

## Pilot Plant Scale 중고압장치를 이용한 멸치의 효소적 가수분해

이화진 · 방은 · 이선영 · 인예원 · 조형용\*

차의과학대학교 식품생명공학과

### Enzymatic Hydrolysis of Anchovy Using Medium-High Pressure Pilot Plant Scale Systems

Hwa-Jin Lee, Eun Bang, Sun-Young Lee, Ye-Won In, and Hyung-Yong Cho\*

Department of Food Science and Biotechnology, CHA University

#### Abstracts

Medium pressure and mixed enzyme were used to hydrolyze raw anchovy under controlled conditions at a batch-pilot plant-scale process for the production of anchovy protein hydrolysates (APH). Mass balance calculations were carried out so that the degree of protein solubilization and yields could be estimated. Almost complete hydrolysis could be achieved in 12 h, at 50°C and 75 MPa, with no pH adjustment, at 1% (10 g/kg) mixed enzyme using raw anchovy. This was achieved with the addition of water (1/2 raw anchovy/water). The degrees of protein solubilization and yield were 63.50% and 55.61%, respectively. Fractionation using UF/NF pilot scale systems was carried out for producing four different fractions on the APH. Successive fractionation on UF and NF membranes allowed the concentration of the peptides of selected sizes without, however, carrying out sharp separations, and with some MW classes being found in several fractions. Spray drying processes for 10 kDa permeate were described to increase their usability. The free amino acid profile of the fractions was identical to that of the APH.

**Key words:** anchovy, enzymatic hydrolysis, medium-high pressure, pilot plant scale, membrane filtration

#### 서 론

식품산업에서 고압처리기술은 다양한 압력 범위에서 활용되고 있다. 예를 들어 0-50 MPa 범위에서는 고온·고압 (high pressure) 상태의 아임계 또는 초임계 기술을 활용한 유용성분의 추출(Herrero et al., 2007; Mustafa & Turner, 2011) 50-300 MPa 범위의 중고압 (medium high pressure) 영역에서는 포자의 발아(Setlow, 2003) 또는 효소의 활성을 조절(Ohmae et al., 2007; Kim et al., 2013)하거나 단백질과 같은 식품의 성분 중 거대분자의 형태를 변화(Torres Bello et al., 2014)시킬 수 있는 기술로서 활용 범위를 넓히고 있으며, 400-700 MPa 범위의 초고압 (ultra high pressure)은 주로 식품 중의 유해 미생물의 살균목적(Heinz & Buckow, 2010; Torres Bello et al., 2014)으로 사용되어져 왔다. 초고압 기술을 이용한 비열살균기술의 경우에는

1899년 Hite에 의해서 최초로 보고된 이후 약 100년이 지난 1992년 일본의 미쯔비시 중공업의 수직형 초고압 처리 장치를 이용 초고압처리 jam이 시장에 출시되고, 1998년에 최초로 GEC ALSTOM ACB에서 개발한 수평형 초고압 처리 장치를 이용하여 스페인 육가공 회사인 Espufia에서 육가공 제품이 출시되었다(Jung et al., 2010). 즉, 초고압 처리장치 개발이 개발기술의 산업화를 견인한 사례로 볼 수 있다(Balda et al., 2012). 반면에 중고압 영역에서는 아주 작은 규모의 처리 장치를 이용하여 Curl & Jansen (1950)이 pepsin 및 chymotrypsinogen에 미치는 고압의 영향에 대한 보고 등 주로 반응기작 또는 반응속도론적 기초 연구에 치우치다 2000년을 전·후로 하여 효소를 이용한 가수분해의 경우 처리되는 압력에 따라 단백질 가수분해효소의 활성에 영향을 줄 수 있다는 연구 결과가 보고되면서(Seyderhelm et al., 1996; Hurtado et al., 2002; Ohmae et al., 2007; Hernández-Andrés et al., 2008) 중고압을 이용한 효소가수분해에 대한 산업적 응용 가능성이 제시되었다. 특히, Okazaki et al. (2003)는 어류단백질의 자가소화에 In et al. (2016a,b)은 멸치의 효소가수분해에 중고압을 활용하여 여간장과 유사한 가수분해물을 제조하였다고 보고 하였다. 중고압을 이용한 유일한 산업화 사례는 일본에서 시판되고 있는 저염간장이다.

\*Corresponding author: Hyung-Yong Cho, Department of Food Science and Biotechnology, College of Life Science, CHA University, Seongnam 13488, Republic of Korea  
Tel: +82-31-881-7125; Fax: +82-31-881-7219  
E-mail: [hycho5710@cha.ac.kr](mailto:hycho5710@cha.ac.kr)

Received September 1, 2016; revised October 18, 2016; accepted November 1, 2016

단백질 가수분해물은 바이오산업에서 세포 배양을 위한 배지의 질소원(산업적으로는 peptone이라 함, Pasupuleti & Braun, 2010)으로 사료의 값싼 영양원(Kristinsson & Rasco, 2010)으로 상용화 되었지만 시장에서 특수 목적을 위한 고품질의 가수분해물에 대한 수요 증가, 식품산업에서는 특정 효소를 사용하여 특정 부위의 펩타이드 결합을 자르기 시작 (Mullally et al., 1994)하면서 가수분해물의 활용 영역이 더욱 증가하고 있다. 특히, 자원의 효율적 이용 또는 환경적인 측면에서 어류단백질의 효소적 가수분해가 재조명(Chalamaiah et al., 2012)되고 있으며 반응메카니즘에 대한 많은 연구가 보고되었다(Mohr, 1978; Kristinsson & Rasco, 2000).

