
博士學位論文

連續式 膜反應器를 이용한 가자미皮 젤라틴의
酵素的 修飾 및 利用

濟州大學校 大學院

食品工學科



1992年 6月

連續式 膜反應器를 이용한 가자미皮 젤라틴의
酵素的 修飾 및 利用

指導教授 宋 大 鎭

姜 泰 中

이 論文을 工學博士學位 論文으로 提出함.

1992年 6月

姜泰中の 工學博士學位 論文을 認准함.

JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

審査委員長	姜 永 周
委 員	申 錫 雨
委 員	河 璣 桓
委 員	金 世 權
委 員	宋 大 鎭

濟州大學校 大學院

1992年 6月

ENZYMATIC MODIFICATION OF FLOUNDER
SKIN GELATIN IN A CONTINUOUS
MEMBRANE REACTOR AND ITS UTILIZATION

Tae-Jung Kang
(Supervised by Professor Dae-Jin Song)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIRMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF ENGINEERING

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1992. 6

목 차

ABSTRACT	1
I. 서 론	4
II. 재료 및 방법	10
1. 재료	10
2. 방법	10
(1) 어피 전처리	10
(2) 젤라틴 제조	10
(3) 일반성분 및 물리적 성질 측정	11
1) 일반성분 분석 및 무기질 함량	11
2) 물리적 성질 측정	11
① 응고점과 용점	11
② Jelly 강도	13
③ 점도	13
④ 등전점	13
⑤ 탁도 및 전기전도도	14
(4) 분자량 측정	14
1) SDS-PAGE 분석법	14
2) Gel 여과법	16
(5) 회분식 반응기에서 젤라틴 가수분해물 제조	16
1) 최적 가수분해 효소의 선별	16
2) 젤라틴의 회분식 가수분해	17
3) 아미노산 분석	17
(6) 연속적 막반응기를 이용한 젤라틴의 가수분해	19

1) 연속식 막반응기 장치	19
① pH 및 온도조절	19
② 중공사막(Hollow fibre membrane)	22
③ 유출속도의 조절	22
④ 유출속도에 미치는 순환속도의 측정	22
⑤ 유출속도에 미치는 압력의 측정	22
⑥ 기질공급과 반응부피 조절	22
2) 회분식에서의 반응속도 상수(K_m , V_{max}) 측정	26
3) 연속식 막반응기에서의 반응속도 상수 측정	26
4) 연속식 막반응기에서 젤라틴 가수분해 조건	26
① 효소농도	26
② 기질농도	27
③ 유출량(Flux)	27
④ 반응용액의 부피	27
5) 연속식 막반응기 작동시 효소의 안정성에 미치는 인자	27
① 온도의 영향	28
② 기계적인 전단응력에 의한 영향	28
③ 중공사 막에 의한 영향	28
④ 효소의 누출	28
6) Fouling 성질 측정	29
7) 기질농도의 한계	29
8) 연속식 막반응기에서의 생성량 측정	30
(7) 연속식 막반응기로 제조한 가자미피 젤라틴 가수분해물을 이용한	
조미간장 및 복합조미료 제조	30
1) 조미간장의 제조	30
2) 복합조미료의 제조	31

3) 관능검사	31
Ⅲ. 결과 및 고찰	33
1. 젤라틴 추출 조건	33
(1) 첨가수량	33
(2) 추출시간	33
(3) 추출온도	36
(4) 추출용액의 pH	36
2. 분자량	39
3. 일반성분 및 물리적 성질	39
(1) 일반성분 및 중금속 함량	39
(2) 물리적 성질	42
4. 회분식에 의한 젤라틴의 가수분해	44
(1) 효소 선별	44
(2) 젤라틴의 가수분해 조건	44
1) 반응온도	44
2) 반응용액의 pH	46
3) 반응시간	49
4) 효소농도	49
(3) 분자량	52
(4) 가수분해물의 일반성분 및 점도	55
(5) 아미노산 조성	58
5. 연속식 막반응기를 이용한 젤라틴의 가수분해	60
(1) 막반응기장치 조건 설정	60
(2) 회분식 반응기에서 젤라틴에 대한 trypsin의 반응속도 상수	61
(3) 연속식 막반응기에서 젤라틴에 대한 trypsin의 반응속도 상수	61
(4) 연속식 막반응기에서의 젤라틴 가수분해 조건	65

1) 효소농도	65
2) 기질농도	67
3) 반응부피 및 유출속도	71
4) 잔류시간	71
(5) 연속식 막반응기에서의 효소 안정성에 미치는 인자	75
1) 효소의 열안정성	75
2) 기계적인 전단응력에 의한 영향	75
3) 효소의 누출	79
(6) Fouling 성질	79
(7) 고 기질농도의 한계	83
(8) 생산량(Productivity)	83
(9) 분자량	86
6. 가자미피 젤라틴 가수분해물로 제조한 조미간장 및 복합조미료	86
IV. 결론 및 요약	95
V. 참고 문헌	98
VI. 감사의 글	111



ABSTRACT

The gelatins was extracted from flounder(*Limanda aspera*) skin by alkaline(B-type) or enzyme(E-type) pretreatment for effective utilization of fish skin wasted from marine manufactory. E-type was compared with B-type in terms of extraction conditions, physical properties and molecular weights. In addition the enzymatic hydrolysis conditions of two types of gelatins by trypsin were investigated in batch reactor, and the yield and kinetics of the hydrolysates were compared. A continuous membrane reactor(CMR) was developed and optimized for the production of E-type gelatin hydrolysates. The development of the natural seasoning using the hydrolysate has also been accomplished. The results were summerized as follows :

1. The optimal extraction conditions of the B-type gelatin were 9 times in added water(w/w), 3 hrs in extraction time, 60°C in extraction temperature and pH 5 in hydrogen ion concentration. The maximum amount of E-type gelatin was extracted at 60°C for 3 hours using water controlled to pH 6(material : water = 1 : 9, w/w). The yields of the B- and E-type gelatin were 64.2% and 59.2%, respectively. The B-type was superior to the E-type in physical properties such as jelly strength, viscosity and electric conductivity. Molecular weight of B-type was greatly larger than that of the E-type. Hydrolysis ratio of the E-type was higher than that of the B-type because of its molecular weight.

2. The proteolytic conditions of the gelatins(B-type and E-type) by

trypsin in batch reactor were as follows : reaction temperature, 55°C; pH, 9.0; enzyme concentration, 0.1% ; reaction time, 4hrs for B-type and 1hr for E-type. The degrees of hydrolysis of the B-type and E-type gelatin under the above conditions were 63% and 82%, respectively. The major molecular weights of the hydrolysates were 15,000 dalton for B-type and 12,400 dalton for E-type. 57% of the total amino acid in the hydrolysates was glycine, alanine, proline, hydroxyproline and serine having a sweet taste, while 18% was valine, leucine, phenylalanine, tyrosine, methionine, arginine and histidine having a bitter taste.

3. The K_m value of the CMR was 2.4 times higher than that of the batch reactor, indicating reduced enzyme affinity for the substrate. The K_2 value of the CMR was 8.5 times lower than that of the batch process, showing a significant reduction in trypsin activity in the CMR. The optimum operating conditions for the CMR process were 55°C, pH 9.0, flux 7.79ml/min, residence time 77min, and trypsin to substrate ratio, 0.01(w/w). After operating for 60min under the above conditions, 79% of the total amount of initial gelatin was hydrolysed. Enzyme leakage was observed through the 10,000 MWCO membrane after the 20min of reactor operation, while none occurred after 5hr. Total enzyme leakage was about 12.95% at 55°C for 5hrs. However, there was no apparent correlation between enzyme leakage and substrate hydrolysis. The membrane has a significant effect on trypsin activity loss for 60min of the CMR operation. The CMR operating with the membrane lost 34% of the initial activity versus a 23% loss of activity after 3hr in the CR lacking the

membrane. The measurement of fouling property showed that relative flux reduction was 91% and flux recover rate was 92% at 10% substrate solution. The productivity (378.85mg product/mg enzyme) of the CMR was more than 4 times higher than that of the batch reactor at 55°C. The major molecular weights of the gelatin hydrolysate estimated by gel filtration were 7,500 and 3,500.

4. Base on the sensory evaluation, imitation sauce added 20% fermented soy sauce prepared from gelatin hydrolysate was similar to the traditional soybean sauce in product quality. The complex seasoning containing 34.15% of the hydrolysate was also similar to complex seasoning on the markets.



I. 서 론

2000년이 되면 세계 단백질 수요량은 6,500만톤으로 증가될 것으로 예상하며(FAO), 그 부족량은 2,000만톤에 달할 것이라고 보고하고 있다(Wells, 1973). 단백질 부족은 선진국을 제외하고는 거의 전 세계적인 현상이며, 아시아 및 아프리카 지역의 Kwashiorkor병과 같은 영양장애 현상과 성장기 아동에게 심각한 문제로 대두되고 있다. UN Protein Advisory Group(PAG)은 가격이 저렴하고 영양가가 풍부한 새로운 단백질원의 개발과 실제 식량으로 식품에 첨가되었을 때 영향을 미치는 기능적 성질에 관한 연구를 우선적으로 제안한 바 있다(박, 1986).

따라서 최근 새로운 단백질 자원의 개발 또는 기존 단백질원의 유효 이용이 중요한 과제가 되고 있다. 그러나 식품학적인 입장에서 보면 새로 개발된 단백질원이 영양과 안전성이 우수하다고 해도, 산업적 실용면에서는 효용가치가 없는 것이 많다(Lawrie, 1973). 그 한 예가 농축어류단백질(FPC)이다. FPC는 1950년대부터 국제연합의 후원으로 개발된 영양적으로 우수한 단백질이지만 친수성과 가공적성의 부족으로 식품으로의 이용에는 어려움이 있어 아직도 산업적 생산에는 성공하지 못하고 있는 실정이다(Suzuki, 1978).

따라서 최근에는 기능적 특성이 좋은 여러가지 개량 FPC의 제조에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다(Hevia, 1976, Miller와 Gromiger, 1976, 김 등, 1988, Qrskov 등, 1982, Quagliaand Orban, 1987). 이들은 단백질분해효소를 이용하여 얻어진 가수분해물을 환자의 영양강화제 등의 의약품, 화장품 또는 기능성이 요구되는 식품소재로서의 이용에 관한 시도이다. 그 중에서도 우유단백질의 가수분해물의 항원을 파괴하는데 효과적이라는 것이 밝혀졌다. (Otani 등, 1985, Jost 등, 1987)

단백질을 산이나 알칼리로 처리하는 경우 여러가지의 문제가 야기되는데 산으로 가수분해할 경우 tryptophan과 같은 필수 아미노산과 cysteine이 분해소실되며(Kinsella, 1979) 알칼리로 분해할 경우는 lysinoalanine [N-DL-(amino-2-carboxyethyl)-L-lysine]과 같은 독성물질이 생성되어 안전성 문제가 대두되고 있다(Deng 등, 1990).

단백질의 효소적 가수분해에서 회분식 공정은 장치가 간단하고 조작이 단순하며 고농도의 기질을 사용할 수 있으나, 많은 양의 효소가 필요하며 높은 에너지와 노동력이 필요하다. 그리고 최종 생성물의 저해작용 때문에 수율이 적으며, 최종 생성물의 기능적인 생성을 조절할 수 없는 단점도 있다(Deeslie와 Cheryan, 1981). 이러한 단점의 해결을 위해 효소를 물리화학적으로 고정체표면에 고정화시키므로 단백질을 연속적으로 가수분해시킬 수 있으나, 고정화 방법이 까다롭고 고정화하는데는 입체장애에 의한 활성저하(10%~90%)가 일어난다(Cheryan, M. and Mehaia, M. A., 1986).

현재 수산가공공장에서 원료육을 채취하고 남어지 버려지는 두부, 어피, 내장, 뼈 등의 폐기물의 양이 전어체의 절반 이상을 차지한다. 그리고 가식부라도 수세 등의 공정에서 많은 수용성 단백질 scum(부상분리물) 및 어유 등이 폐기액과 함께 씻겨져 나간다. 그래서 이런 수산물 폐기물중 BOD 및 COD 상승의 직접적인 원인이 되어 환경문제를 야기시키는 수용성 단백질을 천연응집제나 산 알칼리응집제에 의한 회수와 식용화(松本, 1980), 실용규모의 scum회수와 사료로서의 이용 및 어유의 회수 이용이 강구되고 있고(藤井, 1980) 또한 이들 폐액을 효모로 처리하여 BOD 등을 낮추면서 이때 다량 생성되는 효모를 다시 회수하여 SCP(single cell protein)로서 식량이나 사료로서 이용하려는 연구(吉澤, 1981) 등이 활발히 진행되고 있다. 그리고 이보다 양적으로 훨씬 많은 가공 잔사에 대해서는 三宅(1982a, 1982b, 1982c, 1982d)의 어류 가공잔사의 효소처리에 의한 가용화 연구가 있다. 이들 연구는 가공잔사에 붙어 있는 단백질을 효소를 이용하여 회수할 경우 쓴맛이 문제

가 되므로 이에 관한 masking 방법 또는 발효처리에 의한 쓴맛을 감소시키는 연구이다.

Onoue와 Riddle(1973)은 어류 폐기물의 펩신 가수분해물을 기질로 하여 합성효소로 pH5에서 plastein의 합성을 보고하였으며, 캐나다의 Paksakulthai 등(1986)은 방어(Male Capelin)를 원료로 효소를 이용한 fish sauce 제조에 대하여 연구한 바 있다. 岩下(1986)는 콜라겐이 많은 동물 단백질을 가수분해하여 얻은 아미노산 엑기스의 가공법에 대하여 보고하였는데 주로 돼지와 닭의 육부위와 뼈를 원료로 하여 제조한 조미료에 대하여 소개하고 있다.

어육단백질의 가수분해에 관한 연구는 Sen 등(1962)은 peptones생산시 발효배지로 이용하기 위해 어육단백질을 papain으로 가수분해를 최초로 시도하였으며, Hale(1969)은 20여종의 시판 protease로 이들의 각각 최적조건하에서 어육단백질을 분해시켜 용해성을 측정한 결과, 미생물 효소중 pronase가 용해성이 가장 높았으나, 가격이 너무 비싸므로 박테리아에서 분리된 중성 protease가 적당하고 보고하였고, Cheftel(1971)은 회분식 반응기에서 pronase로 어육단백질의 가수분해에 대하여 보고한 바 있다. Satterlee 등(1973)은 소와 돼지피의 가수분해물이 meat emulsions에서 binder로서 이용될 수 있다고 하였고, Monsheimer와 Pfleiderer(1981)는 피혁폐기물을 미생물 protease로 가수분해를 시도하였으며, Appleman(1973)은 카제인 가수분해물에 젤라틴 가수분해물을 혼합하여 관능적으로나 영양적으로 우수한 음료를 만들 수 있었다고 보고하였다. 젤라틴과 다른 단백질을 동시에 가수분해시켰을 때 맛이 좋아졌다는 여러 보고가 있으며 (Schwille 등, 1977 ; Ney, 1979 ; Stanley, 1981), 젤라틴가수분해물은 주로 비식용분야에 이용되고 있지만(Adler-Nissen, 1986) 몇년전부터 구미에서는 diet용 첨가제로 많이 사용되고 있다. (Brozan, 1977). 그러나 어피에서 추출한 gelatin의 가수분해에 관한 보고는 아직 없다.

Biotechnology가 실험실 단계에서 공장생산으로 이행하기 위해서는 분리 정제기술이 선행되어야 한다는 사실이 인식됨에 따라 새로운 분리기술의 개발에 세계적인 관심이 집중되고 있다. 최근 미국, 영국 및 네델란드 등 구미 선진국에서는 매년 막분리기술에 관련된 심포지움이 열리고 있는 실정이다 (Govind and Itoh, 1989). 대표적인 것으로는 Cheryan(1983a)은 막분리기술을 bioreactor에 응용시킨 membrane bioreactor 장치를 개발하여 최초로 미국특허를 얻었고, 막반응기를 이용한 기능성 식품개발(Cheryan, 1983b), 젖산생산(Mehaia and Cheryan, 1986) 및 에틸알콜 생산(Cheryan and Mehaia, 1987)에 관한 연구 보고가 있다.

일본에서도 1982년부터 농수성(農水省)의 보조금을 받아 식품산업의 막이용기술 연구조합(식품회사 18사, 막제조회사 15사)이 설립되어 유가공, 과일가공, 동물성 단백질, 대두 단백질의 이용 분야 등에 대하여 활발한 연구가 이루어지고 있다(김, 1986). 이 조합은 1989년도 연구과제로는 전분당의 제조, glucosyl-cyclodextrin의 제조, 수분활성 조정용 당물질의 개발, 소당류의 제조, 소맥구르텐으로부터 식품소재의 개발, 두유를 원료로한 신식품 개발, 대두, 우유, 혈액으로부터 기능성 단백질의 제조, 어류단백질의 분해, 천연 조미료의 제조, 식용유지의 기능성 부여, 대두 레시틴(lecithin)의 개량, 수용성 meat flavor의 개발, 어유에 의한 식품소재의 제조 등 20여 과제를 수행한 바 있다(Kainuma, 1989). 이와 같이 구미선진국과 일본에서는 막분리기술의 식품공업에의 응용에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

동물의 뼈나 피부 등을 이루고 있는 섬유상 단백질인 콜라겐을 가열 추출하면 아교 또는 젤라틴이 얻어지며 이들은 주로 type I 콜라겐으로 제조된다(Nishio와 Hayashi, 1987). 젤라틴 제조방법에 관한 연구로는 Ames(1949)가 건조된 소의 건(tendom)을 이용하여 수산화칼슘의 침지시간과 젤라틴의 수율 및 겔 강도와와의 관계를, Veis와 Cohen(1955)은 우피를 이용하여 추출용액의 pH가 수율에 미치는 영향에 대하여, Shirley 등(1962)은 곰

상어의 껍질 및 뼈를 이용하여 젤라틴 제조 및 이용, 그리고 高稿 등(1989)은 신선한 돼지뼈를 원료로하여 EDTA를 이용한 탈석회 처리가 수율 및 겔강도에 미치는 영향을 보고한 바 있다. 현재 각 분야에서 이용되고 있는 젤라틴은 주로 육상동물 콜라겐으로 제조된 것이고 어류의 뼈나 껍질로 제조된 젤라틴, 특히 어교(漁膠)는 잘 사용되고 있지 않은데, 상어피는 우피에 비하여 콜라겐의 함량이 낮고 불순단백질이 많으며, proline과 hydroxyproline의 함량이 적어서 내열성이 낮고 겔화력도 약하기 때문이다(浜田, 1990). 국내에서는 어피를 이용하여 어교나 젤라틴 제조에 관한 연구는 이 등(1977, 1978)과 김(1968, 1972)에 의하여 보고된 몇가지에 불과하다.

우리나라 수산가공 공장에서 나오는 연간 약 30만톤의 어피가 일부 사료 또는 비료로 이용되거나 아니면 대부분 폐기되어 환경오염을 야기시키고 있으므로 보다 효율적인 어피 이용에 관한 연구가 절실히 요망되는 실정이다. 어피 단백질 중 80%정도 차지하고 있는 콜라겐은 열수추출법을 통하여 젤라틴으로 쉽게 추출이 가능하지만 젤라틴을 추출하기 전에 어피에 함유되어 있는 비콜라겐 단백질과 불순물을 제거하기 위해서는 전처리 단계가 필요하다. 이 전처리는 일반적으로 산 처리법(A-type)과 알칼리 처리법(B-type)으로 구별된다. 전자는 가교결합이 적은 돼지피에, 후자는 가교결합이 많은 우피에 이용되고 있으며 전처리 과정이 진행되는 동안 가교결합이 파괴되고 펩티드 사슬의 일부가 분해된다(Hinterwader, 1977). 이러한 두 전처리 방법은 처리기간이 6~20주 정도 소요되는 결점이 있으나(Petersen, 1981) 효소를 이용하여 전처리하면 이를 개선할 수 있을 것이다.

본 연구는 수산폐기물의 유효이용과 환경오염방지의 방법으로 종래의 방법 중 B-type과 효소를 이용하는 방법(E-type)으로 가자미 껍질을 전처리하여 젤라틴을 제조한 후 물성, 분자량, 아미노산 조성 및 가수분해물의 최적 조건을 구명하였으며 이미 언급된 문제점들을 해결하기 위하여 연속식 막 반응기를 이용하여 젤라틴을 연속적으로 가수분해하였다. 이 때의 회분식과 연속식

에 있어서의 젤라틴에 대한 효소의 kinetics를 측정 비교하였으며 연속식 막 반응기 장치에서의 효소활성 및 안정성에 미치는 인자에 대하여 검토하여 가수분해 최적화공정을 확립하였으며 아울러 그 가수분해물을 이용한 천연조료의 개발도 검토하였다.



II. 재료 및 방법

1. 재 료

본 실험에서 사용된 가자미(*Limanda aspera*) 껍질은 부산시 사하구 장림 동소재 대경수산(주)에서 구입하여 흐르는 물(15°C)에 1일간 침지하여 수세한 후 차가운 물로 5회 세척하고 cheesecloth로 여과한 다음 동결고(-60°C)에서 저장하여 두고 젤라틴을 제조하였으며 제조된 젤라틴은 -10°C의 냉장고에 저장하여 젤라틴의 가수분해물 제조에 시료로서 사용하였다.

2. 방 법

(1) 어피 전처리

알칼리 처리법(B-type)과 효소 처리법(E-type)의 두가지 방법으로 구별하여 실시하였으며 그 조건은 다음과 같다. 즉, B-type은 0.3% Ca(OH)₂ 용액 100ml에 어피 10g(건물중량 기준)을 2°C에서 24시간 동안 침지한 후 흐르는 물에 세척하여 그 세척액의 pH가 약 7.0이 될 때까지 수세하였다. E-type은 증류수 100ml에 어피 10g을 넣고 효소(Alcalase 0.6L)를 가하고 (기질 : 효소 = 1,000 : 1, w/w) pH를 8.0으로 조절한 후 20°C에서 1시간 동안 침지한 뒤 효소의 불활성화를 위하여 pH 3.5의 증류수로 5회 세척하였다.

(2) 젤라틴 제조

첨가수량(w/w), 추출시간, 추출온도 및 추출용액의 pH 등을 변화시켜 구

명된 최적조건 하에서 추출된 젤라틴 용액을 원심분리(12,000×g, 10min) 하여 상층액만을 여과(Whatman No.1)한 후 활성탄으로 탈취하였다. 이 용액을 양이온 교환수지(Duolite C 26)와 음이온 교환수지(Duolite A 162)로 정제한 다음 열풍건조(37°C, 5일간)하여 B-type 및 E-type 젤라틴 제품을 제조하였다(Fig. 1).

(3) 일반성분 및 물리적 성질 측정

1) 일반성분 분석 및 무기질 함량

수분은 상압건조법, 조지방은 Soxhlet법, 회분은 건식회화법, 그리고 조단백질은 semi-micro Kjeldahl법으로 측정하였다. 무기질 함량은 시료 2g에 황산 10ml를 넣고 가열하여 분해시킨 뒤 질산용액을 백색연기가 날 때까지 첨가한 다음 그 용액을 50ml로 정용하여 ICP 분광광도계(SPS 1200A Plasmaspectrophotometer S II)로 측정하였다.

2) 물리적 성질 측정

① 응고점과 용점

응고점과 용점의 측정은 일본공업규격(JIS) K 8004(1973)에 따라 젤라틴 시료에 대하여 실시하였다. 응고점은 각 시료의 10% 수용액 50ml을 만들어 온도계와 함께 비이커(직경;4.5cm, 높이;6cm)에 넣은 것을 예상한 응고점보다 5°C 낮은 온도의 물을 채운 수조에 넣고 온도가 1분 동안 일정하게 유지되는 점을 응고점으로 하였다. 용점은 응고점 측정이 끝난 후 젤화된 시료의 표면에 모세관을 부착시켜 2분간 1°C씩 수조의 온도를 상승시켰을 때 겔이 녹아서 그 용액이 모세관을 타고 올라갈 때의 온도를 측정하여 용점으로 하였다.



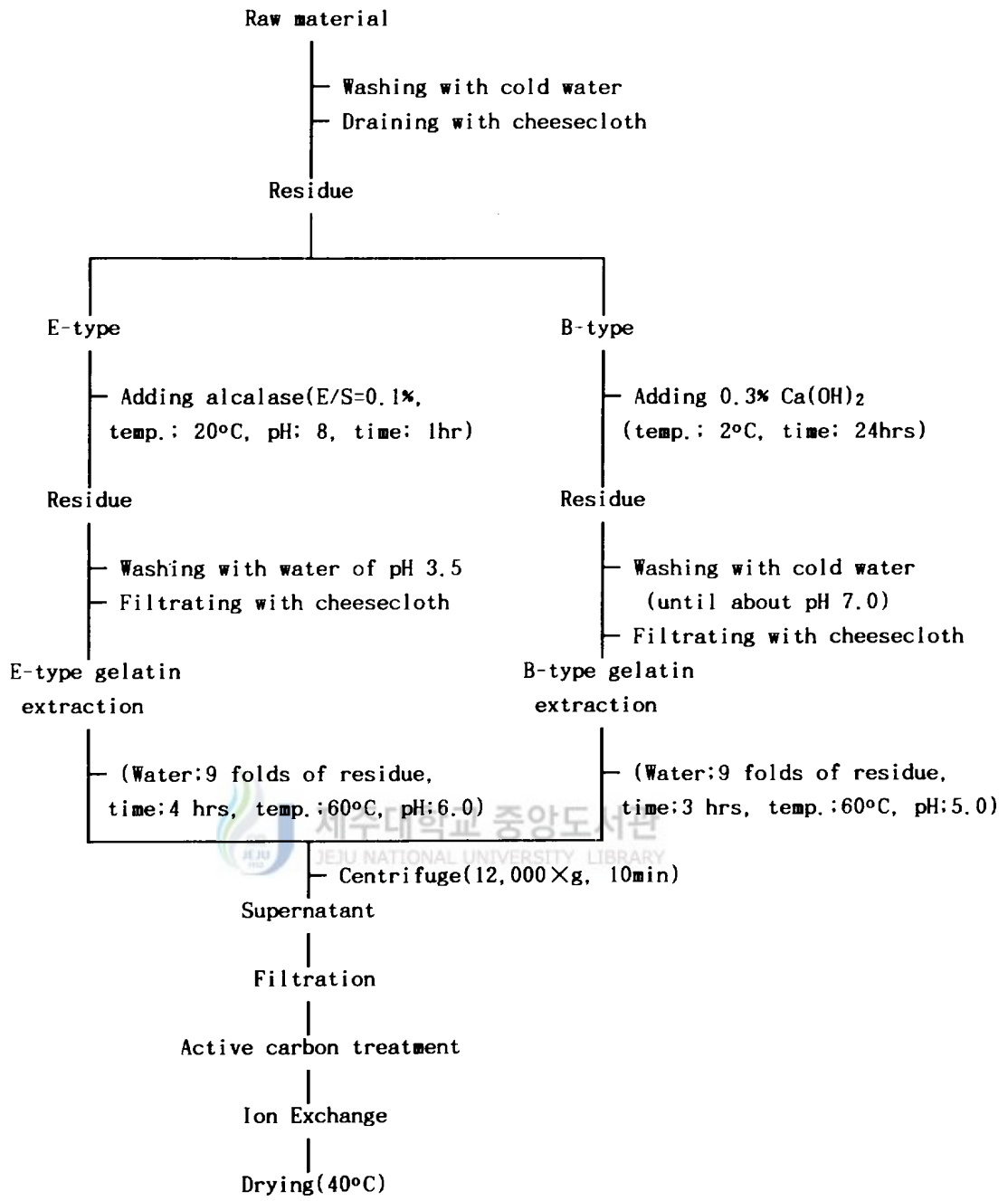


Fig.1. Procedure for extraction of B- and E-type gelatin from flounder skin.

② Jelly 강도

Jelly 강도는 일본공업규격(JIS) K 6503(1970)에 따라서 젤라틴 시료에 대하여 측정하였다. 각 시료 7.5g을 물 100ml에 넣고 30분간 팽윤시킨 후 50°C에서 완전히 녹인 다음, 10°C에서 17시간 동안 냉각시켜 겔화시킨 후 직경 4.5cm, 높이 2.5cm되는 원주형으로 하여 rheometer(SUN rheometer, model SD-406) 기기장치의 시료대 위에 얹고 구의 직경이 5mm되는 plunger가 겔속을 5mm 깊이로 들어갈 때의 강도를 측정하여 g으로 표시하였다.

