

공학박사 학위논문

꽃새우(*Trachysalambria curvirostris*)의
효소가수분해물 및 전구체를 이용한
반응 새우향의 개발 및 특성 해석



식 품 공 학 과

金 明 贊



공학박사 학위논문

꽃새우(*Trachysalambria curvirostris*)의
효소가수분해물 및 전구체를 이용한
반응 새우향의 개발 및 특성 해석

지도교수 김 선 봉

이 논문을 공학박사 학위논문으로 제출함

2011년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

金 明 贊

金明贊의 工學博士 學位論文을 認准함

2011년 2월



主 審 農學博士 李 養 鳳 ①

委 員 工學博士 全 炳 秀 ①

委 員 理學博士 尹 好 東 ①

委 員 工學博士 金 鎮 弘 ①

委 員 農學博士 金 善 奉 ①

목 차

Abstract	xiv
서 론	1
재료 및 방법	6
1. 실험재료	6
1.1 꽃새우	6
1.2 반응전구체	6
1.3 효소 및 시약류	6
2. 실험방법	7
2.1 일반성분, pH 및 휘발성 염기질소(VBN)의 측정	7
2.2 지방산의 분석	7
2.3 유리아미노산의 분석	7
2.4 휘발성 성분의 분석	9
2.5 효소 가수분해물의 제조	10
2.6 가수분해도 측정	10
2.7 DPPH-Scavenging 및 Fe-Chelating activity 측정	14
2.8 최적가수분해 조건설정 및 통계분석	15
2.9 반응전구체를 이용한 반응 새우향의 제조	15

2.9.1 Boiled-type 반응 새우향	18
2.9.2 Grilled-type 반응 새우향	18
2.10 반응 새우향 제품의 제조	21
2.10.1 제품 제조의 원료 배합비	21
2.10.2 제품 형태에 따른 제조 방법	25
2.11 관능 평가 및 통계 처리	28
결과 및 고찰	29
1. 꽃새우의 성분 조성	29
1.1 꽃새우의 일반성분, pH 및 VBN	29
1.2 지방산	29
1.3 유리아미노산	31
2. 효소의 종류에 따른 꽃새우의 가수분해 최적화	33
2.1 시간에 따른 효소 농도별 가수분해	33
2.2 Alcalase	36
2.3 Flavourzyme	48
2.4 Protamax	58
2.5 Neutrase	68
3. 반응 새우향의 제조를 위한 반응 조건 해석	78
3.1 Boiled-type 반응 새우향	78
3.1.1 Amino acid의 선택	78
3.1.2 Sugar의 선택	79
3.1.3 pH 조건 설정	79
3.1.4 반응시간 설정	80

3.2 Grilled-type 반응 새우향	89
3.2.1 Amino acid의 선택	89
3.2.2 Sugar의 선택	90
3.2.3 pH 조건 설정	91
3.2.4 반응시간 설정	91
4. 반응 새우향의 휘발성 성분의 해석	104
4.1 Boiled-type 반응 새우향	104
4.2 Grilled-type 반응 새우향	112
4.3 주요 휘발성 성분의 생성 기작	119
4.3.1 Sulfide류의 생성 기작	119
4.3.2 Pyrazine류의 생성 기작	119
5. 반응 새우향의 제품화	127
5.1 분말(Powder) 제품의 관능 평가	127
5.2 액상(Extract) 제품의 관능 평가	127
요 약	132
감사의 글	136
참 고 문 헌	138

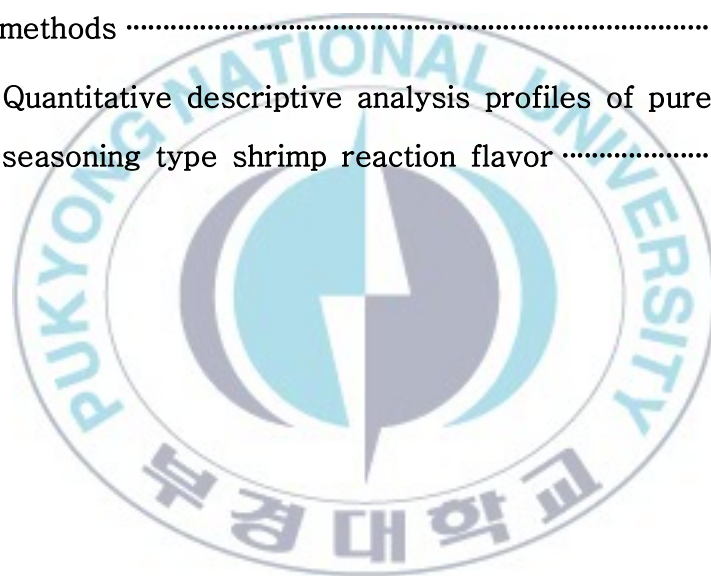
List of Figures

Fig. 1. Flow chart for preparation of enzymatic hydrolysates of spotted shrimp	13
Fig. 2. Flow chart for shrimp reaction flavor from enzymatic hydrolysates of spotted shrimp	17
Fig. 3. Changes of pH according to the enzyme concentration during hydrolysis at 65°C	34
Fig. 4. Relationship between reaction pH and temperature on degree of hydrolysis of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Alcalase	44
Fig. 5. Relationship between reaction pH and temperature on antioxidative activities of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Alcalase	45
Fig. 6. Relationship between reaction pH and temperature on degree of hydrolysis of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Flavourzyme	54
Fig. 7. Relationship between reaction pH and temperature on antioxidative activities of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Flavourzyme	55
Fig. 8. Relationship between reaction pH and temperature on degree of hydrolysis of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Protamax	64

Fig. 9. Relationship between reaction pH and temperature on antioxidative activities of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Protamax	65
Fig. 10. Relationship between reaction pH and temperature on degree of hydrolysis of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Neutrase	74
Fig. 11. Relationship between reaction pH and temperature on antioxidative activities of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Neutrase	75
Fig. 12. Quantitative descriptive analysis profiles of boiled-type shrimp reaction flavor affected by cysteine·HCl or methionine	81
Fig. 13. Quantitative descriptive analysis profiles of boiled-type shrimp reaction flavor affected by sugars	83
Fig. 14. Quantitative descriptive analysis profiles of boiled-type shrimp reaction flavor affected by reaction pH	85
Fig. 15. Quantitative descriptive analysis profiles of boiled-type shrimp reaction flavor affected by reaction time	87
Fig. 16. Quantitative descriptive analysis profiles of grilled-type shrimp reaction flavor affected by threonine	92
Fig. 17. Quantitative descriptive analysis profiles of grilled-type shrimp reaction flavor affected by sugars	94
Fig. 18. Quantitative descriptive analysis profiles of grilled-type	

shrimp reaction flavor affected by glucosamine and sucrose	96
Fig. 19. Quantitative descriptive analysis profiles of grilled-type shrimp reaction flavor affected by glucosamine and xylose	97
Fig. 20. Quantitative descriptive analysis profiles of grilled-type shrimp reaction flavor affected by reaction pH	100
Fig. 21. Quantitative descriptive analysis profiles of grilled-type shrimp reaction flavor affected by reaction time	102
Fig. 22. Total ion chromatogram of volatiles from spotted shrimp hydrolysates	106
Fig. 23. Total ion chromatogram of volatiles from boiled-type shrimp reaction flavor processed at pH 5.0	107
Fig. 24. Total ion chromatogram of volatiles from boiled-type shrimp reaction flavor processed at pH 7.5.	108
Fig. 25. Total ion chromatogram of volatiles from grilled-type shrimp reaction flavor processed at pH 5.0	114
Fig. 26. Total ion chromatogram of volatiles from grilled-type shrimp reaction flavor processed at pH 7.5	115
Fig. 27. Strecker degradation products identified in methionine/ reducing sugar model system(Baltes, 1990)	122
Fig. 28. Possible mechanism for the Strecker degradation of amino acids(Ho, 1996)	123

Fig. 29. Mechanism proposed for the formation of pyrazines from threonine(Shu, 1999)	125
Fig. 30. Possible pathways for formation of volatiles through the Maillard reaction by different pH condition (Nagodawithana, 1994) hydrolysates	126
Fig. 31. Quantitative descriptive analysis profiles of boiled-type and grilled-type shrimp reaction flavor by different drying methods	128
Fig. 32. Quantitative descriptive analysis profiles of pure type and seasoning type shrimp reaction flavor	130



List of Tables

Table 1. Gas chromatography analysis condition of fatty acid	8
Table 2. Operating conditions of automatic thermal desorber	11
Table 3. Analytical condition of gas chromatography and mass selective detector	12
Table 4. Coded level of independent variables in experimental design	16
Table 5. Experimental design on adding amino acid precursors for boiled-type shrimp reaction flavor	19
Table 6. Experimental design for the optimum reaction condition of boiled-type shrimp reaction flavor	20
Table 7. Experimental design on adding precursors for grilled-type shrimp reaction flavor	22
Table 8. Experimental design for the optimum reaction condition of grilled-type shrimp reaction flavor	24
Table 9. Formula of boiled-type shrimp reaction flavor	26
Table 10. Formula of grilled-type shrimp reaction flavor	27
Table 11. Fatty acid composition of total lipid extracted from frozen spotted shrimp	30
Table 12. Free amino acid contents in enzymatic hydrolysates of spotted shrimp	32

Table 13. Changes of pH and TCA according to the enzyme concentration during hydrolysis at 65°C	35
Table 14. Response of the dependent variables of degree of hydrolysis and antioxidative activity according to enzymatic hydrolysis condition of spotted shrimp by Alcalase	38
Table 15. Result of response surface methodology on degree of hydrolysis of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Alcalase	39
Table 16. Result of response surface methodology on antioxidative activity and Fe-chelating activity of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Alcalase	40
Table 17. The statistical result for degree of hydrolysis of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Alcalase	41
Table 18. The statistical result for antioxidative activity and Fe-chelating activity of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Alcalase	42
Table 19. Response surface model for processing conditions of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Alcalase	43
Table 20. Optimal conditions for preparation of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Alcalase	46
Table 21. Experimental and predicted results for preparation of	

enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Alcalase	47
Table 22. Response of the dependent variables of degree of hydrolysis and antioxidative activity according to enzymatic hydrolysis condition of spotted shrimp by Flavourzyme	50
Table 23. Result of response surface methodology on antioxidative activity and Fe-chelating activity of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Flavourzyme	51
Table 24. The statistical result for degree of hydrolysis, antioxidative activity on DPPH and chelating activity on Fe of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Flavourzyme	52
Table 25. Response surface model for processing conditions of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Flavourzyme	53
Table. 26. Optimal conditions for preparation of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Flavourzyme	56
Table. 27. Experimental and predicted results for preparation of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Flavourzyme	57
Table 28. Response of the dependent variables of degree of hydrolysis and antioxidative activity according to enzymatic hydrolysis condition of spotted shrimp by	

Protamax	60
Table 29. Result of response surface methodology on antioxidative activity and Fe-chelating activity of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Protamax	61
Table 30. The statistical result for degree of hydrolysis, antioxidative activity on DPPH and chelating activity on Fe of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Protamax	62
Table 31. Response surface model for processing conditions of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Protamax	63
Table 32. Optimal conditions for preparation of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Protamax	66
Table 33. Experimental and predicted results for preparation of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Protamax	67
Table 34. Response of the dependent variables of degree of hydrolysis and antioxidative activity according to enzymatic hydrolysis condition of spotted shrimp by Neutrase	70
Table 35. Result of response surface methodology on antioxidative activity and Fe-chelating activity of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Neutrase	71
Table 36. The statistical result for degree of hydrolysis,	

antioxidative activity on DPPH and chelating activity on Fe of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Neutrase	72
Table 37. Response surface model for processing conditions of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Neutrase	73
Table 38. Optimal conditions for preparation of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Neutrase	76
Table 39. Experimental and predicted results for preparation of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Neutrase	77
Table 40. Sensory results of boiled-type shrimp reaction flavor affected by cysteine·HCl or methionine	82
Table 41. Sensory results of boiled-type shrimp reaction flavor affected by sugars	83
Table 42. Sensory results of boiled-type shrimp reaction flavor affected by reaction pH	86
Table 43. Sensory results of boiled-type shrimp reaction flavor affected by reaction time	88
Table 44. Sensory results of grilled-type shrimp reaction flavor affected by threonine	93
Table 45. Sensory results of grilled-type shrimp reaction flavor affected by sugars	95

Table 46. Sensory results of grilled-type shrimp reaction flavor affected by glucosamine and sucrose	98
Table 47. Sensory results of grilled-type shrimp reaction flavor affected by glucosamine and xylose	99
Table 48. Sensory results of grilled-type shrimp reaction flavor affected by reaction pH	101
Table 49. Sensory results of grilled-type shrimp reaction flavor affected by reaction time	103
Table 50. Composition of volatiles from spotted shrimp hydrolysates	109
Table 51. Composition of volatiles from boiled-type shrimp reaction flavor processed at pH 5.0	110
Table 52. Composition of volatiles from boiled-type shrimp reaction flavor processed at pH 7.5	111
Table 53. Composition of volatiles from grilled-type shrimp reaction flavor processed at pH 5.0	116
Table 54. Composition of volatiles from grilled-type shrimp reaction flavor processed at pH 7.5	117
Table 55. Sensory results of boiled-type and grilled-type shrimp reaction flavor by different drying methods	129
Table 56. Sensory results of pure type and seasoning type shrimp reaction flavor	131

Development and Quality Characteristics of Shrimp-type Reaction Flavor Using Enzymatic Hydrolysates of Spotted Shrimp (*Trachysalambria curvirostris*) and Precursors

Myung-Chan Kim

*Department of Food Science and Technology, Graduate
School, Pukyong National University*

Shrimp appears to be an alternative fishery resource because of the reduction of fish resource, which represents the primary catching of fish around the Yellow and Southern Seas in Korea, and particularly, the share of big size oriental shrimp, medium size shiba shrimp and spotted shrimp catches takes over 50% of total shrimp catch. Meantime, the natural odor of crustacea such as shrimp does spread an unique flavor which is quite different from those of mammalian meats. When stored for a long time, the unique odor is to fade away stinking with strong fish odor and off-flavor due to its decreased freshness.

This study intends to develop a shrimp reaction flavor which is capable of enhancing the favorite taste sensually by masking the fishy odor and off-flavor

and by reinforcing the unique flavor of shrimp through Maillard reaction process using the shrimp hydrolysate and reactive precursors. In this study, the objectives are to optimize the enzymatic hydrolysis condition of shrimp as the pre-treatment process for shrimp reaction flavor production; to determine optimum precursors and reacting condition, which remove fish odor of the seafood inherent but further reinforce good shrimp flavor; finally to develop boiled-type shrimp reaction flavor used in the seafood sauces and fish meat paste and grilled-type reaction shrimp flavor used in the production of snack and seasoning. In order to obtain the optimum hydrolysis condition of spotted shrimp by the type of enzymes, the two independent variables of reaction pH and temperature are selected based on the central composite design system designating the hydrolysis and anti oxidation efficiencies as dependent variables by using a response surface methodology. The optimum hydrolysis conditions for proteolytic enzymes such as Alcalase, Flavourzyme, Protamax and Nutrase were pH 9.3 and 65.2°C, pH 4.1 and 54.5°C, pH 6.6 and 42.5°C, pH 6.1 and 45.2°C, respectively. Among the four enzymes, Alcalase showed the best anti oxidative activities of 24.9% DPPH-scavenging activity and 26.9% Fe-chelating activity.

Depending on the application purpose, boiled-type shrimp reaction flavor of producing the boiled flavor used in instant noodle soup and seafood sauce, and grilled-type shrimp reaction flavor used in the flavoring, snacks and cookies are manufactured. To manufacture boiled-type shrimp reaction flavor, methionine and sucrose are selected as reaction precursors designating the reactive manufacturing condition as pH 7.5 and 1hr reaction time. To manufacture grilled-type shrimp reaction flavor, methionine, threonine,

glucosamine and xylose were selected as reaction precursors designating the reactive manufacturing condition as pH 7.5 and 2hr reaction time.

Upon executing the analysis on the volatile contents of sulfides and pyrazines which are presumed to further reinforce the unique shrimp flavor, no sulfides and pyrazines are identified from the hydrolyzate. From the boiled-type shrimp reaction flavor, two sulfur-containing compounds of dimethyl disulfide and dimethyl trisulfide and two nitrogen-containing compounds of 2,5-dimethyl pyrazine and 2,3-dimethyl pyrazine were identified. From the grilled-type shrimp reaction flavor, dimethyl disulfide and 7 pyrazines of pyrazine, methyl pyrazine, 2,5-dimethyl pyrazine, 2,3-dimethyl pyrazine, 2-ethyl-5-methyl pyrazine, trimethyl pyrazine and tetramethyl pyrazine were identified.

The boiled-type and grilled-type shrimp reaction flavors were made in the shapes of extracts and powders with the different mixing ingredients for pure type and seasoning type. The extracts were dried by vacuum drying, spray drying and freeze drying. The powders of grilled-type did show no sensory difference in terms of drying methods. As well, the comprehensive sensory score of seasoning type proved to be better than the pure type.

서 론

최근 경제 성장과 더불어 수산물의 소비가 증가하고 있으며, 통계청의 어업생산 통계 조사에 따르면 2008년도 국민 1인당 수산물 소비량이 2000년도에 비해 49%가 증가하여 54.9kg인 것으로 나타났다. 수산물 중 새우, 게 및 바다가재 등 갑각류도 소비가 증가하는 추세이며 수산산업에서 중요한 위치를 차지하고 있다(Kim, 2001). 수산물은 현대인의 성인병 예방에 도움을 주는 EPA, DPA와 같은 고도불포화지방산이 풍부하고 고단백 건강 식품으로 널리 애용되고 있다.

새우는 영양적으로 우수한 고단백·고칼슘 식품으로 다른 식품과 비교하였을 때, 단백질 함량이 21.4%로 육류의 단백질 함량 17.1%에 비해 높고, 칼슘 함량 역시 99.6 mg/100g로 멸치 칼슘의 1/5에 해당한다(Food composition table, 2006). 또한 새우의 껍질 색소인 astaxanthin은 항산화력과 면역증진효과를 지니는 것으로 알려져 있으며(Yang et al., 1997), 새우의 껍질의 키토산은 글루코사민으로 이루어져 있어 관절 및 연골 건강에 효과가 있는 것으로 보고되어 있다(Lee et al., 2006). 새우는 담백한 고급 식품으로 옛날부터 날것이나 건조한 것을 조리할 뿐만 아니라, 소금에 절여 젓갈로 널리 사용하여 왔다. 오늘날에는 튀김이나 전유어의 재료 또는 스낵 식품이나 과자류의 가공 원료로 많이 이용되고 있다.

꽃새우(*Trachysalambria curvirostris*)는 보리새우과(Family Penaeidae)에 속하며, 우리나라의 서해와 남해에서 많이 어획된다. 머리와 가슴을 덮고 있는 껍데기인 두흉갑(頭胸甲)은 두껍고 단단한 편이며, 몸의 표면에는 현미경적인 작은 가시들과 짧은 털이 촘촘히 나 있어 거칠거칠하고, 두 눈 사이로 뾰은 이마 뾰은 두흉갑 길이의 2/5정도로 끝이 뾰족하다. 꽃새우의 최대

크기는 전장이 수컷의 경우 8.1 cm, 암컷의 경우는 9.8 cm 정도로 암컷이 수컷에 비해 크며 몸의 색깔은 밝은 갈색 또는 회색을 띤 갈색이다(Cha et al., 2001).

새우는 어류 자원의 감소로 인한 대체 어자원으로써 서해와 남해의 대표적인 어획대상 종이며, 특히 대하, 중하 및 꽃새우는 전체 새우류 어획량의 50% 이상을 차지하고 있다. 이중 꽃새우는 가격이 저렴할 뿐만 아니라 세계적 수산 어획량 부족에도 불구하고 2000년 이후 년 평균 약 3,000 톤 이상 생산되는 등 어획량이 많은 편이며, 경제 성장의 여파로 식생활 수준이 향상되고 식품의 선택이 다양해짐에 따라 신선하고 독특한 조직감과 풍미를 가지고 있는 새우류의 소비가 증가하는 추세이다(Choi & Kim, 2006). 또한 식생활의 간편화, 다양화 및 고급화 경향으로 새우류를 포함한 수산물 소비 성향이 단순 전어, 부식의 개념에서 탈피하여 반응향 등 향미 재료의 사용과 독특한 조직감 등의 부여로 인하여 즉석, 편리, 고차 가공식품으로 소비가 확대되고 있다.

식품에 사용되는 향료는 식품의 기호성을 향상시키기 위하여 첨가되는 향미물질로 연제품을 비롯한 다양한 가공 제품에 사용이 되고 있다. Flavor는 음식을 먹으면서 느낄 수 있는 냄새, 맛, 자극, 감촉, 온냉감 등의 종합적인 감각을 의미하는 것으로 그러한 효과를 갖는 물질을 뜻한다. 식품에서 flavor의 역할은 첫째, 식품의 기호성을 높이고 식품에 새로운 image를 부각시켜 식품의 가치를 높여주는 것으로 새로운 식품을 창조, 개발하는데 있어서 필수적인 요소이다. 둘째, 식품의 고유향기를 강화·보강·표준화 시켜주는 역할을 함과 아울러 식품의 이취나 가공취를 masking하여 기호성을 높여준다. 따라서 식품에 향의 부여와 맛의 연출에서 flavor는 필수적이며, 다양화되는 소비자 요구에 부응하기 위해 천연감의 재현과 이취의 masking 등에 다양하게 이용되고 있으며 그 용도가 점

차 확대되고 있는 추세이다(Park, 2005).

식품의 flavor는 다음과 같은 3가지 경로를 통해서 생성되는 것으로 알려져 있다. 첫째, 효소나 미생물에 의하여 식품성분이 분해되는 과정(enzymatic reaction)에서 flavor가 형성되는 경로이다. 이의 예로는 과일이나 야채 등이 숙성되는 과정, 알콜 음료 및 발효 유제품 등을 들 수 있다. 둘째, 발효과정 동안 새로이 생성되는 화학적 중간물질을 새로운 반응 재료로 하여 식품향이 생성되는 과정(fermentative reaction)이다. 코코아나 빵의 향기성분이 새로운 전구체로서 발효과정을 통하여 형성된 후 다시 일련의 반응에 의해 새로운 향기성분을 생성하는 경우가 여기에 속한다. 셋째, Maillard reaction으로 알려진 비효소적 갈변 반응(non-enzymatic browning reaction)이다. 이는 식품을 가공 및 조리할 때 가열에 의해 생성되는 경로로, 식품의 구성성분인 탄수화물과 단백질이 복합적으로 반응하여 flavor가 생성된다(Yoo, 2001).

비효소적 갈변 반응은 식품의 가공, 저장 및 조리중에 일어나는 반응으로써 아미노산 또는 단백질 등의 아미노화합물과 환원당 등의 카르보닐화합물이 반응하여 일어난다. 이 반응은 아미노기에 카르보닐기가 결합함으로써 반응이 시작되어 Schiff 염기, 아마도리 전이(Amadori rearrangement), enol화(enolization)와 탈수, 분해, 중합 등으로 갈색물질인 melanoidin을 생성하게 된다. 이 반응이 식품의 착색, flavor의 생성, 항산화성, 항균성, 항돌연변이원성의 발현에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Kim, 1995). 그 중에서도 식품에 새로운 flavor의 부여가 가장 두드러진 특징의 하나이다. 갈변 반응에 의하여 생성된 flavor를 반응향(reaction flavor) 또는 가열향(cooked flavor)라 하는데, 이 기술은 현재 향료산업에서 육고기 향이나 savory향 등을 생산하는데 많이 이용(Manley, 1994)되고 있을 뿐만 아니라 게맛살 등 수산가공품의 기호성 향상 및 신제품의 개발에 커다란

비중을 차지하고 있다.

반응향에 관한 연구로는 Jang et al.(2004)이 참치 혈압육 가수분해물과 반응전구체를 이용하여 반응향을 제조하였고, Kim & Kim(2004)은 반응전구체를 이용하여 갈변반응으로 meat flavor extract를 개발하였으며, Kim & Beak(2003)은 반응향 기술을 이용한 구운 쇠고기향을 개발을 하였다. 또한 Yoon et al.(1994)은 HVP를 이용한 Maillard 반응에 의한 Meat-like flavor 생성을 연구하였으며, Ko et al.(1997)은 천연 조미향상 물질의 첨가에 의한 Maillard 반응에서 Meat-like flavor에 관한 연구를 하였다. Young & cummings(2008)는 Maillard reaction을 이용한 sheepmeat flavor 생성에 있어 xylose에 대한 영향을, Spanier et al.(2004)은 Meat flavor 생성에 있어 protein과 peptides의 영향을, Elmore & Mottram은 cooked beef와 lamb의 주 휘발성 성분인 2-alkyl-(2H)-thiapyrans와 2-alkylthiophenes을 Maillard reaction 반응경로를 통해 연구하였다.

하지만 seafood계 효소 가수분해물과 반응전구체를 이용한 반응향에 관한 연구는 미흡한 편이다. 또한 수산물은 비린내와 이취 등 불쾌취(off-flavor)가 강하여 기호성과 상품성에 많은 제약이 따르므로 반응향을 이용한 이의 제거 및 masking의 필요성이 산업적으로 크게 증대되고 있다.

이에 본 연구에서는 꽃새우의 가수분해물과 반응전구체를 이용하여 Maillard reaction 반응을 통한 비린내와 불쾌취를 masking하고 새우 고유의 풍미성분을 더욱 강화시켜 관능적으로 기호도를 향상시킬 수 있는 반응새우향을 개발하고자 하였다. 본 연구를 위해 첫째, 반응 새우향 제조를 위한 전처리 과정으로 단백질 가수분해 효소를 이용하여 새우의 가수분해물 조건을 최적화 하였으며 둘째, 꽃새우의 가수분해물을 이용하여 수산물 특유의 비린내를 제거하면서도 새우 고유의 풍미성분을 더욱 강화시키는 반응전구체와 반응조건을 찾고자 하였다. 이러한 반응전구체를 이용한 반응

새우향은 사용 목적에 따라 라면의 수프, 해산물계 소스, 연제품 등에 이용되는 boiled-type의 삶은 반응 새우향과 조미, 스낵, 쿠키 등에 이용이 되는 grilled-type의 구운 반응 새우향으로 나누어 제조하였다. Boiled-typed의 반응 새우향과 grilled-type의 반응 새우향의 차이는 사용되는 반응전구체의 종류와 반응향의 제조조건에 따른 반응경로의 차이에 의한 것으로, 반응경로에 따라 생성되어지는 휘발성 성분이 달라진다. 이에 근거하여 셋째, 라면 수프, 해산물계 소스, 연제품용으로 사용되는 boiled-type의 새우향과 조미, 스낵, 쿠키용으로 사용되는 grilled-type의 새우향을 개발하고자 하였으며, 부용제 첨가 여부에 따라 순수한 새우향을 강조한 pure type과 새우의 맛과 향에 감미를 보충시킨 seasoning type으로 나누었으며, 제품의 형태에 따라 분말(powder-type)제품과 액상(extract-type)제품으로 제조하였다.



재료 및 방법

꽃새우의 가수분해물과 반응전구체를 이용한 반응 새우향의 개발을 위한 실험은 첫째, 효소를 이용한 꽃새우의 가수분해 최적화 둘째, 반응전구체를 이용한 반응 새우향의 개발, 셋째 반응 새우향의 제조방법에 따른 제품화 순으로 진행하였다.

1. 실험재료

1.1 꽃새우

본 실험에 사용한 새우는 우리나라 연안에서 생산되는 갑각류 중 비교적 가격이 저렴한 꽃새우로 선정하였고, 원료 꽃새우(*Trachysalambria curvirostris*, 전장 : 5-6 cm, 체중 3-4 g)는 서천군에 소재한 서면 수협에서 선도가 양호한 생새우를 구입하여 동결건조 후 실험에 사용하였다.

1.2 반응전구체

반응향 제조를 위해 사용된 반응전구체 cysteine, methionine, threonine, glucosamine, glucose, xylose, ribose, sucrose는 Sigma Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

1.3 효소 및 시약류

본 연구에 사용된 상업용 시판효소 Alcalase 2.4 L^{FG}, Flavourzyme 500 MG, Neutrase 0.8 L, Protamax는 Novo Nordisk Bioindustrials Inc. (Danbury, CT, USA)에서 제공받아 5℃에서 저장하여 사용하였으며, 실험에 사용된 모든 시약은 연구용 특급품으로 사용하였다.

2. 실험방법

2.1 일반성분, pH 및 휘발성 염기질소(VBN)의 측정

일반성분은 AOAC법(AOAC, 2005)에 따라 수분은 상압가열건조법, 조지방은 Soxhlet법, 회분은 건식회화법, 조단백질은 semimicro Kjeldahl법으로 측정하였다. 가수분해물의 pH는 pH meter로 측정하였다.

휘발성 염기질소(VBN)는 conway를 사용하는 미량확산법으로 측정하였다(日本厚生省編, 1960). 즉, 시료 5 g을 4% trichloroacetic acid 20 mL와 혼합하여 30분간 방치한 다음, 단백질을 침전시키고 여과하여 1 mL를 conway unit의 외실에 첨가하고 내실에 N/150-HCl 1 mL와 포화 K₂CO₃ 1 mL를 첨가한 후 37℃에서 90분간 방치한 다음 N/70 Ba(OH)로 적정하여 휘발성 염기질소의 양을 계산하였다.

2.2 지방산의 분석

꽃새우의 지방은 Soxhlet으로 추출하여 지방 25 mg을 유리튜브에 정밀히 취한다. 여기에 0.5N NaOH-methanol를 1.5 mL 가하고 질소를 불어넣은 후 즉시 뚜껑을 덮고 혼합한다. 이어서 100℃ heating block에서 약 5분간 반응시켜 비누화한다. 비누화된 tube를 상온에서 식힌 후, 14% 트리플루오르보란메탄을 용액 2 mL를 가하고 다시 질소를 불어넣은 후 즉시 뚜껑을 덮어 혼합하고 100℃에서 30분 가온하여 methylation시킨다. 이어 30~40℃로 냉각하여 Hexane 1 mL를 넣어 추출한 후 기기분석용 시료로 하였고(Morrison, 1964), 분석조건은 Table 1과 같다.

2.3 유리아미노산의 분석

유리아미노산은 효소가수분해 시료 0.5 mL에 에탄올 30 mL를 넣어 4℃에서 1시간 추출과정을 거친 후 4℃, 10,000 rpm에서 15분간 원심분리를 한다.

Table 1. Gas chromatography analysis condition of fatty acid

Items	Conditions
Gas chromatography	Thermo Finnigan Trace GC (U.S.A)
Column	Ferries silica capillary COLUMN (AT-1, 007-CW-30-0.25F)
Column temperature	100℃(5℃/min)-200℃(3℃/min)-240℃
Injector temperature	200℃
Detector temperature (FID)	250℃
Carrier gas	N ₂
Gas pressure	65 PSI

70% 에탄올 30 mL를 넣어 위와 같은 추출과정을 반복한다. 감압농축을 한 후 물 20 mL, 에테르 20 mL를 차례로 넣어 분액여두기에 층분리를 시켜 아래층 부분을 취하여 다시 한번 감압농축을 한다. pH 2.2 lithium citrate buffer를 이용하여 일정량의 농도를 맞춘 후 sulfosalicylic acid를 가하여 완전히 녹이고 실온에서 30분간 방치한 다음 원심분리(3,200×g, 20분)하여 침전한 단백질을 제거한다. 0.20 μ m nylon filter에 여과한 후 유리아미노산 자동분석기(amino acid analyzer S433, Germany)로 분석하였다.

