

1. 서 론

어육의 지질을 용매 추출법으로 제거하여 얻은 농축어육단백질(Fish protein concentration, FPC)은 영양학적으로 우수한 단백질원이지만 용해도, 유효능 등 기능성이 매우 낮아 실제 식품산업에 널리 이용되지 못하고 있다. 이러한 문제점들을 개선하기 위하여 Tannenbaum 등[1]은 FPC를 알칼리 조건하에서 열처리하여 가용화한 다음 이를 식품에 적용시켰다. 그러나 단백질을 산이나 알칼리로 분해할 때 여러 가지 문제가 야기되는데 산으로 가수분해 할 경우 tryptophan과 cysteine 같은 필수아미노산이 분해 소실되며[2], 알칼리로 분해할 경우는 lysinoalanine[N-DL-(amino-2-carbox-yethyl)-L-lysine]과 같은 독성물질이 생성되어 안전성 문제가 대두되고 있다[3]. 따라서 최근에는 기능성이 좋은 여러 가지 개량 FPC의 제조에 관한 연구가 활발히 진행되었다[4,5]. 이들 중 대표적인 것이 FPC를 단백질 분해효소로 처리한 가수분해물을 식품소재로서 이용하려는 시도이다.

단백질 분해효소로 처리된 가수분해물은 식품소재로서의 물성이 우수하기 때문에 FPC를 단백질 분해효소로 가용화하여 식품으로서의 이용효율을 높여주는 연구가 많이 보고되고 있다[6, 7]. Nouguchi 등[8]은 FPC를 단백질 분해효소로 처리하여 증미증진을 위한 최적조건을 검토하여 L-glutamic acid 이외의 감칠맛 성분으로서 glutamic acid oligopeptide를 분리동정한 바 있다.

FPC의 효소적 가수분해물의 제조방법으로 회분식 공정은 장치가 간단하고 조작이 단순하며 고농도의 기질을 사용할 수 있지만 많은 양의 효소가 필요하며 높은 에너지와 노동력이 요구된다. 그리고 최종생성물의 저해작용으로 인해 수율이 적고 최종생성물의 기능적인 성질을 조절할 수 없는 단점이 있다[9]. 이러한 단점을 해결하기 위해 효소를 물리화학적으로 고정표면에 고정화시켜 단백질을 연속적으로 가수분해시킬 수 있으나 고정화 방법이 까다롭고 고정화시 입체장애로 인한 활성저하가 일어난다[10]. 그러나 본 연구에서 시도한 효소반응기와 막장치를 조합시킨 한외여과막 반응기는 효소를 고정화시키지 않고 반복 사용할 수 있어 결과적으로 생성물을 연속적으로 분리하고 기능적인 성질을 조절할 수 있을 뿐 아니라 효소를 재순환시켜 활용함으로써 경제적으로도 잇점이 있다.

단백질 가수분해물의 분자량은 여러 가지 기능성을 나타내는 중요한 인자이며[12], 특히 단백질을 효소로 가수분해하여 얻은 특정 펩티드가 인체 생리활성을

나타내는 것으로 밝혀지고 있고 이러한 생리활성은 분자량과 관계가 있음을 고려할 때 FPC를 한외여과막 반응기에서 효소적 가수분해를 하여 분자량별로 분획을 한다면 여러 가지 기능성을 조절할 수 있고 이를 이용한 생리활성 펩티드 탐색도 가능할 것으로 보인다.

Bhuniratana 등[11]은 한외여과막 반응기에서 FPC를 가수분해할 경우 막의 막힘현상과 효소의 불활성화 등의 문제로 시간이 경과함에 따라 유출량이 감소하는 결과를 나타내었는데 FPC를 먼저 회분식에서 1차 가수분해한 후 그 가수분해액을 한외여과막 반응기에서 2차 단백질 분해효소에 의해 가수분해를 실시한다면 이러한 막힘현상의 문제점을 개선할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 불용성 FPC의 기능성을 개선시키고 식품소재로서의 활용도를 높이기 위하여 막반응기를 사용하여 효소적 가수분해를 시도하였다. 막반응기는 효소를 재순환하여 사용함으로써 효소의 이용효율을 높일 수 있을 뿐만 아니라 특정 분자량의 가수분해물을 연속적으로 생산 및 분리할 수 있지만 FPC와 같은 불용성 단백질은 막반응기에 바로 적용시킬 경우, 막힘현상이 일어나기 때문에 회분식에서 1차 가수분해시킨 후 막반응기에서 2차 가수분해를 수행하고자 각 단계별 가수분해조건, 막반응기의 작동조건을 검토하였다.

