

크릴 가공폐기물을 이용한 Carotenoprotein의 추출조건 및 품질안정성에 관한 연구

김세권 · 김용태 · 곽동채 · 조덕제* · 이응호**

부산수산대학 응용화학과

*경남전문대학 식품영양과

**부산수산대학 식품공학과

Extraction Conditions and Quality Stability of Carotenoprotein from Krill Processing Waste by Proteolytic Enzymes

Se-Kwon KIM, Yong-Tae KIM, Dong-Chae KWAK

Duck-Jae CHO* and Eung-Ho LEE**

*Department of Applied Chemistry, National Fisheries University of Pusan,
Pusan, 608-737, Korea*

**Department of Food & Nutrition, Kyung Nam Junior College,
Pusan, 616-012, Korea*

***Department of Food Science and Technolygy, National Fisheries University of Pusan,
Pusan, 608-737, Korea*

The purpose of this paper is to develop a colorant from krill, *Euphausia superba*, process wastes for use in food products. Carotenoproteins were extracted from preboiled krill processing offal(PKPO) and raw frozen krill processing offal(RKPO) with the aid of proteolytic enzymes. The long-term stability of the astaxanthin associated with the carotenoprotein by the addition of protease inhibitor and antioxidant to the product were also investigated.

Total astaxanthin contents of PKPO and RKPO were 35.1mg%, 22.1mg% and those in carotenoproteins were 98.6mg%, 61.9mg%, respectively. The chitin contents of PKPO and RKPO were 6.9%, 4.5%, however, those of carotenoproteins were not determined.

When 0.5% trypsin was added to the extraction medium containing 0.5M Na₃EDTA at 4°C, 74% of astaxanthin and 83% of the protein of PKPO were recovered as carotenoprotein in 24hrs.

The amino acid profile in carotenoprotein was mainly composed of glutamic acid, methionine, aspartic acid and isoleucine. Their contents amounted to about 40% of the total amino acids, followed by alanine, phenylalanine, lysine, leucine, threonine and tyrosine in that order, with a small amount of cysteine and tryptophan. The levels of essential amino acids were high as much as 38.3%~43.6% of the total amino acids.

The maximum observance of the carotenoid fraction from krill processing offal and from carotenoprotein was 469nm in petroleum ether. The separated components of carotenoprotein by TLC had R_f's 0.20~0.23, 0.56~0.60 and 0.88~0.91. The carotenoids were compri-

sed of astaxanthin, astaxanthin monoester and astaxanthin diester in 25~30%, 35~40% and 40~45%, respectively.

The loss of carotenoids in the carotenoprotein can be prevented by the addition of protease inhibitor(trasyolol) and antioxidant(BHT) below 4℃.

서 론

재료 및 방법

Carotenoids색소는 자연계에 널리 분포하고 있고, 그 기능도 매우 다양하다. 수산동물에는 게, 새우와 같은 갑각류에 특히 많이 함유되어 있으며, 연어와 같은 어류나 패류에도 함유되어 있다(Britton 등, 1981).

Carotenoid-protein 복합체는 carotenoids가 단순 단백질 또는 glycoprotein과 화학양론적으로 결합된 carotenoprotein과 carotenoid 이외의 지질을 함유한 lipoprotein과 결합한 carotenolipoprotein으로 분류할 수 있으며, carotenolipoprotein은 알(卵), 난소, 혈액 등에, carotenoprotein은 어피나 갑각류의 껍데기에 많이 존재한다(Zagalsky 등, 1985). 이에 관한 연구로는 Garate 등(1984)의 게껍질의 푸른색 carotenoprotein에 관한 연구, Carlos 등(1985)의 가재의 적색 carotenoprotein에 관한 연구 및 Arnett (1982)의 무척추 동물의 carotenoprotein에 관한 연구보고가 있고, 무지개 송어, 연어 등 어육의 착색을 위한 갑각류의 가공폐기물의 이용에 관한 연구도 있다(Saito와 Regier, 1971, Spinelli 등, 1974, Chen 등, 1984).

이들 대부분의 연구는 화학적 방법(유기용매 추출법)으로 색소를 추출한 결과 산화에 의한 carotenoid의 안정성이 문제가 되었으며 단백질과 같은 유용성분을 동시에 회수할 수 없었다.

새우, 게와 같은 갑각류 또는 크릴의 가공잔사는 전어체의 50~70% 이상을 차지하고 있으며, carotenoid색소는 가공잔사중에 대부분이 함유되어 있다. 따라서 이들 폐기물중의 유효성분의 이용은 경제성 면에서 뿐만 아니라 환경오염방지면에서도 중요한 의미가 있다고 볼 수 있다.

본 연구는 크릴육을 채취하고 남은 잔사에 대부분의 carotenoid색소가 들어 있으므로 이를 회수하여 게맛살등의 식품착색료로 이용할 목적으로 크릴가공 잔사로 부터 carotenoprotein의 추출을 촉진시키기 위해 단백질분해효소와 킬레이트제를 이용하여 carotenoprotein의 추출조건을 구명하는 동시에 항산화제처리에 의한 저장 안정성에 대하여 검토하였다.

1. 재 료

Krill, *Euphausia superba*,은 1987년 12월 3일~1988년 1월 19일 사이에 남위(南緯) 58°~62°, 서경(西經) 45°~65°의 남대양에서 어획하여 즉시 -60℃에서 동결저장한 것으로서 1988년 6월 20일 실험실(4℃)로 옮겨 100℃의 끓는 물에 5분간 자숙한 시료와 비자숙 시료의 육을 저온실에서 채취하고 남은 잔사를 동결건조(DURA-DRY corrossion resistant Freezer-Dryer, F. T. S. System Inc.)하여 -30℃의 동결고에 저장하여 두고 실험하였다. Krill의 크기 및 무게는 각각 39~62mm, 0.2~2.3g 이었다.

