

효소분해에 의한 참치 자숙액의 품질 및 기능성 개선

오현석¹ · 김진수² · 김혜숙² · 지성준² · 이재형² · 정인권² · 강경태³ · 허민수^{1†}

¹경상대학교 식품과학과/해양산업연구소

²경상대학교 해양식품생명공학과/해양산업연구소

³한성기업(주)

Improvement on the Quality and Functionality of Skipjack Tuna Cooking Drip Using Commercial Enzymes

Hyun Seok Oh¹, Jin-Soo Kim², Hye-Suk Kim², Seung Joon Jee², Jae Hyoung Lee², In-Kwon Chung², Kyung Tae Kang³ and Min Soo Heu^{1†}

¹Dept. of Food Science/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University,
Tongyeong 650-160, Korea

²Dept. of Seafood Bioscience and Technology/Institute of Marine Industry,
Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea

³Hansung Enterprise Co., Ltd., Gimhae 621-914, Korea

Abstract

For the use of skipjack tuna cooking drip (STC) as a source of functional seasoning, the STC was hydrolyzed with various commercial enzymes, such as Alcalase, Flavourzyme, Neutrase and Protamex, and its hydrolysate was also investigated on the food component characteristics. The hydrolysate incubated with Alcalase for 30 min (HA30) showed 56.8% for angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and 1.18 for antioxidative activity, which were high or similar compared to the other enzymatic hydrolysates. There were no differences in ACE inhibitory activity and antioxidative activity among HA30, two-step enzymatic hydrolysates, and ultrafilterates (molecular weight cut off, 10 kDa). The HA30 was very stable on the digestive enzymes, such as chymotrypsin, pepsin, trypsin according to the TCA (trichloroacetic acid) soluble index. The results suggested that skipjack tuna cooking drip could be used as a source for preparing functional seasoning sauce.

Key words: skipjack tuna, skipjack tuna cooking drip, seafood byproducts, seafood cooking drip

서 론

우리나라에서 참치는 2000년 이후 23만~27만 M/T 범위로 큰 변화 없이 다량 어획되어 주로 통조림 및 가쓰오부시의 형태로 이용되고 있다. 참치 가공품인 통조림과 가쓰오부시를 제조하기 위하여 우선적으로 자숙처리가 동반되어야 하고, 이로 인해 다량의 자숙액이 발생한다(1). 이와 같은 자숙액은 taurine 및 단백질과 같은 유용 영양성분, glutamic acid와 같은 맛성분 및 건강 기능성 전구물질인 peptide들이 다량 함유되어 있어 우수한 식품 가공 소재이다(2,3). 하지만 참치 자숙액은 단순 농축 처리에 의하여 조미 소스 소재로 이용하고자 하는 경우 맛은 우수하나 냉장고 등과 같은 저온에서는 겔(gel)화 하는 등으로 인하여 이용에 제한을 받고 있다. 하지만 이를 상업적 효소로 가수분해와 같은 전처리를

한 다음 농축하는 경우 겔화 하는 단점의 보완 뿐만이 아니라 ACE 저해능과 항산화능과 같은 건강 기능성이 개선된 우수한 조미 소재로 이용할 수 있어 참치 자숙액의 효율적 이용 방안의 하나로 생각된다(4-6).

참치 자숙액의 유효 이용을 위한 기초적인 연구로는 Jao 와 Ko(7)의 참치 자숙액 유래 가수분해물로부터 항산화능이 우수한 peptide의 분리 및 정제에 관한 연구가 있고, 응-용을 위한 연구로는 Kim 등(8)의 참치 자숙액의 탈염처리 및 이를 이용한 조미료의 개발에 관한 연구와 Ahn과 Kim(9)의 맛 개선을 목적으로 효소처리에 의한 분말 엑기스의 제조 및 특성에 관한 연구 등이 있다. 하지만, 이들의 참치 자숙액에 관한 연구들은 기능성 개선 및 정제에 의하여 고단가의 약용을 목적으로 하는 기초 연구와 단순히 겔화 방지, 수율 및 맛 개선에 의한 천연 조미료의 제조를 시도하였을 뿐이

[†]Corresponding author. E-mail: heu1837@dreamwiz.com
Phone: 82-55-640-3177, Fax: 82-55-640-3170

고, 젤화 방지, 수율 및 맛 개선은 물론이고 ACE 저해능 및 항산화능까지 고려하여 건강 기능성 천연 조미료의 제조를 고려한 연구는 거의 없는 실정이다.

본 연구에서는 참치 통조림 및 가쓰오부시 가공 중 액상 부산물로 발생하는 자숙액의 효율적 이용을 위하여 참치 자숙액에 상업적 효소 처리에 의하여 기존 연구자들이 시도한 젤화 방지, 맛 및 수율 개선과 건강 기능성을 함께 고려한 조미 베이스(basic materials)의 제조 조건을 검토하고자 하였고, 아울러 최적 건강 기능성 천연 조미 베이스의 식품성분 특성에 대하여도 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

재료

참치 통조림 가공 부산액인 참치 자숙액은 2006년 3월에 경상남도 고성군 소재 사조산업(주)로부터 구입하여 2겹의 거즈(cheese cloth)로 1차 여과한 다음 냉동고(-25°C)에 보관하여 두고 실험에 사용하였다.

참치 자숙액의 품질 및 기능성 개선을 위하여 사용한 4종의 상업적 효소 즉, Alcalase 2.4 L FG(이하 Alcalase라 칭함, 최적 온도: 55~70°C, 최적 pH: 6.5~8.5), Flavourzyme 500 MG(이하 Flavourzyme이라 칭함, 최적 온도: 50°C, 최적 pH: 7.0), Neutrerase 0.8 L(이하 Neutrerase라 칭함, 최적 온도: 45~55°C, 최적 pH: 6.0), Protamax 1.5 MG(이하 Protamex라 칭함, 최적 온도: 40°C, 최적 pH: 6.0~7.0)는 Novo 사(Novo Nordisk, Bagsværd, Denmark)에서 구입하여 사용하였다. 또한, 참치 자숙액 가수분해물의 소화효소에 의한 안정성 검토를 위하여 사용한 3종의 소화효소 즉, chymotrypsin(≥ 40 units/mg protein, 최적 온도: 37°C, 최적 pH: 7.0~8.0), pepsin(800~2,500 units/mg protein, 최적 온도: 37°C, 최적 pH: 2.0~4.0) 및 trypsin(1,000~2,000 BAEE units/mg solid, 최적 온도: 37°C, 최적 pH: 8.0)은 Sigma 사(Sigma-Aldrich Co., USA)에서 구입하여 사용하였다.

