

발간등록번호

11-1543000-000841-01

수산 발효 식품인 식해의 품질 향상 및 생산 공정의 표준화 기술 개발

(Quality Improvement and Process Control Standardization of
Sikhe)

강릉원주대학교 산학협력단

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “수산 발효 식품인 식해에 관한 연구” 과제(세부과제 “ 품질 향상 및 생산 공정의 표준화 기술 개발에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2015년 03월 13일

주관연구기관명 : 강릉원주대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 조 순 영

세부연구책임자 : 한 대 원

연 구 원 : 한 호 준

연 구 원 : 김 덕 기

연 구 원 : 김 소 라

협동연구기관명 : 고려대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 황 한 준

협동연구기관명 : (주) 정이푸드빌

협동연구책임자 : 이 정 희

요 약 문

I. 제 목

수산 발효 식품인 식해의 품질 향상 및 생산 공정의 표준화 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

대표적인 3종 이상(가자미, 오징어, 명태 등) 식해의 발효 최적 공정 표준화 연구 및 HACCP 수준의 대량 생산 기술 개발과 식해의 유통기한 연장기술을 개발 및 기능성 등 품질 특성 조사 및 제품화

2. 연구개발의 필요성

현재 우리나라의 젓갈 및 식해류가 국내시장을 넘어 해외로 수출에 박차를 가하고 있는 실정에서 수입국으로부터 수입검사 불합격이 발생하는 현재 우리나라의 식해 생산은 경제성이 낮은 소형어패류를 이용하므로 연근해 어민의 주요 소득원으로 활용될 수 있으며 한국인의 식·기호와 잘 어울리는 맛과 향을 가진 전통 수산 발효제품이나, 과학적 숙성 발효의 조건이 설정되어 있지 않은 등 경험적인 제조방법에 의존하기 때문에 생산된 제품 품질의 재현성이 낮고 지나치게 염도가 높으며 비위생적 생산 유통 및 품질안정화가 어려움 등 그 대책이 시급한 실태이며, HACCP 도입에 대한 사례도 충분하지 않은 실정이다. 따라서 본 연구개발에서는 과학적이고 체계적인 연구로 식해 생산 시 품질 균일성을 추구하며 기호성과 건강성을 포함한 제품의 품질안정화 기법 등을 연구하고자 하며 식해의 품질을 향상시키고 위생적인 HACCP 생산 공정의 표준화 기술을 개발하여 지역경제 활성화에도 기여할 것임.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 가자미, 명태, 오징어식해의 생산 공정의 표준화

- 식해의 표준화 생산 공정의 확립(숙성온도, 숙성기간 등)
- 식해 제조 표준 레시피 확립(부재료 배합비 등)
- 식해의 stater균의 표준화 .

2. 가자미, 명태, 오징어식해의 저장성 향상 및 기능성 부여

- 천연식자재에서 항균 및 항산화성을 확인 및 식해의 기능성 부여
- 에탄올이나 물을 이용하여 유용성분 추출하여 식해의 저장성 향상 시도
- 포장지 종류(Nylon + Polyethylene laminated, 레토르트 파우치)나 포장기법에 따른 식해의 유통기한 연장효과 확인 시도.

3. 가자미, 명태, 오징어식해의 영양기능성 성분의 확인 및 동정

- 식해의 영양기능성 성분 확인 시도
- 기능성 유산균종속의 조사 시도

4. 소비자 기호도 조사 및 제품화

- 소비자 기호도 조사에 의한 제품 recipe 조정
- 표준화된 식해의 제품 사용화 시도

IV. 연구개발결과

1. 가자미, 명태, 오징어식해의 생산 공정의 표준화 확립

- 시판 가자미, 명태, 오징어식해의 이화학적 및 미생물학적 특성 확인 후 평균적인 특성을 확인 할 수 있었으며, 이 자료를 토대로 식해의 숙성온도, 숙성기간을 관능검사 및 이화학, 미생물 실험을 통하여 생산 공정을 확립 할 수 있었다. 또한 반응표면 분석법을 이용하여, 실험설계를 실시하여, 식해 제조에 들어가는 부재료 배합비의 최적점을 확인 할 수 있었으며, 최적레시피를 확립 할 수 있었다.

- 가자미, 명태, 오징어식해에서 각각 우량 stater 후보균 탐색 및 선별하여 최적화 하였으며, 생육특성 및 적합성 등을 확인 분리 동정하여, 표준화된 우량 stater균을 확보하였다. 또한 stater균의 표준화된 각각의 식해에 접종하여, 발효공정의 표준화를 확립시켰다.

- 본 연구의 목적은 가자미, 명태, 오징어 식해에 적용할 발효 젖산균 스타터를 탐색하고, 식품 시스템의 응용에 대한 적합성을 평가하는 것이다. 가자미식해 후보균 YG331(L. brevis)은 가자미식해의 pH, 산도 제어 및 기능성, 소비자 선호도에 가장 적합한 균주로 간주된다. 또한 이번 연구에서 PM03 균주(L. brevis)를 사용하여 제조한 가자미식해에서 발효기간 동안 GABA(γ -aminobutyric acid) 물질 함량이 증가함을 확인하였다. 따라서 더 많은 연구를 통하여 발효 특성을 확인하고, YG331 균주와 혼합하여 적용 가능성을 검토하여 보아야 할 것이다. 명태식해 후보균 M1(L. brevis)은 명태식해의 발효를 위한 pH, 산도 제어 및 안전성, 기능성, 소비자 선호도에 있어 가장 적합한 균주로 간주된다. 또한 이 후보균에서 GABA(γ -aminobutyric acid) 물질을 생성하는 능력이 있음을 확인하였다. 오징어식해 후보균 B1(L. brevis)은 오징어식해의 발효를 위한 pH, 산도 제어 및 안전성, 기능성, 소비자 선호도에 있어 가장 적합한 균주로 간주된다.

2. 식해의 저장성향상 및 기능성 부여

- 항균활성 및 항산화활성을 가진다고 알려진 천연식자재 아로니아베리, 프로폴리스, 고추냉이 등의 각각의 성분들을 추출하여 항균성 및 항산화성을 확인하였고, 그것을 바탕으로 저장성을 확인 하였으며, 고추냉이 및 프로폴리스가 좋은 저장성을 나타내었다. 또한 관능검사를 통하여 최적 첨가량을 확인하였고, 최종적인 식해를 개발 할 수 있었다.

- 포장지 종류 및 포장방법을 달리하여 식해의 저장성을 확인하였다. 일반적인 Nylon +

Polyethylene laminated 포장과 알루미늄이 적층된 포장지를 비교분석한 결과 빛이 차단된 알루미늄이 적층된 레토르트포우치에서 더 좋은 저장성을 나타내었다. 포장방법에서는 일반 용기포장, 질소포장, 진공포장, CO2포장을 실시하였다. 본 연구를 통하여 질소, 진공, CO2포장에서 뛰어난 저장성을 기대하였으나, 일반 레토르트포장과 큰 차이가 나타나지 않았으며, 더 좋지 않은 저장성을 나타내기도 하였다. 이는 혐기적 조건에서 자라는 유산균주로 인하여 숙성 및 발효가 가속화 되어 나타낸 현상으로 사료된다.

3. 소비자 기호도 조사 및 제품화

- 표준화된 최적 생산 조건에 우량 starter균을 접종하여 개발한 식해의 기호도 조사를 통하여 기존 레시피를 최적조건으로 조절하여 최종 식해제품으로 개발하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 가자미, 명태, 오징어식해의 생산 공정의 표준화를 통하여 숙성온도, 숙성기간, 표준 recipe, 표준화된 starter균에 대한 기술개발을 하였고, 식해의 표준화된 맛과 품질향상을 도모하였다. 또한 항균성과 항산화성을 가지는 천연식자재를 이용하여 더 향상된 품질의 식해를 개발 함

- 최종적으로 개발한 가자미, 명태, 오징어식해의 표준화 기술을 통하여 특허출원 9건, 특허등록 2건, 비 SCI논문 5건을 달성하였고, 현재 특허등록 1건 진행되고 있고 추가적으로 특허등록을 1건 이상 더 실시할 예정이며 SCI(E) 논문 1건도 현재 투고 중에 있다. 또한 SCI(E)급 이상의 학술지의 투고는 지속적으로 도전 해나갈 계획 임

- 본 연구개발 성과를 통하여 참여기업인 정이푸드빌 및 여러 기업체에 가자미, 명태, 오징어식해의 생산 공정 표준화에 대한 기술이전을 실시하고, 각각의 기업들의 조건에 맞추어 상품화 및 제품화를 시도 할 예정임

- 기능성 유산균종균의 탐색을 통하여 확인 된 GABA 생선균주나 식중독 및 병원성균에 대한 항균활성을 가지는 후보균주를 이용하여 추가적인 연구를 통해 그 기능성 등을 확인하여, 대량 배양 및 생산하여 고부가치식품으로서의 가치창출을 실시 할 수 있을 것으로 사료됨

- 추후 추가적인 연구과제를 수주하여 가자미, 명태, 오징어식해에서 확인된 영양기능성 성분의 효과를 동물실험이나 추가적인 연구를 통하여 확인 및 동정으로 국내 및 국외 식품관련학술지 등을 통하여 우리나라 전통 발효 식품인 식해의 우수성을 알리면, 기업체의 생산 및 매출증대에 효과적일 것으로 사료됨

- 소비자들의 저염 기호도 및 웰빙 선호 성향에 맞는 식해 고품위화 제품 출시가 기대되며 향후 기존 식해 제품보다 위생적으로 안전하게 전국유통을 할 수 있게 됨은 물론이고 외국으로의 수출에도 크게 도움되는 식해 유통기한연장 신 기술개발에 성공을 거듭으로서 한국의 식해산업 발전에도 크게 기여할 것으로 판단됨.

SUMMARY

I. Title

Quality improvement and processing standardization of sikhae products

II. Object and necessity

1. Object

Studies on standardization of fish sikhae production process

Development of standard HACCP system on fish sikhae products

2. Necessity

Sikhe is traditional marine fermented korean food with flavor which match with korean. it is good for inshore fishermen to get earning from shikhae, because it is made with useless small fishes. for this reason, nowadays sikhae producers want to expand the market of sikhae from the domestic market to oversea market, but they have failed to pass the imported food inspection system in the importing countries the reasons for this are that sikhae is made in the empirical manner which not set up the scientific condition of fermentation and has excessively high salinity. in addition, there is not enough case of adopting HACCP. so it is very urgent for them to make sanitarily process and guarantee stabilization of sikchae's quality.

So, from the research and development with scientific and methodical way, we will improvement the quality of sikhae by making the sanitary HACCP process which guarantee stabilization of sikhae's quality. also the standard HACCP process for sikhae would contribute to regional economy.

III. Contents and range of research

1. Standardization of the flounder sikhae, Alaska pollac sikhae and Squid sikhae production process

- Establishment of the standard sikhae production process like optimum fermentation temperature, salt content and optimum fermentation period
- Establishment of the standard sikhae recipe
- Standardization of stater bacteria

2. Improvement of storability and assign functionality on flounder sikhae, Alaska pollack

sikhae and squid sikhae

- Check on antibacterial and antioxidant of natural material and assign functionality of sikhae
- Check storability of sikhae by using effective component materials extracted from ethanol and water
- Check the storability improving effect of various packaging methods and packaging kinds

3. Identification and identify nutritive functional from flounder sikhae, Alaska pollack sikhae and squid sikhe

- Check on nutritive functional components of sikhaes
- Identification the survivorship of functional lactic acid bacteria

4. Consumer preference test and commercialization

- Adjustment recipes of sikhae reflecting consumer preferences
- Commercialization the sikhae made in standard production process

IV. Research results

1. Establishment flounder, Alaska pollack, squid sikhes standard production process

- We were able to find the average traits of sikhae by investigating the physicochemical and microbiological traits of commercial flounder, Alaska pollack, squid sikhes. from this data, we did the physicochemical and microbiological experiment to know the fermentation temperature and period, finally we were able to established the standard production process. we also found the optimal mixture rate of sikhe minor ingredients by response surface analysis method. as a result, we established the optimal sikhe recipe.
- We sorted good stater substitute bacteria form flounder, Alaska pollack, squid sikhes and checked growth characteristics and suitabilities. and after all we also found standardized good stater bacteria and established the fermentation process by adopting them into each sikhae
- The aim of this study is to select a lactic acid bacterial strain as a starter culture for flatfish-Sikhae, alaska pollack-Sikhae and squid-Sikhae fermentation and to evaluate its suitability for application in a food system. Flatfish-Sikhae Candidate YG331(*L. brevis*) is considered as the best strain for flatfish-Sikhae fermentation for controlling pH changes and acidity and also for safety, functional properties, and consumer preferences. Also this study confirmed that in flatfish-Sikhae produced using the strain *L. brevis* PM03 there was an increase in GABA(γ -aminobutyric acid) content during the fermentation period. Accordingly,

further studies are recommended to confirm the fermentation characteristics of flatfish-Sikhae and to review the possibility of the use of this strain as a mixed starter with YG331. Alaska pollack-Sikhae Candidate M1(L. brevis) is considered as the best strain for Alaska pollack-Sikhae fermentation for controlling pH changes and acidity and also for safety, functional properties, and consumer preferences. Also this candidate is confirmed to produce the GABA (γ -aminobutyric acid). Squid-Sikhae Candidate B1(L. brevis) is considered as the best strain for Squid-Sikhae fermentation for controlling pH changes and acidity and also for safety, functional properties, and consumer preferences.

2. Improvement sikhae storability and application food functionalities

- We verified that natural food material like an Aronia berry, propolis, wasabi have an antibiotic and antioxidant compound. From this compound, we verified that propolis has good storability. We also found optimum amount of that compound from sensory test, and we developed the sikhae that has good storability and food functionalities
- We compared storability of sikhae by adopting various packaging paper and methods comparing normal Nylon + Polyethylene laminated packaging paper and aluminum coated packaging paper, retort pouch coated with aluminum packaging paper which block the light from it showed better storability in case of packaging methods, we compared normal container packaging and nitrogen packaging and vacuum packaging and CO₂ packaging.
- Although we expected that nitrogen packaging and vacuum packaging and CO₂ packaging would show better storability, but there was not big difference with normal retort packaging, even some of them showed worse storability. This phenomenon seems to be caused by accelerative fermentation which lactic acid bacteria make in anaerobic circumstance

3. Research consumer preference about sikhae and commercialization

- We researched the consumer preference about sikhae produced in standard optimized production process by adopting good breed state bacteria. Considering that research results, we completed sickhe products development with optimum recipe

V. Research results and practical use of results plan

- We developed the standard sikhae production process including fermentation temperature, fermentation period, the standard recipe, standard starter bacteria and from that process we pursued standard flavor of sikhae and improvement quality of sikhae.
- We also developed functionalized sikhae that made of the minor ingredients containing an antibiotic and antioxidant compounds

- We are asking for the registration of a patent with standard flounder, Alaska pollack, squid sikhes production process.

additionally we will ask another registration of a patent and we will do our best to registrate the results to SCI(E) level academic journal.

- We will do an technologies transfer about the standard flounder, Alaska pollack, squid sikhes production process to juongleefood and other food companies. and we will try to commercialize them considering an demand of each food company

- With follow-up study, we will do mass culture and mass production of GABA production bacterium or substitute bacteria that have antibiotic property on food poisoning germ, pathogenic bacterium.

as a result, we expect that mass production will create more added value.

- Obtaining the research project, we will do investigate the effect of the flounder, Alaska pollack, squid sikhes functionalities with additional experiment using animals or another research.

if we inform the superiority of sikhae through domestic or international journals, sikhae production companies would gain more order and sale increase indirectly.

- By using this research results, high quality sikhae foods that are matched with consumer's preference like low salinity and well-being would be expected to be released.

the improvement storability fo sickhae would make it more easy to distribute sikhae foods in a sanitary way, and help sikhae companies to export sikhae foods. after all this research result would contribute greatly to development the korean sikhae food industry

CONTENTS

Chapter 1. Concept of research project	1
Chapter 2. Current research status of lotus in domestic and foreign countries	6
Chapter 3. Contents of the project and research results	8
Chapter 4. Achievement and contribution to related fields	294
Chapter 5. Application plan of research results	297
Chapter 6. Information obtained during implementation of project	301
Chapter 7. Reference	303

목 차

제 1장 연구개발과제의 개요	1
제 1절 연구개발의 목적 및 필요성 및 범위	1
1. 연구개발의 목적	1
2. 연구개발의 필요성	1
제 2장 국내외 기술개발 현황	6
제 1절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 차지하는 위치	6
1. 국내외 연구동향 및 기존연구의 문제	6
제 3장 연구개발수행 내용 및 결과	8
제 1절 연구개발의 목표 및 내용	8
1. 연구개발 최종목표 및 주요내용	8
2. 과제별(세부,협동) 연구개발의 목표 및 내용	8
3. 연차별 연구개발의 목표 및 내용	12
제 2절 연구개발의 결과	15
1. 가자미, 명태, 오징어식해 제조 공정 표준화(품질특성)	15
2. 가자미·오징어·명태의 제조 공정 표준화(반응표면분석)	107
3. 표준화된 제품과 기존제품(정어푸드빌)의 품질특성 비교 및 관능검사 비교 실시	153
4. 가자미식해 starter 후보균의 탐색 및 최적화	156
5. 명태식해 starter 후보균의 탐색 및 최적화	183
6. 오징어식해 starter 후보균의 탐색 및 최적화	202
7. 가자미·명태·오징어식해에 적용할 천연항균, 항산화소재 탐색	219
8. 포장지 종류와 포장기법을 달리한 식해의 저장성 비교	252
9. 식해의 starter 후보균의 적용 (Industry scale)	262
10. 가자미·오징어·명태식해의 영양기능성성분의 확인 동정 및 정량	281
제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	294
제 1절 연구목표대비 결과	294
1. 1차 년도 (2012년도)	294
2. 2차 년도 (2013년도)	294
3. 3차 년도 (2014년도)	295
4. 정량적 목표	296
제 2절 관련분야의 기술발전의 기여도	296
1. 수산발효식품의 저장성	296
2. 제조공정의 표준화	296
3. 건강기능식품 산업	296
제 5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	297
제 1절 연구개발 성과	297
1. 논문게재 성과	297
2. 특허출원	298
3. 특허등록	298

4. 기타성과	299
제 2절 성과활용 계획	299
1. 실용화, 산업화 계획	299
2. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획	299
3. 추가연구, 타 연구에 활용 계획 등	299
제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	301
제 1절 연구사례 조사	301
제 7장 참고문헌	303

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

가. 대표적인 3종 이상(가자미, 오징어, 명태 등) 식해의 발효 최적 공정 표준화 연구 및 HACCP 수준의 대량 생산 기술 개발

나. 식해의 유통기한 연장기술 개발

다. 식해의 기능성 등 품질특성 조사 및 제품화

2. 연구개발의 필요성

가. 일반적인 측면

(1) 식해(食醢)는 옛부터 전해오는 저장성 수산발효식품으로 생선과 식염외에 곡물의 첨가로 유산발효를 일으켜 숙성기간이 짧은 것이 특징으로, 젓갈에 김치 맛이 가미되어 독특한 맛과 풍미로 비린내 억제 효과를 갖고 있으며 젓갈보다 염도가 비교적 낮은 식품임

(2) 김치와 발효원리가 같고 첨가되는 부재료가 유사한 식해에서도 김치에서와 똑같은 생리 기능적 특성, 고춧가루에 의한 항돌연변이 효과와 유산균, 식이섬유소 및 마늘에 의한 항암효과가 기대됨

(3) 식해는 전통발효식품으로서 우리의 입맛에 잘 맞을 뿐만 아니라 영양학적 측면이나, 시장성측면에서도 장점이 많으나, 식해에 관한 연구는 최근 일반적인 이화학적 및 미생물학적 성상에 관한 연구가 주를 이루고 있으며 기능성 확인에 관한 연구는 거의 없는 실정임

(4) 최근 건강 지향적인 식품의 소비가 증가함에 따라 젓갈제품은 염의 함량이 훨씬 낮은 양념젓갈의 형태로 많이 이용되고 있는 실정이나, 이러한 저식염의 양념젓갈은 제조시에 발생하는 가장 큰 문제점 중의 하나가 젓갈의 저장성의 단축임

(5) 또한 우리나라의 젓갈류가 국내시장을 넘어 해외로 수출에 박차를 가하고 있는 실정에서 수입국으로 부터의 수입검사 불합격이 발생하는 등 그 대책이 시급한 실정이며, 젓갈류에 대해서는 HACCP 도입에 대한 사례도 충분치 않은 실정에서 대량의 수입젓갈류가 우리시장에 도입되므로 소비자들의 건강에 대한 우려를 갖게 하기에 충분한 실정에 있음

(6) 전통식품의 상품성 있고 세계적인 가공 식품화를 위해서는 위생적 안전성과 저장 유통 안정성 등이 기본적으로 확보되어야 할 뿐만 아니라 식품 고유의 품질 특성, 기호성, 균일성, 가공 안전성 등 다양한 조건이 구비되어야 하며 이를 위해서는 식해의 원료 특성을 포함한 주요 상품화 요소 기술에 대한 집중적 연구를 필요로 하는 실정이며 그중 가장 시급한 것은 공정개선, 기호도 증진을 위한 조미기술 개발과 유통구조 개선이 필요하다고 판단됨

(7) 현재 우리나라의 식해 생산은 경제성이 낮은 소형어패류를 이용하므로 연근해 어민의 주요 소득원으로 활용될 수 있으며 한국인의 식기호와 잘 어울리는 맛과 향을 가진 전통 수산 발효 제품이나, 과학적 숙성 발효의 조건이 설정되어 있지 않은 등 경험적인 제조방법에 의존하기 때문에 생산된 제품 품질의 재현성이 낮고 지나치게 염도가 높으며 비위생적 생산 유통 및 품질안정화가 어려움

(8) 따라서 본 연구개발에서는 과학적이고 체계적인 연구로 식해 생산시 품질 균일성을 추구하며 기호성과 건강성을 포함한 제품의 품질안정화 기법 등을 연구하고자 하며 식해의 품질을 향상시키고 위생적인 HACCP 생산 공정의 표준화 기술을 개발하여 지역경제 활성화에도 기여할 것임

나. 스타터 개발의 중요성

(1) 우리 주변의 발효 식품들은 각종 발효와 숙성 중의 자기소화 및 기질분해산물간의 상호작용 등으로 우수한 영양과 특유의 향미 등 관능성을 향상시키고 면역활성 등의 건강기능성을 부여하기도 하나, 우리나라 발효식품들의 대부분은 자연발생적인 방법에 의한 발효 형태로서 미생물의 대사능력을 효과적으로 이용하기엔 한계가 있고, 위생안전성에 많은 문제점을 안고 있으므로 그들의 대사능력과 안전성, 그리고 표준화 공정 확립을 위해 충분히 시험된 미생물을 스타터 미생물에 의한 통제된 발효 식품제조 형태의 도입이 필요함

(2) 인류가 오래 전부터 바람직한 방향으로 이용해 온 유용물질을 생성하는 미생물 중 대표적인 미생물은 유산균이며, 이들의 발효에 의해 생성되는 젖산 등의 유기산은 변비를 예방하며 또한 장내에서 발암전구물질을 발암물질로 전환시키는 미생물효소의 활성을 유의적으로 감소시키고, 대장의 pH를 낮추어 대장암 예방에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있음

(3) 또한, 유산균은 우리 인체에 유리하게 작용하여 정장작용, 항돌연변이 및 항암작용 등에 관여하고, 젖산발효에 의해 생성되는 lactic acid는 저장성과 관련이 있으며, 부가적으로 생성되는 물질들은 flavor, texture, nutrition에 영향을 미침

(4) Starter의 역할 및 병원성 미생물의 제어 기작에 대한 이해를 통해서만 병원성 미생물의 합리적 제어가 가능하고, 제품의 품질, 위생 및 안전성이 보장될 수 있으나, 국내 발효식품에서 이에 대한 전문적인 연구는 거의 이루어지지 않고 있으므로 국내 생육 또는 발효조건에서 분리한 유산균으로부터 우수한 후보균을 분리함으로써 발효제어 효율을 높이고 국내산으로 대체

효과를 기대할 수 있음

(5) 유산균에 의한 콜레스테롤 저하 효과는 동물 및 임상 실험을 통해 널리 알려져 있음. 그 기작으로는 유산균에 의한 장내 균총의 변화로 *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides* 및 *Eubacterium* 등의 장내세균은 콜레스테롤을 coprostanol로 전환시켜 흡수율을 낮추거나 유산균의 직접적인 지질저하 작용으로 장내에서 콜레스테롤을 흡수하여 혈중 콜레스테롤을 저하시키는 것이 알려져 있음

(6) 또한, 유산균은 개체의 방어체계를 활성화시킴으로서 interferon 유도, 항체 생성 및 세포성 면역 활성화 등의 기작에 의해 항암 작용을 하는 것이 밝혀졌으며, 대식세포와 임파구의 활성을 증진시켜 항종양 및 항암 기능 그리고 영양과 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있음

(7) 한편, 발효식품의 경우 유의한 측면은 많이 부각되어 있긴 하지만 다른 한편에서는 안전성적 측면에서도 대비해야 할 것임

(8) 즉, 이들은 대체로 미생물 대사를 통해 젖산 등 유기산, 향미성분, 아미노산, vitamin 등 다양한 유용 물질 및 기능성 물질을 생성하는 등 인체 건강에 유익하나, 다른 한편으로는 biogenic amines (BAs)의 유해물질이 생성될 수 있음

(9) BAs는 식품의 발효과정 중에 주로 생성이 되며, 식중독 유사 증상을 포함하여 발암가능성이 있는 물질로 평가된 바 있다. 국제적 추세에 비추어 볼 때 전통 발효식품이 많은 우리나라의 특성상 각종 발효식품에서 BAs에 노출되어 있으므로 평가 및 대책이 긴요함

다. 식품의 위생·안전성 측면의 중요성

(1) 식품의 안전성은 사회의 선진화 및 식품산업 발달에 따른 식생활 양식의 변화와 더불어 소비자의 인식변화, 관심도 증가로 인해 사회적 문제로 크게 대두되었음

(2) 전통식품 중 하나인 수산 발효식품에서도 무공해, 친환경, 신선함을 추구하는 소비자의 기호에 맞게 안전성과 신선함을 충족시키는 식품을 가공할 수 있는 친환경적 가공공정의 시스템 개발 및 이의 이행이 절실히 요구됨

(3) 특히 식해의 제조에 있어서 대량생산이 가능한 발효공정의 표준화는 식해의 안전성 확보를 통해 식품의 저장기간 중 품질변화 방지, 저장기간 연장 등 다양한 경제적 손실을 억제하는 데 기여할 수 있을 것으로 사료됨

(4) 현재 식해는 위생·안전성적 측면이나 소비자신뢰도 측면에서 그 업체의 영세성에 비추어 다소 문제가 있다. 따라서 안전성이 확보된 고품질의 식해 생산을 위한 새로운 시스템의 개발이 필요함

(5) 위생적 측면에서는 식품위생법이 정하는 바를 만족해야 할 것이고, 안전성적 측면에서는 다양한 미생물들이 상재하고 있어서 그들 중 biogenic amines을 생산하는 균도 혼재할 가능성이 있다는 것이 문제가 될 수 있으므로 이에 대한 생성 제어기술의 확립이 중요하다. 실제, 2008년 국내 식품기업이 유럽으로 수출했던 멸치젓에 이어, 2009년에도 까나리액젓에서 기준치 (200mg/kg) 이상의 histamine이 검출(602mg/kg)되어 현지에서 부적합 처리를 받은 바 있음

(5) 식해에서는 *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*와 같은 일반식품의 공통규격으로 관리하는 식중독균이 검출되어서는 아니되며, 대장균 및 대장균군이 검출되어서도 아니된다. 그밖에도 *Bacillus cereus*와 *Clostridium perfringens*가 각각 10^4 cfu/g, 10^2 cfu/g 이상 검출되어서는 아니됨

(6) 병원성 미생물뿐만 아니라 유해물질까지 위생·안전성은 가공 및 유통단계에서 위해요소중점 관리제도(Hazard Analysis Critical Control Point; HACCP) 적용으로 개선될 수 있음

(7) 따라서, 본 연구에서는 HACCP 수준에서 식해를 제조하기 위하여 제조공정별로 위해요소 (병원성미생물 및 유해물질 생성제어 등)를 분석하고, 중점관리점(CCP)을 결정하며, 한계기준을 설정하는 등 감시시스템을 확보하고자 함

(8) 그 결과로, 식해의 제조·산업체에서 HACCP 수준에서 생산 기술을 확보함으로써 국내 식해 제조를 위한 과학적이고 체계적인 위생관리 방안을 제시할 수 있고, 그 확보된 위생적 생산 기술은 향후 식해를 포함한 젓갈류 등의 수산가공식품의 소비촉진에 상당한 영향을 미칠 것으로 판단됨

라. Biogenic Amines(BAs) 일반

(1) Biogenic Amine은 보통 미생물들에 의한 유리 아미노산의 탈탄산화 반응에 의해 생성되며, 발효식품에서 주로 검출되는 합질소 유해물질이며 주요 BAs으로는 지방족 화합물(putrescine, cadaverine, agmatine, spermine, spermidine), 방향족 화합물(tyramine, β -phenylethylamine), 헤테로고리 화합물(histamine, tryptamine) 등이 있음

(2) 일반적으로 BAs의 인체에 대한 위해 정도는 비교적 낮은 편이며, 낮은 함량에서는 건강한 성인의 경우 인체의 해독시스템에 의해 별 문제가 없으나, 다량 섭취하거나 해독시스템이 저해 또는 결핍될 경우에는 건강을 크게 손상시킬 수 있음

(3) BA은 일단 형성되면 살균이나 조리 과정에서 의해 파괴되기 힘들기 때문에 식품의 제조과정에서 함량을 감소시키는 것이 중요함

(4) 국내에서는 아직 식품에서의 BAs에 대한 기준 규격이 설정된 바는 없으나 EU 등에서는 히스타민에 대한 권장 규격을 강화·실시하고 있음

(5) 향후 BAs의 유해성에 관한 연구가 진행된다면 가공 및 발효식품 내 BA 함량에 대한 규제가 강화될 것으로 전망되며, 수산발효식품내 아민류 등 유해물질 함량규제 등 예상되는 무역마찰의 예방 및 안전한 식품을 생산 유통시키기 위해서 국내에서의 가이드라인 및 규제 시스템의 확립이 필요하며, 제품 생산 및 유통과정에서 모니터링 기술과 연계하여 식해의 유해물질의 안전성 확보 기술 연구가 절실하게 요구됨

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 국내외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치

1. 국내·외 연구동향 및 기존연구의 문제점

가. 국내 연구 동향

(1) 젓산균에 관한 연구는 국내에서도 활발히 이루어지고 있지만 식해 대상으로 한 우수 유산균에 관한 보고는 미흡함

(2) 국내 식해연구는 단편적인 연구가 일반적으로 진행된 바는 있지만, 식해의 발효에 있어서 스타터의 거동에 대한 심층적인 연구가 진행된 바가 없으며, 산업적 제품화 사례도 없는 실정임

(3) 이 분야의 심도 있는 전문성 확보, 제조 원리와 mechanism의 이해를 통해서만 발효공정의 합리적 제어가 가능하고 제품의 품질, 위생 및 안전성이 보장될 수 있으나, 이에 대한 산업체의 전문가 확보는 거의 이루어지지 않고 있다고 판단됨

(4) 본 연구자 팀은 1998년 이래 국내에서는 처음으로 각종 발효식품(장류, 김치류, 젓갈류, 주류 등)에서의 스타터 미생물 관련 연구를 비롯한 BA 검출, 생성 특성 및 제어 연구 등에 관한 연구(보건복지부, 식약청 등)를 수행해 왔으며, 다수의 SCI급 국제학술지와 국내외 학술발표를 한 바 있음

나. 국외 연구 동향

(1) *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *L. blugaricus*, *streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum*을 이용하여 soymilk를 발효시켰을 때 GABA 함량이 증대에 관한 보고가 있으며, 일본의 전통 발효생선 식품으로부터 분리된 *Lactobacillus paracasei*가 GABA 생산성 효과적으로 증대시켰다고 보고가 있으며, 또한 whiskey가 숙성이 되면서 GABA receptor의 함량이 증가된다고 보고되었음

(2) BAs 생성에 관여하는 탈탄산효소(decarboxylase) 활성을 갖는 균으로는 *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus genera* 등이 있고, 최근에는 *Staphylococcus spp.*, *Enterobacter cloacae*, *Candida spp.* 등이 보고되고 있음

(3) 어류, 치즈, 육과 육제품, 칩채류, 발효대두식품 등에서 분리된 미생물들로부터 histamine, tyramine, cadaverine, putrescine, tryptamine 등의 다양한 BA 고생산성 균주가 분리 동정되었음

(4) 최근 식품 전 분야에 걸쳐 BAs의 안전성 평가에 관한 연구가 다각적으로 진행되고 있음

다. 기존연구의 문제점

(1) 젖산균은 GRAS(Generally Recognized As Safe) 품목이므로 안전성에 별다른 문제가 없다. 그러나 젖산균에서 GABA는 특이적 효소인 glutamate decarboxylase의 탈탄산반응에 의해 일어나며 이는 amine류의 생합성 기작과 유사하므로 amine decarboxylase의 발현가능성을 배제할 수 없음. 따라서 안전성 확보 측면에서 biogenic amine 생성에 대한 확인이 필요함

(2) 이러한 원인으로는 유산균 스타터의 기능적인 면이 충분히 활용화 되지 못하는데 그 원인이 있는 것으로 생각되며 따라서 본 연구팀에서는 지금까지 다양한 과제 및 연구를 통해 쌓아온 기능성 스타터 선별 능력을 통해 생리활성 뿐 만 아니라 향미가 우수한 상업화 가능한 제품을 얻는 것이 본 연구에서 수행할 과제임

(3) 수산식품의 미생물학적 위해성 평가에 대해서는 수학적 정량 평가 모델을 이용하여 *Vibrio parahaemolyticus*와 *Listeria monocytogenes*, 계맛살 부패균의 성장 예측모델을 개발을 한 연구에 국한되어 있음

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발의 최종 목표 및 주요내용

- 가. 가자미 · 오징어 · 명태식해의 발효최적화 연구에 의한 공정표준화
- 나. 가자미 · 오징어 · 명태식해의 HACCP수준의 대량생산기술 개발
- 다. 식해의 유통기한 연장기한 연장기술 개발
- 라. 식해의 영양기능성 등 품질특성조사 분석
- 마. 소비자 기호도조사, 경제성 분석 및 제품화

2. 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

가. 제 1 세부 연구개발의 목표 및 내용 (강릉원주대학교)

연구개발의 목표	연구개발의 내용
가자미 · 오징어 · 명태식해의 발효최적화 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ 원료 및 첨가물 배합조건 검토 ○ 원료에 대한 부재료 종류 및 배합비에 따른 식해제조 최적화 ○ 부재료의 최적첨가 표준 레시피 결정 ○ 시판 가자미, 명태, 오징어식해의 원료와 부재료의 미생물학적, 이화학적 검토
가자미 · 오징어 · 명태식해의 유통기한 연장기술개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 해조다당류(알긴산, fucoidan, agar 등), 해조올리고당, 해조정유, 해조자체분말 등의 식해유통기한 연장실험 ○ 키틴, 키토산, 키틴올리고당, 키토산올리고당 등의 식해유통기한연장 실험 및 현장적용시험 ○ 아로니아베리, 고추냉이, 천연보존료 등을 이용한 식해의 유통기한연장 실험 ○ 항균성 유산균체 직접첨가에 의한 식해유통기한 연장실험 및 현장 적용시험 ○ 각종 포장방법에 따른 유통기한 연장실험(무균포장, 진공 레토르트 pouch 포장, N₂ 가스치환포장, CO₂ 치환 레토르트파우치포장 등 시도) 및 현장적용 시험
가자미 · 오징어 · 명태식해의 영양기능성성분의 확인 동정 및 정량	<ul style="list-style-type: none"> ○ 무기질의 종류와 함량측정 ○ 항암· 항비만 conjugated EPA · DHA의 확인 및 함량측정 ○ 유리아미노산 및 peptides의 확인 및 함량측정 ○ 항고혈압성 GABA(gamma-aminobutylic acid)등 건강기능식품

	<p>성분의 정량</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물균총 조사와 함께 기능성 유산균종속의 조사 ○ 생선식해 중 다량함유 기능성성분에 대해서는 동물실험으로 그 기능활성 확인 시도
<p>가자미 · 오징어 · 명태식해 제품의 소비자 기호도 조사 및 경제성 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 소비자 기호도 조사에 의한 제품 recipe조정 ○ 최종제품경제성 분석시도

나. 제 1협동 연구개발의 목표 및 내용 (고려대학교)

연구개발의 목표	연구개발의 내용
<p>가자미, 오징어, 명태식해의 발효최적화 연구 및 HACCP 공정표준화 기술개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식해(가자미, 오징어, 명태식해)의 미생물 분리, 동정 및 starter(종균) 개발 ○ 원료어의 선별 → 비가식부위 제거 → 세절 → 염장 → 세척·탈수 → 1차양념·1차숙성 → 반제품상태로 냉동숙성 → 2차양념 → 소분 및 냉장보관 → 포장제품화 등의 주요 공정의 최적 HACCP 공정 표준화기술 개발
<p>시판 식해의 품질평가 및 주요상재 미생물 분리 및 동정</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 광범위한 식해 수집 ○ 미생물(균상, 균수)확인 및 위해미생물(E. coli, Salmonella, Staphylococcus, Listeria, coliform 등) 위해미생물의 균상 분석 ○ 광범위한 주요상재 미생물 분리·동정 ○ 분리주(젖산균)의 생육특성 검토 ○ pH, aw, 염농도 등 분석 ○ 식해 원료와 부재료의 미생물학적, 이화학적 특성 검토 ○ 시판 식해의 저장기간에 따른 위해미생물의 소장 및 유해물질분석 (BAs) ○ HPLC를 이용한 정량적 분석
<p>Starter 후보균의 최적화 및 식해제조의 최적화</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우량 starter 후보균의 생육 적합성 및 생리·화학적 특성 검토(in vitro, in situ) ○ 젖산균의 생육 특성: 생육 속도, 유기산 생성 능력, pH 저하 능력, 항균활성, 단백질 분해능과 안전성 등 검토 ○ 원료에 대한 부재료의 배합비에 따른 식해 제조(pilot scale) 및 발효특성 검토 ○ 첨가물의 종류 및 첨가량에 따른 발효 특성 검토(미생물학적, 이화학적 특성) ○ 관능검사를 통한 품질 평가 ○ 발효조건(온도, 기간)최적화
<p>선정된 starter균의 적용에 의한 대량생산(Industry Scale)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Starter 적용에 의한 식해제조 ○ 식해의 미생물학적, 이화학적 특성검토(상법에 따라 시험) ○ 산업적 규모의 최종 제조조건의 확립 ○ 최적화된 제조공정에 의한 식해 제조 ○ 최종식해의 품질평가 ○ 미생물학적, 이화학적 특성 검토 ○ 관능평가 ○ 발효공정 확립 및 산업화

다. 제 2협동 연구개발 목표 및 내용 (정어푸드빌)

연구개발의 목표	연구개발의 내용
가자미, 오징어, 명태식해 제품의 주요생산 공정의 HACCP 관리공정 표준화 기술 적용 및 상용화	<ul style="list-style-type: none"> ○ HACCP 관리공정 표준화 기술 적용 대규모 생산시험 ○ 유통기한 연장을 위한 발효공정 확립 및 산업화 ○ 최종 식해 제품의 상용화 시도
유통기한연장 기술적용 시험	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유통기한 연장을 위한 발효공정 확립 및 산업화

3. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

가. 1 차년도 (2012년) 연구개발 목표 및 내용

연구개발의 목표	연구개발의 내용
<p>가자미·오징어· 명태식해의 공정표준화 기술개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 시판 식해 및 식해 원료와 부재료의 미생물학적, 이화학적 특성 검토 <ul style="list-style-type: none"> ◆ 미생물종(유산균, 박테리아, 효모, 곰팡이, 부패균 등) 분석 ◆ pH, AW, 염농도, biogenic amine 류 등 분석 ○ Starter 후보균의 탐색 및 최적화 <ul style="list-style-type: none"> ◆ 우량 starter 후보균 선별 및 최적화 ◆ 우량 starter 후보균의 생육 적합성 및 생리·화학적 특성 검토(in vitro, in situ) ◆ 젖산균의 생육 특성: 생육 속도, 유기산 생성 능력, 기능성 물질 생성 능력, pH 저하 능력, 항균활성, 단백질분해능 및 안전성 등 검토 ○ 생선식해 발효조건 최적화 <ul style="list-style-type: none"> ◆ 원료에 대한 부재료의 종류 및 배합비에 따른 식해 제조(pilot scale) 및 발효특성 검토 ◆ 첨가물의 종류 및 첨가량에 따른 발효 특성 검토(미생물학적, 이화학적 특성, 관능검사를 통한 품질 평가) ◆ 발효조건 최적화 <ul style="list-style-type: none"> i) 미생물종의 변화 추적 ii) 최적 염농도 iii) 최적 표준 부재료 배합비 결정 iv) 최적 발효 온도 및 최적 발효일수 결정 v) 최적 발효 pH치 등 결정 ○ 표준 레시피 개발 및 표준 제조공정 확립 <ul style="list-style-type: none"> ◆ 원료어의 선별 → 비가식부위 제거 및 세절 → 염장 → 세척·탈수 → 1차양념·1차숙성 → 반제품상태로 냉동숙성 → 2차양념 → 소포장 → 냉장보관 → 포장제품화 ○ 부패균 발효 중 생성양성파악 <ul style="list-style-type: none"> ◆ 미생물(균상, 균수)확인 및 위해미생물 (<i>E. coli</i>, <i>Salmonella</i>, <i>Staphylococcus</i>, <i>Listeria</i>, <i>coliform</i> 등)의 균상 분석 ○ 시판 식해의 저장기간에 따른 위해미생물의 소장 및 유해 물질분석 (BAs)

나. 2 차년도 (2013년) 연구개발 목표 및 내용

연구개발의 목표	연구개발의 내용
<p>Starter 후보균의 최적화 및 생선식해제조의 최적화</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 생선식해의 starter균 개발 및 대량생산에 의한 발효공정 표준화 <ul style="list-style-type: none"> ◆ Starter 적용에 의한 식해제조 ◆ 식해의 미생물학적, 이화학적 특성검토 ◆ 산업적 규모의 최종 제조조건의 확립 ◆ 미생물학적, 이화학적 특성 검토 ◆ 시판식해의 미생물 균상 분석 및 주요생물(젖산균) 분리 ◆ 분리주(젖산균)의 생육특성 검토 ◆ 우량 starter균의 생육 최적화 및 안정성 검토 ◆ 식해제조의 최적화 및 발효공정 표준화 ◆ 최적화된 제조공정에 의한 식해 제조 ◆ 최종식해의 품질평가
<p>가자미, 오징어, 명태식해의 유통기한 연장 기술 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 천연항균제류의 생선식해 유통기한 연장실험 <ul style="list-style-type: none"> ◆ 적정온도에서의 해조다당류(알긴산, fucoidan, carrageenan, agar 등), 해조올리고당, 해조정유, 해조자체분말직접첨가에 의한 식해의 저장기간 30일 동안의 유통기한 연장 효과 실험(pH 측정, 염도측정, 휘발성 염기질소함량측정, 항산화성 측정, 아미노태질소함량 측정, 부패취 측정, 미생물 수 측정 등) 및 현장적용시험 ◆ 적정온도에서의 키틴, 키토산, 키틴올리고당, 키토산올리고당의 식해의 저장기간 30일 동안의 유통기한 연장(pH 측정, 염도측정, 휘발성 염기질소함량측정, 항산화성 측정, 아미노태질소함량 측정, 부패취 측정, 미생물 수 측정 등) 및 현장적용시험 ◆ 적정온도에서의 항균성유산균체 직접첨가에 의한 식해의 저장기간 15일 동안의 유통기한 연장(pH 측정, 염도 측정, 휘발성 염기질소함량측정, 항산화성 측정, 아미노태질소함량 측정, 부패취 측정, 미생물 수 측정) 및 현장적용시험

다. 3 차년도 (2014) 연구개발 목표 및 내용

연구개발의 목표	연구개발의 내용
<p>가자미, 오징어, 명태식해의 유통기한 연장 기술 개발</p>	<p>○ 각종포장방법에 따른 생선식해 유통기한 연장효과 실험</p> <ul style="list-style-type: none"> ◆ Nylon + Polyethylene laminated 필름속지 포장시험 ◆ 레토르트 pouch 진공 포장시험 ◆ 레토르트 pouch N₂가스 치환 포장시험 ◆ 레토르트 pouch CO₂치환 포장시험 등에 의한 유통기한 연장 시도
<p>가자미·오징어·명태 식해 제품의 HACCP 관리표준화 기술개발</p>	<p>○ 생선식해의 주요생산 공정의 최적 HACCP공정 표준화기술개발 및 적용</p> <ul style="list-style-type: none"> ◆ 원료어의 선별 <u>인수검사</u> 비가식부위 제거 및 세질 <u>세균검사</u> <u>염장 AW측정</u> <u>세척</u> <u>탈수</u> <u>수질및수온검사</u> 1차양념·1차숙성 ◆ <u>온도및시간체크</u> 반제품상태로 냉동숙성 <u>온도및시간체크</u> 2차양념 <u>세균검사</u> 소포장 <u>밀봉성및이물시험</u> 냉장보관 <u>관능시험및화학시험</u> 포장제품화 ◆ HACCP(위해요소 중점 관리지침)과 SSOP(표준위생관리 절차)가 실행가능한 작업환경 구축 및 표준절차 마련 ◆ 식해가 외부에 의해 오염되거나 변질되는 것을 방지하는 방안 마련 ◆ 원·부재료에 포함되었거나 공정을 발행할 수 있는 위해요소를 CCP에서 강화된 관리(C.L, 모니터링, 시정조치 및 검증)을 통해 차단하는 방법 마련 및 적용
<p>가자미, 오징어, 명태식해의 영양기능성성분의 확인 동정</p>	<p>○ 식해의 영양기능성 성분의 확인동정 시도</p> <ul style="list-style-type: none"> ◆ 무기질의 종류와 함량측정 ◆ 항암 conjugated EPA · DHA의 확인 및 함량측정 ◆ 유리아미노산 및 peptides의 확인 및 함량측정 ◆ 항고혈압성 GABA 등 건강기능성식품성분의 확인 및 함량측정 ◆ 미생물균총 조사와 함께 기능성유산균종속의 조사 및 균수측정
<p>소비자기호도조사, 경제성 분석 및 제품화</p>	<p>○ 소비자 기호도 조사에 의한 제품 recipe조정</p> <p>○ 최종제품 경제성 분석시도</p> <p>○ 최종 생선식해 제품의 상용화시도</p> <ul style="list-style-type: none"> ◆ Story telling 마케팅 기법으로 on-line shopping mall을 통해서 국내 판매 활성화시도 ◆ 국제식품박람회, 수출전문 buyer 등을 통한 구미·일본으로의 수출판매 시도

제 2 절 연구개발의 결과

1. 가자미, 명태, 오징어식해 제조 공정 표준화(품질특성)

가. 시판식해의 품질 특성 분석

(1) 재료 및 방법

(가) 재료

본 연구에 식해의 표준화를 실시하기 시판 식해의 품질특성을 확인하기 위해 속초시 정이푸 드빌, 고바우식품, 진일맛나식품, 함경도아마이식품 등 식해제조 업체에서 각각 구매하여 사용하였다.

(나) 미생물 수 및 pH 측정

숙성 중 식해의 미생물 총균수는 시료 10 g에 멸균식염수 90 mL를 혼합 분쇄하여 10진법으로 희석하였다. 각각의 희석액 1 mL를 각각의3M film에 접종하고, 유산균은 Di Plate count agar BCP배지를 부어 혼합한 다음 37°C에서 48시간 배양하여 형성된 colony를 계측하여 시료 g당 colony forming units (CFU/g)로 나타내었다. pH측정은 시료 5 g을 취해서 증류수 45 mL를 가해 균질화시킨 후 pH meter (Mettler Toledo, SevenEasy pH, Switzerland)로 측정하였다.

(다) 휘발성염기질소(VBN) 함량 측정

휘발성염기질소(VBN)의 함량은 마쇄한 식해를 사용하여 Conway unit을 사용하는 micro diffusion method (Pharmaceutical Society of Japan, 1980)로 시료 2 g에 20% trichloroacetic acid용액 2 mL와 증류수 16 mL를 혼합한 뒤 Homogenizer로 마쇄 후 여과하여 conway에 주입 후 37°C에서 80분 방치 후 0.01 M HCL로 적정하여 측정하였다.

(라) 아미노태질소 함량 측정

아미노태질소 함량은 Formol 적정법(Choi 등 2007)으로 측정하였다. 시료 10 g을 취하여 증류수 100 mL를 혼합하고 마쇄 후 Sonication에서 30분간 균질화 후 pH meter (Mettler Toledo, SevenEasy pH, Switzerland)이용하여 0.1 N NaOH를 가하여 pH8.4를 맞춘 후 중성 formalin 20 mL를 가한 후 다시 0.1 N NaOH를 가하여 pH8.4에 맞춘 적정량을 이용하여 아미노태질소 함량을 산출하였다.

(마) TBA값의 측정

Witte의 방법에 따라 측정하였다. 시료 20 g을 취하여 2 M phosphoric acid의 20% trichloroacetic acid 용액 50 mL를 마쇄한다 마쇄액을 정량적으로 100 mL 용량플라스크에 옮긴 후 증류수 100 mL로 맞춘 후 흔들어 혼합한액 50 mL를 Whatman No.1여과지로 여과한 여과액 5 mL를 시험관에 옮기고 0.005 M 2-thiobarbituric acid 용액 5 mL를 넣는다. 시험관을 마개로 막고 위아래로 흔들어 혼합한다음 암소에서 상온으로 15시간 정치한다. 발색된 액을

Spectrophotometer로 530 nm에서 흡광도를 측정한다.

(바) 관능검사

관능검사는 식혜의 향기, 맛, 색, 조직감에 잘 훈련된 15인의 panel을 구성하여 색, 맛, 향, 조직감, 전체적인 기호도에 대해 9단계 평점법(매우 나쁘다, 1점; 매우 좋다, 9점)으로 평가하였다. 통계처리는 Windows용 SPSS 20K version을 이용하여 분산분석을 실시하였으며 Duncan's multiple range test로 5%수준에서 시료간의 유의차를 검정하였다.

(사) 통계분석

검사결과에 대한 통계적인 유의성 검정은 Statistical Packages for Social Science(SPSS, Chicago, IL, USA)를 이용하여 Duncan's multiple range test로 유의수준 5% 이내($p < 0.05$)로 각 평균값에 대한 유의적 차이를 조사하였다. 데이터는 각 실험치의 평균값과 표준편차로 나타내었다.

(2) 시판 가자미식해의 품질특성 결과

(가) 시판 가자미식해의 이화학적 품질 평가

시판 가자미식해의 pH, 염도, 휘발성염기질소 함량, Amino-N 함량 그리고 TBA는 Table 1와 같다. 시판가자미식해의 pH를 분석한 결과 F, H, I 시료를 제외하고는 5 이하로 나타났다. 이러한 현상은 식해 제조 시 첨가되는 곡류(기장쌀)에 따른 젖산균의 증가에 따라 유기산이 많이 생산되었기 때문으로 판단되어진다(Kim et al., 1994). pH는 G가 4.60으로 가장 낮았으며, F가 5.11로 가장 높았다. 시료간에 유의적인 차이는 나타났으나 수치상 4.60-5.11로 큰 차이는 보이지 않았다. pH가 5 이상인 시료들은 휘발성염기질소 함량이 37.09-40.66 mg/100g으로 다른 시료들에 비해 비교적 낮은 함량을 나타내었으며, pH가 5이하인 A, B, C, D, E, G 시료는 41.94-47.22 mg/100g으로 유의적으로 높은 함량을 나타내었다. 이는 pH와 VBN함량으로 볼 때 다른 시료들에 비하여 숙성 또는 부패의 진행이 덜 되었음을 알 수 있으며, pH 농도와 비교해 볼 때 결과가 비례함을 보여준다. 총 시료의 휘발성염기질소의 평균적인 함량은 43.47 mg/100g 정도를 나타내었다. 유지 산패를 나타내는 TBA는 비교적 pH가 높고 휘발성염기질소 함량이 낮은 F, H, I 시료에서 0.33-0.38 O/D로 낮은 흡광도를 나타내었고, 나머지 다른 시료들은 0.41-0.87 O/D로 유의적으로 높은 흡광도를 보여줌으로써 휘발성염기질소 함량과 비교해 볼 때 본 연구와 유사함을 알 수 있었다.

염도는 5.33-6.20 %로 시료들간의 유의적인 차이가 나타났다. Mok et al. (2000)에 의하면 고식염 제품은 식미를 저하시키고 다량 섭취 시 고혈압, 신장병, 만성신부전증 등 건강상 문제 요인을 내포하고 있으므로 식해의 염도를 3-4 % 정도로 최대한 낮출 수 있는 저염화 기술개발이 필요시 된다고 사료된다.

아미노태질소 함량은 발효식품의 숙성도 지표로 이용될 뿐만 아니라 향미와 깊은 관련이 있기 때문에 중요한 품질 지표로 인식되고 있다(Oh et al., 2000). 아미노질소 함량은 F, H, I에서 182.24-206.22 mg/100g 다른 시료들에 비해 낮은 아미노질소 함량을 나타냈으며, 모든 시료에서 휘발성염기질소 함량이 높을수록 아미노질소 함량이 비례적으로 증가함을 보여주는데, 이는 Cho et al., (1999)의 연구결과와 유사함을 보여주었다. 시판 가자미식해 A는 246.49 mg/100g으로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 가자미식해의 아미노질소 함량은 평균 213.14 mg/100g 수준이었다. 최종적으로 9종의 시판가자미식해의 평균 pH값은 4.84, 휘발성염기질소(VBN)함량은 43.47 mg/100g, 염도는 5.77%, TBA값은 0.58 O/D, 아미노태질소(Amino-N)함량은 213.14 mg/100g을 나타내었다.

Table 1. Chemical properties of commercial flounder *sikhe*

Producer	pH	NaCl (%)	VBN (mg/100g)	TBA value(O/D)	Amino-N (mg/100g)
A	4.76±0.0 ^d	5.50±0.0 ^b	47.07±0.5 ^d	0.82±0.0 ^d	246.49±4.9 ^e
B	4.79±0.0 ^e	5.33±0.0 ^a	44.55±0.2 ^c	0.66±0.0 ^c	211.04±4.6 ^{bc}
C	4.69±0.0 ^c	5.50±0.0 ^b	45.01±0.2 ^c	0.41±0.0 ^b	209.84±5.2 ^{bc}
D	4.93±0.0 ^f	5.90±0.0 ^{cd}	47.22±1.0 ^d	0.58±0.0 ^b	218.72±1.1 ^{cd}
E	4.63±0.0 ^b	5.83±0.0 ^c	47.19±1.1 ^d	0.84±0.0 ^d	222.08±7.8 ^d
F	5.11±0.0 ^h	6.00±0.0 ^d	37.09±1.3 ^a	0.38±0.0 ^a	182.24±2.7 ^a
G	4.60±0.0 ^a	6.20±0.0 ^e	41.94±0.5 ^b	0.87±0.1 ^d	214.56±1.6 ^{cd}
H	5.03±0.0 ^g	5.87±0.0 ^c	40.66±0.6 ^b	0.33±0.0 ^a	206.22±0.7 ^b
I	5.02±0.0 ^g	5.80±0.0 ^c	40.48±0.5 ^b	0.36±0.0 ^a	206.22±0.2 ^b

^{a-h}Values with different superscripts in the same row are significantly at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(나) 시판 가자미식해의 미생물적 품질 평가

시판 가자미식해의 총균수, 효모, 곰팡이, 젖산균, 대장균, 대장균군에 결과는 Table 2과 같다. 총균수는 A 가자미식해에서 9.9×10^7 CFU/g 으로 가장 많이 나타났으며, 가장 낮은 총균수는 7.6×10^5 CFU/g 으로 F 시료로 이는 Table 2의 pH 농도, 휘발성염기질소 함량 및 아미노질소 함량과 비교해 볼 때 비례적으로 증가함을 보여준다. 전체적으로 총균수는 $10^5 \sim 10^7$ CFU/g 정도로 분포하고 있음을 보여준다. 산균수 또한 B, D, G, H, I 에서 10^6 CFU/g 정도를 나타내었고 A, C, E 에서 10^7 CFU/g을 나타내었으며, 총균수와 비슷한 수준을 나타내었는데 이는 총균수의 대부분이 유산균으로 분포되어 있을 것으로 예측되어진다.

대장균과 대장균군은 총 9종 시판가자미식해 모든 시료에서 검출되지 않았다. 효모는 $3.0 \times 10^2 \sim 6.6 \times 10^4$ CFU/g으로 평균 10^3 CFU/g 정도로 나타났고 곰팡이는 모든 시료에서 나타나지 않았다.

Table 2. Microbiological assay of commercial flounder *sikhe*

(Unit, CFU/g)

Marketing products	Total viable cells	Yeast	mould	Lactic acid bacteria	E.coli	<i>form</i>
A	9.9×10^7	3.0×10^2	N.D	3.1×10^7	N.D	N.D
B	5.8×10^6	4.8×10^3	N.D	5.3×10^6	N.D	N.D
C	6.1×10^7	3.0×10^2	N.D	4.4×10^7	N.D	N.D
D	4.7×10^6	6.6×10^4	N.D	4.6×10^6	N.D	N.D
E	9.6×10^7	5.5×10^3	N.D	6.1×10^7	N.D	N.D
F	7.6×10^5	6.8×10^3	N.D	5.8×10^5	N.D	N.D
G	1.0×10^6	6.7×10^2	N.D	1.7×10^6	N.D	N.D
H	3.1×10^6	4.2×10^3	N.D	2.1×10^6	N.D	N.D
I	2.1×10^6	3.2×10^3	N.D	2.5×10^6	N.D	N.D

N.D ; Not detected

(다) 시판 가자미식해의 관능적 품질 평가

시판 가자미식해 9 종을 15 명의 관능요원에 의해 9 점법으로 관능검사를 실시하였다. 맛, 향, 색, 조직감 4가지 조건에 대한 관능검사 점수는 Table 3에 나타내었다. 조직감에서는 4.00-5.56 점으로 시료 각각의 점수에 차이가 있지만 통계적으로 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 나머지 향, 맛, 색에서는 시료들간의 유의적인 차이를 나타내었는데, pH 5이상이며, 휘발성염기질소 함량과 아미노질소 함량이 비교적 낮은 시료인 F, H, I 에서 향 5.11-5.33 점, 맛 4.89-5.67 점, 색 5.67-6.22 점으로 유의적으로 다른 시료들에 비해서 높은 평가를 나타냈다. 총점에서는 H 가 22.22 점으로 가장 높은 점수를 받았으며 F, I 또한 각각 22.11, 21.67 점으로 H와 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 시료 D와 A는 총점이 14.67, 16.44 점으로 가장 낮은 점수를 나타냈으며 맛, 향, 색, 조직감에서 전체적으로 낮은 점수를 나타내었다.

Table 3. Results on the sensory evaluation of flounder *sikhe*

Producer	Flavor	Taste	Color	Texture	Overall acceptance
A	4.00±1.70 ^{ab}	3.33±1.41 ^a	4.89±1.66 ^{ab}	4.22±1.40 ^a	16.44±5.23 ^{ab}
B	4.78±1.47 ^b	4.33±1.33 ^{abc}	5.67±0.67 ^b	5.11±1.37 ^a	19.89±4.09 ^{bcd}
C	4.11±0.99 ^{ab}	3.67±1.41 ^{ab}	5.11±0.74 ^{ab}	4.56±1.26 ^a	17.44±3.06 ^{abc}
D	3.11±1.20 ^a	2.89±1.20 ^a	4.22±1.47 ^a	4.44±1.64 ^a	14.67±4.62 ^a
E	3.22±1.23 ^a	4.89±1.29 ^{bcd}	5.89±1.10 ^b	4.33±1.25 ^a	18.33±3.06 ^{abc}
F	5.33±1.15 ^b	5.67±1.63 ^{cd}	6.00±1.25 ^b	5.11±1.66 ^a	22.11±4.56 ^d
G	4.44±1.07 ^{ab}	3.56±0.96 ^{ab}	5.22±0.92 ^{ab}	4.00±2.00 ^a	17.22±4.13 ^{abc}
H	5.11±1.29 ^b	5.89±1.37 ^d	5.67±1.63 ^b	5.56±1.17 ^a	22.22±5.07 ^d
I	5.11±0.99 ^b	4.89±1.45 ^{bcd}	6.22±1.03 ^b	5.44±0.83 ^a	21.67±3.20 ^{cd}

^{a-d}Values with different superscripts in the same row are significantly at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

(라) 시판 가자미식해의 Biogenic amines 함량

발효식품에서 발생하는 biogenic amines는 인체에 대한 위해 정도는 낮은 편이나, 다량섭취 또는 이들의 대사를 위한 자연적 기작이 저해 또는 결핍될 경우에는 건강을 크게 손상시킬 수 있다(Hwang et al., 2008). Histamine의 경우 독성증세를 일으킬 수 있고, tyramine의 경우는 혈압증진을 일으킬 수 있다. 이에 biogenic amines의 생성을 확인해보았다. Histamine은 모든 시료에서 거의 검출되지 않았으며, cadaverine 또한 0.17-5.37 mg/kg으로 극소량 검출되었다. 대부분 tyramine과 putrescine이 검출되었는데 총 Bas 함량은 시판 가자미식해 A 에서 47.36 mg/kg으로 가장 높은 biogenic amines 함량을 나타내었으며, F 에서 0.70 mg/kg으로 가장 낮은 함량을 나타내었다. 이는 상기 휘발성염기질소 함량과 아미노질소 함량과 비교해 볼 때, 비례적으로 증가하는 것을 알 수 있었으며, 발효 또는 부패가 진행할수록 biogenic amine 함량이 증가하는 경향을 나타내었다.

Table 4. Levels of biogenic amines in of commercial flounder *sikhe*

(Unit, mg/kg)

Marketing products	Cadaverine	Putrescine	Histamine	Tyramine	Total
A	5.39	18.84	0.47	22.64	47.34
B	N.D	4.16	N.D	11.69	15.85
C	0.17	1.54	N.D	17.24	18.95
D	0.56	10.74	N.D	13.27	24.57
E	0.87	10.01	N.D	10.36	21.33
F	0.30	N.D	N.D	0.40	0.70
G	0.90	1.05	0.07	3.65	5.67
H	0.32	0.57	N.D	0.78	1.67
I	0.52	N.D	N.D	1.48	2.00

N.D; Not detected.

(3) 시판명태 및 오징어식해의 품질특성 결과

(가) 시판명태 및 오징어식해의 이화학적 품질 특성

시판명태 및 오징어식해는 가자미식해에 비해 시판되는 양이 적었으며, 특히 오징어식해의 경우에는 거의 찾기가 힘들었으며 그 품질특성은 Table 5에 나타내었다. A~D까지는 시판명태식해이며, E~F 시판오징어식해이다. 명태식해의 pH는 4.65~4.78로 가자미식해와 비슷하게 pH 5이하로 나타났으며, 평균 pH 4.72 정도를 나타냈다. 오징어식해 또한 pH가 4.22~4.33으로 pH 5이하로 나타났으며, 명태식해에 비해서는 유의적으로 낮은 pH값을 나타내었다. 명태식해의 염도는 4.00~4.30 % 정도를 나타내었으며, Table 1의 제시된 가자미식해의 염도 5.33~6.20% 비해 낮은 염도를 나타내었고, 오징어식해의 경우는 명태식해 보다 더 낮은 3.60~6.67%를 나타내었으며, 유의적으로 차이를 나타내었다. 명태식해의 휘발성염기질소(VBN)함량의 경우에는 43.28~81.81 mg/100g으로 시료간의 차이가 크게 나타났으며, 평균 60.21 mg/100g으로 가자미식해와 비슷한 수준을 나타냈으며, 오징어식해는 더 낮은 34.15~36.33 mg/100g 수준을 나타내었다. TBA값의 경우에는 명태식해에 비해 오징어식해에서 유의적으로 높게 나타났으며, 아미노태질소의 함량은 명태식해에서 261.46~338.39 mg/100g으로 오징어식해 123.09~152.60 mg/100g 높게 나타났으며, VBN함량과 비례적으로 증가하는 것을 알 수 있다.

결과적으로 시판 명태식해의 평균 pH는 4.72, 염도는 4.2%, 휘발성염기질소(VBN)함량은 60.22 mg/100g, TBA값은 0.21 O/D, 아미노태질소(Amino-N)함량은 304.77 mg/100g을 나타내었으며, 시판 오징어식해의 경우에는 평균 pH값 4.30, 염도는 3.6%, 휘발성염기질소(VBN)함량은 35.24 mg/100g, TBA값은 0.39 O/D, 아미노태질소(Amino-N)의 함량은 137.85 mg/100g 수준으로 나타났으며, 식해표준화의 지표로 이용하였다.

Table 5. Chemical properties of commercial Walleye pollock and squid *sikhe*

Marketing products	pH	NaCl (%)	VBN (mg/100g)	TBA value(O/D)	Amino-N (mg/100g)
A	4.70±0.05 ^{cd}	4.30±0.01 ^c	81.81±1.98 ^e	0.24±0.01 ^b	338.39±2.60 ^e
B	4.76±0.00 ^{de}	4.37±0.00 ^c	51.60±0.95 ^c	0.13±0.00 ^a	239.04±1.60 ^c
C	4.65±0.05 ^c	4.13±0.01 ^b	64.17±1.46 ^d	0.20±0.01 ^a	380.20±3.24 ^f
D	4.78±0.00 ^e	4.00±0.00 ^b	43.28±3.64 ^b	0.26±0.03 ^b	261.46±3.29 ^d
E	4.33±0.01 ^b	3.67±0.00 ^a	36.33±5.41 ^a	0.43±0.02 ^c	152.60±7.17 ^b
F	4.22±0.01 ^a	3.60±0.01 ^a	34.15±0.91 ^a	0.35±0.02 ^c	123.09±0.72 ^a

^{a-f}Values with different superscripts in the same row are significantly at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(나) 시판명태 및 오징어식해의 미생물학적 품질 특성

시판명태 및 오징어식해의 미생물학적 품질특성은 Table 6에 나타내었다. 우선적으로 곰팡이, 대장균, 대장균군은 나타나지 않았다. 총균수는 명태식해에서 $1.3 \times 10^6 \sim 9.5 \times 10^6$ CFU/g으로 나타났고, 오징어식해 $4.0 \times 10^4 \sim 6.1 \times 10^4$ CFU/g에 비해서 높게 나타났다. 유산균수 또한 명태식해에서 더 높게 나타났으며, 시판가자미식해와 마찬가지로 명태 및 오징어식해에서 대부분 유산균이 분포하는 것으로 사료 된다. 또한 명태식해와 오징어식해의 총균수 및 유산균수를 비교해 볼 때, VBN함량과 아미노태질소함량과 비례적으로 증가함을 알 수 있다. 이는 명태 및 오징어식해가 발효 숙성하는 동안 단백질 변성이 일어나는데 이때 질소가 생성되면서 VBN함량이 증가하면서, 동시에 유산균수가 증식하는데 cho et al. (2013)의 연구결과와 비교해 볼 때 비슷한 결과로 판단된다.

Table 6. Microbiological assay of commercial Walleye pollock and squid *sikhe*

(Unit, CFU/g)

Marketing products	Total viable cells	Yeast	mould	Lactic acid bacteria	E.coli	<i>form</i>
A	9.5×10^6	4.2×10^3	N.D	2.7×10^7	N.D	N.D
B	6.9×10^6	3.2×10^3	N.D	4.3×10^6	N.D	N.D
C	4.7×10^6	3.1×10^3	N.D	6.4×10^7	N.D	N.D
D	1.3×10^6	7.6×10^2	N.D	2.6×10^6	N.D	N.D
E	6.1×10^4	4.4×10^2	N.D	6.1×10^5	N.D	N.D
F	4.0×10^4	2.6×10^2	N.D	5.8×10^5	N.D	N.D

N.D ; Not detected.

(다) 시판명태 및 오징어식해의 관능적 품질 특성

시판명태 및 오징어식해의 관능적 특성은 Table 7와 같다. 색에서는 시료간에 차이는 나타나지 않았으며 6.18~6.49점 정도의 분포를 나타내었다. 맛은 명태식해가 5.33~6.37점, 오징어식해가 6.20~7.03점으로 오징어식해가 명태식해에 비해서 유의적으로 좋은 점수를 나타내었고 두가지 식해 모두 가자미식해에 비해서는 높은 점수를 나타내었다. 묘사평가를 통하여 원인을 알아본 결과 가자미식해는 가자미자체의 특유의 향과 맛이 명태와 오징어식해에 비해 좋지 않아서 나타난 결과로 사료되며, 오징어식해에 경우는 짓갈로 우리가 많이 접해왔기 때문에 더 좋은 평가가 나타난 것으로 사료된다. 또 명태식해의 경우 D시료가 전체적으로 낮은 평가를 나타내었는데, VBN함량과 아미노태질소함량을 보았을 때 다른 명태식해에 비해 낮은 함량을 나타내었다. 이는 숙성이 완벽히 완전히 진행되지 않아 풍미와 맛 그리고 식감이 다른 식해들에 비해 떨어진 것으로 사료된다. 식감의 경우 명태식해가 5.15~5.23점을 나타내었으며, 오징어식해의 경우 6.04~6.55점으로 높은 평가를 받았다. 하지만 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 총점 또한 둘다 비슷한 수준의 점수를 나타내었다.

Table 7. Results on the sensory evaluation of Walleye pollock and squid *sikhe*

Marketing products	Flavor	Taste	Color	Texture	Overall acceptance
A	6.05±0.41 ^{ab}	6.39±0.50 ^{ab}	6.30±0.10 ^a	5.23±0.41 ^a	5.99±0.46 ^{ab}
B	6.37±0.52 ^{ab}	6.51±0.47 ^b	6.49±0.44 ^a	5.17±0.82 ^a	6.14±0.56 ^{ab}
C	6.20±0.37 ^{ab}	6.47±0.46 ^{ab}	6.48±0.28 ^a	5.85±0.19 ^{ab}	6.25±0.26 ^b
D	5.33±0.49 ^a	5.30±0.62 ^{ab}	6.18±0.05 ^a	5.15±0.78 ^a	5.49±0.40 ^a
E	7.03±0.41 ^b	6.47±0.53 ^a	6.44±0.49 ^a	6.04±0.12 ^{ab}	6.50±0.35 ^b
F	6.20±0.83 ^{ab}	6.60±0.45 ^b	6.49±0.47 ^a	6.55±0.22 ^b	6.46±0.16 ^b

^{a-d}Values with different superscripts in the same row are significantly at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(라) 시판명태 및 오징어식해의 Biogenic amine 함량

시판명태 및 오징어식해의 Bas 함량은 Table 5와 같다. 명태식해 A~D에서는 Cadaverine 0.56~3.39 mg/kg, Putrescine 4.34~8.84 mg/kg, histamine은 불검출, tyramine은 7.27~17.24 mg/kg 정도가 확인 되었으며, 총 amines 함량은 12.17~25.72mg/kg으로 나타났다. Bas함량은 VBN 및 아미노태질소함량을 보았을 때, 그 함량이 높은 식해에서 비례적으로 높게 나타났다. 오징어식해 E~F에서는 cadaverine이 0.24~0.39 mg/kg 정도로 나타났으며, 나머지 4종류의 amines는 검출되지 않았다.

Table 8. Levels of biogenic amines in of commercial Walleye pollock and squid *sikhe*
(Unit, mg/kg)

Marketing products	Cadaverine	Putrescine	Histamine	Tyramine	Total
A	3.39	8.84	N.D	9.64	21.87
B	2.12	6.28	N.D	11.69	20.09
C	1.17	7.31	N.D	17.24	25.72
D	0.56	4.34	N.D	7.27	12.17
E	0.39	N.D	N.D	N.D	0.39
F	0.24	N.D	N.D	N.D	0.24

N.D; Not detected.

나. 가자미, 오징어, 명태식해의 제조공정 표준화 보완사항 확인

기존공정	보완점	해결방안
↓		
원물 입고 (냉동)	냉동과 생물	총균수 및 제품의 관능평가
↓		
비가식 부위 제거 (머리, 내장, 지느러미, 뼈)	-	-
↓		
염장 (소금 염장)	소금염장과 물염장	총균수 및 제품의 관능평가
↓		
세척 (약 2~3회)	세척 시 염농도	염농도의 따른 품질변화 확인 및 관능평가(최적화)
↓		
탈수 (약 2~3시간)	-	-
↓		
양념	양념 시 부재료 배합비	부재료 배합비에 따른 품질변화 확인 및 관능평가(최적화)
↓		
숙성 (15℃, 14일간)	숙성조건	숙성조건에 따른 품질변화 확인 및 관능평가(최적화)
↓		
완료	포장조건	포장법에 따른 품질변화 확인(최적화)

(1) 보완사항의 확인

(가) 냉동품과 생물의 차이점

1) 총균수

가자미와 오징어 원물의 생물과 냉동품의 총균수의 차이를 알아보았다. 표 1에서 보듯 모든 시료에서 $3.7\sim 4.2\times 10$ CFU/g으로 비슷한 수준의 총균수를 나타내었으며 큰 차이는 없었다. 명태는 냉동품은 있으나 생물을 구하기가 힘들어 제외하고 연구를 진행하였다.

<표 1. 가자미, 명태 원물의 총균수>

Sample	총균수(CFU/g)
가자미 생물	420
가자미 냉동	375
오징어 생물	381
오징어 냉동	371

2) 관능평가

원물의 냉동품과 생물로 식해제품 제조 시 품질의 차이를 확인하기 위하여 관능평가를 실시하였다. 가자미와 오징어식해 제조공정은 참여기업 정이푸드빌의 제조법을 이용하여 제조하였다. 8인의 panel이 각각 맛, 향, 조직감, 색을 비교하였는데 가자미식해와 오징어식해의 색과 향에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 가자미식해의 경우 맛에서 생물이 5.1점으로 냉동 제품 4.3에 비해 높은 평가를 받았으며, 조직감 또한 생물이 5.8점으로 냉동품 5.1점에 비해 높은 평가를 받았다. 마찬가지로 오징어식해도 생물이 맛에서 6.7점으로 냉동 5.2점에 비해 높은 평가를 받았으며 조직감에서도 생물이 더 높은 평가를 받았다. 이는 냉동된 가자미와 오징어육을 해동 시 드립현상이 일어나 생물에 비해 관능평가면에서 떨어진 현상으로 사료된다.

<표 2. 가자미, 명태식해의 관능평가>

Sample	Flavor	Taste	Color	Texture	Overall
가자미 생물	5.7 ± 0.24	5.1 ± 0.21	6.2 ± 0.21	5.8 ± 0.15	22.8
가자미 냉동	5.8 ± 0.14	4.3 ± 0.34	5.9 ± 0.17	5.1 ± 0.28	21.1
오징어 생물	6.0 ± 0.11	6.7 ± 0.63	6.7 ± 0.24	5.9 ± 0.21	25.3
오징어 냉동	5.9 ± 0.32	5.2 ± 0.24	6.8 ± 0.14	4.8 ± 0.11	22.7

(나) 염장법의 차이점

1) 총균수

가자미, 명태, 오징어의 염장방법을 달리하여 원물의 총균수를 확인해 보았다. 물 염장과 소금 염장 후 원물의 총균수는 전체적으로 $2.0\sim 3.6 \times 10$ CFU/g으로 차이는 거의 나지 않았다.

<표 3. 가자미, 오징어, 명태 원물의 총균수>

Sample	총균수(CFU/g)
가자미 물염장	275
가자미 소금염장	310
오징어 물염장	201
오징어 소금염장	371
명태 물염장	359
명태 소금염장	261

2) 관능평가

가자미, 명태, 오징어의 염장방법을 달리하여 참여기업 정이푸드빌의 식해제조 공정에 따라 식해를 제조 후 관능평가를 하였다. 가자미의 경우 물 염장이 향과 색에서는 점수의 큰 차이가 없었으나 맛에서 물염장 5.67점으로 소금염장 4.33점에 비하여 높았고, 특히 조직감에서 물염장이 6.33으로 월등히 높았다. 8인 panel의 의견을 종합하였을 때 물 염장 가자미식해가 조직감에서 육자체가 더 탱탱하고 식감이 좋다고 평가하였다. 오징어식해 또한 향과 맛은 차이가 거의 나지 않았지만 맛과 조직감에서 각각 6.00, 6.67점으로 소금염장에 비해 높은 평가를 받았다. 명태식해 또한 같은 양상을 나타내었으며 물 염장 시 염분이 균질하게 흡수되는 점이 있고 육자체에 삼투압현상으로 인하여 육이 좀더 단단해져 식감이 좋아 물 염장이 식해 제조에 유용할 것으로 사료된다.

<표 4. 가자미, 명태, 오징어식해의 관능평가>

Sample	Flavor	Taste	Color	Texture	Overall
가자미 물염장	5.00 ± 0.82	5.67 ± 0.47	6.33 ± 0.47	6.33 ± 0.47	23.33
가자미 소금염장	4.67 ± 0.47	4.33 ± 0.47	6.20 ± 0.82	4.00 ± 0.82	19.20
오징어 물염장	5.00 ± 0.82	6.00 ± 0.82	6.00 ± 0.82	6.67 ± 0.47	23.67
오징어 소금염장	5.33 ± 0.47	5.33 ± 0.47	6.33 ± 0.47	5.00 ± 0.82	21.99
명태 물염장	5.33 ± 0.47	6.00 ± 0.82	5.33 ± 0.47	6.33 ± 0.47	22.99
명태 소금염장	4.67 ± 0.47	4.67 ± 0.47	6.33 ± 0.47	4.33 ± 0.47	20.00

다. 가자미식해의 제조 공정 표준화

(1) 재료 및 방법

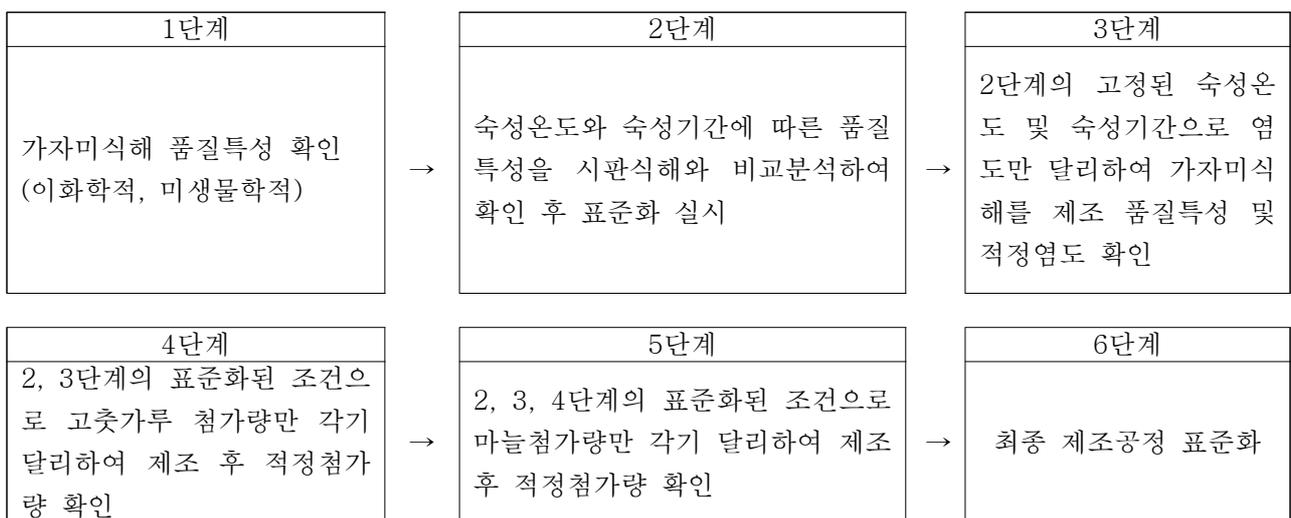
(가) 재 료

연구시료용 가자미식해 제조시에 시료가자미(*Pleuronetide*, 원산지, 대한민국)는 강릉시 중앙시장에서 구입하여 사용하였고, 시험용가자미식해의 염장에 사용한 소금은 천일염(해표(주), 국내산)을 이용하였고, 당장용 첨가제는 백설탕(홈플러스(주), 국내산)을 이용하였고, 나머지 부재료로서는 고춧가루(해찬들(주), 국내산), 마늘(신야원, 국내산), 생강(농협, 국내산), 미원(대상(주), 국내산), 좁쌀(홈플러스(주), 국내산)등 강릉시 소재 농협 하나로마트에서 각각 구입하여 사용하였다.

(나) 가자미식해 제조

시료의 제조 공정은 (주) 정이푸드빌의 가자미식해 레시피를 이용하였다. 가자미 내장 및 머리와 지느러미를 제거한 후 몸통육 적당한 크기(가로×세로, 6×6)로 세절한 후 24시간 염장(천일염 20%)하여 세척하고, 2시간 탈수 후 가자미원물 무게대비 고춧가루 9.3%, 생강 1.9%, 미원 1%, 기장쌀 5%, 다진마늘 4.12%, 무 12.5%를 첨가하여 가자미식해를 제조하였다. 1단계로 온도별 실험은 숙성만 5℃, 10℃, 15℃에서 달리하여 숙성기간별 품질변화를 확인하여 숙성온도 및 기간을 표준화 하였고, 2단계로 염도별 실험 가자미식해는 최종염도 2%, 3%, 4%, 5%, 및 6%로 달리하여 제조하여 적정 염도를 확인하였다. 3단계로 부재료는 고춧가루 첨가량을 달리하여 7%, 9%, 및 11% 첨가하여 제조하여 적정 첨가량은 확인하였고, 4단계로 마늘함량별 실험 시료는 마늘 2%, 4%, 및 6%로 첨가 제조하여 실험에 사용하였으며, 나머지 부재료인 생강 1.9%, 미원 1%, 설탕 3.75%, 기장쌀 5% 모두 동일량을 넣고 버무려 양념한 후 용기에 담아 제조하였다.

(다) 연구방법



(라) 발효조건 최적화 가자미식해의 품질특성 확인 실험법은 상기 “가” 시판가자미식해 품질특성 “(2)” 재료 및 방법, “(가),(나), (다), (마), (바), (사)” 와 같이 실시하였다.

(2) 숙성기간 및 온도를 달리한 가자미식해의 품질특성

(가) 숙성기간 중 pH의 변화 (온도별)

일반적인 수산발효식품은 pH 5 이하가 되면 악취와 더불어 풍미에 악영향을 미치며 유기산을 생성하여 상품성이 없다고 보고되어 있으며, pH는 수산발효식품의 품질특성에 중요한 영향을 미치는 인자이다. 시판가자미식해 준비실험을 통하여 pH값은 4.33-5.12 정도였으며, 직접 제조한 가자미식해의 숙성저장기간 동안 온도별 pH 변화는 Fig 1과 같다. 초기 pH 범위는 5.95-5.99으로 시료들간에 차이가 없었으나 숙성저장 0-14일차에 15℃에 숙성저장한 가자미식해는 5.99에서 4.50으로 감소하였고, 10℃에 숙성저장 가자미식해 또한 5.98에서 4.60으로 pH가 급격히 떨어지는 경향이 있었다. 하지만 5℃ 시료에서는 pH 감소폭은 5.99-5.61로 다른 시료들에 비해 매우 안정하였다. 숙성저장 14일차부터 10℃, 15℃ 시료의 pH가 5 이하로 떨어졌는데, 이러한 현상은 식해 제조 시 첨가되는 곡류에 따른 미생물의 활성 증가에 따라 유기산이 많이 생산되는 것이 원인이라고 보여진다. 이에 따라 고온에서의 발효 및 유통은 식해의 품질을 급속히 저하시키기 때문에 가자미식해는 저온에서 발효 및 유통이 이루어져야 된다고 판단하였다. 하지만 5℃는 14일차까지도 pH 5.5 이상으로 변화가 적었기 때문에 숙성기간 매우 길어지는 것으로 예상되어지며 10℃와 15℃에서 각각 4.75, 4.61로 시판 가자미식해의 평균 pH 4.84와 비슷한 수준을 나타내었다.

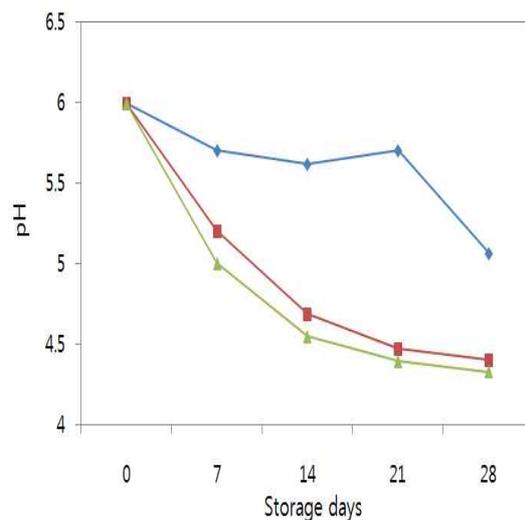


Fig 1. Change of the pH of the Flounder Sikhae during storage at 5°C, 10°C, 15°C for 15 days.

◆, storage at 5°C; ■, storage at 10°C; ▲, storage at 15°C.

(나) 숙성기간 중 휘발성염기질소(VBN)함량의 변화(온도별)

가자미식해를 각각 5°C, 10°C 및 15°C 에서 28일간 숙성하면서 휘발성염기질소의 변화를 조사한 것은 Fig 5과 같다. 각 온도 구간별로 VBN함량이 유의적으로 큰 차이를 보였는데 숙성 14일차까지는 온도 5°C와 10°C의 시료간의 큰 차이를 보이지 않았으나 15°C의 시료는 VBN함량이 35.91 mg/100g으로 다른 시료에 비해 크게 나타났다. 21일차부터 5°C, 10°C 숙성 가자미식해의 VBN함량이 각각 24.85 mg/100 g, 33.61 mg/100 g으로 Table 1에 나타난 시판가자미식해의 VBN함량과 비교해 보았을 때 숙성이 진행 중이거나 숙성이 완료된 상태로 예상되었고, 15°C 숙성 가자미식해의 VBN함량은 41.68 mg/100g 완전숙성이 진행되었음을 알 수 있었다. 5°C 숙성 가자미식해는 숙성 마지막 28일차까지 VBN함량이 28.44 mg/100g으로 시판가자미식해의 VBN함량에 비해 많이 낮아 현재까지도 숙성이 진행중인 것으로 보이며, 10°C 에서 숙성한 가자미식해는 숙성 21일차부터 초기숙성 단계가 시작하는 것을 알 수 있었다. 15°C에서 숙성한 가자미식해는 숙성저장 마지막차인 28일차에 VBN함량이 97.51 mg/100g으로 부패가 되었다. Song et al.(2005)는 보통 신선한 어육의 VBN함량이 일반적인 기준으로 15-25 mg/100g, 30-40 mg/100g은 초기부패 어육, 50 mg/100 g은 부패 정도가 심한 정도로 판정하지만 식해의 경우는 숙성발효 식품이기 때문에 관능검사와 시판가자미식해의 VBN함량분석을 기준으로 부패 정도를 판단하였다. 이것을 통하여 온도별 가자미식해의 숙성기간을 예측할 수 있었으며 15°C 숙성은 급격한 부패가 일어남으로 적합하지 않은 온도임을 예측할 수 있었다. Takahashi (1935)에 의하면 VBN 측정은 어패류의 산도판정법 중 신선한 육에는 없거나 미량 함유되어 있던 것이 선도저하에 따라 생성되어 증가하는 물질을 지표로 하는 대표적인 방법으로 어획 후 시간이 경과할수록 계속 증가한다고 하는데 이것으로 보와 본 연구와 비슷한 결과임을 확인 할 수 있었다.

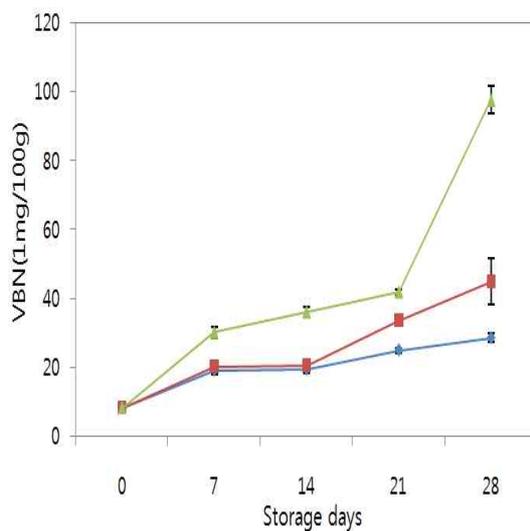


Fig. 2. Changes of the volatile basic nitrogen (VBN) Flounder sikhe products during storage at 5°C, 10°C, 15°C for 15days. ●, Flounder sikhe products during storage at 5°C; ■, Flounder sikhe products during storage at 10°C; ◆, Flounder sikhe products during storage at 15°C.

(다) 숙성기간 중 아미노태질소 함량의 변화(온도별)

아미노태질소량은 발효식품의 숙성도 지표로 이용될 뿐만 아니라 향미와 깊은 관련이 있기 때문에 중요한 품질 지표로 인식되고 있다. 본 연구에서는 가자미식해의 온도별로 각각 5℃, 10℃, 15℃에서 10℃에 숙성저장 기간 중 아미노태질소 함량의 변화량을 조사한 것은 Fig 9와 같다. 가자미식해의 초기 아미노태질소 함량은 162.05-163.05 mg/100g을 나타냈고 그 함량은 시간이 지날수록 상승하였다. 숙성저장 7일차에 온도5℃의 시료는 아미노태질소 함량이 170.74 mg/100g으로 가장 낮았고, 온도 10℃ 및 15℃의 시료는 각각 180.98 mg/100, 185.57 mg/100g으로 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 숙성저장 마지막차까지도 아미노태질소량은 시료간에 유의적인 차이를 보이며 계속 증가하였고 온도 15℃의 시료에서는 304.05 mg/100g으로 가장 높은 수치를 보여 주었고, 전체적으로 21-28일차 사이에 아미노태질소 함량이 시판가자미식해의 아미노태질소 함량과 비슷해 지는것을 알 수 있었다.