2. Carotenoprotein의 추출

Carotenoprotein의 추출은 Jeneks와 Buten(1964)의 방법에 따라 크릴가공 잔사 4g에 0.5M Na₃EDTA(-4℃) 용액 30ml을 가하여 균질기(Ace homogenizer AM-6, 2,000 rpm, 2min)로 균질화시켰다. 균질액에 trypsin(11,000 units, from bovine pancreas Type II, Sigma), papain(19 unit/mg solid, from papaya latex, Sigma), pepsin(1: 10,000, Nakarai Chemical LTD) 및 protease(0.6 units, from *Aspergillus saitoi* Type XIII, Sigma)를 시료량에 대하여 각각 0.05%, 0.2%, 0.5%, 1% (w/w)를 가한 다음 진탕항온수조(4℃)에서 가수분해시킨 후 cheesecloth로 여과하고 그 잔사를 증류수 20ml로 세정하여 얻은 여액과 혼합하여 2N HCl 용액으로 pH를 7.5로 조절하였다. 여기에 분말 황산암모늄을 가하여 45%로 포화시킨 다음 원심분리(2,200×g, 20 min)한 후 그 침전물에 5mM 인산완충액(pH 7.0) 20ml을 가하여 현탁시켜 저온실(4℃)에서 동일 완충액으로 24시간 투석(완충액 5회교환)하여 carotenoprotein을 추출하였다. 추출된 carotenoprotein은 동결건조시킨 후 분석에 이용되었다(Fig. 1).

3. 일반성분 및 아미노산 정량

수분은 상압건조법, 회분은 건식회화법, 지방은 Soxhlet법 그리고 조단백질은 Semi-micro Kjeldahl

법으로, 순단백질은 Barnstein법에 따라 정량하였다.

아미노산조성 분석은 각 시료 0.05g을 정확히 달아 ampoule에 넣고 6N HCl 2.5ml를 가하여 진공밀봉한 다음 110℃ sand bath에서 24시간 가수분해시켰다. 가수분해된 시료는 회전진공증발기로 염산을 제거한 후 25ml로 정용하여 막여과기(Whatman, 0.2μm)로 여과한 여액을 아미노산 자동분석기(LKB 4150-α형)로 정량하였다. 그리고 tryptophan 함량은 Spies와 Chamber(1948)의 방법으로 cysteine 함량은 Pieniazek(1975)의 방법으로 정량하였다.

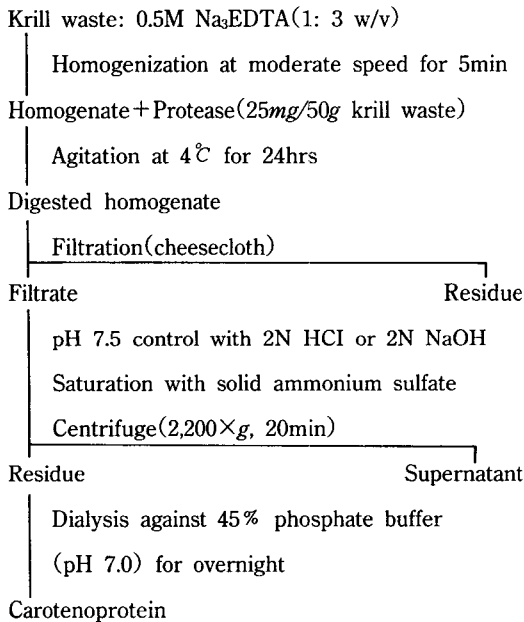


Fig. 1. Scheme for the recovery of carotenoproteins from krill offal.

4. Chitin정량

Chitin은 Spinelli 등(1974)의 방법에 따라 정량하였다. 즉 동결건조한 시료 1g을 마쇄하여 2% NaOH용액 100ml를 가하고 진탕항온수조(98℃)에서 1시간 동안 가수분해시켰다. 가수분해물을 glass filter(17G3)로 여과한 다음 2% NaOH용액으로 세정하였다. 그 잔사에 5% HCl용액 100ml를 가하여 진탕항온수조(23℃)에서 12시간 동안 가수분해한 후 glass filter로 여과하였다. 이 잔사를 16시간 동안 110℃에서 건조시킨 후 무게를 측정하여 chitin을 정량하였다.

5. 박층 크로마토그래피(TLC)에 의한 총 astaxanthin의 분리동정

추출한 총 astaxanthin은 ethyl acetate : benzene (1 : 9)을 전개용매로 한 TLC(Merck Co.)상에서 분리동정하여 이를 TLC scanner(DUAL-WAVE-LENGTH TLC SCANNER CS-910, Shimadzu)로 분석하였으며, 분리한 각 색소를 acetone으로 용해하여 회전진공증발기(40℃)로 acetone을 제거한 후 석유에테르 50ml로 용해한 다음 흡광도(Pye-Unicon 8600 UV/VIS Spectrophotometer, Philips)를 측정하여 최대 흡수파장을 나타내었다.

6. 총 carotenoid색소의 정량

총 astaxanthin은 Saito와 Reigier(1971)의 방법을 약간 수정하여 정량하였다. 즉 동결건조한 시료 5g에 -20℃ acetone 10ml를 가하고 균질기(Ace homogenizer AM-6)로 균질화(2,000 rpm, 2min)한 후 감압여과(Whatman No.1)한 다음 잔사에 -20℃ acetone 50ml를 가하여 세정시킨 후 여액을 분액깔대기에 모아 여기에 석유에테르 50ml를 가하여 서서히 흔든 다음 23℃에서 10분간 방치한 후 분리된 acetone층을 다른 분액깔대기로 옮겨 acetone층의 색이 없어질 때까지 3회 반복하였다. 이와 같이 하여 분리된 석유에테르층을 탈이온수 25ml로 4회 씻은 후 물층을 제거한 다음 무수황산나트륨 25g을 가하여 유리병으로 교반하면서 잔존한 물을 제거시켜 glass filter(17G3)로 여과하였다. 무수황산나트륨에 잔존해 있는 색소를 제거하기 위해 석유에테르 20ml로 세정하였다. 세정액과 여과액을 모아 진공회전증발기(40℃)로 농축시킨 다음 석유에테르 10ml로 정용하여 흡광도(468nm)를 측정하였다. 추출된 carotenoid색소의 농도(C)는 Saito와 Reigier의 식에 의해 계산하였다.

