

살 오징어(*Todarodes pacificus*) 간췌장으로부터 aminopeptidase 활성획분의 쓴맛 개선 효과

김진수 · 김혜숙 · 이현지¹ · 박성환¹ · 김기현 · 강상인 · 허민수^{1,*}
경상대학교 해양식품공학과 · 해양산업연구소, ¹경상대학교 식품영양학과 · 해양산업연구소

Lowering the Bitterness of Enzymatic Hydrolysate Using Aminopeptidase-active Fractions from the Common Squid (*Todarodes pacificus*) Hepatopancreas

Jin-Soo Kim, Hye-Suk Kim, Hyun Ji Lee¹, Sung Hwan Park¹, Ki Hyun Kim,
Sang In Kang, and Min Soo Heu^{1,*}

Department of Seafood Science & Technology · Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University

¹Department of Food & Nutrition · Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University

Abstract Aminopeptidase-active fractions from crude extract of the hepatopancreas of a common squid (*Todarodes pacificus*) were obtained using acetone (AC; 30-40%) and ammonium sulfate precipitation (AS; 60-70% saturation), anion exchange (AE-II; 0.2 M NaCl) and gel filtration chromatography (GF-I; 30-50 kDa), respectively. The debittering capacity of GF-I fraction based on the aminopeptidase activity (89.2 U/mg), recovery (56.6%) and sensory evaluation (1.0) was better than that of other fractions. Release of amino acids increased as incubation time was increased, and the bitterness of the enzyme reaction mixtures decreased. Incubation with the GF-I fraction for 24 h resulted in the hydrolysis of several peptides, as revealed by reverse-phase HPLC profiles. Peaks 3, 5 and 6 showed the decreased area (%), whereas peaks 1, 2 and 4 showed the increased area. The GF-I fractions were found to be suitable for reducing bitterness in protein hydrolysates by catalyzing the hydrolysis of bitter peptides.

Keywords: common squid, hepatopancreas, aminopeptidase, debittering, fractionation

서 론

오징어는 두족강(Cephalopoda), 십완목(Decapod)에 속하는 연체동물의 총칭으로, 세계 전 해역에 약 450여 종이 분포하고 있고, 북태평양에 90여 종이, 우리나라의 전 해역에는 10여 종이 분포하고 있어 세계 각지에 널리 분포하고 있는 것으로 알려져 있다(1).

이러한 오징어는 타우린 및 콜라겐 등과 같은 건강 기능성 성분이 풍부하고, 다량의 아미노산, 인, 비타민 B₂ 등과 같은 영양 성분이 풍부하며, 근육 특성상 특유의 조직감과 식미를 가지고 있다(2). 우리나라에서는 횃갑이나 생체로 조리하여 이용하거나, 건조오징어, 조미오징어, 냉동식품, 젓갈 등과 같이 다양한 형태로 가공하여 이용되어 왔다. 수산가공품의 원료로 이용되고 있는 오징어의 주요 어종으로는 국내산의 경우 우리나라 전 해역에서 어획되고 있는 살 오징어(common squid, *Todarodes pacificus*)가 주류를 이루고 있고, 수입산의 경우 북태평양과 일본 등에서 생

산 공급되는 빨강 오징어(neon flying squid, *Ommastrephes bartramii*), 페루 근해에서 생산 공급되는 아르헨티나 대왕오징어(jumbo flying squid, *Dosidicus gigas*), 뉴질랜드 어장에서 생산 공급되는 웰링턴 오징어(Wellington flying squid, *Nototodarus sloani*) 및 남대서양의 포틀랜드 어장에서 어획 공급되는 아르헨티나 짧은 지느러미 오징어(Argentine shortfin squid, *Illes argentinus*) 등이다(3). 그리고, 오징어는 우리의 식미에 맞게 가공 및 조리하는 경우에 반드시 내장, 껍질, 자숙수, 먹물 등과 같은 부산물이 다량 발생하고 있다. 이와 같은 연체류 가공 부산물 중 내장에는 다양한 효소(4-7)가 존재하고 있으며, 소화효소인 endoprotease가 대부분을 차지하는 다른 수산동물의 내장(8)과는 달리 exopeptidase가 다량 함유되어 있다(9,10). 이러한 일면에서, 본 연구자들은 원양산 오징어(Argentine shortfin squid, *I. argentinus*) 내장으로부터 endoprotease(11)와 exopeptidase(12)를, 갑오징어 간췌장(13)으로부터 추출 최적조건과 다양한 단백질 분획방법을 적용하여 각 획분의 분해특성에 대하여 보고한 바 있다. 단백질 분해효소는 단백질의 펩타이드 결합을 분해하는 가수분해효소(EC 3.4. peptide hydrolase)로서 전체 효소 산업의 약 60%로 대부분을 차지하고 있으며(14), 식품가공에서 저분자 물질의 생산을 위해 아주 유용하게 사용되고 있다. 하지만, 이들 효소의 대부분은 endoprotease이어서 식품산업에서 응용하는 경우 숙성 및 가수분해 중 쓴맛 펩타이드에 기인한 풍미의 저하로 인하여 제품의 질이 저하되는 단점이 있다(15,16). 따라서 exopeptidase 활성 획분

*Corresponding author: Min Soo Heu, Department of Food and Nutrition, Gyeongsang National University, Jinju, Kyeongnam 660-701, Korea

Tel: 82-55-772-1440

Fax: 82-55-772-1430

E-mail: heu1837@dreamwiz.com

Received July 23, 2014; revised October 7, 2014;

accepted October 14, 2014

의 특성 및 단백질 가수분해물의 쓴맛 개선을 위한 적용 조건에 대하여 구명하는 경우, 오징어 내장 유래 exopeptidase의 산업적 응용이 가능하리라 판단된다. Exopeptidase인 aminopeptidase를 산업적으로 이용하려는 시도로 단백질 가수분해물의 쓴맛 개선에 관한(17-22) 연구가 진행되었다. 본 연구에서는 살 오징어(*T. pacificus*)의 가공부산물인 간체장의 효소자원으로서의 이용을 위하여, 쓴맛 개선능이 우수한 endoprotease와 aminopeptidase 획분들을 단백질 성질을 이용한 다양한 분획방법들로 분획한 다음, 이의 산업적 응용을 위하여 쓴맛개선을 위한 적용 조건에 대하여 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

우리나라 전 해역에서 어획되고 있는 살 오징어(*T. pacificus*, length: 53.7±6.8 cm, weight: 411.5±28.5 g)로부터 분리한 간체장(length: 18.5±4.5 cm, weight: 86.8±5.8 g)은 부산광역시 서구 소재의 S수산에서 동결상태로 분양받아 냉동상태(-70°C)로 보관하여 두고 조효소 추출 및 분획시료로서 실험에 사용하였다.