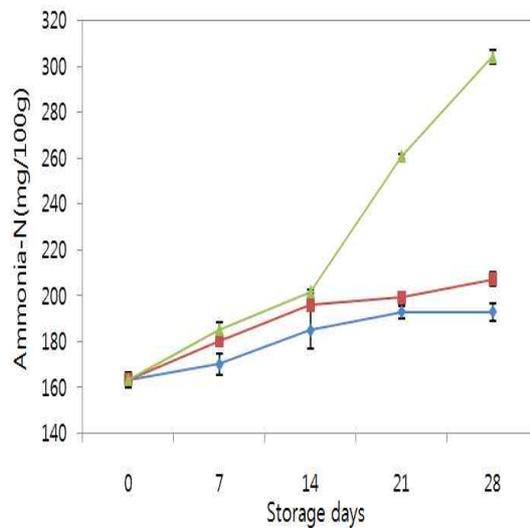


Fig. 3. Changes of the Ammonia-N of the Flounder sikhe products during storage at 5℃, 10℃, 15℃ for 15 days. ◆, Flounder sikhe products during storage at 5℃; ■, Flounder sikhe products during storage at 10℃; ▲, Flounder sikhe products during storage at 15℃.

(라) 숙성기간 중 총균수의 변화(온도별)

가자미식해의 숙성저장온도를 달리하여 총 28일간 총균수의 변화를 Fig. 17에 나타내었다. 실험 초기 총균수는 4.60-4.21 Log(CFU/g)이었다. 예상되려 온도가 증가 할수록 기간에 따라 총균수가 점점 증가하는 경향을 보였다. 숙성저장 5°C의 가자미식해를 제외한 10°C, 15°C의 가자미식해에서 숙성저장 7일차부터 총균수가 10^7 CFU/g 이상으로 나타났고, 숙성저장 21일까지도 급격한 증가가 일어났다. 숙성저장 5°C의 가자미식해는 28일차까지도 총균수가 7.11 Log(CFU/g)으로 시판가자미식해의 총균수에 미치지 못함으로 숙성초기단계 또는 그 전이라고 예상되며 숙성기간이 너무 오래 걸리기 때문에 숙성온도로 적합하지 못하였고, 15°C의 가자미식해는 숙성저장 14일차부터 총균수가 10^8 CFU/g 이상으로 증가하면서 너무 급격한 변화가 있었기 때문에 비교적 안정한 10°C를 적정 숙성온도로 정하였으며, 10°C의 가자미식해에서 14-21일차 사이에 총균수가 7.5-8.4 Log(CFU/g)으로 시판가자미식해의 총균수와 비슷하였다.

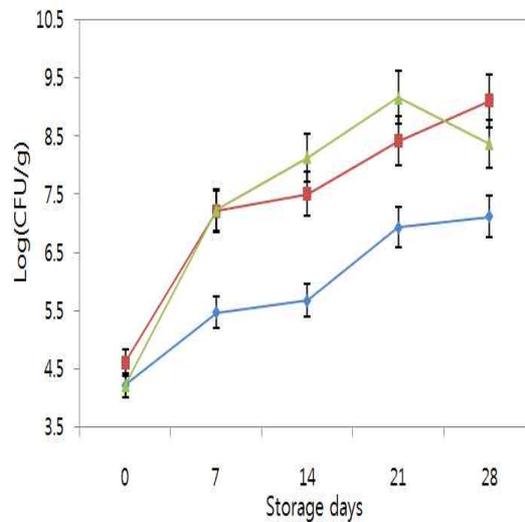


Fig 4. Changes of the total viable cells of the Flounder sikhe products during storage at 5°C, 10°C, 15°C for 15days. ◆, Flounder sikhe products during storage at 5°C; ■, Flounder sikhe products during storage at 10°C; ▲, Flounder sikhe products during storage at 15°C.

(마) 숙성기간 중 유산균수의 변화(온도별)

숙성온도를 달리한 가자미식해의 유산균수의 변화를 Fig. 21에 나타내었다. 총균수와 마찬가지로 숙성기간동안 온도간에 가자미식해의 유산균수의 변화는 유의적인 차이를 나타냈으며, 숙정저장 15℃의 가자미식해에서 가장 급격한 유산균수의 증가가 나타났고, 숙성저장 21일차부터 유산균의 감소가 나타났는데 이는 관능검사와 비교해 볼 때 초기부패가 시작되서 유산균이 감소하는 것으로 예상된다.

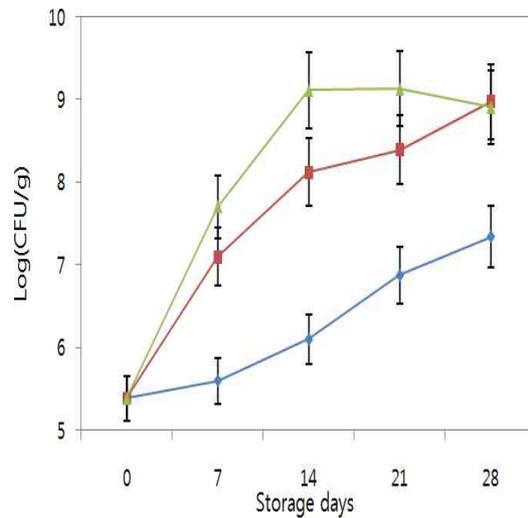


Fig 5. Changes of total viable lactic acid bacteria of the Flounder sikhe products during storage at 5°C, 10°C, 15°C for 15days. ◆, Flounder sikhe products during storage at 5°C; ■, Flounder sikhe products during storage at 10°C; ▲, Flounder sikhe products during storage at 15°C.

(바) 숙성온도 및 기간에 따른 가자미식해의 관능평가

숙성온도와 숙성기간에 따른 관능검사 결과를 Table 9에 나타내었다. 15°C 에서 21일과 마지막 일차인 28일에는 부패취가 심하여 관능검사를 실시 할 수가 없었다. 0일차에는 숙성이 시작되지 않아 시료간의 점수 차이가 거의 없었으며, 7일차부터 차이가 나기 시작하였다. 8번시료인 숙성 10°C, 14일차의 결과를 보면 5.33점으로 가장 좋은 결과를 보여주었으며, 21일차 이후에는 숙성의 정도가 지나침에 따라 관능검사 점수가 낮아지는 것으로 판단된다. 본 연구를 통하여 관능검사를 중점으로 볼 때 숙성온도 10°C, 숙성기간 14일이 최적조건으로 사료되며, 앞서 실험한 시판가자미식해의 품질특성과 표준화된 가자미식해의 품질특성을 비교 볼 수 있었다. 시판가자미식해는 pH 4.7, VBN 42.99 mg/100g, 총균수 $10^6\sim 10^7$ CFU/g 나타났고, 본 연구를 통한 표준화된 가자미식해의 품질특성을 보면 10°C, 14일차에서 pH 4.68, VBN 25.29 mg/100g, 총균수 1.33×10^7 CFU/g, 관능점수 5.33점으로 서로간의 차이를 확인할 수 있었다. 최종적으로 숙성온도 10°C, 숙성기간 14일을 1단계 조건으로하여 최적염도 및 부재료 배합비에 대한 표준화를 실시하였다.

Table 9. Results on the sensory evaluation for storage and period condition of flounder *Sikhe*

sample No.	Variable Level Ingredient						Overall quality
	Factors		Flavor	Taste	Texture	Color	
	Temperature (°C)	Day					
1	5	0	4.17±1.23 ^{ab}	3.96±1.65 ^a	4.04±1.41 ^a	5.03±1.47 ^a	4.30±1.22 ^a
2	5	7	4.36±1.11 ^b	4.15±1.21 ^{ab}	4.01±1.69 ^a	5.01±1.54 ^a	4.38±1.49 ^a
3	5	14	4.17±1.36 ^{ab}	5.12±1.23 ^{bc}	4.26±1.45 ^a	5.14±1.87 ^a	4.67±1.51 ^{ab}
4	5	21	4.88±1.24 ^{bc}	5.41±1.74 ^b	4.68±1.31 ^{ab}	5.18±1.32 ^a	5.04±1.20 ^b
5	5	28	4.29±1.54 ^{ab}	4.58±1.20 ^b	4.87±1.74 ^b	5.16±1.52 ^a	4.72±1.33 ^{ab}
6	10	0	4.62±1.22 ^b	4.55±1.33 ^b	4.89±1.65 ^b	5.21±1.46 ^a	4.82±1.52 ^b
7	10	7	4.98±1.11 ^{bc}	4.97±1.10 ^{bc}	4.62±1.36 ^{ab}	5.33±1.35 ^a	4.97±1.21 ^{bc}
8	10	14	5.10±1.37 ^c	5.60±1.20 ^c	5.40±1.44 ^c	5.22±1.45 ^a	5.33±1.25 ^a
9	10	21	4.00±1.54 ^{ab}	3.91±1.00 ^a	4.03±1.10 ^a	5.34±1.11 ^a	4.32±1.03 ^a
10	10	28	3.50±1.63 ^a	-	-	5.24±1.32 ^a	-
11	15	0	4.11±1.84 ^{ab}	3.99±1.64 ^a	4.04±1.30 ^a	5.19±1.41 ^a	4.33±1.20 ^a
12	15	7	4.33±1.41 ^b	4.34±1.31 ^b	4.55±1.54 ^{ab}	5.27±1.32 ^a	4.62±1.57 ^{ab}
13	15	14	4.21±1.55 ^{ab}	4.00±1.41 ^a	4.09±1.63 ^a	5.14±1.22 ^a	4.36±1.46 ^a
14	15	21	-*	-	-	5.26±1.41 ^a	-
15	15	28	-	-	-	5.30±1.23 ^a	-

^{a-c}Values with different superscripts in the same row are significantly at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

*Not sensory test

(3) 숙성기간 중 염농도에 따른 가자미식해의 품질 특성

염농도를 2, 3, 4, 5, 6%로 각기 달리하여 1단계에서 표준화한 숙성온도 10℃에서 숙성기간 14일간 숙성한 염농도가 다른 가자미식해의 관능평가를 실시하였으며, 28일까지 가자미식해의 이화학적 미생물적인 품질특성의 변화를 확인 하였다.

(가) 숙성기간 중 pH의 변화 (염도별)

염도별 가자미식해의 숙성저장 중 pH 변화는 Fig 2 와 같다. 숙성저장 온도는 10℃로 하였으며, 7일차부터 시료간의 pH 의 변화에 유의적인 차이가 나타났다. 식염농도 2%와 3%의 가자미식해에서 0~7일간 pH 가 6.10-5.13으로 다른 시료들에 비하여 가장 큰 변화가 있었고 식염농도 6%인 가자미식해에서 pH가 6.10-5.90으로 가장 안정하였다. Kim et al(2008). 등은 강릉지방의 오징어식해 개발에 관한 연구에서 젓갈의 숙성 중 염농도가 낮을수록, 온도는 높을수록 미생물의 활성 증가에 따른 유기산의 증가로 인해 pH는 급격히 감소하였다고 하였는데, 이는 본 연구와 유사하였다.

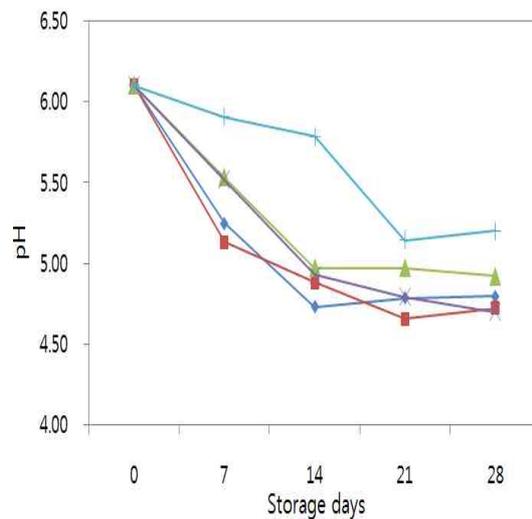


Fig 6. Change of the pH of the different salinity Flounder sikhe during storage at 10℃ for 10 days. ◆, salinity of 2% squid sikhae; ■, salinity of 3% Flounder sikhe; ▲, salinity of 4% Flounder sikhe; ×, salinity of 5% Flounder sikhe ; +, salinity of 6% Flounder sikhae.

(나) 숙성기간 중 (휘발성염기질소)VBN함량의 변화(염도별)

가자미식해 식염농도 2%, 3%, 4%, 5% 및 6%를 28일간 10℃에서 숙성 저장하면서 VBN함량의 변화를 조사한 것은 Fig 6와 같다. 식염농도 2%, 3%, 4%, 5% 및 6% 각각의 시료에서 VBN함량은 유의적으로 차이를 나타냈으며 모든 시료에서 숙성저장 7일차부터 차이가 나타나기 시작하였다. 식염농도 2%와 3%의 가자미식해는 숙성저장 7일차부터 VBN함량이 각각 54.25 mg/100g, 46.70 mg/100g으로 다른 시료들에 비해 시판가자미식해 수준의 VBN함량 정도로 급격히 상승하였고, 식염농도 4%, 5% 및 6%의 시료도 34.33~37.10 mg/100g 정도로 상승하였다. 숙성저장 14일차부터 식염농도 2%인 시료를 제외하고는 나머지 식염농도의 가자미식해에서 시판가자미식해와 비슷한 수준의 VBN함량을 나타냈다.

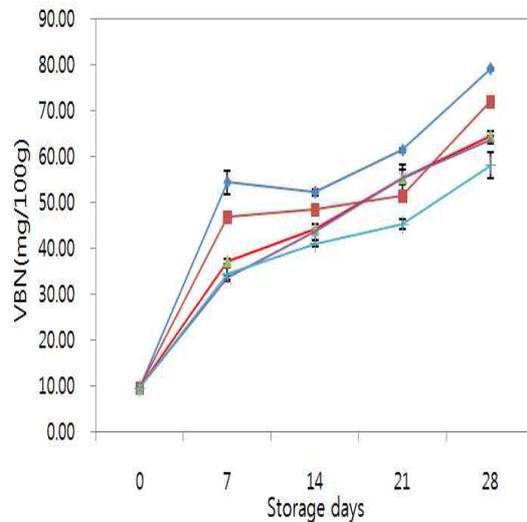


Fig 7. Changes of the volatile basic nitrogen (VBN) of the different salinity Flounder sikhe during storage at 10℃ for 10 days. ◆, salinity of 2% Flounder sikhe; ■, salinity of 3% Flounder sikhe; ▲, salinity of 4% Flounder sikhe; ×, salinity of 5% Flounder sikhe ; +, salinity of 6% Flounder sikhe.

(다) 숙성기간 중 아미노태질소 함량의 변화(염도별)

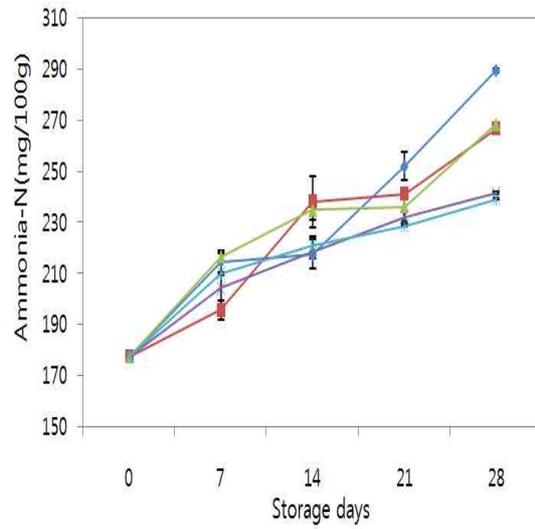


Fig 8. Changes of the Ammonia-N of the different salinity Flounder sikhe during storage at 10°C for 10 days. ◆, salinity of 2% Flounder sikhe; ■, salinity of 3% Flounder sikhe; ▲, salinity of 4% Flounder sikhe; ×, salinity of 5% Flounder sikhe ; +, salinity of 6% Flounder sikhe.

(라) 숙성기간 중 총균수의 변화(염도별)

가자미식해를 식염농도 2%, 3%, 4%, 5% 및 6%으로 만들어 10°C에서 숙성하여 총균수의 변화를 Fig. 18에 나타내었다. 식염농도에 따라 총균수의 유의적인 차이가 나타났다. 초기균수는 5.38-5.39 Log(CFU/g)을 나타냈고, 숙성저장 7일차부터 모든 시료에서 10^7 CFU/g 이상으로 총균수의 급격한 증가가 나타났으며, 식염농도 2%, 3%의 가자미식해에서 급격한 총균수의 증가가 나타났다. 식염농도 4%이상의 가자미식해에서는 숙성저장 28일까지도 총균수가 8.16-8.97 Log(CFU/g)으로 총균수의 증가가 비교적 안정했으며 관능검사를 병행하여 평가해본 결과 부패취등을 느끼지 못하였고 염도 4%의 가자미식해에서 총점이 가장 높아 가자미식해의 식염농도를 4% 정하였다. 이 실험을 통하여 각각 시료의 숙성저장 일차별 균상과 적정 숙성일을 예측할 수 있었다.

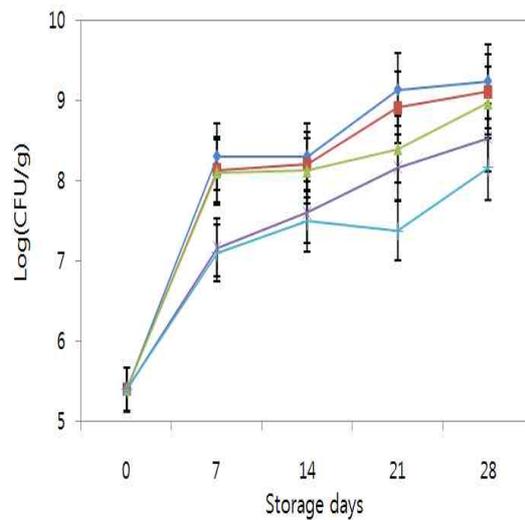


Fig. 9. Changes of the total viable cells of the different salinity Flounder sikhe during storage at 10°C for 10 days. ◆, salinity of 2% Flounder sikhe; ■, salinity of 3% Flounder sikhe; ▲, salinity of 4% Flounder sikhe; ×, salinity of 5% Flounder sikhe ; +, salinity of 6% Flounder sikhe.

(마) 숙성기간 중 유산균수의 변화(염도별)

숙식염농도 2%, 3%, 4%, 5% 및 6%의 가자미식해의 유산균수의 변화는 Fig. 22를 보면 알 수 있는데 식염농도 6%의 가자미식해에서 유산균수의 변화가 0-28일차까지 5.41-8.16 Log(CFU/g)으로 가장 적었고, 나머지 식염의 가자미식해에서는 숙성저장 7일차부터 급격한 유산균수의 증가가 나타났으며, 14일차까지 유산균수의 유의적인 차이는 나타나지 않았고 숙성저장 28일까지도 식염농도 2%의 가자미식해를 제외하고는 유산균수의 변화에 큰 차이가 나타나지 않았다.

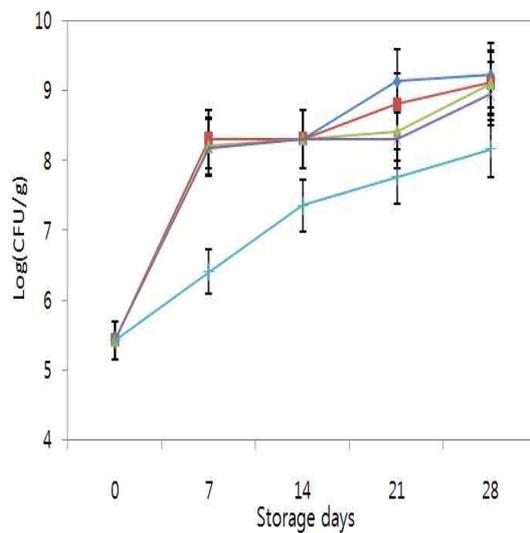


Fig. 10. Changes of total viable lactic acid bacteria of the different salinity Flounder sikhe during storage at 10°C for 10 days. ◆, salinity of 2% Flounder sikhe; ■, salinity of 3% Flounder sikhe; ▲, salinity of 4% Flounder sikhe; ×, salinity of 5% Flounder sikhe ; +, salinity of 6% Flounder sikhe.

(바) 염농도가 다른 가자미식해의 관능검사

1단계에서 결정한 10℃에 14일간 숙성조건을 바탕으로 염도별로 2%, 3%, 4%, 5% 및 6%로 숙성한 가자미식해의 관능평가 결과는 Table 4와 같다. 향에서는 염도 2%가 2점으로 가장 낮은 점수를 나타냈으며, 3%에서도 2.3점으로 염도 2%와 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 나머지 염도 4%, 5% 및 6%의 가자미식해는 3.2~3.6점으로 비슷한 점수를 나타내었다. 색과 식감에서는 모든 시료가 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 맛에서는 염도가 낮은 2%, 3%에서 각각 2.7점 및 3.5점으로 좋지 못한 평가를 받았으며, 염도 4%가 5.2점으로 가장 좋은 점수를 나타내었다. 유의차상으로는 염도 4%, 5%, 6% 맛에서 차이가 나타나지 않았지만 염도가 높을수록 패널들이 너무 짜다는 평가를 내렸고, 총점으로 볼 때 염도 4%가 5.3점으로 가장 높은 점수를 나타내었기 때문에, 최적염도를 4%로 정하였다.

Table 9. Sensory evaluation of Flounder sikhe stored at 10℃ for 14days

Treatment	Flavor	Taste	Color	Texture	Overall acceptance
Salinity 2%	2.0 ± 0.1 ^a	2.7 ± 0.8 ^a	3.6 ± 1.2 ^a	3.3 ± 1.3 ^a	1.7 ± 0.9 ^a
Salinity 3%	2.3 ± 1.3 ^{ab}	3.5 ± 1.1 ^a	3.4 ± 1.2 ^a	4.3 ± 1.5 ^a	3.3 ± 0.5 ^b
Salinity 4%	3.6 ± 2.2 ^b	5.2 ± 1.9 ^b	3.7 ± 1.3 ^a	4.6 ± 1.4 ^a	5.3 ± 1.0 ^c
Salinity 5%	3.4 ± 1.4 ^b	4.7 ± 1.5 ^b	3.3 ± 1.4 ^a	4.3 ± 1.2 ^a	4.9 ± 0.5 ^c
Salinity 6%	3.2 ± 1.2 ^b	4.3 ± 1.6 ^b	3.7 ± 1.2 ^a	4.5 ± 1.3 ^a	4.8 ± 0.3 ^{bc}

Values with different superscripts in the same row are significantly at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

(3) 고춧가루첨가량에 따른 가자미식해의 품질특성의 변화

가자미식해의 최적 고춧가루 첨가량을 확인하기 위해 1단계와 2단계에서 표준화한 숙성온도, 숙성기간, 염도의 값을 고정시킨 후 고춧가루 첨가량을 7, 9, 11%로 각기 달리하여 제조한 후 관능평가 및 품질 특성의 변화를 관찰하였다.

(가) 숙성기간 중 pH의 변화 (고춧가루첨가량별)

고춧가루함량을 7%, 9%, 및 11%로하고 식염농도 4%에서 온도 10℃로 숙성한 가자미식해의 pH변화는 Fig 3과 같다. 고춧가루 첨가량을 달리하면 pH가 전체적으로 큰 차이를 보이지는 않았으나 고춧가루함량이 높아질수록 pH는 더 빨리 낮아지는 경향을 보였다.

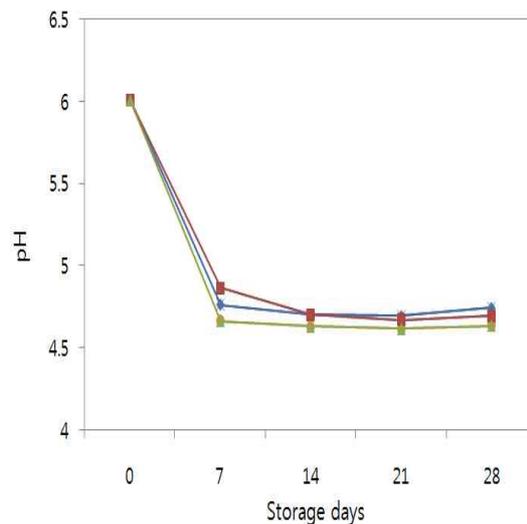


Fig 11. Change of the pH of the Flounder sikhae during storage at 10°C for 10 days. ◆, chili powder 7% added of Flounder sikhe; ■, chili powder 9% added of Flounder sikhae; ▲, chili powder 11% added of Flounder sikhe.

(나) 숙성시간 중 휘발성염기질소(VBN)함량의 변화(고춧가루첨가량별)

가자미식해의 고춧가루함량 각각 7%, 9% 및 11%로 하여 모든 시료 식염농도를 4%로하고 10℃에서 숙성 저장하면서 VBN함량의 변화를 조사한 것은 Fig 7과 같다. 초기 모든 시료에서 VBN함량은 8.00~8.02 mg/100g 정도로 나타났다. 이후 숙성저장 14일차부터 고춧가루 11%첨가 시료에서 VBN함량은 28.01 mg/100g으로 가장 높게 나타났고, 숙성저장 마지막차인 28일차까지도 51.21mg/100g로 다른 시료들에 비해 높은 수준으로 나타났다. 또한 고춧가루 7%와 9%첨가 시료에서도 고춧가루첨가 함량이 더 높은 9%첨가 시료에서 VBN함량이 47.13 mg/100g으로 7%첨가 시료 43.84 mg/100g에 비해서 더 높게 나타나는 경향을 보여주었다. 이것은 부재료인 고춧가루에 일반적으로 균이 많다고 보고되어지고 있는데 이것으로 인하여 가자미식해의 숙성과 부패를 촉진한 것으로 보여진다.

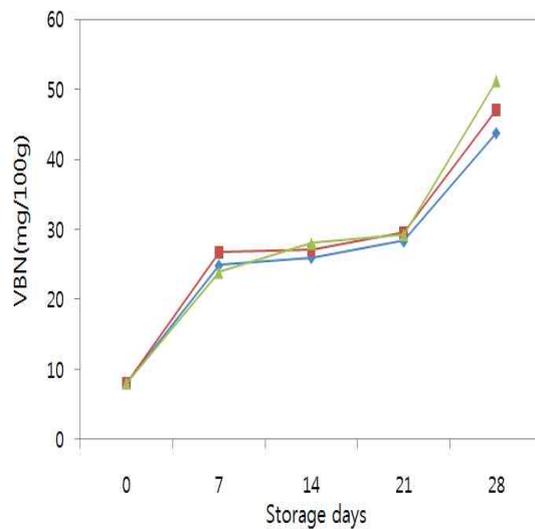


Fig 12. Changes of the volatile basic nitrogen (VBN) of the Flounder sikhe during storage at 10℃ for 10 days. ◆, chili powder 7% added of Flounder sikhe; ■, chili powder 9% added of Flounder sikhe; ▲, chili powder 11% added of Flounder sikhe.

(다) 숙성기간 중 아미노태질소 함량의 변화(고춧가루첨가량별)

가자미식해의 고춧가루함량별로 각각 7%, 9% 및 11%의 시료를 식염농도4%에 숙성저장기간 28일동안 10℃에서 아미노태질소 함량의 변화는 Fig. 11과 같다. 숙성저장 7일차에 시료 7%, 11%의 아미노태질소 함량은 각각 184.48 mg/100 g, 181.53 mg/100 g 유의적인 차이가 없었고 고춧가루첨가 9%의 194.71 mg/100 g 다른 시료에 비해 약간 높은 수치를 나타냈고 유의적으로 차이가 나타났다. 시료 특성상 여러 가지 조건으로 인하여 균등하게 숙성되지 않아 구간별로 아미노태질소 함량의 수치가 다소 안정하지 못하였다. 또한 숙성저장 21-28일차에 전체적인 시료의 아미노태질소 함량이 시판가자미식해와 비슷한 수준으로 나타났다.

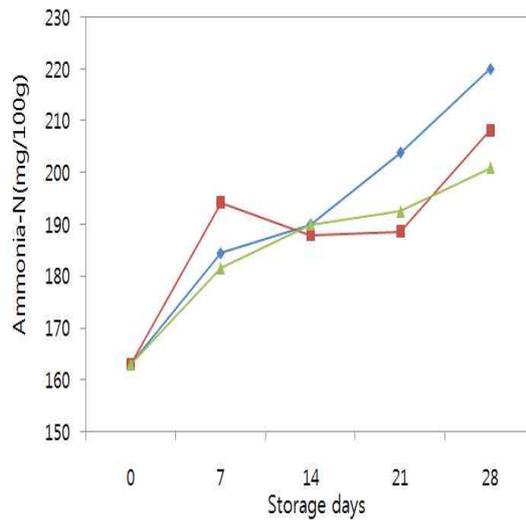


Fig 13. Changes of the Ammonia-N of the Flounder sikhe during storage at 10℃ for 10 days. ◆, chili powder 7% added of Flounder sikhe; ■, chili powder 9% added of Flounder sikhe; ▲, chili powder 11% added of Flounder sikhe.

(라) 숙성기간 중 총균수의 변화(고춧가루첨가량별)

Fig. 19을 보면 고춧가루첨가량을 달리한 가자미식해의 총균수의 변화를 알 수 있다. 고춧가루첨가량을 7%, 9%, 11% 각각 달리한 가자미식해의 총균수는 숙성저장 14일차까지는 총균수가 유의적으로 시료간에 차이가 나타나지 않았으나 21일차 이후부터는 고춧가루 11%가 첨가된 가자미식해에서 총균수의 증가가 다른 시료들에 비해서 더 많이 증가하였으며 이는 고춧가루 차체 내의 균이 많아서 나타난 결과라고 예측된다.

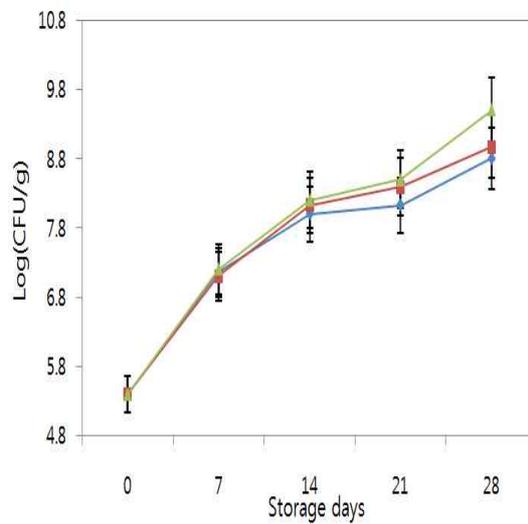


Fig. 14. Changes of the total viable cells of the Flounder sikhe during storage at 10°C for 10 days. ◆, chili powder 7% added of Flounder sikhe; ■, chili powder 9% added of Flounder sikhe; ▲, chili powder 11% added of Flounder sikhe.

(마) 숙성기간 중 유산균수의 변화(고춧가루첨가량별)

Fig. 23, 24를 보면 고춧가루첨가량과 마늘첨가량을 달리한 가자미식해의 유산균수의 변화를 알 수 있다. 0-28일차까지 각각의 시료의 유산균수의 변화에 차이는 유의적으로 나타나지 않았으며, 고춧가루첨가량 7%와 마늘첨가량 4%의 가자미식해에서 유산균수가 약간 높게 나타남을 알 수 있었다.

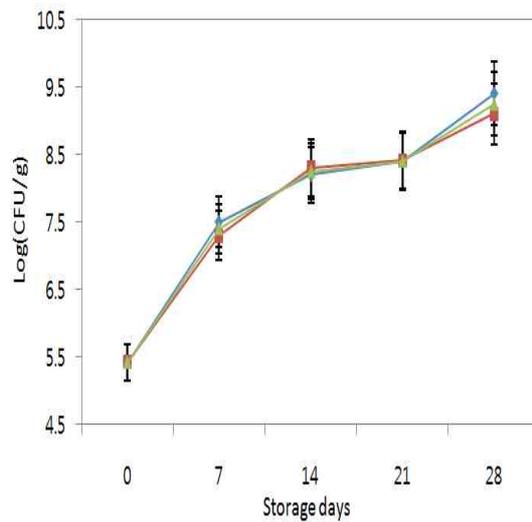


Fig. 23. Changes of total viable lactic acid bacteria of the Flounder sikhe during storage at 10°C for 10 days. ◆, chili powder 7% added of Flounder sikhe; ■, chili powder 9% added of Flounder sikhe; ▲, chili powder 11% added of Flounder sikhe.

(바) 고춧가루첨가량별 10℃에서 14일간 숙성한 가자미식해의 관능검사

1단계와 2단계에서 표준화 조건으로 정한 숙성온도 10℃, 숙성기간 14일, 염도 4%를 조건으로 하여 고춧가루의 첨가량을 달리하여 가자미식해를 제조한 관능평가는 Table 5와 같다. 향과 조직감에서는 고춧가루첨가량 7%, 9% 및 11%에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 맛에서는 고춧가루 9%를 첨가한 가자미식해가 5.9점으로 가장 높은 점수를 받았으며, 고춧가루 7%가 3.2점으로 가장 낮은 평가를 받았다. 또한 색에서 고춧가루 7%가 4.8점으로 가장 낮은 점수를 받았으며, 색이 너무 연하여 낮은 점수를 받은 것으로 사료된다. 총점으로 보았을 때 고춧가루 9%가 5.8점으로 가장 높은 점수를 나타내었으며, 다른 시료들과 비교했을 때 유의적으로도 차이를 나타내었다.

Table 10. Sensory evaluation of Flounder sikhe stored at 10℃ for 14days

Treatment	Flavor	Taste	Color	Texture	Overall acceptance
Red papper powder 7%	5.6±0.8 ^a	3.2±0.6 ^a	4.8±0.5 ^a	4.9±0.5 ^a	4.6±0.6 ^a
Red papper powder 9%	5.4±0.6 ^a	5.9±0.2 ^c	6.7±0.6 ^b	5.2±0.7 ^a	5.8±0.2 ^c
Red papper powder 11%	5.2±1.0 ^a	4.6±0.4 ^b	6.5±0.8 ^b	4.8±0.9 ^a	5.2±0.2 ^b

^{a-c}Values with different superscripts in the same row are significantly at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(4) 마늘첨가량을 달리한 가자미식해의 품질 특성

앞에서 표준화한 숙성저장 온도 10℃에서 숙성저장일 14일, 염도 4%, 고춧가루첨가량 9%를 기본값으로 고정하고 마늘 첨가량 2, 4, 6%로 각각 달리하여 가자미식해를 제조하였다.

(가) 숙성기간 중 pH의 변화 (마늘첨가량별)

반대로 마늘첨가량을 달리한 가자미식해에서는 숙성저장 기간 동안 유의적인 차이는 나타나지 않았지만 pH가 6.01-4.70으로 마늘 6%의 시료에서 pH변화가 가장 적게 일어나는 것을 보여주었다.

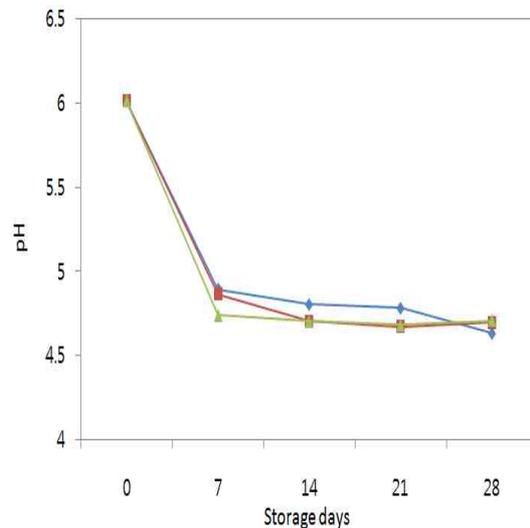


Fig 15. Change of the pH of the Flounder sikhe during storage at 10℃ for 10 days. ◆, garlic 2% added of squid sikhe; ■, garlic 4% added of Flounder sikhe; ▲, garlic 6% added of Flounder sikhe.

(나) 숙성기간 중 휘발성염기질소(VBN)함량의 변화(마늘첨가량별)

가자미식해의 마늘함량을 각각 2%, 4%, 6%로 하였고 모든 시료의 염도는 4%, 고춧가루함량은 9%로 하여 10℃에서 28일간 숙성저장 하였고 Fig. 8과 같다. 숙성저장 7일차부터 마늘첨가량이 가장 높은 6%인 가자미식해에서 VBN함량이 21.59 mg/100g으로 가장 낮은 수치를 나타냈으며, 나머지 2% 및 4%의 마늘을 첨가한 가자미식해에서는 유의적으로 차이는 없지만 각각 27.62 mg/100g, 26.78 mg/100g의 VBN함량은 나타났다. 숙성저장 마지막차인 28일차까지도 모든 시료 간에 유의적인 차이를 보이면서 VBN함량이 증가하였고, 마늘첨가량이 가장 높은 6%첨가 시료에서 VBN함량이 23.60 mg/100g으로 가장 낮은 수치를 보여 주었다. 이는 마늘이 다량의 페놀 화합물과 플라보노이드를 함유하고 있어 VBN의 생성 및 단백질의 변성을 억제시키기 때문이라고 하였는데 본 실험과 같은 결과를 보여준다. 하지만, 마늘첨가 6%의 시료는 숙성기간을 너무 연장시키고 관능검사를 통하여 비교하여 본 결과 마늘 향과 맛이 강하여 낮은 점수를 나타내었다. 그래서 본 실험을 통하여 관능검사 점수가 가장 높고 저장성이 높은 마늘 4%첨가 시료가 가장 적절하다고 결정하였다.

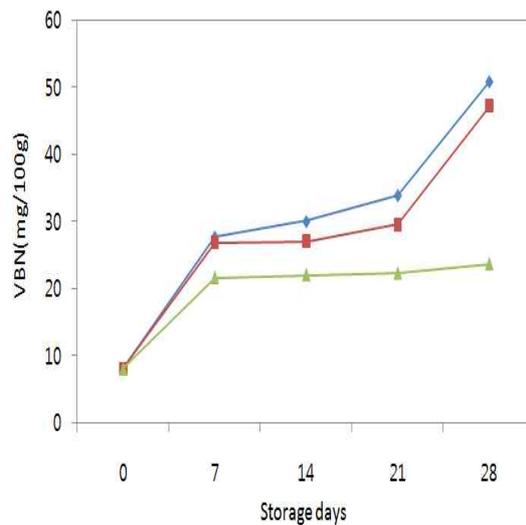


Fig 16. Changes of the volatile basic nitrogen (VBN) of the Flounder sikhe during storage at 10℃ for 10 days. ◆, garlic 2% added of Flounder sikhe; ■, garlic 4% added of Flounder sikhe; ▲, garlic 6% added of Flounder sikhe.

(다) 숙성기간 중 아미노태질소 함량의 변화(마늘첨가량별)

가자미식해의 마늘함량을 2%, 4%, 6%로 하여 28일간 염도 4%, 숙성저장 온도를 10℃로 하여 아미노태질소 함량의 변화를 측정할 결과 Fig. 12와 같다. 숙성저장 7일차에 마늘첨가량 4%의 시료에서 아미노태질소 함량이 194.17 mg/100g 가장 높았고 14일차 이후로는 마자막 28일차까지 가장 낮은 아미노태질소 함량을 나타냈다. 전체적인 아미노태질소 함량은 비슷하였고 관능검사를 통하여 가자미식해의 맛과 향 등에서 가장 점수가 높은 마늘첨가 4%의 시료가 가장 적절한 것으로 알 수 있었고, 마늘첨가량 4%첨가 가자미식해의 적정 숙성기간을 21일차로 볼 때 그 함량은 188.62-208.22 mg/100g 정도로 예측 할 수 있었다.

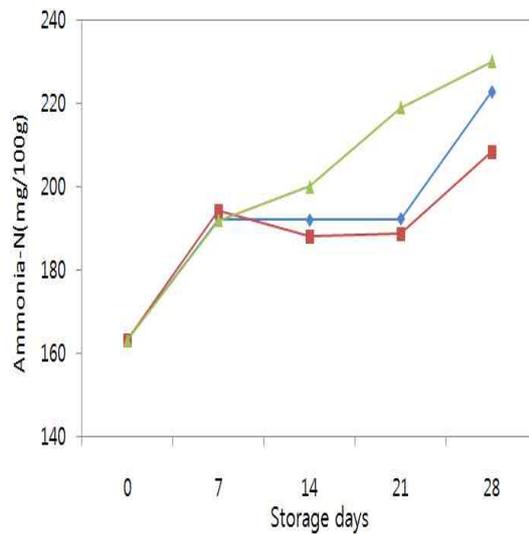


Fig 17. Changes of the Ammonia-N of the Flounder sikhe during storage at 10℃ for 10 days. ◆, garlic 2% added of Flounder sikhe; ■, garlic 4% added of Flounder sikhe; ▲, garlic 6% added of Flounder sikhe.

(라) 숙성기간 중 총균수의 변화(마늘첨가량별)

마늘첨가량을 달리한 가자미식해의 총균수의 변화를 Fig 20에 나타냈었다. 마늘첨가 6%의 가자미식해에서 숙성저장 0~28일까지 총균수가 5.01~8.9 Log(CFU/g)으로 마늘첨가 2%, 4%에 비하여 가장 적었지만, 관능검사와 병행하여 실험해 본 결과 총점에서 마늘의 향과 맛이 강하여 낮은 점수를 받았고 총균수가 유의적으로 마늘첨가 4%와 비교해 볼 때 유의적인 차이가 나타나지 않았으므로 관능검사 총점이 높은 마늘첨가량을 4%로 정하였다.

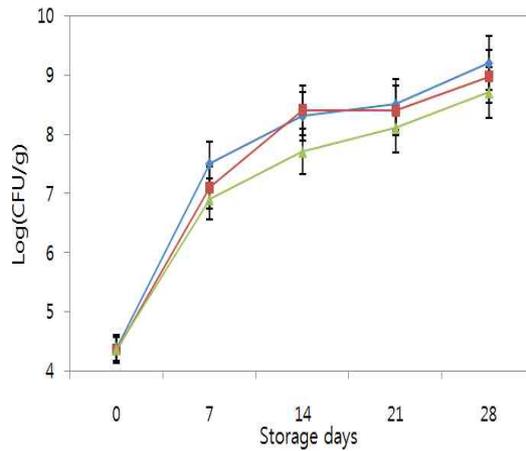


Fig 18. Changes of the total viable cells of the Flounder sikhie during storage at 10°C for 10 days. ◆, garlic 2% added of Flounder sikhie; ■, garlic 4% added of Flounder sikhie; ▲, garlic 6% added of Flounder sikhie.

(마) 숙성기간 중 유산균수의 변화(마늘첨가량별)

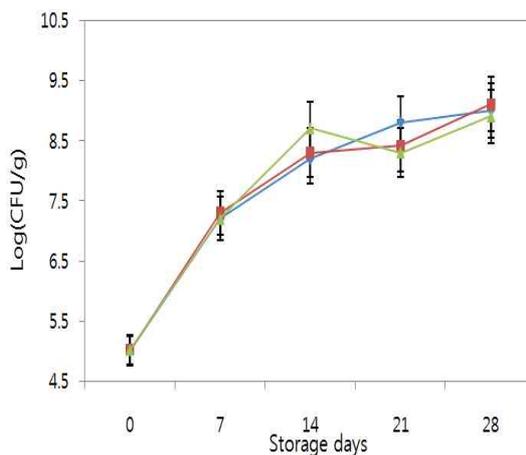


Fig 19. Changes of the total viable lactic acid bacteria of the Flounder sikhie during storage at 10°C for 10 days. ◆, garlic 2% added of Flounder sikhie; ■, garlic 4% added of Flounder sikhie; ▲, garlic 6% added of Flounder sikhie.

(바) 마늘첨가량별 10℃에서 14일간 숙성한 가자미식해의 관능검사

상기에서 실시한 1단계, 2단계, 3단계 가자미식해의 표준화한 제조 공정인 숙성온도 10℃, 숙성기간 14일, 염도 4%, 고춧가루함량 9%를 바탕으로하여 마늘첨가량을 2%, 4%, 6%로 각각 달리하여 가자미식해를 제조하였다. 향에서는 4.6~5.0점으로 시료들간의 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 맛에서는 마늘첨가량 4%가 5.4점으로 가장 높은 점수를 받았고 2%가 5.2점으로 두 번째로 높았다. 색과 조직감에서는 마늘첨가량 4%와 6%가 높았고 서로간의 유의적인 차이는 없었다. 총점으로 마늘첨가량 4%가 5.1점으로 가장 높았기 때문에 최적마늘첨가량을 4%로 정하였다.

Table 10. Sensory evaluation of Flounder sikhe stored at 10℃ for 14days

Treatment	Flavor	Taste	Color	Texture	Overall acceptance
garlic 2%	5.0 ± 1.0 ^a	5.2 ± 0.5 ^b	5.1 ± 0.2 ^a	4.4 ± 0.3 ^a	4.9 ± 0.1 ^a
garlic 4%	4.6 ± 0.5 ^a	5.4 ± 0.3 ^{bc}	5.5 ± 0.4 ^b	5.0 ± 0.4 ^b	5.1 ± 0.2 ^b
garlic 6%	4.6 ± 0.4 ^a	4.0 ± 0.5 ^a	5.8 ± 0.7 ^b	5.4 ± 0.9 ^b	4.9 ± 0.4 ^{ab}

Values with different superscripts in the same row are significantly at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

(사) 부재료 배합비 표준화 설정

가자미식해를 관능검사와 이화학적, 미생물학적 실험을 통하여 분석한 결과 숙성온도 조건에서 pH와 VBN함량을 통하여 15℃ 시료는 급격한 부패가 일어남을 확인하였는데, 곡류에 의한 미생물의 활성 증가에 따라 유기산이 많이 생산되는 것이 원인이라고 보여진다. 이에 따라 고온에서의 발효 및 유통은 식해의 품질을 급속히 저하시키기 때문에 가자미식해는 저온에서 발효 및 유통이 이루어져야 된다고 판단되었다. 그런데, 5℃ 숙성시료는 숙성의 속도가 너무 오래 걸리는 경향이 있기 때문에 가자미식해제조의 최적온도는 10℃로 결정하였고 시판가자미식해와 이화적이나 미생물적으로 비슷한 숙성도를 나타낸 21일차를 숙성 적정기간으로 판단하였다. 식염농도 2%, 3% 시료에서는 VBN, 아미노태질소 함량과 pH를 조사해 본 결과 숙성이 빨리 되고 금방 부패하는 경향이 있었고, 식염농도 4%, 5%, 6%등의 가자미식해들은 완만한 숙성결과를 보여주었다. 또 관능검사 결과 식염농도 5%, 6% 가자미식해는 관능적으로 너무 짜서 낮은 점수를 받았으며, 식염농도 4%인 가자미식해가 5.3점으로 가장 좋은 평가를 받았기 때문에 가자미식해의 염도를 4% 정하였다.

고춧가루함량에 있어서는 관능적으로 판단해 볼 때 고춧가루 9%첨가 시료가 총점 5.8점으로 가장 좋았으며 이화학적 미생물적으로 고춧가루 11%첨가 시료에 비해 고춧가루 9% 첨가 시료의 숙성저장 기간이 가장 좋았기 때문에 고춧가루 9%첨가를 최적고춧가루 첨가량으로서 결정 선택하였다. 마늘함량별 제조 가자미식해 중에서는 관능검사로 판단 했을 때 마늘 4% 첨가가 적합한 것으로 총점 5.1점으로 가장 좋았고, VBN함량이 마늘 6%첨가 가자미식해제품에 비해 빠른 증가가 일어났지만 적정 숙성일을 21일차로 볼 때 시판가자미식해와 비슷한 수준 이었으며 6%의 마늘첨가 가자미식해는 숙성저장기간이 너무 길어지는 경향이 있었다. 결과적으로 숙성저장 온도 10℃에서 숙성저장일 14일, 염도 4%, 고춧가루첨가량 9%, 마늘첨가량 4%의 첨가 숙성공정이 가자미식해 가공 표준화 생산조건인 것으로 판단하여 결론을 내렸다.

라. 명태식해의 제조공정 표준화

(1) 재료 및 방법

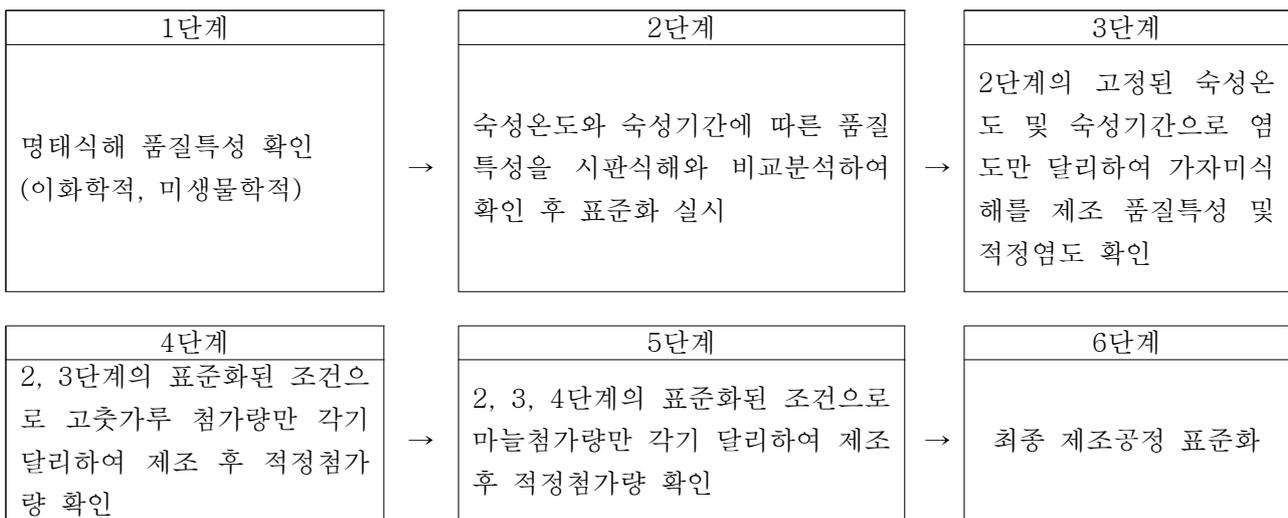
(가) 재 료

본 연구에 명태식해 제조시에 시료명태(*Theragra chalcogramma*, 원산지, 대한민국)는 강릉시 중앙시장에서 구입하여 사용하였고, 시험용명태식해의 염장에 사용한 소금은 천일염(해표(주), 국내산)을 이용하였고, 당장용 첨가제는 백설탕(홈플러스(주), 국내산)을 이용하였고, 나머지 부재료로서는 고춧가루(해찬들(주), 국내산), 마늘(신야원, 국내산), 생강(농협, 국내산), 미원(대상(주), 국내산), 기장쌀(홈플러스(주), 국내산)등 강릉시 소재 농협 하나로마트에서 각각 구입하여 사용하였다.

(나) 명태식해 제조

시료의 제조 공정은 명태 내장 및 머리와 지느러미를 제거한 후 몸통육 적당한 크기(가로×세로, 6×6)로 세절한 후 24시간 염장(천일염20%)하여 세척하고, 2시간 탈수 후 명태원물에 원물 대비 고춧가루 11%, 마늘 4%, 생강 1.6%, 미원 0.83%, 설탕 3.32%, 좁쌀 4.5%를 넣고 버무려 양념한 후 용기에 담아 숙성하였다. 실험방법에 따라 온도별 실험의 시료는 숙성만 5℃, 10℃, 15℃에서 달리하여 제조하였고, 염도별실험 시료는 염도 2%, 3%, 4%, 5%, 및 6%로 달리하여 제조하였다. 부재료별 시료의 제조는 고춧가루함량별 실험 시료는 고춧가루 9%, 11%, 및 13% 첨가하여 제조하였고, 마늘함량별 실험 시료는 마늘 2%, 4%, 및 6%로 첨가 제조하여 실험에 사용하였다.

(다) 연구방법



(라) 발효조건 최적화 가자미식해의 품질특성 확인 실험법은 상기 “가” 시판가자미식해 품질특성 “(2)” 재료 및 방법, “(가),(나), (다), (마), (바), (사)” 와 같이 실시하였다.

(2) 숙성온도 및 숙성기간 따른 명태식해의 품질특성

(가) 숙성기간 중 pH의 변화(온도별)

명태식해의 숙성 온도에 따른 pH의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 초기 pH는 6.2-6.3 정도를 나타냈으며 온도가 높을수록 pH변화폭은 크게 나타났다. 5°C 에서 숙성한 명태식해는 0-20일까지 pH가 6.30-6.09로 비교적 안정하였으나 숙성이 빠르게 이루어지지 않았고 숙성 8일차까지 10°C 와 15°C 의 명태식해에서 pH의 유의적인 차이가 나타나지 않았지만 그 이후부터는 15°C 의 명태식해 pH급격히 낮아짐을 알 수 있었다. 이러한 이유로 숙성기간 중 pH변화폭이 안정하면서 숙성이 완만히 진행되는 10°C 를 적정온도로 정하였고, 관능검사와 병행하여 비교해 보면서 적정숙성 기간을 12~14일 정도로 예측 할 수 있었다.

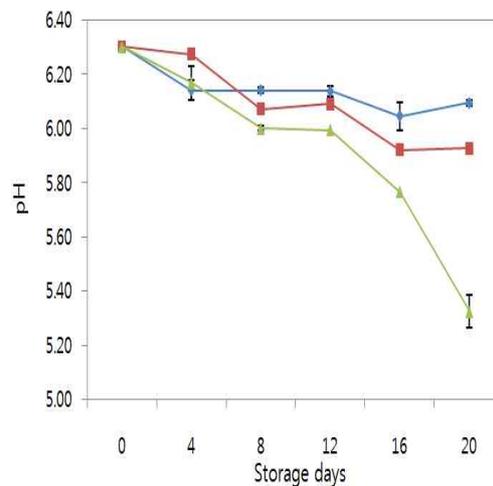


Fig 20. Changes of the pH of the Walleye pollock sikh during storage at 5°C, 10°C, 15°C for 15 days. ◆, Storage at 5°C; ■, Storage at 10°C; ▲, Storage at 15°C.

(나) 숙성기간 중 휘발성염기질소(VBN)함량의 변화(온도별)

명태식해의 숙성저장 온도에 따른 VBN의 변화를 Fig 5에 나타내었다. 초기 VBN함량은 10 mg/100g 정도였으며, 숙성저장온도 15℃의 명태식해 VBN함량 증가가 큰 폭으로 나타났으며, 숙성저장 8일부터 VBN함량이 35.33으로 시판명태식해 수준이 이르렀으며, 16일차부터 부패취가 나타나기 시작하였다. 5℃의 명태식해에서는 0-20일까지 VBN함량이 10.01-30.61mg/100g으로 초기숙성단계이거나 거의 숙성이 일어나지 않았고 pH와 비교해 볼 때 숙성온도로 적정치 않은 것을 알 수 있었다. 이 같은 이유로 pH와 VBN함량과 관능검사를 통하여 적정숙성온도가 10℃ 정도로 예측된다.

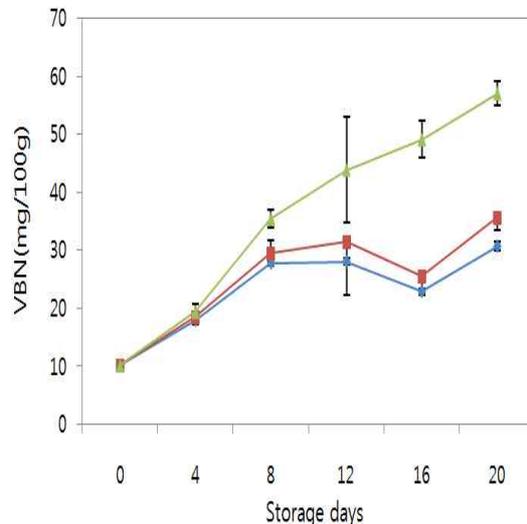


Fig 21. Changes of the volatile basic nitrogen (VBN) Walleye pollock sikhe products during storage at 5℃, 10℃, 15℃ for 15days. ●, Walleye pollock sikhe products during storage at 5℃; ■, Walleye pollock sikhe products during storage at 10℃; ◆, Walleye pollock sikhe products during storage at 15℃.

(다) 숙성기간 중 아미노태질소 함량의 변화(온도별)

아미노태질소량은 발효식품의 숙성도 지표로 이용될 뿐만 아니라 향미와 깊은 관련이 있기 때문에 중요한 품질 지표로 인식되고 있다. 본 연구에서는 명태식해의 온도별로 각각 5℃, 10℃, 15℃에서 10℃에 숙성저장 기간 중 아미노태질소 함량의 변화량을 조사한 것은 Fig 9와 같다. 숙성저장 5℃에서는 초기 아미노태질소 함량이 160 mg/100g 정도였으나 숙성저장 20일까지도 아미노태질소 함량의 증가가 거의 일어나지 않는 경향을 보여주었으며, 온도가 높을수록 아미노태질소함량이 급격히 증가하는 경향을 볼 수 있다.

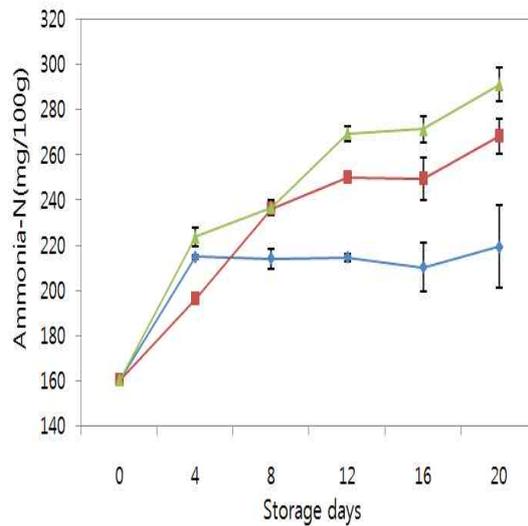


Fig 22. Changes of the Ammonia-N of the Walleye pollock sikhe products during storage at 5℃, 10℃, 15℃ for 15days. ◆, Walleye pollock sikhe products during storage at 5℃; ■, Walleye pollock sikhe products during storage at 10℃; ▲, Walleye pollock sikhe products during storage at 15℃.

(라) 숙성기간 중 총균수의 변화(온도별)

명태식해의 숙성저장 온도조건을 달리한 명태식해의 총균수의 변화를 Fig 13에 나타내었다. 온도가 높은 15°C의 숙성저장한 명태식해에서 총균수가 급격한 증가를 보였으며, 숙성저장 4일차부터 총균수가 5.52 Log(CFU/g)으로 다른 시료에 비해 높게 나타났다. 숙성저장 20일차에는 8.12 Log(CFU/g)으로 관능검사를 통하여 부패취를 확인하였고 초기부패가 시작되는 것을 알 수 있었다. 숙성 12까지 5°C와 10°C에 숙성저장한 명태식해의 총균수가 유의적인 차이를 보이지 않았으나 그 이후부터 10°C의 숙성저장한 명태식해에서 더 높은 총균수가 나타났다.

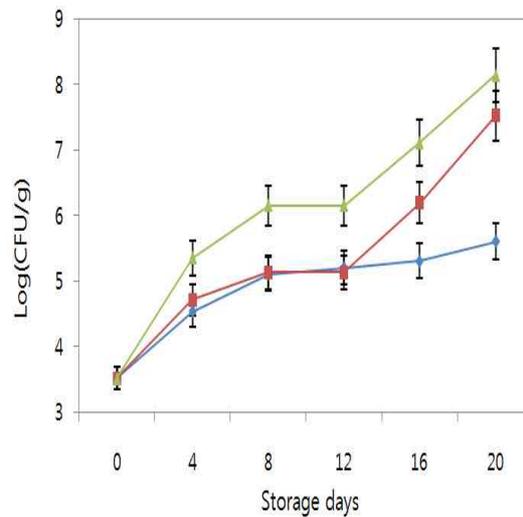


Fig. 23. Changes of the total viable cells of the Walleye pollock sikhe sikhe products during storage at 5°C, 10°C, 15°C for 15days. ◆, Walleye pollock sikhe sikhe products during storage at 5°C; ■, Walleye pollock sikhe sikhe products during storage at 10°C; ▲, Walleye pollock sikhe ikhe products during storage at 15°C.

(마) 숙성기간 중 유산균수의 변화(온도별)

유산균수의 변화는 총균수와 비슷한 경향을 보였으며, 숙성저장 온도를 달리한 명태식해의 유산균수의 변화를 Fig. 15에 나타내었다. 초기 유산균수는 3.21-3.41 Log(CFU/g) 정도를 나타냈으며, 숙성 4일차부터 시료간의 유산균수가 유의적인 차이를 나타내기 시작했다. 숙성저장 15°C의 명태식해는 0-20일간 유산균수가 3.41-8.01 Log(CFU/g)으로 급격한 증가를 나타냈으며, 5°C에 숙성저장한 명태식해는 10⁵이상으로 유산균수가 증가하지 못하였다. 10°C의 명태식해에서는 숙성 12-16일 사이에 10⁶정도로 시판명태식해의 유산균수와 비슷한 수준을 나타냈다

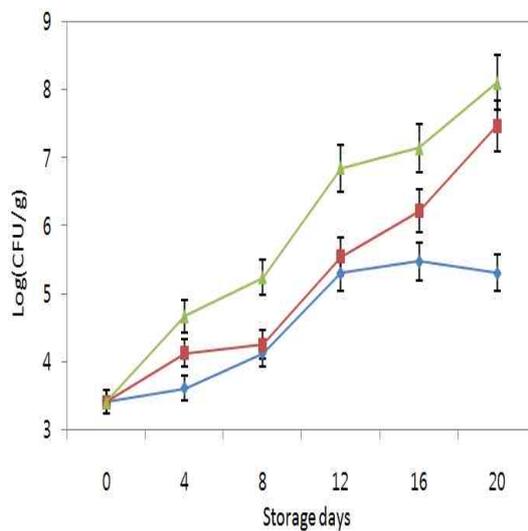


Fig 24. Changes of total viable lactic acid bacteria of the Walleye pollock r sikhe products during storage at 5°C, 10°C, 15°C for 15days. ◆, Walleye pollock sikhe products during storage at 5°C; ■, Walleye pollock sikhe products during storage at 10°C; ▲, Walleye pollock sikhe products during storage at 15°C.

(바) 숙성기간 중 관능평가

명태식해의 숙성기간 중 관능평가의 결과는 Table 11과 같다. 숙성온도는 5℃, 10℃, 15℃로 각각 달리하였으며, 4일마다 한번씩 관능평가를 하면서 총 16일간 확인하였다. 초기 0일차는 숙성이 되지 않았기 때문에 향과 맛 전체적인 면에서 낮은 평가가 나타났다. 5℃의 명태식해는 숙성 12일차까지 VBN함량이 30 mg/100g 이하였으며, 총 점이 4.56점으로 낮은 평가를 받았다. 이는 VBN함량으로 볼 때 아직 숙성이 완료되지 않아 풍미와 맛이 떨어져서 나타난 결과로 사료되며 이화학적평가와 비교해 볼 때와 마찬가지로 5℃는 숙성기간이 너무 길어져 숙성조건에 맞는 양은 것으로 생각된다. 반면 15℃의 경우는 숙성속도가 빨라서 8일차부터 35.33mg/100g 수준의 VBN함량을 나타냈고 관능평가 총점이 5.63점으로 5℃와 15℃의 다른 구간의 시료들에 비해 높은 점수를 받았다. 하지만 12일차부터 부패취나 나타나기 시작하여 향에서 3.49점으로 낮은 점수를 나타냈으며, 맛과 식감은 평가할 수가 없었다. 이런점을 이화적, 미생물학적 품질특성 결과와 비교해 볼 때, 급격한 숙성과 부패가 일어남을 확인하였고, 앞에서 서술하였듯이 적정숙성온도로서 불안정한 온도임을 확인 할 수 있었다. 반면에 숙성온도 10℃에서는 숙성기간이 지날수록 점점 관능점수가 서서히 증가함을 볼 수 있는데 숙성 12일차에서 맛과 향 모든면에서 높은 점수를 받았으며, 총점 또한 6.47점으로 가장 높은 점수를 나타내었다. 종합적으로 볼 때 숙성온도 10℃에서 숙성기간 약 12일 정도가 최적 구간으로 예측 할 수 있었고 이를 바탕으로 다음 연구를 진행하였다.

Table 11. Results on the sensory evaluation for storage and period condition of Walleye pollock *Sikhe*

sample No.	Variable Level Ingredient						Overall quality
	Factors		Flavor	Taste	Texture	Color	
	Temper-ature (°C)	Day					
1	5	0	4.15±0.14 ^c	2.15±0.88 ^a	5.60±0.36 ^{abcd}	5.13±1.57 ^a	4.26±1.32 ^b
2	5	4	4.50±0.27 ^{cd}	3.48±0.44 ^{abc}	4.67±0.45 ^a	5.11±1.24 ^a	4.44±0.60 ^b
3	5	8	5.40±0.30 ^{ef}	2.93±0.58 ^{ab}	4.98±0.19 ^{ab}	5.14±1.27 ^a	4.61±0.98 ^b
4	5	12	4.92±0.57 ^{de}	3.13±0.64 ^{ab}	5.00±0.40 ^{ab}	5.18±1.32 ^a	4.56±0.83 ^b
5	5	16	5.80±0.47 ^{fg}	3.91±0.37 ^{bc}	4.83±0.50 ^{ab}	5.16±1.52 ^a	4.93±0.68 ^b
6	10	0	4.11±0.09 ^c	2.15±0.88 ^a	5.60±0.36 ^{abcd}	5.11±1.36 ^a	4.24±1.32 ^b
7	10	4	4.90±0.16 ^{de}	2.59±0.39 ^{ab}	4.76±0.68 ^{ab}	5.23±1.35 ^a	4.37±1.04 ^b
8	10	8	5.50±0.28 ^{ef}	4.49±0.45 ^{cd}	5.60±0.35 ^{abcd}	5.22±1.55 ^a	5.21±0.43 ^b
9	10	12	7.05±0.21 ⁱ	6.99±0.50 ^f	6.49±0.45 ^d	5.34±1.11 ^a	6.47±0.69 ^b
10	10	16	6.56±0.27 ^{hi}	6.66±0.48 ^{ef}	6.04±0.23 ^{cd}	5.24±1.31 ^a	6.13±0.56 ^b
11	15	0	4.23±0.05 ^c	2.15±0.88 ^a	5.66±0.31 ^{abc}	5.19±1.41 ^a	4.31±1.35 ^b
12	15	4	5.15±0.06 ^{def}	3.69±0.41 ^{bc}	5.45±0.38	5.27±1.32 ^a	4.89±0.70 ^b
13	15	8	6.18±0.10 ^{gh}	5.60±0.47 ^{de}	5.60±0.25 ^{abcd}	5.14±1.22 ^a	5.63±0.37 ^b
14	15	12	3.49±0.45 ^b	-	-	5.26±1.21 ^a	4.38±0.88 ^a
15	15	16	1.53±0.45 ^a	-	-	5.20±1.23 ^a	3.37±1.83 ^a

^{a-c}Values with different superscripts in the same row are significantly at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

*Not sensory test

(3) 염농도를 달리한 명태식해의 품질특성의 변화

표준화한 숙성온도 및 숙성기간 10°C, 12일간의 조건으로 염도를 2%, 3%, 4%, 5% 및 6%로 달리하여 명태식해 관능평가를 실시하였고 총 20일간 숙성 중의 품질 특성의 변화를 확인하였다.

(가) 숙성 중 pH변화(염도별)

식염농도를 2%, 3%, 4%, 5% 및 6%로 달리하여 명태식해의 숙성기간 중 pH변화를 Fig. 1에 나타내었다. 식염농도가 높을수록 pH변화가 안정하였으며 식염농도 2%의 명태식해에서는 0-28 안 pH가 6.0-4.0으로 급격히 감소하였으며, 숙성저장 16일부터 부패가 진행되기 시작하였다. 식염농도 5%와 6%의 명태식해에서는 숙성 20일까지 pH가 5.5 이상으로 숙성이 진행되지 않거나 초기 숙성단계로 숙성기간이 너무 오래 걸리는 경향을 보였다. 이 실험을 통하여 pH의 변화가 안정하면서도 관능평가와 가장 좋은 수를 받는 염도 4%를 적정염도로 선택하였다.

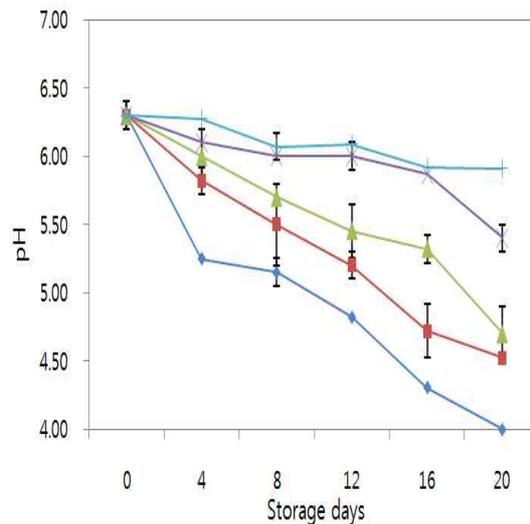


Fig 1. Changes of the pH of the different salinity Walleye pollock sikhe during storage at 10°C for 10 days. ◆, Salinity of 2% Walleye pollock sikhe; ■, Salinity of 3% Walleye pollock sikhe; ▲, Salinity of 4% Walleye pollock sikhe; ×, Salinity of 5% Walleye pollock sikhe ; +, Salinity of 6% Walleye pollock sikhe.

(나) 숙성 중 휘발성염기질소(VBN)함량의 변화(염도별)

식염농도를 달리한 명태식해의 VBN함량을 Fig. 2에 나타내었다. 식염농도 2%와 3%의 명태식해는 예상되는 빠른 숙성이 이루어져 숙성 14일부터 VBN함량이 50mg/100g 이상을 나타냈으며 초기부패가 일어났으며, 식염농도 5%와 6%는 14일부터 시판명태식해와 비슷한 40mg/100g정도의 VBN함량을 나타내었다.

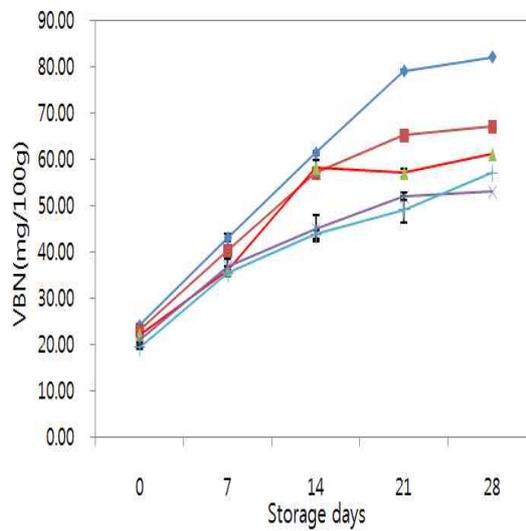


Fig 2. Changes of the volatile basic nitrogen (VBN) of the different salinity Walleye pollock sikhe during storage at 10°C for 10 days. ◆, salinity of 2% Walleye pollock sikhe; ■, salinity of 3% Walleye pollock sikhe; ▲, salinity of 4% Walleye pollock sikhe; ×, salinity of 5% Walleye pollock sikhe ; +, salinity of 6% Walleye pollock sikhe.

(다) 숙성 중 아미노태질소함량의 변화(염도별)

염도를 달리한 명태식해는 Fig. 3을 보면 알 수 있는데 숙성저장 7일까지 시료간에 아미노태질소 함량은 유의적으로 차이를 나타내지 않았지만 시간을 지날수록 염도가 낮은 명태식해에서 아미노태질소 함량의 증가 폭이 크게 나타났다.

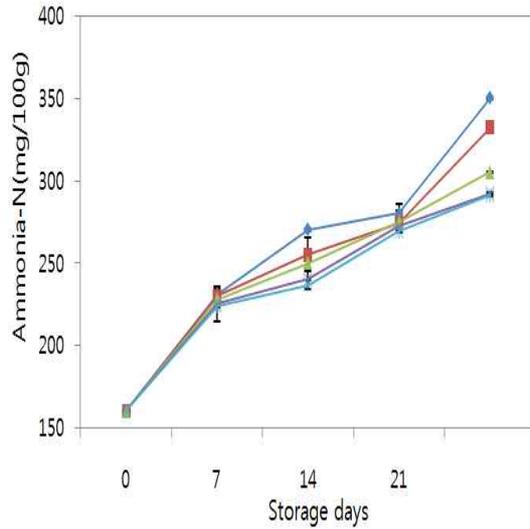


Fig 3. Changes of the the Ammonia-N of the different salinity Walleye pollock sikhe sikhe during storage at 10°C for 10 days. ◆, salinity of 2% Walleye pollock sikhe sikhe; ■, salinity of 3% Walleye pollock sikhe sikhe; ▲, salinity of 4% Walleye pollock sikhe sikhe; ×, salinity of 5% Walleye pollock sikhe sikhe ; +, salinity of 6% Walleye pollock sikhe sikhe.

(라) 숙성 중 총균수의 변화(염도별)

염도를 달리한 명태식해의 총균수의 변화를 Fig. 4에 나타내었다. 숙성저장 14일차까지 식염농도 6%의 명태식해에서는 시판명태식해에 미치지 못하는 10^4 CFU/g 정도의 총균수가 나타났고, 식염농도 2%, 3%, 4% 및 5%의 명태식해에서 10^6 CFU/g 이상으로 시판명태식해와 비슷한 수준의 총균수를 나타냈다. 식염농도 2%와 3%의 명태식해는 숙성 14일부터 급격한 총균수의 증가를 보였다.

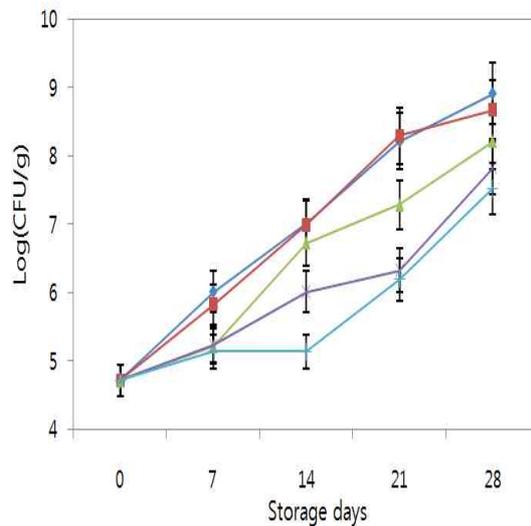


Fig 4. Changes of the total viable cells of the different salinity Walleye pollock sikhe during storage at 10°C for 10 days. ◆, salinity of 2% Walleye pollock sikhe; ■, salinity of 3% Walleye pollock sikhe; ▲, salinity of 4% Walleye pollock sikhe; ×, salinity of 5% Walleye pollock sikhe ; +, salinity of 6% Walleye pollock sikhe.

(마) 숙성 중 유산균수의 변화(염도별)

염도를 달리한 명태식해의 유산균수의 변화는 Fig. 5에 나타내었다. 식염농도가 증가함에 따라 유산균수가 비례적으로 낮은 경향을 보였으며, 숙성저장 14일차에 2%, 3% 및 4%에서 10^6 CFU/g이상의 유산균수를 보였으며, 시판명태식해와 비슷한 수준의 유산균수를 나타냈다. 식염농도 6%의 명태식해는 숙성저장 21일차까지도 시판명태식해에 미치지 못하는 유산균수를 나타냈으며, 숙성저장기간이 다른 시료들에 비해 상대적으로 긴 것을 판단 할 수 있었다.

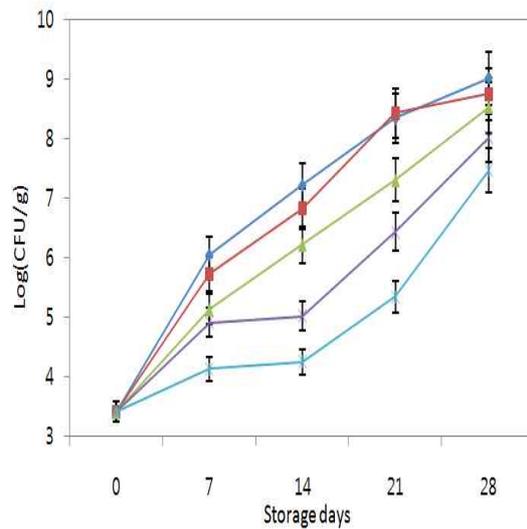


Fig 5. Changes of total viable lactic acid bacteria of the different salinity Walleye pollock sikhes during storage at 10°C for 10 days. ◆, salinity of 2% Walleye pollock sikhes; ■, salinity of 3% Walleye pollock sikhes; ▲, salinity of 4% Walleye pollock sikhes; ×, salinity of 5% Walleye pollock sikhes ; +, salinity of 6% Walleye pollock sikhes.

(바) 염도를 달리한 명태식해의 관능평가

식염농도 4%의 명태식해가 총점 6.5점으로 가장 높은 점수를 얻었다. 명태식해 염도 5%, 6%의 명태식해제품에서는 짠맛이 강하여 4.2-4.4점으로 염도 4%에 비해 낮은 점수를 받았으며 염도 2%와 3%의 명태식해제품은 약간의 비린향과 맛이 느껴져서 점수가 3.0-3.3점으로 낮았다.

Table. 4. Sensory evaluation of Walleye pollock sikhe stored at 10°C for 12days

Treatment	Flavor	Taste	Color	Texture	Overall acceptance
Salinity 2%	3.0 ± 1.1 ^a	3.7 ± 0.3 ^a	6.6 ± 1.0 ^a	4.3 ± 1.1 ^a	4.4 ± 0.9 ^a
Salinity 3%	3.3 ± 1.2 ^a	3.5 ± 1.2 ^a	6.4 ± 1.6 ^a	5.3 ± 1.4 ^{ab}	4.6 ± 0.5 ^a
Salinity 4%	5.6 ± 1.3 ^c	6.2 ± 1.1 ^c	6.7 ± 1.5 ^a	7.6 ± 1.5 ^c	6.5 ± 0.5 ^c
Salinity 5%	4.4 ± 1.1 ^{bc}	5.7 ± 0.5 ^{bc}	6.3 ± 1.1 ^a	6.3 ± 1.0 ^b	5.6 ± 0.5 ^b
Salinity 6%	4.2 ± 1.4 ^b	5.3 ± 0.2 ^b	6.7 ± 1.3 ^a	6.5 ± 1.2 ^b	5.6 ± 0.3 ^b

Values with different superscripts in the same row are significantly at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

(4) 고춧가루/마늘 첨가량을 달리한 명태식해의 품질 특성

(가) 숙성 중 pH 변화 (고춧가루/마늘 첨가량별)

고춧가루와 마늘의 첨가량을 달리하여 명태식해의 pH변화는 Fig. 1, 2를 보면 알 수 있는데 시료간에 pH변화에 유의적인 차이가 거의 나타나지 않았고, 고춧가루 13%첨가 명태식해에서 숙성 14일까지 pH의 변화가 조금 더 빠른 경향을 보였다.

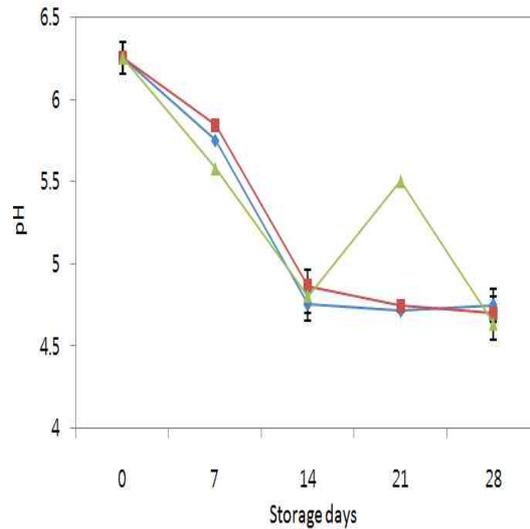


Fig 1. Changes of the pH of the Walleye pollock sikhe during storage at 10°C for 10 days. ◆, Chili powder 9 %added of Walleye pollock sikhe; ■, Chili powder 11% added of Walleye pollock sikhe; ▲, Chili powder 13% added of Walleye pollock sikhe.

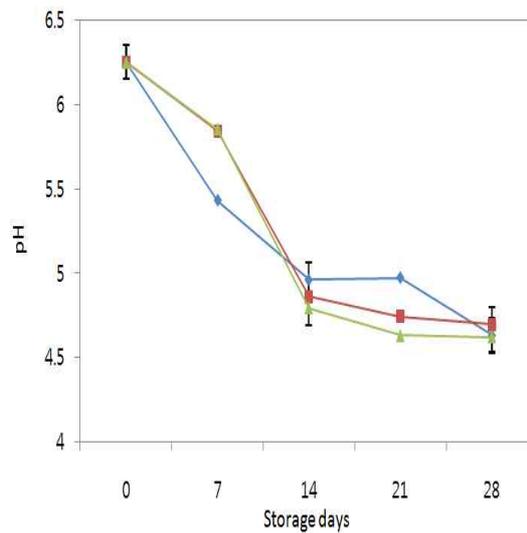


Fig 2. Changes of the pH of the Walleye pollock sikhe during storage at 10°C for 10 days. ◆, Garlic 2% added of Walleye pollock sikhe; ■, Garlic 4% added of Walleye pollock sikhe; ▲, Garlic 6% added of Walleye pollock sikhe.

(나) 숙성 중 휘발성염기질소(VBN)함량의 변화 (고춧가루/마늘첨가량별)

고춧가루첨가량을 달리한 명태식해의 VBN함량의 변화를 Fig. 3을 보면 알 수 있다. 숙성저장 7일부터 고춧가루 13%첨가 명태식해에서 VBN함량이 37.59mg/100g으로 시판명태식해 수준에 이르렀으며, VBN함량이 급격하게 증가하는 경향을 보였고 숙성 28일부터는 VBN함량이 48mg/100g으로 높은 VBN함량을 나타냈다. 고춧가루 11%를 첨가한 명태식해는 다른 시료들에 비해 안정적인 VBN함량의 변화를 보여 주었으며, 관능검사를 통하여 맛과 향에서 가장 높은 점수를 받았기 때문에 고춧가루 11%를 적정첨가량으로 정하였다. 마늘첨가량을 달리한 명태식해의 VBN함량의 변화는 Fig. 4에 나타내었다. 예상과 달리 마늘첨가 6%의 명태식해에서 VBN함량의 증가가 가장 크게 나타나 저장성이 좋지 않았으며, 마늘첨가 4%의 명태식해에서 0-28일 숙성기간동안 VBN함량의 변화가 8.92-32.72mg/100g으로 가장 안정적이었고, 관능검사를 통하여 마늘첨가 6%에서 마늘 맛과 향이 강해 낮은 점수를 받은 반면에, 마늘첨가 4%에 맛과 향에서 가장 높은 점수를 받았기 때문에 이 실험을 통하여 마늘첨가량을 4%로 정하였다.

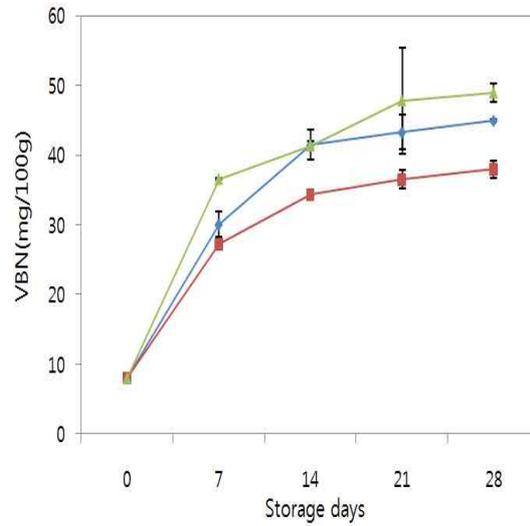


Fig 3. Changes of the volatile basic nitrogen (VBN) of the Walleye pollock sikhe during storage at 1 0°C for 10 days. ◆, chili powder 9% added of Walleye pollock sikhe; ■, chili powder 11% added of Walleye pollock sikhe; ▲, chili powder 13% added of Walleye pollock sikhe.

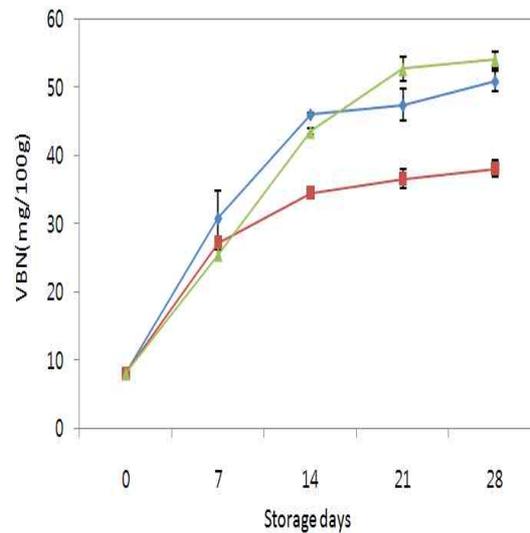


Fig 4. Changes of the volatile basic nitrogen (VBN) of the Walleye pollock sikhe during storage at 1 0°C for 10 days. ◆, garlic 2% added of Walleye pollock sikhe; ■, garlic 4% added of Walleye pollock sikhe; ▲, garlic 6% added of Walleye pollock sikhe.

(다) 숙성 중 아미노태질소함량의 변화(고춧가루/마늘첨가량별)

고춧가루첨가량을 달리한 명태식해의 아미노태질소 함량의 변화는 Fig. 5에 나타내었다. 숙성 14일까지 아미노태질소 함량이 210.21-228.23 mg/100g 정도로 시료간에 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 그 이후로 고춧가루 13%를 첨가한 명태식해에서 아미노태질소 함량이 급격하게 증가하는 것을 볼 수 있다. 마늘첨가량을 달리한 명태식해의 아미노태질소 함량은 Fig. 6에 나타내었는데 고춧가루첨가 시료와 비슷한 수준으로 숙성 14일차에 200 mg/100g 수준의 아미노태질소 함량을 나타냈으며, 시판명태식해와 비슷한 아미노태질소 함량을 나타내었다. 숙성저장 21부터 마늘첨가량에 따라 시료간의 아미노태질소 함량에 유의적인 차이가 나타났으며, 마늘첨가 2%의 명태식해에서 아미노태질소 함량의 증가가 크게 나타났다.

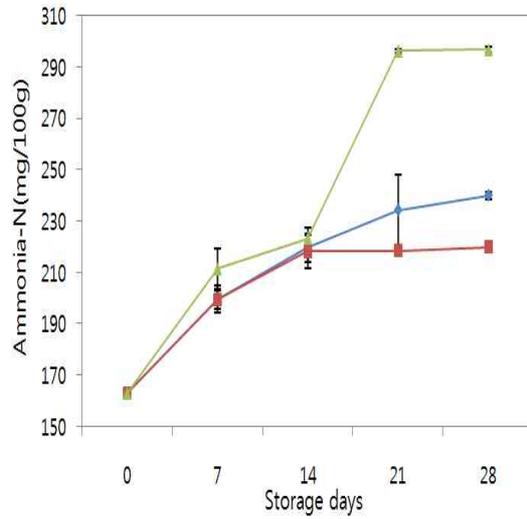


Fig 5. Changes of the Ammonia-N of the Walleye pollock sikhie during storage at 10°C for 10 days. ◆, chili powder 9% added of Walleye pollock sikhie; ■, chili powder 11% added of Walleye pollock sikhie; ▲, chili powder 13% added of Walleye pollock sikhie.

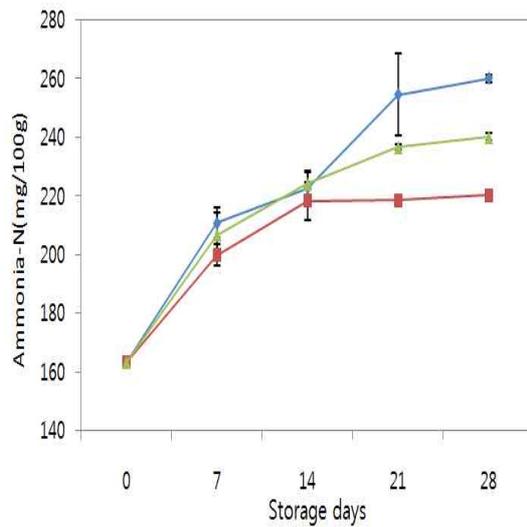


Fig 6. Changes of the Ammonia-N of the Walleye pollock sikhie during storage at 10°C for 10 days. ◆, garlic 2% added of Walleye pollock sikhie; ■, garlic 4% added of Walleye pollock sikhie; ▲, garlic 6% added of Walleye pollock sikhie.

(라) 명태식해의 부재료 첨가별 관능평가

명태식해의 부재료 첨가량별 제조 후 14일차에 실시한 관능검사 결과는 Table 1, 2과 같다. 숙성된 명태식해를 15명의 관능요원에 의해 9점법으로 관능검사를 실시하였다. 고춧가루첨가량을 달리한 명태식해제품에서는 고춧가루 11%첨가 명태식해제품에서 총점 5.6점으로 가장 높은 점수를 받았는데 고춧가루 13%로 명태식해제품에서는 고춧가루함량이 높아 고춧가루 향과 맛이 강하여 낮은 점수를 받았다. 마늘첨가량을 달리한 마늘 4%첨가 명태식해제품이 총점 6.1점으로 가장 높은 점수를 받았고 맛과 향에서 높은 점수를 얻었다. 맛에서는 마늘 2%와 4%첨가 명태식해제품의 점수가 유의적인 차이가 나타나지 않았으며 색과 Texture에서도 모든 명태식해제품에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

Table 1. Sensory evaluation of Walleye pollock sikhe stored at 10°C for 12days.

Treatment	Flavor	Taste	Color	Texture	Overall acceptance
chili powder 9%	5.6±0.8 ^a	3.7±0.6 ^a	5.8±0.5 ^a	5.1±0.5 ^a	5.0±0.6 ^a
chili powder 11%	5.4±0.6 ^a	5.1±0.2 ^c	6.7±0.6 ^b	5.2±0.7 ^a	5.6±0.2 ^b
chili powder 13%	4.2±1.0 ^a	4.4±0.4 ^b	6.5±0.8 ^b	5.1±0.9 ^a	5.0±0.2 ^a

Values with different superscripts in the same row are significantly at p<0.05 by Duncan's multiple range test

Table 2. Sensory evaluation of Walleye pollock sikhe stored at 10°C for 12days.

