

최 종
연구보고서

저알러지 대두 단백질 가수분해물을 첨가한
기능성 전통 식품 개발
Development of functional traditional food using
hypoallergenic soy protein hydrolyzate

경 기 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “저알러지 대두 단백질 가수분해물을 첨가한 기능성 전통 식품 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 4월 24일

주관연구기관명 : 경 기 대
총괄연구책임자 : 김 명 희
연 구 원 : 윤 수 경
협동연구기관명 : 용 인 대
협동연구책임자 : 김 혜 영(A)
협동연구기관명 : 건 국 대
협동연구책임자 : 박 상 규

요 약 문

I. 제 목

저알러지 대두 단백질 가수분해물을 첨가한 기능성 전통식품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

우리나라에서 콩은 식량자원으로써 쌀 다음으로 중요한 부분을 차지하고 있으므로 콩의 생산량 증대는 국가적으로 대단히 중요한 문제이다. 그러나 국내산 콩의 자급률은 생산량 감소와 외국산 수입증가에 따라 급속히 감소되어 현재 자급률이 약 5% 대에 이르고 있다. 국내산 콩의 낮은 자급률은 국산콩의 높은 가격 (국산콩 2000원/kg, 수입콩 700원/kg)에 따른 경쟁력 저하와 이에 따른 콩 재배면적의 감소와 콩의 낮은 단보당 수익률 등에 기인한다고 볼 수 있다. 이와 같이 국산콩은 가격적인 측면에서 수입산에 비해 그 격차가 5~6배 차이가 나므로 국산콩의 경쟁력을 향상시켜 자급율을 끌어올리기 위하여서는 무엇보다도 국산콩과 국산콩가공제품의 우수성을 과학적으로 입증하여 소비를 적극적으로 유도해야 할 필요가 있다.

우리나라 전통콩은 황색, 흑색, 청색 등 다양한 색을 가지고 있다. 노란콩은 가장 많이 사용하는 콩으로 주로 된장, 고추장, 간장 등의 콩 발효제품 제조에 이용하며 메주콩이라고도 한다. 유색콩에는 흑태, 쥐눈이콩, 서리태 등의 여러 가지 종류가 있다. 쥐눈이콩은 보통 검정콩보다 훨씬 작고 쥐눈처럼 생겼다고 하여 쥐눈이콩 또는 서목태(鼠目太)라고 부르고 한방에서 약으로 쓰이기 때문에 약콩으로도 부른다. 서리태는 생육기간이 길어서 10월 경에 서리를 맞은 뒤에나 수확해서 서리태라 부르며, 껍질은 검은 색이지만 속은 파랗다고 하여 속청이라고도 한다.

콩의 종류에 따라 생리활성물질 함량이 약간씩 다르게 들어있는데, 이소플라본 중 제니스타인 함량은 노란콩에 더 많고, 검정콩에는 수용성 flavonoid 색소인 안토시아닌 색소가 풍부하다. 검정콩의 안토시아닌 색소도 항산화 활성을 가지며, in vitro 실험에서 고혈압에 관여하는 angiotensin converting enzyme의 저해 효과, 통풍에 관여하는 xantine oxidase의 저해, 염증에 관여하는 phospholipase A₂의 활성 저해

및 암세포 증식 억제에 효과가 있는 것으로 보고되었다.

현재 우리나라의 성인병에서 가장 문제가 되는 것은 영양과잉 및 운동 부족으로 인한 비만과 그에 수반되는 순화기질병과 당뇨병을 들 수 있다. 성인병을 예방 및 치료하기 위해서는 여러 방법이 있을 수 있으나 기능성 식품을 이용하여 질병을 미연에 방지하는 것도 좋은 예방법일 것이다. 대두 단백질은 동물성 단백질에 비하여 비만, 고혈압, 동맥경화, 고지혈증 등을 개선하는데 효과가 있다고 알려져 왔으며, 대두 단백질을 섭취할 경우 혈중 고밀도 콜레스테롤의 함량은 증가하나, 저밀도 콜레스테롤의 함량은 감소한다고 보고되었다. 또한 콩으로 만든 전통 발효 식품이나 콩 가수분해물에서 유래된 여러 종류의 펩타이드가 생쥐 및 사람의 백혈병, 림프암 및 대장암 세포주의 생육을 저해함으로써 항종양 활성을 나타냈다는 보고가 있다. 이와 같은 결과는 콩으로 만든 정통 발효 식품이나 콩 가수분해물에서 유래된 여러 종류의 펩타이드들이 건강기능성을 갖는 신 기능식품 소재로서 응용될 수 있는 가능성을 보여준다.

우리나라는 연간 8000ton 정도의 식품 단백질을 외국에서 수입하여 식품첨가물로서 이용하고 있는 실정이며, 이중 반은 casein, egg protein, 혈청과 같은 동물성 단백질이며, 나머지는 분리대두 단백질(ISP)이다. 식물성 소재 단백질에 대한 소비적 욕구가 증가하고 있는 이 시점에서 국내산 대두를 이용하여 기능성 단백질 소재를 생산해 낸다면, 연간 320억에서 600억원의 외화 낭비를 막을 수 있을 것이라고 예상되고 있다. 한편 1985년 이후 쌀의 자급율이 100% 달성한 이후 쌀 소비의 감소로 생산량에 비하여 소비량에 훨씬 떨어짐에도 불구하고, 쌀의 수입은 계속적으로 증가하고 있는 추세이다. 1998년 수입량 61,631,335kg에서 2004년 9월까지 집계 114,150,093kg로 약 두 배 증가하였다. 따라서 농가 소득의 증가와 국가 식량 안보 차원에서 잉여 농산물의 수급을 위한 쌀 가공품의 생산도 절실히 필요하며, 소비촉진의 한 방법으로 전통 쌀 가공품의 상품화를 모색한다면, 사회적, 기술적 의의가 있을 것으로 사료된다.

식사대용 식이로서의 떡 이용 의사에 관한 조사에서는 10대(56.0%), 30대(51.0%), 50대 이상(66.3%)이 이용의사를 밝혔으며, 성별로 보면, 여자의 경우 64.0%, 남자의 경우 42.3%가 식사대용으로 떡을 이용할 의사가 있는 것으로 조사되었으며, 특히 30대와 40대가 각각 52.0%, 51.6%로 떡을 아침식사 대용으로 이용할 의사가 있는 것으로 보고되었다. 떡의 주재료인 쌀에 부족한 영양소를 보완하기 위하여 떡에 은행 분말, 수리취, 뽕잎, 식이 섬유 등 다양한 부재료 첨가에 관한 연구가 이루어져 왔다. 그러나 대두 단백질 가수분해물 등의 정제된 기능성 소재를 개발하여

떡에 첨가하여 떡의 품질 특성의 변화를 살펴본 경우는 매우 드물다. 쌀가공품인 떡이 상품성이 떨어지는 이유는 전분의 노화로 인하여 저장 유통을 문제가 있는 것으로 지적된다. 현재까지는 지방질, 병반, 여러 종류의 당, 셀룰로오스, 식이섬유 등이 노화 억제 방법으로 많이 사용되어 왔는데, 대두 단백질 가수분해물을 첨가하였을 때의 저장성의 변화 등에 대해서도 연구가 되어 있지 않은 상태이다.

따라서 본 연구에서는 국내산 대두를 이용한 기능성 대두단백가수분해물의 소재 개발과 생리 기능성 확인 및 개발된 대두단백가수분해물을 첨가하여 최적의 제조 배합을 통한 기능성 전통 음식인 증편을 개발하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 대두 단백질 가수분해물 제조 및 기능성 전통 식품 개발

가. 국내산 대두로부터 분리한 soy protein의 fractionation과 hydrophobicity 측정

- 대두종의 일반 성분 분석
- 가수분해 조건 확립
- 제조된 가수분해물의 소수성 측정
- 제조된 가수분해물의 기능성 평가

나. 대두 단백질 가수분해물 첨가 기능성 전통 증편의 개발

- 대두 단백질 가수분해물을 첨가한 기능성 전통 증편의 물리적 이화학적 평가
- 대두 단백질 가수분해물을 첨가한 기능성 전통 증편의 품질 특성 분석
- 대두 단백질 가수분해물을 첨가한 기능성 전통 증편의 저장성 평가

2. 대두 단백질 가수분해물의 소화율과 지질 저하작용 평가

가. 국내산 대두가 실험 동물의 생리 대사에 미치는 영향 평가

- 여러 종류의 대두가 실험 동물의 체중 증가에 미치는 효과 판정
- 여러 종류의 대두가 실험 동물의 체내 지질에 미치는 효과 판정
- 여러 종류의 대두가 실험 동물의 지질과산화에 미치는 효과 판정

나. 대두 단백질 가수분해물의 지질저하작용과 항산화력 평가

- 대두 단백질 가수분해물의 성장을 평가
- 대두 단백질 가수분해물의 소화흡수율 평가
- 대두 단백질 가수분해물의 지질저하작용 평가
- 대두 단백질 가수분해물의 항산화력 평가

3. 저알러지 대두 단백질 가수분해물 대량 생산 공정 확립

가. 면역반응 항원 물질이 제거된 항알러지성 단백질 제조

- 항원체 제거 방법 검색
- 저알러지 대량 생산방법 개발

나. 면역 반응 항원 물질의 제거된 저알러지성 단백질 제조 및 단백질 물성과의 관계 규명

- 면역 반응 항원 물질이 제거된 저알러지성 단백질 제조
- 효소적 변성법을 통한 단백질의 기능적 특성 측정

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구 개발 결과

1) 대두 단백질 가수분해물 제조 및 기능성 전통 식품 개발

가. 국내산 대두로부터 분리한 soy protein의 fractionation과 hydrophobicity 측정

① 대두 종의 일반 성분 분석 결과

서리태와 메주 콩을 비교 하였으며, 크기와 무게 모두 서리태가 크고 무거운 것으로 나타났다. 일반 성분 분석에서는 단백질의 함량에 42.3으로 메주콩에 비하여 높은 수치를 보여 주었으며, 그에 반하여 수분은 서리태가 8.9로 메주콩 10.2%에 비하여 낮게 나타났다. 아미노산 함량은 메주콩이 높으나 isoflavone 함량에서는 서리태가 729.7mg으로 메주콩 407.9에 비하여 월등히 높은 것으로 분석되어 졌다.

② 가수분해물의 제조 방법 요약

일반 성분 분석 결과와 생리활성 평가에 의하여 국내산 대두로 서리태가 선정되었으며, 효소적 가수분해를 위하여 다양한 protease의 가수분해율을 실험한 결과 alcalase가 48%로 가장 높게 분석되어져 본 연구를 위하여 alcalase를 선정하였다. 기존의 연구에 의하여 pH(pH8)와 온도(50℃)는 결정되어졌으며, 부가적으로 가수분해 조건을 설정하기 위해 대두 단백질의 농도, 효소의 농도, 가수분해 시간이 실험되었다. 대두 단백질 농도는 효소 농도가 점차 증가할 수록 peptide량도 점차 증가하는 것으로 나타났으나 효소 농도 1%정도 이면 충분한 가수분해가 이루어 지는 것으로 분석되어 졌다. 시간에 따른 가수분해 정도를 보면 시간이 증가 할 수 록 점차 증가하는 추세를 나타냈으며, 특히 1시간 이상에서 peptide량이 월등히 많은 것으로 나타났다. 단백질 농도가 높을수록 가수분해가 더 많이 일어나는 것으로 나타났다. 가수분해 시간을 달리한 결과는 시간이 증가할수록 peptide 량은 증가하였으며 60분 이상에서 월등히 높게 나타났다.

③ 제조된 가수분해물의 소수성 측정 결과 요약

SDS-Page의 실험을 통하여 가수분해 시간을 달리하여 가수분해물을 제조한 결과, 가수분해 전 대두단백질과 가수분해 후의 단백질 모양이 확연히 다른 것으로 나타났다. 45 kDa 이상의 단백질은 가수분해 1시간 이상에서 작은 크기의 분자로 가수분해 되어 밀도로 빠지는 것으로 분석되어 졌다. 또한 소수성 측정의 결과에 의하여 가수분해 시간이 경과할수록 hydrophobicity가 증가하는 것으로 보이며, 가수분해 전과 후를 비교하였을 때 peptide 함량이 가수분해한 대두 단백질에서 월등히 높게 나타났다.

④ 제조된 가수분해물의 기능적 특성 분석 결과 요약

식품제조에서 가장 필수 적인 요소인 용해도를 확인하기 위하여 turbidity가 측정되어 졌다. 대두 단백질의 가수분해 처리는 용해도를 증가 시켰으며, 특히 산성에 가까울 수록 용해도가 현저히 증가하였다. 또한 효소적 가수분해에 의해서 생성된 멍치는 현상은 NaCl, CaCl₂, heating에 의하여 상당히 풀어지는 것으로 분석되어 졌다.

나. 대두 단백 가수분해물 첨가 기능성 전통 증편의 개발

① 대두 단백 가수분해물을 첨가한 기능성 전통 증편의 물리적 화학적 변화 측정 결과 요약

증편의 제조를 위하여 전통적인 우리나라 고유의 증편 레시피를 사용하였으며, 여기에 최적의 조건으로 제조된 가수분해물을 1%, 3%, 7%로 달리하여 첨가하였다. 발효과정상의 pH의 변화에서는 첨가량이 증가할 수록 pH도 유의적으로 증가하는 것으로 보여졌다. 용해도와 팽창력에서도 유의적인 차이가 나타났으며, 온도가 높을수록, 대두 단백질 가수분해물의 첨가량이 증가할수록 높은 수치를 보여주었다. 수분 함량에서는 유의적인 차이는 없었으나, 수분 결합력에서는 유의적인 차이가 나타났으며, 특히 가수분해물의 첨가량이 높을수록 수분 결합력이 우수하였다. 비중에서도 시료에 따른 유의적인 차이를 볼 수 있었다. 기포 형성력에서도 유의적인 차이가 나타났으며, 대조군에 비하여 대두단백가수분해물 첨가군들이 기포형성력이 우수한 것으로 나타났다. 따라서 증편의 품질적 특성에 결정적인 영향을 미치는 망상 구조의 형성으로 인한 볼륨감의 향상에 대두 단백질가수분해물이 많은 영향을 미치고 있는 것으로 판단되어 졌다.

② 대두 단백질 가수분해물을 첨가한 기능성 전통 증편의 품질 특성 평가 결과 요약

대두 단백질 가수분해물을 첨가한 증편의 색은 명도 적색도 황색도 모두에서 유의적인 차이가 있는 것으로 나타났다. 명도는 대조군이 대두단백가수분해물 첨가군이 높게 나타났다. 적색도를 나타내는 a 값은 모두 음(-)으로 나타내 약간의 녹색도 경향을 띠었으며, 대조군 -13.42에 비하여 0에 가까운 수치를 보여주어 적색의 경향이 나타남을 알 수 있었다. 부피지수와 대칭성 평가에서는 유의적인 차이를 보여주었다. 부피지수는 첨가량이 증가할 수록 점차 증가하였다. 이러한 결과는 첨가군이 기포형성력, 수분결합력, 팽창력에서 대조군에 비해 높게 나타난 것과 관계가 있다고 할 수 있겠다. 또한 증편을 수직으로 절단한 단면의 기공의 크기를 보면 대조구가 가장 기공이 작았으며, 대두 단백질 1% 첨가군도 이와 유사하였다. 첨가량이 증가할 수록 기공의 크기가 커졌으며, 기공의 균일성을 뛰어난 것으로 보여진다. 전문가 집단에 대한 관능검사의 결과는 부착성 이외의 특성에 대해서는 모두 유의적인 것으로 분석되어 졌다. 조직의 균일성은 대조구가 9.24로 대두 단백질 가수분해 1%와 3% 첨가물은 비슷한 것으로 보여졌으나, 대두분과 대두 단백질 가수분해물 7%에서는 각각 5.62, 5.32로 떨어지는 것을 볼 수 있다. 조직의 크기는 대조군 (3.54)에 비하여 대두분이나 대두단백 가수분해물 첨가물을 큰 것으로 나타났다. 견고성은 대조군 (11.18) 보다는 첨가군이 덜 견고한 것으로 분석되어 졌다. 맛에 대해서는 대두분 첨가군이 3.12로 가장 맛이 없는 것으로 조사되었으며, 대조군(8.20)보다 대두 단백질 가수분해물 첨가군(9.2, 10.26, 10.77)들이 더 맛있는 것으로 분석되어 졌다. 전체적인 바랍직함 정도는 대조군이나 대두분 첨가물에

비하여 가수분해 첨가물들이 높게 나타났다. 소비자 집단에 대한 관능검사는 신맛에 대한 기호도, 단맛과 신맛에 대한 강도를 제외한 항목들에 유의적인 것으로 분석되어 졌다. 부드러움(softness)는 대두분 첨가군이 9.21로 가장 높게 나왔으며, 대두 단백질 가수분해물이 8.59, 대조군이 5.33의 순서고 낮게 분석되어 졌다. 강도 (intensity)에서는 뚝은 맛(harsh taste)이 가장 두드러진 차이를 보였다. 대두단백가수분해물 첨가군이 대조군에 비하여 뚝은 맛이 덜한 것으로 분석되어 졌다. 전반적인 기호도에서는 대조군이 5.06인데 반하여 대두 단백질 가수분해물이 7.26으로 높게 나타났다. 따라서 대두 단백질 가수분해물을 첨가는 볼륨감의 향상을 도움과 함께 증편의 맛과 소비자의 기호도에서 상당히 긍정적인 영향을 미치는 있는 것으로 분석되어 졌다.

③ 대두 단백질 가수분해물을 첨가한 기능성 전통 증편의 노화도 분석 결과 요약

시차주사열 분석기인 Differential Scanning Calorimetry가 이용되어 졌으며, 호화와 노화정도를 측정하기 위하여 반죽과 증자 한 후의 증편을 냉장 온도(4℃)에서 72시간 저장시킨 후 측정되어 졌다. 호화 개시 온도는 54.65℃에서 64.65℃까지 대두 단백질 가수분해물을 첨가에 따라 유의적으로 약간씩 증가하였음을 알수 있다. 이외에 호화 최고 온도, 호화 종료온도, 엔탈피도 증가 하고 있는 것으로 나타났다. 이는 대두 단백질 가수분해물의 수분 흡착력으로 인하여 호화 온도를 높이고 호화가 천천히 진행되도록 하여 부드러운 조직감을 형성하도록 한다고 판단되어 진다. 72시간 저장후의 노화도를 보면 대조군의 엔탈피에서 2.14을 보여주며 대두 단백질 가수분해물의 첨가량이 증가할수록 점차 감소하고 있는 것으로 분석되어 졌다. 여기서 엔탈피는 저장중 수소 결합이 형성되면서 전분 분자는 부분적으로 재배열이 일어나며, 이를 재호화 시키는데 필요한 열량을 의미한다. 따라서 대두 단백질 가수분해물 첨가군의 엔탈피가 감소하는 것으로 보아 대두 단백질 가수 분해물의 첨가는 노화를 지연 시키는 효과를 가지고 오는 것으로 보여진다.

2) 대두 단백질 가수분해물의 소화율과 지질 저하작용 평가

가. 국내산 대두가 실험동물의 생리 대사에 미치는 영향 평가

① 여러 종류의 대두가 실험동물의 체중증가에 미치는 효과

여러 종류의 국내산 대두를 섭취한 흰쥐의 식이 섭취량과 최종 체중 및 식이 효율은 casein군과 차이가 없었다.

② 여러 종류의 대두가 실험 동물의 체내 지질에 미치는 효과

분리대두단백(ISP군)과 콩 함유식이는 casein군에 비해 혈액 중성지질 저하효과가 있었으며, 혈액 지질의 감소 정도는 분리대두단백, 쥐눈이, 서리태군에서 뚜렷하게 나타났다. 분리대두단백군(ISP군)은 casein군보다 간의 총지질과 중성지질 저하 효과가 있었고 간 콜레스테롤은 casein군보다 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다. 콩함유군들의 경우 콩 종류에 따라 지질 저하 정도에 차이가 있어서 노란콩과 서리태의 경우 간 총지질 함량이 낮았으나, 흑태와 쥐눈이콩의 경우에는 감소 효과가 나타나지 않았다. 콩 함유군들에서 간 콜레스테롤 감소 효과는 나타나지 않았다.

③ 여러 종류의 대두가 실험 동물의 지질과산화에 미치는 효과

혈액 과산화지질은 각 군들간에 유의차는 나타나지 않았으나, 노란콩, 쥐눈이, 서리태에서 낮은 경향이였다. 간 손상 정도의 지표로 많이 사용되는 GOT와 GPT 활성도의 경우 ISP군이 casein군보다 활성도가 낮았다. GOT 활성도는 모든 콩 함유군에서 casein군보다 낮았고, GPT의 경우에는 쥐눈이콩과 서리태군에서 낮은 활성을 보이는 경향이였다.

④ 여러 종류의 대두가 실험동물의 생리 대사에 미치는 효과 요약

분리대두단백식이는 혈액과 간의 지질 및 콜레스테롤의 저하 효과와 GOT, GPT를 낮추는 효과가 뚜렷하였고, 20% 콩 함유군의 경우에는 쥐눈이, 노란콩, 서리태가 흑태보다 체내 지질 감소와 지질 과산화 감소 효과가 높았다.

나. 대두단백 가수분해물의 지질저하작용과 항산화효과 평가

① 대두단백 가수분해물의 성장을 평가

대두단백 가수분해물군과 분리대두단백군의 체중증가 및 식이효율은 casein군과 차이가 없었다.

② 대두단백 가수분해물의 소화흡수율 평가

변 1주차에서의 지질소화흡수율은 분리대두단백군(ISP)이 casein군보다 유의적으로 낮았다. 변 4주차에서는 불용성 대두단백가수분해물(IS)군이 다른 군보다 지질소화흡수율이 유의적으로 낮았다. IS군의 1주차와 4주차 변을 비교하여보면 총지방, 중성지방, 콜레스테롤 배설량이 1주에서 4주로 갈수록 많아졌다. 변1주차 실험에서 단

백질소화흡수율은 casein군이 수용성 또는 불용성 대두단백가수분해물군보다 높았고, 변4주차 실험에서는 단백질소화흡수율은 각 군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

③ 대두단백 가수분해물의 지질저하작용 평가

혈액 중성지방은 불용성 대두단백가수분해물(IS)군이 casein군보다 유의적으로 낮았고, 서리태가수분해물(SH)군과 ISP군도 낮은 경향을 보였다. 혈액 총콜레스테롤은 유의적인 차이는 없었지만 IS군이 casein군보다 낮은 경향이었고, HDL-cholesterol은 대두단백가수분해물군들과 ISP군이 높은 경향이였다. LDL-cholesterol 및 동맥경화지표(AI)는 대두단백가수분해물들과 ISP군이 casein군보다 낮은 경향이였다. 간의 총 지질은 유의적인 차이를 보이지 않았으나 ISP군이 casein군보다 낮은 경향이였다.

④ 대두 단백질 가수분해물의 항산화력 평가

총항산화력은 각 군 간에 유의적인 차이는 없었으나 서리태가수분해물(SH)군이 약간 높았다. 혈액 과산화지질은 ISP군과 불용성 대두단백분해물(IS)군이 다른 군들보다 유의적으로 낮게 나타났었다. GOT와 GPT 활성도는 군 간에 유의적인 차이는 없었으나, GOT는 서리태가수분해물군이 GPT는 ISP군이 casein군보다 낮은 경향이였다.

⑤ 대두단백 가수분해물의 지질저하작용과 항산화력 요약

대두단백 가수분해물이 지질소화흡수율을 낮추는 효과는 불용성대두단백가수분해물군과 분리대두단백군에서 뚜렷하였다. 대두단백가수분해물들은 혈액 중성지질을 낮추고, 혈액 총 콜레스테롤과 LDL-cholesterol을 낮추어서 동맥경화지표(atherogenic index)를 낮추는 효과가 있었으며, 그 효과는 특히 불용성가수분해물군에서 더 탁월하였다. 서리태단백가수분해물은 총항산화능이 증가하는 효과를 보이고, 불용성 대두단백가수분해물군과 분리대두단백은 혈액의 과산화지질을 낮추어서 대두단백가수분해물들은 항산화작용에도 좋은 영향을 보여주었다.

3) 저알러지 대두 단백질 가수분해물 대량 생산 공정 확립

가. 면역반응 항원 물질이 제거된 항알러지성 단백질 제거

① 대두로부터 단백질을 분리하였으며 단백질의 단백질 함량은 95%이상의 순도를 가졌

으며, 수율은 52%이상으로 분리 정제하여 매우 좋은 수율은 확인하였다.

- ② 필수 미네랄 원소의 결핍을 유발하는 phytate의 제거가 기능성 소재로서 분리 대두 단백 가수분해물을 제조하는데 중요하다. 따라서 low phytate 분리 대두단백질을 생산하여, 분리대두단백질 및 peptide 내의 phytic acid 함량을 확인하였다.
- ③ 인체에서 결핍되기 쉬운 철분 성분이 보강된 iron-binding 대두단백질을 생산하여, 생산 효율 및 수율을 확인하였다.
- ④ 면역 반응 항원물질인 38kDa의 단백질은 일반 대두 단백질의 등전점이 pH 4.5 인데 비해 훨씬 높은 pH 6.3이며, 이를 이용하여 항원특성이 없는 단백질을 분리 정제하며, 효소 처리를 통하여 완전히 항원체를 제거하였다.

나. 면역 반응 항원 물질의 제거된 저알러지성 단백질 제조 및 단백질 물성과의 관계 규명

서리태로부터 순도 및 수율 높은 분리 대두 단백질의 생산을 체계화하고, 생산된 SPI를 기존의 효소적변형법을 최적화함으로써 대두의 주요 allergens을 보다 간편하고, 경제적으로 제거하여 저알러지 대두 단백질을 생산하고 이를 다양한 분야의 적용을 위해 대두 분리 단백질의 functional properties를 측정 한 결과의 요약은 다음과 같다.

- ① 서리태로부터 대두 분리 단백질(SPI)추출 및 정제 결과 수율은 56%이고, SPI의 단백질 함량은 micro-kjeldahl법과 bovine serum albumin을 사용한 lowry법 (12)으로 측정한 결과 96%의 순도를 나타내었다.
- ② 저알러지 대두 분리 단백질을 생산하기 위한 최적화 실험은 단백질량에 대한 효소의 농도를 0.5%, 1%, 1.5%, 2.0%로 각각 달리하여 8시간 동안 가수분해를 실시하였고, 효소 반응의 최적 pH와 온도는 Novozyme사에서 제공한 조건으로 실시한 결과 효소 농도 0.5%와 1%에서는 대두 분리 단백질의 allergen site가 미미하게 나타났으나, 1.5%와 2.0%의 농도에서는 항원이 모두 제거 된 것으로 나타났다.

- ③ 대두분리단백질에 효소(alcalase)를 첨가하고, 반응 시간(0, 30, 1, 2, 3, 5, 8h)을 각각 달리하여 가수분해 정도를 측정하였다. 가수분해 3시간까지는 급격한 증가를 보인 반면 이후에는 가수분해 정도가 감소하였다. 이는 기질의 고갈이나 최종생산물에 의해 저해로 인한 감소로 사료된다.
- ④ 용해도 측정 실험은 8시간동안 가수분해한 샘플과 가수분해 시키지 않은 샘플(unmodified SPI)을 각각 pH를 달리하여 용해도를 비교 측정 하였다. 그 결과, Unmodified SPI 경우 대두 단백질의 등전점 부근(pH4.5~5.0)에서 용해도가 3.3%로 가장 낮은 수치를 나타낸 반면, 8시간 동안 가수분해한 샘플은 등전점 pH에서 13.7%로 상대적으로 좋은 용해도를 보였다.
- ⑤ 유화력 및 유화 안정성 측정 실험은 가수분해 샘플(hydrolyzated SPIs: 30, 1, 2, 3, 5, 8시간)과 가수분해 시키지 않은 샘플을 가지고 실시하였다. 이 실험에서 Bovine serum albumin(BSA)은 훌륭한 유화력을 가지고 있어 standard로 사용하였다. 유화력 측정 결과 서로 큰차이는 보이지 않았지만 8시간 샘플이 가수분해 시키지 않은 샘플에 비해 약간 높은 수치를 나타냈다. 하지만, BSA와 비교시 유화형성력은 BSA의 41.9% 밖에 미치지 못했다. 유화 안정성은 가수분해가 진행될수록 그 능력이 향상되는 경향을 보였다.
- ⑥ 거품 형성력과 안정도 측정은 샘플로 unmodified SPI, hydrolyzated SPI(8시간) 그리고 거품형성력이 좋은 Egg white를 standard로서 사용하였고, 3가지 pH로 나누어 실시하였다. 전체적인 pH범위에서 hydrolyzated SPI샘플은 unmodified SPI 샘플 보다 좋은 거품력을 보였다. 이는 대두 분리 단백질이 가수분해가 되면서 펩타이드 사슬 경계면에서 펼쳐지는 경향이 증가하는 것으로 사료된다. 거품의 안정성은 시간이 지남에 따라 감소하였고, 알칼리 pH범위에서는 불안정한 것으로 나타났다.
- ⑦ SDS-PAGE 분석을 통하여 가수분해 시간에 따른 샘플들의 단백질 분자량을 확인하였다. 확인 결과 가수분해 시간이 증가함에 따라서 대두의 주요 allergen site(60kDa, 38kDa, 26kDa)가 점차 감소하는 것을 확인했고, 효소에 의해 8시간 동안 가수분해된 샘플에서는 주요 allergen이 모두 제거되어 저알러지 대두 분리 단백질을 확인할 수 있었다.

2) 활용에 대한 건의

- ① 대두 단백질 가수분해물을 첨가한 기능성 전통 증편은 세계 최초로 개발되었으며, 소비자와 전문가 집단의 관능검사에서 좋은 반응을 보이고, 노화도 검사에서 노화도 지연 정도가 확연히 보였으므로 앞으로 전통 음식의 상품화에 적극적으로 활용될 것으로 기대된다.
- ② 대두의 종류와 대두단백 가수분해물의 분획에 따른 기능성의 차이로 불용성분해물에서 생리기능성이 높은 것은 증편 뿐 아니라 다른 식품에의 첨가 시에도 활용이 기대되는 바이다.

SUMMARY

I. Title of Research

Development of functional traditional food using hypoallergenic soy protein hydrolyzate

II. The Objective and Importance Research

Soy bean is the second food resource followed by rice. The increase of soy bean yield is considered as an national issue. Unfortunately, the degree of self sufficiency is no more than 5% due to the decrease of the yield and the increase of soy bean import. The customers are reluctant to buy a domestic soy bean by the high price of domestic soy bean (the domestic bean: 2000won/kg, the imported bean:700won/kg). The low consumption rate causes the area under cultivation decrease and the earning rate per tan be lower. Therefore, the scientific merits of the domestic soy bean and the processed soy bean food have to be proved and advertised to consumers.

The domestic soy bean was classified by color and named as yellow bean, serae tae, black bean and so on. The yellow bean has been mostly consumed and used for making soy bean paste and sauce. The black bean is much smaller than the serae tae and is used as herbal medicine. The serae tae harvested after the first frost has the black film and the blue contents.

Each of soy bean has the different phytochemicals. The yellow bean has more gestic in isoflavone than others. The black bean and serae tae has anthocyanin coloring matter. This coloring matter being one of phytochemicals has the inhibition effect of angiotensin converting enzyme related to hypertension, xantine oxidase causing gout, and phospholipase A₂ causing inflammation.

Now, the adult disease such as obesity, diabetes, and circulatory disease is rapidly on the increase due to lack of exercise and excess of nutrition. Researchers, doctors, and government make many effort on decreasing these disease. The use of functional food is considered as a good preventive measure. Soy protein is known as having effects of improvement on fatness, hypertension, arteriosclerosis, and hyperlipemia. it reported that eating soy protein decreases HDL cholesterol and increases HDL cholesterol. As well;, The traditional fermented foods made soy bean and soy bean hydrolyzates were proven having the activity on antitumor by inhibition on growth of the large intestine and lymph cancer tissue.

These results show the possibility of the usage as the new functional food material.

In korea, about 8000 ton food protein per year has been imported and used a food additive. The half of imported food protein is animal protein such as casein, egg protein, and serum and the other half is isolated soy protein (ISP). At this point that the increase of consumer desire on vegetable protein, ot assumes that development of functional food material with domestic soy bean makes a possibility on saving 60 billion dollars. On the other hand, the self sufficiency of rice is 100% after 1985. Recently, the consumption rate is rapidly decreased compared to the production rate and importation rate is increased. Therefore, farmhouse revenue is on the decrease and provision security is floated as a serious issue. It is necessary to make the processed rice food for keeping the demand and supply of rice and the promotion of rice consumption. Expecially, development of traditional rice processed food such as rice cake give a good meaning society with progress of technique.

The research reported that the comsumer want to eat rice cake for breakfast and the well being trend causes consumer to consume more. Many rice cakes have been developed by adding jingko flour, surichu, mulberry leaves, and fiber. As well, many reserchers make an effort on delaying dematuration of starch preventing commercialization

It is rarely that quality contributes of rice cake are studied after adding developed functional food materials like soy protein hydrolyzates. Until now, there is not any study about dematuration effect when soy protein hydrolyzates add to rice cake.

This study developed soy protein hydrolyzates and identified functional effect of hydrolyzates. It developed *Jeungpyun* replaced with soy protein hydrolyzates and conducted sensory and physiochemical properties, and storage test in order to verify the possibility of commercialization.

III. The Scope and Contents of Research

1. Development of soy protein hydrolyzate and functional traditional food (*Jeungpyun*)

A. Fractionation of soy protein separated from the domestic soy bean and measure of hydrophobicity

- Development of soy protein hydrolyzates
- Measure of hydrophobicity of soy protein hydrolyzates
- Test of functional properties

B. Development of *Jeungpyun* added soy protein hydrolyzates

- Conduction on sensory properties of developed *Jeungpyun*
- Investigation on physico-chemical and physical properties of developed *Jeungpyun*
- Conduction on storage test

2. The effect of lipid lowering and antioxidative effect of soy protein hydrolysate

- A. The effect of different kinds of Korean soybeans on body lipids and lipid peroxidation in rats
- The effect of different kinds of Korean soybeans on body weight of the rats
 - The effect of different kinds of Korean soybeans on body lipids of the rats
 - The effect of different kinds of Korean soybeans on lipid peroxidation of the rats
- B. The effect of soy protein hydrolysate on body lipids and antioxidative activity in rats
- The effect of soy protein hydrolysate on growth rate of the rats
 - The absorption rate of soy protein hydrolysate in rats
 - The effect of soy protein hydrolysate on body lipids of the rats
 - The effect of soy protein hydrolysate on antioxidative activity of the rats
3. Development of Hypoallergenic Soy Protein Hydrolyzates in Pilot-plant Scale
- A. Preparation of Hypoallergenic Soy Proteins without Antigen
- Development of method removing antigen from soybean
 - Preparation of Hypoallergenic soy proteins in pilot-plant scale
- B. Enzymatic modification for structural changes and improving functional properties
- Preparation of Hypoallergenic soy Proteins using enzyme modification
 - Enzymatic modification for improving functional properties

IV. Results of Research

1. Development of soy protein hydrolyzate and functional traditional food (*Jeungpyun*)

A. Fractionation of soy protein separated from the domestic soy bean and measure of hydrophobicity

Seraetae was selected by lipid lowering and antioxidative effect for making hydrolyzates. Alcalase as enzyme were chosen by hydrolyzated level test of enzymes. In order to investigate functionality of soy protein hydrolyzates, turbidity was tested. The longer hydrolyzated soy protein showed higher solubility. On the pH effect, possibility of isoelectric precipitation was indicated by intermolecular hydrogen bonding through amide group interaction. The test of hydrophobicity resulted that the longer hydrolyzated hour increased peptide content.

B. Development of *Jeungpyun* added soy protein hydrolyzates

Functional *Jeungpyun* was prepared with rice flour that added with soy protein hydrolyzates (at the levels of 1,3,7%). Batter pH decrease as fermentation progressed, but showed higher pH after steaming, pH increased with the increase of hydrolyzated soy protein concentration. Solubility, foaming ability, water content, and water coherence increased as the level of soy proteins hydrolyzates increased. The result of consumer panel and specialist panel indicated that *Jeungpyun* with soy protein hydrolyzates were preferred. In storage experiments measured by a DSC, the effect of the soy bean hydrolyzates on retrogradation was observed to exert a great influence of *Jeungpyun*. *Jeungpyun* with soy protein hydrolyzates made transition temperature and enthalpy higher than the control.

2. The effect of lipid lowering and antioxidative effect of soybean protein hydrolysate

A. The effect of different kinds of Korean soybeans on body lipids and lipid peroxidation in rats

SD male rats(n=48) were assigned to six different groups and provided experimental diets for 28 days. The protein source of the diet was casein, isolated soy protein(ISP), or casein plus traditional soy powders(yellow bean, huktae, jununi or seorietae). The ISP and soy powder diets decreased blood triglycerides. The ISP group had lower hepatic total lipid and triglycerides than casein group. The yellow bean and Seorietae group had hepatic lipid lowering effects, but the effect was not found in Huktae and Jinuni group. The blood malondialdehyde content was lower in Yellow bean, Jinuni, and Seoritae than the Casein group. The glutamate-oxaloacetate transaminase activity was significantly decreased in ISP and all the soy powder groups. The glutamate-pyruvate transaminase activity was decreased in ISP, Jinuni and Seorietae. The results of this study suggest that Seorietae, Jinuni and Yellow bean groups are more effective in lowering body lipids and lipid peroxidation than Huktae group.

B. The effect of soybean protein hydrolysate on body lipids and antioxidative activity in rats

SD male rats(n=40) were assigned to five different groups and provided experimental diets for 28 days. The protein source of the diet was casein, isolated soy protein(ISP), seorietae hydrolysate(SH), soluble soyprotein hydrolysate(SS), and insoluble soyprotein hydrolysate(IS). The apparent lipid absorption was significantly lowered in isolated soy protein at week 1 and in insoluble soyprotein hydrolysate at week 4 of the experimental period. The soyprotein hydrolysate groups had lower blood triacylglycerol, total cholesterol and LDL-cholesterol than casein group. The effect was more prominent in insoluble soyprotein hydrolysate. Seorietae hydrolysate had higher antioxidative activity and ISP and IS had lower blood lipid peroxidation.

3. Development of Hypoallergenic Soy Protein Hydrolyzates in Pilot-plant Scale

Soybean is generally considered a source of hypoallergenic protein, and may serve as a suitable ingredient for infant formulations, thus adding a variety to restricted diets of children with food allergies. Allergenicity of soybean proteins have been well documented in the literature. However, investigation on allergenicity of soy proteins is limited. Our preliminary study showed that allergenic proteins were 5% and 0.2 % of total extractable highly antigenic proteins with 38 kDa molecular size. Although soybean is nutritional and pharmaceutical potential has been recognized, at present, rice bran protein concentrates and isolates are not commercially produced. This can be attributed to lack of commercially feasible extraction methods due to: 1) poor solubility due to extensive aggregation and disulfide bonding of the proteins, 1995), and 2) the complex nature of proteins in soybean. These inherent properties of rice bran proteins makes it difficult to extract proteins by a simple extraction procedure. Alkali extraction condition can cause undesirable side reactions and potential toxicity. This alkalinity not only affect the nutritional properties but also the functional properties of proteins which are important for the processing, preparation, and quality in a variety of food products. Therefore, development of effective and efficient methods for extracting proteins from soybean is critically important.

Recently, an enzymatic method using alcalase has been developed in our laboratory to produce soy protein isolate containing over 90% protein with a yield of about 75% from non-heat treated and defatted soybean. To date no other work on soy protein isolate preparation has been reported, and this is the first time that a soy protein isolate (SPI) has been produced with a yield over 75% and protein content of 90 %.

The poor solubility of soy proteins makes them undesirable for functional applications. Hence, in addition to improving protein extractability, structural modification of soy proteins is necessary to produce functional ingredients and

for beverage/infant formula applications. Controlled enzymatic modification can lead to optimum balance between different molecular characteristics including, size, charge, surface groups and flexibility, of proteins due to changes in protein conformation and structure which give soybean to desirable physicochemical and functional properties. To optimize specific functionality by structural modification, information on structure–function relationship on soy proteins are essential.

Proteins structural properties and the interaction with other food components determine the functional application of proteins in a food system. Each functional property of a protein requires different characteristics. For example, molecular flexibility with less secondary and tertiary structures is essential to impart foaming ability, while intermolecular cohesiveness, elasticity, and viscosity are important to maintain foam stability. Hence to optimize specific functionality of proteins by structural modification, information on structure–function relationship is essential. Investigations and information on soy protein isolate and its applications are limited due to the lack of simple extraction methods.

The successful outcome of this research is the development of an economical method to produce hypoallergenic soy protein isolate which can lead to new uses for use of soybean and new technology, and potential commercialization of soy products.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of research project	25
Chapter 2. Research progress in korea and other countries	31
Chapter 3. Contents of the research project and results of the study	37
Chapter 4. Achievements and contribution to related fields	149
Chapter 5. Application Plans of the research results	152
Chapter 6. Information obtained during implementation of the research	155
Chapter 7. References	157

목 차

제 1 장 연구 개발 과제의 개요	25
제 2 장 국내외 기술 개발 현황	31
제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과	37
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	149
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	152
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	155
제 7 장 참고 문헌	157

제 1 장 연구 개발 과제의 개요

제 1 절 연구 개발의 필요성 및 목적

우리나라에서 콩은 식량자원으로써 쌀 다음으로 중요한 부분을 차지하고 있으므로 콩의 생산량 증대는 국가적으로 대단히 중요한 문제이다. 그러나 국내산 콩의 자급률은 생산량 감소와 외국산 수입증가에 따라 급속히 감소 되어 1997년에는 자급률이 8.0%에 이르렀음. 정부는 오늘 2004년까지 식용콩 수요 50만 ton중 50%인 25만 ton 자급계획을 수립하였는데 (농림부 발표, 농어민신문, 1999년 2월 22일), 이를 현실화하기 위해서는 다각적인 대책이 필요하다. 더욱이 세계 각지에서 빈번하게 발생하는 기상이변 등에 의한 식량과동과 국제곡물가의 상승 등은 식량 수급의 불안정을 초래하고 있다. 그 한 예로서 콩의 국제 가격을 보면 94년도에 ton당 가격이 USD268, 95년도에는 USD290, 96년도에는 USD320로 매년 상승하고 있어, 식량 안보적인 차원에서 자급률을 높이는 것이 시급한 실정이다. 국내산 콩의 낮은 자급률은 국산콩의 높은 가격 (국산콩 2000원/kg, 수입콩 700원/kg)에 따른 경쟁력 저하와 이에 따른 콩 재배면적의 감소와 콩의 낮은 단보당 수익률 등에 기인한다고 볼 수 있다. 이와 같이 국산콩은 가격적인 측면에서 수입산에 비해 그 격차가 5~6배 차이가 나므로 국산콩의 경쟁력을 향상시켜 자급율을 끌어올리기 위하여서는 무엇보다도 국산콩과 국산콩가공제품의 우수성을 과학적으로 입증하여 소비를 적극적으로 유도해야 할 필요가 있다.

현대 대부분의 성인병중 가장 문제가 되는 것은 영양과잉 및 운동 부족으로 인한 비만과 그에 수반되는 순화기질병과 당뇨병이다(조홍연, 1995). 이것을 예방 및 치료하기 위해서는 여러 방법이 있을 수 있으나 기능성 식품을 이용하여 질병을 미연에 방지하는 것이 좋은 예방법일 것이다. 이에 대두 단백질은 동물성 단백질에 비하여 비만, 고혈압, 동맥경화, 고지혈증 등을 개선하는데 탁월한 효과가 알려져 왔으며, 실제로 대두 단백질의 섭취할 경우 혈중 고밀도 콜레스테롤의 함량은 증가하나, 저밀도 콜레스테롤의 함량은 감소한다고 보고되었다(이연숙 외 4인, 1997; Fring Cs 외 1인, 1970; 김창임 외 1인, 1995). 또한 서울대 이형주 교수 연구팀에 의하면 콩으로 만든 전통 발효 식품이나 콩 가수분해물에서 유래된 여러 종류의 펩타이드들은 생쥐 및 인간의 백혈병, 림프암, 대장암 세포주의 생육을 저해함으로써 항종양 활성을 나타내었고

angiotensin 전환 효소의 활성이 나타났다고 분석하였다. 이와 같은 결과는 콩으로 만든 정통 발효 식품이나, 콩 가수분해물에서 유래된 여러 종류의 펩타이드들이 항종양 혈압강하, 혈청 콜레스테롤 강하 활성 등을 갖는 신 기능 식품 소재로서 응용될 수 있는 가능성을 보여준다. 한편 우리나라는 연간 8000ton 정도의 식품 단백질을 외국에서 수입하여 식품첨가물로서 이용하고 있는 실정이며, 이중 반은 casein, egg protein, 혈청과 같은 동물성 단백질이며, 나머지는 분리대두 단백질(ISP)이다. 식물성 소재 단백질에 대한 소비적 욕구가 증가하고 있는 이 시점에서, 국내산 대두를 이용하여 기능성 단백질 소재를 생산해 낸다면, 연간 320억에서 600억원의 외화 낭비를 막을 수 있을 것이라고 예상한다(이부용, 2001). 또한 1985년 이후 쌀의 자급율을 100% 달성한 이후, 쌀 소비의 감소로 생산량에 비하여 소비량에 훨씬 떨어짐에도 불구하고, 쌀의 수입은 계속적으로 증가하고 있는 추세이다. 1998년 수입량 61,631,335kg에서 2004년 9월까지 집계 114,150,093kg로 약 두 배 증가하였다(농촌진흥청, 2001; 농림부, 2001). 따라서 농가 소득의 증가와 국가 식량 안보 차원에서 잉여 농산물의 수급을 위한 쌀가공품의 생산이 절실히 필요하며, 소비촉진의 한 방법으로 전통 쌀 가공품의 상품화를 모색한다면, 사회적, 기술적 의의가 있을 것으로 사료된다. 식사대용 식이로서의 떡 이용 의사에 관한 조사에서는 10대(56.0%), 30대(51.0%), 50대 이상(66.3%)이 이용의사를 밝혔으며, 성별로 보면, 여자의 경우 64.0%, 남자의 경우 42.3%가 식사대용으로 떡을 이용할 의사있는 것으로 조사되었으며, 특히 30대와 40대가 각각 52.0%, 51.6%로 떡을 아침식사 대용으로 이용할 의사가 있는 것으로 보고되었다(김옥선, 2003; 황혜전, 2004). 떡의 주재료인 쌀에 부족한 영양소를 보완하기 위하여 떡에 은행 분말(김정미 외 3인, 2004), 수리취(김명희, 1993), 뽕잎(유진현, 2004), 식이 섬유(박미자, 1998) 등 다양한 부재료 첨가에 관한 연구가 이루어져 왔다. 그러나 정제된 기능성 소재를 개발하여 떡에 첨가한 경우는 매우 드물다. 쌀가공품인 떡이 상품성이 떨어지는 이유를 전분의 노화로 인하여 저장 유통을 문제가 있는 것으로 지적된다(Park 외 2인, 1993). 현재까지는 지방질(Hini, 1990), 병반(Lee, 1993)), 여러 종류의 당(Carins, 1991), 셀룰로오스, 식이섬유 등이 노화 억제 방법으로 많이 사용되어 있다. 보다 상품의 가치를 높이기 위해서는 다양한 측면에서의 보습성과 보존성을 높여 주는 방법이 연구되어 질 필요가 있다.

