

단백질 분해효소를 이용하여 제조한 속성 멸치 액젓의 펩티드 특성

1. 단백질 분해효소에 의한 멸치 액젓 및 Actomyosin의 가수분해

김인수 · 최영준 · 허민수 · 조영제* · 임영선* · 구연숙* · 여생규** · 박재윤***

경상대학교 해양생물이용학부 (해양산업연구소), *부경대학교 식품공학과, **부산정보대학 레저산업계열, ***OSU, Seafood Lab.

Peptide Properties of Rapid Salted and Fermented Anchovy Sauce Using Various Proteases

1. Hydrolysis of Anchovy Sauce and Actomyosin by Various Proteases

In-Soo KIM, Yeung-Joon CHOI, Min-Soo HEU, Young-Je CHO*, Yeong-Sun IM*,
Yeun-Suk GU*, Saeng-Gyu YEO** and Jae-Woon PARK***

Division of Marine Bioscience / Institute of Marine Industry, GyeongSang National Univ., Tongyeong 650-160, Korea

*Dept. of Food Science and Technology, Pukyong National Univ., Pusan 608-737, Korea

**Group-dept. of Leisure Industry, Pusan college of Information Technology, Pusan 616-737, Korea

***OSU, Seafood Lab, 2001 Marine Dr., Astoria, OR 97103, USA

The optimal conditions of enzymatic hydrolysis for preparation of rapid salted and fermented anchovy sauce (SFAS) using various proteases such as trypsin, chymotrypsin, crude enzyme from squid liver and viscera, Alcalase, Neutrase and Protamex were studied. SFAS prepared with squid viscera had higher level of VBN (173.6 mg/100 g) when stored for 70 days than other samples, and peroxide values were almost equal among all samples during fermentation period. Total amino acids and nonprotein nitrogenous compounds remarkably increased as SFAS treated with Alcalase or Protamex which exhibited higher the hydrolysis rate of 57% at 60 day than others. The optimal pHs of trypsin, chymotrypsin, Alcalase, Neutrase and Protamex on anchovy actomyosin were 7.5, 6.5, 6.5, 7.0 and 5.0, respectively. Optimal temperatures of trypsin, chymotrypsin, Alcalase and Neutrase were 55, 45, 60 and 55°C, respectively. Otherwise, Protamex activity increased as temperature increased from 20 to 70°C. Protamex had higher K_m (3.545) and V_{max} value (2.688) than others. Protamex affected less by NaCl had 52.5% activity at the fermentation condition of 20°C and 25% NaCl. Protamex appeared to be very effective for the hydrolysis of crude actomyosin from anchovy.

Key words: anchovy sauce, protease, anchovy actomyosin

서 론

어장유의 발효 기간 단축은 발효 용기의 재사용 cycle을 단축시켜 작업 효율을 향상시킬 뿐만 아니라 발효 기간 단축에 따른 경제적 이익이 동반하기 때문에 어장유 제조업에서는 해결해야 할 과제 중의 하나이다. 식염 농도를 낮추고 제조기간을 단축하기 위한 방법으로서 단백질 가수분해 효소를 이용한 속성 제조를 가장 많이 사용하고 있으며, 이와 관련하여 제조 방법, 조건 및 제품의 품질 평가에 관해서 많은 연구가 수행되어 왔다 (Han et al., 1990; Bae et al., 1990a, 1990b, 1990c). 전통 발효와 비슷한 조건을 만들기 위하여 Kim et al. (1990)과 Koo et al. (1990)은 정어리 자가소화액과 정어리 기질 코오지를 이용한 속성 정어리 액젓 제조 조건과 정미성분을 분석하여 전통 발효 조건과 비교 검토하여 것갈의 발효 기구를 구명하였고, 저염의 것갈을 조제하기 위하여 Cha and Lee (1989)는 것갈에서 분리한 단백질 분해균을 이용한 저식염 멸치젓의 속성 발효를 시도하였다. 그러나 속성 발효 제품은 장기간 숙성하여 저장한 제품에 비하여 풍미가 현저히 떨어지며 (Koo et al., 1990), 속성 발효에 의하여 leucine 및 isoleucine

이 증가하고, 절단된 펩티드의 말단에 위치한 leucine 때문에 쓴 맛이 증가한다고 알려져 있다. 따라서 속성 발효를 실용화하기 위하여 속성 발효 제품의 풍미 개선은 시급히 해결되어야 한다.

한편 Pyeun et al. (1995, 1996), Cho et al. (1996) 및 Lee et al. (1996)은 자가소화에 관여하는 효소를 근육과 내장에서 각각 분리하여 이들의 생화학적 특성을 구명하고, 어육 구조 단백질에 대한 작용 경로를 추적한 결과, 멸치 육의 사후 변화 및 자가소화에 trypsin보다도 cathepsin L과 chymotrypsin의 단백질 분해 활성이 더 깊이 관여한다고 보고하였다. 그러나 단백질 분해 효소를 첨가하여 전통적인 발효와 동일한 조건에서 발효시킨 후, 이들 단백질 분해 효소의 최적 조건 및 활성의 변화, actomyosin의 분해형태에 대한 연구는 거의 수행되어 있지 않다.

