

반응표면분석법에 의한 키조개 부산물 단백질 가수분해물의 제조조건

차용준 · 김은정 · 백형희*

창원대학교 식품영양학과, *미시시피주립대학교 식품공학과

Processing of Pen Shell By-product Hydrolysate Using Response Surface Methodology

Yong-Jun Cha, Eun-Jeong Kim and Hyung-Hee Baek*

Department of Food Science and Nutrition, Changwon National University

*Department of Food Science and Technology, Mississippi State University

Abstract

The hydrolysis of pen shell by-product by the APL 440™, selected as the suitable alkaline protease on the basis of cost per unit enzyme activity, was optimized using response surface methodology(RSM). A model equation obtained from the results of RSM could be used for the prediction of degree of hydrolysis(DH) as follows: %DH=51.126+2.419 pH+2.415T-2.426S-2.846pH²-4.211T²-3.014t²+2.419S². From the ridge analysis, the conditions favoring the highest degree of hydrolysis were pH 10.2, 61.4°C, 2.58 hrs reaction time, 30.9% substrate concentration, and 0.32% enzyme/substrate ratio. The effect of autolysis affecting degree of hydrolysis in pen shell by-product was negligible. Hydrolysate produced under the optimal condition increased 3.5 times and 7.7 times in amino nitrogen and salinity, respectively, comparing with raw pen shell by-product.

Key words: pen shell by-product, response surface methodology, alkaline protease APL 440.

서 론

우리나라 남해안에서 어획되어지는 조개류 중에서 가장 대형이며 고급 수산식품의 하나인 키조개의 생산량은 양식기술의 발달로 인하여 1980년대 이후부터 증가하여, 1993년에는 3,321 M/T이 생산되었다⁽¹⁾. 그러나 패주를 제외한 나머지 부분은 현재 식용으로 이용되지 않고 대부분이 사료로서 이용되고 있는 실정이다. 또한 그 비율이 75%라고 하므로 93년도 생산량으로 계산하면 2,490 M/T이 부산물로 배출된다. 따라서 이의 처리와 이용은 자원의 유효 이용과 동시에 환경적인 문제를 해결한다는 점에서도 중요하다고 볼 수 있다.

수산물을 기피하는 미국에서도 조개나 굴과 같은 패류는 상당히 선호하여 이들 원료로부터 산업적으로 조미료나 향미제 개발에 관한 연구가 많이 보고 되고 있다⁽²⁾. 그러나 현재까지 국내외에서 키조개에 대한 연구 결과를 보면 주로 생산량 증대를 목적으로 양식기술에 관한 것^(3,4), 화학적 성분 및 정미성분에 관한 연구가 대부분이며⁽⁵⁻⁸⁾, 키조개의 가공적성에 관한 연구는 보기 드문 실정이다.

따라서 본 연구에서는 반응표면분석법을 이용하여 수산가공 산업현장의 실정에 알맞게 실험디자인하여 에너지 손실 및 경비절감을 극대화하고자 키조개 부산물로부터 부가가치가 높은 향미제의 제조를 시도하였다.

재료 및 방법

재료

전남 여수 근해에서 양식되는 키조개, *Atrina pectinata japonica*를 현장(여수 신평무역(주))에서 패주육 및 내장을 제거한 나머지 부산물을 채취하여 빙장한 다음 실험실로 운반하여 냉동고(-20°C)에 저장하여 두고 실험하였다. 상업용 효소(Table 3)로는 neutral protease 5종(Neutrase 0.5L™, Complex enzyme™ 2000, Alcalase 2.4L™, Alcalase 0.6L™ 및 Protease A™), alkaline protease 4종(Protease S™, Protease P™, APL™ 440 및 Proleather™) 그리고 acidic protease 2종(Newlase F™ 및 Protease M™) 등 총 11종의 효소를 구입하여 실험하였다.

