

효소적 가수분해에 의한 홍게껍질 단백질의 특성*

노경희¹ · 민관희² · 서보영¹ · 김소희³ · 서영완⁴ · 송영선^{1S}

인제대학교 식의약생명공학과, 기초과학연구소,¹ 경희대학교병원 임상화학연구소,²
동주대학교 외식조리제과계열,³ 해양대학교 해양환경·생명과학부⁴

Characteristics of protein from red crab (*Chionoecetes japonicus*) shell by commercial proteases*

Noh, Kyung-Hee¹ · Min, Kwan-Hee² · Seo, Bo-Young¹ · Kim, So-Hee³ · Seo, Young-Wan⁴ · Song, Young-Sun^{1S}

¹Center of Smart Foods and Drugs and Food Science Institute, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

²Clinical Research Institute CRL, Kyung Hee University Hospital, Seoul 134-727, Korea

³School of Culinary Art & Baking Technology, Dong-Ju College, Busan 604-080, Korea

⁴Division of Marine Environment & Bioscience, Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea

ABSTRACT

This study was performed to examine the characteristics of protein of red crab (*Chionoecetes japonicus*) shell powder hydrolyzed by commercial proteases. Red crab shell was digested by commercial proteases, such as Protamex (P), Neutrase (N), Flavourzyme (F), Alcalase (A), Protease M (PM) and Protease A (PA). Protein yield analyzed by Biuret assay, absorbance at 280 nm and brix revealed that PA was the enzyme having the highest proteolytic activity. SDS PAGE showed that molecular weight of proteins produced by protease treatments was various and below 150 kDa. Combinational treatment of proteases (PA + P, PA + PM, PA + F, PA + A) was tried whether these increase protein hydrolysis from red crab shell powder compared to a PA single treatment. Soluble protein content was similar, but amino acid concentration by combinational treatments was higher than PA single treatment [PA + P 247.4 mg/g > PA + F (206.4 mg/g) > PA + A (133.4 mg/g) > PA + PM (59.1 mg/g) > PA (54.9 mg/g)]. Amino acid composition by combinational treatments was slightly different. Most abundant essential amino acids were phenylalanine, glycine, alanine, and leucine, whereas tyrosine and cystine were not detected. (Korean J Nutr 2012; 45(5): 429 ~ 436)

KEY WORDS: red crab (*Chionoecetes japonicus*) shell, protease, amino acid composition, MW.

서 론

홍게 (*Chionoecetes japonicus*)는 수심 200~2,000 m의 심해에 분포하며, 심층으로 갈수록 분포 밀도가 높은 생태적 특성으로 인해 환경오염이 적고,^{1,2} 조직이 부드럽고 특유의 맛이 있어 우리나라 사람들이 즐겨먹는 수산물 중의 하나이다.³ 홍게는 식용으로 이용되는 부위가 15% 정도이며 85%는 가공 부산물로 폐기되고 있어 이를 재활용하고자하는 연구가 활발히 진행되고 있다.^{3,4} 홍게 부산물은 기능성 식품소재인 키틴 및 키토산의 제조 원료로 주로 사용되고 있으나,^{3,5,6} 홍게껍질에는 키틴 외에도 회분, 단백질 및 많은 향미성분과 아스타잔

틴 같은 고부가가치 식품소재가 함유되어 있으나 이들 식품소재의 활용도는 매우 저조한 실정이다.⁷

본 연구에서는 홍게 부산물로 나오는 홍게껍질에서 단백질을 회수하여 자원으로 활용하면 새로운 단백질 식량자원이 되며 홍게껍질의 처리 비용을 절감하는 효과가 있으리라 사료되어 다양한 방법으로 단백질을 추출하고 아미노산 조성분자량 등 특성을 연구하였다. 홍게 가공 부산물의 단백질에 관한 연구로는 홍게의 자숙가공과정에서 발생하는 폐액에서 단백질을 회수하여 식품학적 특성을 보고한 연구가 있다.⁷⁻⁹ 식품으로부터 효소적 처리를 하여 단백질을 추출하고 식품소재로 활용하려는 연구들이 있다.¹⁰⁻¹⁴ 단백질 가수분해물 자체로서의 이용 뿐 아니라 효소분해한 단백질 가수분해물을

접수일: 2012년 9월 11일 / 수정일: 2012년 9월 24일 / 채택일: 2012년 10월 4일

*This work was supported by grant of the iPET (Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries), Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea.

^STo whom correspondence should be addressed.

E-mail: fdsnsong@inje.ac.kr

© 2012 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Maillard 반응을 이용한 반응향의 전구물질로 이용하고자하는 연구도 있다.³⁾ 또한 Lee¹⁵⁾는 효소적 가수분해방법으로 녹용의 세포벽에 있는 섬유질이나 당단백질 또는 알긴산 고분자 물질 등을 분해시키면 활성물질들이 원활히 추출되며, 최적조건에서 제조된 가수분해물은 수율이 높아 식품 첨가제 혹은 건강식품소재로 사용가능하고 생체 내에서도 쉽게 이용될 수 있다고 보고하였다.

단백질은 종류별로 각각 기능과 특성이 달라 단백질을 변형시켜 기능특성을 개선하여 식품에의 이용성을 증가시키려는 연구가 시도되고 있으며 그 방법은 주로 산이나 알칼리에 의해 단백질을 가수분해 시키는 화학적 변형과 효소적 변형 방법이 있다. 화학적 변형은 유해물질의 생성과 필수아미노산의 손실 등의 문제점이 있으므로 단백질에 효소를 처리하여 부분적으로 가수분해시켜 새로운 영양 및 가공기능성을 향상시키려는 연구가 많이 시도되고 있다.¹³⁾ 식품소재로서 활용도가 낮은 붉은 대게의 껍질을 이용하여 고압가열추출방식의 붉은 대게 아메리칸 소스를 제조한 연구^{2,16-18)}가 있으나 홍게껍질에 함유된 단백질의 회수 및 기능성에 대한 연구 보고는 미비한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 폐기되는 홍게껍질의 단백질을 재활용하기 위하여 단백질분해 효소를 단일 혹은 혼합하여 처리하여 획득한 단백질 가수분해물의 분자량 및 아미노산 조성 등을 비교 분석하여 기능성 소재 및 보충제로서의 활용 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 효소