Treatment	Flavor	Taste	Color	Texture	Overall acceptance
garlic 2%	5.0 ± 1.0 ^a	6.2 ± 0.5 ^b	6.1 ± 0.2 ^a	5.2 ± 0.3 ^a	5.6 ± 0.1 ^a
garlic 4%	6.6 ± 0.5 ^b	6.4 ± 0.3 ^b	6.2 ± 0.4 ^a	5.4 ± 0.4 ^a	6.1 ± 0.2 ^b
garlic 6%	4.6 ± 0.4 ^a	5.2 ± 0.5 ^a	6.2 ± 0.7 ^a	5.2 ± 0.9 ^a	5.3 ± 0.4 ^a

Values with different superscripts in the same row are significantly at p<0.05 by Duncan's multiple range test

(마)부재료 배합비 표준화 설정

명태식해를 관능검사와 이화학적, 미생물학적 실험을 통하여 분석한 결과 숙성온도 조건에서 pH와 VBN함량을 통하여 15℃ 시료는 급격한 부패가 일어남을 확인하였는데, 곡류에 의한 미생물의 활성 증가에 따라 유기산이 많이 생산되는 것이 원인이라고 보여진다. 이에 따라 고온에서의 발효 및 유통은 식해의 품질을 급속히 저하시키기 때문에 명태식해는 저온에서 발효 및 유통이 이루어져야 된다고 판단되었다. 그런데, 5℃ 숙성시료는 숙성의 속도가 너무 오래 걸리는 경향이 있기 때문에 명태식해제조 최적온도는 10℃로 결정하였고 시판명태식해와 이화적이나 미생물적으로 비슷한 숙성도를 나타낸 14일차를 숙성 적정기간으로 판단하였다. 식염농도 2%, 3% 시료에서는 VBN, 아미노태질소 함량과 pH를 조사해 본 결과 숙성이 빨리 되고 금방 부패하는 경향이 있었고, 식염농도 4%, 5%, 6%등의 명태식해들은 완만한 숙성결과를 보여주었다. 또 관능검사 결과 식염농도 5%, 6% 명태식해는 관능적으로 너무 짜서 낮은 점수를 받았으며, 식염농도 4%인 명태식해가 6.5점으로 가장 좋은 평가를 받았기 때문에 명태식해의 염도를 4% 정하였다.

고춧가루함량에 있어서는 관능적으로 판단해 볼 때 고춧가루 11%첨가 시료가 총점 5.6점으로 가장 좋았으며 이화학적 미생물적으로 고춧가루 13%첨가 시료에 비해 고춧가루 11% 첨가 시료의 숙성저장 기간이 가장 좋았기 때문에 고춧가루 11%첨가를 최적고춧가루 첨가량으로서 결정 선택하였다. 마늘함량별 제조 명태식해 중에서는 관능검사로 판단 했을 때 마늘 4% 첨가가 적합한 것으로 총점 6.1점으로 가장 좋았고, VBN함량이 마늘 6%첨가 명태식해제품에 증가폭이 적었고 적정 숙성일을 14일차로 볼 때 시판명태식해와 비슷한 수준 이였으며 6%의 마늘첨가 명태식해는 숙성저장기간이 짧아지는 경향이 있었다. 결과적으로 숙성저장 온도 10℃에서 숙성저장일 14일, 염도 4%, 고춧가루첨가량 11%, 마늘첨가량 4%의 첨가숙성공정이 명태식해 가공 표준화 생산조건인 것으로 판단하여 결론을 내렸다.

마. 오징어식해의 제조공정의 표준화

(1) 재료 및 방법

(가) 재 료

본 연구에 사용한 대조군인 시판오징어식해는 속초시 정이푸드빌, 고바우식품에서 각각 구매하여 사용하였고, 연구시료용 오징어식해 제조시에 시료오징어(*Todarodes paxificus*, 원산지, 대한민국)는 강릉시 중앙시장에서 구입하여 사용하였고, 시험용오징어식해의 염장에 사용한 소금은 천일염(해표(주), 국내산)을 이용하였고, 당장용 첨가제는 백설탕(홈플러스(주), 국내산)과 물엿(오뚜기(주), 국내산)을 이용하였고, 나머지 부재료로서는 고춧가루(해찬들(주), 국내산), 마늘(신야원, 국내산), 생강(농협, 국내산), 미원(대상(주), 국내산), 무우(농협, 국내산), 좁쌀(홈플러스(주), 국내산)등 강릉시 소재 농협 하나로마트에서 각각 구입하여 사용하였다.

(나) 오징어식해 제조

시료의 제조 공정은 오징어 내장 및 껍질과 다리를 제거한 후 몸통육 잘게 세절한 후 24시간 염장(천일염20%) 및 24시간 당침(설탕 6%, 물엿 6%)하여 세척하고, 2시간 탈수 후 오징어원물에 원물대비 고춧가루 6%, 마늘, 생강 1%, 미원 2%, 좁쌀 8%, 절인무 50%를 넣고 버무려 양념한 후 용기에 담아 숙성하였다. 실험방법에 따라 온도별실험의 시료는 숙성만 5℃, 10℃, 15℃에서 달리하여 제조하였고, 염도별실험 시료는 염도 2%, 3%, 4%, 5%, 및 6%로 달리하여 제조하였다. 부재료별 시료의 제조는 고춧가루함량별 실험 시료는 고춧가루 4%, 6%, 및 8% 첨가하여 제조하였고, 마늘함량별 실험 시료는 마늘 2%, 4%, 및 6%로 첨가 제조하여 실험에 사용하였다.

(2) 숙성온도 및 숙성기간에 따른 오징어식해의 품질특성

(가) 숙성기간 중 pH의 변화(온도별)

일반적인 수산발효식품은 pH 5 이하가 되면 악취와 더불어 풍미에 악영향을 미치며 유기산을 생성하여 상품성이 없다고 보고되어 있으며, pH는 수산발효식품의 품질특성에 중요한 영향을 미치는 인자이다. 숙성저장기간 동안 온도별 pH 변화는 Fig. 1와 같다. 초기 pH범위는 5.85-5.96으로 시료들간에 차이가 없었으나 숙성저장 6일차에 15°C에 숙성저장한 오징어식해는 5.85에서 4.96으로 감소하였고, 다른 시료들은 pH범위가 5.91-5.98로 유의적으로 차이가 없었다. 숙성저장 9일차부터 10°C, 15°C 시료의 pH가 5 이하로 떨어졌는데, 이러한 현상은 식해 제조 시 첨가되는 곡류에 따른 미생물의 활성 증가에 따라 유기산이 많이 생산되는 것이 원인이라고 보여진다. 이에 따라 고온에서의 발효 및 유통은 식해의 품질을 급속히 저하시키기 때문에 오징어식해는 저온에서 발효 및 유통이 이루어져야 된다고 판단하였고 5°C, 10°C 숙성저장 6일차까지 pH의 큰차이가 나타나지 않았고 5°C는 9일차까지도 pH변화가 적었기 때문에 숙성기간이 너무 길어서 적당한 10°C에서 이후의 실험들을 진행하였고 적정 숙성일을 6-7일정도로 본다.

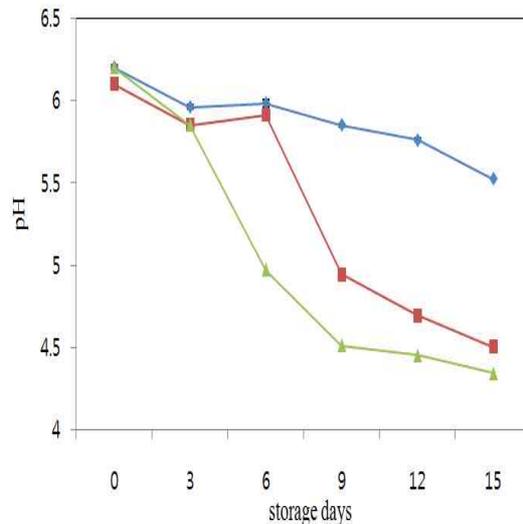


Fig. 1. Changes of the pH of the squid sikhe during storage at 5°C, 10°C, 15°C for 15 days. ◆, storage at 5°C; ■, storage at 10°C; ▲, storage at 15°C.

(나) 숙성기간 중 VBN함량의 변화(온도별)

오징어식해를 각각 5℃, 10℃, 15℃에서 15일간 숙성하면서 휘발성염기질소의 변화를 조사한 것은 Fig. 2과 같다. 각 온도 구간별로 VBN함량이 유의적으로 큰 차이를 보였는데 숙성 3일차까지는 시료간의 큰 차이를 보이지 않았으나 6일차부터 5℃, 10℃숙성 오징어식해의 VBN함량이 각각 18.56 mg/100g, 32.01 mg/100g으로 Table. 1에 나타난 시판오징어식해의 VBN함량과 비교해 보았을때 숙성이 진행 중이거나 숙성이 완료된 상태였으나 15℃숙성 오징어식해의 VBN함량은 65.26 mg/100g 부패가 진행되었음을 알 수 있었다. 5℃숙성 오징어식해는 숙성 마지막 15일차까지 VBN함량이 38.05 mg/100g으로 시판오징어식해의 VBN함량과 비슷한 수치를 나타냈으며, 10℃숙성 오징어식해는 숙성12일차부터 초기부패하기 시작하는 것을 알 수 있었다. Song et al.(2005)는 보통 신선한 어육의 VBN함량이 일반적인 기준으로 15-25 mg/100g, 30-40 mg/100g은 초기부패 어육, 50 mg/100g은 부패 정도가 심한 정도로 판정하지만 식해의 경우는 숙성발효 식품이기 때문에 관능검사와 시판오징어식해의 VBN함량분석을 기준으로 부패 정도를 판단하였다. 이것을 통하여 온도별 오징어식해의 숙성기간을 예측할 수 있었으며 15℃숙성은 급격한 부패가 일어남으로 적합하지 않은 온도임을 예측할 수 있었다. Takahashi (1935)에 의하면 VBN 측정은 어패류의 산도판정법중 신선한 육에는 없거나 미량 함유되어 있던 것이 선도저하에 따라 생성되어 증가하는 물질을 지표로하는 대표적인 방법으로 어획 후 시간이 경과할수록 계속 증가한다고 하였다.

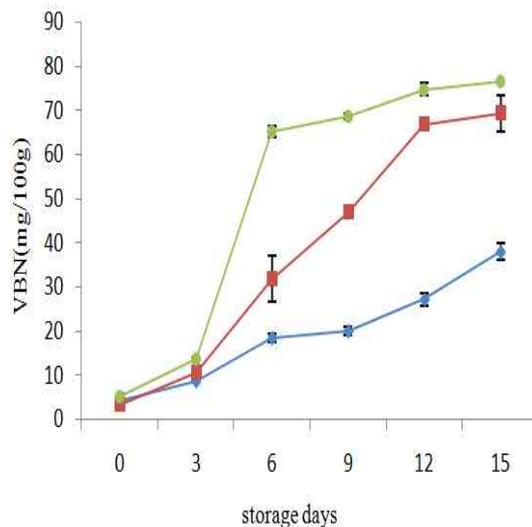


Fig 2. Changes of the volatile basic nitrogen (VBN) squid sikhe products during storage at 5℃, 10℃, 15℃ for 15days. ●, squid sikhe products during storage at 5℃; ■, squid sikhe products during storage at 10℃; ◆, squid sikhe products during storage at 15℃.

(다) 발효숙성기간 중 아미노태질소 함량의 변화(온도별)

아미노태질소량은 발효식품의 숙성도 지표로 이용될 뿐만 아니라 향미와 깊은 관련이 있기 때문에 중요한 품질 지표로 인식되고 있다. 본 연구에서는 오징어식해의 온도별로 각각 5℃, 10℃, 15℃에서 10℃에 숙성저장 기간 중 아미노태질소 함량의 변화량을 조사한 것은 Fig. 3와 같다. 숙성저장 기간 3일차까지는 시료간의 유의적으로 차이가 없었으나 6일차부터 15℃ 숙성 저장한 시료가 아미노태질소 함량이 251.19 mg/100g으로 급격히 상승하였고, 숙성저장 5℃, 10℃ 시료는 9일차부터 서로간의 유의적으로 큰 차이를 보여 주었다. Kim et al.(1993)은 오징어 젓갈에 관한 연구에서 아미노질소량은 숙성온도가 높을수록, 염농도가 낮을수록 아미노질소량의 생성 속도는 빨라졌다고하는데 본 실험결과와 유사하였다., 각 시료들은 VBN함량과 비교해 보았을 때 비례적으로 수치가 상승하였으며 숙성저장 3-6일차 사이가 시판오징어식해의 아미노태질소 함량과 비슷한 수준을 나타냈음을 알 수 있었다.

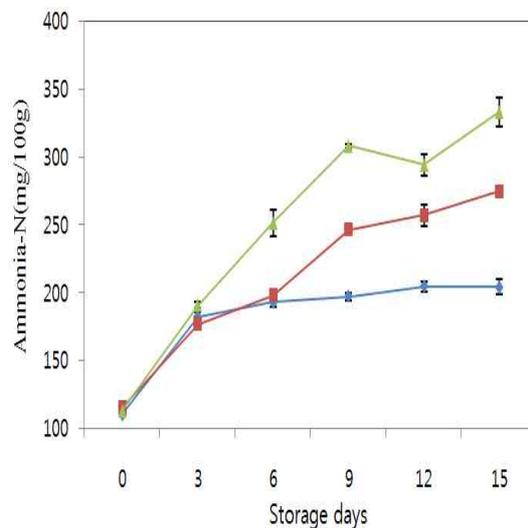


Fig 3. Changes of the Ammonia-N of the squid sikhe products during storage at 5℃, 10℃, 15℃ for 15days. ◆, squid sikhe products during storage at 5℃; ■, squid sikhe products during storage at 10℃; ▲, squid sikhe products during storage at 15℃.

(라) 숙성기간 중 TBA value의 변화(온도별)

온도를 달리한 오징어식해의 저장온도에 따른 TBA의 변화를 Fig. 4에 나타내었다. TBA는 지질의 산패 정도를 측정하는 지표이다. TBA의 변화는 숙성저장 3일차까지는 시료간의 0.20-0.23 O/D로 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 저장9일차부터 VBN함량이나 아미노태질소 함량과 같이 온도가 높은 시료에서 TBA가 수치가 급격히 높아지는 것을 알 수 있었다. 숙성저장 9-15일차 까지 5℃, 10℃ 시료는 서서히 상승하였으나 15℃ 시료는 0.3-0.7 O/D로 급격히 상승하여 산패가 진행됨을 보여준다. Keskinel et al.(1964)의 연구에서 TBA의 변화는 지방산 조성, pH, 시료의 크기, 온도에 크게 영향을 받는다고 보고 있다.

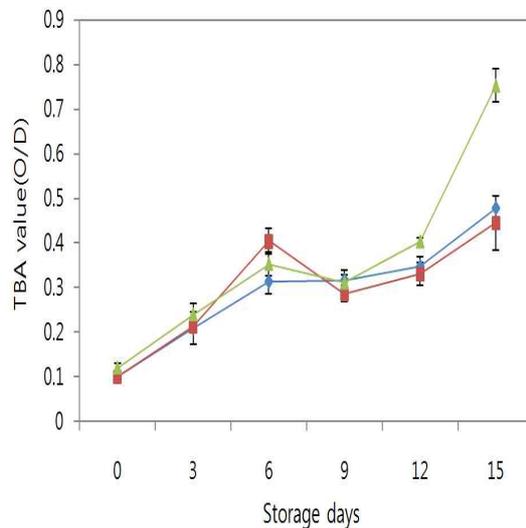


Fig 4. Changes of the TBA value of the squid sikhe products during storage at 5℃, 10℃, 15℃ for 15days. ◆, squid sikhe products during storage at 5℃; ■, squid sikhe products during storage at 10℃; ▲, squid sikhe products during storage at 15℃.

(마) 숙성기간 중 총균수의 변화(온도별)

온도를 달리한 오징어식해의 저장온도에 따른 총균수의 변화를 Fig. 5에 나타내었다. 제조직 후에 해당되는 숙성저장 0일차 총균수를 보면 2.12×10^4 - 2.14×10^4 CFU/g으로 시료간의 유의적인 차이는 없었다. 숙성저장 3일차에서는 15°C 시료에서 2.20×10^7 CFU/g으로 시판식해의 총균수보다 더 많이 나타나기 시작하였고 5°C, 10°C의 시료는 각각 4.6×10^5 CFU/g, 5.9×10^5 CFU/g으로 15°C 시료에 비하여 비교적 낮게 나타났다. 숙성저장 6일차에 15°C 시료에서 1.2×10^8 CFU/g이 나타났으며 관능검사를 실시한 결과 오징어식해에서 부패취가 나기 시작했기 때문에 오징어식해에서는 총균수가 10^8 CFU/g이상일 때 부패로 예측할 수 있었다. 숙성저장 마지막차인 15일차에서는 5°C 시료를 제외하고 10^8 CFU/g이상의 균이 검출되었고 관능적으로도 부패했음을 알 수 있었다.

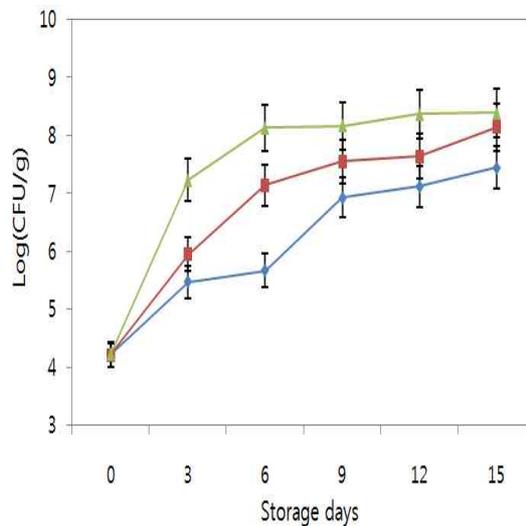


Fig 5. Changes of the total viable cells of the squid sikhe products during storage at 5°C, 10°C, 15°C for 15days. ◆, squid sikhe products during storage at 5°C; ■, squid sikhe products during storage at 10°C; ▲, squid sikhe products during storage at 15°C.

(바) 숙성기간 중 유산균수의 변화

오징어식해의 온도별 숙성저장 15일간 유산균수의 변화는 Fig 6을 보면 확인할 수 있다. 총균수와 마찬가지로 온도별로 시료간에 유의적으로 큰 차이를 보였다. 숙성저장 6일차에 15℃ 시료에서 유산균수가 9.12×10^8 CFU/g으로 최대치를 보였으며 그 이후로는 점점 감소하였고, 5℃, 10℃의 시료는 숙성저장 9일까지 급격히 상승하다가 그 후로는 서서히 증가하는 경향을 보였으며, 시판식해의 유산균수와 비교해 볼 때 10℃ 시료 6일차에서 2.22×10^7 CFU/g으로 비슷하게 나타났다.

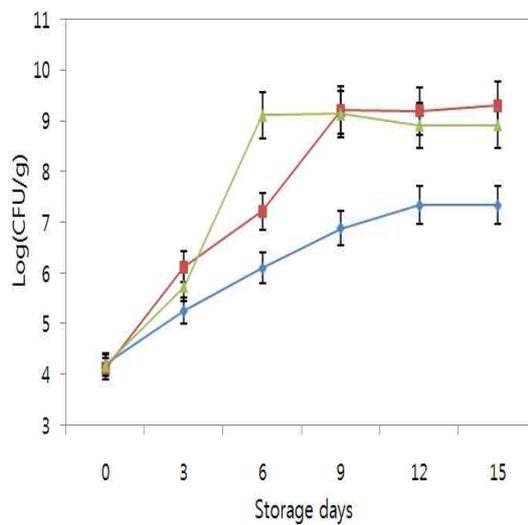


Fig 6. Changes of total viable lactic acid bacteria of the squid sikhe products during storage at 5°C, 10°C, 15°C for 15days. ◆, squid sikhe products during storage at 5°C; ■, squid sikhe products during storage at 10°C; ▲, squid sikhe products during storage at 15°C.

(3) 염도를 달리한 오징어식해의 품질특성

(가) 숙성기간 중 pH의 변화(염도별)

염도별 오징어식해의 숙성저장 중 pH변화를 Fig 7와 같다. 숙성저장 온도는 10℃로 하였으며, 6일차까지 전 시료구간에서 pH완만한 감소를 보여 주었으나 저염인 염도 2%, 3%의 오징어식해의 pH가 5이하로 급격히 감소하는 경향을 보였다. 염도가 높을수록 pH변화 폭은 적었으며 염도 4%, 5%, 6% 시료가 각각 5.06, 5.35, 5.54로 pH의 변화가 안정적인 것을 알 수 있었다. 또한 Kim 등(25)은 강릉지방의 오징어 식해 개발에 관련 연구에서 젓갈의 숙성 중 염농도가 낮을수록, 온도는 높을수록 미생물의 활성 증가에 따른 유기산의 증가로 인해 pH는 급격히 감소하였다고 하였는데, 이는 본 연구와 유사하였다.

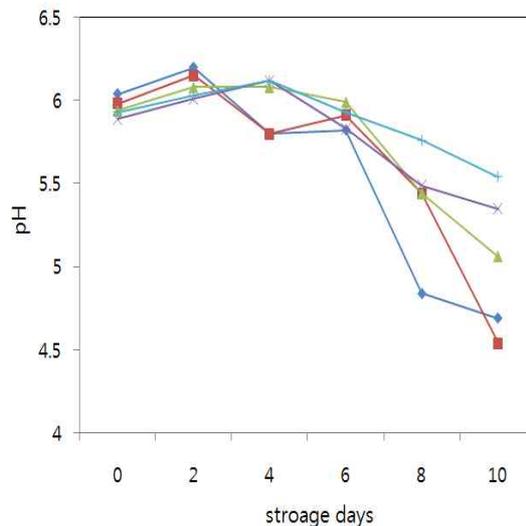


Fig 7. Changes of the pH of the different salinity squid sikkhe during storage at 10℃ for 10 days. ◆, salinity of 2% squid sikkhe; ■, salinity of 3% squid sikkhe; ▲, salinity of 4% squid sikkhe; ×, salinity of 5% squid sikkhe ; +, salinity of 6% squid sikkhe.

(나) 숙성기간 중 VBN함량의 변화(염도별)

오징어식해의 염도별 2%, 3%, 4%, 5%, 6% 10일간 10℃에서 숙성 저장하면서 VBN함량의 변화를 조사한 것은 Fig. 8와 같다. 염도별 2%, 3%, 4%, 5%, 6% 각각의 시료에서 VBN함량은 유의적으로 차이를 나타냈으며 모든 시료에서 숙성2일차까지는 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 염도2% 오징어식해는 숙성 저장기간 4일차에 VBN함량이 31.98 mg/100 g으로 시판오징어식해의 VBN함량과 비슷한 수치를 나타냈으며 염도3% 오징어식해는 4-6일차에서 18.77-20.7 mg/100 g으로 시판오징어식해의 VBN함량과 비슷하게 나타났다. 전체적으로 2%, 3%, 4%오징어식해는 6일차 이후로 급격히 VBN함량이 상승하였으나 염도 5%, 6%의 오징어식해는 숙성 저장 마지막 10일차 까지도 16.07 mg/100 g , 31.70 mg/100 g의 VBN함량을 나타냈다.

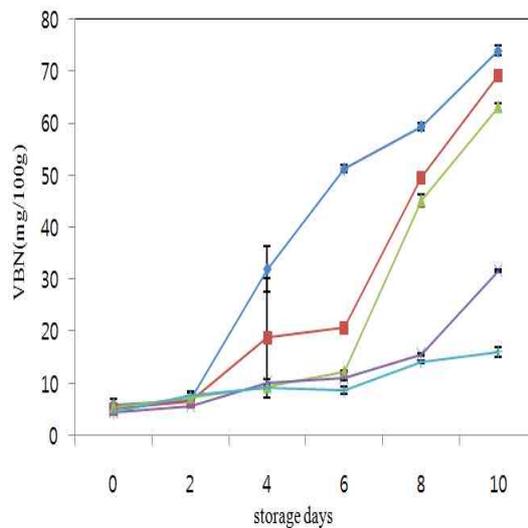


Fig 8. Changes of the volatile basic nitrogen (VBN) of the different salinity squid sikhe during storage at 10℃ for 10 days. ◆, salinity of 2% squid sikhe; ■, salinity of 3% squid sikhe; ▲, salinity of 4% squid sikhe; ×, salinity of 5% squid sikhe ; +, salinity of 6% squid sikhe.

(다) 숙성기간 중 아미노태질소함량의 변화(염도별)

오징어식해의 염도 2%, 3%, 4%, 5%, 6% 시료의 10℃에서 숙성저장 10일간 아미노태질소 함량의 변화를 Fig. 9을 보면 알 수 있다. 염도별로 시료간의 아미노태질소 함량의 변화는 염도에 따라 서로 유의적으로 차이를 보였다. 염도 5%, 6% 시료에서 숙성저장 10일차까지 각각 193.47 mg/100 g, 201.91 mg/100 g으로 상승폭이 가장 적었으며 2%, 3%, 4%의 시료는 222.33 mg/100 g, 226.76 mg/100 g, 218 mg/100 g으로 시료간의 유의적으로 차이가 나타나지 않았다. 또한 2-6일차 구간에 시판오징어식해의 아미노태질소 함량과 비슷한 수준을 유지함을 알 수 있었다. 또한 초기숙성이 완료된 6일차에 관능검사를 통하여 염도 4%의 오징어식해 맛이 가장 좋았으며 이때 아미노태질소 함량은 162.51 mg/100g 정도로 알 수 있다.

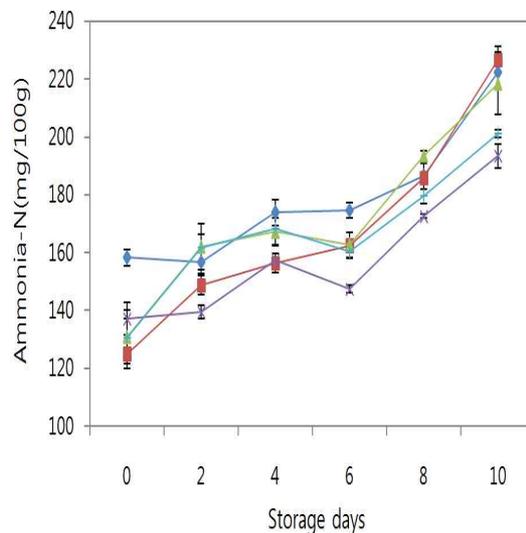


Fig 9. Changes of the the Ammonia-N of the different salinity squid sikhe during storage at 10℃ for 10 days. ◆, salinity of 2% squid sikhe; ■, salinity of 3% squid sikhe; ▲, salinity of 4% squid sikhe; ×, salinity of 5% squid sikhe ; +, salinity of 6% squid sikhe.

(라) 숙성기간 중 총균수의 변화(염도별)

오징어식해의 염도 2%, 3%, 4%, 5%, 6% 시료의 10°C 에서 숙성저장 10일간 총균수의 변화는 Fig. 10을 보면 알 수 있다. 숙성저장 2일차부터 시료간의 총균수가 유의적인 차이를 나타냈다. 염도 2%, 3% 시료는 각각 1.51×10^7 CFU/g, 1.21×10^6 CFU/g으로 나머지 염도 4%, 5%, 6% 시료들에 비해 총균수가 급격히 증가 하였다. 숙성저장 4일째까지 염도 5%, 6%의 시료는 107이하로 다른 시료들에 비해 총균수의 증가가 비교적 안정하였지만 염도 4% 시료는 염도 2%, 3% 시료와 마찬가지로 급격히 총균수가 상승하였다. 이 실험을 통하여 각각 시료의 숙성저장 일차별 균상과 적정 숙성일을 예측할 수 있었다.

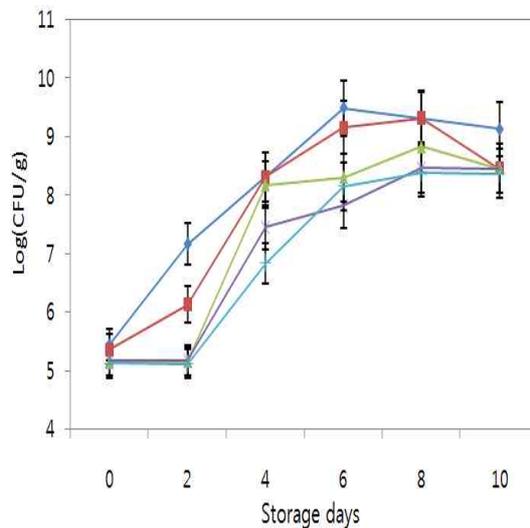


Fig 10. Changes of the total viable cells of the different salinity squid sikhes during storage at 10°C for 10 days. ◆, salinity of 2% squid sikhes; ■, salinity of 3% squid sikhes; ▲, salinity of 4% squid sikhes; ×, salinity of 5% squid sikhes; +, salinity of 6% squid sikhes.

(마) 숙성기간 중 유산균수의 변화(염도별)

염도별 오징어식해의 유산균수의 변화는 Fig. 11와 같다. 초기 숙성저장 2일차까지 염도2%를 제외한 모든 시료에서 유산균수는 $3.2-8.6 \times 10^5$ CFU/g을 나타냈다. 염도 2%, 3% 시료에서 총균수와 마찬가지로 균의 증가가 급격하게 일어났으며, 10일차에서는 2%, 3% 시료에서 $1.5-1.7 \times 10^9$ CFU/g까지 상승하였다.

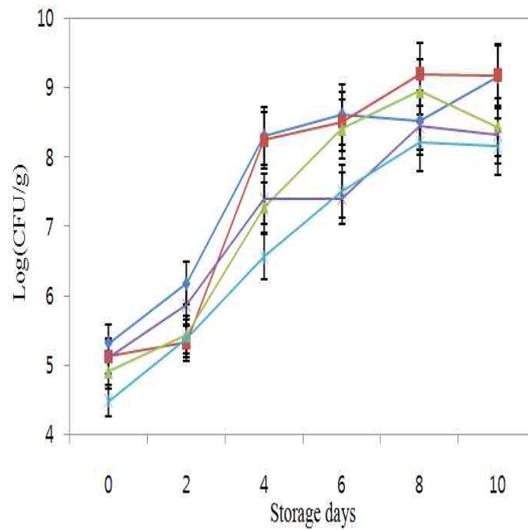


Fig 11. Changes of total viable lactic acid bacteria of the different salinity squid sikhe during storage at 10°C for 10 days. ◆, salinity of 2% squid sikhe; ■, salinity of 3% squid sikhe; ▲, salinity of 4% squid sikhe; ×, salinity of 5% squid sikhe ; +, salinity of 6% squid sikhe.

(바) 숙성온도 10°C 에서 6일간 숙성한 오징어식해의 관능평가

숙성온도 10°C 에서 6일간 숙성한 오징어식해의 관능적 특성은 Table 1에 나타내었다. 염도 2%,와 3%는 각각 총점이 2.3, 2.7점으로 가장 낮았으며, 검사자들의 의견은 너무 낮은 염도 때문에 비린맛과 향이 느껴지는 점이 있어 낮은 점수가 나타났으며 염도 6% 또한 3.8점으로 낮은 평가를 나타내었는데, 이는 너무 짠맛이 강하여 낮게 나타난 것으로 보인다. 하지만 향에서는 3.7점으로 높은 평가를 나타내었으며 조직감 및 맛에서 낮은 점수를 받은 것으로 확인 되었다. 염도 4%는 맛에서 5.7점으로 높은 점수를 나타내었으며 총점이 4.3점으로 가장 높게 나타났다. 염도 5%의 총점 또한 4.1점으로 염도 4%와 유의적인 차이는 나타나지 않았지만 염농도를 낮추는 추세에서 염도 4%가 가장 적절한 염농도로 사료된다.

Table 1. Sensory evaluation of squid sikhe stored at 10°C for 6days

Treatment	Flavor	Taste	Color	Texture	Overall acceptance
Salinity 2%	1.0 ± 0.0 ^a	2.2 ± 0.8 ^a	3.0 ± 1.2 ^a	3.3 ± 1.4 ^a	2.3 ± 0.9 ^a
Salinity 3%	2.3 ± 1.6 ^{ab}	2.2 ± 1.1 ^a	3.0 ± 1.2 ^a	3.3 ± 1.4 ^a	2.7 ± 0.5 ^{ab}
Salinity 4%	3.2 ± 2.2 ^b	5.7 ± 1.9 ^b	3.7 ± 1.4 ^a	4.7 ± 1.5 ^a	4.3 ± 1.0 ^c
Salinity 5%	3.5 ± 1.6 ^b	4.5 ± 1.5 ^b	3.7 ± 1.4 ^a	4.5 ± 1.1 ^a	4.1 ± 0.5 ^c
Salinity 6%	3.5 ± 1.6 ^b	4.1 ± 1.6 ^b	3.7 ± 1.4 ^a	3.7 ± 1.5 ^a	3.8 ± 0.3 ^{bc}

Values with different superscripts in the same row are significantly at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

(3) 고춧가루/마늘첨가량에 따른 오징어식해의 품질 특성

(가) 숙성 중 pH 변화(고춧가루/마늘첨가량별)

고춧가루함량을 4%, 6%, 8%로하고 염도 4%에 온도 10℃로 숙성한 오징어식해의 pH변화는 Fig. 12과 같다. 숙성저장 4일차까지는 pH가 4.85-49.1로 시료간에 유의적인 차이가 나타나지 않았고, 8-10일차까지 고춧가루 8%시료가 pH변화가 4.74-4.85로 가장 안정적으로 나타났다. 마늘함량 2%, 4%, 6%의 오징어식해 pH변화는 Fig. 13와 같다. 숙성저장 2일차 이후로 모든시료의 pH 급격히 감소하였으며 숙성저장 마지막차인 10일차에서는 마늘2%, 4%, 6% 모든시료의 pH가 4.45, 4.40, 4.56로 유의적인 나타났고 마늘6%의 pH변화가 비교적 안정적이였다.

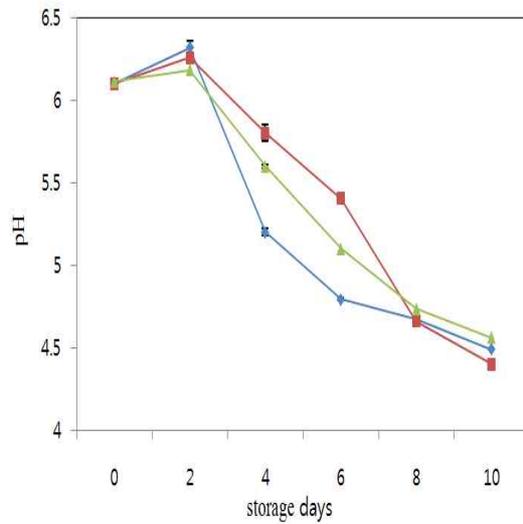


Fig 12. Changes of the pH of the squid sikhe during storage at 10°C for 10 days. ◆, chili powder 4% added of squid sikhe; ■, chili powder 6% added of squid sikhe; ▲, chili powder 8% added of squid sikhe.

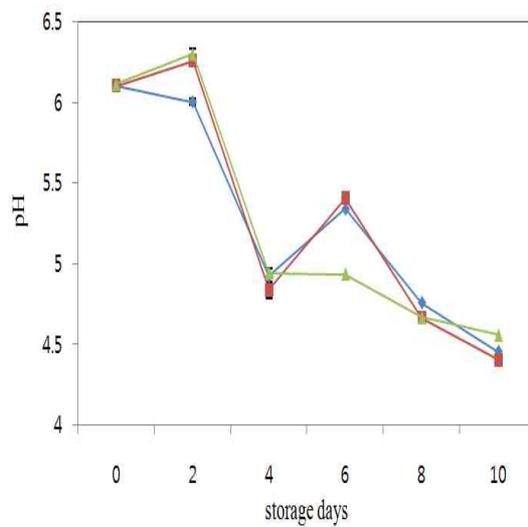


Fig 13. Changes of the pH of the squid sikhe during storage at 10°C for 10 days. ◆, garlic 2% added of squid sikhe; ■, garlic 4% added of squid sikhe; ▲, garlic 6% added of squid sikhe.

(나) 숙성기간 중 VBN함량의 변화(고춧가루/마늘첨가량별)

오징어식해의 고춧가루함량 각각 4%, 6%, 8%로 하여 모든 시료 염도 4%, 10℃에서 숙성 저장 하면서 VBN함량의 변화를 조사한 것은 Fig. 14과 같다. 모든 시료에서 숙성저장 2일차에서는 유의적으로 차이가 없었으나 4일차부터 고춧가루 8%의 시료에서 VBN함량이 고춧가루 4%, 6% 시료에 비하여 유의적으로 큰 차이를 보였고 숙성저장 마지막차인 10일차까지도 39.49 mg/100g으로 VBN함량이 높게 나타났다. 또 고춧가루 4%, 6% 시료는 숙성저장 6일차까지 VBN함량이 유의적인 차이를 보였으나 8-10일차까지 유의적으로 차이가 나타나지 않았다. 고춧가루 8%의 시료가 VBN함량이 높게 나타난 것은 부재료인 고춧가루에 일반적으로 균이 많다고 보고 되어 지고 있는데 이것으로 인하여 오징어식해의 숙성과 부패를 촉진한 것으로 보여진다. 오징어식해의 마늘함량을 각각 2%, 4%, 6%로 하였고 모든 시료의 염도는 4%, 고춧가루함량은 6%로 하여 10℃에서 10일간 숙성저장 하였고 Fig. 15과 같다. 모든 시료는 숙성저장 2일차까지는 유의적인 차이를 보이지 않았으나 저장4일차부터 마늘2%, 6%첨가 시료가 VBN함량이 각각 18.67, 20.56 mg/100g으로 마늘4%첨가 시료에 16.58 mg/100g에 높게 나타났고 마지막 10일차에서도 마늘첨가 2% 시료에서는 29.63 mg/100g을 VBN함량을 나타냈지만 마늘첨가 4% 시료에서 27.76 mg/100g으로 VBN함량이 더 적게 나타나 단백질 부패를 억제시키는 것을 보여 주었다. 이는 마늘이 다량의 페놀화합물과 플라보노이드를 함유하고 있어 VBN의 생성 및 단백질의 변성을 억제시키기 때문이라고 하였다. 하지만 마늘 6% 첨가구는 0-10일차까지 VBN함량이 다른 시료에 비하여 높게 나타났다. Lee et al.(1989) 등은 마늘첨가량을 달리한 김치의 숙성실험에서 마늘량이 많을수록 산도가 빠르게 증가하여 마늘이 김치의 숙성을 촉진한다고 하였는데 이는 본 연구결과와 일치하고 있다.

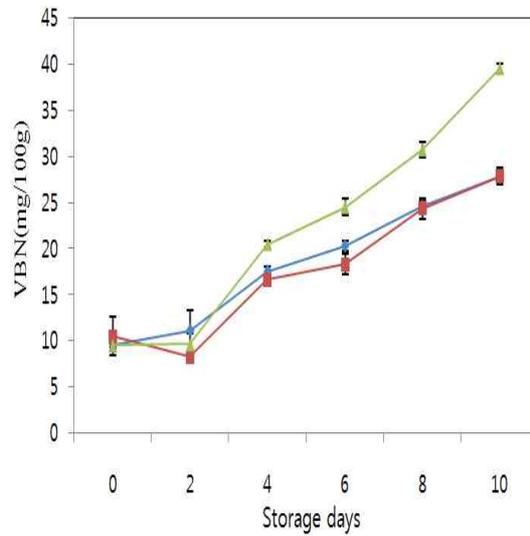


Fig 14. Changes of the volatile basic nitrogen (VBN) of the squid sikhe during storage at 1 0°C for 10 days. ◆, chili powder 4% added of squid sikhe; ■, chili powder 6% added of squid sikhe; ▲, chili powder 8% added of squid sikhe.

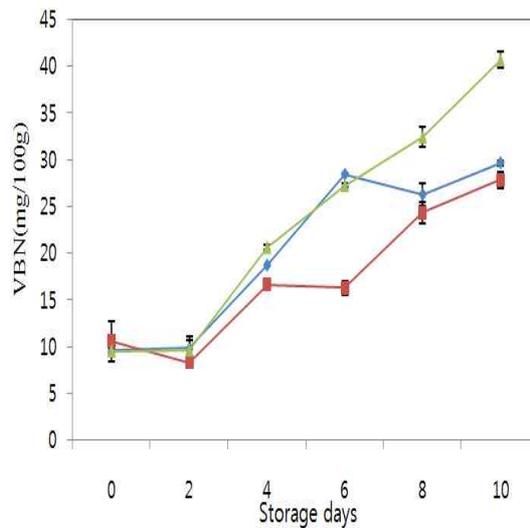


Fig 15. Changes of the volatile basic nitrogen (VBN) of the squid sikhe during storage at 1 0°C for 10 days. ◆, garlic 2% added of squid sikhe; ■, garlic 4% added of squid sikhe; ▲, garlic 6% added of squid sikhe.

(다) 숙성기간 중 아미노태질소함량의 변화(고춧가루/마늘첨가량별)

오징어식해의 고춧가루함량별로 각각 4%, 6%, 8%의 시료를 염도3%에 숙성저장기간 10일동안 10℃에서 아미노태질소 함량의 변화는 Fig. 16과 같다. 숙성저장 6일차에 시료 6%, 8%의 아미노태질소 함량은 각각 172.60 mg/100 g, 172.77 mg/100 g 유의적인 차이가 없었고 시료 4%는 170.91 mg/100 g 다른 시료에 비해 약간 낮은 수치를 나타냈고 유의적으로 차이가 나타났다. 시료 특성상 여러 가지 조건으로 인하여 균등하게 숙성되지 않아 구간별로 아미노태질소 함량의 수치가 다소 안정하지 못하였지만 숙성저장 마지막 10일차에 고춧가루 4%, 6%의 아미노태질소 함량이 230.40 mg/100 g, 224.92 mg/100 g으로 유의적인 차이가 나타나지 않았고 고춧가루 8% 시료에서 249.26 mg/100 g으로 다른 시료들에 비해 높은 아미노태질소 함량을 보였다. 이것은 다른 실험과 비교해 볼 때 비례적으로 고춧가루 함량이 높을수록 숙성 및 부패가 빨리 진행됨을 보여준다. 오징어식해 마늘함량 2%, 4%, 6%로 하여 10일간 염도3%, 숙성저장 온도를 10℃로 하여 아미노태질소 함량의 변화를 측정할 결과 Fig. 17와 같다. 숙성저장 4일차까지 마늘 2%, 4%, 6% 아미노태질소 함량은 유의적인 차이를 보이지 않았으나 숙성저장 6일차부터 VBN함량 변화와 비례적으로 마늘2% 첨가 시료와 마늘6% 시료에서 각각 177.84 mg/100 g, 176.58 mg/100 g 유의적 차이가 없었으나 마늘 4%시료에서 아미노태질소 함량이 172.60mg/100 g으로 다소 적게 나왔고, 숙성저장 마지막차인 10일차까지도 마늘 6%첨가 시료가 다른 시료들에 비해 아미노태질소 함량이 더 적게 나타났다. 이것으로 보아 아미노태질소 함량이 VBN함량의 변화와 연관성이 있다고 보여진다. 발효시 아미노태질소함량이 최고치를 나타낼 때 맛이 가장 우수하다고 보고된 바가 있지만 관능검사를 통하여 비교해본 결과 아미노태질소 함량이 200 mg/100 g이상을 초과하면 부패취와 맛이 떨어지는 것을 알 수 있었다.

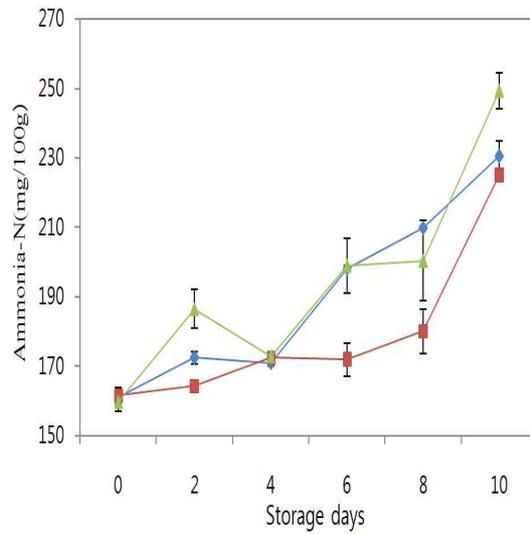


Fig 16. Changes of the Ammonia-N of the squid sikhe during storage at 10°C for 10 days. ◆, chili powder 4% added of squid sikhe; ■, chili powder 6% added of squid sikhe; ▲, chili powder 8% added of squid sikhe.

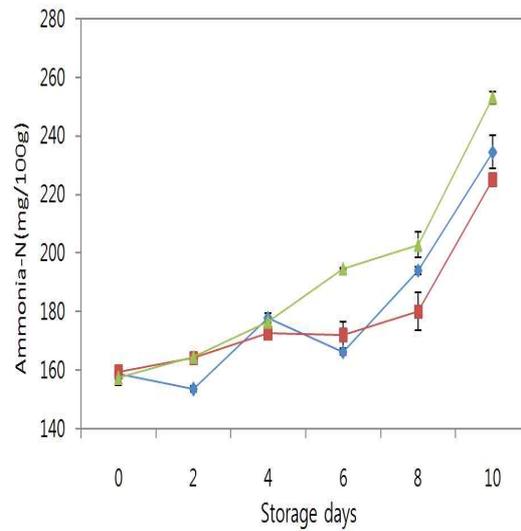


Fig 17. Changes of the Ammonia-N of the squid sikhe during storage at 10°C for 10 days. ◆, garlic 2% added of squid sikhe; ■, garlic 4% added of squid sikhe; ▲, garlic 6% added of squid sikhe.

(라) 숙성기간 중 TBA값의 변화(고춧가루/마늘첨가량별)

오징어식해의 고춧가루첨가량을 4%, 6%, 8%로 하여 10℃에서 10일간 숙성저장한 TBA값의 변화는 Fig. 18와 같다. 전체적으로 고춧가루 8%첨가 시료에서 TBA가 숙성저장 10차까지 0.31 O/D로 수치적으로 4%, 6% 시료 0.26, 0.29 O/D에 비해 높게 나타났으나 유의평가를 한결과 유의적인 차이가 나타나지 않아서 유지산패에는 큰 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다. 오징어식해의 마늘첨가량에 따른 TBA값의 변화는 Fig. 19 보면 알 수 있다. 숙성저장 2일차까지는 시료간의 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 숙성저장 4일차부터는 마늘첨가 2%, 4%, 6% 시료에서 TBA값은 각각 0.31, 0.17, 0.23 O/D로 마늘 2% 첨가구에서 가장 높게 나타났으며, 숙성저장 10일차까지도 다른 시료에 비해서 큰 차이가 나타났고, 4%, 6% 시료들간에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이것으로 보아 마늘에는 다량의 페놀화합물과 플라보노이드를 함유하고 있어 항산화성을 가지기 때문에 마늘 농도가 높은 4%, 6% 시료에서 2% 시료에 비해 큰 항산화성을 보여준 것을 알 수 있다.

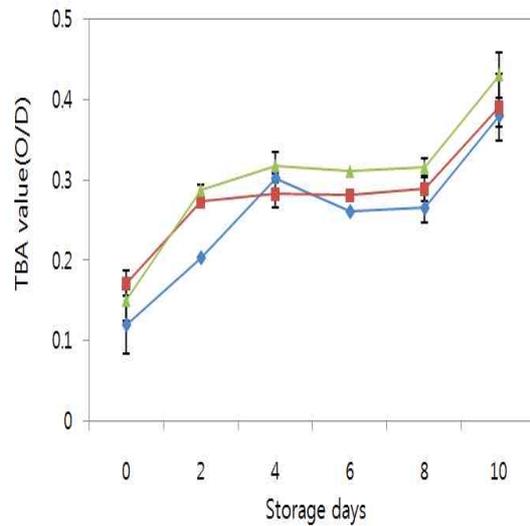


Fig 18. Changes of the TBA value of the squid sikhe during storage at 10°C for 10 days. ◆, chili powder 4% added of squid sikhe; ■, chili powder 6% added of squid sikhe; ▲, chili powder 8% added of squid sikhe.

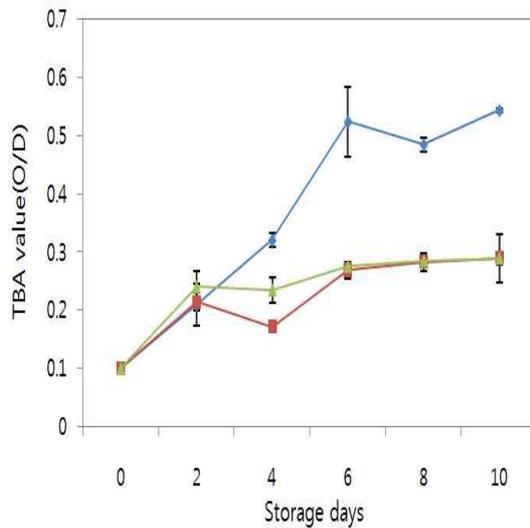


Fig 19. Changes of the TBA value of the squid sikhe during storage at 10°C for 10 days. ◆, garlic 2% added of squid sikhe; ■, garlic 4% added of squid sikhe; ▲, garlic 6% added of squid sikhe.

(마) 숙성기간 중 총균수의 변화(고춧가루/마늘첨가량별)

Fig. 20-21을 보면 고춧가루첨가량과 마늘첨가량을 달리한 실험에서는 시료별 총균수가 크게 차이 나지 않았고 마늘2%에서 다른 마늘 4%, 6% 비해서 저장 마지막차인 10일차에 균수가 8.93×10^8 CFU/g으로 가장 높았고 유의적으로 차이가 나타났다.

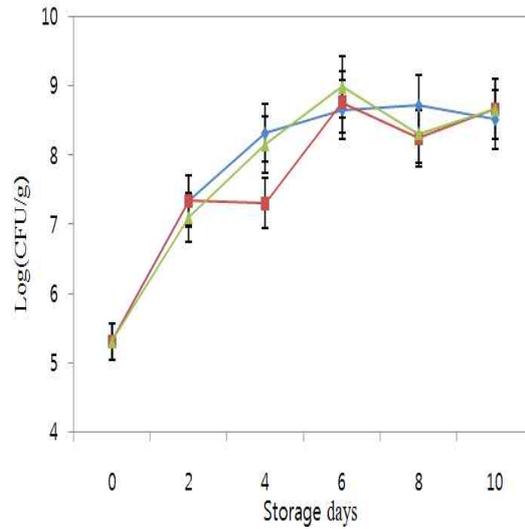


Fig 20. Changes of the total viable cells of the squid sikhe during storage at 10°C for 10 days. ◆, chili powder 4% added of squid sikhe; ■, chili powder 6% added of squid sikhe; ▲, chili powder 8% added of squid sikhe.

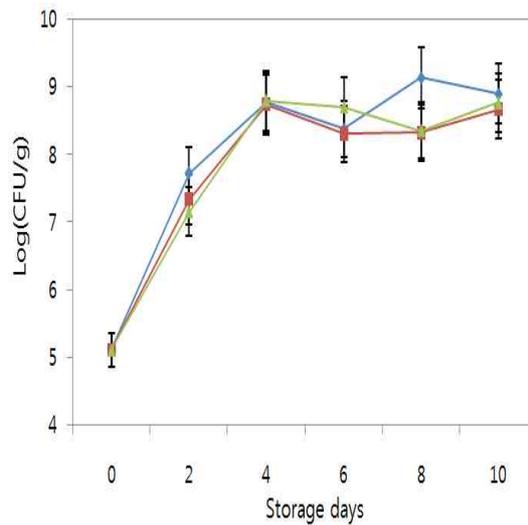


Fig 21. Changes of the total viable cells of the squid sikhe during storage at 10°C for 10 days. ◆, garlic 2% added of squid sikhe; ■, garlic 4% added of squid sikhe; ▲, garlic 6% added of squid sikhe.

(바) 숙성기간 중 유산균수의 변화(고춧가루/마늘첨가량별)

고춧가루함량을 달리한 오징어식해의 유산균수의 변화는 Fig. 22을 보면 알 수 있는데 고춧가루함량에 따라 유산균수의 변화는 초기 $5.51-5.52 \times 10^5 \text{CFU/g}$ 에서 숙성저장 10일차 $4.3-9.4 \times 10^8 \text{CFU/g}$ 으로 모든 시료간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 마늘첨가량을 달리한 오징어식해의 유산균수의 변화는 Fig. 23에 나타내었다. 초기 유산균수는 $5.0-5.1 \times 10^5 \text{CFU/g}$ 을 나타냈으며, 마늘 4%첨가 시료에서 숙성저장기간 동안 유산균수의 증가폭이 가장 안정하게 증가하였으며, 마늘함량이 2%첨가 시료에서 유산균수가 숙성저장 6일차에 $3.01 \times 10^8 \text{CFU/g}$ 으로 가장 높았으며 4%, 6%첨가 시료에서는 각각 $6.67, 5.70 \times 10^7 \text{CFU/g}$ 을 나타내었으며 총균수의 증가와 비슷한 경향을 나타내었다.

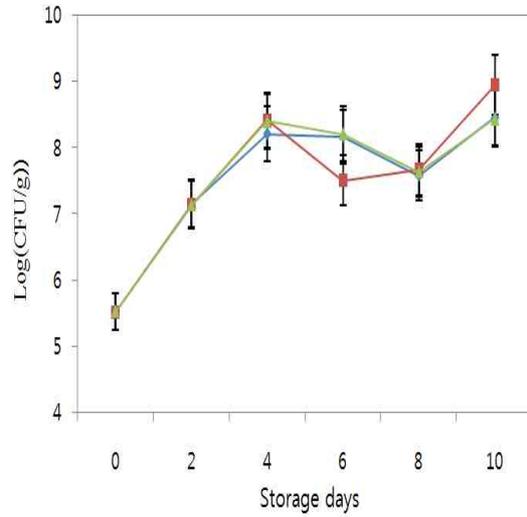


Fig 22. Changes of total viable lactic acid bacteria of the squid sikhe during storage at 10°C for 10 days. ◆, chili powder 4% added of squid sikhe; ■, chili powder 6% added of squid sikhe; ▲, chili powder 8% added of squid sikhe.

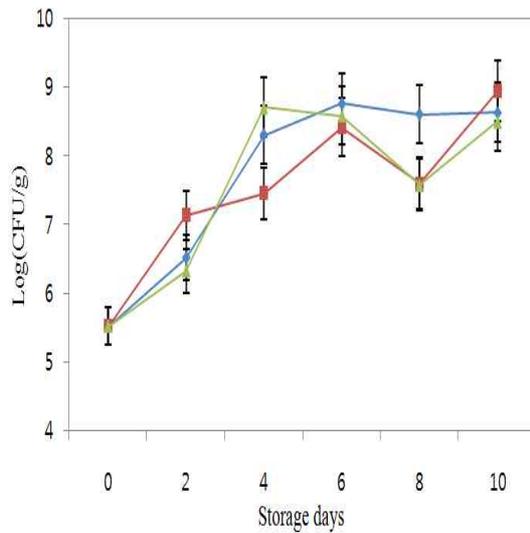


Fig 23. Changes of the total viable lactic acid bacteria of the squid sikhe during storage at 10°C for 10 days. ◆, garlic 2% added of squid sikhe; ■, garlic 4% added of squid sikhe; ▲, garlic 6% added of squid sikhe.

(사) 숙성기간 10°C 에서 6일간 염도 4%로 숙성한 고춧가루/마늘첨가량을 달리한 오징어식혜의

1) 관능평가

고춧가루함량별 오징어식혜는 향과 맛에서는 유의차가 나타나지는 않았으나 고춧가루4% 첨가한 제품은 맛과 향, 조직감에서는 다른 제품과 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 고춧가루함량이 적어 오징어식혜의 색이 연하게 나타나 변질된 느낌을 받았기 때문에 낮은 3.8점으로 다른 제품에 비해 낮은 점수를 받았다. 전체적인 점수에서 고춧가루6% 첨가 제품이 5.2점으로 가장 높은 점수를 받았다. 마늘함량별 오징어식혜는 마늘6%첨가 시료에서 총점 5.7점으로 가장 높은 점수를 나타냈으며, 조직감을 제외한 모든 관능검사에서 가장 좋은 점수를 나타냈다.

Table 2. Sensory evaluation of squid sikhe stored at 10°C for 6days.

Treatment	Flavor	Taste	Color	Texture	Overall acceptance
chili powder 4%	4.6±0.8 ^a	4.2±0.7 ^a	3.8±0.4 ^a	4.8±0.4 ^a	4.4±0.4 ^a
chili powder 6%	5.0±0.6 ^a	5.4±0.8 ^a	5.2±0.7 ^b	5.0±0.0 ^a	5.2±0.2 ^b
chili powder 8%	5.2±1.0 ^a	4.6±1.2 ^a	5.5±0.8 ^b	4.6±0.8 ^a	5.0±0.4 ^b

^{a-b}Values with different superscripts in the same row are significantly at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 3. Sensory evaluation of squid sikhe stored at 10°C for 6days.

Treatment	Flavor	Taste	Color	Texture	Overall acceptance
garlic 2%	5.0 ± 1.1 ^a	5.4 ± 0.5 ^{ab}	5.2 ± 0.1 ^a	5.4 ± 0.5 ^a	5.3 ± 0.2 ^{ab}
garlic 4%	4.6 ± 0.5 ^a	5.0 ± 0.6 ^a	5.3 ± 0.7 ^b	5.0 ± 0.6 ^a	5.0 ± 0.2 ^a
garlic 6%	5.6 ± 0.5 ^a	6.0 ± 0.6 ^b	5.8 ± 0.4 ^b	5.2 ± 0.4 ^a	5.7 ± 0.3 ^b

^{a-b}Values with different superscripts in the same row are significantly at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

(아) 부재료 배합비 표준화 설정

오징어식해를 관능검사와 이화학적, 미생물학적 실험을 통하여 분석한 결과 숙성온도 조건에서 pH와 VBN함량을 통하여 15℃ 시료는 급격한 부패가 일어남을 확인하였는데, 곡류에 의한 미생물의 활성 증가에 따라 유기산이 많이 생산되는 것이 원인이라고 보여진다. 이에 따라 고온에서의 발효 및 유통은 식해의 품질을 급속히 저하시키기 때문에 오징어식해는 저온에서 발효 및 유통이 이루어져야 된다고 판단되었다. 그런데, 5℃ 숙성시료는 숙성의 속도가 너무 오래 걸리는 경향이 있기 때문에 오징어식해제조의 최적온도는 10℃로 결정하였고 시판오징어식해와 이화적이나 미생물적으로 비슷한 숙성도를 나타낸 6일차를 숙성 적정기간으로 판단하였다. 식염농도 2%, 3% 시료에서는 VBN, 아미노태질소 함량과 pH를 조사해 본 결과 숙성이 빨리 되고 금방 부패하는 경향이 있었고, 식염농도 4%, 5%, 6%등의 오징어식해들은 완만한 숙성결과를 보여주었다. 또 관능적으로 식염농도 5%, 6% 오징어식해는 관능적으로 너무 짜서 낮은 점수를 받았으며, 식염농도 4%인 오징어식해가 4.3점으로 가장 좋은 평가를 받았기 때문에 오징어식해의 염도를 4% 정하였다.

고춧가루함량에 있어서는 관능적으로 판단해 볼 때 고춧가루 6%첨가 시료가 총점 5.2점으로 가장 좋았으며 이화학적 미생물적으로 고춧가루 8%첨가 시료에 비해 고춧가루 6% 첨가 시료의 숙성저장 기간이 가장 좋았기 때문에 고춧가루 6%첨가를 최적고춧가루 첨가량으로서 결정 선택하였다. 마늘함량별 오징어식해 중에서는 관능검사로 판단했을 때 마늘 6% 첨가가 적합한 것으로 총점 5.7점으로 가장 좋았고, VBN함량이 다른 마늘 2%나 4%첨가 오징어식해제품에 비해 빠른 부패가 일어났지만 TBA측정 결과 숙성저장 2-10일차까지 다른 시료에 비해서 뛰어난 항산화능을 보여 주었고 다른 유산균수이나 총균수와 비교하여 유의적으로 큰차이를 보이지 않았기 때문에 오징어식해의 마늘첨가량은 6% 첨가가 적합한 것으로 결정하였다. 결과적으로 숙성저장 온도 10℃에서 숙성저장일 6일, 염도 4%, 고춧가루첨가량 6%, 마늘첨가량 6% 등의 첨가숙성공정이 오징어식해 가공 표준화 생산조건인 것으로 판단하여 결론을 내렸다.

2. 가자미·오징어·명태의 제조 공정 표준화(반응표면분석)

가. 관능평가를 통한 반응표면분석을 이용한 식해의 제조공정 표준화(가자미)

(1) 재료 및 방법

(가) 재 료

본 연구에 사용한 가자미식해의 제조를 위한 원료 중 가자미(*V. Jordan et Gilbert*; 원산지, 대한민국)는 냉동품이 아닌 생물을 강릉시 중앙시장에서 구입하여 사용하였고, 소금은 천일염(해표(주), 국내산)을 이용하였으며, 당장용 첨가제는 백설탕(홈플러스(주), 국내산)과 물엿(오뚜기(주), 국내산)을 이용하였다. 그리고, 기타 식해 나머지 부재인 고춧가루(해찬들(주), 국내산), 마늘(신야원, 국내산), 생강(농협, 국내산), 미원(대상(주), 국내산), 무우(농협, 국내산), 좁쌀(홈플러스(주), 국내산)등은 강릉시 소재 농협 하나로마트에서 각각 구입하여 사용하였다.

(나) 가자미식해 제조

가자미식해의 제조를 위하여 라운드(round) 상태의 가자미(*V. Jordan et Gilbert*)는 내장 및 껍질을 제거한 후 몸통육 만을 취해서 잘게 세절(가로 x 세로, 6cm x 6cm)한 후 24 h 동안 염장(전처리 어체에 대한 천일염 20%, W/W) 하였다. 이어서 염장 가자미(*V. Jordan et Gilbert*)를 세척하고, 2 h 동안 탈수한 후 여기에 원물대비 부재료 첨가량(W/W) 및 숙성온도, 숙성기간, 염도는 Table 1, 2, 3에 나타내었다.

(다) 실험계획 및 반응표면 분석

가자미식해의 제조 공정에 대한 모든 설계는 반응표면 실험계획법의 central composite design에 따라 SAS(statistical analysis system 10.0) 프로그램을 사용하였다. 가자미식해 제조 최적화를 위하여 총 3단계로 실험계획을 설계하여 반응표면 분석을 실시하였다. 1단계 계획으로 독립변수로는 온도(X_1),기간(X_2),염도(X_3)의 함량을, 종속변수로는 관능적 특성의 색, 향, 조직감, 맛 전반적인 기호도로 설정하여 표준화하였고 이를 바탕으로 2단계는 독립변수로 고춧가루(X_1),마늘(X_2),미원(X_3),종속변수로 관능적 특성을 설정하였다. 3단계 또한 1-2단계를 바탕으로하여 종속변수 무(X_1),생강(X_2),좁쌀(X_3),독립변수는 관능적 특성으로 설정 하였다. 각 요인의 최소 및 최대 범위를 각각 온도 5~25℃, 기간 8~20일, 염도 3~7%, 고춧가루 5~25%, 마늘 1~13%, 미원 1~5%로 정하였다. 완성된 실험 각각의 디자인의 재료 혼합 비율은 Table 1, 2, 3과 같다.

Table 1. Experimental design for flounder (*V. moseri Jordan et Gilbert*) *sikhe* prepared of fermentation condition

Sample No.	Variable Level Ingredient								
	Factors			Red papper powder (%)	Garlic (%)	MSG ¹ (%)	Radish (%)	Ginger (%)	Foxtail millet (%)
	X ₁	X ₂	X ₃						
Temp (°C)	Day	Salinity (%)							
1	10	11	4	15	7	3	15	3	14
2	10	11	6	15	7	3	15	3	14
3	10	17	4	15	7	3	15	3	14
4	20	11	4	15	7	3	15	3	14
5	10	17	6	15	7	3	15	3	14
6	20	17	4	15	7	3	15	3	14
7	20	11	6	15	7	3	15	3	14
8	20	17	6	15	7	3	15	3	14
9	15	14	5	15	7	3	15	3	14
10	15	14	5	15	7	3	15	3	14
11	15	14	5	15	7	3	15	3	14
12	15	14	5	15	7	3	15	3	14
13	25	14	5	15	7	3	15	3	14
14	5	14	5	15	7	3	15	3	14
15	15	20	5	15	7	3	15	3	14
16	15	8	5	15	7	3	15	3	14
17	15	14	7	15	7	3	15	3	14
18	15	14	3	15	7	3	15	3	14

¹Monosodium glutamate.

Table 2. Experimental design for flounder(*V. moseri Jordan et Gilbert*) *sikhe* prepared with material proportion

Sample No.	Variable Level Ingredient								
	Factors			Temp (°C)	Day	Salinity (%)	Radish (%)	Ginger (%)	Foxtail millet (%)
	X ₁	X ₂	X ₃						
	Red papper powder (%)	Garlic (%)	MSG ¹ (%)						
1	10	4	2	11.6	4.6	4.6	15	3	14
2	10	4	3	11.6	4.6	4.6	15	3	14
3	10	10	2	11.6	4.6	4.6	15	3	14
4	20	4	2	11.6	4.6	4.6	15	3	14
5	10	10	4	11.6	4.6	4.6	15	3	14
6	20	10	2	11.6	4.6	4.6	15	3	14
7	20	4	4	11.6	4.6	4.6	15	3	14
8	20	10	4	11.6	4.6	4.6	15	3	14
9	15	7	3	11.6	4.6	4.6	15	3	14
10	15	7	3	11.6	4.6	4.6	15	3	14
11	15	7	3	11.6	4.6	4.6	15	3	14
12	15	7	3	11.6	4.6	4.6	15	3	14
13	25	7	3	11.6	4.6	4.6	15	3	14
14	5	7	3	11.6	4.6	4.6	15	3	14
15	15	13	3	11.6	4.6	4.6	15	3	14
16	15	1	3	11.6	4.6	4.6	15	3	14
17	15	7	5	11.6	4.6	4.6	15	3	14
18	15	7	1	11.6	4.6	4.6	15	3	14

¹Monosodium glutamate.

Table 3. Experimental design for flounder(*V. moseri Jordan et Gilbert*) *sikhe* prepared with material proportion

Sample No.	Variable Level Ingredient								
	Factors			Red papper powder (%)	Garlic (%)	MSG ¹ (%)	Temp (°C)	Day	Salinity (%)
	X ₁	X ₂	X ₃						
Ginger (%)	Radish (%)	Foxtail millet (%)							
1	2	10	10	16.0	7.2	2.9	11.6	4.6	4.6
2	2	10	18	16.0	7.2	2.9	11.6	4.6	4.6
3	2	20	10	16.0	7.2	2.9	11.6	4.6	4.6
4	4	10	18	16.0	7.2	2.9	11.6	4.6	4.6
5	2	20	18	16.0	7.2	2.9	11.6	4.6	4.6
6	4	20	10	16.0	7.2	2.9	11.6	4.6	4.6
7	4	10	18	16.0	7.2	2.9	11.6	4.6	4.6
8	4	20	18	16.0	7.2	2.9	11.6	4.6	4.6
9	3	15	14	16.0	7.2	2.9	11.6	4.6	4.6
10	3	15	14	16.0	7.2	2.9	11.6	4.6	4.6
11	3	15	14	16.0	7.2	2.9	11.6	4.6	4.6
12	3	15	14	16.0	7.2	2.9	11.6	4.6	4.6
13	5	15	14	16.0	7.2	2.9	11.6	4.6	4.6
14	1	15	14	16.0	7.2	2.9	11.6	4.6	4.6
15	3	25	14	16.0	7.2	2.9	11.6	4.6	4.6
16	3	5	14	16.0	7.2	2.9	11.6	4.6	4.6
17	3	15	22	16.0	7.2	2.9	11.6	4.6	4.6
18	3	15	6	16.0	7.2	2.9	11.6	4.6	4.6

¹Monosodium glutamate.

(라) 관능검사

관능검사는 식혜의 향기, 맛, 색, 조직감에 잘 훈련된 15인의 panel을 구성하여 이들의 관능 항목과 전체적인 기호도에 대해 9단계 평점법(매우 나쁘다, 1점; 매우 좋다, 9점)을 사용하였고, 검사항목은 색(color), 맛(taste), 풍미(flavor), 조직감(texture), 전반적인 기호도(overall quality)로서 평가하였다.

(마) 통계분석

검사결과에 대한 통계적인 유의성 검정은 Statistical Packages for Social Science(SPSS, Chicago, IL, USA)를 이용하여 Duncan's multiple range test로 유의수준 5% 이내($P < 0.05$)로 각 평균값에 대한 유의적 차이를 조사하였다. 데이터는 각 실험치의 평균값과 표준편차로 나타내었다.

(2) 가자미식해의 제조 공정 최적화(반응표면분석)

본 연구는 가자미식해의 제조 공정 최적화 기술개발을 위하여 단계별로 반응표면분석을 실시하였다. 반응표면분석은 숙성온도, 숙성기간 및 염도를 달리한 1단계 조건과 고춧가루, 마늘, 미원 첨가량을 달리한 2단계, 그리고 생강, 무, 좁쌀 첨가량을 달리한 3단계로하여 순차적으로 최적화를 시도하였다. 모든 조건을 한번에 데이터화 하여 반응표면 분석을 할 시 가장 좋지만, sample의 수가 너무 많아지고 관능검사로 이것을 데이터화 하기에는 편차와 오류가 크기 때문에 총 3단계로 나누어 최적화를 시도하였다

(가) 숙성온도, 기간, 염도의 조건을 달리한 가자미식해 관능적 특성

숙성온도와, 숙성기간, 그리고 염도를 각각 달리한 조건에 따른 가자미식해의 맛, 색, 조직감, 향에 대한 기호도는 Table 4와 같다. 예비 실험을 통하여 5℃와 25℃ 구간의 조건으로 하여 총 18가지 종류의 가자미식해를 제조하여 15인의 panel이 각각의 숙성기간 마다 관능검사를 실시하였다.

20℃ 구간에서는 8~20일간의 숙성기간 동안 염도가 비교적 높았던 염도 6%인 7번 시료를 제외하고는 부패가 진행되어 관능평가를 진행할 수 없었으며, 25℃에서 숙성한 시료 또한 부패가 진행되어 관능평가를 할 수 없었다. 이는 Cho et al. (2012)에서의 예비실험을 통한 가자미식해의 숙성온도가 너무 높을 시 빠른 부패가 일어난 것과 비슷한 결과를 나타내었다. 전체적인 가자미식해에서는 신맛과 향이 강하에 나타났는데 Kim et al. (1994)는 강릉지방의 가자미식해 개발 연구에 관한 연구에서 식해의 숙성 중 고온에서 염농도가 낮고 숙성온도가 높을수록 미생물활성에 인하여 유기산이 증가하여 pH가 낮아지면서 신맛을 나타낸다는 내용과 유사한 결과를 나타내었다. 또한 이는 20~25℃ 높은 온도에서 과도한 숙성을 통한 부패의 원인으로도 사료된다.

가자미식해의 염도에 따라 panel의 맛의 선호도를 보았을 때, 염도가 가장 낮았던 18번 시료가 염도 3%로 맛에서 3.56점으로 최저점을 나타내었고, 염도 4% 시료들에 비해서 염도 5%의 가자미식해가 맛에서 더 좋은 평가를 나타내었다. 이는 Cho and Kim (2012)의 오징어식해의 관능평가에서 염도가 낮은 오징어식해에 비하여 조금 더 높은 시료가 더 좋은 평가를 받았던 연구결과와 비슷한 결과를 나타내었다. 또한 18인의 panel들의 묘사평과 결과 염도가 낮은 시료에서 약간의 비린맛이 느낀다고 하였는데 이러한 영향이 관능평가에 준 것으로 사료된다.

16번 시료인 온도 15℃, 기간 8일, 염도 5%의 가자미식해가 총점 5.8 점으로 가장 좋은 관능평가 점수를 나타내었으며 다른 시료들에 비해 유의적으로도 큰 차이를 나타내었다. 5℃에서 숙성한 가자미식해는 온도가 숙성온도가 낮아 발효기간이 14일 정도로 길어지는 경향이 있었으나 관능평가에서 5.1 점으로 두 번째로 좋은 결과를 나타내었으며, 이 관능검사 점수를 통하여 Table 4와 같이 숙성온도, 숙성기간, 염도에 대한 실험계획을 세울 수 있었다.

Table 4. Experimental design for flounder (*V. moseri Jordan et Gilbert*) *sikhe* prepared of fermentation condition

Sample No.	Factors			Variable Level				Ingredient	Overall quality
	X ₁	X ₂	X ₃	Flavor	Taste	Texture	Color		
	Temp (°C)	Day	Salinity (%)						
1	10	11	4	4.97±0.21 ^b	4.78±0.48 ^c	5.00±0.14 ^c	5.67±0.88 ^b	5.01±0.14 ^b	
2	10	11	6	4.47±1.21 ^d	4.78±0.91 ^c	4.44±0.45 ^d	4.67±0.69 ^d	4.54±0.81 ^c	
3	10	17	4	—*	—*	—*	—*	—*	
4	20	11	4	—*	—*	—*	—*	—*	
5	10	17	6	4.53±0.45 ^d	4.33±0.78 ^d	4.78±0.41 ^d	5.33±0.44 ^c	4.52±0.10 ^c	
6	20	17	4	—*	—*	—*	—*	—*	
7	20	11	6	4.81±0.23 ^c	4.44±1.11 ^d	5.11±0.84 ^c	5.56±0.75 ^b	4.81±0.54 ^{bc}	
8	20	17	6	—*	—*	—*	—*	—*	
9	15	14	5	4.64±0.76 ^c	4.22±0.24 ^d	5.00±0.71 ^c	5.56±0.39 ^b	4.60±0.15 ^c	
10	15	14	5	4.98±0.47 ^b	4.78±0.11 ^c	5.22±0.15 ^b	5.33±0.57 ^c	5.01±0.64 ^b	
11	15	14	5	4.64±0.62 ^c	4.22±0.87	5.00±0.54 ^c	5.56±0.41 ^b	4.62±0.14 ^c	
12	15	14	5	4.98±0.18 ^b	4.78±0.84 ^c	5.22±0.67 ^b	5.33±0.16 ^c	5.00±0.49 ^b	
13	25	14	5	—*	—*	—*	—*	—*	
14	5	14	5	5.15±0.74 ^a	5.11±0.23 ^b	5.33±0.64 ^a	5.44±0.18 ^c	5.12±0.16 ^{ab}	
15	15	20	5	—*	—*	—*	—*	—*	
16	15	8	5	5.75±0.16 ^a	6.22±0.34 ^a	5.67±0.17 ^a	6.22±1.19 ^a	5.81±0.84 ^a	
17	15	14	7	4.20±0.11 ^d	4.44±0.69 ^d	4.44±0.78 ^d	4.00±0.95 ^d	4.21±0.26 ^d	
18	15	14	3	3.91±0.32 ^e	3.56±0.81 ^e	4.33±0.34 ^d	4.44±0.41 ^d	3.90±0.74 ^e	

^{a-e} Values with different superscripts in the same row are significantly at P<0.05 by Duncan's multiple range test

* - No data.

(나) 온도, 기간, 염도의 조건을 달리한 가자미식해 제조 최적화

Table 4의 실험계획을 자료로 하여 반응표면 분석을 실시한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 독립변수로는 온도(X_1),기간(X_2),염도(X_3)의 함량을, 종속변수로는 관능적 특성의 색, 향, 조직감, 맛 전반적인 기호도로 설정하여 3차원 그래프화 하여 표준화하였다. 일차식(primary regression)은 5% 수준에서 유의성($P < 0.05$)이 있으며, 이차식(quadratic regression)은 유의성이 없었다. 각 요인의 최소 및 최대 범위 온도 5~25°C 구간에서는 11.63°C가 가장 최적조건으로 나타났으며, 숙성기간 8~20일 구간에서는 9.12일이 최적 조건을 나타냈다. 염도는 3~7% 구간에서 4.66% 구간이 가장 적정구간으로 나타났으며 염도가 너무 높거나 낮아도 관능평가에서 낮은 점수를 나타냈다. 본 반응표면 분석법을 계획한 결과값은 결정계수(R-squared)가 0.7969로 0.5 이상을 나타내어 신뢰성을 가지는 결과를 나타내었다. 결과적으로 숙성온도, 숙성기간, 염도의 최적조건은 온도 11.63°C, 기간 9.12일, 염도는 4.66% 라는 결론을 내릴 수 있었다. 이 조건을 고정하여 Table 2의 고춧가루, 마늘, 미원을 함량을 달리하여 제조한 가자미식해의 제조 최적화의 실험 설계를 실시하였다.

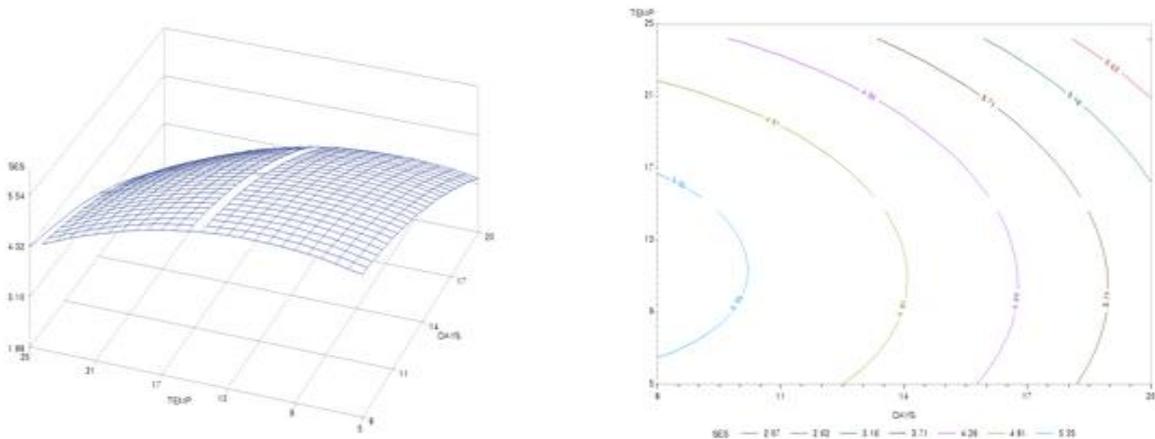


Fig. 1 Perturbation plot and response surface for the effect of sensory characteristics of flounder (*V. moseri Jordan et Gilbert*) sikhe prepared with production process standardization

(다) 가자미식해의 온도, 날짜, 염도 첨가량을 각각 달리한 유리아미노산 함량

반응표면분석을 위해 실험설계한 18종의 유리아미노산함량을 비교해보았다. 유리아미노산은 젓갈 및 식해류의 향미에 가장 중요한 영향을 미치는 단백질 분해산물로서 발효시에도 중요한 품질의 지표로 활용되고 있다. 가자미식해의 온도, 날짜, 염도의 첨가량을 달리한 각각의 시료의 유리아미노산 함량을 아래에 나타내었으며, 반응표면분석을 이용한 실험설계와 비교하여 보았다. 발효식품의 중요 아미노산은 proline, alanine, arginine, methionine, glutamic acid이 있다. 총 18개 시료에서 glutamic acid가 가장 높은 비중을 차지 하였으며, 총아미노산 함량은 시료마다 큰 차이를 나타내었다. 각각의 시료의 조건을 상기 가자미식해의 반응표면분석 자료에 명시되어 있다. 13번 시료의 유리아미노산 함량은 2699.99mg/100g인데, 숙성온도 25℃에 저장 기간이 15일로 가장 높은 온도와 긴 시간 숙성한 시료이며, 1996.14mg/100g인 5번 시료 또한 10℃에서 17일간 숙성한 시료이다. 이외 유리아미노산 함량이 높은 시료는 온도 또는 숙성기간이 장기간인 가자미식해에서 나타났다. 관능검사와 비교해 볼 때, 16번 시료에서 가장 높은 점수를 나타내었는데, 이 시료의 유리아미노산 함량은 1770.57mg/100g을 나타냈으며, glutamic acid (80%), alanine (2.3%), arginine(1.1%), methionine (7.6%) 가량을 차지하고 있었다.

<표 1. 숙성온도 및 기간에 따른 유리아미노산 함량>

(mg/100g)

	Sample No.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tau	44.72	47.89	40.59	42.75	58.68		59.04		38.89
Ala	38.01	33.05	41.69	64.09	40.34		50.13		11.44
Lys	4.44	8.00	7.46	28.26	10.53		25.70		7.14
Leu	15.27	18.98	24.85	56.08	25.29		45.23		9.24
Glu	1582.29	1293.50	1355.58	1293.63	1549.85		1412.95		1164
Val	20.67	20.98	22.79	39.05	26.62		35.44		0
Tyr	9.78	13.65	8.07	25.84	18.32		26.72		21.79
Gly	10.72	12.19	14.46	29.54	15.18		23.06		1.99
Met	8.03	8.30	12.22	36.61	10.38		18.58		0
Arg	54.17	49.20	21.20	40.19	60.55		58.26		35.09
g-ABA	17.12	14.25	21.66	23.84	16.65		21.75		15.46
His	4.75	5.53	5.20	8.86	7.69		9.52		4.35
Asp	87.66	70.96	63.13	75.27	94.78		91.59		65.48
Cys	0	0	0	0	0		0		20.52
Ser	15.09	16.89	9.41	18.64	21.90		26.94		11.78
Thr	12.19	12.18	14.14	26.83	16.30		19.91		20.06
Phe	17.45	18.65	26.45	46.91	23.08		37.55		7.50
Total	1942.36	1644.2	1688.9	1856.39	1996.14	0	1962.37	0	282.37

	Sample No.								
	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Tau	44.86	38.89	44.86	44.75	42.75	42.47	35.78	58.03	41.92
Ala	41.06	11.44	41.06	169.67	32.26	48.43	41.03	32.88	28.35
Lys	9.63	7.14	9.63	93.83	5.23	10.21	9.19	5.64	1.46
Leu	27.12	9.24	27.12	175.40	17.26	27.24	23.54	17.61	13.31
Glu	1149.69	11.64	1149.69	1429.05	1152.20	1493.18	1443.65	1343.58	995.88
Val	23.99	0	23.99	75.05	19.44	26.61	23.70	21.20	15.82
Tyr	9.11	21.79	9.11	54.06	6.69	13.35	12.16	14.59	6.01
Gly	15.52	1.99	15.52	111.06	10.15	13.75	12.34	11.23	10.11
Met	13.56	0	13.56	90.98	7.54	13.24	13.62	7.87	7.63
Arg	25.09	35.09	25.09	21.31	36.25	49.86	19.85	51.56	25.28
g-ABA	20.39	15.46	20.39	61.03	12.88	20.23	24.33	14.74	10.58
His	5.68	4.35	5.68	16.60	4.78	5.19	3.98	5.85	4.21
Asp	65.05	65.48	65.05	161.39	63.74	92.48	62.66	77.86	46.52
Cys	0	20.52	0	25.43	0	0	0.00	0.00	0.00
Ser	12.18	11.78	12.18	3.95	14.07	20.33	5.56	15.71	7.57
Thr	15.07	20.06	15.07	61.20	11.12	16.53	13.01	11.87	9.76
Phe	28.75	7.50	28.75	105.23	18.41	23.98	26.17	18.64	15.70
Total	1506.75	282.37	1506.75	2699.99	1454.77	1917.08	1770.57	1708.86	1240.11

(라) 고춧가루, 마늘, 미원의 첨가량을 달리한 가자미식해의 관능적 특성

1단계에서 가자미식해의 숙성온도, 숙성기간 및 염도의 최적화를 통하여 숙성조건을 숙성온도 11.63℃, 숙성기간 9.12일, 염도는 4.66% 동일조건에서 고춧가루, 마늘, 미원의 첨가량을 달리하여 총 18가지 종류의 가자미식해를 제조하여 관능검사를 실시하였다. 고춧가루 첨가량이 적은 시료들은 상기의 염도와 비슷하게 panel들에게서 맛에 낮은 점수를 받았으며, 약간의 비린맛을 느낀다고 대답하였다. 마늘 또한 Lee et al. (1989)은 마늘을 첨가하지 않은 김치에 비하여 2g을 첨가한 김치에서 외관, 이취, 종합적인 맛에서 좋게 평가되었다고 하는데 본 관능평가와 비교해 볼 때, 16번 시료인 마늘첨가 1%인 가자미식해가 가장 낮은 점수를 받은 것과 비교해 볼 때, 유사한 결과를 나타낸다. 또한 Kim et al. (1994)에 따른 오징어식해 자체의 품질변화에는 고춧가루와 마늘의 첨가량이 크게 영향을 미치지 않는다고 하는데 이는 각각의 가자미식해들의 색(color)과 조직감(texture)에서 전반적으로 큰 점수 차이를 나타내지 않는 것과 비교해 볼 때 유사한 결과라고 사료된다. 부재료 배합비를 달리한 가자미식해의 최고점은 18번 시료인 고춧가루 15%, 마늘 7%, 미원 1%가 5.8점으로 가장 높은 기호도를 나타내었으며, 다른 시료들과 유의적으로도 차이를 나타내었다. 5번 시료인 고춧가루 10%, 마늘 10%, 미원 4%가 4.6 점으로 가장 낮은 점수를 얻었다. 이를 바탕으로 실험설계를 하여 반응표면분석을 실시하였다.

Table 5. Experimental design for flounder(*V. moseri Jordan et Gilbert*) *sikhe* prepared with material proportion

Sample No.	Variable Level Ingredient							
	Factors			Flavor	Taste	Texture	Color	Overall quality
	X ₁	X ₂	X ₃					
	Red pepper powder (%)	Garlic (%)	MSG* (%)					
1	10	4	2	5.75±0.12 ^a	5.50±0.35 ^b	5.25±0.32 ^{ab}	5.88±0.11 ^a	5.21±0.21 ^{bc}
2	10	4	3	5.13±0.51 ^b	5.50±0.21 ^b	5.00±0.51 ^c	5.88±0.21 ^a	5.42±0.15 ^b
3	10	10	2	4.88±0.97 ^c	5.13±0.51 ^c	5.00±0.21 ^c	5.50±0.25 ^{ab}	5.10±0.21 ^c
4	20	4	2	4.37±0.14 ^d	4.50±0.32 ^d	4.75±0.12 ^d	5.63±0.61 ^a	4.81±0.75 ^d
5	10	10	4	4.13±0.22 ^d	4.63±0.21 ^d	4.63±0.64 ^d	5.13±0.32 ^c	4.62±0.23 ^d
6	20	10	2	4.75±0.84 ^c	5.00±0.33 ^c	5.75±1.01 ^a	5.50±0.28 ^{ab}	5.31±0.54 ^b
7	20	4	4	4.62±0.42 ^d	4.63±0.27 ^d	4.50±0.32 ^d	5.25±0.74 ^c	4.82±0.12 ^d
8	20	10	4	4.88±0.64 ^c	4.25±0.63 ^e	4.63±0.29 ^d	4.88±0.12 ^d	4.70±0.91 ^d
9	15	7	3	5.00±0.12 ^c	5.00±0.12 ^c	5.13±0.21 ^c	5.38±0.54 ^b	5.10±0.21 ^c
10	15	7	3	5.00±0.42 ^b	5.00±0.23 ^c	5.13±0.54 ^c	5.38±0.21 ^b	5.12±0.11 ^c
11	15	7	3	5.00±0.32 ^{bc}	5.50±0.45 ^b	5.13±0.52 ^c	5.38±0.63 ^b	5.35±0.36 ^b
12	15	7	3	5.00±0.17 ^c	5.50±0.23 ^b	5.13±0.31 ^c	5.38±0.55 ^b	5.31±0.12 ^b
13	25	7	3	5.00±0.41 ^{bc}	5.13±0.11 ^c	5.25±0.82 ^b	5.63±0.51 ^a	5.35±0.22 ^b
14	5	7	3	5.13±0.26 ^b	4.38±0.18 ^e	5.50±1.00 ^a	5.25±0.23 ^b	5.10±0.24 ^c
15	15	13	3	5.25±0.12 ^b	4.38±0.24 ^e	5.50±1.32 ^a	5.38±0.94 ^b	5.11±0.58 ^c
16	15	1	3	3.13±0.37 ^d	3.25±0.32 ^f	5.25±0.81 ^b	5.25±0.41 ^b	4.22±0.12 ^e
17	15	7	5	5.00±0.12 ^{bc}	5.38±0.12 ^{bc}	5.38±0.62 ^b	5.50±0.66 ^{ab}	5.35±0.63 ^b
18	15	7	1	5.13±0.63 ^b	6.13±0.12 ^a	5.50±0.15 ^a	5.63±0.41 ^a	5.65±0.23 ^a

^{a-f}Values with different superscripts in the same row are significantly at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test

¹monosodium glutmate.

(마) 고춧가루, 마늘, 미원의 첨가량을 달리한 가자미식혜의 제조 최적화

Table 5의 실험설계를 통하여 반응표면 분석을 실시한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 독립변수로 고춧가루(X_1), 마늘(X_2), 미원(X_3), 종속변수로 관능적 특성을 설정하였다. 일차식(primary regression)은 0.97, 이차식(quadratic regression)은 0.08로 5% 수준에서 유의성($P < 0.05$)이 없으며 각 부재료별 첨가량의 최소 및 최대 범위는 원물대비 고춧가루 5-25%, 마늘 1-13%, 미원 1-5% 하였으며, 이 구간에서 고춧가루 16.08%, 마늘 7.21%, 미원 2.96%가 최적조건으로 결과가 도출되었다. 반응표면 분석결과 관능평가에서 1순위였던, 18번 시료에 비해 17번 시료의 배합비와 유사한 결과를 나타내었으며, 반응표면 분석법을 계획한 결과값은 결정계수(R-squared)가 0.67로 신뢰성이 있음을 알 수 있었다. 실험설계 1. 2단계의 자료를 토대로 3단계 실험을 진행하였다.

