

# 살 오징어(*Todarodes pacificus*) 간체장 유래 한외여과 Aminopeptidase Retentate Fraction의 특성과 쓴맛 개선효과

김진수<sup>1,2</sup> · 이정석<sup>1</sup> · 윤인성<sup>2</sup> · 강상인<sup>2</sup> · 박선영<sup>2</sup> · 정우철<sup>1</sup> · 허민수<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>경상대학교 수산식품산업화기술지원센터, <sup>2</sup>경상대학교 해양식품생명의학과/해양산업연구소, <sup>3</sup>경상대학교 식품영양학과/해양산업연구소

## Characteristics of Aminopeptidase Retentate Fraction from the Common Squid *Todarodes pacificus* Hepatopancreas Obtained by Ultrafiltration, and Its Lowering the Bitterness

Jin-Soo Kim<sup>1,2</sup>, Jung Suck Lee<sup>1</sup>, In Seong Yoon<sup>2</sup>, Sang In Kang<sup>2</sup>, Sun Young Park<sup>2</sup>, U-Cheol Jeong<sup>1</sup> and Min Soo Heu<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Research Center for Industrial Development of Seafood, Gyeongsang National University, Tongyeong 53064, Korea

<sup>2</sup>Department of Seafood and Aquaculture Science/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Tongyeong 53064, Korea

<sup>3</sup>Department of Food and Nutrition/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea

This study investigated some enzymatic properties and bitterness improvement of an aminopeptidase retentate fraction (ARF) from common squid *Todarodes pacificus* hepatopancreas extract (HPE), obtained by ultrafiltration with a 10 kDa molecular weight cut off membrane. Endoprotease and aminopeptidase (AP) activity, and the purity of the ARF (>10 kDa) increased by 6.69-18.11 U/mg and 1.5-2.6 fold, respectively, compared to HPE (2.63-9.37 U/mg). The AP activity toward LeuPNA was stable at 20-55°C and pH 5-9, but decreased slightly with increasing concentration of NaCl in the reaction mixture. The ARF was the most active MetPNA and preferentially hydrolyzed Glu, Leu and AlaPNA. The bitterness tryptic casein hydrolysates (BTCHs) were treated with ARF, and the bitterness of ARF-BTCHs significantly decreased with increasing amounts of released amino acids Ala, Val, Met, Ile and Leu, which show strong correlations with bitterness. Therefore, the ARF of *T. pacificus* HPE obtained by ultrafiltration may have a considerable potential for application in protein hydrolysis and appears to be ideally suited to the purpose of lowering bitterness in protein hydrolysates.

Keywords: *Todarodes pacificus*, Hepatopancreas, Ultrafiltration, Aminopeptidase, Lowering bitterness

### 서론

오징어는 우리나라, 일본을 비롯한 아시아에서 가장 많은 소비가 이루어지는 수산자원이다. 이들은 소비자들에게 아미노산, 무기질, 비타민 등 풍부한 영양성분, 타우린 및 콜라겐 등과 같은 건강기능 성분이 다량 함유되어 있고, 근육의 특성상 어류와는 다른 특유의 조직감과 식미를 가지고 있어 선호도가 높은 수산 식품이다(Kim et al., 1997). 오징어의 주요 가식부인 근육을 제외하면, 가공부산물로서 간체장, 중장선, 껍질, 지느러미,

뼈, 먹물 등은 콜라겐, 지방, 무기질, 유리아미노산, 효소와 같은 유용성분이 풍부하며, 전체 중량의 약 40%가 가공 중에 발생한다. 특히 간체장 및 중장선과 같은 오징어 내장은 효소자원을 추출하기 좋은 자원이다. 그러나 이들 오징어 내장은 주로 사료용의 어분이나 비료로서 일부 사용되지만, 대부분은 무단 폐기되고 있어, 환경오염 유발의 원인이 되고 있다. 따라서 이들 가공부산물의 유용성분을 활용하려는 노력 없이 단순폐기로 야기되는 환경오염을 줄이면서, 고부가가치의 활용 방안을 모색하여야 한다(Ono et al., 2004; Kim et al., 2012a). 한편, 연

\*Corresponding author: Tel: +82. 55. 772. 1440 Fax: +82. 55. 772. 1430

E-mail address: minsheu@gnu.ac.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0112>

Korean J Fish Aquat Sci 53(1), 112-122, February 2020

Received 7 January 2020; Revised 20 January 2020; Accepted 5 February 2020

저자 직위: 김진수(교수), 이정석(연구교수), 윤인성(대학원생), 강상인(대학원생), 박선영(대학원생), 정우철(연구교수), 허민수(교수)

체동물의 간췌장(hepatopancreas, HP)에는 전체중의 14-21%를 차지하고, 이 중에 14-17%가 단백질이며(Sugiyama et al., 1989; Kim et al., 2012a), 강한 단백질분해 활성을 나타내는 다양한 효소가 분포하고 있다(Raksakulthai and Haard, 1999; Ezquerro-Brauer et al., 2002; Kim et al., 2012a). 단백질분해 효소는 제빵, 맥주, 치즈 및 어간장 등의 가공공정에 가공보조제로서 널리 이용되고 있다(Kim et al., 1999; Raksakulthai and Haard, 2001). 또한 식품단백질원에 대한 단백질분해효소의 이용은 단백질의 화학적, 영양학적 및 기능적인 특성을 개선하는 것으로 알려져 있어, 오징어 간췌장은 이러한 단백질 분해효소를 얻을 수 있는 좋은 추출소재가 될 수 있으며, 이들 오징어 간췌장 유래 효소의 특성에 대해 검토하는 것 또한 중요하다(Kim et al., 2012a).

앞서의 연구에서, 연체류 HP 추출물로부터 단백질의 용해도, 하전, 분자량차이에 따른 분획을 통해 얻어진 endoprotease 및 exopeptidase 획분의 분획효과(Kim et al., 2008a, 2008b; Kim et al., 2012b)와 이들 획분들의 쓴맛 개선효과(Kim et al., 2014a; 2014b)에 대해 보고한 바 있다. 이들 보고에서, 단백질 특성에 기초한 유기용매, 폴리에틸렌글리콜 및 염류를 사용한 분획공정은 대량처리가 가능하고 비교적 우수한 분획효율을 나타내었으나, 최종획분으로부터 이들 잔류 화학물질을 제거해야 하는 공정이 필요하였다. 한편, 크로마토그래피에 의한 분획방법은 용해도차이에 의한 분획방법보다 우수한 분획효율을 나타내었으나, 공정상 대량처리 및 연속처리가 어렵고, 크로마토그래피 장치가 필요하여 경제적이지 못한 것이 단점이었다(Kim et al., 2008a; 2008b; Kim et al., 2012a; 2012b).

한외여과 공정(ultrafiltration, UF)은 크로마토그래피 및 전기영동과 같은 공정에 비하여 대량 및 연속처리가 용이한 장점이 있을 뿐만 아니라 최종산물의 순도 및 생산성에 있어서 경제적인 방법이다(Li et al., 2006). 이러한 UF 공정은 난백의 lysozyme (Ghosh et al., 2000), surimi 수세액의 단백질분해효소 (Dewitt and Morrissey, 2002), 감자 및 과일주스의 천연단백질 (Zwijnenberg et al., 2002), 어류내장의 단백질분해효소와 가수분해물(Gildberg, 1992) 그리고 닭 혈액의 혈장단백질(Torres et al., 2002)과 같은 단백질 분리 및 분획에 널리 이용되고 있다.

과도한 단백질 가수분해로 인한 쓴맛은 음료 및 발효소스와 같은 단백질가수분해물의 이용 및 제품개발에 있어서 제약요인으로 보고되고 있다(Cho et al., 2004; Kim et al., 1999; Kim et al., 2005). 단백질 가수분해물의 쓴맛을 개선하거나 제거하기 위한 노력은 유기용매(Lalasis and Sjoberg, 1978), 소수성 작용 크로마토그래피(Bumberger and Belitz, 1993) 또는 활성탄(Carr et al., 1956)을 이용한 시도가 있었다. 단백질 가수분해물의 쓴맛은 펩타이드의 소수성과 밀접한 관련이 있기 때문에 (Clegg and Lim, 1974), endoprotease와 exopeptidase의 처리를 통해 쓴맛 펩타이드를 가수분해함으로써 효소를 이용하여 쓴맛을 개선하거나 감소시키려는 여러 시도도 있었다(Umetsu

et al., 1983, 1988; Minagawa et al., 1989; Izawa et al., 1997; Saha and Hayashi, 2001; Kim et al., 2014a, 2014b). 이상의 연구보고에 따르면, 오징어 간췌장에는 다량의 aminopeptidases가 분포하고 있으며, 이들 효소는 쓴맛개선효과가 있는 것으로 나타났다.

