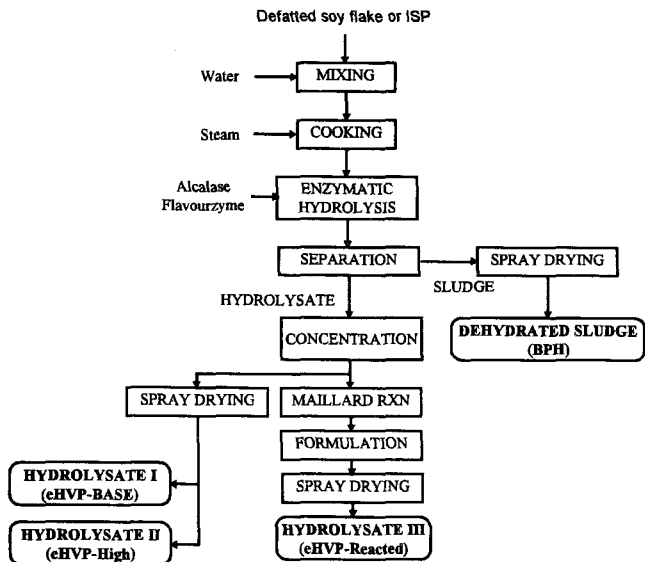


Fig. 1. Process diagram for the production of enzymatically hydrolyzed vegetable proteins.

질 원료를 120°C에서 10분간 스팀으로 가열 처리 후 냉각시켰다. 30% NaOH를 이용하여 pH를 7.5로 조절한 다음, 반응 용액의 단백질 농도 기준으로 0.5%(w/w)의 Alcalase와 0.25%(w/w)의 Flavourzyme을 첨가하여 55°C에서 4시간 동안 1차 가수분해하였다. 1차 가수분해 후 pH를 5.0으로 조절하고 Flavourzyme을 0.25%(w/w)되도록 첨가한 다음 4시간 동안 2차 가수분해하였다. 가용성 가수분해물의 회수는 PCI사(England)의 한외여과시스템(MW cut-off=100,000)을 이용하였고, 여과된 액을 50-60°C에서 감압 농축, 분무 건조하여 Hydrolysate I(eHVP-Base)과 II(eHVP-High)을 제조하였다. 분무 건조 조건은 유입 온도가 180°C, 유출 온도가 80°C이었다. 탈지 대두박의 가수분해물인 Hydrolysate I(eHVP-Base)의 건조 전 농축액을 갖고 마일러드 반응(Maillard reaction) 및 조미하여 Hydrolysate III(eHVP-Reacted)를 제조하였다. 고품분 기준으로 30° Brix되도록 농축된 Hydrolysate I에 중량 기준으로 0.5% 자일로스(xylose), 1% 포도당(dextrose), 0.5% 글리신(glycine)을 첨가하고 스팀 재킷이 부착된 반응조에 넣고 90°C에 도달할 때까지 가열하였다. 90°C에 도달한 후 동일 온도에서 30분간 반응을 진행시킨 후 반응액에 중량 기준으로 0.84% 모노소듐글루탐산(monosodium glutamic acid, MSG), 0.04% 이노신모노포스페이트(inosine monophosphate, IMP), 5% 식염을 첨가하면서 자연 냉각하에 교반하였다. Hydrolysate II와 III의 경우도 동일한 방법으로 분무 건조하였다.

탈지 대두박으로부터 효소분해 후 한외여과를 거쳐 유용 단백질(Hydrolysate I)이 분리되고 남은 슬러지(sludge)도 동일한 방법으로 분무 건조하였고 이를 BPH(byproduct of protein hydrolysate)로 명명하였다.