2.4 휘발성 성분의 분석

반응향의 휘발성 성분의 분석은 Dynamic headspace isolation, 자동탈착기, 가스크로마토그래피와 질량분석기를 사용하였다. 반응향의 휘발성 향기 성분을 분리 동정하기 위해 시료 10 mL에 내부표준물질 octanal(sigma aldrich chemical Co., USA) 2 μ L를 넣어 50°C dry oven에서 20분 정치하였다.

흡착튜브에 휘발성 성분의 흡착 과정 : 시료용 진공펌프를 이용하여 Tenax-TA가 충전된 총 길이 90 cm의 스테인레스 스틸 흡착튜브(agilent, USA)에 고순도 질소 실린더와 연결하여 물질을 흡착시킨다. 흡착튜브는 사용하기 전 튜브컨디셔닝을 이용하여 300°C에서 약 2시간 컨디셔닝을 실시하여 깨끗한 blank 상태로 준비한다.

흡착튜브에 휘발성 성분의 탈착 과정 : 흡착튜브를 질소실린더와 분리하고 자동열탈착장치(automatic thermal desorber 400, perkin elmer, UK)에 장착하여 350°C 부근의 열로 흡착방향의 역방향으로 탈착시킨다. 열탈착장치 조건은 Table 2와 같다.

휘발성 성분의 분리 및 동정 : 자동열탈착장치에 의해서 gas chromatography column(AT-1, 60 m ×0.32 mm×1.0 μ m)으로 유입된 휘발

성 성분은 gas chromatography(shimatzu 2010, Japan)와 mass selective detector(shimazu QP-2010 plus, Japan)에 의해 분리동정 하였다. 분석조건은 Table 3과 같다.

2.5 효소 가수분해물의 제조

꽃새우의 효소가수분해물은 전보의 방법(Oh, 2000)을 수정하여 조제하였으며, 꽃새우 효소가수분해 공정도는 Fig. 1과 같다.

2.6 가수분해도 측정

가수분해도 측정은 Boundrant & Cheftel(1976)에 의한 방법을 수정하여 사용하였다. 가수분해물 1 mL를 취하여 test tube에 옮긴 후 0.3 M trichloroacetic acid(TCA) 2 mL를 첨가한다. 이 용액을 실온에서 약 20분간 방치한 후 여과지(Whatmans No.4)로 여과한다. 여과액의 25 μ L에 증류수 0.225 mL, 0.5N NaOH 1.25 mL, 1.0 N Folin & Ciocalteu's phenol reagent 0.25 mL를 첨가한 후 즉시 혼합하여 30 $^{\circ}$ C, 15분간 방치한다. 그리고 용액 내의 불투명한 물질을 제거하기 위해 Toyo No.2로 여과한 후 여과액 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. OPA는 Church et al.(1983) 방법, TNBS는 Angles-Garcia(1997) 방법으로 측정하였다. 가수분해도의 계산은 다음과 같다.

$$DH(\%) = \frac{D_t - D_0}{D_{\max} - D_0} \times 100$$

D_0 : 가수분해되지 않은 용액의 흡광도

D_t : t시간 가수분해한 용액의 흡광도

$D_{\max}$: 시료 0.1 g에 6 N HCl 4 mL를 첨가하여 110 $^{\circ}$ C에서 24시간 가수분해한 후의 흡광도

Table 2. Operating conditions of automatic thermal desorber

Items	Conditions
ATD 400	Perkin Elmer, UK
Primary tube type	Tenax- TA (Agilent, USA)
Cold trap type	Tenax-TA 20 mg
1st Desorption	350℃ - 1min
2nd Cryo temp.	-30℃
2nd Desorption	350℃ - 1min
Desorb flow	50.2 ml/min
Inlet split	No
Out split	11.5 ml/min

Table 3. Analytical condition of gas chromatography and mass selective detector

Items	Conditions
Gas chromatography	Shimatzu 2010 , Japan
Mess selective detector	Shimatzu QP-2010 plus, Japan
Column	AT-1 60 m ×0.32 mm × 1.0 μm
Column temperature	35℃ - 10min 8℃/min- 120℃ -10min 12℃/min-180℃ -7min 15℃/min-230℃ -10min
Injector temperature	230℃
Detector temperature	250℃
Carrier gas	He ₂ (purity 99.9999%)
Column pressure	15.9 psi
Mass range	20~350 m/z

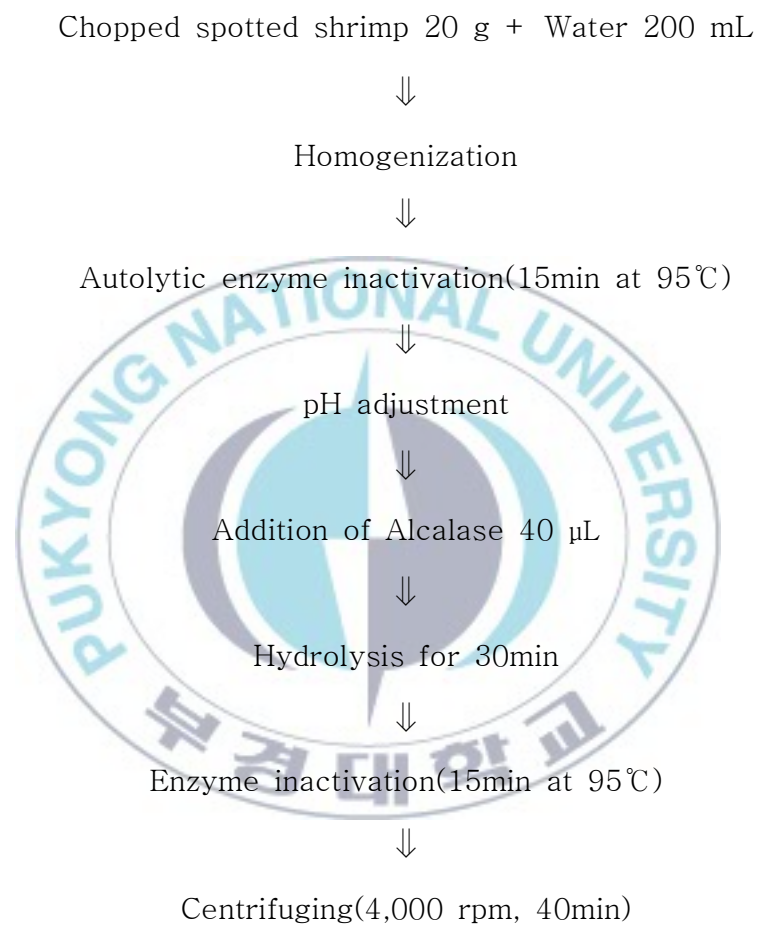


Fig. 1. Flow chart for preparation of enzymatic hydrolysates of spotted shrimp.

2.7 DPPH-Scavenging 및 Fe-Chelating activity 측정

DPPH에 대한 항산화효과 측정은 Guerard et al.(2007) 방법에 준하여 실험을 하였으며 Fe-Chelating측정은 Raghavan & Kristinsson(2008)의 방법으로 측정하였다. 시료를 원심분리하여 상층액을 사용하며 DPPH 시약은 10 mg을 50 mL methanol 용액에 녹여 사용한다. Control 시료는 3 mL supernatant와 0.15 mL DPPH MeOH를 사용하고 blank는 3 mL MeOH:Water (1.5:1 or 1.8:1.2 mL)+0.15 mL MeOH를 사용하였다. 시료용액은 3 mL 상층액 + 0.150 mL DPPH · MeOH를 사용하였다. 모든 시료는 Al-foil로 빛을 차단하였고 30분 동안 상온에서 반응시켰다. 흡광도는 519 nm에서 측정하였고 항산화 측정값은 아래의 식으로 계산하였다.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{\text{blank}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{control}})}{A_{\text{blank}}} \times 100$$

금속 Fe^{2+} 를 이용한 chelating activity의 측정은 ferrozine시약을 사용하는 분석방법을 이용하였다. 즉 시료 2.5 mL에 12.5 mL의 MeOH를 첨가한 후 원심분리(2,000 rpm, 20분)하여 상층액을 사용한다. Control 시료는 3 mL의 상층액에 0.1 mL의 FeCl_2 와 0.2 mL의 증류수를 사용하였고, sample 시료는 3 mL의 상층액에 0.1 mL의 FeCl_2 와 0.2 mL의 ferrozine를 사용하였고, blank는 3 mL의 MeOH에 0.1 mL의 FeCl_2 와 0.2 mL의 ferrozine를 사용하였다. 모든 시료는 Al-foil로 빛을 차단하였고 30분 동안 실온에서 반응시켰다. 흡광도는 561 nm에서 측정하였고 항산화 측정값은 아래의 식으로 계산하였다.

$$\% \text{ Metal chelation} = \frac{A_{\text{blank}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{control}})}{A_{\text{blank}}} \times 100$$

2.8 최적가수분해 조건설정 및 통계분석

가수분해 최적화 실험에 앞서 예비실험을 통하여 가수분해 효소의 농도 (%)를 설정한 후, 가수분해에 영향을 미치는 독립변수인 pH와 온도에 대하여 실험영역을 설계하여 Table 4와 같이 각 효소별로 5수준으로 code화 (-1.414, -1, 0, 1, +1.414) 하였다. 이러한 독립변수들과 code를 이용하여 반응표면 실험계획을 중심합성계획(central composite design(CCD), Box & Wilson, 1951)에 따라 작성하였으며, 실험결과를 SAS software(version 9.1, SAS Institute Inc., USA)를 사용하여 통계처리하면 실험에 대한 2차 회귀 방정식을 얻을 수 있다.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=2}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (i < j)$$

2.9 반응전구체를 이용한 반응 새우향의 제조

Boiled-type과 grilled-type의 반응 새우향 제조를 위한 반응전구체의 선택 및 반응향 제조조건 실험의 flow chart는 Fig. 2와 같다. 먼저 반응 전구체 선택을 위해 amino acid원으로 cysteine, methionine, threonine을 sugar원으로는 6탄당인 glucose, 5탄당인 xylose, ribose, 이당류인 sucrose와 아미노당인 glucosamine를 선택하였다.

Table 4. Coded level of independent variables in experimental design

Enzymes	Independent variables	Code units				
		-1,414	-1	0	+1	+1,414
Alcalase	pH	7.6	8.0	9.0	10.0	10.4
	Temp(°C)	50.9	55.0	65.0	75.0	79.1
Flavourzyme	pH	2.6	3.0	4.0	5.0	5.4
	Temp(°C)	35.9	40	50	60	79.1
Neutrase	pH	3.6	4.0	6.0	8.0	8.4
	Temp(°C)	25.9	30	40	50	69.1
Protamax	pH	3.6	4.0	6.0	8.0	8.4
	Temp(°C)	25.9	30	40	50	69.1

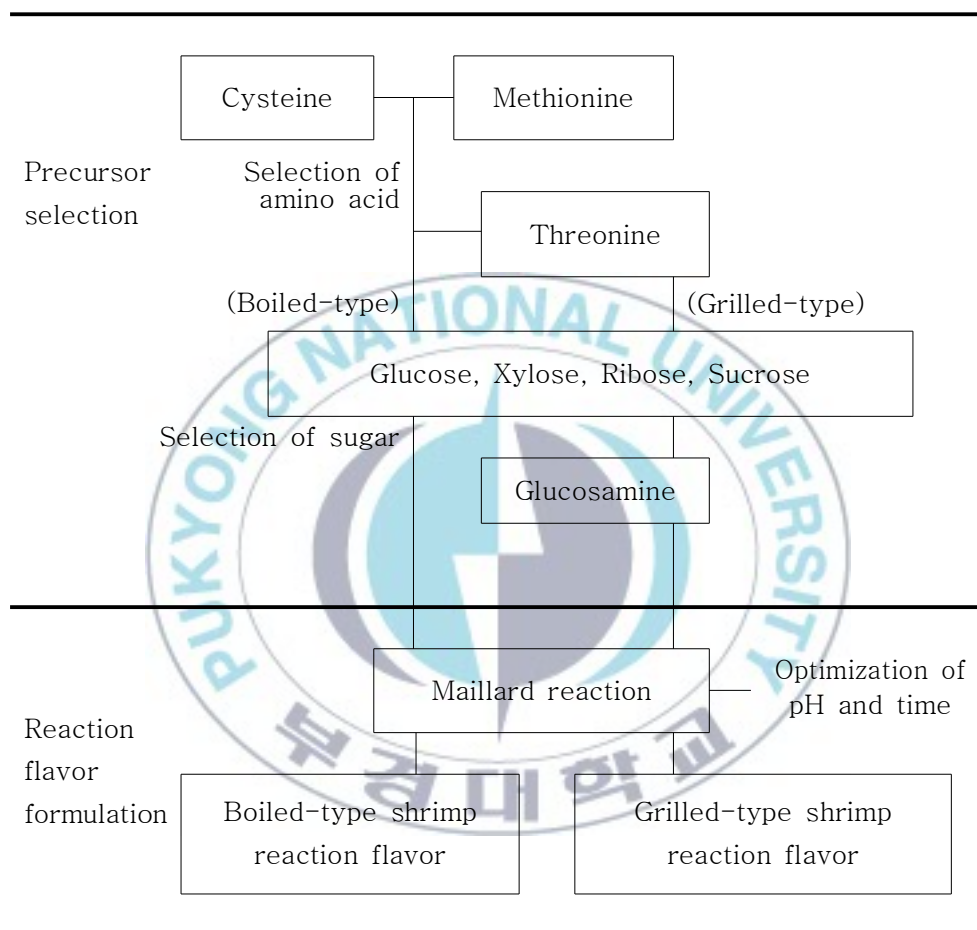


Fig. 2. Flow chart for shrimp reaction flavor from enzymatic hydrolysates of spotted shrimp.

2.9.1 Boiled-type 반응 새우향

반응전구체의 선정 : Table 5의 배합비율에 따라 함황화합물인 cysteine · HCl과 methionine을 먼저 반응시켜 관능검사를 비교한 후 아미노산을 선택하고, glucose, xylose, ribose 및 sucrose을 반응시켰으며, 각 단계의 전구체의 선택은 종합적인 관능평가 점수가 가장 높으면서도 boiled-type 반응 새우향에 가장 가까울 것이라고 생각되는 아미노산과 당을 반응전구체로 선택하였다. 반응전구체 선택을 위한 model system의 반응조건은 반응온도는 물의 끓는 온도인 100℃를 기준으로 설정하였고, 아미노산과 당의 배합비율을 1:1로 고정하였다. 반응시간과 반응물의 pH는 임의로 2시간, pH 7.0로 고정하였으며, 전구체의 용매로 물과 꽃새우 효소 가수분해물을 이용하여 관능검사를 비교하였다.

반응향 제조 조건의 설정 : Model system에서 선택되어진 반응전구체를 이용하여 반응향 제조 조건을 설정하기 위해 Table 6과 같이 실험을 진행하였다. 우선 pH 별로(pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0) 실험을 실행한 후, 관능검사의 결과를 기준으로 최적의 pH를 선정하였으며, 선정된 pH 조건하에서 시간 별로(1hr, 2hr, 3hr) 실험을 진행하였다.

2.9.2 Grilled-type 반응 새우향

반응전구체의 선정 : Table 7의 배합 비율에 따라 함황화합물인 cysteine · HCl과 methionine을 먼저 반응시켜 관능검사를 비교한 후, 아미노알콜류인 threonine을 반응시켜 최종 아미노산 반응전구체를 선택하였다. Sugar로 glucose, xylose, ribose 및 sucrose를 반응시켰으며, 또 다른 반응전구체로 아미노기와 알데하이드기를 모두 가지고 있는 glucosamine을 고려하였다. 각 단계의 전구체의 선택은 종합적인 관능평가 점수가 가장 높으면서도 grilled-type 반응 새우향에 가장 가까울 것이라고 생각되어지는 아미노

Table 5. Experimental design on adding amino acid precursors for boiled-type shrimp reaction flavor

1) Model system of shrimp reaction flavor on adding amino acid precursors

▷ Effects of cysteine and methionine precursors

Ingredient (g)	A	B	C	D	E	F
Cysteine·HCl	0.3	–	0.15	0.3	–	0.15
Methionine	–	0.3	0.15	–	0.3	0.15
Water	50	50	50	–	–	–
Shrimp enzyme hydrolysates	–	–	–	50	50	50
Glucose	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Total	50.6	50.6	50.6	50.6	50.6	50.6

2) Model system of shrimp reaction flavor on adding sugar precursors

Ingredient (g)	A	B	C	D	E	F	G	H
Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Glucose	0.3	–	–	–	0.3	–	–	–
Xylose	–	0.3	–	–	–	0.3	–	–
Ribose	–	–	0.3	–	–	–	0.3	–
Sucrose	–	–	–	0.3	–	–	–	0.3
Water	50	50	50	50	–	–	–	–
Shrimp enzyme hydrolysates	–	–	–	–	50	50	50	50
Total	50.6	50.6	50.6	50.6	50.6	50.6	50.6	50.6

Table 6. Experimental design for the optimum reaction condition of boiled-type shrimp reaction flavor

1) Model system of shrimp reaction flavor on reaction pH

Ingredient (g)	pH			
	5.0	6.0	7.0	8.0
Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Sucrose	0.3	0.3	0.3	0.3
Shrimp enzyme hydrolysates	50	50	50	50
Total	50.6	50.6	50.6	50.6

2) Model system of shrimp reaction flavor on reaction time

Ingredient (g)	Time (hrs)		
	1	2	3
Methionine	0.1	0.1	0.1
Sucrose	0.3	0.3	0.3
Shrimp enzyme hydrolysates	50	50	50
Total	50.6	50.6	50.6

산과 당을 반응전구체로 선택하였다. 반응전구체 선택을 위한 model system의 반응조건은 반응온도는 물의 끓는 온도인 100℃를 기준으로 설정하였고, 아미노산과 당의 배합비율을 1:1로 고정하였다. 반응시간과 반응물의 pH는 임의로 2시간, pH 7.0로 고정하였으며, 전구체의 용매로 물과 꽃새우 효소 가수분해물을 이용하여 관능검사를 비교하였다.

반응향 제조조건의 설정 : Model system에서 선택되어진 반응전구체를 이용하여 반응향 제조 조건을 설정하기 위해 Table 8과 같이 실험을 진행하였다. 우선 pH 별로(pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0) 실험을 실행한 후, 관능검사의 결과를 기준으로 최적의 pH를 선정하였으며, 선정된 pH 조건하에서 시간 별로(1hr, 2hr, 3hr) 실험을 진행하였다.

2.10 반응 새우향 제품의 제조

2.10.1 제품 제조의 원료 배합비

Boiled-type 반응 새우향은 꽃새우의 효소가수분해물과 실험을 통해 선정된 반응전구체를 최적의 반응조건에서 반응시켜 얻은 반응액에 carrier 역할을 하는 maltodextrin을 넣어 제조한 것을 pure type이라 정의하였으며, pure type으로 제조된 새우향에 부용제(taste enhancer)를 넣어 조미시킨 것을 seasoning type이라고 정의하였다. Carrier는 향과 맛을 포집(encapsulation)하는 역할을 하는 것으로, liquid를 solid로 형태로 제조하는 과정에서 향과 맛이 손실되는 것을 최소화시켜주며 제품의 색과 물성을 향상 시켜준다(Versic, 1998). Boiled-type 반응 새우향의 pure type과 seasoning type의 배합비는 Table 9와 같다.

Grilled-type 반응 새우향은 꽃새우의 효소가수분해물에 실험을 통해 선정된 반응전구체를 최적의 반응조건에서 반응시켜 얻은 가수분해물과 carrier 역할을 하는 maltodextrine을 넣어 제조한 것을 pure type이라 정의

Table 7. Experimental design on adding precursors for grilled-type shrimp reaction flavor

1) Model system of shrimp reaction flavor on adding amino acid precursors

① Effects of cysteine and methionine precursors

Ingredient (g)	A	B	C	D	E	F
Methionine	0.3	0.15	–	0.3	0.15	–
Threonine	–	0.15	0.3	–	0.15	0.3
Water	50	50	50	–	–	–
Shrimp enzyme hydrolysates	–	–	–	50	50	50
Glucose	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Total	50.6	50.6	50.6	50.6	50.6	50.6

② Effects of methionine and threonine precursors

Ingredient (g)	A	B	C	D	E	F	G	H
Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Glucose	0.3	–	–	–	0.3	–	–	–
Xylose	–	0.3	–	–	–	0.3	–	–
Ribose	–	–	0.3	–	–	–	0.3	–
Sucrose	–	–	–	0.3	–	–	–	0.3
Water	50	50	50	50	–	–	–	–
Shrimp enzyme hydrolysates	–	–	–	–	50	50	50	50
Total	50.6	50.6	50.6	50.6	50.6	50.6	50.6	50.6

2) Model system of shrimp reaction flavor on adding sugar precursors

Ingredient (g)	A	B	C	D	E	F
Cysteine·HCl	0.3	–	0.15	0.3	–	0.15
Methionine	–	0.3	0.15	–	0.3	0.15
Water	50	50	50	–	–	–
Shrimp enzyme hydrolysates	–	–	–	50	50	50
Glucose	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Total	50.6	50.6	50.6	50.6	50.6	50.6

3.1) Model system of shrimp reaction flavor on adding glucosamine and sucrose precursors

Ingredient (g)	1	2	3	4	5	6
Methionine	0.15	0.1	–	0.15	0.1	–
Threonine	0.15	0.1	–	0.15	0.1	–
Sucrose	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Glucosamine	–	0.1	0.3	–	0.1	0.3
Water	50	50	50	–	–	–
Shrimp enzyme hydrolysates	–	–	–	50	50	50
Total	50.6	50.6	50.6	50.6	50.6	50.6

3.2) Model system of shrimp reaction flavor on adding glucosamine and xylose precursors

Ingredient (g)	1	2	3	4	5	6
Methionine	0.15	0.1	–	0.15	0.1	–
Threonine	0.15	0.1	–	0.15	0.1	–
Xylose	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Glucosamine	–	0.1	0.3	–	0.1	0.3
Water	50	50	50	–	–	–
Shrimp enzyme hydrolysates	–	–	–	50	50	50
total	50.6	50.6	50.6	50.6	50.6	50.6

Table 8. Experimental design for the optimum reaction condition of grilled-type shrimp reaction flavor

1) Model system of shrimp reaction flavor on reaction pH

Ingredient (g)	pH			
	5.0	6.0	7.0	8.0
Methionine	0.1	0.1	0.1	0.1
Threonine	0.1	0.1	0.1	0.1
Xylose	0.3	0.3	0.3	0.3
Glucosamine	0.1	0.1	0.1	0.1
Shrimp enzyme hydrolysates	50	50	50	50
Total	50.6	50.6	50.6	50.6

2) Model system of shrimp reaction flavor on reaction time

Ingredient (g)	Time (hrs)		
	1	2	3
Methionine	0.1	0.1	0.1
Threonine	0.1	0.1	0.1
Xylose	0.3	0.3	0.3
Glucosamine	0.1	0.1	0.1
Shrimp enzyme hydrolysates	50	50	50
Total	50.6	50.6	50.6

하였으며, pure type으로 제조된 새우향에 부용제(taste enhancer)를 넣어 조미를 한 것을 seasoning type이라고 정의하였다. Grilled-type 반응 새우향의 pure type과 seasoning type의 배합비는 Table 10과 같다.

2.10.2 제품 형태에 따른 제조 방법

분말(powder-type) 제품은 진공 건조기(vacuum dryer), 분무 건조기(spray dryer), 동결 건조기(freezing dryer)를 이용하여 제조하였다. 진공건조는 진공도 700 cm/Hg, 온수 온도 70℃, chamber 온도 55~60℃ 조건으로 3시간 건조하였으며, 이때 base액 brix는 70%로 하였다. 분무건조는 inlet 온도 200℃, outlet 온도 95~110℃, disk 속도 15,000 rpm, input 양 30 mL/min 조건으로 건조하였으며, 이때 base액 brix는 35%로 하였다. 동결건조는 진공도 0.1 torr 동결온도 -80℃에서 48시간 건조하였으며, 이때 base액 brix는 35%로 하였다. 액상(extract-type) 제품은 base액을 brix 40%로 진공 농축하여 제조하였다.

Table 9. Formula of boiled-type shrimp reaction flavor

Ingredients	Quantities (g)	
	Pure type	Seasoning type
Shrimp enzyme hydrolysates	1000	1000
Methionine	6	6
Sucrose	6	6
Maltodextrin	364	364
Salt	100	100
Sodium succinate	–	3.5
Nucleic acid IMP+GMP	–	8
Glycine	–	10
Glucose	–	20
DL-Alanine	–	5
Xanthan Gum	–	0.4
Total	1,476	1,522.9

Table 10. Formula of grilled-type shrimp reaction flavor

Ingredients	Quantities (g)	
	Pure type	Seasoning type
Shrimp enzyme hydrolysates	1000	1000
Methionine	2	2
Threonine	2	2
Sucrose	6	6
Glucosamine	2	2
Maltodextrin	364	364
Salt	100	100
Sodium succinate	-	3.5
Nucleic acid IMP+GMP	-	8
Glycine	-	10
Glucose	-	20
DL-Alanine	-	5
Xanthan Gum	-	0.4
Total	1,476	1,522.9

2.11 관능 평가 및 통계 처리

관능적 특성을 평가하기 위하여 비전문가 panel인 훈련된 부경대학교 식품공학과 학생 8명과 반응향 15년 경력 전문가 panel 1명을 선발하여 관능 검사요원으로 하였다. 각 시료는 투명용기(직경 5 cm, 높이 7 cm)에 제시하였으며 직접 향을 맡아본 후 스멜링 브로터(smelling blotter)를 이용하여 향을 한번 더 맡아본다. 시료는 9점 기호척도법을 사용하여 평가하였으며 1점은 아주 약함이나 아주 나쁨, 5점은 보통, 9점은 아주 강함이나 아주 좋음을 나타내었다. 시료의 제시는 무작위 완전블록 실험계획법(randomized complete block design, Kim & Lee, 1998)을 적용하였으며 모든 관능검사는 식사시간을 피하여 주로 오후 4시를 전후하여 실시하였다. 관능검사의 결과는 SAS package를 이용하여 ANOVA 처리를 하였으며 그 유의적 차이는 Duncan's multiple range test를 이용하여 분석하였다(Seoung, 2003).

결과 및 고찰

1. 꽃새우의 성분 조성

1.1 꽃새우의 일반성분, pH 및 VBN

동결 건조한 꽃새우의 조단백질, 조지방 및 회분의 함량은 53.84%, 22.49%, 12.4%였다. 동결새우의 수분함량은 74.6%, 꽃새우 육의 pH는 7.9로 나타났으며, 휘발성 염기질소 함량은 동결새우에서 5.6 mg/100g, 새우의 가수분해물에서는 7.0 mg/100g로 선도는 신선한 것으로 판정이 되었다.

1.2 지방산

새우의 생시료에서 추출한 총지질의 지방산 조성은 Table 11과 같다. 지방산 조성을 살펴보면, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 20:1, 21:0, 24:0이 주요 지방산이었고 불포화지방산의 구성비는 39.2%, 다가불포화지방산의 구성비는 4.9%로 나타났다. 수산물계 flavor는 다가불포화지방산의 lipoxigenases 작용에 의해서 6-,8-,9- carbonyls과 alcohols를 생성하는데 이는 신선한 어류의 flavor에 기인하는 것으로 알려져 있으며, 수산물의 가공·저장 시에는 이러한 다가불포화지방산이 산화·분해되어 카르보닐화합물을 생성하고 이는 불쾌취(off-flavor) 산패취(rancid flavor)를 유발하는 것으로 알려져 있다(Ho, 1989). 또한 다가불포화지방산은 carotenoid pigment와 co-oxidation 반응을 하여 fish의 flavor에 영향을 주는 것으로 보고되어 있으며, 신선한 수산물의 고도불포화지방산은 시료 중 유리 아미노산류와 가열 반응하여 heterocyclic compound를 형성하는 것으로 보고되어 있다(Ho, 1989). Heterocyclic compounds의 종류로는 furan, thiophenes, thiazoles, cyclic polysulfides, pyridines, pyrazines 등이 있으며 이러한 compounds는 향미 생성에 좋은 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Lindsay, 1994).

Table 11. Fatty acid composition of total lipid extracted from frozen spotted shrimp

Fatty acids	Content (area %)
14:0	2.07
14:1	0.37
15:0	0.50
15:1	0.63
16:0	18.26
16:1	8.91
17:0	0.97
17:1	0.66
18:0	7.04
18:1n9	18.44
18:2n9	1.12
18:3n6,9,12	0.60
18:3n9,12,15	0.37
20:0	1.67
20:1	5.69
20:2	0.27
20:3	0.46
21:0	14.67
20:4	0.62
20:5	0.64
22:0	0.11
22:1	0.42
22:2	0.80
23:0	1.48
24:0	13.25
Total	100

1.3 유리아미노산

아미노산, 펩타이드, 그리고 단백질은 식품의 가장 중요한 성분중 하나로 식품의 화학적·물리적 성질이나 그 영양가에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, 이를 함유하고 있는 식품의 맛에도 직접적으로 영향을 준다.

식품 중의 아미노산들은 그 맛에 따라 다섯 개의 그룹으로 나눌 수 있다. 첫째, 전혀 맛이 없거나 거의 맛이 없는 아미노산 그룹으로는 D,L-aspartic acid, D-alanine, D,L-arginine, L-histidine, D,L-isoleucine, D,L-lysine, D,L-proline, D,L-serine, D,L-threonine, D,L-valine 등이 있다. 둘째, 단맛을 가진 아미노산으로는 D-histidine, D-phenylalanine, D-tyrosine, D-leucine, L-alanine, glycine 등이 있다. 셋째, 쓴맛을 가진 아미노산으로는 L-phenylalanine, L-tyrosine, L-leucine 등이 있다. 넷째, 유화물과 비슷한 맛(sulfurous taste)을 가진 아미노산으로는 D,L-cysteine, D,L-methionine 등이 있다. 마지막으로 amino acid 단독으로는 별 뚜렷한 맛을 갖고 있지는 않으나 함께 존재함으로써 다른 물질의 맛을 변화(flavor modifier)시키거나 강화시켜주는 성질(flavor intensifier)을 가진 아미노산으로 L-glutamic acid가 있다(Kim, 1987).

시료 꽃새우 효소 가수분해물의 유리아미노산 조성은 Table 12와 같다. 유리아미노산의 총량은 1,072 mg/100g이며, 주요 유리 아미노산은 산성아미노산인 L- α -aminoadipic acid와 L-leucine, L-lysine, L-alanine으로 나타났다. 감칠맛에 관여를 하는 aspartic acid와 glutamic acid의 함량은 각각 1 mg/100g, 39 mg/100g으로 나타났으며, 단맛에 관여하는 L-alanine, L-glycine의 함량은 각각 102 mg/100g, 61 mg/100g로 나타났다. 쓴맛을 가진 아미노산인 L-phenylalanine의 함량은 67 mg/100g, L-tyrosine의 함량은 24 mg/100g, L-leucine의 함량은 116 mg/100g이었으며, sulfurous taste를 가지는 아미노산인 L-methionine는 62 mg/100g로 나타났다.

