

참치 유래 조효소를 이용한 민태(*Johnius belengeri*) Frame으로부터 단백질 가수분해물의 회수 및 그 기능성

전유진 · 이병조¹ · 변희국 · 김종배² · 김세권*

부경대학교 화학과, ¹동원산업(주), ²군산대학교 수산가공학과

초 록 : 어류 중 수산가공공장에서 대량으로 사용되고 있는 민태(hoki, *Johnius belengeri*)의 부산물인 frame으로부터 단백질을 효율적으로 회수하고자, 참치 내장 유래 단백질 분해효소를 이용하여 가수분해시키고, 여기서 얻어진 가수분해물의 기능성을 개선할 목적으로 한외여과막을 이용하여 가수분해물에 함유되어 있는 펩티드를 분자량에 따라 분획한 후 각각의 가수분해물에 대하여 기능성을 검토하였다. 참치 유문수 유래 단백질 분해효소(tuna pyloric caeca crude enzyme: TPCCE)를 이용한 경우, 민태 frame 단백질을 가수분해하기 위한 최적 조건은 pH 10.0, 반응온도 50°C 및 기질농도 0.4%, 기질 대 효소비 100:1(w/w), 반응시간 12시간이었다. 최적 가수분해 조건 하에서 민태 frame 단백질을 TPCCE로 가수분해하여 생성된 가수분해물의 수율은 약 77%(건조중량 기준)였다. 가수분해물을 4종류의 한외여과막(MWCO 30, 10, 5 및 1 K)을 이용하여 분자량의 크기에 따라 4종류로 분획하여 기능성을 검토한 결과, 용해도는 분자량이 낮은 1 K 가수분해물이, 유효성과 포말성은 분자량인 높은 30 K와 10 K 가수분해물이 우수하였다.(1998년 11월 12일 접수, 1999년 1월 8일 수리)

서 론

어류 frame은 수산가공공장에서 어류의 육 채취를 위한 filleting 작업을 한 후 남은 잔사로서 많은 양의 어뼈와 근육 단백질을 함유되어 있다. 이것으로부터 단백질을 회수하기 위한 가장 효율적인 방법으로써 특정한 단백질 분해효소를 이용하는 방법이 고려될 수 있다.^{1,4} 효소적 가수분해는 단백질의 용해도를 증가시키고, 점도를 감소시키며, 포말성 및 유효성을 변화시키는 특징이 있다.⁹ 어류 frame의 효소적 가수분해를 위해 이용될 수 있는 효소로서는 상업적으로 시판되고 있는 trypsin, chymotrypsin, collagenase, papain, pronase, protease 등의 단백질 분해효소가 있으나, 가격이 비싸 산업적으로 이용하는 데에는 문제가 되고 있다. 그러나 어류의 내장에는 이들 효소들이 복합적으로 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.⁶⁻¹⁴ Simpson과 Haard^{15,16}는 어류 유래 단백질 분해효소들이 낮은 온도에서 높은 활성을 나타내며, 중성 및 알칼리성 영역에서도 높은 활성을 보이고, 또한 활성화 에너지가 낮다는 등 여러 가지 잇점이 있다고 보고한 바 있다. 따라서 어류 내장의 효소를 조효소 형태로 추출하여 산업적으로 활용하는 것이 바람직할 것으로 판단된다. 특히 참치는 다른 어종에 비해 어체가 크기 때문에 그 내장도 상당히 크고, 또한 Kim 등¹⁰의 연구에서 보고된 바와 같이 매우 높은 단백질 분해활성을 지니고 있어 산업적으로 이용할 때 효용 가치가 매우 클 것으로 사료된다.

본 연구에서는 어류 중 수산가공공장에서 대량으로 사용되고 있는 민태(hoki, *Johnius belengeri*)의 부산물인 frame

으로부터 단백질을 효율적으로 회수하고자, 참치 내장 유래 단백질 분해효소를 이용하여 민태 frame 단백질을 가수분해시키고, 또한 이 가수분해물의 기능성을 개선할 목적으로 한외여과막을 이용하여 가수분해물에 함유되어 있는 펩티드의 분자량에 따라 분획한 후 각각의 가수분해물에 대하여 기능성을 검토하였다.

재료 및 방법

원료로 사용된 민태(Hoki, *Johnius belengeri*) frame은 동원산업(주) 가공공장에서부터 filleting한 후, 남은 잔사인 frame(수분 76.27%, 뼈 3.94%, 육조직 19.79%)을 제공받아 동결건조 후 -20°C에서 냉동보관하였다. 단백질 가수분해 효소를 추출하기 위하여 (주)동원산업으로부터 제공받은 참치 유문수(tuna pyloric caeca)는 -60°C에 저장하여 두고 사용하였다. 시판 단백질 분해효소는 α -chymotrypsin(EC 3. 4. 21. 1; from bovine pancreas, Type II), papain(EC 3. 4. 21. 2; from papays latex, Type IV) 및 pronase E(from *Streptomyces griseus*, Type XIV) 등을 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였다.

참치 유문수 유래의 조효소 추출

참치 유문수(2 kg, 수분함량 82.66%)로부터 유래되는 protecinase 조효소의 추출은 Kim 등¹⁰의 방법에 따라 다음과 같이 수행하였다. 즉, 참치 유문수를 잘게 자른 후 완충용액(20 mM Tris-HCl buffer containing 5 mM CaCl₂, pH 7.0)을

찾는말 : hoki frame, 참치 유문수 조효소, 효소분해, 한외여과막, 기능성
*연락처자

2배 가량 첨가하여 균질기(Ace homogenizer, Nessei AM-7)로 2회 반복하여 균질화(9,500×g, 2 min)시켰다. 이것을 40°C 항온수조에서 3시간 동안 활성화시킨 후, 원심분리(9,500×g, 20 min)하여 얻어진 상층액에 동일한 양의 acetone을 첨가하여 2°C 냉장실에서 6시간 동안 방치하여 두고 침전물을 얻었다. 이것을 다시 원심분리(2,370×g, 10 min)하여 얻어진 침전물에 동일한 양의 50% acetone을 첨가하여 원심분리(2,370×g, 10 min)한 후 침전물을 다시 얻었다. 회수된 단백질에서 불용성 단백질 부분을 제거하기 위하여 동일한 양의 증류수를 첨가하여 원심분리(9,500×g, 10 min)한 후 그 상층액을 동결건조하여 -20°C에 저장하여 두고 참치 유분수 유래의 조효소(TPCCE; tuna pyloric caeca crude enzyme)로 사용하였다.

