

Alkaline Protease에 의한 닭 간 단백질의 분해

이근택 · 박숙영 · 김우정*

강릉대학 식품과학과, *세종대학교 식품공학과

Alkaline Protease Hydrolysis of Chicken Liver for Food Utilization

Keun-Taik Lee, Suk-Young Park and Woo-Jung Kim*

Department of Food Science, Kangnung National University,

*Department of Food Science and Technology, King Sejong University

Abstract

Chicken liver was enzymatically hydrolyzed with an alkaline protease and determined the optimal conditions of reaction temperature and time, pH and enzyme to substrate ratio(E/S ratio) for possible utilization as a protein supplementary ingredient. The functional properties of hydrolysate measured were water and oil absorption capacity, emulsifying activity and viscosity and sensory properties were also evaluated. It was found that hydrolysis at 60°C and pH 8.0 were most effective and the degree of hydrolysis increased with increasing E/S ratio. A decrease in water and oil absorption capacity and an increase in viscosity were found during hydrolysis. The lowest emulsifying activity and highest water absorption were measured for 1/2 hour-hydrolysate and little difference was found for those treated more than 1 hour. The sensory characteristics of odor showed no significant difference among the chicken liver hydrolysates while the brightness increased and red decreased significantly($p < 0.01$) as the hydrolysis proceeded.

Key words : chicken liver, enzyme hydrolysis, hydrolysis conditions, functional properties

서 론

닭 간은 영양학적으로 우수한 부존자원이다. 그러나 닭고기를 가공하여 만든 편이식품(convenience food)이 다양해지고 소비자들 특히 젊은층의 기호성 변화로 인하여 식용비율이 떨어지고 있으며, 현재에는 소량의 닭 간이 계육과 함께 조리, 섭취되고 있을 뿐이다. 그러나 대부분은 간 특유의 냄새와 색 등과 같은 기호상의 문제점과 이를 개선시키는 적합한 가공방법이 개발되지 못하여 단순히 동물의 사료로 저가로 공급되거나 특히 하절기에는 유통상 및 저장상의 문제로 폐기율의 더욱 높아지고 있어 닭 간의 이용방안의 개발이 절실히 요구되고 있다. 그럼에도 불구하고 닭 간의 이용에 관한 연구는 간소시지 제조에 관한 것 이외에는 극히 제한되어 있다^(1,2).

따라서 본 연구에서는 닭 간의 주된 성분인 단백질을 처리하여 기능성 식품 또는 조미료의 소재로서 이용할 수 있는 방안을 검토하였다. 즉, protease인 alcalase를 이용하여 닭 간 단백질을 효소적으로 가수분해하는 과정에서 가수분해의 최적조건을 파악하기 위하여 반응온도, 시간, pH 및 효소 첨가량 등의 조건을 검토하고

가수분해된 제품의 기능적 특성을 파악하기 위하여 수분과 기름의 흡수성, 유화활성, 점도 등을 조사하고 아울러 관능학적인 평가를 병행하여 가수분해 제품의 품질과 가치를 검토하였다.

재료 및 방법

재료 및 시료의 제조

본 실험에 사용한 닭 간은 시장의 닭집에서 신선한 것을 구입하여 사용하였다. 시료 조제시 사용된 시약은 모두 일급 시약이었으며, 단백질 분해효소는 alkaline protease(Alcalase 0.6 L, 0.6 Anson unit/g)로서 Novo Industri Ltd.(Denmark)에서 공급받아 사용하였다.

닭 간 단백질 가수분해물은 Fig. 1과 같은 방법으로 처리하였다. 닭 간에 붙어있는 쓸개를 제거한 후 흐르는 물에 깨끗이 잘 씻어 물기를 제거하고 blender로 마쇄한 다음, 마쇄한 시료 일정량에 동량의 증류수를 첨가하여 4 N NaOH나 2 N HCl로 pH를 각각의 조건에 맞추도록 조절하였다.

