

말쥐치육 단백질의 효소적 가수분해물을 이용한 Plastein의 합성 및 그 물성

I. 말쥐치육 단백질의 가수분해 조건 및 Plastein의 합성조건

김 세 권 · 이 응 호*
부산수산대학 응용화학과, *부산수산대학 식품공학과
(1987년 6월 9일 수리)

Synthesis and Functional Properties of Plasteins from the Enzymatic Hydrolysates of Filefish Protein

1. The Conditions of Protein Hydrolysis and Plastein Synthesis from Peptic Hydrolysate

Se-Kwon KIM and Eung-Ho LEE*

Department of Applied Chemistry, National Fisheries University of Pusan, Pusan, 608 Korea

*Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Pusan, 608 Korea

(Received June 9, 1987)

In order to exploit a new type of food source, enzymatically modified hydrolysates and the plasteins synthesized from the filefish (*Novoden modestus*) protein hydrolysates by plastein reaction were investigated. The optimum conditions for enzymatic hydrolysis of filefish muscle and synthesis of plasteins using papain, pepsin, α -chymotrypsin and protease (from *Streptomyces griseus*) were determined.

The optimum temperature and pH for the hydrolysis of filefish muscle by papain, pepsin, α -chymotrypsin and protease were 50°C, 40°C, 55°C and 50°C; and 6, 2, 7 and 8, respectively. Those for incubation time and enzyme concentration were 4hr, 0.5% for papain and protease, 24hrs 1.0% for pepsin and α -chymotrypsin. The pepsin was found to be more reasonable substrate for plastein synthesis from the economic point of view.

The enzyme-induced plastein reaction could be optimized, namely, pH 4 for pepsin, pH 7 for α -chymotrypsin, pH 6 for papain and protease; substrate concentration 40% for pepsin, α -chymotrypsin and protease, 50% for papain; the time of incubation, 24hr; enzyme/substrate ratio, 1 : 100(W/V); incubation temperature, 50°C.

서 론

FAO에 의하면 1980년의 세계 단백질 수요량은 4,200만톤이며, 2000년에는 6,500만톤으로 증가될 것으로 예상되어 그 부족량은 2,000만톤에 달할 것

이라고 보고하고 있다¹⁾. 이 단백질 부족현상은 선진국을 제외하고는 거의 전세계적으로 일어나고 있으며, 아시아 및 아프리카 지역의 kwashiokor 병과 같은 영양장애 현상은 성장기 아동에게 심각한 문제로 대두되고 있다.

말쥐치육 단백질의 효소적 가수분해물을 이용한 Plastein의 합성 및 그 물성

UN Protein Advisory Group(PAG)은 단백질원의 보급을 위하여 가격이 저렴하고, 영양가가 풍부한 새로운 단백질원의 개발과 실제로 식량으로 식품에 첨가되었을 때 영향을 미치는 기능적 성질에 관한 연구를 우선적으로 제안한 바 있다²⁾.

따라서 최근 새로운 단백질 자원의 개발 또는 기존 단백질원의 유효이용이 중요한 과제가 되고 있다. 그러나 식품학적 입장에서 보면 새로 개발된 단백질원이 영양과 안전성에 문제가 없다하더라도 산업적 실용성에 있어서는 문제가 되는 경우가 많다³⁾.

그 한 예로서 농축어류단백질(FPC)을 들 수 있다. FPC는 1950년대 부터 국제연합의 후원으로 개발된 영양학적으로 우수한 단백질이지만 친수성과 가공적성(加工適性)에 문제가 있어 이용에 제약을 받고 있기 때문에 산업적 생산에 성공하지 못한것 중의 하나이다⁴⁾.

따라서 최근에는 기능성이 좋은 여러가지 개량 FPC의 제조에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다^{5)~11)}. 이들 중 대표적인 것이 어류단백질을 단백질 분해효소로 처리한 가수분해물을 식량소재로서 이용하려는 시도이다. 단백질효소 가수분해물은 식품소재로서의 물성이 우수하기 때문에 FPC를 분해효소로 가공화하여 식품으로서 이용도를 높이라는 많은 연구보고가 있다^{5),12),13)}.

Nouguchi 등¹⁴⁾은 FPC를 단백질분해효소로 처리하여 정미증진(呈味増進)을 위한 최적조건을 검토하여 L-glutamic acid 이외의 감칠맛성분으로서 glutamic acid oligopeptide를 분리동정한 바 있다. 그러나 FPC의 효소가수분해물은 물성에 있어서는 우수하나 쓴맛 때문에 이용상 문제가 되고 있다. 단백질 효소 분해물의 쓴맛 현상은 옛부터 알려져 있고, 쓴맛의 본체는 효소분해에 의해 생성된 peptide라고 알려져 있다¹⁵⁾. Fujimaki 등¹⁶⁾은 대두단백질의 pepsin 가수분해물에서 쓴맛 peptide를 분리 동정하였으며, Matoba 등¹⁷⁾은 카제인의 bacterial proteinase 분해물로부터 쓴맛 peptide를 분리하여 그 구조를 결정하였다.

Umetsu 와 Ichishima¹⁸⁾는 FPC의 pepsin 가수분해물을 wheat carboxypeptidase로 가수분해 시킴으로써 쓴맛이 낮아 졌다고 하였다. 또한 Arai 등¹⁹⁾은 단백질 가수분해물의 재가수분해에 의한 쓴맛 제거의 반대 개념으로 plastein 반응을 착안하였다. Plastein 반응에 가장 적합한 기질은 효소로 적당히 분해된 단백질 가수분해물이어야 한다²⁰⁾.

Fujimaki 등²¹⁾은 대두단백질의 pepsin 가수분해물

로부터 α -chymotrypsin에 의한 plastein 반응 조건을 연구한 결과, 반응시간에 따라 TCA 불용분이 증가하였으며, 쓴맛도 상당히 감소하였다고 보고하였다.

현재 세계 총어획고중 기능성에 문제가 있어 약 1/3정도가 비식용 원료로 이용되고 있는 실정이다⁴⁾. 따라서 비식용 어류나 가공폐기물을 효율적으로 이용하기 위한 방안으로서 plastein 반응을 이용하여 이들의 물성을 개량하여 식량화하는 것이 바람직할 것으로 사료된다. 그러나 어류단백질의 물성개량에 plastein 반응을 이용한 연구보고는 찾아 볼 수 없다.

본 연구는 연간 약 20만톤이 어획되는 다뤄성 어류인 말쥐치를 고도이용할 목적으로 pepsin, α -chymotrypsin, papain 및 protease를 이용하여 말쥐치육 단백질의 가수분해 조건 및 plastein 합성 조건을 구명하였다.