Table 12. Free amino acid contents in enzymatic hydrolysates of spotted shrimp

Amino acid	Content (mg/100g)
Phosphoserine	7
Taurine	31
L-Aspartic acid	1
L-Threonine	22
L-Serine	34
L-Glutamic acid	39
L- α -Aminoadipic acid	289
L-Glycine	61
L-Alanine	102
L-Citrulline	3
L-Valine	23
L-Methionine	62
L-Isoleucine	61
L-Leucine	116
L-Tyrosine	24
L-Phenylalanine	67
L-Ornithine	13
L-Lysine	117
Total	1,072

2. 효소의 종류에 따른 꽃새우의 가수분해 최적화

중심합성계획법에 의하여 독립변수(independent variable)로는 pH(X_1), 효소분해 온도(X_2)를, 종속변수(dependent variable)로는 가수분해도를 나타내는 TCA(Y_1 , %), OPA(Y_2 , %), TNBS(Y_3 , %)와 항산화력을 측정하는 DPPH-scavenging activity(Y_4 , %), Fe-chelating activity(Y_5 , %)를 선택하여 최적 제조조건을 확립하였다. 가수분해도는 효소분해정도를 측정하는 중요한 요소이며 실험방법에 따라 TCA, OPA, TNBS법으로 측정할 수 있다. 효소분해에 의해 분리된 펩타이드와 아미노산은 여러 가지 기능성을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며(Gildverg & Stenberg, 2001; Cheong, 2007), 이러한 기능성 중 하나로 항산화력을 종속변수로 선정하였다. 중심합성 계획법에 의한 실험구간 및 범위는 Table 4에 나타내었다.

2.1 시간에 따른 효소농도별 가수분해

단백질 가수분해 효소에 의한 최적 가수분해조건을 설정하기 위해 앞서 시간에 따른 효소 농도별 가수분해 정도를 알아보았다. 효소농도에 따른 시간별 pH의 변화는 Fig. 3 및 Table 13과 같다. 초기 pH는 9.2로 나타났으며 가수분해가 점점 진행됨에 따라 pH가 낮아져 반응종결 시 pH는 7.2-7.4로 나타났다. 효소농도 0.2%일 때는 가수분해가 서서히 일어나 반응 150분 후 pH 7.4, 가수분해도 23.9%로 반응이 종결됨을 볼 수 있다. 효소농도 0.5%의 경우 반응 150분 후 pH 7.4, 가수분해도 28.5%로 효소농도 0.2%와 비슷한 것으로 나타났다. 효소농도 3-7% 범위일 때는 10분 이내로 가수분해 반응이 종결되었으며 이때의 pH는 7.2-7.3, 가수분해도는 30%로 나타났다. 이는 Kim(2010)이 효소농도가 증가함에 따라 가수분해율이 증가한다는 연구결과와 유사한 경향을 보였다. 따라서 반응 3시간 후에는 모든 효소농도에서 반응이 종결되므로, 반응시간을 3시간 이상 지속한다면 효소

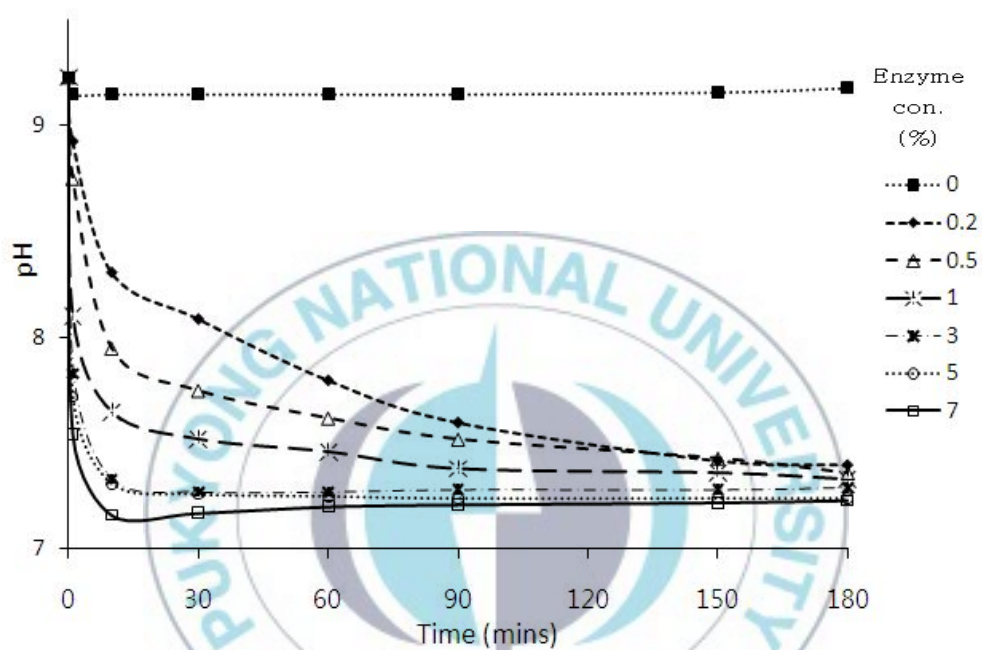


Fig. 3. Changes of pH according to the enzyme concentration during hydrolysis at 65°C

Table 13. Changes of pH and TCA according to the enzyme concentration during hydrolysis at 65℃

Enzyme con. (%)	Time (mins)								TCA (%)
	0	1	10	30	60	90	150	180	
0		9.2	9.2	9.2	9.2	9.2	9.2	9.2	1.4
0.2		8.9	8.3	8.1	7.8	7.6	7.4	7.4	23.9
0.5		8.8	8.0	7.8	7.6	7.5	7.4	7.4	28.5
1.0	9.2	8.1	7.7	7.5	7.5	7.4	7.4	7.3	30.0
3.0		7.8	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	30.0
5.0		7.7	7.3	7.7	7.3	7.2	7.2	7.2	30.0
7.0		7.5	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	30.0

농도는 0.2%일 때가 가장 경제적인 것으로 생각되어진다.

2.2 Alcalase

Alcalase에 의한 꽃새우 가수분해물의 최적 제조조건을 알아 보기위해 예비실험을 실시하였으며 예비실험을 통해 효소의 농도는 0.2%로 고정하였고, 가수분해에 영향을 미치는 각각의 독립변수의 중심영역을 설정하여 중심합성계획법에 의해 무작위로 실험을 수행하였다(Table 14).

반응표면식과 유의차 검증을 위하여 SAS software로 통계처리 하였으며, 다중회귀분석 결과는 Table 15 및 16과 같다. 2차 회귀방정식의 적합도에 대한 결정계수(R-square)에 있어 가수분해도 측정값인 TCA, OPA, TNBS가 각각 0.9618, 0.9173, 0.9106, 항산화력 측정값인 DPPH-scavenging activity, Fe-chelating activity가 각각 0.9459, 0.9844로 나타나 실험이 만족할 만한 디자인으로 설계되었음을 알 수 있었다. 적합결여검증에 있어서도 가수분해도 측정값인 TCA, OPA, TNBS가 각각 0.0001이하, 0.0011, 0.0015, 항산화력 측정값인 DPPH-scavenging activity, Fe-chelating activity가 각각 0.0003, 0.0001이하로 2차 회귀방정식의 설계가 유의함을 알 수 있었다 (Table 17, 18). 각 독립변수들의 실험에 대한 영향과 변수간의 상관관계를 살펴보면 가수분해도에 있어서 TCA, TNBS의 일차항과 이차항은 99%의 수준에서 높은 수준의 유의성을 나타내어 실험에 대해 영향이 있는 것으로 나타났으나, 교차항은 95%수준에서 유의성을 나타내지 않아 영향이 없는 것으로 나타났다. OPA는 이차항의 경우 99%수준에서 높은 유의성을 나타내었으나 일차항과 교차항의 경우 95%수준에서 유의성을 나타내지 않았다. 항산화력에 있어서 DPPH-scavenging activity과 Fe-chelating activity의 일차항, 이차항은 99%의 수준에서 높은 수준의 유의성을 나타내어 실험에 대해 영향이 있는 것으로 나타났으나, 교차항은 95%수준에서 유의성을 나

타내지 않아 영향이 없는 것으로 나타났다(Table 17, 18). 이러한 결과를 토대로 얻어진 2차 회귀방정식은 Table 19와 같다.

가수분해에 영향을 미치는 두 독립변수 상호간의 상관관계를 알아보기 위해 2차 회귀방정식을 maple software를 이용하여 3차원 그래프(tree dimensional graph)를 그렸으며 그 결과는 Fig. 4, 5와 같다. 두 종속변수가수분해도와 항산화력에 대한 독립변수의 최적조건 값은 Table 20에 나타내었다. 가수분해도를 나타내는 TCA(Y_1)의 최적화 조건은 pH(X_1) 9.3, 효소처리 온도(X_2) 64.5℃, OPA(Y_2)의 최적화 조건은 pH(X_1) 9.2, 효소처리 온도(X_2) 64.4℃, TNBS(Y_3)의 최적화 조건은 pH(X_1) 9.3, 효소처리 온도(X_2) 67.7℃로 서로 유사한 것으로 나타났으며 실험방법에 따른 가수분해도 값의 차이는 없는 것으로 나타났다. 항산화력을 나타내는 DPPH-scavenging activity(Y_4)의 최적화 조건은 pH(X_1) 9.4, 효소처리 온도(X_2) 65.0℃, Fe-chelating activity(Y_5)의 최적화 조건은 pH(X_1) 9.5, 효소처리 온도(X_2) 64.6℃으로 나타났다. 가수분해도와 항산화력의 종속변수들에 대한 최적 조건의 값들이 거의 유사하여 Alcalase를 이용한 최적 제조조건을 독립변수들의 평균값으로 나타내었는데 그 결과는 pH(X_1) 9.3, 효소처리 온도(X_2) 65.2℃로 나타났다. 독립변수의 최적조건에서 예상되는 종속변수인 가수분해도의 최대값은 TCA 31.4%, OPA 29.2%, TNBS 29.5%였으며, 항산화력의 최대값은 DPPH-scavenging activity 24.9%, Fe-chelating activity 26.9%로 나타났다. 실제실험의 최대값은 TCA 31.9%, OPA 29.5%, TNBS 29.3%였으며, 항산화력의 최대값은 DPPH-scavenging activity 25.1%, Fe-chelating activity 26.7%로 예상되는 최대값과 큰 차이를 나타내지 않았다(Table 21).

Table 14. Response of the dependent variables of degree of hydrolysis and antioxidative activity according to enzymatic hydrolysis condition of spotted shrimp by Alcalase

Expt. no	Independent variables ¹⁾		Dependent variable				
	(X ₁) Reaction pH	(X ₂) Reaction temp. (°C)	Degree of hydrolysis			Antioxidative activities	
			(Y ₁) TCA (%)	(Y ₂) OPA (%)	(Y ₃) TNBS (%)	(Y ₄) DPPH -scavenging activity (%)	(Y ₅) Fe-Chelating activity (%)
1	0	0	30.6	29.4	27.0	23.7	26.1
2	0	0	30.5	29.1	29.1	24.1	27.1
3	0	0	31.5	30.4	27.3	23.2	25.3
4	0	0	31.0	24.9	30.1	24.2	25.4
5	0	0	30.3	30.5	28.9	24.4	25.7
6	0	-1.414	10.8	17.5	15.0	12.8	13.7
7	0	+1.414	15.3	21.6	22.5	16.3	11.8
8	-1	-1	8.5	7.6	14.8	11.8	14.9
9	-1	+1	6.6	10.5	19.0	6.1	11.4
10	+1	-1	20.1	19.5	19.0	17.7	19.1
11	+1	+1	11.5	10.0	23.0	15.7	18.4
12	-1.414	0	8.3	7.6	6.5	6.8	13.0
13	+1.414	0	21.7	18.3	24.2	21.5	25.2

¹⁾The coded levels of independent variables are same as represented in Table 4.

Table 15. Result of response surface methodology on degree of hydrolysis of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Alcalase

Parameter	DF ¹⁾	Degree of hydrolysis					
		TCA		OPA		TNBS	
		Coefficient	P-value	Coefficient	P-value	Coefficient	P-value
Intercept	1	-1200.466786	<0.0001	-1168.919499	0.0001	-711.266608	0.0008
pH	1	170.235873	<0.0001	189.025607	0.0001	115.432957	0.0009
Temp	1	13.749397	<0.0001	10.231723	0.0024	5.966117	0.0137
pH×pH	1	-8.305353	<0.0001	-9.196933	0.0002	-6.163545	0.0006
pH×Temp	1	-0.167500	0.2339	-0.310000	0.1025	-0.005000	0.9718
Temp×Temp	1	-0.094569	<0.0001	-0.057323	0.0026	-0.043736	0.0040

¹⁾DF means degree of freedom.

Table 16. Result of response surface methodology on antioxidative activity and Fe-chelating activity of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Alcalase

Parameter	DF ¹⁾	Degree of hydrolysis			
		DPPH -scavenging activity		Fe-chelating activity	
		Coefficient	P-value	Coefficient	P-value
Intercept	1	-607.859561	0.0004	-517.144236	<0.0001
pH	1	94.794894	0.0005	61.027343	0.0001
Temp	1	5.718045	0.0039	7.851546	<0.0001
pH×pH	1	-5.347324	0.0002	-3.444813	<0.0001
pH×Temp	1	0.092500	0.3897	0.070000	0.2112
Temp×Temp	1	-0.050655	0.0003	-0.065906	<0.0001

¹⁾DF means degree of freedom.

Table 17. The statistical result for degree of hydrolysis of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Alcalase

1) TCA

Regression	DF ¹⁾	Type	I sum of squares	R-square	F-value	P-value
Linear	2		159.142675	0.1313	12.03	0.0054
Quadratic	2		995.027992	0.8212	75.22	<.0001
Crossproduct	1		11.222500	0.0093	1.70	0.2009
Total Model	5		1165.393166	0.9618	35.24	<.0001

¹⁾DF means degree of freedom.

2) OPA

Regression	DF	Type	I sum of squares	R-square	F-value	P-value
Linear	2		87.950812	0.0953	4.03	0.0684
Quadratic	2		719.857988	0.7803	33.01	0.0003
Crossproduct	1		38.440000	0.0417	3.53	0.1025
Total Model	5		846.248800	0.9173	15.52	0.0011

3) TNBS

Regression	DF	Type	I sum of squares	R-square	F-value	P-value
Linear	2		181.527439	0.3120	12.21	0.0052
Quadratic	2		348.319326	0.5986	23.43	0.0008
Crossproduct	1		0.010000	0.0000	0.00	0.9718
Total Model	5		529.856765	0.9106	14.26	0.0015

Table 18. The statistical result for antioxidative activity and Fe-chelating activity of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Alcalase

1) DPPH-scavenging activity

Regression	DF ¹⁾	Type I sum of squares	R-square	F value	P-value
Linear	2	165.322949	0.3139	20.31	0.0012
Quadratic	2	329.452132	0.6255	40.47	0.0001
Crossproduct	1	3.422500	0.0065	0.84	0.3897
Total Model	5	498.197591	0.9459	24.48	0.0003

¹⁾DF means degree of freedom.

2) Fe-chelating activity

Regression	DF	Type I sum of squares	R-square	F value	P-value
Linear	2	106.912326	0.2309	51.64	<0.0001
Quadratic	2	346.904635	0.7492	167.56	<0.0001
Crossproduct	1	1.960000	0.0042	1.89	0.2112
Total Model	5	455.776961	0.9844	88.06	<0.0001

Table 19. Response surface model for processing conditions of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Alcalase

Response	Quadratic polynomial model
TCA(%)	$Y_1 = -1200.4668 + 170.2359X_1 + 13.7749X_2 - 8.6054X_1^2 - 0.0946X_2^2$
OPA(%)	$Y_2 = -1168.9195 + 189.0256X_1 + 10.2317X_2 - 9.1969X_1^2 - 0.0573X_2^2$
TNBS(%)	$Y_3 = -711.2666 + 115.4330X_1 + 5.9661X_2 - 6.1635X_1^2 - 0.0437X_2^2$
DPPH -scavenging activity(%)	$Y_4 = -607.8596 + 94.7949X_1 + 5.7180X_2 - 5.3473X_1^2 - 0.0507X_2^2$
Fe-chelating activity(%)	$Y_5 = -517.1442 + 61.0273X_1 + 7.8515X_2 - 3.4448X_1^2 - 0.0659X_2^2$

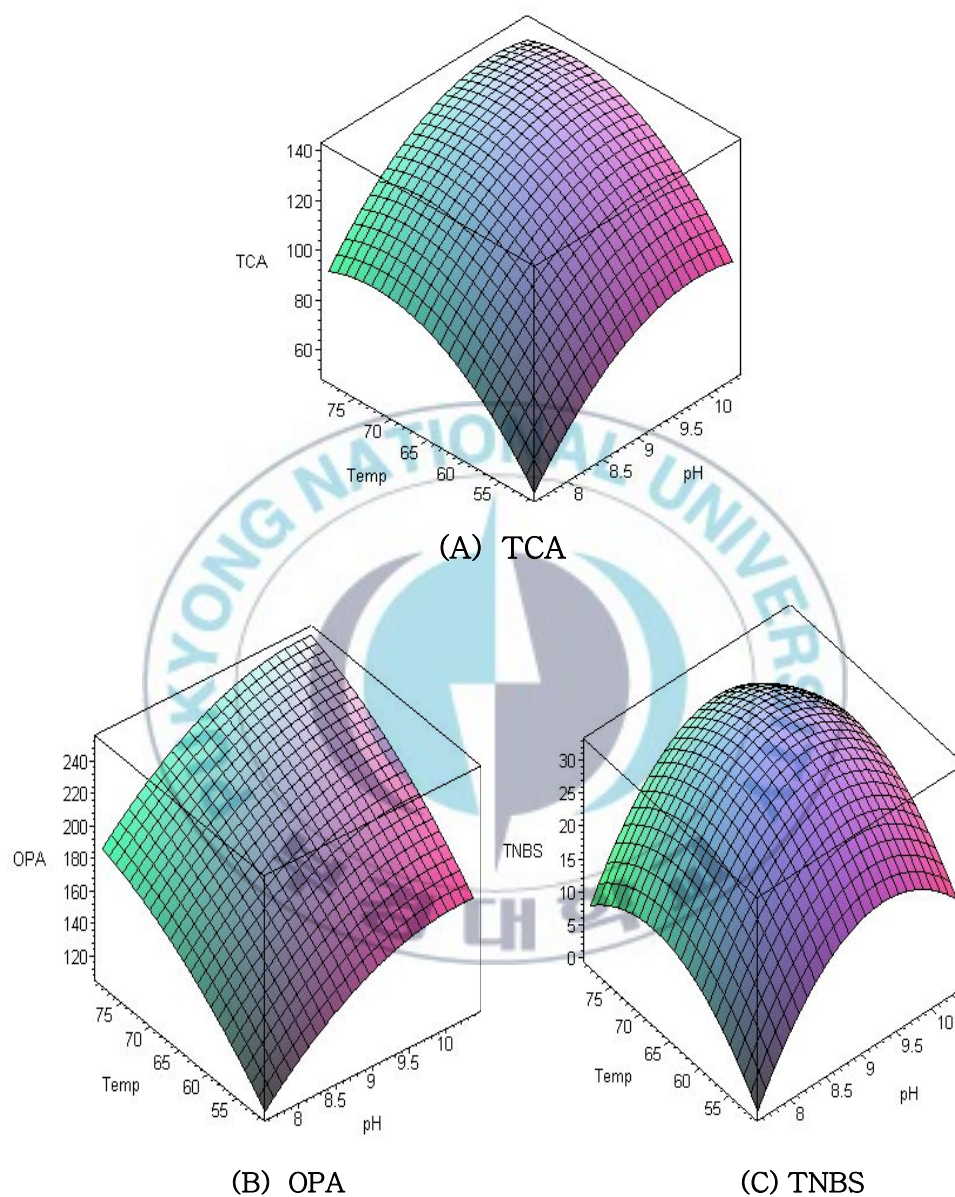
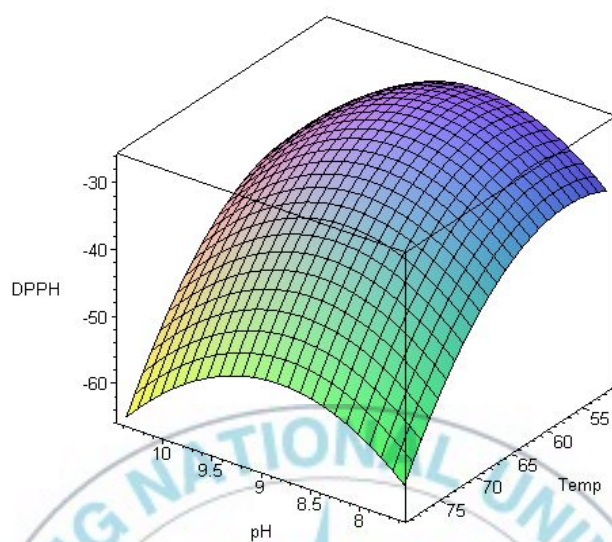
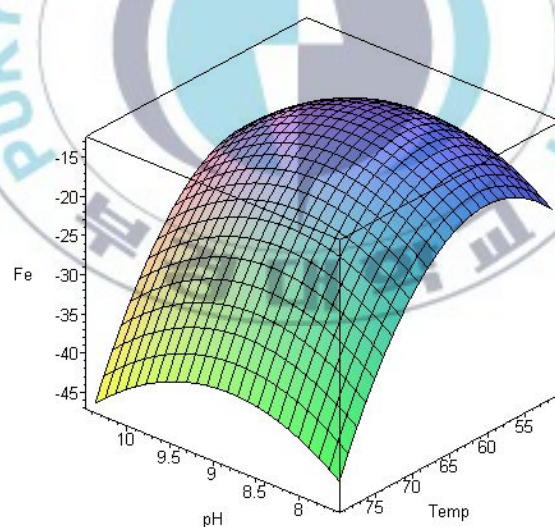


Fig. 4. Relationship between reaction pH and temperature on degree of hydrolysis of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Alcalase.



(A) DPPH-scavenging activity



(B) Fe-chelating activity

Fig. 5. Relationship between reaction pH and temperature on antioxidative activities of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Alcalase.

Table 20. Optimal conditions for preparation of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Alcalase

Dependent variables	Independent variables	Critical value		Predicted value	Stationary point
		Coded	Uncoded		
Y ₁ (TCA,%)	X ₁	0.188	9.3	31.4	Maximum
	X ₂	-0.036	64.5		
Y ₂ (OPA,%)	X ₁	0.137	9.2	29.2	Maximum
	X ₂	-0.043	64.4		
Y ₃ (TNBS,%)	X ₁	0.241	9.3	29.5	Maximum
	X ₂	0.189	67.7		
Y ₄ (DPPH-scavenging activity,%)	X ₁	0.300	9.4	24.9	Maximum
	X ₂	0.003	65.0		
Y ₅ (Fe-chelating activity,%)	X ₁	0.367	9.5	26.9	Maximum
	X ₂	-0.027	64.6		
Average of Y ₁ , Y ₂ , Y ₃ ,Y ₄ and Y ₅	X ₁	0.247	9.3	-	-
	X ₂	0.017	65.2		

X₁, pH ; X₂, enzyme treatment temperature, °C

Table 21. Experimental and predicted results for preparation of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Alcalase

Dependent variables	Predicted value	Experimental value
$Y_1(\text{TCA}, \%)$	31.4	31.9
$Y_2(\text{OPA}, \%)$	29.2	29.5
$Y_3(\text{TNBS}, \%)$	29.5	29.3
$Y_4(\text{DPPH-scavenging activity}, \%)$	24.9	25.1
$Y_5(\text{Fe-chelating activity}, \%)$	26.9	26.7

Optimal conditions : pH 9.3, enzyme treatment temperature 65.2℃

2.3 Flavourzyme

Flavourzyme에 의한 꽃새우 가수분해물의 최적 제조조건을 알아 보기 위해 예비실험을 실시하였으며 예비실험을 통해 효소의 농도는 0.2%로 고정하였고, 가수분해에 영향을 미치는 각각의 독립변수의 중심영역을 설정하여 중심합성계획법에 의해 무작위로 실험을 수행하였다(Table 22).

반응표면식과 유의차 검증을 위하여 SAS software로 통계처리 하였으며, 다중회귀분석 결과는 Table 23과 같다. 2차 회귀방정식의 적합도에 대한 결정계수(R-square)는 가수분해도가 0.8284, 항산화력 측정값인 DPPH-scavenging activity는 0.6441, Fe-chelating activity는 0.7894로 나타났다. 적합결여검증에 있어서도 가수분해도는 0.0131, 항산화능 측정값인 DPPH-scavenging activity는 0.1288, Fe-chelating activity는 0.0254로 나타나 가수분해도와 Fe-chelating activity에 있어서 2차 회귀방정식의 설계가 유의함을 알 수 있었다(Table 24). 각 독립변수들의 실험에 대한 영향과 변수간의 상관관계를 살펴보면, 가수분해도에 있어서 일차항과 이차항은 95%의 수준에서 높은 수준의 유의성을 나타내어 실험에 대해 영향이 있는 것으로 나타났으나, 교차항은 95%수준에서 유의성을 나타내지 않아 영향이 없는 것으로 나타났다. 항산화력에 있어서 DPPH-scavenging activity의 이차항은 95%, Fe-chelating activity의 이차항은 99%의 수준에서 높은 수준의 유의성을 나타내어 실험에 대해 영향이 있는 것으로 나타났으나, 일차항과 교차항은 95%수준에서 유의성을 나타내지 않아 영향이 없는 것으로 나타났다(Table 24). 이러한 결과를 토대로 얻어진 2차 회귀방정식은 Table 25와 같다.

가수분해에 영향을 미치는 두 독립변수 상호간의 상관관계를 알아보기 위해 2차 회귀방정식을 maple software를 이용하여 3차원 그래프(tree dimensional graph)를 그렸으며 그 결과는 Fig. 6, 7과 같다. 두 종속변수

가수분해도와 항산화력에 대한 독립변수의 최적조건 값은 Table 26에 나타내었다. 가수분해도(Y_1)의 최적화 조건은 pH(X_1) 4.2, 효소처리 온도(X_2) 54.1℃, 항산화력을 나타내는 DPPH-scavenging activity(Y_2)의 최적화 조건은 pH(X_1) 3.9, 효소처리 온도(X_2) 59.2℃, Fe-chelating activity(Y_3)의 최적화 조건은 pH(X_1) 4.2, 효소처리 온도(X_2) 50.3℃으로 나타났다. 가수분해도와 항산화력의 종속변수들에 대한 최적 조건의 값들이 거의 유사하여 Flavourzyme을 이용한 최적 제조조건을 독립변수들의 평균값으로 나타내었는데 그 결과는 pH(X_1) 4.1, 효소처리 온도(X_2) 54.5℃로 나타났다. 독립변수의 최적조건에서 예상되는 종속변수인 가수분해도의 최대값은 19.3%였으며, 항산화력의 최대값은 DPPH-scavenging activity 14.5%, Fe-chelating activity 26.6%로 나타났다. 실제실험을 하였을 경우 가수분해도의 최대값은 20.6%였으며, 항산화력의 최대값은 DPPH-scavenging activity 15.8%, Fe-chelating activity 25.3%로 예상되는 최대값과 큰 차이를 나타내지 않았다(Table 27).

Table 22. Response of the dependent variables of degree of hydrolysis and antioxidative activity according to enzymatic hydrolysis condition of spotted shrimp by Flavourzyme

Expt. no	Independent variables ¹⁾		Dependent variable		
			Degree of hydrolysis(%)	Antioxidative activities	
	(X ₁) Reaction pH	(X ₂) Reaction temp.(°C)	(Y ₁) TCA(%)	(Y ₂) DPPH-scavengi ng activity(%)	(Y ₃) Fe-chelating activity(%)
1	0	0	20.4	14.4	27.5
2	0	0	18.1	14.8	27.1
3	0	0	19.0	13.9	27.0
4	0	0	18.1	15.2	27.5
5	0	0	19.4	14.2	28.1
6	0	-1.414	14.0	8.7	23.3
7	0	+ 1.414	15.8	11.3	15.9
8	-1	-1	13.0	10.3	9.1
9	-1	+ 1	17.0	13.2	3.9
10	+ 1	-1	18.5	11.9	18.7
11	+ 1	+ 1	15.4	7.5	17.2
12	-1.414	0	9.1	6.1	11.7
13	+ 1.414	0	17.6	12.3	16.7

¹⁾The coded levels of independent variables are same as represented in Table 4.

Table 23. Result of response surface methodology on antioxidative activity and Fe-chelating activity of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Flavourzyme

Parameter	DF ¹⁾	Degree of hydrolysis					
		TCA		DPPH -scavenging activity		Fe-chelating activity	
		Coefficient	P-value	Coefficient	P-value	Coefficient	P-value
Intercept	1	-89.737889	0.0055	-88.522107	0.0239	-137.906488	0.0717
pH	1	31.437764	0.0024	30.051942	0.0138	65.515561	0.0119
Temp	1	1.563529	0.0132	1.558439	0.0459	1.030684	0.4725
pH×pH	1	-2.570977	0.0060	-2.543582	0.0253	-8.295664	0.0032
pH×Temp	1	-0.177500	0.0727	-0.182500	0.1533	0.092500	0.7120
Temp×Temp	1	-0.007483	0.0371	-0.007327	0.1061	-0.014122	0.1342

¹⁾DF means degree of freedom.

Table 24. The statistical result for degree of hydrolysis, antioxidative activity on DPPH and chelating activity on Fe of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Flavourzyme

1) TCA

Regression	DF ¹⁾	Type I sum of squares	R-square	F-value	P-value
Linear	2	31.885483	0.2764	5.64	0.0348
Quadratic	2	51.068646	0.4427	9.03	0.0115
Crossproduct	1	12.602500	0.1093	4.46	0.0727
Total Model	5	95.556629	0.8284	6.76	0.0131

¹⁾DF means degree of freedom.