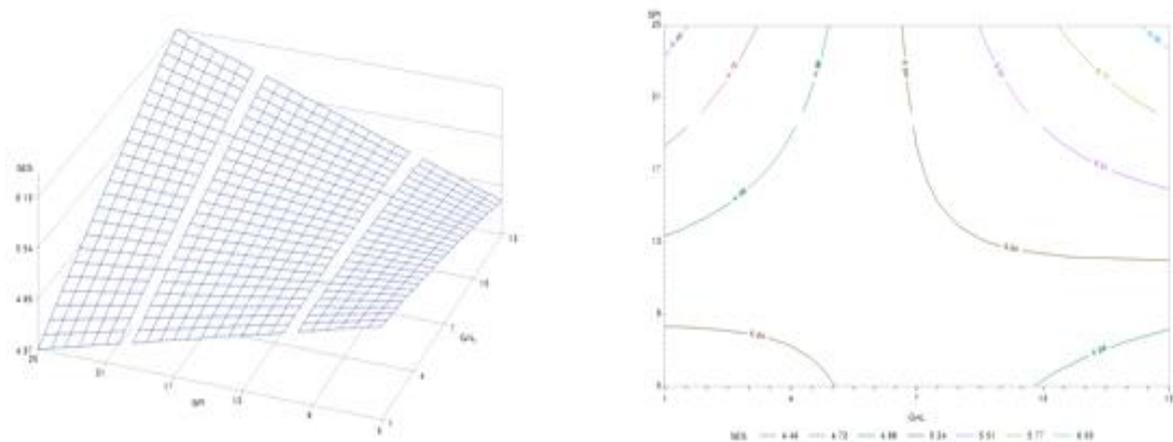


Fig 2. Perturbation plot and response surface for the effect of sensory characteristics of flounder (*V. moseri Jordan et Gilbert*) sikhe prepared with production process standardization

(바) 가자미식해의 고춧가루, 마늘, 미원 첨가량을 각각 달리한 유리아미노산 함량

부재료 첨가량을 달리한 가자미식해의 유리아미노산 함량은 아래와 같다. cystein은 모든 시료에서 거의 나타나지 않았으며, 상기 온도, 염도, 숙성기간에 따른 조건에서 제조한 식해에 비해 비교적 높은 유리아미노산 함량을 나타내었다. 2번 시료가 3378.22mg/100g으로 가장 높은 유리아미노산 함량을 나타내었으며, MSG 함량에 따라 glutamic acid의 함량의 변화가 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. 상기의 관능평가와 비교해 보면 17번 시료가 가장 높은 점수를 받았는데, 일반적으로 유리아미노산 함량이 관능에 영향을 주지만, 함량의 높낮음에 관능평가가 비례하지는 않았다. 17번 유리아미노산 함량은 2461.36mg/100g을 나타내었으며, 이 중 glutamic acid가 87.4%을 차지하고 있다. alanine은 약 1%정도를 차지하고 있었다.

<표 2. 유리아미노산 함량>

(mg/100g)

	Sample No.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tau	41.34	40.64	32.81	46.62	33.40	41.71	36.95	37.10	30.34
Ala	42.50	40.93	28.29	34.35	29.64	31.49	30.27	31.43	27.44
Lys	8.17	11.88	9.90	7.51	7.24	10.87	5.81	4.49	7.28
Leu	32.65	28.12	18.95	24.73	20.84	20.71	20.27	20.33	18.00
Glu	1653.27	2889.45	1309.34	1336.21	2551.55	1517.02	2102.38	2029.25	1435.26
Val	34.14	28.70	24.18	31.12	25.30	32.93	24.39	27.25	20.89
Tyr	33.00	25.60	20.01	18.37	19.77	18.89	18.15	18.89	19.18
Gly	20.89	21.15	13.81	13.63	13.32	11.24	12.45	11.52	12.52
Met	15.98	14.20	9.93	12.29	10.32	9.59	10.34	10.01	9.57
Arg	75.93	74.85	76.85	53.04	79.55	104.78	49.45	66.51	56.19
g-ABA	31.45	31.33	22.41	28.60	18.94	32.84	27.66	25.14	20.38
His	8.02	7.39	6.20	5.71	6.21	6.61	4.79	5.61	4.41
Asp	99.16	98.90	77.24	126.22	83.38	143.33	103.91	104.73	78.55
Cys	0	0.00	0.00	0.00	25.30	0.00	5.50	0.00	0.00
Ser	25.24	24.17	17.55	20.00	17.83	19.15	17.00	17.13	15.81
Thr	21.07	19.99	14.66	19.74	15.23	20.68	16.52	16.49	13.73
Phe	28.49	21.42	17.88	20.75	18.82	19.87	17.06	18.15	16.01
Total	2171.3	3378.72	1700.01	1798.89	2976.64	2041.71	2502.9	2444.03	1785.56

	Sample No.								
	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Tau			33.15	35.15	22.35	29.45	28.57	26.34	26.07
Ala			25.71	26.81	21.69	23.82	18.97	23.46	23.73
Lys			7.41	0.84	4.48	10.50	3.11	6.27	9.50
Leu			19.04	16.19	13.33	17.33	13.64	17.10	18.89
Glu			1579.97	1367.34	1434.54	1507.94	1172.70	2152.66	463.69
Val			24.22	23.66	14.21	23.48	15.99	21.68	22.73
Tyr			16.31	13.57	10.73	16.20	11.97	15.11	16.39
Gly			10.92	8.37	11.10	10.08	8.59	9.48	10.65
Met			9.32	8.13	7.21	8.09	7.11	8.14	9.51
Arg			57.26	39.73	42.14	73.44	18.90	48.00	48.78
g-ABA			21.72	21.65	10.66	18.51	12.80	19.48	20.40
His			5.29	3.84	4.20	5.11	2.94	4.00	4.07
Asp			82.44	98.06	35.71	83.48	57.86	69.21	67.81
Cys			0.00	0.00	3.86	0.00	0.00	0.00	0.00
Ser			15.59	12.98	11.64	15.11	10.87	13.45	14.53
Thr			14.63	12.00	9.21	14.06	9.72	12.19	12.83
Phe			17.52	15.16	11.25	16.82	12.86	14.79	15.82
Total	0	0	1940.5	1703.48	1668.31	1873.42	1406.6	2461.36	785.4

(사) 생강, 무, 좁쌀의 첨가량을 달리한 가자미식해의 관능적 특성

생강, 무, 좁쌀의 첨가량을 달리한 가자미식해는 실험 1, 2단계의 결과인 온도 11.63℃, 기간 9.12일, 염도는 4.66%, 고춧가루 16.08%, 마늘 7.21%, 미원 2.96%의 조건을 고정하여 총 18종류를 만들어서 관능검사를 실시한 결과를 Table 6에 나타내었다. 생강 4%, 무 10%, 좁쌀 18%로 첨가한 가자미식해에서 6.25점으로 가장 높은 점수를 나타냈고, 생강 1%, 무 15%, 좁쌀 14%의 가자미식해에서는 2.59점으로 가장 낮은 점수를 나타내었다. 두 개의 시료를 비교해 보면 생강의 함량이 가자미식해의 기호도에 큰 영향을 미치는 것으로 사료되며, 좁쌀 또한 첨가량이 증가할수록 평균적으로 관능점수가 높게 나타났다. 또한 무의 경우에는 관능평가에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 최종적인 각각의 관능평가와 재료배합비를 토대로하여 반응표면 분석을 위한 실험설계를 하였다.

Table 6. Experimental design for flounder(*Verasper moseri* Jordan et Gilberu) sikhe prepared with material proportion

Sample No.	Variable Level Ingredient			Flavor	Taste	Texture	Color	Overall quality
	Factors							
	Ginger (%)	Radish (%)	Foxtail millet (%)					
1	2	10	10	4.75±0.23 ^d	5.13±0.36 ^d	5.50±0.14 ^c	5.13±0.11 ^c	5.13±0.26 ^e
2	2	10	18	4.63±0.21 ^d	5.50±0.22 ^c	5.88±0.52 ^b	5.00±0.21 ^d	5.25±0.16 ^e
3	2	20	10	3.88±0.91 ^e	4.88±0.78 ^e	4.75±0.36 ^e	4.88±0.10 ^d	4.59±0.58 ^f
4	4	10	18	5.25±0.33 ^c	5.88±0.82 ^b	5.63±0.33 ^c	5.88±0.36 ^{ab}	5.66±0.33 ^c
5	2	20	18	5.25±0.51 ^c	5.75±0.63 ^{bc}	5.38±0.44 ^c	5.75±0.24 ^b	5.53±0.14 ^c
6	4	20	10	5.63±0.24 ^b	5.13±0.56 ^d	6.13±0.25 ^{ab}	5.75±0.63 ^b	5.66±0.61 ^c
7	4	10	18	6.13±0.36 ^a	6.13±0.98 ^a	6.63±0.63 ^a	6.13±0.12 ^a	6.25±0.39 ^a
8	4	20	18	3.63±0.74 ^e	4.75±1.03 ^e	5.25±0.84 ^c	4.75±0.22 ^d	4.59±0.21 ^f
9	3	15	14	5.13±0.22 ^c	5.38±0.94 ^c	5.88±0.59 ^b	5.13±0.85 ^c	5.38±0.14 ^d
10	3	15	14	5.13±0.36 ^c	5.38±0.13 ^c	5.88±0.93 ^b	5.13±0.39 ^c	5.38±0.89 ^d
11	3	15	14	4.75±0.51 ^d	4.88±0.36 ^e	5.88±0.21 ^b	5.38±0.93 ^{bc}	5.22±0.12 ^d
12	3	15	14	4.75±0.36 ^d	4.88±0.36 ^e	5.88±0.53 ^b	5.38±0.36 ^c	5.22±0.11 ^d
13	5	15	14	4.75±0.19 ^d	5.00±0.23 ^d	5.00±0.12 ^d	5.38±0.12 ^c	5.03±0.74 ^d
14	1	15	14	1.88±0.05 ^f	3.13±0.11 ^f	1.75±0.12 ^f	3.63±0.51 ^f	2.59±0.21 ^g
15	3	25	14	4.75±0.36 ^d	5.38±0.32 ^c	5.63±0.36 ^c	5.75±0.36 ^b	5.38±0.69 ^c
16	3	5	14	5.13±0.23 ^c	4.75±0.51 ^e	5.25±0.41 ^{cd}	4.63±0.56 ^d	4.94±0.74 ^f
17	3	15	22	5.63±0.78 ^b	6.25±0.69 ^a	6.00±0.48 ^b	6.00±0.41 ^a	5.97±0.14 ^b
18	3	15	6	5.13±0.34 ^c	4.88±0.26 ^e	5.63±0.26 ^c	5.63±0.31 ^b	5.31±0.21 ^d

^{a-f}Values with different superscripts in the same row are significantly at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(아) 생강, 무, 좁쌀의 첨가량을 달리한 가자미식혜의 표준화

생강, 무, 좁쌀의 첨가량과 관능평가를 토대로 반응표면 분석을 실시한 결과는 Fig. 3과 같다. 종속변수 생강(X_1), 무(X_2), 좁쌀(X_3), 독립변수는 관능적 특성으로 설정하였다. 생강, 무, 좁쌀 첨가량 범위에서 가장 적정 첨가량은 각각 원물 무게 대비 생강 3.70%, 무 10.12%, 좁쌀 13.72%를 나타냈으며, 반응표면 분석법을 계획한 결과값은 결정계수(R-squared)가 0.77로 신뢰성을 가짐을 보여 주었다. 가장 점수가 높았던 관능평가 시료와 비교해 보았을 때, 생강과 무의 첨가량을 비슷한 수준을 나타내었으며, 좁쌀은 4% 정도 낮은 함량을 나타내었다. 생강과 무, 좁쌀의 첨가량의 최종적으로 가자미식혜의 제조 공정 최적화 조건은 숙성온도 11.63°C, 숙성기간 9.12일, 염도는 4.66%, 고춧가루 16.08%, 마늘 7.21%, 미원 2.96%, 생강 3.70%, 무 10.12%, 좁쌀 13.72%로 나타났다. 본 연구를 진행하면서 발효숙성 식품인 가자미식혜의 제조 최적화 조건을 찾기에 발효라는 특별한 조건에 의하여 각각의 데이터가 일정하지 않아서 많은 어려움이 있었다. 추가적인 연구를 통하여 각각의 최적화 조건을 점점 줄여나가면서 최적의 조건의 가자미식혜를 제조하는 방법을 연구한다며 더 나은 품질의 가자미식혜를 제조할 수 있을 것으로 사료된다.

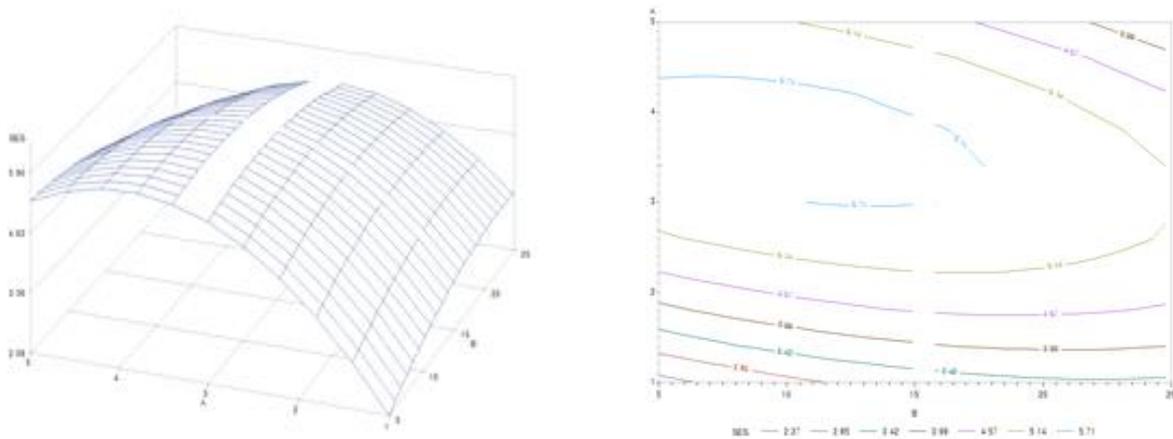


Fig. 3 Perturbation plot and response surface for the effect of sensory characteristics of flounder (*V. moseri Jordan et Gilbert*) sikhe prepared with production process standardization.

(자) 가자미식해의 생강, 무, 좁쌀 첨가량을 각각 달리한 유리아미노산 함량

생강, 무, 좁쌀 첨가량을 달리한 가자미식해의 각각의 유리아미노산 함량은 아래와 같다. 상기 숙성온도, 기간, 염도의 표준화를 1단계 스텝으로 한 후 이를 기준으로 각각의 부재료 첨가량을 달리한 가자미식해에서 대부분 총유리아미노산 함량이 2000mg/100g 이상을 나타내는 경향을 보여 주었다. 각각의 1단계 (온도,기간,염도), 2단계 (고춧가루, 마늘, 미원), 3단계 (생강, 무, 좁쌀), 총 3단계 스텝으로 최종 제조된 시료에서는 7번시료가 관능평가에서 가장 높은 점수를 나타냈으며, 이 시료의 총 유리아미노산 함량은 2259.96mg/100g을 나타냈다. glutamic acid가 약 87%를 차지하였으며, alanine 1.13%, arginine과 methionine이 약 0.5% 정도를 차지하였다.

<표 3. 유리아미노산 함량>

(mg/100g)

Sample No.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tau	41.67	40.12	36.89	31.76	30.92	34.10	41.93	40.49	
Ala	27.08	24.90	24.94	30.42	23.87	27.74	25.61	24.94	
Lys	1.71	1.19	3.19	1.00	0.71	2.57	2.75	2.61	
Leu	15.64	13.99	17.42	19.34	14.16	16.52	18.90	17.17	
Glu	1945.01	1937.06	1810.22	1862.25	1646.10	1870.69	1964.80	1836.38	
Val	20.61	19.73	21.08	21.26	17.85	20.14	21.59	20.63	
Tyr	11.73	10.78	12.37	14.49	9.49	13.16	13.37	12.23	
Gly	10.65	9.89	9.92	11.08	8.79	11.04	10.71	9.92	
Met	7.70	6.81	8.46	9.34	6.58	8.36	9.14	8.02	
Arg	2.01	2.51	0.00	0.00	1.32	2.25	6.72	0.00	
g-ABA	18.50	16.92	16.72	14.37	16.06	17.86	15.79	17.98	
His	4.11	3.83	4.00	4.15	3.62	4.19	3.90	3.77	
Asp	78.85	81.33	75.96	77.16	70.48	77.90	84.38	77.22	
Cys	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
Ser	14.13	13.27	14.01	15.38	11.83	14.48	14.50	13.88	
Thr	12.55	11.94	12.31	12.39	10.50	12.11	12.50	12.07	
Phe	12.87	11.71	13.35	13.63	10.92	12.71	13.37	12.33	
Total	2224.82	2205.98	2080.84	2138.02	1883.2	2145.82	2259.96	2109.64	0

Sample No.									
	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Tau		32.83	39.00	44.71	40.42	40.29	39.31	34.96	43.14
Ala		20.46	22.45	27.67	26.08	23.32	23.50	21.09	24.56
Lys		1.05	1.81	1.87	5.02	2.00	0.83	2.08	1.53
Leu		14.06	14.28	18.39	21.99	16.18	15.10	13.98	15.13
Glu		1445.77	1572.06	1856.88	1800.69	1754.79	1898.18	1548.48	1574.04
Val		16.47	17.90	21.24	22.95	19.81	19.53	17.46	18.70
Tyr		11.16	11.30	14.15	13.57	10.16	13.00	11.14	12.67
Gly		9.50	9.93	12.15	11.27	9.84	10.28	9.64	11.01
Met		7.07	7.05	8.81	98.76	7.81	7.62	7.05	7.41
Arg		0.00	0.47	2.25	0.00	0.86	4.09	1.72	1.19
g-ABA		11.10	13.77	14.98	16.10	16.86	20.00	13.97	13.05
His		3.28	3.53	4.10	4.82	3.75	3.81	3.42	4.15
Asp		59.14	68.38	78.08	78.70	76.85	80.22	65.53	67.00
Cys		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ser		11.57	12.21	15.53	15.49	13.42	13.11	12.06	13.66
Thr		9.46	10.61	13.07	13.64	11.86	11.46	10.28	11.36
Phe		11.63	11.14	13.32	15.43	11.65	13.84	10.85	12.20
Total	0	1664.55	1815.89	2147.2	2184.93	2019.45	2173.88	1783.71	1830.8

(3) 명태식해의 제조 공정 최적화(반응표면분석)

명태식해의 제조 공정에 대한 모든 설계는 반응표면 실험계획법의 central composite design에 따라 SAS(statistical analysis system 10.0) 프로그램을 사용하였다. 1단계 계획으로 독립변수로는 온도(X_1), 기간(X_2), 염도(X_3)의 함량을, 종속변수로는 관능적 특성의 색, 향, 조직감, 맛 전반적인 기호도로 설정하여 표준화하였고 이를 바탕으로 2단계는 독립변수로 고춧가루(X_1), 마늘(X_2), 미원(X_3), 종속변수로 관능적 특성을 설정하였다. 3단계 또한 1-2단계를 바탕으로하여 종속변수 무(X_1), 생강(X_2), 좁쌀(X_3), 독립변수는 관능적 특성으로 설정 하였다. 각 요인의 최소 및 최대 범위를 각각 온도 5~25℃, 기간 8~20일, 염도 3~7%, 고춧가루 4~16%, 마늘 1~9%, 미원 1~5%로 정하였다. 완성된 실험 각각의 디자인의 재료 혼합 비율은 Table 7, 8, 9와 같다.

Table 7. Experimental design for Alaska pollack sikhae prepared of fermentation condition

Sample No.	Variable Level Ingredient								
	Factors			Red paper Powder (%)	Garlic (%)	MSG (%)	Radish(%)	Ginger(%)	Foxtail millet (%)
	X_1 TEMP (°C)	X_2 DAY	X_3 Salinity (%)						
1	10	11	4	10	5	3	10	3	5
2	10	11	6	15	5	3	10	3	5
3	10	17	4	15	5	3	10	3	5
4	20	11	4	15	5	3	10	3	5
5	10	17	6	15	5	3	10	3	5
6	20	17	4	15	5	3	10	3	5
7	20	11	6	15	5	3	10	3	5
8	20	17	6	15	5	3	10	3	5
9	15	14	5	15	5	3	10	3	5
10	15	14	5	15	5	3	10	3	5
11	15	14	5	15	5	3	10	3	5
12	15	14	5	15	5	3	10	3	5
13	25	14	5	15	5	3	10	3	5
14	5	14	5	15	5	3	10	3	5
15	15	20	5	15	5	3	10	3	5
16	15	8	5	15	5	3	10	3	5
17	15	14	7	15	5	3	10	3	5
18	15	14	3	15	5	3	10	3	5

Table 8. Experimental design for Alaska pollack sikhae prepared with material proportion

Sample No.	Variable Level Ingredient								
	Factors			TEMP (°C)	DAY	Salinity (%)	Radish (%)	Ginger (%)	Foxtail millet (%)
	X ₁	X ₂	X ₃						
	Red paper power (%)	Garlic (%)	MSG (%)						
1	7	3	2	15	8	5	10	3	5
2	7	3	4	15	8	5	10	3	5
3	7	7	2	15	8	5	10	3	5
4	13	3	2	15	8	5	10	3	5
5	7	7	4	15	8	5	10	3	5
6	13	7	2	15	8	5	10	3	5
7	13	3	4	15	8	5	10	3	5
8	13	7	4	15	8	5	10	3	5
9	10	5	3	15	8	5	10	3	5
10	10	5	3	15	8	5	10	3	5
11	10	5	3	15	8	5	10	3	5
12	10	5	3	15	8	5	10	3	5
13	16	5	3	15	8	5	10	3	5
14	4	5	3	15	8	5	10	3	5
15	10	9	3	15	8	5	10	3	5
16	10	1	3	15	8	5	10	3	5
17	10	5	5	15	8	5	10	3	5
18	10	5	1	15	8	5	10	3	5

Table 9. Experimental design for Alaska pollack sikhae prepared with material proportion

Sample No.	Variable Level Ingredient								
	Factors			Red papper power (%)	Garlic (%)	MSG (%)	TEMP (°C)	DAY	Salinity (%)
	X ₁	X ₂	X ₃						
	Ginger (%)	Radish (%)	Foxtail millet (%)						
1	2	5	3	13	7	4	15	8	5
2	2	5	7	13	7	4	15	8	5
3	2	15	3	13	7	4	15	8	5
4	4	5	3	13	7	4	15	8	5
5	2	15	7	13	7	4	15	8	5
6	4	15	3	13	7	4	15	8	5
7	4	5	7	13	7	4	15	8	5
8	4	15	7	13	7	4	15	8	5
9	3	10	5	13	7	4	15	8	5
10	3	10	5	13	7	4	15	8	5
11	3	10	5	13	7	4	15	8	5
12	3	10	5	13	7	4	15	8	5
13	5	10	5	13	7	4	15	8	5
14	1	10	5	13	7	4	15	8	5
15	3	20	5	13	7	4	15	8	5
16	3	1	5	13	7	4	15	8	5
17	3	10	9	13	7	4	15	8	5
18	3	10	1	13	7	4	15	8	5

(가) 온도, 기간, 염도의 조건을 달리한 명태식해 관능적 특성

온도와, 숙성기간, 그리고 염도를 각각 달리한 조건에 따른 명태식해의 맛, 색, 조직감, 향에 대한 기호도는 Table 10과 같다. 예비 실험을 통하여 5℃와 15℃ 구간의 관능적으로 나쁜 조건은 배제하여 총 18가지 조합으로 명태식해를 제조하여 관능검사를 실시하였다. 16번 시료인 온도 15℃, 기간 8일, 염도 5%의 명태식해가 총점 5.8점으로 가장 좋은 기호도를 나타내었으며 20℃ 이상의 고온에서의 명태식해는 금방 부패되어 관능평가를 실시 할 수 없었다. 5℃에서 숙성한 명태식해는 온도가 낮은 되는 발효기간이 길어지는 경향이 있었으나 관능평가에서 5.1점으로 두 번째로 좋은 결과를 나타내었으며, 이 자료 조건을 통하여 Table 10과 같이 온도, 숙성기간, 염도, 기호도에 대한 실험계획을 세울 수 있었다.

Table 10. Experimental design for Alaska pollack sikhae prepared of fermentation condition

sample No.	Variable Level Ingredient			Flavor	Taste	Texture	Color	Overall quality
	Factors							
	X ₁ TEMP (°C)	X ₂ DAY	X ₃ Salinity (%)					
1	10	11	4	5	5	4.6	5	4.9
2	10	11	6	4	4	4.6	5	4.4
3	10	17	4	0	0	0	0	0
4	20	11	4	4	4	5	5	4.5
5	10	17	6	0	0	0	0	0
6	20	17	4	0	0	0	0	0
7	20	11	6	5	5	4.2	5	4.8
8	20	17	6	0	0	0	0	0
9	15	14	5	5	4	4.4	5	4.6
10	15	14	5	5	4	4.4	5	4.6
11	15	14	5	5	4	4.4	5	4.6
12	15	14	5	5	4	4.4	5	4.6
13	25	14	5	0	0	0	0	0
14	5	14	5	5	5	5.4	5	5.1
15	15	20	5	0	0	0	0	0
16	15	8	5	6	6	6.2	5	5.8
17	15	14	7	4	4	4.4	4	4.1
18	15	14	3	4	4	3.6	4	3.9

(나) 온도, 기간, 염도의 조건을 달리한 명태식혜 표준화

Table 10의 실험계획을 자료로 하여 반응표면 분석을 실시한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 독립변수로는 온도(X_1), 기간(X_2), 염도(X_3)의 함량을, 종속변수로는 관능적 특성의 색, 향, 조직감, 맛 전반적인 기호도로 설정하여 3차원 그래프화 하여 표준화하였다. 일차식(linear regression)은 0.71으로 5% 수준에서 유의성($P < 0.05$)이 없으며 이차식(quadratic regression)도 0.11로 유의성이 없었다. 각 요인의 최소 및 최대 범위 온도 5~25°C 구간에서는 12.22°C가 가장 최적조건으로 나타났으며 숙성기간 8~20일 구간에서는 8.3일이 최적 조건을 나타냈다. 염도는 3~7% 구간에서 4.8% 구간이 가장 적정구간으로 나타났다. 본 반응표면 분석법을 계획한 결과값은 결정계수(R-square)가 0.8254로 0.5 이상을 나타내어 신뢰성을 가지는 결과를 나타내었고 온도, 숙성기간, 염도의 최적 조건은 온도 약 12°C, 기간 약 8일, 염도는 4.8%로 라는 결론을 내릴 수 있었다. 이 조건을 고정하여 Table 11의 고춧가루, 마늘, 미원을 함량을 달리하여 제조한 명태식혜의 실험설계를 실시하였다.

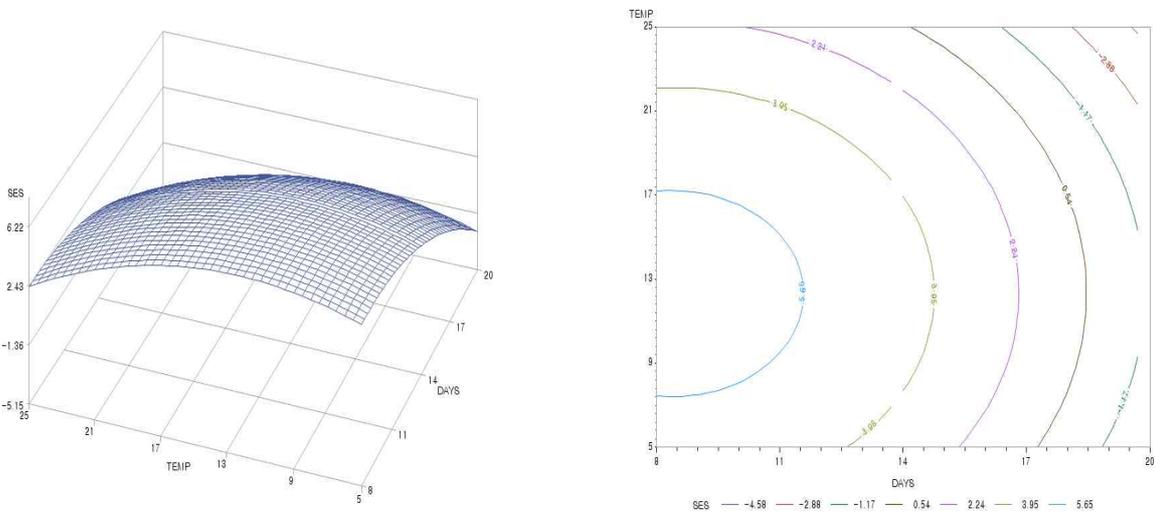


Fig. 4 Perturbation plot and response surface for the effect of sensory characteristics of sikhe prepared with production process standardization

(다) 명태식해의 온도, 날짜, 염도 첨가량을 각각 달리한 유리아미노산 함량

명태식해의 숙성온도, 기간, 염도를 달리한 총 18종의 시료의 총 유리아미노산 함량은 아래와 같다. 명태식해 또한 가자미 식해와 같이 Cys는 나타나지 않았다. 타우린 함량은 가자미식해와 비슷하게 25~40mg/100g 정도를 나타내었으며, 총 유리아미노산 함량에서 가자미식해에 비해 높은 경향을 나타내었다. 관능평가에서 5.8점으로 가장 높은 점수를 받은 16번 시료의 총 유리아미노산 함량은 2919.49mg/100g을 나타냈으며, 64.8%의 glutamic acid가 차지하고 있으며, alanine 2.5%, Arg 2.12% 정도를 차지하였다. 13번 시료의 총 유리아미노산 함량은 4032.29mg/100g으로 다른 시료들에 비하여 월등히 높은 함량을 나타내었는데, 25℃, 14일의 명태식해로 부패하여 관능이 어려운 상태였다. 이로 보아 유리아미노산의 함량이 높을수록 관능에 관여하지는 않는 것으로 사료되며, 추가적인 실험을 통하여 가장 좋은 유리아미노산 함량을 표준화 할 필요성이 있다고 사료된다.

<표 4. 유리아미노산 함량>

(mg/100g)

	Sample No.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tau	39.27	44.75	40.85	48.36	34.60		38.89		28.73
Ala	33.79	42.86	40.25	46.80	34.36		73.39		71.25
Lys	8.35	20.97	12.50	26.36	14.66		59.79		41.89
Leu	16.86	23.59	22.47	44.87	21.67		64.88		71.65
Glu	2270.47	2516.57	2263.39	1765.15	1633.15		1894.22		2230.40
Val	19.77	25.53	22.50	33.94	21.60		45.47		46.18
Tyr	12.45	18.03	15.41	14.86	14.59		33.68		35.63
Gly	8.72	11.48	9.77	17.75	10.09		21.37		17.64
Met	7.71	9.33	10.71	19.33	13.29		28.55		36.58
Arg	40.28	62.40	36.85	24.23	45.36		55.11		84.92
g-ABA	17.07	21.93	22.59	27.48	11.28		20.16		25.43
His	3.43	4.67	3.78	4.97	3.78		8.35		9.15
Asp	89.01	93.63	81.68	77.44	65.02		89.23		85.20
Cys	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00		0.00
Ser	13.40	19.93	11.34	21.68	17.14		34.89		28.97
Thr	11.41	14.69	12.23	19.90	11.87		25.69		25.62
Phe	17.41	23.15	22.97	31.56	19.48		41.60		51.72
Total	2609.4	2953.51	2629.29	2224.68	1971.94	0	2535.27	0	2890.96

	Sample No.								
	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Tau	26.51			29.87	22.75	28.57	26.17	33.92	28.35
Ala	56.42			231.06	35.79	82.65	48.29	33.44	37.77
Lys	36.80			229.11	22.00	50.75	23.19	19.36	10.20
Leu	52.00			270.47	22.01	87.57	38.90	22.47	24.84
Glu	2090.34			2384.57	1662.42	2002.61	2485.95	1956.62	1679.07
Val	36.32			139.93	20.58	54.92	30.24	21.36	21.14
Tyr	24.00			42.50	11.46	42.71	17.91	14.84	14.33
Gly	13.42			59.22	9.55	23.38	10.88	9.35	8.94
Met	25.77			104.89	9.85	46.59	18.19	8.75	10.24
Arg	77.78			4.67	50.03	73.93	62.02	52.93	20.66
g-ABA	19.23			78.24	13.47	42.71	15.97	15.51	33.94
His	6.68			29.29	3.95	9.27	4.13	3.98	3.71
Asp	87.37			235.45	65.44	84.03	75.89	79.61	31.80
Cys	0.00			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ser	26.16			47.61	19.12	32.07	21.99	17.80	5.16
Thr	20.57			29.83	12.51	30.57	16.59	12.67	11.00
Phe	32.59			115.58	18.54	64.93	23.18	20.23	27.90
Total	2631.96	0	0	4032.29	1999.47	2757.26	2919.49	2322.84	1969.05

(라) 고춧가루, 마늘, 미원의 첨가량을 달리한 명태식해의 관능적 특성

고춧가루, 마늘, 미원의 첨가량을 달리하여 총 18가지 종류의 명태식해를 제조하여 관능검사를 실시하였다. 숙성조건은 1단계에서 실시한 최적조건인 온도 약 12.2℃, 기간 약 8.3일, 염도는 4.8% 동일조건에서 제조하였다. 최고점은 8번 시료인 고춧가루 13%, 마늘 7%, 미원 4%가 6.09점으로 가장 높은 기호도를 나타내었으며, 고춧가루첨가량이 가장 적은 5번 시료인 고춧가루 4%, 마늘 5%, 미원 3%가 3.66점으로 가장 낮은 점수를 얻었다. 전반적으로 고춧가루, 함량이 7%이상인 시료에서는 시료간에서 큰 점수차이는 보이지 않았으나, 그 이하인 명태식해는 낮은 기호도가 나타났다. 이를 바탕으로 실험설계를 하여 반응표면분석을 실시하였다.

Table 11. Experimental design for Alaska pollack sikhae prepared with material proportion

Sample No.	Variable Level Ingredient							Overall quality
	Factors			Flavor	Taste	Texture	Color	
	Red papper paper(%)	Garlic(%)	MSG(%)					
1	7	3	2	5.25	5.25	5.00	5.38	5.22
2	7	3	4	4.88	6.00	5.50	5.63	5.50
3	7	7	2	5.25	6.13	5.25	5.50	5.53
4	13	3	2	5.38	5.63	5.75	5.75	5.63
5	7	7	4	4.75	5.50	4.88	5.38	5.13
6	13	7	2	4.13	5.63	4.75	5.50	5.00
7	13	3	4	4.63	4.75	5.88	5.50	5.19
8	13	7	4	5.50	6.38	6.25	6.25	6.09
9	10	5	3	5.00	5.88	5.88	6.13	5.72
10	10	5	3	5.00	5.88	5.88	6.13	5.72
11	10	5	3	5.00	5.25	5.75	5.75	5.44
12	10	5	3	5.00	5.25	5.75	5.75	5.44
13	16	5	3	5.63	5.63	6.00	6.00	5.81
14	4	5	3	3.00	4.00	3.13	4.50	3.66
15	10	9	3	4.38	6.25	6.00	6.00	5.66
16	10	1	3	5.00	5.63	6.13	6.13	5.72
17	10	5	5	5.00	6.13	6.13	6.38	5.91
18	10	5	1	4.63	5.25	5.00	5.50	5.09

(마) 고춧가루, 마늘, 미원의 첨가량을 달리한 명태식혜의 표준화

Table 11의 실험설계를 통하여 반응표면 분석을 실시한 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 독립변수로 고춧가루(X_1), 마늘(X_2), 미원(X_3), 종속변수로 관능적 특성을 설정하였다. 일차식(linear regression)은 0.65, 이차식(quadratic regression)은 0.11로 5% 수준에서 유의성($P < 0.05$)이 없으며 각 부재료별 첨가량의 최소 및 최대 범위는 원물대비 고춧가루 4~16%, 마늘 1~9%, 미원 1~5% 하였으며, 이 구간에서 고춧가루 14.20%, 마늘 8.44%, 미원 4.1%가 최적조건으로 결과가 도출되었다. 반응표면 분석결과 관능평가에서 6.09점으로 가장 점수가 높았던 8번 시료의 배합비와 유사한 결과를 나타내었으며, 반응표면 분석법을 계획한 결과값은 결정계수(R-squaer)가 0.80로 신뢰성이 있음을 알 수 있었다. 실험설계 1. 2단계의 자료를 토대로 3단계 실험을 진행하였다.

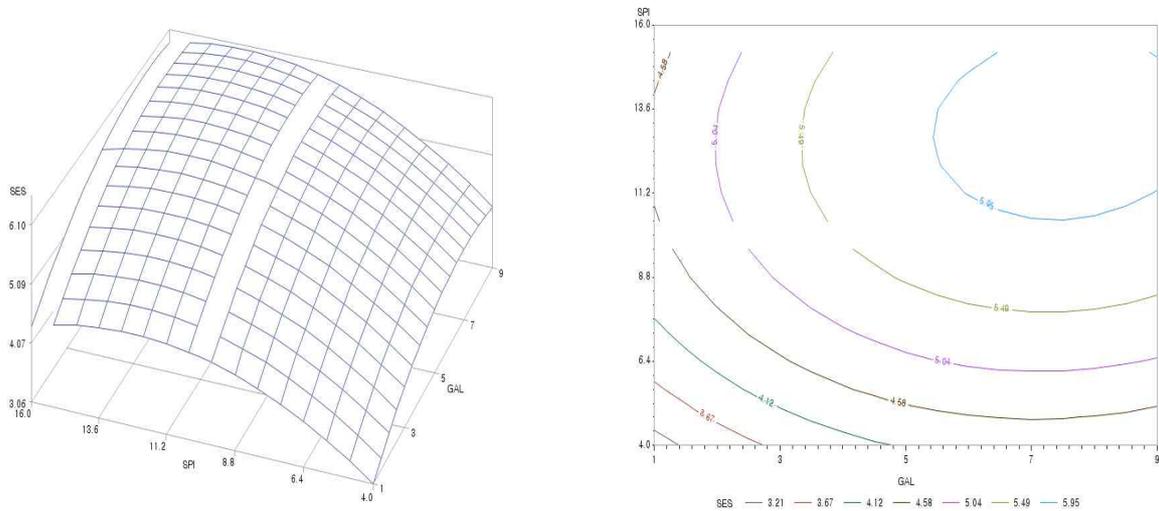


Fig. 5 Perturbation plot and response surface for the effect of sensory characteristics of sikhe prepared with production process standardization

(바) 명태식해의 고춧가루, 마늘, 미원 첨가량을 각각 달리한 유리아미노산 함량

명태식해의 부재료첨가량별 총 유리아미노산 함량은 아래에 나타내었다. 관능평가에서는 8번 시료가 가장 높은 점수를 받았는데, 이 때의 명태식해의 총 유리아미노산 함량은 2352.85mg/100g을 나타냈다. glutamic acid가 86%를 차지하였으며, 대부분을 식해들과 비교할 때, 비슷한 수준을 함유하는 것으로 사료된다. Ala 1%, Met 0.4%, Arg 2.12% 정도를 각각 차지하고 있었으며, Cys는 검출되지 않았다.

(mg/100g)

	Sample No.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tau	13.55	12.78	12.42	20.30	12.25	17.99	16.56	17.57	14.49
Ala	19.32	17.66	18.03	22.01	15.81	20.57	21.43	24.02	18.79
Lys	12.71	8.34	12.34	6.59	10.75	11.09	11.52	13.32	11.59
Leu	17.94	9.13	15.78	17.11	10.51	16.67	18.39	19.22	16.08
Glu	1288.05	2277.68	1258.28	1186.02	2137.89	1335.51	2160.77	2042.38	1617.50
Val	17.43	15.07	18.42	20.78	15.44	20.74	19.41	21.33	17.60
Tyr	12.71	6.66	13.06	13.74	11.59	13.19	12.89	14.14	12.25
Gly	5.84	5.88	5.61	6.40	5.26	5.74	6.00	6.41	5.42
Met	8.86	5.63	8.31	9.06	5.84	8.64	9.16	9.43	7.83
Arg	30.93	29.09	48.40	34.13	48.69	49.00	29.97	51.17	34.75
g-ABA	13.84	14.49	11.83	18.81	13.33	23.07	15.58	19.27	13.45
His	2.22	2.20	2.33	2.27	2.19	2.96	2.14	2.59	2.14
Asp	47.65	44.90	49.60	70.90	45.27	75.10	64.51	70.96	52.75
Cys	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ser	10.33	9.49	10.94	12.31	10.30	12.40	11.13	13.15	10.20
Thr	8.99	8.29	9.41	11.71	8.16	11.30	10.21	11.88	9.00
Phe	14.78	9.04	14.83	17.01	13.16	16.95	15.53	16.01	14.57
Total	1525.15	2476.33	1509.59	1469.15	2366.44	1640.92	2425.2	2352.85	1858.41

	Sample No.								
	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Tau			14.50	11.80	7.73	11.59	12.38	11.40	16.52
Ala			18.49	11.31	12.81	18.39	17.61	18.55	23.54
Lys			11.22	6.31	4.93	12.98	6.63	10.41	12.82
Leu			13.70	10.15	7.40	14.64	13.58	13.49	20.29
Glu			1656.85	1012.50	1403.63	1410.58	1473.27	2528.53	703.62
Val			16.67	12.44	11.46	19.35	14.99	15.83	20.47
Tyr			7.54	4.96	4.73	14.89	5.86	10.41	14.12
Gly			5.11	3.51	4.52	5.79	5.08	4.99	6.80
Met			7.21	4.76	4.33	7.42	6.58	7.53	9.70
Arg			39.41	22.41	31.92	67.87	19.49	35.86	44.32
g-ABA			14.89	11.02	8.33	14.75	15.81	17.88	14.23
His			2.22	1.60	1.64	2.84	1.88	1.96	3.18
Asp			57.92	48.05	26.49	55.96	48.83	53.11	58.56
Cys			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ser			9.91	7.35	7.01	11.54	9.71	9.91	12.92
Thr			9.22	7.08	5.45	9.72	8.76	8.34	11.28
Phe			11.86	8.71	7.34	16.31	9.94	12.58	17.96
Total	0	0	1896.72	1183.96	1549.72	1694.62	1670.4	2760.78	990.33

(사) 생강, 무, 좁쌀의 첨가량을 달리한 명태식해의 관능적 특성

생강, 무, 좁쌀의 첨가량을 달리한 명태식해는 실험 1, 2단계의 결과인 온도 약 12.2℃, 기간 약 8.3일, 염도는 4.8%, 고춧가루 14.2%, 마늘 8.4%, 미원 4.1%의 조건을 고정하여 총 18종류를 만들어서 관능검사를 실시한 결과를 Table 12에 나타내었다. 생강 2%, 무 5%, 좁쌀 3%와 좁쌀 7% 첨가한 명태식해에서 1, 2번에서 5.8점으로 가장 높은 점수를 나타냈고, 비교적 생강이 많이 첨가된 8번 시료 생강 4%, 무 15%, 좁쌀 7%의 가자미식해에서는 4.8점으로 가장 낮은 점수를 나타내었다. 두 개의 시료를 비교해 보면 생강의 함량이 명태식해의 기호도에 큰 영향을 미치는 것으로 사료되며, 각각의 관능평가와 재료 배합비를 토대로하여 반응표면 분석을 위한 실험설계를 하였다.

Table 12. Experimental design for Alasak pollack sikhae prepared with material proportion

Sample No.	Variable Level Ingredient			Flavor	Taste	Texture	Color	Overall quality
	Factors							
	X ₁	X ₂	X ₃					
	Ginger (%)	Radish (%)	Foxtail millet (%)					
1	2	5	3	5.0	5.2	5.0	5.0	5.2
2	2	5	7	6.0	6.6	6.2	6.0	6.2
3	2	15	3	4.8	5.0	5.0	4.0	4.7
4	4	5	3	5.0	5.0	5.0	4.6	4.9
5	2	15	7	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
6	4	15	3	4.8	5.0	4.4	5.0	4.8
7	4	5	7	5.0	5.4	5.0	5.0	5.1
8	4	15	7	4.6	5.0	5.0	4.6	4.8
9	3	10	5	5.0	5.0	5.4	5.0	5.1
10	3	10	5	5.0	6.0	5.6	5.0	5.4
11	3	10	5	5.0	5.0	5.4	5.0	5.1
12	3	10	5	5.0	6.0	5.6	5.0	5.4
13	5	10	5	5.0	5.4	5.0	5.0	5.1
14	1	10	5	5.0	5.0	5.4	5.0	5.1
15	3	20	5	5.0	5.4	5.0	5.4	5.2
16	3	1	5	5.0	6.0	5.0	5.6	5.4
17	3	10	9	6.0	5.0	5.2	5.4	5.4
18	3	10	1	5.0	6.0	6.0	5.0	5.5

(아) 생강, 무, 좁쌀의 첨가량을 달리한 명태식혜의 표준화

생강, 무, 좁쌀의 첨가량과 관능평가를 토대로 반응표면 분석을 실시한 결과는 Fig 6과 같다. 종속변수 생강(x1), 무(x2), 좁쌀(x3), 독립변수는 관능적 특성으로 설정하였다. 반응표면분석을 실시한 결과 생강, 무, 좁쌀 첨가량 범위에서 가장 적정 첨가량은 각각 원물 무게 대비 생강 2.6%, 무 5.6%, 좁쌀 8.7%를 나타냈으며, 반응표면 분석법을 계획한 결과값은 결정계수 (R-square)가 0.59로 신뢰성을 가짐을 보여 주었다. 6.2점으로 관능평가 점수가 가장 높았던 2번 시료와 비교해 보았을때, 비슷한 수준의 각각의 첨가량을 나타내었다.

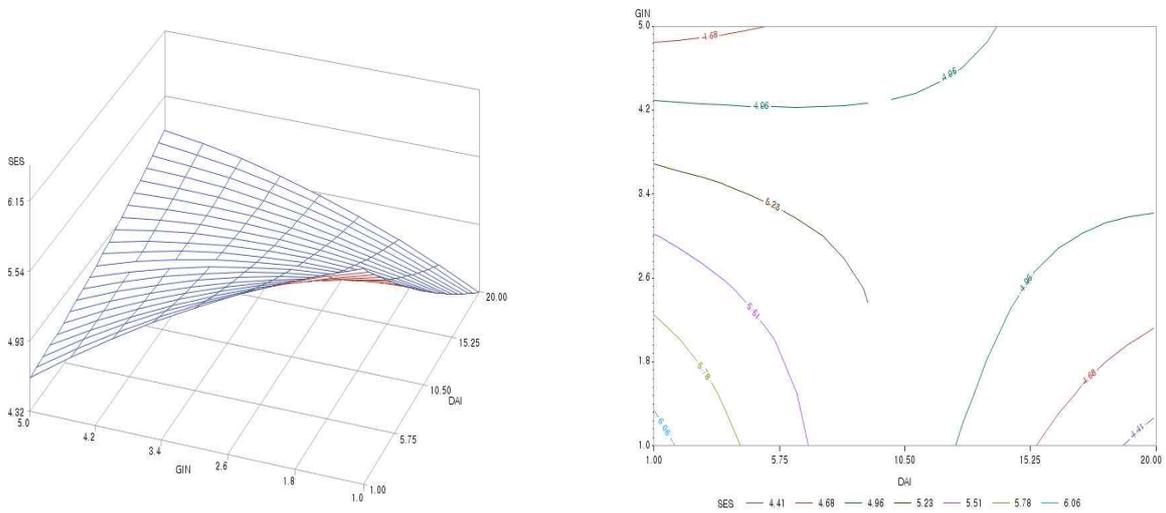


Fig. 6 Perturbation plot and response surface for the effect of sensory characteristics of sikhe prepared with production process standardization

(자) 명태식해의 생강, 무, 좁쌀 첨가량을 각각 달리한 유리아미노산 함량

명태식해의 부재료첨가량별 총 유리아미노산 함량은 아래에 나타내었다. 관능평가에서는 2번 시료가 가장 높은 점수를 받았는데, 이때의 명태식해의 총 유리아미노산 함량은 3710.93mg/100g을 나타냈다. glutamic acid가 82%를 차지하였으며, 대부분을 식해들과 비교할 때, 비슷한 수준을 함유하는 것으로 사료된다. Cys는 검출되지 않았다.

(mg/100g)

	Sample No.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tau	27.31	41.69	21.76	23.16	24.76	20.28	23.10	24.60	
Ala	36.07	43.63	22.63	27.64	27.31	38.66	45.72	45.33	
Lys	22.48	28.87	12.68	15.89	7.96	22.00	35.60	28.16	
Leu	36.87	40.83	21.44	26.49	25.65	46.71	53.08	51.65	
Glu	2324.75	3257.98	2304.09	2342.39	1911.96	1907.27	2090.13	1919.93	
Val	26.63	27.34	20.07	23.11	23.58	29.89	33.01	31.67	
Tyr	15.93	15.06	11.57	13.37	14.38	18.05	21.48	22.87	
Gly	9.93	11.38	6.80	8.74	9.34	10.22	13.73	11.16	
Met	20.42	13.46	10.15	12.18	12.02	24.67	26.84	27.70	
Arg	3.90	24.56	2.47	0.00	2.77	0.82	11.41	0.30	
g-ABA	12.20	23.28	15.19	14.06	12.05	13.83	11.72	18.31	
His	2.70	3.49	2.32	2.34	2.81	2.84	3.79	2.94	
Asp	70.85	112.61	70.47	73.90	57.08	59.77	72.16	62.21	
Cys	4.37	0.00	0.00	0.00	0.00	5.34	5.46	5.82	
Ser	19.01	22.74	12.47	15.23	15.37	20.63	25.28	21.97	
Thr	15.45	20.71	10.42	11.97	12.61	16.20	19.22	17.33	
Phe	19.24	23.30	15.94	17.37	17.53	24.92	25.56	30.08	
Total	2668.11	3710.93	2560.47	2627.84	2177.18	2262.1	2517.29	2322.03	0

	Sample No.								
	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Tau		26.21	25.47	2.10	24.85	19.25	26.91	21.04	28.33
Ala		38.64	40.19	56.94	25.36	41.63	45.55	49.22	34.26
Lys		25.49	26.19	50.20	12.73	26.76	25.39	33.44	16.05
Leu		42.77	44.30	66.62	24.30	43.79	41.88	54.42	32.82
Glu		2241.38	2294.14	1824.30	1888.88	1965.51	2172.97	1890.50	2216.22
Val		29.79	30.66	37.72	21.92	30.90	31.77	34.06	21.33
Tyr		17.19	22.45	25.73	13.31	17.39	21.29	25.60	13.13
Gly		11.01	12.16	14.95	8.20	10.19	12.99	13.83	9.76
Met		24.36	25.00	31.14	16.64	23.31	22.81	27.76	9.88
Arg		0.00	5.22	9.83	0.00	0.35	36.16	1.52	22.74
g-ABA		16.31	19.15	12.44	11.07	17.72	15.30	17.12	20.67
His		2.79	3.01	6.15	2.47	3.18	2.77	3.87	2.80
Asp		71.75	72.79	71.09	79.16	69.41	68.98	67.76	71.87
Cys		6.22	6.27	6.32	0.00	4.61	0.00	5.89	0.00
Ser		20.51	21.48	30.00	13.21	20.49	21.54	25.17	18.69
Thr		16.74	16.82	22.01	11.15	16.22	16.84	18.75	15.87
Phe		22.75	27.02	30.63	16.95	25.59	23.69	31.09	19.31
Total	0	2613.91	2692.32	2298.17	2170.2	2336.3	2586.84	2321.04	2553.73

(차) 결 론

본 연구는 식해의 제조공정 표준화 기술개발을 위하여 단계별로 반응표면분석을 실시하여 표준화하였다. 1단계는 숙성온도, 기간, 염도 최적 구간을 찾아 표준화 하였고 2단계는 1단계의 숙성조건을 고정하여 고춧가루, 마늘, 미원 첨가량에 대한 표준화를 실시하였다. 3단계는 1, 2 단계의 표준화 조건을 고정하여 생강, 무, 좁쌀 첨가량에 대해 표준화를 실시하였다. 최종 표준화 조건은 온도 약 12.2℃, 기간 8.3일, 염도는 4.8%, 고춧가루 14.20%, 마늘 8.40%, 미원 4.10%, 생강 2.6%, 무 5.6%, 좁쌀 8.7%로 명태식해 최적 제조 조건을 확립하였다.

(4) 오징어식해의 제조 공정 최적화(반응표면분석)

오징어식해의 제조 공정에 대한 모든 설계는 반응표면 실험계획법의 central composite design에 따라 SAS(statistical analysis system 10.0) 프로그램을 사용하였다. 1단계 계획으로 독립변수로는 온도(x1), 기간(x2), 염도(x3)의 함량을, 종속변수로는 관능적 특성의 색, 향, 조직감, 맛 전 반적인 기호도로 설정하여 표준화하였고 이를 바탕으로 2단계는 독립변수로 고춧가루(x1), 마늘(x2), 미원(x3), 종속변수로 관능적 특성을 설정하였다. 3단계 또한 1-2단계를 바탕으로하여 종속변수 무(x1), 생강(x2), 좁쌀(x3), 독립변수는 관능적 특성으로 설정 하였다. 각 요인의 최소 및 최대 범위를 각각 온도 5~25℃, 기간 1~5일, 염도 3~7%, 설탕 4~20%, 고춧가루 1~9%, 마늘 1~8%, 미원 1~5%로 정하였다. 완성된 실험 각각의 디자인의 재료 혼합 비율은 Table 7, 8, 9와 같다.

Table 13. Experimental design for squid sikhae prepared of fermentation condition

Sample No.	Variable Level Ingredient									
	Factors				Red					
	TEMP (°C)	DAY	Salinity (%)	설탕 (%)	paper powder (%)	Garlic (%)	MSG (%)	Radish (%)	Ginger (%)	Foxtail millet (%)
1	10	2	4	8	5	4	3	93	1	8
2	10	2	4	16	5	4	3	93	1	8
3	10	2	6	8	5	4	3	93	1	8
4	10	4	4	8	5	4	3	93	1	8
5	20	2	4	8	5	4	3	93	1	8
6	10	2	6	16	5	4	3	93	1	8
7	10	4	6	8	5	4	3	93	1	8
8	20	4	4	8	5	4	3	93	1	8
9	20	2	4	16	5	4	3	93	1	8
10	10	4	4	16	5	4	3	93	1	8
11	20	2	6	8	5	4	3	93	1	8
12	10	4	6	16	5	4	3	93	1	8
13	20	4	6	8	5	4	3	93	1	8
14	20	2	6	16	5	4	3	93	1	8
15	20	4	4	16	5	4	3	93	1	8
16	20	4	6	16	5	4	3	93	1	8
17	15	3	5	12	5	4	3	93	1	8
18	15	3	5	12	5	4	3	93	1	8
19	15	3	5	12	5	4	3	93	1	8
20	15	3	5	12	5	4	3	93	1	8
21	25	3	5	12	5	4	3	93	1	8
22	5	3	5	12	5	4	3	93	1	8
23	15	5	5	12	5	4	3	93	1	8
24	15	1	5	12	5	4	3	93	1	8
25	15	3	7	12	5	4	3	93	1	8
26	15	3	3	12	5	4	3	93	1	8
27	15	3	5	20	5	4	3	93	1	8
28	15	3	5	4	5	4	3	93	1	8

Table 14. Experimental design for squid sikhae prepared with material proportion

Sample No.	Variable Level Ingredient								
	Factors			TEMP (°C)	DAY	Salinity (%)	Radish (%)	Ginger (%)	Foxtail millet (%)
	Red paper powder (%)	Garlic (%)	MSG (%)						
1	3	2	2	15	1	5	93	1	8
2	3	2	4	15	1	5	93	1	8
3	3	6	2	15	1	5	93	1	8
4	7	2	2	15	1	5	93	1	8
5	3	6	4	15	1	5	93	1	8
6	7	6	2	15	1	5	93	1	8
7	7	2	4	15	1	5	93	1	8
8	7	6	4	15	1	5	93	1	8
9	5	4	3	15	1	5	93	1	8
10	5	4	3	15	1	5	93	1	8
11	5	4	3	15	1	5	93	1	8
12	5	4	3	15	1	5	93	1	8
13	9	4	3	15	1	5	93	1	8
14	1	4	3	15	1	5	93	1	8
15	5	8	3	15	1	5	93	1	8
16	5	1	3	15	1	5	93	1	8
17	5	4	5	15	1	5	93	1	8
18	5	4	1	15	1	5	93	1	8

Table 15. Experimental design for squid sikhae prepared with material proportion

Sample No.	Variable Level Ingredient								
	Factors			Red paper power (%)	Garlic (%)	MSG (%)	TEMP (°C)	DAY	Salinity (%)
1	0.5	61	6	7	2	2	15	1	5
2	0.5	61	10	7	2	2	15	1	5
3	0.5	93	6	7	2	2	15	1	5
4	1.5	61	6	7	2	2	15	1	5
5	0.5	93	10	7	2	2	15	1	5
6	1.5	93	6	7	2	2	15	1	5
7	1.5	61	10	7	2	2	15	1	5
8	1.5	93	10	7	2	2	15	1	5
9	1	77	8	7	2	2	15	1	5
10	1	77	8	7	2	2	15	1	5
11	1	77	8	7	2	2	15	1	5
12	1	77	8	7	2	2	15	1	5
13	2	77	8	7	2	2	15	1	5
14	0.1	77	8	7	2	2	15	1	5
15	1	109	8	7	2	2	15	1	5
16	1	45	8	7	2	2	15	1	5
17	1	77	12	7	2	2	15	1	5
18	1	77	4	7	2	2	15	1	5

(가) 온도, 기간, 염도의 조건을 달리한 오징어식해 관능적 특성

온도와, 숙성기간, 그리고 염도를 각각 달리한 조건에 따른 오징어식해의 맛, 색, 조직감, 향에 대한 기호도는 Table 16과 같다. 예비 실험을 통하여 5℃와 15℃ 구간의 관능적으로 나쁜 조건은 배제하여 총 18가지 조합으로 오징어식해를 제조하여 관능검사를 실시하였다. 24번 시료인 온도 15℃, 기간 1일, 염도 5%의 오징어식해가 총점 5.7점으로 가장 좋은 기호도를 나타내었으며 20℃ 이상의 고온에서의 오징어식해는 금방 부패되어 관능평가 점수가 전체적으로 낮았다. 5℃에서 숙성한 오징어식해는 온도가 낮은 되는 발효기간이 길어지는 경향이 있어서 관능평가에서 4.2점으로 낮은 점수를 얻었다.

Table 16. Experimental design for squid sikhae prepared of fermentation condition

Sample No.	Variable Level Ingredient				Flavor	Taste	Texture	Color	Overall quality
	TEMP (°C)	DAY	Salinity (%)	설탕 (%)					
1	10	2	4	8	4	5.2	5	5	4.8
2	10	2	4	16	5	5.2	4	5	4.8
3	10	2	6	8	5	4.6	4	4	4.4
4	10	4	4	8	4.8	4	4	4	4.2
5	20	2	4	8	4	4.4	4.4	4	4.2
6	10	2	6	16	5	5	5	5	5
7	10	4	6	8	5	4.8	5	4.4	4.8
8	20	4	4	8	3	3	3.6	3.6	3.3
9	20	2	4	16	4	5	4	5	4.5
10	10	4	4	16	4	4.8	5	5	4.7
11	20	2	6	8	5	5	5	4.2	4.8
12	10	4	6	16	4	5	4.8	5	4.7
13	20	4	6	8	3	4	3	3.6	3.4
14	20	2	6	16	4	4	3.6	4	3.9
15	20	4	4	16	3.4	3	3.4	3	3.2
16	20	4	6	16	4	4	4	4	4
17	15	3	5	12	4.6	5	4.6	5	4.8
18	15	3	5	12	4.6	5	4.6	5	4.8
19	15	3	5	12	4.6	5	4.6	5	4.8
20	15	3	5	12	4.6	5	4.6	5	4.8
21	25	3	5	12	3	2.8	3	2.4	2.8
22	5	3	5	12	4	4.8	4	4	4.2
23	15	5	5	12	3	2.8	3	2.4	2.8
24	15	1	5	12	5.8	6	5	6	5.7
25	15	3	7	12	4	5	4	4.6	4.4
26	15	3	3	12	5	4.2	4.4	4	4.4
27	15	3	5	20	5	4	5	4	4.5
28	15	3	5	4	5	5	4.2	5	4.8

(나) 온도, 기간, 염도의 조건을 달리한 오징어식해 표준화

Table 17의 실험계획을 자료로 하여 반응표면 분석을 실시한 결과는 Fig. 7에 나타내었다. 독립변수로는 온도(x1), 기간(x2), 염도(x3)의 함량을, 종속변수로는 관능적 특성의 색, 향, 조직감, 맛 전반적인 기호도로 설정하여 3차원 그래프화 하여 표준화하였다. 일차식(linear regression)은 0.52로 5% 수준에서 유의성(p<0.05)이 없었으며, 이차식(quadratic regression) 또한 0.16으로 유의성이 없었다. 각 요인의 최소 및 최대 범위 온도 5~25℃ 구간에서는 13.45℃가 가장 최적조건으로 나타났으며 숙성기간 1~5일 구간에서는 2.21일이 최적 조건을 나타냈다. 염도는 3~7% 구간에서 4.43% 구간이 가장 적정구간으로 나타났다. 본 반응표면 분석법을 계획한 결과값은 결정계수(R-square)가 0.7271로 0.5 이상을 나타내어 신뢰성을 가지는 결과를 나타내었고 온도, 숙성기간, 염도의 최적 조건은 온도 약 13.5℃, 기간 2.21일, 염도는 4.43%로 라는 결론을 내릴 수 있었다. 이 조건을 고정하여 Table 18의 고춧가루, 마늘, 미원을 함량을 달리하여 제조한 가자미식해의 실험설계를 실시하였다.

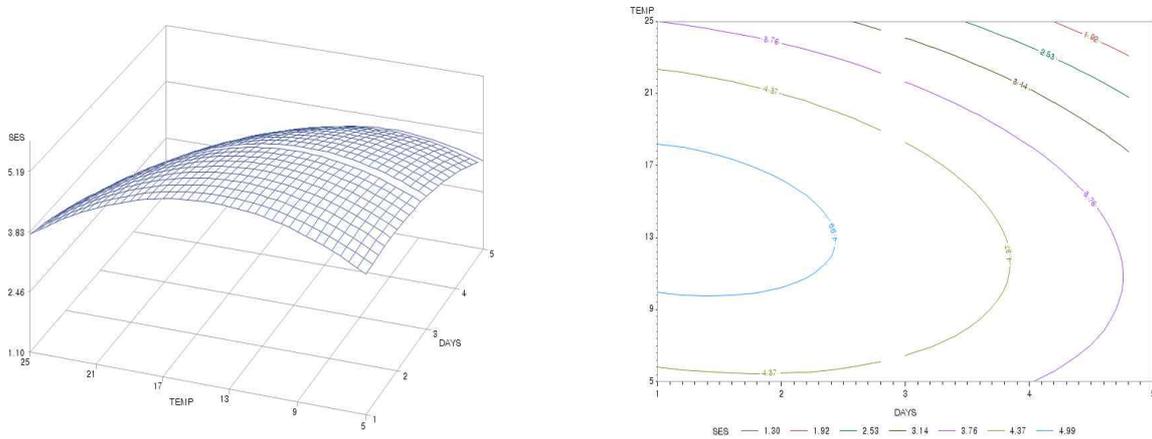


Fig. 7 Perturbation plot and response surface for the effect of sensory characteristics of sikhe prepared with production process standardization

(다) 고춧가루, 마늘, 미원의 첨가량을 달리한 오징어식혜의 관능적 특성

고춧가루, 마늘, 미원의 첨가량을 달리하여 총 18가지 종류의 가자미식혜를 제조하여 관능검사를 실시하였다. 숙성조건은 1단계에서 실시한 최적조건인 온도 13.45°C, 기간 약 2.21일, 염도는 4.43% 동일조건에서 제조하였다. 최고점은 4번 시료인 고춧가루 7%, 마늘 2%, 미원 2%가 5.6점으로 가장 높은 기호도를 나타내었으며, 16번 시료인 고춧가루 5%, 마늘 1%, 미원 3%가 1.3점으로 가장 낮은 점수를 얻었다. 전반적으로 고춧가루, 마늘, 미원 함량에 비례적으로 기호도가 높고 낮아지는 경향을 나타내지 않았으며, 시료간에 총점에서 큰 차이를 나타내지 않았다. 이를 바탕으로 실험설계를 하여 반응표면분석을 실시하였다.

Table 18. Experimental design for Alaska pollack sikhe prepared with material proportion

Sample No.	Variable Level Ingredient							Overall quality
	Factors			Flavor	Taste	Texture	Color	
	Red paper power (%)	Garlic (%)	MSG (%)					
1	3	2	2	5.0	5.4	5.4	5.0	5.2
2	3	2	4	5.2	5.4	5.2	5.4	5.3
3	3	6	2	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
4	7	2	2	5.0	6.0	6.0	5.4	5.6
5	3	6	4	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
6	7	6	2	4.0	4.0	4.0	3.6	3.9
7	7	2	4	5.6	6.0	5.0	5.0	5.4
8	7	6	4	4.0	5.0	4.0	4.2	4.3
9	5	4	3	3.0	3.0	3.8	3.0	3.2
10	5	4	3	3.0	3.0	3.8	3.0	3.2
11	5	4	3	3.0	3.0	3.8	3.0	3.2
12	5	4	3	3.0	3.0	3.8	3.0	3.2
13	9	4	3	3.0	2.2	3.0	3.0	2.8
14	1	4	3	3.0	4.0	4.0	3.0	3.5
15	5	8	3	1.0	2.0	1.0	1.2	1.3
16	5	1	3	4.0	5.0	4.0	4.2	4.3
17	5	4	5	4.0	4.4	4.0	4.0	4.1
18	5	4	1	4.0	3.0	4.0	3.0	3.5

(라) 고춧가루, 마늘, 미원의 첨가량을 달리한 오징어식혜의 표준화

Table. 18의 실험설계를 통하여 반응표면 분석을 실시한 결과는 Fig. 8에 나타내었다. 독립변수로 고춧가루(x1), 마늘(x2), 미원(x3), 종속변수로 관능적 특성을 설정하였다. 일차식(linear regression)은 0.67로 유의성이 없었으며, 이차식(quadratic regression)은 0.02로 5% 수준에서 유의성(p<0.05)이 있었다. 각 부재료별 첨가량의 최소 및 최대 범위는 원물대비 고춧가루 1-10%, 마늘 1-8%, 미원 1-5% 하였으며, 이 구간에서 고춧가루 7.7%, 마늘 3.3%, 미원 2.6%가 최적조건으로 결과가 도출되었다. 반응표면 분석법을 계획한 결과값은 결정계수(R-squaer)가 0.76로 신뢰성이 있음을 알 수 있었다. 실험설계 1. 2단계의 자료를 토대로 3단계 실험을 진행하였다.

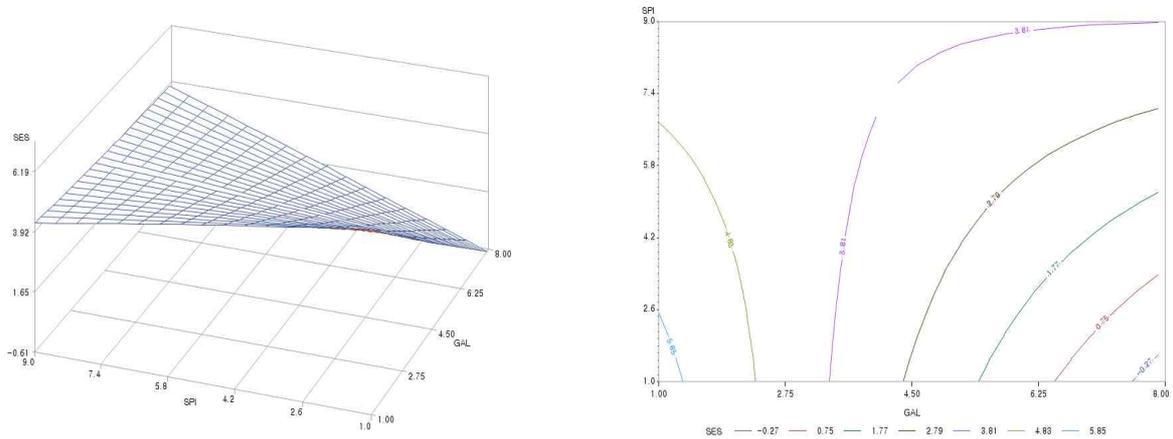


Fig. 8 Perturbation plot and response surface for the effect of sensory characteristics of sikhe prepared with production process standardization

(마) 오징어식해의 고춧가루, 마늘, 미원 첨가량을 각각 달리한 유리아미노산 함량

고춧가루, 마늘, 미원 첨가량을 달리한 총 유리아미노산 함량은 882.61-2472.30mg/100g 정도로 명태나 가자미식해에 비해서 낮은 함량을 나타내었다. 이 중 관능검사 점수가 가장 높았던, 4번 시료에서 1327.66mg/100g의 총 유리아미노산 함량을 나타내었다. Glu가 71%, Ala 2.2%, Arg 4.2%, Met 1.2% 정도를 차지하고 있었으며, 다른시료들과 달리 Cys가 13.61mg/100g으로 검출되었다

(mg/100g)

	Sample No.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tau	37.66	35.20	37.25	40.69	32.43	32.33	46.01	39.18	39.18
Ala	59.31	31.16	31.79	30.00	27.30	26.62	32.56	30.58	30.58
Lys	17.79	15.59	19.62	16.88	16.72	17.03	19.95	19.72	19.72
Leu	29.55	27.05	30.97	30.99	26.59	28.16	35.14	31.28	31.28
Glu	816.04	2118.14	821.08	954.68	1436.48	777.87	1646.19	1614.88	1614.88
Val	19.38	20.99	20.01	20.29	17.40	18.37	22.01	20.78	20.78
Tyr	10.29	9.86	12.10	10.84	10.14	8.45	14.63	12.16	12.16
Gly	9.67	9.10	9.62	9.49	8.95	8.47	10.57	9.40	9.40
Met	15.33	14.07	15.90	16.57	14.23	14.50	18.59	16.54	16.54
Arg	53.02	54.98	59.23	56.64	53.00	51.81	60.18	61.74	61.74
g-ABA	19.82	34.61	24.48	27.79	16.94	22.39	27.84	33.95	33.95
His	14.33	13.27	14.75	14.03	12.61	12.53	16.11	14.30	14.30
Asp	26.17	31.89	27.16	35.30	24.18	34.61	38.77	38.77	38.77
Cys	12.75	11.66	12.99	13.61	24.18	11.40	15.76	12.57	12.57
Ser	11.70	11.42	12.05	11.87	10.82	11.09	12.89	12.81	12.81
Thr	11.06	11.85	11.39	12.39	9.99	10.57	12.85	12.32	12.32
Phe	23.34	21.46	24.40	25.60	21.65	22.00	29.21	25.97	25.97
Total	1187.21	2472.3	1184.79	1327.66	1763.61	1108.2	2059.26	2006.95	2006.95

	Sample No.								
	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Tau	39.18	39.18	38.50	38.79	32.50	34.03	30.11	35.23	37.66
Ala	30.58	30.58	29.77	29.45	28.48	30.27	20.91	27.00	27.71
Lys	19.72	19.72	18.65	17.96	18.37	19.20	13.20	17.03	19.10
Leu	31.28	31.28	31.49	31.81	27.73	28.56	23.53	28.79	32.12
Glu	1614.88	1614.88	1470.86	1271.57	1220.50	1310.87	1116.39	1535.05	525.47
Val	20.78	20.78	21.28	23.90	19.49	22.63	15.16	19.70	21.22
Tyr	12.16	12.16	11.27	10.91	11.81	16.41	4.74	11.49	9.62
Gly	9.40	9.40	10.00	9.52	9.18	9.18	7.64	9.03	10.03
Met	16.54	16.54	17.47	17.16	15.29	13.76	12.80	15.73	16.97
Arg	61.74	61.74	57.04	58.05	56.46	69.76	30.97	49.45	57.16
g-ABA	33.95	33.95	21.10	33.56	18.18	28.02	12.24	24.01	16.37
His	14.30	14.30	14.57	14.49	14.24	14.19	11.08	13.99	14.88
Asp	38.77	38.77	34.55	41.89	23.18	35.35	24.43	26.28	32.06
Cys	12.57	12.57	12.98	14.92	11.77	12.43	9.98	12.08	14.19
Ser	12.81	12.81	11.98	12.77	10.74	12.33	8.61	10.79	11.90
Thr	12.32	12.32	12.42	14.86	10.22	13.47	8.50	11.31	12.55
Phe	25.97	25.97	23.88	23.34	21.46	22.15	16.00	21.86	23.60
Total	2006.95	2006.95	1837.81	1664.95	1549.6	1692.61	1366.29	1868.82	882.61

(바) 생강, 무, 좁쌀의 첨가량을 달리한 오징어식해의 관능적 특성

생강, 무, 좁쌀의 첨가량을 달리한 오징어식해는 실험 1, 2단계의 결과인 온도 약 14℃, 기간 약 1일, 염도는 4.46%, 고춧가루 7.7%, 마늘 3.3%, 미원 2.6%의 조건을 고정하여 총 18종류를 만들어서 관능검사를 실시한 결과를 Table. 19에 나타내었다.

Table 19. Experimental design for squid sikhae prepared with material proportion

Sample No.	Variable Level Ingredient							Overall quality
	Factors			Flavor	Taste	Texture	Color	
	Ginger (%)	Radish (%)	Foxtail millet (%)					
1	0.5	61	6	5.1	4.9	5.1	5.2	5.1
2	0.5	61	10	4.8	5.1	4.9	5.2	5.0
3	0.5	93	6	4.5	4.9	4.6	4.8	4.7
4	1.5	61	6	4.7	5.0	4.9	4.6	4.8
5	0.5	93	10	4.9	4.5	4.8	4.6	4.7
6	1.5	93	6	5.0	5.3	5.0	5.4	5.2
7	1.5	61	10	5.2	4.8	4.9	5.1	5.0
8	1.5	93	10	5.2	5.1	4.9	5.1	5.1
9	1	77	8	4.8	5.2	5.1	4.6	4.9
10	1	77	8	4.8	5.2	5.1	4.6	4.9
11	1	77	8	4.8	5.2	5.1	4.6	4.9
12	1	77	8	4.8	5.2	5.1	4.6	4.9
13	2	77	8	5.2	5.1	5.1	4.9	5.1
14	0.1	77	8	5.8	5.5	5.9	5.3	5.6
15	1	109	8	5.6	5.8	5.7	5.7	5.7
16	1	45	8	6.2	6.3	5.9	5.9	6.1
17	1	77	12	5.4	5.1	5.3	5.2	5.3
18	1	77	4	5.9	6.0	5.8	5.7	5.8

(사) 생강, 무, 좁쌀의 첨가량을 달리한 오징어식혜의 표준화

생강, 무, 좁쌀의 첨가량과 관능평가를 토대로 반응표면 분석을 실시한 결과는 Fig. 9과 같다. 종속변수 생강(x1), 무(x2), 좁쌀(x3), 독립변수는 관능적 특성으로 설정하였다. 생강, 무, 좁쌀 첨가량 범위에서 가장 적정 첨가량은 각각 원물 무게 대비 생강 1.02%, 무 78.70%, 좁쌀 8.33%를 나타냈으며, 반응표면 분석법을 계획한 결과값은 결정계수(R-square)가 0.51로 신뢰성을 가짐을 보여 주었다.

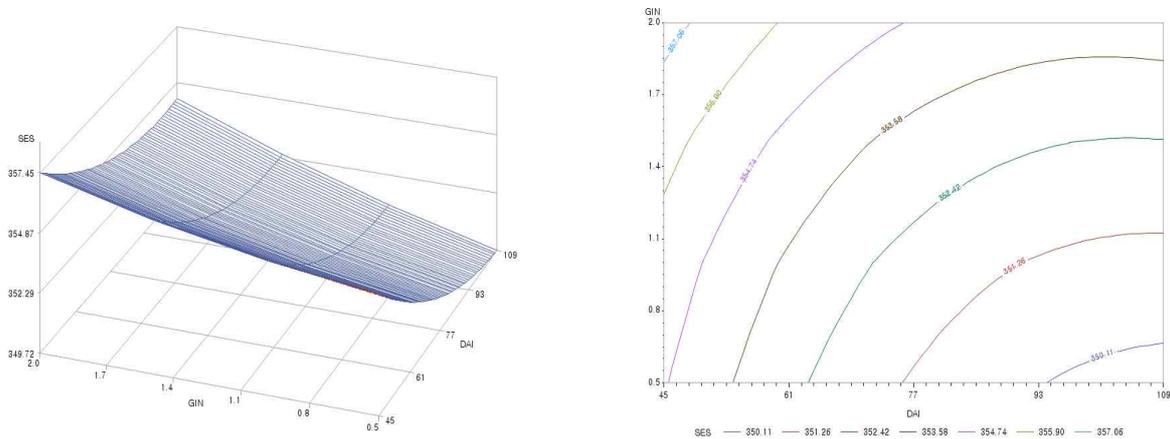


Fig. 9 Perturbation plot and response surface for the effect of sensory characteristics of sikhe prepared with production process standardization

(아) 오징어식해의 생강, 무, 좁쌀 첨가량을 각각 달리한 유리아미노산 함량

생강, 무, 좁쌀 첨가량을 달리한 오징어식해에서도 Cys가 검출되었으며, 16번 시료가 관능점수에서 가장 높은점을 받았다. 16번 시료의 총 유리아미노산 함량은 1264.21mg/100g을 나타내었으며, Glu 70.4%, Ala 2.8%, Arg 3.5%를 차지하였으며, Cys가 23.10mg/100g 정도 검출되었다. 전체적으로 볼때 가자미와 명태식해에 비해 총 유리아미노산 함량은 적게 나타났으며, 오징어식해에서만 특별하게 cystein이 검출되었다.

〈유리아미노산 함량〉

(mg/100g)

	Sample No.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tau	65.81	56.69	43.14	54.87	51.27	45.74	52.04	42.98	42.98
Ala	36.91	33.00	27.92	34.71	32.24	30.14	32.16	28.10	28.10
Lys	14.86	14.13	10.96	11.66	11.99	10.34	10.97	8.40	8.40
Leu	32.95	30.18	24.59	29.80	28.79	25.44	26.33	23.71	23.71
Glu	885.84	755.15	707.73	802.10	755.39	711.69	752.60	630.44	630.44
Val	21.50	19.47	17.61	18.59	19.11	18.40	17.79	16.25	16.25
Tyr	135.81	10.21	9.37	9.57	9.08	9.34	5.65	7.85	7.85
Gly	11.41	10.35	8.78	10.18	10.09	8.94	9.47	8.27	8.27
Met	18.50	16.14	13.69	16.01	15.71	14.01	13.94	12.79	12.79
Arg	57.66	50.84	47.93	44.35	44.94	50.21	47.13	40.88	40.88
g-ABA	24.43	15.10	21.26	15.23	21.05	23.11	17.20	14.62	14.62
His	22.81	20.84	15.02	17.86	17.50	14.46	16.79	12.57	12.57
Asp	33.60	29.44	27.30	28.49	30.03	25.39	26.81	23.29	23.29
Cys	25.26	23.64	18.50	22.23	21.60	19.23	20.18	18.07	18.07
Ser	11.48	10.76	9.57	9.85	10.14	9.09	9.60	8.21	8.21
Thr	13.88	12.16	10.77	11.12	11.42	11.11	11.83	9.73	9.73
Phe	24.80	21.67	18.74	21.64	21.51	19.81	17.58	17.99	17.99
Total	1437.51	1129.77	1032.88	1158.26	1111.86	1046.45	1088.07	924.15	924.15

	Sample No.								
	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Tau	42.98	42.98	53.50	54.27	44.75	47.52	58.72	51.33	4.48
Ala	28.10	28.10	32.46	35.17	29.70	32.60	36.16	32.86	31.58
Lys	8.40	8.40	12.85	11.11	12.22	10.91	13.68	12.43	11.58
Leu	23.71	23.71	28.41	27.57	25.86	27.77	29.20	29.11	26.55
Glu	630.44	630.44	751.84	797.93	829.26	699.72	891.04	752.99	724.51
Val	16.25	16.25	19.59	19.52	18.45	18.71	19.42	22.82	17.93
Tyr	7.85	7.85	11.01	6.69	8.11	8.88	7.80	9.28	9.95
Gly	8.27	8.27	9.93	10.02	8.79	9.69	10.62	9.77	9.18
Met	12.79	12.79	15.54	14.31	13.90	14.71	14.84	15.39	14.23
Arg	40.88	40.88	52.26	53.14	47.57	43.32	45.89	54.00	45.79
g-ABA	14.62	14.62	20.44	23.22	25.06	16.45	18.76	23.3	18.31
His	12.57	12.57	18.72	16.72	16.55	15.56	20.22	17.74	16.50
Asp	23.29	23.29	28.60	27.99	29.85	27.12	31.86	29.25	26.07
Cys	18.07	18.07	22.06	21.16	19.33	20.77	23.10	21.48	20.17
Ser	8.21	8.21	10.61	10.31	9.96	10.21	11.32	10.72	9.47
Thr	9.73	9.73	11.92	12.67	10.93	11.09	12.25	12.43	10.63
Phe	17.99	17.99	21.47	18.99	19.83	20.79	19.33	21.20	19.93
Total	924.15	924.15	1121.21	1160.79	1170.12	1035.82	1264.21	1126.1	1016.86

(자) 결 론

본 연구는 식해의 제조공정 표준화 기술개발을 위하여 단계별로 반응표면분석을 실시하여 표준화하였다. 1단계는 숙성온도, 기간, 염도 최적 구간을 찾아 표준화 하였고 2단계는 1단계의 숙성조건을 고정하여 고춧가루, 마늘, 미원 첨가량에 대한 표준화를 실시하였다. 3단계는 1, 2 단계의 표준화 조건을 고정하여 생강, 무, 좁쌀 첨가량에 대해 표준화를 실시하였다. 최종 표준화 조건은 온도 약 13.5℃, 기간 2.2일, 염도는 4.5%, 고춧가루 7.7%, 마늘 3.3%, 미원 2.6%, 생강 1.0%, 무 78.7%, 좁쌀 8.3%로 오징어식해 최적 제조 조건을 확립하였다.

3. 표준화된 제품과 기존제품(정이푸드빌)의 품질특성 비교 및 관능검사 비교 실시

가. 가자미식해

표준화된 가자미식해 레시피와 기존 업체의 레시피로 제품을 제조하여 품질특성 및 관능평가를 실시하였다. 각각의 레시피는 표 3-1에 나타내었다. 품질특성을 비교하여 보면 기존레시피의 가자미식해는 pH가 4.67, VBN함량이 24.44 mg/100g, 아미노태질소함량이 275.48 mg/100g으로 표준화된 레시피에 비해 높은 함량을 나타내었으며, 숙성이 더 많이 된 것을 알 수 있었다. 총균수와 유산균수 또한 기존레시피에서 더 많이 수를 나타내었다. 관능검사를 비교해 보았을 때, 색에서는 두 시료간의 차이를 나타내지 않았지만, 맛과 향과 조직감에서 기존 가자미식해 레시피에 비해 총점 24점으로 높은 점수를 나타내었다.

<표 3-1. 제조 레시피 비교>

	기존제품 레시피(정이푸드빌)	반응표면분석 표준화 레시피
숙성온도	10~15℃	12℃
숙성기간	14일	12.5일
염도(완성제품)	5%	4.60%
고춧가루 첨가량	15%	16.80%
마늘 첨가량	7%	7.21%
미원 첨가량	3%	2.96%
생강 첨가량	3%	3.70%
무 첨가량	15%	10.12%
즙쌀 첨가량	14%	13.72%

* 부재료 첨가량은 원물무게 대비 %

<표 3-2. 품질 특성 비교>

	기존제품 레시피(정이푸드빌)	반응표면분석 표준화 레시피
pH	4.67	4.86
VBN	24.44	16.70
아미노태질소 함량	275.48	205.32
총균수	3.13×10^7	5.12×10^6
유산균	7.24×10^6	3.24×10^5

<표 3-3. 관능검사 비교>

	기존제품 레시피(정이푸드빌)	반응표면분석 표준화 레시피
색	6.3	6.2
맛	5.5	6.3
향	5.5	5.9
조직감	5.3	5.6
총점	22.6	24

나. 명태식해

명태식해의 기존레시피와 표준화된 레시피의 품질특성과 관능평가를 통하여 비교분석하였다. 제조 레시피는 표 3-4와 같으며, 품질특성은 표 3-5에 나타내었다. 가자미와 유사하게 기존레시피의 경우 pH가 4.48로 표준화레시피 4.76 보다 낮았으며, VBN함량과 아미노태질소함량 또한 기존레시피가 각각 25.25 mg/100g, 272.91 mg/100g으로 표준화레시피에 비해서 높게 나타났다. 총균수 및 유산균수 또한 10^7 CFU/g으로 높게 나타났으며 관능평가에서 표준화된 레시피가 총점 25.2점으로 기존레시피 21.7점에 비해 높은 관능평가 점수를 받았다.

<표 3-4. 제조 레시피 비교>

	기존제품 레시피(정어푸드빌)	반응표면분석 표준화 레시피
숙성온도	15~18℃	12.2℃
숙성기간	14일	8.3일
염도(완성제품)	5%	4.8%
고춧가루 첨가량	11%	14.2%
마늘 첨가량	2.3%	8.4%
미원 첨가량	0.8%	4.1%
생강 첨가량	1.6%	2.6%
무 첨가량	11%	5.6%
좁쌀 첨가량	4.4%	8.7%

* 부재료 첨가량은 원물무게 대비 %

<표 3-5. 품질 특성 비교>

	기존제품 레시피(정어푸드빌)	반응표면분석 표준화 레시피
pH	4.48	4.76
VBN	25.28mg/100g	19.79mg/100g
아미노태질소 함량	272.91mg/100g	231.61mg/100g
총균수	7.12×10^7	2.11×10^6
유산균	5.24×10^7	1.24×10^6

<표 3-6. 관능검사 비교>

(점)

	기존제품 레시피(정어푸드빌)	반응표면분석 표준화 레시피
색	5.1	6
맛	5.2	6.4
향	5.8	6.6
조지감	5.6	6.2
총점	21.7	25.2

다. 오징어식해

오징어식해의 기존레시피와 표준화된 레시피를 비교 분석하였다. 레시피는 표 3-7에 나타내었다. 품질특성은 가자미와 명태와 마찬가지로 기존레시피의 VBN함량과 아미노태질소함량이 각각 12.09mg/100g, 155.63mg/100g으로 표준화된 레시피에 비하여 높게 나타났으며, 총균수 및 유산균수 또한 10^7 CFU/g으로 높게 나타났다. 관능평가에서는 표준화된레시피가 총점 25점으로 기존레시피 18.7점에 비해 높은 평가를 받았다.

<표 3-7. 제조 레시피 비교>

	기존제품 레시피(정어푸드빌)	반응표면분석 표준화 레시피
숙성온도	10~15℃	13.5℃
숙성기간	3일	2.21일
염도(완성제품)	5%	4.5%
고춧가루 첨가량	5.6%	7.7%
마늘 첨가량	4%	3.3%
미원 첨가량	3%	2.6%
생강 첨가량	1%	1.0%
무 첨가량	93%	78.7%
좁쌀 첨가량	8%	8.3%

* 부재료 첨가량은 원물무게 대비 %

<표 3-8. 품질 특성 비교>

	기존제품 레시피(정어푸드빌)	반응표면분석 표준화 레시피
pH	5.01	6.21
VBN	12.09mg/100g	9.34mg/100g
아미노태질소 함량	151.63mg/100g	141.62mg/100g
총균수	6.25×10^7	7.21×10^6
유산균	3.42×10^7	5.44×10^6

<표 3-9. 관능평가>

	기존제품 레시피(정어푸드빌)	반응표면분석 표준화 레시피
색	4.2	6.5
맛	5.0	6.2
향	4.2	6.0
조식감	5.3	6.3
총점	18.7	25

4. 가자미식해 starter 후보균의 탐색 및 최적화

가. 시판 가자미식해의 원료와 부원료의 미생물학적, 이화학적 특성 검토

(1). 재료 및 방법

시판 식해의 품질평가 및 주요 상재 미생물 분리 및 동정과 식해의 원료와 부원료의 미생물학적, 이화학적 특성을 검토하기 위하여 국내 재래시장과 소규모 마트에서 시료를 수집하였다. 본 실험에 사용된 국내시료의 제조원과 제품명은 표.1과 같다.

<표 1. 국내의 가자미식해 제품>

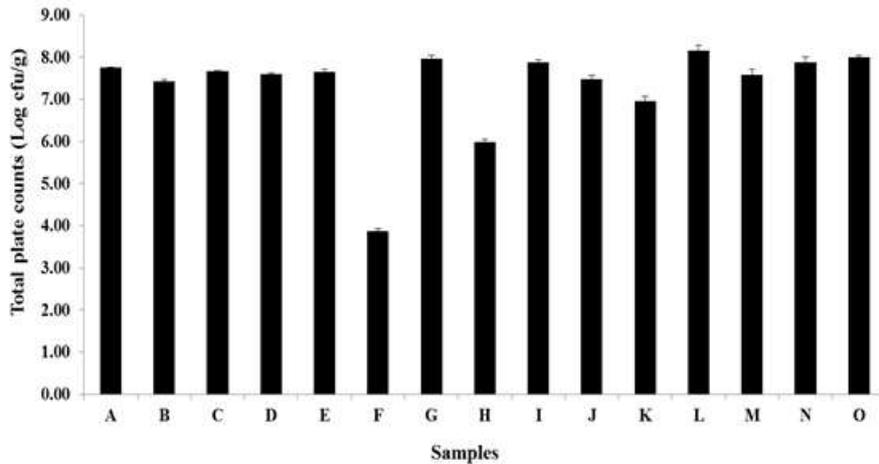
제품류	시료명	제품명
가자미식해	A	SHGS
	B	DHGS
	C	DBGS
	D	SAGS
	E	YSGGS
	F	LJHGS
	G	DCGS
	H	CCWGS
	I	CSPGS
	J	OONGS
	K	HCGS
	L	MAGS
	M	GBWGS
	N	DHRGS
	O	OMNGS

총균수 측정을 위한 배지로는 PCA(Plate count agar)를 젖산균 분리를 위한 배지로는 BCP (0.006% bromocresol purple)와 MRS (deMan Rogosa Sharpe) 배지를 사용하였다. 균수 측정 방법은 식품공전 미생물시험법에 따라 시료 25 g에 멸균 희석수 225 ml 첨가하여 희석한 다음 배지에 도말하여 35±2℃, 혐기적 조건에서 24시간 배양한 후 생성된 집락을 관찰하였다. BCP 평판배지에서 노랗게 배지를 변화시키고 MRS 평판배지에서 집락 주변을 투명하게 변화시키는 집락들을 2회 이상 분리하여 산 생성 여부를 확인하였다. 순수한 집락을 다시 MRS broth에 18 시간 배양한 후 배양액을 15% glycerol의 농도로 -70℃에서 저장하면서 실험에 사용하였다. 병원성미생물도 식품공전 미생물시험법에 따라 증균배지, 선택배지 등에 24~48시간 배양한 후 생성된 집락을 관찰하였다. 그리고 시료에서 분리한 젖산균을 현미경 검경과 API-kit system (Bio-Merieux)을 이용하여 동정하였다.