진탕항온조(shaking water bath)에서 각각의 반응 온도에 도달하였을 때 기질별 효소 첨가량(enzyme/substrate ratio, E/S ratio)에 맞추어 효소를 첨가하고 6시간 동안 반응 시키면서 반응 시간별로 꺼낸 닭 간 가수분해물을 20% 삼염화초산(trichloroacetic acid, TCA)으로

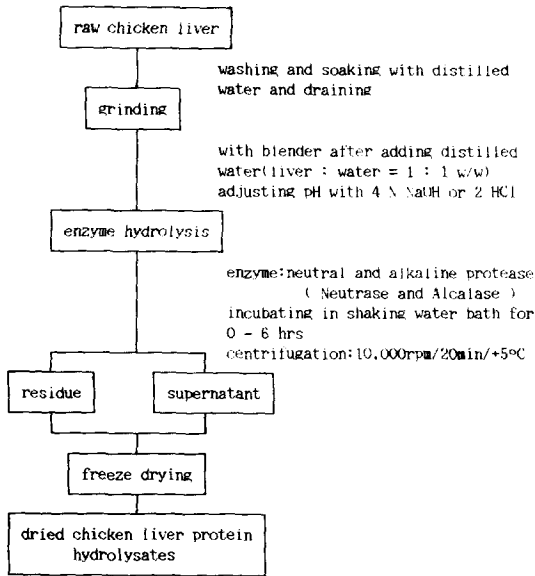


Fig. 1. Procedure for the preparation of chicken liver protein hydrolysates

침전시켜 8,000×g에서 20분간 원심분리 한 다음 얻어진 상등액은 가수분해도를 측정하기 위해서 사용하였고, 전체 가수분해물은 동결건조 한 다음 기능성 조사에 사용하였다. 반응 중 pH는 기질농도의 변화를 최소화시키는 범위하에서 4 N NaOH나 2 N HCl로 조절하였다.

가수분해의 조건

닭 간 단백질이 alkaline protease에 의하여 가수분해 되기 위한 적정조건을 찾아내기 위하여 반응온도는 50°C~70°C, 반응시간은 6시간, pH는 6.0~8.5 그리고 효소첨가량(V/W)은 1~3%로 하여 이들의 조건에 따라 가수분해정도를 측정하였다.

가수분해도 측정

5 ml의 가수분해물에 5 ml의 20%TCA 용액을 첨가하여 실온에서 1시간 방치하여 침전시킨 후 8,000×g에서 20분간 원심분리하였다. 상등액은 지방을 제거하기 위하여 여과지(Whatman #1)로 여과한 후 상등액의 비단백 질소량(NPN)을 가수분해물 중의 질소량(total N)으로 나누어 계산하였다.

$$\text{가수분해도(DH)} = \frac{\text{NPN}}{\text{total N}} \times 100$$

이 때 질소량은 Kjeldahl법으로 측정하였다.

가수분해물의 기능성

Alkaline protease로 60°C와 pH 8.0에서 닭 간을 분해

시켜 동결건조한 가수분해물을 사용하여 다음의 기능성을 측정하였다.

수분과 기름의 흡수력 측정

Beuchat⁽³⁾의 방법을 참조하여 실온에서 측정하였다. 시료 1g에 증류수나 식용유를 10g씩 첨가하여 Ultraturrax(IKA-Labortechnik, T 25)로 10,000 rpm에서 20초씩 3번 균질하여 완전히 혼합한 다음 실온에서 30분간 정지한 후 4,000×g에서 30분간 원심분리 하였고 흡수력은 시료 1g당 흡수된 수분과 기름의 g수로 나타내었다.

유화활성 측정

유화활성은 Kato 등⁽⁴⁾의 방법을 참조하여 측정하였다. 각 닭 간 단백질 가수분해물 시료를 2%NaCl(pH 6.5) 용액에 0.1%되게끔 균질, 용해시킨 후 15 ml를 취하여 5 ml의 식용유를 가하고 균질기로 9,500 rpm에서 1분간 균질, 혼합하였다. 혼합된 유화물 0.05 ml를 5 ml의 0.1% SDS(sodium dodecylsulfate) 용액에 가하여 혼든 후 분광 광도계(Shimadzu, UV-120-02)로 500 nm에서 혼탁도의 변화로서 유화활성을 측정하였다. 유화활성은 유화물이 형성된 후 1분 간격으로 10분간 측정하였다.

