

## 이취 제거를 위한 굴 가수분해물의 발효공정과 제품의 특성

이수선<sup>1,2</sup> · 박시향<sup>1</sup> · 김현아<sup>2</sup> · 최영준<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(주)선마린바이오테크

<sup>2</sup>경상대학교 해양식품공학과/해양산업연구소

### Fermentation Process for Odor Removal of Oyster (*Crassostrea gigas*) Hydrolysate and Its Properties

Su-Seon Lee<sup>1,2</sup>, Si-Hyang Park<sup>1</sup>, Hyeun-A Kim<sup>2</sup>, and Yeung-Joon Choi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sunmarine Biotech. Co., Ltd.

<sup>2</sup>Department of Seafood Science and Technology /  
Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University

**ABSTRACT** This study was carried out to investigate the optimal processing conditions for odor removal and maximal antioxidant effects of oyster (*Crassostrea gigas*) hydrolysate. The optimal hydrolysis conditions were 3.3% neutrase as the protease, 50°C as the hydrolysis temperature, and 8.3 h as the hydrolysis time. Fish odor of enzymatic oyster hydrolysate was greatly reduced during *Saccharomyces cerevisiae* fermentation at 24°C with 0.5% glucose. The protein content of the fermentation product from oyster hydrolysate powder was 25.7%, which contained the major amino acids Glu, Asp, Lys, Arg, Gly, and Ala, whereas Leu, Ala, Phe, Val, and Tau were abundant free amino acids. The important minor minerals were Zn and Fe. Toxicity against Chang cells was not observed in the fermentation product from the oyster hydrolysate up to 200 µg/mL. The results suggest that fermentation with *S. cerevisiae* could reduce the fish odor of enzymatic oyster hydrolysate. The hydrolysate has potential application as a food ingredients and nutraceutical.

**Key words:** oyster, hydrolysate, odor, fermentation

## 서 론

국민 소득의 증가, 식생활의 서구화, 건강 증진 효과에 관한 관심이 증가함에 따라 다양한 생리활성 물질을 함유한 안전한 식품을 섭취함으로써 성인병, 비만 등 다양한 질환을 예방하고자 하는 요구가 증가하고 있다(1). 식품의약품안전처의 보고에 의하면 2013년 국내 식품시장 규모는 54조 6,902억 원이었으며 건강기능식품이 1조 7,920억 원으로 전체 식품 시장의 약 3.3%를 차지하고 있으나, 최근 5년간 연평균 성장률은 11.5%로 2009년 이후 지속적인 성장세를 보이고 있다.

해양생물은 특이한 생태계를 이루는 환경 때문에 적자생존의 경쟁 속에서 살아남기 위해 물리적 방어 능력이 부족한 해양생물의 2차 대사산물은 육상생물의 것과 상이한 화학적 특성을 가지는 경우가 많다(2). 우리나라는 지역 특성상 많은 해양생물자원을 확보할 수 있으나 해양생물에서 유래하

는 특유의 이취, 이취는 기호적인 문제와 식품첨가물 혹은 건강기능식품으로의 응용에 제한 요소로 인식됨에 따라 경제적인 관점에서의 상용화에 제약을 초래하고 있다(3). 그리고 노령 인구의 소비 저하, 저연령 인구의 소비 기피, 해양식품의 정보 제공 강화, 안전성 관리 강화 등의 요인으로 인해 해양식품의 소비에 많은 변화가 일어나고 있다(4).

굴은 경남이 전국 총 굴 생산량의 85.9%를 차지하며, 주로 통영, 고성 및 거제 지역에서 생산하는 지역 특화 수산물이다. 단백질, 아미노산, 타우린 및 미네랄 등의 영양 성분이 풍부하며(5), 세계 10대 수산물로 널리 이용되고 있다. 굴의 기능성과 관련하여 가수분해물의 항산화 효능(6), 아세트아미노펜 독성에 대한 간 보호 활성(7), ACE 저해 활성(8-10) 등의 많은 연구가 진행되어 왔다. 해양생물의 비린내는 어종 및 선도에 따라 차이가 크며(11), 일반적으로 불쾌취는 선도 저하 시에 trimethylamine oxide(TMAO)가 세균의 환원 작용에 의하여 trimethylamine(TMA)으로 분해되어 생성된다(12). 이들의 이취는 해양생물 소재의 산업화에 제약이 되고 있으며, 이를 극복하기 위하여 유산균, 황국균 등 미생물을 이용한 발효에 의한 이취 제거 효과(13,14), 초임계 이산화탄소를 이용한 이취 제거 효과(15-17), 해양식물의 이취 제거 효과(18-20)에 관한 연구가 많이 진행되었으나,

Received 13 October 2015; Accepted 11 March 2016

Corresponding author: Yeung-Joon Choi, Department of Seafood Science and Technology/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 52828, Korea  
E-mail: yjchoi@gnu.ac.kr, Phone: +82-55-772-9143

해양동물을 소재로 한 제품의 이취 제거에 관한 연구는 미미한 실정이다.

본 연구는 굴 단백질 가수분해물의 첨가물과 기능성 식품 제조 시 문제점 중의 하나인 굴 단백질 가수분해물의 이취를 감소시킬 목적으로 상업용 효소를 이용하여 단백질을 가수분해한 후, 효모와 젖산균으로 발효를 실시하여 이취의 masking 효과를 관능적으로 측정하고 이취를 감소시킨 굴 가수분해물의 발효제조공정의 최적화를 실시하였다. 그리고 이들 가수분해물의 특성을 확인할 목적으로 아미노산 조성, 무기질 조성, 분자량 분포 및 Chang 세포주에 대한 독성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용한 참굴(*Crassostrea gigas*; 각장  $5.8 \pm 0.4$  cm, 각고  $3.2 \pm 0.4$  cm, 체중  $9.8 \pm 2.1$  g)은 경남 통영시 연안의 양식장에서 2013년 10월부터 2014년 4월에 걸쳐 채취하여 인근의 가공 공장에서 알굴의 형태로 급속 동결한 굴제품(Individually Quick Frozen, IQF)으로 2014년 12월 경남 통영시에 소재하는 D 식품에서 구입하여 사용하였다. 가수분해를 위한 상업용 효소, Alcalase 2.4L(2.4 AU/g, endopeptidase, *Bacillus licheniformis*), Flavourzyme 500 MG(500 LAPG/g, endoprotease and exopeptidase, *Aspergillus oryzae*), Protamex 1.5MG(1.5 AU/g, *Bacillus protease, complex*) 및 Neutrase 0.8L(0.8 AU/g, endoprotease, *Bacillus amyloliquefaciens*)는 Biosis(Busan, Korea)에서 구입하였다.

