

어류가공 부산물로부터 단백질분해 효소제의 조제 및 보관안정성

김진수 · 허민수*

경상대학교 해양생물이용학부 · 해양산업연구소

Preparation and Keeping Quality of Proteolytic Enzymes from Seafood Processing Wastes

Jin Soo KIM and Min Soo HEU*

Division of Marine Bioscience · Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea

Keeping qualities of crude proteases (CP) and fractionated proteases (FP) sedimenting with 30-80% ammonium sulfate from four kinds of fish viscera as a seafood processing waste were examined. Azocaseinolytic activities (pH 6 and 8) of CP from anchovy (*Engraulis japonica*), mackerel (*Scomber japonicus*), bastard flatfish (*Pararlichthys olivaceus*) and red sea bream (*Chysorphrys major*) were stable without activity loss at 4°C for 7 months. Activities of NaCP (CP containing 30% sodium chloride) on azocasein were approximately 30% lower than those of CP. FP activities increased 3.4-16.1 folds compared to those of CP and NaCP. Powdered crude protease (PCP) and fractionated and powdered protease (FPP) containing various sugars (lactose, sucrose, glucose and dextrin) were prepared by freeze drying. Activities of PCP and FPP containing sucrose were higher and more stable than those of PCP and FPP containing other sugars at 30°C for whole keeping periods. PCP and FPP from mackerel viscera showed the highest proteolytic activity among four kind of fish viscera. The Optimum conditions and stabilities of FPP from mackerel viscera were pH 9 and 50°C, and pH 5-10 and 20-45°C, respectively. The results of this study suggest that FPP from seafood processing waste may be used as processing aids.

Key words: Seafood processing wastes, By-products, Fish viscera, Proteolytic enzyme

서 론

효소는 식품을 비롯하여 섬유, 피혁, 사진, 제지, 화장품, 폐기물처리, 제약, 의료, 환경 등 모든 산업 분야에서 이용되고 있으며, 현재에도 가장 널리 이용되고 있는 것은 당질분해효소 및 단백질분해효소이다 (Haard et al., 1982, 1983; Hamed and Haard, 1985; Haard, 1994).

단백질분해효소는 작용하는 용액의 pH에 따라 산성 (Gildberg, 1988; Squires et al., 1986), 중성 (Barrett and Kirschke, 1981; Ueno et al., 1988) 및 알칼리성 단백질분해효소 (Yoshinaka et al., 1981; Pyeon and Kim, 1986)로 나뉘어지며, 산업적으로 유용하게 이용하기 위해서는 가급적 중성 부근에서 넓은 pH영역과 온도범위에 걸쳐 활성이 발현되는 성질이 요구된다. 이러한 일면에서 수산동물의 가공부산물인 내장은 효소의 주요자원으로 판단된다 (Haard, 1992). 한편, 수산가공 부산물의 식품 재자원으로 유효이용에 관한 연구로는 수산가공 부산물의 식품성분 (Heu et al., 2003a), 수산가공 부산물로부터의 액젓제조와 육류의 분해능 (Kim et al., 2003a), 효소의 추출, 분획 및 특성 (Heu et al., 1995; Heu et al., 1997; Heu et al., 2003b), 수산발효 액젓의 조제 (Kim et al., 1999), 어류 내장으로부터 분리한 단백질분해효소를 이용한 수산가공부산물로부터

유용성분의 회수 (Kim et al., 2003b) 등이 있다. 이러한 연구를 토대로 대부분 폐기되고 있는 수산가공부산물 중에서 어류의 내장으로부터 유용한 효소자원을 추출, 분획을 통하여 효소제를 개발할 수 있으리라 생각된다.

Heu and Ahn (1999)은 10종의 어류 내장으로부터 추출한 조효소 및 분획 방법별 분획효소의 단백질분해효소의 분포에 대한 연구결과, 조효소 상태에서 비교적 넓은 pH 범위에서 활성이 높은 멸치 (*Engraulis japonica*), 고등어 (*Scomber japonicus*), 참돔 (*Chysorphrys major*) 및 넙치 (*Pararlichthys olivaceus*)를 시료로 선정하여 acetone 및 ammonium sulfate를 사용하여 분획한 효소의 수율 및 정제도 그리고 상용 효소와의 활성비교에서 효소제로서의 조제 가능성이 입증되었다. 따라서, 본 연구에서는 4종의 어류 내장으로부터 추출한 조효소와 30% 식염을 함유한 조효소의 4°C에서의 보관안정성 및 식염첨가에 따른 활성변화 정도를 검토하여 효소제 조제를 위한 기초자료로 활용하고자 하였다. 또한 조효소 및 30-80% 포화농도의 ammonium sulfate 분획 효소에 대하여 당류를 각각 혼합한 분말효소제를 조제하여, 상온 (30±3°C)에 보관하면서 효소활성 변화를 검토하여 보관 안정성을 확립하고자 하였으며, 아울러 분말효소제의 pH 및 온도의 최적반응 조건과 안정성에 대하여도 검토하였다.

*Corresponding author: heu1837@intizen.com

재료 및 방법

재료

적색육 어류인 멸치 (*E. japonica*)와 고등어 (*S. japonicus*) 그리고 백색육 어류인 넙치 (*P. olivaceus*)와 참돔 (*C. major*)의 내장으로부터 추출한 조효소 (CP)와 전보 (Heu and Ahn, 1999)에서 나타난 결과를 토대로 수율을 최대화 할 수 있는 30-80% 포화농도의 범위에서 ammonium sulfate 염석을 통해 분획된 효소 (FP)를 시료로 하였다.

단백질 농도

Lowry et al. (1951)의 비색 법에 따라 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 구한 검량 곡선으로부터 단백질 농도를 측정하였다.

효소 활성

1% azocasein (pH 6과 8)에 대한 활성은 Starky (1977)의 방법에 따라, 일정량의 효소 (10-100 μ L)와 2 mL의 1% azocasein을 함유하는 완충액 (pH 6과 8)을 반응 혼합액으로 하여 40°C에서 30분간 반응시킨 후, 2 mL의 5% TCA (trichloroacetic acid)용액을 가하여 반응정지를 시킨 다음, 원심분리 (3,000 \times g, 15 min)하여 흡광도 (410 nm)를 측정하였다. 효소활성 단위 (U/mg)는 1 mg의 효소가 1분간 변화시키는 흡광도 0.1을 1 U/mg으로 하였다.

조효소 추출 및 분획효소의 조제

조효소의 추출은 100 g의 어류 내장에 대하여 3배량의 탈이온수를 가하여 40°C에서 3시간 진탕 가온한 후, 원심분리 (12,000 \times g, 15 min)하여 얻은 상층액에 시료량의 0.2배량에 해당하는 사염화탄소를 가하여 탈지한 것을 조효소 용액으로 사용하였다. 분획효소의 조제는 이 조효소 용액에 30%의 포화농도에 해당하는 ammonium sulfate를 가하여 용해시킨 후, 원심분리(12,000 \times g, 15 min)한 상층액에 다시 80%의 포화농도에 해당하는 ammonium sulfate를 가하여 용해한 후, 원심분리하고, 여기서 얻어진 잔사를 탈이온수로 용해하여 투석을 통해 얻어진 용액을 30-80% 분획효소로 사용하였다. 식염첨가 효소제 (NaCP)는 조효소에 대하여 식염을 30% (w/v) 첨가하여 조제하였다.

