

*Bacillus subtilis*와 *Lactobacillus bulgaricus*에 의한 청국장 단백질의 용해성, 점성, 보수성 및 보유성

이진우
수원대학교 식품영양학과

Solubility, Viscosity, Water Holding Capacity, and Oil Holding Capacity of Soybean Proteins by *Bacillus subtilis* and/or *Lactobacillus bulgaricus*

Lee, Jin Woo

Dept. of Food and Nutrition, University of Suwon, Hwaseong, Korea

ABSTRACT

Soybean seeds were fermented by *Bacillus subtilis* and/or *Lactobacillus bulgaricus* to improve solubility, viscosity, water holding capacity and oil holding capacity of soybean proteins in *Chongkukjang*. The maximum colony forming unit and protease activity of *B. subtilis* or *L. bulgaricus* were observed after 60 hours of fermentation, and those of the mixed fermentation by two microorganisms were steadily increased during the fermentation periods. Solubilities of soybean proteins by *B. subtilis* or *L. bulgaricus* were steadily increased before the values were considerably increased to 60 hours of fermentation, whereas water holding capacities of the proteins were decreased by *B. subtilis* or *L. bulgaricus* and those of the mixed fermentation were decreased progressively. Viscosities of soybean proteins by *B. subtilis* and/or *L. bulgaricus* were decreased progressively during the fermentation. Viscosities of soybean proteins by *B. subtilis* and/or *L. bulgaricus* were decreased progressively during the fermentation. Oil holding capacities of soybeans by *B. subtilis* or *L. bulgaricus* were maximum at 20 or 80 hours of fermentation and those of the mixed fermentation were decreased after 10 hours of the fermentation.

Key words: soybean protein, solubility, viscosity, liquid holding capacity

I. 서론

콩은 우리나라에서 오랫동안 우리 식생활에서 장류, 두부, 두유, 콩나물 등 중요한 부분을 차지하여 왔고 값이 비교적 저렴하고 영양적으로 우

수하며 여러 가지 생리활성성분이 포함된 식품재료이다. 콩단백질은 여러 가지 식품에서 단백질 보충제와 물리적 기능성제로 이용되어 왔으나 유제품, 육제품, 수산제품 등 고가의 제품에 증량 또는 대체품(한국콩박물관건립추진위원회편 2005)

과 생물분해 가능한 식품포장재 등(Rhim & Lee 2004; Rhim et al. 2004) 적극적으로 이용하기 위하여 콩단백질의 물리적 기능성의 개선이 요구된다. 단백질의 물리적 기능성을 개선하는 물리적, 생물적, 화학적 방법중 생물적 및 효소적 방법의 장점은 반응조건이 완만하고 바람직하지 않은 반응과 부산물의 최소화, 특정부위 펩타이드 결합의 절단 등이 있다(Qi et al. 1977).

단백질 가수분해물은 영양보충과 물리적 기능성 개선이라는 면에서 중요하다. 미생물 혹은 효소에 의한 단백질의 부분적 가수분해를 통하여 가수분해물의 수용성증가(Yim & Lee 2000; Calderon De Barca et al. 2000; 이호석 등 2006), 여러 가지 기능성 변화(Yim & Lee 2000; Lee et al. 2003; Feng & Xiong 2003), 새로운 식품으로서 기능성(Feng et al 2003; 표영희 2006)이 가능하다. 이러한 기능적 특성의 변화는 주로 효소에 의한 단백질의 구조변화, 분자량감소, 친수성기의 변화 등과 같은 단백질 분자내의 변화에 의한 것으로 보인다(Kinsella 1982). 실제로 Lee(2004)는 콩단백질의 물리적 기능성을 개선하기 위하여 콩의 침지액과 청국장 발효별로 단백질의 물리적 기능성과 단백질의 분자량과 분자전하비 별로 보고하였다. Yim 과 Lee(2000)는 매주에서 유래한 미생물단백질 분해효소를 이용하여 콩단백질을 변화시켜 분자크기별로 용해성, 액체보유성, 유화성, 거품성을 조사하였다. 가수분해 조절방식으로 기질의 열처리와 다른 효소를 사용하는 방법도 제시되었고(Tsumuta et al. 2004) 가수분해를 안정적으로 높이는 열에 강한 미생물의 열저항성 효소가 보고되었다(Lee et al. 2004). 또한 두유제품 개발에 열처리와 유산균 발효 방법이 제시되기도 하였으며(LeBlanc et al. 2004) 단백질의 복합적 변형방법으로 분리대두단백을 단백질분해효소로 가수분해시킨 후 비피더스균 단독 또는 유산균으로 혼합배양하여 생균수 등이 보고 되었다(이정은·이숙영 2001). 이전 연구에도 불구하고 콩단백질을 대표적 전통발효균인 청국장균과 유산균 단독 또는 혼합배양하여 단백질분해 조절과 단백질의 물리적 기능성 조사는 미흡한 상태이다.