재료 및 방법

1. 시료어

본 실험에 사용된 말쥐치(*Novodon modestus* Günther; 체중 98~116g, 체장 20.5~25.5cm)는 부산공동어시장에서 구입하여 fillet로한 육을 폴리에틸렌 비닐봉지에 넣어 -30°C 동결고에 저장하여 두고 실험에 사용하였다.

2. 분말단백질의 조제

마쇄한 시료육에 대하여 10배량의 ethylalcohol을 삼구플라스크에 담아 수조상에서 80°C로 가열하고, 여기에 마쇄한 시료육을 넣어 교반하면서 처리하였다. Lee 등²²⁾의 방법에 따라 5분간씩의 회분식 추출을 4회 반복한 후, 동양여지 No.2를 간 Büchner funnel 상에서 감압여과하고 잔사를 건조분쇄하여 분말단백질 시료로 하였다.

2. 가수분해물의 조제

1) 가수분해 조건

말쥐치육 단백질의 가수분해조건 검토는 金 등²³⁾의 방법을 수정하여 다음과 같이 하였다. 즉 해동한 마쇄육 100g 과 물 60g을 균질기(Ace homogenizer AM-6)로 균질화한 다음 10g씩 가수분해용 시험관에 넣었다. 여기에 마쇄육량에 대하여 일정비율의 단백질 분해효소를 함유한 물 4g을 가하여 마쇄육

량과 물의 혼합비가 1:1이 되도록 하여 진탕수조상에서 가수분해시켰다. 이 때 첨가된 효소는 pepsin (1:10,000 Nakarai Chemicals LTD), α -chymotrypsin (51 Unit/mg solid, from Bovin Pancrease type II, Sigma), papain (19 Unit/mg solid, from papaya latex, Sigma), protease (5.6 Unit/mg solid, from *Streptomyces griceus*, Sigma)였으며, pH는 0.1 N HCl 및 0.1 N NaOH로 조절하였다. 분해완료후 98°C의 물중탕에서 15분간 열처리하여 효소를 불활성화시킨 다음 20% 삼염화아세트산(TCA) 10 ml를 가하여 원심분리(4,000 rpm, 10 min)한 후, 상층액의 가용성 질소를 정량하였다. 가수분해도는 다음과 같이 나타내었다.

$$\text{가수분해도} = \frac{\text{가용성 질소}}{\text{총질소}} \times 100$$

이때 가용성 질소는 10% TCA 용액에 침전되지 않은 질소로 하였다.

2) 가수분해물의 제조

합성기질로 사용할 가수분해물의 제조는 Yamashita 등²⁴⁾ 및 Edward와 Ship²⁵⁾의 방법에 따랐다.

마쇄육 16 kg에 물 13 l를 가하여 균질화한 다음 2 N HCl 과 물로 pH 2.0으로 조절하였다. 이때 pepsin 16 g을 소량의 물에 용해시킨 후, 효소와 기질의 비가 1:100이 되도록 기질용액에 서서히 가하여 40°C의 진탕항온수조(60 strokes/min, Philip harris limited Model SS40)에서 24시간 가수분해하였다. 가수분해 후 1 N NaOH로 pH 7.0으로 조절하였으며, 또한 잔존해 있는 pepsin을 불활성화하기 위해 2시간동안 실온에서 교반하였다.

가수분해물은 12,000 g에서 10분간 원심분리하였으며, 그 상층액의 유리지방을 제거하기 위해 whatman No. 1 여지로 여과한 후 동결건조(DURA-DRY corrossion resistant Freezer-Dryer, F. T. S. System Inc.)하였다. 동결건조된 가수분해물은 용기에 넣어 밀폐하여 5°C에 저장하여 두고 실험에 사용하였다.

가수분해도의 측정은 Yamashita 등²⁴⁾의 방법에 따랐다. 가수분해 과정중 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24, 및 48시간 후 각각 50 ml를 취하여 여기에 20% TCA 용액 50 ml씩을 가하여 원심분리(4,000 rpm, 10 min)한 다음 Kjeldahl 법으로 상층액의 질소를 정량하였다.

3) Peptide 사슬의 길이 측정

Kang과 Rice²⁶⁾의 방법에 따라 가수분해 시간별로

20 ml씩 분취하여 원심분리(4,000 rpm, 10 min)하였다. 상층액은 여지(Whatman No. 1)로 여과하여 증류수로 100 ml로 하였다. 이 중 1 ml씩 분취하여 총 가용성 질소 및 α -amino 태질소를 정량하였다. Peptide 사슬길이는 다음과 같이 측정하였다.

$$\frac{\mu\text{g } \alpha\text{-amino N}}{\mu\text{g soluble N}} = \frac{1}{\text{Average peptide chain length}}$$

여기서 α -amino 태질소는 Spies 등²⁷⁾의 동염법에 따라 비색정량하였다.

4. Plastein 합성

1) 반응조건

Montecalvo 등²⁸⁾의 방법에 따라 동결건조한 단백질 가수분해물 8 g에 증류수 20 ml를 가하여 기질농도가 40%(W/V)가 되게 하였다. 2 N HCl 으르 pH 5로 조절한 후, pepsin 80 mg을 가하여 서서히 혼합하였다. 이들 시료는 37°C에서 24시간 진탕항온수조에서 반응시켰다. 그리고 20% TCA 용액 20 ml를 가한 다음, plastein을 침전시키기 위하여 유리봉으로 교반한 후에 원심분리(5,000 rpm, 15 min)하였다.

TCA 불용분을 취하여 동결건조하였다. 동결건조한 TCA 불용분은 비탁법에 의하여 plastein 생성량을 검토하기 위한 표준곡선을 작성하였다. 이 때 효소를 가하지 않은 대조구도 만들었다.

2) Plastein 반응에 미치는 영향인자

pH: 동결건조한 가수분해물 2 g에 증류수와 pH 조절을 위해 가한 HCl 및 NaOH 첨가량을 합한 5 ml를 가하여 기질농도가 40%(W/V)가 되도록 용해시켰다. 0.5 N HCl과 0.5 N NaOH로 pH를 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10까지 조절하였다. 이때 기질농도의 pH를 조절하기 위해 사용된 HCl 또는 NaOH 양은 기질농도에 영향을 주지 않도록 예비실험을 통하여 결정하였다.