효소제의 조제

분말효소제의 조제는 시판 상업용효소를 2% (w/v) 효소용액으로 조제한 후, Lowry et al. (1951)의 방법으로 단백질 농도를 측정하여 2% 시판 효소용액 중의 단백질 함량과 비단백질성분의 비를 구하였다. 이어서 단백질 (조효소 및 분획효소)과 당류 (glucose, lactose, sucrose 및 dextrin)비를 시판효소의 비율과 동일하게 혼합·용해한 후, 진공동결 건조하여 조제하였으며, 보관 기간 중의 효소활성은 분말효소제를 2% (w/v) 용액으로 조제하여 사용하였다.

효소제의 보관 안정성

조효소, 30% 식염첨가 조효소, ammonium sulfate 분획효소

는 4°C에서, 조효소와 ammonium sulfate 분획효소에 lactose, sucrose, glucose 및 dextrin을 각각 혼합·용해시켜, 진공 동결 건조한 분말 조효소제 (PCP)와 분말 분획효소제 (FPP)는 30 \pm 2°C에 각각 보관하면서 azocasein (pH 6과 8)에 대한 분해활성을 측정하였고, 대조구 (control)는 효소제 조제전의 조효소와 분획효소의 활성으로 표시하였으며, '0 month'는 효소제 조제 직후의 활성으로, 각각 조제 전 (control)의 효소활성과 비교하여 나타내었다. 한편, 4종의 ammonium sulfate 분획 효소제 중에서 가장 강한 단백질 분해활성을 나타내는 효소제에 대하여는 pH 및 온도의 최적반응 조건과 안정성을 측정하였다.

당류혼합 분획 효소제의 pH 의존성 및 안정성

효소활성에 미치는 pH에 대한 의존성은 2% 효소용액의 10 μ L와 2 mL의 1% azocasein을 함유하는 각 pH의 기질용액을 반응혼합액으로 활성을 측정하여 효소반응 최적 pH를 구하였으며, pH 안정성에 대하여는 2% 효소용액 일정량을 각각의 pH 완충액 (pH 3-11) 중에 투석한 후 (4°C, 2 hr), 각 pH에서 투석한 10 μ L의 효소용액과 2 mL의 1% azocasein을 함유하는 최적 pH의 기질용액을 반응 혼합액으로 하여 전술한 방법에 따라 효소활성을 측정하였다.

당류혼합 분획 효소제의 온도 의존성 및 안정성

효소활성에 미치는 온도에 대한 의존성은 2% 효소용액의 10 μ L와 2 mL의 1% azocasein을 함유하는 최적 pH의 기질용액을 반응혼합액으로 하여 효소반응 최적온도를 구하였으며, 효소의 온도 안정성에 대하여는 일정량의 효소 (10 μ L)를 각각의 온도 (20-60°C)에서 30분간 전 단계 반응을 시킨 후, 2 mL의 1% azocasein을 함유하는 최적 pH의 기질용액을 반응시켜 전술한 방법에 따라 효소활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

조효소, 식염 첨가 조효소 및 분획효소의 보관안정성

탈이온수로 추출한 조효소의 4°C에서 보관 중 활성변화를 Fig. 1에 나타내었다. Azocasein (pH 6)에 대한 분해활성은 4종의 조효소 모두 보관 7개월까지는 거의 변화가 없었으나, 이후 서서히 감소하여 보관 11개월 제 control에 비하여 멸치는 43%, 고등어는 15%, 참돔은 13%, 그리고 넙치는 47%의 감소를 나타내었다. pH 8에서의 azocasein에 대한 분해활성의 감소는 멸치, 고등어 및 참돔의 경우는 보관 7개월까지 5-10% 정도였으나, 넙치의 경우는 보관 2개월째 약 27% 활성 감소를 보였으며, 이후 보관 7개월까지는 변화가 없었다. 한편, 조효소의 활성은 pH 6에서의 경우, 멸치, 고등어와 참돔이 약 0.28 U/mg였으며, 넙치의 경우 0.20 U/mg이었고, pH 8에서의 활성은 보관 7개월까지 고등어가 0.58 U/mg, 멸치와 참돔의 경우 0.51 U/mg, 그리고 넙치가 0.37 U/mg의 순이었다. Pycun et al. (1996)은 적색육 어류로서 멸치 (*Engraulis japonica*)와 전어 (*Clupanodo punctatus*), 그리고 백색육 어류로서 농어 (*Lateolabrax japonicus*)와 도다리 (*Pleuronichthys*

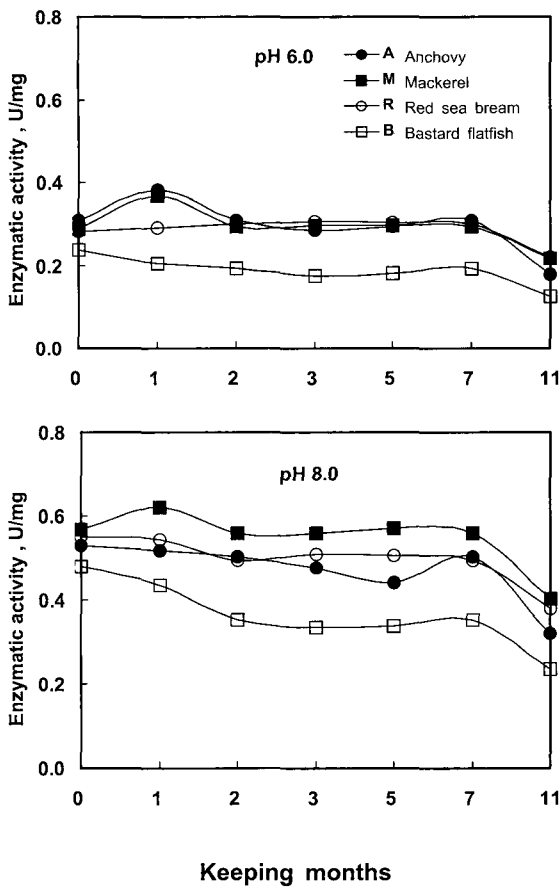


Fig. 1. Changes in azocaseinolytic activity of crude proteases (CP) extracted from viscera of four fish species during keeping periods at 4°C.

cornutus)의 합성기질을 사용하여 검색한 내장에 분포하는 단백질분해효소는 약산성 (pH 6)과 알칼리성 (pH 8)에서 활성을 나타내는 trypsin과 chymotrypsin 유사 단백질분해효소가 분포하고 있다고 하였으며, 아울러 적색육 어류의 내장효소활성이 백색육 어류보다 강하다고 하였다. 따라서, 본 실험 결과에서도 azocasein에 대한 분해활성의 강도는 pH 6에서보다 pH 8에서 약 2배 정도 강한 것으로 나타나, 알칼리성 단백질 분해효소가 다량 분포하고 있을 것으로 추정되었으며, 적색육 어류가 백색육 어류에 비하여 활성이 강한 경향을 보인 것과 일치하였다. 수산동물의 주된 가공부산물인 어류의 내장으로부터 추출한 조효소의 4°C 보관의 경우 7개월 이내에서는 비교적 안정한 것으로 판단되었다.