(2) 실험결과

(가) 시판 가자미식해의 미생물학적 분석결과

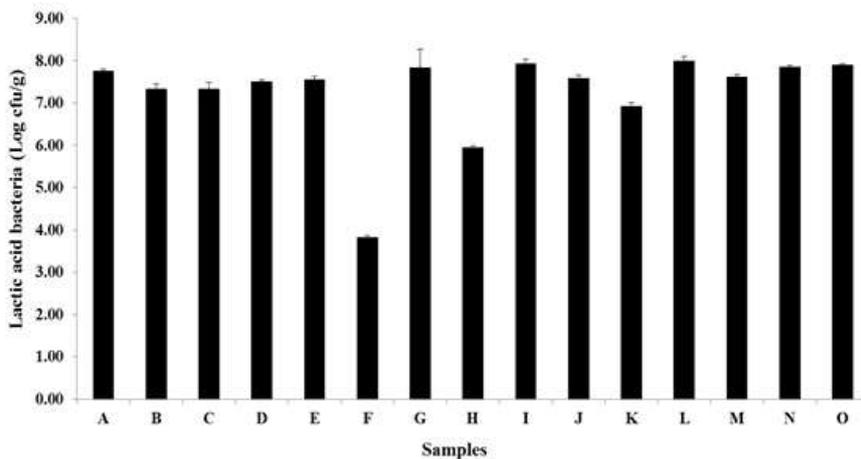
1) 시판 가자미식해의 총균수



<그림 1. 시판 가자미 식해의 총균수>

시판되는 가자미식해를 시료로 수거하여 미생물 검사를 실시하였다. 그 결과 시판되는 가자미식해의 총균수는 시료에 따라 3.88~8.15 log CFU/g의 넓은 범위를 나타내었으며, 평균 7.32 log CFU/g을 나타내었다.

2) 시판 가자미식해의 젖산균수



<그림 2. 시판 가자미식해의 젖산균수>

시판 되는 가자미식해의 젖산균의 경우 시료에 따라 3.83~7.99 log CFU/g의 넓은 범위를 나타내었고, 평균 7.26 log CFU/g을 나타내었다.

3) 시판 가자미식해의 병원성 미생물

<표 2. 병원성미생물>

Samples	Tested pathogenic microorganisms ¹⁾					
	CO	EO	SS	SA	LM	VP
A	-*	ND*	ND	ND	ND	ND
B	-	ND	ND	ND	ND	ND
C	-	ND	ND	ND	ND	ND
D	-	ND	ND	ND	ND	ND
E	-	ND	ND	ND	ND	ND
F	-	ND	ND	ND	ND	ND
G	-	ND	ND	ND	ND	ND
H	-	ND	ND	ND	ND	ND
I	-	ND	ND	ND	ND	ND
J	-	ND	ND	ND	ND	ND
K	-	ND	ND	ND	ND	ND
L	-	ND	ND	ND	ND	ND
M	-	ND	ND	ND	ND	ND
N	-	ND	ND	ND	ND	ND
O	-	ND	ND	ND	ND	ND

*ND : not detected, (-) : negative

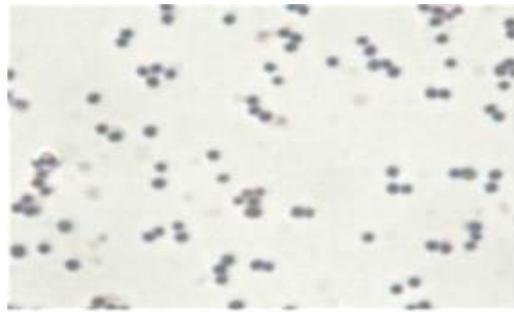
¹⁾CO: Coliform; EO: *Escherichia coli* O157:H7; SS: *Salmonella* spp.; SA: *Staphylococcus aureus*, LM: *Listeria monocytogenes*; VP: *Vibrio parahaemolyticus*.

식품에서 검출되어서는 안되는 *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*는 시판되는 식해 모두에서 검출되지 않았다. 또한, 기타 대장균군도 검출되지 않았다.

4) 시판 가자미식해의 주요 상재 미생물 동정



총세균(간균)



젖산균(구균)

<그림 3. 시판 가자미식해의 미생물 균상 분석>

<표 3. 시판 가자미식해의 미생물 동정>

시료	동정결과
A, C	<i>Lactobacillus fermentum</i> 2 (% ID, 99.9)
E, G, J	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> (% ID, 78.4)
F	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides/dextranicum</i> 2 (% ID, 98.6)
K, N	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 3 (% ID, 99.7)
D	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides/dextranicum</i> 2 (% ID, 95.3)
H, O	<i>Bacillus</i> spp. (% ID, 90.0)
B	<i>Lactobacillus brevis</i> (% ID, 99.3)

총세균과 젖산균에서 분리한 균주를 대상으로 현미경 검경을 실시한 결과 간균과 구균으로 판독되었고 동정 결과 *Bacillus* spp., *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* 2, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, *Lactobacillus acidophilus* 3, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum* 2 등으로 동정되었다.

(나) 시판 가자미식해의 이화학적 분석 결과

1) 시판 가자미식해의 a_w , pH, 염도 분석 결과

시판되는 가자미식해의 이화학적 특성을 분석한 결과 pH 값은 pH 4.43~5.11의 범위를 나타내었고, 평균 pH 4.83을 나타내었으며, 산도의 경우 0.67~1.11%를 나타내었고, 평균 0.88%의 산도를 나타내었다. 수분활성도의 경우 0.910~0.941을 나타내었으며, 평균 0.926의 수분활성도 값을 나타내었고, 염도 범위는 2.30~4.81%, 평균 3.60%의 염도를 나타내는 것을 확인하였다.

<표 4. 시판 가자미식해의 이화학적 분석 결과>

	a_w	pH	acidity (%)	Salt content (%)
A	0.940 ± 0.01	4.79 ± 0.12	0.93 ± 0.01	3.80 ± 0.06
B	0.937 ± 0.00	4.77 ± 0.02	0.96 ± 0.01	2.30 ± 0.08
C	0.935 ± 0.00	4.55 ± 0.02	1.11 ± 0.04	3.00 ± 0.06
D	0.937 ± 0.00	4.70 ± 0.02	0.95 ± 0.00	2.70 ± 0.06
E	0.941 ± 0.00	5.00 ± 0.02	0.91 ± 0.02	3.40 ± 0.13
F	0.920 ± 0.00	4.43 ± 0.01	1.30 ± 0.04	3.21 ± 0.18
G	0.915 ± 0.01	4.76 ± 0.00	0.98 ± 0.16	3.23 ± 0.09
H	0.913 ± 0.00	4.95 ± 0.02	0.71 ± 0.01	4.22 ± 0.15
I	0.920 ± 0.00	5.02 ± 0.03	0.69 ± 0.03	4.67 ± 0.34
J	0.920 ± 0.00	4.87 ± 0.01	0.77 ± 0.00	4.81 ± 0.27
K	0.910 ± 0.00	4.87 ± 0.02	0.75 ± 0.01	4.18 ± 0.10
L	0.926 ± 0.00	4.99 ± 0.01	0.67 ± 0.01	2.82 ± 0.08
M	0.936 ± 0.01	4.74 ± 0.00	0.93 ± 0.04	3.93 ± 0.13
N	0.919 ± 0.00	4.90 ± 0.03	0.81 ± 0.07	3.99 ± 0.02
O	0.928 ± 0.00	5.11 ± 0.08	0.77 ± 0.05	3.78 ± 0.10
average	0.926 ± 0.01	4.83 ± 0.18	0.88 ± 0.17	3.60 ± 0.71

(다) 부원료의 미생물학적 분석 결과

1) 부원료의 총균수

식해 제조 시 사용되는 원료 (가자미) 및 부원료 (무, 다진마늘, 생강, 고춧가루, 조밥, 차조)를 시료로 채취하여 미생물 검사를 실시하였다. 그 결과 총균수는 원료인 가자미의 경우 6.55 log CFU/g을 나타내었다. 부원료의 경우 다진마늘을 제외한 다른 시료의 총균수는 무의 경우 5.13 log CFU/g, 생강의 경우 3.79 log CFU/g, 고춧가루의 경우 5.06 log CFU/g, 조밥의 경우 7.05 log CFU/g, 차조의 경우 6.22 log CFU/g 범위를 나타내었다. 다진마늘의 경우 항균활성물질로 알려져 있는 알리신의 영향으로 총세균이 검출되지 않은 것으로 사료된다. 또한, 모든 시료 (원료 및 부원료)에서 젖산균이 검출되지 않았다.

원료 (가자미)의 수분활성도와 pH를 측정한 결과 가자미의 경우 수분활성도는 0.967, pH 값은 pH 6.41을 나타내었다. 부원료 (무, 다진마늘, 생강, 고춧가루, 조밥, 차조) 시료를 수거하여 이화학적 검사를 실시한 결과는 다음과 같다. 무의 경우 수분활성도는 0.979, pH는 pH 7.07을 나타내었으며, 마늘의 경우 0.962의 수분활성도 값과 pH 4.83을 나타내었다. 생강과 고춧가루의 경우 수분활성도 값은 각각 0.970, 0.795를 나타내었으며 pH 값은 pH 6.52, 4.81을 각각 나타내었다. 조밥의 경우 원재료인 차조에 비해 수분활성도 (조밥: 0.964; 차조: 0.841) 값과 pH 값 (조밥: pH 7.06; 차조: pH 6.33)이 높게 나타나는 것을 확인하였다.

<표 5. 원료 및 부원료 미생물학적 이화학적 분석 결과>

Samples	aw	pH	Viable cell counts (log CFU/g)	
			Total viable cells	Lactic acid bacteria
가자미	0.967 ± 0.01	6.41 ± 0.13	6.55 ± 0.09	ND
무	0.979 ± 0.01	7.07 ± 0.11	5.13 ± 0.06	ND
마늘	0.962 ± 0.00	4.83 ± 0.05	ND	ND
생강	0.970 ± 0.00	6.52 ± 0.02	3.79 ± 0.03	ND
고춧가루	0.795 ± 0.03	4.81 ± 0.04	5.06 ± 0.02	ND
조밥	0.964 ± 0.00	7.06 ± 0.04	7.05 ± 0.05	ND
차조	0.841 ± 0.01	6.33 ± 0.01	6.22 ± 0.03	ND

(라) 시판 가자미식해의 유해물질 분석

1) 시판 가자미식해의 biogenic amine 함량 분석

시판되는 가자미식해 시료를 수거하여 HPLC를 통해 바이오제닉 아민 함량을 분석한 결과는 표. 6과 같다. 그 결과 히스타민의 평균 함량은 21.6 mg/kg, 타이라민의 평균 함량은 17.9 mg/kg을 나타내었고, 다른 아민들의 평균 함량은 10 mg/kg 이하인 것을 확인하였다.

<표 6. 시판되는 가자미식해의 바이오제닉 아민 함량>

<i>Sikhae</i>	Biogenic amines (mg/kg)						
	Trp ^a	Phe	Put	His	Tyr	Spd	Spm
A ^b	ND	1.83 ± 0.08	5.55 ± 0.32	25.3 ± 0.96	15.3 ± 1.55	5.15 ± 0.44	ND
B	ND	0.31 ± 0.09	1.33 ± 0.33	11.4 ± 0.32	16.8 ± 2.33	3.39 ± 0.32	5.11 ± 0.33
C	ND	0.15 ± 0.03	1.40 ± 0.23	26.8 ± 0.65	32.5 ± 0.08	10.2 ± 0.18	12.0 ± 0.03
D	ND	0.88 ± 0.23	6.32 ± 0.64	28.5 ± 0.56	15.2 ± 1.32	1.31 ± 0.03	3.62 ± 0.05
E	ND	0.99 ± 0.04	2.33 ± 1.03	21.2 ± 0.89	20.2 ± 0.09	4.43 ± 0.04	8.05 ± 0.09
F	ND ^c	0.14 ± 0.20	1.30 ± 0.31	25.5 ± 0.54	14.6 ± 1.96	5.97 ± 0.79	6.07 ± 0.85
G	ND	0.38 ± 0.08	5.10 ± 0.33	22.9 ± 0.92	16.7 ± 1.55	2.99 ± 1.07	4.43 ± 1.60
H	ND	1.17 ± 0.14	9.28 ± 0.26	22.8 ± 0.14	23.8 ± 5.32	7.70 ± 0.37	9.58 ± 4.93
I	ND	0.91 ± 0.12	12.5 ± 2.74	23.7 ± 0.83	14.0 ± 3.63	5.44 ± 1.39	4.84 ± 6.84
J	ND	1.85 ± 1.02	11.3 ± 6.73	11.9 ± 8.32	13.6 ± 5.33	5.23 ± 2.00	16.1 ± 0.91
K	ND	1.29 ± 1.01	11.5 ± 10.1	29.4 ± 12.4	12.4 ± 6.43	4.60 ± 2.53	13.7 ± 2.41
L	0.20 ± 0.29 ^d	1.89 ± 0.22	22.5 ± 0.89	14.1 ± 0.44	11.7 ± 7.31	6.35 ± 0.18	6.69 ± 1.96
M	ND	0.74 ± 0.05	34.1 ± 1.98	20.1 ± 12.2	28.4 ± 0.75	11.0 ± 0.32	7.80 ± 0.17
N	0.75 ± 0.53	0.74 ± 0.14	8.02 ± 3.08	20.6 ± 0.82	14.2 ± 5.21	6.13 ± 2.28	13.1 ± 2.52
O	3.23 ± 0.27	0.83 ± 0.31	8.18 ± 2.67	27.5 ± 4.29	20.6 ± 5.82	1.37 ± 1.42	7.52 ± 1.74
Average	0.29 ± 0.81	0.94 ± 0.56	9.38 ± 8.53	21.6 ± 5.32	17.9 ± 5.86	5.42 ± 2.66	7.90 ± 4.18

^a Trp: tryptamine, Phe: β -phenylethylamine, Put: putrescine, His: histamine, Tyr: tyramine, Spd: spermidine, Spm: spermine

^bA~O: Commercial Flatfish-*Sikhae*

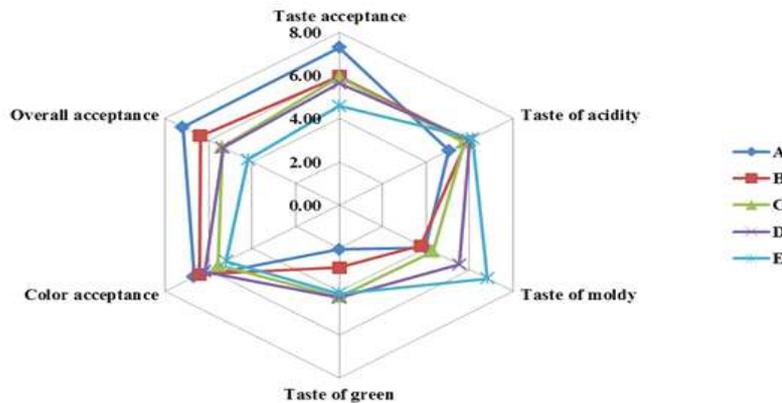
^cND: Not detected (amine level is less than 0.1 mg/kg)

^dMean ± standard deviation

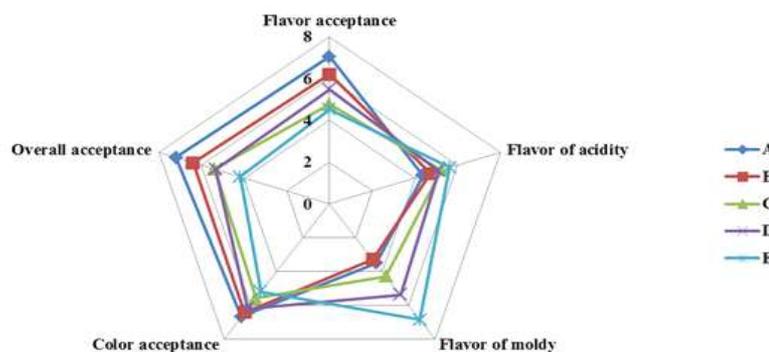
(마) 시판 가자미식해의 관능검사 결과

관능평가 방법

시판되는 가자미식해 15개 중 5개의 시료에 대해 관능검사를 실시하였다. 관능검사는 식해에 대한 후각적, 미각적, 시각적 평가에 대해 훈련된 18명의 패널을 구성하여 각 평가 항목 및 전체적인 기호도에 대해 9점 평점법으로 평가하였다. 후각적 평가 항목으로는 향에 대한 기호도와 신내, 군덕내를 평가하였고, 미각적 평가 항목으로는 맛에 대한 기호도 및 신맛, 덜 익은맛 및 군덕맛을 평가하였으며, 시각적 평가 항목으로는 색의 기호도를 평가하였다. 향기, 맛, 색에 대한 전체적인 기호도는 1에 가까울수록 대단히 싫고, 9에 가까울수록 대단히 좋은 것으로 나타내었고, 냄새와 맛의 감지 정도는 1에 가까울수록 감지 불가능하고 9에 가까울수록 감지 가능한 것으로 나타내었다. 후각 및 미각적 지각은 구강 내에서 입과 코로 감지되는 것으로 평가하였고, 이때 신맛과 신내는 산에 의해 나타나는 감각, 군덕맛과 군덕내는 오래된 김치 또는 된장에서 나는 불쾌한 정도로 정의하였다. 그 결과는 그림 4, 5와 같다.



<그림 4. 시판 가자미식해의 맛에 대한 관능평가>



<그림 5. 시판 가자미식해의 향에 대한 관능평가>

관능평가 결과

관능 검사 결과 각 항목에 대해 5개의 시료 (A~E) 중 시료 A의 평가가 가장 높게 나타나는 것을 확인하였고, 이들 시료에 대한 이화학적 분석 및 균수파악을 통해 관능이 우수한 가자미식해의 특성을 확인하였다. 그 결과는 표 7. 과 같다.

〈표 7. 관능검사를 실시한 가자미식해의 미생물학적 이화학적 특성〉

Samples	a _w	pH	acidity (%)	Salt content (%)	Viable cell counts (log CFU/g)	
					Total viable cells	Lactic acid bacteria
A ^a	0.940 ± 0.01	4.79 ± 0.12	0.93 ± 0.01	3.80 ± 0.06	7.75 ± 0.01	7.77 ± 0.04
B	0.937 ± 0.00	4.77 ± 0.02	0.96 ± 0.01	2.30 ± 0.08	7.42 ± 0.06	7.34 ± 0.11
C	0.935 ± 0.00	4.55 ± 0.02	1.11 ± 0.04	3.00 ± 0.06	7.66 ± 0.01	7.33 ± 0.16
D	0.937 ± 0.00	4.70 ± 0.02	0.95 ± 0.00	2.70 ± 0.06	7.60 ± 0.02	7.51 ± 0.03
E	0.941 ± 0.00	5.00 ± 0.02	0.91 ± 0.02	3.40 ± 0.13	7.66 ± 0.05	7.56 ± 0.07
average	0.938 ± 0.00	4.76 ± 0.01	0.97 ± 0.07	3.04 ± 0.52	7.62 ± 0.11	7.50 ± 0.16

관능평가가 우수한 시료 A의 경우, 수분활성도는 0.940, pH 값은 pH 4.79, 산도는 0.93%, 염도는 3.80%를 나타내었고, 총균수와 젖산균수는 각각 7.75, 7.77 log CFU/g을 나타내었다.

나. 가자미식해 starter 후보균의 탐색 및 최적화

(1) Starter 후보균 선별 및 생리, 화학적 특성

(가) 분리주의 형태학적, 생리적 특성

미생물 염색법을 수행하여 예비 starter 균주의 morphology를 현미경 (Axioskop, ZEISS, Germany)를 이용하여 관찰하였다. Starter 후보균의 생리적 특성을 검토하고 동정하기 위해 catalase test, 당 분해력, gas 생성력, pH, 생육속도, 다양한 온도에서의 생육 특성을 수행하였다.

(나) Catalase test

Catalase test는 분리주를 broth에 24 시간 동안 배양한 후 배양액을 취해 slide glass에 1ml정도를 적하한 후 3% H₂O₂를 반응시켜 거품 형성 여부를 관찰하였으며 거품이 형성되면 양성, 형성되지 않으면 음성으로 간주하였다.

(다) 당 분해능

당분해능은 기본 peptone 배지에 최종농도가 1%가 되도록 당 (glucose, lactose, maltose, raffinose, sucrose)을 첨가하고 지시약으로 0.004% bromocresol purple을 사용하여 30℃에서 24 시간 배양 후 배지의 색이 변하는 것으로 나타내었다. 보라색의 배지가 노랗게 변하면 양성, 변하지 않으면 음성으로 나타내었다.

(라) Gas 생성력

Gas 생성력은 MRS broth에 durham tube를 넣고 분리주를 배양하여 24h 후 gas 생성 여부를 관찰하였다.

(마) 생육속도

생육속도는 각각의 분리주를 30°C에 배양하여 24시간 후에 생성되는 균체량을 spectrophotometer (UV-1601, SHIMADZU)를 이용하여 측정하였다. 준비된 MRS broth에 분리주를 접종한 후 각각 4°C, 15°C, 37°C 1~7일 간 배양하여 생육 특성을 관찰하였다.

(2) 분리주의 항균활성 실험

(가) 시료 전처리

1차 분리주의 항균활성을 측정하기 위해 분리주를 MRS broth에 30°C에서 24시간 배양 후 4°C로 냉장시켰다. 산에 의한 pH와 H₂O₂가 항균활성 결과에 미치는 영향을 배제하기 위해 0.1 M의 NaOH를 이용하여 pH를 7.0으로 조정하였으며 catalase를 50 U/ml을 첨가하여 1시간 동안 30°C에서 반응시켰다. 반응시킨 후 5000 x g, 4°C에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 동결건조기를 이용하여 동결 건조시킨 후 50 mM sodium phosphate buffer를 이용하여 10배 농축시켜 조시험액으로 하였다. 조 시험액은 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 대조구로는 MRS broth를 동량 취하여 같은 방법으로 전처리하여 사용하였다.

(나) ADT 수행

분리주들의 항균활성을 확인하기 위해 agar diffusion test (ADT)를 수행하였다. 시험균주는 그람 양성균으로 *Listeria monocytogenes* (KCTC3710), *Staphylococcus aureus* (KCTC1916) 을 그람 음성균으로 *E. coli* O157:H7 (KCTC1039), *Salmonella enteritidis* (KCTC12400), *Vibrio parahaemolyticus* (KCTC2471)를 이용하였다. 우선 paper disc (Whatman, Φ 8 mm)에 시료를 80 μ l를 적하하여 무균 상태에서 건조시킨 후 시험균주가 도말된 배지 위에 올려놓고 35 \pm 2°C에서 24시간 이내에 paper disc 주변에 저해환이 형성되는 것으로 항균활성 여부를 판단하였다.

(3) 분리주의 안전성 실험

(가) 용혈성 시험

용혈성은 미생물의 중요한 독성인자로 간주되고 있다. 용혈성 여부를 조사하기 위하여 분리주들을 7% sheep blood가 첨가된 Blood Agar Base (Oxoid)에 접종 후 37°C에서 24시간 배양한 뒤 α , β 및 γ 용혈성을 확인하였다. 배양 후 생성된 colony 주변에 clear zone이 관찰되는 것을 β -hemolysis라 하며, 이는 완전 용혈을 의미한다. 또한, 용혈이 완전하지 않아 colony 주변이 녹색의 용혈환이 생기는 경우를 α -hemolysis라 한다. 반면에 용혈반응이 일어나지 않는 경우는 γ -hemolysis라 한다.

(나) 바이오제닉아민

선별된 분리주의 바이오제닉아민 함량 측정을 위해 sample 3 g에 0.4 M perchloric acid (Sigma, USA) 27 mL을 넣어 잘 혼합한 뒤 추출을 3시간동안 진행한 후, 원심분리(3,000 rpm, 4°C, 5 min.) 하여 상등액을 1 mL 취한 후 이 상등액에 Na₂CO₃ 300µl, 2 M NaOH 200 µl 및 1% dansyl chloride 2 mL을 첨가하여 잘 혼합하고, 40 °C에서 45분간 유도체화를 거친 후 ammonium hydroxide 100 µl를 넣어 여분의 dansyl chloride를 제거한 뒤, acetonitrile 1.4 mL을 첨가하고, 원심분리(3,000 rpm, 4°C, 5 min.) 하여 상등액을 0.22 µm syringe filter로 여과 후 기기분석에 사용하였다. 분석기기는 photodiode array가 장착된 HPLC(Waters)를 이용하였으며, column은 Nova-Pak C₁₈4µm 3.9 x 150 mm(Waters, Ireland)를 사용하였고, 이동상으로 0.1 M ammonium acetate(Sigma, USA)와 HPLC급 acetonitrile(Merck, USA)를 사용하였다.

(4) 실험결과

(가) 가자미식해 분리주의 형태학적, 생리적 특성

catalase test에서는 분리주 200주 모두 음성이었으며, 그람염색 시험에서 그람 양성, micro-morphology는 쌍구균 또는 단구균으로 나타났다. 상대적으로 강한 특성을 보이는 19주의 당 분해능 및 gas 생성을 검토하였으며 그 결과는 표 8. 과 같다. 그리고 4°C를 제외한 15°C, 37°C의 온도 범위에서 생육 가능한 것으로 확인 되었으며 그 결과는 표 9. 와 같다.

<표 8. 24시간 배양 후 분리주의 생리·화학적 특성>

Strains	· Acid formation from					Gas from glucose
	Glucose	Lactose	Maltose	Raffinose	Sucrose	
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+

〈표 9. 분리주의 생육속도 및 pH생성능〉

	O.D(18h)	pH(18h)	O.D(24h)	pH(24h)
Control	0.177	6.14	0.176	6.15
1	1.548	4.72	1.597	4.54
2	0.225	5.99	0.406	5.23
3	1.162	5.09	1.694	4.52
4	0.287	5.91	0.284	5.92
5	1.538	4.77	1.474	4.6
6	0.214	6.02	0.242	5.45
7	0.865	5.20	1.599	4.53
8	1.308	5.00	1.735	4.49
9	0.278	5.96	0.277	5.93
10	1.465	4.86	1.63	4.57
11	0.897	5.23	1.468	4.61
12	0.221	6.01	0.478	4.92
13	0.271	5.96	0.275	5.97
14	0.253	6.00	0.253	5.99
15	1.651	4.66	1.612	4.57
16	0.217	6.03	0.221	6
17	0.248	5.99	0.246	6.03
18	0.312	5.95	0.307	5.96
19	0.245	6.04	0.235	6.05

(나) 가자미식해 분리주의 생리, 화학적 및 생육 특성 결과

Catalase test에서는 분리주 300주 모두 음성이었으며, 그람염색 시험에서 그람 양성, micro-morphology는 쌍구균 또는 단구균으로 나타났다. 상대적으로 강한 특성을 보이는 33주의 당 분해능 및 gas 생성을 검토하였으며 그 결과는 표 10. 과 같다. 또한, 15°C, 37°C의 온도 범위에서 생육 가능한 것으로 확인 되었으며 그 결과는 표 11. 과 같다.

<표 10. 24시간 배양 후 가자미식해 분리주의 생리·화학적 특성>

Strains	• Acid formation from					Gas from glucose
	Glucose	Lactose	Maltose	Raffinose	Sucrose	
33-1	+	+	+	+	+	+
33-2	+	+	+	+	+	+
33-3	+	+	+	+	+	+
33-4	+	+	+	+	+	+
33-5	+	+	+	+	+	+
33-6	+	+	+	+	+	+
33-7	+	+	+	+	+	+
33-8	+	+	+	+	+	+
33-9	+	+	+	+	+	+
33-10	+	+	+	+	+	+
33-11	+	+	+	+	+	+
33-12	+	+	+	+	+	+
33-13	+	+	+	+	+	+
33-14	+	+	+	+	+	+
33-15	+	+	+	+	+	+
33-16	+	+	+	+	+	+
33-17	+	+	+	+	+	+
33-18	+	+	+	+	+	+
33-19	+	+	+	+	+	+
33-20	+	+	+	+	+	+
33-21	+	+	+	+	+	+
33-22	+	+	+	+	+	+
33-23	+	+	+	+	+	+
33-24	+	+	+	+	+	+
33-25	+	+	+	+	+	+
33-26	+	+	+	+	+	+
33-27	+	+	+	+	+	+
33-28	+	+	+	+	+	+
33-29	+	+	+	+	+	+
33-30	+	+	+	+	+	+
33-31	+	+	+	+	+	+
33-32	+	+	+	+	+	+
33-33	+	+	+	+	+	+

<표 11. 가자미식해 분리주의 생육속도 및 pH생성능>

Strains	15°C		37°C	
	O.D	pH	O.D	pH
33-1	2.013	4.31	2.150	4.15
33-2	1.031	5.01	1.597	4.46
33-3	1.272	5.11	1.421	4.59
33-4	0.310	6.04	1.498	4.64
33-5	0.257	6.02	1.589	4.68
33-6	0.281	5.99	1.547	4.60
33-7	0.236	6.04	1.559	4.63
33-8	0.245	5.98	1.553	4.63
33-9	1.079	5.21	1.513	4.64
33-10	0.935	5.26	1.726	4.39
33-11	1.833	4.49	2.047	4.28
33-12	0.825	5.31	1.755	4.41
33-13	0.924	5.29	1.696	4.43
33-14	1.079	5.21	1.606	4.46
33-15	1.272	5.02	1.686	4.52
33-16	1.312	4.96	1.670	4.42
33-17	1.165	5.09	1.531	4.47
33-18	1.258	5.02	1.954	4.29
33-19	1.167	5.09	1.713	4.35
33-20	1.233	5.11	1.806	4.35
33-21	1.371	4.89	1.579	4.46
33-22	1.025	5.21	1.574	4.43
33-23	1.988	4.40	2.051	4.21
33-24	0.253	6.05	1.676	4.36
33-25	0.220	6.03	1.691	4.35
33-26	0.266	5.98	1.715	4.36
33-27	0.195	6.10	1.699	4.42
33-28	0.195	6.08	1.595	4.50
33-29	0.200	6.07	1.623	4.42
33-30	0.982	5.29	1.676	4.36
33-31	1.015	5.25	1.759	4.44
33-32	0.212	6.11	1.546	4.49
33-33	0.208	6.28	1.351	4.81

(다) 가자미식해 분리주의 생육속도와 염도별 균수 및 pH 저하능

이들 중 다음 온도 범위에서 다른 균주들에 비해 상대적으로 높은 OD값과 낮은 pH 값을 갖는 균주들을 선별한 후, NaCl (2%, 3%, 4%)을 첨가한 MRS broth에 접종하여 48시간 배양 후 OD값과 pH를 측정하여 균주들의 내염성을 확인 하였다. 그 결과는 표 12, 13 과 같다.

<표 12. 가자미식해 분리주의 염도별 생육속도 및 pH생성능 (37°C)>

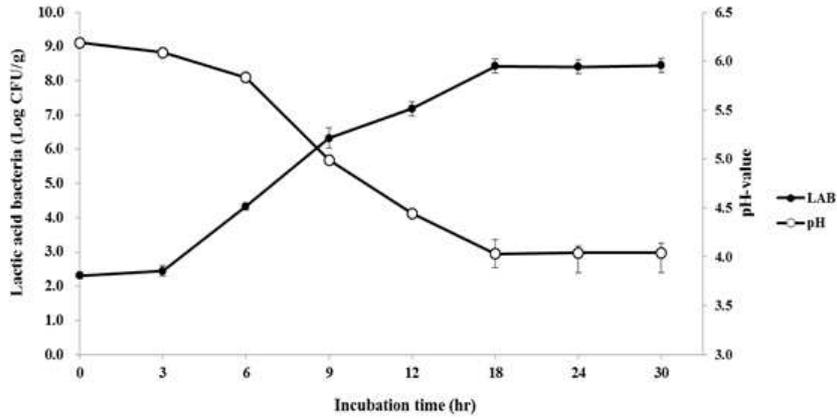
Strains	37°C							
	2% NaCl		3% NaCl		4% NaCl		Control	
	O.D	pH	O.D	pH	O.D	pH	O.D	pH
33-1	2.113	4.18	2.013	4.35	1.991	4.41	2.150	4.15
33-2	1.333	5.31	1.313	5.39	1.211	5.45	1.597	4.46
33-3	1.351	5.15	1.224	5.45	1.013	5.68	1.421	4.59
33-4	1.501	4.78	1.133	5.53	1.051	5.61	1.498	4.64
33-5	1.499	4.88	1.373	5.11	1.231	5.32	1.589	4.68
33-6	1.473	4.91	1.429	4.97	1.366	5.08	1.547	4.60
33-7	1.553	4.64	1.233	5.32	1.009	5.71	1.559	4.63
33-8	1.387	5.35	1.222	5.41	1.010	5.79	1.553	4.63
33-9	1.498	4.75	1.371	4.83	1.127	5.48	1.513	4.64
33-10	1.661	4.41	1.558	4.55	1.319	4.71	1.726	4.39
33-11	1.979	4.43	1.918	4.45	1.901	4.51	2.047	4.28
33-12	1.713	4.48	1.652	4.53	1.238	4.93	1.755	4.41
33-13	1.558	4.51	1.481	4.59	1.301	4.62	1.696	4.43
33-14	1.313	4.65	1.259	4.73	1.112	4.78	1.606	4.46
33-15	1.371	4.61	1.223	4.79	1.035	4.88	1.686	4.52
33-16	1.199	4.73	1.108	4.81	0.961	4.94	1.670	4.42
33-17	1.451	4.54	1.333	4.66	1.117	4.77	1.531	4.47
33-18	1.911	4.48	1.905	4.50	1.883	4.58	1.954	4.29
33-19	1.666	4.44	1.558	4.51	1.317	4.65	1.713	4.35
33-20	1.757	4.40	1.611	4.55	1.444	4.61	1.806	4.35
33-21	1.501	4.53	1.413	4.63	1.308	4.70	1.579	4.46
33-22	1.437	4.57	1.222	4.78	1.116	4.89	1.574	4.43
33-23	1.997	4.43	1.988	4.47	1.893	4.53	2.051	4.21
33-24	1.551	4.42	1.447	4.53	1.233	4.67	1.676	4.36
33-25	1.613	4.38	1.523	4.49	1.418	4.55	1.691	4.35
33-26	1.559	4.48	1.458	4.59	1.332	4.71	1.715	4.36
33-27	1.317	4.53	1.213	4.64	1.105	4.89	1.699	4.42
33-28	1.525	4.58	1.315	4.77	1.031	5.01	1.595	4.50
33-29	1.603	4.53	1.491	4.88	1.133	4.78	1.623	4.42
33-30	1.677	4.35	1.573	4.51	1.151	4.77	1.676	4.36
33-31	1.531	4.59	1.401	4.66	1.100	4.89	1.759	4.44
33-32	1.418	4.61	1.328	5.11	1.213	5.18	1.546	4.49
33-33	1.117	5.03	1.013	5.41	0.981	5.61	1.351	4.81

<표 13. 가자미식해 분리주의 염도별 생육속도 및 pH생성능 (15°C)>

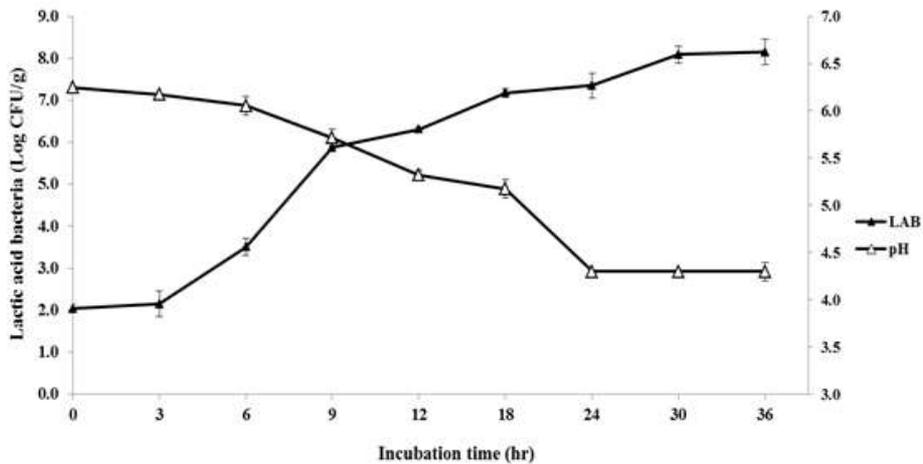
Strains	15°C							
	2% NaCl		3% NaCl		4% NaCl		Control	
	O.D	pH	O.D	pH	O.D	pH	O.D	pH
33-1	2.010	4.32	2.006	4.35	1.925	4.41	2.013	4.31
33-2	1.131	5.01	1.031	5.18	0.981	5.28	1.031	5.01
33-3	1.117	5.18	1.027	5.25	0.915	5.33	1.272	5.11
33-4	0.315	6.03	0.305	6.08	0.299	6.05	0.310	6.04
33-5	0.265	6.05	0.263	6.05	0.258	6.08	0.257	6.02
33-6	0.241	6.00	0.238	6.01	0.222	6.09	0.281	5.99
33-7	0.244	6.03	0.233	6.05	0.218	6.05	0.236	6.04
33-8	0.251	6.01	0.245	6.05	0.233	6.05	0.245	5.98
33-9	1.053	5.38	1.007	5.49	0.815	5.61	1.079	5.21
33-10	1.010	5.44	0.974	5.55	0.788	5.69	0.935	5.26
33-11	1.799	4.51	1.657	4.63	1.559	4.69	1.833	4.49
33-12	0.826	5.32	0.755	5.39	0.633	5.44	0.825	5.31
33-13	0.888	5.41	0.777	5.49	0.633	5.53	0.924	5.29
33-14	0.934	5.44	0.824	5.54	0.733	5.61	1.079	5.21
33-15	1.123	5.31	0.983	5.45	0.818	5.51	1.272	5.02
33-16	1.235	5.08	1.115	5.11	1.003	5.19	1.312	4.96
33-17	1.155	5.03	1.038	5.15	0.955	5.23	1.165	5.09
33-18	1.155	5.18	1.135	5.22	1.118	5.25	1.258	5.02
33-19	1.003	5.25	0.878	5.35	0.711	5.41	1.167	5.09
33-20	1.111	5.29	0.935	5.39	0.813	5.45	1.233	5.11
33-21	1.237	4.99	1.113	5.06	1.031	5.21	1.371	4.89
33-22	0.988	5.35	0.855	5.44	0.717	5.57	1.025	5.21
33-23	1.818	4.57	1.799	4.63	1.701	4.70	1.988	4.40
33-24	0.256	6.03	0.256	6.04	0.256	6.03	0.253	6.05
33-25	0.223	6.08	0.223	6.05	0.223	6.08	0.220	6.03
33-26	0.275	6.00	0.275	6.00	0.275	6.01	0.266	5.98
33-27	0.205	6.11	0.205	6.12	0.205	6.13	0.195	6.10
33-28	0.203	6.15	0.203	6.15	0.203	6.15	0.195	6.08
33-29	0.200	6.11	0.200	6.11	0.200	6.11	0.200	6.07
33-30	0.963	5.35	0.823	5.44	0.725	5.51	0.982	5.29
33-31	1.003	5.28	0.999	5.33	0.831	5.41	1.015	5.25
33-32	0.215	6.13	0.215	6.13	0.215	6.13	0.212	6.11
33-33	0.218	6.30	0.218	6.30	0.218	6.30	0.208	6.28

(라) 가자미식해 우수 후보 분리주의 생육속도와 염도별 균수 및 pH 저하능

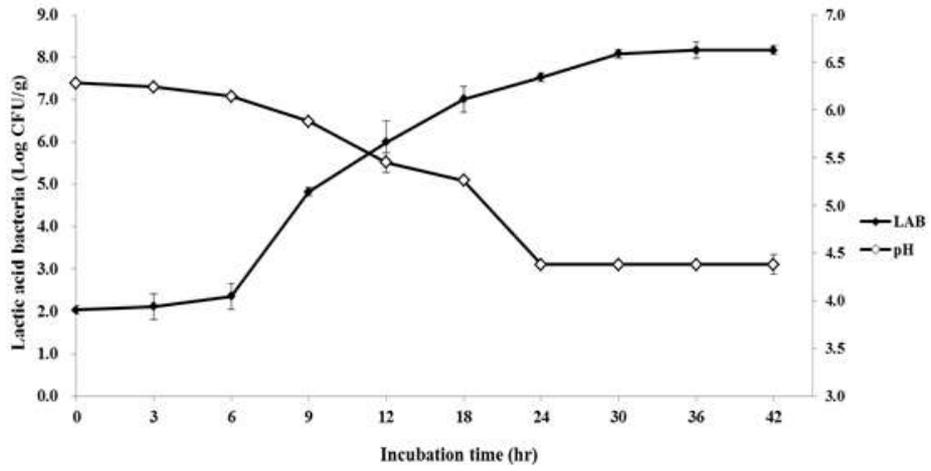
이들 균주 중 다음 온도 및 염도 범위내에서 다른 균주에 비해 높은 OD값과 낮은 pH값을 나타낸 4 균주를 선별하여 시간에 따른 균수 증가 및 pH 저하 속도를 정량적으로 확인하였고, 그 결과는 그림 6~9 와 같다.



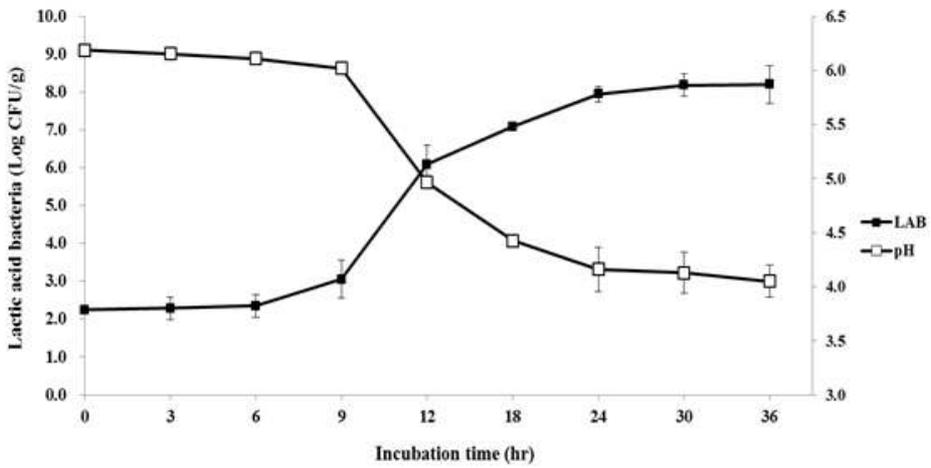
<그림 6. 시간에 따른 33-1 균주의 균수 및 pH 변화>



<그림 7. 시간에 따른 33-11 균주의 균수 및 pH 변화>



<그림 8. 시간에 따른 33-18 균주의 균수 및 pH 변화>



<그림 9. 시간에 따른 33-23 균주의 균수 및 pH 변화>

시판되는 가자미식해로부터 분리한 젖산균 4주의 염도에 따라서 균수 및 pH를 측정하였고, 그 결과는 표 14. 와 같다.

<표 14. 염도 (2%, 3%, 4%)에 따른 균주의 균수 및 pH 값>

15°C								
Strains	2% NaCl		3% NaCl		4% NaCl		Control	
	pH	LAB ¹⁾	pH	LAB	pH	LAB	pH	LAB
33-1	4.31 ±	8.35 ±	4.33 ±	8.19 ±	4.64 ±	8.05 ±	4.48 ±	8.37 ±
	0.022)	0.03	0.00	0.05	0.03	0.09	0.02	0.05
33-11	4.78 ±	8.03 ±	4.40 ±	8.01 ±	5.12 ±	7.13 ±	4.88 ±	8.29 ±
	0.02	0.05	0.00	0.05	0.06	0.01	0.03	0.04
33-18	4.83 ±	7.81 ±	4.75 ±	7.55 ±	5.23 ±	7.11 ±	4.80 ±	8.21 ±
	0.03	0.01	0.01	0.03	0.06	0.03	0.05	0.02
33-23	4.42 ±	8.21 ±	4.39 ±	8.18 ±	5.49 ±	6.83 ±	4.52 ±	8.35 ±
	0.19	0.03	0.00	0.01	0.13	0.07	0.00	0.01

¹⁾LAB : Lactic acid bacteria; unit : log CFU/ml

²⁾Mean ± standard deviation

(2) 가자미식해 분리주의 항균활성

(가) 가자미식해 분리주의 병원성 미생물에 대한 항균활성

선별된 젓산균 33주의 항균활성시험 수행 결과 *E. coli* O157:H7과 *Salmonella enteritidis* 및 *Staphylococcus aureus*에서 강한 활성을 나타내는 균주들을 확인할 수 있었다.

<표 15. 가자미식해 분리주의 항균활성>

(inhibition zone diameter (mm))

Strains	Test microorganisms				
	EO ¹⁾	SS	LM	SA	VP
33-1	23.00 ± 0.00	ND ²⁾	ND	27.67 ± 0.94	ND
33-2	ND	ND	ND	ND	ND
33-3	ND	ND	ND	ND	ND
33-4	ND	ND	ND	ND	ND
33-5	14.00 ± 0.01	ND	ND	ND	ND
33-6	18.00 ± 0.01	ND	ND	ND	ND
33-7	20.00 ± 0.01	ND	ND	ND	ND
33-8	ND	ND	ND	ND	ND
33-9	ND	ND	ND	ND	ND
33-10	ND	ND	ND	ND	ND
33-11	ND	25.00 ± 0.00	ND	ND	ND
33-12	ND	ND	ND	ND	ND
33-13	ND	ND	ND	ND	ND
33-14	ND	ND	ND	ND	ND
33-15	ND	ND	ND	ND	ND
33-16	ND	ND	ND	ND	ND
33-17	ND	ND	ND	ND	ND
33-18	ND	ND	ND	ND	ND
33-19	ND	ND	ND	ND	ND
33-20	ND	ND	ND	ND	ND
33-21	ND	ND	ND	ND	ND
33-22	ND	ND	ND	ND	ND
33-23	14.67 ± 0.47	23.00 ± 0.03	ND	17.00 ± 0.00	ND
33-24	ND	ND	ND	ND	ND
33-25	ND	ND	ND	ND	ND
33-26	ND	ND	ND	ND	ND
33-27	ND	11.00 ± 0.01	ND	ND	ND
33-28	ND	ND	ND	ND	ND
33-29	ND	ND	ND	ND	ND
33-30	ND	24.00 ± 0.03	ND	ND	ND
33-31	ND	ND	ND	ND	ND
33-32	ND	ND	ND	ND	ND
33-33	ND	ND	ND	ND	ND

¹⁾EO: *Escherichia coli* O157:H7; SS: *Salmonella enteritidis*; LM: *Listeria monocytogenes*; SA: *Staphylococcus aureus*; VP: *Vibrio parahaemolyticus*.

²⁾ND: no-inhibition



33-1 균주의 *E. coli* O157:H7에 대한 항균활성



33-1 균주의 *St. aureus*에 대한 항균활성



33-18 균주의 *E. coli* O157:H7에 대한 항균활성



<그림 10. 가자미식해 분리주의 항균활성>

균주의 성장능, pH 저하능, 내염성 실험을 통해 총 300 주의 젖산균 중 4주를 우수 스타터 후보균으로 선별하였다. 이들의 항균활성 실험을 진행한 결과 특정 병원성 미생물에 대해 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

(3) 가자미식해 분리주의 안전성

(가) 가자미식해 분리주의 안전성 시험

시판 가자미식해에서 분리한 젖산균에 대한 안전성을 확인하기 위해 hemolysis test와 biogenic amines (BAs) 검출시험을 실시하였다. Hemolysis test에서는 선정된 4종의 균주 모두 γ -용혈성 (Non hemolytic)을 나타내었다 (data not shown). BAs 검출시험에 대한 결과는 표 16. 과 같다.

<표 16. 가자미식해 분리주의 히스타민 생성량>

Starter candidates	Biogenic amines (mg/kg)
	Histamine
33-1	28.28 ± 7.79 ^{a)}
33-11	16.97 ± 1.25
33-18	23.14 ± 7.11
33-23	24.65 ± 5.14

^{a)}Mean ± standard deviation

시판되는 가자미식해에서 분리한 젖산균 4주에 대해 바이오제닉 아민 생성능을 측정한 결과 히스타민 함량의 경우 33-1 균주에 의해 28.28 mg/kg 검출되었고, 나머지 후보균으로부터의 히스타민 함량은 각각 16.97, 23.14, 24.65 mg/kg 검출되는 것을 확인하였으며 기타 아민의 경우 그 함량이 5 mg/kg 이하인 것으로 확인되었다 (data not shown).

위의 실험을 통해 선별한 4주의 우수 스타터 후보균 (33-1, 33-11, 33-18, 33-23)의 가자미식해에 대한 적용이 적합하다고 판단하여, 가자미식해 제조과정에 적용하여 *in situ* 실험을 진행하였다.

다. 선별한 가자미식해 후보균의 적용 (*in situ*)

(1) 가자미식해 제조

한국의 동해안에서 어획된 가자미를 동결된 상태로 구입하여 사용하였다. 부재료는 고춧가루, 마늘, 생강, 설탕, 좁쌀, 무, 소금을 사용하였고 제조방법은 다음과 같다. 가자미는 머리, 지느러미와 내장을 제거하고 4-5등분으로 세절하여 가자미 무게의 20% 비율의 소금으로 염장 (20°C, 24 시간)후 수돗물로 3회 세척하고, 20°C에서 탈수한 후, 각 재료를 표 17.의 비율로 혼합하였다. 스타터 또는 스타터 후보균으로 사용할 젖산균의 경우 동결조건을 통해 파우더 형태로 조제하여 재료 혼합단계에서 전체 무게의 1%를 첨가하였다. 제조가 완료된 가자미식해는 우수 스타터 후보균 첨가균과 비첨가균으로 나누어 플라스틱 밀폐용기에 옮겨 담은 후 15°C cool incubator에서 10일간 발효하였고, 이 후에 숙성은 4°C에서 진행하였다.

<표 17. 가자미식해 제조 비율>

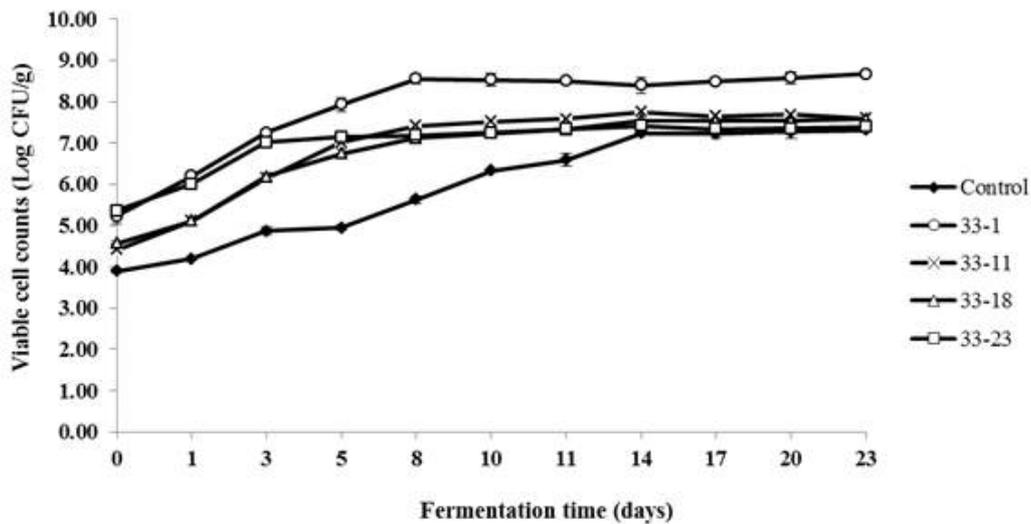
Materials	Weight ratio (%)
Flat fish (20% salted)	73
Red pepper powder	7
Ginger	1
MSG	1
Sugar	3
glutinous Millet	4
Garlic	3
Salted Radish (1% salt)	9

(2) 실험결과

(가) 미생물학적 분석 결과

1) 우수 starter 후보균을 적용한 가자미식해의 총균수 변화

33-1 균주를 적용한 실험군의 경우, 발효기간 동안 총 균수는 발효 개시일로부터 10일까지 5.22 log CFU/g으로부터 8.53 log CFU/g으로 증가하였고, 이후 숙성 12일까지 거의 변화가 없었다. 33-23 균주를 적용한 가자미식해의 경우 발효 개시일로부터 10일까지 5.35 log CFU/g에서 7.25 log CFU/g으로 균수가 증가하였다. 이후 12일후에 약 7.40 log CFU/g을 나타내었으며, 33-11 균주와 33-18 균주를 적용한 가자미식해의 총 균수는 발효 개시일부터 발효 10일후에 각각 4.42-7.52 log CFU/g, 4.56-7.23 log CFU/g을 나타내었으며, 이후 숙성 12일후에 약 7.60 log CFU/g으로 나타났다.

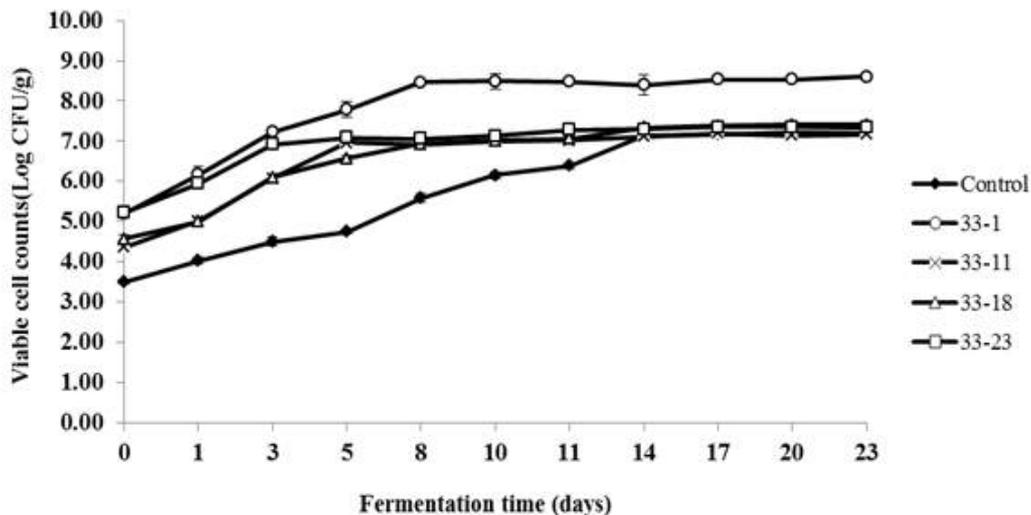


<그림 11. 우수 스타터 후보균을 적용한 가자미식해의 발효기간 동안 총균수 변화>

2) 우수 starter 후보균을 적용한 가자미식해의 젖산균수 변화

젖산균수 또한 각각의 실험군에서 총 균의 변화와 유사한 양상을 나타내었는데, 33-1 균주를 적용한 실험군의 경우 발효 개시일부터 발효 10일까지 5.19 log CFU/g으로부터 8.49 log CFU/g으로 증가하였고 이후 숙성 12일후에 거의 변화가 없었다. 33-11 균주를 적용한 실험군의 경우 발효 개시일부터 발효 10일후에 4.36 log CFU/g에서 7.00 log CFU/g으로 증가하였고, 이 후 숙성 12일에 7.16 log CFU/g을 나타내었고, 33-18과 33-23균주를 적용한 실험군의 경우 발효 개시일부터 발효 10일 후에 각각 4.57~7.02 log CFU/g, 5.22~7.13 log CFU/g을 나타내었고 이후 숙성 12일에 각각 7.40, 7.34 log CFU/g을 나타내었다.

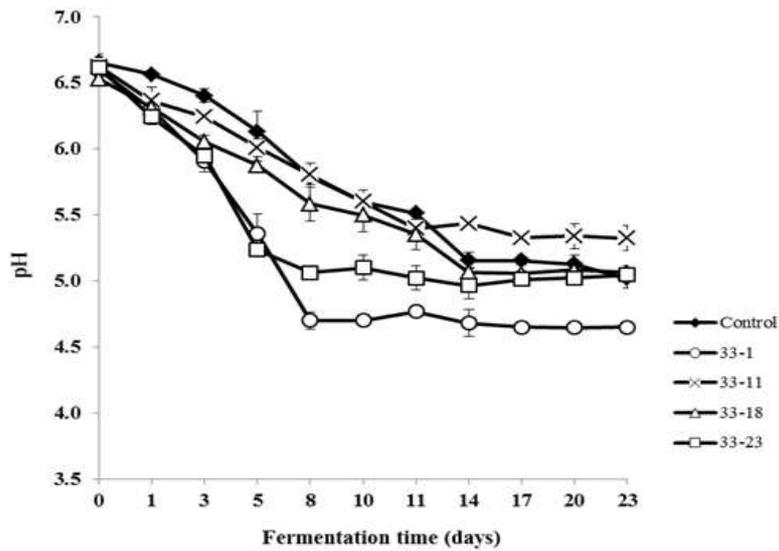
자연발효 시킨 가자미식해 (Control)의 총 균수 변화는 발효 개시일에 3.90 log CFU/g을 나타내었고 발효 10일에 6.33 log CFU/g을 나타내어 젖산균수의 변화와 유사한 양상을 보여주었으며, 각 실험군에서의 총 균수와 젖산균수의 변화 또한 동일한 양상을 나타내는 것으로 보아 가자미식해의 총 균은 대부분 젖산균에 의해 지배되는 것으로 사료된다.



<그림 12. 우수 스타터 후보균을 적용한 가자미식해의 발효기간 동안 젖산균수 변화>

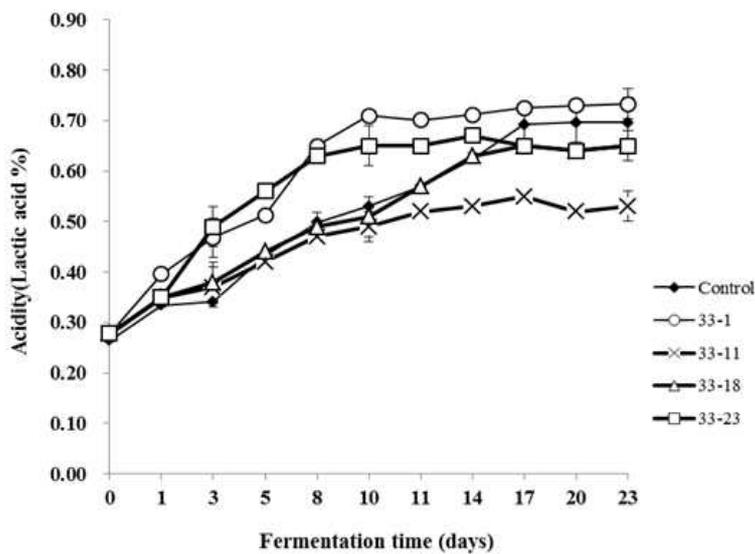
(나) 이화학적 분석 결과

1) pH 변화



<그림 13. 우수 스타터 후보균을 적용한 가자미식해의 발효기간 동안 pH 변화>

2) 산도 변화



<그림 14. 우수 스타터 후보균을 적용한 가자미식해의 발효기간 동안 산도 변화>

33-1 균주를 적용한 가자미식해의 pH값은 발효 개시일부터 10일까지 pH 6.6에서 pH 4.7로 감소하는 것을 확인하였고 이후 숙성 12일까지 pH 값이 약 4.6으로 유지되는 것을 확인하였다. 산도의 경우 발효 개시일부터 발효 10일후에 0.28%에서 0.70%까지 증가하는 것을 확인하였고, 이후 숙성 12일까지 약 0.7%의 산도를 유지하는 것을 확인하였다. 33-11, 33-18, 33-23 균주를

적용한 실험군의 경우 pH 값은 발효 10일에 각각 pH 5.6, pH 5.5, pH 5.1을 나타내었고 이후 12일후에 각각 pH 5.3, pH 5.1, pH 5.0을 나타내었으며, 산도는 각 실험군에서 숙성 12일에 0.53, 0.65, 0.65%를 나타내었다.

우수 스타터 후보균을 적용한 가자미식해와 비교하여 자연발효시킨 가자미식해의 경우 산도는 발효 17일에 약 0.7%로서 실험군과 비교하여 유사한 값을 나타내었으나, pH 값의 경우 pH 5.0 이하에 도달하지 못하는 것을 확인 할 수 있었다.

염도의 경우 각각의 균주를 적용한 가자미식해는 발효 및 숙성기간 동안 큰 변화가 없이 약 3%를 나타내었고, 수분활성도 또한 약 0.95의 수분활성도 값을 유지하는 것으로 나타났다 (data not shown).

(다) 우수 starter 후보균을 적용한 가자미식해의 위생 안전성

1) 제조한 가자미식해의 병원성 미생물

가자미식해는 제조 시 사용되는 가자미 원물의 경우 멸균 처리 과정이 없기 때문에 어패류에 존재할 수 있는 병원성미생물 (Coliform, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*)이 검출 될 가능성이 있다. 이를 확인하기 위해 가자미식해의 원료 및 부재료와 발효 및 숙성기간 동안 가자미식해에서의 병원성미생물을 확인한 결과 각 스타터 후보균을 적용한 실험군과 자연발효시킨 대조군에서 모두 검출되지 않는 것을 확인하였다. 그 결과는 표 18, 19. 와 같다.

<표 18. 가자미식해 원료 및 부원료의 병원성 미생물 검출 결과>

Materials	CO ¹⁾	EO	SS	SA	LM	VP
Flat fish (Gajami, raw)	-*	ND*	ND	ND	ND	ND
Salted fish (Gajami)	-	ND	ND	ND	ND	ND
Galric	-	ND	ND	ND	ND	ND
Ginger	-	ND	ND	ND	ND	ND
Radish	-	ND	ND	ND	ND	ND

*ND : not detected, (-) : negative

1) CO: Coliform; EO: *Escherichia coli* O157:H7; SS: *Salmonella* spp.; SA: *Staphylococcus aureus*, LM: *Listeria monocytogenes*, VP: *Vibrio parahaemolyticus*

<표 19. 제조한 가자미식해의 발효기간 동안 병원성 미생물 검출 결과>

Test microorganisms	Fermentation days										
	0	1	3	5	8	11	14	17	20	23	
CO ¹⁾	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EO	ND*	ND									
SS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
VP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*ND : not detected, (-) : negative

1) CO: Coliform; EO: *Escherichia coli* O157:H7; SS: *Salmonella* spp.; SA: *Staphylococcus aureus*, LM: *Listeria monocytogenes*, VP: *Vibrio parahaemolyticus*

2) 제조한 가자미식해의 히스타민 (histamine) 함량

33-1 균주를 적용하여 제조된 실험군의 경우 발효 및 숙성기간 동안 8.14 mg/kg의 히스타민이 검출되었다. 33-11, 33-18, 33-23 균주를 적용한 실험군에서는 각각 9.25, 11.3, 10.7 mg/kg의 히스타민이 검출되는 것을 확인 하였다. 그 결과는 표 20. 과 같다.

<표 20. 우수 스타터 후보균을 적용한 가자미식해의 발효기간 동안 히스타민 생성량>

우수 스타터 후보균을 적용한 가자미식해	Biogenic aimes (mg/kg)
	Histamine
33-1	8.14 ± 4.65 ^{a)}
33-11	9.25 ± 4.33
33-18	11.3 ± 3.12
33-23	10.7 ± 4.15
Control	14.3 ± 8.45

^{a)}Mean ± standard deviation

이는 인체 섭취허용량 (200 ppm 이하)에 해당하는 수준으로 스타터 후보균주를 적용한 실험군 과 대조군 모두 인체에 안전한 것을 확인하였다.

(라) 우수 starter 후보균을 적용한 가자미식해의 관능검사

1) 제조한 가자미식해의 관능검사 결과

스타터 후보균을 적용하여 제조한 가자미식해의 pH 및 산도 측정 결과 각 실험군에서 pH값과 산도가 숙성 6일후부터 큰 변화 없이 유지되어 숙성이 종료되는 숙성 12일후에 관능검사를 실시하였고, 관능 점수의 비교를 위해 자연발효시킨 가자미식해를 대조군으로써 함께 실시하였다. 그 결과는 표 21. 과 같다.

<표 21. 우수 스타터 후보균을 적용한 가자미식해의 관능검사 결과>

	Control	33-1	33-11	33-18	33-23
Flavor acceptance	6.06 ± 1.81	7.06 ± 0.91	5.06 ± 1.78	4.94 ± 2.30	5.11 ± 1.70
Flavor of acidity	4.56 ± 2.57	4.67 ± 2.58	5.50 ± 2.32	5.56 ± 2.79	4.00 ± 2.56
Flavor of moldy Taste acceptance	3.28 ± 2.35	2.83 ± 1.86	4.06 ± 2.48	3.83 ± 2.91	4.11 ± 2.51
Taste of acidity	5.83 ± 1.95	6.44 ± 1.74	4.61 ± 2.19	4.89 ± 2.13	4.56 ± 2.14
Taste of moldy	4.17 ± 2.57	6.00 ± 2.33	5.28 ± 2.45	5.39 ± 2.38	4.33 ± 2.75
Taste of green	3.56 ± 2.63	2.72 ± 1.37	5.00 ± 2.65	3.83 ± 2.69	4.44 ± 2.73
Color acceptance	3.17 ± 1.92	2.11 ± 1.24	3.39 ± 2.00	3.33 ± 2.08	3.72 ± 2.30
Overall acceptance	4.94 ± 1.84	6.83 ± 1.17	5.72 ± 1.82	5.94 ± 1.54	6.00 ± 1.91
Overall acceptance	6.06 ± 1.87	7.33 ± 0.94	4.33 ± 1.97	5.11 ± 2.23	4.94 ± 2.04

종합적인 만족도에서 33-1 균주를 적용한 가자미식해가 다른 실험군 및 대조군에 비해 높게 나타났다. 또한 가자미식해의 풍미 중 중요한 신미는 자연발효시킨 가자미식해의 경우 평가치 4.1을 나타내었고 33-11, 33-18, 33-23 균주를 적용한 가자미식해의 경우 각각 평가치 5.3, 5.4, 4.3을 나타냈다. 그러나, 33-1 균주를 적용한 시료에서는 평가치 6.0을 나타내었고, 익음 정도에서도 다른 실험군 및 대조군에 비해 33-1 균주를 적용한 시료가 좋은 점수를 나타내었을 뿐만 아니라 전반적인 기호도에서도 높게 나타났다. 또한 생선 특유의 비린내에 대한 감지 정도가 자연발효시킨 가자미식해에 비해 낮다는 평가가 지배적이었다.

결론적으로 관능평가 결과 33-1 균주를 적용하여 가자미식해를 제조할 경우 소비자의 기호도 만족과 균일한 품질을 갖는 가자미식해를 제조할 수 있을 것으로 사료된다.

5. 명태식해 starter 후보균의 탐색 및 최적화

가. 시판 명태식해의 원료와 부원료의 미생물학적, 이화학적 특성 검토

(1) 재료 및 방법

시판 명태식해의 품질평가 및 주요 상재 미생물 분리 및 동정과 미생물학적, 이화학적 특성을 검토하기 위하여 (주)정이푸드빌 및 국내 재래시장에서 시료를 수집하였다. 본 실험에 사용한 국내시료의 제품은 다음과 같다.

<표 24. 국내 명태식해 제품>

제품류	시료명
명태식해	A
	B
	C
	D
	E
	F

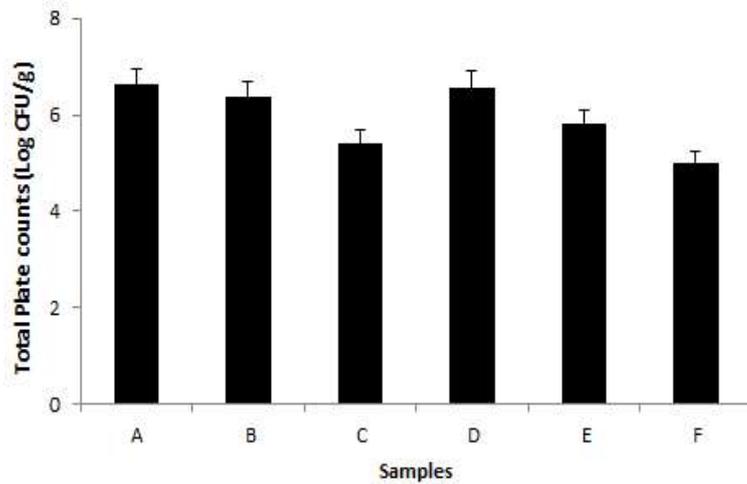
A: 풍미식품; B: 속초대성; C: 속초명품; D: 김송순아마이; E: 속초젓갈; F: 동해젓갈

총균수 측정을 위한 배지로는 PCA (Plate count agar)를 젖산균 분리를 위한 배지로는 BCP (0.006% bromocresol purple)를 첨가한 MRS (Difco™) 배지를 사용하였다. 균수 측정 방법은 식품공전 미생물시험법에 따라 시료 25 g에 멸균 희석수 225 ml 첨가하여 희석한 다음 배지에 도달하여 $35 \pm 2^\circ\text{C}$, 혐기적 조건에서 24시간 배양한 후 생성된 집락을 관찰하였다. BCP 첨가 MRS배지에서 노란색 집락들을 2회 이상 분리하여 산 생성 여부를 확인하였다. 순수한 집락을 다시 MRS broth에 18 시간 배양한 후 배양액을 15% glycerol의 농도로 -70°C 에서 저장하면서 실험에 사용하였다. 병원성미생물은 식품공전 미생물시험법에 따라 증균배지, 선택배지 등에 24~48시간 배양한 후 생성된 집락을 관찰하였다.

(2) 실험결과

(가) 시판 명태식해의 미생물학적 분석결과

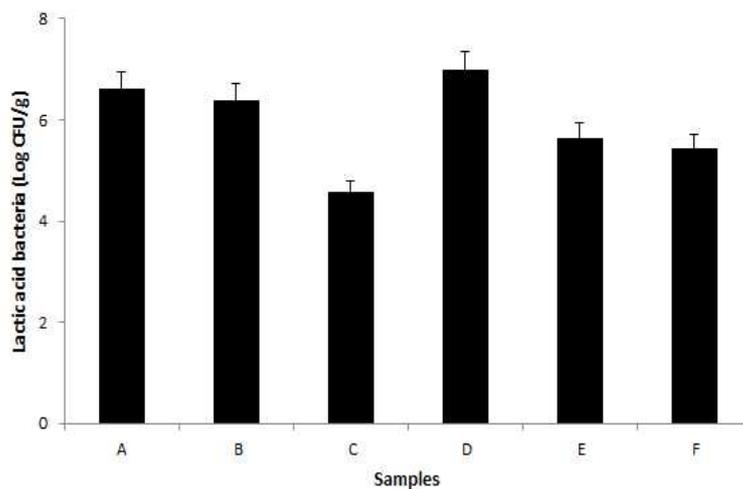
1) 시판 명태식해의 총균수



<그림 20. 시판 명태식해 총균수>

수거한 시판 명태식해의 총균수를 측정한 결과 4.56~7.00 log CFU/g을 나타내었으며, 평균 6.31 log CFU/g을 나타내었다.

2) 시판 명태식해의 젖산균수



<그림 21. 시판 명태식해 젖산균수>

수거한 시판 명태식해의 젖산균수를 측정한 결과 4.41~6.62 log CFU/g을 나타내었으며, 평균

5.80 log CFU/g을 나타내었다. 각 시판제품의 젖산균수가 총균수와 비슷한 수치를 나타내는 것으로 보아 대부분 젖산균이 지배적으로 성장한 것으로 사료된다. 또한 총균수보다 젖산균수가 높은 경우도 있었는데, 이는 각각의 우점균인 젖산균이 배지와 배양 환경의 차이(특히, 호·혐기적 조건)에 따라 얻어진 결과로 사료된다.

3) 시판 명태식해의 병원성 미생물

시판되는 명태식해로부터 병원성 미생물 (Coliform, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*) 검출 시험을 실시하였으나 모든 시료에서 병원성 미생물이 검출되지 않는 것을 확인하였다.

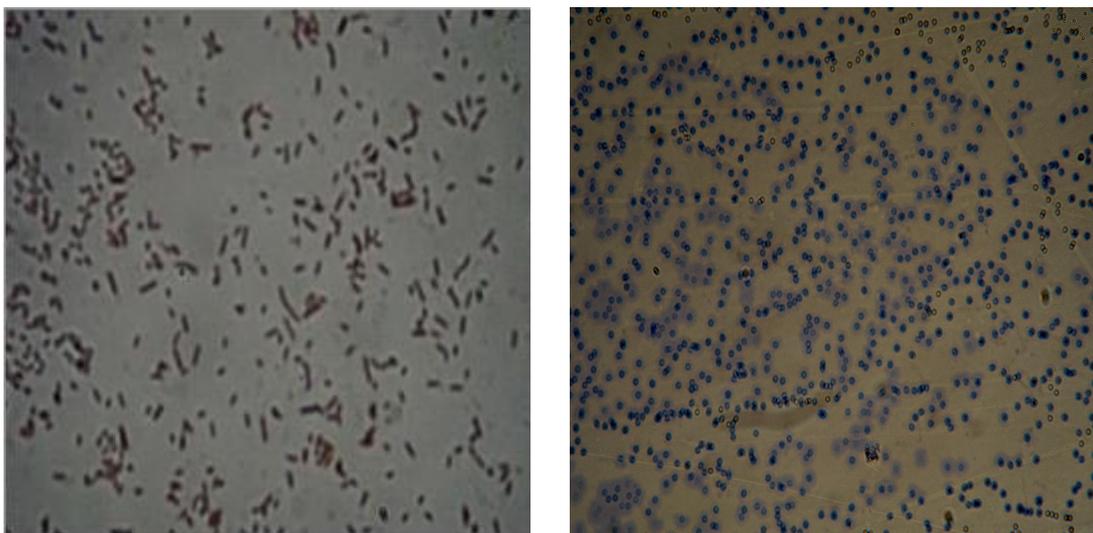
〈표 25. 시판 명태식해의 병원성 미생물 검출〉

Samples	Tested pathogenic microorganisms ¹⁾				
	EO	SS	SA	LM	VP
A	ND*	ND	ND	ND	ND
B	ND	ND	ND	ND	ND
C	ND	ND	ND	ND	ND
D	ND	ND	ND	ND	ND
E	ND	ND	ND	ND	ND
F	ND	ND	ND	ND	ND

*ND : not detected, (-) : negative

1) EO: *Escherichia coli* O157:H7; SS: *Salmonella* spp.; SA: *Staphylococcus aureus*; LM: *Listeria monocytogenes*; VP: *Vibrio parahaemolyticus*

4) 시판 명태식해의 주요 상재 미생물 동정



총세균(간균)

젖산균(구균)

〈그림 22. 시판 명태식해의 미생물 균상 분석〉

<표 26. 시판 명태식해의 미생물 동정>

시료	동정결과
F	<i>Lactobacillus fermentum</i> 2 (% ID, 99.9)
A	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> 1 (% ID, 95.6)
C	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides/dextranicum</i> 2 (% ID, 98.6)
B	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> (% ID, 78.4)
D	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides/dextranicum</i> 2 (% ID, 95.3)
A, C	<i>Bacillus</i> spp. (% ID, 90.0)
E	<i>Lactobacillus brevis</i> (% ID, 99.0)

총세균과 젖산균에서 분리한 균주를 대상으로 현미경 검경을 실시한 결과 간균과 구균으로 판독되었고 동정 결과 *Bacillus* spp., *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* 2, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* spp. *lactis* 1, *Lactobacillus brevis/fermentum* 2 등으로 동정되었다.

(나) 시판 명태식해의 이화학적 분석 결과

1) 시판 명태식해의 a_w , 염도, pH 분석 결과

<표 27. 시판 명태식해의 이화학적 분석 결과>

Products	a_w	pH	acidity (%)	Salt content (%)
A	0.923 ± 0.01	4.31 ± 0.01	0.40 ± 0.01	3.43 ± 0.01
B	0.920 ± 0.00	4.51 ± 0.00	0.37 ± 0.00	3.45 ± 0.03
C	0.925 ± 0.00	4.40 ± 0.01	0.35 ± 0.01	3.21 ± 0.00
D	0.910 ± 0.00	4.94 ± 0.01	0.21 ± 0.00	3.51 ± 0.01
E	0.917 ± 0.01	4.90 ± 0.01	0.24 ± 0.01	3.33 ± 0.03
F	0.928 ± 0.00	4.98 ± 0.03	0.23 ± 0.01	3.18 ± 0.02
average	0.921 ± 0.01	4.67 ± 0.01	0.30 ± 0.01	3.35 ± 0.02

시판되는 명태식해의 이화학적 특성을 분석한 결과 pH 값은 pH 4.31~4.98의 범위를 나타내었고, 평균 pH 4.67을 나타내었으며, 산도의 경우 0.21~0.40%를 나타내었고, 평균 0.30%의 산도를 나타내었다. 수분활성도의 경우 0.910~0.928을 나타내었으며, 평균 0.921의 수분활성도 값을 나타내었고, 염도 범위는 3.18~3.51%, 평균 3.35%의 염도를 나타내는 것을 확인하였다.

(다) 시판 명태식해의 유해물질 분석

1) 시판 명태식해의 biogenic amine 함량 분석

<표 28. 시판되는 명태식해의 바이오제닉 아민 함량>

<i>Sikhae</i>	Biogenic amines (mg/kg)						
	Trp ^a	Phe	Put	His	Tyr	Spd	Spm
A ^b	ND ^c	ND	7.56 ± 0.32	15.1 ± 0.76	22.5 ± 1.55	ND	1.18 ± 0.33
B	ND	ND	4.31 ± 0.33	13.3 ± 0.22	24.7 ± 0.13	ND	0.48 ± 0.13
C	ND	ND	ND	21.5 ± 0.05	23.3 ± 0.08	ND	1.90 ± 0.19
D	ND	0.58 ± 0.13	ND	20.9 ± 0.66	21.3 ± 1.32	ND	11.03 ± 0.07
E	ND	2.33 ± 0.05	5.31 ± 1.03	25.3 ± 0.79	27.9 ± 0.09	ND	5.55 ± 0.09
F	ND	1.00 ± 0.10	3.71 ± 0.31	28.6 ± 0.56	23.5 ± 1.96	ND	7.15 ± 0.55

^a Trp: tryptamine, Phe: β -phenylethylamine, Put: putrescine, His: histamine, Tyr: tyramine, Spd: spermidine, Spm: spermine

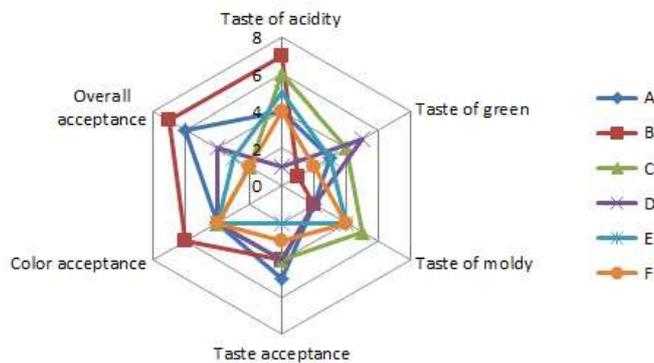
^bA~F: Commercial Alaska pollack-*Sikhae*

^cND: Not detected (amine level is less than 0.1 mg/kg)

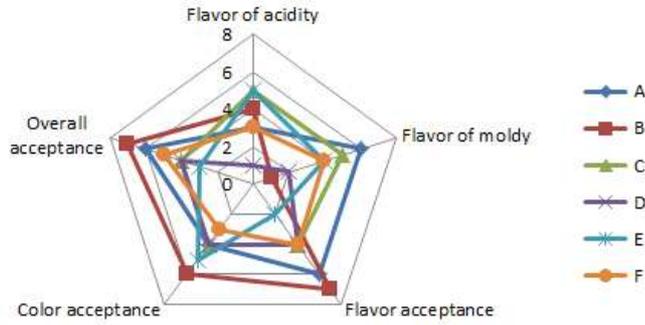
Mean ± standard deviation.

시판되는 명태식해 시료를 수거하여 HPLC를 통해 바이오제닉 아민 함량을 분석한 결과는 표 25. 와 같다. 그 결과 히스타민의 평균 함량은 20.78 mg/kg, 타이라민의 평균 함량은 23.87 mg/kg을 나타내었고, 다른 아민들의 평균 함량은 10 mg/kg 이하인 것을 확인하였다.

(라) 시판 명태식해의 관능검사 결과



<그림 23. 시판 명태식해의 맛에 대한 관능평가 결과>



<그림 24. 시판 명태식해의 향에 대한 관능평가 결과>

시판되는 명태식해 6종의 관능평가 결과 제품 B가 전반적인 맛과 향에서 우수한 점수를 받았다.

나. 명태식해 starter 후보균의 탐색 및 최적화

(1) Starter 후보균 선별 및 생리, 화학적 특성

(가) 분리주의 형태학적, 생리적 특성

미생물 염색법을 수행하여 예비 starter 균주의 morphology를 현미경 (Axioskop, ZEISS, Germany)를 이용하여 관찰하였다. Starter 후보균의 생리적 특성을 검토하고 동정하기 위해 catalase test, 당 분해력, gas 생성력, pH, 생육속도, 다양한 온도에서의 생육 특성을 수행하였다.

(나) Catalase test

Catalase test는 분리주를 broth에 24 시간 동안 배양한 후 배양액을 취해 slide glass에 1ml정도를 적하한 후 3% H₂O₂를 반응시켜 거품 형성 여부를 관찰하였으며 거품이 형성되면 양성, 형성되지 않으면 음성으로 간주하였다.

(다) 당 분해능

당분해능은 기본 peptone 배지에 최종농도가 1%가 되도록 당 (glucose, lactose, maltose, faffinose, sucrose)을 첨가하고 지시약으로 0.004% bromocresol purple을 사용하여 30°C 에서 24 시간 배양 후 배지의 색이 변하는 것으로 나타내었다. 보라색의 배지가 노랗게 변하면 양성, 변하지 않으면 음성으로 나타내었다.

(라) Gas 생성력

Gas 생성력은 MRS broth에 durham tube를 넣고 분리주를 배양하여 24h 후 gas 생성 여부를 관찰하였다.

(마) 생육속도

생육속도는 각각의 분리주를 30°C에 배양하여 24 시간 후에 생성되는 균체량을 spectrophotometer (UV-1601, SHIMADZU)를 이용하여 측정하였다. 준비된 MRS broth에 분리주를 접종한 후 각각 4°C, 15°C, 37°C 1~7일 간 배양하여 생육 특성을 관찰하였다.

(2) 분리주의 항균활성 실험

(가) 시료 전처리

1차 분리주의 항균활성을 측정하기 위해 분리주를 MRS broth에 30°C에서 24시간 배양 후 4°C로 냉장시켰다. 산에 의한 pH와 H₂O₂가 항균활성 결과에 미치는 영향을 배제하기 위해 0.1 M의 NaOH를 이용하여 pH를 7.0으로 조정하였으며 catalase를 50 U/ml을 첨가하여 1 시간 동안 30°C에서 반응시켰다. 반응시킨 후 5000 x g, 4°C에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 동결건조기를 이용하여 동결 건조시킨 후 50 mM sodium phosphate buffer를 이용하여 10 배 농축시켜 조시험액으로 하였다. 조 시험액은 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 대조구로는 MRS broth를 동량 취하여 같은 방법으로 전처리하여 사용하였다.

(나) ADT 수행

분리주들의 항균활성을 확인하기 위해 agar diffusion test (ADT)를 수행하였다. 시험균주는 그람 양성균으로 *Listeria monocytogenes* (KCTC3710), *Staphylococcus aureus* (KCTC1916) 을 그람 음성균으로 *E. coli* O157:H7 (KCTC1039), *Salmonella enteritidis* (KCTC12400), *Vibrio parahaemolyticus* (KCTC2471)를 이용하였다. 우선 paper disc (Whatman, ϕ 8 mm)에 시료를 80 μ l를 적하하여 무균 상태에서 건조시킨 후 시험균주가 도말된 배지 위에 올려놓고 35 \pm 2°C에서 24 시간 이내에 paper disc 주변에 저해환이 형성되는 것으로 항균활성 여부를 판단하였다.

(다) 분리주의 기능성 탐색

1) GABA (γ -aminobutyric acid) 생성균주 분리

국내 시판 중인 식해로부터 젖산균을 분리하여 실험에 사용하였다. 식해에서 분리한 젖산균의 GABA 생산성 시험을 위해 rapid screening media (Lactobacilli MRS broth supplemented with 1% L-Glutamic acid, 0.005% pyridoxal phosphate, 0.001% BCP and 1.6% agar)를 이용하여 배지의 색변화를 보인 집락을 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주들은 silica gel TLC plate (Kieselgel 60, F254, 0.2 mm, Merck, Germany)에 표준물질 GABA (Sigma)와 함께 분리주의 배양물을 2 μ l씩 전개시켜 spot이 크고 진한 밴드를 보인 균주들을 GABA 생산균주로 선별하였다.

2) GABA (γ -aminobutyric acid) 생산균주의 동정

선별된 분리주의 동정을 위해 발효능력시험 (fermentation potential test)과 16S ribosomal DNA (rRNA) sequence analysis를 실시 하였다. 당 발효능력을 확인하기 위해 API 50 CH strip과 API

50 CHL Medium (bioMerieux, sa 69280 Marcy l'Etoile, France)을 이용하였으며, 결과는 24, 48 시간 후에 확인하였다. 분리주의 genomic DNA는 genomic DNA isolation kit (Intron, Sunghnam, Korea)를 이용하여 분리하였으며, bacteria의 16S ribosomal DNA에 특이적인 primer를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. PCR condition은 35 cycle (1 min at 94°C, 1 min at 58°C, 2 min at 72°C)과 elongation의 1 cycle (7 min at 72°C)로 이루어졌으며 16S rRNA sequencing 결과를 이용하여 genbank의 blast 검색을 통해 GABA 생산 균주를 동정하였다.

3) GABA (γ -aminobutyric acid) 생산성의 정량적 확인

분리주의 GABA 생산성은 정량적 확인을 위해 HPLC (Waters)를 사용하였으며 분리주의 배양 물을 원심분리 (3,500 rpm, 20 min)하여 0.2 μ m membrane filter로 여과한 후 10배로 희석한 것을 sample로 이용하였다. 이것을 0.01 N HCl을 이용하여 단백질을 제거 후 AQC reagent (Waters, USA)를 이용하여 유도체화한 것을 HPLC 분석에 사용하였다. column은 reverse-phase column (150 \times 3.9 mm I.D. AccQ.Tag C18, Waters)를, U.V-spectrophotometric detector (254 nm) 제품을 이용하였다. 이동상은 A solution (140 mM Sodium acetate, 5.6 mM Triethylamine, pH 5.03)과 B solution (acetonitrile/distilled water = 60/40)의 gradient condition (initial 100% A: 35 min 67% A)에서 flow rate 1 ml/min, injection volume 20 μ l의 조건으로 분석하였다.

(라) 명태식해 분리주의 안전성

1) 명태식해 분리주의 안전성 시험 (Biogenic amine)

선별된 분리주의 바이오제닉아민 함량 측정을 위해 sample 3 g에 0.4 M perchloric acid (Sigma, USA) 27 mL을 넣어 잘 혼합한 뒤 추출을 3시간동안 진행한 후, 원심분리(3,000 rpm, 4°C, 5 min.) 하여 상등액을 1 mL 취한 후 이 상등액에 Na₂CO₃ 300 μ l, 2 M NaOH 200 μ l 및 1% dansyl chloride 2 mL을 첨가하여 잘 혼합하고, 40 °C에서 45분간 유도체화를 거친 후 ammonium hydroxide 100 μ l를 넣어 여분의 dansyl chloride를 제거한 뒤, acetonitrile 1.4 mL을 첨가하고, 원심분리(3,000 rpm, 4°C, 5 min.) 하여 상등액을 0.22 μ m syringe filter로 여과 후 기기분석에 사용하였다. 분석기기는 photodiode array가 장착된 HPLC(Waters)를 이용하였으며, column은 Nova-Pak C₁₈4 μ m 3.9 x 150 mm(Waters, Ireland)를 사용하였고, 이동상으로 0.1 M ammonium acetate(Sigma, USA)와 HPLC급 acetonitrile(Merck, USA)를 사용하였다.

(3) 실험결과

(가) 명태식해 분리주의 형태학적, 생리적 특성

1) 명태식해 분리주의 생리, 화학적 및 생육 특성 결과

Catalase test에서는 분리주 210주 모두 음성이었으며, 그람염색 시험에서 그람 양성,

micro-morphology는 쌍구균 또는 단구균으로 나타났다. 이중에서 상대적으로 강한 특성을 보이는 균주 46주를 선정하였고, 이들의 당 분해능 및 gas 생성, 그리고 젖산 생성으로 인한 pH 변화 및 시간에 따른 균주의 성장능과 산 생성능을 검토하였으며 그 결과는 표 29, 30. 과 같다. 또한, 15°C, 37°C의 온도 범위에서 생육 가능한 것으로 확인 되었으며 그 결과는 표 31. 과 같다.