효소 가수분해물 및 한외 여과물의 제조

참치 자숙액의 향미 및 기능성 개선을 위한 참치 자숙액 유래 1단 효소 가수분해물(이하 1단 가수분해물이라 칭함)의 제조는 사용하고자 하는 상용효소의 최적 온도로 조절하고, 여기에 참치 자숙액의 단백질에 대하여 1%(w/w)에 해당하는 효소를 첨가한 다음, 일정시간(30분, 60분, 120분, 180분 및 360분) 동안 반응시켰다. 이어서 1단 가수분해물에 대한 반응 효소의 실활을 위하여 끓는 물에서 10분간 자숙처리한 다음, 체가름(120 mesh)하여 1단 가수분해물을 제조하였다. 1단 가수분해물은 단일 효소의 작용으로 한정된 기질 특이성에 따라 peptide의 기능성이 한정될 것으로 추정되어 이의 개선을 위하여 참치 자숙액 유래 2단 효소 가수분해물(이하 2단 가수분해물이라 칭함)의 제조를 시도하였다. 1단 가수분해물에 사용한 효소의 최적 온도로 재조정한 후, 여기

에 1단 가수분해물의 단백질 함량에 대하여 1%(w/w)에 해당하는 효소를 첨가하고 반응(120분)시켰다. 이어서 2단 가수분해물에 대한 반응 효소의 실활을 위하여 끓는 물에서 10분간 자숙처리한 후, 체가름(120 mesh)하여 2단 가수분해물로 사용하였다.

한외 여과물은 Alcalase로 제조한 1단 가수분해물을 10배 희석하여 분자량 한계 범위(molecular weight cut-off; MWCO)가 10 kDa인 한외여과막에 통과시켜 10 kDa 이하의 분자량에 해당하는 하층액과 대부분이 10 kDa 이상의 분자량으로 추정되는 상층액을 4:1의 비로 분리하여 제조하였다.

효소 가수분해물의 건강 기능 안정성

건강 기능성을 함유한 참치 자숙액 가수분해물의 소화효소에 대한 안정성을 검토하기 위하여 1단 가수분해물의 단백질 함량에 대하여 1%에 해당하는 chymotrypsin, pepsin 및 trypsin과 같은 3종의 소화효소를 각각 가하고, 소화효소의 최적 pH(각각 8.0, 2.0 및 8.0) 및 인체 온도인 37°C로 조정한 다음 2시간 동안 각각 반응시켰다. 이어서 반응물에 존재하는 소화효소의 실활을 위하여, 끓는 물에서 10분간 가열처리 및 체가름하여 참치 자숙액 가수분해물이 가지는 건강 기능성의 소화효소에 대한 안정성을 다음과 같이 살펴보았다.

$$\text{가수분해물의 건강 기능 안정성} = \left(1 - \frac{F_1 - F_2}{F_1} \right) \times 100$$

F1: 소화효소 무처리 가수분해물의 ACE 저해능

F2: 소화효소 처리 가수분해물의 ACE 저해능

일반성분, 염도, pH 및 brix

일반성분은 AOAC법(10)에 따라 수분의 경우 상압가열 전조법, 조단백질의 경우 semimicro Kjeldahl법, 조지방의 경우 Soxhlet법, 그리고 조회분의 경우 전식회화법으로 각각 측정하였다. 그리고, 염도는 염도계(model 460CP, Iste, Korea)를 사용하여 측정하였고, pH는 pH meter(691, Metrohm, Swiss)로 측정하였으며, brix는 hand-held refractometers(2E, Atago, Japan)로 측정하였다.

탁도 및 갈변도

탁도 및 갈변도를 측정하기 위한 시료는 참치 자숙액(1단 또는 2단 가수분해물)을 원심분리(5,000 rpm, 20분)한 다음 얻어진 상층액으로 하였다. 탁도 및 갈변도는 분광광도계(UV-140-02, Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 탁도는 파장 660 nm에서 측정한 투과율(%)로 하였고, 갈변도는 파장 430 nm에서 측정한 흡광도로 하였다.

TCA soluble index

측정 시료는 참치 자숙액 유래 효소 가수분해물에 동량의 20%(w/v) TCA(trichloroacetic acid)를 넣고 혼합하여 단백질을 제거하고, 원심분리(1,000×g, 20분)하여 제조하였다.

TCA soluble index는 전처리 시료를 semimicro Kjeldahl법으로 측정한 다음 아래 식에 따라 계산하였다.

$$\text{TCA soluble index}(\%) = \frac{\text{무처리 총질소} - \text{엑스분 질소}}{\text{무처리 총질소}} \times 100$$

Angiotensin I converting enzyme (ACE)의 저해능 및 항산화능

ACE 저해능은 정제 ACE를 이용하는 Horiuchi 등(11)의 방법에 따라 전처리를 한 후 Zorbax 300SB C₈ column (Hewlett Packard Co., 4.6×150 mm)이 장착된 HPLC (LC-10AVP, Shimadzu Co., Japan)로 측정하였다.

항산화능은 Rancimat(743 Metrohm AG, CH-9101 Herisau, Switzerland)를 이용하는 Gogolewski 등(12)과 Kajimoto 등(13)의 방법에 따라 측정하여 유도기(시간)로 나타내었다.