수산발효식품의 제조에 이용가능성을 살펴보기 위하여 30% (w/v)의 식염을 첨가한 조효소 (NaCP)의 4°C 보관 중의 azocasein에 대한 분해활성 변화를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. pH 6에서의 멸치, 고등어, 참돔 및 넙치 유래 식염첨가 조효소의 분해활성은 control (0.24-0.31 U/mg)의 분해활성에 비하여, 식염첨가 직후 (0 months, 0.12-0.16 U/mg)의 경우 47-55% 가량 감소하였으나, 효소용액이 식염과 평형화가 이

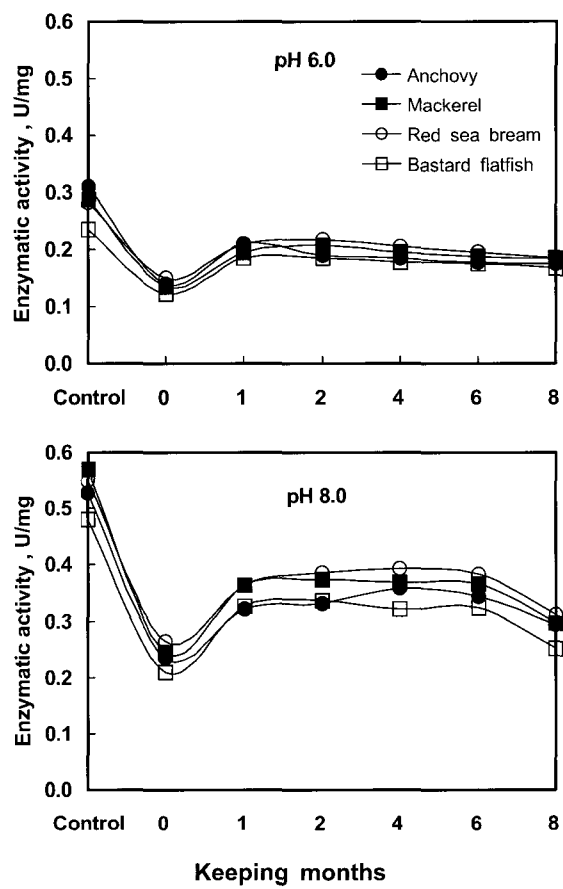


Fig. 2. Changes in azocaseinolytic activity of crude proteases (NaCP) containing 30% sodium chloride during keeping periods at 4°C.

루어진 1-6개월까지 (0.18-0.21 U/mg)는 control에 대하여 약 65-70%의 활성이 유지되었다. pH 8에서의 활성 변화는 pH 6에서의 활성변화와 유사한 경향이었고, control (0.48-0.58 U/mg)에 비하여 식염첨가 직후 0.21-0.27 U/mg를 나타내어 약 56-58% 정도 감소하였으며, 보관 1-6개월 중에는 고등어와 참돔의 경우 약 0.38 U/mg, 그리고 멸치와 넙치는 약 0.32 U/mg로서 control에 비하여 60-66%의 잔존활성을 나타내었다. 이후 보관 6-8개월 사이에도 다소 활성이 감소하여 control에 대한 잔존활성 (residual activity)은 52-56%이었다. Pyeun et al. (1995)은 cathepsin L, chymotrypsin 및 trypsin의 식염첨가에 따른 casein 및 근원섬유단백질에 대한 단백질 분해활성은 식염의 첨가농도가 높을수록 활성은 점차적으로 낮아져 식염 최종농도가 25%일 때, casein에 대하여는 최대활성의 약 80%, 근원섬유단백질에 대하여는 약 60%가 감소한다고 하였으며, Lee et al. (1996)은 4종의 어류 내장 조효소의 식염첨가에 따른 casein에 대한 분해활성은 멸치와 전어의 조효소는 25%의 식염첨가에도 변화가 없는 반면, 농어와 도다리의 경우는 40-50%의 활성감소를 나타내었다고 하였다. 이와 같은 분해활성의 차이는 기질단백질의 구조와 효소의 기질 친화

성 차이에 원인이 있지만, 열변성을 거쳐 조제된 casein의 경우, 구조적으로 느슨해진 단백질 구조내의 SH 및 OH기 등의 음전하를 띠는 이온과 Na⁺ 이온이 결합하여 효소의 작용을 방해하기 때문인 것으로 추정되며 (Brown and Smith, 1990), 아울러, 효소 반응혼액 중의 이온강도의 증가로 인하여 효소와 기질간의 구조적 변화가 그 원인으로 판단된다 (Dixon and Webb, 1979). 또한 Kim et al. (1999)에 의하면, 젓갈 숙성조건인 pH 6.5와 20°C에서 시판 상용효소인 Alcalase, Neutrase 및 Protamex는 20% 식염농도에서 무첨가 대조군에 대하여 각각 17%, 22%, 55%의 잔존활성을 보인다고 하여 시판 상용효소도 식염이 효소활성에 상당한 영향을 미치는 것으로 보고하였다. 따라서, 본 실험의 식염 첨가효소제는 고농도의 식염 존재 하에서도 상당기간 (6개월) control에 비하여 약 70% 정도의 활성이 유지됨으로서, 숙성 수산발효식품의 제조에 이들 효소제가 이용 가능하리라 판단되었다.

한편, ammonium sulfate 염석을 통하여 분획한 30-80% 포화농도 획분(FP)의 4°C에서 보관 중 azocasein에 대한 분해활성 변화를 Fig. 3에 나타내었다. pH 6의 경우, 효소활성은 멸치의 경우는 1.8 U/mg, 고등어는 4.3 U/mg, 참돔은 1.2 U/mg 그리고 넙치의 경우는 2.8 U/mg 이었으며, 보관 1개월까지 (1.2-4.3 U/mg)는 활성변화가 없었으나, 이후 활성이 감소하여, 보관 2-8개월까지 약 8-19%의 활성이 감소하였다. pH 8에서의 활성 변화는 pH 6에서와 비슷한 경향이었으며, 각 분획효소의 활성은 멸치가 3.2 U/mg, 고등어는 8.1 U/mg, 참돔은 2.0 U/mg, 그리고 넙치의 경우는 3.8 U/mg 였고, 보관 2개월째 멸치와 고등어는 약 18%의 활성이, 참돔과 넙치는 각각 25%와 32%가 감소하였으며, 이후 서서히 감소하여 보관 8개월에 이르러서는 control에 대하여 37-59% 정도의 잔존활성을 나타내었다. 전보 (Heu and Ahn, 1999)에서는 합성기질을 이용한 분획효소의 단백질 분해효소의 분포검색 및 상용효소와의 활성 비교에서 상용효소보다 다양한 endoprotease와 exoprotease가 분포하고 있으며, 활성의 세기도 강하다고 하였고, Heu et al. (2003b)은 새우 가공부산물로부터 회수한 단백질분해 조효소에 대한 ammonium sulfate 염석을 통해 부분 정제한 분획효소의 활성이 약 7배정도 증가하였으며, 아울러 30-50% 및 50-70%로 ammonium sulfate의 포화농도를 달리하여 분획한 효소의 경우, 30-50% 분획효소는 주로 endoprotease가, 50-70% 분획효소는 주로 exoprotease가 분포하여, 효소의 분포에 있어 차이를 보인다고 하였다.