시약 및 완충액

효소활성 측정을 위한 기질은 endoprotease의 기질로서 azocasein과 aminopeptidase의 기질로서 L-leucine-*p*-nitroanilide (LeuPNA), 쓴맛 가수분해물 제조를 위한 trypsin 및 casein, 그리고 쓴맛 표준물질로서 glycyphenylalanine (Gly-phe)는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA) 제품을 구입하여 사용하였고, 기타 시약은 분석급으로 구입하여 사용하였다.

본 실험에서 사용한 모든 완충액은 Dawson 등(23)의 방법에 따라 조제하여 사용하였다.

간체장 crude extract (CE)의 조제 및 단백질 농도

살 오징어(*T. pacificus*)의 간체장으로부터 crude extract (CE)의 추출은 Kim 등(9)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 냉동상태의 간체장을 부분해동 및 마쇄한 다음, 100 g에 대하여 3배(v/w)의 탈이온수를 가하여 6시간 동안 교반(20°C)하면서 추출하였고, 이어서 0.2배량의 에틸에테르를 사용하여 분액여두를 통해 3회 반복하여 탈지한 다음, 원심분리(Supra 22K, Hanil Science Co., Daejeon, Korea; 12,000×g, 20 min)하여 탈지 CE를 조제하였다.

단백질 농도는 Lowry 등(24)의 비색법에 따라 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 구한 검량곡선으로부터 측정하였다.

간체장 CE로부터 endoprotease 및 aminopeptidase의 분획

살 오징어 간체장 100 mL의 CE로부터 endoprotease의 분획은 Kim 등(11)의 방법, 그리고 aminopeptidase의 분획은 Kim 등(12)의 방법에 따라 분획하였다. 즉, 단백질의 용해도 차이에 의한 분획법으로 아세톤(acetone, AC) 및 황산암모늄(ammonium sulfate, AS), 단백질의 하전차이에 따른 분획법으로 음이온 교환 크로마토그래피(anion exchange chromatography, AE) 및 단백질 분자량 차이에 따른 분획법으로 겔 여과 크로마토그래피(gel filtration chromatography, GF)를 각각 이용하여 분획한 endoprotease 활성 획분은 각각 AC 0-30%, AS 70-80% 포화농도, AE-UF (unabsorbed fraction, 비흡착 획분) 및 GF-II 획분(15-24 kDa)으로 선정하였고, aminopeptidase 활성 획분은 AC 40-50%, AS 60-70% 포화농도, AE 0.2 M NaCl 및 GF-I 획분(30-50 kDa)으로 선정하여 사용하였다.

효소 활성

Endoprotease의 활성은 Kim 등(11)의 방법에 따라 azocasein 기질을 사용하여 측정하였다. 즉, 10-20 μL의 조효소와 2 mL의 1% azocasein 기질이 용해되어 있는 0.1 M sodium phosphate 완충액(pH 6.0)을 혼합, 반응(50°C, 1 h)시키고, 이 반응액에 동량(2 mL)의 5% trichloroacetic acid (TCA) 용액을 가하여 실험 시킨 후, 정치(30 min) 및 원심분리(1,460×g, 20 min)한 다음 흡광도를 측정(410 nm)하여 검토했다.

Aminopeptidase의 활성은 LeuPNA를 기질로 사용하여 Kim 등(12)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 10-20 μL의 효소 용액과 1 mL의 0.2 mM 기질이 용해되어 있는 0.1 M sodium phosphate 완충액(pH 7.5)을 혼합 및 반응(50°C, 1 h) 시킨 다음, 반응혼합액에 0.3 mL의 33% acetic acid를 가하여 실험 시킨 후 정치(30 min) 및 원심분리(1,460×g, 20 min)한 다음, 흡광도를 측정(410 nm)하여 검토했다.

이들 endoprotease와 aminopeptidase의 활성은 1 mg의 효소(단백질)가 1시간 동안 변화시키는 흡광도 0.1을 1 U/mg으로 나타내었다. 또한, 활성 획분 처리 쓴맛 tryptic casein 가수분해물에 대한 효소농도 및 반응시간별 효소활성 변화는 파장 280 nm에서의 흡광도를 측정하여 나타내었다.

Trypsin 처리 쓴맛 casein hydrolysate (CH)의 제조

Trypsin 처리 casein hydrolysate (CH)은 가수분해정도에 따라 쓴맛이 강한 것으로 알려져 있어(25-28), 쓴맛의 강도가 2% Gly-phe과 유사한 trypsin 처리 CH를 제조하여 쓴맛 개선 효과를 검토하기 위한 기질로 사용하고자 하였다. Trypsin을 사용한 쓴맛 CH의 제조는 Nishiwaki 등(19)의 방법을 다소 수정한 Kim 등(17)의 방법에 따라 제조하였다. 즉, 0.2% (w/v) trypsin과 2% (w/v) casein용액(0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.5)을 1/6,000(단백질 함량 기준)의 비율로 효소반응 혼합액을 조제하고, 50°C에서 일정시간(1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 및 24 h) 동안 반응시켰다. 이후 효소의 실험(100°C, 20 min), 냉각 및 원심분리(1,460×g, 20 min)하여 각각 반응시간 별 쓴맛 CH를 제조하였다.

이들 쓴맛 CH는 쓴맛 표준용액(0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 및 2.0% Gly-phe)의 농도차이를 인지하는 7인의 쓴맛평가 요원(해양식품공학 및 식품영양학 전공 대학원생)을 선발하여, 이들 trypsin 처리 쓴맛 CH에 대해 쓴맛 평가를 실시한 결과, 2% Gly-phe에 준하는 쓴맛 CH(쓴맛평가요원 7인 중 6인 이상이 유사하다고 인지한 가수분해물)는 상기 반응조건에서 8시간 가수분해하였을 때이었다. 이를 토대로 살 오징어의 간체장 CE로부터 여러 가지 분획방법으로 분획한 획분들의 쓴맛 개선 효과를 검토하기 위하여 기질로 사용한 trypsin 처리 쓴맛 CH는 효소(trypsin)와 기질(2% casein)의 비를 1/6,000으로 하고 50°C에서 8시간 반응시켜 조제하여 사용하였다.