이와 같은 lab scale에서의 연구결과를 산업화하기 위해서는 pilot plant scale로 규모를 확장시켜 전체 공정에 대한 생산 효율성을 확인해야 한다. Pilot plant scale 연구는 주로 생물자원을 가수분해하여 바이오매스를 생산하는 연구에서 진행되어 왔으며(Ropars et al., 1992; Taherzadeh et al., 2007), Himonides et al. (2011)은 단백질 분해효소인 파파인을 이용하여 대구 살과 뼈로부터 가수분해물의 산업적 생산 가능성을 검토하고자 pilot plant scale에서 연구를 하였으나 아직까지 미미한 실정이다. 더구나 효소적 가수분해에 고압을 활용한 경우는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 전 보(In et al., 2016a,b)에서의 연구결과를 산업화 공정으로 개발하기 위하여 pilot plant scale로 규모를 확장시켜 생멸치 증고압효소가수분해물 생산에 대한 가능성 및 효율을 확인하고, 가수분해물의 효용성을 확대하기 위하여 10 kDa로 cut-off 한 분획물을 분말 제형으로 개발 하고자 분무건조 조건을 탐색하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 연구에서 사용한 멸치(*Engralis japonica*)는 동해수산(Busan, Korea)에서 구입한 것으로 2013년 3월에 제주도 해역에서 어획된 것으로, -20°C에서 냉동 보관하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용 된 효소는 Alcalase® 2.4 L (Novozymes, Bagsvard, Denmark)와 Flavourzyme™ 500MG (Novozymes)로 대종상사(Seoul, Korea)로부터 구입하였다.

### 멸치 가수분해물의 제조

증고압을 이용한 멸치 가수분해물의 제조는 전 보(In et al. 2016b)와 같은 순서로 규모가 다른 장비를 사용하여 제조되었다. 멸치와 물을 1:2 (w/w)의 비율로 혼합하여 믹서기로 2분씩 세 번 분쇄한 후에 콜로이드밀(Super masscolloider, ZA10-15J, Masuko sangyo, Kawaguchi, Japan)로 균질화하였다. Alcalase® 2.4 L와 Flavourzyme™ 500MG을 각각 1:5 비율로 혼합한 혼합효소를 균질화된 멸치 분쇄물에

원료 멸치 대비 1% (w/w)를 첨가한 후 pilot 규모의 고압액화시스템(TFS 50 L, Dimapuretech, Incheon, Korea)을 이용하여 50°C, 75 MPa의 압력 조건 하에서 12시간 동안 증고압 처리하였다. 증고압 처리 한 시료는 80°C에서 20분 동안 증탕 처리를 하여 효소를 불활성화 시킨 후 4°C에서 12시간 이상 숙성하여 지방층을 제거하였다. 지방층이 제거된 시료는 연속식 원심분리기(Tubular Centrifuge, A-V10675G, Tomoe Engineering, Osaka, Japan)를 이용하여 17,000 rpm에서 원심 분리하였으며, 원심 분리 전 시료를 멸치증고압효소가수분해물로 원심 분리 후 상층액을 APH로 명명하였다. 각각의 일부를 동결건조하여 -4°C에서 저온저장하면서 분석용 시료로 사용하였다.

### APH의 분획

APH를 10 kDa, 5 kDa 이하로 분획하기 위하여 사용된 한외여과장치는 Proflux M60 Tangential flow filtration system (Milipore, Bedford, MA, USA)으로 최대 용량은 30 L (launching tank 27 L+dead volume 3 L)로 이 시스템에 10, 5 kDa 한외여과막(Pellicon 2 cassette Biomax 5 or 10, Milipore)을 장착하였으며, 250 Da 이하로 분획하기 위하여 사용된 나노여과 시스템은 Prolab system (Milipore)으로 최대 용량은 5 L (launching tank 4.5 L+dead volume 0.5 L)이고, 이 시스템에 Helicon-RO4 (Milipore)을 장착하였다. 한외여과(10 kDa, 5 kDa) 및 나노여과(250 Da)는 Fig. 1의 순서대로 진행하여 분자량이 10 kDa 이상의 분획물은 APHU-1, 5 kDa에서 10 kDa 사이의 분획물은 APHU-2, 250 Da에서 5 kDa 사이의 분획물은 APHN-1으로 나머지 250 Da 이하의 분획물은 APHN-2로 명명한 후 일부를 동결건조 하여 -4°C에서 저온저장하면서 분석용 시료로 사용하였다. 동결건조된 시료를 2.5% w/v로 재 용해한 후에 전 보(Yun et al., 2015; In et al., 2016b)에서와 같은 방법으로 pH, 수용성 고형분 함량, 총 고형분 함량, 염도, Na 함량 및 질소함량 등과 같은 물리화학적 특성을 측정하였다.

### Mass-Balance 계산

원재료 및 멸치 가수분해 전과 후, 그리고 공정 전 과정(아래의 각 step)에 있어 무게와 질소함량(Kjeldahl), 수분 또는 총 고형분 함량을 측정하였다. 1) 멸치, 물, 그리고 효소의 무게와 2) 멸치 가수분해물의 무게 3) 원심분리 후 상층액의 무게 4) 멸치증고압효소가수분해물의 조단백 함량( $N \times 6.25$ ) 5) APH의 조단백 함량 6) APH의 고형분 함량(drying at 105°C until constant weight) 및 7) UF/NF 전 후의 무게 및 조단백 함량을 단계별로 측정하고 계산하였다.

