

우렁쉥이 껍질의 색소 및 효소 가수분해물을 이용한 무지개 송어의 품질 향상

1. 우렁쉥이 껍질 및 효소 가수분해물의 화학적 특성

최병대 · 강석중* · 이강호**

경상대학교 수산대학 식품과학과, *양식학과 · **부산수산대학교 식품공학과

Quality Improvement of Rainbow Trout with Pigments and Enzymatic Hydrolysates of Ascidian (*Halocynthia roretzi*) Tunic

1. Chemical Specificity of Ascidian Tunic and Its Hydrolysates

Byeong-Dae CHOI, Seok-Joong KANG* and Kang-Ho LEE**

Department of Food Science, *Aquaculture, College of Fisheries, Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea

**Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

Properties of enzymatic hydrolysates from ascidian tunic were assessed on supernatant ratio, solid yields and solid concentration. The concentration of solid and yields in the extracts were increased as the enzyme concentration raised from 100 μ l to 1000 μ l during the extraction period. The optima concentration and reaction time of each enzyme on digestion were 400 μ l and 60 minutes, through treated with Duncan's multiple test. The percent of yields of solid, protein and carotenoids for 60 minutes extraction at 400 μ l were 32.32%, 1.34% and 74.60 mg%, respectively, in Viscozyme systems.

The extracts were composed with many kinds of carbohydrates such as arabinose, ribose, xylose, galactose, glucose, N-acetyl-D-galactosamine, and N-acetyl-D-glucosamine.

Aspartic and glutamic acid were noted as predominant amino acids in all parts. Amino acid profiles of various ascidian tunic part were similar to each other, but most of essential amino acids content of inter coat was higher than that of root and tunic (body).

About sixty six fatty acids components were observed, and their distribution among neutral and polar lipids was compared. The main fatty acids were found to be 14:0, 16:0, 16:1n7, 18:0, 18:1n9, 18:1n7, 18:2n6, 20:5n3, and 22:6n3.

Key words : ascidian tunic, enzymatic hydrolysates, carotenoids, carbohydrates, fatty acids

서 론

우렁쉥이는 오래 전부터 태평양 및 인도양 연안국가를 중심으로 식용되어져 왔으며, 최근 우리나라에서는 남해안을 중심으로 다량 양식되어 전 국민에게

공급되고 있다. 특히 양식어류는 양식 할 때 항생제의 과다사용, 인공사료 급이에 따른 맛의 저하로 자연산과는 차별화되어 가고 있다. 또한 해산물의 건강에 대한 중요성과 보건상의 이유 등으로 천연산 어류 및 해산물에 대한 기호도도 점차 증가하고 있다. 비록

이 논문은 1994년도 교육부 학술연구조성비(해양수산과학분야)에 의해 연구되었음.

우렁쉥이가 양식된다고는 하지만 섭이 특성상 천연 플랑크톤을 섭이하기 때문에 천연산의 범주에 넣고 있다. 따라서 수요의 증가로 인하여 kg 당 가격이 1,500원대까지 상승되어 생산량이 계속 증가하고 있다. 우렁쉥이는 생식되는 다른 식품으로 개발되어 있지 않기 때문에 생식이나 가공처리시 껍질이 대량 폐기되고 있다. 이러한 우렁쉥이의 껍질은 쉽게 분해되지 않아 연안해역을 오염시킬 뿐만 아니라 쓰레기 종량제에 따른 여러 문제점을 야기시킬 수도 있을 것이다.

이와 같은 관점에서 본 연구자들은 우렁쉥이 껍질에 대한 연구를 시작하여 껍질속의 색소를 '무지개송어 착색제로서의 이용 가능성'에 관한 연구를 시도하였다. 그 결과 우렁쉥이 껍질 추출물이 인공합성착색제인 carophyll pink (Hoffman La-Roche, Basle, Switzerland)와 같은 착색효과가 있었을 뿐만 아니라 성장 상승 효과도 높았다고 보고하였다 (Lee et al., 1994).

우렁쉥이 껍질에 관한 연구로서 Tsuchiya and Suzuki (1962)가 pepsin, trypsin 및 papain으로 효소처리한 껍질 중의 단백질 함량을 조사한 결과 tunicin에는 비교적 많은 양의 질소가 존재한다고 하였으며, 그 조직은 유사 keratin과 비슷한 아미노산 조성을 가진다고 하였다. 또한 수용성 단백질의 일부는 당을 함유한 당단백질인 것으로 추정하였으며, 식물성 cellulose 일종인 tunicin으로 구성되어 있다고 하였다.

따라서 본 연구에서는 우렁쉥이의 껍질로부터 색소 성분을 용매 추출하는 경우 용매처리에 따른 비용 및 잔류물질의 제거에 따른 문제 등을 해소하기 위한 방안의 하나로 우렁쉥이 껍질 분말에 복합효소 처리를 위한 기본자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

재 료

3년된 우렁쉥이의 껍질을 40°C에서 18시간 열풍건조하여 분쇄기 (FM-700W, Hanil electronic Co.; 39-CTM-100, Kukje scientific Co., Seoul, Korea)로 2단계 분쇄하여 100mesh로 만들어 잘 혼합하여 냉동고에 보관하면서 시료로 사용하였다. 다당류 분해효소인 Viscozyme (100 FBG/g), Celluclast (1500 NCU/g)와

Ultrazyme (5000 FDU/g)은 (주)Novo에서 공급받아 사용하였으며, Viscozyme은 carbohydrases, arabinase, cellulase, β -glucanase, xylanase, hemicellulase가, Celluclast는 cellobiohydrolase, 1,4- β -D-glucosidase, 1,4-D-glucanase가, 그리고 Ultrazyme은 pectintranse-liminase, polygalaturonase, hemicellulase, pectinesterase가 함유된 복합효소로서 이들의 최적온도 및 적정 pH는 각각 40~50°C, 3.5~5.0 범위였다.

껍질 추출액의 제조

껍질분말에 약 10배의 물을 첨가한 후 잘 혼합한 다음, 0.1N HCl로 효소의 적정 pH 5.0으로 조절하여 50°C에서 3시간 예비 활성화시킨 효소 일정량 (100, 200, 400, 800, 1000 μ l)을 첨가하여 50°C의 항온수조에서 천천히 교반하면서 일정시간 분해시켜서 원심분리 (3000 rpm, 20 min) 한 후 상청액 (上淸液)을 분리하였다. 혼합효소인 Viscozyme-Celluclast는 1:1 (v/v)로 각 효소를 혼합하여 다른 효소와 같이 일정량을 첨가하였다.