③ 점도

점도 측정은 젤라틴 시료에 대하여서는 일본공업규격(JIS) K 6503(1970)에 따라서 실시하였다. 점도는 각 시료 7.5g을 물 100ml에 넣고 30분간 팽윤시킨 후 60°C에서 Ostwald 점도계로 물의 점도와 비교하여 상대점도를 측정하였다. 그리고 젤라틴 가수분해물에 대한 점도는 농도, pH 및 온도를 변화시키면서 측정하였다. 즉, 가수분해물의 농도를 1~10%까지 변화시킨 용액을 2시간 방치한 후 20°C에서 측정하였으며, 또한 1% 가수분해물을 1N HCl과 1N NaOH로 pH 3.0~11.0까지 조정하여 2시간 방치한 후 pH변화에 따른 점도를 측정하였다. 그리고 1% 가수분해물을 20°C~80°C까지 변화시키면서 각 온도에서 측정하였다.

$$\frac{\eta_1}{\eta_2} = \frac{d_1 t_1}{d_2 t_2} \quad (\eta: \text{점도}, d: \text{밀도}, t: \text{낙하시간})$$

④ 등전점

등전점은 Hayashi 등(1990)의 방법에 따라 Amberlite IRA-400 음이온 수지(Fluka Co.) 20ml와 IR-120 Plus 양이온 수지(Fluka Co.) 10ml를 1% 시료 용액 100ml에 첨가하여 20분간 교반하였다. 이 혼합용액을 원심분리(3,000×g, 5min)하여 수지를 제거한 다음 상층액의 pH를 측정하여 등

전점으로 하였다.

⑤ 탁도 및 전기전도도

일본위생시험법 주해(1980)에 따라서 kaolin으로 표준용액을 제조하여 검량선(Fig. 2)을 작성하고 젤라틴 용액 0.1%를 660nm에서 분광광도계(PYEUNICAM PU UV/Vis Spectrophotometer, PHILIPS Co.)로 흡광도를 측정한 후 검량선으로부터 탁도를 계산하였다. 전기전도도 측정은 Shimada 등(1984)의 방법에 따라 각각의 시료를 탈이온수에 녹여서 1% 수용액 50ml를 만들어 20°C에서 30분간 방치한 후 Conductivity meter (Metrohm Ltd.)로 측정하였다. 전기전도도, $k(\text{mho})$ 를 구하는 식은 $(\text{mho}/\text{cm}) = (1/R) \times (L/S)$ 이다. 여기서 R 은 저항(Ω), S 는 도체의 단면적(cm^2) 그리고 L 은 도체간의 길이(cm)이다.

(4) 분자량 측정

1) SDS-PAGE 분석법

제조된 B-type과 E-type 젤라틴의 분자량 측정은 Weber와 Osborn(1969)의 측정방법에 따라 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 분자량을 측정하였다. 5%의 polyacrylamide gel 농도로 pH 7.0에서 각시료당 8mA의 전류를 8시간 동안 통전시켰고, 고정액(메탄올 : 빙초산 : 물 = 400ml : 70ml : 530ml)과 염색액(고정액 500ml 속에 Coomassie brilliantblue 1.25g) 및 탈색액(메탄올 50ml와 빙초산 75ml를 1l로 정용)에 차례로 넣어서 marker protein과 비교하여 분자량을 측정하였다. Marker protein은 carbonic anhydrase(29KDa), bovine serum albumin(66KDa), alcohol dehydrogenase(150KDa), β -amylase(200KDa) 및 apoferritin(443KDa) 등을 사용하였다. 가수분

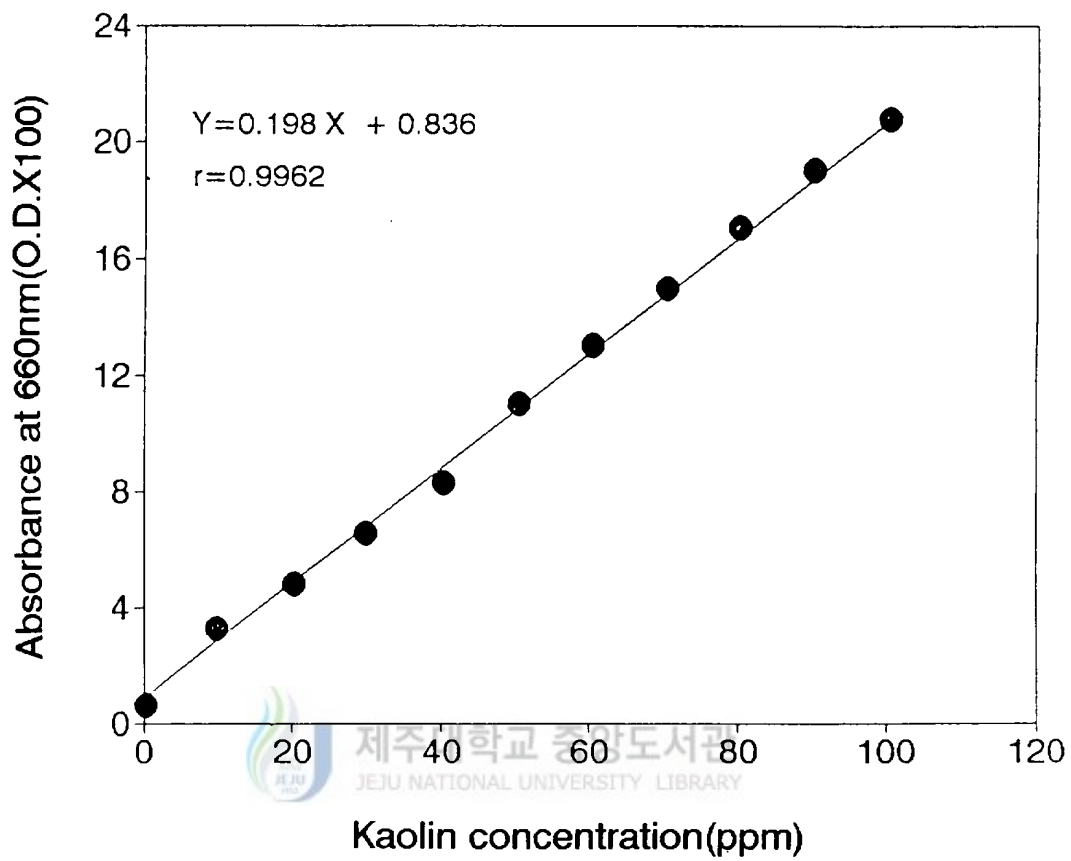


Fig. 2. Standard curve for the determination of kaolin as an index for turbidity.

해물에 대한 분자량은 Laemmli(1970)의 방법에 따라 SDS-PAGE로 다음과 같이 측정하였다. separating gel과 stacking gel 농도를 각각 15%와 5%로 조제하여 stacking gel은 15mA, separating gel은 30mA의 전류를 통전시켜 전개가 끝난 다음 위의 것과 같은 방법으로 실시하였다. 이 때의 marker protein은 BSA, carbonic anhydrase, cytochrome C(12.4KDa) 및 insulin(5.7KDa)을 사용하였다.

2) Gel 여과법

Gel 여과는 Heck(1983)와 Vega(1987)의 방법에 따라 동결건조된 가수분해물에 대하여 측정하였다. 각 시료 0.05g을 1ml의 0.05M 인산칼륨완충액(pH8.0)에 용해시킨 후 동일한 완충액으로 평형화된 Sephadex G-50 column(0.9 60cm)으로 여과하였으며, 용리액의 단백질 흡광도는 분광광도계(PYEUNICAM PU 8600 UV/VIS Model 8610)를 사용하여 280nm에서 흡광도를 측정하였다. 분자량 측정에 사용된 표준물질은 BSA, carbonic anhydrase, cytochrome C 및 insulin이었으며, 각 표준물질 1mg씩을 각각 1ml의 0.05M인산칼륨완충액에 용해시킨 후 gel여과하여 용리된 용리액은 위와 같은 방법으로 측정하였다. 분자량 측정용 표준곡선은 Andrew(1964)의 방법에 따라 작성하였다.

(5) 회분식 반응기에서 젤라틴 가수분해물 제조

1) 최적 가수분해 효소의 선별

가자미피 젤라틴의 가수분해를 위한 효소 선정은 다음과 같이 각 효소에 대한 가수분해도를 측정 비교하여 결정하였다. 각 효소의 가수분해 최적조건하에서 1%(w/w) 기질 용액을 가수분해시 일정시간 마다 2ml씩 취하여 20% 삼염화아세트산(TCA) 2ml가 들어 있는 시험관에 넣어 효소를 불활성화시킨

후 원심분리(1,500×g, 10min)하여 상층액의 가용성 질소를 micro-Kjeldahl 법으로 정량하여 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{가수분해도(\%)} = (\text{가용성질소}/\text{총질소}) \times 100$$

이 때 가용성 질소는 10% TCA용액에 침전되지 않은 질소로 하였다. 실험에 사용된 효소는 Alcalase 0.6L(S.G.=1.25, NOVO Ind., Copenhagen/Denmark Batch No. PMN 0106 88-9), pepsin(800-2,500 units/mg solid, Sigma Co., No. P-7125), protease(0.3 units/mg solid, Sigma Co., No. P-2143) 및 trypsin(10,000 BAEE units/mg solid, Sigma Co., No. T-8003)이었다.

2) 젤라틴의 회분식 가수분해

효소에 의한 가자미피 젤라틴의 가수분해조건은 김과 이(1983)의 방법을 수정하여 다음과 같이 하였다. Fig. 3에 나타낸 pH자동조절기(Cole-Parmer Instrumental Co., pH controller Model 5652-50)가 연결된 반응기에 2%의 기질용액을 넣고 효소를 가하여 pH자동조절기로 pH를 일정하게 유지하면서 반응온도, pH, 반응시간 및 효소농도를 각각 변화시키면서 가수분해하였다. 이때의 가수분해도는 위에서 언급한 방법으로 측정하여 최적가수분해조건을 결정하였다.

3) 아미노산 분석

아미노산 조성 분석은 각 시료 50mg을 정평하여 6N HCl로 산가수분해하여 아미노산 자동분석기(日本 Hitachi Co.)로 분석하였다. 그리고 hydroxyproline 함량은 Edwards와 O'brien(1980)의 방법을 다소 수정하여 정량하였다. 즉, 각 시료 50mg을 정평하여 ampoule에 넣고 6N

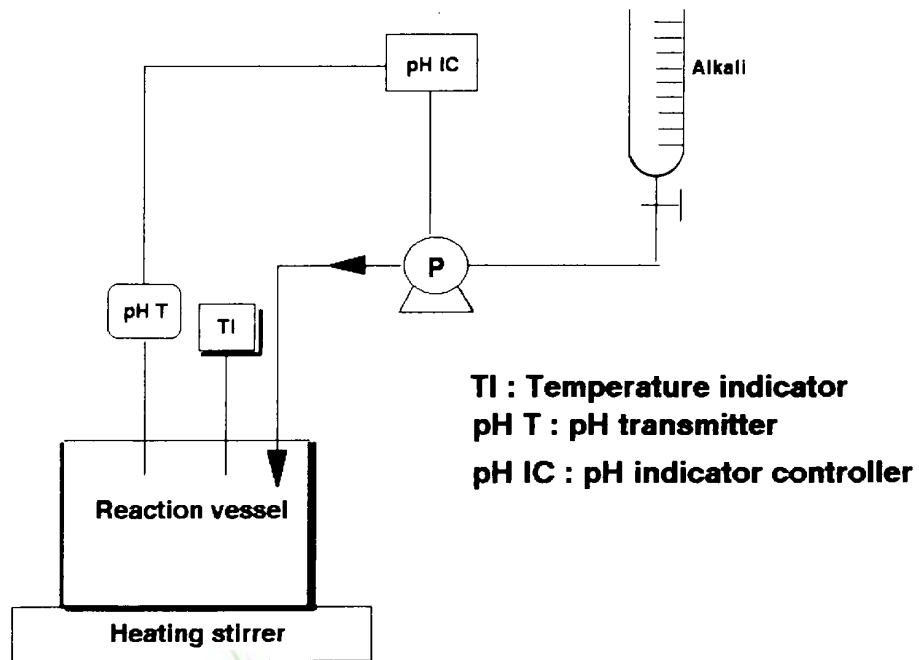


Fig. 3. Schematic diagram of batch reactor system.

HCl 5ml를 가하여 진공 밀봉한 다음 120°C에서 24시간 동안 가수분해시켰다. 이 가수분해물을 여과한 후, 그 여액을 50°C에서 감압, 건조한 다음 구연산완충액(pH 6.0-6.5)으로 50ml 정용하였다. 이 용액을 200배 희석하여 2ml 취하고 여기에 Chloroamine-T (0.05M) 1ml와 aldehyde-perchloric acid 1ml를 가하고 60°C에서 15분간 반응시킨 후, 차가운 물에 냉각한 다음 550nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정하여 hydroxyproline 표준용액으로 작성된 검량곡선(Fig. 4)에 의하여 시료 중의 hydroxyproline 함량을 구하였다.

(6) 연속적 막반응기를 이용한 젤라틴의 가수분해

1) 연속식 막반응기 장치

연속식 막반응기 장치는 Fig. 5에서와 같이 기질 공급장치, 반응혼합물 순환장치 및 pH 조절장치로 구성되어 있으며 반응기, 중공사(hollow fibre) 막, 열판교반기(Nuova II, stir plate), pH 자동조절계, 유량계, 압력조절 밸브와 3개의 펌프(기질공급펌프, 반응혼합물의 순환펌프, 알칼리 공급펌프)로 설치하였다. 이들 각 장치를 효율적으로 작동하기 위해 다음과 같이 작동 조건을 측정하였다.



① pH 및 온도조절

연속식 막반응기에서 pH와 온도는 회분식에서 선정된 효소 trypsin의 최적조건인 pH 9.0과 온도 55°C로 유지하였다. 반응 혼합물의 pH는 자동조절기를 이용하여 pH 9.0으로 고정시켜 pH가 9.0으로 떨어지면 알칼리 공급펌프가 작동되므로써 3N NaOH가 가해져 pH 9.0±0.1, 그리고 온도는 열판교반기(Nuova II, stir plate)로 55±0.5°C로 조절되었으며 자석막대를 반응기에 넣고 No. 5(교반속도)에 고정시켜 반응과정 중 일정하게 유지되도록 조절하였다.

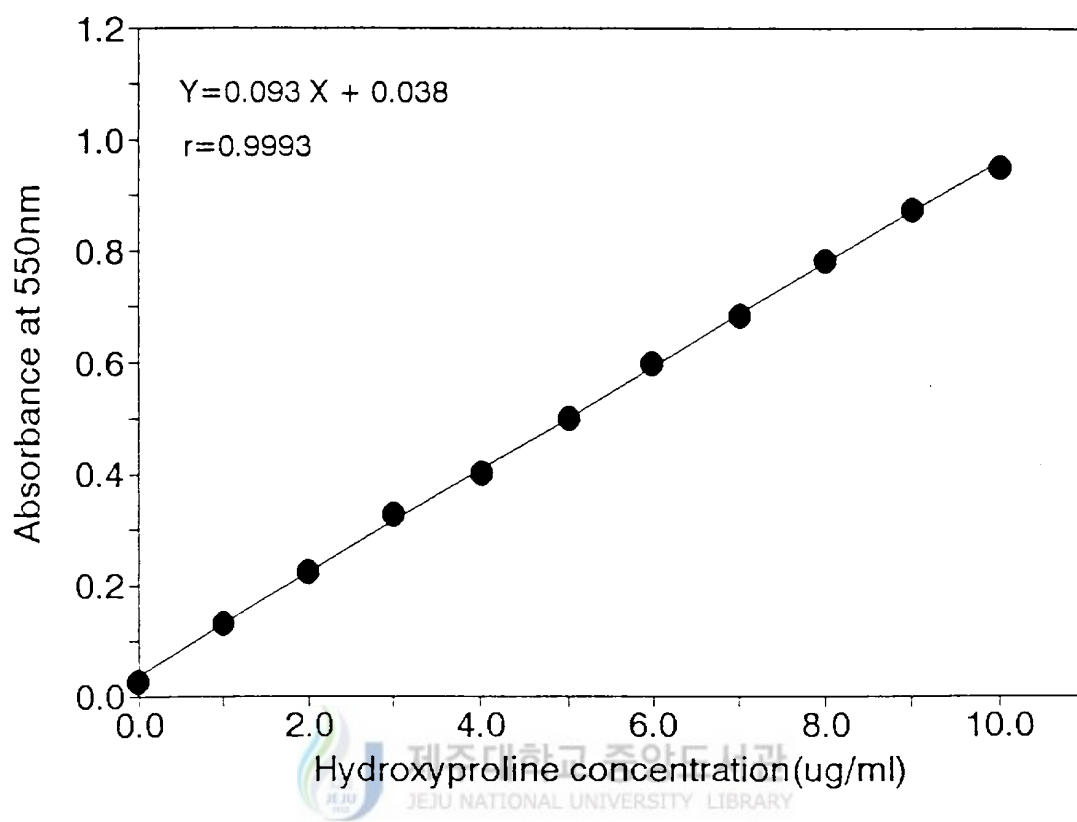


Fig. 4. Standard curve for the determination of hydroxyproline

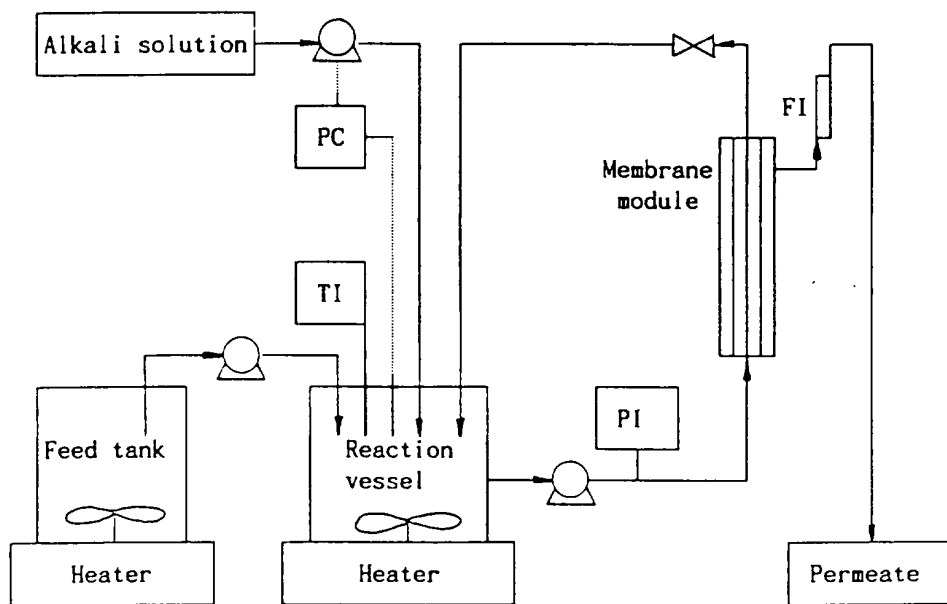


Fig. 5. Flow diagram of a continuous membrane enzyme reactor for the hydrolysis of fish skin gelatin.

FI : flowmeter indicator PC : pH controller
 PI : pressure indicator TI : temperature indicator

② 중공사막(Hollow fibre membrane)

중공사막(A/G Technology Co., Model UFP-10-L-4)은 가수분해물의 분자량이 10,000 이하만이 유출되는 10,000 MWCO를 사용하였다.

③ 유출속도의 조절

중공사막을 통한 유출속도는 유량계(Gilmont Instrument, Inc.)를 가수분해물의 출구에 설치하였다. 유출속도는 중공사막을 통해 나오는 출구부분에 압력밸브를 설치하여 조절하였으며, 유량기의 flow meter reading에 대한 유출속도의 calibration curve는 Fig. 6과 같다.

④ 유출속도에 미치는 순환속도의 측정

순환속도에 의한 유출속도에 미치는 영향을 측정하기 위해 반응기에 1% (w/w) 젤라틴 용액 500ml를 넣고 55°C로 조절한 다음 3N NaOH로 pH 9.0으로 조절하였다. 순환속도의 변화에 따른 유출속도는 Fig. 7과 같다.

⑤ 유출속도에 미치는 압력의 측정

반응기에 각각 증류수와 1, 2, 4 및 6% 젤라틴 용액 500ml를 넣고 온도 55°C, pH 9.0으로 조절한 다음 순환속도를 860ml/min(Masterflex No. 5)로 일정하게 유지시켜 압력변화에 따른 유출속도를 측정하였다. 압력 변화에 따른 유출속도는 Fig. 8과 같다.

⑥ 기질공급과 반응부피 조절

기질공급탱크에 필요한 농도의 젤라틴 용액은 온도 55°C, pH 9.0으로 조절된 다음 기질공급펌프를 통하여 가수분해물의 유출속도와 동일한 속도로 반응기에 공급되었다. 이때 순환속도를 일정하게 고정시키고 압력조절밸브만을 이용하여 유출속도를 조절하였다.

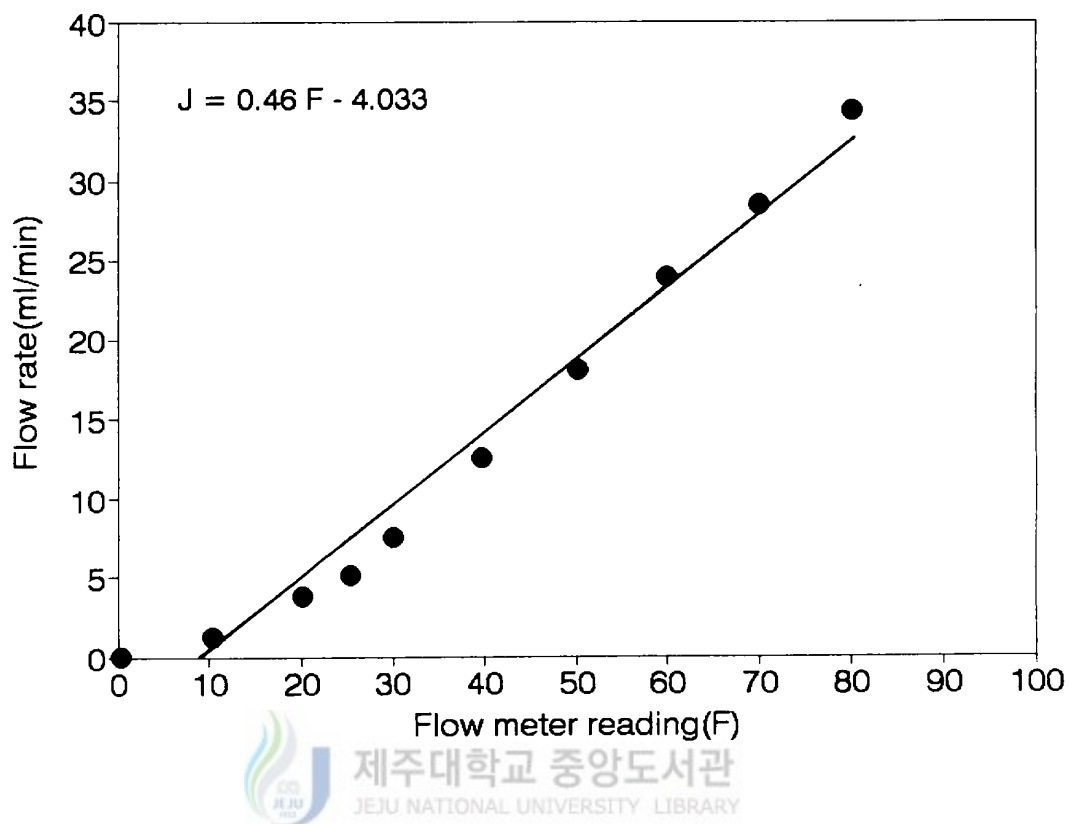


Fig. 6. Calibration curve of permeate flux using Gilmont flow meter at 55°C, pH 9.0

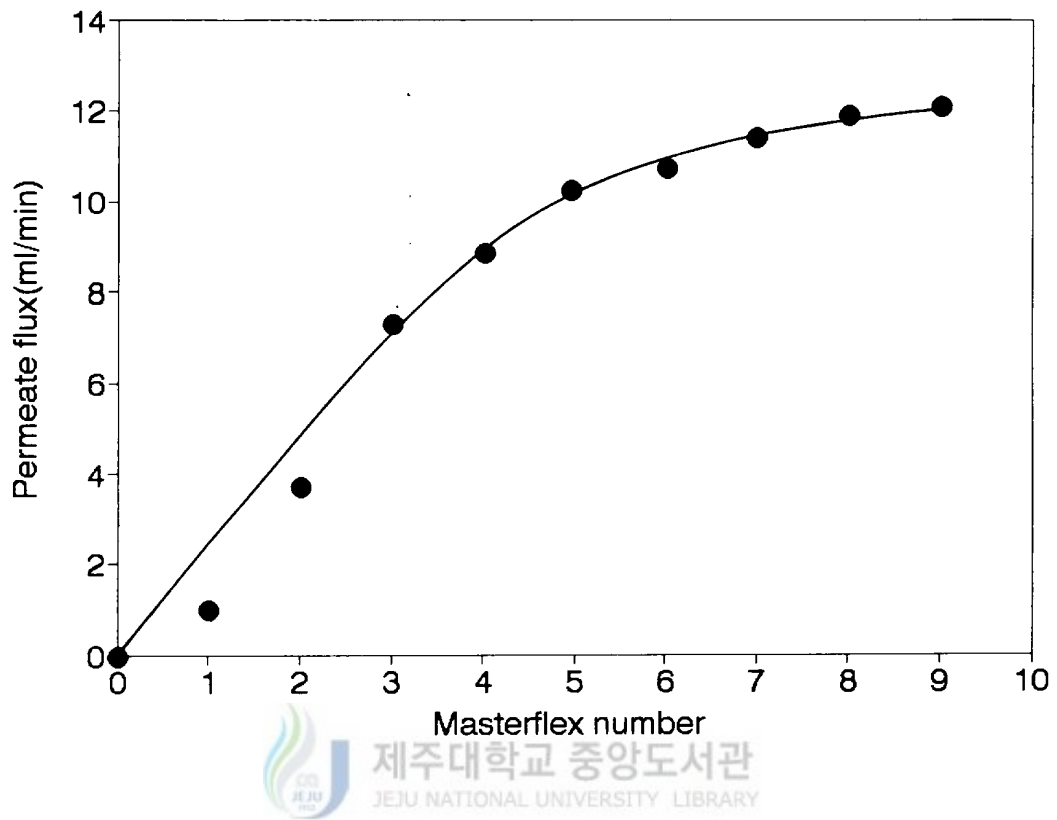


Fig. 7. Effect of recycling rate on permeate flux. ($P_T=7.5$ psig, $S=1\%$ (w/v), pH 9.0, 55°C)

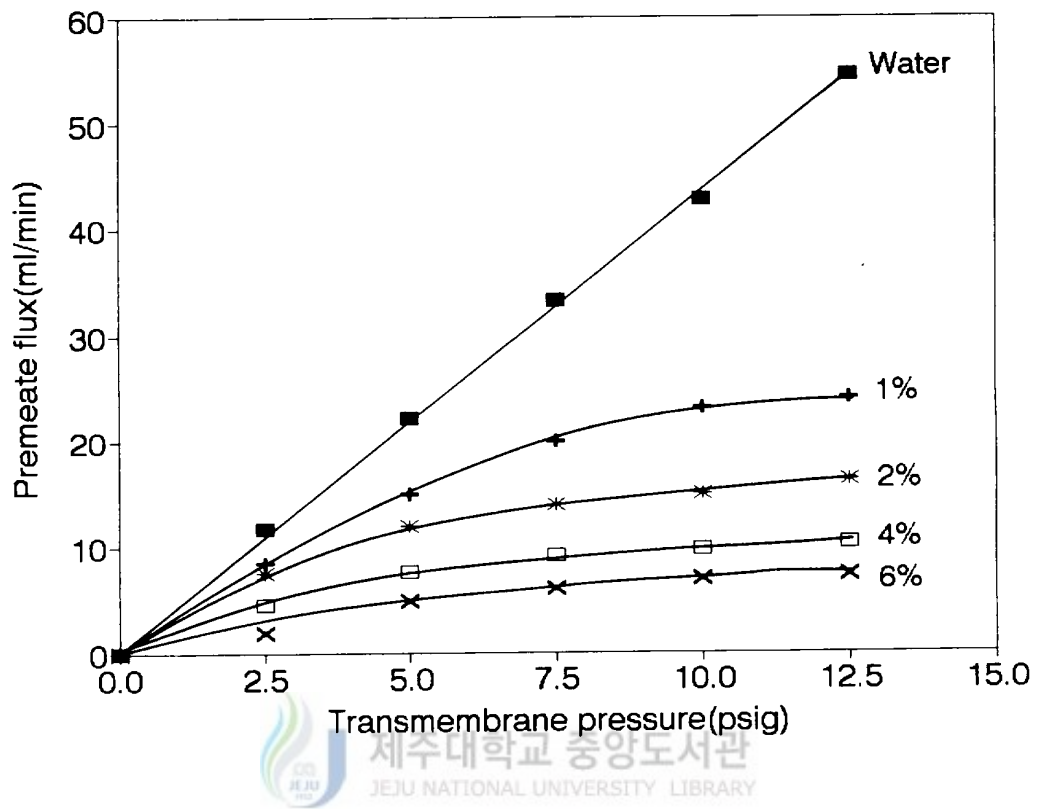


Fig. 8. Effect of transmembrane pressure on permeate flux vs flounder skin gelatin(% w/v). (Recycling rate 860ml/min, pH 9.0, 55°C)

2) 회분식에서의 반응속도 상수(K_m , V_{max}) 측정

회분식에서 trypsin으로 젤라틴을 가수분해할 때 반응속도 상수를 측정하기 위해 먼저 기질농도 0.05, 0.1, 0.25, 1, 2 및 4%(w/w)인 기질용액 100ml를 반응기에 넣고 55°C로 가열한 다음 0.5N NaOH로 pH 9.0로 조절하였다. 이어서 반응기질에 대해 효소용액 0.05mg/ml를 가한 다음 15초 간격으로 2분간 계속 자동피펫으로 가수분해물 3ml를 취하여 20% 삼염화아세트산(TCA) 용액 3ml가 들어있는 시험관에 넣고 vortex mixer상에서 1분간 교반한 후 원심분리(1,500×g, 10min)하였다. 상층액 3ml를 취하여 가용성 질소량을 micro-Kjeldahl법으로 정량하여 K_m 값 및 V_{max} 값을 계산하였다.