$C(\mu\text{g/g sample}) =$

$$\frac{A_{468\text{nm}} \times \text{vol of extract} \times \text{dilution}}{0.2 \times \text{weight of sample used in grams}}$$

여기서 0.2는 표준 canthaxantin 1ml 당 1μg의 $A_{468\text{nm}}$ 이다.

7. 항산화제 처리에 의한 Carotenoprotein의 안정성

Carotenoprotein 중 항산화제인 BHT, protease의 저해제인 trasylol(Sigma Co.)등에 의한 astaxanthin의 안정성에 대한 영향을 실험하였다. 즉, Cheesecloth로 여과한 여액(Fig. 1) 100ml에 BHT 10mg, trasylol 100μl, BHT 10mg과 trasylol 100μl를 각각

침가하여 진탕항온수조에서 4, 8, 12, 16, 20, 24일 간격으로 온도별로 항온처리하였다. 이때 대조구도 병행 실시하였다. 처리액 일정량을 취하여 총 astaxanthin 함량을 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 생동결 및 자숙크릴의 가공잔사 및 carotenoprotein의 일반성분, chitin 및 총 astaxanthin

생동결 및 자숙 크릴로부터 육을 분리시킨 잔사 및 그 잔사로 부터 추출한 carotenoprotein의 일반 성분과 총 astaxanthin 함량은 Table 1과 같다. 자숙 크릴가공 잔사의 총 astaxanthin, chitin 및 조지방 함량은 각각 35.1mg%, 6.9%, 9.4%로 생동결 크릴가공 잔사의 22.1mg%, 4.5%, 7.3%에 비하여 다소 높은 함량이었다. 그러나 단백질함량은 생동결 크릴가공 잔사가 54.1%로 자숙 크릴가공 잔사의 49.6%보다 약간 높았다. 이러한 결과는 자숙크릴 가공잔사와 생동결 크릴잔사에 붙어 있는 육의 양이 다르기 때문인 것 같다. 즉 생동결 시료의 경우는 자숙한 것 보다 육의 분리가 어려워 육이 많이 붙어 있기 때문에 분석시료 중에 있는 성분중에 단백질이 많아지고 다른 성분은 상대적으로 적어진 것 같다.

Carotenoprotein의 경우, 자숙 크릴가공 잔사의 지방함량이 13.6%로 생동결 크릴가공 잔사의 15.9%에 비해 낮았으나 총 astaxanthin 함량은 자숙 크릴가공 잔사가 98.6mg%로 생동결 크릴가공 잔사의

61.9mg%에 비해 훨씬 높은 함량이었다. Carotenoprotein을 추출한 잔사중 chitin 함량은 54.2~55.9%를 차지하였다.

2. Carotenoprotein의 추출조건

1) 단백질 회수에 대한 추출시간의 영향

동결 건조한 생동결 크릴가공 잔사 및 자숙 크릴가공 잔사 4g에 0.5M Na₃EDTA용액 30ml를 가하여 균일화 시킨 후 trypsin, papain, pepsin 및 protease를 각각 1%(w/w)가하여 4℃에서 가수분해시간 변화에 따른 carotenoprotein중의 단백질 회수율을 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에서 볼 수 있는 바와 같이 가수분해 8시간까지는 단백질 회수율이 비교적 급격히 증가하였으나, 가수분해 24시간 이후에는 trypsin을 제외한 효소의 경우는 오히려 단백질 회수율이 감소하는 경향을 나타내었다.

Trypsin으로 24시간 가수분해하였을 때 자숙크릴 잔사로 부터의 단백질 회수율은 78%로 생동결 크릴잔사의 64%에 비해 회수율이 높았다.

Trypsin은 papain, pepsin 및 protease에 비하여 단백질 회수율이 매우 높았다. 이와 같은 경향은 생동결 크릴잔사에서도 비슷한 경향을 보였다. 자숙크릴 잔사가 생동결 크릴잔사에 비하여 효소에 의해 회수된 단백질이 전체적으로 높았다. 이러한 경향에 대한 확실한 근거는 찾을 수가 없었으나 열처리 받은 자숙크릴 잔사가 열처리 하지 않은 생동결 시료에 비해 단백질이 효소작용에 민감해졌기 때문이라 짐작된다.

Simpson과 Haard(1985)는 새우 가공폐기물에서

Table 1. Proximate composition, chitin and total Astaxanthin of freeze-dried krill Waste, krill carotenoprotein and extracted residue (wet weight basis, %)

Component	Krill Waste		Krill Carotenoprotein		Residue	
	Cooked	Uncooked	Cooked	Uncooked	Cooked	Uncooked
Crude protein	49.6	54.1	70.2	68.9	12.0	13.6
Pure protein	43.0	49.0	66.5	61.0	ND	ND
Crude fat	9.4	7.3	13.6	15.9	3.9	4.9
Ash	19.5	17.2	8.1	7.7	20.9	22.8
Moisture	6.0	6.5	3.5	3.9	4.8	4.6
Carbohydrate*	15.5	14.9	4.6	3.6	58.9	56.1
Chitin	6.9	4.5	0	0	55.9	54.2
Total astaxanthin(mg%)	35.1	22.1	98.6	61.9	ND	ND

Note: Data are average values of duplicate determination.

*: Carbohydrate calculated by difference and represents chitin and other minor solids.

ND: not determined.

trypsin에 의해 단백질 80%가 회수되었다고 보고 하였는데, 이 결과는 본 실험 크릴 가공잔사의 단백질 회수결과와 거의 일치하였다.

