

단백질 분해효소를 이용하여 제조한 속성 멸치 액젓의 펩티드 특성

2. 멸치 액젓 및 Actomyosin의 가수분해 펩티드의 특성

최영준·김인수·조영제*·서덕훈*·이태기**·박영범***·박재윤****
경상대학교 해양생물이용학부 (해양산업연구소), *부경대학교 식품공학과. **장흥대학 수산가공과,
강원도립대학 수산식품과학과, *OSU, Seafood Lab.

Peptide Properties of Rapid Salted and Fermented Anchovy Sauce Using Various Proteases

2. Characterization of Hydrolytic Peptides from Anchovy Sauce and Actomyosin

Yeung-Joon CHOI, In-Soo KIM, Young-Je CHO*, Duck-Hoon SEO*, Tae-Gee LEE**,
Yeung-Beom PARK*** and Jae-Woon PARK****

Division of Marine Bioscience/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National Univ., Tongyeong 650-160, Korea

*Dept. of Food Science and Technology, Pukyong National Univ., Pusan 608-737, Korea

**Dept. of Marine Food Science and Technology, Provincial College of Changhung, Changhung 529-850, Korea

***Dept. of Sea Food Science, Kangwon Province University, Kangnung 210-800, Korea

****OSU, Seafood Lab, 2001 Marine Dr., Astoria, OR 97103, USA

Hydrolytic peptides of salted and fermented anchovy sauce, and anchovy actomyosin for the development of a rapid fermentation method with conventional tastes and flavors were studied. The optimal temperatures of crude enzymes isolated from anchovy, liver and viscera of squid were 55, 40~45 and 45~60°C, respectively. Crude enzyme isolated from anchovy was more effective on hydrolysis of anchovy actomyosin than that from squid liver and viscera. But the crude enzyme from squid liver was less effective on NaCl than that from anchovy. Three peptides occurred in anchovy actomyosin hydrolyzed with crude enzymes from anchovy and squid liver for 30 min. Their molecular weight were determined by Superdex 200 gel chromatography as 10,800, 5,800 and 2,600 dalton. When anchovy sauce was hydrolyzed with crude enzymes of anchovy, squid liver and viscera, and Protamex during 70 days, ranges of their low molecular weight of hydrolyzed peptides were 300~1,000dalton detected by Sephadex G-50 and their major amino acid compositions were glutamic acid, glycine and alanine, which was related with conventional tastes. Those amino acid compositions were similar to those of anchovy sauce hydrolyzed with squid liver. In the case of Protamex treatment, hydrolyzed peptides had high levels of isoleucine and leucine, being associated with the bitter, but a low level of glutamic acid.

Key words: hydrolytic peptides, rapid fermentation, anchovy sauce, anchovy actomyosin

서 론

어장류는 동남아 지역에서 부식으로 많이 애용되고 있고, 우리나라에서는 주로 김치의 재료로 사용하고 있지만, 높은 식염 농도로 인하여 조미료 또는 조미 원료로는 널리 사용하고 있지 않는 실정이다. 우리나라는 동남아 지역에 비하여 기온이 낮기 때문에 젓갈의 발효 기간이 비교적 긴 반면에 오랫동안 숙성하므로 이들 지역에서 생산되는 제품과는 다른 독특한 풍미를 가지고 있다. 그러나 장기간의 발효는 어장류 제조 산업의 경제성을 저해하는 요인이기 때문에 발효 시간의 단축과 이에 따른 고유 풍미 유지의 상반된 인자를 만족시킬 수 있는 제조법에 관한 연구는 액젓 산업의 경제성을 보완하기 위하여 필요한 과제이다. 어장유의 발효 기간을 단축시키고 풍미를 향상시키기 위한 연구는 많이 이루어졌지만 (Han et al., 1990; Bae et al., 1990a, 1990b, 1990c), 어류 특유의 비린내와 쓴맛의 증가로 인한 풍미의 변화 때문에 실용화 되지 못했고, 이 같은 풍미의 변화를 방지하고 천연 발효 조건과 비슷한 환경을 조성하기 위하여 코오지를 첨가한 속성 정어리

액젓의 제조를 시도하였으며 (Kim et al., 1990; Koo et al., 1990), 젓갈의 발효 기구를 밝히고 젓갈에서 분리한 미생물을 이용한 속성 젓갈 제조 방법이 검토된 바 있다 (Cha and Lee, 1989). 그러나 어류의 사후 변화 및 자가소화 과정, 어육 구조 단백질에 대한 효소의 작용 경로를 추적한 결과, 육에 분포하는 cathepsin류와 내장에 분포하는 chymotrypsin이 자가소화에 깊이 관여하고 있어 젓갈 제조에는 이들 효소가 미생물에 의한 육 분해 보다 더 깊이 관여한다고 하였다 (Pyeun et al., 1995, 1996; Cho et al., 1996; Lee et al., 1996). 또한, 젓갈 제조시에 첨가하는 20~25% (w/w)에 해당하는 다량의 염은 극히 일부의 미생물을 제외하고는 생육이 불가능하기 때문에 미생물에 의한 다양한 형태의 육 단백질의 분해는 불가능할 것으로 추정하였다 (Pyeun, et al., 1995). 이 같은 염은 어류 자체에 포함되어 있는 단백질 분해 효소의 활성을 50% 까지 저해하기 때문에 저염에서 시판용 단백질 분해 효소를 사용하여 제조한 젓갈과는 육 단백질의 절단 부위가 틀려 생성되는 펩티드의 종류에 큰 차이가 있을 것이며, 이 같은 차이는 젓갈의 풍미에 큰 영향을 줄 것으로 판단된다. 아울러 미생물 기원의

단백질 분해효소의 최적 온도는 어류에 분포하는 단백질 분해 효소에 비하여 높은 특징을 보이기 때문에 저온 발효와 풍미를 유지하기 위해서는 어류 자체에 존재하는 효소를 이용하는 것이 효과적이라는 보고도 있다 (Simpson and Haard, 1987).