2. 실험

2.1. 시료 및 시약

본 실험에서 사용된 말퀴치(*Novodon modestus*; 체중 99~112 g, 체장 20.3~24.8 cm)는 부산 공동어시장에서 구입하여 fillet한 후 육을 마쇄하였다. 분말 농축어육단백질의 제조는 Lee 등[13]의 방법에 따라 마쇄한 시료육에 대하여 10배량의 ethylalcohol을 삼구플라스크에 담아 수조상에서 80℃로 가열하고, 여기에 마쇄한 시료를 넣어 교반하면서 지방을 제거하였다. 그리고 반응액을 whatman No. 1으로 감압여과하고 잔사를 건조, 분쇄하여 분말 농축어육단백질을 제조하였다. 실험에 사용된 효소는 Alcalase(0.6 AU/G, NOVO Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark), Neutrase (0.5 AU/G, NOVO Industri A/S Copenhagen, Denmark), pronase E(6.6 units/mg solid, Sigma Co., USA), papain(14 units/mg solid, Sigma Co., USA), pepsin(2,260 units/mg solid, Sigma Co., USA), α -chymotrypsin(51 units/mg solid, Sigma Co., USA), trypsin(10,500 units/mg solid, Sigma

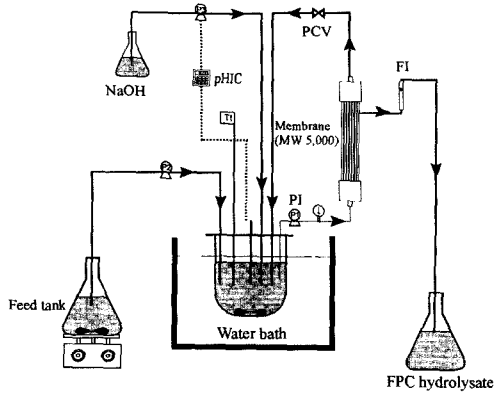


Fig. 1. Schematics of membrane reactor for the production of FPC hydrolysate. TI : temperature indicator, PI : pressure indicator, FI : flow indicator, P1 : recycling pump, P2 : feed pump, P3 : NaOH pump, PCV : pressure control valve, pHIC : pH indicator controller.

Co., USA)이었고, 그외 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

2.2. 한외여과막 장치

한외여과막 반응기 장치 (Ultrafiltration membrane reactor system)는 Fig. 1에 나타냈으며 단백질 용액의 공급장치, 막, 반응기, 순환장치 및 pH 조절장치로 구성되어 있다. 단백질 공급장치에는 용기, 공급펌프 (Peristaltic pump, Cole-Parmer Instrument Co., USA) 및 항온수조 (Jeio Tech)로, 순환장치는 반응기, 유량계, 순환펌프 (Peristaltic pump, Japan), 한외여과막 (MWCO 5,000, A/G Tech. co.), 항온수조 및 압력조절밸브로, pH 조절장치는 pH 자동조절기 (pH/ORP Controller, Cole-Parmer Instrument Co.)와 산, 알칼리 공급펌프로 구성되어 있다.

2.3. 한외여과막의 특성

한외여과막은 A/G Tech사에서 구입한 UFP5C4 (MWCO 5,000)를 사용하였다. 한외여과막의 특성은 중공사 형상의 polysulfone으로 만들어진 것으로서 작동 가능한 최대 압력은 30 psi이고, 안정한 pH 범위는 25°C에서 pH 2~12범위이다.

2.4. 회분식에서 FPC의 1차 가수분해조건

2.4.1. 효소선정

FPC에 대한 각종 단백질 분해효소의 활성을 비교

검토하기 위해 0.5 g의 FPC를 100 ml beaker에 취하여 Alcalase, Neutrase, pronase E, papain, α-chymotrypsin 및 trypsin은 pH 8인 완충용액에 그리고 pepsin은 pH 2인 완충용액 50 ml를 가한 후 교반기로 10분동안 균질화시켜 가수분해하였다. 반응온도는 Alcalase와 Neutrase는 50°C, 나머지 효소들은 37°C로 조정된 진탕항온수조에서 실험하였다. 이때 효소 대 기질비는 1대 250이었으며, 반응시간은 3시간이었다. 가수분해도는 반응용액 2 ml를 취하여 20% TCA(Trichloroacetic acid)용액[14] 2 ml에 혼합하여 1분간 교반한 후 원심분리(1,500×g, 10 min)한 다음 상층액의 일정량을 취하여 질소량을 Lowry 등[15]의 방법으로 측정하였다.

2.4.2. 최적 가수분해 조건

pH : FPC 0.5 g을 pH가 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 및 10인 완충용액 50 ml에 넣고 교반기로 10분동안 균질화시켜 pepsin 2 mg을 증류수 1 ml에 녹여서 가한 후 37°C에서 3시간동안 진탕항온수조에서 반응시켰다. 가수분해도의 측정은 효소선정 실험에서와 같은 방법으로 하였다.

반응온도 : FPC 0.5 g을 pH 2.0인 Glycine-HCl 완충용액 50 ml에 넣고 10분간 교반한 후, pepsin 2 mg을 증류수 1 ml에 녹여서 가하고 진탕항온수조에서 온도를 30°C, 35°C, 45°C, 50°C, 55°C 및 60°C로 조절하여 3시간 반응시킨 다음, 가수분해도를 측정하였다.

기질농도 : 0.2%, 0.5%, 1%, 2% 및 5% FPC 용액은 pH 2.0인 Glycine-HCl 완충용액 50 ml로 제조하였고, Pepsin 2 mg을 증류수 1 ml에 녹여서 가한 후, 45°C에서 3시간 동안 진탕항온수조에서 반응시키고 가수분해도를 측정하였다.

