

홍게 가공부산물의 효소적 단백질 가수분해 최적화

장종태 · 서원호 · 백형희*
단국대학교 식품공학과

Enzymatic Hydrolysis Optimization of a Snow Crab Processing By-product

Jong Tae Jang, Won Ho Seo, and Hyung Hee Baek*
Department of Food Engineering, Dankook University

Abstract The objectives of this study were to evaluate a protease suitable for the enzymatic hydrolysis of a snow crab processing by-product (SPB) and to optimize the hydrolysis conditions using response surface methodology (RSM). The SPB was hydrolyzed at 50°C and pH 7.0-7.2 to obtain various degree of hydrolysis (DH) using Flavourzyme at an enzyme/substrate (E/S) ratio of 3.0%. The reaction progress curve exhibited an initial fast reaction rate followed by a slowing of the rate. The DH was increased to 30% at 90 min with a final DH 32 to 36%. A central composite experimental design having three independent variables (reaction temperature, reaction time, and E/S ratio) with five levels was used to optimize the enzymatic hydrolysis conditions. Based on the DH data, the optimum reaction conditions for the enzymatic hydrolysis of the SPB were a temperature of 51.8°C, reaction time of 4 hr 45 min, and an E/S ratio of 3.8%. It was demonstrated that the enzymatic hydrolysate of SPB could be used as a flavoring agent or a source of precursors for the production of reaction flavors.

Key words: snow crab processing by-product, enzymatic hydrolysis, flavor, response surface methodology

서 론

식품산업에서 대부분의 가공식품이 원재료의 일부분만을 원료로 사용하기 때문에 많은 가공부산물이 발생된다. 이러한 가공부산물을 Cooper(1)는 “식품 또는 사료로 이용되지 않은 원료 농산물”로 정의하였다. 특히 Pigott(2)는 수산물에서 가공부산물을 가공과정에서 버려지는 것들을 포함하는 “2차 원료 물질”이라고 정의하여 재활용이 가능한 물질이라고 하였다. 식품산업에서 가공부산물로 인한 환경오염은 심각한 수준이며 가공부산물을 처리하기 위하여 추가 비용이 발생되기도 한다. 따라서 식품 또는 원료에서 발생하는 가공부산물을 이용하여 고부가가치 식품소재로 재활용하기 위한 연구는 21세기 식품과학에 있어서 6대 주요 연구 분야의 하나로 인식되고 있다(3).

수산 가공부산물에 대한 연구는 주로 갑각류(crustacean)와 조개류(shellfish) 가공부산물의 재활용에 초점이 맞추어졌었다. Shiau와 Chai(4)는 굴 채취 후 껍데기에 남아있는 용액에 많은 향미성분이 존재함을 확인하고, 이를 이용하여 굴 스프를 개발하였다. Joh와 Hood(5), Peddy와 Flick(6), Reddy 등(7)은 가공부산물인 조개 세척액과 조개 내장을 농축, 건조하여 향미 소재를 생산하거나 효소와 같은 유용성분을 회수하였다. 또한 Burnette 등(8)은 대

합 착즙액을 진공농축한 후 동결 및 분무 건조하여 향미소재를 생산하였고, Depaola 등(9)은 새우 가공부산물에서 식품용 단백질을 회수하였다. Ochi(10)는 수산물로부터 추출물을 얻고 이를 이용하여 향미제를 개발하는 방법론을 제시하였다.

갑각류 중에서 특히 게 가공부산물에 대하여 다양한 연구가 이루어졌는데, Jaswal(11)은 31-32%의 단백질(건물 기준)을 함유하고 있는 게 가공부산물을 HCl로 가수분해한 단백질 가수분해물을 사료 및 미생물 배지로 이용하고자 하였다. Lee 등(12)은 꽃게 가공부산물로부터 게살 부스러기를 회수하고 이를 이용하여 crabcake을 개발하였고, Cha 등(13)은 홍게 자숙액을 농축하여 천연 향미제로 이용하고자 하였다. 또한 Chung과 Cadwallader(14)는 꽃게(*Callinectes sapidus*)의 게살과 가공부산물의 휘발성 성분을 비교 분석하고 게 가공부산물이 휘발성 향미성분을 회수할 수 있는 좋은 자원이라고 보고하였다. Baek과 Cadwallader(15,16)는 가재 및 게 가공부산물의 단백질을 효소로 가수분해하고 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 이용하여 가수분해조건을 최적화하여 천연향미제를 개발하기 위한 전구물질로 이용하고자 하였다.

