

키토산 효소분해물을 이용한 어육연제품의 유통기간 연장

조학래 · 장동석* · 이원동** · 정은탁* · 이은우*
동의공업전문대학 식품공업과,*부경대학교 식품공학과,**한성기업(주)

Utilization of Chitosan Hydrolysate as a Natural Food Preservative for Fish Meat Paste Products

Hak-Rae Cho, Dong-Suck Chang*, Won-Dong Lee**,
Eun-Tak Jeong* and Eun-Woo Lee*

Department of Food Technology, Dong-Eui Technical Junior College
*Department of food science and technology, Pukyong National University
**Hansung Enterprise Co., LTD.

Abstract

The authors found out that *Aspergillus oryzae* ATCC 22787 has the activity to produce a pretty strong chitosanase. Therefore, the strain was used for preparing the chitosan hydrolysate with high antimicrobial activity. The antimicrobial activity of the chitosan hydrolysate was increased gradually with decreasing of viscosity of the solution. The chitosan hydrolysate showing viscosity 5~10 cp (30°C) of 2% solution was revealed the most strong antimicrobial activity. The growth of the *Bacillus* sp. isolated from the fish meat paste was inhibited with the concentration of 50 ppm. The astringent taste of chitosan solution was reduced with decreasing of viscosity of the solution. The fish meat paste products containing 0.3% chitosan hydrolysate was extended its shelf life by 6 days stored at 15°C, 4 days at 20°C and 2 days at 30°C.

Key words: chitosan, natural food preservative, fish meat paste products

서 론

키토산(chitosan)은 게, 새우 등의 해산 갑각류의 껍질을 산 처리 및 알칼리 처리하여 얻은 키틴(chitin)을 다시 고농도의 수산화나트륨 용액속에서 가열처리하여 제조한 poly-β(1,4)-D-glucosamine의 천연 다당류이다. 키토산은 묽은 산에 녹아 점조한 고분자의 양이온성 용액이 된다. 이렇게 (+)하전을 띠는 키토산용액은 폐수처리시 고분자 물질의 응집제로 이용되고 있고, 흡습·보수성을 이용하여 화장품을 비롯한 의약품 등의 분야에도 이용되고 있으며, 키토산 film이나 키토산 섬유 등으로도 제조되어 이용되고 있다. 게다가 키토산은 항암작용, 항균작용, 혈중 콜레스테롤 개선작용, 고혈압 조절작용, 체내의 유해물질의 배설작용, 비피더스균의 증식을 촉진하는 작용 등과 같은 기능성을 보유하고 있으므로 건강식품으로도 활발히 개발되

고 있다⁽¹⁾. 그러나 키토산은 분자량이 클수록 특유한 강한 짙은맛을 나타내므로 그대로는 식품소재로 이용하기는 곤란한 실정이다.

키토산은 가수분해시켜 저분자화시키면 항균력이 증가되고, 짙은 맛도 현저하게 감소하는 등 기능성이 상당히 개량됨을 본 연구자 등이 이미 밝힌 바 있다^(2,3).

본 연구에서는 고분자 키토산을 가수분해시켜 높은 항균력을 가지는 키토산 효소분해물을 제조하여 이를 기능성을 갖춘 어육용 보존료로 이용하고자 하였다. 키토산의 가수분해를 위해서는 *Aspergillus oryzae* ATCC 22787의 효소를 탐색하였는데, 키토산 가수분해효소를 생산하는 미생물에 관한 연구에는 Kendra 등⁽⁴⁾, Price 등⁽⁵⁾, 小林⁽⁶⁾의 보고 등이 있다.

재료 및 방법

사용 키토산 및 용해법

고분자 키토산 제품인 (주)신영키토산의 SY-1,000

Corresponding author: Hak-Rae Cho, Department of Food Technology, Dong-Eui Technical Junior College, Yangjeong-dong San 72, Pusanjin-gu, Pusan 614-715, Korea

(탈아세틸화도 95%, 건조감량 10%)을 2% 이하의 용액의 제조에 사용하였고, 중간 분자 제품인 (주)영덕 키토산의 점도 100~150 cp의 제품(탈아세틸화도 98.5%, 건조감량 10%)을 어묵보존효과시험을 위한 4% 용액의 제조에 사용하였다.

