

# 살 오징어(*Todarodes pacificus*) 간췌장 유래 Aminopeptidase 활성획분에 의해 쓴맛이 개선된 멸치 조미소스의 제조 및 식품특성

윤인성<sup>1</sup> · 김진수<sup>1,2</sup> · 최유리<sup>1</sup> · 손숙경<sup>1</sup> · 이지운<sup>1</sup> · 강상인<sup>2</sup> · 권인상<sup>3</sup> · 허민수<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>경상국립대학교 해양식품공학과/해양산업연구소, <sup>2</sup>경상국립대학교 수산식품산업화기술지원센터, <sup>3</sup>경상국립대학교 식품영양학과/해양산업연구소

## Preparation and Food Characteristics of Seasoned Anchovy Sauce with Improved Bitterness by Treatment of Aminopeptidase Active Fraction Derived from Common Squid *Todarodes pacificus* Hepatopancreas

In Seong Yoon<sup>1</sup>, Jin-Soo Kim<sup>1,2</sup>, Yu Ri Choe<sup>1</sup>, Suk Kyung Sohn<sup>1</sup>, Ji Un Lee<sup>1</sup>, Sang In Kang<sup>2</sup>, In Sang Kwon<sup>3</sup> and Min Soo Heu<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Seafood Science & Technology/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Tongyeong 53064, Korea

<sup>2</sup>Research Center for Industrial Development of Seafood, 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 the preparation of seasoned anchovy sauce (SAS) and its functional characteristics by using aminopeptidase active fractions (AAFs) derived from squid *Todarodes pacificus* hepatopancreas as a bitter taste improver. As the base of the SAS, a hydrolysate (AAAH) prepared by continuously treating raw anchovies with Alcalase-AAF was used. The high-performance liquid chromatography profile of the AAAH suggested that the action of AAFs decreased the hydrophobicity of the N-terminal peptide related to bitterness in the protein hydrolysates. SAS was prepared by blending with the AAAH and other ingredients. The crude protein (2.5%), carbohydrates (18.4%), amino acid-nitrogen (1,325.1 mg/100 mL), and total free and released amino acids (FRAAs, 700.2 mg/100 mL) of SAS were higher than those of commercial anchovy sauce (CAS). Sensory evaluation revealed that SAS was superior to CAS in flavor, color, and taste. The main FRAAs of SAS were glycine (16.8%), alanine (13.2%), glutamic acid (7.8%), and leucine (7.3%). The amino acids that had a major influence on the taste according to the SAS taste values were glutamic acid, aspartic acid, alanine, and histidine. The angiotensin-converting enzyme inhibitory (2.21 mg/mL) and antioxidant activities (3.58 mg/mL) of SAS were superior to those of CAS.

Keywords: Debitting, Anchovy hydrolysate, Seasoned anchovy sauce common squid, Aminopeptidase active fraction

### 서론

최근 우리나라는 여성의 사회진출기회 확대, 맞벌이, 일인가구의 증가 등의 사회적 변화, 식생활에서도 식재료 구입을 통한 직접조리에서 소비자의 편의 지향으로 meal-kit 또는 간편 편의 식품을 온라인이나 마트에서 구입하는 패턴으로 변화하고 있다. 이러한 변화로 인하여 조리시간은 현저히 줄어들었고, 최근 코로나 19로 외식의 기회가 줄어들었다(Lee and Kim, 2021). 그 결과 식품가공산업 성장이 가파른 성장세를 보였으며, 특히

소스류 시장은 홈쿡(home cook) 트렌드로 인해 소비량이 증가하여 생산액이 2016년 1조 6,584억원에서 2020년 2조 296억 원으로 22.4% 증가하며 급격한 성장세를 보이고 있다(aTFIS, 2021). 천연 조미소스류 시장, 또한 급격히 성장하고 있다. 이러한 일면에서 식품산업 전반의 트렌드 변화에 따른 장류식품 산업에서도 전처리 공정이 복잡한 된장, 고추장, 젓갈 및 액젓과 같은 전통 발효식품과 이를 베이스로 하여 다양한 천연재료가 첨가된 조미소스류의 개발이 절실한 실정이다. 또한 최근 우리나라 소비자의 식품에 대한 인식은 식품의 안전성, 건강지향

\*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.2021.0849>

Korean J Fish Aquat Sci 54(6), 849-860, December 2021

Received 8 October 2021; Revised 15 November 2021; Accepted 8 December 2021

저자 직위: 윤인성(대학원생), 김진수(교수), 최유리(대학원생), 손숙경(대학원생), 이지운(대학원생), 강상인(연구원), 권인상(대학원생), 허민수(교수)

성, 영양성 및 기호성 측면을 중시하는 경향으로 바뀌었으며, 천연 조미소스류에 있어서도 효소를 활용하여 재료 본연의 맛에 기호성, 저염 등 건강지향의 기능성을 부여하기 위한 노력이 요구된다.

한편, 단백질 급원으로서 수산물 및 수산가공부산물의 부가가치를 높이기 위해서는 단백질분해효소를 활용한 가수분해공정을 통해 수산단백질 가수분해물(seafood protein hydrolysate)을 제조하게 되면, 생리활성 물질 및 필수영양소의 회수가 가능하며, 이를 조미가공소재 또는 건강기능 소재로 영양 및 생리활성 개선된 식품의 개발에 적용 가능할 것이다(Idowu and Benjakul, 2019). 그러나, 단백질분해효소에 의한 단백질의 과도한 가수분해는 쓴맛을 야기시키고, 이는 음료 및 발효 조미소스와 같은 단백질가수분해물의 이용 및 제품개발에 있어서 제약요인이다(Idowu and Benjakul, 2019; Cho et al., 2004).

또한 단백질 가수분해물의 쓴맛은 peptide의 소수성과 밀접한 관련이 있기 때문에(Kristinsson and Rasco, 2000; Clegg and Lim, 1974), exopeptidase의 처리를 통해 쓴맛 peptide의 말단에 노출된 아미노산을 가수분해함으로써 쓴맛을 개선하거나 감소시키려는 여러 시도도 있었다(Nishiwaki et al., 2002; Kim et al., 2014a, 2014b; Kim et al., 2020).

수산자원으로부터 다양한 시판 단백질분해효소를 이용하여 제조한 가수분해물의 건강기능성에 관한 연구로는 명태 및 다시마 가공부산물(Kim et al., 2012), 가다랑어 알(Intarasirisawat et al., 2013), 정어리 가공부산물(Bougatef et al., 2010), 연어 frame (Heu et al., 2009), 명태 가공부산물 젤라틴(Park et al., 2009), 수산가공 자숙액(Oh et al., 2007a), 붉은대게 자숙수(Kang et al., 2007), 새우 부산물(Heu et al., 2007a), yellow stripe trevally (Klompong et al., 2007), 굴(Chung et al., 2006a, 2016b, 2016c) 등의 효소 가수분해물에 대한 연구 등이 시도되었다. 또한 이의 산업적 응용에 관한 연구로는 천연풍미소재 및 건강기능 조미소스(Kim et al., 2003; Heu et al., 2007a; Oh et al., 2007b; Heu et al., 2010; Kim et al., 2012), 곰탕-유사제품(Heu et al., 2007b), 요거트(Chung et al., 2006c) 등이 보고되었다.

앞서의 연구에서, 오징어류 간체장 추출물로부터 분획한 endoprotease 및 exopeptidase 획분들의 쓴맛 개선효과(Kim et al., 2014a, 2014b), 그리고 경제적이고 산업적 활용도가 높은 한외여과법에 의한 aminopeptidase 활성 획분의 회수, 쓴맛개선 및 효소특성에 대해 연구한 바 있다(Kim et al., 2020).

본 연구에서는 쓴맛 제거/감소효과(Kim et al., 2014b; Kim et al., 2020)가 뛰어난 것으로 확인된 살 오징어(*Todarodes pacificus*) 간체장 유래 한외여과 aminopeptidase active fraction (AAF)을, alcalase 처리한 쓴맛 멸치 가수분해물(alcalase treated anchovy hydrolysates, AAH)에 적용을 통해(Yoon et al., 2021), alcalase-AAF 연속처리로 제조한 쓴맛이 제거된 가수분해물(alcalase-AAF treated anchovy hydrolysate, AAAH)

을 조미소스 베이스로 한, 멸치 조미소스(seasoned anchovy sauce, SAS)를 제조하고, 이의 이화학적 특성, 맛 성분 및 건강기능성 특성에 대해, 시판 멸치소스(commercial anchovy sauce, CAS)와 비교 검토하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

앞서의 연구(Yoon et al., 2021)를 통해, 쓴맛 멸치(anchovy *Engraulis japonicus*) 가수분해물(alcalase-treated anchovy hydrolysate, AAH)의 제조를 위해 사용한 시판 단백질분해효소는 alcalase 2.4 L (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark)를 구입하여 사용하였다.