2) 단백질 회수에 대한 효소농도의 영향

동결건조한 생동결 크릴 가공잔사 및 자숙크릴 가공잔사 4g에 5M Na₃EDTA용액 30ml를 가하여

균일화 시킨 후 4°C에서 24시간 가수분해시 효소 농도변화에 따른 carotenoprotein중의 단백질 회수율은 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 자숙크릴 잔사는 효소농도가 0.1%까지는 단백질 회수율이 비교적 급격히 증가되었으나 trypsin을 제외한 papain, pepsin, protease의 경우는 효소농도가 증가되어도 단백질 회수율에는 큰 차이는 볼 수 없었다. 그러나 trypsin은 효소농도 0.5%까지는 단백질 회수율이 증가하였으나 그 이상의 효소농도에서는 단백질 회수율은 거의 일정하였다.

생동결 크릴잔사의 경우도 trypsin농도가 0.1%까지 단백질 회수율이 급격히 증가되었으나, trypsin

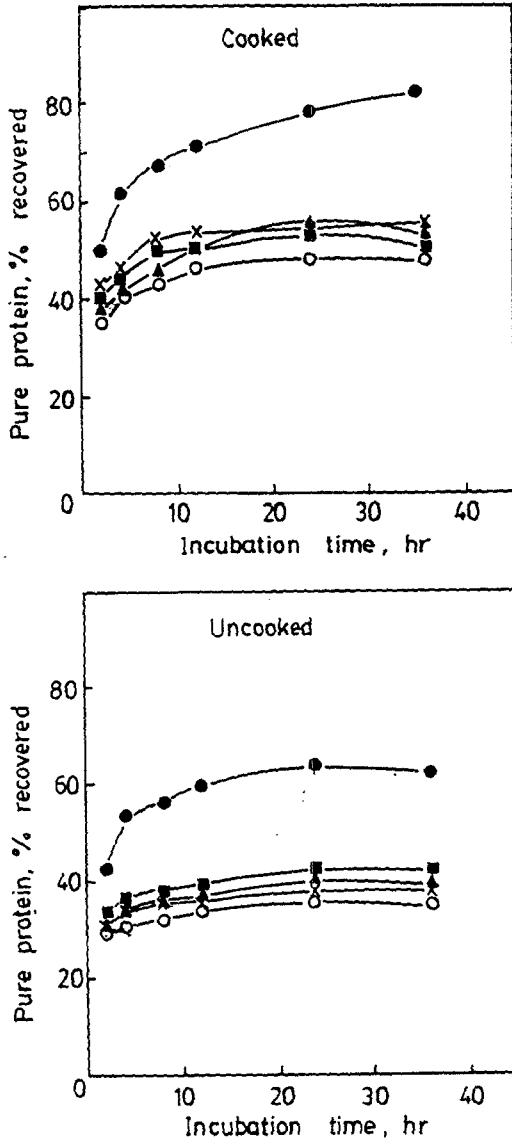


Fig. 2. Effect of incubation time on recovery of protein in carotenoprotein fraction.

- Trypsin ▲—▲ Pepsin
- ×—× Papain ■—■ Protease
- Control

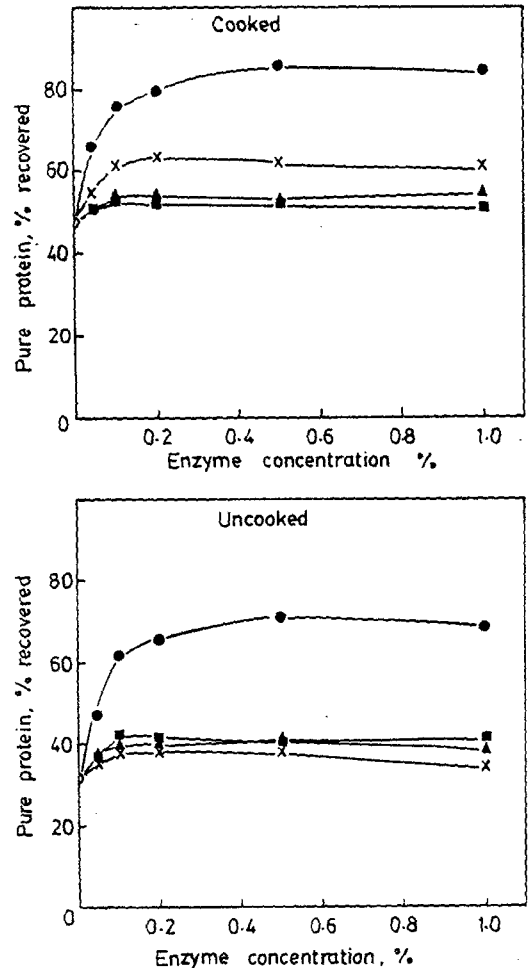


Fig. 3. Effect of enzyme concentration on recovery of protein in carotenoprotein fraction.

- Trypsin ▲—▲ Pepsin
- ×—× Papain ■—■ Protease

농도 0.1%에서 0.5%까지는 단백질 회수율이 서서히 증가되었다. Trypsin농도 0.5%에서 단백질 회수율은 71%로 자숙크릴의 83%에 비해 단백질 회수율이 낮았다.

Cano-Lopez 등(1987)은 새우 가공폐기물로 부터 carotenoprotein 회수시 bovine trypsin보다는 Atlantic cod trypsin이 추출효율이 좋다고 보고한 바 있다.

3) Carotenoid추출에 대한 가수분해 시간의 영향

동결건조한 생동결 크릴잔사 및 자숙크릴 잔사 4g에 0.5M Na₃ EDTA용액 30ml를 가하여 균질화시킨 후 trypsin, papain, pepsin, protease를 각각 1% 가하여 4℃에서 가수분해시간 변화에 따른 carotenoprotein 중의 총 carotenoid회수율을 Fig. 4에 나타내었다.

