

오징어 간 가수분해물의 기능성

이수선¹ · 박시향² · 박주동³ · Kunihiko Konno⁴ · 최영준^{1*}

¹경상대학교 해양식품공학과/해양산업연구소, ²선마린바이오테크
³CJ 제일제당 식품연구소 ⁴북해도대학교 수산대학원

Functionalities of Squid Liver Hydrolysates

Su-Seon Lee¹, Si-Hyang Park², Joo-Dong Park³, Kunihiko Konno⁴, and Yeung Joon Choi^{1*}

¹Dept. of Seafood Science and Technology/Institute of Marine Industry,
Gyeongsang National University, Gyeongnam 650-160, Korea

²Sun Marine Biotechnology Co., Gyeongnam 650-160, Korea

³Food R&D, CJ Cheiljedang, Seoul 152-051, Korea

⁴Lab of Food Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hokkaido 041, Japan

Abstract

The autolysate and hydrolysate of a common squid liver, *Todarodes pacificus*, were prepared. Autolysis (liver ratio, pH, temperature) and Protamex-treated hydrolysis (pH, temperature, ratio of protease to liver) conditions were optimized by response surface methodology using central composite design for under 1 hr of hydrolysis time. The desirability profile indicated that maximum DH could be achieved at a squid liver of 93.5%, pH 6.4, and 47°C in autolysis, while that of Protamex-treated hydrolysis did at a Protamex-to-squid liver level of 0.33%, pH 6.0, and 55°C. Three amino acids, proline, cysteine, and methionine, were not detected in the total amino acid composition of the Protamex-treated hydrolysate, while they were detected in the free amino acid composition. Cadmium was 8.32±0.03 mg/100 g-powder for raw, 3.56±0.02 mg/100 g-powder for the autolysate, and 13.26±0.04 mg/100 g powder for the Protamex-treated hydrolysate. The major molecular weight ranged from 1.0 to 1.5 kDa for the autolysate and from 210 to 470 Da for the Protamex-treated hydrolysate. Food functionalities of the autolysate, such as surface hydrophobicity, emulsion activity index, emulsion stability, water, and fat adsorption, were similar to the Protamex-treated hydrolysate. Both the autolysate and Protamex-hydrolysate showed high inhibitory activities on the angiotensin-I converting enzyme. Cell toxicity against the HepG2 cell line was not detected in the autolysate or the Protamex-treated hydrolysate by 200 µg/mL.

Key words: squid liver, autolysate, hydrolysate, functionalities

서 론

수산업을 기반산업으로 하는 북해도는 오징어 가공 후 내장 등의 비가식부를 다량 배출하여 이들의 처리가 문제되고 있다(1). 식도, 위, 장 등의 소화기관과 간, 신장, 생식선, 기타를 포함한 오징어 내장은 체중의 13~20%를 차지할 정도로 상대적 비율이 높지만 31~35%에 달하는 지방과 건조중량으로 22.3~79.7 ppm 범위의 Cd를 포함하기 때문에 수산식품으로서 오징어 간의 유효이용은 많은 제약을 받고 있다(2). 따라서 최종제품에는 다량의 지방과 Cd의 처리 공정을 이용한 오징어 비가식부의 전통수산식품과 부가가치 제품의 개발이 절실히 요구된다.

가수분해물의 제거는 영양성분을 유지하면서 기능성을 개선할 수 있기 때문에 부가가치 제품 개발을 위한 공정으로 사용할 수 있다(3). 오징어 간은 2.7~3.0%의 총질소 함량

중에서 열수 가용성 질소가 52%를 차지하며(4), 강력한 단백분해활성과 cathepsin B 및 cathepsin L 유사 단백질 분해 효소(5,6) 및 exo-protease 활성을 가지고 있다(7,8). 오징어 내장의 유효한 이용과 관련한 연구로서 오징어 가공 부산물을 이용한 저염 어장의 속성 발효(9), 오징어 간과 육의 자가 소화물(10)과 오징어 체장과 연어 육의 효소 가수분해물에서 얻은 정제 펩티드의 ACE 저해효과(1), 오징어 육 효소 가수분해물의 냉동변성방지 효과(11), 오징어 간 체장으로 트립신 저해제의 단리와 정제(12), 오징어 간 외피에서 추출한 chondroitin sulfate의 단리와 특성에 관한 연구(13)가 있다. 그러나 산업적으로 적용할 수 있는 오징어 간의 가수분해물 제조를 위한 최적화 조건과 고부가가치 소재 생산을 위한 가수분해물의 특성을 조사한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 오징어 자가소화물과 효소 가수분해물 제조를 위한 효소 대 기질의 비, 온도 및 pH에 관한

*Corresponding author. E-mail: yjchoi@gnu.ac.kr
Phone: 82-55-772-9143, Fax: 82-55-772-9149

최적 조건을 중심합성법으로 검토하고 제조한 가수분해물의 특성과 식품 기능성 및 생리활성을 조사하여 식품첨가물로서 오징어 간장의 이용 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

오징어(*Todarodes pacificus*, 체장 20~25 cm, 체중 320~390 g)는 일본 북해도 하코다데시에 소재하는 수산시장에서 신선한 선어 상태로 구매하여 연구실로 운반한 후, 간장을 적출하여 실험에 사용하였다. Angiotensin I-converting 효소 저해제 실험을 위한 ACE(5 units, rabbit lung)와 hippuryl-histidine-leucine(HHL)은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 가수분해를 위한 단백질 분해효소 Protamex 1.5 mg(bacillus protease, complex)은 Biosis(부산, 한국)에서 구입하였다. 펩티드 분자량 분포 측정을 위한 Supedex peptide 칼럼(1.0×30 cm)은 GE Healthcare(Piscataway, NJ, USA)에서 구입하였다.

일반성분, 비단백 및 아미노 질소화합물의 측정

간장의 수분함량은 상압가열 건조법, 조단백질은 semi-micro Kjeldahl법 및 조지방은 Folch 등의 방법(15)으로 측정하였다. 순단백질 질소화합물은 정확하게 칭량한 오징어 간장 2 g에 증류수 100 mL를 가하고 6% CuSO₄ 용액 25 mL와 1.25% NaOH 용액 25 mL를 가하여 단백질을 침전시킨 후, 여과 및 수세하여 얻은 침전물의 질소 함량을 semi-micro Kjeldahl법으로 정량하였으며, 여과액의 질소 함량을 같은 방법으로 측정하여 비단백 질소화합물로 계산하였다. 그리고 아미노 질소화합물의 함량은 Ninhydrine 법(16)으로 측정하여 L-leucine으로 작성한 표준곡선에 따라 계산하였다. 총휘발성 염기질소 함량은 미량화산법(17)으로 측정하였으며, pH는 정확하게 칭량한 오징어 간장 5 g에 증류수 100 mL를 첨가하여 균질화 한 후 pH meter(AR-15, Fisher Scientific Co., Waltham, MA, USA)로 측정하였다.

