

## 다구찌 기법을 이용한 멸치 고압효소가수분해 공정의 최적화

인예원 · 윤호선 · 이유진 · 이미연<sup>1</sup> · 조형용\*

차의과학대학교 식품생명공학과, <sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원

### Optimization of a Process for the Pressure-Assisted Enzymatic Hydrolysis of Anchovy Using Taguchi Method

Ye-Won In, Hyo-Seon Yun, You Jin Lee, Mi-Yeon Lee<sup>1</sup>, and Hyung-Yong Cho\*

Department of Food Science and Biotechnology, CHA University

<sup>1</sup>National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration

#### Abstracts

A Taguchi robust design method with an L<sub>9</sub> orthogonal array and larger-the-better characteristics was implemented to optimize experimental conditions for the hydrolysis of raw anchovy using a pressure-assisted enzymatic reaction method. The degree of hydrolysis (DH), nitrogen recovery (NR) and yield were considered as the response parameters. Pressure, reaction temperature, reaction time, and mixed enzyme amount were chosen as control parameters. As a result of the Taguchi analysis in this study, the pressure was found to be the most influential parameter on DH and NR. The amount of mixed enzyme in the reaction also had a significant effect on DH and NR. Meanwhile, the optimum values were confirmed to be similar at 95% confidence and 5% significance level through analysis of variance (ANOVA). Furthermore, new hydrolysates at optimum conditions and control hydrolysates at atmospheric pressure were compared in terms of the DH, resulting in the improvement of DH by more than 52.6%.

**Key words:** Taguchi Robust Design, optimization, pressure-assisted, enzymatic hydrolysis, raw anchovy

#### 서 론

최근 수산업계에서는 자원 고갈, 환경 규제 및 자유무역 협정에 따른 시장 개방으로 수산가공 부산물 또는 미이용 자원에 가치를 부여하는 기술개발에 많은 노력(Kim & Mendis, 2006)을 기울이고 있다. 예로서, 어류단백질 가수분해물(FPH, fish protein hydrolysate)과 펩타이드류 그리고 수산자원으로부터 분리·정제한 활성성분들의 일부는 이미 건강지향 식품의 원료 또는 풍미 증진제로 사용되고 있다(Thorkelsson & Kristinsson, 2009; Chalamaiiah et al., 2012). Thorkelsson et al. (2008)은 FPH 생산에 필요한 원료, 가공방법 및 건강에 미치는 영향 등에 대한 문헌조사에서 관련 제품이 시장에 진입하기 위해서는 경제성 있는 가공공정개발, 소비자 기호에 적합한 품질을 갖는 제품의 개발 및 안전성 등 해결하여야 할 과제가 많다고 보고하였다.

수산 자원으로부터 단백질 가수분해물과 펩타이드를 이용하는 제품 중 가장 오래된 것은 어간장이다. 이러한 어간장은 다양한 요리에 풍미를 증진시키는 조미소재로 사용되고 있으며, Schindler et al. (2011)과 Yun et al. (2015)은 짠맛증진물질로서의 가능성을 제시하였다. Lopetcharat et al. (2001)은 어간장 제조 방법에 대한 문헌조사에서 고염 처리에 의한 건강상 유해와 장기 발효에 따른 효율성을 문제로 제시하고, 식염 농도를 낮추고 제조기간을 단축하기 위한 방법으로서 단백질 가수분해 효소를 이용한 속성 제조를 가장 많이 사용하고 있다고 보고하였다. 그러나 단백질 가수분해 효소를 이용한 속성 발효의 가장 큰 문제는 쓴맛에 있으며, 이를 해결하기 위한 방법으로 Nilsang et al. (2005)은 exo-peptidase 또는 exo-와 endo-peptidase를 혼합하여 활용하는 방안을 제시하였다. 어류 단백질을 속성으로 가수분해하는 기술로서 Okazaki et al. (2003)은 식염을 첨가하지 않고 60 MPa의 고압 하에서 50°C, 48 시간 동안 생멸치를 자가소화시켜 어간장과 매우 유사한 분해물을 얻을 수 있다고 하였다.

최근 식품산업에서는 고압을 활용하는 기술에 많은 관심(Hendrickx et al., 1998; Knorr et al., 2006; Rivalain et al., 2010)을 기울이고 있으며, 50내지 200 MPa 범위에서의 효

\*Corresponding author: Hyung-Yong Cho, Department of Food Science and Biotechnology, College of Life Science, CHA University, Seongnam, 13488, Korea  
Tel: +82-31-881-7125; Fax: +82-31-881-7219  
E-mail: [hychos5710@hanmail.net](mailto:hychos5710@hanmail.net)  
Received August 28, 2016; revised September 9, 2016; accepted September 19, 2016

소 반응에 주목하고 있다. 200 MPa 이하에서는 효소반응의 평형상수와 반응속도상수에 영향을 미쳐 효소활성이 증가한다고 하였다(Ohmae et al., 2007). 또한 Akasaka et al. (2008)은 기질로서 ubiquitin을 효소로서  $\alpha$ -chymotrypsin이 반응하는 효소반응의 경우에 수 kbar 영역에서의 압력은 단백질 가수분해반응을 촉진한다고 하였다. 그 근거로 기질인 ubiquitin이 압력에 의해서 folded conformer에서 unfolded conformer로 변하기 때문이라 하였다. 이와 같이 단백질 가수분해반응을 압력에 의해서 가속화하기 위해서는 반응시스템(기질, 온도 및 pH 등), 압력 조건 및 효소의 선정이 매우 중요하다. 이와 같은 고압과 효소반응을 연계한 연구는 실험실 규모에서 주로 이루어졌으며 산업적 적용 사례는 매우 제한적이다.