### Centrifuging Index for Protein (CIP)

Himonides et al. (2011)의 방법에 따라 가수분해 후에

달성된 단백질 용해도(the degree of protein solubilization)를 나타내는 값으로 centrifuging index for protein (CIP)을 식 (1)에 따라 산출하였다. 원심분리 전 후의 질소함량은 pH 조절 없이 측정하였다.

CIP (%)

$$= \frac{\text{원심분리 후 질소함량(APH 1 mL당)}}{\text{원심분리 전 질소함량(멸치고합효소가수분해물 1 mL당)}} \quad (1)$$

### APH 및 분획물의 분자량 분포

APH 및 각 분획물에 대한 분자량 분포를 확인하기 위하여 Gel permeation chromatography (GPC) 분석을 전 보 (In et al., 2016a)와 동일한 방법으로 수행하였다. 사용된 GPC system은 ÄKTAprime plus system (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK)이었으며, 표준물질로는 Vitamin B<sub>12</sub> (MW 1355.37 Da, Sigma, St. Louis, MO, USA), Vitamin B<sub>1</sub> (MW 337.27 Da, Yakuri Pure Chemicals Co. Ltd., Osaka, Japan), L-Glutamic acid (MW 147.13 Da, Samchun Pure Chemicals Co. Ltd., Pyeongtack, Korea)를 사용하였다.

### 분무건조(Spray drying)

분무건조기(SD-1000, EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 10 kDa 한외여과막을 통과한 APHU-2를 분말제형으로 제조하였다.

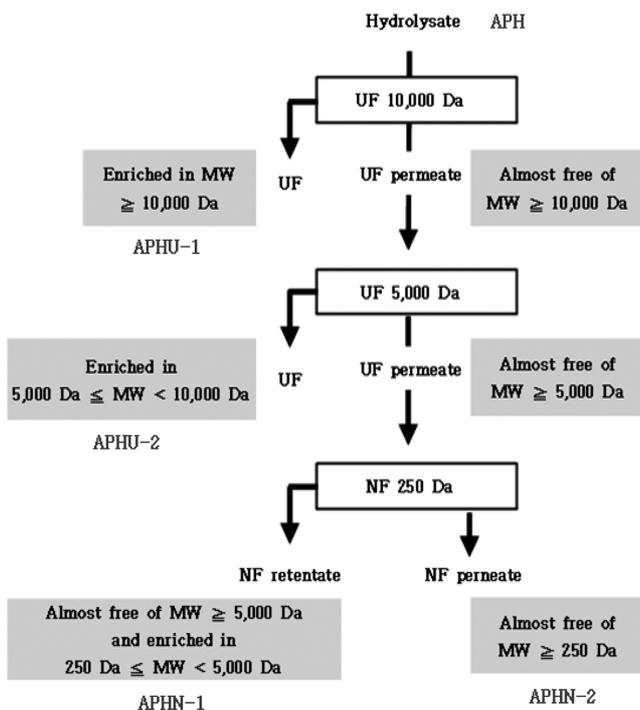


Fig. 1. Flow diagram for Ultrafiltration and nanofiltration.

### 통계처리

데이터의 통계처리는 3반복 측정값을 SAS 프로그램 (Cary, NC, USA)을 사용하여 분산분석을 하고, Duncan의 다중범위검정(유의수준 5%) 방법으로 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 물질수지 및 CIP

중고압에서 pilot plant 규모로 APH 생산 및 분획 과정에 따른 물질 수지는 Fig. 2와 같다. 멸치 11 kg과 물 22 kg에 멸치 중량의 1%인 0.11 kg의 효소를 첨가하여 중고압 효소가수분해를 시킨 후에 제조된 가수분해물의 무게는 25.18 kg으로 생산 과정에서 초기 계산 무게(33.11 kg)보다 약 8 kg 정도가 손실되었으며, 원심분리 후 상층액의 무게는 22.2 kg으로 약 3 kg 정도가 손실되었다. 이는 슬러지와 연속형 원심분리 장치 내에서 빠져나오지 못한 양으로 추측된다. 한외여과 시스템(MWCO 10 kDa)을 통하여 분획한 10 kDa retentate 시료(10 kDa ≤ MW, APHU-1)와 permeate 시료(MW < 10 kDa)의 비율은 각각 12.23%와 87.77%였으며, 10 kDa permeate 시료를 한외여과 시스템(MWCO 5 kDa)을 이용하여 2차 분획한 결과 5 kDa retentate 시료(5 kDa ≤ MW < 10 kDa, APHU-2)와 permeate 시료(MW < 5 kDa)의 비율은 각각 11.36%와 88.63%로 나타났으며 5 kDa permeate 시료를 나노여과 시스템(MWCO 250 Da)을 이용하여 3차 분획한 결과 250 Da retentate 시료(250 Da ≤ MW < 5 kDa, APHN-1)와 permeate 시료(MW < 250 Da, APHN-2)