기질 대 효소비 : 0.5 g의 FPC를 100 ml 비이커에 취하고 pH 2.0인 Glycine-HCl 완충용액 50 ml를 가하여 1% FPC 용액을 제조하고 기질 대 효소비가 50 (w/w), 100 (w/w), 150 (w/w), 200 (w/w), 250 (w/w), 300 (w/w), 500 (w/w) 및 1000 (w/w)이 되도록 pepsin을 넣고 45°C에서 3시간동안 진탕항온수조에서 반응시킨 후 가수분해도를 측정하였다.

반응시간 : 0.5 g의 FPC를 100 ml 비이커에 취하고 pH 2.0인 Glycine-HCl 완충용액 50 ml를 가하여 1% FPC 용액을 제조하고 기질 대 효소비가 150 (w/w)이 되도록 pepsin을 가하여 45°C에서 시간별로 24시간동안 반응시킨 후, 가수분해도를 측정하였다.

2.5. 회분식에서의 반응속도 상수 (K_m , V_{max}) 측정

회분식 반응기에서 pepsin으로 FPC를 가수분해할 때 반응속도 상수는 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 즉 회분식 반응기에 각각 Glycine-HCl 완충용액 (pH 2.0)을 이용하여 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 및 5.0% (w/v)인 FPC 용액 100 mL를 제조하고, 반응액을 45°C로 등온상태를 유지하였다. 각각의 FPC 용액에 pepsin 6.7 mg을 증류수 1 mL에 녹여 가한 후 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 및 120분에 반응혼합물 1ml를 취하여 20% (w/v) TCA용액[14] 1 mL가 들어있는 시험관에 넣고 vortex mixer상에서 1분간 교반한 후 원심분리 (1,500×g, 10 min)하였다. 그리고 상층액의 일정량을 취하여 질소량을 Lowry 등 [15]의 방법으로 측정하여 각 기질농도 변화에 따른 초기속도를 구하고 Lineweaver-Burk 방법[16]에 의해 $1/v_0$ 와 $1/[S_0]$ 에 대한 plot을 하여 K_m 및 V_{max} 값을 구하였다.

2.6. 한외여과막 반응기의 작동조건

2.6.1. 순환속도

막반응기에 1% (w/v) FPC용액 600 mL를 넣고 40°C로 조절한 다음, 0.2 N NaOH와 0.2 N HCl 용액으로 pH 8.0로 조절한 후 막을 통과하여 나오는 가수분해물을 메스실린더에 10 mL 모으는데 걸리는 시간을 측정하여 순환속도에 따른 투과유속의 변화를 측정하였다.

2.6.2. 압력

막반응기에 1% (w/v) FPC 용액 600 mL를 넣고 40°C로 조절한 다음, 0.2 N NaOH와 0.2 N HCl용액으로 pH 8.0로 조절한 후, 순환속도를 474 mL/min으로 일정하게 유지하면서 순환속도에서와 동일한 방법으로 압력변화에 따른 투과유속을 측정하였다.

2.6.3. pH

1% FPC 용액 600 mL를 40°C에서 0.2 N NaOH와 0.2 N HCl용액으로 pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10 그리고 11로 조절하였다. 순환속도는 474 mL/min으로 고정하고 투과압력은 한외여과막을 통해 나오는 출구의 압력밸브를 조절하여 15 psi로 일정하게 유지하여 pH에 따른 투과유속의 변화를 상기와 동일한 방법으로 측정하였다.

2.6.4. 반응온도

1% (w/v) FPC 용액 600 mL를 막반응기에 넣고

0.2 N NaOH와 0.2 N HCl용액으로 pH 8.0로 조절한 후 순환속도와 투과압력을 각각 474 mL/min, 15 psi로 조절하고 온도를 30°C, 40°C, 50°C 및 60°C로 변화시키며 온도변화에 따른 투과유속을 측정하였다.

2.7. 한외여과막 반응기에서 FPC의 2차 가수분해

2.7.1. 효소농도

1% (w/v) FPC 용액 600 mL를 막반응기에 넣고 pH 자동조절장치를 이용하여 용액의 pH를 8.0로 일정하게 유지하였다. 막반응기의 순환속도, 투과압력 및 온도는 각각 474 mL/min, 15 psi 및 40°C로 조절하였으며 효소농도 0.01, 0.05, 0.1 및 0.3 mg/mL가 되도록 pronase E를 첨가하여 2시간 동안 10분 간격으로 유출되는 반응용액 1 mL를 취하여 20% TCA용액[14] 1 mL에 혼합하여 1분간 교반한 후 원심분리(1,500×g, 10 min)한 다음 상층액의 일정량을 취하여 질소량을 Lowry 등[15]의 방법으로 측정하였다.

2.7.2. 생산량

한외여과막 반응기 장치의 최적조건하에서 1% FPC의 pepsin 1차 가수분해액 600 mL를 넣은 후, 40°C, pH 8.0로 조절한 다음 0.05 mg/mL의 효소를 첨가하여 순환속도 474 mL/min, 압력 15 psi로 조절하였다. 반응기내의 기질과 효소비가 일정하게 유지되도록 유출속도와 동일하게 기질공급펌프를 조절하여 1% FPC Pepsin 1차 가수분해액 (45°C, pH 8.0)을 공급하였다. 이때 한외여과막을 통해 유출되는 가수분해물의 생성량은 질소량을 측정하여 Deeslie[17]의 방법에 따라 순간 생산량 (P_I) 또는 누적 생산량 (P_C)으로 나타내었다.