분자량 패턴

시료는 microfilter 처리(0.20 μm)한 다음 이를 0.1 M NaCl을 함유하는 0.01 M sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형화시킨 칼립(Sephacryl S-100 HR, φ 1.6×100 cm)에 주입하였다. 이어서 칼립을 동일 완충액으로 용출(16 mL/hr)하면서 일정량(0.8 mL)씩 분취하였다. 이 때 용출되는 단백질은 215 nm에서 흡광도로 검출하였다.

통계처리

데이터의 표준편차 및 유의성 검정(5% 유의수준)은

SPSS 통계 패키지[SPSS for Windows, release 10.0.1(1 Jun 2000)]에 의한 ANOVA test를 이용하여 분산분석한 후 Duncan의 다중위험정을 실시하였다(14).

결과 및 고찰

1단 가수분해물의 특성

효소의 종류(Alcalase, Flavourzyme, Neutrerase 및 Protamex) 및 가수분해 시간(0~6시간)에 따른 효소 무처리 참치 자숙액 원액 및 1단 가수분해물의 TCA soluble index, angiotensin I converting enzyme(ACE) 저해능(%) 및 항산화능은 Table 1과 같다. 효소 종류 및 가수분해 시간의 차이에 관계없이 모든 참치 자숙액 1단 가수분해물의 경우 냉장고에서 48시간 동안 결화되지 않아 출화시켜서 사용하여야 한다는 불편성을 개선되었다(데이타 미제시). 이와 같은 결과는 참치 자숙액 중 고분자 젤라틴의 조성비가 높았으나, 효소 처리에 의하여 저분자화 되었기 때문이라 판단되었다. 효소 무처리 참치 자숙액 원액의 TCA soluble index는 74.6%이었다. 이를 기질로 하여 4종의 상업적 효소로 가수분해한 참치 자숙액 1단 가수분해물의 TCA soluble index는 Alcalase 가수분해물 및 Protamex 가수분해물의 경우 가수분해 180분에 각각 90.1% 및 90.6%로, Flavourzyme 가수분해물 및 Neutrerase 가수분해물의 경우 가수분해 360분에서 각각 93.7% 및 92.0%로 최대를 나타내어, 효소 무처리 참치 자숙액 원액에 비하여 16.1~19.1%의 개선 효과가 인정되었

Table 1. Trichloroacetic acid (TCA) soluble index, angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antioxidative activity (induction period) of hydrolysates from skipjack tuna cooking drip incubated with various enzymes for different times

	Hydrolysis time (min)	Enzymes			
		Alcalase	Flavourzyme	Neutrerase	Protamax
TCA soluble index (%)	0	74.6±4.5 ^{b1)}	74.6±4.5 ^c	74.6±4.5 ^c	74.6±4.5 ^c
	30	86.7±1.4 ^a	80.5±2.1 ^{bc}	81.5±0.8 ^b	80.5±2.1 ^{bc}
	60	87.5±1.1 ^a	84.7±4.9 ^b	87.9±2.1 ^a	86.0±2.1 ^{ab}
	120	88.7±2.1 ^a	92.9±2.9 ^a	91.6±1.6 ^a	89.7±4.4 ^a
	180	90.1±1.4 ^a	92.7±2.9 ^a	91.5±2.1 ^a	90.6±4.2 ^a
	360	89.5±2.1 ^a	93.7±0.8 ^a	92.0±3.6 ^a	89.9±4.2 ^a
ACE inhibitory activity (%)	0	20.2±2.1 ^d	20.2±2.1 ^c	20.2±2.1 ^c	20.2±2.1 ^c
	30	56.8±0.9 ^a	41.4±1.3 ^{ab}	46.4±1.2 ^a	56.7±4.9 ^a
	60	57.1±0.9 ^a	43.2±1.3 ^a	42.8±1.3 ^b	49.9±5.8 ^{ab}
	120	45.0±1.1 ^c	40.5±1.3 ^{ab}	43.6±1.2 ^b	50.7±5.7 ^{ab}
	180	50.4±1.0 ^b	41.2±1.3 ^{ab}	43.4±1.2 ^b	46.0±6.2 ^b
	360	44.6±1.1 ^c	39.2±1.3 ^b	41.9±1.3 ^b	51.3±5.6 ^{ab}
Antioxidative activity (hrs)	Control	3.19±0.15 ^c	3.19±0.15 ^b	3.19±0.15 ^b	3.19±0.15 ^b
	0	3.18±0.05 ^c	3.18±0.05 ^b	3.18±0.05 ^b	3.18±0.05 ^b
	30	3.80±0.25 ^a	3.40±0.33 ^{ab}	3.77±0.16 ^a	3.75±0.08 ^a
	60	3.48±0.14 ^b	3.75±0.16 ^a	3.74±0.23 ^a	3.70±0.28 ^a
	120	3.61±0.06 ^{ab}	3.64±0.14 ^a	3.52±0.18 ^a	3.65±0.09 ^a
	180	3.48±0.24 ^{ab}	3.65±0.12 ^a	3.46±0.27 ^{ab}	3.68±0.16 ^a
	360	3.79±0.06 ^a	3.77±0.18 ^a	3.77±0.10 ^a	3.26±0.12 ^b

The concentrations of samples for measuring ACE inhibitory activity were 5 mg/mL.
Induction period of 20 mM ascorbic acid was 3.96±0.17 hrs.

¹⁾Means with different letters within the same column are significantly different ($p<0.05$).

다. 하지만 이들 효소 가수분해물의 TCA soluble index의 최대치는 Alcalase 가수분해물의 경우 30분 처리 이후의 것 (86.7%), Flavourzyme 가수분해물의 경우 120분 처리 이후의 것(92.9%) 및 Neutrerase 가수분해물(87.9%)과 Protamex 가수분해물(86.0%)의 60분 처리 이후의 것들의 TCA soluble index와 유의수준 5% 범위에서 최대치와 차이가 없었다.