이상의 결과로 미루어 보아 부분적으로 정제한 분획효소 (Fig 3)가 조효소 및 식염첨가 조효소 (Fig. 1과 2)보다 활성은 약 3.4-16.1배 가량 높아졌다. 이러한 결과는 염석을 통한 정제과정 중에 효소이외의 단백질들이 제거됨으로서 상대적으로 효소활성이 높아진 것이라고 판단되었다. 또한, 효소제의 조제시, 이러한 정제과정을 적절히 이용하는 경우 효소활성 세기의 조절이 가능할 뿐만 아니라, 효소의 분포도 다소 조절할 수 있으리라 추정되었다. 아울러 이들 4종 어류내장으로부터

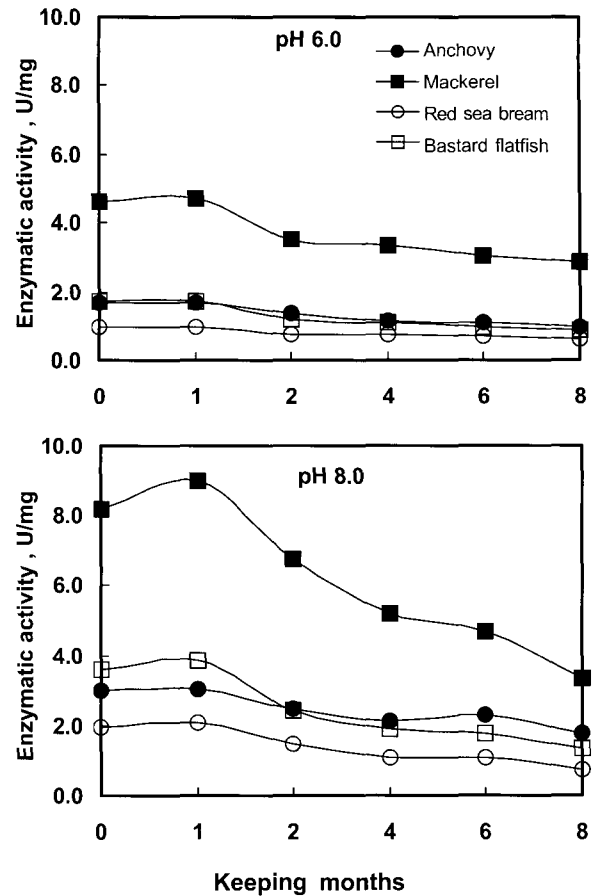


Fig. 3. Changes in azocaseinolytic activity of the fractionated proteases (FP) by the 30-80% ammonium sulfate saturation during keeping periods at 4°C.

터 탈이온수로 효소를 추출한 조효소, 여기에 식염을 첨가하거나, 또는 염석을 통하여 부분 정제한 다음, 분말화 하지 않은 용액의 경우에도 4°C이하의 온도에서 약 6개월 정도의 보관에 70% 가량의 효소활성이 유지되어 보관안정성이 인정되었다.

조효소 및 분획효소의 당 혼합 분말 효소제의 보관안정성

멸치, 고등어, 참돔 및 넙치의 내장으로부터 추출한 조효소들의 각각에 대하여 lactose, sucrose, glucose 및 dextrin을 일정 비율로 혼합하고, 진공동결 건조하여 조제한 분말 조효소제의 보관기간 중 활성변화를 Fig. 4에 나타내었다.

분말 조효소제의 보관 (30°C)중 효소활성 변화는 pH 6에서의 경우 동결 건조 전 (control)의 활성 (멸치, 0.20 U/mg; 고등어, 0.49 U/mg; 참돔, 0.15 U/mg; 넙치, 0.16 U/mg)에 비하여 동결 건조 직후 (0 month, 멸치, 0.14-0.16 U/mg; 고등어, 0.35-0.39 U/mg; 참돔, 0.13-0.14 U/mg; 넙치, 0.11-0.13 U/mg)에 다소 감소한 경향 (2-25%)을 보였으며, 이후 보관중 활성변화는 멸치, 참돔 그리고 넙치의 경우 보관 4개월까지 변화가 없었으

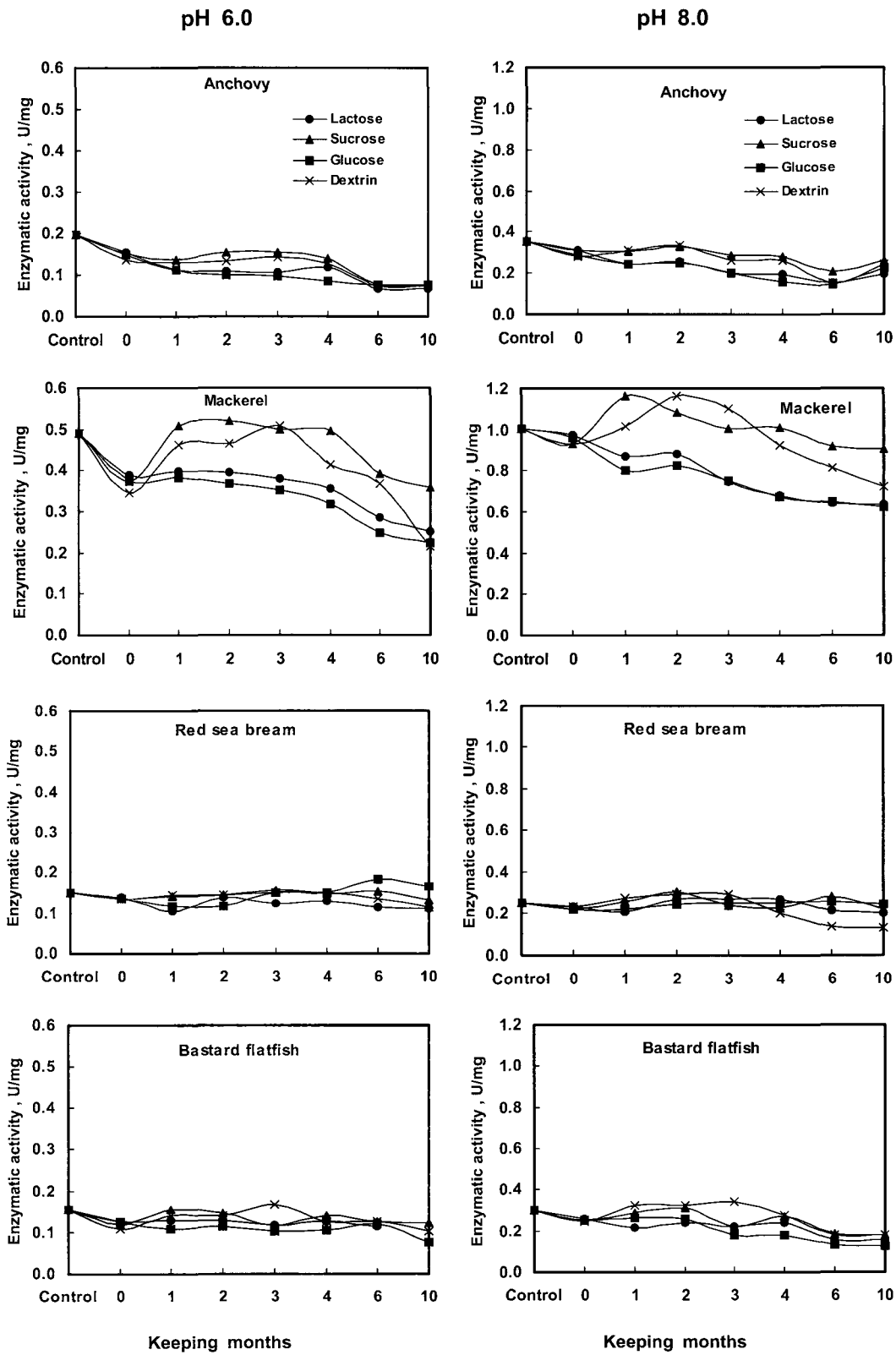


Fig. 4. Changes in azocaseinolytic activity of powdered crude proteases (PCP) containing various sugars during keeping periods at 30°C.