따라서 본 연구에서는 국내산 대두를 이용한 천연 기능성 물질의 소재 개발과 기능성 확인, 이를 첨가하여 최적의 제조 배합을 통한 기능성 전통 음식인 증편의 개발 및 제조된 기능성물질이 노화에 미치는 효과를 규명할 것이다.

1. 경제 산업적 측면

- 현재 항알러지 식품 (hypoallergenic food)에 관한 연구는 많이 진행되어 있지 않은 실정이며, 새로운 allergen 탐색기술 개발의 발전이 기대 되어짐. 항알러지 식품이란 종래식품의 특성이었던 영양성과 기호성에 식품의 생체조절성을 강조하면서 생체면역성 강화를 주 기능으로 한 식품을 저알러지성 식품이라 말함. 노령인구와 만성질환의 지속적인 증가로 인한 질병 예방적 수단으로서 저알러지성 식품의 도입과 활성화가 필연적으로 요구되고 있음. 저알러지성 식품의 과학적인 접근 방식으로 antigenicity나 immunogenicity가 검증되고 소비자의 요구에 맞는 고기능성 식품의 개발로 국민건강증진은 물론 국제경쟁력을 갖춘 국가 기반산업으로의 발전을 모색하고 있음.
- 건강보조식품 및 식이요법의 증가와 비약물 치료에 대한 선호도가 증가하고 있으며, 따라서 임상적인 측면에서 안전성이 확보된 식물성 천연물질을 이용한 기능성, 영양성을 가지고 있는 구체적인 개념의 보건 기능성 식품은 전무한 상태임.
- 국내 시장의 경우도 1998년 현재 건강보조식품시장이 8500억원이며, 매년 약 20-25%의 성장률을 보이고 있고, 기능성 식품 소재를 이용하는 식품군까지 통합할 경우 시장 규모는 더욱 클 것으로 예상됨.
- 일본과 미국의 시장은 96년 현재 6500억엔과 93년 45억불의 시장이 형성되고 있음. 그러나 기능성 소재는 대부분 수입에 의존하고 있음.
- 기능성 식품소재 시장과 건강보조식품시장의 건실한 발전을 위해 국내생산 소재 필요함.
- 1998년 현재 미국의 nutraceutical 시장은 25억달러로 추산되고 있고, 유럽 역시 비슷한 규모로 파악됨. 96년 일본의 경우 약 303억엔의 시장규모를 가짐.
- 국내외적으로 치료식 시장의 제품구성은 5대 영양소로 이루어져 있으며, 질환의 개선보다는 유지가 주된 기능으로 대두 peptide를 함유한 기능성 떡의 개발은 성인병 발발의 예방과 면역력 증강에 적극적인 이용이 가능함으로써 medical food 및 nutraceutical 제품에의 활용과 시장의 확대에 기여할 가능성을 확신함.
- 따라서 본 연구의 궁극적인 목표는 재래식 국산콩의 우수성을 과학적으로 입증하여 저가의 수입콩에 의해 잠식되어 있는 국산콩의 자급률을 50% 상으로 높이고 개발한 기능성 단백질 소재를 함유하는 식품을 상품화하여 농가소득을 증가시키는 데 목표를 두고 있음.

2. 사회 문화적 측면

- 우리나라 국민소득의 급격한 향상은 국민 식생활 수준을 높이고 그 체계를 육식 위주로 변화시켰으나 이로 인하여 각종 성인병의 발생빈도가 높아져 국민 의료비의 과중한 부담이 국가 경제적 차원에서 위기감을 자아내기에 이르렀음. 이와 같은 성인병을 대두식품으로 예방할 수 있으며 한편으로 국민으로 하여금 연간 30억 달러에 해당하는 높은 의료비의 부담을 덜어 줄 뿐 만 아니라, 건강한 생활을 도모할 수 있도록 한다는 점에서 이점이 있음. 따라서 국산콩을 이용한 대두식품의 우수성을 과학적으로 입증함으로써 국민의 건강을 증진시킬 수 있음.
- 콩에는 단백질, 지질, 탄수화물이 각각 30-45%, 15-20%, 25-30%로 3대 영양소가 균형 있게 함유되어 있을 뿐 아니라 생명활동에 대한 조절기능을 수행하는 물질들이 다량 함유되어 있음이 밝혀지고 있음.
- 국산콩은 수입산 콩에 비해서 외관상 껍질이 얇고 깨끗하며, 윤택이 많이 나고 낱알을 z크기가 고르지 않다고 알려져 있다. 국산콩의 성분도 수입콩과는 차이가 있으며 단백질과 B/A의 비율이 높음.

구분	단백질	수용성 단백질	B/A	지방	회분	수분
국산콩	39.7%	33.1%	83.4%	17.0%	5.7%	11.8%
수입콩	34.9%	38.4%	81.4%	33.0%	5.0%	10.0%

- 이와 같이 콩에 관한 연구는 주로 미국을 비롯한 일본 등의 선진국에서 자국의 품종에 관하여서 진행되어 온 바, 우리나라 고유의 대두 품종에 대하여서는 체계적인 연구가 아직 진행되지 못한 상태에 있음.
- 또한, 최근에는 유전자재조합 농산물(Genetic Modified Organism, GMO)이 국내에 다량 수입되어 유통되고 있는데, 1997년에 총 수입량 162만 톤 중 49만 톤이 GMO 콩일 것으로 추정됨. GMO 농산물은 알레르기 유발 문제, 항생제 내성 문제, 독성 문제 등 안전성에 관한 논란이 끊임없이 제기되고 있으므로 콩을 제 2의 주식으로 하고 있는 우리에게는 중요한 관심사가 아닐 수 없음.
- 대두단백질식품은 영양면에서 풍부하고 기능면에서 성인병의 예방과 치료에 효과가 있으므로 이와 같은 기능성 식품의 도입은 국민에게 건강하고 밝은 사회문화생활을 영위하게 함. 각종 성인병으로 인한 국민의존의 가중을 대두식품으로 예방함으로써 가계의 경제생활을 풍요롭고 원활하게 할 수 있음.

3. 영양학적 측면

- 국민 식생활의 급격한 서구화로 인하여 영양과다로 인한 고지혈증, 동맥경화증의 유병율이 증가하고 있음. 이러한 순환기질환은 합병증의 심각성으로 생산성과 삶의 질을 저하시키고 그에 따른 과도한 의료 경비 지출로 인하여 단순한 의료 문제에 그치지 않고 21세기를 바라보는 오늘의 가정, 사회 및 경제에 무거운 짐이 되고 있음.
- 1997년을 기준으로 국내 의료비는 17조여원에 달하고 있으며 국민 1인당 연간 진료비의 지출도 1990년 83,996원에서 1996년 190,286원으로 증가되었음.
- 향후 사회 경제적인 짐이 될 소지가 있는 의료비 증가의 현 시점에서 최근 소비자들은 생활이 향상됨에 따라 건강지향 식품과 천연 식품을 사용한 치료보조 식품을 선호하게 되었음. 따라서 특수 생체 기능을 갖는 대두 기능성 식품을 경제적으로 생산하여 보급할 경우 안전성이 높고 경쟁력이 있을 뿐 아니라 순환기 질환의 치료 보조 수단으로 사용될 수 있을 것임.
- 이러한 치료 보조 식품은 의료비를 절감시킬 뿐 아니라 국민의 건강을 증진시키고 복지를 위하여 필요함. 이러한 치료 보조 식품은 구미에서는 "Designer Food" 또는 "Nutraceutical"로 일본에서는 "특정보건용식품" 또는 "기능성식품"으로 불려지며 최근 EU 산하 연구기관의 보고에 따르면 2009년 이후에는 일반화 될 것으로 예측되고 있음.
- 특히, 면역강화 식품의 개발은 미래 식품개념에 있어서 최종 목표로서 그 중요성이 매우 강조되고 있는 실정이며, 면역항원체가 제거된 식품원료개발과 면역강화 소재 개발 및 이들이 보강된 식품개발은 필수적이며 매우 혁신적인 연구과제로 여겨짐.
- 따라서 본 연구의 궁극적인 목표는 재래식 국산콩의 우수성을 과학적으로 입증하여 저가의 수입콩에 의해 잠식되어 있는 국산콩의 자급률을 50% 상으로 높이고 개발한 기능성 peptide 소재와 이를 첨가한 전통 식품을 통하여 농가소득을 증가시키는 데 목표를 두고 있음.

제 2 절 연구의 범위

1. 대두 단백질 가수분해물 제조 및 기능성 전통 식품 개발

가. 국내산 대두로부터 분리한 soy protein의 fractionation과 hydrophobicity 측정

- 대두종의 일반 성분 분석
- 가수분해 조건 확립
- 제조된 가수분해물의 소수성 측정
- 제조된 가수분해물의 기능성 평가

나. 대두 단백질 가수분해물 첨가 기능성 전통 증편의 개발

- 대두 단백질 가수분해물을 첨가한 기능성 전통 증편의 물리적 이화학적 평가
- 대두 단백질 가수분해물을 첨가한 기능성 전통 증편의 품질 특성 분석
- 대두 단백질 가수분해물을 첨가한 기능성 전통 증편의 저장성 평가

2. 대두 단백질 가수분해물의 소화율과 지질 저하작용 평가

가. 국내산 대두가 실험 동물의 생리 대사에 미치는 영향 평가

- 여러 종류의 대두가 실험 동물의 체중 증가에 미치는 효과 판정
- 여러 종류의 대두가 실험 동물의 체내 지질에 미치는 효과 판정
- 여러 종류의 대두가 실험 동물의 지질과산화에 미치는 효과 판정

나. 대두 단백질 가수분해물의 지질저하작용과 항산화력 평가

- 대두 단백질 가수분해물의 성장율 평가
- 대두 단백질 가수분해물의 소화흡수율 평가
- 대두 단백질 가수분해물의 지질저하작용 평가
- 대두 단백질 가수분해물의 항산화력 평가

3. 저알러지 대두 단백질 가수분해물 대량 생산 공정 확립

가. 면역반응 항원 물질이 제거된 항알러지성 단백질 제조

- 항원체 제거 방법 검색
- 저알러지 대량 생산방법 개발

나. 면역 반응 항원 물질의 제거된 저알러지성 단백질 제조 및 단백질 물성과의 관계 규명

- 면역 반응 항원 물질이 제거된 저알러지성 단백질 제조
- 효소적 변성법을 통한 단백질의 기능적 특성 측정

제 2 장 국내외 기술 개발 현황

제 1 절 국내외의 기술 현황

1. 대두 단백질의 기능성

대두는 단백질이 35~40% 정도로 비교적 풍부하게 함유되어 있을 뿐만 아니라 쌀과 밀보다 단백질이 높아 식물성 단백질 공급원으로도 우수하다(Giese, 1994). 오늘에 이르러서는 채식을 선호하는 사람들을 위해 대두 콩을 이용한 인조고기, 과자류, 콩 요구르트, 콩 아이스크림, 콩 치즈 등을 제조와 개발이 이루어지고 있으며, 콩의 건강 기능성을 이용한 화장품, 비누 등의 연구개발되고 있다. 우리의 식탁에 늘 가까이 있는 대두의 성분에는 인지질인 lecithinen choline, 색소성분인 isoflavone, saponins 그리고 단백질인 peptide, 식이 섬유인 soy fiber등의 건강 기능성 성분을 함유하고 있는데, 이들 성분은 심혈관질환과 같은 성인병을 예방하고, 항암 기능을 가지고 있으며, 갱년기에서 생길 수 있는 여러 기능 장애를 예방한다라고 한다(한명규, 2002) Brantle 등 (1979)은 casein peptone에서 아편성 마취 물질인 β -casomorphin의 peptide를 분리하여 Table 2-1에서와 같이 식품 단백질로부터 효소적 소화 처리에 의해 많은 종류의 생리 활성 peptides를 분리해 냈다. 이들 물질들은 효소 억제제(Maruyama 외 1인, 1985), 장내흡수를 증진시키는 peptides(Sato 외 1인,1986: Sugano 외 1인, 1998), 미생물 증식을 억제시키는 peptides(Tonita 외 2인, 1995), 항산화 기능을 지닌 peptides(Chen 외 2인, 1995) 등으로 인체내에서 유용한 기능을 수행하고 있다.

Table 2-1. Bioative peptide derived from food protein

Peptides	Orgin	Physiological effect
β -Casomorphin	Casein	Suppression of intestinal mobility
Gluten exorphin A	Glutein	Improvement of learning
Rubiscolin	Rubisco	Improvement of learning
Ovokinin	Ovalbumin	Anti-hypertension
Soymetide	Glycinin	Protection from hair loss
Casein Phosphopeptide	Casein	Improvement of calcium absorption
Soybean	Soybean protein	Hypocholesteroeemic effect
Casein Phosphopeptide	Lactoferrin	Anti-infection

특히 콩단백질이 골다공증 예방이나 골소실 지연에 유의한 이유 중 하나로 이소플라본에 관심이 고조되고 있다(Spencer 외 1인, 1988; Riggs 외 1인, 1995). 이소플라본은 구조와 분자량이 여성호르몬인 에스코르겐(17 β - estradiol)과 유사하여 약한 에스트로겐의 성질을 가진다고 보고되었으며(Zemel, 1988), 골다공증 치료 약물인 ipriflavone과 구조적으로 유사하다는 점 때문에 이소플라본이 풍부한 콩 단백질은 폐경 후 여성의 골다공증 발병 위험을 줄여 줄 있다고 제시되었다(Mazess 외 1인, 1974). 또한 이소플라본은 에스트로겐 수용체 - β 에 선택적으로 작용하여 에스트로겐 수용체 - β 가 주로 분포되어 있는 조직인 갑상선, 뼈, 혈관 등에는 더욱 선택적으로 작용 할 것이라는 조직 선택적 효과에 대한 가능성이 제시되었다(Brazel 외 1인, 1998). 이러한 성질 때문에 이소플라본은 폐경 이후 여성에서 에스트로겐 분비 부족으로 인한 골손실 위험을 낮춰 줄 수 있다고 제안한다. 최미자와 조현주는 콩 단백질을 성장기 암컷 흰쥐에 실험 식이를 한 결과 9주 식이 이상에서 대조군에 비해서 척추와 대퇴골의 골밀도가 유의적으로 높은 것으로 나타났다(최미자, 2003). 흰쥐의 칼슘 기전에 관한 육류의 단백질과 대두단백질의 비교 연구에서는 대두단백질을 식이한 그룹의 흰쥐가 칼슘흡수력이 높았으며, 골밀도도 육류 단백질인 casein을 식이한 그룹보다 훨씬 높게 나타났다(Yoon 외 1인, 2006). Sellmeyer et al.은 육류 단백질의 섭취율이 높을수록 골밀도가 떨어졌으며, 그렇지 않은 사람에 비해서 골반 골절의 위험을 더 많이 가지고 있다고 보고한다(Sellmeyer, 2001). 또한 당뇨 흰쥐에 분리대두 단백질을 4주간 투여한 결과 혈청의 총지질, 중성지방 및 총 콜레스테롤 농도를 낮추었으며, 당뇨군에서의 신장비대를 완화시켰으며, 사구체여과율도 감소시키는 것으로 나타났다(정수현, 2001).

2. 대두 단백질 가수분해물의 물성적 특성

대두 단백질은 우수한 단백질 공급원임에도 불구하고 phytic acid, trypsin 저해제와 같은 요소 때문에 식품에 적용하기가 쉽지 않았으나, 대두 단백질의 효소적 처리는 이러한 antinutritive 요소들을 제거하여 영양학적인 가치를 상승시켜 줄 뿐만 아니라 색깔과 풍미에 있어서도 다른 식품과 결합의 가능하게 한다고 하였다(Nielsen 외 2인, 1980). Vijayalakshimi et al. (1986)은 단백질 가수분해물은 낮은 분자량의 peptides, 특히 di- 와 tripeptides 들은 대량함유하고 있다고 하였으며, 이는 영양적으로도 우수하며, 치료학적인 가치를 가지고 있다고 하였다(Vijayalakshmi, 1986). Wen-Dee

Chiang et al.은 분리대두단백질을 다섯가지의 효소(alcalase, flavourzyme, trypsin, chymotrypsin, pepsin) 처리를 통한 가수분해물과 기존의 분리대두 단백질의 ACE 저해 활동 수준을 측정한 결과, 효소적 가수분해물이 ACE 저해 활동이 높은 것으로 나타났으며, 특히 alcalase에 의한 가수분해물이 가장 높은 ACE 저해활동을 보여주는 것으로 나타났다(Li 외 2인, 1989).

가수분해 처리는 기능적, 물성적 특성에도 영향을 주는 것으로 분석되어 졌다. Pancreatin에 의한 가수분해물은 용해도와 유화도를 증가시키는 것으로 나타났으며 (Moteiro, 1994), Papain 처리된 가수분해물은 용해도와 거품형성력을 증가시켜주는 것으로 연구되어 졌다. 시중에서 사용되고 있는 대부분의 효소들에 의한 가수분해물은 기능적 특성을 향상시켰으며, 효소 종류와 가수분해 조건에 따라 상당히 정도 차이가 있는 것으로 보여졌다(Chobert 외 2인, 1998; Bernardi, 1991).

3. 기능성 떡의 개발

쌀에는 우리 몸에 이로운 많은 영양소들이 있지만 단백질으로 필수아미노산인 라이신과 트립토판이 부족하다고 지적되어 진다. 이의 보충은 콩 및 잡곡의 혼합에 있으며, 콩과 잡곡을 혼합하는 방법의 떡류들을 전통적으로 즐겨 먹어오던 방법들이다. 과채류, 한약재, 감미료 및 향신료의 배합은 곡류에 없는 비타민 A,B,C 복합체와 무기질, 아미노산 균형 등 영양상의 균형과 약효효과를 준다. 좀더 구체적인 예를 들면 무시루떡은 주재료인 맵쌀에 부족한 비타민 B1과 단백질을 고물인 팔이 보충해 주고 있으며, 특히 팔에 많이 함유되어 있는 B1은 체내에 흡수된 당질을 연소시키는 작용을 한다. 썩떡의 경우에는 맵쌀가루에 썩을 섞음으로써 질감이 쫄깃하여 미각을 돋우며, 나아가 영양면에서 썩에 다량 함유되어 있는 단백질과 비타민 A와 C가 쌀에서 부족한 영양소를 보충하여 영양상의 조화를 이루게 한다(유진현, 2004). 이렇듯 우리나라 전통음식인 떡은 영양적으로 매우 우수한 식품이다. 근래의 여러 연구자들에 의해서 기존의 떡에 부재된 영양소를 가지고 있는 다양한 천연 식품들을 첨가하여 기능성 식품으로서의 변모를 모색하고 있다. 빵잎을 기존의 증편에 첨가하였을 경우 vit. A, 칼슘, 인이 크게 증가하였으며, 백미 대신에 현미떡을 만들었을 경우 섬유소가 최대 420%이상 증가한 것으로 나타났다(우경자, 2003).

Table 2-2. 기능성 떡 관련 연구

연구자	떡 명	부재료	내 용
홍진숙 외 1인 (2005)	인절미	뽕은 감 농축액	뽕은감 농축액의 첨가량이 증가할 수록 색, 향, 단맛, 쓴맛, 뽕은 맛, 촉촉한 정도, 씹힘성을 강하게 나타냈으며, 8%첨가군이 가장 좋게 평가되었음.
박금순 외 1인 (2004)	증편	동충화초	1차 발효 3시간과 2차 발효 30분에서 부피가 가장 증가한 것으로 나타남.
남태희 외 2인 (2004)	증편	빵잎가루	첨가량이 증가할 수록 수분함량은 높게 나타났으며, 텍스처에서는 빵잎 첨가 증편이 경도, 응집성, 점성, 부서짐성에서 모두 유의적으로 낮게 나타남.
장윤희 (2003)	설기떡	백복령 가루	첨가량이 증가할 수록 색도에서는 L 값이, 텍스처에서는 응집성이 감소하는 것으로 나타남.
최미용 외 2인 (2003)	설기떡	유화제, 효소첨가	호화도는 유화제와 효소 첨가군이 유화제와 효소 무첨가군에 비하여 저장기간이 늘어 날수록 높았으며, 텍스처에서는 씹힘성을 제외한 모든항목에서 유의한 것으로 나타남.
조정순 외 2인 (2002)	설기떡	표고버섯 가루	적색도와 황색도는 첨가량이 증가할 수록 유의적으로 증가하였고 명도는 유의적으로 감소하는 경향을 보임.
정현숙(2002)	백설기	흑미	흑미 6-8%첨가군에서 호화도가 가장 높게 나타남.
정진영 외 3인 (2004)	증편	프리카즙	10% 첨가군에서 부피가 가장 증가하였음, 색도에서는 lightness는 대조구가 가장 높았으며, yellowness와 redness는 첨가량이 증가할 수록 높은 것으로 나타났음.
임영희 외 3인 (1999)	쌀편	오징어 먹물	먹물떡 6%, 8%첨가군이 관능검사에서 가장 선호도가 높은 것으로 나타남.
김향희 외 1인 (1998)	절편, 설기떡	녹차분말	전박적인 기호도에서 절편은 녹차 분말 농도의 3%에서 가장 좋게 평가되었으나 설기떡에서는 녹차분말의 농도가 높을 수록 기호도도 높아져서 7%일 때 가장 좋은 것으로 평가되었음.
김귀영 외 2인 (1999)	설기떡	감잎가루	관능검사 결과, 전반적인 품질은 감잎가루의 첨가량이 증가할 수록 유의적으로 감소하는 것으로 나타남.
정현숙(1998)	설기떡	오미자	오미자 7% 첨가군이 가장 선호되는 것으로 나타났으며, 색상의 경우는 L치는 오미자 첨가량이 증가할 수록 명도가 낮아졌으며, 적색도를 나타내는 치에서는 오미자 7%이상 첨가군에서만 +값을 나타내었음.
박금순 외 1인 (1998)	설기떡	감국	관능평가에서는 감국을 첨가한 떡이 전반적으로 높게 나타났으며, 첨가량이 증가할 수록 부드러운 정도와 촉촉한 정도가 증가하였음.

4. 증편의 품질 특성

지금까지 진행되어 온 증편에 관한 연구로 증편의 품질에 영향을 미치는 제조조건으로 Kim, J.C.와 De Ruiter(1968)는 발효원으로 효모를 이용하여 25-35°C에서 2차 발효시켜 발효 단계에 따른 증편을 제조하는 방법을 설정하였고, 이옥희(1983)와 한재숙(1984)은 발효제로서 효모와 탁주를 비교하였으며, 이종미는 동동주, 날콩국물, 식혜를 비교하였는데 탁주로 발효 시켰을 때는 팽화, 질감, 기호도에서 좋았고 객관적인 물성평가에서는 효모를 사용한 방법이 경도가 낮았다고 하였다(이종미, 1988). 서은주(1990)와 조윤희 등(1994)은 발효온도, 발효시간, 탁주 량, 설탕 비율이 증편의 품질에 영향을 준다고 하였다.

전통 증편의 영양적 가치 증가를 위하여 콩가루와 콩단백 추출물을 넣었을 때 무첨가 증편보다는 팽화 질감이 월등히 좋았으며, 발효원으로 쌀가루에 1.5%에 해당하는 효모와 식초를 첨가하였을 때 증편의 발효시간은 단축되었으며, 제품의 품질과 텍스처도 향상되었다. 김영희 등은 쌀가루에 밀가루 25% 첨가한 증편제조가 가능하며 발효시간은 2시간이 적절하다고 보고하였다. 신광숙 등은 콩 첨가 증편의 Dextran과 내부구조에 관하여 연구하였으며, 콩 첨가가 증편의 dextran생성을 돕고 이 dextran이 증편의 망상 형성에 영향을 주어 증편의 내부 구조가 균일하고 작은 기공을 형성하도록 한다고 보고하였다(신광숙 외 1인, 2001). 그러나 대두 단백질 가수분해물이 증편의 품질 특성과 저장 특성에 미치는 영향에 관한 연구는 아직 이루어진바 없으며, 전통 식품의 산업화를 위해서는 다양한 측면에서의 품질 특성 연구가 필요되어 진다.

제 2 절 연구결과가 국내외 기술현황에 차지하는 위치

1. 대두 단백질의 기능성에 관한 연구는 국내외에서 이루어져 왔다. 그러나 대두 종류에 따른 기능성의 차이에 관한 연구는 이루어지지 않았다. 또한 대두단백질의 기능성은 여러모로 연구가 되었지만, 대두단백 가수분해물의 기능성 연구는 드문 상태이다. 따라서 본 연구에서의 기능성에 관한 연구 결과는 국내산 콩의 우수성을 알리고 대두 단백질가수분해물의 기능성 식품 소재로의 가능성을 타진하기 위하여 매우 필요한 것이라 사료된다.

2. 대두 단백질 가수분해물의 물성적 특성에 관한 본 연구의 결과는 효소의 적합성을 알려주었으며, 이를 소재로 한 기능성 식품을 개발하기 위하여 적합한 식품선택에 많은 영향을 미칠 것으로 판단되어 진다.
3. 국내에서는 아직까지 대두 단백질 가수분해물의 대량 생산 체계가 갖추어져 있지 않다. 따라서 대량 생산에 관한 본 연구의 결과는 대두 단백질 가수분해물의 대량 생산을 위한 초석을 놓을 것으로 판단되어 진다.
4. 국내에서는 기능성 소재를 첨가한 떡의 개발과 함께 떡의 노화도를 지연시켜 산업화를 위한 여러 방안 들이 연구되어 졌다. 본 연구에서 개발한 기능성 증편 또한 좀 더 효과적으로 저장성을 향상 시킬 수 있는 새로운 방안을 제시하여 준다.
5. 쌀을 주성분으로 하는 떡에 대두 단백질 가수분해물을 첨가함으로써 한 식품안에서의 영양의 균형을 도모한다. 따라서 핵가족화와 맞벌이, 독신자들의 증가로 아침 식사 대용을 위한 다양한 음식이 선호되어 지고 있는 현실에서 아침 식사 대용식으로서 상품화의 가능성을 제시한다.

제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 대두 단백 가수분해물 제조 및 기능성 전통 식품 개발

가. 국내산 서리태로부터 분리한 soy protein hydrolyzates의 functionality와 hydrophobicity 측정

1) 연구 개발 내용

국내산 서리태로부터 분리한 탈지 대두분을 이용하여 대두단백질을 만들었으며, 이에 Alcalase를 첨가하여 가수분해물을 생성하였다. 가수분해시의 조건 (pH, 단백질 농도, 효소 농도, 온도)을 최적화 하였으며, 이를 ninhydrin반응을 통하여 알아보았다. 또한 생성된 가수분해물이 NaCl, CaCl₂, heating에 반응에 따른 용해도를 분석하기 위하여 turbidity를 측정하였으며, 또한 target peptide를 추출하기 위하여 fractionation을 시도하였다.

2) 연구 방법 및 결과

가) 선정된 대두의 일반적 특성 분석

콩의 무게는 종피가 파괴된 종자, 분할된 종자, 이물질 등을 제거하여 선별한 건전립을 100립 취하여 3반복으로 무게를 칭량한 후 평균값으로 나타내었다. 길이의 측정을 위하여 각 품종의 콩을 100개씩 취한 후 콩의 부위를 수직길이, 장폭, 단폭 및 배꼽길이와 종피의 두께를 caliper로 사용하여 5반복 측정하여 평균값으로 나타냈는데 종피 두께의 측정부위로는 배꼽의 반대쪽을 택하였다.

Table 3-1. General characteristics of the soybean samples

(unit : mm)

variety	100-seed weight(g)	Whole length(A)	Long width(B)	Ratio of A : B : C	Hilum length
서리태	36.59±0.89	10.15±0.38	9.33±0.34	1 : 0.92 : 0.71	4.302±0.19
메주콩	13.44±2.02	7.13±0.09	6.23±0.21	1 : 0.87 : 0.76	3.45±0.05

색도 측정은 색차계(Color JC801, Color Techno System Co., Ltd., Japan), L 값(명도), a값(적색도), b값(황색도)를 측정하였는데 측정 전 모든 시료는 분쇄하여 입도가 80~100 mesh가 되도록 하였다. 이때 사용한 표준 백판은 L=100.04, a=3.61, b=10.77이었다.

Table 3-2. Color values¹⁾ of soybean samples

Variety	L ²⁾	a ²⁾	b ²⁾
서리태	70.84 ^a	1.19 ^c	21.9 ^e
메주콩	78.56 ^b	5.40 ^d	28.4 ^f

1) Means of tree replication; Same letters a column are not significantly different each other(P<0.05).

2) L : Light scale(100 = pure white, 0 = black), a : (+ red, - green), b : (+ yellow, - blue)

일반성분 분석은 AOAC법(AOAC, 15th ed.)에 의하여 수분함량은 105℃에서 상압 건조하여 측정하였고, 조단백 함량은 micro-Kjeldahl법으로 측정하였으며 질소계수 6.25를 사용하여 환산하였다. 조지방 함량은 시료 8 g을 Soxhlet 장치를 사용하여 65℃에서 8시간 petroleum ether로 추출하였다. 회분함량은 550℃ 직접 회화법을 사용하여 측정하였다. 탄수화물 함량은 100에서 수분함량, 조단백 함량, 조지방 함량, 회분 함량을 뺀 값을 사용하였다. 각 실험성적은 3회 반복하여 얻은 평균값을 사용하였다.

Table 3-3. Proximate composition of the soybean samples

(unit : %, w/w)

Variety	Water	Crude protein	Crude lipid	Ash	Carbohydrate
서리태	8.9	42.3	19.0	4.5	25.3
메주콩	10.5	38.7	20.8	4.5	26.2

지방질은 silicic acid 컬럼 크로마토그래피에 의하여 중성지방질, 당지방질 및 인지방질로 분리하였다. Silicic acid를 콜로이드성 미립자를 제거하기 위하여 증류수로 2번 washing하고, methyl alcohol로 2번 washing하여 105~110°C에서 12시간 activation 시킨다. 1.76×42.8 cm column을 사용하여 flow rate 1~3 ml/min, solvent volume은 bed volume의 6배로하여 chloroform, acetone, methyl alcohol의 순서로 용출시켜, 중성지방질은 chloroform, 당지방질은 acetone, 인지지방질은 methyl alcohol 용출분획으로 분획하였다. 각 지방질 분획을 분석하기 전에 먼저 유리지방산을 얻기 위하여 지방질을 비누화 한 후 가스크로마토그래피를 이용하여 지방산을 분석하다.

시료 0.2 g을 정확히 취해 이형 플라스크에 넣고 0.5 N MeOH-NaOH을 4 ml을 첨가하여 냉각관을 설치하여 30분간 반응시킨 후 BF₃-methanol 5 ml첨가하고 2분 후에 냉각관을 통해 hexane 3 ml을 넣고 1분 후에 saturated salt solution을 첨가해 hexane층을 25 ml 삼각 플라스크에 옮기고 과량의 무수 sodium sulfate를 넣고 hexane층에 잔류하는 수분을 제거한 다음 여과하여 지방산 분석 시료로 사용하였다. GC를 이용한 분석조건은 Table 3-4와 같다.

Table 3-4. Percentage of lipid fraction in soybeans(%)

Lipid	서리태	메주콩
Neutral lipid	96.5	98.3
Glycolipid	0.2	0.2
Phospholipid	3.3	1.6

Table 3-5. Fatty acid composition of total lipid of soybeans(%)

Fatty acid	서리태	메주콩
Myristic acid (14:0)	0.1	0.2
Palmitic acid (16:0)	10.8	11.4
Stearic acid (18:0)	2.8	4.6
Oleic acid (18:1)	22.8	23.4
Linoleic acid (18:2)	53.9	52.2
Linolenic acid (18:3)	8.5	7.1
Arachidic acid (20:0)	0.3	0.2
Behenic acid (22:0)	0.1	0.3
SFA ²⁾	14.1	16.5
UFA ³⁾	85.2	82.7

1) tr:trace

2) SFA : Saturated Fatty Acid

3) UFA : Unsaturated Fatty Acid

아미노산 측정을 위하여 60~70 mesh가 되도록 분쇄한 콩분말을 0.25 g을 칭량하여 ampule에 넣고 6 N-HCl 15 ml로 가한 다음 N₂로 치환하여 신속하게 밀봉하였다. 이를 110℃ 오븐에서 24시간 가수분해시킨 뒤 방냉하여 탈이온수로 50 ml 정용 플라스크에 정용 후 0.2 μm membrane filter로 여과하여 AccQ-Tag 방법으로 유도체화시킨 다음 아미노산을 HPLC로 분석사용하였다. 이때 column은 Nova-Pak C₁₈(3.9×150 mm), injection volumn은 5μl, flow rate은 1 ml/min이고, 검출기는 fluorescence, 이동상은 0.14 M sodium acetate(A), 60% acetonitrile(B)를 gradient법으로 분석하였다.

Table 3-6. Amino acid content of the soybean sample

(unit : mg/g protein)

Amino acid	서리태	메주콩
Asp	99.2	103.1
Ser	27.9	28.0
Glu	153.9	155.9
Gly	36.9	37.2
His	22.4	22.2
Thr	25.9	26.0
Arg	60.0	57.4
Ala	36.4	38.2
Pro	47.0	42.2
Cys	9.1	5.7
Tyr	26.4	29.0
Val	44.4	43.8
Met	3.7	2.9
Lys	52.7	56.5
Ile	42.6	42.7
Leu	64.1	64.2
Phe	36.1	43.7
Total	788.7	798.6

Isoflavone 측정을 위하여 각 시료를 분쇄하여 건조시킨 0.1 g을 정확히 칭량하여 0.1% acetic acid를 포함한 70% ethanol 수용액 0.5 ml을 가하여 교반한 후 실온에서 24시간 방치하여 추출하였다. 이것을 원심분리(12,500 rpm, 5분)한 후 상층액을 취하여 membrane filter(gelman LC13, 0.45 μ m)로 여과하여 HPLC 분석 시료로 사용하였다.

Isoflavone은 aglycon인 daidzein, glycitein, genistein과 그들의 포도당 배당체인 daidzin, glycitin, genistin, malonyl-daidzin, malonyl-glycitin, malonyl-genistin, acetyl-daidzin, acetyl-glycitin, acetyl-gencitin으로 12가지의 성분을 HPLC로 검출하였다. JASCO(Japan)사의 HPLC system을 이용하였으며 column은 YMC(packed ODS A303(4.6 \times 250 mm))을 사용하고, UV detector 254 nm에서 측정하였고 flow rate는 1.0 ml/min이었다. 그 결과는 Table 3-7과 같다.

Table 3-7. Isoflavone content of whole seeds in soybean varieties

(unit : mg/100g)

Variety	Glucoside			Malonyl			Acetyl			Aglycon			Total isoflavones
	Din	Glin	Gin	Din	Glin	Gin	Din	Glin	Gin	Dein	Glein	Gein	
서리태	12.9	6.2	24.3	247.5	14.6	387.5	24.9	4.1	nd	2.8	nd	4.7	729.7
메주콩	33.4	12.0	43.3	174.1	20.1	233.8	14.3	4.9	nd	7.6	26	8.8	407.9

Abbreviations : Din, daidzin; Glin, glycerin; Gin, genistin; Gein, daidzin; Glein, glycitein; Gein, genistein; tr, trace; nd, no detected.

Phytic acid의 함량 측정을 위한 시료의 제조는 Hartland and Oberlass에 의한 이온교환수지 방법을 이용하였으며, phytic acid 함량은 Latta and Ersknin에 의한 비색법으로 측정하였다. 시료 0.5 g에 2.4% HCl 30 ml을 가한 후 2시간 동안 실온에서 교반하였다. 이를 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 냉장 보관하여 사용하였다.

한편 직경이 1.0 cm×15 cm column에 음이온 교환 수지(AG1-X8, Bio-Red Lab) 1.5 g을 충전한후 0.7 M NaCl로 활성화 시켰음 이를 증류수로 Cl⁻이온이 검출되지 않을 때까지 충분히 씻어 주었다. 여기에 추출한 상등액을 5배 희석하여, 10 ml를 주입하였으며, 증류수 20 ml와 0.05 M NaCl 25 ml로 씻어 주어 무기인을 제거하고 0.7M NaCl 15 ml를 가하여 phytate를 용출한 후 이 용액을 30 ml로 정용하였다. 이 희석 용액 3 ml에 Wade 시약(Ferric chloride 0.03% 와 sulfosalicylic acid 0.3%) 1 ml를 넣어 발색시켜, 500 nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정하고, phytic acid(dodecasodium salt)를 표준물질로 작성한 표준 곡선에 의해 phytic acid를 정량하였다. 그 결과는 Table 3-8과 같다.

Table 3-8. Content of phytic acid in soybean variety(%)

Variety	Whole seed
서리태	2.2
메주콩	2.17

올리고당의 측정을 위하여 시료 1.0 g에 10% alcohol 25 ml를 가하고 30°C의 water bath에서 1시간 추출 후에 10% lead acetate를 5 ml 첨가하여 단백질을 제거하였다. 추출액을 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 취하여 membrane filter(gelman LC13, 0.45 μ m)로 여과하여 HPLC 분석 시료로 사용하였다. 분석조건은 JASCO사의 HPLC system을 이용하였으며 column은 Kromasil NH₂ 10 μ m(4.6 mm×250 mm)을 사용하였다. 이동상은 acetonitrile과 water를 70:30비로 혼합한 단일 용매를 사용하여 분석하였다. 유속은 2.0 ml/min로 조절하였고, injection volume은 20 μ l였으며 RI 930 detector(Jasco)로 분석하였다. 올리고당 분석에 사용된 표준물질은 sucrose, raffinose, stachyose의 3종류였다.

Table 3-9. Content of oligosaccharides of the soybean

(unit : % w/w)

Variety	Sucrose	Raffinose	Stachyose	Total
서리태	10.1	3.9	4.3	18.3
메주콩	5.1	1.3	3.9	10.3

나) Preparation of protein samples

구매된 서리태를 믹서로 갈아서 대두분을 만들었으며 이것을 0.01M β - mercaptoethanol과 0.02% sodium azide를 포함한 0.03 M Tris-HCl(pH7.5)로 상온에서 1시간 동안 stirring 시키는 것에 의해서 탈지 시켰다. 여기서 만들어진 탈지 대두분에 Thanh *et al*(1975)의 방법으로 whole protein을 추출하였으므로 추출된 대두 단백질은 선정된 protease reaction에 의한 가수분해물을 생성한다.

다) Protease 처리에 의한 가수분해도 (degree of hydrolysis) 측정

가수분해도는 Alder-Nissen (1979)의 방법에 따라 측정하였다. Whole protein을 효소 종류에 따라 24시간 동안 가수분해 한 수 반응용액을 각각 취하여 1% sodium dodecyl sulfate에 넣은 후 75°C에서 15분간 가열하여 효소를 불활성화시켰다.

Table 3–10. List of protease for hydrolysis of soy protein to make soy protein hydrolyzate

Protease	Units	pH	Temp. (°C)	Standard Units (units/mg solid)
Animal				
Trypsin ^a	1580 BASE units/mg	7.5	25	1500
Pepsin ^a	439 units/mg	2.0	37	1500
Bacteria				
Protamex ^b	1.5AU/g	6.0	40	1500
Neutrase ^b	0.8AU/g	6.0	40	1500
Alcalase ^b	0.6AU/g	8.0	50	1500
Fungi				
Flavourzyme ^b	500LAPU/g	7.0	50	1500
Plant				
Papain ^a	1.7 units/mg	6.2	25	20
Bromelain ^a	2.8 units/mg	4.6	25	20

a. Sigma products; b. Novo products

Table 3–11. Degree of hydrolysis (DH) of whole protein by various protease for 24 h

Protease	DH(%)
Animal	
Trypsin	27
Pepsin	30
Bacteria	
Protamex	24
Neutrase	18
Alcalase	48
Fungi	
Flavourzyme	33
Plant	
Papain	27
Bromelain	30

시료 0.25 ml을 pH 8.2, 0.2123 M sodium phosphate buffer(2.0 ml)에 넣고 0.1% trinitro-benzenesulfonic acid(2.0 ml)를 첨가 한 후 알루미늄 랩으로 반응 시험관을 싸서 빛을 차단하고 50°C 항온 수조에서 60분간 반응 시켰다. 반응을 중지 시키기 위해 0.1 N HCl (4.0 ml)을 첨가하고 상온에서 30분 방치한 후 340 nm에서 흡광도를 측정하였으며, L-leucine 표준 곡선과 비교하여 상대적인 가수분해도를 측정하였다.

라) 가수 분해 조건 확립

시료의 가수분해를 위하여 Novozyme에서 Alcalase를 구매하였다. 구매시의 product sheet에서 pH 8과 50°C에서 효소가 가장 활성도가 높다고 하였으며, Dong Shang-gui *et al* (2004)과 Periago *et al*(1998)의 실험에서도 비슷한 온도와 pH를 제시하였으므로 가수분해의 조건을 pH 8(phosphate buffer, 0.08 M), 50°C로 정하였다. 효소의 농도와 단백질 농도의 조건을 찾기 위하여 ninhydrin반응 실험을 실시하였다. Cronowska와 Pronzuk(1981)의 방법을 수정하여 적용하였다. 먼저 조건을 달리 하여 가수분해 시킨 후에 이것을 test tube에 2 ml을 넣고 여기에 2 ml의 phosphate buffer(pH 7.0, 0.080 M)과 1 ml ninhydrin solution (1%)를 넣은 후에 끓는 물에 30분간 증탕 시킨다. 증탕된 시료를 꺼내어 식힌 후에 100 ml volume flask에 넣고 증류수로 볼륨을 맞춘다. 시료와 증류수가 섞이도록 30분 둔 후에 570 nm에서 흡광도를 측정한다. Figure 3-1은 단백질에 대한 Alcalase농도를 0.1, 0.5, 1, 3%로 달리하고, 가수분해 시간은 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 20, 30, 60, 120분으로 달리한 ninhydrin 반응의 결과이다. 효소 농도가 점차 증가할 수록 peptide량도 점차 증가하는 것으로 나타났으나 효소 농도 1%정도이면 가수분해가 충분히 이루어졌다고 생각이 되어 효소 농도는 1%로 정하였다. 시간에 따른 가수분해 정도를 보면 시간이 증가 할 수 록 점차 증가하는 추세를 나타냈으며, 특히 1시간 이상에서 peptide량이 월등히 많은 것으로 나타났다. Figure 3-2는 단백질 농도와 가수분해를 달리한 실험의 결과이다. 단백질 농도가 높을수록 가수분해가 더 많이 일어나는 것으로 나타났다. 가수분해 시간을 달리한 결과는 Figure 3-1과 유사하게 나타났다. 시간이 증가할수록 peptide 량은 증가하였으며 60분 이상에서 월등히 높게 나타났다.