3) 연속식 막반응기에서의 반응속도 상수 측정

연속식 막반응기에서 trypsin에 의한 젤라틴 가수분해시 반응속도 상수(K_m , V_{max})의 측정은 0.5, 1, 2, 4 및 6% 젤라틴 용액 500ml를 만들어 반응기에 넣고 온도 55°C, pH 9.0으로 조절한 후 0.1mg/ml 효소량을 가하여 반응시켰다. 반응혼합물의 순환속도는 860ml/min으로 고정시켜 놓고 압력밸브를 이용하여 유출속도를 7.79ml/min으로 조절하였다. 막을 통과한 가수분해물을 10분 간격으로 60분 동안 3ml씩 분취하여 회분식 반응기에서와 같은 방법으로 질소량을 측정한 다음 초기속도(mgN/ml/min)를 계산하여 K_m 과 V_{max} 를 계산하였다.

4) 연속식 막반응기에서 젤라틴 가수분해 조건

① 효소농도

연속식에서 1% E-type젤라틴 용액 500ml를 반응기에 넣고 55°C로 가열하여 3N NaOH로 pH 9.0으로 조절하였다. 기질용액에 각 효소농도가

0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.1, 0.2 및 0.5mg/ml가 되도록 가한 후 10분 간격으로 120분간 3ml씩 취하여 20% 삼염화아세트산 용액 3ml가 들어 있는 시험관에 넣어 vortex mixer상에서 1분간 교반한 다음 원심분리 (1,500×g, 15min) 한 상층액의 가용성 질소를 micro-Kjeldahl법에 의해 측정하여 가수분해도를 계산하였다.

② 기질농도

E-type젤라틴 농도를 각각 0.5, 1, 2, 4 및 6% 용액 500ml를 반응기에 넣고 55°C로 가열하여 3N NaOH 용액으로 pH 9.0으로 조절한 후 0.1mg/ml 효소량을 가한 다음 효소농도에서와 같은 방법으로 가용성 질소량을 측정하여 가수분해도를 계산하였다.

③ 유출량(Flux)

1% E-type젤라틴 용액 500ml를 조제하여 반응기에 넣고 55°C로 가열하여 3N NaOH로 pH 9.0으로 조절한 후 0.1mg/ml 효소량을 가하고 유출속도를 1.03, 3.77, 7.79, 13.04 및 18.18ml/min로 각각 변화시키면서 가용성 질소량을 측정하여 가수분해도를 계산하였다.

④ 반응용액의 부피

1% E-type젤라틴 용액을 각각 400, 500, 600, 800 및 1000ml를 반응기에 넣고 55°C로 가열한 후 3N NaOH로 pH 9.0으로 조절하였다. 각 용액에 효소량이 0.1mg/ml가 되도록 효소를 가하여 유출속도를 7.79ml/min으로 조절한 다음 10분 간격으로 120분 동안 3ml씩 분취하여 가수분해도를 계산하였다.

5) 연속식 막반응기 작동시 효소의 안정성에 미치는 인자

① 온도의 영향

기계적 장치에 의한 효소활성 감소를 피하기 위하여 회분식에서 실시하였다. 즉, 회분식 효소반응기에 증류수 600ml를 넣고 온도 55°C, pH9.0으로 조절한 후 trypsin 1mg/ml를 가하였다. 반응기로부터 효소액 1ml를 10분 간격으로 분취하여 55°C에서 3N NaOH로 pH 9.0으로 조절된 1% 젤라틴 현탁액 4ml와 혼합하여 10분 동안 반응시킨 후 20% (w/w) 삼염화아세트산 용액 5ml를 가하여 반응을 종결시켰다. 효소의 활성은 삼염화아세트산용액 가용물에 존재하는 질소량을 측정하여 나타내었다.

② 기계적인 전단응력에 의한 영향

중공사 막반응기 작동시 회분식에 비해 기계적인 장치에 의한 효소활성에 미치는 영향을 측정하기 위해 막 반응기에 증류수 600ml를 넣고 온도 55°C로 일정하게 유지하고 pH 9.0으로 조절한 다음 1mg/ml 효소를 가하여 유출속도 7.79ml/min, 순환속도 860ml/min로 작동하면서 반응기로부터 효소액 1ml를 10분 간격으로 분취하여 온도의 영향에서와 같은 방법으로 가용성 질소량을 측정하였다.

③ 중공사 막에 의한 영향

상기와 동일한 조건하에서 막에 의한 효소의 손실을 측정하기 위하여 막 대신 Tygon tubing으로 교체하여 효소활성을 측정하였다.

④ 효소의 누출

막반응기에서 막을 통한 효소의 누출량을 측정하기 위해 젤라틴 가수분해 최적 조건하에서 행하였다. 즉, 반응기에 증류수 600ml를 넣고 pH 9.0, 온도 55°C로 조절한 다음 1mg/ml의 효소를 가한 후 순환속도 860ml/min, 유출속도 7.79ml/min로 조절하여 막을 통해 누출되는 효소 단백질량을 측

정하였다. 반응기의 부피를 일정하게 유지하기 위해 유출속도와 동일한 속도로 온도 55°C, pH 9.0으로 조절된 증류수를 일정하게 공급해 주었다.

6) Fouling 성질 측정

막효소 반응기에서 젤라틴 기질에 대한 fouling 성질은 Capannelli 등(1990)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 반응기에 초기순수 600ml를 넣고 pH 9.0, 온도 55°C로 조절한 다음 순환속도를 860ml/min으로 일정하게 하여 압력을 10, 15 및 20psig로 변화시키면서 유출속도를 측정하였다. 그리고 기질용액의 농도를 1, 2, 4, 6, 및 10%로 변화시키면서 상기의 조건에서 압력변화에 따른 각 기질용액의 유출속도를 측정하였다. 최종순수 유출속도는 온도 50°C의 증류수로 5회 세척한 다음 상기의 각 조건에 따른 유출속도를 측정하여 초기순수 유출속도에 대한 상대적인 유출속도의 감소비(Relative flux reduction, RFR)를 다음식에 의해 계산하였다.

$$RFR(\%) = (1 - J_p / J_{w.o}) \times 100(\%)$$

$J_{w.o}$: 정상상태에서의 초기순수 유출속도

J_p : 젤라틴 용액에서의 유출속도

유출속도의 재생비(flux recovery ratio, FRR)

$$FRR(\%) = (J_{w.f} / J_{w.o}) \times 100(\%)$$

$J_{w.f}$: 젤라틴 용액이 막을 통과한 후 세척한 다음 순수의 최종 유출속도

7) 기질농도의 한계

많은 양의 가수분해물을 얻기 위하여 젤라틴 농도를 높여 상기의 최적 조건 하에서 가수분해도를 측정하였다. 즉, 기질용액 10, 15, 20 및 25%를 600ml를 반응기에 각각 넣고 pH 9.0, 온도 55°C에서 각 기질에 대해 S/E=100(w/w)이 되도록 효소량을 가하여 10분 간격으로 120분간 유출되는

가수분해물의 가용성 질소량을 측정하여 가수분해도를 계산하였다.

8) 연속식 막반응기에서의 생성량 측정

연속식 막반응기를 이용하여 젤라틴 가수분해시 생성량을 측정하기 위하여 가수분해 최적조건하에서 실시하였다. 즉, 반응기에 10% 젤라틴 용액 600ml를 넣은 후 온도 55°C, pH 9.0으로 조절한 다음 1mg/ml 효소를 가하여 순환속도 860ml/min으로 고정시키고 압력조절밸브로 사용하여 유출속도 7.79ml/min으로 조절하였다. 반응과정 중 반응기의 부피를 일정하게 유지되도록 온도 55°C, pH 9.0으로 조절된 10% 젤라틴 용액을 유출속도와 동일한 속도로 기질을 공급하였다. 가수분해물의 생성량은 막을 통해 유출되는 가수분해물의 질소량을 측정하여 계산하였다.

P_I : 순간생성량

P : t시간내 평균생성량(mgN/ml)

P_I (mgN/mgE) =

J : 유출속도(ml/min)

V : 반응물의 부피(ml)

E : 효소농도(mg/ml)

$$P_c = \sum P_I \quad \frac{P \cdot J \cdot t}{E \cdot V} \quad P_c : \text{시간변화에 따른 생성량의 합(mgN/mlE)}$$

t : 시간(min)

(7) 연속식 막반응기로 제조한 가자미피 젤라틴 가수분해물을 이용한 조미간장 및 복합조미료 제조

1) 조미간장의 제조

조미간장을 제조하기 위해 먼저 진공동결 건조된 가자미피 젤라틴 가수분해물 10.0g, 식염 10.0g, 설탕 3.0g, MSG(monosodium glutamate) 0.5g, 카라멜 분말(명신화학 Co.) 0.1g, 사과식초(오뚜기 식품 Co., 총산도 :

6.7-7.0%) 3.0ml, 마늘분말(명신화성 Co.) 0.05g, 검은후추분말(명신화성Co.) 0.1g 및 감초분말(보락 Co.) 0.2g 모두를 물 100ml에 녹였다. 이를 열처리(끓기 시작한 후 5분간)하여 식힌 후 여과포(cheesecloth)로 여과하여 얻어진 여액을 조미간장 제조용 원액으로 하였다. 이 원액과 시판되고 있는10 0% 양조간장을 8:2(V:V)의 비율로 혼합하여 조미간장으로 하였다.

2) 복합조미료의 제조

가자미피 젤라틴 가수분해물 35.0g, 볶음소금(태경농산,Co.) 30.0g, 설탕 15.0g, MSG(monosodium glutamate) 15.0g, 글루코오스(태경농산,Co.) 6.0g, 마늘분말(명신화성,Co.) 0.5g, 양파분말(명신화성,Co.) 0.5g, 검은후추분말(명신화성,Co.) 0.5g, 생강분말(동도산업,Co.) 1.0g, 고추장분말(태경농산,Co.) 5.0g , 된장분말(태경농산,Co.) 2.0g을 혼합, 마쇄하여 가자미피 젤라틴 가수분해물 복합조미료로 하였다.

3) 관능검사

10인의 관능검사요원을 구성하여 5단계평점법(5점;매우좋다, 3점;보통이다, 1점;매우 나쁘다)으로 제조된 조미간장제품(imitation sauce, IS)과 3종류의 시판간장 S1, S2, 및 S3를 맛, 냄새, 색 및 종합평가면에서 관능평가한 후 최소유의차 검정하였다(中山, 1979). 여기서 시판간장 S1,S2는 산분해간장 80%와 양조간장 20%로, 시판간장 S3는 산분해간장 50%와 양조간장 50%로 구성되어 있는 간장이었다. 그리고 제조된 가자미피 젤라피 가수분해물 복합조미료(gelatin hydrolysate complex seasoning, GHCS)는 시판 복합조미료 즉, 멸치복합조미료(anchovy complex seasoning, ACS), 조개복합조미료(shellfish complex seasoning, SCS) 및 쇠고기 복합조미료(beef complexseasoning, BCS)와 함께 관능평가하였다. 이때 관능평가용 각 시료는 물 100ml을 가열하여 끓기 시작한 후 복합조미료 6.0ml

을 가하고 계속 3분간끓여서 제조하였으며 관능검사 방법은 간장의 경우와 동일하게 하였다.



Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 젤라틴 추출 조건

(1) 첨가수량

원료어피를 효소와 알칼리 용액으로 전처리한 각 시료 10g에 물을 7~14배 까지 첨가한 후 1N NaOH와 HCl을 사용하여 pH를 7.0으로 조절한 다음 50°C에서 4시간 동안 추출하였을 때 수율은 Fig.9와 같다. B-type와 E-type 모두 다 첨가수량이 기질 어피의 9배까지는 수율의 증가를 보였지만 그 이상에서는 큰 차이를 보이지 않았다. Brody(1965)는 시료량과 같은 양의 물을 가하여 추출하는 것이 좋다고 하였고, 이 등(1977)은 명태피교(皮膠) 제조시에는 3배, 말쥐치 피교 제조시에는 5배 가량의 물을 첨가하는 것이 가장 좋다고 보고 한 바 있다. 본 실험의 경우 최적 첨가수량은 어피의 9배 정도로 상당히 많았는데 이는 본 실험에 사용된 원료어피가 전처리 후 동결건조되어 수분함량이 12%로 낮았기 때문이라 생각된다.

(2) 추출시간

앞의 결과에 따라 각 시료 10g에 9배 가량의 물을 첨가한 후 pH를 7.0으로 조절하여 50°C에서 추출시간을 1~7시간까지 변화시켰을 때의 수율은 Fig.10와 같다. B-type는 3시간 동안, 그리고 E-type는 4시간 동안 추출한 수율이 각각 64.5%, 57.2%이었으며 그 이상의 시간이 경과하여도 수율의 증가 폭은 뚜렷하지 않았다. 이 등(1978)도 피교(皮膠)의 추출에서 붕장어피는 4시간, 먹장어피는 3시간 동안 각각 추출한 것이 가장 좋은 수율을 얻었으며 그 이상의 시간에서는 큰 변화가 없었다고 보고하였다.

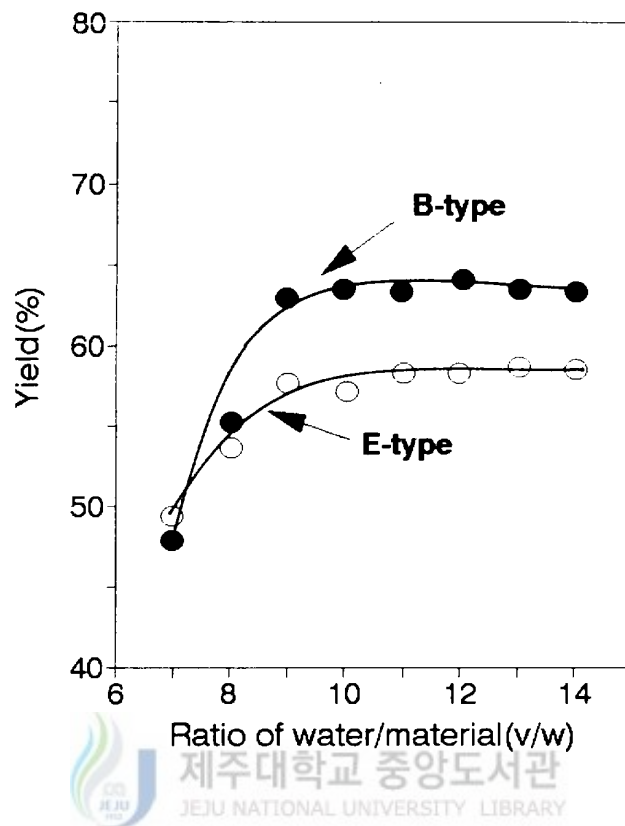


Fig. 9. Influence of ratio water/material(v/w) on the yield of B- and E-type gelatin from flounder skin(B-type was prepared by alkali pretreatment and E-type by Alcalase pretreatment).

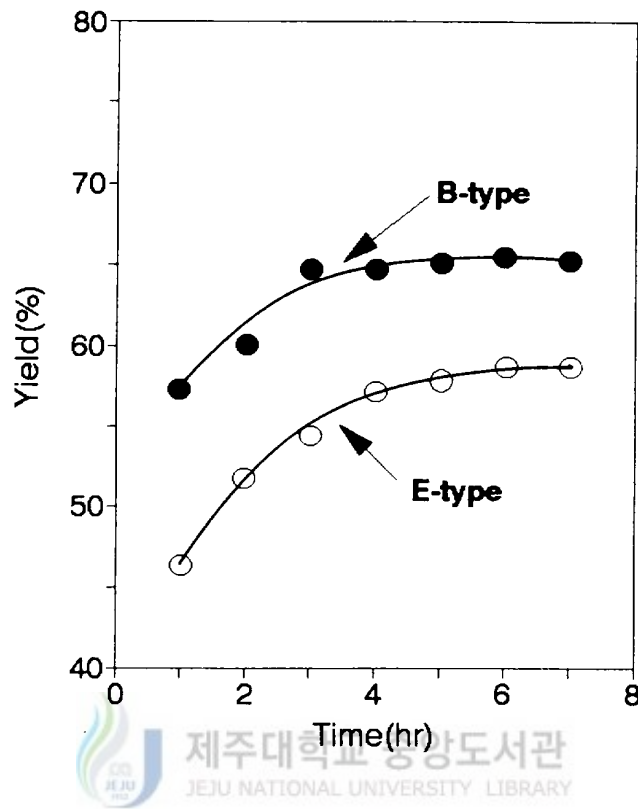


Fig. 10. Influence of extraction time on the yield of B- and E-type gelatin from flounder skin.

(3) 추출온도

앞의 결과에 따라 각각 10g의 어피 시료에 첨가수량 9배, pH 7.0으로 조절하여 40~90°C까지 온도의 변화를 주며 B-type는 3시간, E-type는 4시간 동안 각각 추출하여 수율을 Fig. 11에 나타내었다. B-type와 E-type 모두 60°C에서 각각 65.0%와 58.7%의 수율을 나타냈으며 더 이상 증가하지 않았다. 浜田 등(1990)은 상어皮的 젤라틴 추출에서 온도가 증가할 수록 수율이 증가한다고 보고하였으나 Himterwaldner(1977)는 온도를 너무 높이면 젤형성력을 떨어지게 한다고 하였는데, 60°C 이상에서 가자미 피교를 추출하면 콜라겐의 조직이 수축되어 helix 구조가 파괴되고 수소결합과 같은 결합력이 붕괴됨으로서 콜라겐의 변성에 의한 "soluble" 젤라틴이 생성되어 (Johns와 Courts, 1977) 더 이상의 수율이 증가되지 않았던 것으로 생각되었다.

(4) 추출용액의 pH

위의 결과에 따라 각 시료 10g에 시료의 9배 가량의 물을 첨가하여 pH를 3~10까지 변화시켜 온도 60°C에서 B-type는 3시간, E-type는 4시간 동안 각각 추출하여 나타낸 수율은 Fig. 12과 같다. B-type은 pH 5.0에서, 그리고 E-type은 pH 6.0에서 각각 높은 수율을 얻었으나 알칼리 영역에서는 감소하였다. 이 결과는 Baier와 Zisman(1975)이 A-type은 산성에서, B-type은 중성~약산성 범위에서 추출된다는 보고와 日本藥局方解説書(1976)의 젤라틴 추출 범위는 pH 5.0~6.0이라는 사실과 일치하였다.

이상의 결과를 종합하여 보면, 최적 추출조건은 B-type 제품의 경우 첨가수량은 시료의 9배, pH 5.0 및 60°C, 3시간이었으며 E-type 제품의 경우 첨가수량은 시료의 9배, pH 6.0 및 60°C, 4시간이었다. 이때의 수율은 B-type 64.2%로 E-type의 59.2%보다 5% 높았다.

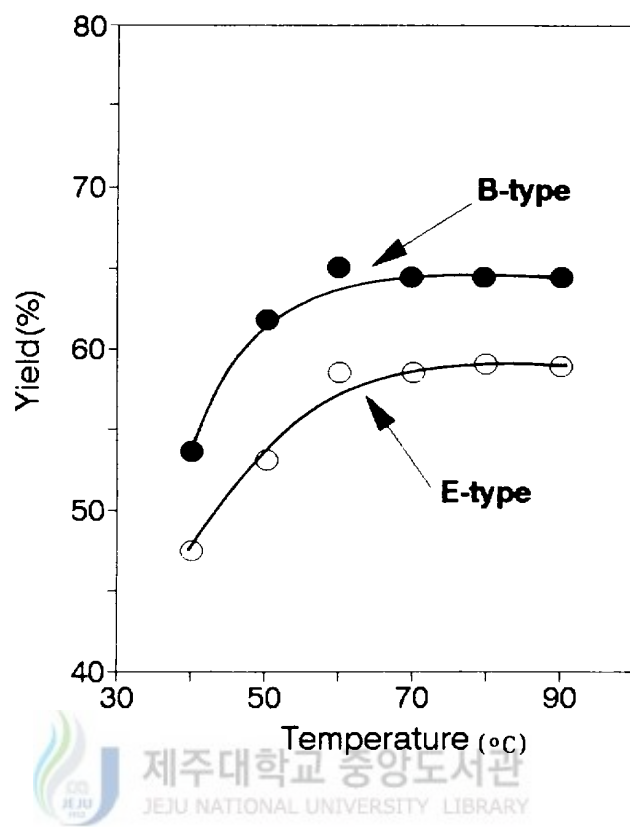


Fig. 11. Influence of extraction temperature on the yield of B- and E-type gelatin from flounder skin.

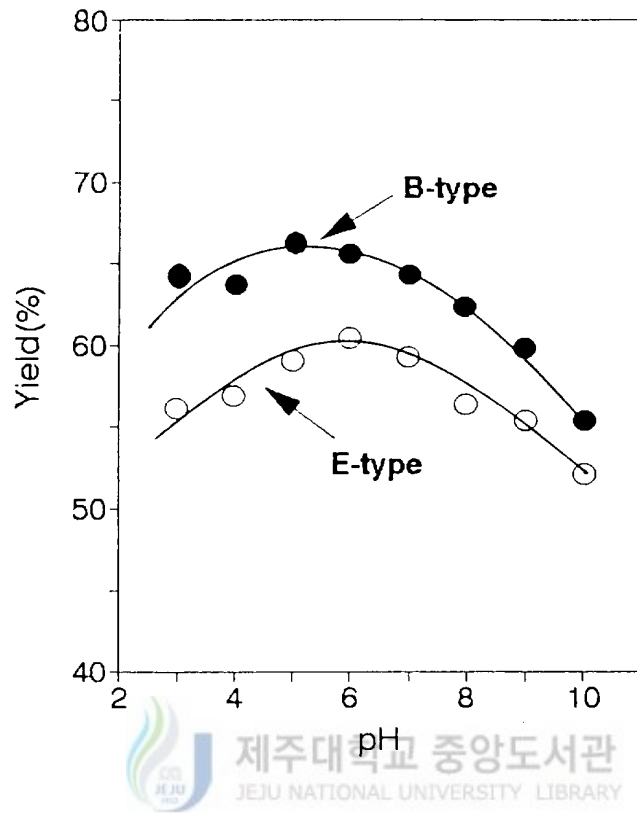


Fig. 12. Influence of pH of extraction on the yield of B- and E-type gelatin from flounder skin.

2. 분자량

B-type과 E-type 제품의 분자량은 Fig.13에 나타낸 것과 같이 B-type은 대부분 66KDa 이상의 분자량을 가진 것으로 나타났으며 주요 분자량은 각각 200, 250, 450KDa이었다. E-type은 대부분 66KDa 이하의 분자량으로 분포되어 있으며 특정한 분자량을 가진 띠는 형성되지 않았다. 이러한 결과로 보면, 효소로 전처리하는 과정에서 효소의 작용으로 인하여 어피의 분해를 유발시켜 분자량의 감소가 일어났으며 이로 인하여 추출된 젤라틴은 그 물성이 현저하게 변화되어 E-type 제품이 겔화가 형성되지 않는 것으로 판단된다. Kinsella(1983)는 젤라틴의 분자량은 아주 다양하게 분포되어 있지만 대개 평균 분자량은 100KDa 부근이라고 보고한 바 있는데 이것에 비하면 B-type 제품의 분자량은 상당히 큰 것으로 판명되었다.

3. 일반성분 및 물리적 성질

(1) 일반성분 및 중금속 함량

젤라틴의 일반성분 및 중금속 함량은 Table 1과 같다. 젤라틴의 단백질 함량은 건물량을 기준으로 하여 볼 때, B-type과 E-type이 각각 99.3%와 99.1%로서 시판 젤라틴(경기 젤라틴 LTD.)의 97.8%보다 약간 높았으며 수분 함량은 시판 젤라틴이 11.8%로서 상당히 높았다. 지방 함량은 B-type 제품은 낮았으나 E-type과 시판 젤라틴은 조금 높았으며 회분 함량은 제조된 두 제품 모두 0.4%로서 상당히 낮은 함량을 보였다.

중금속 함량은 망간이 다른 중금속보다 다소 많이 검출되었는데, 그 중 시판젤라틴이 가장 많이 검출되었으며 카드뮴, 비소 및 망간 등은 제조된 젤라틴 제품에 검출되지 않거나 극미량 함유되어 있었다.

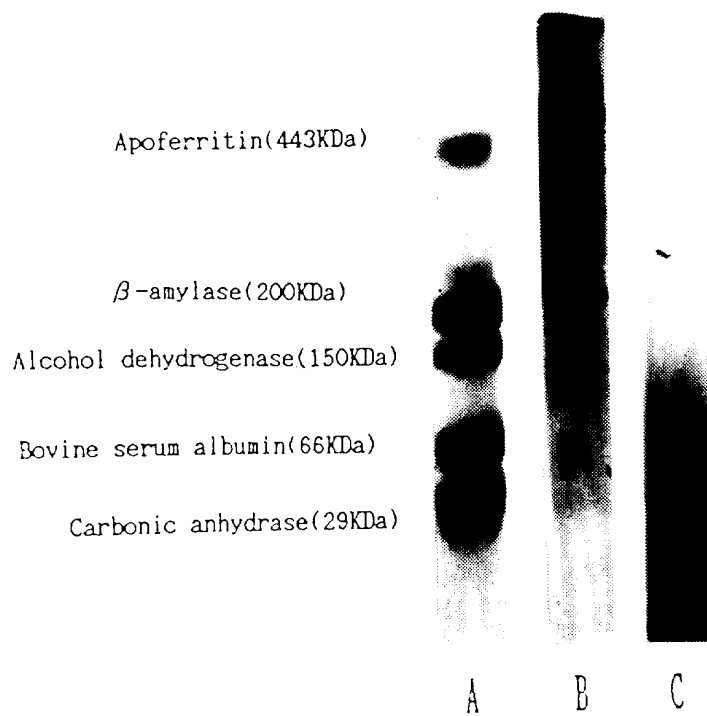


Fig. 13. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE) for B- and E-type gelatin was carried out at pH 7.0 by 8mA per each sample and in 5% concentration of polyacrylamide gel for 6hrs.
 A; Marker protein, B; B-type gelatin, C; E-type gelatin

Table 1. Proximate compositions and heavy metal contents for B- and E-type gelatin

Product	Proximate composition(%)				Heavy metal(ppm)				
	Moisture	Crude protein	Crude fat	Ash	Zn	Cd	Pb	Mn	Mg
market gelatin	11.8	86.3(97.8)	1.4	1.2	1.68	ND*	0.30	95.69	ND
B-type gelatin	5.0	94.3(99.3)	0.6	0.4	3.73	ND	0.04	ND	ND
E-type gelatin	4.5	94.6(99.1)	1.1	0.4	9.19	ND	0.10	23.26	ND

* Not detected

Values in parentheses are dry basis.