따라서 본 연구는 멸치 액젓 고유의 풍미를 유지시키면서, 발효 속도를 향상시키기 위하여 멸치, 오징어 간 및 내장에서 얻은 조효소의 멸치 actomyosin에 대한 가수분해 특성을 구명하고, 전통적인 액젓 제조 방법으로 제조한 멸치 액젓과 오징어 간 및 내장, Protamex를 첨가하여 제조한 멸치 액젓의 펩티드 특성을 gel chromatography 및 아미노산 분석을 통해 비교하였다.

재료 및 방법

1. 재료

실험에 사용한 멸치는 1997년 5~12월에 걸쳐 거제도 근해에서 어획된 멸치 (체장 9.4~10.4 cm, 체중 8.4~11.7 g)를 재래 시장에서 구입하여 실험실로 운반하여 깨끗이 세척한 후 젓갈 및 효소 추출용 시료로 사용하였으며, 오징어 간과 내장은 1996년 10~12월에 거문도 근해에서 어획하여 동결 저장한 오징어에서 적출하여 사용하였다. 멸치 젓갈의 제조는 마쇄 멸치 육에 20%의 정제 염을 첨가한 후, 오징어 간과 내장은 각각 2.5% (w/w), Protamex는 2% (w/w)씩 첨가하여 20~25°C의 암소에서 70일 동안 발효시키면서 분석용 시료로 사용하였다.

2. 조효소 및 actomyosin의 추출

멸치 육, 오징어 간 및 내장에서 다음과 같이 조효소를 추출하였다. 즉 시료에 3배량의 1% NaCl, 5 mM의 CaCl₂ 및 0.02%의 sodium azide를 포함한 25 mM sodium phosphate (pH 7.0) 용액을 첨가하여 Ultra-Truux (Ika, Model T-25)로 3분 동안 균질화한 후, 40°C의 항온 수조에서 3시간 천천히 저어주면서 효소를 활성화시키고, 10,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액에 있는 비수용성 물질을 제거하기 위하여 두 겹의 가아제로 거른 다음, 0.2배량의 carbon tetrachloride를 첨가하여 분액 깔대기에서 지방층을 분리하여 제거하였다. 수용성 획분을 모아서 30~70% 포화 ammonium sulfate로 염석하고, 10분 동안 원심분리 (10,000×g)하여 모은 침전물을 25mM sodium phosphate (pH 7.0)에 녹인 후, 동일 완충액에서 하룻밤 투석하였다. 이 완충액을 원심분리 (10,000×g, 10 min)하여 변성 단백질을 제거한 후, 상층액을 -80°C의 심온 동결고에 보관하면서 조효소 용액으로 사용하였다.

멸치 actomyosin은 内山 등 (1978)의 방법을 일부 변형한 전보의 방법 (Kim et al., 1999)으로 추출하였으며, 단백질 농도는 측정 농도 범위에 따라 Bradford 법 (1976)과 Umemoto의 Biuret 변법 (1966)을 사용하여 측정하였다. 조효소 및 actomyosin의 추출은 특급시약을 사용하였으며, 4~6°C의 저온실에서 행하였다.

3. 효소 모델 실험

멸치 actomyosin에 대한 단백질 분해 효소의 활성은 김 (1986)의 방법을 수정한 전보의 방법 (Kim et al., 1999)에 따라 유리티

는 tyrosine의 양을 흡광도 280 nm에서 측정하였으며, 검량선에서 양을 산출하였다. 효소 활성 (Unit/mg)은 분 당 효소 단백질 1 mg이 생성하는 1 μmole Tyr 상당량을 1 Unit로 표시하였다.

4. 분자량 분포 측정

가수분해에 의한 분자량 분포를 검토하기 위하여 멸치 actomyosin을 멸치, 오징어 간 및 내장에서 추출한 조효소로 30분, 60분 및 120분 동안 가수분해한 후, 0.1 M NaCl과 0.01% sodium azide를 포함한 50 mM sodium phosphate 완충액 (pH 7.0)에서 하룻밤 투석한 후, Superdex 200 prep column (1.6×60 cm)에 주입하여 동일 완충액으로 1 ml/min의 속도로 용출하면서 4 ml씩 분획하였다. 이때 단백질의 용출은 280nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 그리고 마쇄한 멸치와 마쇄한 멸치에 2.5%의 오징어 간 및 내장, 2%의 Protamex를 각각 첨가하여 70일 동안 가수분해한 후, 액젓 중에 있는 고분자와 저분자량의 펩티드 존재를 확인하기 위하여 분자량 10,000 (PM 10, Amicon)의 막을 사용하여 한외여과 (Amicon stirred cell)하였다. 분자량 10,000 이상의 액젓은 0.1M NaCl과 0.01% sodium azide를 포함한 50mM sodium phosphate 완충액 (pH 7.0)으로 하룻밤 투석한 후, Superdex 200 prep column (1.6×60 cm)에, 분자량 10,000 미만의 물질은 그대로 Sephadex G-50 column (1.6×63 cm)에 주입하여 동일 완충액을 사용하여 분자량 분포를 조사하였다.