따라서, 본 연구는 각종 단백질 분해 효소에 의한 멸치 actomyosin의 가수분해 및 생성된 펩티드 형태를 전통적인 발효방법에 의해 생성된 것갈 모델 실험을 통해 비교하고, 적절한 효소를 구명함으로써 전통적인 발효 형태와 유사한 가수분해 형태를 지닌 속성 발효 방법을 제시하기 위하여 일차적으로 각종 단백질 분해 효소에 의한 멸치의 가수분해 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

실험에 사용한 멸치는 1997년 5~12월에 걸쳐 거제도 근해에서 어획된 멸치 (체장 9.4~10.4 cm, 체중 8.4~11.7 g)를 재래 시장에서 구입하여 실험실로 운반한 다음 깨끗이 세척한 후 젓갈 및 효소 추출용 시료로 사용하였다. 가수분해를 촉진하기 위하여 사용한 오징어 간과 내장은 1996년 10~12월에 거제도 근해에서 어획한 후, 동결 저장한 오징어에서 적출하였다. 멸치 젓갈의 제조는 마쇄 멸치 육에 20%의 정제 염을 첨가한 후, 오징어 간장과 내장은 각각 2.5% (w/w), 시판 상용효소 (Neutrase, Alcalase 및 Protamex)는 각각 2% (w/w)씩 첨가하여 20~25°C의 암소에서 70일 동안 발효시키면서 분석용 시료로 사용하였으며, 첨가물 조성과 본 실험에서 사용한 시료명 및 젓갈 제조조건은 Table 1과 같다. 그리고 멸치육 actomyosin의 분해 특성을 알아보기 위한 모델 실험에는 trypsin (Sigma, T-7409), chymotrypsin (Sigma, C-4129), Alcalase (0.6AU/g, Novo), Neutrase (Novo) 및 Protamex (1.5AU/g, Novo)를 사용하였다.

2. 일반성분과 pH 측정

수분은 상압가열 건조법, 조단백질 함량은 semi-micro Kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet법, 회분은 건식회화법 (AOAC, 1990)으로 각각 측정하였으며, pH는 pH meter (Oakiton, Japan)를 사용하여 측정하였다.

3. 휘발성 염기질소 및 과산화물가 측정

휘발성 염기질소값은 미량확산법 (日本厚生省, 1960)으로, 과산화물가는 시료를 chloroform · 초산용액 (2:3, v/v)에 녹여 포화 KI를 가한 다음, 1% 전분 용액을 지시약으로 1/100 N Na₂S₂O₃용액의 적정값으로 산출하였다.

4. 비단백태 질소화합물, 아미노산 및 단백질 함량 측정

비단백태 질소화합물은 시료 5g에 최종 농도가 5%가 되도록 20%의 TCA를 첨가하여 균질화 하고 30분 이상 방치한 후, 원심분리하여 침전 단백질을 제거하고, 상층액에 있는 질소 함량을 semi-micro Kjeldahl법으로 측정하였다. 아미노산 함량은 ninhydrin으로 발색시켜 570nm에서 leucine의 검광곡선을 이용하여 정량하

였으며, 단백질 함량은 단백질 농도 범위에 따라 Bradford법 (1976)과 Umemoto의 Biuret 법 (1966)으로 측정하였다.

5. 가수분해도 측정

효소에 의한 멸치의 가수분해 정도는 멸치 액질의 총질소 함량에 대한 비단백태 질소화합물의 양 (%)으로 표시하였다.

6. Crude actomyosin의 추출

Crude actomyosin은 内山 등 (1978)의 방법을 다소 수정하여 Fig. 1과 같은 방법으로 추출하였다.

7. 효소 모델 실험

멸치 actomyosin에 대한 단백질 분해 효소의 분해활성은 김 (1986)의 방법을 다소 수정한 Fig. 2의 방법에 따라 유리되는 tyrosine의 양을 흡광도 280nm에서 측정하여, 검광선에서 양을 산출하였다. 효소 활성 (unit/mg)은 분 (min)당 효소 단백질 1 mg이 생성하는 1 μmole Tyr 상당량을 1 unit/mg로 표시하였으며, Alcalase, Neutrase 및 Protamex는 % 농도로 사용하였다.

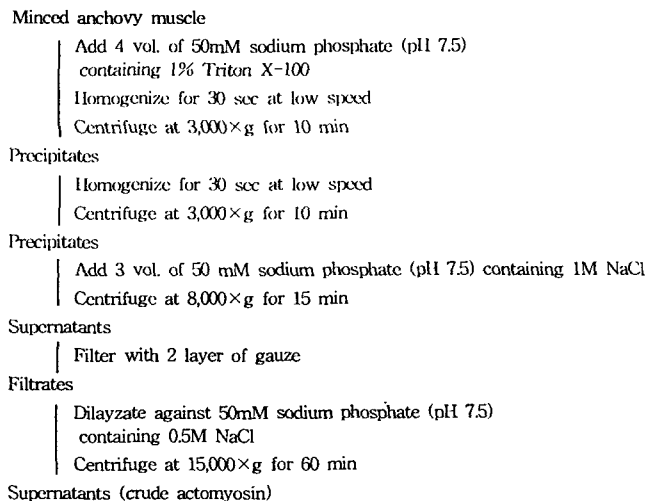


Fig. 1. Preparation of crude actomyosin from anchovy.

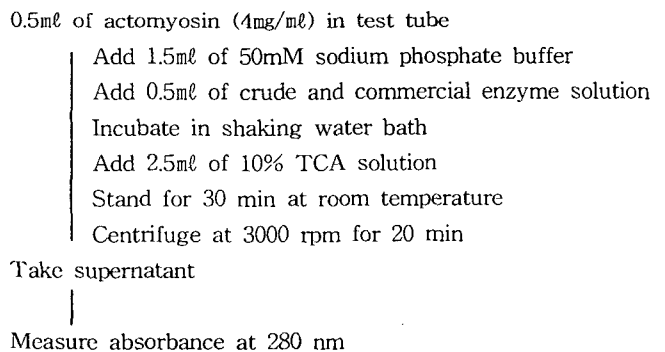


Fig. 2. Determination of proteolytic activities for crude actomyosin from anchovy.

Table 1. Ingredients for preparation of salted and fermented anchovy sauce

Sample name	Ingredients composition
R	Raw anchovy + 20% salt (w/w)
M	Minced anchovy + 20% salt (w/w)
L	Minced anchovy + 20% salt + 2.5% Squid liver
V	Minced anchovy + 20% salt + 2.5% Squid viscera
N	Minced anchovy + 20% salt + 2.0% Neutrase
A	Minced anchovy + 20% salt + 2.0% Alcalase
P	Minced anchovy + 20% salt + 2.0% Protamex

The refined salt was used. Neutrase, Alcalase and Protamex were purchased from Novo.