따라서, 오징어 가공부산물인 간췌장으로부터 한외여과 막을 이용하여 경제적이고 효율적인 aminopeptidase 획분을 얻기 위한 분획조건과 이렇게 얻어진 aminopeptidase UF 획분의 효소적 특성 및 쓴맛 개선효과에 대한 평가가 필요하다.

이 연구는 살 오징어(*T. pacificus*)의 간췌장 추출물로부터 10 kDa 한외여과 막을 이용하여 분획한 aminopeptidase retentate fraction (ARF)의 효소적 특성과 tryptic casein 가수분해물의 쓴맛 개선효과에 대하여 평가하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료

실험에 사용한 국내산 살 오징어(common squid *Todarodes pacificus*; length, 53.7±6.8 cm; weight, 411.5±28.5 g) hepatopancreas (HP; length, 18.5±4.5 cm; weight, 86.8±5.8 g)는 부산광역시 소재의 SJ수산에서 동결상태로 분양받아, 냉동상태(-70°C)로 보관하여 두고 실험에 사용하였다.

### 시약

쓴맛 casein 가수분해물의 조제를 위한 trypsin (EC3.4.21.4; porcine pancreas)과 효소활성 측정용 기질로서 azocasein, casein, L-leucine-p-nitroanilide (LeuPNA), L-arginine-p-nitroanilide (ArgPNA), L-lysine-p-nitroanilide (LysPNA), L-proline-p-nitroanilide (ProPNA), L-methionine-p-nitroanilide (MetPNA), L-phenylalanine-p-nitroanilide (PhePNA), L-glutamic acid-p-nitroanilide (GluPNA), L-valine-p-nitroanilide (ValPNA), L-alanine-p-nitroanilide (AlaPNA) 및 L-glycine-p-nitroanilide (GlyPNA), 그리고 쓴맛 표준물질로서 glycylphenylalanine (Gly-phe) 등은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하였고, 기타 시약은 분석급으로 구입하여 사용하였다. 한편, UF system의 구성은 분획용 한외여과 막(10 kDa molecular weight cut off)은 pellicon XL filter (50 cm<sup>2</sup> PLCGC 10K regenerated cellulose, Milipore Co., Billerica, MA, USA)을 연결한 peristaltic pump (RP-2100 EYELA, Rikakikai Co., LTD., Tokyo, Japan)로 구성하여 사용하였다.

### 간췌장 추출물(hepatopancreas extract, HPE)의 제조

살 오징어(*T. pacificus*) HPE는 Kim et al. (2014b)의 방법에 따라 제조하였다. 즉, 냉동상태의 시료를 부분해동 및 마쇄한 다음, 마쇄한 HP (600 g)에 대하여 3배량(v/w)의 탈 이온수를 가하여 균질기(Polytron PT 1200E, Kinematica AG, Lucerne,

Switzerland)로 균질화 및 교반(20°C, 6 h) 하여 추출하였다. 이어서 HPE에 대해 0.2배량(v/v)의 에틸에테르를 가하여 분액 여두를 통해 3회 반복하여 탈지한 다음, 원심분리(Supra 22K, Hanil Science Co., Daejeon, Korea; 12,000 g, 20 min)하여 얻어진 상층액을 탈지한 살 오징어 HPE로서 효소활성 및 ultrafiltration (UF) system을 이용한 분획용 시료로 사용하였다.

### Bitterness tryptic casein hydrolysates (BTCHs)의 제조

앞서 언급한 UF system을 이용하여 HPE로부터 분획한 ARF fraction의 쓴맛 개선 효과를 살펴보기 위하여 기질로 사용한 BTCH의 조제는 Nishiwaki et al. (2002)의 방법을 다소 수정한 Kim et al. (2014b)의 방법에 따라 제조하였다. 즉, 0.2% (w/v) trypsin과 2% (w/v) casein이 용해되어 있는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.5)를 1/6,000 (효소/기질비)의 비율로 효소반응 혼합액을 조제하여 반응시킨(50°C, 8 h) 다음, 효소 불활성화를 위해 80°C에서 20분간 가열처리하였다. 이를 원심분리하여 얻은 상층액은 관능검사를 통해 2% (w/v) Gly-phe 쓴맛 용액의 쓴맛강도에 준하는 BTCH로 제조하였다.

### 단백질 농도

단백질 농도는 Lowry et al. (1951)의 비색법에 따라 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 구한 검량곡선으로부터 측정하였다.

### Endoprotease 및 aminopeptidase 활성

Endoprotease의 활성은 azocasein 기질을 사용하여 Kim et al. (2008a)의 방법을 다소 수정하여 측정하였다. 즉, 20 µL의 효소 용액과 2 mL의 1% (w/v) azocasein 기질이 용해되어 있는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)를 혼합 및 반응(50°C, 1 h) 시키고, 이 반응액에 동량(2 mL)의 5% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) 용액을 가하여 실활 시킨 후, 정치(30 min) 및 원심분리(1,460 g, 20 min) 한 다음, 상층액의 흡광도를 측정(파장 410 nm)하여 검토하였다.

Aminopeptidase의 활성은 LeuPNA의 9종의 N-terminal blocked p-nitroanilide 기질로 사용하여 Kim et al. (2008b)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 20 µL의 효소 용액과 1 mL의 0.2 mM 기질이 용해되어 있는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.5)를 혼합 및 반응(50°C, 1 h) 시킨 다음, 반응 혼합액에 0.3 mL의 33% (v/v) acetic acid를 가하여 실활 시킨 후, 정치(30 min) 및 원심분리(1,460 g, 20 min)한 다음 흡광도를 측정(파장 410 nm)하여 검토하였다. 이들 endoprotease 및 aminopeptidase의 활성은 1 mg의 효소(단백질)가 1시간 동안 변화시키는 흡광도 0.1 digit을 1 U/mg으로 나타내었다.

### HPE로부터 aminopeptidase retentate fraction (ARF)의 분획

살 오징어 HPE로부터 ARF는 10 kDa molecular weight cut off (MWCO) 한외여과 막(Pellicon XL filter, PLCCG 10K regenerated cellulose, Milipore Co., Billerica, MA, USA)을 부착한 peristaltic pump (RP-2100 EYELA, Rikakikai Co., LTD., Tokyo, Japan)로 구성된 UF system의 container에 2 L의 HPE를 주입하고, 주입압력 10 bar 및 사출압력 20 bar로 pump의 압력을 설정한 다음, 30-50 mL/min의 crossflow rate로 한외여과를 실시하였다. 이 과정에서 각각 400 mL의 retentate fraction (RF, >10 kDa) 및 1,550 mL의 permeate fraction (PF; <10 kDa)을 회수하였다. 이들 UF fractions의 분획효과는 단백질 농도, 천연 및 합성 기질에 대한 효소활성을 측정하여 total activity 및 회수율로서 검토하였다.

### ARF의 안정성

살 오징어의 HPE로부터 한외여과를 통해 얻어진 ARF의 pH 안정성 검토를 위한 0.1 M citrate (pH 3.0-7.0), 0.1 M acetate (pH 4.0-5.0), 0.1 M sodium phosphate (pH 6.0-8.0), 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5-8.0), 0.1 M glycine-NaOH (pH 9.0-10.0), 0.1 M sodium carbonate (pH 9.0-10.0), 0.025 M NaHCO<sub>3</sub>-NaOH (pH 10.0 및 0.025 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH (pH 11.0) buffer는 Dawson et al. (1986)의 방법에 따라 각각 제조하여 사용하였다.

ARF의 LeuPNA에 대한 분해활성으로 측정된 pH 안정성은 20 µL의 ARF와 50 µL의 다양한 pH buffer (pH 3-11)로 전 단계 반응(40°C, 30 min)을 실시한 후, 그리고 온도 안정성은 20 µL의 RF를 20-80°C의 온도별로 30분간 전 단계 반응을 실시한 후, 각각 1 mL의 0.5 mM LeuPNA를 함유하는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.5)를 가하고, 앞서의 aminopeptidase 활성 측정방법(50°C, 1 h)에 따라 실시하였다. ARF의 pH 및 온도에 변화에 따른 안정성은 ARF의 최대활성(100%)에 대한 relative activity (%)로 나타내었다.