키조개 부산물의 가수분해 및 가수분해도 실험

이중 자켓으로 된 반응조(100 ml, Wheaton Co., USA)에 Baek⁽⁹⁾ 및 Cha와 Kim⁽¹⁰⁾의 방법에 따라 균질화한 키조개 부산물 50g과 증류수 50 ml를 넣고 각 상업용

Corresponding author: Yong-Jun Cha, Department of Food Science and Nutrition, Changwon National University, Sarim-dong 9, Changwon 641-773, Korea

Table 1. Boundaries of the experimental domain and spacing of levels expressed in coded and natural units

Code units	Experimental factor [abbreviation]				
	pH [pH]	Temp [T]	Time [t]	Substrate conc. [S] (% w/v)	E/S ratio [E/S] (% v/w)
-2	8.0	40	0.5	15	0.1
-1	9.0	50	1.5	30	0.2
0	10.0	60	2.5	45	0.3
+1	11.0	70	3.5	60	0.4
+2	12.0	80	4.5	75	0.5

효소의 최적 pH와 온도조건(Table 3)으로 조정된 다음 효소를 넣고 반응시켜 생성된 TCA soluble peptides를 1 N Folin & Ciocalteu's phenol용액(Sigma Co.)으로 발색시켜 578 nm에서 흡광도를 측정(Varian No.634 spectrometer)하여 대조구와의 차를 표준곡선에서 tyrosine ($\mu\text{g/ml}$, 30°C) 함량으로 환산하였다. 가수분해도 실험은 Boudrant와 Cheftel⁽¹¹⁾의 방법을 변형한 Baek⁽⁹⁾, Cha와 Kim⁽¹⁰⁾의 방법에 따랐다.

최적 효소 선정 실험

단백질 분해효소의 선정은 Baek⁽⁹⁾ 및 Hale⁽¹²⁾의 방법에 기초하여 30% 가수분해율을 나타내는 데 필요한 효소량과 가수분해율을 상호 비교하여 선정하였다. 즉 효소량 (\log_{10} Enzyme)과 한시간 동안 효소반응 후의 가수분해율을 plot하여 외삽법으로 30% 가수분해율에 필요한 효소량을 상호 비교하였다.

최적 가수분해조건 설정 및 통계분석

예비실험을 통하여 가수분해에 영향을 미치는 변수인 pH, 온도, 가수분해시간, 기질의 농도 및 기질에 대한 효소의 농도에 대하여 실험영역을 설계하여 Table 1과 같이 code화하였다. 그리고 이러한 변수와 code를 이용하여 반응표면 실험계획을 중심합성계획(central composite design)인 2차 모형으로 작성하여⁽¹³⁾, fractional 2⁴ factorial design(16점), star points(10점) 및 central points(10점)으로 총 36개 실험을 무작위로 수행하였다. 그리고 RSREG(Statistical Analysis System)⁽¹⁴⁾를 이용하여 통계분석을 하였으며, PS-Plot(Polysoft, Salt Lake City, USA)으로 영 수준(zero level)에서 두 독립변수간의 상관성을 검토하였다.

일반성분, 염도, 아미노질소 및 색도실험

일반성분은 AOAC법⁽¹⁵⁾에 따라 수분은 상압가열건조법, 조단백질은 micro-Kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet법, 회분은 건식회화법에 의하였으며, 염도는 Mohr법⁽¹⁶⁾, pH는 pH meter(DMS DP-880, Korea)로 측정하였다. 아미노질소는 Formol법⁽¹⁷⁾으로 측정하였으며, 색도는 분

Table 2. Central composite design consisting of 36 experiments for the study of five experimental factors in coded units