Aminopeptidase 활성 획분 처리 쓴맛 개선 CH의 제조

분획방법별로 분획한 endoprotease와 aminopeptidase 활성 획분 처리 쓴맛 개선 가수분해물은 전체 반응액의 부피를 50 mL로 하여, 각 활성 획분과 쓴맛 CH (pH 7.5)를 1/2,000, 1/1,000 및 1/500 (단백질 함량기준 효소와 기질비)의 농도비율로 혼합하고, 50°C에서 0, 8, 16 및 24 시간동안 각각 반응시킨 다음, 실험(100°C, 20 min), 냉각 및 원심분리(1,460×g, 20 min)하여 제조하였다. 이들 쓴맛 개선 CH는 활성 획분들의 효소활성, 관능검사 및 high performance liquid chromatography (HPLC) 분석을 위한 시료로 사용하였다.

쓴맛 개선 가수분해물의 쓴맛 평가 및 효소활성

Aminopeptidase 활성 획분 처리 쓴맛 개선 CH의 관능검사에 의한 쓴맛 개선의 정도는 앞서 서술한 쓴맛 평가 요원을 대상으로 1% Gly-phe 용액의 쓴맛을 기준점으로 하여 이보다 강하다(또는 약하다)고 느끼는 쓴맛 평가 요원의 인원수로 나타내는 방법과, 1% Gly-phe 용액의 쓴맛을 기준점(3점)으로 하고, 활성 획분 처리 가수분해물의 쓴맛이 이보다 약할수록 1-2점으로, 이보다 강할수록 4-5점으로 하는 5점 평점법으로 실시하여 평가하였다. 쓴맛 CH에 대한 활성 획분의 반응시간(0, 8, 16, 및 24 h)별 효소활성은 UV spectrophotometer (UV 2200, Hitachi Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 파장 280 nm에서 흡광도를 측정하여 나타내었다.

쓴맛 개선 가수분해물의 HPLC 분석

쓴맛 개선능이 가장 뛰어난 것으로 확인된 aminopeptidase 활성 GF-I 획분에 대하여는 GF-I 획분의 가수분해 시간별(8-24시간) 그리고 기질비(500, 1,000 및 2,000)에 따른 쓴맛 개선 CH를 앞서 언급한 방법에 따라 제조하였다. 이어서 쓴맛 개선 가수분해물의 HPLC의 분석은 Kim 등(17)의 분석조건에 따라 실행하였다. 즉, 5C₁₈-AR column (i.d. 4.6×250 mm, 5 μm, Waters Co., Milford, MA, USA)이 장착된 HPLC (L-2000, Hitachi Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 이동상을 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA)가 함유된 acetonitrile 용액으로 하고, linear gradient (0-45% 범위)로 실시하였으며, 이 때 유속을 0.7 mL/min, 용출시간을 60 min, UV 검출기(L-2400, Hitachi Co., Tokyo, Japan)의 파장을 214 nm로 하였다. HPLC 분석에 따른 쓴맛 개선의 정도는 가수분해시간과 효소/기질비에 따른 HPLC chromatogram상의 전체 펩타이드 분포 변화와 그 변화가 두드러진 피크의 변화정도(area %)로 검토하였다.

통계분석

데이터의 통계처리는 SPSS 통계 프로그램(Version 12.0K, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 분산분석한 후, Duncan의 다중위 검정으로 5% 유의수준에서 실시하였다.

결과 및 고찰

Endoprotease 및 aminopeptidase 활성 획분의 분획특성

살 오징어(*T. pacificus*)의 간췌장 CE로부터 단백질의 용해도차이에 따른 아세톤과 황산암모늄 분획, 하전(net charge)차이에 따른 음이온 교환 크로마토그래피와 분자량크기에 따른 겔 여과 크로마토그래피로 분획한 endoprotease와 aminopeptidase 활성 획분을 대상으로 이들의 azocasein 및 LeuPNA에 대한 specific activity와 recovery (회수율)에 따른 분획특성을 살펴 본 결과는 Table 1과 같다. 단백질 기질인 azocasein에 대한 endoprotease 활성 획분의 specific activity 및 회수율(%)은 CE (1.8 U/mg 및 100%)에 대하여 AC 0-30% 획분의 경우 각각 32.1 U/mg 및 29.5%, AS 70-80% 포화획분의 경우 각각 15.0 U/mg 및 25.8%, AE-UF의 경우 각각 41.4 U/mg 및 28.5%, 그리고, GF-II 획분의 경우 각각 24.4 U/mg 및 42.0%이었다. 또한 이들 endoprotease 활성 획분들의 aminopeptidase 기질로서 LeuPNA에 대한 specific activity 및 회수율은 CE (7.7 U/mg 및 100%)에 대하여 AE-UF 획분이 각각 60.5 U/mg 및 9.9%로 가장 높은 활성을 나타내었으나, 회수율은 AS 70-80% 포화획분(15.7%)이 가장 높았다. 이와 같은 결과로부터 살 오징어 간췌장 CE로부터 endoprotease를 분획 및 정제 소재로 활용하고자 하는 경우 음이온 교환 크로마토그래피의 비흡착 획분(AE-UF)을 이용하는 것이 가장 적절하리라 판단되었다.

한편, aminopeptidase 활성 획분들의 azocasein에 대한 specific activity 및 회수율은 CE에 대하여 specific activity는 AE-II (20.2 U/mg)이, 그리고 회수율은 AC 40-50% 획분(28.5%)이 가장 높은 것으로 나타났으며, 다음으로는 GF-I 획분이 27.9%의 회수율을 나타내었다. 반면에 LeuPNA에 대한 specific activity 및 회수율은 AC 40-50% 획분이 각각 29.5 U/mg 및 20.0%, AS 60-70% 포화획분의 경우 각각 66.4 U/mg 및 24.5%, AE-II 획분은 각각 102.6 U/mg 및 16.6%, 그리고 GF-I의 경우 각각 89.2 U/mg 및 56.6%이었다. 연체류 간췌장 CE로부터 적절히 분획하여 그 획분 자체를 이용하고자 하는 경우, specific activity (U/mg)가 고려된 회수율(%)이 높은 획분을 이용하는 것이 적절하리라 판단되었다(10-

Table 1. Endoprotease and aminopeptidase activities of active fractions obtained from the *T. pacificus* hepatopancreas crude extract by different fractionation methods