자가소화 및 가수분해물의 제조

적출한 간장을 biohomogenizer(M 133/1281-0, Biospec Products Inc, Bartlesville, OK, USA)로 8,500 rpm에서 균질화한 다음, 원심분리(5,000×g, 20 min, 4°C, H-3FR, Kokusen Co., Shizuoka, Japan)하여 지방층과 미분해 잔사물을 분리하였다. 원심분리물의 중간층은 Toyo No. 3(Whatman, Piscataway, NJ, USA)의 여과지로 여과한 후 여액을 가수분해를 위한 시료로 사용하였다. 최적 가수분해 조건은 표면 반응 분석법으로 수행하였다. 완전요인 분석에 따라 자가소화 및 Protamex 가수분해에 영향을 미치는 인자를 조사한 후, 자가소화인 경우 간의 함량(90~99%), pH(pH 5.0~7.0) 및 가수분해 온도(30~70°C)를 인자로 설정하였으며, Protamex 가수분해물은 간장에 대한 Protamex의 비(0.1~0.5%),

pH(pH 6~8) 및 온도(40~60°C)를 주요 인자로 설정하여 2 수준의 표면반응분석을 실시하였다. 가수분해 1시간 후 TCA 가용성 물질의 함량이 0차 반응에 도달하는 예비실험의 결과에 따라 가수분해 시간은 1시간으로 설정하였다. 반응값은 각 가수분해물의 TCA 가용성 단백질의 함량으로 계산한 가수분해도를 사용하였다. 가수분해도는 다음의 식과 같이 계산하였다.

$$\text{가수분해도 (\%)} = \frac{\text{총질소 함량} - \text{TCA 가용성 질소 함량}}{\text{총질소 함량}} \times 100$$

가용성 단백질의 함량은 Lowry법(18)으로 측정하였으며, bovine serum albumin으로 작성한 표준곡선에 따라 계산하였다.

총 아미노산, 유리아미노산 및 무기질 함량의 측정

구성 아미노산과 유리아미노산 함량은 Udomsil 등의 방법(19)으로 측정하였으며, 무기질은 유기질을 건식 분해한 후 ICP(inductively coupled plasma spectrophotometer, Atomscan 25, TJA, Franklin, MA, USA)로 분석하였다.

분자량 분포의 측정

효소 처리한 가수분해물의 분자량 peak는 Superdex HR peptide 칼럼(1.0×30 cm)에 0.20 μm nylon filter로 여과한 시료 100 μL를 loading하여 0.1 N NaCl을 포함하는 20 mM tris-HCl(pH 7.5) 용액을 0.3 mL/min의 속도로 용출하면서 216 nm에서 검출하였다. 분자량은 같은 조건에서 용출한 carbonic anhydrase(분자량 29,000), cytochrome C(분자량 12,400), aprotinin(분자량 6,500), vitamine B₁₂(분자량 1,355) 및 carnosine(분자량 225)으로 작성한 검량곡선에 따라 측정하였다.

식품학적 기능성의 측정

표면 소수성의 잔기는 sodium dodecyl sulfate(SDS) 결합법(20)으로 측정하였다. 동결건조 분말의 유흡능과 유흡안정성 및 지방과 수분 흡착능은 Choi 등의 방법(21)으로 측정하였다. CIE Lab color는 색차계(ZE-2000, Nippon Denshoku, Tokyo, Japan)로 측정하였으며, 색차계는 표준 색 plate(L*=96.83, a*=-0.36, b*=0.62)로 표준화하였다.

생물활성의 측정

DPPH 라디칼 소거능은 Park 등의 방법(22)에 따라 측정하였다. 즉 시험관에 시료 용액 500 μL를 넣고, 500 μL의 ethanol과 250 μL의 0.5 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)/ethanol 용액을 첨가하여 25°C의 실온에서 30분 동안 방치한 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신 500 μL의 탈이온수를 사용하였으며, Blank 시험은 DPPH와 증류수 대신 750 μL의 ethanol을 사용하였다. Antiradical 활성은 DPPH 탈색의 %로 계산하였다. Fe²⁺-chelating 활성은 Rajapakse 등(23)의 방법을 다소 변형하여 측정하였다. 즉 시험관에 시료 용액 0.5 mL를 넣고, 1.85 mL

의 증류수, 50 μ L의 1% FeCl₂, 0.1 mL의 5 mM ferrozine 용액을 가하고 25°C에서 10분 동안 반응시킨 후, 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신에 증류수 0.5 mL를 사용하였고, 공시험은 ferrozine 대신에 증류수 0.1 mL를 사용하였다. 활성은 다음의 식에 따라 계산하여 %로 표시하였다.

$$\text{Chelating 활성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료의 흡광도}}{\text{대조구 흡광도}}\right) \times 100$$

Linoleic acid의 항산화 활성은 Chen 등의 방법(24)에 따라 측정하였으며, blank 시험은 반응 혼합 용액 대신 50 μ L의 탈이온수를 사용하였다. 항산화 활성은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{항산화 활성} = \left(1 - \frac{\text{시료의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}}\right) \times 100$$

ACE 저해활성은 Wanasundara 등의 방법(25)에 따라 기질로 HHL을 사용하여 고속액체 크로마토그래피(HPLC system, Hitachi, Tokyo, Japan)에서 분리된 hippuric acid(HA)의 함량을 측정하였다. 시약 조제를 위한 완충액은 50 mM tris-HCl(pH 8.3)을 사용하였다. 시험관에 3.0 mM HHL 50 μ L, 효소 용액 50 μ L(1.25 Units)와 시료 용액 50 μ L를 가하여 37°C의 항온수조에서 30분 동안 정치하여 항온한 후, 흔들어 주면서 다시 30분 동안 반응시켰다. 150 μ L의 glacial acetic acid를 가하여 반응을 중지시킨 다음 HPLC로 hippuric acid의 함량을 측정하였다. HA의 정량을 위해 guard 칼럼(Bonclone C₁₈, 10 μ m, 50 \times 1.0 mm, Phenomenex Co., Torrance, CA, USA)과 C₁₈ 역상 칼럼(Bondclone C₁₈, 5 μ m, 250 \times 4.6 mm, Phenomenex Co.)을 장착한 반응용액 10 μ L를 주입하고, 12.5%(v/v) acetonitrile 용액(pH 3.0)으로 용출하면서 280 nm에서 peak를 검출하였다. 대조구는 시료 대신 50 μ L의 완충액을 사용하였으며 효소 활성의 저해는 다음 식으로 계산하였다. 시료 농도별로 ACE 저해 활성을 측정하여 농도별 저해 활성을 선형 회귀분석한 후 ACE 활성의 50%를 저해하는 데 필요한 시료 농도를 IC₅₀으로 정의하였다.

