

RSM을 이용한 홍게 (*Chionoecetes japonicus*) 자숙부산물물의 최적 효소가수분해 조건

백정화·정은정·전선영·차용준*

창원대학교 식품영양학과

Optimal Conditions for Enzymatic Hydrolysate of Snow Crab *Chionoecetes japonicus* Cooker Effluent Using Response Surface Methodology

Jeong-Hwa Baek, Eun-Jeong Jeong, Seon-Young Jeon
and Yong-Jun Cha*

Department of Food and Nutrition, Changwon National University,
Changwon 641-773, Korea

This study was performed to determine the optimal hydrolysis conditions for the production of a flavoring from the precipitation of snow crab cooker effluent (PSCCE) with commercial proteases. Based on cost-per-enzyme activity and sensory evaluations, Flavourzyme[®] 500 MG plus Protamex[®] (1:1 ratio, w/w) were selected as suitable enzymes. Three independent variables consisting of the substrate concentration (S), enzyme-to-substrate ratio (E/S), and hydrolysis time (T) were examined using response surface methodology (RSM). A model equation obtained from RSM was used to predict the degree of hydrolysis (DH) as follows: % DH = 52.285 - 6.371[S] + 5.469[E/S] + 7.599[T] - 5.818[S]² - 5.633[E/S]² - 6.528[T]² - 3.265[E/S][S] - 5.415[T][S] + 4.315[T][E/S]. From the ridge analysis, the conditions favoring the highest degree of hydrolysis were pH 7.45, 55°C, a S of 21.82%, an E/S of 0.50%, and a T of 3.74 h.

Key words: Snow crab cooker effluent, Enzyme hydrolysis, Response surface methodology

서 론

홍게 (*Chionoecetes japonicus*)는 동해안 연안의 수심 200~2,000 m에 분포하고 털게, 꽃게, 왕게 등에 비하여 조직감이 부드러우면서 맛이 진하고 담백하다 (Cha et al., 2006). 붉은 대게로도 불리는 홍게는 우리나라 연안에서 가장 많이 어획되는 게로 대게와는 달리 혹서기인 7~8월을 제외하고는 연중 조업이 가능한 중요한 식품자원이라 할 수 있다. 또한 갑각의 조직이 유연해 근육의 분리가 용이하여 소비자들로부터 각광받고 있는 갑각류이다 (Kang et al., 2007). 이러한 홍게는 가공시 주로 자숙공정을 거쳐 게 살만을 채육하여 통조림으로 가공 후 소비자에게 판매되는 것이 보통이다. 이러한 가공 공정에서 발생하는 자숙액에는 유리아미노산, 유기산 및 ATP 관련 화합물이 풍부한 것으로 알려져 있으나 부가가치가 높은 가공방법이 현재까지 정립되어 있지 않다. 따라서 단순 농축하여 국내용으로 소비되거나 폐기되므로 해양오염의 원인이 되며, 또한 단순 농축한 응용상품의 경제성이 낮고 농축에 따른 에너지 비용부담도 큰 실정이다 (Ahn et al., 2006).

이에 본 연구에서는 가공부산물인 홍게 자숙액을 고부가가치성의 천연 향미제로 개발하기 위하여 자숙액으로부터 향미소재 전구물질을 물리화학적으로 회수하여 에너지 저감화를 시도하였고 단백질 가수분해 효소를 이용하여 반응표면분석

법 (Response surface methodology, RSM)으로 최적의 가수분해조건을 설정하였다.

재료 및 방법

재료

홍게 가공부산물물은 경북 영덕 소재 홍게 가공업체인 세웅수산(주)에서 2010년 6월경에 다리부와 몸통부의 자숙액을 제공받아 3시간 이내에 이동하여 동결고 (-20°C)에 저장하여 두고 실험에 사용하였다. 또한 홍게자숙액 침전물의 가수분해물을 제조하기 위해 사용한 상업용 단백질 가수분해효소인 Flavourzyme[®] 500 MG, Protamex[®] 및 Alcalase[®] 2.4 L FG은 Novozymes (Novozyymes, Denmark)의 제품으로, 바이오시스 (Biosis Co., Ltd., Korea)에서 제공받았다.