5. 아미노산 분석

최종 액젓 제품에 있는 저분자 펩티드의 구성 아미노산 조성을 확인하기 위하여, gel chromatography를 통해 용출된 펩티드 획분을 모은 후, 이 중 일부를 취하여 같은 부피의 12N 염산으로 100°C에서 24시간 가수분해시켜 아미노산 자동분석기 (S433, AX-XIOM Chromatography, Inc, England)로 구성 아미노산의 조성을 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 조효소에 의한 멸치 actomyosin의 분해

효소농도 및 반응시간의 영향: 효소 농도에 따른 활성의 변화는 Fig. 1에 나타낸 바와 같이, pH 7.0, 40°C에서 60분 동안 반응시켰을 때, 멸치, 오징어 간 및 내장에서 분리한 조효소는 농도의 증가에 따라 멸치 actomyosin에 대한 활성은 직선형으로 증가하였다. 특히 멸치에서 분리한 조효소는 효소 농도 2.0~10 mg/ml의 범위에서 효소 농도 증가와 더불어 단백질 분해 활성은 급속히 증가하였고, 비활성도 가장 높게 나타났다. 이 같은 결과는 염이 없는 상태에서는 멸치의 조효소가 멸치 actomyosin에 대하여 가장 높은 선택성을 보이고 있음을 나타내고 있다. Cho et al. (1996)은 멸치 내장에서 정제한 trypsin은 기질 BAPNA (N α -benzoyl-DL- arginine-p-nitroanilide)에 대하여 효소 농도 0.25~4.0 μg/ml의 범위에서 활성 증가는 효소 농도에 비례하며, 반응 30분까지 직선형으로 증가한다고 하였다. 한편 멸치, 오징어 간 및 내장 조효소를 기질 (actomyosin) 농도 2.24 mg/ml에 대해 각각 2.3, 7.6 및 5.9 mg/ml 첨가하여 반응시간

에 따른 효소활성의 변화를 측정된 결과, 멸치 조효소의 actomyosin 분해 활성은 반응시간 120분까지 거의 직선형으로 증가하였으나, 오징어 간 및 내장 조효소의 경우는 반응시간에 따른 활성의 증가가 멸치 조효소에 비하여 미미하였다 (Fig. 2).

pH 및 온도의 영향; 오징어 내장 조효소는 pH에 따른 활성의 변화를 거의 보이지 않아 내장에 분포하는 단백질 분해 효소의 활성이 미미한 것으로 판단된다. 그리고 오징어 간 조효소는

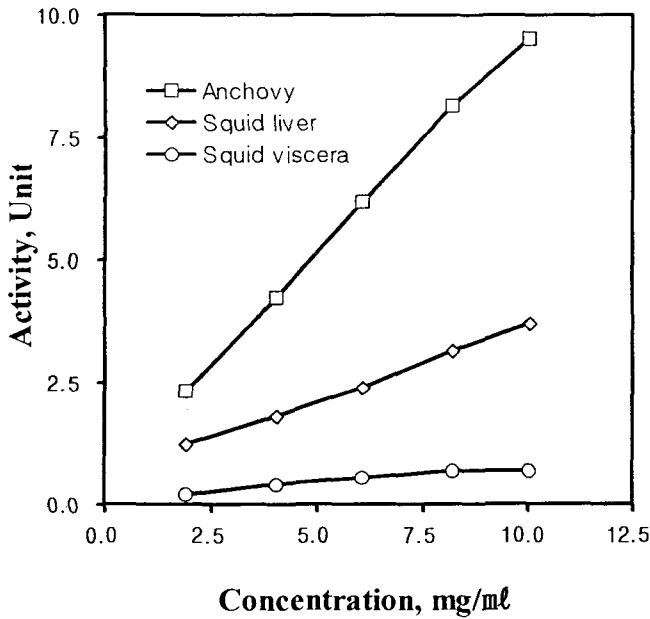


Fig. 1. Effects of crude enzyme concentration on proteolytic activities of crude actomyosin from anchovy.

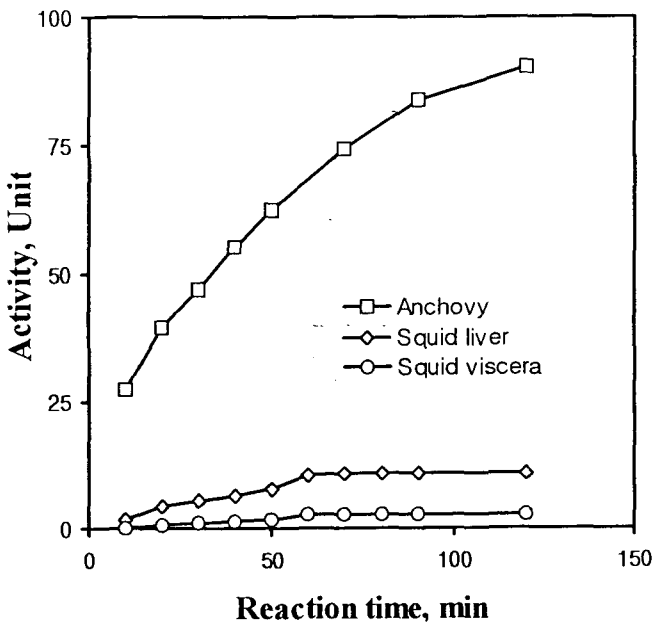


Fig. 2. Changes of proteolytic activities of crude actomyosin from anchovy during reaction time.

pH 6.0까지는 활성이 다소 감소하였으나, 액질의 pH 범위에 속하는 pH 6.0~7.0사이에서는 거의 변화가 없었다. 한편 멸치 조효소는 pH 7.5까지 pH 증가와 더불어 활성도 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 3). 이 같은 결과는 알칼리성 단백질 분해효소의 영향인 것으로 판단된다. 이와 관련하여 Pyeun et al. (1986)과 Kim et al. (1986)은 고등어와 정어리의 소화관에 분포하는 단백 분해 효소는 산성, 약산성 및 알칼리 pH에서 각각 활성을 보이는데, 소화관, 체장, 유문수 및 비장에는 알칼리성 단백질 분해효소, 위에는 산성 단백질 분해효소, 간에는 산성, 중성, 알칼리성 단백질 분해효소가 분포하고 있으며, 위, 체장, 유문수에 분포하는 효소가 간과 비장에 분포하는 효소에 비하여 활성이 높다고 하였다.