Active fractions ¹⁾	Total volume (mL)	Protein (mg/mL)	Azocasein		LeuPNA	
			Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)
0.2% Trypsin ²⁾	-	0.4	928.0	-	7.9	-
CE	100.0	23.4	1.8	100	7.7	100
Endoprotease						
AC 0-30%	29.6	1.3	32.1	29.5	17.4	3.8
AS 70-80%	6.0	12.2	15.0	25.8	38.7	15.7
AE-UF	16.8	1.7	41.4	28.5	60.5	9.9
GF-II	30.0	2.4	24.4	42.0	9.8	4.0
Aminopeptidase						
AC 40-50%	19.2	6.2	10.1	28.5	29.5	20.0
AS 60-70%	4.2	16.0	11.8	18.5	66.4	24.5
AE-II	17.2	1.7	20.2	13.9	102.6	16.6
GF-I	45.0	2.5	10.4	27.9	89.2	56.6

¹⁾CE, crude extract; acetone fractionation, AC 0-30% (v/v) fraction and AC 40-50% (v/v) fraction; ammonium sulfate fractionation, AS 70-80% and AS 60-70% saturated fraction; anion exchange chromatography, AE-UF, unabsorbed fraction and AE-II, 0.2 M NaCl fraction; gel filtration chromatography, GF-I, 30-50 kDa fraction and GF-II, 15-24 kDa fraction

²⁾Trypsin (EC 3.4.21.4, 1,300 BAEE units/mg solid) from porcine pancreas

Table 2. Bitterness evaluation of tryptic casein hydrolysates treated with active fractions obtained from the *T. pacificus* hepatopancreas crude extract by different fractionation methods for hydrolysis time

Active fractions ¹⁾	Hydrolysis time (h)			
	0	8	16	24
CE	5.0±0.0 ^a	5.0±0.3 ^a	4.9±0.3 ^a	4.8±0.4 ^a
Endoprotease				
AC 0-30%	5.0±0.0 ^a	4.5±0.5 ^b	4.3±0.5 ^{bc}	4.0±0.5 ^c
AS 70-80%	5.0±0.0 ^a	4.5±0.5 ^b	4.1±0.3 ^c	3.7±0.5 ^d
AE-UF	5.0±0.0 ^a	4.9±0.3 ^a	4.5±0.5 ^b	3.9±0.3 ^c
GF-II	5.0±0.0 ^a	4.7±0.5 ^{ab}	4.6±0.5 ^{ab}	4.4±0.7 ^b
Aminopeptidase				
AC 40-50%	5.0±0.0 ^a	4.4±0.5 ^b	3.7±0.5 ^c	3.3±0.5 ^d
AS 60-70%	5.0±0.0 ^a	3.6±0.5 ^b	2.6±0.5 ^c	1.9±0.3 ^d
AE-II	5.0±0.0 ^a	3.9±0.3 ^b	3.4±0.5 ^c	2.2±0.4 ^d
GF-I	5.0±0.0 ^a	2.2±0.4 ^b	1.3±0.5 ^c	1.0±0.0 ^d

¹⁾Fractions are the same as explained in footnote of Table 1. The score on bitterness of 1% Gly-phe, 3; stronger bitter taste, 4-5; weaker bitter taste, 1-2. Different letters of the same row indicate a significant difference at $p < 0.05$.

13). 이상의 결과와 보고로부터 살 오징어 간체장 CE로부터 aminopeptidase를 분획하여 쓴맛 개선제와 같이 이용하고자 하는 경우, 겔 여과법에 의하여 30-50 kDa이 주로 함유되어 있는 획분(GF-I)을 분획하는 것이 가장 적절하리라 판단되었고, aminopeptidase계 효소를 정제하기 위하여 음이온 교환 크로마토그래피에 흡착된 시료를 0.2 M NaCl로 분획한 specific activity가 높은 획분(AE-II, 102.6 U/mg)을 이용하는 것이 적절하리라 판단되었다.

쓴맛 casein hydrolysates (CH)에 대한 활성 획분의 쓴맛 개선

2% Gly-phe의 쓴맛에 준하도록 제조한 trypsin 처리 쓴맛 CH를 기질로 하여 여러 가지 분획방법(Table 1)에 따라 분획한 endoprotease와 aminopeptidase 활성 획분(효소)을 처리한 가수분해물의 쓴맛 개선 정도에 대한 평가는 Table 2와 같다. Endoprotease 활성 획분 처리 CH의 쓴맛 개선 효과는 AC 0-30% 및 AS 70-80% 포화획분이 반응 8시간 이후부터 AE-UF 획분은 16시간 이후, GF-II 획분은 24시간에 이르러서야 쓴맛의 감소가 인지되었다(3.7-4.5점). 따라서 쓴맛 CH에 대한 endoprotease 활성 획분의 쓴맛의 유의적인 개선효과는 인지되었으나($p < 0.05$), 이는 쓴맛 강도가 1% Gly-phe(3점)보다 강한 쓴맛으로 인지되어, 이들 효소 획분은 쓴맛 개선제로서의 산업적으로 이용하기에는 적절하지 못할 것으로 판단되었다. 한편, aminopeptidase 활성 획분에 의한 쓴맛 개선 효과는 AS 60-70% 포화획분은 16시간(2.6점) 이후부터, AE-II 획분은 반응 24시간(2.2점)에, 그리고 GF-I 획분은 반응 8시간만(2.2점)에 유의적인 쓴맛 개선 효과를 나타내었다($p < 0.05$). 그러나 AC 40-50% 획분(4.4-3.3점)은 전체 반응시간에 있어 1% Gly-phe (3점)보다 높은 쓴맛 평가를 받아 개선효과를 보이지 않았다. 따라서 aminopeptidase 활성 획분이 endoprotease 활성 획분들에 비하여 쓴맛 CH에 대한 쓴맛 개선 효과가 뚜렷한 유의적인 차이를 나타냄으로서, 산업적 응용이 가능성이 상대적으로 높을 것으로 판단되었다. 이상의 결과로 미루어 보아 살 오징어 간체장 CE로부터 분획한 endoprotease 및 aminopeptidase 활성 획분들 중 쓴맛 개선 효과가 가장 우수한 획분은 겔 여과법의 GF-I 획분(30-50 kDa)이었다.

