

11-
1543000-
001484-
01

가
공
공
정
개
선
에
의
한
나
트
류
저
감
화
개
발
방
법
최
종
보
고
서

2016

농
림
축
산
식
품
부

고부가가치식품기술개발 R&D Report

발간등록번호

11-1543000-001484-01

가공공정 개선에 의한 나트륨 저감화 개발 방법 최종보고서

2016. 09. 21.

주관연구기관 / 차의과학대학교

협동연구기관 / 전주대학교

건국대학교

바이오벤(주)

위탁연구기관 / 경기대학교

차의과학대학교

건국대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “가공공정 개선에 의한 나트륨 저감화 방법 개발”(개발기간 : 2012. 08. ~ 2016. 08.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 09. 21.

주관연구기관명 : 차의과학대학교 산학협력단
협동연구기관명 : 전주대학교 산학협력단
협동연구기관명 : 건국대학교 산학협력단
협동연구기관명 : (주)바이오벤
위탁연구기관명 : 경기대학교 산학협력단
위탁연구기관명 : 건국대학교 산학협력단
위탁연구기관명 : 차의과학대학교 산학협력단

김 용 환
김 진 수
서 정 향
변 유 량
이 준 성
서 정 향
김 용 환



주관연구책임자 : 조 형 용
협동연구책임자 : 신 정 규
협동연구책임자 : 최 미 정
협동연구책임자 : 이 석 훈
위탁기관책임자 : 이 재 권, 금 영 수, 고 성 호

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	312010-4	해 당 단 계 연구 기 간	2015. 08. 08 - 2016. 08. 07	단 계 구 분	(최종단계)/ (총 4 단 계)
연구사업명	중 사업명	고부가가치식품기술개발사업			
	세부 사업명	저탄소·신가공/공정			
연구과제명	대 과 제 명	가공공정 개선에 의한 나트륨 저감화 개발 방법			
	세부 과제명	바이오선도가공기술을 활용한 HAP제조와 이를 활용한 나트륨 사용 저감화			
		관능검사를 활용한 짠맛 증진물질의 HTS 스크리닝 기법 개발 및 짠맛 평가 방법 확립			
		물리적 변화를 통한 나트륨 사용 저감화			
		신제조공정을 이용한 단백질수분해물 제조와 이를 활용한 저염화방법 개발			
연구책임자	조 형 용	해당단계 참 여 연구원 수	총: 35명 내부: 3명 외부: 32명	해당단계 연구 개발비	정부: 300,000 천원 민간: 100,000 천원 계: 400,000 천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 120명 내부: 12명 외부: 108명	총 연구개발비	정부: 1,200,000 천원 민간: 400,000 천원 계: 1,600,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	(1세부) 차의과학대학교 식품생명공학과		참여기업명: (주)다손, (주)대영수산식품		
	(1협동) 전주대학교 한식조리학과				
	(2협동) 건국대학교 생명자원식품공학과		참여기업명: 주식회사 삼양제넥스		
	(3협동) (주)바이오벤				
위탁연구	연구기관명: 경기대학교 식품생물공학과		연구책임자: 이 재 권		
	연구기관명: 건국대학교 생명자원식품공학과		연구책임자: 금 영 수		
	연구기관명: 차의과학대학교 바이오공학학과		연구책임자: 고 성 호		
<ul style="list-style-type: none"> ○ 발효-효소 가수분해, 초고압 처리기술 등을 활용한 동식물 단백질 가수분해 소재 생산공정 확립 및 짠맛증진 소재 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 짠맛증진 eHAP 베이스 소재 개발(APH, APH powder 2건) - 짠맛증진 eHVP 베이스 분말소재 개발(FEN-G, FEN-S 2건) ○ 개발 소재/기술을 활용한 공정개선으로 나트륨 20%↑ 저감화 달성 <ul style="list-style-type: none"> - 저염 어간장(sodium reduction(SR): 19~40%) - 액상 소스 및 조미료 base 개발 - 분무건조 조건에 따른 염미 강화가 다른 건식 소금 제조 - 라면 수프 (SR>20%) ○ 가공방법 및 가공적성 개선에 의한 나트륨 저감화 목표 달성 <ul style="list-style-type: none"> - 짠맛증진소재를 활용한 액상소스(SR: 90%) 및 복합조미식품개발(SR: 0.1%) - 가압함침 기술에 의한 저염 오징어 젓갈 개발(SR: 29~50%) - 소금의 불균일 짠맛 강화 제빵 기술 개발 - 염미강화제(GABA, MSG), 혹은 대체염(KCl, CaSO₄, MgSO₄)이 첨가된 저염 육제품 개발 - 리포솜 내 소금코팅 기술을 통한 소금 분포도 변화에 따른 짠맛 증진 체면 기술 개발 - 이중에멀전을 이용한 저염 치즈, 저염 사골 국물 개발 ○ 짠맛의 객관적 평가 확립 및 짠맛 증진물질 신속평가를 위한 랩은어칩 개발 ○ 기술이전 1건, 특허출원 9건, 특허등록 4건, 비SCI 논문 15건, SCI급 논문 8건, 시제품 2건, 시작품 12건, 홍보 17건, 및 인력양성 8명의 성과 창출 		<p>57~212쪽, 176쪽과 208쪽 507~577쪽, 564쪽</p> <p>212~229, 229쪽 236~242쪽 363~382쪽 507~577쪽, 565쪽</p> <p>237~244쪽 244~245쪽 246~272쪽 383~405쪽 405~415쪽</p> <p>415~451쪽</p> <p>451~459쪽</p> <p>279~362쪽, [별첨3] 참고</p> <p>587~594쪽</p>			

국문 요약문 - 제1세부

(바이오선도가공기술을 활용한 HAP제조와 이를 활용한 나트륨 사용 저감화)

	코드번호	D-01
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구의 목적: 동물성단백질 고압효소분해기술의 개발(짠맛증진물질 생산 및 대량 생산공정 개발) 및 가공공정 개선에 의한 나트륨 저감화 20% 달성(소스류 및 저염 젓갈) ○ 연구의 내용: <ul style="list-style-type: none"> ▪ 동물성 단백질 고압효소분해기술의 개발 ▪ eHAP 제조기술/공정개발 및 활용방안 검토 ▪ Pilot scale에서 공정 개선을 통한 짠맛증진물질 대량생산공정 개발 ▪ 저염 어간장 제조 기술 및 대량 생산 공정 개발 ▪ 저염 천연소스 및 복합조미식품 개발 ▪ 저염 젓갈 제조 기술 개발 ▪ 새로운 염미증진제 개발 가능성 탐색 	
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 동물성 단백질 고압효소분해기술의 개발 (lab scale) <ul style="list-style-type: none"> ▪ 원료, 상업적 효소 및 바이오선도가공기술(고압 활용) 선정 ▪ 짠맛증진물질 생산 가능성 탐색 ○ eHAP 제조기술/공정개발 및 활용방안 검토 (lab and pilot scale) <ul style="list-style-type: none"> ▪ 다구찌 강건설계에 의한 고압효소가수분해 조건의 최적화 ▪ pilot scale 단위공정 개발 및 1차 통합공정 개발 ▪ 염미증진제 가능성 탐색 및 규명과 제조된 eHAP의 활용방안 검토 ○ Pilot scale에서 공정 개선을 통한 짠맛증진물질 대량생산공정 개발 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 사업화 방안에 따라 공정 개선(여과 및 SD 공정) ▪ 원료 및 고압장비 변경에 의한 pilot scale에서의 고압효소가수분해 조건의 최적화(RSM 활용) ▪ 공정 개선 결과에 따른 대량생산을 위한 통합공정 개발 및 경제성 평가 ▪ 짠맛증진물질: 분말 시제품(APH: Anchovy Protein Hydrolysate) 1건과 액상 시제품 1건 제조 ○ 저염 어간장 제조 기술 및 대량 생산 공정 개발 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 현 공정의 개선과 APH의 혼합에 의한 저염 어간장 제조 기술 개발 ▪ 시제품(prototype) 개발: 액상 1건, 시제품(pilot): 분말제형 1건(다양한 농도로 변화 가능 → 나트륨 저감화 19~40%) ▪ 저염 어간장 대량 생산 공정 개발 ○ 저염 천연소스 및 복합조미식품 개발 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 액상 및 분말형 조미소재 base 개발 ; 시제품 각 1건 ▪ 저염 천연소스 제조기술 개발 ; 시제품 1건(나트륨 저감화 90%) ▪ 복합조미식품 제조기술 개발 ; 시제품 1건(나트륨 저감화 0.1%) ○ 저염 젓갈 제조 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 가압함침기술의 개발에 의한 염농도 5% 이하의 오징어 양념 젓갈 시제품 제조 ; 나트륨 저감화 29~50% ▪ APH로 소금 대체 가능성 확인(나트륨 저감화 10% 효과) ○ 새로운 염미증진제 개발 가능성 탐색 	

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 제1협동 위탁에서 짠맛증진물질 HTS 시스템의 가능성 확인 ▪ 동물성 기원의 새로운 eHAP 2건 확보 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개발된 고압효소가수분해기술 및 가압함침기술은 일본에 이어 세계에서 두 번째로 상용화 시스템을 갖춘 바이오선도가공기술로서 타 제품에 기술 적용 확대를 기대함 ○ 공정 개선에 의한 나트륨 저감화 가공식품(어간장, 소스 및 양념 젓갈)은 현 공정에서 바로 생산 가능하므로 확대 보급 기대 ○ 짠맛증진소재는 다양한 제품에서 나트륨 저감화에 활용 가능하므로 기술보급 기대 ○ 나트륨이 저감화된 가공식품의 확대 보급에 따라 국민 건강 증진에 기여 				
중심어 (5개 이내)	짠맛증진소재	고압효소가수분해기술	가압함침기술	저염 어간장 및 소스	저염 젓갈

국문 요약문 - 제1협동

(관능검사를 활용한 짠맛 증진물질의 HTS 스크리닝 기법 개발 및 짠맛 평가 방법 확립)

	코드번호	
	D-01	
연구의 목적 및 내용	<p>[목적]: - 관능검사를 통한 짠맛 증진 효과 평가 프로토콜 확립 - 패널 및 기기를 활용한 짠맛증진물질 규명 - 짠맛 증진 물질의 high-throughput screening system 확립</p> <p>[내용 및 범위]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Salt Enhancer HTS system 확립 및 짠맛 증진 관련 감각적 테스트 기반 기초자료 확립 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 관능검사 salt enhancer HTS system 확립을 위한 Panel 선발 및 훈련 ▪ Panel을 활용한 짠맛 증진 물질 효과 평가 protocol 작성 ▪ 기기분석을 통한 짠맛 증진 물질 규명 방법 확립 ○ 관능검사 및 기기분석을 이용한 짠맛증진물질의 HTS system 확립 <ul style="list-style-type: none"> ▪ Training panel을 활용한 HTS system 확립 및 짠맛 증진물질 탐색 지원 ▪ 기기분석(sensomics mapping)을 활용한 짠맛 증진 물질 규명 ▪ 분석 지원 시스템 구축 이화학적 성분 조사 및 분석 ○ 묘사분석을 활용한 Salt Enhancer 물질의 관능적 특성 및 cell based HTS system 개발 <ul style="list-style-type: none"> ▪ Receptor cell을 이용한 짠맛 증진 물질의 high speed HTS system 개발 추진 ▪ 묘사분석을 활용한 salt enhancer 소재의 관능적 특성 분석 ▪ Receptor cell based HTS system (Lab on a chip) 개발 ○ HTS system을 활용한 짠맛 증진 물질의 screening 및 validation <ul style="list-style-type: none"> ▪ HTS system(관능검사 및 Lab on a chip)을 활용한 짠맛 증진 물질의 screening 및 validation ▪ 짠맛 증진 물질이 적용된 제품의 나트륨 저감화 평가 및 검증 ▪ 신규 소재 탐색 	
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 관능검사원의 선발, 교육 및 훈련을 통한 짠맛 증진 평가법 확립 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 짠맛 증진물질 또는 대체물질의 관능적 특성을 규명하기 위한 관능검사원 선발, 교육 및 훈련. ▪ 짠맛 평가 및 짠맛 증진 물질 screening법 확립 ○ Training panel을 활용한 HTS system 확립 및 짠맛 증진물질 탐색 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 양조간장을 이용한 식품 내 소금사용량 감소효과 확인 ▪ 동물성 단백질 가수분해물(eHAP)의 관능적 특성 및 짠맛 증진효과 검증 ▪ 식물성 단백질 가수분해물(eHVP)의 관능적 특성 및 짠맛 증진효과 검증 ○ 염미 증진 효능 저분자량 peptide 분석법 확립 및 장류 시료 분석 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 장류식품 및 원료 제품의 가공 공정에 따른 염미 증진 peptide 및 휘발성 성분의 조성 및 정량분석 실시 ○ 랩온어칩을 개발하여 짠맛 증진후보물질의 효능을 신속, 간단, 저렴하게 평가할 수 있는 새로운 시스템 구축 	
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 짠맛 증진 물질을 평가할 수 있는 관능검사법 및 짠맛 증진 물질 screening panel 훈련 방법 확립으로 다양한 짠맛물질의 신속 선별 가능 ○ Lab on a chip에 의한 짠맛 증진물질 screening 활용 가능 ○ 국내 전통 식품에서 짠맛 증진 물질 탐색에 활용 	
중심어 (5개 이내)	짠맛 증진물질	관능검사
	고속 선별법	나트륨 정량분석
		나트륨 저감

국문 요약문 - 제2협동
(물리적 변화를 통한 나트륨 사용 저감화)

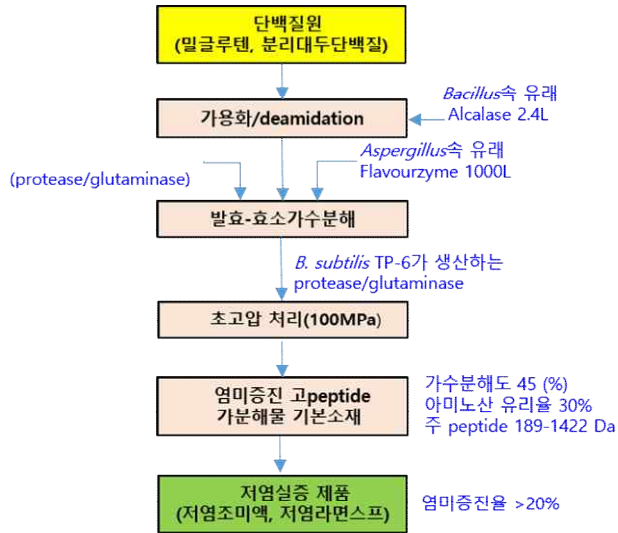
		코드번호	D-01		
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구의 목적: 물리적 가공 방법의 개선을 통한 나트륨 사용 저감화를 목적으로, 건식소금, 저염 제빵, 저염제면 가공 방법 개발하고 상용화 조건의 최적화 공정과정을 찾는 것을 최종 목적으로 한다. ○ 연구의 내용 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 염미강화제 첨가, 분무건조 조건에 따른 염미 강화가 다른 건식 소금 제조 ▪ 소금의 불균일 보편맛 강화 제빵 기술 개발 ▪ 염미강화제(GABA, MSG), 혹은 대체염(KCl, CaSO₄, MgSO₄)이 첨가된 저염 육제품 개발 ▪ 리포솜 내 소금코팅 기술을 통한 소금 분포도 변화에 따른 짠맛 증진 제면 기술 개발 ▪ 이중에멀전을 이용한 저염 치즈, 저염 사골 국물 개발 ▪ 건식소금, 저염 강화된 제빵, 제면의 대량 생산 적용 최적화 확립 				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 염미강화제 첨가, 분무건조 조건에 따른 염미 강화가 다른 건식 소금 제조 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 분무건조 공정 조건에 따른 소금결정체 나노입자미세화 제조 확립 ▪ 나노미세화 된 소금의 짠맛 증진 효과 확립 ▪ 대체염, 염미강화제 첨가 건식소금 제조 시 염미강화 증진효과 향상 ○ 소금의 불균일 분포도에 따른 짠맛 강화 제빵 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 짠맛 농도조절을 통한 염미 증진 효과 확립(최적 혼합비, 리포솜 코팅 소금) ▪ 짠맛 증진제 첨가를 통한 짠맛 강화 제빵 기술 개발 ▪ 기존 사용 소금 양의 20% 저감 효과: 기술이전 1건 ○ 염미 강화제(GABA, MSG), 혹은 대체염(KCl, CaSO₄, MgSO₄)이 첨가된 저염 육제품 개발 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 육패티 적용 시 MSG의 경우 20%의 나트륨 저감 성공 ○ 리포솜 내 소금코팅 기술을 통한 소금 분포도 변화에 따른 짠맛 증진 제면 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 건면, 생면에서 기존 사용 소금 양의 5% 저염 효과 ▪ 염미증진제 사용 시 기존 사용 소금양의 10%의 저염 효과 ○ 이중에멀전을 이용한 저염 치즈 및 저염 사골 국물 개발 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 저염 액상 식품 적용을 위한 담수 코팅 기술 개발 성공 ▪ 담수가 코팅된 이중에멀전이 적용된 저염치즈 개발 ▪ 담수가 코팅된 저염 사골 국물 개발 ▪ 기존 사용 소금양의 20% 저감 효과 ○ 건식소금, 저염 강화된 제빵, 제면의 대량 생산 적용 최적화 확립 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 대량생산 최적화 공정과정 확립 ▪ 기술이전 및 건식소금이 가미된 스낵, 식빵 및 제면 시제품 개발 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 저비용, 고효율의 물리적 가공 방법의 변화를 통한 저염화 된 건식소금, 제빵, 제면, 한식국물 제조 가능으로 확대 보급 기대 ○ 다양한 염미증진제, 대체제의 제품별 적용 가능성 제시로 나트륨 저감화 활용 가능 ○ W/O/W emulsion 응용을 통한 액상 조미 식품 전반 적용 확대 가능 ○ 다양한 식품 군의 나트륨 저감화 가능성 제시로 국민 식품 전반에 적용하여 국민 건강 증진에 기여 				
중심어 (5개 이내)	나트륨 저감화	저염빵	저염스낵	저염제면	이중에멀전

국문 요약문 - 제3협동

(신제조공정을 이용한 단백가수분해물 제조와 이를 활용한 저염화방법 개발)

	코드번호	D-01
연구의 목적 및 내용	<p>○ 목적</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 효소기반 생물공학기술과 초고압 기술 등의 신가공기술의 융복합에 의해 고수준의 가수분해도를 단시간에 달성하며 저분자 peptide 가수분해액을 효율적으로 생산할 수 있는 식물성 단백질 신가수분해법 개발. ▪ 염미증진 효과와 우수한 정미력을 가진 식물성 단백질 가수분해물 베이스를 개발하고 이를 이용하여 소비자가 수용할 수 있는 짠맛 강도와 풍미를 줄 수 있는 저염 실증제품 개발. <p>○ 내용</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 식물성 단백질 (소맥글루텐, 분리대두단백질) 가수분해 효소와 glutaminase 활성이 우수한 균주를 선발하고 그 가수분해 특성을 연구. ▪ 단백질원의 가용화와 가수분해를 위한 가압열수 및 고압효소분해 특성을 연구하고, 발효-효소가수분해 기술과의 융복합을 통한 고도가수분해 공정 개발. ▪ 신가수분해기술에 의한 염미증진 기초소재 시제품을 생산하고 이를 이용한 조미 저염간장 및 저염 라면스프를 개발하여 나트륨 저감화 실증시험. 	
연구개발성과	<p>○ 시판 프로티아제의 단백질원의 가수분해 특성을 비교 연구 하여 단백질 가용화를 위한 Alcalase 2.4L (Novo) 및 가수분해를 위한 end/exo형 protease를 함유한 Flavourzyme 1000L (Novo)을 선정</p> <p>○ 발효형 효소분해 조미료 생산에서 glutamine으로부터 glutamic acid를 생성시키는 glutaminase가 고가이고 대량생산이 어렵다는 문제점을 해결할 수 있는 우수한 발효균주인 <i>Bacillus subtilis</i> TP6 선발.</p> <p>○ 아임계수 (120~250℃) 처리가 식물성 단백질의 enzyme susceptibility에 미치는 영향 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 식물성 단백질의 아임계수 처리조건에 따른 protease accessibility 변화 연구 <p>○ 단백질을 Alcalase로 액화 시키고 여기에 Flavourzyme과 <i>B. subtilis</i> TP-6를 접종하여 발효와 효소가수분해를 동시에 진행시킴으로서 저분자 peptide 가수분해물을 효율적으로 생산할 수 있는 salty enhancer 베이스 생산공정 확립</p> <p>○ 단백질 가수분해물 salt enhancer 베이스 생산 성공</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 가수분해율 45%, 아미노산 유리율 30% 및 5 kDa 이하의 peptide 함량 약 70%인 고펙타이드 단백질 가수분해물 베이스 생산 성공 ▪ FEN-G (fermentation and enzyme hydrolyzed wheat gluten) 	

▪ FEN-S (fermentation and enzyme hydrolyzed soybean protein isolate)



〈식물성 단백질 가수분해물 salty enhancer 베이스 생산공정〉

- 저염조미액 개발
 - FEN-S에 최근 염미증진물질로 주목받고 있는 BioGABA를 이용한 「조미 저염간장」 (low salt soy sauce like seasoning) 개발
- 저염 라면스프 시험제품 및 시판 라면스프의 나트륨 저감화 실증
 - 지보단 코리아와의 협력을 통하여 「저염 라면스프」 시험제품 개발
 - 시험제품과 시판 진라면스프에 FEN-G를 적용하여 20% 이상의 나트륨 저감화와 만족한 소비자 기호도 확인

연구개발성과의
활용계획
(기대효과)

- 독자적인 발효-효소 병용 (*B. subtilis* TP-6-Flavour) 가수분해기술에 의해 재래 효소법 및 발효법의 결점인 우마미 부족과 쓴맛 생성을 방지.
- 짠맛 증진, 지미 및 마스킹 효과를 부여하는 저분자 peptide를 풍부하게 함유한 가수분해물을 무첨가로 분말화한 범용 조미 베이스소재 생산.
- 스프 생산 전문기업과의 협력을 통하여 salty enhancer 조미소재로서 염미증강 조미액, 각종 분말스프 등 다양한 활용 추진
- 개발된 짠맛 증진 베이스 소재는 저염효과가 우수하여 다양한 식품의 나트륨 저감화에 기여할 것으로 기대 됨.

중심어 (5개 이내)	식물성단백가수 분해물	나트륨 저감화	저염조미료	염미증진제	저염라면스프
----------------	----------------	---------	-------	-------	--------

〈SUMMARY-SP1〉

(Manufacturing of HAP using bio-guided processing and sodium reduction by processing technique and HAP)

	코드번호	D-02
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Objective: Development of technology for pressure-assisted enzymatically hydrolysis of animal protein (production of salt enhancer and development of mass production process) and sodium reduction of 20% (in sauces and Jeot-gal) by process improvement ○ Content of research: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Development of technology for pressure-assisted enzymatically hydrolysis of animal protein ▪ Development of process and manufacturing technology for eHAP, and feasibility study on usage of them ▪ Development of mass production process of salt enhancer by process improvement in pilot scale ▪ Development of mass production process and manufacturing technology for low-salt fish sauce ▪ Development of seasonings and natural low-salt sauce ▪ Development of manufacturing technology for low-salt Jeot-gal ▪ Screening of new salt enhancer with HTS system 	
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Development of technology for pressure-assisted enzymatically hydrolysis of animal protein (in lab scale) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Selection of Anchovy as a raw materials, mixed enzyme (Alcalase : Flavourzyme = 1 : 2) as a commercial proteolytic enzymes, and medium pressure processing technology as a novel technology ▪ Feasibility study on production of salt enhancer ○ Development of process and manufacturing technology for eHAP, and feasibility study on usage of them <ul style="list-style-type: none"> ▪ Optimization of process conditions for pressure-assisted enzymatically hydrolysis of raw Anchovy by using Taguchi Robust Design Method ▪ Development of integrated process and unit operation for production in pilot scale ▪ Feasibility test on the extended use of eHAP and screening of feasibility as a salt enhancer ○ Development of mass production process of salt enhancer by process improvement in pilot scale <ul style="list-style-type: none"> ▪ Process improvement of filtration and spray drying ▪ Because of changing raw material and pressure system, optimization of process conditions for pressure-assisted enzymatically hydrolysis of raw 	

	<p>Anchovy in pilot scale by RSM</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Evaluation of cost-effectiveness and development of integrated process and mass production process by process improvement in pilot scale ▪ Pilot: 1 (powder type of salt enhancer) ▪ Prototype: 1 (liquid type of salt enhancer) <p>○ Development of mass production process and manufacturing technology for low-salt fish sauce</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Present process improvement and mixing of APH (as a salt enhancer) ▪ Prototype: 1 (liquid) → 19~40% sodium reduction ▪ Pilot: 1 (powder) → 19~40% sodium reduction ▪ Development of mass production process for low-salt fish sauce <p>○ Development of seasonings and natural low-salt sauce</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Development of base ingredients for seasonings: 2 prototype (liquid and powder) ▪ Development of manufacturing technology for natural low-salt sauce: 1 prototype (90% sodium reduction) ▪ Development of manufacturing technology for seasonings: 1 prototype (0.1% sodium reduction) <p>○ Development of manufacturing technology for low-salt Jeot-gal</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Pressure impregnation technology was developed for manufacturing of Jeot-gal with 5% salt content. → 29~50% sodium reduction ▪ Confirmation of feasibility on substitute APH for salt → 10% sodium reduction <p>○ Screening of new salt enhancer with HTS system</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ APH was screening of salt enhancer by Lab on a chip. ▪ New eHAP: We obtained 2 eHAP from Innoway. 				
Expected Contribution	<p>○ Pressure-assisted enzymatically hydrolysis and pressure impregnation technology may be secondly developing as a novel technology with commercial production system in the world. So, it is expected to extend the usage of them in the food-related industry.</p> <p>○ It is possible to apply manufacturing technology of low-salt processed foods (fish sauce, sauce and Jeot-gal etc.) by process improve to a present process. So, it is expected to extend the usage of them.</p> <p>○ It is possible to reduce sodium usage by the salt enhancer in processed food industry. So, it is expected to extend the usage of them.</p> <p>○ Suggesting reduction of saltiness in various processed foods, it can make improve people health.</p>				
Keywords	salt enhancer	pressure assisted enzymatically hydrolysis	pressure impregnation	low salted fish sauce and sauce	low salted jeot-gal

〈SUMMARY-CP1〉

(Development of salt enhancer HTS screening method by sensory evaluation and establishment of salty taste assessment method)

	코드번호	D-02
Purpose& Contents	<p>[Purpose]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Establishment of salty enhancement evaluation protocol by sensory method ○ Examination of salty enhancer by sensory panel and instrument analysis ○ Establishment of high throughput screening system for salty enhancer <p>[Contents]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Establishment of salty enhancer HTS system and Rearch of sensory test data related to salty enhancement <ul style="list-style-type: none"> ▪ Selection and training of panel for salty enhancer HTS system setting by sensory evaluation ▪ Make an evaluation protocol of salty enhancer by sensory panel ▪ Examination of salty enhancer by instrument analysis ○ Establishment of HTS system of salty enhancer HTS system setting by sensory evaluation <ul style="list-style-type: none"> ▪ Establishment of HTS system with training panel and support of salty enhancer screening ▪ Examinatin of salty enhancer by instrument analysis ▪ Analysis of physicochemical properties by analytical system ○ Sensory properties of salty enhancer by descriptive analysis and development of cell based HTS system <ul style="list-style-type: none"> ▪ Screening and validation of salty enhancer with HTS system (sensory evaluation and lab on a chip) ▪ Evaluation and validation of sodium reduction of salty enhancer applied products 	
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Establishment of evaluation method by selection, education and training of sensory panels <ul style="list-style-type: none"> ▪ Panel selection, education and training for examination of salty taste enhancer ▪ Salty taste evaluation and establishment of salty enhancer screening method ○ Establishment of HTS system using training panel and screening of salty enhancer <ul style="list-style-type: none"> ▪ Validation of salt reduction effect in foods with fermented soy sauce ▪ Sensory properties and salty taste enhancement validation of eHAP 	

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sensory properties and salty taste enhancement ○ Establishment of low molecular weight peptide analysis method with salty taste enhancement and analysis of soy fermented foods ▪ Analysis of salty enhancement peptide and volatile component as process of soy fermented foods ○ Development of rapid analysis system with lap on a chip of various salty enhancer 				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Rapid screening of various salty enhancer by rapid screening sensory evaluation method and trained panel for salty enhancer screening ○ Application on salty taste enhancer screening by Lab on a chip ○ Application on salty taste enhancer screening from Korean traditional foods 				
Keywords	slat enhancer	sensory evaluation	High-throughput screening	sodium instrumental analysis	sodium reduction

〈SUMMARY-CP2〉

(Strategy to reduce additional sodium using physical modification technique)

	코드번호	D-02
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Objective: To reduce salt consumption by improving mechanical food processing process, it is aimed to develop low-salt dried salt, breads and noodles manufacturing processes and establish the optimized processes for commercialization. ○ Content of research <ul style="list-style-type: none"> ▪ Manufacturing dried salts with various salt enhancing intensity depending on salt enhancers and spray-drying conditions. ▪ Developing saltier baking process by irregularly locating salts in breads. ▪ Developing new meat products added with salt enhancers (GABA, MSG) and replacers (KCl, CaSO₄, MgSO₄). ▪ Developing salt-enhanced noodle through the change of salt dispersion by liposome coating salts in itself. ▪ Developing low salt cheeses and beef leg bone soup by utilizing double emulsion technology. ▪ Establishing the optimal mass production process of low-salt dried salt, breads and noodles developed in this research. 	
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Manufacturing dried salts with various salt enhance ability depending on salt enhancer and spray-drying conditions. <ul style="list-style-type: none"> ▪ Established the manufacturing process of nano-sized fine salt crystals with diverse conditions of spray-drying. ▪ Verified effect on enhancing saltiness of nano-sized fine salt crystals. ▪ Improved the efficiency of salt enhancer on manufacturing dried salt added with replacers or salt enhancers. ○ Developing saltier baking process by irregularly locating salts in breads. <ul style="list-style-type: none"> ▪ Verified the effect on enhancing saltiness with regulation of saltiness (optimal mixing ratio, the salt coated by liposome). ▪ Developed the baking process of saltier breads with salt enhancers. ▪ Reduced the salt consumption by 20% compared to previous consuming tendency: A technology transfer achieved. ○ Developing new meat products added with salt enhancers (GABA, MSG) and replacers (KCl, CaSO₄, MgSO₄). <ul style="list-style-type: none"> ▪ Acquired the reduce in salt by 20% on employing MSG to meat patties. ○ Developing salt-enhanced noodle through the change of salt dispersion by 	

	<p>liposome coating salts in itself.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Reduced the salt consumption by 5% in dried and raw noodles. ▪ Reduced the salt consumption by 10% with salt enhancers. <p>○ Developing low salt cheeses and beef leg bone soup by utilizing double emulsion technology.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Succeeded in developing the technology that can coat fresh water, acceptable for applying to liquefied seasoning industry. ▪ Developed low-salt cheese applied with double emulsion which coated fresh water. ▪ Developed low-salt beef leg bone soup applied with double emulsion which coated fresh water. ▪ Reduced the salt consumption by 20%. <p>○ Establishing the optimal mass production process of low-salt dried salt, breads and noodles developed in this research.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Established the optimal mass production process. ▪ Achieved a technology transfer and produced prototypes of white pan breads noodles and snacks added low-salt dried salt. 				
Expected Contribution	<p>○ It is expected to develop the usage to low-salt dried salt, bread, noodle and Korean style soup by changing to cost-effective mechanical food processing process.</p> <p>○ It is possible to reduce sodium consumption by providing various salt enhancers and replacers and its acceptability to commercial products.</p> <p>○ It can be generally accepted to liquefied seasoning industry by applying W/O/W emulsion technology.</p> <p>○ Suggesting reduction of saltiness in various foods, it can make improve people health.</p>				
Keywords	salt reduction	white pan bread	noodle	snack	double emulsion

〈SUMMARY-CP3〉

(Development of HVP by fusion hydrolysis process and application for salt reduction)

	코드번호	D-02
Purpose& Contents	<p>[Purpose]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Development of fusion technology for protein hydrolysis using enzymatic hydrolysis under hyper pressure and microbial fermentation ○ Development of salty taste enhancer which give consumer same salty taste and favor in spite of low salt content <p>[Contents]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Selection of enzyme for vegetable protein hydrolysis ○ Hydrothermal treatment and enzymatic hydrolysis under hyper pressure (100 MPa) for vegetable protein hydrolysis ○ Verifying test for salty taste enhancer to soybean sauce and ramen soup 	
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Selection of enzyme for vegetable protein hydrolysis <ul style="list-style-type: none"> ▪ Alcalase 2.4L (<i>Bacillus</i> origin) ▪ Flavourzyme 1000L (<i>Aspergillus</i> origin) ▪ Crude microbial enzyme (<i>Bacillus subtilis</i> sp. TP6) ○ Characteristic study of subcritical water treatment to vegetable protein <ul style="list-style-type: none"> ▪ change of enzymatic hydrolysis activity to vegetable protein ○ Establishment a basis of fusion protein hydrolysis <ul style="list-style-type: none"> ▪ Liquefying with Alcalase 2.4 L ▪ Enzymatic hydrolysis with Flavourzyme and crude enzyme of <i>Bacillus subtilis</i> sp. TP6 ▪ Hydrolysis under high pressure (100 MPa) ○ Production of HVP as salty taste ehancer <ul style="list-style-type: none"> ▪ Hydrolysis ratio 45%, free amino acid content 30% and high 	

	<p>proportion(about 70%) of low molecular peptide (under 5 kDa)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ FEN-G (fermentation and enzyme hydrolyzed wheat gluten) ▪ FEN-S (fermentation and enzyme hydrolyzed soybean protein isolate) <p>○ Development of low salt soy sauce</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Usage of FEN-S and BioGABA ▪ Sodium reduction 20% up <p>○ Verification test for sodium reduction</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Usage of FEN-G ▪ Ramen soup supported by Gaubodan Korea ▪ Verifying above 20% sodium reduction in spite of same salty taste and favor 				
Expected Contribution	<p>○ Production of low sodium food due to reduce salt content</p> <p>○ Application to ramen soup and soy source etc.</p> <p>○ Development of novel salt market by combination of salt and enhancer(low sodium salt - same salty taste and favor)</p>				
Keywords	HVP	Low sodium	Low salt seasoning	Salty taste enhancer	Low salt

CONTENTS

Chapter 1. Introduction of the project	20
Chapter 2. Domestic and foreign present condition of the research	33
Chapter 3. Research progresses & results	57
Section 1. Manufacturing of HAP using bio-guided processing and sodium reduction by processing technique and HAP	57
Section 2. Development of Salt Enhancer HTS Screening method by Sensory Evaluation and Establishment of Salty Test Assessment method	279
Section 3. Strategy to reduce additional sodium using physical modification technique	363
Section 4. Development of HVP by fusion hydrolysis process and application for salt reduction	465
Chapter 4. Goal achievement & level of contribution	578
Chapter 5. Plans for future application	595
Chapter 6. Foreign scientific and technological intelligence	598
Chapter 7. Security grade of R&D outputs	600
Chapter 8. Research facility & equipment status	601
Chapter 9. Implementation of safety measures	601
Chapter 10. Typical research achievement of the project	603
Chapter 11. Etc.	604
Chapter 12. References	604
 <Attachment> Reports of contract research project	
1. Development of Low molecular peptide analysis method of soy fermented foods by LC-MS	
2. Development of lap-on-a-chip for rapid evaluation of salty enhancer	
3. Sensory evaluation for various low sodium foods	

〈 목 차 〉

제1장. 연구개발과제의개요	20
제2장. 국내외 기술개발 현황	33
제3장. 연구수행 내용 및 결과	57
제1절. 바이오선도가공기술을 활용한 HAP제조와 이를 활용한 나트륨 사용 저감화	57
제2절. 관능검사를 활용한 짠맛증진물질의 HTS 스크리닝 기법 개발 및 짠맛 평가 방법 확립	279
제3절. 물리적 변화를 통한 나트륨 사용 저감화	363
제4절. 신제조공정을 이용한 단백질가수분해물 제조와 이를 이용한 저염화방법 개발	465
제4장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	578
제5장. 연구결과의 활용계획 등	595
제6장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	598
제7장. 연구개발성과의 보안등급	600
제8장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	601
제9장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	601
제10장. 연구개발과제의 대표적 연구실적	603
제11장. 기타사항	604
제12장. 참고문헌	604

〈별첨〉 위탁연구개발보고서

1. LC-MS를 이용한 장류식품의 저분자량 펩타이드 분석법 개발
2. 짠맛 증진물질 신속평가를 위한 랩온어칩 개발
3. 다중 저염 식품군의 관능평가 분석

제1장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발 목적

1. 최종목표

- 가공식품의 나트륨 사용 저감화를 위한 가공방법 및 가공적성 개선 기술 개발
 - 나트륨 저감화 목표: 20%
 - 물리적 처리에 의한 소금(제재 또는 가공소금), 짠맛 증진 물질(eHAP 및 eHVP), 천연조미료 개발
 - 가공방법 및 가공적성 개선을 통한 제품개발 5건(식빵, 우동면, 젓갈, 라면용 스프, 소스 또는 드레싱)
 - 짠맛의 객관적 평가법 확립



Fig. 1-1-1 연구 개략도

2. 세부 및 협동 과제별 목표

가. 제1세부: 바이오선도가공기술을 활용한 HAP제조와 이를 활용한 나트륨 사용 저감화

- 효소 기반 기술과 고압액화기술의 융합에 의해 기존 효소가수분해공정에서 달성할 수 없었던 고수준의 가수분해율을 단기간에 달성할 수 있는 새로운 동물성 단백질 고압효소분해기술 개발

- 제조된 eHAP의 염미증진제로서의 가능성 탐색 및 규명
- 고압효소분해기술 및 eHAP를 활용하여 저나트륨 가공식품 제조기술개발(소스 및 젓갈)

나. 제1협동: 관능검사를 활용한 짠맛 증진물질의 HTS 스크리닝 기법 개발 및 짠맛 평가 방법 확립

- 관능검사를 통한 객관적 짠맛 증진 효과 평가 프로토콜 확립
- Panel test & Instrument analysis (sensomics mapping)을 활용한 짠맛증진물질 규명
- 짠맛 증진 물질의 High-throughput screening system 확립

다. 제2협동: 물리적 변화를 통한 나트륨 사용 저감화

- 소금입자를 마이크로에서 나노크기까지 제조하여, 입자크기에 따른 짠맛감도에 대한 database를 구축하여, 최대 짠맛을 낼 수 있는 최적 공정과정을 확립한다. 이를 기초로 소금 첨가량 및 내재된 나트륨 함량의 최소화 및 소비자가 수용할 수 있는 짠맛을 구현 하면서, 최종적으로 가공식품에 적합한 제과제빵용 나트륨 저감화 가공 공정 기술 개발 및 산업화

라. 제3협동: 신제조공정을 이용한 단백질가수분해물 제조와 이를 활용한 저염화방법 개발

- 효소생물공학기술과 신가공기술인 가압열수의 융합에 의해 기존 효소가수분해공정에서 달성할 수 없었던 고수준의 가수분해율을 단시간에 달성할 수 있는 새로운 「식물성 단백질 가수분해법」 개발
- 증미력이 우수한 식물성 단백질 고도가수분해물 천연조미료 소재(배합원료) 및 저염 실증 제품 레시피 개발
- 소비자가 수용할 수 있는 짠맛강도와 풍미를 줄 수 있는 저염 라면스프 개발

제2절 연구개발의 필요성

1. RFP에서 제시한 필요성

- 우리나라는 해외에 비해 국민 일인당 평균 나트륨 섭취가 상대적으로 높음
- 유럽연합 및 미국 등 선진국에서는 국가 차원에서 나트륨의 저감화를 위한 방안 및 규제안을 제시하고 있어, 국내에서도 국민 건강적인 측면은 물론, 가공식품 산업의 지속적인 성장을 위해 가공식품 중 나트륨의 저감화를 위한 지속적인 연구가 필요함
- 최근 나트륨 등에 의한 짠맛의 감지/인지 기작이 새롭게 규명되고 있어, 이를 활용한 과학적인 저감화 방법이 필요함
- 선진국에서는 가공방법 개선 등에 의한 나트륨 저감화에 대한 새로운 시도가 이루어지고 있으나, 국내에서는 기존의 원료대체 수준의 연구방법으로, 사용량 자체의 감소를 위한 가공법 또는 제품 적용 기술을 추진함

2. 국민건강증진을 위해 나트륨 섭취 저감화 필요성

가. Health and Sodium Intake

- 소금은 인체 내의 생리작용을 위하여 필수적인 무기질 중 하나로 체액의 구성분 중 필수 불가결한 물질이며, 주성분은 염화나트륨(NaCl ; Sodium Chloride)으로서 Na 이온은 세포 외액에서 삼투압을 비롯하여 산과 염기의 평형 등 체내 항상성 유지에 주요한 역할을 하고, 그 외에도 신경을 흥분시켜 근육을 수축시키거나, 영양소를 이동시키는 운반수단으로 체내에서 중요한 작용을 함.
- 체내에서 요구하는 생리학적 나트륨의 양은 180-230 mg/day로 일반적으로 섭취하는 자연식품에서 충분히 공급받을 수 있는 정도임(WHO, 2007). 그러나 보건복지부 보고 자료에 따르면 우리나라 국민의 일일 나트륨 섭취량은 4878 mg으로, 세계보건기구(WHO) 최대 섭취 권고량의 2000 mg보다 2.4배 높은 매우 심각한 수준이다 (Fig. 1-2-1). 이는 소금 12 g(소금 1 g당 나트륨 0.4 g)에 해당하는 양이다. 특히 30-50대 남성의 경우는 무려 6327 mg으로 3배가 넘었으나 국민건강증진종합계획에 의한 나트륨 저감화 정책에 의해 3,900-5,300 mg/day로 줄었다. 아직도 이러한 나트륨 섭취량은 아프리카 국가를 제외하고 최고치인 것으로 나타났다. 일일 소금의 섭취량을 비교해 본 결과 미국의 경우 3,400-3,500 mg/day를 섭취하고 있으며, 유럽연합은 2,160-3,900 mg/day(EFSA, 2005)으로 현재도 미국이나 유럽연합에 비하여 매우 높아 **나트륨 저감화 기술 개발이 시급**.

국민 1인당 일일 나트륨 섭취량



표 2-5-2 주요국 나트륨 일일 섭취량 현황 : 2014

Table 2-5-2. Status of major daily sodium intake amount : 2014

구분 Classification	한국 Korea	일본 Japan	영국 England	독일 Germany	프랑스 France	미국 USA
성인남성	5,280	4,280	3,900	2,840	3,880	3,463
성인여성	3,885	4,280	2,720	2,160	2,960	3,463

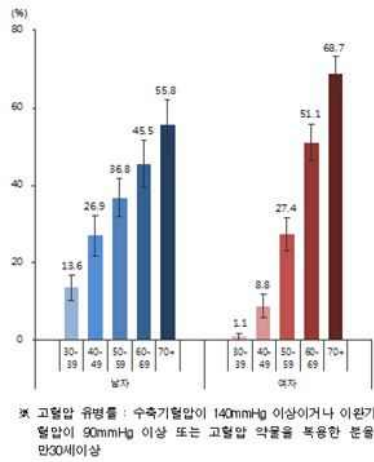
자료 : 식품의약품안전처 영양안전정책과

Source : MFDS, Nutrition Safety Policy Division

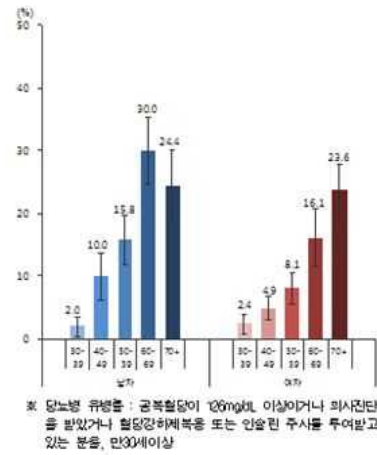
Fig. 1-2-1 국민 1인당 일일 나트륨 섭취량과 해외 나트륨 섭취량 비교(2015년, 식품의약품 통계연보)

- 소금의 과다 섭취로 고혈압 유병율은 지속적으로 증가(Fig. 1-2-2.)하고 있고, 고혈압 입원환자 비율이 OECD 국가 중 4번째로 높게 나타나고 있으며, 하루 소금 6 g을 더 섭취하면 관상동맥 심장질환 사망률 56%, 심혈관 질환 사망률 36%가 증가한다는 연구결과가 보고 됨(2007, WHO).
- 나트륨 과잉섭취와 관련된 4대 만성질환 진료비(고혈압, 뇌혈관질환, 심장질환, 당뇨병)가 전체의 15.1%를 차지하는 가운데 4대 질환 보험급여 규모 및 환자가 빠르게 증가하고 있으며, 년도별 4대 질환 보험급여 규모가 2005년 2조 5천 5백억 원에서 2010년도에는 4조 9천 1백억 원으로 나트륨 함량 증가와 더불어 늘어나는 추세임.
- 고염섭취로 인한 혈압상승과 이로 인한 심혈관 질환의 증가를 명확하게 규정하였으며, 전 세계 인구의 26%는 고혈압환자이고, 노화로 인한 고혈압은 소금의 과다 섭취와 명백한

인과관계 나타났으며, 위암, 골다공증, 당뇨 등의 발생과 관련이 있어 비만과 함께 성인 병의 주요 인자로 대두되고 있음(2007, WHO).



(A) 연령별 고혈압 유병률



(B) 연령별 당뇨병 유병률

Fig. 1-2-2 30세 이상 성인의 고혈압 유병률 25.5%, 당뇨병 유병률 10.2%, 보건복지부자료(2014년, 보건복지부)

○ 소금을 섭취하는 형태

- 유럽 및 북미지역 - 75% ; 가공식품 및 외식에서 섭취
- 덴마크 - 90% ; 가공식품의 소금에서 유래
- 아시아 - 72~76% ; 가정식 및 소금의 형태로 섭취

▶ Table 1-2-1.에서 볼 수 있듯이 우리나라의 나트륨을 공급하는 식품 중 1위가 소금의 형태이며, 김치와 장류를 제조 할 때 소금을 사용하므로 나트륨 함량이 적은 소금 대체제 또는 적은 사용으로도 짠맛과 풍미에 영향을 주지 않는 새로운 유형의 가공 또는 제재소금 개발이 시급.

Table 1-2-1. 나트륨 섭취량의 주요 급원식품 : 성별, 만1세이상(2014)

구분 순위	전체 (n=6,801)					남자 (n=2,976)					여자 (n=3,825)				
	식품명	섭취량 (mg)	표준 오차	섭취 분율 (%)	누적 분율 (%)	식품명	섭취량 (mg)	표준 오차	섭취 분율 (%)	누적 분율 (%)	식품명	섭취량 (mg)	표준 오차	섭취 분율 (%)	누적 분율 (%)
1	소금	916.6	39.7	23.6	23.6	소금	1,118.1	66.0	24.5	24.5	소금	715.1	29.2	22.2	22.2
2	간장	390.4	12.6	10.0	33.6	김치,배추김치	478.5	13.2	10.5	35.0	간장	340.7	12.4	10.6	32.8
3	김치,배추김치	390.0	8.9	10.0	43.6	간장	440.1	19.5	9.7	44.7	김치,배추김치	301.5	9.4	9.4	42.1
4	된장	245.6	8.5	6.3	49.9	된장	283.7	11.6	6.2	50.9	된장	207.4	9.8	6.4	48.6
5	라면	180.9	10.2	4.7	54.6	라면	255.7	17.1	5.6	56.5	고추장	120.2	5.4	3.7	52.3
6	고추장	154.8	5.3	4.0	58.6	고추장	189.3	8.1	4.2	60.7	라면	106.2	8.0	3.3	55.6
7	국수	103.3	8.5	2.7	61.2	국수	121.9	13.5	2.7	63.4	국수	84.7	8.0	2.6	58.2
8	쌈장	62.2	6.1	1.6	62.8	쌈장	79.2	8.9	1.7	65.1	빵	54.9	3.7	1.7	59.9
9	단무지	61.9	4.6	1.6	64.4	단무지	72.9	7.1	1.6	66.7	단무지	50.9	5.7	1.6	61.5
10	빵	59.1	3.9	1.5	65.9	어패류젓	67.2	6.3	1.5	68.2	어패류젓	46.5	5.5	1.4	62.9

▶ Table 1-2-2.에서 볼 수 있듯이 우리나라 국민은 국, 찌개, 면류 (31%), 반찬 등의 부식류 (27%), 김치류(25%)로 **조리된 음식으로부터 나트륨을 많이 섭취 함**. 이는 국물류와 발효음식을 즐기는 우리 식문화와 관련이 있음. 또한 최근에는 소득 증대, 맞벌이 부부 증가로 외식 및 급식 비율이 급증하고 있어, 짜거나 매운 음식을 먹을 수밖에 없는 상황이 전개되고 있어 **이의 개선기술개발이 시급함**.

Table 1-2-2. 한국인이 즐겨먹는 식품의 나트륨 함량.

종류	나트륨 함량(단위:mg)
흰 식빵한 조각	80-230
런천미트 3온스	450-1050
냉동피자 4온스	370-730
닭가슴살 4온스	40-330
켄 치킨수프 1컵	100-940
치즈버거 1개	710-1690
아메리칸 치즈 1온스	330-460
미트볼소스 파스타 1컵	530-980
돼지고기 바비큐 5온스	600-1120
감자칩 1온스	50-200

음식	나트륨 함량(단위:mg)
라면	평균 1757(870~2680)
칼국수	2900
자반 고등어찜(1토막)	1500
김밥(1줄)	650
물냉면	1800
된장찌개	950
돼지불고기(50g)	600
참치김치찌개	900

○ 한국인이 즐겨 먹는 식품의 나트륨 함유량(mg)

국	칼국수	우동, 라면	물냉면	된장찌개	참치 김치찌개	배추된장국
2900	2100	1800	950	900	750	
반찬류	자반 고등어찜	1토막	1500	배추김치	100g(10조각)	1000
	김밥	1줄	650	멸치볶음	멸치15g	650
	돼지불고기	등심50g	600	동치미	1그릇	600
	오징어 젓갈	15g	600	간식류	피자	1조각(200g)
					더블버거	1개(200g)
					햄	3조각(60g)
					롤케이크	2조각
					감자칩	1봉지
					치즈	1조각(20g)

- 음식종류별 : 국·찌개·면류(31.5%)>김치류(22.5%) 순('14. 국민건강영양조사)
 - 한끼당 나트륨 섭취량 : 단체급식(2,236 mg)>외식(1,959 mg)>가정식(1,342 mg)
 - 연도별 추이 : 4,388 mg('07) → 4,553 mg('08) → 4,646 mg('09) → 4,878 mg('10)
 - 외국의 일일 섭취량 : 일본 4,280 mg('09), 영국 3,440 mg('08), 미국 3,436 mg('06)
- 전 세계적으로 소금의 과잉 섭취를 지양하기 위하여 나트륨은 권장량이 아닌 감량 목표치를 권장량으로 정하였는데, 각 국가의 나트륨 감량 목표치를 조사 해 본 결과,
- WHO ; 2,000 mg-Na⁺/day 이하, 대부분의 국가 ; 2,400 mg-Na⁺/day 이하
(실제로 고혈압에 효과 ; 1,200 mg-Na⁺/day 이하)
 - 일본 ; 10 g-NaCl/day로 제한
 - 미국 ; 2,400~1,500 mg/day이하(CSPI) → Health Plan 2020에서 2300 mg/day을 목표
 - 우리나라 ; 8.7 g/day로 제한(한국영양학회)
- ¹⁾ Shin M G., Lee G H. 2010. Sensory and Anti-oxidative Properties of the Spice Combinations as Salty Taste Substitute. J Korean Soc Food Sci Nutr. 39: 428-434
- 현재 나트륨의 섭취가 필요량보다 약 10배 이상인 경우가 대부분이기 때문에 여러 국가에서는 저염기구를 설립하여 나트륨 섭취량을 줄이기 위하여 노력하고 있음.
- 미국 ; The Inst. of Medicine of the Natl. Academy of Sciences에서 ADI(Adequate daily intakes) 설정.
 - World Action on Salt and Health(WASH) ; 80여개국에 참가한 저염 기구.
 - 우리나라의 농림수산물부 ; 한식의 세계화 프로젝트에서 저염기술 중에 저염이 가장 큰 issue.
 - 한국식품개발연구원 ; 지식경제부 대상으로 '염미제 개발 및 미각기술개발 프로젝트' 사업 진행.

- 식품의약품안전청 ; 2020년 까지 나트륨 일일섭취량 20%(소금 2.5 g)을 줄이기 위하여 『나트륨 줄이기 운동본부』를 출범시키고 추진계획을 선포함.
 - Health Plan 2020(국민건강증진종합계획, 보건복지부)에서는 나트륨 1일 2,000 mg 이하로 섭취하는 인구비율(만 6 세 이상)을 15.0%까지 늘리는 것을 목표로 설정하여 나트륨 저감화를 위한 정책을 추진하고 있음.
- INTERSALT study(52개 기관에서 실시한 연구)에서 일일 6 g의 소금을 감소시키면 혈압이 5 mmHg 감소하며, 이는 뇌졸중을 24% 경감시키고 관상동맥질환 사망률을 18% 감소시켜 전 세계적으로 250만 명의 사망을 줄일 수 있다(He and MacGrego, 2004)고 밝혀냄.
- 여러 기업 및 국가에서의 소금 저감화
- Unilever ; The Nutrition Enhancement Programme 2003에 따라 16,000개의 제품에서 저염화를 실현하여 연간 3,000t의 소금을 저감
 - Givaudan ; KCl 없이 flavor를 이용한 염미 부여
 - Senomyx ; salt receptor SNMX-29를 통한 염미 증진제를 개발
 - 영국, 프랑스, 호주, 뉴질랜드 ; 주식인 빵과 시리얼을 비롯해 fat spreads, 스프, 소스, 스낵 등 다양한 식품군에서 10~30%의 저염화를 실현
 - 핀란드 ; 1980년대부터 table salt를 KCl, MgCl₂가 보강된 대체 소금으로 제품을 만들어 저염화를 실현하고 있으며 40%의 저염화를 성취
- 최근 건강유지 및 삶의 질 향상을 추구하는 국민의 의식 변화로 인해 성인병 환자 뿐 만 아니라 일반인들도 식품의 나트륨 함량이 낮은 제품을 선택하는 경향이 있어, 안전성이 보장된 염미증진용 천연조미료나 새로운 형태의 제재 또는 가공소금은 국내 뿐 만 아니라 세계적으로도 각광받는 소재가 될 수 있으므로 개발 필요함.

나. 소금의 용어적 정의

- 염관리법상 ‘염’과 식품공전상의 ‘제재, 가공, 정제소금’으로 나누어진다. ‘염’은 식용으로 사용할 수 없는 원료 형태이기 때문에 일반적으로 소금은 식용으로 사용하는 식품공전상의 ‘제재, 가공, 정제소금’을 의미함.

Table 1-2-3. Definition of salt.

관련규정	유형	정의	염화나트륨함량
염관리법	염	100분의 40이상 염화소다(염화나트륨)을 함유한 결정체와 함수	40% 이상
식품공전	제재소금	원료 소금(100%)을 용해, 탈수, 건조 등의 과정을 거쳐 다시 재결정화시켜 제조한 소금.	88% 이상
	태움·용융소금	원료소금(100%)을 태움·용융 등의 방법으로 그 원형을 변형한 소금. 단, 원료 소금을 세척, 분쇄, 압축의 방법으로 가공한 것은 제외	88% 이상
	정제소금	해수를 이온교환막에 전기 투석시켜 정제한 농축함수를 증발관에 넣어 제조한 소금.	95% 이상
	가공소금	제재소금, 정제소금, 태움·용융소금(95% 이상)에 식품 또는 식품첨가물을 가하여 가공한 소금	93% 이상

다. 저염/저나트륨(Low salt/Low sodium)의 정의

Table 1-2-4. Definition of Low salt/Low sodium.

소금영양 강조표시	한국	CODEX	미국	캐나다	영국	EU
Free of	<5mg/100g	<5mg/100g	<5mg/serving	<5mg/serving	-	<5mg/100g
Very low	-	<5mg/serving	<35mg/serving	-	-	<40mg/100g
Low	<120mg/100g	<120mg/100g	<140mg/serving	<140mg/serving	<40mg/100g	<120mg/100g
Little salt	NA	-	-	-	<100mg/100g	-
No salt added	NA	-	No NaCl added, Na salt compounds; can contain intrinsic Na	No NaCl added, Na salt compounds or NaCl substitutes	-	-
Lightly salted	NA	-	-	>50% less Na than the "earlier version"	-	-
Reduced sodium content	NA	-	>25% less Na than "earlier version"	>25% less Na than the "earlier version"	-	>25% less Na than a similar product
Less sodium	>25% less Na than a reference product	-	-	>25% less Na than a reference product (e.g., regular)	-	-
High sodium content	NA	-	-	-	<500mg/100g	-

- ▶ 덜, "더", "감소 또는 라이트" 용어의 사용
- ▶ 영양소의 함량의 차이가 다른 제품의 표준값과 비교하여 열량 및 많이 함유되어 있는 영양소(대량영양소)의 경우는 최소 25% 이상의 차이가 있어야 함.

라. 저감화기술

- 나트륨 저감화는 Table 1-2-5.와 같이 시대별로 발전하고 있으며, 최근 나트륨 등에 의한 짠맛의 인지/감지 기작에 대한 연구가 진행됨에 따라 나트륨 저감화 방법은 Fig. 1-2-3.에서와 같이 다양하게 시도되고 있음.

Table 1-2-5. 시대별 저감화 실현.

1950/1960	Begin search for salt substitutes
1970's	Introduced low sodium (<140mg) soups
1980's	Silent Incremental Reduction (5-20%) First to voluntary label sodium (1981) Research at 7 universities on salt taste mechanism
1990's	Patent issued for non-sodium salt taste enhancers
2000's	Funded research on receptor and sodium ion channels, and mechanism of salt taste. Product breakthrough leveraging lower sodium natural sea salt and product design expertise (~25% and greater,)

Ways to reduce salt

- Salt substitutes
- Salt enhancers
 - 단백질가수분해물
 - MSG, 핵산, 아미노산 등 지미 성분
 - flavour etc.
- Stealth
- Sodium chloride availability
 - changing salt particle form
 - using reception/perception mechanism
 - double emulsion
 - optimizing receptor stimulation
 - delivery: temporal contrast , pulse, mixing, dissolution etc.
- Reformulation
 - multisensory principles: aroma, herb, natural condiments etc.

Fig. 1-2-3. 소금 및 나트륨 저감화 방법

- 나트륨 저감화를 위하여 현재 진행되고 있는 미국, 유럽 등의 선진국의 연구 방향은
 - Taste research(salt taste mechanism의 정확한 규명과 이해, 식품 내에서의 NaCl functions)
 - Genetic and development(salt taste perception and preference)
 - Non-chloride sodium salts and blood pressure
 - Behavior and Compliance research
 - Screening technologies
 - Safety of a 1500 mg diet
 - Consumer research needs

3. 사용량 자체의 감소를 위한 가공법 또는 제품 적용 기술 개발 필요성

가. 전통적 가공기술의 개선 필요

- 우리나라는 전통적으로 발효식품이 많으며, 그 중에는 장류, 젓갈류 등은 미생물이 생산하는 효소에 의하여 동식물 단백질이 가수분해 되어 다양한 아미노산 또는 펩타이드의 증미성분이 생성되어 이들의 조합된 맛이 나타나게 되는 일종의 HVP(hydrolyzed vegetable protein) 내지 HAP(hydrolyzed animal protein)로 볼 수 있음.
- 우리나라민들에게 익숙한 증미성분을 가진 HVP와 HAP는 이미 가공식품 제조에 폭넓게 이용되고 있으며 잘 알려진 비교적 저렴한 풍미료(flavouring agent)이며, 기본맛(basic taste)을 형성하는데 기여하고 또한 풍미상승제(flavour enhancer)로도 작용도 하므로 최근 천연증미제로 새롭게 조명되고 있음.
- MSG로 대표되는 감칠맛(우마미, 旨味)는 글루타메이트 외에 이노신산, 구아닐산 등이 알려져 있으나, 많은 연구에 의하여 단백질 가수분해물 중의 di-, tri- 펩타이드인

Glu-Asp-Glu, Asp-Glu-Ser, Thr-Glu, Ser-Glu-Glu 등의 산성 펩타이드(Noguch, 1975)와 pGlu-Pro-Ser, pGlu-Pro, pGlu-pGlu-Pro-Glu, pGlu-Pro-Gln 등의 밀단백 유래의 phyoglutamyl peptides(Hedwig and Amado, 2002)도 글루타메이트와 유사한 맛을 낸다고 하였으며 Lioe등(2006)은 간장 중의 우마미는 주로 유리상태의 Glu와 Asp에 기인한다고 보고하였다. MSG 등의 우마미는 NaCl과 혼합되어 있을 때, 우마미의 증진 뿐 아니라 짠맛을 증진시키는 효과도 있는 것으로 알려져 있음.

- "Kokumi"는 일본어로 'deliciousness'의 뜻을 가진 말로 식품 산업계에서는 조미료 중의 향미 증진제의 개념으로 사용되고 있으며, 자신은 맛과 향을 가지고 있지 않지만 식품의 맛 또는 향을 증진시키거나 변형시키는 flavour enhancers로 정의되고 있다. Kokumi는 아미노산이나 펩타이드로부터 유래된다고 보고되고 있으며(Hedwig and Amado, 2002), Dunkel(2007)이나 Toelstede 와 Hofmann(2009)에 따르면 di- 또는 tri- 형태의 glutamyl peptides가 주로 영향을 주는 것으로 보고되고 있다. 한편, Hofmann 등(2011)은 fish source에 존재하는 L-alanine과 arginyl dipeptides가 짠맛 증진 물질이며, 특히 arginyl dipeptides의 짠맛 증진 효과가 매우 큰 것으로 보고함.
- 이상의 결과에서 단백질 가수분해물에 존재하는 Glutamate와 Arginine 등의 유리아미노산 과 이들을 포함하고 있는 다양한 di 또는 tri 형태의 펩타이드가 우마미, 고쿠미 등으로 짠맛을 증진시킬 수 있는 가능성을 보여주고 있다. 따라서 기존의 조미료용 단백질 가수분해는 유리아미노산의 함량을 중시하여 개발되었으나, 염미 증진제의 개발을 위한 단백질 효소가수분해는 di 또는 tri 형태의 저분자 peptides 함량을 중시하여 이루어져야 함.
- 이를 위해서는 기존의 전통적인 발효, 숙성 및 효소분해기술로는 한계가 있으므로 공정 개선(고염, 효소선정, 장시간 운전, 탈색, 탈취, 분리·정제, 및 분말화 등의 단위공정 문제해결) 및 바이오선도가공기술(고압액화기술, 아임계 및 초고압 등)을 이용한 신가공기술의 개발이 필요함.
- 뿐만 아니라 개발기술 자체를 활용한 공정 개선에 의한 나트륨 저감화(저염 어간장 개발), 개발 소재의 산업화를 위해서는 통합공정 개발 및 scale up 그리고 개발된 가수분해물의 조미소재화, 이를 활용하는 방안의 개발(액상 및 분말조미료 base, 라면 수프 등)이 필요함

나. 단순 가공 공정의 개발을 통한 식품 종류별 나트륨 저감화 시도 필요

- 소금입자 결정의 크기를 작게 제조하여 table소금으로 제조하면, 입자의 크기가 작으면 작을수록 일정부피당 표면적이 넓어져, 입속에서 소금이 녹아 들어갈 때 상대적으로 높은 짠맛을 느낄 수 있는 원리를 이용하여 나노 기술 활용 가능
- Table salt의 저염화(건식 소금)를 통해 chip 등과 같은 과자류에 적용 범위 확대 필요

다. 나노 기술의 짠맛 증진 효과 기술의 식품 적용 필요

- 소금입자 결정의 크기를 작게 제조하여 table소금으로 제조하면, 입자의 크기가 작으면 작을수록 일정부피당 표면적이 넓어져, 입속에서 소금이 녹아 들어갈 때 상대적으로 높은 짠맛을 느낄 수 있는 원리를 이용하여 나노 기술 활용 가능
- Table salt의 저염화(건식 소금)를 통해 chip 등과 같은 과자류에 적용 범위 확대 필요

라. 식품 종류별 특화된 나트륨 저감 기술 확보

- 혀에서 느껴지는 맛의 인지는 식품의 종류와 구성 성분에 따라서도 다르게 느껴지고, 실제 지미 성분이 첨가되어 적용하여 짠맛에 대한 감도는 식품의 종류에 따라 다르게 반영
- 식품 종류별 (제빵, 제면, 육제품, 국물류 등) 공정과정 변화를 통한 나트륨 저감화를 통해 보다 과학적인 나트륨 저감 기술 확보 필요

마. 부가적인 첨가물 없이 짠맛 증진 효과 방법 개발

- 지미증진 소재 첨가 대신 소금의 불균일 분포를 통한 제품 개발을 통해 식품의 자연 친화 음식 개발 필요

4. 감지/인지 기작을 활용한 객관적 짠맛 평가 기준 확립 필요성

가. 감지/인지 기작을 활용한 객관적 짠맛 평가 기준 확립 필요

- 국민 건강적인 측면은 물론, 가공식품 산업의 지속적인 성장을 위해 가공식품 중 나트륨의 저감화를 위한 지속적인 연구가 진행되고 있음
- 최근 나트륨 등에 의한 짠맛의 감지/인지 기작이 새롭게 규명되고 있어, 이를 활용한 과학적인 저감화 및 검증방법이 필요함
- 가공방법 개선 등에 의한 나트륨 저감화에 대한 새로운 시도, 신가공기술 또는 제품 적용 기술을 추진함 이를 통해 다양한 나트륨 저감 관련 물질이 개발되고 있으나 이를 객관적으로 평가할 수 있는 지표에 대한 연구에 대해서는 미비한 실정

나. 짠맛증진물질의 HTS 스크리닝 기법 개발 필요

- 기존의 짠맛 증진후보물질의 효능 평가는 관능적인 검사에 대부분 의존하고 있는데 이는 좀 더 정확한 결과를 도출해 내는데 다소 한계를 보이고 있음. 또한, 다양한 짠맛 증진후보물질 중 의미 있는 효능을 보이는 후보 물질을 탐색하는데 드는 비용 및 시간이 상당히 소요되는 문제점도 안고 있음
- 따라서, 짠맛 증진 물질 탐색 시, 이러한 한계점들을 극복하여 좀 더 신속하고 정확하며 저비용으로 우수한 짠맛 증진효능을 가진 후보 물질을 찾는 데 적합한 새로운 평가 시스템 개발이 절실함. 이러한 새로운 시스템 개발에는 나노, 기계, 전기, 화학, 바이오 기술들이 융합된 미세구조 랩온어칩 혹은 바이오센서의 응용이 적합함

제3절 연구개발 범위

1. 바이오선도가공기술을 활용한 HAP제조와 이를 활용한 나트륨 사용 저감화 (제1세부)

가. 동물성 단백질 고압효소분해기술 개발

- HAP 제조 공정의 선별 및 단백질원 선정
- 효소제의 선정
- 고압효소분해조건의 최적화

나. eHAP 제조 기술/공정 개발 및 활용방안 검토

- 고압 처리시 효소 안정성과 최적화 검증

- Pilot scale에서의 단위공정 개선/짠맛증진소재 생산을 위한 통합공정 개발
- 제조된 eHAP의 활용방안 검토 염미증진제 가능성 탐색 및 규명
- 개발기술을 활용한 저염어간장 개발

다. 천연 저염 소스 또는 드레싱 제조기술 개발

- 유사제품에 대한 benchmark
- Entire Supply Chain Approach를 통한 개선 및 개발 방안 도출과 해결책 탐색
- 탐색된 해결방안을 중심으로 제품제조공정 및 시작품개발
- 사업화 계획 수립

라. 저염 젓갈 제조 기술 개발 및 염미증진제 개발 가능성 탐색

- 저염 젓갈 제조 기술 개발
 - 유사제품에 대한 benchmark
 - Entire Supply Chain Approach를 통한 개선 및 개발 방안 도출과 해결책 탐색
 - 탐색된 해결방안을 중심으로 제품제조공정 및 시작품개발
- 염미증진제 개발 가능성 탐색 (High-throughput screening system에 적용 검토)

2. 관능검사를 활용한 짠맛 증진물질의 HTS 스크리닝 기법 개발 및 짠맛 평가 방법 확립 (제1협동)

가. Salt Enhancer HTS system 확립 및 짠맛 증진 관련 감각적 테스트 기반 기초자료 확립

- 관능검사 Salt Enhancer HTS system 확립을 위한 Panel 선발 및 훈련
- Panel을 활용한 짠맛 증진 물질 효과 평가 protocol 작성
- 기기분석을 통한 짠맛 증진 물질 규명 방법 확립

나. 관능검사 및 기기분석을 이용한 짠맛증진물질의 HTS system 확립

- Training Panel을 활용한 HTS system 확립 및 짠맛 증진물질 탐색 지원
- 기기분석(sensomics mapping)을 활용한 짠맛 증진 물질 규명
- 분석 지원 시스템 구축/이화학적 성분 조사 및 분석(위탁)

다. 묘사분석을 활용한 Salt Enhancer 물질의 관능적 특성 및 Cell based HTS system 개발

- Receptor cell을 이용한 짠맛 증진 증진물질의 high speed HTS system 개발 추진(위탁)
- 묘사분석을 활용한 Salt Enhancer 소재의 관능적 특성 분석
- Receptor cell based HTS system (Lab on a chip) 개발(위탁)

라. HTS 시스템을 활용한 짠맛 증진 물질의 screening validation

- HTS system(관능검사 및 Lab on a chip)을 활용한 짠맛 증진 물질의 screening validation (위탁포함)
- 짠맛 증진 물질이 적용된 제품의 나트륨 저감화 평가 및 검증
- 신규 소재 탐색

3. 물리적 변화를 통한 나트륨 사용 저감화(제2협동)

가. 짠맛 증진을 위한 소금의 미세화 가공 공정 개발

- 관능검사 Salt Enhancer HTS system 확립을 위한 Panel 선발 및 훈련
- Panel을 활용한 짠맛 증진 물질 효과 평가 protocol 작성
- 기기분석을 통한 짠맛 증진 물질 규명 방법 확립

나. 제빵 및 제면용 짠맛 증진 소금코팅 기술 개발

- 제빵용 지질 코팅 소금/간수 입자 최적 공정 기술 개발
 - 짠맛에 따른 소금 선정: NaCl, KCl
 - 용점에 따른 지질 소재를 활용한 소금 코팅 막 탐색 및 선정: palm oil, monoglyceride
 - Spray cooling 장치를 활용한 소금 지질 코팅막 최적 공정과정 확립
 - 제조공정별 소금입자의 외부환경에 따른 release rate profile 작성
 - 관능검사(위탁)
 - 대량생산이 가능한 최적공정기술을 위한 database 구축
- 제조된 지질코팅소금으로 나트륨 저감화된 제빵 가공 기술 개발
 - 지질코팅소금의 분포도에 따른 dough의 물성측정
 - 빵 내부 지질코팅소금의 분포도에 따른 짠맛 감도 측정: 빵의 내부에 inhomogenous 소금 분포도 유도
 - 지질코팅소금의 크기, 농도, 제빵과정에 따른 짠맛 변화 측정
 - 빵의 물성측정
 - 관능검사(위탁)
 - 대량생산이 가능한 최적공정기술을 위한 database 구축

다. 제면용 짠맛증진 소금코팅 기술 개발

- 제면용 단백질 코팅 소금/간수 입자 최적 공정 기술 개발
 - 용점에 따른 난황 소재를 활용한 소금 코팅 막 탐색 및 선정: egg yolk, casein, gluten
 - Spray cooling 장치를 활용한 단백질 코팅막 최적 공정과정 확립
 - 제조공정별 간수 입자의 외부환경에 따른 release rate profile 작성
 - 관능검사(위탁)
 - 대량생산이 가능한 최적공정기술을 위한 database 구축

라. 저염 제빵, 제면, 스낵 제품 개발

- 저염빵 시제품 개발
- 저염 제면 시제품 개발
- 저염 스낵 시제품 개발
- 시제품 관능평가(위탁)
- 실 나트륨 함량 대비 짠맛 대조 결과에 따른 나트륨 감소량 측정

마. 기타 추가 제품 개발

- 염미 강화제가 첨가된 patties개발
- 염미 대체제가 첨가된 patties개발

- 이중에멀전 기술이 적용된 저염 치즈, 저염 사골 국물 개발

4. 신제조공정을 이용한 단백질가수분해물 제조와 이를 활용한 저염화방법 개발(제3협동)

가. 식물성 단백질의 가압열수 및 효소 가수분해 기술 개발

- 가압열수 가수분해 조건 연구
- 상압 및 고압조건에서 효소가수분해 연구

나. 융합공정에 의한 식물성 단백질의 고도가수분해 및 정제/분획 공정개발

- 융합가수분해 공정 개발
- 정제/분획 공정 개발
- 분획물 관능검사

다. 천연조미료 소재개발 및 ‘조미저염간장’ 레시피 개발

- 식물성단백 천연조미료 소재 생산공정 최적화
- 식물성단백 유래 천연조미료 기초소재 시제품 제조
- 조미 저염간장 시제품의 레시피 개발

라. ‘저염 라면스프’ 레시피 개발 및 나트륨 저감화 실증시험

- ‘저염 라면스프’ 레시피 개발
- ‘저염 라면스프’의 나트륨 저감화 실증시험
- 소비자 기호도 조사 및 대량생산을 위한 pilot type scale-up 연구

제2장 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

제1절 국내외 나트륨 저감화 정책 현황

1. 국외현황

가. 정부정책

- 전 세계적으로 나트륨 함량이 나날이 늘어가고 있으며, 권장량보다 많은 나트륨의 섭취가 이루어지고 있음.
- 하루 평균 나트륨 섭취량은 프랑스 3,120 mg, 핀란드 3,300 mg, 미국 3,435 mg, 브라질 4,500 mg, 터키 7,200 mg으로 미국 IOM (Institute of Medicine)의 상한 섭취량인 2,300 mg을 모두 넘고 있음.
- 대부분의 나라에서는 소금을 가공식품으로부터 섭취하고 있으며, 가공 식품으로부터의 소금의 섭취 비율은 전체 섭취량의 70% 수준에 이르는 것으로 보고되고 있음.
- 이에 따라 각 나라에서는 나트륨 저감화에 대한 관심이 증대되고 있으며, 나트륨 섭취를 위한 다양한 정책을 펼치고 있음.

(1) 영국

- 영국에서는 1900년대 초 식이 나트륨 섭취 저감화에 대한 필요성이 제기되었고, 1994년 노동 정부가 독립적인 자문 패널 (the Committee on Medical Aspects of Food and Nutrition, COMA)을 두어 관련 근거 자료를 검토하여 하루에 6 g(나트륨 2,358 mg)의 소금 섭취량을 권장사항으로 제시함.
- 국가적인 나트륨 감소 정책을 관리하기 위하여 식품 기준청(Food Standard Agency of the UK, FSA)를 두고, FSA와 보건부의 총괄아래 소금 섭취 감소에 대한 방침을 제시함.
- 이러한 정책의 일환으로 식품산업체에게는 소금 모델을 개발하고 소금 함량 감소 계획 follow-up 프로그램을 진행하였으며, 신호등 라벨제, 국민의식 함양 캠페인 등의 사업을 펼쳐 소금 섭취의 양을 줄이도록 하고 있음.
- 뿐만 아니라 소비자가 식품 내 소금함량과 소금의 함량을 인식할 수 있도록 정보 공유에 많은 노력을 기울임.

(2) 미국

- 미국에서는 뉴욕주가 중심이 되어 국가 보건 단체 및 기관들과 함께 전국민 소금 줄이기 운동(National Salt Reduction Initiative, NSRI)을 결성하여 개별적인 소금 저감화 계획을 세우고 있음.
- NSRI의 나트륨 섭취량 저감화를 위한 전략은 주요전략, 중간전략, 지원전략의 3단계로 구분되어 진행되고 있으며, 주요 전략으로는 정부 기관인 FDA가 식품의 나트륨 함량에 대한 강제적인 국가 표준 기준을 설정하는 것, 중간 전략은 식품산업계로부터 자발적 참여를 이끌 수 있는 방법의 제시, 지원 전략은 정부 및 공공기관 그리고 민간 단체가 나트륨 수준의 저감화를 위한 다양한 활동을 수행하는 것으로 되어 있음.

- 2010년 IOM 보고서 권고 사항을 토대로 장기적 계획을 마련하여 나트륨 저감화를 위해 지속적으로 사업을 시행하고 있고 특히 집중할 수 있는 부분은 가공 식품 소금함량 규제를 마련하여 가공식품에 적용하려는 적극적인 움직임을 보이고 있음. 특히 패스트푸드 속에 있는 나트륨의 함량을 줄이기 위하여 노력(Kim & Jeong, 2016).
- 소금과 건강 관련 다양한 임상연구를 의학과 식품학계가 정부 주도하에 실시하고 있음 (<http://www.cdc.gov/salt/pdfs/sodium-references-abstracts.pdf>).

(3) 핀란드

- 핀란드는 가장 적극적인 정책을 실시하는 나라로서 1970년대 후반부터 국민의 소금 섭취 감소를 위한 국가적 소금 저감화 캠페인을 시작하였으며, 체계적인 소금 저감화 정책을 시도했던 최초의 국가임.
- 1979년부터 1982년 건강증진사업을 통해 소금 섭취 감소 운동을 수행하였으며, 이로 인해 국민의 인식을 높이는 계기가 됨.
- 93년도부터 소금표시법 시행과 고농도 소금의 경우 'high salt' 표시를 하도록 가공식품에 법적으로 규제하고 있음.
- 핀란드 정부와 헬싱키 대학이 공동 개발한 나트륨 대체 소금 '펜솔트'의 활용도를 높이도록 권장하면서 소금 저감화에 큰 성공을 거둠(Shin, 2012).

Table 2-1-1 국가별 나트륨 저감화 정책

구분	권고량	나트륨 줄이기 사업	가공식품
핀란드	2,000 mg/d (소금 5.0 g)이하	- '70년 후반부터 시행 - 인문홍보활동 통해 국민적 관심 유도 - 소금표시법 시행('93년 6월)	- 법적으로 '93년 6월부터 'high salt' 표시 - '08년 기준강화
영국	2,400 mg/d (소금 6.0 g)이하	- '94년 소금 섭취 권고 발표 - '04년부터 단계적 캠페인 시행(현재 4단계진행 중) - TV 광고, 포스터/ 리플릿 배포	- 업체 자발적으로 '05년부터 주요 10종 식품군에 소금 함유량 10% 줄이기 시행
캐나다	2,300 mg/d (소금 5.8 g)이하	- '07년 Sodium Working Group 발족 - 유관기관이 나트륨 줄이기 전략 논의 - '16년까지 나트륨 2,300 mg으로 낮추도록 목표 설정 - '10년 6월 전략보고서 발표	- 영국의 FSA 식품의 나트륨함량 기준 도입 논의 중
미국	2,300 mg/d (소금 5.8 g)이하	- '69년 문제인식 - 나트륨 저감화를 위해 지속적으로 시행 - '10년 4월 IOM의 보고서 권고사항을 토대로 장기적 계획 마련	- 가공식품 소금함량 규제 마련 계획
싱가포르	2,000 mg/d (소금 5.0 g)이하	- 「Salt : Less is Best」 캠페인 - 식이에서 나트륨 섭취를 줄이고 충분한 과일과 채소섭취 교육 - 포스터, 리플릿 배포	- 'Healthier Choice Symbol'
일본	2,400 mg/d (소금 6.0 g)이하	- 2004년 고혈압 학회에서 섭취량을 6.0 g으로 하향 - Health Japan 21 - 네 가지 목표와 세 가지의 실행 단계를가지고 나트륨 저감화 정책을 추진	- 가공식품의 나트륨 저감화를 정 부 차원에서 규제하지 않음
한국	2,000 mg/d (소금 5.0 g)이하	- 권고수준 3,500 mg('00)에서 2,000 mg('00)으로 하향 조정 - '당, 나트륨 섭취 저감화' 추진('06) - 나트륨 섭취 저감화를 위한 교육·홍보 - 급식·외식 나트륨 실태조사 - 급식·외식·나트륨저감화 시범사업	- 업체의 자발적 저감화 유도

(4) 기타 : 국가별 나트륨 저감화 정책을 Table 2-1-1에 제시함.

나. 기업정책

(1) 네슬레

- 1998년부터 제품의 소금 함량 감소를 위해 노력해 온 네슬레는 2005년 전 제품에 대해 소비자가 기대하는 맛과 품질을 유지하면서 나트륨 섭취를 저감화하는 정책으 시작하였으며, 이 정책은 영국의 SACN, 미국의 IOM의 권장량에 근거하여 설정하였음.
- 단계적 나트륨 저감화를 중요전략으로, 관능평가를 통해 소비자들의 나트륨 저감화에 대한 수용도 테스트를 하여 이를 반복적으로 수행하면서 실제 제품에 적용하였음.

(2) 유니레버

- 전 세계시장에서 팔리는 2만 2천여종의 전제품의 소금 함량을 2010년까지 대폭적으로 줄이는 획기적인 조치를 단행하여 2015년까지 하루 소금 섭취량을 5 g으로 낮추는 것을 목표로 하고 있음.
- 유니레버의 한 브랜드인 Knorr의 경우 Salty라는 캐릭터를 통해 저염 제품 홍보를 통해 소비자들에게 한걸음 가깝게 다가가는 전략을 취하고 있고 실제 이러한 전략이 성공적으로 수행되고 있음.

(3) Firmenich

- 스위스의 회사로 나트륨 저감을 위한 구체적 실험결과를 제시하여 짠맛 증진제 및 염화칼륨의 적용 가능성을 제시하고 있음.

(4) 기타

- 그 이외에도 여러 회사들이 저나트륨 제품 전략을 선보이고 있어 ConAgra사는 2015년까지 소비자제품의 소금함량을 20% 줄이기로 하였으며, Sara Lee도 향후 5년동안 평균 20%의 소금량을 줄이기로 함.
- General Mills 같은 경우는 어린이용 제품에서 나트륨 함량을 한자리수 까지 낮추기로 하였으며, Bird Eye사는 반가공 식품에서의 소금 함량을 2g 미만으로 낮추는 노력을 하고 있음.
- 일본 기업의 경우(Table 2-1-2 참고), 저염 가공 식품에 대한 연구가 소스 중심으로 많이 이루어져 왔는데 간장, 카레 등의 식품에 개발되어 판매(Kim & Jeong, 2016).

Table 2-1-2 일본 식품기업의 저염식품 확대 계획

구분	내용
에이스코쿠	국립 순화기병 연구센터 '가부시오'인증 취득 신제품 5종 발표
아지노모토	조미료 '혼다시'저염제품의 염분 축소비율을 확대 (30~40%)
마루다이식품	저염식품 라인인 '우스시오'시리즈 품목 수를 3배 이상 확대
미츠칸	식초를 이용해 염분을 줄이는 메뉴 레시피 사이트를 개설
에스비식품	염분을 줄인 (1g/1인분) 업소용 카레 개발, 패밀리레스토랑 납품 예정
카코메	간장, 미소를 토마토 케첩으로 바꾸는 레시피 개발, 제안

(자료출처: 니혼게이자신문)

2. 국내현황

가. 나트륨 저감화 실시 배경

- 2010년 한국인의 나트륨 일일 평균 섭취량은 4,878 mg으로, 세계보건기구 (WHO)의 권고량보다 2.4배 이상 높으며, 특히 30-50세 남성의 경우 6,621 mg으로 3배이상 높음.
- 그리고 우리 국민의 나트륨 섭취량을 매년 증가하는 실정으로 이는 다른나라와 비교하면 미국, 영국보다 높고 우리와 식문화가 비슷한 일본보다도 많이 섭취하는 등 세계적으로 높은 수준임.
- 이러한 과다 나트륨 섭취는 고혈압, 심혈관계 질환, 관상동맥질환등의 발병율을 높이고 국내 의료비뿐만 아니라 각종 사회, 경제적 손실을 일으키고 있음.

나. Health Plan 2020에 따른 나트륨 저감화 노력

- 정부는 Health Plan 2010에 의거, 식품의약품안전처를 중심으로 2005년부터 나트륨 저감화를 위한 꾸준한 노력을 기울여 왔으며, 실제로 수년간 외식, 급식, 가공식품 등에서의 나트륨 함량 실태를 조사하고 한국인 나트륨 민감도 조사, 어린이기호식품 나트륨 표시 의무화 등의 정책을 펼치고 있음(Fig. 2-1-1 참고).



Fig. 2-1-1. 한국의 1차 나트륨저감화 정책방안.

- 식품의약품안전처는 2차 나트륨 저감화 정책으로 Health Plan 2020에서 “나트륨을 1일 2,000mg 이하로 섭취하는 인구비율(만 6세 이상)을 2008년 13.4%에서 2020년 15.0%로 증가”를 목표로 2012년부터 펼친 나트륨 저감화 사업으로 9개 식품군 165개 제품의 나트륨 함량이 평균 21.0% 줄었다고 2014년 7월 18일 보도함.
- 식품의약품안전처는 2012년부터 펼친 나트륨 저감화 사업으로 9개 식품군 165개 제품의 나트륨 함량이 평균 21.0% 줄었다고 18일 밝히면서, 나트륨 함량이 감소된 제품도 2012년

52개, 2013년 58개, 2014년 70개로 해마다 수가 늘어나고 있는 것으로 조사되었다고 함.

- 식품군별로는 라면류가 60개로 가장 많았고 장류 16개, 김치류 9개, 치즈류 9개 순이었다. 함량 감소는 치즈류가 평균 32.5%를 줄여 저감 정도가 가장 컸으며 라면류 19%였으며 장류 10.3%, 김치류 19.2%, 등이었으며, 업체별로는 오뚜기(46개), 농심(27개), 대상(15개) 등 대기업들이 나트륨 저감화에 적극적으로 참여함(Fig. 2-1-2 참고).

'나트륨 줄이기' 에 자율 참여한 가공식품업체

구분	참여업체
라면류	
장류	
조미식품 등	

가공식품업체 '나트륨 줄이기' 자율선언 참여 현황

구분	참여업체	품목수	저감화정도
라면류	6개	90개	4~15%
장류	7개	61개	2~5%
조미식품 등	5개	51개	1~43%

Fig. 2-1-1. 나트륨저감화 자발적 참여업체.

- 식약처는 “식품업계 등의 자발적인 나트륨 저감화 노력에도 우리 국민 하루평균 나트륨 섭취량은 OECD 국가 중 나트륨 섭취량 5위(4583mg)”라며 “나트륨 저감화 기술 및 정책이 식품산업 현장에서 실질적으로 반영될 수 있도록 공동기술 개발 및 행정지원을 강화할 계획”이라고 밝힘.

3. 시사점

- 가공식품 업체를 중심으로 라면 및 장류 등 나트륨이 높은 품목에 대한 저감화 노력을 기울이고 있으며, 소비자의 인식개선과 행동변화를 위한 캠페인 등의 노력도 함께 진행되고 있으나 여전히 전통적으로 소비가 많은 라면 및 장류 등은 저감화 실적이 미미함.
- 따라서 **전통적인 가공기술의 개선이 필요함.**
- 국외 사례와 같이 정보를 공유할 수 있는 DB 구축과 질병과의 상관관계에 대한 연구 지원이 필요하다 사료됨.
- 예를 들면, 한국인의 소금 섭취량과 질병과의 상관관계에 대한 연구 등이 필요함.

제2절 Salt and Sodium

1. Salt

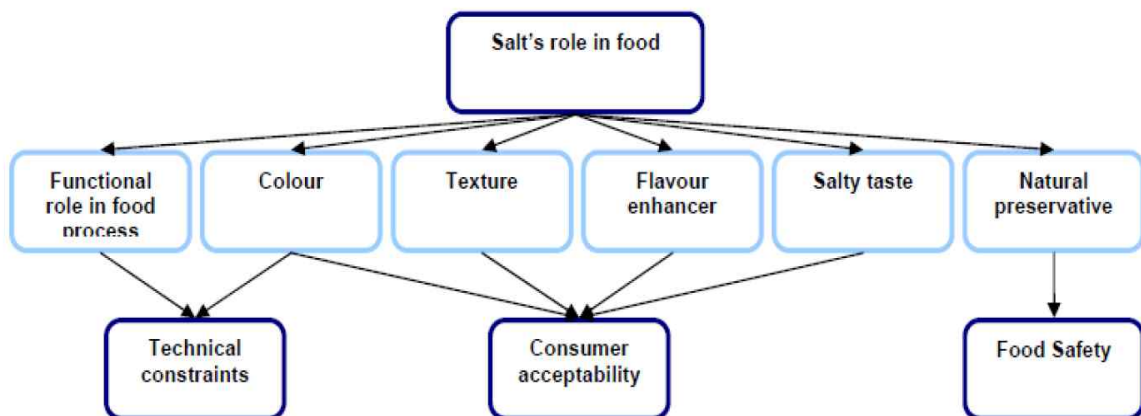
- 염화나트륨(sodium chloride, NaCl)으로 알려진 소금(Table salt)은 일상생활의 식단에 있어서 필수적이며 중요한 재료로서, 나트륨뿐만 아니라 여러 가지 무기질이 함께 포함되어져 있음. 세계적으로 소금은 여러 source로부터 얻어지고 있는데 바닷물(sea water), 우물물(natural brine or wet-mind salt), 암염(salt rocks) 등이 주요 source임(Amr and Jabay, 2004). 현재 미국, 유럽, 아시아, 아프리카 등 세계 거의 모든 지역에서 생산되고 있는 소금은 지역적·기후적·생산방식에 따라서 화학적 조성이 다르게 되는데, 대부분의 지역에서 태양광에 의한 자연적 증발로 소금을 생산하고 있음(Mannar and Dunn, 1995). 과거 100년 전 연간 1천만톤 정도 생산되었던 소금은 현재 연간 2억톤 정도가 생산되고 있으며, 미국의 경우 1978년 100만톤 이었던 소금 판매량이 2005년에 약 160만톤 까지 증가하였음.

가. 소금의 특성

- 소금은 화학적으로 양이온인 나트륨(Na^+)과 음이온인 염소(Cl^-)로 구성되어져 있으며, 소금 1g 중 함량은 나트륨 39.3%, 염소 60.7%이다. 고 순도의 소금은 투명하고 색이 없으며, 육면체의 결정 형태를 가지고 있고, 25°C에서 100 ml 당 35.9 g 정도가 용해되며, 알코올에는 소량 용해되고, 801°C의 녹는점과 1465°C의 끓는점을 갖는 것으로 알려져 있음 (Salt Institute, 2006).

나. 식품에서 소금의 역할

- 가공식품의 가공공정과 가공적성의 개선/개발을 통하여 나트륨 저감화를 달성하기 위해서는 먼저 타겟 제품에서의 소금의 기능적 역할(functional role)에 대한 정확한 이해가 필요함 (Fig. 2-2-1과 Table 2-2-1을 참고)
- 각각의 기능에 대한 설명을 아래에 제시함.



Source: Impact Assessment of Revised Salt Reduction Targets (Food Standards Agency, 2009)

Fig. 2-2-1. 식품에서 소금의 역할.

Table 2-2-1 A Summary of Functions Performed by Salt in Some Food Products

Food product	Functions performed by salt
Bread	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Imparts flavour ▪ Controls yeast growth and fermentation rate ▪ Assists product texture ▪ Reduces spoilage
Breakfast cereals	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Imparts flavour ▪ Assists product texture
Margarine and spreads	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Imparts flavour ▪ Prevents spoilage ▪ Controls shallow-frying performance in some products
Sauces and pickles	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Imparts flavour ▪ Assists in preservation ▪ Retains texture of pickled vegetables during storage prior to bottling ▪ Inhibits clouding of vinegar in pickled products
Savoury snacks	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Imparts flavour ▪ Assists product texture in some expanded products ▪ Acts as a solid carrier of applied seasonings and flavours, enabling accurate measurement and improving flowability
Meat products	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Imparts flavour ▪ Assists in preservation ▪ Increases water-holding capacity in some products, and increases meat binding in others
Cheese	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Imparts flavour ▪ Helps reduce metabolic activity of starter culture bacteria ▪ Modifies enzyme activity, thereby playing an important part in maturation of some cheeses

Source: Reducing salt in foods (Kilcast & Angus, 2007, p. 158)

(1) 보존제(Preservative)

- 식품의 저장기간을 늘리는 역할로서 소금의 첨가는 식품으로부터 유효수분을 감소시켜 미생물의 생육을 막는 역할을 함.

(2) 조직감 개선(Texture Enhancer)

- 소금은 식품의 조직감을 형성하는 데 중요한 역할을 하는데, 특히 제빵에 있어서 소금은 효모의 발효 속도나 글루텐의 형성이 크게 영향을 주게 된다. 또한 단백질의 겔화, 치즈의 생산, 소시지, 햄 등의 가공육, 제과에 있어서 바삭감(crunch texture) 등을 부여하는데 있어서도 중요한 역할을 함.

(3) 풍미 증진제(Flavor or Taste Enhancer)

- 소금은 기본적으로 사람들이 가장 선호하는 짠맛의 풍미를 제공할 뿐만 아니라 단맛이나 쓴맛 같은 여러 향미에 영향을 미치어 소량의 소금은 과일이나 기타 식품의 단맛을 증가시키고, 쓴맛을 감소시키는 역할을 함.

(4) 영양원(Nutrient Source)

- 소금은 사람이 생명을 유지하는데 주요한 성분이며, 소량의 요오드나 기타 무기질을 함유

하고 있어 요오드 결핍증, 무기질 결핍증 등을 예방하는 역할을 함.

(5) 결합제(Binder)

- 단백질의 gel화를 촉진시켜 결합제로서의 역할을 함으로써 소시지나 가공육에 있어서 조직을 형성시켜 제품의 형태를 유지하는 역할을 함.

(6) 발색제(Color Enhancer)

- 햄이나 핫도그와 같은 가공육에서 육색을 선명하게 하는 역할을 하며, 추가적으로 색을 지속시키고 흐려지는 것을 방지함.

다. 소금의 섭취원

- 소금은 다양한 식이원으로부터 섭취가 되고 있다. Mattes & Donnelly (1991)에 의하면 소금 섭취의 3/4은 가공식품으로부터 섭취하고 있으며, 식품에 원래부터 존재하는 것으로부터 12%, 조리 중이나 음식에 직접 첨가하는 형태로 5-10%를 섭취하는 것으로 보고됨. 그러나 국내의 경우 Fig. 2-2-3과 같이 전체 소금 섭취량 중 40% 정도만을 가공식품으로 섭취하고 있고, 나머지 60% 정도를 가정식이나 소금의 형태로 섭취하는 것으로 조사되었음.

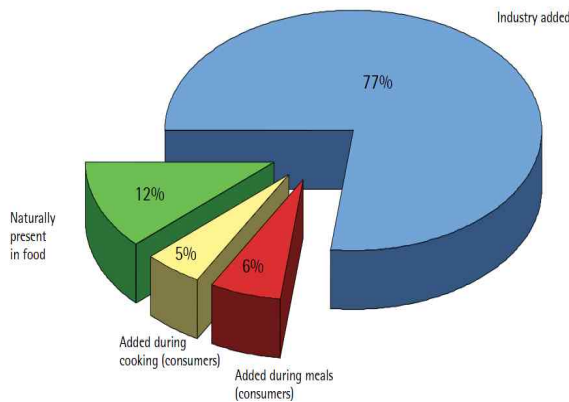


Fig. 2-2-2. Sources of Dietary Sodium (Mattes and Donnelly, 1991).



Fig. 2-2-3. Salt intake in the Korean diet (KFDA, 2005).

- 식품별 소금 함량은 Fig. 2-2-4에서와 같이, 가공식품에 숨어 있는 소금이 많기 때문에 소비자들은 부지불식간에 권장량보다 많은 양의 소금을 섭취하고 있으며, 무엇보다 직접적으로 섭취하지 않더라도 MSG (monosodium glutamate), sodium citrate, sodium alginate, sodium hydroxide, sodium phosphate와 같은 형태로도 나트륨을 섭취하고 있음 (Luff et al., 1991). 현재 국내의 나트륨 섭취량은 WHO 권고량인 2,000 mg의 약 2.4배로 해마다 그 섭취량이 증가하고 있는 실정으로, 2008년 4,553 mg, 2009년 4,646 mg, 2010년

4,878 mg으로 집계되고 있어 나트륨을 과다섭취하고 있는 것으로 나타났음.

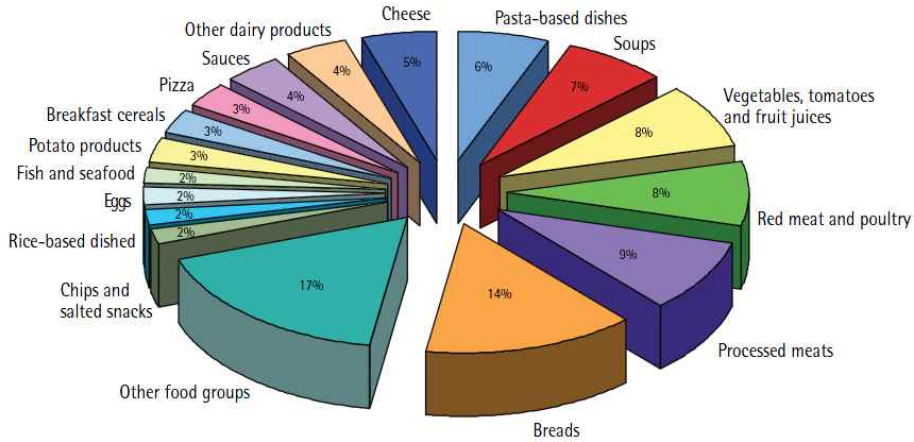


Fig. 2-2-4. Salt content in the main food groups (CTAC, 2009).

제3절 소금 저감화 기술 동향 및 대체제

1. 개요

○ 현재 소금 섭취를 줄이기 위한 방법으로는 점진적 소금 섭취의 저감 (small step reduction), 대체 원료의 사용 (replace salt by other ingredients), 맛 증진제의 사용 (use of taste enhancers), 맛 감지 변조 첨가물 사용 (add ingredients that modify taste perception), 염의 사용 (use of salt-flavored ingredients), 보존제의 사용 (use of preservative agents) 등이 시도되고 있다. 현재 소금 섭취를 줄이기 위한 R&D, 상업화, 소비자 조사, 법률적 검토의 단계별 내용과 전략을 Table 2-3-1에 제시함.

Table 2-3-1. Dietary sodium reduction stages and strategy

Stage	R&D	Commercialization	Consumer Research	Regulation
1	Compare salt content of product portfolio			
2		Analyse products on market		
3		Prioritize product reformulation projects		
4		Position products to be reformulate; claim health check		
5	Determine target salt content for reformulation			
6	Identify sodium sources in formulation			
7	Target the main sodium contributing ingredients			
8	Determine the role of the ingredients to be reduced or replaced			
9	Assess the microbiological risk of reformulation			
10	Identify replacement solutions (formulation parameters, ingredients, processes)			

Table 2-3-1. Continued

Stage	R&D	Commercialization	Consumer Research	Regulation
11				Check that ingredients are allowed
12	Generate reformulated prototype series (lab or pilot)			
13	Evaluate prototypes (in-house panel)			
14			Conduct sensory analysis of prototype with customers	
15	Modify process or processes: transformation, conditioning and packaging			
16	Validate modifications to processes implemented			
17	Generate prototypes			
18	Validate food safety by microbiological testing and conservation length studies			
19			Conduct sensory analysis of prototype s with customers	
20	Assess the 'risk' of commercializing the product			
21	Commercialize			

2. 소금 사용량의 점진적 저감(Small step reduction)

○ 가장 단순한 해결 방법으로 다른 변화 없이 절대적 소금 사용량을 감소시키는 방법으로 식이 중 소금의 농도는 습관에 의해 영향이 크게 작용하는 것으로 보고되어 있으며(Wise et al., 2007), 이는 조리에 사용되는 소금의 양을 점진적으로 줄여가는 방법임(Girgis, 2003). 이 방법은 가공식품, 조리식품 등 일상생활에서 섭취하는 모든 식품에서 소금의 양을 소비자가 인지하지 못할 정도로 감소시키면서 소비자의 식이 습관을 바꾸는 것으로 오랜 시간을 두고 실시하여야 한다. 현재 이 방법은 이미 식품업계에 적용이 되어 제품의 풍미에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 제품의 배합비 등이 조정되고 있으며, 공공적 차원에서 진행되고 있음.

3. 대체 원료의 사용(Replace salt by other ingredients)

○ 식품과 가장 잘 맞는 taste profile을 가지고 있는 대체 원료를 선택 후 조합하여 사용하는 방법으로 소금 사용량의 점진적 저감법에 비해서 복잡하고 어려운 방법이나 빠르게 소금의 사용량을 줄일 수 있으며, 최대 30-50%까지 소금의 사용량을 줄일 수 있을 것으로 예상하고 있음. 현재 소금을 대체할 수 있는 원료로는 yeast extracts, hydrolyzed vegetable protein(HVP), autolysed dry yeast, flavor(primary taste and reaction taste), monosodium glutamate (MSG), guanylate or inosinate, peptide-based compounds, spices 등이 언급되고 있다. Poirier (2006)에 의하면 실제로 위의 앞의 대체 원료를 첨가하여 식

품내의 소금을 부분적 또는 완전히 대체할 수 있는 것으로 보고되고 있으며, HVP와 일부 yeast products는 현재 산업계에서 널리 사용되고 있다고 보고하고 있음. 짠맛을 대체하는 원료의 조합은 Fig. 2-3-1과 같은 원료의 특성을 고려하여 이루어지게 되는데, 이러한 대체물질 중 spices 같은 경우 다양한 sauce에 활용되어 실제적으로 소금의 함량을 낮추는 역할을 하고 있음.

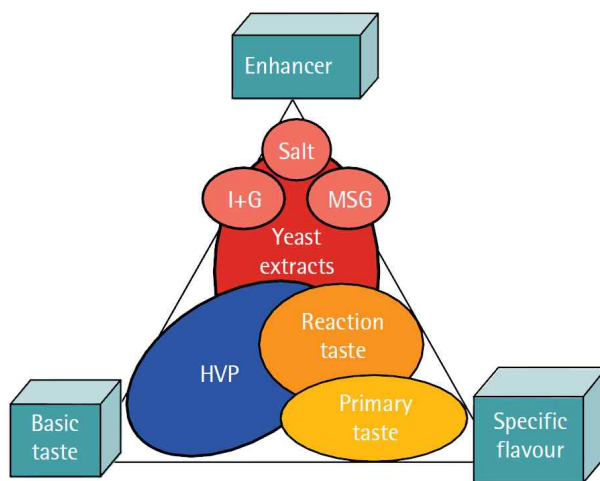


Fig. 2-3-1. Taste profile of certain ingredients.

4. 맛 증진제의 사용(Use of taste enhancer)

- 단독으로는 두렷한 맛을 가지고 있으며, 맛을 변화시키지도 않으면서 식품의 향이나 맛의 아도를 증가시키는 물질을 taste enhancer라 하며, 이러한 taste enhancer는 입이나 목에 receptor를 활성화시키는 작용을 하여 감소된 소금의 맛을 대체하는 역할을 하는 한다. 또한 taste enhancer는 식품 내 맛의 감지 균형을 향상시키고, 감칠맛과 연결된 수용체를 자극하며, 이미를 masking하는 역할을 하기도 함. taste enhancer는 대부분 감칠맛을 자극하는 물질로서 비율이 다르긴 하지만 대부분의 식품에 존재하고 있으며, 그 주요 성분은 글루탐산(glutamic acid)으로 밝혀져 있으며, taste enhancer로 사용되는 원료로는 soy sauce, yeast extracts, monosodium glutamate(MSG), nucleotide concentrated ingredients, ribonucleotide (disodic or calcic), sodium or calcium guanylate, sodium or calcium inosinate, monopotassium or monosodium glutamate, hydrolyzed vegetable protein등이 있음.

가. Glutamates

- Monosodium 또는 monopotassium glutamate(MSG)는 가장 일반적이고 널리 쓰이는 taste enhancer로서 식품 내에서 손쉽게 짠맛을 상승시키며, 2003년 한해에만 150만톤이 생산되었고, 아시아 지역에서 80%가 사용되었음. MSG의 화학명은 sodium(S)-2 - amino - 5 - hydroxy - 5 -oxo-pentanoate($C_5H_8NNaO_4$)로 무색의 결정형 분말이며, 글루탐산에 나트륨이 염의 형태를 이루고 있음. MSG는 유제품, 육제품, 생선, 채소 등의 다양한 식품

에 존재하고 있으며 특히 버섯이나 토마토 등에 다량 존재하고 있고 체내에서도 합성이 되는 물질로 알려져 있다. EU에 의하면 MSG는 인체에 무해한 taste enhancer로서 사용이 허가되었으며, 아직까지 MSG의 유해성에 대해서는 여러 가지 논란(Vitamin B₆ 결핍증을 가진 사람에게 투통, 메스꺼움을 유발)이 있으나 이러한 현상이 MSG와 직접적인 연관이 있는 것으로 밝혀지지 않고 있음.

나. Soy Sauce and Fish Sauce

- Soy sauce는 glutamic acid를 포함한 약 300여종의 flavor compounds를 함유하고 있으며, 쓴 맛을 지닌 물질의 단맛 profile을 향상시키고, 최종 제품에 acidic taste의 균형을 맞추는 역할을 함.
- Fish sauce는 HAP의 일종으로 최근에 짠맛증진물질의 존재와 물질에 대한 동정이 이루어짐(Schindler et al., 2011).

다. Yeast products

- 식용으로 사용되는 yeast는 대부분 *Saccharomyces cerevisiae* 균주로서 ‘inactive dry yeast’, ‘yeast autolyzate’, ‘yeast extracts’ 등으로 알려져 있으며, glutamic acid, peptides, nucleotides, glutathione, group B vitamins, minerals 그리고 여러 향 성분등이 함유되어 있으며, salt enhancer 또는 umami flavor enhancer로서 사용되고, kokumi effect도 가지고 있는 것으로 밝혀짐. 식품에 0.25-2%의 농도로 사용하면 식품에 사용되는 소금이나 HVP, MSG를 대체하거나 줄일 수 있으며, 높은 용해도로 식품의 조직감에 변화를 주지 않고 사용할 수 있으며, 단백질의 농도도 높아 basic ingredient로서 사용도 가능한 것으로 보고됨. 현재 soup, broths and sauces, salted drinks, snacks, ready-made meals, meat products, fish derivatives, bakery products, dairy products등에 응용되고 있음.

라. High nucleotide ingredients

- 단독으로 umami profile을 나타내지는 못하지만 일부의 nucleotide는 salt 대체제로서 짠맛과 감칠맛을 향상시키는 것으로 보고되고 있음.

(1) Disodic guanylate

- Guanosine monophosphate(GMP) soda salt로 umami taste enhancer로서 사용되며 yeast, fish, dried algae등을 사용하여 생산하며, Salt replacer로서 풍미를 향상시키고 매우 낮은 농도로 사용되고 있음.

(2) Disodic inosinate

- Inosinic acid disodic salt로 disodic guanylate처럼 umami effect를 향상시키는 물질로 사용됨.

(3) Calcium inosinate

- Disodic salt로부터 유도된 inosinic acid로 뜨거운 물에 불안정하며 식품 내 인산성분에

의해서 분해되는 물질로 육제품, 수산품, 보존제, 즉석면 등에 널리 사용되고 있음.

(4) Disodic ribonucleotide

- 두 개의 flavor enhancer(disodic guanylate+disodic inosinate)가 섞인 복합물로서 무향의 백색분말이며 MSG와 함께 상승효과를 나타내어 식품산업에 널리 사용되는 물질임. 98% MSG와 2%의 disodic ribonucleotide를 섞어 쓰면 MSG를 단독으로 쓸 때보다 4배의 상승효과를 갖음.

(5) Calcium ribonucleotide

- Calcium guanylate와 calcium inosinate로 구성되어진 복합물로 부작용이 없음.

마. Hydrolyzed vegetable proteins (HVPs)

- Hydrolyzed vegetable proteins (HVPs)는 화학적인 방법이나 효소적 방법을 통해 분해하여 아미노산을 만드는 것으로 산가수분해 → 중화 → 여과 → 분무건조의 공정을 거쳐 만들어지는 물질임. HVPs는 basic taste를 견고히 하고 flavor enhancer로서의 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 그 기능은 탈색의 정도, 단백질원(soy, corn, canola, wheat 등), 첨가물, 가수분해 방법, 건조방법 등의 영향을 받음.

5. 맛 감지 변조 물질 (Taste perception modify ingredients)

가. Adenosine monophosphate (bitterness inhibitor)

- Adenosine monophosphate (AMP)는 감각 수용체의 활성화를 억제하여 몇몇 쓴 맛 물질의 쓴 맛을 감소시키는 역할을 하는 물질로서 미국의 Linguanen and RedpointBio社가 기술적 및 용도 특허를 가지고 있음. AMP는 짠 맛과 감칠 맛에 positive effect를 보이며, potassium chloride와 mixture로 사용하여 소금 대체 물질로 사용됨.

나. Menthol, menthyl-lactate and other by-products

- Menthol, menthyl-lactate, TK-10, WS-3 과 WS-23은 0.001-0.005 ppm의 농도로서 소금 대체제로 사용되고 있으며, Givaudan에서 2008년에 용도 특허를 등록하였음 (WO2008148234).

다. Peptides and amino acids (L-arginine)

- Peptides는 대부분 쓴 맛을 가지고 있으며, 일부는 단 맛도 가지고 있는 물질로서 ornithyl-β-alanine.OH·HCl, glycine ethyl ester.HCl 등이 사용되고 있으며, 승인이 이루어진지 얼마 되지 않아 아직 널리 사용되고 있지는 않음. 일부 상용화된 peptide 물질로는 L-lysine, L-arginine등이 있으며 이들은 짠맛을 가지고 있으며, 짠맛의 enhancing effect를 가지고 있음(Tamura et al., 1989, 1993).
- Breslin & Beauchamp (1995)에 의하면 NaCl을 KCl로 50% 정도 대체할 경우 KCl에 의해 느껴지는 금속느낌의 후미를 masking할 수 없기 때문에 쓴 맛을 억제하는 추가적인

물질이 필요한 것으로 보고함. Keast 등(2004)과 Ogawa 등(2004)은 L-arginine이 quinine의 쓴 맛을 억제하는 특징을 가지고 있으며, NaCl의 첨가에 의해 이러한 기능은 더욱 상승되어 짠맛을 증강시키는 물질로의 가능성을 제시하였음. L-arginine의 쓴 맛 억제 기작은 사람의 미뢰에 존재하는 sodium channel과 L-arginine의 guanidium group과의 상호작용, 수용체와의 binding에 의한 것임.

6. Salt-Flavored Ingredients

가. Minerals

(1) Potassium chloride (KCl)

- KCl은 NaCl, 즉 나트륨의 감소를 위해 가장 널리 사용되는 물질로서 소금과 가장 비슷한 짠 맛을 가지고 있지만 짠맛의 강도는 NaCl의 30%정도임. 가장 널리 사용되고 있는 KCl이지만 짠 맛 뒤에는 쓴 맛과 금속 맛이 잔류하며, Type I의 당뇨병을 가진 사람들에게는 간이나 심장에 무리를 줄 수 있어 사용에 제한점이 있음. 쓴 맛이나 금속 맛 등에 의해 단독으로보다는 taste enhancers (glutamate, yeast extracts) 또는 flavors와 함께 사용하여 짠 맛 이외의 맛을 감소시키는 방법으로 사용되고 있으며, 대표적인 것으로 Pansalt (KCl+Mg sulphate + amino acid + hydrochloride de L-Lysine)이 있음.

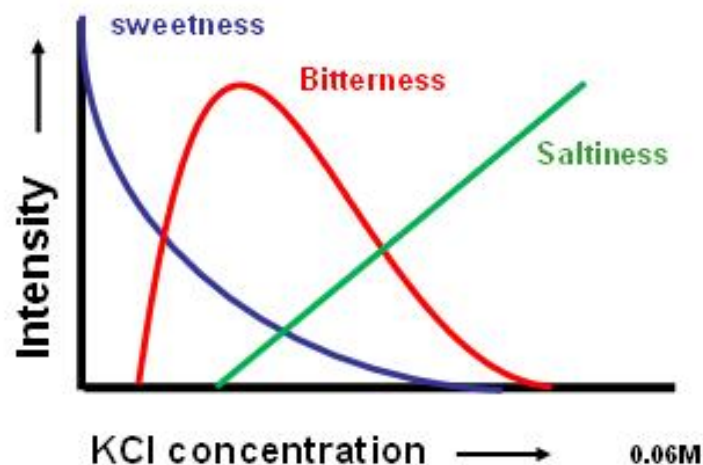


Fig. 2-3-2. Taste profile Potassium Chloride (Dzendolet & Meiselman, 1967).

(2) Potassium sulphate

- Potassium sulphate는 짠 맛, 신 맛, 쓴 맛, 단 맛에 영향을 미치며 sulphate의 농도가 증가함에 따라 단맛이 감소하는 경향을 보임.

(3) Calcium chloride

- Calcium chloride는 쓴 맛, 신 맛, 단 맛을 가지고 있으며, NaCl의 짠 맛을 증진시키는 역할을 함. Sucrose와 citric acid는 calcium chloride의 맛을 억제하고, calcium 염에 감칠맛을 부여하는 성질을 가지고 있으며, 금속 맛, 떫은 맛, 자극적인 맛을 크게 낮출 수 있음.

(4) Magnesium sulphate

- 짠 맛과 쓴 맛을 가지고 있으며, 다른 염과 함께 사용하면 소금 대체제로서 사용이 가능함.

나. Mycoscent

- Mycoscent는 곰팡이 단백질의 유도체이며, ribonucleotides의 원료임. Mycoscent는 영국의 Marlow Foods社가 만든 것으로 breads, meat products, snacks, soups prepared dishes등에 사용되고 있으며, enhancer의 기능이 있어 짠 맛을 상승시키는 역할을 함.

다. Trehalose

- Trehalose (α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside, dihydrate)는 비환원당으로 두 개의 포도당으로 구성되어 있으며, 쓴 맛, 떫은 맛, 금속 맛을 제거 내지는 경감시키는 역할을 통해 짠맛을 상승시킴. 현재는 energy bar, sports drink에 적용되고 있음.

라. Lactates

- FDR에 의하면 lactic acid salts는 첨가물로서 식품의 맛을 상승시키는 물질이며, potassium lactate, sodium lactate는 보존제로서 육제품과 가공류 제품에 사용되고 있음.

마. Glycine

- Glycine은 육제품에서 소금의 맛을 향상시키고 수분활성을 저하시키는 역할을 하며, 소시지에서는 자극적인 맛과 소금의 감지를 낮추는 역할을 함.

바. Concentrated dairy minerals

- 우유를 분획하는 공정에서 얻어진 Lacto Salt Opti Taste d'Amor Protein은 80%의 dairy minerals (sodium 8-10%, potassium 28-30%, chloride 40-45%, calcium 2.5%)을 함유하고 있으며, 식품 그대로의 맛을 향상시키는 역할을 함.

사. Dairy taste enhancer

- 발효유, maltodextrin, 유단백질로 구성된 물질로서 100 g 당 sodium 250 mg, potassium 5 g, calcium 460 mg을 함유하고 있으며, 소금 대체제로서의 가능성이 제기되고 있는 물질임.

7. 작은 결정염의 사용

- Sodium chloride는 물에 용해되면 짠맛을 나타내는데 소금의 결정의 크기, 형태를 다르게 하면 짠 맛의 강도가 다르게 나타나는 것으로 보고되고 있으며, 일반적인 결정 크기보다는 작은 결정 크기를 가진 소금이 짠 맛의 강도가 크고 결정의 크기가 작을수록 시간에 따른 짠 맛의 인지 강도가 크게 나타나는 것으로 보고됨(Bravier, 1983). 현재 이러한 기술은 snacks, chips 그리고 일부 육제품등에 응용되고 있음.

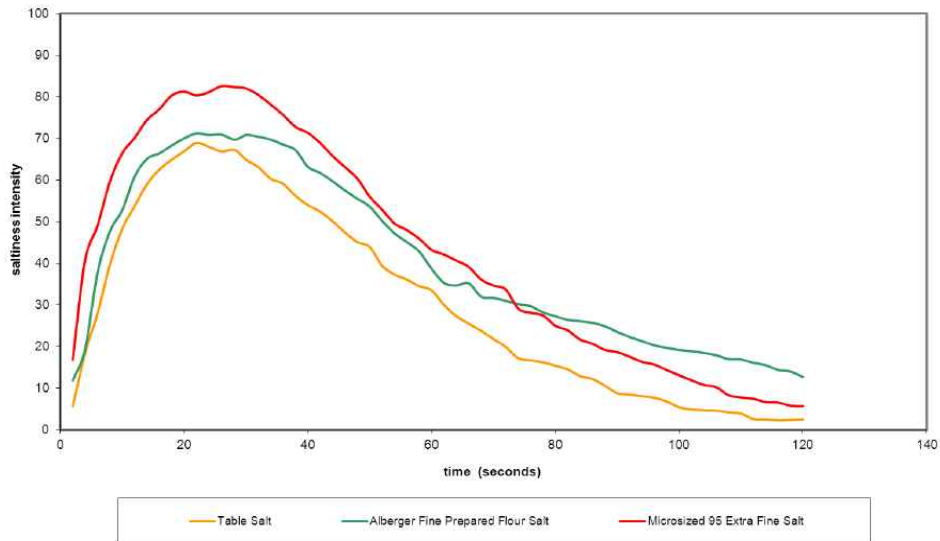


Fig. 2-3-3. Salt intensity vs. time for salt crystals of differing size. (Leatherhead Food Research, 2007).