멸치 조효소, 오징어 간 및 내장 조효소의 최적 활성 온도는 각각 55°C, 40~45°C 및 45~60°C 였으며 (Fig. 4), 오징어 간과 내장 조효소의 멸치 actomyosin에 대한 가수분해 비활성은 멸치 조효소에 비하여 약 7%와 3% 정도로 아주 낮았다. 허 (1993)는 멸치 육 중에 분포하는 cathepsin L의 BA-NAP (N α -benzoyl-DL-arginine- β -naphthyl amide)와 casein에 대한 최적 pH 및 온도는 6.0 과 50°C이며, Kim and Pyeun (1986)은 고등어 유문수에 있는 단백질 분해 효소의 최적 반응 pH와 온도는 각각 9.4~9.8과 45°C라고 보고하였다. Pyeun et al. (1988)은 가다랑어 유문수에서 4개의 알칼리성 단백질 분해효소를 확인하고, 활성이 가장 높은 2개의 효소는 pH 9.6과 48°C에서 최적 활성을 나타낸다고 하여, 대체로 육에 있는 단백질 분해효소의 최적온도가 내장에 분포하는 효소에 비하여 다소 높은 것으로 나타났다. 본 실험의 결과, 멸치 조효소의 최적 온도가 내장 기원 효소에 비하여 다소 높은 것은 육 단백질 분해 효소의 영향인 것으로 생각된다.

조효소의 Kinetics; 멸치 actomyosin에 대하여 멸치, 오징어 간 및 내장의 조효소를 pH, 7.0, 최적온도에서 멸치는 50분, 오징어

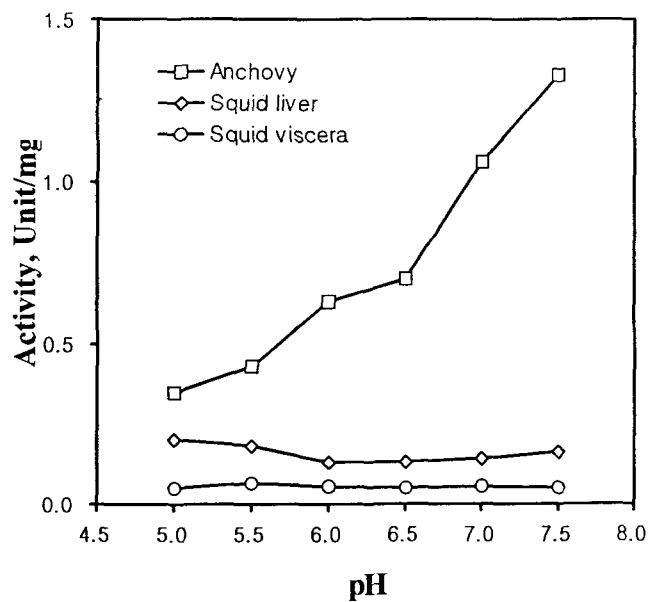


Fig. 3. Effects of pH on proteolytic activities of crude actomyosin from anchovy.

간 및 내장은 60분 동안 반응시킨 후, 반응속도와 기질에 대한 상관을 Lineweaver-Burk 식으로 plot하여 K_m 과 V_{max} 값을 구하였다 (Table 1).

동일 효소 농도에서 오징어 내장 조효소가 멸치 actomyosin에 대하여 가장 큰 친화성을 보였으며, 오징어 간 조효소, 멸치 조효소의 순으로 친화성은 현저히 낮았다. 그러나 최대 반응속도 (V_{max})는 이와 반대로 멸치 조효소가 가장 높았고, 오징어 간 조효소, 오징어 내장 조효소 순으로 기질에 대한 친화성 (K_m)이 최대 반응속도 즉, 효소 활성 세기를 반영하는 것이 아니라는 것을 나타내고 있다. 따라서 효소의 기질에 대한 촉매능 (V_{max}/K_m)으로 환산하면, 멸치 조효소가 3.79, 오징어 간 조효소 1.09, 오징어 내장 조효소 0.689로, 멸치 조효소의 촉매능이 가장 높아 멸치 actomyosin의 분해에는 효과적인 것으로 나타났다. 이 같은 결과는 Pyeun et al. (1995)이 멸치 육에 있는 cathepsin L과 내장에 있는 chymotrypsin의 K_m 과 V_{max} 는 기질인 멸치 근원섬유에 대하여 각각 1.86, 0.56 U/mg 및 0.63, 1.08 U/mg으로 trypsin에 비하여 높으며, 멸치의 사후 분해 또는 젓갈 제조시의 자가소화는 cathepsin L과 chymotrypsin이 지배하고 있다는 보고에 비추어, 멸치 actomyosin의 가수분해는 멸치 육에 분포하는 단백질 분해효소가 비교

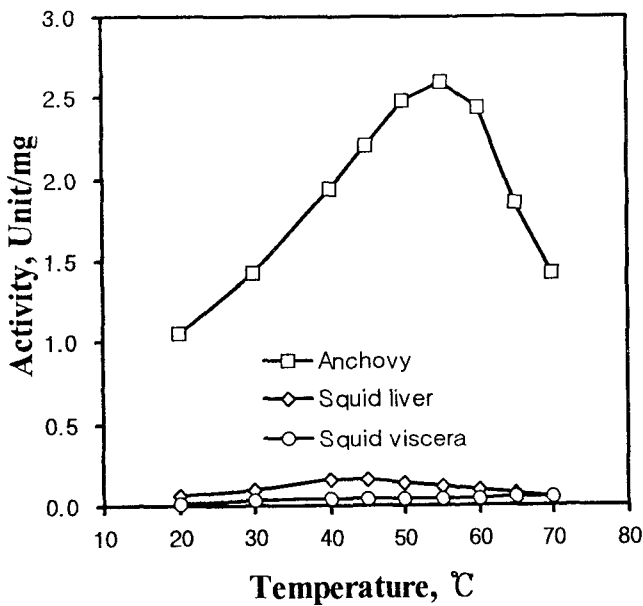


Fig. 4. Effects of temperature on proteolytic activities of crude actomyosin from anchovy.