효소 무처리 참치 자숙액 원액의 ACE 저해능(5 mg/mL에서 %)은 20.2%에 불과하였다. 이를 기질로 하여 효소의 종류 및 가수분해 시간에 따른 가수분해물의 ACE 저해능(5 mg/mL에서 %)은 상업적 효소의 종류에 관계없이 가수분해 30분에서 Alcalase 가수분해물의 경우 56.8%를, Flavourzyme 가수분해물의 경우 41.4%를, Neutrerase 가수분해물의 경우 46.4%를, Protamex 가수분해물의 경우 56.7%를 나타내어 최대치 또는 이와 유사한 값(5% 유의수준에서 차이가 없음)을 나타내어, 효소 무처리 참치 자숙액 원액에 비하여 21.2~36.5%의 개선 효과가 인정되었고, 이후 증감을 하였다. 하지만 1단 가수분해물의 ACE 저해능은 시간에 따른 의존성과 TCA soluble index에 따른 의존성은 없었다. 이와 같은 결과는 단백질 가수분해물의 기능성은 peptide를 구성하는 아미노산의 종류에 의해 결정되므로, 적정 이상으로 가수분해되는 경우 기능성 함유 peptide가 오히려 분해되기 때문이라 판단되었다. 한편, Byun과 Kim(15)도 상업적 효소를 이용한 명태 껍질 가수분해물을 제조하여 ACE 저해능을 살펴 본 결과 가수분해도와 ACE 저해능 간에는 상관성이 없었다고 보고한 바 있다. 이상의 ACE 저해능의 결과로 미루어 보아 참치 자숙액의 ACE 저해능을 기대하기 위한 적정 효소는 Alcalase 또는 Protamax, 가수분해 시간은 30분으로 판단되었고, 이들 가수분해물의 ACE 저해능은 각각 56.8% 및 56.7%로 차이가 없었다.

유도기(시간)로 살펴 본 가수분해물의 항산화능은 대두유에 자숙액을 대신하여 탈이온수 첨가 시료구인 대조구의 경우 3.19시간이었고, 효소 무처리 참치 자숙액의 경우 3.18시간으로 대조구에 비하여 효과가 인정되지 않았으나, 4종의 상업적 효소로 가수분해하는 경우 효소의 종류 및 가수분해 시간에 관계없이 3.26~3.80시간 범위로 연장되어 효과가 인정되었다. 하지만 Alcalase로 60분간 가수분해시킨 가수분해물과 Protamex로 360분 가수분해시킨 가수분해물을 제외한다면 동일 효소로 30~360분 가수분해시킨 가수분해물 간의 항산화능은 5% 유의수준에서 유의차가 인정되지 않았다. 또한, Alcalase로 60분간 가수분해시킨 가수분해물과 Protamex로 360분 가수분해시킨 가수분해물을 제외한다면 효소 가수분해물의 항산화능은 Alcalase 가수분해물들의 경우 3.48~3.79시간, Flavourzyme 가수분해물들의 경우 3.40~3.77시간, Neutrerase 가수분해물들의 경우 3.46~3.77시간 및 Protamex 가수분해물들의 경우 3.65~3.75시간이었다. 이와 같은 결과로 미루어 보아 가수분해물의 제조를 위하여 사용하는 효소의 종류에 따른 항산화능의 차이는 인정되지

않았다. 이상의 결과로부터 항산화능의 기대를 위한 상업적 효소의 가수분해 처리시간은 30분으로 충분하리라 판단되었다. 하지만, 이들 여러 가지 효소와 여러 가지 가수분해 시간으로 구명된 항산화능을 고려한 최적 조건의 경우도 20 mM ascorbic acid의 유도기 3.96시간에 비하여는 약간 낮았다. 이상의 결과로부터 참치 자숙액이 상업적 효소에 의해 단시간 가수분해됨으로써 최대의 항산화 효과를 나타내는 것은 참치 자숙액에는 이미 다량의 peptide가 함유되어 있어 효소에 의한 가수분해로 항산화 기능에 관계되는 저분자량의 peptide 생성이 더욱 촉진되었기 때문이라 판단되었다. 한편, 항산화능의 가수분해 시간 및 TCA soluble index와의 상관관계는 ACE 저해능의 경우와 마찬가지로 상업적 효소의 종류에 관계없이 의존성이 없었다. 이와 같은 결과는 단백질 가수분해물의 기능성은 peptide를 구성하는 아미노산의 종류, 특히 말단기의 구조적 차이에 결정적으로 영향을 받으므로, 적정 시간 이상으로 가수분해되는 경우 기능성 함유 peptide가 오히려 분해되기 때문이라 판단되었다. 한편, Wu 등(16)도 자가소화효소 및 상업적 효소를 이용하여 고등어 근육 가수분해물을 제조하여 항산화능을 살펴 본 결과 가수분해 시간과 항산화능 간에는 상관성이 없었고, anserine 및 carnosine과 같은 유리아미노산과 몇 종의 peptide 만이 상관성이 있었다고 보고한 바 있다.

따라서 건강 기능성인 ACE 저해능과 항산화능을 동시에 고려하는 경우 Alcalase와 Protamex로 30분 가수분해시킨 가수분해물이 최적이라 판단되었고, 가수분해율도 고려하는 경우 같은 시간에서 Alcalase 처리가 Protamex 처리보다 효과가 좋아, 본 실험에서는 이후 Alcalase를 이용하여 30분 가수분해 처리하는 조건을 건강 기능성을 고려한 1단 효소 가수분해물의 최적 가수분해 조건으로 선정하였다.