한편 ARF의 LeuPNA의 분해활성에 미치는 NaCl의 영향은 10-20 µL의 RF와 1 mL의 0.5 mM LeuPNA가 함유하는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.5)에 NaCl의 최종농도가 0-4.5 M이 되도록 첨가하여, 앞서의 aminopeptidase 활성 측정방법(50°C, 1 h)에 따라 측정하였다. NaCl을 첨가하지 않은 control의 활성에 대한 각 NaCl 농도별 활성을 relative activity (%)로 NaCl에 대한 안정성을 검토하였다.

### HPE 및 ARF의 기질 특이성

살 오징어 HPE 및 ARF의 N-terminal blocked 합성기질에 대한 기질특이성을 살펴보기 위하여, 10종의 LeuPNA, ArgPNA, LysPNA, ProPNA, MetPNA, PhePNA, GluPNA, ValPNA, AlaPNA 및 GlyPNA에 대한 분해활성은 효소 용액 20 µL와 1 mL의 0.5 mM 합성 기질을 함유하는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.5)를 혼합한 다음, 앞서의 aminopeptidase 활성 측정방법(50°C, 1 h)에 따라 측정하여, specific activity (U/mg)으로 나타내었다. 아울러 HPE의 LeuPNA의 활성에 대한 relative

activity (%)로도 나타냄으로써 UF system을 통한 분획효과에 대하여도 살펴보았다.

### 한외여과 ARF 및 permeate fraction (PF)의 쓴맛 개선 효과

ARF 및 PF의 BTCH에 대한 쓴맛개선 효과는 ARF- 및 PF-BTCH를 제조하여, 이들 가수분해물의 관능검사, HPLC profile 및 유리된 아미노산의 분석을 통하여 살펴보았다.

먼저, ARF- 및 PF-BTCH의 제조는 효소 (ARF 및 PF)와 기질(TBCH)의 비율을 1/10-1/2,000 (단백질 함량기준)으로 혼합하여, 50°C에서 8, 16 및 24시간동안 반응시킨 다음, 효소반응 정지(90°C, 20 min) 및 원심분리(1,460 g, 20 min)한 상층액을 효소 첨가비율 및 반응시간에 따른 ARF- 및 PF-BTCH로 사용하였다.

ARF- 및 PF-BTCH의 쓴맛에 대한 관능평가는 7인의 panel (해양식품공학과 및 식품영양학과 대학원생)이 1% Gly-phe 표준용액의 쓴맛강도와 유사하거나 강하게 느끼는 panel의 인원수로 나타내었다. 또한 ARF- 및 PF-BTCH의 HPLC profile에 의한 peptide 분석은 5C<sub>18</sub>-AR column (i.d. 4.6×250 mm, 5 μm, Waters Co., Massachusetts, USA)을 장착한 HPLC (L-2000 Series System, Hitachi Co., Tokyo, Japan)를 사용하였다. 반응시간 별 ARF-BTCHs에 대해 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA)가 함유된 acetonitrile 용액을 이동상으로 하여 linear gradient (0-45% 범위)로 용출하였다. 이때 유속은 0.7 mL/min, 용출시간은 60 min, UV detector (L-2400, Hitachi Co., Tokyo, Japan)의 파장은 214 nm로 하여 각 반응시간 별 가수분해물의 주요 peak area (%)와 HPLC (high performance liquid chromatography) profile의 변화에 대하여 검토하였다.

ARF-BTCHs의 유리된 아미노산(released amino acid) 분석 시료조제는 ARF-BTCHs (0, 8, 16 및 24 h)에 대해 동량의

20% trichloroacetic acid (TCA)를 가해 제단백질하고, 원심분리(10,000 g, 15 min)한 다음, 상층액에 동량의 ether를 가해 남아있는 TCA를 제거하는 과정을 3회 반복하였다. 이들 시료의 2 mL (50 mg의 단백질)에 각각 2 mL의 conc. HCl (12 N)를 가하여 밀봉한 다음, heating block (HF21, Yamato, Japan)으로 가수분해(110°C, 24 h)한 후, glass filter로 여과 및 감압건조하고, 이를 sodium citrate buffer (pH 2.2)로 정용하여 최종 분석용 시료를 제조하였다. 아미노산 자동분석기(Biochrom 30, Pharmacia Biotech, London, England)를 통해 각 ARF-BTCH의 유리된 아미노산을 분석하고 아미노산 조성(%), g/100 g of protein) 및 함량(mg/100 mL of BTCH)으로 나타내었다.

### 통계처리

모든 실험은 최소 3회 이상 반복 실시하였으며, 평균(mean)과 표준편차(standard deviation)로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 한외여과 획분들(UFs)의 endoprotease 및 aminopeptidase 활성분포

살 오징어(*Todarodes pacificus*) hepatopancreas extract (HPE)로부터 한외여과막(MWCO 10 kDa)으로 분획한 aminopeptidase retentate fraction (ARF, >10 kDa fraction) 및 permeate fraction (PF, <10 kDa fraction)의 endoprotease 및 aminopeptidase의 분해활성과 회수율은 Table 1과 같다. 먼저, HPE의 총 단백질량(27,660 mg)에 대하여 한외여과 과정을 거침으로서 각각 ARF (10,540 mg)는 38.1% 그리고 PF (13,780 mg)는 49.8%로 분획되었다. UFs (ARF 및 PF)의 azocasein에 대한 specific activity는 ARF가 6.76 U/mg으로, PF의 1.36 U/mg에 비하여 약 5.0배정도 강하였으며, HPE의 specific activ-

Table 1. Endoprotease and aminopeptidase activities of ARF and PE from the common squid *Todarodes pacificus* HPE by the ultrafiltration toward azocasein, LeuPNA and ArgPNA as substrates

Substrate	Fraction <sup>1</sup>	Total volume (mL)	Protein (mg/mL)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purity (fold)
Azocasein	HPE	2,000	13.83	72,613	2.63	100.0	1.0
	ARF	400	26.35	71,250	6.76	98.1	2.6
	PF	1,550	8.89	18,755	1.36	25.8	0.5
LeuPNA	HPE	2,000	13.83	269,044	9.73	100.0	1.0
	ARF	400	26.35	190,880	18.11	71.0	1.9
	PF	1,550	8.89	4,882	0.35	1.8	0.1
ArgPNA	HPE	2,000	13.83	126,492	4.57	100.0	1.0
	ARF	400	26.35	70,480	6.69	55.7	1.5
	PF	1,550	8.89	8,525	0.62	6.7	0.1

<sup>1</sup>HPE, hepatopancreas extract; ARF, aminopeptidase retentate fraction, >10 kDa fraction; PF, permeate fraction, <10 kDa fraction filtrated by the ultrafiltration membrane (MWCO 10 kDa)

ity (2.63 U/mg)에 비하여도 2.6배 정도 높아 한외여과 처리에 의한 endoprotease의 분획효과가 인정되었다. 한편 UF의 HPE에 대한 총 회수율(%) 및 total activity (U)는 ARF가 각각 98.1% 및 71,250 U로, PF의 25.8% 및 18,755 U에 비하여 월등히 높은 수준이었다. 이상의 endoprotease의 분해활성에 대한 결과로 미루어 보아, 한외여과 처리 ARF에는 주로 수산 동물의 내장에 분포하고 있는 trypsin, chymotrypsin 및 pepsin 유사효소 등과 같은 소화관련 endoprotease (Heu and Ahn, 1999; Bezerra et al., 2005; Li et al., 2006)가 분포하고 있으리라 추정되었다. UF의 LeuPNA에 대한 specific activity, 정제도 및 회수율은 HPE에 대하여, ARF의 경우 각각 18.11 U/mg, 1.9배 및 71.0%이었고, PF의 경우 각각 0.35 U/mg, 0.04배 및 1.8%이었다. 또한, total activity는 ARF가 190,880 U로 PF (4,883 U)에 비하여 약 39.1배 정도 높아, ARF에는 LeuPNA를 분해할 수 있는 aminopeptidase가 다량 분포하고 있으리라 추정되었다. Leucine aminopeptidase (EC 3.4.11.1)는 exopeptidase로서 peptide의 free  $\alpha$ -amino group에 인접한 peptide 결합을 가수분해하는 효소이며, Leu 잔기에 특이적으로 친화성이 높으나 Leu 뿐만이 아니라 Met 등과 같은 소수성 아미노산 잔기에 대해서도 비교적 높은 기질 친화성을 가진다고 알려져 있다(Minagawa et al., 1989). 그리고, Pan and Tanokura (2004)는 *Lactobacillus helveticus*로부터 정제한 aminopeptidase는 N 말단에 위치한 소수성 아미노산인 Leu, Ala 및 Phe 잔기에 특이적으로 친화성이 높다고 보고한 바 있다. 한편, UF의 ArgPNA에 대한 specific activity, 정제도 및 회수율은 ARF의 경우 각각 6.69 U/mg, 1.46배 및 55.7%이었고, PF의 경우 각각 0.62 U/mg, 0.14배 및 6.7%이었다. Total activity는 PF가 70,480 U로 PF (8,525 U)에 비하여 약 8.3배 정도 높아, ARF에는 ArgPNA를 분해할 수 있는 aminopeptidase도 다량 분포하고 있으리라 판단되었다. Arginine aminopeptidase (EC 3.4.11.6)는 동식물 및 미생물과 같은 생물체내에 존재하는 막-결합 효소로서, N 말단에 위치한 Arg 및 Lys 잔기에 특이적으로 높은 기질 친화성을 가진다고 보고하였으며(McDonald and Barrett, 1986), Sanz and Toldra (2002)는 *Lactobacillus sakei*로부터 정제한 arginine aminopeptidase의 경우 ArgAMC, ArgPNA, LysAMC 및 LysPNA와 같은 기질에 대하여 상대적으로 높은 분해활성을 가진다고 보고한 바 있다. 앞서의 보고(Kim et al., 2014b)에 따르면, 살오징어 HPE에 대한 회수율 측면에서 단백질 용해도차이에 의한 분획법(20.0-24.5%)과 크로마토그래피법(16.6-56.6%)에 의한 aminopeptidase 활성분획에 비하여 이 연구의 한외여과 ARF의 회수율(71%)이 월등히 높아 한외여과에 의한 효소분획이 산업적 응용에 있어 우수하다는 것이 확인되었다.