본 연구에 사용된 홍게 (*Chionoecetes japonicus*) 다리 껍질은 경남 김해시 대동면에 위치한 (주)네스코로부터 제공받아 50 mesh로 분쇄하여 분말로 조제하였다. 단백질 분해 효소는 상업적으로 널리 사용되는 Protamex (Novozyme, Bagsvaerd, Denmark), Neutrase (Novozyme, Bagsvaerd, Denmark), Flavourzyme (Novozyme, Bagsvaerd, Denmark), Alcalase (Novozyme, Bagsvaerd, Denmark), Protease M (Amino, Nagoya, Japan)과 Protease A (Amino, Nagoya, Japan)의 총 6종의 효소를 구입하여 사용하였다.

다양한 단백질분해효소의 분해능 비교

단일효소 처리

홍게 다리 껍질의 단백질을 가수분해하기 위한 효소처리는 Kim 등의 방법¹⁹⁾에 따라 실시하였다. 시료분말에 증류수를 가하여 15% 현탁액으로 만든 후 시료 양의 0.5% 농도로 효소를

처리하여 각 효소의 최적온도와 최적 pH에서 200 × g의 속도로 24시간동안 진탕하면서 반응시켰다. 반응이 끝난 현탁액은 95°C에서 5분간 처리하여 효소를 불활성화 시킨 뒤, 원심분리 (5,000 rpm, 30 min)하여 상등액을 취하여 단백질 농도 및 가수분해도를 측정하였다. 이들 가수분해 효소의 최적온도와 pH는 Protamex (50°C, pH 6), Neutrase (50°C, pH 6.5), Flavourzyme (50°C, pH 7), Alcalase (60°C, pH 7), Protease M (50°C, pH 6), Protease A (50°C, pH 7)이었다.

효소 최적 농도 및 분해 시간 결정

단일효소처리 분석 결과에서 가장 강력한 단백질 분해능을 가진 효소는 Protease A로 확인되어 Protease A 효소의 최적 농도와 분해 시간을 결정하기 위해 최적 온도와 pH에서 반응시켰다. 즉, 기질농도의 0.05, 0.5, 1%로 효소 농도를 처리하여 12시간에서 72시간동안 반응시킨 후 분해된 단백질의 양은 4,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하여 분석하였다.

혼합효소 처리에 의한 단백질분해능 비교

가장 단백질분해능이 강력한 Protease A (PA)에 Protamax (P), Protease M (PM), Flavourzyme (F), Alcalase (A) 효소를 각각 1대 1의 비로 혼합 (PA + P, PA + PM, PA + F, PA + A)하여 단백질분해능을 비교하였다. 즉, 각 혼합효소를 홍게껍질 분말에 증류수를 가하여 15% 현탁액으로 만든 후 기질의 0.5%의 농도로 첨가한 후 24시간 동안 반응시킨 후 분해된 단백질은 동결건조하여 -70°C에서 보관하면서 단백질 함량과 아미노산 조성을 분석하는데 사용하였다.

가수분해물의 단백질 농도 및 °Brix 측정

가수분해물의 단백질 농도는 Biuret assay²⁰⁾ 및 280 nm assay로 분석하였으며, °Brix는 굴절당도계 (PR-101, Atago Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

SDS page

가수분해물의 단백질 분자량은 SDS-PAGE를 이용한 Laemmli²¹⁾의 방법을 다소 수정하여 확인하였다. SDS-PAGE는 12% polyacrylamide와 0.1% SDS가 포함된 separating gel과 4% polyacrylamide와 0.1% SDS가 함유된 stacking gel을 만들어 사용하였다. 가수분해물된 단백질 100 µg을 gel에 loading 하여 100 volt에 전기영동한 후 coomassie blue로 염색하여 단백질 밴드를 확인하였다.

아미노산 분석

동결건조한 가수분해물 증류수에 녹여 아미노산 조성은 GC (HP6890N, SpectraLab Scientific Inc., USA)로 분석하

Table 1. Analysis conditions of gas chromatography

Instrument	HP6890N GC-FID
Column	ZB-AAA 10 m × 0.25 mm × 0.20 μm
Injection	250℃, 2 μL
Carrier gas	Helium, 1.5 ml/min
Oven Programs	110℃ to 240℃, 35℃/min
Detector	FID@320℃

였으며, 컬럼은 ZB-AAA (10 m × 0.25 mm × 0.20 μm), FID detector를 사용하였다. 분석 조건은 Table 1에 제시하였다. 이때 아미노산 표준용액은 Phenomenex사의 아미노산 표준 물질을 200 μmol/L로 제조하여 사용하였다. 아미노산의 함량은 표준용액에서 검출한 각각의 아미노산의 retention time 을 비교 분석한 후 내부표준법으로 결정하였다.

통계처리

모든 실험의 분석결과는 means ± SD로 표시하였으며, 통계처리는 SPSS package (Version 15.0, SPSS Inc., Chicago, USA)를 이용하여 분석하고 각 군 간의 유의성은 one-way ANOVA와 Duncan's multiple range test로 p < 0.05 수준에서 검정하였다.

