

## 단백질 분해효소에 의한 홍합 단백질의 분해에 관한 연구

최인재 · 남희섭 · 신재익 · 이병훈\*

(주)농심 기술개발연구소, \*캐나다 맥길대학교 식품학과

### A Study on the Proteolysis of Mussel Protein by a Commercial Enzyme Preparation

In-Jae Choi, Hee-Sop Nam, Zae-Ik Shin and Byong-Hoon Lee\*

Research and Development Center, Nong Shim

\*Department of Food Science, McGill University

#### Abstract

The patterns on the proteolysis of mussel protein using a commercial enzyme preparation were investigated. The best one among six commercial enzyme preparations for the manufacture of mussel extract was Corolase PP, based on the degree of hydrolysis (DH). When the raw mussel paste, without water addition, was adjusted to pH 6.5, added 0.1% (w/w dry basis) of Corolase PP, and reacted at 50°C for four hours, it reached the maximum value of DH (79%). The precooking of raw mussel decreased the efficiency of extraction and hydrolysis of the protein, due to the inactivation of the autolytic enzymes contained in the mussel. During the course of proteolysis, major free amino acids such as glycine, alanine, glutamic acid and lysine, representing a characteristic brothy taste of mussel were replaced with free hydrophobic amino acids including valine, methionine, isoleucine, and leucine. The electrophoretic pattern and HPLC-GPC pattern of mussel protein hydrolysates during the hydrolysis were observed and also discussed.

Key words: mussel protein, enzyme, proteolytic pattern, precooking

## 서 론

최근, 식품가공기술의 발달과 소비자들의 의식수준이 높아짐에 따라 가공식품의 다양성과 천연성이 강조되면서, 이와 같은 요구에 부응하기 위한 각종 동식물성 가수분해물과 효모 추출물의 천연 extract 재조기술이 개발되고 있다<sup>(1,2)</sup>. 이 중 어패류는 원료가 다양한 뿐만 아니라 영양가도 풍부하며 다른 식품에서는 찾아볼 수 없는 독특한 정미성분과 향미성분을 갖고 있기 때문에 천연 extract의 소재로써 널리 이용되고 있다<sup>(3-5)</sup>. 어패류 구성물질의 대부분을 차지하고 있는 단백질은 그 자체로서 직접 맛에 영향을 주지는 않지만, 가공처리 중 가수분해되어 peptides와 유리 아미노산이 되었을 때 식품의 맛에 기여하게 된다<sup>(6)</sup>. 따라서, 가수분해 과정 중의 단백질 분해 pattern과 생성되는 유리 아미노산의 종류 및 양은 가수분해물의 맛과 기능성을 예측하는데 좋은 지표가 될 것이다. 실제로 Quaglia 등<sup>(7)</sup>은 gel permeation chromatography를 이용하여 정어리 가수분해물의 mole-

cular distribution과 유화특성간의 상관관계를 살펴본 바 있으며, Toyohara 등<sup>(8)</sup>은 SDS-PAGE를 이용, 온도별 취지육의 분해 pattern을 연구하였다. 또한 Noguchi 등<sup>(9)</sup>은 FPC(Fish Protein Concentrate)의 flavor potentiating fraction으로부터 MSG와 유사한 맛과 향을 내는 oligopeptides를 분리, 동정하여 각각의 threshold level을 결정하였고, Jaswal 등<sup>(10)</sup>은 계의 가공처리물로부터 양질의 아미노산 가수분해물을 얻고자, 분해시 사용되는 산의 농도와 분해시간에 따르는 아미노산의 변화 pattern을 살펴본 바 있다.

본 연구에서는 범용적인 해산물 맛으로 널리 사용되고 있는 홍합을 소재로 하여 천연 extract를 제조할 때 최적 효소반응 조건을 결정하였으며, 또한 그에 따르는 단백질의 분해 pattern과 정미성분인 유리 아미노산의 조성 변화를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 홍합 extract의 제조

본 실험에 사용한 홍합은 시장에서 신도가 양호한 것을 구입하여 사용하였다. 먼저 원료를 깨끗한 물로 수세한 후 동량의 물을 섞은 뒤, Waring blender(Dynamics cor-