홍게(snow crab)는 학명이 *Chioneceter japonicus*로 통상 우리나라에서는 붉은 대게 또는 홍 대게라고 불린다. 홍게는 연간 국내 수확량이 25,388톤(2007년)에 이르며 특유의 감칠맛과 향 때문에 많은 사람들이 별미로 즐겨 먹거나 맛살, 그라탱 등 가공식품제조에 이용하고 있다. 홍게는 식용으로 이용되는 부위가 15% 정도이고 나머지 85%는 가공부산물로 폐기되고 있어 이를 재이용하고자 하는 연구가 활발히 이루어지고 있다(17). 홍게 가공부산물은 최근 기능성 식품소재인 키틴 및 키토산의 제조 원료(18)로 사용되고 있으나, 키틴 및 키토산 추출 후에도 많은 향미성분과 astaxanthin 같은 고부가가치 식품소재가 함유되어 있다.

*Corresponding author: Hyung Hee Baek, Department of Food Engineering, Dankook University, Cheonan, Chungnam 330-714, Korea
Tel: 82-41-550-3565
Fax: 82-41-550-3566
E-mail: baek@dankook.ac.kr
Received July 27, 2009; revised September 22, 2009; accepted September 30, 2009

효소분해한 단백질 가수분해물을 식품소재로 이용하고자 하는 연구도 많이 이루어져서, Imm과 Lee(19)는 단백질 분해효소인 Flavourzyme과 Savorase를 이용하여 붉은 대구(*Urophycis chuss*)로부터 해산물 계통의 향미소재를 생산했으며 Kim 등(20)은 폐기 되는 굴 자숙액을 효소로 가수분해하여 향미소재를 개발하였다. 또한, 단백질 가수분해물 자체로의 이용 뿐 아니라 효소분해한 단백질 가수분해물을 Maillard 반응을 이용한 반응향(reaction flavor)의 전구물질로 이용하고자 하는 연구도 많이 이루어졌다. Wu 등(21)은 효소적으로 가수분해한 식물성 단백질(E-HVP)을 이용하여 고기향을 나타내는 반응향을 개발하였으며, Baek 등(22)도 E-HVP를 이용하여 소고기 향을 나타내는 반응향을 개발하였다.

따라서 본 연구에서는 천연향미제의 원료로서 많은 향미성분 들을 함유하고 있는 홍게 가공부산물을 고부가가치 식품소재 및 반응향을 제조하기 위한 단백질 소재로 이용하기 위하여 적절한 단백질 분해효소를 선택하여 가수분해하고 반응표면분석법으로 가수분해 조건을 최적화하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

홍게 가공부산물은 경북 영덕 소재 홍게 가공업체인 태훈바이 오(주)로부터 제공받아 실험에 사용하였다. 본 실험에 사용한 홍 게 가공부산물은 계살 채취공정에서 남는 계살 부스러기로써 실험에 사용하기 전까지 냉동상태로 보관하였다. 또한 홍게 가공부 산물의 단백질 가수분해를 위하여 Flavourzyme(Novo Nordisk Korea Ltd., Seoul, Korea)을 사용하였다.

홍게 가공부산물의 일반 성분 분석

홍게 가공부산물의 조단백, 조지방 및 조회분은 각각 AOAC법 (23)에 준하여 정량하였고 수분은 적외선 수분 측정기(Kett. FD-230, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 또한 식염은 Mohr법 에 의한 염소(Cl) 정량법(24)을 이용하여 정량하였다.

홍게 가공부산물의 효소적 가수분해

단백질 분해효소 역가측정: 실험에 사용한 단백질 분해효소인 Flavourzyme의 역가를 표준화하기 위하여 casein을 기질로 단백질 분해효소 역가를 측정하였다. 2 g의 casein(Sigma Chemical. Co., St. Louis, MO, USA)을 25 mL 0.1 N NaOH에 넣고 10분 정도 가열하 면서 녹인 후 냉각시켰다. 0.1 N HCl로 pH를 7.0으로 조정하고 10 mL의 1 M 인산완충용액(pH 7.0)을 넣은 후 전체 용액의 양이 100 mL이 되도록 증류수로 희석하여 2% casein 용액을 제조하였 다. 2% casein 용액 2.5 mL을 취하여 37°C에서 10분간 유지시킨 후 Flavourzyme을 넣고 20분 동안 반응시켰다. 5 mL의 0.3 M trichloroacetic acid(TCA)를 넣어서 반응을 종결시킨 후 실온에서 20분간 방치하고 Whatman No. 40 여과지로 여과하였다. 상정액 1 mL을 취하여 5 mL의 0.5 N NaOH와 1 mL의 1.0 N Folin & Ciocalteu's phenol 시약(Sigma Chemical. Co.)과 즉시 혼합하였다. 이 혼합액을 30°C에서 15분 동안 방치하여 발색시킨 후 UV/visible spectrophotometer(Shimadzu UV-1201, Kyoto, Japan)를 사용하여 578 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 0.3 M TCA 가용성 펩타 이드의 양은 L-tyrosine 표준곡선을 이용하여 정량하였다. L-Tyrosine 의 농도가 10, 20, 30, 40, 50, 100 µg/mL이 되도록 제조하고 각각 1 mL을 취하여 5 mL의 0.5 N NaOH와 1 mL의 1.0 N Folin & Ciocalteu's phenol 시약과 즉시 혼합한 후 30°C에서 15분 동안 발 색시킨 후 흡광도를 측정하였다. 단백질 분해효소 1 unit는 위 반