각 효소 20 mg을 기질용액에 첨가하여 서서히 혼합한 후 37°C에서 6시간동안 진탕항온수조에서 반응시켰다. 반응완료 후 반응액에 20% TCA 용액 5 ml를 가하여 균일하게 혼합한 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 침전물에 10% TCA 용액 10 ml를 가하여 1,000 rpm에서 3분 동안 균일화한 후 0.2 ml를 분취하여 10% TCA 용액 20 ml에 혼합된 용액을 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

기질농도: 동결건조한 가수분해물을 1 g, 1.5 g, 2 g, 2.5 g 및 3.5 g을 50 ml beaker에 취하여 일정량의 증류수를 가한 다음, 1 N HCl과 1 N NaOH로,

pepsin의 경우 pH 4, α -chymotrypsin pH 7, papain과 protease는 pH 6으로 조절하면서, 기질농도가 20%, 30%, 40%, 50% 및 60%가 되도록 증류수로 조절한 후 효소를 기질농도와의 비가 1:100이 되도록 각각 가한 다음 37°C에서 6시간 동안 진탕항온수조에서 반응시켰다. 흡광도측정은 pH 영향조건 실험에서와 같은 방법으로 하였다.

반응시간: 가수분해물 2.0g(papain의 경우 2.5g)씩을 50 ml beaker에 취하여 기질농도 조건에서와 같은 방법으로 pH를 조절하면서 기질농도가 40%(W/V)(papain의 경우 50%)가 되도록 증류수를 가한 다음, 각 효소를 기질과의 농도비가 1:100이 되도록 가하여 서서히 혼합한 후 37°C에서 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 48시간 동안 진탕항온수조에서 각각 반응시켰다. 흡광도는 pH 조건에서와 같은 방법으로 측정하였다.

효소농도: 시간조건에서와 같은 방법으로 기질용액을 만든 다음, 여기에 효소를 각각 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 및 1.5%가 되도록 첨가하여 혼합한 후, 37°C에서 24시간 동안 진탕항온수조에서 반응시킨 후 plastein 생성량을 pH 조건과 같은 방법으로 흡광도를 측정하였다.

온도: 시간조건과 같은 방법으로 기질용액을 만들어, 여기에 효소를 각각 1%씩 가하여 혼합한 후, 진탕항온수조에서 온도를 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C에서 각 시료를 24시간 반응시킨 후 plastein 생성량을 pH 조건에서와 같은 방법으로 흡광도를 측정하였다.

가수분해도: 가수분해도가 각각 다른 가수분해물 시료를 시간조건과 같은 방법으로 기질용액을 만들어 여기에 각 효소를 1%씩 가하여 50°C에서 24시간 반응시킨 후 plastein 생성량을 pH 조건과 같은 방법으로 흡광도를 측정하였다.

3) Plastein 정량

Plastein 정량은 Yamashita 등²⁴⁾ 및 Hofsten과 Lalasidis²⁹⁾의 방법에 따랐다. 즉, plastein 합성반응 중 생성된 10% TCA 침전물의 증가량을 구하여 조건을 결정하였다.

비탁법(Turbidometric assay)에 의한 plastein 정량은 동결건조한 plastein 100 mg을 10% TCA 용액 50 ml를 넣어 균질화하여 현탁액을 만들었다. 표준 plastein 용액은 10% TCA 용액으로 연속적으로 희석하여 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 1.0 mg/ml 농도로 만들었다. 각 표준용액을 vortex mixer 상에서 2분

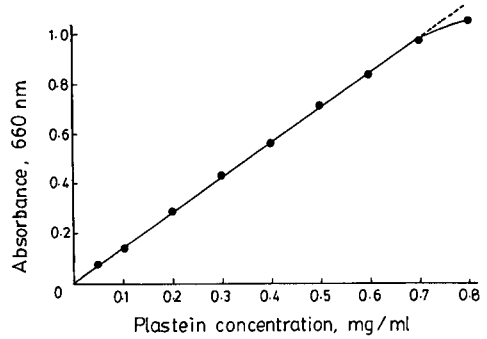


Fig. 1. Standard curve on absorbance vs. plastein concentration for turbidometric plastein assay.

간씩 혼합하여 UV/VIS Spectrometer(Pye Unicon Model 8610)를 사용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선(Fig. 1)을 만들었다. 이때 plastein 시료에 대한 흡광값은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Plastein productivity} = \frac{\text{Plastein abs. at } 660 \text{ nm}}{\text{Substrate abs. at } 660 \text{ nm}}$$

결과 및 고찰

1. 가수분해물의 조제

1) 가수분해에 영향하는 인자

온도: 말쥐치 마쇄육의 혼합물에 육량에 대하여 0.1%의 효소를 첨가하여 각 온도별로 6시간 가수분해시킨 결과는 Fig. 2와 같다. 자가소화의 경우는 60°C 부근에서 가장 높은 소화율을 보였으나, 효소를 첨가하였을 때는 pepsin 40°C, α -chymotrypsin 55°C 그리고 papain과 protease는 50°C 부근에서 높은 분해율을 보였다. Papain 및 protease가 pepsin 및

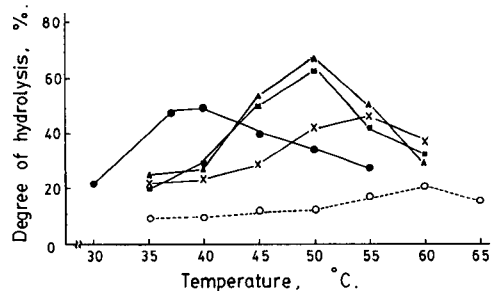


Fig. 2. Effect of incubation temperature on the hydrolysis of filefish muscle with 0.1% of four enzymes for 6 hours. (●), pepsin; (×), α -chymotrypsin; (▲), papain; (■), protease.

α -chymotrypsin 보다 가수분해도가 높았다.

Hale¹³⁾은 어류단백질을 상업적 효소로 가수분해시 최적온도는 protease 50°C, pepsin 40°C 및 papain 60°C 부근이라고 보고하였는데 이 결과는 papain을 제외하고 본 실험의 결과와 일치하였다. 그러나 金 등²³⁾은 정어리 배육(背肉)과 물의 혼합물에 육중량에 대하여 0.05%의 pronase, bromelain, protease 및 ficin을 첨가하여 4시간 가수분해시킨 결과, 모든 효소가 55°C 부근에서 가장 높았고, 효소를 첨가하지 않은 대조구는 45°C 부근에서 가수분해도가 높았다고 하였는데, 대조구에 있어서 본 실험의 결과와는 차이가 있었다.