2) DPPH-scavenging activity

Regression	DF	Type I sum of squares	R-square	F-value	P-value
Linear	2	2.752283	0.0269	0.26	0.7747
Quadratic	2	49.728476	0.4867	4.79	0.0490
Crossproduct	1	13.322500	0.1304	2.56	0.1533
Total Model	5	65.803259	0.6441	2.53	0.1288

3) Fe-chelating activity

Regression	DF	Type I sum of squares	R-square	F-value	P-value
Linear	2	148.504032	0.1930	3.21	0.1026
Quadratic	2	455.543696	0.5920	9.84	0.0093
Crossproduct	1	3.422500	0.0044	0.15	0.7120
Total Model	5	607.470228	0.7894	5.25	0.0254

Table 25. Response surface model for processing conditions of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Flavourzyme

Response	Quadratic polynomial model
TCA(%)	$Y_1 = -89.7379 + 31.4378X_1 + 1.5635X_2 - 2.5710X_1^2 - 0.0075X_2^2$
DPPH-scavenging activity(%)	$Y_2 = -88.5221 + 30.0519X_1 + 1.5584X_2 - 2.5436X_1^2 - 0.0073X_2^2$
Fe-chelating activity(%)	$Y_3 = -137.9064 + 65.5156X_1 + 1.0307X_2 - 8.2957X_1^2$

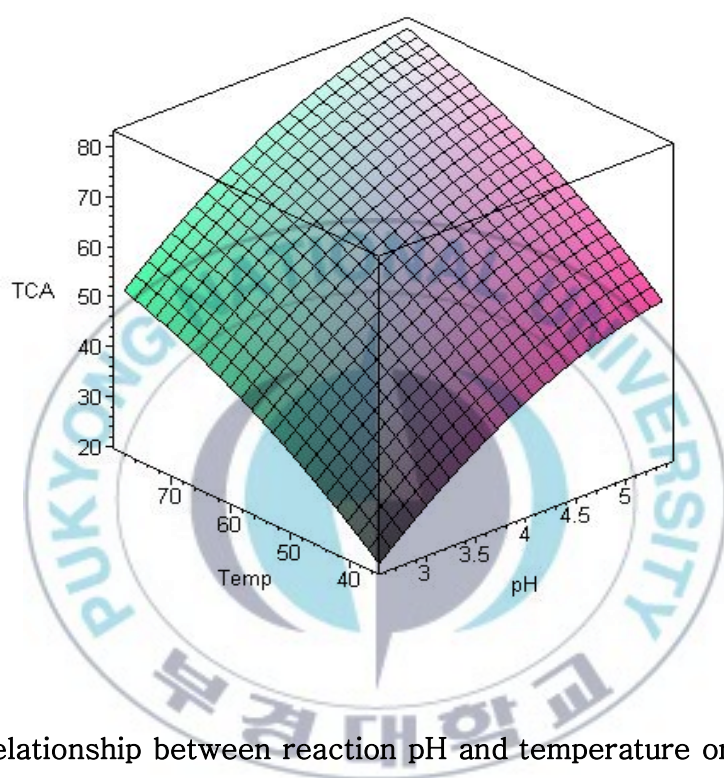
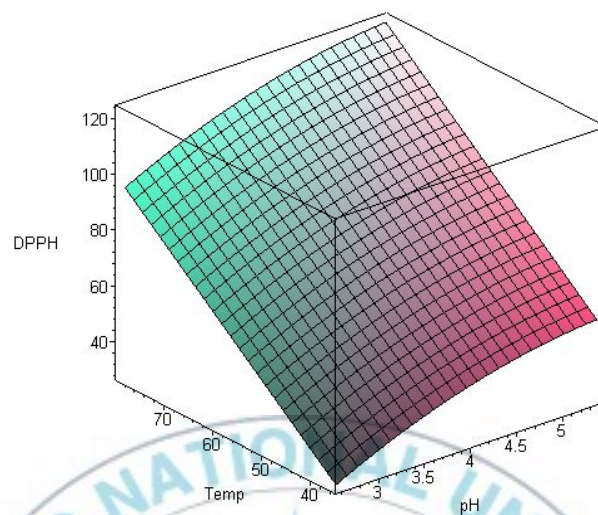
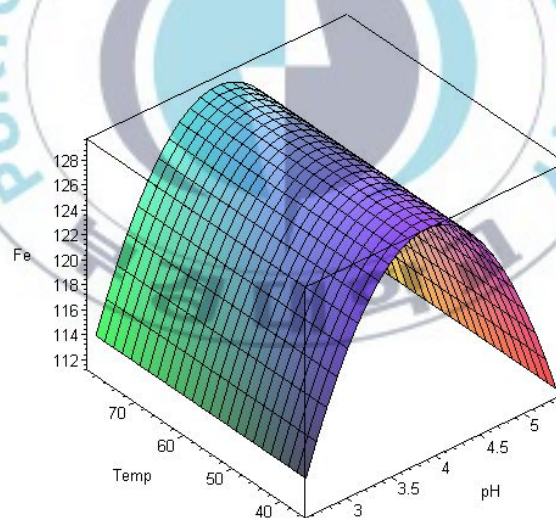


Fig. 6. Relationship between reaction pH and temperature on degree of hydrolysis of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Flavourzyme.



(A) DPPH-scavenging activity



(B) Fe-chelating activity

Fig. 7. Relationship between reaction pH and temperature on antioxidative activities of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Flavourzyme.

Table 26. Optimal conditions for preparation of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Flavourzyme

Dependent variables	Independent variables	Critical value		Predicted value	Stationary point
		Coded	Uncoded		
Y ₁ (TCA,%)	X ₁	0.176	4.2	19.3	Maximum
	X ₂	-0.157	54.1		
Y ₂ (DPPH-scavenging activity,%)	X ₁	-0.156	3.9	14.5	Maximum
	X ₂	0.081	59.2		
Y ₃ (Fe-chelating activity,%)	X ₁	0.164	4.2	26.6	Maximum
	X ₂	-0.331	50.3		
Average of Y ₁ , Y ₂ and Y ₃ ,	X ₁	0.061	4.1	-	-
	X ₂	-0.136	54.5		

X₁, pH ; X₂, enzyme treatment temperature, °C

Table 27. Experimental and predicted results for preparation of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Flavourzyme

Dependent variables	Predicted value	Experimental value
Y_1 (TCA,%)	19.3	20.6
Y_2 (DPPH-scavenging activity,%)	14.5	15.8
Y_3 (Fe-chelating activity,%)	26.6	25.3
Optimal conditions : pH 4.1, enzyme treatment temperature 54.5℃		

2.4 Protamax

Protamax에 의한 꽃새우 가수분해물의 최적 제조조건을 알아 보기위해 예비실험을 실시하였으며 예비실험을 통해 효소의 농도는 0.2%로 고정하였고, 가수분해에 영향을 미치는 각각의 독립변수의 중심영역을 설정하여 중심합성계획법에 의해 무작위로 실험을 수행하였다(Table 28).

반응표면식과 유의차 검증을 위하여 SAS software로 통계처리 하였으며, 다중회귀분석 결과는 Table 29와 같다. 2차 회귀방정식의 적합도에 대한 결정계수(R-square)는 가수분해도가 0.9614, 항산화력 측정값인 DPPH-scavenging activity는 0.9032, Fe-chelating activity는 0.8591로 나타나 실험이 만족할 만한 디자인으로 설계되었음을 알 수 있었다. 적합결여 검증에 있어서도 가수분해도는 0.0001이하, 항산화력 측정값인 DPPH-scavenging activity는 0.0020, Fe-Chelating activity는 0.0068로 나타나 2차 회귀방정식의 설계가 유의함을 알 수 있었다(Table 30). 각 독립변수들의 실험에 대한 영향과 변수간의 상관관계를 살펴보면, 가수분해도에 있어서 일차항과 이차항은 99%의 수준에서 높은 수준의 유의성을 나타내어 실험에 대해 영향이 있는 것으로 나타났으나, 교차항은 95%수준에서 유의성을 나타내지 않아 영향이 없는 것으로 나타났다. 항산화력에 있어서 DPPH-scavenging activity의 일차항과 이차항은 99%, Fe-chelating activity의 일차항은 95%, 이차항은 99%의 수준에서 높은 수준의 유의성을 나타내어 실험에 대해 영향이 있는 것으로 나타났으나, 교차항은 95%수준에서 유의성을 나타내지 않아 영향이 없는 것으로 나타났다(Table 30). 이러한 결과를 토대로 얻어진 2차 회귀방정식은 Table 31과 같다.

가수분해에 영향을 미치는 두 독립변수 상호간의 상관관계를 알아보기 위해 2차 회귀방정식을 maple software를 이용하여 3차원 그래프(tree dimensional graph)를 그렸으며 그 결과는 Fig. 8, 9와 같다. 두 종속변수

가수분해도와 항산화력에 대한 독립변수의 최적조건 값은 Table 32에 나타내었다. 가수분해도(Y_1)의 최적화 조건은 pH(X_1) 6.7, 효소처리 온도(X_2) 44.3℃, 항산화력을 나타내는 DPPH-scavenging activity(Y_2)의 최적화 조건은 pH(X_1) 6.5, 효소처리 온도(X_2) 40.5℃, Fe-chelating activity(Y_3)의 최적화 조건은 pH(X_1) 6.5, 효소처리 온도(X_2) 42.9℃으로 나타났다. 가수분해도와 항산화력의 종속변수들에 대한 최적 조건의 값들이 거의 유사하여 Protamax를 이용한 최적 제조조건을 독립변수들의 평균값으로 나타내었는데 그 결과는 pH(X_1) 6.6, 효소처리 온도(X_2) 42.5℃로 나타났다. 독립변수의 최적조건에서 예상되는 종속변수인 가수분해도의 최대값은 25.8%였으며, 항산화력의 최대값은 DPPH-scavenging activity 18.5%, Fe-chelating activity 22.7%로 나타났다. 실제실험을 하였을 경우 가수분해도의 최대값은 25.1%였으며, 항산화력의 최대값은 DPPH-scavenging activity 17.8%, Fe-chelating activity 21.2%로 예상되는 최대값과 큰 차이를 나타내지 않았다(Table 33).

Table 28. Response of the dependent variables of degree of hydrolysis and antioxidative activity according to enzymatic hydrolysis condition of spotted shrimp by Protamax

Expt. no	Independent variables ¹⁾		Dependent variable		
	(X ₁) Reaction pH	(X ₂) Reaction temp.(°C)	Degree of hydrolysis	Antioxidative activities	
			(Y ₁) TCA (%)	(Y ₂) DPPH-scavengi ng activity (%)	(Y ₃) Fe-chelatin g activity (%)
1	0	0	26.1	18.6	22.0
2	0	0	24.8	18.4	23.6
3	0	0	25.0	18.3	22.4
4	0	0	24.7	18.4	21.0
5	0	0	25.8	18.3	23.8
6	0	-1.414	19.7	16.7	19.2
7	0	+1.414	19.6	16.4	18.7
8	-1	-1	12.4	13.6	13.7
9	-1	+1	12.1	12.4	12.9
10	+1	-1	21.8	15.7	16.9
11	+1	+1	21.1	14.9	15.7
12	-1.414	0	10.8	8.6	7.5
13	+1.414	0	21.4	16.6	20.5

¹⁾The coded levels of independent variables are same as represented in Table 4.

Table 29. Result of response surface methodology on antioxidative activity and Fe-chelating activity of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Protamax

Parameter	DF ¹⁾	Degree of hydrolysis					
		TCA		DPPH -scavenging activity		Fe-chelating activity	
		Coefficient	P-value	Coefficient	P-value	Coefficient	P-value
Intercept	1	-69.001858	0.0007	-25.688182	0.0410	-56.396329	0.0268
pH	1	22.193157	<0.0001	12.518719	0.0006	20.642239	0.0017
Temp	1	0.936768	0.0190	0.164780	0.5572	0.563908	0.3185
pH×pH	1	-1.644294	<0.0001	-0.973895	0.0003	-1.572706	0.0009
pH×Temp	1	-0.005000	0.8896	0.005000	0.8727	-0.005000	0.9349
Temp×Temp	1	-0.010197	0.0038	-0.002437	0.2785	-0.006201	0.1718

¹⁾DF means degree of freedom.

Table 30. The statistical result for degree of hydrolysis, antioxidative activity on DPPH and chelating activity on Fe of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Protamax

1) TCA

Regression	DF ¹⁾	Type I sum of squares	R-square	F-value	P-value
Linear	2	141.151202	0.4030	36.57	0.0002
Quadratic	2	195.588745	0.5584	50.67	<0.0001
Crossproduct	1	0.040000	0.0001	0.02	0.8896
Total Model	5	336.779947	0.9614	34.90	<0.0001

¹⁾DF means degree of freedom.

2) DPPH-scavenging activity

Regression	DF	Type I sum of squares	R-square	F-value	P-value
Linear	2	29.547399	0.2821	10.20	0.0084
Quadratic	2	64.994512	0.6206	22.43	0.0009
Crossproduct	1	0.040000	0.0004	0.03	0.8727
Total Model	5	94.581911	0.9032	13.06	0.0020

3) Fe-chelating activity

Regression	DF	Type I sum of squares	R-square	F-value	P-value
Linear	2	68.124182	0.2454	6.10	0.0293
Quadratic	2	170.340868	0.6136	15.24	0.0028
Crossproduct	1	0.040000	0.0001	0.01	0.9349
Total Model	5	238.505050	0.8591	8.54	0.0068

Table 31. Response surface model for processing conditions of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Protamax

Response	Quadratic polynomial model
TCA(%)	$Y_1 = -69.0019 + 22.1932X_1 + 0.9368X_2 - 1.6443X_1^2 - 0.0102X_2^2$
DPPH-scavenging activity(%)	$Y_2 = -25.6882 + 12.5187X_1 - 0.9739X_1^2$
Fe-chelating activity(%)	$Y_3 = -56.3963 + 20.6422X_1 - 1.5727X_1^2$

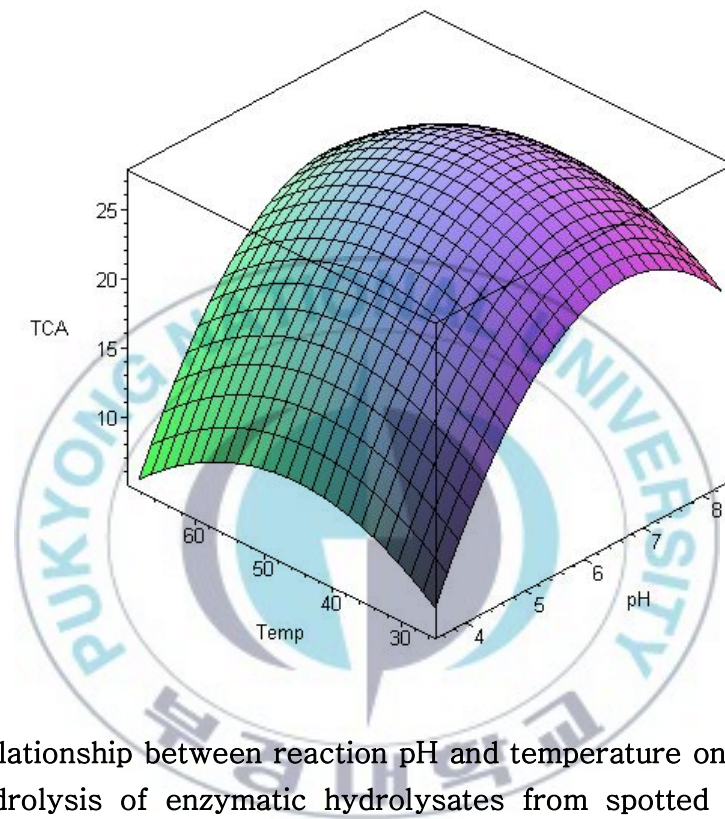
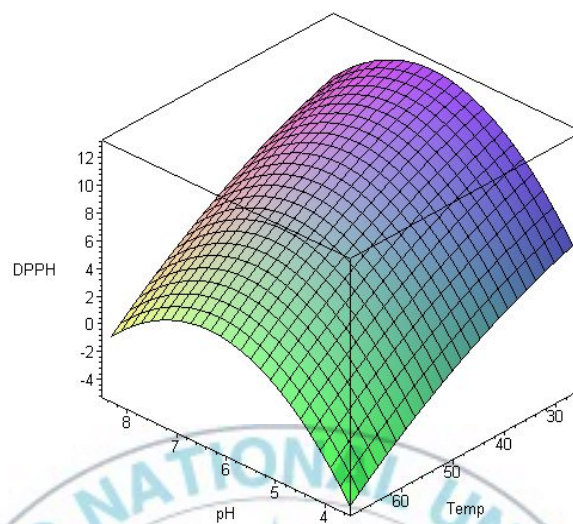
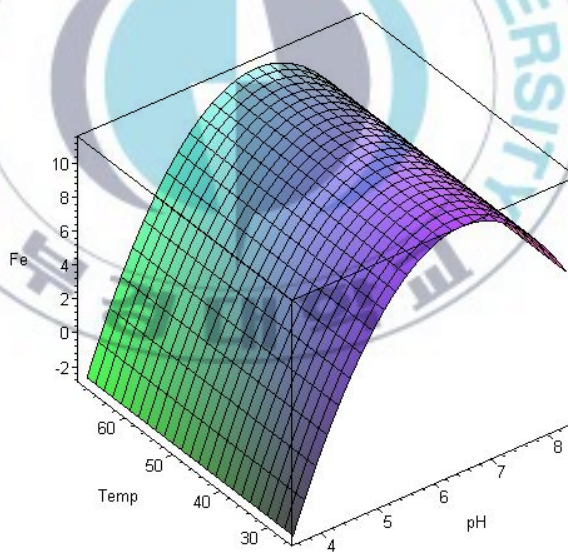


Fig. 8. Relationship between reaction pH and temperature on degree of hydrolysis of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Protamax.



(A) DPPH-scavenging activity



(B) Fe-chelating activity

Fig. 9. Relationship between reaction pH and temperature on antioxidative activities of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Protamax.

Table 32. Optimal conditions for preparation of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Protamax

Dependent variables	Independent variables	Critical value		Predicted value	Stationary point
		Coded	Uncoded		
Y ₁ (TCA,%)	X ₁	0.284	6.7	25.8	Maximum
	X ₂	-0.148	44.3		
Y ₂ (DPPH-scavenging activity,%)	X ₁	0.221	6.5	18.5	Maximum
	X ₂	-0.324	40.5		
Y ₃ (Fe-chelating activity,%)	X ₁	0.206	6.5	22.7	Maximum
	X ₂	-0.215	42.9		
Average of Y ₁ , Y ₂ and Y ₃ .	X ₁	0.237	6.6	-	-
	X ₂	-0.229	42.5		

X₁, pH ; X₂, enzyme treatment temperature, °C

Table 33. Experimental and predicted results for preparation of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Protamax

Dependent variables	Predicted value	Experimental value
Y ₁ (TCA,%)	25.8	25.1
Y ₂ (DPPH-scavenging activity,%)	18.5	17.8
Y ₃ (Fe-chelating activity,%)	22.7	21.2
Optimal conditions : pH 6.6, enzyme treatment temperature 42.5℃		

2.5 Neutrase

Neutrase에 의한 꽃새우 가수분해물의 최적 제조조건을 알아 보기위해 예비실험을 실시하였으며 예비실험을 통해 효소의 농도는 0.2%로 고정하였고, 가수분해에 영향을 미치는 각각의 독립변수의 중심영역을 설정하여 중심합성계획법에 의해 무작위로 실험을 수행하였다(Table 34).

반응표면식과 유의차 검증을 위하여 SAS software로 통계처리 하였으며, 다중회귀분석 결과는 Table 35와 같다. 2차 회귀방정식의 적합도에 대한 결정계수(R-square)는 가수분해도가 0.9928, 항산화력 측정값인 DPPH-scavenging activity는 0.9543, Fe-chelating activity는 0.9363로 나타나 실험이 만족할 만한 디자인으로 설계되었음을 알 수 있었다. 적합결여 검증에 있어서도 가수분해도는 0.0009, 항산화력 측정값인 DPPH-scavenging activity는 0.0001, Fe-chelating activity는 0.0005로 나타나 2차 회귀방정식의 설계가 유의함을 알 수 있었다(Table 36). 각 독립변수들의 실험에 대한 영향과 변수간의 상관관계를 살펴보면, 가수분해도에 있어서 이차항은 99%의 수준에서 높은 수준의 유의성을 나타내어 실험에 대해 영향이 있는 것으로 나타났으나, 일차항과 교차항은 95%수준에서 유의성을 나타내지 않아 영향이 없는 것으로 나타났다. 항산화능에 있어서 DPPH-scavenging activity와 Fe-chelating activity의 이차항은 99% 수준에서 높은 수준의 유의성을 나타내어 실험에 대해 영향이 있는 것으로 나타났으나, 일차항과 교차항은 95%수준에서 유의성을 나타내지 않아 영향이 없는 것으로 나타났다(Table 36). 이러한 결과를 토대로 얻어진 2차 회귀방정식은 Table 37과 같다.

가수분해에 영향을 미치는 두 독립변수 상호간의 상관관계를 알아보기 위해 2차 회귀방정식을 maple software를 이용하여 3차원 그래프(tree dimensional graph)를 그렸으며 그 결과는 Fig. 10, 11과 같다. 두 종속변

수 가수분해도와 항산화력에 대한 독립변수의 최적조건 값은 Table 38에 나타내었다. 가수분해도(Y_1)의 최적화 조건은 pH(X_1) 6.2, 효소처리 온도(X_2) 44.7°C, 항산화력을 나타내는 DPPH-scavenging activity(Y_2)의 최적화 조건은 pH(X_1) 6.1, 효소처리 온도(X_2) 46.0°C, Fe-chelating activity(Y_3)의 최적화 조건은 pH(X_1) 6.0, 효소처리 온도(X_2) 44.8°C로 나타났다. 가수분해도와 항산화력의 종속변수들에 대한 최적 조건의 값들이 거의 유사하여 Neutrase를 이용한 최적 제조조건을 독립변수들의 평균값으로 나타내었는데 그 결과는 pH(X_1) 6.1, 효소처리 온도(X_2) 45.2°C로 나타났다. 독립변수의 최적조건에서 예상되는 종속변수인 가수분해도의 최대값은 15.7%였으며, 항산화력의 최대값은 DPPH-scavenging activity 18.3%, Fe-chelating activity 19.3%로 나타났다. 실제실험을 하였을 경우 가수분해도의 최대값은 16.1%였으며, 항산화력의 최대값은 DPPH-scavenging activity 17.4%, Fe-chelating activity 18.8%로 예상되는 최대값과 큰 차이를 나타내지 않았다(Table 39).

Table 34. Response of the dependent variables of degree of hydrolysis and antioxidative activity according to enzymatic hydrolysis condition of spotted shrimp by Neutrase

Expt. no	Independent variables ¹⁾		Dependent variable		
			Degree of hydrolysis	antioxidative activities	
	(X ₁) Reaction pH	(X ₂) Reaction temp.(°C)	(Y ₁) TCA (%)	(Y ₂) DPPH-scavenging activity (%)	(Y ₃) Fe- chelating activity (%)
1	0	0	15.9	18.7	19.6
2	0	0	15.8	18.1	20.6
3	0	0	15.6	18.1	18.9
4	0	0	15.9	18.1	19.1
5	0	0	15.7	18.7	19.5
6	0	-1.414	10.7	13.6	14.8
7	0	+1.414	10.8	15.1	15.6
8	-1	-1	7	10.3	10.4
9	-1	+1	7.1	10.5	9.4
10	+1	-1	10.9	12.1	10.8
11	+1	+1	10.3	11.3	9.9
12	-1.414	0	7.8	8.1	8.7
13	+1.414	0	9.2	9.4	10.0

¹⁾ The coded levels of independent variables are same as represented in Table 4.

Table 35. Result of response surface methodology on antioxidative activity and Fe-chelating activity of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Neutrase

Parameter	DF ¹⁾	Degree of hydrolysis					
		TCA		DPPH -scavenging activity		Fe-chelating activity	
		Coefficient	P-value	Coefficient	P-value	Coefficient	P-value
Intercept	1	-56.253581	0.0014	-58.576753	0.0005	-64.417345	0.0018
pH	1	16.774898	0.0002	19.983496	<0.0001	22.696838	<0.0001
Temp	1	0.884363	0.0180	0.705606	0.0243	0.674288	0.0898
pH×pH	1	-1.315568	<0.0001	-1.598431	<0.0001	-1.880672	<0.0001
pH×Temp	1	-0.008750	0.7949	-0.012500	0.6660	0.001250	0.9750
Temp×Temp	1	-0.009281	0.0043	-0.006843	0.0090	-0.007612	0.0242

¹⁾DF means degree of freedom.

Table 36. The statistical result for degree of hydrolysis, antioxidative activity on DPPH and chelating activity on Fe of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Neutrase

1) TCA

Regression	DF ¹⁾	Type	I sum of squares	R-square	F-value	P-value
Linear	2		11.426097	0.0750	3.40	0.0929
Quadratic	2		129.084692	0.8471	38.42	0.0002
Crossproduct	1		0.122500	0.0008	0.07	0.7949
Total Model	5		140.633289	0.9928	16.74	0.0009

¹⁾DF means degree of freedom.

2) DPPH-scavenging activity

Regression	DF	Type	I sum of squares	R-square	F-value	P-value
Linear	2		3.211577	0.0170	1.30	0.3302
Quadratic	2		176.704961	0.9360	71.73	<0.0001
Crossproduct	1		0.250000	0.0013	0.20	0.6660
Total Model	5		180.166538	0.9543	29.25	0.0001

3) Fe-chelating activity

Regression	DF	Type	I sum of squares	R-square	F-value	P-value
Linear	2		0.951930	0.0036	0.20	0.8233
Quadratic	2		243.874623	0.9326	51.23	<0.0001
Crossproduct	1		0.002500	0.0000	0.00	0.9750
Total Model	5		244.829053	0.9363	20.57	0.0005

Table 37. Response surface model for processing conditions of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Neutrase

Response	Quadratic polynomial model
TCA(%)	$Y_1 = -56.2536 + 16.7749X_1 + 0.8844X_2 - 1.3156X_1^2 - 0.0093X_2^2$
DPPH-scavenging activity(%)	$Y_2 = -58.5768 + 19.9835X_1 + 0.7056X_2 - 1.5984X_1^2 - 0.0068X_2^2$
Fe-chelating activity(%)	$Y_3 = -64.4173 + 22.6968X_1 - 1.8807X_1^2 - 0.007612X_2^2$

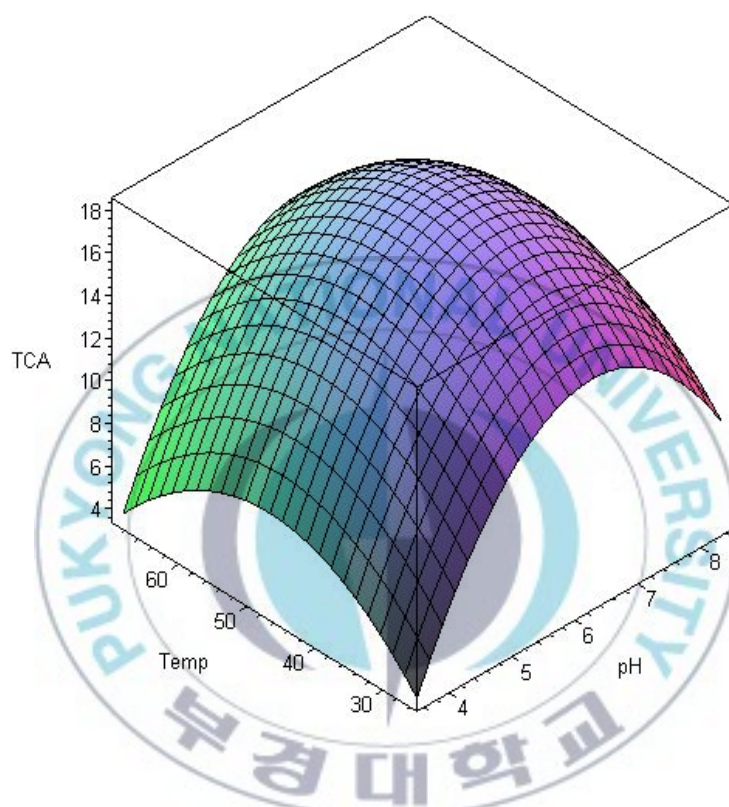


Fig. 10. Relationship between reaction pH and temperature on degree of hydrolysis of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Neutrase.

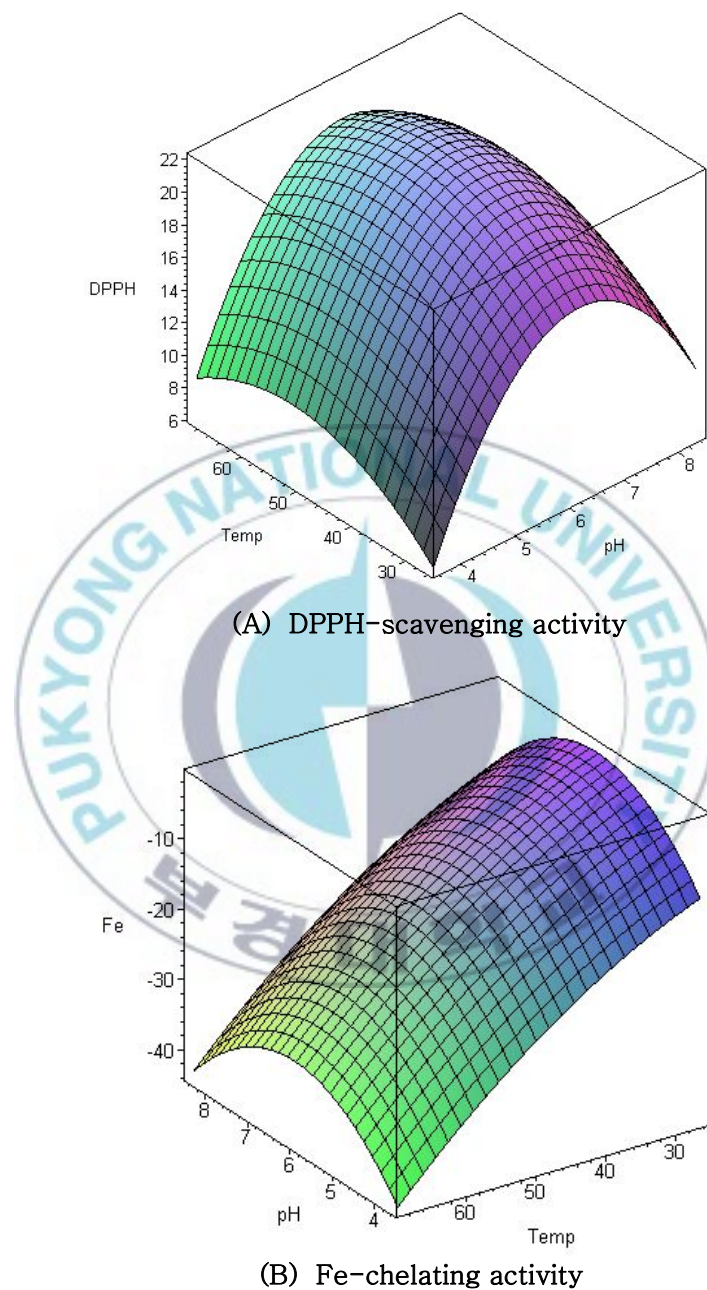


Fig. 11. Relationship between reaction pH and temperature on antioxidative activities of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Neutrase.

Table 38. Optimal conditions for preparation of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Neutrase

Dependent variables	Independent variables	Critical value		Predicted value	Stationary point
		Coded	Uncoded		
Y ₁ (TCA,%)	X ₁	0.095	6.2	15.7	Maximum
	X ₂	-0.129	44.7		
Y ₂ (DPPH-scavenging activity,%)	X ₁	0.030	6.1	18.3	Maximum
	X ₂	-0.069	46.0		
Y ₃ (Fe-chelating activity,%)	X ₁	0.020	6.0	19.3	Maximum
	X ₂	-0.126	44.8		
Average of Y ₁ , Y ₂ and Y ₃	X ₁	0.048	6.1	-	-
	X ₂	-0.108	45.2		

X₁, pH ; X₂, enzyme treatment temperature, °C

Table 39. Experimental and predicted results for preparation of enzymatic hydrolysates from spotted shrimp by Neutrase

Dependent variables	Predicted value	Experimental value
Y_1 (TCA,%)	15.7	16.1
Y_2 (DPPH-scavenging activity,%)	18.3	17.4
Y_3 (Fe-chelating activity,%)	19.3	18.8
Optimal conditions : pH 6.1, enzyme treatment temperature 45.2℃		

3. 반응 새우향의 제조를 위한 반응 조건 해석

3.1 Boile-type 반응 새우향

Boile-type 반응 새우향의 제조는 Maillard reaction을 이용하여 수산물의 향기성분중의 하나인 황함화합물을 생성하기 위하여 amino acid 원으로 cysteine · HCl와 methionine를, sugar로 glucose, xylose ribose, sucrose를 반응전구체로 고려하였다. 반응향 제조조건은 임의로 100℃에서 2시간 반응시켰다.