시료 전처리

등전점 침전을 이용하여 Fig. 1의 방법에 따라 홍게자숙액의 침전물을 회수하였다. 즉, 다리부 (pH 8.74)와 몸통부 (pH 8.90)의 자숙액을 동량 혼합하여 원심분리기 (A-F700BN, Tomoe Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 원심분리 한 후, 다음으로 6 N NaOH와 6 N HCl을 이용하여 pH를 10에서 3으로 차례대로 조절하여 생성된 침전물을 원심분리하여 얻었으며 냉동 (-20°C)상태로 보관하였다.

*Corresponding author: yjcha@changwon.ac.kr

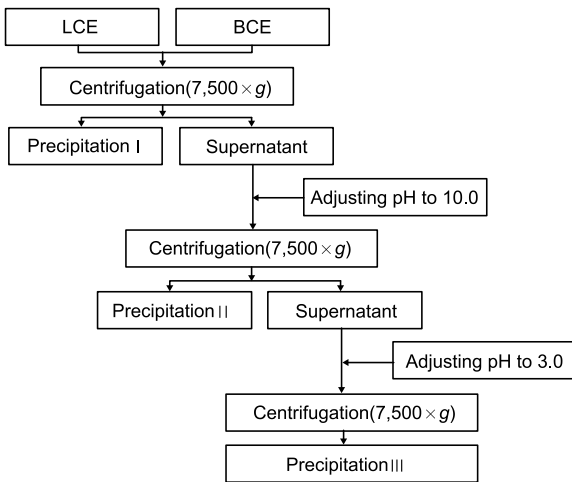


Fig. 1. Procedure for precipitation of snow crab cooker effluent (PSCCE). LCE, cooker effluent of leg part; BCE, cooker effluent of body part.

Table 1. Experimental design levels expressed in coded and natural units

Coded units	Independent variables		
	S (% w/w)	E/S ¹⁾ ratio (% w/w)	Time (hr)
-2	16	0.2	0.5
-1	23	0.3	1.5
0	30	0.4	2.5
1	37	0.5	3.5
2	44	0.6	4.5

¹⁾The ratio of Flavourzyme® 500 MG + Protamex® (1:1, w/w) to substrate.

가수분해물 제조 및 가수분해도 측정

냉동 (-20°C)보관하고 있던 홍게자숙액 침전물을 해동처리하여 수분함량이 80%가 되도록 조절하여 blender (Hanil Electric, Seoul, Korea)를 사용하여 분쇄하였다. 이를 이중 자켓으로 된 반응조 (200 mL, Wheaton Co., USA)에 넣고 물로서 총 용량을 80 g으로 하여 가수분해물 제조를 위한 기질로 사용하였다. 가수분해도 실험은 Boudrant and Chefel (1976)의 방법을 변형한 Cha and Kim (1995)의 방법에 따라 가수분해된 각 시료의 TCA 가용성 peptide를 1 N Folin & Ciocalteu's phenol 용액 (Sigma Co., St Louis MO, USA)으로 발색시킨 후 578 nm에서 UV/Visible spectrophotometer (Shimadzu, Tokyo, Japan)로 흡광도를 측정하였으며 대조구와의 차이를 표준곡선에서 tyrosine (µg/mL, 30°C)함량으로 환산하였다.

최적 효소 선정 실험

홍게자숙액 침전물의 가수분해를 위한 최적 효소를 선정하기 위해 Novozymes (Novozymes, Denmark)에서 제공하는 각 효소의 최적 조건에 따라 Flavourzyme® 500 MG (최적 pH 6.5~8.5, 최적온도 60°C), Protamex® (최적 pH 5.5~7.5, 최적온도 35~60°C), Alcalase® 2.4 L FG (최적 pH 7.5, 최적온도 60°C),

Flavourzyme® 500 MG와 Protamex®을 동량 혼합 (1:1, w/w)하여 사용하였다. 이때 사용한 기질은 홍게자숙액 침전물과 증류수를 동량 혼합 (1:1, w/w)한 것이었으며 E/S 비는 0.2%로 각각 1시간 간격으로 가수분해도를 측정하였다.