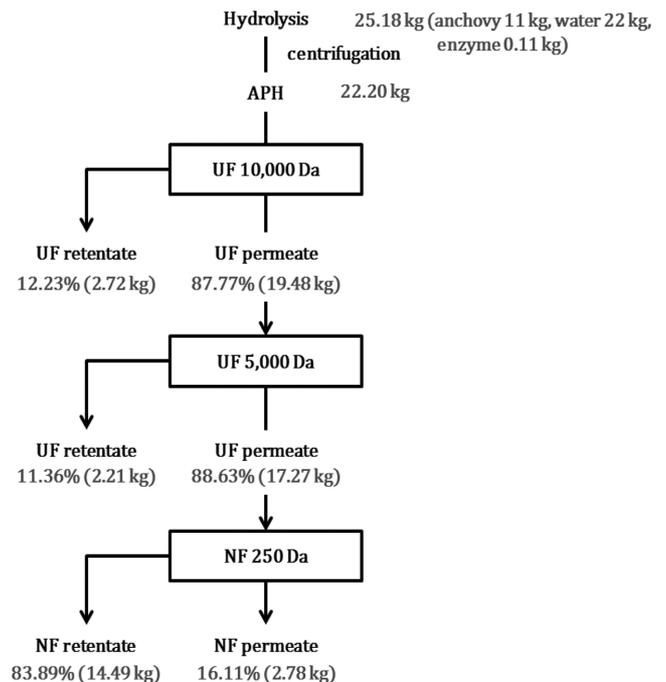


Fig. 2. Mass-balance calculations for the production of the soluble anchovy protein hydrolysate.

의 비율은 각각 83.89%와 16.11%였다. 각 분획물의 비율은 사용한 여과장치의 특성상 시료가 dead volume 이하로 남았을 경우 물을 넣어 관에 남아있던 시료를 밀어주었기 때문에 여과장치 통과 후 시료의 양이 증가하였다. 따라서 각각의 시료를 건조하여 얻은 분말의 무게를 이용하여 retentate 시료와 permeate 시료의 비율을 계산하였다.

멸치중고압효소가수분해물로부터 APH로의 단백질 용해도 또는 추출효율은 CIP 값을 계산하여 Table 1에 나타내었다. 한 배치당 멸치 가수분해물의 원심분리 전 단백질 함량은 1 kg당 51.90±2.52 g으로 한 배치의 분쇄 혼합된 시료의 총 단백질 양은 1,306.84±63.45 g이었다. 멸치중고압효소가수분해물의 soluble한 상태로 존재하는 단백질의 함량을 알아보기 위하여 원심분리 후 상층액의 단백질 함량을 측정된 결과 총 830.43±9.73 g의 단백질이 상층액에 존재하여 가수분해 후 단백질 용해도(CIP 또는 rate of protein solubilization)는 63.54±3.12%로 계산되었다.

#### 한외여과와 나노여과로 분리한 분획물의 수율 및 특성

Table 2에는 멸치중고압효소가수분해물로부터 APH 및 각 분획물의 동결건조 후 중량에 따른 수율 및 질소함량을 기준으로 한 수율을 나타내었다. 각 시료의 동결 건조 후 측정된 수분함량을 기준으로 환산한 멸치중고압효소가수분해물 8.39 kg당 건부량 기준의 멸치중고압효소가수분해물 중량은 2.1 kg이었으며, APH의 건조 중량은 1,110.20 g으로 멸치중고압효소가수분해물 대비 52.86%의 수율을 나타내었다. 각 분획물들의 건조 중량은 APHU-1 130.2 g, APHU-2 94.90 g, APHN-1 309.99 g, APHN-2 59.51 g이었으며 멸치중고압효소가수분해물에 대한 수율로 환산 시

**Table 1. Protein solubilization for the pilot-plant enzymatic hydrolysis of anchovy under pressurization**

Anchovy/water (1:2)	
Protein concentration of washed Anchovy (g/kg)	51.90±2.52 <sup>1)</sup>
Soluble protein/total protein (CIP) (%)	63.50±3.12

<sup>1)</sup>Means±SD.

**Table 2. The yield(%) and contents of protein for APH and fractions of UF/NF**

	Hydrolyzate <sup>1)</sup>	APH <sup>2)</sup>	UF		NF	
			APHU-1 <sup>3)</sup>	APHU-2 <sup>4)</sup>	APHN-1 <sup>5)</sup>	APHN-2 <sup>6)</sup>
Dry weight (g)	2,100	1,110.20	130.20	94.40	309.99	59.51
Yield (%) (dry basis)	-	52.86	6.20	4.64	14.76	2.83
Protein (g)	1,493.42±42.32 <sup>7)</sup>	830.43±3.24 <sup>a</sup>	95.57±2.45 <sup>b</sup>	71.37±3.12 <sup>c</sup>	244.27±2.14 <sup>d</sup>	ND
Yield (%) (protein basis)	-	55.61±0.08 <sup>a</sup>	6.40±0.06 <sup>b</sup>	4.78±0.07	16.36±0.05 <sup>d</sup>	ND

<sup>1)</sup>Medium-pressure assisted enzymatic hydrolyzate of raw anchovy.

<sup>2)</sup>Medium-pressure assisted enzymatic hydrolyzate of raw anchovy after centrifugation.

<sup>3)</sup>10 kDa retentate (10 kDa ≤ MW).

<sup>4)</sup>5 kDa retentate (5 kDa ≤ MW < 10 kDa).

<sup>5)</sup>250 Da retentate (250 Da ≤ MW < 5 kDa).

<sup>6)</sup>250 Da permeate (MW < 250 Da).

<sup>7)</sup>Means±SD with different superscripts in the same rows are significantly different ( $p < 0.05$ ).