Run No.	Independent variables					Dependent variable
	pH	T	t	S	E/S	Degree of hydrolysis(%)
1	-1	-1	-1	-1	-1	33.0
2	1	-1	-1	-1	1	44.0
3	-1	1	-1	-1	1	47.8
4	1	1	-1	-1	-1	50.2
5	-1	-1	1	-1	1	42.5
6	1	-1	1	-1	-1	43.9
7	-1	1	1	-1	-1	43.7
8	1	1	1	-1	1	50.9
9	-1	-1	-1	1	1	35.5
10	1	-1	-1	1	-1	41.8
11	-1	1	-1	1	-1	43.5
12	1	1	-1	1	1	47.9
13	-1	-1	1	1	-1	39.6
14	1	-1	1	1	1	42.5
15	-1	1	1	1	1	46.9
16	1	1	1	1	1	50.5
17	-2	0	0	0	0	35.2
18	2	0	0	0	0	44.4
19	0	-2	0	0	0	34.5
20	0	2	0	0	0	34.2
21	0	0	-2	0	0	34.1
22	0	0	2	0	0	44.1
23	0	0	0	-2	0	73.5
24	0	0	0	2	0	48.3
25	0	0	0	0	-2	51.6
26	0	0	0	0	2	55.2
27	0	0	0	0	0	39.5
28	0	0	0	0	0	50.3
29	0	0	0	0	0	49.3
30	0	0	0	0	0	57.8
31	0	0	0	0	0	54.3
32	0	0	0	0	0	48.6
33	0	0	0	0	0	56.1
34	0	0	0	0	0	50.9
35	0	0	0	0	0	52.7
36	0	0	0	0	0	51.7

말화한 시료를 standard plate(L: 91.6, a: 0.28, b: 2.69)를 이용하여 직시색차계(日本電色; model ND-1001DP)에서 L값, a값, b값 및 ΔE값을 측정하였다.

결과 및 고찰

산업용 효소의 가수분해율 및 최적 효소의 선정

키조개 부산물에 적합한 최적 가수분해효소를 선정하기 위하여 한시간 동안에 키조개 부산물을 30% 가수분해 시키는데 필요한 효소량을 구하였으며, 이 효소량의 역수를 효소활성값(A)으로 산출하였다. 그리고 효소활성을

Table 3. Evaluation of eleven commercial proteases for the hydrolysis of pen shell by-product

Protease	Opt. Temp. (°C) ²⁾	Opt. pH ²⁾	Activity(A) ³⁾	Cost(C) ¹⁾	A/C
Neutral					
Neutrase 0.5L	45	6.0	1.26	1.24	1.02
Complex enzyme 2000	50	7.0	1.35	1.96	0.69
Alcalase 2.4L	60	7.0	10.26	4.95	2.07
Alcalase 0.6L	60	7.0	3.86	1.00	3.86
Protease A	50	7.0	3.81	8.87	0.43
Alkaline					
Protease S	70	8.0	6.88	8.87	0.78
Protease P	45	8.0	10.26	8.87	1.16
APL 440	60	10.0	45.62	3.61	12.64
Proleather	60	10.0	19.24	8.87	2.17
Acidic					
Newlase F	45	3.0	4.22	8.87	0.48
Protease M	50	4.5	6.83	8.87	0.77

¹⁾Neutrase 0.5L, Alcalase 2.4L and Alcalase 0.6L were obtained from Novo Nordisk (Denmark); Protease A, Protease S, Protease P, Proleather, Neulase F and Protease M were obtained from Amano Pharmaceutical Co. (Japan); Complex enzyme 2000 and APL 440 were obtained from Pacific Chemical Co. (Korea) and Solvay Enzyme Inc. (USA), respectively.

²⁾Optimal temperature and pH of each protease were suggested by the producing company.

³⁾Inverse of the amount of protease required for 30% hydrolysis at optimal temperature and pH of each enzyme for 1 hr.

⁴⁾Least expensive enzyme was given a value of 1.0.

다시 판매가격(C)으로 나눈값(A/C)이 가장 높은 것을 최적효소로 선정하였다. 이것은 산업적으로 응용될 경우의 경제성을 고려한 때문이며, 그 결과를 Table 3에 표시하였다.

Neutral protease 중에서는 Alcalase 2.4L이 효소활성 10.26으로 가장 높았으나 판매가격과 비교하여 보면 Alcalase 0.6L이 가장 적절하였다. 그리고 alkaline protease 중에서는 APL 440이 45.62로서 가장 높았으며 다음으로 Proleather, Protease P 순이었다. 그러나 가격으로 환산하였을 경우 APL 440이 12.64로서 가장 양호하였다. Acidic protease는 전반적으로 neutral protease보다 활성이 높았으나 가격과 비교할 적에 적절하지 못하였으며 가수분해후 약간 쓴맛 및 이취가 있었다. 기존의 가수분해에 대한 연구보고^(18,19)는 효소의 활성도에 의하여 선정하였으나 산업적으로 응용하는 것을 전제로 할적에 경제성이 고려되어야 할 것으로 생각된다. 따라서 본 실험에서는 APL 440을 최적 효소로 선정하였다(Table 3). 그러나 향후 가수분해물의 맛과 향기면에서의 종합적인 검토 필요성이 고려되었다.