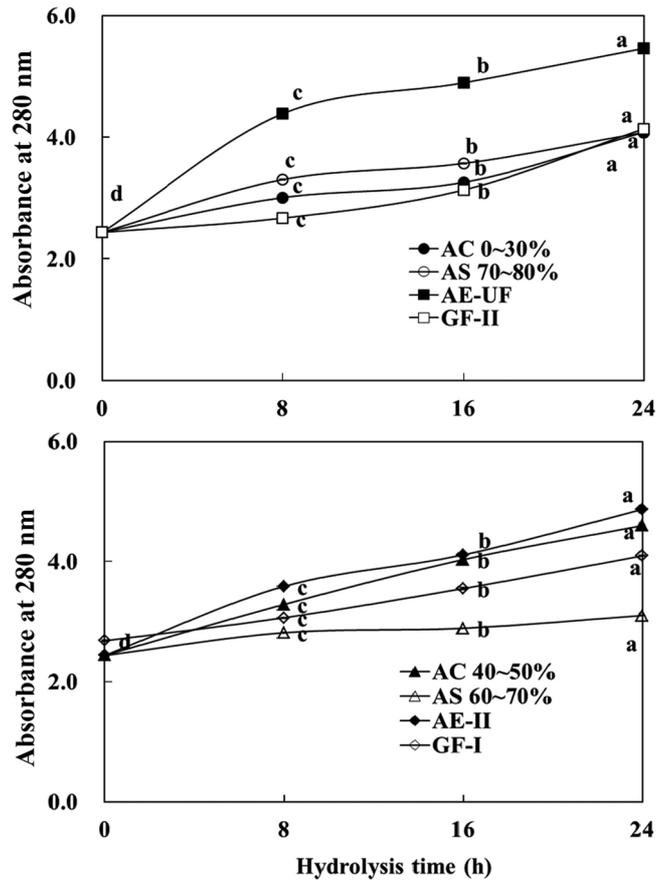


Fig. 1. Hydrolysis of tryptic casein hydrolysates treated with endoprotease (up) and aminopeptidase (bottom) active fractions from the *T. pacificus* hepatopancreas crude extract. Different letters on the same symbol indicate a significant difference at $p < 0.05$.

Aminopeptidase의 단백질 가수분해물에 대한 쓴맛 개선 효과에 관한 연구로는 Raksakulthai 등(29)은 오징어(*I. illecebrosus*)의 aminopeptidase 획분(Squid AP)과 상용효소를 사용하여 속성 cheddar cheese 제조 시 적용한 결과 향미 개선 효과는 인정되었으나, 쓴맛 개선 효과는 없었다고 한 반면, Kim 등(17)은 원양산 오징어(*I. argentinus*) 간체장의 분획방법별 exopeptidase 활성 획분이 쓴맛 casein 가수분해물에 대한 쓴맛 개선 효과와 분획 방법 중 겔 여과법에 의한 획분이 개선효과가 뛰어나다고 보고하였다. Izawa 등(21)은 *Aeromonas caviae* 유래 aminopeptidase를, Nishiwaki 등(19)은 흰 잎새 버섯(*Grifola frondosa*) 유래 aminopeptidase를 각각 쓴맛 casein 가수분해물에, Liu와 Yasuda(15)는 *Monascus carboxypeptidase*를 쓴맛 soybean 가수분해물에 적용한 결과 쓴맛 개선 효과가 인정되었다고 보고한 바 있다. 이상의 결과와 연구보고로부터, aminopeptidase 활성 획분은 쓴맛 단백질(casein 및 soybean) 가수분해물에 대하여 관능평가에 따른 쓴맛 개선 효과가 있는 것으로 판단하였다.

쓴맛 CH에 대한 활성 획분들의 분해활성

쓴맛 CH에 대한 endoprotease와 aminopeptidase 활성 획분들의 가수분해시간 별 효소활성을 측정하여 Fig. 1에 나타내었다. Endoprotease 활성 획분의 분해활성은 반응 0시간에서는 분획방법에 관계없이 모두 2.44로 차이가 없었으나, 반응 8-24시간에 걸쳐 AC 0-30% 획분은 3.00-4.08범위의 활성변화를 나타내었으며,

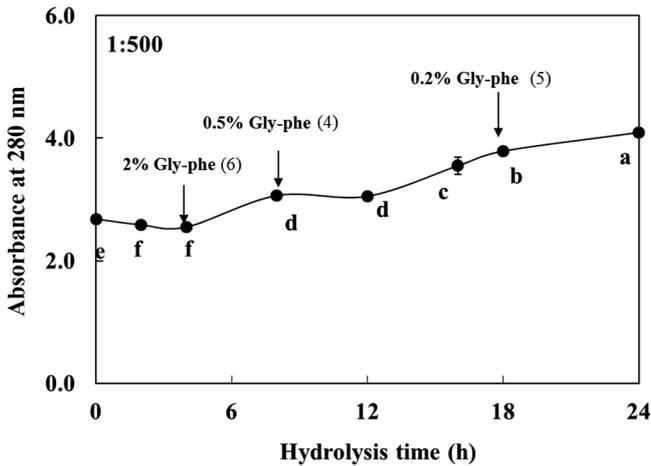


Fig. 2. Hydrolysis pattern and bitterness of tryptic casein hydrolysates incubated with GF-I fraction from the *T. pacificus* hepatopancreas crude extract during hydrolysis time. Numerical in parentheses represent the number of panel felt similar bitterness to 0.5-2% Gly-phe. Different letters on the symbol indicate a significant difference at $p < 0.05$.

AS 70-80% (4.06-5.13), AE-UF (4.39-5.46), 그리고 GF-II 획분이 2.66-4.13 범위의 분해활성을 나타내었으며, AE-UF 획분의 효소 활성이 가장 강하였다. Endoprotease 활성 획분들의 반응시간이 경과할수록 유의적으로 활성이 증가하는 경향을 나타내었다 ($p < 0.05$). 한편, aminopeptidase 활성 획분들의 효소활성은 반응 8-24시간에서 AE-II 획분이 3.59-4.87범위로 가장 높았으며, AC 40-50% (3.29-4.60), AS 60-70% (2.80-3.10) 및 GF-I 획분은 3.06-4.09 범위의 분해활성을 나타내었다.

이상의 결과에서 쓴맛 CH에 대한 활성 획분들의 분해활성은 aminopeptidase 활성 획분들이 endoprotease 활성 획분들에 비하여 낮은 것으로 나타나 Table 1의 단백질기질인 azocasein에 대한 분해활성 결과와 유사하였으나, 쓴맛 개선 효과(Table 2)에서는 aminopeptidase 활성 획분들이 endoprotease 활성 획분에 비하여 우수한 것으로 나타남으로써 활성 획분들의 가수분해정도가 쓴맛 CH에 대한 쓴맛 개선 효과 간에는 절대적인 상관관계가 없는 것으로 판단되었다.