결과 및 고찰

젓갈을 담그기 위해 사용한 멸치의 일반성분은 수분 73.4%, 조단백질 16.0%, 조지방 6.5%, 회분 3.3%이었고, pH 값은 6.5이었으며, 전 실험군의 일반성분 변화는 전 숙성기간(70일)에 걸쳐 수분은 약 1.4~4%, 조지방은 1~2%, 회분은 1%내외 그리고 염도는 0.9%내외의 변화를 보였으며, 조단백질의 경우 숙성기간이 경과함에 따라 감소하는 경향(16.8~14.2%)을 나타내어, 가수분해에 의한 비단백태 질소량의 증가를 의미하였다. 한편 pH는 숙성기간에 걸쳐 6.1~6.7의 범위로서 큰 차이를 보이지 않았다. 숙성기간의 경과와 더불어 비단백태 질소량이 증가하고, 지방 함량에 다소 변화를 보이는 것은 젓갈의 풍미에 관계하는 성분이 비단백태 질소 성분과 지방임을 제시하고 있으며, pH의 급격한 변화가 없는 것에 미루어 멸치 육 단백질은 완충능이 대단히 큼을 알 수 있었다.

1. 휘발성 염기질소량 및 과산화물가의 변화

대조군(R과 M), 오징어 간(L) 및 내장(V), 그리고 상용효소를 첨가한 멸치 젓갈(N, A, 및 P)의 휘발성 염기질소(VBN) 및 과산화물가(POV)의 변화를 측정된 결과를 Fig. 3과 4에 나타내었다.

모든 실험군의 멸치 젓갈에서의 휘발성 염기질소는 숙성기간의 경과와 더불어 급속히 증가하였으며, 숙성 70일째에 대조군 중에서 전어체를 사용한 멸치 젓갈(R)과 마쇄한 멸치를 사용한 멸치 젓갈(M)은 약 140 mg/100g으로 차이가 없었으며, 오징어 내장을 첨가한 젓갈(V)에서 173.6 mg/100g으로 가장 높았고, Neutralse를 첨가한 젓갈(N)이 155.6 mg/100g 였으나, 오징어 간(L), Alcalase(A) 및 Protamex(P)를 첨가한 젓갈은 100.4~138.2 mg/100g으로 대조군에 비하여 낮은 편이었다. 오징어 내장(V)을 첨가한 젓갈에서 휘발성 염기 질소 값이 높은 것은 원료 오징어 내장에 잔존하는 저급 분해산물들의 영향에 기인하는 것으로 생각된다.

Kim et al. (1990)은 55°C에서 마쇄한 정어리의 자가소화 중 휘발성 염기질소량은 6시간 이후 급속히 증가하여 8시간만에 200 mg%에 육박한다고 하였으며, 아미노태 질소량도 숙성 초기에 급속히 증가한다고 보고하였다.

숙성 기간의 경과에 따라 과산화물가(POV)는 증가하였다(Fig. 4). 숙성 70일째 대조군 R과 M은 21.9 meq/kg으로 대조군 간에는 차이가 없었으며, 오징어 내장(V)을 첨가한 젓갈이 23.1 meq/kg으로 가장 높았고, Neutralse 첨가 젓갈(N)이 19.1 meq/kg으로 가장 낮았다. 따라서 실험군간의 과산화물가의 차이는 미미하여, 단백질 가수분해로 인한 지질의 산화는 크게 영향을 받지 않은 것으로 나타났다.

2. 아미노태 질소 화합물 및 아미노산 함량의 변화

숙성 기간별, 젓갈 중의 비단백태 질소 화합물과 아미노산 양의 변화를 각각 Fig. 5와 Fig. 6에 나타내었다.

숙성 초기 10일째에서 모든 실험군에서 비단백태 질소화합물(Fig. 5)의 급격한 증가를 보였다. 대조군(R과 M)에서는 전어체를 사용한 젓갈(R)이 1.21 mg-N/100g이며, 어체를 마쇄하여 담근 젓갈(M)이 1.41 mg-N/100g으로 다소 차이를 보여 숙성 40일째 까지 약 3 mg-N/100g정도의 차이를 유지하다 숙성 60일 이후에는 2.10 mg-N/100g으로 비단백태 질소화합물의 양에 차이가 없었다. 숙성 20일에서 40일 까지는 대조군(M)과 오징어 내장(V) 및 간(L), 그리고 Neutralse 첨가 젓갈(N)의 비단백태 질소화합물의 양이 약 1.57~1.75 mg-N/100g으로 대조군과 차이가 없었다. Alcalase(A)와 Protamex(P)를 첨가한 젓갈은 숙성 초기(10~30일)에 다른 실험군에 비하여 비단백태 질소화합물이 급격히 증가함으로써 이들 첨가효소가 젓갈 숙성 초기의 분해에 주된 작용을 하는 것으로 나타났다.

숙성기간 중의 아미노산 함량(Fig. 6)의 변화는 숙성기간의 경과와 더불어 증가하는 경향이었으며, 숙성 70일째, 대조군(R과

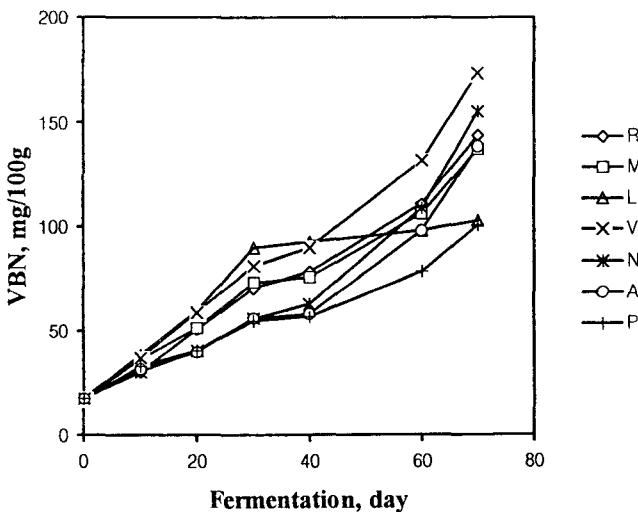


Fig. 3. Changes in volatile basic nitrogen (VBN) of salted and fermented anchovy sauce during fermentation. See table 1 for sample names.

