

막반응기에서 참치 유문수 유래 단백질 분해효소를 이용한 참치 자숙액의 연속적 가수분해

김세권 · 변희국 · 전유진
부경대학교 화학과

Continuous Hydrolysis of Tuna Boiled Extract using Proteinase from Tuna Pyloric Caeca in Membrane Reactor

Se-Kwon KIM, Hee-Guk BYUN and You-Jin JEON

Department of Chemistry, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

The purpose of this study was to determine the optimum hydrolysis conditions for the production of enzymatic hydrolysate from tuna boiled extract (TBE) using membrane (molecular weight cut off 10,000Da) reactor. The tuna pyloric caeca crude enzyme (TPCCE) was identified as the most suitable enzymes for the hydrolysis of TBE. The optimum hydrolysis conditions of TBE in the batch reactor were 40°C, pH 9 and substrate to TPCCE ratio 50 (w/w). For 6hr under the above conditions, 70% of the total amount of initial TBE was hydrolysed. The optimum hydrolysis conditions of TBE in the membrane reactor were 40°C, pH 9, enzyme 0.1 g/l, volume 1 l and substrate to enzyme ratio 100 (w/w). The degree of hydrolysis of TBE was above 60% for 3 hr. The TBE hydrolysate were prepared with 5% TBE solution under the optimum hydrolytic conditions in the membrane reactor

Key words: tuna boiled extract, tuna pyloric caeca, enzymatic hydrolysis, membrane reactor, ultrafiltration.

서 론

최근 다양한 수산가공품 생산량의 증가와 더불어 발생하는 가공부산물에 대량 폐기되고 있는데, 이들 중에는 단백질, 무기질 및 정미성분 등과 같은 유용한 성분이 다량 함유되어 있기 때문에 이들의 효율적인 회수 및 이용에 관한 연구가 필요한 실정이다. 특히 수산가공 부산물에 함유되어 있는 수용성 단백질의 회수 및 이용에 관한 연구는 자원의 효율적인 이용 및 환경적인 면에서 매우 바람직하다.

현재 단백질을 효율적으로 이용하기 위하여 가수분해에 의한 소재개발이 이루어지고 있으며, 이러한 자원의 개발은 식품소재로의 이용에 관한 특성외에 기능적인 특성까지 요구되고 있기 때문이다. 따라서 최근 이러한 단백질 가수분해물은 단백질을 산 또는 알칼리로 가수분해한 것을 거의 산업적으로 이용되고 있다. 그러나 단백질을 산으로 가수분해 할 경우, tryptophan과 같은 필수아미노산과 cysteine이 분해 소실되고 (Kinsella, 1979), L-형의 아미노산이 D-형의 아미노산으로 변환되며, 알칼리로 분해할 경우는 lysinoalanine[N-DL-(amino-2-carboxyethyl)-L-lysine]과 같은 독성물질이 생성되어 생체내에서의 안전성에 문제가 되고 있다 (Lahl and Grindstaff, 1989). 따라서 최근 생물학적인 방법인 효소를 이용한 가수분해법이 널리 이용되고 있다. 그러나 현재 효소적 가수분해는 대부분 회분식 가수분해법을 사용하고 있는데, 이것은 효소의 대량 소비에 의한 생산비의 증가 초래하며, 일정한 분자량을 가진 생성물을 효율적으로 생산하기 어렵고, 수율이 낮으며 효소의 불활성화 과정이 필요하다는 등이 문제점으로 지적되고 있다 (Cheryan, 1986).

이러한 문제를 해결하고자 고정화 효소를 이용한 단백질의 연속적 가수분해에 관한 연구가 수행되었지만 (Kennedy et al., 1990; Sakai et al., 1991; Malcata et al., 1992) 고정화 방법이 까다

롭고 고정화하는데 입체장애에 의한 활성저하가 일어났다 (Cheryan and Mehaia, 1990). 그러나 막 반응기 장치는 효소를 고정화시키지 않고 반복하여 이용할 수 있고 연속적으로 생성물을 분리하여 분자량이 각각 다른 가수분해물을 생산할 수 있어 산업적으로 응용할 수 있다. 또한, 막 반응기 장치에 의한 분리는 상변화를 일으키지 않기 때문에 에너지 소요량이 적고, 연속조작이 가능하며, 열이나 pH에 민감한 물질의 분리를 가능하게 할 수 있는 많은 장점을 가지고 있다. 따라서 수산가공분야에서도 막분리기술의 이용이 급속히 진행되어 종래 공정을 변경시킨다든지 새로운 공정 개발이 이루어지고 있어 그 응용분야는 더욱 확대될 것으로 생각된다.

단백질의 가수분해에 관한 연구로는 Sattlerlee et al. (1973)은 소와 돼지피의 가수분해물이 meat emulsions에서 binder로서 이용될 수 있다고 하였고, Monsheimer and Pfeleiderer (1981)는 피혁폐기물을 미생물 protease로 가수분해를 시도하였다. Kang et al. (1992)은 회분식에 의한 가자미피 젤라틴의 효소적 가수분해물의 제조조건에 대하여 보고하였다.

단백질의 가수분해에서 한외여과막의 이용에 관한 연구로는 Deeslie and Cheryan (1981)과 Cheryan and Deeslie (1983; 1984)의 한외여과막 반응기에서의 단백질의 연속적 가수분해에 관한 연구, 2단계 한외여과막 공정에 의한 유청 단백질 펩티드의 생산과 이용에 관한 연구 등이 보고된 바 있다. 저자 등은 어피 젤라틴 가수분해물의 연속적 생산을 위하여 한외여과막 반응기를 이용 (Kim and Byun, 1994; Kim et al., 1994; Kim et al., 1993; Kim et al., 1991)에 관하여 보고한 바 있으며, 생성된 어피 젤라틴 가수분해물의 기능성에 관한 연구 (Kim et al., 1995) 및 천연조미료 개발에 관한 연구 (Kim et al., 1995) 등도 수행한 바 있다. 그리고 단백질의 한외여과막에 대한 투과특성에 관한 연구 (Byun et al., 1998)도 보고하였다.