AAH의 쓴맛 개선을 위해 사용한 효소는 Kim et al. (2020)의 방법에 따라, 살 오징어(common squid *Todarodes pacificus*) 간체장 추출물로부터 한외여과 막(Pellicon XL filter, PLCGC 10K regenerated cellulose; Milipore Co., Billerica, MA, USA)를 통해, 1/10로 농축하여 얻은 aminopeptidase active fraction (AAF)을 사용하였다.

멸치 조미소스의 베이스로 사용한 쓴맛이 제거된 alcalase-AAF 연속처리 멸치 가수분해물(alcalase-AAF sequentially treated anchovy hydrolysate, AAAH)과의 배합을 위한 부재료는 dextrin, 정제염, glycine, 이노신 inosine monophosphate (IMP), disodium succinate 및 caramel color 등을 MSC Co., LTD (Yongsan, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

조미소스 베이스로서 AAAH와 부재료를 배합하여 제조한 멸치 조미소스(seasoned anchovy sauce, SAS)는 식품성분과 생리활성을 비교하기 위하여 C사의 시판 멸치 조미소스(commercial anchovy sauce, CAS) 제품을 경상남도 통영시 소재 슈퍼마켓에서 구입하여 사용하였다.

### 조미소스 베이스로써 AAAH의 제조

조미소스 베이스로서 쓴맛이 제거된 AAAH는 Yoon et al. (2021)의 반응표면분석법에 의해 구명된 최적조건에 따라 제조하였다. 먼저, 쓴맛 멸치 가수분해물(AAH)은 원료 멸치에 대해 동량의 증류수를 가해 고속균질기(Polytron PT 1200E; Kinematica AG, Lucerne, Switzerland)로 균질화 한 후, 원료 멸치 단백질의 1% (효소/기질비 1:100)에 해당하는 alcalase를 첨가하여 pH 7.0 및 50°C에서 8시간 반응시킨 다음, 90°C에서 20분간 열탕 처리를 통해 제조하였다. 이렇게 제조한 효소반응액은 AAF 연속처리를 위한 기질(AAH)로 사용하였다. 이어서 기질인 AAH에 원료 멸치 단백질의 3.4%에 해당하는 AAF를 첨가하고, 50°C에서 9시간 효소 반응, 90°C에서 30분간 효소실활 및 여과를 통해, 조미소스 베이스로 사용하기 위한 쓴맛이 제거된 가수분해물(AAAH)을 제조하였다.

시판 단백질분해효소를 첨가하지 않은 멸치의 내인성 단백질

분해효소에 의한 자가소화분해물(auto-hydrolysate, AH)은 pH 7.0 및 50°C에서 8시간 반응하여 제조하였으며, HPLC profile을 의한 쓴맛 제거효과를 살펴보기 위한 대조구로 사용하였다.

### AAAH의 HPLC profile

AH, AAH 및 조미소스 베이스로서 AAAH에 대한 HPLC profile은 Kim et al. (2014b, 2020)의 방법에 따라, 5C<sub>18</sub>-AR column (i.d. 4.6×250 mm, 5 μm; Waters Co., Milford, MA, USA)이 장착된 HPLC (L-2200; Hitachi Co., Tokyo, Japan)로, 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA)가 함유된 acetonitrile 용액을 이동상으로 하여, linear gradient (0-45% 범위)로 분석하였다. 이때의 유속은 0.7 mL/분, 용출시간은 60분, UV detector (L-2400; Hitachi Co.)의 파장은 UV 214 nm로 검출하였다. 이들 가수분해물들의 HPLC profile과 그 변화가 두드러진 peak의 조성비(area %)로 검토하였다.

### AAAH를 이용한 조미소스의 제조

SAS의 제조는 CAS의 배합비를 참조하여, AAAH 35.5%, 정제수 35.5%, dextrin 21.2%, 소금 5.8%, glycine 1.4%, IMP 0.4%, 호박산 나트륨 0.15% 및 카라멜 색소 0.05%를 각각 혼합한 다음, 이의 완전 용해 및 혼합을 위하여 증탕 (100°C, 5 분)하여 제조하였다. 원료 멸치로부터 alcalase-AAF 연속처리 가수분해물을 베이스로 하여 제조한 최종 멸치 조미소스(seasoned anchovy sauce, SAS)의 제조 공정은 Fig. 1과 같다.

### 일반성분, pH, 염도 및 brix

일반성분은 AOAC (1995)법에 따라 수분은 상압가열건조법, 조단백질은 semimicro Kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet법에 따라 측정하였고, 조회분은 건식회화법으로 측정하였다. pH는 pH meter (model 691; Metrohm, Swiss)로 측정하였고, 염도의 시료는 일정량의 시료를 탈이온수로 10배 희석하여, 혼합한 다음, 염도계(model 460CP; Istek, Seoul, Korea)로 각각 측정하였다. Brix는 0-32% 범위의 굴절계(Atago N1; Atago, Tokyo, Japan)로 측정하였다.

### 총 질소 및 아미노산 질소함량

총 질소함량은 semimicro Kjeldahl법(AOAC, 1995)으로 측정하였고, 아미노산 질소 함량은 KFN (2000)의 Formol법에 따라 시료를 10배 희석한 다음 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.5로 조정후, 30 mL의 중화 포르말린(pH 8.5)를 가하고, 다시 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.5가 될 때까지 적정하여, 이를 토대로 산출하였다.

### 탁도 및 갈변도

탁도 및 갈변도는 분광광도계(UV-140-02; Shimadzu Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 탁도는 파장 660 nm에서 측정된 투과율(%)로 나타내었고, 갈변도의 경우, 파장 430 nm에서 측정

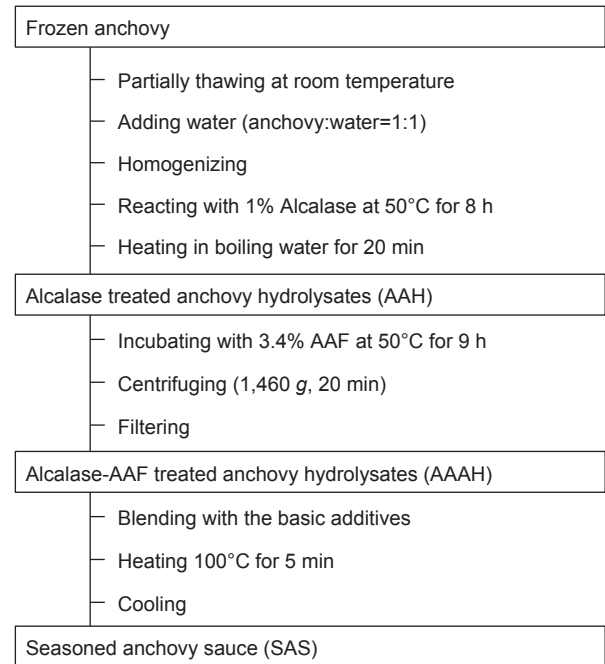


Fig. 1. Process flowchart for seasoned anchovy *Engraulis japonica* sauce prepared from anchovy hydrolysate continuously treated with alcalase-AAF. AAF, aminopeptidase active fraction recovered from *Todarodes pacificus* hepatopancreas by the ultrafiltration.

한 흡광도로 나타내었다.

### 유리아미노산 및 taste value

유리 아미노산의 분석을 위한 시료는 일정량의 시료에 동량의 20% trichloroacetic acid (TCA)를 가하여 교반(10분) 및 원심 분리(1,460 g, 10분)한 다음 정용(100 mL)하였다. 시료 일부를 분액깔때기에 취하고 동량의 ether를 사용하여 TCA 제거공정을 3회 반복하였고, 다시 이를 농축 및 lithium citrate buffer (pH 2.2)로 정용(25 mL)하여 제조하였다. 이를 아미노산 자동분석기(Biochrom 30; Pharmacia Biotech., England)로 분석하였다.

멸치 조미소스의 맛 강도를 살펴보기 위하여 검토한 taste value는 유리 아미노산 함량을 Kato et al. (1989)이 제시한 유리아미노산의 맛 역치(threshold)로 나누어 얻어진 값으로 나타내었다.

### 산화유도 시간에 따른 항산화 활성

산화유도 반응시간을 측정하는 Rancimat (743 Metrohm AG; Metrohm, Herisau, Switzerland)를 이용한 항산화 활성은 Oh et al. (2007a, 2007b)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, Rancimat에 의한 산화는 반응용기에 2.5 g의 대두유(O사, Pyeongtaek, Korea)와 멸치 SAS 및 CAS (C사, Nonsan, Korea)를 각각 0.5

g씩 가하고, 120°C로 조절된 aluminum heating block상에서 20 L/h의 여과된 공기를 주입하면서 산화를 유도하였다. 이 때 발생하는 휘발성 산화 생성물이 증류수가 들어있는 흡수용기 (absorption vessel)에 이항시켜, 전기전도도의 변화에 따라 유도시간(h)을 측정하고, 이를 protection factor (PF, 시료의 유도기/대조구의 유도기)로 나타내었다. 아울러 양성 대조구(positive control)로서 20 mM ascorbic acid 대한 PF와도 함께 비교하였다.