각각 6.20%, 4.64%, 14.76%, 2.83%로 APHN-1의 수율이 분획물들 중 가장 높게 나타났다. 즉, 가수분해물의 대부분이 250 Da에서 5 kDa 사이의 분자량 분포를 하고 있음을 확인할 수 있었다. 단백질 함량을 기준으로 하는 경우에도 유사한 경향을 보이고 있다. 그러나 물질 수지를 이용하여 분석하면, 장치의 dead volume을 고려하여도 27% 이상의 손실이 발생되었다. Mohr (1978), Kristinsson & Rasco (2000) 그리고 Himonides et al. (2011)에 의하면 가수분해 첫 단계에서 주로 soluble material들이 대량으로 손실되며, 어류가수분해 제조에 참여하는 작업자들 또한 장비 및 원료 처리 미숙에 의하여 회수율이 낮아지는데 일조한다고 하였다. 즉, 가수분해물의 산업화를 위해서는 장비 사용법의 훈련 또는 분획 공정의 재검토가 필요하다고 판단하였다.

Table 3에서는 APH 및 각 분획물을 동결건조 후 2.5%로 재 용해하여 측정된 물리화학적 특성을 Table 4에는 유리아미노산 함량을 측정하여 동결건조 시료 1 kg 당 mg으로 나타내었다.

pH는 APHN-2시료가 5.9±0.2로 가장 낮게 나타났으며, 나머지 시료는 6.2±0.2에서 7.1±0.1 범위로 시판 간장 및 어간장과 유사하였다. 수용성 고형분 함량(°Brix) 역시 시료별로 유사한 결과를 나타냈으며, 염도계로 측정된 salt의 양(%)은 APHN-2 시료가 다른 시료들보다 월등히 높게 나타났다. 이것은 염이 나노 여과막을 모두 통과함으로써 APHN-2 분획물에 모두 모였기 때문이라고 사료된다. 즉, 나노 여과 시스템은 peptides의 분획뿐만 아니라 desalting에도 큰 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다. Ion chromatography로 정량 분석한 sodium (Na) 함량과 염도계로 측정된 염의 양이 일치하지는 않았지만, 공통적으로 APHN-2 시료에서 두드러지게 염의 농도가 높았으며, 짠맛 증진 peptides가 가장 많이 분포되어 있으리라 여겨지는 APHN-1 시료에 가장 적은 sodium 함량을 나타내어 서로 유사한 경향성을 나타내었다.

Table 4를 보면, 쓴맛을 내는 tryptophane 함량은 APHN-1 분획물에서 가장 낮게 나타났던 반면, 감칠맛을 내는

**Table 3. Physicochemical properties for APH and fractions of UF/NF**

	Solubility (%)	pH	Brix (°)	Salt (%)	Na (g/100g of powder)
APH <sup>1)</sup>	100	7.1±0.1 <sup>6),a</sup>	2.9±0.2 <sup>a</sup>	0.32±0.2 <sup>a</sup>	4.5±0.2 <sup>a</sup>
APHU-1 <sup>2)</sup>	100	6.4±0.2 <sup>b</sup>	2.8±0.2 <sup>a</sup>	0.07±0.2 <sup>b</sup>	4.4±0.2 <sup>a</sup>
APHU-2 <sup>3)</sup>	100	6.6±0.2 <sup>b</sup>	2.4±0.2 <sup>a</sup>	0.18±0.2 <sup>c</sup>	4.7±0.2 <sup>a</sup>
APHN-1 <sup>4)</sup>	100	6.2±0.2 <sup>c</sup>	2.5±0.2 <sup>a</sup>	0.00±0.2 <sup>d</sup>	1.1±0.2 <sup>b</sup>
APHN-2 <sup>5)</sup>	100	5.9±0.2 <sup>c</sup>	2.2±0.2 <sup>a</sup>	1.13±0.2 <sup>c</sup>	15.6±0.2 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>Medium-pressure assisted enzymatic hydrolyzate of raw anchovy after centrifugation.

<sup>2)</sup>10 kDa retentate (10 kDa ≤ MW).

<sup>3)</sup>5 kDa retentate (5 kDa ≤ MW < 10 kD).

<sup>4)</sup>250 Da retentate (250 Da ≤ MW < 5 kD).

<sup>5)</sup>250 Da permeate (MW < 250 Da).

<sup>6)</sup>Means±SD with different superscripts in the same columns are significantly different (*p*<0.05).

glutamic acid의 함량은 APHN-1 분획물에서 가장 높게 나타났다. 따라서 분자량별로 분획한 가수분해물 중 APHN-1 분획물은 짠맛 증진효과 뿐만 아니라 유리아미노산 함량이 높아 그 자체의 정미성분과 상호작용하여 맛의 상승효과 또한 가져올 것으로 판단되었다. 이 밖에도 단맛을 내는 glycine, proline, alanine 및 serine은 APHN-2 분획물에 가장 많이 함유되어 있었다. 이와 같이 시료별 개별 유리아미노산 함량에는 차이가 있었지만 유리아미노산 프로파일의 경우에는 APH와 각 분획물이 일치하였다.