고형분 수율, 단백질 수율 및 상청액율의 측정

추출액의 단백질 함량은 micro Kjeldahl법에 의하여 측정하였고, 상청액율 (上淸液率, %)은 원심분리 (3000 rpm, 20 min)한 후 튜브를 조심스럽게 기울여 분리시켜 양 (ml)을 측정하여 첨가된 물의 양 (ml)으로 나누어 계산하였다. 가용성 고형분 농도는 refractometer (Atago hand refractometer, Atago Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 Brix를 측정한 다음 105°C 건조법으로 측정한 고형분 농도와 Brix간의 표준직선관계에서 구하였다. 고형분과 단백질 수율은 추출액에 회수된 각각의 양을 추출에 사용된 분말 우렁쉥이 껍질의 함량으로 나누어 백분율 (%)로 환산하였고 각 실험구간의 차이는 Duncan's New Multiple Range Test (Duncan, 1955)로 유의차를 검정하였다.

효소추출액의 당분석

각 효소 처리구의 상청액을 진공동결건조한 후 Chaplin (1982)의 방법에 따라 시료 50 mg을 cap tube에 취하여 건조 메탄올성 HCl과 methyl acetate (4:1, v/v)을 넣은 후 70°C에서 16시간 분해하여 methyl ester는 제거하고 trimethylsilylate화 하였다. 이것을

1. 우렁쉥이 껍질 및 효소 가수분해물의 화학적 특성

capillary column (DB-1, 60 m×0.25 mm i.d., J & W Scientific, CA, USA)이 부착된 GC (Donam System, Model DS6200, Seoul, Korea)로써 분석하였다. 당 조성의 분석조건은 injector 및 detector (FID) 온도는 각각 250°C, column 온도는 100°C에서 240°C까지 3°C/min로 승온시켰다. Carrier gas는 He을 사용하였으며, split ratio는 100 : 1로 하였고, 각 당의 동정은 표준품의 retention time과 Geyer et al. (1982)의 분석결과를 응용하였다.

아미노산 및 총 collagen의 측정

단백질 구성 아미노산 분석은 일정량의 시료에 6N HCl을 가하고 진공 밀봉한 다음 110°C에서 24시간 가수분해 시켰다. 분해된 시료는 회전진공증발농축기로 염산을 제거한 후에 정용하여 아미노산 자동 분석기 (Biochem 20, Pharmacia LKB)로써 아미노산 조성을 분석하였다. 총 콜라겐의 측정은 5g의 마쇄된 시료 (껍질, 내피)를 6N HCl로 가수분해 시킨 후, 활성탄과 Dowex 1×8 이온교환수지를 1 : 2의 중량비로 혼합한 탈색제를 이용하여 humin을 제거하고 탈색하였다. 이를 6N NaOH를 사용하여 중화시킨 후, aminobenzaldehyde법에 따라서 비색정량 하였으며 (Hatae et al., 1986), 콜라겐 함량은 7%의 hydroxyproline을 갖는 것으로 가정하여 환산계산하였다 (Bagason, 1984). 이때 hydroxyproline의 표준곡선은 Fig. 1과 같다.

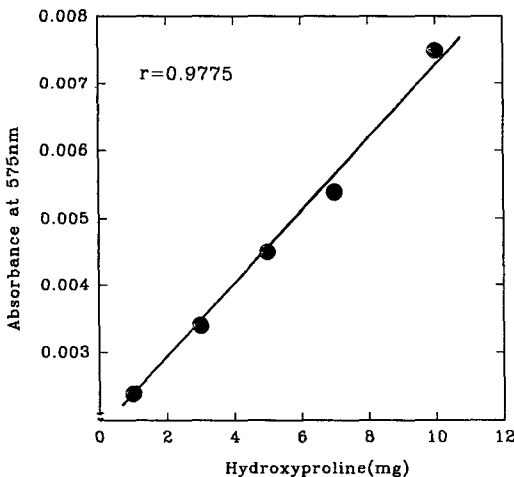


Fig. 1. Standard curve of hydroxyproline.

Carotenoid 함량의 측정

효소 처리 후 남아있는 잔사에 acetone 3배량을 가하여 하룻밤 실온에 방치한 후 색소성분을 추출하고 여과하였다. 이 조작을 3회 반복하여 시료로부터 색소를 충분히 용출시켰다. 여과된 acetone 용액을 회전진공증발농축기로 40°C 이하에서 농축한 후 분액여두로 옮기고 여기에 ether를 가하여 색소성분을 전용시킨 후 다시 회전진공증발농축기를 이용하여 용매를 완전히 제거하여 색소 추출물로 하였다. 총 carotenoid 함량은 MecBeth (1972)의 방법에 따라 흡광계수 $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 2,400$ 으로 하여 계산하였다.

총지질의 추출 및 분획

우렁쉥이 껍질의 총지질은 Folch 법 (1957)으로 추출하였고, 일정량의 총지질을 Sep-Pak silica cartridge (25 mm×10 mm i.d., Waters Milford, MA, USA)를 사용하는 Juaneda and Rocquelin 방법 (1985)에 의해 중성지질 (neutral lipid, NL) 및 극성지질 (polar lipid, PL)로 분획하였다.

지방산조성의 분석

약 100 mg의 총지질을 정평하여 1N KOH-95% ethanol 용액으로 검화한 다음, 검화물을 10% BF₃-methanol 을 3 ml 가하여 95°C에서 20분간 가열하여 지방산 methylester시료를 조제하였다. 이것을 capially column (Supelcowax 10 fused silica column, 30 m×0.25 mm i.d., Supelco Inc., PA, USA)이 부착된 GC (Shimadzu 14-A, Tokyo, Japan)로써 분석하였다. 지방산 조성의 분석조건은 injector 및 detector (FID) 온도는 각각 250°C, column 온도는 185°C에서 8분간 유지한 후 3°C/min로 승온시켜 220°C에서 20분간 유지하였다. Carrier gas는 He을 사용하였으며, split ratio는 100 : 1로 하였고, 각 지방산의 동정은 표준품의 retention time과 비교하였으며, 표준품이 없는 경우는 equivalent chain length 법 (Ackman, 1989)에 의해 동정하였다.