### DPPH 라디칼 소거활성

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 라디칼 소거활성은 Yoon et al. (2017)에 따라 측정하였다. 각 시료액(1.5 mL)에 대하여 동량의 0.4 mM DPPH radical ethanolic 용액(1.5 mL)과 혼합하고, 실온의 암소에서 30분동안 반응시킨 후, 파장 517 nm (UV-2900; Hitachi, Kyoto, Japan)에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 50%의 DPPH 소거활성을 나타내는 시료의 농도(IC<sub>50</sub> value, mg/mL)로 나타내었다.

### ACE 저해활성

Angiotensin I-converting enzyme (ACE) 저해활성은 Cushman and Cheung (1971)의 방법을 다소 수정한 Yoon et al. (2017)에 따라 측정하였다. 즉, 100 µL의 시료용액, 50 µL의 ACE 용액 그리고 50 µL의 0.05 M sodium borate 완충액(pH 8.3)을 혼합한 반응용액은 실온에서 30분 동안 전 단계 반응을 실시한 다음, 여기에 50 µL의 5 mM hippuric acid (HHL) acetate salt를 함유한 0.05 M sodium borate 완충액(pH 8.3)을 가하여 37°C의 항온수조에서 60분 동안 반응을 진행하였다. 효소반응의 정지는 250 µL of 1 N HCl을 가하여 실시하였으며, 이어서 반응용액 중의 유리된 hippuric acid의 추출을 위하여, 1.5 mL의 ethyl acetate를 가한 다음, 원심분리(1,460 g, 10 분, 4°C)하였다. 1.0 mL의 상층액을 시험관에 옮기고 100°C의 heating block에서 1시간 동안 ethyl acetate를 완전히 증발시킨 다음, 남아있는 hippuric acid는 1.0 mL의 탈 이온수로 용해시켜, 파장 228 nm (UV-2900; Hitachi)에서 흡광도를 측정하였다. ACE 저해활성은 ACE 활성의 50%를 저해하는 시료의 농도(IC<sub>50</sub>, mg/mL)로 나타내었다.

### 관능검사 및 통계처리

SAS에 대한 관능검사는 7인의 평가요원(해양식품공학 및 식품영양학 전공 대학원생)을 대상으로 향, 색(외향) 및 맛에 대하여 5점 척도법으로 평가한 다음, 평균값으로 나타내었다. 즉, 대조구 시판조미소스(CAS)의 관능평가 기준을 3점으로 하여, 각 평가항목에 대해 이보다 좋을수록 4-5점으로, 이보다 나쁠수록 강할수록 2-1점으로 하여 평가하였다. 데이터의 통계처리는 ANOVA test로 분산분석 한 후, SPSS 통계 프로그램(Version 12.0K, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 Duncan의 다중위 검정으로 5% 유의수준에서 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 멸치 가수분해물의 HPLC profile

살 오징어 간체장 유래 AAF에 의한 쓴맛 제거효과를 살펴보기 위해 실시한 AH (멸치 자가소화분해물), AAH (alcalase 처리 쓴맛 가수분해물) 및 AAAH (alcalase-AAF 연속처리 가수분해물)의 소수성 정도에 따라 분리한 역상 HPLC profile과 피크면적(%)의 변화는 각각 Fig. 2와 Table 1과 같다.

멸치 가수분해물들은 공통적으로 23분대의 피크1, 32분대의 피크2, 37분대의 피크3, 45분대의 피크4, 50분대의 피크5 그리고 57분대의 피크6가 확인되었으며(Fig. 2), 이들 피크면적에 있어서도 두드러진 변화가 인지되었다(Table 1). 이들 피크들은 분석 시 사용한 칼럼(C<sub>18</sub>)과 이동상(0-45% acetonitrile)의 특성

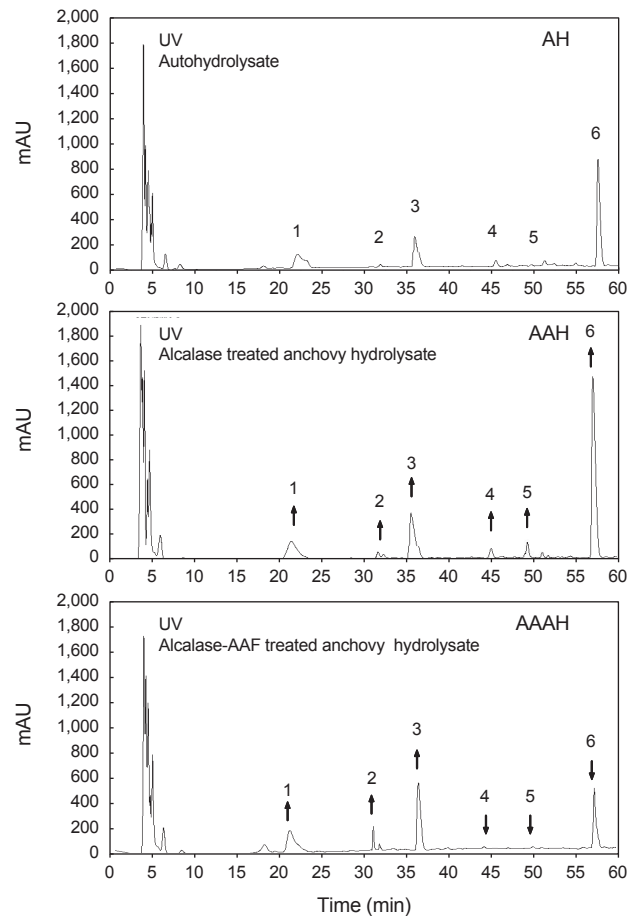


Fig. 2. Reverse-phase HPLC profile of alcalase-treated anchovy *Engraulis japonica* hydrolysates reacted with aminopeptidase active fraction (AAF) from *Todarodes pacificus* hepatopancreas extracts by ultrafiltration. AH, anchovy auto-hydrolysate; AAH, alcalase-treated anchovy hydrolysates; AAAH, alcalase-AAF sequentially treated anchovy hydrolysate.

으로, 머무름 시간(retention time, 0-60분)이 길어질수록 상대적으로 소수성이 강한 펩타이드 획분이 용출된 것으로 확인되었다. 효소 가수분해물의 쓴맛은 과도한 가수분해로 인해 생성된 펩타이드의 말단에 노출된 소수성 아미노산이 원인인 것으로 알려져 있어(Clegg and Lim, 1974; Kristinsson and Rasco, 2000; Nishiwaki et al., 2002), 피크4-6이 상대적으로 피크1-3에 비해 머무름 시간이 길어 이들 획분의 소수성이 강할 것으로 추정되며, 따라서 쓴맛에 주된 영향을 미칠 것이라 판단되었다(Kim et al., 2014a, 2014b, 2020). 아울러 alcalase 처리 수산물 기원의 가수분해물은 쓴맛의 발생이 두드러진다고(Hoyle and Merritt, 1994)하여 이 연구의 AAH와 유사하였다.

AH, AAH, 그리고 AAAH의 HPLC profile (Fig.2)에 따른 피크면적(%)의 변화(Table 1)는 먼저 AH의 경우, 피크6이 49.1%로 가장 넓은 면적을 차지하였으며, 다음으로 피크3 (25.4%), 피크1 (20.0%)의 순이었으며, 그 외 세 개 피크(4, 2 및 5)의 총 피크면적은 5.5% 수준이었다. AAH의 피크면적 분포는 피크1 (16.7%), 피크2 (1.6%) 및 피크3 (20.3%)의 면적이 모두 AH에 비해 감소한 반면, 피크 4-6의 면적은 증가하였다. 또한 피크6 (53.5%)의 면적이 가장 큰 것으로 나타났고, 피크5 (4.9%)의 증가 폭이 높은 것으로 확인되었다. 따라서 쓴맛 멸치 가수분해물인 AAH의 쓴맛은 주로 피크5와 6에 의한 것이라고 추정되었다(Nishiwaki et al., 2002; Kim et al., 2014b, 2020).

한편, 멸치 조미소스의 베이스로 활용하기 위해 alcalase-AAF 연속 처리하여 제조한 쓴맛이 제거된 AAAH는 AH 및 AAH에 비해 피크1-3의 면적이 현저하게 증가한 반면에 피크 4-6의 면적은 감소하였으며, 소수성이 가장 강한 피크6의 면적 감소가 두드러졌다. 이상의 결과로 멸치 내인성 단백질분해효소에 의한 자가소화분해물과 alcalase 처리 쓴맛 멸치 가수분해물(AAH)은 상대적으로 소수성이 강한 피크4-6의 면적분포 (52.8-61.5%)가 친수성 획분(피크1-3)에 비해 큰 것으로 확인되어, 가수분해물을 구성하는 펩타이드들의 말단에 소수성 아

미노산들이 다량 노출되어 나타난 결과로 추정되었다. 이와 달리 AAAH의 경우, 쓴맛 제거/감소효과(Kim et al., 2020)가 확인된 살 오징어 간체장 유래 한외여과 aminopeptidase 활성획분(AAF)에 의해 쓴맛 가수분해물의 펩타이드 말단에 노출된 소수성 아미노산의 방출로 쓴맛과 관련한 가수분해물의 소수성은 현저히 감소한 반면에, 상대적으로 친수성 획분(피크1-3)의 증가로 쓴맛이 제거/감소된 것으로 판단되었다(Kim et al., 2014a, 2014b, 2020; Kristinsson and Rasco, 2000).