따라서 본 연구는 콩단백질의 기능성을 미생

물학적으로 개선하기 위하여 청국장균과 유산균을 독립 또는 혼합적으로 배양하여 발효된 콩단백질의 용해성, 점성, 보수성, 보유성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 사용균주

청국장 균주는 시판 청국장에서 *Bacillus subtilis* 균을 분리용 배지(15g soluble starch, 1g potassium phosphate, 0.1g magnesium sulfate, 1% manganese sulfate, 1% calcium chloride, 1,000cc distilled water)를 이용한 평판 배양액에 peptone water로 단계적으로 희석하여 만든 평판을 40 °C에서 2일 배양하고 0.14 I₂ 용액으로 전분을 액화시킨 무색 투명한 균체를 구하였다(고한수 등 1999). 유산균주는 시판 yoghurt를 사용하여 *Lactobacillus bulgaricus* 균을 MRS medium(10g peptone, 10g beef extract, 5g yeast extract, 20g glucose, 1g Tween 8, 2g dipotassium hydrogen phosphate, 5g sodium acetate, 2g triammonium citrate, 0.1g magnesium sulfate, 0.05g manganese sulfate, 15g agar, 1,000cc distilled water)에서 분리 사용하였다(한국식품영양학회 2000a).

2. 콩단백질의 변화

콩(진품 품종, 2006년산)를 세척후 실온에서 수돗물에 12 시간 침지하여 물을 제거한 후 250cc 삼각 flask에 250g 넣어 면전과 aluminum foil로 봉한 다음 멸균기에서 121 °C, 20 분간 멸균하였다. *B. subtilis*와 *L. bulgaricus* 균은 분리 균주 대수 증식기 상태의 배양액(10⁴ CFU/g)을 일정한 시간동안 발효시켰고 혼합배양은 납두균 혹은 유산균을 20시간 혹은 40시간 배양한 후 다른 균을 발효시켰다.

3. 생균수

*B. subtilis*의 생균수 측정은 분리용 배지를 이용한 평판법에 의하여 peptone water로 단계적으로 희석하여 만든 평판을 40 °C에서 2일간 배양

하고 0.1N I₂ 액으로 성분을 액화시키고 무색 투명한 균체를 구하였다(고한수 등 1999). *L. bulgaricus*의 생균수 측정은 송영민 등 방법(2004)에 준하였다.

4. 단백질 분해효소의 활성

발효된 콩 1g에 1% 식염수 100cc를 가하고 1시간 추출후 효소액을 Formol 측정법(한국식품영양학회 2000b)에 의하여 단백질 분해효소의 활성을 측정하였다.

5. 콩단백질의 추출

발효된 콩의 유지는 hexane으로 추출하였다(Wolf 1972). 증류수에 청국장을 5:1로 희석하고 0.1N NaOH로서 pH 8.0으로 유지시켜 수용성 성분을 얻은 다음 원심분리를 8,000xg에서 20분간 하였다. 상정액을 0.1N HCl로서 pH 4.5로 조절한 후 8,000xg, 20분간 원심분리하여 침전시켰고 이 침전물은 pH 7.0으로 즉시 조절하여 동결건조시켰다.

6. 용해도

원심분리용 tube에 분해된 콩 단백질 0.1g과 phosphate 완충용액 5cc를 가한 후 1시간 동안 흡수시키고 Vortex 교반기로 속도를 일정하게 한 다음 2분간 교반시켰다. 원심분리를 1,300xg, 10분간 한 후 상정액은 0.07M tris 완충용액(pH 6.5)으로 희석하고 아미노기를 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid(TNBS) 반응(Habeeb 1966)으로 분석하였다.

7. 점도

상대점도는 27 °C 항온수조에서 Ostwald viscometer로 측정하였다. 콩단백질 11mg를 0.07M tris 완충용액(pH 6.5)에 용해시킨 후 물의 점도와 비교한 단백질의 점도비로 하였다.

8. 보수성

처리된 콩 단백질의 용해도 측정을 위한 상정액을 제거한 다음 나머지를 평량하고 단백질 무게당 물의 무게를 포수성으로 산출하였다(Childs & Park 1978).

9. 보유성

콩 단백질의 포유성 측정도 포수성과 동일하게 하고, 다만 Tris 완충용액 대신 100% 옥수수 기름을 사용하였다(Childs & Park 1978).

10. 통계처리

실험결과는 SAS 프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 제시하였고 각 처리별 유의성은 ANOVA test후 Duncan's multiple test로 p<0.05 수준에서 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 생균수와 단백질 분해효소

생균 생장이 우수한 *Bacillus subtilis*와 *Lactobacillus bulgaricus* 균주를 분리 배양하면서 가열된 콩에 일정량 접종(104 CFU/g)하여 발효온도 40 °C와