점도 측정

점도는 닭 간 단백질 가수분해물의 농도를 1%, 2%, 5%, 10%로 하여 예비실험을 해본 결과를 토대로 고형분의 농도를 10%가 되게끔 하여 Ultraturrax 8,000 rpm에서 1분간 균질시킨 후 실온에서 30분간 방치한 다음 viscometer(Haake Mess Technik Co., VT 500)로 온도 20°C, 회전속도 4에서 측정하였으며, 2분동안의 최고치를 Pa·s단위로 나타내었다.

관능검사

닭 간을 alkaline protease로 분해시켜 동결건조시킨 시료의 관능검사는 다음과 같이 하였다. 관능검사원은 닭 간 냄새에 대한 차이 식별능력이 있고 흥미를 갖고 있는 7명의 검사원을 선정할 뒤, 8가지의 냄새와 색(닭 기름내, 썩은내, 역겨운내, 시큼한내, 밝기, 붉은색, 녹색)에 대한 이해와 강도 차이에 대하여 훈련시켰다. 냄새평가를 위한 시료는 동결건조한 닭 간을 증류수에 3%되게 분산시키고 시료의 온도를 70°C 내외로 하였으며 색은 동결건조한 닭 간을 60 mesh 정도로 마쇄하여 비교하였다. 검사방법은 다시료 비교법에 의한 9점 채점법으로 하였고 표준시료(R)는 효소처리하지 않고 동결건조시킨 닭 간으로 강도를 5로 하였다. 색의 밝기는 1을 흰색, 9는 가장 검은색으로 하였으며 붉은색은 표준시료의 빨간 정도를 5로하여 1은 붉은 정도가 거의 없는 것, 9는 대단히 붉은것으로 하였으며, 녹색은 그 강도가 낮아 가장 진한 닭 간의 녹색을 4정도로 하였다. 검사시간은 오전과 오후로하여 3회 반복 평가하였으며 얻어진 결과의 분석은 분산 분석법에 의한 유의성 검토와

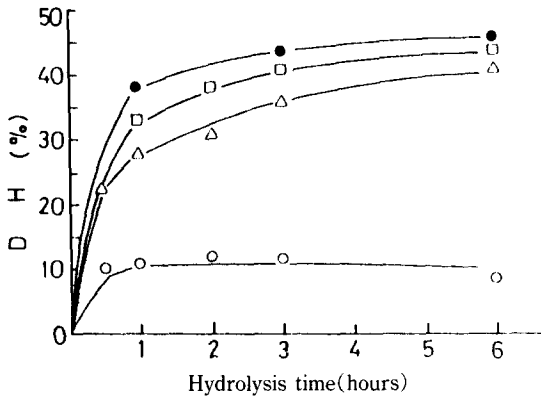


Fig. 2. Effect of enzyme/substrate ratio on degree of hydrolysis of chicken liver protein treated with alkaline protease at pH 8.0 and 60°C

○—○ : 0%, △—△ : 1%, □—□ : 2%, ●—● : 3%

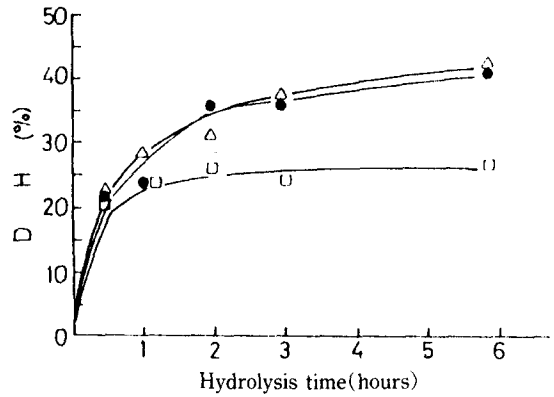


Fig. 3. Effect of temperature on degree of hydrolysis of chicken liver protein treated with 1% alkaline protease at pH 8.0

●—● : 50°C, △—△ : 60°C, □—□ : 70°C

정량적 묘사 분석방법(QDA)에 의하여 닭 간의 전체적인 특성을 비교하였다.