$$\text{ACE 저해(\%)} = \left(1 - \frac{\text{대조구의 HA} - \text{시료의 HA}}{\text{대조구의 HA}}\right) \times 100$$

자가소화 및 Protamex 가수분해물의 환원력은 Nam 등의 방법(26)에 따라 측정하였다.

가수분해물의 세포독성의 측정

간암세포인 HepG2 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂가 유지되도록 배양하였다. 이때 미생물의 오염이나 중식을 억제하기 위해 배지용 항생제를 사용하였다. 세포가 80% 정도 dish를 덮으면 phosphate-buffered saline-EDTA(PBS-EDTA)로 세척한 후 트립신 처리하여 계대배양 하였으며, 배지는 48시간마다 교환하여 세포를 배양하였다. 시료는 DMEM(FBS free)배지에 0.2% PBS 용액에 시료를 녹여 사용하였다. 시료의 최종농도는 1~200 μ g/mL의 농도 범위에서 실험하였다. MTT assay

를 이용한 세포독성 측정은 HepG2를 96 well plate에 세포농도 1×10^5 cells/mL로 100 μ L씩을 분주한 후 세포 부착을 위해 24시간 배양하고 시료를 첨가한 FBS free 배지로 교환한 다음 24시간 동안 배양하였다. PBS 용액으로 2회 세척한 다음 MTT 시약으로 처리한 후 490 nm에서 microplate reader(VICTOR X multilabel plate readers, Perkin Elmer 1420, Waltham, MA, USA)로 흡광도를 측정하였다.

통계 분석

각 실험은 3회 반복 실시하였으며, 실험결과와 평균과 표준오차 및 실험 설계와 표면반응분석은 MiniTab 통계 package(Eretec INC, State College, PA, USA)를 사용하였다.

결과 및 고찰

일반성분과 비단백 질소 함량

일본산 오징어의 조단백질 및 지방함량은 각각 $13.8 \pm 0.5\%$ 와 $36.8 \pm 2.1\%$ 로서 지방함량이 높음을 확인하였다. 오징어 간의 비단백 질소함량은 순단백질 질소함량의 1.25배에 해당하여 비단백 질소함량이 높은 특징을 보이고 있었다(Table 1). 일본산 오징어 간장의 일반성분 조성은 어획 시기 및 크기에 따라 차이가 있으나 간장의 수분과 조지방은 각각 40~50%와 25~40%의 범위이고 조단백질 함량은 20% 미만이며, 한편 총단백질 중에서 52~55%가 열수가용성 질소로서 열수가용성 질소의 대부분이 비단백 질소라고 보고하였다(4). 이 같은 보고에 비추어 오징어 간장의 상당 부분이 수용성 비단백질 질소로 이루어져 있음을 확인할 수 있었다. 일본산 오징어 간장의 pH는 6.06~6.10의 약산성 범위를 나타내고 있었다.

자가소화 및 가수분해의 최적 조건

자가소화의 경우 오징어 간의 함량과 균질물의 pH는 오징어 간장의 자가소화에 영향을 미치지($p < 0.05$), 가수분해 온도는 가수분해도에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Table 2). 오징어 간의 자가소화는 오징어 간에 분포하고 있는 여러 종류의 단백질 분해효소에 의해 일어나며, 자가소화에 미치는 인자들 간의 교호작용은 오징어 간의 함량과 pH가 유의적인 영향을 미치는 것으로 나타났다($p < 0.05$). 한편

Table 1. Proximate composition and nitrogen content of Japanese squid liver

Proximate composition	%
Moisture	47.5 ± 0.0
Crude protein	13.8 ± 0.5
Crude fat	36.8 ± 2.1
Ash	0.8 ± 0.1
Nitrogen content	
Proteinous-N (N-g/100 g sample)	1.28 ± 0.1
Non-proteinous-N (N-g/100 g-sample)	1.60 ± 0.0
Total volatile nitrogen (mg/100 g-sample)	109.0 ± 0.0
pH	5.9 ± 0.2

Table 2. ANOVA table of DH as affected by enzyme concentration, pH and temperature during optimization experiments using autolysis and Protamex

Autolysis			Protamex hydrolysis		
Variables	T ¹⁾	P ²⁾	Variables	T	P
Liver ratio (1)	2.206	0.031*	pH (1)	-1.174	0.206
pH (2)	5.185	0.000**	Temperature (2)	6.685	0.000**
Temperature (3)	-1.670	0.105	Protamex (3)	-0.394	0.695
1*1	-1.396	0.173	1*1	1.670	0.101
2*2	-0.951	0.349	2*2	-3.979	0.000**
3*3	-1.762	0.088	3*3	-0.345	0.731
1*2	-2.081	0.046*	1*2	-1.675	0.100
1*3	-0.981	0.334	1*3	2.490	0.016*
2*3	0.242	0.811	2*3	-0.564	0.575

¹⁾F-distribution: Statistically significant at the continuous probability distribution.

²⁾P-value: Statistically significant at the level of p-value represented.

*p<0.05, **p<0.01.

Protamex 가수분해인 경우는 가수분해 온도가 유의적인 영향을 미치며, 온도와 온도, pH와 Protamex 함량 사이에 유의적인 교호 작용이 확인되었다(p<0.05). 자가소화의 경우 최대 가수분해도를 보이는 오징어 간의 함량과 pH 및 가수분해온도는 각각 93.5%, pH 6.4 및 47°C로 나타났으며, 47°C 이상에서 가수분해도는 감소하였다. Protamex 가수분해물의 경우, 오징어 간장에 대하여 0.33%의 Protamex를 첨가하여 pH 6.0과 55°C에서 가수분해할 때 가장 높은 가수분해도를 보였다(Fig. 1). 이 같은 결과는 오징어 채장에 분포하는

단백질 분해효소의 최적 pH와 온도는 각각 5.0과 55°C란 보고(5)와 비슷하며, 인도산 잉어 내장의 alcalase 가수분해 최적 조건인 효소 대 기질 비 1.5%, pH 8.5 가수분해온도 50°C (27)와는 다소 차이를 보인다. 이 같은 차이는 기질과 단백질 분해효소의 차이에 기인할 것으로 추정된다.