Table 2-3-2. Potential Solution for Salt Reduction

Product	Company	Potential Applications *	Benefits	Shelf-Life**	Functionality	Consumer Acceptance ***	Clean Label	Other Barriers
Smart Salt® patented technology with magnesal	SmartSalt	Meat and meat products, bakery and cereal products, cheese products, snacks, soups and ready to eat meals	Optimised blends to be used as 1:1 salt replacement for different products	Trials have been conducted and reports available	Assessed for effect on pH and a _w and for functionality in bread products	Evaluated extensively in commercial development facilities and manufacturing environments as well as food research establishments,	Labelling requirements vary depending on geographical and preferred blending option. Smart Salt® is able to provide advice on request	None identified
Yeast extract enhancers and combinations	DSM	Soups, sauces, ready to eat meals, meat products, bakery and seasonings	Reduction in sodium levels and good flavour profile	No trials on shelf-life conducted	No effect on functionality other than replacing taste of salt	Sensory and consumer acceptability trials conducted	Yeast extract and/or natural flavouring would need to be declared in accordance with (EC) No 1334/2008	Powder properties of salt versus the yeast extract based ingredients may be different in handling, in factory.
PuraQ Arome NA4	Purac	Processed cooked meats both cured and uncured, bakery products, sauces, snacks and ready to eat meals.	Provides savoury taste, compensates for lack of flavour and contributing towards lowering the water activity of the food.	Shelf-life trials have been conducted	Effect on water activity has been evaluated	Sensory and consumer trials conducted	Natural flavouring would need to be declared in accordance with (EC) No 1334/2008.	None identified
Suprase!® Loso OneGrain™	Akzonobel	Bakery specifically bread and morning goods. Product for meat in development	Provides NaCl, KCl and yeast extract in one grain with a defined blend ratio	Trials in progress	Effect on bread dough functionality similar to salt	Consumer trials conducted in Dutch style bread	Contains NaCl, KCl and yeast extract	Contains KCl which is currently not advised for use by DH

Table 2-3-2. *Continued*

Product	Company	Potential Applications *	Benefits	Shelf-Life**	Functionality	Consumer Acceptance ***	Clean Label	Other Barriers
Sub4salt*	Jungbunzlauer	Suitable for all applications	1:1 substitute with easy handling properties	Shelf-life trials conducted	Effect on water activity has been evaluated	Sensory and consumer acceptability trials have been conducted in a range of different products	Contains NaCl, KCl and sodium gluconate	Contains KCl which is currently not advised for use by DH
SaltPrint® 4D and 5D	Firmenich	Soups, sauces ready meals and potato crisps	Salt enhancers designed to allow reduction in salt level of up to 45%	None conducted to date	No data	Sensory and consumer acceptability trials have been carried out in a range of different products Sensory work ongoing in meat products	Natural flavouring would need to be declared in accordance with (EC) No 1334/2008	SaltPrint 5d is designed to be used in conjunction with KCl which is currently not advised for use by DH
Salt Enhancer	Natural Taste Consulting	Demonstrated so far in meat, bakery, dairy and beverages but potential across food industry	Salt enhancer with the additional benefit of masking off notes associated with KCl	None conducted to date	No data	Tests have been conducted in soups and meat, bakery, cheese and isotonic beverages	Natural flavouring would need to be declared in accordance with (EC) No 1334/2008	None identified
Sante	Lycored	Meat and meat analogues, soups, seasonings, sauces and snacks.	Reduction of up to 30% in salt levels with no detrimental effects on taste	No data	No data	Sensory tests conducted on Sante itself but not in food products. Trials may have been conducted by end product manufacturers but results would be proprietary	Sante is a natural product, entirely originating from tomato	None Identified
Superbind™ HB-CT	Innophos	Comminute Meats	Effective protein extraction in meat with lower use level than salt	Some food safety work is in progress	Designed to reproduce the same binding functionality in meats as salt	Sensory and consumer acceptability trials carried out	Labelled as phosphates	Potential negative consumer perception

Table 2-3-2. *Continued*

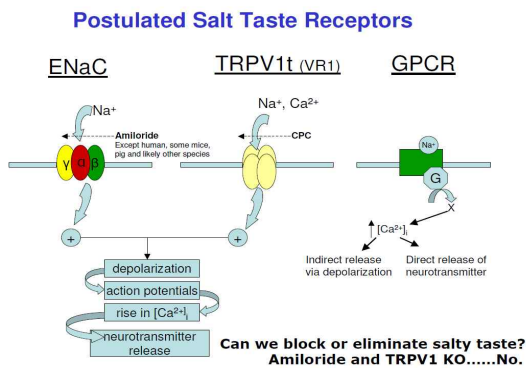
Product	Company	Potential Applications *	Benefits	Shelf-Life**	Functionality	Consumer Acceptance ***	Clean Label	Other Barriers
FlakeSelect™ & SodiumSense™	Cargill	Meats (beef, pork, and poultry), dairy (e.g. natural cheese, cottage cheese), bakery (breads, tortillas), cereals, snacks & seasonings, canned vegetables, beverages	Address the functional roles of salt in food applications, such as, taste (salty and flavour enhancement), texture, protein modification and microbial management,	Shelf life trials are in progress	No data	Some sensory and consumer trials conducted	FlakeSelect™ labelled as Potassium chloride or Salt and Potassium Chloride SodiumSense™ labelled as Potassium Chloride and Natural Flavouring	Contains KCl which is currently not advised for use by DH
KUDOS Potassium bicarbonate	Kudos Blends	Sweet baked goods including products such as fruit scones, crumpets, and muffins.	Potassium bicarbonate designed to be used in place of sodium bicarbonate	The shelf life of the end product, i.e. the baked cake, is not affected or altered by using potassium bicarbonate in place of sodium bicarbonate	Fine particle size ensures full dissolution in batter, delivering products with equivalent volume, texture and eating characteristics to those based on sodium bicarbonate.	A recognised bakery ingredient and is being used commercially in many products	Labelled as potassium bicarbonate	Contains potassium which is currently not advised for use by DH
Soda-Lo®	Eminate	Currently used in bread, pies, pastry and pizza bases. Potential use in cheese and meat products	Labelled as salt	Results in bread have demonstrated that bakers can also achieve significant increases in shelf-life, trials ongoing in cheese	Soda-Lo* is salt but has a smaller particle size, it enhances product functionality as demonstrated in bread where the salt crystals cross link gluten more effectively than standard salt	When used at the correct levels there is no impact on taste and this has been demonstrated in bread and cheese. It is being used commercially in bread, pies and pastry and pizza bases.	Labelled as salt	None identified

Table 2-3-2. *Continued*

Product	Company	Potential Applications*	Benefits	Shelf-Life**	Functionality	Consumer Acceptance***	Clean Label	Other Barriers
Seaweed	SeaGreens	Bread	Additional Satiety Effect	No data	No impact on bake quality of Bread	Trials in progress	Labelled a Seagreens (Ascophyllum nodosum), this is a clean label product that is also manufactured from a sustainable source.	Imparts a green coloration to products in which it is used.
Sea SaltTrim	Wild Flavours	Soups, sauces and salad dressings, Meats, Bread and baked goods, Salty snacks, Meal kits, Canned foods, Vegetable beverages and bouillons, cube and powders	1:1 replacement that imparts a umami taste	No data	No data	A consumer acceptability study has been conducted with potato chips using employees as test subjects. Samples were blind coded. No significant differences were identified between acceptability and perceived saltiness	Low sodium sea salt/natural flavouring	None identified

8. 짠맛 증진 물질의 스크리닝 방법

- 현재 많은 과학자들이 짠맛 인지 기작을 좀 더 정확하게 밝히기 위하여 연구를 진행하고 있으며, 이러한 연구결과를 바탕으로 30% 이상의 나트륨 저감화를 달성하기 위한 천연의 salt booster 즉, 염미증진제를 개발하는데 집중하고 있음. 미생물학적(유전학적) 방법을 이용하는 방법으로는 상피(epithelial)의 나트륨 채널(sodium channel)을 modulating하는 물질을 발현하는 유전자(vector)를 활용하여 modulating material을 만들어 이를 활용하는 방법(US patent 20090075320)이 보고되었으며, 또한 2012년에도 유전자를 활용하여 짠맛의 감지나 짠맛 대체물질을 enhancing하거나 inhibit하는 물질을 찾기 위해 salty taste receptor protein을 발현하는 DNA를 만들어 insertion하는 방법이 보고됨. 물리화학적 방법은 짠맛을 낸다고 보고되어 있는 다양한 물질들을 선별한 후 이들 물질을 대조물질(소금)과 비교하거나 대조물질과의 적절한 combination을 통해 적절한 농도를 찾아 최적의 농도를 갖는 salty enhancer의 조합을 찾거나 짠맛을 갖는 물질의 화학적 구조를 바꾸어 짠맛을 강화시키는 방법 등이 보고되고 있음. 사람의 관능을 이용하는 경우에는 하루에 10~20개의 물질을 스크리닝 할 수 있지만, Senomyx나 Chromocell 등의 미국계 회사에서는 Fig. 2-3-4의 TRPV1t (VR1)과 같은 수용체를 이용한 cell-based high throughput screening 방법으로 하루에 10,000개 이상의 물질을 테스트할 수 있다고 함.
- 뿐만 아니라 나트륨 저감화를 정확하게 평가하기 위해 나트륨 섭취에 대한 실질적인 monitoring 기술로서 호르몬 레벨에서의 연구, 짠맛에 대한 sensitivity와 preferences의 monitoring 기술, salt sensitivity를 어떻게 정의하고 측정할 것인가? 그리고 평가를 위한 신속 screening tools의 개발 등이 시도되고 있음.



Salt boosters

- Finding molecules from nature that can trigger or boost the sodium channel
- Evaluation with a panel: 10-20 compounds per day
- Testing >10,000 compounds: high throughput screening

Sodium Channel

Cell membrane

Tareilus et al.

Fig. 2-3-4. Salt Taste Receptors and High Throughput Screening.

제4절 나트륨 저감 가공식품의 개발 및 시장 동향

1. 국외 나트륨 저감 제품 현황

○ 최근 몇 년간 식품제조업체들은 지속적으로 저 나트륨 제품 개발을 위한 노력을 기울여 왔으며, 나트륨 저감 제품의 출시는 급속히, 그리고 지속적으로 증가하고 있는 것으로 나타났다. 특히 2009년 유럽 국가에서 나트륨 저감 제품의 출시가 크게 증가되었음(Shin, 2012).

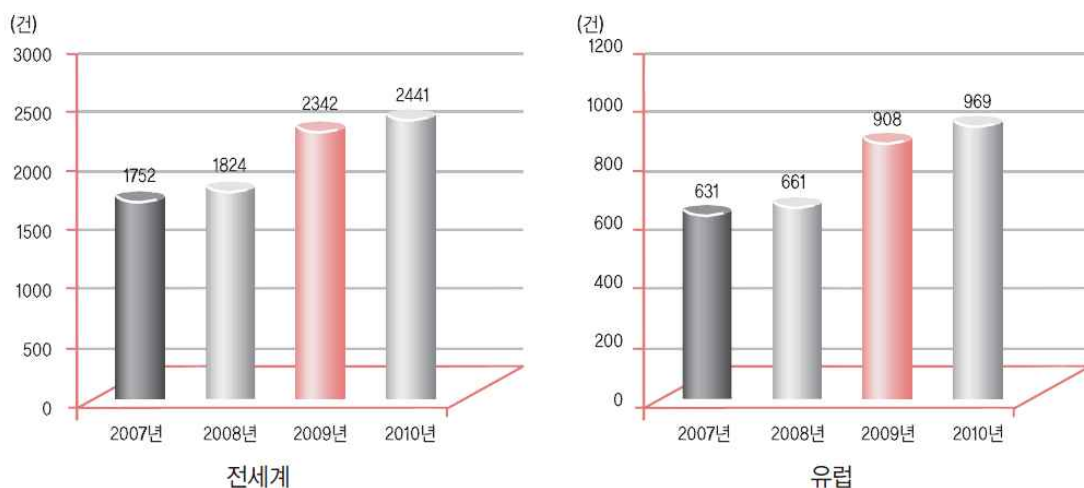


Fig. 2-4-1. Launching of Salt Reduction Products for 2007-2010. (Innova database).

○ 나트륨 저감 제품 시장의 제품 출시 현황을 살펴보면 미국(30.8%)과 영국(13.2%)이 가장 높은 제품 출시율을 보이며 저 나트륨 관련 제품 시장을 선도하고 있는 것으로 나타남.

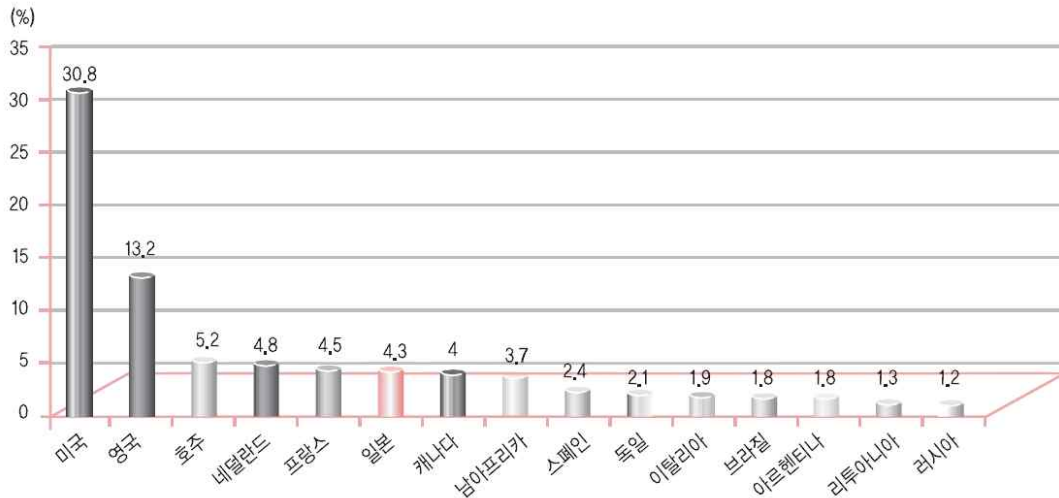


Fig. 2-4-2. Launching of Salt Reduction Products by countries for 2009-2010. (Innova database).

2. 저 나트륨 제품에 사용되는 대체 소재 현황

- 유럽의 대체 소재 현황을 살펴보면 효모 추출물(46.7%), 천일염(28.4%), MSG(23.2%), 염화칼륨(15.5%)의 순으로 나타났으며, 효모추출물은 나트륨 대체제로 사용되거나 혹은 지미를 부여하기 위한 용도로 사용됨.

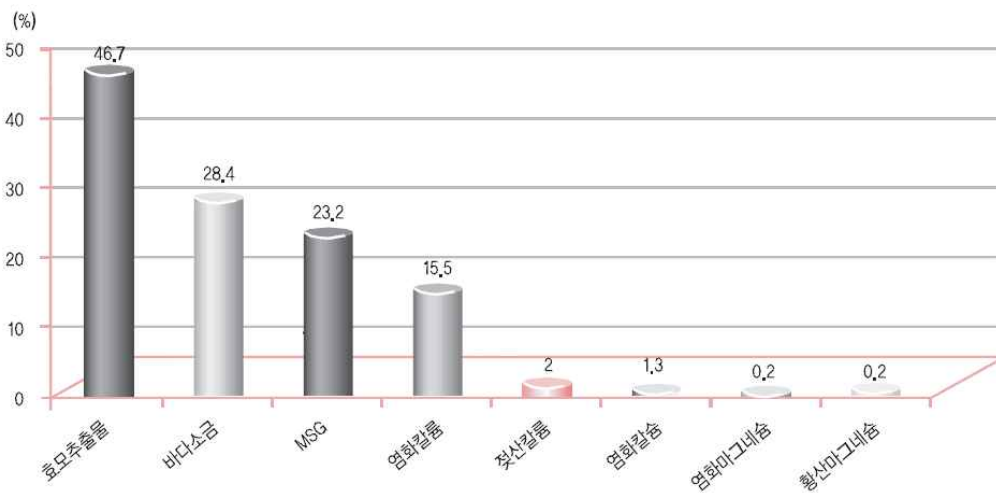


Fig. 2-4-3. Salt substitute ingredients in EU (Innova database, 2008-2010).

- 대부분의 나트륨 대체소재는 스프, 소스, 양념류, ready to eat 제품 등 인스턴트 제품에 사용되는 경향을 보이고 있음. 효모 추출물과 MSG의 경우에는 저 나트륨 함량임에도 좋은 맛을 유지하기 위한 목적으로 첨가되고 있으며, 염화칼륨은 소스 및 양념류, 육류, 식사대용식, 제과, 유제품 등에서 폭넓게 사용되고 있음.

Table 2-4-1. Usage of salt substitute ingredient (Innova database, 2008-2010)

	Yeast extracts	Sea salt	MSG	KCl
soups	∨		∨	
sauce, seasoning	∨	∨	∨	∨
instant foods	∨	∨	∨	∨
infant foods	∨			
snacks	∨	∨	∨	
cereals		∨		
bakery		∨		∨
fish and eggs			∨	∨
dairy product				∨

- 저 나트륨 제품에는 향미를 증진시키기 위한 향미증진제가 사용되는데, 전 세계적으로 저 나트륨 제품에 가장 많이 사용되고 있는 재료는 마늘이며, 셀러리, 파프리카 등과 함께 사용되는 경우도 많음.

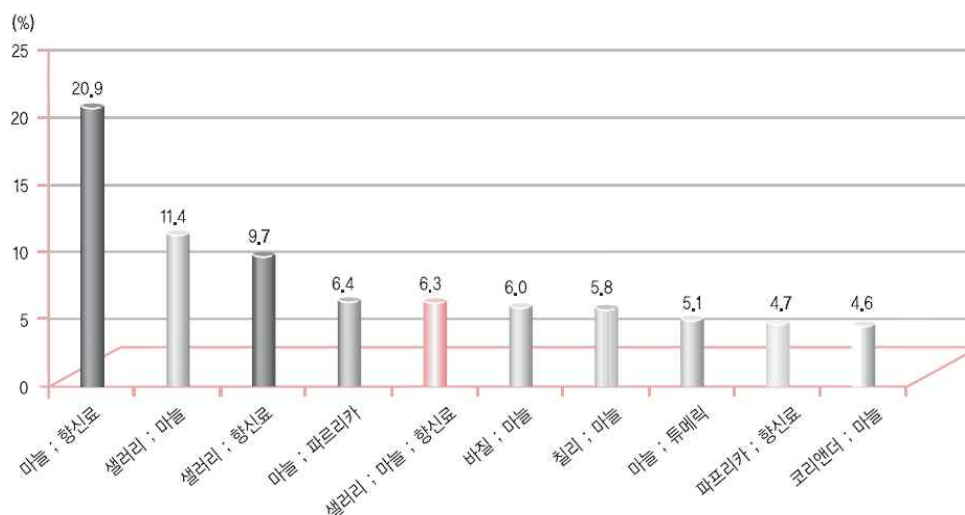


Fig. 2-4-4. Top 10 salt reduction ingredient. (Innova database, 2008-2010).

- 세계적으로 소금대체 및 보완제 시장의 필요성은 점차 증가하고 있으나, 그 연구 및 실용화 제품은 극히 한정적.

3. 전통 발효 식품에서의 염미 강화 소재 탐색의 지속적인 노력

- 고염 장류의 저염화를 위한 방법으로 에탄올 첨가법, 수분 활성 조절법, 발효 후 곡물 첨가법 등이 활용되고 있으며, 나트륨 대체물질로 호모추출물, MSG 등을 사용하고 있는 실정 (Israr 등, 2016).
- 식습관이 우리나라와 비슷한 일본의 경우, 식품별 저감화 가이드라인을 개발하였으며, 장류, 김치류, 절임식품류 업체를 대상으로 실시하는 중소기업 나트륨 저감화 기술지원 사업을 추진(Lee, 2015).

4. 기타 신가공기술을 접목한 저염 가공 기술

- Tamm 등(2016)의 연구에서 100 MPa 압의 초고압기를 이용하여 소금 대체제인 0.2% KCl 과 1.1% 소금의 복합체를 만들어 햄에 적용한 결과, 45%의 나트륨 저감화 효과를 나타내었다고 보고.
- 유사 연구내용으로 고압의 처리를 한 소금에서 짠맛이 더욱 강하게 인지되었다고 보고하였는데, 이는 높은 압력이 NaCl과 고기와의 부착력에 영향을 주어, 방출되는 속도가 달라지기 때문이라고 보고(Atsushi 등, 2006).

5. 본 과제에서 시도한 코팅기술을 이용한 저염가공식품 부재

- 논문, 특허, 상품에 대한 분석 결과 현재까지 개발된 저염화 된 건식 소금, 저염빵, 저염 면에 대한 새로운 시도는 전무한 상태임.
- 따라서 본 연구개발 기술의 적용이 확대 보급될 것으로 사료됨.

6. 국내외 저염기술 관련 특허 현황

가. 제외국 소금/나트륨 저감 식품 특허 출원 현황

- 2000년대에 들어서면서 특허 수가 꾸준히 증가하고 있으며, 지난 5-6년 동안 저염 및 저 나트륨 기술과 관련하여 특허 출원 수가 급증하였음.

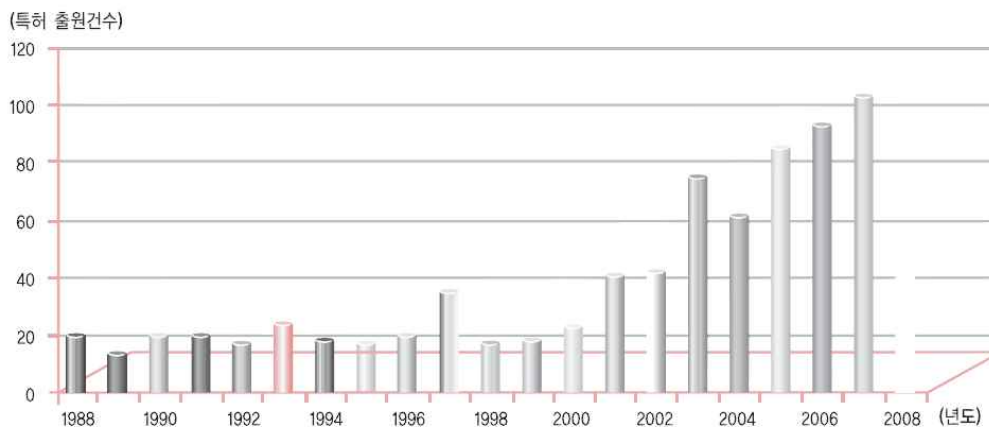


Fig. 2-4-5. Top 10 salt reduction ingredient. (Innova database, 2008-2010).

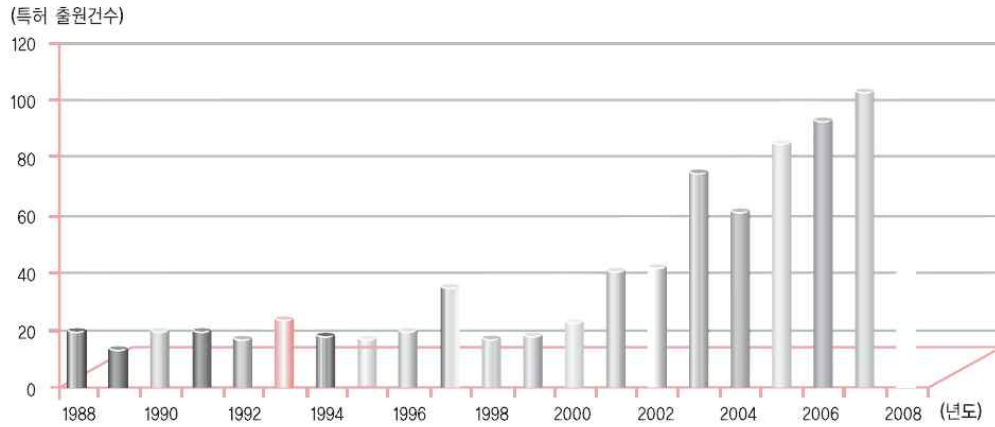


Fig. 2-4-6. Recent patents of Low Salt food products. (Food, Nutrition & Agriculture, 2009).

나. 제외국 나트륨 저감 관련 특허 주요 사례

○ 나트륨 저감 관련 특허 사례를 Table 2-4-2에 제시함.

Table 2-4-2. 나트륨 저감 관련 특허 주요 사례

구분	특허내용	식품 예
미각 인식에 영향을 미치는 소금 대체제 개발	○ 나트륨을 줄이는 대신 짠맛을 더 잘 느끼도록 혼합물 사용 - 칼륨염을 용융소금(melten salt) 형태로 사용 - 칼슘과 비타민 D, 혹은 칼슘과 마그네슘 사용 - 전체 또는 일부를 칼륨염+aminobutyric acid로 대체 - 캡사이신 첨가	치즈 밀가루 소스
	○ 대체제 사용 시 쓴맛 억제제를 함께 사용 taurine and 5'-adenosinic acid, 5'-inosinic acid, 5'-guanylic acid	모든 식품
	○ 향미증진제 효과 강화 또는 5가지 맛에 대한 인지정도 변화 N-substituted unsaturated alkyl amide	모든 식품
소금 저감에 의한 기능적 문제 보완 (보존기간, 식품의 질 등)	○ 질감 및 수분 보유력 관련 기술 - 육류의 질감 향상을 위해 tyrosinase 사용 - 소금 양을 낮추고 밀단백질 등의 단백질 부분 가수분해물과 transglutaminase 첨가	육류, 생선, 가금류 등
	○ 보존기간과 관련된 기술 - 저염 제품을 냉동 건조하여 수분함량 감소 - pH 감소, 유기산 첨가 - 염화나트륨 이외의 수분활성억제제 사용(예: 피클에 에틸알코올 사용 등)	모든 식품
	○ 기타 질감, 겔화능력, 색, 맛 변화와 관련된 특허기술 - 간장을 NF(nanofiltration) membrane 처리 - 채소를 소금과 아르기닌이 포함된 수용액에 담금 - thiamine dilaurylsulfate 첨가 등	피클, 소스
탈염, 필터링,	○ 식품 가공의 마지막 단계에서 탈염 기술을 이용	생선, 피클

희석방법을 사용한 소금 저감화	- 생선 추출물로 생선 탈염 - 우롱차 또는 저삼투액을 사용하여 탈염	
	○ 전기투석방법을 이용한 필터링 기술	육류, 소스
	○ 심해층수, 사케, 간장 등을 이용한 희석 기술	소스
소금 흡착정도를 감소하는 기술	○ 소금 수송장벽(salt-transport barrier)을 사용 - 생선의 탈수/조미/훈제 시 반투막을 사용 - 살짝 소금 처리된 생선에 수분흡착 시트로 수분흡착	생선, 어패류, 육류
	○ 저 농도 염액을 사용하거나 소금의 첨가정도 조절 - 제빵 시 밀가루에 소금, 염화칼륨 및 아스코르빈산 첨가 - 피클 만들 때, 소금 농도가 낮은 피클 용액에 담금 등	빵, 생선, 피클, 소스

다. 국내 저염 기술 관련 특허 현황

- 1995년 주요 대체염 소재로 염화칼륨을 사용한 기능성 식염 조성물(출원번호: 10-1994-0025393) 특허가 출원되었으며, 그로부터 10년 이후인 2005년 천연물을 사용하여 ‘고혈압 환자를 위한 소금 대체용 식물추출액 분말의 혼합 조성물 제조방법’이 개발되었음. 이후 매년 꾸준히 약 2-3개의 저염기술 관련 특허가 출원되었음. 출원된 총 12건 중 8건이 염화칼륨을 활용하였으며 3건은 천연물을 사용하였는데 마늘, 양파, 무, 다시마 등의 추출물을 사용한 경우와 토마토 장액을 이용한 천연 유래 식염 대용물을 개발한 특허 건 등이 있었음(Table 2-4-3 참고).

Table 2-4-3. 국내의 저염 기술 관련 특허

No.	특허명	주요대체염소재	내용 및 특징
1	알칼리성분이 풍부한 식품첨가제 및 그 제조방법	염화칼륨	- 천일염과 염화칼륨 혼합용액에 알칼리수를 분사하여 알칼리성분이 풍부한 식품첨가제를 제조함 - 미네랄성분이 풍부한 소금 대체식품
2	고혈압 환자를 위한 소금대체용 식물추출액분말의 혼합 조성물 제조	천연물	- 식물(마늘, 양파, 무, 다시마 등)로부터 추출한 수용성물질로 지나트륨 식물 추출액분말 혼합조성물 제조천연물 - 소금대체용 천연향신료로 사용
3	조미용 물소금 및 조미용 물소금의 제조방법	염화칼륨	- 염화칼륨, 아미노산, 유기산, 당류를 포함한 조미용 액상 소금
4	기능성 식염 조성물	염화칼륨	- 식염과 염화칼륨 혼합물에 구연산나트륨을 첨가하고 천연조미료 등의 조미성분, 비타민 및 미네랄 등의 강화제를 함유한 기능성 식염조성물

제3장 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

제 1 절 바이오선도가공기술을 활용한 HAP제조와 이를 활용한 나트륨 사용 저감화

1. 동물성 단백질 고압효소분해기술의 개발

가. HAP 제조 공정의 선별 및 단백질원 선정

(1) 단백질 가수분해물 제조 공정

- 단백질은 아미노산을 기본 단위로 하여 구성되어 있다. 단백질 내에서 밝혀진 아미노산은 20내지 22개이며 인체의 단백질 형성에 필요하지만 체내에서 합성되지 않아 반드시 섭취해야 하는 필수아미노산(essential amino acids)과 그렇지 않은 것으로 분류한다. 단백질은 20여개의 서로 다른 아미노산이 펩타이드 결합을 통하여 중합된 고분자화합물로, 탄수화물이나 지질에 비해 분자가 크고 그 구조가 훨씬 복잡하며 종류도 매우 많아 다양한 특성을 나타낸다. 단백질은 신체의 각 기관 및 호르몬, 효소의 구성 성분이며, 에너지 발생, 체성분의 유지, 산·알칼리 평형 유지 등의 역할을 수행한다.
- 식품에 존재하는 단백질은 식물성 단백질과 동물성 단백질로 구분한다. 이러한 단백질은 영양학적 특성, 가공 적성 및 기능적 특성으로 인하여 Fig. 3-1-1과 같이 식품 시장에서 원료로 사용되고 있다.

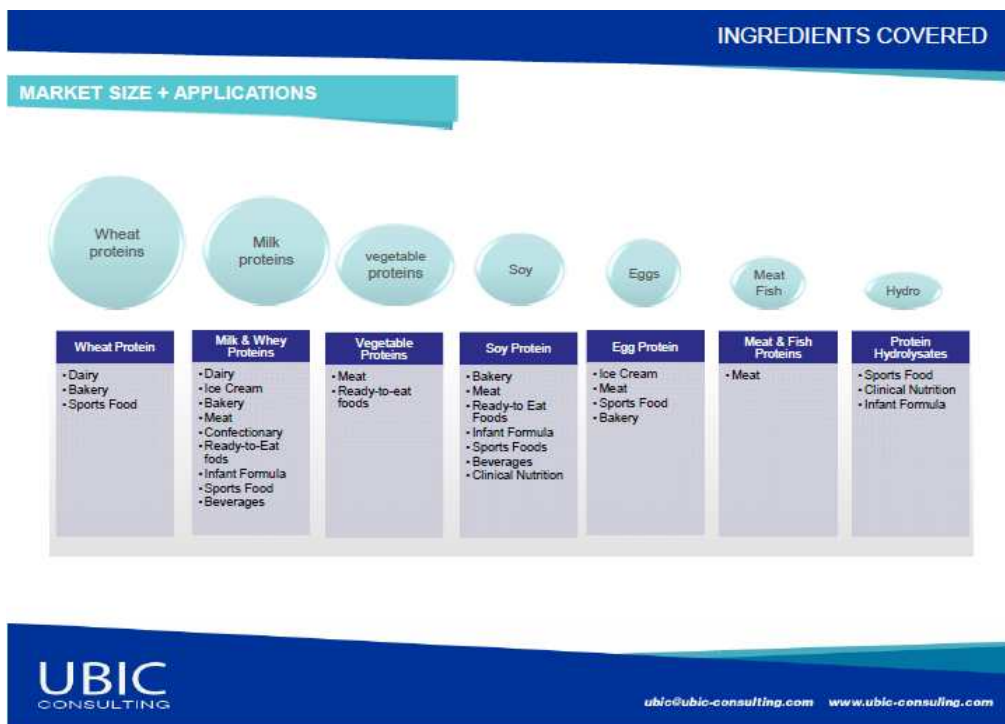


Fig. 3-1-1. 단백질 소재 활용 시장 현황(출처: UBI consulting)

- 특히, 단백질 가수분해물은 바이오산업에서 세포 배양을 위한 배지의 질소원(상업적으로는 peptone이라 함, Pasupuleti & Braun, 2010)으로 사료의 값싼 영양원(Kristinsson & Rasco, 2010)으로 상용화 되었지만 시장에서 특수 목적을 위한 고품질의 가수분해물에 대한 수요 증가, 식품산업에서는 특정 효소를 사용하여 특정 부위의 펩타이드 결합을 자르기 시작 (Mullally 등, 1994)하면서 가수분해물의 활용 영역이 더욱 증가하고 있다.
- 단백질 가수분해물의 새로운 용도 즉, 짠맛 증진 물질로 활용하기 위한 새로운 제조 공정 개발 및 기존 공정의 개선을 위하여 우선 상업적인 기존의 단백질 가수분해물 제조 공정, 가수분해물 활용 방안, 단백질 급원 선별 및 하류 공정(downstream process)에 대하여 조사한 후에, 풍미 증진제 역할이 가능한 국내 시판 제품을 선정하였다.

(가) 상업적 제조공정

- 효소를 이용하는 가수분해가 가장 많이 사용되고 있지만, 아직도 산업적으로는 산과 알칼리 가수분해도 사용되고 있다.

① 산 가수분해

- 1820년 Braconnot(Hill, 1965)에 의해서 최초로 보고된 이후 상업화하는데 수세기가 소요되었으며, 여전히 가장 오래된 공정으로 사용되고 있다. 산 가수분해 단백질은 대부분 향미증진제(flavor enhancer)로 활용되고 있으며, 일부가 염을 부분적 또는 완전히 제거하여 바이오산업에서 활용하고 있다(Nagodawithann, 1995).
- 단백질을 가수분해하기 위하여 염산 또는 황산이 사용되며 일반적으로는 염산이 주로 사용된다. tryptophan, methionine, cystine 그리고 cysteine과 같이 필수아미노산 중에 일부가 산 가수분해에 의하여 파괴된다. 더구나 glutamine과 asparagine은 각각 glutamic acid와 aspartic acid로 전환된다(Bucci and Unlu, 2000). 일반적으로 산 가수분해는 단백질을 아미노산 형태로 분해하며, 분해물 중 극히 일부가 작은 펩타이드 형태로 존재한다. 이 공정에서는 미생물의 생육에 유해하거나 가수분해물의 가공 적성 또는 기능성을 저해할 만한 염이 생성된다. 이러한 이유로 인하여 일부 제조업체에서는 nanofiltration이나 ion exchange resin을 사용하여 염을 제거하기도 한다. 이러한 산 가수분해물은 식품산업 또는 애완동물용 사료 산업에서 향미증진제로 널리 사용되고 있다(Nagodawithann, 1998, 2010). 산 가수분해물을 생산하기 위해서는 고온, 고압에 견딜 수 있는 스테인레스 스틸 반응조가 필요하며, 공장의 안전도 매우 중요하다. 산 가수분해 시에 고려해야 할 인자는 사용할 산의 종류(염산 혹은 황산)와 농도, 온도(120~140℃), 압력(2~3 atm), 가수분해 시간(2~8 hrs) 그리고 단백질 농도(50~65 %) 등이다. 이러한 인자는 최종 산물의 품질에 지대한 영향을 미친다.
- 산업적으로 생산된 카제인 또는 콩단백질의 산 가수분해물이 진단 배지(diagnostic

media)나 발효에 사용 된다.

② 알칼리 가수분해

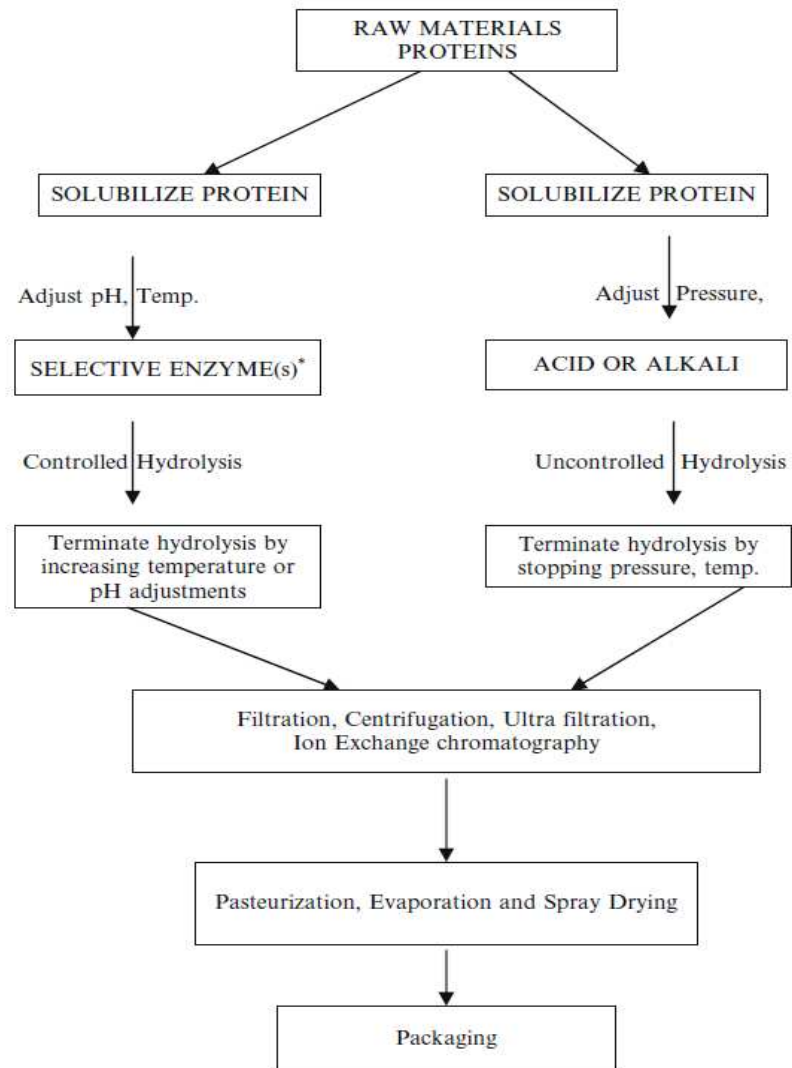
- 조사한 바로, 알칼리 단백질 가수분해물을 바이오산업에서 활용하는 예를 찾지 못했지만 식품 산업에서는 산업적 규모로 활용되고 있었다. serine이나 threonine과 같은 일부 아미노산이 파괴되지만 tryptophan은 손상 되지 않는다.
- 알칼리 가수분해는 꽤 간단하고 진행형 공정이다. 즉, 먼저 단백질을 가열에 의하여 용해한 후에 $\text{Ca}(\text{OH})_2$, NaOH 또는 KOH와 같은 알칼리를 더하고 일정 온도($27\sim 55^\circ\text{C}$)로 유지하면 된다. 원하는 가수분해도에 도달 할 때까지 계속하여 분해한 후에 증발 농축, 살균 및 분무 건조를 하면 된다.

③ 효소 가수분해

- 사용되는 효소는 대부분 미생물, 식물 또는 동물에서 유래한다. 최근에 단백질 가수분해 기술의 발전은 발효 공정에 의해서 생산되는 단백질 분해 효소로부터 유래한다. 단백질 효소가수분해의 장점은 가수분해 조건이 비교적 마일드하고 효소의 특성에 따라 제조업자가 최종 소비자에게 맞춤형 제품이나 가수분해도를 정밀하게 조절할 수 있도록 해 준다.
- 동물, 식물 및 미생물 발효 기원의 다양한 단백질 분해 효소가 시판되고 있으며, 단백질 가수분해물 제조에 많이 사용되는 효소는 pancreatin, trypsin, pepsin(동물 유래)과 papain, bromelain(식물 유래) 그리고 bacterial and fungal protease(발효 유래)가 있다. 단백질 가수 분해는 단일 공정 및 여러 효소를 이용한 연속 공정으로도 가능하다. 사용할 효소 선정은 단백질 급원과 최종 제품의 요구 사항에 따라 결정하여야 한다. 예를 들어, 단백질에 소수성 아미노산이 많이 존재하면 소수성 아미노산을 잘라 내기를 선호하는 효소를 선택하면 된다(Alder-Nissen, 1986).
- 단백질의 산, 알칼리 및 효소 가수분해 이외에도, 기능적 특성을 갖는 di 또는 tri 펩타이드를 생산하기 위한 새로운 경향은 효소에 의한 아미노산 결합의 생성 혹은 발효 공정에 의한 di 그리고 tri 펩타이드 대량 생산(Ota et al., 1999; Pasupuleiti, 2005) 등이라고 보고하고 있다.

(나) 단백질 가수분해물 process flow diagram

- 제조업자나 제품의 형태에 따라 의존하지만 대개 반응조는 2 m^3 에서 38 m^3 의 중·소규모 크기와 38 m^3 이상의 대용량 크기로 나눌 수 있다. Fig. 3-1-2의 도식적인 생산 공정 흐름도에서와 같이 단백질을 먼저 Fig. 3-1-3과 같은 가수분해 반응조에서 고형분 함량 8~20%가 되도록 용해한다. 필요에 따라 전처리로서 가열(90°C 이상)을 하기도 하고, 산과 알칼리로 pH를 조절($3.5\sim 9.0$)하고 온도를 일정 온도($38\sim 65^\circ\text{C}$)로 유지한 후에 효소를 첨가한다.



*Preservative for longer Hydrolysis

Fig. 3-1-2. Typical manufacturing overview of protein hydrolysates.

- 첨가하는 효소는 상업적으로 정제된 효소나 동물성 기원의 반정제 또는 조효소를 사용한다. 가수분해 시간은 대략 1~100 시간 정도이고 그 이상인 경우도 있다. 가수분해 시간이 오래 걸리는 경우에는 잡균의 오염을 방지하기 위하여 제조업자에 따라 세균 발육 억제제(bacteriostatics, 정세균제) 또는 살균 보존제(bactericidal preservatives)를 첨가하기도 한다. 이러한 첨가제는 하류 공정에서 제거하여야 한다. 이러한 방법은 매우 고전적인 방법이고 최근에는 UV 또는 PEF 처리(Uchida et al., 2008)나 오존 처리(Oliver and Duncan, 2002)가 대안으로 연구되고 있다. 실제로 산성 조건과 고온에서 작용 가능한 효소를 이용하여 가수분해 시간을 4시간 정도로 단축하여 이러한 문제를 해결하는 시도나 해결한 경우도 있다. 이들 새로운 기술들은 좀 더 정확한 공정 제어뿐만 아니라 제품의 품질을 균일하게 유지하는데 많은 기여를 하였다. 실제로 가수분해도(DH %) 혹은 가수분해 시간을 실시간으로 모니터링 하고 있다. 목표로 하는 가수분해도에 도달하면 효소를

불활성화 할 수 있도록 고온으로 온도를 올려 반응을 종료한다.



Fig. 3-1-3. Bank of hydrolysis reactors (Courtesy: Kerry Biosciences).

- 제품에 따라 다르지만, 단백질 분해 산물은 살균, 증발 농축 그리고 분무 건조하거나 단계적으로 하류 공정을 거치게 된다. 이러한 하류 공정의 첫 번째 단계는 원심분리, 가압엽상 여과기(plate and frame filter press) 혹은 micro filtration system을 이용하여 단백질 분해 산물로부터 용해되지 않은 물질을 제거하는 정제단계이다. 제품의 색과 투명도를 위하여 이러한 정제 공정을 반복하기도 한다. 이 공정에서 활성탄이 많이 사용되며 활성탄은 탈색 또는 부유물을 생성하는 성분(haze-forming components)을 제거하기 위하여 사용된다.
- 최근에는 가압엽상 여과기 대신에 Fig. 3-1-4와 같은 ultra filtration(한외 여과) system을 사용한다. 이 장비는 최대 10,000 Da 이상의 분자량을 갖고 있는 물질을 제거할 수 있다.
- 여과 후에는 미생물 수를 줄이기 위하여 가열하거나 살균 과정을 거친다. 이 공정은 실제 제조업체에서 너무 과하게 열을 가하는 경우가 많아 좀 더 주위 깊은 연구가 필요하다.
- 살균 후에는 고형분 함량이 30~50%가 되도록 증발 농축한다. 경우에 따라서는 60% 이상까지 농축하는 경우도 있다. 이는 최종 제품의 물리화학적 특성 또는 품질 특성에 따라 조절되어야 한다. 제조 업체에 따라 최종 살균 과정을 한번 더 거친 후에 분무 건조를 하

고 포장한다.



Fig. 3-1-4. Ultra filtration system (Courtesy: Milk Specifications Global)

(다) 원료의 선별

- 동물성 단백질 가수분해물의 단백질 급원으로는 카제인, 유청, 기원이 다른 여러 육류와 어류가 이용되고 있으며, 식물성 단백질 가수분해물은 콩이나 밀을 이용하였다. 최근에는 쌀, 완두콩 및 목화씨를 이용하여 상업적으로 가수분해물을 제조 하였다(Sheffield Product Manual, 2009와 Kristinsson H.G. and Rasco B.A., 2010). 이 들 단백질 급원의 아미노산 조성, 단백질 구조, 용해도 및 변성 등은 효소나 다음 단계의 처리 방법의 선택에 영향을 주므로 매우 중요하다.
- 품질이 일정하고 고품질의 단백질 가수분해물을 생산하기 위한 첫 번째 단계는 이러한 단백질 급원의 선택이다. 특히 원료 수급 및 가격, 제품에 대한 규제(BSE/TSE free, Kosher, Halal, etc.) 등을 고려하여야 한다. 제조업자로서는 가장 중요하며 많은 시간을 필요로 하는 단계이다.
- 단백질 급원과 함께 또 다른 중요한 원료로 효소, 물 및 가공 보조제 등이 있으며 이 들은 최종 제품의 품질에 커다란 영향을 미친다.
- 효소는 가수분해도(AN/TN 비율), 펩타이드 사슬 길이, 분자량 분포 프로파일, 자유 아미노산 및 총 아미노산의 양에 영향을 미친다. 산 및 알칼리 가수분해에 비해서 효소를 이

용하는 가수분해는 다음과 같은 이점을 갖고 있다.

- 사용량이 비교적 많지 않아 효소가수분해 후에 효소를 불활성화 하기가 쉽다.
- 온도와 pH 조건이 비교적 마일드 하다.
- 아미노산이 파괴되지 않는다.
- chloropropanol이 생성되지 않는다.
- 가수분해물이 덜 복잡하여 결과적으로 비교적 쉽게 목적물을 정제할 수 있다.
- 상업적으로 유용한 효소의 종류가 다양하여 목적에 맞도록 효소를 선택하기가 비교적 용이하다.

○ 오래 전부터 단백질을 분해하여 자유 아미노산 그리고 일정 길이의 펩타이드 사슬을 가진 펩타이드를 만들기 위하여 단백질 가수분해 효소를 사용하여 왔다. 특히 바이오산업 분야에서는 초기에 미생물 배지를 만들기 위하여 단백질을 가수분해하는데 돼지에서 유래한 단백질 가수분해 효소를 대부분 사용하였다. 오늘날에는 단독 또는 복합적으로 다양한 효소를 이용하고 있다. 예를 들면, pepsin, pancreatin, carboxyl peptidase 그리고 amino peptidase 등이 있다. 동시에 널리 사용되고 있는 식물 유래 효소에는 papain, bromelain 등이 있다. 특히 발효기술과 유전 공학 기술이 발전하면서 serine protease, fungal protease 그리고 endo 및 exo peptidas가 개발되어 사용되고 있다.

○ 산업적으로 단백질 가수분해물의 품질을 관리하는데 가수분해도를 이용하고 있다. 단백질 가수분해도(the degree of hydrolysis of protein, DH %)는 총 펩타이드 결합수에 대한 유리된 펩타이드 결합수의 백분율이다. 이는 대부분 총 질소에 대한 아미노태 질소 (AN/TN)의 비율로 표현하며, 아미노태 질소는 대부분 다음의 3가지 방법으로 측정한다.

- Formal Titration (Sorensen 1908)
- OPA method modified by use of N,N-dimethyl-2-mercaptoethyl ammonium chloride as thiol component (Fres 1988)
- TNBS (Adler-Nissen 1979)

○ 총 질소는 Kjeldahl(Bradstreet, 1954) 또는 micro Kjeldahl법(Fearon, 1920)이나 연소법 (Brink and Sebranek, 1993).을 사용하여 측정한다.

○ 또한 총 아미노산 및 유리아미노산의 양, 펩타이드의 분자량 분포 등(Jandik et al., 2003; Jun et al., 2008)을 측정하여 단백질 가수분해물의 품질을 나타내기도 한다.

(㉔) 최종 제품을 위한 하류 공정(downstream processing)

○ 올바른 단백질 급원과 효소류를 선정하여 원하는 가수분해도를 달성하였다면 이제 전 공정의 반을 완성한 것이다. 단백질 가수분해물의 최종 제품 품질은 나머지 반을 차지하는 하류 공정이 좌우한다. 즉, 사용 목적에 따라 정제 단계를 조절하여야 한다. 이러한 공정

에는 다음과 같은 공정을 이용하고 있다.

- Micro Filtration
- Centrifuge
- Ultra Filtration
- Plate and Frame Filtration
- Nano Filtration
- Ion Exchange Chromatography

(마) 결론

○ 지금까지 조사한 내용을 바탕으로 단백질 가수분해물을 이용하며, 풍미 증진제로 활용 가능한 국내 제품에 대한 조사를 실시하여 Table 3-1-1에 나타내었다. 이 중에서 가장 많이 소비자에게 이용되고 있는 제품은 전통식품으로 식물성 단백질을 이용하는 장류와 동물성 단백질 중에서 어류를 이용하는 액젓 또는 어간장이었다.

Table 3-1-1. 단백질 가수분해물을 활용하는 제품군

단백질원	가수분해물을 이용한 시판 제품	기본 제조 공정
<ul style="list-style-type: none"> • Animal Protein - 돼지, 소 - 가금류(닭, 오리 등) 	<ul style="list-style-type: none"> • 조미소스, 분말·과립형 조미료 • 단백질 보충제 • 제약, 건강 보조 식품 	<ul style="list-style-type: none"> • 발효 (숙성) • 열수 추출 • 가수분해 (효소, 산)
<ul style="list-style-type: none"> • Fish Protein 	<ul style="list-style-type: none"> • 화장품 • 어간장, 액젓, 육젓 	
<ul style="list-style-type: none"> • Plant Protein 	<ul style="list-style-type: none"> • 장류, 소스류 	

○ 짠맛 증진효과가 있는 공정을 선택하기 위하여 시판 간장 및 어간장류를 선택하여 표시 기준을 분석하여 Table 3-1-2에 나타내었다.

Table 3-1-2. 선별한 시판 간장류 및 어간장 제품의 표시 기준

종류	저염간장 (국내)	저염간장 (국외)	양조간장	전통간장	전통간장 (청장)
형상					
제품명	저염 미네랄 플러스	Kenyo soy sauce 1.8% Sodium content	우리콩 양조간장	기순도 전통간장	기순도 전통 청장
중량/유형	930ml/양조간장	5g×50 pouches/12 months after production	480ml/양조간장	300ml/재래한식간장	300ml/재래한식간장
원재료/함량	탈지대두 21.3% (인도산), 소맥 (밀, 미국산), 정제수, 전일염, 액상과당, 주정, 신안바다 구연산나트륨, 효모추출물, 계발, 영양강화제	Soy sauce malt (Non-fat soy bean, (Non-genetic recombination), including wheat, Soy sauce), Sweetened glucose, Wheat fermented flavor, Rice fermented flavor, Processed soy sauce, Yeast extract	콩30%(국산), 밀10%(국산), 전일염, 중국, 정제수	대두(국산), 죽염 (국산), 정제수	죽염 (전일염, 국산), 대두 (국산), 정제수
제조사	샘표 주식회사	Naris Wings B&H Co., Ltd.	맛가마 식품	농(주)고려 전통식품	농(주)고려 전통식품
종류	어간장 (고등어, 전갱이)	어간장 (멸치)	액젓 (멸치)	액젓 (까나리)	육젓(새우)
형상					
제품명	제주 맛있는 어간장	장녕 멸치 어간장	하선정 멸치액젓	하선정 서해안 까나리액젓	새우젓
중량/유형	1.5 L/효소분해간장	4.5 L/액젓	658 mL/액젓	2,057 mL/액젓	2 kg/새우젓(염장)
원재료 함량	국내산 (고등어, 전갱이, 다시마, 무우, 말랭이, 밀감, 식염)	생멸치(남해안)75%, 전일염 25%	멸치액젓100% [멸치77% (생물기준·국산), 전일염 (수입산)]	까나리액젓 (100% [까나리50% (생물기준·국산), 전일염 (중국산), 끈쟁이 등 기타어류])	새우75%, 정제염25%
제조사	해머핀 산지가공	대영 수산식품(주)	씨제이 제일제당(주)	씨제이 제일제당(주)	두리루드

(2) 시판 전통식품의 짠맛 증진 효과

- 시판 간장(5 종) 및 어간장류(5 종)에서 짠맛 증진효과가 있는 공정을 선택하기 위하여 일반 성분, 이화학적 특성 및 짠맛 증진 효과를 분석하였다.

(가) 시판 전통식품의 성분 분석

- 시판 전통식품의 일반성분으로 수분, 조지방, 조단백, 회분이 분석되었다. 본 실험에서 분석된 조단백의 함량은 이 후 총질소 함량으로서 가수분해도와 질소의 분포도 산출에 사용되었다.
- 수분함량은 105℃ 건조법으로 24시간 건조 후 칭량하여 분석하였다.
- 조지방은 soxhlet(Raypa, SX-6MP)법을 이용하여 측정하였다. 원통형 여과지에 동결건조한 시료를 적정량 넣고 탈지면으로 원통형 여과지 입구를 막는다. 플라스크의 무게를 측정 후 Diethyl Ether를 적정량 첨가하고 85℃ 이상으로 가열하여 Ether와 지방을 연소시키고 칭량한다.
- 조단백 함량은 micro-Kjeldahl 법을 이용하여 분석하였다. 어간장 등 시료 약 0.5~1.0 mL을 취하여 Kjeldahl flask 에 넣고, 분해 촉진제(Kjeltabs tablets containing Potassium Sulphate and a catalyst, Foss. Denmark) 3.5g을 첨가한 후, 농황산(96%, Kanto, 0172-00438, Japan) 5 mL을 가한 후 플라스크를 흔들어 주면서 잘 혼합한다. 단백질 분해장치(Raypa-R. Espinar, S.L, Spain)에 시료와 시약을 넣은 Kjeldahl flask를 넣은 후 최종 시료가 투명하게 분해 될 때까지 약 1~2시간 동안 420℃ 에서 분해한다. 분해가 완료된 후 플라스크를 실온으로 꺼내 15분 동안 방냉시킨다. 증류장치 (Raypa-R. Espinar, S.L, Spain)에서 20 mL 4% boric acid에 5분간 증류하여 포집한다. 증류액 포집이 완료되면 자동적정기(Crison Instruments, S.A., Titromatic, Spain)에 의해 0.1N 염산용액 (Samchun, H0241, Korea)으로 적정하였다.

$$\text{조단백질(\%)} = 0.0014 \times (T-B) \times F \times 6.25 \times 100 / W$$

T는 시험용액의 0.1N-염산용액 적정치(mL), B는 공시험용액의 0.1N-염산용액 적정치(mL), F는 0.1N-염산용액 Factor, W는 시료무게(g)이다.

- 회분은 시료와 용기를 칭량 후 회화로(LAB House, DMF-3T, Korea)에 넣고 550℃에서 3시간 회화시킨다. 회화를 마친 시료는 Desiccator에서 상온으로 냉각한 후 칭량하여 남아 있는 회분의 양을 측정한다.
- 측정된 결과를 Table 3-1-3에 나타내었다. 짠맛 증진 효과를 나타낼 수 있는 성분은 조단백질에 속하며 전통청장, 새우 육젓, 창녕 어간장, 전통 간장 등의 순서로 나왔다. 일본 저염 간장의 경우에 약 0.4%로 매우 적게 나타나 국내의 저염 간장 제조법과는 매우 다

른 공정으로 제조된 것으로 판단하였다. 나머지 성분은 문헌상의 자료와 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Table 3-1-3. 시판 간장 및 어간장의 일반 성분 비교

(%)	국내 저염간장	일본저염간장	양조간장	전통간장	전통청장
수분	73.42	80.99	58.57	60.66	67.26
조지방	0.05±0.00		0.13±0.02	0.03±0.00	0.04±0.01
조단백	9.98±1.16	0.40±0.00	7.70±0.00	11.45±0.00	13.10±0.00
조회분	10.38±0.83		19.30±0.09	19.09±0.77	17.53±0.21
(%)	제주어간장	창녕 어간장	멸치 액젓	까나리 액젓	새우 육젓
수분	68.61	73.46	69.72	72.09	59.85
조지방	0.05±0.01	0.12±0.01	0.02±0.00	0.05±0.01	0.20±0.00
조단백	7.66±3.45	11.35±0.35	7.52±0.15	7.68±0.32	13.00±0.00
조회분	20.15±1.29	23.80±0.65	28.82±1.15	29.55±1.94	20.12±0.39

○ 이화학적 특성으로 pH(pH meter, Orion 4-star Plus, Thermo Sci., USA), 염도(Salt meter, Master-S28M, Atago, Japan), 및 당도(Master Refractometer, Master-M, 2M and 3M, Atago, Japan)를 이용한 수용성 고형분의 함량(Brix, %) 등을 측정하여 Table 3-1-4에 나타내었다.

Table 3-1-4. 시판 간장 및 어간장의 이화학적 특성 비교

	국내저염간장	일본저염간장	양조간장	전통간장	전통청장
pH	4.81±0.01	5.15±0.01	4.46±0.02	6.30±0.01	5.57±0.01
Salt (%)	9.66±0.36	1.86±0.01	20.55±1.47	20.33±1.10	18.84±1.45
Brix (%)	30.93±0.09	27.00±0.00	31.47±0.09	31.87±0.19	28.93±0.09
	제주어간장	창녕어간장	멸치액젓	까나리액젓	새우젓
pH	6.01	5.83	5.83	5.86	6.89
Salt (%)	23.04±1.51	22.37±1.53	23.74±2.02	25.98±1.91	19.28±0.82
Brix (%)	35.33±0.19	33.93±0.25	33.13±0.19	33.13±0.19	29.80±1.13

○ pH는 4.46에서 6.89 범위로 문헌 자료와 유사하였으며, 염도계로 측정한 염도 역시 유사한 결과를 나타내었다. 특이한 점은 일본 저염간장의 경우에 염도가 1.86±0.01로 매우 낮게 나타나 국내의 저염간장과는 다른 품질 특성을 지니고 있음을 확인할 수 있었다. 염도계로 측정한 염도와 sodium(Na)함량을 비교하기 위하여 제 1협동에 의뢰하여 ICP로 sodium(Na)함량을 정량 분석한 결과(data는 제1협동 보고서에 있음)는 까나리액젓 > 멸치액젓 > 제주어간장 > 전통간장 > 양조간장 > 전통청장 > 새우젓 > 국내저염간장 > 일본 저염간장의 순서로 함량이 높게 나타났다. 전통 청장과 전통 간장의 경우에 염도 순서와 sodium 함량 순서가 다른 이유는 두 가지로 해석하였다. 하나는 소금에서 기인하지 않는 sodium(Na)이 존재하는 경우이고 또 다른 하나는 불순물이 존재가 염도계 측정의 정확성을 방해하는 것으로 판단된다. 짠맛 증진 물질이 존재할 가능성이 있는 수용성 고

형분 함량은 제주어간장 > 창녕어간장 > 멸치액젓=까나리액젓 > 전통간장 > 양조간장 > 국내저염간장 > 새우젓 > 전통 청장 > 일본저염간장의 순으로 나타나 어간장 제조 공정의 선정 가능성을 예측할 수 있었다.

- 시판 시료의 가수분해도와 질소 분포(nitrogen distribution)를 분석하기 위하여 아미노태 질소는 Formol 적정법과 TNBS법을 사용하여 정량하였다.
- TNBS(2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid)법에서는 표준물질을 L-Leucine(JUNSEI, Japan)으로 하였고, 시료 0.25 mL에 0.2 mol의 phosphate buffer(pH 8.2) 2 mL, 0.05% TNBS(Sigma, USA) 2 mL을 넣고 50°C 압소에서 60분간 반응시킨다. 반응을 중지시키기 위해 0.1N HCl 4 mL을 넣고 30분간 반응한 후 UV/Vis spectrophotometer(Beckmen, DU530, USA)로 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. Formol 적정법에서는 시료를 증류수로 40배 희석하고 pH를 7.0으로 조절한다. 이 후 시료에 formalin 10 mL 을 넣고 NaOH를 이용하여 pH 8.5로 적정하여 첨가된 NaOH 양으로부터 아래 식을 사용하여 formol nitrogen의 함량을 산출하였다.

$$\text{mg Formol nitrogen} = \text{mL NaOH} \times \text{normality of NaOH} \times 14$$

- 수용성 단백질은 Lowry법으로 정량하였다. 표준시료는 BSA(Bovine Serum Albumin, Sigma, USA)를 사용하였고, 시료 1 mL에 Lowry reagent(Sigma, TP0300-1KT Kit, USA) 1 mL을 넣고 20분 동안 반응시킨다. 이 후 Folin & Ciocalteu's Phenol reagent(Sigma, TP0300-1KT Kit, USA)를 0.5 mL 넣고 30분 간 반응시킨 후, UV/Vis Spectrophotometer(Beckmen, DU530, USA)으로 570 nm에서의 흡광도를 측정하였다.
- 가수분해도(degree of hydrolysis, DH %)는 $\frac{AN(\text{아미노태 질소})}{TN(\text{총 질소})} \times 100$ 으로 계산하였으며, Nitrogen 분포도는 총 질소의 함량, 수용성 단백질에 함유되어 있는 질소의 함량, 유리 아미노산의 형태로 존재하는 질소의 함량으로부터 계산되었다. 수용성 단백질에서의 질소함량은 $\frac{\text{수용성 단백질 함량}}{6.25}$ 으로 계산하고 총 질소 함량에 대한 백분율로 산출하였다. 측정되지 않은 nitrogen의 함량은 unknown으로 나타내었다. 이 때 unknown 성분에는 휘발성 비단백태 질소와 침전된 질소가 포함된다. 결과를 Table 3-1-5와 Fig. 3-1-5에 나타내었다.
- 총 질소는 간장류 > 어간장 및 액젓류 > 일본저염간장의 순이었고, 아미노태 질소는 전체적으로 Formol 법이 TNBS 법에 조금 많게 측정되었으나 이는 전처리 상의 문제로 전체 경향은 일치하였다. 즉, 아미노태 질소는 어간장 및 액젓류 > 국내저염간장 > 일본저염간장 > 간장류로 나타났다.
- Lowry 법으로 측정한 수용성 단백질의 질소 함량은 일본저염간장, 국내저염간장, 전통간

장에서 너무 높게 나타나 여러 가능성을 분석해 보았지만 정확한 과학적 근거를 제시할 수 없었다. 다만 일본저염간장은 제조방법 자체가 비교 시료와 다르다는 판단을 하였고, 국내저염간장의 경우에는 제품에 드러난 성분을 보아 첨가된 수용성 단백질(효모추출 분말과 영영강화제)이 존재를 의심하였고 전통간장은 제품의 특성상(점도가 높음) Lowry 법으로 분석이 어렵다는 결론을 내렸다. 나머지 시료에 대한 수용성 단백질의 질소 함량은 양조간장 > 전통청장 > 제주어간장 > 창녕 어간장 > 까나리액젓 > 새우육젓 > 멸치액젓의 순이었다. 이러한 결과는 수용성 고형분 함량을 가지고 짠맛 증진 효과 가능성을 예측하려는 판단은 옳지 않음이 밝혀졌다.

Table 3-1-5. 시판 간장 및 어간장의 가수분해도, 총질소, 아미노태 질소 및 수용성 단백질 함량

Source	Total N (mg/mL)	Formol N (mg/mL)	TNBS N (mg/mL)	Lowry Protein N (mg/mL)	DH (%)**
국내저염간장	24.61	11.37	9.57	11.47	38.89
일본저염간장*	12.8	9.93	9.20	19.04	71.88
양조간장	24.64	6.58	6.17	7.94	25.04
전통간장	36.64	7.74	5.37	14.88	14.661
전통청장	41.92	7.11	4.79	5.57	11.43
제주어간장*	12.26	6.93	5.81	5.41	47.39
창녕어간장*	18.16	16.84	16.07	5.39	88.49
멸치액젓	16.14	10.36	9.24	3.09	57.25
까나리액젓	18.91	9.42	8.92	4.69	47.17

* 실험 오차가 심함

** DH(%)는 TNBS로 측정된 값을 이용

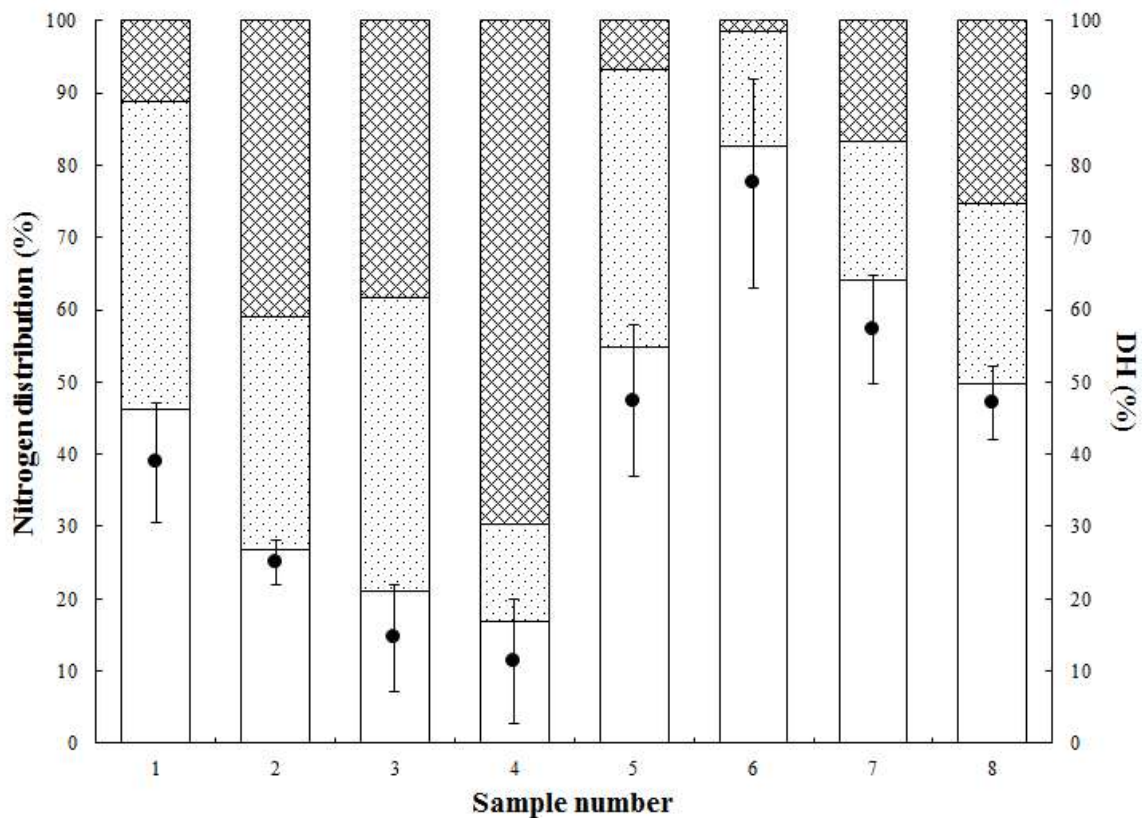


Fig. 3-1-5. Degree of hydrolysis (%) and nitrogen distribution (%) of the commercial fermented fish and soy sauces. ; Amino acid N from formol nitrogen data, ; Lowry N from lowry soluble protein data(Lowry N = Lowry protein/6.25), ; Other N determined by total N - amino acid N - lowry N and could include volatile nitrogen, nucleic acid and breakdown products, ●; degree of hydrolysis determined by $\frac{AN}{TN} \times 100$, AN from TNBS nitrogen data and TN from total nitrogen data by micro-Kjeldahl method

- 일본저염간장과 국내저염간장을 제외하고 가수분해도를 분석한 결과, 창녕어간장 > 멸치액젓 > 제주어간장 > 까나리액젓 > 양조간장 > 전통간장 > 새우액젓 > 전통청장의 순서로 나타났다. 이러한 결과는 숙성 기간과 비례하는 것으로 이론적으로 가능한 결과로 판단되었다. 결과적으로 짠맛 증진 효과를 갖고 있는 공정을 판단하는데 좀 더 다른 시각의 접근이 필요하다는 판단이다.
- 시판 시료의 아미노산 프로파일은 분석 전문기관에 의뢰하여 HPLC를 사용하여 분석한 결과를 Table 3-1-6과 Fig. 3-1-6에 제시하였다.

Table 3-1-6. 유리아미노산(free amino acid) 분석 결과

분류	저염 간장	양조 간장	전통 간장	전통 청장	제주 어간장	창녕 어간장	멸치 액젓	까나리 액젓	새우 육젓
glutamate	1146.66	378.39	123.67	117.34	339.64	1150.79	533.12	126.60	392.39
asparagine	4.82	18.08	42.49	41.72	3.47	0.00	0.00	45.95	236.13
serine	469.68	288.89	2.27	0.00	0.00	0.00	118.97	0.00	201.41
glutamine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	385.54
histidine	116.30	101.82	0.00	0.00	41.89	213.67	144.59	0.00	65.90
glycin	258.80	138.69	238.85	111.87	150.55	670.26	272.25	118.69	286.13
threonine	347.51	225.63	0.00	0.00	14.19	0.00	203.93	0.00	190.74
arginine	197.64	397.93	0.00	0.00	3.61	0.00	92.85	0.00	572.01
alanine	418.55	260.77	701.21	425.88	470.79	1845.05	642.91	449.87	337.71
GABA	13.42	37.32	730.13	18.27	0.00	0.00	0.00	19.70	0.00
tyrosine	64.83	91.92	0.00	0.00	22.84	0.00	54.39	0.00	53.90
valine	415.37	270.04	289.82	149.19	245.67	687.55	405.18	158.76	218.16
methionine	111.87	71.67	70.65	30.89	99.73	269.22	208.04	34.58	140.10
tryptophan	0.00	118.13	0.00	145.88	0.00	0.00	314.76	151.99	315.82
phenylalanine	418.96	269.77	309.35	154.94	182.64	0.00	301.89	175.79	164.89
isoleucine	434.42	271.47	314.38	150.81	207.22	462.53	380.37	160.36	186.03
leucine	664.34	416.32	456.34	221.17	290.98	622.59	571.09	235.40	394.89
lysine	414.10	357.94	478.73	290.34	375.20	1346.00	985.51	345.18	475.37
proline	425.38	252.38	33.55	105.64	118.78	393.87	113.27	103.96	273.13
Total	5922.66	3967.14	3791.45	1963.94	2567.19	7661.53	5343.11	2126.83	4890.25

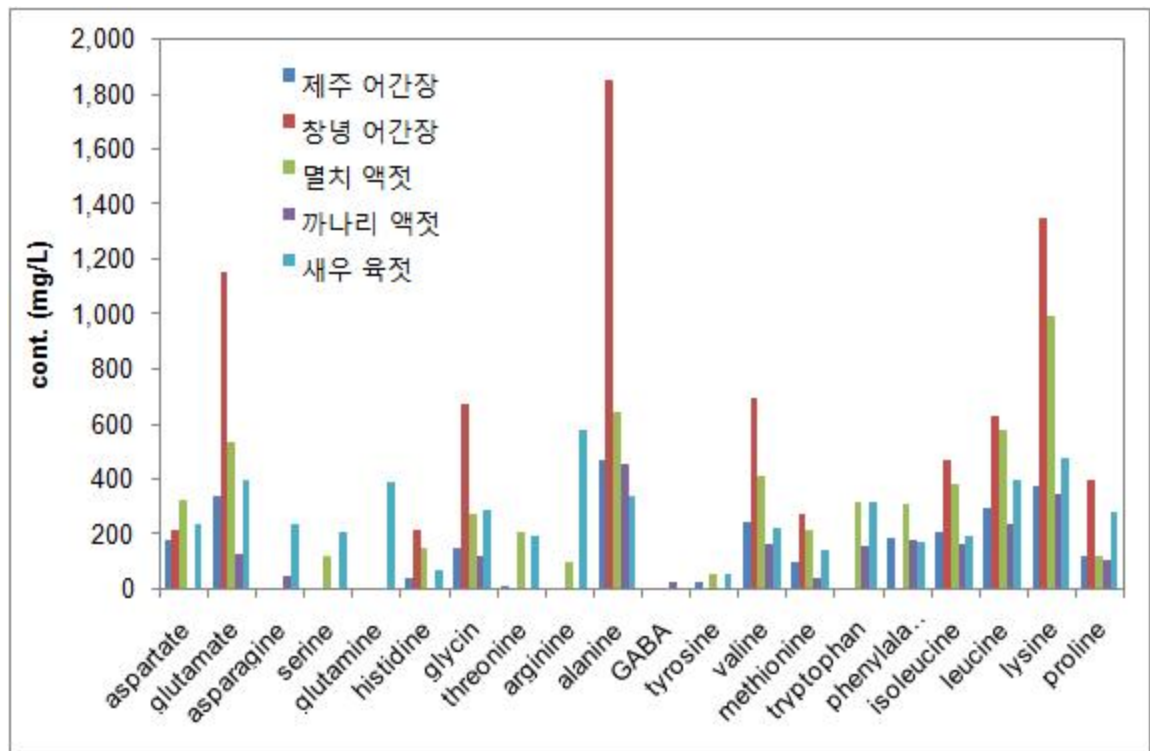
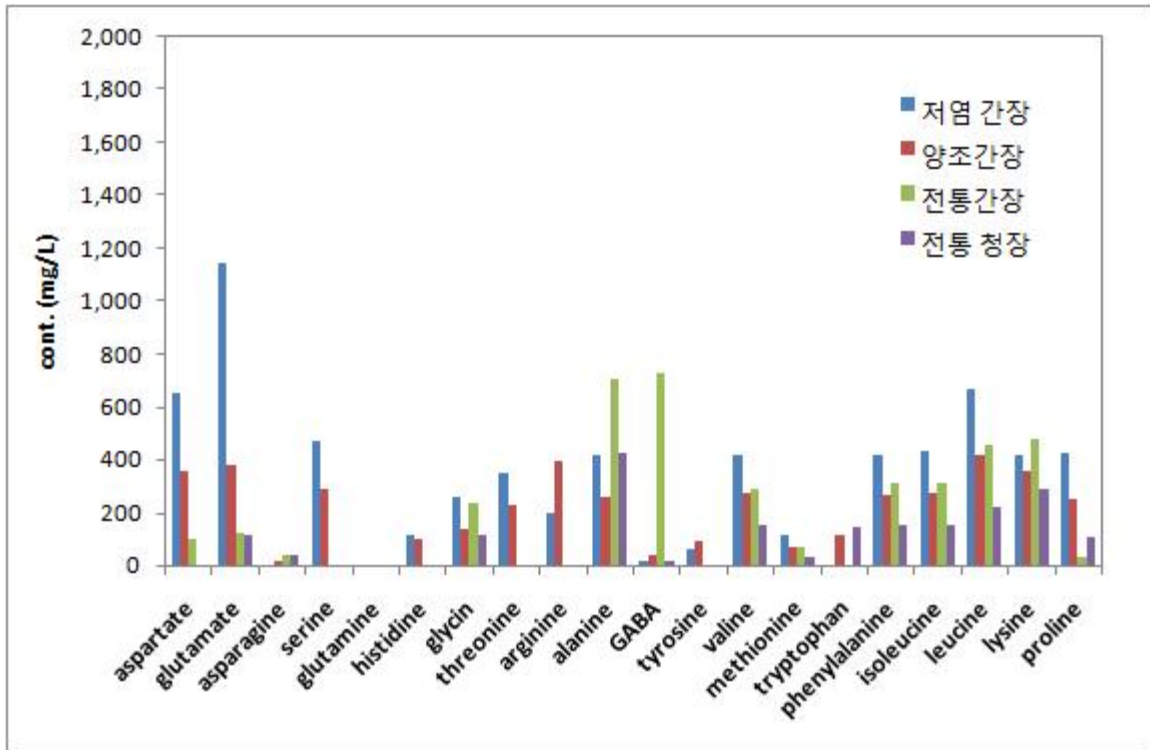


Fig. 3-1-6. 시판 간장과 어간장의 유리아미노산(free amino acid) 함량 비교.

○ 유리 아미노산은 수집된 문헌들의 결과와 유사하였다. 특히 창녕어간장의 유리아미노산 함량이 가장 높게 나타났다.

(나) 짠맛 증진 효과

- 시판 간장 및 어간장 시료의 짠맛 증진 효과 여부를 확인하기 위하여 제1협동에게 의뢰하여 관능적으로 짠맛 강도를 분석한 결과, 첫 번째 차이 관능검사에서는 전통 간장이 가장 짠맛이 강하게 느껴지고 새우젓, 멸치액젓, 창녕어간장, 전통청장, 까나리액젓, 양조간장 순으로 짠맛이 강한 것으로 결과가 나타났다. 관능검사 시 색에 의한 오차가 발생하기도 하는데 간장 및 어간장의 경우 시료의 색이 매우 진하여 시료의 색이 관능검사 결과에 영향을 미쳤을 것으로 생각하여 시료들을 탈색 하였고, 관능평가 결과 어간장의 비린내와 전통 간장 특유의 냄새로 인하여 관능평가를 하는 것이 매우 힘들었다는 관능평가 요원들의 의견을 수렴하여 시료들의 탈취와 탈염을 실시하였으나 이 역시 부정확하였다.

(다) 짠맛 증진 효과 비교 분석

- 짠맛 증진 효과를 좀 더 확실하게 비교 분석하기 위하여 최근에 발표된 어류 단백질의 효소 분해물이 짠맛을 증진시킨다고 한 자료(Shimono and Sugiyama, 2009)와 Schindler 등(2011)이 sensomics approach를 통하여 단백질 분해물과 발효 fish sauces로부터 arginyl dipeptides가 짠맛을 증진시킨다고 보고한 실험과 비교 분석을 실시하였다. 이들이 보고한 분획 실험인 Gel permeation chromatography(GE healthcare, AKTAP prime plus)를 실시하였다. Glass Column(GE healthcare, XK16/70)에 stationary phase로써 Sephadex G-10(Sigma, G10120)을 충전하여 분자량별로 분리하였다. Mobile phase는 1% Formic acid를 0.5 mL/min의 flow rate로 사용하였고, 214 nm에서 검출하였다.
- 창녕어간장의 GPC 크로마토그램(오른쪽)과 Schindler 등(2011)이 발표한 GPC 크로마토그램(왼쪽)을 비교하여 Fig. 3-1-7에 나타내었다. 매우 유사한 결과로서 III, IV 분획에 짠맛 증진 물질이 있다는 보고 결과를 보면 분명 창녕어간장에도 짠맛 증진 물질이 있음을 확신할 수 있었다. 다만 창녕어간장에서는 분획 VIII의 unknown peak가 발견 되었다.

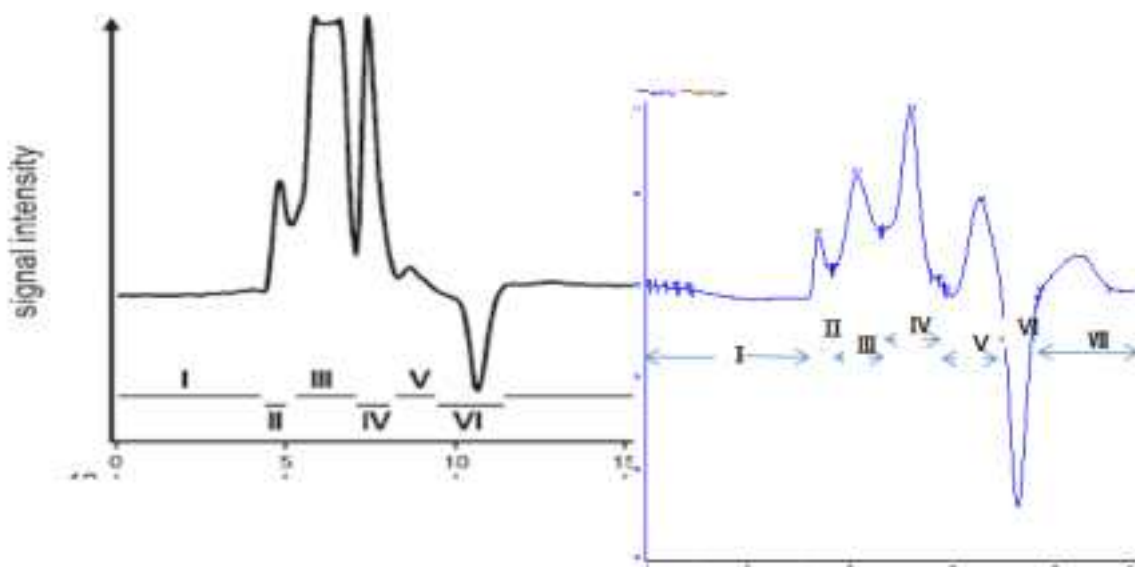


Fig. 3-1-7. GPC chromatogram 비교.

○ 시판 시료에 대한 GPC chromatogram을 비교하기 쉽게 하나로 묶어 Fig. 3-1-8에 나타내었으며 분자량 크기별로 3개 구간으로 나누어 분자량 분포를 Table 3-1-7에 나타내었다. peak II는 Schindler 등(2011)이 짠맛 증진 물질이 존재한다고 보고한 III, IV 분획 (Fig. 3- 1-7)과 일치한다.

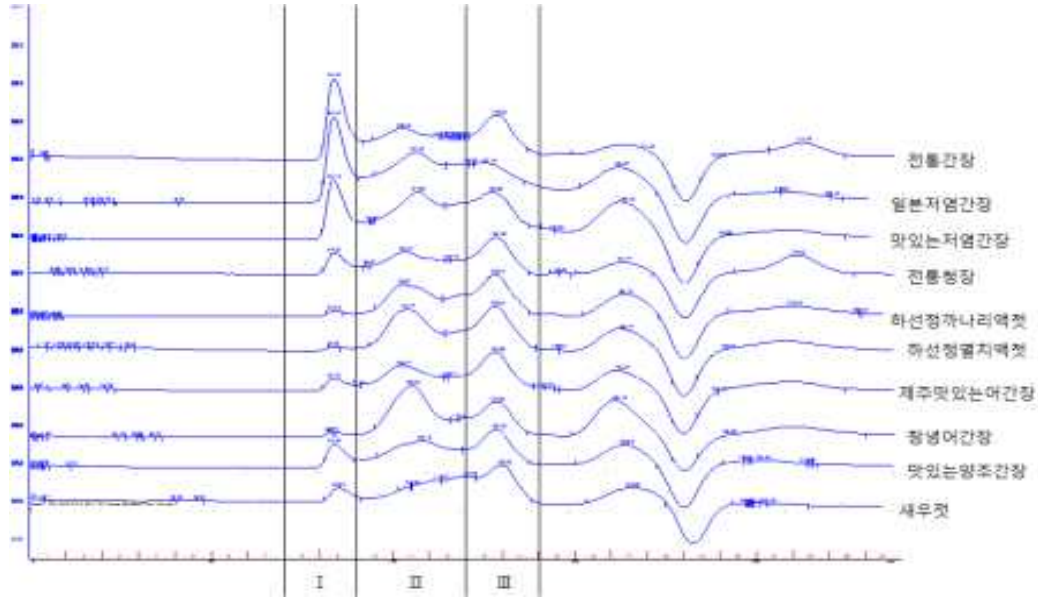


Fig. 3-1-8. 시판 시료에 대한 GPC chromatogram 비교

Table 3-1-7. 시판 제품들의 단백질 분자량 분포 비교 분석

	Molecular weight (%)		
	Peak I	Peak II	Peak III
국내 저염간장	34.246	27.548	38.207
일본 저염간장	45.204	28.737	26.059
양조간장	14.281	35.53	50.189
전통간장	51.768	13.501	34.73
전통청장	16.454	25.447	58.099
제주어간장	8.07	36.184	55.746
멸치어간장	0.074	63.192	36.734
멸치액젓	0.172	46.575	53.253
까나리액젓	1.201	40.114	58.684
새우젓	12.729	31.179	56.091

*Peak I: 1300 Da 이상, peak II: 500 Da, peak III: 150 Da 이하

○ 짠맛증진물질의 존재 가능성이 높은 분획 II는 멸치어간장 > 멸치액젓 > 까나리 액젓 > 제주어간장 > 양조간장 > 새우육젓 > 일본저염간장 > 국내저염간장 > 전통청장 > 전통

간장의 순서로 나타났다. 이 결과를 바탕으로 짠맛 증진물질을 어류단백질 가수분해를 기본으로 하는 국내의 어간장 제조 방법으로 생산할 수 있다는 판단을 하였다.

- 관능의 어려움을 해소하고자 실시한 탈염 실험에 대한 보고와 개선해야 할 공정으로 선정된 어류 단백질 가수분해 공정에 대하여 조사를 하였다.

(㉔) 탈염 공정에 대한 분석

- 최근 보고된 자료에 의하면 전기투석 또는 Macroporous Adsorption Resin(MAR)을 사용하여 저염 간장을 제조할 수 있다고 하였다. 하지만 관능적 짠맛 증진 효과를 검토하면서 탈염 처리에 대한 분석을 실시한 결과(Table 3-1-8, 9, 10, 11과 Fig. 3-1-9) 짠맛 증진물질이 탈염과정에서 함께 손실되는 결과를 보였다.

Table 3-1-8. 탈염 처리 결과

	투입량 (L)	교반시킨 후의 양(ml)	비고
어간장	1	950	색이 많이 얼어짐. 누렇게 됨.

Table 3-1-9. Desorption 결과

	투입량 (L)	교반시킨 후의 양(ml)	비고
25% ethanol	1	925	원물보다는 얼지만 진한 색이 우러나옴.
50% ethanol	1	970	25% 에탄올보다 훨씬 진한 색이 우러나옴.
95% ethanol	1	970	교반 후의 상층부보다는 진하지만 많이 얼음.

Table 3-1-10. 고형분 측정

	투입량	고형분 함량 (%)	비고	
창녕 멸치 어간장	3.000	31.48	130℃, 50분	
24hour 교반 후 상층부	3.065	23.03	130℃, 40분	고형분에서 고소한 냄새가 나고 짠맛이 남.
25% ethanol	3.091	0.74	105℃, 30분	짜고 비린 냄새가 나고 짠맛이 남.
50% ethanol	3.030	0.23		짠 냄새가 조금 남.
95% ethanol	3.095	0.17		짠 냄새가 조금 남.
95% ethanol 보관액	3.022	0.03		짠 냄새가 조금 남.

- 탈염은 1L 어간장에 500 ml MAR을 넣고 24시간 동안 교반시킨 후 MAR을 침전시켜 상층부 액을 제거해 보관한다. resin을 5배의 증류수에 10분 동안 교반시켜 washing을 한다. washing한 증류수는 버린다. desorption은 25% ethanol 1 L를 넣고 20분씩 교반시킨 후 상층부 액을 취하고 50% ethanol, 95% ethanol 순으로 25% ethanol과 같은 방법으로 교반시킨 후 상층부 액을 채취한다. 채취한 액들을 수분함량측정기(Sartorius, MA30)로 고

형분을 측정하고 염도계(ATAGO, MASTER-S28a)로 염분을 측정한다. Gel permeation chromatography(GE healthcare, AKTAPprime plus)를 이용하여 GPC 크로마토그램을 구했다.

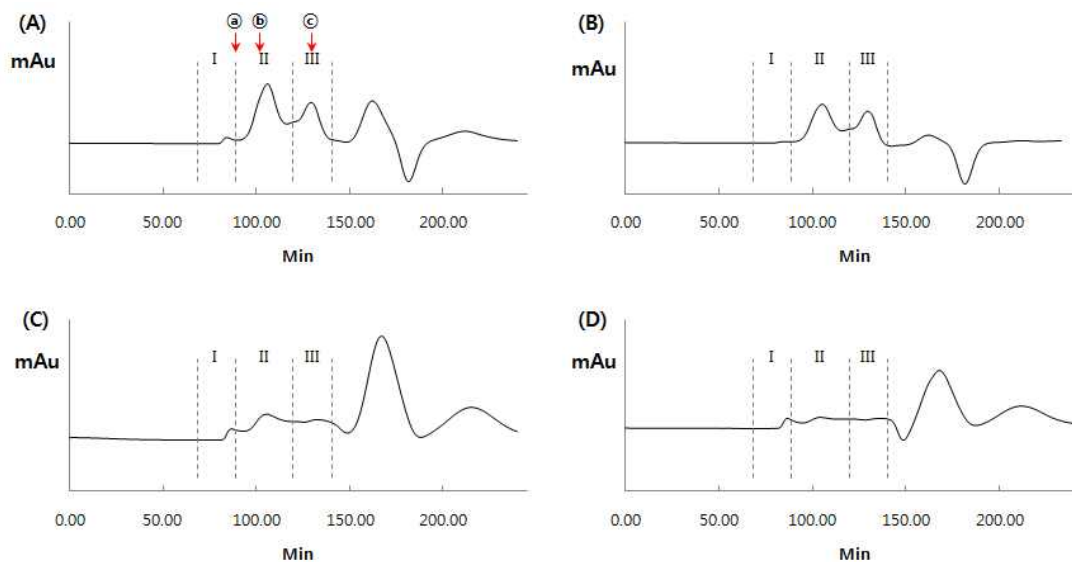


Fig. 3-1-9. GPC chromatogram ($\lambda = 214 \text{ nm}$) of (A) 1/10 dilution of anchovy sauce, (B) supernatant after absorption by MAR, (C) supernatant after desorption with 25% ethanol, (D) supernatant after desorption with 50% ethanol. Marker materials: ① Vitamin B₁₂ (1355.37 Da), ② Vitamin B₁ (337.27 Da), ③ L-Glutamic acid (147.13 Da). GPC fractions: I (> 1100 Da), II (220 Da ~ 1100 Da), III (< 220 Da)

○ resin을 제거하고 남은 여액을 건조하였을 경우, 비린내가 거의 없는 건조물이 만들어져 추후 비린내 제거용으로 사용 가능성이 있다는 판단을 하였다. 고형분 함량의 수치(balance)가 맞지 않는 것은 흡착된 레진을 증류수로 washing하는 과정에서 표면 등에 묻어 있는 부분의 제거 등에서 오는 것으로 판단하였다.

Table 3-1-11. 염분 측정

	어간장	24hour 교반 후 상층부	25%	50%	95%	95% 보관
염분%(w/w)	36	24	0	0	0	0

○ 실험에 사용한 MAR에 의한 탈염은 가능하나 desorption 부분에서 염분이 검출되지 않았으며, resin을 제거한 후의 염도는 24%로 측정되어 원물의 36%보다 낮아진 것은, resin을 사용할 때 증류수로 세척하여 사용하였는데 이때 resin과 함께 증류수가 첨가되어 염도가 낮아진 것으로 사료된다.

(마) 결 론

- 짠맛 증진 물질이 존재할 가능성이 있는 수용성 단백질 함량과 GPC 크로마토를 분석하여 어간장 제조 공정이 짠맛 증진 물질을 생산할 가능성이 가장 큰 공정으로 판단되어 개선시켜야 할 공정으로 선정하였으며, 현존하는 탈염공정은 유효 물질의 손실을 피할 수 없음을 확인하였다.

(3) 어류 단백질 가수분해물 제조 공정

- 전통 어간장의 제조 공정의 개선 방향을 도출하기 위하여 전통 어간장 제조 공정을 분석하였다.

(가) 전통 어간장(액젓) 제조 공정

- 젓갈류(또는 액젓)는 우리나라의 전통수산물발효식품 중 가장 대표적인 제품이다. 젓갈류는 어패류의 육, 내장, 생식소 등에 식염을 첨가하여 부패를 억제하면서 자가소화 및 미생물의 작용에 의하여 적당히 분해시킨 제품이다. 이러한 젓갈을 유형별로 살펴보면, 단백질 급원 60% 이상을 사용하여 식염을 가해 발효 숙성한 것을 젓갈, 젓갈에 고춧가루, 조미료 등 양념을 첨가한 것을 양념젓갈, 젓갈을 여과 분리한 액을 액젓, 액젓을 회석하여 염수나 조미료를 첨가한 것을 조미액젓으로 분류한다. 또한 젓갈에 곡류를 가해 숙성시킨 것을 식해라 부르고 있다. 특히 액젓은 어류, 패류, 어류의 내장 등에 소금을 가하여 부패균의 번식을 억제하고 어패류 자체의 효소와 외부 미생물의 효소작용으로 육질을 분해시킨 후 걸러서 만든 독특한 맛과 풍미를 가진 발효식품이다.
- 젓갈 및 액젓의 제조 공정을 일반화하여 도식화한 것을 Fig. 3-1-10에 나타내었다. 멸치 액젓의 제조 방법은 물론 제조시기와 지역, 제품의 용도에 따라 다소 차이가 나지만 신선한 원료와 식염을 사용하여야 한다. 일반적으로는 원료 멸치 선별에 있어서 선도가 양호할수록 최종 제품의 향미 및 색택이 양호하므로 내장이 터지지 않은 신선한 멸치가 좋다. 변질품, 헝잡물, 각종 오물을 제거하며 3% 정도의 소금물(10℃ 이하)로 조심스럽게 씻어 혈액, 내장, 해양에서 유래한 진흙 등 수용성 오염물을 제거하여 플라스틱 용기, 또는 대바구니 등에 담아 물기를 뺀다. 식염을 가하는 염지 방법은 지역이나 제품의 용도에 따라 다소 차이가 있으나 넓은 용기에서 멸치와 정제염을 일정 비율로 혼합하는 살염법이나 가염지에 멸치를 첨가하는 개량 물간법을 이용한다. 이때 가염량은 상온 발효 시 원료 중량 기준 20내지 30%, 저온 발효시 15내지 20%가 일반적인 방법이다. 원료의 지방 함량이 많을수록, 숙성 발효 온도가 높을수록, 원료의 선도가 나쁠수록 가염량을 높여야 제품의 품질을 유지할 수 있다. 소금과 골고루 혼합하여 염지한 멸치는 반지하식 콘크리트 발효조나 PE대를 넣은 숙성용 용기에 차곡차곡 넣고, 맨 위에 2~3 cm 두께의 소금을 추가로 가한 후에 공기가 들어가지 않도록 하여 지하 저장고, 자온숙성실, 토굴 등의 저장겸용의 숙성실에 옮겨 2~5개월 동안 발효 숙성시킨다. 액젓의 경우에는 12개월 이상 소요 된다.

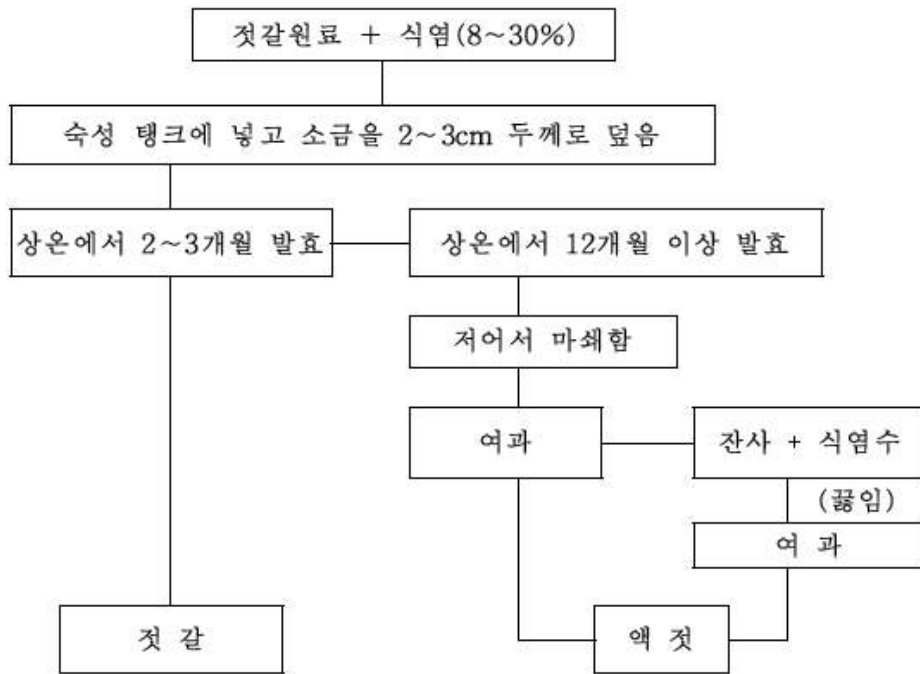


Fig. 3-1-10. 일반적인 재래식 젓갈 및 액젓의 제조 공정도
(출처: 수산물가공기술편람, 2005).

- 우리나라 액젓 품질에 관한 규격은 식품공전에는 성상(고유의 색택과 향미를 가지고 이미·이취가 없어야 한다), 총질소(액젓 1.0% 이상, 조미액젓 0.5% 이상), 아미노산질소(액젓 600.0 mg% 이상, 조미액젓 300.0 mg% 이상), 대장균군, 타르색소(검출되어서는 아니 된다.)로 규정되어 있고, 한국산업규격에는 멸치액젓에 국한하여 성상(고유의 색택과 풍미를 가지고 청징하며 이미·이취가 없어야 한다), 수분(멸치액젓 68%이하, 멸치조미액젓 70% 이하), 총질소(멸치액젓 1.2% 이상, 멸치조미액젓 0.5% 이상), 아미노산성질소(멸치액젓 600.0 mg% 이상, 멸치조미액젓 300.0 mg% 이상), 염도(25% 이하)로 규정되어 있다. 또한 수산전통식품 품목별 품질기준에는 액젓의 품질기준으로 색택(고유의 색깔을 띠고 변색이 없어야 한다), 향미(고유의 향미를 가지고 이취가 없어야 한다), 협잡물(토사 및 기타 협잡물이 없어야 한다), 수분(70% 이하), 염분(23% 이하), 전질소(1.0% 이상) 등에 관한 규정만 설정되어 있을 뿐 조미액젓과 액젓의 규격이 구분되어 있지 않다(장미라 등 2004; KFDA, 2002; KSA, 2002; MMAF, 2002).

(나) 전통 어간장(액젓)의 속성화 기술

① 전통적인 제조방법의 문제

- 젓갈류는 밥을 주식으로 하는 우리의 식생활과 잘 어울려 식용의 역사가 긴 주요 수산발효식품으로서 그 제조원리 및 품질 특성에 관한 과학적인 연구가 본격적으로 이루어지기 시작한 것은 1950년대 후반부터라고 할 수 있다. 젓갈의 숙성 발효과정 중 미생물 분포의 변화와 단백질 가수분해에 관여하는 효소 작용에 관하여 연구되어 있으며, 젓갈의 영양

성분 함량과 정미 관련 성분들이 속속 밝혀졌다. 그러나 대부분의 연구는 전통적 제조 방법에 따라 만들어진 젓갈을 대상으로 연구된 것으로서 젓갈의 숙성 발효 및 품질 특성 규명에 치우쳐 있다. 전통적인 방법으로 제조된 젓갈은 대부분 식염만을 첨가 혼합하여 발효·숙성시키는데 약 20% 이상의 고농도 염을 사용하여 수개월간 숙성 발효시키는 것이 일반적이다. 이와 같이 고염의 어류 발효제품은 염농도가 높아 숙성 중 부패 변질의 염려가 적으나 식미를 저하시키고 개인당 소비량을 증가시킬 수 없는 요인으로 작용하고 있으며, 다량 섭취 시에는 나트륨의 과다 섭취에 따른 건강상 문제 요인을 내포하고 있다. 또한 제조 기간이 길어 상품으로서 경제성 추구 및 위생적 품질 상태의 유지관리도 쉽지 않은 실정이다. 이와 같은 제반 문제점을 해결하기 위한 노력의 일환으로 숙성화 및 저염화를 위한 신기술 개발 연구가 다각적으로 이루어지고 있다.

② 숙성화 기술

- 액젓 발효 시 장기간의 발효시간이 요구되는 점을 개선하기 위하여 starter를 첨가하는 방법이 시도되었다. 이러한 목적을 위하여 재래식으로 숙성된 멸치젓으로부터 호염성이면서 protease를 생산하는 미생물을 분리하여 멸치 어간장 제조에 starter로 사용하였다. 재래식 방법에 비하여 1/3으로 기간을 단축할 수 있었으며 염농도가 15%인 경우에 가장 품질이 우수하다고 하였다(Cho, 1985).
- 김 등(1980)은 중성 protease인 papain을 원료 멸치에 0.05~0.2% 수준으로 첨가하고 25%의 가염 및 상온 조건에서 숙성 발효시킨 결과를 보고하였다. 원료 중량에 대하여 0.15% 상당의 papain을 첨가하여 상온에서 숙성시킬 경우 원료육의 마쇄처리 여부에 관계없이 약 45일이 소요되어 효소를 사용하지 않은 것에 비하여 숙성기간을 1/2로 단축 가능하다고 보고 하였다. 또한 김 등(1986a, 1986b)은 정어리 마쇄육에 어간장의 풍미 개선을 위해 gluten을 첨가하여 효소가수분해 시켜 여과해서 일정량의 식염과 보존료를 첨가한 숙성어간장 제조를 시도하였다.
- 단백질분해효소를 사용하는 방법 이외에도 강력한 protease 활성을 갖는 *Aspergillus oryzae* 또는 *Aspergillus sojae*의 koji를 활용한 실험 결과들이 보고 되었다(김 등, 1988; 김 등, 1990). 이들은 2주일 이내로 제조 기간을 단축시킬 수 있다고 보고하였다. 이와 유사한 연구로서 이 등(1984)은 정어리 잔사를 이용하여 효소가수분해 및 koji 첨가에 의한 어간장 제조를 시도하였고, 마쇄한 가다랑이 잔사에 koji와 glucose를 첨가하여 90일간 숙성하면서 어간장을 제조하였다(이 등, 1989). 신 등(2002)은 효소 처리만으로 단시간 내에 제조하는 것은 본연의 맛·향·색도에 다소 미흡할 소지가 있고 koji 처리시에 있어서도 제조에 장시간이 소요됨으로 이를 보완할 목적으로 파쇄육즙을 가열 여과한 다음 효소가수분해시켜 대두와 소맥으로 제조된 koji를 가해 28일만에 색·맛·향에 있어 전통간장보다 우수한 숙성 어간장을 제조하였다고 보고 하였다.
- 어간장 제조의 숙성화 기술에 대한 보고는 국내 뿐만 아니라 어간장을 전통식품으로 여기고 있는 동남아시아의 여러 나라 즉, 일본, 중국, 베트남, 태국 등에서 다양한 보고가 있

지만 국내 기술보다 현저하게 우수한 기술은 찾기 어려웠으나 세 가지 보고는 매우 흥미로웠다. Lopetcharat and Park(2002)은 Pacific whiting 어간장을 제조하는데 발효온도를 50℃까지 높혀서 15일 만에 제조하였다고 보고하였다. 이러한 결과는 사용 효소의 최적온도가 55℃이기 때문인 것으로 판단하였다. Yongsawatdigul 등(2007)은 상업적 효소와 새롭게 분리한 bacteria starter cultures를 단계별로 조합 처리하여 35℃에서 4개월 만에 기존의 어간장에 품질이 전혀 뒤지지 않는 멸치 어간장을 제조하였다고 보고 하였다. 2011년과 2012년에 중국의 JIMEI 대학에서에서는 저온발효를 통하여 제조 기간을 단축할 수 있다고 보고하였다.

- 하지만 이러한 전통 어간장 제조에 대한 속성화 기술은 현재 국내에서는 상업적으로 활용되지 못하고 있다. 특히 식물 및 미생물 기원의 단백질 분해효소를 첨가 할 경우 어류의 근육단백질 분해속도는 빨라지지만 장기간 숙성시켰을 경우에 비하여 쓴맛 펩타이드에 기인한 풍미의 저하와 유산균 등에 기인하는 풍미가 없으므로 제품의 질이 저하하는 단점이 있고 쓴맛을 제거하기 위하여 현재의 고염을 사용하는 액젓의 제조공정에서 기존의 단백질분해효소나 쓴맛 펩타이드 제거용 효소를 사용할 경우 고염에 기인한 활성의 유지가 어려워 첨가하는 효소량을 많이 첨가하여야 되지만 효소의 가격이 고가이므로 경제성에 문제가 있다고 강 등(1999)은 보고 하였다.

(㉔) 전통 어간장(액젓)의 저염화 기술

- 국내에서 액젓(어간장)의 저염화 기술에 대해서는 연구된 적이 거의 없으며 다만 속성화 기술을 개발하는 단계에서 starter나 효소를 사용하는 경우에 부수적으로 염함량이 15% 정도가 되었다는 보고가 있을 뿐이다. 이와 유사한 경우로 Gildberg 등(1984)은 acetic acid와 염산을 사용하여 pH를 4로 조절하여 발효함으로서 멸치로부터 5%에서 15% 정도의 저염 어간장을 2개월 만에 제조 할 수 있다고 보고하였다.
- 하지만 나트륨의 과다 섭취가 건강에 유해하다는 보고에 따라 최근에는 저염 어간장 개발 및 고염 제품에서의 desalting 방법 등이 보고되고 있다. 이 중에서 desalting 방법에 대한 것은 본 과제에서 실험적으로 유효하지 못함을 제시하였다.
- 저염 어간장 제조에 관한 보고로 중국의 JIMEI 대학에서 자국내 특허로 출원한 Method for producing low-salt fish sauce(CN 101933602 A)와 Low salt fish sauce production method of Method for producing low-salt fish sauce(CN 101933602 B)에서 자체 개발한 효소와 저온 발효를 단계적으로 적용하여 속성화와 저염화(1/2)를 동시에 달성할 수 있다고 하였다. Xu 등(2008)은 오징어 가공 부산물에 상업적 효소와 soybean koji를 이용하여 30일 내에 9% 정도의 저염 어간장을 제조할 수 있다고 보고하였다. 특히 풍미 부분에서 매우 품질이 우수함을 관능검사로서 검증하였다. 또한 2007년 일본에서는 soy sauce yeast를 이용(알콜 발효를 위한 탄소원으로 10% glucose 또는 22% wheat koji 첨가)하여 10%대의 저염 어간장을 60일 만에 제조하였다고 보고하였다.

- 가장 획기적인 속성화 및 저염화 기술은 2003년 Okazaki 등이 보고한 “Autolysis of unsalted fish protein under pressurization” 이다. 이들은 단백질 급원으로 멸치를 사용하였고 멸치 내의 자가효소와 압력과 온도 조절을 이용하여(60 MPa, 50℃) 염을 첨가하지 않고서 48시간 만에 총질소 2.6%, formol nitrogen 1.4%, 그리고 11.6%의 자유 아미노산 함량(by weight)의 가수분해물을 제조하였다고 보고 하였다. 이들 함량은 상업적으로 생산·유통되고 있는 어간장이나 간장보다 더 높다.

(㉔) 결론(제조 공정 개선 방향)

- 전통 어간장 제조 공정의 핵심 요소는 쓴맛 제거(debittering), 속성화 및 저염화 그리고 경제성에 있음을 조사 결과 확인할 수 있었다. 따라서 속성화 및 저염화 기술로서 세계 최고로 판단되는 고압이용 기술에 쓴맛 제거를 위해서는 비교적 값이 저렴하면서 쓴맛 제거 기능을 갖고 있는 적절한 효소를 선정·첨가하는 방향으로 공정을 개선하고자 한다. 자가 효소에 상업적 효소를 더하므로 속성화는 더욱 개선되어 경제성 부분도 획기적으로 보완되리라 사료된다.
- 우선 어류 단백질 가수분해를 고압과 상업적 효소의 병행 처리하여 액화 수율(yield, %) 향상을 목표로 설정하였고 도출된 공정 조절 핵심인자는 압력, 온도, pH, 가수분해시간 및 효소와 기질의 비율로서 효소 첨가량이다.

(4) 단백질원의 선정

(㉕) 우리나라 수산물 생산현황

- 우리나라의 수산물의 총생산량은 2008년도에 약 336만 1천톤이었다가 2010년도에는 311만톤으로 약간 감소하는 경향을 보이며, 최근 2012년은 318만 3천톤으로 생산량이 다소 회복하는 경향을 보이고 있다. 생산금액 역시 2008년도에 6조 3천억원, 2010년도에 7조 4천억원 그리고 2012년도에 약 7조 7천억으로 조금씩 증가하는 추세이다. Table 3-1-11에 연도별 수산물 어업 생산현황(생산량 및 생산금액)에 대한 자료를 정리하였다.

Table 3-1-11. 연도별 수산물 어업 생산현황

연도	2008년		2009년		2010년		2011년		2012년		
	생산량 (톤)	금액 (백만원)	생산량 (톤)	금액 (백만원)	생산량 (톤)	금액 (백만원)	생산량 (톤)	금액 (백만원)	생산량 (톤)	금액 (백만원)	
일반 해면	어류	877,976	1,973,902	795,502	2,092,676	736,198	2,169,604	842,603	2,553,857	704,387	2,231,433
	갑각류	87,631	418,401	100,126	508,751	108,199	529,316	101,723	546,458	105,234	530,238
	패류	81,308	175,978	90,192	232,758	80,380	223,832	72,230	213,430	58,056	191,223
	연체류	216,273	597,500	223,212	747,879	187,777	919,205	197,415	1,056,615	207,409	940,658
	기타	7,836	42,827	7,091	44,015	6,939	50,505	6,731	53,783	5,825	42,869
	해조류	13,866	13,644	10,843	14,354	13,043	19,217	14,787	19,959	10,148	14,732

	소계	1,284,890	3,222,252	1,226,966	3,640,433	1,132,536	3,911,679	1,235,489	4,444,102	1,091,059	3,951,153
천해양식	어류	99,006	764,565	109,516	981,609	80,110	867,695	72,449	771,232	76,281	733,803
	갑각류	1,924	27,718	1,893	28,518	2,731	36,387	2,860	42,606	2,819	46,297
	패류	343,704	368,784	326,544	494,013	355,699	509,405	389,159	556,545	370,112	513,399
	기타	15,345	22,433	16,743	22,981	14,788	23,156	20,795	32,710	17,423	26,534
	해조류	921,024	336,619	858,659	319,188	901,672	379,000	992,283	381,150	1,022,330	440,882
	소계	1,381,003	1,520,119	1,313,355	1,846,309	1,355,000	1,815,643	1,477,546	1,784,243	1,488,965	1,760,915
내수면	어류	25,343	249,325	25,718	246,751	26,326	304,018	26,521	343,638	22,872	288,872
	갑각류	726	7,086	511	5,419	345	4,571	262	3,735	321	5,089
	패류	2,993	14,141	3,742	17,043	4,085	15,441	5,297	20,131	4,688	16,858
	기타	118	4,732	100	4,536	226	9,803	190	9,960	249	12,489
	소계	29,180	275,284	30,071	273,749	30,982	333,833	32,270	377,464	28,130	323,308
원양어업	어류	445,367	1,104,194	493,857	1,027,686	488,155	1,166,876	413,985	1,187,211	463,970	1,411,747
	갑각류	35,522	36,183	29,588	36,575	36,057	46,219	24,705	35,358	26,205	39,105
	연체류	185,293	187,016	88,505	99,487	67,904	151,428	71,934	244,473	85,133	204,553
	소계	666,182	1,327,393	611,950	1,163,748	592,116	1,364,523	510,624	1,467,042	575,308	1,655,405
합계	3,361,255	6,345,058	3,182,342	6,924,248	3,110,634	7,425,685	3,255,929	8,072,860	3,183,463	7,690,789	

*출처 : 수산정보포털(www.fips.go.kr) 어업생산통계자료

○ 통계청의 보고에 의하면 우리나라 1980년에 어업생산량이 가장 많은 어종은 쥐치, 멸치, 갈치, 명태 순이었으나, 해수온도의 상승으로 인하여 점차 쥐취, 명태, 정어리 등의 생산량은 현저하게 줄어들었고, 2005년도 이후부터는 온수성 어종인 멸치, 오징어, 고등어 등의 생산량이 증가하였다.(Fig. 3-1-11)

(단위 : 톤)

1980년		2010년	
어종	생산량	어종	생산량
계	1,372,347	계	1,133,721
쥐치	229,230	멸치	249,636
멸치	169,657	오징어	159,130
갈치	119,980	고등어	94,331
명태+노가리*	96,384	갈치	59,242
고등어	62,690	삼치	35,778
참조기	48,843	꽃게	33,193
오징어	48,490	참조기	31,931
기타	597,073	기타	470,480

(노가리는 명태 새끼로 명태 생산량에 합산)

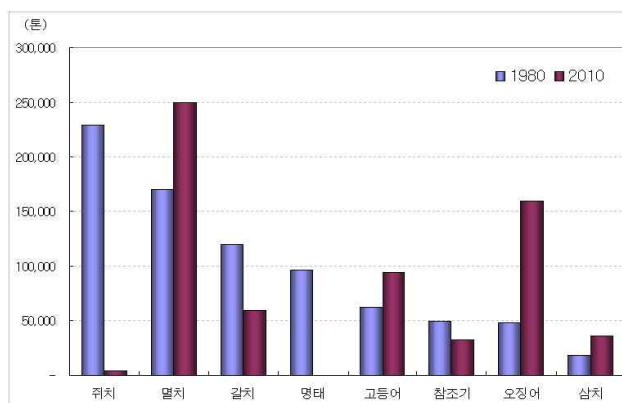


Fig. 3-1-11. 우리나라 수산물 생산량 상위어종 현황.

○ 우리나라 국민선호 어종 중 명태(-100.0%), 갈치(-50.6%) 등은 1980년에 비해 생산량이 급격하게 감소한 반면, 김(316.8%), 오징어(228.2%), 미역(93.0%), 굴(55.3%), 고등어(50.9%) 등은 1980년에 비해 2010년도 생산량이 증가하였으며, 특히 명태의 생산량이 2000년 이후 대폭 감소함에 따라 1980년 대비 kg당 평균가격 상승률이 3,840.2%로 가장 높았으며, 갈치(1,477.3%), 멸치(617.4%), 굴(616.1%), 고등어(557.5%), 오징어(264.8%) 등의 순으로 보고되었다.(Table 3-1-12)

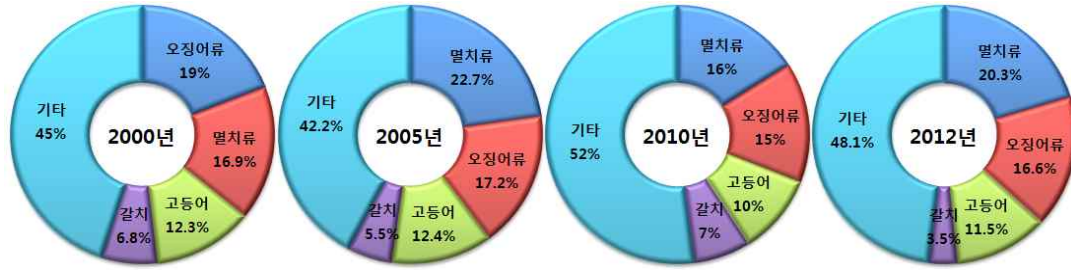
Table 3-1-12. 국민 선호 어종 생산량

(단위:천톤, 백만원, kg/원,%)

		갈치	고등어	멸치	명태 노가리	오징어	김	미역	굴
1980년	생 산 량	120	63	170	96	48	57	206	187
	생산금액	38,634	17,240	36,985	15,779	47,423	60,354	15,067	17,394
	평균단가	322	275	218	164	978	1,068	73	93
1990년	생 산 량	104	96	130	26	74	101	274	235
	생산금액	123,689	54,715	86,777	11,794	146,372	125,759	32,661	66,985
	평균단가	1,192	568	667	448	1,973	1,243	119	285
2000년	생 산 량	81	146	201	1	226	130	214	193
	생산금액	203,707	148,771	203,278	3,585	279,595	100,281	26,479	96,169
	평균단가	2,513	1,020	1,010	4,680	1,235	769	124	498
2010년	생 산 량	59	95	250	0	159	236	398	290
	생산금액	300,903	171,108	390,405	19	567,828	230,604	71,297	193,307
	평균단가	5,079	1,808	1,564	6,462	3,568	979	179	666
증감률 (‘10/’80)	생 산 량	△50.6	50.9	47.1	△100	228.2	316.8	93.0	55.3
	생산금액	678.9	892.5	955.6	△99.9	1,097.4	282.1	373.2	1,011.3
	평균단가	1,477.3	557.5	617.4	3,840.2	264.8	△8.3	145.2	616.1

(평균단가는 연근해 및 천해양식으로 생산한 물량(톤)을 생산금액(천원)으로 나눈 kg당 단
순평균 가격임.) *출처 : 통계청 보도자료(2011년 5월)

○ 또한 국립수산과학원의 보고에 의하면 우리나라 연근해어업의 경우, 2000년에는 단일어종으로 오징어류(19.0%)가 가장 많은 생산량을 나타내었고 다음으로 멸치류(16.9%), 고등어(12.3%), 갈치(6.8%)순이었다. 그런데 2005년부터는 멸치가 22.7%로 가장 많은 생산량을 나타내었으며, 오징어(17.2%), 고등어(12.4%), 갈치(5.5%)순이었으며, 2010년은 물론 최근 2012년도 역시 2005년도와 동일한 어종의 순으로 생산량을 나타냈는데 2012년도의 경우 멸치가 20.3%로 가장 많은 생산량을 나타내었으며, 오징어(16.6%), 고등어(11.5%), 갈치(3.5%)순이었다.(Fig. 3-1-12)



*출처1 : 연근해어업총조사, 국립수산물과학원(2010년)

*출처2 : 수산정보포털(www.fips.go.kr) 어업생산통계자료

Fig. 3-1-12. 우리나라 연근해 어종별 생산순위의 변화.

- 2008년부터 2012년까지 최근 5년간 우리나라 주요 품종별 생산량 통계자료를 정리한 결과 역시 일반해면(연근해업)의 경우 멸치의 생산량이 가장 많으며 그 다음은 오징어, 고등어 순으로 나타났다.(Table 3-1-13)

Table 3-1-13. 연도별 주요수산물 어업 생산현황

연도	품종	2008년		2009년		2010년		2011년		2012년	
		생산량 (톤)	금액 (백만원)	생산량 (톤)	금액 (백만원)	생산량 (톤)	금액 (백만원)	생산량 (톤)	금액 (백만원)	생산량 (톤)	금액 (백만원)
일반 해면	고등어	187,240	205,838	117,960	190,236	94,331	167,876	138,729	287,794	125,143	257,462
	멸치	261,532	286,631	203,728	286,418	249,636	390,404	292,730	429,826	221,980	286,224
	까나리	6,702	3,160	2,380	1,162	13,557	9,838	7,439	5,569	4,261	4,697
	전갱이	22,752	23,689	22,087	16,654	19,305	25,053	42,853	36,549	31,908	31,808
	젓새우	14,934	41,912	13,722	39,194	18,861	49,802	20,728	92,322	20,221	74,085
	오징어	186,160	282,700	189,160	390,506	159,130	567,828	171,643	693,642	181,408	548,876

*출처 : 수산정보포털(www.fips.go.kr), 어업생산통계자료

(나) 우리나라 수산물 가공품 생산현황

- 우리나라 수산물 가공품은 전체 수산물 생산량 중에서 약 55~59%를 차지하고 있으며 Table 3-1-14에 연도별 수산물 가공품의 생산현황을 나타내었다.

Table 3-1-14. 연도별 수산물 가공품 생산현황

(단위 : 톤)

가공품	2007년	2008년	2009년	2010년	2011년	2012년
냉동품	1,140,665	1,134,882	1,259,438	1,289,583	1,249,510	1,215,935
통조림품	130,030	73,579	61,287	54,168	82,452	84,793
연제품	76,203	107,437	142,591	114,823	121,018	129,188
소건품	22,590	15,812	6,146	3,622	3,906	12,036
염건품	2,593	19,444	20,192	12,565	34,700	33,966
자건품	37,231	32,792	54,218	44,974	33,651	29,859
해조제품	112,249	157,285	156,803	164,104	205,810	189,753

한천	229	206	334	206	450	409
조미가공품	17,220	96,701	33,714	34,654	44,271	43,790
어유분	5,736	8,984	10,037	13,287	3,128	15,766
염장품	3,344	4,102	12,948	9,933	23,468	24,258
염신품	35,831	48,811	41,134	35,315	27,228	35,193
수산피혁품	723	513	1,736	743	794	824
기타	28,412	65,980	97,557	37,309	35,160	69,667
합계	1,613,056	1,766,528	1,898,135	1,815,286	1,865,546	1,885,437

*수산정보포털(www.fips.go.kr), 어업생산통계자료

- Table 3-1-14에서 수산물 가공품의 생산량은 냉동품이 약 65% 이상으로 가장 많으며, 해조제품(약 7~10%) 그리고 연제품(약 6% 정도) 등의 순으로 나타났는데, 가공품 중에 소금 및 어유와 관련된 가공품을 원물과 연관한 가공실적을 Table 3-1-15에 나타내었다.

Table 3-1-15 연도별 가공품 품목별 가공실적

(단위 : 톤)

품목		2007년	2008년	2009년	2010년	2011년	2012년
염건품	조기류	2,480	19,145	19,897	12,189	34,357	33,508
	기타	113	299	295	376	325	458
	소계	2,593	19,444	20,192	12,565	34,682	33,966
자건품	굴	194	450	164	450	153	0
	멸치	36,719	31,990	53,451	44,035	33,041	29,511
	새우	97	95	163	165	197	125
	홍합	58	18	132	80	33	53
	기타	163	239	308	244	227	170
	소계	37,231	32,792	54,218	44,974	33,651	29,859
어유분	오징어유	280	991	1,471	948	473	355
	기타어간유	1,596	853	679	5,536	391	4,161
	어분, 어비	3,860	7,140	7,887	6,803	2,264	11,250
	계	5,736	8,984	10,037	13,287	3,128	15,766
염장품	고등어	2,197	2,327	9,210	5,963	7,631	7,429
	청어알	0	56	0	0	0	0
	기타	1,147	1,719	3,738	3,970	15,837	16,829
	소계	3,344	4,102	12,948	9,933	23,468	24,258
염신품	멸치젓	10,900	14,109	10,701	14,951	10,999	11,664
	새우젓	5,228	17,792	19,753	6,910	4,864	7,358
	오징어젓	1,258	1,605	2,792	2,245	1,945	3,438
	조개젓	275	370	472	395	896	867
	굴(어리굴젓)	276	399	657	516	623	581
	성게젓	1	3	4	2	4	40
	명란젓	2,670	3,833	2,167	5,003	4,643	4,977
	창란젓	651	558	631	553	522	499
	황석어젓	4,229	492	783	424	385	419
	기타	10,343	9,650	3,174	4,316	2,347	5,350
소계	35,831	48,811	41,134	35,315	27,228	35,193	

*수산정보포털(www.fips.go.kr), 어업생산통계자료

- Table 3-1-15를 살펴보면 가공실적이 많은 자건품과 염신품 중에서 우리나라 수산물 생산량이 가장 많은 멸치가 가장 많이 사용되고 있음을 확인할 수 있었으며, 특히 젓갈류인 염신품에서 다른 원물에 비하여 가장 많이 사용되고 있었다.
- 그러므로 본 과제진행을 위한 동물성 단백질 급원으로는 국내에서 가장 많이 생산되는 것은 물론 가공품 중 염신품에서도 가장 많이 사용되고 있는 우리나라의 대표적인 수산물인 멸치를 선정하였다.