Archer 등³⁰⁾은 monzyme 으로 FPC를 가수분해하였을 때 60°C에서 최대활성을 보였다고 하였고, 韓 등³¹⁾은 정어리를 통채로 마쇄한 육에 bromelain, papain, protease를 첨가한 것은 55°C 부근에서 최대 활성을 나타내었다고 하였다.

시간 : 효소농도를 0.1%로 하고, pepsin 40°C, α -chymotrypsin 55°C, papain과 protease는 50°C에서 마쇄육을 가수분해시키되 가수분해시간을 달리하였을 때의 가수분해도 및 55°C에서의 대조구의 가수분해도를 Fig.3에 나타내었다. 자가소화인 경우 가수분해 6시간까지 다소 가수분해도가 증가하였으

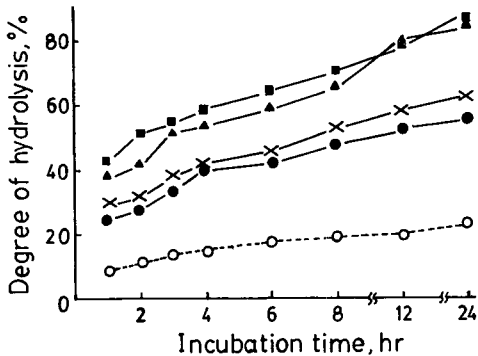


Fig. 3. Effect of incubation time on the hydrolysis of the filefish muscle with 0.1% of enzymes. Incubation temperature: 40°C for pepsin (●), 50°C for protease (■), and papain (▲), 55°C for α -chymotrypsin (×).

나, 그 이상으로 가수분해시간이 증가하여도 가수분해도에는 큰 차이가 없었다. 효소를 첨가한 시료는 4시간까지 가수분해도가 높게 증가하였으나 4시간 이후에는 서서히 증가하는 경향을 보였으며, 온도 조건에서와 마찬가지로 papain과 protease가 pepsin과 α -chymotrypsin에 비해 비교적 높은 경향이있

다. 金 등²³⁾은 정어리의 자가소화에 의한 분해율은 5시간 후에 최고값에 도달하였으나, 0.05%의 효소를 첨가한 경우에는 효소에 의한 가수분해와 육조직 내의 효소에 의한 자가소화의 복합적인 가수분해율이 최고 값을 나타낸다고 하였다. 그리고 가하여진 효소 단독에 의한 가수분해율로 보면 0.05%의 저농도에서는 papain이 효과적이었으며, pronase-P와 protease는 가수분해 시간에 거의 영향을 받지 않았다고 보고하였다.

pH : 효소농도가 0.1%되게 가하고 가수분해도 및 시간을 앞의 결과에 따라 최적조건으로 하여 pH만을 변화시켰을 때의 가수분해도를 Fig.4에 나타내었다. Fig.4에서 볼 수 있는 바와 같이 pepsin은 pH 2,

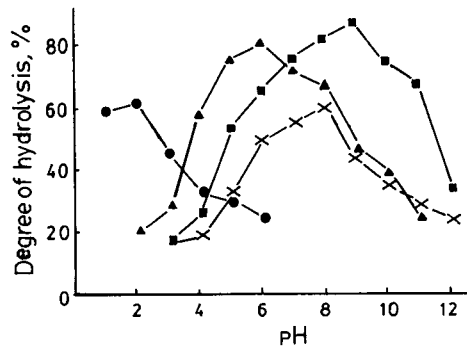


Fig. 4. Effect of pH on the hydrolysis of the filefish muscle with 0.1% of enzyme for 24 hrs. Incubation temp., 40°C for pepsin (●), 50°C for protease (■) and papain (▲), 55°C for α -chymotrypsin (×).

α -chymotrypsin pH 8, protease는 pH 9에서 각각 최대 가수분해도를 나타내었다. 이같은 결과는 Hale¹³⁾이 보고한 어류단백질의 가수분해시 pepsin pH 2, papain pH 5~6, protease pH 7~8에서 최대 활성을 나타내었다는 결과와 일치하였다.

효소농도 : 가수분해의 온도, 시간 및 pH를 앞의 결과에 따라 최적조건으로 하고 첨가한 효소농도를 달리하였을 때의 가수분해도를 Fig.5에 나타내었다. Fig.5에 나타난 바와 같이 papain과 protease는 첨가효소농도가 0.3%, 그리고 pepsin과 α -chymotrypsin의 경우는 0.5%까지는 효소농도가 증가함에 따라 가수분해도가 비교적 급속히 증가하다가 그 이상의 농도에서는 완만히 증가하였으나 1%이상에서는 거의 일정하였다. Papain과 protease는 0.05%의 저농도에서 가수분해도가 64%이상으로 pepsin과 α -chymotrypsin의 30%정도에 비해 월등히 높았다.

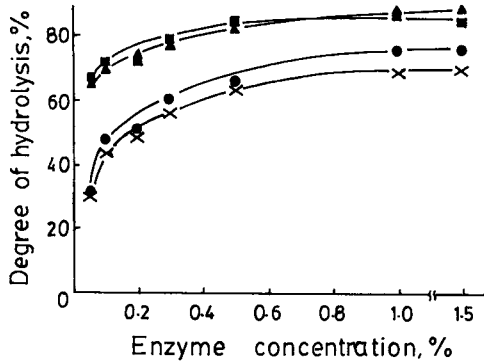


Fig. 5. Effect of enzyme concentration on the hydrolysis of the filefish muscle with enzymes for 24 hrs. Incubation temp. and pH: 40°C and pH 2 for pepsin(●), 50°C and pH 9 for protease(■), 55°C and pH 6 for papain(▲), 55°C and pH 8 for α-chymotrypsin(×).

金 등²³⁾은 55°C에서 4시간 가수분해시켜서 정어리 육량에 대한 첨가효소의 농도를 달리하였을 때, 기질에 대한 효소의 농도가 증가함에 따라 protease와 pepsin과는 거의 같은 정도의 분해율을 나타내었으며 육량에 대해 0.2%일 때 분해율은 거의 90%에 달했다고 하였다.

Onishi와 Higashi³²⁾은 어류액화단백질의 제조에 0.2% pronase-P를 사용하였으며, Iseki 등³³⁾은 육량에 대한 효소농도는 0.3%가 적당하다고 하였고, Quaglia와 Orban³⁴⁾은 상업적 효소를 이용 정어리 단백질의 가수분해시 효소농도가 1~2% 범위에서 60~70%의 단백질이 회수되었다고 보고한 바 있다.