#### 한외여과와 나노여과로 분리한 분획물의 분자량 분포

APH와 한외여과 및 나노여과하여 분획된 시료의 분자량 분포 결과는 Fig. 3과 같다. 주요 peak 3 개(peak I; 1,300 Da 이상, peak II; 250 Da-1,300 Da, 그리고 peak III; 250 Da 이하)가 나타났으며 이는 멸치 가수분해물에 대한 Yun et al. (2015)과 In et al. (2016a)의 GPC 결과와 매우 유사한 패턴을 보였다. 또한 분자량이 1,300 Da보다 큰 분획물(APHU-1, APHU-2, APHN-1)의 분자량 분포를 살펴보면 peak II와 peak III가 나타났다. 분자량을 기초로 하여 분획된 분획물들은 1,300 Da 이하에서 서로 유사한 분자량 분포 및 패턴을 보였으나, 분획에 사용된 막의 한계 분자량에 따라 peak의 비율은 서로 차이를 보였다. APHU-1의 분자량 분포도에서 peak I의 비율은 24.6%로 APH 및 다른 분획물에 배하여 높은 값으로 나타났다. 또한 막의 한계 분자량이 낮아질수록 peak I이 차지하는 비율은 점차 감소되어 APHN-2에서 peak I의 비율은 0.0%로 나타난 반면, 막의 한계 분자량이 낮아질수록 peak II와 III의 비율이 높게 나타났다. In et al. (2016a)의 연구를 살펴보면 짠맛증진효과가 있는 arginyl dipeptides는 주로 peak II에 분포될 가능성이 높다고 하였으며, 이를 토대로 분자량 분포도 확인 결과 APHU-2와 APHN-1에 짠맛증진물질인 arginyl dipeptides가 다량 존재할 것으로 추측되었다.

#### 멸치 가수분해물의 제형화

분무건조는 미세캡슐화 등 분말 제형을 만드는 상업화된

**Table 4. Free amino acid composition of the APH and fractions of UF/NF** (mg/kg of freeze dried)

	APH <sup>1)</sup>	UF		NF	
		APHU-1 <sup>2)</sup>	APHU-2 <sup>3)</sup>	APHN-1 <sup>4)</sup>	APHN-2 <sup>5)</sup>
Asp	2,910	29,874	22,802	39,890	3,921
Glu	54,765	39,170	39,505	83,311	3,406
Asn	806	626	538.7	205	495
Ser	1,007	16,675	10,604	311	29,002
Gln	1,437	14,973	14,777	7,412	9,868
His	20,003	17,403	18,179	20,973	7,837
Gly	17,640	11,751	11,847	709	34,819
Thr	28,727	22,460	23,407	10,055	21,729
Arg	<b>1,432</b>	<b>33,963</b>	<b>17,701</b>	<b>36,624</b>	<b>11,489</b>
Ala	44,043	33,353	35,620	6,495	64,358
Tyr	7,392	17,193	51,743	5,771	8,208
Val	53,794	28,536	29,778	26,188	18,870
Met	22,311	19,384	19,503	8,625	24,513
Trp	<b>3,659</b>	<b>3,246</b>	<b>3,582</b>	<b>2,015</b>	<b>3,454</b>
Phe	25,187	25,183	28,782	12,141	28,747
Ile	32,177	28,703	27,883	35,103	14,280
Leu	51,929	50,500	49,886	54,282	32,402
Lys	16,246	48,333	50,688	100,376	12,209
Pro	7,503	7,326	8,094	2,598	10,248
<b>Total</b>	<b>374,979</b>	<b>448,650</b>	<b>464,917</b>	<b>453,082</b>	<b>339,856</b>

<sup>1)</sup>Medium-pressure assisted enzymatic hydrolyzate of raw anchovy after centrifugation.

<sup>2)</sup>10 kDa retentate (10 kDa ≤ MW).

<sup>3)</sup>5 kDa retentate (5 kDa ≤ MW < 10 kD).

<sup>4)</sup>250 Da retentate (250 Da ≤ MW < 5 kD).

<sup>5)</sup>250 Da permeate (MW < 250 Da).

방법 중 가장 보편화 된 방법으로 여러 분야에서 다양한 목적으로 이용되고 있다. 미역과 다시마와 같은 해조류는 특별한 처리 공정을 거치지 않는 경우 비린내가 심하여 다양한 용도 개발에 어려움이 따르나 분무건조의 경우 분무탈취(deodorization by spray drying)에 의한 맛과 냄새의 masking 효과 및 최종산물의 안정성이 좋고 대량으로서 계속적인 생산이 가능하며, 또한 산업 현장에서 쉽게 적용되고, 저렴하게 적용될 수 있는 장점이 있다. 이러한 장점들

살려 10 kDa permeate 즉, APHU-2의 유용성을 증진시키고자 분말 제형을 만들고자 4가지 조건으로 분무건조를 실시하여 분무건조 수율과 수분 함량을 측정된 결과를 Table 5에 나타내었다.

각각의 수율은 기기에 주입한 10 kDa permeate 액상 시료(375 mL)에 존재하는 고형분 함량(18.38 g/375 mL) 대비 건조된 파우더의 무게(g)를 백분율로 나타내었다. 분무건조에 따른 시료의 수율은 조건에 따라 각각 34.01±1.05%,