(2) 물리적 성질

제조된 젤라틴에 대한 응고점, 용점, 점도, jelly 강도, 등전점, 탁도 및 전기전도도를 측정된 결과를 Table 2에 나타내었다. 젤라틴은 찬물에서 30분정도 팽윤시킨 후, 50~60°C에서 용해시키면 균질한 젤라틴 수용액(渡瀨와西成, 1984)이 되며 그 수용액은 농도가 충분히 높을 때 또는 낮은 온도에서 gel을 형성하며 유동성을 잃게 되고(Hayashi와 Oh, 1983) 이 gel은 다시 온도를 상승시킴으로서 sol로 변화하게 되는데, 이와 같이 온도의 변화에 의해 gel↔sol의 가역적 변화에 대한 측정값을 응고점과 용점으로 표시하였다. 본 시제품의 응고점과 용점은 B-type이 각각 7°C와 17°C로서 E-type보다 높았지만 시판 젤라틴보다는 낮았다. 점도는 B-type이 3.48cps로서 시판 젤라틴보다 높았으나 E-type은 0.84cps로서 훨씬 낮았다. 일반적인 젤라틴의 점도범위는 2.0~7.5cps 정도이다(Kinsella, 1983). Jelly 강도는 시판 젤라틴이 104g인데 비하여 B-type는 49g이고 E-type는 겔이 형성되지 않아서 측정하지 못하였다. Petersen 등(1981)은 소의 뼈와 가죽에서 젤라틴의 추출은 알칼리로 처리하는 것보다 효소로 처리하는 것이 훨씬 시간이 단축되는 반면에, 물성의 차이는 없는 것으로 보고하였지만 본 실험에서 사용한 어피의 경우는 Alcalase에 의한 전처리 과정에서 많은 분해로 인해 겔화가 일어나지 않는 것으로 짐작되며 이러한 이유로 젤라틴으로 사용하기에는 다소 문제가 있는 것으로 생각된다. 이러한 문제를 개선하기 위해서는 효소처리 시간이나 농도를 달리해서 더욱 더 자세한 검토가 있어야 할 것으로 본다. 등전점은 B-type과 E-type이 각각 pH 4.95와 5.38로 측정되었는데, 일반적인 B-type젤라틴의 등전점인 pH 4.7~5.0의 범위와(식품첨가물 공전, 1988) 일치하였지만 효소로 처리하여 얻은 것은 이 범위를 벗어났다. B-type 제품의 등전점이 낮은 것은 알칼리로 전처리되는 과정에서 아미노산 중의 glutamine과 asparagine의 아미드기가 카르복실기로 치환되기 때문이다(Eastoe 등, 1977). 탁도는 B-type이 7.05ppm, E-type이 8.49ppm으로

Table 2. Physical properties for B- and E-type gelatin

Item	Market gelatin	B-type gelatin	E-type gelatin
Setting point($^{\circ}C$)	22	7	2
Melting point($^{\circ}C$)	25	17	4
Jelly strength(g)	104	49	-
Viscosity(cps)	2.60	3.48	0.84
Isoelectric point	4.40	4.95	5.38
Turbidity(ppm)	1.26	7.05	8.49
Electric conductivity ($\mu mho/cm$)	193.2	2.1	57.1

서 시판 젤라틴보다 불투명하였으며, 전기전도도는 B-type과 E-type이 각각 2.1과 57.1 μ mho/cm로서 시판 젤라틴의 193.2 μ mho/cm 보다 낮았는데, 이것은 무기질 함유량이 낮기 때문인 것으로 생각된다. 결과적으로 B-type은 시판 젤라틴보다 jelly강도가 낮았으나 점도는 높았으며 활성탄과 이온 수지에 의한 정제로 인하여 무기질 함유량이 적어 전기 전도도는 낮았다. 浜田(1990)는 이러한 어피 젤라틴의 추출 중 농축과정에서 에탄올을 첨가하는 침전법을 이용한 결과jelly 강도가 증가하였다고 보고한 바 있다.

4. 회분식에 의한 젤라틴의 가수분해

(1) 효소 선별

가자미피(皮) 젤라틴에 대한 각종 단백질 분해효소의 활성을 비교 검토하기 위해 가수분해도를 측정한 결과는 Fig. 14와 같다. Fig. 14에 나타난 바와같이 trypsin이 다른 단백질 분해효소보다 분해율이 높은 것으로 나타나 trypsin을 젤라틴 분해효소로 선정하였다. 김 등(1991b)은 pH-drop법을 이용한 1% 대구피 용액에 대한 collagenase, trypsin, pronase, collagenase/trypsin, collagenase/pronase의 활성을 비교한 결과 collagenase를 가하고 5분 후에 pronase를 가하였을 때 활성이 가장 좋다고 보고하였고, Bhumiratana 등(1977)은 trypsin이 어육단백질농축물(FPC)에 대해 chymotrypsin이나 papain보다 더 높은 반응성을 가진다고 보고한 바 있다.

(2) 젤라틴의 가수분해 조건

1) 반응온도

기질농도를 2%로 하여 pH 8.0으로 조절하고 trypsin를 E/S(w/w)=0.003되

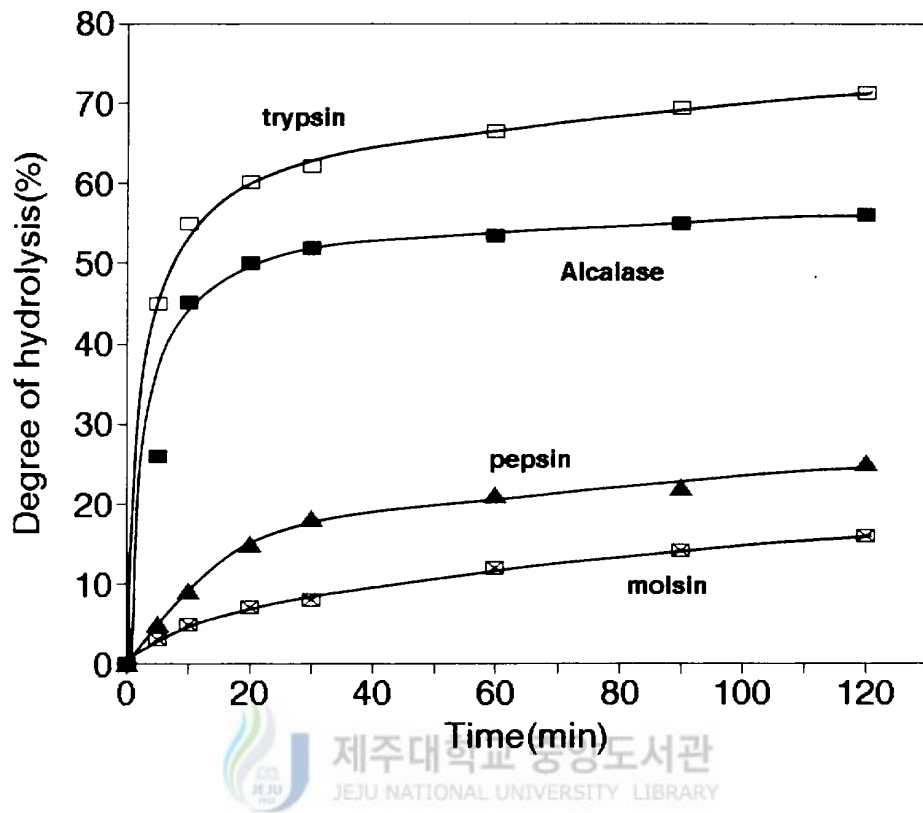


Fig. 14. Comparison of the proteolytic activity of Alcalase, trypsin, pepsin and molsin.

도록 가하여 각 온도별로 1시간 동안 가수분해시킨 결과는 Fig.15와 같다. 온도가 증가함에 따라 B-type과 E-type 젤라틴 모두 55°C에서 분해율이 최고값을 나타내었으나 60°C에서는 분해율이 현저하게 떨어졌는데 이같은 결과는 열에 의한 효소의 불활성화에 기인된 것으로 생각된다. Bhumiratana 등(1977)은 FPC에 대해 trypsin을 E/S(w/w)=0.001되도록 가하고 pH를 8.0으로 조절하여 온도변화에 따라 가수분해시킨 결과 50°C 부근이 최적 온도라고 보고하였고, Edward 등(1980)은 녹엽단백질농축물(LPC)을 trypsin으로 47°C에서 4시간 가수분해시킨 결과 가수분해율이 97%이었다고 보고한 바 있다. E-type 젤라틴의 가수분해도가 B-type의 그것에 비해 온도 변화에 관계없이 약 16%정도 높았다.

2) 반응용액의 pH

기질농도 2%에 trypsin을 E/S(w/w)=0.003되도록 가하고 반응온도를 앞의 결과에 따라 55°C로 하고 pH를 달리하면서 1시간 동안 가수분해도를 측정한 결과는 Fig.16과 같다. Fig.16에서 보는 바와 같이 B-type과 E-type 젤라틴은 pH증가에 따라 가수분해도가 완만히 증가하다가 pH 9.0에서 최대값을 나타내었고, 그 이상의 pH에서는 가수분해율이 오히려 감소하는 경향을 나타내었다. 이같은 결과는 Bhumiratana 등(1977)이 trypsin으로 5% FPC를 가수분해시킬 때 최적 pH가 9.0이라는 결과와 일치하였다. 김 등(1991b)은 대구피를 pronase로 가수분해시킬 때 pH 6.0에서 가수분해도가 가장 높았으나 pH 9.0 이상에서는 가수분해도가 현저히 감소하였다고 보고하였으며, Fujii와 Kobayashi(1973)는 hide collagen을 pronase로 가용화시킬 때 pH 6.0에서 가장 높은 수율을 나타내었고, Gildberg와 Raa(1979)는 Capelin(*Mallotus Villosus*)피(皮)를 소화효소로 가용화시킬 때 pH 4.0에서 가수분해도가 가장 높았다고 보고한 바 있다. 최적 pH에서 E-type 젤라틴의 가수분해도는 81%로서 B-type의 그것에 비해 약 18%

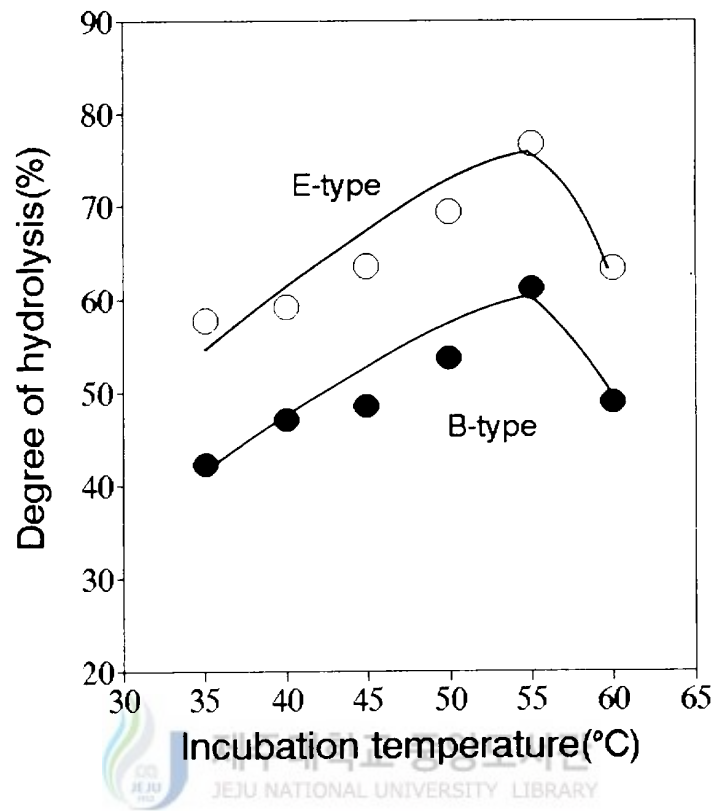


Fig. 15. Effects of incubation temperature on the hydrolysis of E- and B-type gelatin with 0.3% trypsin at pH 8 for 1hr.

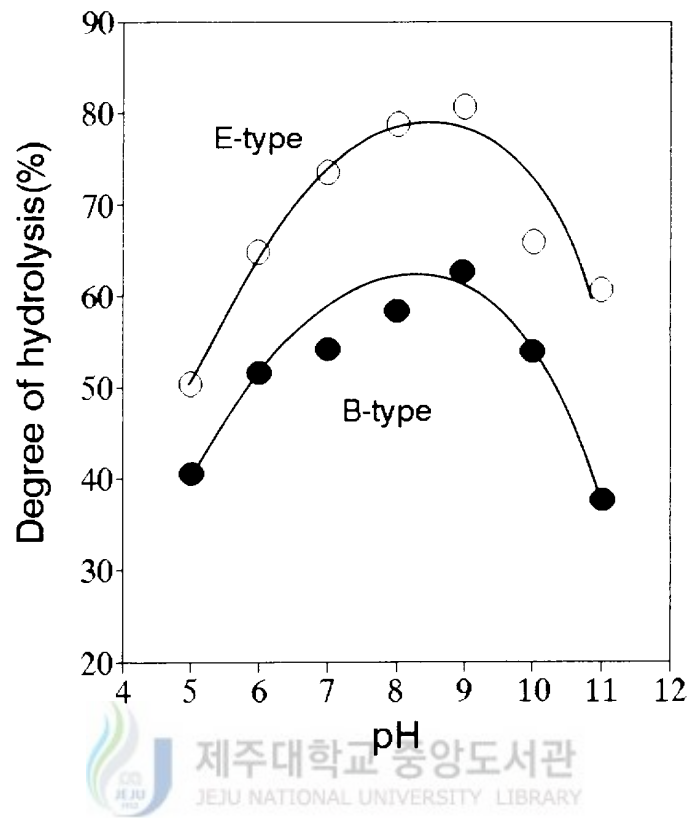


Fig. 16. Effects of pH on the hydrolysis of E- and B-type gelatin with 0.3% trypsin at 55°C for 1hr.

정도 높았다.

3) 반응시간

기질용액 2%에 trypsin을 E/S(w/w)=0.003되도록 가하고 앞의 결과에 따라 반응온도는 55°C와 pH는 9.0으로 하여 반응시간을 달리하면서 가수분해도를 측정한 결과는 Fig.17과 같다. Fig.17에 나타난 바와 같이 E-type 젤라틴의 경우 가수분해할 때 1시간까지 가수분해도는 급격히 증가하다가 그 이상 반응시간이 증가하여도 분해도는 큰 변화가 없었으나 B-type 젤라틴은 반응시간 1시간까지 급격히 증가하다가 반응시간 4시간까지 가수분해도는 완만히 증가하는 경향을 나타내었다. 최적 반응시간은 B-type과 E-type 젤라틴을 각각 4시간과 1시간으로 하였다. 김 등(1991b)은 4% 대구피 용액에 0.03% pronase를 가하고 50°C에서 반응시간을 변화시켜 가수분해도를 측정한 결과 반응시간 1시간까지는 가수분해도가 비교적 급격히 증가하다가 반응시간 3시간까지 약간 증가를 보였다고 하였고, Bhumiratana 등(1977)은 5% FPC 기질용액에 E/S(w/w)=0.001되도록 trypsin을 가해 40°C에서 반응시간에 대한 분해율을 보면 1시간까지는 급격히 증가하다가 그 이후에서는 계속적으로 완만히 증가하였다고 하였다.

4) 효소농도

기질용액 2%에 반응온도, 반응시간 및 pH는 앞의 결과에 따라 최적 조건으로 하고 효소농도만을 달리하였을 때의 가수분해도를 Fig.18에 나타내었다. 효소농도가 E/S(w/w)=0.001까지는 급격히 증가하다가 그 이상의 농도에서는 완만히 증가하여 0.1%를 최적 효소농도로 선정하였다. 김 등(1991b)은 pronase로 대구피를 가수분해시킬 때 0.03%에서 가수분해도가 78.8%였으나 대구피를 collagenase로 1시간 가수분해 후 pronase로 처리한 경우 가수분해도는 90.83%이었다고 보고하였고, Fujii와 Kobayashi

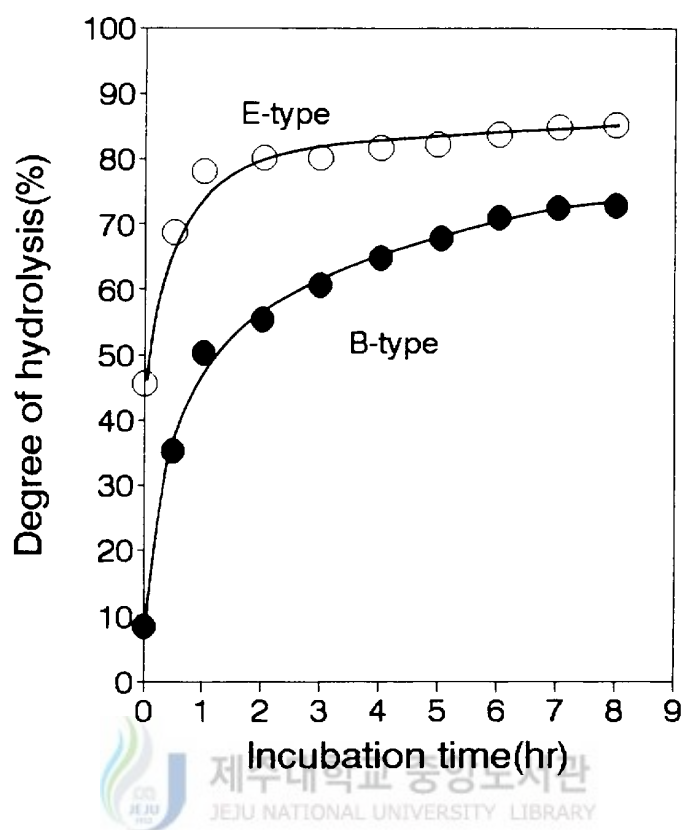


Fig. 17. Effects of incubation time on the hydrolysis of E- and B-type gelatin with 0.3% trypsin at 55°C and pH 9.

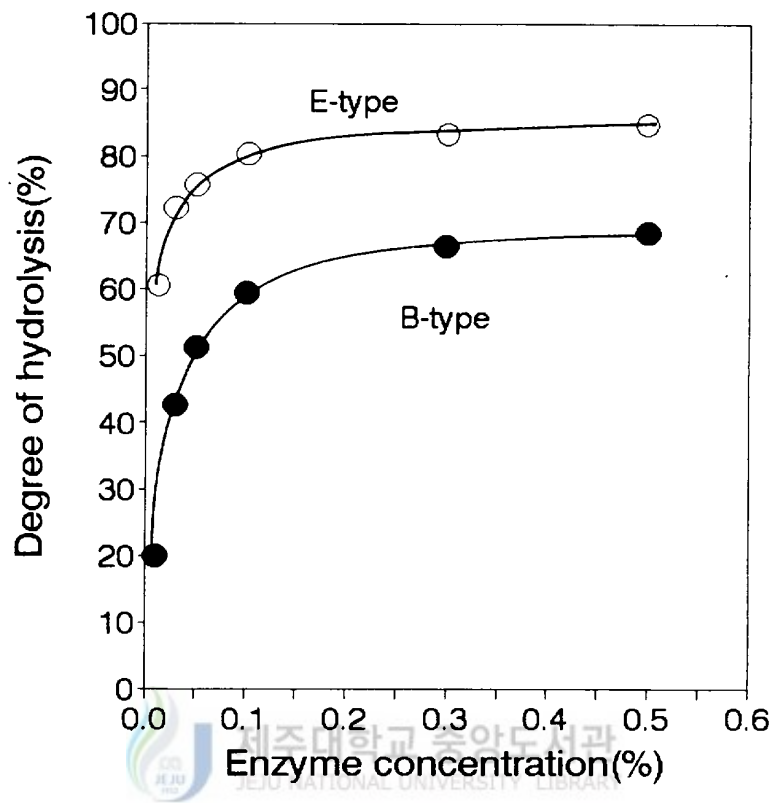


Fig. 18. Effects of enzyme concentration on the hydrolysis of E- and B-type gelatin with trypsin for 1hr and 4hrs at 55°C, pH 9, respectively.

(1973)는 2% pronase로 hide collagen을 40시간 가수분해한 결과 88%가 분해되었다고 보고한 바 있다.

이상의 결과로 미루어 보아 trypsin의 가자미피 젤라틴에 대한 최적 가수분해조건은 B-type과 E-type 젤라틴 모두 온도 55°C, pH9.0 및 효소농도 E/S(w/w)=0.001로 같았으나 반응시간만 E-type 젤라틴이 1시간으로 B-type 젤라틴의 4시간에 비해 훨씬 분해시간이 짧았으며 최적 조건하에서 B-type 및 E-type 젤라틴의 가수분해도는 각각 63%와 82%이었다.

(3) 분자량

Fig. 19에서와 같이 B-type 젤라틴 가수분해물의 분자량이 6.5~25KDa으로 널리 분포되어 있지만, E-type의 경우는 분자량이 6~20KDa으로 분포되어 있는 것을 알 수 있었다. 보다 정확한 분포를 알기 위해 gel여과법으로 분자량을 확인한 결과(Fig. 20), SDS-PAGE 분석법과 같이 넓게 분포되어 있었는데 B-type의 경우 분자량이 15KDa이 주종을 이루고 있었으며 E-type의 경우는 분자량이 12.4KDa이 주종을 이루고 있었고 유리아미노산은 존재하지 않는 것으로 확인되었다. 이처럼 E-type 젤라틴 가수분해물이 B-type의 그것보다 분자량이 낮은 것은 전처리 과정에 사용된 Alcalase가 어피를 분해시켜 분자량을 감소시킨 것으로 생각된다. Weiss(1976)는 pepsin에 의한 젤라틴가수분해물의 분자량은 69, 21KDa였다고 보고하였고 김 등(1991b)은 대구피를 collagenase로 가수분해시킨 가수분해물의 분자량은 10~20KDa 범위였고 pronase로 처리한 것은 15 KDa 정도가 주종을 이루었으나 collagenase로 1시간 분해후 pronase로 다시 3시간 분해시킨 것은 7~10KDa 범위였다고 보고한 바 있다. 이와 같이 효소에 의한 젤라틴 분해물의 분자량이 비교적 큰 것은 젤라틴 중에는 Gly-Gly, Gly-Pro 사슬이 많고, 이들 사슬의 절단이 곤란하기 때문에 casein이나 gluten처럼

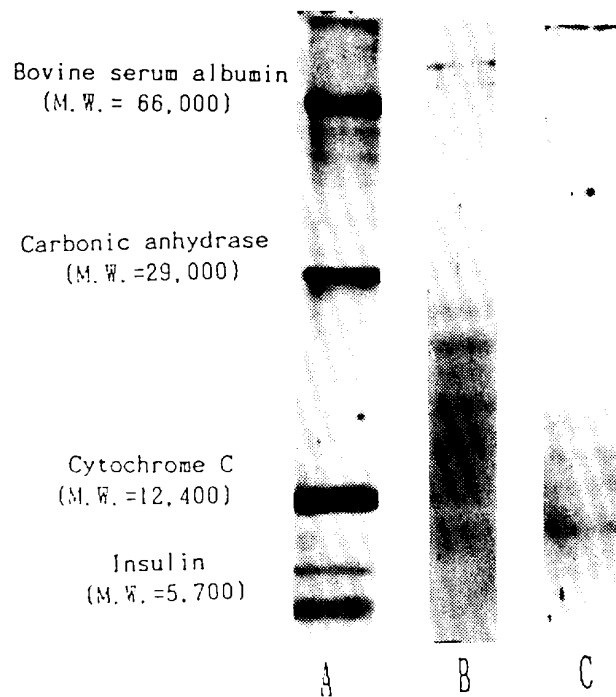


Fig. 19. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) for hydrolysate of flounder skin gelatin. (pH 8.3, 15mA for 12hrs, 15% polyacrylamide gel)
 A : Marker protein
 B : B-type gelatin hydrolysate
 C : E-type gelatin hydrolysate.

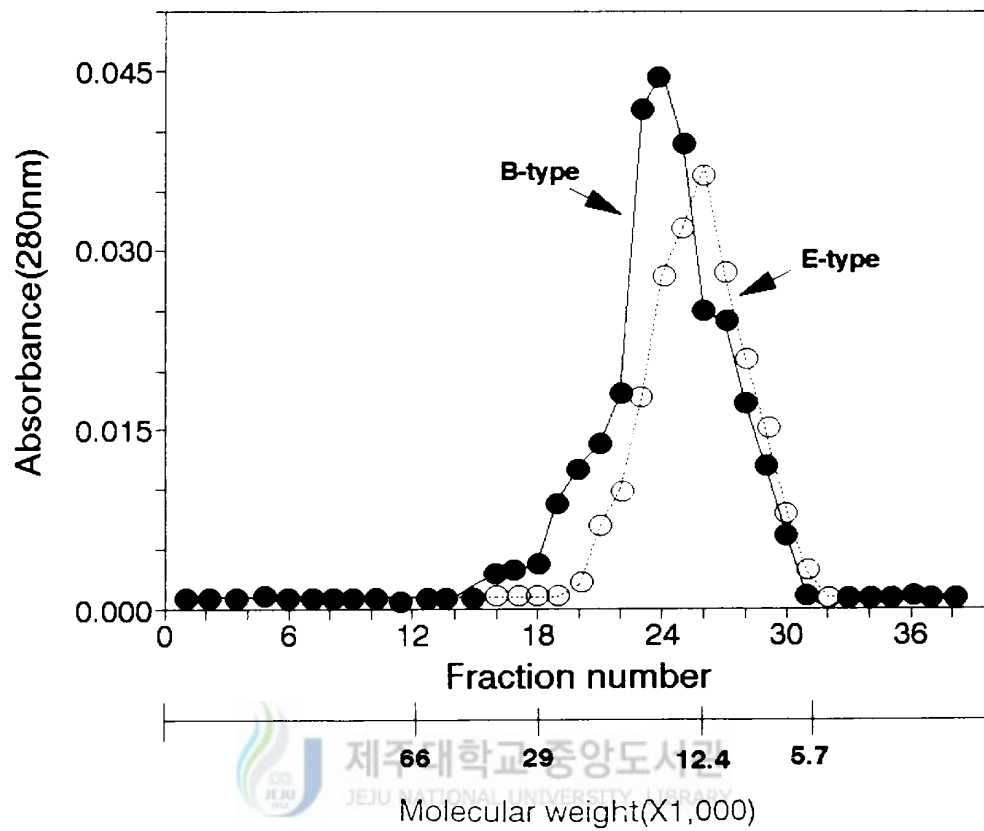


Fig. 20. Gel filtration of hydrolysate of flounder skin gelatin on a Sephadex G-50 column (2×90cm).
 (Eluent : phosphate buffer(pH 8.0), flow rate : 30ml/hr, fraction volume : 10ml).

분해율을 높일 수 없었다(丹戶 등, 1984) 그러나 젤라틴을 복합효소로 처리한다면 아미노산 수준으로 분해가 가능할 것으로 보아 이에 관한 연구가 이루어져야 할 것으로 본다.

(4) 가수분해물의 일반성분 및 점도

B-type 및 E-type 젤라틴가수분해물의 일반성분, 등전점 그리고 전기전도도는 Table 3와 같다. 조단백질 함량은 B-type과 E-type이 각각 93.1%와 94.3%로 원료인 젤라틴의 단백질 함량과 거의 같았으나 회분 함량은 원료인 젤라틴에 비해 가수분해물에서 5배 이상 증가를 보였는데 이같은 결과는 가수분해시킬 때 NaOH로 pH를 조절하였기 때문에 염의 증가에 기인된다고 판단된다.