Kwon & Jang (2013)은 다구찌 기법을 제품개발과 공정 개선에 효과적으로 활용될 수 있는 방법론으로 수학과 통계를 혼합한 기술로서 복잡한 공정을 최적화하기 위해서는 매우 적합한 도구로서 이론적인 측면보다는 산업현장에서 사용되는 문제해결의 강력한 도구라 하였으며, 최근에는 생물공학 응용의 통계적 수단으로도 이용되고 있다(Rao et al., 2008). 비교적 실험 횟수가 적게 요구되고 통계적 변동에 따른 일부 영향을 제거하여 최적조건에서 가장 변동성이 적은 실험조건을 결정할 수 있으며, ANOVA (analysis of variance)를 이용하여 실험 데이터를 통계적으로 분석할 수 있다. Aggarwal et al. (2008)은 다구찌 기법과 RSM (Response Surface Methodology)은 거의 유사한 결과를 나타내지만 실험에 요구되는 시간이 RSM의 경우에 거의 2배에 이른다고 보고하였다. Benyounis & Olabi (2008)는 RSM과 ANNs (Artificial Neural Networks)와 비교하여 다구찌 기법이 제품의 품질과 신뢰성을 개선하는데 있어서 가장 강력한 최적화 기술이라고 보고하였다.

따라서, 본 연구에서는 경제성을 고려한 멸치 고압효소가수분해물의 산업화 생산 공정을 개발하기 위한 기초연구로서 다구찌 기법의 망대특성과  $L_9(3^4)$  직교배열표를 사용한 실험계획으로 전 보(In et al., 2016)에서 선정된 혼합효소와 고압을 활용하는 멸치 가수분해공정에서 최적 운전조건을 결정하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 연구에서 사용한 생멸치, *Engralis japonica* (체장  $7.2 \pm 0.5$  cm, 체중  $2.7 \pm 0.4$  g)는 2013년 3월에 제주도 해역에서 어획한 것을 동해수산(Busan, Korea)에서 구입, 빙냉 운반하여 일정량씩 polyethylene film bag에 넣은 다음 냉동고(-20°C, FC-1353 HMS, LG Electronics Inc., Seoul, Korea)에 저장하여 두고 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 복합효소는 대명상사(Seoul, Korea)로부터 구입한 상업

용 효소로 Novozymes (Bagsvard, Denmark)의 Alcalase® 2.4 L와 Flavourzyme™를 1 : 5의 비율로 혼합하여 사용하였다. 멸치 고압효소가수분해물과 품질 특성 비교를 위하여 시판되고 있는 멸치액젓과 멸치어간장을 부친 시내 대형 마트 및 인터넷 쇼핑몰에서 각각 구입하여 -20°C 이하의 냉동고에서 보관하면서 분석용 시료로 사용하였으며, 실험에 사용된 분석용 시약은 모두 분석 시약급을 사용하였다.

### 다구찌 강건 설계

다구찌 방법은 직교배열표를 이용한 실험계획법으로 유일한 해를 찾으려는 것보다는 품질과 비용의 최적해를 구하려는 의도에서 출발한 것으로, 제품 및 공정 설계에서 가장 저렴한 비용으로 안정적이고 신뢰성이 높은 성능을 나타내는 인자의 조합을 찾는 데 이용되며, 실험할 때 실제 사용하는 조건과 똑같이 잡음조건을 바꾸어 가면서 실험하여 최적 조건을 찾는 데, 이 점이 기존의 실험 계획법과 커다란 차이점이다(Taguchi, 1986). 품질 특성의 목표 값을 유지하면서, 분산을 줄이는 인자에 대해 설정 값을 추출할 수 있다. 따라서 다구찌 방법은 제어 가능하고 영향력이 강한 인자를 찾아내어 이 인자들의 영향력을 최대로 하고 제어할 수 없는 잡음의 영향력을 최소로 하는 강건 설계(robust design)를 할 수 있다.

다구찌 방법에서 개선을 위한 정도를 나타내는 측정치로 SN 비(ratio of signal to noise)를 사용한다. SN 비는 잡음에 대한 제어 인자의 비를 나타내며 식 (1)과 같이 정의된다(Taguchi, 1986).

$$\begin{aligned} SN비 &= \frac{\text{신호가 산출물에 전달한 힘}}{\text{잡음이 산출물에 전달한 힘}} \\ &= \frac{\text{모평균 제품의 추정값}}{\text{분산의 추정값}} \end{aligned} \quad (1)$$

본 연구에서 사용한 품질 특성은 크면 클수록 좋기 때문에 망대특성(larger-the-better characteristics)을 이용했다. 망대 특성을 갖는 SN 비는 식 (2)와 같다(Taguchi, 1986).

$$\text{망대 특성 SN 비} = -10 \log_{10} \left[ \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right] \quad (2)$$

다구찌 방법에서 제어인자(control factor)는 최적 설계 조건 또는 최적 공정조건을 찾기 위하여 사용되는 인자로서 온도, 압력 등과 같이 가장 영향이 큰 모수 인자로 분산을 줄이기 위해 비용을 크게 상승시키지 않고 품질 개선을 할 수 있는 인자다.

제어인자가 설정되면 다음엔 수준을 결정하고, 특성치에 영향을 주고 있으나 그 요인의 상태를 파악할 수 없으며, 이유는 알 수 없으나 품질 분산에 나쁜 영향을 주는 인자

로서 잡음인자(noise factor)를 선정하여 직교배열표에 의한 실험 설계를 한다.

직교배열표 선정은 제어인자의 수, 제어인자의 수준 수, 교호작용의 존재 여부를 고려하여, 내측배열은 제어인자와 각 수준을 보여주고 있고, 외측배열은 신호인자, 잡음인자 등의 조합으로 전체 실험의 반복수를 나타낸다. 동특성에서는 신호인자와 잡음인자를 같이 고려하고, 정특성에서는 신호인자를 고려하지 않는다.