2단 가수분해물의 특성

참치 자숙액을 Alcalase로 30분간 반응시킨 1단 가수분해물을 기질로 하여 Alcalase를 제외한 나머지 3종의 상업적 효소(Flavourzyme, Neutrerase 및 Protamax)로 반응시킨 2단 효소 가수분해물의 TCA soluble index, ACE 저해능(5 mg/mL에서의 %) 및 항산화능은 Table 2와 같다. 효소 종류 및 가수분해 시간의 차이에 관계없이 모든 참치 자숙액 2단 가수분해물의 경우 1단 가수분해물과 같이 냉장고에서 48시간 동안 결화되지 않아 열처리 등과 같은 전처리에 의하여 졸화 시켜서 사용하여야 한다는 소비자의 불편성은 개선되었다(데이터 미제시). Alcalase 1단 가수분해물의 총질소에 대한 10% TCA soluble nitrogen의 상대비율인 TCA soluble index는 86.7%로 상당히 저분자 상태이었다. 3종의 가수분해물 모두가 가수분해 1시간까지는 4~5% 정도의 증가가 인정되었으나 이후 5% 유의수준에서 차이가 인정되지 않았다. Alcalase로 반응시킨 효소 가수분해물을 기질로 하여 3종의 효소로 1시간 동안 재가수분해시킨 가수분해물의 TCA soluble index는 Alcalase-Protamax 가수분해물이

Table 2. Trichloroacetic acid (TCA) soluble index, angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antioxidative activity (induction period) of two-step enzymatic hydrolysates from skipjack tuna cooking drip incubated with various enzymes for different times

	Hydrolysis time (min)	Enzymes		
		Alcalase-Flavourzyme	Alcalase-Neutrerase	Alcalase-Protamax
TCA soluble index (%)	0	86.7±1.4 ^{b1)}	86.7±1.4 ^b	86.7±1.4 ^b
	30	91.1±1.4 ^a	91.6±0.8 ^a	91.6±1.8 ^a
	60	91.7±0.8 ^a	91.9±0.8 ^a	92.9±1.8 ^a
	120	91.7±0.8 ^a	92.6±1.7 ^a	93.2±1.1 ^a
	180	91.7±1.6 ^a	92.9±2.5 ^a	94.0±1.1 ^a
	360	92.0±0.8 ^a	93.8±1.8 ^a	95.1±2.1 ^a
ACE inhibitory activity (%)	0	56.8±1.1 ^a	56.8±1.1 ^b	56.8±1.1 ^b
	30	51.3±0.1 ^c	53.1±0.3 ^c	45.9±0.1 ^e
	60	50.1±0.1 ^d	53.3±0.4 ^c	54.9±0.1 ^c
	120	50.3±0.1 ^d	56.1±0.1 ^a	55.4±0.2 ^c
	180	52.5±0.1 ^b	55.4±0.2 ^b	53.3±0.1 ^a
	360	50.6±0.1 ^c	56.8±0.2 ^a	58.4±0.1 ^a
Antioxidative activity (hrs)	Control	2.71±0.31 ^b	2.71±0.31 ^c	2.71±0.31 ^b
	0	3.24±0.06 ^a	3.24±0.06 ^a	3.24±0.06 ^a
	30	3.14±0.08 ^a	3.10±0.06 ^{ab}	2.80±0.12 ^b
	60	3.24±0.08 ^a	2.94±0.05 ^c	2.67±0.10 ^b
	120	3.13±0.07 ^a	2.90±0.06 ^c	2.70±0.07 ^b
	180	3.27±0.11 ^a	2.90±0.05 ^c	2.74±0.14 ^b
	360	3.04±0.09 ^a	2.95±0.08 ^{bc}	2.77±0.12 ^b

The concentrations of samples for measuring ACE inhibitory activity were 5 mg/mL.

Induction period of 20 mM ascorbic acid was 3.96±0.17 hrs.

¹⁾Means with different letters within the same column are significantly different ($p<0.05$).

92.9%로 가장 높았고, 다음으로 Alcalase-Neutrerase 가수분해물(91.9%)의 순이었으며, Alcalase-Flavourzyme 가수분해물이 91.7%로 가장 낮았다.

참치 자숙액 유래 Alcalase 가수분해물을 기질로 하여 3종의 효소와 가수분해 시간에 따른 2단 가수분해물의 ACE 저해능은 1단 가수분해물에 Protamex로 360분 처리한 것 (ACE 저해능: 58.4%)을 제외한다면 1단 가수분해물의 56.8%에 비하여 이를 30~360분간 가수분해시킨 가수분해물의 경우 Alcalase-Flavourzyme 가수분해물이 50.1~52.5% 범위로, Alcalase-Neutrerase 가수분해물이 53.1~56.8% 범위로, 그리고 Alcalase-Protamax 가수분해물이 45.9~55.4% 범위로 모두 낮거나 유사하였다. 또한, 1단 가수분해물의 건강 기능특성과 같이 가수분해 시간 및 TCA soluble index에 따른 의존성은 인정되지 않았다. 이와 같이 1단 가수분해물에 비하여 2단 가수분해에 의해 TCA soluble index가 증가하였음에도 불구하고 ACE 저해능에 대하여 차이가 없는 것은 ACE 저해능의 경우 단순히 저분자화에 의하여 활성이 증대하는 것이 아니고 말단 관능기의 특성에 의하여 활성이 발현하기 때문이라 판단되었다(5). 이상의 결과로 미루어 보아 1단 효소 가수분해물을 기질로 하여 기능성 개선을 목적으로 3종의 상업적 효소로 2단 효소 가수분해한 결과 ACE 저해능이 감소하거나 차이가 없었고, 또한 약간 상승한 Protamex로 6시간 동안 2차 가수분해한 가수분해물조차 큰 차이가 없어 ACE 저해능만으로 미루어 볼 때 2단 가수분해의 필요성은 인정되지 않았다.

가수분해물의 항산화능은 대두유에 자숙액을 대신하여 탈이온수 첨가 시료구인 대조구의 경우 2.71시간이었고, Alcalase 1단 가수분해물의 경우 3.24시간으로 대조구에 비하여 효과가 인정되었다. Alcalase 1단 가수분해물을 30~360분 동안 재가수분해시킨 2단 가수분해물의 항산화능은 Alcalase-Flavourzyme 가수분해물의 경우 3.04~3.27시간 범위로, Alcalase-Neutrerase 가수분해물의 경우 2.90~3.10시간 범위로, Alcalase-Protamax 가수분해물의 경우 2.67~2.80시간 범위로 Alcalase 1단 가수분해물의 항산화능에 비하여 5% 유의수준에서 유사하거나 오히려 낮아, 효소의 종류 및 가수분해 시간에 관계없이 2단 가수분해물의 항산화능 개선 효과는 인정되지 않았다. 한편, 항산화능의 가수분해 시간 및 TCA soluble index에 대한 의존도는 ACE 저해능과 같이 상업적 효소의 종류에 관계없이 의존성이 없었다. 이상의 항산화능 결과로 미루어 보아 ACE 저해능의 결과와 같이 1단 가수분해물을 기질로 하여 항산화능을 개선을 위한 2단 가수분해의 필요성은 인정되지 않았다.