3.1.1 Amino acid의 선택

Cysteine · HCl와 methionine의 반응전구체에 따른 관능검사의 결과는 Fig. 12와 Table 40과 같다. 반응전구체 model system의 종합적인 관능검사 결과를 살펴보면 cysteine · HCl는 유황취가 7.6점으로 아주 강하게 났으며, methionine는 삶은 감자취가 6.7로 높게 나타났다. Cysteine · HCl는 Maillard reaction 중 Strecker 분해에 의해서 mercapto 화합물을 생성하며 이는 자극적인 향으로 meat flavor와 같은 향을 내는 것으로 보고되어 있으며, methionine는 Strecker분해에 의해서 methional이 생성하며 이는 삶은 감자취나 야채취를 생성하는 것으로 알려져 있다(Tressl, 1989; Ko, 1997; Kim& Baek, 2003). 반응전구체를 꽃새우 효소 가수분해물과 반응시킨 관능검사의 결과를 살펴보면, cysteine · HCl의 경우 유황취가 4.4점, 종합적인 관능점수가 4.7점, methionine은 삶은 감자취가 3.0점, 종합적인 관능점수가 6.7점, cysteine · HCl과 methionine을 1:1로 혼합하여 반응시킨 경우 종합적인 관능점수가 5.8점으로 나타났다. 따라서 meat계에서와는 달리 seafood계 flavor생성에 있어는 methionine이 관능에 있어 더 긍정적인 영향을 주는 것으로 생각이 되어, boiled-type의 반응향을 위한 amino acid 반응전구체로 methionine을 선택하였다.

3.1.2 Sugar의 선택

6탄당인 glucose, 5탄당인 xylose와 ribose, 이당류인 sucrose 반응 전구체 선택에 대한 관능검사 결과는 Fig. 13과 Table 41과 같다. Model system에서 종합적인 관능점수 결과를 살펴보면 methionine을 glucose와 반응시켰을 경우 2.3점, xylose 3.1점, ribose 3.6점, sucrose는 3.5점으로 나타났다으며, 반응전구체를 가수분해물과 반응시킨 종합적인 관능검사의 결과는 methionine을 glucose와 반응시켰을 경우 5.5점, xylose는 6.0점, ribose는 6.3점 sucrose는 7.6점으로 나타났다. 또한 ribose에 비해 sucrose가 전체적인 향의 조화도 좋은 것으로 나타나 boiled-type 새우향을 위한 sugar의 반응 전구체로 sucrose를 선택하였다.

3.1.3 pH 조건 설정

반응향 제조에 있어서 pH의 조건과 시간은 중요한 요인이다. 반응향 pH 제조 조건을 선정하기 위해서 100℃에서 pH(pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0)별로 2시간 실험을 진행하였으며, 선정된 pH 조건 하에서 최적의 반응시간 조건을 찾기 위하여 1시간, 2시간, 3시간에서 관능검사를 비교하였다.

pH에 따른 관능검사의 결과는 Fig. 14와 Table 42와 같다. Boiled-type 새우향의 종합적인 관능검사를 살펴보면 pH 5에서 1.7점, pH 6에서 2.0점, pH 7에서 5.6점, pH 8에서 7.0점으로 나타나 산성의 pH일 때와 중성 및 약알칼리 조건에서의 종합적인 관능점수 결과가 현저한 차이를 보였다. 또한 pH가 낮을수록 화학취, 간장달인 취와 같은 이취가 많이 생성되었다. 이는 pH에 따라 반응전구체들이 형성하는 중간 생성물들의 차이에 기인하는 것으로 pH는 Maillard reaction과 flavor생성에 중요한 역할을 한다. Mattram & Whitfield(1994)는 meat like Maillard system에서 pH 따라 생성되는 휘발성 물질이 달라지며, 산성 pH에 비해 중성 pH에서 황화합물

과 pyrazine 많이 생성하는 것으로 보고하였다. 본 연구 결과, pH가 중성이거나(pH 7.0)이거나 약알칼리에서(pH 8.0) 종합적인 관능결과가 좋았고, 특히 pH 8.0에서 화학취(chemical flavor)와 같은 이취가 약한 것으로 나타나 boiled-type 새우향을 위한 pH 조건은 8.0이 가장 적합한 것으로 생각되어진다.

3.1.4 반응시간 설정

반응시간에 따른 관능검사의 결과는 Fig 15와 Table 43과 같다. Boiled-type 새우향의 종합적인 관능검사를 살펴보면 반응 1시간과 2시간에서 6.8 점, 3시간에서 5.9점으로 나타났다. 또한 반응시간이 길어질수록 grilled shrimp flavor가 증가하였는데, 이는 Ko, et al.(1997)이 반응시간이 길어질수록 갈색물질 형성이 증가하며 이러한 갈색물질 형성은 pyrazine형성과 유사한 경향을 보인다는 연구결과에 비추어볼 때, 고소한 향을 내는 pyrazine형성과 관련이 있을 것으로 생각되어진다. 따라서 유의적인 차이는 없었지만 반응 1시간에서 종합적인 관능점수가 제일 높았고, boiled shrimp의 향이 제일 많이 나는 것으로 나타나 boiled-type 새우향은 반응 1시간이 적절한 것으로 생각되어진다.

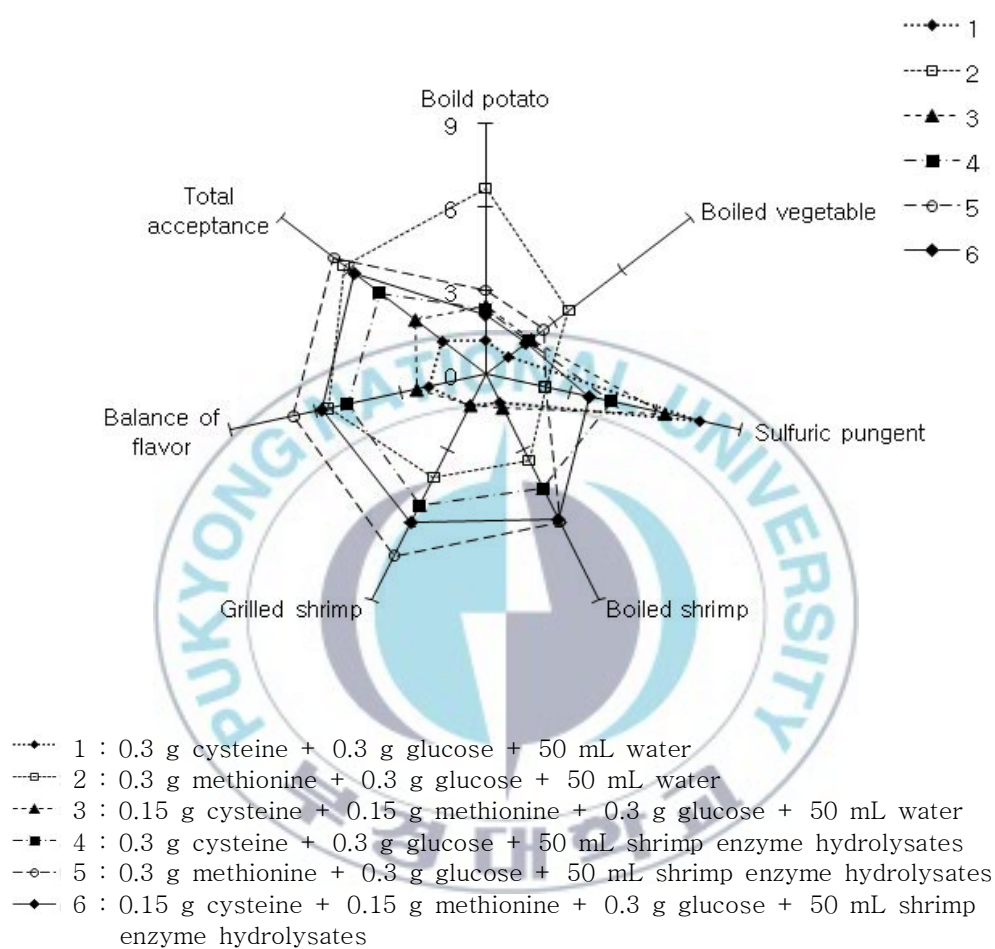


Fig. 12. Quantitative descriptive analysis profiles of boiled-type shrimp reaction flavor affected by cysteine·HCl or methionine.

Table 40. Sensory results of boiled-type shrimp reaction flavor affected by cysteine·HCl or methionine

Category	Model system					
	1 ¹⁾	2	3	4	5	6
Total preference	1.9 ^{d2)}	6.2 ^{ab}	3.1 ^{cd}	4.7 ^{bc}	6.7 ^a	5.8 ^b
Boiled potato	1.2 ^b	6.7 ^a	2.4 ^b	2.3 ^b	3.0 ^b	2.1 ^b
Boiled vegetable	1.0 ^b	3.7 ^a	2.0 ^{ab}	1.9 ^{ab}	2.6 ^a	1.8 ^b
Sulfuric pungent	7.6 ^a	2.1 ^d	6.3 ^{ab}	4.4 ^{bc}	2.1 ^d	3.7 ^c
Boiled shrimp	1.1 ^c	3.4 ^b	1.3 ^c	4.6 ^b	5.9 ^a	5.8 ^a
Grilled shrimp	1.2 ^c	4.1 ^b	1.2 ^c	5.2 ^{ab}	7.2 ^a	5.9 ^a
Balance of flavor	2.0 ^c	5.6 ^{ab}	2.4 ^c	4.9 ^b	6.8 ^a	5.8 ^a

¹⁾ 1 : 0.3 g cysteine + 0.3 g glucose + 50 mL water

2 : 0.3 g methionine + 0.3 g glucose + 50 mL water

3 : 0.15 g cysteine + 0.15 g methionine + 0.3 g glucose + 50 mL water

4 : 0.3 g cysteine + 0.3 g glucose + 50 mL shrimp enzyme hydrolysates

5 : 0.3 g methionine + 0.3 g glucose + 50 mL shrimp enzyme hydrolysates

6 : 0.15 g cysteine + 0.15 g methionine + 0.3 g glucose + 50 mL shrimp enzyme hydrolysates

²⁾ The different letters are significantly different at the $p < 0.05$ level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

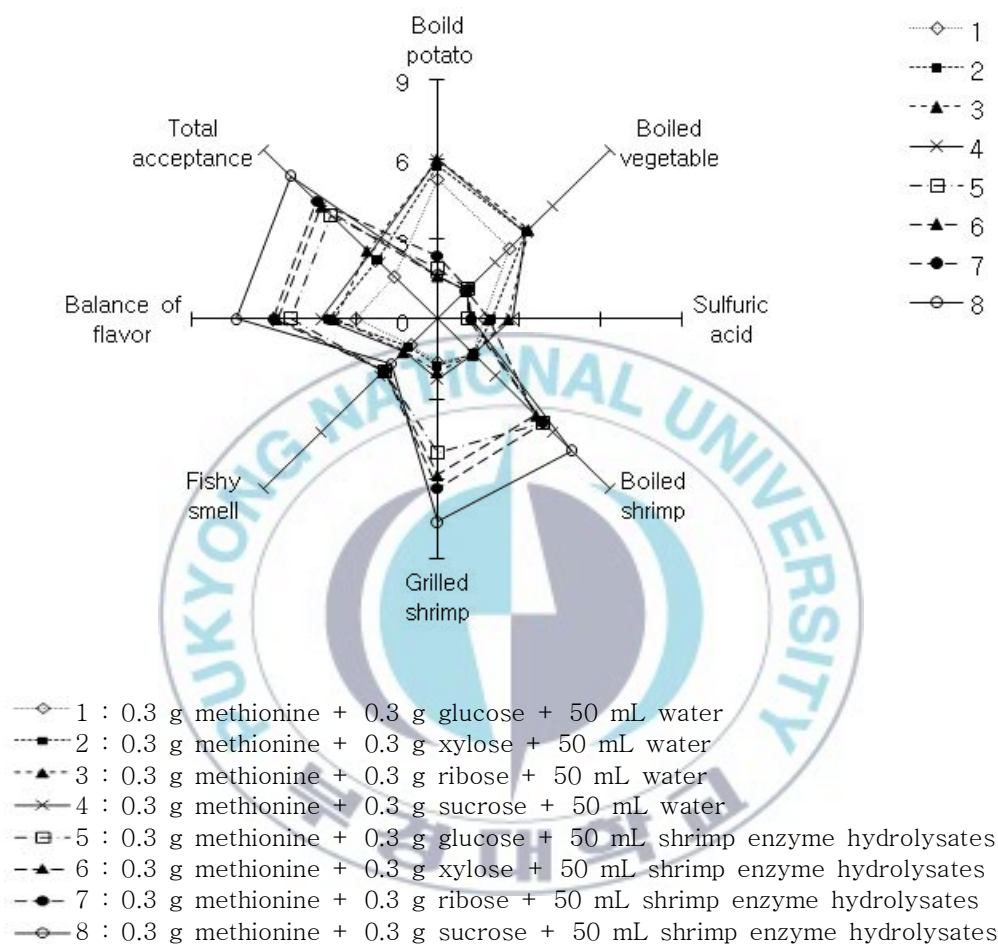


Fig. 13. Quantitative descriptive analysis profiles of boiled-type shrimp reaction flavor affected by sugars.

Table 41. Sensory results of boiled-type shrimp reaction flavor affected by sugars

Category	Model system							
	1 ¹⁾	2	3	4	5	6	7	8
Total preference	2.3 ^{d2)}	3.1 ^{cd}	3.6 ^{bcd}	3.5 ^c	5.5 ^{abc}	6.0 ^{abc}	6.3 ^{ab}	7.6 ^a
Boiled potato	5.3 ^{ab}	5.8 ^a	6.0 ^a	6.0 ^a	1.9 ^c	1.6 ^c	2.4 ^{bc}	1.6 ^c
Boiled vegetable	3.8 ^{ab}	4.6 ^a	4.8 ^a	4.6 ^a	1.6 ^b	1.5 ^b	1.6 ^b	1.5 ^b
Sulfuric pungent	1.8 ^a	2.0 ^a	2.6 ^a	2.8 ^a	1.1 ^c	1.9 ^a	1.3 ^a	1.3 ^a
Boiled shrimp	1.9 ^b	1.9 ^b	1.9 ^b	1.9 ^b	5.5 ^a	5.1 ^a	5.5 ^a	7.0 ^a
Grilled shrimp	1.6 ^c	1.8 ^c	2.0 ^c	2.3 ^c	5.0 ^b	5.8 ^{ab}	6.4 ^{ab}	7.6 ^a
Fishy smell	1.4 ^a	1.5 ^a	1.8 ^a	1.8 ^a	2.8 ^a	2.8 ^a	2.8 ^a	2.4 ^a
Balance of flavor	3.0 ^b	4.0 ^{ab}	3.8 ^{ab}	4.3 ^{ab}	5.4 ^{ab}	5.9 ^{ab}	6.0 ^{ab}	7.4 ^a

¹⁾ 1 : 0.3 g methionine + 0.3 g glucose + 50 mL water

2 : 0.3 g methionine + 0.3 g xylose + 50 mL water

3 : 0.3 g methionine + 0.3 g ribose + 50 mL water

4 : 0.3 g methionine + 0.3 g sucrose + 50 mL water

5 : 0.3 g methionine + 0.3 g glucose + 50 mL shrimp enzyme hydrolysates

6 : 0.3 g methionine + 0.3 g xylose + 50 mL shrimp enzyme hydrolysates

7 : 0.3 g methionine + 0.3 g ribose + 50 mL shrimp enzyme hydrolysates

8 : 0.3 g methionine + 0.3 g sucrose + 50 mL shrimp enzyme hydrolysates

²⁾ The different letters are significantly different at the $p < 0.05$ level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

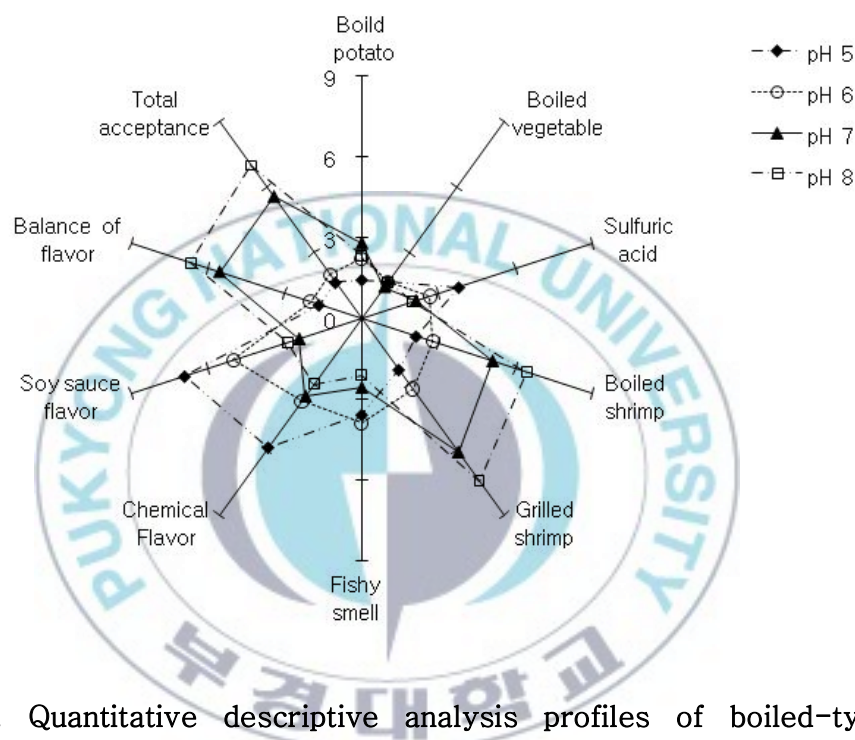


Fig. 14. Quantitative descriptive analysis profiles of boiled-type shrimp reaction flavor affected by reaction pH.

Table 42. Sensory results of boiled-type shrimp reaction flavor affected by reaction pH

Category	pH 5	pH6	pH7	pH8
Total preference	1.7 ^{b1)}	2.0 ^b	5.6 ^a	7.0 ^a
Boiled potato	1.4 ^b	2.2 ^{ab}	2.8 ^a	2.3 ^{ab}
Boiled vegetable	1.7 ^a	1.7 ^a	1.4 ^a	1.7 ^a
Sulfuric pungent	3.8 ^a	2.7 ^{ab}	2.1 ^b	2.0 ^b
Boiled shrimp	2.1 ^b	2.8 ^b	5.1 ^a	6.4 ^a
Grilled shrimp	2.3 ^b	3.2 ^b	6.1 ^a	7.4 ^a
Fishy smell	3.6 ^a	3.9 ^a	2.6 ^a	2.1 ^a
Chemical flavor	5.9 ^a	3.8 ^{ab}	3.6 ^{ab}	3.0 ^b
Soy sauce flavor	6.9 ^a	5.0 ^a	2.4 ^b	2.9 ^b
Balance of flavor	1.7 ^b	2.0 ^b	5.6 ^a	6.7 ^a

¹⁾The different letters are significantly different at the $p < 0.05$ level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

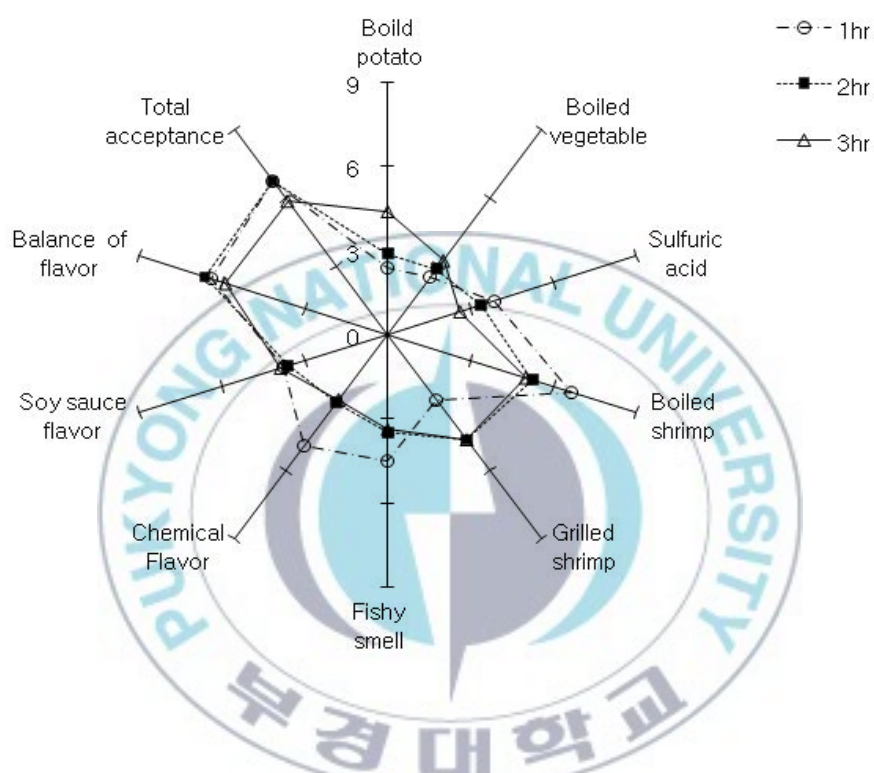


Fig. 15. Quantitative descriptive analysis profiles of boiled-type shrimp reaction flavor affected by reaction time.

Table 43. Sensory results of boiled-type shrimp reaction flavor affected by reaction time

Category	1hr	2hr	3hr
Total preference	6.8 ^{a1)}	6.8 ^a	5.9 ^a
Boiled potato	2.4 ^b	2.9 ^{ab}	4.4 ^a
Boiled vegetable	2.5 ^a	2.9 ^a	3.3 ^a
Sulfuric pungent	3.9 ^a	3.4 ^a	2.6 ^a
Boiled shrimp	6.6 ^a	5.3 ^a	5.0 ^a
Grilled shrimp	2.8 ^a	4.6 ^a	4.6 ^a
Fishy smell	4.5 ^a	3.5 ^a	3.4 ^a
Chemical flavor	4.9 ^a	3.0 ^a	2.9 ^a
Soy sauce flavor	3.8 ^a	3.6 ^a	3.9 ^a
Balance of flavor	6.4 ^a	6.6 ^a	5.9 ^a

¹⁾The different letters are significantly different at the $p < 0.05$ level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

3.2 Grilled-type 반응 새우향

Grilled-type 새우향의 제조는 수산물의 향기성분중의 하나인 황함화합물 (Kim, 2003)을 생성하기 위하여 amino acid 원으로 cysteine · HCl와 methionine를 sugar로 glucose, xylose ribose, sucrose를 반응전구체로 고려하였다. Roast aroma의 중요한 물질인 pyrazine 형성을 위해서 pyrazine 생성의 전구체 역할을 하는 amino alcohol류인 threonine(Baltes, 1990)과 또 다른 전구체로 glucosamine을 고려하였다. Glucosamine은 갑각류 껍질에 많이 함유하고 있는 키틴의 주성분으로(Lee, et al., 2006) 갑각류에 속하는 꽃새우의 반응향에 영향을 줄 것으로 생각이 되며, amino기와 aldehyde기를 모두 가지고 있는 aldose amine 화합물로 Maillard reaction의 반응에 직접적으로 참여 할 것으로 사료되어 반응 전구체로 고려하였다. 반응향 제조조건은 임의로 100℃에서 2시간 반응시켰다.

3.2.1 Amino acid의 선택

Cysteine · HCl와 methionine의 반응전구체에 따른 관능검사의 결과는 Fig. 12와 Table 40과 같다. Boiled-type에서 선택되어진 amino acid 반응전구체를 grilled-type의 새우향을 위한 amino acid 반응전구체로 동일하게 선택하였다. Grilled-type의 고소한 향성분인 pyrazine형성을 위해서 앞서 선택되어진 amino acid원인 methionine과 threonine을 반응시킨 관능평가 결과는 Fig. 16과 Table 44와 같다. 반응전구체 model system의 종합적인 관능검사 결과를 살펴보면 methionine는 6.3점, methionine과 threonine을 1:1로 반응시킨 model에서는 4.8점, threonine는 3.0점으로 나타났고, 반응전구체를 가수분해물과 반응시킨 종합적인 관능검사 결과를 살펴보면 methionine는 4.4점, methionine과 threonine을 1:1로 반응시킨 것은 5.9점, threonine는 5.1점으로 model system에서와는 차이가 있었다. 이는

methionine에서 생성된 methional의 삶은 향과 threonine으로 인해 생성된 pyrazine류의 구운향이 grilled한 새우의 향을 더 풍부하게 해주어 종합적인 관능점수에 긍정적인 영향을 준 것으로 생각되어진다. 따라서 grilled-type 새우향의 반응전구체로 methionine과 threonine을 amino acid원으로 선택하였다.

3.2.2 Sugar의 선택

6탄당인 glucose, 5탄당인 xylose와 ribose, 이당류인 sucrose 반응 전구체 선택에 대한 관능검사 결과는 Fig. 17과 Table 45와 같다. Model system에서 종합적인 관능점수 결과를 살펴보면 methionine과 threonine을 glucose와 반응시켰을 경우 3.4점, xylose, ribose는 3.9점, sucrose는 4.6점으로 나타났다. 반응전구체를 가수분해물과 반응시킨 종합적인 관능검사의 결과는 methionine과 threonine을 glucose와 반응시켰을 경우 6.0점, xylose는 7.6점, ribose는 6.7점 sucrose는 8.0점으로 나타났으나 Fig. 18, 19와 Table 46, 47과 같이 glucosamine과 함께 반응시킨 경우에는 sucrose에 비해 xylose가 반응향의 종합적인 관능점수가 높아 grilled type 새우향을 위한 sugar의 반응 전구체로 xylose를 선택하였다. 앞서 선택되어진 반응전구체 methionine, threonine, xylose와 glucosamine을 반응시킨 관능검사 결과는 Fig. 18, 19와 Table 46, 47과 같다. 가수분해물의 종합적인 관능검사의 결과를 보면 methionine, threonine, glucosamine과 xylose를 모두 반응전구체로 이용하였을 때 종합적인 관능점수가 7.1점으로 가장 높았으며, grilled shrimp flavor향 역시 6.3점으로 가장 강한 것으로 나타났다. 따라서 grilled-type 새우향을 위한 반응전구체로 methionine, threonine, glucosamine과 xylose선택하였다.

3.2.3 pH 조건 설정

Grilled-type의 반응향 pH 제조 조건을 선정하기 위해서 100℃에서 pH (5.0, 6.0, 7.0, 8.0)별로 2시간 실험을 진행하였으며, 선정된 pH 조건 하에서 최적의 온도 조건을 찾기 위하여 반응시간 1시간, 2시간, 3시간에서 관능검사를 비교하였다.

pH에 따른 관능검사의 결과는 Fig. 20과 Table 48과 같다. Grilled-type 새우향의 종합적인 관능검사는 pH 5에서 2.4점, pH 6에서 3.2점, pH 7에서 6.7점, pH 8에서 7.6점으로 나타나 산성의 pH일 때와 중성 및 약알칼리 조건에 따라 다른 종합적인 관능점수의 결과가 현저한 차이를 보였다. 또한 pH가 낮을수록 화학취(chemical flavor)가 많이 생성되어 boiled-type 새우향과 유사한 경향을 보였다. Baltes(1990)는 염기성 암모니아가 pyrazine, pyridines과 같은 N-heterocyclic compounds 생성을 증가시키는 것으로 보고하고 있어 염기성 조건과 휘발성 물질은 중요한 상관관계가 있음을 알 수 있다. 따라서 grilled-type 새우향을 위한 pH 조건은 8.0이 가장 적합한 것으로 생각되어진다.

3.2.4 반응시간 설정

시간에 따른 관능검사의 결과는 Fig. 21과 Table 49와 같다. Grilled-type 새우향의 종합적인 관능검사는 반응 1시간에서 7.1점, 2시간에서 8.3점, 3시간에서 5.6점으로 나타났으며 화학취(chemical flavor)도 반응시간 1, 2, 3시간일 때 각각 2.4점, 1.5점, 3.9점으로 나타나 grilled-type 새우향을 위한 반응 시간은 2시간이 적절한 것으로 생각되어진다.

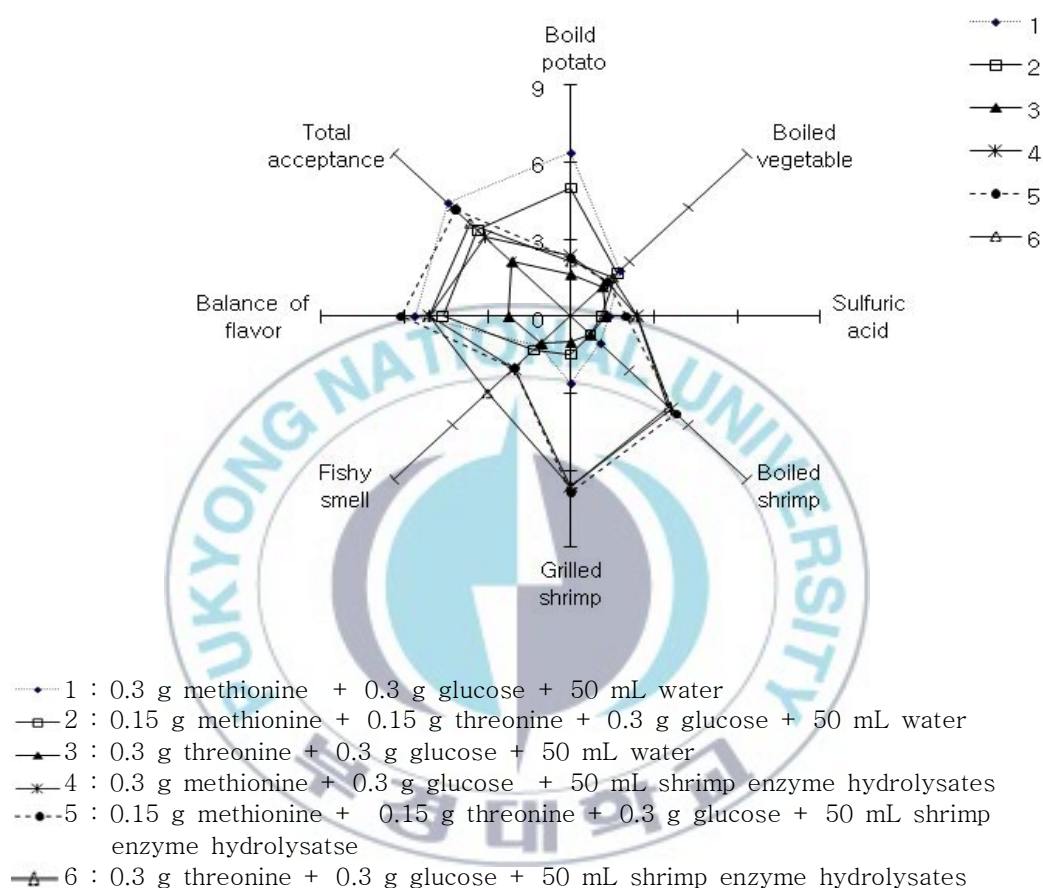


Fig. 16. Quantitative descriptive analysis profiles of grilled-type shrimp reaction flavor affected by threonine.