본 연구에서는 정특성 실험을 수행하였고 생멸치의 고압효소가수분해 공정의 성능을 결정하는 가장 중요한 특성으로 가수분해도(DH, %)와 nitrogen recovery (NR, %) 및 수율(%)을 각각 사용하였다. 이것에 영향을 주는 제어 인자는 전 보(In et al., 2016)에서의 결과와 예비 실험을 통하여 압력, 온도, 반응시간, 및 복합효소농도를 선택하였으며, 각 제어 인자에 대한 수준은 3으로 하여 압력은 50, 75 및 100 MPa, 온도는 40, 50 및 60°C, 반응시간은 12, 24 및 48 h, 그리고 복합효소농도 0, 1 및 2%로 설정하여 Table 1의 내측배열에 나타내었다.

이 때, 직교배열, 자료분석 및 분산분석(ANOVA)은 다구찌 기법에 기초한 MINITAB 16 software (Minitab, Inc., State College PA, PA, USA)를 사용하였다.

### 생멸치 효소가수분해물의 제조

생멸치 효소가수분해물은 전 보(In et al., 2016)에서의 같은 방법으로 제어 인자의 수준만 변경하여 제조하였다. 생멸치 효소가수분해물은 원료 멸치와 물을 1:2 (w/w)의 비율로 혼합하여 믹서기(HMF-3100S, Hanil, Seoul, Korea)로 2분씩 세 번 분쇄한 후에 homogenizer (T25, IKA, Staufen, Germany)로 16,000 rpm에서 5분씩 3번 균질화하였다. 균질화된 멸치 분쇄물에 Alcalase® 2.4 L: Flavourzyme™를 1:5 비율로 혼합한 효소를 원료 멸치 대비 0-2% (w/w) 첨가하고 폴리에틸렌필름 포장지에 담아 완전밀봉한 후에 고압조건(50-100 MPa)에서 일정시간 효소와 반응시켰다. 고압에서의 반응 후, 90-100°C에서 10-15분 동안 불활성하고 4°C에서 12시간 이상 숙성하여 지방층을 제거한 후에 여과하여 -20°C 냉동고에서 보관하면서 분석용 시료로 사용하였다.

### 품질 특성 분석

생멸치, 시판 멸치어간장과 멸치액젓, 대조구 시료 및 고압효소가수분해물의 일반성분은 식품공전(KFIA, 2009)에 따라 수분은 상압건조법으로, 회분은 건식회화법으로, 조단백질은 micro-kjeldahl 분해법으로, 조지방은 soxhlet법으로 정량하였다. 원료 생멸치의 일반성분은 탄수화물 3.41±0.27%, 조단백질 15.72±0.43%, 조지방 1.85±0.19%, 조회분 3.99±0.18% 및 수분 75.03±0.92%이었다.

염도는 salt meter (Master-S28M, Atago, Tokyo, Japan)를

수용성 고형분 함량(°Brix)은 master refractometer (Master-3M, Atago, Tokyo, Japan)를 pH는 pH meter (Orion 4-star Plus, Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 사용하여 측정하였다. 아미노태 질소 함량은 Formol 질소 정량법(KFIA, 2009; AOAC, 2000)과 TNBS법(Rutherford, 2010)으로 측정하였고, 수용성단백질은 TP0300-1Kit (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 Lowry protein assay법을 통하여 측정하였다(Lowry et al., 1951). 가수분해도(Degree of hydrolysis, DH)는 식 (3)에 의해서 산출하였다.

$$\text{가수분해도(DH, \%)} = \frac{h_{\text{amino}} - h_0}{h_{\text{total}}} \times 100 \quad (3)$$

여기서  $h_{\text{amino}}$ 는 효소가수분해물,  $h_0$ 는 가수분해 전 시료에서의 아미노태 질소 함량이고  $h_{\text{total}}$ 은 가수분해 전 시료에서의 총 질소 함량이다. 수율(yield)은 식 (4)에 따라 산출하였다.

$$\text{수율(Yield, \%)} = \frac{h_{\text{hydrolysate}} - h_0}{h_{\text{total}}} \times 100 \quad (4)$$

여기서  $h_{\text{hydrolysate}}$ 는 고압효소가수분해물에서 측정된 총 질소 함량이고  $h_0$ 는 가수분해 전 시료에서의 총 질소 함량이다. 유리아미노산 정량은 HPLC (Hewlett Agilent 1100-series, Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 사용된 컬럼은 C18 column (4.6 mm×150 mm, 5 μm/Youngjinbiochrom, Korea)이었으며, 이동상은 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.8)와 45%(v/v) acetonitrile/45%(v/v) methanol 용액이 사용되었다. 시료는 *o*-phthalaldehyde (OPA)와 반응한 경우 형광검출기(450 nm emission, 305 nm excitation)로, 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC)와 반응시킨 경우 UV 검출기(338 nm)로 분석하였다. Nitrogen recovery (NR)는 Benkajul & Morrissey (1997)을 방법을 변형하여 식(5)에 의해서 산출하였다.

$$\text{Nitrogen recovery (NR, \%)} = \frac{\text{FA}}{\text{TA}} \times 100 \quad (5)$$

여기서 TA (total amino acid contents) 및 FA (free amino acid contents)는 각각 가수분해물에서의 총 아미노산 및 유리 아미노산 함량이다.

## 결과 및 고찰

### 다구찌 실험 설계 및 가수분해물 품질특성

교호작용이 없다는 전제하에 4개의 제어인자에 대한 3 수준계 표준형 직교배열표  $L_9(3^4)$ 를 Table 1의 내측배열과 같이 설계하여 각 조건에서 고압효소가수분해물을 3회 반복 제조하여 품질특성을 측정하고 목적변수로서 DH, NR

및 수율을 산출하였다.