결과 및 고찰

Table 1. Values of supernatant, solid concentration, solid yields of ascidian tunic extracts as affected by enzyme concentration

Enzyme ¹ concentration(μl)	Supernatant (%)	Solid yield (%)	Solid concentration (%)
Viscozyme			
0	53.21 ± 2.46 ^{az}	15.96 ± 1.01 ^a	6.54 ± 0.43 ^a
100	56.93 ± 3.15 ^a	23.06 ± 2.46 ^b	8.38 ± 0.68 ^{ab}
200	55.20 ± 1.11 ^a	27.85 ± 1.06 ^c	10.19 ± 0.22 ^{bc}
400	58.06 ± 2.35 ^a	31.81 ± 2.55 ^d	11.55 ± 0.34 ^{cd}
800	58.97 ± 1.65 ^a	37.65 ± 2.84 ^e	12.85 ± 1.30 ^d
1000	56.35 ± 3.65 ^a	35.05 ± 1.25 ^{de}	12.41 ± 2.85 ^{cd}
Celluclast			
0	52.68 ± 2.46 ^a	16.83 ± 1.01 ^a	6.53 ± 0.58 ^a
100	58.43 ± 3.24 ^{ab}	27.87 ± 1.54 ^b	8.79 ± 0.98 ^{ab}
200	59.77 ± 2.09 ^{ab}	34.40 ± 1.48 ^{bc}	11.73 ± 0.77 ^{bc}
400	62.68 ± 3.42 ^{ab}	39.25 ± 2.65 ^c	14.19 ± 0.85 ^{cd}
800	67.61 ± 2.81 ^{bc}	50.44 ± 2.35 ^d	15.91 ± 2.94 ^d
1000	71.88 ± 1.49 ^c	57.42 ± 3.84 ^d	16.97 ± 2.79 ^d
Visco : Cellu(1 : 1)			
0	52.96 ± 2.46 ^a	16.27 ± 1.01 ^a	6.57 ± 0.26 ^a
100	56.81 ± 2.35 ^{ab}	24.38 ± 2.43 ^{ab}	8.98 ± 0.79 ^{ab}
200	58.24 ± 3.99 ^{ab}	29.93 ± 0.59 ^b	10.64 ± 0.66 ^{bc}
400	61.85 ± 3.17 ^{bc}	41.18 ± 1.00 ^c	13.40 ± 1.05 ^{cd}
800	66.83 ± 2.43 ^c	50.61 ± 3.09 ^{cd}	15.17 ± 2.56 ^{de}
1000	67.77 ± 2.61 ^c	57.27 ± 3.51 ^d	17.00 ± 2.51 ^e
Ultrazyme			
0	53.01 ± 2.46 ^a	16.49 ± 1.01 ^a	6.34 ± 0.07 ^a
100	51.75 ± 4.12 ^a	21.27 ± 2.90 ^a	8.26 ± 0.52 ^{ab}
200	56.31 ± 3.40 ^{ab}	31.00 ± 2.51 ^b	11.10 ± 1.29 ^{bc}
400	59.44 ± 4.12 ^b	37.86 ± 2.31 ^{bc}	12.88 ± 1.33 ^{cd}
800	58.57 ± 2.33 ^b	42.86 ± 2.75 ^c	14.76 ± 1.26 ^d
1000	61.99 ± 1.52 ^b	44.79 ± 2.88 ^c	15.56 ± 1.54 ^d

¹ Treated at 50°C for 3 hrs.

² Values with different letter in same column are significantly different (p<0.05).

효소분해의 영향

우렁쉥이 껍질의 분해를 위하여 사용한 효소는 여러가지 다당류를 분해시킬 수 있는 복합효소로 우렁쉥이 껍질 추출액의 수율과 특성에 미치는 영향을 Table 1, 2 및 Fig. 2, 3에 각각 나타내었다.

적정한 효소량을 결정하기 위하여 1g의 시료에 증류수 10 ml를 넣은 후 활성화된 효소를 100, 200, 400, 800 및 1000 μl씩 첨가하였을 때 추출액의 불용성 고형분과의 분리능력을 의미하는 상청액율은 효소 첨가구의 농도가 55.20~71.88%로 효소 무처리구인 대조

1. 우렁쉥이 껍질 및 효소 가수분해물의 화학적 특성

Table 2. Values of solid and protein yields of ascidian tunic extracts as affected by enzyme hydrolysis time

Enzyme ¹	Hydrolysis time (min)					
	20	40	60	120	180	240
Solid yield (%)						
Viscozyme	26.78 ± 0.87	27.42 ± 2.20	32.32 ± 2.48	30.68 ± 0.39	31.79 ± 1.23	31.21 ± 0.28
Celluclast	25.57 ± 0.37	30.57 ± 2.83	34.07 ± 1.15	33.11 ± 2.41	34.37 ± 2.42	34.61 ± 2.29
Visco-Cellu	27.20 ± 2.36	27.63 ± 1.53	32.35 ± 2.50	35.31 ± 1.60	36.12 ± 1.34	35.59 ± 2.19
Ultrazyme	25.43 ± 3.39	30.80 ± 1.16	30.40 ± 2.05	33.33 ± 3.21	34.83 ± 2.19	34.87 ± 2.22
Protein yield (%)						
Viscozyme	1.13 ± 0.07	1.24 ± 0.01	1.34 ± 0.01	1.43 ± 0.13	1.60 ± 0.09	1.81 ± 0.08
Celluclast	0.74 ± 0.02	0.78 ± 0.02	0.82 ± 0.04	0.86 ± 0.04	0.85 ± 0.02	0.88 ± 0.03
Visco-Cellu	0.84 ± 0.04	0.86 ± 0.04	0.89 ± 0.03	1.07 ± 0.21	1.27 ± 0.09	1.39 ± 0.02
Ultrazyme	0.46 ± 0.03	0.52 ± 0.02	0.56 ± 0.03	0.57 ± 0.01	0.66 ± 0.02	0.96 ± 0.02

¹ Enzyme concentration is 400 μl.

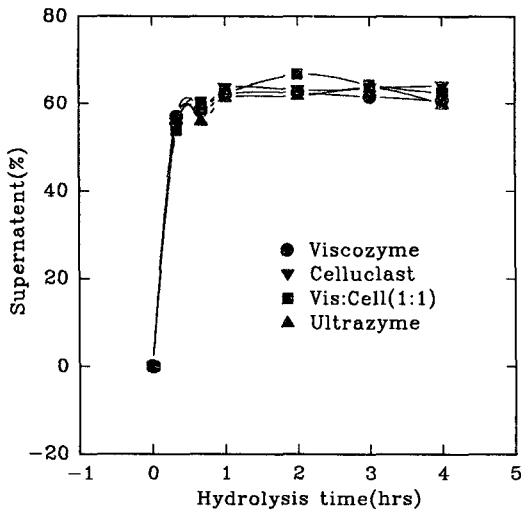


Fig. 2. Changes in the amount of centrifuged supernatant of the ascidian tunic slurry as affected by enzymatic hydrolysis at 50°C.