이상의 결과로부터 plastein 반응을 위한 기질로서 이용되는 말쥐치육 단백질의 가수분해물을 제조하는 데는 실험에 사용한 4종의 효소중 가격이 가장 저렴한 pepsin을 시료육에 1%첨가하는 것이 적합하다고 판단되었다.

2) 가수분해물의 조제

가수분해조건에서 사용된 4종의 효소중에서 경제성을 고려하여 plastein 합성기질로 사용하기 위한 말쥐치육 가수분해물 제조에 pepsin을 택하였다. 말쥐치 마쇄육과 혼합물의 육량에 대하여 pepsin을 1%가하고 pH를 2로 조절하여 시간변화에 따른 가수분해도를 Table 1에 나타내었다. Table 1에서 볼 수 있는 바와 같이 가수분해시간이 길어짐에 따라 가수분해도가 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 12시간 이후에는 서서히 증가하여 24시간 가수분해시켰을 때

Table 1. Approximate degree of hydrolysis of filefish muscle by pepsin

Time of incubation (hr)	Degree of hydrolysis (%)*
1	28.0
2	37.2
4	49.4
8	58.5
12	64.8
18	68.9
24	73.2
48	76.6

$$* \text{Degree of hydrolysis} = \frac{10\% \text{ TCA soluble N}}{\text{Total N}} \times 100$$

73.2%였으며, 48시간 가수분해시켜도 24시간 분해시킨 것 보다 3%정도가 증가되었을 뿐이다. Montecalvo 등²⁸⁾은 분말가자미단백질을 1% pepsin으로 가수분해하였을 때 18시간 가수분해 후에는 가수분해도의 차이가 크지 않았고, 48시간 가수분해하였을 때 85.2%에 도달하였다고 보고하였다.

Pepsin으로 40°C에서 가수분해과정중 가수분해시간에 따른 동결건조 수율을 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Yields of hydrolysate after incubation at 40°C with pepsin

Time of hydrolysis (hr)	Amount of hydrolysate (g)*
1	1.57
2	1.78
4	1.96
8	2.36
12	2.99
18	3.14
24	3.63
48	3.85

* Weight of freeze-dried fraction

시료육 30g을 1시간 가수분해하였을 때 가수분해물은 1.57g이 회수되었으며, 24시간 및 48시간 가수분해시킨 가수분해물의 수율은 각각 3.63g 및 3.85g으로 큰 차이는 볼 수 없었다.

말쥐치육 단백질의 pepsin 가수분해과정중 평균 peptide 사슬길이에 대한 가수분해시간의 효과를 Table 3에 나타내었다. Table 3에서와 같이 peptide 사슬길이는 유리아미노질소 농도와는 반비례하였으며, 1시간 가수분해한 가수분해물의 평균 peptide 길이는 17.2아미노산 잔기였으나 24시간 후에는 6.2아미노산 잔기를 나타내었다. Hale¹³⁾은 pepsin(효소 :

Table 3. Effect of incubation time on the peptide chain size length during pepsin hydrolysis of the filefish muscle

Incubation time (hr)	Soluble N ($\mu\text{g/ml}$)	Amino-N ($\mu\text{g/ml}$)	$\frac{\text{Amino-N}}{\text{Soluble-N}} \times 100$	Est. peptide chain length*
1	753	43.7	5.8	17.2
2	1001	69.5	6.9	14.4
4	1328	128.9	9.7	10.3
8	1573	178.7	11.4	8.8
12	1743	202.6	12.7	7.9
18	1853	253.8	13.7	7.3
24	1969	317.5	16.1	6.2
48	2060	515.7	25.0	4.0

$$* \frac{\mu\text{g } \alpha\text{-amino-N}}{\mu\text{g soluble-N}} = \frac{1}{\text{average peptide chain length}}$$

기질=1:100)으로 FPC를 24시간 가수분해한 후 평균 peptide 사슬길이가 3.5아미노산 잔기였다고 하였고, Montecalvo 등²⁸⁾도 분말가자미단백질을 24시간 가수분해시켰을 때 peptide 사슬길이가 5.7아미노산 잔기였다고 보고한 바 있다. 이와 같은 효소에 의한 평균 peptide 사슬길이의 차이는 단백질 성분 조성 및 변성도가 효소에 의한 단백질분해속도 및 분해정도에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

2. Plastein 반응의 최적조건

1) pH의 영향

효소농도 1%, 기질농도 40%(W/V), 반응온도 37°C에서 pH만을 변화시켜 6시간동안 반응시켰을 때 pH 변화에 따른 plastein 생성량의 흡광도를 Fig. 6에 나타내었다. 효소를 이용한 plastein 합성반응을 위

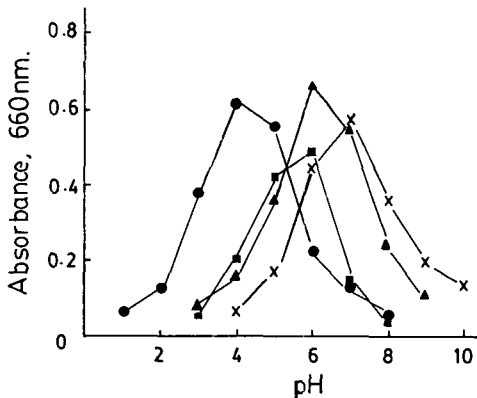


Fig. 6. Effect of pH on plastein production from peptic hydrolysate of filefish muscle using pepsin(●), α -chymotrypsin(×), protease(■) and papain(▲). Enzyme/substrate=1:100; substrate concentration=40%; temperature=37°C.

한 최적 pH는 pepsin과 α -chymotrypsin은 pH 4, pH 7이었으며, papain 및 protease는 모두 pH 6에서 plastein 생성량이 가장 높았다. Papain을 제외한 효소들의 가수분해의 최적 pH와 plastein 합성반응의 최적 pH는 서로 달랐으며, 가수분해의 최적 pH의 영역이 plastein 합성 최적 pH의 그것에 비해 비교적 폭이 넓은 것을 볼 수 있었는데, 이 같은 결과는 Yamashita 등³⁵⁾이 대두를 이용한 plastein 합성 수율과 pH와의 관계에 대하여 보고한 결과와 비슷한 경향을 보였다. Tauber³⁶⁾은 α -chymotrypsin에 대한 plastein 합성의 최적 pH는 7이었다고 하였으며, Yamashita 등³⁵⁾은 α -chymotrypsin과 pepsin의 경우, 각각 최적 pH가 5.5 및 5.0였다고 보고한 바 있으며, 본 실험의 결과와 Tauber³⁶⁾의 결과와는 비슷하였으나, Yamashita 등³⁵⁾의 결과와는 일치하지 않았다.