Corresponding author: Hee-Sop Nam, Research and Development Center, Nong Shim Co. Ltd., 203-1, Dangjeong-Dong, Kunpo-si, Kyungki-do 435-030, Korea

Table 1. The chemical composition of raw mussel<sup>1)</sup>

Composition	Content (%)
Moisture	82.7±0.2
Crude protein	9.73±0.02
Crude lipid	0.96±0.1
Carbohydrate	4.16±0.6
Ash	1.29±0.4
Salt	1.16±0.1

<sup>1)</sup>The data suggested above were obtained by duplicate analysis

poration, 31BL91)로 균질화시킨 다음, 원료 단백질의 0.1%(w/w) 농도로 단백질 분해효소를 가하여 진탕 항온조에서 50°C로 반응을 시키면서 반응액을 채취하였다. 이때 사용한 효소는 Protein PC 10F(Daiwa-Kasei사 제품), Corolase 7092, Corolase 7093, Corolase PP(이상 Röhm사 제품), Pescalase(International Biosynthetics사 제품), Papain(Gist-Brocades사 제품)이었다. 이와 같이 얻은 반응액을 100°C로 10분간 가열처리하여 반응액 중에 존재하는 효소를 불활성화시킨 후, 12,000rpm으로 20분간 원심분리하였다. 원심분리에서 얻어진 액상액의 60°C에서 감압농축하여 종합 extract를 제조하였다.

### 분석

일반 성분분석은 AOAC법<sup>12)</sup>에 의하여 수행하였다. 수분은 105°C에서 4시간 건조시키는 상압건조법, 조단백질은 Macro-Kjeldahl법, 회분은 550°C 직접회분법, 조지방은 Soxhlet법, 전당은 Somogyi법<sup>13)</sup>, 그리고 아미노태질소는 Formol 적정법을 사용하였다. Extract의 유리 아미노산 분석은 amino acid analyzer(Dionex, Bio-LC)를 이용하여 분석하였다.

### 가수분해도(Degree of Hydrolysis)

원료 종합에서 얻을 수 있는 extract의 수용은 단백질 가수분해도(Degree of Hydrolysis; DH)로 나타내었으며, 이는 다음과 같은 식으로 구하였다.

$$DH = \frac{\text{가용성 질소 함량}}{\text{총질소 함량}} \times 100(\%)$$

### 단백질 분해 pattern

종합 단백질의 분해 pattern을 알아보기 위해 반응시간별 시료를 전기영동 및 HPLC 분석하였다.

종합 단백질의 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)는 Laemmli의 방법<sup>14)</sup>에 준하여 행하였다. 전기영동 gel은 15%를 사용하였고 20 mA에서 2~3시간 전기영동한 후, 0.05% Coomassie brilliant blue R-250(Sigma)으로 염색하고 탈색하여 band를 확인하였다. 이때 사용한 표준단백질은  $\beta$ -galactosidase(116,000 dalton), phosphorylase(97,400 dalton), BSA(66,000 dal-

Table 2. The yield of mussel extract treated by several commercial enzymes

Commercial name	DH(%) <sup>1)</sup>
Protin PC10F	68.9
Corolase 7092	42.0
Corolase 7093	50.7
Corolase PP	78.7
Pescalase	75.3
Papain	56.5

<sup>1)</sup>Degree of hydrolysis

ton), egg albumin(45,000 dalton), carbonic anhydrase(29,000 dalton)로 Sigma사 제품이었다.

종합 단백질 분해 pattern의 HPLC 분석을 위해 Protein Pak-125 column(Waters사)을 이용하였고 이때 이 농성으로는 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 사용하였다. Low molecular weight marker들로는 myoglobin의 polypeptide backbone(16,950 dalton), fragment I-II(14,400 dalton), fragment I(8,160 dalton), fragment II(6,210 dalton) 등의 Sigma 제품을 이용하였다.

## 결과 및 고찰

### 종합 단백질 성분

원료 종합의 일반성분을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 종합의 대부분은 수분이며 고형분 중 9.73%가 단백질, 4.16%가 탄수화물이며 기타 지방, 회분, 염분 등으로 구성되어 있다.

### 최적 가수분해 효소의 선정

종합 extract를 제조하는데 최적의 효소를 선정하기 위해 각 효소별 단백질 가수분해도(DH)를 측정하였다(Table 2).