가수분해물의 등전점은 B-type과 E-type이 각각 pH 5.30와 pH 5.27로 측정되었는데 이는 알칼리로 처리하여 얻은 젤라틴의 등전점이 대개 pH 4.7~ 5.0인 범위(식품첨가물공전, 1988)와는 다소 차이가 있는 것으로 나타났다. 전기전도도는 B-type과 E-type이 각각 352.8μ mho/cm와 268.8μ mho/cm로 시판젤라틴의 193.2μ mho/cm보다 높았는데 이같은 결과는 효소의 작용으로 인하여 이온 함량이 증가되었기 때문이라 생각된다.

젤라틴 가수분해물의 점도는 Table 4에서와 같이 B-type 및 E-type 젤라틴 가수분해물 모두 농도가 높아짐에 따라 점도가 증가하였으며 B-type의 점도가 E-type에 비해 약간 높았다. 온도의 경우는 B-type 및 E-type 젤라틴 가수분해물 모두 온도가 높아짐에 따라 점도는 감소하였으나 B-type과 E-type간에는 점도 차이가 있었다. 각 type에서 pH 변화에 따른 점도 변화는 거의 없었다. 김과 이(1987)는 말쥐치육 단백질의 효소적 가수분해물을 이용한 plastein 합성물의 농도가 증가함에 따라 점도가 증가한다고 보고하였고, 김과 전(1991)은 효소적 수식에 의한 가자미피 젤라틴의 pH 변화에 따른 점도 차이는 거의 없다고 보고한 바 있다. Hayashi 등(1990)은 아미

Table 3. Proximate composition and physical properties of gelatin hydrolysates

Gelatin hydrolysate	Proximate composition(%)				Electronic conductivity ($\mu\text{mho/cm}$)	Isoelectric point (pH)
	Moisture	Crude protein	Crude fat	Ash		
B-type	2.08	93.14	0.21	2.34	352.8	5.30
E-type	2.78	94.25	0.47	2.16	268.8	5.27

Table 4. Viscosity of gelatin hydrolysates

Viscosity(Cp)	Concentration(%) ¹⁾					
	1	2	4	6	8	10
B-type gelatin hydrolysate	0.98	1.05	1.14	1.29	1.54	1.81
E-type gelatin hydrolysate	0.97	1.01	1.07	1.17	1.31	1.65

Viscosity(Cp)	Temperature(°C) ²⁾						
	20	30	40	50	60	70	80
B-type gelatin hydrolysate	0.96	0.75	0.68	0.50	0.42	0.36	0.33
E-type gelatin hydrolysate	0.95	0.82	0.60	0.51	0.42	0.35	0.34

Viscosity(Cp)	pH ³⁾				
	3	5	7	9	11
B-type gelatin hydrolysate	1.03	1.05	1.03	1.03	1.02
E-type gelatin hydrolysate	0.99	1.00	1.00	0.99	1.00

- 1) Viscosities of aqueous gelatin hydrolysate solutions were measured at 20°C, pH 7.0.
- 2) Viscosities of 1%(w/v) aqueous gelatin hydrolysate solutions were measured at pH 7.0.
- 3) Viscosities of 1%(w/v) aqueous gelatin hydrolysate solutions were measured at 20°C.

드화된 젤라틴은 높은 등전점을 가지며 이 젤라틴으로 만들어진 겔은 높은 점도와 낮은 겔강도를 가진다고 보고한 바 있다.

(5) 아미노산 조성

젤라틴 가수분해물의 아미노산 조성은 Table 5와 같다. B-type 젤라틴 가수분해물의 아미노산 조성과 E-type의 그것과는 거의 차이가 없었으며 glycine, alanine, proline, hydroxyproline, serine 등 단맛을 내는 아미노산 함량이 전체아미노산의 57%를 차지하였다. Glutamic acid(10.10%)와 aspartic acid(6.32%)는 감칠맛과 신맛을 갖는 아미노산이며 쓴맛을 내는 valine, leucine, phenylalanine, tyrosine, methionine, arginine, histidine 등의 함량은 전체아미노산에 대해 18%에 불과하였다. 특히 쓴맛을내는 arginine은 감칠맛 아미노산 : 단맛 아미노산 : 쓴맛 아미노산의 비가 2 : 2 : 1로 될때 오히려 좋은 맛의 느낌을 갖게 해준다고 한다 (大一와 武恒, 1973). 佐伯(1985)은 젤라틴 아미노산 수준까지 분해시킨 가수분해물은 단맛을 내는 아미노산들이 전체 아미노산의 50% 이상을 차지하고 있어 단맛이 있고, 변질하기 쉬운 아미노산으로서 쓴맛, 악취를 생성하기 쉬운 methionine과 cystine이 매우 적으며 쓴맛과 갈변하기 쉬운 tyrosine이 아주 적다고 보고하였으며 山本 등(1980)은 콜라겐 또는 젤라틴과 탈지 대두를 혼합하여 protease로 분해시키면 맛이 좋은 조미료를 제조할 수 있다고 하였고, 千畑 등(1979)은 콜라겐 가수분해물(M. W. = 1~2.5KDa)을 사라다유, 리놀렌산 및 리놀산에 첨가하였을 때 강한 항산화력을 나타내었다고 보고한 바 있다.

한편, B-type과 E-type젤라틴의 아미노산 조성은 어피의 전처리 방법에 따른 차이가 거의 없었고 대부분 glycine, alanine, glutamic acid 및 iminoacid (proline과 hydroxyproline)로 이루어져 있었다. 이들 아미노산의 잔기수가 전체 아미노산 잔기수의 약 70% 정도 차지하고 있었고, 이중

Table 5. Amino acid composition of gelatin hydrolysates

Amino acid	B-type gelatin hydrolysate		E-type gelatin hydrolysate	
	(g / 100g-protein)	(Residues/ 1000 residues)	(g / 100g-protein)	(Residues/ 1000 residues)
Hydroxyproline	7.29(8.10)*	59.93(66.54)	7.48(7.81)	61.44(64.35)
Aspartic acid	6.32(6.28)	51.26(50.84)	6.46(6.37)	52.23(51.73)
Threonine	2.47(2.50)	22.37(22.57)	2.58(2.60)	23.34(23.62)
Serine	5.91(6.38)	60.70(64.77)	6.32(6.24)	64.70(64.17)
Glutamic acid	10.10(10.05)	74.04(73.56)	9.64(10.07)	70.50(74.00)
Glycine	24.96(24.71)	358.34(354.57)	24.54(24.43)	351.92(351.70)
Alanine	9.72(9.61)	117.72(116.22)	9.88(9.53)	119.36(115.69)
Cysteine	0.46(0.47)	2.07(4.15)	0.46(0.43)	4.09(1.95)
Valine	2.06(1.93)	18.97(17.70)	2.01(2.06)	18.43(18.95)
Methionine	2.08(1.83)	15.01(13.43)	1.97(1.84)	14.23(13.33)
Isoleucine	1.13(1.03)	9.25(8.46)	1.13(1.12)	9.32(9.23)
Leucine	2.41(2.37)	19.80(19.45)	2.37(2.52)	19.46(20.76)
Tyrosine	0.41(0.43)	2.46(2.56)	0.34(0.34)	2.02(2.03)
Phenylalanine	2.17(2.16)	14.16(14.05)	2.01(2.15)	13.10(14.08)
Lysine	4.04(3.92)	29.80(28.86)	4.19(4.20)	30.85(31.01)
Histidine	0.72(0.73)	4.97(5.04)	0.69(0.73)	4.81(5.05)
Arginine	8.54(8.46)	52.86(52.33)	8.62(8.39)	53.26(52.02)
Proline	9.21(9.08)	86.30(84.89)	9.30(9.19)	86.96(86.32)

* : Values in the parentheses are data of gelatins.

iminoacid의 함량은 약 15% 정도이었다. Imino acid는 콜라겐 단백질에 만 특이하게 많이 분포되어 있는 것으로서 이것의 함량은 콜라겐의 열안정성과 분자구조, 그리고 콜라겐의 변성온도에 비례하는 것으로 알려져 있다(김 등, 1986). 또 浜田 등(1990)은 imino acid의 함량이 낮으면 젤라틴의 gelling capacity가 떨어진다고 하였다. Eastoe와 Leach(1977)는 척추동물에서 추출한 젤라틴의 hydroxyproline과 proline의 함량비는 대개 1:1.25로 일정하다고 보고하였으며 이것은 본 실험의 결과와 일치하였다. 젤라틴 아미노산 조성과 가수분해물의 아미노산 조성간에는 큰 차이가 없었다.

5. 연속식 막반응기를 이용한 젤라틴의 가수분해

(1) 막반응기장치 조건 설정

막반응기를 통한 유출속도는 가수분해물의 유출구에 유량계를 설치하여 측정하였다. 반응기에 증류수를 넣어 pH 9.0, 55°C로 조절한 다음 막을 통해 유출되는 양을 분당 10ml의 메스 실린더에 모아서 유량계 눈금(flow meter reading)에 대해서 유출속도를 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. 유출속도에 대한 회귀직선방정식은 $J=0.46 \times F-4.033$ 로 유량계 눈금에 대한 유출속도를 구하는 식으로 나타내었다.

막반응기에서 순환속도를 조절하기 위해서 순환펌프 조절기를 이용하여 순환속도를 변화시킴으로써 유출속도에 미치는 영향을 Fig. 7에 나타내었다. 압력이 30psig 되도록 압력밸브로 고정시킨 다음 순환펌프 조절기로 순환속도를 변화시켜 유출속도를 측정한 결과 Masterflex No.5까지는 변화율을 보였다. 따라서 본 막반응기 장치 시스템에서는 Masterflex No.5에서 작동하는 것이 가장 효율적이라 판단되었다.

유출속도에 미치는 압력의 영향은 Fig. 8에 나타내었다. 증류수를 대조구로 하여 각각의 젤라틴 농도에 대해 압력변화에 따른 유출속도를 나타낸 것으로

서 일정하게 압력을 증가시키에 따라 증류수는 비례적으로 증가하였으며, 각 기질의 농도가 증가함에 따라 압력의 변화에 따른 유출속도의 증가폭은 감소하였으며 1%기질에 대해서는 7.5psig 이상에서는 거의 일정한 유출속도를 나타내었다.

(2) 회분식 반응기에서 젤라틴에 대한 trypsin의 반응속도 상수

회분식 반응기에서 젤라틴의 기질농도 변화에 따른 효소활성을 측정하여 Lineweaver-Burk 방법에 따라 plot한 결과는 Fig. 21과 같다. 낮은 기질 농도에서 계산된 trypsin의 젤라틴에 대한 K_m 및 V_{max} 값은 각각 0.668 mgN/ml(0.371%), 1.468 mgN/ml/min였다. 김 등(1991b)은 pronase에 의한 대구피 가수분해시 K_m 및 V_{max} 값은 각각 1.82 mgN/ml, 0.06mgN/ml/min였고, Alcalase에 의한 젤라틴의 가수분해의 경우 K_m 과 V_{max} 값은 각각 0.377mgN/ml(0.209%), 0.562 mgN/ml/min였다고 보고하였다. Svendsen(1976)은 subtilisin Carlsberg로 pH 8.0, 온도 30°C에서 젤라틴을 가수분해시 K_m 값은 0.5% 근방이라고 보고한 바 있다.



(3) 연속식 막반응기에서 젤라틴에 대한 trypsin의 반응속도 상수

연속식 막반응기에서 반응속도 상수를 측정하기 위하여 각 기질농도를 시간 변화에 따른 생성량을 측정한 결과는 Fig. 22와 같다. 기질농도가 높을수록 정상상태(steady state)에 도달하는 시간이 길었으며 기질농도 6%일때 반응시간 30분이 지나 정상상태에 도달하였다. 각각의 기질농도에 대한 기울기를 측정하여 Lineweaver-Burk plot 하면 Fig. 23과 같다. Michaelis-Menten상수 K_m 값 및 V_{max} 값은 각각 1.162 mgN/ml 및 0.347

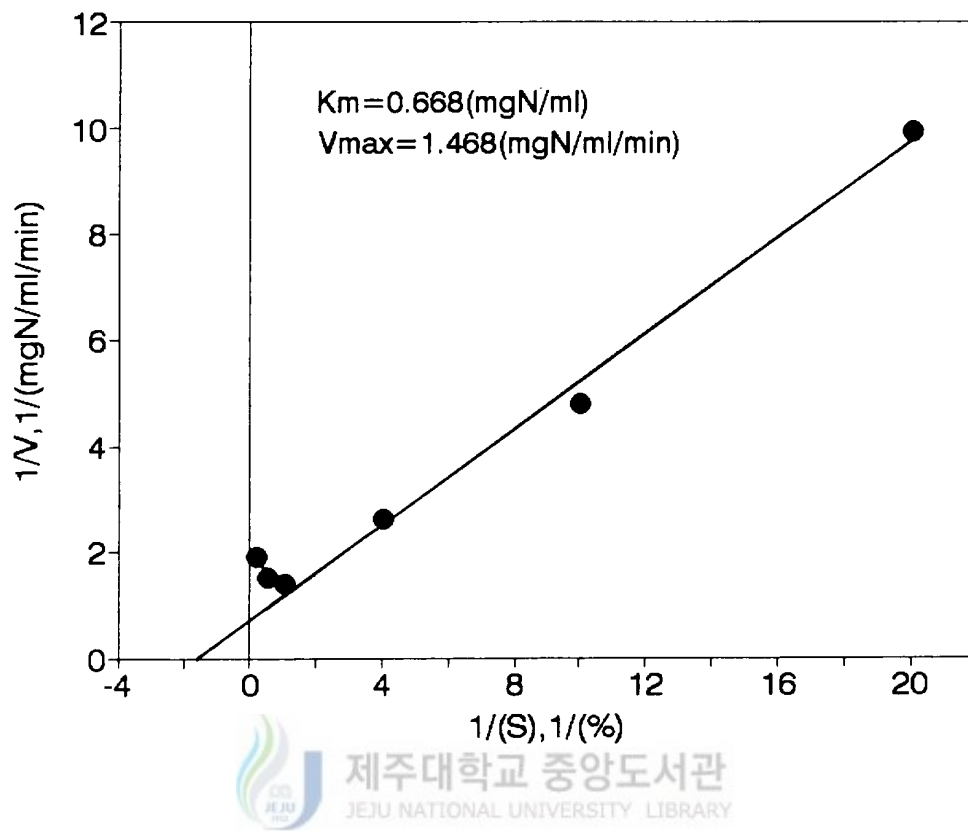


Fig. 21. Lineweaver-Burk plots for trypsin-gelatin hydrolysis in a batch reactor, pH=9, T=55°C, E=0.05mg/ml

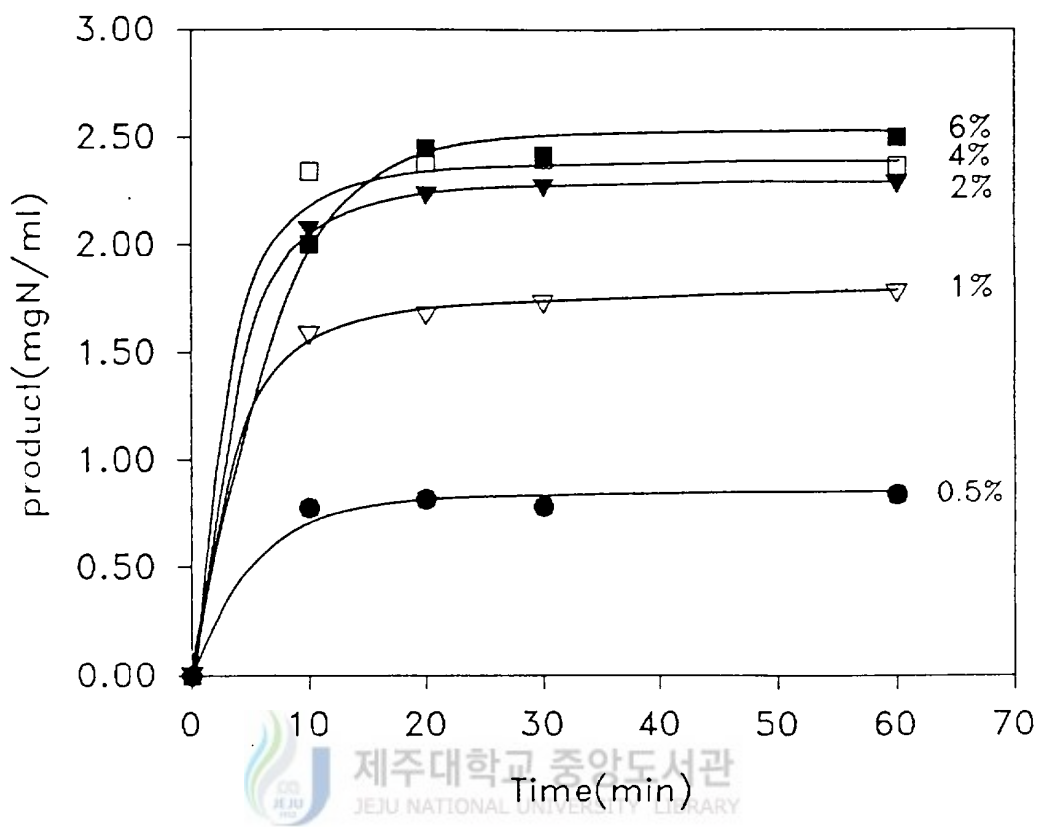


Fig. 22. CMR kinetics - effect of substrate concentration on product concentration at various flounder skin gelatin concentrations. (pH 9.0, T=55°C, E=0.1mg/ml, J=7.79ml/min, V=500ml, Q=860ml/min)

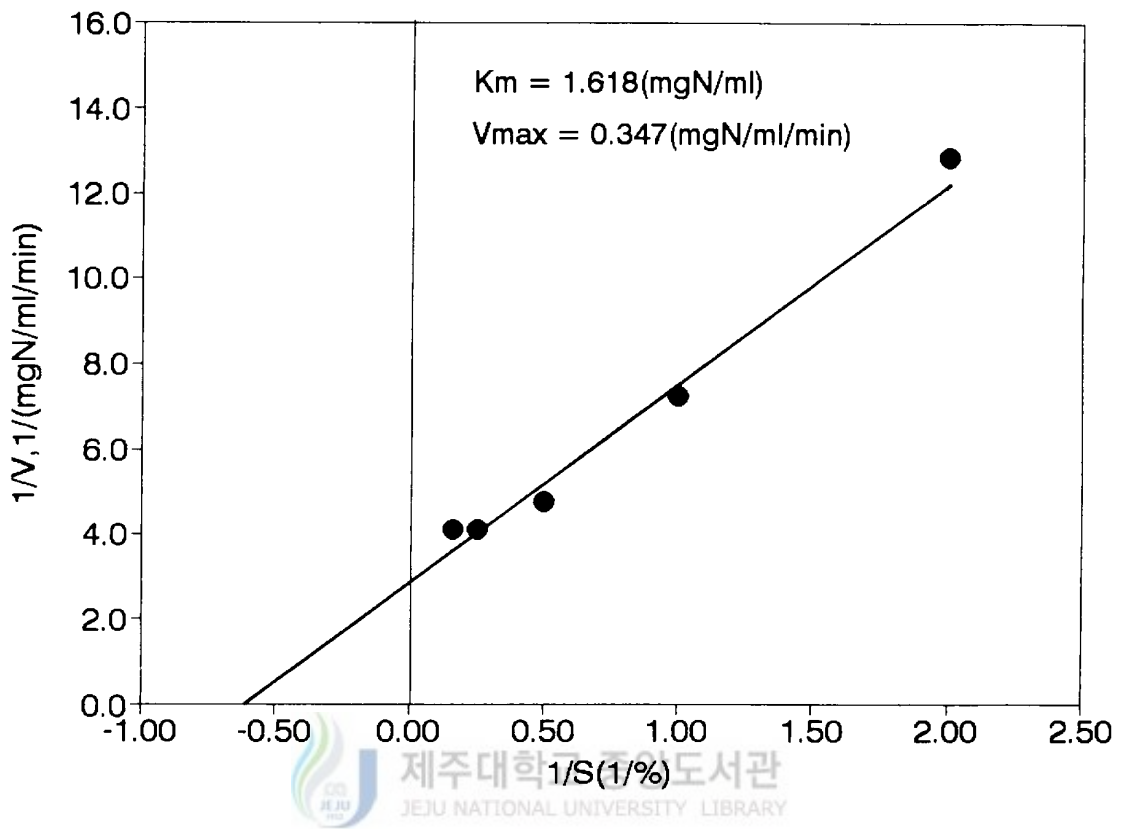


Fig. 23. Lineweaver-Burk plot for trypsin-flounder skin gelatin hydrolysis in CMR. (pH 9.0, T=55°C, E=0.1mg/ml, J=7.79ml/min, Q=860ml/min, V=600ml)

mgN/min였다. Mannheim(1990)은 Km값이 막반응기에서 최적 기질농도의 추정에 이용될 수 있으며 Km값보다 낮은 기질농도에서는 반응속도가 Vmax값보다 매우 낮기 때문에 촉매능을 잃게 되고 Km값보다 높은 기질농도에서는 반응혼합물 중에 고형물의 증가를 초래하였다고 보고하였다. Bliss와 Hultin(1977)은 pronase로 casein의 분해시 Km값이 1.67%였다고 보고하였고, Alder-Nissen 등(1986)은 Alcalase로 casein의 가수분해시 한외여과막 반응기를 효율적으로 사용하기 위해서는 Km값이 0.11~0.5%였다고 보고하였다. 또한, Svendsen(1976)과 Alford 등(1984)은 α -chymotrypsin으로 casein의 가수분해시 Km값이 각각 0.1~0.2% 및 0.26%였다고 보고한 바 있다.

회분식과 연속식에서의 Michaelis-Menten상수는 Table 6에 나타내었다. 연속식에서 Km값은 회분식에 비해 2.4배 정도 큰 반면 Vmax, K_2 값은 매우 작았다. 이와 같이 연속식에서 효소와 기질의 친화력이 낮게 나타나는 것은 효소의 일부가 누출 되었거나 막표면에 효소의 흡착으로 인한 활성저하, 반응혼합물의 순환에 의한 기계적인 전단응력(shearing forces) 등 여러인자에 기인되는 것으로 판단된다(Mannheim, 1985). 연속식에서 Vmax와 K_2 값이 회분식에 비해 각각 4.2 및 8.5배 정도 낮은 것은 위에서 설명한 원인들에 의해 막반응기에서 trypsin의 활성이 감소되는 것으로 판단된다. 기질에 대한 효소의 친화도의 척도로서 Vmax/Km비가 클수록 기질과 효소의 친화도는 크게 되는데 회분식에 비해 막반응기에서 Vmax/Km비가 10배 정도 낮게 나타났다.

(4) 연속식 막반응기에서의 젤라틴 가수분해 조건

1) 효소농도

연속식 막반응기에서 E-type젤라틴 1%용액에 효소농도를 변화시켜 각각

Table 6. Summary of kinetic parameters for batch and CM reactors

Kinetic constants	Batch reactor	CMR
K_m (mg\%/ml) (%)	0.668 (0.371)	1.618 (0.898)
V_{max} (mg\%/ml/min)	1.468	0.347
* K_2 (min) ⁻¹	29.360	3.470
V_{max}/K_m (min) ⁻¹	2.198	0.214
** R^2	0.980	0.990

* $K_2 = V_{max}/E$ (min)⁻¹

** R : Relative coefficient

의 효소가 작용하여 정상상태에 도달하였을때의 가수분해도를 측정한 결과는 Fig. 24와 같다. 1%기질에 대해 효소농도가 0.1mg/ml까지는 가수분해도가 급격히 증가하다가 그 이상으로 효소의 농도가 증가하여도 가수분해도는 72%로 거의 일정하였다. 따라서 효소농도는 0.1mg/ml(S/E=100)가 적합하다고 판단되었다. Edward 등(1978)은 0.5% 소맥 불용성단백질에 효소를 S/E=250(w/w)되게 가하여 가수분해시킨 결과, 가수분해도는 55%였다고 하였으며, Belinda 등(1986)은 Alcalase로 대두단백질을 가수분해시킬 때 기질에 대해 효소농도가 2.5%에서 가수분해도가 79.0%였다고 보고하였다. Payne등(1978)은 한외여과막 반응기에서 녹엽단백질을 trypsin농도가 S/E=500(w/w)되게 가하여 4시간 가수분해시켰을 때 가수분해도는 97%였다고 보고한 바 있다.

2) 기질농도

연속식 막반응기에서 일정한 효소량에 대해서 기질농도의 변화에 따른 가수분해도는 Fig. 25과 같다. 기질 1%(w/v) 이하의 젤라틴에서는 가수분해도가 70% 이상으로 나타났으나 기질농도가 그 이상으로 증가함에 따라 가수분해도는 다소 감소하는 경향을 보였다. 또한, 기질농도가 낮을수록 정상상태에 도달되는 시간은 단축되었지만 생산성은 오히려 낮아지는 경향을 보였다. 이같은 결과는 회분식 반응기에서 관찰되었던 기질저해가 막반응기에서는 나타나지 않았기 때문이라고 생각된다.