$$P_I (\text{mgN/mgE}) = \frac{\bar{P} J \bar{t}}{EV}$$

P_I : 순간생산량(Instantaneous productivity)

\bar{P} : 일정시간 t (min)내의 평균생산량 (mgN/mL)

J : 유출속도 (mL/min)

\bar{t} : 시간간격

V : 반응물의 부피 (mL)

E : 효소농도 (mg/mL)

$$P_C = \sum P_I$$

P_C : 시간 변화에 따른 각 생산량의 합 (mgN/mgE)

Table 1. Optium condition for hydrolysis of FPC by pepsin

	Optium condition
pH	2.0
Temp.	45°C
Conc. of substrate	1%
S/E ratio	150 (W/W)
Reaction Time	5hr

2.8. 분자량 측정

FPC 가수분해물의 분자량은 GPC 컬럼 (YMC Co., Japan)이 장착된 HPLC로 측정하였다. 1% (w/v) FPC의 1, 2차 가수분해물의 건조시료 10 mg을 0.1 M Phosphate 완충용액(pH 7.4) 1 ml에 녹인 후 Diol-60 칼럼 (φ8×500 mm.)에 주입하여 동일한 완충액을 사용하여 1 ml/min의 유속으로 용리하였고 215 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분자량 표준물질은 Sigma사에서 구입한 Albumin (MW 66,000), Carbonic anhydrase (MW 29,000), Cytochrome C (MW 12,400), Angiotensin I (MW 1296.5)과 Phe-Phe-Phe (MW 459.5)을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 회분식에서 최적 가수분해 조건

3.1.1. 효소선정

단백질 분해효소를 선정하기 위하여 1% FPC 용액에 Alcalase, Neutrase, pronase E, papain, pepsin, α-chymotrypsin 그리고 trypsin 2 mg을 각각 1 mL의 증류수에 녹여 가한 후, 가수분해를 측정할 결과, pepsin의 경우 가수분해도가 86.06%로 가장 높았고, 다음으로는 papain 70.98% 및 trypsin 69.85% 순이었다. Cheftel 등[18]은 pepsin과 pronase가 다른 단백질 분해효소에 비해 FPC에 대한 가수분해 작용이 높게 나타난다고 보고하여 본 연구에서와 같은 결과를 보였다. 따라서 FPC를 가수분해하기 위한 단백질 분해 효소는 pepsin으로 선정하였다.

3.1.2. 최적 가수분해 조건

Pepsin에 의한 FPC의 가수분해는 pH, 반응온도, 기질농도, 기질대 효소비 및 반응시간을 변화하여 측정하였다. FPC의 가수분해 최적조건은 Table 1에서와 같이 pH 2, 반응온도 45 °C, 기질농도 1% 및 기질 대 효소비는 150 (w/w)이었고 가수분해는 반응시작 5시간까지 급격히 증가하다가 이후로는 일정하였

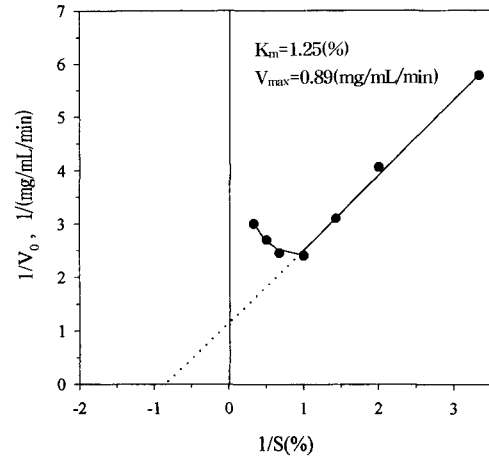


Fig. 2. Lineweaver-Burk plot for Pepsin-FPC batch hydrolysis. [Temp. 45°C, pH 2, enzyme conc. 6.7 mg/ml].

다. 이 등[19]은 FPC를 trypsin으로 기질에 대한 효소비 100 (w/w)로 8시간 가수분해시켰을 경우 약 61%의 가수분해도를 보였다고 보고하였으며 Bae와 Woo [20]는 가다랭이 혈합육 단백질 농축물을 chymotrypsin으로 6시간 반응시켰을 때 약 72%의 가수분해도를 나타낸다고 보고하였다. 또한 Kim 등 [21]은 정어리 분말 단백질을 pepsin으로 가수분해하였을 때 가수분해 8시간에 56%의 가수분해도를 보였으며 그 이후 서서히 증가하였다고 보고하였다. 본 연구에서는 FPC를 최적 가수분해 조건하에서 5시간 동안 가수분해하였을 경우 89.42%의 높은 가수분해도를 나타내었다.