Table 1. Colony forming units(CFU) of *Chongkukjang* by fermented by *Bacillus subtilis* and/or *Lactobacillus bulgaricus*

| Microorganism(s) | CFU(10 ⁸ /g) ¹⁾ | | | | | |
|---|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Fermentation(hours) | | | | | |
| | 10 | 20 | 40 | 60 | 80 | 120 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 4.0±0.2 ^e | 9.2±0.3 ^c | 31.8±0.6 ^b | 52.6±0.9 ^a | 36.2±0.7 ^b | 27.0±0.6 ^c |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i> | 3.3±0.2 ^f | 6.5±0.3 ^{ef} | 24.1±0.5 ^d | 35.2±0.7 ^c | 26.8±0.5 ^d | 16.4±0.4 ^d |
| <i>Bacillus/Lactobacillus</i> ²⁾ | 8.5±0.3 ^c | 7.3±0.3 ^{de} | 7.8±0.3 ^e | 8.2±0.3 ^e | 8.6±0.3 ^e | 9.2±0.2 ^f |
| <i>Bacillus/Lactobacillus</i> ³⁾ | 45.0±0.9 ^a | 45.2±0.9 ^a | 45.5±1.0 ^a | 45.6±0.9 ^b | 46.8±0.9 ^a | 47.8±0.9 ^a |
| <i>Lactobacillus/Bacillus</i> ²⁾ | 5.5±0.2 ^d | 5.8±0.2 ^f | 6.3±0.3 ^f | 7.2±0.3 ^f | 8.7±0.3 ^e | 10.2±0.3 ^e |
| <i>Lactobacillus/Bacillus</i> ³⁾ | 25.6±0.6 ^b | 26.3±0.6 ^b | 27.1±0.6 ^c | 28.3±0.6 ^d | 30.5±0.6 ^c | 31.8±7 ^b |

¹⁾ Values are mean±SE; Means with different superscript on the same column are significantly different at p<0.05.

^{2), 3)} The secondary fermentation was conducted after the primary fermentation for 20 hours and 40 hours, respectively.

상대습도 90%에서 균주(조합)별 발효시간 별로 발효된 콩의 생균수를 나타냈다(Table 1). *B. subtilis* 혹은 *L. bulgaricus* 단독배양은 발효 60시간에 높은 값을 보였으며 혼합 배양인 경우 2차 균의 수가 점차 증가하였다. *B. subtilis*가 *L. bulgaricus*보다 생균수가 높은 것은 본 실험 조건에서는 호기성 상태가 강하여 호기성균인 *B. subtilis*균 생장이 촉진된 것으로 사료된다. 발효된 콩의 pH를 조사한 결과 *B. subtilis*는 발효시간 0, 10, 20, 40, 60, 80시간에서 각각 pH 6.5, 6.3, 6.2, 6.0, 6.1, 6.1였고, *L. bulgaricus*는 발효시간 0, 10, 20, 40, 60, 80시간에서 각각 pH 6.5, 5.4, 5.3, 5.1, 4.7, 4.5였다. 따라서 *Bacillus/Lactobacillus* 조합인 경우가 *Lactobacillus/Bacillus* 조합보다 생균수가 높은 값을 나타낸 것은 *Lactobacillus*에 의한 유기산 생성이 *Bacillus* 생육에 영향을 것으로 보여 혼합배양시 가수분해를 조절하여 단백질의 선택적 가수분해할 수 있을 것이다. 한편 이정은과 이숙영(2001)은 분리대두단백질을 효소로 처리한 후 배피더스균과 유산균을 혼합배양한 결과 생균수는 더 많았다고 보고했다.

콩 단백질 분해효소 활성을 균주별 및 배양일 별로 조사한 결과 Table 2와 같다. *B. subtilis* 혹은 *L. bulgaricus* 배양인 경우 40 - 60 발효 시간까지 단백질 분해효소의 활성이 증가 하였으나, 80시간후에는 효소 역가가 감소하였다. 그러므로 청국장 배양시간은 단백질 분해의 역가로 보면

60시간이 좋으나 아노태의 증가와 장의 중량 손실로 보면 20 - 40 시간으로 판단된다. *L. bulgaricus* 균주가 *B. subtilis* 균주에 비하여 단백질 분해 활성이 낮았으며 혼합발효인 경우 중간 특성을 보였다. 한편 *L. bulgaricus* 배양인 경우 효소의 역가는 점진적으로 증가하였다. *Bacillus* 발효후 *Lactobacillus* 발효가 *Lactobacillus* 발효후 *Bacillus* 발효보다 단백질 분해효소 활성이 높은 것은 균 성장과 일치하였다.

2. 용해도와 점성

단일 균 혹은 혼합균 접종에 의한 청국장 제조중 아미노 group의 변화로 표시된 단백질의 용해도는 Table 3과 같다. 아미노 group은 40 - 60 시간까지 현저히 증가하였으나 *B. subtilis*를 제외하고는 발효시간이 더 경과하여도 증가율은 크지 않았다. *B. subtilis* 균이 *L. bulgaricus* 균보다 높은 유리아미노 group을 나타낸 것은 단백질 분해효소의 활성과 동일하였다. 동시에 *Lactobacillus* 균은 가장 낮은 유리아미노 group을 나타냈고 연속 배양인 경우에는 두 균주의 중간정도 유리아미노 group을 보였다. 혼합발효처리에서 1차 *Bacillus* 균은 1차 *Lactobacillus* 균보다 높은 유리아미노 group을 나타낸 것은 *Lactobacillus* 대사물질이 *Bacillus*의 생육을 억제한 것으로 보인다. 따라서 *Bacillus*와 *Lactobacillus*로 구성된 혼합배양 방법을 수행하면 다양한 기능성, 기호성, 소화성이 있