총 아미노산, 유리아미노산 및 무기질의 함량

자가소화 및 Protamex 가수분해물의 총 아미노산 함량은 각각 41.34±5.70 g/100 g과 45.52±1.47 g/100 g으로서 Protamex 가수분해물이 다소 높았으나, 조성은 큰 차이가 없었다(Table 3). 자가소화물과 Protamex 가수분해물에서 주요 아미노산인 glutamic acid의 함량은 14.4~14.6%였으며, aspartic acid, lysine, leucine의 순으로 함량이 높았으나, proline과 cysteine은 검출되지 않았다. 인도산 잉어 내장 alcalase 가수분해물의 아미노산 함량은 glutamic acid> glycine> aspartic acid> leucine, lysine> alanine의 순으로 높

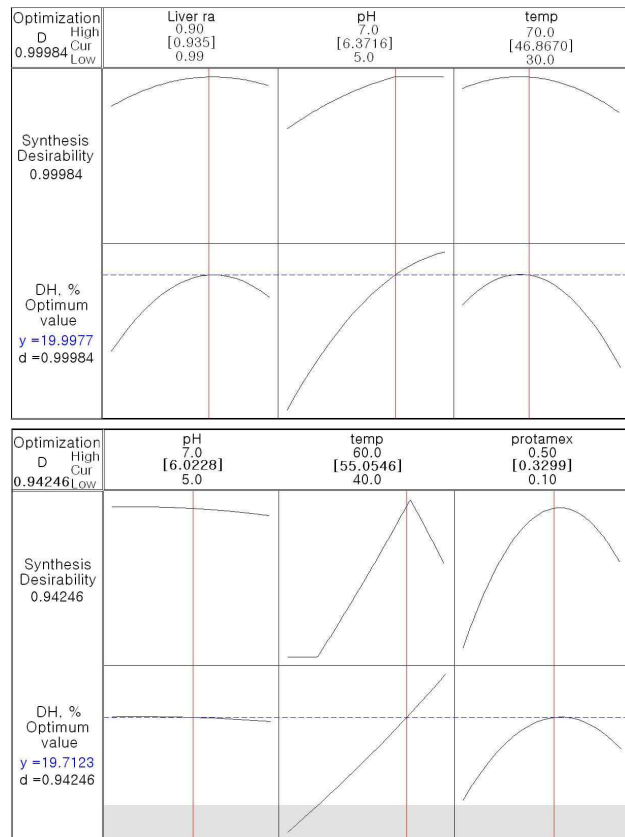


Fig. 1. Desirability profile for the maximum degree of hydrolysis in autolysate and Protamex-treated hydrolysate.

Table 3. Total amino acid composition of autolysate and Protamex hydrolysates (g/100 g-hydrolysate)

Amino acid	Autolysate	Protamex hydrolysate
Asp	4.83±0.45	5.73±0.02
Thr	2.16±0.24	2.41±0.07
Ser	3.06±0.67	3.16±0.13
Glu	5.95±0.80	6.64±0.29
Pro	-	-
Gly	1.89±0.13	2.15±0.01
Ala	3.11±0.26	3.55±0.21
1/2Cys	-	-
Val	1.29±0.18	1.45±0.03
Met	0.34±0.47	-
Ile	3.18±0.76	3.56±0.06
Leu	3.74±0.58	4.01±0.08
Tyr	1.49±0.14	1.29±0.10
Phe	2.70±0.16	3.04±0.21
His	1.12±0.12	1.21±0.14
Lys	4.34±0.46	5.02±0.08
Arg	2.16±0.28	2.31±0.04
Total	41.34±5.70	45.52±1.47
Protein	41.90±0.40	42.74±0.40
Recovery (%)	98.7	106.5

Table 4. Free amino acid composition of autolysate and Protamex hydrolysate from squid liver (g/100 g-hydrolysate)

Amino acid	Autolysate	Protamex hydrolysate	Amino acid	Autolysate	Protamex hydrolysate
Tau	0.60±0.01	2.00±0.02	Leu	1.66±0.36	2.07±0.03
Urea	0.06±0.00	0.20±0.00	Tyr	0.37±0.00	0.36±0.01
Thr	0.58±0.00	0.88±0.01	Phe	1.25±0.00	1.24±0.02
Ser	0.40±0.00	0.76±0.01	Homocys ⁵⁾	0.07±0.00	0.03±0.00
Asn	0.39±0.01	0.81±0.01	GABA ⁶⁾	—	0.03±0.00
Glu	1.07±0.01	2.11±0.04	Ethanolamine	0.05±0.00	0.09±0.02
Sar ¹⁾	0.31±0.00	0.15±0.00	Ammonia	0.10±0.00	0.21±0.00
AAA ²⁾	0.02±0.00	0.03±0.00	Hylys ⁷⁾	0.08±0.01	0.01±0.00
Pro	0.89±0.05	0.83±0.01	Orn ⁸⁾	0.09±0.00	0.30±0.00
Gly	0.24±0.00	0.51±0.01	Lys	1.97±0.08	2.37±0.03
Ala	0.83±0.00	1.28±0.02	1-metHis	0.14±0.00	—
Val	0.89±0.01	1.33±0.03	His	0.54±0.01	0.49±0.01
AABA ³⁾	0.03±0.00	0.04±0.00	3-metHis	0.26±0.00	0.15±0.01
Cys	0.03±0.01	1.33±0.03	Ans ⁹⁾	2.02±0.07	—
Met	0.73±0.00	0.10±0.00	Car ¹⁰⁾	0.12±0.04	0.13±0.05
Cysth ⁴⁾	0.04±0.00	0.75±0.01	Arg	1.67±0.02	1.57±0.02
Ile	0.71±0.01	0.04±0.00	Total	19.10±0.74	23.48±0.44

¹⁾Sar: Sarcosine. ²⁾AAA: Aromatic amino acid. ³⁾AABA: α -Aminobutyric acid. ⁴⁾Cysth: DL+Allocystathionine. ⁵⁾Homocys: Homocystine. ⁶⁾GABA: γ -Aminobutyric acid. ⁷⁾Hylys: Hydroxylysine. ⁸⁾Orn: Ornithine. ⁹⁾Ans: Anserine. ¹⁰⁾Car: Carnosine.