Table 44. Sensory results of grilled-type shrimp reaction flavor affected by threonine

Category	Model system					
	1 ¹⁾	2	3	4	5	6
Total preference	6.3 ^{a2)}	4.8 ^{ab}	3.0 ^c	4.4 ^b	5.9 ^a	5.1 ^{ab}
Boiled potato	6.4 ^a	5.0 ^a	1.6 ^b	2.4 ^b	2.3 ^b	2.1 ^b
Boiled vegetable	2.5 ^a	2.4 ^a	1.6 ^a	1.9 ^a	1.9 ^a	2.1 ^a
Sulfuric pungent	1.4 ^b	1.1 ^b	1.3 ^b	2.4 ^a	2.0 ^{ab}	2.4 ^a
Boiled shrimp	1.5 ^b	1.0 ^b	1.0 ^b	5.1 ^a	5.4 ^a	5.0 ^a
Grilled shrimp	2.6 ^b	1.5 ^{bc}	1.0 ^c	6.6 ^a	6.9 ^a	6.6 ^a
Fishy smell	1.6 ^b	1.9 ^b	1.5 ^b	2.9 ^{ab}	2.9 ^{ab}	4.3 ^a
Balance of flavor	5.6 ^a	4.6 ^a	2.3 ^b	5.1 ^a	6.1 ^a	5.1 ^a

¹⁾ 1 : 0.3 g methionine +0.3 g glucose +50 mL water

2 : 0.15 g methionine +0.15 g threonine +0.3 g glucose +50 mL water

3 : 0.3 g threonine +0.3 g glucose + 50 mL water

4 : 0.3 g methionine +0.3 g glucose + 50 mL shrimp enzyme hydrolysates

5 : 0.15 g methionine +0.15 g threonine +0.3 g glucose + 50 mL shrimp enzyme hydrolysates

6 : 0.3 g threonine +0.3 g glucose + 50 mL shrimp enzyme hydrolysates

²⁾ The different letters are significantly different at the $p<0.05$ level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

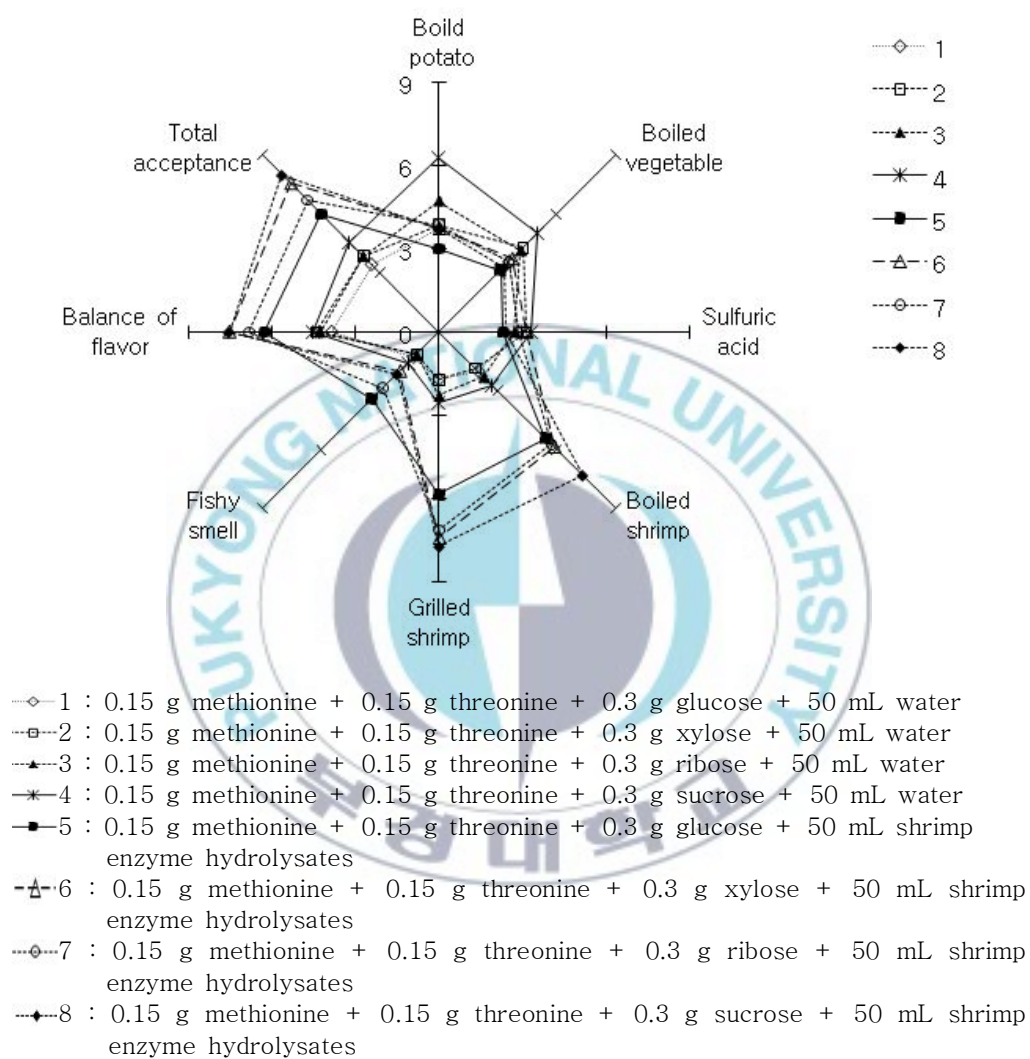


Fig. 17. Quantitative descriptive analysis profiles of grilled-type shrimp reaction flavor affected by sugars.

Table 45. Sensory results of grilled-type shrimp reaction flavor affected by sugars

Category	Model system							
	1 ¹⁾	2	3	4	5	6	7	8
Total preference	3.4 ^{d2)}	3.9 ^d	3.9 ^d	4.6 ^{cd}	6.0 ^{bc}	7.6 ^{ab}	6.7 ^{ab}	8.0 ^a
Boiled potato	3.7 ^b	3.9 ^b	4.7 ^a	6.3 ^a	3.0 ^b	3.7 ^b	3.9 ^b	3.7 ^b
Boiled vegetable	3.6 ^a	4.3 ^a	4.1 ^a	5.0 ^a	3.1 ^a	3.7 ^a	3.6 ^a	3.3 ^a
Sulfuric pungent	2.9 ^a	3.1 ^a	2.7 ^a	3.3 ^a	2.3 ^a	3.1 ^a	2.9 ^a	2.4 ^a
Boiled shrimp	2.0 ^c	1.9 ^c	2.3 ^c	2.7 ^c	5.4 ^b	5.9 ^b	5.7 ^b	7.3 ^a
Grilled shrimp	1.7 ^c	1.7 ^c	2.3 ^c	2.6 ^c	5.9 ^b	7.4 ^a	7.1 ^{ab}	7.7 ^a
Fishy smell	1.3 ^c	1.1 ^c	1.1 ^c	1.6 ^c	3.4 ^a	2.0 ^{abc}	2.9 ^{ab}	2.1 ^{abc}
Balance of flavor	3.9 ^b	4.4 ^b	4.3 ^b	4.6 ^b	6.3 ^a	7.6 ^a	6.9 ^a	7.6 ^a

¹⁾ 1 : 0.15 g methionine + 0.15 g threonine + 0.3 g glucose + 50 mL water

2 : 0.15 g methionine + 0.15 g threonine + 0.3 g xylose + 50 mL water

3 : 0.15 g methionine + 0.15 g threonine + 0.3 g ribose + 50 mL water

4 : 0.15 g methionine + 0.15 g threonine + 0.3 g sucrose + 50 mL water

5 : 0.15 g methionine + 0.15 g threonine + 0.3 g glucose + 50 mL shrimp enzyme hydrolysates

6 : 0.15 g methionine + 0.15 g threonine + 0.3 g xylose + 50 mL shrimp enzyme hydrolysates

7 : 0.15 g methionine + 0.15 g threonine + 0.3 g ribose + 50 mL shrimp enzyme hydrolysates

8 : 0.15 g methionine + 0.15 g threonine + 0.3 g sucrose + 50 mL shrimp enzyme hydrolysates

²⁾ The different letters are significantly different at the $p < 0.05$ level of significance as determined by Duncan's multiple range test

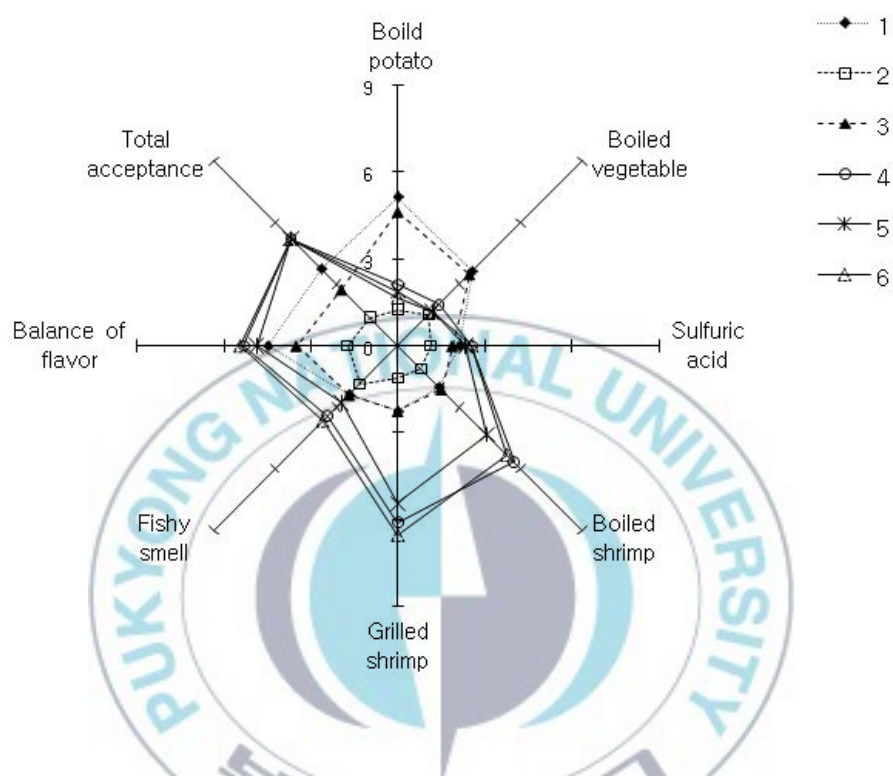


Fig. 18. Quantitative descriptive analysis profiles of grilled-type shrimp reaction flavor affected by glucosamine and sucrose.

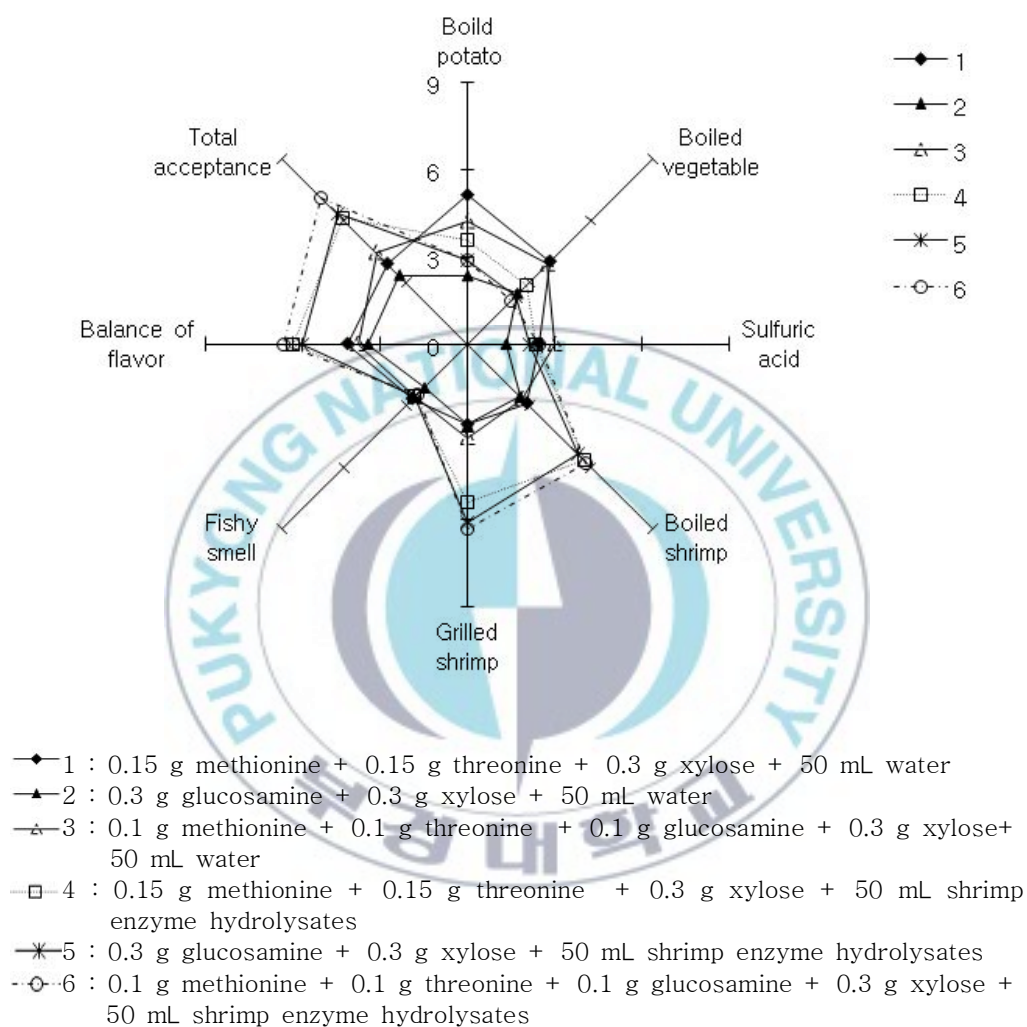


Fig. 19. Quantitative descriptive analysis profiles of grilled-type shrimp reaction flavor affected by glucosamine and xylose.

Table 46. Sensory results of grilled-type shrimp reaction flavor affected by glucosamine and sucrose

Category	Model system					
	1 ¹⁾	2	3	4	5	6
Total preference	3.8 ^{ab2)}	1.4 ^c	2.8 ^{bc}	5.2 ^a	5.2 ^a	5.2 ^a
Boiled potato	5.1 ^a	1.3 ^b	4.6 ^a	2.1 ^b	1.9 ^b	1.7 ^b
Boiled vegetable	3.6 ^a	1.5 ^b	3.5 ^a	2.0 ^b	1.7 ^b	1.7 ^b
Sulfuric pungent	2.1 ^{ab}	1.1 ^b	1.9 ^{ab}	2.6 ^a	2.3 ^{ab}	2.6 ^a
Boiled shrimp	2.0 ^b	1.1 ^b	2.1 ^b	5.7 ^a	4.3 ^a	5.3 ^a
Grilled shrimp	2.3 ^b	1.1 ^b	2.3 ^b	6.1 ^a	5.4 ^a	6.6 ^a
Fishy smell	2.4 ^a	1.9 ^a	2.4 ^a	3.4 ^a	2.8 ^a	3.7 ^a
Balance of flavor	4.5 ^{ab}	1.8 ^c	3.5 ^{bc}	5.3 ^{ab}	4.9 ^{ab}	5.4 ^a

¹⁾ 1 : 0.15 g methionine + 0.15 g threonine + 0.3 g sucrose + 50 mL water

2 : 0.3 g glucosamine + 0.3 g sucrose + 50 mL water

3 : 0.1 g methionine + 0.1 g threonine + 0.1 g glucosamine + 0.3 g sucrose + 50 mL water

4 : 0.15 g methionine + 0.15 g threonine + 0.3 g sucrose + 50 mL shrimp enzyme hydrolysates

5 : 0.3 g glucosamine + 0.3 g sucrose + 50 mL shrimp enzyme hydrolysates

6 : 0.1 g methionine + 0.1 g threonine + 0.1 g glucosamine + 0.3 g sucrose + 50 mL shrimp enzyme hydrolysates

²⁾ The different letters are significantly different at the $p < 0.05$ level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

Table 47. Sensory results of grilled-type shrimp reaction flavor affected by glucosamine and xylose

Category	Model system					
	1 ¹⁾	2	3	4	5	6
Total preference	3.9 ^{c2)}	3.3 ^c	4.4 ^{bc}	6.1 ^{ab}	6.3 ^{ab}	7.1 ^a
Boiled potato	5.1 ^a	2.3 ^b	4.2 ^{ab}	3.6 ^{ab}	2.9 ^b	2.9 ^b
Boiled vegetable	4.0 ^a	2.4 ^a	3.9 ^a	2.9 ^a	2.3 ^a	2.1 ^a
Sulfuric pungent	2.4 ^a	1.3 ^a	3.0 ^a	2.3 ^a	2.1 ^a	2.4 ^a
Boiled shrimp	2.9 ^b	2.6 ^b	2.7 ^b	5.7 ^a	5.3 ^a	5.9 ^a
Grilled shrimp	2.8 ^c	2.8 ^c	3.2 ^{bc}	5.4 ^{ab}	6.1 ^a	6.3 ^a
Fishy smell	2.7 ^a	2.1 ^a	2.6 ^a	2.6 ^a	2.6 ^a	2.4 ^a
Balance of flavor	4.1 ^{bc}	3.4 ^c	3.8 ^c	6.0 ^a	5.7 ^{ab}	6.3 ^a

¹⁾ 1 : 0.15 g methionine + 0.15 g threonine + 0.3 g xylose + 50 mL water

2 : 0.3 g glucosamine + 0.3 g xylose + 50 mL water

3 : 0.1 g methionine + 0.1 g threonine + 0.1 g glucosamine + 0.3 g xylose + 50 mL water

4 : 0.15 g methionine + 0.15 g threonine + 0.3 g xylose + 50 mL shrimp enzyme hydrolysates

5 : 0.3 g glucosamine + 0.3 g xylose + 50 mL shrimp enzyme hydrolysates

6 : 0.1 g methionine + 0.1 g threonine + 0.1 g glucosamine + 0.3 g xylose + 50 mL shrimp enzyme hydrolysates

¹⁾ The different letters are significantly different at the $p < 0.05$ level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

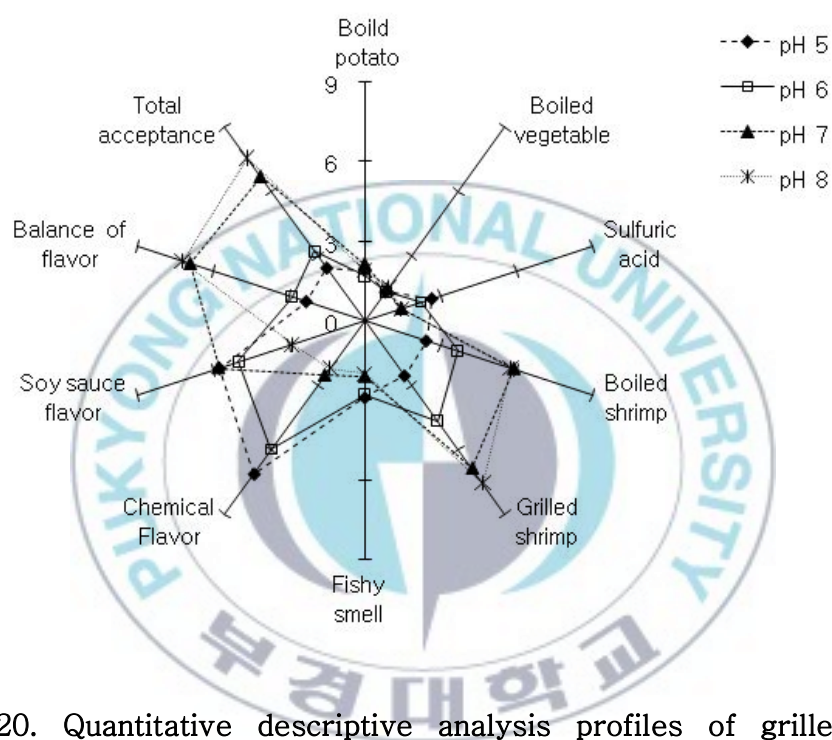


Fig. 20. Quantitative descriptive analysis profiles of grilled-type shrimp reaction flavor affected by reaction pH.

Table 48. Sensory results of grilled-type shrimp reaction flavor affected by reaction pH

Category	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
Total preference	2.4 ^{b1)}	3.2 ^b	6.7 ^a	7.6 ^a
Boiled potato	1.9 ^a	1.7 ^a	2.1 ^a	1.9 ^a
Boiled vegetable	1.3 ^a	1.3 ^a	1.4 ^a	1.6 ^a
Sulfuric pungent	2.7 ^a	2.2 ^a	1.4 ^a	1.4 ^a
Boiled shrimp	2.4 ^b	3.7 ^b	5.9 ^a	5.8 ^a
Grilled shrimp	2.6 ^c	4.7 ^b	6.9 ^a	7.6 ^a
Fishy smell	2.9 ^a	2.8 ^a	2.1 ^a	2.0 ^a
Chemical flavor	7.1 ^a	6.0 ^a	2.6 ^b	2.2 ^b
Soy sauce flavor	5.8 ^a	5.0 ^{ab}	5.8 ^a	2.9 ^b
Balance of flavor	2.3 ^b	2.9 ^b	6.9 ^a	7.2 ^a

¹⁾The different letters are significantly different at the $p < 0.05$ level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

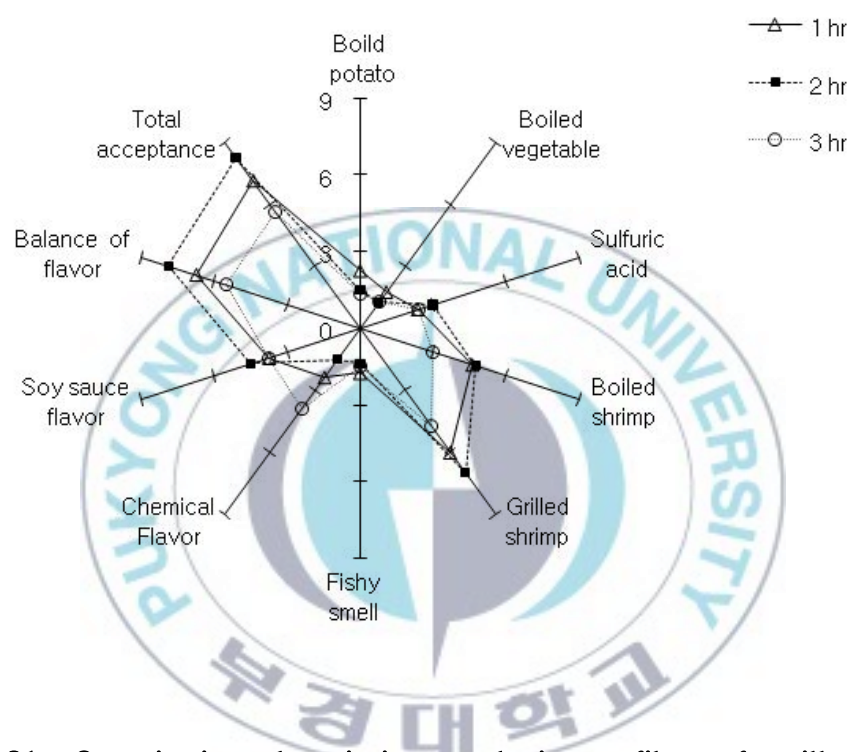


Fig. 21. Quantitative descriptive analysis profiles of grilled-type shrimp reaction flavor affected by reaction time.

Table 49. Sensory results of grilled-type shrimp reaction flavor affected by reaction time

Category	1hr	2hr	3hr
Total preference	7.1 ^{a1)}	8.3 ^a	5.6 ^b
Boiled potato	2.3 ^a	1.5 ^a	1.4 ^a
Boiled vegetable	1.8 ^a	1.3 ^a	1.3 ^a
Sulfuric pungent	2.4 ^a	3.0 ^a	2.4 ^a
Grilled shrimp	6.0 ^{ab}	7.0 ^a	4.8 ^b
Fishy smell	1.8 ^a	1.4 ^a	1.5 ^a
Chemical flavor	2.4 ^{ab}	1.5 ^b	3.9 ^a
Soy sauce flavor	3.8 ^a	4.5 ^a	3.8 ^a
Balance of flavor	6.8 ^{ab}	7.9 ^a	5.5 ^b

¹⁾The different letters are significantly different at the $p < 0.05$ level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

4. 반응 새우향의 휘발성 성분의 해석

4.1 Boiled-type 반응 새우향

Boiled-type 반응 새우향의 pH는 IOFL에서 제시하는 reaction flavor 제조에 대한 지침(IOFI Guidelines, 1994)에 의거하여 pH 8.0을 넘지 않도록 하기 위해서 pH 7.5로 실험을 진행하였다.

새우의 가수분해물에서 분리 동정된 휘발성 성분은 Fig. 22와 Table 50과 같다. Aldehyde류는 acetaldehyde, 2-methylpropanal, 3-methylbutanal, 2-methylbutanal, 2-nonenal 5종이 분리되었고, alcohol류는 ethanol, ketone류는 acetone이 분리되었다. 카르보닐 화합물은 주로 선도가 저하한 어패류나 조리가공품에서 검출이 되는데 대구, 고등어, 볼락 등을 빙장할 때, ethanal, propanal, butanal 및 pentanal이 생성되는 것으로 보고되어 있으며, 지질의 자동산화 경로에 의해서 aldehyde뿐 아니라 ketone, alcohol 등의 휘발성 성분을 생성하는 것으로 알려져 있다(Kim, 1995).

pH 5.0에서 반응전구체를 넣고 반응시킨 꽃새우 가수분해물에서 분리 동정된 휘발성 성분은 Fig. 23과 Table 51과 같다. Aldehyde류는 acetaldehyde, 2-methylpropanal, 3-methylbutanal, 2-methylbutanal, methional, 2-pentyl-2-nonenal 6종이 분리되었다. Methional은 methionine이 strecker 분해에 의해서 생성된 것으로 삶은 감자튀나 야채튀를 생성하는 것으로 알려져 있다(Tressl, 1989; Ko, 1997). Alcohol류는 ethanol, Isopropylalcohol 2종, ketone류는 acetone이 분리되었다. Sulfide류는 dimethyldisulfide, dimethyltrisulfide 2종이 분리되었는데 이는 methionine과 같은 함황아미노산으로부터 생성되는 것으로 생선의 이취로도 발견된다(Kim, 1995). Dimethyldisulfide는 천연에서 양파, 무, 감자에 존재하는 휘발성분으로 감귤이나 과즙에 소량 첨가 시 신선한 청량감을 주며 양파, 양배추의 향에 사용된다. Dimethyltrisulfide는 천연에서 흙, 양배추, 브로콜리

에 존재하는 휘발성분으로 meat flavor에 첨가시 grilled chicken향을 내며 과자류, 팝콘, 미트 소스 등에 사용된다. Furan류는 2-hydroxymethyl furan이 생성되었는데 이는 코코아, 커피, 빵 등의 식품에 존재하며 감미로운 oil취로 캐러멜 향을 내는 것으로 알려져 있고 캐러멜, 과일, 커피, 버터의 브랜디 향으로 사용된다(Artificial flavor, 1994).

pH 7.5에서 반응전구체를 넣고 반응시킨 꽃새우 가수분해물에서 분리 동정된 휘발성 성분은 Fig. 24, Table 52와 같다. Aldehyde류는 2-methylpropanal, 3-methylbutanal, 2-methylbutanal, 2-nonenal 4종이 분리되었고, alcohol류는 ethanol, ketone류는 acetone, 3,5-dimethyl-4-octanone 2종과, sulfide류로 dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide 2종이 분리되었다. Furan류로 2,3-dihydrofuran이 분리되었는데 일반적으로 furan 화합물은 달콤한 향을 내는 것으로 알려져 있다(Manley, 1999). N-containing compound인 pyrazine류는 2,5-dimethylpyrazine, trimethylpyrazine 2종이 분리되었다. 2,5-dimethylpyrazine는 천연에서 땅콩 등에 존재하며 초콜렛향을 내며, dried shrimp 향을 내는 것으로도 알려져 있으며, trimethylpyrazine은 천연에서 아몬드, 커피, 팝콘 등에 존재하는 휘발성분으로 구운 감자, 초콜렛의 향을 내며 grilled shrimp 향을 내는 것으로 알려져 있다(Artificial flavor, 1994; Choi, 1987).

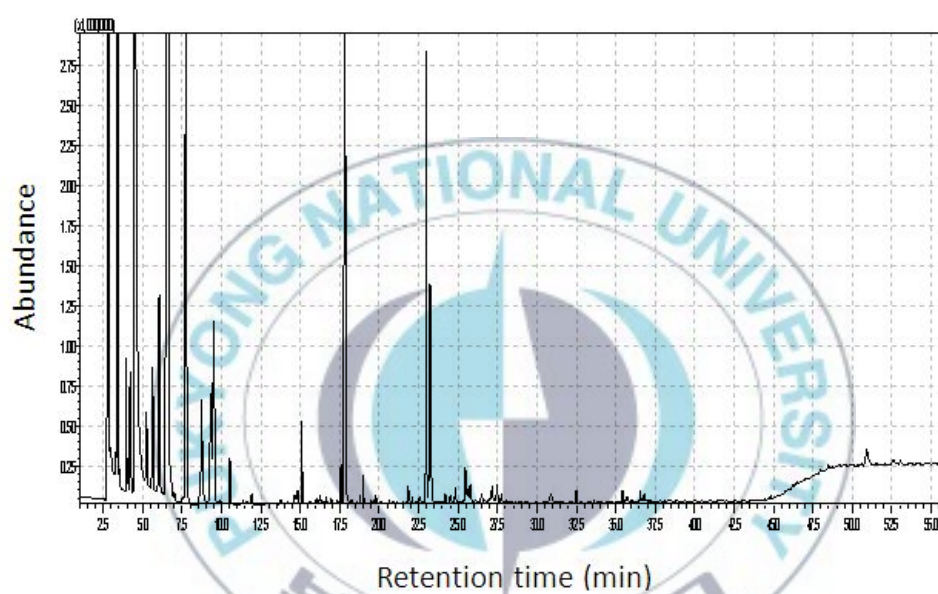


Fig. 22. Total ion chromatogram of volatiles from spotted shrimp hydrolysates.

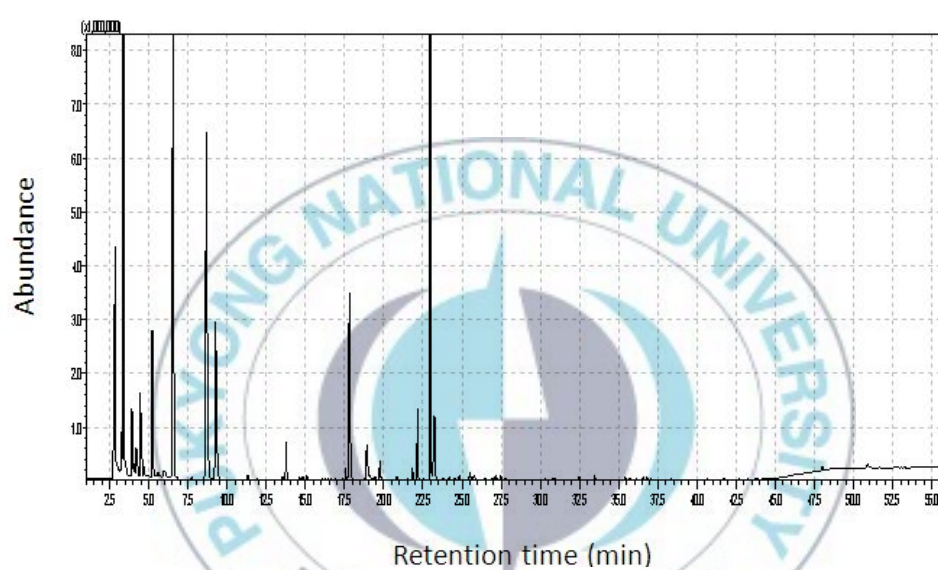


Fig. 23. Total ion chromatogram of volatiles from boiled-type shrimp reaction flavor processed at pH 5.0.