이와 같은 결과로부터 본 실험에서는 참치 자숙액 유래 건강 기능성 조미 소재의 제조를 위한 효소 처리는 Alcalase를 이용하여 30분 동안 1단 가수분해 처리하는 것으로 결정하였다.

한외여과물의 특성

참치 자숙액을 Alcalase로 1단 가수분해하여 얻은 가수분해물과 이의 10 kDa의 분리능력을 가진 membrane이 장착된 한외여과장치를 사용하여 얻은 액 중 상층액과 여과물인

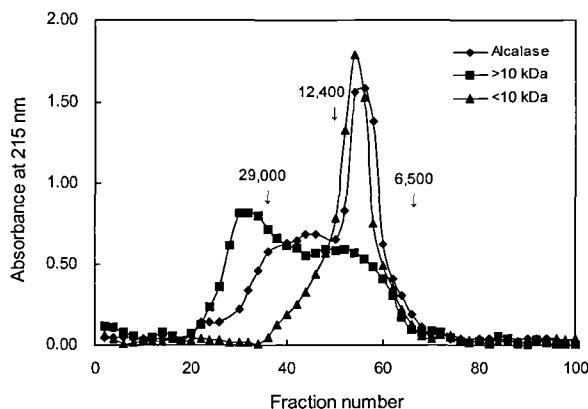


Fig. 1. Molecular weight distribution profiles of supernatants and ultrafiltrates from one-step enzymatic hydrolysate of skipjack tuna cooking drip using ultrafiltration membranes.

The ultrafiltrates were chromatographed on Sephadex S-100 HR column.

하층액의 분자량 분포는 Fig. 1과 같다. 한외여과 시료인 참치 자숙액 Alcalase 가수분해물을 fraction No. 20~80까지 고분자 및 저분자 혼분들이 분리되지 않고 다양하게 존재하여 있었다. 1단 가수분해물의 한외여과막 통과 하층액의 분자량 분포는 대체로 fraction No. 35 이하의 고분자 혼분의 경우 검출되지 않았고, fraction No. 35부터 검출되기 시작하여 fraction No. 46~65 사이에 주 피크를 나타내어 상당히 저분자화 되었음을 알 수 있었다. 한편 한외여과막을 통과하지 못한 상층액의 분자량 분포는 1단 가수분해물의 분자량 분포에 비하여 fraction No. 20~40 사이에 피크가 현격히 증대하였고, fraction No. 40~60 사이에 피크가 현격히 감소함을 알 수 있어 한외여과 처리가 적절히 되었음을 알 수 있었다.

참치 자숙액을 Alcalase로 1단 가수분해하여 얻은 가수분해물을 한외여과막 처리를 통하여 얻은 하층액과 통과하지 않은 상층액의 ACE 저해능(IC_{50}) 및 항산화능(유도기)은 Table 3과 같다. 1단 Alcalase 가수분해물의 ACE 저해능은 4.79 mg/mL이었고, 이를 한외여과막으로 처리한 경우 하층액은 3.12 mg/mL이었으며, 상층액은 8.73 mg/mL이었다. 이상의 결과로 미루어 보아 ACE 저해능은 1단 가수분해물에 비하여 한외여과막 처리에 의해 다소 개선되었으나 수율의 감소, 장치의 설치 및 한외여과막의 소실 경비 등을 고려할 때 한외여과 처리에 의한 건강 기능성 개선 효과는 낫다고 판단되었다. 유도기는 대두유에 자숙액을 대신하여 털이온수첨가 시료구인 대조구가 2.57시간이었고, 20 mM ascorbic acid가 3.04시간이었으며, 1단 가수분해물이 3.05시간으로 유사하였다. 하지만, 유도기는 한외여과 처리 하층액 및 상층액이 각각 3.09시간 및 2.97시간으로, 1단 가수분해물에 비하여 유사하거나 오히려 낫았다. 이와 같은 결과와 한외여과막, 막의 교체 및 수율 손실 등을 감안할 때 항산화능

Table 3. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antioxidative activity of ultrafiltrates from enzymatic (Alcalase) hydrolysates of skipjack tuna cooking drip ultrafiltrated with ultrafiltration membrane (molecular weight cut off, 10 kDa)

	ACE inhibitory activity (IC_{50} , mg/mL)	Antioxidative activity (induction period, hr)	
Control	-	2.57	
20 mM ascorbic acid	-	3.04	
Alcarase-treated hydrolysate	4.79	3.05	
Ultrafiltrates	Supernatants Filtrates	8.73 3.12	3.09 2.97

개선을 위하여 참치 자숙액 Alcalase 가수분해물을 한외여과막 처리로 여과할 필요는 없으리라 판단되었다.

이상의 ACE 저해능 및 항산화능의 결과로 미루어 참치 자숙액 유래 Alcalase 가수분해물의 경우 ACE 저해능 및 항산화능과 같은 건강 기능성 개선을 위하여 2단 가수분해물의 제조를 위한 시도나 한외여과 처리 등과 같은 조작은 필요 없으리라 판단되었다.