응조건에서 20분간 1 µL의 단백질 분해효소에 의해 생성된 L-tyrosine의 양으로 정의하였다.

홍게 가공부산물의 가수분해: 홍게 가공부산물을 Flavourzyme 으로 가수분해하기 위하여 먼저 냉동상태의 홍게 가공부산물을 냉장온도(4°C)에서 하룻밤 동안 방치하여 해동하였다. 해동된 홍 게 가공부산물을 믹서(Kenwood Ltd., Havant Hants, England)로 곱게 갈고 100 mL의 jacketed beaker에 넣고 50°C에서 30분 동안 가운하였다. pH meter(Inolab, Weilheim, Germany)를 이용하여 홍 게 가공부산물의 pH를 측정하고 Flavourzyme의 양(E/S)이 3%가 되도록 첨가하고 50°C에서 가수분해하였다. 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240분간 가수분해 후 가수분해물 1 mL을 취하여 2 mL의 0.3 M TCA용액이 들어 있는 시험관에 넣어 반응을 종결 시키고 이 혼합물을 실온에서 20분 동안 방치시킨 후 여과하였 다. 상정액 25 µL을 취하여 0.225 mL의 증류수, 1.25 mL의 0.5 N NaOH, 0.25 mL의 1 N Folin & Ciocalteu's phenol 시약과 함께 혼합하였다. 30°C에서 15분간 발색시킨 후 UV/visible spectropho tometer를 사용하여 578 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0.3 M TCA 가용성 펩타이드의 양은 L-tyrosine 표준곡선을 이용하여 정량하 였다.

가수분해도(Degree of hydrolysis, DH): 홍게 가공부산물의 가 수분해도(degree of hydrolysis, DH)는 Baek과 Cadwallader(15)의 방법에 따라 다음과 같이 정의하였다.

$$\frac{(D'_{at\ time\ t} - D_0)}{(D_{max} - D_0)} \times 100$$

(D₀: Flavourzyme을 첨가하지 않은 홍게 가공부산물의 0.3 M TCA 가용성 펩타이드의 양(대조구), D_{max}: 가수분해될 수 있는 홍 게 가공부산물의 0.3 M TCA 가용성 펩타이드의 최대량, D'_{at time t}: t시간 후에 Flavourzyme에 의해 가수분해된 홍게 가공부산물의 0.3 M TCA 가용성 펩타이드의 양)

홍게 가공부산물 단백질 가수분해 최적화

가수분해 최적화를 위한 요인변수: 홍게 가공부산물의 단백질 가수분해를 최적화하기 위하여 반응온도(T), 반응시간(t) 및 홍게 가공부산물에 대한 Flavourzyme의 양(E/S)을 요인변수로 선정하 였다. 기질농도는 교반이 가능한 홍게 가공부산물의 최대량으로 하였고, pH는 조절하지 않고 가수분해를 실시하였다.

반응표면분석법(response surface methodology, RSM): 홍게 가 공부산물의 단백질 가수분해 조건을 최적화하기 위하여 T, t 및 E/S를 독립변수(independent variable)로 하여 반응표면분석을 실 시하였다. T, t 및 E/S의 범위는 효소에 대한 자료 및 예비실험 결과를 기초로 하여 정하였다. 3개의 실험 요인변수에 5개의 수 준에 따라 부호화하여 값을 부여하고(Table 1) 이들을 중심합성 설계법(central composite design)을 이용하여 반응표면분석을 실시 하였다. 가수분해도(DH)를 종속변수(dependent variable)로 측정하 였고, 측정된 값들은 이차반응 모형식을 적용하여 다중회귀분석 에 의하여 분석하였다. 사용된 이차반응식은 다음과 같았다.