분석 방법

가수분해도(degree of hydrolysis, DH)와 유리 아미노산

함량은 각각 TNBS법¹¹⁾ 및 OPA법¹²⁾에 의해 분석하였고 분자량 분포는 GPC법¹³⁾에 의해, 단백질 함량(총 질소 함량x 6.25)은 총 질소(TN)를 킬달기를 이용하여 정량함으로써 분석하였다.¹⁴⁾ 일반 성분 분석은 AOAC법¹⁵⁾에 준하여 실시하였다. 수분결합력(water binding capacity)은 김 등¹⁶⁾의 방법에 의해 측정하였다.

결과 및 고찰

가수분해물의 제조

일반적으로 효소분해법으로 제조되는 HVP는 산분해 HVP나 양조 간장에 비해 가수분해도와 유리 아미노산의 함량이 낮아 풍미가 약하고 유기산 등의 향미 성분이 존재하지 않아 우수한 관능적 성질을 갖기 어렵다.²⁾ 본 연구에서는 이를 보완하기 위해 효소분해로 얻은 Hydrolysate I(eHVP-Base)에 마일러드 반응을 시키고 조미하여 Hydrolysate III(eHVP-Reacted)를 제조하였다. 이 때 마일러드 반응 시간이 미각에 미치는 영향을 조사하였다. 사용한 관능검사 방법은 특성묘사시험(descriptive test)로서 6명의 panel원이 시료에 대한 특성을 묘사 기술하는 방식이었다. 90°C 도달 후 경과 시간이 0, 15, 30, 40분이 지난 후 미각적 특성을 살펴 본 결과 0분 경과 후 얻은 시료는 강한 대두취를, 15분 경과 시료는 초기에 강하고 날카로운 풍미를 보였으며, 45분 경과 시료는 부드러운 맛을 보였으나 탄 맛이 감지되었다. 따라서 마일러드 반응 시간을 30분으로 결정하였다. Hydrolysate II(eHVP-High)의 경우 고 단백질인 ISP(단백질 함량, 95%)를 가수분해함으로써 유아식, 환자식, 스포츠 음료 등의 영양보급원 및 용해도가 높은 고 단백질 소재로서의 용도 개발을 위해 제조하였다. BPH는 Hydrolysate I의 가수분해 공정 후 남은 미분해 부산물로서 대두박 유래의 식이섬유원을 다량 함유하고 있어 스낵 및 제과류의 식이섬유 소재, 냉동식품의 보습제, 증량제로서의 용도를 위해 제조하였다.

이상의 방법으로 제조한 효소분해 산물들의 MCPD와 DCP의 함량을 채 등¹⁷⁾의 방법에 의해 분석한 결과 두 물질이 전혀 검출되지 않았다.

물리화학적 물성 분석

Table 1은 앞서 제조한 세 종류의 가수분해물에 대하여 단백질, 염 함량, 분자량 분포 등을 조사한 결과이다. 가수분해물의 종류에 따라 상이한 단백질 함량을 보였는데 단백질 함량이 45%인 탈지 대두박의 가수분해물인 Hydrolysate I(eHVP-Base)의 경우 60%의 단백질 함량을 갖으며, Hydrolysate I을 갖고 마일러드 반응 및 조미 과정을 거쳐 제조된 Hydrolysate III(eHVP-Reacted)는 Hydrolysate I(eHVP-Base) 보다 낮은 40%의 단백질 함량을 얻을 수 있었다. Hydrolysate II(eHVP-High)는 원료 단계에서부터 단백질 함량이 높은 ISP를 가수분해함으로써 높은 단백질 함량(85%)을 얻을 수 있었다.