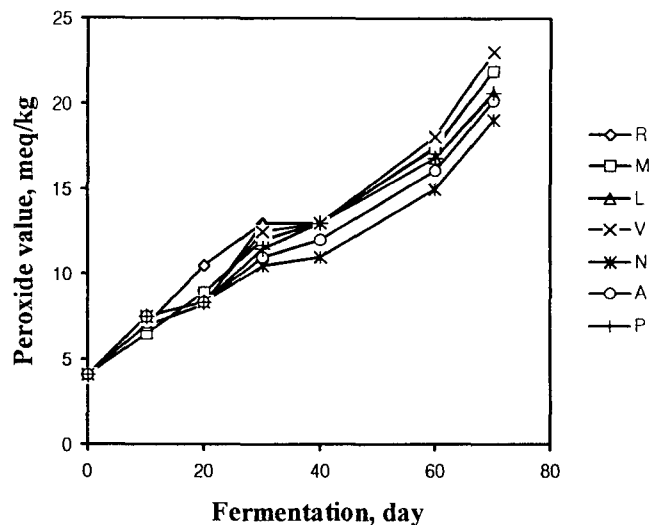


Fig. 4. Changes in peroxide value of salted and fermented anchovy sauce during fermentation. See table 1 for sample names.

M)은 전 어체를 사용한 것갈 (R)이 238.6 mM/100g과 어체를 마쇄하여 담근 것갈 (M)이 265.7 mM/100g 이었으며, 효소 첨가군이 286.8~356.7 mM/100g으로 대조군 보다 8~50%가량 아미노산 함량이 높았다. 어체를 마쇄한 것갈 (M)의 아미노산의 함량이 전 어체를 사용한 것 보다 다소 많은 것은 멸치 육과 내장 중에 존재하는 단백질 분해 효소가 마쇄 육조직에 보다 쉽게 작용하기 때문인 것으로 추정된다.

비단백태 질소화합물과 아미노산의 생성량으로 판단한 각 효소 첨가군의 가수분해 정도는 A=P (356.7 mM/100g)>N (327.1 mM/100g)>L (300.0 mM/100g)>V (287.2 mM/100g)>M>R의 순이었다. 한편, 전 숙성 기간동안 비단백태 질소 화합물은 2.32~2.64배 증가하였으나, 아미노산은 3.77~5.63배 증가하여 전체

아미노산 함량의 변동이 가수분해 정도를 더욱 민감하게 반영하는 것으로 나타났다. 이와 관련하여 Choi et al. (1998)은 ninhydrin 법에 의한 액젓의 유리아미노산 양은 아미노산 자동분석기로 분석한 총 유리아미노산 양의 80% 이상을 반영한다고 보고하였다.

3. 가수분해도

대조군과 효소 첨가군의 숙성 기간에 따른 가수분해도를 Fig. 7에 나타내었다.

오징어 간 (L), Neutrase (N), Alcalase (A) 및 Protamex을 각각 첨가하여 숙성시킨 멸치 액젓의 저장 60일째에 가수분해도는 약 57% 정도로써 대조군 (R과 M)의 가수분해도인 43%에 비하여 약 14%가량 더 분해된 것으로 나타났으며, 숙성 초기 (10일째)에 대조군 (R과 M)은 각각 19%와 26%, 그리고 효소첨가군 (L,V,N,A 및 P)은 33~39%로 급속히 가수분해되는 것으로 미루어, 단백질 분해 효소는 가수분해 초기 속도의 증가에 크게 기여하는 것 같다.

이와 같은 결과는 Pyeun et al. (1996)과 Lee et al. (1996)이 어류의 초기 사후 변화 과정 중 체조직의 pH인 6.0부근에서 내장에 분포하는 조효소가 육의 조효소에 비하여 근원섬유단백질에 대하여 보다 높은 분해활성을 나타내며, 멸치 육과 내장에 분포하는 조효소는 방어 근원섬유단백질에 대하여도 반응 초기에 가수분해가 신속히 진행되었다고 한 보고와 거의 일치하고 있다. 한편, 마쇄한 멸치 (M)와 전 어체를 사용한 멸치 것갈 (R)의 가수분해 속도를 비교하면, 전 어체를 사용한 것에 비하여 마쇄한 것이 숙성 초기에 상당히 빠른 가수분해도를 보였으나, 저장 60일 부터는 거의 비슷한 수준을 유지하였다.

본 실험의 결과, 단백질 분해 효소의 첨가는 가수분해 초기 속도를 증가시키지만, 일정 기간 후에는 거의 일정한 분해도를 유지하는 것에 미루어 일정 기간이 지난 후에는 가수분해 생성물이 가수분해 속도를 저해하는 것으로 판단된다.

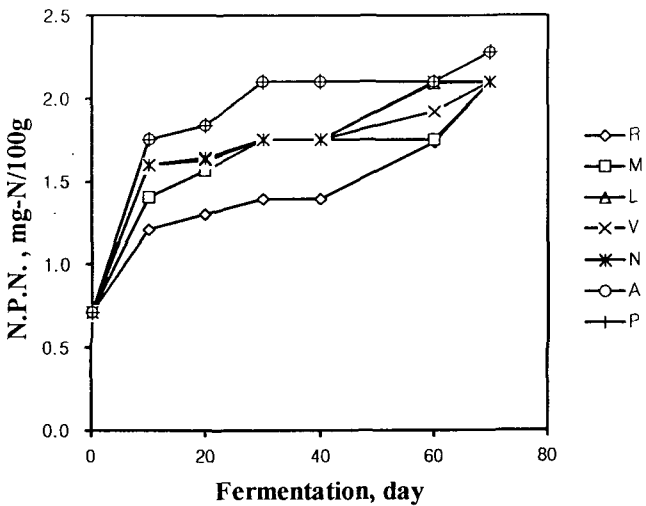


Fig. 5. Changes in nonprotein nitrogenous compounds (N.P.N.) of salted and fermented anchovy sauce during fermentation. See table 1 for sample names.