구 52.68%에 비하여 모두 높았다. Celluclast는 1000 μl 첨가시 71.88%까지 계속 증가하여 분해능이 가장 좋았으며, viscozyme은 농도가 증가함에 따라 800 μl까지는 약간씩 증가하였다가 1000μl의 농도에서는 감소하였다. 고형분 수율은 celluclast 1000μl 처리구가 57.42%로 가장 좋았다. Visco : cellu (1 : 1, v/v)도 24.38 ~ 57.27%로 농도가 증가함에 따라 고형분 수율도 증가하였으나, viscozyme 800μl 처리구는 37.65%로 증

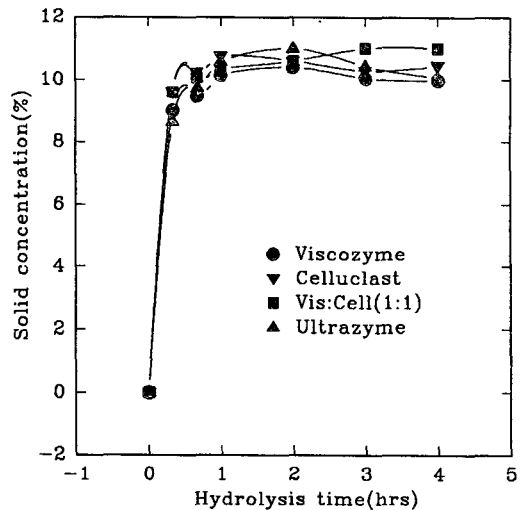


Fig. 3. Changes in solid concentration of supernatant obtained after centrifugation during enzymatic hydrolysis with a concentration of 400 μl at 50°C.

가하였지만 1000μl 첨가후에는 도리어 감소하였을 뿐만 아니라 다른 세구에 비하여 효소 농도별로 가장 낮은 수율을 보였다. Ultrazyme에 의한 고형분 수율은 농도의 증가에 따라 증가하여 1000μl에서는 44.79%를 나타내었다. 상청액의 고형분 농도 역시 celluclast와 visco : cellu (1 : 1, v/v)는 농도 증가에 따라 거의 비슷한 변화를 보였으며, viscozyme은 고형분 농도는 대

조구 6.54%에서 800 μ l의 12.85%까지 증가하다가 1000 μ l 농도에서는 12.41%로 감소하였다. 이와같은 결과를 이용하여 Duncan multiple test를 실시하여 각 인자간의 상관관계를 고려한 후 기준 농도를 400 μ l로 설정하고 (Table 1), 기준 농도에 따른 최적 분해시간을 결정하고자 하였다 (Fig. 2, 3; Table 2).

효소 400 μ l를 첨가하여 50 $^{\circ}$ C에서 20, 40, 60, 120, 180, 240분간 효소분해한 결과 상청액은 60분 분해 시까지는 효소의 종류에 관계없이 약간씩 증가하다가 60분 이후부터는 거의 변화가 없었고 (Fig. 2), 상청액의 고형분 농도는 분해 60분까지는 celluclast가 가장 좋았다. Visco-cellu 혼합효소구는 240분까지 완만한 증가를 보였으나, viscozyme, celluclast 및 ultrazyme 처리구는 120분 이후 감소하는 경향이였다 (Fig. 3). 고형분수율은 viscozyme과 celluclast는 60분까지는 증가하였으나 이후 완만한 변화를 보였다. 60분 분해 시 고형분 수율은 celluclast가 가장 높아 34.07%였으나, 120분 분해시에는 visco : cellu 혼합효소 처리구가 35.31%로 가장 높았고, 180분 이후에는 거의 변화가 없어 효소작용에 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 이와 아울러 효소작용에 따른 단백질 수율의 차이는 고형분 수율과 차이를 보여 ultrazyme 처리구의 단백질 수율은 낮았으나 시간 경과에 따라 서서히 증가하였다. 가장 높은 단백질 수율은 viscozyme 처리구였고 시간경과에 따라 증가하였다. Visco-cellu 혼합효소 처리구는 분해초기에는 수율이 낮았으나 시간경과에 따라 viscozyme 처리구와 같이 증가하는 경향이였다.

또한, 효소처리에 따른 색소함량을 측정한 결과 (Table 3) viscozyme 처리구의 색소함량이 가장 낮게

나타나 단백질 수율과 상반되는 결과를 보였다. 가장 높은 함량을 나타낸 celluclast구는 120분 분해시까지 는 증가하다가 이후 완만한 변화를 보였으며, visco : cellu 혼합구도 120분 이후 감소하는 경향이였다. 따라서 연어과 어류의 사료를 제조하기 위한 우렁쉥이 껍질의 효소가수분해 조건은 이와같은 여러가지 변화를 기초로 visco : cellu (1 : 1, v/v) 혼합효소 처리구로 50 $^{\circ}$ C에서 60분간 효소분해하는 것이 가장 효과적일 것으로 추정하였다.

효소추출액의 당 조성 분석

우렁쉥이 껍질 분말에 혼합효소 400 μ l를 가하여 50 $^{\circ}$ C에서 180분간 분해시켜 얻어진 상청액을 진공동결 건조 시킨 후 일정량을 취하여 trimethylsilylate화 하여 GC 분석한 결과는 Fig. 4와 같다. Viscozyme (V) 처리구의 경우 arabinose, ribose, xylose와 같은 5탄당의 peak는 흔적량이였으나, glucose나 N-acetyl-D-galactosamine의 함량은 가장 높게 나타났다. Celluclast (C) 처리구는 V 처리구와는 달리 5탄당인 xylose가 검출되었고, N-acetyl-D-galactosamine의 함량은 낮은 반면 glucose, N-acetyl-D-glucosamine이 주성분으로 나타났다. 이로 미루어 볼 때 우렁쉥이 껍질은 C의 구성효소에 의하여 당 성분의 일부가 가장 잘 분해되어지는 것으로 추정된다. Ultrazyme (U)은 glucose 유리능이 가장 좋았으며, arabinose나 xylose와 같은 5탄당도 일부 유리되었다. 그러나 혼합효소 처리구인 visco-cellu (VC)는 glucose와 N-acetyl-D-galactosamine의 함량이 높은 것으로 미루어 볼 때 C 효소보다는 V 효소에 의한 영향이 큰 것으로 추정된다.