Table 2. Protease activities of Chongkukjang by *Bacillus subtilis* and/or *Lactobacillus bulgaricus*

| Miororganism(s) | Protease activity(unit/g) ¹⁾ | | | | | |
|---|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Fermentation(hours) | | | | | |
| | 10 | 20 | 40 | 60 | 80 | 120 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 2.3±0.1 ^e | 5.4±0.2 ^b | 15.6±0.4 ^b | 24.8±0.5 ^a | 17.6±0.4 ^a | 16.8±0.4 ^a |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i> | 1.6±0.1 ^f | 2.8±0.1 ^d | 3.2±0.1 ^e | 3.8±0.1 ^d | 5.4±0.2 ^d | 6.3±0.2 ^c |
| <i>Bacillus/Lactobacillus</i> ²⁾ | 5.3±0.2 ^b | 5.6±0.2 ^b | 5.8±0.2 ^c | 6.1±0.2 ^c | 7.8±0.2 ^b | 7.3±0.2 ^b |
| <i>Bacillus/Lactobacillus</i> ³⁾ | 14.6±0.4 ^a | 15.2±0.3 ^a | 16.5±0.4 ^a | 17.0±0.4 ^b | 17.3±0.4 ^a | 17.1±0.4 ^a |
| <i>Lactobacillus/Bacillus</i> ²⁾ | 2.6±0.1 ^d | 2.5±0.1 ^e | 2.8±0.1 ^f | 3.2±0.1 ^e | 3.7±0.1 ^e | 4.1±0.2 ^d |
| <i>Lactobacillus/Bacillus</i> ³⁾ | 3.1±0.1 ^e | 3.8±0.1 ^c | 4.6±0.1 ^d | 5.7±0.2 ^c | 6.3±0.2 ^c | 6.5±0.2 ^c |

¹⁾ Values are mean±SE; Means with different superscript on the same column are significantly different at p<0.05.

^{2), 3)} The secondary fermentation was conducted after the primary fermentation for 20 hours and 40 hours, respectively.

는 전통 발효식품 개발이 가능할 것으로 기대된다. 발효에 의한 용해도의 상승은 효소반응이 진행됨에 따라 단백질이 분해되고 그 결과 친수성 group이 증가되거나 친수 group이 노출되어 친수 반응 가능성이 높아질 수 있다. 실제로 단백질의 용해도는 가수분해에 의하여 증가하는데 이는 단백질의 평균분자량의 감소에 기인한다(Hsieh et al. 1979). 단백질의 용해도에 영향을 주는 요인으로 펩타이드 사슬의 분자량감소, NH₃⁺와 COO⁻같은 단백질의 극성 이온기 증가, 분자적 공간 배열의 변화에 기인한다고 보면 단백질 분해효소를 처리한 분리콩단백질이 효소처리하지 않은 분리콩단백질보다 용해도가 감소된 것은 분자적 공간 배열의 변화에 의한 것으로도 볼 수 있다(Phillips & Beuchat 1981). 단백질의 기능성은 단백질의 아미노산 구성, 배열, 주위 환경, 단백질의 구조, 단백질의 분자량과 전하 등에 의하여 결정된다고

판단된다. 따라서 단백질의 용해도는 다른 기능성을 설명할 수 있고 높은 용해도는 단백질이 음료식품으로 이용되기 위하여 용해성을 높이는 것이 중요하다.

콩단백질 발효중 단백질의 상대점도는 발효균주, 발효시간 별로 상이한 값을 보였다(Table 4). 미생물 단백질 효소에 의한 콩단백질의 과도한 가수분해는 점도를 감소시켰다. *Lactobacillus* 발효 초기에 콩의 점도는 *Bacillus*보다 높았으며 혼합발효인 경우 *Lactobacillus* 1차 발효후 *Bacillus* 2차 발효처리가 *Bacillus* 1차 발효후 *Lactobacillus* 2차 발효처리보다 높았다. 단백질의 점도와 단백질 분해효소의 활성과는 가역적인 관계로 볼 때 가수분해효소가 단백질 크기에 영향을 준 것으로 보인다. 이해연 등(2005)은 발아콩의 점도 감소는 단백질과 섬유질의 분해로 전체적으로 가용성 성분의 증가로 흡광도의 증가로 보아 본 실험과 일