<표 29. 24시간 배양 후 명태식해 분리주의 생리·화학적 특성>

Strains	·Acid formation from					Gas from glucose
	Glucose	Lactose	Maltose	Raffinose	Sucrose	
M-1	+	+	+	+	+	+
M-2	+	+	+	+	+	+
M-3	+	+	+	+	+	+
M-4	+	+	+	+	+	+
M-6	+	+	+	+	+	+
M-7	+	+	+	+	+	+
M-9	+	+	+	+	+	+
M-10	+	+	+	+	+	+
M-11	+	+	+	+	+	+
M-12	+	+	+	+	+	+
M-13	+	+	+	+	+	+
M-14	+	+	+	+	+	+
M-15	+	+	+	+	+	+
M-16	+	+	+	+	+	+
M-17	+	+	+	+	+	+
M-18	+	+	+	+	+	+
M-20	+	+	+	+	+	+
M-21	+	+	+	+	+	+
M-22	+	+	+	+	+	+
M-23	+	+	+	+	+	+
M-24	+	+	+	+	+	+
M-25	+	+	+	+	+	+
M-26	+	+	+	+	+	+
M-27	+	+	+	+	+	+
M-28	+	+	+	+	+	+
M-29	+	+	+	+	+	+
M-30	+	+	+	+	+	+
M-31	+	+	+	+	+	+
M-32	+	+	+	+	+	+
M-33	+	+	+	+	+	+
M-34	+	+	+	+	+	+
M-35	+	+	+	+	+	+
M-36	+	+	+	+	+	+
M-37	+	+	+	+	+	+
M-38	+	+	+	+	+	+
M-39	+	+	+	+	+	+
M-40	+	+	+	+	+	+
M-41	+	+	+	+	+	+
M-42	+	+	+	+	+	+
M-43	+	+	+	+	+	+
M-45	+	+	+	+	+	+
M-46	+	+	+	+	+	+
M-47	+	+	+	+	+	+
M-48	+	+	+	+	+	+
M-49	+	+	+	+	+	+
M-50	+	+	+	+	+	+

<표 30. 명태식해 분리주의 시간별 성장능 및 pH 변화 결과>

Strains	0 hr.		3 hr.		6 hr.		9 hr.		12 hr.	
	O.D	pH	O.D	pH	O.D	pH	O.D	pH	O.D	pH
M-1	0.259	6.10	0.401	6.00	2.309	4.87	2.181	4.88	2.181	4.87
M-2	0.244	6.09	0.252	6.07	0.250	6.02	0.378	5.91	1.144	5.40
M-3	0.209	6.08	0.298	6.07	0.218	6.07	0.288	5.96	0.824	5.58
M-4	0.219	6.09	0.224	6.08	0.310	6.05	0.264	6.02	0.403	5.93
M-6	0.225	6.07	0.324	6.06	0.325	6.04	0.329	5.99	0.495	5.84
M-7	0.228	6.08	0.226	6.06	0.264	6.04	0.327	5.95	1.035	5.53
M-9	0.220	6.08	0.219	6.12	0.239	6.04	0.383	5.92	1.315	5.35
M-10	0.224	6.08	0.223	6.06	0.225	6.06	0.299	5.98	0.641	5.80
M-11	0.913	6.22	0.218	6.23	0.228	6.05	0.333	5.98	1.503	5.45
M-12	0.211	6.23	0.264	6.00	0.264	6.00	0.264	6.01	0.264	6.18
M-13	0.178	6.21	0.265	6.01	0.265	6.01	0.278	6.03	0.271	6.16
M-14	0.201	6.23	0.272	6.01	0.268	6.02	0.267	6.02	0.137	6.17
M-15	0.194	6.23	0.262	6.02	0.262	6.00	0.276	6.03	0.261	6.17
M-16	0.206	6.23	0.264	6.02	0.264	6.01	0.278	6.01	0.278	6.15
M-17	0.254	6.02	0.258	6.02	0.250	6.04	0.317	5.99	0.404	6.16
M-18	0.213	6.21	0.258	6.02	0.259	6.06	0.284	6.00	0.280	6.16
M-20	0.213	6.22	0.250	6.03	0.260	6.02	0.270	6.03	0.270	6.18
M-21	0.219	6.22	0.267	6.02	0.268	6.03	0.293	6.00	0.384	5.93
M-22	0.213	6.21	0.233	6.24	0.250	6.02	0.242	6.04	0.246	6.05
M-23	0.242	6.26	0.348	6.14	1.927	4.91	2.214	4.44	2.422	4.31
M-24	0.189	6.23	0.177	6.23	0.170	6.21	0.265	6.02	0.363	5.97
M-25	0.167	6.21	0.179	5.97	0.395	5.85	0.280	6.01	0.366	5.96
M-26	0.200	6.24	0.175	5.97	0.256	6.02	0.291	6.00	0.354	5.97
M-27	0.371	5.69	0.160	5.97	0.227	6.02	0.254	6.00	0.258	6.00
M-28	0.164	5.97	0.236	6.03	0.248	6.01	0.259	6.02	0.330	5.98
M-29	0.168	6.23	0.208	6.22	0.250	6.02	0.253	6.03	0.254	6.04
M-30	0.201	6.22	0.168	5.98	0.174	5.98	0.265	6.02	0.260	6.04
M-31	0.237	6.24	0.307	5.92	1.849	4.99	2.301	4.45	2.260	4.33
M-32	0.202	6.11	0.207	6.11	0.222	6.20	0.222	6.19	0.229	6.18
M-33	0.201	6.12	0.211	6.14	0.183	6.23	0.235	5.97	0.242	5.88
M-34	0.236	6.11	0.209	6.13	0.210	6.20	0.220	6.18	0.231	6.13
M-35	0.234	6.15	0.265	6.12	1.387	5.45	2.232	4.56	2.370	4.34
M-36	0.228	6.12	0.213	6.11	0.200	6.19	0.328	6.13	1.413	5.49
M-37	0.186	6.13	0.214	6.12	0.193	6.22	0.234	6.00	0.240	6.00
M-38	0.189	6.15	0.202	6.10	0.254	6.00	0.217	6.20	0.218	6.18
M-39	0.228	6.13	0.220	6.13	0.204	6.23	0.263	6.00	0.269	5.99
M-40	0.232	6.11	0.203	6.16	0.223	6.08	0.225	6.20	0.231	6.17
M-41	0.234	6.13	0.224	6.12	0.230	6.23	0.231	6.22	0.235	6.18
M-42	0.238	6.14	0.321	6.01	0.203	6.20	0.211	6.21	0.220	6.18
M-43	0.241	6.12	0.267	6.02	0.204	6.22	0.213	6.22	0.221	6.18
M-45	0.219	6.12	0.207	6.11	0.200	6.22	0.195	6.24	0.208	6.19
M-46	0.218	6.15	0.274	6.11	0.247	6.01	0.210	6.23	0.219	6.18
M-47	0.248	6.19	0.273	6.11	1.104	5.50	2.223	4.59	2.358	4.37
M-48	0.253	6.16	0.264	6.12	1.375	5.34	2.323	4.43	2.466	4.23
M-49	0.244	6.16	0.253	6.13	1.172	5.58	2.334	4.43	2.436	4.28
M-50	0.227	6.16	0.214	6.12	1.258	5.53	2.335	4.42	2.466	4.29

<표 31. 명태식해 분리주의 온도별 생육 및 pH 결과>

Strains	15℃		37℃	
	O.D	pH	O.D	pH
M-1	2.245	4.55	2.268	4.21
M-2	0.253	6.27	0.264	6.18
M-3	1.614	5.57	2.088	4.43
M-4	2.436	5.06	2.270	4.96
M-6	0.250	6.27	0.261	6.17
M-7	1.579	5.61	2.075	4.45
M-9	1.346	5.07	2.436	4.97
M-10	1.312	5.07	2.422	4.97
M-11	1.395	5.25	2.482	5.22
M-12	1.653	5.51	2.088	5.43
M-13	0.244	6.35	0.266	6.28
M-14	0.609	5.79	2.709	4.89
M-15	1.613	5.94	2.709	5.88
M-16	1.613	5.90	1.737	4.88
M-17	1.157	5.93	1.613	4.88
M-18	1.135	5.49	2.214	5.47
M-20	0.379	5.48	2.214	5.45
M-21	0.341	6.14	0.379	6.13
M-22	0.342	6.15	1.860	6.14
M-23	1.884	5.70	2.312	4.30
M-24	0.364	6.08	0.421	6.06
M-25	0.386	6.06	1.875	6.04
M-26	1.128	5.52	2.241	4.36
M-27	0.340	6.14	0.379	6.12
M-28	1.900	5.55	2.063	4.54
M-29	0.339	6.14	2.173	4.99
M-30	1.135	5.50	2.358	4.37
M-31	0.343	4.40	1.955	4.60
M-32	0.435	5.56	2.382	4.22
M-33	0.340	6.07	0.437	5.97
M-34	0.342	5.62	2.232	4.36
M-35	1.969	4.62	0.380	4.11
M-36	0.341	6.04	0.583	5.08
M-37	0.341	6.15	1.459	5.30
M-38	1.260	6.17	0.379	6.12
M-39	0.338	5.75	2.205	4.43
M-40	0.340	6.14	0.378	6.11
M-41	0.410	6.16	0.380	6.14
M-42	1.533	5.66	2.346	4.34
M-43	0.372	6.14	0.380	6.11
M-45	0.429	6.15	0.380	6.12
M-46	0.312	6.04	0.361	6.03
M-47	2.089	4.29	2.108	4.15
M-48	2.108	4.34	2.112	4.03
M-49	2.347	4.37	2.469	4.05
M-50	2.431	4.40	2.531	4.04

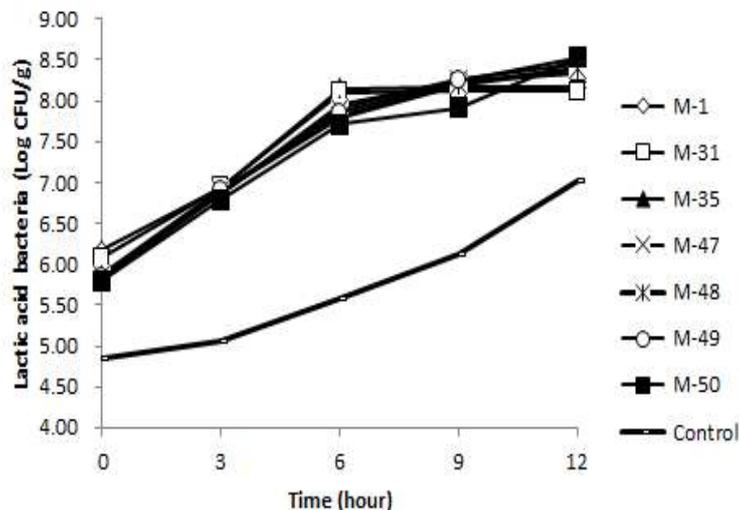
성장능 및 pH 변화 관찰 실험에서 M-1, M-31, M35, M-47, M-48, M-49, M-50 균주는 다른 균주들에 비하여 O.D값의 증가율이 높았으며, pH 저하 속도가 빠름을 확인하였다. 이들 중 15°C, 37°C 온도 범위에서 다른 균주들에 비해 상대적으로 높은 O.D값과 낮은 pH 값을 갖는 균주들을 선별한 후, NaCl (2%, 3%, 4%)을 첨가한 MRS broth에 접종하여 48시간 배양 후 OD값과 pH를 측정하여 균주들의 내염성을 확인 하였다. 그 결과는 표 32. 와 같다. 생육 활성이 우수한 상기 7가지 균주와 그 외 나머지 균주들의 평균값을 대조군으로 하여 시간별 성장능 및 pH 변화를 그림 25. 26. 에 나타내었다.

<표 32. 염도(2%, 3%, 4%)에 따른 균주의 균수 및 pH 값>

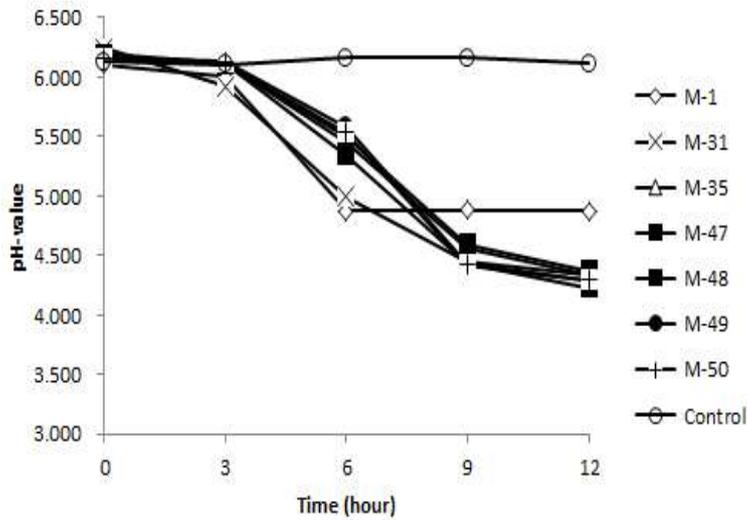
Strains	15°C					
	2% NaCl		3% NaCl		4% NaCl	
	pH	LAB ¹⁾	pH	LAB	pH	LAB
M-1	²⁾ 4.32 ± 0.00	7.50 ± 0.01	4.45 ± 0.02	7.42 ± 0.02	4.53 ± 0.02	7.53 ± 0.03
M-31	4.28 ± 0.11	7.31 ± 0.02	4.33 ± 0.01	7.28 ± 0.03	4.30 ± 0.02	7.34 ± 0.01
M-35	4.41 ± 0.01	7.44 ± 0.01	4.30 ± 0.02	7.32 ± 0.02	4.33 ± 0.01	7.34 ± 0.00
M-47	4.30 ± 0.02	6.98 ± 0.02	4.37 ± 0.01	7.02 ± 0.01	4.36 ± 0.01	7.11 ± 0.01
M-48	4.33 ± 0.00	6.78 ± 0.03	4.40 ± 0.01	6.69 ± 0.01	4.42 ± 0.02	6.72 ± 0.00
M-49	4.55 ± 0.02	7.22 ± 0.00	4.67 ± 0.02	7.31 ± 0.02	4.67 ± 0.00	7.32 ± 0.01
M-50	4.62 ± 0.01	7.17 ± 0.02	4.65 ± 0.00	7.22 ± 0.01	4.66 ± 0.01	7.10 ± 0.04

¹⁾LAB : Lactic acid bacteria; unit : log CFU/ml

²⁾Mean ± standard deviation.



<그림 25. 생육활성 우수 명태식해 분리균주와 대조군의 시간별 생육능 변화 결과>



<그림 26. 생육활성 우수 명태식해 분리균주와 대조군의 시간별 pH 변화 결과>

명태식해 분리균들 중 M-1, M-31, M-35, M-47, M-48, M-49, M-50의 초기균수는 평균 5.80 log CFU/g 수준을 보였고, 배양 6시간 경과 후 평균 8.36 log CFU/g 까지 빠르게 성장하였다. 대조군으로 두었던 일반 다른 명태식해 분리균주들의 초기균수는 평균 4.84 log CFU/g 수준을 보였고, 배양 12시간 경과 후 평균 7.02 log CFU/g 으로 서서히 증가하는 경향을 보였다. pH의 경우 분리주 M-1, M-31, M35, M-47, M-48, M-49, M-50의 경우 초기 pH는 평균 6.17 수준을 보였고, 배양 6시간 경과 후 pH 5.00 이하로 낮아져 산 생성력이 우수하다고 판단할 수 있었던 반면, 대조군으로 두었던 일반 다른 명태식해 분리균주들의 초기 평균 pH는 6.13 수준을 보였고, 배양 12시간이 경과하여도 평균 pH 6.11 정도로 뚜렷한 변화를 보이지 않아 산 생성력이 높지 않은 것을 알 수 있었다.

(나) 명태식해 분리주의 항균활성

1) 명태식해 분리주의 병원성 미생물에 대한 항균활성

명태식해 분리주의 생리, 화학적 및 생육 특성 결과 상대적으로 강한 특성을 보이는 균주 46주를 선정하였고, 이에 대하여 항균활성을 실시한 결과 5가지 병원성 미생물인 *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus* 에서 모두 뚜렷한 clear zone 형성이 확인되지 않아 항균활성이 크지 않은 것으로 사료된다 (data not shown).

(다) 명태식해 분리주의 안전성

1) 명태식해 분리주의 안전성 시험 (Biogenic amine)

<표 33. 명태식해 분리주의 히스타민 생성량>

Starter candidates	Biogenic amines (mg/kg)
	Histamine
M-1	18.22 ± 0.54 ^{a)}
M-31	29.17 ± 1.21
M-35	24.71 ± 3.15
M-47	21.88 ± 2.27
M-48	31.08 ± 1.06
M-49	25.02 ± 2.17
M-50	27.28 ± 4.14

^{a)}Mean ± standard deviation.

시판되는 명태식해에서 분리한 젖산균에 대해 바이오제닉 아민 생성능을 측정한 결과 히스타민 함량의 경우 M-1 균주에서 18.22 mg/kg 검출되었고, 나머지 후보균으로부터의 히스타민 함량은 각각 29.17, 24.71, 21.88, 31.08, 25.02, 27.28 mg/kg 검출되는 것을 확인하였으며 기타 아민의 경우 그 함량이 10.00 mg/kg 이하인 것으로 확인되었다 (data not shown).

위의 실험을 통해 선별한 7주의 우수 스타터 후보균의 명태식해에 대한 적용이 적합하다고 사료된다.

(라) 명태식해 분리주의 기능성 탐색

1) GABA (γ -aminobutyric acid) 생성균주 분리 및 선발

명태식해에서 선별된 분리균주 시료액 1 ml를 취하여 식해 시료액으로부터 7종의 균주를 1차적으로 분리하였다. TLC 상에서 분리주 중 3개의 배양물에서 GABA의 존재가 확인되었고, 정량적 분석결과 그중에서 가장 높은 함량을 지닌 M-1을 GABA 생산성 우수 균주로 최종 선별하였다.

<표 34. 명태식해 우수 후보 분리균주의 GABA 함량 정량분석 결과>

Strains	GABA (mM)
M-1	42.29 ± 3.29
M-31	N.D
M-35	18.32 ± 7.29
M-47	11.56 ± 6.27
M-48	N.D
M-49	N.D
M-50	N.D

(마) 생산 균주의 동정

분리주 M-1의 동정실험에서 API kit를 이용한 결과는 Lactobacillus brevis가 99.6%의 상동성을 갖는 것으로 나타났으며, 16S rRNA sequence analysis의 결과 Lactobacillus brevis가 99%의 상동성을 보여 두 가지 방법의 유사성을 보였다.

다. 선별한 명태식해 후보균의 적용 (*in situ*)

(1) 명태식해 제조

명태식해 우수 후보균 (M-1)을 적용하여 Industry scale로 제조하였다. 명태는 러시아에서 어획된 명태를 동결된 상태로 해동 후 사용하였다. 부재료는 고춧가루, 마늘, 생강, 설탕, 좁쌀, 무, 소금을 사용하였고 제조방법은 다음과 같다. 명태는 머리, 지느러미와 내장을 제거하고 4-5 등분으로 세절하여 명태포 무게의 20% 비율의 소금으로 염장 (20℃, 24 시간)후 수돗물로 3회 세척하고, 20℃에서 탈수한 후, 각 재료를 표 42. 의 비율로 혼합하였다. 최종 스타터 후보균으로 사용할 젓산균의 경우 동결건조를 통해 파우더 형태로 조제하여 재료 혼합단계에서 전체 무게의 1%를 첨가하였다. 제조가 완료된 명태식해는 우수 스타터 후보균 첨가균과 비첨가균으로 나누어 플라스틱 밀폐용기에 옮겨 담은 후 15℃ cool incubator에서 14일간 발효하였고, 이후에 숙성은 4℃에서 진행하였다.

<표 35. 명태식해 제조 비율>

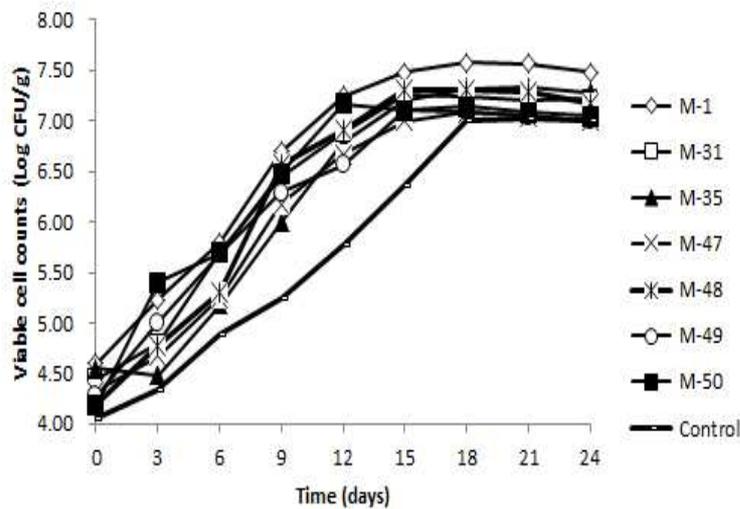
Materials	Weight ratio (%)
Sliced Alaska pollack	74
Red pepper powder	8
Ginger	1
MSG	1
Sugar	3
Glutinous Millet	3
Garlic	2
Salted Radish(1% salt)	7
Starter Culture	1

(2) 실험결과

(가) 미생물학적 분석 결과

1) 우수 starter 후보균을 적용한 명태식해의 총균수 변화

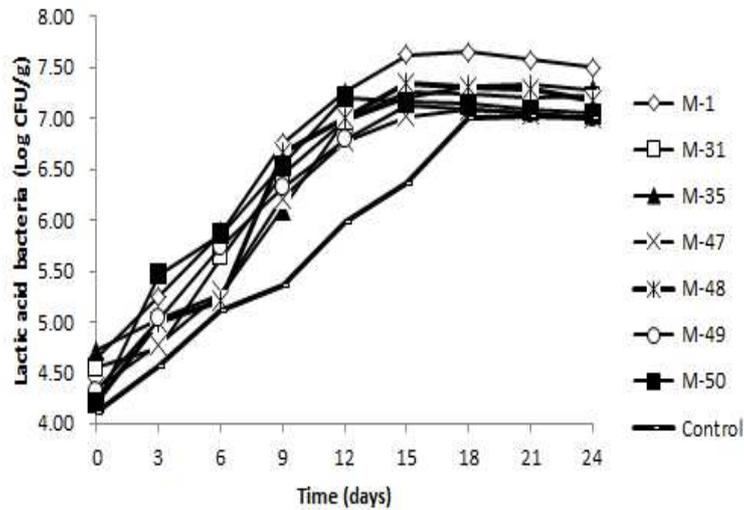
M-1 균주를 적용한 실험군의 경우, 발효기간 동안 총 균수는 발효 개시일로부터 15일까지 4.50 log CFU/g으로부터 7.45 log CFU/g으로 증가하였고, 이후 숙성 24일까지 일정한 수준을 유지하였다. M-1 균주 외에 M-31, M-35, M-47, M-48, M-49, M-50 균주를 적용한 실험군의 경우, 발효 개시일로부터 12일까지 평균 4.00 log CFU/g에서 6.68 log CFU/g으로 균수가 증가하는 비슷한 경향을 보였다.



<그림 27. 우수 스타터 후보균을 적용한 명태식해의 발효기간 동안 총균수 변화>

2) 우수 starter 후보균을 적용한 명태식해의 젖산균수 변화

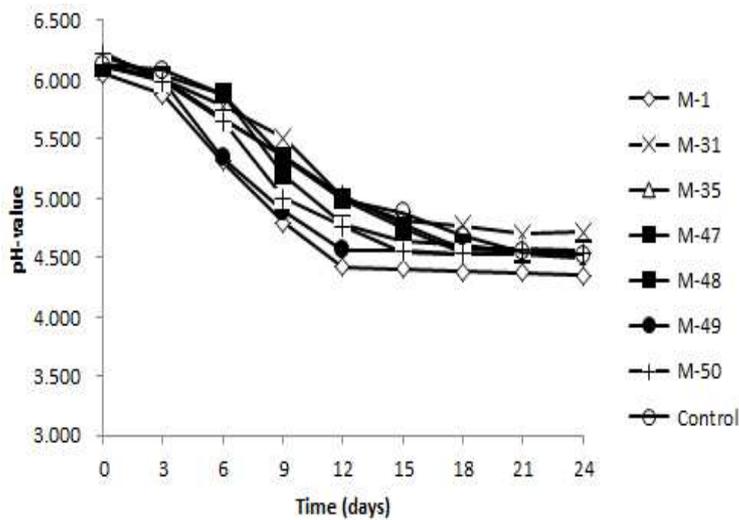
M-1 균주를 적용한 실험군의 경우, 발효기간 동안 총 균수는 발효 개시일로부터 15일까지 4.20 log CFU/g으로부터 7.53 log CFU/g으로 증가하였고, 이후 숙성 24일까지 일정한 수준을 유지하였다. M-1 균주 외에 M-31, M-35, M-47, M-48, M-49, M-50 균주를 적용한 실험군의 경우, 발효 개시일로부터 12일까지 평균 4.00 log CFU/g에서 7.20 log CFU/g으로 균수가 증가하는 비슷한 경향을 보였다. 총균수와 젖산균수를 비교하여 볼 때 서로 유의적인 차이를 보이지 않는 것으로 보아 명태식해 내의 미생물은 스타터로 쓰인 후보균들이 대부분 차지하는 것으로 사료된다.



<그림 28. 우수 스타터 후보균을 적용한 명태식해의 발효기간 동안 젖산균수 변화>

(나) 이화학적 분석 결과

1) pH 변화



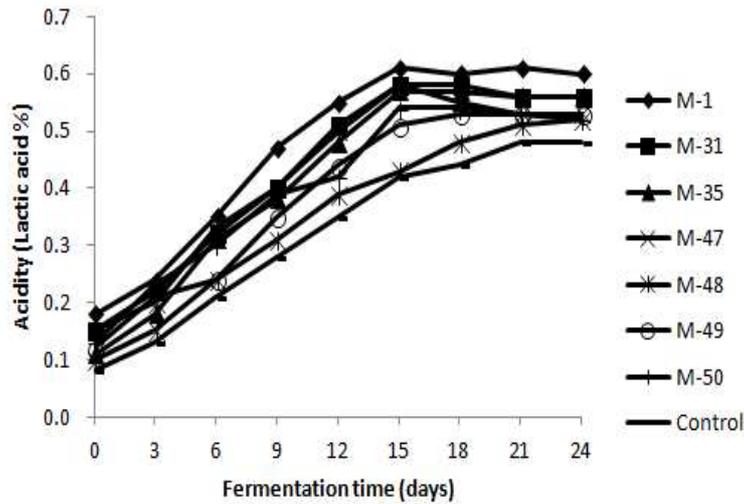
<그림 29. 우수 스타터 후보균을 적용한 명태식해의 발효기간 동안 pH 변화>

2) 산도 변화

M-1 균주를 적용한 명태식해의 pH값은 발효 개시일부터 12일까지 pH 6.12에서 pH 4.44로 감소하는 것을 확인하였고 이후 숙성 24일까지 pH 값이 약 4.50으로 유지되는 것을 확인하였다. 산도의 경우 발효 개시일부터 발효 15일후에 0.13%에서 0.62%까지 증가하는 것을 확인하였고, 이후 숙성 24일까지 약 0.60%의 산도를 유지하는 것을 확인하였다.

우수 스타터 후보균을 적용한 명태식해와 비교하여 자연발효시킨 명태식해의 경우 산도는 발효 24일에 약 0.48%, pH 값의 경우 약 pH 4.50 수준으로 나타나 우수 스타터 후보균을 적용한 명태식해에 비해서는 모두 산 생성력이 낮은 것으로 나타났다.

염도의 경우 각각의 균주를 적용한 가자미식해는 발효 및 숙성기간 동안 큰 변화가 없이 약 4.20%를 나타내었고, 수분활성도 또한 약 0.925의 수분활성도 값을 유지하는 것으로 나타났다 (data not shown).



<그림 30. 우수 스타터 후보균을 적용한 명태식해의 발효기간 동안 산도 변화>

(다) 우수 starter 후보균을 적용한 명태식해의 위생 안전성

1) 우수 후보균주를 적용하여 제조한 명태식해의 병원성 미생물

우수 후보균주들을 적용하여 제조한 명태식해의 발효기간 동안 병원성 미생물들은 모두 검출되지 않았다.

<표 36. 제조한 명태식해의 발효기간 동안 병원성 미생물 검출 결과>

Test microorganisms	Fermentation days									
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	
CO ¹⁾	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EO	ND*	ND								
SS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
VP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*ND : not detected, (-) : negative

1) CO: *Coliform*; EO: *Escherichia coli* O157:H7; SS: *Salmonella* spp.; SA: *Staphylococcus aureus*; LM: *Listeria monocytogenes*; VP: *Vibrio parahaemolyticus*.

(라) 우수 starter 후보균을 적용한 명태식해의 관능검사

1) 제조한 명태식해의 관능검사 결과

종합적인 만족도에서 M-1 균주를 적용한 명태식해가 다른 실험군 및 대조군에 비해 높게 나타났다. 또한 명태식해의 풍미 중 중요한 신미는 자연발효시킨 명태식해의 경우 평가치 3.8을 나타내었고 M-31, M-35, M-50 균주를 적용한 명태식해의 경우 각각 평가치 5.8, 5.9, 5.8을 나타냈다. 그러나, M-1 균주를 적용한 시료에서는 평가치 6.3을 나타내었고, 익음 정도에서도 다른 실험군 및 대조군에 비해 M-1 균주를 적용한 시료가 좋은 점수를 나타내었을 뿐만 아니라 전반적인 기호도에서도 높게 나타났다. 또한 비린내에 대한 감지 정도가 자연발효시킨 명태식해에 비해 낮다는 평가가 지배적이었다.

결론적으로 관능평가 결과 M-1 균주를 적용하여 명태식해를 제조할 경우 소비자의 기호도 만족과 균일한 품질을 갖는 명태식해를 제조할 수 있을 것으로 사료된다.

<표 37. 우수 스타터 후보균을 적용한 명태식해의 관능검사 결과>

	Control	M-1	M-31	M-35	M-50
Flavor acceptance	5.02 ± 0.32	7.15 ± 0.45	6.11 ± 1.29	5.02 ± 1.50	6.71 ± 0.10
Flavor of acidity	3.34 ± 1.07	5.50 ± 1.28	5.21 ± 1.58	4.30 ± 1.91	5.02 ± 0.06
Flavor of moldy	4.02 ± 0.21	3.02 ± 0.24	4.21 ± 1.28	4.10 ± 0.36	4.00 ± 1.37
Taste acceptance	4.11 ± 0.08	6.38 ± 0.51	5.28 ± 1.00	5.17 ± 0.25	5.81 ± 0.26
Taste of acidity	3.81 ± 1.29	6.27 ± 1.10	5.79 ± 0.78	5.91 ± 0.11	5.83 ± 1.05
Taste of moldy	4.03 ± 1.25	2.48 ± 0.29	4.38 ± 0.91	3.20 ± 0.04	2.97 ± 0.16
Taste of green	4.33 ± 0.72	2.11 ± 1.20	3.20 ± 0.05	2.78 ± 0.01	2.91 ± 0.31
Color acceptance	5.39 ± 0.25	6.49 ± 0.27	5.05 ± 0.16	6.35 ± 0.37	6.02 ± 0.11
Overall acceptance	5.34 ± 0.82	7.26 ± 0.28	6.07 ± 0.26	6.23 ± 0.52	6.98 ± 0.14

6. 오징어식해 starter 후보균의 탐색 및 최적화

가. 시판 오징어식해의 원료와 부원료의 미생물학적, 이화학적 특성 검토

(1) 재료 및 방법

시판 오징어식해의 품질평가 및 주요 상재 미생물 분리 및 동정과 미생물학적, 이화학적 특성을 검토하기 위하여 (주)정이푸드빌 및 국내 재래시장에서 시료를 추가 수집하였다. 본 실험에 사용한 국내시료의 제품은 표 44. 와 같다.

<표 44. 국내 오징어식해 제품>

제품류	시료명
오징어식해	A
	B
	C
	D
	E

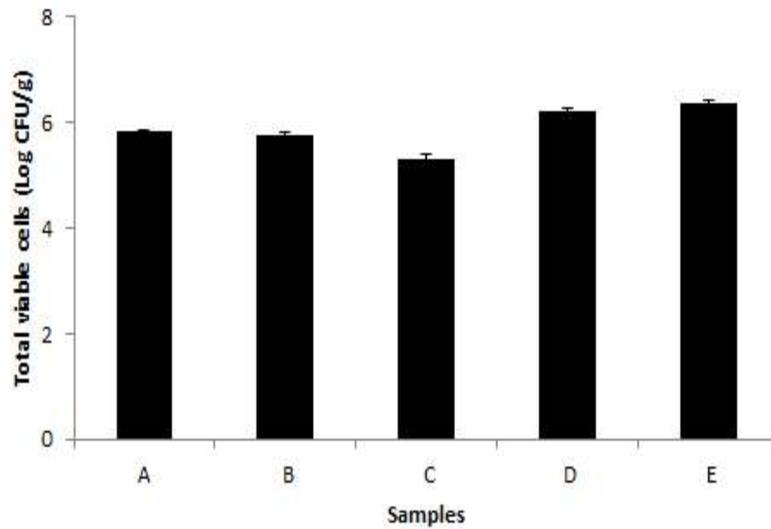
A: 정이푸드빌; B: 영덕밥식해; C: 재래시장; D: 실험실제조; E: 실험실제조

총균수 측정을 위한 배지로는 PCA(Plate count agar)를 젖산균 분리를 위한 배지로는 BCP (0.006% bromocresol purple)를 첨가한 MRS (Difco™) 배지를 사용하였다. 균수 측정 방법은 식품공전 미생물시험법에 따라 시료 25 g에 멸균 희석수 225 ml 첨가하여 희석한 다음 배지에 도달하여 $35 \pm 2^\circ\text{C}$, 혐기적 조건에서 24시간 배양한 후 생성된 집락을 관찰하였다. BCP 첨가 MRS배지에서 노란색 집락들을 2회 이상 분리하여 산 생성 여부를 확인하였다. 순수한 집락을 다시 MRS broth에 18 시간 배양한 후 배양액을 15% glycerol의 농도로 -70°C 에서 저장하면서 실험에 사용하였다. 병원성미생물도 식품공전 미생물시험법에 따라 증균배지, 선택배지 등에 24~48시간 배양한 후 생성된 집락을 관찰하였다.

(2) 실험결과

(가) 시판 오징어식해의 미생물학적 분석결과

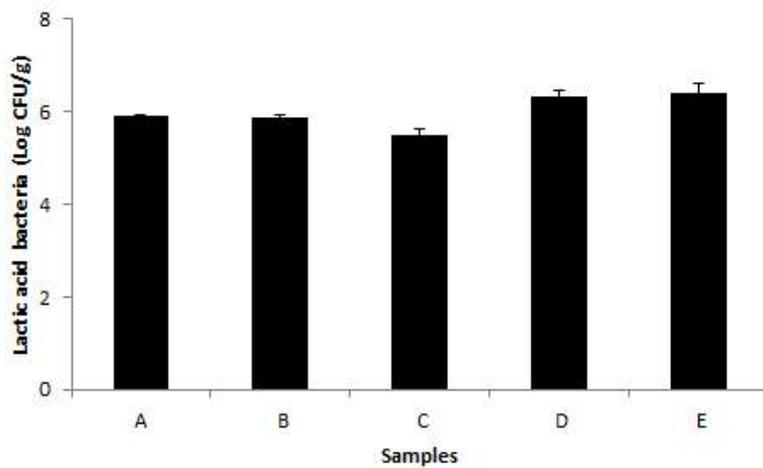
1) 시판 오징어식해의 총균수



<그림 36. 시판 오징어식해 총균수 비교>

수집한 시판 오징어식해의 총균수를 측정한 결과 5.30 ~ 6.35 log CFU/g 정도로 다양한 분포를 나타내었으며, 평균 5.89 log CFU/g을 나타내었다.

2) 시판 오징어식해의 젖산균수



<그림 37. 시판 오징어식해 젖산균수 비교>

수집한 시판 오징어식해의 젖산균수는 5.50 ~ 6.40 log CFU/g 정도로 다양한 분포를 나타내었으며, 평균 6.00 log CFU/g을 나타내었다. 각 시료마다 젖산균수가 총균수와 거의 유사한 것으로 보아 대부분 젖산균이 분포하고 있음을 알 수 있었다.

3) 시판 오징어식해의 병원성 미생물

시판되는 오징어식해로부터 병원성 미생물 (*Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*) 검출 시험을 실시하였으나 모든 시료에서 병원성 미생물이 검출되지 않는 것을 확인하였다.

<표 45. 시판 오징어식해의 병원성 미생물 검출>

Samples	Tested pathogenic microorganisms ¹⁾				
	EO	BC	SA	LM	VP
A	ND*	ND	ND	ND	ND
B	ND	ND	ND	ND	ND
C	ND	ND	ND	ND	ND
D	ND	ND	ND	ND	ND
E	ND	ND	ND	ND	ND

*ND : not detected

1) EO: *Escherichia coli* O157:H7; BC: *Bacillus cereus*; SA: *Staphylococcus aureus*; LM: *Listeria monocytogenes*; VP: *Vibrio parahaemolyticus*.

(나) 시판 오징어식해의 이화학적 분석 결과

1) 시판 오징어식해의 a_w , 염도, pH 분석 결과

<표 46. 시판 오징어식해의 이화학적 분석 결과>

Products	a_w	pH	acidity (%)	Salt content (%)
A	0.924 ± 0.00	4.75 ± 0.01	0.45 ± 0.01	3.88 ± 0.00
B	0.941 ± 0.01	4.68 ± 0.00	0.46 ± 0.03	4.02 ± 0.00
C	0.933 ± 0.00	4.80 ± 0.00	0.33 ± 0.02	4.35 ± 0.00
D	0.921 ± 0.01	4.49 ± 0.00	0.51 ± 0.01	3.53 ± 0.01
E	0.937 ± 0.00	4.47 ± 0.02	0.55 ± 0.00	3.41 ± 0.01

시판되는 오징어식해의 이화학적 특성을 분석한 결과 pH 값은 4.75 ± 0.01의 범위를 나타내었고, 산도의 경우 0.45 ± 0.01%를 나타내었다. 수분활성도의 경우 0.924 ± 0.00을 나타내었으며, 염도 범위는 3.88 ± 0.02%로 확인하였다.

(다) 시판 오징어식해의 유해물질 분석

1) 시판 오징어식해의 biogenic amine 함량 분석

<표 47. 시판되는 오징어식해의 바이오제닉 아민 함량>

<i>Sikhae</i>	Biogenic amines (mg/kg)						
	Trp ^a	Phe	Put	His	Tyr	Spd	Spm
A ^b	ND ^c	ND	ND	3.55 ± 0.21	ND	ND	ND
B	ND	1.27 ± 0.02	ND	10.25 ± 1.38	ND	ND	ND
C	ND	9.21 ± 0.23	ND	15.09 ± 0.04	ND	ND	ND
D	ND	ND	ND	0.24 ± 0.00	ND	ND	ND
E	ND	ND	ND	0.39 ± 0.01	ND	ND	ND

^a Trp: tryptamine, Phe: β -phenylethylamine, Put: putrescine, His: histamine, Tyr: tyramine, Spd: spermidine, Spm: spermine

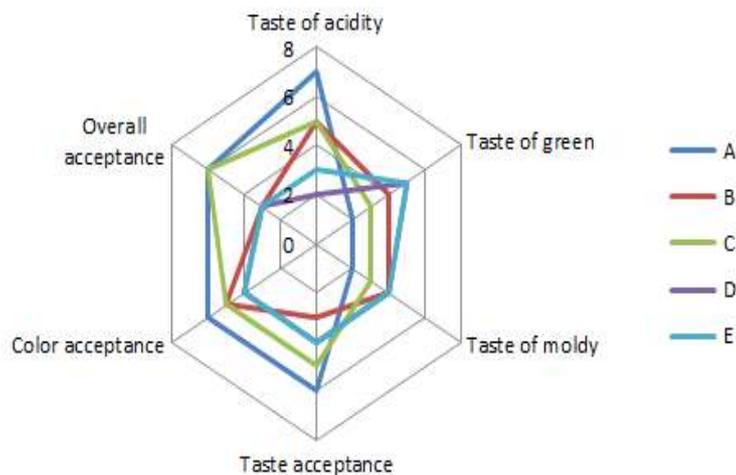
^bA~F: Commercial Squid-*Sikhae*

^cND: Not detected (amine level is less than 0.1 mg/kg)

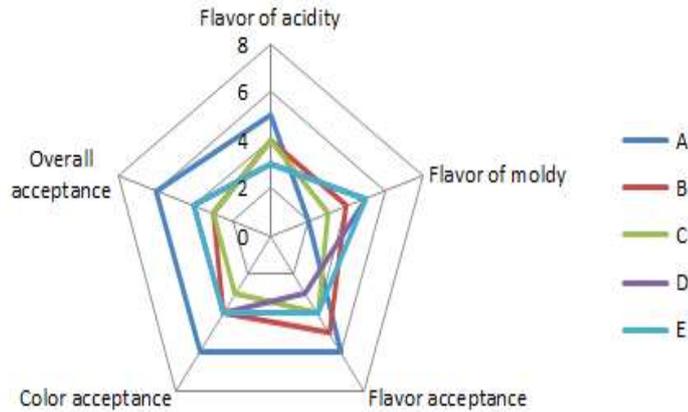
Mean ± standard deviation.

시판되는 오징어식해 시료를 수거하여 HPLC를 통해 바이오제닉 아민 함량을 분석한 결과는 표 47. 과 같다. 그 결과 히스타민의 평균 함량은 5.90 mg/kg을 나타내었고, β -페닐에틸라민은 일부 제품에서 미량으로 검출되었다. 그리고 다른 아민들은 검출되지 않았다.

(라) 시판 오징어식해의 관능검사 결과



<그림 38. 시판 오징어식해의 맛에 대한 관능평가 결과>



<그림 39. 시판 오징어식해의 향에 대한 관능평가 결과>

나. 오징어식해 starter 후보균의 탐색 및 최적화

(1) Starter 후보균 선별 및 생리, 화학적 특성

젖산균 분리를 위한 배지로는 BCP (0.006% bromocresol purple)를 첨가한 MRS (Difco™) 배지를 사용하였다. 균수 측정 방법은 식품공전 미생물시험법에 따라 시료 25 g에 멸균 희석수 225 ml 첨가하여 희석한 다음 배지에 도달하여 $35 \pm 2^\circ\text{C}$, 혐기적 조건에서 24시간 배양한 후 생성된 집락을 관찰하였다. BCP 첨가 MRS배지에서 노란색 집락들을 2회 이상 분리하여 산 생성 여부를 확인하였다. 순수한 집락을 다시 MRS broth에 18 시간 배양한 후 배양액을 15% glycerol의 농도로 -70°C 에서 저장하면서 실험에 사용하였다.

(가) 분리주의 형태학적, 생리적 특성

미생물 염색법을 수행하여 예비 starter 균주의 morphology를 현미경 (Axioskop, ZEISS, Germany)를 이용하여 관찰하였다. Starter 후보균의 생리적 특성을 검토하고 동정하기 위해 catalase test, 당 분해력, gas 생성력, pH, 생육속도, 다양한 온도에서의 생육 특성을 수행하였다.

1) Catalase test

Catalase test는 분리주를 broth에 24 시간 동안 배양한 후 배양액을 취해 slide glass에 1ml정도를 적하한 후 3% H₂O₂를 반응시켜 거품 형성 여부를 관찰하였으며 거품이 형성되면 양성, 형성되지 않으면 음성으로 간주하였다.

2) 당 분해능

당분해능은 기본 peptone 배지에 최종농도가 1%가 되도록 당 (glucose, lactose, maltose,

faffinose, sucrose)을 첨가하고 지시약으로 0.6% bromocresol purple을 사용하여 30°C에서 24시간 배양 후 배지의 색이 변하는 것으로 나타내었다. 보라색의 배지가 노랗게 변하면 양성, 변하지 않으면 음성으로 나타내었다.

3) Gas 생성력

Gas 생성력은 MRS broth에 durham tube를 넣고 분리주를 배양하여 24h 후 gas 생성 여부를 관찰하였다.

4) 생육속도

생육속도는 각각의 분리주를 37°C에 배양하여 24시간 후에 생성되는 균체량을 spectrophotometer (UV-1601, SHIMADZU)를 이용하여 측정하였다. 준비된 MRS broth에 분리주를 접종한 후 37°C 48시간 배양하여 활성을 준 후 3시간 간격으로 12시간동안 O.D값 및 pH를 측정하여 생육 특성을 관찰하였다.

(나) 분리주의 항균활성 실험

1) ADT 수행

분리주들의 항균활성을 확인하기 위해 agar diffusion test (ADT)를 수행하였다. 시험균주는 그람양성균으로 *Listeria monocytogenes* (KCTC 3710), *Staphylococcus aureus* (KCTC 1916)를 그람음성균으로는 *E. coli* O157:H7 (KCTC 1039), *Bacillus cereus* (KCTC 1012), *Vibrio parahaemolyticus* (KCTC 2471)을 이용하였다. 우선 paper disc (Whatman, ϕ 8 mm)에 시료 80 μ l를 적하하여 무균 상태에서 건조시킨 후 시험균주가 도말된 배지 위에 올려놓고 35 \pm 2°C에서 24시간 이내에 paper disc 주변에 clear zone이 형성되는 것으로 항균활성 여부를 판단하였다.

(2) 실험결과

(가) 오징어식해 분리주의 형태학적, 생리적 특성

1) 오징어식해 분리주의 생리, 화학적 및 생육 특성 결과

Catalase test에서는 분리주 100주 모두 음성이었으며, 그람염색 시험에서 그람 양성, micro-morphology는 간균으로 나타났다. 이 중에서 상대적으로 강한 특성을 보이는 균주 31주를 선정하였고, 이들의 당 분해능 및 gas 생성, 그리고 젖산 생성으로 인한 pH 변화를 검토하였으며 그 결과는 표. 48, 49 와 같다. 또한, 15°C, 37°C의 온도 범위에서 생육 가능한 것으로 확인 되었으며 그 결과는 표. 50 과 같다.

<표 48. 24시간 배양 후 오징어식해 분리주의 생리·화학적 특성>

Strains	·Acid formation from					Gas from glucose
	Glucose	Lactose	Maltose	Raffinose	Sucrose	
A-1	+	+	+	+	+	+
A-2	+	+	+	+	+	+
A-3	+	+	+	+	+	+
A-4	+	+	+	+	+	+
A-5	+	+	+	+	+	+
A-6	+	+	+	+	+	+
A-7	+	+	+	+	+	+
A-8	+	+	+	+	+	+
A-9	+	+	+	+	+	+
A-10	+	+	+	+	+	+
A-11	+	+	+	+	+	+
A-12	+	+	+	+	+	+
A-13	+	+	+	+	+	+
A-14	+	+	+	+	+	+
A-15	+	+	+	+	+	+
A-16	+	+	+	+	+	+
A-17	+	+	+	+	+	+
A-18	+	+	+	+	+	+
A-19	+	+	+	+	+	+
A-20	+	+	+	+	+	+
B-1	+	+	+	+	+	+
B-2	+	+	+	+	+	+
B-3	+	+	+	+	+	+
B-4	+	+	+	+	+	+
B-5	+	+	+	+	+	+
B-6	+	+	+	+	+	+
B-7	+	+	+	+	+	+
B-8	+	+	+	+	+	+
B-9	+	+	+	+	+	+
B-10	+	+	+	+	+	+
B-11	+	+	+	+	+	+

<표 49. 오징어식해 분리주의 시간별 성장능 및 pH 변화 결과>

Strains	0 hr.		3 hr.		6 hr.		9 hr.		12 hr.	
	O.D	pH	O.D	pH	O.D	pH	O.D	pH	O.D	pH
A-1	0.108	6.22	0.192	6.12	0.204	5.57	1.064	5.46	0.979	5.46
A-2	0.185	6.21	0.206	6.12	0.313	5.46	1.115	5.46	1.102	5.43
A-3	0.109	6.42	0.198	6.15	0.576	5.81	0.796	5.56	0.890	5.43
A-4	0.115	6.45	0.237	6.11	1.057	5.46	1.176	5.46	1.054	5.44
A-5	0.113	6.29	0.198	6.10	0.731	5.51	1.119	5.54	1.027	5.44
A-6	0.119	6.40	0.208	6.08	0.833	5.49	1.145	5.49	1.086	5.54
A-7	0.256	6.28	0.191	6.10	0.834	5.44	1.247	5.45	1.106	5.44
A-8	0.116	6.24	0.165	6.13	0.659	5.52	1.133	5.44	1.047	5.43
A-9	0.085	6.23	0.181	6.12	0.763	5.49	1.246	5.45	1.069	5.44
A-10	0.111	6.22	0.151	6.15	0.397	5.93	0.979	5.44	1.074	5.42
A-11	0.111	6.23	0.198	6.13	0.824	5.45	1.192	5.45	1.098	5.44
A-12	0.107	6.23	0.192	6.09	0.783	5.44	1.139	5.44	1.034	5.45
A-13	0.101	6.23	0.152	6.15	0.643	5.42	1.154	5.43	1.125	5.45
A-14	0.111	6.24	0.296	5.98	0.642	5.51	1.104	5.44	1.108	5.44
A-15	0.245	6.07	0.283	5.99	0.523	5.52	1.151	5.42	1.085	5.44
A-16	0.242	6.24	0.145	6.21	0.574	5.67	1.239	5.43	1.151	5.43
A-17	0.257	6.05	0.162	6.17	0.676	5.54	1.313	5.34	1.230	5.44
A-18	0.115	6.25	0.161	6.17	0.630	5.64	1.221	5.45	1.185	5.42
A-19	0.248	6.07	0.159	6.20	0.334	6.00	1.813	5.82	1.202	5.45
A-20	0.100	6.26	0.168	6.22	0.481	5.78	0.172	5.72	1.390	5.08
B-1	0.103	6.25	0.161	6.18	0.223	5.58	1.112	5.45	1.936	4.73
B-2	0.108	6.25	0.141	6.20	0.474	5.64	1.235	5.45	1.138	5.45
B-3	0.112	6.21	0.141	6.19	0.510	5.70	1.225	5.44	1.129	5.46
B-4	0.113	6.22	0.150	6.19	0.761	5.49	1.431	5.26	1.237	5.24
B-5	0.112	6.23	0.153	6.18	0.510	5.94	0.831	5.63	1.017	5.42
B-6	0.122	6.23	0.172	6.18	0.423	5.68	1.212	5.42	1.097	5.45
B-7	0.107	6.19	0.147	6.14	0.537	5.88	0.716	5.74	0.846	5.49
B-8	0.117	6.21	0.181	6.13	0.513	5.68	1.204	5.43	1.196	5.44
B-9	0.109	6.20	0.118	6.15	0.457	5.92	0.686	5.78	0.927	5.47
B-10	0.114	6.20	0.168	6.14	0.502	5.66	1.276	5.44	1.394	5.02
B-11	0.114	6.21	0.163	6.13	0.396	5.66	1.289	5.46	1.254	5.46

<표 50. 오징어식해 분리주의 생육 속도 및 pH 생성능>

Strains	15°C		37°C	
	O.D	pH	O.D	pH
A-20	1.172	4.81	1.982	4.72
B-1	1.193	4.46	2.046	4.28
B-10	1.187	5.08	1.897	4.98

성장능 및 pH 변화 관찰 실험에서 B-1 균주는 다른 균주들에 비하여 O.D값의 증가율이 높았으며, pH 저하 속도가 빠름을 확인하였다. 이들 중 15°C, 37°C 온도 범위에서 다른 균주들에 비해 상대적으로 높은 OD값과 낮은 pH 값을 갖는 균주들을 선별한 후, NaCl (2%, 3%, 4%)을 첨가한 MRS broth에 접종하여 48시간 배양 후 OD값과 pH를 측정하여 균주들의 내염성을 확인 하였다. 그 결과는 표. 51 과 같다.

<표 51. 염도 (2%, 3%, 4%)에 따른 균주의 균수 및 pH 값>

Strains	15°C					
	2% NaCl		3% NaCl		4% NaCl	
	pH	LAB ¹⁾	pH	LAB	pH	LAB
A-20	4.65 ± 0.01 ²⁾	7.25 ± 0.02	4.70 ± 0.01	7.88 ± 0.02	5.22 ± 0.01	8.05 ± 0.09
B-1	4.58 ± 0.01	7.73 ± 0.03	4.60 ± 0.03	7.51 ± 0.04	4.92 ± 0.05	7.43 ± 0.02
B-10	4.91 ± 0.03	7.90 ± 0.02	4.75 ± 0.01	7.85 ± 0.02	4.83 ± 0.03	7.55 ± 0.04

¹⁾LAB : Lactic acid bacteria; unit : log CFU/ml

²⁾Mean ± standard deviation.

(나) 오징어식해 분리주의 항균활성

1) 오징어식해 분리주의 병원성 미생물에 대한 항균활성

선별 된 스타터 후보균 31주의 항균활성시험 수행 결과 *Bacillus cereus*와 *Staphylococcus aureus*에서 활성을 나타내는 균주들을 확인할 수 있었다.

<표 52. 오징어식해 분리주의 항균활성>

(inhibition zone diameter (mm))

Strains	Test microorganisms ¹⁾				
	EO	BC	LM	SA	VP
A-1	-	-	-	-	-
A-2	-	-	-	-	-
A-3	-	-	-	-	-
A-4	-	-	-	-	-
A-5	-	-	-	-	-
A-6	-	-	-	-	-
A-7	-	-	-	-	-
A-8	-	-	-	-	-
A-9	-	12.00 ± 0.04	-	-	-
A-10	-	-	-	-	-
A-11	-	-	-	-	-
A-12	-	13.00 ± 0.02	-	-	-
A-13	-	-	-	-	-
A-14	-	-	-	-	-
A-15	-	11.00 ± 0.03	-	-	-
A-16	-	14.00 ± 0.00	-	-	-
A-17	-	-	-	-	-
A-18	-	12.00 ± 0.02	-	-	-
A-19	-	-	-	-	-
A-20	-	14.00 ± 0.03	-	-	-
B-1	-	22.00 ± 0.02	-	12.00 ± 0.01	-
B-2	-	-	-	-	-
B-3	-	10.00 ± 0.01	-	-	-
B-4	-	11.00 ± 0.02	-	-	-
B-5	-	-	-	-	-
B-6	-	-	-	-	-
B-7	-	-	-	-	-
B-8	-	-	-	-	-
B-9	-	-	-	-	-
B-10	-	-	-	-	-
B-11	-	-	-	-	-

- : no-inhibition

1) EO: *Escherichia coli* O157:H7; BC: *Bacillus cereus*, LM: *Listeria monocytogenes*, SA: *Staphylococcus aureus*, VP: *Vibrio parahaemolyticus*.



B-1 균주의 *Bacillus cereus*에 대한 항균활성

<그림 40. 오징어식해 분리주 B-1의 항균활성>

(다) 오징어식해 분리주의 안전성

1) 오징어식해 분리주의 안전성 시험 (Biogenic amine)

<표 53. 명태식해 분리주의 히스타민 생성량>

Starter candidates	Biogenic amines (mg/kg)
	Histamine
A-20	25.35 ± 0.11 ^{a)}
B-1	19.08 ± 0.33
B-10	27.02 ± 1.48

^{a)}Mean ± standard deviation.

명태식해 우수 후보균주의 히스타민 생성량은 19.08~27.02 mg/kg으로 대체적으로 비슷한 양이 검출되었으나 B-1 균주의 경우 그 중에서 가장 낮은 값인 19.08 mg/kg을 나타냈다.

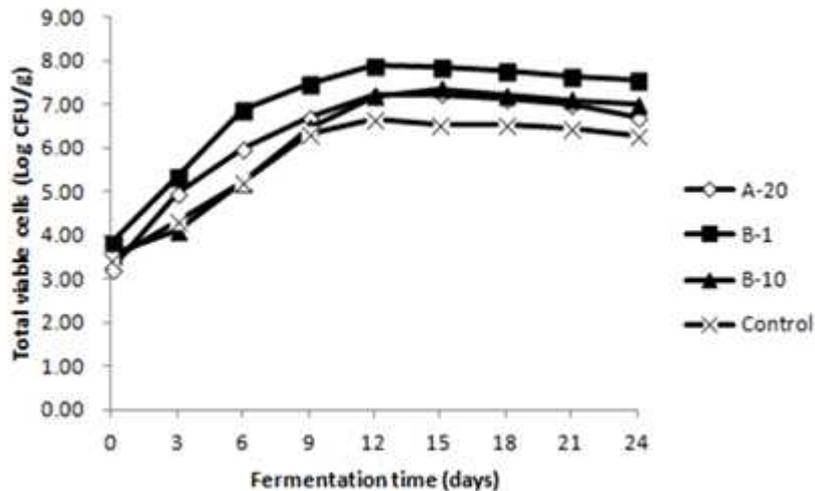
다. 선별한 오징어식해 후보균의 적용 (*in situ*)

(1) 오징어식해 제조

(2) 실험결과

(가) 미생물학적 분석 결과

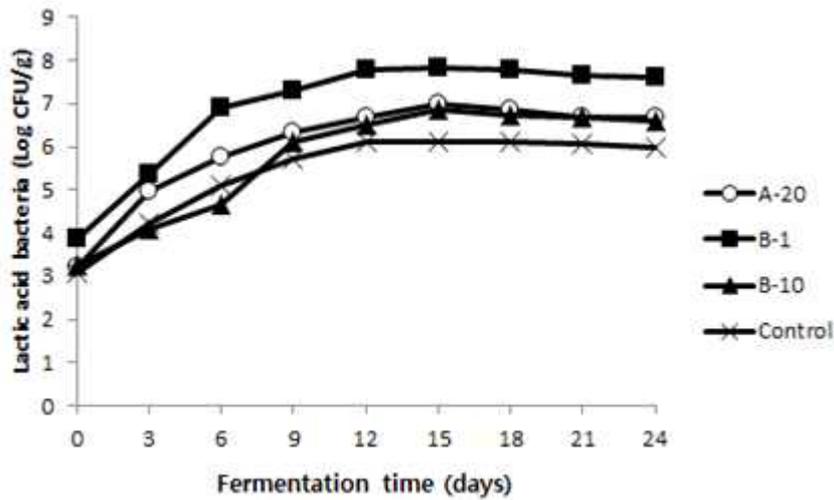
1) 우수 starter 후보균을 적용한 오징어식해의 총균수 변화



<그림 41. 우수 스타터 후보균을 적용한 오징어식해의 발효기간 동안 총균수 변화>

B-1 균주를 적용한 실험군의 경우, 발효기간 동안 총균수는 발효 개시일로부터 12일까지 약 4.00 log CFU/g으로부터 7.78 log CFU/g으로 증가하였고, 이후 숙성 24일까지 비슷한 균수를 유지하였다. 대조군인 스타터 무첨가 실험군의 경우, 발효기간 동안 총 균수는 발효 개시일로부터 12일까지 약 3.20 log CFU/g으로부터 6.35 log CFU/g으로 증가하였고, 그 이후로 숙성 24일까지 비슷한 균수를 유지하였다. A-20, B-10 균주의 경우 발효기간 동안 총균수는 발효 개시일로부터 12일까지 약 3.32 log CFU/g으로부터 6.99 log CFU/g으로 증가하였고, 그 이후로 숙성 24일까지 서로 비슷한 균수를 유지하였다. B-1 균주를 적용한 실험군과 대조군을 비교하여 보았을 때, B-1 균주 적용군이 대조군보다 빠른 균수 증가를 보였다.

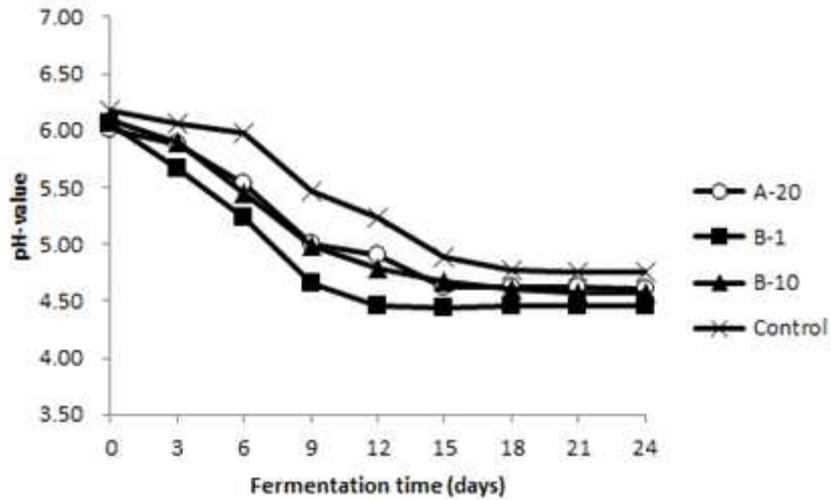
2) 우수 starter 후보균을 적용한 오징어식해의 젖산균수 변화



<그림 42. 우수 스타터 후보균을 적용한 오징어식해의 발효기간 동안 젖산균수 변화>

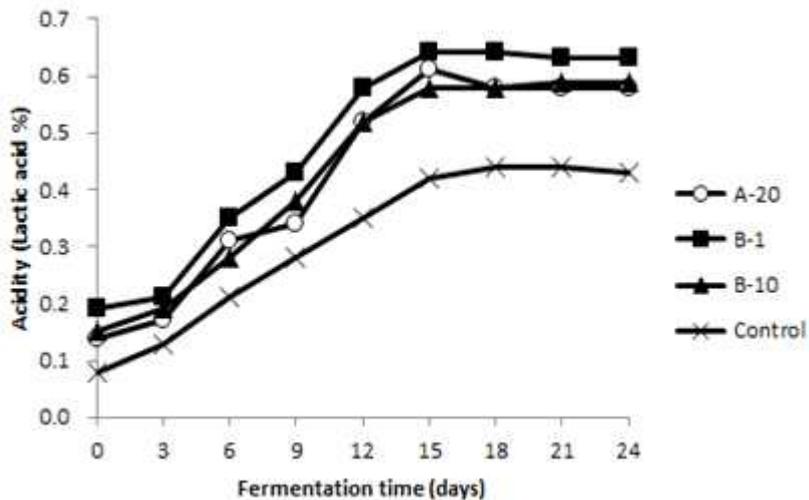
B-1 균주를 적용한 실험군의 경우, 발효기간 동안 총균수는 발효 개시일로부터 12일까지 약 4.00 log CFU/g으로부터 7.98 log CFU/g으로 증가하였고, 이후 숙성 24일까지 비슷한 균수를 유지하였다. 대조군인 스타터 무첨가 실험군의 경우, 발효기간 동안 총 균수는 발효 개시일로부터 12일까지 약 3.11 log CFU/g으로부터 6.50 log CFU/g으로 증가하였고, 그 이후로 숙성 24일까지 비슷한 균수를 유지하였다. A-20, B-10 균주의 경우 발효기간 동안 총균수는 발효 개시일로부터 12일까지 약 3.20 log CFU/g으로부터 7.00 log CFU/g으로 증가하였고, 그 이후로 숙성 24일까지 서로 비슷한 균수를 유지하였다. B-1 균주를 적용한 실험군과 대조군을 비교하여 보았을 때, B-1 균주 적용군이 대조군보다 빠른 균수 증가를 보였다. 각 실험군에서의 총 균수와 젖산균수의 변화가 동일한 양상을 나타내는 것으로 보아 오징어식해의 총 균은 대부분 젖산균에 의해 지배되는 것으로 사료된다.

(나) 이화학적 분석 결과
1) pH 변화



<그림 43. 우수 스타터 후보균을 적용한 오징어식해의 발효기간 동안 pH 변화>

2) 산도 변화



<그림 44. 우수 스타터 후보균을 적용한 오징어식해의 발효기간 동안 산도 변화>

B-1 균주를 적용한 오징어식해의 pH값은 발효 개시일부터 10일까지 pH 6.2에서 pH 4.7로 감소하는 것을 확인하였고 이후 숙성 12일까지 pH 값이 약 4.6으로 유지되는 것을 확인하였다. 산도의 경우 발효 개시일부터 발효 10일후에 0.20%에서 0.64%까지 증가하는 것을 확인하였고, 이후 보관 24일까지 약 0.7%의 산도를 유지하는 것을 확인하였다. A-20, B-10 균주를 적용한

실험군의 경우 pH 값은 발효 12일에 각각 pH 4.8, pH 4.9 를 나타내었고 이후 보관 24일까지 각각 pH 4.7, pH 4.6을 나타내었으며, 산도는 각 실험군에서 숙성 12일에 0.50, 0.52%를 나타내었다.

우수 스타터 후보균을 적용한 오징어식해와 비교하여 자연발효시킨 오징어식해의 경우 산도는 발효 12일에 약 0.35%, pH는 5.2로서 실험군과 비교하여 낮은 값을 나타내었다.

(다) 우수 starter 후보균을 적용한 오징어식해의 위생 안전성

1) 제조한 오징어식해의 병원성 미생물

오징어식해는 제조 시 사용되는 오징어 원물의 경우 멸균 처리 과정이 없기 때문에 어패류에 존재할 수 있는 병원성미생물 (*Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*)이 검출 될 가능성이 있다. 이를 확인하기 위해 오징어식해의 원료 및 부재료와 발효 및 숙성기간 동안 오징어식해에서의 병원성미생물을 확인한 결과 각 스타터 후보균을 적용한 실험군과 자연발효시킨 대조군에서 모두 검출되지 않는 것을 확인하였다. 그 결과는 표 54, 55 와 같다.

<표 54. 오징어식해 원료 및 부원료의 병원성 미생물 검출 결과>

Materials	EO	SS	SA	LM	VP
Squid (Squid, raw)	ND*	ND	ND	ND	ND
Galric	ND	ND	ND	ND	ND
Ginger	ND	ND	ND	ND	ND
Radish	ND	ND	ND	ND	ND

*ND : not detected, (-) : negative

1) EO: *Escherichia coli* O157:H7; SS: *Salmonella* spp.; SA: *Staphylococcus aureus*; LM: *Listeria monocytogenes*; VP: *Vibrio parahaemolyticus*.

<표 55. 우수 starter를 적용한 오징어식해의 발효기간 중 병원성 미생물 검출 결과>

Test microorganisms	Fermentation day									
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	
EO	ND*	ND								
SS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
VP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*ND : not detected, (-) : negative

1) EO: *Escherichia coli* O157:H7; SS: *Salmonella* spp.; SA: *Staphylococcus aureus*, LM: *Listeria monocytogenes*, VP: *Vibrio parahaemolyticus*.

2) 제조한 오징어식해의 biogenic amine 함량

<표 56. 우수 starter를 적용한 오징어식해의 발효기간 중 아민 함량 변화 관찰 결과>

Day	Biogenic amines (mg/kg)						
	Trp ^a	Phe	Put	His	Tyr	Spd	Spm
0	ND ^b	20.12 ± 0.20 ^c	ND	15.89 ± 0.01	ND	ND	ND
3	ND	16.31 ± 0.17	ND	17.22 ± 0.28	ND	ND	ND
6	ND	16.82 ± 0.30	ND	18.19 ± 0.23	ND	ND	ND
9	ND	18.28 ± 0.40	ND	20.31 ± 0.49	ND	ND	ND
12	ND	18.10 ± 0.17	ND	22.63 ± 0.06	ND	ND	ND
15	ND	21.39 ± 0.80	ND	26.04 ± 0.21	ND	ND	ND
18	ND	24.37 ± 0.01	ND	33.20 ± 0.08	ND	ND	ND
21	ND	23.19 ± 0.23	ND	32.82 ± 0.41	ND	ND	ND
24	ND	25.55 ± 0.61	ND	34.23 ± 0.32	ND	ND	ND

^a Trp: tryptamine, Phe: β -phenylethylamine, Put: putrescine, His: histamine, Tyr: tyramine, Spd: spermidine, Spm: spermine

^bND: Not detected (amine level is less than 0.1 mg/kg)

^cMean ± standard deviation.

우수 starter를 적용하여 제조한 오징어식해를 HPLC를 통해 바이오제닉 아민 함량을 분석한 결과는 표. 56 과 같다. 그 결과 β -phenylethylamine의 평균 함량은 20.46 mg/kg, histamine의 평균 함량은 24.50 mg/kg을 나타내었고, 다른 아민들은 검출되지 않은 것을 확인하였다.

(라) 우수 starter 후보균을 적용한 오징어식해의 관능검사

1) 제조한 오징어식해의 관능검사 결과

<표 57. 우수 스타터 후보균을 적용한 오징어식해의 관능검사 결과>

	Control	A-20	B-1	B-10
Flavor acceptance	4.11 ± 0.05	6.87 ± 0.15	7.05 ± 0.03	6.18 ± 0.14
Flavor of acidity	4.16 ± 0.05	5.24 ± 0.32	5.60 ± 0.39	4.28 ± 0.82
Flavor of moldy	4.35 ± 0.03	4.45 ± 0.20	3.30 ± 0.12	4.00 ± 0.27
Taste acceptance	4.20 ± 0.12	5.41 ± 0.67	6.16 ± 0.08	5.80 ± 0.21
Taste of acidity	4.22 ± 0.59	5.32 ± 0.12	5.86 ± 0.02	4.85 ± 0.37
Taste of moldy	3.55 ± 0.13	3.52 ± 0.24	2.28 ± 0.37	3.42 ± 0.25
Taste of green	4.30 ± 0.12	3.28 ± 0.91	2.20 ± 0.05	2.59 ± 0.18
Color acceptance	5.40 ± 0.29	5.39 ± 0.15	6.31 ± 0.07	6.00 ± 0.02
Overall acceptance	5.27 ± 0.14	6.21 ± 0.10	6.89 ± 0.16	5.33 ± 0.58

종합적인 만족도에서 B-1 균주를 적용한 오징어식해가 다른 실험군 및 대조군에 비해 높게 나타났다. 또한 오징어식해의 풍미 중 중요한 신미는 자연발효시킨 오징어식해의 경우 평가치 4.2를 나타내었고 A-21, B-10 균주를 적용한 오징어식해의 경우 각각 평가치 5.3, 4.9를 나타냈다. 그러나, B-1 균주를 적용한 시료에서는 평가치 5.9를 나타내었고, 익음 정도에서도 다른 실험군 및 대조군에 비해 B-1 균주를 적용한 시료가 좋은 점수를 나타내었을 뿐만 아니라 전반적인 기호도에서도 높게 나타났다. 또한 비린내에 대한 감지 정도가 자연발효시킨 오징어식해에 비해 낮다는 평가가 지배적이었다.

결론적으로 관능평가 결과 B-1 균주를 적용하여 오징어식해를 제조할 경우 소비자의 기호도 만족과 균일한 품질을 갖는 오징어식해를 제조할 수 있을 것으로 사료된다.

(마) 오징어식해 분리주의 기능성 관찰

오징어식해에서 선별된 분리균주 시료액 1 ml를 취하여 식해 시료액으로부터 3종의 균주를 1차적으로 분리하였다. TLC 상에서 분리주 중 3개의 배양물에서 GABA의 존재는 확인되지 않았다. 따라서 항균활성 및 산 생성력이 우수한 B-1 균주를 최종 starter로 선정하였다.

〈표 58. 오징어식해 우수 후보 분리균주의 GABA 함량 정량분석 결과〉

Strains	GABA (mM)
A-20	N.D
B-1	N.D
B-20	N.D

7. 가자미·명태·오징어식해에 적용할 천연항균, 항산화소재 탐색

가. 재료 및 방법

(1) 재료

본 연구의 식해에 제조에 사용한 가자미(*Verasper moseri* Jordan et Gilberu)와 오징어는 강릉 수산시장에서 세절된 물가자미를 구하여 사용하였다. 천일염(Salt, Haepyo, Gangneung), 고춧가루(Red paper, Nonghyup, Gangneung), 마늘(Garlic, Nonghyup, Gangneung), MSG (Monosodium glutamate, Daesang, Seoul), 생강(Nonghyup, Gangneung), 무(Nonghyup, Gangneung), 좁쌀(Nonghyup, Gangneung)은 강릉시 소재 농협 하나로마트에서 각각 구입하여 사용하였다.

추출에 사용된 천연식자재 꿀(Choroc, Gangneung), 프로폴리스(Choroc, Gangneung)는 강릉시 소재 초록마을, 후코이단(Fucoidan, MSC, Yangsan), 아로니아베리(Aronia berry, Nonghyup, Gangneung)와 고추냉이(Wasabi, Nonghyup, Gangneung)는 강릉시 소재 농협 하나로마트에서 구입하였다. 추출에 사용된 용매로 에탄올 99.5%(Ethanol, Daejung, Siheung)를 구매하여 사용하였다.

(2) 가자미식해 제조

세절된 물가자미에 천일염을 원물대비 20%를 첨가하여 24 h 염장 후 깨끗이 2-3회 세척 후 1 h 탈수하여 가자미육의 염도는 4.60%로 맞춘 후 고춧가루 16.80%, 마늘 7.21%, 미원 2.96%, 생강 3.70%, 무 10.12%, 좁쌀 13.72% 첨가하여 용기에 저장하고 나서 숙성온도 15 °C, 숙성기간 14일 발효 숙성하여 제조 하였다. 숙성이 완료된 가자미식해는 각각의 천연식자재 에탄올추출물을 10,000 mg/L 농도로 희석하여 가자미식해 무게 대비 0.5% 분주하여 제조하였다.

(3) 오징어식해 제조

내장과 비늘을 제거 후 가로×세로(1×4) 정도로 잘게 썰은 오징어육에 천일염을 원물대비 20%를 첨가하여 12 h 염장 후 깨끗이 2-3회 세척 후 1 h 탈수하여 오징어육의 염도는 5.00%로 맞춘 후 고춧가루 7%, 마늘 2%, 미원 2%, 생강 1%, 무 61%, 좁쌀 8% 첨가하여 용기에 저장하고나서 숙성온도 15 °C, 숙성기간 2.1일 발효 숙성하여 제조 하였다. 숙성이 완료된 오징어식해는 각각의 천연식자재 에탄올추출물을 10,000 mg/L 농도로 희석하여 가자미식해 무게 대비 0.5% 분주하여 제조하였다.

(4) 천연식자재 추출액을 제조

꿀, 프로폴리스, 아로니아베리, 푸코이단 등 을 70% 에탄올에 1:5 (sample:에탄올) 비율로 교반

후 sonication (JAC4020, Kodo, Hwaseong, Korea)을 이용하여 50°C 에서 1 h 초음파추출을 하였다. 추출한 1:5 (sample:에탄올) 용액을 감압여과하여 여과한 여액을 회전식농축증발기 (R200A, Buchi, Flawil, Switzerland)로 50°C 에서 감압농축하여 에탄올이 완전 증발 할 때까지 농축시킨다.

(5) Paper disc법을 이용한 항균성 Test

세균에 대한 항균력 측정은 Paper disc methods를 이용하였다. 각 균주 1 백금을 취하여 10 mL의 Lactose broth에 접종하고 30-37°C 에서 48 h 배양하여 활성화시켰다. 이 활성화된 균주 100 µL를 Lactose agar 배지에 도말하였다. 균이 흡수되면 paper disc (8.0mm, Advantec, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)를 배지위에 올리고 농도별로 조제한 시료를 각각 흡수시켜서 24 h 동안 배양하였다. 그 후 disc 주위의 inhibition zone의 직경(mm)을 측정하였다.

Table 1. Indicator strains and growth condition

	Indicator strains	Media	Temp(°C)
Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 144458	LB	37
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	LB	30
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	LB	30
Gram (-)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	LB	37
	<i>Salmonella typhimurium</i> KCTC 1925	NA	37

(6) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Tawada 등(11)에 방법을 일부 변형하여 비색 정량하였다. 각각의 추출물을 10 ppm의 농도로 만든 후, 시료 0.4 mL에 증류수 3 mL, Folin-Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) 0.2 mL을 넣은 후 saturated sodium carbonate 0.4 mL를 첨가하여 혼합한 후, 실온에서 1 h 정치한 뒤 분광광도계 (JP/V-550, Jasco, Tokyo, Japan)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 이용한 표준곡선은 Gallic acid (Sigma-Aldrich) 증류수에 녹여 최종농도가 0, 10, 20, 40, 60, 100, and 150 mg/L 용액이 되도록 조제하고 이를 일정량 취하여 위와 같은 방법으로 725 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다. 추출물의 총 폴리페놀 함량은 표준검량선으로부터 얻어진 총 폴리페놀함량을 계산하였다.

(7) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드는 Moreno 등 (12)의 방법에 따라 추출물 0.5 mL에 10% aluminum nitrate (Daejung, Siheung, Korea) 0.1 mL, 1 M potassium acetate (Daejung, Siheung) 0.1 mL 및 ethanol 4.3 mL를 차례로 가하여 혼합하고 실온에서 40 min 정치한 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin (Sigma-Aldrich)을 표준물질로 하여 0-100 µg/mL 농도 범위에서 얻어진 표준 검량선으로부터 추출물의 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

(8) DPPH radical 소거능 측정

전자공여능 (electron donating ability, EDA)은 Ozgen 등 (13) 방법에 따라 측정하였다. 각 시

료 용액 100 mL에 0.15 mM 에탄올로 희석한 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich) 용액 100 mL 넣고 교반한 후 30 min 방치한 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도값 O.D.으로 나타내었다. 대조군으로는 gallic acid를 사용하였다.

(9) 총균수 및 pH 측정

숙성 중 가자미식해의 미생물 총균수는 시료 10 g에 멸균식염수 90 mL를 혼합 분쇄하여 10진법으로 희석하였다. 각각의 희석액 1 mL를 각각의 3M Petrifilm Aerobic Count Plate (3M, St. Paul, MN, USA)에 접종한 다음 37°C에서 48 h 배양하여 형성된 colony를 계측하여 시료 g당 colony forming units (CFU/g)로 나타내었다. pH 측정은 시료 5 g을 취해서 증류수 45 mL를 가해 균질화시킨 후 pH meter (S-20K, Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland)로 측정하였다.

(10) 휘발성염기질소(VBN) 함량 측정

휘발성염기질소(VBN)의 함량은 마쇄한 가자미식해를 사용하여 Conway unit을 사용하는 Micro Diffusion Method (14)로 시료 2 g에 20% trichloroacetic acid용액 2 mL와 증류수 16 mL를 혼합한 뒤 Homogenizer로 마쇄 후 여과하여 conway에 주입 후 37°C에서 80 min 방치 후 0.01 M HCL로 적정하여 측정하였다.

(11) 아미노태질소 함량 측정

아미노태질소 함량은 Sorensen (KOKC, 1997) 적정법으로 측정하였다. 시료 10 g을 취하여 증류수 100 mL를 혼합하고 마쇄 후 Sonication에서 30min 균질화 후 pH meter (Mettler Toledo, SevenEasy pH, Switzerland)이용하여 0.1 N NaOH를 가하여 pH8.4를 맞춘 후 중성 formalin 20 mL를 가한 후 다시 0.1 N NaOH를 가하여 pH8.4에 맞춘 적정량을 이용하여 아미노태질소 함량을 산출하였다.

(12) Biogenic amines 함량 분석

BA 성분을 추출하기 위해 시료 5 g에 0.1N HCl을 25 mL 2회 반복 추출하여 상층액 1mL를 취하여 1% dansyl chloride 2 mL에 포화탄산나트륨 0.5mL, 내부표준용액 100 µg/mL 0.1mL를 첨가하여 진탕하여 45°C에서 50분간 유도체화하였다. 유도체화 후 0.1 N Ammonia waterd를 0.1 mL 첨가하여 dansyl chloride를 제거하여 0.45 µm로 여과한 것을 시험용액으로 사용하였다. 표준품으로 histamine, tyramine, cadaverine, putrescine을 구입하여 사용하였고, 이동상을 HPLC급 Acetonitrile을 구입하여 사용하였다.

(13) 통계분석

검사결과에 대한 통계적인 유의성 검정은 Statistical Packages for Social Science (SPSS Statistics 18, Chicago, IL, USA)를 이용하여 Duncan's multiple range test로 유의수준 5% 이내 ($p < 0.05$)로 각 평균값에 대한 유의적 차이를 조사하였다. 데이터는 각 실험치의 평균값과 표준편차로 나타내었다.

나. 결과 및 고찰

(1) 대장균 및 식중독균에 대한 Paper disc 항균성 확인

항균, 항산화성이 뛰어나다는 천연소재인 꿀, 프로폴리스, 아로니아베리, 흑마늘, 푸코이단, 알긴산, 키틴, 키토산, 키토올리고당, 와사비, 아카시아꿀 추출액에 대한 대장균 및 식중독 원인균에 대한 항균성을 paper disc 법을 이용하여 확인해 보았다. 추출용매로 ethanol, chloroform, water 을 이용하여 유효성분을 추출하여 각각 test한 결과를 Table.1 에 나타내었다. water에 추출한 성분에서는 모든 시료에 각각의 균에 대한 항균활성이 나타나지 않았다. 또한 ethanol 및 chloroform에서도 많은 항균활성이 나타나지 않았지만, 프로폴리스에서 ethanol 추출액에 *B. cereus*에 14mm, *S. aureus* 15mm, *L. monocytogenes* 12mm, chloroform 추출액에 *B. cereus*에 14mm, *S. aureus*에 13mm, 정도 생육저해가 나타났다. 흑마늘은 ethanol 추출액에서는 항균활성이 나타나지 않았지만, chloroform 추출액에서는 *B. cereus*, *S. aureus*에 각각 22mm, 15mm 정도의 항균활성이 나타났다. 또한 아로니아베리에서는 chloroform 추출액에서는 모든 균에서 생육을 저해하는 항균활성이 나타나지 않았고, ethanol 추출액에서 *Salmonella typhi*에 15mm 정도의 항균활성이 나타났다. 나머지 시료에서는 예상과 달리 모든 용매와 균에서 항균활성이 나타나지 않았다. 이러한 식중독 원인균에 대한 저해기작의 추가적인 연구를 통하여 key compound를 도출해내어 식품천연항균제로서 이용 가능 하리라 사료됨.

Table 1. 천연식자재 유기용매 추출물의 paper disc법을 이용한 항균성 test

(Unit: mm)

sample	Diameter(mm) of inhibitory clear zone				
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella typhi.</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>
Control (Ethanol)	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*
꿀 (chloroform)	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*
꿀 (Ethanol)	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*
Propolis (chloroform)	14	13	N.D*	N.D*	N.D*
Propolis (Ethanol)	14	15	N.D*	12	N.D*
흑마늘 (chloroform)	22	15	N.D*	N.D*	N.D*
흑마늘 (Ethanol)	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*
아로니아베리 (chloroform)	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*
아로니아베리 (Ethanol)	N.D*	N.D*	15	N.D*	N.D*
푸코이단 (chloroform)	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*
푸코이단 (Ethanol)	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*
키틴 (Ethanol)	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*
키토산 (Ethanol)	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*
알긴산 (Ethanol)	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*
키토올리고당 (Ethanol)	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*
와사비 (chloroform)	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*
와사비 (Ethanol)	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*
아카시아꿀 (Ethanol)	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*	N.D*

(2) 폴리페놀, 플라보노이드함량 및 DPPH radical 소거능 확인

상기의 항균성 및 항산화성이 뛰어나고 알려진 천연소재 중 항균성이 나타난 시료를 주료하여 꿀, 푸코이단, 흑마늘, 프로폴리스, 아로니아베리, 와사비에 대한 항산화성을 확인 하였다. 폴리페놀 및 플라보노이드는 phenolic hydroxyl을 2개 이상 갖고 있는 방향족 화합물로 우리 몸에 있는 활성산소를 중화시키고, 항암, 항산화, 항균활성과 같은 생리활성 기능을 가지는 물질로 보고되고 있다(15,16). 본 실험에는 ethanol추출물을 이용하여 각각의 폴리페놀함량, 플라보노이드함량, DPPH radical 소거능을 Table 2에 나타내었다. 상기와 항균성실험과 같이 control로는 모든 에탄올추출물 희석에 이용한 95% 에탄올을 사용하였으며, 꿀은 프로폴리스의 대조군으로 사용하였다. 각각의 꿀, 프로폴리스, 고추냉이, 아로니아베리, 후코이단 에탄올추출액을 1000 ppm으로 희석하여 517 nm에서 분광광도계 (JP/V-550, Jasco, Tokyo, Japan)로 측정 한 결과 꿀에서는 폴리페놀함량이 0.58 $\mu\text{g/mL}$ 가장 낮게 나타났고, 후코이단 또한 5.00 $\mu\text{g/mL}$ 이하로 낮게 나타났다. 고추냉이 에탄올추출물에서는 폴리페놀이 검출되지 않았다. 이에 반해 상기의 항균성실험에서 식중독균에 대한 생육억제가 나타났던, 아로니아베리는 61.20 $\mu\text{g/mL}$ 그리고 프로폴리스는 91.18 $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 높은 폴리페놀함량을 나타냈다. 식물에 널리 분포되어 있는 플라보노이드 역시 최근 많은 연구에서 밝혀지고 있다. 꿀에서는 플라보노이드 함량이 control보다 낮게 나타나 거의 존재하지 않는 것으로 나타났으며 고추냉이 또한 플라보노이드가 검출되지 않았다. 후코이단은 플라보노이드 함량이 151.28 $\mu\text{g/mL}$ 정도로 나타났고, 폴리페놀이 높았던, 아로니아베리와 프로폴리스도 각각 197.00 $\mu\text{g/mL}$, 457.09 $\mu\text{g/mL}$ 로 높은 플라보노이드 함량을 나타냈는데, 그 중에서도 프로폴리스가 월등히 높은 플라보노이드 함량을 나타냈다. 전자공여능은 항산화 측정에 대표적으로 쓰이는 방법이다. DPPH는 항산화활성을 측정하기 위한 기질로 사용되고, 페놀, 플라보노이드와 같은 페놀성 물질에 대한 항산화작용의 지표라고 알려져 있으며, 유리 라디칼에 전자를 공여하여 식품 중의 지방산화를 억제하고 인체 내 노화를 억제시키는 작용을 한다. 각 추출물의 DPPH radical 소거능은 Table 3과 같다. 각각의 추출물을 100 ppm으로 ethanol 99.5%를 이용하여 희석하여 사용하였다. 꿀에서는 control보다 DPPH radical 소거능이 더 낮게 나타났으며, 항산화효과가 거의 없는 것으로 확인되었다. 이에 반해 프로폴리스 ethanol 추출액의 DPPH radical 소거능은 0.65 O.D.로 높은 항산화 소거능을 나타내었다. 결과적으로 프로폴리스의 항산화활성이 가장 뛰어났는데, 이와 같이 프로폴리스가 다양한 생리활성을 가지는 주된 이유는 cinnamic acid와 caffeic acids ester를 비롯한 많은 플라보노이드에 의한 것으로 입증되었다고 하는 내용과 유사한 결과로 보여진다(17).

Table 2. The contents of total phenol, and DPPH free radical scavenging activity

sample	Diameter(mm) of inhibitory clear zone		
	Polyphenol(ug/mL)	Fravonoid(ug/mL)	DPPH radical
Control (Ethanol)	0.10±0.04 ^a	0.10±0.01 ^a	2.38±0.00 ^d
꿀 (Ethanol)	0.58±0.04 ^a	0.00±0.00 ^a	2.46±0.00 ^f
Propolis (Ethanol)	91.18±1.35 ^d	457.09±2.67 ^e	0.65±0.00 ^b
흑마늘 (Ethanol)	13.65±0.13 ^{ab}	162.28±1.81 ^c	0.38±0.00 ^a
아로니아베리 (Ethanol)	61.20±1.63 ^c	197.00±10.54 ^d	0.35±0.00 ^a
푸코이단 (Ethanol)	4.09±0.13 ^b	151.28±1.81 ^c	2.30±0.00 ^c
와사비 (Ethanol)	2.60±0.13 ^{ab}	60.69±2.17 ^b	2.39±0.00 ^e

(3) 가자미식해에 적용한 천연항균, 항산화소재를 이용한 저장성 확인

(가) 가자미식해의 저장중 pH 변화

에탄올, 꿀, 아로니아베리, 고추냉이, 프로폴리스, 후코이단 에탄올 추출물을 가자미식해에 각각 첨가하여 14일간 숙성 후 15 °C에서 15일 저장기간 동안 pH 변화는 Table 3과 같다. 일반적으로 수산발효식품은 pH 5 이하가 되면 악취와 더불어 풍미에 악영향을 미치고, 유기산을 생성하여 상품성이 없다고 보고되어 있다(18). 저장 3일차부터 각각 시료에 pH 값에 유의적인 차이가 나타났다. control인 에탄올을 첨가한 가자미식해의 pH 가 5.99로 가장 낮았으며, 다른 시료에서는 6.00-6.08로 pH 값의 유의적인 차이를 나타내었으나, 수치상 큰 차이는 나타나지 않았다. 저장 9일부터 저장 15일까지 폴리페놀, 플라보노이드함량이 높고, DPPH radical 소거능이 가장 좋았던 프로폴리스의 pH 변화가 6.04에서 5.39로 가장 적게 나타났고, 두 번째로 좋았던 아로니아베리가 6.06에서 5.32로 적은 pH 의 변화를 나타내었다. 후코이단 또한 저장 15일까지 6.00에서 5.30으로 아로니아베리와 유의적인 차이가 나타나지 않았고, control, 꿀, 고추냉이에서는 pH 변화가 다른 시료들에 비하여 크게 나타났다. 이것으로 볼 때, 항산화활성이 높은 시료들에서 낮은 pH 변화를 나타내는데, 항산화 작용이 부패균이나 유기산을 억제하여 나타나는 현상으로 사료된다.

Table 3. Changes of pH of the flounder sikhae during storage at 15°C for 15 days

Sample	Storage days				
	3	6	9	12	15
Control (70% ethanol)	5.99±0.00 ^a	6.09±0.00 ^d	5.34±0.01 ^a	5.16±0.02 ^a	4.53±0.01 ^a
Honey	6.05±0.00 ^d	5.82±0.01 ^a	5.75±0.00 ^b	5.58±0.01 ^b	4.98±0.01 ^b
Aronia berry	6.06±0.01 ^d	6.07±0.01 ^{cd}	5.97±0.00 ^d	5.77±0.04 ^c	5.32±0.00 ^d
Wasabi	6.08±0.00 ^e	6.03±0.01 ^c	5.87±0.02 ^c	5.75±0.02 ^c	5.04±0.00 ^c
Propolis	6.04±0.00 ^c	6.06±0.00 ^{cd}	5.85±0.00 ^c	5.85±0.00 ^d	5.39±0.00 ^e
Fucoidan	6.00±0.00 ^b	5.96±0.02 ^b	6.03±0.01 ^d	5.82±0.01 ^d	5.30±0.00 ^d

^{a-d}Means with different letters in the same column are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

(나) 가자미식해의 저장 중 VBN 함량의 변화

대부분의 어패류는 어획 후 선도가 저하되면 어육 내 인지질 등의 지질 성분의 산화, 어육 중에 존재하는 환원계 효소나 세균의 작용에 의해 TMAO (trimethylamineoxide)가 환원되어 생성되는 TMA (trimethylamine) 등의 저급 염기성물질의 생성, 세균의 증식에 의해 단백질이 분해되어 생성되는 암모니아 질소 등에 의해 휘발성염기질소 (VBN)의 함량이 증가하게 된다. 일반적으로 신선한 어패류의 육에는 VBN이 미량 함유되어 있으나 어획 후 시간이 경과할수록 증가하는 것으로 보고되어 VBN의 측정은 어패류의 선도판정법으로 널리 이용되고 있다(19).