았으며(27), multifect-neutral 가수분해물의 총 아미노산 함량은 glutamic acid> glycine> aspartic acid> alanine> leucine> lysine의 순으로서(28) 아미노산의 구성비는 효소의 종류에 크게 영향을 받지 않은 것으로 보고하여 본 연구의 총 아미노산의 구성과 유사하였다.

자가소화물과 Protamex 가수분해물의 유리아미노산 함량은 각각 총 아미노산 함량의 43.5%와 51.8%를 차지하여 비단백 질소의 비중이 높음을 확인하였다(Table 4). Protamex 가수분해물의 유리아미노산 함량이 자가소화물에 비하여 높은 것으로 나타나 첨가한 Protamex의 가수분해 효과를 추정할 수 있었다. 자가소화물은 methionine, isoleucine, anserine 및 arginine의 함량이 높은 반면, Protamex 가수분해물은 대부분의 아미노산에서 함량이 높았으며, 특히 taurine, glutamic acid 및 cysteine의 함량이 높았다. 그리고 Protamex 가수분해물에서 디펩티드인 anserine이 검출되지 않는 것에 미루어 기질 비특이적인 Protamex에 의한 분해를 추정할 수 있었다. 중국산 mitten 계육의 유리아미노산 함량

은 2,090 mg/100 g으로서 arginine, glycine 및 alanine이 전체 유리아미노산의 70% 이상을 점한다고 하였고(29), pacific cod 필렛 마쇄물의 alcalase와 flavourzyme 가수분해물의 유리아미노산 함량은 각각 총 아미노산 함량의 20.4%와 46.1%로서 건조 중량 100 g당 각각 10.50 g과 21.78 g이고, flavourzyme 가수분해물의 주요 유리아미노산은 Cys, Glu, Arg 및 Lys으로 보고하였다(30).

자가소화물과 Protamex 가수분해물은 다량원소인 K와 Na의 함량이 가장 높았으며, 미량원소로서 Fe, Cu 및 Zn의 함량도 건조중량으로 19.49~24.47 mg/100 g, 68.93~70.28 mg/100 g 및 10.32~22.47 mg/100 g의 범위로서 비교적 높은 수준을 보였다(Table 5). 오징어 간에서 가장 문제인 Cd 함량은 83.2±0.3 ppm이었다. 오징어 간 Cd 함량은 성숙 정도에 따라 차이가 있으며, 미성숙 및 성숙한 오징어 간의 Cd 함량은 건조중량으로 각각 37.8~169.3 ppm과 11.8~30.0 ppm의 범위라고 보고하였다(2). 한편 새우 비가식부와 부산물 젓산균 가수분해물의 Cd와 Pb 함량은 0.01 ppm 미만으로

Table 5. Mineral and heavy metal content of raw, autolysate and Protamex hydrolysate from squid liver (mg/100 g-sample)

Mineral		Raw	Autolysate	Protamex hydrolysate
Macro mineral	Na	85.12±0.38	842.00±5.66	1406.50±23.48
	K	419.29±0.86	1377.50±2.55	1334.50±3.25
	Ca	59.95±0.30	335.95±0.00	624.10±16.63
	P	25.07±0.11	708.75±0.64	803.50±1.84
	Mg	85.12±0.38	145.15±0.72	151.03±0.49
Micro mineral	Mn	1.73±0.01	—	2.46±0.39
Heavy metal	Fe	25.07±0.11	19.49±0.26	24.47±0.56
	Cu	83.95±0.38	70.28±0.52	68.93±0.06
	Zn	39.50±0.15	10.32±0.69	22.47±2.25
	As	0.11±0.03	—	0.38±0.02
	Cd	8.32±0.03	3.56±0.02	13.26±0.04
	Pb	0.09±0.01	0.01±0.00	0.07±0.02
Total		833.32	3,513.01	4,451.67

오징어 간과 많은 차이를 보인다(31). 이 같은 보고에 미루어 오징어 간의 Cd 함량이 극히 높은 것은 종에 따른 특성인 것으로 추정된다. 오징어 간을 식품으로 이용하기 위해서 Cd 함량의 허용 기준값인 2 ppm 이하로 낮출 필요가 있다. 따라서 오징어 간을 식품첨가물로 활용하기 위해서 Cd 함량을 기준값 이하로 낮추는 부가적인 공정이 필수적이다.

분자량의 분포

오징어 간 자가소화물의 저분자 펩티드는 1.0~1.5 kDa이 43.2%, 디펩티드 혹은 트리펩티드에 해당하는 분자량 250~450 Da이 31.9%를 차지하는 반면, Protamex 가수분해물에서는 210~470 Da의 비율이 증가하였다(Fig. 2). 이같은 결과는 Protamex가 1 kDa 미만의 저분자 펩티드의 생성과 유리아미노산의 함량 증가에 기여하고 있음을 지적하며, 유리아미노산 함량의 증가와 일치한다. 시판 어육 단백질효소가수분해물인 prolastin과 MariPep C의 주요 펩티드 분자량의 범위는 각각 300~1,000 Da과 1~4 kDa의 범위(32)로서 본 연구의 자가소화물과 Protamex 가수분해물에 비하여 고분자량의 비율이 높은 것은 오징어 간장에 분포하는 단백질 분해효소의 강력한 효소 작용을 시사한다.

