

살 오징어(*Todarodes pacificus*) 간췌장 유래 Aminopeptidase 활성획분에 의한 Alcalase 처리 멸치(*Engrauris japonica*) 가수분해물의 쓴맛 개선 최적화

윤인성¹ · 김진수^{1,2} · 이정석^{1,2} · 권인상³ · 허민수^{2,3*}

¹경상국립대학교 해양식품공학과/해양산업연구소, ²경상국립대학교 수산식품산업화 기술지원센터, ³경상국립대학교 식품영양학과/해양산업연구소

Optimization of Reduced Bitterness of Alcalase-treated Anchovy *Engrauris japonica* Hydrolysate by Aminopeptidase Active Fraction from Common Squid *Todarodes pacificus* Hepatopancreas

In Seong Yoon¹, Jin-Soo Kim^{1,2}, Jung Suck Lee^{1,2}, In Sang Kwon^{1,3} and Min Soo Heu^{2,3*}

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

²Research Center for Industrial Development of Seafood, Gyeongsang National University, Tongyeong 53064, Korea

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

This study used response surface methodology to investigate the optimal conditions to reduce the bitterness of alcalase-treated anchovy hydrolysate (AAH) by the aminopeptidase active fraction (AAF) derived from the common squid *Todarodes pacificus* hepatopancreas. The central composite design selected AAF/AAH ratio (X_1 , %) and hydrolysis time (X_2 , h) as independent variables, and the degree of hydrolysis (Y_1) and bitterness (Y_2) as dependent variables. The uncoded values of the multiple response optimization for independent variables were 3.4% for the AAF/AAH ratio and 9.2 h for the hydrolysis time. The predicted values of the yield and bitterness score of alcalase-AAF continuously treated anchovy hydrolysate (AAAH) under the optimized conditions were 68.9% and 4.6 points, respectively. Their measured values of 69.5% for yield and 4.6 ± 0.5 points for bitterness were similar to the predicted values. The food components of AAAH were 91.4% (moisture), 7.5% (protein), 0.1% (lipid) and 0.6% (ash). The findings indicate the potential value for use as an anchovy seasoning base. The results also confirm that the bitterness of AAH was remarkably improved by AAF and implicates AAF derived from squid hepatopancreas as a good enzyme to catalyze reduced bitterness.

Keywords: Common squid, Aminopeptidase active fraction, Lowering bitterness, Anchovy hydrolysate

서론

세계적으로 주요 단백질급원으로서 수산물의 소비는 인구의 증가와 더불어 증가하는 추세이며, 수산단백질 급원에 대한 높은 수요는 수산물가공 산업에 있어 매우 중요하다. 산업적으로 어류와 같은 수산물은 일반적으로 내장을 제거하거나 필렛(fillets)형태로 가공되며, 이 과정에서 많은 가공부산물이 발

생한다(Klomklao and Benjakul, 2017; Idowu and Benjakul, 2019). 수산가공부산물에는 머리, 내장부위(소장, 알, 간 포함), 껍질 및 프레임(frame)등이 있으며, 식품성분 및 영양적인 측면에서 가식부인 근육부위와 큰 차이를 보이지 않는다. 그럼에도 불구하고, 이들 가공부산물 일부는 어분, 비료 및 사료로 가공되어 그 부가가치가 현저히 낮은 수준으로 이용되고 있을 뿐이며(Hsu, 2010), 대부분은 해상에 바로 투기하거나, 폐기물로 버려

*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.2021.0724>

Korean J Fish Aquat Sci 54(5), 724-732, October 2021

Received 1 September 2021; Revised 26 September 2021; Accepted 13 October 2021

저자 직위: 윤인성(대학원생), 김진수(교수), 이정석(부교수), 권인상(대학원생), 허민수(교수)

집으로서 심각한 환경오염 및 폐기물 처리비용이 상승 원인이 되어, 수산가공품의 제품단가에 전가됨으로써 수산가공업체의 수익감소로 이어지게 된다(Klomklo and Benjakul, 2017; Idowu and Benjakul, 2019).

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(Thiansilakul et al., 2007; Nalinanon et al., 2011; Idowu et al., 2018). 그러나, 단백질분해효소에 의한 단백질의 과도한 가수분해는 쓴맛을 야기시키고, 이는 음료 및 발효 조미소스와 같은 단백질가수분해물의 이용 및 제품개발에 있어서 제약요인이다(Kim et al., 1999; Cho et al., 2004; Kim et al., 2005).

이러한 단백질 가수분해물의 쓴맛을 개선하거나 제거하기 위한 노력은 알코올류(Lalasis and Sjoberg, 1978; Wasswa et al., 2007), 황성탄소(Suh et al., 2000; Saha and Hayashi, 2001; Mohammad-Khah and Ansari, 2009), maillard 반응(Fu et al., 2019), cyclodextrin (Tamura et al., 1990; Linde et al., 2009), 크로마토그래피법(Kim et al., 2003; Liu et al., 2013), plastein 반응(Synowiecki et al., 1996; Stevenson et al., 1998; Gong et al., 2015)을 활용하여 시도되었다. 또한 단백질 가수분해물의 쓴맛은 peptide의 소수성과 밀접한 관련이 있기 때문에(Clegg and Lim, 1974; Kristinsson and Rasco, 2000), exopeptidase의 처리를 통해 쓴맛 peptide의 말단에 노출된 아미노산을 가수분해함으로써 쓴맛을 개선하거나 감소시키려는 여러 시도도 있었다(Umetsu and Ichishima, 1988; Izawa et al., 1997; Saha and Hayashi, 2001; Nishiwaki et al., 2002; Kim et al., 2014a; 2014b; Kim et al., 2020).

앞서의 연구에서, 연체류 간체장 추출물로부터 endoprotease 및 exopeptidase 획분을 회수하기 위한 단백질의 용해도, 하전, 분자량차이에 따른 분획효과(Kim et al., 2008a, 2008b; Kim et al., 2012a, 2012b), 이들 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.