### 식품성분 및 이화학적 특성

멸치 조미소스(seasoned anchovy sauce, SAS) 제조 공정 (Fig. 1)에 따라, AAAH를 조미소스 베이스로 하여 제조한 액상 멸치 조미소스(SAS)의 식품성분, 관능평가 및 물리화학적 특성은 시판 멸치 조미소스(CAS)와 비교하여 Table 2에 나타내었다. SAS의 식품성분은 수분이 73.5%, 조단백질이 2.5%, 조지방이 0.1%, 조회분이 5.5% 및 탄수화물이 18.4%로, CAS에 비하여 수분 및 조회분의 함량은 낮은 반면, 조단백질 함량은 1.4배 높은 수준을 나타내었다. 또한 SAS 제조 시 dextrin 첨가량이 반영되어 탄수화물 함량은 CAS에 비해 약 2배 많았다. 이와 같은 결과는 SAS의 제조를 위하여 사용한 멸치 조미소스 베이스(AAH), 배합 부재료 종류 및 배합비, 그리고 제조공정의 차이에 기인할 것으로 추정되었다.

AAH를 베이스로 하여 제조한 SAS의 관능평가는 3점을 기준으로 한 CAS에 대해 냄새(4.0), 색조(4.8) 그리고 맛(4.6)에 있어 모두 우수하였다. 냄새에 있어서는 SAS가 원료멸치로부터 alcalase-AAF 연속처리 가수분해과정을 거침으로서 쓴맛 및 비린내의 감소에 의한 것이라 추정되며(Yoon et al., 2021), 색에 있어서는 아래 사진(Table 2)에서 보이는 바와 같이 상대적으로 옅은 색의 대한 선호가 높은 결과일 것으로 판단되었다. 그러나 맛에 대한 평가는 쓴맛이 제거된 AAAH를 베이스로 하여 제조한 SAS가 시판 소스인 CAS에 비해 염도가 50% 수준으로 소스의 짠맛에 1차적으로 반영된 것과 조단백질 함량과 아미노산 질소가 2차적인 소스의 맛에 영향을 준 것으로 판단되었다.

한편 SAS와 CAS에 대한 이화학적 특성은 먼저, pH는 각각 5.90 (SAS) 및 5.63 (CAS)이었으며, 염도는 SAS가 6.4%로서 CAS (13.3%)에 비해 50% 수준으로 많은 차이가 있었으며, brix는 각각 28° (SAS) 및 26° (CAS)으로 다소의 차이를 보였다. 염도와 brix의 결과로 보아, 조회분 및 탄수화물함량에 차이가 반영된 결과라 추정되었으며, SAS는 dextrin 첨가에 따른 탄수화물함량이, CAS는 2배가량 높은 염도에 따른 조회분 함량이 brix에 영향을 준 것으로 판단되었다.

멸치 조미소스와 시판 소스를 2배 희석하여 측정된 투과도(%) 및 갈변도(흡광도)는 SAS가 96.2% 및 0.259로서 CAS (69.7% 및 0.823)에 비해 투과도는 높은 반면에 갈변도는 낮았다. 맛에 영향을 주는 아미노산 질소함량은 SAS가 1,325.1

Table 1. Changes in major peaks area (%) from HPLC profile of alcalase-AAF sequentially treated anchovy *Engraulis japonica* hydrolysates (AAAH) (Area %)

Peak No.	Anchovy hydrolysates		
	AH	AAH	AAAH
1	20.0	16.7	29.0
2	1.8	1.6	5.3
3	25.4	20.3	39.0
4	2.9	3.1	1.4
5	0.8	4.9	1.5
6	49.1	53.5	23.8

AH, anchovy auto-hydrolysate; AAH, alcalase-treated anchovy hydrolysates; AAAH, alcalase-AAF sequentially treated anchovy hydrolysate.

Table 2. Food component characteristics and sensory evaluation of seasoned anchovy sauce prepared from anchovy hydrolysate continuously treated with Alcalase-AAF

Components		Seasoned anchovy sauce (SAS)	Commercial anchovy sauce (CAS)
Proximate composition (g/100 mL)	Moisture	73.5±0.2	76.1±0.2
	Crude protein	2.5±0.0	1.8±0.0
	Crude lipid	0.1±0.0	0.6±0.1
	Crude ash	5.5±0.1	12.1±0.2
	Carbohydrate <sup>1</sup>	18.4±0.5	9.4±0.5
Sensory evaluation	Flavor	4.0±0.5	3.0±0.0
	Color	4.8±0.4	3.0±0.0
	Taste	4.6±0.5	3.0±0.0
pH		5.90±0.03	5.63±0.03
Salinity (%)		6.4±0.1	13.3±0.2
Brix (°)		28±1	26±2
Transmission (% at 660 nm)		96.2±0.1	69.7±0.2
Brownness (430 nm)		0.259±0.003	0.823±0.002
Amino-N (mg/100 mL)		1,325.1±2.6	1,133.5±1.4

Photo



<sup>1</sup>Carbohydrate was calculated by 100-(moisture+crude protein+lipid+ash). AAF, aminopeptidase active fraction recovered from *Todarodes pacificus* hepatopancreas by the ultrafiltration. Values are the means±standard deviation of three determinations.

mg/100 mL로, CAS의 1,133.5 mg/100 mL 비교하여 SAS에서 높은 수준으로, 관능평가의 결과(맛)에 영향을 준 것으로 판단되었다. 아울러 SAS와 CAS의 외관(photo)은 이화학적 식품특성 반영되어, 시각적으로 확연히 차이가 인지되었다.

### 유리 및 방출된 아미노산

Alcalase-AAF 연속처리 쓴맛이 제거된 멸치 가수분해물인 AAAH를 베이스로 하여, 여기에 부재료와 배합해 제조한 SAS의 맛 특성을 살펴보기 위하여, 분석한 유리(free) 및 효소가수분해로 방출(released)된 아미노산 함량과 개별 아미노산의 맛역치를 고려하여 나타낸 결과는 시판 조미소스인 CAS와 비교하여 Table 3에 나타내었다. 여기서 유리아미노산은 조직단백

질을 구성하는 아미노산이 아닌, 체액(physiological fluid)이나 조직 중에 유리된 상태로 존재하는 아미노산을 말하며, 방출된 아미노산은 단백질분해효소의 작용으로 조직 단백질이 가수분해 되어 방출된 아미노산을 의미하였다.

유리 및 방출된 아미노산은 SAS가 30종이 동정되었고, CAS는 이보다 4종이 적은 26종이 동정되었다. 총 유리 및 방출된 아미노산함량은 SAS가 700.2 mg/100 mL로 CAS (472.3 mg/100 mL)에 비하여 약 1.5배가량 높은 수준이었으며, 이는 조단백질 및 아미노산질소 함량(Table 2)의 차이가 반영된 결과로 판단되었다.

유리아미노산(free amino acid, FAA)함량은 SAS가 48.0 mg/100 mL (6.9%)으로 CAS (67.4 mg/100 mL, 14.2%)에 비해 50% 정도 낮은 수준이었고, SAS의 주요 유리아미노산은 taurine (18.0 mg/100 mL, 2.6%), CAS의 경우는 taurine (37.0 mg/100 mL, 7.8%) 및 ornithine (10.3 mg/100 mL, 2.2%)이었으며, 특히 taurine은 콜레스테롤 중에서 저밀도 지단백질(low density lipoprotein, LDL)을 감소시키고, 상대적으로 고밀도 지단백질(high density lipoprotein, HDL)을 증가시켜 동맥경화와 고혈압을 억제하는 것으로 알려져 있다(Mochizuki et al., 1998).

효소분해에 따른 SAS의 유리 및 방출된 필수아미노산(essential amino acid, EAA)함량은 SAS가 321.3 mg/100 mL (45.8%)으로 CAS (193.6 mg/100 mL, 41%)에 비해 높은 수준으로, SAS는 leucine, arginine, lysine 그리고 valine이, CAS는 lysine, leucine 및 histidine이 주요 필수아미노산이었다. 비 필수 아미노산(NEAA)함량의 경우, SAS가 333.0 mg/100 mL (47.2%)으로, CAS (211.2 mg/100 mL, 44.8%)에 비해 높았으며, SAS는 glycine, alanine 및 glutamic acid이, CAS는 glutamic acid, glycine 그리고 alanine이 주요 비필수 아미노산이었다.