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i x_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=2}^3 b_{ij} x_i x_j \quad (i < j)$$

(b₀, b_i, b_{ii}, b_{ij}: 상수, x_i, x_j: 독립변수)

Table 1. Levels of independent variables expressed in coded and natural units for the enzymatic hydrolysis optimization of a snow crab processing by-product using Flavourzyme

Coded units	Independent variables		
	Temperature (°C)	Reaction time (hr)	E/S ¹⁾ (%)
-1.682	41.6	2.32	1.32
-1	45	3	2.0
0	50	4	3.0
+1	55	5	4.0
+1.682	58.4	5.68	4.68

¹⁾The ratio of Flavourzyme to substrate

SAS program(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 반응표면 회귀식을 구하였다. 또한 3차원 반응 표면 곡선은 부호화된 0 수준에서 두개의 독립변수간의 영향을 보기 위해서 작성하였다.

결과 및 고찰

홍게 가공부산물의 일반성분

홍게 가공부산물의 일반성분은 수분 89.4%, 조단백 6.1%, 조지방 1.8%, 당 1.6%, 회분 1.1%였으며 조단백의 경우 건조 중량 기준으로 환산하면 57.6%이었다. 키틴 추출 후 게 가공부산물은 단백질 29.2%, 지방 1.4%, 회분 40.6%이었으며(18), 향미제로 개발한 굴 자숙액은 수분 80.3%, 총질소 6.7%, 회분 8.5% 및 미량의 조지방을 함유하고 있었다(20). 본 실험의 결과로 볼 때 홍게 가공부산물의 단백질 함량은 다른 수산 가공부산물과 비슷한 수준으로 나타났다. 따라서 홍게 가공부산물은 단백질 함량이 높아 단백질 가수분해에 의해 향미제로 개발이 가능함을 확인할 수 있었다. 또한 홍게 가공부산물의 pH를 측정된 결과 7.0-7.2의 범위를 나타내었다. 홍게 가공부산물의 가수분해를 위하여 사용한 Flavourzyme의 최적 pH 범위가 5.0-7.0로서 환경 친화적인 조건을 고려해 pH를 조절하지 않고 홍게 가공부산물 자체의 pH 범위에서 가수분해를 실시하였다. 또한 Mohr법을 이용하여 홍게 가공부산물의 식염을 정량한 결과 7.4%의 식염을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 단백질 가수분해물을 이용하여 반응향 제조 시 식염은 반응향의 충만감과 맛의 조화에 영향을 주며 쓴맛과 이취를 감소시켜준다고 알려져 있다(25).

홍게 가공부산물의 효소적 가수분해

본 실험에 사용한 Flavourzyme의 역가를 2%의 casein 용액을 기질로 측정된 결과 33.2 unit로 나타났다. Flavourzyme은 *Aspergillus oryzae*에서 생산되는 endopeptidase와 exopeptidase의 특성을 가지는 단백질 가수분해효소로서, 단백질 가수분해물의 쓴맛을 최소화 하는데 유리한 효소로 알려져 있다. Adler-Nissen(26)은 exopeptidase로 단백질 가수분해 시 쓴맛을 나타내는 펩타이드의 생성을 최소화 한다고 하였다. Seo 등(27)에 의하면 Flavourzyme은 대두 단백질 가수분해 시 다른 단백질 효소에 비하여 가수분해물이 상대적으로 낮은 쓴맛을 나타낸다고 하였다. 또한 Imm 과 Lee(19)는 pH를 조절하지 않고 사용하였을 때 Flavourzyme과 같은 fungal protease로 가수분해 시 더 높은 가수분해도를 나타낸다고 하였다. 홍게 가공부산물을 기질로 Flavourzyme을 반응시켰을 때 단백질 가수분해도를 나타낸 효소반응곡선은 Fig. 1에 나타내었다. 반응 초기에는 반응속도가 빠르

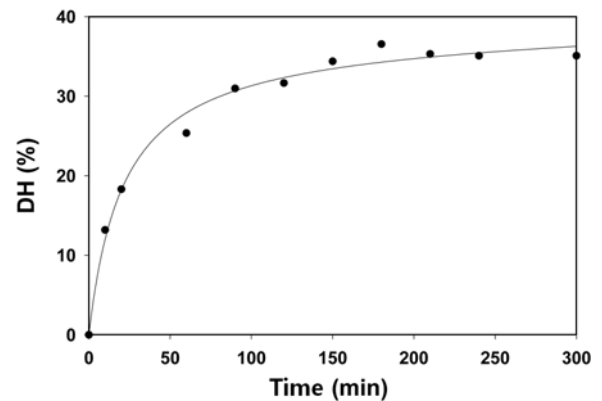


Fig. 1. Reaction progress curve for the enzymatic hydrolysis of a snow crab processing by-product by Flavourzyme.