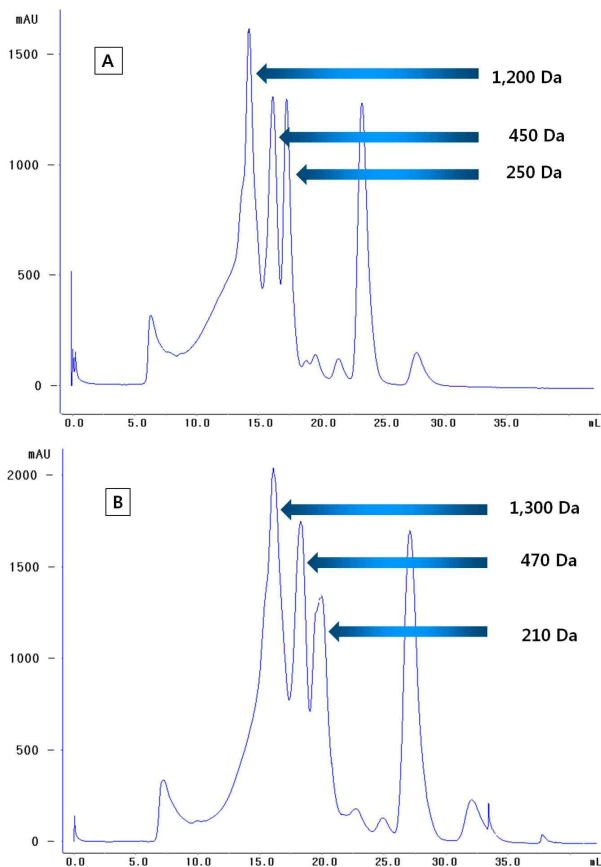


Fig. 2. Molecular weight distribution of autolysate (A) and Protamex-treated hydrolysate (B) from squid liver by Superdex peptide HR column (1.0×30 cm). The peptides were eluted with 20 mM tris-HCl (pH 7.5) containing 0.1 N NaCl, and detected in 216 nm at the flow rate of 0.3 mL/min.

Table 6. Food functionalities of autolysate and Protamex hydrolysate from squid liver

Function	Autolysate	Protamex hydrolysate
SDS surface hydrophobicity (µg of bound SDS/mg of protein)	2.88±0.02	2.84±0.08
Emulsion activity index (m ² /g-sample)	15.6±0.25 ^a	16.9±0.48 ^b
Emulsion stability after 24 hr (%)	15.9±0.4 ^a	15.6±0.8 ^a
Water adsorption (g/g-sample)	0.1±0.0 ^a	0.1±0.0 ^a
Fat adsorption (g/g-sample)	2.4±0.1 ^a	2.5±0.1 ^a
Lab color		
L*	32.13±0.44 ^a	49.48±1.08 ^b
a*	12.99±0.23 ^a	20.23±0.43 ^b
b*	11.48±0.11 ^a	18.66±0.39 ^b

^{a,b}Different superscripts within a row indicate significantly different at 5% level.

식품학적 기능성

자가소화물과 가수분해물의 SDS-표면 소수성은 각각 2.88 µg/mg과 2.84 µg/mg으로서 유의적인 차이가 없었다 (Table 6). 이 같이 비교적 높은 SDS-결합능은 11S globulin과 ovalbumin과 비슷한 수준이고(20), 기질 특이성이 낮은 효소에 의한 무작위적인 가수분해는 단백질 중심의 소수성 잔기의 노출을 초래하여 높은 소수성을 가진다는 보고(33)와 일치하며, 분자량 분포의 결과와 일치한다. 가수분해물을 식품첨가물로 사용할 때 색은 전체적인 기호도에 중요한 영향을 미친다. Protamex 가수분해물의 명도, 적색도 및 황색도는 자가소화물에 비하여 높았다. Protamex 가수분해물의 유효활성 지표(EAI)는 자가소화물에 비하여 다소 높았으며, 이 같은 결과는 유리 소수성 아미노산의 비율이 높기 때문인 것으로 추정된다. 가수분해물의 유효활성 지표는 단백질 분해효소의 형태와 가수분해도 및 SDS 표면 소수성에 의존한다. 본 연구의 결과는 깡치육의 Protamex 가수분해물의 4~6 m²/g과 난백과 소혈청 단백질의 2~3 m²/g(21)에 비하여 높은 값을 나타내고 있었다. 유효 안정성은 자가소화물과 Protamex 가수분해물 사이에 유의적인 차이가 없으나, 낮은 유효안정성은 가수분해로 인한 저분자 물질의 증가 때문이다. 2 kDa 이상의 분자량을 가진 펩티드는 유효안정성에 긍정적으로 기여하며 높은 유효안정성은 고분자량 물질의 분포에 기인한다(21,33). 육제품의 첨가물로서 활용 가능성을 평가하기 위하여 수분과 지방 흡착능을 측정된 결과, 자가소화물과 Protamex 가수분해물의 지방 흡착능은 각각 2.4±0.1 g/g과 2.5±0.1 g/g으로서 난백과 대두단백질 단리물의 지방 흡착능(21)과 유사하였으나, 수분 흡착능은 거의 측정되지 않았다. 유지 흡착능은 가수분해물의 가수분해도와 분자 크기에 의존하며 단백질의 식품학적 기능성은 고유인자로서 조성, 입체구조 및 균질성에 영향을 받는다(21). 가수분해도 5%인 가수분해물은 10% 혹은 15% 가수분해도의 가수분해물에 비하여 유지 흡착능이 높고, 이 같은 결과는 펩티드의 분자량에 의존한다(34). 식품학적 기능성에 미루어 오징어

Table 7. Bioactivities of autolysate and Protamex-treated hydrolysate from squid liver

Bioactivity	Positive control	Autolysate	Protamex-treated hydrolysate
DPPH radical scavenger (EC ₅₀ , mg/mL) ¹⁾	0.01	5.36	4.59
Fe ²⁺ -chelating activity (absorbance, 526 nm) ²⁾	0.929±0.003	1.245±0.001 ^a	1.240±0.0096 ^a
Antioxidation for linoleic acid (absorbance) ³⁾	0.126±0.006	0.404±0.001 ^a	0.428±0.003 ^b
Reducing power (absorbance, 700 nm) ⁴⁾	0.112±0.004	0.056±0.004 ^a	0.048±0.003 ^b
ACE inhibition (IC ₅₀ , mg/mL)	—	0.246	0.177

¹⁾Positive control: ascorbic acid. ²⁾Positive control: 1 mM EDTA.2Na.

³⁾Positive control: 1 mM α-tocopherol. ⁴⁾Positive control: 1 mM ascorbic acid.

^{a,b}Different superscripts within a row indicate significantly different at 5% level.

간 효소 가수분해물은 유화제 혹은 지방 흡착을 위한 첨가물로 사용 가능할 것으로 보이나, Cd의 함량으로 인하여 첨가 수준을 고려할 필요가 있을 것이다.