최적가수분해 조건 설정 및 통계분석

최적의 가수분해조건을 설정하기 위하여 기질의 농도 (S), 기질에 대한 효소 농도 (E/S), 가수분해 시간 (T)을 독립변수로 설정하였으며 실험영역으로는 Table 1과 같이 code화 (-2에서 +2)하였다. 이러한 독립변수들과 code를 이용하여 반응표면 실험계획을 중심합성계획에 따라 작성하였다. 즉 fractional 2³ factorial design (8개), star points (6개) 및 central points (5개)로 총 19개의 실험을 무작위로 수행하였으며 종속변수는 가수분해도 (DH, %)로 하였다. 모든 실험 결과는 SAS (Statistical Analysis System) program을 이용하여 통계분석하였으며 3차원 반응표면도를 SAS/GRAPH의 G3GRID와 G3D절차를 사용하여 zero level에서 두 독립변수간의 상관성을 검토하였다.

일반성분, 염도, pH 및 아미노질소

홍게 자숙액의 일반성분은 AOAC법 (AOAC, 1995)에 따라 수분은 상압가열건조법, 조단백은 semi-micro kjeldahl법, 조회분은 직접 회화법, 조지방은 soxhlet 추출법으로 분석하였다. pH는 pH meter (530-pH meter, Corning Pinnacle CO., Switzerland)를, 염도는 염도계 (TM-30D, Takernura Electric Works, Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였으며 아미노질소는 Formol법 (KSFSN. 2000)으로 분석하였다.

관능검사

홍게자숙액 침전물의 가수분해물을 창원대학교 식품영양학과에 재학중인 학부생 및 대학원생으로 구성된 12명의 패널에게 제공하여 맛과 냄새에 대한 순위를 1위부터 4위까지 매기는 선호도 검사를 실시하였다. 유의성 검증은 Basker (1988a, 1988b)에 의한 순위법 유의성 검정표를 이용하여 95% 수준에서 실시하였다.

결과 및 고찰

홍게자숙액 침전물의 수율 및 홍게자숙액의 이화학적 성분

홍게 다리 자숙액과 몸통 자숙액을 혼합해 원심분리하고 등전점 침전을 위해 pH를 10에서 3으로 조절해서 (Fig. 1) 원심분리하였다. 침전물 I의 수율은 0.21~0.36%, II 및 III에서는 각각 0.16%, 0.21~0.48%였고, 총 수율은 0.86% (w/w)였다.

홍게자숙액의 이화학적 성분은 Table 2와 같이 다리자숙액의 수분은 95.96%, 조단백질은 2.91%, 조회분 및 조지방은 각각 2.64%와 0.29%였고 pH는 8.74, 염도는 2.83%였으며 아미노질소는 69.94 mg%였다. 반면 몸통자숙액의 염도는 1.44%, 아미노질소는 125.92 mg%로서 원료에 따른 가염처리 조건에 따라 염도의 함량이 차이가 많았다. 수분을 제외하면 조단백과 조회분이 가장 큰 비중을 나타내는 것으로 나타났

다. Park et al. (2003) 및 Kang et al. (2007)이 보고한 동해산 붉은 대게의 식품조성과 자숙수의 일반성분에서도 조단백질, 조회분 순으로 함량이 많았다.

Table 2. Proximate composition, pH and Amino-N of snow crab cooker effluent

Samples ¹⁾	Proximate composition (%)					pH	Amino-N (mg%)
	Moisture	Crude protein	Crude ash	Crude lipid	Salinity		
LCE	95.96±0.02	2.91±0.06	2.64±0.02	0.29±0.06	2.83	8.74	69.94±1.37
BCE	95.98±0.03	2.52±0.06	1.38±0.02	<0.00	1.44	8.90	125.92±0.83

¹⁾LCE, cooker effluent of leg part; BCE, cooker effluent of body part.

²⁾Mean±S.D (n=3).