기질대 효소비(S/E, w/w)의 변화에 따른 가수분해도는 Fig. 26에서와 같이 S/E가 1000(w/w)에서 20(w/w)으로 낮아졌을때 가수분해는 25% 정도 높았으며 경향을 보였으며, 100(w/w)에서는 가수분해도가 72% 였다. 그러나 그 이하에서도 가수분해도는 거의 같았으므로 본 실험에서는 기질대 효소비는 100(w/w)으로 하였다. Deeslie와 Cheryan(1980)는 대두단백질을 pronase로 연속적 가수분해시 최적 E/S비는 1/9와 1/16사이 였다고 보

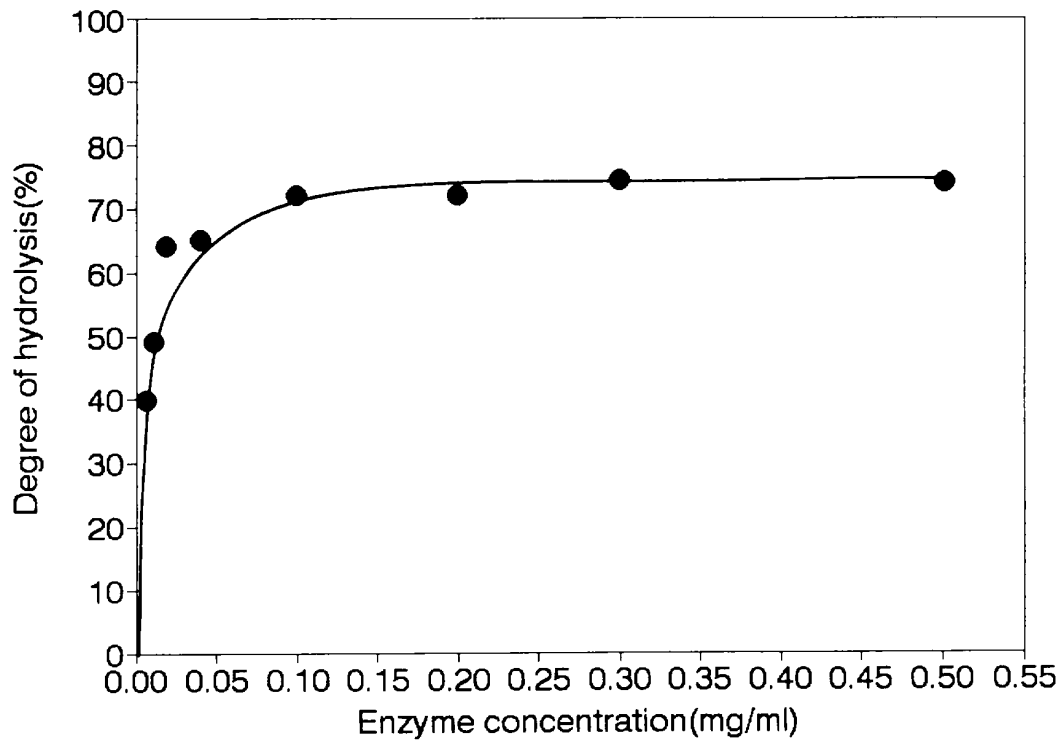


Fig. 24. Effect of enzyme concentration on the hydrolysis in CMR, trypsin-flounder skin gelatin. (pH 9.0, T=55°C, $S_0=1\%$ (w/v), J=7.79ml/min, V=500ml)

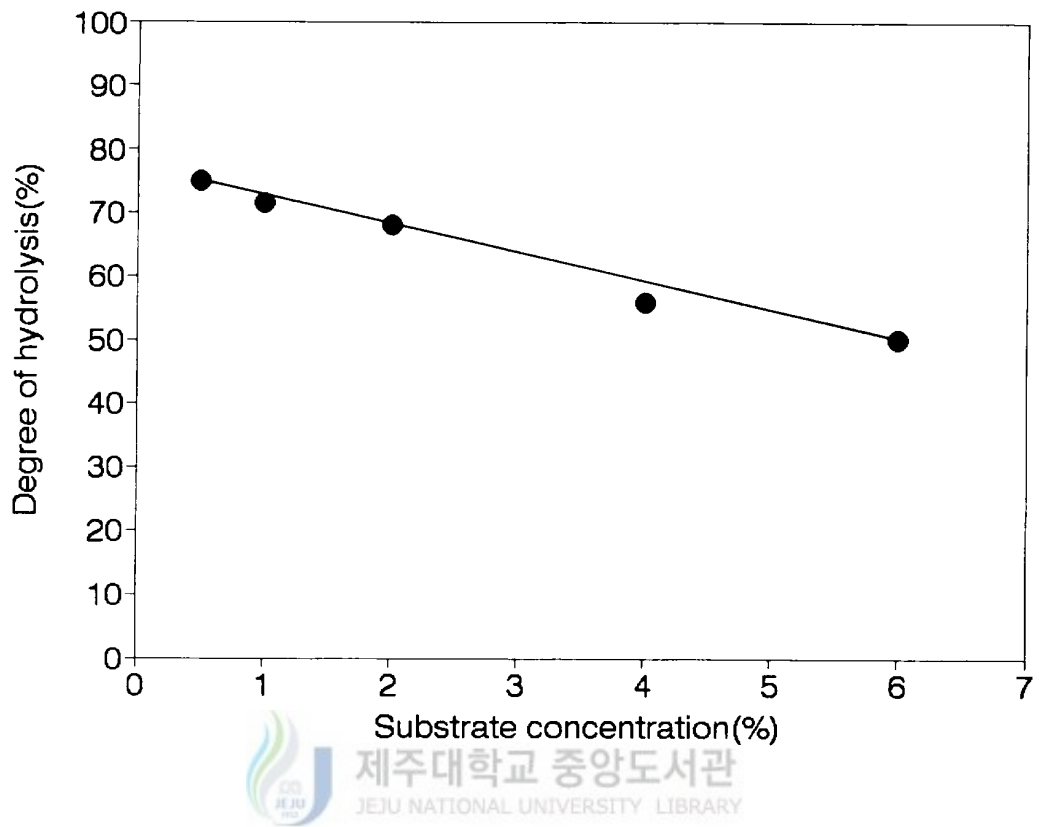


Fig. 25. Effect of substrate concentration on the hydrolysis in CMR, trypsin-flounder skin gelatin. (pH 9.0, T=55°C, E=0.1mg/ml, V=500ml)

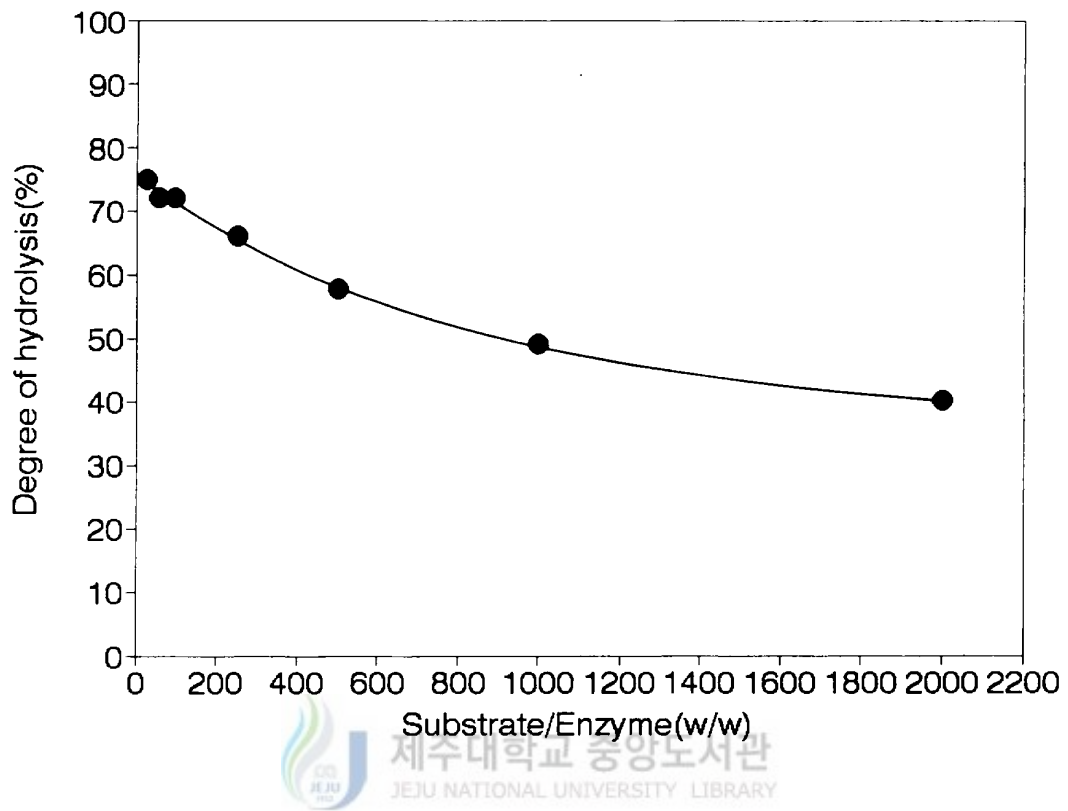


Fig. 26. Effect of substrate to enzyme ratio(w/w) on the hydrolysis in CMR, trypsin-flounder skin gelatin. (pH 9.0, T=55°C, J=7.79ml/min, V=500ml)

고한 바 있다.

3) 반응부피 및 유출속도

연속식 막반응기에서 젤라틴 가수분해시 반응기의 부피에 의한 가수분해도를 반응부피를 400ml에서 1000ml까지 변화시켜 측정한 결과 Fig. 27과 같다. 반응혼합물의 부피가 400ml이하에서는 기계적장치의 제한으로 재순환이 불가능하였으며, 부피가 600ml이상에서는 가수분해도가 79%로 거의 일정하였다. 이러한 반응부피의 영향은 일정한 유출속도에서 효소와 기질이 접촉하여 반응할 수 있는 시간적 차이에 의해 결정되는 것으로 추측된다.

유출속도 변화에 따른 기질의 가수분해도를 측정한 결과는 Fig. 28과 같다. 유출속도가 높을수록 정상상태에의 도달은 빨랐지만 가수분해도는 다소 감소하는 경향을 보였다. 이 결과는 반응부피의 영향과 동일한 원인으로 빠른 유출속도로 인해 반응용기에서 기질과 효소가 작용할 시간이 감소되기 때문이라고 생각된다. 따라서 본 실험에서는 유출속도를 가수분해도가 75%인 7.79 ml/min으로 정하였다.

4) 잔류시간

반응기내에서 기질과 효소가 반응할 수 있는 접촉시간이며 정상상태에서 반응기내의 효소와 기질이 반응할 수 있는 잔류시간 변화에 따른 가수분해도를 Fig. 29에 나타내었다. Fig. 29에서와 같이 잔류시간이 10분에서 75분까지 증가함에 따라 가수분해도가 50%에서 74%로 급격히 증가하다가 그 이후로는 잔류시간이 증가되어도 가수분해도는 거의 일정하였다. 유출속도가 7.79 ml/min에서 잔류시간은 77분이었으며 이때의 기질의 가수분해도는 75%였다. 김 등(1991a)은 Alcalase로 대구피젤라틴을 가수분해시 유출속도가 7.31 ml/min에서 잔류시간 82분이 적합하다고 보고한 바 있다. Deeslie 등(1981)은 대두단백질을 pronase로 가수분해시 17분에서 34분으로 잔류시간

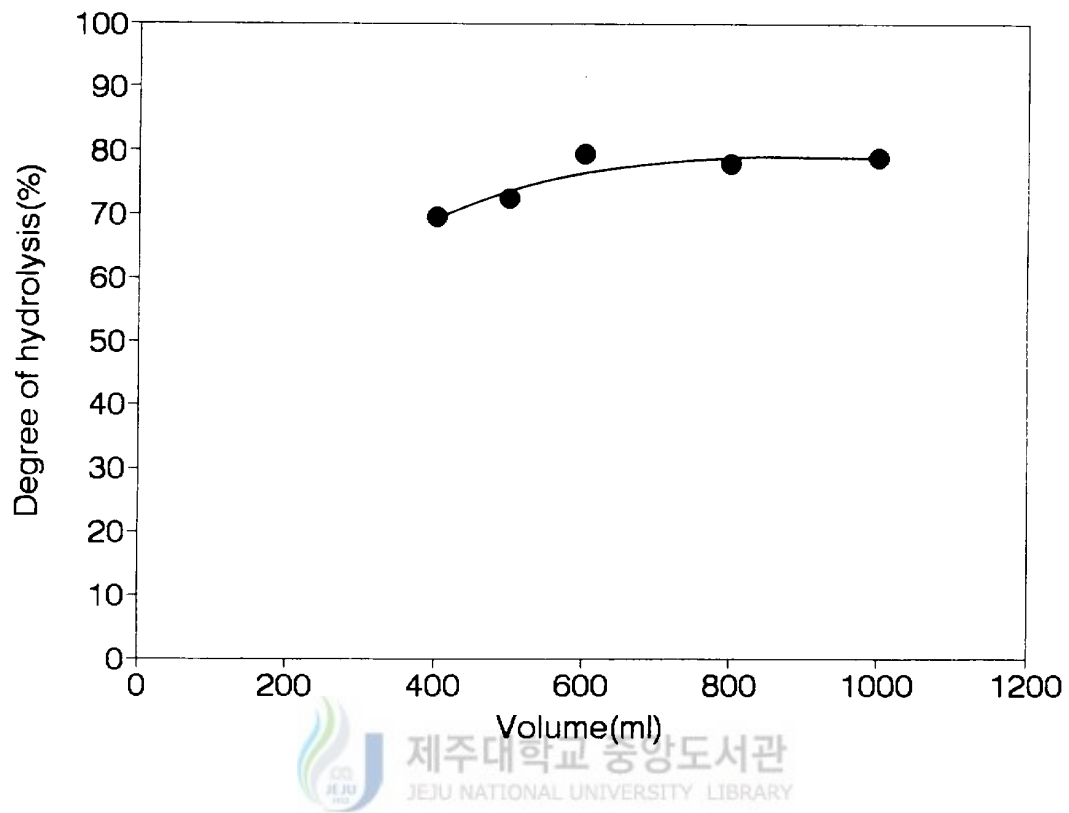


Fig. 27. Effect of reactor volume on the hydrolysis in CMR, trypsin-flounder skin gelatin. (pH9.0, T=55°C, S=1%(w/v), E=0.1mg/ml, J=7.79ml/min)

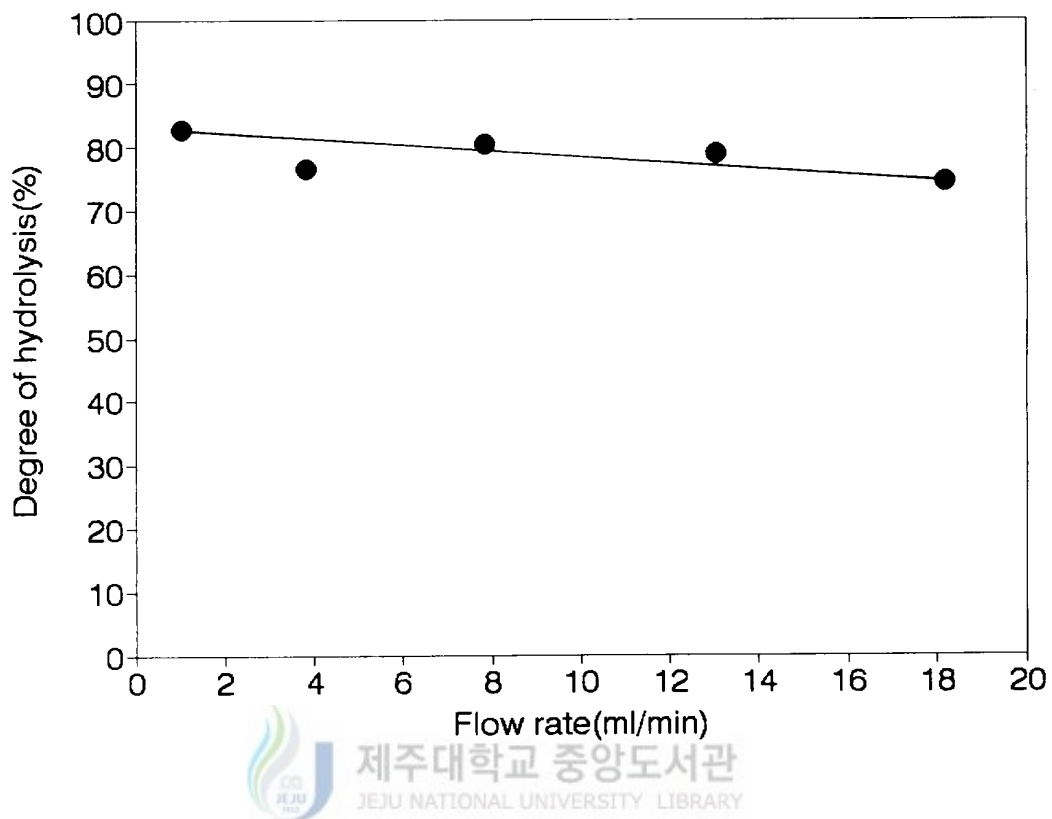


Fig. 28. Effect of flow rate on the hydrolysis in CMR, trypsin-flounder skin gelatin. (pH 9.0, T=55°C, $S_0=1\%$ (w/v), E=0.1mg/ml, V=600ml)

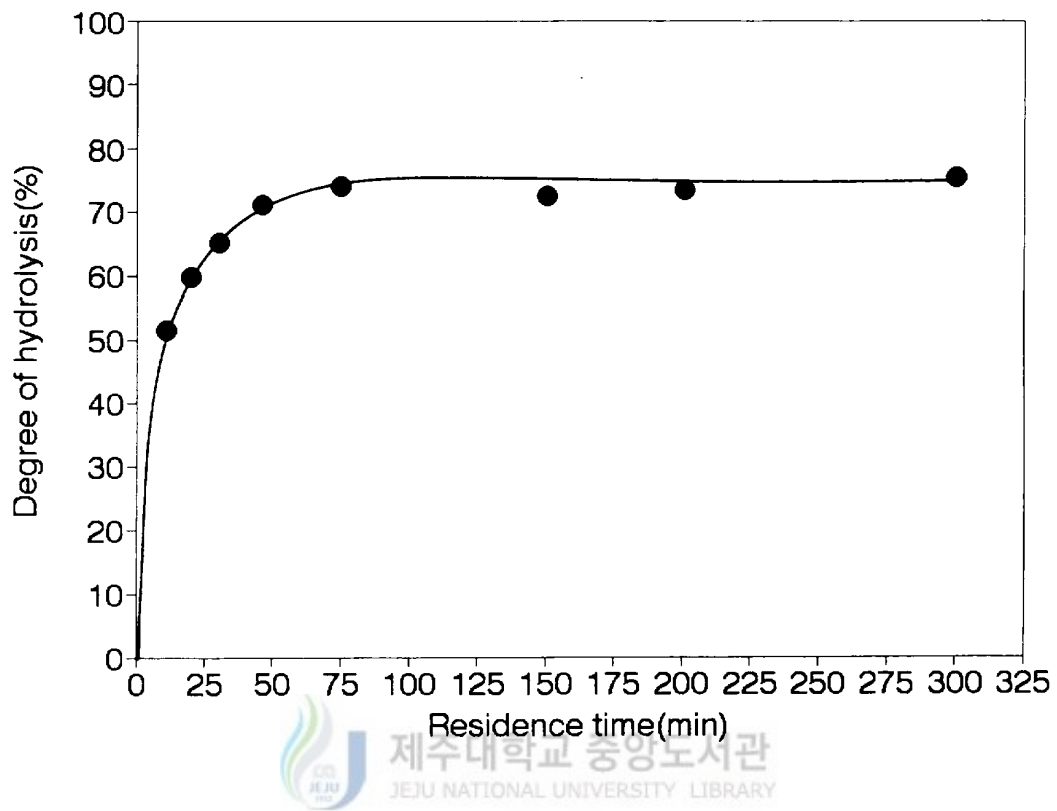


Fig. 29. Effect of residence time on the hydrolysis in CMR, trypsin-flounder skin gelatin. (pH 9.0, T=55°C, S=1%(w/v), E=0.1mg/ml)

이 길수록 높은 생성량을 얻을 수 있지만 정상상태에 도달되는 시간은 길어지고 최적잔류시간은 180분이었으며 잔류시간이 그 이상일 때는 경제적인 관점에서 실용적이지 못하다고 보고하였다.

(5) 연속식 막반응기에서의 효소 안정성에 미치는 인자

1) 효소의 열안정성

효소의 안정성에 미치는 영향 중 온도에 의한 영향만을 알아보기 위해 회분식 반응기에서 trypsin 효소에 대한 열안정성을 측정한 결과는 Fig. 30에 나타내었다. Fig. 30에서와 같이 효소안정성은 55°C에서는 40분까지 초기효소활성에 비해 급격히 감소하다가 2시간 이후 50%정도까지 감소하였으나 25°C에서는 시간 변화에 따라 효소활성이 완만하게 감소하였으며, 2시간 후로는 20%정도의 감소율을 나타내었다. Mannheim(1990)은 회분식반응기에서 Alcalase의 안정성에 미치는 온도(50°C와 37°C)의 영향을 측정한 결과 반응 2시간후 Alcalase의 안정성은 50°C에서 초기활성의 75% 손실되었으며, 37°C에서는 40%가 손실되었다고 보고하였다.

2) 기계적인 전단응력에 의한 영향

회분식에서 나타난 결과에 따라 25°C에서 수용액 중에서 trypsin의 활성에 대한 기계적인 전단응력 및 막에 의한 영향을 알아보기 위해 초기 활성을 측정한 결과는 각각 Fig. 31과 Fig. 32에 나타내었다. Fig. 31에서와 같이 회분식 반응기에 비해 연속식 막반응기에서 기계적인 전단응력에 의한 영향은 최초 1시간까지 효소활성이 27% 감소하였으며 1시간 이후로는 완만하게 감소하였다. 온도에 의한 안정성에 비해 기계적인 전단응력에 의한 효소의 안정성에 미치는 영향이 다소 적은것으로 나타났다. 기계적인 전단응력과 막반응기의 영향 중에서 막에 의한 영향만을 정확하게 측정하기 위하여 막 대신에

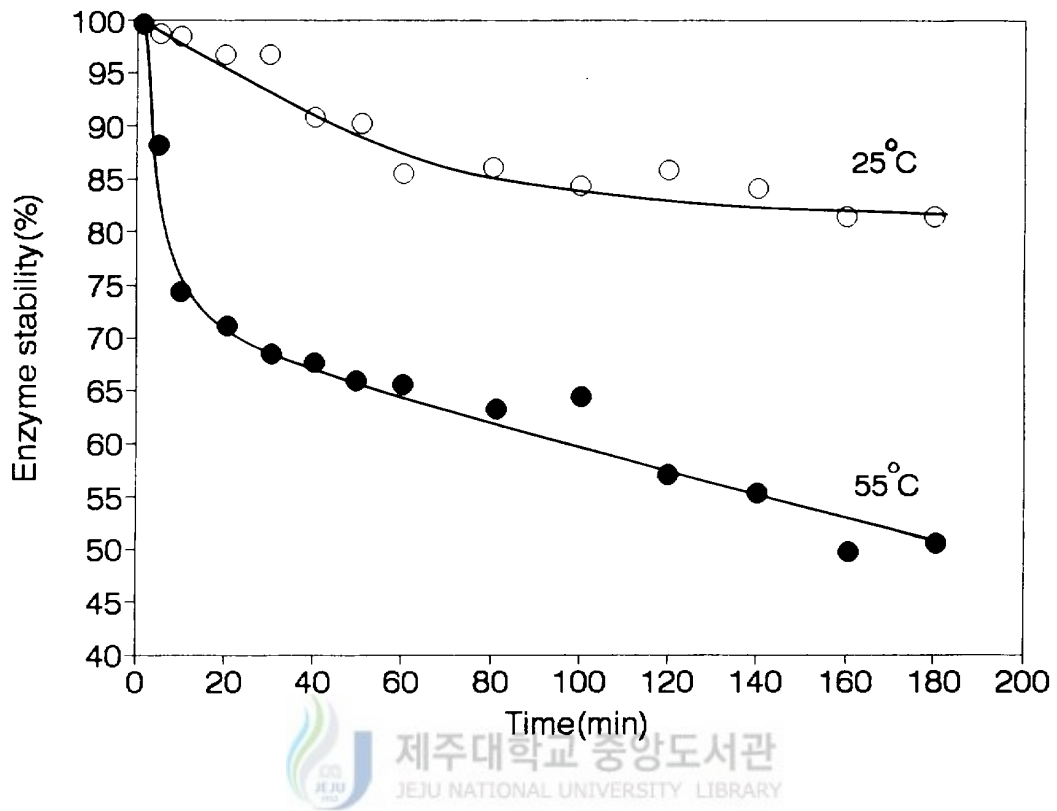


Fig. 30. Effect of temperature on trypsin stability

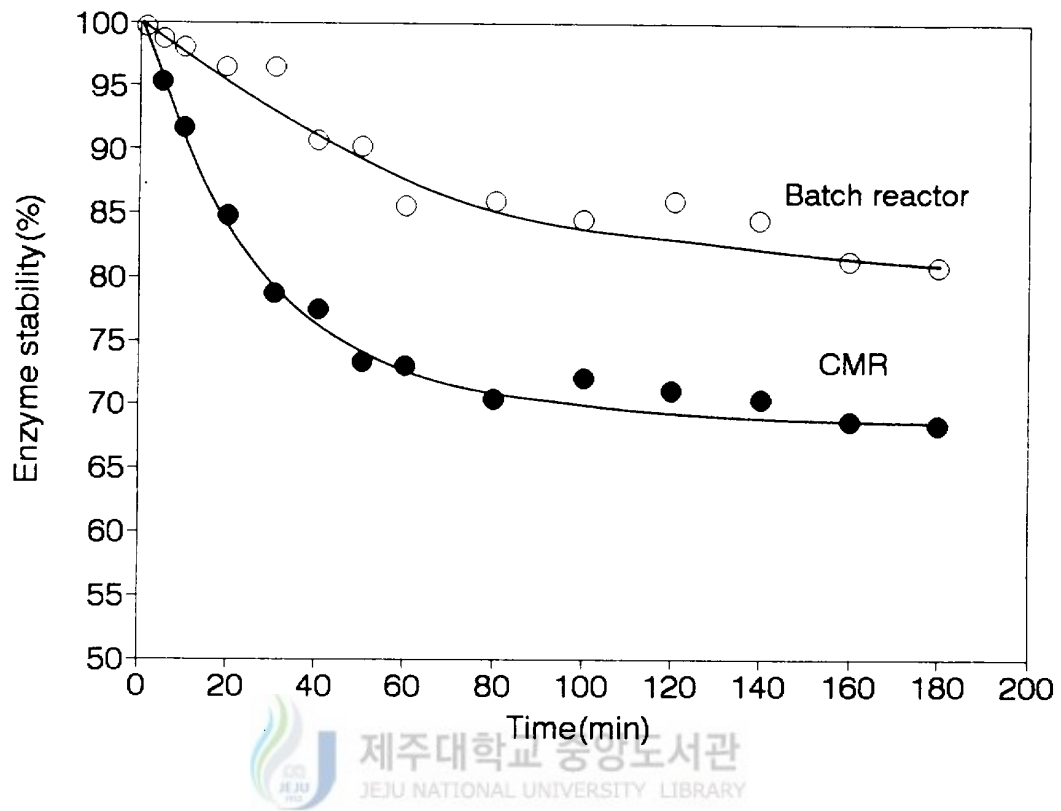


Fig. 31. Effect of membrane and mechanical shear rate on trypsin stability

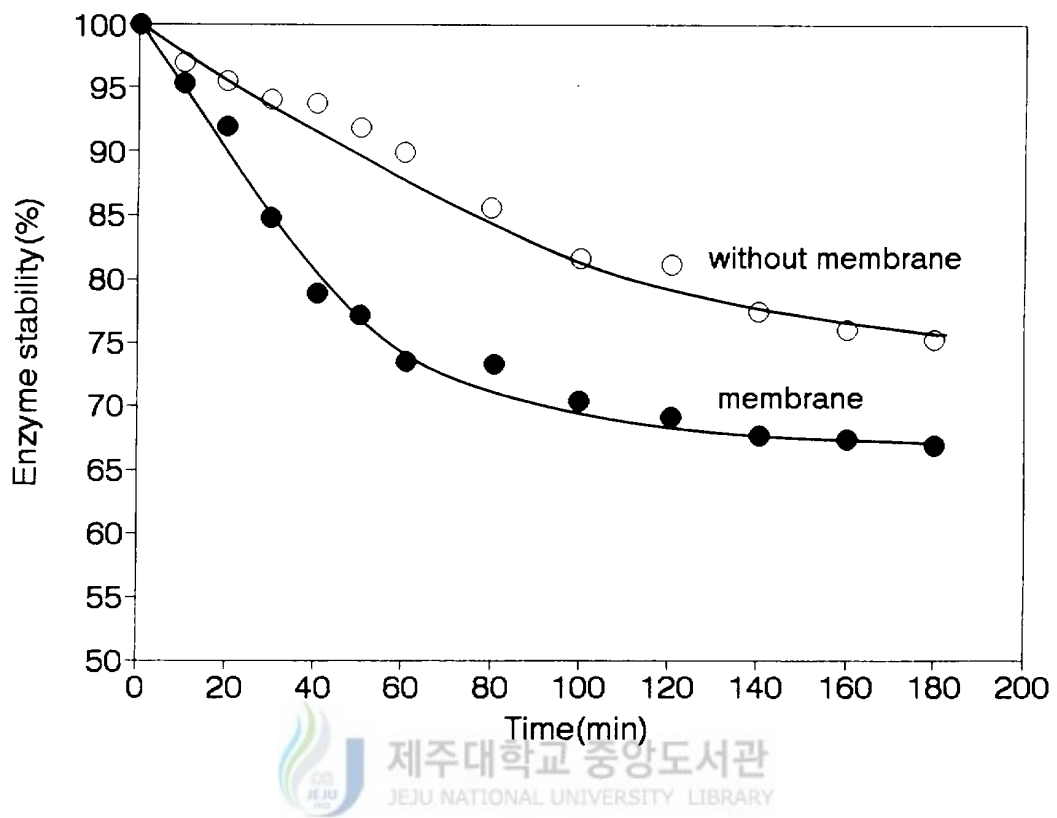


Fig. 32. Effect of membrane on trypsin stability.

Tygon tube로 대체시킨 장치를 대조구로 사용하였다. 연속식 막반응기 (CMR)는 작동시간 1시간까지 trypsin의 활성이 급격히 저하하였으나 1시간 이후에는 거의 활성 저하가 나타나지 않았다. 작동시간 3시간에서 초기속도의 34%가 저하하였다. 그러나 막을 제거시킨 반응기에서는 trypsin의 활성이 반응시간이 길어짐에 따라 서서히 감소되었으며 반응시간 3시간에서 23%의 활성저하를 나타내었다. 막(polysulfone)은 trypsin을 흡착하거나 활성부위에 영향을 미치는 것으로 판단된다. 효소활성에 대한 막의 영향에 대하여 Cheryan(1986)의 보고가 있다. 막에 의한 영향과 비교하였을때 10%정도 효소안정성에 차이가 있었다. Mannheim과 Cheryan(1990)은 한외여과막반응기에서 Alcalase의 활성에 미치는 막의 영향을 측정한 결과 막이 있을때 60분에서 Alcalase 초기활성의 85%가 손실되었으며 막을 제거시켰을때는 30% 효소활성이 감소되었다고 보고하였으나 본 실험에서는 이에 비해 막에 의한 효소활성의 저하가 낮았다.