가수분해도는 가수분해된 펩타이드의 백분율로서 효소분

Table 1. Comparison of properties of enzymatically hydrolyzed soy proteins

Properties	Hydrolysate I (eHVP-Base)	Hydrolysate II (eHVP-High)	Hydrolysate III (eHVP-Reacted)
Moisture	7.5	7.8	7.7
Protein(%)	60	85	40
Ash(%)	8	6	30
Salt(%)	1.9	1.5	15
DH(%)	50	53	50
Bulk density(g/ml)	0.3	0.3	-
Average MW	300	250	300
MW over 1000	-	<15%	-

해의 척도로 사용된다.¹⁶⁾ 본 연구에서는 endoprotease와 exoprotease의 혼합 사용으로 50% 이상의 높은 가수분해도를 얻을 수 있었으며 분자량 분포 분석(Fig.2)을 통해 평균 분자량이 250-300임을 알 수 있었다. 이로부터 본 연구에서 제조한 단백질 가수분해물들은 유리 아미노산을 비롯하여 펩타이드 chain length가 비교적 작은 단백질로 구성되어 있음을 알 수 있었다. 특히 Hydrolysate II 중에는 분자량이 1000을 넘는 펩타이드의 분율이 15%를 넘지 않았으며 SDS-PAGE 실험 결과 6000이상의 펩타이드가 존재하지 않는 것으로 나타나 유아식이나 병원식의 저 알러지 단백질원으로 사용하기에 적합한 것으로 나타났다(데이터 제시 생략).

Table 1에서 보는 바와 같이 Hydrolysate I과 II의 염 함량은 1.5-1.9%로서 이는 원료 자체로부터 직접, 또는 효소 반응 전후 pH 조절용으로 사용된 NaOH와 HCl로부터 유래하는 것으로 조미 소재로서 다른 원료와의 배합에 제한을 주지 않는 특성이라 할 수 있다. Hydrolysate III의 경우는 조미 과정에서 식염을 사용함으로써 염 함량이 15%로 검출되었으며 이는 식염 사용량의 자유로운 조절이 가능하다는 특징을 갖고 있다.

Hydrolysate III는 마일러드 반응 및 조미 과정을 거쳐 풍미

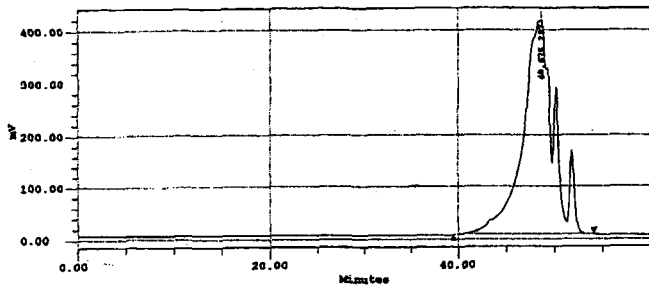


Fig. 2. Molecular weight distribution of Hydrolysate I.

Table 3. Amino acids composition of eHVP-related products

Amino acid	Hydrolysate I(eHVP-Base)	Hydrolysate II(eHVP-High)	Hydrolysate III(eHVP-Reacted)	BPH
	Free amino acid(%)			Total amino acid(%)
Alanine	0.8	1.2	0.6	1.4
Arginine	1.9	1.9	1.0	2.0
Asparagine	1.3	1.8	0.7	-
Aspartic acid	1.1	1.0	0.5	2.9
Glutamic acid	2.1	3.2	3.2	4.5
Glutamine	0.5	1.2	0.1	-

가 향상되었으며 이는 단독 또는 양조간장과 혼합되어 효소 분해간장 및 복합조미료 기본 베이스로 사용될 수 있었다.