Table 1. Kinetic properties and optimal conditions of crude enzyme from anchovy, squid liver and viscera for the hydrolysis of anchovy actomyosin

Crude enzyme	pH	Temp (°C)	V_{max} (A_{280})	K_m (%)
Anchovy	7.0	55	0.762	0.201
Squid liver	7.0	40	0.104	0.095
Squid viscera	7.0	45	0.035	0.051

V_{max} was expressed absorbance at 280 nm; K_m was expressed concentration of anchovy actomyosin; The concentration of crude enzyme was used 4.60 mg/ml in reaction mixture

적 많이 관여할 것으로 판단된다.

NaCl에 의한 영향; 멸치, 오징어 간 및 내장 조효소의 멸치 actomyosin 가수분해에 미치는 NaCl 농도의 영향을 pH 7.0에서 일 반적인 젓갈 숙성 온도인 20°C와 효소의 최적 온도에 상당하는 55°C에서 각각 측정하여 NaCl이 존재하지 않을 때의 활성에 대한 상대 활성으로 나타내었다 (Fig. 5). 반응 온도에 관계없이 NaCl의 함량이 증가함에 따라 활성은 감소하였으며, 활성의 감소 폭은 20°C에서 더욱 심하게 나타났다. 우리나라의 일반적인 젓갈 숙성 온도인 20°C와 25%의 NaCl이 있을 때, 멸치 조효소의 활성은 8.4%까지 감소하였으며, 55°C에서는 약 33.3%의 활성이 남아있었다. 이 같은 실험 결과는 Pyeun et al. (1995)이 멸치에서 정제한 cathepsin L, trypsin 및 chymotrypsin의 멸치 actomyosin에 대한 활성은 25% NaCl 농도에서 50% 가량 감소하며, 특히 trypsin은 10°C와 20°C의 저온에서 현저히 활성이 감소한다고 한 보고와 비슷하였으나, 감소 정도는 다소 큰 것으로 나타났다.

이 같은 이유는 조효소로 인한 여러 가지 저해 인자들의 복합적인 저해 활성에 기인하는 것으로 보인다. 그리고 저온에서 오징어 간 조효소의 활성 감소는 멸치 조효소와 비슷하였으나, 20°C, 25%의 NaCl 농도에서도 약 61.6%, 55°C에서는 79.1%의 활성이 잔존하였다. 한편 오징어 내장 조효소는 55°C에서 NaCl에 의하여 활성이 오히려 증가하여 25% NaCl 농도에서 111.4%의 활성을 보였으나, 비활성이 낮기 때문에 액젓 제조시 육의 가수분해에는 크게 영향을 미치지 않을 것으로 판단된다. 따라서 멸치 액젓 제조시에 오징어 간의 첨가는 멸치 육의 신속한 가수분해에 보완적인 역할을 충분히 수행할 수 있을 것으로 생각된다.

2. 조효소에 의한 멸치 actomyosin의 가수분해 형태

멸치 및 오징어 간에서 추출한 조효소와 멸치 actomyosin을 20°C에서 30분, 60분 및 120분 가수분해한 후, 가수분해물을 0.1M NaCl과 0.01% sodium azide를 포함하는 sodium phosphate (pH 7.0)에 하룻밤 투석하고, Superdex 200 prep column (1.6×60 cm)에 주입한 후, 동일 완충액으로 용출시켰을 때 용출되는 펩티드의 분자량 분포를 조사하였다 (Fig. 6).

멸치와 오징어 간 조효소에 의한 멸치 actomyosin의 분해 형태는 거의 비슷하였으며, 분자량 10800, 5800 및 2600 dalton에 해당하는 펩티드가 다량으로 생성되었다. 멸치 조효소는 actomyosin의 가수분해 시간이 길어짐에 따라 분자량 2600 dalton에 해당하는

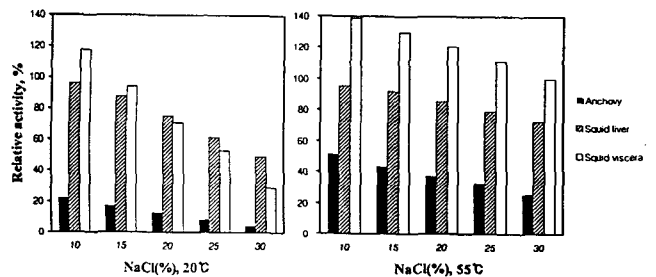


Fig. 5. Effects of NaCl on proteolytic activities of crude enzyme from anchovy, squid liver and viscera.

펩티드의 양은 줄어드는 것으로 나타났으나, 오징어 간 조효소에서서는 가수분해 시간에 따른 차이를 보이지 않았다. 한편 오징어 내장 조효소의 경우는 가수분해 비활성이 매우 낮아서 actomyosin 가수분해 실험에는 사용하지 않았다.