3) 효소의 누출

막반응기의 최적조건하에서 막을 통해 누출되는 효소량을 측정한 결과는 Fig. 33와 같다. 막반응기 작용시간 20분에서 0.085 mg/ml로 가장 많이 누출되었으며 그 이후 3시간까지 급격히 감소하다가 5시간에는 거의 누출되지 않았다. 이때의 전체 효소누출량은 12.95%였다. Mannheim(1989)은 막 반응기를 이용하여 Alcalase로 casein을 가수분해시 효소의 누출량을 측정한 결과 온도 50°C와 37°C에서 각각 효소의 누출량은 57% 및 52%였으며 반응기 조작 90분 이내에 누출용액에서만 단백질 분해활성을 측정할 수 있었다고 하였으며, 초기단계에서 누출된 효소는 잔류효소의 활성에 크게 영향을 미치지 않는다고 보고한 바 있다. 김 등(1991a)은 효소누출과 반응기 안정성 간에는 직접적인 상호관계는 나타나지 않아 초기단계에서 누출된 효소는 잔류 효소의 활성에 크게 영향을 미치지 않는다고 보고하였다.

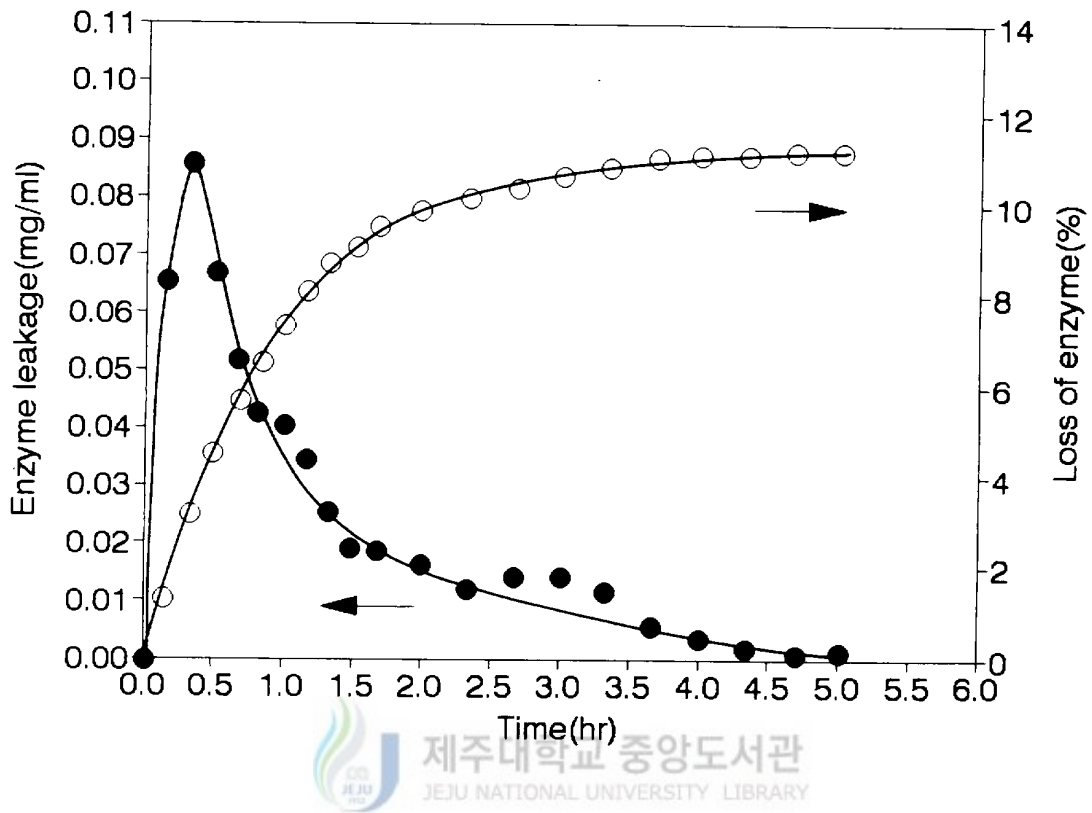
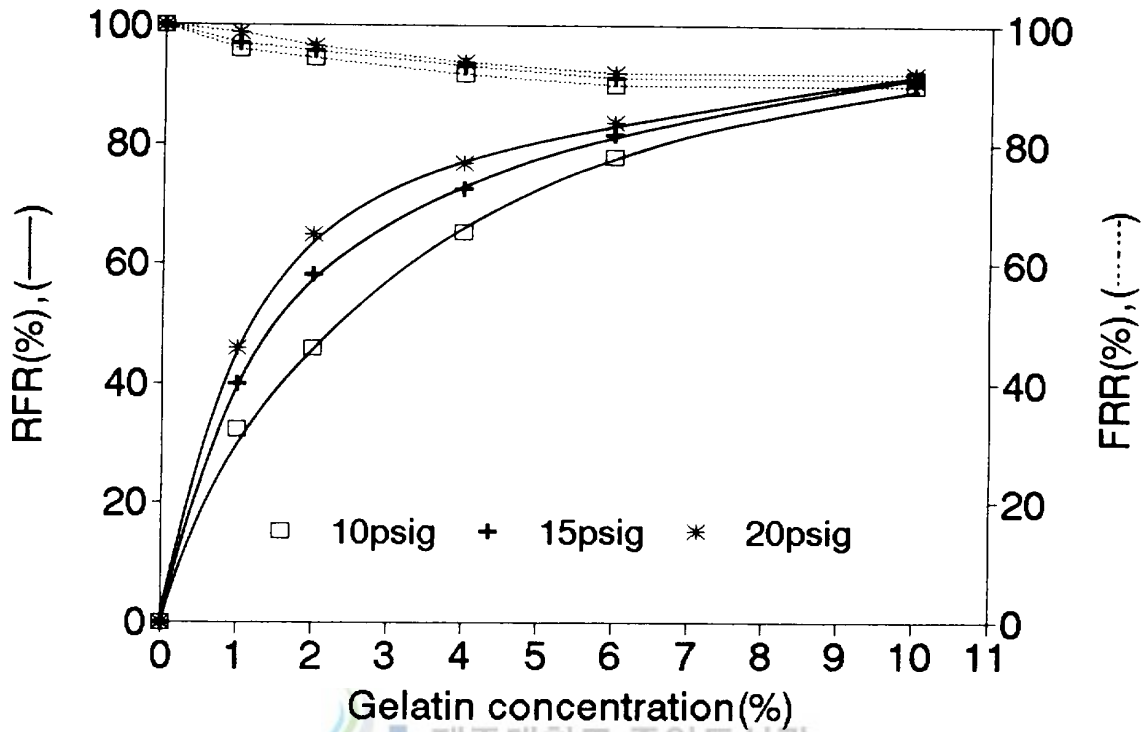


Fig. 33. Leakage of enzyme in the CMR at 55°C (pH 9.0, E=1mg/ml, J=7.79ml/min, V=600ml, Q=860ml/min)

(6) Fouling 성질

젤라틴 용액과 순수의 상대적인 투과성에 영향을 주는 fouling 성질을 측정 한 결과는 Fig. 34에 나타내었다. Fig. 34에서와 같이 순수에 비해 기질이 증가함에 따라 상대적인 유출속도 감소율(RFR)이 증가하였으며 10%기질 용액에서는 RFR(%)값이 91%였다. 또한 기질농도의 변화에 따라 압력을 달리 하였을때 기질농도가 6%까지는 기질농도가 높을수록 RFR(%)도 증가하지만 기질농도가 10%에서는 농도에 관계없이 RFR(%)값이 일정하여 압력에 의한 영향은 받지 않았다. 기질농도가 6% 이하에서는 RFR값의 증가폭이 컸지만 기질농도가 높아짐에 따라 RFR값의 증가폭은 감소되었지만 전체 RFR값은 매우 높은것으로 나타났는데 이같은 결과는 Cheryan과 Chiang (1984)이 보고한 미농축탈지유의 유출속도의 절대값은 농축된 탈지유(3 or 5 fold)에 비해 훨씬 낮았지만 농축된 탈지유의 유출속도는 미농축 탈지유의 그것에 비해 거의 flux가 감소된다는 결과와 일치하였다. 유출속도 재생율은 (FRR)은 Fig. 34에서와 같이 기질농도가 증가됨에 따라 유출속도 재생율은 다소 감소되는 경향을 보였으며 10%젤라틴 용액에서 재생율이 92%로 비교적 높게 나타내었는데 이는 기질인 젤라틴이 수용성이므로 수세외에 막세척에 의해 막투과성의 거의 재생시킬 수 있을 것으로 판단된다. 막의 fouling 성질에 크게 영향을 미치는 인자로서는 온도, 유출속도, 압력 및 공급기질의 농도 등을 들수 있으며 특히, 막 fouling 성질에 크게 영향을 미치는 것은 막의 화학적 성질과 막과 용질의 상호작용을 들수 있다(Cheryan, 1986). Capannelli 등(1990)은 막의 재질에 따라 순수와 0.1%(w/v)의 유장단백질(whey protein)의 fouling 성질을 측정한 결과 PF(polyvinylidene fluoride)재질인 막의 RFR(%)값 및 FRR(%)값은 각각 82.6~87.0% 및 87.0~99%였으며, PS(polysulfone)재질인 막의 경우는 각각 63.0~70.3% 및 51.8~74.5%로 PS막 재질보다 PF막 재질이 더 좋은 anti-fouling 성



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 34. Fouling properties with pure water and gelatin solution fluxes in UFP-10 membrane. (conditions : pH 9.0, T=55°C, recycling rate=860ml/min)

질을 나타내었으며 막재질의 친수성이 높을 때 anti-fouling성질이 양호하다고 보고한 바 있다.

(7) 고 기질농도의 한계

연속식 막반응기(CMR)에서 최적가수분해 조건인 pH 9.0, 온도 55°C, 유출속도, 7.79ml/min, 부피 600ml, S/E=100(w/w)에서 기질농도를 10, 15, 20 및 25%로 변화시켜 높여 가수분해율을 측정한 결과는 Fig. 35와 같다. 기질농도가 10%에서는 처음 반응시간 40분까지는 가수분해도는 75%로 증가하였으며, 2시간 반응시킨 후 가수분해도는 89%였다. 기질농도 15, 20 및 25%에서는 처음 40분까지는 가수분해도가 60%로 증가하였지만 그 이후로는 거의 일정하였다. 일반적으로 효소에 의한 가수분해시 기질농도는 1~5%범위로 보고(Mennheim, 1988)되어 있으므로 본 연구에서의 기질농도 10%는 매우 높은 기질농도임을 알 수 있다.

(8) 생산량(Productivity)

회분식과 연속식의 최적가수분해 조건하에서 부피대체율에 대한 생산량은 Fig. 36에 나타내었다. Fig. 36에서와 같이 부피대체율이 7배까지는 생산량이 비례적으로 증가하였지만 그 이후로는 생산량이 완만하게 증가하는 경향을 나타내었다. 이와 같이 부피대체율이 증가함에 따라 생성량이 완만하게 증가하는 것은 반응기내에서 효소의 누출, 막반응기에 의한 기계적인 전단응력, 막 등에 의해 효소의 활성이 저하되기 때문이라 생각된다. 이 문제는 반응기작동 후 생산량의 감소가 나타나는 부피대체율에서 효소를 가해줌으로써 해결할 수 있을 것으로 생각된다.

회분식에서 생산량은 부피변화에 무관하며 효소로 반응시키면서 정상상태에

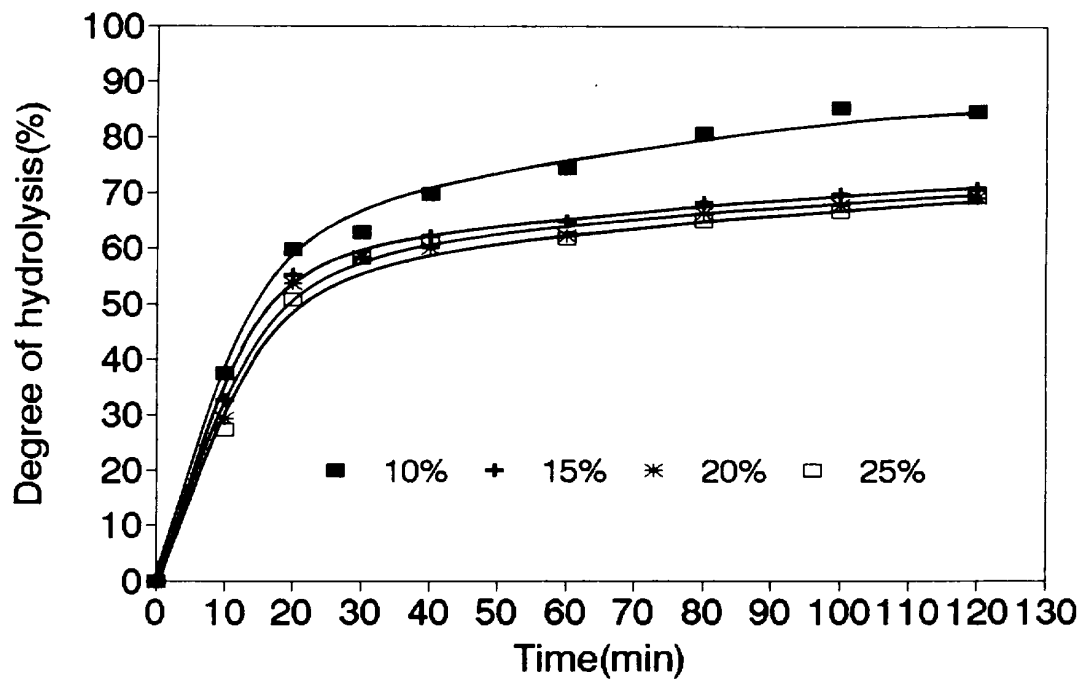


Fig. 35. Comparison of the hydrolysis of CMR with substrate concentration at 55°C, pH 9.0, (conditions : S/E=100(w/w), flow rate 7.79ml/min, volum 600ml).

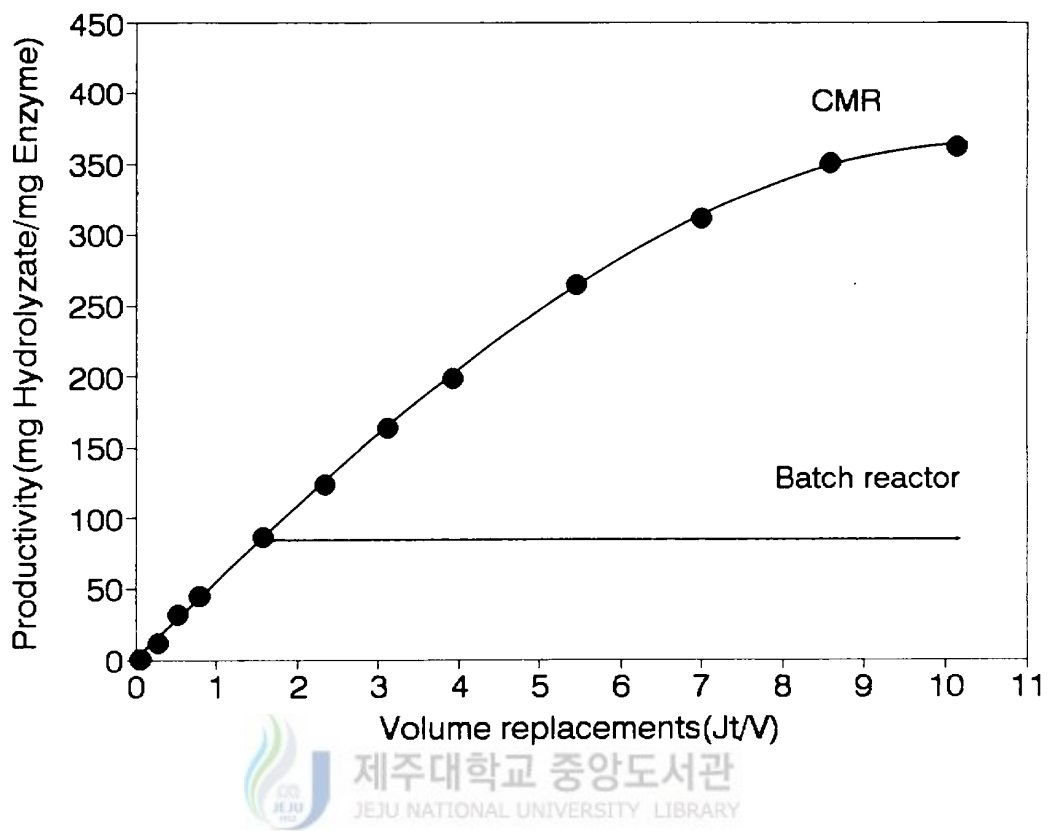


Fig. 36. Productivity of CMR and batch reactor at 55°C. CMR conditions : S=10%(w/v), E=1mg/ml, flow rate 7.79ml/min, volum 600ml.

도달하였을때 생산량은 효소mg당 가수분해율이 87.58mg이었다. 이에 비해 연속식에서는 효소 mg당 가수분해물의 생산량이 378.85mg으로 회분식의 생산량에 비해 4배 이상이었다. 연속식은 기질에 대한 효소의 친화력이 회분식에 비해 낮았지만 효소를 재순환시켜 사용함으로써 효소당 생산량은 회분식에 비해 월등히 높았다.

(9) 분자량

연속식 막반응기에서 가수분해시킨 젤라틴 가수분해물을 겔여과법으로 겔여과한 크로마토그램은 Fig. 38과 같다. Fig. 38을 이용하여 Markerprotein의 분자량 분포를 나타낸 Fig. 37과 비교하여 분자량을 측정한 결과 분자량 3,500 및 7,500dalton영역에서 주종을 이루고 있었으며 유리아미노산은 존재하지 않았다. 또한 Fig. 39에서와 같이 SDS-PAGE전기영동법으로 분자량을 측정한 결과는 겔여과의 결과와 같이 분자량 분포가 거의 일치함을 볼수 있었다. 이같은 분자량은 회분식에서 제조한 가수분해물의 분자량 6,500~25,000dalton에 비해 훨씬 작았다. 이같은 결과는 연속식에서는 10,000 dalton이하의 분자량을 cut-off 할 수 있는 막을 사용하였기 때문이라고 생각된다. 김과 이(1987)는 말쥐치 육단백질을 pepsin으로 분해시켰을 때 분자량 2,000 및 310의 peptide성 분자가 대부분이었으며 유리아미노산은 소량 생성되었다고 보고한 바 있으나 젤라틴 중에는 Gly-Gly, Gly-Pro 사슬의 절단이 곤란하기 때문에 말쥐치육단백질 처럼 분해율을 높일 수 없다(丹戶, 1984). 그러나 복합효소로 젤라틴을 가수분해시킨다면 유리아미노산까지도 분해가 가능할 것으로 보아 앞으로 이에 관한 연구가 이루어져야 할 것으로 본다.

6. 가자미피 젤라틴 가수분해물로 제조한 조미간장 및 복합조미료

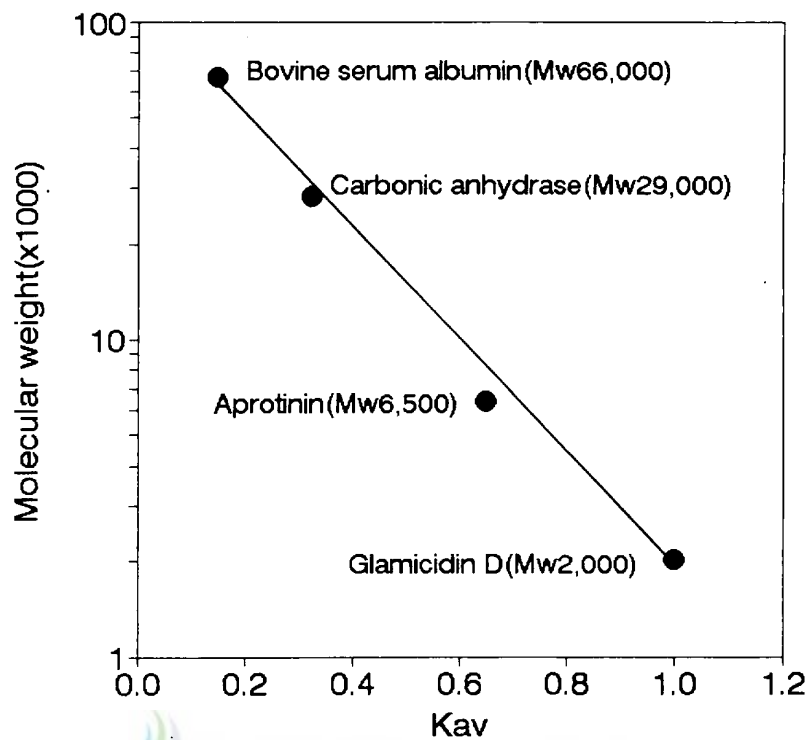


Fig. 37. Standard curve for the determination of molecular weight of permeate with sephadex G-50 gel filtration. (Eluent : phosphate buffer(pH7.5), Flow rate : 30ml/hr, Fraction volume : 5ml)

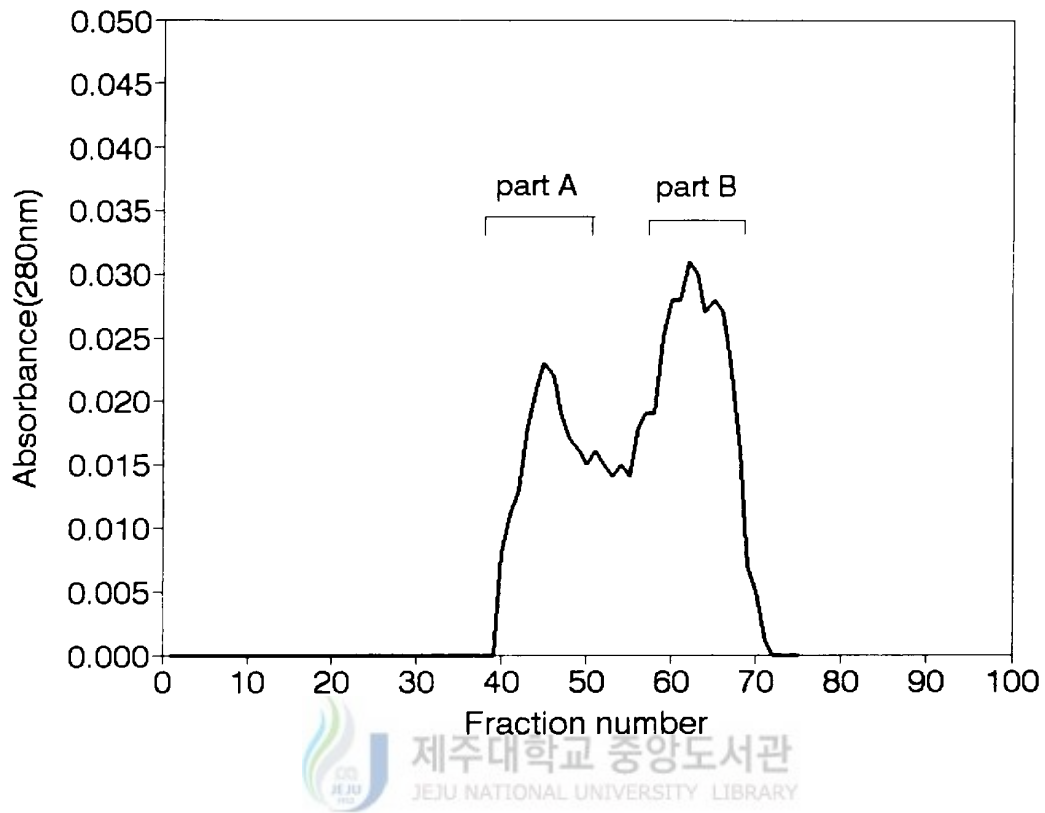


Fig. 38. Gel filtration of permeate on a sephadex G-50 column (2×95cm).
 (Eluent : phosphate buffer(pH7.5), Flow rate : 30ml/hr,
 Fraction volume : 5ml)

Bovine serum albumin
(M. W. = 66,000)

Carbonic anhydrase
(M. W. = 29,000)

Cytochrome C
(M. W. = 12,400)

Insulin
(M. W. = 5,700)

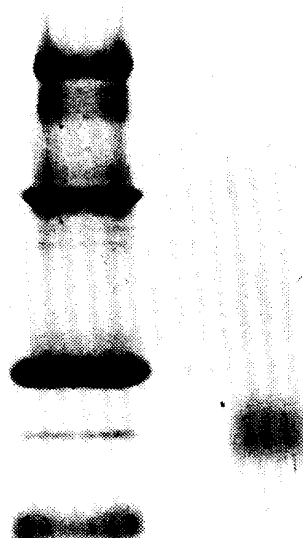


Fig. 39. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) for hydrolysate of flounder skin gelatin in CMR. (pH 8.3, 15mA for 12hrs, 18% polyacrylamide gel)
A : Marker protein, B : Gelatin hydrolysate

단백질 가수분해물은 각종 가공식품이나 세제, 화장품 등 기타 여러분야에서 필수적으로 이용되고 있고 국내에서는 거의 단백질 산가수분해물을 이용하고 있는 실정이다. 그러나 단백질은 산이나 알칼리로 가수분해할 경우 lysinoalanine과 같은 독성이 있는 부산물이 생성되거나 tryptophan과 같은 필수아미노산의 손실을 가져온다(Kinsella, 1979). 이같은 이유로 최근 구미 선진국에서는 단백질 산가수분해물의 안전성 문제가 대두되고 있다. 특히 미국에서는 단백질 산가수분해물을 사용하지 않았다는 표시를 한 제품도 나오고 있다. 국내 장류업계에서는 단백질을 산가수분해하여 제조되는 화학간장의 수명을 향후 5년정도로 내다보고 대체간장의 개발에 노력을 기울이고 있다고 한다(김 등, 1991b). 이런 면에서 볼 때 본 연구에서 제조한 가자미피 젤라틴 가수분해물은 효소적으로 가수분해된 것이기 때문에 안전성면에서 문제가 없을 뿐만 아니라 효소가수분해시 문제가 되는 쓴맛이 없을 분해물이기 때문에 이를 이용해 조미간장 및 복합조미료의 제조를 시도하였다.

조미간장 제조시 첨가하는 가자미피 젤라틴 가수분해물의 양을 결정하기 위해 첨가농도에 따른 조미간장의 관능검사 결과는 Table 7과 같다. 물 100ml에 다른 원료와 같이 첨가하는 가자미피 젤라틴 가수분해물의 양을 5.0g, 10.0g 및 15.0g씩 첨가했을 경우 색과 냄새면에서는 1%유의수준내에서 관능적으로 유의차가 없었지만 맛의 경우는 무첨가구 및 5.0g첨가구는 10.0 및 15.0g첨가구에 비해 낮은 관능평가점수를 얻었다. 10.0g과 15.0g 첨가구는 맛면에서 서로 유의차가 없었기 때문에 경제적인 면을 고려해 조미간장 제조시 첨가하는 가자미피 젤라틴 가수분해물의 양을 10.0g으로 결정하였다. 조미간장과 세 종류의 시판간장을 관능검사한 결과는 Table 8과 같다. 모든 관능평가 항목에서 좋은 점수를 얻은 제품은 모조간장 IS와 시판간장 S₁이었고 시판간장 S₃는 가장 낮은 관능평가점수를 얻었다. 조미간장 IS는 시판간장 S₁과는 5%유의수준에서 유의차가 없었지만 S₂ 및 S₃와는 유의차가 있었다. 그리고 가자미피 젤라틴 가수분해물을 원료로 제조한 복합조미료

Table 7. Sensory evaluations of imitation sauces containing different contents of flounder skin gelatin hydrolysate

Content** (g)	Mean score*		
	Taste	Color	Odor
0	2.5 ^b	3.4 ^a	3.1 ^a
5	3.0 ^b	3.6 ^a	3.0 ^a
10	3.9 ^a	3.5 ^a	3.1 ^a
15	4.0 ^a	3.6 ^a	3.2 ^a

* Means within each column followed by the same letters are not statistically different($P < 0.01$).