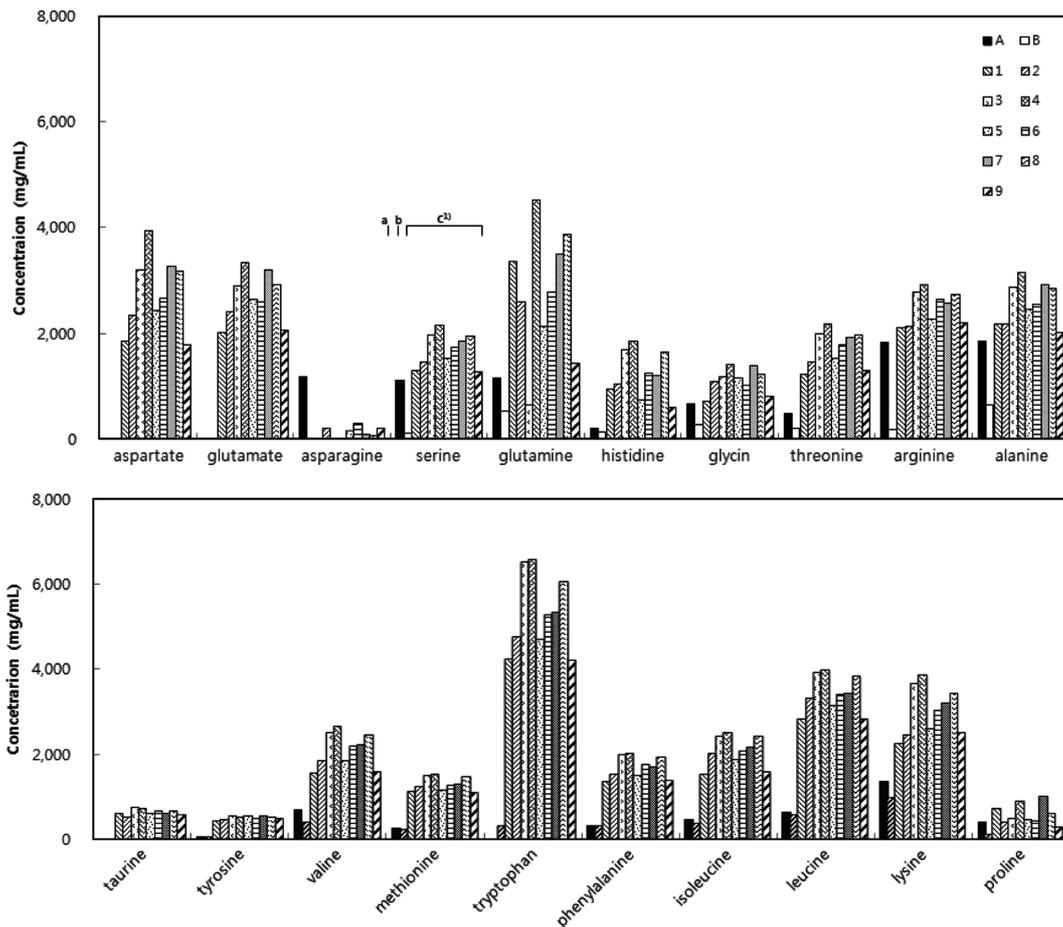
먼저, 고압효소가수분해물에 대한 품질특성으로 측정된 평균 일반성분(조단백질 4.53±0.42%, 조지방 0.04±0.04%, 조회분 0.28±0.12% 및 수분 94.43±0.84%), pH (평균 6.41±0.41), 염도(평균 0.39±0.28)는 실험군별 95% 신뢰수준에

서 유의적인 차이를 보이지 않았으나 수용성 고형분 함량을 나타내는 °Brix는 최소 4.47±0.12에서 최대 8.00±0.01으로 실험군별 유의적인 차이를 나타내었다. 이러한 사실은 각 제어조건에 따라 가수분해 정도가 다르기 때문으로, Nilsang et al. (2005)이 fish soluble concentrate의 상업적

**Table 1. Experimental results and SN ratio according to orthogonal array with control factors and levels**

No.	Inner array				DH (%)				SN1	NR (%)				SN2	Yields (%)			
	Pressure (MPa)	Temp. (°C)	Time (h)	Enzyme <sup>1)</sup> (%)	R1	R2	R3	R1		R2	R3	R1	R2		R3	SN3		
1	50	40	12	0	13.99	15.23	13.56	23.05	40.30	40.68	39.30	32.06	86.30	44.77	62.39	35.28		
2	50	50	24	1	18.25	19.89	20.01	25.73	58.15	60.03	59.67	35.46	74.15	58.40	63.35	36.17		
3	50	60	48	2	18.33	18.23	18.96	25.34	53.20	52.60	51.80	34.41	67.76	58.66	66.23	36.10		
4	75	40	24	2	25.40	23.10	23.96	27.64	70.12	68.15	69.30	36.80	70.91	81.28	78.23	37.66		
5	75	50	48	0	20.12	19.38	21.85	26.18	61.35	65.55	58.14	35.77	50.34	64.38	65.26	35.37		
6	75	60	12	1	28.32	27.32	29.63	29.06	80.23	81.01	81.96	38.18	71.94	90.62	72.45	37.73		
7	100	40	48	1	24.99	26.35	25.36	28.15	76.70	76.08	79.05	37.76	47.99	79.97	62.56	35.50		
8	100	50	12	2	27.82	25.68	25.36	28.37	78.85	76.08	77.04	37.76	98.62	88.99	78.23	38.83		
9	100	60	24	0	21.02	20.05	21.52	26.38	62.59	64.56	60.15	35.90	75.58	67.26	68.23	36.91		

<sup>1)</sup>Mixed enzyme (Alcalase® 2.4 L:Flavourzyme™ = 1:5).