민태 frame 단백질의 가수분해

TPCCE를 이용한 민태 frame 단백질의 가수분해 조건은 민태 frame에 붙어 있는 근육 단백질을 따로 분리하여 최적 pH, 온도, 기질농도 및 반응시간 등을 검토하였다. 즉 민태 frame 단백질을 가수분해하기 위한 최적 pH의 검토는 민태 frame 단백질 시료 1 g을 완충용액 100 ml에 분산시켜 1%(w/v) 기질용액으로 하여 40°C에서 1시간 반응시켰으며, 첨가된 효소량은 기질 대 효소비가 100:1(w/w)이 되도록 하였다. 이 때 사용된 완충용액으로는 0.1 M glycine-HCl(pH 3.0~4.0), 0.1 M sodium acetate-acetic acid(pH 5.0~6.0), 0.1 M disodium hydrogen phosphate-sodium dihydrogen phosphate(pH 7.0), 0.1 M Tris-HCl(pH 8.0~9.0), 0.1 M sodium carbonate-sodium bicarbonate(pH 10.0~12.0)였다.

최적 온도는 30°C에서 70°C까지 변화시켜서 측정하였으며, 최적 기질농도는 0.2%부터 3%까지 변화를 시켜서 검토하였다. 민태 frame 단백질을 가수분해하기 위한 최적 반응시간은 최적 반응조건으로 검토된 pH, 온도 및 기질농도 조건 하에서 1, 4, 8, 12, 24 및 48시간 동안 반응시킨 후 민태 frame 단백질의 가수분해도를 검토하였다. 이 때 TPCCE의 대조구로서 비교된 시판 단백질 분해효소는 papain(12 units/mg solid), α -chymotrypsin(38 units/mg solid) 및 pronase E(5.5 units/mg solid) 등이었다. 모든 가수분해 반응조건의 검토는 민태 frame 단백질의 가수분해도로서 나타내었다.

가수분해도 측정

민태 frame 단백질의 가수분해도(degree of hydrolysis; DH)는 Hoyle과 Merritt¹⁷⁾에 의한 trichloroacetic acid(TCA)법으로 측정하였다. 즉, 반응이 종료된 반응혼합물에서 2 ml를 취하고 여기에 20% TCA를 동량 첨가하여 원심분리(2,370×g, 5 min)한 다음, 상층액의 일정량을 취하여 Lowry 법¹⁸⁾으로 10% TCA 가용성 질소량을 측정한 후 다음 식으로부터 가수분해도를 계산하였다.

$$\text{가수분해도(DH), \%} = \frac{\text{10\% TCA 가용성 질소량}}{\text{총질소량}} \times 100$$

민태 frame 단백질 가수분해물의 제조

민태 frame 2 kg(건조물 기준)을 최적 가수분해 조건하에서 반응시킨 후 100°C에서 20분간 효소를 불활성화시킨 다음 그 추출액을 여과(Whatman No. 41) 및 원심분리(4,650×g, 20 min)로 어뼈잔사 및 미반응 근육 단백질 부분을 제거하였다. 이것을 한외여과막 장치(ultrafiltration membrane system)를 이용하여 분자량 한계범위(molecular weight cut-off: MWCO)가 각각 30, 10, 5 및 1 kDa인 한외여과막을 차례로 통과시켜 각각을 분자량 크기에 따라 대량 분획하여 농축 후 동결건조하여 민태 frame 단백질 가수분해물(30, 10, 5 및 1 K 가수분해물)의 시료로서 사용하였으며, 각 시료에 대한 수율과 일반성분을 측정하여 Table 1에 나타내었다. 가수분해물은 2 kg의 민태 frame으로부터 약 1540 g이 생성되었으며(수율 77%), 그 나머지는 민태 frame의 뼈 부분이였다. 즉, 반응종료 후 뼈 부위에 붙어 있었던 단백질은 거의 분해되어 회수되었다.

아미노산 조성

아미노산 조성 분석은 각각의 가수분해물 시료 50 mg을 정평하여 ampoule에 넣고 6 N HCl 5 ml를 가하여 진공 밀봉한 다음 22시간 동안 110°C 항온기에서 가수분해시켰다. 이 가수분해물을 여과하고, 그 여액을 50°C에서 감압, 건조하여 염산을 제거한 후 sodium loading buffer(pH 2.2)로 10 ml로 정용하였다. 이 중 일부를 아미노산 자동분석기(Biochrom 20, Pharmacia Biotech Co., UK)로 분석하였다.

분자량 측정

추출한 민태 frame 가수분해물의 분자량 측정은 HPLC(Spectra Physics P-2000, USA)를 이용하여 측정하였다. 즉 GPC column(Altech Co., pore size 60 Å, 250×4.6 mm)을 0.05 M KH₂PO₄ & 0.05 M KOH buffer(pH 7.0)로 평형화시킨 후, 각 1 mg/1 ml의 시료 용액 20 μ l를 유출속도 0.3 ml/min으로 용리시켜 220 nm에서 흡광도로 확인하였다. 표

Table 1. Yields and proximate compositions of protein hydrolysates produced from hoki frame by enzymatic hydrolysis using TPCCE (%)

	Yield ¹⁾	Moisture	Crude fat	Crude protein	Crude ash
30 K ¹⁾	11.6	0.88	0.64	80.6	14.4
10 K ²⁾	10.4	0.91	0.19	76.8	17.4
5 K ³⁾	19.5	8.71	0.45	52.9	35.9
1 K ⁴⁾	58.5	13.88	0.31	29.6	54.6

¹⁾30 K is the hydrolysate was permeated through a 30,000 molecular weight cut-off(MWCO) membrane.

²⁾10 K is the hydrolysate through a 10,000 MWCO membrane.

³⁾5 K is the hydrolysate through a 5,000 MWCO membrane.

⁴⁾1 K is the hydrolysate through a 1,000 MWCO membrane.

⁵⁾hoki frame used for the enzymatic hydrolysis was 2 kg on a dry weight basis. The protein hydrolysate produced was approximately 1,540 g of freeze-dried hydrolysate(77% as yield) and the rest was bones of the frame. No muscle protein was left on the bones after the hydrolysis with TPCCE for 12 hrs. The respective yields fractionated were calculated on a basis of 1,540 g of the freeze-dried hydrolysate.

준 단백질로서 pepsin(MW 34,700 Da), cytochrome c(MW 12,400 Da), aprotinin(MW 6,500 Da) 및 vitamin B₁₂(MW 1355.4 Da)를 각각 사용하였다.