Table 3. Changes in carotenoid yields of ascidian tunic extracts during enzymatic hydrolysis at 50 $^{\circ}$ C (mg%)

Enzyme ¹	Hydrolysis time (min)					
	20	40	60	120	180	240
Viscozyme	69.09 \pm 2.22	72.54 \pm 2.16	74.60 \pm 2.16	76.77 \pm 1.08	78.05 \pm 1.03	79.52 \pm 0.59
Celluclast	79.01 \pm 0.38	88.14 \pm 1.46	91.51 \pm 1.36	95.66 \pm 0.52	96.19 \pm 0.70	95.46 \pm 0.22
Visco-Cellu	75.23 \pm 2.36	81.25 \pm 2.61	83.41 \pm 1.50	83.61 \pm 1.02	82.40 \pm 1.58	81.93 \pm 0.99
Ultrazyme	66.75 \pm 1.82	73.11 \pm 2.21	76.46 \pm 1.69	78.24 \pm 2.63	77.32 \pm 2.11	85.34 \pm 1.20

¹ Enzyme concentration is 400 μ l.

1. 우렁쟁이 껍질 및 효소 가수분해물의 화학적 특성

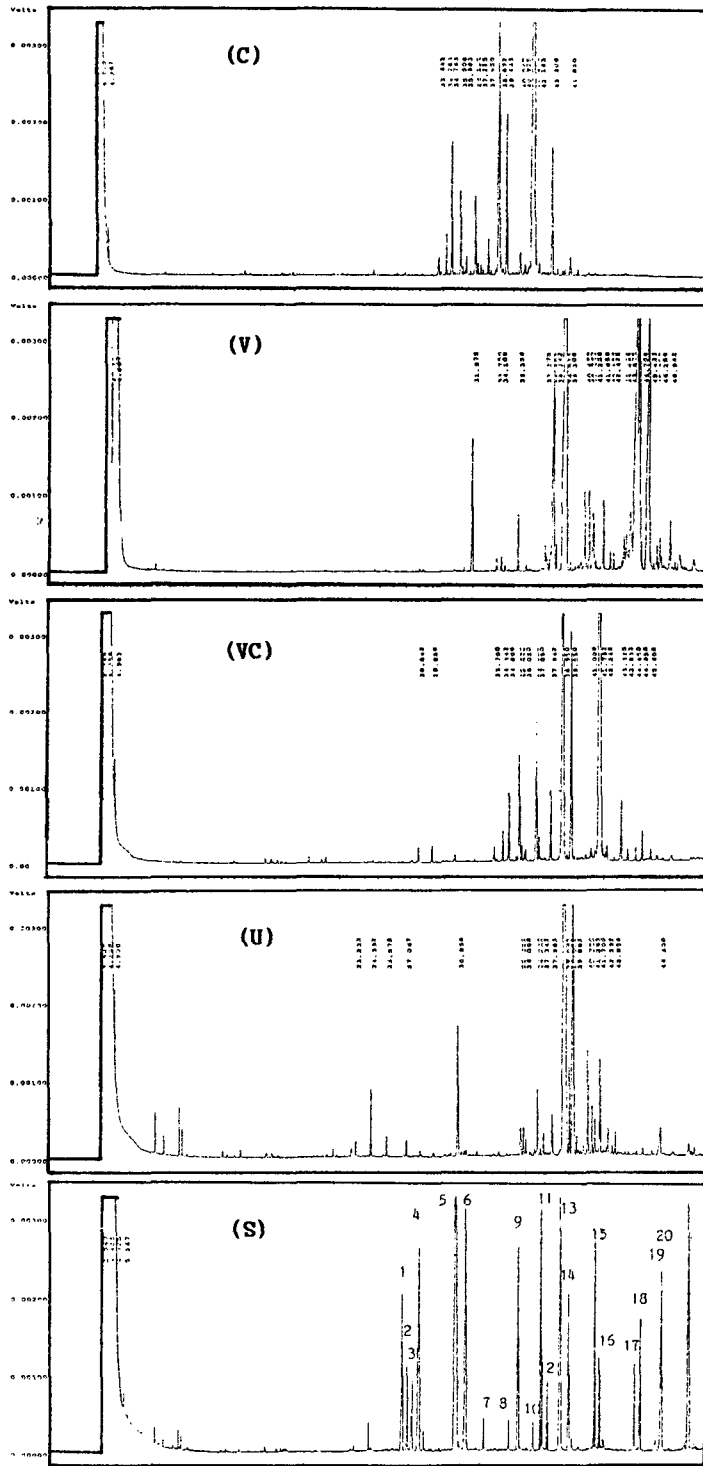


Fig. 4. GC chromatogram of trimethylsilylated monosaccharides derived from the hydrolytic products of ascidian tunic extracts. (V) was viscozyme treated, (C) was celluclast treated, (VC) was Visco-Cellu (1 : 1, v/v) treated, and (U) was Ultrazyme treated. The peaks were identified from standard chromatogram (S). Peak number of 1,2 is arabinose, 3,4 is ribose, 5,6,7,8 is xylose, 9,10 is mannose, 11, 12 is galactose, 13,14 is glucose, 15,16 is N-acetyl-D-galactosamine, 17,18,19,20 is N-acetyl-D-glucosamine.

Anno et al. (1974)의 분석결과에 따르면 우렁쟁이 껍질 중 수용성 다당류는 sulfate성 chitin 화합물로서 hexamine이 전체 희분의 45%를 차지하고 그 중 glucosamine이 39.6%를 구성하며, hexose로서는 galactose가 4.6% 였다고 하였다. 본 실험에서는 효소처리 결과 효소분해물 중에는 6탄당인 galactose와 glucose를 비롯한 galactosamine과 glucosamine의 함량이 높은 것으로 나타났다.

아미노산 및 총 collagen 함량의 측정

우렁쟁이 껍질은 약 40%의 단백질(건물량)을 함유하고 있지만 각 부위별 단백질 구성 아미노산 조성을 분석하기 위하여 껍질, 내피 및 뿌리 부분으로 나누어서 분석한 결과를 Table 4에 나타내었다.

우렁쟁이 껍질 자체를 무지개 송어 사료에 첨가하여 이용할 경우 성장에 큰 영향을 미치는 것으로 명되었다(Lee et al., 1994). 따라서 껍질을 어류가 소화할 수 있는 형태로 만들기 위해 색소가 분해되지 않고 어류의 성장을 저해하지 않는 범위내에서 고압 가열처리나 효소처리와 같은 전처리를 할 수 있을 것이다.