**Fig. 1. Profiles of free amino acids of pressure-assisted enzymatic hydrolysates of raw anchovy and two commercially available anchovy sauce.** \*A: Changnyeong fish sauce, B: Myeolchi aekjeot (fermented anchovy sauce), 1-9: Experimental no. in Table 1, <sup>a-c</sup>: Means with different superscripts above the bars are significantly different. <sup>c\*</sup>: Significantly different in groups (experiment no.).

효소에 의한 가수분해를 최적화하는 경우에 온도, 반응시간 및 효소농도를 조절변수로 설정하여 보고한 결과와 유사한 경향을 보였다. 즉, 제어인자 설정 근거가 타당함을 확인할 수 있었다.

제어조건에 따른 9개 실험군과 액젓(시료 B) 및 어간장(시료 A)에 대한 개별 유리 아미노산 및 총 유리 아미노산 함량에 대한 95% 신뢰수준에서 유의검정을 실시한 결과, 총 유리 아미노산 함량 및 유리 아미노산별로 각 9개 실험군과 액젓(시료 B) 및 어간장(시료 A)에서 유의적인 차이를 확인하고 Fig. 1에 대표적으로 세린의 경우만 나타내었다. 총 유리 아미노산은 9개 실험군에서 모두 액젓 및 어간장보다 유의적으로 많이 생성되어 효소 및 고압처리가 전통적인 액젓 및 어간장 생산 공정을 개선할 수 있음을 확인할 수 있었다. 특히, 풍미 또는 짠맛증진성분으로 알려진(Schindler et al., 2011; Yun et al., 2015) glutamine, arginine, glycine 등과 lysine 및 tryptophan이 시판 멸치 어간장 및 액젓보다 풍부하게 생성되었다. 이러한 결과는 Yun et al. (2015)이 어간장 생산 공정을 개선하여 짠맛증진물질 생산 가능성을 제시한 보고와 일치하는 결과이다.

다구찌 설계 분석 및 확인시험

Table 1의 우측에는 실험설계에 따라 순차적으로 실험을

실시하여 산출된 목적변수의 값과 통계분석용 소프트웨어 Minitab의 실험계획법-다구찌 설계(Taguchi, 1986)를 이용하여 산출된 망대 특성 SN비를 보여주고 있다. 여기서 외측배열의 R1, R2 및 R3는 실험상 잡음인자(예, 원료 성분 등)에 대한 수준을 제어할 수 없어 3회 반복하여 측정하였음을 의미한다.

설계변수에 대한 SN비의 반응표(data not shown)에 따른 델타 통계량에 의하면 목적변수인 DH와 NR의 경우에는, 압력, 혼합효소의 첨가량, 반응온도 및 반응시간의 순서로 영향을 미치며, 반면에 수율의 경우에는 반응시간, 복합효소의 농도, 압력 및 반응온도의 순서로 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

Fig. 2는 각 설계변수의 수준 변동에 따른 SN비의 변화로 직교배열에서 각 설계변수가 갖는 동일 수준의 SN비 평균값을 도시한 것으로 각 그래프의 가장 큰 값이 최적 수준을 의미한다. 또한, 점선은 목적변수별 SN비 전체 평균을 의미한다. 따라서 SN비로 목적변수를 최대화하는 공정조건을 결정하면, DH의 경우에는 압력 75-100 MPa, 반응온도 60°C, 반응시간 12 h, 복합효소농도 1%이고, NR의 경우에는 압력 100 MPa, 반응온도 50°C, 반응시간 12 h, 복합효소농도 1%이며, 수율의 경우에는 압력 100 MPa, 반응온도 60°C, 반응시간 12 h, 복합효소농도 2%이다.