결과 및 고찰

가수분해도 변화

Alcalase를 이용하여 닭 간 단백질을 가수분해시 온도, pH, 반응시간 및 효소첨가량을 달리 하였을 때 가수분해도를 지표로한 단백질의 분해정도를 조사한 결과는 다음과 같다.

효소첨가량에 따른 가수분해도

pH 8.0, 온도 60°C에서 효소 첨가량의 변화에 따른 가수분해도의 변화는 Fig. 2와 같다. 각 처리구에서 공히 시간이 경과함에 따라 가수분해도가 증가하는 경향을 나타내었으며 처리 1시간 이내에 급격한 상승치를 보였다. 이러한 변화는 효소의 첨가시 반응성이 좋은 펩티드 결합들부터 우선적으로 쉽게 분해되어지고 그외 반응성이 약한 펩티드 결합은 천천히 분해되는 것에 기인하는 것으로 판단된다. 이와 유사한 곡선의 형태는 어류 단백질⁽⁵⁾, 콩 단백질⁽⁶⁾ 쇠고기 정육⁽⁷⁾에서도 나타난 것으로 보고되었다. 또한 E/S ratio의 비율이 높아짐에 따라 가수분해도가 증가하였는데 이는 결국 높은 효소 첨가량이 효소반응을 촉진하기 때문으로 사료된다.

반응온도에 따른 가수분해도

pH 8.0, E/S 1%에서의 반응온도에 따른 가수분해도의 변화는 Fig. 3과 같다. 50°C와 60°C사이의 가수분해도에 있어서는 전 반응시간에서 큰 차이를 나타내지 않았으나 70°C에서는 두 온도대에서보다 현저히 낮은 값을 보였다. 이는 쇠고기 정육을 Alcalase로 처리하였을 때 55~60°C의 범위에서 최대활성을 나타내었다는 O'Meara와 Mu-

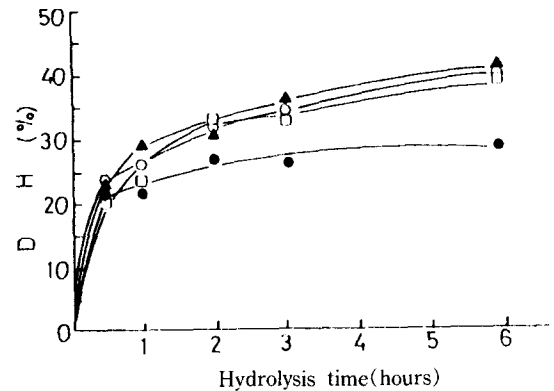


Fig. 4. Effect of pH on degree of hydrolysis of chicken liver protein treated with 1% alkaline protease at 60°C

●—● : pH 6.0, □—□ : pH 7.0, ▲—▲ : pH 8.0, ○—○ : pH 8.5

nro⁽⁷⁾의 보고와도 일치하였다. 70°C에서 50°C와 60°C에 비해 가수분해도가 낮게 나타났것은 고온에서 단백질분해효소의 열불활성화에 의한것으로 사료된다.

pH 조건에 따른 가수분해도

온도 60°C, E/S 1%에서의 각각의 pH조건에 따른 가수분해도의 변화는 Fig. 4와 같다. 반응 1시간에서는 pH 8.0에서 가장 높은 값을 보였으나 그 이후에는 pH 7.0과 pH 8.5에서 pH 8.0과 비슷한 값을 나타내었다. 그러나 pH 6.0에서는 다른 세 pH대에서와 비교하여 반응 2시간 이후부터 뚜렷하게 그 값이 낮았다. 이는 alkaline protease가 pH 8.0~9.0 부근에서 최대활성을 나타내기 때문으로 생각된다. O'Meara와 Munro⁽⁷⁾는 pH 8.5에서 쇠

