

## 일본산 오징어 간을 이용한 은연어 가수분해물 제조의 최적화와 가수분해물의 특성

이수선<sup>1</sup> · 박주동<sup>2</sup> · Kunihiro Konno<sup>3</sup> · 최영준<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>경상대학교 해양식품공학과/해양산업연구소

<sup>2</sup>CJ 제일제당 식품연구소

<sup>3</sup>북해도 대학교 수산대학원

## Optimization of Coho Salmon Hydrolysate Using Japanese Squid Liver and Its Properties

Su-Seon Lee<sup>1</sup>, Joo-Dong Park<sup>2</sup>, Kunihiro Konno<sup>3</sup>, and Yeung Joon Choi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Gyengsang National University/Institute of Marine Industry, Gyeongnam 650-160, Korea

<sup>2</sup>CJ Cheiljedang, CJ Food R&D, Seoul 152-051, Korea

<sup>3</sup>Faculty of Fisheries Science, Hokkaido University, Hokkaido 041-8611, Japan

**ABSTRACT** In this study, the optimal conditions for salmon hydrolysate using squid liver and compositional properties of hydrolysate were investigated. The optimal conditions were 55°C, pH 5.5 and 0.66~0.67% (w/w) in the ratio of squid liver to acidic and thermal treated salmon muscle. The free amino acid of hydrolysate from the acidic treated salmon muscle was higher than that of hydrolysate from the thermal treated salmon muscle, while the total amino acid and mineral were high in the acidic treated salmon muscle. Furthermore, cadmium of hydrolysate from the thermal denatured salmon muscle was below 2 ppm, and has an acceptable level as potential ingredient. The distribution of peptide molecular weight was 40.0% for 1.0~9.5 kDa, 6.7% for 0.5 kDa, and 47.4% of others in hydrolysate from the thermal treated salmon muscle. Both hydrolysates did not show any toxicity against the HepG2 cell line for up to 200 µg/mL.

**Key words:** optimization, salmon hydrolysate, squid liver, mineral, cadmium

## 서 론

식품 첨가물로서 기능성 단백질은 식품의 물성 개량, 가공 안정성의 개선뿐 아니라 생리활성을 부여할 수 있기 때문에 비교적 부가가치가 높은 제품이다(1). 적절한 아미노산 조성을 가진 단백질 자원을 활용한 효소 가수분해물의 제조는 영양학적 품질의 손상은 최소로 하면서 다량의 아미노산 혹은 펩티드를 생성하기 때문에 단백질의 기능성을 현저히 향상시킨다. 어류 부산물의 가수분해물 제조와 관련하여 연어 두부(2)와 새우 부산물(3) 효소 가수분해물의 식품화학적 특성, 어류 부산물 효소 가수분해물의 angiotensin-I converting enzyme(ACE) 저해능(4,5), 가자미와 오징어 껍질 젤라틴 가수분해물(6)과 가다랑어 간 단백질 가수분해물(7), yellowfin sole frame 단백질(8)의 항산화 특성, blue whiting과 새우 두부 효소 가수분해물의 cholecystokinin (CCK) 유리 활성 자극(9) 등의 많은 연구가 수행되었다.

오징어 간은 강력한 단백분해활성과 cathepsin B 및 cathepsin L 유사 단백질 분해효소(10,11) 및 exo-protease 활성을 가지고 있다(12,13). 한편 연어 육은 높은 카텝신 B, D, H 및 L 활성을 갖기(14) 때문에 가수분해물 제조에 따른 상업적 효소의 첨가량을 줄일 수 있고, 내인성 효소의 기질 특이성에 기인한 독특한 생리활성을 기대할 수 있다.

일본의 북해도는 다량의 오징어와 연어를 어획하고 있으나 내장을 포함하는 극히 일부분의 부산물을 어분 혹은 어유로 가공되고 있을 뿐이며, 가공 제품의 상업적 가치도 낮기 때문에 고부가가치의 제품으로서 오징어 부산물의 활용이 중요하다(15,16). 오징어 간은 건조중량으로 22.3~79.7 ppm 범위의 카드뮴(Cd)을 포함하고 있기 때문에(17) 오징어 간을 부산물로 활용하기 위해서 간에 포함된 Cd 제거를 위한 전처리 공정이 반드시 필요하다. 한편 두 가지 속의 연어, 즉 *Salmo*와 *Oncorhynchus*는 주로 냉동 필렛과 냉훈 제품으로 널리 소비되고 있어서 가공 중 두부, 내장 및 뼈 등의 부산물을 생산한다(18). 그러나 연어 부산물은 알의 제외하고 적절한 부산물의 유효이용을 대책을 수립하지 못하고 있는 실정이다.

본 연구는 오징어 간에 분포하는 단백질 분해효소를 이용

Received 30 July 2013; Accepted 11 September 2013

\*Corresponding author.

E-mail: yjchoi@gnu.ac.kr, Phone: 82-55-772-9143

하고, Cd의 저감을 위한 은연어 육의 전처리 공정과 최적 가수분해 조건을 조사할 목적으로 오징어 간에 대하여 가열 처리와 산 처리한 은연어 육의 비, 온도 및 pH에 관한 최적 가수분해 조건을 중심합성법으로 분석하고, 제조한 가수분해물의 특성을 조사하여 식품 첨가물로서 오징어 간의 이용 가능성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

은연어(*Oncorhynchus kisutch*, 체장 60~70 cm, 체중 500~800 g)는 일본 북해도 하코다테 시에 소재하는 시장에서 신선한 선어 상태로 구매(2009. 11)하여 연구실로 운반한 다음, 오징어의 간을 적출하고 은연어 육은 펠렛하여 -20 °C의 냉동고에 저장하면서 분석 시료로 사용하였다.