나, 고등어의 경우, sucrose 및 dextrin 혼합 조효소제 (0.5 U/mg)는 다른 3종의 효소제와 같이 보관 4개월까지 변화가 없는 반면, lactose와 glucose 혼합 조효소제는 보관 1개월부터 10개월까지 서서히 감소하는 경향 (27-35%)을 보였다. pH 8에서의 경우, 네 어종 모두 pH 6에서의 활성보다 약 2배 강한 활성을 나타내었고, 동결 건조 전 (control)의 활성 (멸치, 0.35 U/mg; 고등어, 1.00 U/mg; 참돔, 0.25 U/mg; 넙치, 0.30 U/mg)에 비하여 동결건조 직후의 활성 (멸치, 0.28-0.31 U/mg; 고등어, 0.93-0.97 U/mg; 참돔, 0.22-0.24 U/mg; 넙치, 0.25-0.26 U/mg)이 다소 감소 (3-20%)하였다. 이후 보관중의 활성변화는 멸치, 참돔 그리고 넙치는 보관 4개월까지 거의 변화가 없었으나, 고등어의 경우, 보관 10개월까지 sucrose 혼합 조효소제 (0.91 U/mg)는 활성변화가 거의 없는 반면, dextrin 혼합 조효소제는 0.73 U/mg, lactose 혼합 조효소제는 0.63 U/mg 그리고 glucose 혼합 조효소제는 0.62 U/mg를 나타내어 동결 건조 직후보다 약 22-35% 감소를 보였다. Lee et al. (1996)에 의하면, 전어와 농어의 내장에서 추출한 조효소를 각각 동결건조와 glycerol을 첨가하여 조제한 분말 및 액상 효소제의 20°C에서 보관안정성은 azocasein에 대하여 전어의 분말 효소제가 보관 4개월에 약 5% 내외의 활성 감소만을 나타낸 반면, 농어의 효소제는 약 25%의 감소 보였다고 하였으며, 액상효소제의 경우, 전어와 농어 모두 4개월까지 활성감소가 없었다고 보고하였다. 이상의 결과로 어류의 내장으로부터 분말 조효소제의 조제 및 보관안정성의 부여를 위하여는 당류첨가 및 동결건조법이 적절하다고 판단되었다.

Ammonium sulfate 분획효소의 당류혼합 분말효소제의 30°C에 보관 중 활성변화 (Fig. 5)는 멸치의 경우, 동결건조 직후 1.49-1.73 U/mg (pH 6)과 2.71-3.14 U/mg (pH 8)였으며, sucrose 혼합 분획효소제를 제외하고는 보관 2개월부터 활성이 급격히 감소하여 보관 10개월째 11-38% 정도 (pH 6과 8)의 잔존활성을 나타낸 반면, 보관 10개월의 sucrose 혼합 분획효소제는 35-51% (pH 6과 8)의 잔존활성을 보였다. 고등어의 경우 동결건조 직후의 활성은 4.52-4.84 U/mg (pH 6)과 8.56-9.17 U/mg (pH 8)였으며, sucrose와 dextrin 혼합 분획효소제는 보관 10개월까지 control에 대하여 각각 69-75%와 60-70%의 활성이 유지되었다. 그러나 glucose와 lactose 혼합 분획효소제는 보관 10개월까지 control에 대하여 각각 40-44%와 25-28%의 활성만이 남아있다. 참돔의 경우, 동결건조 직후의 효소활성은 0.94-1.04 U/mg (pH 6)과 2.08-2.14 U/mg였으며, 보관 2개월부터 lactose 혼합 분획효소제의 활성이 급격히 감소 (65%)하여 보관 10개월째 82%의 활성 감소를 보였다. 그러나 sucrose 혼합 분획효소제는 보관 4개월까지 75-90% 이상의 활성이 유지되고 있었으나, 그 이후 보관기간의 경과에 따라 활성이 감소하여 보관 10개월째에는 47-52%의 활성만이 잔존하였다. Dextrin과 glucose 혼합 분획효소제의 활성은 보관 10개월까지 control에 대하여 각각 41% 정도와 24-35%의 활성만이 남아있었다. 한편, 넙치의 경우는 동결건조 직후의 효소

활성이 1.66-1.75 U/mg (pH 6)과 3.66-4.04 U/mg (pH 8)였으며, 보관 2개월부터 lactose 혼합 분획효소제는 pH 6과 8에서의 효소활성이 급격히 감소하여 control에 대하여 약 50% 감소하였고, 보관 10개월에 이르러서는 10-14%만이 잔존하였다. 그러나 sucrose 혼합 분획효소제는 보관 4개월까지 67-70%의 활성이 유지되었으며, 이후의 보관 경과에 따라 활성은 감소하여 보관 10개월에 이르러서는 50% 수준을 유지하였다. Dextrin 혼합 분획효소제는 보관 3개월째 control에 대하여 40-50%의 활성감소를 보였으며, 보관 10개월에는 26-33%의 활성만이 잔존하였다.

이상의 결과로 당류혼합 분말 조효소제와 분획효소제의 보관안정성 (30°C)은 4종의 당류 중에서 sucrose 혼합 효소제가 가장 우수한 것으로 나타났으며, 다음으로 dextrin, glucose, lactose의 순이었다. 아울러, 효소제의 보관이 본 실험 조건인 30°C에서 보다 낮은 온도에서 이루어진다면, 효소활성의 감소를 지연시킬 수 있으리라 판단되었다.

당류혼합 분획효소제의 최적 pH 및 pH 안정성

4종의 어류내장 유래 sucrose 혼합 분획효소제 (Fig. 6)와 고등어내장 유래 4종의 당류혼합 분획효소제의 azocasein 분해활성에 미치는 pH의 영향 및 pH 안정성에 대한 결과는 Fig 7과 같다. 어종별 sucrose 혼합 분획효소제는 모두 pH 9.0에서 최대 활성을 나타내었고 (Fig. 6, up), 이때의 각 어종별 활성은 멸치가 2.68 U/mg, 고등어가 11.15 U/mg, 참돔이 2.38 U/mg 그리고 넙치가 3.43 U/mg 이었다. 또한, 4종의 어류 모두 pH 6.0에서 최대활성의 약 40% 이상을 나타내었으며, pH 11에서도 최대활성의 70-83%를 보였다.

어종별 sucrose 혼합 분획효소제의 pH 안정성 (Fig. 6, bottom)은 멸치, 참돔 및 넙치의 경우 pH 8에서, 고등어의 경우는 pH 6에서 가장 안정한 것으로 나타났다. 또한, 멸치는 pH 6-9의 범위에서, 고등어와 넙치는 pH 5-11 범위에서, 그리고 참돔은 pH 5-10의 범위에서 최대활성의 60-70% 이상의 활성을 보여, 고등어와 참돔의 효소제가 멸치와 참돔의 효소제에 비하여 넓은 pH 영역에서 안정한 것으로 나타났다. 따라서 이들 효소제는 약산성에서 알칼리성 영역의 pH에서 산업적으로 이용 가능할 것으로 사료된다.