3. 조효소에 의한 멸치 액젓의 가수분해 형태

마쇄한 멸치에 20%의 NaCl를 첨가하여 제조한 멸치 액젓 (Anchovy), 여기에 오징어 간과 내장을 각각 2.5%씩 첨가하여 제조한 멸치 액젓 (Anchovy+Squid liver, Anchovy+Squid viscera) 및 2%의 상용효소 Protamex를 첨가하여 제조한 멸치 액젓 (Anchovy+Protamex)을 실온 (20 ± 2°C)에서 70일 동안 숙성시킨 후, 이들 멸치 액젓 중에 존재하는 비교적 분자량이 큰 펩티드의 분포를 gel chromatography (Superdex 200 prep column, 1.6×60 cm)로 측정하였다 (Fig. 7). 마쇄한 멸치에 20%의 NaCl을 첨가하여 조제한 멸치 액젓은 4개의 획분 (Fraction No. 23, 25, 28 및 34)을 나타내고 있는 반면, 2.5%씩의 오징어 간 및 내장, 2%의 Protamex를 첨가하여 제조한 액젓 모두에서 25번 획분이 두 개의 획분 (24와 25)으로 나누어졌다. 멸치 액젓에서 가장 특징적인 34번 획분은 오징어 간 및 내장, Protamex를 첨가한 액젓에서는 나타나지 않았으며, 오징어 간과 내장을 첨가한 액젓에서는 이 보다 분자량이 다소 큰 33번 획분이 나타났고, Protamex를 첨가한 경우는 33번과 34번 획분이 소실되었다. 그러므로 멸치 액젓에 가장 근접한 분해형태를 보이는 것은 오징어 간을 첨가한 액젓임을 확인할 수 있었다.

또한, 같은 조건에서 숙성시킨 멸치 액젓에 있는 저분자의 펩티드 분포를 확인하기 위하여 액젓을 cut off limit가 10,000인 한의

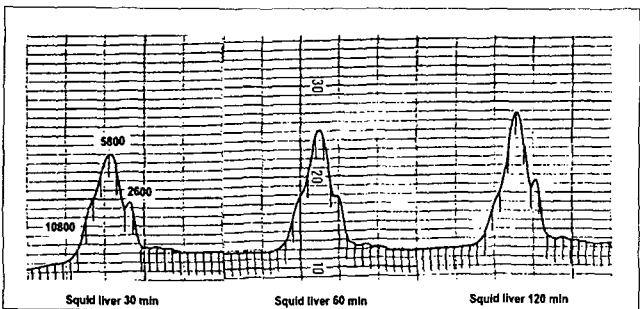
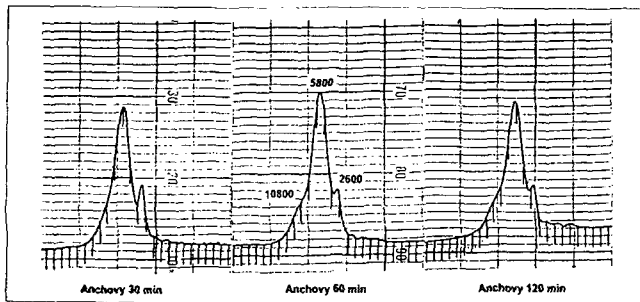


Fig. 6. Gel chromatography pattern by superdex 200 prep column (1.6×60 cm) of actomyosin hydrolysates. Flow rate and fraction volume were 1 ml/min and 4 ml, respectively.

여과막으로 여과한 후, Sephadex G-50 (1.6×63 cm)에서 gel chromatography하였다 (Fig. 8). 생성된 저분자 펩티드는 분자량이 1,000에서부터 300 dalton까지였으며, 각각 마쇄 멸치 액젓과 오징어 내장 첨가 액젓, 오징어 간 첨가 액젓과 Protamex 첨가 액젓의 chromatography pattern이 비슷함을 확인할 수 있었다. 이같이 오징어 내장 첨가 액젓이 마쇄 멸치 액젓의 chromatography pattern과 비슷한 것은 오징어 간 및 오징어 내장 첨가 액젓에 비하여 상대적 효소활성이 낮아서 가수분해 정도가 대단히 약하기 때문으로 생각된다.

4. 저분자 펩티드의 아미노산 조성

마쇄 멸치 액젓, 오징어 간 첨가 액젓 및 Protamex 첨가 액젓의 저분자 펩티드를 구성하고 있는 아미노산의 조성은 Table 2와 같다.

액젓의 맛 성분과 밀접한 관계를 가진 glutamic acid, glycine 및 alanine의 함량은 마쇄 멸치 액젓에서 각각 19.14%, 6.32%, 15.55%로 가장 많았고, 특히 Protamex 첨가시에는 glutamic acid와 alanine의 함량이 마쇄 멸치 액젓 (anchovy)의 약 절반 정도에 불과하였다. 그리고 쓴맛에 기여하는 것으로 알려진 isoleucine

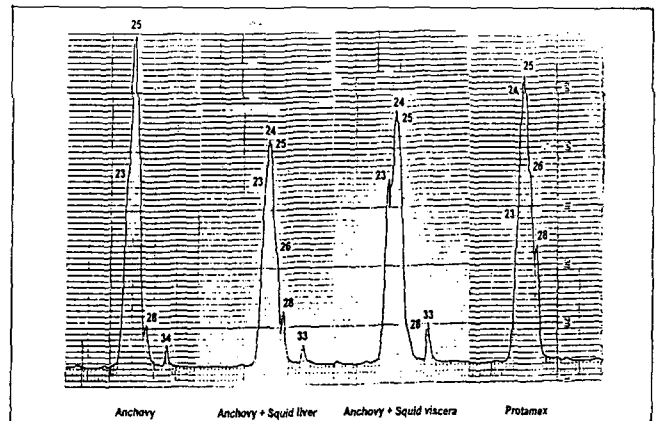


Fig. 7. Gel chromatography pattern by Superdex 200 prep column (1.6×60 cm) of anchovy sauce. Flow rate and fraction volume were 1 ml/min and 5 ml, respectively.