또한 본 실험의 10 kDa 한외 여과막을 이용한 한외여과 공정은 살 오징어 간체장 추출물(HPE)의 부피를 20% 수준으로 낮추는 농축효과뿐만 아니라, 저분자량(PF)의 희분을 효과적으로 제거할 수 있었고, endoprotease 및 aminopeptidase 분해활

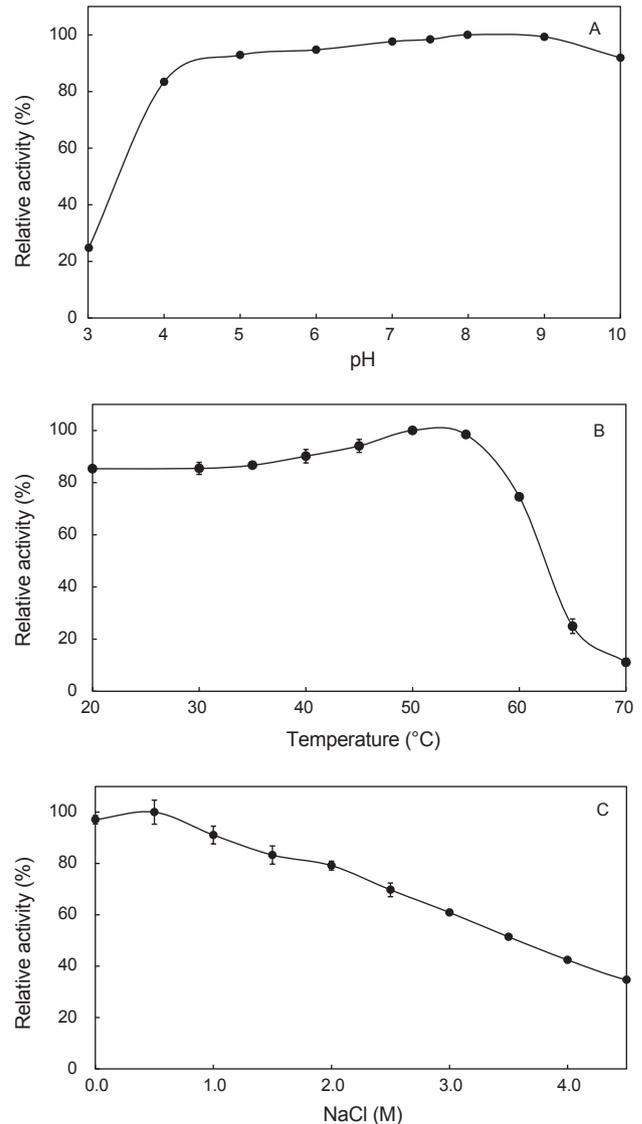


Fig. 1. Effect of pH stability (A), thermal stability (B) and NaCl (C) on aminopeptidase activity of the retentate fraction from the common squid *Todarodes pacificicus* hepatopancreas extracts by the ultrafiltration toward LeuPNA as a substrate.

성으로 살펴본 회수율 및 분획/정제효과가 우수한 것으로 나타났다. 이상의 결과와 보고에서 오징어 간체장의 한외여과 ARF는 endoprotease의 분해 특성 보다는 aminopeptidase의 분해 특성이 상대적으로 우수하였고, ArgPNA에 비하여 상대적으로 LeuPNA를 특이적으로 분해할 수 있는 aminopeptidase가 다량 분포하고 있다고 판단되어, 쓴맛 가수분해물 중 peptide 말단의 소수성 아미노산을 유리시켜 맛 증강 및 쓴맛개선을 시키는 품질 개선제로 이용 가능할 것으로 판단되었다.

#### 한외여과 ARF의 안정성

살 오징어 HPE로부터 한외여과법으로 분획한 ARF와 pH별 완충액과의 전 단계 반응 후, LeuPNA에 대하여 최적반응 조건 (pH 7.5, 50°C, 1 h)에서 분해활성을 측정한 RF의 pH 안정성은 Fig. 1A와 같다. pH 5-10 범위에서, RF의 분해활성은 92-100%의 분해활성을 나타내어 가장 안정한 pH범위이었으며, pH 4에서는 83.4%이었으나, pH 3에서는 급격한 활성감소를 보여 25%를 나타내었다. 한편, Rakskulthai and Haard (1999)는 오징어 간췌장으로부터 분획한 aminopeptidase 희분은 pH 6-7 범위에서, Park et al. (1998)은 *Bacillus licheniformis*로부터의 aminopeptidase는 pH 6-12 범위, Pan and Tanokura (2004)는 *Lactobacillus helveticus*로부터 aminopeptidase를 정제하여 효소(분획)의 pH 안정성을 살펴본 결과, pH 4.5-8.0 범위에서 안정하였다고 보고한 바 있다. 이와 같은 결과와 보고로 미루어 보아 살 오징어의 ARF는 넓은 pH 영역에서 안정성을 나타내어 산업적 및 효율적 이용이 가능하리라 판단되었다.

살 오징어 ARF의 LeuPNA에 대한 열 안정성은 Fig. 1B와 같다. ARF는 20-55°C 범위에서 80-100%의 활성이 유지되어 안정하였고, 60°C에서 활성이 87.2%로 감소하였으며, 그 이상의 온도에서는 급격히 저하하여 23%이하의 활성을 나타내었다. Park et al. (1998)은 *Bacillus licheniformis*로부터, 그리고 Pan and Tanokura (2004)는 *Lactobacillus helveticus*로부터 amino-peptidase를 분리 정제한 다음, 온도 안정성을 살펴 본 결과 최대 활성은 각각 50°C 및 40°C이었고, 그 이상의 온도에서는 활성이 급격히 감소하였다고 보고한 바 있다. 그리고, Murai et al. (2004)은 *Aneurini bacillus* sp.로부터 aminopeptidase를 정제하여 온도안정성을 살펴본 결과 55°C에서 최대 활성의 약 80% 이상을 유지하였다고 보고한 바 있다. 이상의 aminopeptidase에 대한 여러 연구자들의 연구 결과와 본 실험의 결과 간에 온도 안정성에 있어 차이가 없는 것으로 확인되었으며, 비교적 넓은 온도 범위에서 안정하였다.