굴 가수분해물의 발효를 위해 사용한 *Saccharomyces cerevisiae*(이하 *S. cerevisiae*, KCTC No. 17298) 및 *Lactobacillus plantarum*(이하 *L. plantarum*, KCTC No. 21004)은 미생물자원센터 KCTC(Korean Collection for Type Cultures, Daejeon, Korea)에서 분양받았으며, 간 보호 활성 측정을 위한 Chang cell은 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받아 실험에 사용하였다.

### 굴 가수분해물의 제조

어취와 해수에서 기인하는 염을 제거하기 위해 해동한 IQF 굴을 10분 동안 끓는 물에 데치고 육 마쇄기(M-12S, Hankook Fufee Industry, Hwaseong, Korea)로 균질화하였다. 마쇄한 굴에 2배량의 증류수를 가하여 균질기(T-25 basic, Ika Works Inc., Wilmington, NC, USA)로 다시 균질화하였다.

굴 가수분해물을 제조하기 위한 상업용 효소를 선정하기 위하여 반응시간과 온도를 독립변수로, 가용성 가수분해도 및 항산화 활성을 종속변수로 설정하여 반응표면 분석을 하였다. 단백질 가수분해효소는 Alcalase 2.4L, Flavourzyme 500MG, Protamex 1.5MG, papain 및 Neutrase 0.8

L을 사용하였고, 효소 반응을 위한 pH는 균질화한 굴의 pH를 그대로 사용하였다.

Neutrase에 의한 단백질 가수분해조건의 최적화는 공정의 최소 비용화를 고려하여 반응온도는 50°C로 고정하고, 효소 대 기질비 2~8%, 반응시간 1~3시간을 독립변수로 2수준에서 중심합성법으로 표면반응분석으로 시행하였다. 종속변수는 가수분해물 수율 지표로서 TCA 가용성 가수분해도와 기능성의 지표로서 ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)] 라디칼 소거능을 사용하였다. 각 반응 조건에서 가수분해 반응을 종료한 후 95~100°C에서 30분간 효소를 불활성화시키고, 3,000 rpm에서 20분 동안 원심분리(Supra 22K, Hanil Sci. Industry Co., Incheon, Korea) 하여 그 상등액을 실험에 사용하였다.

### 가수분해도와 단백질 함량의 측정

가수분해도는 굴 효소 가수분해물에 최종 농도가 5%가 되도록 20%(w/v) trichloroacetic acid(TCA)를 첨가하여 원심분리(3,000 rpm, 20 min; Supra 22K, Hanil Sci. Industry Co.) 한 다음 일정량의 상등액을 취하여 가용성 단백질 함량으로 측정하였다. 가수분해도는 다음의 식과 같이 계산하였다.

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

가용성 단백질의 함량은 Biuret 법(21)으로 측정하였으며, 단백질 함량은 bovine serum albumin으로 작성한 표준곡선에 따라 계산하였다.

### 이취 제거를 위한 발효 공정

수산물 특유의 비린내를 발효 과정에서 생성되는 알코올과 산성 화합물을 통해 masking 할 목적으로 효모균인 *S. cerevisiae*, 유산균인 *L. plantarum*을 이용하여 가수분해물의 발효를 실시하였다. 예비 실험 결과 5%의 균을 접종하는 것이 이취 제거에 가장 적절하였으나 굴 가수분해물 기원의 탄소원이 부족한 것으로 판단되어 균의 성장을 촉진하기 위하여 탄소원인 glucose를 첨가하였다. 독립변수로서 굴 가수분해물의 단백질 농도에 대하여 0, 0.5, 1.0, 2.0%의 glucose를 첨가하고, 가수분해물(단백질 농도)에 대하여  $1 \times 10^7 \sim 8$ /mL의 균을 5% 농도로 첨가하여 24°C에서 48시간 발효하였다. 발효 후 100°C에서 30분간 가열하여 균을 사멸시킨 후 4점의 거즈로 여과하여 여액을 ABTS 및 냄새 판정에 사용하였다. 냄새 판정의 경우 균을 접종하지 않은 것을 대조구로 사용하여 중간 점수인 3점을 두고 대조구보다 발효물의 이취가 나쁠 경우 1~2점, 차이를 느끼지 못하면 3점 및 개선 효과를 느끼면 4~5점으로 판정하였다.

### ABTS 라디칼 소거능의 측정

ABTS 라디칼 소거능의 측정은 Re 등(22)의 방법에 따라

측정하였다. 7 mM ABTS와 140 mM potassium persulfate를 혼합하여 어두운 곳에 12시간 동안 양이온화한 후, 흡광도가 734 nm에서  $0.70 \pm 0.01$ 이 되도록 PBS(pH 7.4) 용액을 가해 조절한 ABTS 용액을 사용하였다. 시료용액 10  $\mu$ L와 ABTS 용액 190  $\mu$ L를 혼합하여 6분간 실온에서 차광한 상태로 반응시키고 734 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 식에 의해 라디칼 소거능을 계산하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 흡광도}}{\text{대조구 흡광도}}\right) \times 100$$