GF-I 획분의 반응시간에 따른 쓴맛 CH에 대한 가수분해 패턴

쓴맛 개선 효과(Table 2)가 가장 우수한 aminopeptidase 활성 획분은 겔 여과법으로 분획한 GF-I 획분(30-50 kDa범위)이었으며, 이러한 결과를 토대로 GF-I 획분의 쓴맛 CH에 대한 가수분해 시간에 따른 효소활성 변화와 이의 쓴맛 변화정도를 농도별 Gly-phe 쓴맛 표준용액과 비교하여 Fig. 2에 나타내었다. GF-I 획분과의 반응 4시간까지는 2% Gly-phe 용액에 준하는 쓴맛을 나타내었으나, 반응 8시간 이후부터 0.5% Gly-phe 용액에 준하는 쓴맛을 나타내어 쓴맛 개선 효과가 인정되었으며, 반응 18시간 이후에는 미미한 정도의 쓴맛을 지닌 0.2% Gly-phe 용액의 맛에 준하여, 쓴맛 개선 효과가 확연히 인정되었다($p < 0.05$).

GF-I 획분 처리 쓴맛 CH에 대한 시간별 가수분해물(CH, CH08, 및 CH24)의 HPLC 크로마토그램과 피크면적(%)의 변화는 각각 Fig. 3과 Table 3에 나타내었다. GF-I 획분의 반응시간별 총 60분간의 분석에서 24분대의 피크 1, 27분대의 피크 2, 31분대의 피크 3, 33분대의 피크 4, 44분대의 피크 5 그리고 47분대의 피크 6이 HPLC 크로마토그램상에서 피크면적(%)의 변화가 두드러진

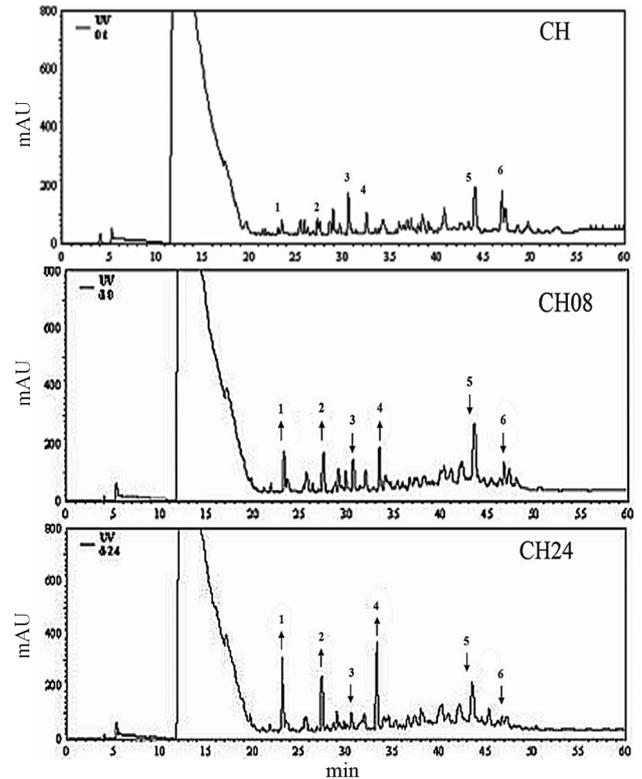


Fig. 3. Reverse-phase HPLC chromatograms of tryptic casein hydrolysates treated with GF-I fraction. CH: tryptic casein hydrolysate before GF-I fraction treatment, CH08: tryptic casein hydrolysate after 8 h of treatment with GF-I fraction, CH24: tryptic casein hydrolysate after 24 h of treatment with GF-I fraction.

Table 3. Change in major peak area (%) from HPLC chromatograms of tryptic casein hydrolysates treated with GF-I for hydrolysis time (Area %)

Peak No. ¹⁾	Casein hydrolysate (CH)	Casein hydrolysate with GF-I	
		CH08	CH24
1	2.3	21.2	31.9
2	9.0	12.9	15.5
3	18.5	12.3	3.0
4	15.6	35.6	40.1
5	20.5	13.5	7.5
6	34.2	4.4	1.9

¹⁾Refer to the footnote and peak number of Fig. 3.

것으로 나타났다. 이들 피크들은 분석시 사용한 칼럼(C₁₈)과 이동상(0-45% acetonitrile)의 특성에 따라 retention time (머무름시간)이 길어질수록 상대적으로 소수성이 강한 펩타이드 획분들이 용출된 것으로 추정되었으며, Nishiwaki 등(19), Bumberger와 Belitz (25), Lin 등(30) 및 Park과 Lee(31)도 aminopeptidase를 이용하여 casein 가수분해물의 쓴맛 개선을 시도하였고, 그 효과를 C₁₈ reverse-phase HPLC로 분석한 결과, 머무름 시간 30분대 이후의 소수성이 강한 피크들이 감소한 반면 30분대 이전의 상대적으로 친수성이 강한 피크들이 증가하였다고 보고하여 본 실험 결과와 일치하였다. 아울러 반응시간에 따른 HPLC 크로마토그램상(Fig. 3)의 피크면적(%)의 변화(Table 3)는 6개의 피크들 중에서 상대적으로 소수성이 강한 펩타이드로 추정되는 피크 6 (34.2%, CH)에서 1.9% (CH24)로의 감소가 두드러졌으며, 다음으로 피크 5

Table 4. Change in major peak area (%) from HPLC chromatograms of tryptic casein hydrolysates treated with GF-I as affected by enzyme concentration and hydrolysis time
(Area %)

Peak No.	Casein hydrolysate (CH)	Additional ratios of enzyme		
		CH20	CH10	CH05
1	2.3	10.4	11.4	31.9
2	9.0	12.6	14.2	15.5
3	18.5	12.9	12.7	3.0
4	15.6	25.2	37.3	40.1
5	20.5	17.8	12.8	7.5
6	34.2	21.1	11.7	1.9

Peak No.: refer to the Fig. 3.

CH: tryptic casein hydrolysate

CH20: 1/2,000(w/w) ratio of GF-I and tryptic casein hydrolysate

CH10: 1/1,000(w/w) ratio of GF-I and tryptic casein hydrolysate

CH05: 1/500(w/w) ratio of GF-I and tryptic casein hydrolysate

(20.5%에서 7.5%로) 및 피크 3 (18.5%에서 3.0%로)의 순으로 감소하는 경향을 보인 반면에, 소수성이 상대적으로 약한 펩타이드로 추정되는 피크 1은 23.%(CH)에서 31.9%(CH24)로, 피크 2는 9.0%(CH)에서 15.5%(CH24)로, 그리고 피크 4는 15.6%(CH)에서 40.1%(CH24)로서 GF-I 희분과의 가수분해 시간의 경과와 더불어 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 구성 펩타이드 희분의 소수성이 강할수록 쓴맛이 강하다고 보고(16,30,31)와 이상의 결과로부터 살 오징어 간체장 유래 GF-I 희분의 적용으로 쓴맛 CH 중의 구성 펩타이드 희분의 소수성은 전반적으로 감소하는 동시에 상대적인 친수성은 증가함을 나타냄으로서 쓴맛 개선 효과가 인정되었다.