이 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, 시판 단백질분해효소로 제조한 쓴맛 멸치 가수분해물(bitter anchovy hydrolysates, BAH)에 적용하여, 반응표면 분석법을 통해 쓴맛 제거를 위한 최적조건을 구명하고, 확립된 최적조건에서 제조한 Alcalase-AAF 연속처리 가수분해물(AAAH)의 식품성분 분석을 통해 조미소재로서의 이용가능성에 대해 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

재료

앞서의 연구(Kim et al., 2014b; Kim et al., 2020)를 통해 효소 가수분해물의 쓴맛 제거/감소 효과가 확인된 효소 추출자원으로 살 오징어(common squid *Todarodes pacificus*) 간체장은 부산광역시 소재의 SJ수산에서 동결상태로 분양을 받아, 냉동상태(-70°C)로 보관하면서 실험에 사용하였다.

쓴맛 효소 가수분해물의 제조를 위해 사용한 멸치는 통영시 소재의 KJ수산에서 구입하여, 지퍼 팩에 일정량씩 포장한 후, 냉동고(-70°C)에 보관하여 두고 실험에 사용하였다.

아울러, 쓴맛 멸치 효소가수분해물의 제조를 위하여 사용한 시판 food-grade 단백질분해효소로는 alcalase 2.4 L (*Bacillus licheniformis*, pH 7.0, 50°C), flavourzyme 500 MG (*Aspergillus oryzae*, pH 7.0, 50°C), neutrase 0.8 L (*Bacillus amyloliquefaciens*, pH 7.0, 50°C) 및 protamex 1.5 MG (*Bacillus sp.*, pH 7.0, 50°C)는 novozymes (Bagsvaerd, Denmark)에서 구입하여 사용하였다.

Aminopeptidase 활성획분(AAF)의 분획

멸치 효소 가수분해물의 쓴맛의 제거 또는 감소를 위한, 살 오징어 간체장의 추출물 및 한외여과법에 의한 aminopeptidase active fraction (AAF)은 Kim et al. (2020)의 방법에 따라 제조하였다. 즉, 냉동상태의 시료를 부분해동 및 마쇄한 다음, 시료에 대하여 3배(v/w)의 탈이온수를 가하여 혼합 및 교반 (20°C, 6 h)하여 추출하였다. 이어서 추출물에 대하여 0.2배량(v/v)의 에틸에테르를 가하여 분액여두를 통해 3회 반복하여 탈지과정을 실시하고, 이를 원심분리(12,000 g, 20 min)한 상층액(탈지추출물)을 한외여과를 위한 시료로 사용하였다.

살 오징어 간체장 유래 한외여과 AAF는 10 kDa molecular weight cut off (MWCO)의 한외여과 막(Pellicon XL filter, PLCGC 10K regenerated cellulose; Milipore Co., Billerica, MA, USA)과 연결한 peristaltic pump (RP-2100 EYELA; Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)로 구성된 한외여과장치의 container에 일정량(500 mL)의 탈지 추출물을 주입하고, 주입 압력 10 bar 및 사출압력 20 bar로 pump의 압력을 설정한 다음, 30-50 mL/min의 crossflow rate로 한외여과를 실시하였다. 이 과정에서 aminopeptidase 활성획분(AAF, 100 mL)과 여과액(permeate, 900 mL)로 각각 분획하였다.

쓴맛 멸치 효소가수분해물(BAH)의 제조

AAF에 의한 쓴맛 제거 및 감소효과를 살펴보기 위한 쓴맛 멸치 가수분해물(bitter anchovy hydrolysate, BAH)은 멸치에 대해 3배량의 증류수를 가하여, 고속균질기(Polytron PT 1200E; Kinematica AG, Lucerne, Switzerland)로 균질화한 균질액을 pH 7.0 및 50°C로 조정된 다음, 균질액 중 원료 멸치 단백질의

1% (효소/기질비 1:100)에 해당하는 각각의 시판 단백질분해효소를 첨가한 후, 진탕항온수조(SWB-10; Jeio Tech., Daejeon, Korea)에서 8시간 반응하였으며, 대조구로서 효소를 첨가하지 않은 자가소화분해에 의한 멸치 가수분해물(auto-hydrolysate, AH)은 pH 7.0 및 50°C에서 8시간 반응하여 제조하였다. 이들 멸치 자가소화 및 효소처리 가수분해물은 90°C에서 20분간 열탕 처리하여 효소반응을 정지하였으며, 이를 흐르는 물에서 5분간 냉각한 다음, 원심분리(1,460 g, 20 min)하여, 얻어진 상층액을 실험분석을 위한 시료로 사용하였다.

멸치 자가소화 및 효소처리 가수분해물에 대하여, 총 질소함량(mg/100 mL), 가수분해율(%) 및 쓴맛 관능평가를 통해 쓴맛 멸치 가수분해물의 최적 시판 단백질분해효소를 선택하였다.

또한, 상기 조건에서 가수분해율(%)과 쓴맛 관능평가에서 가장 높은 BAH로 판정된, alcalase 처리 멸치 가수분해물(alcalase-treated anchovy hydrolysate, AAH)에 대하여는 반응시간별(1-18 h)로 가수분해율을 측정하여, 살 오징어 간체장의 한외여과 AAF에 의한 연속처리에 따른 쓴맛 제거/감소에 대해, 최적 반응조건(시간) 범위를 설정하고자 하였다.

가수분해율(DH)

가수분해율(Degree of hydrolysis, DH)은 Kim et al. (2002)의 방법을 다소 수정하여 측정하였다. 즉, 멸치 자가소화 및 효소처리 가수분해물의 일정량에 대하여 동량의 20% (w/v) trichloroacetic acid (TCA)를 가해, 원심분리(SUPRA 22K; Hanil Science Industrial Co., Gimpo, Korea; 1,460 g, 20 min)하여 제단백질 처리하고, 상층액의 TCA 가용성 질소를 semi-micro Kjeldahl법으로 정량하여, 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Degree of hydrolysis (DH, \%)} = \frac{\text{Ht} - \text{Ne}}{\text{Nt} - \text{Ne}} \times 100$$

여기서 Ht는 멸치 효소 가수분해물의 총 질소함량, Nt는 가수분해를 위해 사용한 원료 멸치의 총 질소함량, 그리고 Ne는 가수분해를 위해 사용한 원료 멸치의 10% TCA 가용성 질소함량을 의미한다.

