

멸치 액젓 중에 존재하는 미분해 펩티드의 특성과 이용

2. 미분해 펩티드에 미치는 숙성기간의 영향

조영제 · 김세환 · 임영선 · 김인수* · 김동수** · 최영준***

부경대학교 식품공학과, *경상대학교 식품과학과 (해양산업연구소)

한국식품개발연구원, *경상대학교 수산가공학과 (해양산업연구소)

Properties and Utilization of Undigested Peptides in Anchovy Sauces

2. Effect of Fermentation Periods on Undigested Peptides of Anchovy Sauces

Young-Je CHO, Se-Hwan KIM, Yeong-Sun IM, In-Soo KIM*,

Dong-Su KIM** and Yeung Joon CHOI***

Department of Food Science and Technology, Pukung National University, Pusan 608-737, Korea

*Department of Food Science/Institute of Marine Industry, ***Department of Marine Food Science and Technology/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Tongyong 650-160, Korea

**Korea Food Research Institute, Seong Nam Si, KyungGi-Do 463-420, Korea

The effect of fermentation period on the accumulation of 55,600 dalton polypeptide was analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as a quality parameter of anchovy sauces. Also, proximate compositions, total nitrogen contents, amount of specific peptide and isoelectric point (pI) were investigated during fermentation periods.

Total nitrogen contents significantly increased until 18 months. Polypeptide of 55,600 and 46,900 dalton on SDS-PAGE and pI 5.2, 5.6 and 6.0 on isoelectric focusing were identified in all the samples. Especially, the amount of 55,600 dalton had no important change during fermentation periods, and it had a high correlation with dilution degree of anchovy sauces diluted with water.

The results could be suggest that the amounts of 55,600 dalton polypeptide will be index for quality estimation of commercial anchovy sauces.

Key words: anchovy sauce, SDS-PAGE, isoelectric focusing, peptide, quality estimation

서 론

우리나라 멸치의 수명은 1년 반으로 어획 시기에 따라 봄과 가을 멸치로 구분하고 있으며 (국립수산진흥원, 1994), 액젓용 멸치는 연중 시장에 출하되나 대체로 수요가 최대로 되는 김장철에 출하 시기를 맞추기 위해 주로 봄멸치를 원료로 사용하고 있다.

멸치젓의 숙성 발효는 전적으로 원료의 상태, 가염방법 및 가염량, 숙성 발효와 온습도 조건에 영향을 받으며, 비교적 많은 양의 지방을 포함하기 때문에 계절에 따라 일반성분의 변동이 심하고, 이 같은 구성 성분의 함량 변화는 멸치 액젓의 품질에 큰 영향을 미친다 (김과 김, 1990). 또한 멸치젓의 숙성 기간도 액젓의 풍미 뿐만 아니라 비단백태 질소 화합물의 함량에 크게 영향을 미치며, 일반적으로 질소함량의 증가는 어느 정도까지 숙성 기간에 비례하는 것으로 알려져 있다 (차, 1985, 김과

김, 1990).

중소업체에서 제조하는 멸치 액젓의 일부는 비계통 출하에 의한 시판도 있으나, 대부분의 경우는 13~15개월 숙성 후 비교적 규모가 큰 업체에 납품하고 있으며, 가격은 총질소함량에 의해 결정된다. 따라서 일정 단계 이상의 숙성 과정을 거친 멸치 액젓의 품질 판정을 위해서는 총질소 함량에 영향을 받지 않는 품질 지표를 설정함으로써 인위적인 질소 성분의 첨가에 의한 품질 변화에 적절히 대체할 수단이 필요하다. 최 등 (1997)은 전보에서 SDS-PAGE 전기영동상에 나타난 55,600 dalton의 미분해성 펩티드를 품질 판정의 기준으로 설정할 것을 제안하였다.