가수분해도는 Corolase PP가 78.7%로 가장 높았으며, 이어서 Pescalase가 75.3%, Protin PC10F의 68.9% 순으로 나타났다. 나머지 효소들은 42.0~56.5%로 비교적 낮은 값을 나타냈다. 따라서 Corolase PP가 종합 extract 제조에 최적의 효소로 판단되었다.

### 가열 전처리

효소에 의한 가수분해시 원료를 미리 열이나 알콜 등으로 처리해 주는 것이 수용을 향상시키는데 유리하다는 보고<sup>15)</sup>가 있다. 이는 원료 단백질을 전처리 해 줌으로써 folding되어 있던 단백질 3차 구조를 unfolding 상태로 변화시켜 효소가 공격하기 유리한 open structure를 만드는데 주된 목적이 있다<sup>16)</sup>. 한편, 생물에는 자기소화효소(autolytic enzymes)가 있어서 효소반응에 의한 extract 제조조건에서 활성을 나타낼 수 있어 이 등에는 정어리 산사를 이용한 정어리 간장 제조시 자기소화효소에 의한 분해도가 80%에 달함을 보고한 바

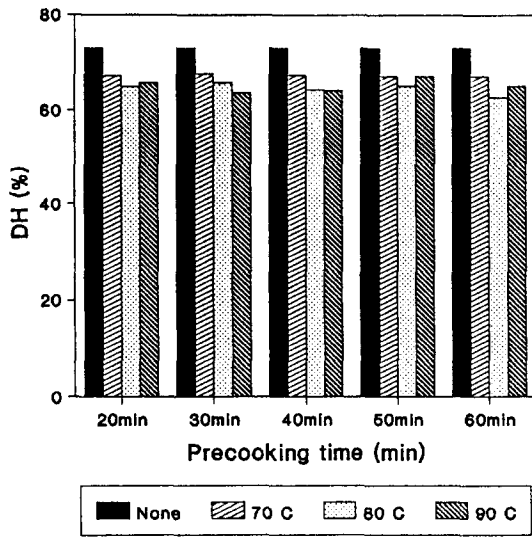


Fig. 1. Effect of precooking on the hydrolysis of mussel protein

있다. 따라서 가열처리를 하게되면 자기소화효소가 불활성화되어 수율이 감소될 가능성이 있다.

본 실험에서는 이 현상이 일어나는지 여부를 관찰하기 위해 마쇄된 홍합원료를 70, 80, 90C의 온도에서 각각 20, 30, 40, 50, 60분간 가열처리한 뒤 효소반응을 시킨 후 가수분해도를 비교하였다(Fig. 1). 그 결과 가열처리된 홍합 extract의 가수분해도는 가열처리되지 않은 홍합 extract의 경우보다 5~8% 낮게 나타났다. 이것은 효소반응에 의한 홍합 extract 제조시, 홍합내에 존재하는 자기소화효소가 가열처리에 의해 불활성화 되었기 때문으로 사료되었다. 이것을 확인하기 위해 홍합원료에 효소를 첨가하지 않고 50, 70C에서 효소반응 조건과 동일하게 반응시킨 결과(Fig. 2), 50C에서는 원료 홍합 자체의 자기소화효소에 의해 단백질 가수분해도가 47%까지 상승된 반면, 70C에서는 단백질 가수분해도가 거의 증가하지 않아 홍합내에 자기소화효소의 활성을 확인할 수 있었다. 이상의 결과에서 효소분해에 의한 홍합 extract 제조시, 가열에 의한 전처리는 원료 자체에 존재하는 자기소화효소를 불활성화시켜 전체적인 수율을 저하시키는 요인이 되는 것으로 판단되었다. 따라서, 홍합 extract의 가수분해도를 증가시키기 위해서는 가열 전처리를 하지 않는 것이 유리한 것으로 판단되었다.