그리고, 멸치 효소 가수분해물의 수율은 가수분해에 사용된 원료 멸치의 총 질소함량에 대한 가수분해물의 총 질소함량(mg/100 mL)의 백분율(%)로 나타내었다.

AAF에 의한 AAH의 쓴맛 감소 최적화

Alcalase 처리 멸치 가수분해물(AAH)의 쓴맛 제거/감소를 위하여, 살 오징어 간체장 유래 AAF를 이용한 최적 반응조건의 구명은 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 활용하였다. RSM의 중심합성계획(central composite design)에 따른 독립 변수(X_1)는 AAH의 단백질에 대한 AAF의 단백질 비율(AAF/AAH ratio, 0.2-5.8%, X_1)과 가수분해 시간(2.3-13.7 h, X_2)을 5단계로 부호화한 다음, factorial design (4

Table 1. Symbol, experimental ranges, and values of independent variables in the central composite design for debittering of Alcalase-treated anchovy *Engraurus japonica* hydrolysate (AAH) reacted with aminopeptidase active fraction (AAF) from *Todarodes pacificicus* hepatopancreas extracts by ultrafiltration

Independent variables	Symbol	Range level				
		-1.414	-1	0	1	+1.414
E/S ratio (AAF/AAH, %)	X_1	0.2	1	3	5	5.8
Hydrolysis time (h)	X_2	2.3	4	8	12	13.7

구), star points (4구) 및 central points (3구)와 같이 총 11구로 설정하였으며(Table 1), 이들 각각의 실험구는 무작위로 제조하여 실험하였다.

또한 살 오징어 간체장 유래 한외여과 AAF에 의한 쓴맛 제거/감소의 최적화를 위한 종속변수(Y_n)는 수율(yield, Y_1)과 쓴맛에 대한 쓴맛 관능평가(bitterness, Y_2)로 설정하였으며, 이들은 3회 반복 측정하여 그 평균값을 회귀분석에 사용하였다.

회귀 분석에 의한 최적점의 예측 및 확인은 MINITAB 통계 프로그램(MINITAB Ver. 18; MINITAB, State College, PA, USA)을 이용하였으며, 중심합성계획에 따라 무작위로 제조한 11개 시료의 실험결과를 토대로 독립변수와 종속변수 상호간의 연관성에 의해 제시되는 반응표면 회귀 계수 및 분산분석 결과를 토대로 모델(model), 1차항(linear), 2차항(quadratic), 교차항(crossproduct) 및 적합성 결여도(lack of fit)의 유의성(P-value)에 대한 인정($P < 0.05$) 여부를 확인하였고, 이들 결과 값에 대하여 최종적으로 결정계수(R^2)를 확인하여 최적조건을 산출하였다. 또한, 이를 근거로 하여 독립변수 및 종속변수의 설계 모형의 적합성은 반응 최적화 도구를 이용하여 종속변수에 대한 각각의 목표값(target value)을 설정하여 확인하였고, 프로그램에서 산출된 부호값(coded value)을 환산하여 얻은 실제 값(actual value)을 토대로 예측치(predicted value) 및 최적 조건에서의 실험을 통한 실험치(measured value)를 비교, 분석하여 나타내었다.

일반성분, pH, 염도 및 brix

일반성분은 AOAC (1995)법에 따라 수분은 상압가열건조법, 조단백질은 semimicro Kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet법에 따라 측정하였고, 회분은 건식회화법으로 측정하였다. pH는 시료에 10배량의 탈이온수를 가하고 마쇄한 다음 마쇄물을 시료로 하여 pH는 pH meter (model 691; Metrohm, Swissland)로 측정하였다.

총 질소함량 및 갈변도

총 질소함량은 semimicro Kjeldahl법 (AOAC, 1995)으로 측정하였고, 갈변도(brownness)는 분광광도계(UV-140-02; Shimadzu Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 파장 430 nm에서 흡광도를 측정하였다.

쓴맛 관능평가 및 통계처리

쓴맛 관능평가는 쓴맛 표준용액(0-2.0% 범위의 gly-phe)의 농도차이를 인지하는 7인의 쓴맛 평가요원(해양식품공학 및 식품영양학 전공 대학원생)을 선발하여, 앞서 서술한 쓴맛 멸치 효소 가수분해물(BAH) 제조의 경우, 1% gly-phe 용액보다 쓴맛이 강하다고 평가한 인원수로 쓴맛의 강도를 평가하였으며, alcalase-AAF 연속처리 멸치 가수분해물(AAAH)의 쓴맛개선 최적화에 대하여는 1% Gly-ph용액의 기준점수를 3점으로 하고, 이보다 쓴맛이 약한 경우 4 및 5점으로, 이보다 쓴맛이 강할 경우 2 및 1점으로 평가하는 5점 척도법으로 관능평가를 실시한 다음, 그 평균값으로 나타내었다.

실험 및 분석 데이터의 통계처리는 ANOVA test로 분산분석한 후, SPSS 통계 프로그램(Version 12.0K; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 Duncan의 다중위 검정으로 5% 유의수준에서 실시하였다.

결과 및 고찰

쓴맛 멸치 효소 가수분해물(BAHs)의 제조

단백질분해효소를 이용한 어류 단백질 가수분해물(fish protein hydrolysate, FPH)은 과도한 분해로 인해, 쓴맛의 증가로 인한 전반적인 기호성은 나빠지지만, 생리활성을 가지는 아미노산과 peptide의 좋은 공급원이 되어, 영양성 강화 및 생리활성을 개선하는 소재로서 이용이 가능하다(Idowu and Benjakul, 2019). 이 연구에서는 효소를 이용한 쓴맛 멸치 가수분해물의 제조하고, 이들 가수분해물에 대해 살 오징어 간체장 유래 aminopeptidase 활성획분(AAF)을 연속처리 함으로서 어류 단백질 가수분해물의 조미소재로서 이용 가능성을 살펴보고자 하였다.