키조개 부산물의 자가소화 효소에 의한 효과

단백질 분해효소에 의한 최적 가수분해조건을 결정하기 전에 먼저 키조개 부산물 자체가 가지고 있는 자가소화효소의 활성정도를 검토하기 위하여 Fig. 1에 나타난 것처럼 APL 440 protease 첨가구와 무첨가구를 반응시간에 따라 최적 pH(10.0)와 온도(60°C)에서 가수분해정도를 측정하였다. 4시간 동안 반응시킨 결과 대조구(효소

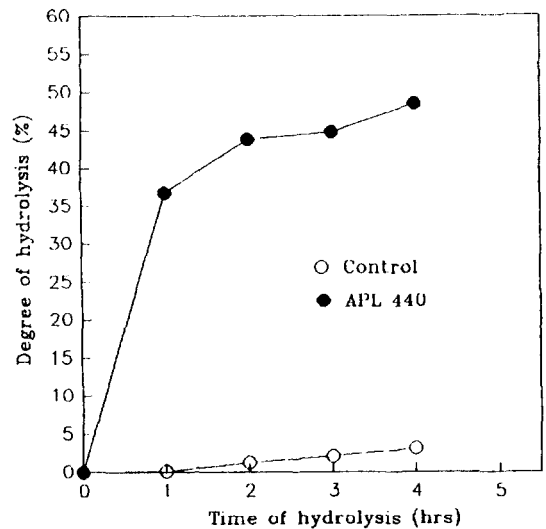


Fig. 1. Degree of hydrolysis of pen shell by-product with and without APL 440 protease during hydrolysis at 60°C and pH 10.0

무첨가구)에서는 3% 미만의 가수분해율을 보인 반면에, APL 440 첨가구에서는 한시간 후에 37%의 가수분해율을 보였으며, 그후 계속해서 증가하였다. 정어리잔사⁽²⁰⁾나 크릴⁽²¹⁾에서의 자가소화효소에 의한 70% 이상의 가수분해율과 비교하여 볼적에 본 실험에서는 키조개 부산물 자체의 자가소화 효소에 의한 가수분해 효과는 무시할

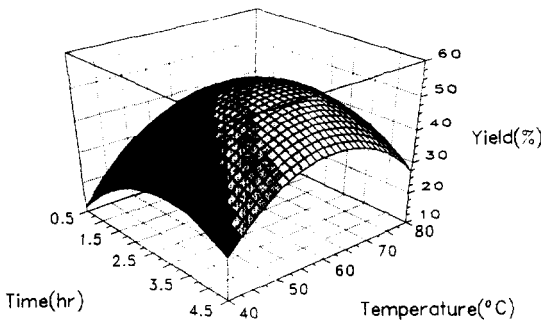


Fig. 2. Response surface plot for the effect of time and temperature on the hydrolysis of pen shell by-product

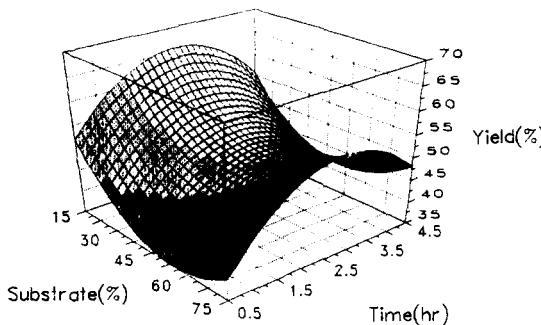


Fig. 3. Response surface plot for the effect of substrate and time on the hydrolysis of pen shell by-product