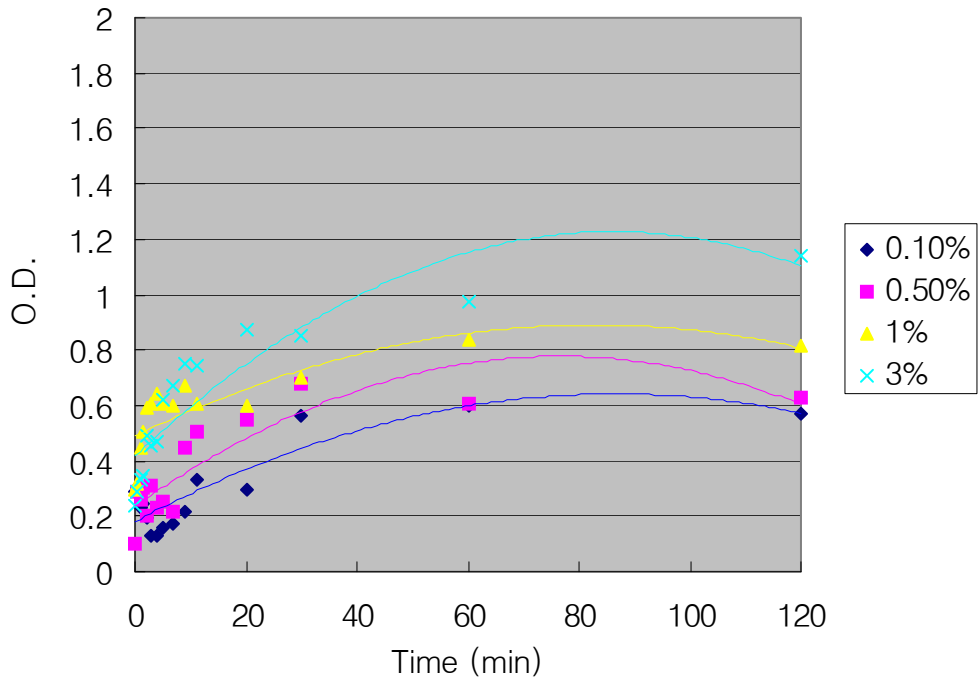


Figure 3-1 . Alcalase 농도별 반응 시간에 따른 흡광도

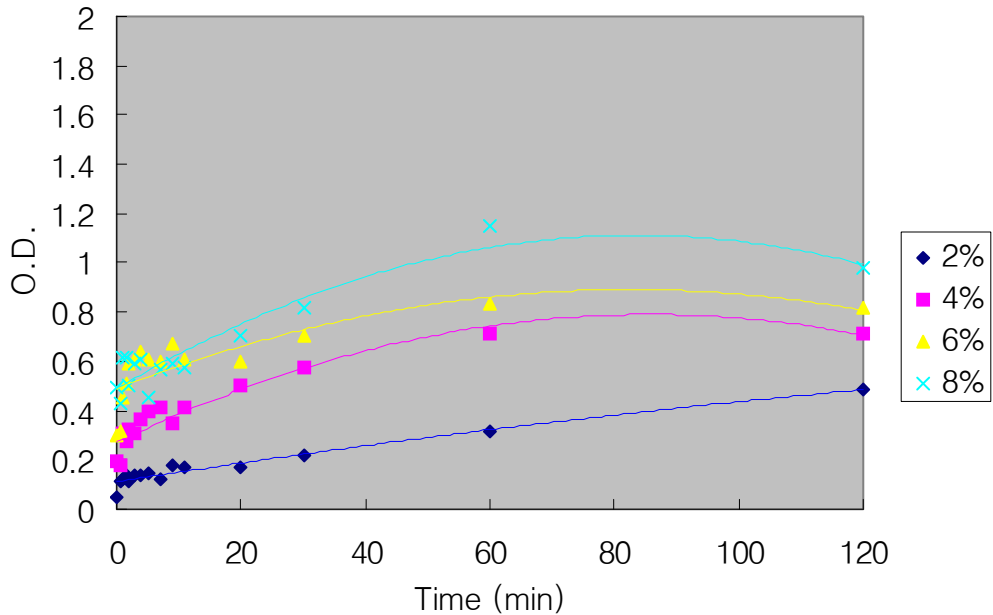
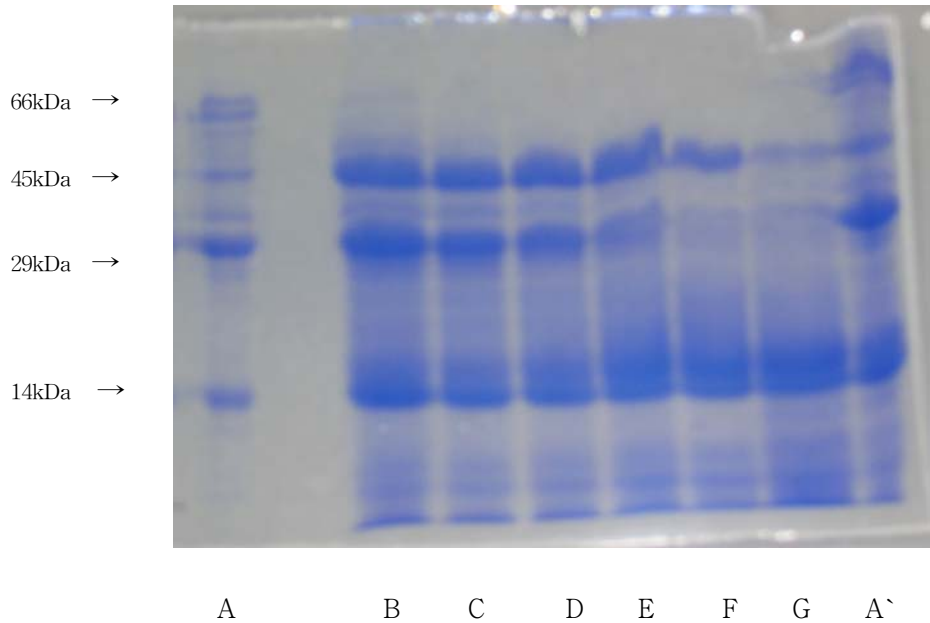


Figure 3-2. 단백질 농도별 효소 첨가 후 반응시간에 따른 흡광도

마) Electrophoresis

단백질의 분자 모양을 확인하기 위하여 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 실시하였다. Separating gel(12%)와 stocking gel (4%)를 사용하였으며 100 V로 2시간동안 실행시켰다. Loading한 샘플이 separating gel 밑바닥 까지 내려온 것을 확인하고 중지시켰다, 판에서 분리한 gel은 Comassie brilliant blue G-250을 사용하여 만든 staining solution에 30분간 담근 후 destaining solution에 넣어 destaining 시켰다. Figure 3에서 보여지는 것처럼 가수분해 전 대두단백질과 가수분해 후의 단백질 모양이 확연히 다른 것으로 나타났다. 45 kDa 이상의 단백질은 가수분해 1시간 이상에서 작은 크기의 분자로 가수분해 되어 밑으로 빠지는 것을 알 수 있었다.



- A, A` = 가수분해 전 대두단백질
- B= 가수분해 2분
- C= 가수분해 5분
- D= 가수분해 11분
- E= 가수분해 30분
- F= 가수분해 1시간
- G= 가수분해 2시간

Figure 3-3. 가수분해 시간에 따른 SDS - PAGE의 protein band의 변화

바) Gel Permeation Chromatography (GPC)

Gel Permeation Chromatography 에 의해 펩타이드의 size를 확인하기 위하여 Sepharose CL-6B 컬럼을 사용하였으며 이에 얻어진 결과는 Figure 3-4와 같다. 비효소처리과 시간에 따라 효소 처리하여 가수분해 후에는 모두 5개의 peaks를 보여 주고 있으며, 비효소 처리군에서는 1번째 peak인 고분자량의 펩타이드 단백질의 함

량이 높은 것으로 측정할 수 있었다. 시간에 따라 11 min, 30 min, 60 min 효소처리하여 가수분해 후에는 2번째 peak와 3번째 peak가 합쳐져서 하나의 peak로 나타났다으며 5번째 peak인 저분자량의 펩타이드를 가진 단백질의 함량이 높게 나타났다.

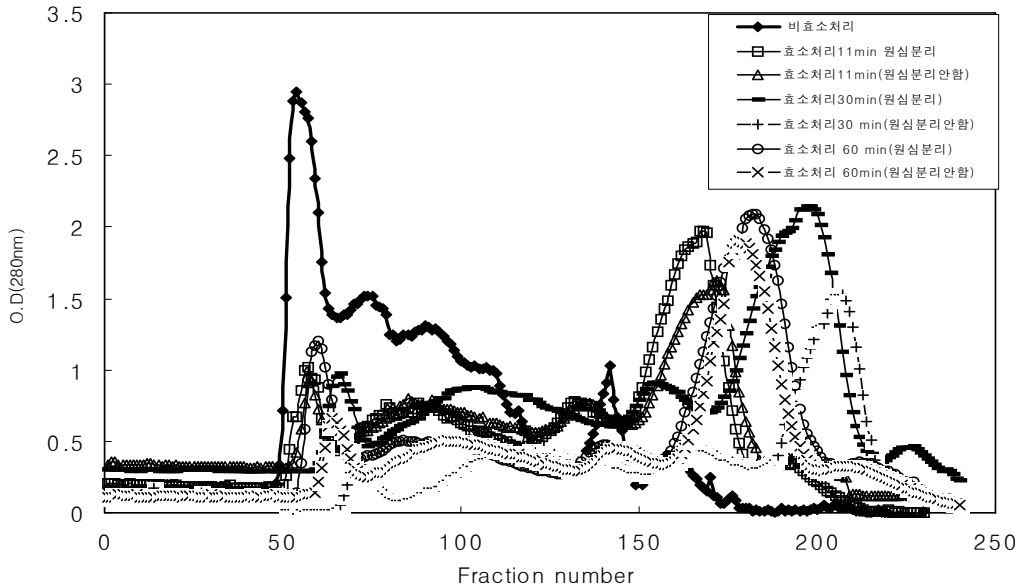


Figure 3-4. Gel permeation chromatography of SPI hydrolyzed on Sepharose CL-6B column (5× 90 cm) —◆— : 비효소처리, —□— : 효소처리 11 min(원심분리), —△— : 효소처리 11 min(원심분리안함), —○— : 효소처리 30 min (원심분리), —+— : 효소처리 30 min (원심분리 안함), —○—: 효소처리 60 min(원심분리), —×— : 효소처리 60 min (원심분리 안함)

사) Functional properties

가수분해물의 pH에 따른 용해도, 열 안정도, NaCl과 CaCl₂ 첨가 시의 반응을 알아보기 위하여 turbidity를 측정하였다. 실험을 위하여 가수분해 전 대두단백질, 가수분해 11분, 가수분해 60분, 가수분해 120분의 시료가 각각 동결건조하여 준비하였다. 각각의 준비된 시료는 증류수에 용해하여 8000 × g에 30분간 원심분리하여 상등액을 취하여 실험에 사용하였다. 분광광도계는 500 nm에서 측정되어 졌으며 모든 실험을 3번 반복되어 졌다.

(1) Measurement of solubility

다양한 pH에 따른 가수분해물의 용해도를 분석하기 위하여 turbidity가 측정되어졌다. pH 2.0과 pH 2.5는 KCl-HCl buffer, pH 3에서 pH 6 사이는 citrate-sodium citrate buffer, pH 7에서 pH 9 사이는 Tris-HCl buffer를 제조, 준비한다. 최종 buffer 농도는 0.06 M, 단백질 농도는 0.1%로 맞춘다. 500 nm에서 측정하며 측정하기 전에 buffer와 단백질이 고르게 되도록 test tube를 흔들어 측정하였다. 측정 결과, 효소를 첨가한 후에는 일정 시간동안 turbidity는 증가하나 2시간 후 부터는 감소하는 것으로 나타났다. 또한 pH 6 ~ 9에서는 용해도가 높은 것으로 나타났으나, pH 3과 pH 5사이에서는 용해도가 낮은 것으로 나타났다. Elfadil Elfadl Babiker(2000)의 연구에서는 pH 4와 pH 6에서 혼탁정도가 높은 것으로 분석되어졌으며, 본 실험의 결과와는 상이하나 pH별로 가수분해의 효과는 본 실험과 같게 turbidity가 감소하는 것으로 나타났다.

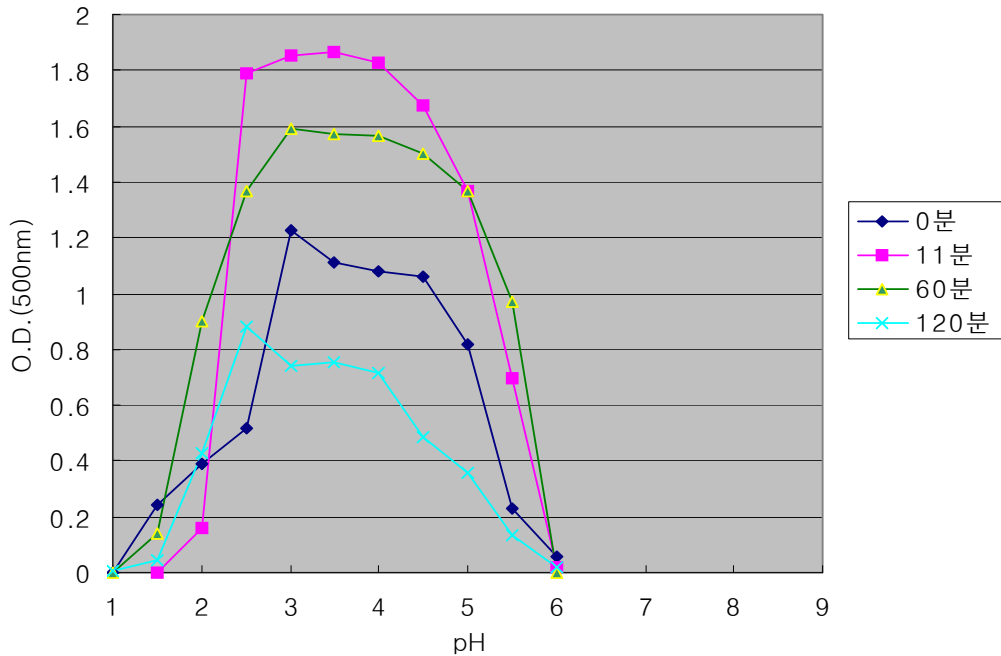


Figure 3-5. Turbidity profile of protein hydrolyzates depending on pH

(2) Effect heating on turbidity

가수분해 0분, 11분, 60분, 120분을 20℃에서 100℃까지 온도를 달리하여 10분 간 heating한 후 turbidity (500 nm)를 측정하였다. Figure 3-6에서 보여지는 것처럼 가수분해정도는 열안정도에 상당히 기여하고 있는 것으로 나타났다. 기존의 여러 연구에서 지적되어 진 것처럼 열 반응에 의하여 가수분해 0분의 단백질의 응집현상은 whole protein 기본 단위들의 상호적인 것으로 파악되어 진다(German *et al*, 1982, Hashizume and watanabe, 1979, Yamagishi *et al*, 1980). 또한 그들의 연구에서는 heating에 의하여 형성된 aggregate는 본래 친수성성격이 강하여 지속적인 heating에는 풀어진다고 하였다.

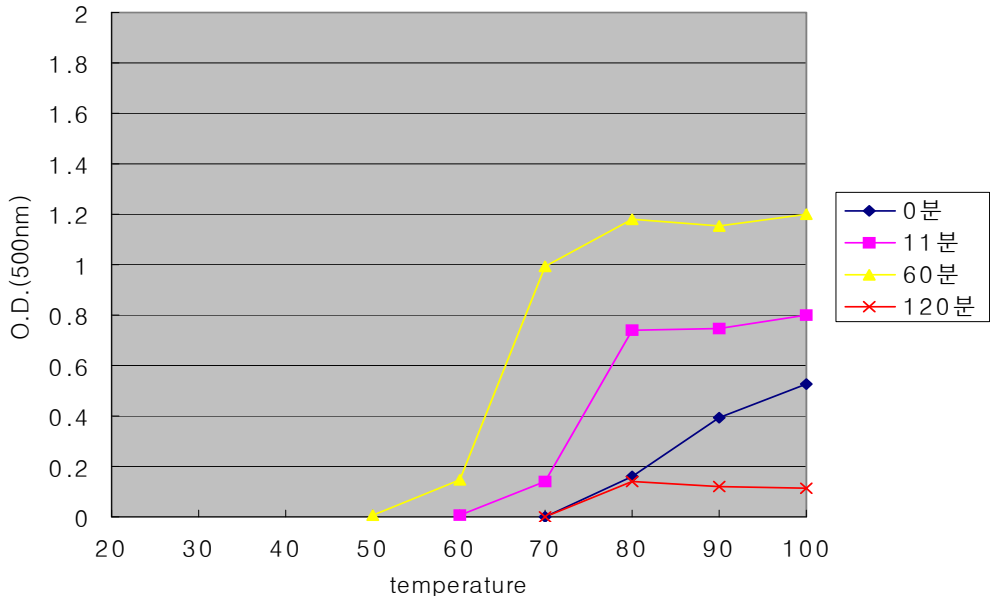


Figure 3-6. Turbidity profile of protein hydrolyzates depending on temperature (pH 8)

(3) Effect of NaCl on turbidity

가수분해 시간별로 NaCl 농도와 pH를 달리하여 turbidity를 500 nm에서 측정하였다. Figure 7 ~ 10은 NaCl이 단백질 용해도에 미치는 영향은 지대한 것으로 나타났다. pH 3에서 pH 6사이에서는 NaCl의 농도가 증가할수록 turbidity는 감소되어졌다. 그러나 산성에 가까울수록 NaCl증가는 용해도를 오히려 용해도를 감소시켜 turbidity를 증가시키는 것으로 나타났다.

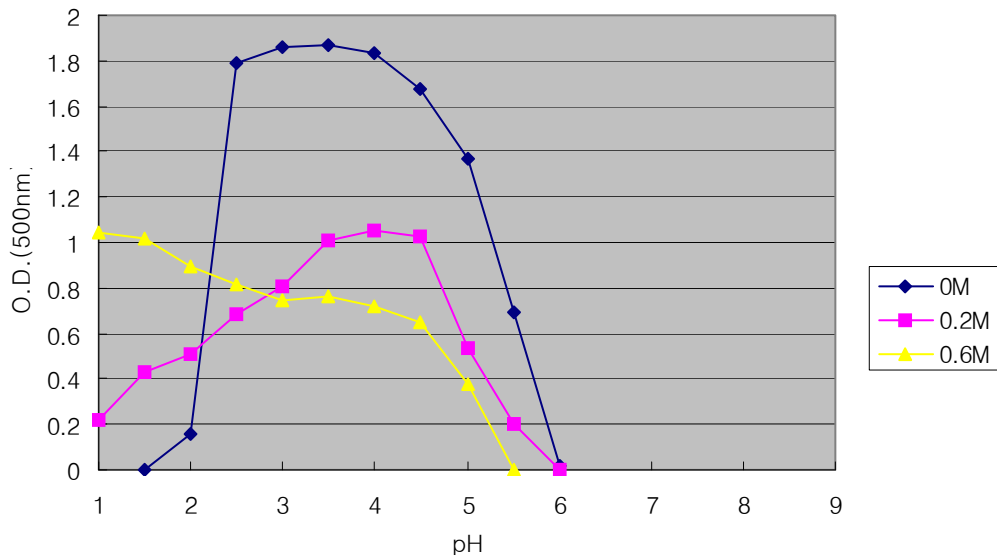


Figure 3-7. 11분 가수분해물의 NaCl 첨가에 따른 Turbidity 변화

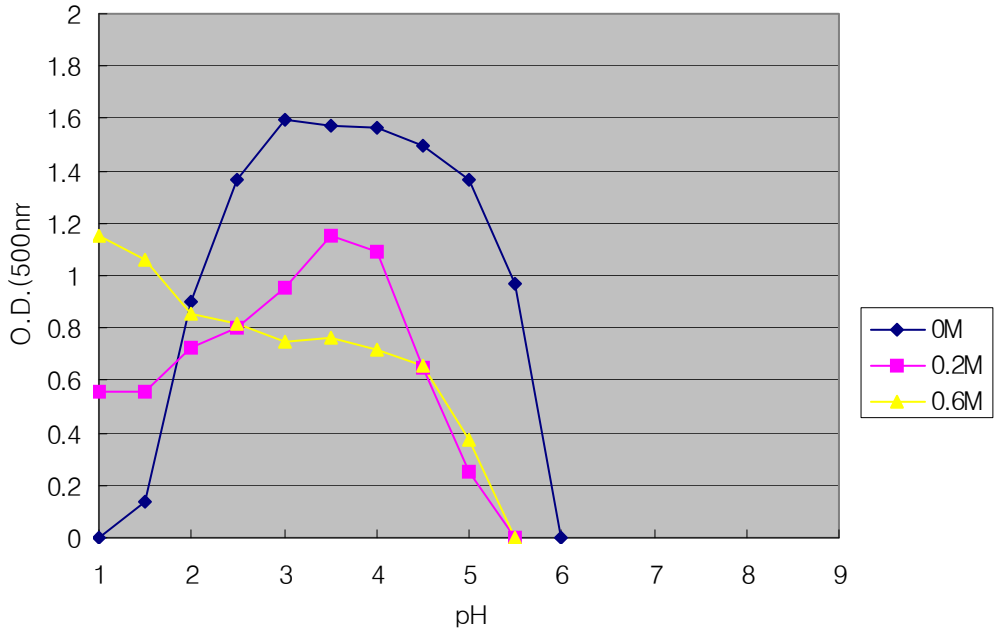


Figure 3-8. 60분 가수분해물의 NaCl첨가에 따른 turbidity

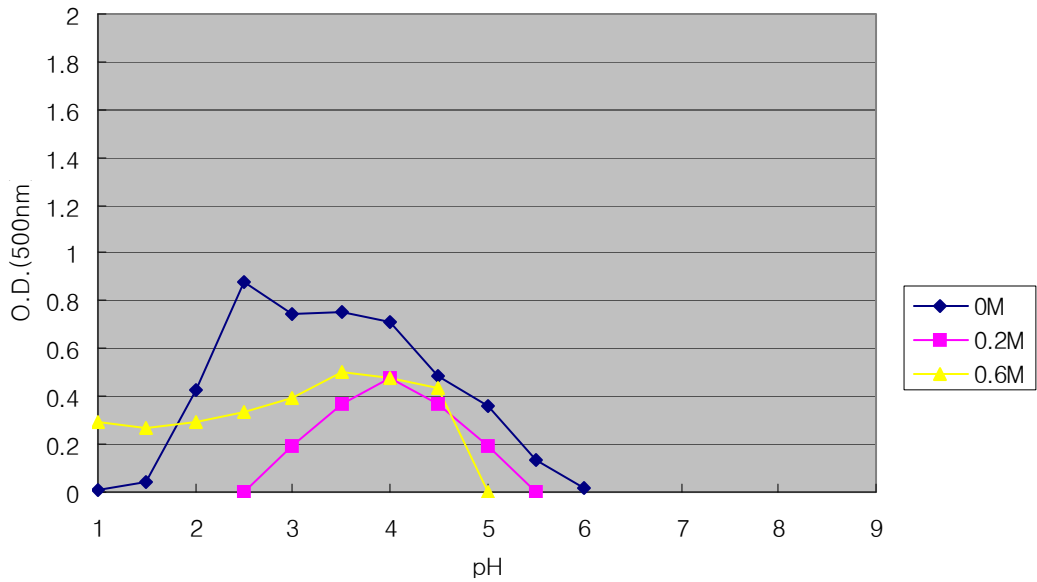


Figure 3-9. 120분 가수분해물이 NaCl첨가에 따른 turbidity

Figure 3-10은 NaCl농도를 달리한 후 heating 한 결과이다. 결과에 의하면 이온화가 증가할 수록 thermal aggregation은 감소하는 것으로 나타났다(Catsimpoilas *et al*, 1971, Hashizume and Watanabae, 1979). Figure 3-12에서 Figure 3-14까지는 NaCl농도를 0.6 M로 고정시키고 pH별로 heating의 효과를 측정하는 것이다. Heating은 NaCl첨가에 의해서 용해된 단백질을 다시 뭉치게 하는 효과를 가져왔다. 모든 가수분해 물에서 heating은 aggregation을 야기 했지만 가수분해물 120분에서는 그 정도가 상당히 약한 것으로 분석되어 진다.

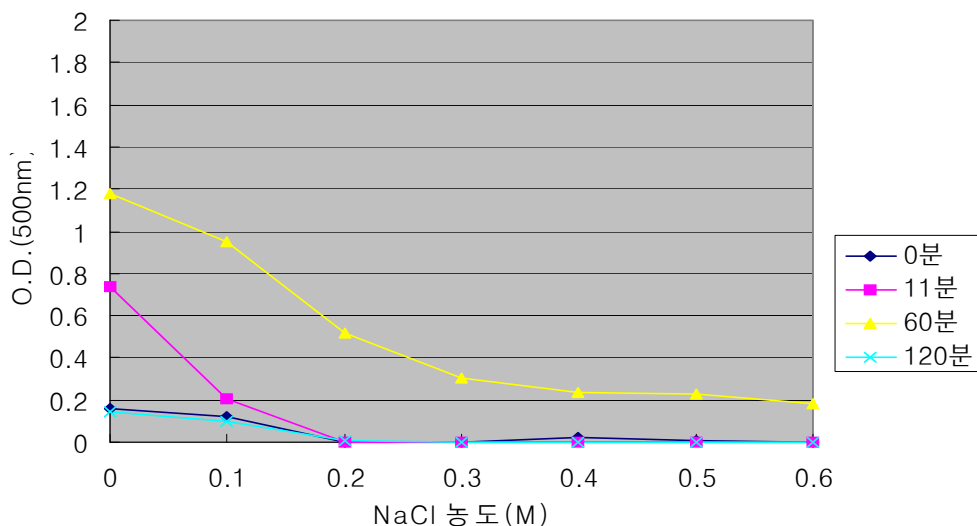


Figure 3-10. Effect of heating on turbidity of soy protein hydrolyzates depending on NaCl concentration (pH 7)

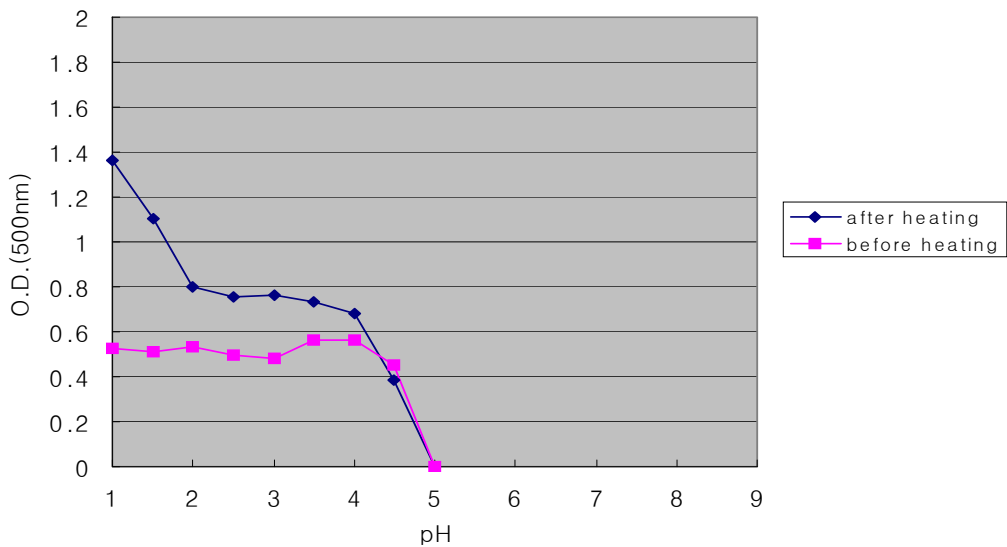


Figure 3-11. Effect of heating on turbidity of native soy protein depending on pH

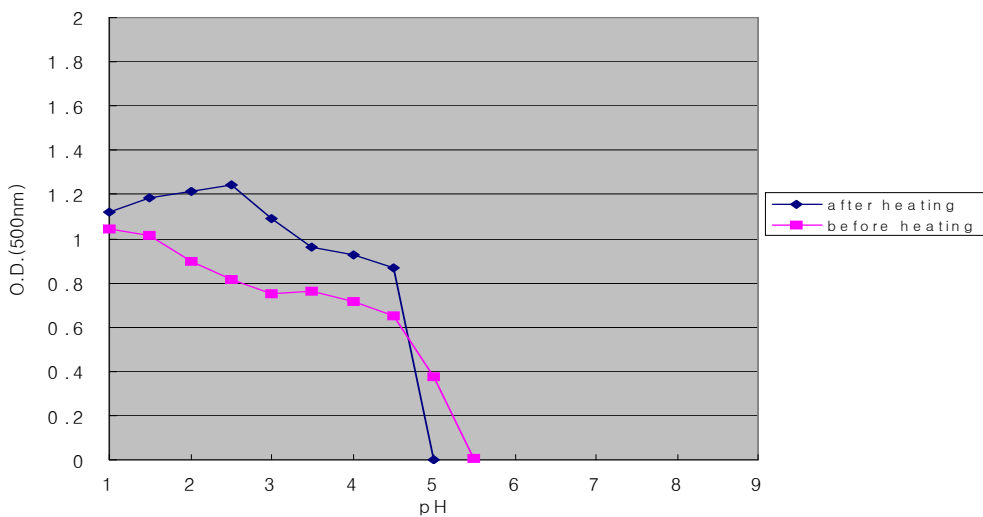


Figure 3-12. Effect of heating on turbidity of soy protein hydrolyzates (11min) added NaCl (0.6 M) depending on pH

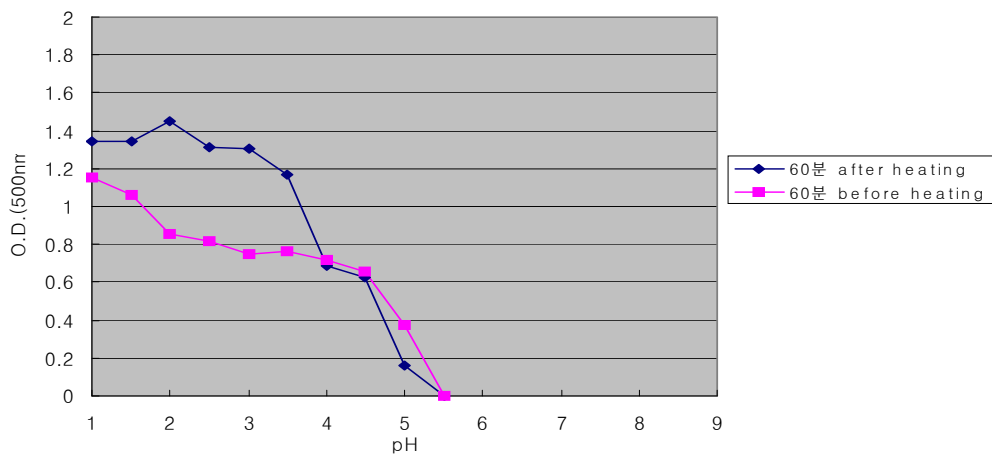


Figure 3-13. Effect of heating on turbidity of soy protein hydrolyzates (60min) added NaCl (0.6 M) depending on pH

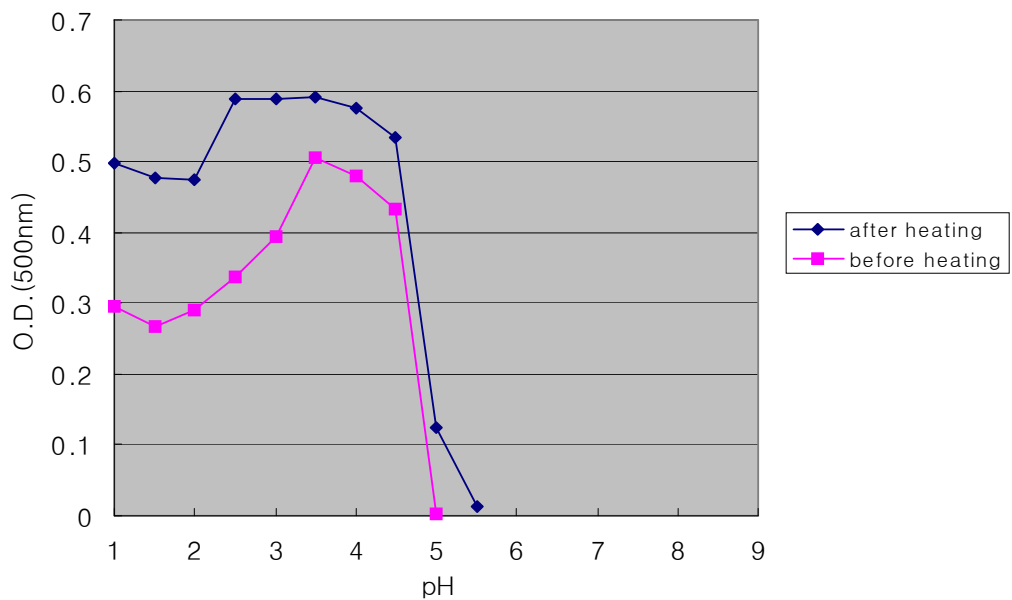


Figure 3-14. Effect of heating on turbidity of soy protein hydrolyzates (120min) added NaCl (0.6 M) depending on pH

Figure 3-15에서 Figure 3-17까지는 calcium 이온화의 효과에 관한 결과이다. Calcium이온화는 약간의 용해도의 증가는 있지만 NaCl에 비해서 그다지 영향이 없는 것으로 나타났다. 그러나 Figure 3-20부터 Figure 3-23까지는 CaCl₂첨가 후 heating의 효과에 관한 것으로 heating을 한 후 에는 aggregation되었던 것들의 상당 부분이 풀어지는 것으로 나타났다.

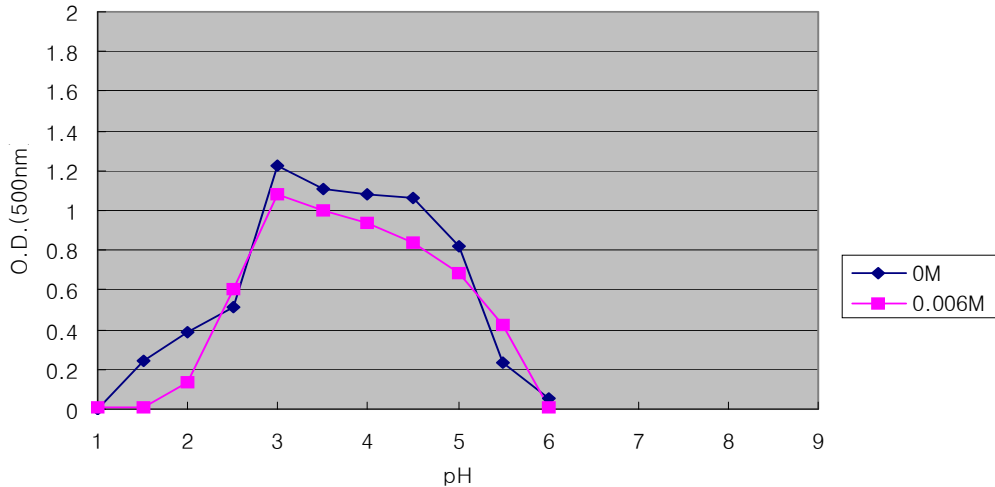


Figure 3-15. Turbidity of native soy protein depending on CaCl₂ added at different pH

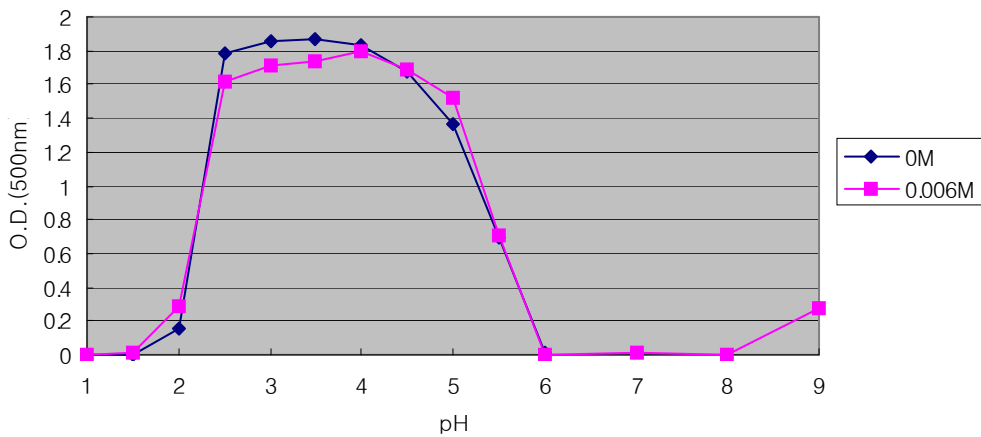


Figure 3-16. Turbidity of hydrolyzate (11min) depending on CaCl₂ added at different pH

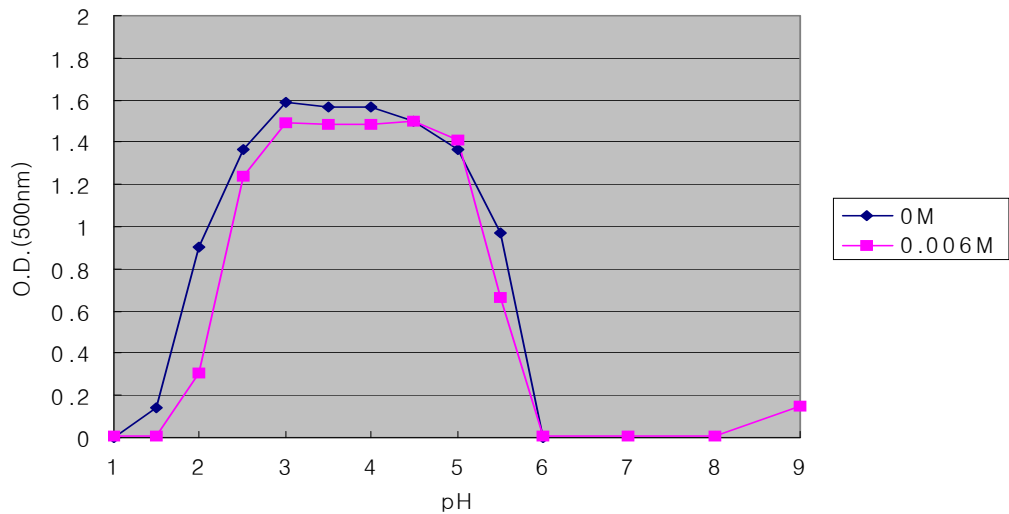


Figure 3-17. Turbidity of hydrolyzate (60min) depending on CaCl₂ added at different pH

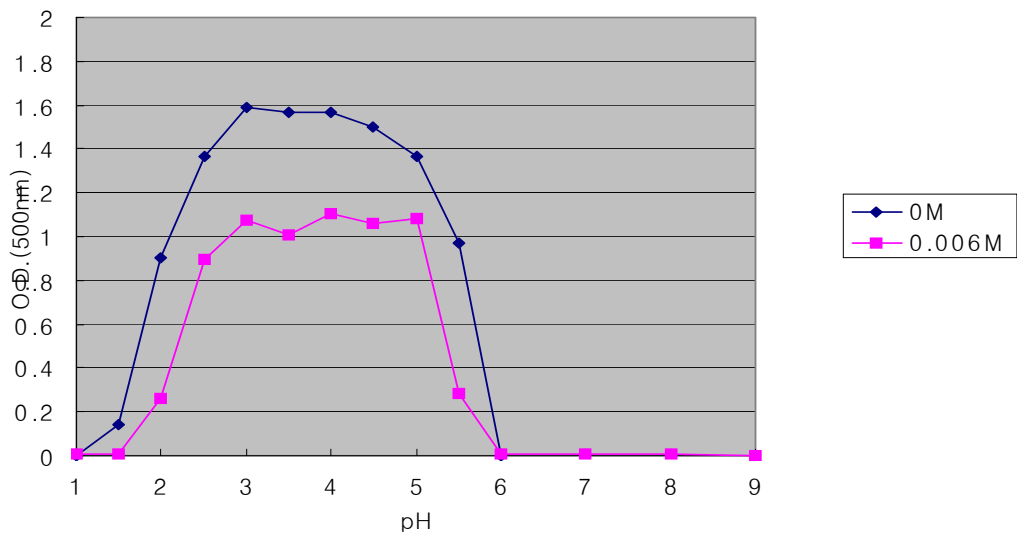


Figure 3-18. Turbidity of hydrolyzate (120min) depending on CaCl₂ added at different pH

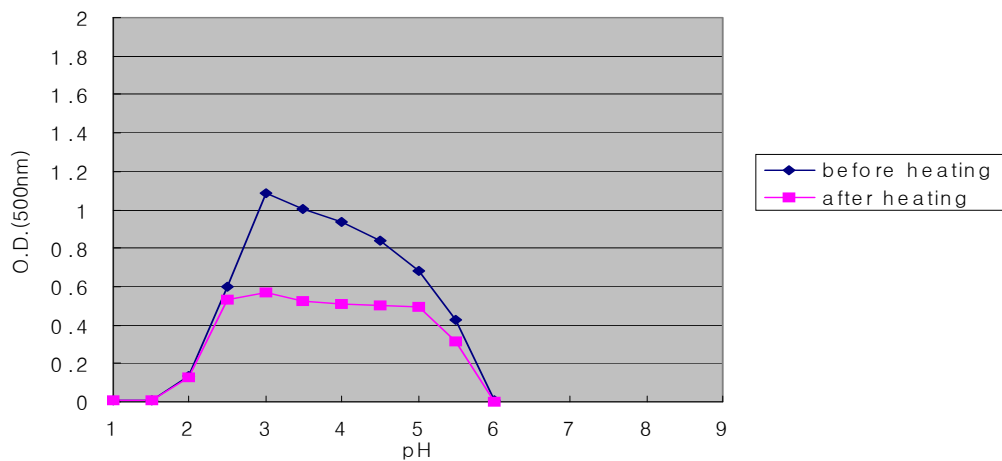


Figure 3–19. Effect of heating on turbidity of native soy protein depending on CaCl_2 added at different pH

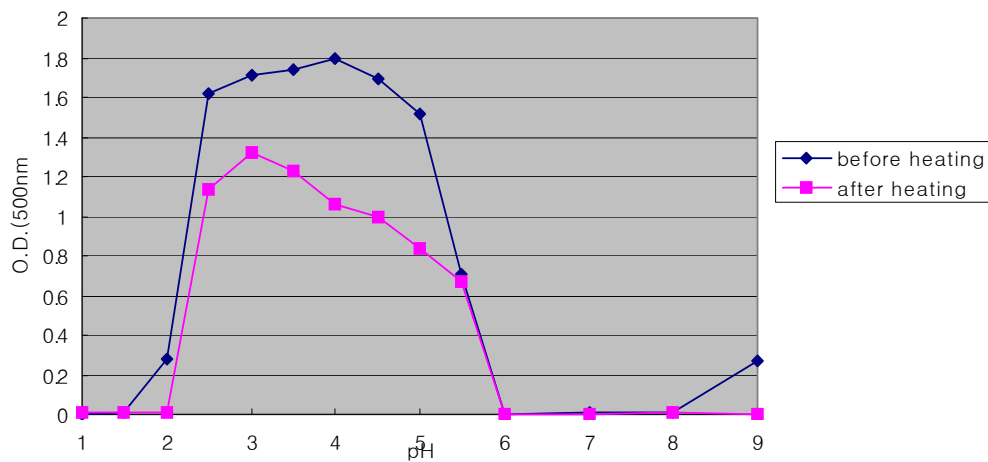


Figure 3–20 Effect of heating on turbidity of hydrolyzate (11min) depending on CaCl_2 added at different pH

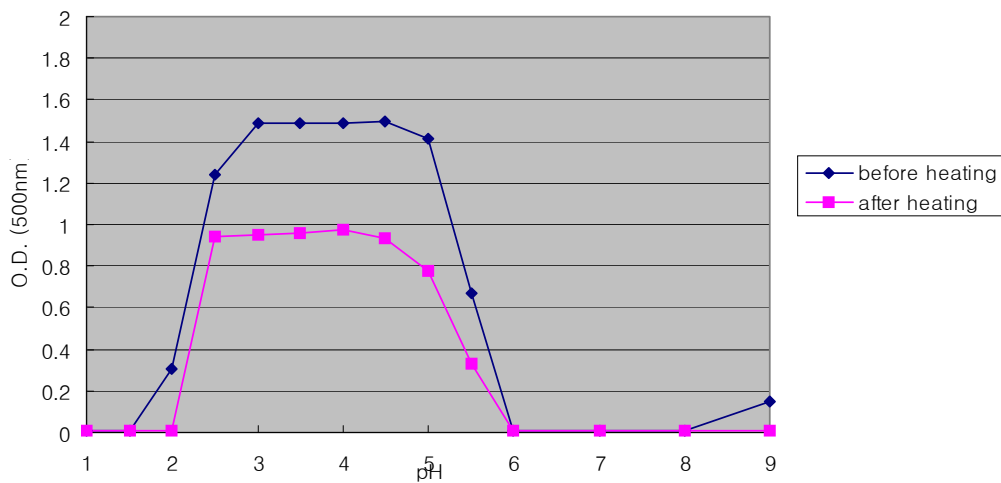


Figure 3-21. Effect of heating on turbidity of hydrolyzate (60 min) on CaCl_2 added at different pH

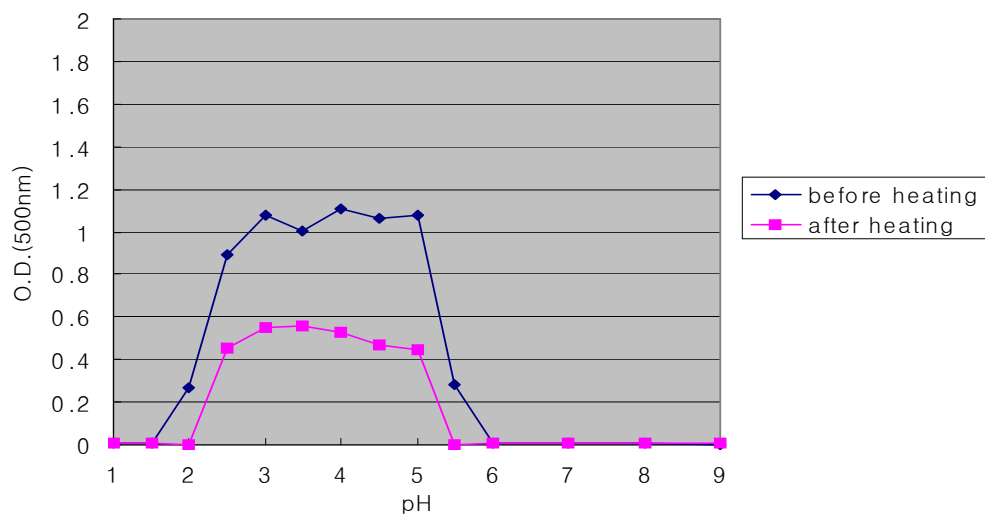


Figure 3-22. Effect of heating on turbidity of hydrolyzate (120 min) on CaCl_2 added at different pH

6. Ion exchange chromatography

DEAE - Sephadex A-50 chromatography(7×42 cm)을 사용하여 분리하였다. pH 8, 0.08 M의 phosphate buffer 1000 ml을 사용하여 흡착되지 않은 단백질을 내렸으며, 흡착된 단백질은 0.8 M NaCl을 함유한 phosphate buffer 1000 ml로 흡착제로부터 분리시켰으며, flow rate은 60 ml/hr, 각각의 test tube volume은 7 ml로 조정하였다. 분리 후 비흡착단백질을 함유하고 있는 45에서 55의 단백질을 모아 투석하였으며, 흡착된 단백질은 fraction number 175에서 185의 단백질을 모아 똑같은 방법으로 투석 후 동결건조 시켰다. 비흡착 단백질과 흡착 단백질의 단백질 크기를 알기 위하여 SDS-PAGE 실험을 하였다. 실험 결과는 Figure 3-23와 같으며, 비 흡착단백질이 흡착단백질에 비하여 더 작은 분자의 단백질로 구성된 것을 알 수 있었다.