단백질 가수분해의 부산물인 BPH의 일반 성분을 분석한 결과(Table 2), 단백질 함량은 30%로 비교적 낮은 반면 탄수화물 함량이 높고 특히 섬유소가 21% 함유되어 있다. 이는 단백질 가수분해효소에 의해 가용화 되지 못하는 일부 단백질과 탄수화물 등 불용성 물질이 회수된 결과로 보인다. 이 BPH는 가수분해 과정의 부산물이지만 제조과정에서 산이나 유기용매 등의 유해 물질을 사용하지 않았고 탈지대 두박에 함유되어 있는 탄수화물이 주성분으로서 식품으로서도 효용 가치가 있다고 판단되었다. BPH의 수분결합력(water binding capacity)를 측정한 결과(Table 2) 8.0 g H₂O/g-BPH로서 11.71 g H₂O/g의 수분결합력을 보이는 gum carrageenan¹⁶⁾에 다소 못 미치지만 비교적 높은 수준의 보습 효과를 갖는 것으로 밝혀졌다. 구약감자 glucomannan과식이섬유 음료에 널리 사용되는 폴리덱스트로스(polydextrose)의 수분결합력은 각각 18.15, 0.69 g H₂O/g이다.¹⁶⁾ 따라서 제과, 제빵, 제면, 냉동식품 등의 수분 보습제로서의 응용 가능성이 매우 높은 것으로 판단되었다. 또한 직접 제과, 제빵의 식이섬유원으로 사용하거나 적절한 처리에 의해 가용화시켜 음료 등의 천연 식이섬유원으로 응용이 가능할 것으로 보인다.

가수분해물 및 부산물의 유리 아미노산 또는 총 아미노산 함량을 분석한 결과 Hydrolysate I(18.5%)에 비해 Hydrolysate II가 높은 수준(26.0%)의 유리 아미노산을 함유하는 것으로 나타났다(Table 3). Hydrolysate I은 상용화되어 있는 산분해 HVP(~20-25%)보다 낮은 수준의 유리 아미노산 함량을 갖는 것으로 나타났는데 이는 가수분해도가 산분해HVP에 비하여 낮기 때문인 것으로 보인다. 고온과

Table 2. Proximate analysis results, mineral contents and physical properties of the dehydrated sludge(BPH).

Protein(%)	30
Moisture(%)	5.82
Crude Ash(%)	3.2
Crude Fiber(%)	21
Carbohydrate(%)	38
Calcium(%)	0.43
Phosphorus(%)	0.50
Sodium(%)	0.09
Potassium(%)	0.69
Bulk density(g/ml)	0.43
Water binding capacity(gH ₂ O/g)	8.0
Color	light yellow

Table 3. Continued

Amino acid	Hydrolysate I(eHVP-Base)	Hydrolysate II(eHVP-High)	Hydrolysate III(eHVP-Reacted)	BPH
	Free amino acid(%)			Total amino acid(%)
Glycine	0.3	0.4	1.5	1.4
Histidine	0.5	0.7	0.3	1.0
Isoleucine	2.5	2.0	0.7	1.8
Lysine	1.2	0.1	-	1.9
Leucine	-	4.3	1.6	2.9
Methionine	0.3	0.5	0.2	-
Phenylalanine	1.6	2.7	1.0	1.7
Serine	1.0	0.8	0.3	1.5
Threonine	0.8	1.4	0.5	1.2
Tryptophan	0.4	0.5	1.0	-
Tyrosine	1.0	0.2	0.1	1.0
Valine	1.2	2.1	0.8	1.9
Total	18.5	26.0	14.1	27.1

- : Not detected.

강산 조건의 산분해HVP제조 조건에서는 가수분해물 중에 glutamine이 존재하기 어려운 반면 효소분해HVP에서는 glutamine이 분해되지 않고 검출되었다(0.5-1.2%). 이것은 효소분해HVP가 갖는 또 다른 특징 중의 하나이다.

감사의 글

본 연구는 덴마크의 NOVO사(NOVO Nordisk A/S)와의 공동 연구로 진행된 것으로 Mr. Klaus Pommer를 비롯한 NOVO사 관계자들에게 감사 드립니다.