결 과

단일효소 처리

홍게껍질 분말에 Protamex (P), Neutrase (N), Flavourzyme (F), Alcalase (A), Protease M (PM)과 Protease A (PA) 등 6종의 단일효소를 시료 양의 0.5% 농도로 처리하여 각 효소의 최적 온도와 최적 pH에서 24시간동안 가수분해 시킨 후 단백질 분해능을 비교하였다. 단백질 분해능은 가수분해물의 단백질 농도로 확인하였으며 단백질 농도는 Biuret assay와 280 nm assay 및 °Brix의 3가지 방법으로 분석하였다. Fig. 1에서 보듯이 Biuret assay로 확인한 단백질 분해능은 각각의 단일효소에 따라 현저한 차이를 보였다. PA 효소처리가 다른 단일효소처리에 비해 현저하게 높은 수준의 단백질 농도를 보였으며 그 다음은 P > PM > N > A > F 효소처리의 순으로 나타나 단백질 분해능이 가장 강력한 것으로 확인되었다 (p < 0.05). 280 nm assay에서 비색법으로 확인한 단백질 분해능은 PA 효소 처리시 다른 단일효소 처리에 비하여 단백질 농도가 가장 높은 수준이었고 그 다음이 A 효소처리였으며 PM, N, P, F의 효소 처리 시에는 유사한 수준이었다.

6종의 단일효소를 각각 처리하였을 때 °Brix로 분석한 단백질 분해능은 Fig. 2에서 보듯이 PA와 P 효소처리가 다른 단일효소처리에 비해 단백질 농도가 현저하게 높은 수준이었

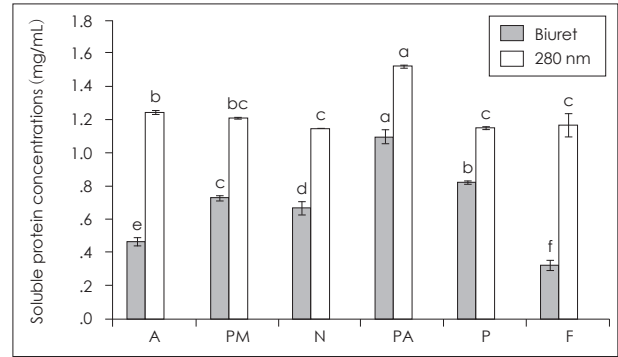


Fig. 1. Protein contents of red crab shell hydrolyzed with commercial proteases by Biuret and A280. Data represent the means ± SD, each values being the mean of triplicate assays. Values sharing same superscript are not significantly different by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range at p < 0.05. A: Alcalase, PM: Protease M, N: Neutrase PA: Protease A, P: Protamex, F: Flavourzyme.

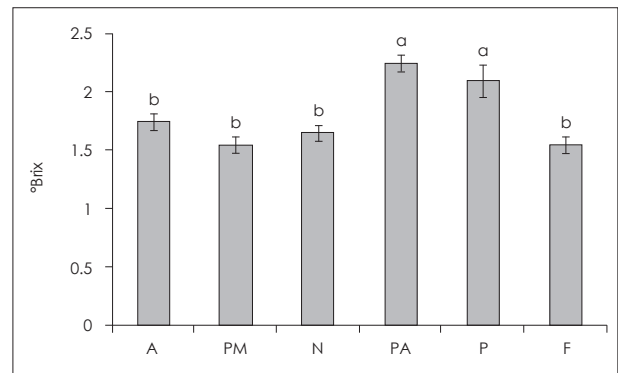


Fig. 2. °Brix of red crab shell hydrolyzates by commercial proteases. Refer to Fig. 1.

으나 두 효소 간의 차이는 보이지 않았다. 나머지 4종의 단일 효소 처리 시에서는 단백질 분해능은 유사한 수준으로 나타났다.

단백질 특성

홍게껍질 분말에 6종의 효소를 처리하여 획득한 가수분해물의 단백질 패턴 분석을 위한 SDS-PAGE를 실시한 결과는 Fig. 3에서 보듯이 단백질 분자량은 150 kDa 이하에서 밴드가 나타났다. A 효소로 처리한 가수분해물은 75 kDa 이하에서 5개의 밴드가 확인되었다. F 효소는 150~15 kDa 사이에 12개의 밴드를 형성하였고 150~100 kDa 사이에서도 2개의 밴드를 확인하였다. N 효소의 가수분해물에서는 150 kDa 미만에서 10개의 밴드가 형성되었고 15 kDa 미만에서도 밴드가 확인되었다. P 효소는 75 kDa 미만의 1개의 밴드와 30 kDa 미만에서 3개의 밴드를 형성하여 6종의 효소 중 가장 적은 단백질 밴드를 확인 할 수 있었다. PA 효소는 75 kDa의 9개의 밴드 중 4개의 밴드는 25 kDa 이하에서 형성되었다. PM 효소는 10개의 밴드 중 100~150 kDa의 밴드가 1개 형성되었

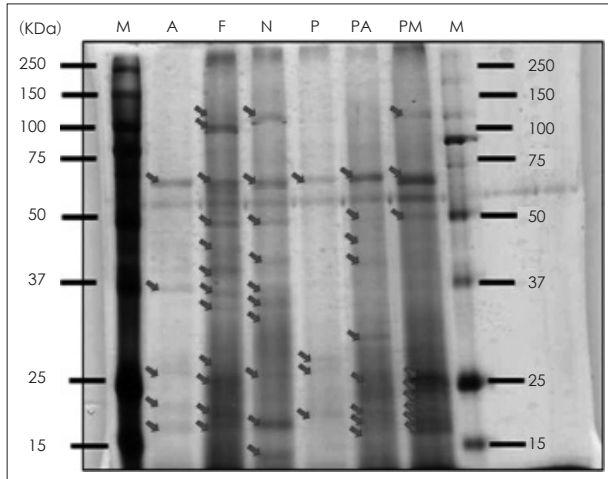


Fig. 3. SDS-PAGE patterns of red crab shell hydrolysates by commercial proteases. M: molecular marker. Refer to Fig. 1.

으며 15~25 kDa 크기의 밴드가 6개를 확인하였다. 홍게껍질에 효소처리 후 가수분해물의 단백질 밴드는 75 kDa 이하에서 주로 형성되는 것으로 나타났다. A와 P 및 PA 효소반응으로 생성된 단백질 가수분해물의 분자량은 75 kDa 미만의 폴리펩티드 또는 아미노산으로 분해된 것으로 나타났으나 F와 N 및 PM 효소를 처리하여 생성된 가수분해물에 존재하는 단백질은 100~150 kDa의 크기도 확인되었다.