(㉔) 멸치 현황

- 멸치(*Engraulis Japonica*)는 우리나라 사람들이 예로부터 자건품, 액젓, 젓갈, 조미료의 분말 등으로 많이 사용하는 우리나라의 대표적인 수산물 중 하나이며, 1990년 이후부터 생산량이 꾸준히 증가하여 2000년대 이후 연간 약 25만톤 정도로 증가 추세이다.(멸치자원조사, 국립수산물과학원, 2010년)
- 멸치는 밴댕이와 함께 청어목(*Clupeiforms*), 멸치과(*Engraulidae*)에 속하면서 연안성, 표층 회유성, 난류성 어족으로서 남해안을 중심으로 우리나라 전 연안에 분포하는데 연안 수온이 13~15℃로 상승하는 3월 하순경에 남해도와 대마도를 연결하는 해역에 어군이 밀집되며, 4월에 남해안 일대와 부산-기장간의 연안측에 분포하게 되며 대략 4월부터 산란을 시작하는 것으로 알려져 있다.(연근해어업총조사, 국립수산물과학원, 2010년 / 이규형, 한국어업기술학회지, 48, 1, 59-71, 2012)
- 멸치의 활동수온과 회유도 및 공개된 멸치에 대한 일반적인 내용을 Fig. 3-1-13과 3-1-14에 제시함

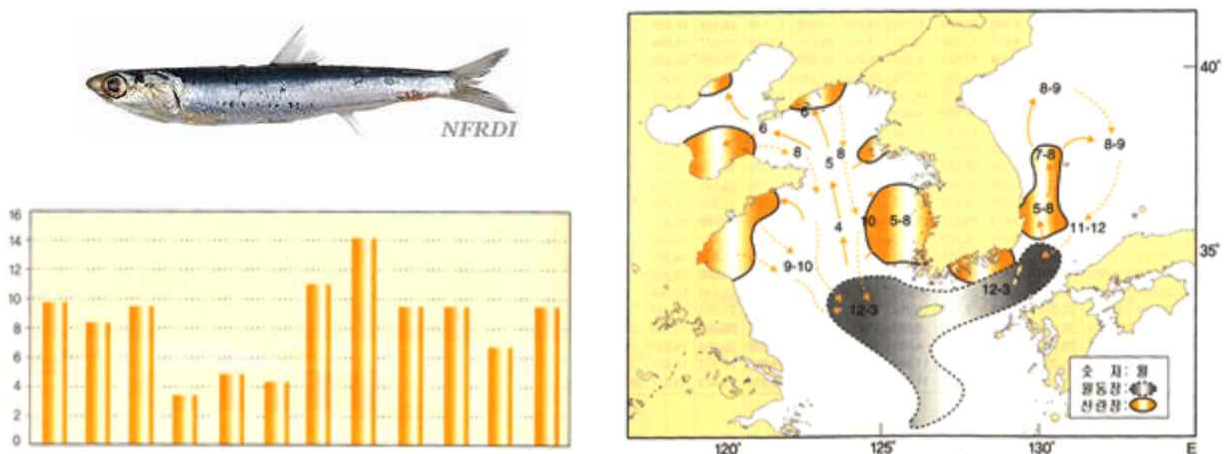


Fig. 3-1-13. 멸치의 활동수온 및 회유도.

구분	내용		
국명	멸치	학명	<i>Engraulis japonicus</i>
영명	Japanese anchovy	일명	カタクチイワシ
분류	청어목멸치과목		
분포	우리나라 전 연안, 일본 전 연안, 중국 연안		
산란	연중 성숙된 알을 가지나 산란기는 봄·가을 2차례이며, 산란장은 수심 200m 이내인 대륙붕의 수심 20~30m 층에서 한밤중에 산란한다.		
습성	수심 20m 이내의 대륙붕 해역으로 아침에는 5m층 내외, 낮에는 10m층 내외, 저녁에는 거의 표층에서 생활한다.		
생활사	몸은 다소 긴 원통형이며, 주둥이는 돌출되어 있다. 입은 약간 아래쪽으로 향하고 위턱이 아래턱보다 길다. 입은 눈보다도 훨씬 뒤쪽까지 위치하며, 눈에는 기름눈꺼풀이 있다. 양 턱에는 1줄의 작은 이빨이 있다. 등지느러미는 몸의 거의 중앙에 위치하고, 가슴지느러미는 배쪽에 가깝게 위치한다. 배지느러미는 등지느러미보다 앞쪽에서 시작하며, 뒷지느러미는 등지느러미보다 뒤쪽에 위치한다. 배쪽 가장자리에는 모비늘이 없다. 몸에는 옆줄이 없다.		



*출처 : 해양수산연구정보포털(<http://portal.nfrdi.re.kr>) 수산자원

Fig. 3-1-14. 멸치의 일반적인 내용.

- 멸치는 다량의 단백질, lysine 및 taurine과 같은 양질의 아미노산, 칼슘 및 인과 같은 유용 무기질, eicosapentaenoic acid(EPA, 20:5n-3) 및 docosapentaenoic acid(DHA, 22:6n-3) 등과 같은 n-3 계열의 고도 불포화지방산, 비타민 E 등과 같은 영양 및 건강 기능성분이 다량 함유되어 있다.(김진수 외, 한국식품영양과학회지, 29, 973-980, 2000) 또한 멸치는 유리아미노산, ATP 관련물질, trimethylamine oxide(TMAO) 등과 같은 맛성분도 다량 함유되어 있어서 영양, 건강 기능성 및 기호성을 특성으로 하는 수산가공품의 원료로서 잠재적 이용가치가 매우 우수한 수산가공 자원이다.(김진수 외, 한국식품영양과학회지, 35, 873-95, 2006)

Table 3-1-16. 멸치의 영양성분

(영양성분 100g 기준)

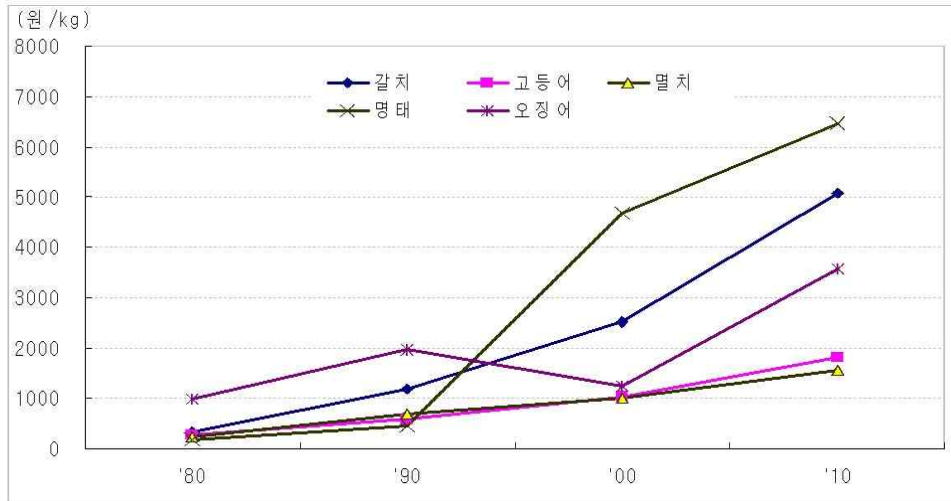
성분	함량	성분	함량	성분	함량
니아신	8.80mg	비타민 A	38.00 μ gRE	아연	1.63mg
나트륨	240.00mg	비타민 B1	0.04mg	엽산	12.30 μ g
단백질	17.70g	비타민 B2	0.26mg	인	421.00mg
당질	0.20g	비타민 B6	0.26mg	지질	4.10g
레티놀	38.00 μ g	비타민 C	1.00mg	철분	2.90mg
베타카로틴	0.00 μ g	비타민 E	2.10mg	콜레스테롤	114.00mg
칼륨	370.00mg	칼슘	509.00mg	회분	3.20g

*출처 : 네이버(이화여자대학교 식품영양학과 제공)

- 우리나라 멸치 생산량(어획량)은 남해안의 어획비율은 타 해역에 비해 50% 이상을 차지하고 있으며 멸치잡이 어선들이 주로 조업하는 어장 또한 전라남도과 경상남도 일대의 남해안에서 주 어장이 형성되고 있고 주생산지로는 남해안의 경우 통영(통영만, 육지만, 사랑도근해), 마산(진해만일대, 거문도근해), 여수(돌산도, 거문도, 청산도근해)와 서해안의 경우 보령, 태안, 부안, 군산 등이며 동해안의 경우 기장, 포항, 울산 등이다.(멸치자원조사, 국립수산물과학원, 2009년)
- 멸치의 어획방법으로는 기선권현망, 유자망, 저인망, 양조망이 있으며 마른멸치는 주로 기선권현망어업에서 어획되며, 젓갈용 멸치는 유자망어업 등에서 어획되는데, 멸치의 선도제한속도는 다른 건조 어종보다 빠르게 진행되므로 외관손상은 물론 상품가치가 저해되는 문제가 발생되기가 쉽기 때문에 어획된 멸치를 조업선에서 어획 직후 자숙선으로 옮겨 신속하게 자숙하고 건조시키는 양이 많으므로 수산물 가공품 중에 멸치 자건품의 양이 많은 것도 이와 같은 이유이다.(표 1-15. 연도별 가공품 품목별 가공실적 참조)
- 기선권현망어업의 어획시기는 매년 7월부터 익년 3월 사이이며 주조업 시기는 매년 7월부터 11월 사이이고, 4월부터 6월 사이에는 멸치의 산란시기로 법정조업 금지시기이다.
- 멸치 원물의 수급은 계절에 따라 약간의 차이가 있는데, 생멸치의 경우에는 주 생산시기인 봄과 가을에만 수급이 가능하고, 멸치의 특성상 어획 후 신속하게 냉동시킨 냉동품의 경우에는 산지에서 생물에 비해 비교적 안정적인 수급이 가능하다. 또한 연중 일정한 수급을 위해서는 생산시기에 생멸치를 충분히 확보한 후 냉동시키는 방안도 가능할 것으로 사료된다.
- 멸치 원물의 가격은 해마다 생산량에 따라 차이가 나지만 우리나라의 대표적인 어종으로서 통계청의 자료를 확인해 본 결과 타어종에 비해 비교적 가격이 저렴하고 지난 약 30년 동안의 가격 상승폭도 타어종에 비해 가장 낮은 경향을 나타내고 있다.(Fig.3-1-15) 총생산량을 생산금액으로 나누어 kg 당 단순 평균 가격을 확인해 본 결과 2010년도에 평균단가가 약 1,564원/kg, 2011년도에 1,470원/kg 이었고 2012년도에는 1,290원/kg으로 조사되었고, 우리나라 국민 선호어종 중 하나인 고등어보다도 kg 당 평균단가가 약 500원~800원 정도 저렴한 것으로 조사되었다.

(라) 결 론

- 본 과제진행을 위한 동물성 단백질 급원으로는 국내에서 가장 많이 생산되고 가공품 중 소금과 관련된 제품인 염신품에서도 가장 많이 사용되고 있으며, 우리나라의 대표적인 수산물로써 가격도 타어종에 비하여 저렴한 멸치를 선정하였다.



*출처 : 통계청 보도자료(2011년 5월)

Fig. 3-1-15. 국민 선호 어종 평균단가 변동추이.

나. 효소제의 선정

- 3가지 상업적 효소(Alcalase, Protamex, Flavourzyme), 혼합(Alcalase : Flavourzyme) 및 멸치 내재 조효소 3가지(whole anchovy, 근육 및 내장)를 비교 분석하여 쓴맛 제거 효과 및 액화 수율의 향상과 가수분해 반응의 가속화를 위한 상업적 효소를 선정하였다.

(1) 서론

- 최근 발효와 효소를 이용하는 단백질가수분해물의 짠맛증진효과에 대한 연구가 매우 활발하게 추진되고 있다. Lioe et al. (2007)은 최초로 콩단백질을 발효하여 제조된 전통 일본식 간장에서 저분자 펩타이드(500 Da 이하)가 짠맛과 우마미를 가지고 있다고 보고하였으며, Kremer et al. (2009)과 Gohet et al. (2011)은 셀러드 드레싱, 수프 및 돈까스를 제조하는데 간장을 적용하여 17~50%의 소금 사용을 줄일 수 있었다고 보고하였다. 또한 어류단백질의 효소가수분해물이 짠맛을 증진한다는 연구결과(Shimono & Sugiyama, 2009) 및 sensomics approach와 HPLC-MS/MS를 통해 시판중인 어간장(fish sauce)에서 짠맛 증진물질을 분리·동정하여 arginyl dipeptides라고 최초로 밝혀 보고 (Schindler et al., 2011) 하였다. Yun et al. (2015)은 이러한 짠맛증진물질을 국내의 전통 멸치 어간장 제조 방법으로도 생산 가능하다고 하였다.

- 어간장을 제조하기 위한 고농도의 식염 처리는 건강에 해를 끼치는 문제뿐만 아니라 어류 내에 존재하는 proteinase와 peptidase의 활성을 저해(Noda et al., 1982; Yoshinaka et al., 1983)하여 자가소화 기간이 길어진다. 결과적으로 어간장의 제조 기간이 6개월에서 2년에 이르게 된다. 따라서 이러한 문제를 해결하기 위하여 저염 및 속성어간장 제조에 관하여 많은 노력을 기울이고 있다(Lopetcharat et al., 2001). 산 처리, 효소 처리, 코지 첨가, 어류의 내장 첨가 등으로 소금의 농도를 20% 이하로 유지하면서 자가소화 기간을 단

측할 수 있었지만 속성 및 저염으로 제조된 가수분해물의 관능검사 결과, 어취가 너무 강하거나(Yoshinaka et al., 1983; Dohmoto et al., 2001), 색이 너무 밝다거나(Nakamura et al., 1979) 단맛과 쓴맛이 있다고(Park et al., 2002; Morioka et al., 1999; Kim et al., 1997; Lee et al., 1982) 보고되었다. 특히, 쓴맛의 경우에 Fujimaki et al. (1973)은 단백질 가수분해 시 같은 기질이라도 사용되는 효소의 종류에 따라 그 쓴맛 정도가 상이하며, 효소의 선택에 따른 쓴맛 정도가 약한 가수분해물의 제조 가능성을 제시하였고 현재는 exo-peptidase 또는 exo-와 endo-peptidase를 혼합하여 활용하는 방안이 제시(Raksakulthai & Haard, 2003; Nilsang et al., 2005; FitzGerald & O'uinn, 2006)되어 쓴맛 제어를 위해 상업적으로 활용되고 있다.

- 식품산업에서 고압처리 기술은 주로 식품 중의 유해 미생물의 살균목적으로 사용되어져 왔다. 그러나 최근 고압 기술은 미생물의 활성을 조절하거나 단백질, 효소 그리고 이외의 식품 성분 중 거대분자를 변화시킬 수 있는 비가열기술로서 활용 범위가 점차적으로 증가하는 추세에 있다. 특히, 50~200 MPa에서의 중고압(medium high pressure)을 이용한 효소반응에 주목하고 있으나 어류 근육 내에서 단백질 가수분해효소 활성에 미치는 압력의 영향에 대한 연구는 어종, 압력의 세기, 반응온도, 시간, 반응 시스템의 pH 및 효소의 종류에 대한 것으로 극히 제한적이다(Ashie & Simpson, 1996; Hurtado et al., 2002; Seyderhelm et al., 1996). 300 MPa 이상의 경우 근육 내에서 추출한 효소는 효소의 구조, 구조 내 형태 변화 등에 의해서 불활성화 되고(Hernández-Andrés et al., 2008), 200 MPa 이하에서는 효소반응의 평형상수와 반응속도상수에 영향을 미쳐 효소활성이 증가한다고 하였다(Ohmae et al., 2007). 또한 Akasaka et al. (2008)은 기질로서 ubiquitin을 효소로서 α -chymotrypsin이 반응하는 효소반응의 경우에 수 kbar 영역에서의 압력은 단백질 가수분해반응을 촉진한다고 하였다. 그 근거로 기질인 ubiquitin이 압력에 의해서 folded conformer에서 unfolded conformer로 변하기 때문이라 하였다. 이와 같은 기술의 활용 예로서 Okazaki et al.(2003)은 식염을 첨가하지 않고 60 MPa의 고압 하에서 50℃, 48 시간 동안 생멸치를 자가 소화시켜 어간장과 매우 유사한 분해물을 얻을 수 있었다고 하였다. 그러나 이러한 기술의 산업적 적용 사례는 미미한 실정이다.

- 여기서는 전통적인 어간장 제조 공정을 짠맛증진물질을 생산하는 산업적 공정으로 개선하기 위한 기초자료를 확보하기 위하여 중고압(100 MPa 이하) 하에서 비교적 효소 활성이 안정하며 쓴맛이 제거된 가수분해물을 생산할 수 있는 상업용 단백질 분해효소를 선별하고자 하였다.

(2) 재료 및 실험 방법

(가) 상업적 효소에 대한 조사

- 문헌 및 제조 회사로부터 자료를 수집하여 정리 하였다.

(나) 재료 및 시약

- 생멸치, *Engralis japonica*(체장 7.2±0.5 cm, 체중 2.7±0.4 g)는 2013년 3월에 제주도 해역에서 어획한 것을 동해수산(기장)에서 구입, 빙냉 운반하여 일정량씩 polyethylene film bag에 넣은 다음 동결고(-20℃)에 저장하여 두고 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 상업용 효소는 Novozymes (Bagsvard, Denmark)의 Alcalase[®] 2.4 L와 Flavourzyme[™] 500MG, Neutrase[®], Protamex[™]로 대명상사(Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 사용된 효소의 특징은 Table 1과 같다. 시약은 모두 분석 시약급을 사용하였다.

(다) 시료의 조제

① 멸치 내재 조효소의 제조

- 해동된 멸치는 내장과 살로 분리하여 Whole 멸치(WA), 내장(VA), 근육(MA)으로 준비하였다. 각각의 시료들은 20 mM의 Phosphate buffer(pH 7.0)에 1:2로 희석하고, homogenizer(IKA, Germany)로 균질(16,000 rpm, 5 min)한다. 균질한 분쇄물은 17,500 g에서 20분간(4℃) 원심분리하여 상등액을 분리하고, 분리된 상등액은 여과지(Whatman paper No. 4)로 다시 한 번 여과하여 조효소액으로 사용한다.

② 효소의 고압 및 상압 처리 시료 제조

- Alcalase[®] 2.4 L, Flavourzyme[™] 500MG, Neutrase[®], Protamex[™] 및 혼합효소(Alcalase[®] : Flavourzyme[™] 500MG = 1 : 5)를 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) 10 ml에 2% (w/v)의 비율로 첨가한 개별 효소용액을 각각 동결보존용 튜브에 넣고 완전 밀봉하였다. 밀봉된 효소용액을 고압액화기(TFS-20, Innoway, Incheon, Korea)에 넣고 50℃, 100 MPa의 조건에서 1, 2, 6, 12 그리고 24시간 처리하였고, 상압(0.1 MPa)에서는 50℃로 온도를 조절된 항온수조(Wisd WB-11, Daihan, Seoul, Korea)에 동결보존용 튜브에 밀봉된 효소용액을 넣고 동일시간 처리하였다. 각 조건으로 처리된 시료는 즉시 단백질 분해 활성을 측정하였다. SDS-PAGE를 실시하기 위하여 각각의 효소를 Tris-HCl buffer (20 mM, pH 7.0)에 1% (w/v)로 제조하여 동일한 방법으로 100 MPa, 50℃에서 24시간 처리한 후 0℃로 조절된 chiller (Micon control system-FC-B53 HMS, LG, Seoul, Korea)에서 냉각하고, 분석 전까지 -20℃에서 냉동보관 하였다.

③ 생멸치 효소가수분해물의 제조

- 멸치 효소가수분해물은 원료 멸치와 물을 1:2 (w/w)의 비율로 혼합하여 믹서기(Hanil, Seoul, Korea)로 2분씩 세 번 분쇄한 후에 homogenizer (IKA, Staufen, Germany)로 16,000 rpm에서 5분씩 3번 균질화하였다. 균질화 된 멸치 분쇄물에 4종의 상업적 효소와 혼합효소를 원료 멸치 대비 2% (w/w) 첨가하고 폴리에틸렌 필름 포장지에 담아 완전밀봉한 후에 고압 및 상압조건에서 일정시간(1, 2, 6, 12 그리고 24시간) 효소와 반응시켰다. 고압에서의 반응은 고압액화기에서 100 MPa, 50℃의 조건으로 상압에서는 항온수조에서 50℃의 조건으로 실시하였다. 일정시간 반응 후, 80℃에서 20분 동안 불활성하고 4℃에서 12시간 이상 숙성하여 지방층을 제거한 후에 4℃에서 30분간 원심분리(17,000 rpm, supra

22k, Hanil, Seoul, Korea)하여 상등액을 -20℃ 냉동고에서 보관하면서 분석용 시료로 사용하였다.

(라) 분석

① 일반성분 및 가수분해도

○ 일반성분은 식품공전에 준하여 이전과 같은 방법으로 분석하였다.

○ 가수분해물의 가수분해도(degree of hydrolysis: DH)는 다음 식에 의해서 산출하였다.

$$DH(\%) = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100$$

여기서 h 는 가수분해물에서의 아미노태 질소 함량이고 h_{tot} 는 가수분해 전 시료에서의 총 단백질 함량이다. 아미노태 질소 함량은 Alder-Nissen (1979)의 방법에 준하여 trinitrobenzensulfonic acid (TNBS-P2297, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 측정하였다. 시료 0.25 ml에 0.2 M phosphate buffer(pH 8.2) 2 ml, 0.05% TNBS 2 ml을 가하고 50℃ 암소에서 60 분간 반응시켰다. 0.1 N HCl 4 ml을 넣고 반응을 정지시켜 30 분간 방치 후 spectrophotometer (DU 530, Beckman, MO, USA)으로 340 nm에서 흡광도를 측정하고 검량선으로부터 함량을 산출하였다. 총 단백질 함량은 auto Kjeldahl system (MBCM-12; DNP-2000MP; Crison, Titromatic, Raypa, Germany)을 사용하여 micro-Kjeldahl법으로 측정하였다(질소계수 6.25).

② 단백질 분해 활성 측정

○ 고압 및 상압 처리 후의 효소활성은 Gupta (2005)의 방법을 수정하여 측정하였다. 기질로 Casein (Sigma C-7078, St. Louis, MO, USA) 분말을 0.03 M phosphate buffer (pH 7.5)에 20 mg/mL의 농도로 제조하여 사용하였다. 기질 5 mL에 효소액을 각각 1 mL 씩 첨가하여 50℃에서 30분간 반응시키고, 0.44 M TCA용액을 5 mL를 첨가 후 실온에 30분간 정지시켜 효소반응을 중단시켰다. 이를 원심분리(17,000 rpm, 10분)하여 상등액을 취하고 0.2 μm Whatman Puradisc syringe filter (Whatman International Ltd., Maidstone, Kent, UK)로 여과하였다. 여과액 1 mL에 0.55 M Na₂CO₃용액 2.5 mL, 1N Folin & Ciocalteu (Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.5 mL을 첨가하고 37℃에서 30분간 발색, 상온에 10분간 정지시킨 후 660nm에서 흡광도를 측정하여 Tyr 생산량을 검량선에서 산출하였다. 이 때 효소액 1 mL가 1분간 1 μg 에 해당하는 tyrosine을 생산하는 것을 1 Unit로 하였다. 표준품으로는 L-tyrosine (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 사용하였다. 상압 및 고압 처리 후의 잔존효소활성은 아래 식에 의하여 산출하였다.

$$\text{잔존효소활성}(\%) = \frac{\text{처리 후 효소활성}}{\text{처리 전 효소활성}} \times 100$$

③ SDS-PAGE

- 고압 처리한 효소의 안정성을 확인하기 위하여 효소의 분자량 분포를 Laemmli (1970)의 방법을 다소 수정하여 확인하였다. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 Ez Way™ PAG 4-15% acrylamide gradient gel (KOMA Biotech Inc., Seoul, Korea)을 사용하였고 냉동 시료를 해동하여 KTG020 버퍼 용액 (10% glycerol, 2% SDS, 0.003% bromophenol blue, 5% β -mercaptoethanol, 63 mM Tris, pH 6.8, KOMA Biotech Inc., Seoul, Korea)과 동량(v/v)으로 혼합하였다. 가수분해된 단백질 20 μ l을 gel에 loading 하여 140 V에서 약 1시간 전기영동한 후 coomassie blue로 염색하여 단백질 밴드를 확인하였다. 각 단백질 분포는 image J (National institutes of health, Bethesda, MD, USA) 소프트웨어를 이용하여 electrophoretic mobility maps (EMMs)로 나타내어 분석하였다. 표준단백질은 Precision plus protein standard (10-250 kDa, Bio-Rad Lab. Inc., Pinole, CA, USA)를 사용하였다.

④ Gel Permeation Chromatography (GPC)

- 이전과 동일한 방법으로 가수분해물의 Gel Permeation Chromatography (GPC)는 ÄKTAprius plus system (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK)을 사용하여 분석하였다. 표준물질로는 Vitamin B₁₂(MW 1355.37 Da, Sigma, St. Louis, MO, USA), Vitamin B₁(MW 337.27 Da, Yakuri Pure Chemicals Co. Ltd., Osaka, Japan), L-Glutamic acid(MW 147.13 Da, Samchun Pure Chemicals Co. Ltd., Pyeongtack, Korea)를 사용하였다.

⑤ 관능평가

- 멸치 가수분해물의 쓴맛 강도 평가를 위하여 본교 생명과학대학 대학원생 7명(남자 3명, 여자 4명)을 선발하였다. Hou et al. (2011)의 방법에 따라 농도를 다르게 한 tea alkaloid 표준용액(0 g/L, 0.1 g/L, 0.2 g/L, 0.4 g/L, 0.8 g/L, 그리고 1.6 g/L)의 농도 순서에 따라 쓴맛강도를 1(no bitterness), 2(weakly bitter), 3(mildly bitter), 4(bitter), 5(strongly bitter) 및 6(extremely bitter)으로 수치화하였다. 제조된 표준용액을 이용하여 쓴맛에 대하여 주 4회에 걸쳐 1개월 훈련시킨 후 가수분해물에 대한 쓴맛 강도 평가를 실시하였다. 이때 관능검사 시료는 냉동 보관하였던 가수분해물을 상온에서 해동한 후에 단백질 함량이 5%가 되도록 조절한 후에 사용하였다. 다만 시료간의 차이를 정확히 구분하게하기 위하여 한 가지의 시료를 맛본 후 입안을 생수로 헹궈내도록 하였다.

⑥ Tryptophan 함량

- Tryptophan의 함량은 high performance liquid chromatography (HPLC 1100-series, Hewlett Agilent, Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. 분석시료는 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 취하여 사용하였다. 상등액 1 mL에 12% HClO₄ 0.5 mL을 넣고 혼합한 후 다시 10,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 0.22 μ m syringe filter에 통과시킨 후 HPLC에 주입하였다. HPLC 분석조건은 column (ZORBAX Eclipse AAA, 5

μm, 4.6 mm×150 mm, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)을 사용하였으며 이동상으로 Buffer A는 40 mM potassium phosphate(pH 7.8), Buffer B는 acetonitrile(HPLC grade) : methanol(HPLC grade) : 3차 D.W.을 각각 45:45:10(v/v/v)의 비율로 혼합하여 사용하였다. 유속은 2 ml/min로 고정하여, 340~450 nm의 Scanning Fluorescence detector(Waters 474, Milford, MA, USA)로 검출하였다.

⑦ 통계처리

- 모든 실험은 3회 이상 반복실험에 대한 평균으로 나타내었다. 실험 결과에 대한 통계 처리는 SPSS software package (Version 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분산분석을 하고, Duncan의 다중범위검정($p < 0.05$) 방법을 실시하였다.

(3) 실험 결과 및 고찰

㉠ 1차 상업적 효소의 선정

- 국내에서 구하기 쉬운 효소에 대한 정보를 Table 3-1-17에 정리하였고 이 중에서 1차 선정된 3가지 효소에 대하여 좀 더 세밀하게 특성을 조사하여 Table 3-1-18에 정리하였다.

Table 3-1-17. 국내에서 구입 가능한 효소의 특성

효소명	상품명	기원	type	작용기전
Protease (Subtilisin)	Alcalase 2.4L	Bacillus licheniformis	endo (serineendoprotease)	serine기에 작용. Gelatin Extraction
Protease (neutral)	Neutrase 0.8L	Bacillus amyloliquefaciens.	endo (metalloendoprotease)	gluten weakening. 반죽의 특성을 우수하게 향상
Trypsin	PTN 6.OS	porcine pancreas		arginine과 lysine 잔사의 carboxyl side에 peptide 결합을 깬다.
Amino-peptidase	Flavourzyme 500MG	Aspergillus oryzae	exo (aminopeptidase), endo	
Amino-peptidase	Flavourzyme1000L	Aspergillus oryzae	exo, endo mix	치즈, 효모, 생선, 고기 등의 펩타이드 제조가 용이. 풍미향상
Protease (Subtilisin)	Protamex	Bacillus	endo (serineendoprotease)	다른 endoprotease와 달리 낮은 가수분해도에서도 쓴맛을 내는 단백질 분해물을 생성하지 않음
protease	Bromeline 1200 GDU	pineapple		
protease	Collupullin MG	carica papaya		
Multi-enzyme complex	Viscozyme L	Aspergillus aculeatus		cell wall 파괴

Table 3-1-18. 1차 선정된 상업적 효소의 특성

Properties	Molar mass (kDa)	pH optimum	Temp. optimum (°C)	Metal ion requirement (s)	Active site amino acid (s)	Major inhibitor(s)
Alcalsae 2.4L	18~35	6.5~8.5	55~70	Ca ²⁺	serin	phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and diisopropylfluorophosphate
Flavourzyme	30~45	5.5~7.5	45~65	—	N-terminal	N-bromophenacyl bromide, Iodine, potassium permanganate
Protamex	18~35	5.5~7.5	35~60	Ca ²⁺	serin	phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), EDTA

(나) 기질(생멸치)의 일반성분 분석 결과

○ 국내산 멸치의 일반성분은 Table 3-1-19 와 같다. 조규옥(2002)이 분석한 생멸치의 일반성분 조성을 보면, 수분 함량의 경우 72.6%, 단백질 함량의 경우 17.4%, 지질 함량의 경우 6.7%, 그리고 회분 함량의 경우 3.2%라고 보고하여 본 실험에서 검토한 생멸치의 일반성분 결과에 비하여 수분함량, 단백질, 그리고 회분 함량이 낮게 나타났다.

Table 3-1-19. 생멸치의 일반성분 분석

(100 g 기준)

성분	함량
수분	75.03 ± 0.12 g
지방	1.85 ± 0.06 g
단백질	17.80 ± 0.04 g
회분	3.99 ± 0.08 g
나트륨(Na)	205.15 ± 12.17 mg

(다) 효소 혼합비율의 선정

○ 쓴맛이 적게 생산되게 할 수 있는 혼합 효소로 제조사에서 Alcalase 2.4L와 Flavourzyme 를 1:5의 비율로 혼합할 것을 제안하여 이를 기준으로 효소 활성을 측정하였다(표 1-20 참고). 온도는 50°C, 기질의 pH는 7.5로 모두 동일하게 유지하였다. 제조사에서 제안한 혼합비율과 문헌 상에서 가장 효율적이라는 Alcalase의 활성이 매우 유사하여 비교 판단에 적합하다 사료되어 혼합비율은 제조사의 제안대로 확정하였다.

Table 3-1-20. 1차 선정된 효소, 내재효소 및 혼합효소의 proteolytic activities

Enzymes		Protease activity* (U/g)
Alcalase		15100.00
Protamax		13402.63
Flavourzyme A		8400.00
Mixed enzyme (Alcalase : Flavourzyme A)	5 : 1	17800.00
	4 : 2	19050.00
	3 : 3	17375.00
	2 : 4	16100.00
	1 : 5	15425.00
내재효소	WA (전체)	44.74
	MA (근육)	34.21
	VA (내장)	163.16

* (1 Unit: 1 μ g Tyr/ml/min)

(㉔) 상압 및 고압 조건에서의 효소 안정성

- 이전 실험에서와 같이 짠맛증진물질의 생산 가능성이 있는 멸치 가수분해물의 산업적 생산을 위해서는 전통적인 고염, 장기간 숙성 또는 효소를 이용한 숙성 가수분해 공정을 저염에서 쓴맛을 제어하고 경쟁력 있는 생산단가를 맞출 수 있는 공정으로의 개선이 필요하다.
- 따라서 본 실험에서는 서론에서 언급한 바와 같이 공정 개선 방안으로 고압을 사용하기 위하여 먼저 0~200 MPa에서 가수분해 반응을 촉진시킬 수 있으며, 쓴맛 제어 효과가 있는 효소를 선별하고자 우선적으로 100 MPa에서의 효소 안정성을 확인하고자 하였다.
- 단백질 가수분해 공정에서 산업적으로 가장 많이 이용되고 있는 Alcalase[®] 2.4 L, Flavourzyme[™] 500MG, Neutrase[®], Protamex[™] 등의 4가지 효소와 쓴맛의 제어를 위하여 exo-와 endo-peptidase를 혼합하여 활용하는 방안(Raksakulthai & Haard, 2003; Nilsang et al., 2005; FitzGerald & O'uinn, 2006)에 따라 효소 제조사로부터 제안된 Alcalase[®] 2.4 L와 Flavourzyme[™] 500MG을 1대 5의 비율로 혼합한 효소(mixed enzyme, ME)를 sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 사용하여 2%(w/v) 용액으로 제조하였고 50℃에서 24시간까지 장시간 고압(100 MPa) 및 상압(0.1 MPa) 처리 후, 각각의 효소에 대한 단백질 분해 활성을 측정하여 잔존 활성을 산출한 결과는 Fig. 3-1-16과 같다.
- Duncan의 다중범위검정($p < 0.05$, data not shown)과 Fig. 3-1-16에 나타난 바와 같이 상압 및 고압 처리 모두 시간이 경과함에 따라 유의적으로 활성이 감소하였으며, 고압 처리가 상압에서 보다 유의적으로 효소 활성이 잔존하였다($p < 0.05$). 24시간 처리 후에 잔존 활

성은 고압 처리의 경우에는 Flavourzyme™ 500MG, ME, Neutrase®, Alcalase® 2.4 L, Protamex™의 순서로 상압의 경우에는 Neutrase®, ME, Alcalase® 2.4 L, Flavourzyme™ 500MG, Protamex™의 순서로 유의적인 차이를 보이며 높게 나타났다($p < 0.05$). 뿐만 아니라 고압 처리에 따른 잔존 효소 활성의 증가를 확인하기 위하여 각 효소별, 처리 시간별 잔존 활성 차이에 대한 평균을 분석한 결과(data not shown), 효소별로는 유의적인 차이를 보이며 Flavourzyme™ 500MG(39.4), Protamex™(28.4), Alcalase® 2.4 L(13.2), ME(9.1), Neutrase®(7.5)의 순서로 나타났지만 시간별로는 분산이 심하여 통계적으로 의미 있는 결론을 확인하기에는 미흡하였다.

- 이러한 결과는 중 고압 영역(200 MPa 이하)에서 효소에 대한 열안정성과 활성 증가에 대하여 보고한 결과(Mozhaev et al., 1996; Ohmae et al., 2007)와 중온성 세균으로부터 유래된 효소를 압력조건(0.1 MPa~600 MPa, 25°C, 0.1 M sodium phosphate buffer)에서 처리 후 잔존효소 활성에 대하여 실험한 결과, 100-300 MPa까지 잔존효소 활성이 유지되었다는 보고(Athès et al., 1997)와 일치한다. 따라서 본 연구에서 사용한 모든 상업적 효소는 고압에서 사용할 수 있음을 확인하였다.

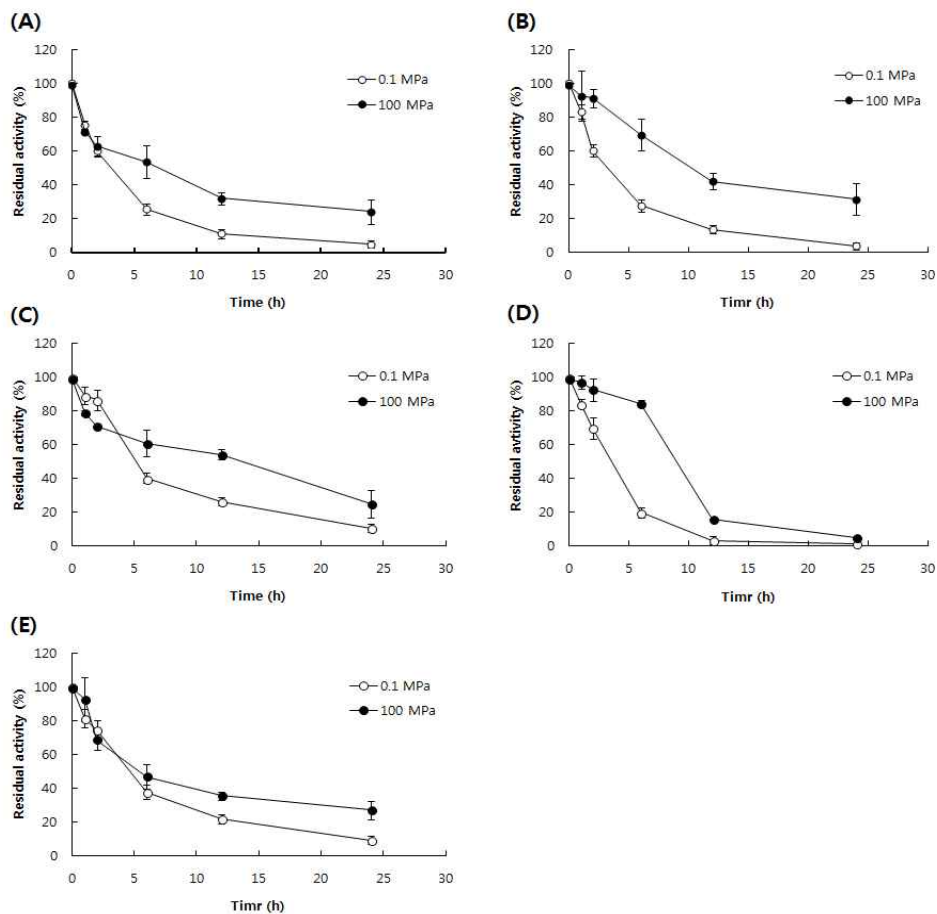


Fig. 3-1-16. Residual activities of commercial protease in phosphate buffer (pH 7.0) after treatments of ambient pressure and 100 MPa at 50°C. (A) Alcalase® 2.4 L, (B) Flavourzyme™, (C) Neutrase®, (D) Protamex™, (E) Mixed enzyme (Alcalase® 2.4 L : Flavourzyme™ 500MG = 1 : 5). Data represent means ± S.D.

- 효소에 대한 열안정성과 활성 증가 또는 가수분해 반응의 속도 증가 효과에 대한 기작에 대한 여러 보고(Mozhaev et al., 1996; Balny 2006; Ohmae et al., 2007; Vila Real et al., 2006; Akasaka et al., 2008)에 의하면 두 가지로 요약된다. 첫째는 고압에서의 효소 반응에 대하여 전이 상태이론(transition state theory)을 적용하여 기질과 효소가 결합된 전이 상태에서의 부피가 고압에 의하여 줄어들면서 자유에너지(ΔG)에 영향을 미치고 결국, 반응속도상수를 증가시켜 반응속도를 가속화시킨다는 것이고, 둘째는 효소 반응에 관여하는 기질 단백질의 형태학적 구조에 관한 것으로 압력에 의해서 기질 단백질의 구조가 풀린 구조가 되어 반응이 일어날 확률이 증가하여 결국 반응속도가 가속화된다고 하였다. 효소 역시 단백질이므로 본 연구에서는 Flavourzyme™ 500MG, Alcalase® 2.4 L 및 ME를 50°C, 100 MPa에서 24시간 처리 후에 효소의 안전성을 형태학적 구조변화를 측정하여 확인하고자 하였다.
- 고압 및 상압 처리된 시료를 SDS-PAGE 실시하고 결과를 electrophoretic mobility maps (EMMs)로 표현하여 나타내었다(Fig. 3-1-17). Alcalase® 2.4 L의 경우인 Line 1과 Line 2의 분자량 분포에서 상압과 고압 처리에 따른 차이가 없었으며, Flavourzyme™ 500MG의 line 3, 4의 분자량 분포와 ME의 결과인 line 5, 6에서는 동일한 분자량 분포도를 나타내었다. 이러한 결과는 150 Mpa 이하에서 ubiquitin을 α -chymotrypsin으로 가수분해물의 분자량 분포가 변하지 않는다는 보고(Akasaka et al., 2008)와 trypsin 및 thermolysin으로 밀 글루텐을 37°C의 상압 및 고압 조건(300 MPa)에서 1시간 동안 반응시킨 가수분해물의 분자량 분포를 EMMs를 통하여 나타낸 패턴(Kim et al., 2013)과 유사함을 확인 할 수 있었다. 따라서 시험된 3가지 효소 모두 100 MPa에서는 형태학적 구조가 변하지 않는 것으로 확인되었다.

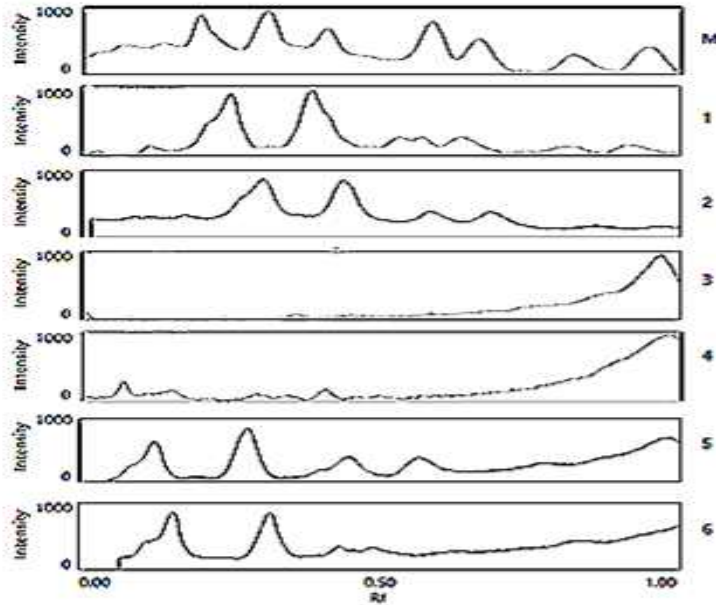


Fig. 3-1-17. The corresponding EMMs of commercial enzymes after treatments of ambient pressure and 100 MPa at 50°C, 24 h. M: molecular marker(161-0373, Bio-rad), line 1: Alcalase[®] 2.4 L prepared after treatment of ambient pressure, line 2: Alcalase[®] 2.4 L prepared after treatment of 100 MPa, line 3: Flavourzyme[™] prepared after treatment of ambient pressure, line 4: Flavourzyme[™] prepared after treatment of 100 MPa, line 5: Mixed enzyme (ME) prepared after treatment of ambient pressure, line 6: Mixed enzyme (ME) prepared after treatment of 100 MPa.

(마) 고압 조건에서 효소반응 증진 효과

- 100 MPa에서의 효소에 대한 안전성을 잔존 활성과 SDS-PAGE를 통하여 확인하였지만 고압 처리에 의한 잔존 효소 활성의 증가 효과를 확인하기에는 부족하여 생멸치를 기질로 동일한 조건(50°C, 상압 및 100 MPa)에서 1, 2, 6, 12 및 24시간 다섯 가지 효소로 각각 가수분해반응을 실시하여 가수분해물을 얻고, 가수분해도를 측정한 결과를 Table 3-1-21에 제시하였다. 여기서 어떠한 효소도 가하지 않은 자가 효소에 의한 가수분해를 대조구로 설정하였다.
- 대조구에서는 상압 및 고압의 조건에서 시간에 따라 계속하여 유의적인 차이($p < 0.05$)를 보이며 반응이 진행되고 있는 것으로 나타나고 있으나, 효소에 의한 가수분해 반응은 상압에서 6시간 이후에는 서서히 반응이 진행되어 평형에 가까이 진행되는 것으로 보이고, 고압에서는 시간에 경과함에 따라 유의적인 차이($p < 0.05$)를 보이면서 계속하여 반응이 진행되었다. 따라서 100 MPa의 고압 하에서는 효소 반응이 증진되는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

Table 3-1-21. Degree of hydrolysis (DH, %) of enzymatic hydrolysates at various reaction time using commercial proteases under ambient pressure and 100 MPa at 50 °C

Reaction time (h)	Degree of hydrolysis (%)					
	Control ¹⁾	Alcalase [®] 2.4 L	Flavourzyme [™] 500MG	Neutrase [®]	Protamex [™]	Mixed enzyme ²⁾
0.1 MPa						
1	2.0±0.4 ^{a,3)}	14.9±0.5 ^a	15.7±1.0 ^a	9.3±1.2 ^a	11.2±1.8 ^a	21.4±0.4 ^a
2	7.7±1.3 ^b	20.1±1.0 ^b	22.9±0.1 ^b	13.8±1.3 ^b	14.5±2.2 ^{ab}	23.4±0.9 ^{ab}
6	13.8±0.3 ^c	23.2±0.6 ^{bc}	27.2±1.2 ^{bc}	18.7±1.6 ^c	17.1±1.9 ^b	26.1±2.7 ^{bc}
12	18.1±0.4 ^{cd}	25.6±0.7 ^{cd}	29.5±0.5 ^c	20.9±1.6 ^{cd}	19.5±1.0 ^{bc}	30.2±0.9 ^{cd}
24	22.1±1.4 ^d	28.9±0.7 ^d	31.4±0.6 ^{cd}	24.1±2.0 ^d	22.6±2.1 ^c	32.2±0.7 ^{de}
100 MPa						
1	19.5±4.1 ^d	33.3±2.4 ^e	36.8±5.3 ^{de}	32.9±1.7 ^e	33.3±0.2 ^d	36.2±1.8 ^{ef}
2	18.7±2.6 ^{cd}	34.9±3.0 ^e	39.4±5.4 ^e	33.7±1.5 ^e	34.8±2.3 ^d	37.8±2.5 ^f
6	32.8±3.7 ^e	43.3±3.2 ^f	46.9±3.0 ^f	42.9±2.7 ^f	42.9±5.2 ^e	45.0±4.7 ^g
12	42.1±5.9 ^f	52.7±1.9 ^g	57.4±6.3 ^g	50.9±3.4 ^g	51.9±4.9 ^f	49.0±3.3 ^g
24	47.1±1.8 ^g	58.3±3.5 ^h	62.9±4.2 ^g	59.5±3.2 ^h	57.2±2.7 ^g	57.5±2.8 ^h

¹⁾Control was hydrolyzed without any commercial protease

²⁾Mixed enzyme (ME): Alcalase[®] 2.4 L : Flavourzyme[™] 500MG = 1 : 5

³⁾Mean±SD (n=3); ^{a-h)}Means within the same column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

○ 고압 및 효소 처리에 따른 효소 반응의 증진 효과를 분석하기 위하여 시간의 경과를 무시하고 처리 군별 가수분해도의 산술평균을 구하여 반응 촉진 효과를 계산한 결과(data not shown), 평균 가수분해도는 고압 효소군(45.26±9.83), 고압 대조군(35.18±12.88), 상압 효소군(18.44±6.34) 및 상압 대조군(15.43±6.16)의 순서로 나타났으며, 상압에서 효소 처리군의 증진 효과는 19.6±1.8%, 고압에서 효소 처리군의 증진 효과는 28.7±3.6% 이었다. 고압 처리 시 증진 효과는 대조군 및 효소 처리 군에서 각각 128.0±5.3% 및 145.4±7.3%로 계산되어 가수분해 반응 증진 효과는 고압에 의한 영향이 효소에 의한 영향보다 우월한 것으로 판단된다. 이러한 결과는 앞서 기술한 100 MPa의 고압 처리 후에도 효소 활성이 상압의 경우보다 더 많이 남아 있었던 결과와 일치하였다.

(바) 짠맛증진물질의 생산 가능성

- 50 °C, 100 MPa의 조건에서 2시간 동안 멸치에 상업적 효소를 첨가하여 반응 시킨 후의 가수분해물에 대한 GPC 크로마토그램 분석결과는 Fig. 3-1-18과 같다.
- Yun et al. (2015)의 멸치 어간장의 분자량 분포를 확인하여 중합도 2~10 사이의 oligo peptides 영역(분자량 220~1,100)에서 짠맛증진물질의 존재 가능성에 대한 보고와 짠맛증진물질로 밝혀진 arginyl dipeptides가 존재할 가능성이 있는 분획 II의 분율은 효소 처리군이 대조군에 비하여 약 2배 이상 크게 측정되었으며, Yun et al. (2015)의 멸치 단백질 가수분해물의 강도평가를 통한 짠맛증진효과에 대하여 보고한 결과 상업적 효소를 사용하여 고압 조건에서 짠맛증진 물질의 생산 가능성을 확인할 수 있었다.

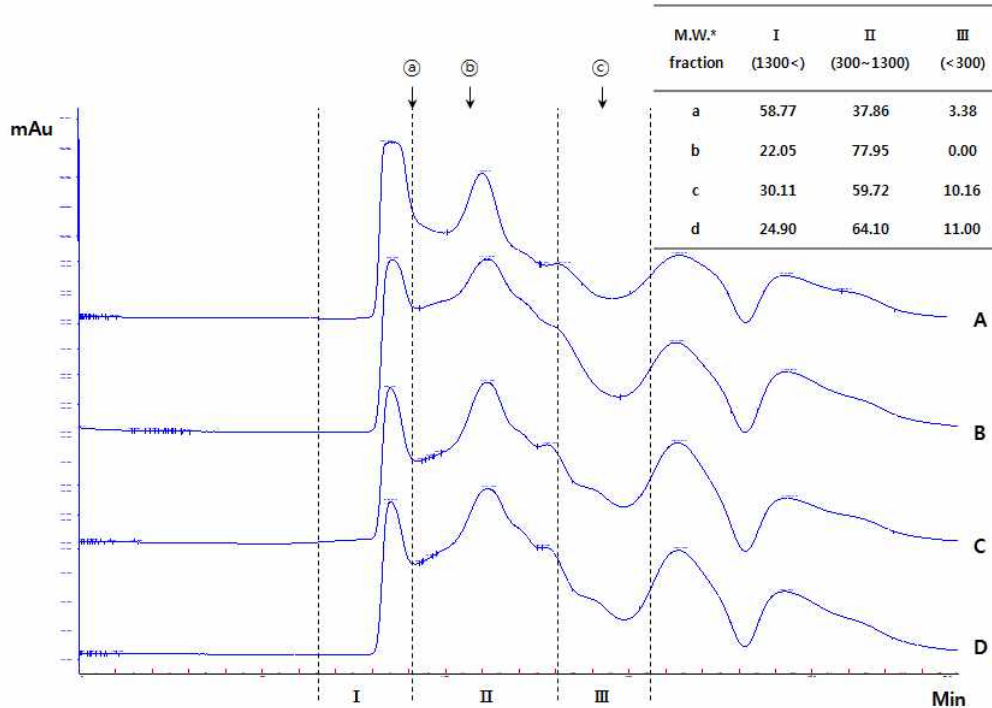


Fig. 3-1-18. GPC chromatogram ($\lambda = 214$ nm) of anchovy protein hydrolysate prepared by commercial proteases under 100 MPa at 50 °C. a: Control (without commercial enzyme); b: Alcalase[®] 2.4 L ; c: Flavourzyme[™] d: Mixed enzyme. Marker materials: ① Vitamin B₁₂ (1355.37 Da), ② Vitamin B₁ (337.27 Da), ③ L-Glutamic acid (147.13 Da). GPC fractions: I (> 1,100 Da), II (220 Da ~ 1,100 Da), III (< 220 Da). *: Molecular weight.

(㉞) 고압 멸치효소 가수분해물의 쓴맛 강도

○ 단백질의 효소가수분해 시 생성되는 쓴맛은 소비자들의 기호에 적합하지 않아 가수분해물의 활용에 제약을 받고 있으며, 이를 해결하는 방안으로 exo-peptidase 또는 exo-와 endo-peptidase를 혼합하여 활용하는 방안이 제시되고 있다(FitzGerald et al., 2006; Hou et al., 2011). 이에 본 연구에서는 쓴맛 제어가 가능한 상업적 효소를 선별하기 위하여, 경제적이면서 가장 가수분해 활성이 좋은 Alcalase[®] 2.4 L와 작용 기작이 exo-와 endo-인 Flavourzyme[™] 500MG 그리고 이들을 각각 1 : 5의 비율로 혼합한 효소(ME)를 사용하여 50°C, 100 MPa의 조건에서 가수분해를 실시하여 제조한 가수분해물에 대한 쓴맛 강도를 관능검사에 의하여 평가하였고 그 결과는 Fig. 3-1-19(A)와 같다.

○ Alcalase[®] 2.4 L에 의해서 제조된 가수분해물의 쓴맛 강도는 12시간까지는 증가하는 경향을 보이고 있으며, 12시간 이후부터는 쓴맛에 대한 강도가 증가하지 않았으며 강도는 4(bitter taste) 보다 조금 높았다. exo-와 endo-형이 혼합된 Flavourzyme[™] 500MG과 ME의 경우에는 매우 유사한 경향을 보이며 18시간 이후로는 강도가 감소하여 강도 3(mildly bitter taste)을 나타내었다. 현저한 차이를 확인할 수는 없었지만, 이러한 결과는

Hou et al.(2011)이 미생물로부터 유래 된 endo-, exo- protease를 혼합한 효소를 이용하여 명태 프레임을 가수분해하는 경우에 쓴맛을 저하시킬 수 있었다는 보고와 유사한 결과로 Flavourzyme™ 500MG이나 ME를 생멸치의 고압효소가수분해에 이용하면 관능적으로 쓴맛이 개선된 가수분해물을 생산할 수 있으리라 판단된다.

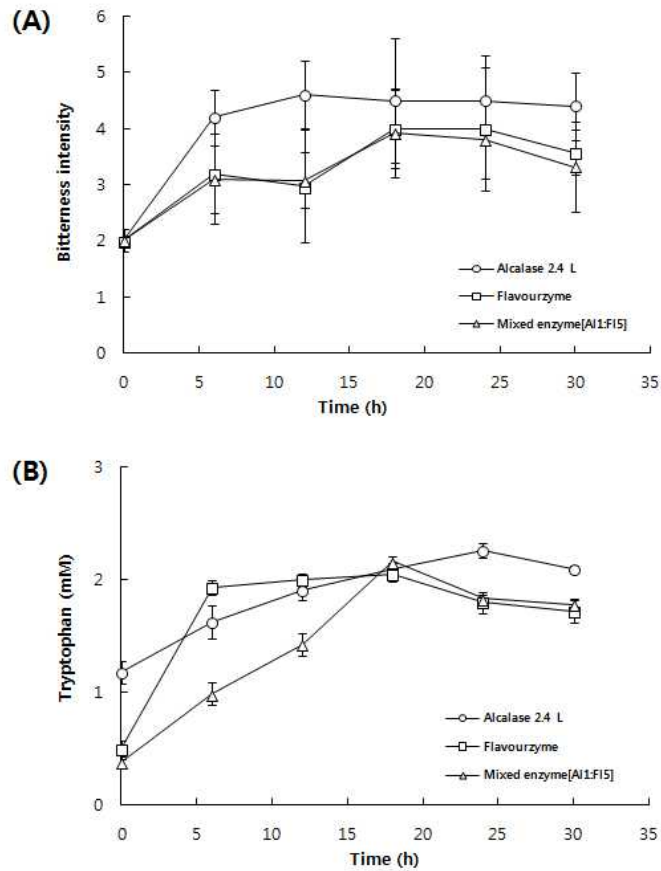


Fig. 3-1-19. Bitterness tendency (A) and tryptophan contents (B) of anchovy protein hydrolysates prepared by using Alcalase® 2.4 L, Flavourzyme™ 500MG and Mixed enzyme under pressurization at 100 MPa and 50°C. Data represent means ± SD.

○ 단백질의 가수분해 시 쓴맛은 소수성 잔기를 포함하는 peptide들에 의하여 나타나며, leucine, isoleucine, valine과 같은 branched-chain amino acids (BCAAs)와 phenylalanine, tryptophan, tyrosine은 쓴맛을 내는 아미노산으로 알려져 있다(Mukai et al., 2007; Malin et al., 2010; FitzGerald et al., 2006). 뿐만 아니라 어떤 연구(Smyth & FitzGerald, 1998; Nilsang et al., 2004)에서는 이러한 쓴맛을 나타내는 아미노산 중에 tryptophan을 쓴맛 지표로 사용하여 가수분해물의 쓴맛을 정량화하였다. 본 연구에서도 관능검사 결과를 검증하기 위하여 쓴맛 강도를 평가한 시료와 동일한 시료에서 tryptophan 함량을 측정하였고 그 결과는 Fig. 3-1-19(B)와 같다.

- Tryptophan 함량 또한 관능검사 결과와 유사한 경향을 보이고 있으며, 이러한 결과는 Nilsang et al.(2004)이 FSC(Fish soluble contrate)에서 Flavouzyme™과 다른 상업적 효소를 이용하여 가수분해 한 결과 Flavouzyme™을 사용하는 경우에 tryptophan이 가수분해 반응 중에는 생성되지 않았다는 결과와 참치에서 Flavouzyme™을 이용하여 가수분해 시 tryptophan 함량이 감소하였다고 한 Herpandi et al.(2012)의 결과와 유사하였다. 특히, 반응 초기에 ME를 사용하는 경우에 가장 적게 tryptophan이 생성됨을 확인하고 최종적으로 ME를 중고압(100 MPa 이하) 하에서 비교적 효소 활성이 안정하며 쓴맛이 제거된 가수분해물을 생산할 수 있는 상업용 단백질 분해효소로 선별하였다. 하지만 반응 초기의 관능 평가 결과와 쓴맛 지표 성분인 tryptophan 함량과는 직접적인 상관관계를 보이지 않아 추후 보완실험을 통하여 쓴맛 펩타이드 성분들에 대한 분석 및 대조군을 활용한 관능 평가를 통하여 개선 효과를 검증할 필요가 있을 것으로 사료된다.

(4) 결 론

- 국내산 멸치의 효소가수분해를 개선하기 위하여 압력을 활용하고자, 중고압(200 MPa 이하) 하에서 비교적 효소 활성이 안정하며 쓴맛이 제거된 가수분해물을 생산할 수 있는 상업용 단백질 분해효소를 선별하고자 하였다.
- 상업용 효소인 Alcalase® 2.4 L, Flavourzyme™ 500MG, Neutrase®, Protamex™) 및 Alcalase™ 2.4 L와 Flavourzyme™ 500MG을 1 : 5의 비율로 혼합한 ME에 대한 안정성 평가로써 50℃에서 상압 및 100 MPa의 조건에서 처리시간에 따른 잔존효소활성과 전기영동을 실시하여 고압 처리 시 효소 활성의 잔존율이 증가하고 효소의 형태학적 변화가 없이 안정함을 확인하였고, 고압에서 잔존 활성이 높은 Flavourzyme™ 500MG과 ME를 1차적으로 선별하였다.
- 동일한 조건으로 멸치 효소가수분해물을 제조하여 고압의 효소반응 증진 효과, 짠맛증진물질 생산 가능성 및 쓴맛 감소 가능성을 검토하였다. 가수분해도를 분석하여 가수분해반응 증진 효과는 고압에 의한 영향이 효소에 의한 영향보다 2배 이상 우월함을 확인하였고, GPC 크로마토그램으로 짠맛증진물질의 생산 가능성을 확인하였으며 이 중에서 Alcalase® 2.4 L가 가장 우수하여 2차로 선별하였다. 1차 및 2차에서 선별된 효소로 100 MPa 및 50℃ 조건에서 제조된 멸치 효소가수분해물의 쓴맛 강도와 지표성분으로 tryptophan 함량을 측정하여 mildly bitter taste와 tryptophan을 가장 적게 생산하는 ME를 최종적으로 선별하였다.

다. 고압효소분해조건의 최적화 I

(1) 고압효소분해조건 최적화를 위한 예비실험

- 고압 효소 분해 공정 절차의 확립과 최적화를 위한 실험 조건의 선정을 위한 예비 실험은 크게 시료의 전처리 가공공정, 후처리 공정으로 진행되었다. 일차적으로 고압액화에 사용되기 위한 원료로서 선정된 멸치는 냉동상태로 공급되었다. 냉동멸치는 상온에서 해동되었으며, 이 후 10~15℃에서 1시간 동안 침지 및 수세과정을 통하여 탈염 및 불순물 제

거가 진행되었다. 본 실험에서는 내장을 포함한 전체 멸치가 사용되었다.

- 고압 효소 분해과정에서 효소가 기질에 용이하게 작용할 수 있도록 멸치 분쇄물의 입자를 100 μm 이하로 감소시키기 위하여 2단계의 분쇄가 진행되었다. 1차 분쇄는 가정용 믹서로 2분간 2회 진행되었으며, 이 후 입자의 평균크기는 약 1,000 μm 이하로 감소되었다. 이 때 분쇄를 용이하게 하기 위하여 멸치의 중량의 2배의 물을 첨가하였다. 입자의 크기를 100 μm 이하로 감소시키기 위한 2차 분쇄는 homogenizer로 16,000 rpm으로 5분간 진행되었다. 본 실험조건(기질의 양, 분쇄 조건)으로는 입자의 크기는 약 180 μm 까지 조절되었다. 예비실험 과정에서 분쇄속도가 입자 크기의 감소에 영향을 주었으나, 5분 이상, 16,000 rpm 이상에서는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다.
- 입도가 조절된 멸치 분쇄물에 첨가하는 효소는 이전 실험 결과를 적용하기로 하였으며, 효소의 작용을 최대화하기 위해서는 pH의 조절이 요구되지만, 본 실험은 액화물의 산업적 생산을 고려하여 공정을 단순화하고자 하는 목적으로 pH 조절은 생략하기로 하였다.
- 효소를 첨가한 멸치 분쇄물은 각 100 mL의 단위로 포장하여 고압액화를 진행하였으며, 예비실험결과 효소의 작용이 48시간 까지 진행되는 것으로 나타났으며, 상업효소들의 경우 보고되고 있는 최적 온도보다 압력 하에서는 약 5 $^{\circ}\text{C}$ 정도 상승된 온도에서 최적의 활성을 나타내는 것으로 보고되고 있어, 40~60 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 액화를 진행하기로 결정하였다.
- 본 실험에 사용되는 고압액화기의 작동 한계는 온도 60 $^{\circ}\text{C}$ 이고 압력은 약 150 MPa 정도이다. 압력을 100 MPa 이상으로 설정하는 경우에는 온도 조절에 문제가 발생되어 최적화 압력 범위를 50~100 MPa로 설정하기로 결정하였다.
- 액화를 마친 후의 공정은 아래와 같은 과정을 여러번 반복 실험하여 어류 단백질 가수분해물 제조 후 처리 절차를 확정하였다.
- 액화를 마친 시료를 바로 90~100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 불활성화 처리를 하고, 0 $^{\circ}\text{C}$ chiller에서 냉각하여, 추가적인 효소의 반응을 정지시켰다. 다음 단계에서는 12시간 동안 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 aging 하여 시료 내 지방성분의 고형화를 유도하고, 고형화한 지방은 원심분리 및 여과 과정을 통하여 제거하였다. 충분한 냉각과정이 이루어지지 않으면 저장 시료에서 부유 지방이 발생하는 것으로 나타나 충분한 시간의 aging은 반드시 요구되어진다. 최종 시료의 지방함량은 약 0.1% 이하로 이는 시료의 이취발생 억제에 중요한 인자로 작용하는 것으로 나타났다. 냉각된 시료는 원심분리와 여과 과정을 통하여 가수분해 되지 않은 침전물들과 부유하는 고형 지방성분들을 제거하여 냉동 저장하였다.
- 결국 예비 실험을 실시하여 Fig. 3-1-20과 같은 고압효소가수분해 처리 절차가 확립되었고, 고압효소가수분해 최적화를 위한 변수로서 온도(40~60 $^{\circ}\text{C}$), 압력(50~100 MPa), 시간

(12~48 시간) 및 효소 사용 농도(0~2%)가 설정 되었다.

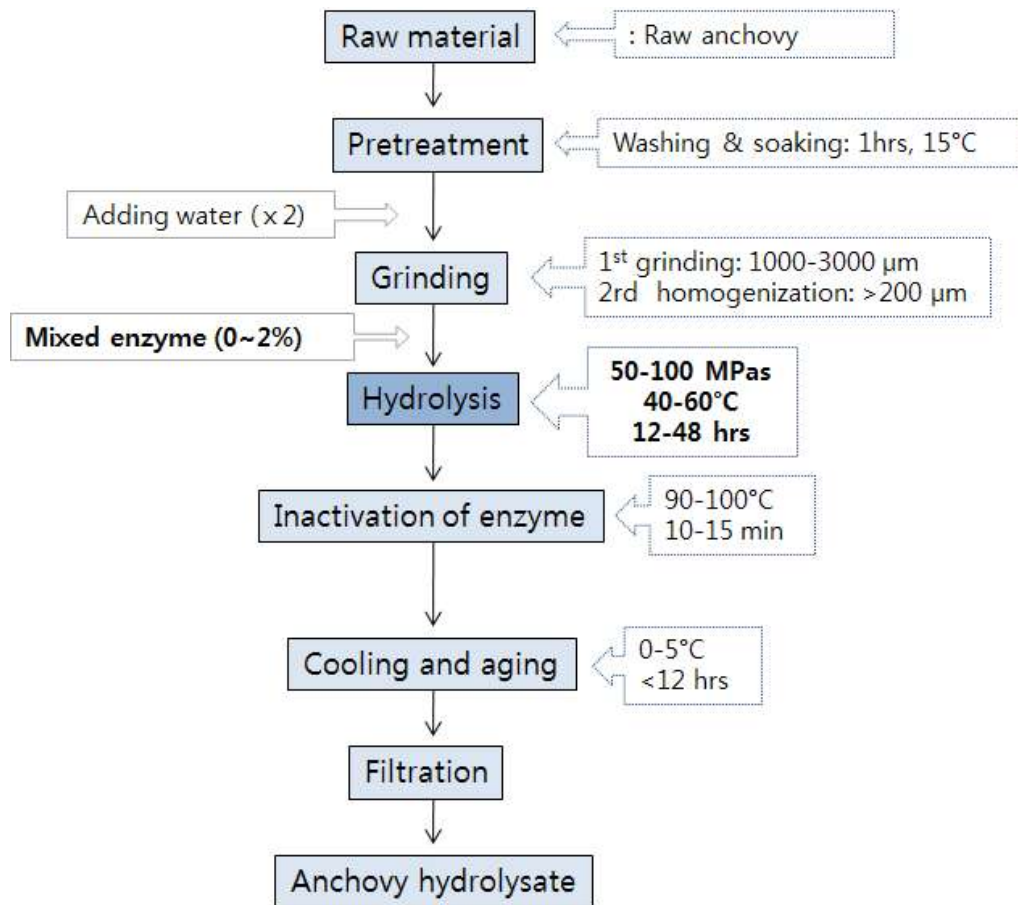


Fig. 3-1-20. 고압효소가수분해 처리 공정 도해도.

(2) 고압 조건에서의 효소 Stability에 관한 이론적 배경

- 고압이라는 용어는 초고압이라는 용어와 함께 사용하면서 50 MPa 이상의 압력대를 모두 초고압이라 하였지만 극히 최근에는 압력 범위에 따라 여러 작용 기작이 밝혀 지면서 150 내지 200 MPa를 기점으로 medium pressure와 high pressure로 분리하여 적용하는 흐름이 나타나고 있다. 이를 이용하여 작용기작을 분류하여 Fig.3-1-21에 나타내었다.
- 본 과제에서 활용하려는 압력대는 중압 범위(50~200 MPa)로서 가수분해를 촉진시키는 기작을 두 가지 이론으로 설명하고 있다. 먼저 modulation of enzymatic activities에 대한 이론은 다음과 같다.
- Masson 등(2001)은 특히 protease의 경우, 200 MPa 이하의 압력에서는 대부분 효소의 안정성(stability)과 기능성(functionality)이 변하지 않기 때문에 압력으로 효소 활성을 조절할 수 있다고 하였다.

High Pressure

- 비열살균기술
 - ✓ 미생물/효소 불활성화 기작
- 물성개선기술 (열과 압력 병행처리)
- 다른 물리적·생물학적·생화학적 효과를 조합하여 새로운 형질 전환 연구
 - ✓ 세포 붕괴에 의한 투과성 증진
 - ✓ 추출의 전처리
 - ✓ Allergenicity and digestibility
 - ✓ Disinfection of biomolecules
 - ✓ Vaccine development
 - ✓ Genetic transformation
 - ✓ Cell extraction
 - ✓ Preparation viral vectors
 - ✓ Etc.

Medium Pressure

- Modulation of enzyme activities
- Stabilization of protein
- Dissociation of protein complexes
- Protein-DNA interactions
- Stable tools for biotechnological applications

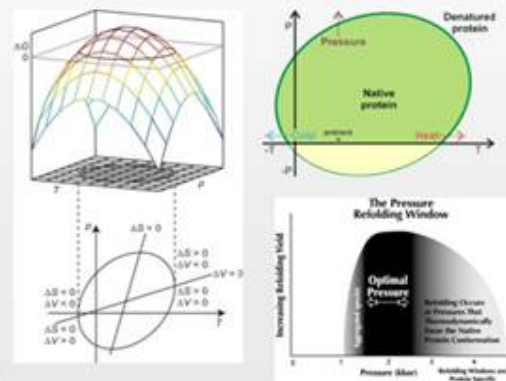


Fig. 3-1-21. 압력대별 작용기작 (High pressure: 400 MPa, Medium pressure: 50~200 MPa).

○ 어떤 효소들은 압력이 증가함에 따라 활성을 잃어 버리기도 한다. 예를 들면, horse liver alcohol dehydrogenase (HLADH)의 촉매 작용에 관한 활성이 100~400 MPa 범위의 압력 하에서 크게 감소한다고 하였으며, 이를 fluorescence and FTIR spectroscopy를 이용하여 형태 구조적 변화(conformational changes)와 관련이 있다고 밝혔다(Trovaslet et al., 2003). 이와는 반대로 촉매 반응에 의해서 유도되는 부피 변화가 음($\Delta V < 0$)이면 고압은 관련 효소의 활성을 증가시킬 수 있다(Rivalain et al., 2010). 예를 들어, 470 MPa에서 alphachymotrypsin의 효소 활성이 상압에서보다 6.7배 증가하였다고 한다(Aertsen et al., 2009; Balny, 1996; Mozhaev et al., 1996b). 유사한 내용으로 Kunugi 등(1997)은 thermolysin이 상압에서 보다 200 MPa에서 활성이 증가하였다고 보고하였다. 하지만 200 MPa 이상에서는 효소의 구조 변화 때문에 압력에 의해서 유발되는 효소 활성의 증가가 상쇄되어 급격하게 활성을 잃어 버린다고 하였다. 또한 중압대에서는 단백질의 열저항성이 증가할 수 있다고 한다. 일반적으로 온도가 올라가면 효소반응 속도는 증가하는 것으로 알려져 있다. 압력에 의해서 효소의 열안정성이 좋아져 반응의 최적 온도가 증가함으로써 반응속도가 개선되고 생산 수율의 증가를 가져 올 수 있다고 한다. 예를 들면, 50°C에서 alpha-chymotrypsin의 효소 활성보다 50°C, 360 MPa에서 30 배 증가하였다고 한다(Aertsen et al., 2009; Balny, 1996; Mozhaev et al., 1996b). 아래 Fig. 3-1-22와 같이 열

역학적 함수와 kinetics 연계하여 설명하면 Le Chatelier의 법칙에 따라 압력이 증가하면 부피 감소가 일어나므로 정반응을 촉진하는 설명이 가능하다(Mozhaeve et al., 1994).

Box 1. Equations describing pressure effects on thermodynamics and kinetics

For an elementary equilibrium process $A \leftrightarrow B$, the changes in the free energy of the system (ΔG), thermal energy (ΔE), volume (ΔV) and entropy (ΔS) are expressed as a function of temperature (T) and pressure (p) by the equation:

$$\Delta G = \Delta E + p\Delta V - T\Delta S \quad (\text{Eqn 1})$$

where ΔV is equal to the difference in the volumes of the final (V_B) and initial (V_A) states, and at constant temperature is determined by the following expression:

$$\Delta V = V_B - V_A = (\partial\Delta G/\partial p)_T = -RT(\partial \ln K/\partial p)_T \quad (\text{Eqn 2})$$

where R is the gas constant, equal to $0.082 \text{ ml atm K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ and K is the equilibrium constant.

Pressure effects on the rate (v) of an elementary process $A \rightarrow B$ derive from the equation:

$$\Delta V^* = V^* - V_A = (\partial\Delta G^*/\partial p)_T = -RT(\partial \ln v/\partial p)_T \quad (\text{Eqn 3})$$

where ΔG^* and ΔV^* are the changes in the activation free energy and volume, respectively, and ΔV^* is equal to the difference in the volumes of the activated (V^*) and initial (V_A) states.

Le Chatelier's principle predicts that an increase in pressure favours the state that occupies the least volume in a system. For a process with ΔV of -16 ml mol^{-1} , an increase in pressure from atmospheric pressure to 1 kbar leads to a nearly twofold increase in the value of K ; for a process with ΔV^* of -16 ml mol^{-1} , the same pressure increase results in a twofold acceleration of the rate of the reaction.

In biochemical studies, the following pressure units are used most often:

$$1 \text{ atm} = 1 \text{ kg cm}^{-2} = 1.01325 \text{ bar} = 0.101325 \text{ MPa} = 14.6 \text{ lb in}^{-2}$$

The difference between the atm, bar and kg cm^{-2} units is usually ignored if precise numerical values are not too important. The Pascal is the official SI unit.

Fig. 3-1-22. 열역학 및 kinetics에 미치는 압력의 영향을 나타내는 식.

- 또 다른 이론은 효소 반응에 관여하는 기질 단백질의 형태학적 구조에 관한 사항으로 압력에 의해서 기질인 단백질 구조가 unfolding 되어 반응이 쉽게 일어난다는 이론으로서 Fig. 3-1-23에 기작을 나타내었다(Akasaka, et al., 2008). 뿐만 아니라 이 메카니즘 역시 unfolded conformer(U)와 folded conformer(N) 사이의 반응에 대한 열역학적 해석이 가능하다.

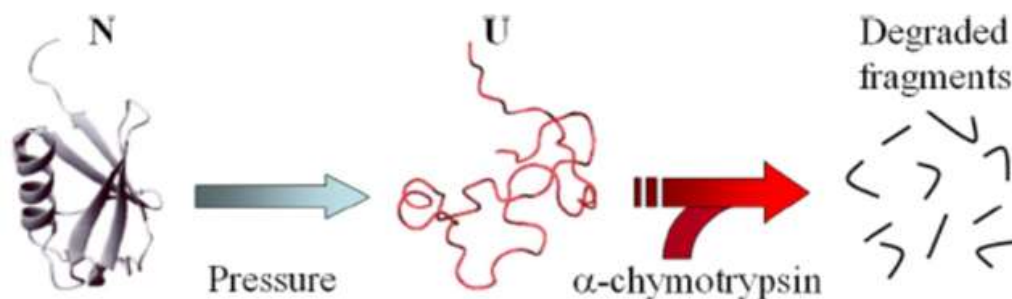


Fig. 3-1-23. General mechanism for pressure enhancement of enzymatic proteolysis of a globular protein.

- 압력이 증가하면 고 에너지를 띠게 되는 unfolded conformer가 더 많이 존재하게 되며, 효소 반응이 촉진되게 된다. 열역학적으로 표현하면,

$$\frac{n_U}{n_N} = \exp\left(\frac{-(\Delta G_{U-N}^\ominus + p\Delta V_{U-N})}{RT}\right)$$

- 이 식에서 ΔG_{U-N}^\ominus 은 표준 상태(1 bar)에서 N에서 U로 변하는 반응의 Gibbs 에너지이고, ΔV_{U-N} 은 부분몰부피의 변화량이다. 이 식이 유도된 원리에 따라 ΔV_{U-N} 은 우리가 관심을 가지는 압력 범위에서 거의 일정하여 압력 p 에서의 n_U 즉 Unfolded conformer의 개체수는 1 bar에서의 개체수에 대한 비로서 나타낼 수 있다. 이를 식으로 표현하면 다음과 같다.

$$n_U = \frac{\exp\left(\frac{-(\Delta G_{U-N}^\ominus + p\Delta V_{U-N})}{RT}\right)}{\exp\left(\frac{-(\Delta G_{U-N}^\ominus)}{RT}\right)} = \exp\left(\frac{-p\Delta V_{U-N}}{RT}\right)$$

- 이 식은 압력이 증가함에 따라 n_U 즉 Unfolded conformer의 개체수가 지수적으로 증가함을 나타낸다.

(3) 고압효소가수분해 조건의 최적화 방안 설정

- 어류 단백질 가수분해물을 제조하는 공정 중, 국내의 전통 멸치 어간장 제조 공정을 선정하여 가염을 하지 않고 짠맛 증진 물질을 가장 빠른 시간에 최대한 생산할 수 있도록 하고, 쓴맛이 가장 적게 생성 되도록 공정을 개선하기 위하여 50 MPa에서 200 MPa 범위의 압력과 endo type과 exo type의 상업적 효소를 복합하여 처리 하고자 한다.
- 공정을 선정하기 위한 실험 단계에서 짠맛 증진 물질은 가수분해도(DH %)가 높기 보다는 수용성 단백질 함량이 많거나 GPC 크로마토그램의 peak II 부분이 많아야 한다는 사실은 확인하였다. 따라서 본 실험에서는 일차적으로 액화 수율을 최대로 올리는 것을 목표로 설정하였다.
- 개선 방향으로 선정한 압력과 효소의 병행 처리는 온도, 압력, 시간, E/S 비율, pH, 단백질 급원인 멸치의 상태, 경제성, 이외에도 시스템적인 조절 파라미터가 존재하여 공정 조건을 최적화하기 위한 변수가 너무 많다. 따라서 RSM 등 기존의 실험계획법으로는 실험 횟수가 너무 많아 이런 경우에 적합한 최적화 기법으로 다구치의 강건설계 방법을 선택하였다.

○ Taguchi가 제안한 강건 설계(Robust Design)는 Fig 3-1-24와 같은 절차에 따르며, 과거 통계적 실험계획법에 시스템 내부 파라미터를 효율적으로 결정하는 공학적 실험계획법이다. 이 방법은 복잡한 공정을 단순화 시키는데 있어서 가장 경제적이며 최적화 실험방법 중에서 가장 실험 횟수가 적은 방법이다. 이 방법의 목적은 제품이나 공정이 잡음요소(noise factor)에 대하여 가장 흔들리지 않는 즉, 강건한 조절 파라미터를 찾는 데 있다. 구체적으로 설명하면 SN비(신호 대 잡음비)를 최대로 하는 조건을 찾는 것이다. Benyounis and Olabi(2008)는 RSM 그리고 ANNs(Artificial Neural Networks)와 비교해 보아도 가장 적은 비용으로 제품의 품질과 신뢰성을 개선시킬 수 있는 가장 파워풀한 최적화 기법 중 하나라고 보고하였다.

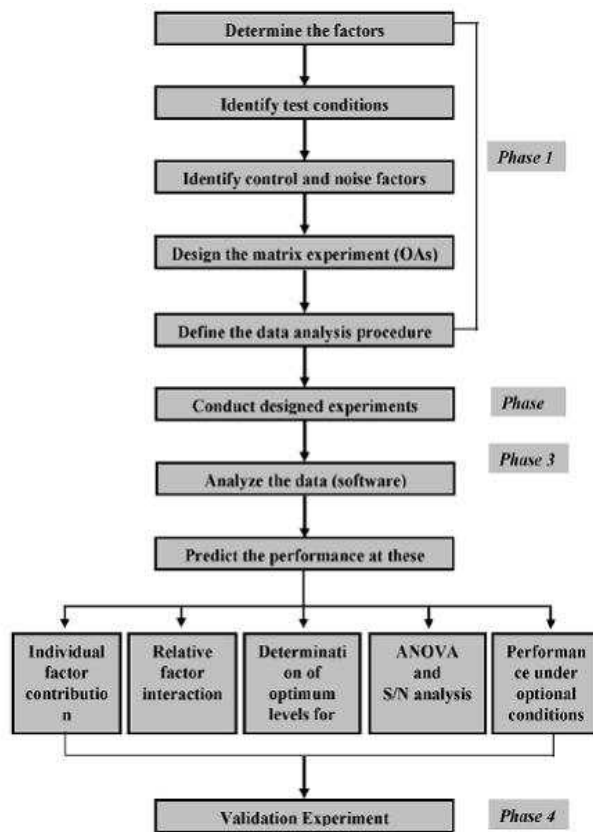


Fig. 3-1-24. 다구치 방법 진행 절차.

2. eHAP 제조기술/공정개발 및 활용방안 검토

가. 다구찌 기법을 이용한 열치 고압효소가수분해 공정의 최적화

(1) 서론

○ 최근 수산업계에서는 자원 고갈, 환경 규제 및 자유무역협정에 따른 시장 개방으로 수산 가공 부산물 또는 미이용 자원에 가치를 부여하는 기술개발에 많은 노력(Kim and

Mendis, 2006)을 기울이고 있다. 예로서, 어류단백질 가수분해물(FPH)과 펩타이드류 그리고 수산자원으로부터 분리·정제한 활성성분들의 일부는 이미 건강지향 식품의 원료 또는 풍미 증진제로 사용되고 있다(Thorkelsson and Kristinsson, 2009; Chalamaiyah et al., 2012). Thorkelsson et al.(2008)은 FPH 생산에 필요한 원료, 가공방법 및 건강에 미치는 영향 등에 대한 문헌조사에서 관련 제품이 시장에 진입하기 위해서는 경제성 있는 가공공정개발, 소비자 기호에 적합한 품질을 갖는 제품의 개발 및 안전성 등 해결하여야 할 과제가 많다고 보고하였다.

- 수산 자원으로부터 단백질 가수분해물과 펩타이드를 이용하는 제품 중 가장 오래된 것은 어간장이다. 이러한 어간장은 다양한 요리에 풍미를 증진시키는 조미소재로 사용되고 있으며, Schindler et al.(2011)과 Yun et al.(2015)은 짠맛증진물질로서의 가능성을 제시하였다. Lopetcharat et al.(2001)은 어간장 제조 방법에 대한 문헌조사에서 고염 처리에 의한 건강상 유해와 장기 발효에 따른 효율성을 문제로 제시하고, 식염 농도를 낮추고 제조기간을 단축하기 위한 방법으로서 단백질 가수분해 효소를 이용한 속성 제조를 가장 많이 사용하고 있다고 보고하였다. 그러나 단백질 가수분해 효소를 이용한 속성 발효의 가장 큰 문제는 쓴맛에 있으며, 이를 해결하기 위한 방법으로 Nilsang et al.(2005)은 exo-peptidase 또는 exo-와 endo-peptidase를 혼합하여 활용하는 방안을 제시하였다. 어류 단백질을 속성으로 가수분해하는 기술로서 Okazaki et al.(2003)은 식염을 첨가하지 않고 60 MPa의 고압 하에서 50℃, 48 시간 동안 생멸치를 자가소화시켜 어간장과 매우 유사한 분해물을 얻을 수 있다고 하였다
- 최근 식품산업에서는 고압을 활용하는 기술에 많은 관심(Rivalain et al., 2010; Knorr et al., 2006; Hendrickx et al., 1998)을 기울이고 있으며, 50내지 200 MPa 범위에서의 효소 반응에 주목하고 있다. 200 MPa 이하에서는 효소반응의 평형상수와 반응속도상수에 영향을 미쳐 효소활성이 증가한다고 하였다(Ohmae et al., 2007). 또한 Akasaka et al.(2008)은 기질로서 ubiquitin을 효소로서 α -chymotrypsin이 반응하는 효소반응의 경우에 수 kbar 영역에서의 압력은 단백질 가수분해반응을 촉진한다고 하였다. 그 근거로 기질인 ubiquitin이 압력에 의해서 folded conformer에서 unfolded conformer로 변하기 때문이라 하였다. 이와 같이 단백질 가수분해반응을 압력에 의해서 가속화하기 위해서는 반응시스템(기질, 온도 및 pH 등), 압력 조건 및 효소의 선정이 매우 중요하다. 이와 같은 고압과 효소반응을 연계한 연구는 실험실 규모에서 주로 이루어졌으며 산업적 적용 사례는 매우 제한적이다.
- Kwon and Jang(2013)은 다구찌 기법을 제품개발과 공정 개선에 효과적으로 활용될 수 있는 방법론으로 수학과 통계를 혼합한 기술로서 복잡한 공정을 최적화하기 위해서는 매우 적합한 도구로서 이론적인 측면보다는 산업현장에서 사용되는 문제해결의 강력한 도구라 하였으며, 최근에는 생물공학 응용의 통계적 수단으로도 이용되고 있다(Rao et al, 2008). 비교적 실험 횟수가 적게 요구되고 통계적 변동에 따른 일부 영향이 제거하여 최적조건에서 가장 변동성이 적은 실험조건을 결정할 수 있으며, ANOVA (analysis of

variance)를 이용하여 실험 데이터를 통계적으로 분석할 수 있다. Aggarwal et al.(2008)은 다구찌 기법과 RSM (Response Surface Methodology)은 거의 유사한 결과를 나타내지만 실험에 요구되는 시간이 RSM의 경우에 거의 2배에 이른다고 보고하였다. Benyounis and Olabi(2008)는 RSM과 ANNs (Artificial Neural Networks)와 비교하여 다구찌 기법이 제품의 품질과 신뢰성을 개선하는데 있어서 가장 강력한 최적화 기술이라고 보고하였다.

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

(2) 재료 및 방법

(가) 재료 및 시약

- 본 연구에서 사용한 생멸치, *Engralis japonica*(체장 7.2 ± 0.5 cm, 체중 2.7 ± 0.4 g)는 2013년 3월에 제주도 해역에서 어획한 것을 동해수산(기장)에서 구입, 빙냉 운반하여 일정량씩 polyethylene film bag에 넣은 다음 동결고(-20°C)에 저장하여 두고 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 복합효소는 대명상사(Seoul, Korea)로부터 구입한 상업용 효소로 Novozymes(Bagsvard, Denmark)의 Alcalase[®] 2.4 L와 Flavourzyme[™]를 1 : 5의 비율로 혼합하여 사용하였다. 멸치 고압효소가수분해물과 품질 특성 비교를 위하여 시판되고 있는 멸치액젓과 멸치어간장을 부친 시내 대형 마트 및 인터넷 쇼핑몰에서 각각 구입하여 -20°C 이하의 냉동고에서 보관하면서 분석용 시료로 사용하였으며, 실험에 사용된 분석용 시약은 모두 분석 시약급을 사용하였다.

(나) 다구찌 강건 설계

- 다구찌 방법은 직교배열표를 이용한 실험계획법으로 유일한 해를 찾으려는 것보다는 품질과 비용의 최적해를 구하려는 의도에서 출발한 것으로, 제품 및 공정 설계에서 가장 저렴한 비용으로 안정적이고 신뢰성이 높은 성능을 나타내는 인자의 조합을 찾는데 이용되며, 실험할 때 실제 사용하는 조건과 똑같이 잡음조건을 바꾸어 가면서 실험하여 최적 조건을 찾는데, 이 점이 기존의 실험 계획법과 커다란 차이점이다(Taguchi, 1986). 품질 특성의 목표 값을 유지하면서, 분산을 줄이는 인자에 대해 설정 값을 추출할 수 있다. 따라서 다구찌 방법은 제어 가능하고 영향력이 강한 인자를 찾아내어 이 인자들의 영향력을 최대로 하고 제어할 수 없는 잡음의 영향력을 최소로 하는 강건 설계(robust design)를 할 수 있다.
- 다구찌 방법에서 개선을 위한 정도를 나타내는 측정치로 SN비(ratio of signal to noise)를 사용한다. SN비는 잡음에 대한 제어 인자의 비를 나타내며 식 (1)과 같이 정의된다(Taguchi, 1986)..

$$SN비 = \frac{\text{신호가 산출물에 전달한 힘}}{\text{잡음이 산출물에 전달한 힘}} = \frac{\text{모평균 제곱의 추정값}}{\text{분산의 추정값}} \quad (1)$$

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

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

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

○ 제어인자가 설정되면 다음엔 수준을 결정하고, 특성치에 영향을 주고 있으나 그 요인의 상태를 파악할 수 없으며, 이유는 알 수 없으나 품질 분산에 나쁜 영향을 주는 인자로서 잡음인자(noise factor)를 선정하여 직교배열표에 의한 실험 설계를 한다.

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

○ 본 연구에서는 정특성 실험을 수행하였고 생멸치의 고압효소가수분해 공정의 성능을 결정하는 가장 중요한 특성으로 가수분해도(DH, %)와 nitrogen recovery(NR, %) 및 수율(%)을 각각 사용하였다. 이것에 영향을 주는 제어 인자는 전 보(In et al., 2016)에서의 결과와 예비 실험을 통하여 압력, 온도, 반응시간, 및 복합효소농도를 선택하였으며, 각 제어 인자에 대한 수준은 3 으로 하여 Table 3-1-22과 같이 설정하였다.

Table 3-1-22. Levels of the control factors

Control Factor	Level		
Pressure (MPa)	50	75	100

Temperature (°C)	40	50	60
Reaction time (hrs)	12	24	48
Mixed enzyme concentration (%)	0	1	2

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

(㉔) 생멸치 고압효소가수분해물의 제조

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

(㉕) 생멸치 상압효소가수분해물의 제조

○ 생멸치 상압효소가수분해물은 고압효소가수분해물과의 효율을 비교하기 위한 대조구로서 상압, 50°C에서 혼합효소 2%를 가하여 30시간 동안 가수분해한 후 90-100°C에서 10-15분 동안 불활성하고 4°C에서 12시간 이상 숙성하여 지방층을 제거한 후에 여과하여 -20°C 냉동고에서 보관하면서 분석용 시료로 사용하였다.

(㉖) 품질 특성 분석

○ 생멸치, 시판 멸치어간장과 멸치액젓 및 고압효소가수분해물의 일반성분은 식품공전(문헌)에 따라 수분은 상압건조법으로, 회분은 건식회화법으로, 조단백질은 micro-kjeldahl 분해법으로, 조지방은 soxhlet법으로 정량하였다. 특히, 원료 생멸치의 일반성분 분석결과는 다음과 같다.

Table 3-1-23. Proximate composition of raw anchovy

Proximate composition (%)				
Carbohydrate*	Protein	Lipid	Ash	Moisture
3.41±0.27	15.72±0.43	1.85±0.19	3.99±0.18	75.03±0.92

*: Values are the means±SD of three determinations.

- 염도는 salt meter (Master-S28M, Atago, Tokyo, Japan)를 수용성 고형분 함량(°Brix)은 master refractometer (Master-3M, Atago, Tokyo, Japan)를 pH는 pH meter (Orion 4-star Plus, Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 사용하여 측정하였다. 아미노태 질소 함량은 Formol 질소 정량법(KFIA, 2009; AOAC, 2000)과 TNBS법(Rutherford, 2010)으로 측정하였고, 수용성단백질은 TP0300-1Kit (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 Lowry protein assay법을 통하여 측정하였다(Lowry et al., 1951). 가수분해도(degree of hydrolysis, DH%)는 (3)식에 의해서 산출하였다.

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

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

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

- 여기서 $h_{hydrolysate}$ 는 고압효소가수분해물에서 측정된 총 질소 함량이다. 유리아미노산 정량은 HPLC (Hewlett Agilent 1100-series, Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA)에 의하여 분석하였다. Nitrogen recovery(NR, %)는 Benkajul and Morrissey(1997)을 방법을 변형하여 식(5)에 의해서 산출하였다.

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

- 여기서 TA 및 FA 는 각각 가수분해물에서의 총 아미노산 및 유리 아미노산 함량이다.

(3) 실험결과 및 고찰

(가) 대구찌 실험 설계 및 가수분해물 품질특성

- 교호작용이 없다는 전제하에 4개의 제어인자에 대한 3 수준계 표준형 직교배열표 L_9 (3^4)를 Table 3-1-24의 내측배열과 같이 설계하여 각 조건에서 고압효소가수분해물을 3회 반복 제조하여 품질특성을 측정하고 목적변수로서 DH, NR 및 수율을 산출하였다.
- 먼저, 고압효소가수분해물에 대한 품질특성(Table 3-1-26 및 27 참고)으로 측정된 일반성

분, pH (평균 6.41±0.41), 염도(평균 0.39±0.28)는 실험군별 95% 신뢰수준에서 유의적인 차이를 보이지 않았으나 수용성 고형분 함량을 나타내는 °Brix는 최소 4.47±0.12에서 최대 8.00±0.01으로 실험군별 유의적인 차이를 나타내었다.

- 이러한 사실은 각 제어조건에 따라 가수분해 정도가 다르기 때문으로, Nilsang et al. (2005)이 fish soluble concentrate의 상업적 효소에 의한 가수분해를 최적화하는 경우에 온도, 반응시간 및 효소농도를 조절변수로 설정하여 보고한 결과와 유사한 경향을 보였다. 즉, 제어인자 설정 근거가 타당함을 확인할 수 있었다.

Table 3-1-24. Experimental results and SN ratio according to orthogonal array with control factors and levels

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

¹⁾Mixed enzyme (Alcalase[®] 2.4 L: Flavourzyme[™] = 1 : 5).

Table 3-1-25. 고압/효소 처리된 멸치 가수분해물의 일반 성분

Exp. No.	수분(%)	조지방(%)	조단백(%)	조회분(%)
1	95.78±0.06	0.10±0.01	3.98±0.01	0.14 ±0.20
2	94.46±0.10	0.07±0.00	4.36±0.02	0.28 ±0.39
3	93.42±0.20	0.09±0.00	5.18±0.00	0.43 ±0.60
4	93.48±0.13	0.03±0.00	4.90±0.00	0.41 ±0.57
5	94.96±0.01	0.04±0.00	4.21±0.01	0.16 ±0.22
6	94.62±0.06	0.01±0.00	4.41±0.01	0.27 ±0.38
7	94.48±0.07	0.01±0.00	4.45±0.01	0.28±0.38
8	93.45±0.14	0.00±0.00	5.08±0.02	0.40±0.56
9	95.21±0.02	0.01±0.00	4.18±0.00	0.14±0.20

Table 3-1-26. 고압/효소 처리된 멸치 가수분해물의 이화학적 특성

Exp. No.	pH	염도(%)	Brix (%)
1	6.17±0.02	0.08±0.00	5.80±0.00
2	6.51±0.01	0.37±0.01	6.40±0.00
3	6.35±0.00	0.74±0.01	8.00±0.00
4	6.45±0.01	0.73±0.01	7.60±0.00
5	6.55±0.01	0.08±0.01	6.00±0.00
6	6.40±0.00	0.33±0.00	5.33±0.12
7	6.44±0.00	0.45±0.00	6.80±0.00
8	6.36±0.00	0.66±0.00	6.40±0.00
9	6.50±0.00	0.06±0.00	4.47±0.12

○ 제어조건에 따른 9개 실험군과 액젓(시료 B) 및 어간장(시료 A)에 대한 유리 아미노산 함량을 분석하여 나타낸 Fig. 3-1-25 및 Table 3-1-27에서도 위와 같은 결과를 나타내었다.

Table 3-1-27. 고압/효소 처리된 멸치 가수분해물의 유리아미노산(free amino acid) (mg/L)

분류	Changnyeong fish sauce	Myeolchi aekjeot	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Aspartate	0.00	0.00	1853.94	2336.31	3177.16	3926.92	2416.45	2661.21	3247.31	3158.00	1770.11
Glutamate	0.00	0.00	2007.80	2397.26	2880.68	3329.25	2640.57	2575.29	3183.72	2904.26	2056.83
Asparagine	1182.12	0.00	0.00	205.90	0.00	0.00	159.01	297.71	80.10	69.12	190.78
Serine	1123.25	118.97	1291.27	1442.93	1958.10	2136.44	1515.97	1730.82	1849.28	1937.89	1252.86
Glutamine	1150.79	533.12	3345.68	2576.31	648.34	4509.64	2110.83	2779.53	3485.74	3853.03	1426.46
Histidine	213.67	144.59	943.75	1038.05	1689.60	1845.14	724.80	1249.80	1195.03	1633.53	593.66
Glycin	670.26	272.25	703.89	1071.28	1167.74	1408.02	1158.61	1011.74	1382.54	1209.29	804.72
Threonine	489.23	203.93	1222.47	1455.38	1981.70	2167.88	1512.86	1767.33	1911.45	1960.42	1277.10
Arginine	1823.12	192.85	2088.37	2124.21	2775.38	2903.18	2270.69	2641.43	2569.81	2720.68	2200.49
Alanine	1845.05	642.91	2163.44	2179.34	2874.90	3147.71	2446.71	2534.83	2914.38	2838.40	1999.13
Taurine	0.00	0.00	608.49	517.29	744.70	708.85	597.91	668.89	600.25	665.12	562.55
Tyrosine	62.12	54.39	432.63	456.93	541.54	516.04	545.67	494.51	535.39	505.85	470.08
Valine	687.55	405.21	1541.99	1829.54	2495.44	2637.13	1836.54	2183.58	2222.65	2442.98	1586.83
Methionine	269.22	208.04	1112.12	1220.92	1505.25	1515.77	1138.04	1263.97	1297.92	1463.45	1086.36
Tryptophan	0.00	314.76	4222.73	4758.35	6510.15	6574.62	4692.94	5271.15	5328.27	6046.98	4193.87
Phenylalanine	325.56	301.89	1350.66	1534.65	1996.89	2021.14	1487.70	1740.71	1697.32	1936.70	1370.07
Isoleucine	462.53	380.37	1511.85	2012.07	2426.38	2505.83	1865.24	2068.11	2164.58	2412.00	1588.37
Leucine	622.59	571.09	2818.21	3315.97	3907.03	3966.16	3150.27	3401.41	3412.07	3825.85	2828.99
Lysine	1346.00	985.51	2244.41	2431.90	3664.01	3849.42	2597.35	3035.24	3180.91	3417.81	2495.62
Proline	393.87	113.27	710.70	403.55	487.77	892.14	456.09	417.55	996.15	604.00	278.87
Total	12666.93	5443.15	32174.40	35308.14	43432.76	50561.26	35324.25	39794.81	43254.86	45605.36	30033.37

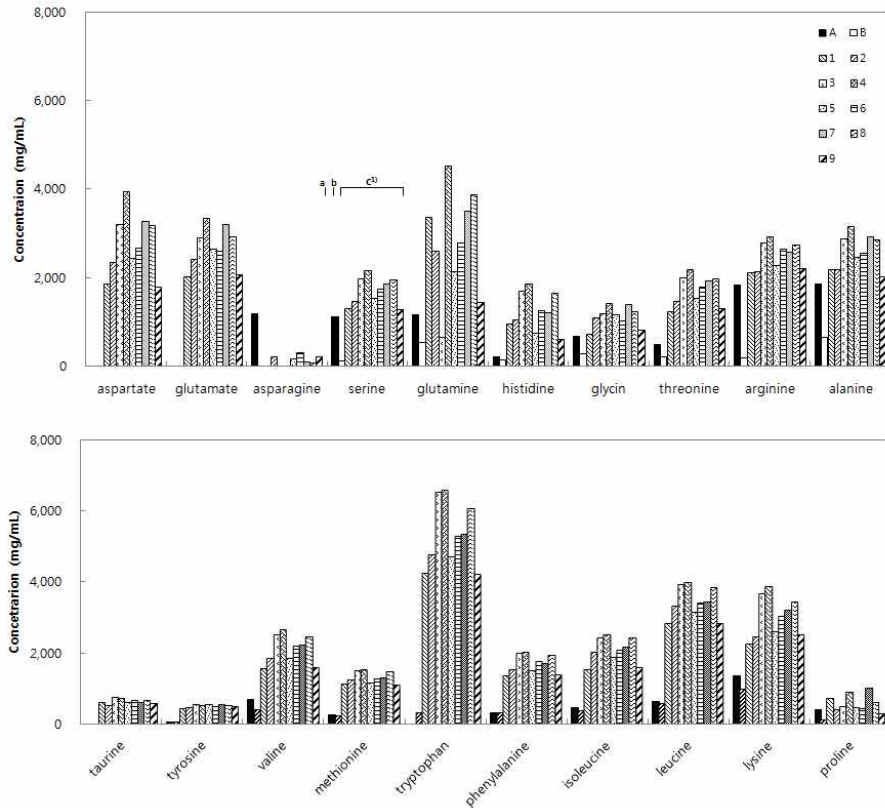


Fig. 3-1-25. Profiles of free amino acids of pressure-assisted enzymatic hydrolysates of raw anchovy and two commercially available anchovy sauce.

*A: *Changnyeong* fish sauce, B: Myeolchi aekjeot (fermented anchovy sauce), 1~9: Experimental no. ^{a-c}: Means with different superscripts above the bars are significantly different. ^{c*}: Significantly different in groups (experiment no.).

○ 개별 유리 아미노산 및 총 유리 아미노산 함량에 대한 95% 신뢰수준에서 유의검정을 실시한 결과(data not shown), 두 가지 경우 모두 모든 시료에서 유의적인 차이를 확인하였다. 특히 9개 실험군에서의 총 유리 아미노산 함량이 시판 제품보다 많이 생성되어 효소 및 고압처리가 전통적인 액젓 및 어간장 생산 공정을 개선할 수 있음을 확인할 수 있었다. 특히, 풍미 또는 짠맛증진성분으로 알려진(Schindler et al., 2011; Yun et al., 2015) glutamine, arginine, glycine 등과 lysine 및 tryptophan이 시판 멸치 어간장 및 액젓보다 풍부하게 생성되었다.

○ 이러한 결과는 Yun et al., (2015)이 어간장 생산 공정을 개선하여 짠맛증진물질 생산 가능성을 제시한 보고와 일치하는 결과이다.

(나) 다구찌 설계 분석

○ Table 3-1-25의 우측에는 실험설계에 따라 순차적으로 실험을 실시하여 산출된 목적변수의 값과 통계분석용 소프트웨어 Minitab의 실험계획법-다구찌 설계(Taguchi, 1986)를 이용하여 산출된 망대 특성 SN비를 보여주고 있다. 여기서 외측배열의 R1, R2 및 R3는 실

험상 잡음인자(예, 원료 성분 등)에 대한 수준을 제어할 수 없어 3회 반복하여 측정하였음을 의미한다.

- 설계변수에 대한 SN비의 반응 표(Table 3-1-28 참고)에 따른 델타 통계량에 의하면 목적변수인 DH와 NR의 경우에는, 압력, 혼합효소의 첨가량, 반응온도 및 반응시간의 순서로 영향을 미치며, 반면에 수율의 경우에는 반응시간, 복합효소의 농도, 압력 및 반응온도의 순서로 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

Table 3-1-28 SN 비에 대한 반응 표.

반응변수	수준	Pressure	Temperature	Time	Mixed enzyme
DH	1 수준	24.71	26.28	26.83	25.20
	2 수준	27.63	26.76	26.58	27.64
	3 수준	27.63	26.93	26.56	27.12
	델타*	2.93	0.65	0.27	2.44
	순위	1	3	4	2
NR	1 수준	33.97	35.54	36.00	34.58
	2 수준	36.92	36.33	36.05	37.13
	3 수준	37.14	36.16	35.98	36.32
	델타	3.17	0.79	35.98	36.32
	순위	1	3	4	2
Yields	1 수준	35.85	36.15	37.28	35.85
	2 수준	36.92	36.79	36.92	36.47
	3 수준	37.08	36.92	35.66	37.53
	델타	1.23	0.77	1.62	1.68
	순위	3	4	2	1

* : 최고수준 - 최저수준

- Fig. 3-1-26은 각 설계변수의 수준 변동에 따른 SN비의 변화로 직교배열에서 각 설계변수가 갖는 동일 수준의 SN비 평균값을 도시한 것으로 각 그래프의 가장 큰 값이 최적 수준을 의미한다. 또한 점선은 목적변수별 SN비 전체 평균을 의미한다. 따라서 SN비로 목적변수를 최대화하는 공정조건을 결정하면, DH의 경우에는 압력 75~100 MPa, 반응온도 60℃, 반응시간 12 hrs, 복합효소농도 1%이고, NR의 경우에는 압력 100 MPa, 반응온도

50°C, 반응시간 12 hrs, 복합효소농도 1%이며, 수율의 경우에는 압력 100 MPa, 반응온도 60°C, 반응시간 12 hrs, 복합효소농도 2%이다.

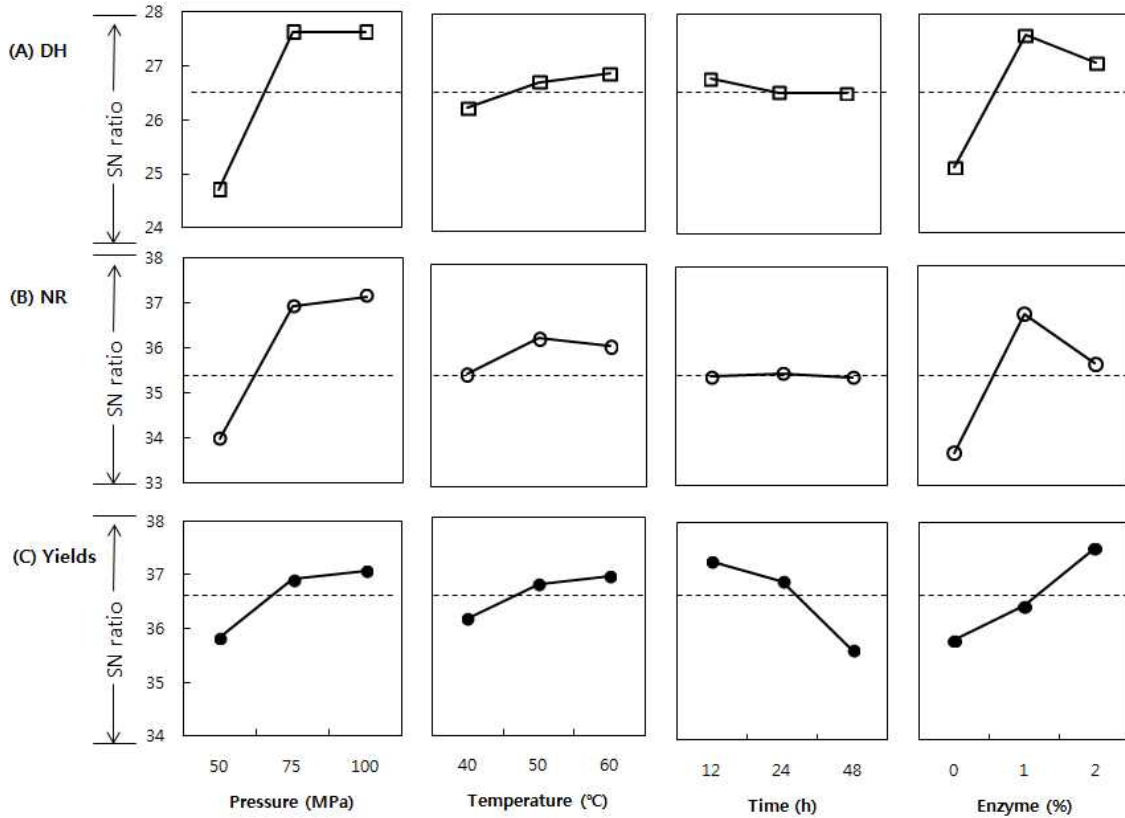


Fig. 3-1-26. Means of SN ratios and optima of design variables (circles) according to degree of hydrolysis (DH, %), nitrogen recovery (NR, %) and yields (%), respectively. * --- : average of SN ratio.

- 한편 Minitab의 분산분석 중 일반선형모형을 이용하여 각각의 특성치에서의 SN비에 대한 분산분석의 결과(Table 3-1-29 참조), 분산분석표에서 DH와 NR의 경우에는 변동이 작은 반응온도와 반응시간을 오차 변동으로 처리하였다. F 검정의 결과, DH에 대한 압력과 혼합효소의 첨가량의 F 값이 각각 42.12, 24.41이다. 그리고 압력과 혼합효소의 첨가량의 p 값이 각각 0.002, 0.006이다. 따라서 압력과 혼합효소의 첨가량은 신뢰도 95%, 유의수준 5%에서 p 값이 0.05보다 작아 통계적으로 유의하였다. NR의 경우에는 유사한 경향을 나타냈지만 수율의 경우에는 설계변수 모두가 p 값이 0.05보다 커서 통계적으로 유의함을 보여주지 못하였다. 이러한 사실은 수율을 목적변수로 선정하는 것은 제고할 필요가 있음을 보여준다.

Table 3-1-29. Analysis of variance for SN ratios.

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

¹⁾Degree of freedom, ²⁾Sum of squares, ³⁾Mean square, ⁴⁾F-value, ⁵⁾P-value.

(다) 확인시험

○ 3 가지 목적 변수와 경제성 및 장치의 성능(온도 60℃와 압력 100 MPa은 현 장비로서는 한계치)을 고려하여 최적 조건으로 압력을 75 MPa, 반응온도 50℃, 반응시간 12 hrs, 복합효소농도 1%로 설정하여 예측한 값과 이 조건으로 3회 반복 실험한 값을 비교하였다 (Fig. 3-1-27 참조).

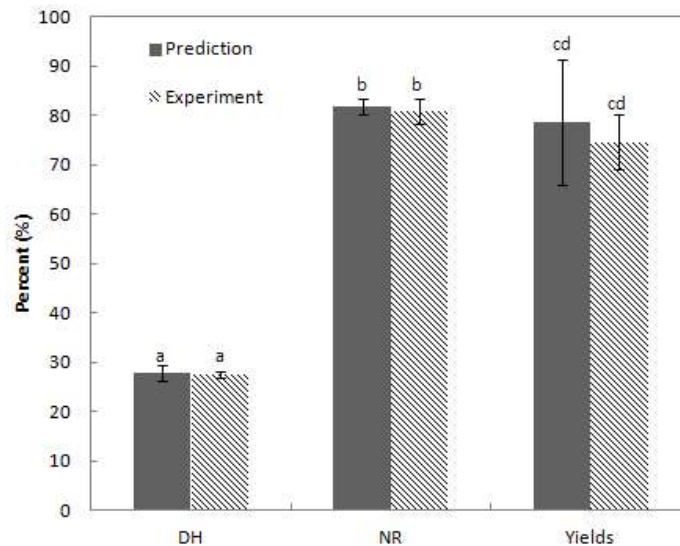


Fig. 3-1-27. Comparison of optimal condition (Pressure; 75 MPa, Temperature; 50℃, Time; 12 hrs, and Mixed enzyme; 1%).

○ Fig. 3-1-27에서와 같이 NR 및 DH의 경우에는 최적 조건에서 예측한 값과 실험값이 매우 근사하였지만, 수율의 경우에는 95% 신뢰수준에서 유의적인 차이를 보여 다구찌 실험 설계 분석의 타당성을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 다구찌 설계분석에서 수율을 목적 변수로 설정하기에 부족하다는 결과와 일치한다.

(라) 품질특성 및 개선 효과

○ 도출된 최적 조건에서 제조된 생멸치 고압가수분해물과 시판 멸치 어간장 및 액젓의 품질특성으로 Table 3-1-30에는 일반성분, pH, 염도 및 수용성 고형분 함량을 나타내는 °Brix를 측정하여 나타내었고, Table 3-1-32에는 유리아미노산을 측정하여 나타내었다.

Table 3-1-30. Some properties and proximate analysis of two commercially available anchovy sauce and pressure-assisted enzymatic hydrolysates at optimal conditions.

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

¹⁾Values are the means±SD of three determinations.

○ Table 3-1-30에서와 같이 가수분해물의 염도는 0.73±0.01이지만, 이를 수분 함량을 유사하게 농축한다는 가정 하에 계산하면 염을 가하지 않고도 어간장 및 액젓과 유사한 단백질 함량의 생멸치 가수분해물을 생산할 수 있으며, 농축 여부에 따라서 품질기준을 조절할 수 있으리라 판단하였다.

○ Table 3-1-31에서와 같이 고압효소가수분해물에서 풍미 또는 짠맛증진성분으로 알려진 (Schindler et al., 2011; Yun et al., 2015) glutamine, arginine, glycine 등과 lysine 및 tryptophan이 각각 2935.50, 2701.13, 1206.70, 3249.80 및 5323.76 mg/L으로서 시판 멸치 어간장 및 액젓에서 보다 총량으로 각각 3.1, 2.3배 이상 풍부한 것으로 나타나, 가수분해물의 풍미증진제로서의 가능성을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라 필수 아미노산의 경우에도 총량 기준으로 시판 멸치 어간장 4배, 액젓보다 1.3배 더 풍부하여 영양적인 가치 역시 고압효소가수분해물이 우수하였다.

○ 고압에서의 효소가수분해에 대한 성능 개선 효과를 분석하기 위하여 대조군으로 상압에서 혼합효소 2%를 가하여 30시간 동안 가수분해를 실시하여 가수분해물에 대한 총 질소, Formol 법과 TNBS 법에 의한 아미노태 질소와 Lowry 법에 의한 수용성 단백질 내의 질소 함량을 측정한 후에 가수분해도를 산출한 결과(Fig. 3-1-28 참조), 상압에서의 효소

가수분해 반응은 24시간 부근에서 종료되는 것으로 나타났으며, 최대 가수분해도는 18±1.3%에 이르렀다. 최대 가수분해도를 기준으로 고압효소가수분해반응의 성능 개선 효과를 비교한 결과, 최적 조건에서의 가수분해도는 27.47%로서 성능 비교 지표로 선정하였던 상압효소가수분해의 DH 값인 18%±1.3%보다 52.6%의 개선 효과를 확인할 수 있었다.

Table 3-1-31. Free amino acid compositions of two commercially available anchovy sauce and pressure-assisted enzymatic hydrolysates at optimal conditions

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

¹⁾Values shown are the average from two replicates.

²⁾Essential amino acid.

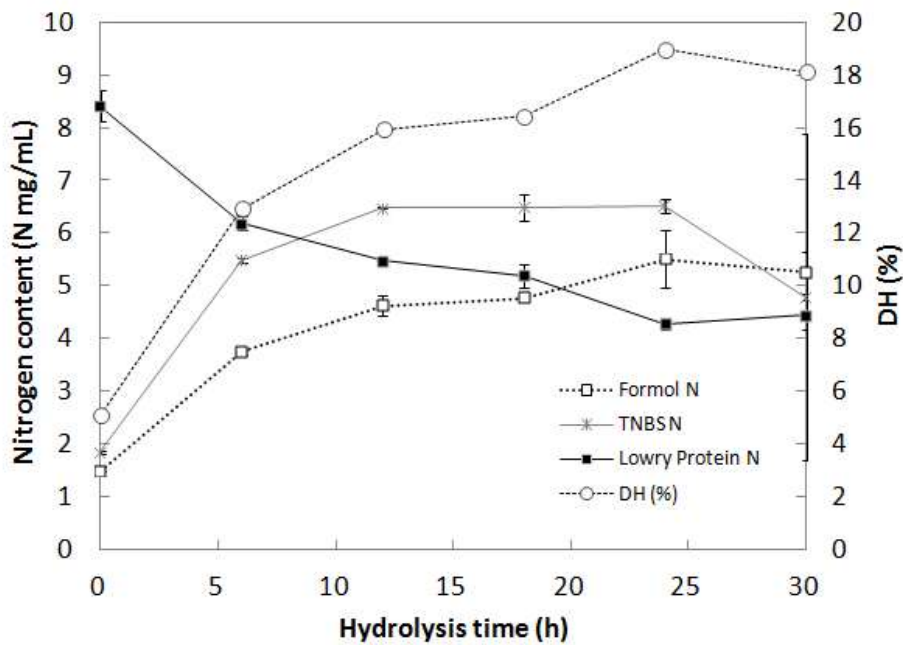


Fig. 3-1-28. Changes in formal nitrogen, TNBS nitrogen, Lowry protein nitrogen, and degree of hydrolysis (DH, %) during enzymatic hydrolysis of raw anchovy under atmosphere at 50°C as a control. *Values are the means±SD of three determinations.

(4) 결론

- 본 연구는 멸치 고압효소가수분해물의 산업화 생산 공정을 개발하기 위한 기초연구로서 다구찌 기법을 사용하여 고압과 효소를 이용하는 멸치 고압효소가수분해 공정의 운전 조건을 최적화 하고, 최적화 공정 조건으로 가수분해물을 생산하여 품질특성 및 성능치의 개선 효과를 산출함으로써 신뢰성을 검증하였다.
- 다구찌 기법의 망대특성과 L_9 직교배열을 사용한 실험계획을 통하여 멸치 고압효소가수분해물의 특성치를 최대화시키는 공정 조건으로, DH의 경우에는 압력 75~100 MPa, 반응 온도 60°C, 반응시간 12 hrs, 복합효소농도 1%이고, NR의 경우에는 압력 100 MPa, 반응 온도 50°C, 반응시간 12 hrs, 복합효소농도 1%이며, 수율의 경우에는 압력 100 MPa, 반응 온도 60°C, 반응시간 12 hrs, 복합효소농도 2%이었다.
- 최적 조건에 대한 확인 실험으로 압력을 75 MPa, 반응온도 50°C, 반응시간 12 hrs, 복합 효소농도 1%로 설정하여 예측한 값과 실험값을 비교한 결과, 잘 일치함으로써 최적 조건의 신뢰성을 확보함을 확인하였다.
- 최적화 조건을 적용하여 생산한 멸치 고압효소가수분해물은 시판 멸치 어간장 및 액젓보다 더욱 풍부한 풍미증진 유리아미노산을 함유하고 있었으며, 필수아미노산 역시 풍부하

었다. 뿐만 아니라 상압 조건에서의 가수분해물보다 가수분해도가 52.6% 이상 증진되었다.

나. 1차 Scale up

(1) 시험생산

- Lab 규모 생산에서 멸치 10 kg을 한 배치로 하는 pilot 규모로 생산하기 위하여 시행착오를 거치면서 공정 개발 방향 및 방법을 도출하였다.
- 현재는 냉동 멸치를 원료로 사용하지만 실제 생산에 있어서는 수확한 멸치를 바로 사용하는 경우도 고려해야 하므로 공정 개발 시에 세척조, 동결 원료 및 생멸치를 바로 mincing할 수 있는 시스템을 고려해야 할 것이며, 생멸치를 사용하는 경우에 가열처리와 효소처리의 유무 등도 고려해야 한다.
- 제품의 위생적 처리를 고려하고 제품의 extension을 생각하면, 세척과 mincing 공정 사이에 가열 공정을 고려할 필요가 있음을 판단하였다.
- 고압 처리 시스템으로 현재 활용 가능한 규모는 1 L, 5 L, 30 L, 50 L 및 250 L 크기의 장비를 국내 기술로 제작 가능하며, (주)이노셀 코리아의 0~250 MPa, 0~75℃에서 장시간 처리 가능한 30 L 크기의 고압 시스템 2 대를 활용할 수 있음을 확인하였다.
- 고압 처리 전에 tank에서 효소를 첨가하고 pouch에 주입, 밀봉하는 공정이 필요성이 제시 되었다.
- 고압 처리 후 효소반응을 종결하기 위한 가열공정과 급냉 및 저온에서의 숙성(24 시간 이내)을 위한 공정, 최소 가공기술을 이용한 지방 성분 및 불순물 제거 공정의 필요성 및 원심분리 또는 여과 공정은 연속식 원심분리기를 활용하면 여과 공정을 생략하여도 됨을 확인하였다.
- 필요에 따라 분리·정제/탈색 및 탈취/탈염 공정 개발의 필요성도 대두 되었다.
- 소재화에 따른 제형화 공정/살균 공정/포장 공정 등이 개발 되어야 한다.