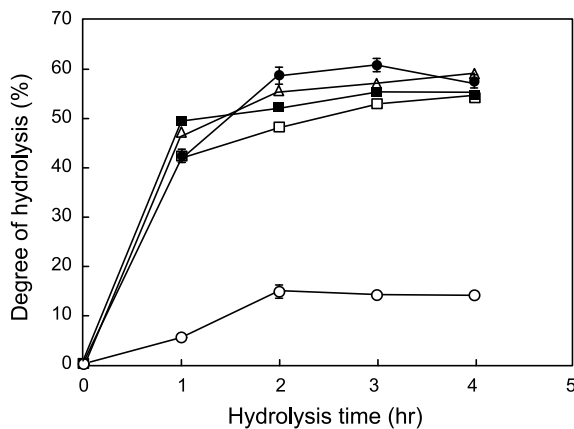


Fig. 2. Degree of hydrolysis of precipitation of snow crab cooker effluent (PSCCE) with commercial proteases. —○—, control; —●—, Alcalase[®] 2.4 L FG; —▲—, Flavourzyme[®] 500 MG+Protamex[®] (1:1, w/w); —■—, Protamex[®]; —□—, Flavourzyme[®] 500 MG;

가수분해 최적 효소 선정

홍게자숙액 침전물에 가수분해도가 높은 효소를 선정하기 위해 3종의 상업용 단백질분해효소를 이용하여 가수분해도를 측정하였다. Fig. 2와 같이 반응 3시간까지 모든 효소들의 가수분해도가 증가하였고 이후로는 일정수준이었다. 대조구인 홍게자숙액 침전물 자체의 자가소화효소에 의한 가수분해 효과는 5.29%에서 반응 2시간에는 14.64%까지 증가하였는데, Cha and Kim (1995)의 키조개 부산물에서 3%미만의 가수분해도를 보인 것에 비해서는 다소 높은 것으로 나타났다. 반응 3시간째의 가수분해도는 Alcalase[®] 2.4 L FG은 60.69%, Flavourzyme[®] 500 MG 와 Protamex[®] (1:1, w/w)의 혼합사용시 57.09%, Protamex[®]는 55.18%, Flavourzyme[®] 500 MG는 52.85% 순으로 나타났다. 이때의 가수분해도를 효소첨가량으로 나누어 효소활성값 (A)으로 나타내었으며 산업적으로 대량생산될 경우의 경제성을 고려하여 효소의 판매가격 (C)으로 효소활성값 (A)을 나눈 결과를 Table 3에 나타내었다. 가격대비 가수분해도가 가장 높은 Alcalase[®] 2.4 L FG이 경제성 측면에서 가장

우수한 것으로 나타났고 다음으로 Flavourzyme[®] 500 MG와 Protamex[®] (1:1, w/w), Protamex[®] 및 Flavourzyme[®] 500 MG 순이었다.

Table 3. Evaluation of commercial protease for hydrolysis of precipitation of snow crab cooker effluent (PSCCE) and sensory evaluation of hydrolysate

Enzymes ¹⁾	Activity (A) ²⁾	Cost (C) ³⁾	A/C	Sensory Evaluation	
				odor	taste
F	264.25	1.57	168.31	37	39 ^b
P	275.90	1.60	172.43	26	24 ^{ab}
F+P	285.45	1.56	182.98	32	21 ^a
A	300.45	1.00	300.45	25	36 ^{ab}

¹⁾F: Flavourzyme[®] 500 MG, P: Protamex[®], F+P: Flavourzyme[®] 500 MG + Protamex[®] (1:1, w/w), A: Alcalase[®] 2.4 L FG.

²⁾Degree of hydrolysis at 3 hrs/enzyme concentration.

³⁾Least expensive enzyme was given a value of 1.00.

^{a-b}Values in the same column with different superscripts are significantly different (n=12, P<0.05).