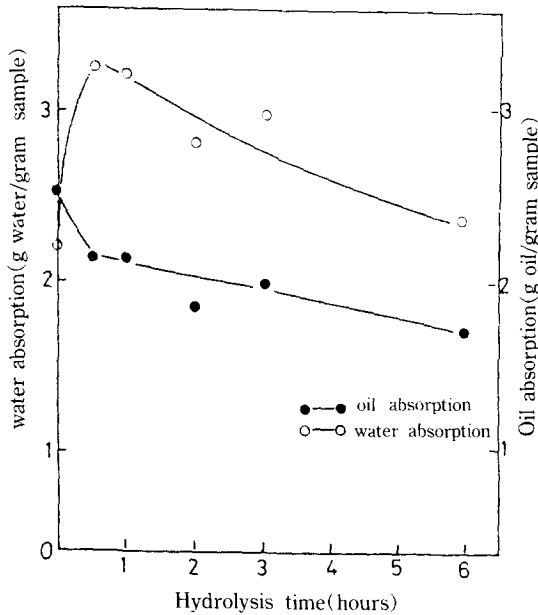


Fig. 5. Changes in water and oil absorption capacities of chicken liver protein during hydrolysis alkaline protease at pH 8.0 and 60°C

고기 정육을 Alcalase로 처리하였을 때 최대의 용해도를 보였으며 Boudrant와 Cheftel⁽⁸⁾는 Alcalase로 casein을 가수분해시켰을 때 pH 8.8에서 최대활성을 나타내었다고 보고하였다. 따라서 효소의 최대활성을 나타내는 pH 값은 기질에 따라 다소 차이가 나는 것으로 보여진다.

수분과 기름의 흡수력

Alcalase로 처리한 닭 간 가수분해물의 수분과 기름의 흡수력은 각각 Fig. 5와 같다. 수분 흡수력은 효소를 첨가하지 않은 0시간에서 2.222 g/g으로 낮은 값을 보여 주었고 1 hr 이후부터는 반응시간이 경과함에 따라 감소하는 경향으로 나타내었다. 이는 *Aspergillus oryzae*로부터 얻은 protease로 목화씨를 처리한 Rahma와 Narasinga Rao⁽⁹⁾와 winged bean을 부분 가수분해한 Narayana와 Narasinga Rao⁽¹⁰⁾의 결과와도 유사한 경향을 나타내었다. 가수분해시에는 단백질 분자내에 친수성기를 증가시키나 가수분해로 인하여 야기될 수 있는 구조적 변화가 효소처리된 시료의 수분 흡수력을 감소시킨다고 추측된다.

기름의 흡수력도 반응 0시간에서 2.640 g/g을 나타내었으며 반응이 진행될수록 점차 감소하는 경향을 나타내었다. Nakai⁽¹¹⁾는 열변성된 단백질 지방의 결합능력과 표면의 소수성기와의 관계에 대하여 보고하였는데, 단백질의 가수분해가 표면의 친수성기를 감소시키나 그 이유는 불분명하다고 하였다.

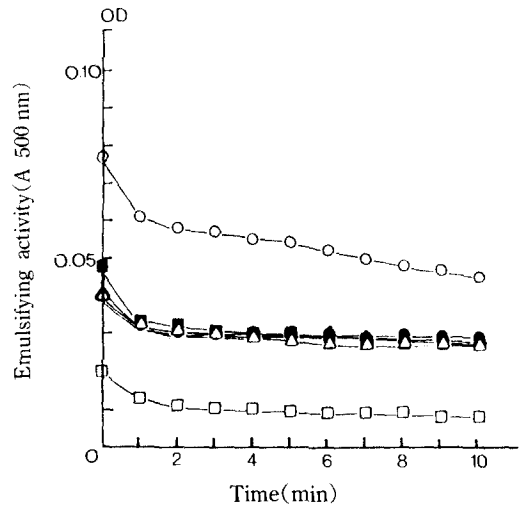


Fig. 6. Changes in the turbidity of emulsions of chicken liver protein hydrolysates during setting after emulsion formed

○—○ : control, □—□ : 1/2 hr, △—△ : 1 hr, ■—■ : 2 hrs, ●—● : 3 hrs, ▲—▲ : 6 hrs

Table 1. Viscosity of chicken liver protein treated with Alcalase as a function of hydrolysis time

Hydrolysis time (hrs)	Apparent viscosity ^{a)} (Pa · s)
0	0.62
1/2	1.05
1	1.24
2	1.34
3	1.36
6	1.39

^{a)} temperature = 20°C, rotation speed = 4

유화활성 및 점도

Alcalase로 처리한 닭 간 단백질 가수분해물의 유화활성은 Fig. 6과 같다. 대조구의 값은 Alcalase 처리구보다 높게 나타났고 그 중 1/2시간의 처리구가 가장 낮은 값을 보였으며 1시간 이상 처리된 구들 사이에는 큰 차이를 보이지 않았다.