1단 가수분해물의 건강 기능성에 대한 안정성

참치 자숙액 유래 천연 조미료에 의한 건강 기능성을 인정받고자 하는 경우 섭취 후 chymotrypsin, pepsin, trypsin과 같은 인체에서 위 및 장내 효소들에 의하여 일부 가수분해되어 그 기능을 소실할 수도 있어 이를 효소에 대한 안정성은 반드시 검토되어야 한다. 참치 자숙액 유래 Alcalase 가수분해물을 3종의 소화효소로 반응시킨 소화물의 TCA soluble index, ACE 저해능 및 항산화능은 Table 4와 같다. Alcalase 가수분해물을 3종의 소화효소로 반응시킨 소화물의 TCA soluble index는 5% 유의수준에서 차이가 인정되지 않았다. 또한, TCA soluble index는 Alcalase 가수분해물이 위에서 pepsin의 작용을 받은 후 chymotrypsin과 trypsin의 작용을 각각 받는 경우 두 가수분해물 모두 작용을 받기 전과 5% 유의수준에서 차이가 없었다. 하지만, 1단 가수분해물이 조미소스로 인체에 섭취된 후 pepsin-trypsin-chymotrypsin 등이나 pepsin-chymotrypsin-trypsin의 작용을 받는 경우 차이가 있어 건강 기능성에 관여하는 말단 관능기의 변화를 가져올 수 있음을 시사하였다.

ACE 저해능은 1단 가수분해물이 56.8%이었고, 이를 3종의 소화효소로 각각 가수분해한 경우 pepsin 가수분해물은 57.6%로 거의 차이가 없었으나, trypsin 가수분해물 및 chymotrypsin 가수분해물은 각각 63.7% 및 64.9%로 개선되었다. 이와 같이 단독 소화효소의 종류에 따른 TCA soluble index에 의한 차이는 인정되지 않았으나, ACE 저해 활성의 차이가 인정되는 것은 각 소화효소의 기질 특이성 때문이라 판단되었다. 참치 자숙액을 Alcalase와 pepsin 순의 가수분해물을 기질로 하여 이를 다시 chymotrypsin 및 trypsin 순의 재가수분해물의 ACE 저해능은 기질의 ACE 저해능인

Table 4. Trichloroacetic acid (TCA) soluble index, angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antioxidative activity of hydrolysates of skipjack tuna cooking drip sequentially incubated with commercial enzymes and digestive enzymes

	TCA soluble index (%)	ACE inhibitory activity (%)	Antioxidative activity (induction period, hr)
Control	-	-	2.47±0.13 ^{c1)}
20 mM ascorbic acid	-	-	3.04±0.08 ^a
A	89.0 ^b	56.8 ^c	2.94±0.06 ^b
AP	89.1 ^b	57.6 ^c	2.89±0.09 ^b
AT	89.4 ^b	63.7 ^b	2.99±0.12 ^b
AC	90.1 ^b	64.9 ^b	2.91±0.06 ^b
APT	89.5 ^b	63.4 ^b	2.84±0.21 ^{bc}
APC	91.2 ^{ab}	59.0 ^c	2.84±0.05 ^{bc}
APTC	93.1 ^a	65.7 ^{ab}	3.01±0.08 ^b
APCT	92.0 ^a	68.3 ^a	2.91±0.04 ^b

A: Alcalase, AP: Alcalase-Pepsin, AT: Alcalase-Trypsin, AC: Alcalase-Chymotrypsin, APC: Alcalase-Pepsin-Chymotrypsin, APT: Alcalase-Pepsin-Trypsin, APCT: Alcalase-Pepsin-Chymotrypsin-Trypsin, APTC: Alcalase-Pepsin-Trypsin-Chymotrypsin.

¹⁾Means with different letters within the same column significantly different ($p<0.05$).

Table 5. Proximate composition, pH, transmission and browning index of hydrolysate from skipjack tuna cooking drip incubated with Alcalase for 30 min

Components	Skipjack tuna cooking drip incubated	
	Without Alcalase	With Alcalase
Proximate composition (g/100 mL)	Moisture	92.1±0.1 ¹⁾
	Crude protein	5.3±0.1 (67.1) ²⁾
	Crude lipid	0.3±0.1 (3.8)
	Crude ash	2.3±0.1 (29.1)
pH	5.77±0.02	6.48±0.02
Brix (°)	10	10
Salinity (g/100 mL)	2.8±0.1	2.9±0.1
Transmission, % (660 nm)	81.7±0.7	96.5±0.3
Browning index (430 nm)	0.23±0.1	0.20±0.1

¹⁾Values are the means±standard deviation of three determinations.

²⁾This value is based on dry weight.

57.6%에 비하여 다소 개선(각각 63.4% 및 59.0%)되었다. 또한, 참치 자숙액을 Alcalase, pepsin, chymotrypsin 및 trypsin 순의 가수분해물이나 Alcalase, pepsin, trypsin 및 chymotrypsin 순의 가수분해물의 ACE 저해능은 각각 65.7% 및 68.3%로 참치 자숙액 유래 Alcalase 가수분해물의 ACE 저해능에 비하여 개선되었다.

유도기는 대두유에 자숙액을 대신하여 탈이온수 첨가 시료구인 대조구가 2.47시간이었고, Alcalase 가수분해물이 2.94시간으로 다소 연장되었으며, Alcalase 가수분해물을 기질로 하여 3종의 소화효소로 각각 가수분해한 소화물은 pepsin 소화물이 2.89시간, trypsin 소화물 및 chymotrypsin 소화물이 각각 2.99시간 및 2.91시간을 나타내어 큰 변화는 인지되지 않았다. 참치 자숙액을 Alcalase와 pepsin 순의 가수분해물을 다시 chymotrypsin 및 trypsin으로 재가수분해한 가수분해물의 유도기는 두 가수분해물 모두 2.62시간을 나타내어 큰 차이가 없었다. 또한, 참치 자숙액을 Alcalase, pepsin, chymotrypsin 및 trypsin의 순으로 가수분해하거나 Alcalase, pepsin, trypsin 및 chymotrypsin의 순으로 가수분

해한 가수분해물들의 유도기는 각각 2.91시간 및 3.01시간을 나타내어, Alcalase 가수분해물의 유도기에 비하여 큰 차이가 없었다. 이상의 결과로 미루어 보아 Alcalase 가수분해물을 조미소재로 이용하여 이를 섭취하는 경우 Alcalase 가수분해물의 항산화능은 소화효소에 의하여 큰 변화가 없으리라 판단되었다.