Table 4. Response of dependent variables to the hydrolysis conditions for Flavourzyme[®] 500 MG + Protamex[®] (1:1, w/w)

Design point	Independent variables			Dependent variables
	S (%)	E/S ratio (%)	Time (hr)	Degree of hydrolysis (%)
1	-1	-1	-1	46.82
2	1	-1	-1	41.61
3	-1	1	-1	48.59
4	1	1	-1	45.71
5	-1	-1	1	50.36
6	1	-1	1	45.33
7	-1	1	1	62.04
8	1	1	1	48.15
9	2	0	0	39.69
10	-2	0	0	51.67
11	0	2	0	51.71
12	0	-2	0	40.02
13	0	0	2	54.38
14	0	0	-2	35.56
15	0	0	0	50.61
16	0	0	0	51.07
17	0	0	0	52.94
18	0	0	0	53.64
19	0	0	0	51.59

그러나 식품에 첨가되는 향미제의 특성상 경제성뿐만 아니라 관능적으로 소비자를 충분히 만족시킬 수 있어야 하므로 가수물에 대한 관능검사를 실시하여, 각 가수분해물의 냄새와 맛을 순위합으로 나타내었다 (Table 3). 냄새에서의 시료

간의 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 맛에서는 Alcalase® 2.4 L FG의 가수분해물이 쓴 맛을 보여 낮은 순위를 나타내었다. 이는 Alcalase® 2.4 L FG이 단백질 소수성 부분의 절단에 관여하여 쓴맛을 나타내는 소수성 아미노산들이 다수 노출되었기 때문이라 사료된다 (Matoba and Hata, 1972). 또한 Adler-Nissen (1986)은 단백질 가수분해물의 쓴 맛은 동일한 기질이 사용될 경우 사용된 효소의 종류에 크게 좌우된다고 하였다. 따라서 향미제의 관능적인 우수함을 우선으로 생각하여 Alcalase® 2.4 L FG보다는 A/C값이 낮으나 맛 부문에서 우수한 결과를 나타낸 Flavourzyme® 500 MG와 Protamex®의 혼합사용을 최적의 효소로 선정하였다.

Table 5. Model coefficients estimated by multiple linear regression for the enzymatic hydrolysis of precipitation of snow crab cooker effluent

Factor	Estimated values for regression coefficients
Constant	52.285
Linear	
X ₁	-6.371*
X ₂	5.469*
X ₃	7.599*
Quadratic	
X ₁ ²	-5.818*
X ₂ ²	-5.633*
X ₃ ²	-6.528*
Crossproduct	
X ₂ × X ₁	-3.265
X ₃ × X ₁	-5.415
X ₃ × X ₂	4.315
R ²	0.9342
F	14.21
Probability>F	0.0003

¹⁾*P<0.05

Abbreviation: X₁=Substrate (% w/w), X₂=E/S ratio (% w/w), X₃=Hydrolysis time.

반응표면분석에 의한 최적 가수분해조건 설정

Table 1에서 디자인한 중심합성계획법에서 도출된 19개의 실험값을 통계처리하여 가수분해도로 나타내었으며 그 결과는 Table 4와 같다. 가수분해도는 35.56~62.04%의 범위로 측정되었으며, 그 결과 전체적인 모형이 유의성 (P<0.05)을 보였고 결정계수 (R²)는 0.9342로 나타났다 (Table 5). 반응모형 중 일차항 (linear)과 이차항 (quadratic)이 유의 (P<0.01, P<0.05)한 것으로 나타났으나 전체적인 모형에서 유의성을 나타내었기 때문에 교차곱을 포함한 전체 반응모형식은 DH (가수분해도, %) = 52.285-6.371[기질농도] + 5.469[E/S] + 7.599[가수분해시간] - 5.818[기질농도]² - 5.633[E/S]² - 6.528[가수분해시간]² - 3.265[E/S][기질농도] - 5.415[가수분해시간][기질농도] + 4.315[가수분해시간][E/S]였다.