한편, 4종의 어류 중에서 가장 강한 활성을 보인 고등어 분획효소를 대상으로 4종의 당류를 혼합하여 조제한 효소제의 효소활성에 미치는 pH의 영향 (Fig. 7, up)은 모두 pH 9에서 최대 활성을 나타내었으며, 이때의 당류별 효소활성은 sucrose 혼합 효소제 (15.21 U/mg)가 가장 강하였고 다음으로 lactose (11.47 U/mg), glucose (11.17 U/mg), dextrin (7.37 U/mg)의 순이었다. 따라서, 당류의 혼합이 효소활성 최적 pH에는 영향을 주지 않았으나, 활성의 강도에는 영향을 주는 것으로 나타났다. 한편, 각각의 pH 완충액 중에 전 단계 반응을 거친 다음 측정된 4종의 당류혼합 고등어 분획 효소제의 pH에 대한 안정성 (Fig. 7, bottom)은 pH 5-11 범위에서 lactose는 최대활성의 70% 이상의 활성을 유지하였고, sucrose는 70-82%, glucose는

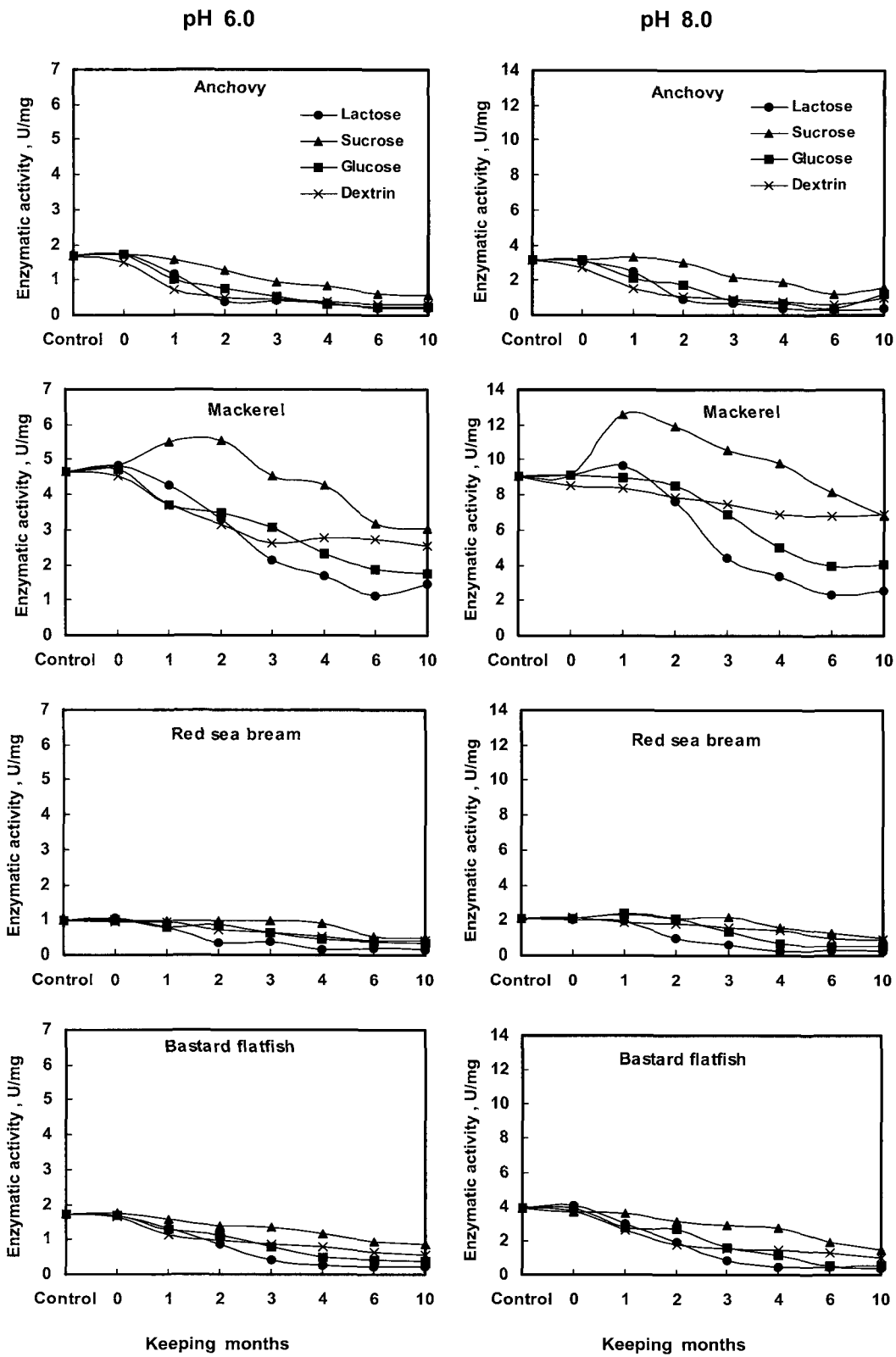


Fig. 5. Changes in azocaseinolytic activity of the fractionated and powdered proteases (FPP) containing various sugars during keeping periods at 30°C.

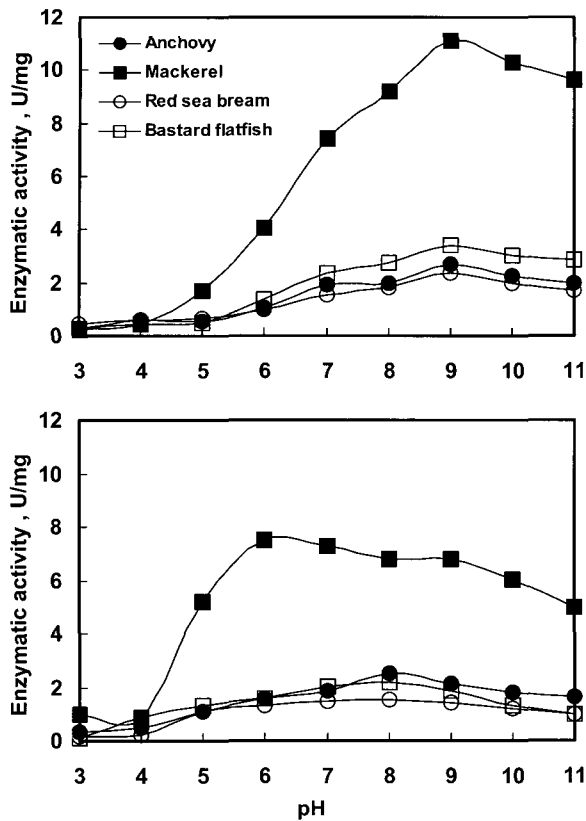


Fig. 6. pH dependence (up) and stability (bottom) on the azocaseinolytic activity of the fractionated and powdered proteases (FPP) containing sucrose from four fish species.

60-65% 그리고 dextrin은 54-67% 이상의 효소활성이 유지됨으로서, sucrose 혼합이 pH에 대한 효소의 안정화에 기여할 뿐만 아니라 활성의 강도에 있어서도 가장 강하여 활성유지에 도움을 주는 것으로 나타났다.