다가 이 후에 느려져 평형에 도달하는 전형적인 단백질 효소 분해 양상을 보였다. 이러한 반응곡선은 Baek과 Cadwallader(15)의 가재 가공부산물의 효소적 가수분해, Archer 등(28)의 생선 단백질의 효소적 가수분해, Diniz와 Martin(29)의 상어(*Squalus acanthias*) 근육의 효소적 가수분해 및 O'Meara와 Munro(30)의 지방을 제거한 소고기의 효소적 가수분해에서 보고된 효소반응곡선과 유사하였다. Adler-Nissen(26)은 이런 형태의 효소반응곡선은 단백질과 가수분해에 의해 생성되는 펩타이드와의 기질경쟁에 의해 나타난다고 설명하였다. 또한 O'Meara와 Munro(30)는 반응 초기에는 잘 분해되는 펩타이드 결합이 빠르게 분해되고 반응 후반에는 잘 분해되지 않는 펩타이드 결합이 분해되기 때문에 이러한 형태의 효소반응곡선이 나타난다고 하였다. Flavourzyme으로 가수분해 시 초기에 반응 속도가 급격히 증가하여 90분에 30%의 가수분해도를 나타내다가 이후 서서히 증가하여 150분 이후에는 32-36%의 가수분해도를 나타내었다. Cho와 Ahn(31)에 의하면 Flavourzyme으로 가수분해 시 반응초기에는 가수분해도가 서서히 증가한다고 하였고, Seo 등(27)도 Flavourzyme으로 가수분해 시 다른 단백질 분해효소에 비해 상대적으로 느린 효소반응속도를 나타낸다고 보고하였다. 본 연구에서는 사용한 효소의 양이 3%로서 다른 연구에 비해 많은 양의 효소를 사용하여 초기에 높은 가수분해도를 나타냈다고 생각된다.

홍게 가공부산물 가수분해 조건 최적화

홍게 가공부산물의 효소적 가수분해를 최적화하기 위해 행한 반응표면분석법의 중심합성설계와 각 독립변수에 따른 각 부호화된 수준에서 얻은 종속변수인 가수분해도를 Table 2에 나타내었다. 또한 반응표면분석을 행하여 계산된 반응모형계수는 Table 3에 나타내었다. Table 3을 보면 종속변수에 대한 각각의 회귀계수는 반응시간(t , X_1), 홍게 가공부산물에 대한 Flavourzyme의 양(E/S , X_2)은 linear effect(at $p < 0.1$)를 보였으며, 반응온도(T , X_3)와 반응시간은 quadratic effect(at $p < 0.1$)를 갖는 것으로 나타났다. 가수분해도(Y)에 의해 계산된 회귀계수를 가지고 $p < 0.1$ 에서 효소반응을 가장 잘 설명하는 반응모형식은 다음과 같았다.

$$Y = 57.32 + 1.899X_2 + 1.175X_3 - 1.795X_1^2 - 1.049X_2^2$$

계산된 회귀계수 중 linear effect의 반응시간이 1.899로 가장 큰 값을 보였는데 이것은 독립변수 중 반응시간이 가수분해도에 가장 크게 영향을 미치며 반응시간이 증가할수록 가수분해도가 증가함을 나타낸다. 또한 홍게 가공부산물에 대한 Flavourzyme의

Table 2. Response of the dependent variables to the hydrolysis conditions for the enzymatic hydrolysis of a snow crab processing by-product using Flavourzyme

Design point	Independent variables			Dependent variables
	Temperature (°C)	Reaction time (hr)	E/S (%) ¹⁾	Degree of hydrolysis (%)
1	-1	-1	-1	53.1
2	+1	-1	-1	49.6
3	-1	+1	-1	55.2
4	+1	+1	-1	56.4
5	-1	-1	+1	51.0
6	+1	-1	+1	54.0
7	-1	+1	+1	54.0
8	+1	+1	+1	55.3
9	-1.682	0	0	52.0
10	+1.682	0	0	53.2
11	0	-1.682	0	51.0
12	0	+1.682	0	58.5
13	0	0	-1.682	51.1
14	0	0	+1.682	60.7
15	0	0	0	56.2
16	0	0	0	57.4
17	0	0	0	59.6
18	0	0	0	56.6
19	0	0	0	57.1
20	0	0	0	57.0

¹⁾The ratio of Flavourzyme to substrate

Table 3. Model coefficients¹⁾ estimated by multiple linear regression for the enzymatic hydrolysis of a snow crab processing by-product using Flavourzyme

Factor	Estimated values for regression coefficients
	Degree of hydrolysis (%)
Intercept	57.321***
Linear	
T	0.297
t	1.899**
E/S	1.175*
Quadratic	
T ²	-1.795*
t ²	-1.049*
(E/S) ²	-0.639
Interactions	
T×t	0.375
t×E/S	-0.580
T×E/S	0.838
R ²	0.770
F	3.711
Probability>F	0.027

¹⁾Model on which X₁=temperature (T), X₂=time (t), X₃=the ratio of Flavourzyme to substrate (E/S).