Fig. 4에 나타난 바와 같이 자숙크릴 잔사의 경우 가수분해 12시간 까지는 carotenoid회수율이 급격히 증가되었으나 그 이후에는 큰 변화가 없었으며 trypsin이 다른 효소에 비해 carotenoid회수율이 매우 높았다. 생동결 크릴잔사의 경우는 자숙크릴 잔사의 경우와는 달리 가수분해 8시간 까지는 carotenoid회수율이 증가하였으나, 그 이후에는 오히려 감소하는 경향을 보였다. 생동결 크릴잔사에 있어서도 trypsin에 의한 carotenoid회수율이 다른 효소에 비해 높았다.

Chen과 Meyers(1982)는 가재(crawfish)폐기물의 astaxanthin추출에 상업적 효소인 fungal protease, bacterial protease, alkaline protease, papain 및 Milenzyme 8X를 이용한 결과, Milenzyme 8X가 astaxanthin-protein결합을 파괴시키는데 가장 효과적이었으며, Milenzyme 8X의 농도 0.6%, pH 8.8, 45℃에서 1시간 가수분해하였을 때 회수된 astaxanthin 양은 58% 증가를 보였다고 보고한 바 있다.

4) Carotenoid색소 추출에 대한 효소농도의 영향

동결건조한 생동결 크릴잔사 및 자숙 크릴잔사 4g에 0.5M Na₃EDTA용액 30ml를 가하여 균질화시킨 후 4℃에서 24시간 가수분해시 효소농도 변화에 따른 carotenoprotein중의 총 carotenoid회수율을 Fig. 5에 나타내었다.

Fig. 5에서 볼 수 있는 바와 같이 자숙크릴 잔사의 경우, trypsin농도가 0.2%까지는 carotenoid 회수율이 증가되었으나 효소농도가 그 이상에서는 큰 차이는 없었다. 이와 같은 경향은 생동결 크릴 잔사에서도 마찬가지였다.

효소농도 0.2%에서 자숙시료 및 생동결 시료에서 carotenoid회수율은 각각 74%, 66%였다.

3. Carotenoprotein의 아미노산조성

자숙크릴 잔사와 생동결크릴 잔사로 부터 trypsin처리시 얻어진 carotenoprotein과 효소처리하지

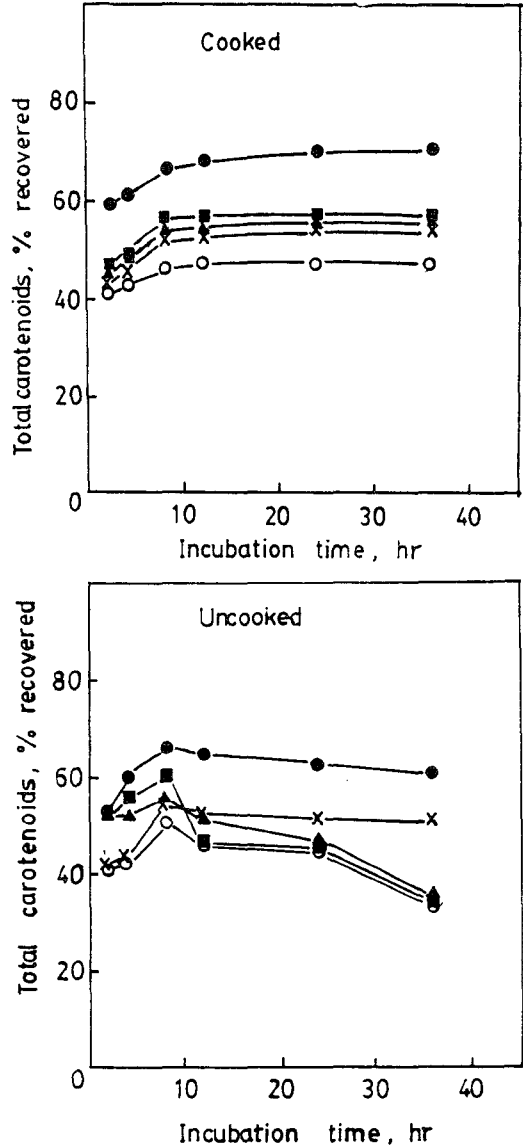


Fig. 4. Effect of incubation time on recovery carotenoid in carotenoprotein fraction.

●—● Trypsin ▲—▲ Pepsin
 ×—× Papain ■—■ Protease
 ○—○ Control

않은 대조구의 아미노산조성은 Table 2와 같다. 자속크릴 잔사로 부터 얻어진 carotenoprotein의 아미노산조성중 대조구의 경우 glutamic acid와 aspartic acid이 각각 13.96%, 12.06%로 가장 높았으며, trypsin으로 처리하여 얻어진 carotenoprotein에 있어서도 이들의 함량이 각각 12.94%, 10.00%로 높은 함량이었다. 대조구의 histidine함량은 7.37%였으나, trypsin으로 처리한 것은 4.09%로 낮았으며, arginine함량은 trypsin처리한 시료가 5.04%로 대조구의 2.46%에 비해 높았다. 그러나 다른 아미노산조성간에는 큰 차이를 볼 수 없었다.

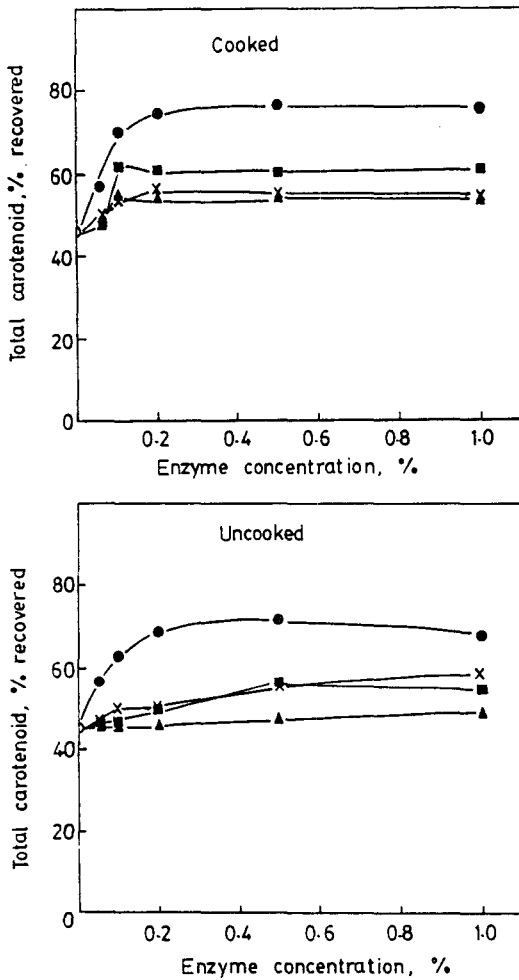


Fig. 5. Effect of enzyme concentration on recovery carotenoid in carotenoprotein.
 ●—● Trypsin ▲—▲ Pepsin
 ×—× Papain ■—■ Protease