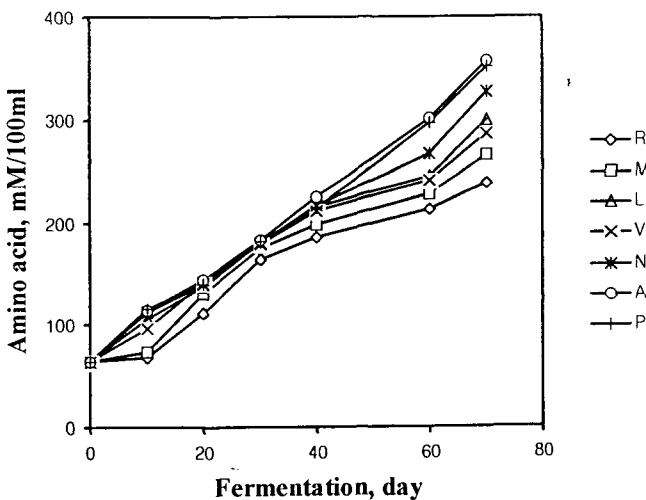


Fig. 6. Changes in amino acid content of salted and fermented anchovy sauce during fermentation. See table 1 for sample names.

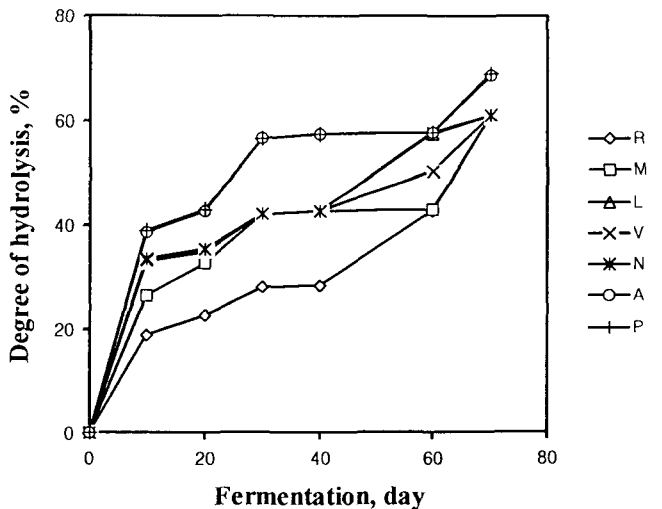


Fig. 7. The degree of hydrolysis in salted and fermented anchovy sauce during fermentation. See table 1 for sample names.

4. 단백질 분해 효소에 의한 멸치 actomyosin의 분해

효소 농도 및 반응시간의 영향: 멸치 actomyosin (2.17 mg/ml)에 대하여 정제 효소인 trypsin과 chymotrypsin을 각각 0.5~8.0 µg/ml (효소농도/기질농도 ; 1/4340~1/271) 첨가하여 40°C에서 60분 동안 반응시켰을 때의 효소 활성과, Neutrase, Alcalase 및 Protamex를 각각 1~5 mg/ml의 범위 (효소농도/기질농도 ; 1/2.17~2.30)로 첨가하여 반응시킨 결과를 Fig. 8에 나타내었다.

Trypsin과 chymotrypsin은 5 µg/ml 이상의 농도에서부터 0차 반응에 해당하였으며, Protamex는 2.0 mg/ml, Neutrase와 Alcalase는 3.0 mg/ml 이상의 농도에서 활성이 오히려 감소하였다.

효소활성에 미치는 반응시간의 영향 (Fig. 9)은 trypsin과 chymotrypsin은 효소 농도 2 µg/ml에서 반응 시간 80분까지, Alcalase (3.0 mg/ml), Neutrase (3.0 mg/ml) 및 Protamex (2.0 mg/ml)는 전체 반응 시간 동안 거의 직선형으로 증가하였다. Cho et al. (1996)은 멸치 내장의 trypsin 활성은 기질 BAPNA (N α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide)에 대하여 효소 농도 0.25~4.0 µg/ml의 범위에서 효소 농도에 비례하며, 반응 30분까지는 직선형으로 증가한다고 하였다. 본 실험도 거의 비슷한 반응 형태를 보이고 있었으며, 가수분해 반응을 위한 효소 농도와 반응 시간은 1차 반응 농도에 해당하는 범위와 시간으로 한정하였다.

pH 및 온도의 영향: 젓갈의 숙성 중에 단백질 분해 효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 알아보기 위하여, 일반적인 젓갈 제품의 pH 범위를 넘지 않을 것으로 예상되는 pH 5.0~7.5에서 활성의 변화를 측정하였다 (Fig. 10)

Trypsin, Neutrase 및 Alcalase는 실험한 범위의 pH 영역에서 거의 pH 의존성을 보이지 않았으며, chymotrypsin은 pH 6.5에서 가장 활성이 높았고, Protamex는 pH 6.0까지 활성이 감소하였으나, 그 후의 pH에서는 거의 일정한 것으로 나타났다. 이 같은 실험 결과는 Novo사에서 보고한 Alcalase의 최적 조건 (pH 6.5~8.5, 온도 55~70°C)과 Protamex의 최적 조건 (pH 5.5~7.5, 온도 35~60°C)과는 다소 차이를 보였으나, 이는 사용한 기질의 차이에 기인하는 것으로 생각된다. 그리고 실험 범위의 pH에서 trypsin의 pH 의존성이 보이지 않는 것은 trypsin의 최적 pH가 알칼리 쪽에 치우쳐 있기 때문으로 판단된다.