먼저 BAHs의 제조에 적절한 효소를 구명하기 위하여, 4종의 시판 food-grade 단백질분해효소(alcalase, flavourzyme, neutrase 및 protamex)에 의한 가수분해와 원료 멸치의 내인성 단백질분해효소에 의한 자가소화분해(auto-hydrolysis)를 각각 8시간 동안 실시한 후, 멸치 가수분해물의 총 질소함량, 가수분해율 및 관능평가의 결과는 Table 2와 같다.

시판 food-grade 단백질분해효소에 의한 멸치 가수분해물들의 총 질소함량(Total-N)은 alcalase 처리한 가수분해물이 1,272 mg/100 mL로 가장 높았으며, 다음으로 neutrase (1,138 mg/100 mL), protamex (1,134 mg/100 mL) 및 flavourzyme (1,126 mg/100 mL)의 순이었다. 멸치의 자가소화효소에 의한 가수분해물(auto-hydrolysate, AH)은 999 mg/100 mL로서 효소 처리 가수분해물들에 비하여 유의적으로 낮은 수준이었고 ($P<0.05$), 효소 처리 가수분해물들 중에서 flavourzyme, protamex 및 neutrase 간의 총 질소함량은 유의적인 차이가 인정되지 않았다($P>0.05$).

가수분해율(DH, %)은 총 질소함량의 결과와 유사하게 al-

Table 2. Total nitrogen content, degree of hydrolysis (DH) and bitterness of bitter anchovy *Engrauris japonica* hydrolysates (BAHs) prepared by various food-grade proteases

Enzymes	Total-N (mg/100 mL)	DH (%)	Bitterness ¹
Auto-hydrolysate	999.0±20.0 ^e	41.7±2.2 ^e	6
Alcalase	1,272.0±30.5 ^a	68.1±3.3 ^a	7
Flavourzyme	1,126.6±11.6 ^b	54.0±2.1 ^b	4
Neutrase	1,138.4±10.4 ^b	51.5±3.3 ^b	6
Protamex	1,134.7±16.1 ^b	48.6±3.3 ^b	7

¹Number indicates the panel number felt the similar bitterness to 1% Gly-phe solution. Means with different letters within the same column are significantly different ($P<0.05$). Values are the means±standard deviation of three determinations.

calase 처리 가수분해물이 68.1%로 가장 높았으며, 다음으로 flavourzyme (54.0%), neutrase (51.5%) 및 protamex 처리물 (48.6%)의 순이었으며, 자가소화 가수분해물이 41.7%로 가장 낮아 효소처리에 의한 가수분해율이 자가소화에 비하여 유의적으로 높은 수준을 나타내었다($P<0.05$).

한편, 0.1% gly-phe 쓴맛 용액보다 쓰다고 감지한 관능 평가요원의 인원수로 나타낸 효소처리 멸치 가수분해물들에 대한 쓴맛의 관능평가는 flavourzyme 처리 가수분해물(4명)을 제외한 자가소화 및 효소처리 가수분해물들에 대해 모두 6-7명이 쓴맛을 감지한 것으로 나타났다. 총 질소함량, 가수분해율 그리고 쓴맛 관능평가의 결과(Table 2)에 따라, 살 오징어 간체장 유래 AAF를 활용한 쓴맛 제거/감소 및 이의 조미소재화를 위하여, 쓴맛 멸치 효소 가수분해물의 제조는 alcalase 처리하는 것으로 선택하였다.

Alcalase 처리 시간(1-18시간)에 따른 쓴맛 멸치 가수분해물의 가수분해율을 살펴본 결과는 Fig. 1과 같다. Alcalase 처리 시간에 따른 가수분해율은 가수분해 시간이 8시간까지는 5% 유

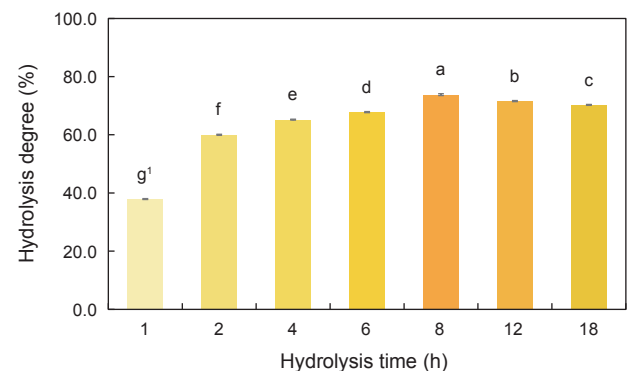


Fig. 1. Hydrolysis degree of bitter anchovy *Engrauris japonica* hydrolysates (BAHs) treated with alcalase according to hydrolysis time. ¹Different letters on the bar indicate a significant difference at $P<0.05$.

의수준에서 계속적으로 증가하는 경향을 나타내어 73.8%로 최대치를 나타내었고, 그 이후에는 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과로 미루어 보아 쓴맛 멸치 가수분해물의 제조를 위한 alcalase의 적정 처리시간은 8시간으로 판단되었다.

단백질분해효소에 의한 단백질 가수분해물은 과도한 분해로 인한 쓴맛의 증가로 기호성이 현저히 낮아져서 음료 및 발효 조미소스와 같은 단백질가수분해물의 이용 및 제품개발에 있어서 제약요인(Kim et al., 1999; Cho et al., 2004; Kim et al., 2005)이 되는 반면에, 완충능, 보수력, 용해성과 같은 식품기능성(Kim et al., 2020; Yoon et al., 2020)과 향균, 향암, 향산화성, 향당노 및 항고혈압활성 등의 생리활성이 개선되는 효과가 있다(Idowu and Benjakul, 2019).