2) 기질농도의 영향

pH를 최적조건에 맞추고 효소농도 1%, 온도 37°C에서 기질농도만을 변화시켜 6시간 반응시킨 후 기질농도 변화에 따른 plastein 생성량의 흡광도를 측정된 결과는 Fig. 7과 같다. Fig. 7에서 볼 수 있는 바와 같이 plastein 합성을 위한 최적 기질농도는 papain의 경우의 50%를 제외하고 pepsin, α -chymotrypsin 및 protease는 모두 40%가 plastein 합성을 위한 최적조건이었다. 이와 같은 결과는 Fujimaki 등²⁶⁾ 및 Hofstein과 Lalasidis³⁴⁾의 연구결과와 일치하였다.

3) 시간의 영향

Pepsin과 α -chymotrypsin에 대해 pH를 각각 4와 7로, papain과 protease는 pH6으로 조절하고, 기질농도는 papain 50%, 다른 3종의 효소의 경우 40%

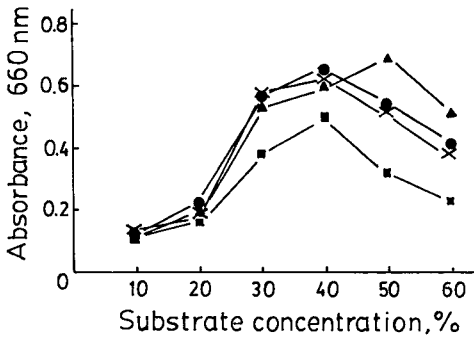


Fig. 7. Effect of substrate concentration on plastein production from peptic hydrolysate of filefish muscle. Enzyme/substrate=1:100, pH 4 for pepsin(●), pH 7 for α -chymotrypsin(×), pH 6 for protease(■) and papain(▲), temperature = 37°C.

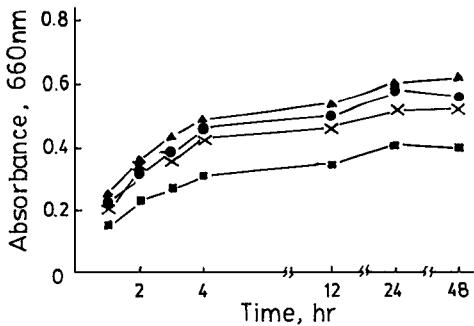


Fig. 8. Effect of incubation time on plastein production from peptic hydrolysate of filefish muscle. Enzyme/substrate=1:100; pH 4 for pepsin(●), pH 7 for α -chymotrypsin(×), pH 6 for protease(■), and papain(▲); substrate concentration=40% for pepsin, α -chymotrypsin and protease, 50% for papain; temperature = 37°C.

로 하고, 효소농도를 1%로 첨가하여 반응시간을 변화시켜 반응시간에 따른 plastein 생성량의 흡광도를 Fig. 8에 나타내었다. 4종의 효소 전부가 반응시간 4시간까지 plastein 생성량이 급격히 증가하였고, 4시간 이후부터 24시간까지는 서서히 증가하였으며, 24시간 이후는 증가하지 않았거나 오히려 감소하는 경향을 보였다. 이와 같은 결과는 plastein 복합체의 해리 또는 효소적 가수분해에 기인한 것으로 생각된다. Yamashita 등³⁷⁾ 및 Fujimaki 등³⁸⁾은 plastein이 완전히 회합하기 위해서는 24시간 항온처리기간이 허용되어야 한다고 제안하였다. 따라서 본 연구에서도 24시간 항온처리를 최적조건으로 하였다.

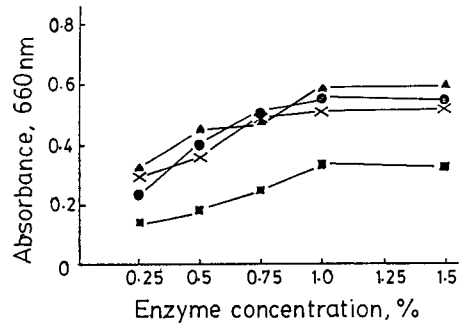


Fig. 9. Effect of enzyme concentration on plastein production from peptic hydrolysate of filefish muscle. pH 4 for pepsin(●), pH 7 for α -chymotrypsin(×), pH 6 for protease(■) and papain(▲); substrate concentration = 40% for pepsin, α -chymotrypsin and protease, 50% for papain; temperature = 37°C; incubation time = 24 hrs.

4) 효소농도의 영향

Pepsin 과 α -chymotrypsin 의 경우는 pH를 각각 4와 7로, papain 과 protease 는 6으로 조절하고, 기질농도는 papain 의 50%를 제외하고는 40%로 하여 효소농도를 달리하여 40°C에서 24시간 합성시켰을 때 plastein 생성량에 대한 효소농도의 영향을 Fig. 9에 나타내었다. 4종류의 효소 모두가 효소농도 1%까지는 plastein 생성량이 증가하였으나, 그 이상의 효소농도에서는 거의 일정한 값을 나타내었다. 따라서 plastein 형성 속도는 가한 효소량에 의존하는 것으로 볼 수 있다. Fujimaki 등³⁸⁾은 plastein 합성시 경제적인 면에서 효소와 기질의 비가 1 : 100이 좋다고 제의한 바 있다.

본 실험에서도 1%의 효소농도에서 24시간 항온처리하는 것이 가장 적합하다고 판단되었다.

5) 온도의 영향

pH를 pepsin 4, α -chymotrypsin 7 및 papain 과 protease 는 6으로 조절하고, 기질농도는 papain 50%, pepsin, α -chymotrypsin 및 protease 는 40%로 하고 효소농도를 1%로 하여 온도를 변화시켜 24시간 합성시켰을 때 plastein 생성량에 대한 온도의 영향을 Fig. 10에 나타내었다. 4종류의 효소가 모두 50°C까지는 plastein 생성량이 증가하였으나 그 이상의 온도에서는 차차 감소하는 경향을 보였다. Plastein 합성시 plastein 합성반응은 37°C에서 행하는 것이 일반화되어 있으나, 본 실험결과, 50°C가 plastein 합성에 최적온도임을 알 수 있었으며, 온도는 plastein

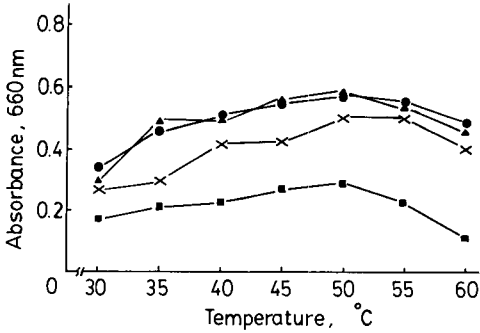


Fig. 10. Effect of incubation temperature on plastein production from peptic hydrolysate of filefish muscle using 1% enzyme. pH 4 for pepsin(●), pH 7 for α -chymotrypsin (×), pH 6 for protease(■) and papain (▲); substrate concentration = 40% for pepsin, α -chymotrypsin and protease, 50% for papain, incubation time = 24 hrs.