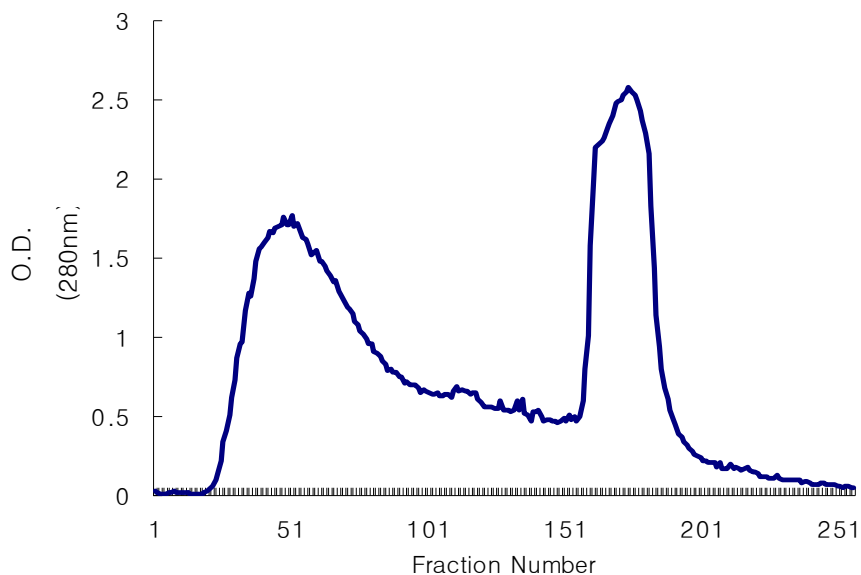


Figure 3-23. 2시간 가수분해물의 DEAE - Sephadex A-50 column에 의한 fractionation

아) Surface Hydrophobicity

가수분해물의 Surface hydrophobicity는 fluorescence probe(ANS)를 사용하는 것에 의해서 결정되어 졌다. Sample은 각 시료별로 0.0001 ~ 0.0005 g/ml의 농도로 phosphate buffer를 사용하여 만들어 졌으며, 이에 10 μ l ANS (8 mM in the standard buffer)이 부과되어 졌다. Fluoresce intensity는 Amico Bowman Spectrophotometer를 사용하여 excitation wavelength 390 nm, emission wavelength 470 nm에서 측정되어 졌다. 이에 얻어진 결과는 Figure 25와 같으며, 가수분해 시간이 경과할수록 hydrophobicity가 증가하는 것으로 보이며, 120분 가수분해 물에서 최대인 것으로 분석되어 졌다.

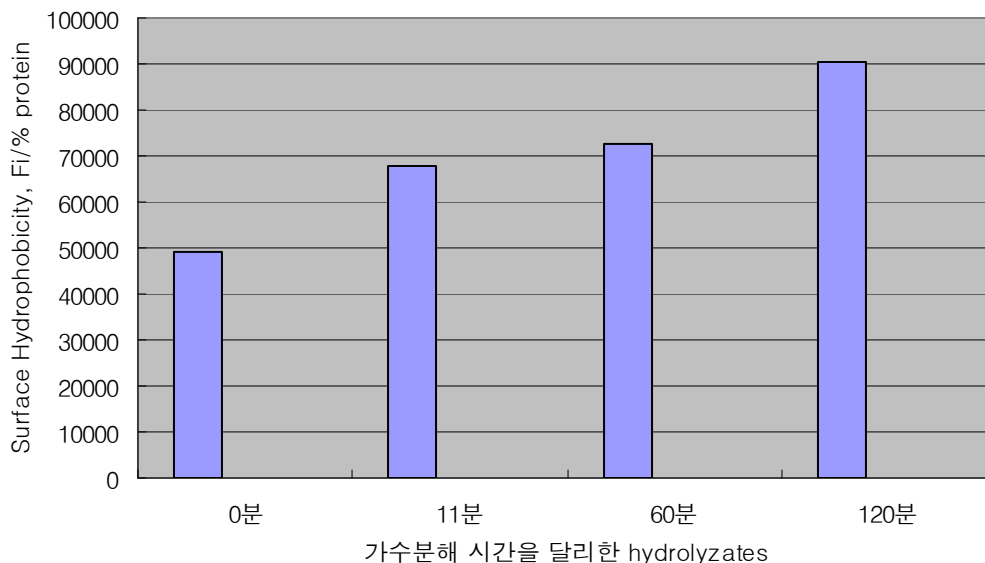


Figure 3-24. Surface hydrophobicity of native and hydrolyzates

차) 연구결과의 요약

- ① 여러 protease을 통한 예비 실험 결과 Alcalase가 가수분해도가 우수하여 앞으로의 실험에서 사용하게 될 효소로서 선정되었다.
- ② 효소 반응 최적화 조건을 50°C, 120 min, 단백질 농도 6%, 효소 농도(단백질 농

도대비) 1%, pH 8로 설정하였다.

- ③ 가수 분해 시간이 증가할수록 펩타이드 분자의 크기가 상당히 작아졌으며, 2시간 경과하였을 때는 45 kDa미만의 분자만이 보였다.
- ④ 가수분해는 용해도를 증가시켰으며, 특히 산성에 가까울수록 용해도가 현저히 증가하였다.
- ⑤ 효소적 가수분해서 형성된 aggregation이 NaCl, CaCl₂, heating 효과에 의해서 풀어졌다.
- ⑥ 소수성 측정 결과에서는 가수분해 시간이 경과할수록 증가하였으며, 특히 120분에서는 최대인 것으로 분석되어졌다.

나. 대두 단백질 가수분해물을 첨가한 기능성 전통식품 개발

1) 연구 개발 내용

대두 단백질 가수분해물을 첨가한 증편의 제조를 위하여 멥쌀은 농협에서 구매한 경기미(2005년 수확)를 사용하며, 소금은 정제염(염도 88 % 이상)을 사용하였다. 탁주는 살균처리하지 않은 것(서울 장수 막걸리)을 구매하였으며, 엿기름은 농협에서 구매하여 사용하였다. 개발된 증편의 품질 특성을 확인하기 위하여 반죽과 제조된 증편의 물성변화와 제조된 증편의 저장성, 관능검사를 실시하였다.

2) 연구의 방법

가) 대두단백 가수분해물을 첨가한 증편의 제조

증편의 전통적인 recipe를 사용하여 쌀가루에 대두단백 가수분해물의 비율을 달리하여 첨가하였다. 증편의 제조에 앞서 멥쌀을 2시간 불리고 30분 물을 뺀 후 곱게 갈고 식혜물을 엿기름 1컵에 물 15컵으로 하여 만들어 놓았다. 뺀 멥쌀을 채에 곱게 내리고 여기에 첨가량에 맞게 첨가물을 혼합하였다. 혼합된 쌀가루를 반으로 나누고, 반은 뜨거운 물로 익반죽하고 나머지 반은 막걸리 3/4컵에 설탕 4/1을 섞은 것으로 반죽을 하였다. 그리고 두 반죽을 합하여 식혜물을 풀어주었다(1컵). 이것을 항아리에 담아서

잘 밀봉하고 따뜻한 곳에 두어 4시간 정도 발효 시킨 후 가스를 빼고 다시 두시간 정도 발효 시켰다. 다시 가수를 빼고 증편 틀에 담아서 중간 불에 20분간 찐다.

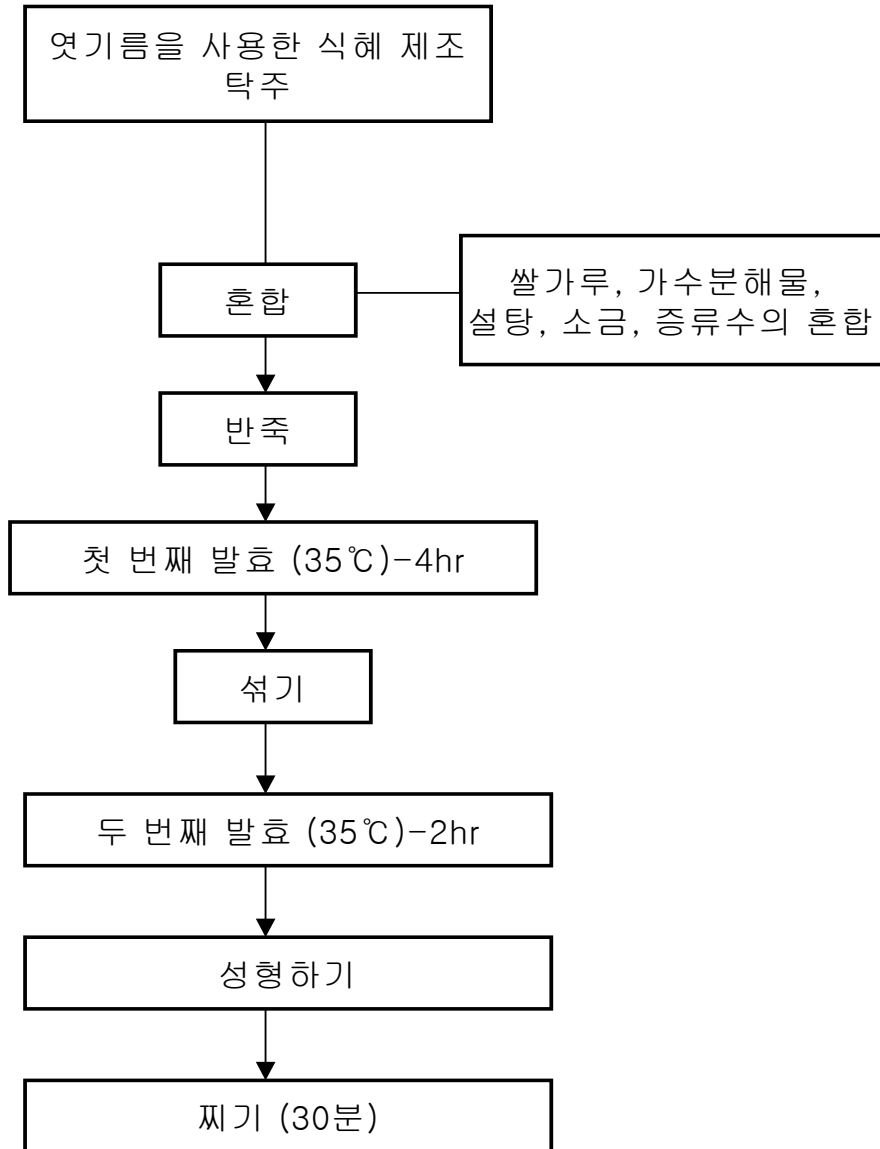


Figure 3-25 증편의 제조 과정

나) 증편 반죽의 발효 중 물성 변화

(1) pH

Mathason의 방법에 따라 발효 전, 2차 발효 후, 증자 후에 반죽 5g에 증류수 45ml를 가하여 pH meter(Suntex, SP-2200, USA)로 측정하였다. 증자한 증편의 pH는 동결건조된 시료 5 g 증류수 45 ml를 더하여 측정하였다.

(2) 비중 (specific gravity)

발효가 끝난 반죽을 비중 병(부피 59.6g)에 넣어 정용한 반죽의 중량비(반죽중량g/증류수중량g)로부터 반죽의 비중을 구하였다(Campbell, 1979).

$$\text{비중 (g/g)} = \frac{\text{시료가 담긴 컵의 무게} - \text{빈컵 무게}}{\text{물이 담긴 컵의 무게} - \text{빈컵 무게}}$$

(3) 점도 (Viscosity)

발효가 끝난 반죽을 Consistometer(지름 5cm, 높이 2.5cm)에 가득넣어 template 위에 올려 놓고 스파츨라로 여분의 반죽을 한 번 깎아 주었다. consistrometer를 제거하고 Line spread test(Mcwilliams, 1993)에 의하여 10분 후에 사방 퍼짐에 값을 더하여 1/4로 나눈 값을 계산하였다.

(4) 기포 형성력(FA: Foaming ability)

기포 형성력은 Shiiba 등(1990)의 방법을 이용하였다. 발효 전, 1차 발효, 2차 발효가 끝난 증편 반죽의 분말 건조시료 3.5g에 50 mM acetate buffer(pH 5.5) 40ml를 넣고 스텐레스 용기에 담아 Homogenizer(Univ KPN 64796)로 균질화 하였다. 이때 rotor의 지름은 12mm로 하였고 속도는 10,000rpm을 유지하고 5분 동안 반응 시킨 후 거품과 액체를 즉시 메스 실린더로 옮겨서 용량(ml)을 측정하고 기포 형성력은 다음 식으로 계산하였다.

$$FA = \left(\frac{F}{L} - 1 \right) \times 100$$

F: 거품과 액체의 부피, L: 액체의 부피.
(FA단위는 %를 unit로 한다.)

다) 증편의 이화화학적 특성

(1) 용해도와 팽창력 (solubility & Swelling Power)

날 쌀가루, 날 현미가루, 날 보리가루와 증편을 증자한 후 1시간 뒤에 증편을 동결건조기에서 건조한 후 Schoch 방법(1964)에 따라 팽창력과 용해도를 각 온도에 (50-90℃) 따라 다음과 같이 측정하였다. 즉, 시료 0.5 g을 원심 분리관에 취하여 증류수 30 ml를 가하여 잘 분산 시킨 후 각 온도의 water bath에서 30분간 교반한 후 3000rpm에서 20분간 원심분리 후 침전물은 무게를 측정하고 상층액은 105℃에서 완전 건조시켜 무게를 측정한 후 다음 식에 의하여 팽창력과 용해도를 계산하였다.

$$\text{용해도} = \frac{\text{상층액을 건조한 고형물의 무게 (mg)}}{\text{시료량 (mg)}} \times 100$$

$$\text{팽창력} = \frac{\text{원심 분리 후 침전물의 중량 (mg)}}{\text{시료량 (mg) (100-용해도)}} \times 100$$

(2) 수분결합력 (water binding capacity) 측정

각 증편 처리 구의 가수율을 정하기 위하여 날 쌀가루와 증편을 각각 동결건조기에서 건조한 후 Sathe 등(1982)과 Medcal 등(1965)의 방법으로 수분 결합력을 측정하였다. 즉 시료 2g에 증류수 40ml를 가하여 magnetic stirrer를 이용하여 1시간 동안 잘 저어준 후 30분간 방치하였다. 2000rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 제거한 다음 5분동안 원심분리관을 거꾸로 세워둔 후 침전된 시료의 무게를 측정하여 처음 시료 량과의 중량 비로부터 수분 결합 능력을 산출하였다.

(3) 일반성분 분석

일반성분 분석을 AOAC법 (AOAC, 1995)에 의하여 측정하였다. 증자한 후 상온에서 1시간 뒤의 증편의 수분 함량은 상압 가열 건조법(채수규, 1998)으로 측정하였다. 시료 5g각각 여기에 담아 105-110℃ dry oven에서 5시간 건조하고 desicator에서 방냉한 후 무게를 재었다. 조단백 함량은 질소 계수 6.25를 사용하여, micro-Kjeldahl 법(Distillation unit B-324)으로 측정하며, 조지방 함량은 시료를 Soxhlet apparatus 장치를 사용하여 70℃에서 5시간 동안 petroleum ether로 추출하였다. 회분 함량은

600°C의 직접 회화법(Eleciric muffle J-FMI, Jeil, Seoul)을 사용하여 측정하였다. 탄수화물 함량은 100에서 수분함량, 조단백 함량, 조지방 함량, 회분 함량을 뺀 값을 사용하였다.

라) 증편의 품질 특성

(1) 색도 측정

색도 측정은 Color difference meter (CR-300, 1991, Minolta, Japan)을 사용하여 명도 (L, Lightness), 적색도 (a, redness), 황색도(B, yellowness)값을 각 시료마다 1회에 3개의 샘플을 취해 측정하여 전체 3회 반복 측정하여 그 평균 값을 구하였다.

Table 3-12 Color differences Classification by ΔE unit

ΔE units	NBS(ΔE)	Note
0 ~ 0.5	trace	L: Lightness, 0 ~ 100
0.5 ~ 1.5	slight	(black=0, white=100)
1.5 ~ 3.0	noticeable	a: Redness, -60 ~ +60
3.0 ~ 6.0	appreciable	(negative: Green, positive: Red)
6.0 ~ 12.0	much	b: Yellowness, -60 ~ =60
over ~ 12.0	very much	(negative: Blue, positive: yellow)

(2) 부피, 대칭성, 균일성

증자한 후의 증편의 부피(Volume), 대칭성(symmetry), 균일성(uniformity)에 대한 지수(index)는 AACC method 10-91(AACC, 1984)에 따라 수정한 template(cloke 외 1인, 1984)를 이용한다. 증편 중심부를 수직으로 절단하여 보여지는 Crumb 부분 양 끝단에 A와 E를 표시하고 중심선을 C로 표시하였다. A와 C사이에 B 선을, C와 E사이에 D의 선을 표시하고 증편의 부피, 대칭성 및 균일성 지수를 다음과 같은 공식으로 계산하였다. (Figure 3-26)

(1) volume: $B+C+D$

(2) symmetry: $2C-B-D$

(3) uniformity: $B-D$

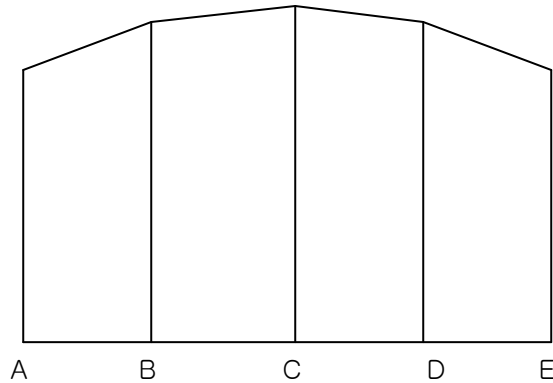


Figure 3-26 The AACC plastic Jeungpyun measuring template chart

(3) 미세구조 관찰

증편의 발효 중 입자 상태와 증자한 후의 증편의 기공상태를 관찰하기 위하여 반죽 20g과 증편 1조각 ($1 \times 1 \times 1\text{cm}^3$)를 동결건조하고 그 일부를 gold-palladium으로 도금하여 주사전자 현미경(Scanning Electron Microscope, Hitachi 2500, Japan)으로 가속전압 20KV에서 1000배율로 관찰하였다.

(4) 관능검사

서리태의 단백질 가수분해물 함유량에 따른 증편의 관능적 특성 변화를 비교하기 위하여 훈련된 pannel 8명을 관능검사 요원으로 선정하였다. 증편 시료는 관능 검사하기 1시간 전에 제조하여 실온에서 냉각 시켰다. 검사 직전에 증편 crumb 부분을 $2 \times 2 \times 3\text{cm}^3$ 크기로 썰어 임의의 세 자리 숫자를 적어 놓은 타원형 접시에 담아 제시하였다. 모든 시료의 평가 사이사이에 입가심 할 수 있도록 증류수를 컵과 함께 제공하였다. 검사 요원들은 칸막이가 되어 있는 개인용 검사대에 앉아 증편의 관능 검사표 선상에 각 특성 별로 느끼는 강도를 표시하도록 한다. 특성은 7점 항목 척도법을 사용하였고 숫자가 클수록 그 정도가 좋은 것으로 나타내었다. 조사하고자 하는 특성은 크게 외관, 향미, 맛, 텍스처, 전체적인 선호도로 크게 5가지 항목으로 평가하였다. 외관 평가에서는 색의 강도, 입자의 크기, 입자의 균일성을 평가하고, 향미에서는 막걸리향을 평가하였다. 맛에서는 단맛과 쓴맛을 평가하며, 텍스처 평가에서는 부드러운 정도, 씹힘성, 탄력성, 촉촉한 정도를 평가하였다. 마지막으로 전체적인 선호도는 시료를 입에 넣고 자연스럽게 씹으면서 외관, 향미, 맛, 텍스처를 종합적으로 고려하여 평가하도록 하였다.

(5) 소비자 검사

소비자 검사는 남녀 대학생 100명을 대상으로 실시하였다. 검사표는 9점척도를 이용하여 표시하도록 하였으며, 1점으로 갈수록 아주 싫다에서 9점으로 갈수록 아주 좋다는 표시하도록 하였으며, 각 시료마다 빨강(대조군), 파랑(대두 단백질 가수분해물 2% 첨가), 노랑(대두 단백질 가수분해물 5% 첨가), 녹색(대두 단백질 가수분해물 8%첨가)으로 평가용기의 색을 정해놓았다. 그리고 평가 시작 부분에 평가 용기의 색을 표시하게 한 후, 기호 특성 강도를 같이 조사하여 결과 해석에 이용하였으며, 평가된 특성은 전반적인 기호도(overall acceptability), 세부적인 사항으로 기호도와 부드러움(softness), 향(aroma), 단맛(sweet flavor), 증편의 향미(Jeung-pyun flavor)의 순서대로 진행하였다.

마) 저장에 따른 노화도 변화

(1) DSC (Differential Scanning Calorimetry) 분석에 의한 노화도 측정

DSC(6100, SEIKO INS, chiba, Japan) 측정을 위하여 호화전 시료는 발효 후 즉시 20 g을 취하였으며, 증편 시료는 증편 제조 후 실온에서 1시간 방치한 신선시료와 저장 30일 된 시료를 각각 20g씩 채취하여 -40°C 에서 급속 동결 하고 다시 15시간 동결건조하여 분쇄기로 마쇄하여 100mesh체로 쳐서 분말로 만들었다. 다시 70°C 의 vacuum oven에서 3시간 동안 진공 건조시켜 desiccator에 넣어 두고 사용하였다. 분발 시료 (1.8 ± 0.1 mg)를 hermetic aluminum pan에 직접 넣고 시료의 4배되는 증류수 (7.2 ± 0.1 mg)를 micropipet으로 주입하여 (aluminum oxide, 10mg)와 함께 0°C 서 150°C 까지 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 속도로 가열 하여 호화 개시 온도(T_o : onset temperature), 호화 최고온도(T_p : peak temperature), 호화 종료온도(T_c : conclusion temperature)와 호화 엔탈피(ΔH)를 측정한다(Lin 외 2인, 1994; Horton 외 2인, 1990). 각 시료의 상대적인 노화도는 호화전 시료에 대한 엔탈피 %비로 산출하였다.

바) 통계 처리

모든 실험은 3회 반복하였으며 그 통계적 분석은 SPSS package(2000)를 이용하였다. 분석 시료간의 유의차가 있는 경우 차이 유무를 알아보기 위해 Duncan's multiple range test에 의해 $p < 0.001$ 수준에서 평균값에 대한 유의성을 검증하였다.

3) 연구의 결과

가) 증편 반죽의 발효 중 물성 변화

(1) pH, 비중

대두분과 대두 단백질 가수분해물을 첨가한 증편의 반죽 발효와 증자한 후의 pH 변화는 Table 3-13 와 같다. 발효전, 일차발효후, 이차발효후, 증자한 후의 pH에 대한 결과를 보면 모두 유의 수준 0.001에서 유의한 것으로 나타났다. 발효전에는 대조군과 가수분해물 1%첨가 군은 각각 pH 5.68, pH 5.84로 대두분 첨가군(pH 6.09)과 가수분해물 3%(pH 6.45), 7%(pH) 첨가군에 비하여 낮은 것을 알 수 있다. 이는 대두 분과 가수분해물이 pH를 높이는 역할을 하고 있는 것으로 사료되며, 대두분과 가수분해물 3% 군은 쌀가루에 같은 질량을 첨가했을 때 가수분해물이 좀더 pH를 높이는 것으로 나타났다. 발효과정상에서의 pH 변화를 살펴보면, 일차 발효 후와 이차 발효 후에서 유의적인 것으로 나타났으나, 대두분과 단백질 가수 분해물에 의한 pH의 변화는 좀 둔화된 모습이다. 일차발효 후에는 대두분 첨가 증편의 pH는 대조군과 차이가 없는 것으로 보여진다. 증자 후의 pH는 발효과정 중 일차발효 후와 이차발효 후에서 떨어졌던 pH가 다시 올라가는 것을 볼 수 있으며 발효전의 pH 보다 더 높아진 것으로 나타났다. 이는 발효에 따른 유기산의 생성에 기인된 것으로써 스펀지 형성에 큰 영향을 주는 효모의 생육과 밀접한 관련이 있다. 이러한 결과는 현미와 보리로 대체한 증편에 관한 연구에서도 유사하게 연구된바 있으며(박미자, 1998), 특히 인도의 발효 쌀 cake인 Idli도 똑같은 현상이 있어 낮다고 한다(Steinkraus, 1976) 이러한 차이는 증자 중의 온도 상승으로 인하여 효소 작용이 활발해짐에 따라 유기산, 유리아미노산, 기타 성분 등의 변화와 또한 고온에서 일어날 수 있는 성분 산화간의 반응 등이 복합적으로 작용한 것에 의한 결과라고 생각되어 진다. 비중의 결과도 유의 수준 0.001에서 유의적인 것으로 나타났다. 대조군이 1.82인데 비하여 대두분 첨가 군은 1.88, 대두 단백질 가수분해물 7% 첨가 군은 1.87로 대조군과 비교하였을 때 차이가 있음이 확인되었다. 대두 가수분해물 1%와 3% 첨가 군은 대조군에 비교하였을 때 차이가 없는 것으로 나타났다.

Table 3-13 Mean values of pH and specific gravity of batter and *Jeungpyun* added soy flour and hydrolyzated soy protein

sample	ratio (%)	pH				SG(g/g)
		BF	A1F	A2F	AS	AF
control	0	5.68 ^a	5.30 ^a	5.08 ^a	6.25 ^a	1.82 ^{ab}
soy flour	3%	6.09 ^b	5.64 ^{ab}	5.41 ^b	6.51 ^b	1.88 ^c
hydrolyzated soy protein	1%	5.84 ^a	5.55 ^{ab}	5.27 ^{ab}	6.31 ^{ab}	1.79 ^a
	3%	6.45 ^c	5.89 ^b	5.62 ^c	6.86 ^c	1.81 ^{ab}
	7%	7.06 ^d	6.53 ^c	6.13 ^d	7.31 ^d	1.87 ^c

BF: before fermentation A1F: after first fermentation

A2F: after second fermentation AS: after steaming

SG:: specific gravity

a-d Different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.001$ by Duncan's multiple range test (column).

(2) 기포형성력

증편 반죽의 발효 단계에 따른 기포 형성력의 변화는 Table 3-14과 같다. 발효전, 1차 발효후, 2차 발효 후의 기포 형성력은 대조군, 대두분 첨가 증편, 대두 단백질 가수분해물 첨가 증편 모두에서 유의 수준 0.001에서 유의적인 것으로 분석되어 졌다. 발효전의 단계에서는 대조군이 13.59인데 비하여 대두분가루 3% 첨가군은 38.75, 대두 단백질 가수분해물 3% 첨가군 62.65, 7% 첨가군 337.30으로 높아지는 것을 알 수 있다. 그러한 현상을 Table 3-14에서 보여지는 것처럼 일차 발효, 2차 발효에도 유사하게 나타났다. 그러나 유의 수준 0.001에서의 대조군과의 유의적인 차이는 가수분해물 7% 첨가군에서 만 보여준다. 발효 과정에 따른 변화에서는 가수분해물 1% 첨가군만 유의적인 것으로 분석되어 졌다. 그러나 발효가 진행될수록 모든 시료에서 기포 형성력이 높아지는 것을 볼 수 있다. 이러한 반죽의 기포 형성력은 반죽의 용해성과 공기의 포집력을 나타내며(박미자, 1998), 제빵에서도 이러한 기포 형성력이 부피의 증가와 스펀지 같은 조직의 형성과 밀접한 관련이 있다고 연구되어 졌다(Shiiba, 1990).

Table 3-14 Changes in foaming ability during fermentation of *Jeungpyun* batter added hydrolyzated soy protein

Treatment	ratio	BF	1F	2F
control	0	13.59 ^a	39.67 ^a	50.03 ^a
soy flour	3%	38.75 ^a	34.61 ^a	42.49 ^a
hydrolyzated soy protein	1%	^A 16.66 ^a	^A 28.94 ^a	^B 52.70 ^a
	3%	62.65 ^a	68.18 ^a	73.81 ^a
	7%	337.30 ^b	550.00 ^b	529.09 ^b

BF: before fermentation 1F: first fermentation 2F: second fermentation

a-b Different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.001$ by Duncan's multiple range test (column).

A-B Different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.001$ by Duncan's multiple range test (row).

나) 증편의 이화학적인 특성

(1) 용해도와 팽창력

증자 후 증편의 용해도와 팽창력의 결과는 Table 3-15, Table 3-16에서 보여진다. 온도에 의한 용해도의 변화에서는 모두 유의적인 차이가 있는 것으로 나타났다 ($p < 0.001$). 대조군에서는 50도와 60도에서는 각각 33.60, 33.47로 유의적인 차이가 없었으나, 70도, 80도, 90도에서는 차이를 보였다. 그리고 온도가 증가할 수록 용해도는 높아진 것을 알 수 있다(Figure 4-27). 대두분 첨가군에서는 70도 까지 변화가 없이 진행되다가 80도부터 변화를 보였다. 또한 대두 단백질 가수분해물 3%와 7% 첨가군에서도 온도가 낮을 때에는 유의적인 차이가 미비하나 온가 높아짐으로써 유의적인 차이가 나타났다($p < 0.001$). 같은 온도대에서 시료의 차이를 분석해 보면 모든 온도 구간에서 유의적인 것으로 분석되어졌다. 그리고 대조군에 비하여 대두분과 대두단백 가수분해물을 첨가한 군이 용해도가 높은 것으로 나타났다. 90도에서의 대조군은 35.7%의 용해도를 보이는 반면에 대두분 첨가군에서는 38.94%, 대두 단백질 가수분해물 3% 첨가군은 39.01%, 대두단백 가수분해물 7% 첨가군은 39.11%로 보여진다.

Table 15 Solubility of *Jeungpyun* added soy flour and hydrolyzated soy protein

Temperature	control	soy flour	hydrolyzated soy protein		
			1%	3%	7%
50	^A 33.60 ^a	^B 34.44 ^a	^C 34.51 ^a	^D 34.67 ^a	^E 34.37 ^a
60	^A 33.47 ^a	^{AB} 34.55 ^a	^{AB} 34.53 ^b	^{AB} 34.71 ^a	^B 35.45 ^b
70	^A 33.80 ^b	^B 34.51 ^a	^C 33.11 ^b	^D 37.99 ^b	^E 35.13 ^b
80	^A 34.69 ^c	^B 37.01 ^b	^C 36.21 ^c	^D 37.51 ^c	^E 37.99 ^c
90	^A 35.70 ^d	^B 38.94 ^c	^C 38.25 ^d	^B 39.01 ^d	^D 39.11 ^d

^{a-d} Different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.001$ by Duncan's multiple range test (column).

^{A-E} Different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.001$ by Duncan's multiple range test (row).

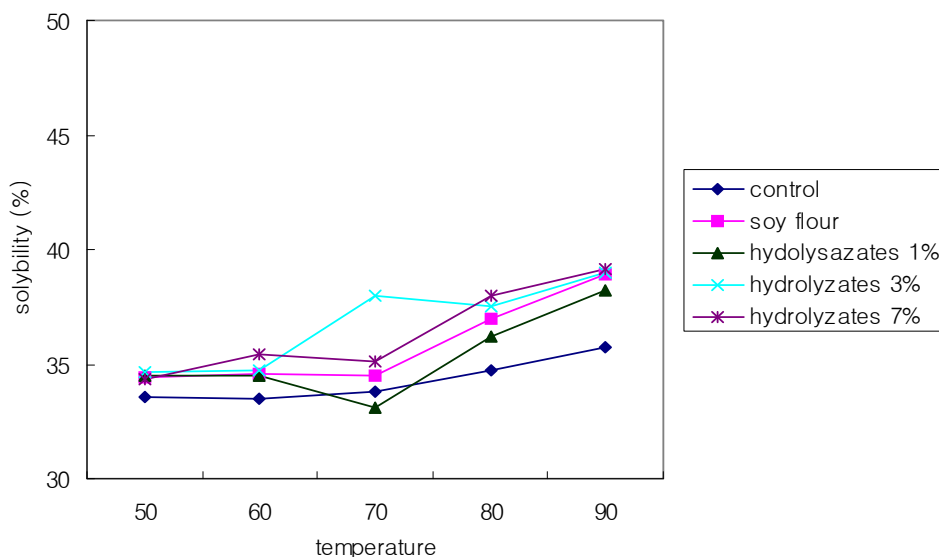


Figure 3-27 Solubility of *Jeungpyun* added soy flour and hydrolyzated soy protein

다음은 증자 후 증편의 팽창력을 온도 구간 별로 살펴보면 시료의 종류에 변화는 전 온도 구간에서 모두 유의적인 것으로 나타났다. 대조군에 비하여 대두분과 대두 단백질 가수분해물을 첨가 군이 팽창력 높은 것으로 분석되어 졌다. 50도에서는 대조군의 팽창력은 8.36이었으며, 대두 단백질 가수분해물 3%는 9.64, 대두 단백질 가수분해물 7% 첨가군은 9.75이며, 90도에서는 대조군은 8.92, 대두 단백질 가수분해물 3% 첨가군은 11.56, 7% 첨가군은 12.52로 나타났다. 시료마다의 온도에 변화에 분석을 보면 온도의 변화가 팽창력에 영향을 미치고 있음이 유의수준 0.001에서 판명되어졌다. 온도가 올라갈수록 팽창력이 증가하는 것으로 보여진다(Figure 3-28).

Table 3-16 Swelling power of *Jeungpyun* added soy flour and hydrolyzated soy protein

Temperature	control	soy flour	hydrolyzated soy protein		
			1%	3%	7%
50	^A 8.36 ^a	^B 9.66 ^a	^C 9.56 ^{bc}	^B 9.64 ^a	^D 9.75 ^a
60	^A 8.38 ^a	^C 9.97 ^a	^B 9.15 ^a	^C 9.59 ^b	^D 10.13 ^b
70	^A 8.66 ^b	^D 10.95 ^b	^C 9.93 ^d	^D 10.30 ^c	^E 11.19 ^c
80	^A 8.57 ^c	^D 11.23 ^c	^B 9.58 ^c	^C 10.64 ^d	^D 11.61 ^d
90	^A 8.92 ^d	^C 11.71 ^d	^B 9.53 ^b	^C 11.56 ^e	^D 12.52 ^e

a-d Different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.001$ by Duncan's multiple range test (column).

A-E Different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.001$ by Duncan's multiple range test (row).

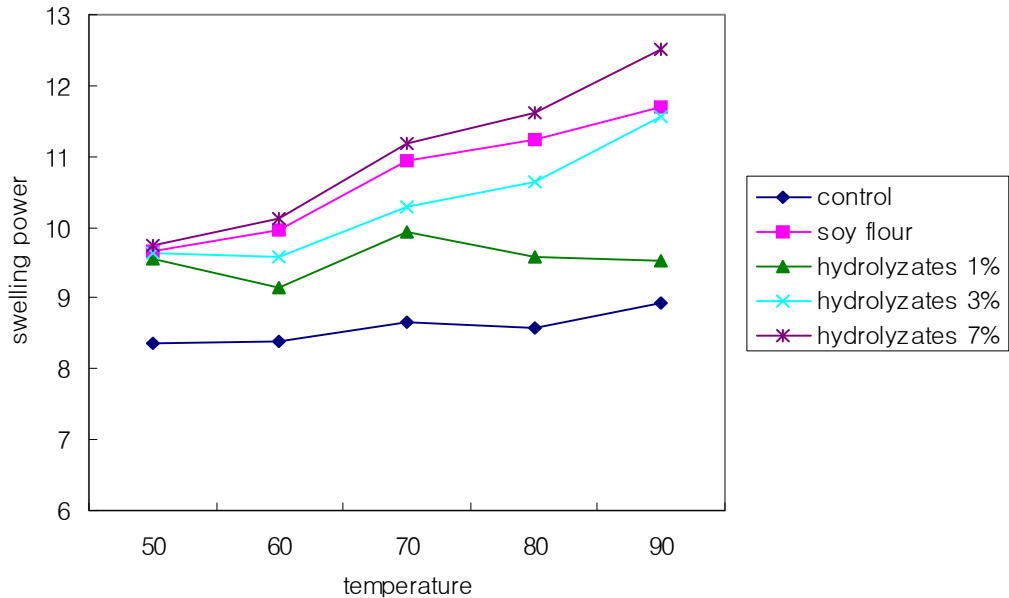


Figure 3-28 Swelling power of *Jeungpyun* added soy flour and hydrolyzated soy protein

(2) 수분 함량과 수분 결합력

증자한 후 직후의 수분 함량과 수분 결합력은 Table 3-17와 같다. 시료의 수분함량은 시료마다의 유의적인 차이는 없었다. 그러나 대조군이 50%인데 반하여 대두 가수분해물 3% 첨가군은 48.23%, 대두 가수분해물 7% 첨가군은 47.74로 대조군에 비하여 수분함량은 줄어드는 것을 볼수 있다. 수분 결합력에서는 유의수준 0.001에서 유의적인 차이가 있었다, 대조군과 가수분해물 1% 첨가군은 차이가 없었으나, 다른 첨가군에서는 차이가 있는 것으로 나타났다. 대조군은 3.81인데 반하여 대두 단백질 가수분해물 3%와 7% 첨가군은 각각 4.88과 5.77로 대두 단백질 가수분해물의 첨가가 수분 결합력을 높이는 것으로 분석되어 졌다.

Table 3-17 Moisture contents and water binding capacity of raw and freezerdied *Jeungpyun* flours added soy flour and hydrolyzated soy protein

Treatment	ratio	moisture content	water binding capacity
control	0	50.00%	3.81 ^a
soy flour	3%	49.26%	5.11 ^b
hydrolyzated soy protein	1%	49.35%	4.02 ^{ab}
	3%	48.23%	4.88 ^b
	7%	47.74%	5.77 ^c

^{a-c} Different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.001$ by Duncan's multiple range test (row).

(3) 일반 성분 분석

증자 한 후의 증편의 일반성분 분석은 Table 3-18과 같다. 회분과 단백질에서만 유의 수준 0.001에서 유의 적인 차이를 보여 주었다. 회분에서는 대조군이 0.11%과 차이는 대두 단백질 가수분해물 3% 첨가군과 7%첨가 군에서만 보여주며, 각각 0.21%, 0.24%인 것으로 나타났다. 단백질에서의 유의적인 차이는 증편 반죽시에 대두분과 대두 단백질 가수분해물 첨가에 의한 것으로 사료되며, 대조군이 0.45%, 대두 단백질 가수분해물 3%, 7% 첨가군이 각각 0.80, 1.20으로 나타났다. 또한 대두분과 대두단백 가수분해물 3% 첨가군은 비교해 보면 쌀가루 대비 3%를 넣었지만 대두 단백질 가수분해물 3% 첨가군이 0.80으로 대두분 첨가군 0.60에 비하여 높은 것으로 보여진다.

Table 3-18 Proximate composition of *Jeungpyun* added soy flour and hydrolyzated soy protein

Treatment	ratio	water	fat	ash	protein	carbohydrate
control	0	50.03	0.75	0.11 ^a	0.45 ^a	48.67
soy flour	3%	49.26	1.16	0.15 ^{ab}	0.60 ^b	48.81
hydrolyzated soy protein	1%	49.54	1.05	0.17 ^{abc}	0.48 ^a	48.74
	3%	48.23	1.11	0.21 ^{bc}	0.80 ^c	49.63
	7%	47.74	1.07	0.24 ^c	1.20 ^d	49.73

^{a-d} Different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.001$ by Duncan's multiple range test (column).

다) 증편의 품질 특성

(1) 색도

대두 단백질 가수분해물을 첨가한 증편의 색은 Table 3-19와 같다. 명도 적색도 황색도 모두에서 시료에 따라 유의 수준 0.001에서 유의적인 차이가 있는 것으로 나타났다. 명도는 대조군이 34인데 반하여 대두 단백질 가수분해물 3% 첨가군은 36.09, 대두 단백질 가수분해물 7%는 40.37로 대조군보다 첨가군이 높게 나타났다. 적색도를 나타내는 a 값은 모두 음(-)으로 나타내 약간의 녹색도 경향을 띠었으며, 대조군 -13.42에 비하여 0에 가까운 수치를 보여주어 적색의 경향이 나타남을 알 수 있었다. 특히 대두분 첨가 군이 -6.59로 가장 높은 a값을 보여주었다.

Table 3-19 Colorimeter characteristics of *Jeungpyun* added soy flour and hydrolyzated soy protein

Treatment	ratio	L	a	b
control	0	34.00 ^a	-13.42 ^a	-8.07 ^a
soy flour	3%	38.00 ^b	-6.59 ^b	-13.76 ^b
hydrolyzated soy protein	1%	33.21 ^c	-12.93 ^a	-8.77 ^c
	3%	36.09 ^d	-8.75 ^{bc}	-9.73 ^d
	7%	40.37 ^e	-7.35 ^b	-12.33 ^e

^{a-d} Different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.001$ by Duncan's multiple range test (column).

(2) 증편의 부피, 대칭성, 균일성

AACC 10-91 template 방법의 수정된 방법을 이용하여 측정된 현미와 보리로 대체한 증편의 부피, 대칭성, 균일성에 대한 결과는 Table 3-20과 같다. 부피지수와 대칭성에서만 유의 수준 0.001에서 유의적인 차이를 보여주었다. 부피지수는 대조군(5.20cm) 보다 대두분 첨가군(7.8cm), 대두 단백질 가수분해물 3% 첨가군(6.8cm), 7% 첨가군(7.2cm)이 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 첨가군이 기포형성력, 수분결합력, 팽창력에서 대조군에 비해 높게 나타난 것과 관계가 있다고 할 수 있겠다. 또한 증편을 수직으로 절단한 단면의 기공의 크기(Figure 3-29)을 보면 대조구가 가장 기공이 작았으며, 대두 단백질 1% 첨가군도 이와 유사하였다. 가장 기공이 큰 것은 대두분 첨가군이었으며, 기공의 균일성은 떨어졌다. 대두 단백질 3% 첨가군의 기공의 크기는 대두분 첨가군 보다는 작았으나, 대조군 보다는 크게 나타났으며, 기공의 크기로 대체로 균일하였다.

Table 3-20 Indices of volume, symmetry and uniformity for the *Jeungpyun* added soy flour and hydrolyzated soy protein(cm)

Treatment	ratio	volume Index	symmetry	uniformity
control	0	5.2 ^a	0.4 ^a	0.0
soy flour	3%	7.8 ^c	0.8 ^b	0.1
hydrolyzated soy protein	1%	5.3 ^a	0.4 ^a	0.0
	3%	6.8 ^b	0.5 ^{ab}	0.0
	7%	7.2 ^c	0.7 ^{ab}	0.1

^{a-c} Different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.001$ by Duncan's multiple range test (column).



(Control)



(soy flour)



(hydrolyzated soy protein 3%)



(control)



(soy flour 첨가군)



(hydrolyzated soy protein 3%)



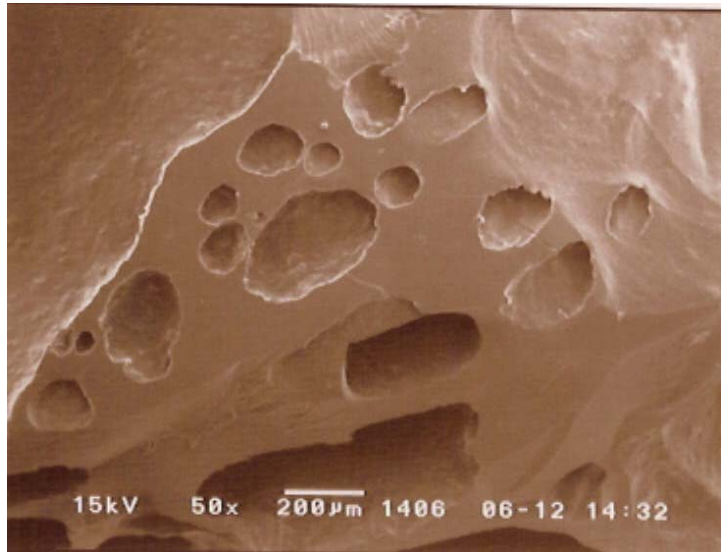
(hydrolyzated soy protein 7%)

Figure 3-29 Cross-sectional views of *Jeungpyun* added soy flour and hydrolyzated soy protein

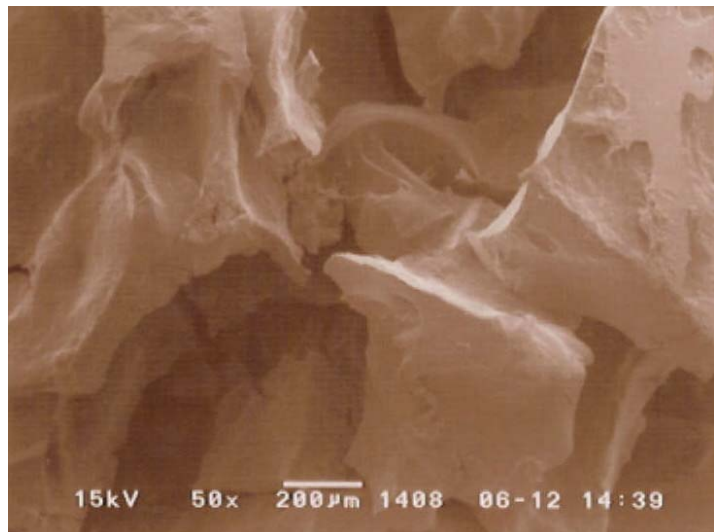
(3) 미세구조 관찰

대조군과 대두분, 대두 단백질 가수분해물을 첨가한 증편의 단면 구조를 주사전자 현미경으로 관찰한 결과는 Figure 3-30과 같다. 대조군은 기공들이 보이나 아주 작은 기공들로 구성되어 있다. 그에 반해 대두분이나 대두 단백질 가수분해물이 첨가된 군에서는 대체로 기공의 크기가 커진 것을 볼 수 있다. 그러나 대두분 첨가 군은 기공이 불규칙했으며, 다른 첨가군들에 비하여 기공의 크기도 많이 컸다. 대두단백 가수분해물 첨가군들은 3%군에서 가장 고른 기공을 보여주었다.