3.2. 회분식에서의 반응속도 상수 (Km, Vmax) 측정

회분식 반응기에서의 기질농도 변화에 따른 효소활성을 측정하여 Lineweaver-Burk 방법[16]에 따라 plot한 결과는 Fig. 2와 같다. 기질 농도 1.5% (w/v) 이상에서는 기질저해가 나타났으며, 그 보다 낮은 기질농도에서 계산된 pepsin의 FPC에 대한 Km 및 Vmax 값은 각각 1.25%, 0.89 mgN/ml/min이었다. Mannheim[10]은 Km값이 가수분해 반응에서 최적 기질농도의 추정에 이용될 수 있으며, Km값보다 낮은 기질농도에서는 반응속도가 Vmax값보다 매우 낮기 때문에 측매능을 잃게 되고, Km값보다 높은 기질농도에서는 반응혼합물 중의 고형물의 증가를 초래한다고 보고하였다. Bliss와 Hultin[22]은 pronase로 casein의 가수분해시 Km값이 1.67%였다고 보고하였다. 또한 김 등[23]은 pronase에 의한 대구피 가수분해시

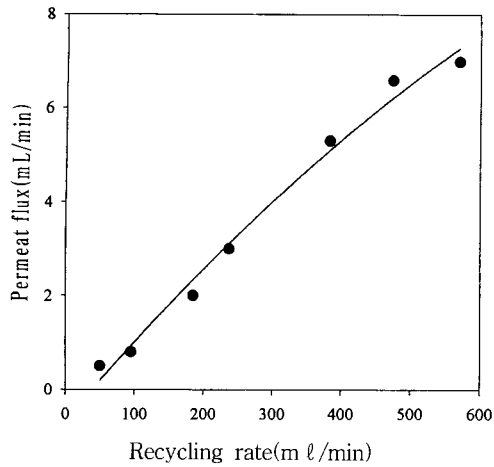


Fig. 3. Effect of recycling rate on permeate flux with FPC hydrolysate by pepsin. [V=600 mL, pH 8.0, temp. 40°C].

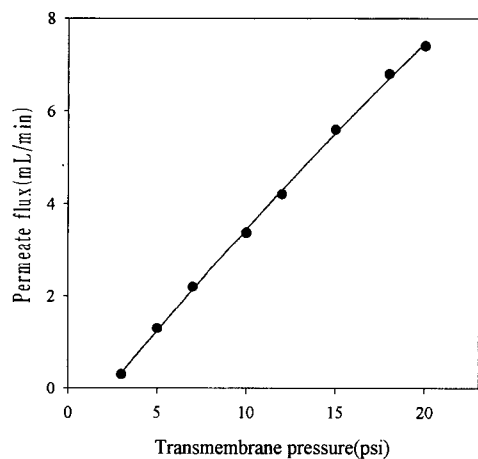


Fig. 4. Effect of transmembrane pressure on permeate flux with FPC hydrolysate by pepsin. [V=600 mL, pH 8.0, temp. 40°C, recycling rate 474 mL/min].

K_m 및 V_{max} 값은 각각 1.82%, 0.006 mgN/m l/min였고, Deeslie[17]은 pronase E로 대두단백질을 가수분해시 K_m , V_{max} 값은 각각 1.15%, 0.303 mgN/m l/min였다고 보고한 바 있다.

3.3. 한외여과막 반응기 작동조건

순환속도 : 막반응기에 1%(w/v) FPC 용액 600 mL를 넣고 40°C로 조절한 다음, 2 N NaOH와 2 N HCl 용액으로 pH 8.0로 조절한 후 순환속도에 따른 투과유속의 변화를 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 순환속

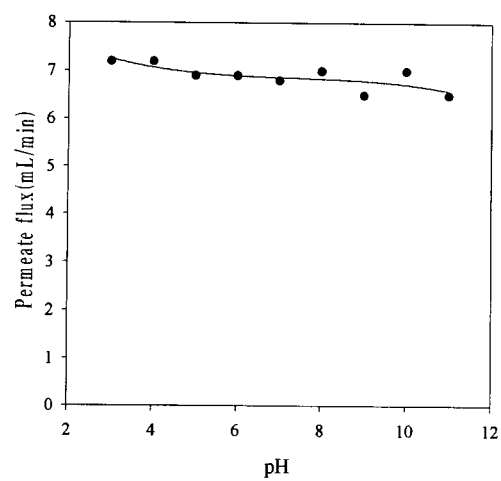


Fig. 5. Effect of pH on permeate flux with FPC hydrolysate by Pepsin. [V=600m l, temp. 40°C, recycling rate 474 m l/min, trans-membrane pressure 15 psi].

도가 증가함에 따라 투과유속이 증가하였으며 이는 순환속도가 증가함으로써 한외여과막 내부압력이 상승하기 때문이다.

투과 압력 : 막반응기에 1% (w/v) FPC 용액 600 mL를 넣고 40°C로 조절한 다음, 2 N NaOH와 2 N HCl 용액으로 pH 8.0로 조절한 후 순환속도를 474 mL/min으로 일정하게 유지하여 투과 압력에 따른 투과유속을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. 1% (w/v) FPC 용액의 압력에 따른 투과유속은 압력에 따라 비례하였다.

pH : pH에 따른 투과유속의 변화를 측정하기 위하여 막반응기에 1% (w/v) FPC 용액 600 mL를 넣고 40°C로 조절한 다음, 2 N NaOH와 2 N HCl 용액으로 pH 8.0로 조절한 후 순환속도를 474 mL/min으로 일정하게 유지시켰다. 투과압력은 압력조절 밸브를 이용하여 15 psi로 조절하였고 그때의 투과유속을 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. Kuo 등[24]은 whey 단백질 용액의 pH의 변화에 따른 투과유속을 측정된 결과, pH 7.0에서 감소하였으며, pH 2.0~3.0의 산성 영역에서 감소폭이 적었는데 그 원인은 pH변화에 따른 단백질 용해성의 차이에 기인한다고 보고하였고, Fane 등[25]은 pH변화에 따라 0.1% BSA (Bovine serum albumin) 용액을 PM30 막으로 여과한 후, 막에 흡착되는 단백질의 양을 측정된 결과, pH 5.0에서 흡착량이 가장 높았다고 보고하였다. 본 연구에서는 FPC 용액의 pH 변화에 따른 투과유속의 변화는 거의 없었는데, 이는 불용성 FPC가 한외여과막 반응기에 적용되기 전에 회분식에서 pepsin에 의한 가수분해가