합성에 미치는 pH, 기질농도 및 시간 등의 인자보다 크게 영향을 미치지 않았다.

Sukan과 Andrew³⁹⁾는 카제인 및 skim milk의 가수분해물로 부터 plastein 합성반응시 최적온도는 37°C에서 24시간, 또는 50°C에서 4~6시간이었으며, 70°C에서도 급속히 plastein은 생성되었으나 수율이 좋지 않았으며, 20°C에서와 비슷한 수율이었다고 보고한 바 있다.

6) 가수분해도의 영향

pH를 pepsin 4, α -chymotrypsin 7, papain과 protease는 6으로 조절하고, 기질농도 40%(단, papain 50%). 효소농도를 1%로 하여 50°C에서 항온처리하였을 때 plastein 합성에 미치는 기질의 가수분해도를 Fig. 11에 나타내었다. 각 효소에 있어서 가수분해도가 60%이하였을 때 기질대조구로 부터 나타나는 10% TCA 불용분의 탁도가 plastein 시료에서 나타나는 탁도를 훨씬 증가하였다. 이와 같은 결과는 합성시료에 있어서 합성반응 보다는 가수분해가 더욱 진행된 것으로 생각되었다. 그러나 가수분해도가 60%이상인 경우는 반응의 방향이 plastein 합성쪽으로 변화된 것을 볼 수 있었다. 가수분해도가 70%이상인 경우에는 24시간 동안 가수분해시킨 가수분해물의 plastein 생성량은 48시간 동안 가수분해시킨 그것과 큰 차이는 없었다.

Yamashita 등³⁷⁾은 대두단백질의 plastein 생성에 미치는 가수분해도의 영향을 평가하였는데 본 실험의 결과와 비슷한 양상을 나타내었으며, 가수분해도

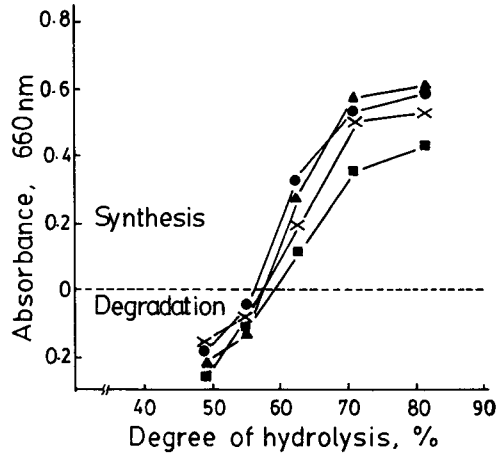


Fig. 11. Effect of the approximate degree of hydrolysis on plastein production from peptic hydrolysate of filefish muscle. Enzyme/substrate = 1 : 100W/W; pH 4 for pepsin (●), pH 7 for α -chymotrypsin(×), pH 6 for protease(■) and papain(▲); temperature = 50°C; incubation time = 24 hrs.

및 pH가 plastein 합성반응에 가장 크게 영향을 미치는 변수가 된다고 하였다.

요 약

어육단백질을 이용한 새로운 식품소재개발을 목적으로 연간 약 20만톤이 어획되는 다핵성 어류인 말쭉치육 단백질질을 이용하여 plastein을 합성하였다. Plastein 합성을 위해 pepsin, α -chymotrypsin, papain 및 protease를 이용한 말쭉치육 단백질의 가수분해 조건과 plastein 합성반응 조건을 구명하였다.

가수분해 최적조건은 papain, pepsin, α -chymotrypsin 및 protease의 경우, 온도는 각각 50°C, 40°C, 55°C 및 50°C, pH는 각각 6, 2, 7, 8, 가수분해시간과 효소첨가농도는 papain과 protease는 4시간, 0.5%, papain과 α -chymotrypsin은 24시간, 1.0%였다. 이들중 경제성을 고려하면 pepsin이 plastein 합성기질 제조에 적합한 것으로 판단되었다.

Plastein 합성 최적조건으로서는 papain, pepsin, α -chymotrypsin 및 protease(from *Streptomyces griseus*)의 경우, pH는 각각 6, 4, 7, 6, 기질농도는 papain 50%, pepsin, α -chymotrypsin 및 protease는 40%였다. 온도는 4종의 효소 모두가 50°C였다. Protease는 plastein 합성반응에 적합하지 않았다.