### 구성 아미노산, 유리 아미노산 및 무기질 조성

꿀 가수분해 발효물의 구성 아미노산과 유리 아미노산 조성은 Udomsil 등(23)의 방법으로 측정하였다. 먼저 구성 아미노산 조성은 꿀 가수분해물(30 mg)을 포함하는 시험관에 과량의 6 M HCl 용액(3 mL)을 첨가하고 감압하면서 밀봉하여 110°C의 heating block(HB-96D, Daihan Sci. Co., Ltd., Seoul, Korea)에서 24시간 산 가수분해하였다. 가수분해한 시료는 3G-glass filter로 여과하여 40°C 이하의 온도에서 회전진공증발기로 염산을 완전히 증발시킨 후 0.01 M HCl 용액으로 50 mL가 되게 정용하였다. 정용한 시료 일부를 취하여 0.45  $\mu$ m filter로 여과한 후 구성 아미노산 시료로 사용하여 아미노산 자동분석기(Biochrom 30, Biochrom, Cambridge, UK)의 sodium 분석 프로그램에 따라 분석하였다. 유리 아미노산 조성은 시료 100 mg을 증류수 2 mL에 용해하고, 5'-sulfosalicylic acid 100 mg을 넣어 30분간 실온에서 방치하여 단백질을 침전하였다. 30분 후 10,000 rpm에서 20분간 원심분리(Micro 17TR, Hanil Sci. Industry Co.) 하여 단백질을 제거하고, 상등액을 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과 후 시료로 사용하였다. 유리 아미노산 조성은 아미노산 자동분석기(Biochrom 30)의 lithium 분석 프로그램에 따라 분석하였다. 무기질 조성은 Chen 등(24)의 방법에 따라 전처리한 후 유도결합 플라즈마 분광기(Optima 4300/5300DV, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)로 측정하였다.

### 분자량 분포의 측정

꿀 가수분해 발효물의 분자량 분포는 Superdex peptide 10/300 GL column(1.0×30 cm)에 0.20  $\mu$ m nylon filter로 여과한 시료 100  $\mu$ L를 주입하여 0.1 N NaCl을 포함하는 25 mM Tris-HCl(pH 8.0) 용액을 1.0 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), vitamin B<sub>12</sub>(분자량 1,355) 및 carnosine(분자량 225)으로 작성한 검량곡선에 따라 측정하였다.

### MALDI-MS fingerprint 측정

꿀 가수분해 발효물 100 mg을 DW 또는 50% acetonitrile에 용해한 후 원심분리 하여 상등액을 ZipTip C18 (Millipore, Bedford, MA, USA)을 이용하여 탈염 처리한 후, SpeedVac 원심분리기(ScanSpeed 40, Labogene ApS, Lyngby, Denmark)에서 완전히 건조했다. 건조한 시료를 10  $\mu$ L의 0.1% TFA 용액에 용해하여 CHCA matrix 용액과 함께 혼합한 후 MALDI-TOF steel plate에 direct spotting 하여 air-dry 한 후 MALDI-TOF/TOF MS(Ultraflex III, Bruker, Bremen, Germany)를 이용하여 가수분해물의 fingerprint를 측정하였다.

### 세포 독성

인간 정상 간세포인 Chang cell을 10% FBS(Lonza, Valais, Switzerland)가 함유된 MEM 배지(Gibco, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 유지되도록 배양하였다. 이때 미생물의 오염이나 증식을 억제하기 위해 배지용 항생제를 사용하였다. 세포가 80% 정도 dish를 덮으면 phosphated-buffered saline-EDTA(PBS-EDTA, Gibco)로 세척한 후 트립신을 처리하여 계대 배양하였으며, 배지는 48시간마다 교환하여 세포를 배양하였다.

세포 독성 측정은 Chang cell을 96 well plate에 세포 농도  $1 \times 10^5$  cells/mL로 100  $\mu$ L씩 분주한 후 세포 부착을 위해 24시간 배양하였다. 새로운 배지에 시료의 최종 농도가 1, 10, 50, 100, 200  $\mu$ g/mL가 되도록 꿀 가수분해 발효물을 제조하여 부착된 세포에 24시간 동안 처리하여 배양하였다. 세포주의 생존율을 측정하기 위해 Promega사(Madison, WI, USA)에서 구입한 CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay를 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다. 시약을 처리한 후 microplate reader(Versa Max ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Silicon Valley, CA, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 시료를 처리하지 않은 대조군에 대비한 시료 처리군의 흡광도로 표시하였다.

### 통계분석

실험 결과는 3반복으로 측정한 실험값의 평균과 표준편차로 표시하였으며, 변동분석은 Turkey HSD로 실시하여 유의성을 검증하였다( $P < 0.05$ ). 표면반응분석은 중심합성 설계로 시행하였다. 변동분석, 선형회귀 및 실험설계는 모두 Minitab 14 통계 프로그램(Minitab Ltd., State College, PA, USA)으로 수행하였다.

## 결과 및 고찰

### 가수분해물의 제조

효소의 종류별 가수분해물 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 5종의 상업용 효소를 이용하여 가수분해하였다.

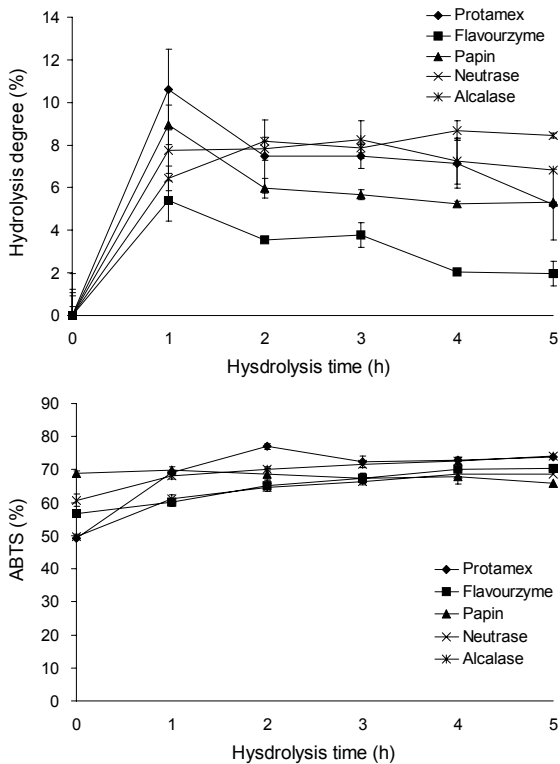


Fig. 1. Effect of proteases on hydrolysis degree and ABTS radical scavenging activity with hydrolysis time.