### 일반성분, 비단백 및 아미노 질소화합물의 측정

오징어 간과 은연어의 수분함량은 상압가열 건조법, 조단백질은 semi-micro Kjeldahl법, 조회분은 건식회화법으로 각각 함량을 측정하였으며(19), 조지방은 Folch 등의 방법(20)으로 측정하였다. 단백질의 질소 함량과 비단백질 질소 함량은 정확하게 칭량한 오징어 간 2 g에 증류수 100 mL를 가하고 6% CuSO<sub>4</sub> 용액 25 mL와 1.25% NaOH 용액 25 mL를 가하여 단백질을 침전시킨 후, 여과 및 수세하여 얻은 침전물과 여과액을 각각 semi-micro Kjeldahl법으로 측정하여 정량하였다. 아미노 질소화합물의 함량은 ninhydrine 법(21)으로 측정하여 L-leucine으로 작성한 표준곡선에 따라 계산하였다. 휘발성 염기질소(volatile basic nitrogen, VBN) 함량은 미량화산법(22)으로 측정하였으며, pH는 정확하게 칭량한 오징어 간과 은연어 5 g에 증류수 100 mL를 첨가하여 균질화한 후 pH meter(AR-15, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)로 측정하였다.

### 가수분해물의 제조

은연어 육 단백질에 대하여 오징어 간에 분포하는 단백질 가수분해 효소의 작용을 증진시키고, Cd의 함량을 감소시킬 목적으로 은연어 육을 각각 가열 및 산 처리하였다. 가열 처리는 은연어 육에 2배량의 증류수를 첨가하여 Biohomo-genize(M133, BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK, USA)로 8,500 rpm에서 2분 동안 마쇄하고 50°C의 항온수조에서 30분 동안 가열 처리한 후, 최종적으로 85 mL로 정용하여 가수분해를 위한 기질 용액으로 사용하였다. 한편 산 처리는 같은 중량의 은연어 육에 2배량의 증류수를 첨가하고 마쇄하여 6 N HCl 용액으로 pH를 3.0으로 조정하고 실온에서 30분 동안 방치하여 산 처리하였다. 산 처리한 마쇄육을 5 N NaOH로 pH 5.0으로 조정하고 85 mL로 정용하여 가수분해를 위한 기질용액으로 사용하였다. 가수분해를 위한 효소용액으로는 오징어 간 110 g에 증류수 180 mL를 가하여 8,500 rpm에서 2분 동안 균질화한 오징

**Table 1.** Actual levels of independent variable along with the observed values for degree of hydrolysis on the response value

Run number	pH (X1)	Temp. (X2)	Squid/salmon ratio (X3)	DH (%)
1	4	40	20	13.67
2	7	40	100	14.96
3	7	40	20	11.42
4	5.5	55	60	28.29
5	4	40	100	21.30
6	7	70	20	11.49
7	4	70	100	30.45
8	7	70	100	17.35
9	4	70	20	25.96
10	5.5	55	60	29.45
11	5.5	55	60	29.62
12	5.5	55	60	29.30
13	5.5	55	125	29.47
14	8	55	60	17.18
15	5.5	55	60	30.17
16	5.5	30	60	12.49
17	5.5	55	0	0.00
18	5.5	80	60	16.99
19	3	55	60	30.84
20	5.5	55	60	31.08

어 간 균질물을 사용하였다. 최적 가수분해 조건은 pH(X1; pH 4~7), 온도(X2; 40°C~70°C) 및 은연어 육과 오징어 간의 중량비(X3; 0.2, 1.0)를 독립변수로 2 수준에서 중심합성법으로 표면반응분석을 실시하였으며, 종속변수는 TCA 가용성 가수분해도를 사용하였다(Table 1). 가수분해도는 다음의 식과 같이 계산하였다.

$$\text{가수분해도}(\%)(\text{degree of hydrolysis, DH}) = \frac{\text{총 단백질 함량} - \text{TCA 가용성 단백질 함량}}{\text{총 단백질 함량}} \times 100$$

가수분해 후 가용성 단백질의 함량은 Lowry법(23)으로 측정하였으며, bovine serum albumin으로 작성한 표준곡선에 따라 계산하였다.

### 총 아미노산, 유리아미노산 및 무기질 함량의 측정

구성 아미노산과 유리 아미노산 함량은 Udomsil 등의 방법(24)으로 측정하였으며, 무기질은 유기질을 건식 분해한 후 ICP(Inductively coupled plasma spectrophotometer, Atomscan 25, Thermo Jarrell Ash, Franklin, MA, USA)로 분석하였다.

### 분자량 분포의 측정

가수분해물의 분자량 분포는 0.1 N NaCl을 포함하는 20 mM tris-HCl(pH 8.0) 용액으로 평행화한 Superdex HR peptide 칼럼(1.0×30 cm)에 시료 500 µL를 loading하여 같은 완충액으로 0.1 mL/min의 속도로 용출하면서 226 nm에서 펩트드 용출 피크를 검출하였다. 분자량은 같은 조건에서 용출한 carbonic anhydrase(MW 29,000), cytochrome C(MW 12,400), aprotinin(MW 6,500), vitamine B<sub>12</sub>(MW

1,355) 및 carnosine(MW 225)으로 작성한 검량곡선에 따라 측정하였다.