용해도 측정

민태 frame 단백질 가수분해물을 한외여과막을 이용하여 그들 분자량의 크기에 따라 분획한 4종류의 가수분해물(30, 10, 5 및 1 K 가수분해물)에 대한 용해도를 pH변화에 따라 측정하였으며, 이때 bovine serum albumin(BSA)은 대조구로서 사용하였다. 즉, 각 1%(w/v)의 시료용액 20 ml를 pH 자동조절기(pH/ORP controller, Cole-Parmer Co., USA)를 사용하여 0.1 N HCl 및 0.1 N NaOH로 pH 2에서 11까지 조절하여 20°C에서 30분간 교반한 후 원심분리(23,000×g, 20 min)하여 상층액의 가용성 질소량을 Lowry법¹⁹⁾으로 측정하였다. 용해도는 시료 중에 함유되어 있는 총질소량에 대한 상층액 중에 녹아 있는 질소량의 비로써 계산하였다.

유화성 및 유화 안정성

유화성과 유화안정성은 Pearce 등¹⁹⁾의 방법을 이용하여 pH의 변화에 따라 탁도법(spectroturbidity)으로 측정하였으며, 대조구로 BSA를 사용하였다. 즉, pH를 2~11까지 조절한 각 시료 1%(w/v) 분산액 3 ml에 대두유 1 ml를 혼합하여 균질기로 12,000 rpm에서 1분간 균질화시켰다. 균질화된 유화액을 100 µl 분취하여 0.1% SDS용액(0.1 M NaCl, pH 7.0) 5 ml에 첨가시켜 희석한 후 즉시 그 희석된 유화액의 흡광도를 500 nm에서 측정하여 유화성으로 나타내었다. 유화 안정성은 시간별(0.5~60 min)로 측정된 흡광도의 반감기를 이용하여 측정하였다.

포말성 및 포말 안정성

포말성 및 포말 안정성은 Johnson 등²⁰⁾과 Watanabe 등²¹⁾의 방법에 따라 측정하였으며, 대조구로 BSA를 사용하였다. 즉, 각 시료 1%(w/v)의 분산액 20 ml를 만들어 0.1 N HCl 및 0.1 N NaOH로 pH 2에서 11까지 조절하여 그 용액을 균질기로 3분간 10,000 rpm에서 포럼시킨 후, 즉시 100 ml 메스실린더에 옮긴 다음 30초 후에 전체량, 거품량 및 물층의 부피를 각각 측정하여 계산하였다.

$$\text{포말성} = \frac{\text{전체부피(ml)} - \text{물층부피(ml)}}{\text{전체부피(ml)}}$$

포말 안정성은 포럼된 각 시료를 100 ml 메스실린더에 옮긴 후, 20°C에서 30분간 정치시킨 후 남아 있는 물층을 측정하여 계산하였다.

$$\text{포말 안정성} = \frac{\text{전체부피(ml)} - \text{물층부피(ml)}}{\text{최초부피(ml)}}$$

결과 및 고찰

TPCCE를 이용한 민태 frame 단백질의 가수분해

민태 frame 단백질을 가수분해하기 위한 최적 가수분해

조건(pH, 온도, 기질농도 및 반응시간)을 검토하여 Fig. 1에 나타내었다.

민태 frame을 가수분해하기 위한 최적 pH의 검토에서, 민태 frame의 가수분해도는 pH 6에서부터 증가하기 시작하여 pH 10에서 약 26%로 가장 효율이 높았고, 그 이후 pH 11 이상부터는 급격한 감소를 보였다. 민태 frame 단백질의 가수분해에 대한 최적 온도의 검토에서는 50°C에서 최대활성을 나타내었으며, 그 이후 급격한 감소를 보여 60°C 이상의 온도에서는 효소가 거의 불활성화되어 전혀 가수분해시키지 못하였다. 한편, 민태 frame 단백질의 농도변화에 따른 가수분해도에서는 0.4%의 기질농도일 때 37%로 가장 높은 것으로 나타났으며, 그 이후 약간 감소하기 시작하여 기질농도가 0.5~3%까지 약 30%의 일정한 가수분해도를 나타내었다.

어류 유문수 유래 단백질 분해효소에 관한 연구에서, Murakami 등²²⁾은 정어리의 유문수에서 추출한 알칼리 proteinase는 casein을 기질로 사용하였을 때, pH 10.0에서, 그리고 Kim 등²³⁾은 고등어와 정어리의 내장 조직 중에 분포하는 단백질 분해효소의 최적 pH는 체장 유래에서는 각각 9.0과 9.8, 유문수 유래에서는 9.4와 10.0이었다고 각각 보고한 바 있다.

참치 유문수 유래 단백질 분해효소인 TPCCE도 마찬가지로 중성 및 약알칼리 영역에서 비교적 높은 활성과 pH 안정성을 보였지만, 온도에서는 50°C보다 다소 높은 60°C 이후에 급격한 활성의 감소가 일어나 열안정성이 매우 낮게 나타났다. 이러한 사실은 어류 유래의 단백질 분해효소가 낮은 온도에서도 높은 활성을 보이지만 열안정성이 매우 낮다고 하는 지금까지 보고^{15,16,24,25)}된 결과와 매우 일치하였다. 따라서 TPCCE와 같은 어류 유래의 단백질 분해효소를 산업적으로 이용을 극대화시키기 위해서는 열안정성이 개선되어야 할 부분이다. 이러한 목적으로 우리의 이전 연구²⁶⁾에서 TPCCE의 열안정성을 위해 키틴과 같은 담체에 효소를 고정화시켜 제조한 고정화 효소의 특성을 검토하여 TPCCE의 열안정성이 크게 증가되었음을 보고한 바 있다.

위에서 검토된 TPCCE의 최적 가수분해조건 하에서 민태 frame 단백질을 반응시간(1, 4, 8, 12, 24, 48시간)의 경과에 따른 가수분해도를 측정하였으며, 이 때 시판 단백질 분해효소인 papain, pronase 및 chymotrypsin과 비교하였다. 민태 frame에 대한 각 효소의 가수분해도 Fig. 1(d)에서와 같이 TPCCE는 반응시간이 12시간 경과하는 동안 계속 증가하여 61.2%의 가수분해를 보였으며 그 이후 완만하게 증가하여 반응시간이 24시간 경과한 후 가수분해도는 약 71%에 도달하였다. 시판 단백질 분해효소는 papain의 경우 반응시간이 24시간 경과하여도 약 40% 정도의 매우 낮은 가수분해도를 보인 반면, pronase E와 chymotrypsin은 TPCCE보다 약 5~10% 높게 나타났다. Hale²⁷⁾은 어류 단백질의 가수분해에서 상업적으로 유용한 효소의 상대활성을 비교한 결과, papain보다는 pronase E가 약 3배 가량 더 높은 가수분해도를 보여 어류 단백질의 가수분해에서는 pronase E가 매우 유용하다고 보고한 바 있다.