우리나라에서 참치류의 생산량은 연간 약 22만 1천톤 (1995년)으로 그 중 약 5만 1천톤이 통조림 가공 원료로 사용되는데 이것은 어패류를 이용한 전체 통조림 생산량 6만 3천톤의 약 81%를 차지한다 (수산년감, 1996). 참치 통조림의 가공시 부산물인 자숙액은 대량으로 폐기되어 환경오염을 야기시키고 있는데, 폐기되는 참치 자숙액은 단백질이나 정미성분과 같은 유용성분이 다량 함유되어 있기 때문에 효율적인 회수 및 이용에 관한 연구가 매우 필요한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 부산물로 대량 생산되고 있는 참치자숙액으로부터 수용성 단백질을 이용하기 위하여 자숙액 중에 함유되어 있는 다량의 염을 전보 (Kim et al., 1998)에서와 같이 탈염하였으며, 막반응기 장치에서 자숙액의 효소적 가수분해를 제조하기 위한 최적 가수분해조건을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 장치

전보 (Kim et al., 1998)에서 확립된 전기투석에 의한 참치 자숙액의 탈염조건 하에서 참치 자숙액을 탈염하여 시료로 사용하였다.

자숙액의 효소적 가수분해를 위하여 참치 유문수 유래 단백질 분해효소 (tuna pyloric caeca crude enzyme: TPCCE)를 전보 (Kim et al., 1997)의 방법에 따라 추출하여 조효소의 형태로 사용하였다. 또한 대조구로서는 시판 단백질 가수분해효소인 α -chymotrypsin (EC 3. 4. 21. 1; from bovine pancreas, Type II), papain (EC 3. 4. 21. 2; from papaya latex, Type IV), trypsin (EC 3. 4. 21. 4; from bovine pancreas, Type II), protease (from *Streptomyces griseus*, Type XIV) 및 pepsin (EC 3. 4. 23. 1; from porcine stomach Mucosa) 등을 Sigma사 (미국)로부터 구입하여 사용하였다.

자숙액을 효소로 가수분해하기 위하여 사용된 막반응기 장치 (X-FLO Module)는 Bio Recovery사 (미국)에서 구입하였으며, 막 (UF-5K-SRC, UF-10K-PES)은 Downstream Technology사 (미국)의 것을 사용하였다. 참치 자숙액 가수분해물 중에서 분자량 1,000 Da이하는 Millipore Minitan System (미국)을 사용하여 분리하였다. 그외 모든 분석시약은 특급시약을 사용하였다.

2. 회분식에서 자숙액의 최적 가수분해 조건

TPCCE를 이용한 참치 자숙액의 가수분해를 위한 최적조건은 반응pH, 반응온도, 기질 대 효소비, 기질농도 및 반응시간 등에 대하여 검토하였다. 먼저, 최적 pH조건을 검토는 1% (w/v) 농도의 자숙액 100 ml를 기질용액으로 하여 40°C에서 기질 대 효소비가 100:1 (w/w)이 되도록 효소를 첨가하여 1시간동안 반응시켰다. 이때 사용된 완충용액으로는 0.1 M sodium acetate-acetic acid (pH 3.0~6.0), 0.1 M disodium hydrogenphosphate-sodium dihydrogen phosphate (pH 7.0), 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0~9.0), 0.1 M sodium carbonate-sodium bicarbonate (pH 10.0~11.0)였다. 최적 온도는 자숙액을 20°C, 30°C, 40°C 및 50°C까지 변화시켜서 검토하였다. 기질로 사용된 참치 자숙액 대 효소비는 20, 50, 100, 200, 500

및 1000 (w/w)으로 변화시켰으며, 기질농도는 자숙액을 1%, 5%, 10%, 15% 및 20%로 각각 조절하여 검토하였다. 최적 반응시간은 최적 pH, 온도, 기질 대 효소비 및 기질농도로 가수분해 조건을 조절한 후 1, 2, 4, 6, 9, 12 및 24시간 동안 각각 반응시킨 용액으로부터 가수분해액을 분취하여 가수분해도를 측정하여 반응시간을 결정하였다. 이 때 시판되고 있는 단백질 분해효소인 α -chymotrypsin, papain, pepsin, protease 및 trypsin 등을 TPCCE와 비교하였다. 모든 가수분해 반응조건을 검토는 참치 자숙액의 가수분해도로서 측정하였다.

3. 가수분해도 측정

참치 자숙액의 가수분해도 (degree of hydrolysis; DH)는 Hoyle and Merritt (1994)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 Lowry법 (1951)으로 10% TCA 가용성 질소량을 측정 후 다음 식으로부터 가수분해도를 계산하였다.

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

4. 막반응기에서 가수분해조건

참치 자숙액의 효소적 가수분해를 위한 막반응기 장치는 Fig. 1에서와 같이 기질 공급장치, 반응기, 막 (MWCO 10,000Da), 열판 교반기 (Nuova II, Stir Plate), pH 자동조절기 (Cole-Parmer Instrumental Co., Model 5652-20), 압력조절밸브, 자숙액 반응혼합물의 순환펌프 및 알칼리 공급펌프 (Cole-Parmer Instrumental Co.,

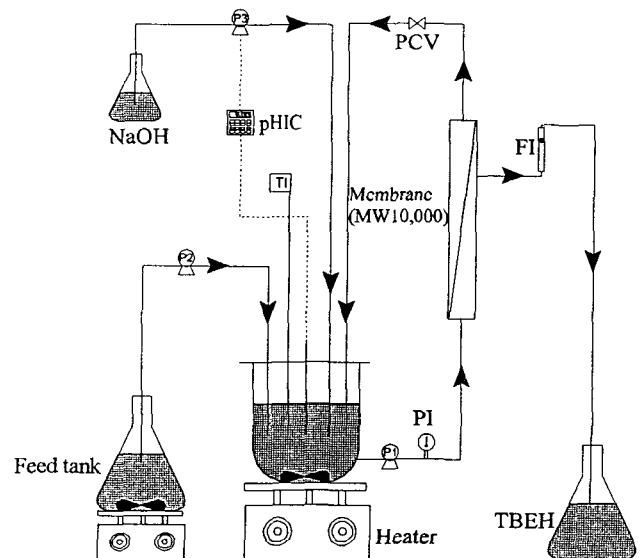


Fig. 1. Schematic diagram of membrane reactor for the production of tuna boiled extract hydrolysate.