(2) Pilot 규모의 생산을 위한 공정개선

- 시험 가능한 현존 pilot plant 규모의 시스템에서 APH(멸치 고압효소가수분해물)를 제조하기 위하여 Lab 규모 공정을 Fig. 3-1-29와 같이 전처리 공정에서 colloid mill을 사용하여 grinding하고, 후처리 공정에서 여과공정을 연속식 원심분리기를 사용하여 여과하는 공정으로 개량하였다

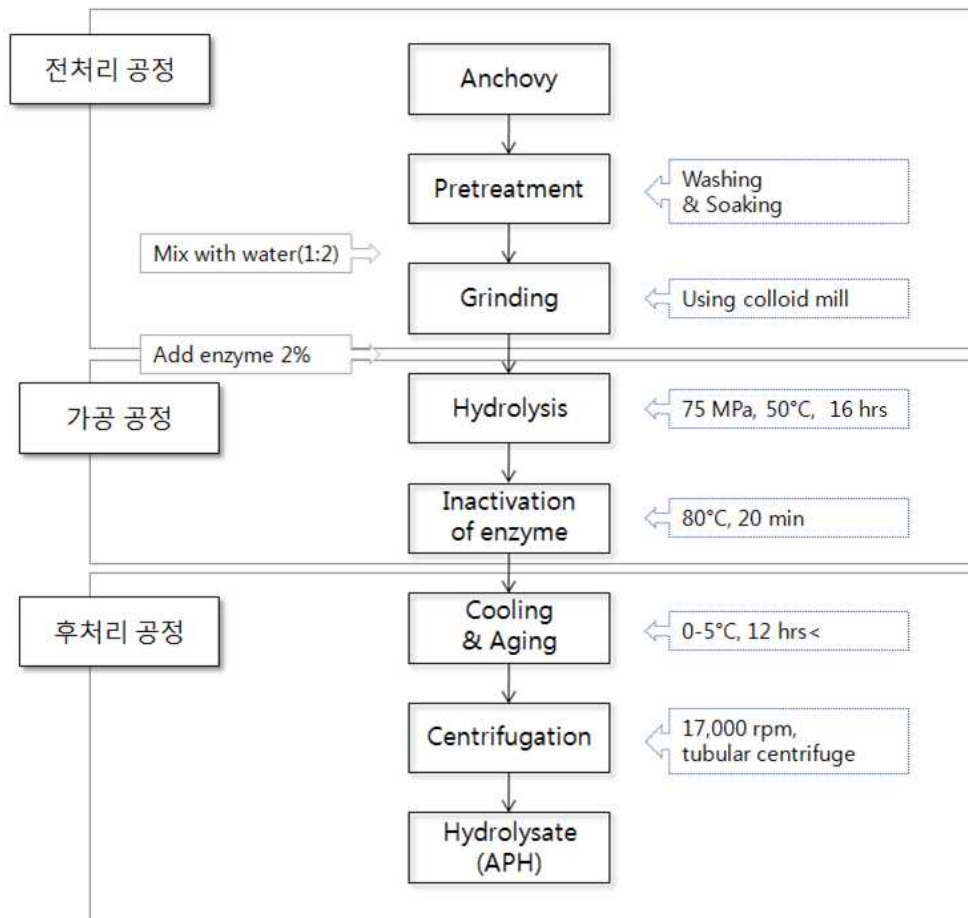


Fig. 3-1-29. Pilot plant scale system을 이용한 멸치 가수분해물 제조 공정도.

- 다음 단계의 기술 및 공정개발 연구에서는 물질수지(mass balance)와 이화학적 특성을 바탕으로 각 단위 공정을 개발하고 운전 조건을 확립하는 실험을 실시하였다.

다. Pilot scale에서 eHAP 제조기술 및 단위공정 개발

- 직전 연구에서 개량 제시된 pilot plant scale system에서의 APH 제조공정을 현존하는 시스템에 적용하여 생산, 시험 결과를 물질수지 및 시험자료를 이용하여 분석 제시하였고, APH의 짠맛 증진 소재 또는 천연액상조미료의 소재로 생산하기 위한 분리·정제, 탈색·탈취, 탈염, 살균, 그리고 제형화 공정을 각 공정별로 운전 조건에 따른 물질수지와 이화학적 특성을 분석하여 운전조건을 설정하고 이에 따른 상업용 규모의 통합공정으로 제조 기술을 개발하고자 하였다.

(1) 정제 및 분획 공정개발

(가) 서론

○ (주)일신에서 제작하여 (주)이노셀코리아에 있는 30 L 규모의 고압처리 시스템을 활용하여 멸치 고압효소가수분해물을 pilot 규모로 생산 후, 정제 및 분획을 한외 및 나노여과 시스템(pilot 규모)으로 실시하고, 물질수지 및 이화학적 특성을 분석하여 scale up 과정에서의 문제점 및 개선방향을 도출하고 이를 개선하여 정제 및 분획공정을 확립하고자 하였다.

(나) 실험 재료 및 방법

① 재료 및 시약

○ Lab scale 실험과 동일한 멸치, 효소 및 시약을 사용하였다.

② 멸치고압효소가수분해물(APH) 제조

○ 멸치 10 kg을 다음 Fig. 3-1-29의 절차에 따라 Fig. 3-1-30과 같이 최적 운전조건에서 고압효소가수분해를 실시하고, 일부는 분석용 시료는 동결 건조하고 나머지는 바로 분리·정제를 실시하였다.



Fig. 3-1-30. 멸치고압효소가수분해물의 Pilot scale 생산 과정

③ Membrane process에 의한 분리·정제물 제조

- 한외 여과(UF) 시스템 ; 실험에 사용된 한외여과 시스템(Fig. 3-1-31, Proflux M60 Tangential flow filtration system, Millipore, USA)의 최대 용량은 30 L (launching tank 27 L + dead volume 3 L)이다. 한외여과 시스템에 사용된 막(Pellicon 2 cassette Biomax 5)은 polyethersulfone으로 이루어져있으며, membrane area는 0.5 m², pore size는 5,000, 한계 pH는 2-14, 그리고 한계 온도는 4-50°C이다. Membrane의 water flux는 Table 3-1-32 과 같다.



Fig. 3-1-31. 실험에 사용된 한외여과 시스템 (Lab U/F system [10 kDa]과 Proflux M60 Tangential flow filtration system [5 kDa]).

Table 3-1-32 실험에서 사용한 한외여과막의 water flux.

Membrane Type	Average time to flush 70 L/m ² at pressure indicated time pressure			Average water flux	
	Minutes	psi	Bar	LMH/psi	LMH/Bar
Biomax-5	28	30	2	5.0	73

- 나노 여과(NF) 시스템 ; 실험에서 사용된 나노여과 시스템(Prolab system, Millipore, USA, Fig. 3-1-32)의 최대 용량은 5 L (launching tank 4.5 + dead volume 0.5 L)이다. 나노여과 시스템에 사용된 막(Helicon-RO4, Millipore, USA)은 polyamide (65% retention in NaCl)로 이루어져 있으며, diameter가 4.6 cm, length는 30.5 cm, area는 0.37 m², 한계 pH는 4-10, 한계 온도는 4-50°C, 그밖에 최적화된 작동 조건은 Table 3-1-33와 같다.



Fig. 3-1-32. 실험에 사용된 나노여과 시스템(Prolab system [250 Da]).

Table 3-1-33 실험에서 사용된 나노여과 시스템의 최적화된 작동 조건.

Membrane Type	crossflow rates	Maximum feed side pressure drop	Maximum reverse pressure	Feed pressure range	
				Recommended	Maximum
	L/min	psi	psi	psi	psi
Helicon-RO4	4	4	5	70-400	600

- 한외여과(10 kDa 그리고 5 kDa) 및 나노여과(250 Da)는 Fig. 3-1-33의 순서로 진행하여,
 - 1차 분획 ; 멸치 고압가수분해물을 원심분리하여 얻은 상층액인 APH를 한외여과막(MWCO 10 kDa)에 temperature $T = \text{room temperature}$, transmembrane pressure $TNP = 10 \text{ psi}$, $\Delta P = 10 \text{ psi}$, 그리고 pump speed = 25%의 조건으로 통과시켜 cut off시켰다. 한외여과막(MWCO 10 kDa)에 의해 분리된 10 kDa retentate 시료 (APHU-1)와 permeate 시료는 각각 deep freezer(-70°C)에서 24 시간 동결시킨 후, 동결건조시켜 냉동상태(-20°C)로 보관하면서 분석 및 분리정제 공정 개발의 원료로 사용하였다.
 - 2차 분획 ; 동결건조된 10 kDa permeate 시료는 물에 1:10 비율로 용해시킨 뒤, 한외여과막(MWCO 5 kDa)을 temperature $T = \text{room temperature}$, transmembrane pressure $TNP = 10 \text{ psi}$, $\Delta P = 10 \text{ psi}$, 그리고 pump speed = 25%의 조건으로 통과시

켜 cut off시켰다. 한외여과막(MWCO 5 kDa)에 의해 분리된 시료 중 5 kDa retentate(APHU-2) 시료는 deep freezer (-70°C)에서 24 시간 동결시킨 후, 동결건조시켜 냉동상태(-20°C)로 보관하면서 분석 및 분리정제 공정 개발의 원료로 사용하였다.

- **3차 분획** ; 한외여과막(MWCO 5 kDa)에 의해 분리된 5 kDa permeate 시료는 나노여과막(MWCO 250 Da)을 temperature $T = \text{room temperature}$, feed pump speed = 6, 그리고 pump pressure = 140 psi의 조건으로 cut off시켰다. 나노여과막(MWCO 250 Da)에 의해 분리된 retentate(APHN-1)와 permeate(APHN-2) 시료를 각각 일정량 확보하여 동결건조한 후, 냉동상태(-20°C)로 보관하면서 분석 및 분리정제 공정 개발의 원료로 사용하였다. 이 때, APHN-1 시료($250 \text{ Da} \leq \text{MW} < 5 \text{ kDa}$)의 일부를 사용하여 동일 시스템에서 탈염 및 농축 시험을 실시하였다. 분획물들의 이름은 각각 APHU-1($10 \text{ kDa} \leq \text{MW}$), APHU-2($5 \text{ kDa} \leq \text{MW} < 10 \text{ kDa}$), APHN-1($250 \text{ Da} \leq \text{MW} < 5 \text{ kDa}$), 그리고 APHN-2($\text{MW} < 250 \text{ Da}$)로 명칭 하였다.

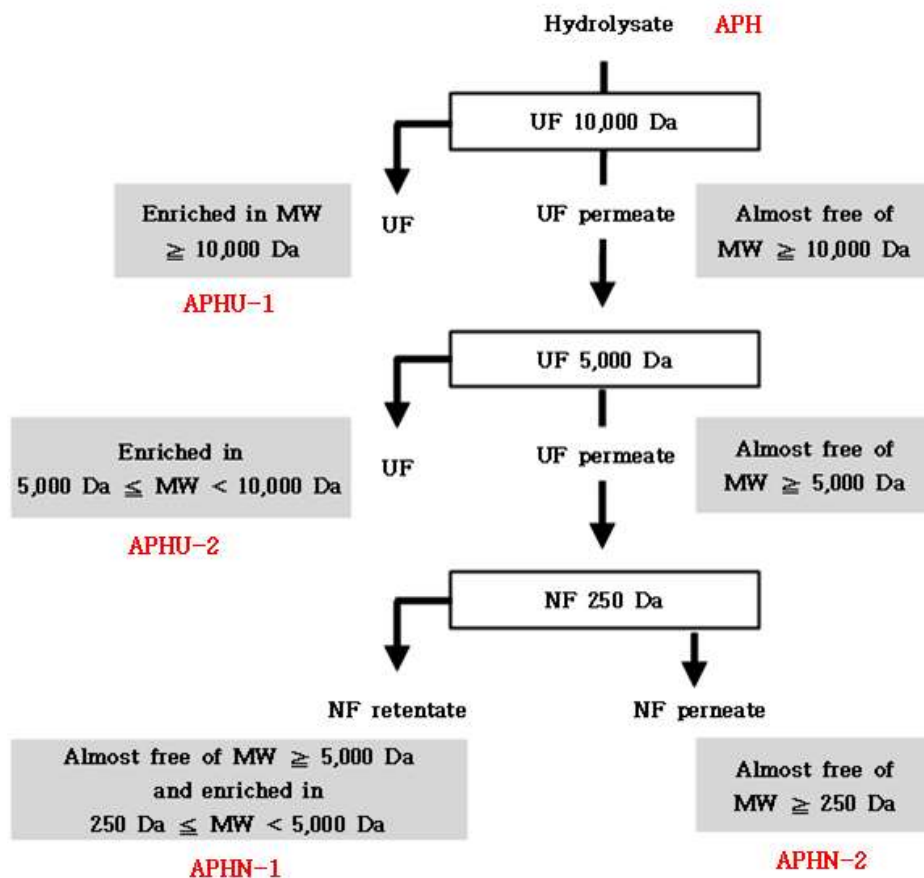


Fig. 3-1-33. Ultra filtration - Nano filtration sequence.

④ Mass balance calculations

○ 원재료 및 멸치 가수분해 전과 후, 그리고 공정 전 과정(아래의 각 step)에 있어 무게와 질소함량, 수분 또는 total solids 함량을 측정하였다.

- 멸치, 물, 그리고 효소의 무게

- 가수분해물의 무게
- 원심분리 후 상층액의 무게
- 가수분해물(원심분리 전)의 조단백 함량(Kjeldahl)
- 원심분리 후 waste의 조단백 함량(Kjeldahl) 및 수분함량
- APH의 조단백 함량(Kjeldahl)
- APH의 solids 함량(drying at -84°C until constant weight)
- APH를 10 kDa 한외여과막에 통과한 후의 시료의 무게
- 10 kDa permeate 시료를 5 kDa 한외여과막에 통과한 후의 시료의 무게
- 5 kDa permeate 시료를 250 Da 나노여과막에 통과한 후의 시료의 무게

⑤ Centrifuging Index for Protein (CIP)

○ Centrifuging index of protein(CIP)는 가수분해 후에 달성된 단백질 용해 정도를 나타내는 값으로 pH 조절 없이 측정한다. 원심분리 전 후에 시료를 취해 각각에서 질소함량을 측정하여 아래와 같이 %로 나타낸다. 원심 분리 조건에 따른 제한 용해도라 할 수 있다.

$$CIP(\%) = \frac{\text{원심분리 후 } N\text{함량(상등액 } 1\text{ml 당)}}{\text{원심분리 전 } N\text{함량(APH } 1\text{ml 당)}} \times 100$$

⑥ 분석방법

- 시료의 일반성분 및 이화학적 특성은 lab scale 실험과 같은 방법을 사용하였으며, 시료의 구성 아미노산과 유리 아미노산을 정량분석하기 위하여 직접 실험하고, 나트륨 함량을 측정하였다.
- 구성 및 유리 아미노산 분석 조건은 Table 3-1-34에 정리하였다.

Table 3-1-34 구성/유리 아미노산 분석 조건.

	Conditions	
	구성 아미노산	유리 아미노산
HPLC 기기	Ultimate 3000(Thermo Dionex, USA)	
FL Detector	Emission 450 nm, Excitation 340 nm(OPA)	
	Emission 305 nm, Excitation 266 nm(FMOC)	
UV Detector	338 nm	
표준품	1 nmol/uL Amino acids 17종 std (0.1 N-HCL 용해) 및 추가 6종	1 nmol/uL Amino acids 17종 std (0.1 N-HCL 용해)
Column	Inno C18 column(4.6 mm x 150 mm, 5 μm/Youngjinbiochrom, Korea)	
Mobile Phase A	Na ₂ HPO ₄ 10 mM, Na ₂ B ₄ O ₇ 10H ₂ O 10 mM, pH 8.2	20 mM Sodium phosphate monobasic, pH 7.8
Mobile Phase B	3D.W. / Acetonitrile / Methanol(10 : 45 : 45 v/v%)	
Injection Volume	1 μL	0.5 μL
Column Temperature	40°C	
Sample Temperature	20°C	

- 시료에 함유된 Sodium (Na) 함량을 정량 분석하기 위하여 제 1협동에 의뢰하여 ion chromatography 분석을 실시하였다. 1×10^{-2} -fold로 준비된 시료(w/v)를 1×10^{-4} -fold로 한 번 더 희석하여 syringe filter (0.20 μm)에 여과 한 후, 1 mL을 검액으로 사용하였다. 검액은 IC (Ion Chromatography, Dionex ICS-900, Termo scientific, Japan) 장치가 안정화 (10 min) 된 후에 사용하였고, 유출속도 1 mL/min, 압력 1,200-1,400 psi, 그리고 전류 60 mA의 조건하에서 분석을 실시하였다. 또한 시료가 바뀔 때마다 증류수로 세척 후 실험을 진행하였다.

(㉔) 실험결과 및 고찰

① APH pilot 규모 생산 공정의 개선

- 냉동멸치는 냉장온도(4°C)에서 해동되었으며, 이 후 10-15°C에서 1 시간 동안 침지 및 수세과정을 통하여 탈염 및 불순물 제거가 진행되었다. 본 실험에서는 내장을 포함한 전체 멸치를 사용하였다. 상업적 공정에서는 생멸치를 수세하여 직접 원료로 사용하거나, 어류 가공 부산물을 원료로 사용할 수 있도록 세척조와 가열 시스템이 필요함을 확인하였다.
- 고압 효소 분쇄과정에서 효소가 기질에 용이하게 작용할 수 있도록 멸치 분쇄물의 입자를 100 μm 이하로 감소시키기 위하여 2 단계의 분쇄를 실시하였다. 1차 분쇄는 멸치와 멸치 중량의 2 배의 물을 가정용 믹서에 첨가한 후, 2 분간 3 회 진행(2 분 분쇄 후에는 2 분씩 휴식)되었으며, 이 후 입자의 평균 크기는 약 1,000 μm 이하로 감소되었다. 2차 분쇄는 입자의 크기를 100 μm 이하로 감소시키기 위하여 콜로이드밀(Super masscolloider, ZA10-15J, Masuko sangyo, Korea)을 사용하였다. 기존 장비의 한계로 본 연구에서는 멸치와 물의 비율을 1차년도에 설정하였던 1 : 2 비율로 실험을 진행하였지만, 실제 산업화 되었을 경우에 경제성을 고려한다면 물의 양을 줄였을 때에도 가수분해가 성공적으로 잘 이루어질 수 있도록 효율적으로 분쇄 및 혼합할 수 있는 시스템이 필요하고 가수 여부를 판단하는 비교 평가 실험이 필요함을 확인하였다.
- 전처리 과정을 거친 멸치 분쇄물은 혼합효소(Alcalase : Flavourzyme = 1 : 5)를 멸치 분쇄물 중량의 2%를 첨가하여 2 kg 단위로 파우치에 넣어 밀봉하였다. 통합 공정을 고려하는 경우에는 분쇄 및 혼합시스템에서 효소 첨가가 이루어 질 것이며 **in-line 상태로 주입-밀봉** 되어야 한다. 본 실험에서는 혼합효소의 양을 1차년도에 선정하였던 멸치 분쇄물 중량의 2%(E/S 약 2%)로 실험을 진행하였다. 하지만 Aristotelis(2011)과 Bhumiratana(1977)는 고형분 표면에 흡착되는 효소의 양이 adsorption isotherm(흡착등온선)에 달려있기 때문에 가수분해율은 효소의 양에 정비례하지 않는다고 보고한바 있다. 따라서 경제성을 고려하여 물의 양과 더불어 효소의 양도 줄일 수 있는 시스템에서 최적화 실험을 진행하여 생산 조건을 개선할 필요가 있다.

- (주)이노셀코리아의 상업용 고압시스템(Fig3-1-34)에서 50℃, 75 MPa의 압력 조건 하에서 시료를 16 시간 동안 고압 처리하였다. 이 과정은 용량에 따라 증설 가능하다. 한 배치당 최대 규모는 350 L 장비까지 국내 생산이 가능한 것으로 조사 되었다. 현 장비는 온도 및 압력이 올라가고 내려가는 시간이 최적 장비에 비하여 비효율적이나 이 역시 개선 가능하다.



Fig. 3-1-34. 30 L 고압처리 시스템((주)이노셀코리아).

- 효소를 불활성화 시키기 위하여 80℃에서 35 분간 과정을 거쳤지만 가열 처리 시스템을 잘 갖춘다면 20 분으로 충분한 처리시간이다. 처리 후에 급냉하여 24 시간동안 냉장보관(4℃)하여 숙성시킨다. 상업적 공정에서는 매우 익숙한 공정으로 설치 가능하다.
- 급냉과 저온 숙성은 지방 성분 제거에 필수 공정으로 가수분해물의 품질에 매우 중요한 공정이다. 따라서 지방 성분을 제거하는 효율적 공정이 필요하다. 본 실험에서는 저온 숙성 후에 고화되어 떠있는 지방을 제거하였다.
- 다음 공정은 여과 및 원심분리 공정으로 lab scale에서 filter paper를 이용하여 pre-filtration 하였던 공정을 scale-up 연구에서는 스타킹을 이용하였지만, 본 실험에서는 연속식 원심분리기(Tubular centrifuge, A-V10675G, Tomoe engineering, Japan, 17,000 rpm)를 이용하여 원심 분리한 결과 여과 공정은 생략가능 하였다. 하지만 dead volume에 의한 손실을 고려하여 대체 공정의 개발이 필요하다.
- APH에 함유된 구성 아미노산에 대한 정성 및 정량 분석 결과로서 HPLC 크로마토그램을 Fig. 3-1-35에 함량은 동결건조물 kg당 mg(mg/kg)으로 Table 3-1-35에 나타내었다. 존재하는 asparagine과 glutamine은 구성아미노산에서는 모두 asparagine acid와 glutamine acid로 전환된 것으로 판단되었고, tryptophane은 검출되지 않았다.

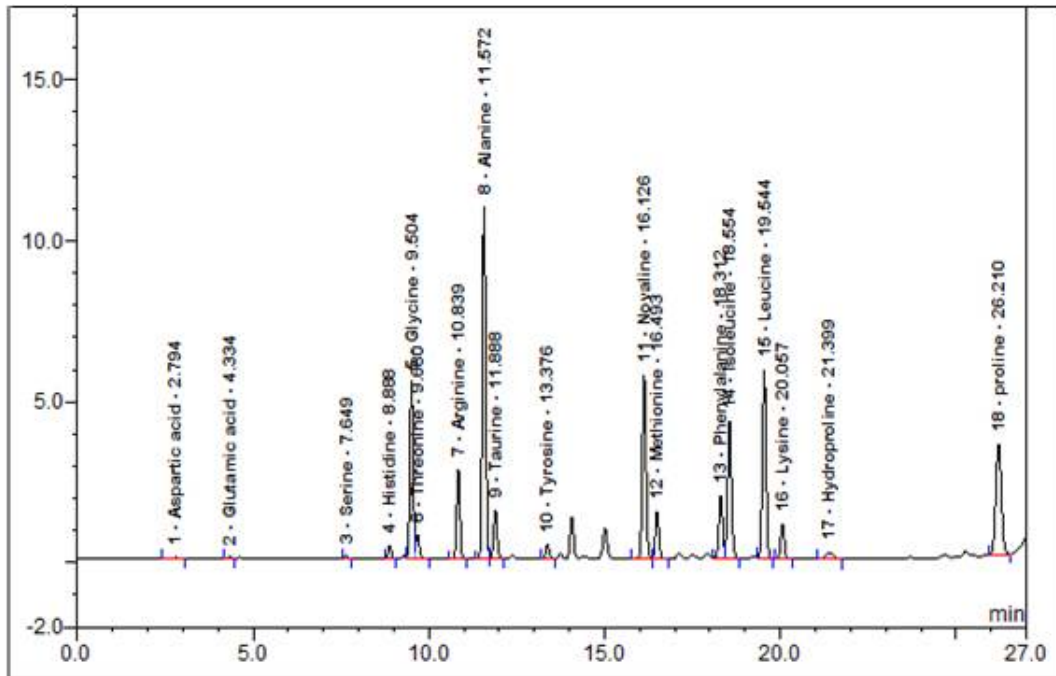


Fig. 3-1-35. APH에서 구성아미노산의 HPLC Chromatogram.

Table 3-1-35. APH에서 구성아미노산의 함량

(mg/kg)

No.	Ret.Time	PeakName	Height	Area	Rel.Area	Amount
	min		LU			
1	2.79	Aspartic acid	0.059	0.014	0.23	860.897
2	4.33	Glutamic acid	0.068	0.007	0.12	542.059
3	7.65	Serine	0.104	0.012	0.21	525.731
4	8.89	Histidine	0.417	0.045	0.77	5166.471
5	9.50	Glycine	5.514	0.621	10.71	18294.064
6	9.68	Threonine	0.760	0.082	1.41	4598.326
7	10.84	Arginine	2.795	0.312	5.38	20143.196
8	11.57	Alanine	10.958	1.247	21.51	44303.244
9	11.89	Taurine	1.522	0.186	3.21	7551.130
10	13.38	Tyrosine	0.434	0.048	0.82	3912.426
11	16.13	Novaline	5.698	0.687	11.85	22076.667
12	16.49	Methionine	1.466	0.178	3.07	9231.835
13	18.31	Phenylalanine	1.944	0.245	4.23	14594.773
14	18.55	Isoleucine	4.286	0.554	9.57	24941.859
15	19.54	Leucine	5.860	0.726	12.52	32930.612
16	20.06	Lysine	1.076	0.138	2.37	36236.801
17	21.40	Hydroproline	0.198	0.050	0.86	1462.020
18	26.21	proline	3.449	0.646	11.15	20034.288
Total:			46.609	5.796	100.00	267406.400

○ 멸치로부터 APH로의 단백질 추출 효율은 CIP 값을 계산하여 Table 3-1-36에 나타내었다. 한 배치당 멸치에 함유된 단백질 함량은 51.90 g/생멸치 kg이다. 따라서 한 배치의 분쇄 혼합된 시료의 총 단백질 양은 1307.68 g이었으며 이 중 830.43 g의 단백질이 가수분해물에 soluble한 상태로 존재하였다. 따라서 단백질 추출 효율은 63.50%가 된다. 이 값으로부터 본 연구를 통해 개발된 공정이 매우 효율적임을 확인할 수 있었다.

Table 3-1-36. Protein solubilization for pilot-plant hydrolysates

	Anchovy/water(1:2)
Protein concentration of washed Anchovy (g/kg)	51.90
Soluble protein/total protein (%)	63.50

○ 본 생산 과정의 물지 수지는 Fig. 3-1-36과 같다. 멸치 11 kg과 물 22 kg에 멸치 중량의 2%인 0.22 kg의 효소를 첨가하여 고압가수분해를 시킨 후에 제조된 가수분해물의 무게는 25.18 kg이다. 이 무게는 가수분해 후, 24 시간 숙성을 거친 다음 측정된 무게이다. 처음 주입된 멸치와 물의 양(대략 33 kg) 보다 가수분해물의 무게가 줄어든 이유는 1) 1차 분쇄와 2차 분쇄를 하는 과정에서 어느 정도의 손실이 생겼고, 2) 고압 가수분해(16 시간) 후에 inactivation하는 과정에서 파우치를 sealing 한 부분이 열에 의해 손상되어 손실이 발생하였다. 즉 1차 손실률은 23.7%이었다. 이는 좀 더 효율적으로 개선이 가능한 포인트가 되리라 예상되었다.

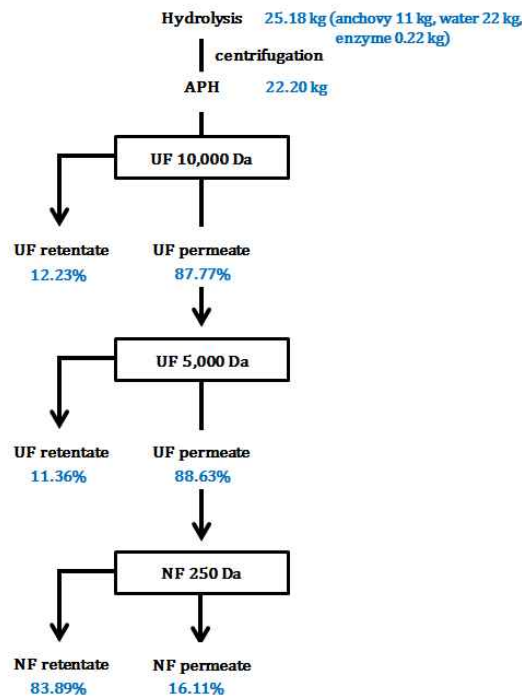


Fig. 3-1-36. Mass-balance calculations for the production of the soluble Anchovy protein hydrolysate.

- 가수분해물(25.18 kg)로부터 연속식 관형 원심분리기를 이용하여 상층액인 APH(22.2 kg)를 얻었다. 22.2 kg을 한외여과 시스템(MWCO 10 kDa)을 통하여 분리 및 정제하였는데, 10 kDa retentate 시료와 permeate 시료의 비율은 각각 12.23%와 87.77%였다. 이 비율은 각각의 시료를 동결건조하여 얻은 분말 무게를 이용하여 측정하였다. 그 이유는 pilot plant scale의 한외여과 시스템을 이용하였기 때문에 기기를 작동시키기 위해서는 탱크에 일정량 이상의 액상물질이 담겨 있어야하고, dead volume을 고려하여 시료가 1 L 이하로 남았을 때에는 물을 넣어 관에 남아있던 시료를 밀어주었기 때문에 처음 주입한 양보다 여과시스템을 통과하여 얻은 시료의 양이 더 많았다. 따라서 시료들을 동결건조하여 얻은 분말로 비율을 측정하였다.
- 10 kDa permeate 시료를 한외여과 시스템(MWCO 5 kDa)을 이용하여 2차 분획하였다. 그 결과 5 kDa retentate 시료와 permeate 시료의 비율은 각각 11.36%와 88.63%였다. 무게 측정방법은 1차 분획 때와 마찬가지로 동결된 시료의 무게로 측정하였으며, 1차 분획 때와 마찬가지로 permeate 시료가 retentate 시료보다 4 배 이상의 비율을 차지하였다.
- 5 kDa permeate 시료를 나노여과 시스템(MWCO 250 Da)을 이용하여 3차 분획한 결과 250 Da retentate 시료와 permeate 시료의 비율은 각각 83.89%와 16.11%였다. 1차와 2차 분획 때와는 달리 retentate(APHN-1에 해당) 시료의 비율이 permeate 시료의 비율보다 4 배 이상 높았으며, 총 분획물(APHU-1, APHU-2, APHN-1, 그리고 APHN-2) 중에 가장 높은 비율 및 수율을 차지하였다.

② 한외여과와 나노여과로 분리한 분획물의 수율

- 제조된 APH를 한외/나노 여과시스템을 통해 분획, 농축하고 동결건조를 하여 최종 파우더를 확보하였다. 최종 수율을 검토한 결과 wet weight 8.39 kg의 멸치(2.1 kg; dry weight)를 처리하였을 경우 멸치 가수분해물은 건조분말로 1.1 kg을 확보할 수 있었으며, 나머지 분획물들의 건조분말 무게 및 수율은 아래 표에 함께 정리하였다(Table 3-1-37).
- APH를 동결건조한 시료의 무게는 1110.2 g인데, 한외여과와 나노여과 시스템을 이용하여 분리한 분획물(APHU-1, APHU-2, APHN-1, 그리고 APHN-2)들의 동결건조 후 합산한 시료의 무게는 594.1 g이다. 이 값은 APH 건조 시료의 53.51%(손실률; 46%)에 해당하는 값으로, 10 kDa, 5 kDa, 그리고 250 Da 여과 시스템 통과 시 발생할 수 있는 각각의 dead volume(10%)을 고려한 27% 손실률보다 큰 값이다. 이는 pilot plant scale system에서의 첫 실험이었기 때문에 실험이 미숙했을 수 있고, 한 장소에서 공정과정이 끝나는 system이 아니라 홍성, 춘천, 그리고 부천 등 다양한 장소를 이동하며 실험하였기 때문에 손실량이 발생했으리라 판단되었다. Aristotelis(2011), Mohr(1978), 그리고 Kristinsson(2000)에 의하면 가수분해 첫 단계에서 주로 soluble material들이 대량으로 손실되며, 어류 가수분해 제조에 참여하는 worker들 또한 회수율이 낮아지는데 일조한다고 하였다. 따라서 통합 공정을 개발하는 경우에 이러한 점을 개선할 수 있도록 방법을 모색하였다.

Table 3-1-37. UF와 NF로 분획한 분획물들의 수율

Material	Anchovy	APH	UF		NF	
			APHU-1	APHU-2	APHN-1	APHN-2
Contents	8.39 Wet wt(kg)	1110.20	130.20	94.40	309.99	59.51
	2.10 Dry wt(kg)	Dry wt(g)	Dry wt(g)	Dry wt(g)	Dry wt(g)	Dry wt(g)
Yields % (dry bases)	100	52.86	6.20	4.64	14.76	2.83
Contents (protein, g)	1493.42	830.43	95.57	71.37	244.27	ND
Protein Yield % (dry bases)	100	55.61	6.40	4.78	16.36	ND

* ND; Not detected.

③ 한외여과와 나노여과로 분리한 분획물의 분자량 분포(GPC 분석)

○ 멸치 단백질을 고압효소 가수분해 시킨 후, 한외여과(10 kDa 그리고 5 kDa) 그리고 나노여과(250 Da) 시스템을 사용하여 APHU-1(10 kDa 한외여과막을 통과하지 못한 획분), APHU-2(10 kDa 한외여과막에는 통과하고 5 kDa인 막에는 통과하지 못한 획분), APHN-1(5 kDa 한외여과막에는 통과하고 250 Da 나노여과막에는 통과하지 못한 획분), APHN-2(250 Da 나노여과막을 통과한 획분) 및 APH(분획하지 않은 가수분해물)를 만들어 분석용 컬럼으로 분자량 분포를 살펴본 결과는 Fig. 3-1-37, Table 3-1-38와 같다. Fig. 3-1-37에서와 같이 주요 peak 3 개(Peak I; 1,300 Da이상, peak II; 250 Da - 1,300 Da, 그리고 peak III; 250 Da이하)가 나타났다. 이러한 결과는 멸치 고압 가수분해 물에 대한 1차년도 GPC 결과와 매우 유사한 패턴을 보였다. 즉, 막분리 공정이 100% 분리가 되지 않음을 보여 주는 결과이다.

Table 3-1-38. 각 분획물 별 GPC peak 분포도

GPC peak	APH (%)	APHU-1 (%)	APHU-2 (%)	APHN-1 (%)	APHN-2 (%)
I	5.8	24.6	5.7	6.0	0.0
II	47.8	38.0	51.3	48.4	35.3
III	46.4	37.4	43.0	45.4	64.7
Distribution	100	100	100	100	100

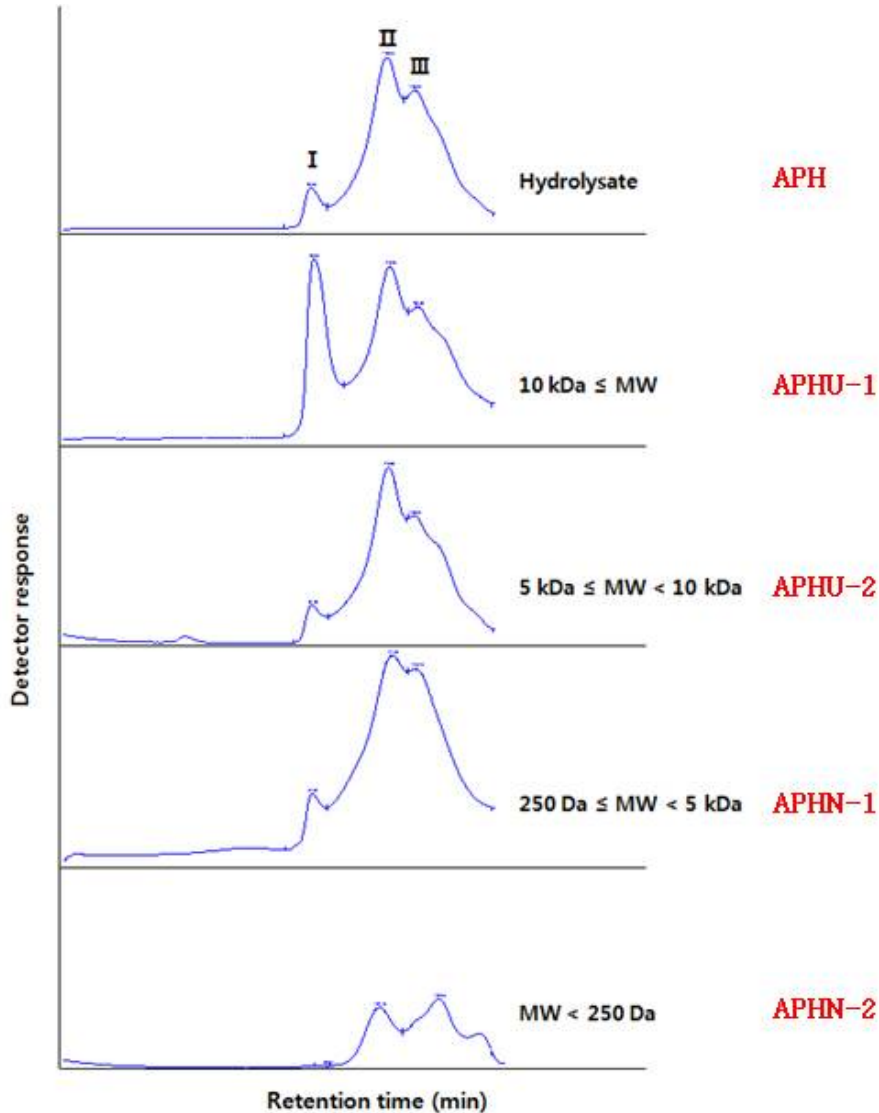


Fig. 3-1-37. 각 분획 단계 별 분획물의 분자량 분포.

(Peak I ; 1,300 Da이상, peak II ; 250 Da ~ 1,300 Da, 그리고 peak III ; 250 Da이하)

- 가수분해물의 분자량을 기초로 하여 분획된 가수분해물 분획물들은 1,500 Da 이하에서 서로 유사한 분자량 분포 및 패턴을 보였으나, 분획에 사용된 막의 한계 분자량에 따라 peak의 비율은 서로 차이를 보였다. 좀 더 자세히 분석하기 위하여 분획물 별 peak 면적을 분석하여 Table 3-1-39에 나타내었다.
- Table 3-1-39의 area값을 비교해 보면, APHU-1 분획물에서는 다른 분획물보다 peak I 이 월등히 높게 나타났다. 막의 한계 분자량이 낮아질수록 peak I 은 점차 줄어들어 APHN-2 분획물에서는 거의 사라진 것을 확인 할 수 있었고, 반면에 peak II와 III의 비율이 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.
- Total area값을 비교해 보면 APHN-1 분획물 peak의 면적이 가장 컸으며, APHN-2 분획

물의 경우에는 Peak I, II, 그리고 III가 급격하게 줄어들어 APHN-1 분획물 면적의 30% 밖에 되지 않는다는 것을 알 수 있었다.

Table 3-1-39. 각 분획물 별 GPC peak 면적

GPC peak	APH (%)	APHU-1 (%)	APHU-2 (%)	APHN-1 (%)	APHN-2 (%)
I	1766.8	9683.0	1686.3	2535.7	4.0
II	14516.2	14961.2	15144.0	20306.1	4370.2
III	14092.7	14735.7	12692.3	19093.2	8020.9
Total area	30375.6	39379.9	29522.6	41935.0	12395.05

* Area값은 Fig3-1-37의 가로축과 세로축 값(min*mAu)을 곱하여 계산하였다.

○ 이러한 결과를 통해 가수분해물 분획물들이 한외여과막 혹은 나노여과막의 한계분자량에 의해서 분획되었다 하더라도 매우 뚜렷하게 분획된 것은 아니지만, 한계분자량 크기가 줄어들수록 가수분해물의 큰 분자량 피크는 감소하거나 제거된다는 것을 알 수 있었다. 이러한 분석 기법을 활용하려면 분획 시 normalization을 시키는 방법을 접목 시키면 좀 더 정확한 분획 효율을 평가할 수 있을 것으로 예상하였다.

○ 본 실험 결과만으로도 대량 생산에는 막분리 공정이 효율적으로 활용가능하리라 판단되었고, 실제 공정에는 분획물의 잔맛 증진 효과 또는 풍미 증진 효과를 분석한 후, 그 결과를 활용 하여 목적으로 하는 분획물의 특성(잔맛 증진 효과, 풍미 증진 효과 또는 분자량 크기 등)에 따라 막분리 공정 활용 여부를 판단하기로 하였다.

④ 분취 컬럼을 이용한 분리공정 시험(GPC separation process)

○ 한외 여과막과 나노 여과막 시스템을 이용하여 APH를 분획하였을 때, 분획물들이 한계 분자량에 따라 뚜렷하게 분획되지 않는 한계점이 발견되어 분취 컬럼을 이용한 GPC 공정의 활용 가능성을 조사하였다.

○ **10 kDa permeate 시료의 분자량 분포** ; 먼저 10 kDa permeate 시료를 분취용 컬럼(column; YMC Pack Diol-60, 300 mm X 20 mm I.D. S-5 μm, 6 nml)을 이용하여 분자량 분포를 분석하여(Fig. 3-1-38, Table 3-1-40), 주요 peak 6 개를 확인하였고 peak 별로 회수하였다. 각 peak들을 정성 및 정량분석하기 위하여 감압농축기를 이용하여 용매를 제거한 뒤, 동결 건조하였다. 하지만, 너무 낮은 수율 때문에 peak별 identification은 확인하지 못하였다(data not shown).

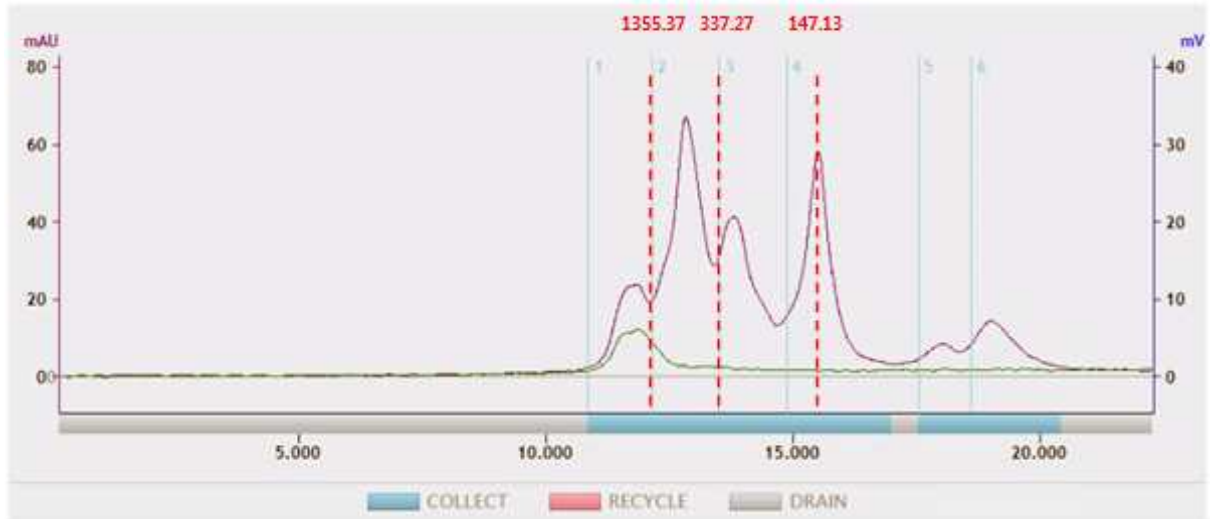


Fig. 3-1-38. MW < 10 kDa 시료의 분자량 분포.

Table 3-1-40. MW < 10 kDa 시료의 분자량 분포

	Fraction 1		Fraction 2		Fraction 3	
GPC peak	1	2	3	4	5	6
Time(min)	10.87-12.15	12.15-13.52	13.52-14.87	14.87-16.93	17.50-18.58	18.58-20.38
Retention time(time)	1.28	1.37	1.35	2.06	1.08	1.8
Volume (ml)	6.4	6.85	6.75	10.3	5.4	9
유속x시간						
Distribution (%)	14.32	15.32	15.10	23.04	12.08	20.13
	14.32		53.46			32.21

- 분취용 GPC를 이용한 분획 효과 ; 회수된 peak 중 peak 1을 분석용 GPC를 이용하여 분석하였다(Fig. 3-1-39). 한외여과 및 나노여과 시스템을 이용하여 멀치 고압가수분해물을 분리 및 정제 하였을 때(Fig. 3-1-37)와 비교해 보면 분획물들이 분획 목적(분자량 크기, 즉 overlap 현상이 거의 보이지 않음)에 따라 정확하게 분리되었음을 확인하였다.

- 본 실험을 통해 분취용 GPC를 이용한 분리 공정이 막분리 공정보다 정확하게 분획이 된다는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 시간과 경제성을 따져보았을 때 pilot plant scale system 공정에서 사용되기에는 불가능하다는 판단을 내렸다.

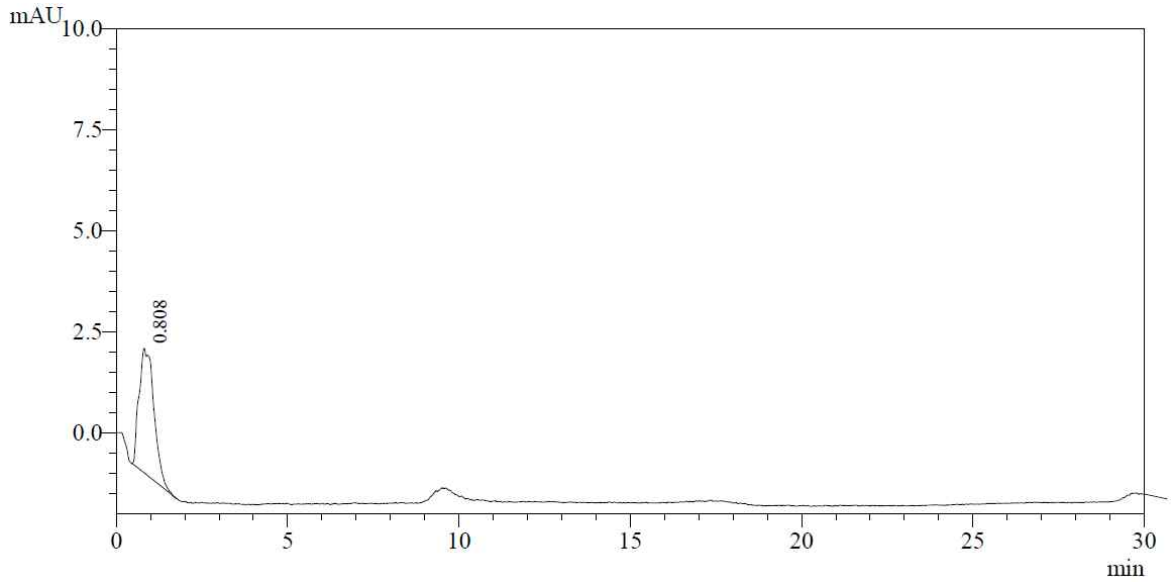


Fig. 3-1-39. GPC를 통해 분획한 peak 1의 분자량 분포.

⑤ 한외여과와 나노여과로 분리한 분획물의 이화학적 성질

- 이화학적 특성으로 각 동결건조물을 물에 2.5%로 용해하여 pH(pH meter, Orion 4-star Plus, Thermo Sci., USA), 염도(Salt meter, Master-S28M, Atago, Japan), 및 당도계(Master Refractometer, Master-M, 2M and 3M, Atago, Japan)를 이용한 수용성 고형분의 함량(Brix) 등을 측정하여 Table 3-1-41에 나타내었다.

Table 3-1-41. 한외여과와 나노여과로 분리한 분획물의 이화학적 성질

	Solubility (%)	pH	Brix (°)	Salt (%)	g/100 g of powder		
					Na	Nitrogen, NK	Protein, NK, 6.25
APH	100	7.1	2.9	0.32	4.5	11.97	74.80
APHU-1	100	6.4	2.8	0.07	4.4	11.74	73.40
APHU-2	100	6.6	2.4	0.18	4.7	12.10	75.60
APHN-1	100	6.2	2.5	0.00	1.1	12.61	78.80
APHN-2	100	5.9	2.2	1.13	15.6	ND	ND

*ND; Not detected.

- pH는 APHN-2시료가 5.9로 가장 낮게 나타났으며, 나머지 시료는 6.2에서 7.1 범위로 시판 간장 및 어간장과 유사하였으며, Solubility(%)는 2.5% 용액 제조에 따른 것으로 용해성이 모든 시료가 매우 우수하게 판정되었으며 Brix는 시료 조제 결과를 정확하게 반영하여 나타남을 확인하였다.
 - Salt 함량(염도)은 동결건조 한 powder를 물에 용해시켜 2.5%의 농도로 시료를 조제 한 후에 Salt meter로 측정한 결과로서, 염도는 APHN-2 시료가 다른 시료들보다 월등히 높게 나타났다. 이러한 사실은 막분리 공정에 의해서 마지막 분획물에 분자 크기가 작은 성분이 모이리라 예상하였던 결과와 일치한다. APH에 존재하는 Na 이온은 분자량 크기가 작아 APHU-2에 모이고 APHU-1에는 거의 존재하지 않으리라 예상한 결과와 유사하지만 물질 수지상 정확한 값을 나타내지는 못했다. 단지 분리 경향만을 확인할 수 있었다. 5 kDa permeate를 나노여과한 시료 APHN-1, 2에서 측정한 결과는 완벽하게 탈염 효과가 있는 것으로 나타났다. 이는 예측하였던 결과와 일치한다. 하지만 물질수지를 이용한 정량적 해석에는 일치하지 않았다. 따라서 나노 여과 시스템은 peptides의 분획뿐만 아니라 desalting에도 큰 효과가 있다는 사실을 확인하는데 의미를 두었다.
 - 동결건조 시료를 ion chromatography로 정량 분석한 sodium 함량 정량 분석 결과는 salt meter로 측정한 염도와 유사하게 APHN-2로 sodium이 농축된다는 사실은 확인하였지만 salt meter로 측정한 염도와 ion chromatography로 정량 분석한 sodium 함량 간의 상관관계는 파악되지 않았다. 이러한 결과는 분획물 내에 존재하는 peptides의 이온성 때문이라고 사료된다.
 - APH, APHU-1, APHU-2, APHN-1 각각 동결 건조된 분말 100 당, 단백질 함량은 73~79% 정도로 매우 높게 나타나 용도에 따라 모두 분획물을 분말화 할 수 있는 가능성을 보여 주고 있다. 다만 APHU-2에는 sodium 함량이 너무 높아 킬달법에 의한 질소 정량에 간섭을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로부터 소재화 가능성 우선순위를 APHN-1, APH, APHU-2, 및 APHU-1으로 결정하고 통합공정을 개발하는 과정에 반영하기로 하였다.
- ⑥ 한외여과와 나노여과로 분리한 분획물의 색 비교**
- 동결건조 한 powder를 물에 용해시켜 2.5%의 농도로 제조한 샘플들의 탁도 및 갈변도는 분광광도계(UV-140-02, Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 측정(탁도의 경우 660 nm 및 갈변도의 경우 430 nm)하였고, 색차계(Colory meter, CM-3500d, Minolta, Japan)를 이용하여 측정한 L(명도, Lightness), a(적색도, Redness) 와 b(황색도, Yellowness)값을 Table 3-1-42에 나타내었다. 이때의 표준 백색판은 L=89.74, a=1.24, b=-7.26을 기준으로 하였다.
 - 탁도는 APHN-2의 값이 가장 낮았으며, 나머지 분획물들은 서로 유의적인 차이가 없었다. 갈변도의 경우에는 APHU-1의 값이 가장 낮은 APHN-2의 값보다 68 배 높은 값을

보여 다른 분획물들 보다 어두운 빛을 띠었다. 색도 L(밝기)값을 보면, APHN-2 분획물이 다른 분획물들에 비해 다소 높았으며, a(적색도)와 b(황색도)값은 APHU-1 분획물이 가장 높게 나타났다.

Table 3-1-42. 한외여과와 나노여과로 분리한 분획물의 색 비교

	Turbidity (OD ₆₆₀ nm)	Browning (OD ₄₃₀ nm)	Change in color parameters		
			Lightness	Redness	Yellowness
APH	0.025	0.537	54.77	-0.52	32.72
APHU-1	0.087	1.162	41.39	7.75	43.27
APHU-2	0.018	0.396	56.33	-1.83	25.71
APHN-1	0.029	0.665	56.17	0.34	37.88
APHN-2	0.001	0.017	67.12	-0.08	-3.83



Hydrolysate 10 kDa ≤ MW 5 kDa ≤ MW 250 Da ≤ MW MW < 250 Da
< 10 kDa < 5 kDa

Fig. 3-1-40. 각 분획물의 색 비교.

⑦ 한외여과와 나노여과로 분획한 분획물의 유리 아미노산 분석

○ 멸치 단백질을 고압효소 가수분해시킨 뒤, 분자량별로 분리한 분획물에 대한 각각의 유리 아미노산 조성에 대한 결과는 Table 3-1-43에 나타내었다.

○ 쓴맛을 내는 tryptophane 함량은 APHN-1 분획물에서 가장 낮게 나타났던 반면, 감칠맛을 내는 glutamic acid의 함량은 APHN-1 분획물에서 가장 높게 나타났다. 따라서 분자량

별로 분획한 가수분해물 중 APHN-1 분획물은 짠맛 증진효과 뿐만 아니라 유리아미노산 함량이 높아 그 자체의 정미성분과 상호작용하여 맛의 상승효과 또한 가져올 것으로 판단된다.

- 이 밖에도 단맛을 내는 glycine, proline, alanine 및 serine은 APHN-2 분획물에 가장 많이 함유되어 있었다.

Table 3-1-43. 각 분획물에서 유리아미노산의 함량

(mg/동결건조된 kg)

	APH	UF		NF	
		APHU-1	APHU-2	APHN-1	APHN-2
Asp	2,910	29,874	22,802	39,890	3,921
Glu	54,765	39,170	39,505	83,311	3,406
Asn	806	626	538.7	205	495
Ser	1,007	16,675	10,604	311	29,002
Gln	1,437	14,973	14,777	7,412	9,868
His	20,003	17,403	18,179	20,973	7,837
Gly	17,640	11,751	11,847	709	34,819
Thr	28,727	22,460	23,407	10,055	21,729
Arg	1,432	33,963	17,701	36,624	11,489
Ala	44,043	33,353	35,620	6,495	64,358
Taurine	8,024	6,642	7,809	1,010	15,317
Gaba	4,497	-	-	-	-
Tyr	7,392	17,193	51,743	5,771	8,208
Val	53,794	28,536	29,778	26,188	18,870
Met	22,311	19,384	19,503	8,625	24,513
Trp	3,659	3,246	3,582	2,015	3,454
Phe	25,187	25,183	28,782	12,141	28,747
Ile	32,177	28,703	27,883	35,103	14,280
Leu	51,929	50,500	49,886	54,282	32,402
Lys	16,246	48,333	50,688	100,376	12,209
Hydroproline	697	493	410	680	156
Pro	7,503	7,326	8,094	2,598	10,248
Total	388,187	455,785	473,136	454,772	355,329

(라) 결론

- 본 연구는 lab 규모에서 개발된 신기술을 국내에 현존하는 pilot plant scale에서 실증 연구(시험생산)를 수행함으로써 pilot 규모의 생산 공정을 개선·개발하고자 하였다.
- Pilot scale production system에서는 멀치 가수분해물 제조 후, lab scale에서 filter paper를 이용하여 pre-filtration 하였던 공정이 생략되어 공정 과정이 간소화 및 개선되었지만

연속식 원심분리기가 dead volume에 의한 손실의 문제가 대두되었다.

- 본 연구결과를 바탕으로 대량 생산을 위한 통합 공정에서는 멸치 고압효소가수분해물 제조 시 첨가되는 물(멸치의 2 배)의 양과 효소의 양(멸치 중량의 2%)에 대한 실증연구의 필요성이 제시되었다.
- 한외여과(UF) 및 나노여과(NF) 시스템을 통해 분리된 분획물들을 GPC로 분석한 결과 몇몇 분자량대의 피크들이 여러 분획물에서 발견된 것을 알 수 있었다. 비록 여과막의 한계 분자량 별로 peptides가 정확하게 분리되지는 않았지만, 한계분자량이 작아질수록 분획물에서 큰 분자량들이 감소하거나 제거된다는 사실을 확인할 수 있었다.
- 한외여과 및 나노여과를 통해 얻은 분획물들의 멸치(dry weight) 대비 수율은 각각 APH(52.8%), APHU-1(6.20%), APHU-2(4.64%), APHN-1(14.76%), 그리고 APHN-2(2.83%)이고, 멸치에 함유된 단백질 대비 수율은 APH(55.61%), APHU-1(6.40%), APHU-2(4.78%), 그리고 APHN-1(16.36%)이다.
- 동결건조된 분획물들의 2.5% 수용액에 대한 이화학적 성질을 분석한 결과 pH는 APHN-2 시료가 가장 낮게 나타났으며, 나머지 시료들은 유사한 값을 나타내었다. Sodium의 양은 APHN-2 시료가 다른 시료들보다 월등히 높게 나타난 반면, 짠맛 증진 peptides가 가장 많이 분포되어 있는 APHN-1 시료에는 가장 적게 함유되어 있었다. 이것을 통해 나노여과 시스템이 peptides의 분획뿐만 아니라 desalting에도 큰 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다.
- 동결건조된 분획물들의 2.5% 수용액에 대한 색을 비교해보면 탁도는 APHN-2의 값이 가장 낮았으며, 갈변도는 APHU-1의 값이 다른 분획물들 보다 월등히 높았다. 색도 L(밝기)는 APHN-2 분획물이 다른 분획물들에 비해 다소 높았으며, a(적색도)와 b(황색도)값은 APHU-1 분획물이 가장 높게 나타났다.
- 동결건조된 분획물들의 유리아미노산 함량을 분석한 결과 APHN-1 분획물에 쓴맛을 내는 tryptophane 함량은 가장 낮게 나타났던 반면, 감칠맛을 내는 glutamic acid의 함량은 가장 높게 나타났다. 따라서 APHN-1 분획물은 짠맛 증진효과 뿐만 아니라 유리아미노산 함량이 높아 천연 조미료 소재로 개발될 때, 그 자체의 정미성분과 상호작용하여 맛의 상승효과 또한 가져올 것으로 판단된다.
- 이러한 결과들로부터 소재화 가능성 우선순위를 APHN-1, APH, APHU-2, 및 APHU-1으로 정하고 통합공정을 개발하는 과정에 반영하기로 하였다.

(2) 탈염 공정개발

(가) 서론

- 제 1협동에서 짠맛 증진 효과를 관능검사로 분석하는 경우, 시료의 양과 나트륨 이온 농도에 따른 검사의 불확실성 때문에 본 연구팀에 요구한 탈염 처리를 위하여 두 가지 방법으로 탈염 처리 연구를 시도하기 위하여, 나트륨의 분자량이 100 Da이하(MW; 23)이기 때문에 나노여과 시스템(MWCO 250 Da)으로 탈염이 가능 할 것으로 예측하여 250 Da retentate 시료와 250 Da permeate 시료의 나트륨 함량을 비교 분석하였다.
- 나노여과 시스템 (MWCO 250 Da)을 이용하여 탈염 공정을 거친 APHN-1 분획물에는 나트륨이 검출되지 않을 것이라 예상하였지만, IC분석 결과 4.5 g/동결건조물 100 g의 나트륨이 검출되었다. 따라서 전기투석 장비를 이용하여 재 탈염 공정을 수행하였다.

(나) 재료 및 방법

① 막 분리 공정 활용

- 한외여과 시스템(MWCO 5 kDa)을 통과한 5 kDa permeate 시료를 나노여과 시스템 (MWCO 250 Da)을 이용하여 desalting 공정을 수행하였고, retentate와 permeate시료를 각각 동결건조 한 후 IC를 이용하여 나트륨 함량을 정량분석 하였다.

② 전기 투석

- 한외여과 시스템(MWCO 5 kDa)을 통과하고, 나노여과 시스템(MWCO 250 Da)을 통과하지 못한 APHN-1 액상 시료를 전기투석 장비(Micro-acilyzer S3, Astom, Japan, 표준탈염 성능; 500 ml/hr)에 카트리지(AC-220, Astom, Japan, 분획분자량; 300, 단백질 등의 중성 물질에서의 탈염)를 장착하여 desalting 하였다.
- 가운데 용기에는 전기를 흐를 수 있도록 유도하기 위해 0.5% NaCl을 채워 넣고(전극액조), 맨 오른쪽 용기에는 탈염하고자 하는 시료(APHN-1)를 넣었다. 탈염 공정이 시작되면, 맨 오른쪽 용기에 있는 시료에 함유되어 있던 Na들이 0.5% NaCl용기로 이동하게 되고, 탈염된 시료는 가장 왼쪽 용기에 회수되었다.
- 실험조건은 voltage(12 V), current(21 A), operation time(40 min), 그리고 interation current(0.22 Ah)이다.

③ 분석 방법

- 시료에 함유된 sodium(Na) 함량을 정량 분석하기 위하여 제 1 협동에 의뢰하여 ion chromatography 분석을 실시하였다. 막분리된 250 Da retentate와 permeate 시료들은 각각 동결 건조한 후에 Na 정량분석을 실시하였고, 전기투석 전과 후의 액상 시료들은 evaporator로 감압농축 한 후에 시료무게 대비 10 배의 물을 첨가하여 Na 정량분석을 실시하였다.
- Salt의 함량은 동결건조된 APHN-1 시료를 물에 2.5% 농도로 시료를 용해시킨 뒤, salt

meter기기(YK-31SA, Lutron, Taiwan)를 이용하여 측정하였고, Table 3-1-44에 제시된 값은 100% 환산하여 기입하였다. 조단백 함량은 micro-Kjeldahl법을 이용하여 분석하였다.



Fig. 3-1-41. 전기투석 장비(Micro-acilyzer S3, Astom, Japan).

(다) 실험결과 및 고찰

① 막 분리

- 나노 여과 시스템을 통과하기 전 시료(APH, APHU-1, 그리고 APHU-2)들의 Na 및 NaCl 함량을 보면(Table 3-1-44), 11.2~11.9 g/동결건조물 100 g으로 유의적인 차이가 없었다. 하지만 나노 여과 시스템으로 분리한 분획물 APHN-1은 2.8 g/동결건조물 100 g으로 NaCl 함량이 1/5로 감소하였으며, APHN-2 시료는 39.6 g/동결건조물 100 g으로 나노 여과 시스템을 통과하기 전 시료들보다는 4 배, APHN-1 시료보다는 14 배 높아진 것을 확인하였다. 이는 분자량이 작은 salt들이 나노 여과막(250 Da)을 통과하면서 여과막을 통과하지 못한 분획물인 APHN-1 시료에서 desalting 공정이 이루어진 것으로 결론지었다.
- IC로 측정한 NaCl 함량(동결건조된 APHN-1시료)과 salt meter기기를 이용하여 측정한 salt 함량은 결과값에서 어느 정도 차이를 보였다. Table 3-1-45에 표기된 NaCl 함량은 IC로 측정한 Na의 분자량을 고려하여 환산한 값이다. 그런데 이 값들은 APHU-1, APHU-2, 그리고 APHN-1시료를 salt meter기로 측정한 salt의 양보다 전체적으로 높게 나왔다. 이유는 시료에 존재하는 Na들이 Cl과 결합하지 않고 다른 분자와 결합한 형태로 존재할 수 있는 가능성이 있기 때문이라고 판단된다. 하지만 salt meter기를 이용할 경우 간단하지만 어느 정도의 경향성을 살펴보는 데는 유용하다고 생각되어진다.

- 본 실험을 통해 나노여과 시스템이 desalting에 큰 효과가 있다는 것을 확인 할 수 있었다.

Table 3-1-44. 나노 여과 시스템을 이용한 탈염

	APH	APHU-1	APHU-2	APHN-1	APHN-2
Na(g/100 g)	4.5	4.4	4.7	1.1	15.6
NaCl(g/100 g)	11.4	11.2	11.9	2.8	39.6
Salt(%)	12.8	2.8	7.2	0.0	45.2

② 전기 투석

- 전기투석 전과 후의 APHN-1 액상 시료의 전기전도도와 Na 함량, 그리고 Nitrogen 함량을 Table 3-1-45에 나타내었다. 전기투석 전의 APHN-1 시료의 전기전도도는 11.2 mS/cm이었지만, 전기투석 후에 시료의 전기전도도는 1/2인 5.9 mS/cm로 떨어졌다. 반면에 0.5% NaCl의 전기전도도는 4.8 mS/cm에서 11.9 mS/cm로 약 2 배 증가하였다(data not shown).

Table 3-1-45. 전기투석 처리 전과 후의 sodium함량과 총질소 비교 분석

	전기투석 전	전기투석 후
전기전도도 (mS/cm)	11.2	5.9
Na (g/100 g)	1.10	0.85
Nitrogen (g/100 g)	13.0	6.70

- 전기전도도 값으로 유추한 Na양과 IC로 분석한 Na함량이 완벽하게 일치하지는 않았지만, 전기투석을 실시하기 전 0.5% NaCl 시료의 전기전도도 값(4.8 mS/cm)을 통해 다른 시료의 Na 함량을 유추 할 수 있었다.
- IC로 알아본 Na 함량을 살펴보면, 전기투석 전 1.1 g/100 g이 전기투석 후에는 0.85 g/100 g으로 감소하였다.
- Kjeldahl법을 이용하여 살펴본 nitrogen의 이동을 보면, 전기투석 후 0.5% NaCl 시료에서도 nitrogen이 검출되었다. 이 결과를 통해 탈염이 진행되면서 염 이외의 물질(nitrogen

포함)들이 함께 제거 및 이동하였다는 것을 알 수 있었다. 따라서 전기투석으로 탈염을 실시할 경우 단백질 손실이 생길 수 있다는 사실이 확인 되었다.

(라) 결론

- 나노여과(250 Da) 시스템과 전기투석 장비를 이용하여 탈염공정을 진행한 결과 나트륨 함량이 탈염공정 처리 전 보다 각각 76.67%, 22.73%씩 감소한 것을 확인 할 수 있었다. 탈염을 하는 데에는 두 공정 모두 효과적이라고 판단되지만, pilot plant scale system에서 대량으로 제품을 생산할 경우 전기투석은 가격대비 효율이 높지 않을 뿐만 아니라 nitrogen 손실이 있기 때문에 적용하지 않기로 결정하였다.
- 그러나 탈염공정이 꼭 필요하다면 NF system을 활용할 예정이다.

(3) 탈색 및 탈취 공정개발

(가) 서론

- 기존의 공정방법에 따라 멸치 어간장을 생산할 경우 장기간의 숙성기간을 요하기 때문에 숙성 중에 색깔이 흑갈색으로 지나치게 짙어지는 경향이 있고(Jo, 1999), 장기 유통 시에는 이취가 발생하거나 휘발성 향기성분에 변화(Cha, 1992)가 또한 문제로 대두된다. 본 연구에서는 고압을 이용하여 멸치를 효소가수분해 시킴으로써 제조 기간을 단축시켜 이러한 문제점을 보완하였다.
- 그러나 여전히 색과 향이 존재하여 색 혹은 이취가 짠맛 증진 효과를 평가하는데 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 APHN-1 시료를 활성탄을 이용하여 탈색 및 탈취하여 탈색률을 측정하고, 관능검사를 실시하여 taste profile, 향미 profile, 그리고 GC 분석을 수행하였다. 분석결과를 이용하여 공정 채택 여부를 판단하기로 하였다.

(나) 재료 및 방법

① 탈색공정

- 가장 먼저 APHN-1 시료(활성탄 처리 전과 후)에 함유된 sodium(Na, 11.3 g/100g)값은 IC를 이용하여 정량분석 하여 강도평가를 수행할 때 활용하였다. 실험에 사용된 model broth는 mono sodium L-glutamate monohydrate(1.9 g/L), maltodextrin(6.375 g/L) 그리고 yeast extract(2.1 g/L)로 제조하였다(Alexander, 2011). 제조된 model broth에 APHN-1 파우더를 농도별(0.1, 0.3, 0.5 그리고 1%)로 첨가한 뒤, 정제 활성탄(SHIN KI CHEMICAL, Korea, No. 2524)을 2%를 첨가하고, 상온에서 5 min동안 교반하였다. 이때, 각 시료에 함유된 NaCl양은 45 mM로 동일하게 맞추어 주었으며, 자세한 시료 제조방법은 제 1 협동 보고서에 나와 있다. 교반 후, 각 샘플들은 원심분리하여, 상층액을 0.45 µm membrane filter(Milipore co.)로 감압여과하였고, Fig. 3-1-42과 3-1-43에 나타내었다.
- **짠맛 강도 평가;** 관능검사는 제 1 협동의 도움을 받아 실험을 수행하였으며, 시료의 펄

타이드 농도를 각각 0.1%, 0.3%, 0.5%, 그리고 1%로 조정하여 제조한 시료들을 패널들 (n=20)에게 제공하여 15 cm line scale상에서 평가하도록 하였다. 강도 평가 시 기준이 되는 시료들은 model broth에 NaCl을 농도별(25 mM~80 mM)로 첨가하여 제조한 12 개의 시료이다. 기준시료 용액 제조방법 역시 제 1 협동 보고서에 자세하게 설명이 되어있다. 평가지는 15 cm 선척도 방법을 사용하였고, 각 기준 시료에 대한 line을 제공하였으며, 기준시료는 1~12 번에 해당되는 시료 번호를 부여하였다. 반면, 평가 시료는 난수번호를 무작위로 추출하여 제공하였다.



Fig. 3-1-42. APHN-1의 활성탄처리 전과 후
(윗줄은 2% 활성탄 처리 후, 아랫줄은 활성탄 처리 전의 시료).



Fig. 3-1-43. 관능검사에 사용된 시료.

② 탈취공정

- 활성탄 처리 후의 탈취 효과를 분석하기 위하여 taste profile, 향미 profile 및 GC분석을 실시하였다.

㉠ Taste profile

- 활성탄을 처리한 샘플과 처리하지 않은 대조군의 관능적 특성을 비교 분석하기 위하여 강도 특성(intensity characteristics)과 기호도 특성(sensory characteristics)으로 구분하여 평가를 실시하였다. 10 명의 패널을 선정하여 5 점 척도법으로 평가하였으며 강도 특성의 경우 1 점을 "매우 약함(extremely weak)", 5 점을 "매우 강함(extremely strong)"으로, 기

호도 특성의 경우 1 점을 "매우 싫음(extremely dislike)", 5 점을 "매우 좋음(extremely like)" 으로 하였다. 실험에 사용된 설문지는 Table 3-1-46에 제시하였다.

Table 3-1-46. Taste profile 측정을 위한 관능검사용 설문지.

Sample Code : #	Date:	Ages:	Gender: male/female
------------------------	--------------	--------------	----------------------------

Please assign score by circuling on number for each question.

1. APPEARANCE

1) How would you rate the **OVERALL APPEARANCE** of the sample?
(귀하께서는 이 샘플의 외관이 전반적으로 얼마나 마음에 드시나요?)

Dislike Extremely	Dislike Moderately	Neither like nor dislike	Like Moderately	Like Extremely
1	2	3	4	5

2. COLOR

1) How would you rate the **intensity of YELLOW COLOR** of the sample?
(귀하께서는 이 샘플의 노란빛의 강도가 어떻다고 생각하시나요?)

Weak Extremely	Weak Moderately	Neither weak nor strong	Strong Moderately	Strong Extremely
1	2	3	4	5

2) How would you rate the **intensity of TRANSPARENCY** of the sample?
(귀하께서는 이 샘플의 투명도가 어떻다고 생각하시나요?)

Transparent Extremely	Transparent Moderately	Neither transparent nor turbid	Turbid Moderately	Turbid Extremely
1	2	3	4	5

3) How would you rate the **COLOR** of the sample?
(귀하께서는 이 샘플의 색이 전반적으로 얼마나 마음에 드시나요?)

Dislike Extremely	Dislike Moderately	Neither like nor dislike	Like Moderately	Like Extremely
1	2	3	4	5

3. AROMA

1) How would you rate the **intensity of AROMA or ODOR** of the sample?
(귀하께서는 이 샘플의 향 혹은 이취의 강도가 어떻다고 생각하시나요?)

Weak Extremely	Weak Moderately	Neither weak nor strong	Strong Moderately	Strong Extremely
----------------	-----------------	----------------------------	-------------------	---------------------

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

2) How would you rate the **intensity of STIMULATE ODOR** of the sample?

(귀하께서는 이 샘플의 자극적인 향의 강도가 어떻다고 생각하시나요?)

Weak Extremely	Weak Moderately	Neither weak nor strong	Strong Moderately	Strong Extremely
1	2	3	4	5

3) How would you rate the **intensity of UNPLEASANT ODOR** of the sample?

(귀하께서는 이 샘플의 불쾌한 향의 강도가 어떻다고 생각하시나요?)

Weak Extremely	Weak Moderately	Neither weak nor strong	Strong Moderately	Strong Extremely
1	2	3	4	5

2) How would you rate the **AROMA** of the sample?

(귀하께서는 이 샘플의 향이 전반적으로 얼마나 마음에 드시나요?)

Dislike Extremely	Dislike Moderately	Neither like nor dislike	Like Moderately	Like Extremely
1	2	3	4	5

4. TASTE

실험방법 :

가수분해물의 짠맛과 쓴맛에 대한 관능평가는 표준용액 (0.1% NaCl)에 대하여 기준점을 3점으로 하고, 이보다 짠맛과 쓴맛의 강도와 강한 경우 4 및 5점으로, 이보다 약한 경우 2 및 1점으로 하는 5점 척도법을 사용하여 평가하였다.

1) How would you rate the **intensity of SALTINESS** of the sample?

(귀하께서는 이 샘플의 짠맛의 강도가 어떻다고 생각하시나요?)

Weak Extremely	Weak Moderately	Neither weak nor strong	Strong Moderately	Strong Extremely
1	2	3	4	5

2) How would you rate the **intensity of BITTERTASTE** of the sample?

(귀하께서는 이 샘플의 쓴맛의 강도가 어떻다고 생각하시나요?)

Weak Extremely	Weak Moderately	Neither weak nor strong	Strong Moderately	Strong
----------------	-----------------	-------------------------	-------------------	--------

		strong		Extremely
1	2	3	4	5

3) How would you rate the **TASTE** of the sample?

(귀하께서는 이 샘플의 맛이 전반적으로 얼마나 마음에 드시나요?)

Dislike Extremely	Dislike Moderately	Neither like nor dislike	Like Moderately	Like Extremely
1	2	3	4	5

5. OVERALL ACCEPTANCE

1) How would you rate the **OVERALL ACCEPTANCE** of the sample?

(귀하께서는 이 샘플이 전반적으로 얼마나 마음에 드시나요?)

Dislike Extremely	Dislike Moderately	Neither like nor dislike	Like Moderately	Like Extremely
1	2	3	4	5

Comments :

- 본 실험에 사용된 시료는 5 kDa permeate 시료이며 농도를 각각 1%와 2%로 준비하였다. 준비된 시료에 활성탄을 2% 첨가한 뒤, 5 분간 교반시켰다. 반응이 끝나면, 원심분리기를 이용하여 상층액을 회수한 뒤 0.45 µm membrane filter를 이용하여 감압여과하였다. 짠맛과 쓴맛을 비교평가 하기 위하여 기준시료(R)을 준비하였는데, 0.1%의 NaCl용액을 준비하였다. R의 농도를 0.1%로 설정한 이유는 1% 5 kDa permeate 시료의 salt함량(%)이 0.1%이기 때문이다. 준비된 시료에는 난수번호(3자릿수)를 부여한 뒤, 패널들에게 제공하였다. 각 샘플들의 이름은 Table 3-1-47과 Fig. 3-1-44에 나타내었다.

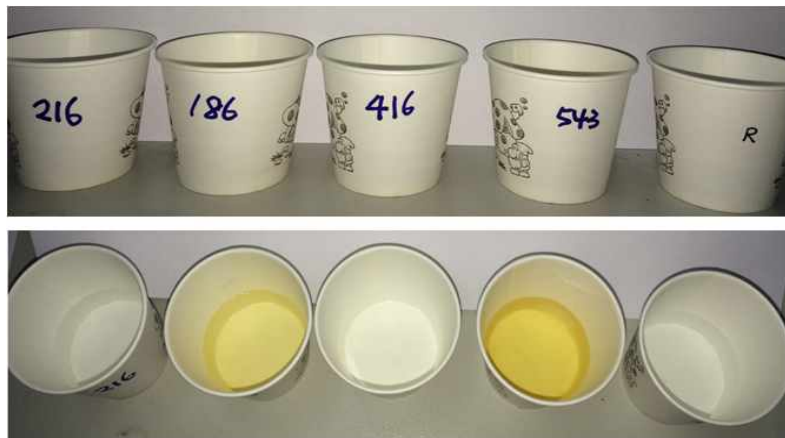


Fig. 3-1-44. Taste profile에 사용된 샘플(5 kDa permeate)과 난수번호.

Table 3-1-47. Taste profile에 사용된 샘플(5 kDa permeate)과 난수번호

난수 번호	1%		2%	
	활성탄 처리 전	활성탄 처리 후	활성탄 처리 전	활성탄 처리 후
	# 186	# 216	# 543	# 416

㉔ 향미 profile(5 kDa permeate 시료의 활성탄 전과 후 비교)

- 활성탄 전 후에 패널들이 느끼는 향미의 차이를 알아보기 위하여 본 연구를 수행하였고, 검사는 제 1협동의 도움을 받아 수행하였다.
- 실험에 사용된 model broth는 mono sodium L-glutamate monohydrate (1.9 g/L), maltodextrin (6.375 g/L) 그리고 yeast extract (2.1 g/L)로 제조(Alexander, 2011)하였고, 본 실험에서 대조군으로 사용되었다. 제조된 model broth에 5 kDa permeate 파우더를 농도별(1%와 2%)로 첨가한 뒤, 정제 활성탄(SHIN KI CHEMICAL, Korea, No. 2524)을 2%를 첨가하고, 상온에서 5 분 동안 교반하였다. 교반 후, 각 샘플들은 원심분리하고, 상층액을 0.45 µm membrane filter(Milipore co.)로 감압여과하여 분석용 시료로 사용하였다(Fig. 3-1-45).



Fig. 3-1-45. 향미 profile에 사용된 시료.

○ 시료의 농도를 각각 1%와 2%로 조정하여 제조한 시료들을 패널들(n=17)에게 제공하여 15 cm line scale상에서 평가하도록 하였다. 강도 평가 시 기준이 될 시료는 NaCl을 첨가하지 않은 model broth로 선정하였다. 평가지(Table 3-1-48 참고)는 15 cm 선척도 방법을 사용하였고, 평가 시료에 난수번호를 무작위로 추출하여 패널들에게 제공하였다. 향미 프로파일은 총 색, 냄새, 맛, 기호도 면에서 평가를 실시하였으며, 검사항목은 색에서는 노란빛의 강도와 샘플의 투명도를, 냄새에서는 전체적인 강도와 바닷물 냄새, 마른 멸치 냄새, 해조류 냄새를, 맛에서는 전체적인 강도와 생선비린 맛, 쓴맛, 짠맛, 마른멸치 맛으로 구성하였다. 또한 기호도는 외관과 냄새, 맛에 대해서 평가 하도록 하였다. 평가는 5 점 척도로 진행하였으며, 각 점수는 중복이 가능하도록 하였다. 강도평가에서 5 점은 매우 강함, 1 점은 매우 약함으로 평가하도록 하였고, 기호도에서는 5 점을 매우 좋음, 1 점은 매우 싫음으로 평가 하도록 하였다. 향미프로파일 실험 진행 시 기준이 될 수 있는 표준 시료를 제공하였는데, 이 표준 시료는 모든 시료에 들어 있는 Model Broth 용액(mono sodium L-glutamate monohydrate(1.9 g/L), maltodextrin(6.375 g/L), yeast extract(2.1 g/L)로 제조하여 제공하였다.

Table 3-1-48. 향미 profile 용 관능검사 설문지

Sample Code : #	Date:	Ages:	Gender: male/female
<p>제시된 멸치 추출액의 냄새와 맛에 대한 관능적 품질을 평가하고자 합니다. 표준시료 (R)와 비교하여 전체적인 강도 및 각 묘사에 대한 강도를 느끼는 대로 다음 평가 요령에 의하여 해당 점수를 표시하여 주십시오.</p> <p>(5: 매우 강함, 4: 강함, 3: 강하지도 약하지도 않음, 2: 약함, 1: 매우 약함)</p>			
		(샘플이름)	(샘플이름) (샘플이름)
색	노란빛의 강도 (yellow color) 샘플의 투명도 (transparency)		
냄새	전체적인 강도 (total intensity) 바닷물 냄새 (sea complex) 마른 멸치 냄새 (dried anchovy) 해조류 냄새 (seaweed like)		
맛	전체적인 강도 (total intensity) 생선비린 맛 (fishy) 쓴 맛 (bitter)		

짠 맛 (salty)			
마른 멸치 맛 (dried anchovy)			
(5: 매우 좋음, 4: 좋음, 3: 좋지도 싫지도 않음, 2: 싫음, 1: 매우 싫음)			
		(샘플이름)	(샘플이름)
기호도	외관 (appearance)		
	냄새 (odor)		
	맛 (taste)		

㉔ GC 분석

- 시료 8 중 (APH 시료의 활성탄 전과 후, 감압농축한 APH 시료의 활성탄 전과 후, 5 kDa permeate 시료의 활성탄 전과 후, 그리고 APHN-1 시료의 활성탄 전과 후)의 탈취효과를 알아보기 위한 GC분석은 제 1협동 위탁기관을 통해서 이루어졌다.
- 시료의 추출, Gas chromatograph-mass spectrometer(GC-MS)에 사용한 Ethyl acetate (EA), 증류수 등은 Burdick&Jackson (B&J HPLC) 제품을 Pyridine은 Junsei 그리고 Trimethyl-silane은 Sigma-Aldrich 제품을 사용하였다. 분석에 이용한 GC-MS는 Shimadzu GC-2010 Plus with GCMS-2010 SE이고, column은 Rtx-5MS(30 m, 0.25 μ m film thickness, 0.25 mm i.d.; Restek, USA)를 사용하였다
- 시료 5 mL에 EA 5 mL과 NaCl 1 g을 넣어 추출하였다. 추출액에 pyridine 50 μ L와 trimethyl-silane 50 μ L를 넣고 Heating block에서 75 $^{\circ}$ C로 75 분간 가열 반응을 진행하였다. 반응 후 추출액은 GC-MS를 이용하여 각 샘플별 탈취여부를 확인하였다.
- GC-MS의 분석 조건은 carrier gas는 Helium을 사용하였고, 유속은 1 mL/min, ion source temperature는 250 $^{\circ}$ C, 그리고 injection temperature는 275 $^{\circ}$ C로 설정하였다. Column temperature는 50 $^{\circ}$ C에서 15 분간 유지하였고, 9 $^{\circ}$ C/min의 속도로 280 $^{\circ}$ C까지 승온시킨 후 10 분간 유지시켰다. Peak 분석은 분자량 50~500까지 TIC 모드로 확인하였다.

(다) 실험결과 및 고찰

① 탈색

㉑ 탈색률

○ 여과조제 처리한 각 샘플들은 희석하여 흡광도(420 nm)를 측정하였으며, 다음 식에 따라 구한 탈색률(Osajima et al., 1993)을 계산하였다.

$$\text{탈색률 (\%)} = \frac{\text{무처리시료의 흡광도} - \text{처리시료의 흡광도}}{\text{무처리시료의 흡광도}} \times 100$$

○ 활성탄 처리를 5 분 이내로 했을 경우 실제 가공공정에서 쓰이기에 적합하지 않다고 판단하였고, 5 분 이후부터는 탈색률이 99%이상을 유지하였기 때문에 반응시간을 5 분으로 정하여 실험을 진행하였다(data not shown).

○ 2.5%의 hydrolysate(가수분해물)에 정제 활성탄을 농도(0.5, 1, 2 그리고 3%)별로 상온에서 5 분간 반응시킨 뒤, 측정된 OD (420 nm) 값과 탈색률(%)을 Table 3-1-49와 Fig. 3-1-46에 나타내었다.

Table 3-1-49. APH에 처리한 활성탄 농도별 OD값 및 탈색률(%)

Concentration of active carbon(%)	Decoloration				
	0.0 (대조구)	0.5	1.0	2.0	3.0
OD	0.570	0.084	0.038	0.005	0.001
탈색률(%)	-	85.3	93.3	99.1	99.8

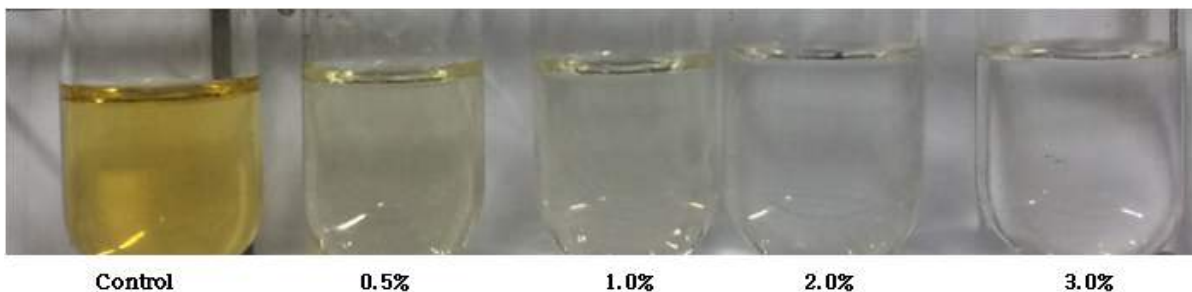


Fig. 3-1 46. APH에 처리한 활성탄 농도별 탈색 효과.

- Table 3-1-49을 보면 활성탄의 농도가 2%이상이었을 경우 탈색률이 99% 이상으로 나타나, 이 결과를 토대로 활성탄의 농도는 2%, 반응시간은 5 분으로 반응조건을 결정하였다.
- 더 높은 APH의 농도에서도 위의 반응 조건이 적합한지 알아보기 위해 APH의 농도(2.5, 5.0, 그리고 10.0%)별로 활성탄을 처리한 실험 결과를 Table 3-1-50에 나타내었다.
- APH의 농도가 2.5%인 경우에 탈색률이 99.1%로 가장 높았으며, 5.0%인 경우에는 94.9%로 다소 낮아졌지만 여전히 90% 이상의 탈색률을 나타내었다. 하지만 APH의 농도가 10%인 경우에는 탈색률이 83.0%로 낮아졌고, Fig. 3-1 47을 보면 2.5%와 5.0% 때와 비교했을 때 육안으로도 노란빛을 띠는 것을 확인 할 수 있었다.

Table 3-1-50. APH의 농도별 OD값 및 탈색률(%)

Concentration of hydrolysate (%)	2.5		5.0		10.0	
	Un-treatment	Treatment	Un-treatment	Treatment	Un-treatment	Treatment
OD	0.570	0.005	1.124	0.057	2.312	0.393
탈색률(%)	99.1		94.9		83.0	

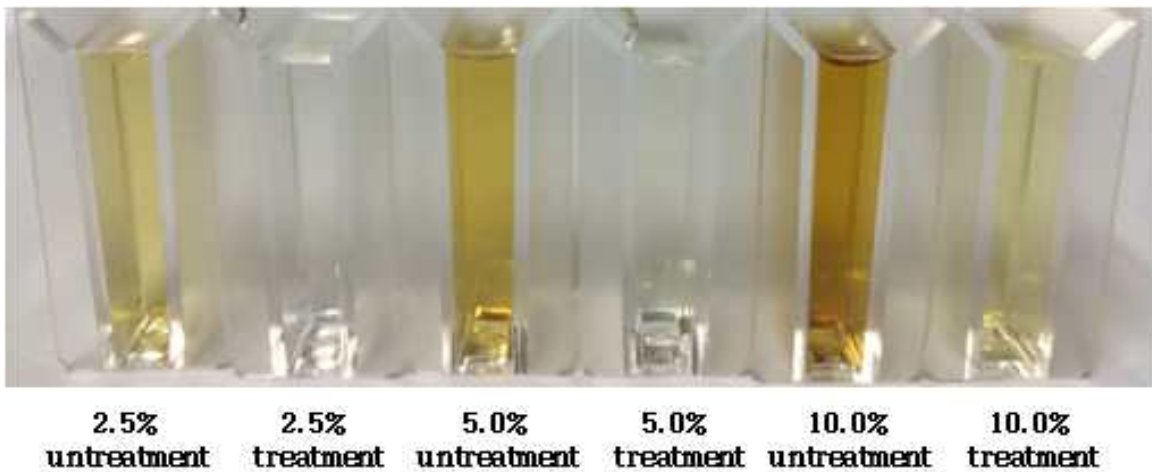


Fig. 3-1 47. 가수분해물의 농도별 활성탄 처리로 인한 탈색 효과.

- 활성탄의 탈색 효과가 온도의 영향을 받는지 알아보기 위해 각 반응온도(room temperature, 40°C, 그리고 60°C)에서 위 실험과 동일한 방법으로 OD값 및 탈색률을 알아보았다(Table 3-1-51).
- Room temperature, 40°C, 그리고 60°C 세조건 모두 탈색률이 99.1%로 나타나 활성탄을 처리 할 때 열처리를 가하지 않아도 높은 탈색효과가 있다는 사실을 확인 할 수 있었다.

Table 3-1-51. 반응처리 온도별 OD값 및 탈색률(%)

Temperature (°C)	Room temperature		40		60	
	Un-treatment	Treatment	Un-treatment	Treatment	Un-treatment	Treatment
OD	0.570	0.005	0.570	0.005	0.570	0.005
탈색률(%)	99.1		99.1		99.1	

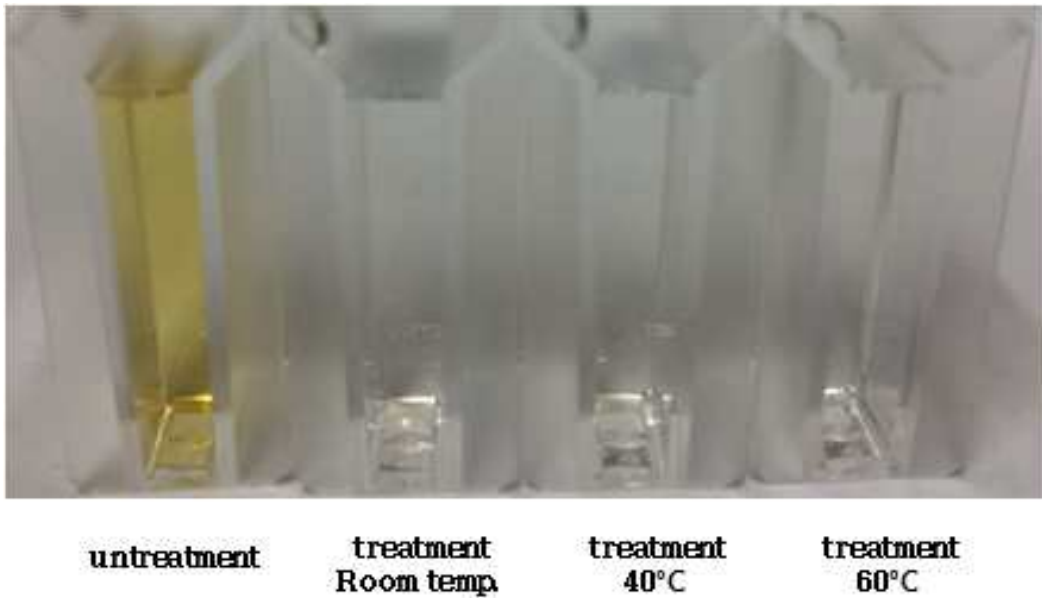


Fig. 3-1-48. 반응 온도에 따라 활성탄을 처리한 가수분해물의 탈색 효과.

- 샘플들의 전처리 공정(대조구, evaporation, 한외여과[MWCO 5 kDa] 처리, 그리고 나노여과 [MWCO 250 Da])에 따른 탈색률을 알아보았다(Table 3-1-52).
- Evaporation 공정을 거친 샘플의 탈색률이 98.8%로 가장 높았으며, 그 다음은 APHN-1(97.8%), MW < 5 kDa(96.8%), 그리고 APH(95.6%) 순이었다. 하지만 나머지 샘플들의 탈색률도 모두 95%이상으로 높은 탈색률을 나타내었다.

Table 3-1-52. 샘플 별 OD값 및 탈색률(%)

Sample	APH		Evaporated APH		MW < 5 kDa		APHN-1	
	Un-treatment	Treatment	Un-treatment	Treatment	Un-treatment	Treatment	Un-treatment	Treatment
OD	0.562	0.025	0.589	0.007	0.411	0.013	0.715	0.016
탈색률 (%)	95.6		98.8		96.8		97.8	

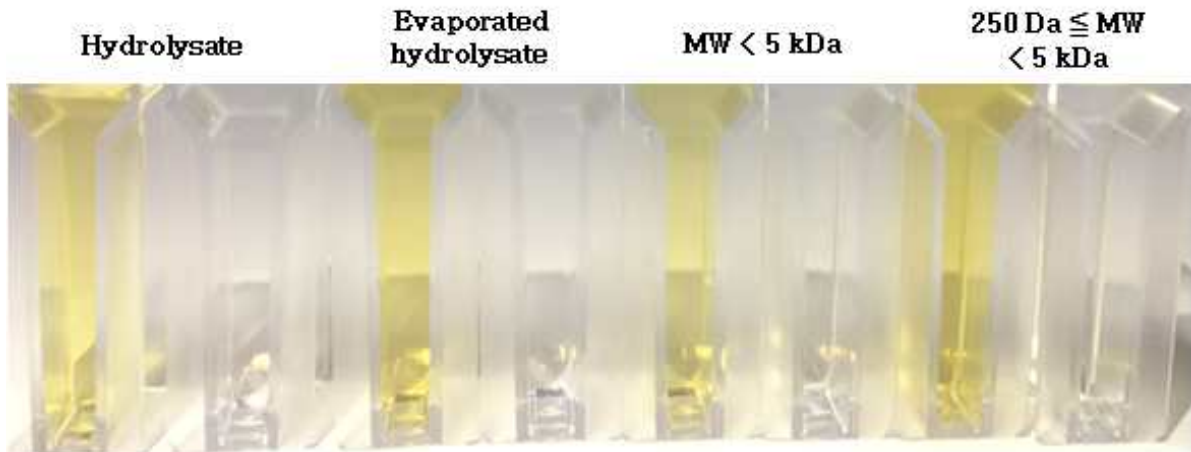


Fig. 3-1-49. 각 샘플 별 활성탄 처리로 인한 탈색 효과.

㉔ 관능검사

- APHN-1시료의 활성탄 처리 전과 후에 패널들이 느끼는 짠맛의 정도를 평가한 결과를 Fig. 3-1-50과 3-1-51에 나타내었고, 염미증진률(%)는 다음의 식으로 계산하였다.

$$\text{염미증진률(\%)} = \frac{(\text{느낀소금물의농도} - \text{실제소금물의농도})}{\text{실제소금물의농도}} \times 100$$

- APHN-1 시료(활성탄 처리 전)를 농도(0.1, 0.3, 0.5, 그리고 1%)별로 첨가하여 강도 평가를 실시한 결과, 시료를 1% 첨가하였을 경우 49.63 mM, 0.5%인 경우 48.40 mM, 0.3%인 경우 48.81 mM 그리고 0.1%인 경우 45.19 mM의 강도로 느꼈다(Fig. 3-1-50). 이 값을

염미증진률로 환산하면 1%는 10.29%, 0.5%는 경우 7.56%, 0.3%는 8.47%, 그리고 0.1%는 0.42%이다.

- APHN-1 시료(활성탄 처리 후)를 농도(0.1, 0.3, 0.5, 그리고 1%)별로 첨가하여 강도 평가를 실시한 결과, 시료를 1% 첨가하였을 경우 48.60 mM, 0.5%인 경우 46.79 mM, 0.3%인 경우 45.48 mM 그리고 0.1%인 경우 44.94 mM의 강도로 느꼈다(Fig. 3-1-51). 이 값을 염미증진률로 환산하면 1%는 8.00%, 0.5%는 경우 3.98%, 0.3%는 1.07%, 그리고 0.1%는 -0.13%이다.

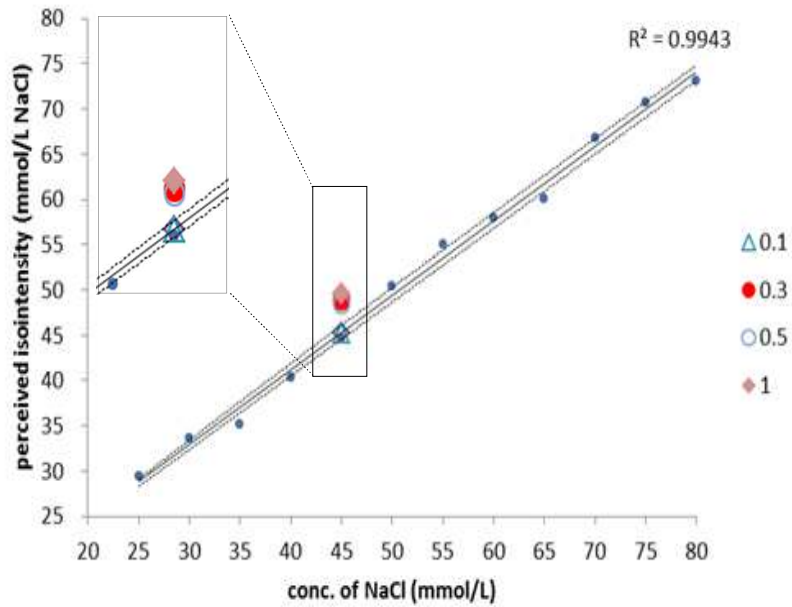


Fig. 3-1-50. APHN-1시료의 활성탄 처리 전 강도평가.

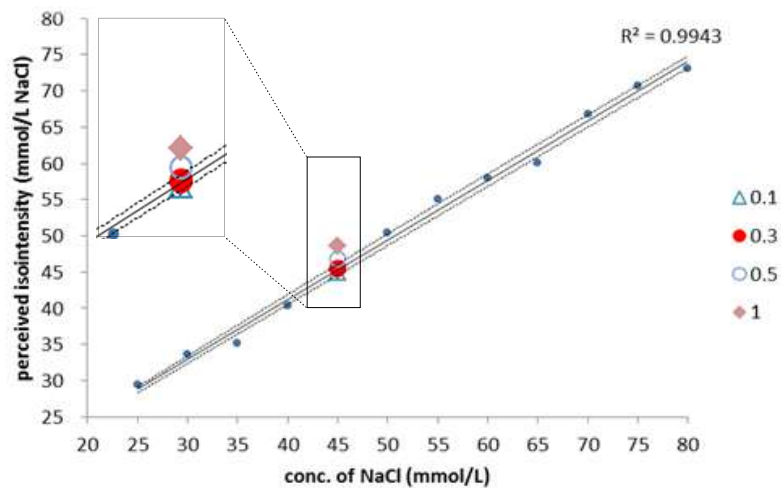


Fig. 3-1-51. APHN-1시료의 활성탄 처리 후 강도평가.

- 활성탄 처리 후 APHN-1이 같은 농도임에도 불구하고 짠맛의 강도를 덜 느낀 이유는 짠맛을 더 강하게 느끼도록 하는 요인인 노란빛과 이취가 제거되었기 때문이라고 생각되어진다.
- 하지만 활성탄 처리 전에는 순위평가 결과가 1% > 0.3% > 0.5% > 0.1% 순으로 나타난 반면, 활성탄 처리 후에는 1% > 0.5% > 0.3% > 0.1% 순위로 나타나 농도에 비례하게 짠맛의 강도를 느끼는 것을 알 수 있었다.

② 탈취

㉠ Taste profile

- Taste profile을 통해 알아본 강도평가 및 선호도 결과를 Fig. 3-1-52와 Fig. 3-1-53에 나타내었다. 1%시료 활성탄 처리 전은 #186, 1%시료 활성탄 처리 후는 #216, 2%시료 활성탄 처리 전은 #543, 그리고 2%시료 활성탄 처리 후는 #416이다.

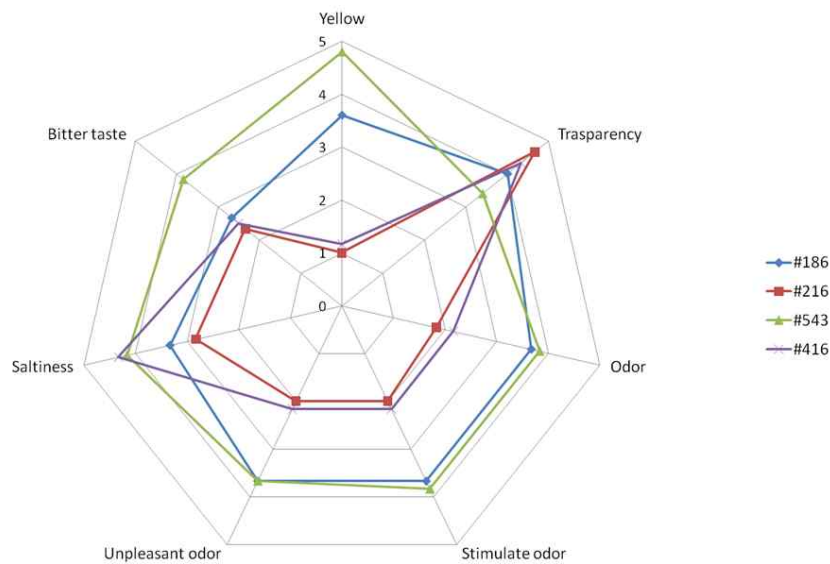


Fig. 3-1-52. 활성탄 처리 후 시료(1%와 2%)의 강도평가.

- **강도평가;** 투명도는 1%시료 활성탄 처리 후 > 2%시료 활성탄 처리 후 > 1% 활성탄 처리 전 > 2% 활성탄 처리 전 순서로 나왔으며, 노란빛의 강도는 2% 활성탄 처리 전이 다른 시료들에 비해 현저하게 높았고, 그 다음으로 1%시료 활성탄 처리 전, 나머지 활성탄 처리후의 시료 두 개는 비슷한 강도로 나타났다(Fig. 3-1-52). 쓴맛은 2%시료 활성탄 처리 전이 가장 높았으며 나머지 3개의 시료들은 비슷한 값을 보여 활성탄을 이용하였을 경우 패널들이 느끼는 쓴맛의 강도가 현저하게 줄어든 것을 알 수 있었다. 짠맛의 경우에는 오히려 2%시료 활성탄 후가 2%시료 활성탄 처리 전보다 강하게 느꼈고, 다음으로는 1%

시료 활성화탄 전 > 1%시료 활성화탄 후 순서로 짜게 느끼는 것을 확인 할 수 있었다.

- 선호도; 전체적인 선호도는 2%시료 활성화탄 처리 후가 가장 높았으며 나머지 3 개의 시료는 비슷한 값을 나타냈다(Fig. 3-1-53). 외형은 1%시료 활성화탄 처리 전이 가장 높았으며, 그 다음은 2%시료 활성화탄 처리 후 > 1%시료 활성화탄 처리 후 > 2%시료 활성화탄 처리 전 순으로 나타났다. 색상은 1%시료 활성화탄 처리 전이 가장 높았고, 나머지 시료 3 개는 비슷한 값을 나타냈다. 향은 1%시료 활성화탄 처리 후 > 2%시료 활성화탄 처리 후 > 1%시료 활성화탄 처리 전 > 2%시료 활성화탄 처리 전 순서로 나타났고, 맛은 4 개 시료모두 비슷하게 나타났다.

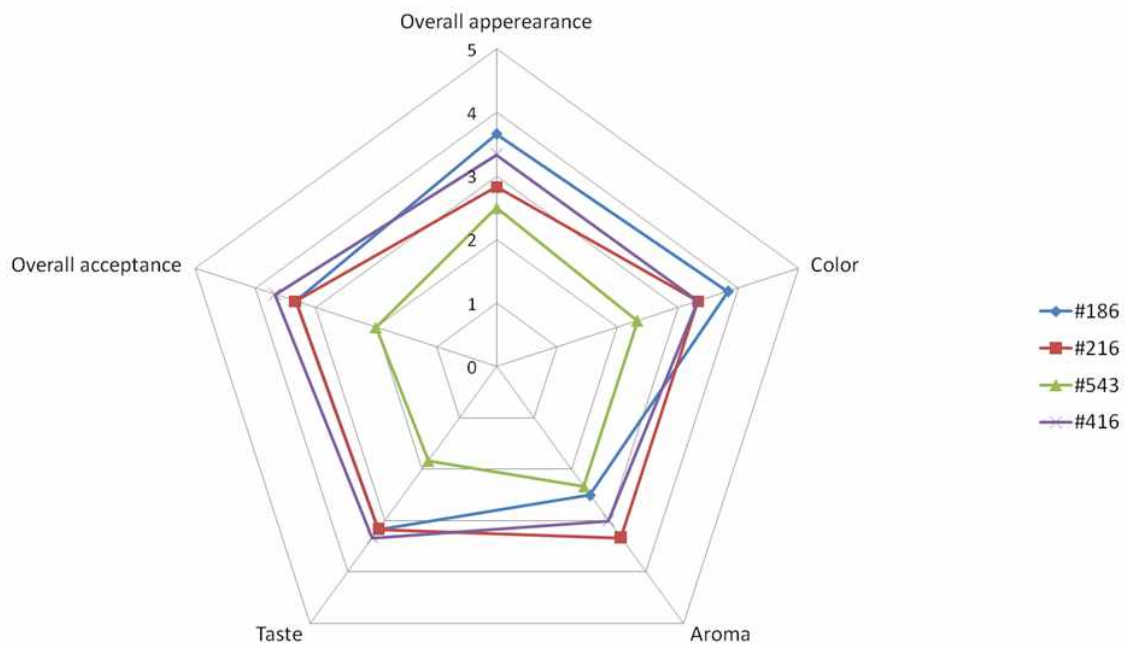


Fig. 3-1-53. 활성화탄 처리 후 시료(1%와 2%)의 선호도.

㉞ 향미 profile

- 향미 profile을 통해 알아본 강도평가 및 선호도 결과를 Fig. 3-1-54에 나타내었다.
- 강도평가; 강도평가를 전체적으로 살펴보면, 2%농도 시료 활성화탄 처리 전의 강도가 다른 시료에 비해 전체적(냄새와 색에 대한 전체적 강도, 노란빛의 강도, 마른 멸치 냄새, 마른 멸치 맛, 짠맛, 쓴맛, 그리고 생선 비린 맛)으로 높게 나타난 것을 확인 할 수 있었다. 2%농도 시료의 활성화탄 처리 전과 후를 비교해 보면, 활성화탄 처리 후 노란빛의 강도, 냄새 (전체적인 강도와 마른 멸치 냄새) 그리고 맛(전체적 강도, 마른 멸치 맛, 짠맛, 쓴맛, 그리고 생선 비린 맛)에 대한 강도가 낮아진 것을 알 수 있다. 활성화탄 처리 후 2%농도 시료에서 느끼는 짠맛이 활성화탄 처리 전보다 다소 낮아지긴 하였지만, 여전히 1%농도 시료보다는 짜게 느낀다는 것을 보아 색이 짠맛의 강도를 느끼는데 절대적인 영향을 미치

지는 않는 것으로 판단된다. 1%농도 시료의 활성탄 처리 전과 후에도 비슷한 경향성을 보여 활성탄 처리가 탈색 및 탈취를 하는데 매우 효과적이라는 사실을 확인 하였다.

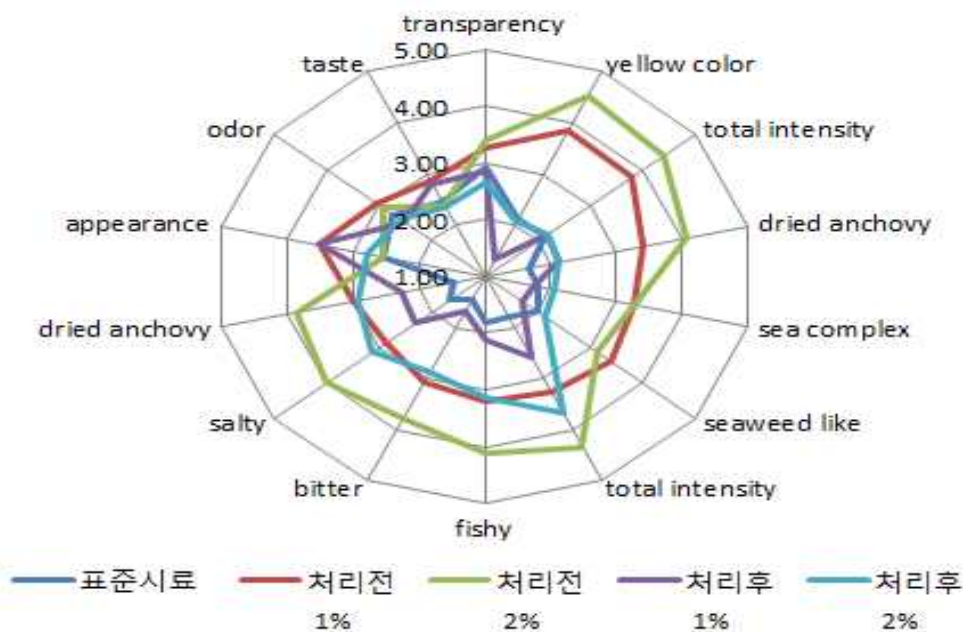


Fig. 3-1-54. 5kDa이하 eHAP 가수분해물 향미프로파일 결과(처리 전, 후 비교).

○ 기호도; 기호도를 살펴보면, 외관, 냄새, 그리고 맛에서 1%농도 시료(활성탄 처리 전)의 기호도가 가장 높게 나타났다. 이것은 본 연구에서 제조된 소재를 액상 조미료 개발에 사용할 때 어느 정도의 노란 빛, 냄새 그리고 향은 소비자들에게 영향을 미치지 않거나 오히려 좋게 받아들여진다는 것을 의미한다. 이보다 더 자세한 결과 분석 내용은 제 1 협동 결과에 서술되어있다.

㉔ GC-MS 분석 결과

○ GC-MS 분석을 통해 각 조건마다 휘발성 성분들이 어떠한 패턴으로 변화하는지 살펴보았다(Fig. 3-1-55). 그 결과 8 개의 시료에서 총 29 종의 휘발성 및 기타 유기 대사 물질이 검출되었는데, 성분 목록과 함량은 제1협동 위탁결과에 자세히 나와 있다.

○ 활성탄을 처리한 시료의 경우, 휘발성이 예상되는 성분으로서 제거된 물질은 phenylacetic acid 및 phenylacetamide 등이 있었으며, 기타 소량의 alkylamine 류의 농도 변화도 관찰되었다.

○ 휘발성 여부가 불분명한 대사물 중에 GC-MS retention time 35 min에서 검출되는 물질들은 활성탄을 처리 하지 않았을 경우 아래 Fig-3-1-55와 같이 다량 존재하였으나, 활성탄을 처리한 후에는 대부분 제거되어 깨끗한 피크를 확인 할 수 있었다.

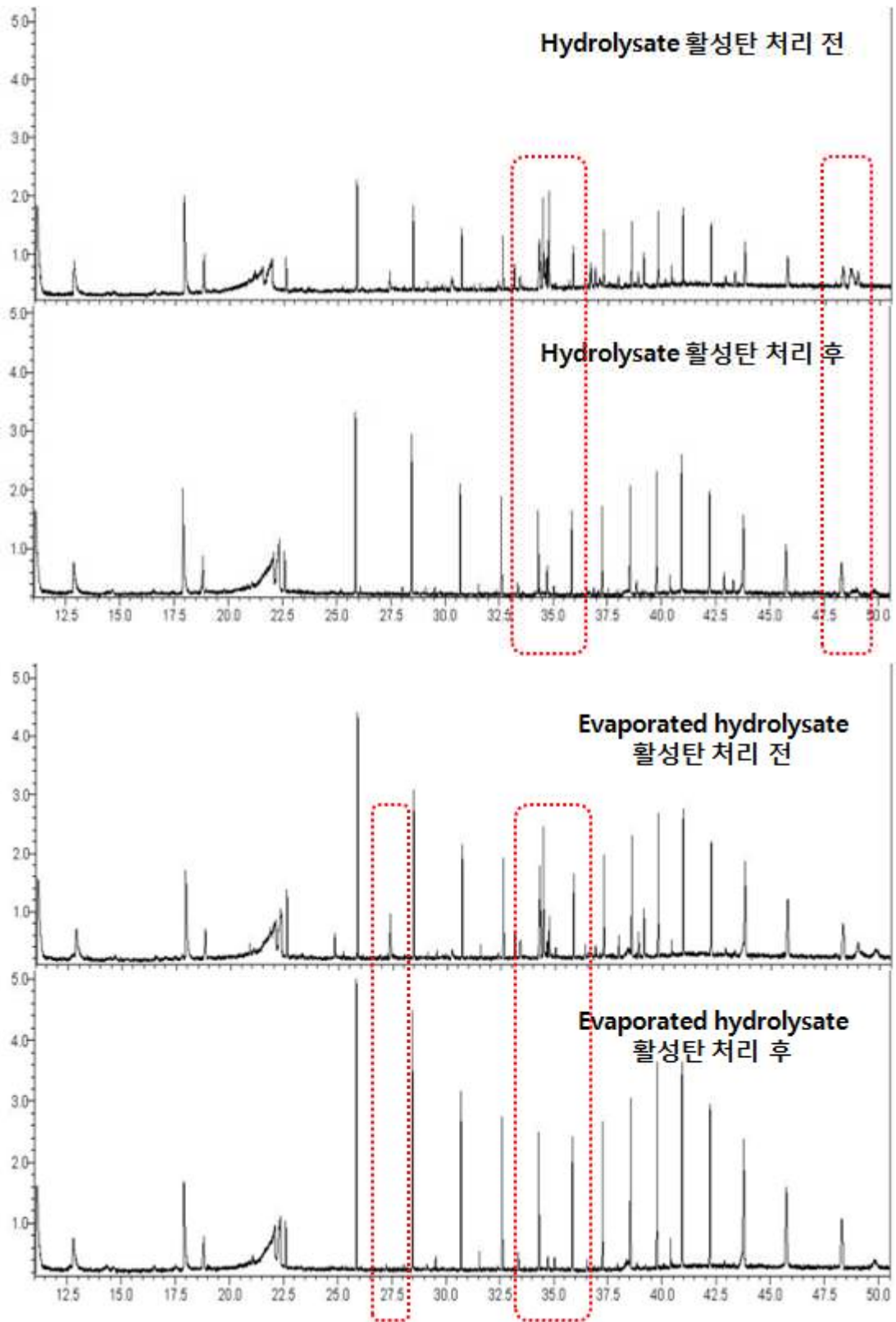


Fig. 3-1-55. 휘발성 물질의 피크 비교.

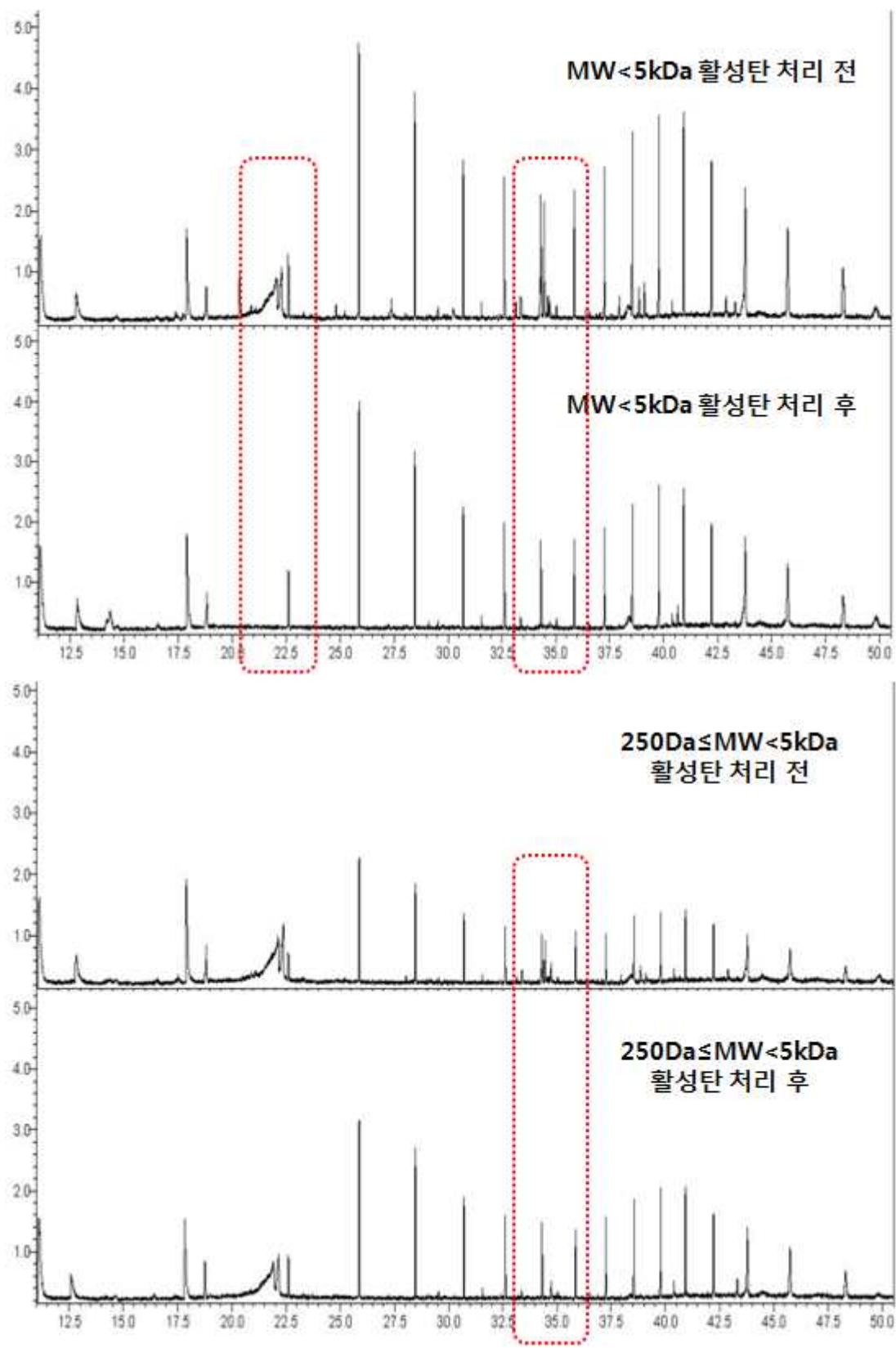


Fig. 3-1-55. Continue

③ 탈색 및 탈취공정 후 총 단백질 함량 변화

○ Evaporation, membrane filter, 그리고 활성탄 처리 후 총 단백질 함량 변화를 Table 3-1-53에 정리하였다. APH는 대조구로 사용하였고, E-APH는 evaporation 공정을 거친 샘플, E.F-APH는 evaporation과 membrane filter 공정을 거친 샘플, 그리고 E.F.A-APH는 evaporation, membrane filter, 그리고 활성탄처리 공정을 거친 샘플이다. 그 결과 evaporation과 membrane filter처리 후에는 대조구 APH와 비교하였을 때 비슷한 함량을 보여 단백질 손실이 거의 없는 것으로 나타났다. 하지만 활성탄 처리 후에는 63.2 g/100 g로 소량 감소한 것을 확인 할 수 있었다.

Table 3-1-53. Evaporation 및 활성탄 처리 전 후의 총 단백질 함량 변화

	APH	E-APH	E.F-APH	E.F.A-APH
Protein (g/100 g)	74.80	72.80	74.80	63.20

(라) 결론

- 활성탄의 농도(0.0~3.0%)별로 탈색률을 확인한 결과 활성탄의 농도가 높아질수록 탈색률이 높아지는 것을 확인 할 수 있었고, 특히 2%부터는 탈색률이 99%이상으로 나타났으며, APH의 농도(2.5, 5.0, 그리고 10.0%)별로 탈색률을 확인한 결과 2.5%와 5.0%인 경우에는 탈색률이 90%이상이었으며, APH의 농도가 10%인 경우에는 탈색률이 83%로 감소하였다. 또한 활성탄 처리 시 온도(room temperature, 40°C, 그리고 60°C)가 탈색률에 어떠한 영향을 미치는 지 확인한 결과 세조건 모두 99.1%의 탈색률을 보여 가열처리가 필요 없음을 알 수 있었다.
- 샘플들의 전처리 공정(대조구, evaporation, 한외여과[MWCO 5 kDa] 처리, 그리고 나노여과 [MWCO 250 Da])에 따른 탈색률을 알아본 결과 evaporation 공정을 거친 샘플의 탈색률이 98.8%로 높다는 것을 확인 할 수 있었다. 활성탄 처리 전에는 APHN-1 시료를 1% 첨가하였을 경우 염미증진효과가 10.29% 있었으며, 활성탄 처리 후에는 8%로 다소 떨어졌지만, 여전히 염미증진효과가 있는 것으로 나타났다. 활성탄 처리 전에는 순위평가 결과가 1% > 0.3% > 0.5% > 0.1% 순으로 나타난 반면, 활성탄 처리 후에는 1% > 0.5% > 0.3% > 0.1% 순위로 나타나 농도에 비례하게 짠맛의 강도를 느끼는 것을 알 수 있었다.
- Taste profile 결과 2% 시료를 활성탄 처리 하였을 경우, 짠맛은 활성탄 처리 전보다 강하게 느끼는 반면, 쓴맛을 느끼는 강도는 줄어들어 전체적인 선호도가 가장 높게 나타났다.

- 향미 profile을 통해 2% 시료를 활성탄 처리 할 경우 노란빛, 냄새, 그리고 맛에 대한 강도들이 활성탄 처리 전 보다 낮아지는 것을 확인 할 수 있었고, 활성탄을 이용한 탈색 및 탈취가 매우 효과적이라는 사실을 알 수 있었다. 하지만 활성탄 처리 후 색, 냄새 그리고 맛의 강도가 전체적으로 낮아짐에도 불구하고, 기호도면에서는 활성탄 처리를 하지 않은 1%농도 시료가 가장 높았다. 따라서 천연 조미료를 개발할 때 본 연구에서 개발한 소재의 농도만 잘 조절한다면 탈색 및 탈취 공정 없이도 제품을 생산할 수 있으리라 판단된다.
- 탈색 및 탈취공정을 위해 사용된 evaporation, membrane filter, 그리고 활성탄 처리 공정 중에 활성탄 처리 공정은 소량의 단백질 손실이 있는 것으로 나타났다.