정제 효소인 trypsin과 chymotrypsin은 멸치 actomyosin (pH 6.5)에 대하여 각각 55°C와 45°C에서 가장 높은 활성을 나타내 비교적 큰 온도 의존성을 보이고 있었으나, Alcalase와 Neutrase는 45~60°C에 걸쳐 비교적 넓은 온도 범위에 걸쳐 높은 활성을 보이고 있어서 최적 온도에 있어서는 Novo사의 보고와 거의 일치하고 있었다. 그리고 Protamex는 70°C까지 온도 상승과 더불어 활성도 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 11).

이 같이 trypsin과 chymotrypsin의 온도 의존성이 높은 것은 다른 단백질 분해 효소에 비하여 높은 정제도에 기인하는 것으로 보인다. Kim et al. (1986)과 Kim and Pyeun (1986)은 고등어, 정어리의 소화관, 췌장, 유문수, 비장에는 알칼리성 단백질 분해 효소가 분포하고 있으며, 산성 단백질 분해 효소가 분포하고 있는 위에 비하여 비활성이 높다고 하였고, 유문수에서 정제한 알칼리성 단백질 분해 효소의 casein에 대한 최적 pH와 온도는 각각 9.4~9.8

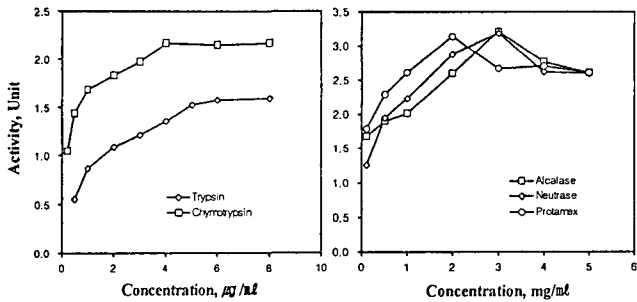


Fig. 8. Changes of proteolytic activities for crude actomyosin from anchovy as affected by protease concentration.

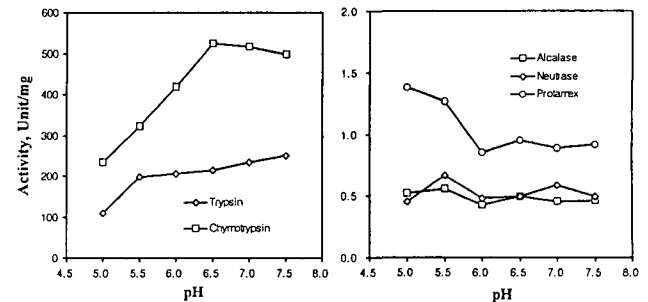


Fig. 10. Effects of pH on proteolytic activities for crude actomyosin from anchovy.

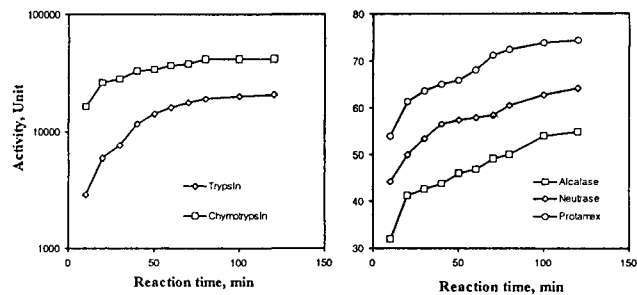


Fig. 9. Effects of reaction time on proteolytic activities for crude actomyosin from anchovy.

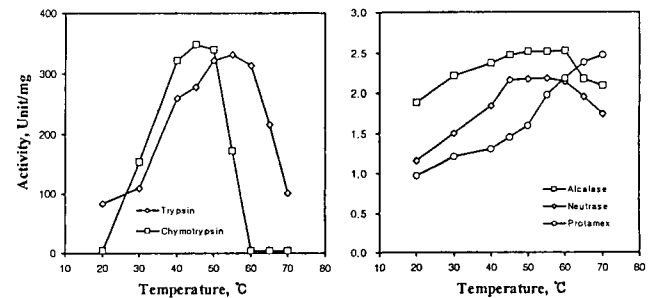


Fig. 11. Effects of temperature on proteolytic activities for crude actomyosin from anchovy.

과 45°C라는 보고와 본 실험의 결과는 다소 차이를 보이고 있다. 이 같은 사실은 본 실험에 사용한 효소들이 포유동물과 미생물 기원의 효소로서 어류 기원 효소에 비하여 다소 높은 최적 온도를 갖기 때문이라고 판단된다.

Kinetics : 멸치 actomyosin에 대한 trypsin, chymotrypsin, Alcalase, Neutrase 및 Protamex의 활성을 pH 6.5와 각각의 최적 온도에서 60분 동안 반응시킨 후, Lineweaver-Burk 식으로 K_m 과 V_{max} 값을 구하였다 (Table 2). 동일 효소 농도에서 멸치 actomyosin에 대하여 chymotrypsin (0.216)이 trypsin (0.188)에 비하여 더 높은 전환수 (V_{max})를 보여주고 있었으며, 사용 효소 중에는 Protamex (2.688)가 가장 큰 전환수를 나타내었다.

그러나, trypsin 및 chymotrypsin과 같은 정제된 효소들과 Alcalase, Neutrase 및 Protamex와 같은 상용효소간에는 실험에 사용한 효소 농도가 다르기 때문에 직접적인 비교는 어렵지만, 효소 첨가에 따른 경제성을 고려하면, Protamex가 가장 경제적인 가수분해 효과를 달성할 수 있음을 나타내고 있다. 멸치 actomyosin에 대한 trypsin과 chymotrypsin의 K_m 상수는 각각 0.582와 0.712%로서 trypsin이 보다 높은 친화성을 나타내었으며, Alcalase (1.020%), Neutrase (1.660%) 및 Protamex (3.545%) 중에서는 Alcalase가 가장 높은 친화성을 보이고 있었다. Pyeun et al. (1995)은 멸치 육에 있는 cathepsin L과 내장에 있는 chymotrypsin의 멸치 근원 섬유 단백질에 대한 K_m 과 V_{max} 는 각각 1.86, 0.56 U/mg 및 0.63, 1.08 U/mg으로서 trypsin에 비하여 높으며, 멸치의 사후 분해 또는 젓갈 제조시의 자가소화는 cathepsin L과 chymotrypsin의 관여가 크다고 하였다.