Protease A 효소의 최적 조건

6종의 단백질 분해 효소 중 단백질 분해능이 가장 강력한 것으로 확인된 PA 효소의 최적 농도와 가수분해 시간을 결정하기 위해 홍게껍질 분말에 증류수를 가하여 15% 현탁액으로 만든 후 기질농도의 0.05, 0.5, 1%의 효소 농도로 처리하여 12시간, 24시간, 48시간, 그리고 72시간 동안 최적 pH (pH 7)와 최적온도 50°C에서 가수분해를 실시하였다. Biuret assay로 분석한 가수분해물의 단백질 농도는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 기질 농도에 대한 효소 농도가 0.05%에 비해 0.5%와 1.0%에서 시간 경과에 따른 현저하게 높은 분해능을 보였으나, 0.5%와 1.0%에서는 유사한 수준이었다. 효소처리 후 12시간 경과 후 단백질의 농도는 거의 완전한 증가를 보였다. 280 nm assay로 가수분해물의 단백질 농도를 측정 하였을 때, 기질 농도에 대한 효소 농도 0.05%에 비해 0.5%와 1.0%로 처리 시 유의적으로 증가하였으나 0.5%와 1.0% 처리 시에는 유사한 수준이었으며 효소처리 후 12시간 경과 시 현저한 증가를 보였으며 반응 시간이 증가할수록 단백질 분해능이 다소 증가하는 것으로 나타났으나 큰 차이는 보이지 않았다.

혼합효소 처리에 의한 단백질 분해

가장 단백분해능이 강력한 PA에 P, PM, F, A 효소를 각각 1대 1의 비로 혼합 (PA + P, PA + PM, PA + F, PA + A)하여

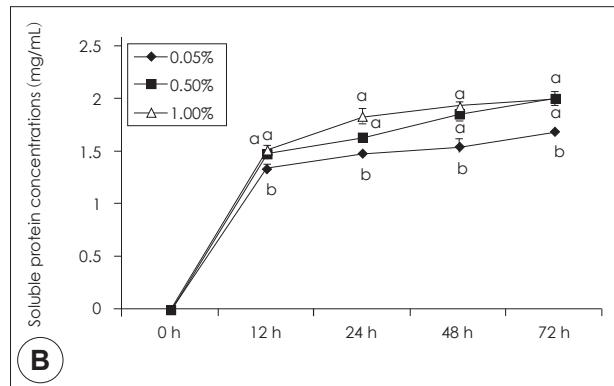
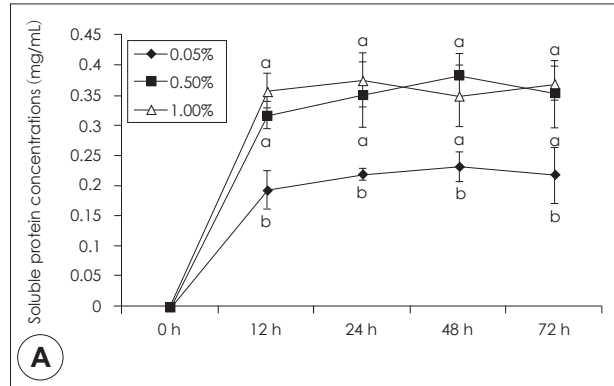


Fig. 4. Effects of incubation time and concentration of protease A on the hydrolysis of red crab shell. Panel A: Soluble protein concentrations by Biuret assay. Panel B: Soluble protein concentrations by 280 nm assay. Refer to Fig. 1.

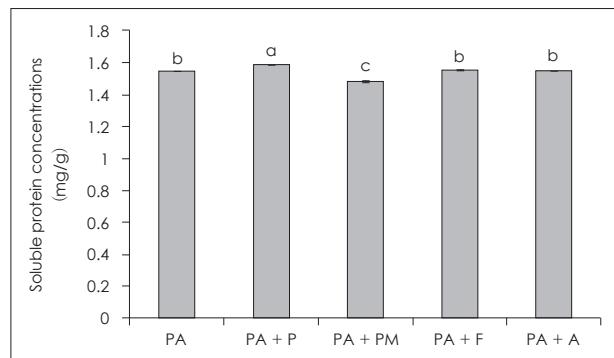


Fig. 5. Protein contents of red crab shell hydrolysates by commercial proteases. PA: Protease A, PA + P: Protease A + Protamex, PA + PM: Protease A + Protease M, PA + F: Protease A + Flavourzyme, PA + F: Protease A + Alcalase. Refer to Fig. 1.

홍게껍질의 단백질 분해능을 비교한 결과는 Fig. 5에 제시하였다. 각 혼합 효소를 기질의 0.5%의 농도로 첨가한 후 24시간 동안 반응시킨 후 280 nm assay로 측정된 단백질 농도는 단일효소를 처리한 PA는 PA + P 혼합효소 처리에 비해 낮은 수준이었으나, PA + F, PA + A의 혼합효소 처리와 유사한 수준이었고 PA + PM 혼합효소 처리보다는 높았다. 혼합효소 처리에서는 PA + P 효소가 가장 높은 단백질 분해능을 보인 반

면 PA + PM 효소 처리가 가장 낮은 단백질 분해능을 보여 PA + P 혼합효소 처리가 가장 단백분해능이 높았다.