(4) 제형화 공정개발(동결건조와 분무건조)

(가) 서론

- 동결건조는 맛, 색, 기능성 성분, 향기 성분 등의 품질지표들은 우수하게 나타나지만 건조시간이 길고 에너지 소비 및 처리비용이 높아 식품건조에는 제한적으로 활용되는 단점이 있다.
- 분무건조법은 미세캡슐화를 만드는 상업화된 방법 중 가장 보편화 된 것으로 그 생산량도 가장 많아서 여러 분야에서 다양한 목적으로 이용되고 있다. 미역과 다시마와 같은 해조류는 특별한 처리 공정을 거치지 않는 경우 비린내가 심하여 다양한 용도 개발에 어려움이 따르나 분무건조의 경우 분무탈취(deodorization by spray drying)에 의한 맛과 냄새의 masking 효과 및 최종산물의 안정성이 좋고 대량으로서 지속적인 생산이 가능하며, 또한 산업 현장에서 쉽게 적용되고, 저렴하게 적용될 수 있는 장점이 있다.
- 본 실험에서는 멸치 고압효소가수분해물을 분말화하여 소재로서 천연 조미료를 제조할 때, 어떠한 공정법이 더 적합한지 판단하기 위하여 두 가지 건조법의 수율, 수분함량, 그리고 입자 사이즈를 비교, 평가하였다.

(나) 재료 및 방법

- Fig. 3-1-56의 절차에 따라 10 kDa permeate 액상 시료를 파우치에 담아 deep freezer (-70°C)에서 24 시간 동결시킨 후, 동결건조(Freeze dryer, PVTF20R, 일신바이오베이스, Korea)시켜 냉동상태(-20°C)로 보관하였다.
- 제2협동에 의뢰하여 10 kDa permeate 시료를 분무건조하기 위한 최적 조건을 찾기 위해 다양한 분무건조 조건을 실시한 뒤 수분 함량과 입자 사이즈를 측정하였다. 제2협동에서 소유한 분무건조기(spray dryer, SD-1000, EYELA, Japan)는 4 가지 공정조건이 있는데 inlet/outlet 온도(°C), atomizing pressure(kPa), blow power(m³/min), feeding rate(mL/h) 등이 해당된다. 본 연구에서 실험한 공정조건을 Table 3-1-54에 정리하였다.

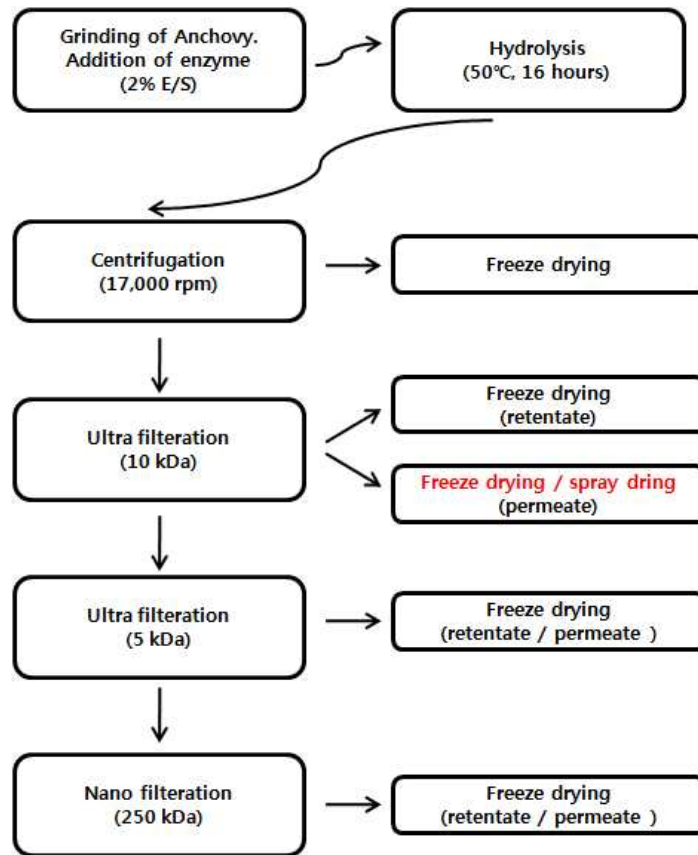


Fig. 3-1-56. Freeze drying - spray drying sequence.

Table 3-1-54. 분무건조 실험 조건

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Inlet temperature (°C)	180	180	200	200
atomizing pressure (kPa)	180	240	240	180
blow power (m ³ /min)	0.50	0.50	0.50	0.50
Feeding rate (mL/h)	500	500	500	500

(다) 실험결과 및 고찰

① 수율 및 수분함량

- 10 kDa permeate 시료를 분무건조 및 동결건조한 분말의 수율과 수분 함량을 비교한 결과는 Table 3-1-55과 같다. 각각의 수율은 기기에 주입한 10 kDa permeate 액상 시료 (375 mL)에 존재하는 고형물(18.38 g/375 mL) 대비 건조한 파우더의 무게(g)를 백분율로

나타내었다. 조건을 달리한 분무건조 시료(Samle 1~4)의 수율은 각각 34.01%, 22.31%, 25.61%, 그리고 27.70%였으며, sample 1의 수율이 가장 높게 나타났다. 동결건조의 수율은 92.30%로 분무건조한 시료에 비해 월등히 높은 값을 나타내었다.

- 수분 함량에서는 분무건조 시료가 동결건조에 비하여 2 배 가량 높은 값을 나타내었다.

Table 3-1-55. 분무건조와 동결건조한 시료의 수율 및 수분 함량 비교

	분무건조				동결건조
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5
회수량 dry weight (g/375 mL)	6.15	4.10	4.72	5.09	16.96
회수율 (%)	34.01	22.31	25.61	27.70	92.30
수분함량 (%)	9.11±1.05	9.33±1.22	9.66±2.52	9.44±1.30	4.86±0.23

② 입자 사이즈

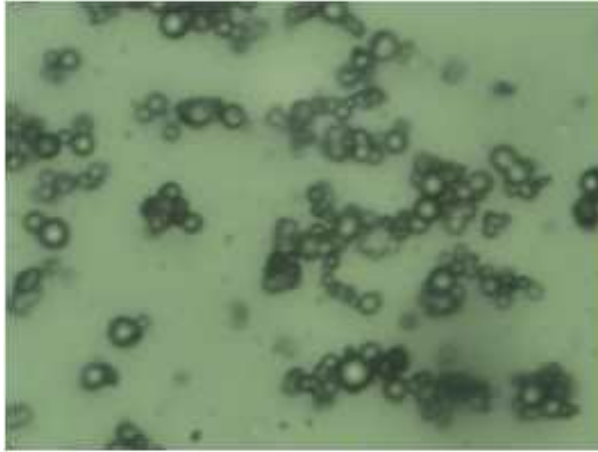
- 10 kDa permeate 시료를 분무건조 및 동결건조한 분말의 입자 사이즈를 측정한 결과는 Table 3-1-56과 Fig. 3-1-57과 같다. 그 결과 분무건조와 동결건조한 시료의 입자 사이즈는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다.

Table 3-1-56. 분무건조와 동결건조한 시료의 입자사이즈 비교

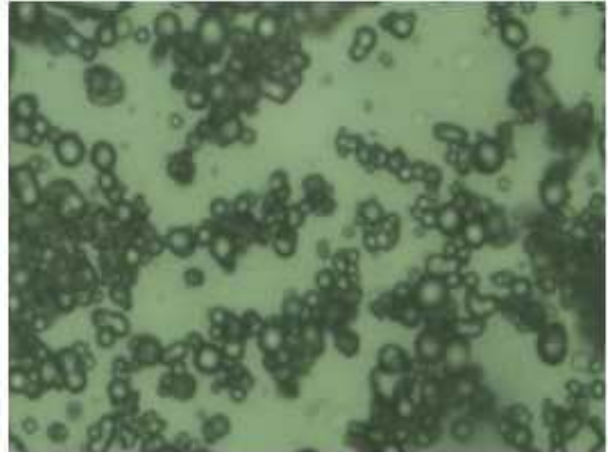
	분무건조				동결건조
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5
사이즈 (μm^2)	28.06±14.39	26.39±12.58	28.35±17.61	23.52±13.72	27.90±14.30

③ 색상 비교

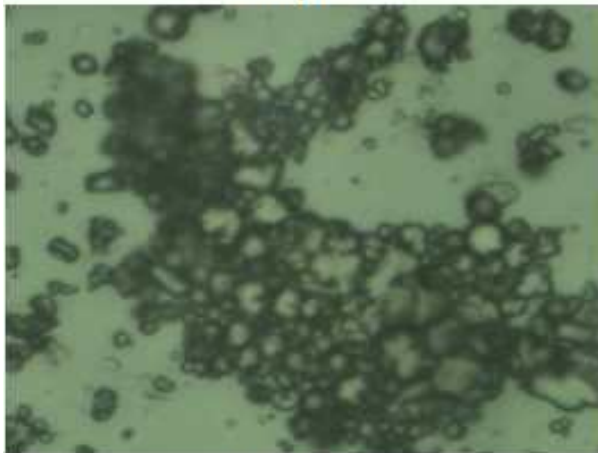
- 10 kDa permeate 시료를 동결건조 및 분무건조한 시료의 사진을 Fig. 3-1-58에 정리하였다. 분무건조한 시료의 색상이 동결건조한 시료의 색상보다 밝은 것을 확인 할 수 있었다.



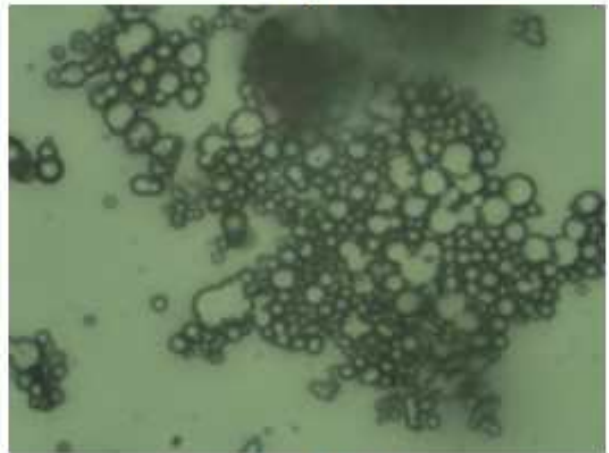
Sample 1



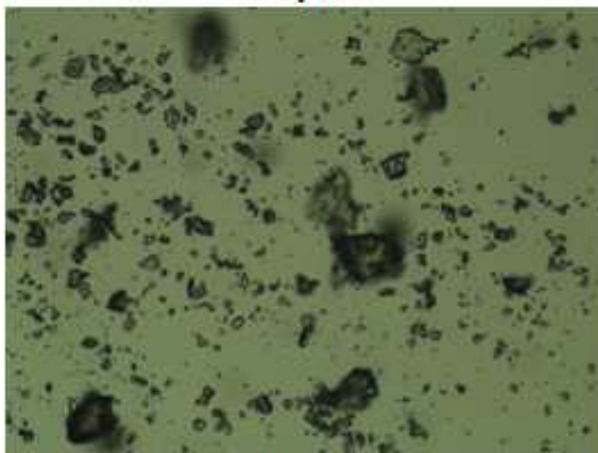
Sample 2



Sample 3



Sample 4



Sample 5

Fig. 3-1-57. 건조된 멸치가수분해물(MW < 10 kDa)을 현미경으로 본 입자사이즈(현미경 배율; Sample 1-Sample 4 [x1,000], Sample 5 [x100]).

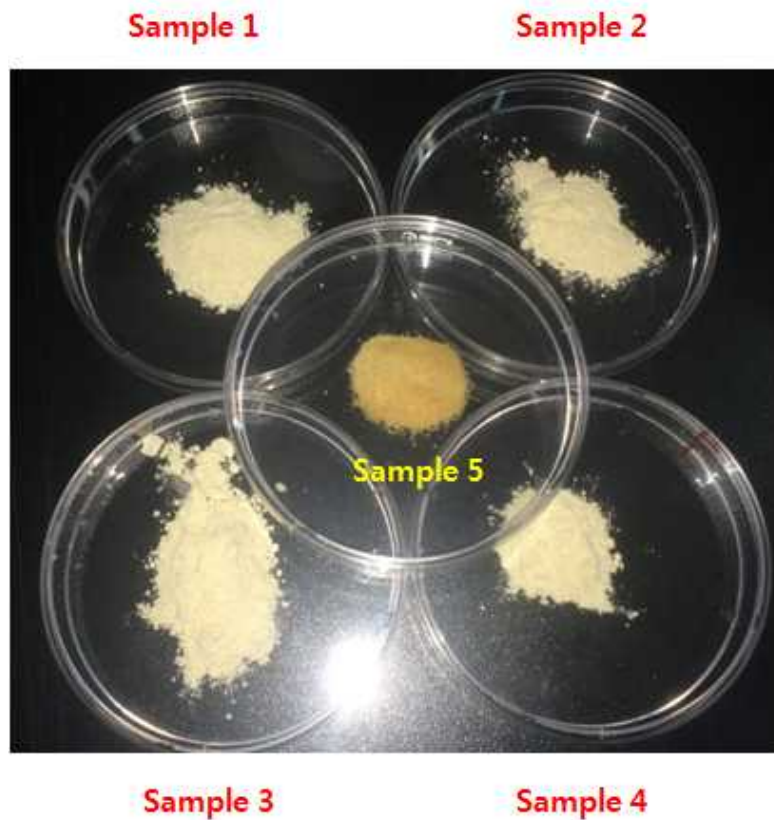


Fig. 3-1-58. 동결건조 및 분무건조한 시료.

(라) 결론

- 멸치 가수분해물 획분(10 kDa permeate)을 동결건조와 분무건조 시스템을 통해 분말 제형의 시료로 만들어 비교 분석 실험을 한 결과, 입자 사이즈는 두 가지 건조 방법에서 유의적인 차이가 없었지만, 회수율은 동결건조한 시료가 분무 건조한 시료보다 많게는 4 배 이상 높았으며, 수분함량은 1/2 배로 나타났다.
- 최적의 분무건조 조건을 찾기 위해 4 가지 공정 조건(inlet/outlet 온도 [°C], atomizing pressure [kPa], blow power [m³/min], feeding rate [mL/h])을 달리 하여 실험 한 결과 Sample 1의 조건 (Inlet temperature; 180°C, atomizing pressure; 180 kPa, blower rate; 0.5 m³/min, 그리고 feeding rate; 500 mL/h)에서의 회수율이 34.01%로 나머지 3 가지 조건에서의 회수율보다 높은 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 사실로는 분무건조를 통한 분말제형 생산 가능성만을 타진한 것이지 공정을 최적화하지는 못한다.
- 하지만 동결건조 및 분무건조한 시료의 색상을 비교한 결과 분무건조한 시료의 색상이 동결건조한 시료의 색상보다 밝은 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 멸치 가수분해물로부터 얻은 분말 제형을 이용하여 천연 조미료의 소재를 개발 할 경우 제품의 외형 및 색상에 덜 영향을 미치는 분무건조 공정이 더 적합하다. 더불어 공정 처리 비용과 건조 시간

을 고려하더라도 분무건조가 동결건조보다 pilot plant scale system에서의 활용 가능성이 높다.

- 상용화를 위한 대량 생산의 경우, 용도에 따라 부영제를 첨가하는 실증 연구를 통하여 운전조건을 최적화 하여야 할 것이다.

(5) 저장성 향상을 위한 공정개발

(가) 분말 제형

- SD 공정으로 분말화 제형을 만드는 경우에는 수분함량이 10% 이내로서 미생물 생육의 문제는 해결 가능하다. 단, 제품 specification에서 미생물 기준을 확립할 필요가 있다.

(나) 액상 제형

- 한외여과법은 과일주스의 청징과, 효소적 갈변현상 억제 수단뿐만 아니라 열처리에 민감한 액상식품의 제균, 고분자 물질의 분획 및 분리, 저온저에너지 농축 등에 이용되며, 폐수 중 유효성분의 회수, 효소의 정제 등 여러 분야에 응용되고 있지만, 멸치가수분해물의 저장성 증진을 위한 한외여과공정 적용에 대한 연구는 찾아보기 어려운 실정이다.
- 특히 아래 Fig. 3-1-59는 APHN-1 시료를 4 주 동안 냉장 보관했을 때의 모습이다. 본 샘플은 나노여과 시스템을 통해 탈염이 된 상태이기 때문에 미생물 증식이 다른 분획물보다 빨리 이루어진 것을 확인할 수 있었다.



Fig. 3-1-59. APHN-1시료를 냉장보관한지 4주 후의 모습.

- 문헌 자료에 의하면 한외 여과를 이용하여 미생물 증식 억제는 10^3 이하로는 어려워 냉장 유통 제품에 적용하는 경우가 다소 발표되고 있다.
- 소재로서 제품화를 하기 위해서는 상온유통이 가능한 제품이어야 경쟁력이 있다고 판단된다. 따라서 UHT를 하거나, 액상을 농축하고 formulation을 하여 pH를 4.0 이하로 낮추

어 HTST와 무균 포장을 하여야 한다. 하지만 이러한 공정은 시설 투자비용이 너무 많이 소요되므로 고품질의 고부가 소재로 개발되어 B2B 제품으로 활용되거나 소재로는 분말 상으로 개발되어야 한다고 판단하였다.

- 본 제품이 고품질의 고부가 제품이라 하더라도 시장 경쟁력이 떨어지는 경우에는 상품화가 요원하므로 소재로서는 분말 상으로 개발되어야 한다고 판단하였고, 액상으로는 차년도 계획에 따라 천연조미료나 풍미와 짠맛증진 효과가 탁월한 액상 소스나 천연조미료 형태로 개발하고자 하는 연구 개발의 필요성을 확인할 수 있었다.

(6) 전 공정의 통합화를 통한 제조기술 확립

(가) 전 공정의 통합화를 통한 생산 공정 설계

- 지금까지 연구개발 결과를 토대로 다음과 같이 단계별 공정의 고려사항을 제시하고, 시설 및 장비를 제시하였다(Table 3-1-57).

Table 3-1-57. 단계별 공정의 고려사항과 검토 시설 및 장비

단계별 공정	고려 사항	검토 시설 및 장비(예상)	
1. 원료 확보	- 운송의 및 원료 확보의 용이성		
2. 세척 (Washing)	- 용량 및 원료 다양성을 고려 - 가열 처리 접목 용이		
3. 분쇄 및 혼합 (Grinding & homogenization)	- 냉동 원료 처리 가능 - 분쇄 효율		
4. 중간 포장 (Packaging)	- 용량 및 가격		

<p>5. 고압가수분해 (Hydrolysis under pressure)</p>	<p>- 용량 및 가격 - 내구성</p>	
<p>6. 가열 처리 (Heat treatment)</p>	<p>- 용량 및 가격 - double jacket tank</p>	
<p>7. 급냉 (Quick cooling)</p>	<p>- 용량 및 가격</p>	<p>- 제작</p>
<p>8. 저온 숙성 (Cold aging)</p>	<p>- 용량 및 가격</p>	
<p>9. 지방제거 (Defatting)</p>	<p>- 제거를 할 수 있는 아이디어 기술</p>	<p>- 경사진 면(stainless) 제작</p>
<p>10. 원심분리 (Centrifuge)</p>	<p>- 용량 및 가격</p>	
<p>11. 분획 및 농축 (Fractionation & concentration)</p>	<p>- 막 특성(UF 10 kDa, 내구성 등) - 용량 및 가격</p>	

12. 건조 (Spray drying)	- 용량 및 가격	
13. 분말 포장 (Powder packaging)	- 용량 및 가격	

(나) 생산 공정 설계도(300 kg 규모)

○ 일 300 kg의 멸치를 고압 효소가수분해 할 수 있는 통합공정은 다음과 같다(Fig. 3-1-60).

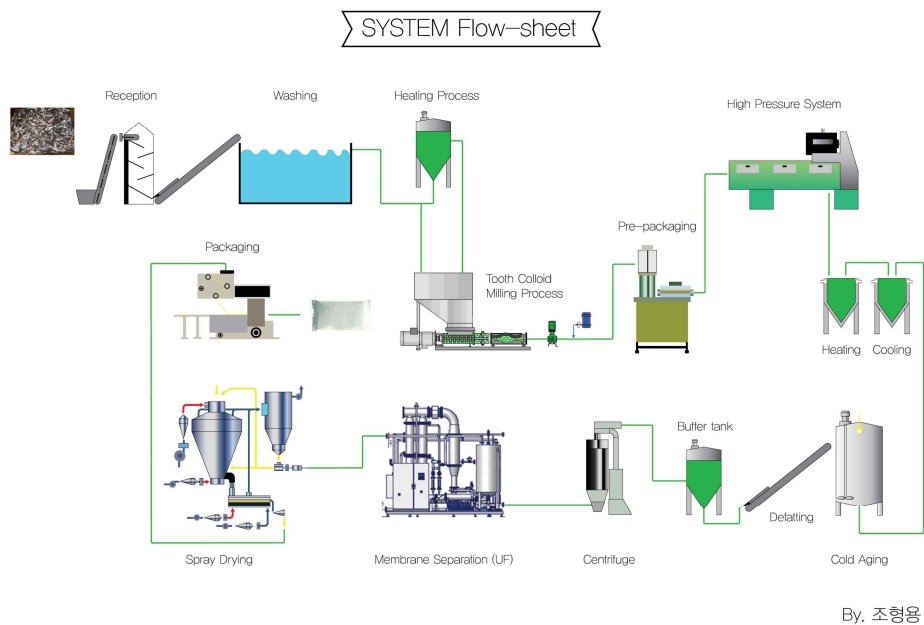


Fig. 3-1-60. 통합 생산 공정 설계도.

라. 염미증진제 가능성 탐색 및 규명

- 고압효소가수분해된 APH와 분획물의 활용방안으로 짠맛증진 소재 및 풍미증진 소재로의 가능성을 타진하고자, 2차 시제품으로 생산된 APH와 그 분획물을 제1협동에 제시하고, 짠맛 증진효과 및 풍미증진 효과에 대한 관능검사와 짠맛증진물질로 밝혀진 **L-Arginine** 과 **Arginyl dieptides** 함량 분석을 의뢰하였다.
- 실험 방법 및 자세한 시험 결과는 제1협동 및 제1협동 위탁 보고서를 참고하기 바란다.

(1) 한외여과와 나노여과로 분획한 분획물들의 L-Arginine과 Arginyl dieptide 함량

- Table 3-1-58을 보면, APHN-2 시료와 APHU-1 시료에서 RA/AR이 검출되지 않은 것을 제외하면, 나머지 시료에서는 8 개의 peptides가 모두 검출되었으며, di-peptides가 가장 많을 것이라 예상하였던 APHN-1 분획물에서 실험에 사용된 모든 compound들의 농도가 높게 나타났다. 이 결과를 통해 APHN-1 분획물에 짠맛 증진 물질이 가장 많이 있음을 확신 할 수 있었고, 생산 공정 중 나노여과 시스템(250 Da)은 peptide의 분획화에 매우 효과적임을 확인할 수 있었다.

Table 3-1-58. 각 분획물에 함유된 L-Arginine과 Arginyl dipetide의 농도

Compound	Concentration(μmol/L)				
	APH	APHU-1	APHU-2	APHN-1	APHN-2
EH	0.8	1.1	0.8	9.9	0.0
RE / ER	0.7	0.7	1.4	4.0	0.0
EQ	4.6	4.6	6.1	12.4	0.0
EG	0.3	3.2	2.3	6.5	0.0
RA / AR	0.1	0.0	0.6	1.3	0.0
RD	0.4	0.2	0.4	1.5	0.0
RG / GR	3.0	1.6	3.5	6.4	0.0
EE	1.7	2.5	2.1	5.4	0.0

- Schindler 등(2011)이 짠맛 증진효과가 있다고 보고한 peptide중에 RE, RA, RG 모두 APHN-1 시료에서 각각 4.0, 1.3, 그리고 6.4 μmol/L로 가장 많이 검출되었고, 그 외의 peptide 중에는 EQ(12.4 μmol/L), EH(9.9 μmol/L), EG(6.5 μmol/L)가 높게 검출되었으며, 분석 대상 peptide 중에서는 EQ(Glu-Gln)가 가장 많은 양이 검출되었다.

(2) 관능검사

- Fig. 3-1-61에서와 같이 Model broth에서 10 kDa permeate 시료의 농도별로 강도 평가를 실시한 결과, 1%인 경우 59.83 mM, 0.5%인 경우 51.23 mM, 0.3%인 경우 55.21 mM, 그리고 0.1%인 경우 53.13 mM의 강도를 느꼈다. 이를 염미증진률로 환산하면, 1%인 경우 32.96%, 0.5%는 13.84%, 0.3%는 22.69%, 그리고 0.1%는 18.07%로 나타났다.

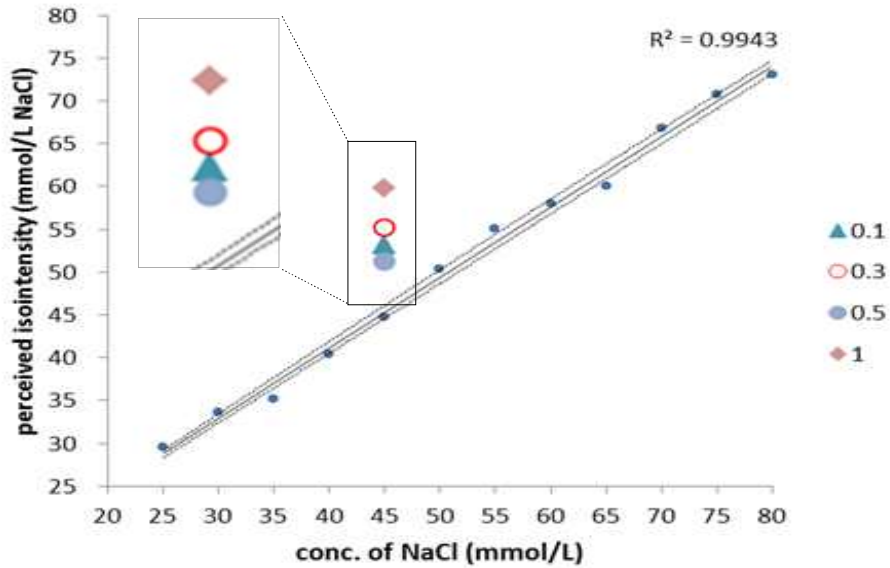


Fig. 3-1-61. 10 kDa permeate 시료의 첨가량에 따른 짠맛 강도 평가(model broth).

○ Fig. 3-1-62에서와 같이 Model broth에 APHN-1 시료를 농도(0.1, 0.3, 0.5, 그리고 1%)별로 첨가하여 강도 평가를 실시한 결과, 시료를 1% 첨가하였을 경우 49.63 mM, 0.5%인 경우 48.40 mM, 0.3%인 경우 48.81 mM 그리고 0.1%인 경우 45.19 mM의 강도로 느꼈다 (그림 1-38). 이 값을 염미증진률로 환산하면 1%는 10.29%, 0.5%는 경우 7.56%, 0.3%는 8.47%, 그리고 0.1%는 0.42%이다.

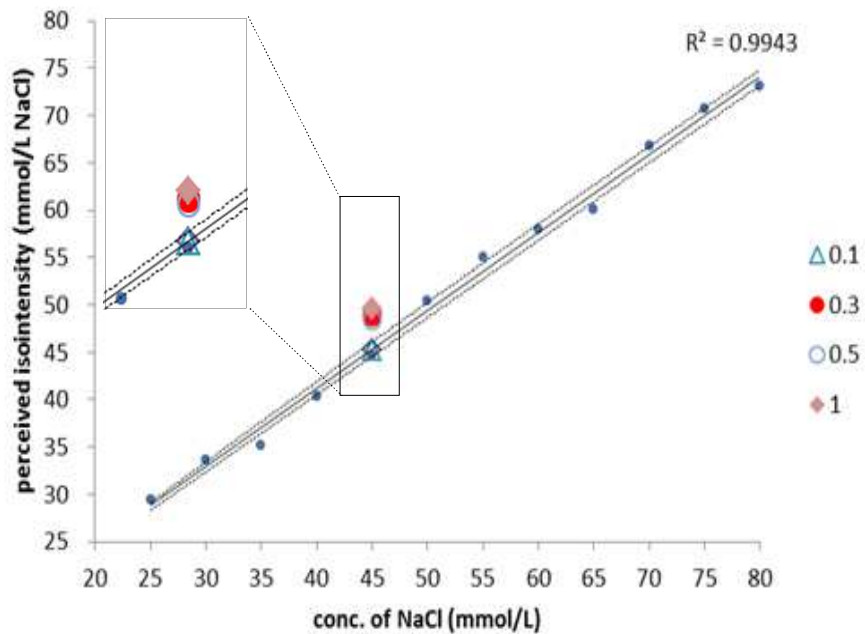


Fig. 3-1-62. APHN-1 시료의 첨가량에 따른 짠맛 강도 평가(model broth).

(3) 결론

- 각각의 분획물에서 짠맛 증진 효과가 있다고 보고된 L-arginine과 arginyl dipeptides의 농도를 비교한 결과 APHN-1 분획물에서 실험에 사용된 모든 compound들의 농도가 높게 나타났다. 이 결과를 통해 APHN-1 분획물에 짠맛 증진 물질이 가장 많이 있음을 확인할 수 있었다.
- APHN-1 시료에서 8 종의 peptides가 가장 많이 검출된 반면, APHN-2 시료에서는 peptides가 전혀 검출되지 않았다. 이로써 생산 공정 중 나노여과 시스템(250 Da)은 di-peptide 이상의 분획화에 매우 효과적임을 알 수 있었다.
- 생수에 NaCl을 각각의 농도(25, 35, 그리고 45 mM)로 용해시킨 뒤, 10 kDa permeate 시료의 농도를 0.1, 0.3 그리고 0.5% 첨가하여 짠맛의 강도를 평가한 결과, 25 mM, 35 mM, 그리고 45 mM에서 모두 짠맛 증진 효과가 나타났으며, 그 중에 45 mM에서 관능검사 요원들이 강도차이를 가장 잘 구분하였다. Model broth에서 10 kDa permeate 시료에 대한 강도 평가를 실시한 결과 생수에 시료를 용해시켜 진행하였던 예비평가보다는 다소 낮아졌지만, 여전히 짠맛 증진 효과가 나타났다. Model broth에서 APHN-1 시료에 대한 강도 평가를 실시한 결과 시료 0.1%, 0.3%, 0.5%, 그리고 1%를 첨가하였을 경우 모두 약간의 짠맛 증진 효과(1%는 10.29%, 0.5%는 경우 7.56%, 0.3%는 8.47%, 그리고 0.1%는 0.42%의 염미증진률)가 나타났다.
- 따라서 이상의 결과로부터 짠맛증진소재로서의 활용가능성을 확인할 수 있었다.

마. 제조된 eHAP의 활용방안 검토

- 개발 기술과 소재를 산업화하기 위해서는 commercial scale의 생산 가능성과 소재로서의 가격 경쟁력이 확보되어야 한다. 따라서 제조된 eHAP의 활용 방안을 검토하기 위하여 2차 생산된 소재를 중심으로 원가를 계산해 보고, 소재로서의 Spec.을 소재 전문가와 협의하여 제시하고자 한다.

(1) Cost-effectiveness

- 2차 Pilot plant scale 규모(생멸치 10 kg base)로 생산한 시제품 생산 자료를 근거로 경제성을 분석(cost-effectiveness)하여 제조 원가를 산출하고자 하였다.
- Table 3-1-59에 생멸치 기준의 pilot plant 규모의 생산 효율을 요약 제시하였으며, Table 3-1-60에 본 시스템에서 분석된 APH 또는 그 분획물(1 회 UF 처리)의 SD 분말 제형 제품 생산에 필요한 평균 비용을 계산하여 제시하였다.
- Table 3-1-60의 UF 분획물 kg당 단가는 약 166,097원으로 평가되었다. 이는 원물 10 kg을 기준으로, 100% 소재에 대한 단가로서 다음과 같은 사항을 고려하여 실제 공정에 적

용한다면 kg 당 2,000~5,000원 정도의 제품의 생산이 가능하여 충분한 경쟁력이 있다고 판단되었다.

- 대량 생산(1 일 멸치 300 kg 처리 - 고압시스템 용량 고려)
- 연속 생산(월 생산량에 따른 단가 조정)
- SD 공정에서 부영제를 활용한 다양한 짠맛 증진 효능 강도 제품
- 가격에 가장 큰 영향을 미치는 효소 사용 억제
- 수율을 3 배 가량 증가하기 위한 물 사용 억제
- 에너지 관리 효율 증대 등

Table 3-1-59. Total yields(%) and content of protein from Anchovy

Materials	Anchovy	APH	Fractionation of UF
Mass	8.39 wet weight(kg)	1.11 FD weight(kg)	0.91 FD weight(kg)
Nitrogen Content(g)	239.6	132.87	104.83
Mass Yields(%) (wet basis)	100	13.23	10.85
NR* Yields(%) (dry basis)	100	55.61	43.75

*: nitrogen recovery

Table 3-1-60. Pilot scale high pressure system(30 L)에서 고압효소분해된 APH 또는 그 분획물의 SD분말 제품 생산에 소요되는 평균 비용 계산

Category	Cost(원) per unit	Cost(원)
Enzyme	66,333/kg	13,267
Anchovy(10 kg)	1500/kg	15,000
Transportation	20/kg	200
Washing & Soaking		
Electricity	185/kWh	481
Water	125/L	2,500
Labor	1300/h	2,600
Mincing & Packaging		
Electricity	185/kWh	204
Pre-packaging	35/kg	1,050
Water	125/L	3,750
Labor	1300/h	7,800

Hydrolysis at 50°C under high pressure

Electricity	185/kWh	66,600
Water	125/L	1,875

Termination of hydrolysis

Electricity	185/kWh	7,400
Water	125/L	3,750
Labor	1300/h	1,300

Cooling & Aging

Electricity	185/kWh	111
-------------	---------	-----

Centrifugation

Electricity	185/kWh	342
Labor	1300/h	1,300

Membrane separation(UF)

Water	125/L	1,850
Electricity	185/kWh	139

Spray Drying

Electricity	185/kWh	34,188
-------------	---------	--------

Packaging

70/kg	63
-------	----

Waste-treatment credit

41/kg	328
-------	-----

Total		166,097
--------------	--	----------------

* 전기, 용수 및 노동력을 계산하는 경우에 부대 비용을 충분히 고려하였음.

(2) 액상 천연조미료 핵심 원료의 개발

- 3차년도에 개발 예정인 액상 또는 분말 제형의 조미료를 개발하기 위한 소재로 활용하기 위하여 멸치 고압효소가수분해물 또는 분획물의 분말형 제형에 대한 기준 규격을 전문가 협의를 거쳐 Table 3-1-61와 같이 1차 설정하였다.

바. 결론

- **다구찌 강건설계를 활용한 고압효소가수분해 조건의 최적화:** 최적 조건으로 압력을 75 MPa, 반응온도 50°C, 반응시간 12 hrs, 복합효소농도 1%로 설정
- **Pilot scale 시험 생산;** 1차 년도에 예측한 짠맛증진물질 생산 최적조건인 75 MPa, 50°C, 혼합효소 2% 및 12 시간의 처리 조건에서 시간을 16 시간으로 조정하여 pilot 규모의 생산에 적용하였다. Pilot 규모의 생산 공정에서는 pre-filtration 공정이 생략되어 lab

scale 연구와 비교하여 공정 과정이 간소화 및 개선되었다.

Table 3-1-61. Product Specification

ITEM	표 준(예)
Appearance	Powder of faint yellow, uniformity and relax, no agglomeration or mildew, no foreign matters with naked eye
Protein Content(dry basis) ≥%	80
Fat Content(dry basis) ≤%	10
Moisture Content ≤ %	8
Ash Content(dry basis)≤%	6
Sugar ≤ %	1.2
Total Plate Count ≤ cfu/g	30000
Coliforms ≤ mpn/g	90
Moulds ≤ cfu/g	50
Salmonella ≤ cfu/25g	Absent/25 g

- **정제 및 분획 공정 개발;** 한외여과(UF) 및 나노여과(NF) 시스템을 통해 APH를 분리 및 정제 할 경우 여과막의 한계 분자량 별로 peptides가 정확하게 분리되지 않는 않지만, 한계분자량이 작아질수록 분획물에서 큰 분자량들이 감소하거나 제거된다는 사실을 확인하였다. 분획물 중, APHN-1에서 쓴맛을 내는 tryptophane 함량이 가장 낮게 나타났으며, 감칠맛을 내는 glutamic acid의 함량은 가장 높게 나타났다. 따라서 APHN-1 분획물은 짠맛 증진효과 뿐만 아니라 유리아미노산 함량이 높아 천연 조미료 소재로 개발될 때, 그 자체의 정미성분과 상호작용하여 맛의 상승효과 또한 가져올 것으로 판단된다.
- **탈염 공정 개발;** 나노여과(MWCO 250 Da) 시스템과 전기투석 장비를 이용하여 탈염공정을 진행한 결과 나트륨 함량이 탈염공정 처리 전 보다 각각 76.67%, 22.73%씩 감소한 것을 확인 할 수 있었다. 탈염효과는 두 공정 모두 효과적이라고 판단되지만, pilot 규모의 생산에서 대량으로 제품을 생산할 경우 전기투석은 가격대비 효율이 높지 않고, nitrogen 손실이 있기 때문에 본 공정에서 적합하지 않다는 결론을 내렸다.
- **탈색 및 탈취 공정 개발;** 탈색률 실험을 수행한 결과(탈색률 90%이상)를 바탕으로 시료의 농도는 2.5%, 활성탄의 농도는 2%, 처리 온도는 room temperature, 그리고 처리 시간은 5 분으로 설정하였다. APHN-1 시료에 활성탄을 처리하여 강도평가를 실시 한 결과 활성탄 처리 후에 다소 떨어지긴 하였지만, 여전히 염미 증진 효과가 있는 것으로 나타났

다. 향미 profile을 통해 2%농도의 시료를 활성탄 처리 한 경우 노란빛, 냄새, 그리고 맛에 대한 강도들이 활성탄 처리 전 보다 낮아지는 것을 확인 할 수 있었고, 활성탄을 이용한 탈색 및 탈취가 매우 효과적이라는 사실을 알 수 있었다. 하지만 활성탄 처리 후 색, 냄새 그리고 맛의 강도가 전체적으로 낮아짐에도 불구하고, 기호도면에서는 활성탄 처리를 하지 않은 1%농도 시료가 가장 높았다. 따라서 천연 조미료를 개발할 때 본 연구에서 개발한 소재의 농도만 잘 조절한다면 탈색 및 탈취 공정 없이도 제품을 생산할 수 있으리라 판단된다.

- **제형화 공정 개발;** 제형화 연구를 통해 분무건조 조건 4 개 중에 가장 회수율이 좋은 조건을 찾았으며, 동결건조 시료가 분모 건조 시료보다 많게는 4 배 이상 회수율이 높다는 것을 확인하였다. 하지만 동결건조 및 분무건조한 시료의 색상을 비교한 결과 분무건조한 시료의 색상이 동결건조한 시료의 색상보다 밝은 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 멸치 고압효소가수분해물로부터 얻은 분말 제형을 이용하여 천연 조미료의 소재를 개발 할 경우 제품의 외형 및 색상에 덜 영향을 미치는 분무건조 공정이 더 적합하다. 더불어 공정 처리 비용과 건조 시간을 고려하더라도 분무건조가 동결건조보다 pilot plant scale system에서의 활용 가능성이 높다고 판단되어진다.
- **제조된 eHAP의 염미증진제로서의 가능성 탐색 및 규명;** 각각의 분획물에서 짠맛 증진 효과가 있다고 보고된 L-arginine과 arginyl dipeptides의 농도를 비교한 결과 APHN-1 분획물에서 실험에 사용된 모든 compound들의 농도가 높게 나타났다. 이 결과를 통해 APHN-1 분획물에 짠맛 증진 물질이 가장 많이 있음을 확인 할 수 있었다. 반면에 APHN-2 에서는 di-dipeptides가 전혀 검출되지 않아 나노여과 시스템이 di-peptides 이상의 분획화에 매우 효과적임을 알 수 있었다. APHN-1 시료에 대한 강도 평가를 실시한 결과 시료 0.1%, 0.3%, 0.5%, 그리고 1%를 첨가하였을 경우 모두 짠맛 증진 효과(1%는 10.29%, 0.5%는 경우 7.56%, 0.3%는 8.47%, 그리고 0.1%는 0.42%의 염미증진률)가 나타나 염미 증진제로서의 가능성을 확인 할 수 있었다.
- **경제성 분석;** 2차 Pilot plant scale 규모(생멸치 10 kg base)로 생산한 시제품 생산 자료를 근거로 경제성을 분석(cost-effectiveness)하여 소재화 가능성을 확인 하였다.
- **액상 천연 조미료 핵심 원료의 개발;** 멸치 고압효소가수분해물 또는 분획한 분말을 소재화하기 위하여 기준 규격을 제시하고 차년도에 개발하고자 하는 천연 액상 또는 분말 조미료의 핵심 원료로 활용하고자 한다.

3. 사업화 방향(전략) 도출 및 이에 따른 공정 · 제조기술 문제점 도출

가. 저염어간장 및 APH의 Key Buying Factor

- **저염화된 어간장 :** 23% 이상의 기존의 어간장에서 20% 이상 저감화 된 제품 강조

- **고압멸치 고압효소가수분해물(APH)** : 고압효소가수분해는 고압처리(50~100 MPa)에 의해서 저분자량 물질보다 소수성결합으로 이루어진 거대한 분자에 대해 선택적으로 작용하고, 효소반응의 화학포텐셜을 증가시켜 효소의 활성을 증가시키면서 염에 절이지 않고 단 시간에 저분자 펩타이드를 생산하는 획기적인 기술임을 강조
- **위생적인 제조공정** : 깨끗한 공정/제조시설에 대한 충분한 설명제시를 통한 신뢰와 믿음을 주는 것이 지속적인 구매를 위한 key point
- **편의성** : 먹는 식품인 만큼 보관용이, 편리성, 사용의 편리성이 부여되어야 하고 용기는 주부들이 주 사용 고객인 만큼 가볍고 심플한 플라스틱이 적합함
- **가격 경쟁력** : 기존 제조방식의 장기간 발효/숙성이 아닌 초고압기술을 이용하였으므로 높은 수율로 인한 가격 경쟁력 확보 및 특징인을 타겟으로 한 고가 정책

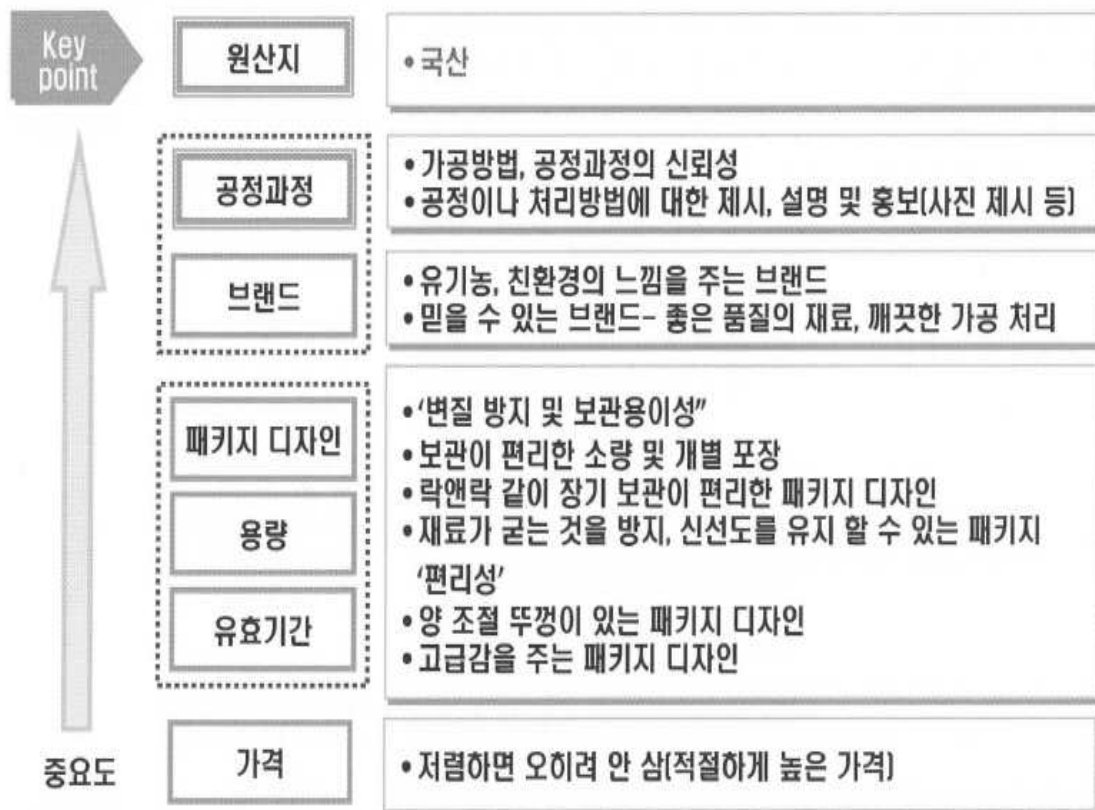


Fig. 3-1-63. 상품화 전략 Key Point

나. 저염 어간장 및 APH의 공정·제조기술 비교

(1) 기존 어간장 및 APH 공정·제조기술

- 원료어 (멸치) → 수세 → 가염(25%)혼합 → 숙성조 투입 → 1차 숙성발효(12개월) → 1차액 분리 → 2차 숙성발효(12개월) → 정밀여과 → 용기충전 → 최상품(원액)
- 어류단백질 가수분해물은 산 또는 효소에 의한 가수분해 후, 대부분 사료로 사용되고 있으나 현재 가수분해물의 기능적 특성에 대한 다양한 연구가 시도되면서, 고부가가치화 작업이 시도되고 있음

(2) 저염 어간장 및 APH의 공정·제조기술

- APH 제조 : 원료어 (멸치) → 수세 → 가수(1:1) → Heating → Maceration → 고압효소분해 (75MPa, 12시간) → Cold aging (5°C, overnight) → Defatting → 원심분리 → APH 원액
- 저염 어간장 제조 : 기존의 제조공정에서 2차 숙성발효된 원액과 APH의 혼합하여 다양한 염농도의 어간장 제품 개발 가능

(3) 분말 제형

- 기존의 어간장 및 APH의 SD 수율은 약 20~35%로서 수율 향상에 관한 기술개발이 시급

(4) 결론

- 기존 방법은 2년간 발효·숙성 시킴으로써 비린내, 유허취, 디메칠아민취(DMA취)등 역겨운 악취를 발생할 수 있으며 또한, 장기숙성이라 경제적인 비용도 많이 듦
- 고압효소분해액(APH)은 12시간 만에 품질이 뛰어난 무염의 APH를 제조하여, 배합에 의해 원하는 염농도를 조절하여 제품을 생산 할 수 있어 제조의 편리성, 경제성 등이 우수하다고 판단됨
- 이러한 결과를 활용하여 사업화를 하기 다음과 같은 문제를 해결하여야 함
 - 고압 장비의 고가 및 대량 생산 문제를 해결하기 위한 대책으로 toll processing plant의 구축이 시급
 - 전 처리 과정에서 가수를 최소화 하는 방안이 필요
 - 현 고압장비의 압력 및 온도 조절의 안정성과 용량이 개선된 장비에서의 시험 및 최적화 필요
 - 후 공정에서는 여과/원심분리 및 분획 공정에 대한 단순화와 분말화 공정에서 수율을 70에서 80%까지 상승 필요

다. 마케팅 전략방향 도출

○ SWOT 분석을 실시하여 Table 3-1-62에 제시함

Table 3-1-62. SWOT 분석

SWOT 분석		강점	약점
		1.고압효소분해기술력 확보 2.우수한 연구진 및 제품개발의 스피드 빠름	1.유통망 미비 2.회사의 브랜드 약함 3.영업망 미비함
기회	1.수산물 선호트렌드 (수산물=건강) 2.핵가족사회, 여성의 사회참여로 가공식품 선호 3.현재 출시된 제품들의 차별성은 없음(신제품 전무함)	*강점과 기회의 MIX 1.고압효소분해기술을 이용한 저염 어간장 제품은 국내최초 부각 2.기능성강조(본연의 향과 맛을 유지하고, 저염 및 보존성이 우수함)	*약점극복 및 기회활용의 MIX 1.우수한 연구진 및 기술영업사원을 영입하여 고압효소분해기술의 우수성 홍보
위협	1.식문화의 서구화, 인스턴트화 2.하선정, 대상의 강력한 시장진입장벽 3.수산자원 고갈 및 해양오염 심각	*강점을 활용한 위협요소 극복 1.생산수율 극대화로 인한 원가절감 및 고압효소분해기술을 활용한 새로운 카테고리의 형성을 통한 기존의 진입 장벽을 뛰어넘음	
전략대안	<ul style="list-style-type: none"> - 기존의 어간장 제품의 제조방법과 고압효소분해기술의 차별성 부각 - 최근 소비자 트렌드인 웰빙에 맞춰서 저염을 전면으로 내세워 소비자의 Needs를 충족함 - 본연의 향과 맛을 그대로 유지하고, 보존성의 우수성을 강조함 		

라. 제품 콘셉 개발

○ 제품개발 개발 컨셉을 정리하여 Table 3-1-63에 제시함

Table 3-1-63. 제품개발 Concept

Benefit	상품 Idea	Category명	Target
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 멸치의 풍부한 영양성분 및 다량의 아미노산을 함유한 신개념 Total 어간장 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 저염 및 짠맛증진 물질 다량 함유 ▪ 휘발성 염기 질소 함량이 적음 ▪ 신선도 유지 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 신선하고, 아미노산이 풍부한 고압효소분해 멸치 어간장 소스 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 신세대 주부 ▪ 가정주부 ▪ 조리 종사자 ▪ 해외 바이어



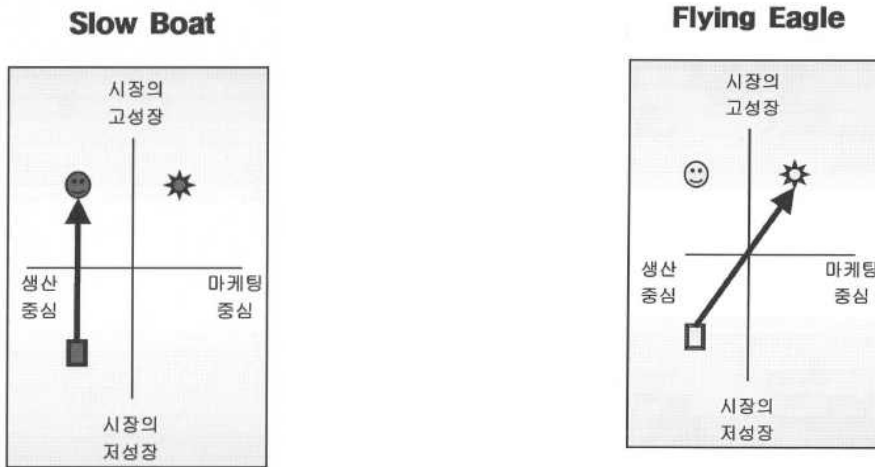
Concept Statement

본연의 향과 맛을 그대로 유지하고, 아미노산이 풍부하고, 짠맛증진물질 함유 및 저염 보존성의 우수한 신개념의 Total 어간장 소스

마. 전략적 시나리오

○ 비관적 전략시나리오

- 맛별이, 독신가정, 외식빈도의 증가에 따른 가정 내 조리빈도 감소로 인한 어간장 소스의 시장 감소
- 하선정종합식품, 대상의 집중적이고 적극적인 매체광고 및 저가의 물량공세로 인한 초기 진입의 실패가능성 높음
- 제조 공정의 미 구축에 따른 유통바이어의 선입견으로 제품의 생산에 신뢰감을 형성하지 못해 입점시 장애요인
- 신규 제품에 대한 대영수산의 판매 경험 부족 및 영업능력 부족
- 대영수산의 브랜드력이 미비하여 소비자의 신뢰확보에 어려움



<비관적 전략시나리오>

<낙관적 전략시나리오>

Fig. 3-1-64. 전략적 시나리오.

○ 낙관적 전략시나리오

- 성숙기 시장에서 기존제품과 차별화되는 컨셉이 기존의 소비자에게 강하게 어필되어 저염 어간장 소스 시장에서 자리매김함
- 하선정종합식품, 대상 등의 메이저 식품회사에서는 기존의 제조방법을 고수하여 제조할 뿐 과학적, 기술적으로 진보된 제품은 없다는 점을 부각
- 고압효소분해기술의 장점과 저염 및 국내산 멸치를 Selling point로 적극 활용
- 천연 그대로의 향, 맛의 기호성을 강조
- 정기적인 모니터를 통한 가정에서 조리하는 주부들의 불만사항들을 신속하게 개선하여 고객의 불만족을 해소함과 동시에 진정 소비자를 생각하는 기업, 믿을 수 있는 기업 이미지 각인

바. 전략적 시나리오에 따른 사업방향

○ 전략적 시나리오에 따른 사업방향을 정리하여 Table 3-1-64에 제시

Table 3-1-64. 사업방향

전략목표	○차별화된 콘셉(저염) 및 고압효소분해기술의 가공기술 확보를 통한 제품개발 ○고압효소분해기술의 우수성을 홍보하여 현재 소비자의 이탈을 가속화시켜, 대영수산의 제 1 사업군으로 육성 ○압력 조건에 따른 기능성을 확보하여 차별성 있는 제품 포트폴리오 구성
사업전략 방향	○어간장 및 천연소스 시장에서 저염, 맛, 향의 신선함을 강조하는 트렌드 선도 전략 ○기존제품보다 고가정책을 써서, VIP 마케팅 전략을 펴 ○강남, 분당등 중산층 주부를 대상으로한 이벤트 실시
인프라구축	○기존의 유통바이어 및 해외바이어를 적극 활용 ○학술단체 및 소비자단체의 지원을 통해 전문조직 확보 및 활용 ○저염 어간장 소스를 이용한 맛있는 김치 담그기 대회 및 기타 요리경연대회 실시하여 주부 체험단 모집
기타	○고압효소분해기술을 활용하기 위한 공정을 조속한 시일에 구축 ○안정적 재료 공급을 위한 냉동 저장 시스템 구축

사. 제품 성공을 위한 중장기 주요전략

○ 사업 진출을 위한 중장기 사업 추진 전략을 수립하여 Table 3-1-65에 제시

Table 3-1-65. 중장기 사업 추진 전략

	주요전략
제품전략 측면	○상품을 “목적달성의 수단”으로서만이 아닌 “감성적 교류의 대상”으로 개발 ○고압효소분해기술 및 저염화기술의 우수성을 활용하여 맛, 향이 강화된 제품으로 개발
브랜드전략 측면	○고급스러우면서도 구입가능성이 높은 대중명품(Masstige化) 브랜드 전략 ○제품 브랜드의 초점을 좁혀 천연 소스 시장 내에서 강력한 브랜드 창출
가격전략 측면	○스키밍 전략활용(발매초기 높은 가격을 형성한 후 경쟁사 시장 진입 및 적극적인 판촉시기에 가격을 낮추는 전략)
유통전략 측면	○해외 바이어 공략 ○향, 맛별로 차별화 포인트를 가진 제품 line 구성 및 선물용 세트 구성을 통한 판매경로의 다각화
프로모션 전략측면	○제품발매 후 초기 임팩트를 극대화 하는 다양한 프로모션 - 소비자들의 “동참”을 통한 소비가치 극대화 추구(김치 담그기 대회, 요리대회, 거리판촉등) ○시장에 성공적인 진입이후 매스미디어 광고 대신 구전 마케팅을 활용해서 배타적이면서도 대중적인 이미지 구축 ○품질에 대한 우위성을 부각시켜, 매스컴을 통한 기사화 노출 유도
인프라 측면	○내부: R&D, 영업, 인적네트워크등의 기존 내부 인프라 적극 활용 ○외부: 전문가집단(학자, 마니아 등)의 적극적인 육성 및 유통전문가 적극 활용
기타	○맛, 향, 기능성이 부여된 액젓을 이용하여 담근 김치의 품질 향상 및 과학화, 더 나아가 한식의 세계화 패러다임 변화 선도

아. 결 론

- 참여기업인 대영수산에 현 공정의 개선과 기술이전에 대한 협상을 진행 중
- 대영수산의 사업화 촉진을 위하여 개발 소재에 대한 활용성 연구 시급
- 뿐만 아니라 개발 기술에 대한 적용 확대와 기술이전을 촉진하기 위해서는 산업적 생산이 가능하도록 다음과 같은 기술개발 및 개선이 필요함
 - 고압 장비의 고가 및 대량 생산 문제를 해결하기 위한 대책으로 toll processing plant의 구축이 시급
 - 전 처리 과정에서 가수를 최소화 하는 방안이 필요
 - 현 고압장비의 압력 및 온도 조절의 안정성과 용량이 개선된 장비에서의 시험 및 최적화 필요
 - 후 공정에서는 여과/원심분리 및 분획 공정에 대한 단순화와 분말화 공정에서 수율을 70에서 80%까지 상승 필요
 - 개발 소재에 대한 안전성 시험이 필요함

4. 사업화 방향에 따른 공정 및 기술의 개선

- 개발 소재에 대한 안전성 시험을 위하여 APH의 화학적 위해요소 분석, 구축 예정인 toll processing plant에 장착할 고압장치에 따른 고압효소가수분해 공정의 최적화 및 분말화 공정의 개선 및 경제성 분석을 실시하였다.

가. APH의 화학적 위해요소 분석

- 화학적 위해요소로서 중금속 및 바이오제닉 아민 함량을 분석하였다.

(1) 중금속 함량 분석

- 시료(APH)의 중금속 분석은 한국식품연구원에 분석 의뢰하였으며, 시료중의 카드뮴(Cd)은 Inductively Coupled Plasma Spectrometer(HITACHI, P-401, Tokyo, Japan)로, 납(Pb), 수은(Hg), 비소(As)는 ICP-MS Perkin-Elmer, Elan 6000, Wellesley, MA, USA)로 그 함량을 측정하여 생물중량으로 나타내었다.
- 측정 결과는 아래 Table 3-1-66에 제시 되었으며, 식품공전에 따른 수산물 중금속 허용 기준은 심해성 어류, 다량어류, 새치류 기준으로 하여 수은(Hg) 0.5 µg/g, 납(Pb), 0.5 µg/g, 카드뮴(Cd) 0.1 µg/g 이하로 설정되어있으며, 멸치 원물로 제조한 고압효소가수분해 물은 허용 기준을 초과하지 않았다.
- Codex에서는 어류에 대해서만 0.3 µg/g으로 설정하고 있으며, 캐나다의 경우 어류단백 0.5 µg/g, 해산및민물어패류를 10 µg/g, 덴마크는 어류 0.3 µg/g, 네덜란드어류 0.5 µg/g

등이며, EU의 경우는 자연함량이 높은 9종(0.4 µg/g)에 제외하고 0.2 µg/g로 정하고 있다.

Table 3-1-66. APH의 중금속 함량.

	Heavy metals (µg/g)			
	<i>Hg</i>	<i>Pb</i>	<i>Cd</i>	<i>As</i>
식품공전	0.5	0.5	0.1	기준없음
APH	0.009	0.01	0.005	10.405

(2) 바이오제닉 아민 함량 분석

- 어류단백질 가수분해물에 대한 위해물질로 바이오제닉 아민이 보고(ZaMaN et al., 2010) 됨에 따라 가수분해물의 원료화를 위하여 생멸치고압효소가수분해물의 바이오제닉 아민의 함량을 Saaid et al. (2009) 및 Byun et al. (2012)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다.
- HPLC Alliance e2695 system (Waters Corporation, Milford, MA, USA)를 이용하여 측정하였고 표준물질은 모두 Sigma (USA)사에서 구입하여 사용함. HPLC 분석조건을 아래 Table 3-1-67에 나타내었다.

Table 3-1-67. HPLC 분석조건

Parameter	Conditions
Detector	UV/Vis detector
Column	YMC Triart C18 (4.6 X 250mm, 5µm, 12nm)
Flow rate	1.0 ml/min
Injection volume	20 µl
Run time	25 min
Moblie phase	A: 0.1 M ammonium acetate, B: acetonitrile
Gradient condition	0.1 M ammonium acetate (0-20min), to 50% acetonitrile in water (20min-25min)
Wavelength	254 nm

- 제조 된 멸치고압효소 가수분해물에 대한 바이오제닉아민(BAs) 함량은 Fig. 3-1-65에서와 같이 분석된 표준물질 tyramine, putrescine, spermidine, cadaverine, histamine에 대하여 제조된 멸치 고압효소가수분해물에서 모두 검출되지 않음이 관찰되었다.
- 현재 식약처 기준규격으로 histamine은 200 mg/kg로 설정되어 있으며 그 외 바이오제닉 아민류에 대한 기준규격은 미흡한 실정이나 인체 및 동물체내에서 중추신경, 혈관계에 직,

간접적으로 조절에 관여하여 과량 섭취 시 신경계 및 혈관계를 자극하여 식중독 증상 유발 및 일부 바이오제닉 아민은 N-nitrosamine과 같은 강력한 발암물질로 전환될 수 있는 잠재성을 가지고 있다고 보고되고 있다(Kim et al., 2003).

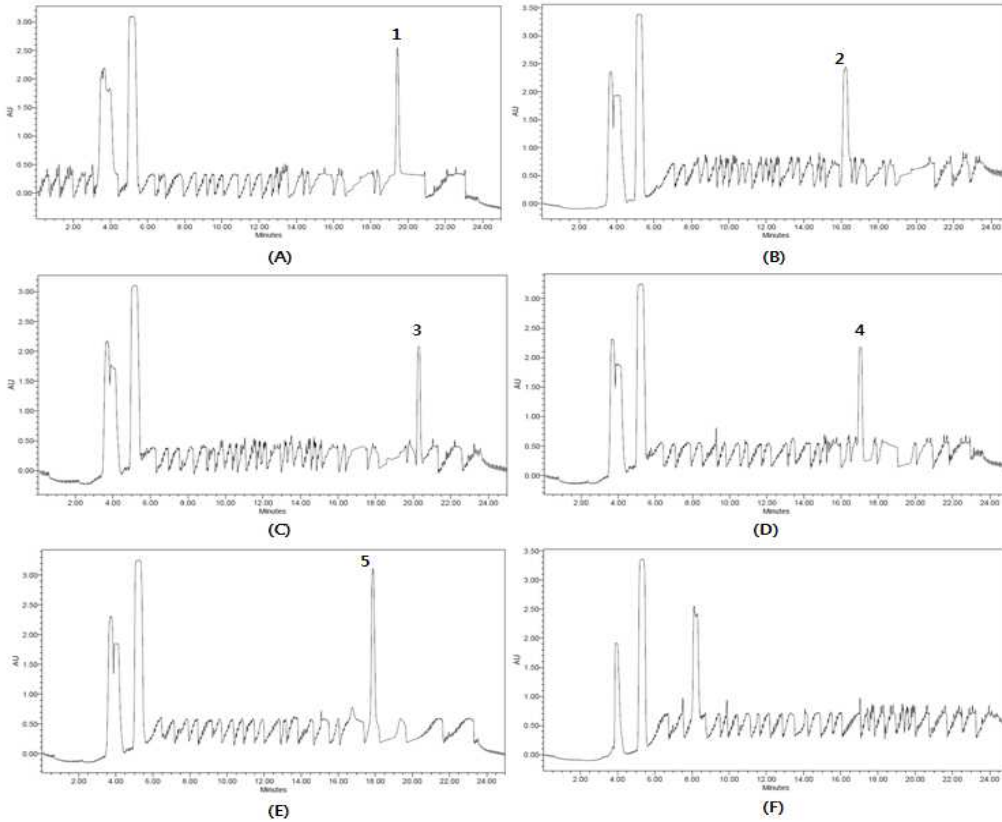


Fig. 3-1-65. 바이오제닉 아민 표준물질(A-E, 5 mg/L each) 및 짠맛증진원료(F)의 바이오제닉 아민 분석 크로마토그램. Peak identity: (A) Tyramine:19.424 (B) Putrescine: 16.239 (C) Spermidine: 20.291 (D) Cadaverine: 17.043 (E) Histamine: 17.071.

- 또한 중 식중독 증세를 유발할 수 있는 것으로 알려진 histamine 및 말초혈관 자극에 의한 여러 임상병리학적 증세를 동반할 수 있는 tyramine (Santos et al., 1996; Ten Brink et al., 1990)이 보고되고 있는 실정이다.

(3) 결론

- 중금속 함량 분석결과 우리나라 수산물 기준규격에 제시되어 있는 납, 카드뮴, 수은은 허용기준 이하로 분석되었으며 위해 안전성을 확인할 수 있었다.
- 바이오제닉 아민 분석결과, 식품공전 상 규격이 설정되어 있는 히스타민과 위해가 보고되고 있는 바이오제닉 아민에 대하여 검출되지 않았다.

○ 따라서 APH는 화학적 위해 요소에 대하여 안전함을 확인할 수 있었다.

나. 고압장치 변경에 따른 고압효소분해공정의 최적화

○ 2차 pilot scale 생산에 사용된 30 L, 고압시스템(일신에서 제작하여 (주)이노셀코리아에 설치)의 장기운전에 따른 불안정성을 해결하고 대량 생산이 가능한 toll processing plant가 (주)이노웨이에서 목포에 구축하는 사업이 결정되고, 참여기업인 대영수산식품이 멸치 선단을 보유하고 있어 대량의 생멸치 원료를 확보할 수 있다.

○ 따라서 원료의 전처리 방법의 개선과 장비 변경에 따른 고압효소가수분해기술의 최적화 필요성이 대두됨에 따라 본 연구에서는 우선적으로 고압효소가수분해 조건의 최적화를 실시하였다.

(1) 장치 변경 과정

○ 2차 최적화에 사용된 장비는 (주)이노웨이가 구축하고자하는 toll processing plant에 설치하는 장비와 동일한 제품으로 용량은 50 L이다. 기술 개발 단계별 장치를 Fig. 3-1-66에 제시하였다.

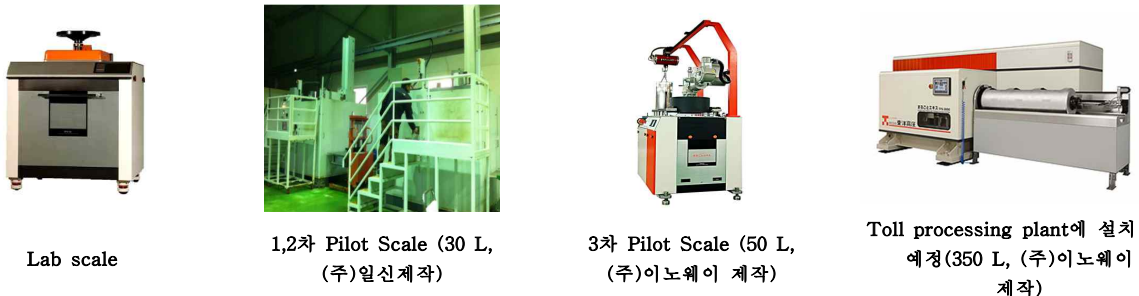


Fig. 3-1-66. 기술개발 단계별 고압장치.

○ 최적화 실험에 사용된 고압 시스템은 국내 및 일본에서 상용화된 장비로서 운전 조건은 처리시간 60 시간, 처리온도 5~60℃ 및 처리압력은 0~300 MPa로서 매우 안정적으로 운전 가능함이 확인되었다.

(2) RSM을 이용한 고압효소분해 조건의 최적화

○ 원료 변경에 따라 멸치는 대영수산에서 냉동 상태로 공급받아 사용하였다.

○ 중심합성계획에 의거 실험 설계를 하고, RSM(response surface methodology)에 의해 결과를 분석하였다. 다구찌 실험 결과에서 반응변수에 영향을 크게 미치는 설계 변수로서 반응변수 DH는 압력 및 복합효소 농도, NR은 압력 및 복합효소 농도 그리고 수율의 경우에는 복합효소 농도 및 시간으로 확인되어 본 실험에서는 온도, 시간 및 복합효소 농도

를 설계 인자로 설정하였고 수준은 다구찌 실험 결과, 경제성 및 장치 성능을 고려하여 온도는 50°C로 고정하고 Table 3-1-68와 같이 설정하였다.

Table 3-1-68. Hydrolysis variables and their coded and actual levels in the central composite rotatable design (CCD)

Variable	Symbol	Coded level of variable				
		-2	-1	0	1	2
Pressure (MPa)	X ₁	0	50	100	150	200
Reaction time (h)	X ₂	1	7	13	19	25
Enzyme concentration (%)	X ₃	0	0.3	0.6	0.9	1.2

- 반응 변수는 다구찌 실험에서와 같이 DH 및 NR을 설정하고 여기에 짠맛증진물질 존재 가능성을 보고한 분자량 1335 Da 이하 분획물의 fraction (% , RMW: ratio of molecular weight below 1335 Da in hydrolysate)을 더하였다. 여기서 RMW 및 NR은 이 전 실험과 동일하게 GPC 및 NR을 측정하였으며, DH는 Nielsen et al. (2001)에 의해서 제안된 방법에 따라 TNBS법에 따라 질소량을 측정하여 h 를 meq α -amino/g of protein으로 환산하여 나타내고, h_{tot} 는 fish protein concentrate의 경우에 8.6 meq α -amino/g of protein을 사용하여 다음 식에 의해서 계산하였다.

$$DH(\%) = \frac{h}{h_{tot}} \times 100\%$$

- 실험 계획에 의한 결과를 Table 3-1-69에 제시하였으며, 각 설계변수에 대한 반응표면분석 결과를 Fig 3-1-67, 68 및 69에 제시하였다.
- Table 3-1-70은 반응표면분석에 의한 회귀분석 결과로서 quadratic polunomoal model에 R²이 3개 반응변수 모두 0.90 이상으로 잘 일치하였으며, 유의확률은 0.001 이하였다.
- Table 3-1-71는 최적 조건을 나타낸다. 그러나 반응 변수에 따라 설계변수의 최적 조건이 다르게 결정되어 이 들의 효과를 통합하는 시도를 하였다. 복합 효소의 농도는 경제성에 지대한 영향을 미치므로 0.6%로 고정하여 superimposing 하는 방법으로 최적 조건을 결정하였다. 이 때 분석된 최적 조건은 **압력 150 MPa, 반응시간 15 h 및 복합효소농도 0.6%**이었으며 등고선도를 Fig. 3-1-70에 제시하였다.
- 최적 조건을 검증하기 위하여 최적 조건에서 5회 반복 실험을 행하고 모델에 의한 예측값과 실험값을 비교한 결과 잘 일치하는 것으로 확인되었다(Table 3-1-72 참고)

Table 3-1-69. Central composite rotatable design arrangement and responses

Run	X ₁ (MPa)	X ₂ (h)	X ₃ (%)	Y ₁ (%)	Y ₂ (%)	Y ₃ (%)
1	0	0	0	64.94	91.90	71.3090
2	-1	1	1	60.10	91.86	75.0019
3	0	0	0	62.55	91.28	73.1695
4	0	0	0	60.32	91.19	74.1484
5	-2	0	0	54.28	90.61	66.4039
6	1	-1	-1	54.75	90.73	67.1382
7	1	-1	1	57.35	90.64	69.4884
8	2	0	0	64.67	92.53	72.6284
9	1	1	1	63.57	92.46	77.7932
10	-1	-1	-1	51.32	88.27	66.0302
11	1	1	-1	64.45	92.31	77.8049
12	-1	-1	1	54.60	89.20	67.7737
13	0	0	2	60.72	91.20	74.3280
14	0	0	0	60.05	91.27	74.4923
15	0	2	0	62.18	91.51	76.9151
16	0	0	0	60.33	90.95	70.5454
17	0	0	-2	56.45	89.53	70.6083
18	0	-2	0	30.33	83.20	48.3250
19	0	0	0	61.00	92.43	75.0991
20	-1	1	-1	59.87	89.88	76.1701

¹⁾X₁: Pressure (MPa); X₂: Time (min); X₃: Concentration of Enzyme (%)

²⁾Y₁: Degree of hydrolysis (DH); Y₂: Nitrogen recovery (NR); Y₃ Ratio of molecular weight below 1355 Da at hydrolysate (RMW)

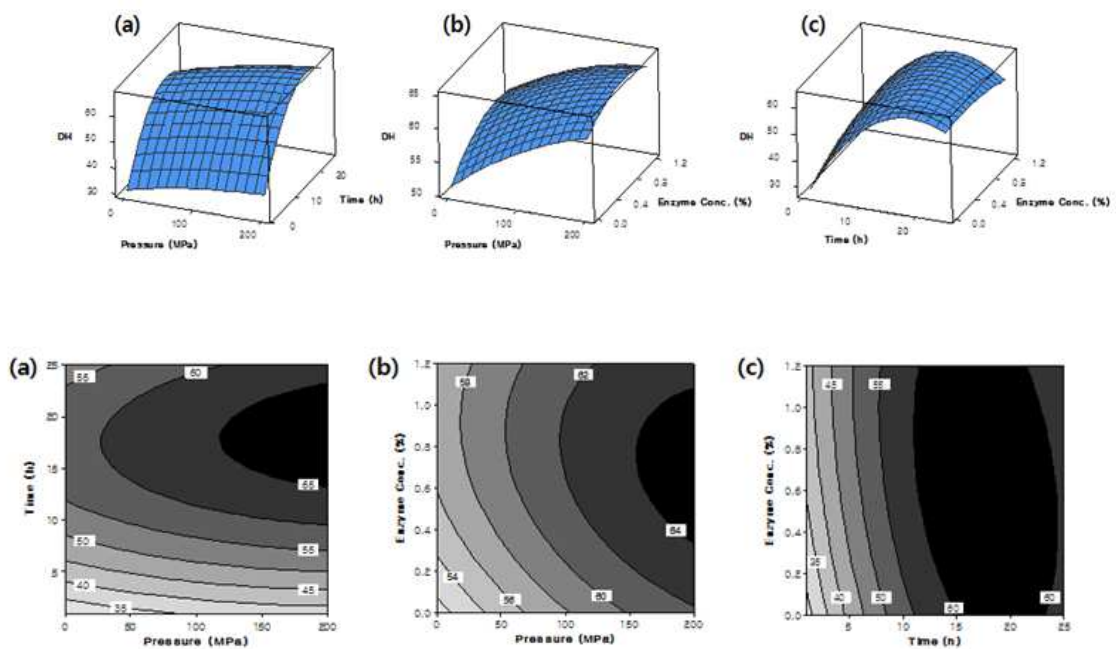


Fig. 3-1-67. Response surfaces and Contour plots of combined effects of independent variables on the degree of hydrolysis (DH) of anchovy hydrolysate:

(a) pressure and time; (b) pressure and enzyme conc.; (c) time and enzyme conc.. The other hydrolysis parameters were set at their center value, i.e., pressure 100 MPa, time 13 h, enzyme conc. 0.6%

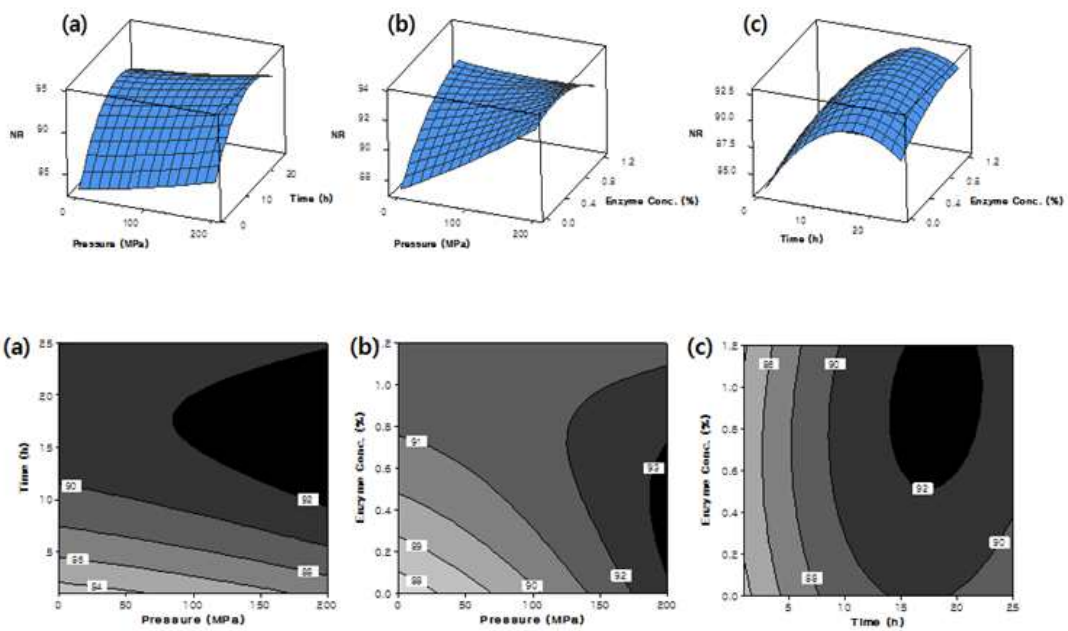


Fig. 3-1-68. Response surfaces and Contour plots of combined effects of independent variables on the Nitrogen recovery (NR) of anchovy hydrolysate: (a) pressure and time; (b) pressure and enzyme conc.; (c) time and enzyme conc.. The other hydrolysis parameters were set at their center value, i.e., pressure 100 MPa, time 13 h, enzyme conc. 0.6%

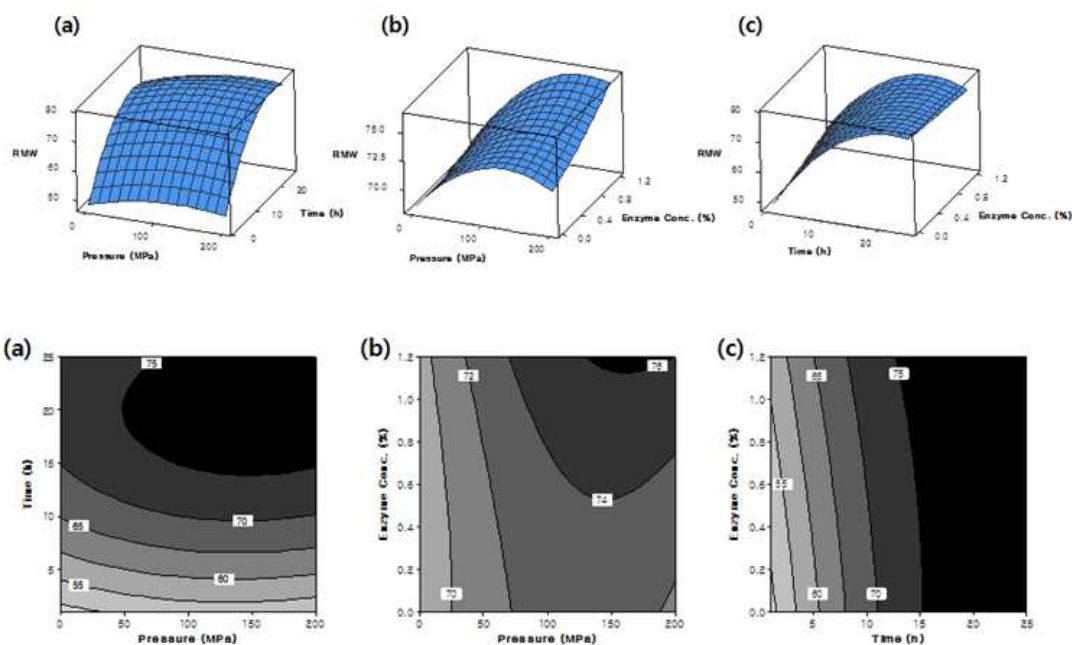


Fig. 3-1-69. Response surfaces and Contour plots of combined effects of independent variables on the ratio of molecular weight below 1335 Da in hydrolysate (RMW) of anchovy hydrolysate:

(a) pressure and time; (b) pressure and enzyme conc.; (c) time and enzyme conc.. The other hydrolysis parameters were set at their center value, i.e., pressure 100 MPa, time 13 h, enzyme conc. 0.6%

Table 3-1-70. Response surface model for hydrolysis conditions of protein from anchovy

	$= 61.8570+2.1881X_1+5.8544X_2+0.8606X_3$	
Y_1	$-0.3515X_1^2-3.6565X_2^2-0.5740X_3^2+0.2338X_1X_2$	0.9024
	$-0.2238X_1X_3-0.8163X_2X_3$	
	$= 91.5937+0.6730X_1+1.5187X_2+0.3958X_3$	
Y_2	$+0.0589X_1^2-0.9948X_2^2-0.2418X_3^2-0.1096X_1X_2$	0.9017
	$-0.3570X_1X_3+0.1600X_2X_3$	
	$= 73.6213+1.2311X_1+5.8450X_2+0.6471X_3$	
Y_3	$-0.6558X_1^2-2.3798X_2^2+0.0822X_3^2+0.2004X_1X_2$	0.9028
	$+0.2204X_1X_3-0.6592X_2X_3$	

¹⁾ Y_1 : Degree of hydrolysis (%), Y_2 : Nitrogen recovery (%), Y_3 : Ratio of molecular weight below 1335 Da in hydrolysate (%)

Table 3-1-71. Optimal conditions for protein hydrolysis from anchovy

Dependent variables	Critical values of independent variables			Predicted value	Stationary point
	X ₁	X ₂	X ₃		
Y ₁	200	18.45	0.51	67.60	Maximum
Y ₂	200	16.76	0.46	93.65	Maximum
Y ₃	171.72	19.08	1.20	78.73	Maximum

¹⁾X₁: Pressure (MPa); X₂: Time (min); X₃: Concentration of Enzyme (%)

²⁾Y₁: Degree of hydrolysis (%), Y₂: Nitrogen recovery (%), Y₃: Ratio of molecular weight below 1335 Da in hydrolysate (%)

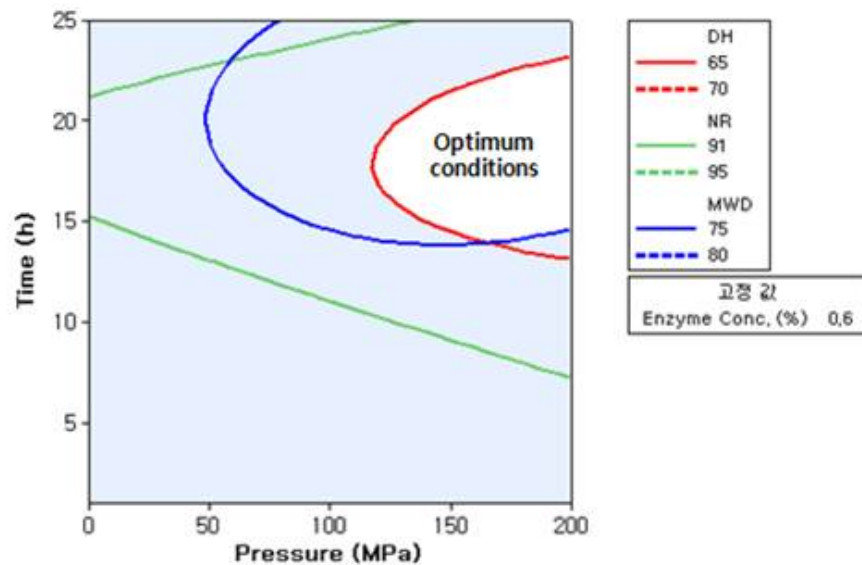


Fig. 3-1-70. Superimposed contour plots showing the shaded overlapping area for which DH ≥ 65 %, NR ≥ 91%, MWD ≥ 75%.

Table 3-1-72. Predicted and experimental values of response variables at given condition within the range of optimum hydrolysis conditions

Response variables	Predicted values	Experimental values	
		Mean	Range
Y ₁	65.32	63.13	62.52-63.93
Y ₂	91.08	89.80	89.69-90.09
Y ₃	75.95	74.95	73.98-75.79

¹⁾Y₁: Degree of hydrolysis (%), Y₂: Nitrogen recovery (%), Y₃: Ratio of molecular weight below 1335 Da in hydrolysate (%)

²⁾Mean value of five experiments

(3) 짠맛증진물질 생산 가능성

- Schindler et al. (2011)이 보고한 어간장에서의 짠맛증진물질인 arginyl-dipeptides (Ala - Arg, Arg - Ala, Arg - Gly, Arg - Met, Arg - Pro, Arg - Ser, Arg - Val, Val - Arg)를 최적 조건에서 생산된 APH에서 정량분석을 하여 짠맛증진물질 생산 가능성을 확인하고자 하였다.
- Agilent Technologies 1290 Infinity HPLC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) coupled with a 6495 Triple Quad Mass Spectrometer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)을 사용하였다.
- 분석결과는 Table 3-1-73와 같으며 arginyl-dipeptides의 생산을 확인하였다.

Table 3-1-73. Concentrations of arginyl dipeptides in hydrolyzed anchovy at optimal condition.

Arginyl dipeptides	Concentration (mg/L)
Ala-Arg/Arg-Ala	73.10±27.16
Arg-Gly	433.18±37.20
Arg-Met	0.49±0.06
Arg-Ser	66.53±9.81
Arg-Val/Val-Arg	2.34±0.30
Arg-Pro	195.63±29.21

¹⁾Values represent means ± S.D. (n=4)

(4) 결론

- 대영수산의 멸치와 50 L 고압시스템((주)이노웨이)을 사용하여 RSM으로 고압효소가수분해 조건을 최적화한 결과, 50℃에서 **압력 150 MPa, 반응시간 15 h 및 복합효소농도 0.6%**이었다.
- 짠맛증진물질인 arginyl-dipeptides를 최적 조건에서 생산한 APH에서 LC-MS/MS로 분석한 결과, 생성이 확인되었다. 따라서 APH를 짠맛증진소재로 활용 가능하다고 판단하였다.
- 본 실험은 3, 4차년도에 추가 실시한 실험으로 결과를 SCI급 논문으로 투고 예정이며, 최종적인 멸치 고압효소가수분해 최적 조건으로 결정하였다.

다. 분말화 공정의 개선

- 분말화 공정의 수율 개선과 염도를 조절한 소재를 제조하고자 SD 장비를 Fig. 3-1-71으로 교체하여 대영수산의 어간장과 APH 분말, 저염 어간장 분말 그리고 말토덱스트린을 활용한 저염 APH 분말을 제조하기 위한 SD 조건을 최적화하고자 하였다.



Fig. 3-1-71. 실험에 사용된 분무건조기(mini spray dryer b-290(Buchi, Sweden)).

(1) 천연 분말 조미료 개발

(가) 서론

- 분말화 공정의 수율 향상과 액상 제형의 제품을 미생물학적으로 안정하고 운반이 용이한 분말 제형의 천연 조미료 base로 개발하여 천연 저염소스 및 복합조미식품을 개발하는 원료로 제공하고자 분말화 공정 개선 실험을 진행하였다.
- 분무건조법은 분말을 제조하는 상업화된 방법 중 가장 보편화 된 기술이고 생산 능력(capacity)도 가장 커서 여러 분야에서 다양한 목적으로 이용되고 있다. 미역과 다시마와 같은 해조류는 특별한 처리 공정을 거치지 않는 경우 비린내가 심하여 다양한 용도 개발에 어려움이 따르나 분무건조의 경우 분무탈취(deodorization by spray drying)에 의한 맛과 냄새의 masking 효과 및 최종산물의 안정성이 좋고 대량으로서 지속적인 생산이 가능하며, 또한 산업 현장에서 쉽게 적용되어, 저렴하게 적용될 수 있는 장점이 있다. 따라서 장점을 잘 살리면 탈취공정의 제거 및 대량 생산 효율 향상의 가능성을 기대한다.
- 1차적으로 대영수산의 어간장 및 APH의 분말화를 위한 SD 조건을 최적화하고, 다음으

로 APH와 대영어간장의 비율을 다르게 함으로써 염 농도를 조절하여 제조한 저염 어간장(액상)의 분말화를 위한 SD 최적 운전조건을 설정하고자 하였다.

(나) 재료 및 방법

- 최적 조건에서 생산된 APH와 (주)대영수산 제품인 바다천지 어간장 3년산을 사용하였으며, 시약은 이전 실험과 동일하게 사용하였다.
- **Spray drying 시료 제조:** APH와 대영수산 어간장의 배합비율에 따른 분무 건조된 입자의 차이를 확인해보기 위해 APH와 대영수산 어간장을 다른 비율로 각각 배합하여 6개 액상시료를 제조하였으며 비율은 Table 3-1-74에 제시하였다.

Table 3-1-74. 시료에 따른 APH와 대영수산 어간장 비율

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6
APH	1	8	6	4	2	0
대영	0	2	4	6	8	1

- **분무 건조:** 액상으로 제조된 시료를 교반기로 균질 시키면서, 분무 건조기(Mini spray dryer, b-290, Buchi, Sweden)을 이용하여 건조물을 얻었다. 온도에 따른 분무 건조된 입자들의 차이를 비교해 보기 위하여 본 실험에서는 입구 온도(Inlet temperature)를 120℃, 또는 140℃로 조절하고 송풍속도(Aspirator)를 0.52 m³/min, 용액주입속도(Pump speed)는 322 ml/h, 유량(Q- flow)은 35 mm로 고정하여 실험하였다. 즉, 본 연구에서 실험한 두 가지 공정조건은 Table 3-1-75과 같다.

Table 3-1-75. 분무건조 실험조건

	Inlet temperature(℃)	Aspirator (m ³ /min)	Feed rate (ml/h)	Q- flow (mm)
1	120	0.52	322	35
2	140	0.52	322	35

- **이화학적 특성:** 염도, 수분함량, 수분활성도, 조단백질 등은 이전 실험과 동일한 방법으로 측정하였으며, 색도는 색차계(Colory meter, CM-3500d, Minolta, Japan)를 이용하여 측정한 L(명도, Lightness), a(적색도, Redness) 와 b(황색도, Yellowness)값을 3회 반복 측정함. 이때의 표준 백색판은 L=61.73, a=0.63, b=-5.51을 기준으로 하였다. 흡습성을 측정하기 위해 약 2 g의 샘플을 무게를 정확하게 잰 후 지름 5 cm의 aluminum pan에 담고 포화 염화나트륨 수용액을 이용하여 데시케이터에 relative humidity가 75.3%가 유지되도록 함. 무게를 잰 샘플을 5 시간 넣어두어 둔 후 샘플의 무게를 다시 재어 solid powder의 g 당 질량 증가로 계산하여 흡습성을 계산하였다. 즉, 흡습성은 solid powder의 g 당

질량 증가로 계산되었고 g 수분/ g 고체로서 계산되었다.







- **Particle Size Distribution:** 분무 건조 온도와 배합비에 따른 입자 크기를 분석하기 위해 Microtac S3500 Laser Diffraction analyzer(S3500, Microtac, Korea)을 이용하여 건식 분석을 실시하였으며, air compressor를 이용하여 분산을 진행하여 D50값으로 대표성을 가질 수 있었다.
- **SEM:** 분무건조 된 분말들의 염 농도와 분무건조기의 입구 온도(inlet temperature)에 따른 입자 구조를 살펴보기 위하여 분무건조가 된 분말 약 5 mg을 carbon tape에 붙인 후 SEM(SNE-3000MB, Sec, Korea)으로 15kV에서 2000배로 입자의 형태 및 크기를 측정하였다.

(대) 실험결과 및 고찰

① 염 농도에 따른 액상시료 이화학적 특성

- Table 3-1-76에서와 같이 어간장 농도가 증가할수록 염도, 고형분 및 조단백질 함량이 예상대로 증가하였으며 색상 역시 염 농도가 증가함에 따라 어두워졌다.

Table 3-1-76. APH와 대영수산 어간장의 배합비에 따른 이화학적 특성 비교

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6
염도	0.74%	4.8%	9.7%	14.13%	18.48%	22.2%
고형분	7.33%	12.51%	19.31%	27.68%	34.44%	36.03%
조단백질	5.7%	6.72%	7.74%	8.92%	10.3%	10.8%
색상						

② 분무 건조된 분말의 이화학적 특성

- Table 3-1-77에 이화학적 특성으로 염도, 조단백질 함량, 수분함량 및 수분활성도를 측정 한 결과를 제시하였다.
- 액상시료의 염도와 마찬가지로 APH 함량이 증가 할수록 염도가 낮아지는 것을 볼 수 있

었으나, 조단백질 함량은 액상시료와는 달리, APH의 함량이 높을수록 조단백질 함량이 높아지는 것을 볼 수 있었다. 따라서 분무 건조에 의해서 분말 소재를 제조하는 경우에는 염도와 조단백질 함량을 고려하여 배합비를 설정해야 할 것으로 판단되었다.

Table 3-1-77. 120℃ 및 140℃에서 분무 건조된 시료의 이화학적 특성

온도	특성	시료 1	시료 2	시료 3	시료 4	시료 5	시료 6
120 ℃	염도(%)	9.39	36.33	47.8	48.97	51.58	59.06
	조단백질(%)	72.3	50.86	38.14	30.91	28.75	28.73
	수분함량(%)	7.03	5.3	4.85	4.07	3.86	4.16
	수분활성도	0.230	0.274	0.293	0.267	0.280	0.276
140 ℃	염도(%)	9.32	36.55	48.11	49.03	51.43	59.14
	조단백질(%)	71.80	51.18	38.39	30.95	28.66	28.77
	수분함량(%)	7.67	4.73	4.22	3.96	4.16	4.02
	수분활성도	0.246	0.257	0.248	0.23	0.242	0.234

- 온도에 따른 염도와 조단백질의 차이는 거의 존재하지 않았다.. 즉 spray drying을 통한 분무건조 분말 제조 시 염도와 조단백질의 차이를 두기 위해서는 Inlet temperature가 아닌 배합비를 고려해 보아야 한다는 것을 알 수 있었다.
- 염의 농도가 증가함에 따라 건조된 분말의 수분함량이 적어지는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 APH의 경우 다른 액상시료와 달리 분말화 하였을 경우 수분함량이 거의 2 배 가량 많은 것을 확인해 볼 수 있었다. 분무 건조된 분말의 수분함량은 Inlet temperature가 높으면 낮아지는 것을 볼 수 있었다. 따라서 수분함량이 적은 분말 제조를 원할시 Inlet temperature을 올리는 것이 좋을 것이라 사료된다.
- 분무 건조된 분말의 수분활성도는 염의 농도와 상관없이 0.23~0.29 사이인 것을 확인 할 수 있었으며, Inlet temperature가 낮음에 따라 분말의 수분활성도가 0.02~0.04 정도 높은 것을 볼 수 있었다. 미생물의 생육 가능한 수분활성도 범위를 살펴보면 곰팡이의 경우에는 0.65 이상, 효모의 경우 0.88 이상, 세균의 경우 0.75 이상으로 건조된 분말은 미생물학 적으로 안전하다고 사료된다.
- **흡습성:** Table 3-1-78에서와 같이 같은 inlet temperature 조건에서 염도가 증가함에 따라 흡습성이 감소하는 것을 볼 수 있어 염이 수분의 증발을 막아주는 효과가 있다고 생각 할 수 있었다. Inlet temperature가 증가 하면 흡습성이 적은 건조분말이 만들어지는 것이 확인되었고, 흡습성이 낮은 건조 분말을 제조하기 위해서는 염도의 양이 10% 이상이어야

하며 분말 제조 시 Inlet temperature를 높게 설정 할 필요가 있음을 확인하였다.

Table 3-1-78. 120℃ 및 140℃에서 분무 건조된 시료의 흡습성

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6
120℃에서의 흡습성(%)	0.17	0.142385	0.103354	0.095798	0.091736	0.081414
140℃에서의 흡습성(%)	0.148052	0.128057	0.105613	0.08666	0.088709	0.06718

○ **외관 및 색:** Fig. 3-1-72은 제조된 분말의 외관을 나타내고, 배합한 APH의 양이 많을수록 분말이 서로 뭉치고 끈적거리는 것을 관찰할 수 있었다. Table 3-1-79과 Table 3-1-80에서와 같이 대영수산 어간장이 증가할수록 명도 값이 증가, 적색도 값 감소, 황색도 값이 감소하였고, E*ab 값이 낮아지며 전체적인 색이 밝아졌다. Inlet temperature가 증가함에 따라 E*ab 값이 낮아지며 색이 밝아지는 것이 관찰되었다. 따라서 건조 분말의 색을 밝게하기 위해서는 inlet temperature를 증가시키거나 대영수산 어간장을 첨가 할 필요가 있음을 확인하였다.



Fig. 3-1-72. 분무건조 시료의 외관.

Table 3-1-79. 120℃에서 분무 건조된 시료의 색

	L	a	b	E*ab
Sample 1	79.40±0.01	1.96±0.02	23.50±0.02	33.99±0.02
Sample 2	80.98±0.18	1.58±0.05	20.78±0.03	32.60±0.08
Sample 3	83.54±0.20	1.00±0.03	17.18±0.04	31.48±0.12
Sample 4	85.25±0.16	0.77±0.06	15.49±0.17	31.53±0.01
Sample 5	85.76±0.07	0.70±0.00	14.02±0.08	30.97±0.01
Sample 6	87.03±0.08	0.67±0.02	12.79±0.06	31.23±0.07

Table 3-1-80. 140℃에서 분무 건조된 시료의 색

	L	a	b	E*ab
Sample 1	78.20±0.07	2.02±0.07	23.19±0.17	33.13±0.19
Sample 2	80.68±0.27	1.57±0.03	20.44±0.39	32.15±0.48
Sample 3	84.13±0.12	0.82±0.02	16.56±0.14	31.45±0.18
Sample 4	85.79±0.19	0.61±0.01	14.40±0.20	31.23±0.23
Sample 5	86.30±0.17	0.73±0.04	13.90±0.13	31.32±0.15
Sample 6	86.70±0.14	0.63±0.07	11.93±0.12	30.46±0.19

③ Particle size distribution

- Table 3-1-81에서와 같이 염의 농도 및 inlet temperature에 상관없이 입자의 크기가 8~10 μm으로 균일하였다.
- Fig. 3-1-73에서와 같이 입자 크기에 따른 분포도에서는 염의 농도가 낮을수록 입자가 균일하게 형성되었으며, 대영수산의 어간장은 입자 크기가 작아서 aspirator로 빨려 들어갈 확률이 높아 수율에 영향을 줄 수도 있다는 판단을 하게 되었다.

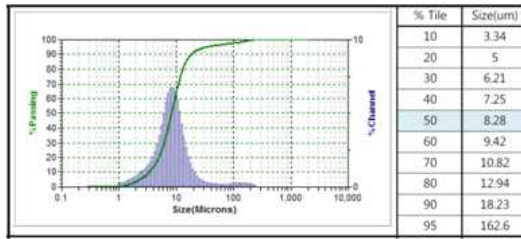
Table 3-1-81. Inlet temperature에 따라 분무 건조된 시료의 입자크기

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6
120℃에서의 입자크기(μm)	8.28	7.86	9.05	9.81	9.43	10.4
140℃에서의 입자크기(μm)	8.65	8.29	9.71	8.85	10.44	10.55

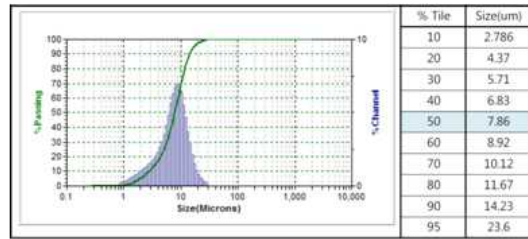
④ Morphology (SEM)

- Fig. 3-1-74과 Fig. 3-1-75에서와 같이 분무 건조에 의해서 제조된 분말들은 염의 농도 및 inlet temperature에 상관없이 전체적으로 둥글고 구멍을 가진 구의 모양을 하고 있다.
- Inlet temperature에 따른 차이는 거의 없으나 염의 농도에 따른 차이가 관찰되었고, 염이 0.74%인 APH의 경우, 다른 배합비로 만들어진 입자들과 달리 구가 접혀진 모양으로 이루어진 입자들이 많이 관찰되었다. 또한 APH가 많이 섞여 있을수록 구의 표면이 매끄러운 것이 확인 되었다.
- Inlet temperature는 분말의 입자모양에는 영향이 거의 없으나, 염도의 경우 입자모양에 영향을 끼친다는 것을 알 수 있었다.

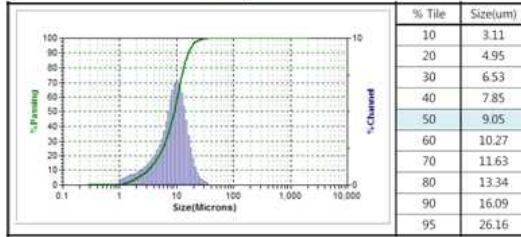
(a) 120°C



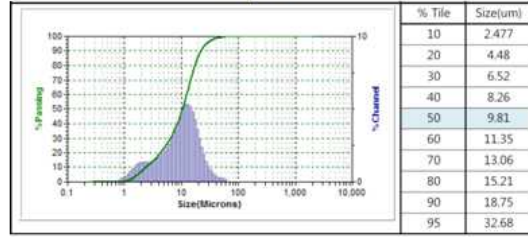
Sample 1



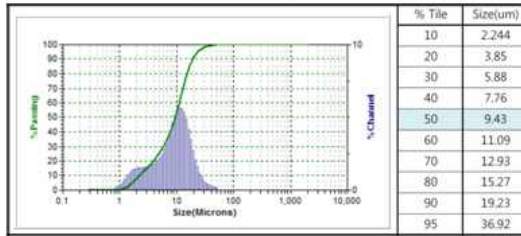
Sample 2



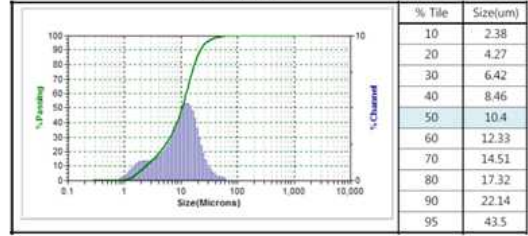
Sample 3



Sample 4

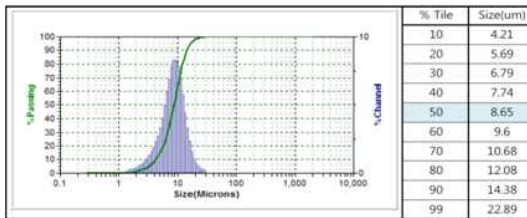


Sample 5

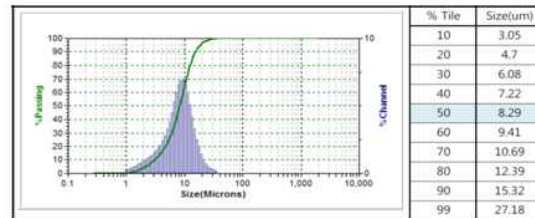


Sample 6

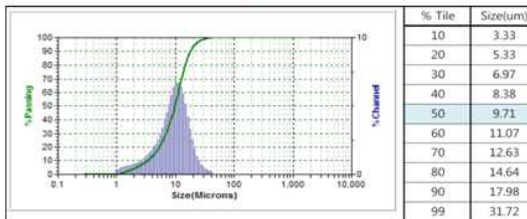
(b) 140°C



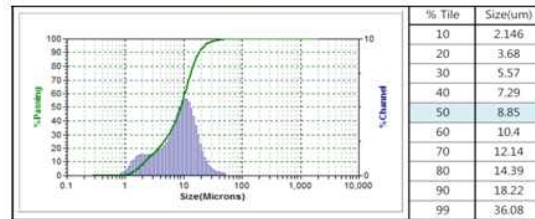
Sample 1



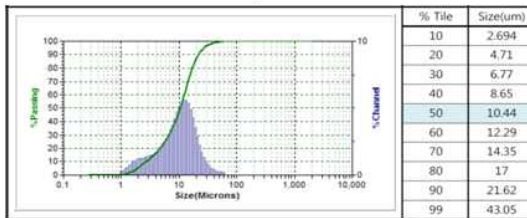
Sample 2



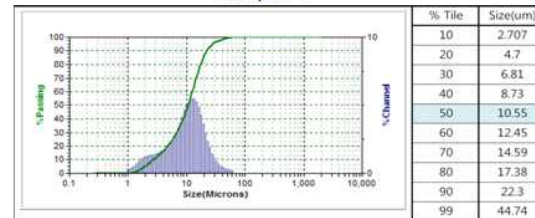
Sample 3



Sample 4

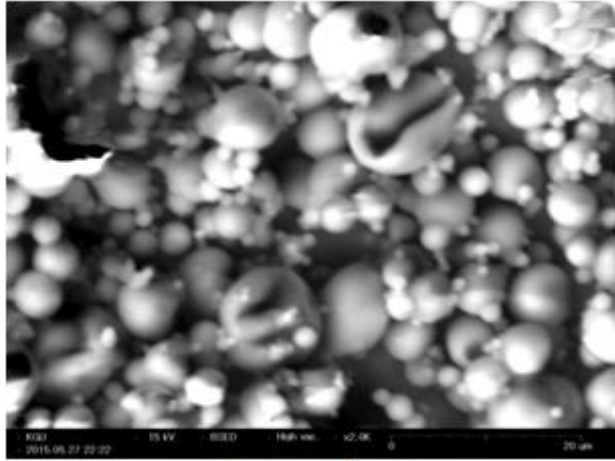


Sample 5

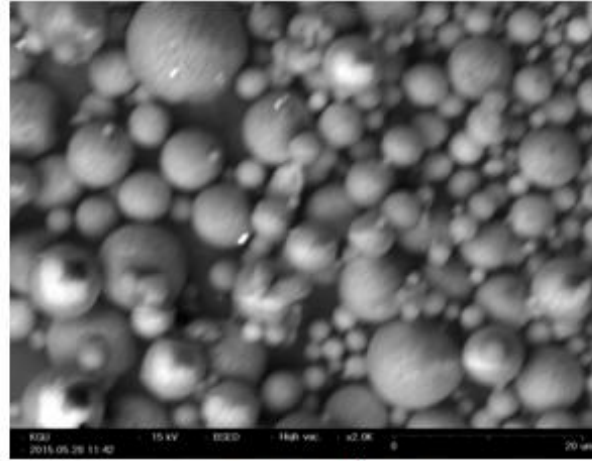


Sample 6

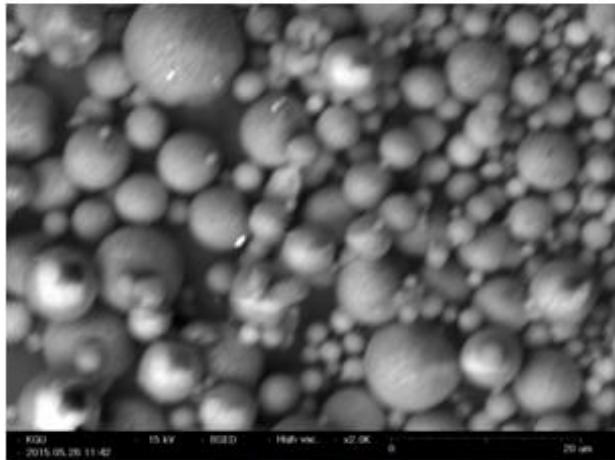
Fig. 3-1-73. Inlet temperature에 따라 제조된 분말의 particle size distribution.



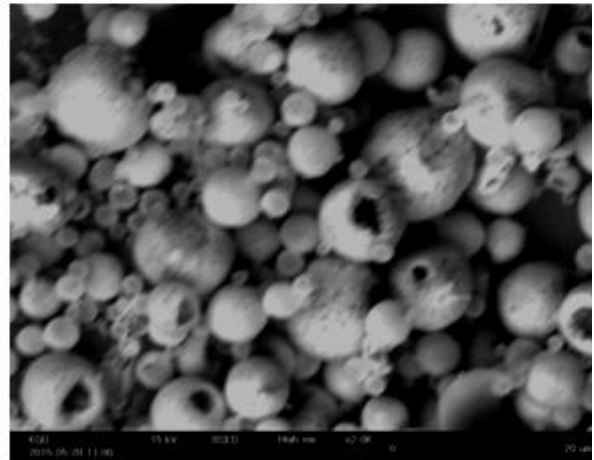
Sample 1



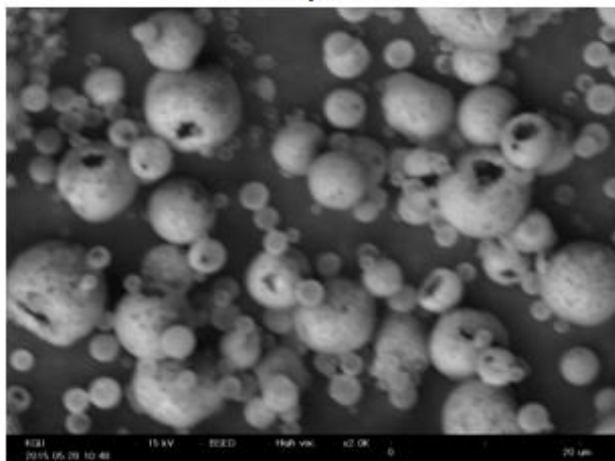
Sample 2



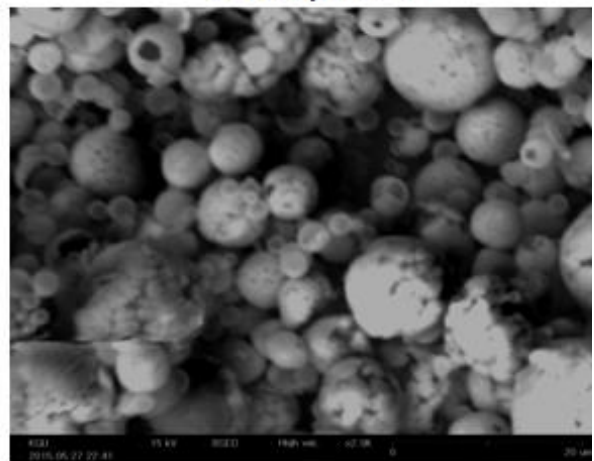
Sample 3



Sample 4

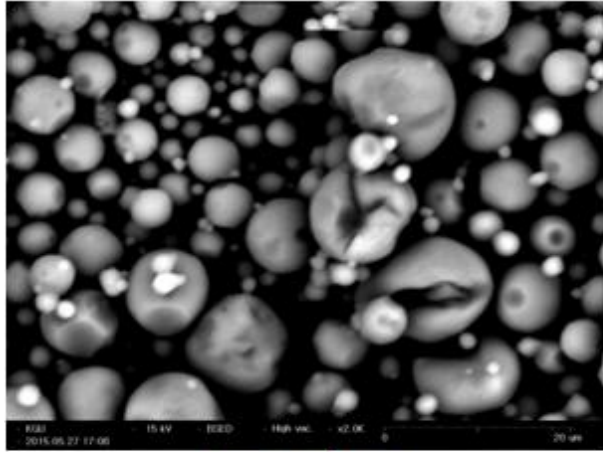


Sample 5

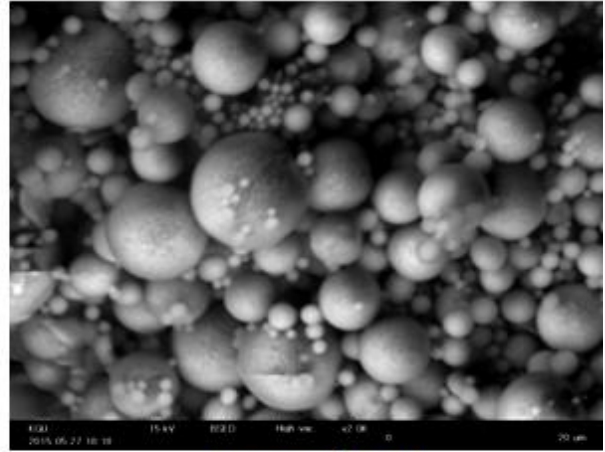


Sample 6

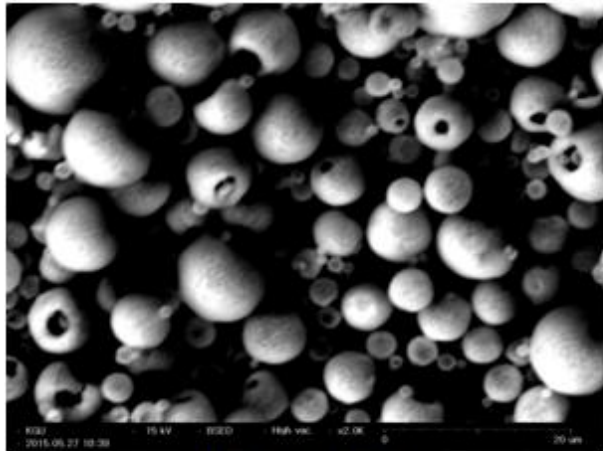
Fig. 3-1-74. 120℃에서 분무 건조된 액상시료의 SEM 이미지.



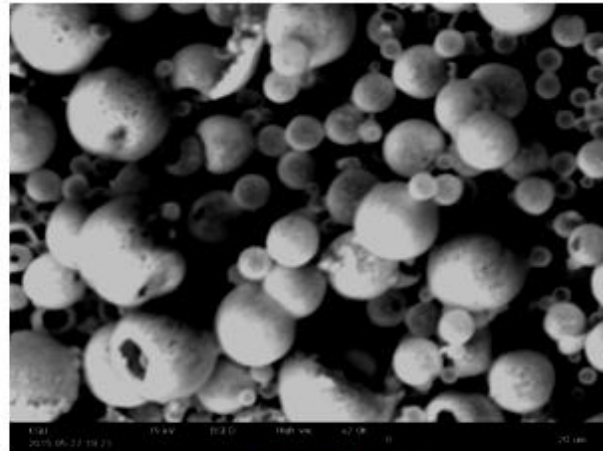
Sample 1



Sample 2



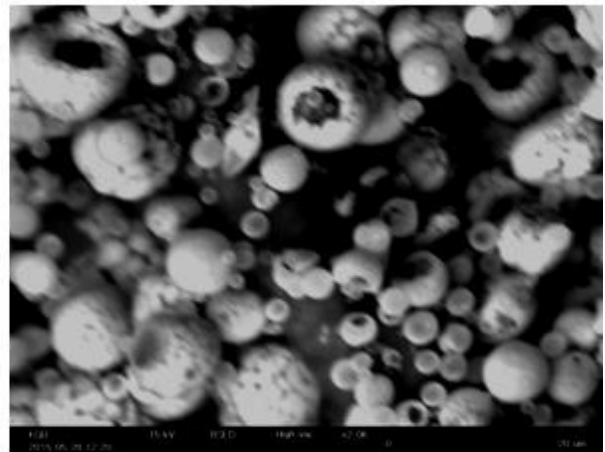
Sample 3



Sample 4



Sample 5



Sample 6

Fig. 3-1-75. 140°C에서 분무 건조된 액상시료의 SEM 이미지.

⑤ 분무건조 수율

- 분무건조 후의 수율은 제조된 분말의 무게와 수분함량, 주입되는 액상의 고형물 함량과 액량을 측정하여 다음과 같이 계산하여 %로 나타내었다.

$$\text{분무건조 수율} = \frac{\text{만들어진분말의무게} \times (100 - \text{건조된분말의수분함량}(\%))}{\text{주입된액상의고형물함량}(\%) \times \text{주입된액량}}$$

- Inlet temperature 변화와 염의 농도 변화에 따른 각 시료의 수율을 Table 3-1-82에 제시하였다.

Table 3-1-82. 분무건조한 시료들의 수율 비교

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6
120℃	74.87%	54.21%	64.88%	57.2%	57.88%	61.21%
140℃	73.62%	84.53%	72.73%	69.4%	64.22%	74.78%

- 염 농도가 증가함에 따른 수율의 차이는 확인되지 않았지만 inlet temperature가 증가함에 따라 분무건조 수율이 높아지는 것을 확인 할 수 있었다.
- 모든 조건에서 사이클론에는 분말이 거의 달라 붙지 않았음에도 불구하고 수율이 약 70% 정도인 것은, 분말의 입자크기가 너무 작고 가벼워서 aspirator을 통해 손실됨을 예상할 수 있었고, 수율을 높이기 위해서는 inlet temperature, 흡입속도(aspirator) 등 운전 조건의 최적화가 필요하다고 판단하였다. 즉, SD 생산 용량 크기의 장치에서 실증 연구가 필요하다.

(라) 결론

- 본 장비를 활용하여 inlet temperature와 염도를 다르게 하여 실험을 실시한 결과, 염의 농도가 높으면 분말의 수분함량이 적고 흡습성이 높다는 것이 확인 되었고, inlet temperature가 140℃ 일 때 수율이 크고 흡습성도 낮아 분말 제조에 최적 조건으로 선정하였다.
- 좀 더 자세히 표현하면, 입구 온도(inlet temperature)를 140℃로 조절하고 흡입속도(Aspirator)를 0.52 m³/min, 용액주입속도(Pump speed)는 322 ml/h, 유량(Q-flow)은 35 mm로 고정함으로써 수율이 70% 이상이 되고, 조단백질 함량이 28% 이상, 염도가 9.32-59.14%인 제품을 얻을 수 있었다.

- 미생물학적으로 안정하고 운반이 용이한 분말 제형의 천연 조미료 base를 대량 생산하기 위해서는 생산 설비에서 수율, 흡습성, 색, 단백질, 염도, 입자크기 등을 고려하여 운전 조건을 최적화하여야 한다.

(2) 말토덱스트린 첨가에 의한 APH 분말의 저염화

- SD에 의해서 분말화 된 APH의 염도는 약 9%로서 이 염도를 낮추고자 액상 APH에 말토덱스트린(DE=14-20, (주)이에스식품원료)을 첨가하여 SD를 한 후, SEM 이미지를 확인하여 저염화 가능성을 확인하고자 하였다.
- SD 실험 조건은 Table 3-1-83에 제시하였고, Table 3-1-84에는 액상 및 분말의 염도를 측정하여 제시하였다. 액상 시료는 잘 섞어주면서, 분말의 염도는 재용해하여 잘 섞어주면서 염도계(YK-31SA salt meter, Lutron Electronics Co., Inc, USA)를 이용하여 측정하였다.

Table 3-1-83. 분무 건조 실험조건

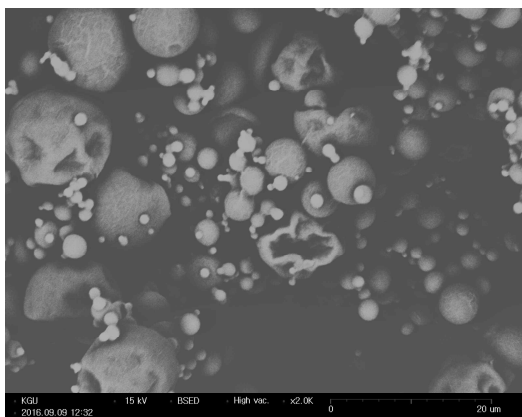
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5
말토덱스트린 (%, w/v)	0	0	5	10	20
Inlet temperature (°C)	120	140	140	140	140
Aspirator (m ³ /min)	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52
Feed rate (ml/h)	322	322	322	322	322
Q-flow (mm)	35	35	35	35	35

Table 3-1-84. APH와 말토덱스트린 첨가량에 따른 염도 비교

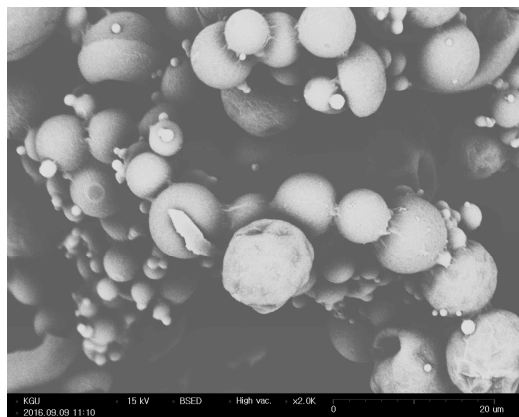
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5
액상 시료의 염도(%)	0.86	0.86	0.70	0.56	0.26
분말화 된 시료의 염도(%)	7.3	7.4	4.3	2.4	1

- 분무건조로 만들어진 분말은 Fig. 3-1-76에서 처럼 Inlet temperature, 말토덱스트린 첨가량에 상관없이 전체적으로 둥근 구의 모양이었으며, Inlet Temperature에 따른 차이는 거의 없으나 덱스트린 첨가량에 따른 차이가 관찰되었다.

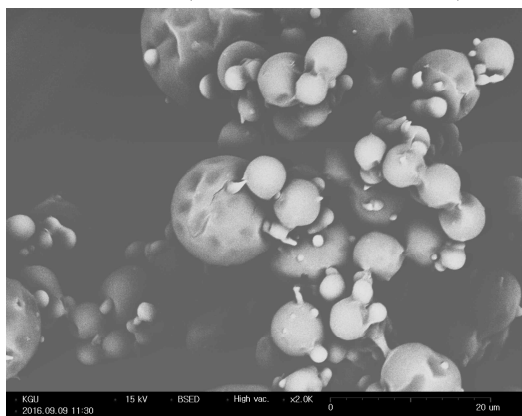
○ APH 시료만으로 분말화 한 경우, 말토텍스트린 첨가한 시료보다 표면이 매끄럽고 구가 접혀진 모양으로 이루어진 입자들이 많이 관찰되었고, 말토텍스트린의 첨가량이 많을수록 구의 표면이 주글주글한 정도가 커지고 내부 방향으로 함몰된 형태로 찌그러짐이 많아지는 것이 관찰되었다. 분말의 염도를 1%까지 조절할 수 있음을 확인하였다.