참고 문헌

- Ericsson, R. J. and G. A.Youngdale (1970) Male antifertility compounds: structure and activity relationships of U-5897, U-15,646 and related substances. *J. Repr. Fert.*, **21**, 263-266.
- Pommer, K. (1995) New proteolytic enzymes for the production of savory ingredients, *Cereal Foods World*, **40**(10), 745-748.
- Olsen, H. S. and J. Adler-Nissen (1979) Industrial production and applications of a soluble enzymatic hydrolyzate of soya protein, *Process Biochem.*, **14**(7), 6-11.
- Lahl, W. J. and S. D. Braun (1994) Enzymatic production of protein hydrolysates for food use, *Food Technol.*, **48**(10), 68-71.
- Frokjaer, B. (1994) Use of hydrolysates for protein supplementation, *Food Technol.*, **48**(10), 86-88.
- 인만진, 최경호, 임철, 유귀환, 김민홍 (1996) 대두박 효소분해물의 미생물 배양물 배지로서의 용도, 한국 공개특허 96-17840호.
- Schmidl, M. K., S. L. Taylor and J. A. Nordlee (1994) Use of hydrolysate-based products in special medical diets, *Food Technol.*, **48**(10), 77-85.
- Mahmoud, M. I., W. T. Malone and C. T. Cordle (1992)

Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties, *J. Food Sci.*, **57**(5), 1223-1229.

- Herbert, A. B. and P. Dunnill (1988) Limited modifications of soya proteins by immobilized subtilisin: comparison of products from different reactor types, *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 475-481.
- 임철, 박완수, 조윤제, 채희정, 김민홍 (1996) 식물단백질의 효소가수분해물을 함유하는 고품미, 고단백 조미료 조성물, 한국 공개특허 96-16754호.
- Adler-Nissen, J. (1979) Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolyzates by trinitrobenzenesulfonic acid, *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 1256-1262.
- Godel, H., P. Seltz and M. Verhoef (1992) Automated amino acid analysis using combined OPA and FMOC-Cl precolumn derivatization, *LC GC International*, **5**(2), 44-49.
- Richter, W. O., B. Jacob and P. Schwandt (1983) Molecular weight determination of peptides by high-performance gel permeation chromatography, *Anal. Biochem.*, **133**, 288-291.
- Hjalmarsson, S., R. Akesson (1983) Modern Kjeldahl procedure, *Int. Laboratory*, **3**, 70-76.
- AOAC (1980) In Official Methods of Analysis, 13th Ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- 김남수, 지수경, 목철균, 김승호 (1994) 구약감자 Glucomannan의 이화학적 특성, 한국식품과학회지, **26**(6), 799-804.
- 채희정, 인만진, 김민홍, 한금수 (1997) 고체상 추출에 의한 1,3-dichloro-2-propanol과 3-chloro-1,2-propanediol의 분석, 한국식품과학회지, **29**(1), 183-187.
- Adler-Nissen, J. (1986) In Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins, p. 1-8, Elsevier Applied Science Publisher, New York.

Characteristic Properties of Enzymatically Hydrolyzed Soy Proteins for the Use in Protein Supplements

Hee Jeong Chae *, Man-Jin In and Min-Hong Kim (*R&D Center, Miwon Co., Ltd, Kyoungki 467-810, Korea*)

Abstract : Enzymatically hydrolyzed vegetable protein (eHVP) was produced from soy protein using proteases, and the physicochemical properties were examined. Soy protein hydrolysate of 60% protein and 50% degree of hydrolysis was useful for the base of savory ingredients. The Maillard-reacted and flavoring compound-added hydrolysate had improved flavor. It was for enzymatically hydrolyzed soy sauces and dehydrated seasonings. ISP hydrolysate of low molecular weight (MW~250) and high protein content (85%) was suitable for special uses such as infant diets, sports nutrition, and medical diets. The eHVP gave no limitation of dosage in the formulation as a flavor enhancer. The byproduct of protein hydrolysis was found to have high content of fiber (21%) and to have potential for the use as dietary fiber or bulking agents.

Key words : soybean, soy protein hydrolysate, hydrolyzed vegetable protein, physicochemical properties

* Corresponding author