Table 3. Free amino groups of soybean proteins fermented by *Bacillus subtilis* and/or *Lactobacillus bulgaricus*

| Microorganism(s) | mM of free amino groups ¹⁾ | | | | | |
|---|---------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | Fermentation(hours) | | | | | |
| | 10 | 20 | 40 | 60 | 80 | 120 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 0.62±0.02 ^d | 1.20±0.03 ^c | 2.65±0.06 ^b | 2.71±0.06 ^b | 2.82±0.06 ^b | 2.86±0.06 ^b |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i> | 0.36±0.01 ^f | 0.51±0.01 ^f | 0.83±0.02 ^e | 0.92±0.02 ^e | 0.97±0.02 ^d | 0.98±0.02 ^d |
| <i>Bacillus/Lactobacillus</i> ²⁾ | 1.20±0.03 ^b | 1.37±0.03 ^b | 1.54±0.03 ^c | 1.63±0.03 ^c | 1.72±0.03 ^c | 1.74±0.03 ^c |
| <i>Bacillus/Lactobacillus</i> ³⁾ | 2.71±0.05 ^a | 2.84±0.06 ^a | 2.90±0.06 ^a | 3.06±0.06 ^a | 3.11±0.06 ^a | 3.18±0.07 ^a |
| <i>Lactobacillus/Bacillus</i> ²⁾ | 0.56±0.02 ^e | 0.56±0.02 ^e | 0.61±0.02 ^f | 0.64±0.02 ^f | 0.67±0.02 ^e | 0.71±0.02 ^e |
| <i>Lactobacillus/Bacillus</i> ³⁾ | 0.82±0.02 ^c | 0.82±0.02 ^d | 0.94±0.02 ^d | 0.97±0.02 ^d | 0.98±0.02 ^d | 0.99±0.02 ^d |

¹⁾ Values are mean±SE; Means with different superscript on the same column are significantly different at p<0.05.

^{2), 3)} The secondary fermentation was conducted after the primary fermentation for 20 hours and 40 hours, respectively.

Table 4. Relative viscosity of soybean protein fermented by *Bacillus subtilis* and/or *Lactobacillus bulgaricus*

| Microorganism(s) | Relative viscosity ¹⁾ | | | | | |
|---|----------------------------------|-------------------------|-------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Fermentation(hours) | | | | | |
| | 10 | 20 | 40 | 60 | 80 | 120 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 1.09±0.02 ^b | 1.08±0.02 ^b | 1.04±0.02bc | 1.02±0.02 ^c | 1.02±0.02 ^c | 1.00±0.02 ^c |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i> | 1.17±0.03 ^a | 1.15±0.02 ^a | 1.13±0.02a | 1.11±0.02 ^a | 1.09±0.02 ^a | 1.09±0.02 ^a |
| <i>Bacillus/Lactobacillus</i> ²⁾ | 1.08±0.02 ^b | 1.08±0.02 ^b | 1.07±0.02b | 1.07±0.02 ^{ab} | 1.06±0.02 ^{ab} | 1.06±0.02 ^{ab} |
| <i>Bacillus/Lactobacillus</i> ³⁾ | 1.04±0.02 ^{bc} | 1.04±0.02 ^{bc} | 1.04±0.02bc | 1.03±0.02 ^c | 1.02±0.02 ^c | 1.01±0.02 ^c |
| <i>Lactobacillus/Bacillus</i> ²⁾ | 1.14±0.02 ^a | 1.14±0.02 ^a | 1.12±0.02a | 1.11±0.02 ^a | 1.10±0.02 ^a | 1.10±0.02 ^a |
| <i>Lactobacillus/Bacillus</i> ³⁾ | 1.13±0.02 ^a | 1.13±0.02 ^a | 1.13±0.02a | 1.12±0.02 ^a | 1.11±0.02 ^a | 1.10±0.02 ^a |

¹⁾ Values are mean±SE; Means with different superscript on the same column are significantly different at p<0.05.

^{2), 3)} The secondary fermentation was conducted after the primary fermentation for 20 hours and 40 hours, respectively.

치하는 경향을 보였다. 이는 단백질의 점도는 분자 크기가 일정한 크기가 유지되어야 점도가 높았고 크기가 감소하면 점도는 낮아지는 것을 보이고 있다.

3. 보수성과 보유성

*B. subtilis*와 *L. bulgaricus*로 단독 혹은 혼합배양하여 다양하게 가수분해된 청국장 단백질의 보수성 변화는 Table 5와 같다. *B. subtilis*는 *L. bulgaricus*보다 발효시간 60시간까지 콩 단백질의 보수성을 감소하였다. *B. subtilis*와 *L. bulgaricus* 혼합발효에 의한 콩단백질의 포수성은 완만한 변화를 보였고, 특히 *L. bulgaricus*를 1차 발효후 *B. subtilis*를 2차 발효시킨 경우 보수성의 변동이 적었다. 이는 혼합배양 등을 이용하여 발효 정도를