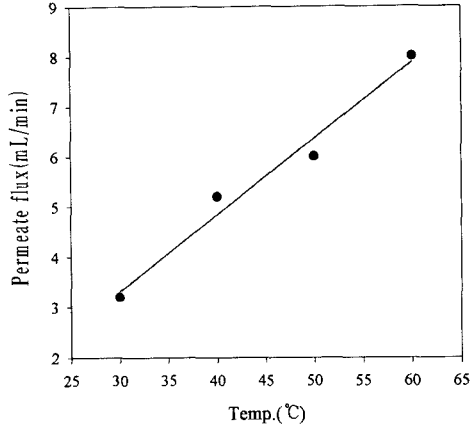


Fig. 6. Effect of incubating temperature on permeate flux with FPC hydrolysate by Pepsin. [V=600 mℓ, pH 8.0, recycling rate 474 mℓ/min].

이루어져 용해도가 증가되었기 때문인 것으로 생각되며 한외여과막에서 2차 분해효소를 첨가한다면 FPC를 저분자로 분해할 수 있을 뿐 아니라 용해도를 증가시켜 막의 막힘현상의 문제도 해결될 수 있을 것으로 판단된다.

반응온도 : 1% (w/v) FPC 용액 600 mℓ를 막반응기에 넣고 막의 투과압력을 15 psi로 조절하여 온도변화에 따른 투과유속을 특정한 결과는 Fig. 6과 같다. Cheryan[26]은 온도변화에 따라 단백질을 여과하였을 때 높은 온도에서 물질의 투과유속은 분산성 증가와 낮은 점도 때문에 높게 나타났다고 보고하였으며, Tarnawski와 Jelen[27]은 cottage cheese whey를 GR60P 막을 사용하여 일정한 압력하에서 온도 증가에 따른 투과 유속은 증가하였는데 이것은 온도상승에 의한 막의 열적인 팽창에 기인한다고 보고하였다. 본 연구에서도 마찬가지로 온도상승에 따른 투과유속의 증가가 관찰되었다.

3.4. 막반응기에서 FPC 가수분해물의 생산

3.4.1. 효소농도

회분식에서 pepsin에 의해 1차 가수분해된 용액을 막반응기에서 2차 가수분해 효소인 pronase E의 농도를 변화시켜 가수분해하였다. 이때 막을 통과하는 단백질량을 시간별로 측정된 결과는 Fig. 7과 같다. Deeslie과 Cheryan[9]은 연속식 막반응기를 사용하여 pronase E로 대두단백질을 가수분해하였을 때 효소농도가 높을수록 투과유속은 증가한다고 하였는데, 이것은 막을 통과할 수 있는 분자량이 작은 대두단백질 가수

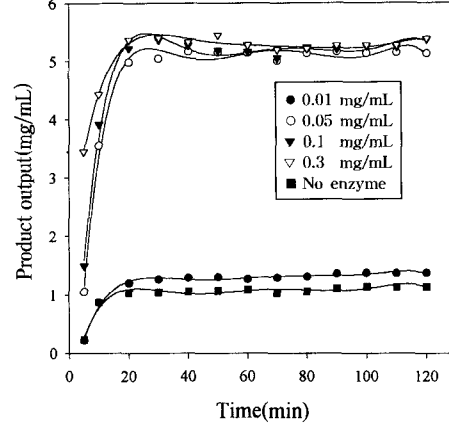


Fig. 7. Effect of enzyme concentration on FPC 2nd-hydrolysis by Pronase E. [V=600 mℓ, temp. 40°C, pH 8.0, reaction time 120 min., recycling rate 474 mℓ/min, transmembrane pressure 15 psi].

분해물이 증가하여 반응혼합물의 투과유속은 증가한다고 하였다. 또한 Byers[28]도 막반응기에서 녹염단백질을 pepsin으로 가수분해시 효소농도의 증가는 단백질의 용해성을 높이기 때문에 투과유속이 증가한다고 하였다. 본 연구에서 효소를 첨가하지 않았을 때 막을 통과하는 단백질량은 반응시간이 20분이 지나자 약 1 mg/mℓ로 거의 일정하였다. 0.01 mg/mℓ의 효소를 첨가하였을 때의 단백질량은 약 1.3 mg/mℓ 정도로 효소를 첨가하지 않았을 때와 거의 유사하였다. 하지만 기질용액의 가수분해는 효소농도가 0.05 mg/mℓ에서 급격히 증가하였으며 유출되는 단백질량은 약 5 mg/mL로 효소를 첨가하지 않았을 때보다 5배정도 높았으며, 그 이상으로 효소농도가 증가하여도 차이점이 관찰되지 않았다. 따라서 2차 가수분해효소의 농도는 0.05 mg/mℓ (S/E=200,w/w)가 적합하다고 판단되었다.