GF-I 희분 처리농도에 따른 쓴맛 CH에 대한 가수분해 패턴

GF-I 희분의 쓴맛 CH에 대한 효소농도(단백질함량 기준으로 효소에 대한 기질의 비율로서 1/2,000, 1/1,000 및 1/500)별 반응 시간에 따른 효소활성 변화를 Fig. 4에 나타내었다. GF-I 희분 첨가 후, CH05와 CH10는 전 반응시간에 걸쳐 활성이 증가하는 경향을 보였으며, 효소첨가농도에 따른 차이를 나타내지 않았다. 그러나 CH20의 경우에는 반응 16시간 이후에는 활성의 유의적인 증가는 나타나지 않았다($p < 0.05$).

GF-I 희분 처리 쓴맛 CH에 대한 효소농도별 가수분해물(CH20, CH10, 및 CH05)의 HPLC 크로마토그램(미제시)에 따른 피크면적(%)의 변화는 Table 4와 같다. Fig. 3에서의 결과에서처럼 피크 1, 2 및 4는 증가하는 경향을 보인 반면, 피크 3, 5 및 6은 첨가농도에 관계없이 감소하는 경향이였다. 다만 CH05의 피크 1 (31.9%로 증가), 3 (3.0%로 감소) 및 6 (1.9%로 감소)의 증감 폭이 CH20 (10.4, 12.9 및 21.1%) 및 CH10 (11.4, 12.7 및 11.7%)에 비하여 큰 것으로 나타나 효소와 기질(쓴맛 CH)의 비율은 본 실험조건에서는 1/500으로 처리하는 것이 쓴맛 개선 효과가 있는 것으로 판단되었다. CH10과 CH05 간의 효소농도에 따른 활성변화(Fig. 4)에서는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타난 반면, HPLC 크로마토그램의 피크면적의 변화(Table 4)에서는 차이를 나타내어 효소활성의 강도가 쓴맛 개선 효과와 절대적인 상관관계는 없는 것으로 나타났다.

아울러 GF-I 희분 첨가효소 농도 및 시간별 처리 쓴맛 CH의 쓴맛 개선 효과를 7인의 쓴맛 평가 요원이 1% 쓴맛 표준용액(glycylphenylalanine)을 기준으로 평가한 관능검사를 통하여 살펴본 결과(Table 5), 반응 8시간에 첨가농도에 상관없이 개선효과가

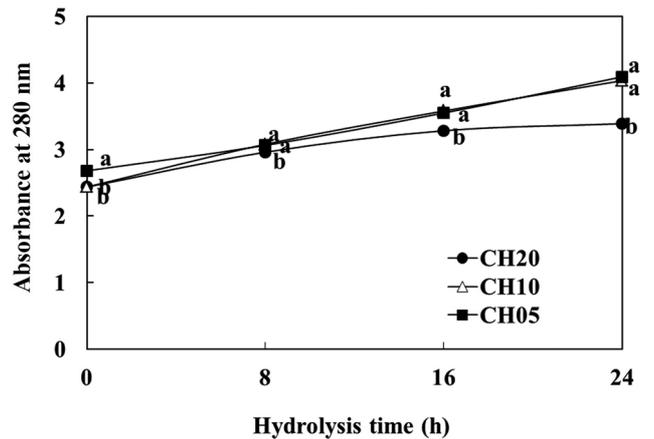


Fig. 4. Hydrolysis of tryptic casein hydrolysates treated with GF-I fraction as affected by enzyme concentration and hydrolysis time. Different letters of the different symbol indicate a significant difference at $p < 0.05$.

Table 5. Bitterness evaluation of tryptic casein hydrolysates treated with GF-I fraction as affected by enzyme concentration and hydrolysis time

Hydrolysates	Hydrolysis time (h)			
	0	8	16	24
CH20	7 ¹⁾	4	4	4
CH10	7	4	3	3
CH05	7	3	1	0

¹⁾Numericals represent the panel number felt strong bitterness to 1% Gly-phe.

Refer to the footnote in Table 4.

인지되었으며, CH20와 CH10은 이후의 반응시간에서도 더 이상의 개선효과가 없는 반면에 CH05의 경우 24시간 처리에서 쓴맛을 아무도 인지하지 못한 것으로 나타났다. 따라서 본 실험 조건에서 국내산 살오징어(*T. pacificus*) 간체장 추출물로부터 겔여과 크로마토그래피로 분획한 분자량 크기 30-50 kDa의 aminopeptidase 활성 희분은 쓴맛 casein 가수분해물에 대해 단백질함량 기준으로 1/500비율로 첨가하여 16-24시간처리로 효과적인 쓴맛 개선 효과를 얻을 수 있었다.

요 약

국내산 살 오징어 간체장 조효소를 추출한 다음, 단백질 성질에 기초한 분획방법(용해도, 전기적 성질 및 분자량크기)으로 분획한 endoprotease 및 aminopeptidase 활성 희분들에 대한 분해 활성 비교한 다음, 이들 희분의 반응시간에 따른 쓴맛 casein 가수분해물의 쓴맛 개선 효과를 효소활성, 관능검사 및 HPLC 크로마토그램을 통하여 살펴보았다. 분획방법별 각 희분의 쓴맛 평가에 의한 쓴맛 개선 효과는 겔 여과법에 의하여 분획된 희분(GF-I, 30-50 kDa)이 가장 효과적이었다. GF-I 희분을 2% Gly-phe에 준하는 쓴맛 casein 가수분해물에 대하여 1/500의 비율로 첨가한 다음, 16시간 이상 반응시킨 가수분해물은 HPLC 크로마토그램 상에서 친수성이 강한 피크면적(피크 1, 2 및 4)은 증가한 반면, 소수성이 상대적으로 강한 피크면적(피크 3, 5 및 6)가 감소하였으며, 쓴맛 평가 결과에서도 쓴맛 개선 효과가 뚜렷하였다. 앞으로의 연구에서는 오징어 간체장 유래 aminopeptidase의 효율적인

산업적 이용을 위한 단백질 분자량 크기에 따른 연속분획 공정을 통한 대량회수 방법 및 쓴맛 개선 가수분해물로부터 유리된 아미노산분석, 효소안정성, 기질특이성 등에 대하여 진행하고자 한다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2010-0021825).