살 오징어 간췌장 유래 한외여과 ARF를 이용하여 시판 상용 효소에 의하여 제조된 단백질가수분해물이나 속성 액젓의 쓴맛을 개선하고자 하는 경우, ARF에 존재하는 exopeptidase가 식염에 대해 내성이 있어야 한다. 이러한 일면에서 ARF의 LeuPNA 기질에 대한 식염의 영향을 살펴본 결과는 Fig. 1C와 같다. ARF의 aminopeptidase 활성은 0.5 M NaCl (약 2.9% 수준)에서는 크게 영향을 받지 않았으나, 이보다 농도를 증가시키는 경우 점차적으로 감소하는 경향을 나타내었고, 4.5 M (약 26.3%)의 식염이 존재하는 경우 최대 활성의 37%만을 나타내었다. 한편, Degraeve and Martial-Gros (2003)와 Vo et al. (1983)의 보고에 따르면 aminopeptidase는 고염 농도에서 효소 활성의 감소가 두드러진다고 하여, 본 연구 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 이는 식염농도의 증가에 따른 효소 반응액 중 이온강도의 증가로 인해 효소 단백질이 구조적 변화를 초래하여 불활성화되기 때문이라고 보고한 바 있다(Dixon et al., 1979). 이상의 결과와 보고로 미루어 보아 살 오징어 간췌장 ARF는 식염농도가

높은 속성액젓(식염농도 25%내외)의 쓴맛 개선에 적용하고자 하는 경우, 식염이 없는 가수분해물에서 보다는 약 3배 정도의 효소량을 추가적으로 첨가하거나, 가능한 낮은 식염 농도에서 적용하는 것이 효과적이라 판단되었다.

한외여과 ARF의 기질 특이성

살 오징어 간췌장 유래 HPE 및 한외여과 ARF의 10종의 선택적 합성기질에 대한 분해활성을 측정하여 기질 특이성을 검토한 결과는 Table 2와 같다. HPE의 LeuPNA 기질에 대한 분해활성(9.72 U/mg 및 100%)을 기준으로 하여 HPE 및 ARF의 합성기질에 대한 상대활성 (%)은 HPE의 경우, GluPNA가 249%로 가장 강한 분해활성을 보였고, 다음으로 MetPNA (161%), LeuPNA (100%), AlaPNA (86%) 순이었으며, ArgPNA, LysPNA, PhePNA, ProPNA, GlyPNA 및 ValPNA는 9-47%의 분해활성을 나타내었다. 한외여과 ARF의 경우, MetPNA가 308%로 가장 강한 분해활성을 나타내었으며, 다음으로 GluPNA (282%), LeuPNA (186%), AlaPNA (160%), ArgPNA (69%)의 순이었으며, PhePNA, LysPNA, ProPNA, GlyPNA 및 ValPNA는 1.2-59%의 분해활성을 나타내었다. 이상의 결과에서, 한외여과 공정을 통하여 분획한 ARF는 HPE에 비하여, ProPNA, ValPNA 및 GlyPNA의 분해활성은 감소한 반면, 나머지 7종의 합성기질에 대한 분해활성은 증가(1.1-1.9 배)하였다. HPE 및 ARF 모두 극성아미노산인 GluPNA, 소수성 아미노산인 MetPNA, LeuPNA 및 AlaPNA에 대한 분해활성이 두드러졌으며, 10종의 선택적 합성기질에 대해 활성의 강도에는 차이가 있었지만 모두 분해활성을 나타냄으로서 광범위

Table 2. Substrate specificity of HPE and ARF of common squid *Todarodes pacificicus* hepatopancreas toward various substrates

Substrates	HPE		ARF	
	Specific activity (U/mg)	Relative activity (%) <sup>1</sup>	Specific activity (U/mg)	Relative activity (%) <sup>1</sup>
GluPNA	24.18±0.01	248.7	27.44±0.09	282.2
LysPNA	3.59±0.00	36.9	4.27±0.12	43.9
ArgPNA	4.57±0.02	47.0	6.69±0.01	68.8
ProPNA <sup>2</sup>	2.03±0.03	20.9	1.18±0.02	12.1
GlyPNA <sup>2</sup>	1.35±0.06	13.9	0.48±0.02	4.9
AlaPNA <sup>2</sup>	8.34±0.11	85.8	15.60±0.23	160.4
ValPNA <sup>2</sup>	0.88±0.12	9.0	0.12±0.02	1.2
MetPNA <sup>2</sup>	15.60±0.06	160.5	29.90±0.05	307.5
LeuPNA <sup>2</sup>	9.72±0.05	100.0	18.11±0.18	186.2
PhePNA <sup>2</sup>	3.31±0.04	34.0	5.77±0.28	59.3

<sup>1</sup>Relative activity (%) was calculated base on LeuPNA specific activity. <sup>2</sup>Hydrophobic amino acid. Values are mean±SD of three determination. HPE, hepatopancreas extract; ARF, aminopeptidase retentate fraction.

한 기질특이성이 확인되었다.

Umetsu et al. (2003)은 가리비 중장선(midgut gland)으로부터 정제한 aminopeptidase의 경우 AlaPNA를 기준으로 하였을 때 MetPNA, GluPNA 및 GlyPNA의 순으로 분해활성(18-34%)이 강하였으나 PhePNA, ArgPNA, 및 LeuPNA에 대하여는 미약한 분해활성(3-7%)을 보인다고 하였으며, 비교적 광범위한 기질 특이성을 나타낸다고 보고하였다. 또한, Vo et al. (1983)은 정어리로부터 정제한 aminopeptidase의 경우 LeuBNA, AlaBNA, LeuPNA 및 AlaPNA에 대하여 강한 분해활성을 나타내었다고 보고한 바 있고, Chiou et al. (1988)은 송어 알로부터 정제한 aminopeptidase의 경우 AlaBNA를 기준으로, PheBNA 및 LysBNA에 대하여 63%이상의 분해활성을 나타내었다고 보고한 바 있다.

이 연구의 결과에서도 ARF는 MetPNA, LeuPNA, GluPNA 및 AlaPNA에 대해 강한 분해활성을 나타내어, peptides 말단의 아미노산들 중 Met, Leu 및 Ala 등과 같은 소수성 아미노산 (Ishibashi et al., 1987; Liu and Yasuda, 2005)의 용이한 절단에 의해 식품의 쓴맛 개선에 일익을 담당할 수 있으리라 판단되었다.

#### 한외여과 RF의 쓴맛개선 효과

살 오징어 간체장 HPE로부터 한외여과공정을 통해 분획한 ARF 및 PF의 첨가비율과 가수분해 시간에 따른 BTCH (쓴맛 tryptic casein 가수분해물)에 대한 쓴맛개선 효과를 1% Gly-Phe 쓴맛 표준용액에 대한 쓴맛평가로 살펴본 결과는 Table 3과 같다. ARF는 효소/기질의 비율이 1/2,000과 1/1,000 일 때,

Table 3. Sensory score on the bitterness of ARF and PF-treated BTCHs

Fraction <sup>1</sup>	E/S	Hydrolysis time (h)			
		0	8	16	24
ARF	1/2,000	7 <sup>2</sup>	7	7	7
	1/1,000	7	7	6	5
	1/500	7	2	1	0
	1/200	7	1	1	0
	1/100	7	1	0	0
	1/50	7	1	0	0
	1/10	7	1	0	0
	PF	1/200	7	7	7
	1/100	7	7	7	7
	1/50	7	7	7	6

<sup>1</sup>ARF, aminopeptidase retentate fraction, >10 kDa fraction; PF, permeate fraction, <10 kDa fraction by the ultrafiltration. <sup>2</sup>Numericals represent the number felt strong bitterness compared to the bitterness of 1% Gly-phe bitter solution. ARF, aminopeptidase retentate fraction; BTCH, bitter tryptic casein hydrolysate; PF, permeate fraction.

가수분해 16시간에 이르기까지 쓴맛에 대한 변화가 없었으며, PF의 경우 1/200, 1/100 및 1/50 일 때 가수분해 시간에 관계없이 7명의 panel member 모두가 1% Gly-phe 용액 보다 쓴맛이 강하다고 평가하여 쓴맛 개선 효과가 전혀 인지되지 않았다. 그러나, ARF에 대한 기질의 비율이 1/500과 1/200은 1% Gly-phe 용액과 쓴맛이 강하다고 평가한 panel이 가수분해 8시간에서 2명, 그리고 16시간에서 1명만이었으며, 24에서 panel member 모두가 1% Gly-phe 보다 쓴맛이 약하거나, 느끼지 못하여 쓴맛 개선 효과가 확연히 인정되었다. 또한 ARF의 첨가비율을 높인 실험군(1/100 이상)은 1% Gly-phe 용액과 쓴맛이 유사하다고 평가한 panel이 가수분해 8시간에서 1명만이었고, 이후의 반응시간에서는 전원이 쓴맛을 감지하지 못하였다. 이와 같은 결과는 ARF에 분포하는 aminopeptidase가 peptide 말단의 쓴맛을 야기하는 소수성 아미노산들의 대부분이 peptide로부터 절단하였기 때문이라 판단되었다(Liu and Yasuda, 2005; Ishibashi et al., 1987a). 이상의 결과로 미루어 보아 살 오징어 간체장 유래 한외여과 ARF는 단백질 가수분해물이나 속성 액질의 쓴맛 개선제로 이용하고자 하는 경우 효소/기질의 비율을 1/500으로 하여 16시간이상 가수분해 시키거나 또는 1/100 이상으로 하여 8시간 이하의 가수분해 처리를 하는 것이 적절하리라 판단되었다.