무지개 송어의 원활한 성장을 위한 아미노산 요구량은 체중 100 g 당 하루 Arg 28 mg, Lys 43 mg, Met 20 mg 및 Trp 4.7 mg을 요구한다고 하였다(Satia, 1974; Zeitoun et al., 1976). 껍질의 경우 Asp, Glu가 각각 2.38 g/100g sample으로 가장 함량이 많았고, Arg, Lys 및 Met이 각각 1.12, 1.41 및 0.32 g/100g sample이었다. Satia (1974)의 실험결과와 비교해 볼 때 소화될 수 있는 형태의 우렁쟁이 껍질을 10%만 첨가하여도 이들 필수 아미노산 함량은 요구량을 충족시킬 수 있을 것이다. 뿌리의 경우도 Glu, Asp의 함량이 가장 많았으나 껍질보다는 단백질 함량이 낮은 것으로 나타났다. 각 부위별 아미노산 함량은 내피 중의 함량이 가장 높아 21.00 g/100g sample이었고, 껍질은 18.18 g/100g sample, 뿌리는 11.00 g/100g sample이었다. 따라서 사료에 첨가시에는 색소 함유량 및 아미노산 함유량을 높이기 위하여 뿌리 부분을 절단하는 것이 효율적이라 추정된다.

수산동물의 경단백질은 collagen, connectin 및 의사-keratin 등이 있고, 이들의 아미노산 조성도 각각 다르다. Collagen은 CySS, Cys과 같은 함황아미노산

Table 4. Amino acid compositions and total collagen content of ascidian

	Tunic	Inter ¹	Root
Amino acid (g/100g sample)			
Aspartic acid	2.38	2.66	1.46
Threonine	1.00	1.17	0.67
Serine	1.05	1.20	0.77
Glutamic acid	2.38	2.92	1.54
Proline	0.47	0.58	0.31
Glycine	1.14	1.21	0.72
Alanine	0.80	0.91	0.49
Valine	1.05	1.19	0.64
Methonine	0.32	0.46	0.19
Isoleucine	0.84	0.95	0.48
Leucine	0.92	1.18	0.53
Tyrosine	1.03	1.38	0.38
Phenylalanine	1.25	1.45	0.43
Histidine	0.41	0.39	0.30
Lysine	1.41	1.37	0.96
NH3	0.69	0.79	0.45
Arginine	1.12	1.27	0.68
Total	18.18	21.00	11.00
Crude protein(%)	21.68	24.98	13.86
Total collagen (mg-protein/g sample)	2.71	5.28	

¹ Inter coat of ascidian tunic.

은 적고, Trp은 함유되지 않으며, 특히 Gly, Pro 및 Hyp은 특이하게 많다고 하였으며, 또한 keratin은 CySS을 다량 함유하여 11~12%에 이르지만, 의사-keratin은 4~8% 밖에 되지 않는다고 하였다(Kimura et al., 1988).

우렁쟁이 껍질은 collagen에 없는 Cys와 Trp을 각각 6.5%, 4.8% 함유하고, collagen에 20~28% 및 8~16%나 되는 Gly 및 Pro은 각각 6.8%, 4.8% 밖에 함유하지 않으므로 collagen보다는 의사-keratin과 유사한 아미노산 조성을 보였다고 하였다(Tsuchiya and Suzuki, 1961).

그러나 본 실험결과 우렁쟁이 껍질 중에는 총 collagen 함량이 2.71 mg, 내피에는 5.28 mg으로 나타나 내

1. 우렁쟁이 껍질 및 효소 가수분해물의 화학적 특성

Table 5. Fatty acid compositions of ascidian tunic (Area %)

ECL ¹	Fatty acid	TL ²	NL ²	PL ²	ECL	Fatty acid	TL	NL	PL
11.98	12:0	0.50	0.49	0.64	18.35	18:2n9	0.14	0.30	0.11
12.45	13:0 iso	0.14	0.10	0.41	18.61	18:2n6	2.17	2.17	2.12
12.97	13:0	0.21	0.20	1.14	18.83	18:2n4	0.10	0.12	0.05
13.56	14:0 iso	0.31	0.26	1.85	18.93	18:3n6	0.40	0.43	0.24
14.00	14:0	4.65	5.23	3.37	19.00	19:0	-	-	0.20
14.11	TMTD	0.24	0.27	0.21	19.17	18:3n4	0.10	0.08	0.15
14.17	14:1n9	0.20	0.25	0.23	19.35	18:3n3	1.50	1.25	0.83
14.29	14:1n7	0.31	0.29	0.51	19.40	18:3n1	0.18	0.19	0.30
14.39	14:1n5	0.11	0.07	0.32	19.64	18:4n3	1.04	1.24	0.22
14.53	15:0 iso	0.94	0.77	1.58	19.79	18:4n1	0.10	0.11	0.15
14.67	15:0 anteiso	0.64	0.46	1.00	20.00	20:0	0.42	0.32	1.16
15.00	15:0	1.40	1.21	1.79	20.14	20:1n11	0.09	0.10	0.09
15.16	15:1n8	0.21	0.23	0.40	20.26	20:1n9	0.44	0.41	0.37
15.38	15:1n6	0.06	0.05	0.14	20.40	20:1n7	1.81	1.73	1.27
15.55	16:0 iso	0.52	0.50	0.65	20.64	20:2NMID	1.15	1.17	0.84
15.69	16:0 anteiso	0.19	0.22	0.32	20.78	20:2n6	0.23	0.27	0.18
15.84	pristanic	0.69	0.16	1.85	20.96	20:3n6	0.08	0.09	0.15
16.00	16:0	17.56	19.18	10.95	20.99	20:3n4	0.39	0.48	0.29
16.20	16:1n7	8.17	8.07	7.23	21.09	20:3n3	-	-	0.97
16.31	7Me 16:0	0.36	0.37	0.40	21.19	20:4n6	4.50	4.25	6.50
16.38	16:1n5	0.49	0.11	0.94	21.52	20:4n3	0.49	0.66	0.40
16.47	16:2n6	0.58	0.44	0.87	21.64	20:5n3	7.85	8.36	6.69
16.56	17:0 anteiso	0.71	0.76	0.63	22.00	22:0	0.52	0.35	1.03
16.78	16:2n4	0.67	0.71	0.49	22.14	22:1n13	1.12	1.13	1.09
16.82	17:0	0.88	0.39	1.50	22.21	22:1n9	0.97	1.16	0.67
16.95	16:3n4	0.19	0.19	0.01	22.25	22:1n7	0.95	1.08	0.79
17.13	16:3n3	0.74	0.60	0.99	22.35	21:5n3	0.50	0.53	0.40
17.22	16:3n1	0.14	0.06	0.23	23.14	22:4n6	0.60	0.73	0.74
17.36	16:4n3	0.41	0.08	0.77	23.39	22:5n6	0.59	0.67	1.24
17.43	16:4n1	0.25	0.24	0.32	23.65	22:4n3	0.41	0.38	0.42
18.00	18:0	6.82	6.50	4.31	23.80	22:5n3	0.95	1.08	1.36
18.04	18:1n9	5.61	6.45	3.20	24.08	22:6n3	5.83	6.26	7.11
18.16	18:1n7	6.82	5.04	7.13	24.19	24:1n9	0.48	0.09	0.69
Total n3		19.72	20.44	20.16	Total sat ³		37.46	37.47	34.78
Total n6		9.21	9.10	12.18	Total unsat		62.63	62.70	65.38
Ratio n3/n6		2.14	2.25	1.66	Ratio sat/unsat		0.60	0.60	0.53
Total mono		27.22	26.26	25.07	Total unknown		2.89	3.03	4.96
Total PUFA		35.41	36.44	40.31					

¹ ECL; equivalent chain length. ² TL; total lipids, NL; neutral lipids, PL; polar lipids.