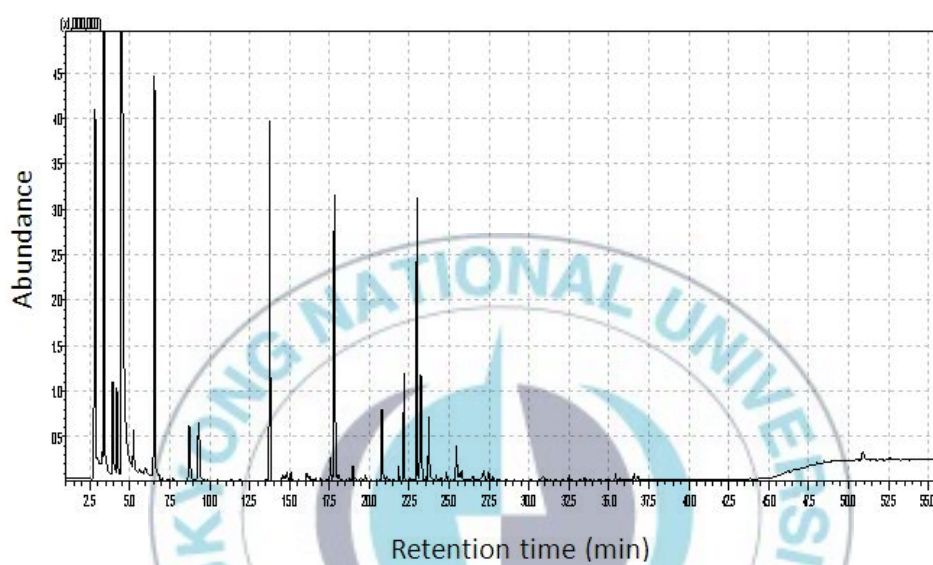


Fig. 24. Total ion chromatogram of volatiles from boiled-type shrimp flavor processed at pH 7.5.

Table 50. Composition of volatiles from spotted shrimp hydrolysates

Compound	RT ¹⁾	RI ²⁾	Peak area(10 ⁶)	Ratio of peak area(%)
Aldehydes (5)				
acetaldehyde	3.264	<600	0.532	0.096
2-methylpropanal	5.239	<600	1.849	0.333
3-methylbutanal	8.722	647	4.115	0.742
2-methylbutanal	9.292	658	4.642	0.837
2-nonenal	25.45	1060	1.383	0.249
Alcohols (1)				
ethanol	3.926	<600	3.446	0.621
Ketones (1)				
acetone	4.194	<600	2.896	0.522
Others (8)				
trimethylamine	4.479	<600	58.278	10.508
2-methylpentane	5.628	<600	3.337	0.602
3-methylpentane	6.048	<600	5.499	0.991
hexane	6.537	600	400.076	72.135
methylcyclopentane	7.733	626	18.157	3.274
cyclohexane	9.502	662	6.728	1.213
toluene	15.088	771	1.706	0.308
octanal	22.97	996	8.955	1.615

¹⁾RT means retention time.

²⁾RI means retention index.

Table 51. Composition of volatiles from boiled-type shrimp reaction flavor processed at pH 5.0

Compound	RT ¹⁾	RI ²⁾	Peak area(10 ⁶)	Ratio of peak area(%)
Aldehydes (6)				
acetaldehyde	<600	3.264	2.435	1.037
2-methylpropanal	<600	5.219	12.182	5.190
3-methylbutanal	646	8.663	40.165	17.111
2-methylbutanal	657	9.253	19.984	8.513
3-methylthiopropional (CAS) methional	839	19.742	1.142	0.486
2-pentyl-2-Nonenal	1779	47.996	0.251	0.107
Alcohols (2)				
ethanol	<600	3.919	5.139	2.189
isopropylalcohol	<600	4.451	9.320	3.970
Ketones (1)				
acetone	<600	4.2	3.052	1.300
Sulfides (2)				
dimethyldisulfide	744	13.763	2.565	1.093
dimethyltrisulfide	971	22.156	4.197	1.788
Furans (1)				
2-hydroxymethylfuran	870	18.911	3.193	1.360
Others (5)				
methylene chloride	<600	4.707	0.718	0.306
acetic cid, ethenyl ester	<600	5.944	0.449	0.191
hexane	600	6.542	45.455	19.365
octanal	996	22.971	51.352	21.877
1-iodo-tetradecane	1804	48.493	0.144	0.061

¹⁾RT means retention time.

²⁾RI means retention index.

Table 52. Composition of volatiles from boiled-type shrimp reaction flavor processed at pH 7.5

Compound	RT ¹⁾	RI ²⁾	Peak area(10 ⁶)	Ratio of peak area(%)
Aldehydes (4)				
2-methylpropanal	5.232	<600	1.813	0.778
3-methyl butanal	8.718	647	3.905	1.677
2-methyl butanal	9.309	658	4.202	1.804
2-nonenal	25.447	1060	2.004	0.860
Alcohols (1)				
ethanol	3.923	<600	4.227	1.815
Ketones (2)				
acetone	4.189	<600	3.405	1.462
3,5-dimethyl-4-octanone	48.506	1804	0.050	0.021
Sulfides (2)				
dimethyldisulfide	13.758	744	14.934	6.413
dimethyl risulfide	22.156	971	3.683	1.582
Furans (1)				
2,3-dihydrofuran	50.408	1894	0.072	0.031
Pyrazines (2)				
2,5-dimethylpyrazine	20.773	926	2.900	1.245
trimethylpyrazine	23.712	1016	2.934	1.260
Others (4)				
trimethylamine	4.416	<600	128.713	55.273
hexane	6.544	6.544	21.494	9.230
2,4-dimethylheptane	17.566	17.566	0.935	0.402
octanal	22.968	22.968	9.667	4.151

¹⁾RT means retention time.

²⁾RI means retention index.

4.2 Grilled-type 반응 새우향

Grilled-type 반응 새우향의 pH는 IOFL에서 제시하는 reaction flavor 제조에 대한 지침(IOFI Guidelines, 1994)에 의거하여 pH 8.0을 넘지 않도록 하기 위해서 pH 7.5로 실험을 진행하였다.

pH 5.0에서 반응전구체를 넣고 반응시킨 꽃새우 가수분해물에서 분리 동정된 휘발성 성분은 Fig. 25와 Table 53과 같다. Aldehyde류는 acetaldehyde, 2-methyl-2-propenal, isobutanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, 2-methylbutanal, methional 6종, alcohol류는 ethanol, 2-propanol 2종, sulfide류는 dimethyldisulfide, dimethyltrisulfide 2종이 분리되었다.

pH 7.5에서 반응전구체를 넣고 반응시킨 꽃새우 가수분해물에서 분리 동정된 휘발성 성분은 Fig. 26과 Table 54와 같다. Aldehyde류는 acetaldehyde, 2-methylpropanal, 3-methylbutanal, 2-methylbutanal, 4종이 분리되었고, alcohol류로 ethanol, isopropyl alcohol 2종, ketone류는 acetone, 1-hydroxy-2-propanone 2종, furan류는 3-methylfuran, 2-hydroxymethylfuran 2종이 분리되었다. Sulfide류로는 dimethyl disulfide가 분리되었으며, pyrazine류로는 pyrazine, methylpyrazine, 2,3-dimethylpyrazine, 2,5-dimethylpyrazine, 2-ethyl-5methylpyrazine trimethylpyrazine, tetramethylpyrazine 7종이 분리되었다. Pyrazine류는 grilled type의 새우향에서 고소한 향을 발현하는데 중요한 역할을 하는데, pyrazine은 천연에서 커피 등의 휘발성분으로 감미로운 향취를 내며 커피 flavor에 소량 사용이 된다. Methylpyrazine는 천연에서 아몬드, 대맥, 땅콩, 커피 등의 휘발성분으로 존재하며 grilled한 chicken, 초콜렛 향을 내며 음료, 아이스크림, 과자, 스프, 곡물제품에 사용된다. 2,3-Dimethylpyrazine는 천연에서 대맥, 커피 등에 존재하며 초콜렛이나 견과류 등에 있는 그린취

(플향)로 사용이 된다. 2,5-Dimethylpyrazine는 천연에서 땅콩 등에 존재하며 초콜렛향을 내며 dried shrimp향을 내는 것으로도 알려져 있으며, Trimethylpyrazine은 천연에서 아몬드, 커피, 팝콘 등에 존재하는 휘발성분으로 구운 감자, 초콜렛의 향을 내며 grilled shrimp 향을 내는 것으로 알려져 있으며, tetrapyrazine은 간장, 땅콩, 커피 등에 존재하며 trimethylpyrazine과 유사한 향을 낸다(Artificial flavor, 1994; Choi, 1987). Sulfide류와 pyrazine류는 낮은 역치로 강한 향을 나타내며 이러한 화합물은 수산물 고유의 비린취(fishy flavor)와 불쾌취(off-flavor)를 마스킹하여 grilled-type의 새우향을 제공할 것으로 생각되어진다.



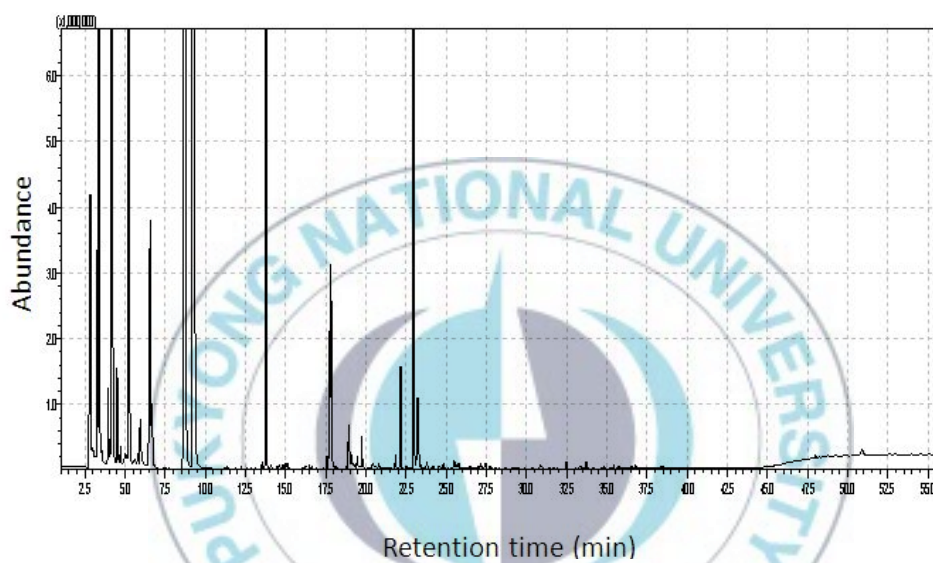


Fig. 25. Total ion chromatogram of volatiles from grilled-type shrimp reaction flavor processed at pH 5.0.

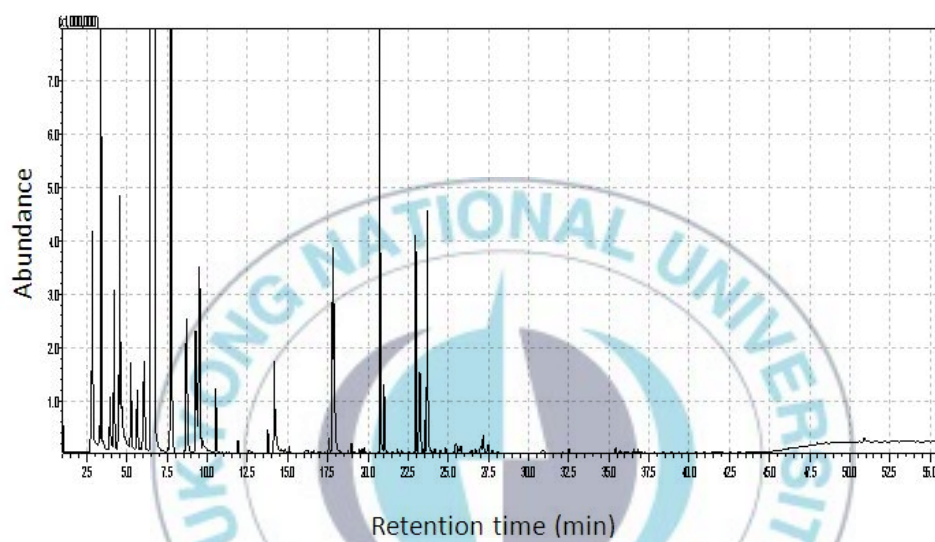


Fig. 26. Total ion chromatogram of volatiles from grilled-type shrimp reaction flavor processed at pH 7.5.

Table 53. Composition of volatiles from grilled-type shrimp reaction flavor processed at pH 5.0

Compound	RT ¹⁾	RI ²⁾	Peak area(10 ⁶)	Ratio of peak area(%)
Aldehydes (6)				
acetaldehyde	3.266	<600	10.200	1.546
isobutanal	5.212	<600	101.272	15.346
2-methylpropenal	5.586	<600	0.349	0.053
3-methyl-butanal	8.665	646	182.332	27.628
2-methyl-Butanal	9.232	657	153.301	23.229
methional	19.740	893	1.545	0.234
Alcohols (2)				
ethanol	3.924	<600	4.722	0.716
2-propanol	4.46	<600	4.958	0.751
Ketone (2)				
acetone	4.165	<600	39.543	5.992
2,3-butanedione	5.937	<600	3.707	0.562
Sulfides (2)				
dimethyldisulfide	13.758	744	37.234	5.642
dimethyltrisulfide	22.156	971	4.831	0.732
Furan (2)				
3-methylfuran	6.668	601	4.539	0.688
2-hydroxymethylfuran	18.909	870	3.100	0.470
Others (7)				
methylene chloride	4.711	<600	0.991	0.150
trimethylamine	5.017	<600	0.950	0.144
hexane	6.554	600	20.419	3.094
furfural	17.691	834	6.525	0.989
3-methylbutanoic acid	19.117	876	0.960	0.145
2-methylbutanoic acid	19.449	885	0.624	0.095
octanal	22.97	1003	44.309	6.714

¹⁾RT means retention time.

²⁾RI means retention index.

Table 54. Composition of volatiles from grilled-type shrimp reaction flavor processed at pH 7.5

Compound	RT ¹⁾	RI ²⁾	Peak area(10 ⁶)	Ratio of peak area(%)
Aldehydes (4)				
acetaldehyde	3.262	<600	1.096	0.102
2-methylpropanal	5.228	<600	6.885	0.642
3-methylbutanal	8.688	646	15.074	1.405
2-methylbutanal	9.261	657	14.556	1.356
Alcohols (2)				
ethanol	3.92	<600	3.902	0.364
isopropylalcohol	4.444	<600	5.114	0.476
Ketones (2)				
acetone	4.173	<600	11.289	1.052
1-hydroxy-2-propanone	9.661	664	0.973	0.091
Sulfides (1)				
dimethyldisulfide	13.762	744	1.387	0.129
Pyrazine (7)				
pyrazine	14.143	752	8.468	0.789
methylpyrazine	17.89	925	11.501	1.072
2,5-dimethylpyrazine	20.732	934	23.708	2.209
2,3-dimethylpyrazine	22.967	996	3.664	0.341
2-ethyl-5-methylpyrazine	23.686	1015	1.934	0.180
trimethylpyrazine	25.492	1061	16.516	1.539
tetramethylpyrazine	27.472	1107	1.721	0.160
Others (11)				
trimethylamine	4.518	<600	22.573	2.103
methylene chloride	4.697	<600	4.055	0.378
acetic acid, methyl ester	4.867	<600	1.402	0.131
2-methylpentane	5.630	<600	5.597	0.522
2-methylpentane	6.057	<600	10.727	0.999
hexane	6.601	600	767.087	71.472

Compound	RT ¹⁾	RI ²⁾	Peak area(10 ⁶)	Ratio of peak area(%)
cyclopentane	7.731	626	58.788	5.477
cyclohexane	9.494	661	22.552	2.101
heptane	11.911	700	0.929	0.087
2,4-dimethylheptane	17.566	831	0.670	0.062
octanal	23.546	1012	12.543	1.169
5-(2-methylpropyl)-nonane	27.171	1101	1.168	0.109
2,3,6,7-Tetramethyloctane	1107	27.472	0.813	0.076

¹⁾RT means retention time.

²⁾RI means retention index.



4.3 주요 휘발성 성분의 생성기작

4.3.1 Sulfide류의 생성 기작

함황화합물인 methionine과 cysteine은 Maillard reaction에 의해 반응성이 큰 황화합물을 생성하므로 roast 향을 내는데 있어 중요한 전구체 역할을 한다. Fig. 27은 새우향의 반응전구체로 선정된 methionine의 반응경로이다. Methionine은 Strecker분해 반응에 의해 methional과 같은 strecker aldehyde를 형성하며 계속 분해가 진행이 되면 methylmercaptan을 생성하여 dimethylsulfide와 dimethyldisulfide와 같은 휘발성 물질의 전구체가 된다(Baltes, 1990). 반응전구체를 넣지 않은 새우가수분해물의 경우 sulfide류가 분리 동정되지 않은 반면 methionine의 반응전구체를 넣어 반응시킨 새우향에서는 methional, dimethyldisulfide, dimethyltrisulfide가 분리 동정되었는데, 이는 methionine의 Strecker분해 반응에 의해 생성된 물질인 것으로 생각되어진다.

4.3.2 Pyrazine류의 생성 기작

Pyrazine류의 생성 반응경로는 Fig. 28과 같다. Reductones 화합물인 dicarbonyl은 α -aminoacid와 축합 반응하여 α -hydroxyketone을 형성하는데 이는 alkylpyrazine을 생성하는 역할을 한다. 또한 α -hydroxyketone은 환원력이 강하여 α -aminoketone 형태로도 존재하며 α -aminoketone 2분자가 결합하여 alkylpyrazine을 생성하기도 한다. Dicarbonyl은 ammonia 존재하에 α -aminoketone을 생성하며 두분자의 α -aminoketone 축합, 탈수하여 pyrazine을 형성한다(Ho, 1996).

Pyrazine생성은 serine과 threonine과 같은 hydroxyamino acid로부터 형성하는 것으로도 알려져 있는데, 본 연구에서 선택한 반응전구체 threonine의 반응경로를 Fig. 29와 같다. Threonine은 탈탄산과 탈수반응에 의해

1-amino-2-propanone를 생성하고 이는 이량체(dimerization)를 형성하여 2,5-dimethylpyrazine을 생성한다. 반응 중간생성물인 1-hydroxy-2-propanone과 2-hydroxypopropanol은 ammonia와 반응하여 2-aminopropanone과 1-amino-2-propanone를 생성하며 이는 self-combination에 의해 2,5-dimethylpyrazine과 cross-combination에 의해 2,6-dimethylpyrazine을 생성한다(Fig. 28-1). 반응 중간생성물 1-hydroxy-2-propanone은 formaldehyde와 반응하여 3-amino-2-butanone을 형성하며 이는 1-amino-2-propanone와 반응하여 trimethylpyrazine을 생성한다(Fig. 28-2)(Shu, 1999). Boiled-type 반응 새우향에 비해 grilled-type 반응 새우향에서 pyrazine 휘발성분이 많이 분리 동정되었는데, 위의 반응경로로 유추해볼 때, 반응전구체 threonine에서 비롯된 것으로 생각되어진다.

Pyrazine의 생성은 반응전구체 뿐만 아니라 pH 환경에 의해서도 영향을 받는 것으로 알려져 있으며, pH에 따른 반응경로는 Fig. 30과 같다. 아마도리 화합물들의 분해는 pH에 따라 다양한 반응경로를 걸치며, 이 반응경로에 의해 새로운 화합물들이 생성이 된다. pH가 5이하의 산성일 때는 furfural, furan등이 생성이 되며 pH가 7이상일 때는 pyrazine, oxazoles 등의 휘발성 성분이 생성된다(Nagodawithana, 1994).

pH 5.0의 경우, boiled-type에서 pyrazine은 생성되지 않았으며 2-hydroxymethylfuran이 분리 동정되었으며, pH 7.5, boiled-type에서 pyrazine류 2,5-dimethylpyrazine, trimethylpyrazine 2종과 적은 양의 2-dihydrofuran이 분리 동정되었다. pH 5.0, grilled-type에서 pyrazine은 생성되지 않았으며, 3-methylfuran, 2-furfurylmethanol 2종이 분리 동정되었다. pH 7.5, grilled-type에서는 furan류가 생성되지 않았으며, pyrazine, methylpyrazine, 2,5-dimethylpyrazine, 2,3-dimethylpyrazine, 2-ethyl-5-

methylpyrazine, trimethylpyrazine, tetramethylpyrazine 7종이 분리 동정되었는데 이는 pH 조건에 따른 반응경로의 차이에 의한 것으로 생각되어진다.



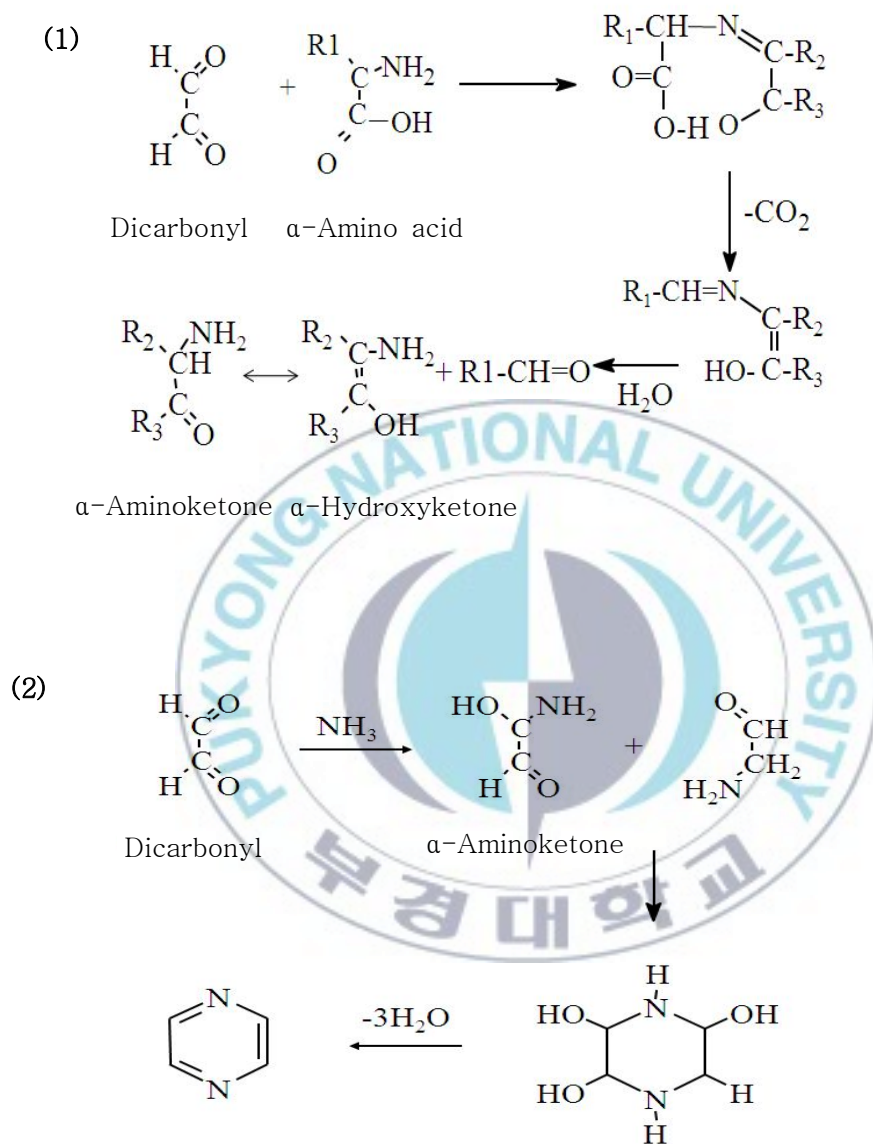
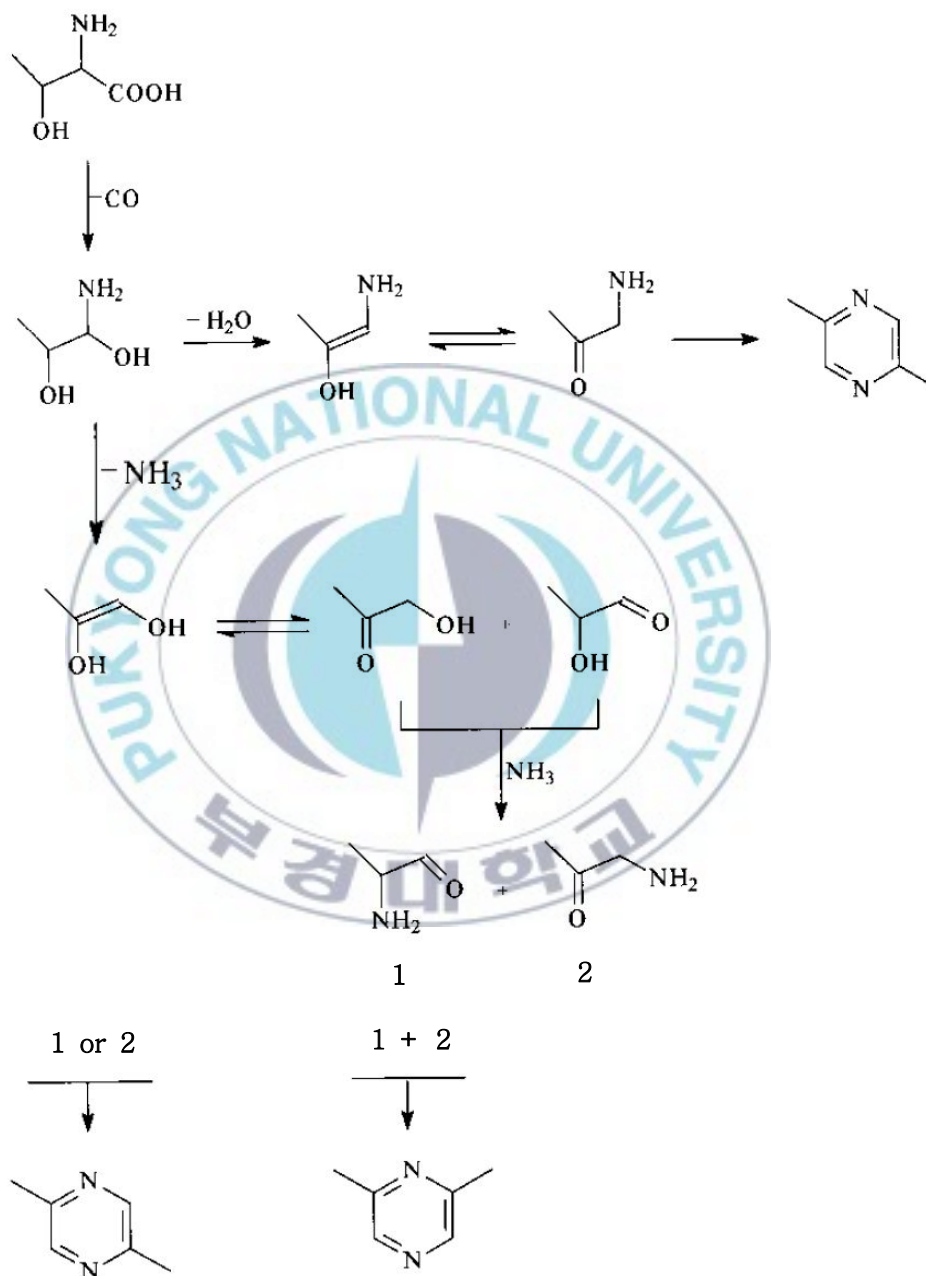


Fig. 28. Possible mechanism for the Strecker degradation of amino acids(Ho, 1996).

(1)



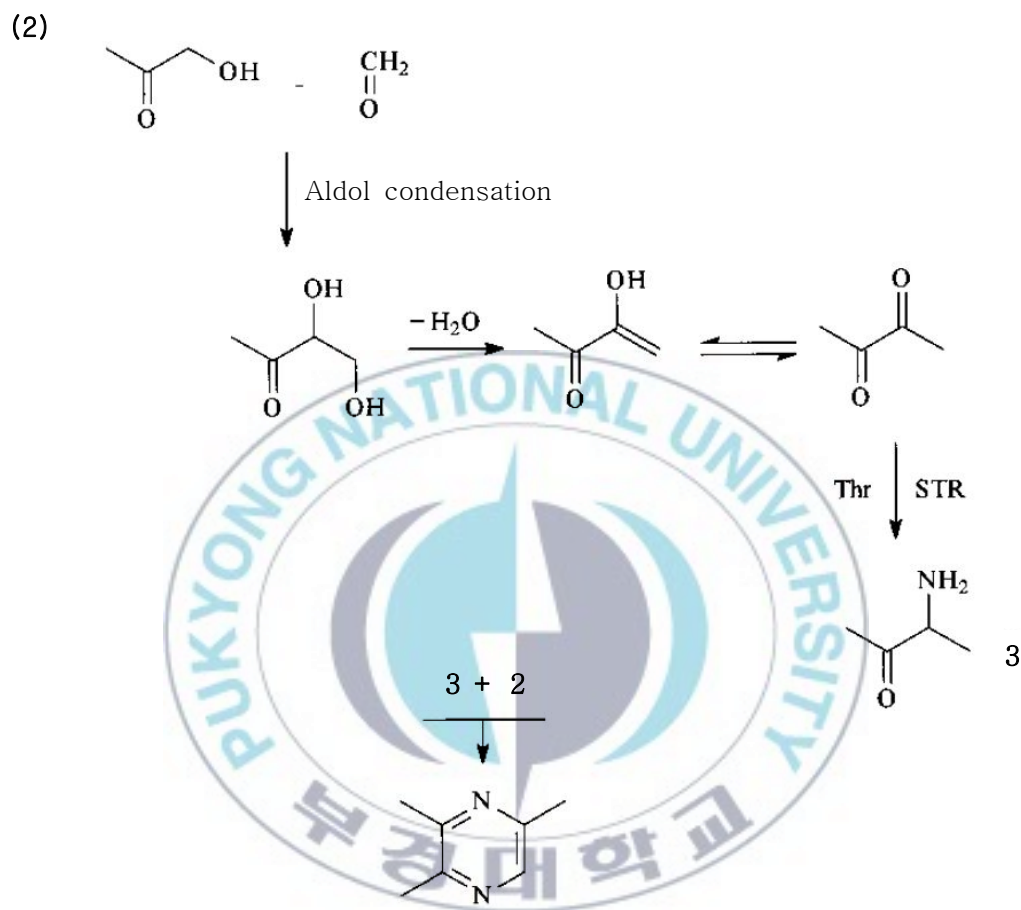


Fig. 29. Mechanism proposed for the formation of pyrazines from threonine(Shu, 1999).