22.31±1.12%, 25.61±0.95% 그리고 27.70±1.03%였으며, 수분함량은 각각 9.11±1.05%, 9.33±1.22%, 9.66±2.52%, 9.44±1.30%로 나타났다. Inlet temperature에 따른 결과를 살펴보면 atomizing pressure가 180 kPa로 고정된 condition 1과 condition 3의 수율을 비교한 결과 inlet temperature가 더 낮은 condition 1의 수율이 더 높게 나타났으나, atomizing pressure가 240 kPa로 고정된 condition 2와 3을 비교한 결과 inlet temperature가 더 높은 condition 3의 수율이 더 높게 나타났다. Atomizing pressure에 따른 수율을 비교한 결과, inlet temperature가 180°C로 고정된 condition 1과 4 중에서 atomizing pressure가 더 낮은 condition 1의 수율이 더 높게 나타났으며, inlet temperature가 200°C인 condition 3과 4의 수율을 비교하였을 때에도 atomizing pressure가 더 낮은 condition 4의 수율이 더 높게 나타났다. 따라서 분무건조 수율은 inlet temperature보다 atomizing pressure에 영향을 더 많이 받는 것으로 추측된다. 이러한 결과는 NaCl/maltodextrin 혼합물의 분무건조에 미치는 공정변수의 영향에 대한 Cho et al. (2015)의 보고와 유사한 경향을 나타내고 있다. Chindapan et al. (2010)은 어간장을 electro dialysis하여 염농도를 달리하여 시료를 분무건조한 경우, inlet temperature가 가장 중요한 변수라고 보고하였지만 이 경우에는 atomizing pressure를 공정변수로 고려하지 않았기 때문으로 사료된다.

## 요 약

증고압효소가수분해 공정의 산업화를 위하여 설정한 생멸치 증고압효소가수분해 최적 조건(복합효소 1%, 압력 75 MPa, 온도 59°C 그리고 반응시간 12 시간)으로 pilot plant 규모의 증고압 처리장치를 이용하여 증고압멸치효소가수분해물을 제조하고, 이를 pilot plant 규모의 연속식 원심분리기와 막여과 장치(UF와 NF)로 APH 및 분자량 분포가 다른 4가지 분획물을 제조하였다. 그리고 분획물을 분말 제형으로 제조하여 그 유용성을 확대하고자 분무건조 조건을 탐색한 결과, 가수분해는 본 조건에서 거의 달성되었고, APH의 단백질 용해도 및 수율은 각각 63.50%와 55.61%이었다. 분획물의 수율, 특성, 유리아미노산 조성 및 분자량 분포 확인한 결과, 몇몇 분자량 대의 피크들이 여러 분

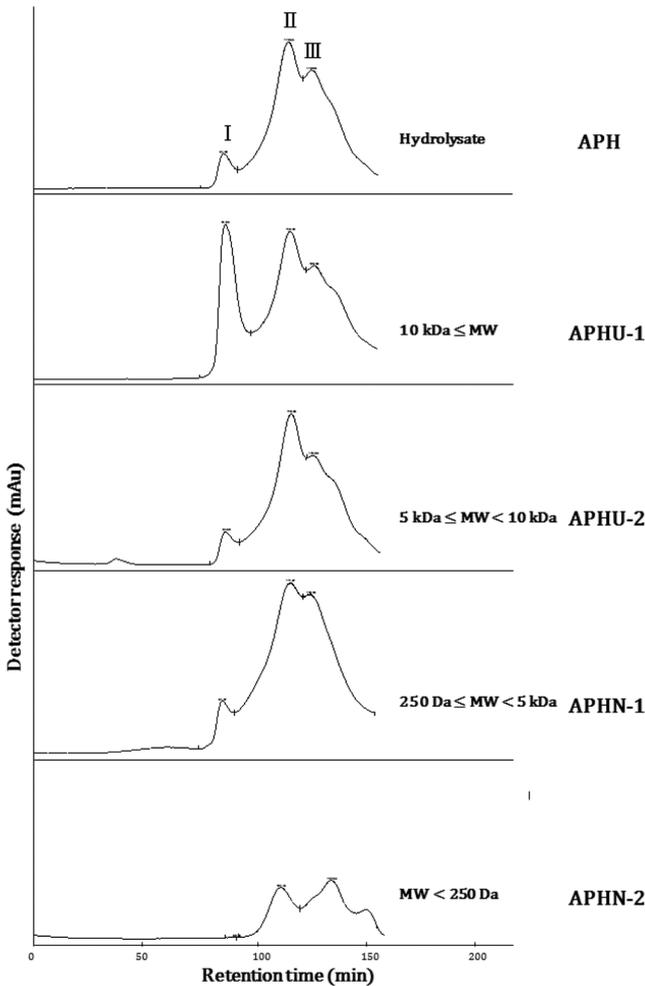


Fig. 3. GPC chromatogram of the APH and fractions of UF/NF (Peak I; 1,300 Da≤MW, Peak II; 250 Da<MW<1,300 Da, Peak III; MW≤250 Da).

Table 5. Recovery ratio and moisture content according to condition of spray drying

	Condition 1 <sup>1)</sup>	Condition 2 <sup>2)</sup>	Condition 3 <sup>3)</sup>	Condition 4 <sup>4)</sup>
Recovery ratio (%)	34.01±1.05 <sup>5)a</sup>	22.31±1.12 <sup>b</sup>	25.61±0.95 <sup>c</sup>	27.70±1.03 <sup>d</sup>
Moisture (%)	9.11±1.05 <sup>a</sup>	9.33±1.22 <sup>a</sup>	9.66±2.52 <sup>a</sup>	9.44±1.30 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Inlet temperature 180°C, Atomizing pressure 180 kPa, Blow power 0.50 m<sup>3</sup>/min, Feeding rate 500 mL/h.

<sup>2)</sup>Inlet temperature 180°C, Atomizing pressure 240 kPa, Blow power 0.50 m<sup>3</sup>/min, Feeding rate 500 mL/h.

<sup>3)</sup>Inlet temperature 200°C, Atomizing pressure 240 kPa, Blow power 0.50 m<sup>3</sup>/min, Feeding rate 500 mL/h.

<sup>4)</sup>Inlet temperature 200°C, Atomizing pressure 180 kPa, Blow power 0.50 m<sup>3</sup>/min, Feeding rate 500 mL/h.