### 가수분해물의 세포 독성의 측정

인간 유래의 간암세포주인 HepG2 cell을 한국세포주은행(KTCC, Seoul, Korea)으로부터 분양받아 간암세포에 대한 독성 여부를 확인하였다. HepG2 cell은 sodium pyruvate(Gibco, Carlsbad, CA, USA), MEM NEAA(Gibco) 및 10% fetal bovine serum(FBS, Lonza, Gamble, Valais, Switzerland)이 함유된 minimum essential medium(MEM, Lonza)을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 배양기에서 배양하였다. 미생물의 오염이나 증식을 억제하기 위해 배지용 항생제(penicillin streptomycin, Gibco)를 사용하였으며, 세포는 일주일에 2~3회 계대배양 하였고 배지는 48시간마다 교환하였다.

96 well plate에 세포농도  $1 \times 10^5$  cells/well로 HepG2 cell을 100 µL씩을 분주한 후 세포 부착과 안정화를 위해 24시간 배양하였다. 새로운 배양 배지에 가수분해물의 최종 농도가 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL 및 200 µg/mL가 되도록 제조하여 분주한 세포를 24시간 동안 배양하였다. 세포의 생존율은 Promega(Fitchburg, WI, USA)에서 구입한 CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation assay를 이용하여 측정하였다. 시약을 처리한 후 microplate reader(Perkin Elmer 1420, VICTORTM X Multilabel Plate Readers, Waltham, MA, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포의 생존율은 시료를 처리하지 않은 대조군에 대비한 시료 처리군의 흡광도로 표시하였다.

### 통계 분석

각 실험은 3회 반복 실시하였으며, 실험결과의 평균과 표준오차 및 실험 설계와 표면반응분석은 통계 package MiniTab(MiniTab 15, Minitab Inc., State College, PA, USA)을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 일반성분과 비단백태 질소 화합물

오징어 간의 조단백질과 지방함량은 각각  $13.8 \pm 0.5\%$ 와  $36.8 \pm 2.1\%$ 로써 단백질에 비하여 지방함량이 높았으며, 오징어 간의 비단백태 질소 함량은 단백질 질소함량의 4.3배에 해당하여 비단백태 질소 함량이 높은 특징을 보이고 있었다(Table 2). 한편 은연어 육의 조단백질과 지방함량은  $23.4 \pm 0.4\%$ 와  $5.1 \pm 1.0\%$ 로써 조단백질 함량이 높은 전형적인 어육의 특징을 보였고, 오징어 간과 반대로 단백질 질소 함량이 비단백태 질소 함량의 약 2.2배에 해당하였다. 이 같은 결과는 오징어 간의 질소화합물은 육을 구성하는 아미노산과 달리 저분자의 질소 대사산물의 함량이 풍부함을 나타내는 것으로 보인다. 8월부터 12월까지에 걸쳐 어획한 북

**Table 2.** Proximate composition and nitrogen content of squid liver and coho salmon muscle

	Squid liver	Coho salmon
Proximate composition (%)		
Moisture	47.5±0.0 <sup>1)</sup>	68.9±1.6
Crude protein	13.8±0.5	23.4±0.4
Crude fat	36.8±2.1	5.1±1.0
Ash	0.8±0.1	1.5±0.1
Nitrogen content (N-g/100 g-sample)		
Proteinous-N	0.3±0.0	2.2±0.0
Non-proteinous-N	1.3±0.0	1.0±0.0
Volatle nitrogen (mg%)	109.0±0.0	16.7±0.0
pH	5.8~6.1	6.5~6.7

<sup>1)</sup>The values represent the mean±SD for triplicate experiments.

해도산 오징어 간의 지방함량은 간의 크기에 따라 차이가 있으나, 23.0~48.0%의 범위(25)로 본 연구의 결과와 일치하였다. 그리고 총 질소 함량, 단백질 질소 함량 및 열수 가용성 질소함량은 각각 2.8~3.0 g/100 g, 0.42~0.51 g/100 g 및 1.47~1.51 g/100 g의 범위라는 보고(25)에 비추어 본 연구의 결과에 비하여 다소 높았으나, 비단백태 질소량이 단백질 질소량에 비하여 높은 경향은 동일하였다.

### 가수분해 지표의 최적화

가수분해 단백질의 생성에 미치는 pH(X1), 온도(X2) 및 은연어 육에 대한 오징어 간의 중량비(X3)의 영향을 중심합성 설계로 수행하였다. 은연어 육의 가수분해 조작 전 가열처리 공정을 독립변수에 유의적인 영향을 미치는 것으로 나타났다( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 산 처리시킨 경우는 유의적인 상관을 보이지 않았다(Table 3). 한편 교호 작용에서 가열처리의 경우는 pH×pH, 온도×온도, 기질 농도비×기질농도비 및 pH×온도가 가수분해 단백질 생성에 유의적인 영향을 미치는 것으로 나타난 반면, 산 처리의 경우는 기질 농도의 교호에서만 유의적인 영향을 가졌다.