유리아미노산 분석

Table 2는 혼합효소처리 한 홍게껍질 분말의 수용성 성분에 존재하는 아미노산 조성을 분석한 결과이며, 총 아미노산 함량은 PA + P 처리 시 247.411 mg/g으로 가장 높았고 그 다음이 PA + F (206.442 mg/g) > PA+A (133.385 mg/g) > PA + PM (59.131 mg/g) > PA 단일효소 처리는 총 아미노산 함량이 54.875 mg/g의 순으로 나타나 2가지 효소를 혼합하여 처리 시 단일효소 처리에 비해 높은 것을 확인할 수 있었다. PA

+ P 혼합효소 처리 시 phenylalanine 함량이 38.81 mg/g으로 가장 높았으며 glycine (29.066 mg/g) > alanine (27.978 mg/g) > leucine (27.173 mg/g) > lysine (25.001 mg/g) > isoleucine (19.355 mg/g)의 순이었다. Proline-hydroxyproline 이 0.704 mg/g 검출되었다. PA + PM 혼합효소처리는 phenylalanine (8.085 mg/g) > leucine (6.111 mg/g) > glycine (5.466 mg/g) > lysine (5.344 mg/g)의 순이었다. PA + F 혼합효소 처리에서는 alanine (30.945 mg/g) > glycine (25.406 mg/g) > phenylalanine (24.897 mg/g) > valine (20.173 mg/g) > isoleucine (18.178 mg/g)의 순으로 검출되었으며 proline-hydroxyproline이 0.486 mg/g 확인되었다. PA + A 혼합효소 처

Table 2. Amino acid composition of red crab shell hydrolysates by combination of proteases (mg/g)

	PA	PA + P	PA + PM	PA + F	PA + A
Valine	3.212	15.639	3.422	20.173	15.714
Leucine	6.111	27.173	6.111	14.076	0.633
Isolucine	4.015	19.355	4.008	18.178	- ¹⁾
Threonine	0.031	0.343	0.062	0.348	-
Methionine	3.028	12.652	3.038	9.228	0.509
Phenylalanine	7.082	38.81	8.085	24.897	5.164
Lysine	5.021	25.001	5.344	13.186	4.136
Tryptophan	2.054	8.573	2.095	3.597	0.214
Histidine	3.356	14.099	3.249	8.18	-
Alanine	4.001	27.978	4.247	30.945	22.893
Sarcosine	0.078	5.244	1.078	3.926	4.567
Glycine	4.616	29.066	5.466	25.406	11.969
α-Aminobutyric acid	0.033	0.616	0.163	0.552	2.016
β-Aminobutyric acid	-	-	-	-	-
Allo-Isoleucine	-	-	-	-	9.139
Serine	0.391	1.603	0.375	2.502	0.225
Proline	0.703	3.667	0.718	0.318	-
Asparagine	-	-	-	-	3.545
Thioprolin	0.422	1.681	0.458	1.373	-
Aspartic acid	0.111	0.58	0.101	0.542	0.861
4-Hydroxyproline	3.317	3.672	3.597	2.11	9.985
Glutamic acid	1.412	8.439	1.562	10.196	1.677
α-Amino adipic acid	-	-	-	1.003	30.866
α-Aminopimelic acid	-	-	-	-	-
Glutamine	0.655	2.516	0.69	0.738	-
Ornithine	-	-	-	-	0.788
Glycine-proline	5.226	-	5.262	14.482	-
Hydroxylysine	-	-	-	-	4.72
Tyrosine	-	-	-	-	-
Proline-hydroxyproline	-	0.704	-	0.486	-
Cystathionine	-	-	-	-	3.764
Cystine	-	-	-	-	-
Total free amino acids	54.875	247.411	59.131	206.442	133.385

1) not detected. PA: Protease A, PA + P: Protease A + Protamex, PA + PM: Protease A + Protease M, PA + F: Protease A + Flavourzyme, PA + A: Protease A + Alcalase

리는 α -aminoadipic acid 함량이 30.866 mg/g 수준으로 가장 높은 수준으로 검출되었으며 alanine (22.893 mg/g) > valine (15.714 mg/g) > glycine (11.969 mg/g)의 순이었다. PA + A 에서 다량으로 검출된 α -aminoadipic acid는 PA + F 혼합효소처리에서 1.003 mg/g 검출된 반면 PA, PA + P, PA + PM 효소 처리에서는 확인되지 않았다.

고 찰

본 연구는 폐기되는 홍계곶질의 단백질을 활용하기 위하여 단백질분해 효소로 처리하여 획득한 단백질의 분자량 및 아미노산 조성 등을 비교 분석하여 기능성 소재 및 보충제로서의 활용 가능성을 확인하고자 하였다. 가장 효과적인 상업효소의 종류를 결정하기 위하여 단백질 수율을 Biuret assay, 280 nm assay, °Brix로 비교하였다. Biuret assay는 알칼리 조건하에서 Cu^{2+} 가 단백질의 peptide nitrogen에 결합하여, 보라색의 착화합물을 생성하고, 540~560 nm에서 흡광을 나타내는 것을 이용한 방법으로 아미노산 조성에 따른 차이는 없으나 민감도가 낮은 것이 단점이라고 할 수 있다. UV 스펙트럼을 이용한 단백질 농도 측정법은 방향족 아미노산인 phenylalanine, tyrosine, tryptophan에 의한 280 nm에서 최대 흡광을 이용한 방법으로 빠르고 단백질 변성이 없는 장점이 있는 반면 완충액, pH, 염 등에 영향을 많이 받으며 아미노산 조성에 따라 값이 달라지는 단점이 있다. Biuret assay과 280 nm assay로 측정된 단백질 농도가 효소별로 나타나는 차이는 구성하고 있는 아미노산 조성에 따라 나타난 결과로 보인다. 280 nm에서 측정된 단백질 농도에서 다른 단일효소들에 비해 상대적으로 높은 수준을 보인 PA 효소와 P 효소처리 시 phenylalanine, tyrosine, tryptophan 등의 아미노산의 생성이 높을 것으로 보인다. °Brix로 분석한 6종의 단일효소를 각각 처리하였을 때 단백질 분해능은 PA와 P 효소가 단백질 농도가 현저하게 높은 수준이었으나 두 효소 간의 차이는 보이지 않았으며 다른 4종의 단일효소 간에는 단백질 분해능은 유사한 수준으로 나타나 280 nm에서 분석한 단백질 농도와 유사한 결과를 보여 혼합효소처리에서는 Biuret assay와 280 nm assay로 단백질 분해능을 분석하였다.