키토산의 용해는 키토산 1 g당 acetic acid를 0.3 mL 비율로 가하고 목적하는 농도가 되도록 물을 가하는데, 물은 4~5 차례로 나누어 가하여 수시로 교반하면서 1일 밤 정도 방치하여 용해시켰다.

효소 생산용 배지

A. oryzae 균주를 이용하여 키토산 분해효소를 생산하기 위하여 고안한 배지의 조성은 키토산 0.5%, yeast extract 0.5%이다. 배지는 110°C에서 20분간 가열살균한 키토산 1% 용액과 121°C에서 15분간 멸균한 yeast extract 1% 용액을 동일한 양씩 혼합하여 사용하였다.

항균력 시험

키토산이 배지성분의 용해도에 영향을 미치지 않는 성분들로 Glucose 1.0%, Casamino acid 1.0%, NaCl 0.5%, K₂HPO₄ 0.25%, KH₂PO₄ 0.1% 조성의 배지를 항균력 측정에 사용하였다^(2,3).

멸균한 배지에 효소분해물을 농도별로 첨가한 후 공시균을 접종하여 생육최적온도에서 배양하면서 균의 증식 여부를 조사하여 균 증식억제에 요구되는 효소분해물의 최저농도(MIC)를 구하였다.

점도의 측정

키토산 용액의 절대점도는 Brookfield 회전 점도계 (BM형, Tokyo Keiki Co., LTD.)를 사용하여 30°C 수조에서 측정해 cp 단위로 표기하였다. 상대점도는 Ostwald형 점도계를 사용하여 30°C 수조에서 측정하였다.

효소분해물의 제조

고분자 키토산용액에 키토산분해효소를 가한 후 40°C에서 효소반응을 시키면서 용액의 상대점도가 목적하는 시점에 도달하면 autoclaving하여 제조하였다.

어묵 및 어묵에 대한 첨가 효과

Table 1의 조성으로 배합한 원료에 가수분해물을 첨가하여 고기갈이를 하였으며 가수분해물을 첨가하는 양만큼 첨가하는 물의 양을 줄였다. 고기갈이를 마친 육은 진공포장한 다음 90°C에서 40분간 가열살균한 후 즉시 얼음물에 담구어 충분히 냉각시켰다. 효소분해물

Table 1. Ingredients of the fish meat paste products submitted to this study

Frozen Alaska pollack meat paste	38.4%
Starch	15.2%
Sodium choride	1.4%
Egg white	4.7%
Soy protein	1.2%
Food additives, liquid	2.1%
Food additives, powder	1.6%
Water	35.4%

이 첨가된 어묵의 탄력측정은 제조한 어묵의 중심부위를 폭 11 mm로 잘라서 rheometer (NRM-2002J)를 사용해 측정하여 g·f 단위로 표기하였고, 색택은 Color difference meter (Model TC-3600, Tokyo Denshoku, Japan)를 사용하여 측정하였으며 X, Y, Z치는 standard로 각각 X=80.8, Y=82.2, Z=91.6으로 조절하였다. Hunter 색체계상의 각 값은 다음의 계산식에 따라 각각 구하였다.

$$L (\text{명도})=10.0 \sqrt{Y}$$

$$a (\text{적색도})=17.5 (1.02 \cdot X - Y) / \sqrt{Y}$$

$$b (\text{청색도})=7.0 (Y - 0.847 \cdot Z) / \sqrt{Y}$$

$$YI (\text{황색도})=(1.28 \cdot X - 1.06 \cdot Z) / 100 \cdot Y$$

$$W (\text{백도})=0.847 \cdot Z$$

결과 및 고찰

균주의 선정

본 저자는 토양에서 분리한 *Aspergillus* sp.가 키토산 분해효소의 활성을 보유한 것을 밝힌 바⁽³⁾있다. 그런데 자연계에서 분리한 균을 식품용 소재의 생산에 사용하려면 균의 생성물에 대한 안전성이 완전히 판별되어야 가능하다. 따라서 *Aspergillus* sp. 균주 중에서 식용미생물로 분류되어 있고, 발효공업에서 널리 사용되고 있는 표준균주 몇가지를 대상으로 균체의 키토산 분해효소 활성을 조사하게 되었는데, *A. oryzae* ATCC 22787이 키토산 분해효소의 활성이 높게 나타났으므로 이후 이 균주를 키토산 분해효소 생산용 균주로 선정하게 되었다. 이 균주는 청주 양조시 쌀 koji 제조용으로 기존 사용되고 있는 균주이므로 균체 생성물의 인체에 대한 안전성에 문제가 없다. 따라서 배양여액은 별다른 정제과정을 거치지 않고도 효소로 바로 사용할 수가 있다.