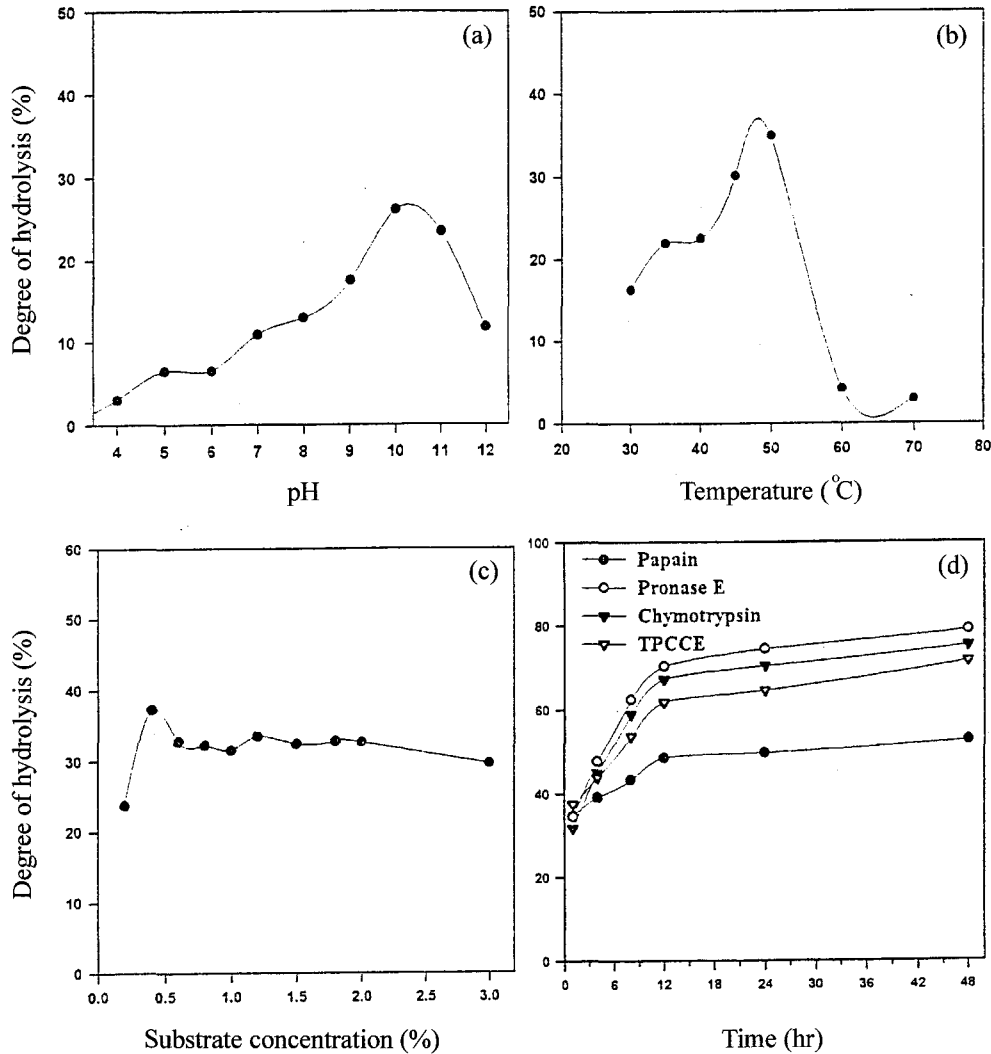


Fig. 1. Optimum hydrolytic conditions of hoki frame protein with TPCCE. (a) is the effect of pH on the hydrolysis. Substrate concentration=1%, enzyme to substrate ratio=1 : 100(w/w), temperature=40°C, incubation time=1 hr. (b) is the effect of temperature on the hydrolysis. The hydrolytic reaction was carried out under the same conditions as (a) at pH 10.0. (c) is the effect of substrate concentration on the hydrolysis. The hydrolysis was carried out under the same conditions as (a) at 50°C. (d) is the degree of hydrolysis profiles during the hydrolysis of hoki frame protein using TPCCE, papain, α -chymotrypsin and pronase E. The hydrolyses were performed under the optimum conditions of the enzyme used.

한편, Ooshiro²⁸⁾는 고등어 유분수에서 추출한 proteinase와 소 유래의 trypsin으로 casein을 4시간 동안 가수분해하였을 때, 고등어 유분수 유래의 proteinase는 펩티드 결합의 70% 정도를 가수분해하였으나 소의 trypsin은 기질특이성으로 인하여 약 15% 만을 가수분해하였다고 보고하였다. Ramakrishna 등²⁹⁾은 어류 유래 효소와 육상의 소 유래 효소의 가수분해 활성 비교에서 기질이 수용성이든 비수용성이든 곱상어에서 추출한 효소가 훨씬 높다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 참치 유래의 TPCCE가 pronase E나 chymotrypsin보다 약간 활성이 낮은 것으로 나타났다.

가수분해물의 분자량과 아미노산 조성

민태 frame으로부터 TPCCE를 이용하여 최적 가수분해 조건 하에서 제조한 단백질 가수분해물을 한외여과막

(MWCO : 30, 10, 5 및 1kDa)을 사용하여 분자량 크기에 따라 분획한 30, 10, 5 및 1 K 가수분해물의 분자량을 측정하여 Fig. 2에 나타내었다.

MWCO 30 kDa의 막을 이용하여 분획한 30 K 가수분해물은 15,000 Da 분자량 범위에서 주로 분포하였으며, MWCO 10 kDa의 막으로 분획한 10 K 가수분해물은 주로 12,000 Da 범위에서 분포하였다. MWCO 5 kDa의 막을 이용한 5 K 가수분해물은 10,000 Da 범위에서 분포하였고, MWCO 1 kDa의 막으로 추출한 1 K 가수분해물은 대부분 8,000~500 Da 범위에서 분포하였으며 1,500 Da 부근에서 가장 높은 피크가 나타났다.