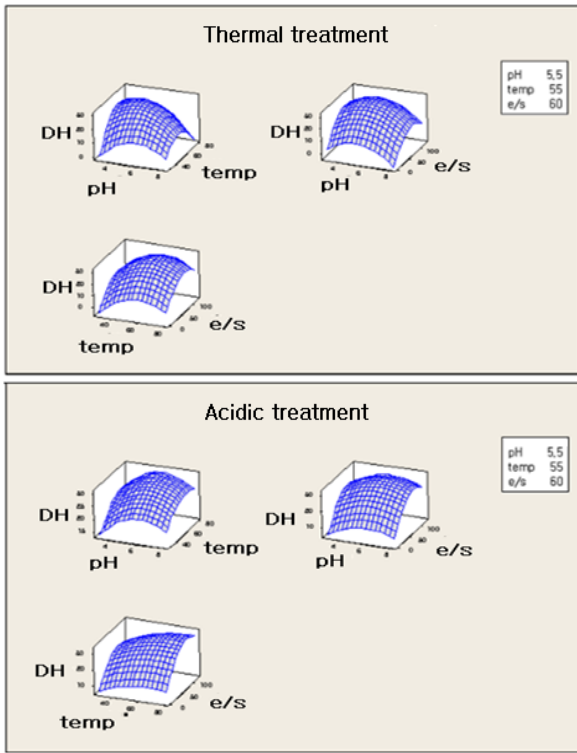
가열 처리한 은연어 육의 가수분해도(DH)에 미치는 독립인자들의 영향은 선형 및 다중 회귀분석의 상관을 가지나( $P < 0.01$ ), 산 처리의 경우는 선형에서는 유의적인 상관을 보이지 않고 다중회귀에서만 유의적인 상관을 보였다( $P < 0.05$ ). 잉어 근원섬유단백질의 가열은 키모트립신에 대한 heavy meromyosin/light meromyosin 연결 부위의 감도를 증가시키고(26), 계육 단백질의 Alcalase 가수분해물의 질소함량은 가열 전처리의 온도 상승과 처리 시간의 연장에 따라 다소 증가하였다(27). 어육 단백질은 pH 2.0~3.0의 산성 용액에서 미오신 중쇄는 산 분해하기 때문(28,29)에 산성 용액에서 육 단백질의 노출에 의한 단백질 구조 변화는 pH 및 온도 변성의 영향을 받지 않는 것으로 판단하였다.

가수분해도 30% 이상의 가수분해 단백질을 생성하는 pH, 온도 및 기질농도비는 pH 5.0~6.0, 온도 50~65°C, 기질농도비 약 0.6~1.0의 범위인 것으로 나타났으며(Fig. 1),

**Table 3.** Regression coefficients for main factors and their interactions during optimization experiments

Factors/ Interaction	Thermal treatment			Acidic treatment		
	Coefficient	SE	P <sup>1)</sup>	Coefficient	SE	P
Constant	-103.747	19.8033	0.000**	-45.2860	28.3120	0.120
pH (X1)	10.704	4.1885	0.016*	11.1873	5.9881	0.072
Temp (X2)	3.122	0.4188	0.000**	0.7936	0.5988	0.195
Squid conc (X3)	0.508	0.1338	0.000**	0.3878	0.1913	0.052
X1 × X1	-0.678	0.3075	0.035*	-0.8909	0.4396	0.052
X2 × X2	-0.022	-7.0270	0.000**	-0.0056	0.0044	0.214
X3 × X3	-0.003	0.0005	0.000**	-0.0023	0.0007	0.002*
X1 × X2	-0.105	0.0408	0.015*	-0.0121	0.0583	0.837
X1 × X3	-0.006	0.0153	0.713	-0.0015	0.0219	0.948
X2 × X3	-0.000	0.0015	0.913	0.0007	0.0022	0.743

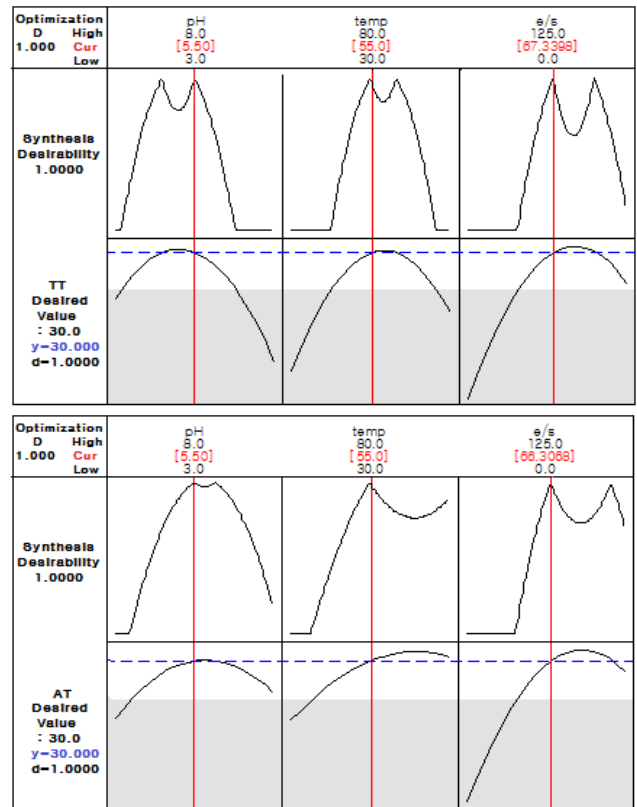
<sup>1)</sup>P-value: Statistically significant at the level of P-value represented.  
 \*P<0.05, \*\*P<0.01.



**Fig. 1.** Surface response plot for optimum hydrolysis of coho salmon muscle using squid liver.

목표 값을 가수분해도 30%로 설정했을 때 가열 처리한 은연어 육의 경우 최적 pH, 온도 및 기질 비는 5.50, 55°C 및 0.67이었고, 산 처리한 은연어 육의 pH와 온도는 동일한 값이었으나 기질농도비는 0.66이었다(Fig. 2). 이 같은 결과는 최대 가수분해도의 약 94~96%에 해당하는 가수분해도 30%의 생성에 미치는 최적 조건은 기질의 처리 방법에 영향을 받지 않음을 제시한다.