또한 소수성 아미노산함량 및 조성에 있어서도 SAS가 388.9 mg/100 mL (55.6%)로 CAS에 비해 함량 및 조성이 높은 수준이었으며, 이는 alcalase 처리 쓴맛 가수분해물(AAH)의 peptide의 말단에 노출된 소수성 아미노산을 exopeptidase인 AAF의 처리에 의해 절단(Clegg and Lim, 1974; Kristinsson and Rasco, 2000)함으로써 소수성 아미노산이 유리 또는 방출에 기인하는 것으로 추정되었다(Nishiwaki et al., 2002; Kim et al., 2020).

이상의 유리 및 방출된 아미노산함량 및 조성의 분석결과에서, 전반적으로 SAS는 유리아미노산을 제외하고, 필수, 비필수 및 소수성 아미노산의 종류, 함량, 조성 그리고 필수/비필수 아미노산 함량비(EAA/NEAA ratio)에서도 CAS에 비해 상대적으로 높은 것으로 나타나, 소스의 맛과 영양성에 있어서 시판 소스에 비해 우수할 것으로 판단되었다. 이와 같은 두 소스 간의 차이는 원료의 처리방법, 조미를 위한 부재료의 종류 및 배합비의 차이에 기인하였다. 또한 효소 분해 가수분해물은 항산화 및 항고혈압과 같은 건강기능성에 있어서도 원료 단백질의

Table 3. Free and released amino acid content and taste value of seasoned anchovy sauce prepared from anchovy hydrolysate continuously treated with Alcalase-AAF

Amino acids	Taste threshold (mg/100 mL) <sup>1</sup>	SAS		CAS	
		mg/100 mL	Taste value	mg/100 mL	Taste value
Taurine		18.0 (2.6)		37.0 (7.8)	
Sarcosine		2.5 (0.4)		-	
α-amino adipic acid		3.6 (0.5)		3.3 (0.7)	
Citrulline		-		1.4 (0.3)	
α-aminoisobutyric acid		1.2 (0.2)		2.7 (0.6)	
Cystathionine		4.7 (0.7)		3.0 (0.6)	
β-Alanine		1.3 (0.2)		2.6 (0.5)	
γ-aminobutyric acid		0.7 (0.1)		2.4 (0.5)	
Ethanolamine		1.7 (0.2)		-	
DL-alloctathionine		3.2 (0.5)		1.5 (0.3)	
Ornithine		0.9 (0.1)		10.3 (2.2)	
1-Methyl histidine		3.7 (0.5)		-	
Anserine		4.1 (0.6)		3.2 (0.7)	
Carnosine		2.4 (0.3)		-	
Free amino acid (FAA)		48.0 (6.9)		67.4 (14.2)	
Threonine	260	24.1 (3.4)	0.1	14.0 (3.0)	0.1
Valine <sup>2</sup>	140	36.0 (5.1)	0.3	22.7 (4.8)	0.2
Methionine <sup>2</sup>	30	28.8 (4.1)	1.0	11.7 (2.5)	0.4
Isoleucine <sup>2</sup>	90	28.6 (4.1)	0.3	18.9 (4.0)	0.2
Leucine <sup>2</sup>	190	50.9 (7.3)	0.3	34.3 (7.3)	0.2
Phenylalanine <sup>2</sup>	90	29.1 (4.2)	0.3	21.5 (4.5)	0.2
Lysine	50	46.5 (6.6)	0.9	36.0 (7.6)	0.7
Histidine	20	30.1 (4.3)	1.5	28.4 (6.0)	1.4
Arginine	50	47.2 (6.7)	0.9	6.1 (1.3)	0.1
Essential amino acid (EAA)		321.3 (45.8)	5.6	193.6 (41.0)	3.5
Aspartic acid	3	27.3 (3.9)	9.1	9.8 (2.1)	3.3
Serine	150	20.9 (3.0)	0.1	18.7 (4.0)	0.1
Glutamic acid	5	54.9 (7.8)	11.0	71.6 (15.2)	14.3
Proline <sup>2</sup>	300	5.7 (0.8)	0.0	17.4 (3.7)	0.1
Glycine <sup>2</sup>	130	117.7 (16.8)	0.9	49.0 (10.3)	0.4
Alanine <sup>2</sup>	60	92.1 (13.2)	1.5	37.8 (8.0)	0.6
Cysteine	-	5.8 (0.8)	-	-	-
Tyrosine	-	6.5 (0.9)	-	6.9 (1.5)	-
Nonessential amino acids (NEAA)		330.9 (47.2)	22.6	211.2 (44.8)	18.8
Total		700.2 (100.0)	28.2	472.3 (100.0)	22.3
Hydrophobic amino acids		388.9 (55.6)		213.3 (45.2)	
EAA/NEAA ratio		0.97	0.25	0.92	0.19

<sup>1</sup>The data were quoted from Kato et al. (1989). <sup>2</sup>Hydrophobic amino acids. AAF, Aminopeptidase active fraction recovered from *Todarodes pacificus* hepatopancreas by the ultrafiltration; SAS, seasoned anchovy sauce; CAS, commercial anchovy sauce. The value in parenthesis means percent ratio of total free and released amino acids -, not detected.

아미노산 및 펩타이드의 조성, 펩타이드의 길이 및 서열 그리고 소수성과 관련이 있다고 하였다(Wu et al., 2003; Bougatef et al., 2010).

참치 자숙액의 가수분해물을 베이스로 한 조미소스(Oh et al., 2007b)는 taurine, anserine, arginine, lysine, histidine, aspartic acid 및 glycine이, 새우가공부산물물의 가수분해물을 베이스로 한 조미소스(Heu et al., 2007a)의 경우, 필수아미노산이 시판 새우액젓에 비해 상대적으로 높으며, aspartic acid, glutamic acid, proline, lysine 및 arginine이 주요아미노산이라고 하였다.

붉은 대게 자숙수의 가수분해물(Kang et al., 2007)의 주요아미노산은 glutamic acid, arginine, sarcosine, glycine, proline 그리고 taurine이, 연어 frame 가수분해물(Heu et al., 2007b)은 anserine, taurine, glutamic acid 및 alanine으로, 특히 anserine은 glutamic acid와 같이 감칠맛의 강화에 기여한다고 보고한바 있다. 이상의 연구보고를 통해, 이 연구의 SAS 아미노산의 종류와 조성에 차이가 있었으며, 이는 기질로 사용된 원료 및 효소의 기질 특이성 차이가 반영된 결과라고 판단되었다.

### Taste value

SAS 및 CAS의 유리 및 방출된 아미노산 분석결과에 대하여, Kato et al. (1989)이 제시한 개별 아미노산에 대한 맛의 역치(taste threshold)를 고려하여 나타난 taste value (Table 3)는 SAS 및 CAS 두 소스 모두 비 필수 아미노산의 total taste value (각각 22.6 및 18.8)가 필수 아미노산(각각 5.6 및 3.5)에 비해 매우 높은 것으로 나타나 비필수 아미노산이 맛 강도에 크게 영향을 미치는 것으로 확인되었으며, SAS (28.2)가 CAS (22.3)에 비해 맛 강도가 강하였다. Taste value로 살펴본, 이들 소스의 맛에 관여하는 주요 아미노산으로는 SAS 및 CAS에 관계없이 공통적으로 aspartic acid, glutamic acid 그리고 histidine이었으나, SAS는 methionine (1.0), glycine (0.9)과 alanine (1.5)의 맛 강도가 CAS에 비해 2배 높아 차이가 있었다.

참치 자숙액 가수분해물을 베이스로 제조한 조미소스(Oh et al., 2007b)는 glutamic acid, histidine, lysine 그리고 aspartic acid 등이 주요 아미노산이었으며, 새우가공부산물(Heu et al., 2003), 새우가공부산물로 제조한 액젓(Kim et al., 2003), 그리고 이의 가수분해물로 제조한 조미소스(Heu et al., 2007a)는 glutamic acid, aspartic acid, alanine, lysine 및 arginine이 맛과 관련한 주요 아미노산이었다.

Heu et al. (2010)은 명태 가공부산물 유래 젤라틴의 가수분해물로 제조한 젤라틴소스, 이를 시판 대두간장과 혼합한 젤라틴혼합간장, 그리고 시판간장의 맛과 관련한 주요 아미노산은 젤라틴소스가 aspartic acid, glutamic acid, glycine, alanine 및 arginine이었으며, 젤라틴혼합간장과 시판간장은 aspartic acid, glutamic acid 및 lysine이라고 하여, 유리아미노산의 종류, 함량 및 조성비 간에 차이가 있으며, 이는 명태 젤라틴과 간장(대두)의 단백질 소재의 차이에 기인한다고 하였다. Kim et al.