이러한 일면에서 효소를 활용한 단백질 가수분해물의 조미소재 또는 생리활성을 가지는 건강기능 소재로서 이용하기 위해서는 원료 단백질을 일차적으로 단백질분해력이 강한 효소로 가수분해물과 수율을 우선적으로 고려하여 1차 가수분해물을 제조하고, 이어서 exopeptidase의 처리를 통해 쓴맛 peptide의 말단에 노출된 소수성 아미노산을 가수분해(Clegg and Lim, 1974; Kristinsson and Rasco, 2000)함으로써 쓴맛을 개선하거나 감소시켜 기호성 향상이 가능할 것이다(Nishiwaki et al., 2002; Kim et al., 2020).

따라서, 쓴맛 개선효과(Kim et al., 2020)가 확인된 살 오징어 간체장 유래 한외여과 획분인 AAF를 활용하여 alcalase 처리 쓴맛 멸치 가수분해물(alcalase-treated anchovy hydrolysate, AAH)의 쓴맛 제거/감소를 위한 최적조건 구명 및 Alcalase-AAF 연속처리 최적 가수분해물(alcalase-AAF treated anchovy hydrolysate, AAAH)의 조미소재화(seasoning sauce base)를 시도 하였다.

Alcalase-AAF 연속처리 멸치 가수분해물(AAAH)의 최적화

Alcalase 처리 쓴맛 멸치 가수분해물(AAH)의 쓴맛 개선을 위한 살 오징어 간체장 유래 한외여과 AAF의 처리 최적조건의 구명은 반응표면분석법(RSM)의 중심합성계획(Table 1)에 따라, 독립변수를 효소/기질 비(X_1 ; AAF/AAH ratio, %) 및 가수분해 시간(X_2 ; hydrolysis time, h)으로 하여 중심 합성계획에 따라 11구의 실험을 설정하여 시료(factorial design, No 1-4; star points, No 5-8; central points, No 9-11)를 제조한 다음, 종속변수인 수율(%) 및 쓴맛 (bitterness)으로 나타낸 결과는 Table 3과 같다.

먼저, 독립변수 X_1 (AAF/AAH ratio, %) 및 X_2 (hydrolysis time, h)에 대한 종속변수 Y_1 (yield, %)은 동일한 효소/기질 비 (No. 1과 3, 2와 4 그리고 7-11)에서 가수분해 시간이 길수록 유의적으로 수율이 높아지는 것으로 나타났으나($P < 0.05$), Y_2 (bitterness)는 효소/기질 비 및 가수분해 시간조건에 따라 star points (No. 5-8)이 1.1-1.3 점의 범위, factorial design (No.

Table 3. Central composite design and responses of dependent variables for yield and bitterness of alcalase-treated anchovy *Engraurus japonica* hydrolysates (AAH) reacted with aminopeptidase active fraction (AAF)

Coefficients assessed by	No	Uncoded values		Dependent variables	
		X_1	X_2	Y_1^1	Y_2^2
Fractional factorial design (4 points)	1	1.0	4.0	62.0±0.1 ^a	2.7±0.8 ^b
	2	5.0	4.0	67.4±0.3 ^e	2.1±0.4 ^{bc}
	3	1.0	12.0	67.9±0.1 ^d	2.1±0.4 ^{bc}
	4	5.0	12.0	68.9±0.4 ^c	2.1±0.9 ^{bc}
Star points (4 points)	5	0.2	8.0	59.8±0.1 ^h	1.3±0.4 ^{cd}
	6	5.8	8.0	69.7±0.2 ^b	1.3±0.4 ^{cd}
	7	3.0	2.3	64.8±0.2 ^f	1.3±0.3 ^{cd}
Central points (3 points)	8	3.0	13.7	74.1±0.1 ^a	1.1±0.2 ^d
	9	3.0	8.0	68.0±0.3 ^d	4.9±0.2 ^a
	10	3.0	8.0	68.2±0.2 ^d	4.9±0.2 ^a
	11	3.0	8.0	68.0±0.3 ^d	4.7±0.3 ^a

¹Yield (%)=total-N/total-N of raw anchovy×100. ²Score on bitterness of 1% Gly-phe, 3; stronger bitter taste, 1-2; weaker bitter taste, 4-5. Means with different letters within the same column are significantly different ($P < 0.05$). X_1 (AAF/AAH ratio, %), X_2 (hydrolysis time, h), Y_1 (yield, %), Y_2 (bitterness, score).

1-4)은 2.1-2.7점 그리고 central points (No. 9-11)가 4.7-4.9점으로 유의적인 차이가 있었다($P < 0.05$). Alcalase-AAF 연속처리 가수분해물들(AAAHs)의 쓴맛의 제거/감소 효과는 central points의 실험구가 가장 우수하였으며, 수율과 쓴맛 관능평가의 두 종속변수 조건을 동시에 모두 만족시키는 multiple response optimization 조건을 구명해야 할 것으로 판단되었다.

Table 3의 결과를 토대로, MINITAB 통계 프로그램의 최소자승 회귀분석(response surface analysis by least-squares regression, RSREG)으로 분석한 종속변수들에 대한 2차 회귀 방정식의 일차항, 이차항(quadratic; X_1^2 , X_2^2) 및 교차항(cross-product; X_1X_2)의 계수들과 이들의 유의성을 살펴본 결과는 Table 4와 같다. 먼저, 수율(Y_1 , %)에 대한 2차 방정식의 각 항의 계수와 P-value는 이차항 X_2^2 와 교차항 X_1X_2 는 유의성이 인정되지 않았고($P > 0.05$) 반면에 일차항(X_1 , X_2)과 이차항의 X_1^2 가 유의성이 인정되어($P < 0.05$), 이를 간편화하여 나타내면 $Y_1 = 68.0667 + 2.5501X_1 + 2.5690X_2 - 1.7958X_1^2$ ($R^2 = 0.837$, P-Value=0.009)이었다.

한편, 쓴맛 관능평가(Y_2 , bitterness)의 경우, 이차항(X_1^2 , X_2^2)과 상수항만이 유의성이 인정되었으나($P < 0.05$), 이외의 일차항(X_1 , X_2)과 교차항(X_1X_2)에서는 유의성이 인정되지 않았다($P > 0.05$). 유의성이 인정된 항만을 간편화하여 도식화하면 $Y_2 = 4.8333 - 1.5167X_1^2 - 1.5667X_2^2$ ($R^2 = 0.819$, P-Value=0.012)이었다.