반응시간 경과에 따른 수율 및 단백질 분해 pattern

최적화된 조건하에서의 반응시간별 홍합 extract의 단백질 가수분해도의 변화는 Fig. 3과 같았다. 효소반응이 시작될지 30분만에 가수분해도는 66%로 급격히 증가했고 이후 서서히 증가하여 반응 4시간이 되어서는 78%에 이르렀다. 이 결과로부터 효소반응은 초기에 급격하게 일어나고 그 이후에 계속적으로 서서히 진행됨을 알 수

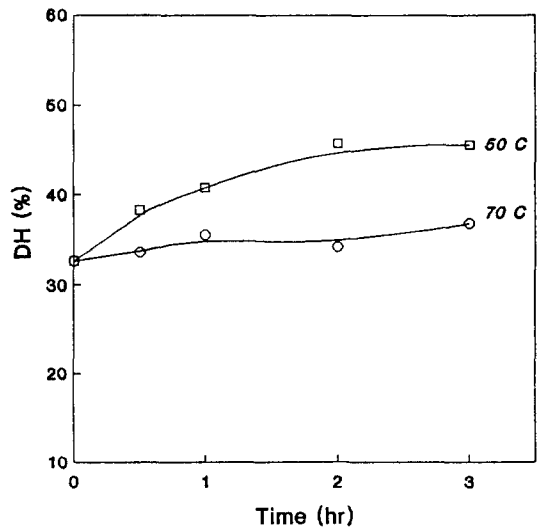


Fig. 2. Effect of temperature on the autolysis of mussel

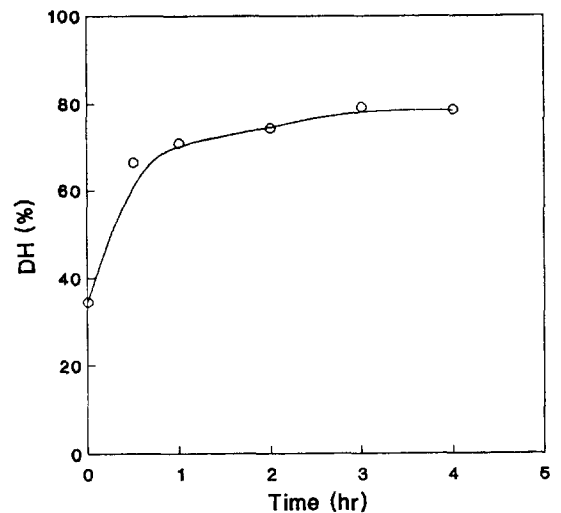


Fig. 3. Time course of hydrolysis of mussel protein treated with Corolase PP under optimum condition

있었다.

반응시간별 홍합내 단백질 분해 pattern을 관찰하기 위해 extract 시료를 전기영동과 GPC column을 이용한 HPLC 분석을 행하였다(Fig. 4, 5).

먼저, 전기영동 결과를 보면(Fig. 4), 효소반응 전에 존재하던 분자량 100,000 이상의 단백질 band들이 반응시간이 경과함에 따라 효소에 의해 분해되어 gel상에서 점점 사라지고, 분자량 66,000 이하의 새로운 band들이 나타났다. 한편, 효소반응 1시간인 시료를 HPLC 분석한 결과, retention time이 서로 다른 8개의 주요 fraction들이 나타났다(Fig. 5). 이들 fraction들의 분자량을 추

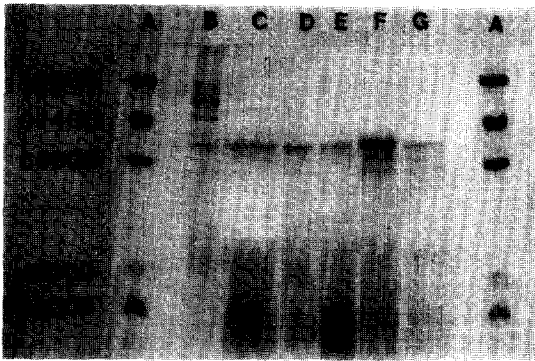


Fig. 4. Electrophoretic patterns of mussel protein hydrolyzates

(A; Marker, B; Control, C; 1/2 hr, D; 1 hr, E; 2 hr, F; 3 hr, G; 4 hr)