1-5 scale : 5:very good, 3:acceptable, 2:poor, 1:very poor

** The content of flounder skin gelatin hydrolysate dissolved with other raw materials in 100.0ml water.

Table 8. Sensory evaluations of the various sauces

Product**	Mean score*			
	Taste	Color	Odor	Overall acceptance
IS	3.8 ^a	3.6 ^a	3.9 ^a	3.9 ^a
S ₁	3.8 ^a	3.5 ^a	4.0 ^a	3.9 ^a
S ₂	3.2 ^b	3.5 ^a	3.2 ^b	3.1 ^b
S ₃	2.7 ^b	2.7 ^b	2.8 ^b	2.7 ^b

* Means within column followed by the same letter are not statistically different ($P < 0.05$).

1-5 scale : 5:very good, 4:good, 3:acceptable, 2:poor, 1:very poor.

** IS : imitation sauce(liquor : fermented soy sauce = 8:2, v:v)
 The liquor was prepared from 110.0g flounder skin gelatin hydrolysate by dissolving with 10.0g NaCl, 3.0g sucrose, 0.5g monosodium glutamate, 0.1g caramel powder, 3.0ml fermented vinegar, 0.05g garlic powder, 0.1g black pepper powder, and 0.2g licorice powder in 100.0ml water, boiling for 5min and filtering with cheesecloth.

S₁, S₂, S₃ : three kinds of soy sauce on the market(S₁, S₂:80% chemical sauce + 20% fermented soy sauce, S₃:50% chemical soy sauce + 20% fermented soy sauce).

Table 9. Sensory evaluation of various complex seasonings

Product**	Mean score*			
	Taste	Color	Odor	Overall acceptance
GHCS	4.0 ^b	2.9 ^a	3.4 ^a	3.8 ^b
ACS	3.3 ^c	2.8 ^a	3.4 ^a	3.2 ^c
SCS	3.4 ^c	2.9 ^a	3.3 ^b	3.2 ^c
BCS	4.7 ^a	3.0 ^a	4.2 ^a	4.4 ^a

* Means within each column followed by the same letter are not statistically different ($P < 0.01$).

1-5 scale : 5:very good, 4:good, 3:acceptable, 2:poor, 1:very poor.

** GHCS : the gelatin hydrolysate complex seasoning prepared from 35.0g flounder skin gelatin hydrolysate by mixing and grinding with 30.0g parching salt, 15.0g sugar, 5.0g monosodium glutamate, 6.0g glucose, 0.5g garlic powder, 0.5g onion powder, 0.5g black pepper powder, 1.0g ginger powder, 5.0g kochujang(fermented not pepper-soybeanpaste) powder, 2.0g soybean paste, and 2.0g soybean sauce powder.

(GHCS)와 시판 멸치복합조미료(ACS), 조개복합조미료(SCS) 및 쇠고기복합조미료(BCS)의 관능검사 결과는 Table 9와 같다. 색은 전제품이 1%유의 수준내에서 유의차가 없었고 맛, 냄새 및 종합평가에서는 BCS가 가장 좋았다. 한편, GHCS는 BCS보다는 좋은 점수를 얻었다. 이와같은 결과를 종합해 볼 때 가자미피 젤라틴 가수분해물을 이용해 제조한 조미간장 IS와 복합조미료GHCS는 시판간장제품이나 복합조미료와 비교해서 손색이 없는 제품임을 알 수 있다. 또한, 김 등(1991b)이 대구피 가수분해물로 제조한 조미간장이

나 복합조미료에 비해 다소 우수한 제품이었다. 이는 대구피 가수분해물 보다 가자미피 젤라틴 가수분해물의 분자량이 적어 맛면에서 좋기 때문이라고 생각된다.



IV. 결론 및 요약

어류가공시 부산물로 얻어지는 어피를 효율적으로 이용하고자 가자미피(皮)로부터 알칼리(B-type)와 효소(E-type)처리법에 의해 전처리가 된 서로 다른 두가지 종류의 젤라틴을 추출하여 그 물성과 분자량 및 아미노산 조성 등을 비교하였다. 그리고 추출된 두 종류의 젤라틴을 trypsin으로 가수분해할 때 회분식에 의하여 각각의 가수분해조건을 구명하였으며 두 종류의 가수분해물에 대한 수율과 동력학적 연구를 비교 검토하였다. 회분식에 의한 젤라틴을 효소로 가수분해할 때 유리한 제품인 E-type 젤라틴으로 연속식막반응기를 이용한 가수분해 최적조건과 막반응기장치에서의 효소활성 및 안정성에 미치는 인자에 대하여 검토하였다. 그리고 최적조건하에서 제조한 가수분해물의 분자량을 회분식에서 제조된 것과 비교 검토하였으며, 또한 가수분해물을 이용한 조미간장과 복합조미료를 시제하여 시판품과의 품질을 비교 검토하였다.

첫번째로, 두가지 서로 다른 B-type과 E-type 젤라틴의 시제에 대한 추출조건과 두 젤라틴의 물성, 분자량 및 아미노산 조성은 다음과 같다. 어피젤라틴의 최적 추출조건은 첨가수량이 어피의 9배, 추출온도가 60°C로서 두 제품 모두 같았으며, 추출시간은 E-type이 4시간, B-type이 3시간이었고, 추출용액의 pH는 B-type과 E-type 각각 5.0과 6.0이었다. 위의 조건에 따른 최종수율은 B-type이 E-type 보다 5% 많은 64.2%였다. 단백질 함량은 두 제품 모두 99%(건물량 기준) 정도로서 상당히 높았고 중금속 함량은 E-type이 23.26ppm 정도의 망간을 함유하고 있을 뿐 대체로 검출되지 않았다. 물리적 성질은 B-type이 E-type보다 jelly 강도, 점도 및 전기전도도에서 우수하였으며, E-type은 겔화가 형성되지 않았다. B-type도 시판 젤라틴보다 점도는 높았으나 jelly 강도는 낮았다. B-type의 분자량은 대개 66KDa 이

상이었고, E-type은 66KDa 이하이었으며 전처리 방법에 따라 분자량의 현격한 차이가 있었다.

두번째로, 두 젤라틴을 회분식으로 가수분해할 때 그 가수분해 조건과 가수분해물에 대한 물성, 분자량 및 아미노산 조성 등에 대한 비교는 다음과 같다. 가수분해 조건은 B-type과 E-type 젤라틴 모두 반응온도 55°C, pH 9.0 및 효소농도 E/S(w/w)=0.001이었고, 반응시간은 B-type은 4시간, E-type은 1시간이었다. 최적 가수분해조건하에서 B-type 및 E-type 젤라틴의 가수분해도는 각각 63%와 82%였다. 가수분해물의 등전점은 B-type과 E-type이 각각 pH 5.30와 pH 5.27이었고, 전기전도도는 각각 352.8 μ mho/cm와 268.8 μ mho/cm로 시판젤라틴의 193.2 μ mho/cm보다 높았다. 점도는 농도와 온도 따라서는 다소 변화가 있었으나 pH의 변화에는 크게 영향을 받지 않았다. 분자량은 B-type이 6.5~25KDa으로 분포되어 있으며 15KDa이 주종을 이루고 있었으나 E-type의 경우는 분자량이 6~20KDa이며 12.4KDa이 주종을 이루고 있었다. 아미노산 조성은 B-type과 E-type 간에 거의 차이가 없었으며 단맛을 내는 glycine, alanine, proline, hydroxyproline 및 serine 등이 전체 아미노산의 57%를 차지하였으며 쓴맛을 내는 valine, leucine, phenylalanine, tyrosine, methionine, arginine 및 histidine 등의 함량은 전체아미노산에 대해 18%에 불과하였다. 이와 같은 결과로 보면, E-type 젤라틴이 가수분해 조건 및 수율에서 B-type 보다 우수하였으며 또한 분자량도 더 낮은 분포를 나타내기 때문에 막반응기를 이용한 젤라틴의 연속적인 가수분해물 제조에 대한 원료로서 적당하였다.

세번째로, 연속식 막반응기에서 가수분해조건을 보면 효소농도 0.1mg/ml 이상에서는 가수분해율이 거의 72%이상이었다. 기질농도 1% 이하에서는 70% 이상의 가수분해율을 나타내었으며 기질농도가 증가함에 따라 가수분해율이 약간 감소하는 경향이였다. S/E=100(w/w)이하에서는 거의 72% 이상

의 가수분해율을 나타내었다. 유출속도가 7.79ml/min일때 잔류시간은 77분이었으며, 이때의 가수분해율은 79%였다. 막반응기 장치의 최적조건은 1% 기질에 대해 효소농도 0.1mg/ml, 유출속도 7.79ml/min, 잔류시간 77분, 반응온도 55°C에서 기질의 가수분해율은 반응시간 1시간 부근에서 최대치를 나타내었다. 효소활성은 온도 55°C에서 50%, 25°C에서 20%가 감소되었으며, 막에 의한 효소활성은 3시간 후에 34% 감소하였다. 막을 통한 효소의 누출은 작동시간 20분에서 최대였으며 작동시간 5시간 이후에는 거의 효소가 누출되지 않았으며, 전체효소량 중 효소누출량은 12.95%이었다.

막의 fouling 성질은 10%(w/v)기질용액에서 순수에 대한 상대적인 유출속도 감소율(RFR)은 91%였으며 유출속도 재생율은 92%였다. 고 기질농도 10%에서는 가수분해도가 89%였으나 그 이상의 기질농도에서는 75%였다.

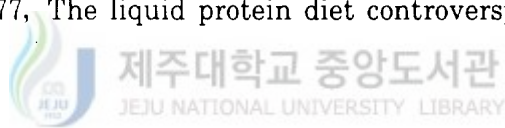
E-type젤라틴에 대한 trypsin의 반응속도 상수인 K_m 및 V_{max} 는 회분식에서 각각 0.668mgN/ml, 1.468mgN/ml/min였으나 연속식에서는 이들의 값이 각각 1.618mgN/ml, 0.347mgN/ml/min였다. 연속식에서 K_m 값은 1.618mgN/ml으로 회분식의 0.668mgN/ml에 비해 2.4배 정도 큰 반면 V_{max} , K_2 는 매우 작았다. 회분식과 연속식에서 최적조건하에서 젤라틴을 가수분해하였을 때 효소mg당 생산하는 가수분해물은 각각 87.58mg 및 378.85mg으로 회분식에 비해 생산량이 4배 이상이었다.

넷째로 가자미피 젤라틴 가수분해물을 원료로 하여 제조한 복합조미료(GHCS)와 시판멸치복합조미료(ACS), 조개복합조미료(SCS) 및 쇠고기복합조미료(BCS)의 관능검사 결과 색은 전제품이 1%수준내에서 유의차가 없었고 맛, 냄새 및 종합평가에서 GHCS는 좋은 점수를 얻었다. 이와 같은 결과를 종합해 볼 때 가자미피 젤라틴 가수분해물을 이용해 제조한 조미간장(IS)과 복합조미료(GHCS)는 시판간장제품이나 복합조미료와 비교해서 손색이 없는 제품임을 알 수 있었다.

V. 참고 문헌

- Adler-Nissen, J., 1986, Relationship of structure to taste of peptides and peptide mixtures., In : *Protein tailoring and reagents for food and medical uses* (R. E. Feeney, J.R. Whitaker, eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp.97-122.
- Alder-Nissen, J., 1976, Enzymatic hydrolysis of protein for increase solubility., *J. Agric. Food. Chem.*, 24, 1040.
- Alford, E. S., V. piriyan, C. W. Dill, C. R. Young, R. L. Richter, and W. A. Landmann, Effect of succinylation on proteolysis of food protein., *J. Food Sci.*, 49, 614-616.
- Ames, W. M., 1949, The manufacture of hide glue and gelatin. *J. Intern. Soc. Leather Trades Chemists.*, 33, 407.
- Andrew, P., 1964, Estimation of the molecular weight of proteins by Sephadex gel filtration., *Biochem. J.*, 91, 222~230.
- Appleman, M. L., 1973, High protein fruit-type beverage and processing therefore., *Br. Patent 1,308,690*(to Daylin Laboratories, Inc., USA).
- Baier, R. E. and W. A. Zisman, 1975, Wetting properties of collagen and gelatin surfaces. In "*Applied chemistry at protein interface*" Ed.

- Baier R. E., American chemical society, pp.155-174.
- Belinda, V. C., N. Shuryo, D. P. William and B. Thomas, 1986, Protein hydrolysates for reducing water activity in meat products, *J. Food Sci.*, 51, 1158-1161
- 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.
- Bliss, F.M. and H.O. Hultin, 1977, Enzyme inactivation by an immobilized protease in a plug flow reactor, *J. Food Sci.*, 42,425.
- Brody, J., 1965, *Fishery by-product technology*, AVI, 1-25.
- Brozan, N., 1977, The liquid protein diet controversy. *New York Times*, 18 May.
- Cheftel, C., 1972, Solubilisation enzymatique continue du concentrate proteique de poisson. Essai de recyclage des enzymes., *Ann. Technol. Agric.*, 21, 423-433.
- Cheftel, C., M. Ahern, D.I.C. Wang, S.R. Tannenbaum, 1971, Enzymatic solubilization of fish protein concentrate : Batch studies applicable to continuous enzyme recycling processes., *J. Agric. Food Chem.*, 19, 155-166



-
- Chen, L., T. Richardson and C. H. Amundson, 1975, Some functional properties of succinylated proteins from fish protein concentrate., *J. Milk Food Technol.*, 38, 89-93.
- Cheryan, M. and M.A. Mehaia, 1984, Ethanol production in a membranere cycle bioreactor. Conversion of glucose using *Saccharomyces cenevisiae.*, *Process Biochemistry.*, 19(December), 204-208.
- Cheryan, M. and M. A. Mehaia, 1986, *Membrane bioreactors in membrane seprations in biotechnology.* Edited by Megregor W. C., Marcel Dekker, Inc.
- Cheryan, M., 1983a, Continuous hydrolysis of proteins in anultrafiltration reactor., *U.S. patent no. 4,443*, p 540.
- Cheyen, M.,1983b, "Application of membrane processing in the soy protein industry." *In Soybean research in China and the United states*, edited by Irwin B. J., J. B. Sinclair and W. Jin-Ling, Intern., Agr. Pub., Univ. Illinois, Urbana, pp.102-107.
- 千畑一郎, 伊藤博, 川島啓助, 福本俊一, 1979, 抗酸化制. 特許公報., 54 340639, 163.
- Deeslie, W.D. and M. Cheryan, 1980, Continuous enzymatic modification of proteins in an ultrafiltration reactor., *J. Food Sci.*, 46, 1035-1042.

- Deng, Q. Y., R.R. Barefoot, L.L. Divsady, L.J. Rwbin, and Y.M. Tzeng, 1990, Lysinoalanine concentrations in rapeseed protein meals and isolates., *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 23, 440.
- Devereux, N. and M. Hoare, 1985, Membrane separation of protein precipitates : Studies with cross flow in hollow fibers, *Biotechnol. Bioeng.*, 118, 422-432.
- Eastoe, J. E. and A. A. Leach, 1977, Chemical constitution of gelatin, In *"The science and technology of gelatin"*, Ed. Ward, A. G. and A. Courts, Academic press, pp.73-107.
- Edwards, C. A. and W. K. O'brien, JR., 1980, Modified assay for determination of hydroxyproline in a tissue hydrolyzate., *Clinica Chimica Acta.*, 104, 161-167.
- 식품첨가물공전, 1988, 젤라틴, 한국식품공업협회., 358
- Fujii, T. and K. Kobayashi, 1973, The effects of pH borohydride reduction on the solubilization of steer hide collagen by pronase. *J. Biochem.*, 74. 307~314.
- Gildberg, A. and J. Raa, 1979, Solubility and enzymatic solubilization of muscle and skin of capelin at different pH and temperature., *Biochem. Physiol.*, 63. 309~315.

-
- Hale, M. B., 1969, Relative activities of commercially-available enzymes in the hydrolysis of fish protein., *Food Technol.*, January 1969, 107~110.
- 浜田盛承, 1990, サメ皮 セラチンの ゲル物性に ぼす 調製法の 影響, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56, 671-677.
- Hayashi, A. and S. C. Oh, 1983, Gelation of gelatin solution., *Agric. Biol. Chem.*, 47, 1711-1716.
- Hayashi, R., Y. Kawamura, T. Ohtsuka and N. Itoh. 1990. Preparation of amidated gelatins and their physicochemical properties., *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2213-2218.
- Heck, N. E., 1983, Characterization of fish protein hydrolysate plastein and the identification of glutamyl-lysine in the plastein material. *Doctor's thesis, University of Washington.*, 84.
- Hevia, P., J. R. Whitaker and H. S. Olcott, 1976, Solubilization of a fish protein concentrate with proteolytic enzyme., *J. Agric. Food Chem.*, 24, 383-385.
- Hinterwaldner, R., 1977, Technology of gelatin manufacture, In *"The science and technology of gelatin"*, Ed Ward, A. G. and A. Courts, Academic press, pp.315-364.

- 藤井 豊, 1980, 昭和 54年度 水産加工廢棄物等利用技術開發成果の概要. 水産廳研究部 研究果, P.451.
- Johns, P. and A. Courts, 1977, Relationship between collagen and gelatin, In *"The science and technology of gelatin"*, Ed. Ward, A. G. and A. Courts, Academic press, pp.137-177.
- Jost, R., J.C. Monti and J.J. Pahud, 1987, Whey protein allergenicity and its production by technological means., *Food Technol.*, 41,118.
- Kainuma, K., 1989 , Application of bioreactor in Food Industry, 日本農藝化學會紙., 63, 610
- 김기현, 1968, 어피(복쟁이 皮)로부터 젤라틴의 제법에 관한 연구, 부산대논문집, 자연과학편, 14, 325-327.
- 김기현, 1972, 피등어 풀뚜기로부터 젤라틴을 추출하는데 관한 연구, 부산대 논문집, 자연과학편, 9, 327-330.
- 김세권, 변희국, M. Cheryan, 1991a, 한외여과막 반응기를 이용한 어피젤라틴의 연속적 가수분해. 한국생물공학회지, 6, 309.
- 김세권, 양현필, 이응호, 1991b, 어피의 효소적 가수분해물을 이용한 천연조미료의 개발. 한국생물공학회지, 6, 327-336.
- 김세권, 이응호, 강옥주, 권칠성, 1986, 어패류의 조리, 가공과 Collagen, 냉동

공조공학, 5, 5-30.

김세권, 이용호, 1987, 말쥐치육 단백질의 효소적 가수분해물을 이용한Plastein의 합성 및 그 물성. 3. Plastein의 기능성, *한국수산학회지*, 20, 582-590.

김세권, 이용호, 오후규, 1987, 막분리기술의 식품공업분야에의 이용., *냉동공조공학*, 6, 16-30.

김세권, 전유진, 1991, 가자미피 젤라틴의 효소적 수식에 의한 유화제의 시제. *한국수산학회지*, 24, 345-355.

김세권, 광동채, 조덕제, 이용호, 1988, Plastein반응을 이용한 정어리단백질의 기능성 개선에 관한 연구., *한국영양식량학회지*, 17, 233-241.

Kinsella, J. E, 1983, Functional properties of food proteins, In *"Food science and technology: Present status and future direction"*, Ed. Mcloughlin, J. V. and B. M. Mckenna, Boole press, Vol. , pp. 226-246.

Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.

Lawrie, R. A., 1973, Protein as human food. *The AVI publishing Co., Ltd.*, Westport Connecticut, p. 365.

이용호, 김세권, 조덕제, 김진동, 스티버노, 김수현, 1978, 붕장어피 및 먹장어피를

- 이용한 피교의 가공조건과 제품의 성상, *한국수산학회지*, 11, 189-195.
- 이응호, 하진환, 허우덕, 1977, 명태피 및 말쥐치피를 이용한 어교의 최적가공조건과 품질에 대하여, *한국수산학회지*, 10, 1-9.
- 松本重一郎, 1980, 昭和 54年度 多獲性 赤身魚の商度利用技術開發研究成果の概要. 水産廳研究部 研究果, p. 393.
- Mehaia, M. A. and M. Cheryan, 1986, Lactic acid from acid Whey permeate in a membrane recycle bioreactor., *Enz. Microbiol. Technol.*, 8, 289.
- Mennheim, A., 1988, Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor., *Master's Thesis, Univ of Illinois, Urbana-Champaign.*
- Miller, R. and H. S. Groninger, 1976, Functional properties of enzyme modified acylated fish protein derivatives., *J. Food Sci.*, 42, 268-272.
- Monsheimer, R., Pfleiderer, E., 1981, Method of dissolving collagen-containing tissues., *U.S. Patent 4,293,647.*
- Ney, K. H., 1979, Taste of potato protein and Amino acid its derivatives., *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 56, 295-297.
- 三宅義章, 1982a, 魚類加工殘瀉の酵素處理による可溶化, *日食工誌*, 29,

- 117-122.
- 三宅義章, 1982b, 魚類加工残瀉の酵素分解と分解液の精製, *日食工誌*, 29, 316-319.
- 三宅義章, 1982c, 魚類加工残瀉酵素分解液の酵素処理, *日食工誌*, 29, 366-371.
- 三宅義章, 1982d, 魚類加工残瀉利用による調味料製造の工業化試験, *日食工誌*, 29, 428-434.
- 日本薬局方解説書, 1976, 日本公定書協會(第9改正版), 廣川書店, 東京, 493-496.
- 日本薬學會編, 1980, 日本衛生試験法註解, 琴原出版社(東京), 728-732
- Nishio, T. and R. Hayashi, 1987, Modification of physical properties of gelatin by use of an immobilized protease in combination with molecular sieve, *J. Food Sci.*, 52, 464-466.
- 大一止, 武恒子, 1973, 各種アミノ酸混合類による旨味液の作成. *營養と食糧*, 26, 146-156.
- Onoue, M. and L.M. Riddle, 1973, Use of plastein reaction in recovering protein from fish waste., *J. Fish Res. Board(Canada)*, 30, 1745

-
- Otani, H., K. Takayama and F. Tokita, 1985, Studies on the antigenicity of bovine α s1-casein, Antigenic activities of some peptides derived from the c-terminal region., *Milchwissenschaft*, 41, 565.
- Park, G. S. and J. R. Park, 1986, Functional properties of silkworm larvac protein concentration, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 18, 204-209.
- Payne, R.E. and C.G. Hill, 1978, Enzymatic solublization of leaf protein concentrate in membrane reactors., *J. Food sci.*, 43, 385-389.
- Petersen, B. R., 1981, "The impact of the enzymatic hydrolysis process on recovery and use of protein", *Enzymes and food processing*, Ed. Birch, G. and G. Blake, Applied science, pp.149-175.
- Qrskov, E. R., H.S. Soliman and C.F.S. Clark, 1982, Use of fish protein hydrolysate in milk replaces., *Animal Feed Sci. Technol.*, 7, 135.
- Quaglia, G.B. and E. Orban, 1987, Enzymatic solubilization of proteins of sardine by commercial protease., *J. Sci. Food Agric.*, 38, 263.
- Reksakulthai, N., Y.Z. Lee and N.F. Haard, 1986, Effect of enzyme supplements on the production of fish sauce from male capelin (*mallotus villosus*) *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 19, 26.

-
- 佐伯邦臣, 1985, コラゲンポリペプチドの食品への新規利用. *フードケミカル*, 2, 44~56.
- Satterlee, L. D., N. Y. Zachariah, E. Levin, 1973, Utilization of beef and pork skin hydrolyzates as a binder or extender in sausage emulsion., *J. Food Sci.*, 38, 268-270.
- Schwille, D., H. Seiz, E. Sorg, U. Sommer, 1977, Process for the production of protein-containing food additives., *Br. Patent*, 1,483,953 (to Agfa-Gevaert AG, BRD).
- Sen, D.P., N.V. Sripathy, N.L. Lahiry, A. Sreenivasan, V. Subrahmanyam, 1962, Fish hydrolysates. I. Rate of hydrolysis of fish flesh with papain., *Food Technol.* May 1962, 138-141.
- Sevendsen I., 1976, Chemical modifications of subtilisins with special preference to the binding of large substrate, A review. *Carlsberg Res. Commun.*, 41, 237-291.
- Shimada, A., I. Yamamoto., H. Sase., Y. Yamazaki., M. Watanabe and S. Arai, 1984, Surface properties of enzymatically modified proteins in aqueous systems. *Agric. Biol. Chem.*, 48, 2681~2690.
- Shirley, E. G., E. Roberts and N. Tomlinson, 1962, Dogfish gelatin., *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 19, 316-326.

- Stanley, D. W., 1981, Non-bitter protein hydrolysates., *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 14, 49-52.
- 試薬一般試験法, 1973, 日本工業規格(JIS), K 8004.
- 試薬一般試験法. 1970. 日本工業規格(JIS), K 6503.
- Suzuki, T., K. Kanna, E. Okazak and N. Morita, 1978, Manufacture of meat-textured fish protein concentrate from various fishes., *Bull. of the Japanese Sci. Fish.*, 44, 1275-1281.
- 丹 尺, 秀昭, 福田, 降西田, 洋子, 1984, コラーゲン蛋白質を素材とした美味な天然調味料の 開発について. *New Food Industry.*, 18, 12~25.
- 高橋幸資, 鈴木 敦, 和田敬三, 1989, 豚骨不溶性コラーゲンのゼラチン., *日食工誌*, 36, 538-542.
- Vega, R., 1987, Fractionation and concentration of fish protein hydrolysates. *Doctor's thesis, University of Reading.*, 44.
- Veis, A. and J. Cohen, 1955, The degradation of collagen. I. The solutilization on process in acid pH range., *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 364.
- Weber, K. and M. Osborn., 1967, The reliability of molecular weight determinations by sodium dodecyl sulfat-polyacrylamide gel

electrophoresis, *J. Biol. Chem.*, 244, 4406-4412.

渡瀬 峰 男 と 西 成 勝 好, 1984, アシル化ゼラチン-アガロ-ス混合ゲルのレオロジ-的性質に與えるpHの影響, *Nippon Shokahin Kogyo Gakkaishi*, 31, 777-782.

Weiss, J. B., 1976, *International review of connective tissue research* ; Enzymatic degradation of collagen., 7, pp.102~116.

Wells, J., 1973, *UNIDO Export Group Meeting. Vienna, Oct.*, pp. 2-3

吉澤 淑, 1981, 酵母を用いる食品工業廢水新處理法の開發. 日本農藝化學會紙, 55, 705-715.

山本 淳, 石田賢吾, 大喜弘, 1980, 調味料の製造法. 特許公報., 55-29659, p. 93.



Ⅵ. 감사의 글

본 논문을 시종일관 세심한 지도와 깊은 사랑으로 이끌어 주신 송대진 지도 교수님께 먼저 감사드리며 부족한 논문을 정성껏 다듬어 주신 강영주 교수님, 하진환 교수님, 부산수산대학교 김세권 교수님, 여수수산대학 신석우 교수님께 마음속 깊이 감사드립니다.

또 그간 많은 가르침을 베풀어 주신 김재하 교수님, 김수현 교수님, 고영환 교수님께도 감사의 말씀을 드립니다. 또한 수시로 자상한 조언을 아끼지 않으신 본 대학 강성구 학장님과 식품공학과 여러 교수님께도 감사를 표하는 바입니다.

그리고 실험과 자료정리를 성심 성의껏 도와준 부산수산대학교 화학과 생화학 연구실 변희국군, 전유진군, 양현필군, 노호석군께도 감사드립니다. 또 바쁜 가운데도 불구하고 관능검사 등 여러면을 검토하여 준 안창범 선생님께도 감사 드립니다. 그리고 무엇보다 오늘이 있기까지 정성으로 보살펴 주신 부모님, 동생들 내외분께 더 없는 감사를 드립니다.

끝으로 오늘까지 고된 생활속에서도 모든 희생을 무릅쓰고 진실한 사랑으로 희망과 용기를 준 이두례 아내와 장녀 미혜, 차녀 미진, 삼녀 지현, 그리고 막내인 장남 호준에게 이 영광을 드립니다.