생물활성

자가소화물과 Protamex 가수분해물의 DPPH 라디칼 소거능(EC₅₀)은 각각 5.36 mg/mL와 4.59 mg/mL로서 Protamex 가수분해물이 더 우수하였다(Table 7). 어류의 조직에 따라 라디칼 소거능에 차이가 있지만 해산어 간 추출물에서 70% 이상의 강한 항산화 효과가 관측되었다(35). DPPH 라디칼 소거능 역시 단백분해효소의 종류와 가수분해도에 의존하며, 가수분해도가 증가함에 따라 증가한다(36). Fe²⁺ 이온 환원력은 펩타이드 농도의 증가와 더불어 감소하였으며, 대조군으로 사용한 ascorbic acid에 비하여 현저히 낮았다. DPPH 라디칼 소거능, 환원력 및 킬레이트능은 alcalase 2.4 L와 flavourzyme 500 L 가수분해물에 따라 차이가 있으며, 효소 가수분해물의 기능성은 사용한 효소와 가수분해도에 의해 결정된다(37). 자가소화물과 Protamex 가수분해물은 linoleic acid 산화의 유도기를 연장하였으며, 특히 자가소화물(0.1 mg/mL)은 60°C에서 16시간 항온한 후 항산화제인 BHA(1 mg/mL) 및 α-tocopherol(1 mg/mL)에 필적하는 항산화 효과를 보였다. 자가소화물과 Protamex 가수분해물의 ACE 저해활성(IC₅₀)은 각각 0.246 mg/mL와 0.177 mg/mL였다. 이 같은 결과는 알칼리 단백질 분해효소로 제조한 정어리 내장 가수분해물의 ACE 저해효과가 2 mg/mL 농도에

서 63.2%라는 보고(38)에 비하여 현저히 높은 수준이다. 다량어 간의 alcalase, Protamex 및 neutrase 가수분해물은 약 36%의 비슷한 ACE 저해능을 보였다(39). 오징어 간 효소 가수분해물의 생물활성 측정 결과는 항산화제 혹은 ACE 저해제로서의 이용 가능성을 제시하였다.

세포독성

자가소화물과 Protamex 가수분해물은 200 µg/mL의 농도까지 HepG2 세포에 대하여 독성을 보이지 않았다. 자가소화물은 1~10 µg/mL의 농도 범위에서 세포를 증식하였으며, Protamex 가수분해물은 농도 증가와 더불어 세포수는 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 3).

요약

복해도산 오징어 간의 유효이용을 목적으로 자가소화물과 Protamex 가수분해물을 제조하고 이들의 식품학적 특성과 몇 가지 기능성을 조사하였다. 자가소화를 위한 최적 조건은 간의 함량 93.5%, pH 6.4, 항온온도 47°C였으며, Protamex 가수분해의 최적 조건은 오징어 간에 대한 Protamex의 첨가비율 0.33%, pH 6.0, 가수분해온도 55°C이었다. Protamex 가수분해물의 총 아미노산 조성에서 proline, cysteine 및 methionine이 검출되지 않았으나, 유리아미노산 조성에서는 검출되었다. 오징어 간, 자가소화물 및 Protamex 가수분해물의 카드뮴 함량은 건조 중량으로 각각 8.32±0.03 mg/100 g, 3.56±0.02 mg/100 g, 13.26±0.04 mg/100 g으로서 식품안전 규정 이하의 농도로 감소시키기 위한 별도의 공정이 필요하다. 자가소화물의 주요 저분자 물질의 분자량은 1.0~1.5 kDa인 반면, Protamex 가수분해물은 210~470 Da이었다. 자가소화물과 Protamex 가수분해물 간에 표면소수성, 유화활성 지표, 유화안정성, 지방 및 수분 흡착능은 큰 차이를 보이지 않았으며, 높은 ACE 효소 저해효과가 관측되었다. 한편 HepG2 세포주에 대한 독성은 200 µg/mL까지 관측되지 않았다.

감사의 글

이 논문 또는 저서는 2009년도 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2009-013-F00009).

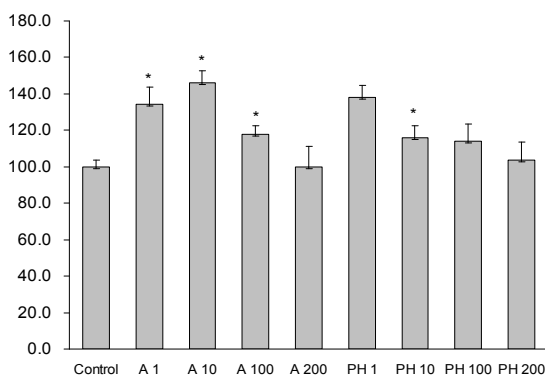


Fig. 3. Cell viability of autolysate and Protamex hydrolysate from squid liver. Capital letter A and PH represent autolysate and Protamex hydrolysate. Numbers are the concentration (µg/mL) of them.