조절할 수 있어 단백질 분해 정도에 따른 기능성 변화를 추정할 수 있을 것이다. 단백질의 수분흡수는 가수분해로 증가하였다가 가수분해가 더 진행되면 감소하여 용해도가 높은 단백질은 수분 결합능력이 낮았다(Lee 2004). 한편, 가수분해에 의한 땅콩단백질의 포수성은 낮았다(Beuchat 1977). Hutton 과 Campbell(1981)은 해바라기 단백질이 콩단백질보다 구조적으로 소수성이기 때문에 숙신닐화는 해바라기 단백질과 같이 콩단백질에서 단백질의 보수성이 높은 것은 친수성의 증가로 보고 있다. 한편 이호석 등(2006)은 분리콩단백질의 보수성과 콩분말의 보수성 차이가 20% 지방, 5% 섬유질과 같은 성분의 차이가 보수성을 저하시킨다고 보고했다. 따라서 콩 단백질의 포수성을 높이기 위하여 단백질의 분자 크기와 전하 크

Table 5. Water holding capacity of soybean proteins fermented by *Bacillus subtilis* and/or *Lactobacillus bulgaricus*

| Microorganism(s) | Water holding capacity(g H ₂ O/g protein) ¹⁾ | | | | | |
|---|--|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| | Fermentation(hours) | | | | | |
| | 10 | 20 | 40 | 60 | 80 | 120 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 6.65±0.12 ^b | 6.36±0.11 ^b | 5.03±0.09 ^d | 4.26±0.08 ^c | 4.16±0.08 ^c | 4.05±0.08 ^c |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i> | 6.92±0.13 ^a | 6.62±0.12 ^a | 6.46±0.12 ^a | 6.25±0.11 ^{ab} | 5.92±0.11 ^b | 5.70±0.10 ^c |
| <i>Bacillus/Lactobacillus</i> ²⁾ | 6.01±0.10 ^d | 5.96±0.10 ^c | 5.83±0.10 ^c | 5.68±0.10 ^c | 5.56±0.10 ^c | 5.61±0.10 ^c |
| <i>Bacillus/Lactobacillus</i> ³⁾ | 4.87±0.09 ^e | 4.83±0.09 ^d | 4.77±0.09 ^e | 4.65±0.09 ^d | 4.56±0.09 ^d | 4.54±0.08 ^d |
| <i>Lactobacillus/Bacillus</i> ²⁾ | 6.51±0.12 ^b | 6.52±0.12 ^a | 6.41±0.12 ^a | 6.36±0.12 ^a | 6.33±0.12 ^a | 6.27±0.11 ^a |
| <i>Lactobacillus/Bacillus</i> ³⁾ | 6.27±0.11 ^c | 6.23±0.11 ^b | 6.18±0.11 ^b | 6.10±0.11 ^b | 6.04±0.11 ^b | 6.01±0.11 ^b |

¹⁾ Values are mean±SE; Means with different superscript on the same column are significantly different at p<0.05.

^{2), 3)} The secondary fermentation was conducted after the primary fermentation for 20 hours and 40 hours, respectively.

Table 6. Oil holding capacity of soybean proteins fermented by *Bacillus subtilis* and/or *Lactobacillus bulgaricus*

| Microorganism(s) | Oil holding capacity(cc oil/g protein) ¹⁾ | | | | | |
|---|--|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Fermentation(hours) | | | | | |
| | 10 | 20 | 40 | 60 | 80 | 120 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 6.25±0.12 ^c | 7.45±0.15 ^a | 6.82±0.14 ^b | 5.60±0.11 ^d | 5.42±0.11 ^d | 5.38±0.11 ^d |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i> | 5.78±0.11 ^{de} | 6.12±0.12 ^c | 6.80±0.14 ^b | 7.02±0.15 ^a | 7.25±0.15 ^a | 7.02±0.15 ^a |
| <i>Bacillus/Lactobacillus</i> ²⁾ | 7.28±0.15 ^a | 7.26±0.15 ^a | 7.12±0.15 ^a | 7.01±0.15 ^a | 6.85±0.14 ^{ab} | 6.60±0.13 ^b |
| <i>Bacillus/Lactobacillus</i> ³⁾ | 6.27±0.12 ^c | 6.25±0.12 ^c | 6.17±0.12 ^d | 6.11±0.12 ^c | 6.01±0.12 ^c | 5.87±0.12 ^c |
| <i>Lactobacillus/Bacillus</i> ²⁾ | 6.03±0.12 ^d | 6.00±0.12 ^{cd} | 5.97±0.12 ^d | 6.03±0.12 ^c | 6.07±0.12 ^c | 6.12±0.12 ^c |
| <i>Lactobacillus/Bacillus</i> ³⁾ | 6.76±0.13 ^b | 6.75±0.13 ^b | 6.75±0.13 ^{bc} | 6.75±0.14 ^b | 6.78±0.14 ^b | 6.81±0.14 ^{ab} |

¹⁾ Values are mean±SE; Means with different superscript on the same column are significantly different at p<0.05.

^{2), 3)} The secondary fermentation was conducted after the primary fermentation for 20 hours and 40 hours, respectively.

기와 함께 그외 인자도 중요한 것으로 보인다.