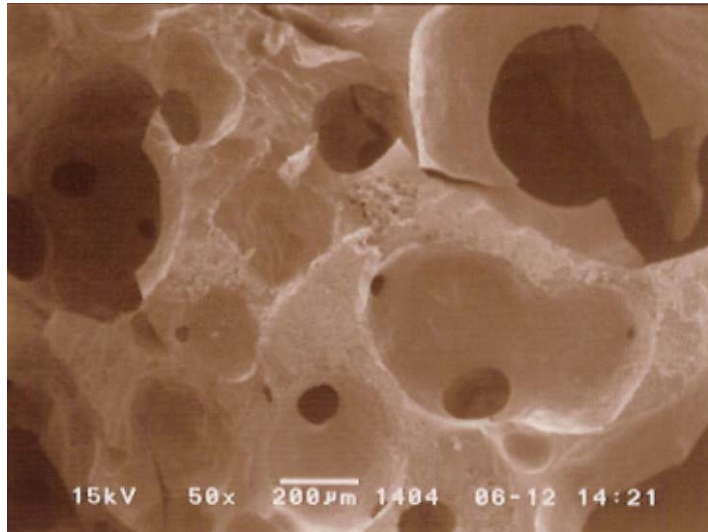
Control



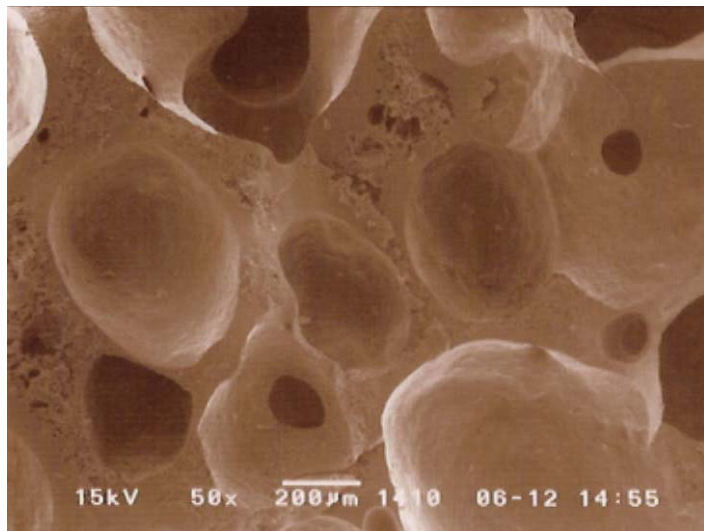
soy bean 첨가군



hydrolyzated soy protein
1% 첨가군



hydrolyzated soy protein
3% 첨가군



hydrolyzated soy protein
7% 첨가군

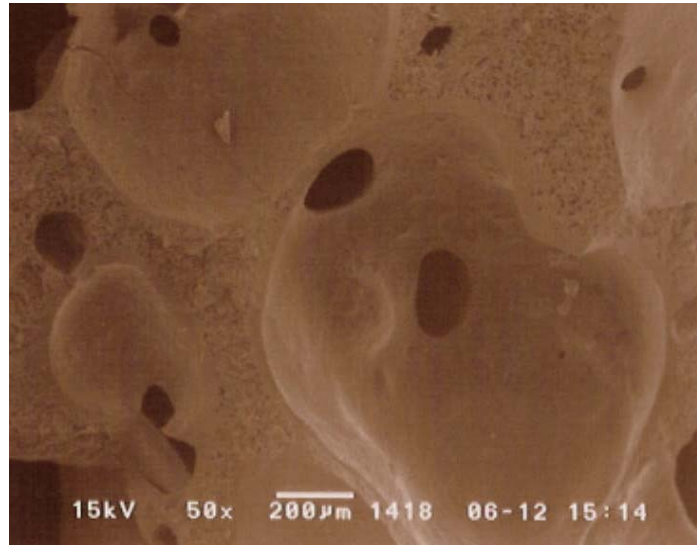


Figure 3-30 Scanning electron micrographs for *Jeungpyun*

(4) 관능검사

전문가 집단에 대한 관능검사의 결과는 Table 3-21과 같다. 부착성 (adhesiveness) 만이 유의수준 0.001에서 유의적이지 않은 것으로 나타났으며, 그 외의 특성에 대해서는 모두 유의적것으로 분석되어 졌다. 조직의 균일성은 대조구가 9.24로 대두 단백질 가수분해 1%와 3% 첨가물은 비슷한 것으로 보여졌으나, 대두분과 대두 단백질 가수분해물 7%에서는 각각 5.62, 5.32로 떨어지는 것을 볼 수 있다. 조직의 크기는 대조군 (3.54) 에 비하여 대두분이나 대두단백 가수분해물 첨가물을 큰 것으로 나타났다. 견고성은 대조군 (11.18) 보다는 첨가군이 덜 견고한 것으로 분석되어 졌다. 맛에 대해서는 대두분 첨가군이 3.12로 가장 맛이 없는 것으로 조사되었으며, 대조군(8.20)보다 대두 단백질 가수분해물 첨가군(9.2, 10.26, 10.77)들이 더 맛있는 것으로 분석되어 졌다. 전체적인 바람직함 정도는 대조군이나 대두분 첨가물에 비하여 가수분해 첨가물들이 높게 나타났다.

Table 3-21 Sensory properties of Jeungpyun added soy flour and hydrolyzated soy protein

	control	soy flour	hydrolyzated soy protein		
			1%	3%	7%
CU	9.24 ^b	5.62 ^a	8.71 ^b	9.03 ^b	5.32 ^a
CS	3.54 ^a	12.95 ^c	4.73 ^a	7.20 ^b	8.60 ^b
SP	4.35 ^a	12.31 ^d	4.32 ^a	6.82 ^b	9.32 ^b
MO	9.12 ^b	6.52 ^a	9.0 ^b	8.37 ^b	7.80 ^b
HA	11.18 ^c	4.91 ^a	10.24 ^c	8.08 ^b	6.28 ^{ab}
FL	4.02 ^a	7.82 ^b	3.82 ^a	4.17 ^a	4.09 ^a
AD	6.75	4.61	6.23	5.22	5.78
TA	8.20 ^b	3.12 ^a	9.2 ^{bc}	10.26 ^c	10.77 ^c
OD	6.72 ^b	4.44 ^a	8.23 ^c	10.97 ^d	11.76 ^d

^{a-d} Different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.001$ by Duncan's multiple range test (column).

CU: cell uniformity, CS: cell size, SP: springness, MO: moistness, HA: hardness, FL: flavor, AD: adhesiveness, TA: taste OD: overall desirability

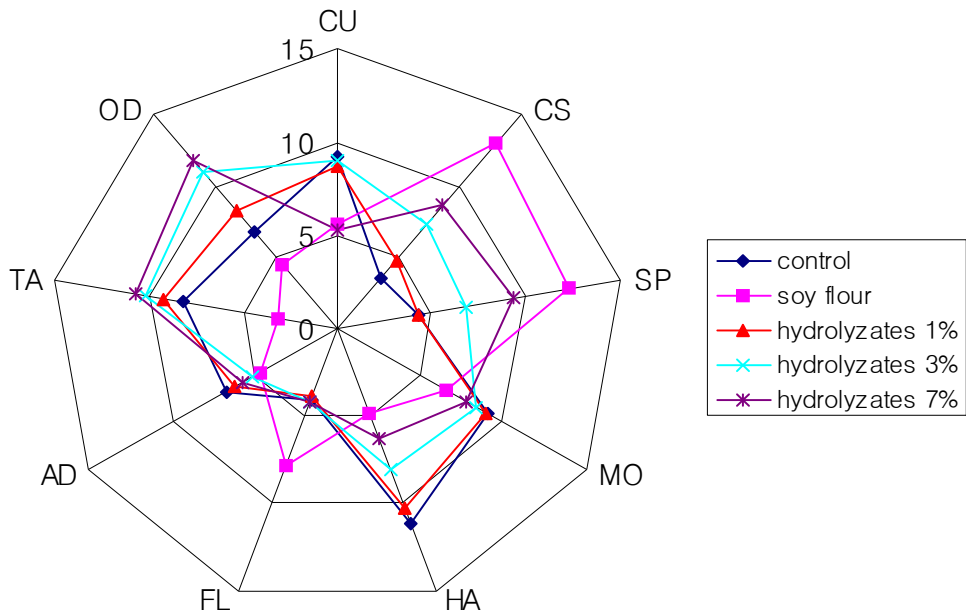


Figure 3-31 Sensory properties of *Jeungpyun* added soy flour and hydrolyzated soy protein CU: cell uniformotu, CS: cell size, SP: springness, MO: moistness, HA: hardness, FL: flavor, AD: adhesiveness, TA: taste OD: overall desirability

소비자 집단에 대한 관능검사는 Table 3-22, Figure 3-32, 3-33, 3-34에서와 같다. 신맛에 대한 기호도, 단맛과 신맛에 대한 강도를 제외한 항목들에 유의수준 0.001에서 유의적인 것으로 분석되어 졌다. 기호도에서는 뚝은 맛(harsh taste)와 부드러운(softness)에서 시료별 차이가 많이 났다. 뚝은 맛(harsh taste)은 대두분 첨가 군이 3.10으로 가장 나왔으며, 대조군과 대두 단백질 가수분해물 첨가군이 각각 7.22, 6.28로 상대적으로 높은 수치를 보여 주고 있다. 부드러움(softness)는 대두분 첨가군이 9.21로 가장 높게 나왔으며, 대두 단백질 가수분해물이 8.59, 대조군이 5.33의 순서고 낮게 분석되어 졌다. 강도 (intensity)에서는 뚝은 맛(harsh taste)이 가장 두드러진 차이를 보였다. 대두분 첨가군 (8.56)이 가장 뚝은 맛이 강한 것으로 나타났으며, 대조군은

3.18, 대두단백 가수분해물은 2.84로 상당히 낮은 수치를 보여준다. 전반적인 기호도에 서는 대조군이 5.06인데 반하여 대두 단백질 가수분해물이 7.26으로 높게 나타났다.

Table 3-22 Consumer test on *Jeungpyun* added soy flour and hydrolyzated soy protein

		control	soy flour	hydrolyzated soy protein (3%)
Acceptance	aroma	5.38 ^{ab}	4.67 ^a	5.62 ^b
	sweet flavor	5.88 ^{ab}	5.12 ^a	6.05 ^{ab}
	sour taste	3.61	4.06	3.72
	harsh taste	7.22 ^b	3.10 ^a	6.28 ^c
	softness	5.33 ^a	9.21 ^b	8.59 ^b
Intensity	aroma	3.35 ^a	3.62 ^{ab}	4.49 ^b
	sweet flavor	4.46	3.72	4.48
	sour taste	2.41	2.31	1.89
	harsh taste	3.18 ^a	8.56 ^b	2.84 ^a
	softness	4.74 ^a	6.95 ^b	7.47 ^b
Overall desirability		5.06 ^b	3.36 ^a	7.26 ^c

^{a-c} Different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.001$ by Duncan's multiple range test (column).

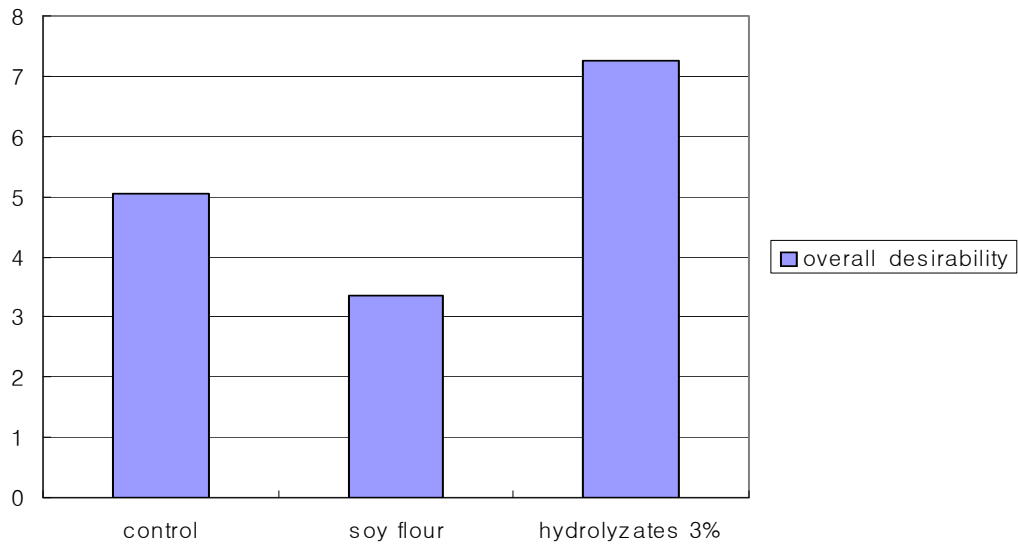


Figure 3–32 Overall desirability of *Jeungpyun* added hydrolyzates

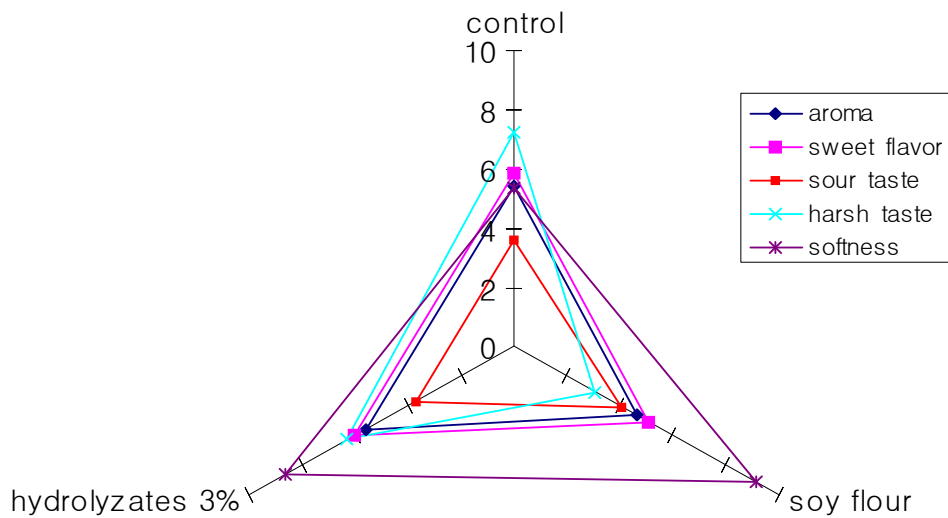


Figure 3–33. Consumer acceptance test on *Jeungpyun* added hydrolyzated soy protein

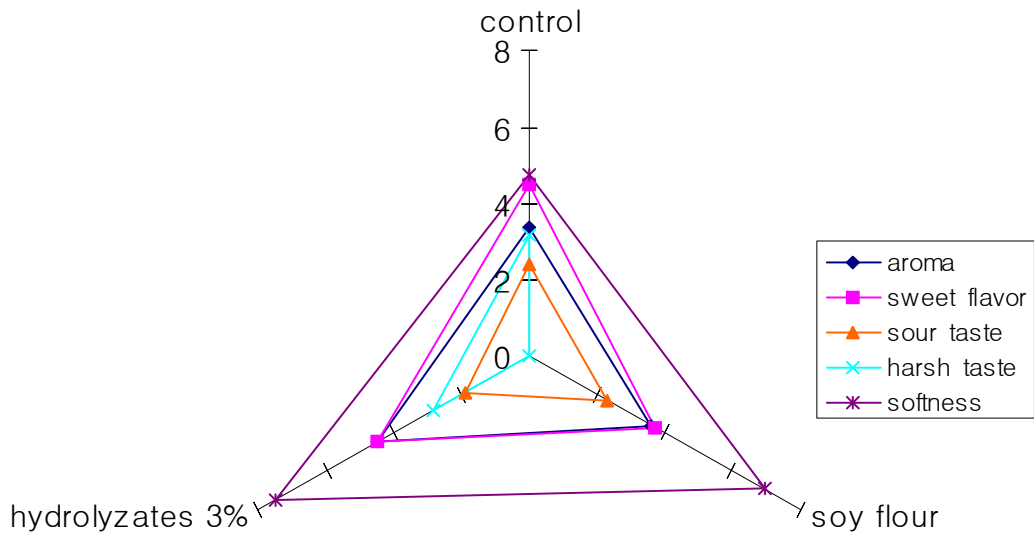


Figure 3-34 Consumer intensity test on *Jeungpyun* added hydrolyzated soy protein

라) 저장에 따른 노화도 변화

(1) DSC (Differential Scanning Calorimetry) 분석에 의한 노화도

시차주사열 분석기인 Differential Scanning Calorimetry는 측정시료와 기준물을 동일 조건하에서 일정한 속도의 열로 가열하여 그 과정에서 생기는 변화와 함께 발생하는 열량 변화를 측정하는 것으로 식품 내부의 물과 얼음의 상태, 단백질의 변성, 그리고 전분의 호화 등의 연구에 이용되어 진다. Table 3-23, Figure 3-35에는 호화와 노화정도를 측정하기 위하여 반죽과 증자 한 후의 증편을 냉장 온도(4°C)에서 72시간 저장시킨 후 측정한 결과가 나와 있다. 호화 개시 온도는 54.65°C에서 64.65°C까지 대두 단백질 가수분해물을 첨가에 따라 유의적으로 약간씩 증가하였음을 알수 있다. 이외에 호화 최고 온도, 호화 종료온도, 엔탈피도 증가 하고 있는 것으로 나타났다. 이는 대두 단백질 가수분해물의 수분 흡착력으로 인하여 호화 온도를 높이고 호화가 천천히 진행되도록 하여 부드러운 조직감을 형성하도록 한다고 판단되어 진다. 72시간 저장후의 노화도를 보면

대조군의 엔탈피에서 2.14을 보여주며 대두 단백 가수분해물의 첨가량이 증가할수록 점차 감소하고 있는 것으로 분석되어 졌다. 여기서 엔탈피는 저장중 수소 결합이 형성되면서 전분 분자는 부분적으로 재배열이 일어나며, 이를 재호화 시키는데 필요한 열량을 의미한다. 따라서 대두 단백 가수분해물 첨가군의 엔탈피가 감소하는 것으로 보아 대두 단백 가수 분해물의 첨가는 노화를 지연 시키는 효과를 가지고 오는 것으로 보여진다.

Table 3-23 DSC Characteristics of *Jeungpyun* added with soy flour and hydrolyzated soy protein comparing fresh batter and 72hrs storage at 4°C

Sample	Jeungpyun Batter				Jeungpyun after steaming			
	T _o	T _p	T _c	ΔH	T _o	T _p	T _c	ΔH
Control	57.65 ^a	63.93 ^a	74.65 ^a	2.70 ^a	41.93 ^a	52.10 ^a	61.24 ^c	2.14 ^c
hydrolyzate d soy protein	1%	59.56 ^{ab}	66.99 ^{ab}	78.11 ^b	3.28 ^{ab}	45.30 ^b	55.74 ^a b	1.20 ^b
	3%	63.27 ^{ab}	71.32 ^b	80.42 ^{bc}	3.82 ^b	46.20 ^c	55.92 ^b	0.93 ^a
	7%	64.65 ^b	72.10 ^b	82.83 ^c	3.90 ^b	45.44 ^b	50.83 ^d	55.56 ^a

^{a-c} Different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.001$ by Duncan's multiple range test (column).

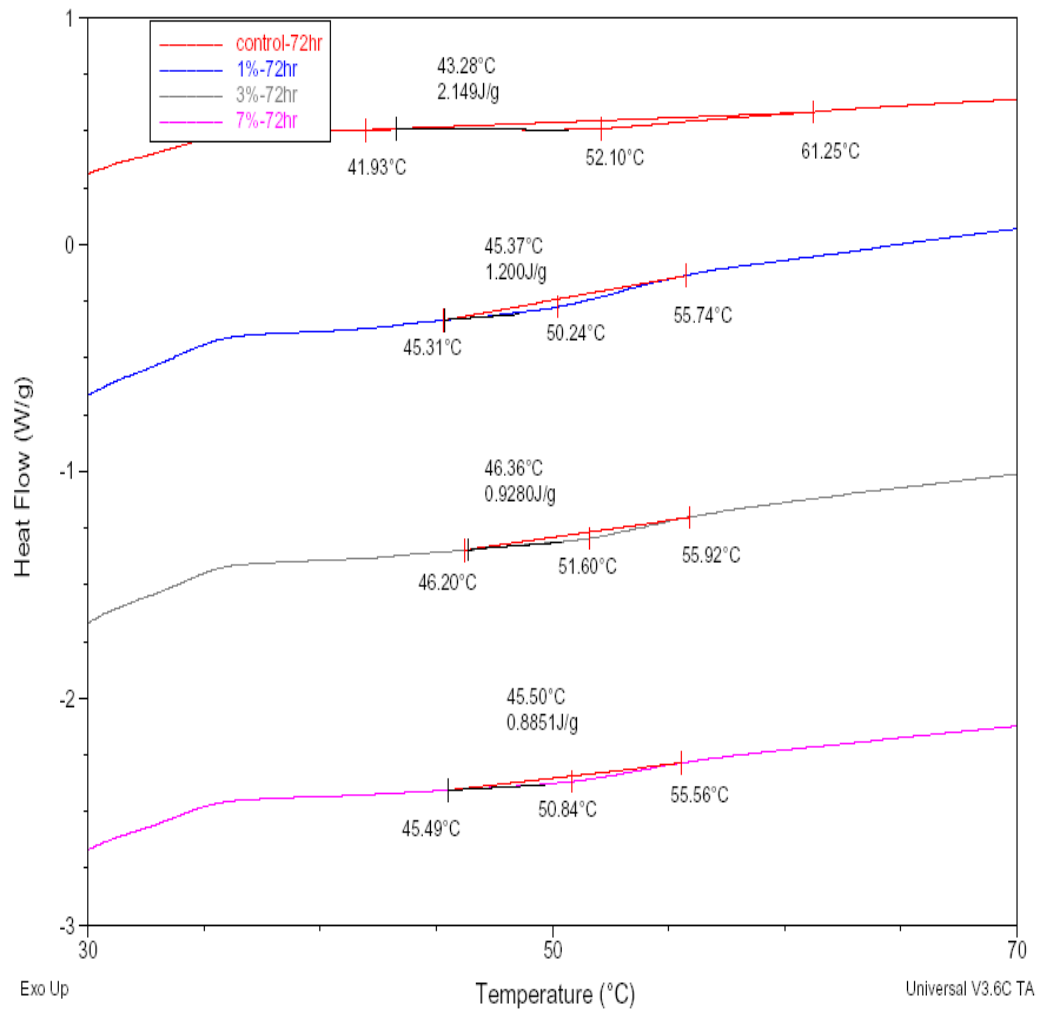


Figure 3–35 DSC thermogram of *Jeungpyun* for 72 hrs storage at 4°C

제 2 절 대두 단백질 가수분해물의 소화율과 지질 저하작용 평가

가. 국내산 대두가 실험동물의 생리대사에 미치는 영향

1) 연구 개발 내용

여러 가지 종류의 대두가 실험동물의 생리대사에 미치는 영향을 분석하기 위하여 단백질 공급원으로 casein, 분리대두단백(isolated soy protein, ISP) 또는 casein에 노란콩, 흑태, 쥐눈이콩, 서리태를 20% 함유한 식이를 4주간 공급하고 실험동물의 체중 증가, 식이 효율, 지질 및 단백질 대사, 과산화 지질, 철 영양상태 및 면역에 미치는 영향을 비교분석하였다.

2) 연구 방법

가) 실험동물 및 실험식이 조성

실험동물은 생후 5주된 Sprague-Dawley 중 수컷 성장기 흰쥐를 사용하였고, 대조군인 casein군은 AIN-93 diet을 기본식으로 하여서 20%의 단백질을 casein으로 공급하고 콜레스테롤을 1% 첨가한 식이로 구성하였다(Table 3-24). 실험군의 단백질 급원은 casein대신 분리대두단백(isolated soy protein, Supro 1500 IP Non-GM, Solae Company, ISP군)을 공급하거나 또는 casein에 노란콩, 흑태, 쥐눈이콩 또는 서리태를 함유한 식이로 하였다. 국내산 콩은 성남 하나로 농협에서 콩을 구매하여 하루동안 수침했다가 autoclave에서 30분간 고온 살균한 뒤 저온건조시켜서 가루로 만들어 이용하였다. 콩 함유군의 식이 조성은 casein 식이를 변형하여 콩을 20% 첨가하고, 콩의 단백질, 지질 및 섬유소의 양을 고려해서 casein군과 에너지 조성비율이 비슷하도록 구성성분을 조절하였다. 실험동물은 1주 동안의 적응 기간을 거친 후 체중에 따라 난괴법에 의해 각 실험군당 8마리씩 나누었고, 한 마리씩 stainless steel cage에 격리하여 사육하였으며 총 사육기간은 4주로 하였다. 실험기간동안 물과 식이는 제한 없이 먹을 수 있도록 하였다.

Table 3-24 Composition of experimental diet

Ingredients	(g/kg diet)		
	Casein	Soybean	ISP
Corn Starch	489.486	429.486	489.486
Casein	200	130	0
soybean	0	200	0
ISP	0	0	200
Sucrose	100	100	100
Soybean oil	100	60	100
Cellulose	50	20	50
Mineral mixture ¹⁾	35	35	35
Vitamin mixture ²⁾	10	10	10
L-Cystine	3	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
tert-Buthylhydroquinone (mg)	14	14	14
cholesterol	10	10	10

1) Mineral mixture : AIN-93 mineral mixture (g/kg Mix)

Calcium phosphate anhydrous 357.00; Potassium phosphate monobasic 196.00; Potassium citrate, tripotassium 70.78; Sodium chloride 74.00; Magnesium oxide 24.00; Zinc carbonate 1.65; Sodium meta-silicate-9H₂O 1.45; Manganous carbonate 0.63; Cupric carbonate 0.30; Chromium potassium sulfate-12H₂O 0.275; Boric acid 81.5mg; Sodium fluoride 63.5mg; Nickel carbonate 31.8mg; Lithium chloride 17.4mg; Sodium selenate anhydrous 10.25mg; Potassium iodate 10.0mg; Ammonium paramolybdate-4H₂O 7.95mg; Ammonium vanadate 6.6mg; Powdered sucrose 215.02

2) Vitamin mixture : AIN-93G vitamin mixture (g/kg Mix)

Thiamin-HCl 0.6; Riboflavin 0.6; Pyridoxine-HCl 0.7; Nicotinic acid 3.0; Calcium pantothenate 1.6; Folic acid 0.2; Biotin 0.02; Cyanocobalamin (Vitamin B-12) 0.025; Retinyl palmitate (Vitamin A) 0.8; dl- α -Tocopheryl acetate 15g; Cholecalciferol (Vitamin D-3) 0.25; phylloquinone (Vitamin K-1) 0.075; Powdered sucrose 974.655g

나) 체중증가율, 식이 효율, 단백질 효율의 측정

실험동물의 체중은 1주일에 1회씩 측정하였으며, 식이 섭취량은 1주일에 3회씩 측정하였다. 실험동물의 식이 섭취량 (또는 단백질 섭취량)과 체중을 이용하여 실험 기간의 체중 증가량을 같은 기간에 섭취한 식이 섭취량 (또는 단백질 섭취량)으로 나누어 식이 효율(Feed Efficiency Ratio, FER)과 단백질 효율 (Protein Efficiency Ratio, PER)을 산출하였다.

다) 실험동물의 혈액 및 장기 채취 방법

동물 실험의 경우, 사육기간이 끝난 실험 동물을 희생시키기 전 12시간을 굶긴 후, ethyl ether로 마취, 개복하여 심장에서 주사기를 이용하여 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액은 응고되는 것을 막기 위해 EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetate)가 들어있는 원심분리관에 담아 2,500rpm에서 30분간 원심분리하여 혈장과 적혈구를 분리하고 혈장은 생화학적 분석을 위해 -20°C 에서 냉동보관하였다. 혈액을 채취한 후에 즉시 간, 비장, 신장, 고환, 부고환지방(epididymal fat pad, EFP)을 분리하여 무게를 측정하였다.

라) 실험동물의 체내 지질 대사 관련 인자 분석

혈장과 간의 총 cholesterol농도와 혈장 HDL-cholesterol 농도는 cholesterol 산화효소를 포함하는 kit(영동제약)을 이용하여 spectrophotometer (HP 8452, U.S.A) 500nm에서 비색정량하였다. 혈장 중성 지방 농도는 혈액분석기인 DTSC (Johnson & Johnson, U.S.A.)를 사용하여 측정하였다. 간의 총 지방 농도는 Biligh & Dyer법(Bligh, 1959)을 이용하여 측정하였고, 간의 중성 지방 농도는 lipoprotein lipase를 포함하는 효소법 kit(영동제약)을 이용하여 546nm에서 비색정량하였다.

마) 혈장 lactate, lactic dehydrogenase, GOT, GPT 및 지질과산화물 분석

혈장 lactate 농도와 lactic dehydrogenase, GOT, GPT의 활성 정도는 혈액 분석기 (Johnson & Johnson Co., USA)를 써서 분석하였다. 혈장의 과산화물은 Yagi법 (Ryu 외 2인, 2003)¹⁾을 이용하여 TBARS(thiobarbituric acid reactive substance)의 양을 분석하였다. 혈장 100 μl 에 1/12N의 황산 4ml과 10% phosphotungstic acid 0.5ml을 첨가하고, 5분간 방치한 후 3,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 침전물에 증류수 1ml을 가하고 잘 혼합하고, 두껍을 단단히 막고 95°C water bath에서 1시간 동안 3,000rpm에서 15분간 원심 분리하여 그 상층액 (butanol층)을 spectrophotometer (HP8452) 532nm에서 비색정량하였다.

바) 혈액 철 영양상태 평가

적혈구 용적비(hematocrit)는 채취한 전혈의 일부를 소형원심분리기 (microcentrifuge)에서 11,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 전 혈액에 대한 적혈구 층의 percent (%)로 표시하고, 혈색소 (Hb)의 농도는 혈액의 헤모글로빈을 cyanomethemoglobin

으로 전환해서 540 nm에서 비색법으로 분석하였다. 혈청 철과 총철결합력은 560 nm에서 비색법으로 분석하였다(Sigma diagnostics, No. 565).

사) 비장 면역세포 증식 실험

비장은 무균적으로 분리하여 RPMI 1640(Gibco, Grand Island N.Y.: 200 mM glutamin, 25 mM Hepes, 1.4 µl/ml gentamycin) 배양액에 넣고, 멸균 sieve를 이용하여 single cell suspension을 만들었다. Spleen single cell suspension을 10% fetal calf serum을 함유한 RPMI 1640 배양액 내의 세포농도가 2.5×10^6 cell/ml되게 하여 96 well plate에 각 well당 100 µl씩 분주하였다. 각 well에 mitogen으로 Con A (concanavalin A, Sigma, 0.75 µg/10 µl) 또는 PHA (phytohemagglutinin, Sigma, 10 µg/10 µl)를 첨가하였다. Control well에는 mitogen을 첨가하지 않았고 모든 실험은 3회 반복하여 실시하였다. 분주된 plate를 37.5 ° C, CO₂ incubator에서 68시간 배양한 후 각 well에 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma, 5mg/ml PBS)를 20 µl씩 첨가하여 다시 4시간 배양하였다. 배양 후 DMSO (Dimethylsulfoxide, Sigma)를 각 well에 200 µl씩 첨가하여 세포를 용해한 후 ELISA reader로 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 비장 면역세포 증식을 (stimulation index)은 mitogen을 처리한 well의 흡광도를 mitogen을 처리하지 않은 well의 흡광도로 나누어 산출하였다.

아) IgG와 IgM 측정

혈장 IgG와 IgM 농도는 ELISA Quantitation kits (Bethyl Co., USA)를 이용하여 측정하였다. Plate의 각 well에 Capture-Ab 1 µl/100 µl coating buffer로 도포하고 60분간 배양시킨 후 wash solution으로 세척하였다. 그 후 200 µl의 blocking solution을 넣고 30분 배양시켜 세척한 뒤, 제조된 standard나 희석한 sample을 각 well에 100 µl씩 넣었다. 60분간 배양 후에 sample을 제거하고 세척한 후 HRP conjugate를 well당 100 µl씩 분주하였다. 배양 후 다시 세척하고 two-substrate reagents를 100 µl씩 분주하여 반응에 따른 색 변화를 본 후 색이 고정되면 2M H₂SO₄를 100 µl씩 넣어 반응을 멈추게 하였다. ELISA reader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 읽고 결과치의 값에 희석배수를 곱하여 IgG와 IgM의 값을 산출하였다.

자) 자료분석 및 통계 처리

조사된 자료는 SPSS프로그램을 이용해서 각 군의 평균과 표준 오차를 계산하였다. 실험군끼리의 비교는 one way ANOVA (analysis of variance)와 Duncan's multiple range test를 이용해서 분석하였으며, 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

3) 연구 결과

가) 분리대두단백이 동물의 생리대사에 미치는 영향

(1) 실험동물의 체중변화, 식이섭취량, 식이효율 및 장기 무게

실험동물의 체중변화 및 식이섭취량과 식이효율은 Table 3-25와 Figure 3-36에, 각종 장기 무게는 Table 3-26과 Figure 3-37에 나타내었다. 실험동물의 식이 섭취량과 체중증가량은 유의적인 차이가 없었다. 그러나 식이 효율과 단백질 효율은 카제인군이 분리대두단백군(ISP군)보다 유의적으로 높았고, 장기의 무게에서도 간의 경우 카제인이나 대두군은 차이가 없었으나, ISP군은 다른 두 군보다 간 무게가 적었다. 다른 장기의 무게는 세 군간에 차이가 없었다.

Table 3-25 Initial body weight, final body weight, body weight gain and diet intake, food efficiency ratio(FER), protein efficiency ratio(PER)

	Casein	Soy	ISP
Initial BW(g)	199.4±3.4	198.8±4.4	199.1±9.6
Final BW(g)	374.6±11.5	367.6±10.1	359.6±7.9
BW Gain(g/wk)	43.8±2.2	42.2±2.2	40.1±2.1
Diet intake(g/wk)	160.35±4.12	161.53±4.78	168.06±5.53
FER	0.27±0.12 ^a	0.26±0.01 ^{ab}	0.24±0.01 ^b
PER	1.37±0.06 ^a	1.30±0.05 ^{ab}	1.19±0.04 ^b

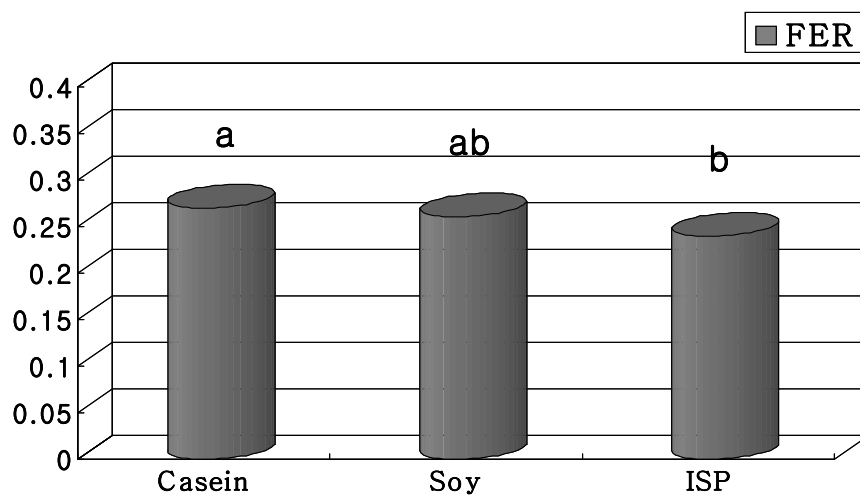


Figure 3-36 FER

Table 26 Liver, Kidney, spleen, testis and epididymal fat pad (EFP) weight

	Casein	Soy	ISP
Liver(g)	20.53±0.93 ^a	20.54±0.95 ^a	16.40±0.67 ^b
Kidney(g)	3.32±0.05	3.23±0.11	3.15±0.11
Spleen(g)	0.78±0.04	0.77±0.04	0.73±0.03
Testis(g)	2.94±0.09	2.97±0.06	2.87±0.07
EFP(g)	5.28±0.42	5.62±0.62	5.42±0.46

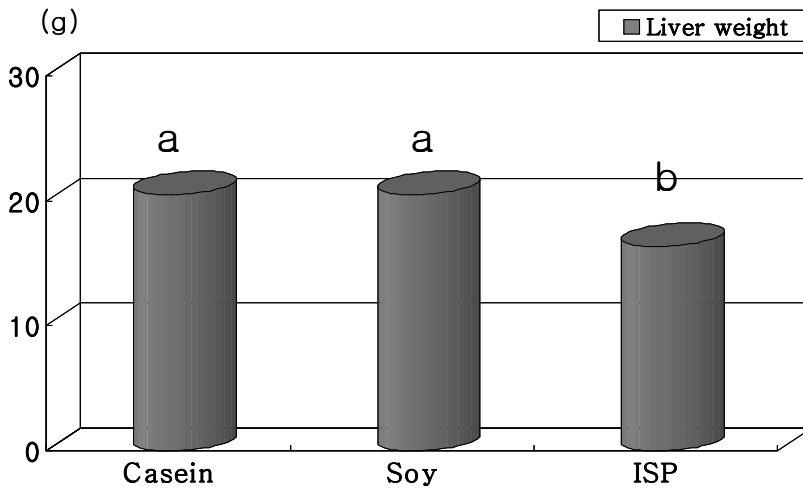


Figure 3-37 Liver weight

(2) 혈액 단백질과 GOT 및 GPT 활성도

혈액 단백질과 GOT, GPT 활성도는 Table 3-27, Figure 3-38, 3-39에 나타나 있다. 혈액의 단백질 농도는 각 군 간에 차이가 없었다. 간 손상 정도의 지표로 많이 사용되는 GOT, GPT 활성도를 살펴보면, GOT 활성도는 대두와 ISP군이 casein군보다 유의적으로 낮았고, GPT 농도에서도 ISP군은 다른 군들보다 유의적으로 낮게 나타났다.

Table 3-27 Plasma protein, Glutamic-Oxaloacetic Transaminase (GOT) and Glutamic-Pyruvic Transaminase (GPT) activities

	Casein	Soy	ISP
Protein (g/dL)	6.71±0.09	6.70±0.06	6.81±0.12
GOT(U/L)	216.38±23.73 ^a	165.43±14.34 ^b	127.13±4.47 ^b
GPT(U/L)	73.75±43.29 ^a	70.71±9.91 ^a	32.25±3.30 ^b

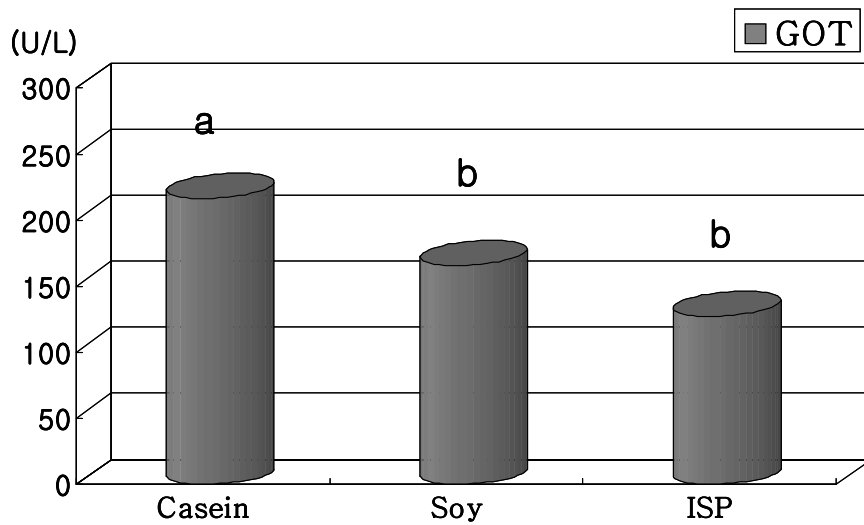


Figure 3-38 GOT activity

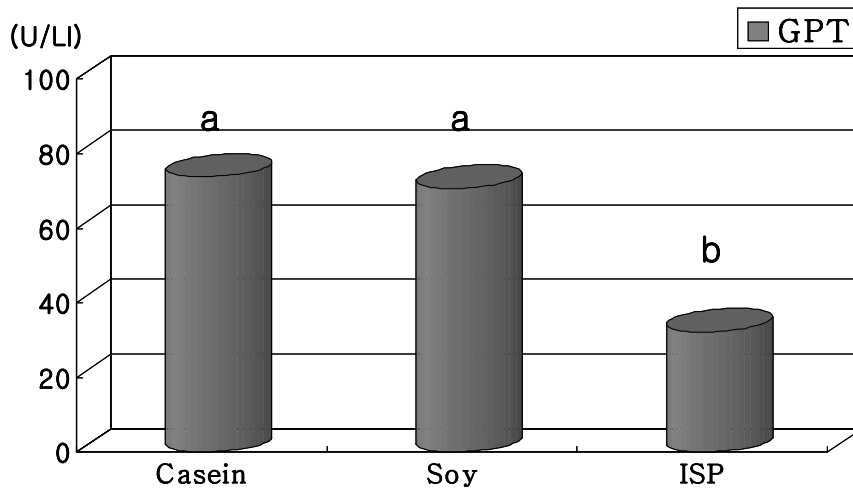


Figure 3-39 GPT activity

(3) 혈액 과산화지질, lactate, LDH 농도

혈장 과산화지질, lactate 및 LDH 농도는 Table 3-28 나타나 있다. 혈장 과산화지질과 젖산의 농도는 세 군간에 차이가 없었다. Lactic dehydrogenase의 활성도 세 군 사이에 유의적인 차이는 없었으나 GOT와 GPT 활성처럼 대두와 ISP군이 카제인군보다 낮게 나타났다.

Table 3-28. Malondialdehyde(MDA), lactate, lactic dehydrogenase concentration of the plasma

	Casein	대두	ISP
MDA(mmol/L)	1.44±0.29	1.14±0.26	1.46±0.26
Lactate(mmol/L)	7.20±0.80	6.90±0.86	7.29±0.44
LDH(U/L)	567.6±78.1	437.6±65.2	413.4±42.1

(4) 혈액 중성지방, 콜레스테롤 및 HDL 콜레스테롤 농도

혈액 중성지방, 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 농도는 Table 3-29, Figure 3-40에 나타나 있다. 혈액 중성지방은 카제인군이 가장 높고, 그 다음이 대두, ISP군의 순서로 나타났다. 혈액 총콜레스테롤은 ISP군이 다른 군들보다 낮은 경향이나 유의적인 차이는 없었고, HDL 콜레스테롤의 경우에는 각 군들 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다

Table 3-29 Plasma triglyceride(TG), total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol(HDL) concentration

mg/dL	Casein	대두	ISP
TG	44.50±4.04 ^a	38.00±2.31 ^{ab}	34.75±1.98 ^b
Total Chol.	44.75±3.63	46.71±3.83	39.00±3.28
HDL-Chol.	11.75±1.08	11.14±0.59	11.75±1.00

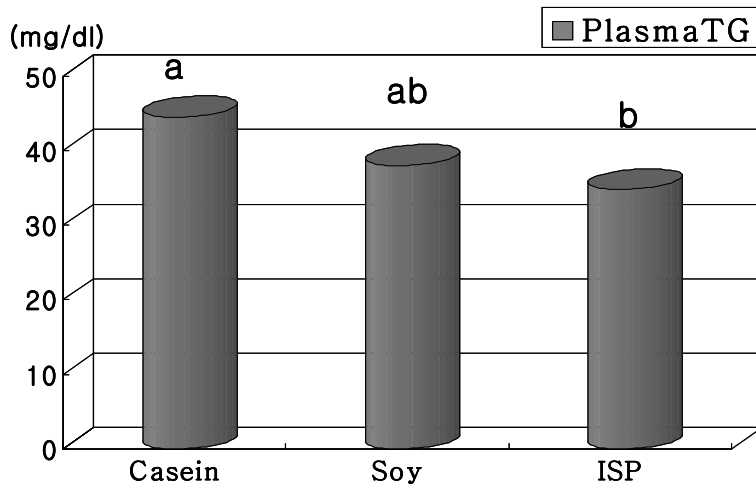


Figure 3-40 Plasma TG

(5) 간의 지질과 콜레스테롤 농도

간의 지질과 콜레스테롤 농도는 Table 3-30, Figure 3-41에 나타내었다. 간의 총지질 농도는 대두군과 ISP군이 카제인군보다 유의적으로 낮게 나타났다. 중성지방도 총지질함량과 비슷한 경향을 보였으나, 유의적인 차이는 발견되지 않았고, 간의 콜레스테롤 농도는 세 군간에 유의적인 차이가 없었다.

Table 3-30 Liver total lipid, triglyceride (TG), cholesterol

	Casein	대두	ISP
Total lipid (mg/g)	220.0±16.3 ^a	162.5±14.2 ^b	130.0±8.9 ^b
TG(mg/g)	63.21±4.38	59.64±4.08	51.48±4.3
Chol.(mg/g)	8.33±0.63	10.47±1.21	6.54±1.17

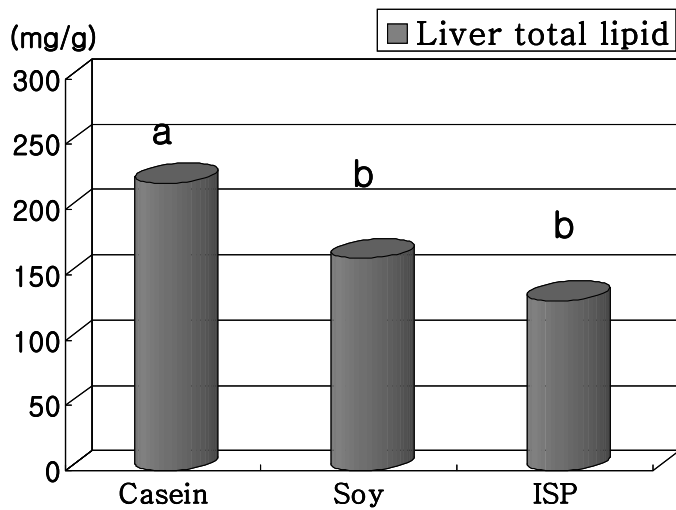


Figure 3-41. Liver total lipid

(6) 혈액 철 지표

카제인과 대두가 혈액 철 상태에 미치는 영향이 있는가를 살펴보기 위해 혈액 철 지표들을 분석하였다. 그 결과는 Table 3-31, Figure 3-42에 나타나 있다. 세 군 모두 정상적인 철 상태를 유지하고 있었으나, ISP군에서 혈액 헤마토크리트 수치가 다른 군들보다 높게 나타났다.