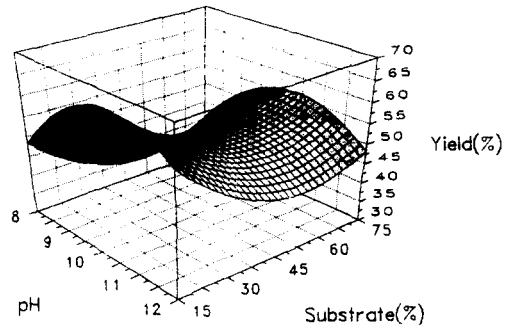


Fig. 4. Response surface plot for the effect of pH and substrate on the hydrolysis of pen shell by-product

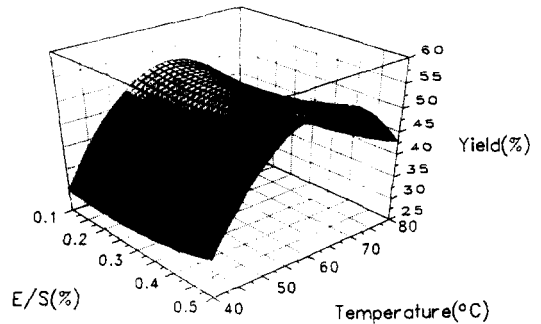


Fig. 5. Response surface plot for the effect of E/S and temperature on the hydrolysis of pen shell by-product

정도였다.

반응표면분석법에 의한 최적 가수 분해조건 결정

Table 1 및 Table 2에서 디자인한 중심합성계획에 따라 얻어진 36개의 실험값을 RSREG 처리후, 두 독립 변수 상호간의 관계를 나머지 변수를 제로 레벨로 놓고 3차원으로 도식하였다. t(시간)과 온도(T)와의 관계(Fig. 2)에서는 중심점 즉 가장 가수분해율이 높은 점은 2.75 시간에서 60~65°C 부근이었으며, S(기질농도)와 시간과의 관계(Fig. 3) 및 pH와 S간의 관계(Fig. 4)에서는 중심점이 안장점(saddle point)을 나타내었는데 가수분해 2.5~3.0시간 범위에서 기질농도가 낮을 수록 가수분해율이 높았고, 기질농도 60% 이상에서도 같은 결과를 보였다. 그리고 S와 pH관계에서는 기질농도가 낮을수록, pH 10~11 영역에서 가수분해율이 높았다. Fig. 5의 E/S와 T와의 관계는 효소농도에는 큰 영향 없이 온도 60~65°C 영역에서 가장 높은 가수분해율을 보였다. 그리고 E/S와 pH와의 관계(Fig. 6)에서도 효소농도와 pH와는 상관성이 없이 pH 10~11에서 가수분해율이 높았다. 이는 다중회귀분석 결과(Table 4)의 일차식(linear regression) ($p < 0.05$) 및 이차식(quadratic regression) ($p <$

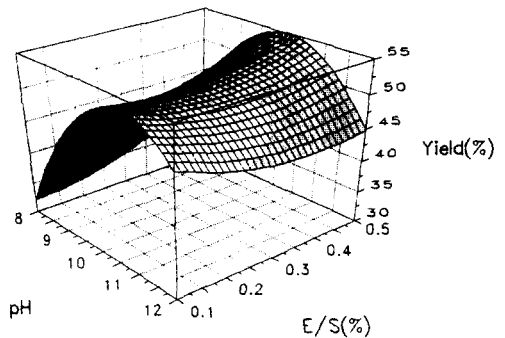


Fig. 6. Response surface plot for the effect of pH and E/S on the hydrolysis of pen shell by-product

regression)의 유의성은 없는 것($P > 0.05$)과 일치하였다. 그러나 반응표면분석법으로 계획한 결과값은 결정계수(R-square)가 0.7896이었으며 lack of fit가 유의성이 없어 ($p > 0.05$), 본 실험에 있어 이차항의 설계가 적합하다고 인정되었다. 다중회귀분석 결과로부터 얻어진 가수분해도(%DH)는 $\%DH = 51.126 + 2.419pH + 2.415T - 2.426S - 2.846pH^2 - 4.211T^2 - 3.014t^2 + 2.419S^2$ 였다. 이러한 결