(2012)의 명태 및 다시마 부산물의 고온고압 혼합추출물, 그리고 이의 가수분해물로 제조한 천연풍미소재는 시판 멸치소스에 비하여 유리아미노산 함량은 1.9배 그리고 총 taste value는 4.9배 높아, 맛의 강도가 월등히 강하였으며, 주요아미노산은 glutamic acid, aspartic acid, alanine이라고 하였다. 또한 붉은 대게 자숙수의 가수분해물(Kang et al., 2007)에 대한 맛 성분으로서 주요 아미노산은 glutamic acid, aspartic acid 및 arginine이며, 감칠맛과 다소 신맛이 어우러진 맛이라고 하였으며, 연어 frame 추출물 및 이의 가수분해물의 총 taste value는 각각 16.3 및 18.2로 나타나, 효소 가수분해로 인해 taste value가 증가하였고, glutamic acid, aspartic acid, histidine, lysine 및 alanine이 주요아미노산이라고 하였다(Heu et al., 2007b).

수산물 기원의 효소 가수분해물과 이를 베이스로 제조한 조미소스는 총 유리 및 방출된 아미노산 함량 및 조성에 따른 taste value에 차이가 있었으며, 이는 다양한 원료 및 가수분해물을 베이스로 제조한 조미소스의 기본 맛을 결정하는 주요 인자라고 판단되었다. 그러나 맛에 관여하는 주요아미노산은 공통적으로 glutamic acid 및 aspartic acid이었다. Kato et al. (1989)와 Hayashi et al. (1981)은 아미노산의 맛은 한 가지 이상의 맛이 어우러져 맛을 내기 때문에 glutamic acid와 aspartic acid는 감칠맛(umami), 짠맛 및 신맛에, 그리고 glycine, alanine, serine 및 proline 주로 단맛과 감칠맛에, lysine과 methionine은 주로 감칠맛 관여하는 아미노산이며, 이외 소수성 아미노산의 대부분은 쓴맛에 관여한다고 하였다(Clegg and Lim, 1974; Kristinsson and Rasco, 2000; Nishiwaki et al., 2002). 이와 같은 유리 및 방출된 아미노산의 결과와 보고로 미루어 보아, SAS와 CAS의 개별아미노산의 종류, 함량 및 조성비에 따른 차이뿐만 아니라, 맛의 강도에도 차이가 있는 것으로 확인되었으며, 이 연구의 alcalase-AAF 연속처리 쓴맛이 제거된 AAAH를 베이스로 하여 제조한 조미소스의 경우 감칠맛과 신맛 그리고 단맛이 어우러진 조미소스로 판단되었다.

### 항산화활성

단백질과 같은 거대 분자는 건강 가능성이 인정되고 있지 않으나, 시판 단백질분해 효소를 이용하여 가수분해한 oligopeptide 등은 angiotensin I converting enzyme (ACE) 저해 및 항산화활성과 같은 여러 가지 건강 가능성이 기대되어 최근 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Ukeda et al., 1992; Cheigh et al., 1993a, 1993b; Byun and Kim, 2001; Bougatef et al., 2010; Kim et al., 2012; Yoon et al., 2017; Yoon et al., 2020).

AAAH를 베이스로 하여 제조한 SAS와 시판 소스인 CAS의 항산화활성(PF 및 DPPH radical 소거능) 그리고 ACE 저해활성으로 살펴본 건강기능성은 Table 4와 같으며, 멸치 가수분해물(AH, AAH 및 AAAH)들과 비교하여 나타내었다. 먼저, 항산화 및 ACE 저해활성을 측정하기 위한 가수분해물들과 소스의 단백질 농도의 분포는 AAH (7.95 mg/mL) 및 AAAH (7.92



mg/mL)간에는 유의적인 차이가 없었으며, 자가소화분해물인 AH와는 유의적인 차이가 있었다( $P<0.05$ ). 이는 첨가효소에 의한 가수분해율의 증가를 반영한 결과이었다. 조미소스의 경우, SAS (2.53 mg/mL)와 CAS (1.82 mg/mL)간에도 유의적인 차이가 인정되었다( $P<0.05$ ).

산화유도시간으로 살펴본 대조군과 양성 대조군인 20 mM ascorbic acid의 PF는 각각 1.00과 1.21이었다(Table 4의 legend 참조). 이에 대하여 AAAH (1.40)가 가장 강한 항산화 활성을 나타내었으며, 다음으로 AAH (1.26)로 대조군 및 양성대조군에 비하여 유의적으로 높은 항산화 활성을 보인 것으로 확인되었다. 조미소스 SAS (1.14)는 AH (1.16)와 유사하였으며, 대조군(1.00)에 비하여도 유의적으로 높은 것으로 나타나 항산화 활성이 인정되었다( $P<0.05$ ). 그러나 시판소스인 CAS (0.95)는 대조군과 유사하거나 다소 낮아 항산화활성은 기대하기 어려울 것으로 판단되었다.

Oh et al. (2007a)은 참치 자숙액의 가수분해물들의 산화유도시간에 따른 항산화활성은 가수분해 1시간까지 급속히 증가한 다음, 이후의 반응시간에서는 유의적인 변화가 관찰되지 않았으나( $P>0.05$ ), 대체로 감소하는 경향을 보인다고 하였다. 붉은 대게 자숙수(Kang et al., 2007)의 가수분해물은 alcalase 처리(1시간), protamax (2시간), flavourzyme (3시간) 그리고 neutrase (4시간) 순으로, 양성 대조군인 20 mM ascorbic acid (2.06)의 수준의 항산화활성을 나타내었으며, alcalase 처리(2시간) 가수분해물에 대하여 나머지 3종의 효소로 2단 가수분해 처리한 가수분해물의 PF는 2.13-2.26 수준으로 항산화활성에 대한 개선효과가 거의 없다고 하였다.

### DPPH radical 소거활성

DPPH 라디칼 소거활성으로 살펴본 항산화활성(Table 4)은 AAAH (3.46 mg/mL)와 SAS (3.58 mg/mL)가 라디칼 소거활성이 가장 강하였으며, 다음으로 CAS (3.81 mg/mL) 및 AAH (3.88 mg/mL) 그리고 AH (5.44 mg/mL) 순으로 유의적인 차이

가 인정되었다( $P<0.05$ ). Alcalase (AAH, 8시간)에 이어 AAF (AAAH, 9시간)로 연속 처리에 의한 radical 소거활성 개선효과는 일부 인정되었다.

붉은 대게 자숙수(Kang et al., 2007)의 1단 및 2단 효소 가수분해물에 대한 DPPH radical 소거활성( $IC_{50}$ )은 1.41 mg/mL 수준이며, 2단 가수분해물이 오히려 소거활성 감소하는 경향을 나타낸다고 하여, 건강기능성 부여를 위한 2단 효소 가수분해는 필요하지 않다고 보고 하였다. Kim et al. (2012)은 고온고압명태 및 다시마 혼합추출물의 효소 가수분해물로 제조한 천연풍미소재의 DPPH radical 소거활성(90.4%)은 20 mM ascorbic acid (94.6%)와 유사하였으나, 시판 멸치 소스(68.3%)에 비해서는 우수한 소거활성을 보인다고 하였다. 한편, Yoon et al. (2017)은 3종의 어류 알 추출물 및 자숙수의 DPPH radical 소거활성( $IC_{50}$ )은 0.54-1.35 mg/mL 범위라고 하였으며, 4종의 진공동결건조 어류 알 농축물(Yoon et al., 2020)은 1.05-3.26 mg/mL로서 어종 간 차이가 있다고 하였다.

한편 Chung et al. (2006a, 2006b)은 단일효소 및 2단계 효소 처리하여 제조한 굴 가수분해물의 경우, 2단계 처리에 따른 항산화활성의 개선효과가 나타나지 않아, 가수분해시간(가수분해율)과 항산화활성 간의 상관관계는 없다고 하였고, 연어 frame 추출물의 효소 가수분해물들(Heu et al., 2007b)에 대한 linoleic acid의 자동산화로 측정된 항산화활성은 0.2-8.8% 수준으로 항산화활성은 기대할 수 없으며, 이의 고온고압 추출물의 가수분해물(Heu et al., 2009)에 대해서도 항산화활성이 20 mM ascorbic acid (66.7%)에 비해 현저히 낮은 수준으로, 가수분해시간(1-8시간)에 따른 상관관계는 없었다고 하였다.