효소의 생산

효소 생산용 배지에 곰팡이를 접종하여 30°C에서

진탕배양(120 rpm)하였다. 배양 1주일경에 곰팡이의 증식이 정지기에 달하고, 배양액 속의 키토산이 완전히 분해되어 용액의 점성이 완전히 소실되었으므로 이때를 배양의 종료시점으로 정하였다. 곰팡이는 진탕배양시 균체가 작은 덩어리상으로 엉기게 되므로 보통의 여과지를 통해서도 그 균체를 거의 제거할 수 있다. 이 액을 적당량씩 나누어 동결보관해 두고 필요 시 용해하여 키토산 분해효소로 사용하였다.

효소의 활성도 확인

제조한 키토산 분해효소의 키토산 가수분해 활성을 확인하기 위하여 키토산 1% 용액 100 mL당 조효소액 0.25 mL 비율로 가해 40°C에서 가수분해시키면서 용액의 점도 변화를 살펴보았다. 효소반응 15분경에 용액의 점도가 절반으로 감소되었고, 반응 2시간 경에 1/10 정도로 감소하는 경향을 나타내었으므로 본 효소가 키토산 분해활성을 보유하고 있음을 확인하였다(Fig. 1).

가수분해반응에 따른 키토산의 기능성 변화

키토산의 가수분해도에 따른 항균력의 변화를 조사해 보기 위하여 키토산 2% 용액을 가수분해시켜 점도 1,000~<4 cp (30°C)의 효소분해물을 얻었으며, 이들 효소분해물의 항균력을 비교해 보았다. 항균력 측정용 배지에 키토산 효소분해물을 여러 농도로 첨가한 후 대장균과 어묵의 주요 부패균으로 분리한 *Bacillus sp.*을 대상으로 MIC를 조사하였다(Table 2).

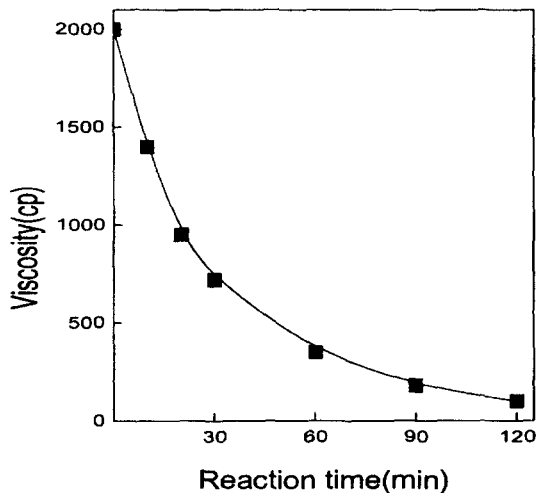


Fig. 1. Enzymatic hydrolyzing pattern of chitosan solution by the action of chitosanase produced by *Aspergillus oryzae* ATCC 22787. 0.25 mL of enzyme solution was added to 100 mL of 1% chitosan solution, reactions were performed at 40°C.

Table 2. Change of MIC and astringent taste by decreasing viscosity of the chitosan solution (2%)

Viscosity (cp/30°C)	MIC (ppm)		Astringent taste
	<i>E.coli</i>	<i>Bacillus sp.</i>	
>100,000	2,000	2,000	Very strong
1,000	1,000	1,000	Very strong
400	1,000	1,000	Very strong
40	1,000	1,000	Strong
10~5	100~200	50	Moderately weak
<4	>1,000	500	Moderately weak