Alcalase-AAF 연속처리에 따른 쓴맛 제거/감소 멸치 가수분해물(AAHs)의 제조조건에 대한 간결 반응모형방정식의 독립변수(X_1 , AAF/AAH ratio; X_2 , hydrolysis time)와 종속변수(Y_1 , yield; Y_2 , bitterness)간의 상관관계를 ANOVA 분석으로 실시한 결과는 Table 5와 같다. AAH의 최적화를 위한 반응모형방정식은 수율(Y_1)의 경우 일차항(linear)만이, 쓴맛 관능평가(Y_2)의 경우 이차항(quadratic)만이 유의성이 인정되었으나 ($P < 0.05$), 모델의 적합성 여부를 나타내는 적합 결여 검증 (lack of fit test)의 P-value는 수율 및 쓴맛 관능평가가 각각 0.003 및

0.019로 5% 범위에서 유의 수준이 인정되어 설계된 모형이 완전하지는 않는 것으로 나타났다. 그러나 이들 반응 모형 방정식은 상관계수(R^2)가 수율의 경우 0.837, 쓴맛 관능평가의 경우 0.819로 1에 가까우며, 전체적인 model값이 0.05보다 낮으므로 가정된 반응 모형이 완전하진 않으나 적합한 것으로 판단되었다(Zhou and Regenstein, 2004).

한편, 효소 가수분해물 제조에 있어, 기질에 대한 효소의 첨가 비율을 높이는 경우, 가수분해시간을 단축할 수 있으나 효소 첨가에 따른 제조단가상승이 예상되고, 효소 첨가비율을 낮추고 가수분해시간을 연장하는 경우에도 마찬가지로 제조단가상승의 문제가 있다. 또한 효소 가수분해물의 효소 첨가비율과 가수분해시간은 수율 및 쓴맛에 직접적인 영향을 미치는 중요한 인자이기에, 쓴맛 개선한 멸치 효소 가수분해물을 베이스로 조미소재의 개발을 위하여는 수율과 쓴맛 관능평가가 모두 최대

Table 4. Estimated coefficients of fitted quadratic polynomial equation for different response (yield and bitterness) of alcalase-treated anchovy *Engrauris japonica* hydrolysates (AAH) reacted with aminopeptidase active fraction (AAF)

	Y_1		Y_2	
	Coefficient	P-value	Coefficient	P-value
Constant	68.0667	0.000	4.8333	0.000
X_1	2.5501	0.006	-0.0750	0.756
X_2	2.5690	0.005	-0.1104	0.649
X_1^2	-1.7958	0.040	-1.5167	0.003
X_2^2	0.5542	0.434	-1.5667	0.002
X_1X_2	-1.1000	0.215	0.1500	0.662

X_1 (AAF/AAH ratio, %), X_2 (hydrolysis time, h), Y_1 (yield, %), Y_2 (bitterness).

Table 5. Analysis of variance (ANOVA) for response of dependent variables (Y_1 and Y_2) for debittering of alcalase-treated anchovy *Engrauris japonica* hydrolysates (AAH) reacted with aminopeptidase active fraction (AAF)

Dependent variable	P-value				
	Model	Linear	Quadratic	Cross product	Lack of fit
Y_1 (Yield, %)	0.009	0.003	0.058	0.215	0.003
Y_2 (bitterness)	0.012	0.848	0.003	0.662	0.019

Table 6. Optimal conditions for debittering of alcalase-treated anchovy *Engrauris japonica* hydrolysates reacted with aminopeptidase active fraction (AAF)

Dependent variables	Value	X_1	X_2
Y_1 (yield, %)	Target	Max	Max
	Coded	0.27	1.41
	Actual	3.54	14.0
Y_2 (bitterness)	Target	Max	Max
	Coded	-0.01	-0.04
	Actual	2.98	7.84
Multiple response optimization	Coded	0.19	0.30
	Actual	3.38	9.2
Data ¹	Predicted	Y_1 (%)	Y_2 (Score)
	Measured	69.2	4.6
		69.5±0.4	4.6±0.4

¹Optimization predicted values obtained using minitab program and measured values tested under optimal conditions. X_1 (AAF/AAH ratio, %), X_2 (hydrolysis time, h).

화하여야 하고, 이에 따른 제조단가도 고려하여야 한다. 따라서 종속변수로서 수율과 쓴맛 관능평가는 모두 최대점(max)으로 정하였다.

이러한 일면에서 독립변수(X_1 , AAF/AAH ratio 및 X_2 , hydrolysis time)에 대한 종속변수(yield 및 bitterness)의 반응모형방정식의 결과를 이용하여, 이들 두 종속변수를 동시에 최적화하는 독립변수 조건과 이의 조건에서 예상되는 각 종속변수들의 예측치를 구명하고자 하였다. Table 6은 MINITAB 통계 프로그램을 구동하여 얻은 독립변수의 최적조건 예측치를 나타내었다. 먼저, alcalase-AAF 연속처리 쓴맛 개선 멸치 가수분해물(AAAH)의 수율의 목표값(max)을 고려한 최적 예측치는 효소/기질 비 및 시간의 부호값(coded value)이 각각 0.27 및 1.41이었고, 실제값(actual value)이 각각 3.54% 및 14시간이었다. 이들 조건에서 제조된 AAAH의 수율은 73.0%로 예측되었다.

한편, AAAH의 대한 쓴맛 관능평가 목표값을 고려한 최적 예측치는 효소/기질비 및 시간에 대한 부호값이 각각 -0.01 및 -0.04이었고, 실제값이 각각 2.98% 및 7.84시간이었다. 또한 이들 조건에서 제조된 AAAH의 쓴맛 관능평가는 4.8로 예측되었다. 이상의 수율과 쓴맛 관능평가에 대한 각각의 최적조건에는 다소 차이가 있어, 이를 동시에 만족하는 다중 반응최적화(multiple response optimization)를 통해 얻어진 효소/기질 비 및 시간의 부호값은 각각 0.19 및 0.30이었으며, 이를 실제값으로 환산하면, 각각 3.38% 및 9.2시간이었다. 이때의 예상 수율 및 쓴맛 관능평가 점수는 각각 69.2% 및 4.6점으로 예상되었다.