홍계곶질 분말에 6종의 단일효소를 처리한 가수분해물을 SDS-PAGE로 분석한 단백질 패턴은 단백질 분자량은 150 kDa 이하의 밴드를 형성하였다. A 효소로 처리한 가수분해물은 75 kDa 이하에서 5개의 밴드가 확인되었다. 홍계곶질에 효소처리 후 가수분해물의 단백질 밴드는 75 kDa 이하에서 주로 형성되는 것으로 나타났다. A와 P 및 PA 효소반응으로 생성된 단백질 가수분해물의 분자량은 75 kDa 미만의 폴리

펩티드 또는 아미노산으로 분해된 것으로 나타났으나 F와 N 및 PM 효소를 처리하여 생성된 가수분해물에 존재하는 단백질은 100~150 kDa의 크기도 확인되었으며, A와 P 및 PA 효소가 F와 N 및 PM 효소처리에 비해 더 작은 펩티드 또는 아미노산으로 분해시키는 것을 알 수 있다. 그리고 P와 PA 효소처리시 가수분해물의 단백질 함량에 비해 단백질 밴드가 적게 형성된 것은 15 kDa 이하의 작은 크기의 폴리펩티드 혹은 아미노산 형태로 분해된 것을 의미한다²²⁾고 할 수 있다. Treimo 등²³⁾은 맥주박의 경우 Alcalase와 같은 펩티드를 맥주박에 처리하였을 때 분자량이 10 kDa 미만의 폴리펩티드와 같은 물질들이 분류되었고 대부분의 단백질은 1 kDa 미만의 작은 펩티드나 아미노산의 형태로 분해가 되는 것으로 보고하였다. Kim 등²²⁾의 탈지미강 단백질의 가수분해 및 가수분해물 연구^{19,22)}에서도 효소처리를 한 시료에서는 어떠한 밴드도 형성이 되지 않았으며 이것은 탈지미강에 존재하는 단백질이 15 kDa 미만의 작은 크기의 폴리펩티드 혹은 아미노산 형태로 분해된 것을 의미한다고 하였다. 이러한 보고는 본 연구의 결과와 유사하였다.

단백질 분해효소는 처리 후 12시간 경과 후 단백질의 농도는 거의 완만한 증가를 보였으며 반응 시간이 증가할수록 단백질 분해능은 큰 차이를 보이지 않았다. 즉 반응초기에는 반응속도가 빠르다가 이후에 느려져 평형에 도달하는 전형적인 단백질 효소 분해 양상을 보였다. 이러한 반응곡선은 Jang 등³⁾의 홍계 가공부산물의 효소적 단백질 가수분해 및 Beak과 Cadwallader²⁴⁾의 가재 가공부산물의 효소적 가수분해에서 보고된 효소반응곡선과 유사하였다. Alder-Nissen²⁵⁾은 이런 형태의 반응곡선은 단백질과 가수분해에 의해 생성되는 펩티드와의 기질 경쟁에 의해 나타난다고 하였다. O'Meara와 Munro²⁶⁾는 반응초기에는 잘 분해되는 펩티드 결합이 빠르게 분해되고 반응 후반에는 잘 분해되지 않는 펩티드 결합이 분해되기 때문에 이러한 형태의 효소반응곡선이 나타난다고 하였다. Kim 등²⁷⁾의 녹용의 단백질가수분해 연구에서 단일효소 처리 시 단백질 분해능이 가장 강력한 A 효소를 효소의 농도 및 처리 시간에 따른 영향 조사 결과는 본 연구 결과와 유사하였다. Lee 등²⁸⁾은 기질에 대해 어느 정도 이상의 효소계를 첨가했을 때 증가하는 효소계의 농도에 비하여 가수분해율이 크지 않았다고 보고하였다. 이상의 결과로 PA 효소 처리에 의한 홍계곶질 단백질 가수분해물의 단백질 농도가 24시간 경과 후부터 큰 변화를 보이지 않았으므로 본 연구에서는 최적 가수분해를 위한 효소의 농도와 시간을 기질 농도에 대한 효소 농도 0.5%와 24시간으로 결정하였다.

가장 단백질분해능이 강력한 PA에 P, PM, F, A 효소를 각각 1대 1의 비로 혼합 (PA + P, PA + PM, PA + F, PA + A)하여

홍계겉질 분말의 0.5%의 농도로 첨가하여 24시간 동안 반응시킨 후 280 nm에서 측정된 단백질 분해능은 단일효소를 처리한 PA는 PA + P 혼합효소에 비해 낮은 수준이었으나, PA + F, PA + A의 혼합효소를 처리와 유사한 수준이었고 PA + PM 혼합효소 처리보다는 높았다. 혼합효소 처리에서는 다른 혼합효소 처리에 비해 PA + P 혼합효소가 가장 높은 단백질 분해능을 보인 반면 PA + PM 혼합효소 처리가 가장 낮은 단백질 분해능을 보여 PA + P 혼합효소 처리가 가장 단백질분해능이 높았다.

Kim 등²²은 다양한 상업적 Protease에 의한 탈지미강 단백질의 가수분해 연구에서 단일효소 처리에서 가장 분해력이 높았던 Protease N에 비해 효소들을 두 개씩 혼합하여 단백질을 분해하여도 상승효과가 뚜렷한 것으로 보고하였다. 이러한 결과는 상업적으로 사용되는 protease의 경우 endo- 또는 exo- 형태로 분해할 수 있는 아미노산이 달라 Protease N 이나 Protease M 또는 Protease A가 각각 분해하지 못했던 아미노산을 분해하여 상승효과가 나타났다고 하였다.²² Gu 등²⁹은 녹두에 전분분해효소와 단백질 분해효소를 혼합하여 처리하였을 때 조단백 함량이 가장 높게 나타났다고 보고하였다. Kim 등¹⁹은 녹용의 단백질 가수분해 및 추출조건에 따른 특성 변화 연구에서 단백질 가수분해 효소 ProteAX와 전분 및 단백질 가수분해 복합효소 KFEN을 혼합처리시 전분과 단백질 가용성 성분의 용출이 촉진되므로 ProteAX와 KFEN을 혼합처리 하는 것이 녹용성분 추출에 효과적이었다고 하였다. 이러한 결과는 본 연구 결과와 유사하였다.