51.42%였는데, 정상점은 안장점을 나타내고 있어 최고 점이라고 할 수 없었다. 따라서 능선분석(ridge of maximum response)에 의해 coded radius가 0.0~1.0범위내에서 예측치와 실측치를 비교한 결과 가장 높은 가수분해율을 나타내는 점(radius 0.5)은 예측치가 56.67%(S.E=2.06)였으며, 실측치는 61.80%의 가수분해율을 보였다. 따라서 본 실험에서는 이 점을 반응표면분석법에 의한 최대 가수분해율을 나타내는 점으로 정하였으며, 이 점을 만족하는 각 변수의 값은 pH는 10.2, 온도는 61.4°C, 반응시간은 2.58시간, 기질농도는 30.9% 그리고 기질에 대한 효소의 농도는 0.32%였다.

가수분해물의 품질

키조개 부산물을 최적 가수분해조건에 따라 가수분해 후 분무건조기(EYELA SD-1, Japan)를 이용하여 분말화하였다. 이때의 일반성분 및 아미노질소를 분석한 결과는 Table 5와 같다. 아미노질소는 건물당 기준으로 생시료에서 755.8 mg%이던 것이 가수분해후 2618.8 mg%로

증가하였다. 그러나 분말화함으로써 염도는 상대적으로 7.7배 증가하였다. 따라서 향미제로 이용하고자 할 때에는 부수적인 염의 첨가는 필요치 않은 것으로 사료되었다. 색도의 분석결과(Table 6) 대조구(시판 분말조미료)에 비하여 명도는 높았으며 적색도 대신에 약간의 녹색도와 낮은 황색도를 보였다. 그리고 갈변도값(ΔE)은 대조구에 비하여 낮은 수치였다. 따라서 이러한 조건으로 키조개 부산물로 부터 단백질 가수분해물을 제조한다면 산업적으로 중간소재로서의 이용 또는 향미제로의 전환이 충분히 가능할 것으로 기대된다.

요 약

키조개의 부산물을 향미제로 개발하기 위하여 반응표면분석법으로 가수분해조건을 디자인하여 키조개 부산물의 가수분해물 제조를 시도한 결과, 상업용 단백질 분해효소 11종 가운데 효소활성을 판매가격에 대한 비율로 환산했을 때 APL 440이 가장 경제성이 있었다. 그리고 키조개 부산물 가수분해과정 중 자가소화 효소에 의한 영향은 무시할 정도로 적었다. 반응표면분석결과 얻어진 가수분해율(%DH)은 $\%DH = 51.126 + 2.419pH + 2.415T - 2.426S - 2.846pH^2 - 4.211T^2 - 3.014t^2 + 2.419S^2$ 였다. 그러나 정상점이 안장점을 나타내므로 능선분석(반경 0.5) 결과 최대점은 pH 10.2, 온도 61.4°C, 기질농도 30.9%, 기질에 대한 효소농도 0.32%에서 2.58시간 가수분해할 때이며, 실제 이 조건에서 61.80%의 가수분해율을 보였다. 분말화한 가수분해물은 아미노질소 및 염도가 생시료에 비하여 각각 3.5배 및 7.7배 증가하였다.

Table 4. Model coefficients estimated by multiple linear regression

Factor	Coefficient
Constant	51.126
pH	2.419 ^c
T	2.415 ^c
t	1.533
S	-2.426 ^c
[E/S]	0.785
pH ²	-2.846 ^b
T ²	-4.211 ^a
t ²	-3.014 ^b
S ²	2.419 ^b
[E/S] ²	0.558
pH×T	-0.256
pH×t	-0.553
pH×S	-0.295
pH×[E/S]	-0.883
T×t	-0.729
T×S	0.009
T×[E/S]	-0.041
t×S	0.293
t×[E/S]	-0.093
S×[E/S]	-1.073

Superscript letters are significantly different: a; p<0.001, b; p<0.01, c; p<0.05.