각 효소의 가수분해도 및 항산화 활성은 Fig. 1과 같다. Neutrased의 가수분해도는 5시간까지 완만한 증가를 했으나, papain, Flavourzyme, Alcalase, Protamex의 경우 다소 감소하는 경향을 보였다. ABTS 항산화 활성은 Protamex, Neutrased 및 Alcalase 가수분해물이 높게 나타났으며, papain은 시간에 따른 활성의 변화가 없었다. 가수분해 시간에 따른 가수분해도의 안정성과 가수분해물의 항산화 활성에 미루어 Neutrased가 굴 가수분해에 적합한 것으로 판단하였다.

**가수분해 조건의 최적화**

Neutrased를 이용한 최적 가수분해 조건을 설정하기 위해 효소 대 기질비( $X_1$ ) 2~8%, 반응시간( $X_2$ ) 2~8%를 독립변수로 표면반응분석을 하였으며, 그 결과 가수분해도 및 항산화 활성은 가수분해의 독립변수에 유의적인 영향을 가지고( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 교호작용에서도 ( $X_1 \times X_1$ ), ( $X_1 \times X_2$ )가 가수분해에 유의적인 영향을 미치는 것으로 나타났다. 가수분해도와 ABTS 활성을 최대 설정하였을 때 효소 대 기질비 6.4%, 반응시간 5.0시간으로 나타났으나, 효소의 첨가량 증가가 제조단가 상승을 초래하여 효소 첨가량을 최소화하는 제한 조건으로 최적화한 결과 효소 대 기질비 3.3%, 반응시간 8.3시간, 반응온도 50°C로 나타났다(Fig. 2).

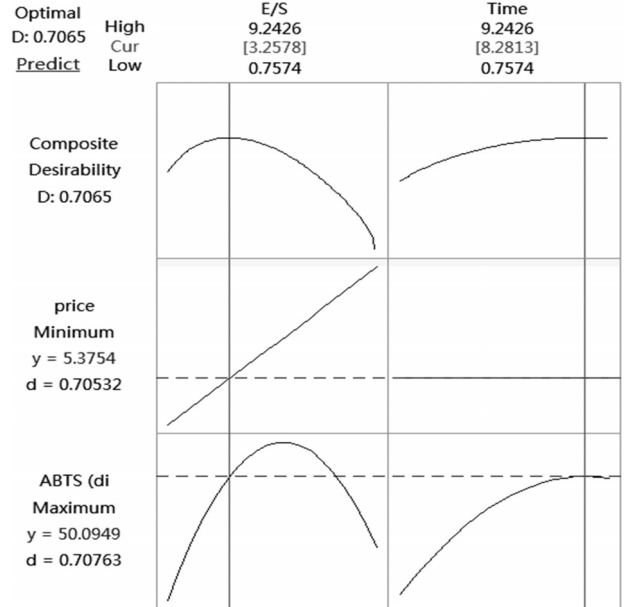


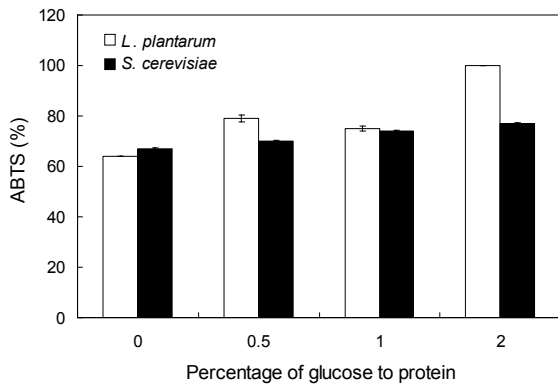
Fig. 2. Optimum E/S and incubation time (h) on the extraction of hydrolysis from oyster by Neutrased.

**이취 제거를 위한 발효**

식품의 발효는 미생물 작용을 통해 식품에 좋은 맛과 향, 조직감 등을 부여하며 식품의 저장성 향상은 물론 발효과정을 통한 독성물질 파괴, 생리활성 물질 생산, 소화 증진 등의 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(25,26). 식품의 발효에 주로 이용하는 균주는 *A. oryzae*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*와 *S. cerevisiae* 등을 들 수 있다. 그중 *Lactobacillus* 속과 *Bifidobacterium* 속은 우유제품의 발효나 젖산의 발효생산 등에 이용되고 정장작용이 강하여 오래 전부터 젖산균 제제나 acidophilus milk의 제조에 이용하고 있다(27,28). 또한 *S. cerevisiae*는 영양소의 소화율 및 이용을 향상시키고 생화학적인 성질이 일정하며 보존성이 우수하여 각종 주류의 제조 및 빵 등 식품의 발효에 유용한 균주이다(29,30).

굴 가수분해물의 이취 제거를 위하여 굴 가수분해물을 효모균인 *S. cerevisiae*와 유산균인 *L. plantarum*을 이용하여 발효를 하였다. 발효하지 않은 Neutrased 가수분해물과 비교하여 ABTS 라디칼 소거능이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 *L. plantarum*이 *S. cerevisiae*보다 높은 ABTS 라디칼 소거능을 보였다(Fig. 3). 일반적으로 ABTS는 비교적 안정한 free radical로서 DPPH 방법과 함께 항산화 활성의 선별에 많이 이용되고 있으며, lipophilic 또는 hydrophilic 항산화 물질의 측정에 적용 가능한 방법으로 이 방법에 따른 항산화 활성은 ABTS 라디칼을 억제하거나 소거하는 것에 의해 이루어진다(31).