NaCl에 의한 영향 : 멸치 actomyosin의 가수분해에 미치는 NaCl 농도의 영향을 pH 6.5에서 일반적인 젓갈 숙성 온도인 20°C와 효소의 최적 온도에 상당하는 55°C에서 각각 측정하여 NaCl이 존재하지 않을 때의 활성에 대한 상대 활성으로 표시하였다 (Fig. 12).

Trypsin은 10%의 NaCl 첨가에 의하여 20°C에서는 활성을 보이지 않은 반면, chymotrypsin은 22.2%의 활성을 보였으나 20% 이상의 NaCl 농도에서는 chymotrypsin도 활성을 보이지 않았다. 이 같은 결과는 trypsin과 chymotrypsin이 NaCl의 영향을 많이 받는다는 것을 의미한다. 그리고 20°C, 20%의 NaCl 농도에서 Alcalase, Neutrase 및 Protamex는 각각 17.6%, 22.1% 및 58.5%의 활성을

Table 2. Kinetic properties and optimal conditions of commercial protease for the hydrolysis of crude actomyosin from anchovy

	pH	Temp (°C)	V_{max} (A_{280})	K_m (%)
Trypsin	6.5	55	0.188	0.582
Chymotrypsin	6.5	45	0.216	0.710
Alcalase	6.5	55	1.280	1.020
Neutrase	6.5	55	1.613	1.660
Protamex	6.5	55	2.688	3.545

V_{max} was expressed absorbance at 280 nm; K_m was expressed concentration of crude actomyosin from anchovy; The concentration of trypsin and chymotrypsin was used 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in reaction mixture; The concentration of Alcalase, Neutrase and Protamex was used 2% (20 mg/ml) in reaction mixture

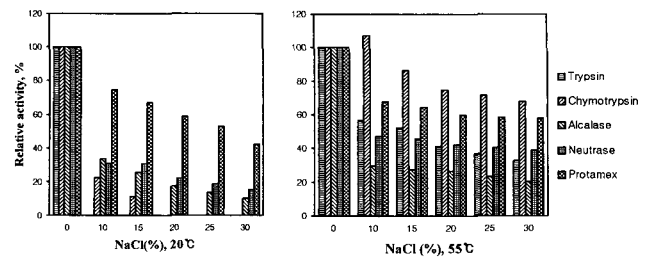


Fig. 12. Effects of NaCl on proteolytic activities for anchovy crude actomyosin from anchovy.

보여 20°C에서 Protamex가 NaCl의 영향을 가장 적게 받는 것으로 나타났다. 한편 효소 활성 최적 온도에 가까운 55°C에서는 trypsin과 chymotrypsin 모두 10~30%의 NaCl 농도 구간에서 활성을 보였으나, NaCl의 농도 증가와 더불어 활성은 감소하였고, 20%의 NaCl 농도에서 각각 41.3%와 75%의 잔여 활성을 보였다. 20°C에서의 결과와 비교할 때 trypsin과 chymotrypsin은 최적온도에서는 고농도의 NaCl에서도 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Pyeun et al. (1995)이 멸치에서 정제한 cathepsin L, trypsin 및 chymotrypsin은 25%의 NaCl 농도에서 멸치 actomyosin에 대한 활성은 50% 가량 감소하며, 특히 trypsin은 10°C와 20°C의 저온에서 현저히 활성이 감소한다고 한 보고와 거의 일치하고 있다. 또한 Alcalase, Neutrase 및 Protamex는 10~30%의 NaCl 농도 구간에서 20 및 55°C 모두에서 멸치 actomyosin에 대한 가수분해 활성을 보였으며, NaCl 농도 증가에 따른 활성의 감소 속도는 20°C에서 더 빨랐으나, Protamex는 20°C, 25% NaCl에서도 약 52.5%의 잔여활성을 보였다. 따라서 고농도의 염의 존재시, Protamex는 다른 효소에 비하여 멸치 actomyosin을 신속히 분해시킬 수 있다고 판단된다.

요 약

전통적인 발효와 유사한 가수분해 형태를 가지는 단백질 분해 효소에 의한 최적 발효 조건을 검토하기 위하여 trypsin, chymotrypsin, Alcalase, Neutrase, Protamex와, 오징어 내장 및 간에서 추출한 조효소를 첨가하여 제조한 멸치 액젓 및 actomyosin의 가수분해 특성을 조사하였다.

멸치 젓갈의 휘발성 염기질소 값은 오징어 내장을 첨가한 젓갈이 저장 70일째 173.6 mg/100 g으로 가장 높았고, 저장 기간에 따른 과산화물가의 증가는 시료 간에 큰 차이를 보이지 않았다. Alcalase와 Protamex를 첨가한 젓갈의 비단백질 질소 함량과 총 유리 아미노산 증가가 가장 높게 나타났다. 숙성 60일째에 Alcalase와 Protamex는 육 단백질에 대해 약 57%의 가수분해율을 보인 반면, 대조구는 약 43%이었다. pH 5.0~7.5 범위에서 멸치 actomyosin에 대하여 가장 높은 활성을 보이는 pH는 trypsin, chymotrypsin, Alcalase, Neutrase 및 Protamex가 각각 7.5, 6.5, 6.5, 7.0 및 5.0이었고, 최적 활성을 보이는 온도는 trypsin, chymotrypsin, Alcalase, Neutrase에서 각각 55, 45, 60 및 55°C였으며, Protamex는 온도의 상승 (20~70°C)과 더불어 활성도 상승하는 것으로 나타났다. 아올

러 Protamex는 사용한 효소 중 가장 높은 K_m (3.545)과 V_{max} 값 (2.688)을 나타내었고, NaCl에 대한 영향을 적게 받아 일반적인 젓갈 숙성 조건인 20°C, 25% NaCl에서도 52.5%의 높은 잔여 활성을 나타내었다. 따라서 Protamex가 멸치 actomyosin의 가수분해에 효과적이라 판단된다.