반응표면분석에서 얻어진 반응계수를 통하여 독립변수 두 개간의 상관관계를 알아보기 위하여 나머지 변수를 zero level

로 두고 3차원 반응표면도 나타내었다 (Fig. 3~5). Fig. 3에서 나타난 E/S비와 가수분해시간과의 관계에서는 E/S비가 높아지고 가수분해시간이 길어질수록 높은 가수분해도를 나타내었다. 즉, 같은 가수분해도에 도달하는데 있어 E/S비가 낮으면 더 많은 가수분해시간을 요구하여 E/S비 0.4~0.6%에서는 가수분해시간이 3.0~4.5시간일 때 최대의 가수분해도가 나타났다.

Fig. 4의 기질 농도와 E/S비의 관계에서는 기질 농도가 낮고 E/S비가 높아질수록 가수분해도가 증가하는 것으로 나타났다. 예측된 반응표면에서는 E/S비가 0.4~0.6%이고 기질농도가 10~20%일 때 53.9% 이상의 가수분해도를 나타내었다.

Fig. 5의 기질 농도와 시간과의 관계에서는 기질 농도가 낮으면서 가수분해시간이 길수록 가수분해도가 높아져 3.0~4.5시간 사이에서 기질농도가 10~20% 일 때 55.7% 이상의 가수분해도를 나타내었다.

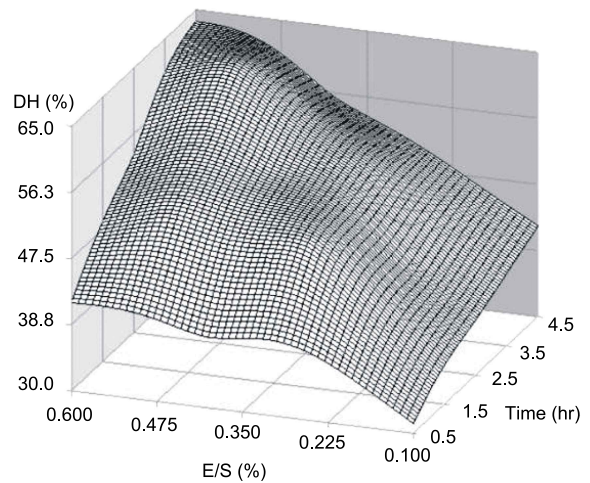


Fig. 3. Response surface plot for the effect of E/S ratio and time on the hydrolysis of precipitation of snow crab cooker effluent (PSCCE).

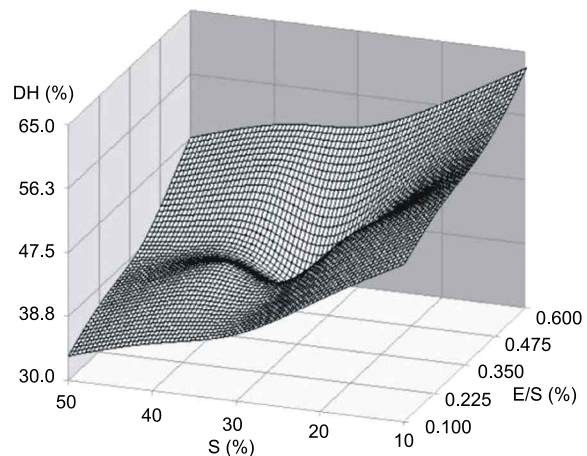


Fig. 4. Response surface plot for the effect of substrate (S) and E/S ratio on the hydrolysis of precipitation of snow crab cooker effluent (PSCCE).

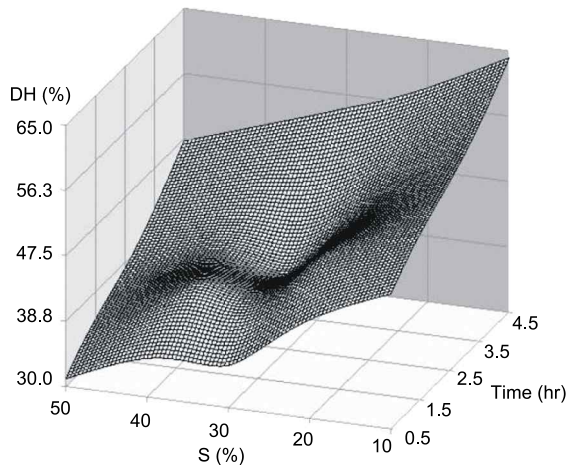


Fig. 5. Response surface plot for the effect of substrate (S) and time on the hydrolysis of precipitation of snow crab cooker effluent (PSCCE).