TI, temperature indicator; PI, pressure indicator; FI, flow indicator; P1, recycling pump; P2, feed pump; P3, pH control valve; PCV, pressure control valve; pHIC, pH indicator controller; TBEH, tuna boiled extract hydrolysate

1~100 rpm) 등으로 구성되었으며, 투과압력, 반응시간, 효소농도, 기질 대 효소비 및 기질농도 등의 조건에 대하여 검토하였다. 먼저, 막반응기에서 투과압력에 따른 참치 자숙액의 투과유속은 참치 자숙액 중의 단백질 함량이 1, 2, 4, 6, 10, 15 및 20%가 되도록 기질의 양을 11로 만들어 반응기에 넣고, 회분식 가수분해의 최적 조건에서 검토된 온도 및 pH로 일정하게 유지한 후, 막을 통하여 나오는 용액의 유출속도를 측정하였다. 막반응기에서 참치 자숙액의 반응시간에 따른 가수분해도의 검토는 1% (w/v) 자숙액 1ℓ를 막반응기에 넣은 후 TPCCE를 가하여 경시적으로 투과유출액 중의 가용성 질소 함량을 측정하여 가수분해도로써 결정하였다. 최적 효소농도의 검토는 막반응기에 1% 자숙액을 막반응기에 넣고 최적 pH와 온도로 조절한 후, 여기에 효소농도는 각각 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 및 0.4 g/ℓ가 되도록 넣고 3시간동안 가수분해시킨 후 가수분해도를 측정하여 결정하였다. 기질 대 효소비에서는 참치 자숙액 대 효소비가 25, 50, 100, 200, 500 및 1000 (w/w)이 되도록 효소를 가하여 3시간 동안 가수분해시킨 후 가수분해도를 측정하여 검토하였다. 막반응기에서의 가수분해를 위한 최적 기질농도는 자숙액을 1, 2, 5 및 10% (w/v) 되도록 만들어 넣고, 상기와 같은 방법으로 하여 가수분해도를 측정하여 최적 효소농도를 결정하였다.

결과 및 고찰

1. 회분식에서 자숙액의 가수분해조건

회분식 반응에서 참치 자숙액을 가수분해하기 위한 최적 pH 조건을 검토한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 자숙액의 가수분해도는 알칼리 영역의 pH에서 높은 것으로 나타났으며, 특히 pH 9.0에서는 60%로 가장 높았다. 자숙액 중의 단백질이 수용성 단백질임에도 불구하고 일반 단백질의 가수분해도에 비하여 자숙액의 가수분해도가 낮게 나타났는데 이것은 자숙액 중에 남아 있는

소량의 지방이 효소활성을 저해하였기 때문인 것으로 추정된다. 자숙액의 가수분해도가 pH 8~10 범위에서 다른 pH보다 상대적으로 높게 나타난 것은 Kim et al. (1997)이 보고한 참치 유문수 유래 단백질 분해효소는 알칼리 영역의 pH 10.0에서 가장 활성이 높은 trypsin-like enzyme이라는 사실에 기인한 것으로 판단된다. 어류 중에서 정어리 유문수 유래의 단백질 가수분해효소는 casein기질에 대해 pH 10 (Murakami and Noda, 1981), 고등어 유문수 유래 단백질 가수분해효소는 pH 9.4 (Pyeun and Kim, 1986), 고등어 및 정어리 내장 유래 효소의 pH 9.0 및 9.8 등의 연구결과에서 알 수 있듯이 어류의 유문수 조직으로부터 추출한 단백질 분해효소는 대부분 알칼리성 영역에서 높은 활성을 나타내고 있기 때문에, 본 자숙액 가수분해에서의 최적 활성 pH도 유사한 결과를 보였다. 자숙액을 가수분해하기 위한 최적 온도조건을 측정한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 자숙액에 대한 TPCCE의 가수분해도는 40°C에서 65%로 최대 활성을 나타내었으며, 30°C 이하에서 보다 50°C에서 더 높은 가수분해활성을 나타내었다.

정어리 및 고등어 유문수 유래의 단백질 가수분해 조효소의 casein에 대한 최적 온도는 45°C (Murakami and Noda, 1981), 대구 유문수 유래 정제 단백질 가수분해 효소 (Ooshiro, 1971) 및 고등어 유문수 유래 정제 trypsin (Simpson et al., 1990)의 최적 온도는 40°C라고 보고된 바 있어, 참치 유문수 유래의 TPCCE를 이용한 자숙액의 가수분해에서도 이와 유사한 결과를 얻을 수 있었다.

자숙액의 단백질 양에 대하여 효소의 비율을 달리하여 기질 대 효소비에 대한 가수분해도를 측정한 결과, Fig. 4에서 나타낸 것과 같이 자숙액 대 효소비는 감소할수록, 즉 효소의 농도가 증가할수록 높은 가수분해도를 나타냈으며, 그 비가 50~100 (w/w)에서 가수분해도가 60~70%로 가장 높게 나타났고, 200 (w/w) 이상에서는 거의 45% 이하의 가수분해도로 일정하였다. 따라서 효소의 소모량과의 가수분해도와와의 관계를 고려한 효율성 측면에서 자숙액 대 효소비는 100 (w/w)에서 최대의 효과를 얻을 수 있었다.