생동결 크릴잔사에 있어서는 대조구의 경우 glutamic acid, proline이 각각 10.26%, 10.62%로 함량이 가장 많았으나, trypsin으로 처리한 것은 aspartic acid와 glutamic acid가 각각 10.57%, 10.14%로 함량이 가장 많았다. 대조구의 아미노산조성중 proline, glycine, arginine이 각각 10.62%, 7.26%, 7.27%인 것에 비해 trypsin처리한 것에서는 이들의 함량이 각각 5.49%, 4.11%, 4.63%로 다소 낮은 함량이었다. 그러나 이 이외의 아미노산조성간에는 큰 차이가 없었다.

생동결크릴 잔사와 자속크릴 잔사간의 아미노산 조성 차이는 glutamic acid, alanine, methionine, isoleucine, histidine의 함량은 자속크릴 잔사가 생동결 크릴잔사에 비해 다소 높은 함량이었으나 proline, glycine, valine, arginine의 함량은 그 반대였다.

필수 아미노산인 isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, tryptophan, valine의 함량은 자속크릴 잔사와 생동결 크릴잔사에서 각각 41.0~43.6%, 38.3~39.0%였다.

李와 金(1982)은 크릴 분말 단백질의 필수아미노산함량은 전체 아미노산의 40.7%로 함량면에서 달걀과 비교하여 손색이 없었다고 보고한 바 있다.

4. Carotenoid추출액의 TLC동정

크릴잔사 및 이들로 부터 trypsin처리로 얻어진 carotenoprotein을 저온에서 acetone으로 처리하여 단백질을 변성시키고 유리된 carotenoid는 TLC로 정제하였다. 전개용매로서 ethylacetate: benzene(1:9)을 사용하여 실리카겔 G를 입힌 마이크로 TLC 판에 전개시켜 분리시킨 다음 이를 TLC분석기로 상대량을 분석한 결과는 Table 3과 같다. 전시료에서 분리된 carotenoid의 자외선 흡수극대는 λ_{max} 469nm였으며, 이 결과는 Yamaguchi 등(1983)의 krill의 carotenoid에 관한 연구결과와 일치하였다. 모든 시료가 TLC에 의해 3가지 성분으로 분리되었다. 자속크릴 잔사로 부터 분리된 성분은 Rf값이 0.18~0.20, 0.55~0.58, 0.90~0.92였으며 다른 시료에서도 이와 유사한 Rf값이 얻어졌다.

TLC에서 상대이동도, 자외선 흡수특성을 고려해 볼 때 크릴잔사 및 이들로 부터 추출한 carotenoprotein에서 분리한 carotenoid성분은 astaxanthin, astaxanthin monoester, astaxanthin diester였다. 이들의 상대량은 각각 25~30%, 35~40%, 40~45%였다. 이와 같은 결과는 Yamaguchi 등(1983)의 결과와 잘 일치하였다. 생동결크릴 잔사의 경우도 자속크릴 잔사의 경우와 비슷한 경향을 보였다.

Table 2. Amino acid composition of carotenoprotein (g/amino acid/16gN)

Amino acid	Cooked		Uncooked	
	Control	BT-treated	Control	BT-treated
Ala	6.30 (7.51)	6.41 (7.72)	3.85 (4.38)	2.37 (3.23)
Arg	2.42 (5.90)	5.04(12.42)	7.27(16.92)	4.63(12.90)
Asp	12.06 (9.62)	10.00 (8.06)	8.15 (6.21)	10.57 (9.64)
Cys	0.44 (0.39)	0.43 (0.38)	0.45 (0.38)	0.44 (0.39)
Glu	13.93(10.05)	12.94 (9.44)	10.26 (7.07)	10.14 (8.37)
Gly	2.87 (4.06)	2.71 (3.88)	7.26 (9.81)	4.11 (6.65)
His	7.37(15.13)	4.09 (8.49)	2.88 (5.65)	2.14 (5.01)
Ile	8.12 (6.57)	7.75 (6.34)	3.45 (2.67)	3.87 (3.58)
Leu	5.41 (4.35)	5.86 (4.79)	7.33 (5.66)	7.71 (7.13)
Lys	7.02(10.20)	6.21 (9.12)	5.99 (8.31)	5.40 (8.97)
Met	7.38 (5.25)	8.32 (5.99)	4.79 (3.16)	4.78 (3.89)
Phe	5.39 (3.46)	6.23 (4.05)	4.72 (2.90)	5.36 (3.94)
Pro	2.74 (2.53)	3.17 (2.96)	10.62 (9.36)	5.49 (5.79)
Ser	4.74 (4.79)	4.58 (4.68)	4.69 (4.53)	4.53 (5.23)
Thr	5.44 (4.85)	5.43 (4.89)	5.49 (4.67)	5.55 (5.66)
Trp	0.70 (0.73)	0.78 (0.82)	0.76 (0.75)	0.85 (1.01)
Tyr	4.42 (2.59)	5.29 (3.13)	4.47 (2.50)	4.36 (2.92)
Val	2.24 (2.03)	3.08 (2.82)	5.77 (5.00)	5.44 (5.64)