*B. subtilis*에 의한 콩단백질의 보유성은 발효 20시간에서 높은 값을 보였으나 *L. bulgaricus*는 80시간 발효에서 높은 보유성을 나타냈다(Table 6). *B. subtilis* 1차 처리 후 *L. bulgaricus* 2차 처리 시 2차 균주처리 초기에 콩단백질은 높은 보유성을 보였고 1차 처리 20시간 처리가 1차 처리 40시간보다 높았다. *Lactobacillus* 1차 처리 후 *Bacillus* 2차 처리시 발효시간이 진행됨에 따라 콩단백질의 보유성은 증가되었고 특히 *Lactobacillus* 1차 처리 40시간 발효후 *Bacillus* 처리처리가 높은 보유성을 나타냈다. 이는 가수분해된 콩단백질의 입자 크기와 전하가 보유성에 영향을 준 것으로 보인다. 단백질의 유지 포집은 단백질 구조의 개별로 보면 조직화된 콩분말의 소형 입자가 대형 입자보다 보유성이 높을 수 있다(Lee 2004). 콩가수분해물의 보유성 증가는 일부 소수성 group 이 분자표면으로 개입되어 지방과 소수결합에 참여 할 수 있을 것이고 유효한 소수성은 단백질의 유지흡착과 단백질 사슬의 유연성에도 중요한 인자이다(Yim & Lee 2000). 따라서 보유성은 단백질의 분자구조와 거대 분자구조에 영향을 받는 것으로 판단된다. 숙신닐화에 의한 분자의 팽창, 제한된 가수분해, 열과같은 물리적 처리는 단백질의 무게에 대한 용적 증가시 분자내 소수성 노출이 보유성을 증가시키는 것으로 보인다(미발표). 일반적으로 과도한 가수분해는 콩단백질 분자를 작게하여 단백질 분자간 반발력을 약화시키는 분자전하로 인하여 보유성이 저하된 것으로 사료된다.

청국장 콩단백질의 기능성은 가수분해 정도와 관련성이 있고 이는 단백질의 크기, 전하와 관련성이 있는 것으로 추정된다. 그러나, 실제 단백질 제품 기능성에 영향을 주는 인자들은 단백질의 물리화학적 특성, 단백질을 변형시킬 수 있는 화학적 변형단계, 공정, 환경, 단백질의 물리적 양태, 아미노산 조성, 1차, 2차, 3차, 4차 구조, 분자내 분자간 결합정도 등이 있어 기능성 평가도 이들과 함께 고려하여야 할 것이다.

IV. 요약 및 결론

콩단백질의 유용성을 증대하기 위하여 청국장 균인 *Bacillus subtilis*와 유산균인 *Lactobacillus bulgaricus*로 단독 혹은 혼합발효시켜 균체 형성 단위, 단백질 분해효소 활성, 콩단백질의 용해성, 보수성, 보유성과 점성을 조사하였다. 균체 형성 단위는 발효 60시간에서 가장 높았으며 *B. subtilis*가 *L. bulgaricus*보다 높았다. 혼합배양시 *B. subtilis*가 1차 배양이 *L. bulgaricus* 1차 배양보다 포자 형성단위가 높았으며 2차 배양시 포자형성 단위가 완만하게 증가하였다. 단백질 분해효소 활성은 *B. subtilis* 접종후 60시간 발효가 최대였으나 *L. bulgaricus* 접종할 경우 연속적으로 증가하였다. *B. subtilis* 1차 접종후 *L. bulgaricus* 2차 접종인 경우가 그 반대 순서인 경우 보다 효소활성이 높았으며 2차 접종후 효소활성은 완만한 증가를 보였다. 유리 아미노기로 표현된 용해성은 *B. subtilis*접종할 때가 *L. bulgaricus*접종할 때보다 높았으며 발효 초기에 현저히 증가하였다. *B. subtilis* 1차 접종과 *L. bulgaricus* 2차 접종할 경우가 반대순서로 접종한 경우보다 콩 단백질의 용해성은 높았고 2차 접종후 용해도 증가율의 차이는 보이지 않았다. 콩단백질의 점성은 *L. bulgaricus* 처리가 *B. subtilis* 처리보다 높았으며 발효시간이 증가함에 따라 감소하였다. *L. bulgaricus* 1차 처리와 *B. subtilis* 2차 처리인 경우가 그 반대인 경우보다 점성이 높았으나 발효시간이 증가함에 따라 감소하였다. 콩단백질의 보수성은 발효 10시간 후 완만하게 감소하였으며 *L. bulgaricus*접종이 *B. subtilis*접종보다 보수성이 높았고 혼합발효인 경우 *L. bulgaricus* 1차 접종과 *B. subtilis* 2차 접종이 높았다. 보유성은 *B. subtilis*접종후 20시간 발효와 *L. bulgaricus* 접종후 80시간 발효시에 가장 높았으며 혼합발효인 경우 *L. bulgaricus* 1차 접종후 *B. bulgaricus* 2차 접종시 보유성이 상승하였다. 이와 같은 특성 들은 *B. subtilis*나 *L. bulgaricus* 단독처리보다 혼합처리 함으로서 기능성, 기호성, 소화성 등이 다양한 단백질생산에 유용할 것이다.