Alcalase로 처리한 닭 간 가수분해물의 점도는 표 1과 같다. 점도는 반응 0시간 0.62에서 반응 6시간에는 1.39로 반응이 진행되도록 증가하는 경향을 나타내었다. 본 결과에 따르면 4차 구조를 가진 닭 간의 섬유상 단백질이 부분 가수분해에 의하여 구조가 넓게 풀림으로써 가수분해의 진행에 따라 점도가 상승하였으리라 추측된다.

관능적 특성

효소처리 중 변화하는 닭 간의 냄새인 닭기름내, 찌내, 썩은내, 역겨운내 그리고 시큼한내와 밝기, 붉은색, 녹색

Table 2. Comparison of odor and color intensities of freeze-dried chicken liver as affected by hydrolysis by proteolytic enzyme of Alcalase at 60°C and pH 8.0

Odor and color	Hydrolysis time						F value
	0 hr	1/2 hr	1 hr	2 hr	3 hr	6 hr	
Chicken fat	5.0	4.9	5.4	4.6	5.1	4.9	0.34
Boiled meat	5.0	5.3	5.9	5.2	5.1	5.3	0.72
Spoiled	5.0	4.7	5.1	5.1	4.9	5.3	0.23
Nauseous	5.0	4.6	5.6	5.3	5.3	5.5	0.86
Sour	5.0	3.9	3.7	4.5	4.0	4.9	1.47
Brightness	5.0	5.6	5.7	4.2	4.1	4.2	4.42 ^{a)}
Red	4.3	4.5	4.4	3.2	3.7	3.3	4.59 ^{a)}
Green	2.5	2.1	2.4	2.9	2.8	3.2	1.04 ^{a)}

a) Values are significant at 1% level

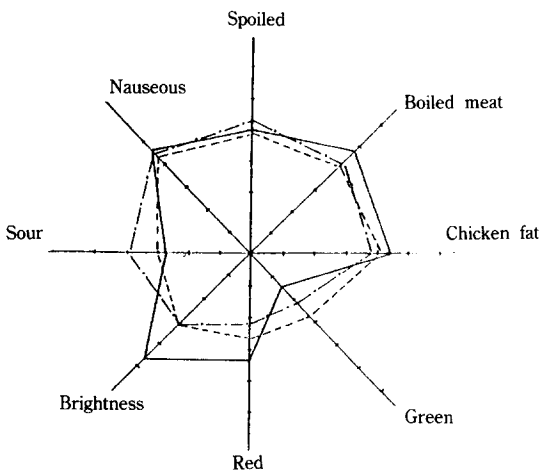


Fig. 7. Comparison of QDA profiles of freeze-dried hydrolysates chicken liver hydrolyzed by alkaline protease at 60°C and pH 8.0

————— : 1 hr, - - - - - : 3 hrs, - · - · - : 6 hrs

등 색에 대하여 비교한 결과는 표 2와 같다. 그 결과 효소처리 시간이 길어짐에 따라 썩내, 닭기름내, 썩은내, 역겨운내, 그리고 시큼한내에서는 별다른 변화가 없어 alkaline protease에 의한 효소분해는 닭 간의 냄새를 크게 향상시키지는 않는 것으로 보여졌다. 각 냄새의 묘사 중 특히 불쾌하다고 여겨지는 썩내, 역겨운내, 시큼한내의 변화를 비교할 때 신 냄새는 1~2시간 후에 감소하였다가 다시 증가함을 보였고, 썩은 냄새는 대조구와 대체로 비슷하였다. 역겨운 냄새에서도 비교적 약하게 변화하였고 처리 30분 후에는 오히려 약간 감소함을 보여 주었다. 한편 동결건조시킨 닭 간 가수분해물 분말의 색은 처리하지 않은 닭 간보다 밝기가 1/2과 1시간에는 감소하였다가 그 이후로는 증가함을 보여주었으며 처리시간이 경과될 수록 이러한 흰색의 증가는 더욱

현저하였다.