본 연구의 결과는 오징어 간에 분포하는 단백질 분해효소의 최적 pH와 온도는 각각 5.5와 55°C라는 보고(30)와 잘 일치한다. 한편 산 처리한 후 가수분해물의 pH 조정 조작용 가수분해 단계를 복잡하게 만들고 산-염기 중화반응에 의해



**Fig. 2.** Optimum pH, temperature and the ratio of squid liver concentration to coho salmon muscle for the targeted production of 30% DH.

염을 생성할 가능성이 있다. 특히 건조 분말인 경우 생성된 염으로 인하여 최종 제품의 영양 및 생물학적 활성에 영향을 미칠 수 있다. 그리고 최종 제품에 2 ppm 이상의 Cd이 검출되어 식품 ingredients로서 응용에 제한적이기 때문에 가수분해 전 처리는 가열 처리가 적절한 공정으로 판단되었다.

**가수분해물의 총 아미노산과 유리아미노산의 함량**

가수분해 분말 시료 100 g 중의 총 아미노산의 함량은 가열 처리와 산 처리 시료는 각각 45.87±5.87 g과 44.92

**Table 4.** Total amino acid composition of coho salmon muscle hydrolysate using squid liver (g/100 g-hydrolysate)

Amino acid	Thermal treatment	Acidic treatment
Asp	5.00±0.06 <sup>1)</sup>	4.97±0.13
Thr	2.64±0.18	2.39±0.04
Ser	2.05±0.18	2.06±0.03
Glu	6.56±0.86	6.59±0.23
Pro	2.22±0.12	2.03±0.12
Gly	2.46±0.35	2.19±0.01
Ala	3.00±0.46	2.84±0.01
1/2Cys	0.31±0.09	0.14±0.02
Val	1.34±0.26	1.28±0.04
Met	1.20±0.20	1.29±0.01
Ile	2.17±0.41	2.25±0.01
Leu	4.13±0.79	3.87±0.05
Tyr	0.75±0.18	1.37±0.01
Phe	2.02±0.35	2.06±0.04
His	1.04±0.21	1.43±0.01
Lys	6.12±1.06	4.46±0.46
Ammonia	1.33±0.16	0.75±0.01
Arg	1.54±0.32	2.64±0.01
Total	45.87±5.87	44.92±1.06

<sup>1)</sup>The values represent the mean±SD for triplicate experiments.

±1.06 g으로서 전처리 과정의 차이에 따른 유의적인 변화는 확인할 수 없었다(Table 4,  $P < 0.05$ ). 가열 처리 및 산 처리 시 glutamic acid, lysine, aspartic acid 및 leucine의 함량이 높게 나타났으며, 산 처리는 가열 처리에 비해 tyrosine 과 arginine 함량이 약 1.7~1.8배 높은 것으로 나타났다. 이 같은 결과는 인도산 담수어인 잉어(*Catla catla*) 내장의 Alcalase 가수분해물의 주요 아미노산이 glutamic acid,

glycine 및 aspartic acid라는 보고(31)와 multifect-neutral 가수분해물의 주요 구성 아미노산이 glutamic acid, glycine, aspartic acid라는 보고(32)와 다소 차이를 보이며, 이는 내장과 간 혹은 육 단백질의 아미노산 조성의 차이에 기인하는 것으로 추정된다.

전처리 조건에 따라 오징어 간으로 가수분해한 은연어 육 가수분해물의 유리 아미노산 조성은 Table 5와 같다. 유리 아미노산의 총 아미노산의 함량은 가열 처리와 산 처리 전처리 시료는 각각 22.98±0.19 g과 24.80±0.32 g/100 g이었으며, 산 처리가 가열 처리에 비하여 유리 아미노산의 함량이 다소 높은 것은 산 처리에 의하여 육 단백질의 가수분해에 기인한 것으로 보인다. 민대구 육을 pH 2.0~3.0 사이로 조정 후 2시간 이내에 pH를 7.0 부근으로 조정 후 민대구 육의 SDS-PAGE 전기영동상에서 미오신 중쇄 단백질이 현저히 감소하였을 뿐 아니라 저분자량의 펩티드가 다량 생성되는 것으로 보고하였다(29,30).

가열 및 산 처리한 가수분해물의 유리아미노산은 lysine, anserine glutamic acid, leucine, proline, phenyl alanine 및 taurine 함량이 높았다. Anserine은 특이적으로 은연어 육에 다량 포함된 유리 아미노산이다(33,34). 한편 산 처리 가수분해물은 가열 처리 가수분해물에 비하여 asparagine, glutamic acid, proline,  $\alpha$ -amino adipic acid, cystathionine,  $\alpha$ -amino isobutyric acid,  $\gamma$ -amino isobutyric acid, ethanolamine, 1- 및 3-methylhistidine의 함량이 다소 높았으며, 이는 오징어 간의 질소 대사산물로 추정된다.