3.4.2. 생산량

최적 가수분해 조건하에서 회분식과 막반응기에서 부피대체율에 대한 생산량은 Fig. 8에 나타내었다. 회분식에서의 생산량은 부피대체율에 대하여 일정하며, 효소로 반응시켜 정상상태에 도달하였을 때 생산량은 효소 mg당 가수분해물이 51 mg이었다. 반면 막반응기에서는 시간이 지남에 따라 단위부피당 유출량이 증가하므로 생산량이 증가하였으며, 효소 mg당 가수분해물은 702 mg로서 회분식의 생산량에 비해 13배 이상 높았다. 이것은 막반응기에서는 효소를 재순환시

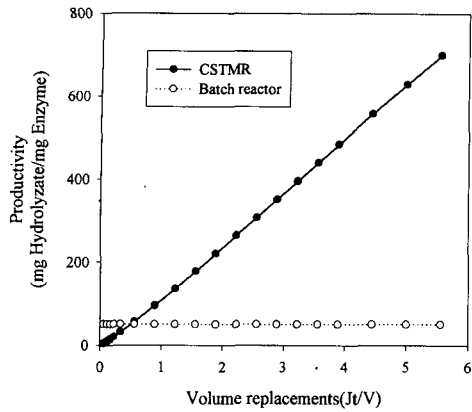


Fig. 8. Comparison of the productivity of UF reactor system with batch reactor. [V=600 m l, E/S=1/200, pH 8.0, temp. 40°C, recycling rate 474 m l/min, transmembrane pressure 15 psi].

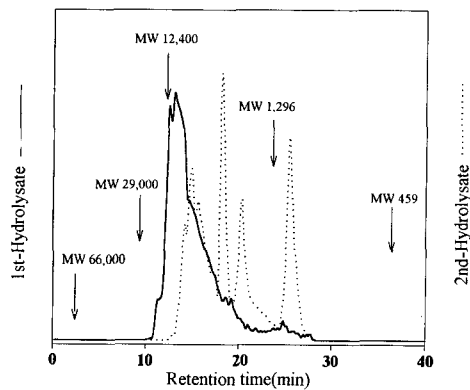


Fig. 9. Molecular weight distribution of FPC 1st and 2nd hydrolysate. [Albumin (MW 66,000), Carbonic anhydrase (MW 29,000), Cytochrome C (MW 12,400), Angiotensin I (MW 1296.5), Phe-Phe-Phe (MW 459.5)].

켜 사용함으로써 효소 mg당 생산량이 회분식에 비해 높기 때문이다. 김 등[29]은 pronase E로 어피젤라틴을 가수분해하였을 경우, 생산량은 회분식에서는 효소 mg당 87 mg이었으며, 막반응기에서의 생산량은 362 mg으로 회분식의 생산량에 비해 4배 이상 높았다고 보고하였다.

3.5. 분자량 측정

1% (w/v) FPC의 pepsin 1차 가수분해물과 2차 가수분해물의 분자량 분포는 Fig. 9에 나타내었다. 1차

가수분해물의 분자량은 2,500 Da~20,000 Da 범위에 분포하고 있었으며, 주요 분자량은 12,000 Da 이었다. 1% (w/v) FPC의 막반응기에서 pronase E에 의한 2차 가수분해물의 분자량은 700 Da~10,000 Da의 고른 분자량 분포를 나타내고 있으며, 주로 9,500 Da, 4,500 Da, 2,800 Da 그리고 700 Da 이었다. Bhuniratana 등[11]은 회분식에서 FPC를 가수분해하였을 때의 평균분자량이 23,800 Da이었다고 보고하였는데 이것은 본 연구에서 측정된 FPC의 1차 가수분해물의 분자량 분포와 비슷한 양상을 나타내었다. 2차 가수분해물의 분자량 분포에서 MWCO 5,000인 막을 사용하였으나 5,000 Da 이상의 가수분해물도 관찰되었다. Jeon 등[30]은 대구뼈 단백질의 효소적 가수분해물을 한외여과막(MWCO 30,000, 10,000, 5,000 및 3,000)을 사용하여 분자량별로 분획하였는데 MWCO 5,000막에서 분획한 가수분해물의 분자량이 13,000 Da, 6,000 Da, 3,000 Da, 1,000 Da 및 500 Da으로 정확한 분리가 이루어지지 않았다고 보고하였다. 이것은 반응온도와 압력 그리고 순환속도에 의한 한외여과막의 막공정 크기의 불균일성과 분자의 형상 또는 성상에 의해 기인된 것으로 추측되며, 이러한 한외여과막의 특성상 정확한 분리가 이루어지지 않았지만 1차 가수분해에 비해 2차 가수분해시 FPC의 저분자화가 확인되었다. 이것은 기질에 대한 효소의 특이적인 반응에 의한 것으로 각 효소마다 절단 부위가 다르기 때문이며, 이러한 효소의 성질과 한외여과막을 이용하면 특정 분자량의 대량 생산도 가능할 것으로 보인다.