***Significant at 0.001 level

**Significant at 0.05 level

*Significant at 0.1 level

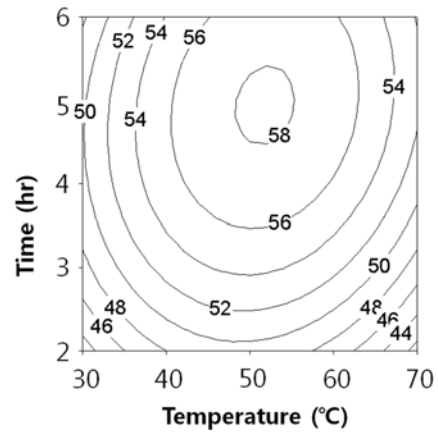


Fig. 2. Contour plot for the effect of temperature and reaction time on degree of hydrolysis (DH) at 3% Flavourzyme/substrate ratio (E/S).

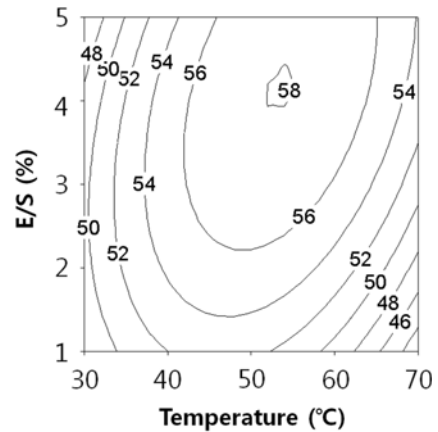


Fig. 3. Contour plot for the effect of temperature and Flavourzyme/substrate ratio (E/S) on degree of hydrolysis (DH) at 4 hr reaction time.

양도 가수분해도를 증가시켜주는 중요한 변수($b=1.175$)로 확인되었다. 이 식의 R²값은 0.77로 다소 낮게 나왔지만 전체 모형식이 어느 정도의 유의수준에서 적합한가를 보여주는 probability>F값은 0.027로 0.05의 유의수준에서 가정된 모형반응식이 적합하다고 말할 수 있다.

반응표면분석을 행하여 구한 반응계수를 가지고 두 개의 독립변수간의 상관관계를 보기 위하여 contour plot을 그렸다(Fig. 2-4). Counter plot은 두 개의 독립변수를 제외한 나머지 독립변수는 부호화된 수준을 0으로 나타내어 그렸다. Flavourzyme으로 가수분해 시 반응온도와 반응시간과의 관계는 Fig. 2에 나타내었다. 3%의 홍게 가공부산물에 대한 Flavourzyme의 양(E/S, coded level=0)에서 반응온도 50-52°C, 반응시간 4시간 40분-5시간에서 가장 높은 가수분해도를 나타내었다. Flavourzyme의 최적 반응온도는 50°C로 알려져 있으며 본 연구에서 나타난 온도범위와 일치하였다. 또한 반응시간도 최적 온도 범위에서 시간이 증가함에 따라 증가하였으나 5시간 이후 서서히 감소하였다. 반응온도와 홍게 가공부산물에 대한 Flavourzyme의 양과의 상관관계는 Fig. 3에 나타내었다. 4시간의 반응시간(coded level=0)에서 반응온도 52-53°C, 홍게 가공부산물에 대한 Flavourzyme의 양 3.8-4.2%의 부근에서 가장 높은 가수분해도를 나타내었다. 최적 반응 온도에서는 홍게 가공부산물에 대한 Flavourzyme의 양이 증가함에 따

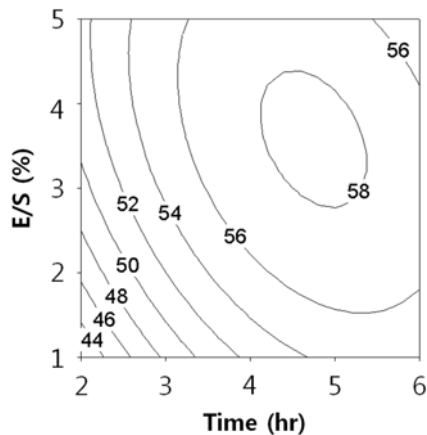


Fig. 4. Contour plot for the effect of reaction time and Flavourzyme/substrate ratio (E/S) on degree of hydrolysis (DH) at 50°C.