15°C에서 저장 15일 동안 가자미식해의 VBN 함량은 Table 4와 같다. 천연추출물을 분주 후 저장 3일부터 시료간의 VBN 함량의 유의적인 차이가 나타났다. 3일차에 에탄올과 꿀에서 각각 17.57, 17.23 mg/100 g으로 가장 높게 나타났으며, 저장 15일차까지도 높은 30.28-30.37 mg/100 g 정도로 다른 시료들에 비해 높은 함량을 나타냈다. 반면에 아로니아베리, 와사비, 프로폴리스, 후코이단 첨가 가자미식해에서 control과 비교해 볼 때, 부패억제 효과를 나타내었다. 아로니아베리, 고추냉이, 후코이단은 저장 15일에 VBN 함량은 각각 27.99, 26.24, 25.46 mg/100 g으로 서로간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 그 중에서도 pH 에서의 결과와 마찬가지로 pH 변화가 가장 적었던, 프로폴리스에서 저장 15일까지도 24.73 mg/100 g으로 가장 낮은 VBN 함량을 나타내었으며, 이는 병원성미생물에 대한 항균효과와 높은 항산화활성으로 인한 것으로 사료된다.

Table 4. Changes of VBN of the flounder sikhae during storage at 15°C for 15 days (mg/100g)

Sample	Storage days				
	3	6	9	12	15
Control (70% ethanol)	17.57 ± 1.11 ^c	18.02 ± 0.41 ^{bc}	19.51 ± 0.39 ^b	25.02 ± 0.08 ^c	30.28 ± 0.22 ^c
Honey	17.23 ± 0.84 ^{bc}	19.19 ± 0.53 ^c	21.52 ± 0.04 ^c	26.18 ± 0.58 ^c	30.37 ± 0.16 ^c
Aronia berry	14.52 ± 1.90 ^a	15.72 ± 0.71 ^a	19.23 ± 0.33 ^c	21.12 ± 0.16 ^a	27.99 ± 0.17 ^b
Wasabi	14.85 ± 0.75 ^{ab}	15.65 ± 0.64 ^a	17.43 ± 0.19 ^a	21.15 ± 0.31 ^a	26.24 ± 0.32 ^b
Propolis	13.66 ± 1.06 ^a	16.97 ± 0.76 ^{ab}	17.99 ± 0.63 ^a	22.39 ± 1.68 ^b	24.73 ± 0.55 ^a
Fucoidan	15.06 ± 0.76 ^{abc}	15.94 ± 1.12 ^a	21.65 ± 1.14 ^c	23.56 ± 1.35 ^b	25.46 ± 0.85 ^b

^{a-c}Means with different letters in the same column are significantly different (P<0.05) by Duncan's multiple range test.

(다) 가자미식해의 저장 중 총균수의 변화

가자미식해의 저장 중 총균수의 변화는 Table 5과 같다. 각각의 시료는 3일차까지 10^6 CFU/g으로 시료간의 총균수의 차이는 크게 나타나지 않았다. 저장 6일차부터 15일차까지 시료간의 유의적인 차이가 나타나기 시작하였고, 그 중 저장성이 가장 좋았던, 프로폴리스가 저장 15일에 1.81×10^7 CFU/g으로 가장 낮은 총균수를 나타내었다. Control은 6.24×10^8 CFU/g으로 가장 높은 총균수를 나타내었으며, 꿀을 첨가한 가자미식해 또한 control과 거의 비슷한 수준의 총균수를 나타내었다. 프로폴리스첨가 외 시료들도 control과 비슷한 10^8 CFU/g을 나타내었으나 약간의 총균수의 감소를 나타내었다. 이것으로 보아 항산화활성이 가장 높고 *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* 병원성균에 대한 항균력이 있었던, 프로폴리스가 저장성 향상에 가장 높은 것으로 사료된다. 하지만 프로폴리스의 항균력은 특정 균에 대한 항균력이 지, 가자미식해의 여러 종류의 미생물의 대한 항균력이 아니기 때문에 상기 3가지 종류의 균의 항균력으로 저장성 향상의 keycompaound로 단정 지을 수 없다. 추가적인 연구를 통하여 정확한 총균수억제 및 저장성향상의 keycompaound를 찾아내야 될 것으로 사료된다.

Table 5. Changes of total viable cell of the flounder sikhae during storage at 15°C for 15 days.

(Unit : CFU/g)

Sample	Storage days				
	3	6	9	12	15
Control (70% ethanol)	5.31×10^6	4.47×10^7	6.31×10^7	2.27×10^8	6.24×10^8
Honey	6.12×10^6	1.75×10^7	5.20×10^7	7.21×10^7	5.28×10^8
Aronia berry	3.22×10^6	7.81×10^6	3.80×10^7	3.21×10^7	1.52×10^8
Wasabi	3.28×10^6	6.90×10^6	1.65×10^7	5.21×10^7	1.66×10^8
Propolis	2.24×10^6	4.05×10^6	8.25×10^6	2.81×10^7	1.81×10^7
Fucoidan	4.22×10^6	6.15×10^7	3.15×10^7	3.21×10^7	4.05×10^8

(라) 가자미식해의 저장 중 아미노태질소 함량의 변화

가자미식해의 15℃ 저장 중 아미노태질소 함량의 변화는 Table 6과 같다. 초기 3일차 아미노태질소 함량은 254.79-265.07mg/100g으로 시료간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 전체적으로 아미노태질소 함량은 데이터가 많이 흔들리는 경향이 있어 편차가 크게 나타나 유의적인 차이를 비교하기에 어려움이 있었다. 하자만 아미노태질소 함량의 증가폭을 볼 때 VBN과 pH에서 변화가 가장 적었던 프로폴리스, 아로니아베리, 후코이단이 저장 15일차까지도 293-307mg/100g으로 control 322.84mg/100g에 비하여 낮은 아미노태질소 함량을 나타내어 저장성 향상에 어느 정도 영향을 미치는 것을 확인 할 수 있었다.

Table 6. Changes of Amino-N of the flounder sikhae during storage for 15 days

Sample	Storage days				
	3	6	9	12	15
Control (70% ethanol)	265.07±24.36 <i>a</i>	270.68±10.21 <i>b</i>	267.71±10.91 <i>ab</i>	296.16±2.58 ^c	322.84±9.88 ^c
Honey	269.12±0.99 ^a	268.53±7.49 ^b	267.73±4.23 ^{ab}	278.08±7.70 ^a	299.03±4.64 ^{ab}
Aronia berry	262.87±4.69 ^a	249.63±0.87 ^a	268.64±9.06 ^{ab}	288.27±4.86 ^{bc}	293.18±1.62 ^a
Wasabi	254.79±5.13 ^a	260.43±8.24 ^{ab}	281.80±7.37 ^b	277.85±2.97 ^a	311.53±5.13 ^c
Propolis	259.17±8.97 ^a	263.02±5.21 ^{ab}	261.20±4.85 ^a	280.79±0.78 ^{ab}	307.81±2.15 ^{bc}
Fucoidan	263.57±6.38 ^a	262.55±3.49 ^{ab}	269.07±6.97 ^{ab}	294.02±0.76 ^c	300.16±0.65 <i>abc</i>

(마) 가자미식해의 저장 중 Biogenic amine 함량의 변화

가자미식해의 숙성 후 15일간 15℃에서의 Biogenic amine 함량의 변화를 확인하였다. 15일간 Bas의 변화는 거의 나타나지 않았다. 초기 히스타민의 경우 모든 시료에서 거의 검출되지 않았으며, 저장 15일차까지도 낮은 수준의 히스타민 함량을 나타내었다. 총 Bas의 함량은 초기 0.27-0.32 정도를 나타내었으며, 저장 12일차까지도 비슷한 수준의 함량을 나타내었다. 이는 저장기간이 짧은 관계로 시료간의 저장중 변화가 크게 나타나지 않아 비교하는데 어려움이 있었다. 이를 보완하여 저장기간 및 설계를 다시하여 추가적인 보완 실험이 필요하고, 식해에 대한 Bas의 기준이 마련되어 있지 않음으로 적정기준의 표준화가 필요 할 것으로 사료된다.

<표1-1. 저장기간 중 가자미식해의 Biogenic amine 함량>

(mg/100g)

	Sample	Butan	Cadaverine	Histamine	Tyramine	Total
3	Control (70% ethanol)	0.06	0.09	0.00	0.17	0.32
	Honey	0.03	0.07	0.00	0.18	0.28
	Aronia berry	0.04	0.09	0.00	0.16	0.29
	Wasabi	0.04	0.10	0.06	0.17	0.37
	Propolis	0.05	0.08	0.00	0.14	0.27
	Furoidan	0.10	0.08	0.00	0.17	0.35
6	Control (70% ethanol)	0.16	0.17	0.00	0.24	0.57
	Honey	0.11	0.21	0.00	0.00	0.32
	Aronia berry	0.19	0.16	0.00	0.00	0.35
	Wasabi	0.16	0.17	0.00	0.00	0.33
	Propolis	0.18	0.16	0.00	0.00	0.34
	Furoidan	0.16	0.18	0.00	0.00	0.34
9	Control (70% ethanol)	0.16	0.16	0.00	0.00	0.32
	Honey	0.13	0.18	0.00	0.00	0.31
	Aronia berry	0.18	0.16	0.00	0.00	0.34
	Wasabi	0.17	0.17	0.00	0.00	0.34
	Propolis	0.19	0.16	0.00	0.00	0.35
	Furoidan	0.27	0.26	0.42	0.39	1.34
12	Control (70% ethanol)	0.08	0.05	0.04	0.15	0.32
	Honey	0.08	0.07	0.08	0.13	0.35
	Aronia berry	0.04	0.06	0.00	0.08	0.17
	Wasabi	0.06	0.07	0.00	0.09	0.22
	Propolis	0.07	0.05	0.00	0.00	0.13
	Furoidan	0.07	0.07	0.00	0.10	0.24
15	Control (70% ethanol)	0.00	0.02	0.07	0.10	0.19
	Honey	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Aronia berry	0.00	0.00	0.00	0.04	0.04
	Wasabi	0.00	0.00	0.00	0.06	0.06
	Propolis	0.00	0.00	0.00	0.04	0.04
	Furoidan	0.00	0.01	0.09	0.08	0.18

저
장
기
간

(바) 요약

본 연구에서는 꿀, 아로니아베리, 고추냉이, 프로폴리스, 후코이단 에탄올 추출물에 대한 항균·항산화 효능 실험과 가자미식해에 추출물을 첨가했을 때 나타나는 저장성 변화에 대하여 확인해 보았다. 그 결과는 다음과 같다. 다른 추출물들과는 달리 프로폴리스 에탄올 추출물은 *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*에서 생육저해가 나타났고, 폴리페놀과 플라보노이드와 같은 항산화물질이 각각 91.18 $\mu\text{g/mL}$, 457.09 $\mu\text{g/mL}$ 가장 많이 함유하면서 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다. 또한 저장성에서도 저장 15일까지 pH변화가 6.04-5.39로 가장 적었으며, VBN함량 24.73 mg/100g 및 총균수까지 가장 낮게 나타나 가장 우수한 저장성을 나타내었다. 이것으로 볼 때, 병원성균에 대한 항균성 및 항산화성이 가자미식해의 저장성에 큰 영향을 미치는 것으로 판단된다. 아로니아베리, 고추냉이, 후코이단에서 또한 control과 비교해 볼 때 저장성 효과가 나타났다. 하지만 아로니아베리에서 *Salmonella typhimurium*에서의 항균력이 나타났으며, 폴리페놀함량 및 플라보노이드함량이 각각 61.20, 197.00 $\mu\text{g/mL}$ 로, 고추냉이 및 후코이단에 비해 높은 함량을 나타내었는데 저장 15일까지의 pH 변화와 VBN함량 및 총균수를 비교 분석한 결과 유의적으로 큰 차이를 나타내지 않았다. 이것으로 보아 항균성 및 항산화성이 저장성 향상과 관련되어 있긴 하지만, 에탄올추출물들의 추출용매의 종류나 추출방법, 유기산에 미치는 영향이나 단백질변성, 발효에 미치는 영향 등 다른 기작으로 인하여, 저장성 향상에 영향을 줄 수도 있다고 판단되며, 현재 아로니아베리나 고추냉이의 저장성에 대한 자료가 적은 상황이며, 추후 추가적인 연구를 통하여 각각의 저장성 향상에 영향을 미치는 천연식자재 에탄올추출물들의 key compounds를 찾아낸다면, 천연보존료로서의 산업적 활용에 큰 도움이 될 것으로 사료된다.

(4) 오징어식해에 적용한 천연항균, 항산화소재를 이용한 저장성 확인

(가) 오징어식해의 저장 중 pH 변화

저장 5일 동안 15°C에서 오징어식해의 pH변화를 Table 1에 나타내었다. 저장 3일차까지 시료간의 pH값의 변화에 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 저장 4일차부터 시료간에 유의적인 차이가 나타나기 시작했는데 프로폴리스가 6.12로 가장 높은 pH를 나타내었으며, 그 변화량 또한 다른 시료들에 비하여 낮은 것을 나타내었다. 하지만 다른 시료들은 control과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 저장 5일차 역시 프로폴리스의 pH가 6.20으로 거의 변화가 없었고 소르빈산의 pH가 4.77로 가장 낮은 수치를 나타내었으며, 다른 시료들은 control보다 낮은 pH값을 나타내었다. 가자미식해와 마찬가지로 프로폴리스가 저장 중 오징어식해의 pH변화의 억제가 가장 큰 것으로 확인되었다.

Table 1. Changes of pH value of the squid sikhae during storage for 15 days

sample	Storage days				
	1	2	3	4	5
Control (70% ethanol)	6.25±0.00 ^c	6.26±0.00 ^b	6.25±0.00 ^b	6.23±0.01 ^e	6.02±0.02 ^e
Honey	6.26±0.00 ^c	6.22±0.00 ^b	6.26±0.02 ^b	6.07±0.01 ^c	5.93±0.00 ^d
Aronia berry	6.22±0.00 ^b	6.22±0.00 ^b	6.23±0.01 ^b	6.02±0.00 ^b	5.72±0.02 ^c
Wasabi	6.25±0.00 ^c	6.23±0.00 ^b	6.23±0.00 ^b	6.12±0.00 ^d	5.66±0.00 ^b
Propolis	6.26±0.02 ^c	6.23±0.01 ^b	6.24±0.00 ^b	6.24±0.00 ^e	6.20±0.00 ^f
Fucoidan	6.24±0.00 ^{bc}	6.26±0.03 ^b	6.23±0.01 ^b	6.24±0.00 ^e	5.73±0.00 ^c
소르빈산	6.03±0.02 ^a	5.73±0.00 ^a	5.82±0.02 ^a	5.47±0.00 ^a	4.77±0.00 ^a

(나) 오징어식해의 저장 중 VBN함량의 변화

15°C에서 저장한 저장 5일간 오징어식해의 VBN함량의 변화는 Table 2와 같다. 저장 2일차까지 시료들간의 유의적인 차이는 거의 나타나지 않았다. VBN함량의 증가가 가장 낮았던 것은 합성보존료인 소르빈산이 5일차 9.30mg/100g으로 가장 좋은 저장성을 나타내었다. 프로폴리스 또한 저장 5일차에 11.09mg/100g으로 소르빈산 다음으로 좋은 저장성을 나타내었으며, 아로니아베리와 후코이단 역시 control에 비하여 낮은 VBN함량을 나타내었다. 하지만 전체적으로 control과 비교해 볼 때 수치상으로는 큰 차이는 나타나지 않기 때문에 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Table 2. Changes of VBN value of the squid sikhae during storage for 15 days

Sample	Storage days				
	1	2	3	4	5
Control (70% ethanol)	8.04±0.09 _{abc}	9.76±0.19 ^b	11.08±3.68 ^c	13.84±0.18 ^d	15.03±0.66 ^d
Honey	7.05±0.33 ^a	9.79±0.48 ^b	12.08±3.75 ^d	13.88±1.11 ^d	16.04±0.16 ^d
Aronia berry	8.60±0.58 ^{bc}	9.55±0.60 ^b	10.89±0.68 ^c	10.68±0.37 ^c	13.00±0.11 ^c
Wasabi	7.83±0.25 _{abc}	9.84±0.88 ^b	10.57±0.90 ^c	10.90±0.12 ^c	13.44±0.77 ^c
Propolis	9.00±1.13 ^c	8.09±0.37 ^a	8.75±1.78 ^b	9.54±1.50 ^b	11.09±0.39 ^b
Fuoidan	7.81±0.24 _{abc}	9.12±0.64 ^{ab}	10.71±2.51 ^c	11.00±1.04 ^c	13.84±0.46 ^c
소르빈산	7.47±0.02 ^{ab}	8.29±0.33 ^a	8.65±2.92 ^a	8.86±0.17 ^a	9.30±3.46 ^a

(다) 오징어식해의 저장 중 아미노태질소 함량의 변화

15℃에서 저장 1일차까지 알긴산과 프로폴리스가 각각 189.83, 186.59mg/100g으로 가장 낮은 아미노태질소 함량을 나타내었다. 짧은 저장 기간으로 5일차까지 모든시료에서 아미노태질소 함량에 큰 변화는 나타나지 않았으며, 시료들간에도 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

Table 3. Changes of Amino-N value of the squid sikhae during storage for 15 days

(mg/100g)

Sample	Storage days				
	1	2	3	4	5
Control	199.64±4.96	197.61±2.3	196.12±1.25	196.37±6.60	189.80±.351
(70% ethanol)	<i>bc</i>	<i>3^b</i>	<i>e</i>	<i>b</i>	<i>a</i>
Honey	189.83±2.27 ^a	190.27±1.8	191.95±2.06	194.18±2.73	192.06±6.82
		<i>9^a</i>	<i>bc</i>	<i>b</i>	<i>a</i>
Aronia berry	191.39±0.79	190.99±0.1	188.62±0.77	191.55±1.28	199.73±4.88
	<i>ab</i>	<i>2^a</i>	<i>ab</i>	<i>b</i>	<i>ab</i>
Wasabi	194.26±4.79	188.72±0.1	197.81±0.01	193.44±2.12	195.36±3.31
	<i>abc</i>	<i>6^a</i>	<i>c</i>	<i>b</i>	<i>ab</i>
Propolis	186.59±3.40 ^a	188.78±0.9	180.44±0.05	179.44±1.29	195.35±3.76
		<i>8^a</i>	<i>d</i>	<i>a</i>	<i>ab</i>
Fucoidan	201.23±6.70 ^c	190.12±2.4	195.74±1.78	182.77±3.22	203.17±4.44
		<i>8^a</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
소르빈산	192.92±1.39	187.93±1.3	183.73±3.49	184.44±2.76	205.25±1.27
	<i>abc</i>	<i>1^a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>b</i>

(라) 오징어식해의 저장 중 Biogenic amines 함량의 변화

오징어 식해의 15℃에서 저장 중 biogenic amines 함량의 변화는 표 1-1과 같다. 1일차의 경우 control과 시료간의 차이는 크게 없으나 저장기간이 늘어날수록 biogenic amines 함량이 증가함을 알 수 있다. 특히 저장 1일차에서 2일차 사이에 biogenic amines 함량이 약 2배 이상 증가한 것을 알 수 있었다. histamine은 저장 2일차까지 거의 검출되지 않았다. 저장 4일차에서 biogenic amines 함량을 보면 와사비 0.98mg/kg, 프로폴리스 0.95mg/kg, 후코이단 1.03mg/kg로 control 1.23mg/kg보다 낮게 나온 것을 알 수 있다. 반면, 알긴산 1.37mg/kg, 소르빈산 1.29mg/kg은 control보다 높은 함량을 나타내었다. 저장 마지막차까지 프로폴리스를 첨가한 오징어식해가 0.27-1.17mg/kg으로 Biogenic amine 함량의 변화가 가장 낮았으며, 와사비와 아로니아베리도 control에 비해 낮은 함량을 나타낸 것으로 나타난다. 이는 VBN이나 아미노태질소 함량과 비교해 볼 때, 비례적으로 증가하며 숙성 또는 부패가 진행이 될수록 높은 아민 함량을 나타낸다.

<표 1-1 저장기간 중 오징어식해의 Biogenic amine 함량>

(mg/100g)

	Sample	Butan	Cadaverine	Histamine	Tyramine	Total
1	Control (70% ethanol)	0.06	0.09	0.00	0.17	0.32
	Honey	0.03	0.07	0.00	0.18	0.28
	Aronia berry	0.04	0.09	0.00	0.16	0.29
	Wasabi	0.04	0.10	0.06	0.17	0.37
	Propolis	0.05	0.08	0.00	0.14	0.27
	Fucoidan	0.10	0.08	0.00	0.17	0.35
	소르빈산	0.00	0.09	0.00	0.35	0.44
2	Control (70% ethanol)	0.20	0.19	0.00	0.39	0.79
	Honey	0.20	0.19	0.00	0.47	0.85
	Aronia berry	0.17	0.19	0.00	0.42	0.78
	Wasabi	0.18	0.19	0.00	0.35	0.71
	Propolis	0.17	0.19	0.00	0.32	0.68
	Fucoidan	0.18	0.19	0.00	0.40	0.77
	소르빈산	0.14	0.19	0.00	0.60	0.93
3	Control (70% ethanol)	0.26	0.20	0.00	0.71	1.17
	Honey	0.27	0.21	0.18	0.81	1.47
	Aronia berry	0.16	0.20	0.19	0.72	1.26
	Wasabi	0.20	0.20	0.19	0.54	1.13
	Propolis	0.20	0.18	0.00	0.56	0.94
	Fucoidan	0.16	0.18	0.17	0.56	1.08
	소르빈산	0.15	0.19	0.18	0.77	1.29
4	Control (70% ethanol)	0.14	0.21	0.19	0.68	1.23
	Honey	0.14	0.22	0.19	0.81	1.37
	Aronia berry	0.14	0.20	0.19	0.67	1.19
	Wasabi	0.09	0.22	0.00	0.67	0.98
	Propolis	0.09	0.21	0.00	0.65	0.95
	Fucoidan	0.14	0.19	0.19	0.51	1.03
	소르빈산	0.14	0.20	0.18	0.78	1.29
5	Control (70% ethanol)	0.22	0.22	0.24	0.65	1.32
	Honey	0.22	0.20	0.23	0.73	1.38
	Aronia berry	0.19	0.20	0.21	0.88	1.48
	Wasabi	0.21	0.21	0.22	0.83	1.47
	Propolis	0.18	0.19	0.21	0.59	1.17
	Fucoidan	0.20	0.22	0.00	0.92	1.34
	소르빈산	0.19	0.23	0.00	0.81	1.24

저장기간

(마) 오징어식해의 저장 중 총균수의 변화

오징어식해 15°C, 5일 저장 중 총균수의 변화는 아래와 같다. 초기 총균수는 1.45×10^5 CFU/g 정도의 총균수를 나타내었으며, 저장 2일까지 모든 오징어식해에서 10^6 CFU/g으로 서로간에 큰 차이가 나타나지 않았다. 저장 3일차부터 control에서 1.85×10^7 CFU/g으로 가장 높은 총균수를 나타내었고, 후코이단 또한 1.75×10^7 CFU/g으로 control과 비슷한 수준의 총균수를 나타내었다. 저장 마지막차인 5일차까지 총균수의 변화를 보면 프로폴리스가 5.60×10^6 CFU/g으로 다른시료들 10^7 - 10^8 CFU/g에 비해 낮은 총균수를 나타내었으며 VBN함량과, 아미노태질소 함량이 가장 낮았던 것과 비교해 볼 때, 비례함을 알 수 있었다.

(Unit : CFU/g)

Sample	저장기간(일)					
	0	1	2	3	4	5
일반오징어식해	1.45×10^5	5.21×10^6	8.32×10^6	1.85×10^7	7.21×10^7	2.27×10^8
에탄올첨가 오징어식해	1.45×10^5	1.30×10^6	5.00×10^6	6.70×10^6	7.75×10^6	4.75×10^8
알긴산첨가 오징어식해	1.45×10^5	1.38×10^6	6.55×10^6	4.05×10^6	4.35×10^7	5.85×10^7
아로니아베리첨가 오징어식해	1.45×10^5	9.55×10^5	3.05×10^6	8.20×10^6	9.00×10^6	3.90×10^7
와사비첨가 오징어식해	1.45×10^5	7.70×10^5	2.85×10^6	6.90×10^6	3.90×10^7	5.00×10^7
프로폴리스첨가 오징어식해	1.45×10^5	5.55×10^5	N.D	5.05×10^6	7.45×10^6	5.60×10^6
후코이단첨가 오징어식해	1.45×10^5	7.20×10^5	3.05×10^6	5.90×10^6	6.95×10^6	5.30×10^7
소르빈산첨가 오징어식해	1.45×10^5	1.25×10^6	3.80×10^6	1.75×10^7	6.75×10^7	7.60×10^8

(5) 천연보존제 첨가 오징어식해의 유통기한 연장 확인

(가) 재료 및 방법

1) 재료

오징어식해는 상기의 표준화한 레시피를 사용하여 제조하였으며, 제조 후 첨가한 천연보존제는 유카추출물, 자몽종자추출물, 프로폴리스, 허브추출물을 구매하여 사용하였고 고추냉이에탄올추출물잔사는 고추냉이를 70%에탄올에 30분간 초음파추출하여 감압여과 후 남은 잔사를 제조하여 사용하였다. 이 천연보존제를 증류수에 10배희석하여 30분간 초음파로 수용성 성분을 추출 후 원물무게대비 3%를 첨가하여 오징어식해를 제조하였다. 각각의 오징어식해 제품을 15°C에서 12일동안의 저장성을 확인해 보았다.

2) 실험방법

저장성의 확인은 pH, 총균수, TBA, VBN함량, 아미노태질소함량으로 품질변화를 확인하였고, 실험법은 상기 저장성 실험에서 제시하였다.

(나) 저장기간 중 오징어식해의 pH값의 변화

15°C에서 12일간 오징어식해의 pH변화를 확인하였고 표 1에 지시하였다. 초기 제조한 오징어식해의 pH함량은 6.88 정도를 나타내었으며, 저장기간 동안 전체적으로 pH가 서서히 감소하였다. 저장 3일차부터 무침가와 와사비침가 오징어식해의 pH가 각각 4.72, 4.86으로 급격히 떨어지는 것을 확인 할 수 있었다. 천연보존제인 자몽과 허브는 3일차에 pH가 각각 6.87, 7.03으로 변화가 가장 적었으며, 저장 12일차 까지는 pH가 5.02, 5.16으로 비교적 안정적인 pH변화량을 나타내었다. 자몽과 허브는 항균활성이 가진다고 보고되어지는데 유산균이 억제되어 그만큼의 유기산이 적어 pH가나 다른 시료들에 비해 높은 것으로 사료된다.

<표 1. 저장기간 중 오징어식해의 pH값의 변화>

Sample	Storage days				
	0	3	6	9	12
무침가	6.88±0.01 ^a	4.72±0.00 ^a	4.52±0.00 ^{ab}	4.51±0.09 ^{ab}	4.50±0.00 ^b
유카	6.88±0.01 ^a	5.15±0.01 ^b	4.54±0.01 ^b	4.39±0.00 ^a	4.39±0.01 ^a
와사비	6.88±0.01 ^a	4.86±0.01 ^c	4.51±0.00 ^a	4.43±0.00 ^a	4.44±0.01 ^a
자몽	6.88±0.01 ^a	6.87±0.00 ^d	5.88±0.00 ^d	4.97±0.00 ^c	5.02±0.00 ^c
프로폴리스	6.88±0.01 ^a	6.63±0.00 ^e	5.15±0.01 ^c	4.57±0.00 ^b	4.49±0.00 ^{ab}
허브	6.88±0.01 ^a	7.03±0.01 ^f	6.58±0.00 ^e	5.25±0.01 ^d	5.16±0.02 ^b

^{a-d}Values with different superscripts in the same row are significantly at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(다) 저장기간 중 오징어식해의 VBN함량의 변화

오징어식해의 초기 VBN함량은 4.11 mg/100g을 나타내었으며, 저장기간이 지날수록 VBN함량은 증가하였다. 표 2에서 보면 저장 3일차부터 시료간 VBN함량의 유의적인 차이가 나타났다. 와사비첨가 오징어식해는 8.54 mg/100g으로 가장 낮은 함량을 나타내었으며, 무첨가 오징어식해는 15.57 mg/100g로 가장 높은 VBN함량을 나타내었다. 저장 6일차에도 와사비첨가 시료에서 8.81 mg/100g으로 가장 적은 함량을 나타내었다. 하지만 자몽과 프로폴리스는 각각 29.87 mg/100g, 26.42mg/100g으로 급격히 VBN함량이 증가하였다. 저장 마지막차인 12일에도 자몽과 프로폴리스첨가 오징어식해가 40.30, 33.47 mg/100g으로 무첨가 오징어식해보다 높은 VBN함량을 나타내었으며, 저장성이 좋지 않은 것으로 확인되었다. 와사비에탄올추출물 잔사를 첨가한 오징어식해는 12.61 mg/100g 가장 낮은 VBN함량을 나타내었으며, 뛰어난 저장성을 보여주었다. 또한 유카와 허브추출물 또한 각각 18.91, 19.99mg/100g으로 오징어식해의 저장성향상을 확인 할 수 있었다.

<표 2. 저장기간 중 오징어식해의 VBN함량의 변화>

Sample	Storage days				
	0	3	6	9	12
무첨가	4.11±0.32 ^a	15.57±0.61 ^d	16.67±0.51 ^b	18.11±0.38 ^c	24.31±0.03 ^d
유카	4.11±0.32 ^a	13.00±0.31 ^{de}	14.97±0.29 ^b	16.22±0.79 ^{bc}	18.91±0.29 ^b
와사비	4.11±0.32 ^a	8.54±0.03 ^a	8.81±0.40 ^a	10.85±0.10 ^a	12.61±0.45 ^a
자몽	4.11±0.32 ^a	11.15±0.12 ^c	29.87±0.17 ^c	34.58±0.71 ^e	40.30±0.33 ^f
프로폴리스	4.11±0.32 ^a	13.59±0.44 ^e	26.42±0.54 ^c	30.58±0.70 ^d	33.47±0.27 ^e
허브	4.11±0.32 ^a	10.10±0.66 ^b	9.27±0.11 ^a	16.99±0.88 ^c	19.99±0.18 ^c

^{a-d}Values with different superscripts in the same row are significantly at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(라) 저장기간 중 오징어식해의 TBA값의 변화

초기 시료의 TBA값은 0.48 O/D를 나타내었다. 저장 3일차에 시료간의 유의적인 차이는 나타났으나, 저장기간이 지날수록 모든 시료의 TBA값에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 또한 저장 12일차까지 초기 TBA값과의 변화가 거의 나타나지 않았다.

<표 3. 저장기간 중 오징어식해의 TBA값의 변화>

(O/D)

Sample	Storage days				
	0	3	6	9	12
무첨가	0.48±0.00 ^a	0.43±0.00 ^a	0.44±0.00 ^a	0.45±0.00 ^a	0.44±0.00 ^a
유카	0.48±0.00 ^a	0.57±0.02 ^b	0.57±0.07 ^a	0.53±0.02 ^b	0.52±0.01 ^a
와사비	0.48±0.00 ^a	0.64±0.07 ^b	0.45±0.00 ^a	0.44±0.02 ^a	0.44±0.00 ^a
자몽	0.48±0.00 ^a	0.46±0.01 ^a	0.44±0.01 ^a	0.41±0.00 ^a	0.52±0.11 ^a
프로폴리스	0.48±0.00 ^a	0.45±0.01 ^a	0.63±0.18 ^a	0.42±0.02 ^a	0.47±0.05 ^a
허브	0.48±0.00 ^a	0.45±0.00 ^a	0.49±0.04 ^a	0.43±0.01 ^a	0.42±0.03 ^a

^{a-d}Values with different superscripts in the same row are significantly at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(마) 저장기간 중 아미노태질소함량의 변화

초기 오징어식해의 아미노태질소함량은 151.63 mg/100g을 나타내었다. 표 4를 보면 저장 6일 차부터 시료간의 아미노태질소함량에 유의적인 차이가 나타났는데 유카추출물에서 158.42 mg/100g으로 가장 낮은 함량을 나타내었고, 자몽추출물에서 176.68 mg/100g으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 저장 12일차에도 마찬가지로 자몽추출물을 첨가한 오징어식해는 194.79 mg/100g으로 높은 함량을 나타내었으며, 고추냉이에탄올 추출물 잔사는 165.98 mg/100g으로 가장 낮은 아미노태질소 함량을 나타내었으며, 오징어식해의 숙성 및 부패를 어느정도 늦추는 효과를 나타내는 것으로 사료되며, VBN함량의 변화와 비교해 볼 때, 비례적인 결과를 나타내었다.

<표 4. 저장기간 중 오징어식해의 아미노태질소함량의 변화>

(mg/100g)

Sample	Storage days				
	0	3	6	9	12
무첨가	151.63±1.20 ^a	162.06±1.50 ^a	160.39±0.77 ^a	169.37±0.69 ^b	172.17±4.40 ^{ab}
유카	151.63±1.20 ^a	158.80±1.48 ^a	158.42±4.03 ^a	171.62±0.74 ^b	179.08±2.24 ^b
와사비	151.63±1.20 ^a	161.56±6.85 ^b	160.09±1.66 ^a	162.99±1.97 ^a	165.98±0.74 ^a
자몽	151.63±1.20 ^a	165.55±2.44 ^a	176.68±6.24 ^c	187.88±1.15 ^c	194.79±5.98 ^c
프로폴리스	151.63±1.20 ^a	164.12±2.57 ^a	165.11±0.99 ^{ab}	171.32±0.19 ^b	178.63±4.46 ^b
허브	151.63±1.20 ^a	163.87±0.57 ^a	170.30±1.52 ^{bc}	171.08±0.84 ^b	175.59±3.80 ^b

^{a-d}Values with different superscripts in the same row are significantly at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(바) 저장기간 중 오징어식해의 총균수의 변화

오징어식해의 초기 총균수는 1.1×10^6 CFU/g을 나타내었다. 총균수의 변화는 프로폴리스를 첨가한 오징어식해가 3일차에 9.7×10^7 CFU/g에서 저장 12일차에 1.1×10^9 CFU/g으로 총균수의 증가가 가장 높았으며, 두 번째로 자몽추출물첨가 시료에서 2.8×10^8 CFU/g에서 8.4×10^8 CFU/g으로 총균수의 증가량이 높았다. 이는 VBN과 아미노태질소함량의 변화와 비교해 볼 때, 비례적으로 상승하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 고추냉이에탄을 추출물 잔사는 VBN함량과 아미노태질소함량이 저장기간 중 가장 낮았는데, 총균수 또한 3일에 6.3×10^6 CFU/g에서 12일차에 6.6×10^7 CFU/g으로 가장 낮은 총균수를 나타내었다.

<표 5. 저장기간 중 오징어식해의 총균수의 변화>

Sample	Storage days				
	0	3	6	9	12
무첨가	1.1×10^6	6.2×10^7	4.7×10^7	4.9×10^7	9.3×10^7
유카	1.1×10^6	1.3×10^8	1.6×10^8	3.4×10^8	1.5×10^8
와사비	1.1×10^6	6.3×10^6	6.2×10^7	8.0×10^7	6.6×10^7
자몽	1.1×10^6	2.8×10^8	1.9×10^8	6.0×10^8	8.4×10^8
프로폴리스	1.1×10^6	9.7×10^7	5.8×10^8	2.5×10^9	1.1×10^9
허브	1.1×10^6	4.2×10^6	3.9×10^6	4.7×10^6	8.4×10^7

(CFU/g)

(사) 저장기간 중 오징어식해의 Biogenic amine 함량의 변화

저장기간 중 오징어식해의 Biogenic amine의 함량은 표 6과 같다. 0일차에 amine함량은 0.06 mg/kg을 나타내었다. Biogenic amine은 발효식품에서 많이 생성된다고 보고되고 있는데 발효식품이 숙정하거나 부패하면 그 함량이 높아지는 경향이 있다. 이러한 사례로 볼 때, 저장성이 가장 뛰어났던, 고추냉이에탄올추출물 잔사 첨가 오징어식해가 3일차에 0.53 mg/kg에서 12일차에 1.40 mg/kg으로 다른 시료들에 비해 뛰어난 Biogenic amine 억제효과가 나타났으며, 반면에 저장성이 좋지 않았던 자몽추출물의 경우에는 저장 12일차에 11.37 mg/kg으로 높은 Biogenic amine함량을 나타내었다. 프로폴리스 또한 저장성이 좋지 않았는데 저장 12일차에 Biogenic amine함량이 9.24 mg/kg으로 두 번째로 높은 함량을 나타내었다.

<표 6. 저장기간 중 오징어식해의 Biogenic amines함량의 변화>

Sample	Storage days				
	0	3	6	9	12
무첨가	0.06	1.50	2.58	2.43	3.85
유카	0.06	1.31	2.12	1.81	3.03
와사비	0.06	0.53	1.00	0.64	1.40
자몽	0.06	1.54	5.05	12.24	11.37
프로폴리스	0.06	1.85	7.63	9.80	9.24
허브	0.06	0.77	1.73	1.81	2.20

(자) 결과 및 고찰

오징어식해에 천연보존제인 자몽종자추출물, 유카추출물, 허브추출물, 고추냉이에탄올추출물 잔사와 프로폴리스의 수용성 성분을 추출하여 첨가하여 저장성 향상을 확인하였다. 그 중 고추냉이에탄올추출물 잔사를 첨가한 오징어식해가 가장 뛰어난 저장성을 나타내었는데, 저장 12일에 VBN함량, 아미노태질소함량, Biogenic amine함량, 총균수 등이 무첨가 시료뿐만 아니라 다른 첨가제들 보다 낮은 함량을 나타내었다. 또한 유카와, 허브추출물 또한 무첨가 시료에 비해 뛰어난 저장성을 확인하였다. 반면에 항균성이 강하고 저장성이 뛰어나다고 알려진 자몽종자추출물을 오징어식해에 첨가하였으나, 좋지 않은 저장성을 나타내었다. 우선 pH에서는 그 변화량이 가장적어 어느정도의 품질의 안전성이 있는 것으로 사료되었으나 단백질부패 지표인 VBN 함량이 가장 높게 나타났으며, 아미노태질소함량과 Biogenic amine함량도 무첨가 및 다른 첨가제에 비해 매우 높게 나타났다. 이는 자몽종자추출물이 유산균을 억제하여 유기산 생성이 저하되어 pH가 변화가 낮은 것으로 사료되며 이러한 유산균의 제어로 인하여 다른 잡균이 증식하여 저장성이 떨어지는 것으로 예측된다. 프로폴리스의 경우는 상기의 저장성 실험에서 70%에탄올 추출물을 적용하였을 때, 저장성 향상되는 것으로 나타났으나 일반 증류수로 추출하였을 때는 저장성이 떨어지는 결과가 나타났다. 본 연구를 통하여 고추냉이에탄올추출물 잔사와 유카, 허브 추출물의 첨가가 오징어식해의 저장성 향상을 확인하였으며, 관능적인 측면과 최적첨가량을 확인하여 고품질의 오징어식해 제조를 할 수 있을 것으로 사료된다.

(6) 고추냉이 에탄올추출물 잔사를 이용한 오징어식해의 저장성 확인 및 최적 첨가량 확인

(가) 재료 및 방법

1) 재료

연구시료용 오징어식해제품의 제조시에는 시료오징어(*Todarodespaxificus*, 원산지, 대한민국)는 강릉시 중앙시장에서 구입하여 사용하였고, 염장에 사용한 소금은 천일염(해표(주), 국내산)을 이용하였고, 당장용 첨가제는 백설탕(홈플러스(주), 국내산)과 물엿(오뚜기(주), 국내산)을 이용하였고, 나머지 부재인 고춧가루(해찬들(주), 국내산), 마늘(신야원, 국내산), 생강(농협, 국내산), 미원(대상(주), 국내산), 무우(농협, 국내산), 좁쌀(홈플러스(주), 국내산)등은 강릉시 소재 농협 하나로마트에서 각각 구입하여 사용하였다.

2) 오징어식해 제조

시료의 제조 공정은 상기의 표준화된 오징어식해의 제조공정법으로 제조하였다. 숙성 후 첨가한 고추냉이 에탄올추출물 잔사는 동결건조기(Operon FDT-8612)로 동결건조한 고추냉이와 70%에탄올을 1:5 비율로 교반 후 초음파교반기(JAC4020)을 이용하여 1시간 초음파추출을 하였다. 추출한 여액을 부호너갈데기에 감압여과하여 남은 잔사를 48시간 건조하여 남은 에탄올을 모두 날린다. 이 후 고추냉이 에탄올추출 잔사물을 원물 무게대비 0.5%, 1.5%, 3%를 첨가하여 무첨가 오징어식해와 저장성을 비교분석 해보았다.

(나) 연구방법

고추냉이 에탄올추출물 잔사의 저장성을 확인하고, 그것에 최적 첨가량을 확인하였다. 저장성은 pH, VBN함량, 아미노태질소함량, TBA, 총균수, 유산균수로 확인하였고 마지막으로 관능평가를 통한 최적첨가량을 확인하였다.

(다) 저장기간 중 미생물 수 및 pH 측정

pH의 변화면에서, 고추냉이에탄올추출물 잔사가 오징어식해의 15℃ 저장 조건에서 저장기간 동안 pH 변화에 미치는 영향을 확인하였다(표 1). 일반적으로 오징어식해는 발효와 저장이 진행됨에 따라 젖산 등의 유기산이 발생하게 되어 저장기간 동안 pH가 감소하게 되는데, 실험군 모두 저장 20일째까지 pH값이 감소하였다. 모든 오징어식해는 저장 4일째까지 서로간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 저장 8째부터 시료간에 pH의 유의적인 차이가 나타났다. 고추냉이에탄올추출물 잔사 0.5%첨가 오징어식해가 pH 변화량이 가장 크게 나타났지만, 전체적인 pH는 저장 20일차까지 4.26-4.38로 통계적으로 유의적인 차이가 나타났지만, 실질적인 pH값으로 볼 때 큰 차이는 나타나지 않은 것으로 나타났다.

미생물의 변화면에서, 어육의 신선도 판정에서 일반세균수 기준치인 1.0×10^5 CFU/g이하는 식해류와 같이 미생물의 적당한 증식으로 바람직한 맛을 내는 발효식품에는 그대로 적용시키기 부적절하다고 판단된다. 그러나 식해제품에서 미생물의 과다한 증식은 신맛이 너무 강해지고, 바람직하지 못한 맛이 생성되므로 적절한 미생물수의 규제치는 필요로 한다. 저장 중 총균수의 변화를 확인한 결과 고추냉이에탄올추출물 잔사 3.0%첨가 오징어식해가 저장 20일까지 5.15×10^8 CFU/g으로 가장 낮은 총균수의 함량을 나타냈으며, 나머지 첨가균 및 무첨가균에서는 10^9 CFU/g으로 비슷한 수준의 총균수를 나타냈다. 이것으로 보아 고추냉이에탄올추출물 잔사의 첨가량이 높을수록 저장성이 더 높은 것을 확인하였다.(표 2 참조)

표 1. 와사비에탄올추출물 잔사 첨가에 따른 저장중(15℃) 오징어식해의 pH 변화

(pH)

Sample	저장기간(일)					
	0	4	8	12	16	20
Control(무첨가)	6.63±0.00 ^a	6.00±0.00 ^a	4.65±0.00 ^c	4.46±0.00 ^c	4.34±0.00 ^b	4.32±0.01 ^c
와사비잔사 0.5%	6.63±0.00 ^a	6.69±0.01 ^a	4.59±0.01 ^b	4.39±0.00 ^b	4.27±0.00 ^a	4.26±0.00 ^a
와사비잔사 1.5%	6.63±0.00 ^a	6.44±0.00 ^a	4.51±0.00 ^a	4.38±0.00 ^a	4.27±0.00 ^a	4.30±0.00 ^b
와사비잔사 3.0%	6.63±0.00 ^a	6.44±0.00 ^a	4.65±0.00 ^c	4.53±0.01 ^d	4.40±0.00 ^c	4.38±0.00 ^d

Values are mean±S.D. for three experiments.

표 2. 고추냉이에탄올추출물 잔사 첨가에 따른 저장중(15℃) 오징어식해의 총균수 변화

(Unit : CFU/g)

Sample	저장기간(일)					
	0	4	8	12	16	20
Control(무첨가)	5.40×10 ⁵	6.52×10 ⁸	7.70×10 ⁸	1.90×10 ⁹	1.85×10 ⁹	1.33×10 ⁹
와사비잔사 0.5%	5.40×10 ⁵	1.53×10 ⁸	7.10×10 ⁸	1.60×10 ⁹	1.41×10 ⁹	1.74×10 ⁹
와사비잔사 1.5%	5.40×10 ⁵	3.10×10 ⁷	6.50×10 ⁸	1.50×10 ⁹	3.10×10 ⁹	1.64×10 ⁹
와사비잔사 3.0%	5.40×10 ⁵	5.70×10 ⁵	6.40×10 ⁷	2.20×10 ⁸	5.30×10 ⁸	5.15×10 ⁸

(라) 저장기간 중 VBN함량의 변화

고추냉이에탄올추출물 잔사가 오징어식해의 15°C 저장 조건에서 저장기간 동안 VBN함량 변화에 미치는 영향을 확인하였다(표 3). Song et al은 VBN 함량이 일반적 기준으로 5~10 mg%은 극히 신선한 어육, 15~25 mg%은 보통 선도의 어육, 30~40 mg%은 부패 초기의 어육, 50 mg% 이상인 경우 부패 정도가 심한 어육으로 판정한다고 보고한 바 있다. 제조당일 실험에 사용한 오징어젓은 8.01 mg/100g 으로 신선한어육 기준에 속했다. 저장 4일째부터 시료간의 VBN함량의 유의적인 차이가 나타났다. 무첨가 시료는 26.33mg/100g으로 고추냉이잔사를 첨가한 시료들에 비해 높은 VBN함량을 나타내었다. 반면에 고추냉이잔사를 0.5, 1.5, 3.0% 첨가한 시료에는 각각 15.52, 10.61, 11.23mg/100g으로 낮은 VBN 함량을 나타내었다. 저장 20일까지 무첨가 시료는 VBN함량이 33.71mg/100g으로 가장 높은 VBN함량을 나타내었으며, 고추냉이잔사 첨가량 0.5, 3.0% 오징어식해의 VBN함량은 27.30, 26.90mg/100g으로 가장 낮은 함량을 나타냈으며, 두 시료간에 유의적인 차이는 나타나지 않았으므로, 고추냉이잔사 첨가량이 높다고 단백질 부패의 큰 영향을 주는 것은 아닌 것으로 확인되었다. (표 3)

표 3. 고추냉이에탄올추출 잔사물 첨가에 따른 저장 중(15°C) 오징어식해의 VBN함량 변화
(Unit : mg/100g)

Sample	저장기간(일)					
	0	4	8	12	16	20
Control (무첨가)	8.01±0.35 ^a	26.33±0.24 ^d	28.22±0.43 ^c	30.46±0.40 ^d	31.48±0.33 ^b	33.71±0.55 ^c
와사비잔사 0.5%	8.01±0.35 ^a	15.52±0.22 ^b	23.37±0.41 ^c	25.86±0.24 ^c	28.25±0.32 ^a	27.30±0.17 ^a
와사비잔사 1.5%	8.01±0.35 ^a	10.61±0.08 ^b	23.87±0.12 ^b	26.68±0.33 ^b	28.23±0.31 ^a	29.12±0.39 ^b
와사비잔사 3.0%	8.01±0.35 ^a	11.23±0.18 ^a	13.44±0.27 ^a	23.49±0.42 ^a	28.14±0.73 ^a	26.90±0.37 ^a

Values are mean±S.D. for three experiments.

(마) Biogenic amine 값의 변화

오징어식해의 15°C 저장 조건에서 고추냉이에탄올 추출물 잔사로 인한 저장기간 동안의 Biogenic amine 생성량을 확인하였다(그림 1). 일반적으로 수산식품이 부패하기 시작하면 amine함량 또한 증가하는 것으로 나타나는데 대표적인 amine물질 histamine, tyramine, cadaverine, putrescine 4가지 물질의 총합량을 측정한 결과 저장 4일부터 20일까지 control(무첨가)에서 0.3mg/100g에서 5.0mg/100g이상으로 다른 고추냉이 에탄올 추출물 잔사첨가 시료들에 비해 매우 높게 나타났다. 고추냉이 에탄올추출물 잔사 첨가구 중에서는 첨가함량이 높을수록 아민함량이 낮게 나타났다. 저장 20일차까지 3.0% 첨가구가 0.81mg/100g으로 가장 낮은 함량을 나타내었고, 0.5%와 1.5% 첨가구에서는 각각 2.1mg/100g, 1.2mg/100g 정도의 함량을 나타내었다. 이것으로 보아 고추냉이에탄올추출물 잔사물의 첨가량이 높을수록 저장성 향상에 기여하는 것으로 사료된다.

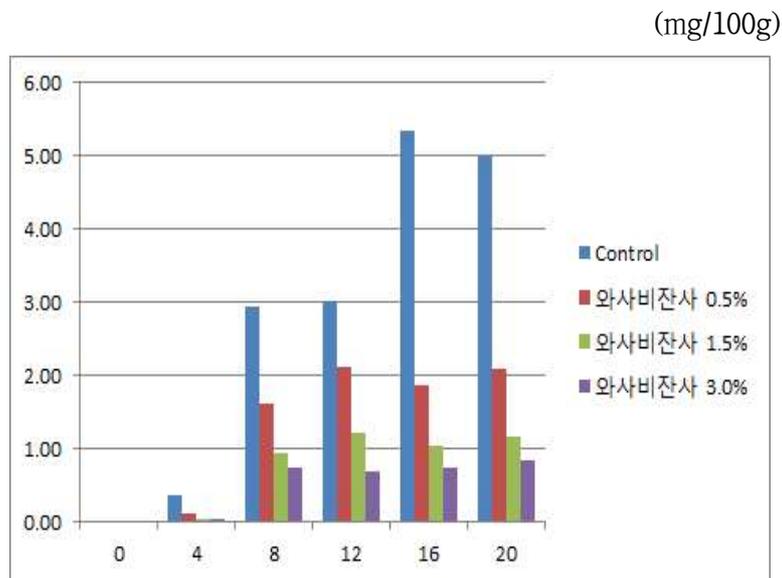


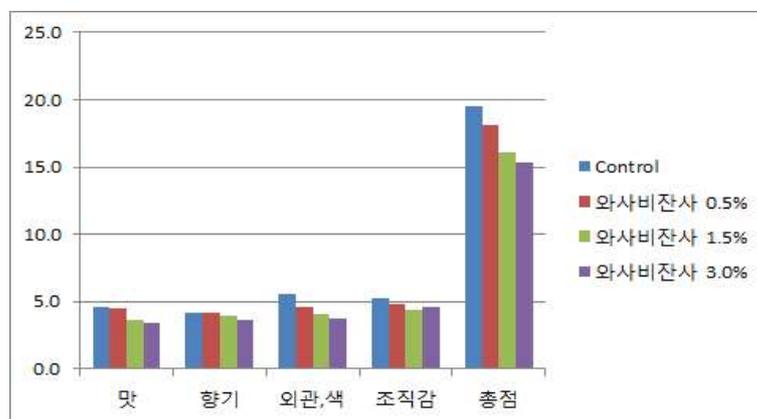
그림 1. 고추냉이에탄올추출물 잔사 첨가에 따른 저장중(15°C) 오징어식해의 Biogenic amine 값 변화.

(바) 제품의 관능검사

상기 제조된 오징어식해에 대해 식해의 향기, 맛, 색, 조직감에 잘 훈련된 15인의 panel을 구성하여 색, 맛, 향, 조직감, 전체적인 기호도에 대해 9단계 평점법 (매우 나쁘다, 1점 매우 좋다, 9점)으로 평가하였다. 통계처리는 Windows용 SPSS 20K version을 이용하여 분산분석을 실시하였으며 Duncan's multiple range test로 5%수준에서 시료간의 유의차를 검정하였다. 고추냉이에탄올 추출물잔사 첨가와 무첨가군 오징어식해 제품을 15인의 패널이 선정하여 관능평가를 실시한 결과는 도 2와 같다. 맛, 향, 외관, 색, 조직감 등 전체적인 총점에서 무첨가 오징어식해 제품의 관능평가점수가 가장 높게 나타났으며, 고추냉이 에탄올추출물 잔사의 첨가량이 많을수록 전체적인 관능평가에서 낮은 점수가 나타났다. 이는 고추냉이의 강한 향과 맛으로 인해 낮은 관능점수가 나타난 것으로 사료된다. 이것으로 보았을 때, 고추냉이 에탄올 추출물 잔사 첨가량의 최소로 하면서 가장 뛰어난 저장성을 나타내는 첨가비율을 정하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

상기 실험 결과를 요약하면, 고추냉이 에탄올 추출물 잔사의 첨가량을 각각 0%, 0.5%, 1.5%, 3.0%로 첨가하여 오징어식해의 관능평가를 실시한 결과 우선적으로 무첨가군의 관능점수가 가장 높게 나타났으며, 고추냉이에탄올추출물 잔사 첨가량이 높을수록 관능점수가 낮게 나타났다. 이것으로 볼 때 고추냉이에탄올추출물 잔사의 첨가량을 최소로 맛과 향을 살리고, 저장성을 향상시키는 첨가비율을 찾는 것이 제품개발에서 가장 중요한 점으로 확인되었다. 그리하여 상기의 각각의 첨가량으로 첨가하여 오징어식해의 저장성을 확인한 결과 pH에서는 각각의 시료에서 큰 차이가 나타나지 않았다. 하지만 VBN함량에서는 무첨가군의 오징어식해가 가장 높은 VBN함량을 나타내면서, 고추냉이에탄올추출물 잔사첨가가 단백질부패 억제에 기여함을 확인하였다. 하지만 잔사첨가량 0.5, 1.5%, 3.0%을 비교한 결과 첨가량이 높다고 VBN함량이 낮게 나타나지 않는 것으로 보아 잔사첨가량이 0.5%정도가 적당한 것으로 확인하였다. 또한 총균수에서도 저장 20일에 시료들간 비교한 결과 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. Biogenic amine의 총함량에서는 고추냉이에탄올추출물 잔사를 많이 첨가한 3.0%에서 월등히 낮은 함량을 나타내었으나, 전체적으로 아민의 총함량이 크게 나타나지 않았고, 관능평가 및 기타 저장성평가와 비교해 볼 때 무첨가군보다 우수했던 0.5% 잔사 첨가가 가장 적당한 것으로 확인되었다.

〈고추냉이에탄올추출물 잔사 첨가에 오징어식해의 관능평가〉
(점)



8. 포장지 종류와 포장기법을 달리한 식해의 저장성 비교

가. 재료 및 방법

(1) 재료

(가) 오징어식해의 제조

상기의 표준화된 오징어식해의 레시피를 이용하여 제조하였다.

(2) 실험방법

(가) 포장지 종류를 달리한 저장성 확인

오징어식해의 포장지 종류에 따른 저장성을 확인하기 위하여, 일반적으로 많이 사용하는 PET 용기포장을 control로 하여 PET+CCP 포장과 PET+Al+CCP 포장지를 이용하여 저장 12일간의 품질특성의 변화를 관찰하였다.

(나) 포장기법을 달리한 저장성 확인

오징어식해의 포장기법에 따른 저장성을 확인하기 위하여, 일반적인 공기포장과 질소포장, CO₂ 포장, 진공포장으로 각각 달리하여 12일간 품질특성의 변화를 확인하였다. 품질특성은 pH, VBN함량, 아미노태질소함량, 총균수, TBA를 확인하였고 시험법은 상기에 저장성 실험에 제시하였다.

나. 포장지 종류를 달리한 오징어식해의 저장기간 중 품질특성

(1) 포장지 종류에 따른 오징어식해의 휘발성염기질소(VBN)함량의 변화

숙성이 완료된 오징어식해를 PET, PET+CCP, PET+Al+CCP 각각의 포장지에 일반포장하여 10°C에서 0일에서 12일까지 저장기간동안의 VBN함량의 변화는 표 1을 보면 확인 할 수 있다. 초기 0일차의 시료의 VBN함량은 25.66 mg/100g을 나타내었고 저장 3일차부터 시료간의 유의적인 차이가 나타났다. 일반 PET포장의 경우 27.41 mg/100g 정도를 나타냈으며 PET+Al+CCP 포장은 25.51 mg/100g으로 가장 낮은 VBN함량을 나타내었다. 저장 6일차에도 PET포장과 PET+CCP 포장간에는 유의적인 차이가 나타나지 않았지만, PET+Al+CCP포장은 27.44 mg/100g으로 가장 낮은 함량을 나타냈으며 유의적으로 차이를 나타내었다. 저장 마지막차인 12일차 또한 PET, PET+CCP 포장에서 각각 31.80, 33.49 mg/100으로 소로간의 유의적인 차이는 나타나지 않았으며 빛이 차단된 PET+Al+CCP 포장에서 30.76 mg/100g으로 가장 낮은 VBN함량을 나타내었다.

<표 1. 저장 0~12일간 15°C 에서의 오징어식해의 VBN함량의 변화>

Treatment	0	3	6	9	12
PET	25.66±0.32 ^a	27.41±0.40 ^c	29.03±0.09 ^b	31.05±0.08 ^c	33.80±0.51 ^b
PET+CCP	25.66±0.32 ^a	26.56±0.21 ^b	29.16±0.11 ^b	30.28±0.32 ^b	33.49±0.42 ^b
PET+Al+CCP	25.66±0.32 ^a	25.51±0.24 ^a	27.44±0.37 ^a	29.33±0.18 ^a	30.76±0.51 ^a

^{a-c}Means with different letters in the same column are significantly different (P<0.05) by Duncan's multiple range test.

(2) 포장지 종류에 따른 오징어식해의 pH값의 변화

포장지 종류를 달리한 오징어식해의 12일 저장기간 동안 pH변화는 표 2와 같다. 초기 pH값은 5.89를 나타냈으며, 저장 3일차부터 시료간의 pH의 큰 차이가 나타나기 시작하였다. 3일차 PET 포장은 pH가 5.18로 가장 낮은 값을 나타내었다. 반면에 PET+Al+CCP 포장의 경우 5.73으로 pH의 변화가 크지 않았다. 저장 6일차에는 PET와 PET+CCP 포장의 pH는 4.72로 서로간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 반면에 PET+Al+CCP 포장의 경우는 4.80으로 가장 적은 pH 변화량을 나타내었다. 저장 마지막차인 12일차에 또한 PET+Al+CCP포장의 pH 4.54로 가장 적은 변화량을 나타내었고, 나머지 PET, PET+CCP 포장의 경우 pH가 각각 4.51, 4.52로 PET+Al+CCP에 비해 낮은 pH값을 나타내었다. 숙성이 빨리 진행 될수록 유기산이 증가하여 낮은 pH값을 나타낸다고 하는데, 이를 VBN함량의 변화와 비교해 볼 때 유사하게 변화함을 알 수 있었다.

<표 2. 저장 0~12일간 15°C 에서의 오징어식해의 pH값의 변화>

Treatment	0	3	6	9	12
PET	5.89±0.01 ^a	5.18±0.00 ^a	4.72±0.00 ^a	4.58±0.00 ^a	4.51±0.00 ^a
PET+CCP	5.89±0.01 ^a	5.67±0.00 ^b	4.72±0.00 ^a	4.58±0.00 ^a	4.52±0.00 ^b
PET+Al+CCP	5.89±0.01 ^a	5.73±0.00 ^c	4.80±0.00 ^b	4.60±0.00 ^b	4.54±0.00 ^c

^{a-c}Means with different letters in the same column are significantly different (P<0.05) by Duncan's multiple range test.

(3) 포장지 종류를 달리한 오징어식해의 아미노태질소함량의 변화

초기 0일차의 아미노태질소함량은 201.74 mg/100g 수준을 나타내었으며, 저장기간이 지날 수록 점점 증가하는 경향을 나타내었다. 저장 3일차까지는 PET+Al+CCP 포장의 215.42 mg/100g으로 가장 낮은 함량을 나타냈으나 저장 6일차부터는 PET, PET+CCP포장의 아미노태질소함량이 낮게 나타났다. 아미노태질소함량 또한 숙성이나 부패가 진행하면서 그 값이 상승한다고 보는데, 아미노태질소함량의 편차가 크게 나타났기 때문에, pH나 VBN함량과 유사한 변화량을 보여 주지는 않았다.

<표 3. 저장 0~12일간 15℃에서의 오징어식해의 아미노태질소함량의 변화>

Treatment	0	3	6	9	12
PET	201.74±5.25 ^a	217.60±3.23 ^c	223.94±1.37 ^a	225.57±2.31 ^b	241.01±4.06 ^c
PET+CCP	201.74±5.25 ^a	215.30±3.48 ^b	224.01±2.30 ^a	219.47±0.73 ^a	234.33±2.26 ^a
PET+Al+CCP	201.74±5.25 ^a	215.42±2.81 ^a	226.37±2.32 ^b	228.40±1.26 ^b	238.34±1.55 ^b

^{a-c}Means with different letters in the same column are significantly different (P<0.05) by Duncan's multiple range test.

(4) 포장지 종류를 달리한 오징어식해의 TBA값의 변화

유지산패의 정도를 알아보기 위해 저장기간 12일 동안 TBA값의 변화를 확인하였으며, 그 결과는 표 4와 같다. 초기 0일차 TBA값은 0.54 O/D를 나타내었으며, 3일차부터 시료간의 유의적인 차이가 나타나기 시작하였다. 3일차 PET의 TBA값은 0.74로 가장 높은 수준을 나타내었으며, PET+CCP와 PET+Al+CCP는 0.71로 PET포장에 비해 낮은 값을 나타내었다. 저장 9일차에는 PET, PET+CCP포장에 비해 PET+Al+CCP 포장에 0.69로 가장 낮은 TBA값을 나타내었으며, 이는 산패가 가장 적게 일어난 것으로 사료된다. 저장 마지막 12일까지도 PET+Al+CCP포장이 0.72 O/D로 다른 포장지에 비해 낮은 TBA값을 나타내었으며, PET+Al+CCP포장이 오징어식해의 산패를 저해하는 것을 알 수 있었다.

<표 4. 저장 0~12일간 15℃에서의 오징어식해의 TBA값의 변화>

Treatment	0	3	6	9	12
PET	0.54±0.41 ^a	0.74±0.00 ^b	0.65±0.04 ^{ab}	0.71±0.00 ^b	0.78±0.03 ^b
PET+CCP	0.54±0.41 ^a	0.71±0.01 ^a	0.62±0.00 ^a	0.73±0.02 ^b	0.76±0.02 ^b
PET+Al+CCP	0.54±0.41 ^a	0.71±0.00 ^a	0.66±0.00 ^b	0.69±0.00 ^a	0.72±0.01 ^a

^{a-b}Means with different letters in the same column are significantly different (P<0.05) by Duncan's multiple range test.

(5) 포장지 종류를 달리한 오징어식해의 총균수의 변화

오징어식해의 초기 숙성된 총균수는 6.1×10^6 CFU/g 정도를 나타냈으며, 저장기간이 길어질수록 총균수가 점점 증가하였다. 저장 3일차에 PET의 총균수는 2.0×10^7 CFU/g 으로 다른 포장지 PET+CCP와 PET+Al+CCP 각각 1.5×10^7 , 1.1×10^7 CFU/g으로 다른 포장지에 비해 높은 총균수를 나타내었다. 저장 6일부터 12일까지 PET의 총균수는 $3.41.1 \times 10^7$ CFU/g에서 1.3×10^8 CFU/g으로 가장 높은 총균수를 나타내었으며, PET+Al+CCP 포장지 1.8×10^7 CFU/g에서 7.3×10^7 CFU/g으로 가장 낮은 총균수를 나타내었다. 이를 보았을 때, VBN함량과 pH값의 변화와 유사한 결과로 나타내어지며, PET+Al+CCP포장지 오징어식해의 저장성 향상에 가장 좋은 것으로 판단되어 진다.

<표 5. 저장 0~12일간 15℃ 에서의 오징어식해의 총균수의 변화>

Treatment	(CFU/g)				
	0	3	6	9	12
PET	6.1×10^6	2.0×10^7	3.4×10^7	4.1×10^7	1.3×10^8
PET+CCP	6.1×10^6	1.5×10^7	2.7×10^7	4.0×10^7	8.2×10^7
PET+Al+CCP	6.1×10^6	1.1×10^7	1.8×10^7	3.2×10^7	7.3×10^7

다. 포장기법을 달리한 저장기간 중 오징어식해의 품질 특성

포장지 종류를 달리하여 PET+Al+CCP포장의 저장성이 가장 뛰어난 것을 확인하였고, 이것을 바탕으로 포장기법 일반, CO₂, 질소, 진공포장으로 각각 달리하여 저장성을 확인 하였다.

(1) 포장기법을 달리한 오징어식해의 저장기간 중 pH값의 변화

포장기법을 달리한 오징어식해의 저장성은 표 1에 나타내었다. 초기 0일차의 pH는 6.07을 나타내었으며, 저장기간이 자날수록 유기산의 생성을 촉진되어 전체적인 pH값이 낮아지는 것을 알 수 있었다. 저장 3일차에 PET+Al+CCP 포장에서 4.03으로 유의적으로 가장 낮은 pH값을 나타내었지만 0.01단위로 측정값 자체로는 큰 차이가 없었다. 저장 마지막 12일차에 PET+Al+CCP+진공포장이 3.82로 가장 적은 pH변화량을 나타내었으며, PET+Al+CCP+질소포장이 3.80으로 적은 변화량을 나타내었다. 일반 PET 용기포장이 3.76으로 가장 큰 pH변화량을 보였으며, 이러한 결과로 보아 진공포장이 어느 정도 유기산의 증식을 억제하여 저장성 향상에 영향을 주는 것으로 사료된다.

<표 1. 저장 0~12일간 15°C에서의 오징어식해의 pH값의 변화>

Treatment	0	3	6	9	12
PET	6.07±0.00 ^a	4.05±0.00 ^b	3.88±0.00 ^a	3.90±0.00 ^a	3.76±0.00 ^a
PET+Al+CCP	6.07±0.00 ^a	4.03±0.00 ^a	3.89±0.00 ^b	3.91±0.01 ^a	3.77±0.00 ^b
PET+Al+CCP+진공	6.07±0.00 ^a	4.07±0.00 ^d	3.90±0.00 ^c	3.92±0.00 ^b	3.82±0.00 ^d
PET+Al+CCP+CO ₂	6.07±0.00 ^a	4.05±0.00 ^b	3.90±0.00 ^c	3.92±0.00 ^b	3.77±0.00 ^b
PET+Al+CCP+질소	6.07±0.00 ^a	4.06±0.00 ^c	3.92±0.00 ^d	3.91±0.00 ^a	3.80±0.00 ^c

^{a-d}Means with different letters in the same column are significantly different (P<0.05) by Duncan's multiple range test.

(2) 포장기법을 달리한 오징어식해의 저장기간 중 VBN함량의 변화

단백질 부패도를 알아보기 위해서 12일간 15°C에서 오징어식해의 VBN함량을 확인하였다. 초기 VBN함량은 6.80 mg/100g을 나타냈으며, 저장 3일부터 시료간의 유의적인 차이가 나타나기 시작하였다. 초기 3일차에는 PET+Al+CCP 포장이 19.92 mg/100g으로 가장 낮은 함량을 나타내었으며 질소, CO₂, 진공 포장은 22.88-23.75 mg/100g으로 PET와 PET+Al+CCP 포장에 비해 높은 VBN함량을 나타내었다. 저장 9일차까지도 비슷한 경향을 나타내었다. 저장 12일 차에는 진공포장이 35.67 mg/100g으로 가장 높은 VBN함량을 나타내었는데 pH에서는 변화량이 가장적어 어느정도의 단백질 부패억제도 예상하였으나 반대의 결과가 나타났다. 또한 일반 PET 포장 또한 35.10 mg/100g으로 높은 VBN함량을 나타내었으며, 나머지 PET+Al+CCP와 PET+Al+CCP 질소포장도 VBN함량의 유의적인 차이는 없었으며, CO₂포장이 32.10 mg/100g으로 가장 낮은 함량을 나타내었다.

<표 2. 저장 0~12일간 15°C에서의 오징어식해의 VBN함량의 변화>

Treatment	0	3	6	9	12
PET	6.80±0.24 ^a	21.55±0.47 ^b	26.01±0.78 ^b	29.25±0.50 ^b	35.10±0.45 ^c
PET+Al+CCP	6.80±0.24 ^a	19.92±0.36 ^a	24.39±0.55 ^a	28.77±0.19 ^a	33.71±0.36 ^b
PET+Al+CCP+진공	6.80±0.24 ^a	23.01±0.24 ^c	26.30±0.73 ^c	30.49±0.14 ^c	35.67±0.46 ^c
PET+Al+CCP+CO ₂	6.80±0.24 ^a	23.75±0.54 ^c	27.20±0.73 ^c	31.60±0.14 ^d	32.10±0.11 ^a
PET+Al+CCP+질소	6.80±0.24 ^a	22.88±0.82 ^c	27.48±0.40 ^c	30.58±0.22 ^c	34.26±0.72 ^b

^{a-d}Means with different letters in the same column are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

(3) 포장기법을 달리한 오징어식해의 저장기간 중 TBA가의 변화

유지의 산패를 보기위한 TBA값 측정에서 초기 TBA가는 0.22 O/D를 나타내었으며, 전체적으로 시료간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 또한 저장 12일차까지도 0.33~0.34 O/D로 시료간의 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 0일차와 비교했을 때 그 변화량이 거의 없는 것으로 판단되었다.

<표 3. 저장 0~12일간 15°C 에서의 오징어식해의 TBA가의 변화>

Treatment	0	3	6	9	12
PET	0.22±0.06 ^a	0.36±0.00 ^c	0.28±0.00 ^b	0.31±0.02 ^{ab}	0.34±0.01 ^a
PET+Al+CCP	0.22±0.06 ^a	0.35±0.00 ^b	0.28±0.00 ^b	0.32±0.01 ^a	0.34±0.00 ^a
PET+Al+CCP+진공	0.22±0.06 ^a	0.34±0.00 ^a	0.28±0.00 ^b	0.28±0.02 ^b	0.33±0.02 ^a
PET+Al+CCP+CO ₂	0.22±0.06 ^a	0.35±0.00 ^b	0.28±0.00 ^b	0.31±0.00 ^{ab}	0.34±0.01 ^a
PET+Al+CCP+질소	0.22±0.06 ^a	0.38±0.00 ^d	0.26±0.00 ^a	0.29±0.02 ^b	0.33±0.02 ^a

^{a-c}Means with different letters in the same column are significantly different (P<0.05) by Duncan's multiple range test.

(5) 포장기법을 달리한 오징어식해의 저장기간 중 총균수의 변화

저장 12일간 오징어식해의 총균수 변화는 표 4와 같다. 초기 총균수는 3.4×10⁶ CFU/g을 나타내었으며, 저장 3일에서 12일까지 전체적으로 10⁸ CFU/g정도를 나타내었다. 일반적으로 식해 자체의 균이 대부분 유산균으로 볼 때 12일차에 pH값과 비례적으로 진공포장에서 1.9×10⁸ CFU/g으로 다른 포장들에 비해 적은 총균수를 나타내었다. 하지만 전체적으로 10⁸ CFU/g을 나타내었으며 총균수에 큰 차이는 없는 것으로 사료된다.

<표 4. 저장 0~12일간 15°C 에서의 오징어식해의 총균수의 변화>

Treatment	0	3	6	9	12
PET	3.4×10 ⁶	8.0×10 ⁸	4.2×10 ⁸	6.1×10 ⁸	5.0×10 ⁸
PET+Al+CCP	3.4×10 ⁶	4.6×10 ⁸	4.5×10 ⁸	5.4×10 ⁸	3.1×10 ⁸
PET+Al+CCP+진공	3.4×10 ⁶	8.0×10 ⁸	3.1×10 ⁸	1.5×10 ⁸	1.9×10 ⁸
PET+Al+CCP+CO ₂	3.4×10 ⁶	5.6×10 ⁸	4.2×10 ⁸	2.5×10 ⁸	3.4×10 ⁸
PET+Al+CCP+질소	3.4×10 ⁶	1.9×10 ⁸	4.5×10 ⁸	2.7×10 ⁸	2.2×10 ⁸

(라) 포장지종류 및 포장방법의 최적화

본 연구에서는 포장지의 종류와 포장방법을 달리하여 식해의 저장성 향상에 좋은 포장기법을 확인하였다. 첫단계로 PET, PET+CCP, PET+Al+CCP 3가지 포장지를 이용한 식해의 저장성을 확인하였는데, 최종 적으로 PET+Al+CCP 포장이 VBN함량이 30.76 mg/100g으로 가장 낮았고, pH값의 변화 또한 가장 적었다. 그리고 TBA값과 총균수 또한 가장 적게 나타났기 때문에, 알루미늄이 적층된 PET+Al+CCP 포장이 가장 우수한 포장지로 선택하게 되었다. 그 후 PET+Al+CCP 포장을 이용하여 질소, 진공, CO₂포장, 일반포장으로 포장방법을 달리하여 식해의 저장성을 비교해 보았다. 총균수나 VBN함량, TBA가, pH 등을 비교 분석한 결과 시료간의 저장성 향상에 큰 차이는 나타나지 않았지만 진공포장이 pH의 변화량과 총균수의 증가가 가장 적었기 때문에 다른 포장들에 비해 식해의 저장성에 안정적인 것으로 판단되었다. 최종적으로 본 연구를 통하여 식해의 포장에 PET+Al+CCP+진공포장이 가장 적절한 것으로 사료된다.

9. 식해의 starter 후보균의 적용 (Industry scale)

가. 가자미식해의 starter 후보균의 적용 (Industry scale)

(1) 재료 및 방법

(가) 가자미식해 제조

고려대학교에서 분리한 가자미식해 우수 후보균을 (주)정이푸드빌에서 Industry scale로 제조하였다. 가자미는 한국의 동해안에서 어획된 가자미를 동결된 상태로 해동 후 사용하였다. 부재료는 고춧가루, 마늘, 생강, 설탕, 좁쌀, 무, 소금을 사용하였고 제조방법은 상기의 가자미식해의 최적화된 레시피를 사용하였으며 표 22와 같다. 가자미는 머리, 지느러미와 내장을 제거하고 4-5등분으로 세절하여 가자미 무게의 20% 비율의 소금으로 염장 (20℃, 24 시간)후 수돗물로 3회 세척하고, 20℃에서 탈수한 후, 각 재료를 표 22.의 비율로 혼합하였다. 최종 스타터 후보균으로 사용할 젖산균의 경우 동결건조를 통해 파우더 형태로 조제하여 재료 혼합단계에서 전체 무게의 1%를 첨가하였다. 제조가 완료된 가자미식해는 우수 스타터 후보균 첨가균과 비첨가균으로 나누어 플라스틱 밀폐용기에 옮겨 담은 후 15℃ cool incubator에서 14일간 발효하였고, 이 후에 숙성은 4℃에서 진행하였다.

<표 22. 가자미식해 제조 비율>

Materials	Weight ratio (%)
Flat fish (20% salted)	72
Red pepper powder	7
Ginger	1
MSG	1
Sugar	3
glutinous Millet	4
Garlic	3
Salted Radish(1% salt)	8
Starter Culture	1

(나) 우수 후보균의 동정

선별된 분리주의 동정을 위해 발효능력시험 (fermentation potential test)과 16S ribosomal RNA (rRNA) sequence analysis를 실시 하였다. 당 발효능력을 확인하기 위해 API 50 CH strip

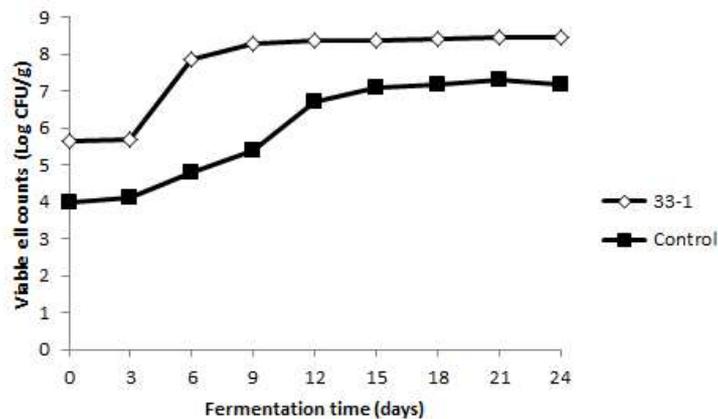
과 API 50 CHL Medium (bioMerieux, sa 69280 Marcy l'Etoile, France)을 이용하였으며, 결과는 24, 48시간 후에 확인하였다. 분리주의 genomic DNA는 genomic DNA isolation kit (Intron, Sungnam, Korea)를 이용하여 분리하였으며, bacteria의 16S ribosomal DNA에 특이적인 primer를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. PCR condition은 35 cycle (1 min at 94°C, 1 min at 58°C, 2 min at 72°C)과 elongation의 1 cycle (7 min at 72°C)로 이루어졌으며 16S rRNA sequencing 결과를 이용하여 genbank의 blast 검색을 통해 GABA 생산 균주를 동정하였다.

(2) 실험결과

(가) 미생물학적 분석 결과

1) 우수 starter 후보균을 적용한 가자미식해의 총균수 변화

33-1 균주 (*Lactobacillus brevis*)를 적용한 실험군의 경우, 발효기간 동안 총균수는 발효 개시일로부터 9일까지 5.65 log CFU/g으로부터 8.30 log CFU/g으로 증가하였고, 이후 숙성 24일까지 비슷한 균수를 유지하였다. 대조군인 스타터 무첨가 실험군의 경우, 발효기간 동안 총균수는 발효 개시일로부터 12일까지 4.15 log CFU/g으로부터 7.00 log CFU/g으로 증가하였고, 그 이후로 숙성 24일까지 비슷한 균수를 유지하였다. 33-1 균주를 적용한 실험군과 대조군을 비교하여 보았을 때, 33-1 균주 적용군이 대조군보다 빠른 균수 증가를 보였다.

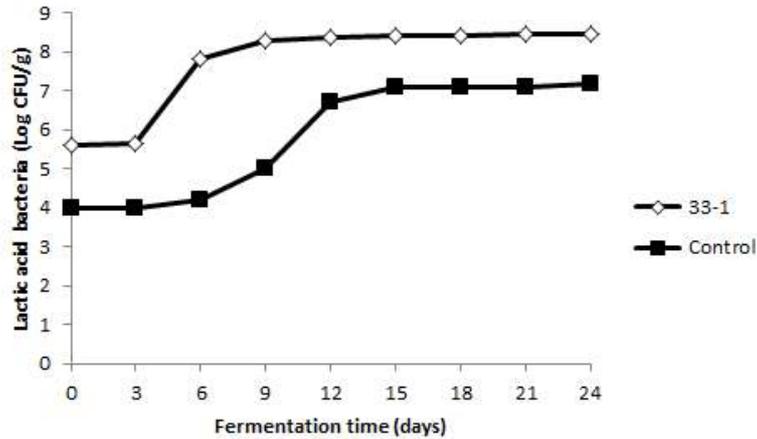


<그림 15. 우수 스타터 후보균을 적용한 가자미식해의 발효기간 동안 총균수 변화>

2) 우수 starter 후보균을 적용한 가자미식해의 젖산균수 변화

33-1 균주를 적용한 실험군의 경우, 발효기간 동안 젖산균수는 발효 개시일로부터 9일까지 5.90 log CFU/g으로부터 8.30 log CFU/g으로 증가하였고, 이후 숙성 24일까지 비슷한 균수를

유지하였다. 대조군인 후보균 무첨가 실험군의 경우, 발효기간 동안 젖산균수는 발효 개시일로부터 12일까지 4.10 log CFU/g으로부터 6.99 log CFU/g으로 증가하였고, 그 이후로 숙성 24일까지 비슷한 균수를 유지하였다. 33-1 균주를 적용한 실험군과 대조군을 비교하여 보았을 때, 33-1 균주 적용군이 대조군보다 빠른 균수 증가를 보였다. 그림 15, 16.과 같이 각 실험군에서의 총 균수와 젖산균수의 변화 또한 동일한 양상을 나타내는 것으로 보아 가자미식해의 총 균은 대부분 젖산균에 의해 지배되는 것으로 사료된다.

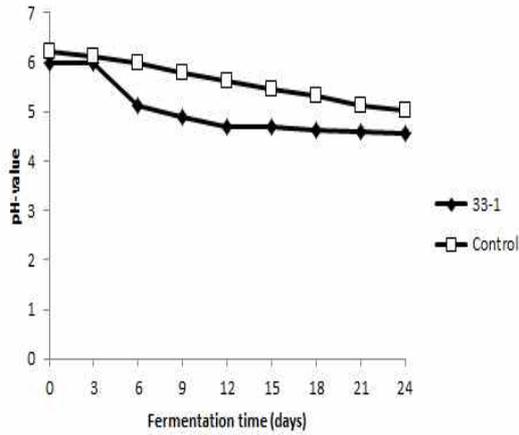


<그림 16. 우수 스타터 후보균을 적용한 가자미식해의 발효기간 동안 젖산균수 변화>

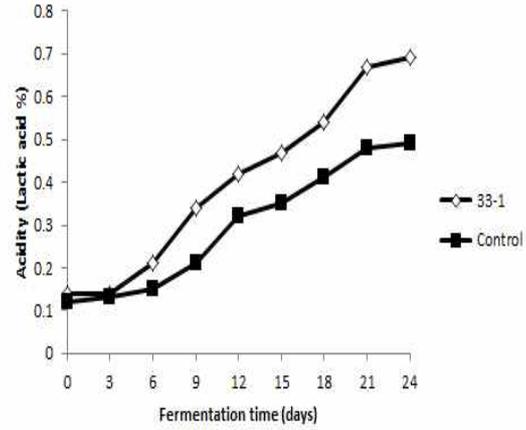
(나) 이화학적 분석결과

1) pH 및 산도의 변화

33-1 균주를 적용한 가자미식해의 pH값은 발효 개시일부터 14일까지 pH 5.98에서 pH 4.69로 감소하는 것을 확인하였고 이후 숙성 24일까지 pH 값이 약 4.57로 유지되는 것을 확인하였다. 산도의 경우 발효 개시일부터 발효 14일후에 0.14%에서 0.50%까지 증가하는 것을 확인하였고, 이후 숙성 24일까지 약 0.7%의 산도로 증가함을 확인하였다. 그 이후로는 0.7%대로 유지됨을 확인하였다 (data not shown). 우수 스타터 후보균을 적용한 가자미식해와 비교하여 자연발효시킨 가자미식해의 경우 산도는 발효 24일에 약 0.55%로서 실험군과 비교하여 낮은 수치를 나타내었고, pH 값의 경우에도 발효 24일에 4.92로 실험군과 비교하여 보았을 때, 더 높은 pH를 유지하였다.



<그림 17. 우수 스타터 후보균을 적용한 가자미식해의 발효기간 동안 pH 변화>



<그림 18. 우수 스타터 후보균을 적용한 가자미식해의 발효기간 동안 산도 변화>

2) 염도의 변화

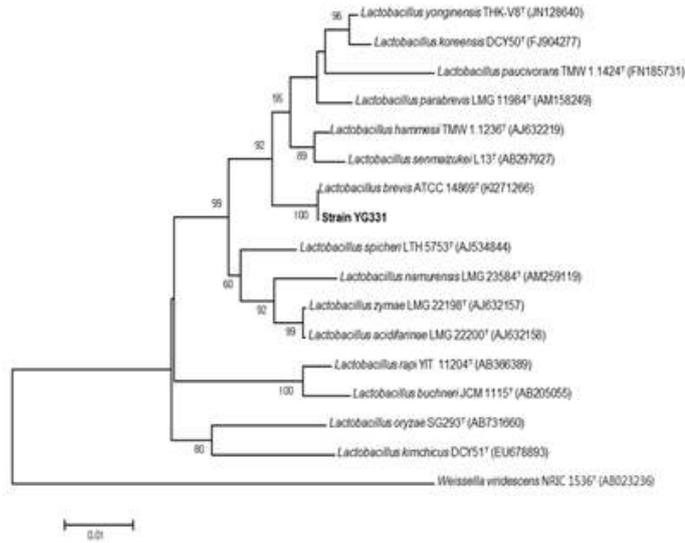
염도의 경우 각각의 균주를 적용한 가자미식해는 발효 및 숙성기간 동안 큰 변화가 없이 평균 3.47%를 나타내었고, 수분활성도 또한 약 0.92의 수분활성도 값을 유지하는 것으로 나타났다.

<표 23. 우수 후보균주 첨가 가자미식해의 발효 기간별 수분활성도 및 염도 변화 결과>

Fermentation days	aw	Salt content (%)
0	0.941 ± 0.00	3.42 ± 0.01
3	0.939 ± 0.00	3.45 ± 0.01
6	0.939 ± 0.00	3.44 ± 0.01
9	0.925 ± 0.00	3.42 ± 0.01
12	0.924 ± 0.00	3.45 ± 0.00
15	0.922 ± 0.00	3.50 ± 0.01
18	0.920 ± 0.00	3.49 ± 0.01
21	0.919 ± 0.00	3.51 ± 0.01
24	0.920 ± 0.00	3.53 ± 0.01

(다) 가자미식해 우수 후보균주 동정결과

가자미식해 제조에 적용한 우수 후보균주를 16S rRNA sequence analysis를 통하여 동정한 결과를 그림 19.에 표기하였다. 16S rRNA sequence analysis 결과 *Lactobacillus brevis*가 97%의 상동성을 보여 최종적으로 *Lactobacillus brevis*로 동정하였다.



<그림 19. 가자미식해 제조에 적용한 우수 후보균주의 16S rRNA sequence 동정 결과>

나. 선별한 명태식해의 starter 후보균의 적용 (Industry scale)

(1) 재료 및 방법

(가) 명태식해 제조

명태식해 우수 후보균 (M-1)을 적용하여 Industry scale로 제조하였다. 명태는 러시아에서 어획된 명태를 동결된 상태로 해동 후 사용하였다. 부재료는 고춧가루, 마늘, 생강, 설탕, 좁쌀, 무, 소금을 사용하였고 제조방법은 다음과 같다. 명태는 머리, 지느러미와 내장을 제거하고 4-5 등분으로 세절하여 명태포 무게의 20% 비율의 소금으로 염장 (20℃, 24 시간)후 수돗물로 3회 세척하고, 20℃에서 탈수한 후, 상기의 명태식해의 최적화된 제조공정으로 제조하였으며 표 38. 과 같다. 최종 스타터 후보균으로 사용할 젖산균의 경우 동결건조를 통해 파우더 형태로 조제하여 재료 혼합단계에서 전체 무게의 1%를 첨가하였다. 제조가 완료된 명태식해는 우수 스타터 후보균 첨가균과 비첨가균으로 나누어 플라스틱 밀폐용기에 옮겨 담은 후 15℃ cool incubator에서 14일간 발효하였고, 이 후에 숙성은 4℃에서 진행하였다.

〈표 38. 명태식해 제조 비율〉

Materials	Weight ratio (%)
Sliced Alaska pollack	74
Red pepper powder	8
Ginger	1
MSG	1
Sugar	3
Glutinous Millet	3
Garlic	2
Salted Radish(1% salt)	7
Starter Culture	1

(나) 우수 후보균의 동정

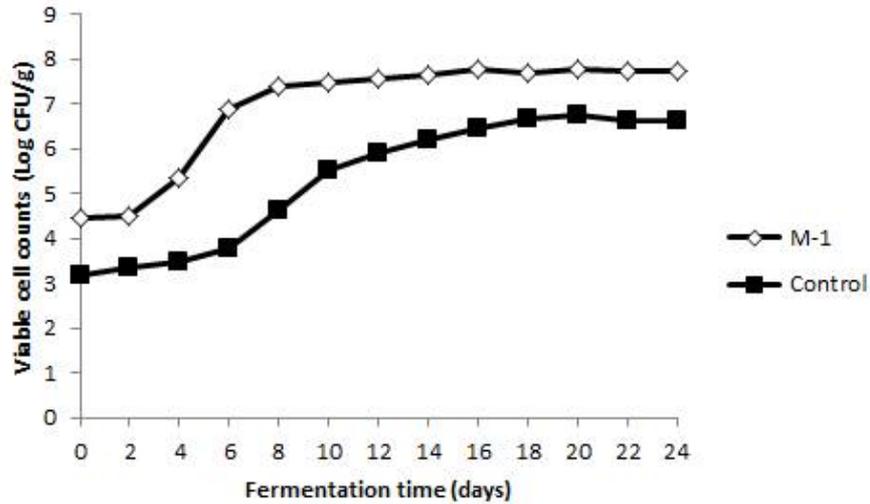
선별된 분리주 (M-1)의 동정을 위해 발효능력시험 (fermentation potential test)과 16S ribosomal RNA (rRNA) sequence analysis를 실시 하였다. 당 발효능력을 확인하기 위해 API 50 CH strip과 API 50 CHL Medium (bioMerieux, sa 69280 Marcy l'Etoile, France)을 이용하였으며, 결과는 24, 48시간 후에 확인하였다. 분리주의 genomic DNA는 genomic DNA isolation kit (Intron, Sungnam, Korea)를 이용하여 분리하였으며, bacteria의 16S ribosomal DNA에 특이적인 primer를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. PCR condition은 35 cycle (1 min at 94°C, 1 min at 58°C, 2 min at 72°C)과 elongation의 1 cycle (7 min at 72°C)로 이루어졌으며 16S rRNA sequencing 결과를 이용하여 genbank의 blast 검색을 통해 GABA 생산 균주를 동정하였다

(2) 실험결과

(가) 미생물학적 분석 결과

1) 우수 starter 후보균을 적용한 명태식해의 총균수 변화

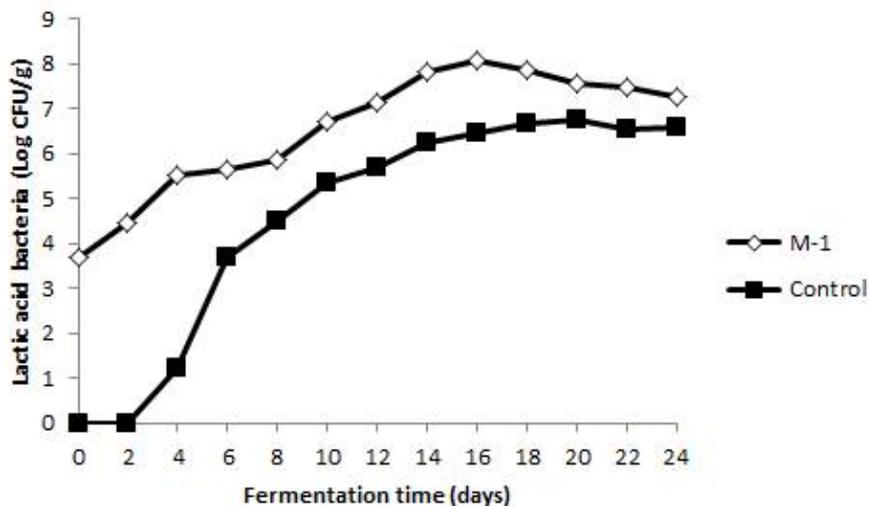
M-1 균주를 적용한 실험군의 경우, 발효기간 동안 총 균수는 발효 개시일로부터 10일까지 4.48 log CFU/g으로부터 7.48 log CFU/g으로 증가하였고, 이후 숙성 24일까지 비슷한 균수를 유지하였다. 대조군인 스타터 무첨가 실험군의 경우, 발효기간 동안 총 균수는 발효 개시일로부터 12일까지 3.19 log CFU/g으로부터 5.89 log CFU/g으로 증가하였고, 그 이후로 숙성 24일까지 비슷한 균수를 유지하였다. M-1 균주를 적용한 실험군과 대조군을 비교하여 보았을 때, M-1 균주 적용균이 대조군보다 빠른 균수 증가를 보였다.