고분자 키토산은 효소분해가 진행되어 감에 따라 항균력이 증가하는 경향을 보였는데, 용액의 점도가 10~5 cp에서 공시균에 대한 증식 억제력이 가장 강하게 나타났다. Gram 음성균인 대장균은 200 ppm으로 증식이 억제되었으나, Gram 양성균인 *Bacillus sp.*은 50 ppm으로도 증식이 억제되었다. 따라서 *Bacillus sp.*의 경우를 미루어 볼 때 무처리의 점도 10만 cp 이상의 고분자 키토산에 비해 점도 10~5 cp의 저분자 키토산은 40배 가량 항균력이 증가하였다고 할 수 있다. 그러나 점도 4.0 cp 이하의 키토산은 *Bacillus sp.*의 증식억제에 500 ppm이 요구되는 등 점도 4.0 cp 이하의 극히 저분자의 키토산은 오히려 항균력이 저하됨에 유의하여야 한다. 이러한 결과는 본 저자가 키토산 1% 용액을 효소분해시키면서 상대점도의 변화에 따른 항균력의 변화를 조사한 결과, 키토산의 가수분해로 용액의 점도가 저하함에 따라 항균력이 증가하다가 상대점도 1.2 이하에서는 오히려 항균력이 감소하였다는 보고⁶⁾나 전 등⁷⁾은 키토산올리고당의 경우 분자량 10,000 Da 이하부터는 분자량이 감소할수록 항균력이 감소하였다고 보고하였고, 이러한 결과는 키토산이 가수분해되어 환원당 생성량이 50 mg/kg일 때는 분해 전보다 높은 항균활성을 나타냈으며 그 이후에는 환원당량이 증가할수록 항균력은 감소한다는 内田의 보고와도 일치한다고 고찰한 바 있다.

키토산용액 특유의 떫은 맛도 키토산이 저분자화되어 감에 따라 현저하게 감소되었다. 따라서 키토산을 식품에 첨가하였을 때 가장 문제시되던 떫은 맛에 관한 우려감도 상당히 줄일 수 있었으므로 키토산 효소분해물이 식품보존료로 이용 가능함을 알 수 있었다.

키토산 효소분해물의 성상

키토산은 가능한 고농도로 용해시켜 식품에 첨가하는 것이 그로 인해 불필요한 수분함량의 증가를 막을 수 있다. 특히 어묵의 경우에는 고기갈이 과정중에 원료어육의 품온이 상승하는 것을 막기위해 가하는 물

Table 3. Properties of the chitosan hydrolysate (4% solution)

Hunter color system			pH	Relative viscosity
L	a	b		
15.6	-3.2	5.1	4.9	1.1~1.2

을 대부분 얼음의 상태로 첨가하고 있다. 만약 저농도의 키토산을 첨가하게 되면 그 만큼 얼음의 양을 줄여야 하므로 고기갈이 과정중의 품온 상승으로 인하여 제품의 탄력이 저하될 수 밖에 없다. 고분자 키토산은 용액의 높은 점도로 인하여 2% 이상의 농도로는 용해

Table 4. Sensory evaluation results of the fish meat paste product added with chitosan hydrolysate

	pH	Hunter color system			Elasticity ¹⁾
		L	a	b	
Control	7.4	75.70	-2.07	8.97	129.13
0.3% added	7.0	70.92	1.22	10.52	134.56
0.5% added	6.9	64.73	1.74	13.99	137.91

¹⁾Brocken strength (g·f)

시키기 어려우므로 4% 용액의 제조에 국내에서 시판 중인 키토산 중에서 가장 저점도의 제품을 4% 용액의 제조에 사용하였는데, 이 제품도 4% 이상의 농도로는 용해시키기 곤란하였다. 키토산 4% 용액의 효소분해물은 pH 4.9, 상대점도 1.1~1.2로 엷은 황갈색을 띠는 투명한 용액이다(Table 3).

효소분해물 첨가 어묵제품의 관능 평가

효소분해물을 첨가한 제품은 키토산 고유의 떫은 맛이 약간 감지되었으나, 0.3% 첨가로는 그 정도가 미약하였으므로 별 문제가 되지 않았다.

효소분해물을 0.3% 첨가하여 제조한 어묵제품은 pH 7.0, 0.5% 첨가한 제품은 pH 6.9로서 무첨가 제품의 pH 7.4 보다는 약간 낮았다. 효소분해물의 첨가로 인한 제품의 탄력 변화를 살펴보면, 무첨가구의 파단강도가 129.13 g·f이었지만 0.3% 첨가구가 134.56 g·f, 0.5% 첨가구가 137.91 g·f로서 효소분해물의 첨가로 제품의 탄력이 향상되는 결과가 나타났다. 이는 키토산 효소분해물의 첨가로 인한 제품의 탄력 증가요인