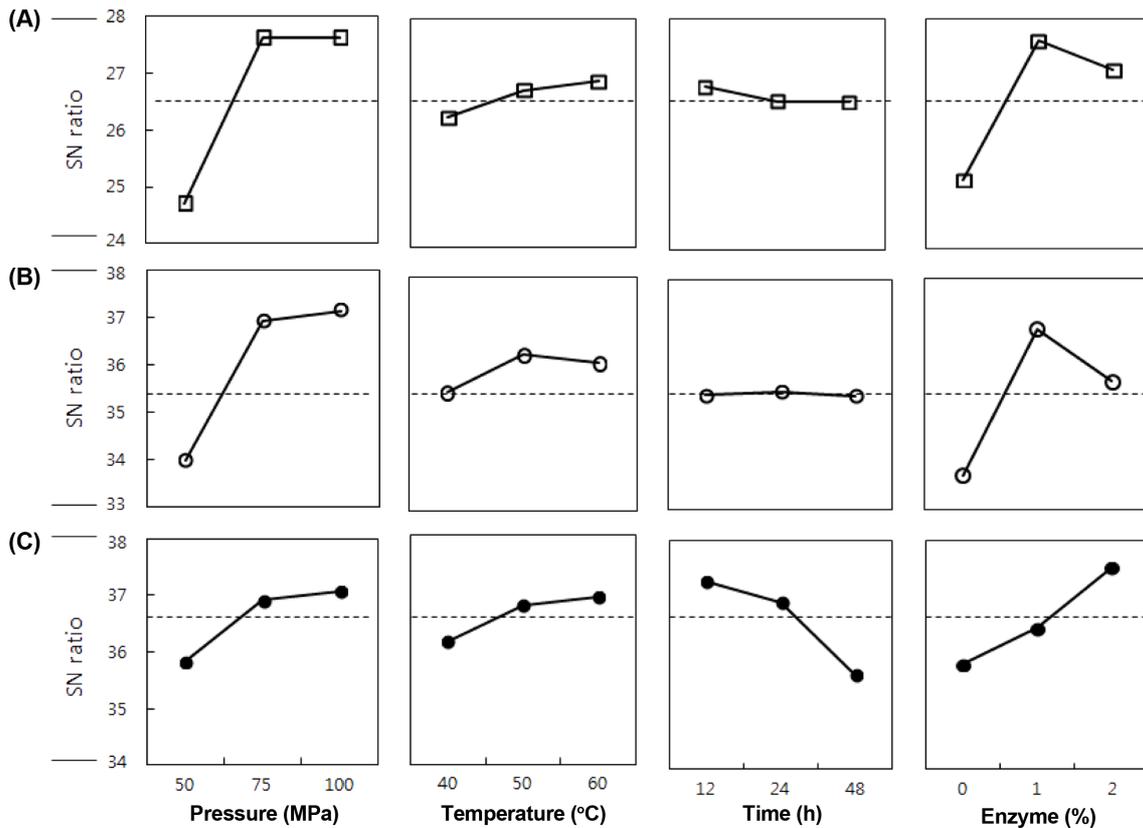


Fig. 2. Means of SN ratios and optima of design variables (circles) according to degree of hydrolysis (DH, %), nitrogen recovery (NR, %) and yield (%), respectively. A: DH, B: NR, C: yields. \*---: average of SN ratio.

**Table 2. Analysis of variance for SN ratios**

	Source	DF <sup>1)</sup>	SS <sup>2)</sup>	MS <sup>3)</sup>	F <sup>4)</sup>	P <sup>5)</sup>
DH	Pressure	2	17.0864	8.5432	42.12	0.002
	Mixed enzyme	2	9.9016	4.9508	24.41	0.006
	Error	4	0.8114	0.2028		
	Total	8	27.7993			
NR	Pressure	2	18.7225	9.3612	35.63	0.003
	Mixed enzyme	2	10.2262	5.1131	19.46	0.009
	Error	4	1.0511	0.2628		
	Total	8	29.9998			
Yield	Pressure	2	2.6935	1.3468	2.63	0.276
	Time	2	4.3549	2.1797	4.25	0.190
	Mixed enzyme	2	4.3291	2.1646	4.23	0.191
	Error	2	1.0245	0.5123		
	Total	8	12.4065			

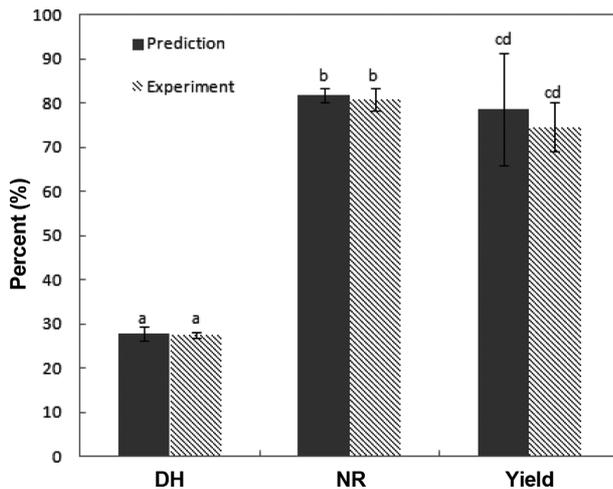
<sup>1)</sup>Degree of freedom.

<sup>2)</sup>Sum of squares.

<sup>3)</sup>Mean square.

<sup>4)</sup>F-value.

<sup>5)</sup>P-value.



**Fig. 3. Comparison of predicted values (degree of hydrolysis, nitrogen recovery and yield) and experimental results at optimal condition (Pressure; 75 MPa, Temperature; 50°C, Time; 12 hrs, and Mixed enzyme; 1%).** \*Values are the means±SD of three determinations. <sup>a-d</sup>Means with different superscripts above the bars are significantly different.

한편 Minitab의 분산분석 중 일반선형모형을 이용하여 각각의 특성치에서의 SN비에 대한 분산분석의 결과(Table 2), 분산분석표에서 DH와 NR의 경우에는 변동이 작은 반응온도와 반응시간을 오차 변동으로 처리하였다. *F* 검정 결과, DH에 대한 압력과 혼합효소 첨가량의 *F* 값이 각각 42.12, 24.41이다. 그리고 압력과 혼합효소의 첨가량의 *p* 값이 각각 0.002, 0.006이다. 따라서 압력과 혼합효소의 첨가량은 신뢰도 95%, 유의수준 5%에서 *p* 값이 0.05보다 작아 통계적으로 유의하였다. NR의 경우에는 유사한 경향

을 나타냈지만 수율의 경우에는 설계변수 모두가 *p* 값이 0.05보다 커서 통계적으로 유의함을 보여주지 못하였다. 이러한 사실은 수율을 목적변수로 선정하는 것은 재고할 필요가 있음을 보여준다.

3가지 목적 변수와 경제성 및 장치의 성능(온도 60°C와 압력 100 MPa은 현 장비로서는 한계치)을 고려하여 최적 조건으로 압력을 75 MPa, 반응온도 50°C, 반응시간 12 h, 복합효소농도 1%로 설정하여 예측한 값과 이 조건으로 3회 반복 실험한 값을 비교하였다(Fig. 3). Fig. 3에서와 같이 NR 및 DH의 경우에는 최적 조건에서 예측한 값과 실험값이 매우 근사하였지만, 수율의 경우에는 95% 신뢰수준에서 유의적인 차이를 보여 다구찌 실험 설계 분석의 타당성을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 다구찌 설계 분석에서 수율을 목적 변수로 설정하기에 부족하다는 결과와 일치한다.