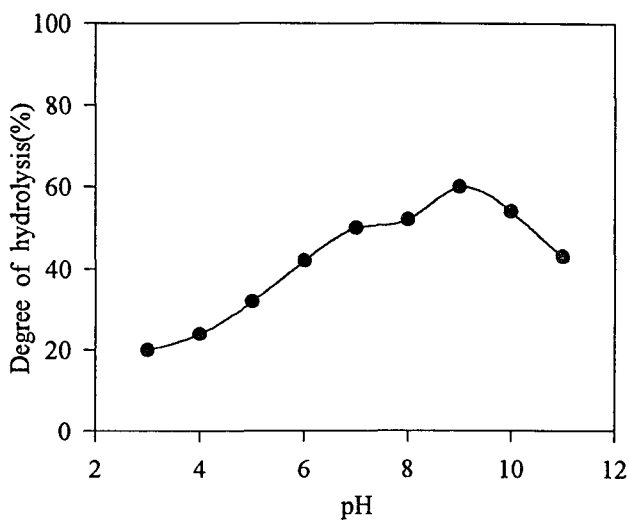


Fig. 2. Effect of pH on the hydrolysis of TBE by TPCCE. Conditions of reaction : Substrate conc. 1% (w/v), Substrate/Enzyme 100 (w/w), 40°C, Incubation time 6 hr.

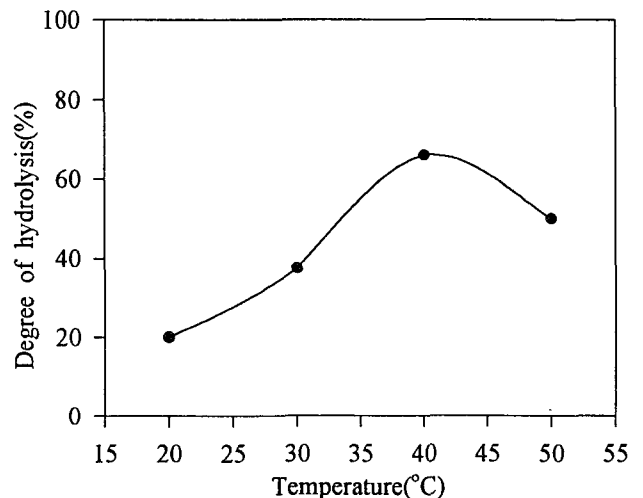


Fig. 3. Effect of temperature on the hydrolysis of TBE by TPCCE. Conditions of reaction : Substrate conc. 1% (w/v), Substrate/Enzyme 100 (w/w) pH 9.0, Incubation time 6 hr.

그리고 자숙액 대 효소비 100 (w/w)에서 기질농도에 따른 가수분해도를 검토한 결과, Fig. 5에서 볼수 있듯이 자숙액의 농도가 증가함에 따라 가수분해도가 감소하는 경향을 나타내었으며, 3% (w/v) 이하의 자숙액의 농도에서도 약 60% 이상의 가수분해도를 유지하였다.

이상의 결과에서 TPCCE를 이용한 자숙액의 최적 가수분해 조건은 pH 9.0, 온도 40°C, 기질 대 효소비 100 (w/w) 및 기질농도 1% (w/v)이었고, 이러한 조건에서 반응시간의 경과에 따른 가수분해도의 변화를 시판 단백질 분해효소인 chymotrypsin, papain, pepsin, trypsin 및 protease과 비교하여 Fig. 6에 나타내었다. TPCCE에 의한 자숙액의 가수분해도는 4시간까지 급격하게 증가하여 5시간 이후에는 거의 일정하였으며, 시판 단백질 가수분해효소에 비해 TPCCE의 가수분해도가 높게 나타났다. Kim et al.

(1997)은 참치내장 유래의 조효소를 이용하여 대구 frame 단백질을 가수분해하였을 때, 상업용 정제효소인 pronase E, chymotrypsin, papain 보다 더 우수한 것으로 보고한 바 있다.

참치유문수에서 추출한 TPCCE는 중성~약알칼리성 영역에서 가장 높은 활성을 가지고 있는 알칼리성 단백질 분해효소임에도 불구하고 약산성 영역의 pH를 가지고 있는 참치 자숙액을 효율적으로 가수분해 할 수 있었다. 이것은 대부분 참치육 및 껍질로부터 유래된 참치 자숙액 단백질이 그 어류의 내장으로부터 추출한 효소에 매우 민감하게 작용하는 것으로 보아 TPCCE는 참치의 자가소화에 관계가 깊은 것으로 생각된다. 그러나 일반적인 단백질의 가수분해도에 비해 전체적으로 낮은 가수분해도를 나타내었는데 이것은 자숙액 중에 완전히 제거되지 않은 지방에 의해 효소반응의 일부가 저해되었을 가능성과 참치 가공과정 중 단백질이 일부 분해되어 저분자화 상태로 자숙액에 함유되어 있을 가능성이 있는 것으로 판단된다.

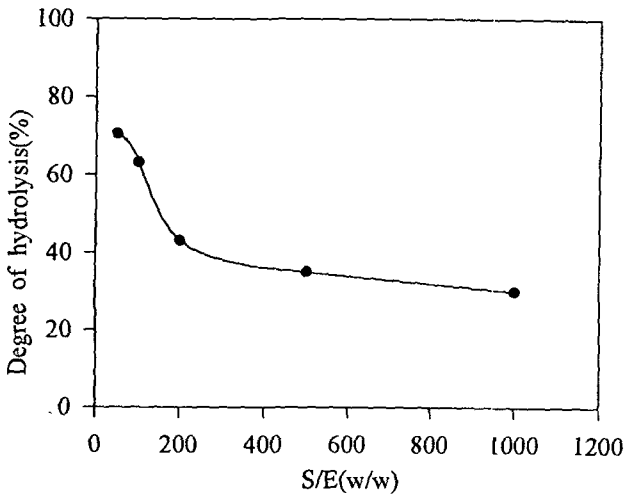


Fig. 4. Effect of substrate/enzyme ratio on the hydrolysis of TBE by TPCCE. Condition of reaction : Substrate concn. 1% (w/v), pH 9.0, 40°C, Incubation time 6 hr.