Table 3-31. Plasma hematocrit(Hct), hemoglobin(Hb), iron, Total Iron Binding Capacity(TIBC) concentrations

	Casein	대두	ISP
Hct(%)	54.96±1.12 ^a	54.93±1.29 ^a	59.01±1.26 ^b
Hb(g/dl)	15.26±0.30	14.91±0.34	15.90±0.34
Iron(mg/dl)	104.6±10.0	111.7±20.4	109.63±6.54
TIBC(mg/dl)	610.4±29.1	594.4±18.8	592.25±26.72

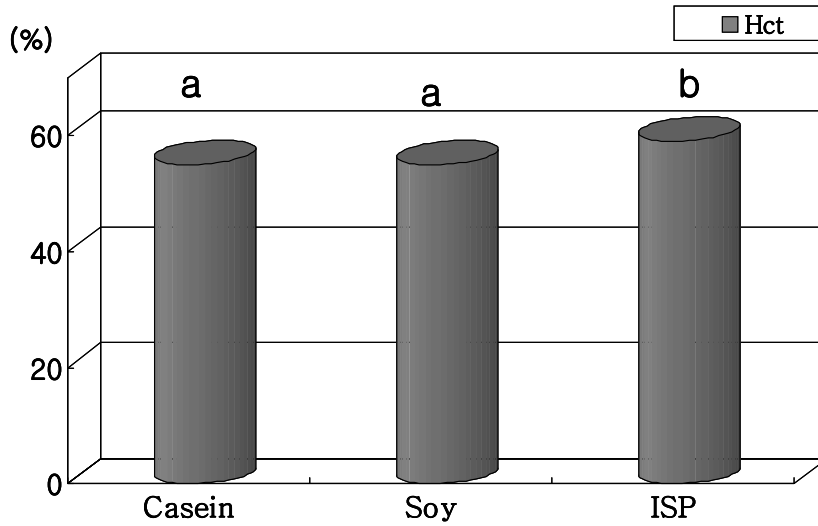


Figure 3-42 Hct

(7) 비장세포 증식능력과 IgM 및 IgG 농도

위의 비장면역세포 증식능력과 IgM 및 IgG농도는 Table 3-32에 나타내었는데, 실험군들 사이에 유의적인 차이가 발견되지 않았다.

Table 3-32. Mitogen Response and humoral immunity

	Casein	대두	ISP
ConA	2.75±0.84	1.33±0.19	2.82±1.27
PHA	2.36±0.85	1.42±0.26	1.70±0.56
LPS	2.81±1.74	1.45±0.31	1.80±0.95
IgG(mg/dl)	5.60±2.31	5.30±1.29	4.71±0.65
IgM(mg/dl)	6.30±1.35	5.04±0.52	6.11±0.55

나) 여러 가지 국내산 콩이 동물의 생리활성에 미치는 영향

(1) 실험동물의 식이섭취량, 체중 및 장기 무게

실험동물의 식이섭취량과 체중 변화 및 식이 효율은 Table 3-33에, 각종 장기 무게는 Table 3-34에 나타나 있다. 식이 섭취량과 최종 체중 및 식이 효율은 각 군간에 차이가 없었다. 각종 장기의 무게도 실험군에 따른 유의적인 차이는 없었다.

Table 3-33. Initial body weight, final body weight, body weight gain and diet intake, food efficiency ratio(FER), protein efficiency ratio(PER)

	Casein	대두	흑태	쥐눈이	서리태
Diet intake(g/wk)	160.35±4.12	161.53±4.78	165.62±2.90	166.88±3.50	168.57±5.59
Initial BW(g)	199.4±3.4	198.8±4.4	199.1±3.4	199.4±3.7	199.4±3.9
Final BW(g)	374.6±11.5	367.6±10.1	386.8±9.7	383.4±5.7	369.4±15.0
BW gain(g)	175.3±9.0	168.9±8.6	187.6±9.3	184.0±6.1	170.0±12.4
FER	0.27±0.01	0.26±0.01	0.28±0.01	0.28±0.01	0.25±0.01
PER	1.36±0.06	1.30±0.05	1.41±0.06	1.38±0.04	1.25±0.06

Table 3-34. Liver, Kidney, spleen, testis and epididymal fat pad (EFP) weight(g)

	Casein	대두	흑태	쥐눈이	서리태
Liver(g)	20.53±0.93	20.54±0.95	20.50±0.70	19.73±1.14	18.97±1.50
Kidney(g)	3.32±0.05	3.23±0.11	3.15±0.11	3.26±0.08	3.07±0.16
Spleen(g)	0.78±0.04	0.77±0.04	0.73±0.02	0.70±0.02	0.84±0.12
Testis(g)	2.94±0.09	2.97±0.06	2.90±0.06	2.82±0.05	2.89±0.14
EFP(g)	5.28±0.42	5.62±0.62	5.77±0.51	5.22±0.40	5.48±0.86

(2) 혈액 단백질과 GOT, GPT 활성도

혈액 단백질과 GOT, GPT 활성도는 Table 3-35, Figure 3-43, 3-44에 나타나 있다. 혈액의 단백질 농도는 각 군 간에 차이가 없었다. 간 손상 정도의 지표로 많이 사용되는 GOT, GPT 활성도에서 GOT 는 콩보충군들이 casein군보다 전체적으로 낮았고, 쥐눈이군에서 가장 낮게 나타나서 casein군과 유의적인 차이를 보였다. GPT 활성도도 쥐눈이군이 가장 낮았으나, 각 군 간에 유의적인 차이는 없었다.

Table 3-35 Plasma protein, Glutamic-Oxaloacetic Transminass (GOT) and Glutamic-Pyruvic Transaminase (GPT) activities

	Casein	대두	흑태	쥐눈이	서리태
Protein (g/dL)	6.71±0.09	6.70±0.06	6.46±0.06	6.67±0.17	6.74±0.10
GOT(U/L)	216.38±23.73 ^b	165.43±14.34 ^{ab}	170.50±9.51 ^{ab}	135.14±11.27 ^a	176.57±39.93 ^{ab}
GPT(U/L)	73.75±43.29	70.71±9.91	72.63±8.03	42.29±3.73	59.43±19.56

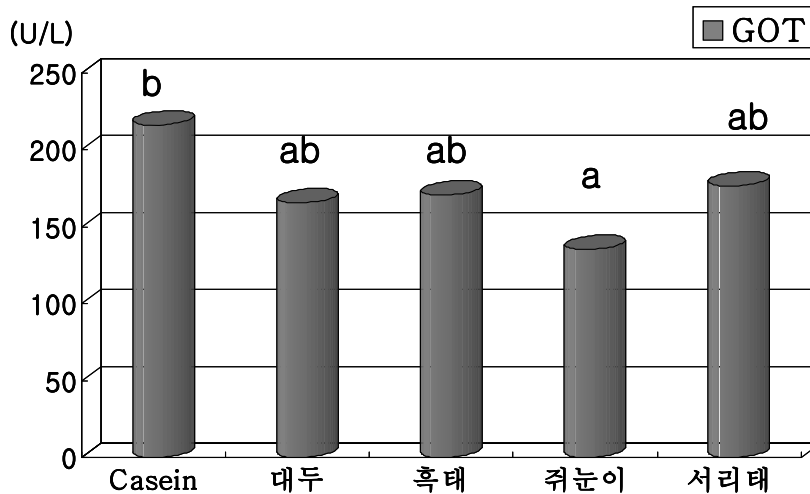


Figure 3-43 GOT activity

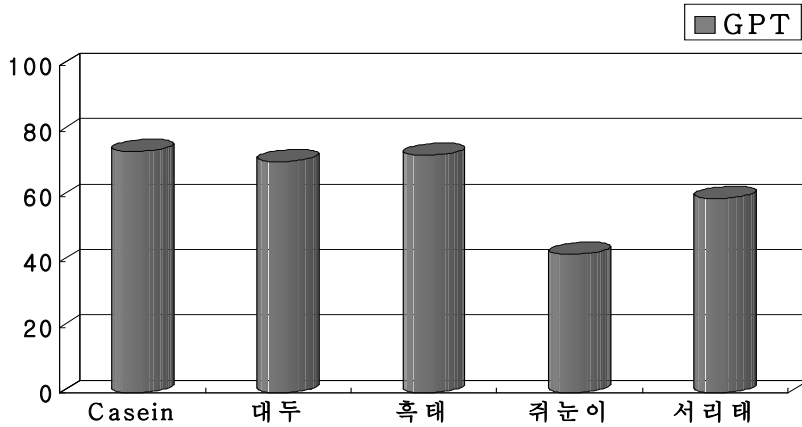


Figure 3-44 GPT activity

(3) 혈액 과산화지질, lactate 및 LDH 활성도

혈액 과산화지질, lactate 및 LDH 활성도는 Table 3-36에 나타나 있는데, 카제인 군과 콩 종류에 따라 과산화지질과 젖산 농도에 유의적인 차이는 나타나지 않았다. LDH 활성도의 경우 유의적인 차이는 없으나, 흑태, 쥐눈이, 대두군의 경우 카제인군 보다 활성도가 낮아서 간 손상 정도가 낮은 것과 관련이 있는 것으로 사료된다.

Table 3-36 Malondialdehyde(MDA), lactate, lactic dehydrogenase concentration of the plasma

	Casein	대두	흑태	쥐눈이	서리태
MDA(mmol/L)	1.44±0.29	1.14±0.26	1.73±0.16	1.25±0.21	1.06±0.12
Lactate(mmol/L)	7.20±0.80	6.90±0.86	6.14±0.99	6.78±0.78	6.86±0.81
LDH(U/L)	567.6±78.1	437.6±65.2	368.3±23.0	409.4±48.7	594.3±104.1

(4) 혈액 중성지방, 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 농도

혈액 중성지방, 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 농도는 Table 3-37 나타나 있다. 혈액 중성지방의 경우 카제인군이 가장 높고, 흑태, 대두, 서리태, 쥐눈이의 순이었으나 유의적인 차이는 없었다. 혈액 총콜레스테롤 및 HDL 콜레스테롤의 경우에는 각 군들 간에 유의적인 차이가 없었다.

Table 3-37 Plasma triglyceride(TG), total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol(HDL) concentration

mg/dL	Casein	대두	흑태	쥐눈이	서리태
TG	44.50±4.04	38.00±2.31	41.13±3.59	34.71±2.63	34.86±2.23
Total Chol.	44.75±3.63	46.71±3.83	44.13±2.35	41.00±3.15	51.14±4.14
HDL-Chol.	11.75±1.08	11.14±0.59	11.50±0.38	10.29±0.75	11.29±0.97

(5) 간의 지질과 콜레스테롤 농도

간의 지질과 콜레스테롤 농도는 Table 3-38, Figure 3-45에 나타내었다. 간의 총지질 농도는 콩종류에 따라 결과가 달라서, 대두와 서리태의 경우 casein군보다 낮았으나, 흑태와 쥐눈이의 경우에는 casein과 차이가 없었다. 간 중성지질의 경우에도 총지질과 마찬가지로 대두와 서리태가 casein군보다 농도가 낮았다. 한편, 간 콜레스테롤의 경우 실험군에 따라 차이가 없었다..

Table 3-38. Liver total lipid, triglyceride (TG), cholesterol

	Casein	대두	흑태	쥐눈이	서리태
Total lipid(mg/g)	220.0±16.3 ^b	162.5±14.2 ^a	221.3±11.7 ^b	210.0±9.3 ^b	141.3±11.3 ^a
TG(mg/g)	63.21±4.38 ^b	59.64±4.08 ^b	83.52±3.84 ^c	78.80±2.50 ^c	43.90±4.08 ^a
Chol.(mg/g)	8.33±0.63	10.47±1.21	7.73±0.69	9.75±1.86	9.81±1.32

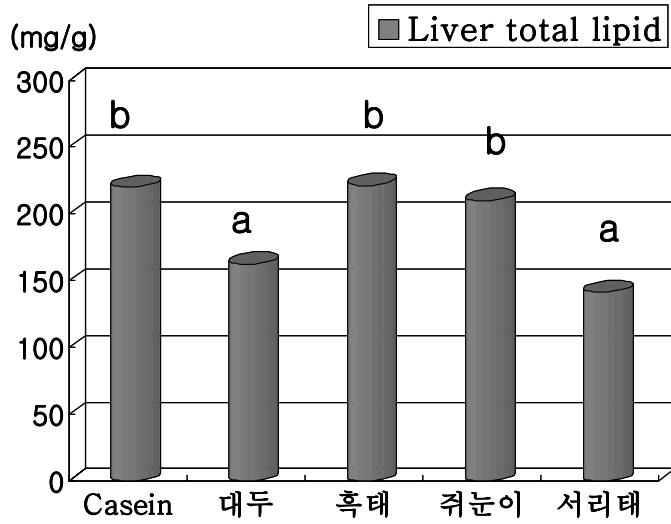


Figure 3-45 Liver total lipid

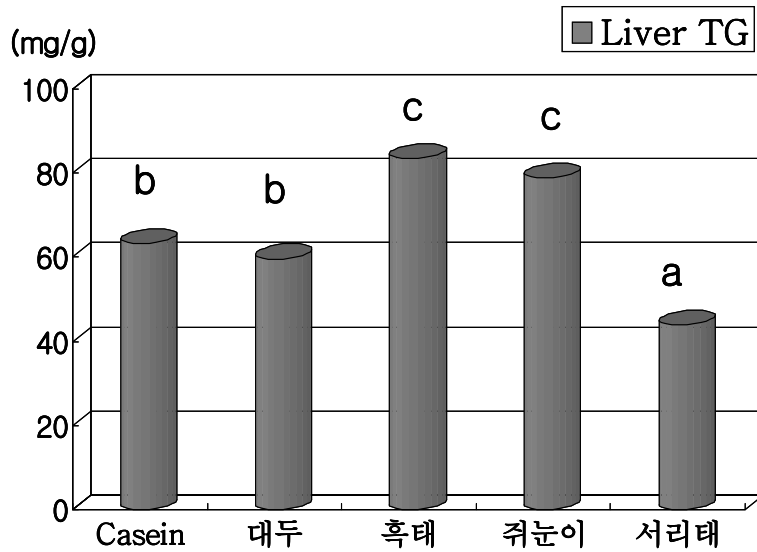


Figure 3-46 Liver TG

(6) 혈액 철 지표

혈액 철 지표는 Table 3-39, Figure 3-47, 3-48에 나타나 있다. 헤마토크리트와 헤모글로빈은 각 군 간에 차이가 나지 않았으며, 정상범위에 있었다. 혈청 철 농도의 경우 카제인군과 차이가 나는 실험군은 없었고, 쥐눈이, 서리태, 대두, 흑태의 순으로 높았다. 총 철 결합력의 경우 서리태의 경우에만 카제인군보다 높게 나타났다.

Table 3-39 Plasma hematocrit(Hct), hemoglobin(Hb), iron, Total Iron Binding Capacity(TIBC) concentrations

	Casein	대두	흑태	쥐눈이	서리태
Hct(%)	54.96±1.12	54.93±1.29	54.15±1.23	55.18±1.44	53.45±1.63
Hb(g/dl)	15.26±0.30	14.91±0.34	14.78±0.23	14.92±0.30	14.30±0.41
Iron(mg/dl)	104.6±10.0 ^{ab}	111.7±20.4 ^{ab}	78.3±7.4 ^a	153.9±30.7 ^b	124.5±11.4 ^{ab}
TIBC(mg/dl)	610.4±29.1 ^a	594.4±18.8 ^a	559.4±11.8 ^a	571.9±14.9 ^a	690.9±17.8 ^b

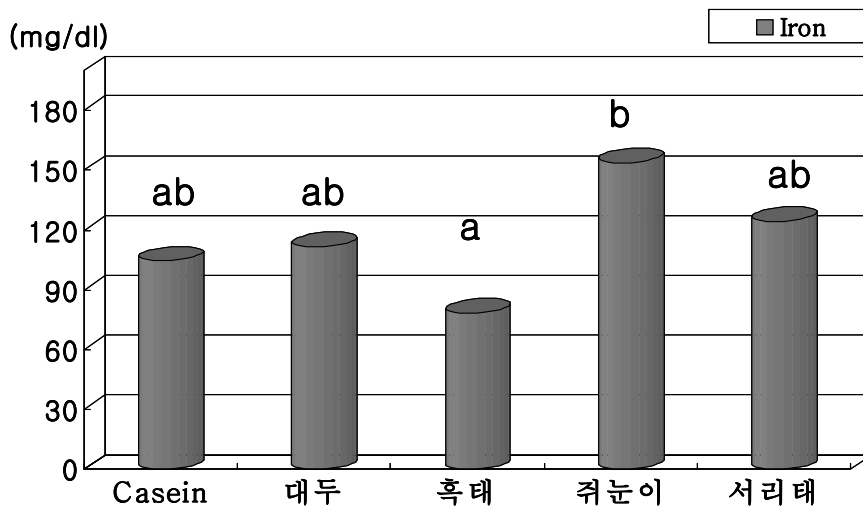


Figure 3-47 Iron

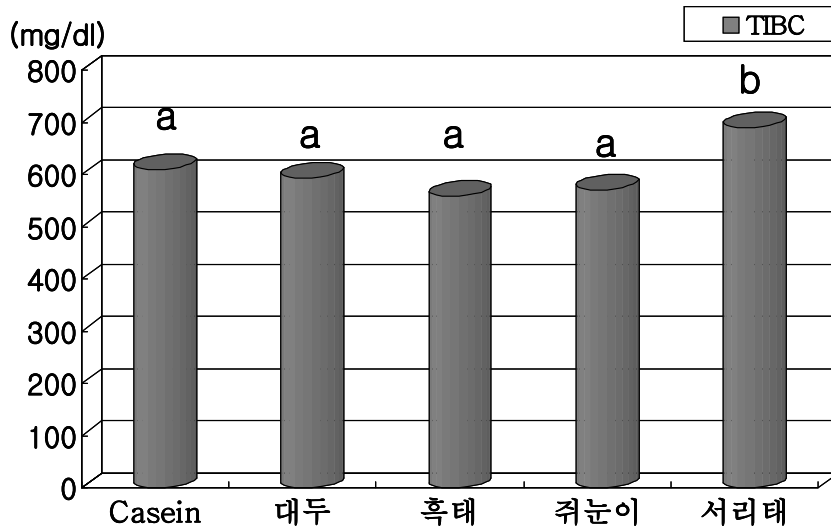


Figure 3-48 TIBC

(7) 비장세포 증식능력과 IgG 농도

쥐의 비장면역세포 증식능력과 IgG 농도는 Table 3-40에 나타내었다. 비장세포 증식능력과 IgG 및 IgM농도는 실험군에 따라 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

Table 3-40 Mitogen Response and IgG concentration

	Casein	대두	흑태	쥐눈이	서리태
ConA	2.75±0.84	1.33±0.19	1.31±0.22	2.10±1.03	1.84±1.24
PHA	2.36±0.85	1.42±0.26	1.61±0.29	1.78±0.39	1.50±0.35
LPS	2.81±1.74	1.45±0.31	1.56±0.45	2.17±1.08	1.28±0.23
IgG	5.60±2.31	5.30±1.29	3.98±0.45	4.89±0.85	5.08±1.0
IgM	6.30±1.35	5.04±0.52	5.73±0.35	7.76±2.03	9.84±1.86

다) 연구 결과 요약

1차년도 대두의 생체내 생리활성 실험에서는 여러 종류의 대두가 흰쥐의 체내 지질과 지질과산화에 미치는 영향을 실험하기 위하여 단백질 급원으로 casein, 분리대두단백(ISP) 또는 casein에 노란콩, 흑태, 쥐눈이콩, 서리태를 20% 함유한 식이를 4주간 공급하고 생리활성의 변화를 살펴보았으며 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

- ① 분리대두단백(ISP군)과 대두 함유 식이는 casein군에 비해 혈액 중성지질 저하효과가 있었으며, 혈액 지질의 감소 정도는 분리대두단백, 쥐눈이, 서리태군에서 더 뚜렷하게 나타났다.
- ② 분리대두단백군(ISP군)은 casein군보다 간의 총지질과 중성지질 저하 효과가 있었고 간 콜레스테롤은 casein군보다 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다. 콩함유군들의 경우 콩 종류에 따라 지질 저하 정도에 차이가 있어서 노란콩과 서리태의 경우 간 총지질 함량이 낮았으나, 흑태와 쥐눈이콩의 경우에는 감소 효과가 나타나지 않았다. 콩 함유군들에서 간 콜레스테롤 감소 효과는 나타나지 않았다.
- ③ 혈액 과산화지질은 각 군들간에 유의차는 나타나지 않았으나, 노란콩, 쥐눈이, 서리태에서 낮은 경향이였다. 간 손상 정도의 지표로 많이 사용되는 GOT와 GPT 활성도의 경우 ISP군이 casein군보다 활성도가 낮았다. GOT 활성도는 모든 콩함유군에서 casein군보다 낮았고, GPT의 경우에는 쥐눈이콩과 서리태군에서 낮은 활성을 보이는 경향이였다.
- ④ 콩종류에 따른 면역력은 카제인군과 유의적인 차이가 없었으며, 쥐눈이콩이 다른 콩들보다 비장 면역세포의 증식능이 높은 경향이였으나, 유의적인 차이는 없었다. 결론적으로 분리대두단백식이는 혈액과 간의 지질 및 콜레스테롤의 저하 효과와 GOT, GPT를 낮추는 효과가 뚜렷하였고, 20% 콩 함유군의 경우에는 쥐눈이, 노란콩, 서리태가 흑태보다 체내 지질 감소와 지질 과산화 감소 효과가 높았다.

나. 대두단백 가수분해물의 지질저하작용과 항산화력 평가

1) 연구 개발 내용

대두단백 가수분해물의 지질 저하작용과 항산화력을 평가하기 위하여 단백질 공급원으로 casein, 분리대두단백(isolated soy protein), 서리태단백가수분해물, 수용성 대두단백가수분해물, 불용성대두단백가수분해물을 4주간 공급한 후에 실험동물의 식이 효율, 체중 증가, 지질소화흡수율, 지질 저하작용과 항산화에 미치는 영향을 판정하였다. 서리태가수분해물은 협동기관(2)에서 받아 실험을 진행하였다.

2) 연구의 방법

가) 실험동물 및 실험식이의 조성

실험동물은 생후 5주된 Sprague-Dawley 종 수컷 성장기 흰쥐를 사용하였다. 대조군인 Casein군은 AIN-93 diet(20% Casein diet)에 콜레스테롤을 1.5% 함유한 식이로 하였고, 실험군은 단백질 조성 중 casein 10%를 분리대두단백(isolated soy protein, Fujipro 850, Jilin Fuji protein co.)또는 대두가수분해물로 대체하였다. 대두가수분해물로는 서리태 대두단백가수분해물(SH군), 용해성 대두단백가수분해물(soluble soy protein hydrolysate, SS), 불용성 대두단백가수분해물(insoluble soy protein hydrolysate, IS)을 이용하였다. 실험동물은 1주 동안의 적응 기간을 거친 후 체중에 따라 난괴법에 의해 군당 8마리씩 나누었고, 한 마리씩 stainless steel cage에 격리하여 사육하였으며 총 사육기간은 4주로 하였다. 실험 기간동안 물과 식이는 제한 없이 먹을 수 있도록 하였다.

Table 3-41 Composition of experimental diet

Ingredients(g/kg)	(g/kg diet)				
	Casein군	ISP군	SH군	SS군	IS군
Corn Starch	434.5	434.5	434.5	434.5	434.5
casein	200	100	100	100	100
ISP		100			
seoritae			100		
SS				100	
IS					100
Sucrose	100	100	100	100	100
Lard	100	100	100	100	100
Soybean oil	50	50	50	50	50
Cellulose	50	50	50	50	50
Mineral mixture	35	35	35	35	35
Vitamin mixture	10	10	10	10	10
L-Cystine	3	3	3	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
tert-Buthylhydroquinone(mg)	14	14	14	14	14
cholesterol	15	15	15	15	15

ISP(isolated soy protein), SH군(seoritae protein hydrolysate군). SS군(soluble soy protein hydrolysate군), IS군(insoluble soy protein hydrolysate군)

1) Mineral mixture : AIN-93 mineral mixture (g/kg Mix)

Calcium phosphate anhydrous 357.00; Potassium phosphate monobasic 196.00; Potassium citrate, tripotassium 70.78; Sodium chloride 74.00; Magnesium oxide 24.00; Zinc carbonate 1.65; Sodium meta-silicate-9H₂O 1.45; Manganous carbonate 0.63; Cupric carbonate 0.30; Chromium potassium sulfate-12H₂O 0.275; Boric acid 81.5mg; Sodium fluoride 63.5mg; Nickel carbonate 31.8mg; Lithium chloride 17.4mg; Sodium selenate anhydrous 10.25mg; Potassium iodate 10.0mg; Ammonium paramolybdate-4H₂O 7.95mg; Ammonium vanadate 6.6mg; Powdered sucrose 215.02

2) Vitamin mixture : AIN-93G vitamin mixture (g/kg Mix)

Thiamin-HCl 0.6; Riboflavin 0.6; Pyridoxine-HCl 0.7; Nicotinic acid 3.0; Calcium pantothenate 1.6; Folic acid 0.2; Biotin 0.02; Cyanocobalamin (Vitamin B-12) 0.025; Retinyl palmitate (Vitamin A) 0.8; dl- α -Tocopheryl acetate 15g; Cholecalciferol (Vitamin D-3)0.25; phyloquinone (Vitamin K-1) 0.075; Powdered sucrose 974.655g

나) 체중증가율과 식이 효율 측정

실험동물의 체중은 1주일에 1회씩 측정하였으며, 식이 섭취량은 1주일에 3회씩 측정하였다. 실험동물의 식이 섭취량 (또는 단백질 섭취량)과 체중을 이용하여 실험 기간의 체중 증가량을 같은 기간에 섭취한 식이 섭취량으로 나누어 식이 효율(Feed Efficiency Ratio, FER)을 산출하였다.

다) 분변의 수집과 소화흡수율 측정

실험동물은 1주와 4주차에 각각 3일씩 분변을 수집하여서 무게를 재고, 변으로 배설되는 단백질과 지질의 양을 측정하였다. 실험동물의 지질소화흡수율은 (지질섭취량-배설량)/지질섭취량 \times 100의 식으로 나타내었다. 지질섭취량은 변을 받은 기간의 식이섭취량에 지질공급량인 15%를 곱하여 계산하였고, 지질배설량은 변 1g당 함유된 지질량에 변의 무게를 곱하여서 구하였다. 실험동물의 단백질소화흡수율은 (단백질섭취량-배설량)/단백질섭취량 \times 100의 식으로 나타내었다. 단백질섭취량은 변을 받은 기간의 식이섭취량에 단백질공급량인 20%를 곱하여 계산하였고, 단백질배설량은 변 1g당 함유된 단백질량에 변의 무게를 곱하여서 구하였다.

콜레스테롤의 소화흡수율도 지질소화율을 구한 식과 같은 방식으로 계산하였다. 식이에 함유된 콜레스테롤의 양이 1.5%이므로, 콜레스테롤 섭취량은 변을 받은 기간의 식이섭취량에 0.015를 곱하여 계산하였다.

라) 실험동물의 혈액 및 장기의 채취

동물 실험의 경우, 사육기간이 끝난 실험동물을 희생시키기 전 12시간을 굶긴 후, ethyl ether로 마취, 개복하여 심장에서 주사기를 이용하여 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액은 응고되는 것을 막기 위해 EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetate)가 들어있는 원심분리관에 담아 2,500rpm에서 30분간 원심분리하여 혈장과 적혈구를 분리하고 혈장은 생화학적 분석을 위해 -80°C 에서 냉동보관 하였다. 혈액을 채취한 후에 즉시 간, 비장, 신장, 고환, 부고환지방(epididymal fat pad, EFP)을 분리하여 무게를 측정하였다.

마) 혈액, 간, 변의 지질대사 관련 인자 분석

혈장과 간 및 변의 총 cholesterol농도와 혈장 HDL-cholesterol 농도는 cholesterol 산화효소를 포함하는 kit(BMI Korea)을 이용하여 spectrophotometer (HP 8452, U.S.A) 각각 505nm와 500nm에서 비색정량 하였다. LDL-cholesterol은 총콜레스테롤-(HDL-cholesterol+중성지방/5)의 공식을 이용하여 계산하였고, 동맥경화지수(Atherogenic index, AI)는 (총콜레스테롤-HDL-cholesterol)/HDL-cholesterol의 공식을 이용하여 계산하였다. 혈장 중성 지방 농도는 lipoprotein lipase를 포함하는 효소법 kit(BMI Korea)을 이용하여 측정하였다. 간과 변의 총 지방 농도는 Biligh & Dyer법(Bligh, 1959)을 이용하여 측정하였고, 간과 변의 중성 지방 농도는 lipoprotein lipase를 포함하는 효소법 kit(BMI Korea)을 이용하여

550nm에서 비색정량 하였다.

바) 혈액 GOT, GPT의 활성도분석

혈장 GOT 및 GPT 활성도는 Reitman-Frankel법을 이용한 kit(아산제약)로 측정하였으며, 혈색소 (Hb)의 농도는 혈액의 헤모글로빈을 cyanomethemoglobin으로 전환해서 540nm에서 비색법으로 분석하였다.

사) 혈장과 간의 지질과산화물 분석

혈장의 과산화물은 Yagi법을 이용하여 TBARS(thiobarbituric acid reactive substance)의 양을 분석하였다. 혈장 100 μ l에 1/12N의 황산 4ml과 10% phosphotungstic acid 0.5ml을 첨가하고, 5분간 방치한 후 3,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 침전물에 증류수 1ml을 가하고 잘 혼합하고, 두경을 단단히 막고 95 $^{\circ}$ C water bath에서 1시간 동안 3,000rpm에서 15분간 원심 분리하여 그 상층액 (butanol층)을 spectrophotometer (HP8452) 532nm에서 비색정량 하였다.

간의 TBARS는 Buckingham법(1985)을 변형하여 측정하였다. 간 0.5g을 phosphate buffer 4.5ml을 넣어 homogenize 시킨 후에, 시험관에 이중 100 μ l를 취한 다음 8.1% SDS(Sodium dodecyl sulfate) 100 μ l, 20% acetic acid solution 750 μ l, 0.8% TBA (2-Thiobarbituric acid) solution 750 μ l, 증류수 350 μ l을 취하여 잘 섞은 다음 95 $^{\circ}$ C에서 60분간 끓인 후 식힌다. N-butanol : pyridine의 부피율이 15:1인 용액을 5ml 넣어 격렬히 섞은 후에 3,000rpm에서 10분간 원심 분리한 다음 그 상층액을 spectrophotometer (HP 8452) 532nm에서 비색정량 하였다.

아) 혈액의 총항산화능 분석

혈액의 총항산화능은 상품화된 Kit(Total Antioxidant Status Assay Kit Cat. No. 615700 Biosciences, Inc., Germany)을 이용하여 측정하였다. 측정원리는 활성산소의 일종인 ABTS(2,2-Azino-di-[3-ethylbenz-thiazoline sulphonate])가 H₂O₂와 반응하여 청록색인 ABTS 방사체로 변하는 것을 이용하여 항산화물질의 존재 시 이 반응이 억제되는 것을 이용하는 것으로 600nm에서 비색정량하였다.

자) 자료분석 및 통계 처리

조사된 자료는 SPSS프로그램을 이용해서 각 군의 평균과 표준 오차를 계산하였다.

실험군끼리의 비교는 one way ANOVA (analysis of variance)와 Duncan's multiple range test를 이용해서 분석하였으며, 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

3) 연구의 결과

가) 실험동물의 체중변화, 식이섭취량, 식이효율 및 장기 무게

실험동물의 체중변화 및 식이섭취량과 식이효율은 Table 3-42, 각종 장기 무게는 Table 3-43에 나타내었다. 실험동물의 체중증가량과 식이 섭취량, 식이효율은 각 군 간에 유의적인 차이가 없었다. 장기의 무게에서도 군 간의 차이가 없었다.

Table 3-42 Initial body weight, final body weight, body weight gain and diet intake, food efficiency ratio(FER)

	Casein	ISP	SH	SS	IS
Initial BW(g)	228.1±31.3	229.4±24.6	235.5±12.7	227.8±30.8	232.1±18.0
Final BW(g)	402.3±31.8	411.9±42.9	398.0±30.3	406.1±37.3	413.9±24.9
BW gain(g/day)	6.2±0.9	6.51±1.3	5.8±0.6	6.4±1.2	6.5±0.8
Diet intake (g/day)	21.6±1.9	21.7±2.4	21.5±2.1	22.8±2.1	21.7±1.4
FER	0.289±0.036	0.299±0.035	0.270±0.015	0.281±0.053	0.298±0.022

ISP(isolated soy protein), SH(seorietae protein hydrolysate), SS(soluble soy protein hydrolysate), IS_군(Insoluble soy protein hydrolysate)

Table 3-43 Liver, Kidney, spleen, epididymal fat pad (EFP) and testis weight

	Casein	ISP	SH	SS	IS
Liver(g)	19.68±1.94	19.72±2.98	21.49±1.58	21.02±2.70	21.95±4.28
Kidney(g)	3.06±0.57	3.11±0.32	2.86±0.51	3.04±0.53	2.99±0.31
Spleen(g)	0.81±0.20	0.78±0.09	0.71±0.15	0.76±0.12	0.74±0.13
EFP(g)	5.84±1.22	6.98±2.29	6.25±0.94	5.93±2.37	6.28±1.46
Testis(g)	3.01±0.64	2.94±0.75	3.03±0.34	2.89±0.38	3.15±0.24

나) 실험 1주와 4주차의 지질 소화흡수율

1, 4주차 지질의 소화흡수율은 각각 Table 3-44, 3-45, Figure 3-49, 3-50에 나타내었다. 실험 1주차에서 지질섭취량은 유의적인 차이를 보이지 않았고, 지질의 배설량은 ISP군이 유의적으로 높게 나타났으며 지질소화흡수율은 ISP군이 다른 군보다 유의적으로 낮게 나타났다.

실험 4주차에서 지질섭취량과 배설량은 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 지질소화흡수율은 불용성대두단백 가수분해물군(IS군)이 유의적으로 낮게 나타났다.

Table 3-44 Fecal lipid intake, content and apparent absorption rate at 1st week

	Casein	ISP	SH	SS	IS
lipid intake (g/day)	2.41±0.42	2.31±0.40	2.18±0.41	2.35±0.33	2.31±0.17
lipid content (g/day)	0.18±0.06 ^{ab}	0.22±0.03 ^b	0.15±0.04 ^a	0.18±0.05 ^{ab}	0.17±0.02 ^{ab}
lipid apparent absorption rate(%)	92.73±1.97 ^b	90.56±0.98 ^a	93.09±1.85 ^b	92.58±1.22 ^b	92.61±0.70 ^b

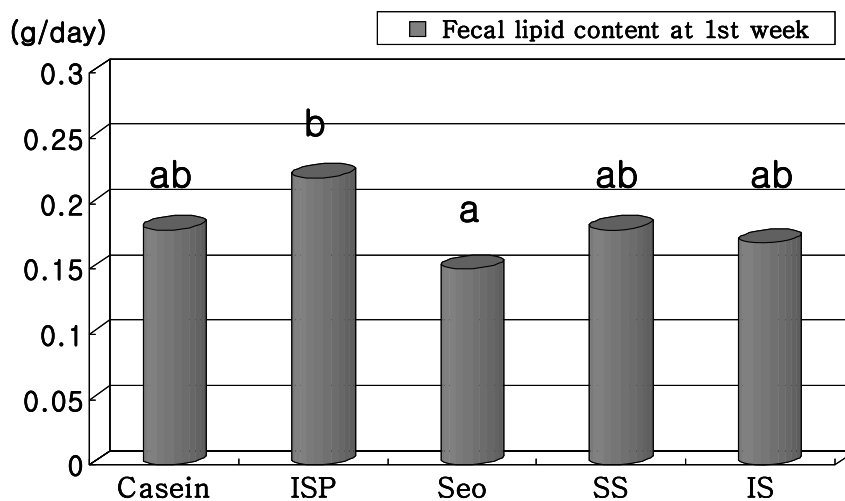


Figure 3-49 Fecal lipid content at 1st week

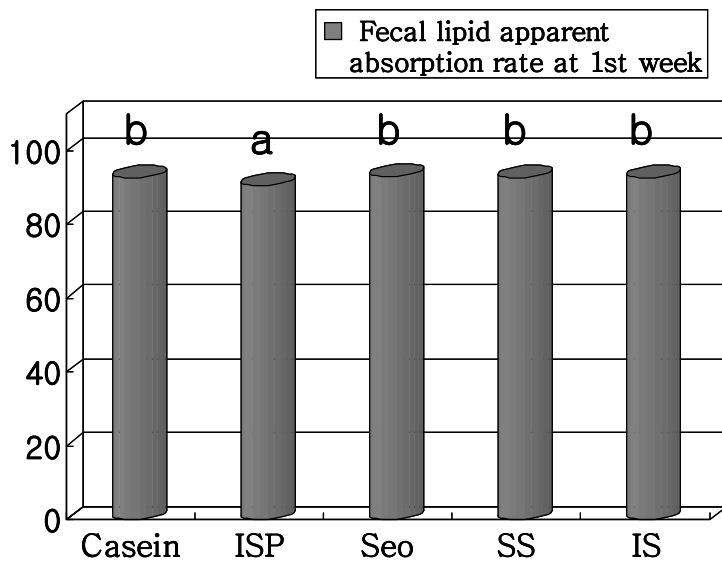


Figure 3-50 Fecal lipid apparent absorption rate at 1st week

Table 3-45 Fecal lipid intake, content, apparent absorption rate at 4th week

	Casein	ISP	SH	SS	IS
lipid intake (g/day)	3.61±0.45	3.66±0.44	3.65±0.24	3.51±0.36	3.31±0.21
lipid content (g/day)	0.18±0.04	0.18±0.03	0.17±0.03	0.19±0.03	0.16±0.02
lipid apparent absorption rate(%)	95.02±0.65 ^{ab}	94.99±0.58 ^{ab}	95.66±0.49 ^b	95.18±1.16 ^{ab}	94.38±0.74 ^a

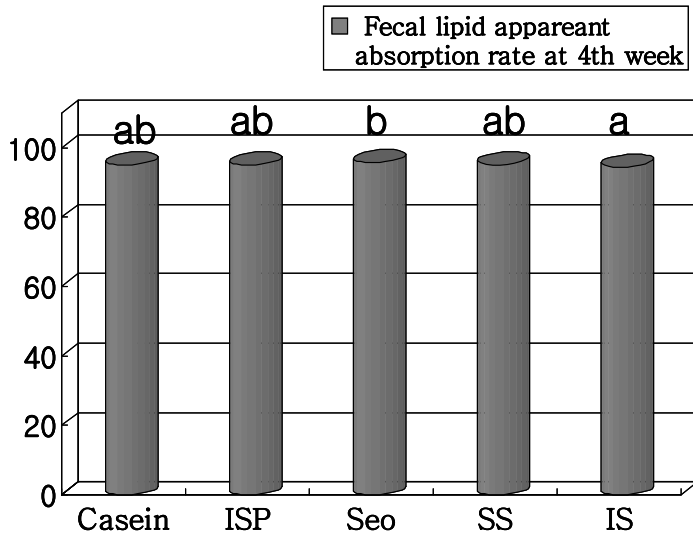


Figure 3-51 Fecal lipid apparent absorption rate at 4th week

다) 실험 1주와 4주차의 콜레스테롤 소화흡수율

1, 4주차 콜레스테롤의 소화흡수율은 각각 Table 3-46, 3-47에 나타내었다. 실험 1주차에서 콜레스테롤섭취량, 배설량, 소화율은 각 군간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 실험 4주차에서도 콜레스테롤섭취량, 배설량, 소화율은 각 군간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Table 3-46 Fecal cholesterol intake, content, apparent absorption rate at 1st week

	Casein	ISP	SH	SS	IS
chol. intake (mg/day)	241.25±42.16	231.32±39.98	217.76±41.20	234.68±33.37	231.45±16.70
chol. content (mg/day)	37.66±26.77	25.18±10.86	24.75±14.61	32.20±14.83	25.55±5.93
chol. apparent absorption rate(%)	84.81±8.56	88.90±4.97	88.67±6.48	86.40±5.45	88.92±2.73

Table 3-47 Fecal cholesterol intake, content, apparent absorption rate at 4th week

	Casein	ISP	SH	SS	IS
chol.intake (mg/day)	361.14±45.36	366.29±43.58	364.61±24.19	351.31±35.73	330.98±21.25
chol. content (mg/day)	28.99±7.85	25.28±8.15	28.96±11.2	29.66±5.71	30.37±13.2
chol. apparent absorption rate(%)	92.00±1.81	93.21±1.56	92.15±2.64	91.39±2.18	90.94±3.52

라) 단백질 소화흡수율

1, 4주차 단백질 소화흡수율은 Table 3-48, 3-49에 나타내었다. 실험1주차에서는 단백질섭취량은 각 군간에 유의적인 차이를 보이지 않았고, 단백질의 배설량은 casein군이 수용성과 불용성 대두단백 가수분해물군보다 적었다. 단백질소화흡수율은 casein군이 수용성 또는 불용성 대두단백 가수분해물군보다 높은 것으로 나타났다. 실험4주차에서는 각 군간에 단백질섭취량과 배설량, 소화흡수율이 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Table 3-48 Protein intake, fecal protein content, apparent absorption rate at 1st week

	Casein	ISP	SH	SS	IS
protein intake (mg/day)	4.21±0.63	4.40±0.38	4.50±0.57	4.58±0.15	4.48±0.22
fecal protein (mg/day)	0.056±0.11 ^b	0.083±0.009 ^{ab}	0.081±0.018 ^{ab}	0.098±0.009 ^a	0.091±0.02 ^a
apparent absorption (%)	98.64±0.46 ^b	98.09±0.27 ^{ab}	98.21±0.31 ^{ab}	97.86±0.21 ^a	97.97±0.35 ^a

Table 3-49 Protein intake, fecal protein content, apparent absorption rate at 4th week

	Casein	ISP	SH	SS	IS
protein intake (mg/day)	4.78±0.45	4.57±0.65	4.61±0.64	4.59±0.23	5.01±0.15
fecal protein (mg/day)	0.114±0.024	0.094±0.02	0.099±0.028	0.124±0.026	0.093±0.011
apparent absorption (%)	97.63±0.41	97.94±0.33	97.78±0.86	97.29±0.61	98.13±0.25

마) 혈액 단백질과 GOT 및 GPT 활성도

혈액 단백질과 GOT, GPT 활성도는 Table 3-50에 나타나있다. 혈액의 단백질 농도는 각 군 간의 차이가 없었다. 간 손상 정도의 지표로 많이 사용되는 GOT, GPT 활성도를 살펴보면, 군 간의 차이는 없으나 GOT는 서리태단백가수분해물군이, GPT는 분리대두단백군이 casein군보다 낮은 경향이였다.

Table 3-50 Plasma protein, Glutamic-Oxaloacetic Transaminase (GOT) and Glutamic - Pyruvic Transaminase (GPT) activities

	Casein	ISP	SH	SS	IS
Protein(g/dL)	7.56±0.59	7.87±0.80	7.93±0.93	7.52±1.04	7.64±0.46
GOT(Karmen/L)	58.38±22.42	54.88±4.31	48.13±5.48	59.79±22.35	59.50±12.64
GPT(Karmen/L)	58.56±23.75	50.00±5.08	56.38±19.77	52.92±6.9	57.88±19.73

바) 혈장과 간의 과산화지질

혈장과 간의 과산화지질농도는 Table 3-51와 Figure 3-52에 나타나있다. 혈장 과산화지질농도는 ISP군과 불용성가수분해물군이 다른 군들보다 유의적으로 낮게 나타났다. 간의 과산화지질농도는 군 간에 유의적인 차이가 없었다.

Table 3-51. Malondialdehyde(MDA) concentrations of the plasma and liver

	Casein	ISP	SH	SS	IS
Plasma MDA (nmol/ml)	231.82±35.01 ^b	206.34±8.43 ^a	237.06±11.82 ^b	217.58±15.09 ^{ab}	205.20±14.10 ^a
Liver MDA (nmol/g)	1667.16±162.04	1727.54±115.14	1690.68±141.00	1592.80±51.34	1621.40±136.40

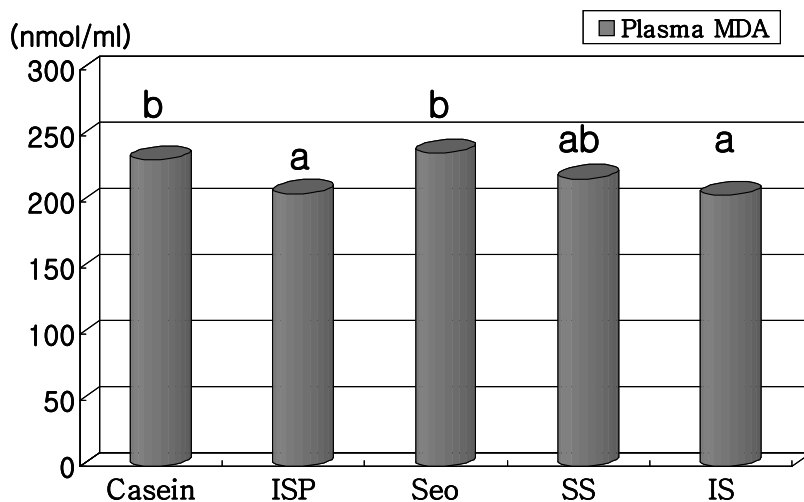


Figure 3-52 Plasma MDA concentration

아) 총 항산화능력

총 항산화능력은 Table 3-52과 Figure 3-53에 나타내었다. 총 항산화능력은 각 군에 유의적인 차이를 나타내지 않으나 서리태가수분해물군에서 약간 높은 경향이였다.