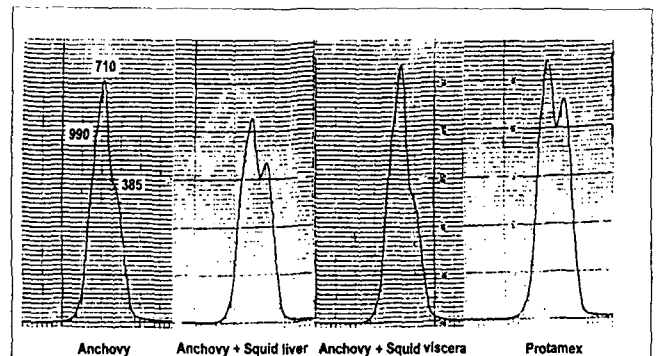


Fig. 8. Gel chromatography pattern by Sephadex G-50 column (1.6×63 cm) of anchovy sauce. Flow rate and fraction volume were 1.5 ml/min and 5 ml, respectively.

Table 2. Amino acid composition of low molecular weight peptide fractionated by Sephadex G-50 gel chromatography from salted and fermented anchovy sauce prepared with rapid fermentation (Unit: conc %)

Amino acid	Anchovy	Squid liver	Protamex
Asp	1.25	1.03	8.93
Thr	2.38	3.50	5.53
Ser	1.65	3.46	2.76
Glu	19.14	15.49	10.08
Pro	3.90	5.72	5.14
Gly	6.32	6.36	6.61
Ala	15.55	15.99	8.70
Cys	5.34	2.44	—
Val	6.93	6.67	6.94
Met	1.71	2.19	2.30
Ileu	3.85	4.54	5.15
Leu	5.01	5.64	6.13
Tyr	—	—	0.67
Phe	3.67	3.87	5.93
His	5.08	5.27	7.10
Lys	11.24	12.00	11.46
Ammonia	3.19	2.81	3.37
Arg	3.79	3.01	3.20
Total	100.00	99.99	100.00

과 leucine의 총량은 마쇄 멸치 액젓이 Protamex의 79%에 해당하여, 효소 첨가에 의한 속성 발효는 감칠맛과 단맛을 감소시키고, 쓴맛을 증가시키는 것으로 나타났다. 한편 액젓의 풍미에 관여하는 cysteine은 Protamex 첨가시에는 검출되지 않았으며, 오징어 간을 첨가한 경우도, 마쇄 멸치 액젓의 약 46%에 해당하여 효소에 의한 가수분해는 cysteine에 기인하는 풍미의 변화와 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다. 그리고 마쇄한 멸치 액젓과 오징어 간 첨가 멸치 액젓에는 tyrosine이 검출되지 않은 반면, Protamex 첨가 멸치 액젓에는 0.67%의 tyrosine이 검출되었다.

요 약

멸치 액젓의 고유한 풍미를 유지하면서 신속한 발효를 진행시키기 위해 멸치, 오징어간 및 내장에서 추출한 조효소에 의한 멸치 actomyosin의 가수분해 특성과 생성된 펩티드의 분자량 분포를 조사하였다. 아울러 멸치를 마쇄하여 제조한 액젓, 멸치에 오징어 간 및 내장에서 추출한 조효소와 상용효소인 Protamex를 첨가하여 제조한 멸치 액젓을 70일 숙성시킨 후 가수분해에 의해 생성된 펩티드의 성상을 gel chromatography 및 아미노산 분석을 통해 비교하였다.

멸치, 오징어 간 및 내장에서 추출한 조효소의 최적 활성온도는 각각 55°C, 40~45°C 및 45~60°C였으며, 오징어 간 및 내장에서 추출한 조효소의 멸치 actomyosin에 대한 비활성은 멸치에서 추출한 조효소에 비하여 약한 것으로 나타났으나, 오징어 간 조효소는 멸치 조효소에 비하여 NaCl에 의한 영향을 덜 받는 것으로 나타났다. 멸치 actomyosin을 멸치 및 오징어간에서 추출한 조

효소 용액으로 30분 동안 가수분해했을 때, 분자량 10,800, 5,800 및 2,600 dalton의 펩티드가 다량으로 생성되었으며, 분해 형태는 거의 비슷하였다.

멸치를 마쇄하여 제조한 액젓, 멸치에 오징어 간 및 내장에서 추출한 조효소와 Protamex를 첨가하여 제조한 멸치 액젓을 70일 숙성시킨 경우 분자량 300~1,000 dalton의 저분자 펩티드가 다량 생산되었다. 이들 펩티드의 아미노산 조성은 액젓의 맛 성분과 밀접한 관계를 가진 glutamic acid, glycine 및 alanine의 함량이 많았으며, 오징어 간을 첨가한 액젓이 마쇄한 멸치 액젓과 가장 비슷한 것으로 나타났다. Protamex의 경우는 glutamic acid의 함량이 상대적으로 낮은 반면, 쓴맛을 나타내는 isoleucine과 leucine의 함량은 높은 것으로 나타났다. 이 같은 결과는 오징어 간의 첨가가 멸치 육의 신속한 가수분해에 보완적인 수단으로 활용될 수 있다고 판단된다.