붉은색은 효소 분해시간이 길어지면서 차츰 감소하였으나 녹색은 오히려 증가함이 뚜렷하였다. Fig. 7은 관능적 검사결과를 QDA도표로 비교한 것으로 냄새와 색의 변화를 전체적으로 쉽게 비교할 수 있었다. 따라서 효소처리하는 전반적으로 냄새의 개선에는 별 도움이 없었으나 색을 밝고 부드럽게 하는데에는 효과적임이 밝혀졌다.

요 약

영양학적으로 매우 우수한 부존자원이라 할 수 있는 닭 간의 이용 가능성을 검토하기 위하여 alkaline protease로 가수분해 시켰다. 가수분해시 최적조건을 파악하기 위하여 온도, 시간, pH 및 효소 첨가량(E/S ratio)의 조건을 검토하고 수분과 기름의 흡수성, 유화활성, 점도 등의 가능성을 조사하였으며 냄새와 색에 대한 관능검사를 시행하였다. Alkaline protease로 닭 간 단백질을 가수분해 시켰을 때 온도 60°C, pH 8.0에서 최대활성을 나타내었고, 효소의 첨가량이 증가할수록 가수분해도는 증가하였다. 수분과 기름의 흡수성은 수분 흡수성에 있어서 0시간에서만 낮은 값을 보여주었고 반응시간이 지날수록 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 점도는 증가하였다. 가수분해 1/2시간에서 유화활성도는 가장 낮았고 수분흡수력은 높았으며 1시간 이후에는 시료간에 큰 차이가 없었다. 동결건조된 닭 간 단백질 가수분해물의 냄새와 색깔에 대한 관능평가에서는 별차이가 없었으나 색깔에서는 밝기와 붉은색에서 유의성이 있었으며 가수분해는 닭 간의 밝기를 증가시키면서 녹색을 약간 있게함을 알 수 있었다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단 신진연구비 지원(1989~1990)으로 수행되었으며 이를 깊이 감사드립니다.

문 헌

1. 송계원 : 닭 내장육을 이용한 소시지 제조시험. 한국축산학회지, 17(2), 170(1975)
2. Acton, J.C. and Dick, R.L. : Turkey liverwurst processed with various meats and meat combinations. *Poul. Sci.*, 60, 2270(1981)
3. Beuchat, L.R. : Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 25, 258(1977)
4. Kato, A., Tanaka, A., Lee, Y., Matsudomi, N. and Kobayashi. : Effects of deamination with chymotrypsin at pH 10 on the functional properties of proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 35, 285(1987)
5. Mohr, V. : Enzymes technology in the meat and fish

- industries. *Process Biochem.*, Aug./Sep., **18**(1980)
6. Alder-Nissen, J., Poulsen, J. and Andersen, P.E. : Enzymatic hydrolysis of soy protein for nutritional fortification of low pH food. *Ann. Nutr.*, **32**, 205(1978)
 7. O'Meara, G.M. and Munro, P.A. : Effects of reaction variables on the hydrolysis of lean beef tissue by Alcalase. *Meat Sci.*, **11**, 227(1984)
 8. Boudrant, J. and Cheftel, C. : Continuous proteolysis with a stabilized protease. II. continuous experiments. *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1735(1976)
 9. Rahma, E.H. and Narasinga Rao, M.S. : Effect of limited proteolysis on the functional properties of cottonseed flour. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 356(1983)
 10. Narayana, K. and Narasinga Rao, M.S. : Effect of partial proteolysis on functional properties of winged bean(*Psophocarpus tetragonolobus*) flour. *J. Food Sci.*, **49**, 944(1984)
 11. Nakai, S. : Structure-function relationships of food proteins with an emphasis on the importance of protein hydrophobicity. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 676 (1983)
-
- (1990년 9월 5일 접수)