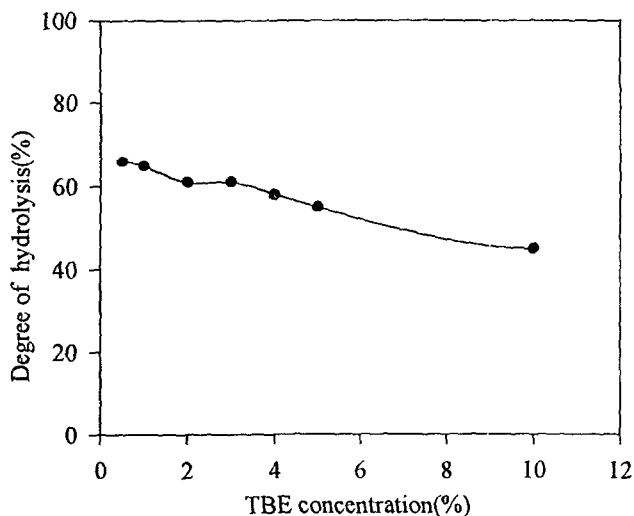


Fig. 5. Effect of substrate concentration on the hydrolysis of TBE by TPCCE. Condition of reaction : pH 9.0, 40°C, Incubation time 6 hr, S/E=100 (w/w).

2. 막반응기에서 자숙액의 가수분해 조건

투과압력에 따른 막반응기에서 가수분해물의 유출속도는 막반응기를 작동시켜 유출량 10 ml씩을 얻는데 걸리는 시간을 측정하여 Fig. 7에 나타내었다. 증류수의 유출속도는 투과압력의 증가에 따라 비례적으로 증가하였지만, 각 기질농도에 따른 유출속도는 투과압력의 증가에 따라 유출속도의 증가폭이 감소하는 경향을 보였으며, 기질농도가 높을 수록 유출속도는 더 감소하는 경향을 나타내었다. 참치 자숙액의 농도가 15% 이상에서 정상상태에 도달되는 투과압력은 30 psi였으며, 4~10%에서는 50 psi로 그 이하의 농도에서는 투과유속이 계속 높아졌다. Taddei et al. (1991)은 투과압력의 증가에 따라 투과유속이 높아지지만 용액의 점도, 막 저항 및 막면의 조밀화에 의해 투과유량이 감소된다고 하였다.

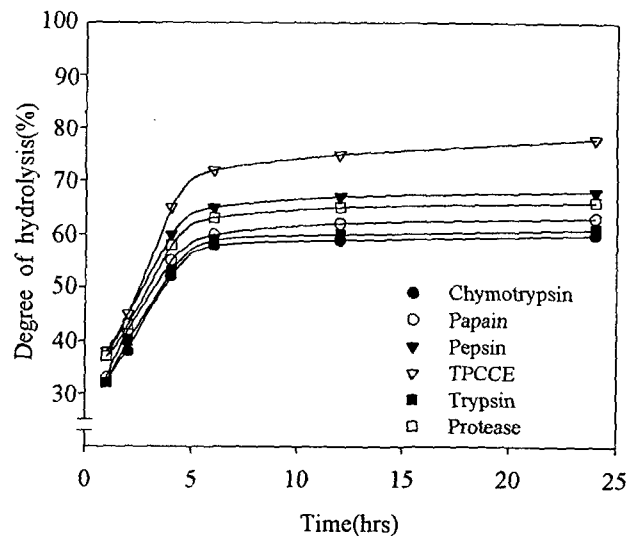


Fig. 6. Comparison of degree of hydrolysis on the TBE by various enzymes. Conditions of reaction : Substrate/Enzyme ratio=100 (w/w), Substrate concentration=1% (w/v). The hydrolysis reactions were carried out under respective optimum conditions of TPCCE and commercial enzymes.

본 연구에서도 압력의 증가에 의해 막표면에 형성된 막표면의 조밀화가 진행되어 막면의 저항이 높아져 전반적으로 투과유량의 감소현상이 나타나는 것으로 판단된다. 따라서 막의 최대 한계압력 50 psi내에서 투과유속이 양호한 30 psi에서 실험을 수행하였다.

막반응기에서 참치 자숙액의 가수분해에 영향을 미치는 반응시간에 대한 검토는 회분식 반응에서 결정된 최적 조건인 pH 9.0 및 40°C에서 반응시켰다. 즉, 막반응기에 1% 자숙액 11를 넣고 경시적으로 TPCCE에 의한 가수분해도를 측정된 결과 (Fig. 8), 참치 자숙액의 가수분해도는 3시간까지 급격하게 증가하여 60%에 도달되었으며, 그 이후에는 정상상태에 도달되어 거의 일정한 가수분해도를 유지하였다.