Table 4. Critical values and true values estimated by RSM

Factor	Critical value	True value
Temperature	0.3495	51.8
Reaction time	0.7431	4 hr 45 min
E/S (%)	0.8110	3.8
Stationary point (DH ¹⁾ value (%)		58.6

¹⁾Degree of hydrolysis

라 가수분해도도 증가하였으나 그 외의 온도 범위에서는 홍게 가공부산물에 대한 Flavourzyme의 양이 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그러나 최적 반응온도보다 온도가 높아지거나 낮아짐에 따라 가수분해도가 급격히 감소함을 나타내었는데 Flavourzyme으로 가수분해 시 가수분해도는 온도에 민감하게 변화하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 반응시간과 홍게 가공부산물에 대한 Flavourzyme의 양과의 상관관계는 Fig. 4에 나타내었다. 50°C에서 가수분해 시 반응시간 4시간 20분-5시간 10분, 홍게 가공부산물에 대한 Flavourzyme의 양 3.4%에서 가장 높은 가수분해도를 갖는 것을 보여주고 있다.

Table 4에서 보듯이 반응표면분석에 의해 나타난 홍게 가공부산물의 가수분해 최적조건은 온도 51.8°C, 반응시간 4시간 45분, 홍게 가공부산물에 대한 Flavourzyme의 양 3.8%로 나타났다.

홍게 가공부산물의 효소적 가수분해물은 특유의 감칠맛과 향을 가지고 있어 식품소재 및 향미소재로서 이용할 수 있을 뿐 아니라 많은 양의 아미노산과 펩타이드를 함유하고 있어 반응향의 전구물질로서 이용할 수 있을 것이다.

요 약

홍게 가공부산물을 고부가가치 식품소재로 이용하기 위하여 단백질 분해효소를 이용하여 가수분해하고 반응표면분석법으로 가수분해 조건을 최적화 하였다. 홍게 가공부산물을 단백질 분해 효소인 Flavourzyme으로 가수분해한 결과 효소반응곡선은 반응 초기 빠른 반응속도를 나타내다가 이 후에 느려지는 전형적인 형태를 나타내었다. 반응초기 90분까지 가수분해도는 30%까지 증가하다가, 이후 최종적으로 32-36%를 나타내었다. 최적화를 하기 위한 가수분해 요인변수로는 반응온도, 반응시간 및 홍게 가공부산물에 대한 Flavourzyme의 양을 선정하였고, 5개의 수준에서 부

호화하여 이들을 중심합성설계법을 이용하여 반응표면분석을 실시하였다. 홍게 가공부산물을 Flavourzyme을 이용하여 반응표면 분석법으로 가수분해 조건을 최적화한 결과, 온도 51.8°C, 반응시간 4시간 45분, 홍게 가공부산물에 대한 Flavourzyme의 양 3.8%로 나타났다. 홍게 가공부산물 효소분해물은 향미소재 및 반응향 제조의 전구물질로서 이용할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부에서 시행한 공업기반기술개발사업의 지원으로 수행한 연구결과와 일부로서 이에 감사드립니다.