³ Sat; saturated fatty acids, unsat; unsaturated fatty acids, mono; mono unsaturated fatty acids, PUFA; polyunsaturated fatty acids.

피 중의 총 collagen 함량이 높았다. Kimura et al. (1972)에 의하면 우렁쉥이 근막체의 조단백질 중 collagen 함량이 12%에 이른다고 하여 본 실험 결과와 비슷한 함량을 보였다.

우렁쉥이 껍질의 지방산조성

우렁쉥이 껍질의 총 지질 (TL)을 중성지질 (NL)과 극성지질 (PL)로 분획한 후, methylester화 하여 GC로 분석한 각 지방산으로부터 0.1% 이상의 면적을 갖는 지방산 총 66 종을 동정하여 Table 5에 나타내었다. 이를 다른 해양 무척추동물들과 비교해 볼 때 그 조성이 매우 다양하였다 (Joseph, 1989).

모세관 칼럼에 의해 분리된 TL의 지방산 중 2% 이상을 차지하는 지방산은 14:0, 16:0, 16:1n7, 18:0, 18:1n9, 18:1n7, 18:2n6, 20:4n6, 20:5n6 및 22:6n3 이었다. NL 및 PL 지방산조성도 TL과 같은 경향이었고, 이들 주 지방산 함량은 TL, NL 및 PL의 각각 약 70%를 차지하였다. TL 중 포화산의 함량은 37.46%, monoene 산의 함량은 27.22%, 고도불포화산 (polyunsaturated fatty acids, PUFA)의 함량은 35.41%였으며, 총 n-3계 지방산은 20%이며 이의 70%가 EPA (eicosapentaenoic acid), DHA (docosahexaenoic acid)였고, 총 n-6계 지방산은 9%로 이 중 50%가 arachidonic acid (AA) 였다.

포화지방산 중에서는 14:0, 16:0 및 18:0가 주성분이었으며, NL에서는 14:0 및 16:0의 함량비가 높았으나, TL에서는 18:0의 함량비가 높게 나타났다. 그러나 13:0, 15:0, 17:0, 20:0 및 22:0 등은 TL, NL에 비하여 PL의 함량이 높았지만 1~2% 범위였다. Kusaka et al. (1985)과 Vysotskii et al. (1992)에 의하면, 우렁쉥이 육질의 포화지방산 중 14:0의 함량이 높았다고 하였으나, Kosetetsky et al. (1983)은 이 지방산의 함량은 높지 않았다고 하여 서로 상반된 결과를 보고하고 있다. 껍질중에서는 4.65%로 높게 나타나 포화지방산의 주성분인 것으로 사료된다. 그 외 포화지방산의 이성체인 iso, anteiso 13:0, 14:0, 15:0, 16:0 및 17:0 등은 TL의 4.7%나 되어 껍질 지방산의 다양화에 기여하는 것으로 나타났다.

TL 중 14:1, 16:1, 18:1, 20:1, 22:1 등의 monoene 산 중 16:1n7, 18:1n7 등 n-7 계열이 대부분 (약 55%)을 차지하였으며, NL 및 PL에서는 n-9 계열보다도 그

함량이 높은 것으로 나타났다. Kusaka et al. (1985)에 의하면 육 지질에서는 15:1, 24:1 등이 검출되었으나, Vysotskii et al. (1992)은 검출되지 않았다고 하였으며, 특히 17:1, 19:1과 이들 이성체의 존재를 확인하였다. 본 실험결과 껍질에서는 15:1, 24:1은 검출되었으나 17:1, 19:1 등의 지방산은 검출되지 않았다. 이로 미루어 두 연구자가 사용한 컬럼 및 분석조건이 서로 상이하여 지방산의 분리능, ECL 값 등에 따른 차이가 있었던 것으로 생각되어진다.

껍질 지질의 TL 중 PUFA 함량은 35.41%였다. 이 중 18:2n6는 TL, NL 및 PL 중 각각 2.17%, 2.17%, 2.12%였으며, 20:4n6에서는 각각 7.85%, 8.36%, 6.69%였고, 22:6n3는 각각 5.83%, 6.26%, 7.11%로 나타났다. Lee et al. (1993)은 통영산 우렁쉥이의 계절별 지방산 조성에 관한 연구에서 PUFA의 함량이 41~49%라고 하여 Vysotskii et al. (1992)의 54.8%와 비슷하였으나, Yoshioka (1981)는 육 중 PUFA가 8% 이하라고 하여 많은 차이를 나타내고 있다. 일반적으로 우렁쉥이는 식물성 플랑크톤을 먹이생물로 섭식하는 것으로 밝혀져 있고, 이와 아울러 18:2n6인 linoleic acid 함량이 극성지질의 3%를 초과하지 못하며, DHA는 거의 20%에 이른다고 하였으나 (Akulin et al., 1975), Kostetsky et al. (1983)에 의하면 linoleic acid가 우렁쉥이 육 지방산조성에서는 15%로 나타난다고 하기도 하였다. 따라서 우렁쉥이 인지질 중 18:2n6가 1.76%, DHA가 20.94% 였다는 보고 (Lee et al., 1993)와 껍질 중 18:2n6의 함량이 2.17% 였다는 것으로 미루어 볼 때 우렁쉥이 성장에 필요한 EPA, DHA는 육중에 저장되었으며 껍질로의 이행은 적었다는 것을 유추할 수 있다.

감사의 글

효소를 제공해주신 (주)Novo-Korea사에 감사드립니다.

요 약

참 고 문 헌

우렁쉥이 껍질은 다량의 색소를 함유하지만 껍질 자체는 어류가 소화시킬 수 없는 구조를 갖기 때문에 색소분해가 일어나지 않도록 고압 가열하거나 효소처리하여 소화할 수 있는 상태로 만들면 어류 사료에 직접 첨가할 수 있게 된다. 따라서 본 실험은 우렁쉥이 껍질 분말에 viscozyme, celluclast, visco-cell (1 : 1), ultrazyme 등의 복합효소를 일정량 첨가한 후 50°C에서 일정시간 분해시키면서 일어나는 화학적 변화를 조사하였다.