단백질은 효소작용에 의해 가수분해되면서 많은 종류의 작은 펩티드들을 생성시키며, 이들 펩티드들은 분자량에 따라 그들의 물리화학적 성질과 생리활성에 큰 영향을 미치

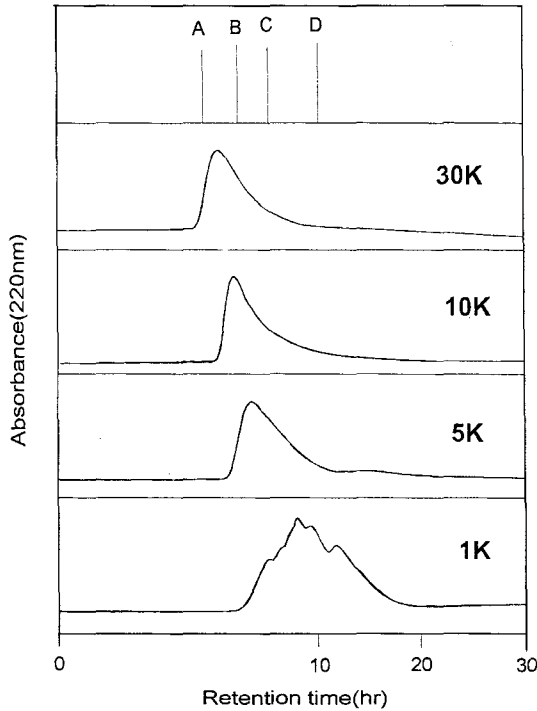


Fig. 2. Molecular weight profiles of 30, 10, 5 and 1 K hydrolysate on GPC column (pore size 60 Å) by HPLC. Marker materials: A, pepsin(MW 34,700 Da); B, cytochrome c(MW 12,400 Da); C, aprotinin(MW 6,500 Da); D, vitamin B₁₂(MW 1355.4 Da) [eluant: 0.05 M KH₂PO₄ & 0.05 M KOH buffer(pH 7.0), flow rate: 0.3 ml/min].

게 된다. 따라서 민태 frame 단백질도 회수를 목적으로 효소적 가수분해가 시도되었으나, 일단 회수된 가수분해물을 보다 효율적으로 이용하기 위해서는 분자량에 따라 분리하는 것이 훨씬 효과적인 것이다.

이와 같이 단백질 가수분해물을 그들 펩티드의 분자량 크기에 따라 대량으로 손쉽게 분획하기 위해서는 적당한 한계범위를 가진 한외여과막을 선정하여 이용하는 것이 가장 바람직할 것으로 판단되며, 민태 frame 단백질 가수분해물도 한외여과막을 이용하여 분획하고 그들의 분자량을 측정할 결과 뚜렷하게 구별되지는 않았지만, 막의 한계범위가 작을수록 분획된 분자량의 크기가 감소함을 알 수 있었다.

민태 frame 단백질 유래 30, 10, 5 및 1 K 가수분해물의 아미노산 조성을 분석한 결과(Table 2), 각 가수분해물의 아미노산 조성간에는 거의 차이가 없었으며, cysteine과 tyrosine을 제외하고는 대부분의 아미노산들이 골고루 분포하고 있었으며, 그 중 glycine, glutamic acid 및 alanine의 함량이 가장 많았다. 또한 구성아미노산 조성 중에서 친수성 아미노산의 함량이 전체 아미노산의 61.6~64.3%를 차지하였고, 소수성 아미노산의 함량은 35.7~38.4%를 차지하였으며, 필수 아미노산의 함량은 31.8~40.9%가 함유되어 있었다.

용해도

가수분해물의 분자량별로 분획한 4종류의 민태 frame 가수분해물들의 용해도를 Fig. 3에 나타내었다. 모든 가수분

Table 2. Amino acid compositions of hoki frame hydrolysates (residues/1000-residues)

Amino acid	30 K	10 K	5 K	1 K
Asp	53.5	57.2	70.3	60.0
Thr ¹⁾	44.9	51.9	48.9	52.4
Ser	40.3	42.8	39.2	35.3
Glu	102.1	109.5	127.9	114.1
Gly	270.1	262.7	224.2	180.3
Ala	91.1	90.2	92.0	90.9
Cys	8.6	0.0	0.0	0.0
Val ¹⁾	46.8	51.6	58.9	61.9
Met ¹⁾	17.1	18.5	15.8	12.0
Ile ¹⁾	50.7	40.9	44.9	44.7
Leu ¹⁾	64.4	69.4	74.2	90.2
Tyr	8.1	8.2	3.5	2.4
Phe ¹⁾	35.3	36.4	37.6	49.0
Lys ¹⁾	40.6	35.4	49.1	83.4
His ¹⁾	18.1	21.9	20.6	15.3
Arg	52.3	52.5	43.2	73.1
Pro	55.9	50.9	49.8	35.1
Essential amino acid	31.8 (%)	32.6 (%)	35.0 (%)	40.9 (%)
Total	1,000	1,000	1,000	1,000

¹⁾Essential amino acid.

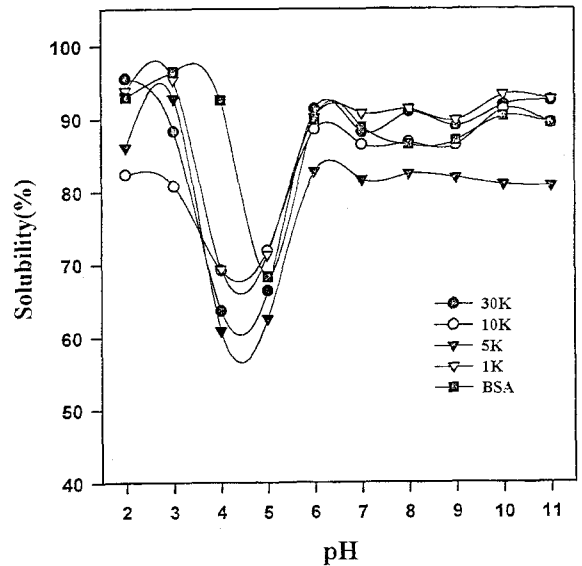


Fig. 3. Solubilities of hoki frame hydrolysates, 30, 10, 5 and 1 K. A control was BSA (bovine serum albumin). Solubility was measured after equilibration for 30 min at room temperature (25°C). The solubility is expressed as percent total protein in supernatant solution.

해물들의 용해도는 pH 4~5에서 60~70%로 가장 낮았으며, pH 2~3의 산성 영역과 중성 및 알칼리성 영역에서는 90~98%로 높은 용해도를 보였다. 분자량이 가장 작은 1 K 가수분해물은 검토된 모든 pH영역에서 용해도가 가장 높았다. 대조군으로 사용한 BSA는 pH 5에서 68%의 용해도를 보였으며, 대체로 산성 영역에서는 가수분해물보다 약간 높게 나타났으나 중성 및 알칼리성 영역에서는 가수분해물과 유사한 용해도를 보였다. 결국, 원료인 민태 frame 단백질은

그 자체는 물에 녹지 않지만, 효소적 가수분해에 의하여 대부분의 pH 영역에서 거의 60% 이상의 용해도를 보였다. 단백질 혹은 그 가수분해물은 등전점 부근의 pH에서 가장 낮은 용해도를 보이기 때문에, 민태 frame 단백질 가수분해물들은 등전점이 pH 4~5 부근인 것으로 추정된다.