#### 품질특성 및 개선 효과

도출된 최적 조건에서 제조된 생멸치 고압가수분해물과 시판 멸치 어간장 및 액젓의 품질특성으로 Table 3에는 일 반성분, pH, 염도 및 수용성 고형분 함량을 나타내는 °Brix를 측정하여 나타내었고, Table 4에는 유리아미노산을 측정하여 나타내었다.

Table 3에서와 같이 가수분해물의 염도는 0.73±0.01이지만, 이를 수분 함량을 유사하게 농축한다는 가정 하에 계산하면 염을 가하지 않고도 어간장 및 액젓과 유사한 단백질 함량의 생멸치 가수분해물을 생산할 수 있으며, 농축 여부에 따라서 품질기준을 조절할 수 있으리라 판단하였다.

Table 4에서와 같이 고압효소가수분해물에서 풍미 또는

**Table 3. Proximate analysis of two commercially available anchovy sauce and pressure-assisted enzymatic hydrolysates at optimal conditions**

Samples	Moisture (%)	Protein (%)	Lipid (%)	Ash (%)	pH	Salt (%)	°Brix
Fish sauce	55.94±0.19 <sup>1)</sup>	11.35±0.35	0.12±0.01	23.80±0.65	5.85±0.01	22.37±1.53	33.93±0.25
Aekjeot	56.75±0.27	7.52±0.15	0.02±0.00	28.82±1.15	5.83±0.01	23.74±1.23	33.13±0.19
Hydrolysate	93.48±0.13	4.90±0.05	0.03±0.00	0.41±0.57	6.45±0.01	0.73±0.01	7.60±0.02

<sup>1)</sup>Values are the means±SD of three determinations.

**Table 4. Free amino acid compositions of two commercially available anchovy sauce and pressure-assisted enzymatic hydrolysates at optimal conditions**

Amino acids	Amount <sup>1)</sup> (mg/L)		
	Hydrolysate	Fish sauce	Aekjeot
Aspartic acid	2727.49	–	–
Glutamate	2663.96	–	–
Asparagine	242.75	1182.12	–
Serine	1817.53	1123.25	118.97
Glutamic acid	2935.50	1150.79	533.12
Histidine <sup>2)</sup>	1252.40	213.67	144.59
Glycin	1206.70	670.26	272.55
Threonine <sup>2)</sup>	1772.19	489.23	203.93
Arginine	2701.13	1823.12	92.85
Alanine	2842.98	1845.05	642.91
Taurine	630.45	–	–
Tyrosine	512.79	62.12	54.39
Valine <sup>2)</sup>	2207.72	687.55	405.21
Methionine <sup>2)</sup>	1342.34	269.22	208.04
Tryptophan <sup>2)</sup>	5323.76	–	314.76
Phenylalanine <sup>2)</sup>	1751.48	325.56	301.89
Isoleucine <sup>2)</sup>	2155.26	462.53	380.37
Leucine <sup>2)</sup>	3535.51	622.59	571.09
Lysine <sup>2)</sup>	3249.80	1346.00	985.51
Proline	639.28	393.87	113.27
Total	41511.03	12666.93	5443.15

<sup>1)</sup>Values shown are the average from two replicates.

<sup>2)</sup>Essential amino acid.

짠맛증진성분으로 알려진(Schindler et al., 2011; Yun et al., 2015) glutamine, arginine, glycine 등과 lysine 및 tryptophan 이 각각 2935.50, 2701.13, 1206.70, 3249.80 및 5323.76 mg/L으로서 시판 멸치 어간장 및 액젓에서 보다 총량으로 각각 3.1, 2.3배 이상 풍부한 것으로 나타나, 가수분해물의 풍미증진제로서의 가능성을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라 필수 아미노산의 경우에도 총량 기준으로 시판 멸치 어간장 4배, 액젓보다 1.3배 더 풍부하였다. 유리 아미노산 총 함량은 고압효소가수분해물 > 어간장 > 액젓의 순서로 많이 생성되었다. 고압효소가수분해물은 Table 3에서의 조단백질 함량과 유사하여 질소 대부분이 아미노산의 형태로 존재함을 의미하며, 액젓 보다는 어간장이 숙성기

간이 길어 유리 아미노산이 풍부하게 생성된 결과로 판단되었다.

고압에서의 효소가수분해에 대한 성능 개선 효과를 분석하기 위하여 대조군으로 상압에서 혼합효소 2%를 가하여 30시간 동안 가수분해를 실시하여 가수분해물에 대한 총 질소, Formol법과 TNBS법에 의한 아미노태 질소와 Lowry법에 의한 수용성 단백질 내의 질소 함량을 측정 한 후 가수분해도를 산출한 결과, 상압에서의 효소가수분해 반응은 24시간 부근에서 종료되는 것으로 나타났으며, 최대 가수분해도는 18±1.3%에 이르렀다. 최대 가수분해도를 기준으로 고압효소가수분해반응의 성능 개선 효과를 비교한 결과, 최적 조건에서의 가수분해도는 27.47%로서 상압 효소가수분해의 DH 값인 18%±1.3%보다 52.6%의 개선 효과를 확인할 수 있었다.