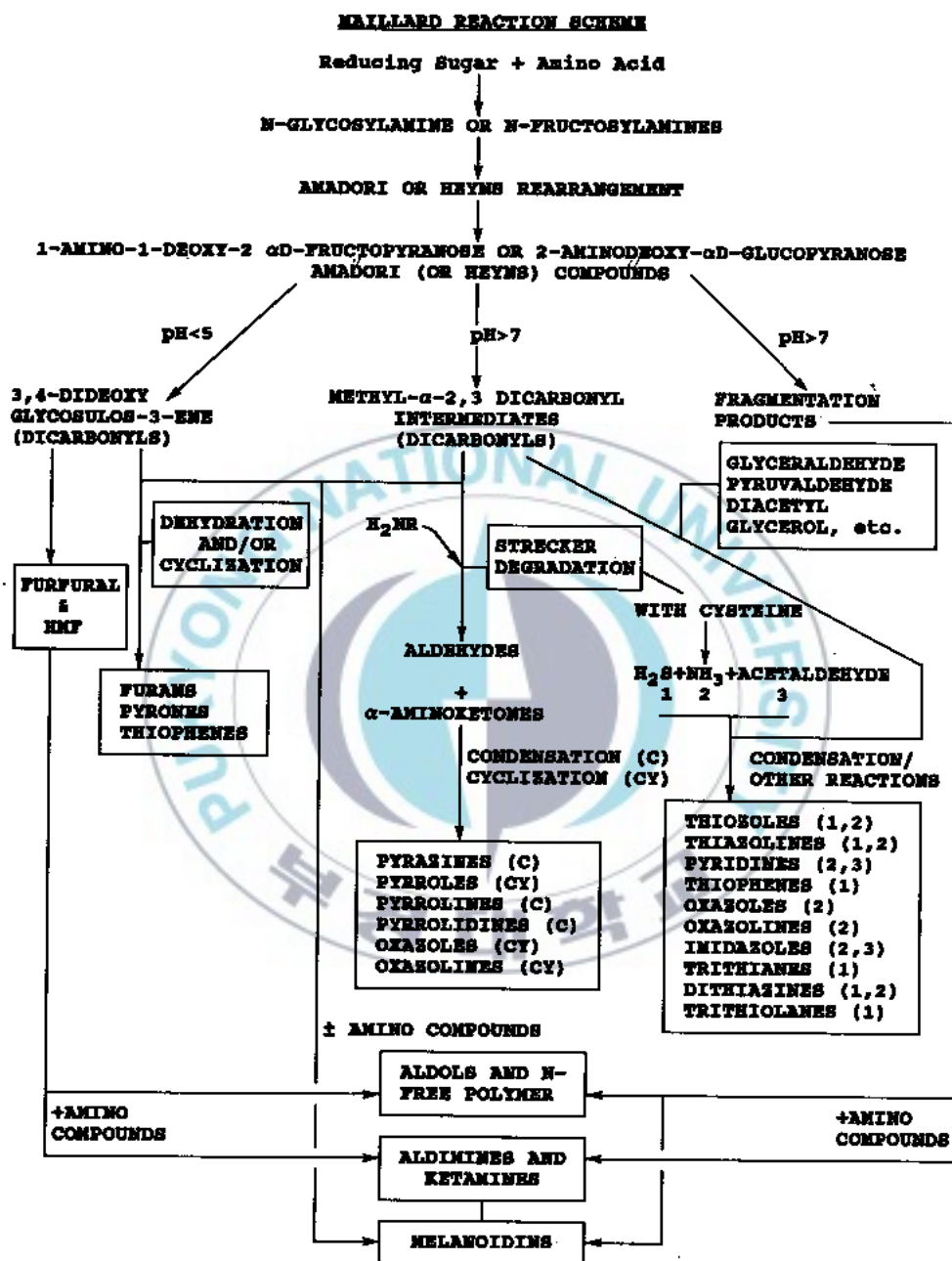


Fig. 30. Possible pathways for formation of volatiles through the Maillard reaction by different pH condition(Nagodawithana, 1994).

5. 반응 새우향의 제품화

Boiled-type 및 grilled-type 반응 새우향을 pure type 및 seasoning type 각각의 원료배합비(Table 9, 10)에 따라 제조하여 분말형태와 액상형태로 제형하였다. 분말형태의 seasoning type의 경우, pure type을 먼저 건조하여 분말형태로 제형한 후 부용제를 후배합하여 제조하므로 seasoning type은 관능에서 제외하였다.

5.1 분말(Powder-type) 제품의 관능 평가

분말은 진공건조, 분무건조, 동결건조하여 제형하였으며, grilled-type 반응 새우향과 boiled-type 반응 새우향의 pure type의 관능검사 결과는 Fig. 31, Table 55와 같다. 종합적인 관능점수 결과를 보면 boiled-type과 grilled-type에 있어 유의성 있는 결과를 나타내지 않았으며 boiled shrimp 향은 boiled-type에서, grilled shrimp 향은 grilled-type에서 각각 높은 관능점수를 받았다. 이는 각각의 제품의 특성에 맞게 향이 잘 구현된 것으로 생각되어지며, 분말건조 방법에 따른 관능의 유의적 차이는 없는 것으로 나타났다.

5.2 액상(Extract-type) 제품의 관능 평가

액상 제품은 진공 농축하여 제조하였으며, boiled-type의 반응 새우향과 grilled-type의 반응 새우향의 seasoning type과 pure type의 관능검사 결과는 Fig. 32, Table 56과 같다. 종합적인 관능점수 결과를 보면 pure type에 비해 seasoning type의 관능점수 결과가 좋았으며 이는 taste enhancer에서 비롯된 감미가 관능에 긍정적인 영향준 것으로 생각되어진다. 또한 pure type과 seasoning type에 상관없이 boiled shrimp 향은 boiled-type에서, grilled shrimp 향은 grilled-type에서 각각 높은 관능점수를 받았다.

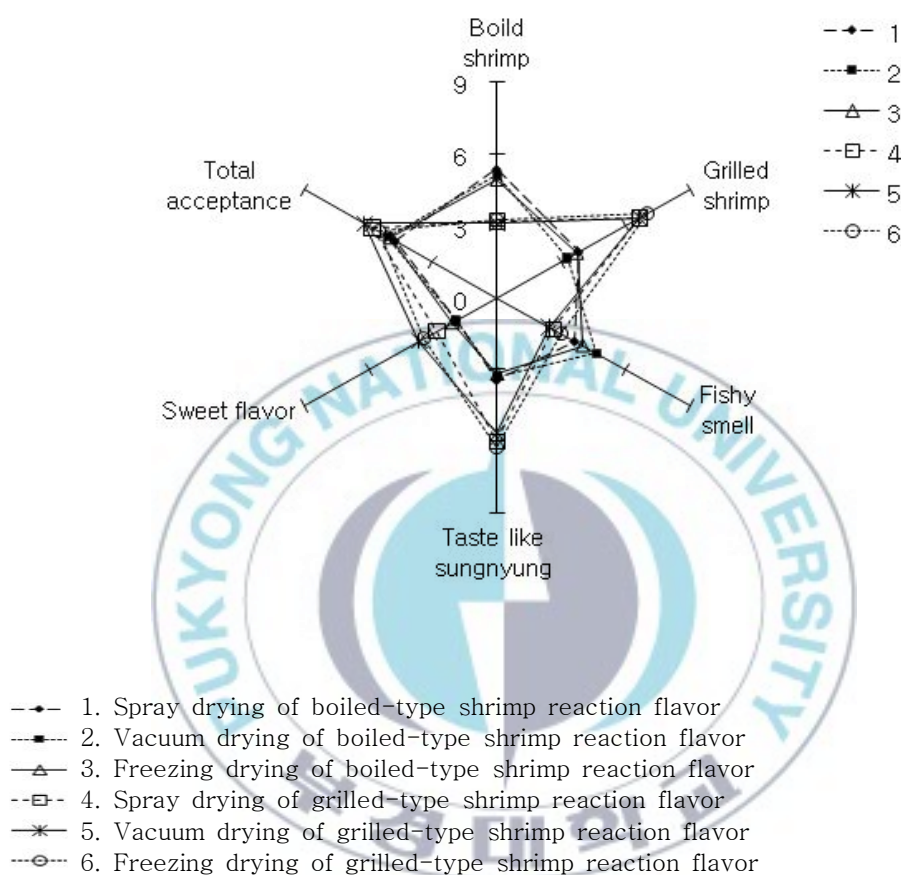


Fig. 31. Quantitative descriptive analysis profiles of boiled-type and grilled-type shrimp reaction flavor by different drying methods.

Table 55. Sensory results of boiled-type and grilled-type shrimp reaction flavor by different drying methods.

Category	1 ¹⁾	2	3	4	5	6
Total preference	4.7 ^{a2)}	5.1 ^a	5.0 ^a	5.8 ^a	6.1 ^a	5.6 ^a
Boiled shrimp	5.4 ^a	5.1 ^a	4.9 ^a	3.2 ^a	3.1 ^a	3.3 ^a
Grilled shrimp	3.8 ^b	3.3 ^b	3.7 ^b	6.6 ^a	6.6 ^a	7.0 ^a
Fishy smell	3.5 ^a	4.6 ^a	4.0 ^a	2.6 ^a	2.5 ^a	3.0 ^a
Taste like sungnyung	3.5 ^{bc}	3.3 ^c	3.2 ^c	6.0 ^{ab}	5.6 ^{abc}	6.3 ^a
Sweet flavor	1.9 ^a	1.9 ^a	2.1 ^a	2.9 ^a	3.6 ^a	3.5 ^a

- ¹⁾ 1. Spray drying of boiled-type shrimp reaction flavor
2. Vacuum drying of boiled-type shrimp reaction flavor
3. Freezing drying of boiled-type shrimp reaction flavor
4. Spray drying of grilled-type shrimp reaction flavor
5. Vacuum drying of grilled-type shrimp reaction flavor
6. Freezing drying of grilled-type shrimp reaction flavor

²⁾ The different superscript letters within the same row for the average values mean significantly different at the $p < 0.05$ level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

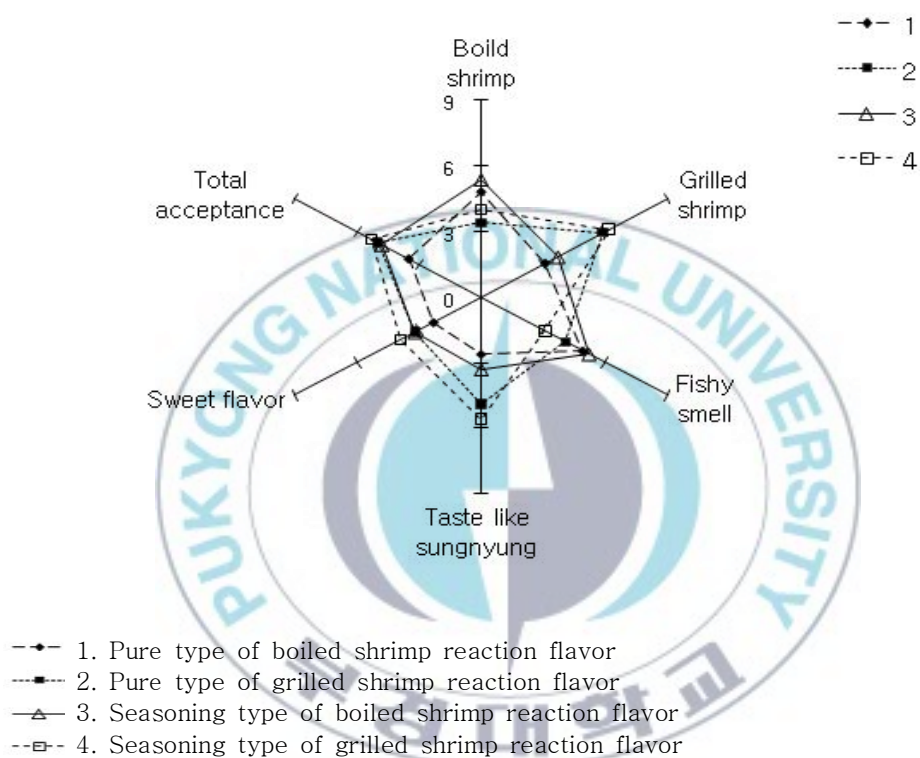


Fig 32. Quantitative descriptive analysis profiles of pure type and seasoning type shrimp reaction flavor.

Table 56. Sensory results of pure type and seasoning type shrimp reaction flavor

Category	1 ¹⁾	2	3	4
Total preference	3.5 ^{a2)}	5.0 ^a	4.8 ^a	5.3 ^a
Boiled shrimp	4.8 ^{ab}	3.4 ^b	5.4 ^a	4.0 ^{ab}
Grilled shrimp	3.1 ^b	5.9 ^a	3.7 ^b	6.2 ^a
Fishy smell	4.9 ^a	4.1 ^a	5.2 ^a	3.1 ^a
Taste like sungnyung	2.6 ^b	4.9 ^a	3.3 ^b	5.6 ^a
Sweet flavor	2.3 ^a	3.2 ^a	3.2 ^a	3.9 ^a

- ¹⁾ 1. Pure type of boiled shrimp reaction flavor
2. Pure type of grilled shrimp reaction flavor
3. Seasoning type of boiled shrimp reaction flavor
4. Seasoning type of grilled shrimp reaction flavor

²⁾ The different superscript letters within the same row for the average values mean significantly different at the $p < 0.05$ level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

요 약

새우는 어류 자원의 감소로 인하여 대체 어자원으로서, 서해와 남해의 대표적인 어획대상 종이며, 특히 대하, 중하 및 꽃새우는 전체 새우류 어획량의 50% 이상을 차지하고 있다. 하지만 이러한 새우와 같은 갑각류의 고유의 향은 축육과는 다른 독특한 냄새를 가지며 장기간 저장 시, 이러한 고유의 향은 사라지고, 비린내와 선도저하에 따라 발생하는 이취 등이 강해진다.

이에 본 연구에서는 꽃새우의 가수분해물과 반응전구체를 이용하여 Maillard reaction을 통하여 비린내와 불쾌취를 masking하고 새우 고유의 풍미성분을 더욱 강화시켜 관능적으로 기호도를 향상시킬 수 있는 반응 새우향을 개발하고자 하였다. 본 연구를 위해 첫째, 반응 새우향 제조를 위한 전처리 과정으로서 단백질 가수분해 효소를 이용하여 꽃새우의 가수분해물 조건을 최적화 하였으며 둘째, 꽃새우의 가수분해물을 이용하여 seafood 특유의 비린내를 제거하면서도 새우 고유의 풍미성분을 더욱 강화시키는 반응전구체와 반응조건을 찾고자 하였다. 셋째, 반응 새우향의 제품화로 해산물계 소스·연제품용으로 사용되는 boiled-type의 반응 새우향과 스낵·조미용으로 사용되는 grilled-type의 반응 새우향을 개발하고자 하였다.

1. 꽃새우의 효소별 가수분해 최적 조건을 구하기 위하여 중심합성계획법에 따라 2가지 독립변수(independent variable)를 선정하고 가수분해도, 향산화력을 종속변수(dependent variable)로 선정하여 반응표면분석법으로 실시한 결과 Alcalase를 이용한 가수분해의 최적 제조조건은 pH 9.3, 효소처리 온도 65.2℃, Flavourzyme은 pH 4.1, 54.5℃, Protamax는 pH 6.6, 효소처리 온도 42.5℃, Neutrase는 pH 6.1, 45.2℃로 나타났다. 효소 중

Alcalase가 최대 항산화력을 나타내었고 최대값은 DPPH-scavenging activity 24.9%, Fe-chelating activity 26.7% 였다.

2. 사용목적에 따라 라면 수프, 해산물계 소스, 연제품 등에 사용되는 삶은 향을 내는 boiled-type의 새우향과 조미, 스낵, 쿠키 등에 사용되는 고소한 향을 내는 grilled type의 반응 새우향을 제조하였다. Boiled-type 반응 새우향 제조를 위해 관능검사 결과를 바탕으로 반응전구체는 methionine, sucrose를 선택하였으며 반응제조 조건은 pH 7.5, 반응시간 1시간으로 선정하였다. Grilled-type 반응 새우향 제조를 위해 관능검사 결과를 바탕으로 반응전구체는 methionine, threonine, glucosamine, xylose를 선택하였으며 반응제조 조건은 pH 7.5, 반응시간 2시간으로 선정하였다.

3. 최적의 조건에서 제조되어진 boiled-type 반응 새우향과 grilled-type 반응 새우향에 있어 비린내와 불쾌취를 masking하고 새우 고유의 풍미성분을 더욱 강화시켜줄 것으로 생각되는 휘발성분인 sulfide류와 pyrazine류의 휘발성분을 분석한 결과 꽃새우 가수분해물에서 sulfide류와 pyrazine류가 분리되지 않았다. Boiled-type 반응 새우향에서 dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide 2종과 2,5-dimethyl pyrazine, 2,3-dimethyl pyrazine 2종이 분리되었으며 grilled-type 반응 새우향에서 dimethyl disulfide 1종과 pyrazine, methyl pyrazine, 2,5-dimethyl pyrazine, 2,3-dimethyl pyrazine, 2-ethyl-5-methyl pyrazine, trimethyl pyrazine, tetramethyl pyrazine 7종이 분리되었다.

4. Boiled-type과 grilled-type 반응 새우향을 배합비에 따라 순수 type과 조미 type으로 나누었고 제품의 성상으로는 분말형태와 액상형태로 제조하였

다. 진공건조, 분무건조, 동결건조한 boiled-type과 grilled-type의 분말형태의 반응 새우향의 관능을 비교한 결과 건조방법에 따른 관능의 차이는 없는 것으로 나타났으며 boiled shrimp 향은 boiled-type에서, grilled shrimp 향은 grilled-type에서 각각 높은 관능점수를 받았다. 또한 순수 type에 비해 조미 type의 종합적인 관능점수의 결과가 좋은 것으로 나타났다. 진공농축하여 제조한 액상의 boiled-type과 grilled-type의 반응 새우향의 경우 순수에 비해 조미 type의 종합적인 관능점수 결과가 좋았다.



감사의 글

2010년 초 친구인 (주)MSBio 김진홍 박사가 해산물계 반응향에 대해서 함께 연구를 하자는 제안을 하였습니다. 이는 나에게 새로운 도전과제의 제안으로 식품용 중간소재를 개발해온 나의 삶을 돌아보는 계기가 되었습니다. 당시, 수산대학 식품 가공학실, 보장실, (주)오뚜기 식품 중앙연구소, (주)고려식료, 에스에스통상, 개인 사업으로 좌충우돌의 나의 삶은 제대로 정리 되지 못한 상태였고 언제나 내 마음 속에는 학위에 대한 아스라한 여운과 아쉬움으로 남아 있었습니다.

참으로 부족한 사람인 나를 반응향의 세계로 인도하였고 언제나 걱정스러운 애정으로 봐주신 지도 교수 김선봉 교수님의 은혜에 고개 숙여 감사드립니다. 또한 flavor 연구에 대해서 세심한 도움 덕분에 실험을 마칠 수 있게 해주신 이양봉 교수님께 감사드립니다. 그리고 논문 심사를 해주신 전병수 교수님, 수산과학원 윤호동 박사님과 조영제 교수님, 양지영 교수님, 안동현 교수님, 김영목 교수님께 감사를 드립니다. 무엇보다도 실험 설계, 실험, 자료 정리 등을 맡아서 해준 (주)MSBio 오정환 사원의 헌신적인 도움으로 이 논문이 나올 수 있었고 고맙다는 말을 꼭 전하고 싶습니다.

이 논문을 준비하는 과정에서 도움을 주신 모든 분들에게 충분한 감사를 표시하기에는 부족하지만 나의 무지에 인내를 가지고 너그럽고 친절하게 해주신 모든 분들에게 특별히 감사를 드립니다.

이 연구를 한 생화학 실험실의 이다선 석사와 학부생들과 서라벌 대학 김경묘 교수, (주)MSBio 김진홍 박사, 김봉연 실장, 이현주 사원과 실험 과정에서 여러 가지 어려운 점이 발생할 때 마다 조언과 도움을 준 (주)에프에이뱅크 박순주 팀장, 한빛 향료 김위중 팀장, 지보당 안효수 팀장, 보락 향료 장성민 팀장, (주)대상 성상욱 팀장, 화창 식품 손강혁 팀장에게 감사를 드립니다.

오랜 친구인 양종철, 서석배, 김훈식, 정명기, 윤도광, 임순천, 김일하, 문

교택, 문명섭, 이철, 김창규, 신용우, 김정례, 이승원과 선배이며 형님 같은 호명석 형, 이준형 형, 권해구 형, 이영식 형, 김종쾌 형, 조영찬 형, 최남군 형에게 사랑하는 마음을 전합니다.

미래의 희망으로 어려움을 이겨내고 있는 천년의 아침(주) 김석춘 사장님, 최영삼 형, 김병국 전무, 김종완 형, 김병도 형, 김광준, 김건석, 김유창 직원에게 이 논문이 작은 희망이기를 기원합니다.

믿음직스러운 동생 김우진 부부와 조카 민성, 혜성, 처제인 박경미, 동서정진수, 처남 박영철 부부, 박영진 부부와 특히 장모님에게는 죄송하다는 말과 감사하다는 말을 동시에 드립니다.

어린 시절부터 늘 사랑과 관심으로 든든한 후원자가 되어 주신 아버지와 어머니의 희생과 사랑에 가슴깊이 감사드립니다. 언제나 건강하시기를 기원합니다.

내 사랑하는 아들 김법성, 김범준 항상 평화와 행복이 함께하기를 기원하며 언제나 그렇듯이 다른 사람들과 비교할 수도 없이 강한 인내심과 묵묵히 내조해 준 사랑스러운 아내 박경숙에게 가장 깊은 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

- Angles Navarrete del Toro, M., & Garcia-Carreno, F. L. (2002). Evaluation of the progress of protein Hydrolysis. *Current protocols in Food analytical chemistry*. B2.2.1-B2.2.14.
- AOAC (2005). In W. Horwitz (Ed.), (17th ed.), Official methods of Analysis, Association of official agricultural chemists international, Gaithersburg, AOAC international.
- Baltes, W. (1990). Roast aroma formation; The role of amino acids during the Maillard reaction. Finot, P.A., Aeschbacher, H.U., Hurrell, R.F. & Liardon, R. (Eds.), The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology (pp. 43-61), Basel, Boston, Berlin, Birkhauser Verlag
- Boudrant, J. & Cheftel, C. (1976). Continuous proteolysis with a stabilized protease. II Continuous experiments. *Biotechnol. Bioeng.*, 18, 1735-1749.
- Box, G.E.P. & Wilson, K.B. (1951). On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society (Series B)*, 13, 1-45
- Cha, H.K., Lee, J.U., Park, C.S., Baik, C.I., Hong S.Y., Park, J.H., Lee,

D.W., Choi Y.M., Hwang, K.S. & Kim, Z.G. (2001). Shrimps of the Korean Waters. National Fisheries Research and Development Institute, Busan, Hangul graphics, 32-33.

Cheong, H.S. (2007). Antioxidant effect of histidine containing low molecular weight peptide isolated from skipjack boiled extract. *Korean J. Food Cookery Sci.*, 23, 221-226.

Choi, B.D. & Kang, S.J. (1997). Development of processing conditions for flavor improvement of sea eel. *J Ins Marine Industry*, 8, 71-80.

Choi, S.E. & Lee, S.G. (2006). 연근해어업 휴어제 도입에 관한 연구. Ministry of marine affairs & Fishers.

Choi, S.H (1987). Cooked odor components of *sergia Lucens* and Its fermented product. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 19, 157-163.

Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter D.H. & Catignani, G.L. (1983). Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J dairy Sci.*, 66, 1219-1227.

Elmore, J.S. & Mottram D.S. (2000). Formation of 2-alkyl-(2H)-thiapyrans and 2-alkylthiophenes in cooked beef and lamb. *J. Agric. Food*

Chem., 48, 2420-2424.

Food composition table. (2006). <http://koreanfood.rda.go.kr>

Gildverg, A. & Stenberg, E. (2001). A new process for advanced utilization of shrimp waste. *Process Biochemistry*, 36, 809-812.

Guerard, F., Sumaya-Martinez, M.T., Laroque, D., Chabeaud, A. & Dufosse, L. (2007). Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards. *Process Biochemistry*, 42, 1486-1491.

Ho, C.H. (1996). Thermal generation of Maillard aromas. I Kan, R. (Ed.), *The Maillard reaction : Consequences for the chemical and life sciences* (pp. 27-53), Chichester, New York, Brisbane, Toronto & Singapore, John Wiley & Sons.

Ho, C.T., Bruechert, L.J., Zhang, Y. & Chiu, E.M. (1989). Contribution of lipid to the formation of heterocyclic compound in model systems. Parliment, T.H., McGorin, R.J. & Ho, C.T. (Eds.), *Thermal generation of aromas* (pp. 105-113), Washington D.C, American Chemical Society.

Indeung W. (1996). Artificial flavors (pp. 929-930). Tokyo, The Japanese Industrial Daily.

IOFI Guidelines for the production and labeling process flavors. (1994)
Gray R. (Ed.), (2nd ed.) Source Book of Flavor (pp. 150-154), New
York, Chapman and Hill.

Jang, H.J., Kim, M.H., Jung, E.J., Kim, S.B. & Lee, Y.B. (2004). Reaction
flavor processing and quality assessment using hydrolysates of
Dark Muscle of Skipjack. *Joint meeting of the korean societies on
fisheries science*. Busan, 107-108.

Kim, D.H. (1987). Chemistry of Food Science (pp. 30-32), Seoul,
Tamgujung publisher.

Kim, D.S. & Kim, J.S. (2004). Manufacturing of meat flavor extract used
for browning reaction. *Korean J. Food & Nutr.*, 17, 313-321.

Kim, H., Lee, Y.M. & Cha, Y.J. (2003). Volatile flavor compounds in
seafood-like flavoring sauce. *Joint meeting of the korean societies on
fisheries science*, Busan, 87-88.

Kim, K.O. & Lee, Y.C. (1998). Sensory evaluation of food (pp. 192),
Seoul, Hakyoon publisher.

Kim, K.W. & Beak, H.H. (2003). Development of a burnt beef flavor by
reaction flavor technology. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 35,
1045-1052.

- Kim, M.R. (2010). Bitterness and solubility of soy protein, casein, gluten, and gelatin hydrolysates treated with various enzymes. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 39, 587-594.
- Kim, S.B. (1995). The theoretical of marine processing (pp. 588-602), Seoul, Hwyingseol Publisher.
- Kim, S.B. (1995). The theoretical of marine processing (pp. 208-219), Seoul, Hwyingseol Publisher.
- Kim, S.G. (2001). Chitosan oligosaccharide let you live a healthy life (pp. 26-35), Seoul, Teail Publisher.
- Ko, S.N., Yoon, S.H., Yoon, S.K. & Kim, W.J. (1997). Development of meat-like flavor by Maillard reaction of model system with amino acids and sugars. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29, 827-838.
- Lee, M.J., Lee, S.J., Cho, J.E., Jung, E.J., Kim, M.C., Kim, G.H. & Lee, Y.B. (2002). Flavor characteristics of volatile compounds from shrimp by GC olfactometry (GCO). *J. Korean Soc. Food Sci Nutr.*, 31, 953-957.
- Lee, S.Y. & Rhee, H.S. (1979). A study on the suppressing effects of spices for fishy odor. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 11, 126-130.
- Lee, Y.E. & Rhee, H.S. (1982). Effect of organic acids on suppression of

fishy odor in salted clam pockle. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 14, 6-10.

Lee, Y.J., Jo J.W., Kim, B.G. & Son, T.W. (2006). Manufacture and characteristic of glucosamine. *Proceedings of the Korean Society of Dyers and Finishers Conference*, Seoul, 207.

Lindsay, R.C. (1994). Flavor of fish. Shahidi, F. & Richard botta, J. (Eds.), *Seafood : chemistry, Processing Technology and quality* (pp. 75-84), London, Glasgow, Weinheim, New york, Tokyo, Melbourne & Madras, Blackie academic & professional.

Manley, C.H. (1994). Process flavor. Reineccius, G. (Ed.), (2nd ed), *Source book of Flavor* (pp. 139-154), New york & London, Chapman & Hall.

Manley, C.H., Choudhury, B.H. & Mazeiko, P. (1999). Thermal process flavorings. Philip R.A. & Ashurst, P.R. (Eds.), (3th ed.) *Food flavorings* (pp. 283-326), Berlin, Springer-Verlag.

Mottram, D.S. & Whitfield F.B. (1994). Aroma volatiles form Meatlike Maillard systems Parliment, T.H., Morello, M.J. & MC Gorrin, R.J.(Eds.). *Thermally generated flavors ; Maillard, Microwave & Extrusion* (pp. 180-191), Washington, D.C, American chemical society symposium series 54.

Morrison, W. R. & Smith, L. M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron trifluoride-methanol. *J. Lipid Res.*, 5, 600-608.

Nagodawithana, T. W. (1994). Savory Flavors. Gabelman, A. (Ed.), Bio Production of flavor and color ingredients (pp. 135-142), Chichester, New York, Brisbane, Toronto & Singapore, A wiley-interscience publication.

Oh, K.S. (2000). Processing of intermediate flavoring substance from low-utilized long finned squid. *J. Korea Soc. Food Sci. Nutr.*, 29, 663-668.

Oh, K.S., Kang, S.T. & Ho, C.T. (2001). Flavor constituents in enzyme hydrolysates from shore swimming crab and spotted shrimp. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 30, 787-795.

Park, W.H. (2005). The newest technology of flavor analysis and development of food flavoring. <http://www.reseat.re.kr>

Raghavan, S. & Kristinsson H. G. (2008). Antioxidative efficacy of alkali-treated tilapia protein hydrolysates : A comparative study of five enzymes. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 1434-1441.

Seoung N. G. (2003). Statistical Analysis of Data (pp.229-251)

Seoul, Freedom Academy.

Shu C.K. (1999). Pyrazine formation from serine and threonine *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4332-4335.

Spanier A.M., Flores M., Toldra F., Aristoy M.C., Bett K.L., Bystricky P. & Bland J.M. (2004). Meat Flavor : contribution of proteins and peptides to the flavor of beef. *Adv Exp Med Biol.*, 542, 33-49.

Tressl, R., Helak, B., Martin, N. & Kersten, E. (1989). Formation of amino acid specific Maillard products and their contribution to thermally generated aromas. Parliment, T.H., Mc, P., Gorrin, R.J. & Ho, C.T. (Eds.), *Thermal generation of aromas* (pp. 156-171), Washington D.C, American chemical society.

Vernin, G. & Parkanyi, C. (1982). Mechanisms of formation of heterocyclic compounds in Maillard and pyrolysis reaction. Vernin, G. (Ed.), *The chemistry of Heterocyclic flavoring and aroma compounds* (pp. 151-207). New York, Ellis Horwood.

Versic, R.J. (1998). Flavor encapsulation. Risch, S.J. & Reineccius, G.A. (Eds.), *Flavor encapsulation* (pp. 1-6), Washington D.C, American chemical society.

Yang, Y.I., Seo, I. T., Park G.H. & Yun G.R. (1997). Amounts of shrimp's natural color. *Joint meeting of the Korean Society for*

Applied Biological Chemistry, 100.

Yoon, S.H., Lee, J.K., Nam H.S. & Lee, H.J. (1994). Formation of Meatlike flavors by Maillard reaction using hydrolyzed vegetable protein(HVP)., *Korean J. Food Sci. Technol.*, 26, 781-786.

Yoo, S.S. (2001). Reaction flavor technique for generation of food flavor. *Food Industry and Nutrition*, 6, 27-32.

Young O.A. & Cummings T.L. (2008). Effect of xylose on sheepmeat flavors in casserole-style cooking. *J. Food Sci.* 73, S308-313.

日本厚生省編 (1960) : 食品衛生指針 I. (pp.30~32)