References

- Okutani T. Cuttlefishes and Squid of the World. Seizando, Tokyo, Japan. p. 198 (2005)
- Stansby ME. 1976. Fish Oils in Nutrition. New York, NY, USA. pp. 6-39 (1976)
- Ministry of Oceans and Fisheries. Year book of marine resources. Available from: http://stat.mof.go.kr/portal/bbs/selectBbsArticle.do?bbsId=BBSMSTR_000000000006&nttlId=62. Accessed Apr. 14, 2013.
- Raksakulthai R, Haard NF. Purification and characterization of a carboxypeptidase from squid hepatopancreas (*Illex illecebrosus*). J. Agr. Food Chem. 49: 5019-5030 (2001)
- Raksakulthai R, Haard NF. Purification and characterization of aminopeptidase fractions from squid (*Illex illecebrosus*) hepatopancreas. J. Food Biochem. 23: 123-144 (1999)
- Hameed KS, Haard NF. Isolation and characterization of cathepsin C from atlantic short finned squid *Illex illecebrosus*. Comp. Biochem. Physiol. 82B: 241 - 246 (1985)
- Gildberg A. Purification and characterization of cathepsin D from the digestive gland of the pelagic squid *Todarodes sagittatus*. J. Sci. Food Agr. 39: 85-94 (1987)
- Heu MS, Ahn SH. Development and fractionation of proteolytic enzymes from an inedible seafood product. J. Korean Fish. Soc. 32: 458-465 (1999)
- Kim HS, Heu MS, Kim JS. Distribution and extraction condition of endoprotease and exoprotease from viscera of *Illex argentinus*. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 50: 308-315 (2007)
- Kim MJ, Kim HJ, Kim KH, Heu MS, Kim JS. Endoprotease and exopeptidase activities in the hepatopancreas of the cuttlefish *Sepia officinalis*, the squid *Todarodes pacificus*, and the octopus *Octopus vulgaris* Cuvier. Fish. Aquat. Sci. 15: 197-202 (2012)
- Kim HS, Kim JS, Heu MS. Fractionation of endoprotease from viscera of Argentina shortfin squid, *Illex argentinus*. J. Korean Fish. Soc. 41: 176-181 (2008)
- Kim HS, Kim JS, Heu MS. Fractionation of exopeptidase from viscera of Argentina shortfin Squid, *Illex argentinus*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 37: 1009-1017 (2008)
- Kim MJ, Kim HJ, Kim KH, Heu MS, Lee JS, Kim JS. Fractionation and enzymatic characterization of endoprotease and exopeptidase from crude extracts of cuttlefish *Sepia officinalis* hepatopancreas. Fish. Aquat. Sci. 15: 283-291 (2012)
- Haard NF. Protein hydrolysis in seafoods: In Seafoods Chemistry, Processing Technology and Quality. Shahidi F. Springer, New York, NY, USA, pp. 10-33 (1994)
- Liu F, Yasuda M. Debittering effect of *Monascus* carboxypeptidase during the hydrolysis of soybean protein. J. Indian Microbiol. Biotechnol. 32: 487-489 (2005)
- Ishibashi N, Arita Y, Kanehisa H, Kogure K, Okai H, Fukui S. Bitterness of leucine-containing peptides. Agr. Biol. Chem. 59: 2389-2394 (1987)
- Kim JS, Kim MJ, Kim KH, Kang SI, Park SH, Lee HJ, Heu MS. Debittering of enzymatic hydrolysate using exopeptidase active fractions from the Argentina shortfin squid *Illex argentinus* hepatopancreas. J. Korean Fish. Soc. 49: 142-149 (2014)
- Capiralla H, Hiroi T, Horokawa T, Maeda S. Purification and characterization of hydrophobic amino acids-specific endopeptidase from *Halobacterium halobium* S9 with potential application in debittering of protein hydrolysates. Process Biochem. 38: 571-579 (2002)
- Nishiwaki T, Yoshimizu S, Furuta M, Hayashi K. Debittering of enzymatic hydrolysates using an aminopeptidase from edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. J. Biosci. Bioeng. 93: 60-63 (2002)
- Saha BC, Hayashi K. Debittering of protein hydrolyzates. Biotech. Advances 19: 355-370 (2001)
- Izawa N, Tokuyasu K, Hayashi K. Debittering of protein hydrolysates using *Aeromonas caviae* aminopeptidase. J. Agr. Food Chem. 45: 543-545 (1997)
- Umetsu H, Ichishima E. Debittering mechanism of bitter peptides from soybean protein by wheat carboxypeptidase. J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol. 35: 440-447 (1988)
- Dawson RMC, Elliot DC, Elliot WH, Jones KM. Data for Biochemical Research. 3rd ed. Oxford Univ Press, Oxford, UK, pp. 417-441 (1986)
- Lowry OH, Watanabe NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951)
- Bumberger E, Belitz HD. Bitter taste of enzymic hydrolysates of casein. Z. Lebensm. Unters. For. 197: 14-19 (1993)
- Tan PS, Van Kessel, TA, Van de Veerdonk FL, Zuurendonk PF, Bruins AP, Konings WN. Degradation and debittering of a tryptic digest from β -casein by aminopeptidase N from *Lactococcus lactis* sub sp. cremoris WG2. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1430-1436 (1993)
- Matoba T, Hayashi R, Hata T. Isolation of bitter peptides from trypsin hydrolysate of casein and their chemical structure. Agr. Biol. Chem. 34: 1235-1243 (1970)
- Matoba T, Hayashi R, Hata T. Bitter peptides from tryptic hydrolysate of casein. Agr. Biol. Chem. 34: 1245-1241 (1970)
- Raksakulthai R, Rosenberg M, Haard NF. 2002. Accelerated cheddar cheese ripening with an aminopeptidase fraction from squid hepatopancreas. J. Food Sci. 67: 923-928 (2002)
- Lin SB, Nelles LP, Cordle CT, Thomas RL. Debittering casein hydrolysates with octadecyl-siloxane (C18) columns. J. Food. Sci. 62: 665-670 (1997)
- Ishibashi N, Sadamori K, Yamamoto O, Kanehisa H, Kogure K, Kikuch E, Okai H and Fukui S. Bitterness of phenylalanine- and tyrosine-containing peptides. Agr. Biol. Chem. 51: 3309-3313 (1987)
- Park SY, Lee BH. Effects of *Lactobacillus casei* LLG on flavor of enzyme-modified cheese. 1. Degradation of hydrophobic peptides by aminopeptidase. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 16: 147-154 (1996)