본 연구는 멸치 액젓의 숙성 기간이 품질 판정의 기준으로 설정한 미분해성 펩티드에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 숙성 기간에 따른 멸치의 총 질소 함량과 미분해성 펩티드의 분포 및 특성 등을 semi-micro Kjeldahl,

SDS-PAG 전기영동 및 등전점 전기영동법으로 알아보고, 전보 (최 등, 1997) 에서 확인된 특정 펩티드에 미치는 숙성 기간의 영향을 검토하였다. 아울러 특정 펩티드의 면적비가 희석한 액젓의 희석비율을 반영하는 지의 여부도 검토하였다.

재료 및 방법

1. 재료

숙성 기간별 멸치 액젓 시료는 통영군에 소재하는 제조회사를 선정하여, 숙성 탱크로부터 액젓 만을 직접 채취한 다음 -20°C 의 동결고에 보관하면서 분석용 시료로 사용하였다. 한편 대조군 시료는 1995년 4월 거제도 인근에서 어획된 멸치 (체장 8~16 cm, 체중 10~30 g)에 대하여 25% (w/w)의 식염을 첨가하고 잘 혼합하여 용기에 넣은 후에 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 의 실온에서 20개월 숙성시킨 후, 원심분리 (3,000×g, 20 min)하고 여과하여 고형물을 제거한 액즙을 분석용 시료로 사용하였다.

2. 분석시료의 전처리

분석을 위한 시료 처리는 다음과 같이 행하였다. 즉 아무런 전처리를 거치지 않은 것을 원액 시료로 하였고, 투석막 (MW cut limit 10,000, Sigma제)으로 원액 중의 염을 탈염한 시료를 원액 투석 시료로, 원액을 분자량 10,000 (PM 10, Amicon제)의 막을 사용하여 한외여과기 (Amicon stirred cell)로 5배 농축한 다음, 증류수에 대하여 하룻밤 투석 (MW cut limit 10,000, Sigma제)한 것을 농축 투석 시료로 사용하였다.

3. 일반성분과 pH의 측정

수분은 상압가열 건조법 (AOAC, 1990B)으로, 총 질소 함량은 semi-micro Kjeldahl법 (AOAC, 1990A)으로, 회분은 건식회화법 (AOAC, 1990B)으로 각각 측정하였으며, pH는 pH meter (Oakton, Japan)를 사용하여 측정하였다.

4. 단백질 및 아미노산 함량의 측정

단백질 함량은 원액 시료를 단백질 농도 범위에 따라 Biuret 법 (Umemoto, 1966)과 Bradford법 (1976)에 준하여 각각 545 nm와 595 nm에서 흡광도를 측정하여, bovine serum albumin으로 작성한 표준 곡선에 따라 정량하였다. 한편 아미노산 함량은 원액 시료를 ninhydrin으로 발색시켜 570 nm에서 흡광도를 측정한 다음 leu-

cine으로 작성한 표준 곡선에 따라 정량하였다.

5. SDS-PAG전기영동

농축 투석 시료를 Laemmli (1970)의 방법에 따라 SDS-PAG (0.4% SDS를 함유하는 10% polyacrylamide gel) 전기영동 하였다. 이때 전기영동 완충액은 25 mM Tris-192 mM glycine, pH 8.3을 사용하였으며, 칼럼 당 3.3 mA의 전류를 흘렸다.

전기영동 후의 SDS 겔은 Coomassie brilliant blue R-250을 사용하여 염색한 후, 빙초산 : 메탄올 : 증류수 (v/v, 1 : 1 : 8)의 혼합 용액으로 탈색하였다. 그리고 펩티드의 분자량은 동일 조건하에서 전기영동한 표준단백질의 이동도와 대조하여 구하였다. 이때 표준단백질로는 bovine albumin (MW, 66,000 dalton), egg albumin (MW, 45,000 dalton), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (MW, 36,000 dalton) 및 carbonic anhydrase (MW, 29,000 dalton)를 사용하였다. 그리고 전기영동상에 있는 띠의 함량은 Image densitometer (Model GS-700, Bio-Rad)로 scanning하여 나타난 띠의 면적을 가지 단백질인 bovine albumin 띠의 면적과 상대 비교하여 산출하였다.