단백질을 적당한 효소로 가수분해하게 되면 작은 크기의 펩티드로 변환됨으로써 모든 영역의 pH에서 용해도의 증가, 점도의 감소, 유화성과 포말성의 변화 등이 일어나는 것으로 알려져 있다.³⁰⁾ 특히 단백질 가수분해물의 용해도는 가수분해반응 후 만들어진 펩티드의 크기에 크게 의존하게 되는데, 그 이유는 펩티드 사슬의 길이가 짧아질수록 펩티드 사슬의 친수성 측쇄로 인한 친수성이 증가되기 때문이다.³¹⁾ 단백질의 용해도 증가는 보다 넓은 범위의 pH 영역에서 사용될 수 있으며, 그들의 응용은 스포츠 영양 음료, 체중조절용 다이어트, 과알레르기성 식품 및 의약품 다이어트 식품 등 잠재적인 기능성 소재 분야에서의 이용이 가능하다.³²⁻³⁵⁾

유화성과 유화 안정성

민태 frame 단백질 가수분해물들이 pH의 변화에 따라 유화성 및 유화 안정성에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 4에 나타내었다. 민태 frame 단백질 가수분해물들의 유화성 및 유화 안정성은 대조군으로 사용된 BSA보다 상당히 낮았다. 그러나 비교적 분자량이 큰 30 및 10 K 가수분해물들은 분자량이 작은 가수분해물들보다 유화성 및 유화 안정성이 우수하였으며, 산성 영역에서보다 중성 및 알칼리성 영역에서 좀 더 높게 나타났고, 이 영역에서의 유화성과 유화 안정성은 BSA보다 약 60% 및 약 50%로 각각 나타났다.

물-기름 계면에서의 pH에 따른 유화성은 등전점보다 pH가 낮은 산성 영역에서는 단백질 분자들이 양(+)전하들의 반발력에 의해 unfolding 됨으로써 많은 소수기가 노출되고, 결과적으로 형성된 소수 결합에 의해 분자들 사이에서 보다 밀집되고 안정된 구조를 가지게 되며, 등전점보다 pH가 높은 알칼리성 영역에서는 단백질들이 음(-)전하를 띠면서 단백질이 물-기름 계면에 흡착된 후 unfolding되면서 소수성기가 노출되어 높은 유화성을 갖게 된다.³⁶⁾ 이렇게 볼 때 민태 frame 단백질 가수분해물들은 알칼리성 영역에서 유화성이 증가되었기 때문에, 아미노산 측쇄의 음전하를 가진 glutamic acid와 aspartic acid의 함량이 가수분해물의 구성 아미노산에 많이 함유되어 있을 것으로 판단되었으며 이것은 아미노산 조성 분석에서 확인되었다.

한편, 단백질 가수분해물의 유화성은 용해도와 마찬가지로 함유되어 있는 펩티드의 사슬길이나 노출된 소수성도에 따라 크게 의존하며,³¹⁾ 특히 유화성과 단백질의 가수분해도와와의 관계에서 Mahmoud 등³⁷⁾은 casein을 채장에서 분비되는 소화액으로 가수분해하였을 때 가수분해도가 증가할수록 유화성은 비례적으로 감소하였다고 보고하였다. 그리고 단백질이 우수한 유화성을 가지기 위해서는 특정한 최적 분자량이 있는 것으로 보고된 바 있으며,^{38,39)} 비록 작은 분자량의 펩티드가 물과 기름의 계면에 재빨리 이동하여 흡착되더라도 계면장력을 낮추는데에는 크게 기여하지 못하며,

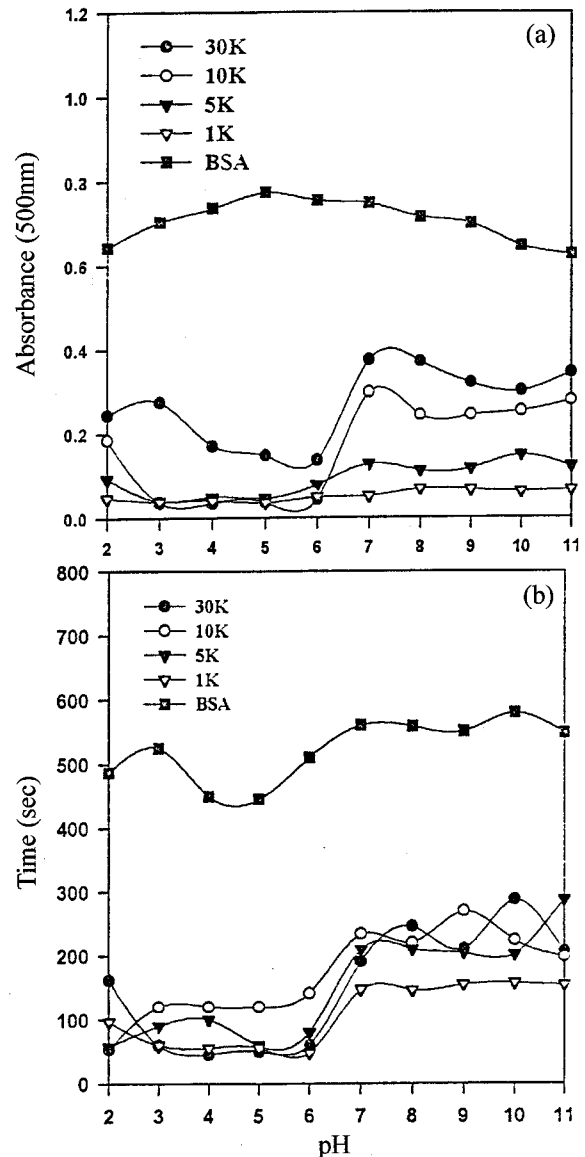


Fig. 4. Emulsifying activities(a) and emulsion stabilities(b) of hoki frame hydrolysates as function of pH. Emulsifying activity was evaluated by spectroturbidity method. The mixture of 3 ml of 1% hydrolysate solution and 1 ml of oil was homogenized at 12,000 rpm for 60 sec. Aliquots were immediately pipetted from the emulsion and diluted 50-fold into 0.1% SDS in 0.1 M NaCl, pH 7.0, and then measured absorbance at 500 nm. The emulsifying activity was expressed as an absorbance. Emulsion stability was evaluated by a half-time(30 sec to 60 min) of absorbance from the stock emulsions prepared for the measurement of emulsifying activity.