반면에 Park et al. (2009)은 명태 수리미 가공부산물(refiner discharge)로부터 얻은 젤라틴의 pronase (2시간) 가수분해물이 70%의 항산화활성을, 이어서 이를 기질로 하여 flavourzyme (2시간) 연속 처리하여 제조한 2단 가수분해물은 15 mM ascorbic acid보다 우수한 항산화활성을 나타내어, 가수분해율과 항산화활성에 있어서 2단 가수분해에 의한 개선효과가 인정된다

Table 4. Protection factor, DPPH radical scavenging and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of seasoned anchovy sauce prepared from anchovy hydrolysate continuously treated with alcalase-AAF

Sample	Protein <sup>1</sup> (mg/mL)	PF	DPPH ( $IC_{50}$ , mg/mL)	ACE inhibition ( $IC_{50}$ , mg/mL)
AH	6.24±0.12 <sup>b</sup>	1.16±0.11 <sup>bc</sup>	5.44±0.08 <sup>a</sup>	3.83±0.08 <sup>a</sup>
AAH	7.95±0.19 <sup>a</sup>	1.26±0.15 <sup>ab</sup>	3.88±0.12 <sup>b</sup>	2.34±0.05 <sup>c</sup>
AAAH	7.92±0.13 <sup>a</sup>	1.40±0.13 <sup>a</sup>	3.46±0.09 <sup>c</sup>	1.92±0.03 <sup>e</sup>
SAS	2.53±0.10 <sup>c</sup>	1.14±0.08 <sup>bc</sup>	3.58±0.12 <sup>c</sup>	2.21±0.05 <sup>d</sup>
CAS	1.82±0.08 <sup>d</sup>	0.95±0.06 <sup>c</sup>	3.81±0.15 <sup>b</sup>	2.88±0.08 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Based on protein concentration (mg/mL) according to the Lowry method (1951) in 10-fold diluted samples. Protection factor (PF), induction period (h) of sample/ induction period (h) of control. PFs of control and 20 mM ascorbic acid were 1.00 and 1.21, respectively. Values represent the mean±SD of n=3.  $IC_{50}$ , the half maximal inhibitory concentration; AH, anchovy auto-hydrolysate; AAH, alcalase-treated anchovy hydrolysates; AAAH, alcalase-AAF sequentially treated anchovy hydrolysate; SAS, seasoned anchovy sauce blended with AAAH and additives; CAS, commercial anchovy sauce; AAF, aminopeptidase active fraction recovered from *Todarodes pacificus* hepatopancreas by the ultrafiltration. Data with different letter within the same column are significantly different at  $P<0.05$  by Duncan's multiple range test.

고 하였다. 또한 Heu et al. (2010)은 명태 부산물 유래 젤라틴의 2단 효소 가수분해물과 시판 대두간장을 혼합하여 제조한 젤라틴혼합간장의 자동산화에 의한 항산화활성은 20 mM ascorbic acid와 유사한 항산화활성 나타내었으며, 대조구인 시판간장에 비하여도 월등한 항산화활성을 보여, 젤라틴 가수분해물의 첨가효과에 의한 것이라 보고 바 있다. 한편, Cheigh et al. (1993a, 1993b)은 시판 간장에서도 항산화활성이 인정되었고, 간장의 주요 항산화성분은 발효과정 중에 일어나는 Maillard 반응으로부터 생성된 melanoidin 관련물질에 기인한다고 보고한 바 있어, 시판 간장에 효소 가수분해물과 적절히 배합한다면 항산화활성을 개선할 수 있을 것이라 판단되었다(Park et al., 2009; Heu et al., 2010).

### ACE 저해활성

멸치 가수분해물(AH, AAH, AAAH) 및 조미소스(SAS)의 ACE 저해활성(IC<sub>50</sub>, mg/mL)은 1.92-3.83 mg/mL 범위로서 모두 유의적인 차이를 나타내었으며(P<0.05), AAAH (1.92 mg/mL)가 가장 강한 ACE 저해활성을, 다음으로 SAS, AAH, CAS 그리고 AH (3.83 mg/mL) 순이었다. 멸치 조미소스 SAS (2.21 mg/mL)는 시판 소스 CAS에 비하여 유의적으로 강한 ACE 저해활성을 나타내었을 뿐만 아니라, Table 2의 결과에서의 단백질함량, 아미노산 질소 그리고 염도를 등을 고려하면, 시판 조미소스인 CAS에 비해 2배 이상의 ACE 저해활성에 관여하는 펩타이드가 분포하고 있을 것으로 추정되었다.

수산자원 유래 효소 가수분해물의 ACE 저해활성(IC<sub>50</sub>, mg/mL)에 대한 연구에서, 굴 가수분해물(Chung et al., 2006a)의 alcalase 및 protamax 처리 1시간(각각 1.70 및 1.49 mg/mL)에서 가장 우수하였고, 가수분해시간과 ACE 저해활성 간에는 상관관계가 없었으며, 2단계 효소처리(1시간)로 저해활성(0.40-1.30 mg/mL)이 증가하는 경향을 보인다고 하였다(Chung et al., 2006b). Chung et al. (2006c)은 2단계 굴 효소 가수분해물을 첨가하여 제조한 요거트는 가수분해물의 첨가 농도에 비례하여 항산화 및 ACE 저해활성이 증가한다고 하였으며, 시판 요거트에 비해서도 우수하다고 하였다.

참치 자숙액의 alcalase 가수분해물 및 이를 베이스로 조미소스(Oh et al., 2007b)는 각각 4.8 및 6.2 mg/mL로서, 조미소스 제조를 위해 배합한 부재료로 인해 ACE 저해효과가 희석된 결과라고 하였다.

새우가공부산물의 alcalase 가수분해물(Heu et al., 2007a)은 1.58 mg/mL의 저해활성으로 자가소화분해물에 비해 2배가량 강한 활성을, Kang et al. (2007)의 붉은 대게 자숙수의 효소 가수분해물들(IC<sub>50</sub>, 1.52-2.08 mg/mL)은 이의 2단 가수분해물(1.40-1.74 mg/mL)에 비해 2단 가수분해에 따른 저해활성의 개선효과가 미미하였으며, Heu et al. (2007b)의 연어 frame 열수추출물에 대한 효소 가수분해물(IC<sub>50</sub>, 0.67-1.10 mg/mL)들은 효소별 저해활성의 차이는 인정되었으나, 가수분해시간에

대한 상관관계는 성립되지 않는다고 하였다.

한편, 명태껍질의 pronase E 가수분해물(Byun and Kim, 2001) 그리고 정어리 근육의 pepsin 가수분해물(Ukeda et al., 1992)의 ACE 저해능(IC<sub>50</sub>)은 각각 0.66 mg/mL 및 0.62 mg/mL이었다고 보고한 바 있다.

Heu et al. (2009)은 연어 frame의 고온고압 추출물의 효소 가수분해물들(42.4-77.6%)의 ACE 저해활성은 가수분해시간(1-8시간)의 경과에 따라 증가하는 경향을 보이나, 가수분해시간(가수분해율)과의 상관관계는 없었으며, protamax 가수분해물이 1.11 mg/mL로서 가장 우수하였다. 명태 가공부산물 유래 젤라틴(Heu et al., 2010)의 2단 효소 가수분해물과 시판 대두간장을 혼합하여 제조한 젤라틴혼합간장의 ACE 저해활성(IC<sub>50</sub>)은 1.5 mg/mL로서 시판간장(2.1 mg/mL)에 비하여 우수하여, 2단 젤라틴 가수분해물의 배합에 따른 개선효과가 인정된다고 하였고, Kim et al. (2012)은 명태 및 다시마 부산물의 혼합추출물의 가수분해물로 제조한 천연풍미소재의 ACE 저해활성(88.9%)은 시판 멸치 소스(79.4%)에 비해 강한 저해 활성을 나타내었다.

이상의 항산화 활성과 ACE 저해활성에 대한 연구결과와 보고를 통해서, 단백질의 기원(자숙수, 추출물, 부산물 및 원료), 효소종류(기질특이성), 반응조건(pH, 온도 및 시간)에 따라 다양한 결과가 도출되는 것으로 확인되었으며, 공통적으로 가공처리수, 자숙수 및 추출물과 같은 수용성의 단백질의 경우, 단일 효소를 사용하여 1단계로 비교적 단시간(2시간)에 효소처리하는 것이, 가공부산물 및 어체와 같은 고형상 원료의 경우, 2단계로 효소 처리하는 것이 가수분해물의 건강기능성을 기대하거나 개선할 수 있을 것이라 판단되었다. 이를 통해 건강기능성이 부여되거나 개선된 수산자원 유래 효소 가수분해물을 베이스로 한 다양한 건강기능 가공제품의 개발에 응용 가능할 것으로 기대되었다.

이 연구의 결과로, 멸치 원료에 대하여 시판 alcalase와 살오징어 간체장 유래 aminopeptidase 활성획분(AAF)의 연속 처리로 제조한 쓴맛이 제거된 AAAH가 가장 강한 항산화 활성과 ACE 저해활성을 나타내었으며, 이를 베이스로 하여 제조한 조미소스인 SAS 또한 시판소스 CAS 비해 유의적으로 우수하였다. 따라서 수율 및 가수분해율 고려하여, 1차로 활성이 강한 효소를 사용하여 원료 가수분해물을 제조한 다음, 이어서 2차로 exopeptidase를 사용하여 쓴맛 개선 또는 제거된 2차 가수분해물을 제조한다면, 기호성 향상과 건강기능성이 부여된 조미소스 베이스로서 활용이 가능할 것이다. 아울러 수산가공부산물인 오징어 간체장으로부터 효소를 추출하여 활용함으로써 폐자원의 upcycle 차원에 있어서도 활용도가 높아질 것으로 생각된다.

## 사 사

이 논문은 2020년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(해양별 특성을 고려한 전통

수산가공식품 개발 및 상품화).