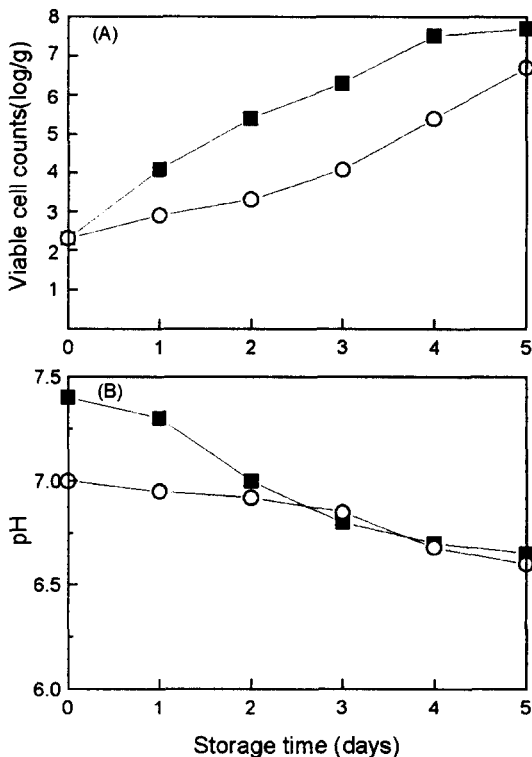


Fig. 2. Change of viable cell count and pH of the fish meat paste product added with chitosan hydrolysate during the storage at 30°C. ■—■: Control, ○—○: 0.3% chitosan hydrolysate

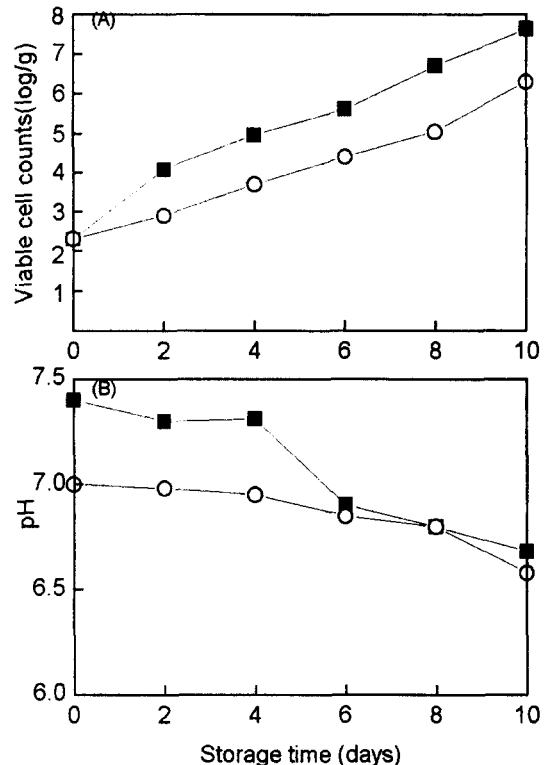


Fig. 3. Change of viable cell count and pH of the fish meat paste product added with chitosan hydrolysate during the storage at 20°C. ■—■: Control, ○—○: 0.3% chitosan hydrolysate

이 pH 저하에 따른 제품의 탄력 감소요인을 상쇄시키고도 남음이 있었음을 알 수 있었다.

Hunter color system상의 색상변화는 효소분해물의 첨가량이 증가함에 따라 a치와 b치가 증가하여 제품의 황색도가 조금씩 높아졌으므로(Table 4) 키토산 효소분해물의 제품에 대한 첨가량은 제품의 맛과 색깔을 고려하여 0.3%로 결정하였다.

어묵 보존효과

30°C 저장시 어묵의 g당 생균수가 105 이상이 되는 시점에 도달하는데 대조구는 2일이 소요되었으나, 키토산 효소분해물 0.3% 첨가로 2일이 연장되어 4일이 소요되었고, 20°C 저장시에는 4일, 15°C 저장시에는 6일 가량 연장되는 효과가 나타났다(Fig. 2, 3, 4). 이렇게 키토산 효소분해물을 어묵에 첨가함으로써 어묵의 보존기간이 상당히 연장되는 효과를 얻을 수 있었으며, 또한 첨가한 키토산이 나타내는 기능성도 감안한다면 어묵보존료로 이용 가능하다고 하겠다.