ARF 처리 BTCHs에 대한 쓴맛평가의 결과(Table 3)로부터 효소/기질 비율을 1/500으로 처리한 가수분해시간 별 가수분해물(8, 16 및 24 h)에 대하여 이들의 쓴맛개선 효과를 HPLC profiles과 peak area (%)의 변화는 각각 Fig. 2와 Table 4에 나타내었다. ARF 처리 BTCH의 HPLC chromatogram 상에서 상당히 많은 peak들이 검출되었으나, 가수분해시간에 따라 변화

Table 4. Changes in major peaks area(%) from HPLC profile of BTCHs treated with ARF of common squid *Todarodes pacificicus* hepatopancreas by the ultrafiltration for different times

Peak No.	BTCH <sup>1</sup>	ARF-treated casein hydrolysate <sup>2</sup>		
		(Area %)		
		ARF-BTCH08	ARF-BTCH16	ARF-BTCH24
1	4.6	4.4	25.4	29.2
2	4.2	18.4	5.4	4.4
3	5.2	7.2	13.1	14.9
4	3.3	6.9	8.6	6.9
5	11.9	17.1	29.8	40.3
6	21.4	1.7	1.4	1.3
7	18.8	16.3	14.4	1.3
8	13.6	2.0	2.0	1.6

<sup>1</sup>BTCH, bitter tryptic casein hydrolysate, <sup>2</sup>ARF-BTCH(08-24), BTCH treated with ARF ratio of 1/500 (w/w) for 8-24 h. HPLC, high performance liquid chromatography; ARF, aminopeptidase retentate fraction.

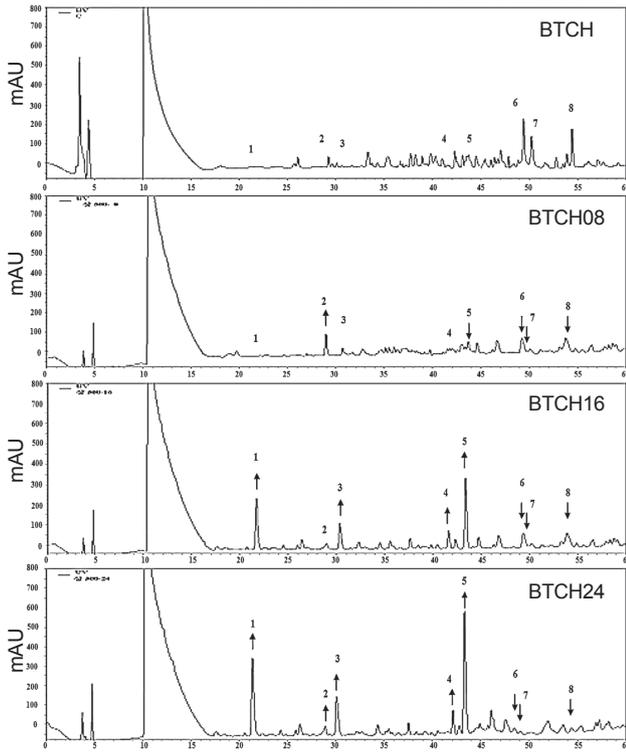


Fig. 2. Reverse-phase HPLC profile of BTCHs treated with ARF of common squid *Todarodes pacificicus* hepatopancreas by the ultra-filtration for different incubation times. BTCH, bitter tryptic casein hydrolysate; BTCH08, BTCH treated with RF/substrate ratio of 1:500 (w/w) for 8 h; BTCH16, BTCH treated with RF/substrate ratio of 1:500 (w/w) for 16 h; BTCH24, BTCH treated with ARF substrate ratio of 1:500 (w/w) for 24 h. HPLC, high performance liquid chromatography; ARF, aminopeptidase retentate fraction.

가 두드러진 peak는 8개로 동정되었다. BTCH의 profile의 경우, 분석시 사용한 칼럼(C18)과 이동상(0-45% acetonitrile)의 특성에 따라 retention time (0-60 min)이 길어질수록 상대적으로 소수성이 강한 peptide 획분들이 용출된 것으로 추정되었으며(peak 6-8), 이들 peak 6-8이 casein 가수분해물의 쓴맛을 내게 하는 peptide 획분으로 판단되었다. ARF 처리 BTCHs (08-24)의 경우, 가수분해시간이 증가에 따라 peaks 1-5는 증가하는 경향을 보인 반면에 peaks 6-8은 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 HPLC profiles 상에서 상대적으로 친수성이 강한 peaks (1-5)의 증가는 소수성이 강한 peaks (6-8)에 분포하는 peptides의 소수성 N 말단 아미노산이 ARF의 작용으로 유리되어 상대적으로 소수성이 약해지면서 peaks 1-5의 증가로 이어진 것이라 판단되었다(Fig. 2).

BTCH 및 ARF 처리 BTCHs (8-24)의 가수분해시간에 따른 HPLC profile상(Fig. 2)의 peak area (%)의 변화(Table 4)는 먼저, 대조구(BTCH)의 8종 peaks에 대한 area %는 peak 1

이 4.6%, peak 2 (4.2%), peak 3 (5.2%), peak 4 (3.3%), peak 5 (11.9%), peak 6 (21.4%), peak 7 (18.8%) 및 peak 8이 13.6% 이었다. RF-BTCH08의 경우, BTCH에 비하여 소수성이 강한 48분대의 peak 6 (1.7%), 및 54분대의 peak 8 (2.0%)이 현저히 감소하였고, 반면 상대적으로 소수성이 약한 27분대의 peak 2 (18.4%) 및 43분대의 peak 5 (17.1%)가 상당한 증가를 보였다. ARF-BTCH16의 경우, 22분대의 peak 1 (25.4%), 29분대의 peak 3 (13.1%) 및 43분대의 peak 5 (29.8%)의 증가가 두드러졌으며, ARF-BTCH24의 경우는 peak 5 (40.3%)의 증가와 49분대의 peak 7 (1.3%)의 감소가 두드러졌다.

Nishiwaki et al.(2002), Bumberger and Belitz (1993), Lin et al. (1997) 및 Park and Lee (1996)도 aminopeptidase를 이용하여 casein 가수분해물의 쓴맛개선을 시도하였고, 그 효과를 C18-RP HPLC 분석 결과 retention time 40분대 이후의 소수성이 강한 peak들이 감소한 반면 40분대 이전의 친수성이 강한 peak들이 증가하였다고 보고하여 본 실험 결과와 유사하였다. 이러한 보고의 내용을 확인하기 위하여 가수분해시간에 따른 ARF 처리 BTCHs의 방출된 아미노산의 조성 변화를 살펴 보고자 한다.

#### 한외여과 ARF 처리 BTCHs의 아미노산의 조성

살 오징어 간췌장 유래 한외여과 ARF에 의한 가수분해시간 별 BTCHs의 아미노산의 변화를 함량(mg/100 mL) 및 조성(%)으로 Table 5에 나타내었다. 먼저, 가수분해시간별에 따른 방출된 총 아미노산 함량(released amino acid)은 쓴맛 가수분해물인 BTCH가 1,912.2 mg/100 mL이었으며, 이 중에서 Phe의 함량이 35.5%를 차지하였다. ARF 처리 BTCH08은 3,915.2 mg/100mL, BTCH16은 4,268.1 mg/100 mL 그리고 BTCH24 6,328.5 mg/100 mL로서 BTCH에 비하여 가수분해시간의 경과에 따라 각각 2.05배, 2.23배 및 3.31배로 ARF에 의해 방출된 총 아미노산 함량이 증가하였다. 17종의 아미노산 모두 ARF의 가수분해에 의해 함량이 증가한 것으로 나타났으며, 특히 Cys, His 및 Phe를 제외한 14종의 유리된 아미노산 함량이 최소 2배 이상 함량이 증가한 것으로 나타났다. 아울러 방출된 아미노산 함량의 증가 더불어, BTCH에 비하여 2배 이상의 두드러진 아미노산 조성(%)의 증가를 보인 아미노산은 Asp, Tyr, Arg, Met, Ile 및 Leu이었으며, 조성비를 유지하거나 다소증가한 아미노산은 Thr, Ser, Glu, Lys, Ala 및 Val로서 이들 유리된 아미노산들은 ARF의 기질 특이성과 밀접한 관련성이 있는 것으로 판단되었다. 또한 가수분해시간에 따른 아미노산의 조성비는 감소하였으나, 아미노산 함량이 증가한 Pro Gly 및 Phe도 관련성이 있을 것으로 추정되었다. 따라서, 이러한 결과는 앞서의 합성기질에 대한 기질 특이성(Table 2)을 그대로 반영한 결과임이 최종적으로 확인되었다. 또한, 총 아미노산 조성에 대한 소수성 아미노산의 비율(%)는 BTCH (50.6%)에 비하여 ARF-BTCHs (08-24)는 39.5-41.4%로 감소하여, 앞서의 HPLC profile의 결