**Table 5.** Free amino acid composition of coho salmon muscle using squid liver (g/100 g-hydrolysates)

Amino acid	Thermal treatment	Acidic treatment	Amino acid	Thermal treatment	Acidic treatment
Tau	1.33±0.00 <sup>1)</sup>	1.09±0.03	Ile	0.69±0.00	0.87±0.01
Urea	0.17±0.02	0.09±0.003	Leu	2.12±0.01	1.92±0.02
Asp	0.83±0.00	0.87±0.02	Tyr	1.07±0.00	0.98±0.01
Hyp	0.83±0.01	0.67±0.03	$\beta$ -Ala	—	0.02±0.00
Thr	0.56±0.00	0.64±0.01	Phe	1.53±0.01	1.61±0.02
Ser	0.39±0.00	0.39±0.01	AAIBA <sup>4)</sup>	0.02±0.00	0.10±0.01
Asn	0.02±0.00	0.21±0.05	Homocys	0.06±0.00	0.15±0.00
Glu	1.56±0.04	1.92±0.11	GABA <sup>5)</sup>	0.03±0.00	0.12±0.00
Sar	—	—	Ethamin	—	0.16±0.00
AAAA <sup>2)</sup>	0.02±0.00	0.15±0.01	Ammonia	0.22±0.02	0.19±0.05
Pro	0.74±0.04	1.69±0.14	Hylys	0.04±0.00	0.26±0.01
Gly	0.30±0.00	0.30±0.00	Orn	0.13±0.00	0.13±0.00
Ala	0.90±0.01	0.89±0.02	Lys	2.27±0.01	2.03±0.04
Citr	—	0.06±0.00	1-metHis	0.06±0.00	0.17±0.01
AABA <sup>3)</sup>	0.02±0.00	0.02±0.00	His	0.78±0.01	0.73±0.01
Val	0.94±0.00	0.97±0.02	3-metHis	0.28±0.02	0.40±0.03
Cys	0.05±0.00	0.07±0.00	Ans	2.12±0.03	1.97±0.06
Met	0.83±0.00	0.99±0.01	Car	0.12±0.00	0.27±0.02
Cysth	0.01±0.00	0.13±0.00	Arg	1.92±0.01	1.56±0.04
Total	22.98±0.19	24.80±0.32			

<sup>1)</sup>The values represent the mean±SD for triplicate experiments.

<sup>2)</sup>AAAA: L- $\alpha$ -amino adipic acid. <sup>3)</sup>AABA:  $\alpha$ -aminobutyric acid. <sup>4)</sup>AAIBA: DL- $\beta$ -aminoisobutyric acid. <sup>5)</sup>GABA:  $\gamma$ -amino-butyric acid.

**Table 6.** Mineral content of coho salmon muscle hydrolysate using squid liver (mg/100 g-hydrolysate)

Mineral	Thermal treatment	Acidic treatment
Na	840.0±1.4 <sup>1)</sup>	1,848.0±22.3
K	2,411.8±5.7	1,444.6±15.2
P	1,535.2±2.5	1,040.5±10.1
Ca	67.5±1.3	69.0±0.8
Mg	205.3±3.5	145.0±2.2
Fe	9.6±0.1	14.1±0.3
Cu	5.6±0.1	23.6±0.4
Zn	6.8±0.1	15.8±0.2
Al	32.3±0.3	28.2±0.4
Mn	4.4±0.1	<0.01
B	0.5±0.1	0.4±0.0
Li	1.4±0.0	5.3±0.0
Sr	0.2±0.0	0.3±0.0
Si	14.8±0.1	26.0±0.5
Ge	3.1±0.6	2.8±0.2
As	0.1±0.6	3.1±0.5
Cd	<0.01	2.6±0.5
Pb	<0.01	<0.01
Cr	<0.01	<0.01
Total	5,139.4±16.4	4,669.3±53.2

<sup>1)</sup>The values represent the mean±SD for triplicate experiments.

### 무기질 함량

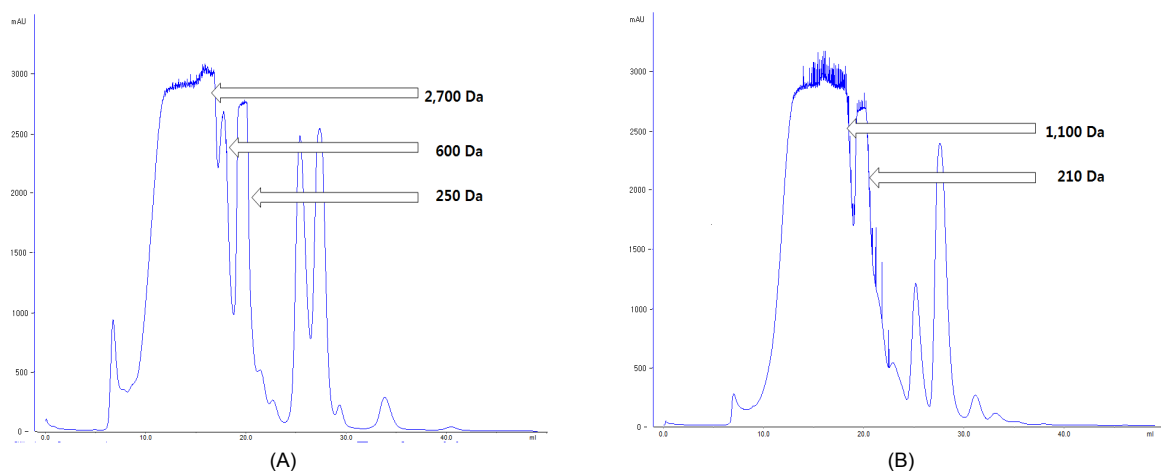
오징어 간으로 가수분해한 은연어 육 가수분해물은 다량 원소로서 K와 P의 함량이 높고, 미량원소로서 Mg의 함량이 높은 특색을 보였다(Table 6). 가열 처리 가수분해물의 총 무기질 함량과 다량 원소의 함량이 산 처리 가수분해물에 비하여 다소 높았으나, Na는 산 처리 가수분해물이 2.2배 높았다. 이 같은 결과는 산 처리 공정에서 pH 전이를 위해 첨가한 HCl과 NaOH 용액의 중화 반응으로 생성된 NaCl에 기인한 것으로 보인다. 오징어 간에 다량 분포하는 것으로 알려진 Cd는 가열 처리 가수분해물에서는 검출되지 않았으나, 산 처리 가수분해물에서는 26±5 ppm이 검출되었다. 오징어