## References

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1995. Official methods of analysis. 16th ed. AOAC, Washington D.C., U.S.A., 69-74.
- aTFIS (Korea Agro-Fisheries and Food Trade Corporation Food Information Statistics System). 2021. Market status of processed food sector (sauce) 2021. aTFIS, Naju, Korea, 58-75.
- Bougatef A, Nedjar-Arroume N, Manni L, Ravallec R, Barkia A, Guillochon D and Nasri M. 2010. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle *Sardinella aurita* by-products proteins. Food Chem 118, 559-565. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.021>.
- Byun HG and Kim SK. 2001. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from Alaska pollack *Theragra chalcogramma* skin. Process Biochem 36, 1155-1162. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00297-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00297-1).
- Cheigh HS, Lee JS and Lee CY. 1993b. Antioxidative characteristics of melanoidin related products fractionated from fermented soybean sauce. J Korean Soc Food Nutr 22, 570-575.
- Cheigh HS, Lee JS, Moon GS and Park KY. 1993a. Antioxidative activity of browning products fractionated from fermented soybean sauce. J Kor Soc Food Nutr 22, 565-569.
- 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>.
- Chung IK, Kim HS, Kang KT, Choi JD, Heu MS and Kim JS. 2006c. Preparation and characterization of enzymatic oyster hydrolysates-added yogurt. J Korean Soc Food Sci Nutr 35, 926-934. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2006.35.7.926>.
- Chung IK, Kim HS, Kang KT, Choi YJ, Choi JD, Kim JS and Heu MS. 2006a. Preparation and functional properties of enzymatic oyster hydrolysates. J Korean Soc Food Sci Nutr 35, 919-925. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2006.35.7.919>.
- Chung IK, Kim JS and Heu MS. 2006b. Improving the functional properties of oyster hydrolysates by two-step enzymatic hydrolysis. Korean J Fish Aquat Sic 39, 269-277. <https://doi.org/10.5657/kfas.2006.39.3.269>.
- Clegg KM and Lim CL. 1974. The structure of a bitter peptide derived from casein by digestion with papain. J Dairy Res 41, 283-287. <https://doi.org/10.1017/S0022029900019695>.
- Cushman DW and Cheung HS. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. Biochem Pharm 20, 1637-1648. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(71\)90292-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(71)90292-9).
- Hayashi T, Yamaguchi K and Konosu S. 1981. Sensory analysis of taste-active components in the extract of boiled snow crab meat. J Food Sci 46, 479-483. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1981.tb04890.x>.
- Heu MS, Ji SG, Koo JG, Kwon JS, Han BW, Kim JG, Kim HJ and Kim JS. 2009. Improvement on yield and functional properties of autoclave-treated salmon frame extracts using commercial enzymes. Korean J Fish Aquat Sci 42, 537-544. <https://doi.org/10.5657/kfas.2009.42.6.537>.
- Heu MS, Kang KT, Kim HS, Yeum DM, Lee TG, Park TB and Kim JS. 2007a. Preparation and characteristics of functional sauce from shrimp byproduct. J Kor Soc Food Sci Nutr 36, 209-215. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2007.36.2.209>.
- Heu MS, Kim JS and Shahidi F. 2003. Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. Food Chem 82, 235-242. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00519-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00519-8).
- Heu MS, Park CH, Kim JG, Kim HJ, Yoon MS, Park KH and Kim JS. 2010. Improvement on the antioxidative and ACE-inhibiting activities of commercial soy sauce using gelatin hydrolysates from the by-products of Alaska pollock. Korean J Fish Aquat Sci 43, 179-187. <https://doi.org/10.5657/kfas.2010.43.3.179>.
- Heu MS, Park SH, Kim HS, Jee SJ, Lee JH, Kim HJ, Han BW and Kim JS. 2007b. Improvement on functional properties of gomtang-like product from salmon frame using commercial enzymes. J Kor Soc Food Sci Nutr 36, 1596-1603. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2007.36.12.1596>.
- Hoyle NT and Merritt JH. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring *Clupea harengus*. J Food Sci 59, 76-79. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb06901.x>.
- Idowu AT and Benjakul S. 2019. Bitterness of fish protein hydrolysate and its debittering prospects. J Food Biochem 43, e12978. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12978>.
- Intarasirisawat R, Benjakul S, Wu J and Visessanguan W. 2013. Isolation of antioxidative and ACE inhibitory peptides from protein hydrolysate of skipjack *Katsuwana pelamis* roe. J Funct Foods 5, 1854-1862. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.09.006>.
- Kang KT, Heu MS and Kim JS. 2007. Improvement on the quality and functionality of red tanner crab cooking drip using commercial enzymes. J Kor Soc Food Sci Nutr 36, 1022-1030. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2007.36.8.1022>.
- Kato H, Rhue MR and Nishimura T. 1989. Role of free amino acids and peptides in food taste. In: Flavor chemistry. Trends and developments. American Chemical Society, Washington D.C., U.S.A., 158-174. <https://doi.org/10.1021/bk-1989-0388.ch013>.
- KFN (The Korean Society of Food Science and Nutrition). 2000. Handbook of experiments in food science and nutrition. Hyoil Publishing Co., Seoul, Korea, 194-200.
- Kim JG, Noh Y, Park KH, Lee JS, Kim HJ, Kim MJ, Yoon MH, Kim JS and Heu MS. 2012. Preparation of natural seasoning using enzymatic hydrolysates from byproducts of Alaska

- pollock *Theragra chalcogramma* and sea tangle *Laminaria japonica*. Korean J Fish Aquat Sci 45, 545-552. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2012.0545>.
- 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 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, Lee JS, Yoon IS, Kang SI, Park SY, Jeong UC and Heu MS. 2020. Characteristics of aminopeptidase retentate fraction from the common squid *Todarodes pacificus* hepatopancreas obtained by ultrafiltration, and it's lowering the bitterness. Korean J Fish Aquat Sci 53, 112-122. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0112>.
- Kim JS, Shahidi F and Heu MS. 2003. Characteristics of salt-fermented sauces from shrimp processing byproducts. J Agric Food Chem 51, 784-792. <https://doi.org/10.1021/jf020710j>.
- Klompong V, Benjakul S, Kantachote D and Shahidi F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally *Selaroides leptolepis* as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. Food Chem 102, 1317-1327. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.016>.
- Kristinsson HG and Rasco BA. 2000. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. Crit Rev Food Sci Nutr 40, 43-81. <https://doi.org/10.1080/10408690091189266>.
- Lee HS and Kim JH. 2021. Analysis of food consumption behavior due to COVID-19: focusing on MZ generation. J Digit Converg 19, 47-54. <https://doi.org/10.14400/JDC.2021.19.3.047>.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193, 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).
- Mochizuki H, Oda H and Yokogoshi H. 1998. Increasing effect of dietary taurine on the serum HDL-cholesterol concentration in rats. Biosci Biotechnol Biochem 62, 578-579. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.578>.
- 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).
- Oh HS, Kim JS and Heu MS. 2007b. Preparation of functional seasoning sauce using enzymatic hydrolysates from skipjack tuna cooking drip. J Kor Soc Food Sci Nutr 36, 766-772. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2007.36.6.766>.
- Oh HS, Kim JS, Kim HS, Jee SJ, Lee JH, Chung IK, Kang KT and Heu MS. 2007a. Improvement on the quality and functionality of skipjack tuna cooking drip using commercial enzymes. J Kor Soc Food Sci Nutr 36, 881-888. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2007.36.7.881>.
- Park CH, Kim HJ, Kang KT, Park J, Heu MS, Park JW and Kim JS. 2009. Fractionation of gelatin hydrolysates with antioxidative activity from Alaska pollock surimi refiner discharge. Fish Aqua Sci 12, 163-170. <https://doi.org/10.5657/fas.2009.12.3.163>.
- Ukeda H, Matsuda H, Osajima K, Matsufuji H, Matsui T and Osajima Y. 1992. Peptides from peptic hydrolysate of heated sardine meat that inhibit angiotensin I converting enzyme. Nippon Noeikagaku Kaishii 66, 25-29. <https://doi.org/10.1271/noeikagaku1924.66.25>.
- Wu HC, Chen HM and Shiau CY. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel *Scomber austriasicus*. Food Res Int 36, 949-957. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00104-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00104-2).
- Yoon IS, Kim HJ, Kang SI, Kim DY, Lee CY, Jeong UC, Kim JS and Heu MS. 2020. Food functionality and bioactivity of vacuum freeze-dried fish roe concentrates. Korean J Fish Aquat Sci 53, 403-416. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0403>.
- Yoon IS, Kim JS, Lee JS, Kwon IS and Heu MS. 2021. Optimization of reduced bitterness of alcalase-treated anchovy *Engrauris japonica* hydrolysate by aminopeptidase active fraction from common squid *Todarodes pacificus* hepatopancreas. Korean J Fish Aquat Sci 54, 724-732. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2021.0724>.
- Yoon IS, Lee GW, Kang SI, Park SY, Kim JS and Heu MS. 2017. Food functionality and biological activity of processed waters produced during the preparation of fish roe concentrates by cook-dried process. Korean J Fish Aquat Sci 50, 506-519. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0506>.