(): mol %

BT: Bovine pancreas trypsin

Table 3. Thin layer chromatography of carotenoid extracts

Sample	Spot ^a	Wave length of max. absorbance (nm)	Relative amounts (%) ^b	R.f values	Tentative identification
Cooked Krill waste	1	469	25~30	0.18~0.20	Astaxanthin
	2	469	35~40	0.55~0.58	Astaxanthin monoester
	3	469	40~45	0.90~0.92	Astaxanthin diester
Cooked Krill carotenoprotein	1	469	25~30	0.20~0.23	Astaxanthin
	2	469	35~40	0.56~0.60	Astaxanthin monoester
	3	469	40~45	0.91~0.93	Astaxanthin diester
Uncooked Krill waste	1	469	20~25	0.19~0.21	Astaxanthin
	2	469	35~40	0.54~0.56	Astaxanthin monoester
	3	469	40~45	0.91~0.93	Astaxanthin diester
Uncooked Krill carotenoprotein	1	469	20~25	0.16~0.18	Astaxanthin
	2	469	35~40	0.50~0.54	Astaxanthin monoester
	3	469	40~45	0.86~0.88	Astaxanthin diester

Note: Data represent ranges obtained for six determinations.

^a In all cases, three distinct components were separated from the extract.

^b Relative amount estimated by TLC Scanner.

5. Carotenoprotein의 안정성

자숙크릴 잔사로 부터 추출한 carotenoprotein의 안정성에 관한 BHT, trasytol 및 BHT와 trasytol의 영향을 Fig. 6에 나타내었다. Fig. 6에서와 같이 저장온도가 저온일수록 항산화제에 의한 carotenoprotein의 안정화 효과가 우수한 것으로 나타났다. 저장온도가 -20°C 의 경우, BHT와 protease inhibitor(trasytol)을 가한 것은 저장 24일까지 총 carotenoid의 5% 정도가 손실되었으나 대조구의 경우는 18% 정도의 손실을 나타내었고, trasytol만을 가한 것은 대조구와 비슷한 경향을 보였다.

4°C 에 저장한 경우 BHT와 trasytol을 가한 것도 저장 일수가 길어짐에 따라 서서히 총 carotenoid가

소실되었으며, 저장 24일에는 9%의 손실을 나타내었다. 그러나 BHT만 가한 것은 22%(저장 24일)까지 손실되었다. Trasytol만을 가한 것도 총 carotenoid의 안정성에 약간의 효과를 나타내었다. 30°C 에 저장한 시료는 BHT와 trasytol을 가한 것은 저장일수 12일까지는 비교적 안정하였으나, 그 이후에는 안정성이 떨어져 저장 24일에는 20%의 총 carotenoid의 손실을 가져왔다. 저장온도가 50°C 의 경우는 30°C 에 저장한 시료보다도 훨씬 총 carotenoid의 손실을 보였다. 어느 것이나 BHT나 trasytol만을 가한 것 보다는 BHT와 trasytol을 동시에 가한 것이 carotenoprotein의 안정성에 우수하였다. 모든 시료가 저장 24일 까지는 좋지 않은 냄새나

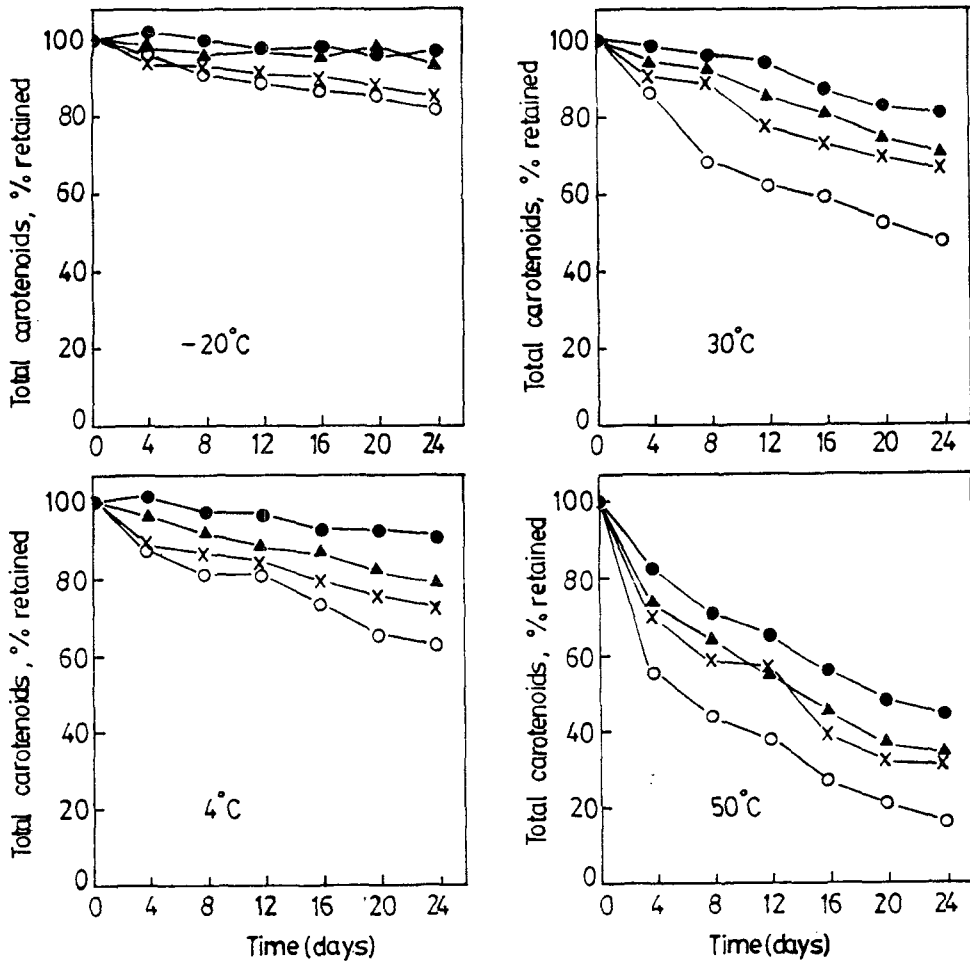


Fig. 6. Influence of BHT, trasytol, or BHT plus trasytol on the stability of carotenoid pigments extracted from cooked krill waste. Values used to plot graphs are averages of tow determinations.