Table 5. Released amino acid compositions of BTCHs treated with ARF of common squid *Todarodes pacificus* hepatopancreas by the ultrafiltration for different times

Amino acid	mg/100 mL of hydrolysate				g/100 g of protein (%)			
	BTCH <sup>2</sup>	ARF-BTCH08	ARF-BTCH16	ARF-BTCH24	BTCH <sup>2</sup>	ARF-BTCH08	ARF-BTCH16	ARF-BTCH24
Asp	27.7	187.1	199.5	292.3	1.5	4.8	4.7	4.6
Thr	32.4	69.1	63.0	117.6	1.7	1.8	1.5	1.9
Ser	39.9	86.7	58.9	145.3	2.1	2.2	1.4	2.3
Glu	124.1	273.8	320.6	483.3	6.5	7.0	7.5	7.6
Cys	71.2	61.4	64.7	76.4	3.7	1.6	1.5	1.2
Tyr	134.8	429.9	505.6	917.9	7.0	11.0	11.8	14.5
His	257.6	210.3	203.5	280.1	13.5	5.4	4.8	4.4
Lys	187.1	473.1	502.9	637.3	9.8	12.1	11.8	10.1
Arg	70.1	579.1	659.3	758.0	3.7	14.8	15.4	12.0
Subtotal	944.9	2,370.5	2,578	3,708.2	49.4	60.5	60.4	58.6
Pro <sup>1</sup>	38.7	38.3	50.3	103.7	2.0	1.0	1.2	1.6
Gly <sup>1</sup>	16.1	38.0	19.7	34.8	0.8	1.0	0.5	0.5
Ala <sup>1</sup>	16.6	68.7	62.7	96.4	0.9	1.8	1.5	1.5
Val <sup>1</sup>	113.8	257.0	272.5	354.1	6.0	6.6	6.4	5.6
Met <sup>1</sup>	18.4	79.4	98.5	213.3	1.0	2.0	2.3	3.4
Ile <sup>1</sup>	39.6	136.6	162.7	333.0	2.1	3.5	3.8	5.3
Leu <sup>1</sup>	44.8	359.2	422.4	657.4	2.3	9.2	9.9	10.4
Phe <sup>1</sup>	679.2	567.4	601.2	827.4	35.5	14.5	14.1	13.1
Subtotal	967.2	1,544.6	1,690	2,620.1	50.6	39.5	39.6	41.4
Total	1,912.2	3,915.2	4,268.1	6,328.5	100.0	100.0	100.0	100.0

<sup>1</sup>Hydrophobic amino acid, <sup>2</sup>Refer to the footnote of Table 4. BTCH, bitter tryptic casein hydrolysate; ARF, aminopeptidase retentate fraction.

과(Fig 2와 Table 4)와 일치하였으며, 쓴맛에 관여하는 소수성 아미노산의 감소를 확인할 수 있었다.

이상의 결과로부터 ARF에 분포하는 aminopeptidases에 의해 BTCH의 peptide들 중 peptide 말단에 Leu 및 Arg 등과 같은 쓴맛에 관여하는 아미노산을 유리함으로써 인하여 상대적으로 친수성 peptide로 전환되는 비율이 높았기 때문이라 판단되었다(Nishiwaki et al., 2002). 한편, Park and Lee (1996)는 cheddar cheese에서 *Lactobacillus casei* ssp. *casei* LLG 유래 aminopeptidase를 분리하여 쓴맛을 가진 상업용 cheddar EMC cheese에 첨가하여 제조한 후, HPLC profile을 분석한 결과 cheddar cheese의 경우 용출 후반부에 나타났던 소수성 peak들의 크기가 줄었고 쓴맛도 소실되었으나, Pro 잔기를 많이 함유하는 fraction은 제거되지 않았다고 보고한 바 있다. 그리고, Minagawa et al. (1989)은 aminopeptidase가 bitter fraction 중 특이적으로 Pro과 Asp 등과 같은 몇몇 종류의 아미노산을 유리시키지 못한다고 보고한 바 있다. 이상의 ARF의 기질특이성, 관능검사, HPLC profile 및 ARF에 의해 방출된 아미노산의 조성의 결과로 미루어 보아, peptide에 의해 야기된 가수분해물의 쓴맛은 살 오징어 간체장 유래 한외여과 ARF (>10 kDa)에 대

하여 기질의 비율을 1/500으로 한 다음 16시간 이상 가수분해시키는 경우 쓴맛을 개선시킬 수 있으리라 판단되었다.

## 사 사

이 논문은 2019년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구의 일부임(해역별 특성을 고려한 전통 수산가공식품 개발 및 상품화).

## References

- Bezerra RS, Lins EJJ, Alencar RB, Paiva PMG, Chaves MEC, Coelho LCBB and Carvalho LB Jr. 2005. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process Biochem* 40, 1829-1834. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.066>.
- Bumberger E and Belitz HD. 1993. Bitter taste of enzymic hydrolysates of casein. *Z Lebensm Unter Forsch* 197, 14-19. <https://doi.org/10.1007/bf01202693>.
- Carr JW, Loughed TC and Baker BE. 1956. Studies on protein hydrolysis. IV. Further observations on the taste of enzymic