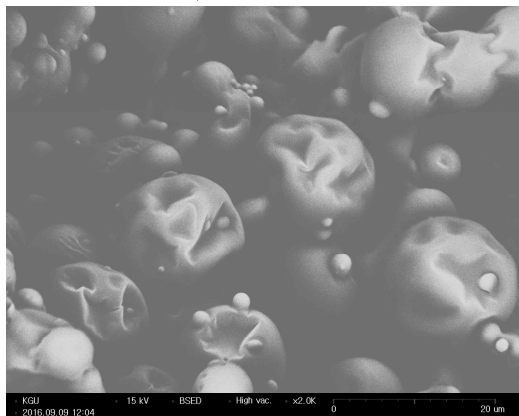
(a) 120°C, 말토텍스트린 0%,



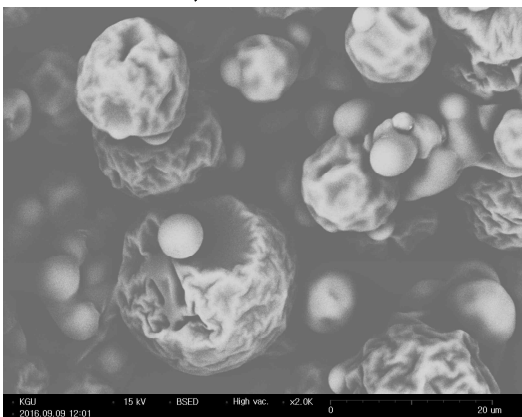
(b) 140°C, 말토텍스트린 0%



(c) 140°C, 말토텍스트린 5%



(d) 140°C, 말토텍스트린 10%



(e) 140°C, 말토텍스트린 20%.

Fig. 3-1-76. Inlet temperature와 말토텍스트린 첨가량을 달리 분무 건조한 시료의 SEM 이미지.

라. 개선 공정에 따른 cost-effectiveness

- 3차 pilot scale 생산 공정에서 원심분리 공정을 ceramic filtration system으로 전환하는 경우를 가정하고, 당시의 물질수지를 활용하여 생산 원가 분석을 실시하였다.
- 생멸치 가수분해물 생산 효율인 63.5%와 SD 효율 80%에 따라 멸치 10 kg(wet weight)에서 생산된 가수분해물(APH)의 단백질 건조 무게는 1.105 kg이었고, 여과를 거친 후 SD에 의해 분말화 된 가수분해물(APH-Powder)의 무게는 약 0.89 kg이었다. 이를 기준으로 산출한 APH-Powder의 생산 비용을 Table 3-1-85에 나타내었다.

Table 3-1-85. Calculation of average costs for one-batch production of anchovy hydrolysate

Category	Cost (₩) per unit	Cost (₩)
Enzyme (100 g)	66,333/kg	6,633
Anchovy (10 kg)	1500/kg	15,000
Transportation	20/kg	200
Washing & Soaking		
Electricity	185/kWh	279
Water	125/L	13
Labor	6,030/h	12,060
Mincing & Packaging		
Electricity	185/kWh	129
Pre-packaging	35/kg	1,050
Water	125/L	13
Labor	6030/h	30,150
Hydrolysis at 50°C under high pressure		
Electricity	185/kWh	1,289
Water	125/L	3
Termination of hydrolysis		
Electricity	185/kWh	22
Water	125/L	20
Labor	6,030/h	6,030
Cooling & Aging⁴		
Electricity	185/kWh	224
Ceramic filtration		
Electricity	185/kWh	22
Labor	6,030/h	6,030
Spray Drying		
Electricity	185/kWh	2148
Packaging	70/kg	39
Waste-treatment credit	41/kg	328
Total		81,681

- 멸치 10 kg에서 생산된 총 APH-Powder의 비용은 81,681 원으로 분말 1 kg당 약 91,777 원이 소요되는 것으로 평가되었다. 멸치 및 효소 등의 원재료 비중이 약 27%이었고 노동 비용이 66.4%를 점유하고 있다. 이는 원료가격 다운, 효소 사용량의 조정, 수율 증가를 위한 물 사용량 억제 및 고압처리 장치의 용량을 고려한 대량 생산, 부영제를 활용한 분무 건조 수율 증대와 같은 사항들을 고려하여 실제 공정에서 적용한다면 APH-Powder의 가격 경쟁력도 확보할 수 있을 것으로 판단되었다.

5. 저염 어간장 개발 및 대량생산공정 개발

- 공정 개선에 의한 나트륨 저감화 목표를 달성하고, 사업화 방향과 참여기업의 사업 촉진을 위하여 APH와 기존의 어간장을 혼합하여 제조하는 저염 어간장 제조기술을 개발하고 이를 대량 생산할 수 있는 공정을 개발하고자 하였다.

가. 저염 어간장 시제품(prototype) 개발

(1) 서론

- 기존 제품과 같은 풍미를 내면서 나트륨이 저감화된 저염 어간장 제품(low sodium, same flavour)을 만들기 위해 시중에 판매되고 있는 어간장 제품과 3차 시험생산에서 제조된 APH(멸치 고압효소가수분해물)를 혼합하여 저염 어간장을 개발하고자 한다.
- 기존의 시판 어간장 제품에 비하여 나트륨을 20% 이상 감소시키고, 유사한 풍미 제품을 개발하고자 총 질소 함량이 1.3% 이상 되는 제품 개발을 목표로 설정하였다.

(2) 재료 및 방법

㉠ 재료 및 시료제조

- **재료:** 3차 Pilot scale에서 생산된 APH와 (주)대영수산(Korea)에서 공급받은 바다천지 어간장 3년산을 사용하였다.
- **시제품의 배합시료 제조:** 대영수산 어간장(R)과 APH(A)를 정해진 비율로 각각 혼합한 시료 6종을 관능 평가를 위해 제조하였고 각 원액의 혼합 비율 및 염도는 Table 3-1-87과 같다.
- **시제품의 속성평가 시료 제조:** 시료 원액은 수령 후 냉장 보관하였으며, 국이나 찌개의 일반적인 염농도 수준(0.5%~1% 수준)에서 평가할 수 있도록 평가 당일 정제수로 20배 희석한 용액을 준비하여 평가용 시료(S1, S2, S3, S4, S5, S6)로 사용하였다(Table 3-1-86 참고). 척도훈련을 위하여 백설탕은 큐원 하얀설탕(삼양사)을, 소금은 정제소금으로 한주 소금(주)한주)을, Citric acid은 대정화금 제품을, Caffeine은 Acros Organics 제품을 사용하였다.

Table 3-1-86. 시료에 따른 대영수산 어간장(R)과 APH(A) 비율 및 염도

시료	R과 A 혼합 비율	염도 (%)
S1	R 100%	21.00
S2	R:A = 8:2	17.00
S3	R:A = 6:4	13.00
S4	R:A = 4:6	9.00
S5	R:A = 2:8	4.90
S6	A 100%	0.70



Table 3-1-87. 속성 강도 평가 시료

시료	R과 A 혼합 비율	원액 염도 (%)	시료 염도(%)
S1	R 100%	21.00	1.05
S2	R:A = 8:2	17.00	0.85
S3	R:A = 6:4	13.00	0.65
S4	R:A = 4:6	9.00	0.45
S5	R:A = 2:8	4.90	0.25
S6	A 100%	0.70	0.04

○ **짠맛 증진 효과 분석용 시료 제조:** APH(A)의 짠맛 증진 효과를 확인하기 위하여 APH(A)의 첨가량을 달리하고 염도를 정제소금(한주소금, Korea)을 이용하여 보정하여 짠맛 증진 효과 시료(E1, E2, E3, E4, E5, E6)로 하였다. 짠맛증진 효과 시료에 대한 기본

첨가량 및 염도(이론값)를 Table 3-1-87에 나타내었다.

Table 3-1-88. 짠맛 증진 효과 시료

	S6 첨가량 (mL/500mL)	소금 첨가량 (g)	염도 (이론값)
E1	0	5.00	1.00%
E2	50	4.88	0.98%
E3	100	4.76	0.96%
E4	200	4.51	0.92%
E5	300	4.27	0.88%
E6	400	4.02	0.83%

(나) 실험 방법

① 이화학적 품질평가

○ pH는 4, 7, 10 calibration 용액으로 calibration을 한 후 시료 10ml을 증류수로 10배 희석하고 pH meter(ORION 4 STAR, Thermo Scientific, USA)를 사용하여 25℃에서 3회 반복 측정하고, 당도는 증류수로 calibration을 한 후 당도계(HI96801, HANNA, Romania)를 사용하여 3회 반복 측정하고 염도는 염도계(YK-31SA salt meter, Lutron Electronics Co., Inc, USA)를 이용하여 측정하며 용출된 측정값이 변화가 없는 시점까지 관찰하였다.

② 관능적 품질평가

○ APH와 어간장 혼합 시료 원액 6종 시료에 대한 향과 맛의 관능적 특징을 훈련된 전문패널 7명을 활용하여 15점 강도 척도로 평가하였다, 묘사분석 활동은 각 시료의 관능 속성 용어를 도출하고, 해당 속성의 강도와 기본 맛에 대한 강도 훈련을 실시한 후 관능속성 강도평가와 짠맛증진효과에 대한 평가를 실시하였다.

○ 용어도출: 훈련된 전문패널을 대상으로 S1, S2, S3, S4, S5, S6에서 느껴지는 관능 속성 용어를 수집하고 인지되는 맛 속성의 정의를 협의하여 도출하였다.

○ 척도훈련: 용어도출 단계에서 뽑아낸 관능 속성을 대상으로 척도 훈련을 실시하였다. 기본 맛 이외의 도출 속성 강도 척도 훈련은 평가 시료 중 특정 속성이 강한 시료의 강도를 표준 시료로 하여 척도 훈련을 실시하였다.

○ 속성강도 평가: 용어도출과 척도훈련 단계에서 정의된 속성과 강도를 기반으로 각 시료의 속성강도를 3반복 평가하였다.

○ 짠맛 증진 효과: 짠맛 증진 효과 시료에 대해 짠맛과 쓴맛 강도를 3반복 평가하였다.

○ **결과 분석:** 속성강도 평가와 짠맛 증진 효과의 결과는 LSD (Least Significant Difference) 방법으로 다중비교 검정하였고 통계분석은 관능검사 소프트웨어 SENSOTOOL(센소메트릭스)가 사용되었다.

③ **유통기한설정 실험**

○ **총균수 측정(미생물학적 안전성 실험):** 저염 어간장의 미생물학적 안전성을 확인하기 위하여 식품공전의 총균수 실험에 준하여 총균수 실험을 실시하였다. 각 원 시료(APH, 대영수산 어간장 및 저염 어간장)를 10진 희석법에 의하여 희석한 후 각 샘플 1 mL를 취하여, PCA(plate count agar) 배지(3M)를 이용하여 pour plate counting method로 30°C에서 72시간 배양하여 총균수를 계수 하였다.

○ **비등온가속시험(acceleration test under nonisothermal condition):** 비등온가속시험장치(Table 3-1-89)를 이용하여 초기온도 25°C에서 시작하여 시간당 온도를 7°C씩 상승시켜 시제품 샘플을 채 취 후 25°C로 냉각하여 품질지표를 측정하였다.

Table 3-1-89. 비등온 가속시험장치의 specification

Volume	Chamber : 150L	Bath : 2L
Electrocal Requirements	220V, 60Hz	
Temperature Range	-20 ~ 100°C	
Temperature Stability	±0.5 °C	
Humidity Range	30 ~ 98 %RH	
Humidity Stability	±1.0 %RH	
Light Source	Xenon Lamp	
Lighting Intensity	0 ~ 20,000Lx	
Interior Dimension (mm) W×D×H	500×500×600	
Overall Dimension (mm) W×D×H	1,050×1,000×1,800	

○ **품질지표 측정:** ,pH와 산도를 품질지표로 선정하여 측정하였다. pH는 온도별로 채취한 시료를 25°C에서 균질화 하여 증류수로 10배 희석하고 pH meter(ORION 4 STAR, Thermo Scientific, USA)를 사용하여 반복 측정하였고 산도는 pH를 측정한 시료 20 ml에

0.1 N NaOH 용액을 적정하여 pH가 8.3이 될 때까지 소요된 용액의 ml수로 나타내었다.

(3) 실험결과 및 고찰

① 시제품의 이화학적 품질특성

○ 저염 간장의 이화학적 품질 분석 결과(Table 3-1-90), 기존 대영수산 어간장 제품과 개발된 APH를 혼합하는 경우에는 total nitrogen(%)는 0.92~1.74%로 나타났고, salt 농도(%)는 APH의 함량 비가 많아질수록 감소되어 이화학적 특성결과에서는 기 개발된 APH를 이용하여 배합 시 기존 어간장을 개선한 저염 어간장의 제품가능성을 확인 할 수 있었다.

Table 3-1-90. 시제품의 혼합 비에 따른 이화학적 품질특성

Sample	R과 A 혼합 비율	pH	brix	salt(%)	TN(%)
S1	R 100%	5.64	48	21.0	1.74
S2	R:A = 8:2	5.79	40	17.0	1.57
S3	R:A = 6:4	5.91	33	14.0	1.34
S4	R:A = 4:6	6.04	24	9.0	1.24
S5	R:A = 2:8	6.20	18	4.9	1.08
S6	A 100%	6.53	9	0.72	0.92

② 관능적 특성 분석

○ 차이식별 검사를 통한 시제품의 용어도출

- S1에서는 기본 맛 외에 액젓향미, 소금 맛, 황태 향미, 비린 맛, 쇠 맛, 멸치향미, 생선향미, 씹쓸한 맛, 물김치 맛, 짭짤한 맛, 바닷물 냄새 등의 총 30여 가지의 용어가 도출됨.
- S2에서는 기본 맛 외에 쫄 생선 맛, 콩 비린내, 생선 비린내, 간장 짠내, 콩 맛, 시큼한 맛, 구수한 맛, 황태 향미, 비린 맛, 멸치향미, 씹쓸한 맛, 짭짤한 맛, 바닷물 냄새 등의 총 30여 가지의 용어가 도출됨.
- S3에서는 기본 맛 외에 쿼퀴한 향, 미원맛, 느끼한 맛, 구수한 맛, 쇠 맛, 액젓향미, 구운 오징어 향미, 멸치향미, 생선 향미, 소금물 향, 물김치 맛, 짭짤한 맛, 바닷물 냄새 등의 총 30여 가지의 용어가 도출됨.
- S4에서는 기본 맛 외에 마린 감 향미, 건 다시마 향, 느끼한 맛, 해조류 향미, 액젓향미, 소금 맛, 황태 향미, 비린 맛, 멸치향미, 등의 총 25여 가지의 용어가 도출됨.
- S5에서는 기본 맛 외에 멍멍한 맛, 시큼한 냄새, 허브 향, 콩 맛, 집 된장 맛, 감 말랭이 맛, 액젓향미, 황태 향미, 비린 맛, 멸치향미, 구수한 맛, 짙은 맛, 바닷물 냄새 등의 총 25여 가지의 용어가 도출됨.
- S6에서는 액젓향미, 소금 맛, 황태 향미, 멸치향미, 바닷물 냄새, 발효콩 향, 감자즙 냄새

새 등의 총 20여 가지의 용어가 도출됨.

- 각 시료에서 도출된 용어를 기반으로 도출 용어들의 정의하였다. 짠맛, 쓴맛, 단맛, 신맛, 감칠맛은 사전적 의미를 기준으로 정의하였으며, 그 밖의 도출 용어는 전문 패널 간 토의를 통해 평가 속성을 정의함.(Table 3-1-91)
- Table 3-1-91에서 정의한 속성들로 각 시료를 예비 평가하여 시료 간 강도 차이가 뚜렷하지 않은 콩 비린내, 생선 비린내, 다시마 맛, 뽕은맛은 평가 속성에서 제외함.

Table 3-1-91. 도출 속성 용어 정의

속성	정의
짠내	바닷물 냄새, 소금물 냄새, 간장, 된장 등 장류에서 느껴지는 짠 냄새.
액젓맛	멸치, 까나리, 피쉬소스 등 생선을 발효한 액젓 류의 맛
말린 생선 육수 맛	마른 멸치, 황태, 북어와 같은 마른 생선에서 느껴지는 맛과 마른 생선으로 끓인 육수에서 느껴지는 맛
콤콤한 향	메주 또는 발효 콩 제품에서 느껴지는 콤콤한 향
구수한 맛	구수한 맛
콩 비린내	두부 등 콩류 식품에서 느껴지는 비릿한 냄새.
생선 비린내	생선이나, 생선 발효물 등에서 느껴지는 비릿한 냄새.
다시마 맛	다시마를 우린 국물의 맛
텁텁함	삼키고 난 뒤의 입안의 텁텁한 정도
뽕은맛	혀나 입안이 마르는 듯 한 자극



Fig. 3-1-77. 용어도출 평가.

○ 척도훈련

- 짠맛, 단맛, 쓴맛, 신맛의 강도는 표준 시료를 통해 훈련하였으며, 그 조성은 Table 3-1-92에 나타내었다.

Table 3-1-92. 속성 강도 기준 척도 표준 시료 농도

표준 물질	속성 강도 기준 척도		
	3점	8점	15점
짠맛 소금	2.5 g/L	4.5 g/L	6.5 g/L
단맛 백설탕	2.5 %	7.0 %	12.0 %
쓴맛 Caffeine	0.4 g/L	0.9 g/L	1.1 g/L
신맛 Citric acid	0.4 g/L	0.8 g/L	2.0 g/L

- 짠내, 비린내, 쿼퀴한 향, 감칠맛, 말린 생선 육수 맛, 구수한맛, 다시마 맛, 짹은 맛, 텁텁한 맛, 액젓 맛은 S1의 강도를 기준으로 하여 척도 훈련하였다(Table 3-1-93).

Table 3-1-93. 속성 별 기준 강도 - S1

속성	기준 강도
짠내*	11.00
감칠맛*	12.00
말린 생선 육수 맛*	10.00
텁텁함*	8.00
액젓 맛*	13.00
비린내	8.00
쿼퀴한 향	9.00
구수한 맛	8.00
다시마 맛	9.00
짹은 맛	6.00

* 관능 속성 강도 평가 속성



Fig. 3-1-78. 속성 강도 훈련.

○ 관능 속성강도

- 시료 별 관능 속성 강도 평가 결과는 Table 3-1-94과 Fig. 3-1-79 및 Fig. 3-1-80에 나타냄.

Table 3-1-94. 시료 별 관능 속성 강도

	S1	S2	S3	S4	S5	S6
짙내	11.29 ^{a1)}	9.86 ^b	9.14 ^b	8.71 ^b	7.33 ^c	4.24 ^d
단맛	5.33 ^a	5.29 ^a	4.90 ^a	5.00 ^a	3.57 ^b	2.38 ^c
짙맛	14.24 ^a	12.38 ^b	11.71 ^b	8.86 ^c	5.95 ^d	2.90 ^e
쓴맛	5.14 ^a	4.33 ^{ab}	3.81 ^{bc}	3.62 ^{bc}	3.00 ^{bc}	3.62 ^c
신맛	3.67 ^a	3.29 ^{ab}	2.86 ^{bc}	2.24 ^c	1.43 ^d	1.10 ^d
감칠맛	11.38 ^a	10.81 ^a	10.62 ^a	8.24 ^b	6.14 ^c	3.86 ^d
말린 생선 육수 맛	12.00 ^a	11.33 ^{ab}	10.95 ^b	9.05 ^c	6.86 ^d	4.71 ^e
액젓 맛	13.19 ^a	11.76 ^b	11.10 ^b	8.48 ^c	5.43 ^d	3.00 ^e
텃텃함	8.48 ^a	7.62 ^{ab}	6.48 ^{bc}	5.76 ^c	4.38 ^d	3.76 ^d

1) 동일한 문자는 시료 간 유의차가 없음을 의미함(p<0.05)
다중비교는 각 속성별로 5개 시료 평균에 대해 LSD 검증함.

- S1은 상대적으로 모든 속성이 강한 것으로 평가됨.
- S2는 상대적으로 모든 속성이 강한 것으로 평가됨.
- S3는 상대적으로 짠맛, 액젓 맛, 말린 생선 육수 맛, 감칠맛이 강한 것으로 평가됨.
- S4는 상대적으로 단맛이 강한 것으로 평가됨.
- S5와 S6은 상대적으로 모든 속성 강도가 약한 제품으로 평가됨.
- 짠내는 S1이 뚜렷하게 강하고, S6이 뚜렷하게 약한 것으로 평가됨.
- 단맛은 S1, S2, S3, S4가 강하고, S6이 뚜렷하게 약한 것으로 평가됨.
- 짠맛은 S1이 뚜렷하게 강하고, S6이 뚜렷하게 약한 것으로 평가됨.
- 쓴맛은 S1이 뚜렷하게 강하고, S6이 뚜렷하게 약한 것으로 평가됨.
- 신맛은 S1이 뚜렷하게 강하고, S5, S6이 약한 것으로 평가되나, 그 강도가 15점 척도의 1~3점대로 모든 시료에서 신맛은 약한 것으로 평가됨.
- 감칠맛은 S1, S2, S3가 강하고, S6이 뚜렷하게 약한 것으로 평가됨.
- 말린 생선 육수 맛은 S1이 뚜렷하게 강하고, S6이 뚜렷하게 약한 것으로 평가됨.
- 액젓 맛은 S1이 뚜렷하게 강하고, S6이 뚜렷하게 약한 것으로 평가됨.
- 텁텁함은 S1이 뚜렷하게 강하고, S5, S6이 뚜렷하게 약한 것으로 평가됨.

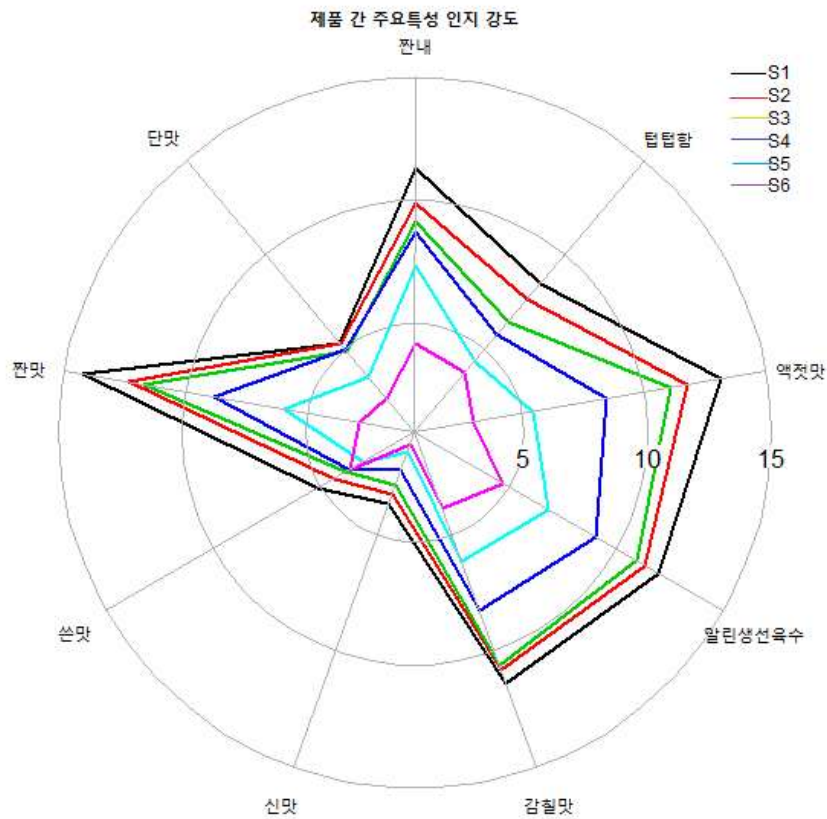
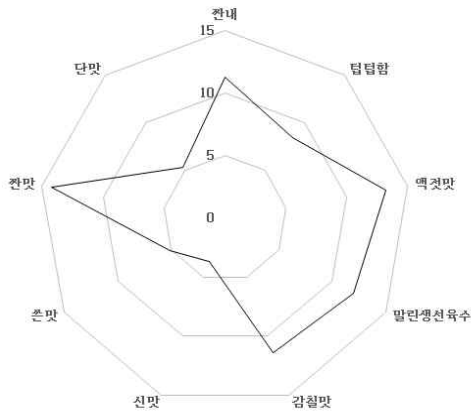
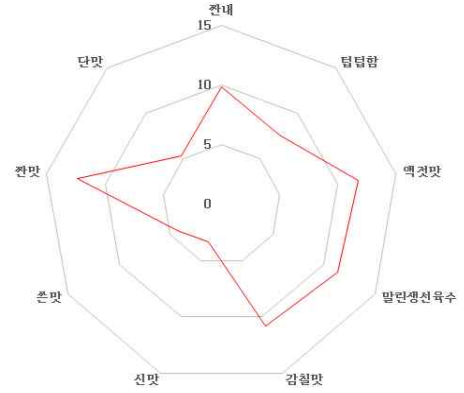


Fig. 3-1-79. 제품 간 주요특성 인지 강도.

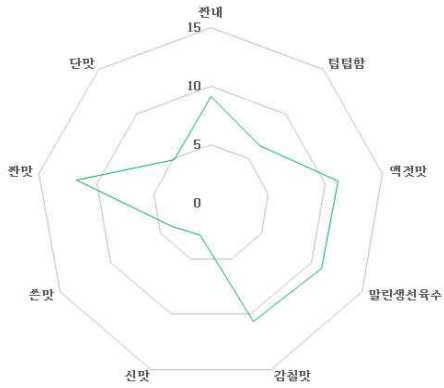
주요특성 인지 강도 - S1



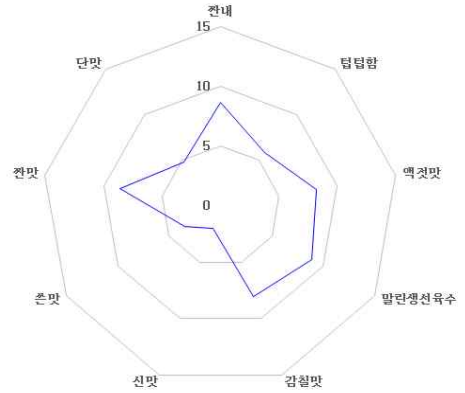
주요특성 인지 강도 - S2



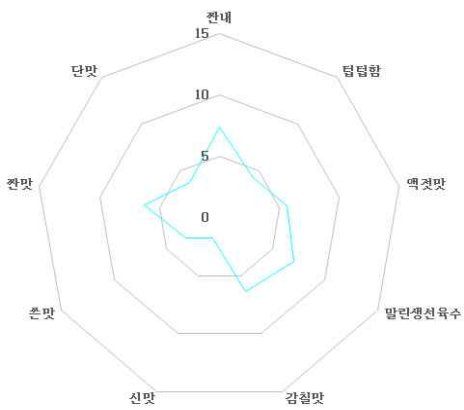
주요특성 인지 강도 - S3



주요특성 인지 강도 - S4



주요특성 인지 강도 - S5



주요특성 인지 강도 - S6

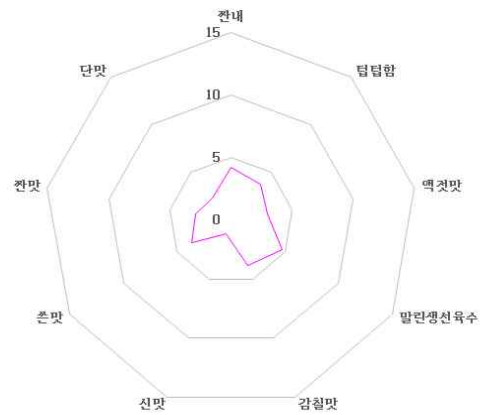


Fig. 3-1-80. 제품별 인지강도.

- **짠맛 증진 효과 확인:** 짠맛 증진 시료의 짠맛과 쓴맛 강도 평가 결과는 Table 3-1-95에 나타냄, 짠맛과 쓴맛 강도의 시료 간 유의적인 차이를 보이지 않는 것으로 평가됨.

Table 3-1-95. 짠맛, 쓴맛 강도 - 짠맛 증진 효과 평가

	S6 첨가 비율 (%)	짠맛	쓴맛
E1	0	13.76 ^{a1)}	3.71 ^a
E2	10	13.00 ^a	3.71 ^a
E3	20	13.00 ^a	3.67 ^a
E4	40	12.86 ^a	4.00 ^a
E5	60	12.57 ^a	3.81 ^a
E6	80	12.52 ^a	4.05 ^a

¹⁾ 동일한 문자는 시료 간 유의차가 없음을 의미함(p<0.05)

③ 유통기한설정 실험

- 시제품 개발 시 미생물학적 안전성을 검증하기 위하여 각 시료의 총 균수 측정 실험을 진행 하였다.
- 기존의 대영수산 3년산 제품과 APH 원 시료의 총 균수와 대장균군 및 바실러스 세레우스는 37℃에서 48시간 배양 하였으나 관찰되지 않아, 농림부 혼합양념 품질기준인 세균수 1.0 X 10⁴ CFU/ml 이하 및 대장균군 장류 및 조미식품의 품질규격인 대장균군과 바실러스 세레우스 균 음성 기준에 부합되었음을 확인하였다.

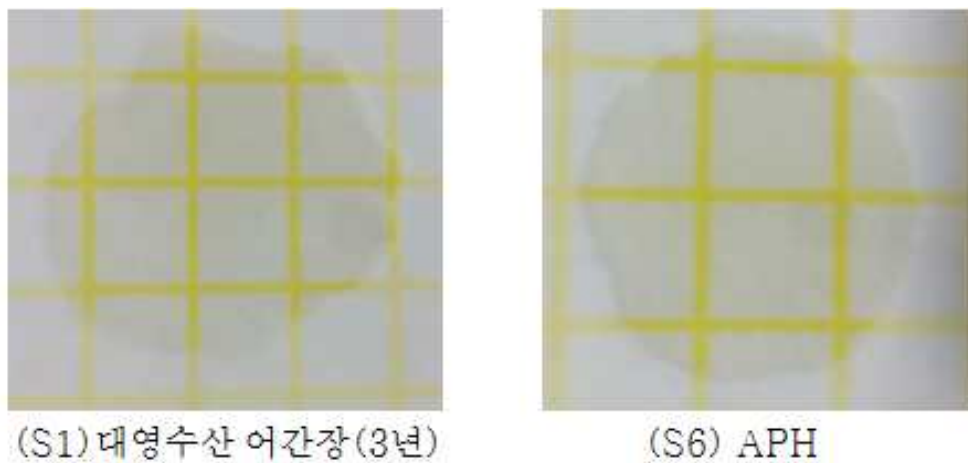


Fig. 3-1-81. 총 균수 측정 결과.

- 그러나 제품의 혼합 시 염도가 18% 이하로 저감화 되어 미생물학적 안전성을 고려하여야 할 것으로 판단되었다.
- 비등온상태의 가속화 시험 방법을 활용하여 시제품(염도 16%)의 품질지표 변화를 측정 한 결과, 외관(색)의 변화는 저장온도에 따라 차이가 없었고 pH는 대조군 5.67과 비교하여 5.61~5.63범위로 관찰되었고 산도는 대조군 5.15 ml, 저장시간별 시료는 5.2~5.3 ml의 값을 나타내어 저장온도에 따라 pH 및 산도의 변화를 거의 관찰할 수 없었다.
- 따라서 유통기한은 완제품 생산 시 살균 공정으로서 HTST 또는 UHT 공정의 미생물학적 안정성에 따라 결정되므로 HTST 또는 UHT 공정의 운전 조건에 따라 유통기한이 결정될 것으로 사료된다.

Table 3-1-96. Acceleration test under non-isothermal condition

Step	온도(℃)	pH	산도 (ml)	조건
	Control	5.67	5.15	
1	25	5.61	5.3	시간당 온도 7℃상승, 1시간 유지
2	32	5.63	5.2	
3	42	5.61	5.2	
4	52	5.62	5.37	
5	62	5.62	5.27	
6	78	5.62	5.27	
7	80	5.62	5.3	
8	90	5.63	5.3	

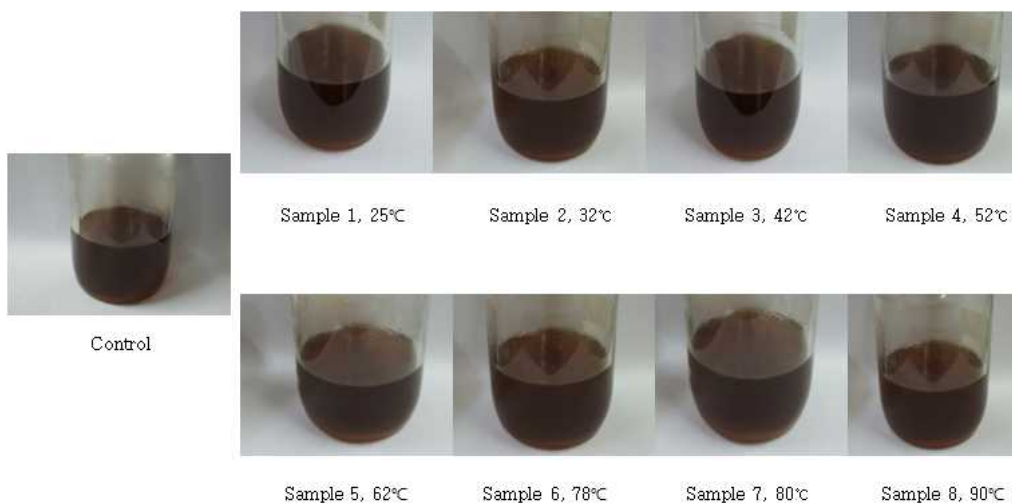


Fig. 3-1-82. Acceleration test under non-isothermal condition에 따른 외관의 변화.

(4) 결론

- 염농도가 감소할수록 짠맛에 대한 인지강도가 낮아지는 것이 일반적으로 기대할 수 있는 현상으로, 평가 결과 또한 염농도가 낮은 멸치 가수 분해물(APH)과 혼합 비율이 증가할수록 짠맛은 낮아지는 경향을 보이고 있다.
- 짠맛 및 짠맛과 관련성이 깊은 속성으로 볼 수 있는 짠내, 감칠맛 속성의 평가 시료 별 강도 변동을 확인해 보면 각 속성 강도 감소 기울기가 일정 구간(S2~S3) 내에서는 완만하게 감소하며, 해당 구간 내 시료 간 속성 강도 결과가 유사한 것을 확인할 수 있었다.
- 특정 염농도 내(13%~17%)에서 멸치 가수 분해물 대체에 의한 짠맛 및 유사 속성의 증진 효과가 있는 것으로 판단되었다(Fig. 3-1-83 참고).

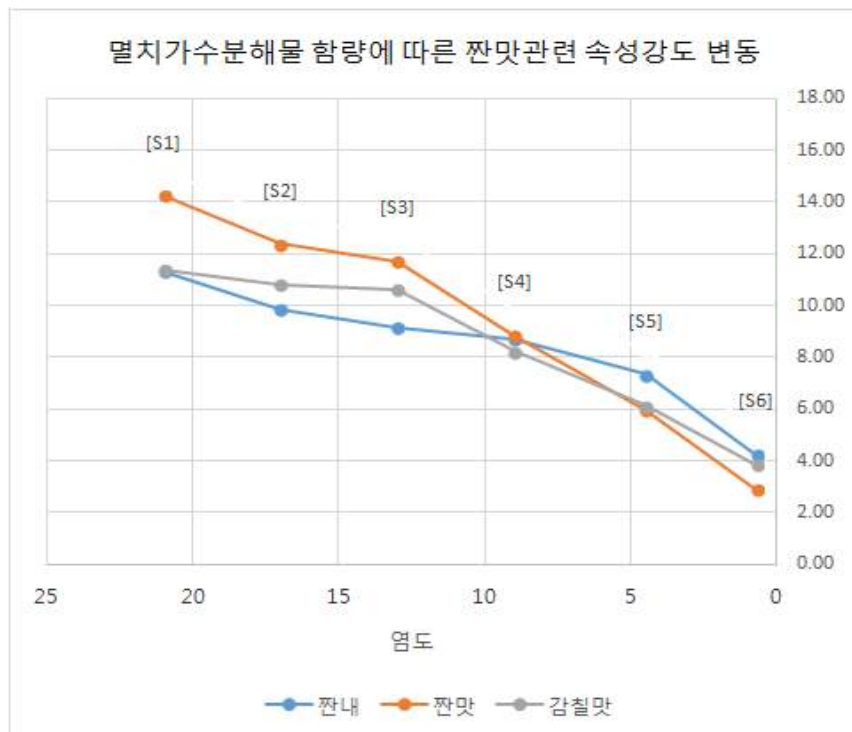


Fig. 3-1-83. 염농도에 따른 짠맛관련 속성강도 변동.

- 소금용액과 멸치 가수 분해물 희석액의 혼합을 통한 짠맛증진효과 평가 결과에서 각 강도 측정결과를 각 시료의 이론적 염농도 수치로 나누어 계산된 단위 염농도 당 짠맛 강도를 시료별(E1~E6)로 비교해 보면 아래와 같이 S6의 증가에 따른 짠맛의 증가 경향이 확인되어, 멸치 가수 분해물의 첨가에 따른 짠맛 증진 효과를 추정해 볼 수 있었다.
- 실질적인 짠맛 강도에 대한 효과 측정을 위해서는 추가적인 조사가 필요할 것으로 사료된다.

- 대영수산 제품과 APH의 총 균수를 측정(37℃에서 48시간 배양)한 결과, 균수는 측정되지 않았고 염농도 16% 시제품으로 유통기한 설정실험 결과, pH, 산도, 외관(색)의 변화는 관찰할 수 없었으나 저염화 된 제품으로 개선 시 미생물학적 안전성 검증이 필요할 것으로 판단되어 HTST 또는 UHT 공정을 부가할 것을 고려하는 것을 제안한다.
- 또한 최종 제품으로 선택하고자 하는 배합 비는 E2~E3의 구간 안에 있는 시료로서 13~17%의 염도를 가지고 있어 대영수산식품 어간장 대비 약 19~40%의 소금을 저감화할 수 있음을 확인하였다(Fig. 3-1-83, Fig. 3-1-84 참고).

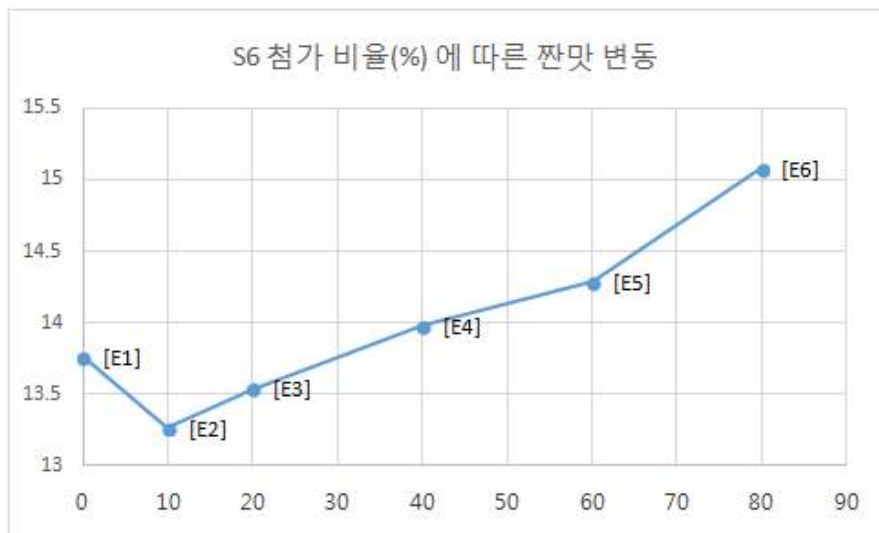


Fig. 3-1-84. APH 첨가에 따른 짠맛 변동.

- E2~E3 염농도의 범위를 적용했을 경우 목표하였던 염 농도를 달성하였으며 nitrogen 함량을 1.3 %로 맞추어 풍미증진 및 천연 조미료의 base로 이용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

나. 저염 어간장 대량생산공정 개발

(1) 서론

- 저염 어간장 생산공정을 개발하기 위하여 기존 공장(대영수산)을 방문하여 공정을 분석하고, 개선 방향을 도출하여 일일 1 ton을 생산할 수 있도록 공정 개선 및 최적화를 실시

(2) 연구내용

(가) 기존 공정의 분석 및 개선 방향 도출

- 기존 공정의 과정은 Fig. 3-1-85와 같다.

魚 간장이야기 / 바다천지 魚간장 제조과정

바다천지 魚간장은 최고의 재료와 최고의 위생시설로 정성을 다하여 빚습니다.



Fig. 3-1-85. 기존의 생산 공정 (대영수산).

○ 공정을 분석한 결과, 매우 위생적으로 HACCP 기준을 만족할 수 있도록 개선이 가능하다고 판단하였고 이 중 본 과제에서는 다음과 같은 사항에 대하여 개선 방향을 도출하여 제안함.

- 1차 여과(원액 추출과정)를 Fig. 3-1-86와 같은 filter press 방식으로 생산 규모에 최적화시켜 개선을 권유하지만 여의치 않으면 기존 방식을 고수하여도 무방함.

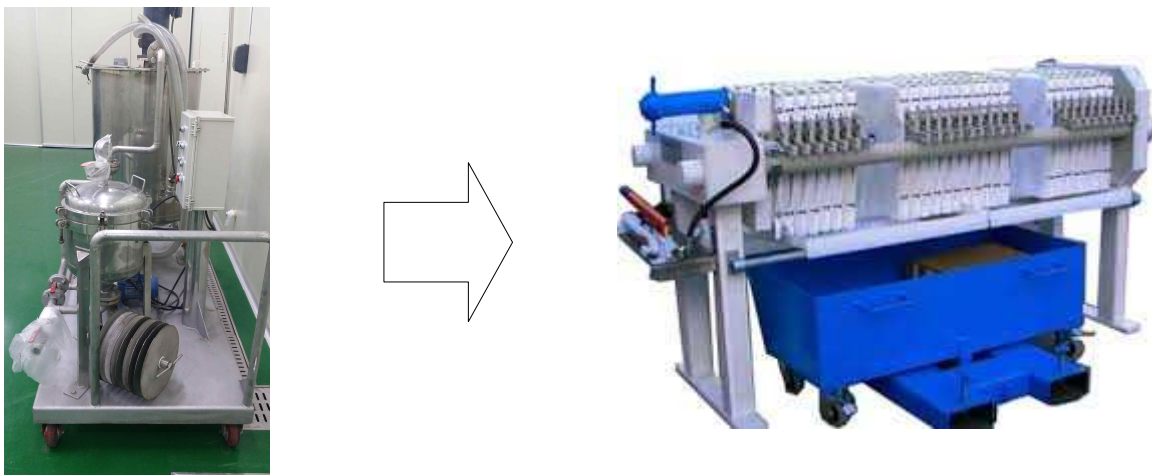


Fig. 3-1-86. 1차 여과 공정 개선 방향.

- 저염화를 위하여 개발된 APH와 혼합하는 공정이 필요함.
- 제안하는 혼합공정에서는 최종품질의 표준화를 위하여 일반 homomixer가 아니라 Fig. 3-1-87과 같은 좀 더 정밀한 장비를 제안함.



Fig. 3-1-87. 혼합공정 장비(Maxx D by Romaco).

- 저염 어간장은 기존 제품과 달리 salt 함량이 약 13~17%로서 미생물학적으로 안전성이 결여된 상태이므로 살균공정은 필수이므로 상업적 살균이 가능한 HTST 또는 UHT 방식을 고려하여 생산규모에 최적화된 다음의 시스템을 제안함.



Fig. 3-1-88. UHT/HTST 겸용 system.

- 기존 공정에서는 open 된 공간에서 주입하고 있으므로 Fig. 3-1-89에서와 같이 저염 어간장이 주입되는 공간만 차단하는 semi-aseptic process를 제안함(간단하게 PC로 차단막을 설치 가능)

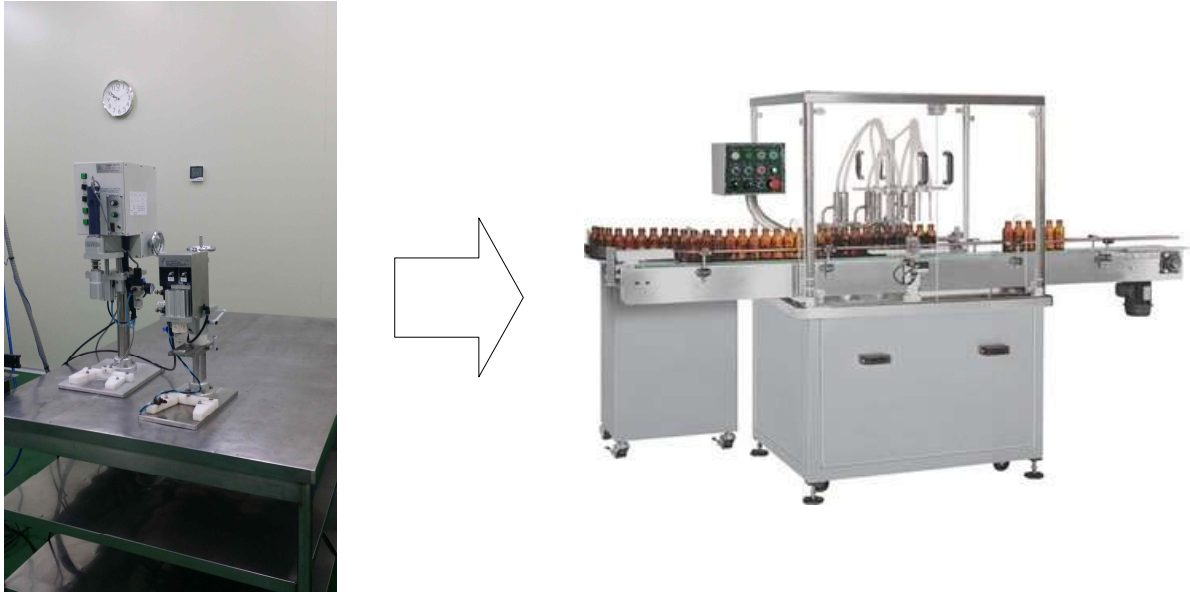


Fig. 3-1-89. 주입 공정 개선 방향.

(나) 개선방향에 따른 생산공정의 개발 및 최적화

- 제안된 개선방향과 새로이 제안한 공정을 포함하여 1일 1 ton의 생산이 가능하도록 최적화된 공정의 개념적 흐름도는 다음과 같다(Fig. 3-1-90 참고).

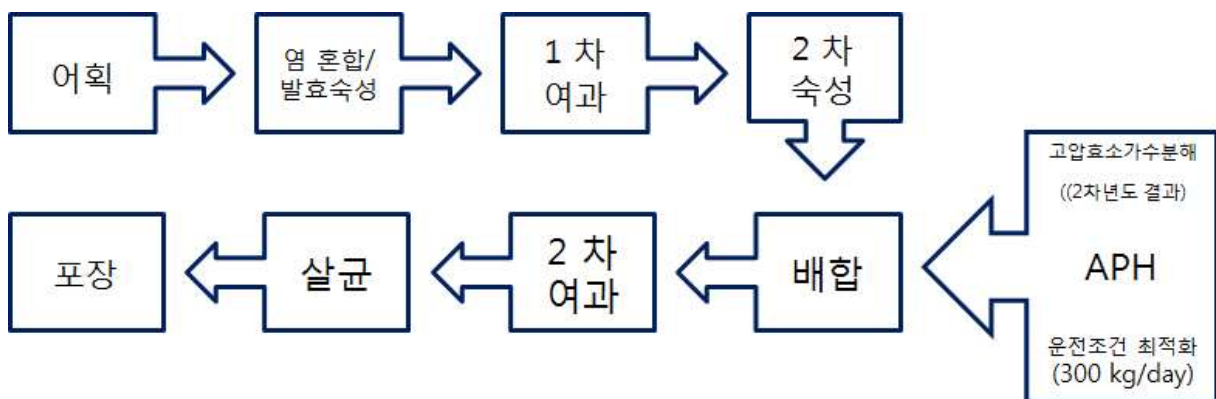


Fig. 3-1-90. 저염 어간장에 대한 개념적 생산 흐름도.

(다) 분말 제조 공정

- 기존의 대영수산의 염도 23% 이상 제품 및 개발된 저염 어간장의 분말 제조공정은 분말화 공정

의 개선에서 제시된 SD 공정의 운전조건으로 (주)S&D(조치원) 또는 진주바이오산업진흥원에서 OEM으로 생산하는 방향을 제시함.

(3) 결론

○ 대영수산의 기존 제조공정에서 개선하여야 할 공정은 혼합, 살균 및 포장 공정으로 혼합 공정은 최종제품 품질의 규격화를 위하여 Fig. 3-1-86과 같은 장비, 살균 공정은 HTST 또는 UHT 공정을 제안하고, 포장 공정은 반 무균조작이 가능하도록 filling과 sealing이 이루어 질 수 있는 공정을 제안함

○ 이에 따라 1일 1 ton 생산에 최적화된 제조공정은 Fig. 3-1-91과 같이 제안함.

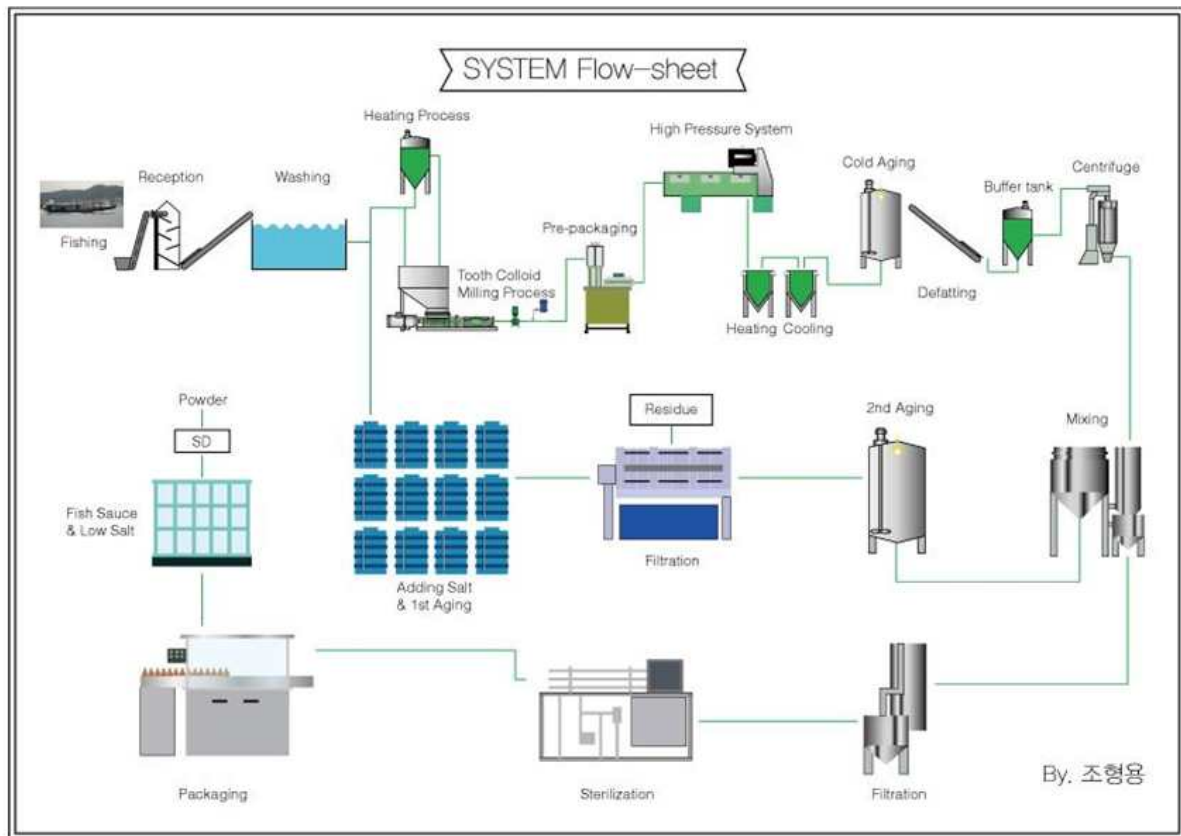


Fig. 3-1-91. 최적화된 저염 어간장 및 분말 제조 공정.

○ 분말 제조는 최적화된 SD 조건(입구 온도(inlet temperature) 140℃, 송풍속도(Aspirator) 0.52 m³/min, 용액주입속도(Pump speed) 322 ml/h, 유량(Q-flow)은 35 mm)으로 진주바이오산업진흥원에서 OEM 생산을 제안

6. 천연소스 또는 드레싱 제조기술 개발

가. 유사제품에 대한 벤치마킹

- 개발된 짠맛증진물질을 활용하여 개발 제품의 유형을 선정 및 나트륨 저감화 목표를 설정하기 위하여 desk research와 시장조사를 실시한 결과,
 - **제품의 제형:** 액상 및 분말 제형을 선정
 - **제품의 종류:** 저염 어간장(본 보고서 제1절 5항 참고), 천연소스 및 복합조미식품
- 소금의 가공적성(functional role)을 조사한 결과, 풍미 증진 및 제품의 미생물학적 안전성을 위해서는 저감화 한계치가 약 16%로 조사 되었다. 따라서 개발제품의 저감화 목표를 다음과 같이 설정하였다.

개발제품의 나트륨 저감 목표

18% < salt(%), 기존 제품 대비 20% 이상 나트륨 저감화

- desk research와 시장조사 및 소금의 가공적성 조사에 대한 자세한 내용은 3차년도 보고서를 참고하기 바란다.

나. Entire Supply Chain Approach를 통한 제품 개선 및 개발 방안 도출

- 시중 판매되고 있는 유사 제품의 재료 및 품질특성 분석을 실시(자세한 결과 및 조사 내용은 3차년도 보고서를 참고)한 결과, 소스류 제품에서의 염분함량은 15~22.3%으로 측정되었다.
- 찌개, 국, 무침, 조림 등의 요리방법과 김치, 라면, 국물요리 등의 나트륨 함량이 높은 식품이 주 식생활에 포함 된 한국인의 경우 특히 나트륨이 저감화 된 천연소스 및 복합조미식품의 개발이 필요하다고 판단되었으며, 제품을 개발하기 위하여 결정된 구체적인 목표치는 Table 3-1-97에, 종합적인 핵심인자는 Table 3-1-98에 나타내었다.

Table 3-1-97. 시제품의 핵심 목표치

항목	목표치
Appearance/flavour (5점 척도) >	4.5
Total nitrogen > %	1.3
Salt ≤ %	18 (20% 이상 reduction)

Table 3-1-98. 제품 개발을 위한 핵심 인자

분 류	핵심 인자	비 고
Sourcing of first ingredients	대영수산의 멸치 선단 활용	수급이 매우 용이함
Source of second ingredients	야채 혼합 base와 당	풍미 증진 및 masking
Manufacturing product feasibility	기존 공정의 개선	혼합공정, Spray Drying
Product design	액상 및 분말	제품 및 소재로 개발
Quality & safety of ingredients	TN(%), Salt(%)	20% 나트륨 저감화 목표
Quality assurance	관능, 미생물학적 안전성, TN(%)	살균 공정의 필요성 대두

다. 탐색된 해결방안을 중심으로 제품제조공정 및 시제품 개발

○ 개발된 핵심 천연원료(APH)를 이용하여 천연소스(소스류 및 복합조미식품) 시제품을 개발하고, 저염화 가능성을 평가하였다.

(1) 제품개발에 사용될 원료(APH powder)의 품질분석 결과

○ 저염 어간장 및 분만 제형을 개발하는 과정에서 제조된 APH powder의 품질특성을 정리하여 Table 3-1-99에 제시하였다.

Table 3-1-99. 제품개발에 사용된 APH 분말원료

사진	항목	분석 값	기타, 관능
	염도(%)	9.12	수용성 복합적 향이 풍부 약간의 쓴맛
	수율(%)	73.62	
	조단백질(%)	74.38	
	수분함량(%)	7.6	
	수분활성도	0.246	
	흡습성(%)	0.15	
	입자크기(μm)	8.65	

○ 분말원료의 관능적 특징으로 약간의 쓴맛을 가지고 있으나 복합적 향미와 맛을 가지고 있으며, 수용성으로 배합제품의 풍미증진 원료로 범용적으로 이용될 수 있을 것이라 판단되었다.

○ 0.3% 이하의 낮은 수분활성도를 나타내므로 원료의 미생물학적 안전성도 확보할 수 있을 것이라 사료되었다.

(2) 소스류 및 복합조미식품 시장조사




○ 시중 제품 분석 내용을 Table 3-1-100 ~ Table 3-1-103에 나타내었다.

Table 3-1-100. 소스류(다시육수)

사진	제품명	제조사	제품유형	원재료	Salt (%)	Brix	pH	관능적특성
	가쓰오맛 사브사브용 육수	MORANBO NG (JP)	소스류	정제수, 발효조미료(고과당콘시럽, 주정, 쌀, 전제염, 구연산), 간장(대두, 밀, 정제염), 정제소금, 설탕, 가다랑어추출물, 미림(쌀, 쌀국, 주정, 포도당), 가다랑어포, 닭고기추출물, 다시마추출물, 효모추출물, 가수분해단백질, 마늘, 향미증진제, (L-글루타민산나트륨, 5'-이노신산이나트륨), 비타민C 구연산, 증점제(구아검, 잔탄검)	12.7	35.5	5.19	가쓰오향
	샘표 만능육수	샘표	소스류	만능육수베이스(우사골추출물[우사골, 우뼈], 천일염, 양파, 양지, 주정, 솔치, 대과, 다시마, 황태, 수염새우, 멸치, 고추씨, 통후추), 발효맛내기(콩발효맛내기액[대두], 밀글루텐, 천일염, 주정, 효모추출물), 대두, 밀, 새우, 쇠고기	19.7	56	5.87	겉 쪽 하 고 진함, 소고기 맛
	가쓰오장국	청정원	소스류	정제수, 양조간장[탈지대두, 소밀], 천일염, 과당, 주정, 가쓰오부시추출농축액, 물엿, 미림(주정, 정백당, 펄쌀, 단백질분해효소, 액화효소), 정제소금, 함수겔정포도당, 다시마엑기스, 백설탕, 멸치농축액, 주정, L-글루타민산나트륨, 간장농축액, 조미맛분말, 혼합제제, 자몽종자추출물	22	55	4.95	가 쓰 오 향 해물향
	베트남식 쌀국수 장국	PENTAX CO.	소스류	간장, 피쉬소스(멸치액, 정제소금, 설탕), 설탕, 히드록시프로필인산이전분, 정제소금, 스타아니스, 고추씨, 시나몬, 마늘, 흑후추, 셀러리, 생강, 정향, 대두유, 구연산, 향미증진제(L-글루타민산나트륨, 5'-이노신산이나트륨, 5'-구아닐산이나트륨), 카라멜색소, 정제수	19	23	4.94	피쉬향, 복합적 향이 풍부
	청정원 해물피쉬소스	청정원	소스류	멸치액젓, 정제수, 정제소금, 주정, 어육단백분해물, 게액기스, 새우액기스, 올리고당, 효모추출물, 다시마추출물, 젖산, 마늘추출물, 대과농축액, 향미증진제	14.7	31	5.12	액젓 향




- 다시용 액상 소스 제품의 경우 salt 함량은 12.7~22%까지 높은 농도대를 형성하고 있었으며 액젓 또는 간장을 베이스로 하여 그 외 어패류 액기스 및 추출물, 향신야채 추출물, 소금, 향미증진제등의 첨가물 등의 매우 여러 종류의 복합적인 재료들이 포함되어 다시용 제품군의 용도로써 배합되고 있는 것을 확인할 수 있었음.
- 다시용 제품의 경우 농축제품으로 소포장 판매되고 있는 점도 분석할 수 있었으며 국물용 다시 제품은 대부분 피쉬소스 또는 액젓, 간장을 베이스로 하여 보유 멸치 소재를 이용할 시에도 비슷한 제품군으로 분류될 수 있을 것으로 생각 됨.



Table 3-1-101. 소스류(Dipping)

사진	제품명	제조사	제품유형	원재료	Salt (%)	Brix	pH	관능적특성
	월남쌈소스	청정원	소스류	정제수, 백설탕, 피쉬액젓(FISH SAUCE)9%(엔초비77%, 정제소금, 설탕/태국산), 포도당, 발효식초(주요, 주정, 효모추출물), 정제소금(국산), 레몬그라스1.4%, 변성전분, 홍고추, 청양고추1.2%, 잔탄검, 고추분0.003%, 올레오레진캡시킴	2.3	51.5	4.08	신맛, 단맛이 강함
	수리 팟타이소스	SURE E INTE RFOO DS CO.	소스류	설탕, 타마린드, 야자설탕, 피쉬소스(멸치액젓, 정제소금, 설탕, 정제수), 정제소금, 초산, 정제수	5.2	87	3.87	피쉬향이 강함
	소भाग케 소바쓰유	HIGE TA SHOY U CO.	소스류	간장, 설탕, 미림(쌀, 쌀누룩, 주정, 소주), 건조물지다래포, 건조가다랑어포, 건조가다랑어포분말, 양조식초(쌀, 정제소금, 정제수), 가수분해단백질(소맥발효조미료, 효모추출물, 텍스트린), 정제수	1.1	17.5	5.16	감칠맛, 다시마맛

- Dipping 제품의 경우 희석하여 먹지 않고 원재료로써 설탕 및 향신재료 등이 더 높은 함량으로 추가되어 있는 바와 같이 salt 함량은 1.1~5.2% 로 측정되었고 설탕의 함량이 약 12%~48%로 매우 높았으며 제품의 특성에 따라 고추, 칠리를 포함하여 매운맛을 강조하거나 식초, 초산이 첨가되어 시큼한 맛을 부각시켜 dipping용 소스 용도에 맞게 배합된 것을 확인할 수 있었음, 물성조절을 하기 위하여 변성전분 및 잔탄검을 첨가하기도 하였음.

Table 3-1-102. 복합조미식품

사진	제품명	제조사	제품유형	원재료	Na (mg/100 g)	Salt (%)	관능적특징
	맛선생해물	청정원	복합조미식품	정제수, 발효조미료(고과당콘시럽, 주정, 쌀, 건제염, 구연산), 간장(대두, 밀, 정제염), 정제소금, 설탕, 가다랑어추출물, 미림(쌀, 쌀국, 주정, 포도당), 가다랑어포, 닭고기추출물, 다시마추출물, 효모추출물, 가수분해단백질, 마늘, 향미증진제, (L-글루타민산나트륨, 5'-이노신산이나트륨), 비타민C 구연산, 증점제(구아검, 잔탄검)	5537.75	35.10	해물향 풍부
	혼다시	아지모노도주식회사	복합조미식품	정제소금, L-글루타민산나트륨(향미증진제), 유당(우유), 설탕, 가쓰오부시분말, 5'-이노신산이나트륨, 가쓰오추출물, 효모추출물, 호박산나트륨	17760.12	45.12	짠맛이 강함
	나물&엔 매콤한맛	청정원	복합조미식품	매콤고추양념(고춧가루, 동결건조생강고추분말, 멸치액젓분말, 마늘분말), 백설탕, 천일염, 볶음참깨, 고춧가루, L-글루타민산나트륨(향미증진제), 숙성마늘맛분, 향신양념, 건마늘조각, 생강가루, 건과분	5537.75	14.16	매콤한 특징

	원물산들애 멸치	CJ	복합조미 식품	멸치가루 32%(멸치:국산), 천일염(국산), 마늘가루, 새우가루, 표고버섯가루, 쌀가루, 양파가루, 무가루, 다시마가루, 양배추가루, 대파가루 *특정성분함량: 멸치 45%(건물기준)	13035.99	33.12	멸 치 향 이 강함
	맛선생오색 자연	청정원	복합조미 식품	맛선생오색자연분말, 정제소금, 마늘품미유, 오색자연분말(양배추, 흑마늘, 느타리버섯, 브로콜리, 단호박, 표고버섯), 진한야채액, 가루엿, 알파쌀가루, 마늘분 효모분말, 양파분, 흑마늘 농축액, 효모농축액	8057	20.47	깔끔한 다 시맛

- 분말 조미료의 경우 salt 함량 편차가 심했는데 14.16~45.12%까지 범위가 매우 넓게 관찰되었으며 제품의 컨셉 및 조리용도, 배합비에 따라 각 제품마다 salt 배합비가 다를 수 있었음.
- 또한, 각 제품마다 멸치, 소고기, 가쓰오, 야채 등의 특징적인 맛을 부각시켜 조리용도에 맞게 개발되어 있음을 알 수 있었음.
- 분말 또는 액상을 혼합하여 과립형태로 다시 가공한 제품들이 대부분이었으나 최근 원물그대로를 같이 혼합한 천연제품이 출시되고 있었음.

Table 3-1-103. 시중 제품에 포함된 첨가물의 역할

첨가물	역 할
L-글루탐산나트륨	감칠맛
5'-이노신산이나트륨	감칠맛(MSG와 병용시 상승작용)
가쓰오부시분말,가쓰오추출물	제품특유의 향미
호박산나트륨	정미료(풍미개량제)로 사용한다. 복합조미료, 조미액 등에 0.01~0.05% 첨가한다. 특유의 조개맛이 난다.
효모추출물	액체, 분말, 과립 또는 페이스트 상 물질의 천연첨가물로 양조, 베이커리 제품, 환자식, 수산 연제품의 향미증강제로 사용한다.
건마늘조각, 건파	식감 증진
생강가루	비린 맛이 제거되고 생강 특유의 독특한 향이 난다
가루엿	물에 녹기 쉽고, 빙점이 높기 때문에 제조능률이 높고, 품질향상에도 효과적임.
붉은대게농축분말, 홍합가루	해물맛
가수분해단백질	물을 첨가했을 때 분해가 되도록 가수분해단백질을 사용함.
구연산	산패방지제(synergist)
구아검,잔탄검	식품의 점착성 및 점도를 증가시키고 유화안정성을 증진하며 식품의 물성 및 촉감 향상

주정	단백질을 응고시키는 성질을 가지고 있으므로 살균작용이 있다. 잡내를 없앴.
술치,다시마,황태,수염새우,멸치	감칠맛, 해물맛
과당	당류 중에서 인체에서 가장 빨리 흡수·소화되며 당류 중에서 감미가 가장 강하다.
함수결정포도당	당화액을 정제, 농축한 후 교반하면서 서서히 냉각하여 30℃ 부근에서 결정시킨 것으로서, 9.1~9.5%의 수분함량을 가진다. 물에 녹기 쉽지만 그 용해도는 설탕에 비해 상당히 낮으며, 감미는 청량감을 띄는 독특한 풍미를 갖고 있다.
자몽종자추출물	독특한 추출공정(Dr. Harich 추출방법)으로 합성된 것으로, 비독성의 광범위한 항균화합물로 이용된다.
히드록시프로필인산이전분	식품의 점착성 및 점도를 증가시키고 유효안정성을 증진하며 식품의 물성 및 촉감을 향상시키기 위한 식품첨가물이다. 주로 식품에 증점제로 사용된다
스타아니스	아네톨(Anetol)에 의한 달콤한 향미가 강하나 약간의 쓴맛과 뽕은맛도 느껴진다.
정향	향신료로 쓰이는 식재료이다. 자극적이지만 상쾌하고 달콤한 향이 특징이다.
젖산	신맛이 나고 식용으로는 과일엑스·시럽·청량음료의 산미제(酸味劑)로 이용되며 주류(酒類)의 발효 초기에 가해서 부패균의 번식을 방지하는 데도 사용된다
새우페이스트	독특한 향
라임분말	각종 비타민과 구연산이 풍부, 독특한 향을 가짐
히드록시프로필인산이전분	식품의 점착성 및 점도를 증가시키고 유효안정성을 증진하며 식품의 물성 및 촉감을 향상시키기 위한 식품첨가물이다. 주로 식품에 증점제로 사용된다.
건조물치다래포, 건조가다랑어포	요리에 감칠맛을 내는 중요한 역할을 한다.
5'-리보뉴클레오티드이나트륨	정미료의 일종으로 핵산계 조미료이다. 100℃에서 30분 가열하여도 분해되지 않을 정도로 안정하다. 이노신산나트륨보다 2배의 감칠맛을 가지고 있으나 구아닐산나트륨보다도 정미력이 약하다. MSG와 병용하여 사용할 때에는 MSG의 1/10-1/100 정도 첨가한다.
인산이전분	고온, 고압, 고속 교반에서 호화에도 뛰어난 점도안정성을 보이고, pH나 설탕 같은 가용성 첨가물에 대하여도 높은 안정성을 나타내기 때문에 식품의 증점제로서 널리 이용되고 있다
카라멜색소	갈색을 띄게 하기 위해 사용
구연산	산패방지제(synergist)
옥수수전분	감자전분으로 소스를 만들 경우, 보통 색이 짙고 탁한 색을 내게 하는데 반해, 옥수수 전분은, 가열하면 할수록, 맑고 투명한 빛을 내기 때문에, 중국 요리에 사용되는 소스에서, 많이 사용한다고 한다.(식감을 자극)

아스파탐	감미도는 설탕의 200배 정도
무수아황산	식품가공과정에서 일반색소와 발색성 물질을 무색의 화합물로 변화시키고 식품의 보존 중 일어나는 갈변, 착색 등의 변화를 억제
고추추출물	산화방지제
타마린드	음식에 맛 좋은 새콤한 향미

- 다양한 합성 첨가물이 시중제품의 원재료에 포함되어 있으며 풍미증진 및 부가적인 품질조절을 위하여 첨가되고 있음을 확인함.
 - 보존제 외에 식품의 물성, 특징적인 풍미의 증진을 위하여 효모 추출물, 해물/야채 농축액, 분말, 합성 첨가물이 다양하게 이용되고 있었음.
- 이전 및 현 단계에서 조사 및 측정되었던 내용을 소스류 및 복합조미식품으로 국한하여 요약하면,
- 소스 및 복합조미식품류에서 소금은 맛 및 풍미증진을 위한 재료로 이용되고 있음.
 - 시중제품들의 salt 함량 분석결과 넓은 범위로 각 제품군별 편차가 매우 크게 확인되었고 저염·저나트륨 범용제품은 많지 않은 것으로 확인됨.
 - 현재 시장 트렌드인 웰빙의 컨셉에 맞추어 저염 제품으로써 소스 및 조미료에서의 소금의 주요기능인 맛과 풍미를 증진시킬 수 있는 저염 소스 및 조미료의 개발로 시장진입이 가능한 제품을 개발할 수 있으리라 판단함.
 - 본 연구진이 개발한 APH powder를 일반 소스 및 복합조미식품의 풍미증진소재를 대체할 수 있을 것이라 판단됨.

(3) 저염 소스류

(가) APH를 이용한 basic formulation 제조(general seasoning base)

- 맛 전문가 및 관련업계 연구원과 원료의 맛 및 풍미 평가 ⇒ 적용방안 제시 및 적용 모체 소스군 선정 ⇒ 배합 solution 완성
- Formulation에 사용한 재료는 경기도 성남시 인근 대형마트에서 구입하였으며 기타 첨가물은 ES식품원료(www.esfood.kr, Seoul, Korea)에서 구입하였다.
- 소스의 제조 방법은 설탕, 소금, APH 외 분말 재료들을 각 함량 비(%)로 계량하고 액상 식물성 우지, 빙초산, 액상포도당(85 brix°)를 계량하여 각각 1차 혼합한 후, 각각의 혼합액을 섞어 물을 함량 비(%)로 첨가하여 혼합하였고 소스팬(Neoflam, Philos, Seoul, Korea)에 넣어 중심온도가 85℃가 될 때까지 교반하였으며 재료의 배합비는 Table 3-1-104 와 같다.

Table 3-1-104. APH General sauce 배합비

Ingredients (g)	Quantity(%)
Sugar Castor	40.000
Salt	3.000
Monosodium Glutamate	1.500
Black pepper powder	0.250
Onion powder	1.500
변성전분	1.700
잔탄검	0.010
APH	1.500
식물성 유지	1.400
빙초산	0.100
액상포도당(85 Brix)	8.500
정제수	40.540
Toral	100.000

(나) APH의 나트륨 대체 효과 평가

- APH의 general sauce를 아래 Table.3-1-105과 Table 3-1-106과 같이 salt 함량을 대체할 수 있는지에 대하여 2가지 방법으로 평가하였다.
 - APH를 general sauce salt %를 3.135%로 동일하게 맞추어 APH를 첨가함.
 - APH general sauce의 salt % 단계적(10~100%)으로 저감하여 배합함.

Table 3-1-105. APH의 salt % 대체에 따른 배합비

APH General sauce Ingredients (g)	Quantity(%)					
	C	v1	v2	v3	v4	v5
Sugar Castor	40.000	40.000	40.000	40.000	40.000	40.000
Salt	3.000	2.685	2.910	3.090	3.045	3.135
Monosodium Glutamate	1.500	1.500	1.500	1.500	1.500	1.500
Blackpepper	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250
Onion powder	1.500	1.500	1.500	1.500	1.500	1.500
변성전분	1.700	1.700	1.700	1.700	1.700	1.700
잔탄검	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
APH	1.500	5.000	2.500	1.000	0.500	0.000
식물성 유지	1.400	1.400	1.400	1.400	1.400	1.400
빙초산	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100
액상포도당(85Brix)	8.500	8.500	8.500	8.500	8.500	8.500
정제수	40.350	40.350	40.350	40.350	40.350	40.350
Na	1.18	1.14	1.05	1.19	1.21	1.23

Table 3-1-106. Salt 함량(%) 저감에 따른 배합비

APH General sauce	Quantity(%)				
	C	V1	V2	V3	V4
Ingredients (g)					
Sugar Castor	40.000	40.000	40.000	40.000	40.000
Salt	3.000	2.700	2.100	1.000	0.000
Monosodium Glutamate	1.500	1.500	1.500	1.500	1.500
Blackpepper	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250
Onion powder	1.500	1.500	1.500	1.500	1.500
변성전분	1.700	1.700	1.700	1.700	1.700
잔탄검	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
APH	1.500	1.500	1.500	1.500	1.500
식물성 유지	1.400	1.400	1.400	1.400	1.400
빙초산	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100
액상포도당 (85Brix°)	8.500	8.500	8.500	8.500	8.500
정제수	40.350	40.350	40.350	40.350	40.350
Na	1.18	1.06	0.82	0.39	-

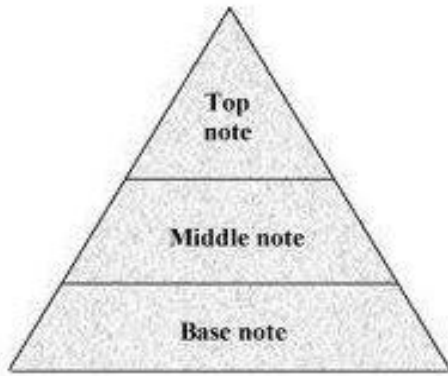
- Salt % 함량 측정 및 관능평가는 앞서 제시한 방법과 동일하게 실시하였다.
- 전체적 기호도, 맛, 향에 대한 관능적 특성을 스펙트럼 묘사분석 방법으로 표현하였다.

(다) 실험결과 및 고찰

① APH를 이용한 base formulation 확립(general sauce base)

- 맛 전문가 및 관련업계 연구원의 APH의 적용방안으로 풍미가 매우 풍부하다는 의견을 공통적으로 수집하였다.
- 일반적으로 식품의 풍부한 맛(body)를 감지하게 할 수 있는 middle note 역할을 할 수 있는 원료로 다목적으로 이용할 수 있을 것이라는 의견을 토대로 베트남 스킨라차(Sriracha) 소스의 구성원료를 모체로 하여 middle note 역할을 한다고 알려진 원료성분 yeast extract %범위(0.3~3%)를 참고로 하여 예비실험을 실시하였다.
- 예비실험에서 APH를 0.5, 1.5, 3% 비율로 각각 첨가하여 맛을 보았으며 1.5% 첨가 시 가장 높은 풍미 및 맛의 균형을 나타내어 **함량 비를 1.5%**로 확정하였다.
- 범용적으로 이용되고 있는 소스류의 분말 base, 액상 base의 감칠맛, 구수한맛을 내어 middle note 역할 담당을 하는 yeast extract, bonito extract, beef extract를 APH로 대체하여 기본 base를 확립하였다.

- Yeast extract를 APH로 대체 시 salt%에는 큰 변화를 관찰되지 않았으나 복합적인 풍미가 풍부하게 느껴져 기존의 yeast 취 등의 냄새(이취)를 masking 하는 역할을 하는 것을 알 수 있었으며, 맛을 상승시킨다는 평가를 받았다.



THE FLAVOR PYRAMID

Fig. 3-1-92. The flavor pyramid.

(출처) 2013. Quara. Oliver Jader Contreras, Food Technologist.



Fig. 3-1-93. Flavour.

(출처) Food lorists. Sauces: Flavour

- (소스에서의 맛의 피라미드-Fig. 3-1-92 및 Fig. 3-1-93 참고) 맛은 2가지 감각의 결합으로써 맛과 냄새의 결합으로 혀에서 감지되는 5가지 기본적인 감각(소금기가 있음, 시큼함, savouriness, 단맛, 그리고 쓴맛)이 수용성인 화학물질에 의하여 일어나고, 소금의 침전이 생기고, 설탕이 되고, 시어짐(산, savoury 아미노산), 그리고 쓴맛(알칼로이드)이 혀에서 감지된다.
- 냄새는 높은 코 부위에서 감지되며 수천의 다른 향기로부터 발생(음식들로부터 설명됨) 된다고 함. 따라서 소스의 배합 시 2가지 감각이 다 만족되어야 하며 복잡한 성분들과 savoury 아미노산들의 반응을 통하여 풍부한 다른 맛들이 생성될 수 있다(조리에 적용 시 반응물이 생성됨).
- 소스에서의 각 구성원료들의 균형과 targeting하고자 맛과 향(top note)의 선택을 통하여 종합적인 배합이 완성될 수 있을 것이다. ⇒ (APH의 첨가로 인한 풍미증진 효과 기대)

② APH의 나트륨 대체 효과 평가

- 액상제품의 경우 대조군에 비교하여 APH waitout 실험군에 비하여 salt%를 약 10% 낮추고 APH로 대체한 실험군에서 짠맛을 더 느끼는 것으로 나타났다. (Fig. 3-1-94., salt %는 3.135%로 동일)

- 또한, Salt가 전혀 들어가지 않은 salt without 실험군은 전체적 기호도 및 맛의 기호도가 가장 낮은 수준으로 평가되었으나 기본 베이스로부터 salt 함량을 30% 줄인 실험군까지 소금이 감소되어도 전체적으로 맛의 차이 및 전반적기호도에 차이가 나지 않음이 관찰되었다.(Fig. 3-1-95.)

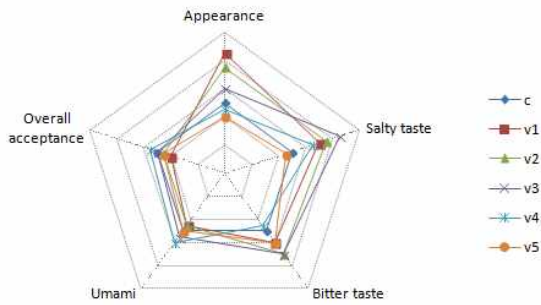


Fig. 3-1-94. APH의 salt % 대체에 따른 관능평가결과

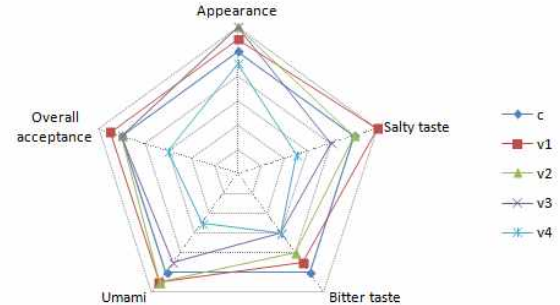


Fig. 3-1-95. Salt 함량(%) 저감에 따른 관능평가결과

(4) 복합조미식품

(가) APH를 이용한 base formulation 제조(general sauce base)

- 맛 전문가 및 관련업계 연구원과 원료의 맛 및 풍미 평가 ⇒ 적용방안 제시 및 적용 모체 조미식품군 선정 ⇒ 범용으로 적용가능 한 배합 solution 제안
- Formulation에 사용한 재료는 경기도 성남시 인근 대형마트에서 구입하였으며 기타 첨가물은 ES식품원료(www.esfood.kr)에서 구입하였다.
- 각 원료를 배합 %로 혼합 후 mesh(AB0240-6, brandnew, Hongkong, China)를 이용하여 aerating하여 균질하게 하였다.

(나) APH의 나트륨 대체 효과 평가

- APH의 general sauce를 아래 Table.3-1-107와 Table.3-1-108과 같이 salt의 함량을 대체할 수 있는지에 대하여 2가지 방법으로 평가하였다.
 - APH를 general sauce salt 농도를 4.5%로 동일하게 맞추어 APH를 첨가
 - APH general sauce의 salt % 단계적(10~30%)으로 저감하여 배합
- Salt % 함량 측정 및 관능평가는 앞서 제시한 방법과 동일하게 실시하였다.
- 전체적 기호도, 맛, 향에 대한 관능적 특성을 스펙트럼 묘사분석 방법으로 표현하였다.

Table 3-1-107. APH의 salt % 대체에 따른 배합비

APH Base powder Ingredients (g)	Quantity(%)				
	C	V1	V2	V3	V4
Salt	4.000	3.600	3.825	4.275	4.500
Sugar Castor	8.000	8.000	8.000	8.000	8.000
Monosodium Glutamate	5.000	5.000	5.000	5.000	5.000
Disodium Siccinate	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200
Citric acid	0.300	0.300	0.300	0.300	0.300
Soy Sauce Powder SSP 720	64.00	64.00	64.00	64.00	64.00
APH	5.500	10.000	7.500	2.500	0.000
Na	1.57	1.41	1.50	1.68	1.77

Table 3-1-108. Salt 함량(%) 저감에 따른 배합비

APH Base powder Ingredients (g)	Quantity(%)			
	C	V1	V2	V3
Salt	4.000	3.600	3.200	2.800
Sugar Castor	8.000	8.000	8.000	8.000
Monosodium Glutamate	5.000	5.000	5.000	5.000
Disodium Siccinate	0.200	0.200	0.200	0.200
Citric acid	0.300	0.300	0.300	0.300
Soy Sauce Powder SSP 720	64.000	64.000	64.000	64.000
APH	5.500	5.500	5.500	5.500
Na	1.57	1.41	1.25	1.10

(다) 실험결과 및 고찰

① APH를 이용한 basic formulation 제조

Table 3-1-109. APH base powder 배합비

APH Base powder	
Ingredients (g)	
Salt	4.000
Sugar Castor	8.000
Monosodium Glutamate	5.000
Disodium Siccinate	0.200
Citric acid	0.300
Soy Sauce Powder SSP 720	64.000
APH	5.500



Fig. 3-1-96. APH base powder 외관(A) 및 시중제품의 외관(B~H).

- 앞서 APH분말을 정제수에 10% 녹여 평가하였을 경우 APH 특유의 쓴맛강도가 높음을 관능평가를 통하여 확인하였고,
- 예비실험을 통하여 APH를 2.0, 5.5, 10% 각각 첨가하여 맛을 보았으며 5.5% 첨가 시 10% 첨가군과 비교하여 고미가 느껴지지 않고 2.0% 첨가군에 비하여 높은 풍미 및 다른 원료와 맛의 균형을 나타내어 함량 비를 5.5%로 확정하였다.
- 범용적으로 이용되고 있는 소스류의 분말 base, 액상 base의 감칠맛, 구수한맛을 내어 middle note 역할 담당을 하게 하는 yeast extract, bonito extract, beef extract를 APH로 대체하여 기본 base를 확립하였다.

② APH의 나트륨 대체 효과 평가

- 분말제품의 경우, Na의 함량을 APH waitout 실험군에 비하여 약 15% 저감하고 APH로 대체하여 배합한 실험군에서 짠맛 및 전체적 기호도가 상승됨이 확인되었다.(Fig. 3-1-97. salt %는 4.5%로 동일)
- Salt %함량을 단계적으로 줄여 배합하여 평가한 경우 기본 베이스로부터 salt 함량을 10% 줄인 실험군에서 더 짠맛이 느껴짐이 관찰되었으며 20%까지 소금이 감소되어도 전체적으로 맛의 차이 및 전반적기호도에 차이가 나지 않음이 관찰되었다.(Fig. 3-1-98.)

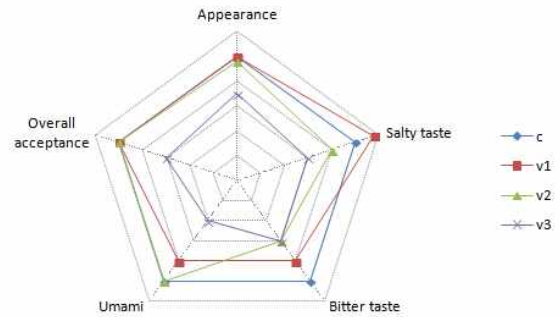
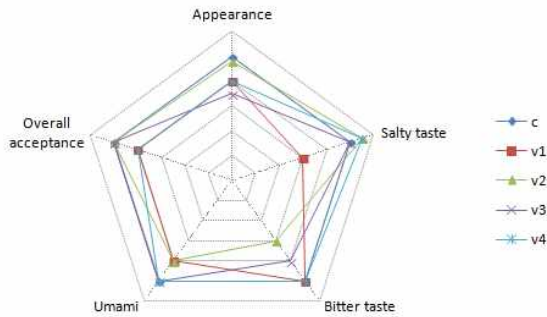


Fig. 3-1-97. APH의 salt % 대체에 따른 관능평가결과

Fig. 3-1-98. Salt 함량(%) 저감에 따른 관능평가결과

(라) 결론

- 풍미소재 전문 식품회사 연구원 및 본교 관능평가 대상 인원들의 의견들을 토대로 하여 APH의 풍미를 이용한 제품적용 활용방안으로
 - Flavour enhancer
 - 나트륨 저감제품에 이용
 - Odour masking의 역할로써 효과성이 있을 것이라 판단되었다.
- 액상제형배합의 경우 대조군 대비 Na의 함량을 약 30% 감소할 수 있었고, 분말제형 배합의 경우 약 15-20% 감소할 수 있어, 나트륨 저감화 목표를 달성하지는 못했지만 다목적으로 사용가능한 범용성 소스 및 조미료의 원료로 적용시킬 수 있을 것이라고 판단하였다.

(5) 새로운 소스 및 복합조미식품 개발

(가) 실험방법

- 앞서 제조한 범용성 액상, 분말 base formulation 2종을 보완하여 타겟하고자 하는 한식 조리방법 및 맛내기에 적합하도록 천연첨가물을 배합하여 새로운 소스 및 복합조미식품 시제품을 개발하였다.
- 제품의 품질로서 salt % 및 관능평가를 실시하여 제품의 적합성을 평가하였다.
- 제품의 분석은 전 part에 수행한 방법과 동일하게 실시하였다.

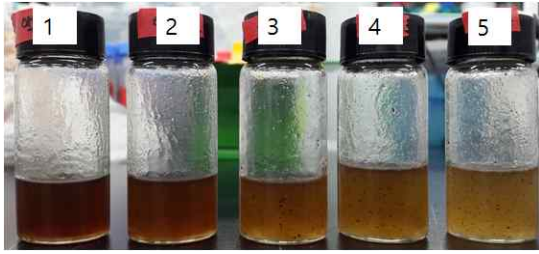


Fig. 3-1-99. APH general sauce 농도별 외관(색).

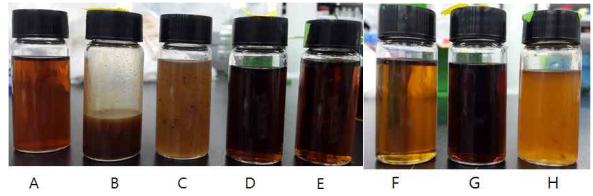



Fig. 3-1-100. 시중 target 제품(A~E: 다시용, F~H; Dipping).

(나) 실험결과 및 고찰

① 소스류 prototype 배합비 및 품질분석


Table 3-1-110. APH General sauce 를 이용한 소스 배합비

구분(소스류)	APH General sauce variation1 (범용, 다시육수)		APH General sauce variation2 (Dipping)	
	구분	함량(%)	구분	함량(%)
배합비	Sugar Castor	20.0	Sugar Castor	40.0
	Salt	3.0	Salt	3.0
	Monosodium Glutamate	1.5	Monosodium Glutamate	1.5
	Onion	1.5	Onion	1.0
	Garlic	0.5	Garlic	0.5
	Mushroom	1.0	Black pepper	0.25
	변성전분	1.7	월남건고추	0.5
	잔탄검	0.01	캡시컴	0.5
	APH	1.5	변성전분	1.7
	정제수		잔탄검	0.01
		APH	1.5	
		정제수		
Salt (%)	1.0		0.6	
pH	5.17		4.86	
Brix°	33		52	
관능평가	깔끔한 맛, 비린맛이 없음, 육수에 적합 전반적 기호도: 3.8/5		짜지않고 적당히 달고 시큼한 맛 전반적 기호도: 3.6/5	
조리방법	 1~2% 물에 희석하여 육수로 사용		월남쌈 등의 dipping 소스에 적용	

- 앞서 설립한 범용성 APH general sauce를 이용하여 target 제품형태에 맞는 소스류 다시용 prototype1과 dipping용 prototype 2를 배합하였다. **다시육수용 액상타입의 경우** APH general sauce로부터 설탕함량을 50% 감소시키고 양파분말, 마늘분말, 버섯분말을 첨가하여 향미증진을 더하여 APH의 풍미와 균형을 맞추었다. 기존의 제품군들 보다 깔끔한 맛으로 한식 찌개 또는 국물에 이용될 수 있는 다시육수 타입으로 좋을 것 같다는 의견을 보였다.
- **액상 dipping 타입의 경우** APH general sauce에 칠리의 매운맛 원료를 첨가하여 현재 동남 쌀국수 등의 칠리 dipping 소스와 비슷한 유형으로 응용 될 수 있는 매운맛 소스를 배합하였다. 기존의 제품군들 보다 단맛이 줄고 짜지 않은 점이 좋다는 의견을 보였다.
- 품질평가 결과, **국물용 다시소스** salt 함량 1.0%, pH 5.17, Brix° 33 으로 분석되어 시중 제품대비 **약 90% 감소**되어진 배합시제품을 개발하였고, **Dipping용 소스** salt 함량 0.6%, pH 4.86, brix° 52으로 시중제품대비 **약 80% 감소**되어진 배합시제품을 개발함

② 복합조미식품 prototype 배합비 및 품질분석

Table 3-1-111. APH Base powder 를 이용한 소스 배합비

구분 (복합조미식품)	APH Base powder variation1 (범용, 다시육수)		APH Base powder variation2 (무침, 볶음)	
	구분	함량(%)	구분	함량(%)
배합비	APH Base powder	94.5	APH Base powder	92
	Onion	3	Onion	2.5
	Garlic	2	Garlic	2.5
	Black pepper	0.5	Black pepper	0.2
			캡시킴	2.0
			월남건고추	0.5
			볶음참깨	0.3
Salt (%)	20.2		13.2	
수분활성도(Aw)	0.341		0.359	
수분함량 (%)	7.791±1.000		7.994±0.107	
관능평가 및 특징	은은한 멸치향, 국물 base에 적합할 것 전반적 기호도: 3.9		매콤하고 깔끔한 맛 전반적 기호도: 3.8/5	
조리방법	 1~2% 물에 희석하여 육수로 사용		나물무침 또는 볶음요리 조미에 사용	

- 앞서 설립한 범용성 APH base powder를 이용하여 천연첨가물 및 맛 보강을 위한 첨가물을 추가하여 target 제품군에 맞는 다시육수용 prototype 1과 무침, 볶음 조미용 prototype 2를 배합하였다. 배합 결과, 다시용 salt 함량은 20.2%, 수분활성도 0.341, 수분함량 7.791%를 나타내었다.
- 관능평가 결과 시중제품대비 감칠맛이 풍부하고 은은한 멸치향으로 국물요리에 다목적으로 이용될 수 있을 것이라고 평가되었으며 쓴맛이 나타나지 않았다. 무침용 salt 함량은 13.2%, 수분활성도 0.359, 수분함량 7.994%로 분석되었다. 매운맛과 잘 조화되어 라면스프로도 이용될 수 있을 것이라는 평가를 받았다.
- 또한 두 type 모두 수분함량 8.0%이하로 식품공전 상 복합조미식품 품질규격에 적합하였다.



Fig. 3-1-101. 복합조미식품 prototype(다시, 무침) 2종.



Fig. 3-1-102. 소스류 prototype(다시, dipping) 2종.

라. 결론

- 기존의 소스 및 조미료의 첨가물로 이용되는 bonito extract, beef extract의 대체할 수 있는 더 풍부한 풍미를 가지고 있음이 확인 되었다.
- APH를 이용하여 제품 제조 시 액상제품의 경우 90% salt 함량이 저감됨을 확인하였음, 분말제품의 경우 기존제품들 대비 비슷한 수준(20.2%)의 salt 함량으로 풍미가 증진된 조미료로 이용될 수 있음을 확인하였다.
- APH를 이용하여 저염 및 풍미가 증진된 소스류 및 복합조미식품으로써의 적용이 기대됨.

7. 저염 젓갈 제조 기술 개발

가. 유사제품에 대한 벤치마킹

- 유사 제품에 대한 문헌조사 및 desk research를 통하여, 저염 젓갈의 유형과 원료 탐색하고 제품 내 소금의 일반적 가공적성(functional role)을 조사하여 나트륨 저감화 목표를 설정하고자 하였다.

(1) 젓갈의 정의

- 젓갈은 어패류에 부패를 방지하기 위해 고농도의 식염을 가하여 저장한 것을 말하며, 주로 원료 자체 내에서 일어나는 효소작용으로 육질이 자가 소화되어 독특한 풍미를 지니며 우리나라에서 전통적으로 식용해 온 발효식품류이다.
- 식품공전상 “**젓갈류**라 함은 어류, 갑각류, 연체동물류, 극피동물류 등의 전체 또는 일부분을 주원료로 하여 이에 식염을 가하여 발효 숙성한 것 또는 이를 분리한 여액에 다른 식품 또는 식품첨가물을 가하여 가공한 **젓갈, 양념젓갈, 액젓, 조미액젓, 식해류**”를 말한다. 식품공전상의 식품유형으로 아래와 같이 구분하고 있다.
 - **젓갈**: 어류, 갑각류, 연체류, 극피류 등의 전체 또는 일부분을 주원료(생물로 기준할 때 60% 이상 이어야 한다)로 하여 식염을 가하여 발효, 숙성시킨 것을 말함.
 - **양념젓갈**: 젓갈에 고춧가루, 조미료 등 양념을 첨가한 것을 말함.
 - **액젓**: 젓갈을 여과하거나 분리한 액 또는 이에 젓갈을 여과하거나 분리하고 남은 것을 재 발효 또는 숙성시킨 후 여과하거나 분리한 액을 혼합한 것을 말함.
 - **조미액젓**: 액젓에 염수 또는 조미료 등을 첨가한 것을 말함.
 - **식해류**: 어류, 갑각류, 연체류, 극피류 등의 전체 또는 일부분을 주원료(생물로 기준할 때 60% 이상)로 하여 이에 식염 및 곡류 등을 가하여 발효·숙성 시킨 것을 말함.
- 양념 젓갈류의 품질규격은 아래 Table 3-1-112과 같다.

Table 3-1-112. 양념 젓갈의 품질 기준(KS H 6021, 2014)

항목	기준						
	명란 젓갈	창란 젓갈	오징어 젓갈	기준 대구 아가미 젓갈	조개 젓갈	어리굴 젓갈	기타 양념젓갈
성상	- 선택과 향미가 양호하고 이미, 이취 및 이물이 없어야 하며 이종의 혼입이 거의 없어야 한다. - 양념의 배합 상태가 양호하여야 한다.						
수분 (%)	63.0 이하	72.0 이하	70.0 이하	75.0 이하	73.0 이하	70.0 이하	75.0 이하
식염 (%)	8.0 이하	8.0 이하	8.0 이하	8.0 이하	8.0 이하	7.0 이하	8.0 이하
총질소 (%)	2.80 이상	1.30 이상	1.70 이상	1.40 이상	1.30 이상	1.20 이상	1.20 이상

* 표 . 이외의 요구사항은 [식품위생법]에 적합하여야 함.

(2) 젓갈의 일반적 제조방법

- 원료에 소금 및 부재료를 고루 혼합하여 밀봉한 후 일정기간 발효, 숙성시킴으로서 원료 육질에 부분적 가수분해에 의한 독특한 향미성분의 생성 및 조직감의 변화로 식미 기호성을 증가시키는 제품으로 젓갈은 염장에 의한 이상발효 및 부패의 억제, 숙성발효에 의한 육성분의 분해, 조미숙성에 의한 풍미기호성의 부여 등으로 제조 원리를 요약할 수 있다.
- 우리나라 젓갈의 제조기술은 전통적으로 식염만을 사용, 2~3개월 상온 발효시켜서 어체 원형이 그대로 유지되도록 하고 있다. 일반적인 제조공정도는 Fig. 3-1-103와 같다.

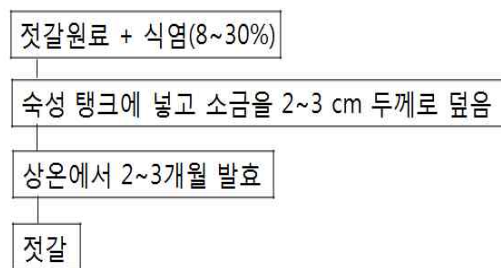


Fig. 3-1-103. 일반적인 재래식 젓갈 제조 공정도(수산물 가공기술편람).

(3) 젓갈에서 소금의 역할(functional role)

- 고식염을 첨가하여 자가소화효소 또는 미생물의 효소작용에 의해 분해된 육질에 의해 독특한 감칠맛과 특유의 향미가 나게 하며, 첨가된 식염에 의해 부패균의 번식이 억제되고 일정기간 발효 및 숙성을 시켜 원료 육질의 부분적 가수분해에 의해 조직감의 변화와 특유의 향미성분을 생성하여 식미 기호성을 증가시킨다고 보고되어 있다(Lee KG, 2012).
- 따라서 젓갈에서 소금의 역할은 **풍미증진 및 미생물학적 안전성 확보**라고 볼 수 있다.

(4) 저염 젓갈

- 최근 소득 수준의 향상으로 건강 지향적인 식품을 선호하는 경향과 더불어 식염이 성인병을 가져오는 원인의 하나라는 것이 규명되면서 소비자들은 고식염의 젓갈제품을 기피하고 있는 추세이다. 이로 인해 젓갈의 식염 농도가 15~20%의 고식염 젓갈에서 7~10%의 저식염 젓갈로 대부분 변화하고 있다.
- 수산가공편람으로부터 전통젓갈과 저염 젓갈의 특성을 조사하였다(Table 3-1-113 참고).
- 전통젓갈에 10% 이상의 식염을 넣은 것은 부패세균의 증식을 억제하기 위한 것이지만, 저염 젓갈을 제조하기 위해서는 낮은 염농도로 인해 저장, 유통 중에 일어날 수 있는 품질변화를 방지하여 저장성을 높이는 것이 필수적이기 때문에 젓갈 중 존재하는 미생물의 사멸이나 효소의 불활성화가 요구되며, 숙성 중에 관여하는 미생물 등에 따라 풍미가 크

게 달라진다.

Table 3-1-113. 전통젓갈과 저염젓갈의 특성 비교(수산가공편람)

	전통 젓갈	저염 젓갈
식염 농도	약 10~20%	약 4~7%
숙성 기간	약 10~20일	약 0~3일
감칠맛 생성	자기소화에 의한 아미노산 등의 생성	조미료 등에 의한 맛 부여
부패 방지	식염에 의한 부패방지	방부제, 수분활성 조절에 의한 방부(냉장)
보존성	높다(상온 저장 가능)	낮다(냉장)
제품 특성	보존식품	기호식품

- 원료에 MSG와 같은 조미료를 가하여 숙성 발효시킨 저염 제품들이 출시되고 있지만 과다한 조미 부재료를 사용함으로써 발효식품으로서의 풍미특성을 상실하고 있다.
- 저염 제품이라 하더라도 식염농도는 7~10% 수준으로 여전히 염농도 높으며, 각종 첨가물의 사용은 고유의 향미를 저하시키고 염분의 과다섭취에 민감한 현대인의 기호를 충족시키지 못한다. 따라서 건강을 위해 과다한 식염함량을 최대한 낮추면서도 기존의 젓갈과 같은 풍미를 갖는 저염 젓갈의 제조가 요구된다.

(5) 저염 젓갈 개발 concept

- 위의 조사에서 젓갈류 중에 젓갈, 액젓 및 조미액젓 등은 본보고서 제3장 제1절 5항에서와 같이 저염 어간장을 기존 어간장 대비 약 19~40%의 나트륨을 감소시켜 개발함으로써 나트륨 저감화 목표를 달성하였으므로 유형 선정에서 제외하고, 양념 젓갈류를 선정하였다.

Table 3-1-114. 식중독 관련 미생물들의 생육 및 독소생산 한계조건

미생물	최저온도 (°C)	최저 pH	최저 Aw	최대 염농도 (%)
<i>Bacillus cereus</i>	7	4.4-5.0	0.93-0.95	7.5
<i>Cl. botulinum</i>				
- A, B type	10-12	4.8	0.94-0.95	10
- E type	3.3	5.0	0.97	5
<i>Cl. perfringens</i>	15-20	5.0	0.92-0.95	4.6
<i>Salmonella sp.</i>	5.2	4.1-4.5	0.95	8
<i>Staphylococcus aureus</i>				
-호기적 생육	6.7	4.3	0.86	16-18
-혐기적 생육	6.7	4.7	0.90	14-16
-호기적 독소생산	10	4.3	0.90-0.93	12-13
-혐기적 독소생산	10	6.5	0.90-0.93	12-13
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3-13	4.8	0.94	8-10

식품과학과 산업 12월호(2008), 김영명

○ 젓갈류에서 조사된 salt role은 1차 풍미증진, 2차 부패미생물의 생육억제 및 자가소화효소 작용에 의한 감칠맛 생성 3차는 저장 및 숙성 중 미생물학적 안전성 확보에 있다. 저염 젓갈의 KS 규격에 의하면 염농도를 8% 이하로 규정하고 있어 유해 미생물의 생육 억제를 위한 한계치(Table 3-1-114 참고) 나트륨 저감화가 이루어졌다 판단하고, 저감화 목표를 설정하기 보다는 제품의 품질향상과 공정개선에 초점을 맞추어 다음과 같은 **개발 목표**를 설정하였다.

- 부패미생물의 생육억제 및 자가소화효소 작용을 증진 효과를 가진 **신가공기술 도입 가능성 탐색**
- 주문자 생산이 가능한 **소량, 고품질 양념 젓갈 생산 공정 설계**
- salt 농도는 **7~10%**를 목표로 설정(critical salt concentration에 대한 탐색)

나. Entire supply chain approach를 통한 개선/개발방안 도출과 해결책 탐색

(1) 원료 선정

○ 해양수산부, 통계청 보도 자료 및 수산정보포털로부터 우리나라 수산물 생산현황, 국민선호어종, 수산물 가공품 생산현황 및 염신품 품목별 제조현황을 조사하여 저염 젓갈 개발 원료로 우리나라 대표적인 양념 젓갈의 원료인 **오징어**를 선정하였다.

- 오징어 (*Todarodes pacificus*)는 예부터 식용되어온 기호성이 매우 높은 우리나라의 전통수산 가공품이며 식량자원 측면에서는 중요한 단백질 공급원으로서 아직까지도 소비자들의 사랑을 받고 있는 품목임. (울릉군 관광정보)



Fig 3-1-104. 오징어(*Todarodes pacificus*).

- 1991년 연근해산 오징어의 생산량이 약 10만톤을 넘어선 이후 약 10년간 오징어의 생산량은 꾸준한 증가세를 보이고 있으며 반면 원양에서 어획하여 유통되는 원양산 오징어는 약간의 감소현상을 보임.
- 우리의 식미 기호에 잘 어울려 건제품뿐만 아니라 생식, 냉동품, 젓갈류 및 조미 가공품 등 여러 가지로 다양하게 식용되고 있으며, 특히 연근해 어업의 명실상부한 우리나라의 대표적인 경제 어종으로 자리를 확고히 하고 있음.
- 수표면 ~100m 에 서식하는 회유성 어종으로 서식수온은 10~20℃임. (오징어자원조사, 국립수산과학원)

- 오징어 생산은 연근해산과 원양산을 합해 연간 약 24만톤 수준이며 연근해산은 주로 8~2월 말 까지 어획되고 원양산은 2~8월까지 어획됨.
- 오징어는 최대 수출국인 중국을 비롯, 뉴질랜드, 미국 등 전세계 50여개국 이상으로 수출되며 수출 비중은 중국 55%, 뉴질랜드 21%, 미국 9% 등으로 보고되어짐.
- 국내 가격은 원양오징어 어획부진 영향에 따른 물량 부족으로 '10년은 전년 대비 27% 이상 상승했으며, '11년도의 경우도 전년의 65%이상 크게 상승함.

Table 3-1-115. 국내 오징어 생산 및 수출 동향

구분		'00	'08	'09	'10	'11	'11.6	'12.6
생산량(톤)	소계	404,152	367,940	273,812	224,546	241,773	97,940	118,509
	원양산	177,843	181,780	84,652	65,416	70,130	59,927	70,056
	연근해산	226,309	186,150	189,160	159,130	171,643	38,013	48,453
수출	물량(톤)	117,439	150,670	101,300	60,406	65,284	41,720	42,102
	금액(천불)	92,251	126,536	108,052	114,762	180,946	113,663	82,738
단가/kg	수출단가(불)	0.79	0.84	1.1	1.89	2.77	2.72	1.97
	국내가격(원)	1,742	1,058	1,257	1,598	2,445	2,040	2,036

* 출처: 수산정보포털 통계(<http://fips.go.kr>)

KATI 무역통계 가격정보(상품, 냉동오징어 기준)

(2) 제품 유형: 양념 젓갈

- 오징어젓은 오징어에 마늘, 설탕, 고춧가루 등과 양념하여 밥반찬용으로 이용되며, 특유의 향미와 조직감을 가짐.
- 오징어젓갈은 양념젓갈 중 가격이 저렴하고, 기호성이 좋아 대중젓갈로 자리 잡고 있음. 오징어젓갈은 귀(지느러미), 몸통(연체부), 다리(팔) 부위 및 일정비율로 혼합하여 판매되고 있는데, 몸통부위가 많을수록 고급품으로 매겨짐. (한국젓갈의 현황과 현대화과제)



Fig. 3-1-105. 각종 오징어젓

○ **제조방법:** 전통적인 오징어 젓갈 제조 방법은 Fig. 3-1-106에 일반적인 배합비는 Table 3-1-116에 제시하였다.

Table 3-1-116. 조미 오징어젓 제품의 원. 부재료 배합비 (수산가공편람)

1차 조미 배합비 (kg)		2차 조미 배합비 (kg)	
오징어	100	숙성 반제품	100
소금	9~10	고춧가루	4.5
글루탐산나트륨	1.0	마늘	3.5
솔비톨	2.5	솔비톨	2.5
		설탕	2.0
		글루탐산나트륨	1.5
		기타	1.5

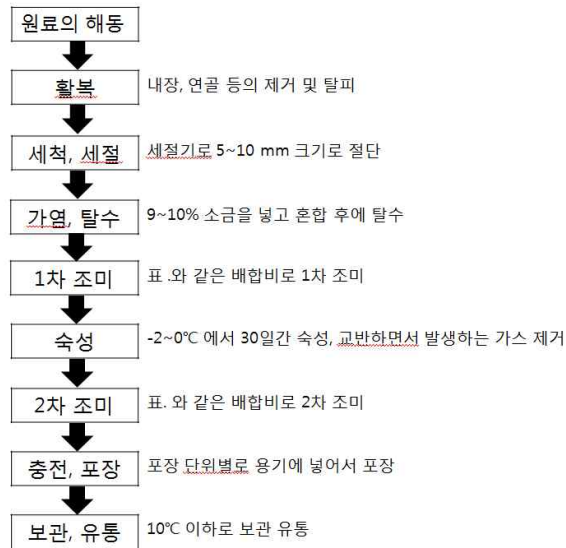


Fig. 3-1-106. 조미 오징어젓 제조공정 (수산가공편람)

(3) 시장 조사

○ 저염 오징어 젓갈이 출시되는 제조사 및 제품을 분석해보면 Table 3-1-117과 같이 주로 식염을 적게 넣는 대신 향미와 보존성을 증진시키기 위해 L-글루타민산나트륨 등 부재료를 첨가하고, 주로 대기업보다 바다인근 지역 중소기업의 제조사에서 제품이 출시되고 있었음.

○ 대부분의 제품이 5~7%의 소금함량을 나타내었는데 이는 2차 배합과정에서 약 2~3% 정도 감소하기 때문으로 판단되었음.

Table 3-1-117. 국내 저염 오징어젓갈 제품

사진	제품명	회사명/ 제조원	주원료	유통기한	제품유형
	오징어젓	참식품 /강원도 속초시 대포동930	오징어(국내산)80%,마늘(중국)4.5%,정제염,물엿,조미고추분말(파프리카추출색소,폴리솔베이트,포도당),마늘,L-글루타민산나트륨(향미증진제),고춧가루,설탕,폴리인산나트륨,피로인산나트륨,산탄검,텍스트린,통계	150일	양념젓갈
	오징어젓	안선씨푸드 /중국	오징어70.5%(중국산),정제소금(중국산),이온물엿,고춧가루(중국산),마늘,설탕,L-글루타민산나트륨(향미증진제),참깨,생강,글리신,마늘농축액,정제포도당,조미분(정제포도당95%,파프리카추출색소5%)		양념젓갈
	오징어젓	강경장수젓갈	오징어(국내산)68.4995%,정제염(국내산)7%,마늘,물엿,조미고추분말(포도당,파프리카추출색소,유화제),혼합조미료(밀),텍스트린,고춧가루(중국산),L-글루타민산나트륨(향미증진제),D-소르비톨,설탕,생강,소르빈산칼륨(합성보존료)0.0005%	12개월	양념젓갈
	오징어젓갈	그린남도반찬푸드 /(유)귀빈정 /익산시황등면	오징어(국내산)72.5%,물엿(옥수수전분100%)5%,조미고추맛분말(파프리카추출색소5.5%,폴리솔베이트5.5%,포도당89%)4%,고춧가루(중국산)3%,D-소르비톨3%,마늘(국내산)2.4%,정제염(중국산)2.4%,설탕2%,L-글루타민산나트륨(향미증진제)1%,생강(국내산)1%,ckaRo(인도산)0.1%,두비믹스30.1%,건다테기(찜쌀가루61%,고춧가루19%,정제염10%,설탕6%,마늘가루4%)1.5%,마늘종(중국산)2%		양념젓갈
	오징어젓갈	선호식품 /강원도 속초시 변영로	오징어68.7%(국내),식염5%(국내),고춧가루4%(중국),물엿3%,파프리카추출색소-일(파프리카추출색소,폴리솔베이트80,포도당,글리세린)3%,참깨2%,혼합조미료(찜쌀가루,고추분,정제염)2%,D-소르비톨(감미료)2%,설탕2%,마늘2%,마늘종2%,L-글루타민산나트륨(향미증진제)1%,올레오레진캡시킴-일(올레오레진캡시킴,폴리솔베이트80,텍스트린,포도당)1%,마늘분1%,생강분0.5%,사이다0.5%,환타0.3%		양념젓갈
	민음 밥도둑 오징어젓	민음 /서울 송파구 가락동	오징어(국산)72%, 정제염(국산)6%, 고춧가루(국산)4%, 물엿7%, 혼합조미료(혼합양념)4%, 파프리카추출색소(천연추출물)0.2%, 정백당0.8%, 솔비톨1%, L-글루타민산나트륨(향미증진제)1%, 액젓1%, 생강0.2%, 마늘2%, 참깨0.2%, 웰믹스0.05%, MF베이스분말0.45%, 솔빈산칼륨(합성보존료)0.1%		절임류
	본 오징어 초무침	농업회사법인(주) 너른마당 / 경기도 부천시 오정동	무절임48.6%[무88.00%(국산),절임액(2배양조식초,스테비텐후레쉬,정제염),오징어젓40.00%[오징어73.10%(국산),정제염,마늘,물엿,조미고추맛분,혼합조미료(밀),마늘분말,파프리카분말(옥수수가루(옥수수),파프리카올레오레진,정제염),볶음참깨,혼합양념분말,고춧가루,생강분말(생강),스테비텐후레쉬]	냉장보관 45일	양념젓갈
	동해랑 오징어젓	풍미식품 /강원도 속초시	오징어(국산)70%,마늘종6.5%,고춧가루5.7%,정제염,물엿,마늘,설탕,양파,깨,생강,멸치액젓,L-글루타민산나트륨(향미증진제)	제조일로부터 60일 이내 (냉장보관 시)	양념젓갈
	웰빙오징어 젓 매운	(주)동광푸드 /강원도 속초시	백조미오징어(오징어(국산)87%,정제염(국산)7%,설탕6%)83%,고춧가루(국산)4.5%,풋고추,파,설탕,마늘,솔비톨(감미료),파프리카추출색소(천연첨가물),L-글루타민산나트륨(향미증진제),기토산메이트,올레오레진캡시킴-일(천연첨가물),참깨	제조일로부터 45일	양념젓갈

	웰빙오징어 어젓	(주)동광푸드 /강원도 속초시	백조미오징어(국산)87%,정제염(국산)7%,고춧가루(국산)4.5%,설탕,꽃고추,파,마늘,설탕,솔비톨(감미료),파프리카추출색소(천연첨가물),키토산메이트,참깨,L-글루타미산나트륨(향미증진제)	제조일로부터 45일	양념젓갈
	소금을줄여 맛있는 오징어젓	(주)다해	오징어젓(오징어(국산)72.5%,고춧가루(중국산)6.6%,정제염4%,조미고추분,씨소닝,L-글루타민산나트륨(향미증진제),호박씨,해바라기씨,김은깨,땅콩)98%,물엿2%	제조일로부터 70일	양념젓갈
	간월도 오징어젓	섬마을 / 충남 서산시 부석면	오징어(국산)80%, 천일염(국산)5%, 고춧가루(국산), 마늘(국산), 참깨(국산), 생강(국산), 양파(국산), 물엿, 설탕	제조일로부터 6개월	양념젓갈
	오징어젓 갈	해음 (주)정이푸드빌	오징어62.3%(국내산),물엿15.6%,정제염4.4%(국내산),설탕4%,고춧가루3.1%(중국산),마늘다대기2.2%,마늘종2.2%(중국산),마늘1.9%,조미고추맛분말(파프리카추출색소,포도당,폴리솔베이트80)1.2%,참깨1.2%,생강0.6%,액젓0.3%,L-글루타민산나트륨(향미증진제)0.3%,옥수수전분0.3%,두비믹스(산도조절제,텍스트린,잔탄검)0.2%,소르빈산칼륨(합성보존료)0.08%,텍스트린0.06%,글리신0.06%	제조일로부터 6개월	양념젓갈
	오징어젓	해담음 (주)정이푸드빌	오징어(국내산)62.3%,물엿,식염(정제염/국내산)4.6%,설탕,고춧가루,마늘다대기,마늘종,마늘,조미고추맛분말(파프리카추출색소,포도당,폴리솔베이트80),참깨,생강,액젓,L-글루타민산나트륨(향미증진제),옥수수전분,두비믹스III(산도조절제,텍스트린,잔탄검),소르빈산칼륨(합성보존료),텍스트린,글리신	개봉후 2달이내	양념젓갈
	오징어 양념젓갈	반찬단지	백조미오징어젓갈65%[오징어(국내산)70%,설탕15%,식염(중국산)15%],조미매운고추맛분#2(포도당,올레오레킨파프리카),고춧가루(중국산),디-하트스파이스(포도당,올레오레킨펜시킵),참깨,L-글루타민산나트륨(향미증진제),글리신,폴리믹스-DW,진탄검,마늘(중국산50%,국내산50%),생강,설탕,물엿(옥수수전분100%),홍고추(중국산),액젓		양념젓갈
	오징어젓	(주)단지푸드 /중국	오징어58.5%(중국산),정제소금,고춧가루,마늘,설탕,생강,이온물엿,참깨,L-글루타민산나트륨(향미증진제),조미분(정제포도당95%,파프리카추출색소5%),정제포도당,마늘분말,양파분말,글리신,마늘농축액		양념젓갈
	오징어젓	삼대명가	오징어(중국산)70.5%,정제소금(중국산),이온물엿,고춧가루,마늘,설탕,L-글루타민산나트륨,참깨,생강,정제포도당,마늘분말,양파분말,락토맛소스,글리신,마늘농축액,조미분		양념젓갈
	오징어젓 갈	굴다리식품 /굴다리영여조합 법인 /충남 아산시	오징어75%(국내산),고춧가루7%(국내산),천일염5.7%(국내산),물엿2%,설탕2%,생각1%,멸치액젓1%,마늘3%,참깨1%,조미분2%(파프리카추출색소,폴리솔베이트,포도당),글루타민나트륨0.3%		양념젓갈
	초록마을 오징어젓 갈	초록마을 (주)청아굿푸드 / 강원횡성군	오징어(국산)62.2%, 쌀조청[쌀(국산), 맥아, 효소], 정제염(국산)5.6%, 마늘(국산), 양파(국산), 갈색설탕, 고춧가루(국산), 고추(국산), 정제수, 한우참맛(대두, 밀), 볶음참깨(국산), 생강(국산)	제조(포장) 일로부터 45일	양념젓갈
	초록마을 비빔오징어 젓갈	초록마을 (주)청아굿푸드 / 강원횡성군	오징어(국산)54.2%, 쌀조청[쌀(국산), 맥아, 효소], 양파(국산), 고춧가루(국산), 마늘(국산), 갈색설탕, 정제염(국산)3%, 무말랭이(국산), 멸치액젓(국산), 당근(국산), 생강(국산), 볶음참깨(국산), 한우참맛(밀, 대두), 고추잎(국산), 정제수	제조(포장) 일로부터 45일	양념젓갈
	오징어젓 갈	한성수산 식품(주) /경북포항시 구룡포읍	오징어73.08%(국산),물엿,식염7.0%(천일염/국산),D-소르비톨,고춧가루,마늘,백설탕,L-글루타민산나트륨(향미증진제),복합시즈닝믹스,참깨,조미액,천연색소(코치닐추출색소,락색소,유화제),L-아스코르빈산나트륨,대두,밀,오징어	제조일로부터 50일	양념젓갈

	골드 오징어젓갈	한성수산 식품(주) /경북포항시 구룡포읍	오징어70.06%(국산),물엿,식염6.5%(천일염,국산),백설탕,D0소르비톨,마늘,고춧가루,양파,L-글루타민산나트륨(향미증진제),매실농축액0.30%,복합시즈닝믹스,참깨,조미액(대두,밀),키토올리고당-TW 0.10%,천연색소(코치닐추출색소,타락소,유화제),L-아스코르빈산나트륨	제조일로부터 50일	양념젓갈
	오마니 오징어젓	동화푸드 /강원도속초시	오징어(국내산)80%,고춧가루5%,식염5%,마늘2%,깨1%,생강1%,물엿6%		양념젓갈
	황토에찬 오징어젓	황토에찬	절임오징어65%(국산),물엿10%(옥수수전분100%,수입산),정제소금5%(국산),고춧가루(중국산),솔비톨분말,마늘(중국산),양파(국산),고추(국산),L-글루타민산나트륨(향미증진제),깨(인도산)		젓갈류
	황토에찬 비빔오징어젓	황토에찬	오징어(국산)61%,물엿9%(옥수수전분100%,수입산),고춧가루(중국산)8%,정제염8%(국산),마늘(중국산),해바라기씨(중국산),호박씨(중국산),땅콩(중국산),깨(인도산),검정깨(중국산),L-글루타민산나트륨(향미증진제),생강(중국산),포리믹스(복합조미료:정제포도당외),글리신,두비믹스(복합첨가물:신탄검,텍스트린외),솔빈산칼륨(합성보존료)		젓갈류
	웰빙오징어젓	(주)나래식품	오징어(국산)67%,무(국산)10%,식염4%,고추,마늘쫄,말티톨(맥아엿),고춧가루(국산),양파,고추조미분(정제포도당,파프리카),마늘,생강	제조일로부터 3개월	양념젓갈
	매운오징어젓	(주)나래식품	오징어(국산)65%,천일염(국산)7%,무6%,고춧가루(국산)4%,물엿,조미고추맛분말5.0%[프파리카추출색소5.5%,폴리솔베이트80(유화제)5.5%,포도당(희석제)90%],양파,마늘,고추,매실액(매실60%,설탕40%),생강,캡시킴분말[파프리카추출색소1.3%,포도당(희석제)89%,올레오레킨캡시킴6.5%,폴리솔베이트80(유화제)3.2%],L-글루타민산나트륨(향미증진제)	제조일로부터 3개월	양념젓갈
	비빔오징어젓	(주)나래식품	오징어(국산)50%,당근(국산)6%,고춧가루(국산)6%,고추6%,물엿6%,양파6%,식염5%,양배추55,고추조미분,설탕,마늘,검정깨,생강	제조일로부터 3개월	양념젓갈
	오징어젓	(주)녹선 /경기도가평군	염장오징어61.73%[오징어(국내산),소금(중국산)10%,설탕,물엿,마늘(중국산),고춧가루,설탕,분말결정포도당,향신료조제품,생강,복합조미식품①,정제수,참깨,L-글루타민산나트륨(향미증진제),소금0.27%,멸치조미액,텍스트린,복합조미식품②,양파,홍국적색소	제조일로부터 20일	양념젓갈
	맛의오징어골드500	대경에프앤비 /부산광역시	오징어67.57%(국내산),물엿(옥수수전분;수입산),정제소금5%(국내산),고춧가루(고추,국내산),마늘,D-소르비톨,정백당,L-글루타민산나트륨(향미증진제),참깨,복합시즈닝믹스,미립,매실농축액,비타민C		양념젓갈
	오징어젓	천일유통 /중국	오징어(중국산)70.5%,정제소금(중국산),이온물엿,고춧가루,마늘,설탕,L-글루타민산나트륨(향미증진제),참깨,생강,글리신,마늘농축액,마늘분말,정제포도당,조미분(정제포도당95%,파프리카추출색소5%)		양념젓갈
	오징어젓	만남갯김치 /단골젓갈 /강원도속초시	오징어80%(국산),고춧가루6%(국산30%,중국70%),조미고추분1%,생강0.8%,L-글루타민산나트륨1%(향미증진제),식염3%(국산),참깨0.4%,설탕1%,물엿3%,마늘3%		양념젓갈
	웰빙오징어젓	젓갈나라 하정식품	오징어56%,물엿8.5%,식염8%,고춧가루6.89%,마늘(중국산)7.44%,설탕3.94%,조미고추맛분말3.11%,깨1.24%,L-글루타민산나트륨1.21%,해바라기씨1.5%,땅콩1%,생강0.44%,포리믹스0.33%,글리신0.33%,두비믹스0.05%,소르빈산칼륨0.02%	제조일로부터 180일	절임류
	오징어젓갈	동양전통식품 /충남논산시	오징어75%(국내산),천일염5%(중국산),물엿,마늘,생강,참깨,파프리카추출색소,L-글루타민산나트륨,알파폴리젤		양념젓갈

(4) 신가공기술로서 Infusion Technology 도입

○ 함침기술(impregnation technology 또는 impregnation technology)은 원물의 형태를 유지하면서 효소, 영양성분 또는 기능성성분을 침투시켜 물성변화를 유도하거나 영양 강화를 유도하는 기술로서 최근 관심이 증폭되고 있는 기술이다. 양념을 무쳐서 숙성시키는 우리의 전통 기술도 함침 기술의 하나인 marinating 함침기술이라 할 수 있다. 기본 메카니즘은 물질전달이며 전달 원동력(driving force)를 상압 및 시간, 농도차를 벗어나 조직변화 및 압력 차이를 발생시켜 전달속도를 빠르게 유도하는 기술들이 새로이 도입되고 있다. 예를 들면, **감압함침법 (Vacuum Infusion), 감합-가압함침법 (Vacuum-Pressure Infusion), 동결함침법 (Freezing/Thawing Infusion), 가압함침법 (Pressure impregnation), Needle injection 효소 주입법, Marinating 기술** 등이 있다.