당류혼합 분획효소제의 최적 반응온도 및 온도 안정성

어종 별 sucrose 혼합 분획효소제의 azocasein 분해활성에 미치는 온도의 영향 (Fig. 8, up)은 네 어종의 sucrose 혼합 효소제 모두 50°C에서 최대 활성을 나타내었고, 이때의 각 어종별 활성은 멸치가 4.94 U/mg, 고등어가 16.70 U/mg, 참돔이 3.04 U/mg 그리고 넙치가 5.40 U/mg 이었다. 또한, 30°C에서 최대 활성의 약 23-36% 이상 활성을 보였으며, 60°C에서도 최대 활성의 약 43-65% 이상 활성을 보여 비교적 넓은 영역에서 분해 활성 갖는 것으로 나타났다. 어종별 sucrose 혼합 분획효소제의 온도 안정성 (Fig. 8, bottom)은 멸치와 고등어의 경우 45°C까지, 참돔과 넙치의 경우는 40°C에서 최대활성의 90% 이상을 보였으나, 이후 활성이 감소하여 60°C에서 4-9% 정도를 나타내었다.

한편, 가장 강한 활성을 보인 고등어 분획효소를 대상으로 4종의 당류를 혼합하여 조제한 분획효소제의 활성에 미치는

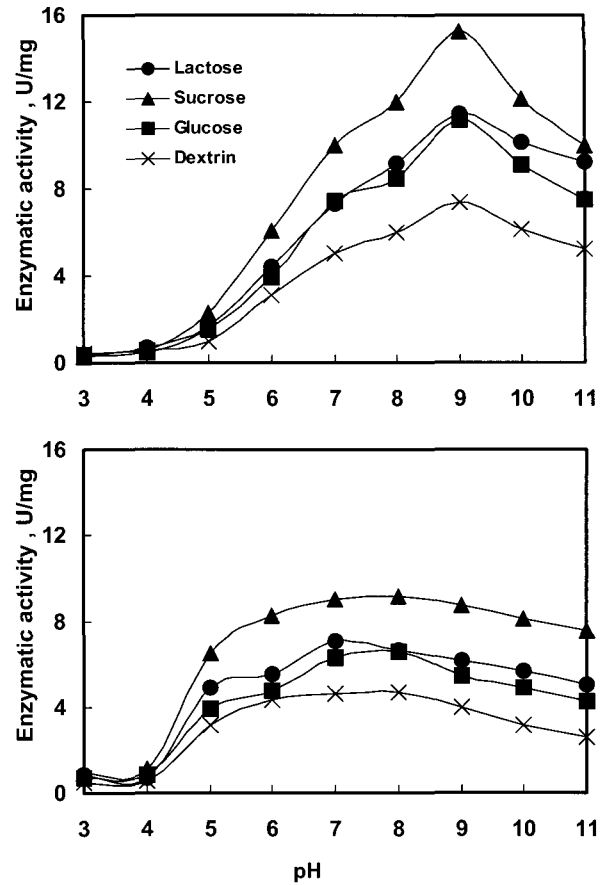


Fig. 7. pH dependence (up) and stability (bottom) on the azocaseinolytic activity of the fractionated and powdered proteases containing various sugars from mackerel.

온도의 영향 (Fig. 9, up)은 50°C에서 최대 활성을 나타내었고, 이때 당류별 효소활성은 sucrose 혼합 효소제 (15.75 U/mg)가 가장 강하였으며 다음으로 lactose (11.70 U/mg), glucose (11.15 U/mg), dextrin (9.57 U/mg)의 순이었다. 혼합당류 별 고등어의 효소제는 모두 20°C에서 최대활성의 20% 이상 활성을 보였고, 60°C에서도 최대활성의 약 50% 이상 활성을 보여 비교적 넓은 온도범위에서 분해활성 갖는 것으로 나타났으며, 전 온도범위에서 sucrose 혼합 효소제가 강한 분해활성을 보였다. 고등어의 당류혼합 효소제의 온도 안정성 (Fig. 9, bottom)은 lactose, sucrose와 glucose 혼합 효소제는 45°C까지, 그리고 dextrin 혼합 효소제는 40°C까지 활성변화가 거의 없이 안정하였으나, 50°C에서 활성의 감소 (최대활성의 30-45%)를 보였고, 이후 활성이 급격히 감소하여 60°C에서 최대활성의 3% 정도의 활성을 나타내었다. 이상의 결과에서 어종 별 sucrose 혼합 효소제가 보관 안정성 (30°C에서 6개월 이상), 비교적 넓은 범위의 pH (pH 5-10) 및 온도안정성 (20-50°C)에서 높은 활성을 유지하는 것으로 나타나, 효소제의 조제에 있어서 안정성을 부여하기 위한 당류로서는 sucrose가 적합할 것으로 되었다.

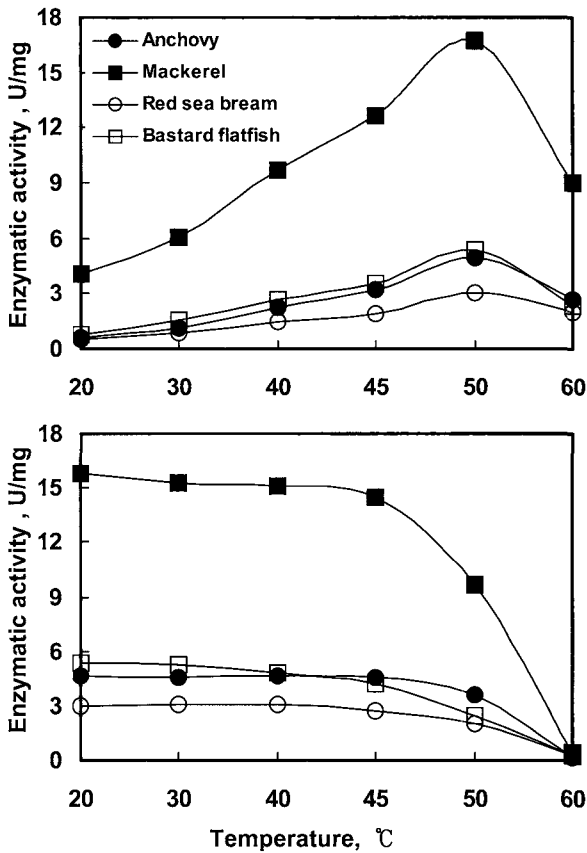


Fig. 8. Temperature dependence (up) and stability (bottom) on the azocaseinolytic activity of the fractionated and powdered proteases containing sucrose from four fish species.

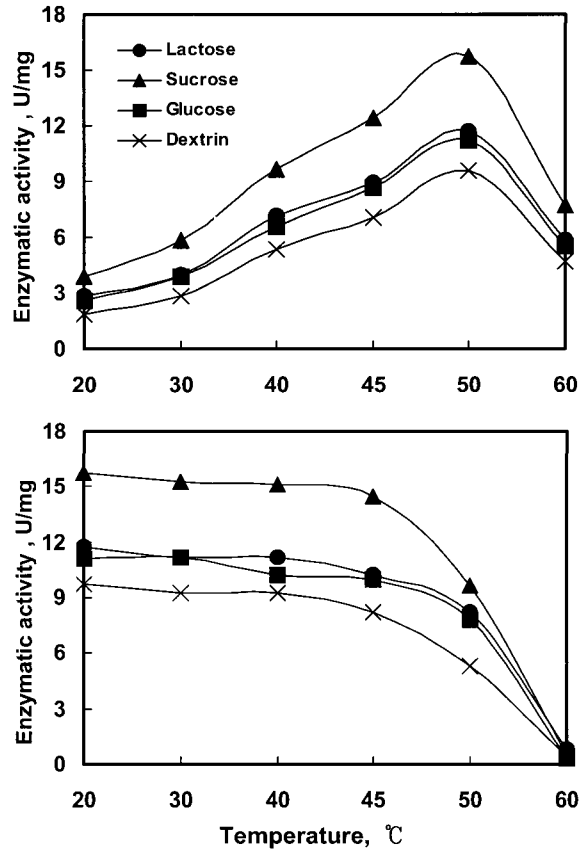


Fig. 9. Temperature dependence (up) and stability (bottom) on the azocaseinolytic activity of the fractionated and powdered proteases containing various sugars from mackerel.