이상의 최적화과정을 통해 확립된 AAAH의 제조조건(AAF/AAH ratio, 3.4%; hydrolysis time, 9 h)에 따라 측정된 수율은 $69.5 \pm 0.4\%$ 이었으며, 쓴맛 관능평가는 4.6 ± 0.4 점으로 최적 예측치와 유의적인 차이는 인정되지 않았다($P > 0.05$).

이상의 결과로 미루어 보아 제시된 반응표면 모델은 살 오징어 간체장 유래 aminopeptidase 활성획분(AAF)를 활용한 alcalase 처리 쓴맛 멸치 가수분해물의 쓴맛 제거/감소를 위한 최적 모델이라 판단되었다.

또한 이 연구의 결과로 시판 단백질분해효소를 이용하여 어류 효소 가수분해물의 제조는 과도한 가수분해로 peptide의 말단에 소수성 아미노산의 노출로 인해 증가된 쓴맛을 exopeptidase인 aminopeptidase를 활용하여 쓴맛의 주된 원인되는 소수성 아미노산의 유리를 시켜 쓴맛제거/감소시킴으로서 소비자의 기호향상을 통해 조미소재/건강기능 소재로 활용이 가능할 것으로 예상되었다(Clegg and Lim, 1974; Kristinsson and Rasco, 2000; Nishiwaki et al., 2002; Kim et al., 2020).

조미소재로서 최적 AAAH의 식품성분

살 오징어 간체장 유래 aminopeptidase 활성획분(AAF)을 활용한 alcalase 처리 쓴맛 멸치 가수분해물(AAH)의 쓴맛 제거/감소의 최적화 공정을 통해 제조한 alcalase-AAF 연속처리 멸치 가수분해물(AAAH)의 식품성분 특성은 Table 7에 나타내

었으며, 멸치의 내인성 자가소화효소에 의한 자가소화분해물(AH)과 비교하였다.

AH, AAH 및 AAAH의 수분함량은 각각 93.0%, 91.2% 및 91.2%, 조단백질의 경우 각각 6.2%, 7.9% 및 7.9%, 조지방의 경우 모두 미 검출, 조회분의 경우 각각 0.5%, 0.6% 및 0.6%로 분석되었으며, AH에 비하여 AAH 및 AAAH는 수분이 약 1.8% 감소하였으며, 이는 효소에 의한 단백질 가수분해의 영향으로 AAH 및 AAAH의 단백질 함량의 증가에 따른 결과로 판단되었다. 조회분의 경우, 효소처리에 따른 함량에는 유의적인 차이가 없었다($P > 0.05$).

한편, AH, AAH 및 AAAH의 가수분해율은 각각 41.7%, 68.1% 및 69.5%로서 가수분해물들 간에 유의적인 차이를 인정되었다. 멸치의 내인성 자가소화효소에 의한 AH에 비하여, AAH는 시판 단백질분해효소인 alcalase 처리(1% w/w)로 자가소화효소와 더불어 가수분해를 촉진하여 약 26.4%의 가수분해율이 증가되었으며, 이는 멸치 육종의 질소성분이 가수분해로 인해 다량 유리된 것으로 판단되었다. 그러나 AAH 및 AAAH 간의 가수분해율에 있어서는 1.4% 정도의 유의적인 차이를 나타내었지만, 가수분해율의 증가가 소폭에 그친 것은 쓴맛 가수분해물인 AAH의 쓴맛 제거를 위해 사용한 살 오징어

Table 7. Comparison of proximate compositions, hydrolysis degree, pH and brownness of alcalase-treated anchovy *Engrauris japonica* hydrolysates (AAH) reacted with aminopeptidase active fraction (AAF)

Components	Anchovy hydrolysates		
	AH	AAH	AAAH
Moisture (%)	93.0±0.2 ^{a1}	91.2±0.2 ^b	91.2±0.1 ^b
Protein (%)	6.2±0.1 ^b	7.9±0.1 ^a	7.9±0.2 ^a
Lipid (%)	ND	ND	ND
Ash (%)	0.5±0.1 ^a	0.6±0.1 ^a	0.6±0.1 ^a
Hydrolysis degree (%)	41.7±0.4 ^c	68.1±0.3 ^b	69.5±0.4 ^a
pH	6.88±0.03 ^c	6.63±0.02 ^b	6.51±0.03 ^a
Brownness (at 430 nm)	0.08±0.01 ^c	0.22±0.02 ^b	0.26±0.02 ^a



Photo

¹Means with different letters within the same row are significantly different ($P < 0.05$). AH, auto-hydrolysate; AAH, alcalase-treated bitter anchovy hydrolysate; AAAH, alcalase/AAF-treated anchovy hydrolysate as a seasoning sauce base; ND, not detected.

간체장 유래 AAF가 단백질을 분해하는 활성이 낮은 대신, 주로 가수분해물의 다양한 peptide 중에 노출된 N말단 아미노산을 유리하는 aminopeptidase의 작용에 의한 결과로 판단되었다(Kristinsson and Rasco, 2000; Nishiwaki et al., 2002; Kim et al., 2020).

한편 AH, AAH 및 AAAH의 pH는 각각 pH 6.88, 6.63 및 6.51로서 효소처리한 가수분해물들 간에 유의적으로 낮아지는 경향을 나타내었다. 이는 양성전해질인 단백질 및 peptide가 가수분해 되어 유리되는 peptide와 아미노산의 하전이 상대적으로 음 하전이 상대적으로 많은 아미노산인 aspartic acid와 glutamic acid가 peptide의 말단에 노출되거나 유리됨으로서 나타난 결과로 판단되었다. 또한 이들 가수분해물들의 파장 430 nm에서 측정할 갈변도는 각각 0.08 (AH), 0.22 (AAH) 그리고 0.26 (AAAH)로서 유의적인 차이를 보였으며, 아래의 가수분해물들의 사진의 결과와도 일치하였다.