○ 양념 젓갈을 제조하는 원리 역시 marination 기술과 유사하므로 신가공 기술의 도입을 위하여 함침기술에 대한 간략한 소개를 하고자 한다.

○ 감압 함침법 (Vacuum Infusion 혹은 Vacuum Impregnation (VI)):

▪ Vacuum impregnation 기술은 영양소 성분, 기능성 성분 및 효소 등을 진공상태에서 식품재료 중심까지 균일하게 스며들게 하는 기술. 이 기술은 타 산업분야에서도 널리 사용되는 기술로서 식품분야에서 초기에는 과일, 채소류의 냉동, 건조 등의 가공공정에서 조직연화를 방지하기 위하여 동결보호제, 칼슘 등을 주입시키는데 주로 이용되었으며, 1994년 효소주입(enzyme infusion)이 제안되었다(*Food Technology*. 1994, 48(11), 85-89).

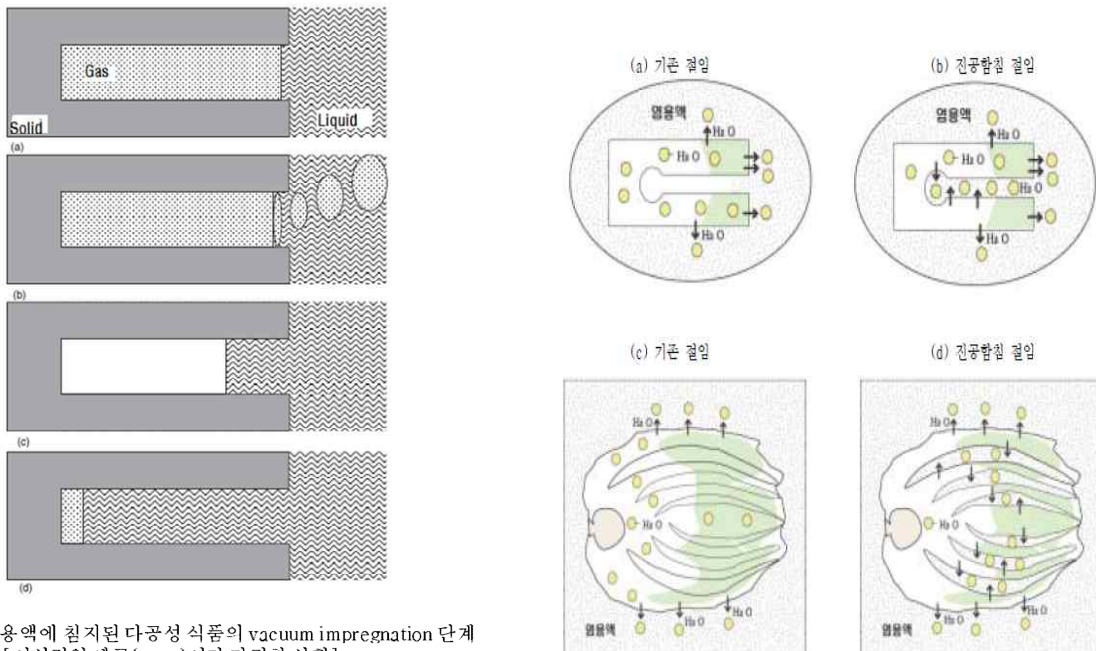


그림 . 용액에 침지된 다공성 식품의 vacuum impregnation 단계
 [이상적인 세공(pore)이라 가정함]
 (a) 상압 하에서 모세관 효과; (b) 감압조건에서 degassing;
 (c) 감압 하에서 모세관 효과; (d) 상압으로 회복된 상태

Fig. 3-1-107. 진공함침법 원리와 기존 절임과의 비교.

- 감압 효소 함침 기술은 압력 변화에 따른 유체역학(hydrodynamic)과 물질전달의 원리를 활용해 효소는 세포내 집어넣는 기술이다. 압력을 낮춰 진공을 잡아주게 되면 식품 내부 존재하는 기체가 확장되어 부분적으로 식품 내에서 외부로 움직이게 된다. 이후 대기압에서 저장하게 되면 양(+)의 압력차이로 액체성분(효소가 들어 있는 함침액)이 가스가 빠져나가고 비어 있는 공간으로 압력이 일정할 때 까지 침투되어 들어가게 되는 원리를 이용한 것이다(Fig. 3-1-107).
- 이는 일반적인 담금함침(marinating)법에 비해 시간이 단축되는 큰 장점이 있어서 생산성 향상과 산업화시 품질균일화를 기대할 수 있다. 또한 원물형태를 유지하는데 보다 유용하게 활용할 수 있는 장점을 지니고 있다.
- 감압 효소 함침 침투율과 식품 원재료 변형도와 함께 중요한 요소인데, 1) 진공도, 2) 진공해제시간, 3) 진공해제주기인 pulse, 4) 기타 (함침액의 온도, 농도 등)에 따라서 달라지게 된다. 식재료 별 최적 공정과정을 선정하는 것이 중요한 부분이라 할 수 있다.
- 그 외에도 감압침투법 사과 공정과정에서 조직을 보다 견고하게 하여 캔 공정에 들어가는 과실의 경우 품질을 향상시킬 수 있다. 그 외에도 당, 소금, 칼슘, 유기산, 향, 색이 들어가는 성분과 함께 사용하여 품질을 증진시킬 수 있다. 또한 치즈 내 가스와 유청제거 시, 잼 제조 시, 생선이나 치즈에 소금첨가, 사과 공정(Fig. 3-1-108) 시 동해방지제 첨가할 때도 진공함침법은 사용된다.

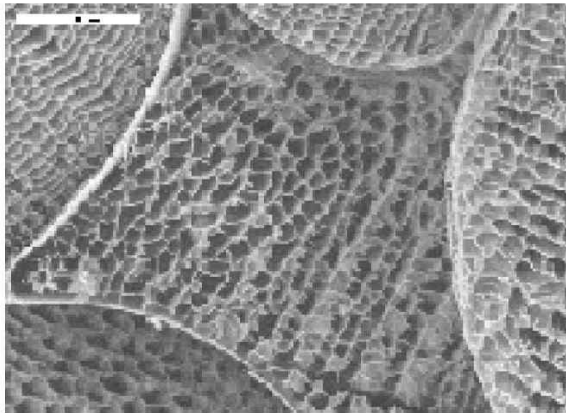


Fig. 3. Intercellular space in impregnated apple tissue (magnification: 1500) (CW: cell wall; IS: intercellular space full of impregnation liquid).

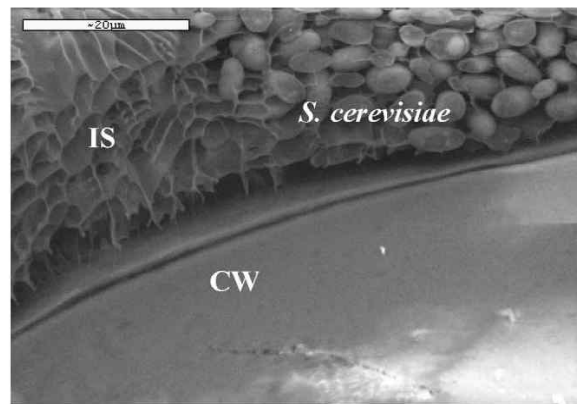


Fig. 4. *S. cerevisiae* in intercellular space of impregnated apple tissue (magnification: 2000) (CW: cell wall; IS: intercellular space full of impregnation liquid with *S. cerevisiae* cells).

Fig. 3-1-108. 사과 조직내 침투된 *S. cerevisiae* SEM 사진.

○ 가압 함침법 (Pressure Infusion or Pressure Impregnation) :

- 압력처리는 주로 비열처리 살균이나 효소변성을 통한 활성 증진 및 억제 등에 활용되어 왔으나, 최근에는 삼투압에 의한 확산속도를 보다 가속화하기 위한 방법으로 초고압처리를 실시 해준다. Restogi와 Niranjana 등에 의하면 삼투압이 진행되기 전에 약 100-700 MPa의 압력을 가해주면 삼투력이 가해질 때 파인애플 내에서 물질전달이 빨리 이루어지는 것을 확인하였다. 이는 확산속도를 빨리 가속화시켜 공정과정을 단축시킬 수 있다.
- Mahadenvan과 Karwe에 따르면 압력 중에서도 초고압 기술을 활용하면 소금과 당 등을 과일이나 채소류 및 고기류에 침투시킬 수 있다. 이는 동결 함침법과 유사하게 세포

막의 파괴를 유도하여 침투시키는데 저항을 줄여주는 원리를 이용한 것이다. 압력에 의한 세포막 파괴에 의한 함침효율 증대는 일반적인 이론이고, 세포막이 파괴되지 않아도 초고압 자체가 유도력(driving force)으로 작용하여 마이크로 구조 변화 없이 함침에 효과적일 수 있다는 이론으로 설명된다.

- Sopanangku 등에 따르면 감자 내 sucrose가 침투되는 속도를 압력별로 실험하였는데, 400 MPa 미만에서 확산속도가 빨라지는 것을 관찰할 수 있었으며, 그 이상의 압력에서는 감자의 호화가 발생하는 것을 알 수 있었다. 이렇듯 초고압을 응용한 물질전달에 관한 함침법 연구는 신가공 기술로 각광받고 있다.
- 압력을 이용한 함침기술은 비열처리 효과와 함께 압력에 의해 물리적으로 조직을 연하게 해줄 수 있어 조직연화 작용에 상승효과를 기대할 수 있다. 실제로 굴을 이용한 조직연화, 압력처리 시간에 따른 양파 껍질에서 세포벽 파괴 등을 유도할 수 있다는 연구 결과가 보고되어 있다(Fig. 3-1-109, Fig. 3-1-110 참고).

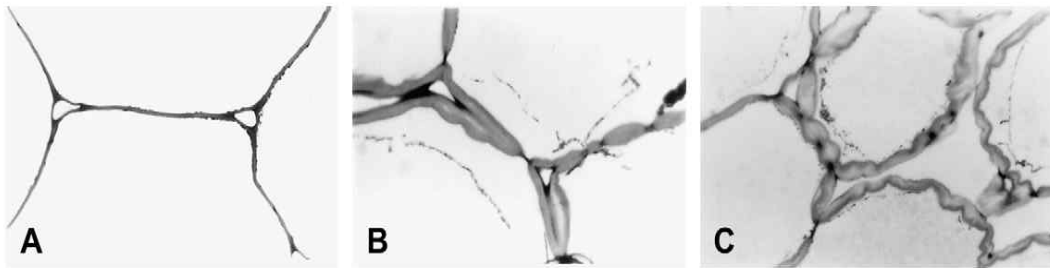


Fig. 2. Light micrographs of onion outer scale leaves: (A) fresh, (B) pressure cooked (20 min) and (C) pressure cooked (50 min).

Fig. 3-1-109. 양파 껍데기 외곽 광학현미경 A: fresh, B: 20분간 처리, C: 50분간 압력 처리.

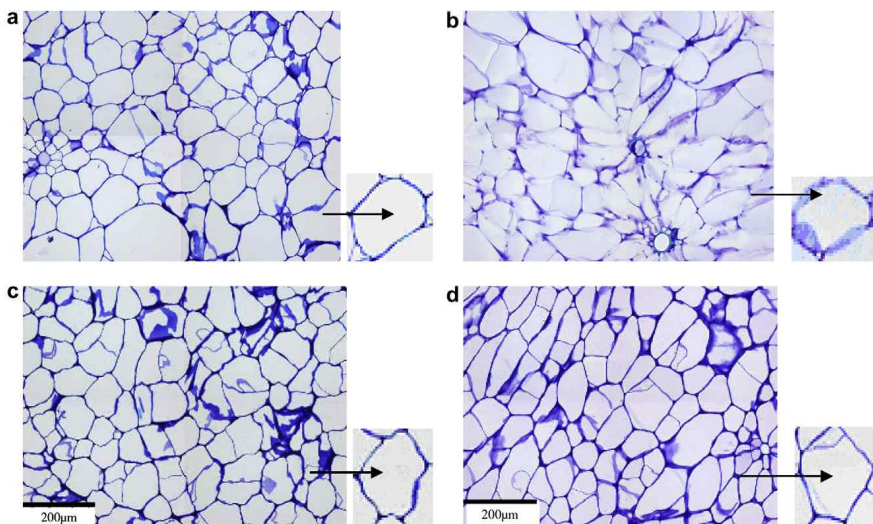


Fig. 3-1-110. 당근 내 세포벽과 세포내 액포 A: 대조구, B: 압력 비처리, 조리 후, C: 초고압처리 및 조리 전, D: 초고압 처리 및 조리 후.

○ 감압-가압 함침법 (Vacuum-Pressure Infusion) :

- 감압 처리 이후 대기압 이상의 압력을 가해 함침액 침투력을 향상시키는 방법이다. 감압 후에 압력을 상대적으로 대기압 이상으로 올려주면 이때 발생하는 압력차에 큰 폭으로 생성되어 상대적으로 함침액이 균일하고 깊게 침투되어 들어가는 효과가 발생한다. 하지만 식재료 별로 외형이 손상될 수 있어서 최적 공정과정의 파악이 필요하다.
- 진공주입은 식품을 용액 내에서 일정시간 감압을 적용한 후 상압상태로 복원하는 것으로 강제적인 감압 적용에 의해 액체와 용질성분이 식품 내에 주입된다. 주입된 액체와 용질의 양은 감압 정도와 적용시간에 의존하며 대부분 적용시간이 5-15분 정도로 매우 짧다. 식품에 대한 진공주입은 유체역학적 기작에 기인하여 다공성 조직 내부의 기체나 액체를 외부의 액체로 교체하는 것으로 식품을 액체에 침지한 후 다음의 2가지 단계로 수행된다.
- 첫 번째 단계는 침지한 식품을 밀폐된 공간에서 짧은 시간 동안 감압을 부여하는 것으로 내부의 기체가 팽창하고 외부로 배출되며 식품의 다공성 조직이 식품 본래의 액체로 채워지는 효과가 있다. 두 번째 단계에서 감압상태에서 대기압 상태로 일정시간 동안 회복되는데 이에 의해 다공성 조직에 남은 일부기체의 부피가 크게 감소하게 되고 연이어 외부의 액체가 다공질 구조로 유입된다. 진공주입은 과일, 채소 등의 건조제품을 제조하기 위한 전처리 방법으로서 많이 활용된다.

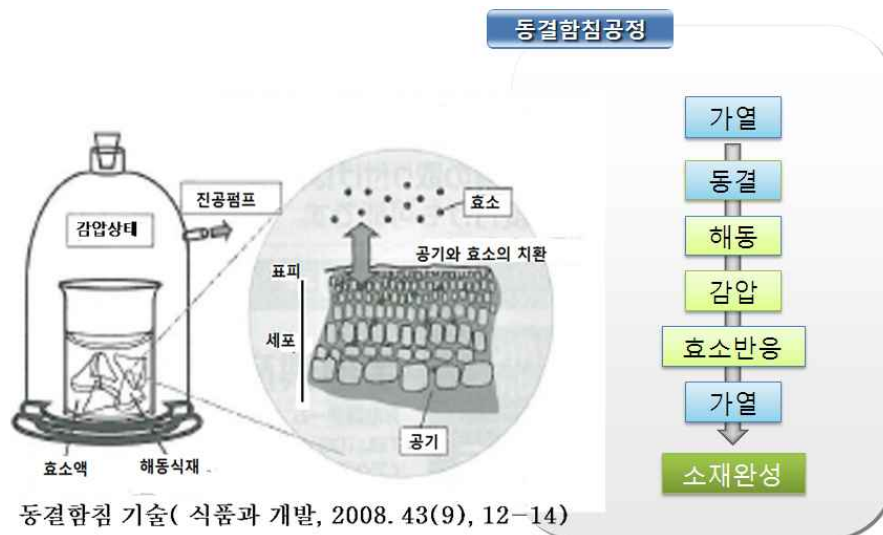


Fig. 3-1-111. 동결함침 기술.

○ 동결함침법 :

- 동결함침법은 고속 함침법으로 세포간격 뿐만 아니라 세포 내부에 물질 주입이 가능하므로 응용 범위가 넓고 전용 가공장치가 필요치 않아 원가절감과 기술 도입이 쉬운 장점이 있다. 동결함침법에 이용되는 효소로는 pectinase나 cellulase를 이용하여 당근, 호박, 감자, 강낭콩, 마늘 등의 강도 개선에 진행되고 있다(Fig. 3-1-111 참고).
- 동결함침공정은 일반적으로 -20°C에서 동결한 뒤 효소액에 침지하여 해동한 후, 진공 펌프 감압을 실시 해준다. 이후 효소액에서 빼낸 뒤 효소반응을 시키면 원하는 목적 경

도에 도달하여 필요할 때 압력 혹은 가열 증속하여 효소 반응을 정지 할 수 있다.

- 동결처리는 빙 결정 생성에 따른 조직의 세포 간극부 일부 손상으로 인한 직접적인 연화유도, 손상된 세포로 인해 확장된 채널 내부로의 효소액 침투 증대로 인한 연화를 유도할 수 있지만 세포벽 손상에 의한 품질 저하 가능성이 있는 단점이 있다. 대표적인 실험으로 사용된 식재료는 감자, 당근, 자색고구마, 우엉, 콩 등이 있다.
- 동결함침법은 주로 일본을 중심으로 개발되었으나 여러 가지 문제점이 있다. 완만동결/해동 과정에서 영양성분의 용출과 일반세균과 식중독균의 증식 위험이 있다. 또한 적용할 수 있는 식재는 효소불활성화를 위해 가열처리가 가능한 식재에 한정된다.
- Nagai 등은 동결함침 처리한 어패류의 연화와 근육 단백질의 변화에 대해 연구를 하였는데, 오징어 등은 모양 변화 없이 경질 정도가 $5 \times 10^4 \text{ N/m}^2$ 보다 낮거나 비슷한 수준으로 낮아지는 것을 관찰 하였다. 일정 시간이 흐른 뒤 효소 함침 된 오징어를 가지고 단백질 분해 정도를 SDS-PAGE 등을 통해 근육 연화도를 관찰하였다. 이때 발생한 유리 아미노산 함량 측정을 살펴보면 효소 동결함침으로 처리한 시료에서 많은 양이 측정되는 것을 알 수 있었다.
- Shibai 등은 백화두(White Flower Beans) 콩에 Mcerozyme 이라는 효소를 동결함침법을 통해 함침시킨 후 통의 연화 정도를 측정하였다. 고온, 고압 처리와 함께 효소 처리한 경우 $7.5 \times 10^4 \text{ N/m}^2$ 의 연화도를 나타내었고, 관능실험 결과 씹을 수 있을 만큼의 처리 상태로 판단되었다고 한다.

(5) 개발 목표치 및 개발 핵심 인자

- 함침기술 중에 가압함침기술을 양념 오징어 젓갈 시제품 (prototype) 제조에 적용 가능성을 탐색하는데 주 목적을 두고, 가압함침기술 활용 목적을 다음과 같이 설정함.
 - 짠맛증진물질 및 저염 어간장을 개발하는데 개발된 고압효소가수분해 기술에 사용된 고압 시스템은 가압함침기술을 개발하는데도 사용되며, **위해 미생물의 생육을 억제하고 자가소화에 의한 가수분해를 촉진**시키기 위한 목적으로 개발된 장비로서 젓갈 제조 시, 소금 첨가의 1차적인 목적과 동일하다. 양념 젓갈 제조에도 적용 가능성을 확인하고자 한다.
 - 양념 젓갈을 제조하는데 있어서 **marination** 기능이 작동하여 고품질의 양념 젓갈 생산가능성을 확인하고자 한다. 본 시스템은 batch type이며 close system으로서 주문 생산에 적합한 공정을 구축할 수 있다.
 - 1, 2차 양념 공정을 **통합하는 공정 개선**의 가능성을 확인하고자 한다.
 - 염농도는 2~10%에서 조절하여 시제품을 제조함.
 - 소금의 2차 기능인 풍미 증진 효과를 APH로 대체 가능한지를 확인하고자 한다.
- 따라서 기술 및 시제품 개발의 핵심인자는 Table 3-1-118와 같다.

Table 3-1-118. 기술(단위 공정) 및 시제품 개발을 위한 핵심 인자

분 류	핵심 인자	비 고
Sourcing of first ingredients	국내산 오징어 활용	수급이 매우 중요함

Source of second ingredients	야채 혼합 base와 당 및 APH	풍미 증진 및 masking (APH에 의해서 소금 저감효과가 있는가?)
Manufacturing product feasibility	기존 공정의 개선	공정 단축, 효율, 위생성 및 소량 다품종 생산 여부
Product design	양념 짓갈	제품으로 개발
Quality & safety of ingredients	Salt(%)	7~10 % 목표
Quality assurance	관능, 미생물학적 안전성, TN(%)	냉장유통 필수 (유통기한설정 시험)

다. 가압함침기술 도입 및 오징어 양념 짓갈 시작품(prototype) 개발

(1) 시중 저염 오징어 짓갈의 품질특성

○ 시중제품(저염 오징어짓갈)의 재료 및 품질특성 분석을 실시하고자 관교역 근처 롯데마트에서 4가지의 저염 오징어짓갈을 구매하여 원재료를 분석한 결과를 Table 3-1-119에 제시하였다.

Table 3-1-119 시판 저염 오징어짓갈의 원재료

제품명	제품 사진	원재료 명 및 함량	기타
양념 오징어짓		오징어71.3 %, 천일염7.0 %, D-솔비톨3.8 %,풋고추3.4 %, 대파 3.0 %,고춧가루4.0 %	제조원: 차인유통 제품유형: 양념짓갈 보관법: 냉장보관
비빔 오징어짓		가공된오징어짓50%[오징어72.5% ,정제염2.5%,물엿5.6%,조미고추맛 분3 %,고춧가루3%, D-솔비톨3 %,마늘3%,,설탕2.5%,L-글루타민 산나트륨2.5 %], 오징어47%, 풋고추2%	제조원: 차인유통 제품유형: 양념짓갈 보관법: 냉장보관
식객 오징어짓		오징어81.8%, 식염 5%,물엿 5%, 고춧가루3%,마늘2%, L-글루타민 산나트륨,설탕 1%, 생강 0.2%	제조원: (주) 천하 제품유형: 양념짓갈 보관법: 냉장보관 유통기한: 제조일로부터 1년
맛있는 오징어짓갈		오징어 73.08%, 식염 7%, 물엿, D-솔비톨,고춧가루,마늘,백설탕, L-글루타민산나트륨, 참깨, 조미액	제조원: 한성수산식품 제품유형: 양념짓갈 보관법: 냉장보관

- 이화학적 특성 분석을 실시한 결과(Fig. 3-1-112~115),
 - a_w 는 네 제품 모두 평균 0.854 ± 0.009 를 나타냈고, 수분은 평균 $48.900 \pm 2.084\%$ 로 네 제품 모두 비슷했으나 엘초이스의 맛있는 오징어 젓갈이 51.274%로 가장 높은 값을 나타냄. 즉, 식중독 원인균의 생육이 불가능한 조건임
 - 당도는 평균 $41.167 \pm 2.009\%$ 로 비교적 높은 값을 나타냄

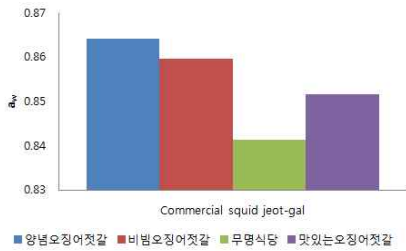


Fig. 3-1-112. a_w of commercial squid jeot-gal

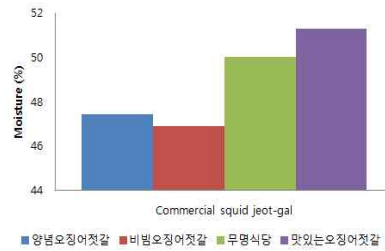


Fig. 3-1-113. Moisture of commercial squid jeot-gal

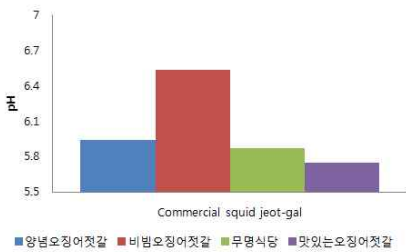


Fig. 3-1-114. pH of commercial squid jeot-gal

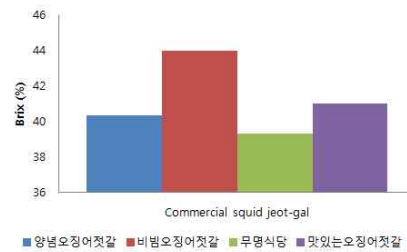


Fig. 3-1-115. Brix of commercial squid jeot-gal

- 결론적으로 유통기한 중 미생물의 위해 안전성을 확보하기 위해서는 수분활성도를 0.85 이하로 목표를 재설정함.

(2) 저염 오징어 젓갈 Salt Critical Concentration 탐색

- 기존 제품과 같은 풍미를 가진 최소 농도의 나트륨 함량을 탐색하기 위하여 원료육에 소금만 첨가하여 숙성하면서 품질 특성을 측정하였다..

(가) 재료 및 방법

① 재료:

- 본 실험에 사용한 오징어는 판교 롯데마트에서 구입하여 일정량씩 polyethylene film bag에 넣은 다음 동결고(-20°C)에 저장하여 두고 실험 전 4°C에서 24시간동안 해동하여 저염 오징

어 젓갈의 Salt CC 탐색 실험에 원료로 사용함.

② 시료 제조:

- 원료 오징어의 내장과 외피(색소 층) 및 연골 부분을 깨끗이 제거하고 점액질 물, 외피, 연골 및 기타이물질 등을 제거하기 위해 냉수로 세척함. 평균 5~10 mm 정도의 크기로 일정하게 절단한 다음, 원물 대비 소금농도 2%, 3%, 5%, 7%, 9% 의 식염을 각각 가하여 2시간 정도 교반한 후, 과잉의 수분과 염용성 단백질 등이 같이 유출되기 때문에 이를 제거하기 위해 광주리에 담아 수분을 자연적으로 탈수시킴. 유출수를 제거한 후 발효 용기(태화용기, 이천)에 담아 10℃에서 15 일 동안 저장하면서 시간별로 분석용 시료로 사용함.

③ 분석 방법:

- 식품공전 및 이전 실험에 따라 수분활성도, pH 등의 이화학적 특성을 측정함.
- VBN (휘발성 염기질소): 동물성 식품에서는 주로 증식한 미생물(부패세균)의 효소작용에 의해 단백질이 분해되어 아미노산으로 되고, 더 나아가 암모니아를 생성시키고, 또한 아미노산으로부터 탈카르복시에 의하여 휘발성 아민류를 생성하는데 이를 통칭해 휘발성염기질소(Volatile Basic Nitrogen, VBN)라고 함. 해산물과 같은 근육식품의 품질을 측정하는 가장 일반적인 방법임. (식육의 선도 판정 기준 마련 연구 최종보고서) 식품공전의 중화법에 의한 미량확산법을 사용하여 측정함.

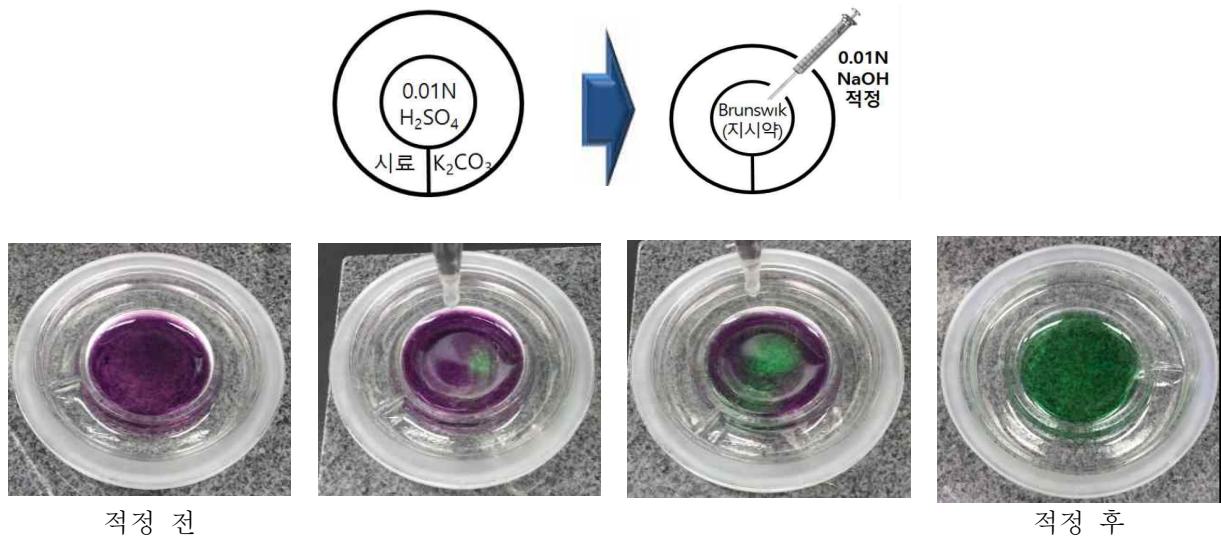


Fig. 3-1-116. VBN 실험방법

시료 10 g에 5배의 증류수를 넣고 마쇄기로 1분간 마쇄한 후 Whattman paper No.1으로 여과한 여액을 시험용액으로 사용함. Conway Dish를 사용하여 Conway수기의 내실에 0.01N- H_2SO_4 용액과 외실의 한쪽에 시료용액을 각각 1 ml씩 넣고 외실의 반대편에 포화 K_2CO_3 용액을 1 ml 넣은 즉시 덮개를 덮고 클립으로 고정 후 외실의 시료용액과 K_2CO_3 용액이 섞이도록 천천히 흔들고 25℃에서 1시간 정치한 후 내실의 0.01N- H_2SO_4 용액에 Brunswick시액 한두 방울을 넣고 0.01N-NaOH용액으로 적정함(V_1 ml). 공시험은 증류수

를 사용하여 동일한 조건에서 실험 하였으며(V_0 ml) 다음 식에 따라 계산함.

$$\text{휘발성 염기질소량(mg\%)} = 0.14 \times (V_0 - V_1) \times F \times D \times \frac{100}{S}$$

V_1 : 0.01 N-NaOH용액 적정 소비량 (ml)

V_0 : 공시험의 0.01 N-NaOH용액 적정 소비량 (ml)

F: 0.01 N-NaOH용액의 역가

D: 희석배수

S: 시료채취량 (g)

- **총균수 측정:** 시료 10 g을 0.85% NaCl의 멸균수로 희석하여 10^{-1} 을 sample로 사용함. 이와 같은 방법으로 멸균수 9 ml에 각각 10^{-1} sample에서 1 ml을 취하여 섞어 연속적으로 희석하여 각각의 sample에서 1 ml을 취하여 Tryptic Soy Agar 배지에 도말하여 37°C에서 48시간 배양하여 균체수를 측정하였음.
- **Lactic acid bacteria 측정:** 시료 10 g을 0.85% NaCl의 멸균수로 희석하여 10^{-1} 을 sample로 사용함. 이와 같은 방법으로 멸균수 9 ml에 각각 10^{-1} sample에서 1 ml을 취하여 섞어 연속적으로 희석하여 각각의 sample에서 1 ml을 취하여 MRS와 0.002%의 bromophenol 시약을 섞은 배지에 도말하여 37°C에서 48시간 배양하여 균체수를 측정하였음.
- **Yeast 측정:** 시료 10 g을 0.85% NaCl의 멸균수로 희석하여 10^{-1} 을 sample로 사용함. 이와 같은 방법으로 멸균수 9 ml에 각각 10^{-1} sample에서 1 ml을 취하여 섞어 연속적으로 희석하여 각각의 sample에서 1 ml을 취하여 Potato Dextrose Agar 배지에 도말하여 37°C에서 48시간 배양하여 균체수를 측정하였음.

(나) 실험결과 및 고찰

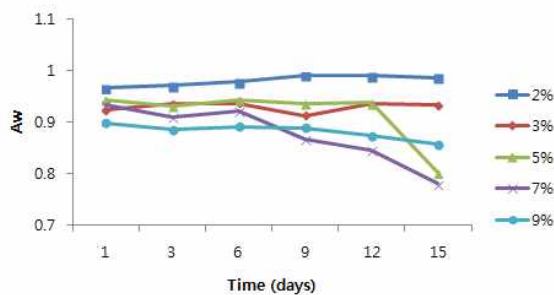


Fig. 3-1-117. 염 농도에 따른 수분활성도.

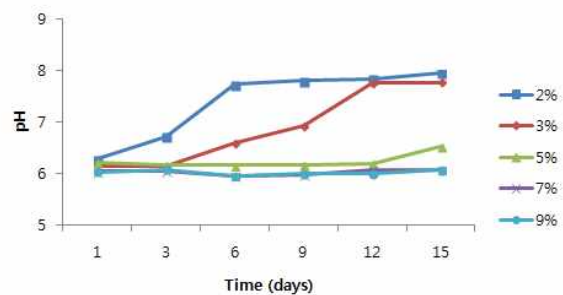


Fig. 3-1-118. 염 농도에 따른 pH.

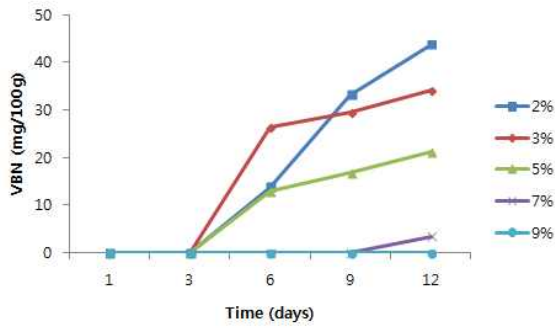


Fig. 3-1-119. 염 농도에 따른 휘발성염기질소(VBN).

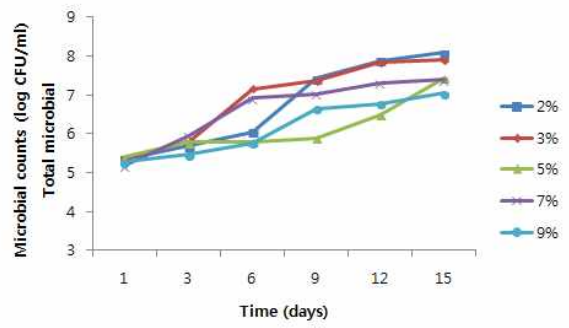


Fig. 3-1-120. 염 농도에 따른 총 균수.

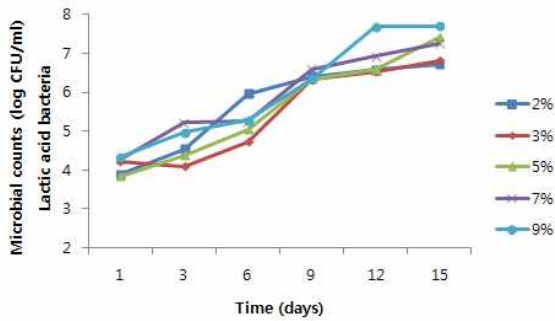


Fig. 3-1-121. 염 농도에 따른 유산균.

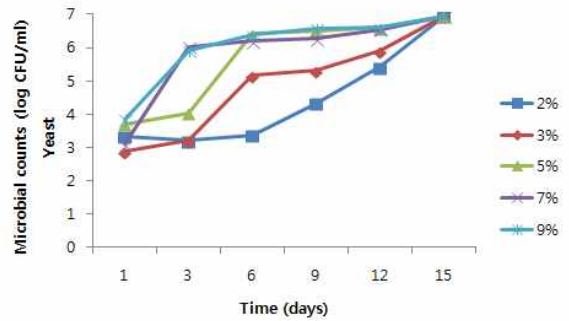


Fig. 3-1-122. 염 농도에 따른 효모.

- 염 농도가 높을수록 유출수가 많아 a_w 는 낮은 경향을 보임.
- 초기 pH는 평균 6.14 ± 0.10 이었으나 염 농도가 낮은 2%, 3%는 숙성 3일 이후 점점 증가하여 pH 8에 가까워짐. 일반적으로 발효가 되면서 유기산이 발생해 pH가 감소한다고 보고되어지고 있지만 Kim, 1993 등은 pH가 7.0 이상이 되면 상품성을 잃는다고 보고하였는데 이를 바탕으로 2%, 3%에서는 부패가 빠르게 진행됨을 알 수 있었음.
- 해산물의 부패 판정 기준인 VBN 함량은 식염 농도 2%, 3%, 5%, 7%, 및 9% 각각의 시료에서 유의적으로 차이를 나타냈으며, 식염 농도 2%, 3%, 5%에서 숙성저장 6일차부터 차이가 나타나기 시작함. 비교적 염 농도가 높은 9%에서는 숙성 12일차까지 VBN함량이 나타나지 않았음.
- 식염 농도에 따라 총 균수의 유의적인 차이가 나타남. 초기균수는 $5.32 \pm 0.09 \text{ Log(CFU/g)}$ 을 나타냈고, 숙성저장 9일차 이후 2%, 3%의 낮은 염농도를 첨가한 시료에서 10^7 CFU/g 이상을 나타냄. 식염농도 5% 이상의 시료에서 숙성저장 15일까지도 총균수가 7.9

Log(CFU/g)으로 증가했지만 비교적 완만하게 증가함.

- 유산균 수는 염 농도가 가장 높은 9%의 시료에서 숙성 15일차 7.7 Log(CFU/g)로 가장 높은 값을 나타냄.
- 효모는 염 농도가 높을수록 급격히 증가하고 염 농도가 낮을수록 완만하게 증가하여 저장 15일째에는 모든 농도에서 6.94 ± 0.04 Log(CFU/g)의 비슷한 경향의 값을 나타냄.
- 결론적으로 고춧가루, 마늘 등 각종 조미 부재료를 혼합하여 숙성시킴으로서 이들의 항균 효과와 젖산균을 비롯한 미생물에 의해서 생성된 유기산이 부패방지에 도움이 될 수 있을 것을 감안하여 **나트륨 저감화 한계치를 염농도 5%로 예측하였다.** 이는 **시중 제품 대비 20% 이상 나트륨 저감화** 목표를 달성할 수 있는 농도이다.

(3) 가압함침 기술을 적용한 저염 오징어 젓갈 시작품 제작 시험

- 저농도의 염을 사용함으로써 과다한 조미료로 인공적인 풍미를 가진 시중 제품과 달리 MSG와 같은 합성 첨가물을 배제한 저염 젓갈을 제조하고자 pressure infusion technology를 도입하여 양념 젓갈 제조기술을 개발하고자 함
- 가압함침 기술을 실시하는 고압시스템은 저염 어간장 및 짠맛증진물질의 생산기술을 개발할 때 사용하였던 동일한 장비를 사용하고, 새로운 가공기술의 개발 목적은
 - 위해 미생물의 생육을 억제하고 자가소화에 의한 가수분해를 촉진
 - 양념의 침투속도 증가에 의한 숙성시간 단축(고품질 양념 젓갈 제조)
 - 2차레에 걸친 조미 공정 단축과 교차오염을 근본적으로 차단하는 위생공정개선 등에 있다.

(㉠) 재료 및 방법

- **재 료:** 이 전 실험에서 동결고(-20℃)에 저장하여 두었던 원료를 실험 전 4℃에서 24시간 동안 해동하여 사용하였음. 각종 부재료인 고춧가루(영양 F&S(주), 국내산), 정제소금(한주(주), 국내산), 설탕(삼양사, 국내산), 다진생강(가나유통, 국내산), 다진마늘(가나유통, 국내산)등도 판교 롯데마트에서 각각 구입하여 사용함.
- **가압함침에 의한 오징어 젓갈 제조:** 원료 오징어의 내장과 외피(색소 층) 및 연골 부분을 깨끗이 제거하고 점액질 물, 외피, 연골 및 기타 이물질 등을 제거하기 위해 냉수로 세척함. 평균 5~10 mm 정도의 크기로 일정하게 절단한 다음 진공 파우치 팩에 각각 30 g의 오징어와 Table 3-1-120과 같은 배합비로 식염 및 부재료를 담아 실링기로 실링함. Table 3-1-121와 같은 조건으로 가압 처리를 한 후, 4℃에서 15일 동안 저장하면서 품질특성을 측정함. Control 군은 초고압 처리를 하지 않고 저장하면서 품질특성을 측정함.

Table 3-1-120. 부재료 배합비

성분	합량 (%)
소금	5
마늘	2
설탕	2
생강	0.5
고춧가루	4.5

Table 3-1-121 초고압 처리 조건

압력 (MPa)	시간 (min)
80 MPa	15
	30
100 MPa	15
	30

- **분석방법:** 수분활성도, pH, VBN, 총균수, Lactic acid bacteria, Yeast 등을 이 전 실험과 동일한 방법으로 측정하였음.
- **관능검사:** 가압 함침을 이용하여 제조한 저염 오징어 젓갈을 관능검사 시료로 사용하였음. 차의과학대학교 대학원생 5명을 관능검사 패널로 구성하여 맛, 냄새, 색, 텍스처, 전반적인 기호도의 5가지 항목에 대하여 9점 척도로 평가하여 제품의 관능적인 성상을 평가하였음.

(나) 결과 및 고찰

① 이화학적 특성

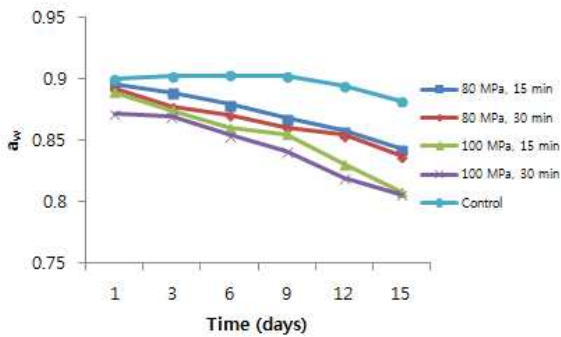


Fig. 3-1-123. 초고압 조건에 따른 a_w

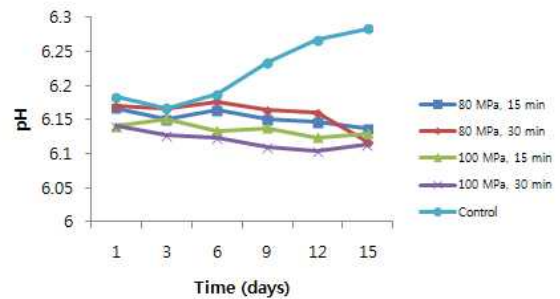


Fig. 3-1-124. 초고압 조건에 따른 pH

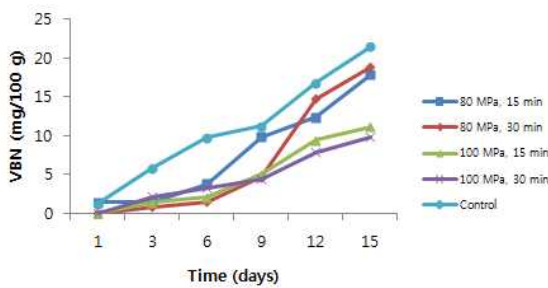


Fig. 3-1-125. 초고압 조건에 따른 VBN.

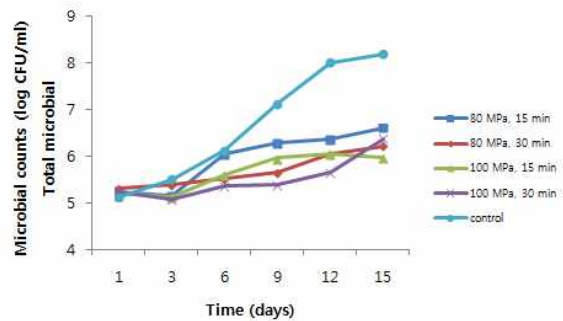


Fig. 3-1-126. 초고압 조건에 따른 총균수.

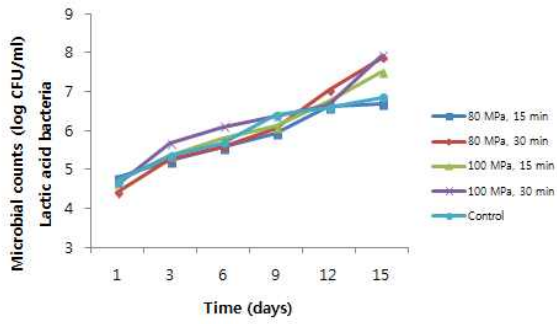


Fig. 3-1-127. 초고압 조건에 따른 유산균.

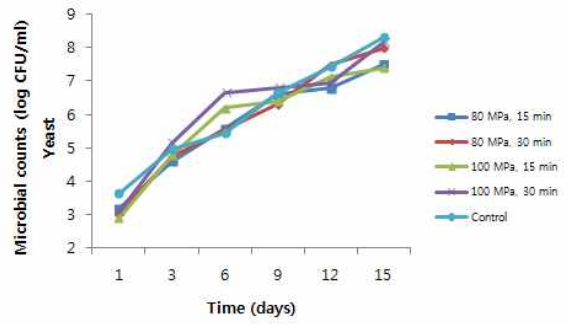


Fig. 3-1-128. 초고압 조건에 따른 효모.

- a_w 는 압력이 높고 시간이 길수록 더 많이 감소하는 경향을 보임.
- 시간이 지날수록 control군은 pH가 증가하고, 초고압처리를 한 시료들은 $6.12 \pm 0.01 \sim 6.15 \pm 0.02$ 의 범위를 보이고, 압력이 높고 시간이 길수록 pH 6.11 ± 0.01 의 제일 낮은 경향을 보임에 따라 다른 조건군에 비해 유기산이 많이 발생함을 알 수 있었음.
- 휘발성염기질소(VBN)은 control 군이 저장기간 동안 제일 급격하게 증가하여 숙성 15일 차 21.50 mg의 가장 높은 값을 나타냈고, 압력이 낮고 시간이 짧을수록 빠르게 증가하였음.
- 총균수는 초기 $5.21 \pm 0.06 \text{ Log(CFU/g)}$ 이었으며, 예상대로 control군이 가장 급격하게 증가하여 저장 15일째 10^7 CFU/g 을 초과하였고, 압력이 낮고 시간이 짧을수록 높은 경향을 보이고 유산균과 효모는 압력이 높고 처리시간이 길수록 높은 경향을 보임.

② 관능검사

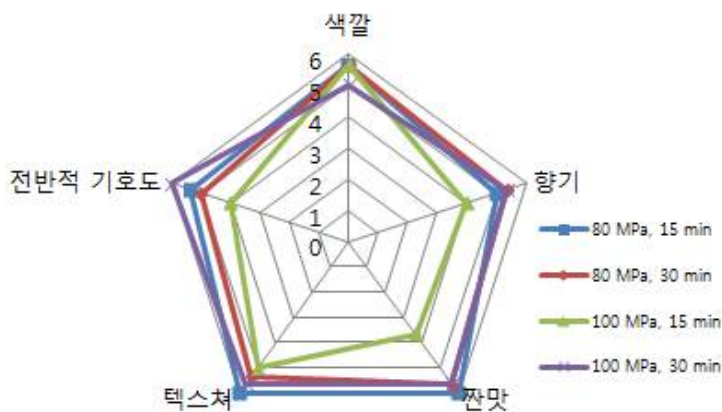


Fig. 3-1-129.

저장 15일째 기호도 검사

○ 색, 향기, 짠맛 및 텍스처는 평균적으로 비슷하지만, 100 MPa에서 30분 가압처리를 한 시료가 전반적 기호도가 6점으로 가장 높았음

○ 결론적으로,

- 소금 함량 5%로 오징어 양념젓갈 시작품을 제조함으로써 나트륨 저감화 목표는 달성되었다. 뿐만 아니라 가압 처리 후 숙성 6일 이후에는 수분활성도의 목표치인 0.85 이하로 떨어짐에 따라 저장 기한의 연장도 가능할 것으로 판단 되었다.
- 압력이 높고 처리시간이 길수록 pH는 낮아져 유기산이 많이 발생하고 유산균과 효모는 증가하나 총 균수는 적음이 확인되어 위해 미생물의 생육은 억제되고 유용미생물은 생육 가능성을 확인하였으나 자가소화에 의한 가수분해를 촉진하는 효과를 측정할 수 있는 시험을 하지 못하였다. 그러나 가압함침 기술 도입의 가능성은 확인할 수 있었다.
- 관능검사 결과, 압력이 높고 처리시간이 길수록 부재료의 infusion 효과가 높아 숙성 발효 및 풍미증진에 도움을 줄 수 있음을 확인하였고 처리시간이 길어야 30분으로 숙성시간 및 제조시간의 단축 가능성은 분명하였다. 뿐만 아니라 제조 공정이 batch 및 close system으로 교차오염은 근본적으로 차단되는 공정이므로 위생적, 주문생산이 가능하리라 판단된다.
- 최고의 품질 제품을 제조하기 위해서는 가압함침 공정에 대한 최적화가 필요하다.

(4) 가압함침 기술을 이용한 APH 첨가 저염 오징어 젓갈 시작품 제조

○ 소금의 풍미증진 효과를 APH로 대체 가능성 및 나트륨 저감화 가능성을 검토하기 위하여 소금의 일부를 APH로 대체하여 가압함침에 의한 오징어 젓갈 시작품을 제조하고 품질 특성을 분석하였다.

(가) 재료 및 방법

○ 오징어는 이 전 실험과 동일한 원료를 사용하였고, APH는 3차 pilot scale 시험생산에서 제조한 SD 분말을 사용하였다.

Table 3-1-122. 부재료 배합비

성분	함량 (%)
마늘	2
설탕	2
생강	0.5
고춧가루	4.5

Table 3-1-123. APH와 식염의 배합비

	NaCl (%)	APH (%)
Control	5	
50%	4.8	2.5
100%	4.5	5

○ 오징어 젓갈 제조: 원료 오징어의 내장과 외피(색소 층) 및 연골 부분을 깨끗이 제거하고 점액질 물, 외피, 연골 및 기타 이물질 등을 제거하기 위해 냉수로 세척함. 평균 5~10

mm 정도의 크기로 일정하게 절단한 다음 진공 파우치 팩에 30 g의 오징어와 표 .와 같은 배합비로 부재료와 Table 3-1-122과 Table 3-1-123의 배합비로 식염과 분말 형태의 APH를 담아 실링기로 실링함. 100 MPa에서 30분 동안 초고압처리 후 4°C에서 15일 동안 저장하면서 품질특성을 관찰함.

○ 품질특성의 측정은 이 전 실험과 동일한 방법으로 실시함.

(나) 실험결과 및 고찰

① 이화학적 품질특성

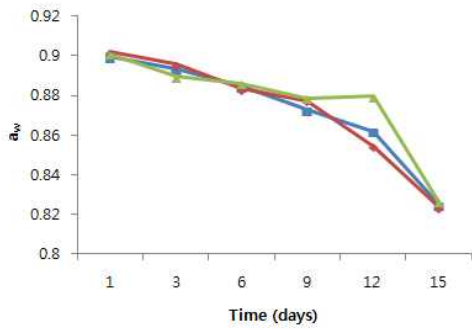


Fig. 3-1-130. APH 배합비율에 따른 a_w .

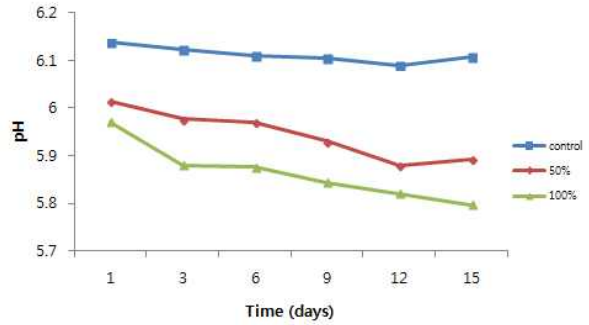


Fig. 3-1-131. APH 배합비율에 따른 pH.

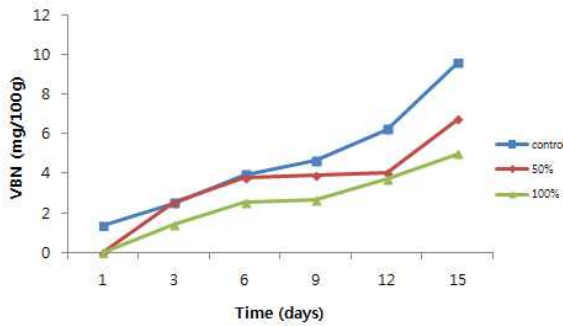


Fig. 3-1-132. APH 배합비율에 따른 VBN.

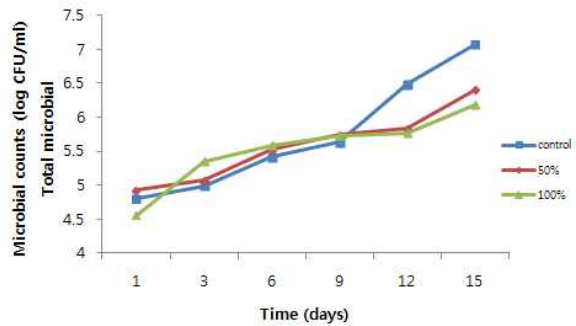


Fig. 3-1-133. APH 배합비율에 따른 총균수.

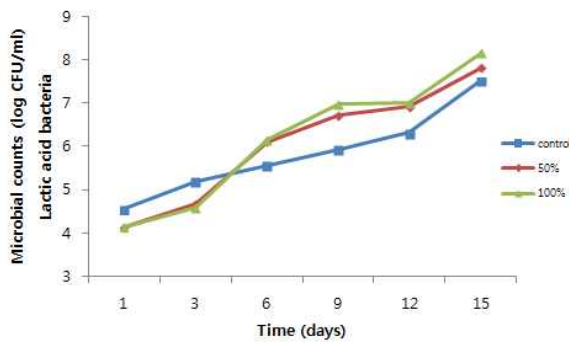


Fig. 3-1-134. APH 배합비율에 따른 유산균.

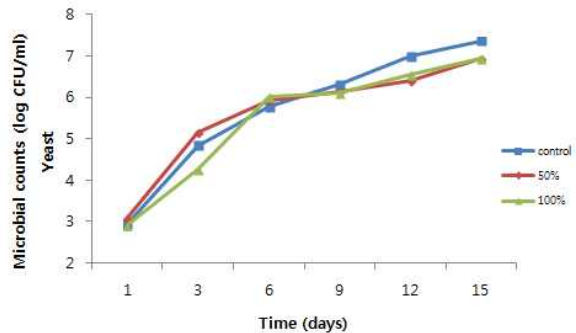


Fig. 3-1-135. APH 배합비율에 따른 효모.

- 초기 a_w 는 평균 0.90으로 세 조건 모두 비슷한 경향으로 감소하여 저장 후 6일 이후로는 0.85 이하로 목표치를 달성함.
- pH는 저장기간 동안 비슷하게 유지하였으나, APH를 더 많이 첨가한 시료에서 5.79~5.97 사이로 가장 낮은 값을 유지함. 이는 유기산의 증가로 인하여 pH가 낮아지며 발효가 일어나는 것으로 예상됨.
- VBN(휘발성염기질소)는 세 조건 모두 증가하는 경향을 보였으나, control군이 가장 급격하게 증가함을 보였음.
- 총 균수는 $4.76 \pm 0.19 \text{ Log(CFU/g)}$ 이었으며, 예상대로 control군이 저장 9일 이후 가장 급격하게 증가하여 12일 이후 10^7 CFU/g 을 초과하였고, APH를 첨가한 조건들은 비슷한 증가 경향을 보였지만 APH를 100%로 넣은 조건에서 가장 낮은 균수를 나타내었고 효모는 모두 비슷한 경향을 보였지만, 유산균은 APH를 첨가한 조건에서 더 많은 균들이 자람.
- 숙성 6일차 이후 Fig. 3-1-134에서 보이는바와 같은 균들이 자라 (주) 솔젼트에 미생물 동정을 맡긴 결과 장류나 젓갈류 발효에 관여하는 *Bacillus subtilis* 균이 자라고 있음을 확인함에 따라 발효가 잘 되어지고 있다고 예상됨.



Fig. 3-1-136. 숙성 6일 이후 나타난 *Bacillus subtilis* 균주.

② 관능검사

- 저장 15일 째 짠맛 증진 소재를 가장 많이 첨가한 시료에서 다른 조건들에 비해 색, 향

기, 짠맛 및 모든 기호도 평가에서 높은 평가를 받음.

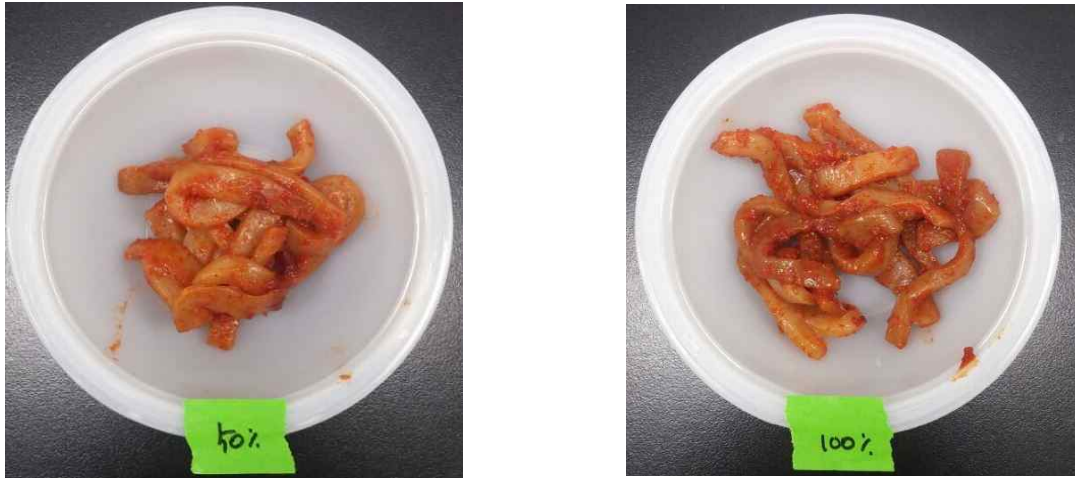


Fig. 3-1-137. 저장 15일 후 제품 사진

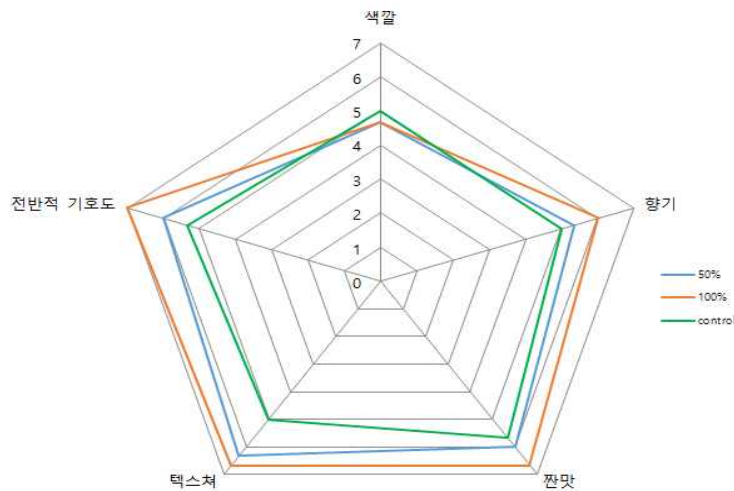


Fig. 3-1-138. 저장 15일째 기호도 검사

- 결론적으로, APH를 소금을 대체하여 약 10%의 나트륨을 더 저감화 할 수 있음을 확인하였고, APH 첨가량이 많을수록 풍미증진효과도 증진됨을 알 수 있었다.

라. 결론

- 양념 젓갈 제조 시 salt의 critical concentration은 약 5%인 것으로 확인됨.
- 5%의 염농도로 오징어 양념 젓갈 시작품을 제조함으로써, 양념 젓갈 제조 공정에 가압함

칩기술이 성공적으로 개발됨.

○ 성공적 개발 근거 :

- 염농도 5%로 저염 오징어 젓갈 제조 (염농도 목표치가 7~10%로서 환산하면 나트륨 저감화 29~50% 달성 → 저감화 총괄 목표인 20% 나트륨 저감화를 초과 달성)
- 제조시간 단축 및 유통기한 연장 가능성 확인
- **위해 미생물의 생육 억제 확인**
- 침투효과 확인 (marination effect)
- APH로 소금을 대체하여 10%의 저감화 효과 확인 및 풍미증진 효과 확인
- 다품종 소량 생산 및 위생적인 공정으로 확인됨

8. 염미증진제 개발 가능성 탐색

- 3차 시험 생산에 의해서 제조된 APH를 제1협동 위탁에 의뢰하여 Lab on a chip에서 짠맛증진소재 신속 탐색 가능성을 확인(별첨 4-3 마. **짠맛센서 칩을 이용한 ENaC 세포 (HepG2)-짠맛 증진후보물질 효능 확인 실험**을 참고)
- 가능성은 확인되었지만 HTS의 기능을 충족하기에는 미흡하여 동물성 단백질 고압효소가 수분해물의 짠맛증진효과 탐색은 중단
- 본 과제에서 개발한 APH는 현재 기술이전 및 사업화를 진행하기 위하여 고압시스템을 장착하는 Toll processing plant를 구축하는 (주)이노웨이와 전략적 제휴를 체결하여 판매처가 확보되면 바로 생산할 수 있도록 준비를 하고 있다. 이 공장은 2017년 말 또는 2018년 초에 완공될 예정으로 사업이 진행되고 있다.
- (주)이노웨이에서는 비육우에서 고압효소분해기술을 활용하여 제조한 2가지(소고기 및 돼지) eHAP을 기증하여 탐색용 시료는 확보됨.

9. 연구개발성과

- 기술개발
 - 고압을 이용하는 효소가수분해기술의 개발: 기술완성도- 기술개발완료 및 실용화 단계
 - 가압침침기술(pressure impregnation technology)의 개발: 기술완성도- 기술개발완료
 - 공정 개선에 의한 나트륨 저감화 기술 개발: 본 과제 목표인 20% 저감화를 초과 달성 하였으며, 현 생산 공정에 바로 적용 가능(공개 기술이전 추진 중)
- 나트륨 저감화 목표 달성을 위한 소재 및 제품 개발
 - 짠맛 및 풍미증진소재(APH)의 개발 및 대량 생산 공정 개발
 - 저염 어간장 시제품 제조(salt concentration: 3~20%, **sodium reduction: 기존 어간장 대비 약 19~40% ↓**) 및 대량 생산 공정 개발

- APH활용 짠맛 및 풍미증진 효과를 지닌 액상 소스 및 복합조미식품 base 시작품 개발
- Base를 활용한 액상 소스(sodium reduction: 90% ↓) 및 복합조미식품(sodium reduction: 0.1% ↓, 풍미증진효과 탁월) 시작품 개발
- 저염(5%)의 양념 젓갈(오징어젓) 시작품 제조(sodium reduction: 29~50%) 및 공정 개발

가. 특허성과

연번	연도	특허명	출원/등록번호	국내외 구분	구분
1	2014	천연 염미 증진제 및 그 제조방법	10-2014-0137892	대한민국	출원
2	2016	저염 어간장 및 그 제조방법	10-1655540	대한민국	등록
3	2013	나노입자성 저염 건식소금 및 그 제조방법	10-1522774	대한민국	등록
4	2016	저염 건면의 제조방법 및 이에 따라 제조된 저염 건면	10-2014-0195281	대한민국	출원

나. 논문게제 성과

(1) SCI 논문게제 성과

연번	게제 연도	논문명	저자			학술지명	Vol (No.)	국내외 구분	SCI 구분
			주저자	교신저자	공동저자				
1	2014	Effect of partial substitutions of NaCl with KCl, CaSO ₄ on on the Quality Characteristics and Sensorial Properties of Pork Patties	Munkhtugs Davaatsuren	최미정	천지연 조형용 민상기	Korean Society for Food Science of Animal Resources	34(4)	국내	SCI
2	2014	Effects of NaCl Replacement with Gamma-Aminobutyric acid (GABA) on the Quality Characteristics and Sensorial Properties of Model Meat	천지연	최미정	김병수 이중규 조형용 민상기	Korean Society for Food Science of Animal Resources	34(4)	국내	SCI

		Products							
3	2014	Effect of NaCl/Monosodium Glutamate (MSG) Mixture on the Sensorial properties and Quality Characteristics of Model Meat Products	천지연	최미정	김병수 이중규 조형용 민상기	Korean Society for Food Science of Animal Resources	34(5)	국내	SCI
4	2015	Effect of Spray-Drying Process on Physical Properties of Sodium Chloride/Maltodextrin Complexes	조형용	최미정	김병수 천지연	Powder technology	277	국외	SCI
5	2016	Changes of Enzymatic Susceptibility of Wheat Gluten after Subcritical Water Treatment	황윤희	조형용	황윤희 김고래 신정규 이석훈 변유량	Food Science and Biotechnology	(투고)	국내	SCI

(2) 비SCI 논문게재 성과

연번	게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol (No.)	국내외 구분	SCI구분
			주저자	교신저자	공동저자				
1	2015	시판 액젓 및 간장으로부터 짠맛 증진물질의 생산 가능성 연구	윤희선	조형용	박한설 이미연 신정규	산업식품공학회지	19(2)	국내	비SCI
2	2015	아임계수를 이용한 분리대두단백질의 가수분해	황윤희	신정규	조형용 김고래 이석훈	한국식품과학회지	47(6)	국내	비SCI

					최미정				
3	2015	양조건장을 이용한 셸러트 드레싱의 나트륨 감소 연구	박한설	신정규	조형용	산업식품공학회지	19(2)	국내	비SCI
4	2016	양조건장을 이용한 식품 내 나트륨 감소 효과 연구	박한설	신정규	조형용	한국식품과학회지	47(4)	국내	비SCI
5	2016	고압 조건에서 멸치가수분해물 제조를 위한 산업용 단백질 분해효소의 선별	인예원	조형용	윤효선 방은 이화진 이미연	산업식품공학회지	20(2)	국내	비SCI
6	2016	멸치 가수분해물이 건면 짠맛에 미치는 영향	이지선	최미정	조형용 이미연 고은영 신정규	산업식품공학회지	20(1)	국내	비SCI
7	2016	묘사분석을 통한 멸치 단백질 효소가수분해물의 관능적 특성	윤소정	신정규	윤소정 김진선 조형용 신정규	산업식품공학회지	20(2)	국내	비SCI
8	2016	리포솜으로 코팅된 소금이 국수의 짠맛에 미치는 영향	이지선	최미정	이미연 조형용	산업식품공학회지	20(2)	국내	비SCI
9	2016	5 kDa 미만의 oligopeptide가 건면의 짠맛에 미치는 영향 분석	이지선	최미정	조형용	산업식품공학회지	20(3)	국내	비SCI
10	2016	다구찌 기법을 이용한 멸치 고압효소가수분해 공정의 최적화	인예원	조형용	윤효선 이유진 이미연	산업식품공학회지	(투고)	국내	비SCI
11	2016	Pilot plant scale 중고압장치를 이용한 멸치의 효소적 가수분해	이화진	조형용	방은 이선영 인예원	산업식품공학회지	(투고)	국내	비SCI

나. 학술발표성과

연번	발표일자 (년.월.일)	발표논문명	행사명	행사 장소	구분	영문 국문
1	2013.08.30	Enzyme selection for producing fish protein hydrolysates with low bitterness under	제 80차 한국식품과학회 국제학술대회	천안	국내	영문

		pressurization				
2	2013.08.30	Optimization of enzymatic hydrolysis of unsalted fish protein under pressurization by means of a taguchi robust design method	제 80차 한국식품과학회 국제학술대회	천안	국내	영문
3	2014.08.27	Feasibility Study for The Production of Salt Taste-active Compounds in Pressure-assisted Enzymatic Hydrolysates of Anchovy	제 81차 한국식품과학회	강릉	국내	영문
4	2015.06.04	Development low salted fish sauce pressure assisted enzymatic hydrolysate of anchovy	제 82차 한국식품과학회 국제학술대회	부산	국내	국문
5	2016.07.18	Optimization of pressure assisted enzymatic hydrolysis of raw anchovy for producing salt enhancer	83차 한국식품과학회 국제학술대회	대구	국내	영문

라. 인력활용/양성

기준년도	인력양성 현황										
	학위별				성별		지역별				
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
2014-2016		3				3	3				

마. 홍보활동

연번	홍보일	내용	홍보기관
1	16.08.09	저염 건식 소금 제조 특허 (나노 입자성 저염 건식 소금 및 그 제조 방법) 소개	2016 농식품 유망기술 발표회 (농림축산식품부)

바. 타 연구개발사업에의 활용

번호	연구사업명	과제명	책임자	과제발주처 (부처)	활용년도
1	고부가가치식품기술개발사업	고령층 영양섭취 및 면역증진을 위한 시리얼 및 곡물 유동식 제품 개발 (제 1세부 위탁)	조형용	농림수산식품기술기획평가원	2014-2016
2	고부가가치식품기술개발사업	유기가공식품용 첨가물 소재 및 수출 전략상품 개발 (제 1세부 위탁)	조형용	농림수산식품기술기획평가원	2015-2017

10. 연구결과

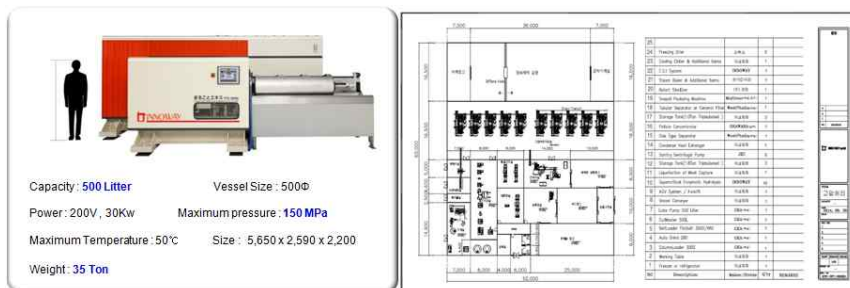
가. 기술적 성과

○ 고압을 이용하는 효소가수분해기술

- 본 기술개발에 활용된 고압시스템은 현존 초고압 시스템과는 제조 방식이 다르며(처리 용기, intensifier head emd), 압력은 낮지만 장시간 운용할 수 있는 세계 최고기술로 평가되며, 이를 이용한 효소가수분해기술 역시 일본과 한국이 산업화를 위해서는 세계 최고 수준이며 국산화율 90% 이상으로 사료됨.
- 현재 장비를 제작하는 (주)이노웨이에서는 본 연구진이 개발한 기술과 자체개발한 기술을 적용하는 Toll processing plant를 구축 중에 있으므로 빠른 시간 내에 생산시스템도 완성되리라 예상됨.
- 본 기술로 제조되는 APH는 활용 가능성이 매우 많아, 사업화 가능성도 매우 큼.
- 현재 (주)대상과는 본 소재를 활용하여 유기농 소스를 개발하는 과제를 진행하고 있으며, (주)폴무원 및 (주)지보당과 활용 가능성에 대한 시험을 진행하고 있음
- 참고로 구축 예정인 Toll processing plant의 조감도와 내부 개념 설계를 Fig. 3-1-137에 제시함.



(a) 조감도



(b) 내부 개념 설계도

Fig. 3-1-139. 구축 예정인 Toll processing plant

- 가압함침기술(pressure impregnation technology)
 - 세계 최고 기술의 고압 시스템 제조기술로 제작된 장비를 활용하여 새로운 활용 기술을 개발
 - 일본 및 국내(본 연구팀)가 세계 최고 수준
 - 기술완성도 - 기술개발완료 단계임
- 공정 개선에 의한 나트륨 저감화 기술 개발
 - 국내 최고의 나트륨 저감화 (저염 어간장, 저염 소스 및 양념 젓갈)
 - 기술이전을 통하여 바로 현장에 적용되기를 바램

나. 경제성 성과

- 참여기업인 (주)대영수산식품에서 구체적인 사업화성과 및 매출실적을 창출하지는 못함. 본 기술 및 제품은 소재에 해당되므로 소재를 필요로 하는 구매업체와의 계약이 먼저 진행되어야 사업화성과 및 매출실적을 창출할 수 있어, 시제품을 생산하여 (주)풀무원, (주)대상 및 (주)지보당 등에 Fig. 3-1-140과 함께 제시하여 협업 및 구매 가능성을 타진하고 있으므로 구체적인 사업화성과 및 매출실적의 창출을 기대하고 있음.
- 공개 기술이전을 통하여 가공업체의 나트륨 저감화에 일조 ⇒ 소금 사용량을 줄여 국민 건강 증진에 이바지하여 의료비 감소 등을 예상함

1. 3년 또는 5년 숙성된 멸치어간장 (대영수산)

2. 멸치를 원료로 하는 고압가수분해물 : 풍민증진소재 및 저염어간장으로의 사업화

	액상	분말	-멸치 원료 확보 -제조공정 및 제조라인 확보 -사업화를 위해서 좀 더 연구를 진행 시켜야 할 내용 Sensory test, Bitter taste, Aggregation, 색깔, Salt or Nitrogen (%) variation, Powdering (부형제), 소재, 저염어간장 및 저염간장의 포장 등
제품사진			
시료명	멸치고압가수분해물(APH)		
원재료	생멸치, 염, Protease(Alcalase 2.4 L, Flavourzyme)		
이화학적 분석결과	Salt(%) 0.79 TN(%) 1.28~ 1.44 조단백질(%) 8~9 pH: 6.53	Salt(%) 9.32~9.39 조단백질(%) 71.80~72.3 수분활성도 0.230~0.246 수율(%) 73.62~74.87	

3. 멸치를 원료로 하는 고압가수분해물 이용 : 복합조미료 또는 소스나 드레싱류의 사업화

복합조미식품				Sauce & Dressing			
							
멸치분말	혼다시	나물오염 매운편맛	맛선생 해물	생표 만능육수	해물피어 소스	국수장국	수리 깻타이 소스
수산물 가공품	복합 조미 식품	복합 조미 식품	복합 조미 식품	소스류 (살균제품)	소스류 (살균제품)	소스류 (살균제품)	소스류 (살균제품)
> 공동연구 진행 과제 ▪ Salt(%) Variation ▪ N(%) 및 formulation 조절 ▪ 부형제 조절				> 공동연구 진행 과제 ▪ Formulation ▪ Critical salt conc. ▪ W ₁ /O/W ₂ 또는 W/O/W			
							

4. Table salt : APH 또는 GABA를 coating

5. 기존 제품의 저염화 방안

Fig. 3-1-140. 구매 및 협업 요청 내용.

제 2 절 관능검사를 활용한 짠맛 증진 물질의 HTS 스크리닝 기법 개발 및 짠맛 평가 방법 확립

1. 관능검사 요원의 선발 및 훈련

가. 선발 절차

- 관능검사를 활용한 짠맛 증진 물질의 탐색을 위한 관능검사 요원을 선발하기 위하여 다음과 같은 지침에 의하여 모집·선발하였음.

(1) 관능검사 지원자의 자격요건

- 전주대학교 한식조리학과 1-3학년 재학 학부생으로 남성·여성 모두 지원 가능하게 하였으며, 4학년의 경우 졸업학기로 관능검사 요원 활동기간이 짧음으로 교육, 훈련 후 활용이 불가능 하여 관능검사 요원 선발에서 제외하였음.
- 월 2회 이상 참석이 가능하고, 12-24개월 이상 지속적으로 참석이 가능하며, 관능평가에 관심이 있고 맛에 대한 기본 지식 및 감각을 가지고 있는 학부생을 대상으로 하였으며, 군 입대를 앞둔 자의 경우 1년 이상 요원 활동이 불가능한 경우 선발 대상에서 제외하였음. 흡연자 및 심한 음주자 또한 흡연자 및 심한 음주자는 관능평가 요원 선발 자격대상에서 제외하였음.

(2) 관능검사 요원 모집인원

- 관능검사 요원 선발인원은 개인적 사유로 불참자가 있을 수 있을 것을 고려하여 실제 활용할 20명 보다 많은 25-30명으로 제한하였음.

(3) 관능검사 요원 선발을 위한 테스트 진행 절차 및 내용

- 위의 관능검사 지원자의 자격 요건을 충족한 자를 대상으로 기본 맛 인지(認知) 검사와 순위 강도 검사를 진행하였음. 기본 맛 인지(認知) 검사는 Sucrose 용액을 이용한 단맛 인지(認知), NaCl 용액을 이용한 짠맛 인지(認知), Water를 이용한 무미 인지(認知) 검사를 실시하였음.
- 관능검사 시 제공되는 모든 시료에는 시료의 번호에 다른 편견이 없도록 임의의 난수를 이용하여 구분하였고, 시료를 담는 종이컵은 무색의 종이컵을 사용하여 색이나 무늬에 의한 오차가 없도록 하여 진행하였음.
- Sucrose용액은 설탕물 0.40% 농도로 준비하였고, NaCl용액은 소금물 0.05%로 관능검사 테스트를 진행하였으며, 인지(認知)한 맛을 짠맛, 단맛, 무미로 구분하여 기술하도록 하였음.

- 무미 및 모든 시료 제조에는 제주특별자치도 개발공사에서 제조하고, (주)광동제약에서 판매하는 제주 삼다수를 이용하였음. 실험 전 4가지의 물을 이용하여 선발대상자 전원에게 맛을 보게 한 결과 무미에 가깝게 느껴지는 물이 제주 삼다수로 선택되어 모든 시료 제조 및 입을 행구는 용도의 물 모두 제주 삼다수를 사용하였음.

Table 3-2-1. 각 회사별 물의 인지(認知) 맛

상품명	제주 삼다수	초이스엘 생수	백산수	롯데 아이시스
인지(認知) 맛	무미	이온 맛, 짠 맛	짠 맛	단 맛

- 순위 강도 검사에는 삼육식품의 삼육두유A를 사용하여 시료제조를 하였음. 두유에 NaCl을 넣어 0.05%, 0.08%, 0.12%, 0.15%의 용액을 제조 하여 순위를 맞추도록 하였으며, 짠맛이 강한 시료를 1위로 정하도록 하고 짠맛이 가장 약한 시료를 4위로 정하도록 하였음.
- 짠맛 순위 강도 검사에서 삼육두유A를 사용한 것은 현재 CJ의 관능검사 패널 선발 시 사용하는 방법으로 식품 내에 첨가된 소금의 함량을 구분 할 수 있는가를 확인하기 위하여 두유를 선정하였으며, 두유 중에서도 단맛이나 다른 맛이 첨가되지 않은 삼육두유A를 시료 제조에 사용하였으며, 이상과 같은 테스트를 통해 기본 맛을 인지(認知) 하지 못하는 자는 선발 인원에서 제외하였음.
- 기본 맛 인지(認知) 검사는 각 항목 10점씩 배점 하였으며 순위 강도 검사는 각 항목 5점씩 배점하여 총 50점 만점으로 평가를 실시하였음. A⁺는 45-50점, A는 40-45점, B⁺는 35-40점, 40점 미만은 B으로 기준을 정하여 A⁺- B 이상의 점수를 획득한 자를 최종 관능검사 요원으로 선발하였음.

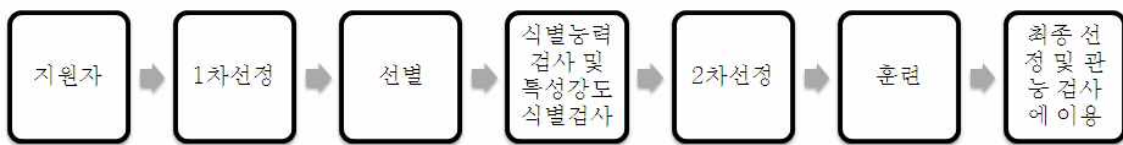


Fig. 3-2-1. 관능검사 요원 선발 Flow Chart.

나. 관능검사 요원의 교육

- 관능검사 요원들의 관능검사에 대한 이해와 기초적인 지식 습득을 위하여 (주)푸드윌텍에 관능검사 실무과정을 의뢰하여 실시하였음.

(1) 관능검사 요원의 교육 목적

- 관능검사의 필요성을 인식하고 패널 선정 및 관능검사에 관한 기본 지식을 습득하며, 관능검사법을 세부적으로 이해하고, 활용에 필요한 능력을 배양한다. 또한 관능검사 기본

지식 습득을 통하여 HTS 체계 확립 시스템을 제대로 이해하고 활용할 수 있도록 하는데 목적이 있음.

(2) 교육 주요 내용

- 식품 관능학 개요, 관능검사 영향요인 및 패널 선정법, 관능검사법, 차이식별검사, 소비자 검사 등

(3) 관능검사 교육 후 이해도 변화

- 관능검사 교육 후 교육에 대한 내용 및 종합적 이해도를 조사한 결과 대부분의 Panel이 교육 전 보다 이해도가 향상된 결과를 보였음.(높음 이상 80.0%)
- 교육은 이론 강의와 실습을 같이 병행하여 향후 관능검사에 임하는 태도와 기본적 지식을 실질적으로 익히도록 하였으며 교육결과 높은 이해도 변화를 보였음.
- 세부 설문결과 학생들이 직접 실습을 해봄으로서 현장 업무를 이해하는데 효과적이었으며, 반복적인 질문에 의해 이론에 대한 이해도를 더욱 높일 수 있었다고 판단됨.

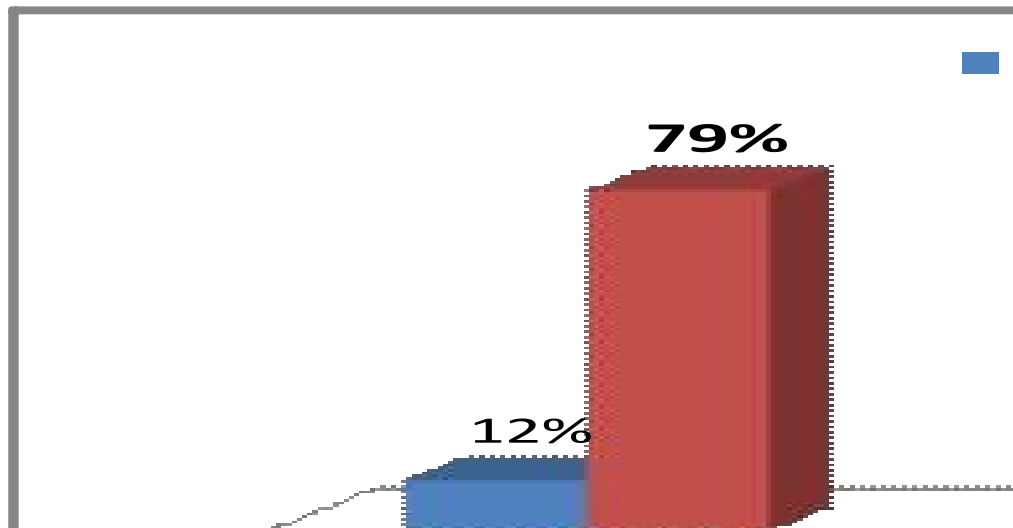


Fig. 3-2-2. 관능검사 교육 후 관능검사에 대한 이해도 변화.



Fig. 3-2-3. 관능검사 및 평가 교육·훈련 모습.

다. 관능검사 요원의 훈련

(1) 관능검사 요원 훈련 방법

- 관능검사 요원의 선발 테스트를 거친 후 최종합격자를 대상으로 훈련을 진행하였음.
- 최종합격자는 관능검사 실시 시 개인적 몸 상태나 개인적 사유로 인한 불참자를 고려하여 예정인원 20명의 1.5배수인 30명을 선발하였으며, 훈련은 매주 월요일, 화요일에 수업이 없는 공강 시간을 이용하여 같은 시간에 훈련이 이루어 질 수 있도록 하였음.
- 관능검사 요원 훈련 시료는 짠맛에 대한 인지능력을 극대화하기 위하여 농도별 NaCl용액을 매 회 새롭게 제조하여 사용하였으며, 훈련 시 소금물의 농도 차이를 넓게 한 A 단계부터 시작하여 차츰 시료수를 늘려가면서 농도와 간격을 좁혀가면서 단계를 올리는 방법으로 수행하였음.
- A-E 단계의 차이는 순위 강도를 평가해야 하는 시료의 수를 4개에서 최대 12개까지 증

가시킴으로써 농도의 차이가 10-20 mmol 간격에서 단계를 높여감에 따라 5 mmol 간격으로 줄어드는 형태로 진행하였음.

- 첫 훈련에는 30 mmole, 50 mmole, 60 mmole, 80 mmole 4가지의 시료를 제공하고 순위 강도를 표시하도록 하였으며 3회 반복 이상 모든 항목의 순위를 정확하게 인지하는 요원들에 한하여 다음 단계인 B단계로 훈련을 진행하였음.
- 각 단계별 시료수와 시료의 소금농도는 다음과 같음.

Table 3-2-2. 관능검사 Panel 훈련에 사용된 단계별 시료

단계	시료수	소금 농도 (mmol)
A	4	30, 50, 60, 80
B	6	30, 40, 50, 60, 70, 80
C	8	30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80
D	10	30, 35, 40, 35, 50, 55, 60, 65, 70, 80
E	12	25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80

- 최종 E단계 까지 모든 관능검사 Panel을 훈련시키는 데에는 3개월이 걸렸으며, 최종훈련 결과 30명 중 3명만이 2-3가지의 순위를 혼동하였고, 정답률이 90% 이상으로, 선발관능검사 Panel의 짚맛에 대한 인지 능력을 갖춘 것으로 판단되어 다음으로 관능검사 연구를 수행함.



Fig. 3-2-4. 관능평가 훈련 수행 모습.

2. 짠맛 및 향미 증진 기능 평가 프로토콜 구축

가. 짠맛 강도 및 기각한계 측정

- 기각한계 설정 연구는 짠맛을 인지할 수 있는 최소농도를 찾기 위한 최소기각한계와 짠맛의 차이를 구분할 수 있는 차이한계에 대한 연구를 진행하였음. 같은 농도의 소금이 함유된 식품의 섭취 시에도 인체 내에서 감지되고 인지되어지는 현상이 개인별로 큰 차이를 나타내는 것은 짠맛에 대한 감지 및 인지 메커니즘이 유전체학적인 요인에 의해 영향을 받는 것보다 습득된 경험에 의해 더 큰 영향을 받기 때문이라는 보고(Wise 등, 2007)에 착안하여 차이 한계에 따라 소금의 양을 조금씩 줄여가면서 최소기각 한계치까지 소금의 양을 줄인다면 sodium 함량을 보다 효율적으로 줄일 수 있을 것이라 생각하여 연구를 진행하였음.

(1) 최소 기각한계치 설정 연구

- 최소기각 한계 설정 : 관능검사 Panel들을 활용하여 짠맛을 인지(認知) 할 수 있는 NaCl 용액의 최소농도를 구하기 위한 관능검사를 수행하였음.
- 관능검사 요원들이 시료의 맛을 보고 인지(認知) 되는 용액의 느낌 정도를 설문지에 표시하도록 하였음. 설문지의 내용은 ① 물과 같다 ② 순수한 물은 아닌 것 같다 ③ 매우 약간 맛이 있으나 무슨 맛인지 모르겠다 ④ 매우 미미한 짠맛이다 ⑤ 미미한 짠맛이다 ⑥ 약한 짠맛이다 ⑦ 분명한 짠맛이다 로 하였으며, 4번 매우 미미한 짠맛이다 부터 짠맛으로 인지하는 답변 영역으로 정하였음.
- 처음 시료의 농도는 관능검사 훈련 시 사용하였던 NaCl 용액의 농도보다 5 mmol 낮은 20 mmol부터 5 mmol 단위로 낮추어 물 2병과 5 mmol, 10 mmol, 15 mmol, 20 mmol 용액을 시료로 준비하여 기각한계치 설정 연구를 시작하였음.
- 첫 회 기각한계치 설정 관능검사 후 10 mmol 부근에서부터 짠맛으로 인지(認知)하는 4번 답안이 발견되어 시료의 농도를 2.5 mmol, 5 mmol, 10 mmol, 15 mmol로 조정하고 물을 포함한 시료 각각 4개씩 동일하게 준비하여 총 20가지의 시료를 이용 하여 기각한계치 설정 관능검사를 진행하였음.
- 2회차 기각한계치 설정 관능검사 결과 에서도 역시 10 mmol이 짠맛 인지(認知) 영역으로 나타났으나, 5 mmol 과 10 mmol NaCl용액 사이에서 기각한계치가 있을 가능성을 염두 3회차에는 5 mmol, 7.5 mmol, 10 mmol, 15 mmol, 물을 시료로 준비하여 2회차 와 동일하게 각 시료 당 4개씩 총 20가지의 시료를 평가하도록 하였음.
- 4회차 기각한계치 설정 관능검사는 시료의 농도를 8 mmol, 10 mmol, 12 mmol로 정하고 물을 포함 4종류의 각 시료 마다 4개씩 준비하여 16가지의 시료를 평가하도록 하였음.

- 그 결과 8 mmol에서 3과4 사이인 3.5 후반 평균이 나타나 5회차 에는 9.5 mmol, 10 mmol, 10.5 mmol, 11 mmol, 물 총 20가지의 시료를 평가하도록 하였음.
- 최종 기각한계치 설정 관능검사 결과 10 mmol이 3회 반복 이상 잔맛 인지(認知)영역인 4 점을 넘고 있으므로 10 mmol을 최소 기각한계치 값으로 설정하였음.



Fig. 3-2-5. 최소기각한계치 설정 관능검사 수행 모습.

Table 3-2-3. 최소기각한계치 설정 결과

차수 소금물 농도 (mmol)	1회차	2회차	3회차	4회차	5회차	6회차	평균
물	1.61	1.72	1.38	1.35	1.38	1.4	1.47
2.5	2.63						2.63
5	3.09	3.02	2.21				2.77
7.5			3.37				3.37
8				3.56			3.56
9					3.58		3.58
9.5					3.67	3.74	3.71
10	4.85	4.87	3.99	4.17	4.03	4.18	4.35
10.5						4.27	4.27
11					4.13	4.38	4.26
12				4.61			4.61
15	5.85	5.63	5.31				5.60

나. 차이 한계 설정 연구

- 차이 한계 설정 : 관능검사 Panel들이 시료 간의 농도차이를 인지(認知)할 수 있는 최소 농도차를 구하고자 관능검사를 수행하였음.
- 차이 한계 설정 관능검사에 사용된 시료의 농도는 관능검사 요원 훈련 시 정답률이 높고, 짠맛의 인지(認知)를 손쉽게 할 수 있는 30 mmol에서 40 mmol 사이의 구간으로 정하였으며, 5 mmol 간격의 경우 훈련기간 동안에도 차이를 인지 할 수 있었으므로 2.5 mmol 간격으로 차이 한계 설정 관능검사를 실시하였음.
- 관능검사의 설문지는 순위강도를 표시하도록 하였고, 짠맛이 가장 강한 시료가 1순위, 가장 약한 시료가 마지막 순위에 오도록 하였음. 짠맛이 같다고 느껴지는 경우 같은 번호를 쓸 수 있도록 하였음.

Table 3-2-4. 순위법 검사에 의한 소금물 농도의 관능검사

소금물 농도 (mmol)	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80
오답률 (%)	18.04	12.05	15.96	12.24	24.37	17.26	30.61	15.96	45.92	21.12	30.61	11.07
정답률 (%)	81.96	87.95	84.04	87.76	75.63	82.74	69.39	84.04	54.08	78.88	69.39	88.93

- 1회차, 2회차 차이 한계 설정 관능검사 시료의 농도는 30 mmol, 32.5 mmol, 35 mmol, 37.5 mmol, 40 mmol로 정하여 관능검사를 실시하였음.
- 2번의 관능검사 결과 2.5 mmol의 간격에서도 차이를 인지하는 것으로 나타났음.

다. 간장, 어간장 및 식염수의 Sodium 함량 정량 분석

- 간장, 어간장 및 식염수의 Sodium 정량 : 관능검사 요원들에게 시료를 제공하기 전 ICP를 이용하여 간장, 어간장 및 식염수의 sodium (Na)함량을 정량하였음.
- 간장, 어간장 및 식염수의 sodium 정량 분석을 위하여 전주시에 소재하고 있는 (재) 전주 생물소재연구소 식의약소재사업단 및 전주대학교 EM연구개발단에 분석 의뢰를 하고 있으며, 직접 ICP분석을 하기 위한 장비를 모두 갖춘 상태임.
- ICP 분석 Analyte는 나트륨 (총1종) 이며, ICP 분석 장치를 사용하여 나온 데이터는 VARIAN 720-ES (Agilent Korea) 를 사용하여 농도를 산출하였음.
- 간장 및 가공시료에 대하여 나트륨 함량을 측정하기 위해 ICP-OES (Inductively Coupled Plasma -Atomic Emission Spectrometer, 유도결합 플라즈마)를 이용하여 정량 분석 실시 후 비교하였음.

○ 나트륨 검사 시료 전 처리법

- 성분: Na
- 장치: ICP-OES
- 시약 및 시액
 - 물: 증류수 또는 이와 동등한 것
 - 표준원액: 각 표준품을 0.5N 질산 (HNO₃) 에 녹여 적당한 농도로 검량선을 작성하였음.
 - 표준용액: 표준원액을 각각 질산 (HNO₃) 에 녹여 적당한 농도로 혼합/희석하였음.
- 기타시약: 특급

○ 시험용액의 조제 : 시험액 조제는 간장 및 가공시료 중 일정량을 취하여 원심분리 실시 (13,500rpm for 10min.) 후 상등액 으로 sample No.1 ~ No.22번까지의 시료는 1×10⁻⁵-fold 희석하였고, sample No.23- No.30번까지의 시료는 1×10⁻⁴-fold 로 희석하여 검액 으로 하였음.

○ 측정은 검액 및 표준액을 가지고 원자흡광광도법에 따라 측정하였음. 원자흡광광도계를 이용하여 각 나트륨 (Na)의 원자흡광분석용 표준원액 (1000 mg/L)을 0.5N 질산을 사용하여 적정 농도로 희석하여 검량선을 작성하고 공시험액으로 보정하여 검액의 흡광도 (또는 강도)를 측정하였으며, 농도의 산출은 표준물질에 대한 가중 최소자승법에 따르는 검량선의 회귀식을 이용해 농도를 산출하였음. 검량선의 작성 및 농도의 산출에는 VARIAN 720-ES 를 이용하였음.

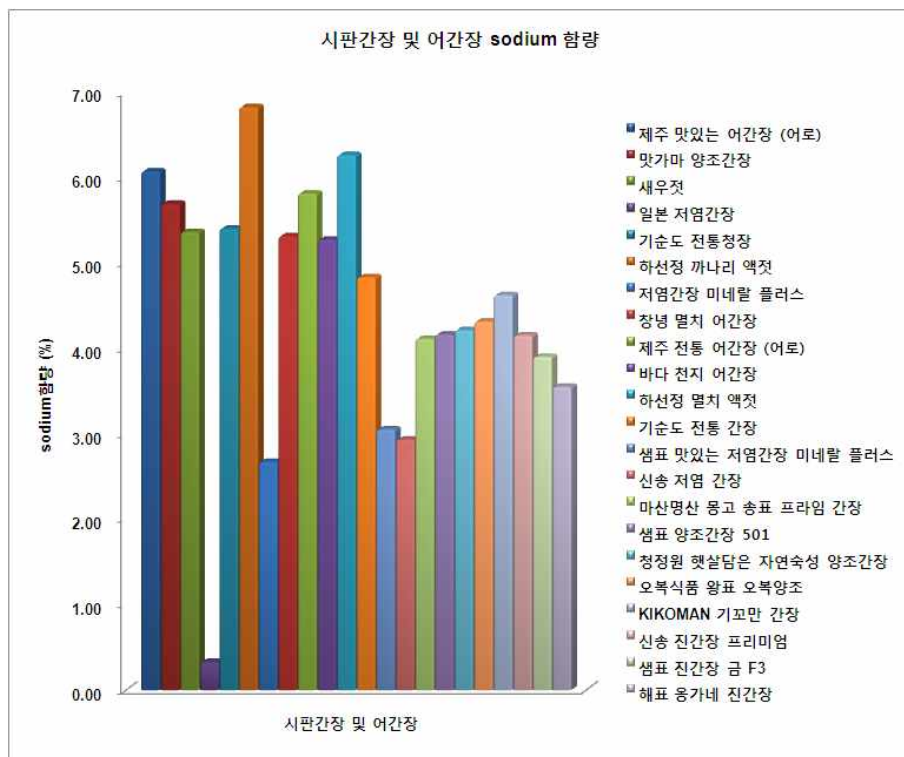


Fig. 3-2-6. 시판 간장 및 어간장 ICP 분석 sodium 함량 정량 결과.

라. 간장, 어간장 및 액젓류의 짠맛 강도 차이 연구

- 시중에서 판매되고 있는 전통간장, 어간장, 그리고 액젓류의 짠 맛의 강도 차이를 연구하여 짠 맛 증진 물질을 탐색하는 기초 자료로서 활용하기 위하여 실험을 실시함.
- 간장, 어간장 및 액젓류의 짠맛 차이 관능검사 : 간장, 어간장 및 액젓류의 sodium 함량에 따라 20 mmol의 농도에 맞도록 각 시료를 희석하여 제공하였음.
- 간장, 어간장 및 액젓류의 짠맛 첫 번째 차이 관능검사에서는 기순도 간장이 가장 짠맛이 강하게 느껴지고 새우젓, 하선정 멸치 액젓, 제주 맛있는 어간장, 기순도 청장, 하선정 까나리 액젓, 맛가마 양조간장 순으로 짠맛이 강한 것으로 결과가 나타났음.
- 관능검사 시 색에 의한 오차가 발생하기도 하는데 간장 및 어간장의 경우 시료의 색이 매우 진하여 시료의 색이 관능검사 결과에 영향을 미쳤을 것으로 생각하여 시료들을 탈색 하였고, 관능평가 결과 어간장의 비린내와 전통 간장 특유의 냄새로 인하여 관능평가를 하는 것이 매우 힘들었다는 관능평가 요원들의 의견을 수렴하여 시료들의 탈취를 하였음.

Table 3-2-5. 1차 간장, 어간장 짠맛 차이 관능검사 결과표

시료명 \ 짠맛 강도	짠맛강함 ←				→ 짠맛약함			
	1	2	3	4	5	6	7	
제주 맛있는 어간장	1	2	9	7	4	4	3	
맛가마 양조 간장	0	2	1	4	3	10	10	
새우젓	10	8	5	0	1	2	4	
기순도 청장	1	0	4	8	7	4	6	
하선정 까나리 액젓	2	1	3	2	9	7	6	
하선정 멸치 액젓	2	8	6	7	5	2	0	
기순도 간장	14	9	2	1	1	1	2	

- 2번째 간장, 어간장 및 식염수의 짠맛 차이 비교 시료는 미리 의뢰하였던 탈색과 탈취를 마친 간장 및 어간장으로 실시하였음.
- 실험 결과 같은 20 mmol농도 일지라도 NaCl용액 보다 간장 및 어간장류에서 더 짠맛을 강하게 느낀다는 결과를 얻을 수 있었음.
- 결과적으로 같은 농도 일지라도 탈색 저염간장미네랄 플러스가 가장 짜게 느껴졌으며 하선정 멸치 액젓, 탈색 하선정 멸치 액젓, 저염간장미네랄플러스, 탈색 기순도 청장, 창녕 멸치 어간장, 탈색 창녕 멸치 어간장, 탈색 하선정 까나리 액젓, 탈색 제주 맛있는 어간

장, 탈색 기순도 간장, 기순도 간장, 기순도 청장, 하선정 까나리 액젓, 새우젓, 탈색 맛가마 양조간장, 제주 맛있는 어간장, 맛가마 양조간장, 소금물 20 mmol 순으로 짠맛이 약하게 느껴졌음.

Table 3-2-6. 탈취·탈색 한 간장, 어간장 및 식염수 짠맛 차이 비교 관능검사 결과

시료명	짠맛 강함 ← → 짠맛 약함																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
제주 맛있는 어간장	0	1	2	2	2	1	1	3	2	2	1	4	3	0	1	1	1	0
탈색 제주 맛있는 어간장	1	2	0	1	3	4	1	1	0	1	2	2	2	3	1	2	1	0
맛가마 양조 간장	0	2	1	1	1	0	2	2	3	1	0	0	3	3	4	2	2	0
탈색 맛가마 양조 간장	1	1	2	0	1	0	1	3	1	1	4	1	0	2	2	3	4	0
새우젓	3	1	0	1	2	1	3	2	0	3	4	1	0	1	2	3	0	0
기순도 청장	0	0	1	0	1	3	4	2	2	2	1	0	2	2	2	4	1	0
탈색 기순도 청장	3	0	3	5	1	0	0	1	1	1	2	2	2	0	3	1	2	0
하선정 까나리 액젓	0	0	0	3	2	2	3	5	4	1	0	2	1	3	0	0	1	0
탈색 하선정 까나리 액젓	1	2	3	1	0	5	1	2	3	0	0	0	2	3	0	1	3	0
저염간장미네랄플러스	4	2	5	3	1	1	1	0	3	3	2	0	0	1	1	0	0	0
탈색저염간장미네랄플러스	4	3	3	4	3	3	1	0	0	1	2	1	0	1	0	1	0	0
창녕 멸치 어간장	2	0	1	3	3	3	3	1	0	1	3	1	1	1	1	1	2	0
탈색 창녕 멸치 어간장	1	3	2	4	5	1	1	0	0	3	1	1	1	1	1	0	2	0
하선정 멸치 액젓	2	4	0	1	3	1	2	3	2	3	3	0	1	0	2	0	0	0
탈색 하선정 멸치 액젓	1	4	3	1	1	1	1	0	3	2	0	3	1	1	2	1	2	0
기순도 간장	1	1	3	3	3	3	4	0	2	1	1	3	1	0	0	0	1	0
탈색 기순도 간장	3	4	2	2	2	1	5	2	0	2	0	1	1	0	0	2	0	0
소금물 20 mmol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	0	2



Fig. 3-2-7. 시판 간장 및 어간장, 식염수의 시료 색 비교.

3. 시판 양조간장을 이용한 짠맛 강도평가

- 주관연구기관 및 제3협동연구기관에서 제공되는 시료(eHAP, eHVP)의 짠맛 강도를 보다 정확하게 평가하기 위해 시중에서 판매되고 있는 양조간장(eHVP)을 이용하여 짠맛 강도에 대한 평가 훈련을 실시하였음.
- 짠맛 강도평가에 사용된 시판 양조간장은 시중에서 판매되고 있는 20종의 양조간장을 구매한 후 성분을 조사하고 양조간장 이외의 다른 식품첨가물의 첨가여부를 검토하여 액상과당이나 기타 짠맛에 영향을 줄 수 있는 첨가물이 들어있지 않은 기꼬만 양조간장으로 선정하였음
- 1차년도 연구에서 간장 원액을 시료로 하여 순위법을 이용한 관능평가를 통해 짠맛에 인지 및 차이식별에 대한 기본 능력을 배양하였으며, 2차년도 연구에서는 짠맛 강도를 평가하는 상호비교능력을 키우기 위해 선척도 방법을 이용하여 추가훈련을 진행하였고. 훈련을 위한 시료로는 구입하기 쉽고, 각각의 다른 특징을 가지고 있는 KIKOMAN 간장, 샘표 유기농 자연콩 간장, 맛있는 저염간장 미네랄 플러스, 진간장 금F3, 양조간장 501 총 5가지의 시판 간장을 선정하여 진행하였음.

가. 검사요원 선정 및 강도평가

(1) 검사 요원 선정

- 강도평가 요원은 기존에 짠맛 차이 판별 훈련을 받은 패널 30명을 대상으로 순위검사를 통해 재평가 한 후 짠맛에 대한 판별력이 일정수준 이상이 되는 패널 27명을 선발하여 실시하였음.

(2) 짠맛 강도 평가 방법

(가) 간장 희석액 강도평가

- 간장은 시판되고 있는 K사에 기꼬만 간장을 사용하여 평가 시료를 제조하였음. 평가 시료에 대해 15cm 선척도 (Line scale)를 사용하여 평가하도록 하였으며, 선의 양쪽 끝에서 1.25cm 들어간 지점에 양극의 강도 (weak-strong)를 표시하였음. 강도평가 요원들은 제공된 시료의 맛을 본 후 평가지 위에 각 시료의 짠맛정도를 제공된 NaCl 기준시료 용액에 비해 어느 정도 짠맛에 해당되는 지를 표시하게 한 후 시료번호를 기입하도록 하였음. 평가 시료는 난수표에서 번호를 무작위 추출하여 시료에 각각 부여하였음.
- 간장 희석액과 NaCl 용액 사이에 짠맛 강도 차이를 알아보기 위하여 간장을 20배(소금농도 기준 3 mmol), 25배(소금농도 기준 5 mmol)로 각각 희석하여 15ml씩 정량 제공하였으며, NaCl용액은 25-80 mmol (in 5.0 steps)로 제조하여 간장의 짠맛 강도평가 1차 실험을 진행하였음.
- 1차 실험 결과 간장 희석액의 짠맛 강도를 80 mmol 이상으로 평가하여 평가 기준 NaCl

용액의 mmol 농도를 90-140 mmol (in 5.0 steps)로 2차 실험을 진행하였음.

- 2차 실험 결과 간장희석액의 짠맛 강도를 90-140 mmol 사이로 평가하여 최종 평가에 사용한 NaCl 용액의 농도를 90 mmol, 96.25 mmol, 100 mmol, 117.5 mmol, 127.5 mmol, 140 mmol로 정하였음.
- 간장 희석액의 제공 순서는 낮은 농도에서 높은 농도순으로 제공하였음.

(나) 간장 원액별 강도평가

- 간장은 시판되고 있는 K사에 기꼬만 간장과 S사의 간장을 특성별로 4가지를 선별, 총 5가지에 시료를 선정하였으며, 평가지 기입방법과 요령은 간장 희석액 강도평가와 동일함.
- 간장 원액별 강도평가 시 간장은 15ml씩 정량 제공하였으며, 난수표에서 번호를 무작위 추출하여 시료에 각각 부여하였음.

(3) 강도평가 결과

(가) 양조간장의 짠맛 강도평가

- 양조간장의 강도평가 시 검사요원에게 제공된 간장 희석액의 Na함량 (%)은 25배 희석액의 경우 0.122%, 20배 희석액의 경우에는 0.223%로 분석되었으며, 이는 소금농도 기준으로 환산하면 53 mmol과 97 mmol에 해당하는 농도임.
- 강도 평가 기준 NaCl 용액을 먼저 제공한 후 희석한 간장 시료를 낮은 농도에서 높은 농도로 제공하였으며, 강도 평가 기준 NaCl 용액과 희석 간장 시료의 선척도 강도 평가 결과는 Table 3-2-7과 같음.

Table 3-2-7. 평가기준 NaCl 용액과 희석 간장 시료의 선척도 강도 평가

시료	평가기준 NaCl 용액						희석 간장 시료	
	90	96.25	100	117.5	127.5	140	25	20
물 농도(mmol)	90	96.25	100	117.5	127.5	140	25	20
Scale(cm)	2.72	3.46	5.44	8.43	10.58	12.40	6.21	10.66

- 선척도 평가에 의해 간장 희석액을 짠맛 강도를 평가한 결과 25배 희석 간장 시료는 100 mmole 보다 강하게 짠맛을 평가하였으며, 20배 희석 간장시료는 127.5 mmole과 비슷한 강도로 평가하였음. 이는 실제 희석 간장 시료에 포함되어 있는 소금 농도에 비해 20배 희석 간장 시료의 경우 20% 이상, 25배 희석 간장 시료의 경우에는 2배 이상으로 짠맛이 평가되고 있음을 알 수 있음. 이러한 평가 결과는 간장에는 소금의 짠맛을 강하게 느끼게 하는 짠맛 증진물질이 함유되어져 있다고 생각할 수 있음.

(나) 간장 종류의 짠맛강도 비교평가

- 간장의 종류에 따른 짠맛 강도 차이를 평가하기 위하여 시중에서 판매되고 있는 5종의 다른 종류의 간장을 이용하여 짠맛 강도를 평가하였음.
- 간장 시료는 종이컵에 5 ml씩 넣어 제공하여 평가하도록 하였으며, 시료의 순서는 무작위로 순서를 달리하여 제공하였음. 시료에 따라 색의 차이는 있었으나 평가에 영향을 줄 정도 판단되지는 않았음.
- 간장 종류에 따른 짠맛 강도 비교 평가에 대한 결과와 각 간장에 함유되어 있는 나트륨의 농도는 Table 3-2-8과 같음.

Table 3-2-8. 짠맛 강도 비교평가 시료의 나트륨 함량 및 강도 평가

시료	KIKOMAN 기꼬만 간장	샘표유기농 자연콩간장	샘표 맛있는 저염간장	샘표 진간장 금 F3	샘표 양조간장 501
나트륨함량(%)	4.49	4.43	3.07	4.13	4.02
강도평가(cm)	8.75	5.1	8.02	9.78	8.92
짠맛강도순위	3	5	4	1	2

- 제공된 간장의 나트륨 함량은 저염간장을 제외하고는 대부분 4% - 4.5%로 큰 차이를 보이지는 않았음.
- 간장의 종류에 따른 짠맛 강도 비교 평가 결과 샘표 진간장 금F3과 샘표 양조간장 501을 가장 짜게 평가되었으며, KIKOMAN 기꼬만 간장, 샘표 유기농 자연콩 간장은 짠맛강도가 상대적으로 낮게 평가되었음.
- 검사요원들이 평가한 짠맛 강도와 실제 간장에 들어있는 나트륨 함량을 비교해 보면 저염간장의 경우 나트륨 함량이 제일 낮음에도 불구하고 기꼬만 간장이나 양조간장과 짠맛강도에 있어서 큰 차이를 보이지 않고 있는 것을 알 수 있음.
- 기꼬만 간장의 경우 다른 시료에 비해 나트륨 함량이 제일 높음에도 중간정도의 짠맛 강도를 갖는 것으로 평가되었는데 이는 시료로 제공된 기꼬만 간장의 경우 추가로 첨가된 추출물이 없는 반면에 다른 간장 모두에는 효모추출물이 첨가되어져 있어 이에 의해 짠맛의 강도가 영향을 받은 것으로 판단될 수 있음.



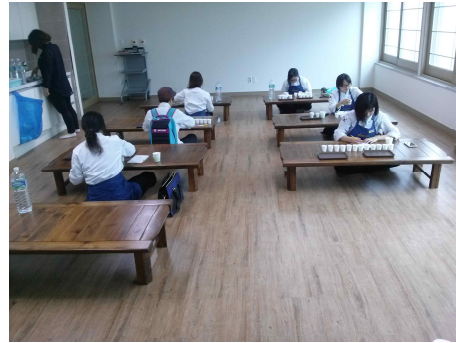
평가기준 NaCl용액과 희석간장시료



종류별 간장 시료



제공된 NaCl용액과 희석간장시료



관능검사중인 패널

Fig. 3-2-8. 짠맛 강도 평가 시료 및 패널 평가 모습.

4. 양조간장을 이용한 식품 내 소금사용량 감소효과

- 우리나라에서는 식품에 짠맛을 부여하는 물질로 소금과 전통 발효식품인 간장을 사용해 왔으며, 특히 간장은 미생물이 생산하는 효소에 의하여 동식물 단백질이 가수분해 되어 다양한 아미노산 또는 펩타이드의 증미성분이 생성된다고 보고되어 있음.
- 증미성분의 조합된 맛이 나타나게 되는 것을 HVP(hydrolyzed vegetable protein) 내지 HAP(hydrolyzed animal protein)로 볼 수 있는데 이들은 비교적 저렴한 풍미료이며, 풍미상승제로 작용하면서 감칠맛에 의해 짠맛을 증진시킬 수 있는 가능성을 보여주고 있음.
- 따라서 우리 국민들에게 익숙한 간장을 활용하여 나트륨을 대체한 식품을 제조, 평가하여 식품 내 소금사용량 감소효과를 연구하였음.

가. 실험방법

- 관능검사를 위하여 전주대학교 한식조리학과 1~2학년에 재학 중이며 흡연을 하지 않고, 관능평가에 관심이 있는 학부생 35명을 대상으로 기본 맛 인지(認知)검사 및 짠맛 구분

테스트를 진행하였음.

- 기본 맛 인지검사와 짠맛구분 테스트를 통과한 30명의 학생을 관능검사 패널로 선정하여 짠맛순위평가를 통하여 맛 훈련을 진행하였으며, 관능검사 패널 중 맛의 구분능력이 뛰어난 20명을 선발하여 식품의 전반적인 맛과 짠맛평가의 최종 패널로 선정하였음.
- 실험은 짝(set) 비교 실험으로 진행하였으며, 소금(w/w)을 넣은 시료와 간장(w/w)을 넣은 시료 2가지를 비교하여 9점선척도에 표시하는 방식으로 평가하였으며, 전반적인 맛의 차이 유무와 짠맛의 강도를 조사하였음.
- 전반적인 맛에 대하여 9점 선 척도 (1=매우 다르다, 9=매우 같다)에 표시하도록 하였으며, 짠맛에 대해서도 9점 선 척도 (1=매우 약하다, 9=매우 강하다)에 표시하도록 하였음.
- 평가를 시작하기 전과 시료를 맛 본 후 입을 헹구도록 하였으며, 1set의 시료를 평가한 후 5분정도의 휴식시간을 두어 혀의 둔화현상을 최소화 하도록 하였음.

(1) 샐러드드레싱의 제조

- 샐러드드레싱의 재료 배합은 Kremer 등(2009)의 샐러드드레싱 제조 방법을 참고하였음.
- 샐러드드레싱의 대조구 제조에 사용된 NaCl용액의 소금농도는 4%였으며, 비교평가를 위해 샐러드드레싱 제조에 사용한 간장용액의 간장농도는 1.00, 1.15, 1.30, 1.45, 1.60%였음.
- 시료의 재료 배합비는 Table 3-2-9와 같으며, 제조 방법은 올리브오일, 발사믹 식초, 후추를 분량만큼 넣어 Blender(HGB25E, WARING COMMERCIAL, USA)의 low단계로 20초, high단계로 30초 교반한 후 미리제조된 NaCl용액과 간장용액을 넣어 high단계로 10초간 교반하였음. 모든 평가 시료는 30분 전에 만들어 상온에서 보관하였음.
- 평가 10분전 냉장보관한 양상추와 시료를 섞은 후 백색 일회용 70ml 용기(PS소스컵 Ø93 x H67mm, Daeheung Industrial co., Korea)에 15g을 담아 뚜껑(PP뚜껑 Ø93 Daeheung Industrial co., Korea)을 닫아 제공하였으며, 스푼(일회용 빙수수저 140mm, Daeheung Industrial co., Korea)과 포크(DS포크-대 155mm, Daesung Industrial co., Korea)를 이용하여 시료를 찢어 먹을 수 있도록 하였음.
- 각 시료에는 난수표에서 선택한 세 자리수의 난수를 부착하여 구분하도록 하였음. 평가 시 샐러드드레싱의 올리브오일이 입에 오래 남아있어 혀의 둔화현상이 올 것을 고려하여 시료와 시료 사이에 입을 헹굴 수 있도록 38±2℃로 가온한 생수(제주 삼다수, Kwang Dong Pharm. co., Jeju, · Korea)와 식빵(아침미소토스트, Samlip general foods co., Siheung, Korea)을 함께 제공하였음.

Table 3-2-9. 셀러드드레싱 재료배합비

Ingredients (g)	SD ¹⁾ -ST ²⁾	SD-S1 ³⁾	SD-S2	SD-S3	SD-S4	SD-S5
Olive oil	90.300	90.300	90.300	90.300	90.300	90.300
Balsamic vinegar	66.000	66.000	66.000	66.000	66.000	66.000
Ground black pepper	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000
Solution	15.800	15.800	15.800	15.800	15.800	15.800
NaCl	0.316	-	-	-	-	-
Soysauce	-	0.158	0.182	0.205	0.229	0.253
Water	15.484	15.642	15.618	15.595	15.571	15.547
Total	174.100	174.100	174.100	174.100	174.100	174.100

¹⁾SD : Salad Dressing

²⁾ST : Standard with salt

³⁾S1~S5 : Variant Sample of soysauce with various concentration,

ST : 2.00%, S1 : 1.00%, S2 : 1.15%, S3 : 1.30%, S4 : 1.45%, S5 : 1.60%

(2) 콩나물국의 제조

- 콩나물국의 재료 배합은 Shon 등(2009)의 콩나물국 제조방법을 참고하여 제조하였음.
- 콩나물국 대조구 제조에 사용된 NaCl용액의 소금농도는 2%였으며, 비교평가를 위해 콩나물국 제조에 사용한 간장용액의 간장농도는 5, 10, 15, 20, 25%였음.
- 시료의 재료 배합비는 Table 3-2-10과 같으며, 제조방법은 전주콩나물을 흐르는 물에 3회 씻어 5분간 체에 받쳐 물기를 제거한 후 국물 팩(웰빙 국물 팩 25 x 35cm, Daiso Asung Co., Korea)에 담아 생수와 함께 냄비(플레티나 NY-1432, Kitchenart co., Korea)에 넣어 핫플레이트(KEP-TM1500, Kitchen flower co., gimpo, Korea)의 5단계(1-5단계로 조절가능, 가장 강한단계 5단계)에서 15분 끓인 후 마늘과 파를 넣은 국물 팩을 콩나물국에 넣고 핫플레이트를 3단계로 줄여 3분간 가열 후 불을 끄고 10분간 식힌 후 콩나물과 파, 마늘이 담긴 국물 팩을 모두 분리하여 맑은 국물만 시료로 사용하였음.