문 헌

- Cooper JL. Research needs on environmental issues. Food Technol. 47: 22S-25S (1993)
- Pigott GM. Enzyme modifications of fishery by-products. pp. 447-452. In: Chemistry & Biochemistry of Marine Food Products. Martin RE, Flick GJ, Hebard CE, Ward DR. (eds). AVI Publishing Company, Westport, CT, USA (1982)
- IFT. Food research needs into the 21st century. Food Technol. 47: 6S-9S (1993)
- Shiau CY, Chai T. Characterization of oyster shucking liquid wastes and their utilization as oyster soup. J. Food Sci. 55: 374-378 (1990)
- Joh Y, Hood LF. Preparation and properties of dehydrated clam flavor from clam processing wash water. J. Food Sci. 44: 1612-1614, 1624 (1979)
- Reddy NR, Flick GJ. Composition, flavor extract, protease, and glucosidases of clam bellies collected from clam processing plant. J. Agr. Food Chem. 37: 341-345 (1989)
- Reddy NR, Flick GJ, Dupuy HP, Boardman GD. Characterization and utilization of dehydrated wash waters from clam processing plants as flavoring agents. J. Food Sci. 54: 55-59 (1989)
- Burnette JA, Flick GJ, Miles JR, Ory RL, St. Angelo AJ, Dupuy HP. Characterization and utilization of ocean quahog (*Arctica islandica*) clam juice as a liquid and dehydrated flavoring agent. J. Food Sci. 48: 353-359 (1983)
- DePaola A, Perkins BE, Harper KP, McPhearson RM. Recovery of protein and microorganisms from shrimp peeler effluent. J. Food Sci. 54: 1660, 1662 (1989)
- Ochi H. Production and applications of natural seafood extracts. Food Technol. 34: 51-53, 68 (1980)
- Jaswal AS. Amino acid hydrolysate from crab processing waste. J. Food Sci. 55: 379-380, 397 (1990)
- Lee E, Meyers SP, Godber JS. Minced meat crabcake from blue crab processing by-products: Development and sensory evaluation. J. Food Sci. 58: 99-103 (1993)
- Cha YJ, Cadwallader KR, Baek HH. Volatile flavor components in snow crab cooker effluent and effluent concentrate. J. Food Sci. 58: 525-530 (1993)
- Chung HY, Cadwallader KR. Volatile components in blue crab (*Callinectes sapidus*) meat and processing by-product. J. Agr. Food Chem. 58: 1203-1207, 1211 (1993)
- Baek HH, Cadwallader KR. Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products. J. Food Sci. 60: 929-935 (1995)
- Baek HH, Cadwallader KR. Optimization of the enzymatic hydrolysis of crab processing by-products using Flavourzyme. Food Sci. Biotechnol. 8: 43-46 (1999)
- Meyers SP, Chen HM, No HK, Lee KS. An integrated approach to recovery and utilization of Louisiana crawfish processing wastes. pp. 161-171. In: Making Profits out of Seafood Wastes, Proceeding of the International Conference on Fish By-products. Anchorage, AK, USA (1990)
- No HK, Lee MY. Isolation of chitin from crab shell waste. J. Korean Soc. Food Nutr. 24: 105-113 (1995)
- Imm JY, Lee CM. Production of seafood flavor from red hake (*Urophycis chuss*) by enzymatic hydrolysis. J. Agr. Food Chem.

- 47: 2360-2366 (1999)
20. Kim DS, Baek HH, Ahn CB, Byun DS, Jung KJ, Lee HG, Cadwallader KR, Kim HR. Development and characterization of a flavoring agent from oyster cooker effluent. *J. Agr. Food Chem.* 48: 4839-4843 (2000)
 21. Wu YF, Baek HH, Gerard PD, Cadwallader KR. Development of a meat-like process flavoring from soybean-based enzyme-hydrolyzed vegetable protein (E-HVP). *J. Food Sci.* 65: 1220-1227 (2000)
 22. Baek HH, Kim CJ, Ahn BH, Nam HS, Cadwallader KR. Aroma extract dilution analysis of a beeflike process flavor from extruded enzyme-hydrolyzed soybean protein. *J. Agr. Food Chem.* 49: 790-793 (2001)
 23. AOAC. Official Methods of Analysis. 16thed. Method 954.01, Method 963.15, Method 942.05. Association of Official Analytical Communities, Arlington, VA, USA (1996)
 24. Choi SY, Kim TB, Yoo JY, Lee IS, Chung KS, Koo YJ. Effect of temperature and salts concentration of kimchi manufacturing on storage. *Korean J. Food Sci. Technol.* 22: 707-710 (1990)
 25. Gillette M. Flavor effects of sodium chloride. *Food Technol.* 39: 47-52 (1985)
 26. Adler-Nissen J. *Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins*. Elsevier Science Publishing Co., New York, NY, USA. pp. 57-109 (1986)
 27. Seo WH, Lee HG, Baek HH. Evaluation of bitterness in enzymatic hydrolysates of soy protein isolate by taste dilution analysis. *J. Food Sci.* 73: S41-S46 (2008)
 28. Archer MC, Ragnarsson JO, Tannenbaum AR, Wang DIC. Enzymatic solubilization of an insoluble substrate, fish protein concentration: Process and kinetic considerations. *Biotechnol. Bioeng.* 15: 181-196 (1973)
 29. Diniz FM, Martin AM. Use of response methodology to describe the combined effects of pH, temperature, and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. *Int. J. Food Sci. Technol.* 31: 419-426 (1996)
 30. O'Meara GM, Munro PA. Selection of a proteolytic enzyme to solubilize lean beef tissue. *Enzyme Microb. Technol.* 6: 181-185 (1984)
 31. Cho HY, Ahn CB. Production and characteristics of protein hydrolysate from sharp toothed eel (*Muraenesox cinereus*). *J. Korean Fish. Soc.* 35: 97-104 (2002)