이 연구의 결과로부터 시판 단백질분해효소들을 이용한 어류 단백질 가수분해물들은 강력한 단백질 가수분해로 인한 쓴맛이 강하게 나타난 것을 확인할 수 있었고, 특히 alcalase 처리한 멸치 가수분해물(AAH)의 가수분해율과 쓴맛이 가장 높았다. 앞서의 연구(Kim et al., 2014b, 2020)에서 쓴맛 제거/감소효과가 확인된 살 오징어 간체장 유래 aminopeptidase active fraction (AAF)를 AAH에 적용하여 수율과 쓴맛 관능평가를 통한 쓴맛 제거/감소된 최적의 가수분해조건을 구명하였고, 이의 식품특성을 살펴봄으로서 조미소재의 베이스로 활용이 가능할 것으로 판단되었다.

사 사

이 논문은 2020년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(대일 검사강화조치 대응 수출시장 다변화 수산식품개발).

References

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1995. Official methods of analysis. 16th ed. AOAC, Washington D.C., U.S.A., 69-74.
- 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, 283-287. <https://doi.org/10.1017/s0022029900019695>.
- Fu Y, Chen J, Bak KH and Lametsch R. 2019. Valorisation of protein hydrolysates from animal by-products: Perspectives on bitter taste and debittering methods: A review. *Inter J Food Sci Tech* 54, 978-986. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14037>.
- Gong M, Mohan A, Gibson A and Udenigwe CC. 2015. Mechanisms of plastein formation, and prospective food and nutraceutical applications of the peptide aggregates. *Biotechnol Rep* 5, 63-69. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.12.003>.
- Hsu KC. 2010. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. *Food Chem* 122, 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.013>.
- 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>.
- Idowu AT, Benjakul S, Sinthusamran S, Sookchoo P and Kishimura H. 2018. Protein hydrolysate from salmon frames: Production, characteristics and antioxidative activity. *J Food Biochem* 43, e12734. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12734>.
- Izawa N, Tokuyasu K and Hayashi K. 1997. Debittering of protein hydrolysates using *Aeromonas caviae* aminopeptidase. *J Agric Food Chem* 45, 543-545. <https://doi.org/10.1021/jf960784t>.
- Kim H, Lee JS and Cha YJ. 2002. Processing of functional enzyme-hydrolyzed sauce from anchovy sauce and soy sauce processing by-products. 1. Optimization of hydrolysis conditions by response surface methodology. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 31, 653-657. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2002.31.4.653>.
- 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 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 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 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. Debittering 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 its lowering the bitterness. Korean J Fish Aquat Sci 53, 112-122. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0112>.
- 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>.
- Kim IMR, Kawamura Y and Lee CH. 2003. Isolation and identification of bitter peptides of tryptic hydrolysate of soybean 11S glycinin by reverse-phase high performance liquid chromatography. J Food Sci 68, 2416-2422. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb07039.x>.
- Klomklao S, and Benjakul S. 2017. Utilization of tuna processing byproducts: Protein hydrolysate from skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* viscera. J Food Process Preserv 41, e12970. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12970>.
- 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>.
- Lalasis G and Sjoberg 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>.
- Linde GA, Junior AL, Vaz de Faria E, Colauto, NB, Farri de Moraes F and Zanin GM. 2009. Taste modification of amino acids and protein hydrolysate by α -cyclodextrin. Food Res Inter 42, 814-818. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.03.016>.
- Liu X, Jiang D and Peterson DG. 2013. Identification of bitter peptides in whey protein hydrolysate. J Agri Food Chem, 62, 5719-5725. <https://doi.org/10.1021/jf4019728>.
- Mohammad-Khah A and Ansari R. 2009. Activated charcoal: Preparation, characterization and applications. Inter J Chem Tech Res 1, 859-864.
- Nalananon S, Benjakul S, Kishimura, H and Shahidi F. 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. Food Chem 124, 1354-1362. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.089>.
- Nishiwaki T, Yoshimizu S, Furuta M and Hayashi K. 2002. Debittering 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).
- Saha BC and Hayashi K. 2001. Debittering 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).
- Stevenson DE, Ofman DJ, Morgan KR and Stanley RA. 1998. Protease-catalyzed condensation of peptides as a potential means to reduce the bitter taste of hydrophobic peptides found in protein hydrolysates. Enzyme Microb Technol 22, 100-110. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00135-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00135-X).
- Suh HJ, Bae SH and Noh DO. 2000. Debittering of corn gluten hydrolysate with active carbon. J Sci Food Agri 80, 614-618. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(200004\)80:5%3C614::AID-JSFA580%3E3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(200004)80:5%3C614::AID-JSFA580%3E3.0.CO;2-L).
- Synowiecki J, Jagietka R and Shahidi F. 1996. Preparation of hydrolysates from bovine red blood cells and their debittering following plastein reaction. Food Chem 57, 435-439. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00005-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00005-2).
- Tamura M, Miyoshi T, Mori N, Kinomura K, Kawaguchi M, Ishibashi N and Okai H. 1990. Mechanism for the bitter tasting potency of peptides using o-aminoacyl sugars as model compounds. Agri Biol Chem 54, 1401-1409.
- Thiansilakul Y, Benjakul S and Shahidi F. 2007. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad *Decapterus maruadsi*. Food Chem 103, 1385-1394. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.055>.
- Umetsu H and Ichishima E. 1988. Debittering 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>.
- Wasswa J, Tang J and Gu XH. 2007. Desalting fish skin protein hydrolysates using macroporous adsorption resin. American J Food Tech 25, 406-413. <https://doi.org/10.3923/ajft.2007.406.413>.
- Yoon IS, Kim HJ, Kang SI, KimDY, 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>.
- Zhou P and Regenstein JM. 2004. Optimization of extraction conditions for pollock skin gelatin. J Food Sci 69, 393-398. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb10704.x>.