홍계겉질 분말에 단백질 분해효소를 혼합처리한 후의 아미노산 분석에서 총 아미노산 함량은 PA + P (247.411 mg/g) > PA + F (206.442 mg/g) > PA + A (133.385 mg/g) > PA + PM (59.131 mg/g) > PA (54.875 mg/g)의 순으로 나타나 2 가지 효소의 혼합처리가 PA 단일효소를 처리에 비해 높은 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 280 nm assay로 분석한 단백질 농도에서 PA 단일효소 처리가 PA + F와 PA + A 혼합효소와 유사한 결과를 보인 것은 실험 오차에 기인한 것으로 생각된다. PA + PM 혼합효소 처리는 PA 단일효소처리보다 낮은 아미노산 함량을 보여 폴리펩티드가 아미노산으로 분해되지 못해 펩티드 형태로 존재하는 것으로 보인다. 쌀 시럽 박의 단백질 가수분해 특성 연구에서 Kim 등¹⁹은 Protease M은 단백질을 분해할 때 펩티드와 아미노산을 동시에 생성하고 자신이 생성한 펩티드를 다시 아미노산으로 분해하는 특성이 있으므로 이러한 특징으로 인해 효소를 혼합하였을 때 그 값이 단일효소 처리 시와 유사한 것으로 판단된다고 하였다.

혼합효소를 처리한 홍계겉질 분말의 수용성 성분에 존재하는 아미노산 조성은 혼합효소의 종류에 따른 특정 패턴은

보이지 않았으나 사용 효소에 따라 생성된 아미노산 조성은 다소 차이가 있었다. 홍계겉질 분말에 PA + P와 PA + F의 단백질 분해효소를 혼합하여 가수분해시 생성되는 아미노산은 필수 아미노산인 phenylalanine, leucine, lysine, isoleucine의 함량이 다소 높았다. 아미노산 중에서 glutamic acid, proline, alanine, glycine, lysine, arginine 등은 어패류의 독특한 풍미에 큰 구실을 한다고 하였으며,⁶ PA + F 혼합효소 처리에서 상대적으로 높은 수준이었다. F는 exopeptide로 단백질 가수분해시 쓴맛을 나타내는 펩티드의 생성을 최소화하는데 유리한 효소로 알려져 있다.³ 본 연구에서는 단맛의 발현에 영향을 주는 aspartic acid와 glutamic acid 함량에 비해 쓴맛에 영향을 주는 valine, leucine, isoleucine, phenylalanine 등의 함량이 높아 홍계겉질 가수분해물은 쓴맛이 강할 것으로 예상된다.¹⁹

이상의 결과에서 PA + P와 PA + F 혼합효소 처리 시 생성되는 아미노산의 함량이 각각 247.411 mg/g과 206.442 mg/g으로 높은 수준이었으며 가수분해 시 생성되는 아미노산은 필수 아미노산인 phenylalanine, leucine, lysine, isoleucine의 함량이 높았으며 쌀을 주식으로 하는 우리나라 사람들에게 부족되기 쉬운 lysine의 함량 (PA + P 27.173 mg/g, PA + F 13.186 mg/g)이 높아 영양보충제로서의 사용이 가능할 것으로 보인다. 또한 많은 연구자들은 단백질이 단백질 분해효소에 의해 가수분해되어 작은 펩티드를 형성하므로써 질병예방 및 기능적 효능을 갖춘 다양한 식품소재로서 재평가되고 있다.^{10,11,13} 고 보고하고 있으므로 생성된 가수분해물의 기능성 소재로서의 활용을 위해 앞으로 이들의 생리활성에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각된다. 또한 PA + A 혼합효소로 생성되는 α -amino adipic acid는 생화학 및 의학의 소재로서의 활용이 가능할 것으로 보인다. 따라서, 본 연구에서 얻어진 결과를 이용하여 유용한 생리기능을 검색하고 확인하는 연구가 진행된다면 더 나은 기능성 소재로서의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 폐기되는 홍계겉질의 단백질을 활용하기 위하여 홍계겉질 분말에 상업적으로 사용하는 6가지 protease를 단일 또는 혼합처리하여 획득한 가용성 가수분해물의 분자량 및 아미노산 조성 등을 비교 분석하여 기능성 소재 및 보충제로서의 활용 가능성을 확인하고자 하였다. 단일효소 6종 중 단백질 분해능은 Biuret assay과 280 nm assay 및 °Brix로 분석한 결과 Protease A (PA)가 현저하게 높았다. 단일효소 처리로 생성된 가수분해물의 단백질 분자량은 150 kDa 이

하의 밴드를 형성하였다. 단일효소 중 단백질 분해능이 가장 강력한 PA의 최적 가수분해 조건을 선정하여 PA에 Protamex (P), Flavourzyme (F), Alcalase (A), Protease M (PM)과 Protease A (PA)를 1대 1의 비로 혼합 (PA + P, PA + PM, PA + F, PA + A)하여 GC로 아미노산 조성을 확인하였다. 총 아미노산 함량은 PA + P 247,411 mg/g > PA + F (206,442 mg/g) > PA + A (133,385 mg/g) > PA + PM (59,131 mg/g) > PA (54,875 mg/g)의 순으로 혼합효소처리가 단일효소처리에 비해 높은 것을 확인할 수 있었다. 혼합효소처리 한 홍계깍질의 아미노산 조성은 사용 효소에 따라 다소 차이가 있었다. 주로 phenylalanine, glycine, alanine, leucine의 함량이 높았으며 tyrosine, cystine은 검출되지 않았다. 쌀을 주식으로 하는 우리나라 사람들에게 부족되기 쉬운 필수 아미노산인 lysine, phenylalanine, leucine, isoleucine의 함량이 높아 아미노산 보충효과를 기대할 수 있을 것으로 보인다.