보다 큰 분자량을 가진 단백질에 의해 쉽게 치환된다고 한다.³⁴⁾ 따라서 유화성과 같은 기능성을 목적으로 단백질을 가수분해할 경우에는 효소적 가수분해의 정도를 조절한다든지 아니면 한외여과막 등을 이용하여 분자량의 크기별로 가수분해물을 분리하는 것이 효과적일 것이다.

포말성과 포말 안정성

민태 frame 가수분해물의 포말성과 포말 안정성은 Table 3에 나타내었다. 포말성은 pH에 따른 변화가 거의 없었으

Table 3. Whippability and foam stability of hydrolysates as a function of pH

pH	Whippability ¹⁾					Foam stability ²⁾				
	30 K	10 K	5 K	1 K	BSA	30 K	10 K	5 K	1 K	BSA
2	0.97	0.93	0.91	0.09	0.94	0.05	0.04	0.06	-	-
3	0.98	0.98	0.89	0.35	0.90	0.03	0.07	0.08	-	-
4	0.96	0.96	0.87	0.40	0.79	0.09	0.08	0.07	-	0.49
5	0.94	0.93	0.86	0.56	0.75	0.14	0.07	0.08	-	0.53
6	0.96	0.94	0.88	0.68	0.73	0.16	0.19	0.08	0.05	0.46
7	0.94	0.93	0.88	0.73	0.60	0.21	0.17	0.05	0.05	0.47
8	0.93	0.90	0.87	0.56	0.59	0.21	0.20	0.06	0.05	0.46
9	0.91	0.87	0.84	0.49	0.64	0.27	0.21	0.04	0.04	0.50
10	0.89	0.88	0.78	0.49	0.68	0.21	0.15	0.05	0.04	0.56
11	0.87	0.83	0.76	0.46	0.74	0.16	0.05	0.03	0.04	0.58

¹⁾Whippability was expressed by the following equation: (Total volume-Drainage volume)/Initial volume.

²⁾Foam stability was expressed by the following equation: (Initial volume-Drainage volume)×100/Initial volume.

며 분자량이 증가할수록 포말성이 증가하였다. 30 K와 10 K 가수분해물은 대부분의 pH영역에서 0.9 이상의 값을 보여 매우 높게 나타났으며, 5 K 가수분해물은 0.76~0.91 비교적 높았고, 가장 분자량이 낮은 1 K 가수분해물도 0.35~0.73의 값을 나타내었다. BSA는 0.60~0.90로서 1 K 가수분해물보다는 높았으나 5, 10 및 30 K 가수분해물보다는 낮았다. 그리고 민태 frame 단백질 가수분해물과는 달리 포말성이 산성 영역으로 갈수록 증가하였다. 포말 안정성은 민태 frame 단백질 가수분해물들이 대부분 낮게 나타났으며, 30 K 가수분해물의 경우 중성 및 알칼리성 영역에서 0.21~0.27로 가장 높게 나타났다. 그러나 대조구인 BSA는 가수분해물보다 높게 나타났으며 알칼리성 영역에서 0.5 이상으로 가장 높게 나타났다. 결과적으로 포말성은 pH에 대하여 거의 영향을 받지 않은 반면에 포말 안정성은 pH에 약간 영향을 받는 것으로 나타났다. 또 포말성에서는 분자량이 큰 가수분해물들이 BSA보다 높았으나 포말 안정성은 BSA가 가장 높았다. 상업적으로 이용되고 있는 “거품을 내는 단백질 (whipping protein)”은 주로 대두 단백질을 제한적으로 가수분해하여 분자량이 큰 펩티드의 함량을 높이고 있는데, 이렇게 함으로써 포말 안정성을 증가시키는 결과를 가져오고 있다. 그러나 분자량이 비교적 큰 민태 frame 단백질 가수분해물들은 포말성은 매우 높으나 포말 안정성이 너무 낮아 이를 개선하여야만 상업적으로 이용이 가능할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부에서 시행한 수산특정연구개발사업 과제 수행에 의한 연구결과이며, 연구비를 지원해 준 해양수산부에 감사드립니다.

참고문헌

1. Surowka, K. and Fik, M. (1992) Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads. I. An application of neutrase to the production of protein hydrolysate. *Int. J. Food Sci. Technol.* **27**, 9-20.
2. In, T. (1990) Seafood flavorants produced by enzymatic hydrolysis. In *Making Profits Out of Seafood Wastes. Proceedings of the International Conference on Fish By-Products*, 197-202, Anchorage, AK.
3. O'Meara, G. M. and Munro, P. A. (1984) Effects of reaction variables on the hydrolysis of lean beef tissue by alcalase. *Meat Sci.* **11**, 227-238.
4. O'Meara, G. M. and Munro, P. A. (1984) Selection of a proteolytic enzyme to solubilize lean beef tissue. *Enzyme Microb. Technol.* **6**, 181-185.
5. Chobert, J.-M., Sitohy, M. S. and Whitaker, J. R. (1988) Solubility and emulsifying properties of casein modified enzymatically by *Staphylococcus aureus* V8 protease. *J. Agric. Food Chem.* **36**, 220-224.
6. Yoshinaka, R., Sato, M. and Ikeda, S. (1981) Distribution of trypsin and chymotrypsin and their zymogens in digestive system of catfish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* **47**, 1615-1618.
7. Smith, L. S. (1989) In *Fish Nutrition; Digestive functions in teleost fishes*, Halver, J. E., 387-389, Academic Press, Inc., New York.
8. Chen, C. S., Tsao, C. Y. and Jiang, S. T. (1989) Purification and characterization of proteases from the ciscera of milkfish, *Chanos chanos*. *J. Food Biochem.* **12**, 269-288.
9. Ooshiro, Z. (1971) Studies on proteinase in the pyloric caeca of fishes-II. Some properties of proteinase purified from the pyloric caeca of mackerel. *Nippon Suisan Gakkaishi* **37**, 145-148.
10. Murakami, K. and Noda, M. (1981) Studies on proteinases from the digestive organs of sardin. Purification and characterization of three alkaline proteinase from the pyloric caeca. *Biochem. Biophys. Acta* **689**, 17-29.
11. Uchida, N., Tsukayama, K. and Nishida, E. (1984) Purification and some properties of trypsins from the pyloric caeca of chum salmon. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish* **50**, 129-138.
12. Simpson, B. K., Simpson, M. V. and Haard, N. F. (1990) Properties of trypsin from the pyloric ceca of Atlantic cod. *Gadus morhua*, *J. Food Sci.* **55**, 959-961.
13. Pyeun, J. H., Cho, D. M. and Heu, M. S. (1993) Trypsins from the dark fleshed fish (anchovy, mackerel, yellowfin tuna and albacore). 1. Purification and optimal reaction conditions. *J. Korean Soc. Food Nut.* **22**, 448-457.