Table 6. Color values in powdered-pen shell hydrolysate

	L ¹⁾	a ²⁾	b ³⁾	E ⁴⁾
Hydrolysate	78.4	-2.0	13.2	22.4
Reference ⁵⁾	43.5	7.9	18.5	51.2

¹⁾L: Measures lightness and varies from 100 for perfect white to zero black

²⁾a: Measures redness when plus, gray when zero, and greenness when minus

³⁾b: Measures yellowness when plus, gray when zero, and blueness when minus

⁴⁾ $\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$

⁵⁾: Powdered Kasuobushi product on the market

Table 5. Proximate composition of raw and hydrolysate of pen shell by-product¹⁾

	Moisture	Protein	Lipid	Ash	pH	NH ₂ -N(mg%)	Salinity
Raw	82.80±0.08	8.02±0.01	1.48±0.08	2.86±0.07	6.12	0.13±0.01	2.55±0.03
Hydrolysate	5.30±0.02	57.78±0.03	2.29±0.02	22.94±0.02	10.20	2.48±0.01	19.63±0.02

¹⁾: Average± standard deviation (n=3)

(g%)

감사의 말

본 연구는 1994년도 한국과학재단 목적기초 연구 사업(핵심전문연구, KOSEF 941-0600-064-1)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

1. 한국수산회: 수산연감, p.434 (1994)
2. Product update: Ingredients from seafoods and for seafood products. *Food Technol.*, 3, 74 (1988)
3. 유성규, 임현식, 유호영, 강경호: 키조개 채묘의 개발연구. *한국수산학회지*, 21, 206 (1988)
4. 유성규, 유명숙: 키조개의 양식개발에 관한 연구. *한국수산학회지*, 17, 529 (1984)
5. Konosu, S. and Watanabe, K.: Occurrence of β -alanine betaine in the adductor muscle of fan-mussel. *Bull. Japan Soc. Sci. Fisher.*, 39, 645 (1973)
6. Konosu, S., Chen, Y.-N. and Watanabe, K.: Atrinine, a new betaine isolated from the adductor muscle of fan-mussel. *Bull. Japan Soc. Sci. Fisher.*, 36, 940 (1970)
7. 최규정: 키조개의 영양성분. 여수수대논문집, 5, 9 (1991)
8. 송대진, 하진환, 강영주: 키조개의 냉동저장에 의한 품질변화. 제주대학논문집, 24, 75 (1987)
9. Baek, H.H.: Enzymatic hydrolysis of crawfish processing byproducts for bioflavor production. *Ph. D. Dissertation*, Louisiana State University, Baton Rouge, USA (1994)
10. Cha, Y.J. and Kim, E.J.: Response surface methodo-

- logy in development of oyster hydrolysate. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 24, 427 (1995)
11. Boudrant, J. and Cheftel, C.: Continuous proteolysis with a stabilized protease. II. Continuous experiments. *Biotechnol. Bioeng.*, 18, 1735 (1976)
12. Hale, M.B.: Relative activities of commercially available enzymes in the hydrolysis of fish protein. *Food Technol.*, 23, 107 (1969)
13. Box, G.E.P., Hunter, W.G. and Hunter, J.S.: *Statistics for Experiments*. John Wiley and Sons, Inc., New York, p.165 (1978)
14. Statistical Analysis System: *SAS/STAT User's Guide, Version 6*, 4th ed., SAS Institute, Inc., USA (1989)
15. AOAC: *Official Methods of Analysis*, 13th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. p.285 (1980)
16. 日本藥學會編: 衛生試驗法主解 金原出版, p.62 (1980)
17. 日本醬油研究所: しょうゆ 試験法. 三雄舎印, p.9 (1985)
18. 이영철, 김동수, 김영동, 김영명: 단백질 분해효소를 이용한 굴과 홍합 가수분해물의 제조. *한국식품과학회지*, 22, 234 (1990)
19. 최인재, 남희섭, 신재익, 이병훈: 단백질 분해효소에 의한 홍합단백질의 분해에 관한 연구. *한국식품과학회지*, 24, 519 (1992)
20. 이용호, 조순영, 하재호, 오광수, 김장량: 정어리잔사를 이용한 정어리간장의 제조. *한국수산학회지*, 17, 117 (1984)
21. 이용호, 조순영, 차용준, 박향숙, 권칠성: 크릴간장 제조에 관한 연구. *한국영양식량학회지*, 13, 97 (1984)

(1995년 8월 21일 접수)