불용성 고형분과의 분리능력을 의미하는 상청액율은 효소 첨가구의 농도가 55.20~71.88%로 효소 무처리구의 52.68%에 비하여 높았고, 고형분 수율도 800 µl 첨가시 까지는 증가하다가 이후 감소하는 경향이 있었다. 이를 토대로 Duncan multiple test를 하여 각 인자간의 상관관계를 고려한 후 기준 첨가량을 400 µl로 하였다.

각 효소의 최적 반응시간을 결정하기 위하여 껍질 분말에 각 효소 400 µl를 첨가한 후 20, 40, 60, 120, 180, 240분간 반응시켰다. 효소의 종류에 관계없이 고형분 수율, 상청액 율 및 고형분 농도 값이 반응 60분 후에는 거의 변화가 없는 것으로 나타났다.

상청액 중 당 조성을 분석한 결과 viscozyme 처리구는 glucose, N-acetyl-D-galactosamine이 주성분이었고, celluclast 처리구는 glucose, N-acetyl-D-glucosamine이, ultrazyme 처리구는 glucose가 주성분이었으며, visco-cellu (1 : 1) 혼합효소구는 celluclast에 의한 영향이 큰 것으로 나타났다.

껍질은 약 40%의 단백질 (건물량)을 함유하지만, 각 부위별 아미노산 조성은 내피 중의 함량이 가장 높아 21.00 g/100 g sample이었다. 이들 아미노산 함량 중 Asp와 Glu가 가장 많았고, 내피 중 펠수아미노산의 함량도 껍질보다 높았다.

껍질 중의 지방산 조성은 매우 다양하였으며, 포화지방산 중에서는 14 : 0, 16 : 0, 18 : 0가 주성분이었으며, 불포화지방산 중에서는 n-3 계열의 총지질 (TL), 중성지질 (NL), 극성지질 (PL)이 각각 19.72%, 20.44%, 20.10%였고, n-6 계열의 TL, NL, PL이 각각 9.21%, 9.10%, 12.18%였다. 총 포화지방산의 함량은 PL이 40.31%, NL이 36.44%, TL이 35.41%로 PL의 함량이 높았다.

Ackman, R.G. 1989. Marine biogenic lipids, fats, and oils. CRC press, Boca Raton, Florida, pp. 3~48.

Akulin, V.N., E.P. Karedin and T.A. Peruninskaya. 1975. Fatty acid composition of the lipids in large Pacific zooplankters. *Gidrobiol. Zh.*, 11, 40~45 (in Russian).

Anno, K., K. Otsuka and N. Seno. 1974. A chitin sulfate-like polysaccharide from the test of the tunicate *Halocynthia roretzi*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 362, 215~219.

Bagason, S.G. 1984. Characterization of the intramuscular connective tissue collagen of three rockfish species (*Sebastes*). Oregon State Uni., Ph. D. Thesis.

Chaplin, M.F. 1982. A rapid and sensitive method for the analysis of carbohydrate components in glycoproteins using gas-liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 123, 336~341.

Duncan, D.B. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometrics*, 11, 1~42.

Folch, J., M. Lee and G.A. Sloane-Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from tissues. *J. Biol. chem.*, 226, 497~509.

Geyer, R., H. Geyer, S. Kühnhardt, W. Mink and S. Stirn. 1982. Capillary gas chromatography of methylhexitol acetates obtained upon methylation of N-glycosidically linked glycoprotein oligosaccharides. *Anal. Biochem.*, 121, 263~274.

Hatae, K., A. Tobimatsu, M. Takeyama and J.J. Matsumoto. 1986. Contribution of the connective tissues on the texture difference of various fish species. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 52, 2001~2007.

Joseph, J.D. 1989. Distribution and composition of lipids in Marine invertebrates. In marine biogenic lipids, fats, and oils, Vol. 2, R.G. Ackman, ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 49~143.

- Juaneda, P. and G. Rocquelin. 1985. Rapid and convenient separation of phospholipids and non-phosphorous lipid from rat heart using silica cartridges. *Lipids*, 20, 40~41.
- Kimura, S., N. Kobayashi and M. Kubota. 1972. Studies on marine collagens-VI. Some properties of collagen from an ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 38, 1163~1169.
- Kostetsky, E.Y., N.V. Naumenko and N.I. Gerasimenko. 1983. Phospholipid composition of 13 species of tunicates. *Biologiya Morya*, N.2, 51~56 (in Russian).
- Kusaka, H., Y. Kaga, Y. Saiki and S. Ohta. 1985. Seasonal changes in the fatty acid composition of ascidian lipids. *Yukagaku*, 34, 262~270 (in Japanese).
- Lee, K.H., C.S. Park, B.I. Hong and W.J. Jung. 1993. Utilization of ascidian, *Halocynthia roretzi*. 2. Lipids of ascidian with seasonal and regional variation. *Bull. Kor. Fish. Soc.*, 26, 141~149 (in Korean).
- Lee, K.H., S.J. Kang, B.D. Choi, Y.J. Choi and M.G. Youm. 1994. Utilization of ascidian (*Halocynthia roretzi*) tunic. 1. Effect of ascidian tunic extracts on pigmentation and growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull. Kor. Fish. Soc.*, 27, 232~239 (in Korean).
- MecBeth, T. W. 1972. Carotenoids from mudibranchs. *Comp. Biochem. physiol.*, 41B, 55~68.
- Satia, B.P. 1974. Quantitative protein requirements of rainbow trout. *Progress in Fish Culture*, 36, 80~85.
- Tsuchiya, Y. and Y. Suzuki. 1962. Biochemical studies of the ascidian, *Cynthia roretzi* v. Drasche-VI. The presence of pseudo-keratin in test. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 28, 222~226 (in Japanese).
- Vysotskii, M.V., T. Ota and T. Takagi. 1992. n-3 Polyunsaturated fatty acids in lipids of ascidian *Halocynthia roretzi*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58, 953~958.
- Yoshioka, M. 1981. The occurrence and distribution of furan fatty acids in marine lives. *Ann. Rep. Inst. Living Sci. Miyagi Gakuin Women's Coll.*, 14, 10~13.
- Zeitoun, I.H., D.E. Ullrey, W.T. Magee, J.L. Gill and W.C. Bergen. 1976. Quantifying nutrient requirements of fish. *J. Fish. Res. Board Can.*, 33, 167~172.

1995년 11월 22일 접수

1996년 5월 4일 수리