문 헌

1. Wells, J. 1973. UNIDO Export Group Meeting. Vienna. Oct. 2-3.
2. Park, G.S and J.R. Park. 1986. Functional properties of silkworm larvac protein concentration. Korean J. Food Sci. Technol. 18(3), 204-209.
3. Lawrie, R.A. 1973. Protein as human food. p.365. The AVI publishing Co., Ltd., Westport Connecticut.
4. Suzuki, T. 1978. Manufacture of marine beef from fish protein. Refregeration 54(615). 19-28.
5. Hevia, P., J.R. Whitaker and H.S. Olcott. 1976. Solubilization of a fish protein concentrate with proteolytic enzyme. J. Agric. Food Chem. 24(2). 383-385.
6. Chen, L., T. Richardson and C.H. Amundson. 1975. Some Functional properties of succinylated proteins from fish protein concentrate. J. Milk Food Technol. 38(2), 89-93.
7. Miller, R. and H. S. Groninger. 1976. Functional properties of enzyme modified acylated fish protein dervatives, J. Food Sci. 41(1), 268-272.
8. Bhumiratana, S., C. G. Hill Jr. and C.H. Amundson. 1977. Enzymatic solubilization of fish protein concentrate in menbrane reaction. J. Food Sci. 42(4). 1016-1019.
9. Lee, K. H., H.S. Groninger and J. Spinelli. 1981. Acylation of fish protein; Effect of reaction conditions on products. Marine Fisheries Review. 43(3), 14-19.
10. Lee, E.H. and S.K. Kim. 1979. Conditions for processing of meaty textured fish protein concentrate from Alaska pollack and mackerel. Bull. Korean Fish. Soc. 12(2), 103-111.
11. Groninger, U.S. and R. Miller. 1979. Some chemical and nutritional properties of acylated fish protein. J. Agric. Food Chem. 27(5), 949-954.
12. Tannenbaum, S. R., M. Athern and R. P. Bates. 1970. Solubilization of FPC 1. An alkaline process. Food Technol. 23, 604-607.
13. Hale, M.B. 1972. Making fish protein concentrate by enzymatic hydrolysis. NOAA Technical Report. NMFS SSRP-657, 1-32.
14. Noguchi, M., M. Yamashita, S. Arai and M. Fujimaki. 1975. On the bitter masking activity of a glutamic acid rich oligopeptide fraction. J. Food Sci. 40(2), 367-370.
15. Mataba, T. 1982. Studies on the development of protein foods from peptide chemical aspects. Nippon Nogeikaku Kaishi 56(9), 803-809.
16. Fujimaki, M., M. Yamashita, Y. Okazawa and S. Arai. 1970. Applying proteolytic enzymes on soybean. III. Diffusable bitter peptides and triamino acids in peptic hydrolysate of soybean protein. J. Food Sci. 35(2), 215-218.
17. Matoba, T., R. Hayashi and T. Hata. 1970. Bitter peptide from tryptic hydrolysate of casein. Agr. Biol. Chem. 34, 1235-1241.
18. Umetsu, H. and E. Ichishima. 1985. Mechanism of digestion of bitter peptide from a fish protein concentration by wheat carboxypeptidase. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 32(2), 281-287.
19. Arai, S., M., Noguchi, S. Kurosawa, H. Kato and M. Fujimaki, 1970. Applying proteolytic enzymes on soybeans IV. Deodorization effect of Aspergillo peptidase-A and debittering effect of Asperigillus acid carboxypeptidase. J. Food Sci. 35(4), 392-395.
20. Arai, S., M. Yamashita and M. Fujamaki. 1976. Plastein synthesis reaction, application to improvement of nutritive values and eating qualities of protein resources. J. Japanese Soc. Food Nutrition 29(6), 295-209.
21. Fujimaki, M., M. Yamashita, S. Arai and H. Kato. 1970. Enzymatic modification of protein in foodstuffs, Part. I. Enzymatic proteolysis and plastein synthesis application for preparing bland protein-like substances. Agr. Food Chem. 34(9), 1325-1332.
22. Lee, E.H., Y.H. Pack, J.H. Pyeun, S.K.

- Kim, S.T. Yang and Y.O. Song. 1978. Studies on the processing and utilization of sardine protein cocentrated. Bull. Korean Fish. Soc. 11(1), 25—37.
23. Kim, C.Y., B.H. Han, K.T. Lee, D.J. Cho, S.K. Kim and S.H. Kim. 1979. Processing of liquefied sardine protein concentrate by enzymatic method and its utilization. Bull. Korean Fish. Soc. 12(3), 143—153.
24. Yamashita, M., S. Arai, J. Matsuyama, M. Gonda, H. Kato and M. Fujimaki. 1970. Enzymatic modification of proteins in foodstuffs. Part. II. Phenomenal survey on α -chymotrypsin plastein synthesis from peptic hydrolyzate of soy protein. Agr. Biol. Chem. 34, 1484—1491.
25. Edwards, J.H. and W.F. Shipe. 1978. Characterization of plastein reaction products formed by pepsin, α -chymotrypsin and papain treatment of egg albumin hydrolysates. J. Food Sci. 43, 1215—1218.
26. Kang, C.K. and E.E. Rice. 1970. Degradation of various meat fractions by tenderizing enzymes, J. Food Sci. 35(2), 563—569.
27. Spies, T.R. and D.C. Chamber. 1951. Spectrophotometric analysis of amino acid and peptides with their copper salt. J. Biol. Chem. 191, 787—797.
28. Montecalvo, J. JR., S.M. Constatinides and C. S.T. Yang. 1984. Enzymatic modification of fish frame protein isolate, J. Food Sci. 49(5), 1305—1309.
29. Hofsten, B. and G. Lalasidis. 1976. Protease catalyzed formation of plastein products and some of their properties. J. Agric. Food Chem. 24, 460—465.
30. Archer, I., M.E. Kimball, T. Deans. Usieh and Chokyunrae. 1981. α -chymotrypsin hydrolysis of soybean protein. J. Agric. Food Chem. 29, 872—874.
31. Han, B.H., J.H. Pyeun, K.T. Lee, S.I. Choi and S.Y. Cho. 1982. A study on rapid fermentation of whole sardine for fish sauce production. Bull. Fish. Res. Dev. Agency. 29, 59—70.
32. Onishi, T. and H. Higashi. 1968. Studies on “Liquefied fish protein”—II. Odor and peptide composition of “Liquefied fish protein”. Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab. No. 55, 225—235.
33. Iseki, S., T. Watanabe and T. Kinumaki. 1968. Studies on “Liquefied fish protein”—IV. Examination of processing conditions for industrial production. Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab. No. 59, 81—99.
34. Quaglia, G.B. and E. Orban, 1987. Enzymatic solubilisation of proteins of sardine by Commercial proteases. J. Sci., Food Agr. 38(2), 263—269.
35. Yamashita, M., S.J. Tsai, S. Arai, H. Kato and M. Fujimaki. 1971. Enzymatic modification of their pH dependence. Arg. Biol. Chem. 35, 86—91.
36. Tauber, H. 1951. Synthesis of protein-like substances by α -chymotrypsin. J. Am. Chem. Soc. 73, 1288—1298.
37. Yamashita, M., S. Arai, J. Matsuyama, M. Gonda, H. Kato, and M. Fujimaki. 1970. Phenomenal survey on α -chymotrypsin plastein synthesis from peptic hydrolysates of soy protein. Agr. Biol. Chem. 34, 1484—1489.
38. Fujimaki, M., S. Arai and M. Yamashita. 1977. Enzymatic degradation and resynthesis for protein improvement. In “Food proteins: Improvement through chemical and enzymatic modification” (Ed) R.E. Feeny and J.R. Whitaker, Advances in chemistry series 160, Washington, D.C. 151—180.
39. Sukan, G. and A. T. Andrew. 1982. Application of the plastein reaction to caseins and to skim-milk powder. I. Protein hydrolysis and plastein formation. J. Dairy Res. 49, 265—278.