6. 등전점 전기영동

농축 투석 시료를 등전점 전기영동용 시료로 하여 Phast System (Pharmacia-LKB)의 separation file No.1의 방법에 따라 pH 4.5~6.0에서 전기영동하였고, Coomassie brilliant blue R-250을 사용하여 염색하였다. 한편 특정 펩티드의 등전점 값은 표준단백질로 작성한 곡선에 따라 측정하였으며, trypsin inhibitor (soybean, pI 4.6), β -lactoglobuline (bovine milk, pI 5.1), carbonic anhydrase II (bovine, pI 5.4) 및 carbonic anhydrase (bovine, pI 5.9)를 표준단백질로 사용하였다.

7. 통계처리

표준 편차, 회귀 분석 및 각 지표들 간의 상관성 등의 통계분석은 JMP (SAS Institute Inc., U.S.A.) 프로그램으로 수행하였다.

결과 및 고찰

1. 숙성기간별 일반성분의 변화

숙성 기간에 따른 멸치 액젓의 일반성분 조성은 Table 1과 같다. 수분의 함량은 숙성 10개월 이후, 거의 비슷한 수준인 약 65% 전후를 유지하였으며, 총 질소 함량은

Table 1. Changes of proximate composition of anchovy sauces during fermentation

Fermentation period (months)	Moisture (%)	Total nitrogen (mg-N/100ml)	Ash (%)	pH (%)
Raw	73.4 ± 0.3	2565 ± 5	3.3 ± 0.6	6.5
8	67.1 ± 0.9	1345 ± 16	21.7 ± 0.2	6.5
10	64.3 ± 3.4	1654 ± 6	21.5 ± 0.3	6.7
13	64.5 ± 0.4	1841 ± 4	21.3 ± 0.2	6.2
18	65.6 ± 0.2	2012 ± 22	20.6 ± 0.5	6.6
24	64.9 ± 0.5	2131 ± 10	20.9 ± 0.3	6.0

숙성 기간에 비례하여 큰 폭으로 증가하였으나, 숙성 18개월 이후는 증가 속도가 둔화하여 거의 정체 상태에 이르는 것으로 나타났다. 이 같은 실험 결과는 원료 육의 총 질소 함량이 2564 ± 5임을 감안한다면, 숙성 24개월째에는 총 질소의 83.1%가 가용화 된 것으로 나타나 더 이상의 가용화는 거의 일어나지 않는 것으로 판단되었으며, 숙성기간에 따른 총질소 함량은 $y = -0.004x^2 + 0.160x + 0.346$ (이 때 y는 총질소함량, x는 숙성기간, 결정계수 = 0.973)와 같은 2차 회귀방정식에 따름을 알 수 있었다. 구 등 (1990)은 15일 숙성한 정어리 액젓의 가수분해율은 58.1%이며, 가정에서 담근 멸치 액젓의 가수분해율은 60.2%라고 보고하였다. 이 같이 총 질소의 가용화 값에 큰 차이를 보이는 것은 숙성 기간의 차이에 기인하는 것으로 보인다. 한편 본 실험의 결과에 미루어 총 질소 함량과 저장 탱크의 사용, 액젓을 다량 소비하는 시기 등을 감안하면 봄멸치인 경우는 15~16개월 간 염장하여 액젓을 제조, 시판하는 것이 경제성이 있을 것으로 판단되었다.

2 숙성기간별 단백질과 아미노산 함량의 변화

숙성 기간이 증가함에 따라 총 질소 함량은 증가하는 반면, 단백질의 함량은 감소하는 경향을 보이고 있었다. 한편 아미노산의 함량은 24개월 숙성 시에 가장 높은 함량을 나타내고 있었으나, 숙성 10개월 이후에는 대체로 비슷한 수준을 유지하고 있었다 (Table 2). 이 같은 결과

Table 2. Changes of total nitrogen, protein and amino acid in anchovy sauce during fermentation