<sup>5)</sup>Means±SD with different superscripts in the same rows are significantly different (*p*<0.05).

획물에서 발견되는 것을 확인할 수 있었다. 비록 여과막의 한계 분자량별로 peptides가 정확하게 분리되지는 않았지만, 여과막의 한계 분자량이 작아질수록 분획물에서 큰 분자량의 peptides가 감소하거나 제거된다는 사실을 확인할 수 있었다. 또한 짠맛증진물질로 알려진 arginine과 arginyl dipeptides는 10 kDa permeate에 다량 존재할 것으로 추측되었으며 분획 수율이 손실이 27% 이상 발생되어 가수분해물의 산업화를 위해서는 장비 사용법의 훈련 또는 분획 공정의 재검토가 필요하다고 판단하였다. 이에 APH 또는 분획물의 분말 제형화를 위해서는 70% 이상의 수율을 얻을 수 있는 최적화 연구와 좀 더 효율을 높일 수 있는 공정개선 연구가 필요하다고 판단되었다.

### 감사의 글

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

### References

- Balda FP, Aparicio BV, Samson CT. 2012. Industrial high pressure processing of foods: Review of evolution and emerging trends. *J. Food Eng.* 2: 543-549.
- 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.
- Chindapan N, Devahastin S, Chiewchan N. 2010. Effect of electro dialysis pretreatment on physicochemical properties and morphology of spray-dried-fish sauce powder. *J. Food Eng.* 99: 31-39.
- Cho HY, Kim BS, Chun JY, Choi MJ. 2015. Effect of spray-drying process on physical properties of sodium chloride/malto-dextrin complexes. *Powder Technol.* 277: 141-146.
- Curl LA, Jansen EF. 1950. The effect of high pressure on pepsin and chymotrypsinogen. *J. Biol. Chem.* 185: 716-723.
- Heinz, IV, Buckow R. 2010. Food preservation by high pressure. *J. Verbrauch. Lebensm.* 5: 73-78.
- Hernández-Andrés A, Pérez-Mateos M, Montero P, Gómez-Guillén MDC. 2008. A comparative study of the effects of high pressure on proteolytic degradation of sardine and blue whiting muscle. *Fisheries Sci.* 74: 899-910.
- Herrero M, Cifuentes A, Ibañez E. 2006. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chem.* 98: 136-148.
- Himonides AT, Taylor AKD, Morris AJ. 2011. Enzymatic hydrolysis of fish frames using pilot plant scale systems. *Food Nutr. Sci.* 2: 586-593.
- Hurtado JL, Montero P, Borderías J, An H. 2002. Properties of proteolytic enzymes from muscle of octopus (*Octopus vulgaris*) and effects of high hydrostatic pressure. *J. Food Sci.* 67: 2555-2564.
- In YW, Yun HS, Bang E, Lee HJ, Lee MY, Cho HY. 2016a. Selection of commercial proteolytic enzymes for the preparation of anchovy protein hydrolysates under pressurization. *Food Eng. Prog.* 20: 89-97.
- In YW, Yun HS, Lee YJ, Lee MY, Cho HY. 2016b. Optimization of a process for the pressure-assisted enzymatic hydrolysis of Anchovy using Taguchi method. *Food Eng.* (in press).
- Jung S, Samson CT, de Lamballerie M. 2010. Chapter 6: High Hydrostatic Pressure Food Processing. In: Alternatives to conventional Food Processing. Andrew P, James HC. (eds). RSC, West Bloomfield, MI, USA, pp. 254-306.
- Kim N, Maeng JS, Kim CT. 2013. Effects of medium high pressure treatments on protease activity. *Food Sci. Biotechnol.* 22: 289-294.
- Kristinsson HG, Rasco BA. 2000. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40: 43-81.
- Mohr V. 1977. Fish protein concentrate production by enzymic hydrolysis. In: Biochemical aspects of new protein food. Pergamon Press. New York, NY, USA, pp. 53-62.
- Mullally MM, O'Callaghan DM, Fitzgerald RJ, Donnelly WJ, Dalton JP. 1994. Proteolytic and peptidolytic activities in commercial pancreatic protease preparations and their relationship to some whey protein hydrolyzate characteristics. *J. Agric. Food. Chem.* 42: 2973-2981.
- Mustafa A, Turner C. 2011. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Anal. Chim. Acta.* 703: 8-18.
- 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.
- Pasupuleti VK, Steven B. 2008. State of the art manufacturing of protein hydrolysates. In: Protein Hydrolysates in Biotechnology. Vijai KP, Arnold LE. (eds). Springer-Verlag. New York, NY, USA, pp. 11-32.
- Ropars, M, Marchal R, Pourquoi J, Vandecasteele JP. 1992. Large-scale enzymatic hydrolysis of agricultural lignocellulosic biomass. Part 1: Pretreatment procedures. *Bioresour. Technol.* 42: 197-204.
- Setlow P. 2003. Spore germination. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 550-556.
- Seyderhelm I, Boguslawski S, Michaelis G, Knorr D. 1996. Pressure induced inactivation of selected food enzymes. *J. Food Sci.* 61: 308-310.
- Taherzadeh MJ, Karimi K. 2007. Enzymatic-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *Bioresources* 2: 707-738.
- Torres Bello EF, Martínez GG, Klotz Ceberio BF, Rodrigo D, López AM. 2014. Review: High pressure treatment in foods. *Foods* 3: 476-490.
- 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.