## 요 약

본 연구는 멸치 고압효소가수분해물의 산업화 생산 공정을 개발하기 위한 기초연구로서 다구찌 기법을 사용하여 고압과 효소를 이용하는 멸치 고압효소가수분해 공정의 운전 조건을 최적화하고, 최적화 공정 조건으로 가수분해물을 생산하여 품질특성 및 성능치의 개선 효과를 산출함으로써 신뢰성을 검증하였다. 다구찌 기법의 망대특성과 L<sub>9</sub> 직교배열을 사용한 실험계획을 통하여 멸치 고압효소가수분해물의 특성치를 최대화시키는 공정 조건으로, DH의 경우에는 압력 75-100 MPa, 반응온도 60°C, 반응시간 12 h, 복합효소농도 1%이고, NR의 경우에는 압력 100 MPa, 반응온도 50°C, 반응시간 12 h, 복합효소농도 1%이며, 수율의 경우에는 압력 100 MPa, 반응온도 60°C, 반응시간 12 h, 복합효소농도 2%이었다. 최적 조건에 대한 확인 실험으로 압력을 75 MPa, 반응온도 50°C, 반응시간 12 h, 복합효소농도 1%로 설정하여 예측값과 실험값을 비교한 결과, 최적 조건의 신뢰성을 확보함을 확인하였다. 최적화 조건을 적용하여 생산한 멸치 고압효소가수분해물은 시판 멸치 어간장 및 액젓보다 더욱 풍부한 풍미증진 유리아미노산을 함유하고 있었으며, 필수아미노산 역시 풍부하였다. 뿐만 아니라 상압 조건에서의 가수분해물보다 가수분해도가 52.6% 이상 증진되었다.

## 감사의 글

본 논문 연구는 농림축산기술개발사업(고부가가치 식품 기술개발사업, 과제번호 312010-4)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## References

- Aggarwal A, Singh H, Kumar P, Singh M. 2008. Optimizing power consumption for CNC turned parts using response surface methodology and Taguchi's technique-A comparative analysis. *J. Mater. Process. Tech.* 200: 373-384.
- Akasaka K, Nagahata H, Maeno A, Sasaki K. 2008. Pressure acceleration of proteolysis: A general mechanism. *Biophysics* 4: 29-32.
- Benjakul S, Morrissey MT. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *J. Agric. Food Chem.* 45: 3423-3430.
- Benyounis KY, Olabi AG. 2008. Optimization of different welding processes using statistical and numerical approaches-A reference guide. *Adv. Eng. Softw.* 39: 483-496.
- Chalamaiah M, Dinesh kumar B, Hemalatha R, Jyothirmayi T. 2012. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chem.* 135: 3020-3038.
- Genichi T. 1986. Introduction to Quality Engineering : Designing Quality into Products and Processes. Kraus International Publications. Richmond, TX, USA, pp. 104-105.
- Hendrickx M, Ludikhuyze L, Van den Broeck I, Weemaes C. 1998. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends Food Sci. Tech.* 9: 197-203.
- In YW, Yun HS, Bang E, Lee HJ, Lee MY, Cho HY. 2016. Selection of commercial proteolytic enzymes for the preparation of anchovy protein hydrolysates under pressurization. *Food Eng. Prog.* 20: 89-97.
- KFIA. 2009. Food code, Korea Foods Industry Association, Moonyongsa Co., Seoul, Korea, pp 319-320.
- Kim SK & Mendis E. 2006. Bioactive compounds from marine processing byproducts-A review. *Food Res. Int.* 39: 383-393.
- Knorr D, Heinz V, Buckow R. 2006. Review: High pressure application for food biopolymers. *Biochim. Biophys. Acta* 1764: 619-631.
- Kwon HM, Jang HA. 2013. Case studies on strengths and weaknesses of Taguchi method. *J. Food Eng.* 39: 383-392.
- Lopetcharat K, Choi YJ, Park JW, Daeschel MA. 2001. Fish sauce products and manufacturing: A Review. *Food Rev. Int.* 17: 65-88.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Nilsang S, Lertsiri S, Suphantharika M, Assavanig A. 2005. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *J. Food Eng.* 70: 571-578.
- Ohmae E, Murakami C, Gekko K, Kato C. 2007. Review: Pressure effects on enzyme functions. *J. Biol. Macromol.* 7: 23-29.
- Okazaki T, Shigeta Y, Aoyama Y, Namba K. 2003. Autolysis of unsalted fish protein under pressurization. *Fisheries Sci.* 69: 1257-1262.
- Rao RS, Kumar CG, Prakasham S, Hobbs PJ. 2008. The Taguchi methodology as a statistical tool biotechnological applications: A critical appraisal. *Biotechnol. J.* 3: 510-523.
- Rivalain N, Roquainc J, Demazeau G. 2010. Research review paper: Development of high hydrostatic pressure in biosciences: Pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnologies. *Biotechnol. Adv.* 28: 659-672.
- Schindler A, Dunkel A, Stähler F, Backes M, Ley J, Meyerhof W, Hofmann T. 2011. Discovery of salt taste enhancing arginyl dipeptides in protein digests and fermented fish sauces by means of a sensomics approach. *J. Agric. Food Chem.* 59: 12578-12588.
- Taguchi G. 1986. Introduction to Quality Engineering, Asian Productivity Organization. Distributed by American Supplier Institute Inc., Dearborn, MI, USA.
- Thorkelsson G, Kristinsson HG. 2009. Bioactive Peptides from Marine Sources. State of Art. Report to the NORA fund, Available from: [http://www.matis.is/media/matis/utgafa/Skyrsla\\_14-09\\_Bioactive-peptides-State%20of%20Art.pdf](http://www.matis.is/media/matis/utgafa/Skyrsla_14-09_Bioactive-peptides-State%20of%20Art.pdf). Accessed Sep. 14, 2016
- Thorkelsson G, Sigurgisladottir S, Geirsdottir M, Jóhannsson R, Guérard F, Chabeaud A, Bourseau P, Vandanjon L, Jaouen P, Fouchereau-Peron M, Le Gal Y, Ravallec-Ple R, Picot L, Berge JP, Delannoy C, Jakobsen G, Johansson I, Batista I. 2008. Mild Processing Techniques and Development of Functional Marine Protein and Peptide Ingredients. Børresen T (ed). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, pp. 363-398.
- Yun HS, Park HS, Lee MY, Shin JK, Cho HY. 2015. A feasibility study on producing salt taste enhancer in the commercial fermented fish and soy sauces. *Food Eng. Prog.* 19: 139-147.