최적 가수분해물(Alcalase 이용 1단 가수분해물)의 성분 특성

1단 Alcalase 가수분해물과 이의 기질인 참치 자숙액의 일반성분은 Table 5와 같다. 참치 자숙액의 일반성분은 수분이 92.1%, 조단백질이 5.3%, 조지방이 0.3% 및 조회분이 2.3%이었다. 이를 기질로 하는 Alcalase 가수분해물의 일반성분은 수분이 92.3%, 조단백질이 5.1%, 조지방이 0.1% 및 조회분이 2.2%로 참치 자숙액의 일반성분과 차이가 인정되지 않았다. 이와 같은 결과는 1단 가수분해물이 기질 단백질의 1%에 해당하는 Alcalase만을 가하여 30분 동안 가수분해시킨 이외에 다른 첨가물이나 공정이 없었기 때문이라 판단

되었다. 한편, pH는 참치 자숙액이 5.77인데 반하여 Alcalase 가수분해물의 경우 6.48로 증가하였다. 이로 미루어 보아 참치 가수분해물을 Alcalase로 가수분해하는 경우 염기성 아미노산을 위치한 일부의 염기성 물질이 생성되었으리라 추정되었다. Brix 및 염도는 참치 자숙액이 각각 10° 및 2.8%이었고, 이를 기질로 하여 제조한 Alcalase 가수분해물이 각각 10° 및 2.9%를 나타내어, 가수분해 전후 제품 간에 차이가 없었다. 투과도 및 갈변도는 참치 자숙액이 각각 81.7% 및 0.23이었고, Alcalase 가수분해물은 각각 96.5% 및 0.20으로, 참치 자숙액에 비하여 혼탁되어 있던 단백질이 Alcalase에 의해 가용화되어 맑아짐으로 인해 투과도의 경우 높았고, 갈변도의 경우 차이가 없었다.

요 약

참치 가공 부산물의 효율적 이용을 위한 일련의 연구로 상업적 효소 처리에 의해 맛 및 건강 기능성을 고려한 참치 자숙액 유래 조미 베이스의 제조를 시도하였고, 아울러 이의 특성에 대하여 살펴보았다. 참치 자숙액을 기질로 하여 효소의 종류(Alcalase, Flavourzyme, Neutrase 및 Protamex) 및 반응시간(30~360분)을 달리하여 가수분해물을 제조한 다음 TCA soluble index, ACE 저해능 및 항산화능을 검토한 결과 Alcalase로 30분간 반응시키는 것이 가장 좋았고, 이 때 ACE 저해능 및 항산화능은 각각 56.8% 및 3.80시간이었다. 1단 Alcalase 가수분해물로 제조한 2단 가수분해물과 이의 한의여과물은 1단 가수분해물에 비하여 ACE 저해능 및 항산화능의 개선 효과가 인정되지 않았다. 또한, 1단 Alcalase 가수분해물의 경우 소화효소인 pepsin, trypsin 및 chymotrypsin 등에 의하여도 ACE 저해능 및 항산화능이 개선되거나 변화가 없었다. 이상의 결과로 미루어 보아 Alcalase로 30분 가수분해 처리한 가수분해물은 건강 기능성 조미 소스의 주원료로 사용 가능하리라 판단되었다.

문 현

- Kim JS, Heu MS, Yeum DM, Kang HG, Kim IS, Kong CS, Lee TG, Heu MS. 2002. *Fundamentals and Applications for Canned Foods*. Hyoil Publishing Co., Seoul. p 45-48, 95, 351-354.

2. Kim JS, Heu MS, Yeum DM. 2001. Component characteristics of canned oyster processing waste water as a food resource. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 299-306.
3. Shiau CY, Chai T. 1990. Characterization of oyster shucking lipid wastes and their utilization as oyster soups. *J Food Sci* 55: 374-378.
4. Ariyoshi Y. 1993. Angiotensin converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trends Food Sci Technol* 4: 139-144.
5. Kim SK, Byun HG, Park PJ, Shahidi F. 2001. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *J Agric Food Chem* 49: 2992-2997.
6. Kim SK, Kim YT, Byun HG, Nam KS, Joo DS, Shahidi F. 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *J Agric Food Chem* 49: 1984-1989.
7. Jao CL, Ko WC. 2002. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolyzates from tuna cooking juice. *Fisheries Science* 68: 430-435.
8. Kim SK, Byun HG, Jeon YJ, Joo DS, Kim JB. 1999. Development of natural seasoning using desalinated tuna boiled extract. *J Korean Fish Soc* 32: 75-82.
9. Ahn CB, Kim HR. 1996. Processing of the extract powder using skipjack cooking juice and its taste compounds. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 319-325.
10. AOAC. 1995. *Official Methods of Analysis*. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC. p 69-74.
11. Horiuchi M, Fujimura KI, Terashima T, Iso T. 1982. Method for determination of angiotensin converting enzyme activity in blood and tissue by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 233: 123-130.
12. Gogolewski M, Nogala-Lafucka M, Galuba G. 2003. Studies on dimerisation of tocopherols under the influence of methyl linoleate peroxides. *Nahrung-Food* 47: 74-78.
13. Kajimoto G, Nakamura M, Yamaguchi M. 1995. Changes in organic acid components of volatile degradation products during oxidation of oil, and effects of organic acid on increased conductivity determined by the Rancimat method. *J Jap Nutr Food* 50: 223-227.
14. Steel RGD, Torrie H. 1980. *Principle and Procedures of Statistics*. 1st ed. McGraw-Hill Kogakusha, Tokyo. p 187-221.
15. Byun HG, Kim SK. 2001. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Process Biochem* 36: 1155-1162.
16. Wu HC, Chen HM, 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.

(2007년 2월 6일 접수; 2007년 6월 26일 채택)