참고문헌

- 고한수 · 조대회 · 황성연 · 김영만(1999) 청국장 제조 방법에 따른 향미 증진 효과. 한국식품영양학회지 12(1), 1-6.
- 송영선 · 김철현 · 백승철(2004) Orotic acid의 원유내 함량과 발효중 유산균에 의한 감소. 한국식품과학회지 36(1), 86-91.
- 이정은 · 이숙영(2001) 단백질분해효소 전처리 및 starter culture의 종류에 따른 frozen soy yoghurt의 품질 특성. 한국식품과학회지 33(6), 676-681.
- 이혜연 · 김주숙 · 김영수 · 김우정(2005) 발아콩을 이용한 콩우유의 isoflavone 함량 및 품질 특성 개선. 한국식품과학회지 37(3), 443-448.
- 이호석 · 엄권용 · 최희숙 · 김동희 · 유상호 · 김우정(2006) 발아콩분말의 기능적 특성. 한국식품과학회지 38(3), 483-487.
- 표영희(2006) 홍국균 발효콩의 mevinolin 생산 조건. 한국식품과학회지 37(1), 142-146.
- 한국식품영양학회(2000a) 식품영양핸드북 식품편. pp. 396-398. 효일.
- 한국식품영양학회(2000b) 식품영양핸드북 식품편. pp. 198-200. 효일.
- 한국콩박물관건립추진위원회편(2005) 콩. pp. 211-312. 고려대학교출판부.
- Beuchat LR(1977) Functional property modification of defatted peanut flour as result of hydrolysis. *Lebensm Wiss Technol* 12, 95-100.
- Calderon De La Barca AM, Ruiz-Salazar RA, Jara-Marini ME(2000) Enzymatic hydrolysis and synthesis of soy protein to improve its amino acid composition and functional properties. *J Food Sci* 65(2), 246-253.
- Childs EA, Park KK(1976) Functional properties of acetylated glandless cottonseed flour. *J Food Sci* 41(4), 713-714.
- Feng J, Xiong YL(2003) Interaction and functionality of mixed myofibrillar and enzyme-hydrolyzed soy proteins. *J Food Sci* 68(3), 803-809.
- Feng J, Xiong YL, Mikel WB(2003) Textural properties of pork frankfurters containing thermally/enzymatically modified soy proteins. *J Food Sci* 68(4), 1220-1224.
- Habeeb AFSA(1966) Determination of free amino group in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal Biochem* 14, 328-336.
- Hsieh DTS, Lin C, Lang ER, Catsimpoalas N, Rha CK(1979) Molecular weight distribution of soybean globulin peptides produced by peptic hydrolysis. *Cereal Chem* 56, 227-231.
- Hutton CW, Campbell AM(1981) Water and fat absorption. pp. 177-200. In: *Protein Functionality in Foods*. Cherry JP(ed). Am Chem Soc. Washington, DC, MD, USA.
- Kinsella JF(1982) Relationship between structure and functional properties of food protein. pp. 51-125. In: *Food Protein*. Fox PF(ed). Applied Sci Publishers, London.
- LeBlanc JG, Garro MS, Savoy de Giori G, Font de Valdez G(2004). A novel functional soy-based food fermented by lactic acid bacteria: Effect of heat treatment. *J Food Sci* 69(8), 246-250.
- Lee JW(2004) Effect of soaking solution on molecular properties, solubility, liquid holding capacity and viscosity of soybean proteins during the chongkukjang fermentation. *Food Sci Biotechnol* 13(6), 695-699.
- Lee NY, Kim YS, Byun MW, Shin DH(2004) High temperature soybean fermentation using microbial strains isolated at high temperature. *Food Sci Biotechnol* 12(2), 185-190.
- Phillips RD, Beuchat LR(1981) Enzyme modification of proteins. pp. 275-335. In: *Protein Functionality in Foods*, Cherry JP(ed). Am Chem Soc Washington, DC, USA.
- Qi M, Hettiarachchy NS, Kalapathy U(1997) Solubility and emulsifying properties of soy protein isolate modified by pancreatin. *J. Food Sci* 62(5), 1110-1115.
- Rhim JW, Lee JH(2004) Effect of CaCl₂ treatment on mechanical and moisture barrier properties of sodium alginate and soy protein-based films. *Food Sci Biotechnol* 13(6), 728-732.
- Rhim JW, Weller CL, Gennadios A(2004) Effect of soy protein coating on shell strength and quality of shell eggs. *Food Sci Biotechnol* 13(4), 455-459.
- Tsumuta K, Saito T, Kugimiya W, Inouye K(2004) Selective proteolysis of the glycinin and β -conglycinin fractions in a soy protein isolate by pepsin and papain with controlled pH and temperature. *J Food Sci* 69(5), 363-367.
- Wolf WJ(1972) Purification and properties of the proteins. pp. 43-143. In: *Soybeans, Chemistry and Technology*. Smith AK, Circle SJ(eds). AVI Publishing Co Inc, Westport, CT, USA.
- Yim MH, Lee JH(2000) Functional properties of fractionated soy protein isolates by proteases from Meju. *Food Sci Biotechnol* 9(4), 253-257.