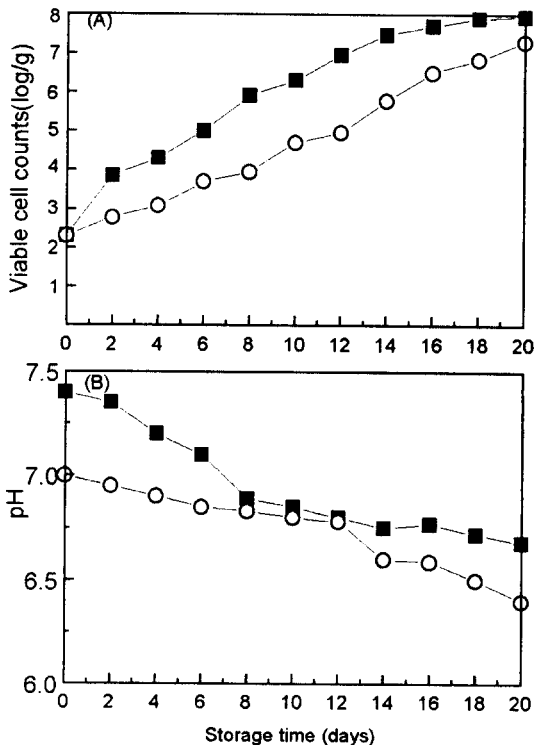


Fig. 4. Change of viable cell count and pH of the fish meat paste product added with chitosan hydrolysate during the storage at 15°C. ■—■: Control, ○—○: 0.3% chitosan hydrolysate

요 약

키토산 분해효소 활성이 높은 미생물로 *Aspergillus oryzae* ATCC 22787를 탐색해 내었으며, 이 균주를 키토산 0.5%, yeast extract 0.5% 조성의 배지에 배양하여 효소를 생산하였다. 고분자 키토산은 효소분해가 진행되어 감에 따라 항균력이 증가하였는데, 2% 용액의 점도가 10~5 cp (30°C)에서 균 증식 억제력이 가장 강하게 나타나 고분자 키토산에 비해 약 40배 가량 항균력이 증가하였다. 또한 키토산용액 특유의 떫은 맛도 키토산이 저분자화되어감에 따라 현저하게 감소되었다. 그러나 점도 4.0 cp 이하의 극히 저분자의 키토산은 항균력이 오히려 소실되었다. 효소분해물을 0.3% 첨가한 제품은 pH 7.0, 0.5% 첨가 제품은 pH 6.9로서 무첨가 제품의 pH 7.4 보다는 약간 낮았다. 효소분해물의 첨가로 제품의 색상은 약간 황색화되었으나 0.3% 정도의 첨가로는 별 문제가 없었다. 탄력은 조금 향상되었고, 맛에도 문제가 없었다. 어묵에 효소분해물을 0.3% 첨가하고 30°C에서 저장하였을 때 저장기한이 무첨가구에 비해 2일 연장되었고, 20°C 저장시에는 4일, 15°C 저장시에는 6일 가량 연장되는 효과가 나타났다.

감사의 글

본 연구는 농림부 1996년도 "현장으로 기술 개발" 연구과제의 연구비 지원으로 수행되었음을 밝히며, 감사드리는 바입니다.

문 헌

1. Kim S.K.: The Fundamental and Pharmacology of Chitin·Chitosan (in Korean), Leehwa Munhwa Book p.17-143 (1997)
2. Chang, D.S., Cho, H.R., Goo, H.Y. and Choe, W.K.: A development of food preservative with the waste of crab processing (in Korean). *Bull. Korean Fish. Soc.*, **22**(2), 70-78 (1989)
3. Cho, H.R.: Antimicrobial activity and food preservative function of a low molecular weight chitosan. *Ph. D. Thesis, National Fish. Univ of Pusan*, Seoul, Korea (1989)
4. Kendra, D.F. and Hadwiger, L.A.: Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*, *Exp. Mycol.*, **8**, 276-281 (1984)
5. Price, J.S. and Storck, R.: Production, purification, and characterization of an extracellular chitosanase from *Streptomyces*. *J. Bacteriol.*, **124**(3), 1574-1585 (1975)

6. 小林文男: "キチン質分解酵素の現況と應用", 別冊フードケミカル-1, キチン/キトサンの科學, p.112-121 (1987)
7. Jeon Y.J. and Kim, S.K.: Antitumor, antibacterial and calcium absorption acceleration effects of chitosan oli-

gosaccharides prepared by using ultrafiltration membrane enzyme reactor (in Korean). *Korean J. Chitin Chitosan*, 2(3), 60-78 (1997)

(1998년 2월 10일 접수)