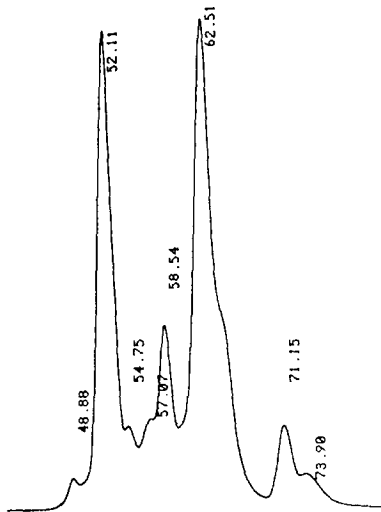


Fig. 5. HPLC chromatogram of peptide fractions in mussel extract after 1 hr reaction

정하고자 Sigma사에서 구입한 low molecular weight marker들을 이용하여 retention time과 분자량 사이의 관계를 plot한 결과(Fig. 6), 이들 fraction들의 추정되는 분자량은 3,000~26,000 범위였다. 이들 fraction들 중 분자량이 약 8,000 dalton인 fraction 6가 45.8%로 가장 높은 비율을 나타내었으며, 이어서 분자량 20,000 dalton의 fraction 2가 28.6%, 분자량 11,000 dalton의 fraction 5가 10.4%였으며 나머지 fraction들은 각각 5% 이하의 비율을 나타내었다(Table 3).

아미노산 함량의 변화

홍합 extract 내의 정미성 성분으로 유리 아미노산의 시간별 함량변화를 살펴보았다(Table 4). 반응 전에 glycine, glutamic acid, alanine, aspartic acid, lysine 등이

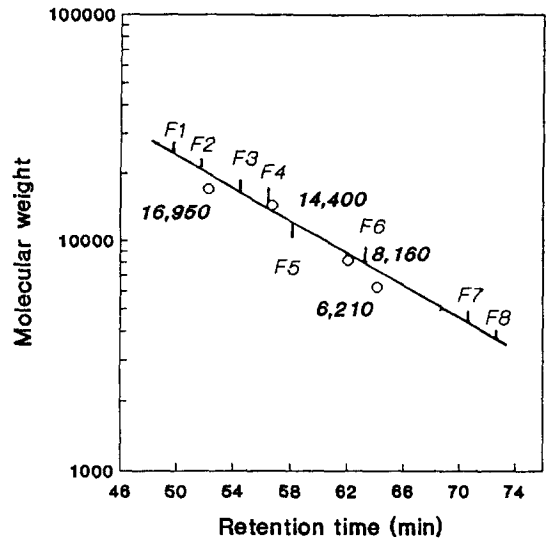


Fig. 6. Molecular weight determination of peptide fractions analyzed by HPLC

Table 3. Characteristics of fractions obtained by HPLC analysis

Fraction	Retention Time (min)	Estimated Molecular Weight	%Area
1	48.94	26,000	1.1
2	52.16	20,000	28.6
3	54.78	16,000	3.0
4	56.86	14,500	3.9
5	58.54	11,000	10.4
6	62.35	8,000	45.8
7	71.04	3,800	4.9
8	73.92	3,000	2.3

Table 4. Change of free amino acids of mussel extract during hydrolysis (Unit: mole%)

Amino acids	Time(hr)					
	0	1/2	1	2	3	4
Asp	7.9	4.6	3.7	4.2	3.8	3.4
Thr	6.6	3.4	3.2	2.7	3.2	3.6
Ser	5.4	9.	4.9	11.6	10.8	12.0
Glu	14.9	8.9	8.8	7.8	8.0	7.2
Gly	30.9	22.5	20.8	15.6	16.9	15.7
Ala	8.8	13.8	15.9	12.7	12.5	11.9
Val	3.2	4.6	5.6	6.5	6.9	6.2
Met	1.6	2.3	2.6	3.0	3.2	3.0
Ile	2.1	3.2	4.1	4.8	5.0	4.9
Leu	3.8	6.9	8.4	8.8	8.4	8.7
Tyr	1.9	4.3	4.5	5.0	4.9	4.4
Phe	4.1	4.6	4.7	4.9	5.2	4.6
Lys	7.3	9.7	10.6	9.8	8.8	10.1
His	1.5	1.8	1.9	2.3	2.1	2.1
Arg	—	—	—	0.3	0.3	0.3

각각 30.9, 14.9, 8.8, 7.9, 7.3%로 높은 비율을 나타냈는데, 이들 아미노산들이 어패류의 정미성 아미노산으로 어패류의 독특한 풍미에 큰 구실을 한다는 石田<sup>(17)</sup>과 鴻巢<sup>(18)</sup>의 보고와 일치하는 결과이다. 한편, 반응시간이 경과함에 따라 이들 어패류의 정미성 아미노산의 비율은 감소하는 반면, 소수성 아미노산인 valine, methionine, isoleucine, 그리고 leucine의 함량이 증가함을 확인하였다.