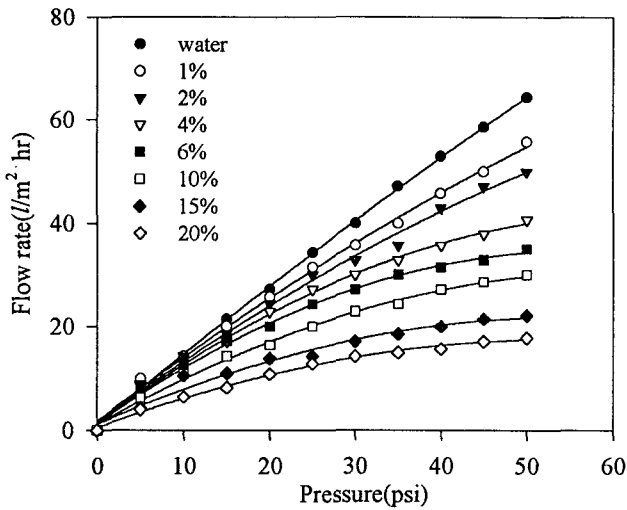


Fig. 7. Effect of transmembrane pressure on flow rate of permeate with TBE concentration by membrane reactor.

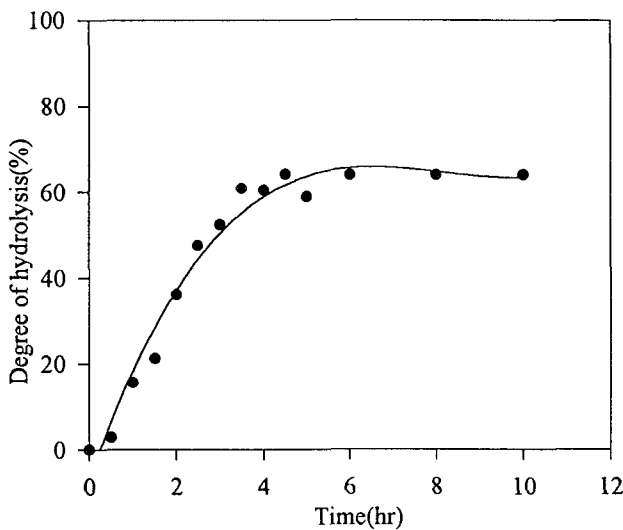


Fig. 8. Effect of reaction time on the hydrolysis of TBE by TPCCE using membrane reactor. Conditions of operation : Membrane 10,000 Da cut-off, Substrate/Enzyme ratio 100/1, 1% (w/v) TBE, Reaction volume 1 ℓ, pH 9.0, 40°C.

고등어 유문수 유래 단백질 가수분해효소와 소 유래의 trypsin으로 casein에 대한 가수분해에서 반응시간 4시간 동안의 가수분해도는 각각 70% 및 15%로, 소의 trypsin은 기질특이성으로 인해 낮은 가수분해도를 나타내었다는 보고가 있다 (Ooshiro, 1971). Bae and Woo (1995)는 가다랭이 혈압육 단백질 농축물을 chymotrypsin으로 가수분해하였을 때 가수분해 6시간까지는 약 72%까지 급격히 증가하다가 그후 10시간까지 증가속도가 둔화되었다고 보고하였다. 또한 Kim et al. (1988)은 정어리 분말 단백질을 pepsin으로 가수분해하였을 때 가수분해 8시간에 56%의 가수분해를 보였으며, 그 이후 서서히 증가하였다고 보고하였다. 본 실험에서도 3시간이후 급격하게 가수분해도가 증가하다가 6시간 후부터 정상상태에 도달되었다.

막반응기에서 자숙액 1% (w/v) 용액에 효소농도에 따른 가수분해도를 경시적으로 측정된 결과는 Fig. 9와 같다. 1% (w/v) 자숙액에 대해 효소농도가 0.1 g/l 이상에서 2시간 반응시켰을 때 가수분해도가 급격히 증가하여 3시간에서 60% 이상이 되었다. 따라서 막반응기에서 자숙액의 가수분해시 효소농도는 0.1 g/l (S/E = 100, w/w)가 적합하다고 판단되었다.

막반응기에서 어육단백질을 효소로 가용화시킬 경우 효소의 양은 0.5 mg/ml가 가장 적합하다고 하였으며 (Bhumiratana et al., 1977), Mannheim and Cheryan (1990)은 casein을 Alcalase로 가수분해시 효소농도가 0.12 mg/ml가 적당하였다고 하였다. 막반응기에서 자숙액 대 효소비 (S/E, w/w)의 변화에 따른 가수분해도는 Fig. 10에서와 같이 자숙액 대 효소비가 높아질 수록 가수분해도는 감소하는 경향을 보였으며, 자숙액 대 효소비 100 (w/w) 이하에서 가수분해도가 거의 비슷하였으나 200 (w/w) 이상에서 급격하게 감소하는 경향을 보였다. 자숙액을 TPCCE로 3시간 가수분해시켰을 경우, 자숙액 대 효소비가 1000 (w/w)에서 50 (w/w)으로 낮아졌을 때 가수분해도는 40%에서 67%로 약 27% 높아졌다.

Deeslie and Cheryan (1981)은 대두단백질을 pronase로 연속적

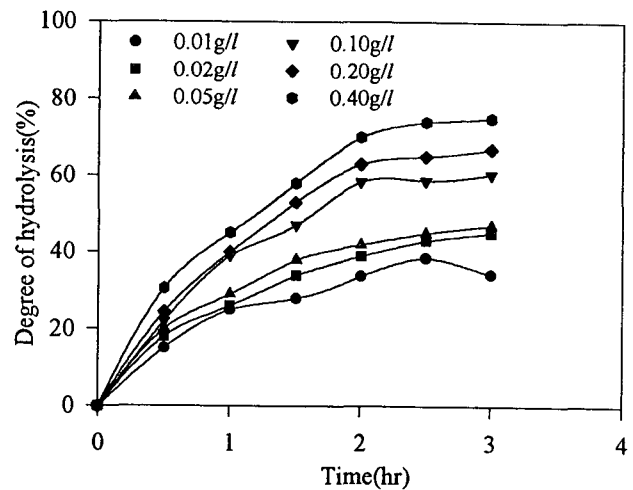


Fig. 9. Effect of enzyme concentration on the hydrolysis of TBE by TPCCE using membrane reactor. Conditions of operation : Membrane 10,000 Da cut-off, 1% (w/w) TBE, Reaction volume 1 ℓ, pH 9.0, 40°C.