- protein hydrolysates. *J Sci Food Agric* 7, 629-637. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740071002>.
- Chiou TK, Matsui T and Konosu S. 1988. Purification and properties of an aminopeptidase from mullet, *Mugil cephalus*, roe. *Agric Biol Chem* 52, 235-242. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.52.235>.
- Cho MJ, Unklebay N, Heieh F and Clarke AD. 2004. Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysates. *J Agric Food Chem* 52, 5895-5901. <https://doi.org/10.1021/jf0495035>.
- Clegg, KM and Lim CL. 1974. The structure of a bitter peptide derived from casein by digestion with papain. *J Dairy res* 41, 383-387. <https://doi.org/10.1017/s0022029900019695>.
- Dawson RMC, Elliot DC, Elliot WH and Jones KM. 1986. Data for biochemical research, 3rd eds. Oxford Univ Press, Oxford, U.K., 417-441.
- Degraeve P and Martial-Gros A. 2003. Purification and partial characterisation of X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase of *Lactobacillus helveticus* ITG LH1. *Inter Dairy J* 13, 497-507. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(03\)00057-8](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(03)00057-8).
- Dewitt MCA and Morrissey MT. 2002. Parameters for the recovery of proteases from surimi wash water. *Bioresour. Technol* 81, 241-247. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(01\)00130-4](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(01)00130-4).
- Dixon M, Webb EC and Thorne CJR. 1979. Tipton KF. Enzymes, 3rd ed. Longman, London, U.K., 138.
- Ezquerria-Brauer JM, Haard NF, Ramírez-Olivas R, Olivas-Burrola H and Velazquez-Sánchez CJ. 2002. Influence of harvest season on the proteolytic activity of hepatopancreas and mantle tissues from jumbo squid (*Dosswicus gigas*). *J Food Biochem* 26, 459-475. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2002.tb00766.x>.
- Ghosh R, Silva SS and Cui ZF. 2000. Lysozyme separation by hollow-fibre ultrafiltration. *Biochem Eng J* 6, 19-24. [https://doi.org/10.1016/s1369-703x\(00\)00069-3](https://doi.org/10.1016/s1369-703x(00)00069-3).
- Gildberg A. 1992. Recovery of proteases and protein hydrolysates from fish viscera. *Bioresour Technol* 39, 271-276. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(92\)90216-k](https://doi.org/10.1016/0960-8524(92)90216-k).
- Heu MS and Ahn SH. 1999. Development and fractionation of proteolytic enzymes from an inedible seafood product. *J Kor Fish Soc* 32, 458-465.
- Ishibashi N, Arita Y, Kanehisa H, Kogure K, Okai H and Fukui S. 1987. Bitterness of leucine-containing peptides. *Agric Biol Chem* 51, 2389-2394. <https://doi.org/10.1080/00021369.1987.10868411>.
- Izawa N, Tokuyasu K and Hayashi K. 1997. Debitting of protein hydrolysates using *Aeromonas caviae* aminopeptidase. *J Agric Food Chem* 45, 543-545. <https://doi.org/10.1021/jf960784t>.
- Kim EM, Jo JH, Oh SW and Kim YM. 1997. Characteristics of squid viscera oil. *Korean J Fish Aquat Sci* 30, 595-600.
- Kim IS, Choi YJ, Heu MS, Cho YJ, Im YS, Gu YS, Yeo SG and Park JW. 1999. Peptide properties of rapid salted and fermented anchovy sauce using various proteases. *J Korean Fish Soc* 32, 481-487.
- Kim HS, Yang SK, Park CH, Han BW, Kang KT, Ji SJ, Sye YE, Heu MS and Kim JS. 2005. Preparation of accelerated salt-fermented Anchovy sauce added with shrimp byproducts. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 34, 1265-1273. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2005.34.8.1265>.
- Kim HS, Kim JS and Heu MS. 2008a. Fractionation of endoprotease from viscera of the Argentina shortfin squid, *Illex argentinus*. *Korean J Fish Aquat Sci* 41, 176-181. <https://doi.org/10.5657/kfas.2008.41.3.176>.
- Kim HS, Kim JS and Heu MS. 2008b. Fractionation of exopeptidase from viscera of Argentina shortfin Squid, *Illex argentinus*. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 37, 1009-1017. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2008.37.8.1009>.
- Kim JS, Kim MJ, Kim KH, Kang SI, Park SH, Lee HJ and Heu MS. 2014a. Debitting of enzymatic hydrolysate using exopeptidase active fractions from the Argentina shortfin squid *Illex argentinus* hepatopancreas. *Korean J Fish Aquat Sci* 47, 135-143. <https://doi.org/10.5657/kfas.2014.0135>.
- Kim JS, Kim HS, Lee HJ, Park SH, Kim KH, Kang SI and Heu MS. 2014b. Lowering the bitterness of enzymatic hydrolysate using aminopeptidase-active fractions from the common squid (*Todarodes pacificus*) hepatopancreas. *Kor J Food Sci Technol* 46, 716-722. <https://doi.org/10.9721/kjfst.2014.46.6.716>.
- Kim MJ, Kim HJ, Kim KH, Heu MS and Kim JS. 2012a. Endoprotease and exopeptidase activities in the hepatopancreas of the cuttlefish *Sepia officinalis*, the squid *Todarodes pacificus*, and the octopus *Octopus vulgaris* Cuvier. *Korean J Fish Aquat Sci* 15, 197-202. <https://doi.org/10.5657/fas.2012.0197>.
- Kim MJ, Kim HJ, Kim KH, Heu MS, Lee JS and Kim JS. 2012b. Fractionation and enzymatic characterization of endoprotease and exopeptidase from crude extracts of cuttlefish *Sepia officinalis* hepatopancreas. *Korean J Fish Aquat Sci* 15, 283-291. <https://doi.org/10.5657/fas.2012.0283>.
- Lalasis G and Sjöberg LB. 1978. Two new methods of debittering protein hydrolysates and a fraction of hydrolysates with exceptionally high content of essential amino acids. *J Agric Food Chem* 26, 742-749. <https://doi.org/10.1021/jf60217a056>.
- Li Z, Youravong W and H-Kittikun A. 2006. Separation of proteases from yellowfin tuna spleen by ultrafiltration. *Bioresour Technol* 97, 2364-2370. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.10.019>.
- Lin SB, Nelles LP, Cordle CT and Thomas RL. 1997. Debitting casein hydrolysates with octadecyl-siloxane (C18) columns. *J Food Sci* 62, 665-670. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb15431.x>.
- Liu F and Yasuda M. 2005. Debitting effect of *Monascus*

- carboxypeptidase during the hydrolysis of soybean protein. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32, 487-489. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0024-9>.
- Lowry OH, Watanabe NJ, Farr AL and Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- McDonald JK and Barrett AJ. 1986. Mammalian proteases : A glossary and bibliography. Volume 2 : Exopeptidases. Academic Press Inc. Ltd., London, U.K., 23-59.
- Minagawa E, Kaminogawa S, Tsukasaki F and Yamauchi K. 1989. Debitting mechanism in bitter peptides of enzymatic hydrolysates from milk casein by aminopeptidase T. *J Food Sci* 54, 1225-1229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb05960.x>.
- Murai A, Tsujimoto Y, Matsui H and Watanabe K. 2004. An *Aneurinibacillus* sp. strain AM-1 produces a proline-specific aminopeptidase useful for collagen degradation. *J Appl Microbiol* 96, 810-818. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02210.x>.
- Nishiwaki T, Yoshimizu S, Furuta M and Hayashi K. 2002. Debitting of enzymatic hydrolysates using an aminopeptidase from edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *J Biosci Bioeng* 93, 60-63. [https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(02\)80055-x](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(02)80055-x).
- Ono S, Kasai D, Sugano T, Ohba K and Takahashi K. 2004. Production of water soluble antioxidative plastein from squid hepatopancreas. *J Oleo Sci* 53, 267-273. <https://doi.org/10.5650/jos.53.267>.
- Pan D and Tanokura M. 2004. Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* JCM 1004. *Food Chem* 88, 511-516. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.082>.
- Park MJ, Lee JK, Kim JW, Nam HS and Oh TK. 1998. Characterization of a glutamyl aminopeptidase from *Bacillus licheniformis* NS115. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 26, 420-426.
- Park SY and Lee BH. 1996. Effects of *Lactobacillus casei* LLG on flavor of enzyme-modified cheese. 1. Degradation of hydrophobic peptides by aminopeptidase. *Kor J Food Sci Ani Resour* 16, 147-154.
- Raksakulthai R and Haard NF. 1999. Purification and characterization of aminopeptidase fractions from squid (*Illex illecebrosus*) hepatopancreas. *J Food Biochem* 23, 123-144. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1999.tb00010.x>.
- Raksakulthai R and Haard NF. 2001. Purification and characterization of a carboxypeptidase from squid hepatopancreas (*Illex illecebrosus*). *J Agric Food Chem* 49, 5019-5030. <https://doi.org/10.1021/jf010320h>.
- Saha BC and Hayashi K. 2001. Debitting of protein hydrolysates. *Biotechnol Adv* 19, 355-370. [https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(01\)00070-2](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(01)00070-2).
- Sanz Y and Toldra F. 2002. Purification and characterization of an arginine aminopeptidase from *Lactobacillus sakei*. *Appl Environ Microbiol* 68, 1980-1987.
- Sugiyama M, Lousu S, Hanabe M and Okuda Y. 1989. Organs and other tissues. In: Utilization of squid. Balkeman AA, ed. CRC Press, Rotterdam, Netherlands, 90-101.
- Torres MR, Marin FR, Ramos AJ and Soriano E. 2002. Study of operating conditions in concentration of chicken blood plasma proteins by ultrafiltration. *J Food Eng* 54, 215-219. [https://doi.org/10.1016/s0260-8774\(01\)00204-7](https://doi.org/10.1016/s0260-8774(01)00204-7).
- Umetsu H, Arai M, Ota T, Kudo R, Sugiura H, Ishiyama H and Sasaki K. 2003. Purification and properties of an aminopeptidase from the mid-gut gland of scallop (*Patinopecten yessoensis*). *Comp Biochem Physiol* 136B, 935-942. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2003.09.008>.
- Umetsu H and Ichishima E. 1988. Debitting mechanism of bitter peptides from soybean protein by wheat carboxypeptidase. *J Jpn Soc Food Sci Technol* 35, 440-447. <https://doi.org/10.3136/nskkk1962.35.440>.
- Umetsu H, Matsuoka H and Ichishima E. 1983. Debitting mechanism of bitter peptides from milk casein by wheat carboxypeptidase. *J Agric Food Chem* 31, 50-53. <https://doi.org/10.1021/jf00115a013>.
- Vo VT, Kusakabe I and Murakami K. 1983. Purification and some properties of two aminopeptidases from sardines. *Agric Biol Chem* 47, 2453-2459.
- Zwijnenberg HJ, Kemperman AJB, Boerrigter ME, Lotz M, Dijksterhuis JF, Poulsen PE and Koops GH. 2002. Native protein recovery from potato fruit juice by ultrafiltration. *Desalination* 144, 331-334. [https://doi.org/10.1016/s0011-9164\(02\)00338-7](https://doi.org/10.1016/s0011-9164(02)00338-7).