4. 결론

불용성 FPC가 회분식에서 pepsin으로 1차 가수분해된 후 다시 한외여과막 반응기 (MWCO 5,000)에서 pronase E에 의해 2차 가수분해되는 최적 조건을 검토하였다. 회분식에서의 최적 가수분해 조건은 45°C, pH 2, 기질 대 효소비 150 (w/w)이었으며 이때 가수분해도는 약 89%였다. 회분식에서의 반응속도는 Lineweaver-Burk plot으로 구하였으며 K_m 과 V_{max} 는 각각 1.25%, 0.89 mg/m l/min이었다. 한외여과막 반응기에서 1차 가수분해액의 유출속도는 순환속도, 투과압력 및 반응온도가 높아짐에 따라 비례적으로 증가하였고 pH에 따른 변화는 관찰되지 않았다. 이것은 순환속도와 투과압력이 증가할수록 막 내부 압력이 상승하였기 때문이며 반응온도가 높아질수록 유출속도가 증가한 것은 농축어육단백질 용액의 분산성이

증가하고 점도가 낮아져 용해도가 증가하였기 때문이다. 효소농도를 0.01 mg/mℓ, 0.05 mg/mL, 0.1 mg/mℓ 그리고 0.3 mg/mℓ로 변화 시켰을 때 가수분해물의 생산량은 0.05 mg/mℓ까지 급격히 증가하였으나 그 이상에서는 큰 차이가 없었다. 1차 가수분해물의 분자량은 2,500 Da~20,000 Da 범위에 분포하고 있었으며, 주요 분자량은 12,000 Da 이었다. 막반응기에서 2차 가수분해물의 분자량은 700 Da~10,000 Da의 고분자량 분포를 나타내었으며, 주로 9,500 Da, 4,500 Da, 2,800 Da 그리고 700 Da 이었다. 따라서 2차 가수분해물은 1차 가수분해물에 비해 다중효소분해에 의한 저분자화가 형성되는 것을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. S. R. Tannenbaum, R. P. Bates and L. Brodfeld, *Food Technol.*, **24**, 607 (1970).
2. J. E. Kinsella and K. J. Shetty, *Food Sci. Nutr.*, **7**, 219 (1979).
3. Q. Y. Deng, R. R. Barefoot, L. L. Divsady, L. J. Rubin and Y. M. Tzeng, *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **23**, 140 (1990).
4. E. H. Lee, H. S. Groninger and J. Spinelli, *Marine Fisheries Review*, **43**(3), 14 (1981).
5. U. S. Groninger and R. Miller, *J. Agric. Food Chem.*, **27**(5), 949 (1979).
6. P. Hevia, J. R. Whitaker and H. S. Olcott, *J. Agric. Food Chem.*, **24**(2), 383 (1976).
7. S. R. Tannenbaum, M. Athern and R. P. Bates, *Food Technol.*, **23**, 604 (1970).
8. M. B. Noguchi, S. Yamashita, S. Arai and M. Fujimaki, *J. Food Sci.*, **40**(2), 367 (1975).
9. W. D. Deeslie and M. Cheryan, *J. Food Sci.*, **46**, 1035 (1980).
10. A. Mannheim, *Master's Thesis, Dept. of Food Sci.*, Univ. of Illinois, Urbana-Champaign (1988).
11. S. Bhumiratana, C. G. Hill jr and C. H. Amundson, *J. of Food Sci.*, **42**(4), 1016 (1977).
12. W. D. Desslie and M. Cheryan, *J. Food Sci.*, **57**(2), 411 (1991).
13. E. H. Lee, Y. H. Park, H. Pyeon, S. K. Kim, S. T. Yang and Y. O. Song, *Bull. Korean Fish Soc.*, **11**(1), 25 (1978).
14. D. M. Bollag, S. J. Edelman, Protein method, *Wiley-Liss Pub.*, (1991).
15. O. H. Lowry, N. J. Rosebrogh, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
16. T. Palmer, Understanding enzymes, *Ellis Horwood Limited*, (1995).
17. W. D. Deeslie, *Ph. D. Thesis, Dept. Food Sci.*, Univ. of Illinois, Urbana-Champaign (1980).
18. C. Cheftel, T. M. Ahren, D. I. C. Wang and S. R. Tannenbaum, *J. Agri. Food Chem.*, **19**, 155 (1971).
19. 이종호, 이근태, 박성민, 박찬규, 한국수산학회지, **31**(1), 132 (1998)
20. Y. J. Bae and K. L. Woo, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**(2), 323 (1995).
21. S. K. Kim, D. C. Kwak, D. J. Cho and E. H. Lee, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **17**(3), 233 (1988).
22. F. M. Bliss and H. O. Hultin, *J. Food Sci.*, **42**, 425 (1977).
23. 김세권, 양현필, 이응호, 한국생물공학회지, **6**, 327 (1991).
24. K. Kuo and M. Cheryan, *J. Food Sci.*, **119**, 269 (1983).
25. A. G. Fane, D. J. D. Fell and A. Suki, *Symposium on Membrane and Membrane Process Perigia, Italy*, p. 19 (1982).
26. M. Cheryan, *J. Food Eng.*, **1**, 269 (1977).
27. V. R. Tarnawski and P. Jelen, *J. Food Eng.*, **5**, 75 (1986).
28. M. Byers, *J. Sci. Food Agric.*, **18**, 33 (1967).
29. 김세권, 변희국, 전유진, 양현필, 조덕제, 한국농화학회지, **37**(2), 130 (1994).
30. Y. J. Jeon, H. G. Byun and S. K. Kim, *Process Biochemistry*, **35**, 471 (2000).