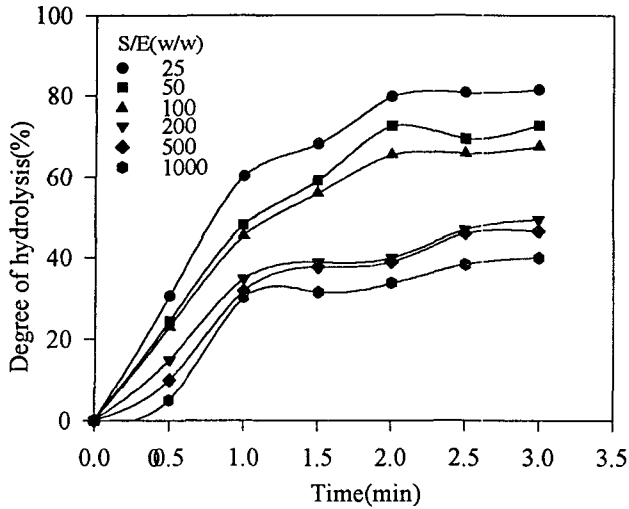


Fig. 10. Effect of substrate/enzyme ratio on the hydrolysis of TBE by TPCCE using membrane reactor. Conditions of operation : Membrane 10,000 Da cut-off, 1% TBE, Reaction volume 1 l, pH 9.0, 40°C.

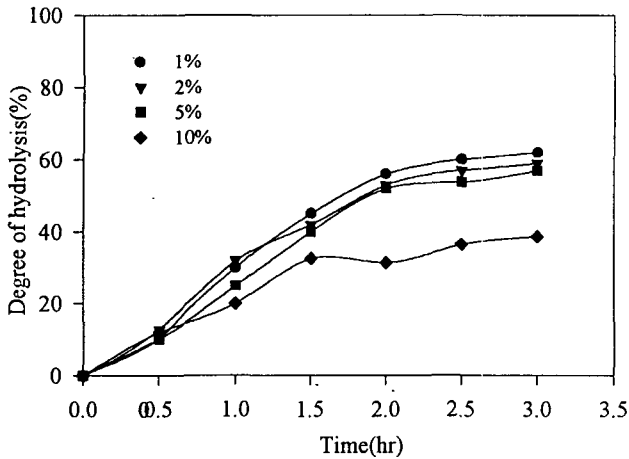


Fig. 11. Effect of substrate concentration on the hydrolysis of TBE by TPCCE using membrane reactor. Condition of operation : Membrane 10,000 Da cut-off, Substrate/Enzyme ratio 100 (w/w), Reaction volume 1 l, pH 9.0, 40°C.

가수분해시 기질대 효소비의 최적조건은 9~16범위였다고 보고하였다.

막반응기에서 자숙액의 농도의 변화에 따른 가수분해도는 Fig. 11에 나타내었다. 자숙액의 농도가 5% 이상에서 2시간 반응시켰을 때 50% 이상의 가수분해도를 나타내었으며, 1시간 이후 가수분해도는 서서히 증가하여 정상상태에 도달되었다. 자숙액의 농도가 1~5%에서는 정상상태에 도달되는 시간 및 가수분해도가 거의 비슷하였지만 10%에서는 가수분해도가 매우 낮았으며, 정상상태에 도달되는 시간도 길었다. 따라서 효율적인 생산성 측면을 고려해 볼 때, TPCCE를 이용한 자숙액 가수분해물의 제조는 막반응기에 5% 자숙액을 넣고 TPCCE로 가수분해하는 것이 가장 효과적일 것으로 판단된다.

요 약

참치 자숙액 중에 함유되어 단백질은 효율적으로 이용하고자 막반응기에서 연속적으로 효소적 가수분해를 수행하기 위한 최적 조건을 검토하였다.

회분식에서 TPCCE를 이용한 자숙액의 최적 가수분해조건은 pH 9.0, 반응온도는 40°C, 기질인 자숙액에 대한 효소비 50 (w/w) 및 기질농도 1% (w/v)였으며, 이 때 6시간의 반응시간에 의해 약 70%의 가수분해도를 나타내었다. 그리고 TPCCE를 이용하는 것이 시판 단백질 분해효소보다 효과적이었다.

막반응기에서 자숙액을 연속적으로 효소적 가수분해를 수행하기 위한 막반응기의 작동조건의 검토에서, 기질용액을 pH 9 및 40°C로 조절한 후 자숙액의 반응시간에 따른 가수분해도는 3시간, 1% (w/v) 자숙액에 대한 효소농도는 0.1 g/l, 자숙액 대 효소비는 100 (w/w), 그리고 기질농도는 5% (w/v)였으며, 이 때 가수분해도는 약 60%를 나타내었다.

감 사

본 연구는 해양수산부에서 시행한 수산특정연구개발사업 (1995) 수행에 의한 연구결과이며, 연구비를 지원해 준 해양수산부에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Bae, Y.J. and K.L. Woo. 1955. A study on the utilization with the protein fortification material of skip-jack dark meat protein by enzymatic hydrolysis. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 24, 323~329.
- Bhumiratana, S., C.G. Hill and C.H. Amundson. 1977. Enzymatic solubilization of fish protein concentrate in membrane reactors. *J. Food Sci.* 42, 1016~1022.
- Byun, H.G., Y.J. Jeon and S.K. Kim. 1998. Characteristics on the permeation of protein through membrane of ultrafiltration reactor. *Membrane J.*, 8, 42~49.
- Cheryan, M and W.D. Deeslie. 1983. Soy protein hydrolysis in membrane reactors. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60, 1112~1115.
- Cheryan, M and W.D. Deeslie. 1984. Protein hydrolysis. U.S. Patent 4 443 540.
- Cheryan, M. 1986. Ultrafiltration handbook. Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster. PA.
- Cheryan, M. and M.A. Mehaia. 1990. Membrane bioreactors: Enzyme processes. In *Biotechnology and Food Process Engineering* (eds. Schwartberg, H. and M. A. Rao), Marcel Dekker, New York, pp. 67.
- Deeslie, W.D. and M. Cheryan. 1981. Continuous enzymatic modification of proteins in an ultrafiltration reactor. *J. Food Sci.*, 46, 1035~1042.
- Hoyle, N.T. and J.H. Merritt. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *J. Food Sci.*, 59, 76~79.
- Kang, T.J., Y.J. Jeon, S.K. Kim and D.J. Song. 1992. Investigation of pretreatment method for gelatin preparation from flounder skin. *Bull. Kor. Fish. Soc.*, 25, 93~102.