냄새 판정 결과(Table 1) 여성은 두 균주의 발효물이 대조군에 비하여 같거나 낮은 값을 보인 반면, 남성의 경우 *S. cerevisiae* 발효물의 관능평가 점수가 높게 나타났다. *S.*



**Fig. 3.** Effect of fermentation on ABTS radical scavenging activity of oyster hydrolysate. The ABTS activities were determined at protein concentration of 2.2 mg/mL.

*cerevisiae* 발효의 냄새 판정은 성에 따라 차이가 크게 나타났는데 이는 *S. cerevisiae* 발효에 의해 소량의 알코올 생성으로 알코올취를 내며 여성보다 남성이 이 발효취를 선호하기 때문으로 추정된다. *A. oryzae*를 접종하여 30일 동안 발효한 잉어육 페이스트는 휘발성 화합물로 에탄올, silanediol, pyrazine, phenol 등을 생성하여 풍미 있는 어육 페이스트 생산에 매력적인 공정임을 제시하였고(32), Chum salmon 어장의 제조 시에 첨가한 내염성 미생물과 *A. oryzae*를 반죽한 보리 코지의 첨가는 어장에 대두장의 향미를 부여하고 에탄올 함량을 증가시킨다고 보고하였다(33). 한편 건강기능식품에 관심을 보이기 시작하는 연령대인 30대 이상의 냄새 관능평가 결과 *S. cerevisiae*의 접종량이 증가할수록 월등히 높게 나타났다. 따라서 굴 가수분해 발효물의 최적 공정은 50°C에서 효소 대 기질비 3.3%, 8.3시간 동안 가수분해한 것에 *S. cerevisiae*( $1 \times 10^{7-8}$ /mL) 14%, 24°C, 48시간 동안 발효가 적절한 것으로 판단하였다.

### 구성 및 유리 아미노산 조성

굴 가수분해 발효물의 구성 아미노산 및 유리 아미노산 조성을 측정된 결과(Table 2), 분무 건조한 굴 가수분해물의 구성 아미노산은 25.7%에 해당하였으며, Glu, Asp, Lys,

Leu, Arg, Gly 및 Ala이 전체의 61.2%를 차지하였다. 비 필수 아미노산에 대한 필수 아미노산의 비는 0.72로 높은 비를 가지는 어패류의 결과에 비해 다소 낮게 함유하고 있다(34).

유리 아미노산 조성의 경우 Leu, Ala, Phe, Val 및 Tau의 순으로 높게 나타났으며, 총 유리 아미노산의 함량은 3.188 g/100 g-sample로 Protamex와 Neutrase로 가수분해한 굴 가수분해물 건조 분말의 1.682 g/100 g-sample(35)보다 약 1.8배 증가한 결과이다. 그러나 유리 아미노산의 증가가 첨가한 균주 자체의 유리 아미노산에 기인하는 것인지는 확실치 않다. 그리고 이 같은 결과는 Protamex와 Neutrase의 굴 2단 가수분해물보다 Thr, Glu, Ala, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe 및 ornithine이 현저히 증가한 것을 나타냈다. 발효 식품은 숙성 과정 및 생물 활성 단백질 가수분해물에서 효소 처리 과정 동안 쓴맛이 생성되며, 이는 발효 식품의 맛에 큰 영향을 미친다(36). 쓴맛은 단백질의 효소에 의한 가수분해 및 발효에 의해 peptide의 소수성 아미노산 잔기의 노출에 의해 증가되며, Leu, Ile, Met, Phe, Lys, Val, Arg이 이에 속하고(37,38), Ala, Gly, Ser 및 The은 단맛을 내는 아미노산에 속한다(38). 본 연구의 가수분해 발효물은 Val, Met, Ile, Leu, Phe을 다량 함유하고 있으나, 지미와 단맛 성분인 Glu과 Ala 또한 발효를 통하여 증가하였기 때문에 맛의 균형을 맞출 수 있을 것으로 판단된다. 그리고 Tau은 인체에 널리 분포되어 있으며, 삼투압 조절, 세포 증식, 갈습의 유입과 유출, 당대사 촉진, 신경 흥분 조절, 해독 작용, 세포막 안정성과 망막 색소 상피세포 증식 촉진 등 광범위한 기능이 있는 중요한 영양소이다(39,40).

### 무기질 함량

굴 가수분해 발효물은 다량 원소로서 Na, P, K의 함량이 높고, 미량원소로서 Zn, Fe의 함량이 높은 특색을 보였다(Table 3). 일반적으로 Zn의 가장 좋은 급원은 굴인 것으로 알려졌으며, 동물성 식품 내에 함유된 Zn이 식물성 식품 내의 Zn보다 흡수가 잘 이루어진다(41).

한편 고시 제2010-76호, 2010.10.29[별표2]의 유해물질 규격 설정 항목에 따르면 건강기능성 식품으로 사용하기

**Table 1.** Effect of fermentation on odor intensity evaluation of oyster hydrolysate

	Glucose (%)	Female	Male	Female+Male	>30 years
<i>L. plantarum</i> <sup>1)</sup>	Control	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0
	0 <sup>2)</sup>	3.0±1.2	2.7±0.6	2.8±0.2	2.7±0.6
	0.5	2.8±1.5	2.3±1.2	2.5±0.3	2.7±0.6
	1	2.0±2.0	3.0±1.0	2.5±0.7	2.7±1.5
	2	3.0±1.4	2.7±0.6	2.8±0.2	3.3±0.6
<i>S. cerevisiae</i>	0	3.5±0.6	4.0±0.0	3.8±0.4	4.0±0.0
	0.5	2.5±1.7	4.0±1.7	3.3±1.1	5.0±0.0
	1	2.3±1.9	3.3±2.1	2.8±0.8	4.7±0.6
	2	2.3±1.3	3.7±2.3	3.0±1.0	4.0±1.7

<sup>1)</sup>*L. plantarum* and *S. cerevisiae* fermentations were incubated at 37°C and 24°C for 48 h from Neutrase hydrolysate, respectively, sterilized at 121°C for 15 min, centrifuged at 3,000 rpm for 20 min and its supernatant was used.