어 간의 Cd 함량은 성숙 정도에 따라 차이가 있으나 미성숙 및 성숙한 오징어 간의 Cd 함량은 건조중량으로 각각 37.8~169.3 ppm과 11.8~30.0 ppm의 범위라고 보고하였다(17). 한편 새우 비가식부와 부산물 젖산균 가수분해물의 Cd와 Pb 함량은 0.01 ppm 미만으로 오징어 간과 많은 차이를 보인다(3). 이 같은 보고에 미루어 오징어 간의 Cd 함량이 극히 높은 것은 서식 환경에 따른 특성인 것으로 추정된다. 오징어 간을 식품첨가물로 이용하기 위해서 Cd 함량의 허용 기준값인 2 ppm 이하로 낮출 필요가 있기 때문에 오징어 간을 이용한 가수분해물 제조 공정에서는 기질인 육의 가열 전처리 공정이 적절한 것으로 판단하였다.

### 분자량의 분포

오징어 간으로 가수분해한 은연어 육 가수분해물의 분자량 분포는 Fig. 3과 같다. 가열 처리한 가수분해물은 1,000~9,500 Da의 분자량이 전체의 약 40.0%를 차지하여 가장 높은 비율을 점하고 있었으며, 500 Da은 6.7%, 200~250 Da는 12.6%, 그 이외의 34.8%이었다. 한편 산 처리 가수분해물은 450~5,600 Da의 분자량이 전체의 약 40.9%, 200~300 Da은 16.8%, 그 외 분자량 비율이 42.3%를 점하고 있었다. 가열 처리 가수분해물이 산 처리한 가수분해물에 비해 고분자량 비율이 높은 것에 비추어 산 처리가 저분자 물질의 생성에 기여하고 있음을 확인할 수 있었다.

상업용 효소인 Alcalase를 이용한 은연어 육 가수분해물의 분자량 분포는 1,100~4,600 Da이 5.4%, 460~1,100 Da이 38.1%, 460 Da 이하가 44.2%였으며(35), 저분자량의 펩티드 생성은 단백질 가수분해 시 먼저 중간 정도 크기의 분자량을 가지는 peptide가 생성되고 이들이 가수분해가 진행됨에 따라 더욱 저분자의 peptide가 되는 zipper mechanism에 기인한다고 보고하였다(36).



**Fig. 3.** Molecular weight distribution of coho salmon hydrolysate using squid liver by Superdex peptide HR column (1.0×30 cm). The hydrolysate were eluted with 20 mM tris-HCl (pH 7.5) containing 0.1 N NaCl. Peptides was detected in 226 nm. (A) thermal treated hydrolysate, (B) acidic treated hydrolysate.

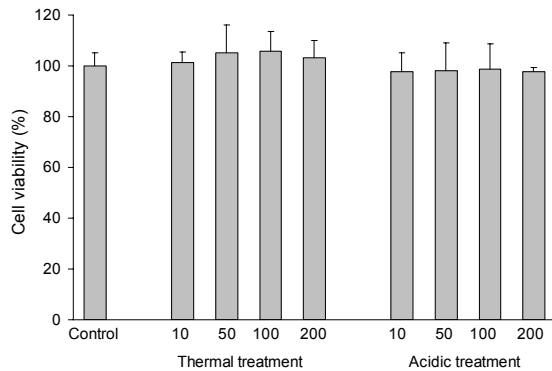


Fig. 4. Cell viability of coho salmon hydrolysate using squid liver against HepG2 cell after incubation for 24 hr.

### 가수분해물의 세포독성

24시간 동안 HepG2 cell에 대하여 오징어 간을 이용한 은연어 육 가수분해물을 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL의 농도로 처리하여 세포 독성을 확인하였다 (Fig. 4). 가수분해물을 처리하지 않은 대조구와 비교하였을 때 가열 처리 및 산 처리 가수분해물은 모든 농도 구간에서 독성을 보이지 않았다. 굴 효소 가수분해물(37)과 파래 효소 가수분해물(38)도 HepG2 cell에 대하여 세포 독성을 보이지 않는다는 보고에 비추어 오징어 간에 의한 세포독성은 나타내지 않는 것으로 추정된다. 이 같은 결과에 비추어 은연어 육 가열 처리 가수분해물은 식품 첨가물로서 잠재적 가치를 지닐 것으로 보인다.

### 요 약

본 연구는 오징어 간에 분포하는 효소를 활용한 은연어 육 가수분해물 제조의 최적 조건과 생성된 가수분해물의 식품 및 생물 활성 특성을 조사하였다. 가열 처리한 은연어 육 가수분해물 제조의 최적 조건은 가수분해 온도 55°C, pH 5.5, 오징어 간의 첨가 비율 0.67%이었다. 총 구성 아미노산 함량은 가열 및 산 처리 가수분해물에서 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 총 유리 아미노산 함량은 조성은 산 처리 가수분해물이 높았다. 한편 무기질 함량은 가열 처리 가수분해물이 높았다. Cd의 허용 기준을 고려할 때 가수분해물 제조 시 전처리 공정은 가열이 적합한 것으로 나타났다. 가열 처리한 가수분해물의 분자량은 1,000~9,500 Da이 40.0%, 500 Da이 6.7%, 200~250 Da은 12.6%, 그 이외 분자량 물질이 34.8%인 반면, 산 처리 가수분해물은 450~5,600 Da이 40.9%, 200~300 Da이 16.8%, 그 이외의 분자량이 42.3%에 해당하였다. 가수분해물은 200 µg/mL의 농도에서 HepG2 세포에 대한 독성은 관측되지 않았다. 가수분해물의 잠재적인 적용 분야를 확인하기 위해 식품 및 건강 기능성에 대한 연구를 진행하고 있는 중이다.