문헌

1. Ono S, Hosokawa M, Inoue A, Yamada D, Takahashi K. 2002. Proteolytic conversion of squid hepatopancreas and upstream chum salmon muscle to angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Nippon Suisan Gakkaishi* 68: 192-196.
2. Kurihara H, Togawa H, Hatano M. 1993. Concentration of cadmium in livers of several kinds of squids and an approach to its elimination. *Bull Fac Fish Hokkaido Univ* 44: 32-38.
3. Kristinsson HG, Rasco BA. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Crit Rev Food Sci Nutr* 40: 43-81.
4. Sugiyama MX, Konosu J, Hamabe M, Okuda Y. 1980. *Utilization of squid*. Koseisha Koseikaku, Tokyo, Japan. p 80-89.
5. Hatate H, Tanaka R, Suzuki N, Hama Y. 2000. Comparison of protease activity in liver among several species of squid and cuttlefish. *Fish Sci* 66: 182-183.
6. Cardenas-Lopez JL, Haard NF. 2005. Cysteine proteinase activity in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) hepatopancreas extracts. *J Food Biochem* 29: 171-186.
7. Komai T, Kawabata C, Tojo H, Gocho S, Ichishima E. 2007. Purification of serine carboxypeptidase from the hepatopancreas of Japanese common squid *Todarodes pacificus* and its application for elimination of bitterness from bitter peptides. *Fish Sci* 73: 404-411.
8. Kim HS, Kim JS, Heu MS. 2008. Fractionation of endoprotease from viscera of the Argentina shortfin squid *Illex argentinus*. *J Kor Fish Soc* 41: 176-181.
9. Xu W, Yu G, Xue C, Xue Y, Ren Y. 2008. Biochemical changes associated with fast fermentation of squid processing by-products for low salt fish sauce. *Food Chem* 107: 1597-1604.
10. Wako Y, Ishikawa S, Muramoto K. 1996. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors in autolysates of squid liver and mantle muscle. *Biosci Biotechnol Biochem* 60: 1353-1355.
11. Hossain MA, Alikhan MA, Ishihara T, Hara K, Osatomi K, Osaka K, Nazaki Y. 2004. Effect of proteolytic squid protein hydrolysate on the state of water and denaturation of lizardfish (*Saurida wanieso*) myofibrillar protein during freezing. *Innovat Food Sci Emerg Technol* 5: 73-79.
12. Kishimura H, Saeki H, Hayashi K. 2001. Isolation and characteristics of trypsin inhibitor from the hepatopancreas of a squid (*Todarodes pacificus*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 130: 117-123.
13. Shetty Ak, Kobayashi T, Mizumoto S, Narumi M, Kudo Y, Yamada S, Sugahara K. 2009. Isolation and characterization of a novel chondroitin sulfate from squid liver integument rich in *N*-acetylgalactosamine(4,6-disulfate) and glucuronate(3-sulfate) residues. *Carbohydr Res* 344: 1526-1532.
14. AOAC. 1990. *Official Method of Analysis of AOAC Intl*. 15thed. Method 900.02A, 955.04, 950.46 and 968.08. Association of Official Analytical Communities, Arlington, VA, USA.
15. Folch J, Lees M, Solane-Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
16. Spies. 1957. Colorimetric procedure for determination of amino acid. In *Methods in Enzymology III*. Colowick SP, Kaplan NO, eds. Academic press, New York, NY, USA. p 467-477.
17. Pyeun JH, Choi YJ, Kim JH, Cho KO. 1984. Postmortem changes of the protein and amino acid composition of muscle in the partially frozen prawn. *Pandalus japonica*. *Bull Korean Fish Soc* 17:280-290.
18. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, Randall RJ. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 256-275.
19. Udomsil N, Rodtong S, Choi YJ, Hua Y, Yongsawatdigul J. 2011. Use of *Tetragenococcus halophilus* as a starter culture for flavor improvement in fish sauce fermentation. *J Agric Food Chem* 59: 8401-8408.
20. Kato A, Matsuda T, Matsudomi NT, Kobayashi K. 1984. Determination of protein hydrophobicity using sodium dodecyl sulfate binding method. *J Agric Food Chem* 32: 284-288.
21. Choi YJ, Hur S, Choi BD, Konno K, Park JW. 2009. Enzymatic hydrolysis of recovered protein from frozen small croaker and functional properties of its hydrolysates. *J Food Sci* 74: C17-C24.
22. Park EY, Murakami H, Mori T, Matsumura Y. 2005. Effects of protein and peptide addition on lipid oxidation in powder model system. *J Agric Food Chem* 53: 137-144.
23. Rajapakse N, Mendis E, Jung WK, Je JY, Kim SK. 2005. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Res Int* 38: 175-182.
24. Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Nokihara K. 1996. Antioxidant activity of designed peptides based on the anti-oxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J Agric Food Chem* 44: 2619-2623.
25. Wanasundara PK, Ross AR, Amarowicz R, Ambrose SJ, Pegg RB, Shand PJ. 2002. Peptide with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibiting activity from defibrinated hydrolyzed bovine plasma. *J Agric Food Chem* 50: 6981-6988.
26. Nam SH, Choi SP, Kang MY, Kozukue N, Friedman M. 2005. Antioxidative, antimutagenic, and anticarcinogenic activities of rice bran extracts in chemical and cell assays. *J Agric Food Chem* 53: 816-822.
27. Bhaskar N, Benila T, Radha C, Lalitha RG. 2008. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresour Technol* 99: 335-343.
28. Bhaskar N, Mahendrakar NS. 2008. Protein hydrolysate from visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*): Optimization of hydrolysis conditions for a commercial neutral protease. *Bioresour Technol* 99: 4105-4111.
29. Chen DW, Zhang M. 2007. Non-volatile taste active compounds in the meat of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Food Chem* 104: 1200-1205.
30. Cheung IW, Liceaga AM, Li-Chan EC. 2009. Pacific hake (*Merluccius productus*) hydrolysates as cryoprotective agents in frozen pacific cod fillet mince. *J Food Sci* 74: C588-C594.
31. Bueno-Solano C, López-Cervantes J, Campas-Baypoli ON, Lauterio-García R, Adán-Bante NP, Sánchez-Machado DI. 2009. Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. *Food Chem* 112: 671-675.
32. Bourseau P, Vandanjon L, Jaouen P, Chaplain-Derouiniot M, Masse A, Guerard F, Chabeaud A, Fouchereau-Peron M, Le Gal Y, Ravallec-Ple R, Berge JP, Picot L, Piot JM, Batista I, Thorkelsson G, Delannoy C, Jakobsen G, Johansson I. 2009. Fractionation of fish protein hydrolysates by ultrafiltration and nanofiltration: impact on peptidic populations. *Desalination* 244: 303-320.

33. Hall SE. 1996. Emulsions. In *Methods of Testing Protein Functionality*. Hall GM, ed. Blackie Academic & Professional, New York, NY, USA. p 153-185.
34. van der Van C, Gruppen H, de Bont DB, Voragen AG. 2001. Emulsion properties of casein and whey protein hydrolysates and the relation with other hydrolysate characteristics. *J Agric Food Chem* 49: 5005-5012.
35. Bae YJ, Kim CH, Kim EJ, Go HJ, Kim IH, Park HY, Yoon HD, Chang YC, Hong YK, Park NG. 2004. Biological activity of the extracts of the eight Korean fish species. *J Kor Fish Soc* 37: 445-454.
36. Samaranayaka AG, Kitts DD, Li-Chan EC. 2010. Antioxidative and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory potential of a Pacific hake (*Merluccius productus*) fish protein hydrolysate subjected to simulated gastrointestinal digestion and Caco-2 cell permeation. *J Agric Food Chem* 58: 1535-1542.
37. Klompong V, Benjakul S, Kantachote D, Shahidi F. 2007. Antioxidant activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chem* 102: 1317-1327.
38. Bougateg A, Nedjar-Arroume N, Ravallec-Ple R, Leroy Y, Guillochon D, Barkia A, Nasri M. 2008. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases. *Food Chem* 111: 350-356.
39. Je JY, Lee KH, Lee MH, Ahn CB. 2009. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Res Int* 42: 1266-1272.

(2012년 10월 16일 접수; 2012년 11월 19일 채택)