Fermentation period (Months)	Total nitrogen (g-N/100ml)	Protein (mg/ml)	Amino acid (M)
8	1.344 ± 0.016	1.22 ± 0.01	0.569 ± 0.070
10	1.654 ± 0.006	1.26 ± 0.05	0.843 ± 0.043
13	1.841 ± 0.004	0.76 ± 0.02	0.769 ± 0.041
18	2.012 ± 0.022	0.47 ± 0.03	0.729 ± 0.040
24	2.131 ± 0.010	0.22 ± 0.03	0.907 ± 0.054

는 장기간 숙성인 경우는 저장 10개월까지 아미노산이 최대 생성되고 이후의 총질소량 증가는 아미노산 외의 저분자 화합물 및 저분자 펩티드의 생성에 때문으로 생각된다. 이와 관련하여, Raksakulthai and Haard (1992)는 식염만을 첨가하여 제조한 액젓은 효소를 첨가하여 제조한 액젓에 비하여 ninhydrin에 발색되지 않는 500~1300 dalton 이상의 펩티드가 다량 생성된다고 보고한 바 있다.

3. 숙성 기간별 SDS-PAG 전기영동상의 변화

SDS-PAG 전기영동상에 나타난 숙성 기간에 따른 멸치 액젓 펩티드의 전기영동 상과 분자량 분포를 각각 Fig.1과 Table 3에 나타내었다. 숙성 8개월 째에는 17개의 확인 가능한 띠가 존재하였으나, 숙성 10개월 이후에는 분자량 55,600 dalton을 초과하는 띠는 소멸하였다. 그리고 숙성 기간에 따라 다소 차이는 있으나, 분자량 55,600 dalton 이하의 펩티드 분포 형태는 숙성 기간에 관계없

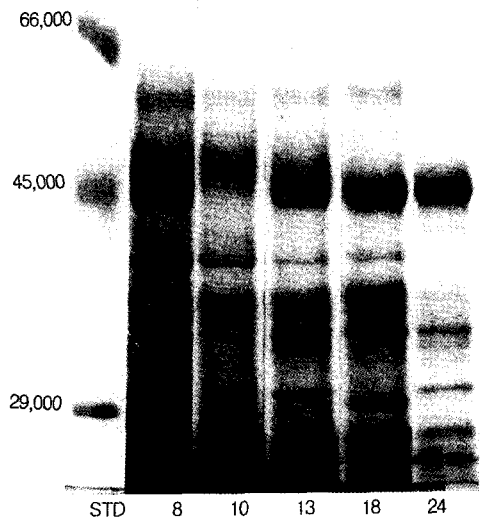


Fig. 1. Patterns of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in 10% gel with concentrates of anchovy sauces during fermented periods.

Table 3. Distribution of peptides in concentrates of anchovy sauces by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in 10% gel

Molecular weight (10 ³ ×Dalton)	Fermentation periods (month)				
	8	10	13	18	24
104.1	+	-	-	-	-
91.3	+	-	-	-	-
79.1	+	-	-	-	-
69.4	+	-	-	-	-
55.6	+	+	+	+	+
46.9	+	+	+	+	+
43.4	+	+	-	-	+
35.6	+	+	+	+	+
37.6	+	+	+	+	+
35.6	+	-	+	+	+
34.7	+	-	+	+	+
32.5	+	+	+	-	+
30.9	+	-	-	+	-
30.1	+	-	-	+	+
29.3	+	+	+	+	+
28.9	+	-	-	+	+
28.2	+	+	+	-	+

이 비슷하였다. 또한 분자량 55,600 dalton과 46,900 dalton의 펩티드는 숙성 기간에 관계없이 나타나 이들 펩티드를 멸치 액젓의 품질 지표로 활용 가능함을 시사하고 있었다. 한편 10% polyacrylamide gel에서 dye front이하로 이동하는 저분자의 물질들이 다량으로 염색되어 있는 것에 미루어 분자량 20,000dalton이하의 펩티드들에 관한 상세한 검토가 이루어져야 할 것으로 생각된다. SDS-PAG 전기영동과 관련하여 Wasserman (1986)은 SDS-PAG 전기영동에 의한 분자량의 검출 한계는 대략 5,000~10,000 dalton이라고 보고하였다.