Literature cited

- Kim HS, Choi SG, Park CH, Han BW, Yang SK, Kang KT, Oh HS, Heu MS, Kim JS. Preparation and characteristics of surimi gel with red-tanner crab (*Chionoecetes japonicus*) paste. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2005; 34(7): 1103-1108
- Seoung TJ, Choi SK, Byun GI. Studies on the processing of sauce by using red crab shell. *Korean J Food Cult* 2008; 23(6): 667-680
- Jang JT, Seo WH, Baek HH. Enzymatic hydrolysis optimization of a snow crab processing by-product. *Korean J Food Sci Technol* 2009; 41(6): 622-627
- Meyer SP, Chen HM, No HK, Lee KS. An integrated approach to recovery and utilization of Louisiana crawfish processing wastes. Making profits out of seafood wastes: Proceedings of the international conference on fish by-products; 1990 Apr 25-27. Anchorage, USA. Fairbanks: Alaska Sea Grant College Program, University of Alaska Fairbanks; 1990
- Kim MJ, Nahmgung B, Kim BN, Lee SJ, Kim CJ, Cho YJ, Kim CT. Preparation and physicochemical characteristics of anchovy hydrolysates produced by high hydrostatic pressure and enzymatic hydrolysis treatment. *Food Eng Prog* 2009; 13(2): 85-91
- Lee YC, Kim DS, Kim YD, Kim YM. Preparation of oyster (*Crassostrea gigas*) and sea mussel (*Mytilus coruscus*) hydrolysates using commercial protease. *Korean J Food Sci Technol* 1990; 22(3): 234-240
- Seoung TJ, Choi SK, Byun GI. Studies on the processing of sauce by using red crab shell. *Korean J Food Cult* 2008; 23(6): 667-680
- Kim YJ, Shin TS, Oh HI. Solubility, emulsion capacity, and emulsion stability of protein recovered from red crab processing water. *Korean J Food Nutr* 1996; 9(3): 319-324
- Kim YJ, Shin TS, Oh HI. Foaming capacity and foaming stability of protein recovered from red crab processing water. *Korean J Food Nutr* 1996; 9(3): 325-330
- Park HK. In vitro antineoplastic effects of chitosan hydrolysates on various tumor cell lines. *Korean J Food Nutr* 2009; 22(4): 639-643
- Yoon YC, An SI, Jeong AR, Han SE, Kim MH, Lee CK. Characteristics of whey protein (WPC-30) hydrolysate from cheese whey. *J Anim Sci Technol* 2010; 52(5): 435-440
- Jang SY, Sin KA, Park NY, Bang KW, Jeong YJ. Protein changes in soymilk and whole soymilk due to enzymatic hydrolysis. *Korean J Food Preserv* 2008; 15(6): 903-908
- Jang SY, Gu YA, Park NY, Kim IS, Jeong YJ. Physicochemical property changes of whole soymilk dependent on hydrolysis conditions. *Korean J Food Preserv* 2007; 14(4): 394-399
- Woo SH, Jhoo JW, Kim GY. Antioxidant activity of low molecular peptides derived from milk protein. *J Korean Soc Food Sci Anim Resour* 2009; 29(5): 633-639
- Lee WB. Study on the free radical scavenging activity of enzymatic extracts from velvet antler of elk (*Cervus Canadensis*) [MS dissertation]. Seoul: Konkuk University; 2007
- Choi SK, Choi H, Lee JS. The characteristics of brown stock prepared by high pressure cooking. *J East Asian Soc Diet Life* 2001; 11(4): 281-288
- Kang SI. Studies on the comparison of characteristics of fond de boeuf brun (beef brown stock) prepared by the traditional and the high pressure extraction methods [Ph. D. dissertation]. Gangneung: Kangnung National University; 2006
- Bae GK, Byun GI, Choi SK. Quality characteristics of fish, crab and red-crab stock prepared by high pressure extract method. *Korean J Culinary Res* 2007; 13(4): 293-304
- Kim CW, Kim HS, Kim BY, Baik MY. Proteolysis of defatted rice bran using commercial proteases and characterization of its hydrolysates. *Food Eng Prog* 2011; 15(1): 41-47
- Sargent MG. Fiftyfold amplification of the Lowry protein assay. *Anal Biochem* 1987; 163(2): 476-481
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680-685
- Kim CW, Park JW, Choi HJ, Han BK, Yoo SS, Kim BY, Baik MY, Kim YR. Hydrolysis of rice syrup meal using various commercial proteases. *J Life Sci* 2011; 21(2): 309-315
- Treimo J, Westereng B, Horn SJ, Forssell P, Robertson JA, Faulds CB, Waldron KW, Buchert J, Eijlsink VG. Enzymatic solubilization of brewers' spent grain by combined action of carbohydrases and peptidases. *J Agric Food Chem* 2009; 57(8): 3316-3324
- Beak HH, Cadwallader KR. Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products. *J Food Sci* 1995; 60(5): 929-935
- Adler-Nissen J. Enzymic hydrolysis of food proteins. New York: Elsevier Science Publishing Co.; 1986. p.57-109
- O'Meara GM, Munro PA. Selection of a proteolytic enzyme to solubilize lean beef tissue. *Enzyme Microb Technol* 1984; 6(4): 181-185
- Kim JH, Yoo CJ, Sin KA, Jang SY, Park NY, Jeong YJ. Changes in properties of deer antler by proteolysis and extraction conditions. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2011; 40(1): 89-93
- Lee SH, Cho YJ, Kim S, Ahn BJ, Choi C. Optimal conditions for the enzymatic hydrolysis of isolated sesame meal protein. *Agric Chem Biotechnol* 1995; 38(3): 248-253
- Gu YA, Jang SY, Park NY, Mun CR, Kin OM, Jeong YJ. Property changes of mung bean depending on hydrolysis conditions. *Korean J Food Preserv* 2006; 13(5): 563-568