<sup>2)</sup>The number represented the percentage ratio of glucose to protein.

**Table 2.** Amino acid compositions of fermentation product from the oyster hydrolysate

Amino acid	(g/100 g sample)	Free amino acid	Fermented oyster (mg/100 g-sample)	Oyster hydrolysate <sup>1)</sup> (mg/100 g-sample)
Asp	2.9±0.1	Pser	56.6±2.7	40.3
		Tau	224.1±5.2	228.7
Thr	1.3±0.1	Urea	197.8±5.2	65.9
		Asp	—	81.0
Ser	1.2±0.1	Thr	151.1±4.3	80.1
		Ser	9.0±0.0	107.9
Glu	3.8±0.3	Asn	59.5±3.0	30.5
		Glu	184.5±8.9	66.1
Pro	1.4±0.1	Aaaa	—	2.21
		Pro	114.4±13.4	88.5
Gly	1.6±0.1	Gly	124.9±3.0	81.0
		Ala	251.9±5.1	135.1
Ala	1.5±0.1	Citr	11.5±1.0	—
		Aaba	2.0±1.0	6.5
Cys	0.2±0.0	Val	225.1±6.5	41.3
		Cys	1.5±0.2	19.5
Val	0.6±0.0	Met	140.0±3.7	40.4
Met	0.7±0.0	Ile	179.3±4.9	15.7
Ile	1.1±0.0	Leu	379.7±6.1	130.3
		Tyr	187.0±5.3	36.5
Leu	1.9±0.0	β-Ala	28.5±0.5	60.5
		Phe	250.8±5.9	66.9
Tyr	1.1±0.0	Gaba	42.4±1.1	—
		Ethamine	2.2±0.2	16.9
Phe	1.3±0.0	Ammonia	30.4±0.2	122.8
		Hyls	6.9±0.1	15.2
His	0.6±0.0	Orn	111.1±3.3	1.6
		Lys	92.8±2.5	38.1
Lys	2.3±0.0	His	19.8±0.7	9.3
		Trp	55.4±1.3	—
Ammonia	0.5±0.0	1-metHis	—	20.0
		Ans	13.3±18.8	—
Arg	1.7±0.1	Arg	34.6±0.2	43.2
Total	25.7±1.1	Total	3,188.1±114.0	1,682.0

<sup>1)</sup>Oyster hydrolysate was hydrolyzed by Protamex and Neutrase as reference (35).

**Table 3.** Mineral content of fermentation product from the oyster hydrolysate

Mineral	Contents <sup>1)</sup> (ppm dry basis)	Contents (ppm dry basis)	
Major		Minor	
Na	14,834±23	Fe	334±11
K	5,979±9	Cu	122±0
Ca	661±4	Zn	531±0
P	4,930±18	Mn	41±0
Mg	886±3	As	0±0
		Cd	5±0
		Pb	2±0
		Cr	1±0
Total			29,653±58

<sup>1)</sup>Values are mean±SD. Values are mean of triplicates.

위해서 Pb, As, Cd, Hg 등은 각각 10.8 ppm, 150 ppm, 3.0 ppm, 2.1 ppm으로 제한 규격이 정해져 있다. 그러나 본 굴 가수분해 발효물에서는 Cd이 5.0 ppm 검출되어 가수

분해 전 원료의 유해성 중금속 여부를 확인하는 것이 중요한 것으로 판단된다.

### 분자량 분포

굴 가수분해 발효물은 대체로 500~4,000 Da의 펩티드로 구성되어 있으며, 약 1,000 Da에 해당하는 peptide가 대부분을 차지하였다(not shown). 굴의 2단 가수분해물(Protamex+ Neutrase)과 TGase를 이용한 단백질 가교 결합 후 2단 가수분해물(TGase+ Protamex+ Neutrase)의 분자량 분포(7)와 비교할 때 다소 큰 펩티드로 구성되어 있다. 이는 2단 가수분해물의 경우 두 가지 효소를 통한 dipeptide 형성의 극대화와 TGase에 의한 공유결합의 결과로 절단 부위에 차이가 있으며 아실기 전이반응과 탈아미노 반응으로 인한 것으로 보인다(42).

또한 굴 가수분해 발효물의 total mass 값을 MALDI-TOF를 이용하여 peptide mass fingerprinting을 실시하여 단편화된 시료의 정확한 mass 값을 측정하고, 가수분해물의

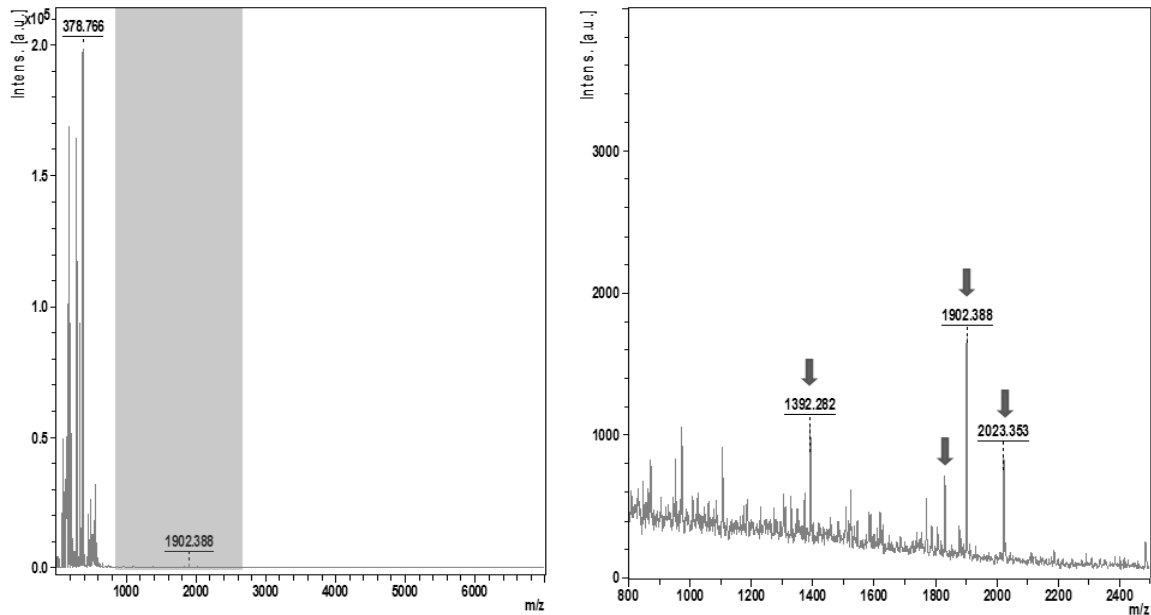


Fig. 4. Fingerprint of fermentation product from the oyster hydrolysate by MALDI-TOF mass spectra.