<그림 31. 우수 스타터 후보균을 적용한 명태식해의 발효기간 동안 총균수 변화>

2) 우수 starter 후보균을 적용한 명태식해의 젖산균수 변화

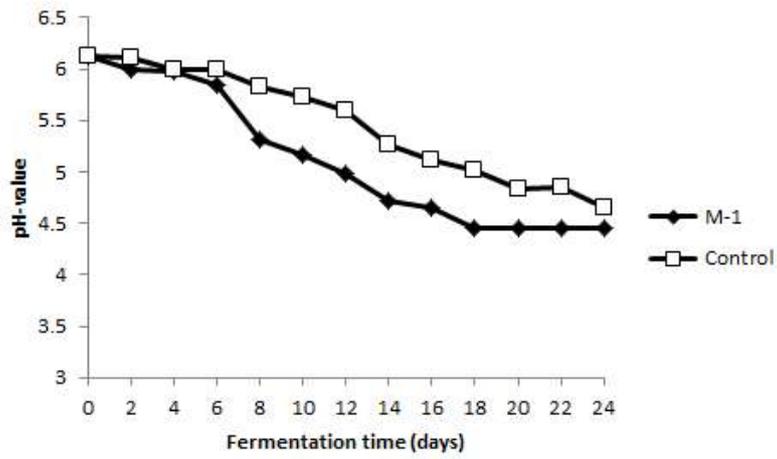
M-1 균주를 적용한 실험군의 경우, 발효기간 동안 총 젖산균수는 발효 개시일로부터 14일까지 3.71 log CFU/g으로부터 7.83 log CFU/g으로 증가하였고, 이후 숙성 24일까지 비슷한 균수를 유지하였다. 대조군인 스타터 무첨가 실험군의 경우, 발효 초기에는 젖산균이 발견되지 않았으나 이후 점점 증가하여 발효 12일에는 5.89 log CFU/g으로 증가하였고, 그 이후로 숙성 24일까지 비슷한 균수를 유지하였다. M-1 균주를 적용한 실험군과 대조군을 비교하여 보았을 때, M-1 균주 적용군이 대조군보다 빠른 균수 증가를 보였다.



<그림 32. 우수 스타터 후보균을 적용한 명태식해의 발효기간 동안 젖산균수 변화>

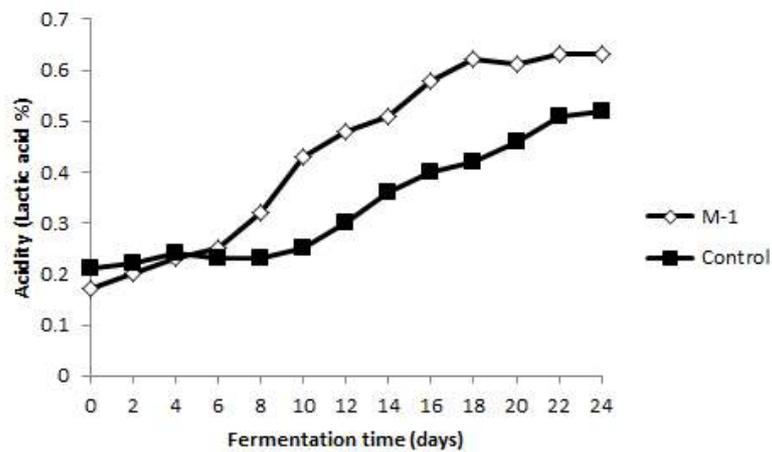
(나) 이화학적 분석결과

1) pH 변화



<그림 33. 우수 스타터 후보균을 적용한 명태식혜의 발효기간 동안의 pH 변화>

2) 산도 변화



<그림 34. 우수 스타터 후보균을 적용한 명태식혜의 발효기간 동안의 산도 변화>

M-1 균주를 적용한 명태식해의 pH값은 발효 개시일부터 18일까지 pH 6.13에서 pH 4.45로 지속적으로 감소하는 것을 확인하였고, 이후 숙성 24일까지 pH 값이 약 4.45로 유지되는 것을 확인하였다. 산도의 경우 발효 개시일부터 발효 14일후에 0.17%에서 0.51%까지 증가하는 것을 확인하였고, 이후 숙성 24일까지 약 0.6%의 산도로 증가함을 확인하였다. 그 이후로는 0.6%대로 유지됨을 확인하였다 (data not shown).

우수 스타터 후보균을 적용한 명태식해와 비교하여 자연발효시킨 명태식해의 경우 산도는 발효 24일에 약 0.52%로서 실험군과 비교하여 낮은 수치를 나타내었고, pH 값의 경우에도 발효 24일에 4.65로 실험군과 비교하여 보았을 때, 더 높은 pH를 유지하였다.

3) 염도 변화

<표 39. 우수 후보균주 첨가 가자미식해의 발효 기간별 수분활성도 및 염도 변화 결과>

Fermentation days	aw	Salt content (%)
0	0.941 ± 0.00	3.42 ± 0.01
3	0.939 ± 0.00	3.45 ± 0.01
6	0.939 ± 0.00	3.44 ± 0.01
9	0.925 ± 0.00	3.42 ± 0.01
12	0.924 ± 0.00	3.45 ± 0.00
15	0.922 ± 0.00	3.50 ± 0.01
18	0.920 ± 0.00	3.49 ± 0.01
21	0.919 ± 0.00	3.51 ± 0.01
24	0.920 ± 0.00	3.53 ± 0.01

염도의 경우 각각의 균주를 적용한 가자미식해는 발효 및 숙성기간 동안 큰 변화가 없이 평균 3.47%를 나타내었고, 수분활성도 또한 약 0.92의 수분활성도 값을 유지하는 것으로 나타났다.

(다) 최종 우수 후보균을 적용한 명태식해의 위생·안전성

1) 제조한 명태식해의 병원성 미생물

명태식해는 제조 시 사용되는 명태 원물의 경우 멸균 처리 과정이 없기 때문에 어패류에 존재할 수 있는 병원성미생물 (*Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*)이 검출 될 가능성이 있다. 이를 확인하기 위해 명태식해의 원료 및 부재료와 발효 및 숙성기간 동안 명태식해에서의 병원성미생물을 확인한 결과 각 스타터 후보균을 적용한 실험군과 자연발효시킨 대조군에서 모두 검출되지 않는 것을 확인하였다. 그 결과는 표 40, 41. 과 같다.

<표 40. 명태식해 원료 및 부원료의 병원성 미생물 검출 결과>

Materials	EO	SS	SA	LM	VP
Alaska pollack	ND*	ND	ND	ND	ND
Galric	ND	ND	ND	ND	ND
Ginger	ND	ND	ND	ND	ND
Radish	ND	ND	ND	ND	ND

*ND : not detected, (-) : negative

1) EO: *Escherichia coli* O157:H7; SS: *Salmonella* spp.; SA: *Staphylococcus aureus*, LM: *Listeria monocytogenes*, VP: *Vibrio parahaemolyticus*

<표 41. 제조한 명태식해의 발효기간 동안 병원성 미생물 검출 결과>

Test microorganisms	Fermentation days									
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	
EO	ND*	ND								
SS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
VP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*ND : not detected, (-) : negative

1) EO: *Escherichia coli* O157:H7; SS: *Salmonella* spp.; SA: *Staphylococcus aureus*, LM: *Listeria monocytogenes*, VP: *Vibrio parahaemolyticus*

2) 우수 후보균주를 적용한 명태식해의 바이오제닉아민 (BAs) 함량 변화

<표 42. 우수 starter를 적용한 명태식해의 발효기간 중 아민 함량 변화 관찰 결과>

Day	Biogenic amines (mg/kg)						
	Trp ^a	Phe	Put	His	Tyr	Spd	Spm
0	ND ^b	23.01 ± 0.15 ^c	ND	24.54 ± 0.06	ND	ND	2.33 ± 0.01
3	ND	17.34 ± 1.17	ND	25.11 ± 0.65	ND	ND	1.88 ± 0.00
6	0.03 ± 0.00	16.95 ± 0.41	ND	27.16 ± 0.90	ND	ND	ND
9	ND	18.35 ± 1.22	ND	26.31 ± 1.29	ND	ND	ND
12	ND	19.99 ± 0.30	ND	28.65 ± 0.01	ND	ND	0.08 ± 0.00
15	ND	16.34 ± 0.01	ND	31.31 ± 1.22	ND	ND	ND
18	ND	17.35 ± 0.22	ND	33.32 ± 1.01	ND	ND	ND
21	ND	18.37 ± 0.18	ND	30.98 ± 0.20	ND	ND	ND
24	ND	15.55 ± 0.39	ND	28.45 ± 1.09	ND	ND	ND

^a Trp: tryptamine, Phe: β -phenylethylamine, Put: putrescine, His: histamine, Tyr: tyramine, Spd: spermidine, Spm: spermine

^bND: Not detected (amine level is less than 0.1 mg/kg)

^cMean ± standard deviation.

우수 starter를 적용하여 제조한 명태식해의 바이오제닉 아민 함량을 분석한 결과는 표. 42 와 같다. 그 결과 β -phenylethylamine의 평균 함량은 18.14 mg/kg, histamine의 평균 함량은 28.45 mg/kg, spermine의 평균 함량은 1.43 mg/kg을 나타내었고, 다른 아민들은 검출되지 않은 것을 확인하였다.

3) 우수 후보균주를 적용한 명태식해의 발효기간 중 GABA 함량 변화

<표 43. 우수 후보균주를 첨가한 명태식해의 발효기간 중 GABA 함량 변화 관찰 결과>

Compound	Ripening periods (mg/kg)								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
GABA	ND ^a	30.20 ± 7.01 ^b	37.41 ± 2.25	35.39 ± 6.20	37.31 ± 1.35	36.30 ± 2.58	38.11 ± 1.09	39.27 ± 0.29	41.03 ± 1.32

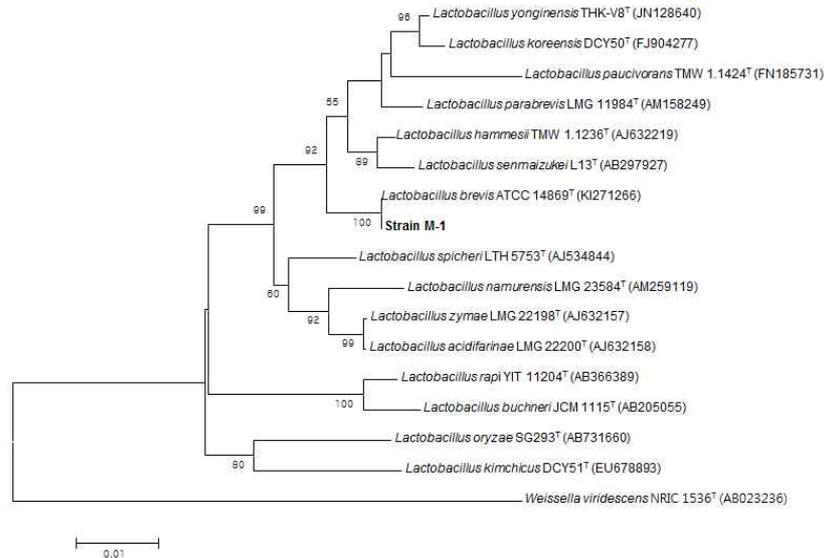
^aND: Not detected (amine level is less than 0.1 mg/kg)

^bMean ± standard deviation.

우수 starter를 적용하여 제조한 명태식해의 GABA 함량을 분석한 결과는 표. 43 과 같다. 그 결과 발효 기간동안 GABA 함량 변화는 0일차를 제외하고는 큰 차이를 보이지는 않았으며, GABA의 평균 함량은 37.13 mg/kg을 나타내었다.

(라) 명태식해 최종 우수 후보균주 동정결과

명태식해 제조에 적용한 우수 후보균주를 16S rRNA sequence analysis를 통하여 동정한 결과를 그림 35.에 표기하였다. 16S rRNA sequence analysis 결과 *Lactobacillus brevis*가 99%의 상동성을 보여 최종적으로 *Lactobacillus brevis*로 동정하였다.



<그림 35. 명태식해 제조에 적용한 우수 후보균주의 16S rRNA sequence 동정 결과>

다. 선별한 오징어식해의 starter 후보균의 적용 (Industry scale)

(1) 재료 및 방법

(가) 오징어식해 제조

고려대학교에서 분리한 오징어식해 우수 후보균 (B-1)을 적용하여 industry scale로 제조하였다. 오징어는 국내에서 어획된 오징어를 동결된 상태로 해동 후 사용하였다. 부재료는 고춧가루, 마늘, 생강, 설탕, 물엿, 좁쌀, 무, 소금을 사용하였고 제조방법은 다음과 같다. 오징어는 머리, 다리, 내장을 제거하고 세절하여 오징어 무게의 7% 비율의 소금으로 염장 (20°C, 24 시간) 과 오징어 무게의 12% 물엿과 설탕으로 당장 (설탕:물엿=50:50, 20°C, 24시간) 후 수돗물로 3회 세척하고, 20°C 에서 탈수한 후, 상기의 표준화된 오징어식해의 제조공정에 따라 제조하였으며 표 47. 의 비율로 혼합하였다. 최종 스타터 후보균으로 사용할 젖산균의 경우 동결건조를 통해 파우더 형태로 조제하여 재료 혼합단계에서 전체 무게의 1%를 첨가하였다. 제조가 완료된 오징어식해는 우수 스타터 후보균 첨가균과 비첨가균으로 나누어 플라스틱 밀폐용기에 옮겨 담은 후 15°C cool incubator에서 14일간 발효하였고, 이 후에 숙성은 4°C 에서 진행하였다.

<표 59. 오징어식해 제조 비율>

Materials	Weight ratio (%)
Sliced squid	45
Red pepper powder	2
Ginger	0.5
MSG	1
Sugar	5
Glutinous Millet	3.5
Garlic	2
Salted Radish (1% salt)	40
Starter Culture	1

(나) 우수 후보균의 동정

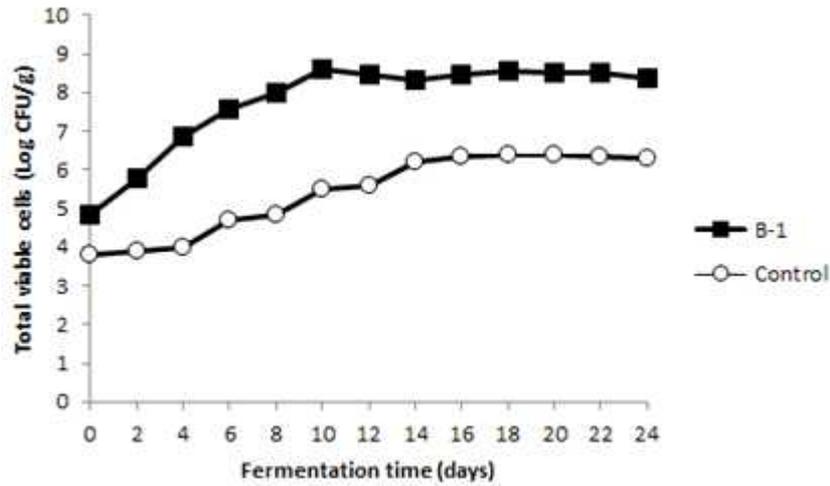
최종 선택된 우수 후보균인 젖산균을 현미경 검경과 API-kit system (Bio-Merieux)을 이용하여 동정하였다.

(2) 실험결과

(가) 미생물학적 분석 결과

1) 우수 starter 후보균을 적용한 오징어식해의 총균수 변화

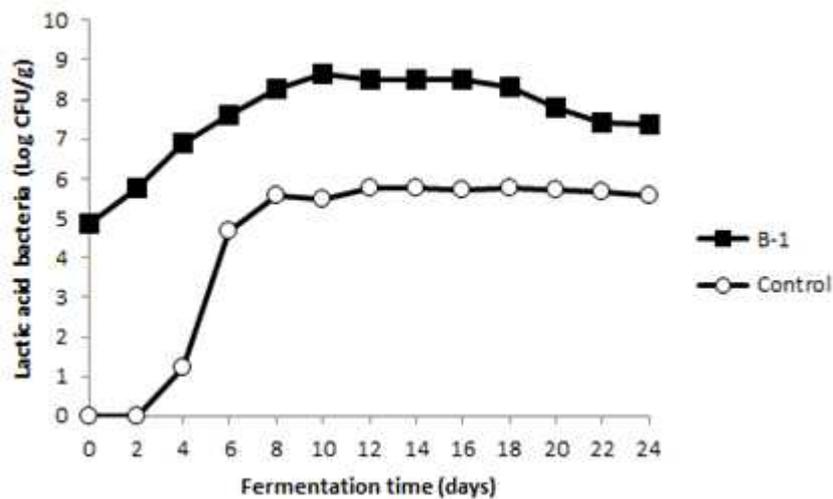
B-1 균주를 적용한 실험군의 경우, 발효기간 동안 총균수는 발효 개시일로부터 10일까지 4.84 log CFU/g으로부터 8.58 log CFU/g으로 증가하였고, 이후 숙성 24일까지 비슷한 균수를 유지하였다. 대조군인 스타터 무침가 실험군의 경우, 발효기간 동안 총 균수는 발효 개시일로부터 14일까지 3.81 log CFU/g으로부터 6.20 log CFU/g으로 증가하였고, 그 이후로 숙성 24일까지 비슷한 균수를 유지하였다. B-1 균주를 적용한 실험군과 대조군을 비교하여 보았을 때, B-1 균주 적용군이 대조군보다 빠른 균수 증가를 보였다.



<그림 45. 우수 스타터 후보균을 적용한 오징어식해의 발효기간 동안 총균수 변화>

2) 우수 starter 후보균을 적용한 오징어식해의 젖산균수 변화

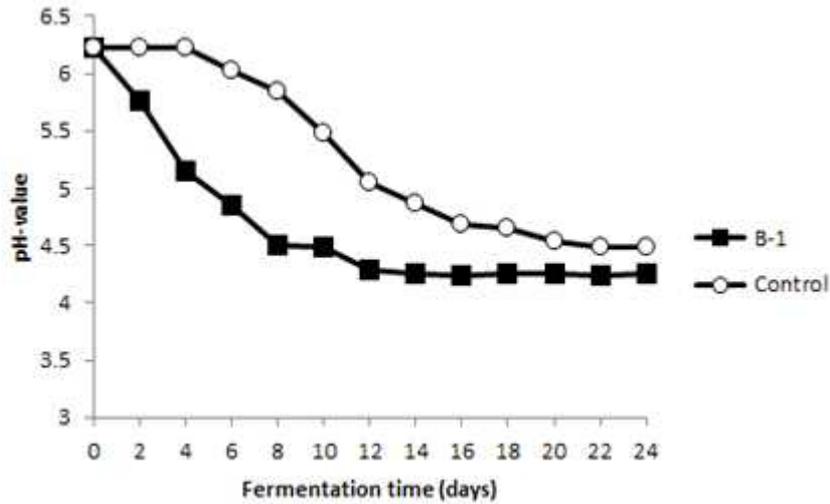
O-22 균주를 적용한 실험군의 경우, 발효기간 동안 총균수는 발효 개시일로부터 10일까지 4.87 log CFU/g으로부터 8.62 log CFU/g으로 증가하였고, 이후 숙성 24일까지 비슷한 균수를 유지하였다. 대조군인 스타터 무침가 실험군의 경우, 발효 초기에는 젖산균이 발견되지 않았으나 이후 점차 증가하여 발효 10일에는 5.49 log CFU/g으로 증가하였고, 그 이후로 숙성 24일까지 비슷한 균수를 유지하였다. B-1 균주를 적용한 실험군과 대조군을 비교하여 보았을 때, B-1 균주 적용군이 대조군보다 빠른 균수 증가를 보였다.



<그림 46. 우수 스타터 후보균을 적용한 오징어식해의 발효기간 동안 젖산균수 변화>

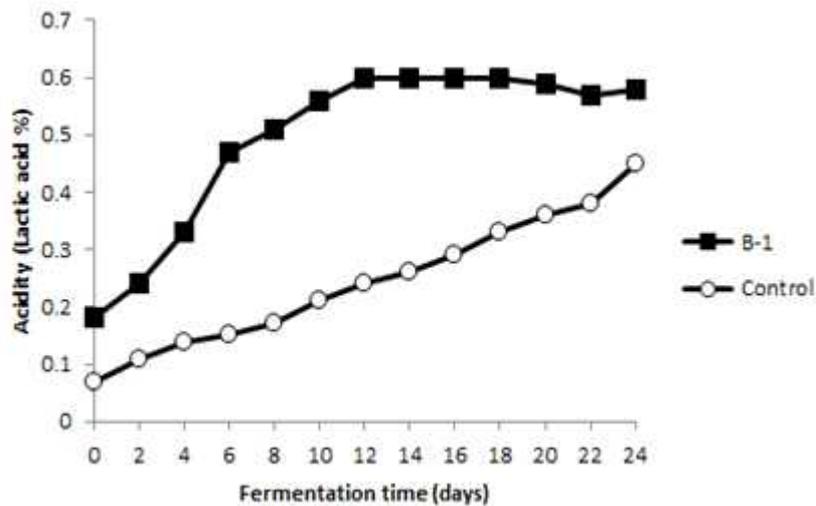
(나) 이화학적 분석결과

1) pH 변화



<그림 47. 우수 스타터 후보균을 적용한 오징어식해의 발효기간 동안 pH 변화>

2) 산도 변화



<그림 48. 우수 스타터 후보균을 적용한 오징어식해의 발효기간 동안 산도 변화>

B-1 균주를 적용한 오징어식해의 pH값은 발효 개시일부터 12일까지 pH 6.23에서 pH 4.28로 지속적으로 감소하는 것을 확인하였고, 이후 숙성 24일까지 pH 값이 약 4.25로 유지되는 것을

확인하였다. 산도의 경우 발효 개시일부터 발효 12일후에 0.18%에서 0.60%까지 증가하는 것을 확인하였고, 그 이후로는 0.6%대로 유지됨을 확인하였다.

우수 스타터 후보균을 적용한 오징어식해와 비교하여 자연발효시킨 오징어식해의 경우 산도는 발효 24일에 약 0.45%로서 실험군과 비교하여 낮은 수치를 나타내었고, pH 값의 경우에도 발효 24일에 4.49로 실험군과 비교하여 보았을 때, 다소 높은 pH를 유지하였다.

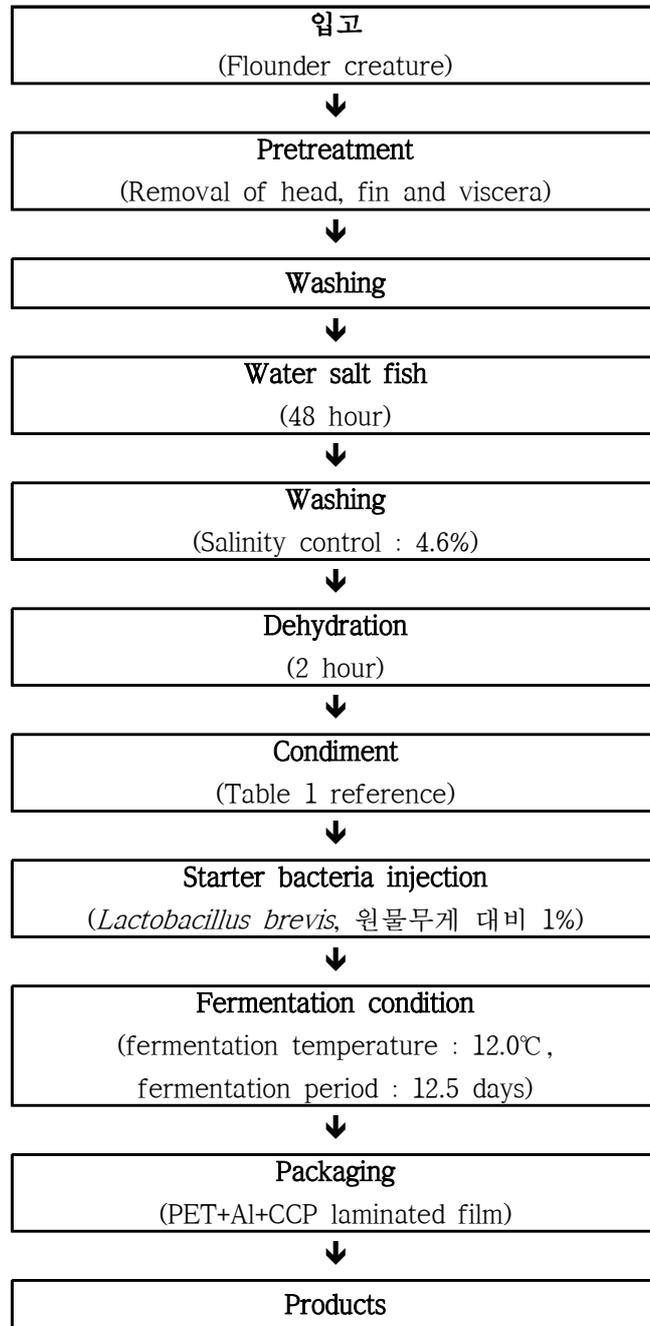
(다) 오징어식해 우수 후보균주 동정결과

<표 60. 오징어식해의 우수 후보균주 미생물 동정>

균주	동정결과
B-1	<i>Lactobacillus brevis</i> 1 (% ID, 92.3)

오징어식해에 적용한 우수 starter의 API 50 CHL kit 동정 결과 *Lactobacillus brevis*로 동정 되었다.

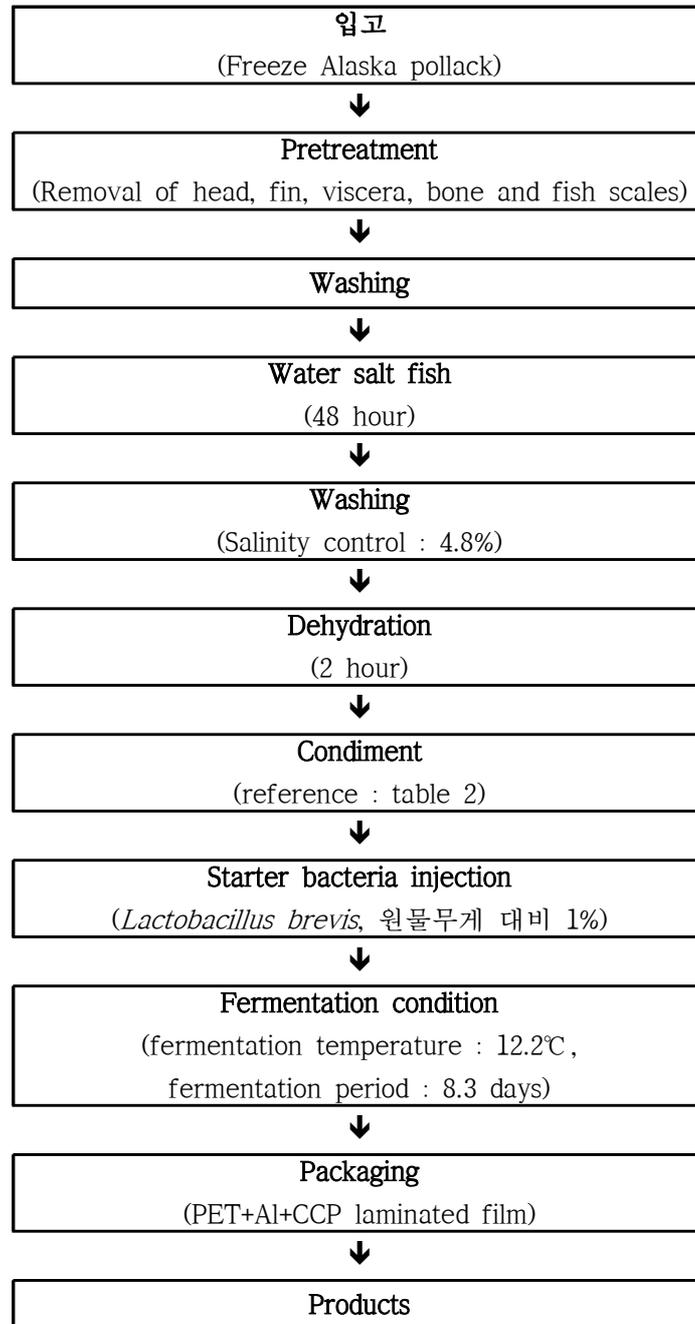
가. 가자미식해의 제조 공정



<Table 1. Sub material amount>

Sub material	Contents(%)
Red pepper powder	16.80
Garlic	7.21
Monosodium glutamate	2.96
Ginger	3.70
White radish	10.12
Foxtail millet	13.72

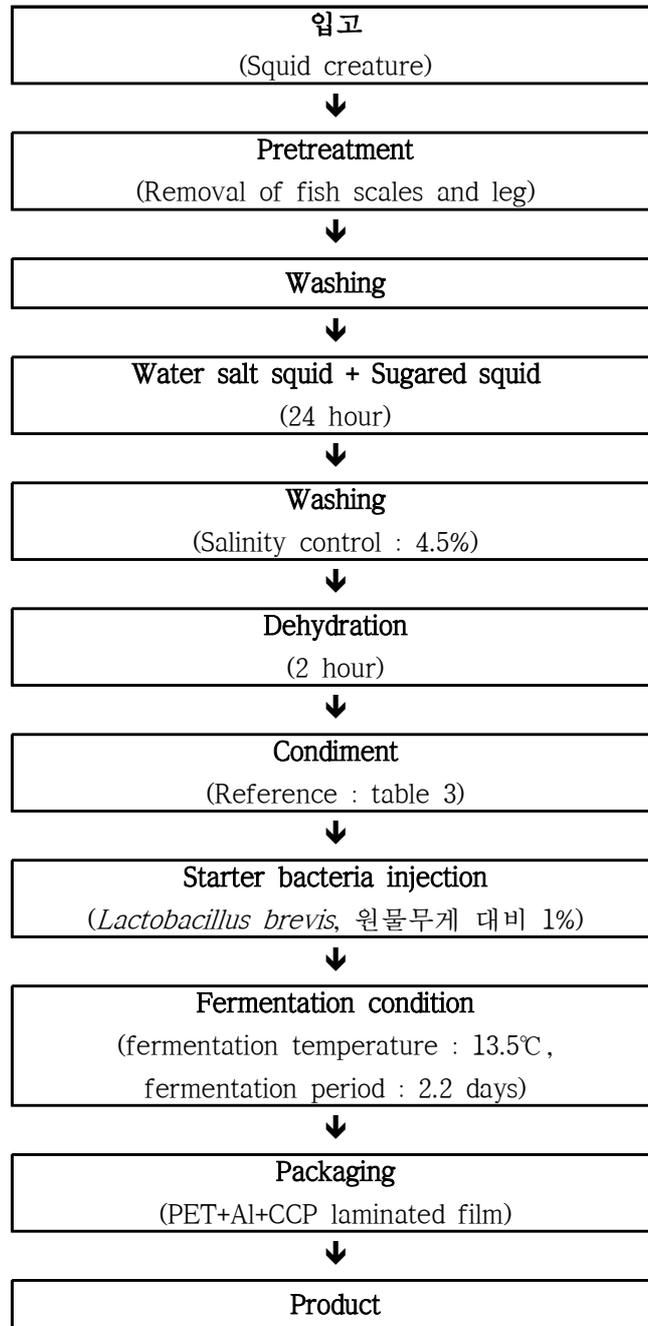
나. 명태식혜의 제조 공정



<Table 2. Sub material amount>

Sub material	Contents(%)
Red pepper powder	14.2
Garlic	8.4
Monosodium glutamate	4.1
Ginger	2.6
White radish	5.6
Foxtail millet	8.7

다. 오징어식해의 제조 공정



<Table 3. Sub material amount>

Sub material	Contents(%)
Red pepper powder	7.7
Garlic	3.3
Monosodium glutamate	2.6
Ginger	1.0
White radish	78.7%
Foxtail millet	8.3%

10. 가자미 · 오징어 · 명태식해의 영양기능성성분의 확인 동정 및 정량

가. 기능성 유산균 종속의 조사 (GABA(γ -aminobutylic acid) 생성 유산균 탐색

(1) 재료 및 방법

(가) 균주분리

가자미식해와 오징어식해로부터 유용균주를 분리하기 위해 MRS배지에 37°C에 48시간 배양 후 단일 colony를 임의로 각각 300종을 분리하여 임의로 선별 후 다시 액체배지에 접종하여 37°C에서 48시간을 다시 배양하였다. 그리고 분리된 유산균은 20% glycerol 되게 배양액에 첨가하여 -70°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

1차 선별은 배양된 균주는 Thin Layer Chromatography(TLC, silica gel 60 F254, merck, Germany)를 이용하여 GABA생성능에 따라 균주를 선별하였다. Standard는 GABA(Sigma chemical Co. St. Louis, Mo, USA)는 0.1M으로 제조하여 0.5 μ L씩 1번 spotting 하였고, 시료인 분리된 균주는 0.5 μ L씩 3번 spotting 하였다. GABA생성균주 선별 TLC 이동상 조성은 (20x20, BuOH : Acetone : water = 4 : 1 : 1) 이다. 선별 기준은 standard retardation factor (Rf)값과 비슷한 spot을 선별하였다. 1차 선별된 후보균주는 2차 선별을 위해 GABA 생성량을 확인하였다. 확인은 아미노산분석기를 이용하여 실시하였다. 유리아미노산의 분석은 유리 아미노산은 시료 10 g를 칭량하여 homogenizer로 마쇄하고 유리당을 추출한 후, 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 얻은 여액을 Ohara와 Ariyoshi(12)의 방법에 따라 분석하였다. 즉 여액 10 mL에 sulfosalicylic acid 25 mg을 첨가하여 4°C에서 4시간 동안 방치시킨 후 원심분리(15,000rpm, 30분)하여 단백질을 제거하고, 상정액을 0.22 μ m membrane filter로 여과하여 얻은 여액을 분석시료로 사용하였다. 아미노산자동분석기의 조건은 아미노산자동분석기(S433, Sykam Co., Germany)를 사용하여 다음과 같은 조건으로 분석하였다. Cation separation column(LCAK60/Na, 4.6 \times 150 mm)를 사용하였고 0.2N Na-citrate buffer 용액(pH 3.45, 10.85)의 유속은 0.45 mL/min, ninhydrin 용액의 유속은 0.25 mL/min, column 온도는 50 ~ 80°C, 반응온도는 131°C로 하였고, 분석시간은 68 min으로 하였다.

(2) 식해의 γ -Aminobutyric acid(GABA) 생성 균주의 탐색 및 확인

(가) TLC를 이용한 γ -Aminobutyric acid(GABA) 생성균주 스크리닝

TLC를 이용한 GABA 생성균주의 1차 선별은 Fig 1과 2에 나타나었다. 배지의 조성을 MRS배지 + Glutamic acid 첨가 1% 배지에서 가자미와 오징어식해의 유산균을 배양하여 각각 150종씩 분리하였고, MRS배지 + Glutamic acid 0%첨가 배지에서 가자미와 오징어식해 유산균을 각각 150종씩 분리하였다. 계대 배양한 총600종의 분리한 균주를 다시 MRS액체 배지에 배양하여, TLC를 이용한 GABA의 유무를 확인하였다. γ -Aminobutyric acid(GABA) standard와 같이 전개하여 동일 선상의 머무르는 균주를 GABA 생성 후보균주로 설정하였는데 총 가자미에서 16종 오징어식해에서 2종을 분리할 수 있었다.

(나) TLC에서 GABA 생성균주로 예측된 후보균주의 GABA 생성량 확인

TLC를 이용하여 1차적으로 GABA생성균으로 예측되는 후보균주 18종을 유리아미노산 분석기를 이용하여 γ -Aminobutyric acid(GABA)의 함량을 측정된 결과는 Table 1과 같다. 1~16번까지는 가자미식해에서 분리한 후보균들이며, 17, 18번은 오징어식해에서 분리한 후보균들이다. 가자미식해 GABA 생성 후보균주 16종 중에서 2, 7, 8과 9번을 제외한 후보균주에서는 GABA 생성량을 확인 할 수 없었다. 또한 나머지 4개의 후보균 또한 0.01~0.03 mg/100g 정도로 아주 적은량의 GABA가 생성되었음을 알 수 있었다. 반면에 오징어식해에서 분리한 GABA 생성 후보균주인 17, 18번 2종의 후보균은 각각 37.40mg/100g, 5.45mg/100g으로 가자미식해 후보균주들에 비해 높은 함량을 나타내었다. 특히 17번 균주에서 높은 γ -Aminobutyric acid(GABA) 생성량을 나타내었으며, 추후 이를 소재로하여 추가적인 연구를 통하여 프로바이오틱스나 건강기능성식품으로서의 개발이 가능하리라 사료된다.

Table 1. 식해에서 분리한 GABA생성 후보균주의 γ -Aminobutyric acid(GABA) 생성량 확인 (mg/100g)

No.	Sample	γ -Aminobutyric acid(GABA)
1	Flounder <i>sikhe</i> 1-1	N.D
2	Flounder <i>sikhe</i> 1-2	0.01
3	Flounder <i>sikhe</i> 1-3	N.D
4	Flounder <i>sikhe</i> 1-4	N.D
5	Flounder <i>sikhe</i> 1-5	N.D
6	Flounder <i>sikhe</i> 1-6	N.D
7	Flounder <i>sikhe</i> 1-7	0.03
8	Flounder <i>sikhe</i> 1-8	0.01
9	Flounder <i>sikhe</i> 1-9	0.02
10	Flounder <i>sikhe</i> 1-10	N.D
11	Flounder <i>sikhe</i> 1-11	N.D
12	Flounder <i>sikhe</i> 1-12	N.D
13	Flounder <i>sikhe</i> 1-13	N.D
14	Flounder <i>sikhe</i> 1-14	N.D
15	Flounder <i>sikhe</i> 1-15	N.D
16	Flounder <i>sikhe</i> 1-16	N.D
17	Squid <i>sikhe</i> 2-1	37.40
18	Squid <i>sikhe</i> 2-2	5.45

N.D ; Not detected.

나. 가자미, 명태, 오징어식해의 항암·항비만 conjugated EPA·DHA의 확인 및 함량측정

(1) 재료 및 방법

(가) 재료

가자미, 명태, 오징어식해는 상기의 최적화된 조건을 이용하여 제조하였다.

(나) 실험방법

1) 지방산함량 측정

균질화된 검체를 약 0.5~1.0 g을 정확히 칭량하여 마조니어관에 넣고 약 100 mg의 피로갈롤을 첨가한 후 2 mL의 내부표준용액을 첨가한다. 마조니어관에 끓임쪽을 넣고 2 mL 에탄올을 첨가하여 전체 검체가 잘 섞일때까지 혼합한다. 8.3M 염산용액 10 mL을 넣고 잘 섞는다. 마조니어관의 마개를 고무줄 혹은 테프론테이프등으로 밀봉한 후, 70~80 °C의 수조에서 적당한 속도로 교반하면서 40분간 분해한다. 마조니어관의 벽면에 붙어있는 입자들이 잘 혼합 될 수 있도록 매 10분마다 교반기로 혼합한다 2~3 mL 클로로포름과 2~3 mL 디에틸에테르추출한 지방을 녹여 15 mL시험관으로 옮긴 후, 40°C 수조에서 질소농축하고 2.0mL 7% 트리플루오로보란메탄올용액과 1.0 mL의 톨루엔을 첨가한다. 테프론/실리콘재질의마개로 잘 밀봉하여 100 °C 오븐에서 45분간 가열한 후 실온으로 냉각한다. 5.0 mL 증류수, 1.0 mL 헥산 및 약 1.0 g 무수황산나트륨을 첨가한 후 진탕하여 정치하고 분리된 상층액을 취하여 약 1.0 g의 무수황산나트륨을 담은 다른 바이알에 넣고 탈수한 후 시험용액으로 한다. 기기분석 Agilent사 가스크로마트그래프를 이용하였으며 분석조건은 칼럼 SupelcoSP-2560 (Capillary column ; polyethyleneglycol 100% ; 100m*0.25mm*0.20µm)을 이용하였으며, 주입온도 250도, 검출기온도 280도, split ratio 100:1, 유량 1.0 mL/min으로 하여 분석하였다.

(2) 가자미, 명태, 오징어식해의 EPA, DHA의 확인 및 함량

가자미, 명태, 오징어식해의 지방산 조성을 보면 포화지방산인 palmitic acid, 불포화지방산인 oleic acid와 linoleic acid가 많았다. 그 외 유효 지방산으로는 eicosapentaenoic acid(EPA)와 docosahexaenoic acid(DHA)가 있는데, EPA는 안구 뒤쪽에 위치한 망막세포와 기억력을 관장하는 대뇌 해마세포의 주성분인 오메가3 지방산으로 몸 안에서 생성되지 않기 때문에 음식물을 통해 섭취해야 하고, 고급생선보다는 고등어, 꽂치, 참치 등의 등푸른생선에 많이 함유되어 있는데, 함유량이 가장 많은 것은 정어리이다. 인체기능에 꼭 필요한 영양소일 뿐 아니라 혈중 콜레스테롤 저하와 뇌기능을 촉진시키는 작용과 함께, 류머티스성 관절염·심장질환·동맥경화증·폐질환의 예방과 치료에도 좋다는 연구결과가 보고되었다. DHA는 생선의 몸체나 눈 뒷부분의 지방에 많이 포함되어 있는 오메가3 지방산의 일종으로 성인 뇌세포의 지방에도 10% 정도 포함되어 있는 것으로 알려져 있다. EPA와 마찬가지로 DHA를 생합성하는 데 필요한 효소가 체내에 존재하지 않기 때문에 필요로 하는 DHA를 함유하는 음식의 섭취에 의존하지 않으면 안 되고, 등푸른생선에 함량이 높다. 특히 참치·방어·고등어·꽂치·정어리 등에 많다. 최근 DHA가 뇌의 움직임을 활발하게 할 뿐만 아니라 콜레스테롤의 수치를 낮추고 치매나 암을 예방하는 효과가 있다는 연구결과가 나왔다.

가자미식해의 총지방 함량 3087.6 mg/100g 중 주요지방산인 EPA와 DHA함량은 365.8 mg/100g, 297.6 mg/100g 함량을 나타내었다. 총 지방산함량에 21.4%를 차지하였다. 이는 Joo et al(1994)에서 고등어, 꽁치, 청어 등 어유에서 EPA와 DHA 조성비가 각각 13.2~28.3%, 8.4~14.6% 정도로 나타났다고 보고하였는데 이와 유사한 조성비를 나타냈다. 명태식해는 총 지방함량 1301.3 mg/100g 중 EPA와 DHA의 함량이 각각 54.6, 122.2 mg/100g으로 가자미식해에 비해서 낮은 함량을 나타내었으며, 조성비 또한 13.8% 정도로 가자미와 오징어식해에 비해서 낮은 비율을 나타내었다. 오징어식해에서는 총 지방함량 600.6 mg/100g 중 EPA와 DHA 함량은 각각 44.4 mg/100g, 151.5 mg/100g을 나타냈으며, 그 함량은 가자미식해보다 적었지만 조성비로 보았을 때는 총 지방 중 32.7% 가장 높은 조성비를 나타내었다.

<표 1. 가자미식해의 지방산 중 EPA, DHA 조성비 및 함량>

Fatty acid	Component	조성비(%)	mg/100g
4:0	Butyric acid	0.0	0.0
6:0	Caproic acid	0.0	0.0
8:0	Caprylic acid	0.0	0.0
10:0	Capric acid	0.0	0.0
11:0	Undecanoic acid		0.0
12:0	Lauric acid	0.2	6.2
13:0	Tridecanoic acid	0.0	0.0
14:0	Myristic acid	4.1	127.1
14:1	Myristoleic acid	0.1	3.1
15:0	Pentadecanoic acid	0.5	15.5
15:1	cis-10-Pentadecenoic acid	0.0	0.0
16:0	Palmitic acid	18.1	561.1
16:1	Palmitoleic acid	9.0	279.0
17:0	Heptadecanoic acid	0.4	12.4
17:1	cis-10-Heptadecanoic acid	0.0	0.0
18:0	Stearic acid	3.3	102.3
18:1 trans	Elaidic acid	0.4	12.4
18:1 cis	Oleic acid	18.6	576.6
18:2 trans	Linolelaidic acid	0.4	12.4
18:2 cis	Linoleic acid	15.0	465.0
20:0	Arachidic acid	0.3	9.3
18:3 trans	γ -Linolenic acid	0.1	3.1
20:1 n-9	cis-11-Eicosenoic acid	1.3	40.3
18:3 n-3	Linolenic acid	1.8	55.8
21:0	Heneicosanoic acid	0.0	0.0
20:2	cis-11,14-Eicosadienoic acid	1.5	46.5
22:0	Behenic acid	0.2	6.2
20:3 n-6	cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid	0.2	6.2
22:1 n-9	Erucic acid	0.3	9.3
20:3 n-3	cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid	0.3	9.3
20:4 n-6	Arachidonic acid	0.0	0.0
23:0	Tricosanoic acid	1.3	40.3
22:2	cis-13,16-Docosadienoic acid	0.4	12.4
24:0	Lignoceric acid	0.1	3.1
20:5 n-3	cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid (EPA)	11.8	365.8
24:1	Nervonoc acid	0.3	9.3
22:6 n-3	cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid (DHA)	9.6	297.6
Total		100	3,087.6

<표 2. 멧태식해의 지방산 중 EPA, DHA 조성비 및 함량>

Fatty acid	Component	조성비(%)	mg/100g
4:0	Butyric acid	0.0	0.0
6:0	Caproic acid	0.0	0.0
8:0	Caprylic acid	0.0	0.0
10:0	Capric acid	0.1	1.3
11:0	Undecanoic acid		0.0
12:0	Lauric acid	0.4	5.2
13:0	Tridecanoic acid	0.0	0.0
14:0	Myristic acid	1.1	14.3
14:1	Myristoleic acid	0.0	0.0
15:0	Pentadecanoic acid	0.1	1.3
15:1	cis-10-Pentadecenoic acid	0.0	0.0
16:0	Palmitic acid	18.4	239.2
16:1	Palmitoleic acid	0.8	10.4
17:0	Heptadecanoic acid	0.2	2.6
17:1	cis-10-Heptadecanoic acid	0.0	0.0
18:0	Stearic acid	4.7	61.1
18:1 trans	Elaidic acid	0.3	3.9
18:1 cis	Oleic acid	10.5	136.5
18:2 trans	Linolelaidic acid	0.1	1.3
18:2 cis	Linoleic acid	44.1	573.3
20:0	Arachidic acid	0.4	5.2
18:3 trans	γ -Linolenic acid	0.0	0.0
20:1 n-9	cis-11-Eicosenoic acid	0.7	9.1
18:3 n-3	Linolenic acid	3.1	40.3
21:0	Heneicosanoic acid	0.0	0.0
20:2	cis-11,14-Eicosadienoic acid	0.2	2.6
22:0	Behenic acid	0.3	3.9
20:3 n-6	cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid	0.0	0.0
22:1 n-9	Erucic acid	0.1	1.3
20:3 n-3	cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid	0.0	0.0
20:4 n-6	Arachidonic acid	0.1	1.3
23:0	Tricosanoic acid	0.3	3.9
22:2	cis-13,16-Docosadienoic acid	0.1	1.3
24:0	Lignoceric acid	0.2	2.6
20:5 n-3	cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid (EPA)	4.2	54.6
24:1	Nervonoc acid	0.2	2.6
22:6 n-3	cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid (DHA)	9.4	122.2
Total		100	1,301.3

<표 3. 오징어식해의 지방산 중 EPA, DHA 조성비 및 함량>

Fatty acid	Component	조성비(%)	mg/100g
4:0	Butyric acid	0.0	0.0
6:0	Caproic acid	0.0	0.0
8:0	Caprylic acid	0.0	0.0
10:0	Capric acid	0.5	3.0
11:0	Undecanoic acid		0.0
12:0	Lauric acid	0.3	1.8
13:0	Tridecanoic acid	0.3	1.8
14:0	Myristic acid	1.0	6.0
14:1	Myristoleic acid	0.0	0.0
15:0	Pentadecanoic acid	0.4	2.4
15:1	cis-10-Pentadecenoic acid	0.0	0.0
16:0	Palmitic acid	20.2	121.2
16:1	Palmitoleic acid	0.4	2.4
17:0	Heptadecanoic acid	0.6	3.6
17:1	cis-10-Heptadecanoic acid	0.0	0.0
18:0	Stearic acid	4.3	25.8
18:1 trans	Elaidic acid	0.0	0.0
18:1 cis	Oleic acid	9.3	55.8
18:2 trans	Linolelaidic acid	0.0	0.0
18:2 cis	Linoleic acid	24.1	144.6
20:0	Arachidic acid	0.3	1.8
18:3 trans	γ -Linolenic acid	0.0	0.0
20:1 n-9	cis-11-Eicosenoic acid	1.6	9.6
18:3 n-3	Linolenic acid	2.1	12.6
21:0	Heneicosanoic acid	0.0	0.0
20:2	cis-11,14-Eicosadienoic acid	0.1	0.6
22:0	Behenic acid	0.2	1.2
20:3 n-6	cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid	0.0	0.0
22:1 n-9	Erucic acid	0.5	3.0
20:3 n-3	cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid	0.0	0.0
20:4 n-6	Arachidonic acid	0.0	0.0
23:0	Tricosanoic acid	0.9	5.4
22:2	cis-13,16-Docosadienoic acid	0.0	0.0
24:0	Lignoceric acid	0.1	0.6
20:5 n-3	cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid (EPA)	7.4	44.4
24:1	Nervonoc acid	0.2	1.2
22:6 n-3	cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid (DHA)	25.3	151.8
Total		100	600.6

다. 가자미, 명태, 오징어식해의 무기질 종류 확인 및 함량측정

(1) 재료 및 방법

(가) 재료

가자미, 명태, 오징어식해는 상기의 최적화된 조건을 이용하여 제조하였다.

(나) 실험방법

검체 약 0.5g을 취한 후 유해금속분석용 질산 7mL와 과산화수소 1mL을 넣고 Microwaving 한 후 시험액이 맑은 액으로 될 때 까지 열분해한다. 그 후 냉각시킨 뒤 50mL 정용수로 정용 후 적당한 농도로 희석하여 시험용액으로 사용한다. 사용기기는 ICP-OPTIMA 8300DW(퍼킨엘머)를 이용하여 분석하였으며, 표준물질은 quality control 21 standard 21을 사용하였고 분석조건은 가스분무량 0.6L/min, 시료주입량 1.5mL/min으로 하였고 각각의 파장에서 Na, Mg, Ca, Zn의 유무와 함량을 측정하였다.

(2) 가자미, 명태, 오징어식해의 무기질 종류 및 함량

식해의 유효 무기질인 Mg, Ca 그리고 Zn의 함량은 Table 1과 같다. Mg의 함량은 가자미식해에서 673.3 mg/kg으로 가장 높았으며, 그 다음으로는 명태식해가 597.4 mg/kg을 나타내었고, 오징어식해가 419.4 mg/kg으로 가장 낮은 함량을 보였다. Mg은 반드시 섭취해야 할 무기물질로 인체 내에서 칼슘, 인과 함께 뼈의 대사에 중요한 기능을 하며 아미노산의 활성화와 ATP의 합성, 단백질의 합성에 결정적인 역할을 하고, 신경전달작용에서 칼슘과 서로 상반되는 작용은 물론 보완작용을 하기도 하며 근육을 이완시키는 기능을 한다. Ca 또한 가자미식해에서 2082.0 mg/kg으로 가장 높았고, 오징어식해에서 100.9 mg/kg으로 가장 낮았다. 가자미식해에서 다른 식해류에 비해 이렇게 높은 수치를 보인 것은 가자미식해 제조시 뼈를 분리하지 않고 제조하지만 다른 명태와 오징어식해에 경우는 뼈를 제거한 후 제조하기 때문에 가자미식해에서 높은 Ca함량을 나타낸 것으로 생각된다. Ca은 혈액 응고, 근육의 수축과 이완, 심장의 규칙적인 박동, 신경전달 물질의 분비, 효소의 활성화, 용모의 운동, 백혈구의 식균작용, 세포의 분열, 여러 영양소의 대사 작용 등에 관여하고 있고, 세포막을 통한 물질이동의 조절인자 역할을 한다. 또한 골밀도뿐만 아니라 체중 조절, 당뇨, 대장암 예방 등에도 역할을 하는 기능이 있다. Zn의 함량은 각각의 식해에서 큰 차이를 보이지는 않으나, Mg와 Ca과 달리 오징어식해에서 5.547 mg/kg으로 가장 높은 함량을 보였고, 명태식해에서 3.360 mg/kg으로 가장 낮은 함량을 보였다. Zn은 인체 내에서 세포를 구성하고 생리적인 기능을 조절하는 대표적인 무기물질로 부족하게 되면 출산 때 기형아나 저체중아를 낳을 수 있으며 성장발육에 문제를 일으키게 되며 과잉 섭취 때에도 미네랄 불균형 등의 문제가 발생한다.

Table 1. The amount of trace elements(Mg, Ca and Zn) in Sikhae

Sample	Mg	Ca	Zn
Squid <i>Sikhae</i>	419.4	100.9	5.547
Alaska pollack <i>Sikhae</i>	597.4	169.8	3.360
Flounder <i>Sikhae</i>	673.3	2082.0	4.217

(mg/kg)

라. 가자미, 명태, 오징어식해의 항고혈압성 GABA(gamma-aminobutylic acid)등 건강기능식품성분의 정량

상기에서 가자미, 명태, 오징어식해의 최적화된 제조공정으로 제조하여 γ -Aminobutyric acid(GABA)의 함량을 측정한 결과는 표 1과 같다. γ -Aminobutyric acid(GABA)함량은 명태식해가 23.28 mg/100g으로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 오징어식해가 18.76 mg/100g으로 두 번째로 높은 함량을 나타내었다. 가자미식해에서 15.76 mg/100g으로 가장 낮은 GABA를 함유하고 있었다. Oh et al (2013)에 따르면 GABA는 식해내의 *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*과 같은 유산균이 고농도로 생산을 한다고 알려져 있는데 이러한 유산균들로 인해 식해에 GABA가 생성된어진 것으로 사료된다. GABA의 유산균 내에서의 대사기작을 살펴보면, GABA는 유산균의 산에 대한 내성 기작의 일환으로서 L-glutamate로부터 전환되어 생성되어진다. 즉 상기의 식해의 최적화된 제조공정을 확인하면 명태식해의 자체의 monosodium glutamate(MSG)의 함량이 4.1%로 가장 많이 첨가되어 다른 식해들에 비하여 높은 GABA함량을 나타낸 것으로 사료된다.

(mg/100g)

Sample	GABA(gamma-aminobutylic acid)
Squid <i>Sikhae</i>	18.76
Alaska pollack <i>Sikhae</i>	23.28
Flounder <i>Sikhae</i>	15.76

마. 가자미, 명태, 오징어식해의 유리아미노산 함량 및 그 조성 확인

가자미, 명태, 오징어식해의 유리아미노산 함량을 보면 한 두 종류의 유리아미노산이 총 아미노산의 50%를 차지하는 경우가 많은데 가자미, 명태, 오징어식해에서는 glutamate가 50% 이상을 차지하고 있다. 가자미식해는 glutamate 1964.80 mg/100g, aspartic acid 84.38 mg/100g, taurine 41.93 mg/100g, 명태식해는 glutamate 3257.98 mg/100g, aspartic acid 112.61 mg/100g, alanine 43.63 mg/100g, 오징어식해는 glutamate 891.04 mg/100g, taurine 58.72 mg/100g, arginine 45.89 mg/100g 등이 주요 유리아미노산으로 가자미와 명태에 비해 오징어 같은 연체동물에 많이 함유되어 있는 taurine은 쓸개즙을 만들뿐더러 많은 생물학적 기능을 하는데, 근골격계를 만들고 심혈관계가 기능을 유지하는데 필수적이고, 뇌혈관장벽(blood brain barrier,

BBB)을 통과할 수 있어서 신경전달물질을 막고, 해마의 기능을 강화시키는 등 중추신경계의 기능을 조절할 수도 있다. 또 체내 활성산소를 막고, 삼투압을 조절하며 칼슘의 항상성을 지킬 수 있고, 지방조직을 조절해 비만을 억제하는 역할을 하는 것으로도 알려져 있다. 그 외에 유효 유리아미노산인 g-ABA는 혈압저하 및 이뇨 효과 외에 뇌의 산소공급량을 증가시킴으로써 뇌 세포의 대사기능을 촉진시키고 신경을 안정시키며 불안감을 해소하기도 하고, 40세 이후에 급격히 고갈되는 성장호르몬은 지방세포의 생성을 억제하고 근육을 생성시키는 기능을 가지고 있다.

(mg/100g)

	Flounder <i>Sikhe</i>	Alaska pollack <i>Sikhe</i>	Squid <i>Sikhe</i>
Tau	41.93	41.69	58.72
Ala	25.61	43.63	36.16
Lys	2.75	28.87	13.68
Leu	18.90	40.83	29.20
Glu	1964.80	3257.98	891.04
Val	21.59	27.34	19.42
Tyr	13.37	15.06	7.80
Gly	10.71	11.38	10.62
Met	9.14	13.46	14.84
Arg	6.72	24.56	45.89
g-ABA	15.79	23.28	18.76
His	3.90	3.49	20.22
Asp	84.38	112.61	31.86
Cys	0.00	0.00	23.10
Ser	14.50	22.74	11.32
Thr	12.50	20.71	12.25
Phe	13.37	23.30	19.33
Total	2259.96	3710.93	1264.21

바. 가자미, 명태, 오징어식해의 영양성분 확인

(1) 오징어식해의 영양성분

오징어식해의 영양성분을 보면 수분 78.7%, 조회분 3.5%, 조단백 8.1%, 탄수화물 9.1%, 조지방 0.6%, 포화지방산 0.1 g/100g, 트랜스지방 0.0 g/100g, 콜레스테롤 108.35 mg/100g, 나트륨 1048 mg/100g 그리고 총 칼로리는 74.2 kcal/100g으로 나타났다. 오징어 원료자체의 생산시기와 생산 지역에 따라 다소 차이는 있겠지만, 껍질을 제거하고 육부분만을 사용하여 제조한 식해이므로 조회분과 조지방이 적고, 조단백질과 탄수화물 함량이 높게 나타났다. 또한 오징어 자체에 콜레스테롤이 많아 오징어식해에서도 많은 콜레스테롤 함량을 볼 수 있었다.

Table 1. Nutritive components of Squid *Sikhae*

Components	Squid <i>Sikhae</i>
Moisture (%)	78.7
Crude ash (%)	3.5
Crude protein (%)	8.1
Carbohydrate (%)	9.1
Crude fat (%)	0.6
Saturated fatty acid (g/100g)	0.1
Trans fat (g/100g)	0.0
Cholesterol (mg/100g)	108.35
Natrium (mg/100g)	1048
Calorie (kcal/100g)	74.2

(2) 명태식해의 영양성분

명태식해의 일반성분을 보면 수분함량 71.4%, 조회분 8.2%, 조단백 11.8%, 탄수화물 7.3%, 조지방 1.3%, 포화지방산 0.2 g/100g, 트랜스지방 0.0 g/100g, 콜레스테롤 108.35 mg/100g, 나트륨 2653 mg/100g 그리고 칼로리는 88.1 kcal/100g으로 나타났다. 명태는 연체동물인 오징어에 비해 단백질의 함량이 높고, 부위에 따라 지방의 함량이 크게 달라 오징어식해보다 조지방의 함량이 높게 측정된 것으로 추측된다. 그리고 식해 제조시 염장과 당침을 하는 오징어식해와는 달리 순수 염장만 하는 명태식해에서 많은 나트륨 함량을 볼 수 있었다.

Table 2. Nutritive components of Alaska pollack *Sikhae*

Components	Alaska pollack <i>Sikhae</i>
Moisture (%)	71.4
Crude ash (%)	8.2
Crude protein (%)	11.8
Carbohydrate (%)	7.3
Crude fat (%)	1.3
Saturated fatty acid (g/100g)	0.2
Trans fat (g/100g)	0.0
Cholesterol (mg/100g)	48.71
Natrium (mg/100g)	2653
Calorie (kcal/100g)	88.1

(3) 가자미식해의 영양성분

가자미식해의 일반성분을 보면 수분함량 69.2%, 조회분 8.2%, 조단백 11.2%, 탄수화물 8.3%, 조지방 3.1%, 포화지방산 0.7 g/100g, 트랜스지방 0.0 g/100g, 콜레스테롤 108.35 mg/100g, 나트륨 2549 mg/100g 그리고 칼로리는 105.9 kcal/100g으로 나타났다. 전체적인 성분은 명태식해와 큰 차이가 없으나, 가자미식해를 제조시 가자미 자체의 껍질을 벗기지 않고 세절하여 제조하기 때문에 껍질 자체에 많은 지방이 함유되어 있어 조지방의 함량이 높게 측정된 것으로 추측되고 그로인해 칼로리 또한 높은 것으로 추측된다.

Table 3. Nutritive components of Flounder *Sikhae*

Components	Flounder <i>Sikhae</i>
Moisture (%)	69.2
Crude ash (%)	8.2
Crude protein (%)	11.2
Carbohydrate (%)	8.3
Crude fat (%)	3.1
Saturated fatty acid (g/100g)	0.7
Trans fat (g/100g)	0.0
Cholesterol (mg/100g)	78.63
Natrium (mg/100g)	2549
Calorie (kcal/100g)	105.9

(4) 가자미, 명태, 오징어식해의 비타민 종류 확인 및 정량

오징어, 명태, 가자미식해의 비타민 함량을 Table 5에 나타냈다. 비타민 B₃ 또는 나이아신이라 불리는 니코틴산은 동물의 간, 살코기, 효모, 곡류 등에 많이 함유되어 있다. 함량은 오징어식해에서 1.33 mg/100g으로 가장 낮았으며, 가자미식해에서 5.97 mg/100g, 명태식해에서 56.63 mg/100g으로 가장 높은 함량을 나타냈다. 간, 육류, 닭고기, 생선과 같은 동물성 식품과 유제품이 식품급원인 리보플라빈은 열량 대상에 중요하다. 함량은 오징어식해에서 0.08 ng/100g으로 가장 낮았고, 명태식해와 가자미식해에서 0.13 ng/100g으로 같은 값을 나타냈다. 이는 단백질 함량이 오징어보다 가자미나 명태가 높기 때문에 나타난 것으로 추측된다. 비타민C의 경우에 명태식해에서 4.45 mg/100g을 나타내었으며, 가자미식해가 0.67 mg/100g 오징어식해가 1.79 mg/100g 정도를 나타내었다.

Table 4. 가자미, 명태, 오징어식해의 비타민 함량

Sample	Nicotinic acid (mg/100g)	Riboflavin (ng/100g)	Vitamin C (mg/100g)
Squid <i>Sikhae</i>	1.33	0.08	1.79
Alaska pollack <i>Sikhae</i>	56.63	0.13	4.45
Flounder <i>Sikhae</i>	5.97	0.13	0.67

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 연구목표대비 결과

1. 1차 년도 (2012년도)

연구개발의 목표	연구개발의 내용	당초연구목표대비 연구결과
시판 식해의 품질 평가 및 주요 상재 미생물 분리 및 동정	○ 시판 식해의 미생물적(균상, 균수 등) 분석	100%
	○ 시판식해의 이화학적(pH, aw, 염농도 등) 특성 및 일반성분분석	100%
	○ 시판 식해에서의 starter 후보균 분리 및 생육 적합성 검토	100%
	○ 시판 식해의 저장기간에 따른 주요 상재 미생물 및 유해 물질분석(BAs)	100%
	○ 식해 원료와 부재료의 미생물학적 및 이화학적 특성 검토	100%
생선식해 발효조건의 최적화	○ 원료에 대한 부재료의 종류 및 배합비에 따른 식해 제조(pilot scale) 및 발효특성 검토	100%
	○ 첨가부재료 종류 및 첨가량에 따른 발효 특성검토(미생물학적, 이화학적 특성, 관능검사를 통한 품질 평가)	100%
	○ 발효조건 최적화	100%
표준제조공정 확립	○ 식해의 최적 제조공정 및 레시피 표준화	100%

2. 2차 년도 (2013년도)

연구개발의 목표	연구개발의 내용	당초연구목표대비 연구결과
Starter 후보균의 최적화 및 생선식해제조의 최적화	○ 젖산균의 생육 특성: 생육 속도, 유기산 생성 능력, pH 저하 능력, 항균활성, 단백질 분해능과 안전성 등 검토	100%
	○ 우량 starter 후보균의 생육 적합성 및 생리·화학적 특성 검토(<i>in vitro</i>)	100%
	○ Starter 후보균 적용에 따른 발효조건(온도, 기간) 및 위생·안전성 검	100%

	토(<i>in situ</i>)	
	○ 관능검사를 통한 품질 평가	100%
	○ 천연식자재의 항균, 항산화성 확인	100%
식해의 유통기한 연장기술 개발	○ 천연식자재에서 추출한 유용물질을 이용하여 식해의 저장성 확인	100%
	○ 천연식자재에서 추출한 유용물질을 이용하여 식해의 최적첨가량 확인 및 제품개발	100%
반응표면분석을 통한 식해의 제조공정 표준화	○ 관능검사를 통한 자료를 바탕으로 반응표면분석 실시	100%
	○ 반응표면분석으로 제조공정의 최적 조건 확립	100%

3. 3차 년도 (2014년도)

연구개발의 목표	연구개발의 내용	당초연구목표대비 연구결과
식해의 유통기한 연장기술개발	○ 포장지 종류에 따른 생선식해 유통기한 연장효과 확인	100%
	○ 포장방법에 따른 생선식해의 유통기한 연장효과 확인	100%
	○ tarter 후보균 적용에 따른 발효조건(온도, 기간) 및 위생·안전성 검토(<i>in situ</i>)	100%
	○ 관능검사를 통한 품질 평가	100%
식해의 건강기능성 성분의 확인 및 동정	○ 무기질의 종류 및 함량 측정	100%
	○ 항암 conjugated EPA·DHA의 확인 및 함량측정	100%
	○ 유리아미노산 및 peptides의 확인 및 함량측정	100%
	○ 항고혈압성 GABA 등 건강기능성 식품성분의 확인 및 함량측정	100%
	○ 미생물균총 조사와 함께 기능성유산균종속의 조사 및 균수측정	100%

4. 정량적 목표

평가항목 (주요성능 Spec ¹⁾)	전체항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%)	연구개발전국내수준 (성능수준)	개발목표치
1.품질, 이화학 (VBN,TBA,pH)	50%	중	100%
2.표준화 (반응표면분석, 관능평가)	10%	중	100%
3.미생물 (starter균, 16s rRNA)	50%	중	100%
4.항산화성 및 항균성 (DDPH, 폴리페놀, 알리신, Paperdisc법)	20%	중	100%

제 2절 관련분야의 기술발전예의 기여도

1. 수산발효식품의 저장성

최근 건강 지향적인 식품의 소비가 증가함에 따라 식해제품은 염의 함량이 훨씬 낮은 식해의 형태로 많이 이용되고 있는 실정이나, 이러한 저식염의 식해는 제조 시에 발생하는 가장 큰 문제점 중의 하나가 저장성 단축이었으나, 식중독이나 병원성균에 대해서 항균활성을 가지고 항산화활성을 지닌 천연식자재의 추출물을 이용하여 저장성 향상시키고 안전한 포장법을 개발함으로써 저염 식해의 저장 안전성에 대한 문제점을 해결하여야 최종적으로 저염의 고품질식해 제품을 개발해내는데에 이바지 가능함.

2. 제조공정의 표준화

세계적인 식해제품의 가공 및 유통을 실현시키기 위해서는 위생적으로 안전하고 동시에 저장 안정성도 기본적으로 확보되어야 할 뿐만 아니라 식품 고유의 품질 특성, 기호성, 균일성, 가공 안전성 등 다양한 조건이 구비되어야 한다. 이를 위해서는 생선식해의 원료 특성을 포함한 주요 상품화 요소 기술에 대한 집중적 연구를 필요로 하는 실정이며 그중에서도 가장 시급한 것은 공정개선, 기호도 증진을 위한 조미기술 개발이다. 본 연구를 통하여 식해의 제조공정 및 레시피를 최적화하고 가장 뛰어난 starter균을 개발하여 식해제품의 균일성 및 안전성을 확보하는 데 기여하고자함.

3. 건강기능식품 산업

식해에는 공역 EPA, 공역 DHA 및 GABA와 같은 건강기능성 물질을 다량 함유함을 확인하였고, 아울러 식중독균이나 병원성균에 대해서 뛰어난 항균활성을 가지는 유산균주를 신규로 분리 동정하였다. 또한 항고혈압의 기능성을 가지는 GABA 생성균주의 확인 등으로 프로바이오틱스제품이나 건강기능식품의 소재로서의 이용가치를 확인하였고, 우리나라 전통식품인 김치에 뒤지지 않은 식해의 우수성을 확인 할 수 있었다.

제 5장 연구개발 성과 및 활용 계획

제 1절. 연구개발 성과

1. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술 지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신 저자	공동 저자				
2012	오징어(Todarodes paxificus) 식해의 제조시 발효 온도 및 염도의 최적화 공정 개발	한대원	조순영	김소라, 임미진	한국수산 과학회지	45(6)	국내	비SCI
2012	오징어(Todarodes paxificus) 식해 제조시 고춧가루 및 마늘의 발효최적 첨가량 최적 공정 개발 시판	김소라	조순영	한대원, 임미진	한국수산 과학회지	45(6)	국내	비SCI
2013	가자미(Verasper moseri Jordan et Gilberu)식해의 품질 특성	한대원	조순영	한호준, 김덕기, 임미진	한국수산 과학회지	46(6)	국내	비SCI
2013	가자미(Verasper moseri Jordan et Gilberu)식해의 최적 발효 조건(온도 및 염도)	한대원	조순영	김덕기, 한호준, 임미진	한국수산 과학회지	46(6)	국내	비SCI
2014	천연 향균 추출물의 첨가가 가자미식해의 품질 및 저장성에 미치는 영향	한호준	조순영	김덕기, 한대원	한국식품 과학회지	46(6)	국내	비SCI
2015	반응표면분석법을 이용한 가자미식해의 제조공정 최적화	한대원	조순영	한호준	한국수산 과학회지	48(1)	국내	비SCI

2. 특허출원

출원된 특허의 경우				
출원 연도	특 허 명	출원인	출원국	출원번호
2012	우수한 품질의 오징어식해를 제조하는 제조방법	강릉원주대학 교산학협력단	대한민국	10-2012-013 2346
2012	우수한 품질의 명태식해를 제조하는 제조방법	강릉원주대학 교산학협력단	대한민국	10-2012-013 2348
2012	우수한 품질의 가자미식해를 제조하는 제조방법	강릉원주대학 교산학협력단	대한민국	10-2012-013 2347
2013	프로폴리스 추출물을 유효성분으로 함유하는 천연 식품보존제, 이외 제법 및 그 조성물	강릉원주대학 교산학협력단	대한민국	10-2013-012 3264
2013	우수한 품질의 가자미식해를 제조하기위한 반응표면분석법 및 이외 제조방법	강릉원주대학 교산학협력단	대한민국	10-2013-012 3263
2013	저장성이 우수한 프로폴리스첨가 오징어식해를 제조하기 위한 제조방법	강릉원주대학 교산학협력단	대한민국	10-2013-012 3265
2014	반응표면 분석법을 이용한 우수한 품질의 표준화된 오징어식해를 제조하는 제조방법	강릉원주대학 교산학협력단	대한민국	10-2014-010 0809
2014	고추냉이 에탄올추출 산사물을 첨가한 유통기한 연장이 연장된 오징어식해의 제조방법	강릉원주대학 교산학협력단	대한민국	10-2014-016 4179
2014	반응표면 분석법을 이용한 우수한 품질의 표준화된 명태식해를 제조하는 제조방법	강릉원주대학 교산학협력단	대한민국	10-2014-017 0135

3. 특허등록

등록된 특허의 경우				
등록 연도	특 허 명	등록인	등록국	등록번호
2014	우수한 품질의 가자미식해를 제조하는 제조방법	강릉원주대학 교산학협력단	대한민국	10-1411130
2014	우수한 품질의 명태식해를 제조하는 제조방법	강릉원주대학 교산학협력단	대한민국	10-1411052

4. 기타성과

산업지원 성과 (단위 : 건)			
학술대회	기술실시	기술지도	합계
5	3	3	11

제 2절 성과활용계획

1. 실용화, 산업화 계획

현재 가자미·오징어·명태식해의 starter균은 *Lactobacillus brevis*는 현재 가자미·명태식해의 최적 제조공정도 특허등록이 된 상태이다. 이에 이 기술들을 활용하여 기술이전 및 산업화를 실시함으로써 속초시의 젓갈제조 식품업체에게 고품질의 생선식해 제조법을 제공함으로써 수산가공업체의 기술력향상과 매출 증대를 동시에 추구할 수 있음

현재 참여기업인 정이푸드빌에 기술지도하여 가자미·명태·오징어식해의 품목제조보고서를 등록하였으며 이를 바탕으로 사업화에 적극 활용함으로써 고부가가치식품 출시가 금년도내에 가능하리라 봄

2. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획

현재 특허등록 2건과 특허출원 9건, 국내 비 SCI 논문 4건이 투고 되었으며 현재 오징어식해의 제조공정 최적화에 대한 특허등록 1건이 진행중에 있다. 또한 국내 비SCI논문 1건과 SCI(E)논문 1건이 투고심사 중에 있으며 추가적으로 SCI(E)논문 2건을 투고 할 계획이다.

3. 추가연구, 타 연구에 활용 계획 등

본 연구를 통하여 생선식해 중의 건강기능성 성분을 확인하였고, 식해내의 유산균주에서 항고혈압성분인 GABA를 생성하는 균주의 탐색 및 확인에 성공하였다. 이러한 건강기능성성분을 생성하는 유용균주를 확보 개발하여 추가적인 연구를 통해 건강기능성이 부여된 생선식해개발과 더 나아가 프로바이오틱스 제품개발상용화 및 기능성식품개발 상용화에 본 연구 발명물인 GABA 다량생산 유산균을 유용하게 산업적으로 활용가능하리라 사료된다. 다른 발효식품의 우수한 starter균으로써도 사용이 가능하리라 사료된다.

4. 제품 및 시장분석 측면

국내 및 국외시장 분석결과 현재 표 1, 2에서 보듯이 젓갈을 선호하는 노령인구의 증가, 생활수준 향상에 따른 Silver 세대의 구매력 증가, 레저생활 등 식생활여건 변화에 의한 편의부식의 수요증가, 웰빙 지향, 전통식품 유행 추세 등 소비기반의 변화에 의해 2009년 1조원의 세계시장 규모에서 2014년에는 2조 8천억원의 시장이 형성될 전망이며 한국 시장 역시 2천억 시장에서 2014년에는 거의 2배 정도로 규모가 커짐을 예상함

젓갈류 산업의 발전을 위한 새로운 기술들이 빠른 속도로 개발 활용될 전망이며, 그동안 고질

적인 문제점으로 기술개발의 필요성이 절실하였던 저장안정성증진기술 부문이나 위생적 안정성 확보, 소비자의 신뢰확보 및 새로운 기호성 창출 부문에서 필요한 기술들이 첨단기술의 응용 및 복합 활용방식으로 다양하게 개발되어 산업적 활용범위를 넓혀갈 전망이다

본 연구과제에서는 저염 건강기능 소재함유 웰빙생선식해제품을 HACCP시스템하에서 위생적으로 생산하는 공정을 완성시켜서 진정으로 혈압을 낮추고 고지혈증·동맥경화증까지 완화시켜주는 저염건강생선식해제품을 Storytelling 마케팅 기법을 동원하여 국내 및 국외에 대량 판매 가능할 것으로 예상함

가. 국내 제품생산 및 시장 현황

<표 1. 품목별 젓갈 생산량의 추이>

(단위 : M/T)

구 분	2005	2007	2009
멸치젓	9,754	8,919	10,701
새우젓	7,553	1,572	19,753
오징어젓	2,414	997	2,792
조개젓	414	137	472
굴(어리굴젓)	239	177	657
성게젓	61	1	4
명란젓	1,544	2,595	2,167
창난젓	833	444	631
황석어젓	833	3,878	783
식해 등 기타	16,522	9,921	3,174
합 계	39,848	28,641	41,134

자료: 농림수산식품부 통계연보, 2010

나. 국외 제품생산 및 시장 현황

<표 2. 젓갈산업의 국내·외 시장 현황>

(단위 : 백만원)

시장규모 \ 년도	2009	2012	2017
세계 시장 규모	1,050,000	1,500,000	2,800,000
국내 시장 규모	210,000	250,000	400,000
국내 시장 \ 년도	2008	2009	2010
수출 규모	72,938	54,748	68,478
수입 규모	125,266	59,699	73,218

2010년 한국무역협회 무역통계, 관세청 무역통계

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1절 연구사례 조사

1. 일본의 경우

일본에서는 생선식해를 나레즈시라고 하는데 어패류를 발효시켜 자연적인 산미를 이용하는 것으로 현재 우리가 먹는 일본 스시의 초밥제품의 원조이다. 나레즈시는 소금에 절인 생선을 대나무 잎에 돌돌 말아서 밥과 함께 자연적으로 발효시켜 먹는 일본 최초의 초밥으로서 독특한 냄새로 인해 보통 사람들은 먹기 힘들다. 나레즈시는 구사레즈시[腐れ熱鮭] 또는 우레즈시[熟れ熱鮭]라고도 하며, 기주(紀州)의 나레즈시[馴鮭]와 오우미[近江]의 후나즈시[ふなずし]가 가장 유명하며 우리나라 식해와 가장 유사한 제조방법이다.

- 마사바를原料とするへしこ及びなれずしの製造過程における脂質酸化の進行と抗酸化活性の変化
(나레즈시제조 과정에서 지질산화에 대한 연구)

- 福井の伝統食品：マサバの「へしこ」と「なれずし」のおいしさと機能性(〈総説特集〉伝統食品の科学-ルーツ、おいしさ、機能-4)
(나레즈시의 맛과 기능성에 대한 연구)

- 鯖馴鮭(サバなれずし)に関する研究-2-漬け込み床のタンパク分解酵素活性と鮭の"馴れ"に及ぼす微生物の添加効果について
(고등어를 이용한 나레즈시의 미생물에 의한 단백질 효소활성에 대한 연구)

- Characteristics of Saba-narezushi (mackerel and pickles) produced in the Wakasa region of Fukui Prefecture.:Chemical Changes in the Fermentation Medium and Mackerel Meat during Fermentation and the Production of Volatile Components
(고등어 나레즈시의 품질특성에 관한 연구)

- 鯖馴鮭(サバなれずし)に関する研究-1-馴鮭製造時の鯖肉の水溶性含窒素化合物のアミノ酸としての量的動態について 아미노산의 변화
(고등어를 이용한 나레즈시의 아미노산의 변화에 관한 연구)

- さば街道筋に伝わる伝統的さば加工品の成分と栄養価およびその嗜好性に及ぼす影響
(일본전통식품인 고등어 나레즈시의 영양성분과 그 기호성)

현재 일본은 우리나라에 비해 식해의 연구개발이 활발히 진행되고 있다. 나레즈시, 후나즈시 등 많은 발효식품 등이 신규로 개발 되어있으며, 현재는 제조공정 표준화를 떠나서 유용물질 및 유용 유사균을 찾아 내어서 기능성식품, 화장품소재화 해나가는 추가적인 연구개발이 활발히 시행되고 있다.

2. 그 외 다른나라

캄보디아에서는 손질한 생선에 밥을 넣어 삭힌 빠숨이라는 전통발효식품이 있으며, 베트남에서도 생선에 밥을 넣어 발효한 엔위라는 발효식품이 있으며, 엔위의 우리나라 가자미식해와 같이 고춧가루를 첨가하여 제조하는 것이 특징이며, 우리나라에 비해서 제조공정이나 위생적인 측면에서 떨어지며 명확한 과학기술이 적용되어 있지는 않다.

3. 미국의 HACCP 적용 현황

1997년 어패류에 대해서는 HACCP을 의무적으로 적용토록 하였으며, 1998년 O-157 사건을 계기로 식육 및 가공류 가공공장에도 HACCP을 의무적용하였으며, 2002년에는 주스 또한 의무 적용하였다. 또한 의무화하고 있는 수산식품, 주스, 식육제품과 관련하여 소규모업자에 대해서는 유연하게 대응하고 있다. 현재 우리나라의 HACCP 시스템 보다 더 강하게 실시되고 있으며 식품자체의 안전관리에 많은 노력을 기울이고 있다.

4. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
생선식해 공정표준화기술	일본	70	80	90	
생선식해 HACCP수준 대량생산기술	일본	70	80	90	
생선식해 발효조건 최적화기술	일본	70	90	100	
생선식해발효공정최적 화기술	일본	70	90	100	
생선식해중의 생리활성검증기술	일본	80	80	100	
생선식해중의 미생물동정기술	일본	80	85	100	
생선식해 최적 배합비결정 기술	일본	90	95	100	
소비자기호도 조사기술	일본	70	70	80	
경제성 분석기술	일본	80	80	90	
생선식해신제품화기술	일본	70	90	100	

제 7 장 참고문헌

Cho SY, Kim GW, Kim HK, Kim JS, An HY, Hu GH, Sin JK, Kim OS. 2008. Characterizing the Quality of salted Mackerel Prepared with Deep Seawater. *J. Kor. Fish. Soc.* 41(3), 163-169)

Song HN, Lee DG, Han SW, Yoon HK and Hwang Ik. 2005. Quality changes of salted and semi-dried mackerel fillets by UV treatment during refrigerated storage. *Korean J. Food Cookery Sci.* 21: 662-668)

Tang T, Shi T, Qian K, Li P, Li J, Cao Y. Determination of biogenic amines in beer with pre-column derivatization by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 877)

Ahmad S, Kitchin KT, Cullen WR. Arsenic species that cause release of iron from ferritin and generation of activated oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.* 382: 195-202 (2000)

Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200 (1958)

B. Durkee. Polyphenols of the bran-aleurone fraction of buckwheat seed. *J. Agric. Food Chem.* 25(2): (1997) pp. 286-287

Cha YJ, Kim SJ, Jeong EJ, Kim H, Cho WJ and Woo MY. Studies on taste compounds in Alaska Pollack Sikhae during fermentation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33: (2004) pp. 1515-1512

Choi C, Lee HD and Choi HJ. A study on quality characteristics and establishment of fermentation process for traditional Kyungsando squid Sikhae. *Korean J Dietary Culture.* 16: (2001) pp. 118-127

Cho WI and Kim SM. 2012. The Biofunctional Activities and Shelf-life of Low-salt Squid Sikhae. *Korean J Food Sci Technol* 44(1), 61-68.

Durkee AB. Polyphenols of the bran-aleurone fraction of buckwheat seed (*Fagopyrum sagittatum*, Gilib). *J. Agr. Food Chem.* 25: 286-287 (1997)

Gasiorowski K, Brokos B, Tabaka H. Evaluation of the immunomodulatory activity of four compounds exerting antimutagenic effects on human lymphocytes in vitro. *Cell Mol Biol Lett.* 5: (2000) pp. 469-481

Greenaway W, May J, Scaysbrook T, Whatley FR. Identification by gas chromatography-mass spectroscopy of 150 compounds in propolis. *Zeitschrift fuer Naturforschung Teil. C46:* (1991) pp. 111-121

Han DW, Kim SR, Im MJ, Cho SY. Optimal Processing Conditions of Fermentation Temperature and Sea Salt Concentration for Preparing Squid *Todarodes paxificus* Sikhae. *Kor J Fish Aquat Sci* 45(6), (2012) pp. 627-634 (2012)

Jo YJ. Study on the antioxidative and antimicrobial activities of wasabi(*wasabia koreana*, cruciferae) extracts. *Korea J.* 1-7 (2008)

Jankowski A, Niedworok J, Jankowska B. The influence of *aronia melanocarpa elliot* on experimental diabetes in the rats. *Herba Polonica* 45: 345-353 (1999)

Japanes Ministry of Hygiene. Food sanitation indices. 1. Volatile basic nitrogens. (1973) pp. 30-32

Kim SM, Back OD, Lee KT. The development of squid (*Todarodes pacificus*) sik-hae in the Kang-Nung district. 4. The effects of red pepper and grain contents on the properties of squid sik-hae. *Bull. Korean Fish. Soc.* 27: 366-372 (1994)

Kim HJ, Hwangbo S, Lee SW. Studies on the antioxidant effect of Korean propolis. *Korean J Food Sci Ani Resour* 22,, (2012) pp. 77-80. (2012)

Kalogeropoulos N, Konteles SJ, Troullidou E, Mourtzinol, Karathanos VT. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chem* 116: (2009) 452-461

Kim SM, Back OD and Lee KT. The development of squid(*Todarodes pacificus* Sikhae in the Kangnung district:4.The effects of redpepper and grain contents on the properties of squid Sikhae. *Bull. Korean Fish. Soc.* 27, (1994) pp. 366-372

Kim SM, Jeong IH and Cho YJ. The development of squid Sikhae in Kangnung district: 1. The effects of fermentation temperatures and periods on the properties of squid Sikhae. *Bull. Korean Fish.*, (1994) 215-222.

Kim YM. Processing technique and quality control of fermented seafood (in Korea). *Bulletin of*

Food Technology, 9: (1996) pp. 65-86

Masuda H. Wasabi as functional food: An overview. International chemical congress of pacific basin societies. (2000) pp. 14-19

Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J Ethopharmacol 71(1-2), (2000) pp. 109-114

Morimitsu Y, Hayashi K, Navagawa Y, Fwii H, Horio F, Uchida K, Osawa T. Antiplatelet and anticancer isothiocyanates in Japanese domestic horseradish, wasabi, mech. Ageing Dev 116(2-3), (2000) pp. 125-134

Niedworok J, Jankowska B, Kowalczyk E, Charyk K, KubatZ. Antiulcer activity of anthocyanin from Aronia melanocarpa Elliot. Herba Polonica. 43: (1997) pp. 222-227

Ohgami K, Ilieva I, Shiratori K, Koyoma Y, Jin X, YoshidaK, Kase S, Kitaichi N, Suzuki Y, Tanaka T, Ohno S. Anti-inflammatory effect of aronia extract on rat endotoxin-induced uveitis. Invest Ophthalmol Vis Sci.. 46, (2005) pp. 275-281

Park JH, Kim SM. property changes of the salt-seasoned and fermented the broken roes of alaska pollock stuffed into cellulose casing. Korean J Food Sci Technol, (2002) pp. 220-224

Park KN, Lee SH. Antimicrobial activity of pine needle extract and horseradish on the growth of vibrio. J Korean Soc Food Sci Nutr 32(2), (2003) pp. 185-190

S. Ahmad, K.T. Kitchin, W.R. Cullen. Arsenic species that cause release of iron from ferritin and generation of activated oxygen. Arch Biochem Biophys. 382(2), (2002) pp. 195-202

Woo KL, Jung HS and Lee SH. 1992. Effect of Salting Levels on the Changes of Taste Constituents of Domestic Fermented Flounder Sikhae of Hamkyeng-Do. Korean J Food Sci Technol 24(1), 59-64.

Lee SK, Shin MS, Jhong DY, Hong YH and Lim HS. 1989. Changes of Kimchis Contained Different Garlic Contents During Fermentation. Korean J Food Sci Technol 21(1), 68-74.

Tawaha K, Alali FQ, Gharaibeh M, Mohammad M, El-Elimat T. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. Food Chem. 104: 1372-1378 (2007)

Ozgen M, Reese RN, Tulio AZ, Scheerens JC, Miller AR. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *J. Agr. Food Chem.* 54: 1151-1157 (2006)

Song HN, Lee DG, Han SW, Yoon HK, Hwang IK. Quality changes of salted and semi-dried mackerel fillets by UV treatment during refrigerated storage. *Korean J. Food Cook. Sci.* 21: 662-668 (2005)

Finlay, B. B. and Falkow, S. 1989. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 53, 210-230

Whipps, J. M; 1987. Effect of media on growth and interactions between a range of soil-born glass-house pathogens and antagonistic fungi. *New Phyto.* 107, 127-142

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업(해당사업 표기)의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업(해당사업 표기)의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.