### 감사의 글

이 논문은 2009년 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2009-013-F00009).

### REFERENCES

- 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. *Innovative Food Sci Emerging Technol* 5: 73-79.
- Gbogouri GA, Linder M, Fanni J, Parmentier M. 2004. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. *J Food Sci* 69: C615-C622.
- Bueno-Solano C, Lopez-Cervantes J, Campas-Baypoli ON, Lauterio-Garcia R, Adan-Bante NP, Sanchez-Machado DI. 2009. Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. *Food Chem* 112: 671-675.
- Fahmi A, Morimura S, Guo HC, Shigematsu T, Kida K, Uemura Y. 2004. Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales. *Process Biochem* 39: 1195-1200.
- Bougatef A, Nedjar-Arroume N, Ravallec-Ple R, Leroy Y, Guillochon D, Barkia A, Nasri M. 2008. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinella (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases. *Food Chem* 111: 350-356.
- Gimenez B, Aleman A, Montero P, Gomez-Guillen MC. 2009. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chem* 114: 976-983.
- 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.
- Jun SY, Park PJ, Jung WK, Kim SK. 2004. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *Eur Food Res Technol* 219: 20-26.
- Cudennec B, Ravallec-Ple R, Courois E, Fouchereau-Peron M. 2008. Peptides from fish and crustacean by-products hydrolysates stimulate cholecystokinin release in STC-1 cells. *Food Chem* 111: 970-975.
- 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.
- Cardenas-Lopez JL, Haard NF. 2005. Cysteine proteinase activity in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) hepatopancreas extracts. *J Food Biochem* 29: 171-186.
- 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.
- 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.
- Yamashita M, Konagaya S. 1990. High activities of cathepsins B, D, H and L in the white muscle of chum salmon

- in spawning migration. *Comp Biochem Physiol Part B: Comp Biochem* 95: 149-152.
15. 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.
  16. Hayashi M, Okumura J, Ichishima E. 1996. Enzymatic production of f 5'-deoxyribonucleotides from salmon milt. *Food Res Int* 29: 751-755.
  17. 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.
  18. Carton I, Bocker U, Ofstad R, Sorheim O, Kohler A. 2009. Monitoring secondary structural changes in salted and smoked salmon muscle myofiber proteins by FT-IR microspectroscopy. *J Agric Food Chem* 57: 3563-3570.
  19. AOAC. 1990. *Official method of analysis of AOAC Intl.* 15th ed. Association of Official Analytical Communities, Arlington, VA, USA. Method 900.02A, 955.04, 950.46, 968.08.
  20. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
  21. Spies JR. 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.
  22. Pyeun JH, Choi YJ, Kim JH, Cho KO. 1984. Postmortem changes of the protein and amino acid composition of muscles in the partially frozen prawn, *Pandalus japonica*. *Bull Korean Fish Soc* 17: 280-290.
  23. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr Lewis A, Randall RJ. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 256-275.
  24. 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.
  25. Suyama M, Kounosu S, Hamabe M, Okuda Y. 1980. *Utilization of squid*. Kouseisha kouseikaku, Tokyo, Japan. p 81-89.
  26. Konno K, Yamamoto T, Takahashi M, Kato S. 2000. Early structural changes in myosin rod upon heating of carp myofibrils. *J Agric Food Chem* 48: 4905-4909.
  27. Cui C, Zhou X, Zhao M, Yang B. 2009. Effect of thermal treatment on the enzymatic hydrolysis of chicken proteins. *Innovative Food Sci Emerging Technol* 10: 37-41.
  28. Choi YJ, Park JW. 2002. Acid-aided protein recovery from enzyme-rich Pacific whiting. *J Food Sci* 67: 2962-2969.
  29. Kim YS, Park JW, Choi YJ. 2003. New approaches for the effective recovery of fish proteins and their physicochemical characteristics. *Fish Sci* 69: 1231-1239.
  30. Chen YN. 2010. Study on the enzymatic properties of proteases squid liver and production of digestive peptides. *PhD Dissertation*. Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hokkaido, Japan.
  31. 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.
  32. 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.
  33. Konosu S, Yamaguchi K, Fuke S, Shirai T. 1983. Amino acids and related compounds in the extracts of different parts of the muscle of chum salmon. *Bull Jap Soc Sci Fish* 49: 301-304.
  34. Hata M, Sato Y, Yamaguchi T, Ito M, Kuno Y. 1988. The chemical and amino acid compositions in tissues of cultured and wild coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Bull Jap Soc Sci Fish* 54: 1365-1370.
  35. Liaset B, Lied E, Espe M. 2000. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterisation and nutritional evaluation. *J Sci Food Agric* 80: 581-589.
  36. Adler-Nissen J. 1976. Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *J Agric Food Chem* 24: 1090-1093.
  37. Park HJ, Do HJ, Kim OJ, Kim A, Ha JM. 2012. Hepatoprotective effects of various enzyme hydrolysates from oysters on tacrine-induced toxicity in human hepatoma cells. *J Life Sci* 22: 117-125.
  38. Kim BY. 2009. Food components of green algae and preparation of bse for the development of natural condiment. *MS Thesis*. Gyeongsang National University, Jinju, Korea.