전보 (Heu and Ahn, 1999)에 따르면, 시판 상용효소와의 활성비교에서 azocasein의 분해능이 어류내장 분획효소가 우수하거나, 비슷한 수준의 활성을 보일 뿐만 아니라, 다양한 기질특이성을 나타낸다고 하였으며, 이들 시판 상용효소 중 Alcalase의 최적 반응조건은 pH 6.5-8.5와 55-70°C (Novo Nordisk, 1996a), Neutrase는 pH 5.5-7.5와 45-55°C (Novo Nordisk, 1996b)이라고 하여, 본 실험결과 (pH 5-10, 40-50°C)가 보다 넓은 pH 범위에서 작용하는 반면에 온도 범위는 좁은 것으로 나타났다. 따라서, 대부분의 상용효소들이 미생물 기원의 효소로서 산업적으로 이용되고 있는 현재, 본 연구결과를 토대로 앞으로 원료의 확보방안 및 실제 식품가공에 적용한 응용실험을 통하여 산업성이 인정된다면, 고등생물체의 효소자원으로서 수산가공부산물로부터 산업적 이용을 위한 효소제의 조제가 가능한 것으로 판단된다.

사 사

이 연구는 2003년도 경상대학교 연구년제 연구교수 연구지원비에 의하여 수행되었음.

참 고 문 헌

Barrett, A.J. and H. Kirschke. 1981. Cathepsin B, Cathepsin H, and Cathepsin L. In: *Methods of Enzymology*, Vol. 80. Lorand L., ed. Academic Press, Inc., New York, pp. 535-561.

Brown, D.H. and W.E. Smith. 1990. The impact of metal ion chemistry on our understanding of enzyme. In: *Enzyme Chemistry*, Suckling, C.J., 2nd ed., Chapman and Hall, London, U.K., pp 227-243.

Dixon, M. and E.C. Webb. 1979. *Enzymes*, 3rd ed., Longman, London, U.K., pp 47-169.

Gildberg, A. 1988. Aspartic proteinase in fishes and aquatic invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 91B, 425-435.

Haard, N.F. 1992. Enzymes from marine organisms as food processing aids. *J. Aquatic Food Prod. Technol.*, 1, 17-35.

Haard, N.F. 1994. Protein hydrolysis in seafoods. In: *Seafoods Chemistry, Processing Technology and Quality*, Shahidi, F., ed. Blackie Academic and Pro-

- fessional, Glasgow, pp. 10-33.
- Haard, N.F., L.A.W. Feltham, N. Helbig and J. Squires. 1982. Modification of proteins with enzymes from the marine environment. In: Modification of Protein in Food, Pharmaceutical, and Nutritional Sciences, Feeney, R. and J. Whitaker eds. American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 223-244.
- Haard, N.F., K. Shamsuzzaman, P. Brewer and K. Arunchalam. 1983. Enzymes from marine organism as rennet substitutes. In: Processing International Symposium on the Use of Enzymes in Food Technology, Dupuy, P., ed. Centre National de la Recherche Scientifique, Editions Lavoisier, Paris, pp. 237-242.
- Hammed, K.S. and N.F. Haard. 1985. Isolation and characterization of cathepsin C from Atlantic short finned squid, *Illex illecebrosus*. Comp. Biochem. Physiol., 82B, 241-246.
- Heu, M.S., H.R. Kim, D.M. Cho, J.S. Godber and J.H. Pyeun. 1997. Purification and characterization of cathepsin L-like enzyme from muscle of anchovy, *Engraulis japonica*. Comp. Biochem. Physiol., 118B, 523-529.
- Heu, M.S., H.R. Kim and J.H. Pyeun. 1995. Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. Comp. Biochem. Physiol., 112B, 557-567.
- Heu, M.S., J.S. Kim and F. Shahidi. 2003a. Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. Food Chem., 82, 235-242.
- Heu, M.S., J.S. Kim, F. Shahidi, Y. Jeong and Y.J. Jeon. 2003b. Extraction and fractionation and activity characteristics of proteases from shrimp processing discards. J. Food Biochem., 27(3), 221-236.
- Heu, M.S. and S.H. Ahn. 1999. Development and fractionation of proteolytic enzymes from inedible seafood product. J. Kor. Fish. Soc., 32(4), 458-465. (in Korean)
- Kim, J.S., F. Shahidi and M.S. Heu. 2003a. Characteristics of salt-fermented sauces from shrimp processing by-products. J. Agric. Food Chem., 51, 784-792.
- Kim, S.K., P.J. Park, H.G. Byun, J.Y. Je, S.H. Moon and S.H. Kim. 2003b. Recovery of fish bone from Hoki (*Johnius belengeri*) frame using a proteolytic enzyme isolated from mackerel intestine. J. Food Biochem., 27(3), 255-266.
- Kim, I.S., Y.J. Choi, M.S. Heu, Y.J. Cho, Y.S. Im, Y.S. Gu, S.G. Yeo and J.W. Park. 1999. Peptide properties of rapid salted and fermented anchovy sauce using various proteases. J. Kor. Fish. Soc., 32(4), 481-487. (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. Kor. Fish. Soc., 29(3), 309-319. (in Korean)
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- Novo Nordisk 1996a. Alcalase food grade. In: Product sheet, B318d-GB500, Denmark, pp 1-4.
- Novo Nordisk 1996b. Neutrase for protein upgrading. In: Product sheet, B855b-GB500, Denmark, pp 1-4.
- Pyeun, J. H. and H. R. Kim, 1986. The proteinase distributed in the intestinal organs of fish. 1. Purification of the three alkaline proteinases from the pyloric caeca of mackerel, *Scomber japonicus*. Bull. Kor. Fish. Soc., 19, 537-546.
- 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. Kor. 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 fish tissues. J. Kor. Fish. Soc., 29(3), 296-308. (in Korean)
- Squires, K., N.F. Haard and L.A.W. Feltman. 1986. Pepsin isozymes from Greenland cod, *Gadus ogac*. Can. J. Biochem. Cell Biol., 65B, 205-209.
- Starky, P.M. 1977. Elastase and cathepsin G: the serine proteinases of human neutrophil leucocytes and spleen. In: Proteinases in Mammalian Cells and Tissues, Barrett, A.J. ed. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 57-89.
- Ueno, R., K. Sakanaka, S. Ikeda and Y. Horoguchi. 1988. Purification and pepstatin insensitive protease from mackerel white muscle. Nippon Suisan Gakkaishi, 54, 691-697.
- Yoshinaka, R., M. Sato and S. Ikeda. 1981. Distribution of trypsin and chymotrypsin, and their zymogens in digestive system of catfish. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 47, 1615-1618. (in Japanese)

2004년 4월 16일 접수

2004년 7월 24일 수리