4. 숙성기간별 등전점 전기영동상의 변화

숙성 기간별로 멸치 액젓의 펩티드를 등전점 전기영동한 결과 (Fig. 2), 숙성 기간에 따라 등전점의 분포에는 다소 차이가 있었으나, 등전점 5.2, 5.6 및 6.0은 숙성 기간에 관계없이 공통적으로 나타났다. 따라서 이들 등전점에 해당하는 펩티드는 액젓 원료어의 확인과 품질 판정에 활용이 가능할 것으로 예상되었다 (Table 4). 전기영동법을 이용한 어종의 확인과 관련하여 Wei et al. (1990)은 등전점 전기영동을 통해 새우 수용성 단백질의 띠를 검출함으로써 새우 혼합 식품군 중에 포함된 특정 새우의 종을 확인하였으며, Huang et al. (1995)은 red sanpper 및 11종의 유사어종 판정을 위해 등전점 전기영동과 SDS-PAG전기영동을 사용하였다.

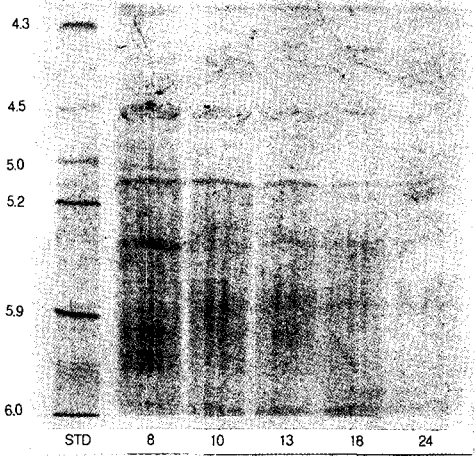


Fig. 2. Patterns of isoelectric focusing in pH 4.0~6.5 with desalted concentrate of anchovy sauces.

Table 4. Isoelectric point distribution of peptides in concentrates of anchovy sauces by isoelectric focusing in pH gradient 4.0~6.5

Isoelectric point	Fermentation periods (month)				
	8	10	13	18	24
4.3	+	+	+	+	-
4.6	-	-	-	-	+
4.8	+	-	-	-	+
5.2	+	+	+	+	+
5.6	+	+	+	+	+
5.7	-	-	+	-	+
5.9	+	+	+	+	+
6.3	+	-	-	-	-

5. 숙성기간에 따른 총 질소 함량, 단백질, 아미노산 및 특정 펩티드 면적 간의 상관성

숙성기간에 따른 총 질소 함량, 단백질, 아미노산 및 특정 펩티드 면적 간의 상관성을 다중 회귀 및 직선 회귀로 분석하여 결정 계수 값과 F 값을 검토하였다. 숙성 기간에 대한 총질소 함량과 단백질 함량의 변화는 각각 결정계수 0.9730 (p<0.05)와 0.9317 (p<0.05)으로서 비교적 높은 상관성을 보였으며, 숙성기간에 대한 아미노산 함량과 SDS-PAG전기영동에 나타난 분자량 55,600 dalton의 펩티드면적 비는 거의 상관성이 없거나 (결정계수, 0.4155), 전혀 없는 것으로 나타났다 (결정계수, 0.0284). 이 같은 결과는 전기영동상에 나타난 55,600 dalton 펩티드의 함량 변화는 숙성기간과 상관성이 없음을 뜻하는 것으로 숙성 기간에 영향을 받지 않는 특정 펩티드의