한편 위의 반응모형식을 정준형식으로 변환하면 $\hat{y}=71.388-1.658\omega_1^2-7.280\omega_2^2-9.042\omega_3^2$ 로 세 고유값 (eigenvalues)들의 부호가 모두 음수로 나타났으므로 정상점은 최대점이며 가수분해도는 가수분해시간, E/S비, 기질의 농도 순으로 민감하게 영향을 받는 것으로 나타났다. 이러한 결과로부터 최대의 가수분해도를 얻기 위한 조건은 기질 농도 15.96%, E/S비 0.58%, 가수분해시간은 4.52시간으로 나타났다.

그러나 산업적으로 적용하기에는 기질의 농도를 낮추기 위해 첨가하는 용수가 많고 가수분해시간은 장시간이기 때문에 경제성이 떨어진다고 판단되어 반경 0.0~1.0에서 능선분석 (ridge analysis)을 수행하였다. 그 결과 반경 1.0의 점에서 61.90%의 가수분해도가 예측되었고 실제 이 조건으로 실험한 실측치는 58.77%로 나타났으며, 이는 standard error를 고려했을 때 유사한 범위 수준이었다. 본 실험에서는 이점을 최대 가수분해도를 나타내는 점으로 설정하였으며, 이때 조건은 반응온도 55°C, pH 7.45에서, 기질농도 21.82%, E/S비 0.50%, 가수분해시간 3.74시간이었다.

사 사

본 연구는 2010년 한국연구재단 일반연구자 지원사업 (2010-0010900)의 지원을 받아 수행된 연구의 일부이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

Adler-Nissen J. 1986. Methods in food protein hydrolysis In: Enzymic hydrolysis of food proteins. Elsevier applied science publishers. Barking, Essex, U.K., 110-131.

- Ahn JS, Kim H, Cho WJ, Jeong EJ, Lee HY and Cha YJ. 2006. Characteristics of concentrated red snow crab *Chionoecetes japonicus* cooker effluent for making a natural crab-like flavorant. J Kor Fish Soc 39, 431-436.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C., U.S.A., 69-74.
- Basker, D. 1988 a. Critical values of differences among rank sums for multiple comparisons. Food Technol 42, 79-84.
- Basker, D. 1988 b. Critical values of differences among rank sums for multiple comparisons by small taste panels. Food Technol 42, 88-89.
- Boudrant, J. and Cheftel, C. 1976. Continuous proteolysis with a stabilized protease. II. Continuous experiments. Biotechnol Bioeng. 18, 1735-1749.
- Cha YJ and Kim EJ. 1995. Response surface methodology in development of oyster hydrolysate. J Korean Soc Food Nutr 24, 427-433.
- Cha YJ, Cho WJ and Jeong EJ. 2006. Characteristics of taste compounds of red snow crab cooker effluent and hepatopancreas for developing a crab-like flavorant. Korean J Food & Nutr 19, 466-472.
- Kang KT, Heo MS and Kim JS. 2007. Improvement on the quality and functionality of red tanner crab cooking drip using commercial enzymes. J Korean Soc Food Sci Nutr 36, 1022-1030.
- KSFSN. 2000. Food Science Part. In: Handbook of experiments in food science and nutrition. The Korean Society of Food Science and Nutrition ed. Hyoil Press, Seoul, Korea, 198-200.
- Matoba T and Hata T. 1972. Relationship between bitterness of peptides and their chemical structure. Agric Biol Chem 36, 1423- 1431.
- Park JH, Min JG, Kim TJ and Kim JH. 2003. Comparison of food components between red-tanner crab, *Chionoecetes japonicus* and Neodo-Daege, a new species of *Chionoecetes* sp. caught in the east sea of Korea. J Korea Fish Soc 36, 62-64.

2011년 2월 7일 접수

2011년 2월 24일 수정

2011년 4월 1일 수리