참 고 문 헌

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed., Assoc. of Offic. Anal. Chem., Arlington.
- Bae, T.J., B.H. Han, H.D. Cho, J.C. Kim, B.S. Kim and H.S. Lee. 1990 c. Conditions for rapid processing of modified fish sauce using enzymatic hydrolysis and improvement of product quality 4. Flavor components of fish sauce from whole sardine. J. Korean Fish. Soc., 23 (5), 373~377 (in Korean).
- Bae, T.J., B.H. Han, H.D. Cho, J.C. Kim, B.S. Kim and S.I. Choi. 1990a. Conditions for rapid processing of modified fish sauce using enzymatic hydrolysis and improvement of product quality 2. Fish sauce from sardine waste and its quality. J. Korean Fish. Soc., 23 (2), 125~136 (in Korean).
- Bae, T.J., B.H. Han, H.D. Cho, J.C. Kim, B.S. Kim and H.S. Lee. 1990b. Conditions for rapid processing of modified fish sauce using enzymatic hydrolysis and improvement of product quality 3. Fish sauce from whole sardine and its quality. J. Korean Fish. Soc., 23 (5), 361~372 (in Korean).
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 24 8~254.
- Cha, Y.J. and E.H. Lee. 1989. Studies on the processing of rapid fermented anchovy prepared with low salt contents by adapted microorganism 1. Biochemical characterization of proteolytic bacteria and their extracellular protease isolated from fermented fish paste. J. Korean Fish. Soc., 22 (5), 363~369 (in Korean).
- Cho, D.M., M.S. Heu, H.R. Kim, D.S. Kim and J.H. Pyeun. 1996. Kinetic analyses for enzymatic properties of trypsins purified from dark-fleshed fish. J. Korean Fish. Soc., 29 (1), 64~70 (in Korean).
- Choi, Y.J., S.H. Kim, Y.S. Im, I.S. Kim, D.S. Kim and Y.J. Cho. 1998. Properties and utilization of undigested peptides in anchovy sauces 1. Use of undigested peptides as a quality parameter of anchovy sauces. J. Korean Fish. Soc., 31 (3), 386~392 (in Korean).
- Han, B.H., T.J. Bae, H.D. Cho, J.C. Kim, B.S. Kim and S.I. Choi. 1990. Conditions for rapid processing of modified fish sauce using enzymatic hydrolysis and improvement of product quality 1. Fish sauce from mackerel waste and its quality. J. Korean Fish. Soc., 23 (2), 10 9~124 (in Korean).
- Kim, D.S., C. Koizumi, B.Y. Jeong and K.S. Jo. 1994. Studies on the lipid content and fatty acid composition of anchovy sauce prepared by heating fermentation. Bull. Korean Fish. Soc., 27 (5), 469~475 (in Korean).
- Kim, H.R., J.H. Pyeun and J.G. Cho. 1986. Proteolytic enzymes distributed in the tissues of dark flesh fish 2. Comparison of the proteolytic activity of tissue extract from the internal organs of mackerel and sardine. Bull. Korean Fish. Soc., 19 (6), 521~528 (in Korean).
- Kim, H.R. and J.H. Pyeun. 1986. The proteinase distributed in the intestinal organs of fish 2. Characterization of the three alkaline proteinase from the pyloric caeca of mackerel, *Scomber japonicus*. Bull. Korean Fish. Soc., 19 (6), 547~557.
- Kim, Y.M., J.G. Koo, Y.C. Lee and D.S. Kim. 1990. Study on the use of sardine meal koji and autolysates from sardine meat in rapid processing of sardine sauce. J. Korean Fish. Soc., 23 (2), 77~86 (in Korean).
- Koo, J.G., Y.M. Kim, Y.C. Lee and D.S. Kim. 1990. Taste compounds of rapid processed sardine sauce. J. Korean Fish. Soc., 23 (2), 87~92 (in Korean).
- Lee, D.S., M.S. Heu, D.S. Kim and J.H. Pyeun. 1996. Some properties of the crude proteases from fish for application in seafood fermentation industry. J. Korean Fish. Soc. 29 (3), 30 9~319 (in Korean).
- Pyeun, J.H., M.S. Heu, D.M. Cho and H.R. Kim. 1995. Proteolytic properties of cathepsin L, chymotrypsin, and trypsin from the muscle and viscera of anchovy *Engraulis japonica*. J. Korean Fish. Soc., 28 (5), 557~568 (in Korean).
- Pyeun, J.H., D.S. Lee, D.S. Kim and M.S. Heu. 1996. Activity screening of the proteolytic enzymes responsible for post-mortem degradation of tissues. J. Korean Fish. Soc., 29 (3), 296~308 (in Korean).
- Umamoto, S. 1966. A modified method for estimation of fish muscle protein by Biuret method. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 32, 427~435.
- 김형락. 1986. 고등어 유문수 조직에서 분리한 3종의 알칼리성 단백분해 효소의 특성. 부산수산 대학원 공학석사 학위 청구논문.
- 内山 均, 加藤 登, 工藤 雄司, 新井 健一. 1978 魚類筋原纖維の生化學的研究. 各種 魚類筋原 纖維Ca-ATPaseの溫度安定性の比較. 日水誌. 44, 491~498.
- 日本厚生省. 1960. 食品衛生検査指針 I, 東京, 日本, pp.13~16.

1999년 4월 7일 접수

1999년 7월 6일 수리