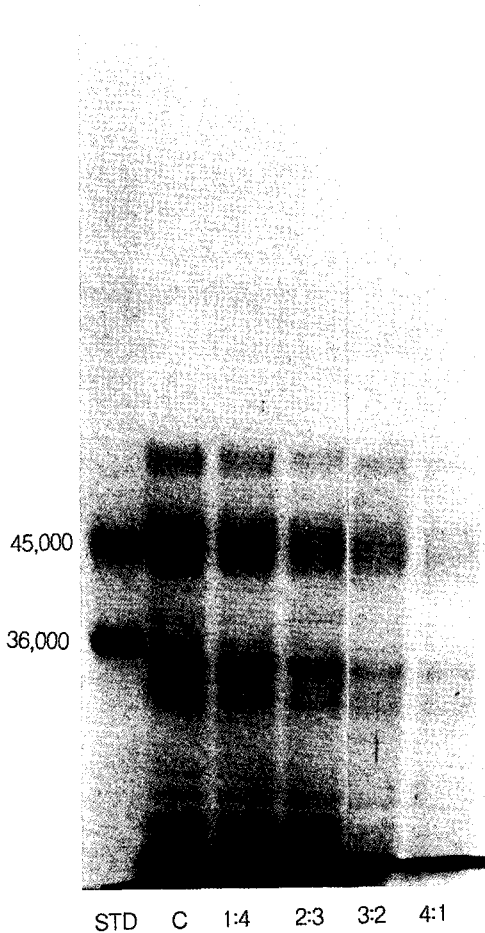


Fig. 3. Patterns of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in 10% gel with concentrates of anchovy sauces by dilution ratio.

면적비는 멸치 액젓의 품질 지표로 활용이 가능할 것으로 판 되었다.

6. SDS-PAG전기영동에 미치는 희석의 영향

희석에 따른 대조군 멸치 액젓의 SDS-PAG전기영동상을 Fig. 3에 나타내었다. 전기영동 상에서 알 수 있듯이 55,600과 46,900 dalton 펩티드의 염색 강도와 띠의 크기는 액젓 시료를 5/4, 3/5, 2/5, 1/5로 희석함에 따라 점차 줄어들고 동시에 띠의 면적도 감소하였다.

이미지 분석기로 측정된 SDS-PAG전기영동상의 55,600과 46,900 dalton 펩티드의 면적은 액젓의 단계별 희석 비율에 따라 감소하였고, 감소비율은 희석 비율을 유의적으로 반영하고 있음을 확인하였다 (결정계수 0.9998,

$p < 0.05$). 한편 전기영동 시료와 동일한 비율로 희석한 농축 투석 시료의 총 질소함량은 희석 비율에 따라 정확히 감소하여, 단계별로 희석한 액젓 시료의 희석 정도를 정확하게 반영하고 있었다 (결정계수, 1.0000, $p < 0.05$). 이 같은 실험의 결과는 SDS-PAG전기영동에 따른 특정 펩티드 면적의 절대값을 품질의 지표로 설정한다면, 인위적인 멸치 액젓의 희석 여부와 희석율을 판단할 수 있는 기준이 될 수 있을 것으로 판단된다 (Fig. 4).

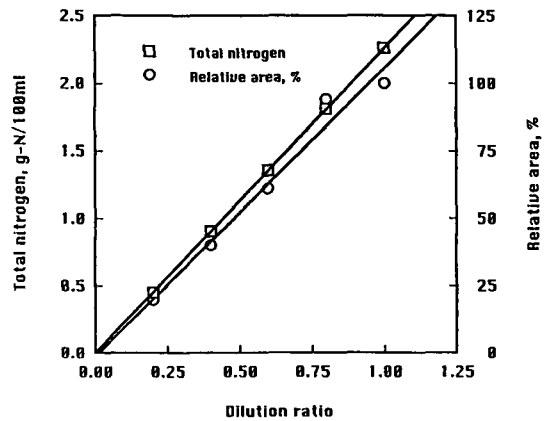


Fig. 4. The changes of total nitrogen and relative area by SDS-PAGE with dilution. The relative area was percent ratio to 55.600 peptide band without dilution.

요 약

멸치 액젓의 숙성 기간이 품질에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 숙성 기간 별에 따른 멸치의 총 질소 함량과 미분해성 펩티드의 분포와 특성 등을 semi-micro Kjeldahl 질소정량법, SDS-PAG 전기영동 및 등전점 전기영동법으로 알아보고, 이 중 전보에서 확인된 특정 펩티드를 품질의 지표로 설정할 때, 이에 미치는 숙성기간의 영향을 검토하였다. 아울러 특정 펩티드의 면적비가 물로 희석한 액젓의 희석 비율을 정확히 반영하는지의 여부도 검토하였다.