●—● BHT+trasytol ×—× trasytol
 ▲—▲ BHT ○—○ control

미생물학적 부패의 징후는 보이지 않았는데, 그것은 Na₃EDTA의 보존효과에 기인되는 것으로 판단된다.

Simpson과 Haard(1985)는 새우 가공폐기물로 부터 회수한 carotenoid를 항산화제 처리한 경우 4℃보다 30℃에 저장한 것이 더 안정하였다고 보고하였는데 이와 같은 결과는 본 실험 결과와는 일치하지 않았다.

요 약

크릴가공시 부산물로 얻어지는 잔사를 보다 효율적으로 이용하기 위하여 크릴가공 잔사로 부터 carotenoprotein을 추출하여 이를 식품착색료로 이용할 목적으로 효소를 이용한 carotenoprotein의 추출조건 및 품질안정성에 대하여 검토하였다.

크릴가공 잔사중 총 astaxanthin함량은 자숙크릴 잔사 및 생동결 크릴 잔사에서 각각 35.1mg%, 22.1mg%였으며, 98.6mg%, 61.9mg%였다. Chitin함량은 크릴가공 잔사인 자숙크릴과 생동결크릴에서 각각 6.9%, 4.5%였으나 carotenoprotein에서는 검출되지 않았다.

Trypsin이 carotenoprotein추출에 가장 효과적이었으며, papain, pepsin, protease는 거의 효과가 나타나지 않았다. Trypsin 첨가농도 0.5%, 반응온도 4℃에서 24시간 분해하였을 때 단백질 및 carotenoid의 회수율은 자숙시료가 각각 83%, 74%로 가장 좋았다. 생동결크릴의 경우는 자숙크릴에 비해 단백질 및 carotenoid 회수율이 다소 떨어졌다.

Carotenoprotein의 아미노산조성중 glutamic acid와 aspartic acid의 함량이 가장 많았으며 필수 아미노산함량도 전체 아미노산의 38.3~43.6%를 차지하였다.

Carotenoprotein중의 carotenoid는 TLC분석에 의해 astaxanthin, astaxanthin monoester, astaxanthin diester로 분리되었으며, 이들의 상대량은 각각 25~30%, 35~40%, 40~45%였다.

Carotenoprotein의 안정성은 저온(-20℃, 4℃)일수록 안정하였으며, BHT와 protease inhibitor인 trasylol을 동시에 가한 것이 BHT와 trasylol만을 단독으로 가한 것보다 안정성이 좋았다.

감사의 글

본 연구는 1988년도 한국과학재단의 연구비 지

원에 의하여 수행되었음을 밝히며 아울러 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Armitt, G. M. 1982. Studies on invertebrate carotenoproteins. ph. D. Thesis, University of Liverpool.
- Britton, G. and T. W. Goodwin. 1981. Carotenoid Chemistry and Biochemistry, Pergamon press. p. 327.
- Cano-Lopez, A., B. K. Simpson, and N. F. Haard. 1987. Extraction of carotenoprotein from shrimp process wastes with the aid of trypsin from Atlantic cod. J. Food Sci., 52(2), 503~506.
- Chen, H. M. and S. P. Meyers. 1982. Extraction of astaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process. J. Food Sic., 47, 892~896.
- Chen, H. M., S. P. Meyers, R. W. Hardy and S. L. Biede. 1984. Color stability of astaxanthin pigmented rainbow trout under various packaging conditions. J. Food Sic., 49, 1337~1340.
- Garate, A. M., E. Urrechaga, J. C. G. Milicua, R. Gomez and G. Britton. 1984. A blue carotenoprotein from the carapace of the crab. Comp. Biochem. Physiol., 77B(3V), 605~608.
- Garlos, J. C. G., R. Gomez, A. M. Garate and J. M. Macarulla. 1985. A red carotenoprotein from the carapace of the crayfish. Comp. Biochem. Physiol., 81B(4), 1023~1025.
- Jencks, W. P. and B. Buten. 1964. The denaturation of crustacyanin. Arch. Biochem. Biophys., 107, 511~520.
- Pieniazek, D., Z. Grabarek and M. Rakowska. 1975. Quantitative determination of the content of available methionine and cysteine in food proteins. Nutr. Metabol., 18, 16~22.
- Saito, A. and L. W. Regier. 1971. Pigmentation of brook trout by feeding dried crustacean waste. J. Fish. Res. Board. Canada. 28, 509~512.
- Simpson, B. K. and N. F. Haard. 1985. Extraction of carotenoprotein from crustacean wastes. Canadian patent Application. File #265-8192-1, filed July 24.

- Simpson, B. K. and N. F. Haard. 1985. The use of proteolytic enzymes to extract carotenoproteins from shrimp wastes. *J. Appl. Biochem.* 7, 212~222.
- Spices, J. R. and D. C. Chamber. 1948. Chemical determination of tryptophan. *Anal. Chem.*, 20, 30~36.
- Spinelli, J., L. Lehman and D. Wieg. 1974. Composition, processing and Utilization of red crab as an aquacultural feed ingredient. *J. Fish. Res. Board Canada.* 31, 1025~1029.
- Yamaguchi, K., W. Miki, N. Toriu, Y. Kondo, M. Murakami and T. Fugika. 1983. The composition of carotenoid pigments in the antarctic krill. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 49(4), 1411~1415.
- Zagalsky, P. E. 1985. Invertebrate carotenoproteins, In "Methods in Enzymology, Vol. III", J. H. Law and H. C. Rilling ed. Academic press, Inc., pp. 216~247.
- 이응호, 김세권. 1982. 분말 Krill단백질의 가공 및 아미노산조성. 국립수산물진흥원 연구보고, 제28호. 119~204.
-
- 1990년 2월 1일 접수
1990년 2월 15일 수리