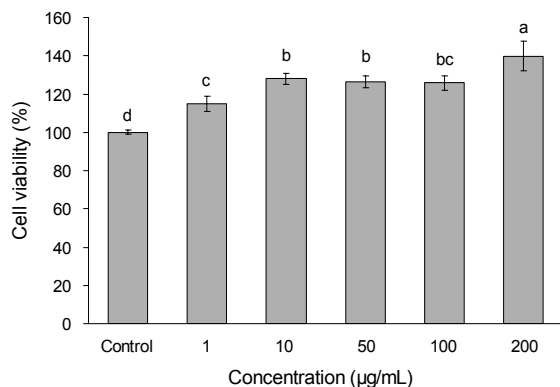


Fig. 5. Cell viabilities of fermentation product from the oyster hydrolysate.

분자량을 예상하였다(Fig. 4). 3,000 m/z 이하로 검출 시 감도는 낮았으며, 대부분의 main peak가 matrix peak와 겹쳐 나타났다. 800 m/z 이하에서 소수의 ion peak가 관찰되었으며, matrix와 구별되는 peak로서 1,392.282, 1,902.388 및 2,023.353 m/z를 확인할 수 있었다. 이 같은 결과는 superdex peptide column으로 측정된 결과와 일치한다.

#### 세포 독성

굴 가수분해 발효물의 정상 간세포인 Chang cell에 대한 세포 독성은 Fig. 5와 같다. 가수분해물의 최종 농도를 1, 10, 50, 100, 200 µg/mL로 처리한 결과 세포 독성을 보이지 않았다. 이 같은 결과는 굴 가수분해 발효물을 이용한 HepG2 cell(7)에 대한 세포 독성이 없다고 보고한 결과와 일치하는 결과를 보여주었다.

## 요 약

굴 가수분해물의 이취 제거를 위한 가수분해 및 발효의 최적 조건과 이의 항산화 효과를 검토하였다. 이취 제거를 위한 굴 가수분해물의 최적 추출 조건은 Neutralse를 이용하여 E/S 3.3%, 50°C, 8.3시간이었으며, 발효 공정은 24°C에서 glucose 0.5%와 *Saccharomyces cerevisiae*를 5% 접종하였다. 굴 가수분해 발효물의 구성 아미노산은 25.7%에 해당하였으며, Glu, Asp, Lys, Leu, Arg, Gly 및 Ala이 전체의 61.2%를 차지하였다. 유리 아미노산 조성의 경우 Leu, Ala, Phe, Val 및 Tau의 순으로 높게 나타났다. 또한 무기질 함량은 Na, P, K, Zn, Fe이 높게 나타났으며, 정상 간세포주인 Chang cell에 대한 독성은 나타나지 않았다. 이상의 결과로 미루어 *S. cerevisiae*에 의해 수산물의 이미취를 masking할 수 있으나, 기능성 원료로 사용하기 위해 최종 제품의 카드뮴 함량을 저감시킬 대책이 필요하다.

## 감사의 글

이 논문은 해양수산부의 재원으로 해양생명공학기술개발사업(PJT200671) 연구개발비 지원에 의해 수행되었습니다.

## REFERENCES

1. Kwon HN, Park JR, Jeon JR. 2008. Antioxidative and hepatoprotective effects of *Acer tegmentosum* M. extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1389-1394.
2. Kim SK. 2013. *Marine biotechnology*. World Science, Seoul, Korea. p 235.
3. Lee BJ. 2013. Development of functional food using fermented marine organism. *Food Industry and Nutrition* 18