수분은 숙성 10개월 이후, 65% 전후를 유지하였고, 총 질소 함량은 숙성기간에 비례하여 증가하다가 18개월 이후는 증가 속도가 둔화하였다. 한편 단백질 함량은 숙성기간에 따라 감소하였고, 아미노산의 함량은 숙성 10개월 이후에는 변화가 거의 없었다.

분자량 55,600 dalton과 46,900 dalton의 펩티드는 숙성기간에 관계없이 나타나, 이들 펩티드가 멸치 액젓의 품질 지표로 활용될 수 있음을 보여주었고 있었다. 한편

등전점 5.2, 5.6 및 6.0의 펩티드는 숙성기간에 관계없이 모든 시료에서 나타났다.

숙성기간에 따른 총질소 함량과 단백질 함량의 변화는 역의 상관관계를 나타내고 있었으며, 아미노산 함량과 SDS-PAG전기영동에 나타난 분자량 55,600 dalton의 펩티드 면적비와는 거의 상관성이 없는 것으로 나타났다. 따라서 8~24개월 동안의 숙성 중에도 거의 영향을 받지 않는 특정 펩티드의 면적비는 멸치 액젓의 품질 지표로 활용이 가능할 것으로 판단되었으며, 또한 액젓의 회석에 따른 총 질소 함량의 변화와 SDS-PAG전기영동상의 펩티드면적비의 변화는 회석비를 정확하게 반영하는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

- AOAC. 1990A. Nitrogen (total) in fertilizers. in "Official Methods of Analysis", 15th ed. Assoc. of Offic. Anal. Chem., Arlington, 17
- AOAC. 1990B. Ash of seafood. in "Official Methods of Analysis", 15th ed. Assoc. of Offic. Anal. Chem., Arlington, 868
- AOAC. 1990B. Moisture in meat. in "Official Methods of Analysis", 15th ed. Assoc. of Offic. Anal. Chem., Arlington, 931
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248~254.
- Choi, Y.J., S.H.Kim, Y.S.Im, I.S.Kim, D.S.Kim and Y.J. Cho. 1998. Properties and utilization of undigested peptides in anchovy sauses I. use of undigested peptides as a quality parameter of anchovy sauces. *S. Kor. Fish. Soc.*, 31.
- Huang, T-S., Marshall, M. R. and Wei, C-I. . 1995. Identification of red snapper (*Lutjanus camperchanus*) using electrophoretic techniques. *J. Food Sci.*, 60, 279~283.
- JMP. 1995. Statistics and graphics. SAS Institute Inc., NC, USA
- Koo, J.G., Y.M.Kim, Y.C.Lee and D.S.Kim. 1990 Taste compounds of rapid processed sardine sauce. *Bull. Kor. Fish. Soc.* 27, 87~92.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680~685.
- Raksakulthai, N. and Haard N.F.. 1992. Correlation between and concentration of peptide and amino acids and the flavor of fish sauce. *ASEANFood Journal.* 7, 86~90.
- Umamoto, S. 1966. A modified method for estimation of fish muscle protein by Biuret method. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 32, 427~435.
- Wasserman, B. P. 1986. Detection of proteolysis by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis: A demonstration of protein hydrolysis and electrophoresis fundamentals. *J. Food Biochem.*, 10, 83~91.
- Wei, C-I., An, H., Chen, J. and Marshall, M. R. 1990. Use of a modified urea gel isoelectric focusing method for species identification of raw or broiled white, pink, and rock shrimp. *J. Food Biochem.* 14, 91~102.
- 국립수산진흥원. 1994. 한국연근해 유용 어류도감. 예문사. 부산. p 47.
- 김영명, 김동수. 1990. 한국의 것갈-그 원료와 제품. 한국식품개발연구원. 서울. pp. 102~126.
- 차용준. 1985. 저식염 멸치젓과 조기젓 제조조건 및 제품의 풍미에 관한 연구. 부산수산대학 대학원 박사학위 청구논문.

1997년 12월 10일 접수

1998년 5월 4일 수리