14. Kim, S. K., Jeon, Y. J., Byun, H. G., Kim, Y. T. and Lee, C. K. (1997) Enzymatic recovery of cod frame proteins with crude proteinase from tuna pyloric caeca. *Fish Sci.* **63**, 421-427.
15. Simpson, B. K. and Haard, N. F. (1984) Purification and characterization of trypsin from the Greenland cod (*Gadus orac*). 1. Kinetic and thermodynamic properties. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* **62**, 894-900.
16. Simpson, B. K. and Haard, N. F. (1984) Trypsin from Greenland cod *Gadus ogac*. Isolation and comparative properties. *Comp. Biochem. Physiol.* **79B**, 613-622.
17. Hoyle, N. T. and Merritt, J. H. (1994) Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *J. Food Sci.* **59**, 76-79.
18. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
19. Pearce, K. N. and Kinsella, J. E. (1978) Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.* **26**, 716.
20. Johnson, E. A. and Brekke, C. R. (1983) Functional properties of acylated pea protein isolates. *J. Food Sci.* **48**, 722.
21. Watanabe, M., Shimada, A. and Arai, S. (1981) Enzymatic modification of protein functionality: Implantation of potent amphiphilicity to succinylated proteins by covalent attachment of leucine alkyl esters. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 1621-1629.
22. Murakami, K. and Noda, M. (1981) Studies on proteinases from the digestive organs of sardin. Purification and characterization of three alkaline proteinase from the pyloric caeca. *Biochem. Biophys. Acta* **689**, 17-29.
23. Kim, H. R., Pyeun, J. H. and Cho, J. G. (1986) Proteolytic enzymes distributed in the tissues of dark fleshed fish. 2. Comparison of the proteolytic activity of the tissue extracts from the intestinal organs of mackerel and sardine. *Bull. Korean Fish. Soc.* **19**, 521-528.
24. Asgeirsson, B. and Bjarnason, J. B. (1989) Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua*. *Eur. J. Biochem.* **180**, 85-90.
25. Kolodzeiskaia, M. V. and Berevka, S. V. (1990) Comparative study of the properties of serine proteases of lower and higher vertebrates. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal*, **62**, 31-37.
26. Jeon, Y. J., Park, P. J., Byun, H. G., Song, B. K., Yang H. P. and Kim, S. K. (1998) Preparation of an Immobilized Enzyme for Enhancing Thermostability of the Crude Proteinase from Fish Intestine. *Korean J. Life Sci.* **8(6)** 627-637.
27. Hale, M. B. (1969) Relative Activities of Commercially-Available Enzymes in the Hydrolysis of Fish Protein. *Food Technol.* **23**, 107-114.
28. Ooshiro, Z. (1968) Studies on proteinase in the pyloric caeca of fishes-I. Some properties of proteinase purified from the pyloric caeca of mackerel. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* **34**, 847-852.
29. Ramakrishna, M., Hultin, H. O. and Atallah, M. T. (1987) A comparison of dogfish and bovine chymotrypsins in relation to protein hydrolysis. *J. Food Sci.* **52**, 1198-1202.
30. Alder-Nissen, J. (1986) *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, New York.
31. Fonkwe, L. G. and Singh, R. K. (1996) Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymatic hydrolysis. *Process Biochem.* **31**, 605-616.
32. Frokjaer, S. (1994) Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Technol.* **48**, 68-71.
33. Cordle, C. T. (1994) Control of food allergies using protein hydrolysates. *Food Technol.* **48**, 72-75.
34. Mahmoud, M. I. (1994) Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technol.* **48**, 89-95.
35. Schmidl, M. K., Taylor, S. L. and Nordlee, J. A. (1994) Use of hydrolysate-based products in special medical diets. *Food Technol.* **48**, 77-80.
36. Kim, Y. S., Cho, H. Y., Cho, E. K., Lee, S. Y., Pyun, Y. R. (1986) A Study on the Adsorption at Oil-Water Interface and the Emulsion Stabilizing Properties of Soy Protein Isolate. *Korean J. Food Sci. Technol.* **18(6)**, 468-475.
37. Mahmoud, M. I., Malone, W. T. and Cordle, C. T. (1992) Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. *J. Food Sci.* **57**, 1223-1229.
38. Adler-Nissen, J. (1978) Enzymatic hydrolysis of soy protein for nutritional fortification of low pH food. *Ann. Nutr. Alim.* **32**, 205-216.
39. Lee, S. W., Shimizu, M., Kaminogawa, S. and Yamauchi, K. (1987) Emulsifying properties of peptides obtained from the hydrolysis of β -casein. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 161-166.

Recovery of Protein Hydrolysate from Hoki (*Johnius belengeri*) Frame with Tuna Pyloric Caeca Crude Enzyme and Its Functionalities

You-Jin Jeon, Byoung-Jo Lee¹, Hee-Guk Byun, Jong-Bae Kim² and Se-Kwon Kim*(*Dept. of Chemistry, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea; ¹Dongwon Industry Co. LTD., Seoul 137-130, Korea; ²Dept. of Sea-Food Science and Technology, Kunsan National University, Kunsan 573-702, Korea*)

Abstract : Enzymatic hydrolysis with tuna pyloric caeca crude enzyme(TPCCE) was performed to recover a protein hydrolysate from hoki frame, fish processing by-product. Optimum hydrolytic conditions were pH 10.0, temperature 50°C, and incubation time 12 hrs, and then the degree of hydrolysis was about 60%. The yield of the hydrolysate from hoki frame by enzymatic hydrolysis was approximately 77% on a dry weight basis. The prepared protein hydrolysates were also fractionated through a series of 30, 10, 5 and 1 kDa molecular weight cut-off (MWCO) membranes in order to investigate the effect of their functionalities according to the difference of their molecular size. As the result of studying functionalities of the hydrolysates, 1 K hydrolysate showed the highest solubility over all pHs, and 30 and 10 K hydrolysate showed more excellent emulsifying property and whippability than the other hydrolysates.

Key words : hoki frame, tuna pyloric caeca, enzymatic hydrolysis, ultrafiltration membrane, functionality

*Corresponding author