- (1): 8-12.
4. Kim BT, Park SW, Jeung MS. 2012. *Seafood consumption trends and tasks according to structural change in population and society*. Korea Maritime Institute, Seoul, Korea. p 180-185.
  5. Park JS, Park JN, Park JK, Han IJ, Jung PM, Song BS, Choi JI, Kim JH, Han SB, Byun MW, Lee JW. 2008. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of gamma-irradiated fresh oysters during storage. *Journal of Radiation Industry* 2(2): 85-91.
  6. Hur SI, Park SH, Lee SS, Chung SY, Choi YJ. 2012. Antioxidative effect of oyster hydrolysate on the serum and hepatic homogenate in SD-rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1940-1948.
  7. Park SH, Moon SS, Xie CL, Chung SY, Choi YJ. 2014. Protective effects of enzymatic oyster hydrolysate on acetaminophen-induced HepG-2 cell damage. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 1166-1173.
  8. Do HJ, Park HJ, Kim OJ, Kim A, Choi YJ, Choung SY, Ha JM. 2012. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of *Crassostrea gigas* (oyster). *J Life Sci* 22: 220-225.
  9. Xie CL, Kim JS, Ha JM, Chung SY, Choi YJ. 2014. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from cross-linked oyster protein. *BioMed Res Int* 2014: 379234.
  10. Xie C, Chung S, Cao G, Lee KW, Choi YJ. 2015. *In silico* investigation of action mechanism of four novel angiotensin- I converting enzyme inhibitory peptides modified with Trp. *J Funct Foods* 17: 632-639.
  11. Shizuyuki O. 1980. Fish odors and masking them. *J Jpn Oil Chem Soc* 29: 469-488.
  12. Obata Y, Yamanishi T. 1950. Chemical studies on the substance of fish smell - III. Investigation on the components of mucilaginous substances of salmon. *Nippon Suisan Gakkaishi* 15: 554-556.
  13. Sung HS, Kim HK, Min HO, Choi JD, Kim YM. 2011. Changes in physicochemical and sensory properties of *Hizikia fusiforme* water extract by fermentation of lactic acid bacteria. *Kor J Fish Aquat Sci* 44: 104-110.
  14. Bae HN, Kim YM. 2010. Improvement of the functional qualities of sea tangle extract through fermentation by *Aspergillus oryzae*. *Fish Aqua Sci* 13: 12-17.
  15. Park JN, Kim RH, Woo HC, Chun BS. 2012. Removal of off-flavor from *Laminaria japonica* by treatment process of supercritical carbon dioxide. *Clean Technology* 18: 191-199.
  16. Roh HS, Youn HS, Jung SM, Hong YR, Kang KY, Chun BS. 2005. Separation of volatile compounds from tuna fish oil with supercritical carbon dioxide. *Korean J Biotechnol Bioeng* 20: 12-17.
  17. Riha V, Brunner G. 2000. Separation of fish oil ethyl esters with supercritical carbon dioxide. *J Supercrit Fluids* 17: 55-64.
  18. Cho EH, Park KH, Kim SY, Oh CS, Bang SI, Chae HJ. 2011. Process development for deodorization of fucoidan using a combined method of solvent extraction and spray drying. *Korean Soc Biotechnol Bioeng J* 26: 49-56.
  19. Cho SY, Joo DS, Kim GS, Yoon UG. 2003. Beverage containing an organic acid extract of *Undaria pinnatifida* and process for the preparation thereof. *Korea Patent* 10-2001-052362.
  20. Kim SK. 2009. Method for producing sea alga powder having no bad smell, the sea alga powder produced there by and cookie composition including the sea alga powder. *Korea Patent* 10-2009-0007000.
  21. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. 1948. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177: 751-766.
  22. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
  23. 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.
  24. Chen YC, Tou JC, Jaczynski J. 2009. Amino acid and mineral composition of protein and other components and their recovery yields from whole Antarctic krill (*Euphausia superba*) using isoelectric solubilization/precipitation. *J Food Sci* 74: H31-H39.
  25. Hubert J, Berger M, Nepveu F, Paul F, Daydé J. 2008. Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ. *Food Chem* 109: 709-721.
  26. Oboh G, Alabi KB, Akindahunsi AA. 2008. Fermentation changes the nutritive value, polyphenol distribution, and antioxidant properties of *Parkia biglobosa* seeds (African locust beans). *Food Biotechnol* 22: 363-376.
  27. Chung SH, Kim IH, Park HG, Kang HS, Yoon CS, Jeong HY, Choi NJ, Kwon EG, Kim YJ. Synthesis of conjugated linoleic acid by human-derived *Bifidobacterium breve* LMC 017: utilization as a functional starter culture for milk fermentation. *J Agric Food Chem* 56: 3311-3316.
  28. Lima IF, De Dea Lindner J, Soccol VT, Parada JL, Soccol CR. 2012. Development of an innovative nutraceutical fermented beverage from herbal mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) extract. *Int J Mol Sci* 13: 788-800.
  29. Nyanga LK, Nout MJ, Gadaga TH, Theelen B, Boekhout T, Zwietering MH. 2007. Yeasts and lactic acid bacteria microbiota from masau (*Ziziphus mauritiana*) fruits and their fermented fruit pulp in Zimbabwe. *Int J Food Microbiol* 120: 159-166.
  30. Shen YB, Carroll JA, Yoon I, Mateo RD, Kim SW. 2011. Effects of supplementing *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product in sow diets on performance of sows and nursing piglets. *J Anim Sci* 89: 2462-2471.
  31. Pellegrin N, Ke R, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Methods Enzymol* 299: 379-389.
  32. Kasankala LM, Xiong YL, Chen J. 2012. Enzymatic activity and flavor compound production in fermented silver carp fish paste inoculated with douchi starter culture. *J Agric Food Chem* 60: 226-233.
  33. Yoshikawa S, Kurihara H, Kawai Y, Yamazaki K, Tanaka A, Nishikiori T, Ohta T. 2010. Effect of halotolerant starter microorganisms on chemical characteristics of fermented chum salmon (*Oncorhynchus keta*) sauce. *J Agric Food Chem* 58: 6410-6417.
  34. FAO/WHO/UNU. 1985. *Energy and protein requirements*. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. WHO Technical Report. No. 724. WHO, Geneva, Switzerland.
  35. Jeong SY. 2015. Development and industrialization of health functional foods from surplus marine natural resources. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Sejong, Korea. 811001-3.
  36. Chung DM, Lee GD, Chun SS, Chung YC, Chun HK. 2011.



- Effect of NaCl on hydrolytic activity of leucine aminopeptidase from *Bacillus* sp. N2. *J Life Sci* 21: 761-765.
37. Choi SH, Kim SM. 2011. Quality properties of fermented squid viscera product with *Aspergillus oryzae* koji and its seasoning. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 94-101.
  38. Cho Y, Rhee HS. 1979. A study on flavorful taste components in kimchis—On free amino acids—. *Korean J Food Sci Technol* 11: 26-31.
  39. Cohen AI, McDaniel M, Orr H. 1973. Absolute levels of some free amino acids in normal and biologically fractionated retinas. *Invest Ophthalmol* 12: 686-693.
  40. Pasantes-Morales H, Wright CE, Gaull GE. 1985. Taurine protection of lymphoblastoid cells from iron-ascorbate induced damage. *Biochem Pharmacol* 34: 2205-2207.
  41. Yu KH. 2007. A study on the nutrient intakes and zinc nutritional status of preschool children in Ulsan. *J Nutr Health* 40: 385-394.
  42. Ashie INA, Lanier TC. 2000. Transglutaminases in seafood processing. In *Seafood Enzymes*. Haard NF, Simpson BK, eds. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA. p 147-166.