참 고 문 헌

- Bae, T.J., B.H. Han, H.D. Cho, J.C. Kim, B.S. Kim and S.I. Choi. 1990a. Conditions for rapid processing of modified fish sauce using enzymatic hydrolysis and improvement of product quality 2. Fish sauce from sardine waste and its quality. *J. Korean Fish. Soc.*, 23 (2), 125~136 (in Korean).
- Bae, T.J., B.H. Han, H.D. Cho, J.C. Kim, B.S. Kim and H.S. Lee. 1990 b. Conditions for rapid processing of modified fish sauce using enzymatic hydrolysis and improvement of product quality 3. Fish sauce from whole sardine and its quality. *J. Korean Fish. Soc.*, 23 (5), 361~372 (in Korean).
- Bae, T.J., B.H. Han, H.D. Cho, J.C. Kim, B.S. Kim and H.S. Lee. 1990 c. Conditions for rapid processing of modified fish sauce using enzymatic hydrolysis and improvement of product quality 4. Flavor components of fish sauce from whole sardine. *J. Korean Fish. Soc.*, 23 (5), 373~377 (in Korean).
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 24 8~254.
- Cha, Y.J and E.H. Lee. 1989. Studies on the processing of rapid fermented anchovy prepared with low salt contents by adapted microorganism 1. Biochemical characterization of proteolytic bacteria and their extracellular protease isolated from fermented fish paste. *J. Korean Fish. Soc.*, 22 (5), 363~369 (in Korean).
- Cho, D.M., M.S. Heu, H.R. Kim, D.S. Kim and J.H. Pyeun. 1996. Kinetic analyses for enzymatic properties of trypsins purified from dark-fleshed fish. *J. Korean Fish. Soc.*, 29 (1), 64~70 (in Korean).
- Han, B.H., T.J. Bae, H.D. Cho, J.C. Kim, B.S. Kim and S.I. Choi. 1990. Conditions for rapid processing of modified fish sauce using enzymatic hydrolysis and improvement of product quality 1. Fish sauce from mackerel waste and its quality. *J. Korean Fish. Soc.*, 23 (2), 109~124 (in Korean).
- Kim, H.R., J.H. Pyeun and J.G. Cho. 1986. Proteolytic enzymes distributed in the tissues of dark fleshed fish 2. Comparison of the proteolytic activity of tissue extract from the internal organs of mackerel and sardine. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 19 (6), 521~528 (in Korean).

- Kim, H.R. and J.H. Pyeun. 1986. The protease distributed in the intestinal organs of fish 2. Characterization of the three alkaline proteinase from the pyloric caeca of mackerel, *Somber japonicus*. Bull. Korean Fish. Soc., 19 (6), 547~557.
- Kim, Y.M., J.G. Koo, Y.C. Lee and D.S. Kim. 1990. Study on the use of sardine meal koji and autolysates from sardine meat in rapid processing of sardine sauce. J. Korean Fish. Soc., 23 (2), 167~177 (in Korean).
- Kim, I.S., Y.J. Choi, M.S. Heu, Y.J. Cho, Y.S. IM, Y.S. Gu, S.G. Yeo and J.W. Park. 1999. Peptide properties of rapid salted and fermented anchovy sauce using various proteases I. Hydrolysis of anchovy sauce and actomyosin by various proteases. J. Korean Fish. Soc., 32 (4), 481~487 (in Korean).
- Koo, J.G., Y.M. Kim, Y.C. Lee and D.S. Kim. 1990. Taste compounds of rapid processed sardine sauce. J. Korean Fish Soc., 23 (2), 87~92 (in Korean).
- Lee, D.S., M.S. Heu, D.S. Kim and J.H. Pyeun. 1996. Some properties of the crude proteases from fish for application in seafood fermentation industry. J. Korean Fish. Soc., 29 (3), 309~319 (in Korean).
- Pyeun, J.H., H.R. Kim and J.G. Cho. 1986. Proteolytic enzymes distributed in the tissues of dark fleshed fish 1. Comparison of the proteolytic activity of the tissue extracts from the meat of mackerel and sardine. Bull. Korean Fish. Soc., 19 (5), 469~476 (in Korean).
- Pyeun, J.H., H.R. Kim and M.S. Hur. 1988. The protease distributed in the intestinal organs of fish 3. Purification of some enzymatic properties of alkaline proteinases from the pyloric caeca of skipjack. Bull. Korean Fish. Soc., 21 (2), 85~96 (in Korean).
- Pyeun, J.H., M.S. Heu, D.M. Cho and H.R. Kim. 1995. Proteolytic properties of cathepsin L, chymotrypsin, and trypsin from the muscle and visera of anchovy *Engraulis japonica*. J. Korean Fish. Soc., 28 (5), 557~568 (in Korean).
- Pyeun, J.H., D.S. Lee, D.S. Kim and M.S. Heu. 1996. Activity screening of the proteolytic enzymes responsible for post-mortem degradation of tissues. J. Korean Fish. Soc., 29 (3), 296~308 (in Korean).
- Simpson, B.K. and N.F. Haard. 1987. Cold-adapted enzymes from fish. in "Food Biochemistry", Knorr, D. (ed.), Marcel Dekker, N. Y., pp. 495~527.
- Umemoto, S. 1966. A modified method for estimation of fish muscle protein by Biuret method. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 32, 427~435.
- 김형락. 1986. 고등어 유문수 조직에서 분리한 3종의 알칼리성 단백질 분해효소의 특성. 부산수산 대학원 공학석사 학위 청구논문.
- 허민수. 1993. 멸치의 자가소화에 관여하는 단백질 분해효소의 특성. 부산수산대학 이학박사 학위 청구논문.
- 内山 均, 加藤 登, 工藤 雄司, 新井 健一. 1978. 魚類筋原纖維の生化學的研究. 各種 魚類筋 原纖維Ca-ATPaseの溫度安定性の比較. 日水誌. 44, 491~498.

1999년 5월 10일 접수

1999년 7월 7일 수리