요 약

공업용 protease를 이용하여 홍합을 원료로, 그 extract의 최적 제조조건과 효소의 가수분해 반응에 의한 홍합 단백질 분해물 특징을 조사하였다. 실험에 사용된 6종의 protease 중, Corolase PP가 가수분해도 78.7%로 최대 가수분해도를 나타내었다. 원료의 전처리 공정으로 사용되는 precooking이 홍합이 가지고 있는 자기소화효소를 불활성화시켜 전체 가수분해도를 저하시켰으며, 그 결과 precooking을 하지 않은 경우보다 가수분해도가 5~8% 정도 낮았다. 효소반응에 따르는 홍합 단백질의 분해 pattern을 전기영동과 HPLC 분석에 의해 살펴본 결과, 반응이 경과함에 따라 분자량 100,000 dalton 이상의 고분자 홍합 단백질이 분해되어 분자량 66,000 dalton 이하의 새로운 분해산물이 나타났다. 분자량 30,000 dalton 이하의 단백질 분해 pattern에 있어서는 분자량이 서로 다른 8개의 주요 fraction이 나타났으며 분자량이 8,000 dalton인 fraction 6가 45.8%로 가장 높은 비율을 나타내었다. 한편, 반응시간이 경과함에 따라 홍합의 주요 아미노산인 glycine, alanine, glutamic acid, lysine은 점차 감소한 반면, 소수성 아미노산인 valine, methionine, isoleucine, leucine의 비율이 증가함을 알 수 있었다.

문 헌

1. 高橋：動物エキスの開發と利用. 食品と開發, 23, 59(1988)
2. 金동수：천연수산식품 추출물의 가공과 이용. 식품공업, 64, 47(1982)

3. 이응호, 박영호, 변재형, 김세권：정어리 분말 단백질의 가공 및 이용에 관한 연구. 한국수산학회지, 11, 25 (1978)
4. 한영실, 김경진, 변재형：가열시간별 가물치육 엑스 중의 아미노산 및 관련 화합물의 변화. 한국수산학회지, 19, 141(1986)
5. Ochi, H.: Production and application of natural seafood extracts. *Food Technol.*, 34(11), 51(1980)
6. 김동훈：식품화학. 탐구당, p.112(1990)
7. Quaglia, G.B. and Orban, E.: Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of Sardine protein hydrolysate. *J. Food Sci.*, 55, 1571 (1990)
8. Toyohara, H. and Shimizu, Y.: Degradation of oval-filfish meat gel caused by myofibrillar proteinase. *J. Food Sci.*, 55, 364(1990)
9. Noguchi, M. and Fujimaki, M.: Isolation and identification of acidic oligopeptides occurring in a flavor potentiating fraction from a fish protein hydrolysate. *J. Agr. Food Chem.*, 23, 49(1975)
10. Jaswal, A.S.: Amino acid hydrolysate from crab processing waste. *J. Food Sci.*, 55, 379(1990)
11. A.O.A.C.: *Official Method of Analysis*, 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D. C., p.330(1984)
12. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, 222, 680(1970)
13. Fukushima, D.: Enzymatic hydrolysis of alcohol denatured soybean proteins. *Cereal Chem.*, 46, 405(1969)
14. Evans, R.J.: Hydrolysis of soybean oil meal proteins by some proteolytic enzymes. *Arch. Biochem.*, 11, 15 (1946)
15. Adler-Nissen, J.: Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *J. Agric. Food Chem.*, 24, 1090 (1976)
16. 이응호, 조순영, 하재호, 오광수, 김장량：정어리 잔사를 이용한 정어리 간장의 제조. 한국수산학회지, 17, 117 (1984)
17. 石田賢吾：天然調味料の性質と利用. 日本食品工業學會誌, 25, 167(1978)
18. 鴻巢章：魚貝類の味. 日本食品工業學會誌, 20, 432 (1973)

(1992년 6월 8일 접수)