Table 3-52 Total antioxidant status assay

	Casein	ISP	SH	SS	IS
Total antioxidant status assay (mM)	1.94±0.17	1.96±0.10	2.18±0.29	2.03±0.22	1.95±0.22

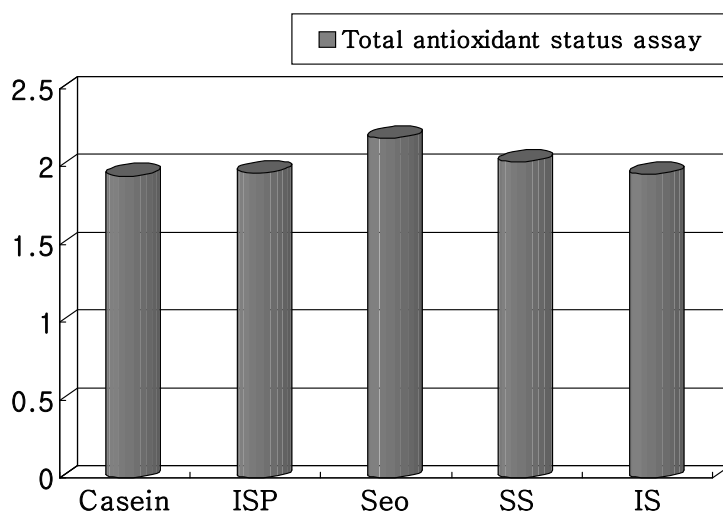


Figure 3-53 Total antioxidant status assay

자) 혈액 총콜레스테롤, 중성지방, HDL과 LDL 콜레스테롤 농도 및 동맥경화지수

혈액 총콜레스테롤, 중성지방, HDL과 LDL 콜레스테롤 농도 및 동맥경화지수는 Table 3-53과 Figure 3-54,55,56,57,58에 나타나 있다. 혈액 중성지방은 불용성 가수분해물군(IS)이 casein군보다 유의적으로 낮았고, 서리태가수분해물군과 ISP군도 낮은 경향을 보였다. 혈액 총콜레스테롤은 ISP군과 대두단백가수분해물들(SH, SS, IS)이 casein군보다 유의적 차이는 없었으나 낮은 경향이였다. HDL-콜레스테롤의

경우에는 대두단백가수분해물군들이 casein군보다 높은 경향인 반면, LDL-콜레스테롤의 경우에는 오히려 낮아지는 경향이였다.

동맥경화지수는 casein군에 비해 대두단백가수분해물들과 ISP군에서 낮은 경향을 보였다.

Table 3-53 Plasma total cholesterol, Triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL), low-density lipoprotein cholesterol (LDL) and atherogenic index(AI)

	Casein	ISP	SH	SS	IS
TG(mg/dl)	70.13±15.70 ^b	58.13±10.15 ^{ab}	49.50±6.90 ^{ab}	69.75±30.92 ^b	40.64±6.52 ^a
Total Chol.(mg/dl)	76.15±19.27	67.21±25.82	66.40±9.79	63.15±22.77	60.98±12.58
HDL (mg/dl)	8.36±2.01	9.78±2.42	9.23±2.28	9.86±2.36	8.69±2.49
LDL (mg/dl)	51.20±19.58	47.79±24.86	47.27±8.387	39.33±22.92	42.22±12.24
AI (동맥경화지수)	8.52±4.50	6.08±1.88	6.38±1.44	6.07±4.54	6.04±2.15

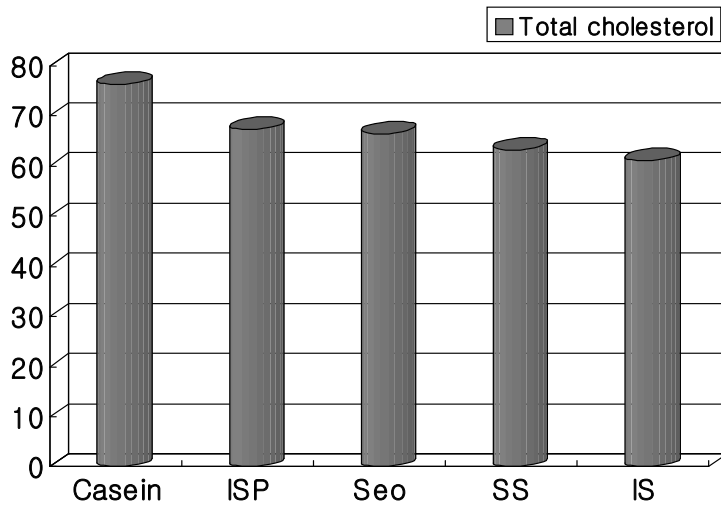


Figure 3-54 Plasma total cholesterol

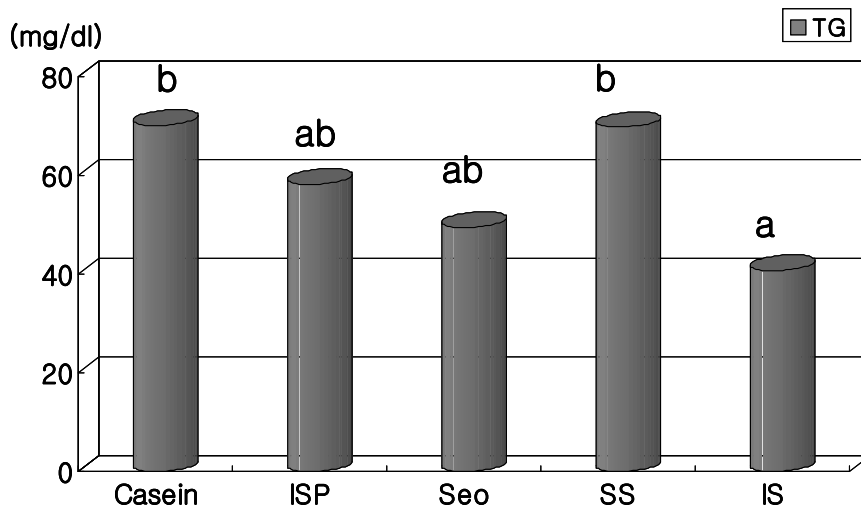


Figure 3-55 Plasma TG

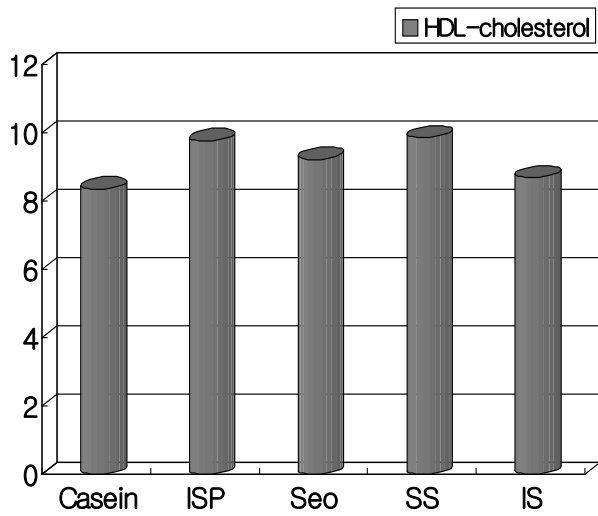


Figure 3-56 Plasma HDL-cholesterol

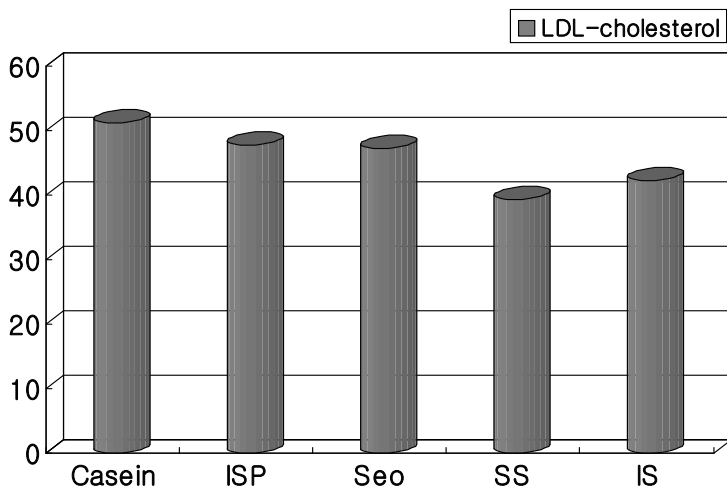


Fig 57. Plasma LDL-cholesterol

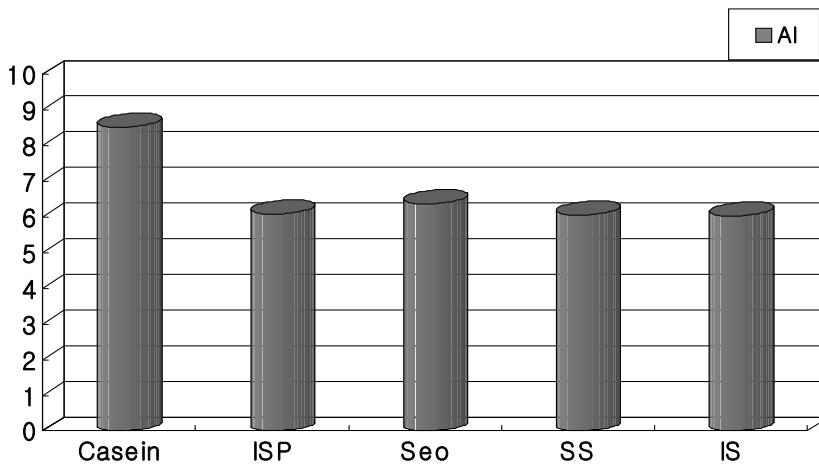


Figure 3-58 Atherogenic index

차) 간의 지질과 콜레스테롤 농도

간의 지질과 콜레스테롤 농도는 Table 3-54에 나타내었다. 간의 총지질 농도와 중성지방, 콜레스테롤의 농도는 각 군간에 유의적인 차이가 없었다.

Table 3-54 Liver total lipid, Triglyceride (TG), cholesterol

	Casein	ISP	SH	SS	IS
Liver total lipid (mg/g)	210.9±26.3	197.5±19.8	220.0±31.8	214.2±25.0	233.4±40.9
TG(mg/g)	38.35±4.83	34.25±6.01	36.31±7.08	35.00±5.46	35.69±4.80
Chol.(mg/g)	5.54±1.02	5.37±1.20	5.72±1.47	5.96±0.87	6.02±1.28

차) 변의 무게와 지질 및 콜레스테롤 농도

변의 무게와 지질 및 콜레스테롤 농도는 Table 3-55, 3-56, Figure 3-59, 60에 나타내었다. 우선 변 1주차의 총지질 농도는 분리대두단백군(ISP군)이 다른 군보다 유

의적으로 높게 나타났고, 변 내에 함유된 중성지방은 불용성가수분해물군(IS군)이 유의적으로 높았고 콜레스테롤농도는 용해성가수분해물군(SS군)이 유의적으로 높았다. 대변무게는 casein에 비해 ISP와 대두단백가수분해물들의 무게가 적었고, 총지방배설량은 ISP군이 높은 경향을 보였고 중성지방 배설량은 IS군이 유의적으로 높았다.

변 4주차의 총 지질 농도는 1주차와는 달리 유의적인 차이는 없었고, 중성지방과 콜레스테롤도 1주차와 같이 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 대변무게는 IS군이 높게 나타났으며, 총지방배설량, 중성지방, 콜레스테롤 배설량에서는 유의적인 차이는 없었으나 IS군이 높은 경향이였다.

Table 3-55 Fecal lipid concentration at 1st week

	Casein	ISP	SH	SS	IS
total lipid(mg/g)	107.9±13.82 ^a	134.25±11.33 ^b	116.45±14.40 ^a	112.83±9.15 ^a	110.80±10.43 ^a
TG(mg/g)	8.24±1.88 ^{ab}	8.44±1.91 ^{ab}	7.75±2.20 ^a	8.23±1.76 ^{ab}	10.72±2.67 ^b
chol.(mg/g)	11.88±3.28 ^{ab}	10.96±5.90 ^{ab}	8.11±3.31 ^a	13.89±3.77 ^b	10.34±2.66 ^{ab}

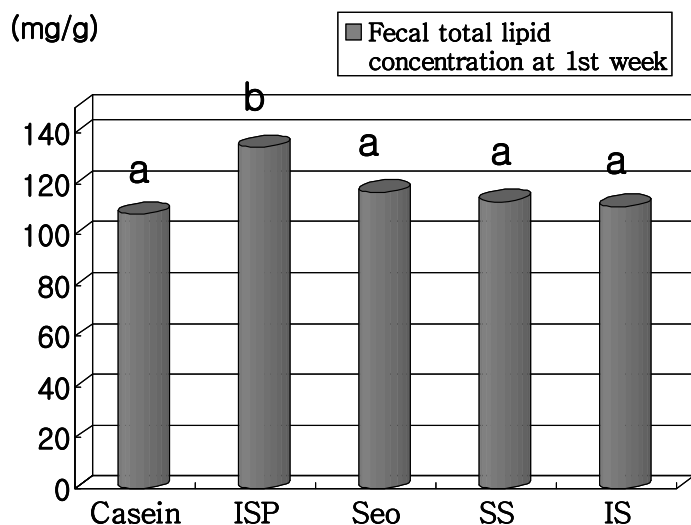


Figure 3-59 Fecal total lipid concentration at 1st week

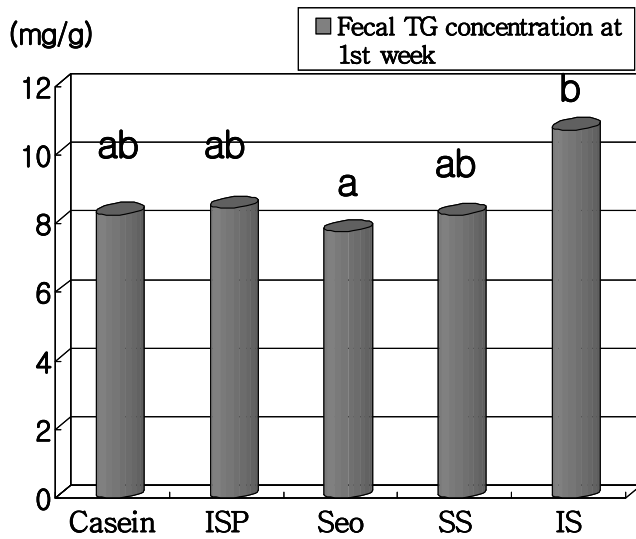


Figure 3-60 Fecal TG concentration at 1st week

Table 3-56 Fecal lipid concentration at 4th week

	Casein	ISP	SH	SS	IS
total lipid(mg/g)	108.7±8.55	122.9±13.5	116.8±5.28	109.7±19.1	109.2±9.06
TG(mg/g)	11.21±1.07	11.65±2.01	11.69±0.47	11.30±2.31	11.46±1.10
chol.(mg/g)	17.69±4.71	16.59±3.21	21.57±8.34	19.54±3.88	17.28±4.98

차) 혈액 철 지표

혈액의 철 지표는 Table 3-57에 나타내었다. 헤모글로빈농도는 각 군에 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

Table 3-57 Plasma hemoglobin concentration

	Casein	ISP	SH	SS	IS
Hemoglobin (g/dl)	20.46±4.55	18.93±2.95	21.13±1.12	20.06±2.61	19.67±3.31

카) 연구 결과 요약

대두 단백질 가수분해물이 실험동물의 생리활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 단백질 급원으로 casein, 분리대두단백 또는 대두단백가수분해물들[서리태단백분해물(SH), 수용성단백분해물(SS) 또는 불용성단백분해물(IS)]을 함유한 식이를 Sprague Dawley 흰쥐에게 4주간 먹인 후 대두 단백질 가수분해물의 소화흡수율과 지질 저하작용 및 항산화효과를 평가한 결과를 요약하면 다음과 같다.

- ① 분리대두단백군과 대두단백 가수분해물군들의 체중증가 및 식이효율은 casein군과 차이가 없었다.
- ② 변 1주차 실험에서 지질배설량은 ISP군이 casein군보다 유의적으로 많았고, 지질 소화흡수율은 ISP군이 casein군보다 유의적으로 낮았다. 변의 1주차 중성지방 지질농도와 배설량은 불용성단백가수분해물군(IS군)이 유의적으로 높았다.
변 4주차 실험에서는 ISP군의 지질배설량과 소화흡수율이 다른 군들과 유의적으로 차이가 나지는 않았지만 여전히 4주차에서도 지질배설량이 높고, 지질소화흡수율은 낮은 경향을 보였다. 불용성단백가수분해물군(IS군)은 1주차 실험에서는 지질배설량과 지질소화흡수율이 다른 군들과 차이가 없었으나, 4주차에서는 지질배설량이 다른 군보다 높아서 지질소화흡수율이 유의적으로 낮았다. IS군의 1주차와 4주차 변을 비교하여보면 총지방, 중성지방, 콜레스테롤 배설량이 1주에서 4주로 갈수록 많아졌다. 단백질소화흡수율은 변1주차 실험에서 casein군이 수용성 또는 불용성 대두단백가수분해물군보다 높았고, 변4주차 실험에서는 각 군간에 차이가 나지 않았다.
- ③ GOT와 GPT 활성도는 군 간에 유의적인 차이는 없었으나 GOT에서는 서리태가

수분해물군이 GPT에서는 ISP군이 casein군보다 낮은 경향을 보였다.

- ④ 총항산화능력은 각 군 간에 유의적인 차이는 없었으나 서리태단백분해물군(SH)이 약간 높았다. 혈액의 과산화 지질은 ISP군과 IS군이 다른 군들보다 유의적으로 낮게 나타났다.
- ⑤ 혈액의 지질농도에서 중성지방은 IS군이 casein군보다 유의적으로 낮았고, 서리태단백분해물군과 ISP군도 낮은 경향을 보였다. 혈액 총콜레스테롤은 유의적인 차이는 없었지만 IS군이 casein군보다 낮은 경향이었고, HDL-cholesterol은 대두단백가수분해물들과 ISP군이 높은 경향이였다. LDL-cholesterol 및 AI 또한 유의적인 차이는 보이지 않았으나 대두단백가수분해물들과 ISP군이 casein군보다 낮은 경향을 보였다. 간의 총 지질은 유의적인 차이를 보이지 않았으나 ISP군이 casein군보다 낮은 경향이였다.

결론적으로 대두단백가수분해물들은 혈액 중성지질을 낮추고, 혈액 총 콜레스테롤과 LDL-cholesterol을 낮추어서 동맥경화지표(atherogenic index)를 낮추는 효과가 있었으며, 그 효과는 특히 단백질가수분해물 중 불용성에서 더 탁월하게 나타났다. 서리태단백가수분해물은 총항산화능이 증가하는 경향을 보였고, 불용성단백가수분해물과 분리대두단백은 혈액의 과산화지질을 낮추어서 대두단백가수분해물들은 항산화작용에도 좋은 영향을 미친 것으로 사료된다.

제 3 절 저알러지 대두 단백질가수분해물 대량 생산 공정 확립

가. 면역반응 항원물질이 제거된 저알러지성 단백질 제조

1) 연구 개발 내용

면역 반응 항원 물질이 제거된 저알러지성 단백질을 제조하기 위하여 효소를 이용하여 저알러지성 대두 단백질가수분해물을 제조 하였으며, 이의 기능을 확인하고 저알러지 대두 단백질가수분해물의 대량 생산공정을 설계하였다.

2) 연구의 방법 및 결과

가) 대두로부터 분리 대두 단백질의 분리정제

분리대두단백질의 정제 분리과정은 단백질 및 펩타이드 식품개발에서 우선 진행되어야 필수 과정이다. 본 연구를 진행하기 위하여 실험실 상황에서 대두를 figure 3-61에 의거하여 분리 정제하였다. 분리대두 단백질의 단백질 함량은 95%이상의 순도를 가졌으며, 수율은 52%이상으로 분리 정제하여 매우 좋은 수율은 확인하였다. 본 결과를 바탕으로 2차년도 분리대두단백질 대량 생산 공정을 계획하고자 한다.

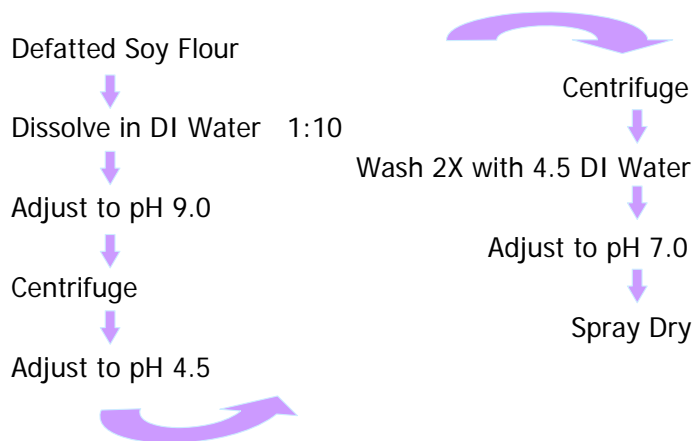
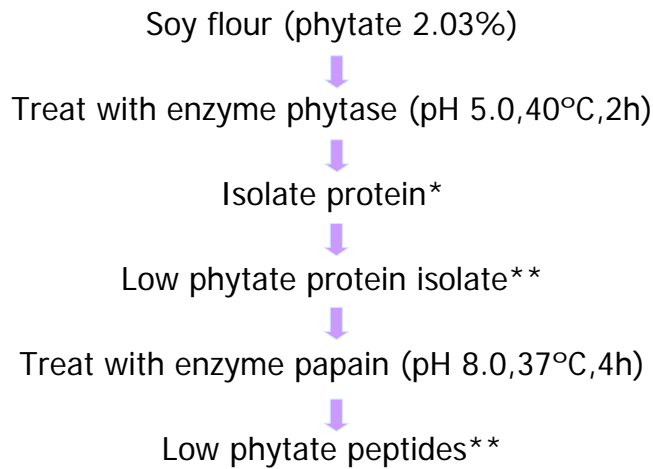


Figure 3-61 Procedure of isolate soy protein.

나) 분리대두 단백질을 Low phytate 분리대두 단백질과 펩타이드 생산

대두단백질 중 phytate 제거는 매우 중요한 과정이다. 일반적으로 phytate는 체내에서 미량의 미네랄 원소와 치환하여 필수 미네랄 원소 결핍을 유발하는 물질로서, 본 연구에서는 low phytate 분리 대두단백질을 생산하여, 분리대두단백질 및 peptide 내의 phytic acid 함량을 확인하였다. 현재 low phytate 단백질 및 peptide 제조와 관련한 많은 연구가 진행되고 있으나, 상업화 관련된 기술 개발은 아직 미미한 실정이다.



*Alkali solubilization at pH 9.0 followed by isoelectric precipitation at pH 4.5.

**Phytate content -0.06% (w/w)

Figure 3-62 Procedure of low-phytate isolate soy protein and peptide.

분리 대두 단백질의 영양학적 보강을 위하여 low phytate soy protein과 peptide 생산 뿐만 아니라 인체에서 결핍되기 쉬운 철분 성분이 보강된 iron-binding 대두단백질을 생산하여, 생산 효율 및 수율을 확인하였다. 단백질의 구조적 특성은 식품의 물성을 갖게 하는 여러 가지 인자 중 가장 중요한 것이다. 다양한 종류의 영양성분을 단백질의 side chain에 화학적 변형을 통해 제조된 단백질은 새로운 물리화학적 특성을 지닌 새로운 단백질로서 식품산업의 원료로 사용이 가능하다. 이를 위하여 단백질의 구조와 물성의 변화를 정확히 이해하고, 각각의 기능적 특성이 식품의 제형에 필수적으로 요구되어지기 때문에 개발하고자 하는 식품의 형태나 type에 따라 요구되어지는 기능적 특성을 다양한 방법으로 변형함으로써 새로운 종류의 식품을 개발할 수 있게 된다.

Table 3-58 화학적 변형을 통한 다양한 대두단백질의 제조 및 수율

Soy Protein Products	Phytic Acid (%w/W)	Native Iron (ppm)	Soy Protein Products	Iron Binding Capacity (ppm)	In-vitro Availability of iron (%)
SPI	2.33 ^a	140 ^a	SPI-Fe	4500 ^a	88 ^a
LPSPi	0.06 ^b	123 ^b	LPSPi-Fe	3800 ^b	86 ^a
HLPSPi	0.06 ^b	118 ^b	HLPSPi-Fe	4400 ^a	86 ^a

^{a,b} Values in the same column denote significant difference P<0.05

다) 분리 대두단백질로부터 저알러지 단백질을 생산하기 위하여 효소적 변형법 최적화
 대두 단백질의 면역반응 항원물질은 분자량 38 kDa에 소량 존재하며 항원성 특성을 강하게 보여 준다. 이 항원 물질을 제거하기 위한 실험실적 방법은 ultrafiltration 법을 이용할 수 있다. 본 연구에서는 상업적으로 사용가능한 방법을 개발하여 대두 단백질로부터 항원을 효소적 변형을 통한 항원체 제거법과 Ultrafiltration 법을 이용하여 제거하고자 한다. 이들 38kDa의 단백질은 일반 대두 단백질의 pH 4.5 등전점에 비해 훨씬 높은 pH 6.3이며, 이를 이용하여 항원특성이 없는 단백질을 분리 정제하며, 효소 처리를 통하여 완전히 항원체를 제거하였다. 단백질의 functional property가 좋지 않으면 이를 식품에 이용하거나, 체내에서의 생체이용률 (bioavailability)이 좋지 않아 식품으로서의 가치가 낮아진다. 그러므로 단백질의 구조적 변화와 이를 통한 functional property를 측정하여 그 응용범위를 확인하여야 한다. 또한 단백질의 구조적 변화가 식품내에서 다른 성분과의 반응으로 원래의 특성을 잃거나, 혹은 전혀 다른 특성을 나타낼 수 있어, 신중히 고려해야 할 중요한 정보이다. 이들 정보를 이용하여 저알러지성 및 면역 항원체가 없는 단백질의 식품 적용범위를 정할 수 있게 된다.

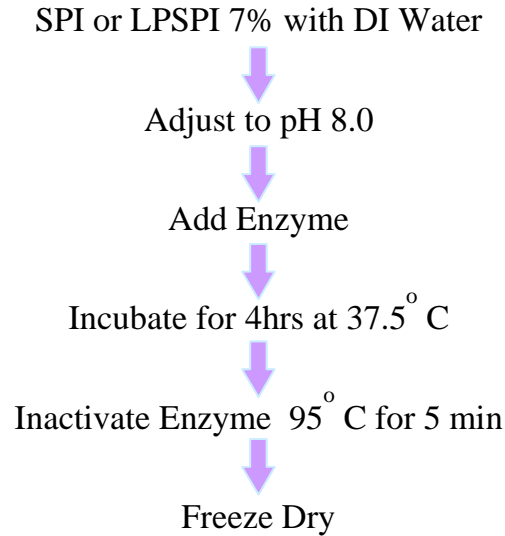


Figure 3- 63 Procudure of enzyme modified soy protein

본 연구 결과로 Papain을 이용한 효소적 변성법을 사용하여, foaming capacity와 emulsion capacity의 증가를 확인 하였다. 향후 다양한 효소를 이용하여 바람직한 물성과 기능성을 가진 새로운 형태의 modified protein을 개발하고자 한다. 단백질의 물성도 물리화학적 특성과 크기, 모양, 아미노산구성, net charge, 친수성/소수성 비율, 형태적 구조등의 구조적 특성과 밀접한 관계가 있으며, 이들 구조적 요인인 형태적 안정성, 소수성, 유연성, 단백질-단백질 상호반응에 의하여 표면 특성이 특징지어진다.

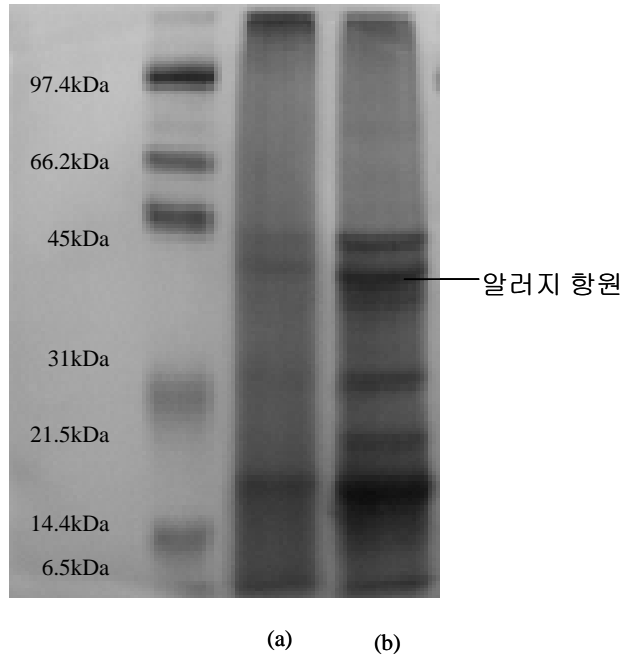


Figure 3-64 SDS-PAGE patterns of (a) enzyme hydrolyzed soy protein and (b) the control. Each of side lanes contained molecular weight protein standard (sigma).

일반적으로 식품산업에서 가장 중요한 물성은 solubility, hydrophobicity, foaming property, emulsion property 이다. 단백질로부터 면역반응을 자극시키는 항원체를 제거하는데 이용되는 다양한 종류의 효소적 변형을 통한 정제된 단백질은 새로운 물리화학적 특성을 지닌 새로운 단백질로서 식품산업의 원료로 사용이 가능하다. 이를 위하여 단백질의 구조와 물성의 변화를 정확히 이해하고, 각각의 기능적 특성이 식품의 제형에 필수적으로 요구되어지기 때문에 개발하고자 하는 식품의 형태나 type에 따라 요구되어지는 기능적 특성을 다양한 방법으로 변형함으로써 새로운 종류의 식품개발을 진행하고자 한다.

나. 저알러지 대두 단백질 가수분해물 대량 생산 공정 확립

1) 연구 개발 내용

콩은 우리나라를 비롯하여 중국, 일본, 유럽 각지와 미국 등에서 널리 재배되어 섭취되고 있으며, 식이 단백질의 주요 공급원일 뿐만 아니라 경제적으로도 매우 중요한 작물이다. 그러나 콩은 잠재적으로 알레르기를 유발 시킬 수 있는 면역반응 항원물질, 즉 분자량 38kDa에 소량 존재 한다. 이전에 보고된 자료에 의하면 대두의 주요 allergen은 Gly m Bd 60K, Gly m Bd 30K, Gly m Bd 28K에 각각 존재한다고 보고된 바 있다.⁽⁵⁾ 현재 콩은 영양적, 기능적 성분을 가진 훌륭한 식품 소재로 사용되어지고 있으며, 체지방 감소와 콜레스테롤을 낮춰주는 생리적 기능들이 보고됨으로서 그 소비량이 증가되었다. 그 결과, 아토피 피부염과 급성 두드러기 환자가 증가되었다. 따라서 본 연구에서는 대두 단백질의 주요 allergen을 제거하기위해 상업적으로 사용 가능한 방법인 효소적 변형을 이용하여 항원체를 제거하고, 이를 SDS-PAGE를 통해 확인 및 저알러지 대두 단백질 생산 공정을 최적화하여 pilot-plant scale화하고, 주요 항원이 제거된 저알러지 대두 단백질의 functional properties를 측정하여 적합한 기능성 전통 식품을 제조하고자한다.

2) 연구의 방법

가) 서리태로부터 분리 대두 단백질(soybean protein isolate: SPI)의 분리 및 정제

분리대두단백질의 정제 분리과정은 단백질 및 펩타이드 식품개발에서 우선 진행되어야 할 필수 과정이다. 본 연구를 진행하기 위하여 실험실 상황에서 대두를 Figure 3-65의 방법에 따라 분리 정제하였다. 대두에서 단백질 분리 및 정제 과정은 1차년도의 분리 대두 단백질 생산 과정을 바탕으로 대량 생산 공정에서의 적합성과 생산 수율 증대를 위한 방법을 고려하여 Figure 3-65에 도식화하였다. 분리 정제 결과, 분리대두 단백질의 단백질 함량은 96%이상의 순도를 가졌으며, 수율은 53%이상으로 분리 정제하여 매우 좋은 수율을 확인하였다.

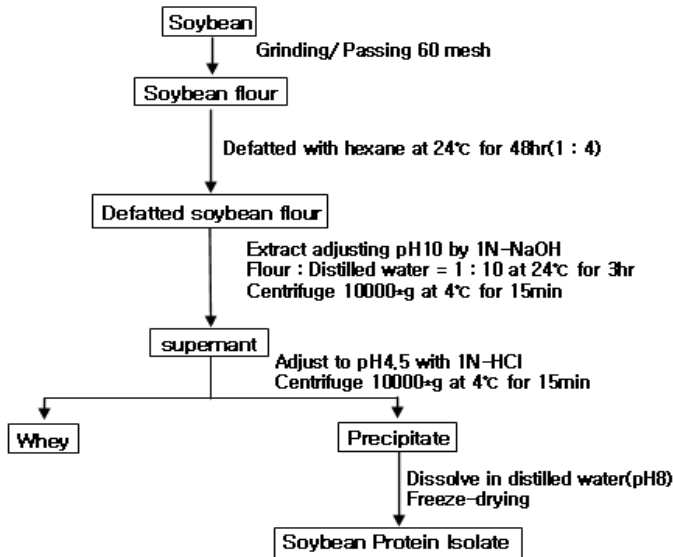


Figure 3-65 Soy protein isolate preparation

나) 분리 대두 단백질로부터 저알러지 단백질을 생산하기 위하여 효소적 변형법 최적화

대두 단백질의 주요 allergen은 Gly m Bd 60K, Gly m Bd 30K, Gly m Bd 28K에 존재한다. Gly m Bd 60K은 주요한 콩 저장 단백질로서 잘 알려진 β -conglycinin의 α -subunit이며, Gly m Bd 30K은 분자량 38kDa인 soybean oil-body-associated glycoprotein이다. 또한, Gly m Bd 28K은 분자량 26kDa으로 vicilin-like-glycoprotein이다. 이들은 콩 단백질에 민감한 환자, 소아와 아토피 피부염 환자들이 대두 단백 면역반응 항원물질을 그대로 섭취하였을 때 알레르기가 유발되거나 그 증상이 악화될 우려가 있다. 따라서 본 연구에서는 대두의 allergens를 제거하기 위해 기존에 사용해왔던 Ultrafiltration과 효소적 변형 중 현재 많은 연구가 진행되고 있는 효소적변형법을 이용하여 대두의 면역반응 항원물질을 제거하기 위한 최적화 방 figure 3-66에 도식화하였다.

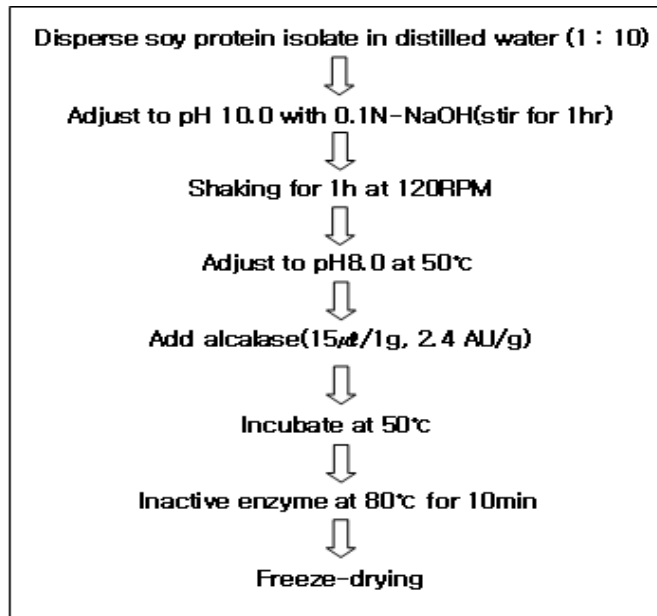


Figure 3-66 Alcalase hydrolysis of soy protein isolate

다) 가수분해 정도의 측정

Alcalase의 가수분해 측정은 20% Trichloroacetic acid(TCA)를 이용하여 측정하였다. 우선, 1% SPI용액을 제조하여 1mL을 취하여 micro-kjeldahl법으로 Total nitrogen함량을 측정한다. 가수분해 샘플(30, 60, 120, 180, 300, 480분)과 Unmodified SPI의 1%용액을 각각 제조한다. 완전히 용해된 각 샘플에서 10mL을 취하고 여기에 20% TCA 10mL을 첨가하여 원심분리(8900 X g, 4°C, 15분)를 실시한다. 원심분리가 끝난 샘플의 상등액에 용해된 nitrogen함량을 micro-kjeldahl법(4)을 이용하여 측정하였다.

$$DH(\%) = \frac{10\% \text{ TCA} - \text{soluble N}}{\text{Total N}} \times 100$$

라) 용해도 측정

저알러지 대두 단백질의 용해도 측정은 Bera 와 Mukherjee(1989)의 측정방법을 약간 변형하여 측정하였다. 용해도 측정시 사용된 샘플은 Unmodified SPI와 Alcalase 2.4L FG로 8h 동안 가수 분해시킨 저알러지 대두단백질을 사용하여 비교 측정하였다. 측정 방법은 각각의 가루샘플을 1%용액으로 조제한다. 완전히 용해 될 때 까지 stir 시킨다. Total nitrogen함량을 측정하기위해 1% SPI용액에서 1mL을 취하여 함량을 측정하였다.⁽⁴⁾ 완전 용해된 샘플은 0.1N-HCl과 0.1N-NaOH를 이용하여 pH3, 5, 7, 9, 11로 각각 조정하여 원심분리(8000RPM, 4℃, 15분)를 실시하였다. 원심분리한 샘플의 상등액 1mL을 취하여 micro-kjeldahl법⁽⁴⁾을 이용하여 nitrogen함량을 측정하였다.

$$NS(\%) = \frac{\text{Ni rogen in supernant(mg)}}{\text{Total ni rogen in sample(mg)}} \times 100$$

마) 유화 형성력 및 유화 안정도 측정

유화 형성력과 유화안정도 측정은 Pearce와 Kinsella⁽⁸⁾의 방법을 약간 변경하여 시행하였다. 먼저, 0.1% 단백질 용액(pH7)을 제조하여 6mL을 취하고, pure corn oil(100%) 2mL을 첨가시켜 homogenizer(10000rpm, 1min, 24℃)로 균일하게 혼합시킨다. 균질 후 바로 용기 바닥에서 유화액 50 μ l(0분: A₀)을 취하고, 10분 뒤 (A₁₀)에 다시 50 μ l을 취하여 각각 유화액에 0.1% SDS 용액 5mL을 첨가하여 희석시킨다. 희석된 유화액은 UV-detector(agilent사)를 사용하여 파장 500nm에서 흡광도를 측정하였다. 유화형성 후 바로 측정한 흡광도 값은 Emulsifying activity 값으로 나타냈고, 유화 안정도는 공식을 이용하여 결과를 산출하였다.

$$ESI(\text{min}) = \frac{A_0 \times \Delta t}{\Delta A}$$
$$\Delta t = 10 \text{ min}, \Delta A = A_0 - A_{10}$$

바) 거품 형성력 및 거품 안정도 측정

저 알러지 대두 단백질 즉 8시간 동안 가수분해 시킨 샘플의 거품 형성력과 거품 안정도 측정은 대조군으로 unmodified SPI와 Egg white를 이용하여 측정 하였다. 각 샘플은 증류수에 용해시켜 1% 용액을 제조(50mL)한 다음, 용액의 pH를 1N-NaOH와 HCl을 이용하여 pH4.0, 7.0, 9.0으로 각각 조정한다. pH조정을 마친 샘플 용액들은 homogenizer(10000rpm, 24°C)를 이용하여 1분간 균질 시킨다. 거품이 형성된 샘플은 즉시 메스실린더로 옮겨서 거품의 양(V_0)을 측정하고 20분 뒤 다시 거품 양을 측정하여 결과 값을 산출하였다.

$$\text{Foaming capacity} = \frac{\text{Initial foam volume}(V_0)}{\text{Initial volume}(50\text{mL})}$$

$$\text{Foaming stability} = \frac{V_0 \times t}{\Delta V}$$

ΔV = change in volume of foam
 V_0 = initial foam volume at 0 min

사) Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis(SDS-PAGE) Analysis

각 가수분해 된 샘플들(0, 60, 120, 180, 300, 480분)의 단백질 분자 모양을 확인하기 위해 SDS-PAGE분석을 실시하였다. 12% acrylamide gel과 4% stocking gel을 사용했고, 100V에서 2시간 동안 실행하여, sample들의 단백질 밴드를 확인하였다. sample buffer은 1M Tri-HCl, 50% glycerol, 10% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 1% bromophenol blue등으로 제조하였고, 여기에 각각의 sample 0.005g을 용해시켰다. 단백질의 standard로 prestained SDS-PAGE standards(Bio-Rad, Ca. No 161-0318)를 사용하였다.

3) 연구의 결과

가) 가수분해 정도의 측정

서리태에서 추출한 대두 분리 단백질을 alcalase 2.4L FG(novozyme)를 처리하여 가수분해 시간에 따른 단백질 분해 정도를 확인 하였다. alcalase처리 전 Novozyme사에서 제공 해준 product sheet에 명시된 효소(alcalase)의 최적 활성 pH와 온도의 조건으로 맞춘 후 가수분해를 실시하였다. 각 샘플의 가수 분해 정도를 측정한 결과 figure 3-67, table 을 보면 2시간까지는 분해정도가 급격하게 증가하다가 그 이후부터는 분해가 서서히 감소하는 양상을 나타내는데 이는 기질의 고갈이나 최종 생산물의 저해에 의한 것이다. 본 실험은 기존에 연구된 연구 데이터와 유사한 결과를 보였다.

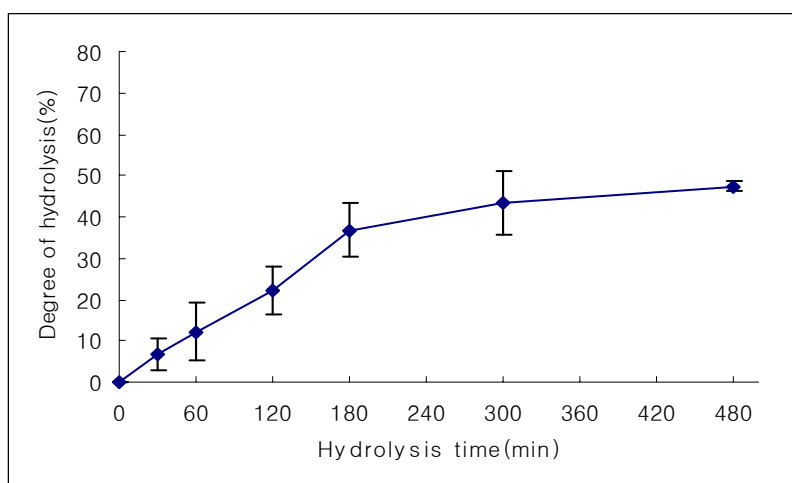


Figure 3-67 Degree of hydrolysis of soy protein isolate with alcalase

Table 3-59 Degree of hydrolysis of soy protein isolate with alcalase

Hydrolysis time(min)	0	30	60	120	180	300	480
DH(%)	0	6.71±3.78	12.16±6.96	22.16±5.77	36.84±6.48	43.57±7.73	47.32±1.24

나) 용해도 측정

Hydrolyzated SPI(8h, AMSPI)와 unmodified SPI를 증류수에 용해시킨 후 각각 다른 pH에서 sample의 용해도 변화를 측정하였다. 용해도 측정 결과 figure 3-68에 나타나있듯이 Hydrolyzated SPI(8h)와 unmodified SPI 2개의 sample 모두 대두 단백질 등전점(pH 4.4~5.0) 부근에서 용해도가 현저히 떨어지는 것으로 나타났다. 그러나 상대적으로 8시간 동안 가수 분해된 sample이 unmodified SPI 보다 등전점 부근에서 용해도가 더 높은 것으로 나타났다. 이 결과 AMSPI(8h)의 용해도 증가 요인은 효소 처리에 따른 단백질의 변형인 1) 펩타이드 사슬의 분자량 감소 2) 극성기 돌출로 인한 친수성기의 증가 3) 분자적 공간 배열의 변화에 의한 것으로 추측된다.