- Kennedy, J.F., E.H.M. Melo and K. Jumel. 1990. Immobilized enzymes and cells. *Chem. Eng. Prog.* 86, 81~89.
- Kim, S.K. and H.G. Byun. 1994. Development of optimum process for continuous hydrolysis of fish skin gelatin using a three-step recycle membrane reactor. *J. Kor. Ind. & Eng. Chem.*, 5, 681~697.
- Kim, S.K. H.G. Byun and M. Cherya n. 1991. Continuous hydrolysis of cod skin gelatin in an ultrafiltration reactor. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 6, 309~319.
- Kim, S.K., D.C. Kwak, D.J. Cho and E.H. Lee. 1988. Studies on the improvements of functional properties of sardine protein by plastein reaction : 1. Synthetic conditions of plastein from the enzymatic hydrolysates of sardine protein. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 17, 233~247.
- Kim, S.K., H.G. Byun and Y.J. Jeon. 1998. Desalination of tuna boiled extract by electrodialysis. *Bull. Kor. Fish. Soc.*, submitted.
- Kim, S.K., H.G. Byun, T.J. Kang and D.J. Song. 1993. Enzymatic hydrolysis of yellowfin sole skin gelatin in a continuous hollow fiber membrane reactor. *Bull. Kor. Fish. Soc.*, 26, 120~132.
- Kim, S.K., H.G. Byun, Y.J. Jeon, C.B. Ahn, D.J. Jou and E.H. Lee. 1995. Functional properties of produced fish skin gelatin hydrolysate in a recycle three-step membrane enzyme reactor. *J. Kor. Ind. & Eng. Chem.*, 6, 984~996.
- Kim, S.K., H.G. Byun, Y.J. Jeon, H.P. Yang and D.J. Jou. 1994. Continuous production of fish skin gelatin hydrolysate using a two-stage membrane reactor. *Agric. Chem. and Biotech.*, 37, 130~141.
- Kim, S.K., Y.J. Jeon, H.G. Byun, C.B. Ahn, D.J. Jou and E.H. Lee. 1995. Development of natural seasoning from Alaska Pollack skin gelatin using continuous three-step membrane reactor. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 10, 510~517.
- Kim, S.K., Y.J. Jeon, H.G. Byun, Y.T. Kim and C.K. Lee. 1997. Enzymatic recovery of cod frame proteins with crude proteinase from tuna pyloric caeca. *Fish. Sci.*, 63, 421~427.
- Kinsella, J.E. 1979. Functional properties of soy proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 56, 242~249.
- Lahl, W.J. and D.A. Grindstaff. 1989. Spices and seasonings: Hydrolyzed proteins. In *Proceedings of the 6th SIFST Symposium on Food Ingredients - Application, status and safety*, Singapore Institute of Food Science & Technology, Singapore.
- Lowry, O.H., Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 193, 265~275.
- Malcata, F.X., C.G. Hill and C.H. Amundson. 1992. Hydrolysis of butteroil by immobilized lipase using a hollow-fiber reactor: Part II. Uniresponse kinetic studies. *Biotechnol. Bioeng.* 39, 984~1001.
- Mannheim, A. and M. Cheryan. 1990. Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor. *J. Food Sci.*, 55, 381~385.
- Monsheimer, R. and E. Pfeleiderer. 1981. Method of dissolving collagen-containing tissues. U.S. Patent 4 293 647.
- Murakami, K. and Noda, M. 1981. Studies on proteinases from the digestive organs of sardine. Purification and characterization of three alkaline proteinase from the pyloric caeca. *Biochem. Biophys. Acta.*, 689, 17~26.
- Ooshiro, Z. 1971. Studies on proteinase in the pyloric caeca of fishes-II. Some properties of proteinase purified from the peloric caeca of mackerel. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* 37, 145~148.
- Pyeun, J.H. and Kim, H.R. 1986. The proteinase distributed in the intestinal organs of fish. 1. Purification of three alkaline proteinases from the pyloric caeca of mackerel, *Scomber japonicus*. *Bull. Korea Fish. Soc.*, 19, 537~546.
- Sakai, G.S., N. Yamamoto, S. Yoshida, K. Mikuni, H. Ishigami and K. Hara. 1991. Continuous production of glucosyl-cyclodextrins using immobilized cyclomaltodextrin glucanotransferase. *Agr. Biol. Chem. Tokyo*, 55, 45~52.
- Satterlee, L.D., N.Y. Zachariah and E. Levin. 1973. Utilization of beef and pork skin hydrolyzates as a binder or extender in sausage emulsion. *J. Food Sci.* 38, 268~270.
- Simpson, B.K., M.V. Simpson, and N. F. Haarde 1990. Properties of trypsin from the pyloric ceaca of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *J. Food Sci.*, 55, 959~961.
- Taddei, C., G. Daufin, P. Aimar, and V. Sanchez 1991. Role of some whey components on mass transfer in ultrafiltration. *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 528~535.
- 수산년감. 1996. 한국수산회.

1998년 11월 16일 접수

1999년 2월 8일 수리