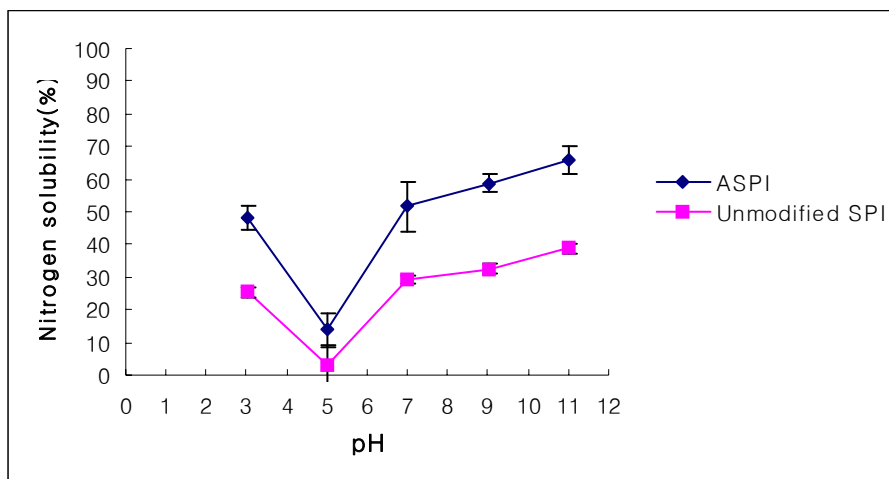


Figure 3-68 Nitrogen solubility of unmodified soybean protein isolate(◆) and alcalase-modified soybean protein isolate(■)

Table 3-60 Nitrogen solubility of unmodified soybean protein isolate and alcalase-modified soybean protein isolate

pH	3	5	7	9	11
ASPI(8h)	48.33±3.54	13.75±5.33	51.67±7.76	58.79±2.98	65.8±4.30
Unmodified SPI	25.37±1.65	3.33±5.77	29.29±1.34	32.57±1.58	38.77±1.60

다) 유화력 및 유화안정도 측정

Hydrolyzated SPIs, unmodified SPI and Bovine Serum Albumin의 유화 형성력과 유화 안정성을 비교하여, Figure 3-69와 Figure 3-70에 각각 나타내었다. Bovine Serum Albumin은 훌륭한 유화 형성력을 가지고 있어 샘플들의 유화력 및 유화 안정성 측정 시 standard로서 사용하였다. Figure 3-69를 보면, 효소 변형을 시키지 않은(0min) 샘플은 전체적으로 다른 샘플에 비해 약간 낮은 유화력을 나타냈다. 이는 효소의 분해 작용에 의해서 기름-물 경계면에서 유화를 형성하는데 유용한 펩타이드 수와 극성기의 증가로 전반적으로 unmodified SPI보다 높은 유화 형성력을 보였으나, BSA와 비교시 hydrolyzated SPI(8h)의 유화형성력은 BSA의 41.9% 밖에 미치지 못했다. 또한, 유화안정도(Figure 3-70)는 효소에 의해 가수 분해가 진행될수록 단백질의 크기가 작아지고, 단백질 구조 내부에 존재하던 소수성기 즉, 친유성을 띠는 작용기들이 구조 외부로 노출된 상태에서 균질을 실시하면 단백질 분자들이 multilayer를 형성하게 되므로 유화 안정성이 증가하는 것으로 사료된다.

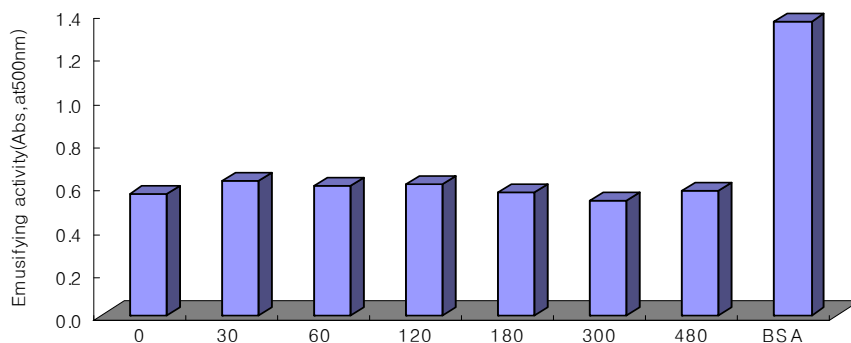


Figure 3-69 Emulsifying activity of hydrolyzated SPIs, unmodified SPI and Bovine Serum Albumin(BSA).

Table 3-61 Emulsifying activity of hydrolyzated SPIs, unmodified SPI and Bovine Serum Albumin(BSA).

Hydrolysis time(min)	0	30	60	120	180	300	480	BSA
EA(Abs)	0.56±0.06	0.62±0.10	0.60±0.12	0.61±0.11	0.57±0.02	0.53±0.03	0.57±0.04	1.36±0.06

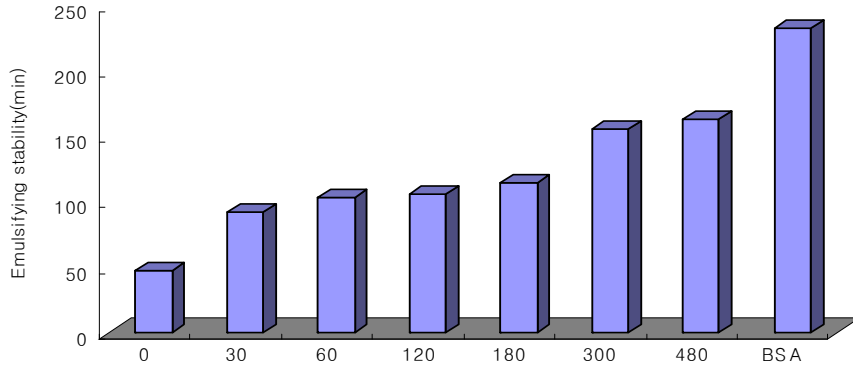


Figure 3-70 Emulsifying activity of hydrolyzated SPIs, unmodified SPI and Bovine Serum Albumin(BSA).

Table 3-62 Emulsifying activity of hydrolyzated SPIs, unmodified SPI and Bovine Serum Albumin(BSA).

Hydrolysis time(min)	0	30	60	120	180	300	480	BSA
ES(Abs)	47.09±15.05	92.38±36.705	103.82±21.800	106.188±21.80	114.40±28.011	155.69±8.401	162.86±55.397	232.33±0.006

라) 거품 형성력 및 안정도 측정

거품 형성력과 안정도 측정 시 샘플로 unmodified SPI(control), Hydrolyzated SPI(MSPI, 8h) 그리고 Egg white를 사용하였다. 거품형성력의 경우 Figure 3-71을 보면, MSPI는 전체적인 pH범위에서 좋은 거품력을 가진 것으로 나타났다. 이 결과, MSPI는 단백질이 가수분해가 되면서 펩타이드 사슬 경계면에서 펼쳐지는 경향이 증가하여 SPI보다 거품형성력이 더 용이한 것으로 나타났다. pH9에서 MSPI의 거품력이 가장 좋은 것으로 나타났고, 거품의 안정성(Figure 3-72)은 시간이 지남에 따라 감소하는 경향을 보였고 알칼리 쪽에서 더 불안정한 것으로 나타났다.

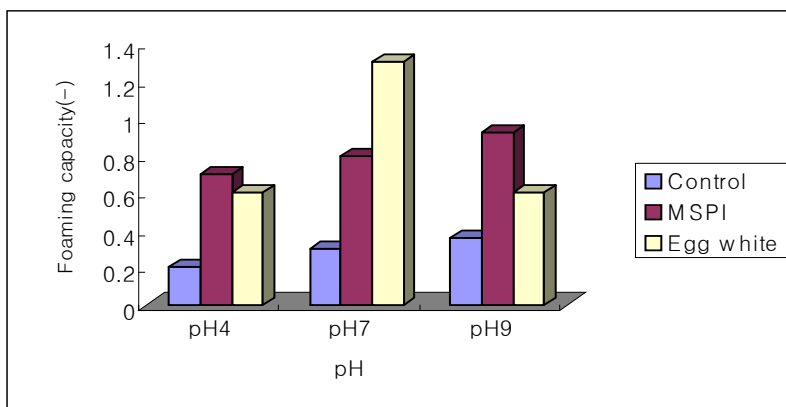


Figure 3-71 Foam capacity of protein samples as related to pH

Table 3-63 Foam capacity of protein samples as related to pH

pH	pH4	pH7	pH9
Control	0.2	0.3	0.36
MSPI	0.7	0.8	0.92
Egg white	0.6	1.3	0.6

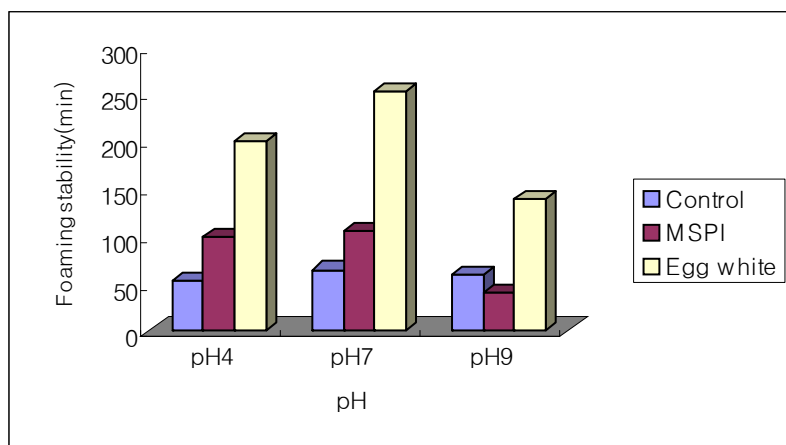


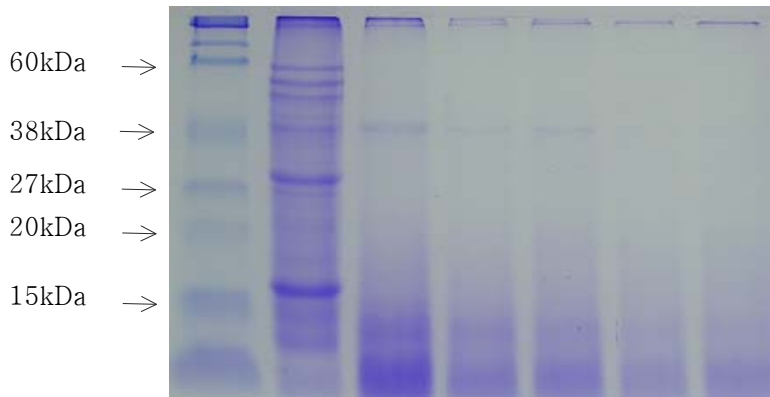
Figure 3-72 Foam stability of protein samples as related to pH

Table 3-64 Foam stability of protein samples as related to pH

pH	pH4	pH7	pH9
Control	53	65	60
MSPI	100	106	41
Egg white	200	252	140

마) Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis(SDS-PAGE) Analysis

음식물 알레르기의 빈도는 성인에서 1.5%, 3세 미만에서는 5~6%로 알려져 있으나 아토피 질환이 있는 소아의 경우는 질환에 따라서 10~30%의 높은 빈도를 보일 수 있다고 한다. 각각 나라마다 식생활과 환경 차이에 의해서 빈도가 다르다. 일례로 성인의 경우, 영국 1.4~1.8%, 스페인 4.6%, 오스트레일리아 19.1%의 다양한 빈도를 보인다고 한다. 국내 어린이들은 음식물 알레르기 의 유병률이 6.5%로 보고된 바 있다. 음식물 알레르기의 90%이상이 견과류, 콩, 생선, 계란, 우유, 갑각류 등에서 발생하는데, 이들 중 콩이 큰 비율을 차지하고 있다. SDS-PAGE 분석을 통해 alcalase 2.4L FG에 의해 가수 분해된 각 대두 단백질 샘플들의 밴드를 확인하였다. 대두 단백질의 주요 allergen은 Gly m Bd 60K, Gly m Bd 30K 그리고 Gly m Bd 28K에 존재한다. Gly m Bd 60K은 주요한 콩 저장 단백질로서 잘 알려진 β -conglycinin의 α -subunit이며, Gly m Bd 30K은 분자량 38kDa인 soybean oil-body-associated glycoprotein이다. 또한, Gly m Bd 28K은 분자량 26kDa으로 vicilin-like-glycoprotein이다. SDS-PAGE 분석 결과, Figure 3-73를 보면 대두 단백질의 주요 allergen site인 분자량 60kDa, 38kDa 그리고 26kDa의 밴드가 8시간 동안 가수분해 시킨 대두 단백질 샘플(F)에는 완전히 제거된 것을 확인 할 수 있고, 이를 통해 저알러지 대두 단백질 생산이 가능함을 입증하였다.



A: unhydrolyzated SPI, B: hydrolysis for 1h, C: hydrolysis for 2h, D: hydrolysis for 3h, E: hydrolysis for 5h, F: hydrolysis for 8h

Figure 3-73 SDS-PAGE electrophoresis pattern of SPI and AMSPI

바) 저알러지 대두 단백질의 항원제거를 위한 효소반응 최적화 및 대량생산 공정 확립.

서리태로부터 순도 및 수율 높은 분리 대두 단백질의 생산을 체계화하고, 생산된 SPI를 기존의 효소적변형법을 최적화함으로써 대두의 주요 allergens을 보다 간편하고, 경제적으로 제거하여 저알러지 대두 단백질을 생산하고 이를 다양한 분야의 적용을 위해 대두 분리 단백질의 functional properties를 측정한 결과의 요약은 다음과 같다.

- ① 서리태로부터 대두 분리 단백질(SPI)추출 및 정제 결과 수율은 56%이고, SPI의 단백질 함량은 micro-kjeldahl법(4)과 bovine serum albumin을 사용한 lowry법(12)으로 측정한 결과 96%의 순도를 나타내었다.
- ② 저알러지 대두 분리 단백질을 생산하기 위한 최적화 실험은 단백질량에 대한 효소의 농도를 0.5%, 1%, 1.5%, 2.0%로 각각 달리하여 8시간 동안 가수분해를 실시하였고, 효소 반응의 최적 pH와 온도는 Novozyme사에서 제공한 조건으로 실시한 결과 효소 농도 0.5%와 1%에서는 대두 분리 단백질의 allergen site가 미미하게 나타났으나, 1.5%와 2.0%의 농도에서는 항원이 모두 제거 된 것으로 나타났다.

- ③ 대두분리단백질에 효소(alcalase)를 첨가하고, 반응 시간(0, 30, 1, 2, 3, 5, 8h)을 각각 달리하여 가수분해 정도를 측정하였다. 가수분해 3시간까지는 급격한 증가를 보인 반면 이후에는 가수분해 정도가 감소하였다. 이는 기질의 고갈이나 최종생산물의 저해로 인한 감소로 사료된다.⁽¹³⁾
- ④ 용해도 측정 실험은 8시간동안 가수분해한 샘플과 가수분해 시키지 않은 샘플(unmodified SPI)을 각각 pH를 달리하여 용해도를 비교 측정 하였다. 그 결과, Unmodified SPI 경우 대두 단백질의 등전점 부근(pH4.5~5.0)에서 용해도가 3.3%로 가장 낮은 수치를 나타낸 반면, 8시간 동안 가수분해한 샘플은 등전점 pH에서 13.7%로 상대적으로 좋은 용해도를 보였다.
- ⑤ 유화력 및 유화 안정성 측정 실험은 가수분해 샘플(hydrolyzated SPIs: 30, 1, 2, 3, 5, 8시간)과 가수분해 시키지 않은 샘플을 가지고 실시하였다. 이 실험에서 Bovine serum albumin(BSA)은 훌륭한 유화력을 가지고 있어 standard로 사용하였다. 유화력 측정 결과 서로 큰차이는 보이지 않았지만 8시간 샘플이 가수분해 시키지 않은 샘플에 비해 약간 높은 수치를 나타냈다. 하지만, BSA와 비교시 유화형성력은 BSA의 41.9% 밖에 미치지 못했다. 유화 안정성은 가수분해가 진행될수록 그 능력이 향상되는 경향을 보였다.
- ⑥ 거품 형성력과 안정도 측정은 샘플로 unmodified SPI, hydrolyzated SPI(8시간) 그리고 거품형성력이 좋은 Egg white를 standard로서 사용하였고, 3가지 pH로 나누어 실시하였다. 전체적인 pH범위에서 hydrolyzated SPI샘플은 unmodified SPI 샘플 보다 좋은 거품력을 보였다. 이는 대두 분리 단백질이 가수분해가 되면서 펩타이드 사슬 경계면에서 펼쳐지는 경향이 증가하는 것으로 사료된다. 거품의 안정성은 시간이 지남에 따라 감소하였고, 알칼리 pH범위에서는 불안정한 것으로 나타났다.
- ⑦ SDS-PAGE 분석을 통하여 가수분해 시간에 따른 샘플들의 단백질 분자량을 확인하였다. 확인 결과 가수분해 시간이 증가함에 따라서 대두의 주요 allergen site(60kDa, 38kDa, 26kDa)가 점차 감소하는 것을 확인했고, 효소에 의해 8시간 동안 가수분해된 샘플에서는 주요 allergen이 모두 제거되어 저알러지 대두 분리 단백질을 확인할 수 있었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구 평가의 착안점 및 목표 달성도

구분	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	목표 달성도
1차 연도	Soy protein과 hydrolyzate의 fractionation과 hydrophobicity 측정	40%	<ul style="list-style-type: none"> - 효소를 이용한 가수분해물 제조 - 가수분해물의 functionality 측정 - hydrophobicity 측정 	100%
	국내산 대두가 실험동물의 생리 대사에 미치는 영향 평가	40%	<ul style="list-style-type: none"> - 여러 종류의 대두가 실험동물의 체중 증가에 미치는 효과 판정 - 여러 종류의 대두가 실험동물의 체내 지질에 미치는 효과 판정 - 여러 종류의 대두가 실험동물의 지질과산화에 미치는 효과 판정 	100%
	면역반응 항원물질이 제거된 항알러지성 단백질 제조	20%	<ul style="list-style-type: none"> - 면역반응 항원물질이 제거된 항알러지성 단백질 제조 	100%
2차 연도	대두 단백질 가수분해물을 첨가한 기능성 전통식품 개발	40%	<ul style="list-style-type: none"> - 기능성 증편의 표준레시피 작성 - 기능성 증편의 품질특성 평가 - 기능성 증편의 물리적, 이화학적 평가 - 기능성 증편의 저장성 평가 	100%
	대두 단백질 가수분해물의 지질저하작용과 항산화력 평가	30%	<ul style="list-style-type: none"> - 대두 단백질 가수분해물의 성장율 평가 - 대두 단백질 가수분해물의 소화흡수율 평가 - 대두단백가수분해물의 지질저하작용평가 - 대두 단백질 가수분해물의 항산화력 평가 	100%
	저알러지 대두 단백질 가수분해물 대량 생산 공정 확립	30 %	<ul style="list-style-type: none"> - SDS-PAGE를 이용하여 대두 항원 제거 확인 - 기능적 특성 측정 	100%

제 2 절 관련 분야에의 기여도

- 가. 우리나라에서 대두는 식량자원으로 중요한 부분을 차지하며 국산콩의 경쟁력을 향상시키기 위하여서는 국산콩과 국산콩가공제품의 우수성을 과학적으로 입증하여 소비를 적극적으로 유도해야 할 필요가 있다. 본 연구의 대두종의 기능성 연구는 과학적으로 기능성을 확인시켜 주며, 소비자로부터의 소비를 유도시킬 수 있을 것으로 사료된다.
- 나. 기능성 식품의 시장이 점차 확대되고 있다. 1998년 현재 미국의 nutraceutical 시장은 25억달러로 추산되고 있고, 유럽 역시 비슷한 규모로 파악된다. 국내외적으로 치료식 시장의 제품구성은 5대 영양소로 이루어져 있으며, 질환의 개선보다는 유지가 주된 기능으로 대두 peptide를 함유한 기능성 떡의 개발은 성인병 발발의 예방과 면역력 증강에 적극적인 이용이 가능함으로써 medical food 및 nutraceutical 제품에서의 활용과 시장의 확대에 기여할 것으로 확신한다.
- 다. 국민 식생활의 급격한 서구화로 인하여 영양과다로 인한 고지혈증, 동맥경화증의 유병율이 증가하고 있다. 이러한 순환기질환은 합병증의 심각성으로 생산성과 삶의 질을 저하시키고 그에 따른 과다한 의료 경비 지출로 인하여 단순한 의료 문제에 그치지 않고 21세기를 바라보는 오늘의 가정, 사회 및 경제에 무거운 짐이 되고 있다. 향 후 사회 경제적인 짐이 될 소지가 있는 의료비 증가의 현 시점에서 최근 소비자들은 생활이 향상됨에 따라 건강지향 식품과 천연 식품을 사용한 치료보조 식품을 선호하게 되었다. 따라서 특수 생체 기능을 갖는 대두 기능성 식품을 경제적으로 생산하여 보급할 경우 안전성이 높고 경쟁력이 있을 뿐 아니라 순환기 질환의 치료 보조 수단으로 사용될 것으로 사료된다.
- 라. 대두단백가수분해물의 지질 저하와 항산화 작용 효과가 동물 실험을 통해 입증되어 대두단백가수분해물을 활용한 좀 더 다양한 기능성 식품의 개발에 박차가 가해질 것으로 사료된다.
- 마. 현재 국내 콩 재배 면적은 한국전쟁 이후, 1953년부터 1968년까지는 증가 추세를 보여 232만 ha까지 증가하였으나 그 이후로 감소하는 경향을 보였다. 콩 단위

면적당 수량성은 연차 간에 어느 정도의 증감은 있었으나 계속하여 증가하였고, 1973년 이전까지 ha당 수량이 1.0톤 이하였으나 그 이후 계속 증가하여 지금은 국가 전체 평균이 ha당 1.5톤 내외에 이르게 되었다. 그러나 주요 콩 생산국에 비하면 매우 낮은 수준이다. 국내 콩의 소비량은 소비자들의 입맛이 서구화되면서 그 소비량 또한 감소하게 되었고, 결국 2003년 국내 콩 자급률은 대두박을 포함하지 않고도 7%이하로 떨어지게 되었다.⁽¹⁴⁾ 따라서 콩의 생리 활성 효과와 같은 기능성 측면을 강화하고, 콩의 알레르기 유발원인 항원(allergen)을 제거한 저알러지 대두를 이용하여 기능성 대두 가공식품을 개발함으로써 국내 콩 소비량을 향상시키고 의료비용 절감효과를 기대하고자 한다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 추가 연구의 필요성

1. 대두 단백질 가수분해물은 우수한 기능성 식품소재로 판단되어진다. 본 연구에서는 증편에 초점을 맞추어 기능성 식품을 개발하였다. 앞으로 뛰어난 용해력과 거품형성력을 가지고 있는 대두 단백질 가수분해물을 보다 다양한 식품에 넣어 개발할 필요가 있다고 사료된다.
2. 대두 단백질 가수분해물을 첨가함으로써 증편의 노화도에 상당한 도움이 되는 것으로 분석되어 졌다. 이것을 시판을 하기 위해서는 저장성을 높이기 위한 포장기술의 연구가 필요할 것으로 사료된다.
3. 수입되고 있는 분리대두단백 가수분해물과 제조되어진 분리대두단백 가수분해물의 기능성과 물성을 비교하여 국내에서 제조된 가수분해물의 우수성을 조명해볼 필요가 있다. 그렇게 하여 국산 콩으로 제조된 단백질 가수분해물의 우수성이 입증된다면 기능성 식품 소재의 수출도 가능할 것이다.
4. 대두단백가수분해물 중 특히 불용성 가수분해물의 지질 저하 효과와 항산화 작용이 뛰어난 것으로 나타나 앞으로 불용성 펩타이드의 성분과 구조 및 생리기능성에 대해 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.
5. SDS-PAGE 분석을 통해 대두 단백질의 분자량 60kDa, 38kDa 그리고 27kDa에 주요 allergen이 존재함을 확인하였고, 이들 체내에서 소화하는 과정에서 인체 면역반응을 자극하는 분자임을 확인하였다. 그러나 allergen의 제거를 확실하게 검증하기 위해 실험동물이나 콩 단백질에 민감한 사람들(soybean-sensitive patients)의 혈청을 통한 면역반응 실험(immunoblotting analysis)이 필요하다.
6. 본 실험에서 raw sample로 서리태를 사용했다. 서리태는 검정색의 콩으로서 색소에는 항산화능력과 항균작용을 가지고 있는 anthocyanin을 다른 품종에 비해 다

량함유하고 있다. 서리태로부터 추출한 SPI와 청안옥콩(백태콩:농진청)에서 추출한 SPI의 색을 서로 비교해보면 서리태의 SPI표면에 검은색 색소가 흡착되어 색이 어두운 것을 볼 수 있었다. 따라서 서리태 SPI와 가수분해물 내에 anthocyanin의 함량을 확인해 볼 필요가 있다고 사료된다.

제 2 절 활용 계획

- 대두 단백질 가수분해물의 제조는 국내산 기능성 식품 소재 생산의 가능성을 열었으며, 이는 콩 이외의 세계적으로 희귀하며 국내에서 생산되는 여러 식물, 종자, 열매로부터의 기능성 물질 추출과 이의 과학적 입증에 위한 발판이 될 것이다. 본 연구의 구체적 결과는 박사 학위 논문(2007, 경기대학교)으로 발표되었으며 앞으로 국제 학술지에 1편, 국내 학술지에 두편을 투고할 예정이다.
- 제조된 대두 단백질 가수분해물을 증편에 넣었을 때 볼륨감이 향상되는 것을 확인하였다. 그래서 볼륨감을 향상시키기 위하여 yeast와 같은 첨가제를 넣지 않아도 되었으며, 노화도 상당 부분 지연 시키는 것으로 분석되어 졌다. 따라서 이스트 대용품으로서 또 전분의 노화를 방지하는 물질로서 다른 식품에서의 사용이 가능할 것이다. 대두단백가수분해물을 첨가한 증편의 제조 방법은 현재 특허 출원된 상태이며, 우리나라 식품의 우수성을 세계에 알리기 위하여 국제급 학술지에 1편을 투고할 예정이다.
- 떡의 산업화에 있어서 전분의 노화가 가장 문제시 되어 지고 있다. 이의 해결 방안 제시는 떡의 산업화를 촉진 시키는데 상당한 기여를 할 것으로 여겨진다.
- 쌀을 주 재료로 한 떡은 단백질이 부족한 식품군이다. 여기에 단백질의 첨가는 영양적으로 균형을 맞추어 주며, 아침 식사 대용식으로 개발 될 수 있을 것으로 판단되어 진다.
- 제조된 증편의 내부 구조는 빵과 유사한 스폰지 구조를 보여 주었다. 따라서 세계적으로 인정받을 수 있는 기능성 식품으로 거듭날 수 있을 것이다.

- 여러 가지 국내산 대두가 실험동물의 생리 대사에 미치는 효과 판정 기술은 현재 까지 2편의 학술대회(한국영양학회, 2006 춘계; 식품영양과학회, 2006)에서 결과를 발표하였고, 학술진흥재단 등재학회지(한국영양학회지, 2007년 4월)에 실린 상태이다. 대두의 종류에 따라 기능성이 다르게 나타나는 것을 활용하여 특정 대두의 선택 시에 많이 활용될 것으로 기대된다.
- 대두 단백질 가수분해물들의 지질저하작용과 항산화효과 평가 기술은 2007년도 전문학술대회에서 발표할 계획이며, 1명의 석사학위 논문으로 준비 중에 있고, 1편의 등재학회지에 논문을 보고할 계획이다. 대두단백가수분해물의 성질에 따른 기능성의 차이로 불용성분해물에서 생리기능성이 높은 것은 증편 뿐만 아니라 다른 식품의 가공시에도 활용이 기대되는 바이다.
- 저알러지 대두 분리 단백질 생산을 통해 콩 단백질에 민감한 사람, 소아, 아토피 피부염환자 그리고 알레르기 환자들의 환자식이나 건강 기능성 식품으로서 제공 될 수 있을 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 대두 단백 가수분해물의 물리적 특성

Urakapa와 Arntfiedl는 salt의 함량이 증가할 수록, pH가 높을 수록 guar gum의 surface hydrophobicity는 증가한다고 보고하였다(Uruakapa, 2006). 또 다른 연구에 의하면 soy protein의 fraction인 11S는 sucrose의 첨가가 hydrophobicity에 전혀 영향을 못미치지만, heating을 함께 처리하였을 경우에는 hydrophobicity를 감소시키는 것으로 나타났다. 반면에 7S fraction은 sucrose와 heating 모두 hydrophobicity를 감소시키는 것으로 연구되어 졌다(Rhan 외 1인, 2005). Pea flour를 acid protease로 가수분해물 제조 후 기능적 특성을 분석한 연구에 의하면, water absorption capacity에서는 차이가 없는 것으로 나타났으나, oil absorption, emulsification, gellation capacity, osmolality는 가수분해물에서 상당히 높게 나타났다. Free amino acid 량의 증가와 trypsin 저해제, phytic acid content의 감소로 영양학적 측면에서 상당히 우수한 것으로 나타났다(Periago 외 7인, 1998).

제 2 절 대두 단백질의 기능성

Brantle 등(1979)은 casein peptone에서 아편성 마취 물질인 β -casomorphin의 peptide를 분리하여 식품 단백질로부터 효소적 소화 처리에 의해 많은 종류의 생리활성 peptides를 분리해 냈다. 이들 물질들은 효소 억제제(Maruyama 외 1인, 1985), 장내 흡수를 증진시키는 peptides(Sato 외 1인, 1986; Sugano, 1998), 미생물 증식을 억제시키는 peptides(Tonita, 1995), 항산화 기능을 지닌 peptides(Chen 외 2인, 1995) 등으로 인체 내에서 유용한 기능을 수행하고 있다. Sellmeyer et al.(2001)은 육류 단백질의 섭취율이 높을수록 골밀도가 떨어졌으며, 그렇지 않은 사람에 비해서 골반 골절의 위험을 더 많이 가지고 있었다고 보고하였다.

Vijayalakshimi et al.(1986)은 단백 가수분해물은 낮은 분자량의 peptides, 특히 di- 와 tripeptides를 대량함유하고 있다고 하였으며, 이는 영양적으로도 우수하며, 치료학적인 가치를 가지고 있다고 하였다. Wen-Dee Chiang et al.은 분리대두단백질을

다섯가지의 효소(alcalase, flavourzyme, trypsin, chymotrypsin, pepsin) 처리를 통한 가수분해물과 기존의 분리대두 단백질의 ACE 저해 활동 수준을 측정한 결과, 효소적 가수분해물이 ACE 저해 활동이 높은 것으로 나타났으며, 특히 alcalase에 의한 가수분해물이 가장 높은 ACE 저해활동을 보여주는 것으로 나타났다(Li, 1989). Pancreatin에 의한 가수분해물은 용해도와 유화도를 증가시키는 것으로 나타났으며 (Moterio 외 1인, 1994), Papain 처리된 가수분해물은 용해도와 거품형성력을 증가시켜주는 것으로 연구되어 졌다.

제 3 절 인체에서의 콩의 생리활성

여러 연구에서 콩 단백질을 함유하는 식품을 섭취할 때 혈액 지질과 콜레스테롤에 변화가 있었다고 보고하였다(Potter, 1996). 인체를 대상으로 한 연구에서는 고콜레스테롤 혈증 환자에게 하루에 50g씩의 콩 단백질을 섭취시키면 총 콜레스테롤이 약 11~12% 감소하는 것으로 추정하고 있다(Anderson et al. 1996). 그러나 콩 단백질 어떤 성분이 이런 변화를 가져오는 지는 아직 완전히 밝혀지지 않은 상태이다.

콩의 생리활성 작용을 설명하는 기전으로 콩에 들어있는 파이토케미칼(phytochemical)의 생체조절 기능이 거론되고 있으며, 이들이 관상심장질환, 골다공증, 암 등에 어떤 효과를 보이는 가에 대해 많은 관심이 모아지고 있다(Barnes, 1998). 대표적인 파이토케미칼인 이소플라본은 콩 단백질 식품에 풍부히 들어있는데, 알코올 추출 과정에서 그 양이 많이 달라질 수 있다. 이소플라본은 에스트로젠 유사체로 체내에서 에스트로젠 수용체에 결합하므로 지질과 골격 대사에서 에스트로젠과 유사한 생리활성을 가지는 것으로 생각하고 있다(Klein, 1998). Potter(1998)는 6개월간 폐경기 여성에게 이소플라본 함유량이 다른 대두단백질을 섭취시켰을 때, 이소플라본이 지질 강하 효과보다는 요추골밀도 증가에 오히려 더 좋은 효과를 주어서, 콩의 콜레스테롤 저하 효과는 이소플라본이 아닌 다른 성분이 더 영향을 미치는 것으로 추정하였다. 이소플라본은 in vitro에서 자유라디칼로 인한 손상으로부터 세포를 보호하고 (Rodranz, 2002), in vivo에서 혈관 확장제로 작용하는 혈액의 nitric oxide 농도를 증가시켜서 혈관을 보호하는 항산화 효과도 가지고 있다(Lee et al, 2001). 한 편, 이소플라본 중 제니스타인은 항산화 작용을 통해 유방암과 전립선암에 대한 항암 작용을 하는 것으로 보고되고 있다(Wie, 1996).

제 7 장 참고 문헌

- 김귀영, 강우원, 최상원, "감잎가루를 첨가한 설기떡의 품질 특성에 관한 연구,"
Journal of The East Asian of Dietary Life, 9(4), pp. 461-467, 1999.
- 김명희, "수리취 절편의 조리과학적 특성," 단국대학교, 박사학위 논문, 1993.
- 김정미, 서동순, 김역석, 김광옥, "은행 분말을 첨가한 죽 및 떡의 물리적 및 관능적 특성," 한국식품과학회지, 36(3), pp.410-415, 2004.
- 김향희, 박금순, "녹차분말 첨가량에 따른 절편과 설기떡의 기호도 및 품질 특성,"
Journal of The East Asian of Dietary Life, 8(4), pp. 454-461, 1998.
- 김옥선, "우리나라 전통 떡의 이용현화에 관한 연구," 경희대학교, 석사학위 논문,
pp.24-60, 2003.
- 김창임, 이연숙, "단백질과 탄수화물 가수분해물이 침수 속박 스트레스로 유도된 위 궤양
회귀의 질소대사에 미치는 영향," 한국영양학회지, 28(4), pp. 291-297, 1995.
- 남태희, 김애정, 우경자, "뽕잎 가루 첨가량에 따른 증편의 품질에 관한 연구," J. East
Asian Soc Dietary Life, 14(4), pp. 379-386, 2004.
- 농림부, "세계의 주요 곡물 수급 및 가격 동향," 8. pp.15-19, 2001.
- 농촌진흥청, "쌀과 식생활," pp. 35-41, 2001.
- 박금순, 박어진, "발효 시간에 따른 동충하초 첨가 증편의 품질 특성," J Korean Soc
food Sci Nutr, 33(10), pp. 1703-1708, 2004.
- 박금순, 신영자, "감국의 첨가에 따른 감국 설기떡의 품질 특성과 기호도," Journal of
The East Asian of Dietary Life, 8(3), pp. 289-296, 1998.
- 박미자, "식이섬유를 함유한 기능성 증편의 이화학적, 관능적 특성과 저장중 품질 특성,"
서울여자대학교, 박사학위논문, 1998.
- 서은주, "증편의 품질에 영향을 미치는 제조조건", 부산 수산대학교 대학원 석사학위
논문, 1990.
- 신광숙, 우경자, "콩 첨가 증편의 Dextran과 내부구조에 관한 연구," Journal of East
Asian Soc. Dietary Life, 11(2). 2001.
- 이부용, "세계 대두 가공산업 현황," 식품 기술, 대두의 생물활성 물질 연구, 개발 및 응용,
14(3), pp. 94-102, 2001.
- 이연숙, 강창임, "Cysteamine에 의해 유도된 십이지장 궤양 회귀의 체내 질소대사에
대한 단백질과 탄수화물 가수분해물의 섭취 효과," 한국영양학회지, 27(7),

pp.699-708, 1994.

- 이연숙, 박영희, 오주환, 김태중, 이현수, "고지방식을 섭취한 흰쥐의 체내지질함량에 대한 단백질 가수분해물의 섭취 효과," 한국영양학회지, 30(6), pp.614-621, 1997.
- 이옥희, "증편 제조에 관한 조리과학적 연구", 세종대학교 석사학위논문, 1983.
- 우경자, 노정옥, "떡류의 영양학적 조명," 식품산업과 영양, 8(1), pp.64-73, 2003.
- 이종미, "제조 방법에 따른 증편의 특성", 한국 문화연구원 논총, pp. 209-247, 1988.
- 임영희, 김미원, 김애정, 김명희, "오징어 먹물 첨가량에 따른 떡물떡의 기호도 및 품질 특성," Journal of The east Asian of Dietary Life, 9(4), pp. 468-474, 1999.
- 유진현, "가래떡 제조의 최적화 및 빙일 첨가 기능성 가래떡에 관한 연구," 경기대학교, 박사학위 논문, 2004.
- 장윤희, "백복령 가루 첨가량과 저장 기간에 따른 설기떡의 품질 특성," 동아시아 식생활학회지, 13(4), pp. 318-325, 2003.
- 조정순, 최미용, 장윤희, "표고버섯 가루의 첨가 함량에 따른 설기떡의 품질 특성," Journal of The east Asian of Dietary Life, 12(1), pp. 55-64, 2002.
- 조윤희, 우경자, 홍성야, "증편 제조에 관한 연구 1(표준화에 관하여) 한국 조리과학회지", 10(4), pp. 322-328, 1994
- 조홍연, "기능성 식품, 한국산업 미생물 학회지," 8(2), pp.44-51, 1995.
- 정수현, 박양자, "분리대두단백질 섭취와 염분 제한이 streptozotocin으로 유도된 당뇨 흰쥐의 혈청지질 수준 및 신장 기능에 미치는 영향," Journal of the East Asian Society Dietary Life, 11(5), 2001.
- 정현숙, "흑미 첨가량 및 수침 상태에 따른 백설기의 물리 특성," Journal of The east Asian of Dietary Life, 9(3), pp. 370-375, 2002.
- 정진영, 최민희, 황정현, 정해정, "과프리카즙을 첨가한 증편의 품질 특성," J Korean Soc food Sci Nutr, 34(4), pp. 869-874, 2004.
- 채수규, "식품분석법," 서울, 지구문화사, pp.221-224, 1998.
- 최미자, 조현주, "콩단백질과 이소플라본이 성장기 암컷 쥐의 골밀도에 미치는 영향," 36(4), pp. 359-367, 2003.
- 최미용, 조정순, 장윤희, "유화제와 효소 첨가가 설기떡 저장 중 품질 특성에 미치는 영향," 동아시아 식생활학회지, 13(3), pp. 197-215.,2003.

한재숙, "한국병과류의 조리과학적 연구, II 증편의 중심으로", 영남대학교자원 문제 연구소, 3, pp. 113-121, 1984.

한명규, "건강 기능성 식품으로서 대두 성분의 기능에 대한 고찰." 용인대학교 논문집, 20, p.234, 2002.

황혜전, "떡 상품의 대중화를 위한 이용 실태 파악과 인지도 조사," 세종대학교, 석사학위 논문, 2004.

홍진숙, 김명애, "뽕은 맛 농축액을 첨가한 인절미의 품질 특성," Journal of Korean Soc food Sci Nutr, 34(8), pp. 1232-1238, 2005.

Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME. "Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids". N Engl J Med, 333, pp. 276-282, 1995.

A.O.A.C., Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. USA, 1995.

Barnes S. "Evolution of the health benefits of soy isoflavones." Proc Soc Exp Biol Med ,217, pp.386-392, 1998.

Brantle V, Teshemacher H, Henschen A, "Novel Opioid Peptides derived from Casein(β -casomorphins)," Hoppe-Seyler's Z., Physiol. Chem., 360, pp. 1211-1256, 1979.

Bernardi Don LS, Pilosof AMR, Bartholomai GB, "Enzymatic modification of soy protein concentrates by fungal and bacterial proteases," Journal of American Oil Chemists Society, 68, pp. 102-105, 1991.

Brazel US, Massey LK, "Excess dietary protein can adversely affect bone. Journal of Nutrition," 128, pp.935-937, 1998.

Campbell AM, Penfield MP, Griwsold RM, "Evaluating food by objective methods, The experimental study of food," 2nd ed. Houghton Mifflin Co. : Dallas, Tx, p.475, 1979.

Cairns P, Anson KJI, Morris VJ, "The effect of added sugars on the retrogradation of sheat starch gel by X-ray diffraction," Food Hydrocolloids, 5, p.151, 1991.

- Chen HM, Muramoto K, Ymauch F, "Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β -conglycinin," *Journal of Agricultural and food chemistry*, 43, pp. 60–567, 1995.
- Chobert JM, Sitohy MZ., Whitaker JH, "Solubility and emulsifying properties of casein modified enzymatically by *Staphylococcus aureus* V8 protease," *Journal of Agricultural and food chemistry*, 36, pp.220–224, 1998.
- Cloke KD. Davis EA, Gordon J, "Volume measurements calculated by several methods using cross-sectional tracings of cake," *Cereal Chemistry*, 61(4), p. 375, 1984.
- Deshpands SS, Sathes SK, Rangnekar P.D., Salunkne DK., "Functional properties of modified black gram starch,"*Journal of Food Science*. 47, p. 1528, 1982.
- Fring Cs, Dumm RT, "A colorimetric method for determination of serum lipids based on the sulfphophovanillin reaction," *American Journal of Clinical Pathol*, 53, pp. 89–91, 1970.
- Giese J, "Proteins as ingredients: types, functions, applications," *Food Technology*, 48(10), pp.50–60, 1994.
- Hini Y. Kitamura, Kuge, "Effect of lipid on the retrogradation of cooked rice," *Cereal Chemistry*, 67, p.7, 1990.
- Horton SD, Nicholas LG, White JS, "Predicting gelatinization temperatures of starch/sweetener systems for cake formulation by Differential Scanning Calorimetry, II. Evaluation and application of a model," *Cereal Foods World*, 42(10), p. 814, 1990.
- Kim JC., Ruitre DD, "Bread form snon-wheat flour', *Food Technology*, 22, pp.867–872, 1968.
- Klein KO. "Isoflavones, soy-based infant formulas, and relevance to endocrine function." *Nutr Rev*, 56, pp. 193–204, 1998.
- Jesus Periago M, Luisa Vidal M, Ros G, Rincon F, Martinez C, Lopez G, Rodrigo J, Martinez I, "Influence of enzymatic treatment on the nutritional and functional properties of pea flour, *Food Chemistry*, 63(1), pp. 71–78, 1998.

- Lee YS, Jang SY, Kim KO. "Effects of soy isoflavone intake on nitrite content and antioxidant enzyme activities in male rats fed high-fat diet." *Korean J Nutr*, 38(2), pp.89-95, 2005.
- Lee S.Y, Lee SG, Kim KJ, Kwon LB, "Effect of alum on the physiochemical properties," *Korea Journal of Food Science Technology*, 25, p. 355, 1993.
- Lin PY , Czuchajowska Z, Pomeranz Y, "Enzyme-resistant starch in yellow layer cake," *Cereal Chemistry*, 71(1), p. 71, 1994.
- Li Z, Alli I, Kermasha S, "Spices and seasonings: hydrolyzed proteins, symposium on food ingredients-applications, status and safety," *Institute of Food Science and Technology, Singapore*, pp. 27-29, 1989.
- Nielsen MA, Summer AK, Whalley LL, "Fortification of pasta with pea flour and air-classified pea protein concentration." *Cereal Chemistry*, 57, pp. 203-206, 1980.
- Maruyama S, Nogucci T, "Angiotenin I-converting Enzyme Inhibitor Derived from an enzymatic hydrolysate of casein," *Agri. Biol. Chem.*, 49, pp. 405-409, 1985.
- Mazess RB, Matger W, "Bone mineral content of North Alaskan Eskimos," *Am J Clin Nutr*, 27, pp. 916-925, 1974.
- Mcwilliams, "Foods : Experimental perspectives," 2nd. by Macmillan Publishing Company, pp. 80-81, 1993.
- Medical DG, Gilles KA, "Wheat starch 1. comparison of physiological properties," *Cereal Chem*, 42, p.558, 1965.
- Moteiro PV, Prakash V, "Functional properties of homogeneous protein fractions from peanuts." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, pp. 274-278, 1994.
- Park JW, Park HL, Song JC, "Suppression effect of maltitol on retrogradation of Korean Rice Cake," *Journal of Korean Soc. Food Sci. Nutr*, 23(2), p.175, 1993.
- Potter SM. "Soy protein and serum lipids." *Curr Opin Lipidol*, 7 pp.260-264, 1996.

- Potter SM, Baum JA, Teng H, Stillman RJ, Shay NF, Erdman JW. "Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women." *Am J Clin Nutr* 68, pp.1375s-1379s, 1998.
- Rhan KJ, Brewer MS "Purification and identification of interacting components in a wheat starch-soy protein system, *Food chemistry*, 89, pp. 109-124, 2005.
- Rodrdanz E, Ohler S, Tran-Thi QH, Kahl R. "The phytoestrogen daidzein affects the antioxidant enzyme system of rat hepatoma H4IIE cells." *J Nutr* 132 , pp.370-375, 2002.
- Sato R, Nogucci T, "Casein phosphopeptide(CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine," *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 32, pp. 67-76, 1986.
- Schoch TJ, "Swelling power and solubility of granular starches, *Methods in carbohydrate chemistry*" whister, RL (ed) Academic Press. New York, 4, pp. 106-108, 1964.
- Sellmeyer DE, Stone KL, "A high ratio of dietary animal to vegetable protein increases the rate of bone loss and the risk of fracture in postmenopausal women, *American Journal of Clinic Nutrition*," 73, pp. 118-122, 2001.
- Shilba K, Negishi, Y. Okada K, Nagao, S, "Chemical change during sponge-dough fermentation," *Cereal Chemistry*, 67(4), pp.350-355, 1990.
- SPSS for Windows Release 10.0[Computer Software], Chiago: SPSS, 2000.
- Sugano M, Yamade Y, "The hypocholesterolemic action of the undigested traction of soy bean protein in rats," *Atherosclerosis*, 72, pp. 15-22, 1998.
- Tonita M, Bellamy W, Kawasw K, "Protein antibacterial peptides generated by pepsin digestion of vivine Lactoferrin," *Journal of Agricultural and food chemistry*, 43, pp. 574-578, 1995.
- Uruakpa FO, Arntfield SD, "Surface hydorphobicity of commercial canola proteins mixed with k-carrageenan or guar gum," *Food Chemisty*, 95,

pp. 255–263, 2006.

Vijayalakshmi A, Lemieux L, Amiot J, High performance size exclusion liquid chromatography of small molecular weight peptides from protein hydrolysates using methanol as a mobile phase additive. *J. Liq. Chromatogr.*, 9, pp. 3559–3576, 1986.

Wei H, Cai Q, Rahn R. "Inhibition of UV light and Fenton reaction induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein." *Carcinogenesis* 17, pp. 73–77, 1996.

Yoon GA, Hwang HJ, "Effect of soy protein/animal protein ratio on calcium metabolism of the rat," *Nutrition*, 22, pp.414–418, 2006.

Zeme IMB, "Calcium utilization: effect of varying level and source of dietary protein," *American Journal of Clininc Nutrition*. pp. 880–883, 1988.