Table 3-2-10. 콩나물국 재료배합비

Ingredients (g)	BSS ¹⁾ -ST ²⁾	BSS-S1 ³⁾	BSS-S2	BSS-S3	BSS-S4	BSS-S5
Bean sprout	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00
Minced garlic	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Leek	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Water	400.00	400.00	400.00	400.00	400.00	400.00
Solution	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00
NaCl	1.20	-	-	-	-	-
Soy sauce	-	1.50	3.00	4.50	6.00	7.50
Water	28.80	28.50	27.00	25.50	24.00	22.50
Total	483.00	483.00	483.00	483.00	483.00	483.00

¹⁾BSS : Bean sprout soup

²⁾ST : Standard with salt

³⁾S1~S5 : Variant Sample of soy sauce with various concentration,

ST : 4%, S1 : 5% S2 : 10% S3 : 15% S4 : 20% S5 : 25%

- 모든 콩나물국은 평가 1시간 전에 만들었으며, 전기온장고(WS-HC 070, Woosung Enterprise Co., Korea)에서 60℃의 온도로 보관하였음.
- 콩나물국은 백색 일회용 70ml 용기(PS소스컵 Ø70 x H30mm, Daeheung Industrial co., Korea)에 10ml를 담아 뚜껑(PP뚜껑 Ø70 x H30mm, Daeheung Industrial co., Korea)을 담아 제공하였으며, 스푼(일회용 빙수수저 140mm, Daeheung Industrial co., Korea)을 이용하여 시료를 떠먹을 수 있도록 하였음.
- 각 시료에는 난수표에서 선택한 세 자리수의 난수를 부착하여 구분하도록 하였으며, 평가 시 혀의 둔화현상을 줄이기 위하여 시료와 시료 사이에 입을 행굴 수 있도록 생수를 함께 제공하였음.

(3) 닭죽의 제조

- 닭죽의 재료 배합은 동결건조 닭죽분말(Ontteurak, Jeungpyeong, Korea)의 제조법을 참고하여 제조하였음.
- 닭죽 대조구 제조에 사용된 NaCl용액의 소금농도는 4%였으며, 비교평가를 위해 콩나물국 제조에 사용한 간장용액의 간장농도는 5, 10, 15, 20, 25%였음.
- 시료의 재료 배합비는 Table 3-2-11과 같으며, 제조방법은 물과 동결건조닭죽분말을 냄

비(플래티나 NY-1432, Kitchenart co., Korea)에 넣어 핫플레이트(KEP-TM1500, Kitchen flower co., gimpo)의 5단계로 5분을 끓인 후 NaCl용액과 간장용액을 넣고 핫플레이트를 3단계로 줄여 2분간 가열 하여 시료로 사용하였음.

Table 3-2-11. 닭죽 재료배합비

Ingredients (g)	CRP ¹⁾ -ST ²⁾	CRP-S1 ³⁾	CRP-S2	CRP-S3	CRP-S4	CRP-S5
Chicken rice porridge freeze-dried powder	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00
Water	350.00	350.00	350.00	350.00	350.00	350.00
Solution	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
NaCl	1.00	-	-	-	-	-
Soysauce	-	1.25	2.50	3.75	5.00	6.25
Water	2400	2375	2250	2125	2000	1875
Total	420.00	420.00	420.00	420.00	420.00	420.00

¹⁾CRP : Chicken rice porridge

²⁾ST : Standard with salt

³⁾S1~S5 : Variant Sample of soysauce with various concentration,
ST : 4%, S1 : 5%, S2 : 10%, S3 : 15%, S4 : 20%, S5 : 25%

○ 모든 닭죽은 평가 1시간 전에 만들어 사용하였으며, 백색 일회용 70ml 용기(PS소스컵 Ø70 x H30mm, Daeheung Industrial co., Korea)에 20g을 담아 뚜껑(PP뚜껑 Ø70, Daeheung Industrial co., Korea)을 닫아 전기온장고(WS-HC 070, Woosung Enterprise co., Korea)의 온도를 50°C로 유지하며 보관하였다 제공하였음.

○ 스푼(PS 아이스크림스푼 90mm x 20mm, Daesung Industrial co., Korea)을 이용하여 시료를 떠먹을 수 있도록 했다. 이 때 각 시료에는 난수표에서 선택한 세 자리수의 난수를 부착하여 구분하도록 하였음.

○ 혀의 둔화현상을 줄이기 위하여 시료와 시료 사이에 입을 행굴 수 있도록 가온한 정수(38±2°C)와 오이, 당근을 함께 제공하였음.

(4) Na함량 분석

○ 분석 시료는 제조된 셀러드드레싱, 콩나물국, 닭죽의 용액을 Whatman filter papere (Whatman No, GE healthcare Bio-Science, Pittsburggh, PA, USA)로 여과하고 HPLC 급 증류수(Honeywell Burdick & Jackson Chemicals, Muskegon, MI, USA)로 희석한

후 syringe filter (PTFE μm , Toyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하여 dionex ion chromatography (ICS-900, Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 분석하였음. 표준곡선은 표준 용액(Dionex Six Cation-II Standard, Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA)을 사용하여 작성하였음.

(5) 색도 측정

○ 셸러드드레싱, 콩나물국, 닭죽의 색도는 색차계(CM-5, Minolta Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 L (명도, lightness), a (적색도, redness), b (황색도, yellowness)를 측정하였음. 시료는 지름 3 cm의 원형 평판접시에 담아 측정하였으며, 총 3회 반복 실험하여 평균값을 나타내었음. 이 때 사용된 표준 백색판의 값은 $L=97.31$, $a=1.01$, $b=2.32$ 이었음.

(6) pH 측정

○ 각 시료별 30g을 50ml Falcon Conical Tube(Centrifuge tubes FA2098, BD Falcon, USA)에 담아 pH meter(Docu-pH meter, Sartorius, Germany)로 상온에서 3회 반복 측정하였음.

(7) 통계분석

○ 소금용액과 농도별 간장용액을 첨가한 식품의 전반적인 맛과 짠맛의 차이가 있는지 알아보기 위하여 비모수검정 중 대응2-표본테스트를 수행했으며, 시료간의 유의적 차이를 검증하기 위하여 윌 콕슨 부호순위 검정(Wilcoxon signed rank test)을 수행하였음($p<0.05$).

○ 시료의 이화화적인 특성의 차이정도를 알아보기 위하여 유의성 검정은 분산분석(ANOVA)과 $p<0.05$ 수준에서 Duncan의 다중범위검정(Duncan's multiple range test)법으로 검증하였으며, 모든 통계분석에 SPSS Version 21.0 package program (SPSS INC., Chicago, USA)을 사용하였음.

나. 실험 결과

(1) 시료의 Na 함량

○ 시료의 Na함량 분석결과는 Table 3-2-12와 같으며, 셸러드드레싱의 Na함량은 소금을 넣어 제조한 SD-ST시료가 3.85 ± 0.03 으로 가장 높았음. 간장을 넣어 제조한 실험구의 Na함량은 SD-S1시료가 0.46 ± 0.01 , SD-S2시료가 0.53 ± 0.01 , SD-S3, SD-S4시료가 각각 0.55 ± 0.01 , 0.65 ± 0.03 으로 나타났으며, 간장이 가장 많이 첨가된 SD-S5시료가 0.68 ± 0.02 로 실험구 중 가장 높은 Na함량을 나타냈음.

Table 3-2-12. 시료의 Na함량 (g/L)

		SD ²⁾ -ST ⁵⁾	SD-S1 ⁶⁾	SD-S2	SD-S3	SD-S4	SD-S5
Salad dressing		3.85±0.03 ¹⁾	0.46±0.01	0.53±0.01	0.55±0.01	0.65±0.03	0.68±0.02
Bean sprout soup		BSS ³⁾ -ST	BSS-S1	BSS-S2	BSS-S3	BSS-S4	BSS-S5
		1.59±0.05	0.38±0.01	0.67±0.01	0.97±0.02	1.24±0.10	1.54±0.02
Chicken rice porridge		CRP ⁴⁾ -ST	CRP-S1	CRP-S2	CRP-S3	CRP-S4	CRP-S5
		1.89±0.03	0.37±0.00	0.58±0.01	0.89±0.01	1.13±0.00	1.44±0.01

¹⁾Mean±SD

²⁾SD : Salad dressing

³⁾BSS : Bean sprout soup

⁴⁾CRP : Chicken rice porridge

⁵⁾ST : Standard with salt

⁶⁾S1~S5 : Sample of soysauce with various concentration,

SD-ST : 2.00% NaCl, SD-S1 : 1.00% soysauce, SD-S2 : 1.15% soysauce, SD-S3 : 1.30% soysauce, SD-S4 : 1.45%, SD-S5 : 1.60%

BSS-ST : 4% NaCl, BSS-S1 : 5% soysauce, BSS-S2 : 10% soysauce, BSS-S3 : 15% soysauce, BSS-S4 : 20% soysauce, BSS-S5 : 25% soysauce

CRP-ST : 4% NaCl, CRP-S1 : 5% soysauce, CRP-S2 : 10% soysauce, CRP-S3 : 15% soysauce, CRP-S4 : 20% soysauce, CRP-S5 : 25% soysauce

○ 콩나물국의 Na함량은 소금을 넣어 제조한 BSS-ST시료가 1.59±0.05으로 가장 높았음. 콩나물국에 간장을 넣어 제조한 실험구의 Na함량은 BSS-S1시료가 0.38±0.01, BSS-S2시료가 0.67±0.01, BSS-S3, BSS-S4시료가 각각 0.97±0.02, 1.24±0.10으로 나타났으며, 간장이 가장 많이 첨가된 BSS-S5시료가 1.54±0.02로 실험구 중 가장 높은 Na함량을 나타냈음.

○ 닭죽의 Na함량은 소금을 넣어 제조한 CRP-ST시료가 1.89±0.03으로 가장 높았으며, 닭죽에 간장을 넣어 제조한 실험구의 Na함량은 CRP-S1시료가 0.37±0.00, CRP-S2시료가 0.58±0.01, CRP-S3, CRP-S4시료가 각각 0.89±0.01, 1.13±0.00으로 나타났으며, 간장이 가장 많이 첨가된 CRP-S5시료가 1.44±0.01로 실험구 중 가장 높은 Na함량을 나타냈음.

(2) 샐러드드레싱

○ 전반적인맛과 짠맛 이점비교 관능검사 결과는 각각 Fig. 3-2-9와 Fig. 3-2-10과 같음.

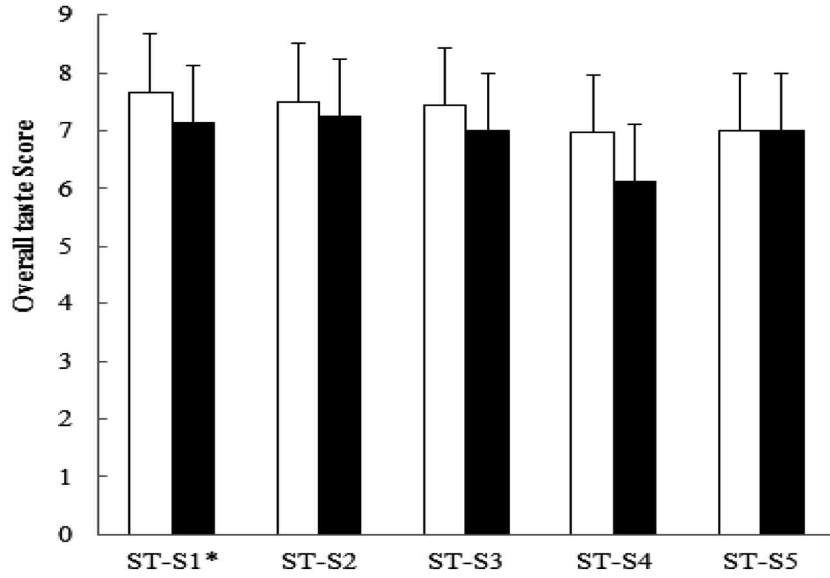


Fig. 3-2-9. 샐러드드레싱의 전반적인 맛 관능검사.

ST : 2.00% NaCl, S1 : 1.00% soysauce, S2: 1.15% soysauce,
 S3 : 1.30% soysauce, S4 : 1.45% soysauce, S5 : 1.60% soysauce

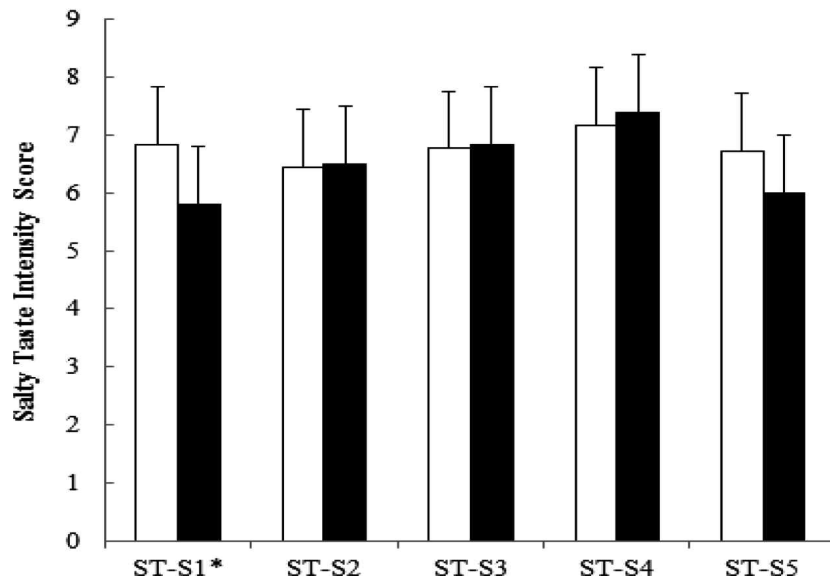


Fig. 3-2-10. 샐러드드레싱의 짠맛 관능검사.

ST : 2.00% NaCl, S1 : 1.00% soysauce, S2: 1.15% soysauce,
 S3 : 1.30% soysauce, S4 : 1.45% soysauce, S5 : 1.60% soysauce

- 샐러드드레싱의 경우 1.00%의 간장용액을 첨가한 실험구의 경우에는 소금용액을 넣은 대조구와 유의적 차이를 나타내어 맛의 차이를 인지하였음. 1.15% 이상의 간장용액을 사용한 실험구의 경우에는 대조구와 유의적인 차이를 보이지 않아 맛의 차이를 인지하지 못하는 것으로 나타났음.

- 대조구와 실험구의 나트륨을 분석한 결과 대조구의 Na함량은 $3.85 \pm 0.03 \text{g/L}$ 으로 간장함량이 가장 높은 1.60% 실험구(SD-S5)의 Na함량인 $0.68 \pm 0.02 \text{g/L}$ 에 비하여 약 5.65배 정도 나트륨 함량이 많았음.
- 전반적인 맛과 짠맛에 대한 이점비교 관능평가의 결과 대조구와 실험구간의 점수 차이가 가장 적은 시료는 간장용액 1.15% 첨가시료로 나타남.
- 결과적으로 샐러드드레싱 제조 시 2%의 소금용액을 1.15%의 간장용액으로 대체하여 사용할 경우 약 88%의 나트륨 감소 효과가 있다고 생각됨. 이는 소금과 간장용액을 사용하여 만든 샐러드드레싱에서 50%의 나트륨 감소효과를 얻을 수 있다는 보고와 비슷한 경향을 보였음(Kremer 등 2009; GOH 등 2011).

(3) 콩나물국

- 콩나물국의 전반적인맛과 짠맛 이점비교 관능검사 결과는 각각 Fig. 3-2-11 및 Fig. 3-2-12와 같음.
- 콩나물국의 전반적인 맛에 대하여 Wilcoxon 부호 순위 검정을 수행한 결과 대조구와 비교하였을 때 5, 10, 15%의 간장용액을 첨가한 실험구에서는 유의적인 차이를 나타내어 서로 맛에 차이가 있는 것으로 나타났으나 20, 25% 간장용액을 첨가한 실험구에서는 대조구와 유의적인 차이를 나타내지 않아 전반적인 맛에 있어 차이가 없는 것으로 나타났음.

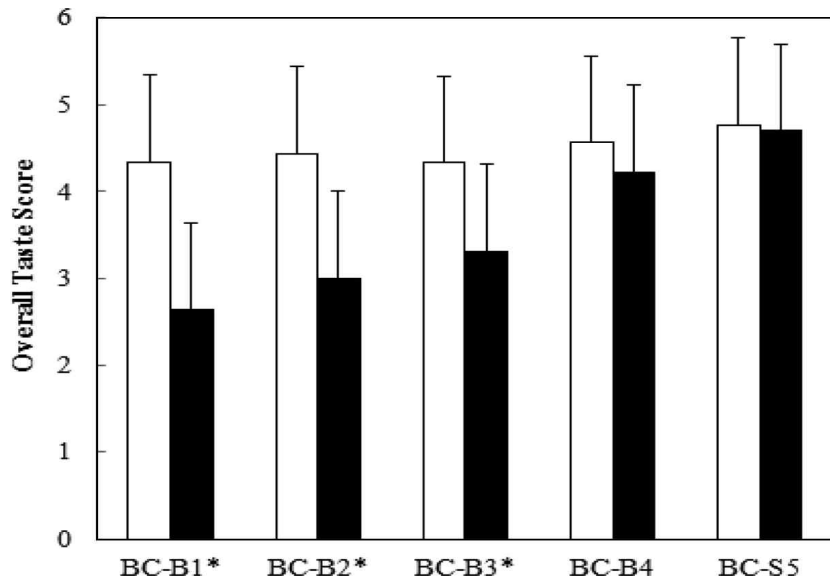


Fig. 3-2-11. 콩나물국의 전반적인 맛 관능검사.

ST : 4% NaCl, S1 : 5% soysauce, S2: 10% soysauce,
S3 : 15% soysauce, S4 : 20% soysauce, S5 : 25% soysauce

- 그러나 콩나물국의 짠맛에 대한 관능검사의 결과는 5% 간장용액을 첨가한 실험구만이 대조구와 짠맛의 유의적 차이를 나타내어 대조구에 비해 상대적으로 느꼈지만 10, 15, 20% 간장용액을 첨가한 실험구는 대조구와 유의적 차이가 없었으나 대조구에 비해 짜게 느끼는 것으로 나타났음.

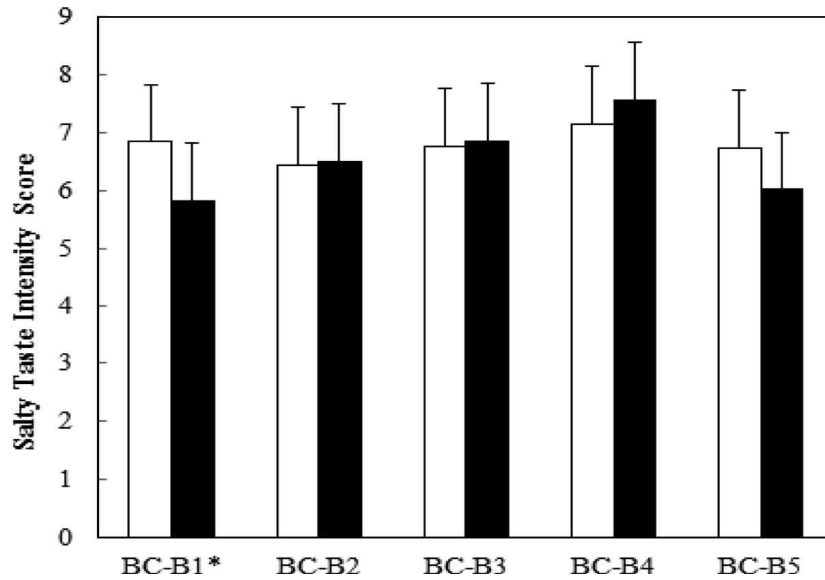


Fig. 3-2-12. 콩나물국의 짠맛 관능검사.

ST : 4% NaCl, S1 : 5% soysauce, S2: 10% soysauce,
S3 : 15% soysauce, S4 : 20% soysauce, S5 : 25% soysauce

- 콩나물국 시료의 나트륨을 분석한 결과 대조구에는 1.59±0.05g/L의 나트륨이 들어있었으며, 5, 10, 15, 20, 25% 간장용액을 넣은 실험구는 각각 0.38±0.01g/L, 0.67±0.01g/L, 0.97±0.02g/L, 1.24±0.10g/L, 1.54±0.02g/L의 나트륨 함량을 나타냈음.
- 결과적으로 전반적인맛과 짠맛 모두 유의적인 차이가 없다고 나타난 20% 간장용액을 사용하여 콩나물국 제조에 사용하면 4%의 소금용액을 사용하여 콩나물국을 끓일 경우 보다 약 22.01%의 나트륨 감소 효과가 있다고 생각됨.

(4) 닭죽

- 닭죽의 전반적인맛과 짠맛 이점비교 관능검사 결과는 각각 Fig. 3-2-13, Fig. 3-2-14과 같으며, 닭죽의 경우 대조구와 비교하여 전반적인 맛과 짠맛에 대해 유의적인 차이가 없는 시료는 10% 간장용액을 사용한 경우인 것으로 나타남. 또한 0.5% 간장용액과 15, 20, 25% 간장용액을 사용하여 닭죽을 제조하였을 경우에는 대조구와 전반적인 맛에 있어서 차이가 있는 것으로 나타났음.
- 닭죽의 경우 짠맛에 대한 관능검사 결과 5% 간장용액을 사용하였을 때는 대조구에 비해

싱겁게 느끼는 것으로 나타났으며, 15% 이상의 간장용액을 사용하였을 경우에는 대조구에 비해 짠맛을 강하게 느끼는 것으로 나타남.

- 시료의 나트륨 함량을 분석한 결과 대조구는 1.89 ± 0.03 g/L로 간장의 함량이 가장 적은 CRP-S1은 0.37 ± 0.00 g/L에 비하여 약 5.06배 정도 높은 나트륨 함량을 나타냈음.

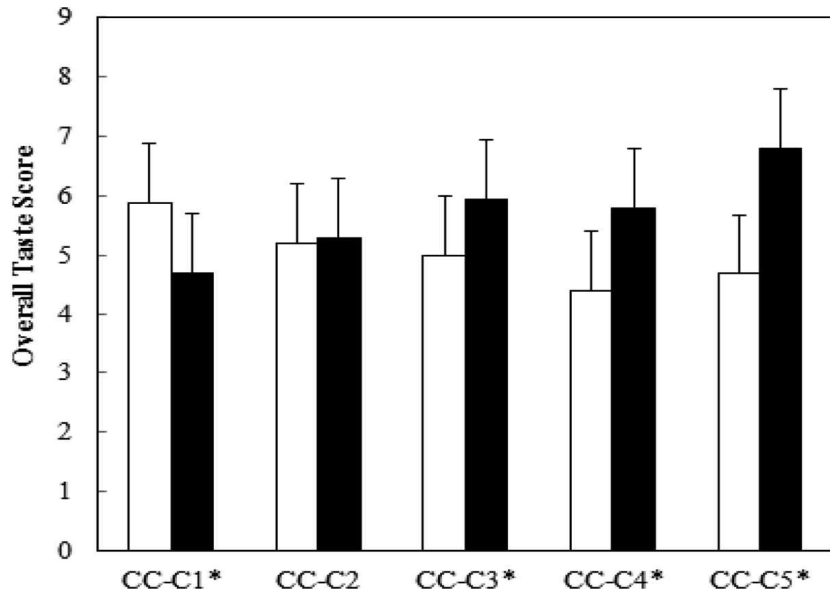


Fig. 3-2-13. 닭죽의 전반적인 맛 관능검사.

ST : 4% NaCl, S1 : 5% soysauce, S2: 10% soysauce,
S3 : 15% soysauce, S4 : 20% soysauce, S5 : 25% soysauce

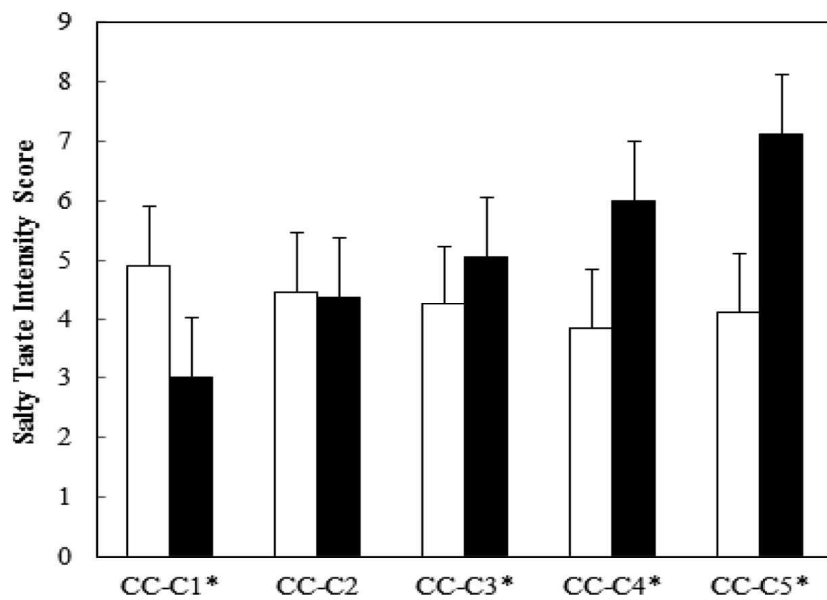


Fig. 3-2-14. 닭죽의 짠맛 관능검사.

ST : 4% NaCl, S1 : 5% soysauce, S2: 10% soysauce,
S3 : 15% soysauce, S4 : 20% soysauce, S5 : 25% soysauce

- 전반적인 맛과 짠맛의 유의적 차이가 없는 10% 간장용액 첨가 실험구를 기준으로 NaCl 대신 간장을 닭죽을 사용할 경우 약 69.30%의 나트륨 감소 효과가 있다고 생각됨.

다. 시료의 색도

(1) 샐러드드레싱

- 짠맛이나 전반적인 맛의 평가 시 시료의 색에 따른 영향을 알아 보기위해 샐러드드레싱의 색도를 측정하였으며, 그 결과를 Table 3-2-13 및 Fig. 3-2-15에 나타내었음.

Table 3-2-13. 샐러드드레싱의 색도

Color value	Salad dressing					
	SD-ST	SD-S1	SD-S2	SD-S3	SD-S4	SD-S5
L	29.97±0.29 ^{1)c}	42.36±0.44 ^a	38.06±1.69 ^b	38.80±0.34 ^b	38.70±2.71 ^b	39.18±0.83 ^b
a	15.05±0.06 ^a	12.32±0.15 ^b	13.17±1.23 ^b	12.55±0.25 ^b	12.98±0.63 ^b	12.91±0.48 ^b
b	22.00±0.20 ^a	19.10±0.10 ^b	20.20±1.27 ^b	19.26±0.06 ^b	20.19±0.87 ^b	19.43±0.40 ^b

¹⁾Mean±SD

^{a-c}Superscriptive letters in a row indicate significance at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.



Fig. 3-2-15. 샐러드드레싱의 색도 비교사진

ST(Standard) : NaCl solution 2.00% S3 : Soysauce solution 1.30%
 S1 : Soysauce solution 1.00% S4 : Soysauce solution 1.45%
 S2 : Soysauce solution 1.15% S5 : Soysauce solution 1.60%

- 셀러드드레싱의 경우 육안 상으로는 밝기의 차이를 구분하기 어려웠으나 명도(L)값의 측정결과 대조구(SD-ST)는 29.97±0.29의 값을 보였으나 간장용액을 사용한 실험구는 42.36±0.44 ~ 38.06±1.69 간장용액을 넣은 SD-S1 실험구가 42.36±0.44로 가장 높게 나타났음.
- 일반적으로 관능평가 시 색이 어두울수록 짠맛에 대한 평가가 높아지는 경향을 보이는 데에도 불구하고 명도가 높은 간장사용 실험구가 짠맛을 강하게 느끼는 것을 알 수 있었음. 간장용액 SD-S2, S3, S4, S5 실험구에서는 유의적 차이가 없었으나 대조구와 1.00% 간장용액을 넣은 실험구와는 유의적 차이가 있었음($p<0.05$).
- 적색도와 황색도의 값은 대조구와 실험구 5가지간의 유의적 차이가 있는 것으로 나타났으나($p<0.05$), 실험구간의 유의적 차이는 나타나지 않았음.

(2) 콩나물국

- 콩나물국의 색도를 측정된 결과를 Table 3-2-14과 Fig. 3-2-16에 나타내었음.
- 콩나물국의 경우에는 간장용액의 농도가 높을수록 명도 값이 어두워지는 것으로 나타났으며, 5% 간장용액을 첨가한 시료가 소금을 첨가한 시료보다 높은 값을 보였으며, 짠맛 평가에 있어서도 대조구에 비해 낮은 값을 나타내었음. 대조구보다 낮은 명도 값을 나타낸 10, 15, 20%의 실험구에서는 짠맛이 강하게 평가되었으나, 가장 어두운 값을 보인 25% 간장용액을 사용한 실험구는 오히려 대조구보다 짠맛이 낮게 평가되어 색도의 값이 짠맛에 비례적으로 영향을 미치지 않는 것으로 판단됨.

Table 3-2-14. 셀러드드레싱의 색도

Color	Bean sprout soup					
	BSS-ST	BSS-S1	BSS-S2	BSS-S3	BSS-S4	BSS-S5
L	19.92±0.13 ^{1)a}	21.48±0.36 ^b	19.59±1.22 ^b	19.67±0.10 ^b	17.83±0.04 ^c	16.63±0.46 ^d
a	-0.80±0.70 ^a	-1.22±0.13 ^b	-1.37±0.14 ^c	-1.39±0.21 ^{bc}	-1.37±0.15 ^c	-1.33±0.19 ^c
b	-2.57±0.38 ^e	-0.19±0.64 ^d	0.99±0.37 ^c	3.36±0.88 ^b	4.90±0.91 ^b	5.75±0.67 ^a

¹⁾Mean±SD

^{a-e}Superscriptive letters in a row indicate significance at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

- BSS-S2와 BSS-S4, S5간 적색도의 유의적 차이는 없는 것으로 나타났으며, 콩나물국의 황색도를 측정된 값을 보면 소금첨가 대조구가 가장 낮은값을 나타냈고, 간장용액의 농도가 높아질수록 점차 증가하는 경향을 보였고, 모든 시료간의 유의적 차이가 있는 것으로 나타났음.

- 콩나물국의 경우 육안으로 살펴 보았을때에도 대조구가 가장 밝은 노란색을 나타내었으며, 간장용액의 농도가 높아질수록 노란색의 강도가 강해지는 것을 알 수 있었고, 대체적으로 노란색이 진해짐에 따라 짠맛을 강하게 느끼는 것으로 나타나 색이 어느 정도 짠맛 평가에 영향을 주는 것으로 판단됨.

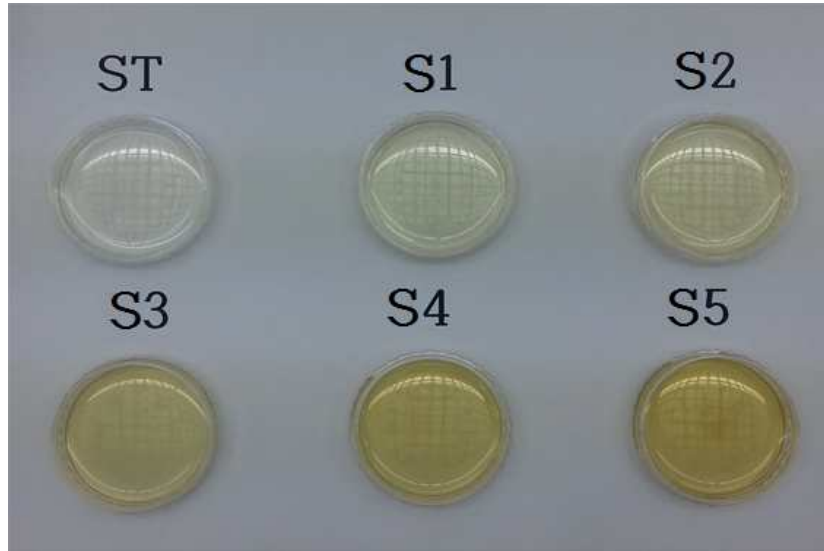


Fig. 3-2-16. 콩나물국의 색도 비교 사진.

ST(Standard) : NaCl solution 4.00% S3 : Soysauce solution 15.00%
 S1 : Soysauce solution 5.00% S4 : Soysauce solution 20.00%
 S2 : Soysauce solution 10.00% S5 : Soysauce solution 25.00%

(3) 닭죽

- 닭죽의 색도를 측정한 결과를 Table 3-2-15과 Fig. 3-2-17에 나타냈음.
- 닭죽의 명도(L)값은 대조구가 73.88 ± 0.46 으로 가장 높아 밝은 닭죽의 색을 나타냈으며 간장을 첨가할수록 명도는 낮아져 어두워지는 경향을 보였음. 짠맛의 평가결과를 보면 간장용액 첨가시료의 경우 명도값이 낮을수록 짠맛을 강하게 평가하는 경향을 보이기는 하였으나, 명도값이 높은 대조구가 간장용액 10%까지는 짠맛을 강하게 느끼는 것으로 나타나 명도값이 짠맛평가에 직접적인 영향을 미치지 않는 것으로 판단됨.
- 적색도(a)는 대조구가 -0.89 ± 0.06 으로 가장 낮았으며, 간장첨가량이 늘어날수록 적색도가 증가하였음. 황색도(b)도 a값과 마찬가지로 대조구가 17.00 ± 0.13 으로 가장 낮았으며 간장이 첨가될수록 황색도가 증가하였음. 또한 닭죽은 대조구와 실험구 5가지 모두 L, a, b값의 유의적 차이가 있는 것으로 나타났음($p < 0.05$).

Table 3-2-15. 닭죽의 색도

Color value	chicken rice porridge					
	CRP-ST	CRP-S1	CRP-S2	CRP-S3	CRP-S4	CRP-S5
L	73.88±0.46 ^a	72.00±0.62 ^b	70.20±0.21 ^c	68.50±0.57 ^d	67.02±0.08 ^e	65.57±0.03 ^f
a	-0.89±0.06 ^f	0.21±0.04 ^e	1.18±0.03 ^d	2.07±0.06 ^c	2.83±0.05 ^b	3.52±0.08 ^a
b	17.00±0.13 ^f	19.32±0.05 ^e	21.10±0.07 ^d	22.53±0.04 ^c	23.70±0.05 ^b	24.62±0.09 ^a

¹⁾Mean±SD

^{a-f} Superscriptive letters in a row indicate significance at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

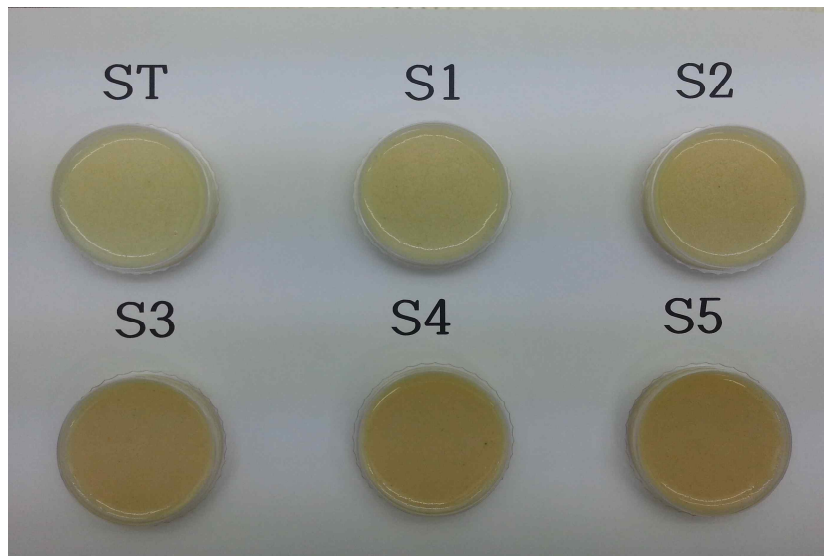


Fig. 3-2-17. 닭죽의 색도 비교 사진.

ST(Standard) : NaCl solution 4.00% S3 : Soysauce solution 15.00%
 S1 : Soysauce solution 5.00% S4 : Soysauce solution 20.00%
 S2 : Soysauce solution 10.00% S5 : Soysauce solution 25.00%

라. 샐러드드레싱의 pH

○ 전반적인 맛이나 짠맛의 평가 시 시료의 pH에 따른 영향을 알아보기 위해 샐러드드레싱의 pH를 측정 한 결과는 Table 3-2-16과 같음.

Table 3-2-16. 샐러드드레싱의 pH

pH	SD-ST	SD-S1	SD-S2	SD-S3	SD-S4	SD-S5
	3.00±0.11 ^{NS}	2.99±0.02 ^{NS}	2.98±0.02 ^{NS}	2.95±0.02 ^{NS}	2.92±0.01 ^{NS}	2.91±0.01 ^{NS}

¹⁾Mean±SD

²⁾NS :Not significant

- 셀러드드레싱의 pH는 대조구인 SD-ST가 3.00 ± 0.11 , 5~25% 간장희석용액 첨가 실험구가 $2.99 \pm 0.02 \sim 2.91 \pm 0.05$ 로 간장을 첨가할수록 pH가 감소하는 경향을 보였으나 대조구와 실험구간의 유의적 차이가 없었음.
- 소금과 간장으로 처리하여 만든 육포의 pH가 유의적으로 차이가 없었다는 보고와 일치하는 결과(Lim 등, 2012)임.

5. 동물성 단백질 가수분해물(eHAP)의 관능적 특성 및 짠맛 증진효과

가. 실험방법

(1) Ion Chromatography를 이용한 짠맛 증진물질의 Na 정량분석

- 짠맛 강도평가 시료 제조를 위하여 주관연구기관인 차의과학대학교에서 제공한 짠맛증진물질에 대해 ion chromatography를 사용하여 Na 함량 분석을 실시하였음.
- 나트륨 분석을 위한 시료는 제조된 소량의 시료를 HPLC급 증류수(Honeywell Brudick & Jackson Chemicals, Muskegon, MI, USA)로 희석한 후 syringe filter (PTFE 0.2 μ m, Tokyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하였으며, 사용된 컬럼은 본 컬럼(Dionex IonPac CG12A RFIC Analytical, Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA)과 가드 컬럼(Dionex IonPac CG12A RFIC Guard, Thermo Scientific Inc.)이었으며, Dionex ion chromatography (ICS-900, Thermo Scientific Inc.)를 이용하여 분석하였음. 표준곡선은 표준용액(Dionex Six Cation-II Standard, Thermo Scientific Inc.)을 이용하여 작성하였음.

(2) eHAP의 짠맛 강도평가

- 주관연구기관에서 제공한 동물성 단백질 가수분해물(eHAP)에 대한 짠맛증진효과를 알아보기 위하여 관능평가 요원을 대상으로 강도평가를 진행하였음. 주관연구기관에서 제조한 eHAP 짠맛증진물질은 액체 상태로 제공받아 Deep freezer (DFC-200AE, OPERON Co., Ltd, Korea)에서 5일 이상 동결 후 Warning Blender (HGB25E, Warning Laboratory Science, Torrington, CT, USA)에 분쇄하여 사용하였음.

(가) 검사요원 선정 및 강도평가

① 검사요원 선정

- 강도평가 요원은 기존에 짠맛 차이 훈련을 받은 패널 30명을 대상으로 짠맛 순위검사에서 정답률이 80% 이상으로 짠맛에 대한 판별력이 일정수준 이상이 되는 패널 21명을 선발하여 강도평가를 실시하였음.

② 짠맛 강도평가 방법

㉠ 평가 시료의 제조

○ eHAP 짠맛 강도 평가를 위한 시료를 제조하기 위하여 eHAP 특유의 색과 향을 배제할 수 있는 model broth를 사용하였으며, 평가시료의 eHAP 첨가량은 0.1, 1.0, 1.5, 2.0%로 eHAP 내 NaCl 농도를 계산한 후 최종 NaCl 농도는 30, 40, 50 mmol /L가 되도록 평가 시료를 제조하였으며, 그 방법은 Table 3-2-17, 3-2-18과 같음. 평가 시 짠맛 기준 농도로 제시된 시료는 model broth에 25 mmole에서 80 mmole 까지 5 mmole 간격으로 제조된 NaCl용액 12가지를 제공하였음.

Table 3-2-17. 강도평가를 위한 기준 시료 제조방법

Ingredients (g)	g/L											
	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80
Na-glutamate						1.90						
Maltodextrin						6.38						
yeast extract						2.10						
NaCl	1.46	1.75	2.05	2.34	2.63	2.92	3.21	3.05	3.80	4.09	4.38	4.67
Water	988.16	987.87	987.57	987.28	986.99	986.70	986.41	986.57	985.82	985.53	985.24	984.95
Total	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00

Table 3-2-18. 강도평가를 위한 eHAP 시료 제조방법

Ingredients (g)	g/L											
	30				40				50			
	0.1	1.0	1.5	2.0	0.1	1.0	1.5	2.0	0.1	1.0	1.5	2.0
model broth	997.25	988.25	983.25	978.28	996.66	987.66	982.66	977.66	996.08	987.08	982.08	977.08
Na-glutamate	1.89	1.88	1.87	1.86	1.89	1.88	1.87	1.86	1.89	1.88	1.87	1.86
Maltodewtrin	6.36	6.31	6.27	6.24	6.36	6.31	6.27	6.24	6.36	6.31	6.27	6.24
Yeast extract	2.09	2.08	2.06	2.05	2.09	2.08	2.06	2.05	2.09	2.08	2.06	2.05
Water	986.91	977.98	973.05	968.10	986.32	977.41	972.46	967.51	985.75	976.83	971.88	966.94
NaCl	1.75	1.75	1.75	1.75	2.34	2.34	2.34	2.34	2.92	2.92	2.92	2.92
eHAP	1.00	10.00	15.00	20.00	1.00	10.00	15.00	20.00	1.00	10.00	15.00	20.00
Total	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00

㊤ 평가방법

○ 제조된 시료는 15 cm 선척도(Line scale) 방법을 활용하여 짠맛에 대한 강도를 평가하도록 하였으며, 평가 시 하나의 시료 평가가 끝나고 난 후 식빵과 당근, 오이 등을 제공하여 입 안을 헹구도록 하였음. 평가 시 제공된 시료에는 난수표에서 번호를 무작위로 추출하여 시료에 각각 부여하였음.

(3) eHAP 짠맛증진물질을 이용한 식품 내 소금사용량 감소효과

(가) 조리적용 시 eHAP 범위 설정

- 훈련된 패널들이 짠맛을 구분할 수 있는 최소 NaCl mmole 농도는 5.0 mmole 이었으며, 이를 감안할 때 패널들이 짠맛 구분범위 내에서 짠맛증진효과를 기대할 수 있는 최소 농도는 eHAP 0.5%이상 일 것으로 예상할 수 있음. 따라서 eHAP 첨가량에 따른 짠맛증진효과가 나타날 것으로 예상되는 eHAP 0.5%, 그리고 증진효과가 있었던 eHAP 1.0%, 1.5%, 2.0% 중 조리적용 시 나타나는 감칠맛의 강도를 고려하여, eHAP 2.0%를 제외하였고, eHAP 0.1, 0.5, 1.0, 1.5%를 조리적용 시 최종 eHAP 첨가 농도로 결정하였음.

(나) 관능검사 패널 선정

- 조리적용 실험의 경우 앞서 강도평가에서 선발된 패널 21명을 최종 패널로 선정하였으며, 기호도 평가의 경우는 한식조리학과 재학생 50명을 대상으로 선발하여 평가하도록 하였음.

(다) 시료의 제조 및 평가방법

① 샐러드드레싱의 제조

- 샐러드드레싱의 재료 배합은 Park (2014), Fiona (2011)의 샐러드드레싱 제조 방법을 참고하였으며, 샐러드드레싱 대조구 제조에 사용된 NaCl 농도는 2.0%였으며, eHAP를 첨가하지 않은 대조구와 eHAP 첨가량을 0.1%, 0.5%, 1.0%, 1.5%로 한 첨가구를 비교평가 하였음.
- 샐러드드레싱의 제조 방법은 올리브유와 발사믹 소스, 후추를 Warning Blender (HGB2E, Warning Laboratory Science, Torrington, CT, USA)에 넣고 low단계로 1분, high단계로 30초 교반한 후 대조구에 사용된 NaCl과 비교평가 시료인 NaCl 및 eHAP를 첨가하여 high단계로 10초간 교반하였으며, 재료 배합비는 Table 3-2-19와 같음.
- 제공된 양상추는 하단부로부터 5cm를 제외한 부드러운 잎만 사용하여 가로 4 cm, 세로 3 cm로 잘라 생수에 2회 세척 한 후 야채 탈수기(Meyer mini salad spinner, Motor Millions Electric Industries Co., Korea, Seoul)에 1분 동안 탈수 후 냉장보관 하였으며, 평가 5분 전 냉장고에 보관한 양상추를 정량 제공하여 시료와 20번 교반한 뒤 포크(DS포크-대 155mm, DaeHeung Industrial Co., Jeonju, Korea)를 이용하여 시료를 먹을 수 있도록 하였음.
- 각 시료에는 난수표에서 선택한 세 자리의 난수 번호를 무작위로 선택하여 구분하도록 하였으며, 평가 시 샐러드드레싱의 올리브오일이 입에 오래 남아있어 혀의 둔화현상이 올 것을 고려하여 시료와 시료 사이에 입을 행굴 수 있도록 식빵(매일아침토스트, Samlip general foods co., Siheung, Korea)과 오이, 당근을 함께 제공하였음.

Table 3-2-19. 샐러드드레싱의 재료 배합비

Ingredients (g)		Based salad dressing				
Olive oil		570.00				
Balsamic vineger		420.00				
Ground black pepper		10.00				
Total		1000.00				
Ingredients (g)	ST ¹⁾	P1 ²⁾	P2	P3	P4	
Based salad dressing	985.00	984.00	980.00	975.00	970.00	
NaCl	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	
eHAP ³⁾	-	1.00	5.00	10.00	15.00	
Total	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	

¹⁾SC : Standard with salt, NaCl solution 1.5%

²⁾P1~P4 : Variant Sample of eHAP with various concentration (NaCl content of 1.5%)

P1 : eHAP peptide 0.1%, P2 : eHAP peptide 0.5%,

P3 : eHAP peptide 1.0%, P4 : eHAP peptide 1.5%

³⁾eHAP : Protein except for NaCl

② 북어국의 제조

- 북어국의 재료 배합은 Lee 등(1994)을 참고하여 제조하였음. 북어국의 대조구에 사용된 NaCl 농도는 0.6% 였으며, eHAP를 첨가하지 않은 대조구와 eHAP 첨가량을 0.1%, 0.5%, 1.0%, 1.5%로 한 첨가구를 비교평가 하였음.
- 북어국의 제조 방법은 북어채 60g을 생수에 담가 30분간 불린 다음 실온에서 2시간 동안 물기를 빼고 냄비(플래티나 NY-1432, Kitchenart Co., Jeonju, Korea)에 참기름과 다진마늘, 불린 북어를 넣어 핫플레이트(KEP-TM1500, Kitchen flower Co., Gimpo, Korea)의 5단계에서 1분간 볶아준 후 상온(23℃)의 생수를 넣어 오른쪽, 왼쪽 각각 5번 씩 섞어준 뒤 5단계에서 4분간 끓여주고, 계란을 넣고 30초 뒤 오른쪽, 왼쪽 각각 5번 씩 섞어준 뒤 파를 넣어 5단계에서 4분간 끓인 후 1단계에서 2분간 더 끓인 뒤 조리용 여과지(Filterbag for source, greenaid Co., Hwaseong, Korea)로 여과한 국물만 모아 1시간 동안 상온에 식힌 후 대조구에 사용된 NaCl과 비교평가 시료인 NaCl 및 eHAP를 첨가하여 시료를 제조하였으며, 재료 배합비는 Table 3-2-20과 같음.
- 백색의 일회용 70 mL 용기에 20 mL씩 담고, 뚜껑을 닫아 평가 30분 전 전기온장고(WC-HC 070, Woosung Enterprise Co., Korea)에서 60℃의 온도로 보관 후 제공하였으며, 시료는 일회용 스푼(일회용 빙수수저 140 mm, Daeheung Industrial Co., Jeonju, Korea)을 이용하여 먹을 수 있도록 하였으며, 이 때 각 시료에는 난수표에서 3자리의 난수번호를 무작위로 선택하여 시료번호로 사용함.

Table 3-2-20. 북어국의 재료배합비

Ingredients (g)	Based dried pollack soup				
Sesame oil	3.00				
soaked dried Pollack	105.00				
Mashed garlic	6.00				
Green onion	6.00				
Eggs	33.00				
water	847.00				
Total	1000.00				
Ingredients (g)	ST ¹⁾	P1 ²⁾	P2	P3	P4
Based dried pollack soup	994.00	993.00	989.00	984.00	979.00
NaCl	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
eHAP ³⁾	-	1.00	5.00	10.00	15.00
Total	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00

¹⁾ST : Standard with salt, NaCl solution 0.6%

²⁾P1~P4 : Variant Sample of eHAP peptide with various concentration (NaCl content of 0.6%)

P1 : eHAP peptide 0.1%, P2 : eHAP peptide 0.5%,

P3 : eHAP peptide 1.0%, P4 : eHAP peptide 1.5%

³⁾eHAP : Protein except for NaCl

③ 숙주나물의 제조

- 숙주나물 무침의 제조는 Lee 등(1994)을 참고하여 제조하였음. 숙주나물 무침의 NaCl 농도는 0.7% 였으며, eHAP를 첨가하지 않은 대조구와 eHAP 첨가량을 0.1%, 0.5%, 1.0%, 1.5%로 한 첨가구를 비교평가 하였음.
- 숙주나물의 제조 방법은 숙주를 흐르는 물에 2회 세척 후 야채탈수기에 1분간 탈수하여 물기를 제거하였으며, 냄비에 숙주 120g과 생수 1 L를 넣어 10분간 가열 후 찬물에 5분간 냉각시켰음. 이후 물기를 제거하여 분량의 파, 마늘, 참깨, 참기름을 넣고 2분간 섞어주었음. 시료는 NaCl과 eHAP를 일정량 넣어 제조하였으며, 숙주나물의 재료배합비는 표 3-2-21과 같음.
- 시료는 백색의 일회용 70 mL 용기에 5 g씩 담아 뚜껑을 닫고 냉장(5℃) 보관 후 평가 10분 전에 상온에 보관하였다가 평가하도록 하였으며, 시료 평가 시 시료 전체를 균일하게 섞어 포크(DS포크-대 155 mm, Daesung Industrial Co., Jeonju, Korea)를 이용하여 일정량의 시료를 먹도록 하였고, 이 때 각 시료에는 난수표에서 3자리 난수번호를 무작위로 선택하여 시료번호로 사용하였음.

Table 3-2-21. 숙주나물의 재료배합비

Ingredients (g)		Based mungbean sprouts				
Blanched Mungbean sprouts		930.00				
Mashed green onion		28.00				
Mashed garlic		15.00				
Sesame seed powder		12.00				
sesame oil		15.00				
Total		1000.00				
Ingredients (g)	ST ¹⁾	P1 ²⁾	P2	P3	P4	
Based mungbean sprouts	993.0	992.0	988.0	983.0	978.0	
NaCl	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	
eHAP ³⁾	-	1.00	5.00	10.00	15.00	
Total	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	

¹⁾ST : Standard with salt, NaCl solution 0.7%

²⁾P1~P4 : Variant Sample of eHAP peptide with various concentration (NaCl content of 0.7%)

P1 : eHAP peptide 0.1%, P2 : eHAP peptide 0.5%,

P3 : eHAP peptide 1.0%, P4 : eHAP peptide 1.5%

³⁾eHAP : Protein except for NaCl

④ 평가방법

- 조리적용 시료의 짠맛 특성 강도평가는 2-AFC (Two-alternative forced choice) 평가 방법을 활용하였으며, 제시도니 시료의 짠맛특성 평가를(매우 약하다-매우 강하다)하였음. 기호도는 15 cm 선척도(line scale) 방법을 활용하여 좋아하는 정도를 (매우 좋다-매우 나쁘다) 평가하였음.
- 평가 시 제공된 식빵과 오이, 당근을 제공하여 시료가 바뀔 때 마다 수시로 먹도록 하였으며, 5분 동안 휴식을 취하게 하여 혀의 둔화현상을 최소화 하도록 하였음.

(라) 시료의 이화학적 특성 분석

① 색도 측정

- 각 시료의 색도는 지름 3 cm의 원형 평판접시(petri dish)에 10 mL씩 담아 색차계 (CM-5, Minolta Co., Japan)를 이용하여 L값(명도, lightness), a값(적색도, Redness), b값(황색도, yellowness)를 3회 반복 측정하여 평균값으로 사용함. 이 때, 표준 백판값은 L=96.50, a=-0.10, b=-0.35 이었음.

② pH 측정

- 각 시료의 pH 값은 시료 10 ml을 따서 15 ml Conical Tube (Centrifuge tubes FA2098, BD Falcon, USA)에 담아 pH meter (Docu-pH meter, sartorius, Germany)로 상온에서 3회 반복 측정하였음.

③ 통계분석

- 조리적용 시 대조구와 eHAP 첨가구 간에 짠맛 차이를 알아보기 위하여 비모수 검정 중 대응-2표본테스트를 수행하였으며, 유의적 차이를 검증하기 위하여 윌콕슨 부호순위 검정 (Wilcoxon signed rank test)을 수행하였음. 기호도 평가와 이화학적 특성은 시료간의 유의적인 차이를 알아보기 위하여 분산분석(ANOVA), Duncan 다중범위검정(Duncan's multiple range test)으로 수행하여 유의성을 나타내었음. 모든 통계 분석의 유의수준은 $p < 0.05$ 였으며, SPSS Version 21.0 package program (SPSS INC., Chicago, IL, USA)을 사용하였음.

(4) 묘사분석을 통한 eHAP 짠맛증진물질의 관능적 특성 평가

(가) 묘사분석 패널의 선발

- 묘사분석과 향미프로필 패널은 짠맛 순위 검사 훈련을 받은 패널들 중 짠맛과 단맛, 쓴맛, 신맛, 감칠맛에 대한 감지검사에서 5가지의 맛을 모두 느낀 패널을 대상으로 기본 맛에 대한 순위 평가 훈련을 진행하였으며, 임의로 설정한 농도 간격 간에 차이를 인지할 수 있는 패널 12명을 최종적으로 선발하였음.

(나) 정량적 묘사분석(QDA, Quantitative Descriptive Analysis)

- 정량적 묘사분석 언어개발을 위한 시료는 생수에 eHAP를 각각 1.0%, 2.0% (w/v)로 제조하여 제공하였음. 시료는 70 mL 일회용 종이컵(소주컵)에 20 mL씩 정량을 담아 색, 향, 짠맛, 단맛, 신맛, 쓴맛, 짙은맛, 감칠맛에 대한 언어개발 및 평가시료에 따른 해당 기준물질들의 강도를 측정하고 패널들이 스스로 인지하도록 하였음.
- 평가 항목 중 색의 경우 DIC COLOR GUIDE (3.2 Version, DIC Co., Japan)를 활용하여 관련된 색상을 기준으로 하여 강도를 평가하였음. 모든 시료는 1회용 멸균 스포이드 (Sterile Disposable Transfer Pipette 1.5 mL, Office ahn, Gwangju, Korea)를 사용하여 1 mL 정량을 먹을 수 있도록 하였으며, 같이 제공되는 식빵과 물을 이용하여 입을 행구도록 하였음. 또한, 한 가지 시료의 평가가 끝난 후에는 30초 이상 휴식을 취하도록 하였고, 평가는 일주일에 1시간 30분씩 2회로 진행되었으며, 10회 이상 반복 진행함.

(다) 향미프로필(Flavor Profile)

- eHAP의 활성탄 처리 전, 후 시료의 관능적 특성 차이를 알아보기 위하여 묘사분석 방법 중 향미프로필 방법을 활용하였으며, 색과 향, 맛에 대한 관능적 특성을 스펙트럼 묘사분석 방법으로 표현하였음.
- 기준시료(R)는 50 mmol/L NaCl Model Broth를 사용하여 평가 시 기준을 제공하였고, 시료는 생수에 eHAP의 함량을 각각 1.0%, 2.0% (w/v)농도로 제조하였음. 또한, 시료의 먹는 양에 대한 평가 오차를 줄이기 위하여 시료는 70 mL 일회용 종이컵(소주컵)에 20 mL씩 제공하여 스포이드로 1 mL 정량을 스푼에 떨어뜨려 먹어본 후 평가하도록 하였음.

(라) 주성분분석(PCA, Principal Components Analysis)

○ 개발된 eHAP 관능적 특성언어와 활성탄 처리 전, 후의 eHAP 시료에 대한 상관관계를 알아보기 위해 주성분 분석을 실시하였음(XLSTAT, Ver.2015, Addinsoft, Paris, France).

(마) 통계분석

○ 통계분석은 묘사분석 시 개발된 언어와 시료 간의 차이를 알아보기 위해 분산분석(ANOVA) 중 일원배치분산분석을 수행하였으며, 유의성을 검정하기 위하여 Duncan 다중범위검정(Duncan's multiple range test)을 수행하음. 통계 분석의 유의 수준은 $p < 0.05$ 였으며, SPSS Version 21.0 package program (SPSS INC., Chicago, IL, USA)을 사용하였음.

나. 실험결과

(1) Ion Chromatography를 이용한 짠맛증진물질의 Na 정량분석 결과

○ 주관연구기관에서 제공한 동물성 식품 (멸치 단백질 가수분해물, eHAP)의 가수분해물에 경우 Na함량을 분석한 결과 6.8%의 Na함량을 나타내었음.

Table 3-2-22. eHAP, eHVP 짠맛증진물질 Na정량 결과

시료명	나트륨함량 (g/L)
멸치 단백질 가수분해물(eHAP)	67.65

(2) eHAP의 짠맛 강도평가 결과

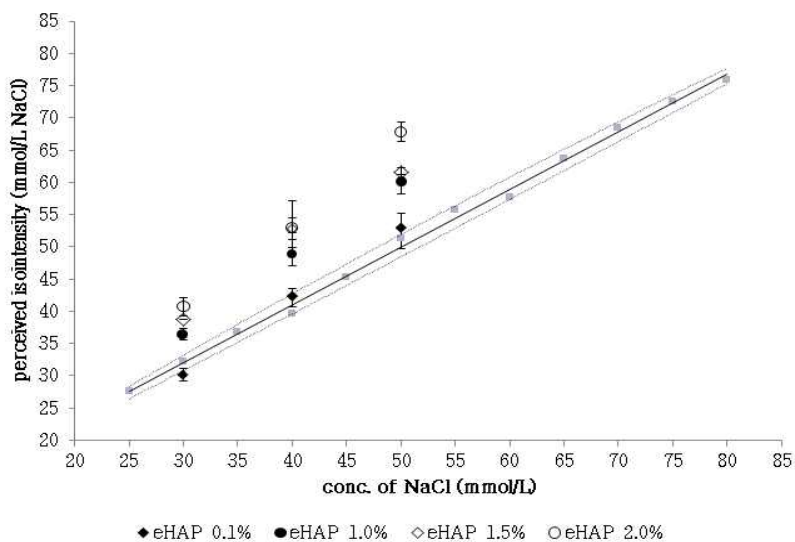


Fig. 3-2-18. 각기 다른 NaCl 농도에서 eHAP의 첨가량에 따른 짠맛증진효과.

- 강도평가 결과 30 mmol/L NaCl에서 eHAP 첨가량이 0.1, 1.0, 1.5, 2.0%일 때, 짠맛증진효과는 각각 30.11 mmole, 36.20 mmole, 38.80 mmole, 40.79 mmole 이었으며, 40 mmol/L NaCl에서는 42.38 mmole, 48.85 mmole, 52.82 mmole, 57.96 mmole의 짠맛증진효과를 보였으며, 50 mmol/L NaCl은 52.99 mmole, 60.14 mmole, 61.66 mmole, 67.79 mmole의 짠맛 증진효과가 있는 것으로 나타남(Fig. 3-2-18).

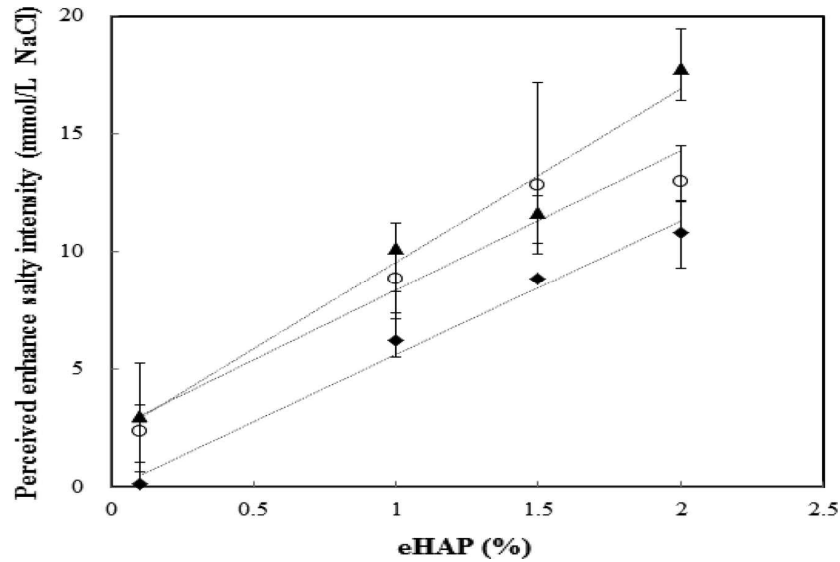


Fig. 3-2-19. 동일한 소금농도에서 eHAP 첨가량에 따른 짠맛증진효과.

- Fig. 3-2-19은 동일한 소금농도에서 eHAP의 짠맛증진효과로 결과적으로 eHAP 첨가량이 증가할수록 짠맛 증진 효과가 직선적으로 증가하는 것으로 나타남.

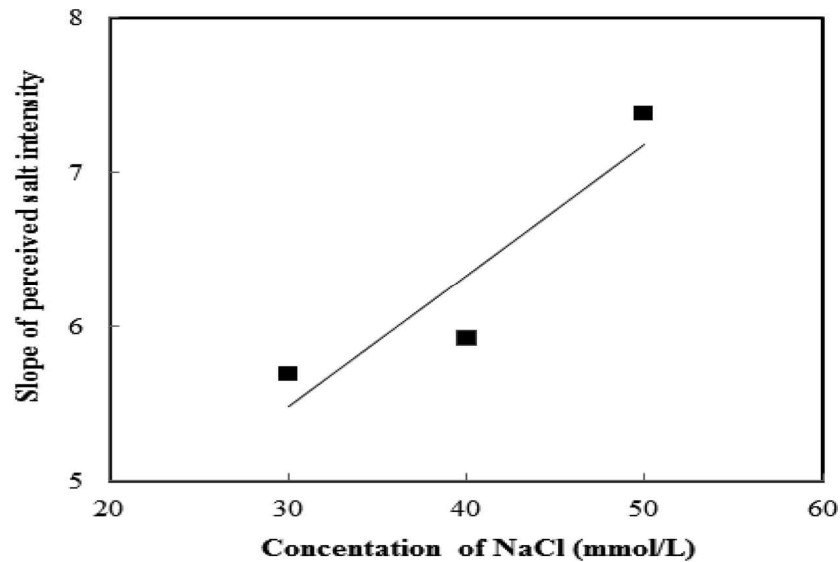


Fig. 3-2-20. 동일한 eHAP 첨가량에서 NaCl 농도에 따른 짠맛증진효과.

- 동일한 eHAP 첨가량에서 NaCl 농도에 따른 짠맛증진효과는 Fig. 3-2-20과 같으며,

eHAP의 첨가량이 2.0%일 경우 소금 농도 30mmol/L에서는 10.79 mmol/L, 40 mmol/L 에서는 12.96 mmol/L, 50 mmol/L 에서는 17.79 mmol/L의 짠맛증진효과를 보임. 결과적으로 소금 농도가 높을수록 짠맛 증진효과가 더 크게 나타남을 알 수 있음.

(3) eHAP 짠맛증진물질을 이용한 식품 내 소금사용량 감소효과

(가) 샐러드드레싱

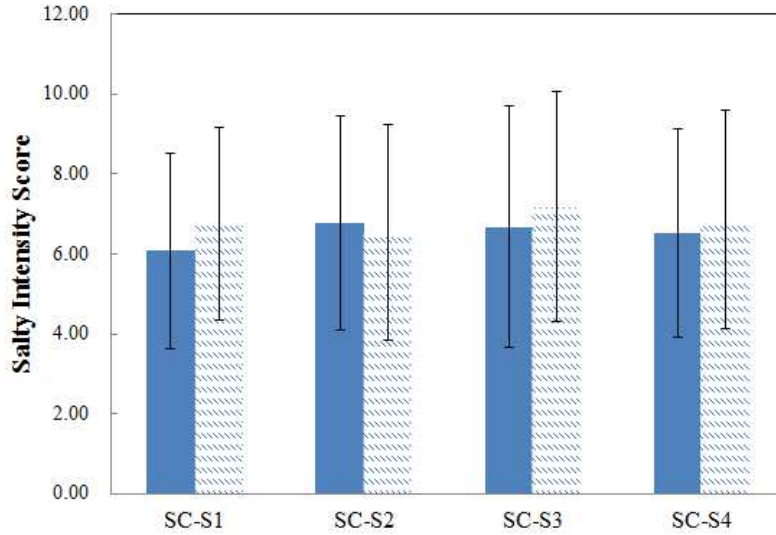


Fig. 3-2-21. 샐러드드레싱의 짠맛 강도평가.

SC : NaCl solution 1.5%,

S1 : eHAP 0.1% in NaCl 1.5% S3 : eHAP 1.0% in NaCl 1.5%

S2 : eHAP 0.5% in NaCl 1.5% S4 : eHAP 1.5% in NaCl 1.5%

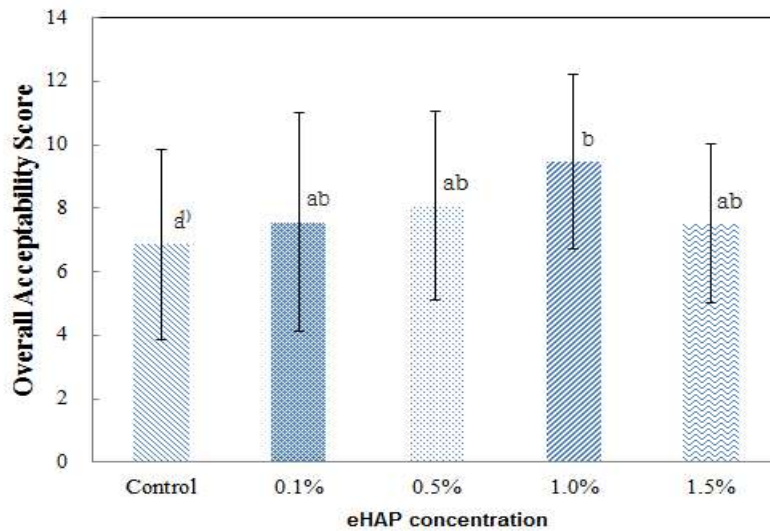


Fig. 3-2-22. 샐러드드레싱의 전반적인 맛 기호도.

SC : NaCl solution 1.5%,

S1 : eHAP 0.1% in NaCl 1.5% S3 : eHAP 1.0% in NaCl 1.5%
 S2 : eHAP 0.5% in NaCl 1.5% S4 : eHAP 1.5% in NaCl 1.5%

- eHAP 첨가량에 따른 셀러드드레싱의 강도 평가 결과는 Fig. 3-2-21과 같음. 대조구와 비교구간의 짠맛강도에는 유의적인 차이가 없었으며, 셀러드드레싱의 짠맛증진효과는 대조구 대비 0.1%첨가구 에서 11%의 증진효과가 있었으며, 0.5% 첨가구 에서는 증진효과가 없는 것으로 나타났고, 1.0% 첨가구 에서는 7%, 1.5%의 첨가구 에서는 5%의 증진효과가 있었는데, 결과적으로 eHAP 첨가량에 따른 증진효과에 대한 상관관계를 확인하기는 어려웠으며, 이는 셀러드드레싱의 신맛성분이 짠맛으로 오미 되어 평가된 것으로 생각됨.
- eHAP 첨가량에 따른 기호도는 Fig. 3-2-22와 같으며, 가장 기호도가 높게 평가된 시료는 1.0% 첨가구였으며, 시료간의 유의적인 차이 또한 1.0% 첨가구와 대조구에서 확인이 되었음. 대체적으로 eHAP 첨가량이 증가할수록 기호도가 높게 나타났으며, 이는 eHAP의 여러 맛 성분들로 인해 산도가 낮아지고 맛의 조화를 이룬 것으로 생각됨. 반면 1.5% 첨가구의 경우 다른 첨가구보다 기호도가 떨어지는 경향을 보였으며, 이는 감칠맛의 농도가 높아지면서 기호도가 떨어진 것으로 생각됨.

(나) 북어국

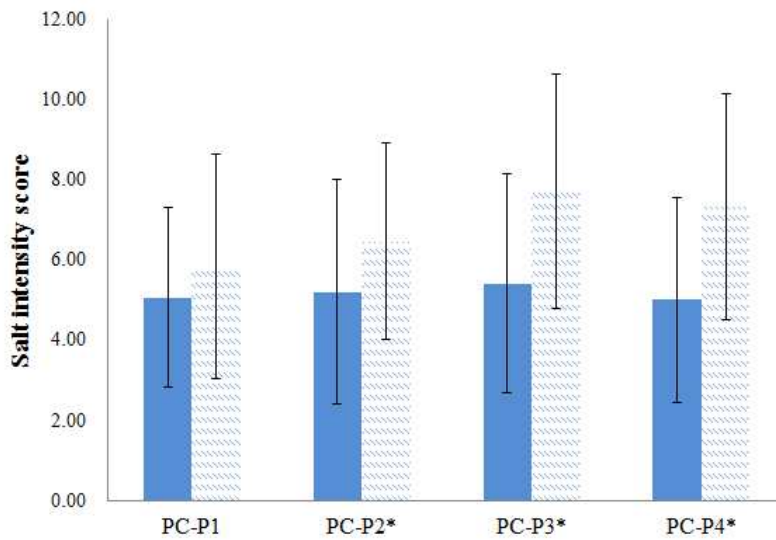


Fig. 3-2-23. 북어국의 짠맛 강도평가.

SC : NaCl solution 0.6%,
 S1 : eHAP 0.1% in NaCl 0.6% S3 : eHAP 1.0% in NaCl 0.6%
 S2 : eHAP 0.5% in NaCl 0.6% S4 : eHAP 1.5% in NaCl 0.6%

- eHAP 첨가량에 따른 북어국의 강도 평가 결과는 Fig. 3-2-23과 같음. 실험 결과 북어국의

짠맛증진 효과는 대조구 대비 0.1% 첨가구에서 15%, 0.5% 첨가구에서는 25%, 1.0% 첨가구에서는 42%, 1.5% 첨가구에서는 46%의 증진효과가 있는 것으로 나타났고, 0.1% 첨가구를 제외한 모든 첨가구 시료에서 대조구와 유의적인 차이가 있는 것으로 나타남. 이는 북어국에 들어있는 여러 맛 성분과 감칠맛, 쓴맛 성분이 생선류에 들어있는 핵산계 감칠맛인 IMP(Inosine monophosphate)와 어우러져 서로 상승작용을 하여(Choi, 2015) 짠맛으로 발현된 것으로 생각됨.

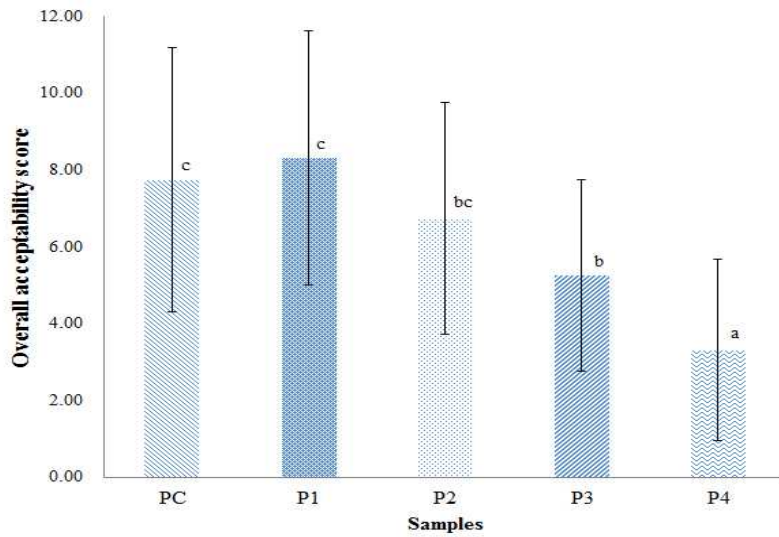


Fig. 3-2-24. 북어국의 전반적인 기호도.

SC : NaCl solution 0.6%,

S1 : eHAP 0.1% in NaCl 0.6% S3 : eHAP 1.0% in NaCl 0.6%

S2 : eHAP 0.5% in NaCl 0.6% S4 : eHAP 1.5% in NaCl 0.6%

- eHAP 첨가량에 따른 북어국의 기호도는 Fig. 3-2-24와 같으며, 0.1% 첨가구에서 가장 높은 기호도를 나타내었으며, 이후 첨가량이 증가할수록 기호도가 낮아지는 경향을 나타냄. 평가 중 쓴맛에 대한 의견이 나왔는데, eHAP의 유리아미노산 중 쓴맛을 나타내는 Histidine, Arginine, Valine, Methionine, Lysine 등과 감칠맛을 내는 glutamic acid의 영향으로 eHAP 첨가량이 증가할수록 이들 맛이 강해져 기호도가 낮아진 것으로 생각됨.

(다) 숙주나물

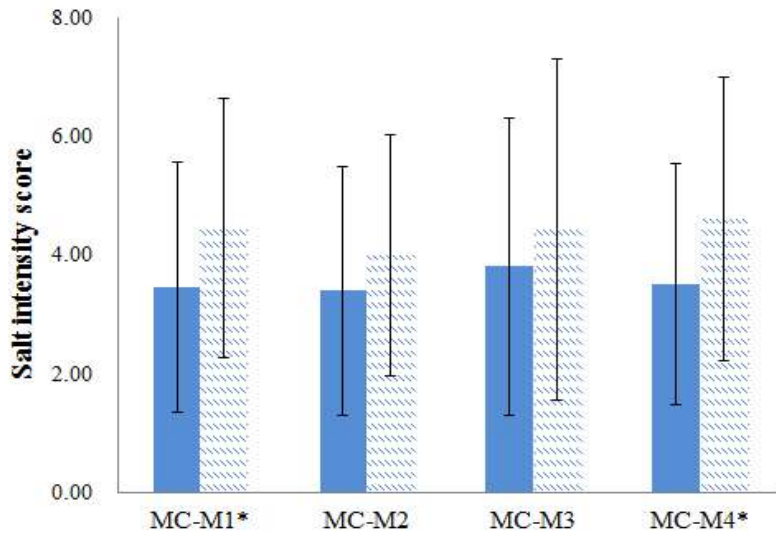


Fig. 3-2-25 . 숙주나물의 짠맛 강도평가.

SC : NaCl solution 0.7%,

S1 : eHAP 0.1% in NaCl 0.7% S3 : eHAP 1.0% in NaCl 0.7%

S2 : eHAP 0.5% in NaCl 0.7% S4 : eHAP 1.5% in NaCl 0.7%

○ eHAP 첨가량에 따른 숙주나물의 강도평가 결과는 Fig. 3-2-25와 같음. 실험결과 숙주나물의 짠맛증진 효과는 대조구 대비 0.1% 첨가구 에서 29%의 짠맛증진효과가 있었으며, 0.5% 첨가구에서 18%, 1.0% 첨가구 에서는 16%, 1.5% 첨가구 에서는 31%의 증진효과를 보였으며, 대조구와 비교하였을 때, 0.1% 및 1.5% 첨가구 에서 유의적인 차이가 나타남.

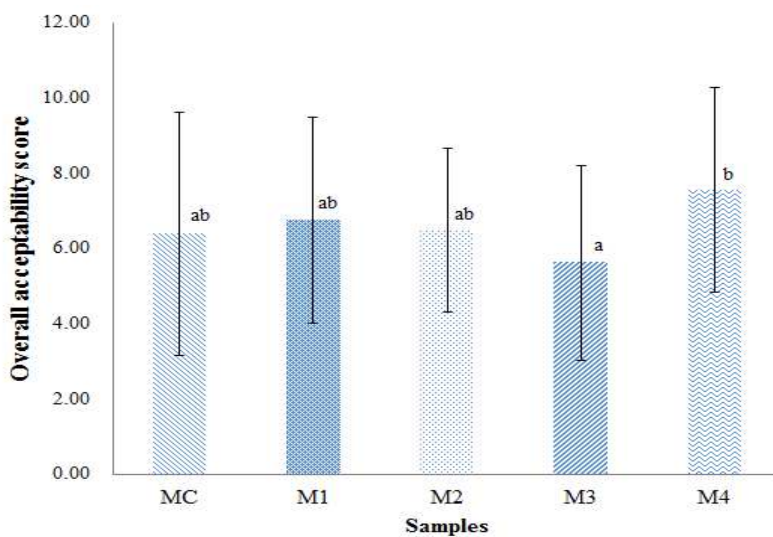


Fig. 3-2-26. 숙주나물의 전반적인 맛 기호도.

SC : NaCl solution 0.7%,

S1 : eHAP 0.1% in NaCl 0.7% S3 : eHAP 1.0% in NaCl 0.7%

S2 : eHAP 0.5% in NaCl 0.7% S4 : eHAP 1.5% in NaCl 0.7%

○ eHAP 첨가량에 따른 숙주나물의 전반적인 맛 기호도는 Fig. 3-2-26과 같으며, 다른 조리적용 실험보다 높은 기호도를 나타냄. 특히 1.5% 첨가구에서 기호도가 가장 높게 나타났으며, 대조구와 비교하였을 때 유의적인 차이는 나타나지 않음. 이처럼 다른 조리적용 실험보다 기호도가 높게 나타난 이유는 숙주나물 무침 시 넣은 파, 마늘 등의 향신채의 영향으로 이들이 이미와 이취를 마스킹해주면서, 본연의 맛은 유지시켜주어 이와 같은 결과가 나타난 것으로 생각됨(Kim, 2012).

(라) 시료의 색도 및 pH

① 샐러드드레싱

○ 짠맛이나 전반적인 맛의 평가 시 시료의 색에 따른 영향을 알아보기 위하여 샐러드드레싱의 색도를 측정하였으며, 그 결과를 Table 3-2-23과 Fig. 3-2-27에 나타내었음.

Table 3-2-23. 샐러드드레싱의 색도 및 pH

	salad dressing				
	SC ¹⁾	S1 ²⁾	S2	S3	S4
pH	2.64±0.03 ^{3)e}	2.79±0.03 ^d	2.95±0.01 ^c	3.11±0.02 ^b	3.23±0.03 ^a
Color					
L	4.55±0.26 ^c	6.56±0.97 ^b	9.97±0.54 ^a	9.05±0.46 ^a	10.31±0.35 ^a
a	9.00±0.19 ^d	10.17±0.62 ^{ab}	10.44±0.01 ^a	10.17±0.88 ^{ab}	9.30±0.01 ^{bc}
b	4.47±0.20 ^b	4.60±1.04 ^b	6.48±0.46 ^a	6.77±1.36 ^a	6.84±0.31 ^a

¹⁾SC : Control of salad dressing (NaCl solution 1.5%)

²⁾S1~S4 : Samples of salad dressing with different contents of eHAP (NaCl content of 1.5%)

S1 : eHAP 0.1%, S2 : eHAP 0.5%,

S3 : eHAP 1.0%, S4 : eHAP 1.5%

³⁾Mean±SD

^{a-e} Means are significantly different within the same row at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test

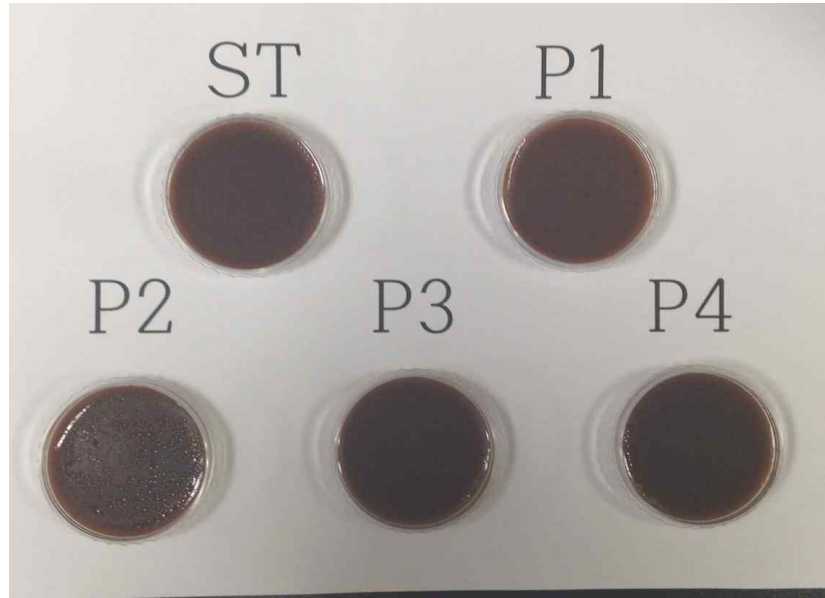


Fig. 3-2-27. eHAP 첨가량에 따른 샐러드드레싱.

- 샐러드드레싱의 pH 측정 결과 대조구와 모든 시료간에 유의적인 차이가 나타났으며 ($p < 0.05$), 첨가구가 높아질수록 pH 값도 높아지는 경향을 보임. 이는 eHAP를 동결건조하기 전 액상형태로 제조된 eHAP의 pH값이 5.8 ± 0.3 이었던 것을 미루어 볼 때 eHAP와 샐러드드레싱이 혼합되면서 pH 값이 증가한 것으로 생각됨.
- 샐러드드레싱의 색도 측정 결과 명도(lightness, L)는 소금만을 넣은 대조구가 가장 낮게 나타났으며, eHAP 첨가량이 증가할수록 명도도 높아지는 경향을 나타내었음. 이는 eHAP의 색이 황갈색으로 eHAP가 첨가되지 않은 샐러드드레싱의 색보다 밝아서 나타나는 것으로 보임. eHAP의 첨가량이 가장 적은 0.1%를 제외하면 나머지 실험구의 경우 명도값에 유의적인 차이가 없는 것으로 나타남. 황색도(yellowness, b)의 경우도 명도와 같은 경향을 나타내었으며, 이는 eHAP 자체의 색이 노란색으로 이에 의한 영향으로 보임. 적색도(redness, a)는 eHAP 첨가량에 따른 명확한 경향이 보이지는 않았음.

② 북어국

Table 3-2-24. 북어국의 색도 및 pH

	Dried pollack soup				
	PC ¹⁾	P1 ²⁾	P2	P3	P4
pH	7.08±0.02 ^a	6.98±0.01 ^b	6.68±0.01 ^c	6.43±0.01 ^d	6.33±0.01 ^e
Color					
L	42.59±0.044 ^a	41.82±0.03 ^b	40.41±0.03 ^c	38.15±0.03 ^d	37.21±0.02 ^e
a	2.61±0.02 ^c	-3.07±0.02 ^d	-3.38±0.01 ^e	-2.49±0.02 ^b	-1.4±0.01 ^a
b	-3.19±0.01 ^e	-0.43±0.05 ^d	7.83±0.04 ^c	13.67±0.06 ^b	17.69±0.05 ^a

¹⁾PC : Control of dried pollack soup (NaCl solution 0.7%)

²⁾P1~P4 : Samples of dried pollack soup with different contents of eHAP (NaCl content of 0.7%)

P1 : eHAP 0.1%, P2 : eHAP 0.5%,

P3 : eHAP 1.0%, P4 : eHAP 1.5%

³⁾Mean±SD

^{a-e} Means are significantly different within the same row at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test

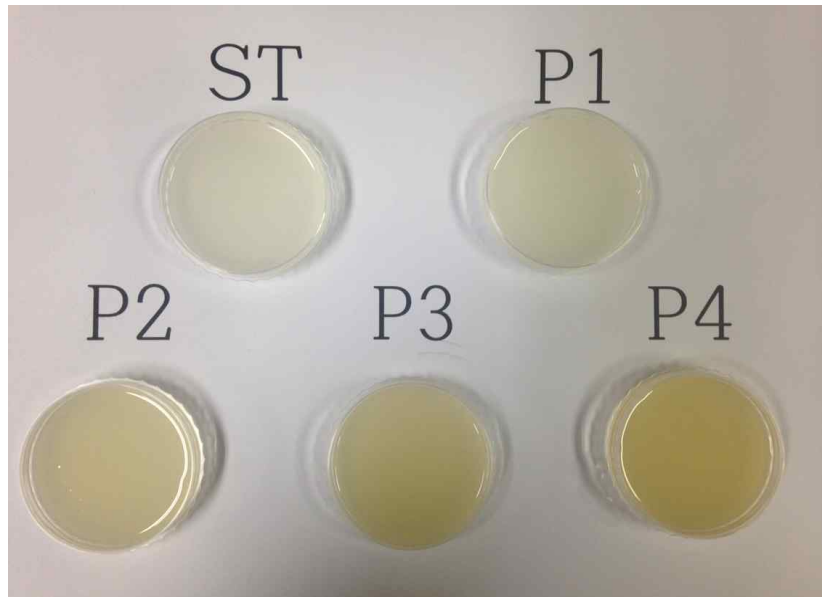


Fig. 3-2-28. eHAP 첨가량에 따른 북어국.

○ 북어국의 pH 측정 결과 소금만이 첨가된 대조구의 경우 7.08±0.02, 실험구의 경우에는 6.98±0.01 ~ 6.33±0.01로 eHAP의 첨가량이 증가함에 따라 pH가 낮아지는 경향을 보였으며, 이는 eHAP의 pH 값이 5.80±0.03으로 eHAP의 첨가량이 증가함에 따라 pH가 감소한 것으로 판단됨.

○ 북어국의 색도 측정 결과 명도(lightness, L)는 소금만을 넣은 대조구가 가장 높은 값을 보였으며, eHAP 첨가량이 많아질수록 값이 낮아지는 경향을 나타내었음. 황색도(yellowness, b)를 보면 명도값과는 반대로 소금만을 첨가한 대조구가 가장 낮은 값을 보였으며, eHAP 첨가량이 증가할수록 값이 크게 높아지는 경향을 보였음. 이는 eHAP 자체

의 색이 황색을 띠고 있어 eHAP 첨가량이 많아짐에 따라 명도값은 낮아지고 황색도는 증가하는 것으로 생각됨.

③ 숙주나물 무침

Table 3-2-25. 숙주나물의 색도 및 pH

	Mungbean sprout				
	MC ¹⁾	M1 ²⁾	M2	M3	M4
pH	5.41±0.02 ^e	5.45±0.01 ^d	5.52±0.01 ^c	5.58±0.01 ^b	5.70±0.01 ^a
Color					
L	66.30±0.03 ^{3)e}	66.14±0.05 ^d	65.21±0.01 ^c	64.64±0.04 ^b	63.56±0.01 ^a
a	2.62±0.01 ^a	2.68±0.04 ^b	2.81±0.04 ^c	2.95±0.02 ^d	3.27±0.00 ^e
b	21.00±0.13 ^a	21.22±0.26 ^b	21.65±0.08 ^c	22.38±0.01 ^d	23.34±0.03 ^e

¹⁾MC : Control of mungbean sprout (NaCl solution 0.6%)

²⁾M1~M4 : Samples of mungbean sprout with different contents of eHAP (NaCl content of 0.6%)

M1 : eHAP 0.1%, M2 : eHAP 0.5%,

M3 : eHAP 1.0%, M4 : eHAP 1.5%

³⁾Mean±SD

^{a-e} Means are significantly different within the same row at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test

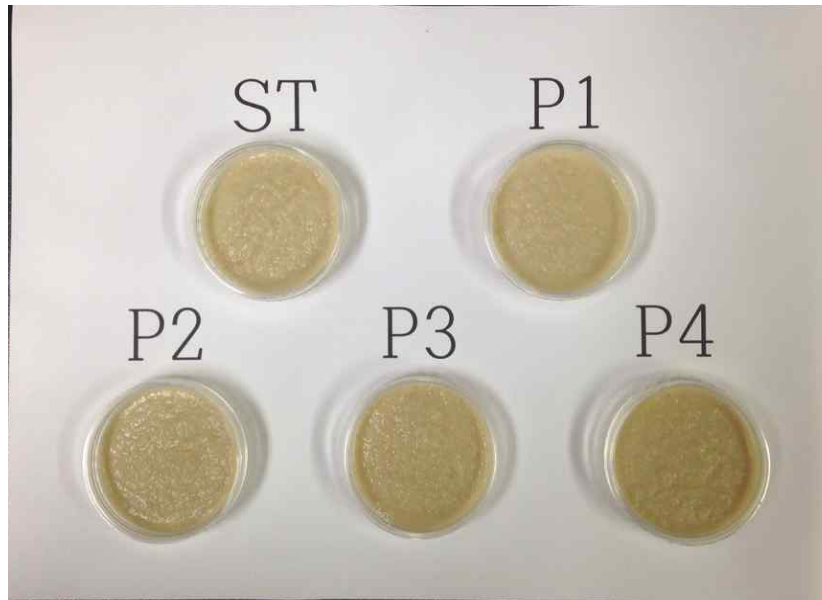


Fig. 3-2-29. eHAP 첨가량에 따른 숙주나물.

○ 숙주나물의 pH 측정결과 숙주나물의 pH를 보면 소금만이 첨가된 경우에는 5.41±0.02, 실험구는 5.45±0.01-5.70±0.01으로 eHAP의 함량이 늘어감에 따라 pH가 증가하는 경향을 보였는데(Table 3-2-25), 앞선 북어국과 마찬가지로 첨가된 eHAP의 pH의 값이 5.80±0.03으로 대조구에 비해 높아 pH가 증가하는 것으로 판단됨.

○ 숙주나물의 색도 측정 결과 북어국과 마찬가지로 명도(L)의 경우 eHAP 첨가량이 증가함

에 따라 값이 감소하는 경향을 나타내었으며, 황색도와 적색도는 eHAP 첨가량이 증가함에 따라 함께 증가하는 경향을 나타내었음. 수치적으로도 유의적인 차이가 있는 것으로 나타남($p<0.05$).

(4) 묘사분석을 통한 eHAP 잔맛증진물질의 관능적 특성 평가

(가) 정량적 묘사분석(QDA, Quantitative Descriptive Analysis)

Table 3-2-26. eHAP의 묘사특성 정의

Sensory attributes	Definition	References	Intensity 0-11(12) DIC-F27
Appearance	yellow-brown color	DIC COLOR GUIDE(3.2 Version, DIC Co., Japan)	- DIC-2532
Flavor/ odor	MSG	Flavor related with sausage	8
	Kanari aekjeot solution	Flavor related with 1.0% Kanari aekjeot solution	5
salty	dried bonito	Flavor related with dried bonit	10
	dried cuttlefish	salty taste related with dried cuttlefish	7
	dried Anchovy	salty taste related with dried Anchovy	11
	sea water	salty taste related with sea water	9.5
	bittern	salty taste related with bittern	8
sweet	dried bonito	salty taste related with dried bonit	7
	brisket of beef and radish soup	sweet taste related with brisket of beef and radish soup	7
	soybean paste	taste related with soybean paste	6.5
	Flesh shrimps	sweet taste related with boiled make shrimps in water	8
	dried shrimps	sweet taste related with boiled make dried shrimps in water	9
sour	black tea	sour taste related with black tea infuse in water	3
	soybean paste	sour taste related with soybean paste	9
	dark soy sauce solution	sour taste related with soup dark soy sauce solution	6.5
	soy sauce solution	sour taste related with soup soy sauce solution	7
bitter	bittern	bitter taste related with bittern	6
	dried cuttlefish	bitter taste related with dried cuttlefish	7
Astringent	burned rice	Astringent taste related with water boiled with burned rice	5
	dried cuttlefish	Umami taste related with dried cuttlefish	7
Umami	kelp	Umami taste related with kelp	8
	burned rice	Umami taste related with water boiled with burned rice	6
	brown seaweed soup	Umami taste related with brown seaweed soup	5

○ 정량적 묘사분석을 통해 개발된 언어를 살펴보면 외관은 노란색-갈색 계열의 색으로 개발되었으며, 개발된 언어의 강도 기준은 DIC-F27 (0점)에서 DIC-2532 (12점)까지로 하여 평가 하였음. 시료에 대한 강도는 활성탄 처리 전 2%가 9점, 1%가 8점이었고, 활성탄 처리 후 2%가 2점, 1%가 1점 이었음. 향/이취에 대해서는 패널들이 향으로 평가한 말린 가쓰오부시 향 10점, MSG향 8점, 패널들이 이취로 평가한 까나리액젓 향 5점으로 총 3가지의 언어와 기준물질에 대한 강도가 개발되었고, 짠맛은 말린 오징어 짠맛 7점, 마른 멸치 짠맛 11점, 바닷물 짠맛 9.5점, 간수 짠맛 8점, 말린 가쓰오부시 짠맛 7점으로 총 5가지, 단맛은 쇠고기무국 단맛 7점, 미소된장 단맛 6.5점, 생새우 단맛 8점, 건새우 단맛 9점으로 총 4가지, 신맛은 홍차 신맛 3점, 미소된장 신맛 9점, 진간장 신맛 6.5점, 국간장 신맛 7점으로 총 4가지, 쓴맛은 간수 쓴맛 6점, 말린 오징어 7점으로 총 2가지, 짭은맛의 경우 누룽지 짭은맛이 5점으로 총 1가지, 감칠맛에 대해서는 말린오징어 감칠맛이 7점, 다시마 감칠맛이 8점, 누룽지 감칠맛이 6점, 미역국의 감칠맛이 5점으로 총 4가지로 각각의 특성에 대한 언어와 기준 강도가 개발되었음.

(나) 향미프로필(Flavor Profile)

Table 3-2-27. eHAP의 관능적 특성강도 점수

Sensory attributes		B-ACT ²⁾ 2%	B-ACT 1%	A-ACT ³⁾ 2%	A-ACT 1%
Appearance	yellow-brown color	9.17 ^{e4)}	7.96 ^d	2.04 ^b	1.08 ^a
Flavor/ Odor	MSG	6.33 ^b	5.83 ^b	2.38 ^a	1.5 ^a
	Kanari aekjeot solution	7.00 ^c	6.83 ^c	2.04 ^{ab}	1.38 ^a
Salty	dried bonito	7.25 ^c	5.92 ^c	2.46 ^{ab}	1.42 ^a
	dried cuttlefish	6.50 ^c	4.67 ^b	3.00 ^a	1.58 ^a
	dried Anchovy	6.42 ^c	3.92 ^b	3.33 ^{ab}	1.67 ^a
	sea water	4.58 ^c	2.88 ^b	3.13 ^b	1.38 ^a
	bittern	5.17 ^b	3.38 ^{ab}	3.50 ^{ab}	2.17 ^a
Sweet	dried bonito	6.00 ^d	4.21 ^{bc}	2.79 ^{ab}	1.42 ^a
	brisket of beef and radish soup	4.08 ^{bc}	4.00 ^{bc}	3.33 ^{ab}	1.96 ^a
	soybean paste	4.00 ^{bc}	3.33 ^{abc}	2.88 ^{ab}	1.92 ^a
	Flesh shrimps	4.54 ^b	3.71 ^{ab}	3.46 ^{ab}	2.36 ^a
Sour	dried shrimps	4.33 ^{ab}	3.88 ^{ab}	3.17 ^a	2.67 ^a
	black tea	4.71 ^b	2.79 ^a	4.54 ^b	2.73 ^a
	soybean paste	5.08 ^b	3.17 ^{ab}	4.79 ^b	2.71 ^a
	dark soy sauce solution	5.41 ^b	3.50 ^a	4.33 ^{ab}	2.96 ^a
Bitter	soy sauce solution	5.25 ^b	3.17 ^a	4.92 ^b	3.29 ^a
	bittern	5.92 ^d	4.33 ^c	2.63 ^{ab}	1.83 ^a
Astringent	dried cuttlefish	6.71 ^c	4.71 ^{ab}	3.71 ^b	1.79 ^a
	burned rice	6.46 ^c	5.17 ^{bc}	3.58 ^{ab}	2.50 ^a

Umami	dried cuttlefish	7.58 ^d	5.83 ^c	3.92 ^b	2.33 ^a
	kelp	6.46 ^b	5.17 ^b	3.75 ^a	2.42 ^a
	burned rice	5.58 ^b	4.04 ^{ab}	3.79 ^{ab}	2.33 ^a
	brown seaweed soup	4.83 ^c	3.67 ^{bc}	3.04 ^{ab}	2.04 ^a

¹⁾Subjects used 12-point category scale (0-11) for the evaluation.

²⁾B-ACT : before activated carbon treatment

³⁾A-ACT : after activated carbon treatment

⁴⁾There are no significant differences ($P>0.05$) using Duncan's multiple comparison test between the samples having the same letter within an attribute.

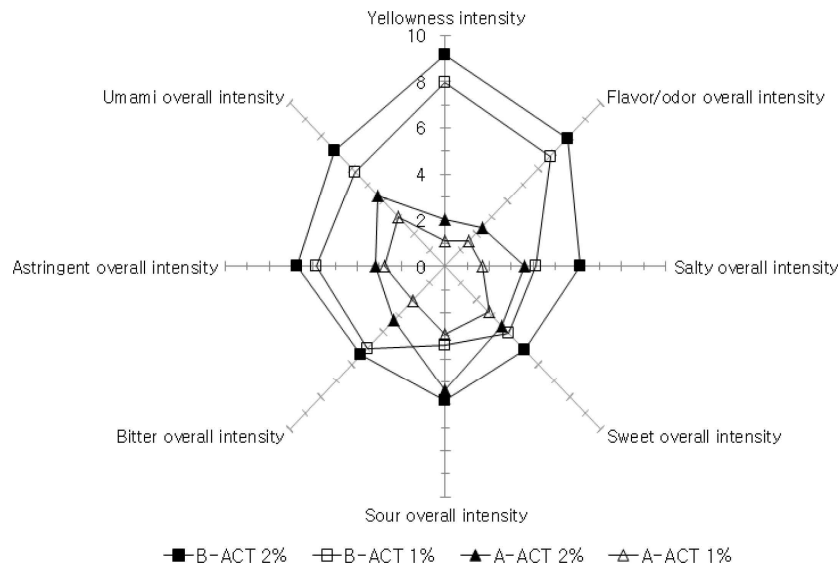


Fig. 3-2-30. eHAP의 종합적 차이강도(향미프로필).

- eHAP 향미프로필 결과, 색과 향/이취, 짠맛(말린오징어, 말린 멸치, 말린 가쓰오부시), 단맛, 쓴맛, 떫은맛, 감칠맛의 경우 활성탄 미처리구가 처리구보다 관능적 특성이 더 강하게 인지되었으며, 활성탄 미처리구에서는 eHAP의 첨가량이 높은 2% 첨가구에서 더 강하게 인지되었음. 색과 향을 평가하는 경우 활성탄 처리를 하였을 때, 색과 향이 적어지거나 제거되어 낮은 평가를 받은 것으로 보이며, 짠맛(말린오징어, 말린 멸치, 말린 가쓰오부시)의 경우 eHAP 첨가용액의 색과 기준물질의 색이 같변으로 인하여 비슷하였으며, 일부 멸치의 휘발성 향미성분인 hexanal, heptanal, octanal, 2,4-hepadial, 2-pentenal, 4-heptenal, 1-penten-3ol과 해산물의 대표 휘발성 향미성분인 1-pentanol, 2-octen1-ol 등(Yoo, 2001; Kang, 2003)으로 인하여 활성탄 미처리구에서 더 높게 평가된 것으로 보임. 단맛과 쓴맛, 떫은맛, 감칠맛 또한 색과 향의 영향을 받아 eHAP 용액의 맛을 느끼는 성분의 양은 같은데도 불구하고 활성탄 미처리구에서 더 특성이 강하게 부각된 것으로 보이며, 활성탄 미처리구 중에서는 eHAP 2% 첨가용액에서 특성이 더 강하게 평가되었음.

- 바닷물 짠맛과 간수 짠맛의 경우, eHAP 첨가량이 높을 수록 특성이 강하게 인지되었는데 이는 기준물질 자체에서 색이 없거나 약했기 때문에 탈색을 한 경우에도 특성 인지가 강하게 된 것으로 보이며, eHAP 2% 첨가구 중 활성탄 미처리구에서 더 높은 점수를 보였음.
- 신맛의 경우 eHAP 첨가량이 많을수록 높게 평가되었고, 첨가량이 많은 경우 활성탄 미처리구에서 더 높은 점수를 보였음. 이러한 결과는 본 실험에서 쓰인 생 멸치의 아미노산 성분인 aspartic acid, glutamic acid, leucine, lysine (Arakaki & Suyama, 1966) 중 신맛 정미성분을 포함한 아미노산인 aspartic acid의 영향일 것으로 생각된다. 마른 멸치의 정미성분을 분석한 논문에서 보면 aspartic acid 함량이 낮은 것을 볼 수 있는데(Schindler, 2011), 이러한 부분을 미루어 볼 때 시료의 원재료로 쓰인 멸치의 신맛은 생멸치를 사용하였을 경우에 나타나는 특징이라고 볼 수 있음. 또한 신맛을 평가할 때 낮은 농도로 희석하여 제공하였는데 이러한 희석용액에 대하여 맛이 깔끔하다는 의견이 있었음. 이는 음료의 농도 변화에 따른 색과 맛의 상관관계를 설명한 연구에서 농도가 연해질수록 깔끔한 맛이 난다고 평가한 연구 결과와 yellow 색상의 강도가 강해질수록(농도가 진해 짐) 신맛이 강해진다는 연구 결과(Lee & Park, 2013; Kim & Kim, 2015)를 비추어 보았을 때 eHAP의 첨가량에 따른 신맛의 상승효과를 설명할 수 있을 것으로 보임. 각 특성의 신맛을 제외한 전체적인 강도는 활성탄 미처리구가 처리구보다 높게 나타났고, 처리에서는 eHAP 첨가량이 늘어날수록 평가 점수가 높게 나타났다. 신맛의 경우 활성탄 처리 전후를 비교하였을 때, 활성탄 미처리구가 더 높은 평가 점수를 받았으며, 모든 eHAP 첨가구 시료를 비교하였을 때 eHAP 2% 첨가용액에 대하여 평가 점수가 높게 나왔음.

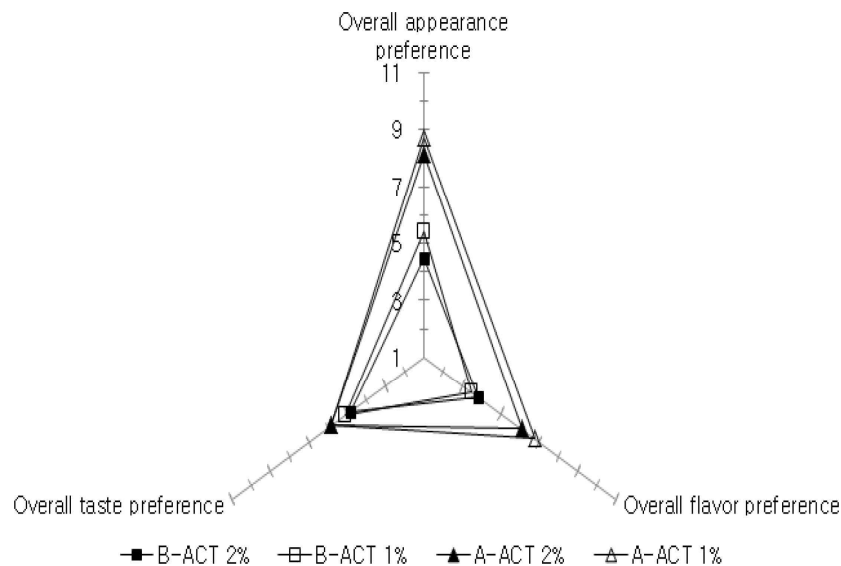


Fig. 3-2-31. eHAP의 전체적 기호도(향미프로필).

- eHAP의 기호도는 각 특성의 강도가 강해질수록 기호도가 낮아졌는데, 이는 색의 강도가 이취와 특유의 감칠맛과 함께 비례하여 증가하기 때문으로 생각됨.

(다) 주성분분석(Principal Component Analysis, PCA)

- 4개의 시료와 24개의 관능적 특성에 대한 주성분 분석을 진행한 결과 F1과 F2에 대한 총 분산 값은 각각 72.13%, 22.01%이었음.
- F1의 경우 양의 값에 위치한 관능적 특성은 색, 향, 짠맛과 쓴맛이었으며, 활성탄 처리 전, 후 시료의 관능적 특성 차이를 알 수 있었고, 이를 통해 활성탄 처리 시 기대했던 색과 이취가 감소한 것을 알 수 있음. 활성탄 처리 전 시료와 같은 곳에 위치한 관능적 특성인 색과 향, 짠맛과 쓴맛, 짠맛의 일부에서 상관관계가 있었으며, 1사분면의 위치한 관능적 특성 중 색과 말린 가쓰오부시 향, 말린오징어 쓴맛, 마른 멸치 짠맛과의 관계가 큰 것으로 나타났음. 활성탄 처리 후 시료의 경우 신맛과 감칠맛, 단맛이 같은 음의 값에 존재하였으며, 그 중 신맛 전체와 누룽지 감칠맛, 다시마 감칠맛과의 상관관계가 큰 것으로 생각됨.

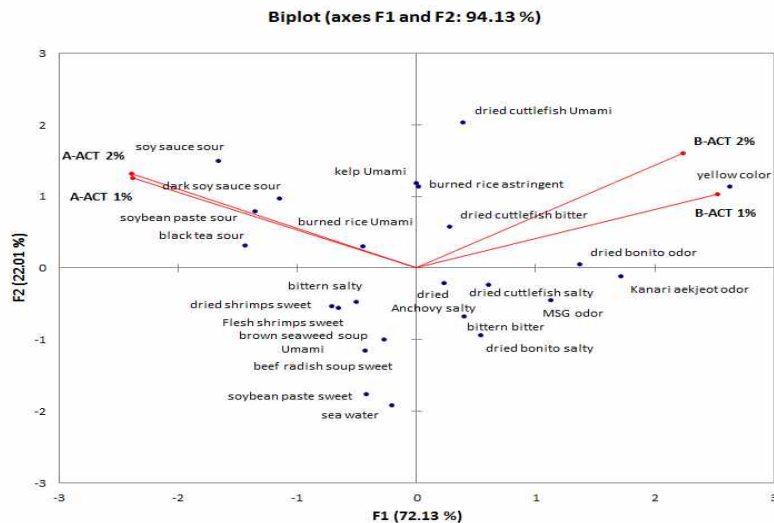


Fig. 3-2-32. eHAP 관능적 용어의 주성분분석.

(B-ACT : before activated carbon treatment,
A-ACT : after activated carbon treatment)

- F2의 경우 시료와의 상관관계가 높고 낮음에 따라 요인이 설정되었으며, 시료와 관련성이 상대적으로 떨어지는 관능적 특성은 짠맛 전체와 말린 가쓰오부시 향을 제외한 모든 향, 단맛 전체, 미역국 감칠맛 이었음. 말린 가쓰오부시 향과 말린 오징어 쓴맛, 누룽지 짠은맛은 F1과 F2에서 모두 양의 상관관계로 1사분면에 위치하였으며 같은 곳에 위치한 시료는 모두 활성탄 처리를 하지 않은 시료였음. 이를 통해 활성탄 처리를 하지 않았을 때 말린 가쓰오부시 향과 말린 오징어 쓴맛, 누룽지 짠은맛이 증가할 가능성이 높다고 분석되었으며, 활성탄에게 밝은 노란색이 신맛을 연상시키는 색이라는 연구결과(Kim., Kim, 2015)를 볼 때 희석하여 제공된 기준물질인 신맛과 색이 연한 누룽지와 관련된 맛을 깔끔한 향미로 인식했을 것으로 생각됨.

6. 분리 대두 단백질 효소 가수분해물(eHISP)의 관능적 특성 및 짠맛 증진효과

가. 실험방법

(1) Ion Chromatography를 이용한 짠맛 증진물질의 Na 정량분석

- 짠맛 강도평가 시료 제조를 위하여 제 3협동 연구기관인 바이오벤에서 제공한 짠맛증진 물질에 대해 ion chromatography를 사용하여 Na 함량 분석을 실시하였음.
- 나트륨 분석을 위한 시료는 제조된 소량의 시료를 HPLC급 증류수(Honeywell Brudick & Jackson Chemicals, Muskegon, MI, USA)로 희석한 후 syringe filter (PTFE 0.2 μm , Tokyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하였으며, 사용된 컬럼은 본 컬럼 (Dionex IonPac CG12A RFIC Analytical, Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 과 가드 컬럼(Dionex IonPac CG12A RFIC Guard, Thermo Scientific Inc.)이었으며, Dionex ion chromatography (ICS-900, Thermo Scientific Inc.)를 이용하여 분석하였음. 표준곡선은 표준용액(Dionex Six Cation-II Standard, Thermo Scientific Inc.)을 이용하여 작성하였음.

(2) eHISP의 짠맛 강도평가

(가) 검사요원 선정 및 강도평가

① 검사요원 선정

- ① 강도평가 요원은 기존에 짠맛 차이 훈련을 받은 패널 35명을 대상으로 짠맛 순위검사에서 정답률이 80% 이상으로 짠맛에 대한 판별력이 일정수준 이상이 되는 패널 25명을 선발하여 이들을 대상으로 eHISP의 강도평가를 실시함.

② 짠맛 강도평가 방법

㉠ 평가 시료의 제조

- eHISP 시료의 경우 2차년도에서 예비실험 결과 시료 특유의 냄새나 맛이 강도평가에 크게 영향을 주지 않는 것으로 판단되었으며, 공정이 개선된 시료에 대해서도 예비실험을 진행한 결과에서도 영향이 없는 것으로 판단됨. 따라서 NaCl 용액을 기준 용액으로 하여 짠맛 강도 평가 실험을 진행하였음.
- 평가시료의 eHISP 첨가량은 0.1, 1.0, 1.5, 2.0%로 eHISP 내 NaCl 농도를 계산한 후 최종 NaCl 농도는 30, 40, 50 mmol/L가 되도록 평가시료를 제조하였으며, 그 방법은 Table 3-2-28, 3-2-29과 같음. 평가 시 짠맛 기준 농도로 제시된 시료는 NaCl 25 mmole에서 80 mmole 까지 5 mmole 간격으로 제조된 NaCl용액 12가지를 제공하여 비교평가 하도록 하였음.

Table 3-2-28. 강도평가를 위한 기준 시료 제조방법

Ingredients (g)	g/L											
	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80
NaCl	1.46	1.75	2.05	2.34	2.63	2.92	3.21	3.05	3.80	4.09	4.38	4.67
Water	998.54	998.25	997.95	997.66	997.37	997.08	996.79	986.57	985.82	985.53	985.24	984.95
Total	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00

Table 3-2-29. 강도평가를 위한 eHAP 시료 제조방법

Ingredients (g)	g/L											
	30				40				50			
	0.1	1.0	1.5	2.0	0.1	1.0	1.5	2.0	0.1	1.0	1.5	2.0
Water	997.25	988.25	983.25	978.25	996.66	987.66	982.66	977.66	996.08	987.08	982.08	977.08
NaCl	1.75	1.75	1.75	1.75	2.34	2.34	2.34	2.34	2.92	2.92	2.92	2.92
eHISP	1.00	10.00	15.00	20.00	1.00	10.00	15.00	20.00	1.00	10.00	15.00	20.00
Total	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00

㉞ 평가방법

○ 제조된 시료의 평가는 15 cm 선척도(line scale) 방법을 활용하여 짠맛강도에 대해 평가하도록 하였음. 시료는 70 mL 일회용 종이 소주컵에 15 mL씩 담아 제공하였으며, 검사원들은 1회용 멸균 스포이드(Sterile disposable transfer pipette 1.5 mL, Office Ahn, Gwangju, Korea)를 사용하여 1 mL씩 정량을 맛보도록 하였음. 각 시료에는 난수표에서 무작위로 추출한 세 자리 숫자를 표시하였으며, 시료의 제시 순서 또한 무작위로 제공하였고, 평가 전과 시료를 맛 본 후에는 입안에 남아있는 맛을 제거하기 위하여 테두리를 제거한 식빵과 생수 등을 제공하여 입 안을 헹구도록 하였음.

(3) eHISP 짠맛증진물질을 이용한 식품 내 소금사용량 감소효과

(가) 조리적용 시 eHAP 범위 설정

○ 관능 패널들이 짠맛을 구분할 수 있는 NaCl mmole 간격은 5 mmole 이며, 이를 고려하여 증진효과가 나타날 수 있는 최소한의 eHISP 농도는 0.5%로 예상하였음. 그러나 강도평가 결과 eHISP 0.1% 범위에서도 증진효과가 나타나 이를 최저 농도로 선정하였음. 이를 기준으로 짠맛증진효과가 나타났던 eHISP 0.1% - 2.0% 범위를 기준으로 임의의 농도를 선정하여 예비실험을 진행하였고 색, 향, 감칠맛 등의 강도를 고려하여 최종적으로 eHISP 0.1%, 0.5%, 1.0%, 1.5%를 최종 농도로 결정하였음.

(나) 관능검사 패널 선정

- 조리적용 실험의 경우 앞서 강도평가에서 선발된 패널 25명을 최종 패널로 선정하였으며, 기호도 평가의 경우는 한식조리학과 재학생 30명을 대상으로 선발하여 평가하도록 하였음.

(다) 시료의 제조 및 평가방법

① 샐러드드레싱의 제조

- 샐러드드레싱의 재료 배합은 Kremer et al. (2009), Park (2014), Youn (2015)을 참고하여 제조하였으며, 시료의 재료 배합비는 Table 3-2-30과 같음. 샐러드드레싱의 NaCl 농도는 2.0%였으며, eHISP를 첨가하지 않는 대조구와 eHISP를 0.1%, 0.5%, 1.0%, 1.5% 첨가한 시료를 비교 평가 하였음.
- 샐러드드레싱의 제조 방법은 올리브오일과 발사믹 식초, 후추를 Warning Blender (HGB25E, Warning Laboratory Science, Torrington, CT, USA)에 넣고 low 단계에서 30초, high 단계에서 40초간 교반한 후 대조구에 사용된 NaCl과 비교평가 시료인 NaCl 및 eHISP를 농도별로 첨가한 시료를 각각 high 단계에서 10초간 교반하였음.
- 양상추는 하단부를 제거한 후 부드러운 잎 부분만을 사용하여 가로 4 cm, 세로 4 cm로 잘라 0℃ 이하의 흐르는 물에서 2회 세척 후 야채탈수기(Meyer mini salad spinner, Motor Millions Electric Industries Co., Seoul, Korea)에 넣어 3분간 탈수 시킨 다음 냉장보관 하였음. 평가 5분 전 냉장보관한 양상추와 샐러드드레싱을 섞어서 제공하였으며, 포크(HY포크-중 155 mm, Daesung Industrial Co., Jeonju Korea)를 사용하여 시료를 먹을 수 있도록 하였음.
- 각 시료 용기에는 난수표에서 무작위로 추출한 세 자리 숫자를 부착하여 시료를 구분하도록 하였음. 평가 시 시료와 시료 사이에는 식빵과 오이, 생수 등을 사용하여 입안을 수시로 헹구도록 하였으며, 평가 도중 혀의 둔화현상을 줄이기 위해 한 쌍의 시료 평가를 끝낸 후 1분 후에 다음 시료를 평가하도록 하였음.

Table 3-2-30. 샐러드드레싱의 재료 배합비

Ingredients (g)		Based salad dressing				
Olive oil		570.00				
Balsamic vinegar		420.00				
Ground black pepper		10.00				
Total		1000.00				
Ingredients (g)		SC ¹⁾	S1 ²⁾	S2	S3	S4
Based salad dressing		980.00	979.00	975.00	970.00	965.00
	NaCl	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
	eHISP ³⁾	-	1.00	5.00	10.00	15.00
Total		1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00

¹⁾SC : Salad dressing control with salt, NaCl solution 2.0%

²⁾S1~S4 : Salad dressing sample of eHISP with various concentration (NaCl content of 2.0%)

S1 : eHISP peptide 0.1%, S2 : eHISP peptide 0.5%,

S3 : eHISP peptide 1.0%, S4 : eHISP peptide 1.5%

³⁾eHISP : Protein except for NaCl

② 된장국의 제조

- 된장국의 재료배합은 Kim (2009)을 참고하여 제조하였으며, 시료의 재료 배합비는 Table 3-2-31과 같음. 된장국의 NaCl 농도는 0.7% 였으며, 된장의 경우 된장 자체가 염분 (NaCl)을 함유하고 있기 때문에, Ion chromatography를 사용하여 나트륨 함량을 분석하였다. 측정된 Na 함량은 4,369 mg/L 이었으며, 이를 NaCl 분자량을 이용하여 계산한 결과 112.99 g/L (NaCl)가 함유되어 있었고, 이를 된장국의 농도를 맞추는데 사용하였음. 된장국의 대조구 NaCl 농도는 0.7% 였으며, eHISP를 첨가하지 않은 대조구와 eHISP 첨가량을 0.1%, 0.5%, 1.0%, 1.5%로 한 첨가구를 비교평가 하였음.
- 제조방법은 된장국의 기본이 되는 육수는 냄비(플래티나 NY-1432, Kitchenart Co., Jeonju, Korea)에 생수 1 L를 넣고 핫플레이트(KPL-2600H, Kitchenart Co., Incheon, Korea)의 8단계 (1-8단계로 조절가능, 가장 강한단계 8단계)에서 물을 가열하였음. 이후 물이 끓으면 멸치와 다시마를 넣고 5분간 가열하였고, 불을 끈 후 육수를 플라스틱 밀폐용기(314×232×155 mm, HPL884, Lock & Lock Co., Seoul, Korea)에 넣고 냉장온도에서 24시간 보관 후 사용하였음. 된장은 18 mesh 체(Test Sieve 18(1.0 mm)) Chung Gye industrial MFG., Co. Gunpo, Korea)에 내려서 사용하였음. 된장국의 제조는 냄비에 분량의 육수를 넣고 핫플레이트의 8단계에서 가열하여 끓으면 체에 내린 된장을 넣고 8단계에서 4분간 끓이고 4단계로 낮춰 3분간 더 가열 후 불을 끄고 상온에서 30분간 식힌 후에 시료로 사용하였고, 완성된 된장국에 eHISP를 넣어 시료를 만들었음.
- 완성된 시료는 백색의 일회용 70 mL 용기에 15 mL씩 담아 뚜껑을 닫고 평가 30분 전 전 기온장고(WS-HC 070, Wosung Enterprise Co., Korea)에 넣어 60℃ 온도에서 보관 후에

제공하였음. 된장국은 평가 2시간 전에 제조하였으며, 시료는 일회용스푼(일회용 빙수수저 140 mm, Daeseung Industrial Co. Jeonju, Korea)을 사용하여 시료를 먹을 수 있도록 하였고, 이 때 각 시료에는 난수표에서 3자리의 난수번호를 무작위로 선택하여 시료번호로 사용함.

Table 3-2-31. 된장국의 재료배합비

Ingredients (g)	Based anchovy and kelp stock				
dried anchovy	4.00				
dried kelp	2.00				
water	994.00				
Total	1000.00				
Ingredients (g)	SC ¹⁾	S1 ²⁾	S2	S3	S4
Based anchovy and kelp stock	993.00	992.00	988.00	983.00	978.00
NaCl(inside of doenjang)	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
eHISP ³⁾	-	1.00	5.00	10.00	15.00
Total	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00

¹⁾SC : Soybean paste soup control with salt inside of Doenjang, NaCl(Inside of Doenjang) solution 0.7%

²⁾S1~S4 : Soybean paste soup Sample of eHISP peptide with various concentration (NaCl content of 0.7%)

S1 : eHISP peptide 0.1%, S2 : eHISP peptide 0.5%,

S3 : eHISP peptide 1.0%, S4 : eHISP peptide 1.5%

³⁾eHISP : Protein except for NaCl

③ 숙주나물의 제조

- 숙주나물 무침의 제조방법은 Lee et al. (1994), Youn (2015)을 참고하여 제조하였으며, 시료의 재료 배합비는 Table 3-2-32와 같음. 숙주나물 무침의 NaCl 농도는 0.7% 였으며, eHISP를 첨가하지 않은 대조구와 eHISP를 0.1%, 0.5%, 1.0%, 1.5% 첨가한 시료를 비교 평가 하였음.
- 숙주나물 무침의 제조방법은 숙주를 흐르는 물에 3회 세척한 후 야채탈수기에 넣어 3분 간 탈수시켰으며, 냄비에 생수 1 L를 넣고 핫플레이트의 8단계에서 물을 100℃까지 끓였음. 여기에 숙주 200 g을 넣고 10분간 가열하였고, 찬물에 담가 5분간 냉각한 후 체에 받쳐 물기를 제거하였음. 다음으로 숙주와 분량의 파, 마늘, 참기름, 참깨를 넣고 섞어주었으며, NaCl과 일정량의 eHISP를 넣어 시료를 제조하였음.
- 시료는 백색의 일회용 용기(PS 소스컵 Ø70 mm × H30 mm, Daeheung Industrial Co., Jeonju, Korea)에 5 g씩 담아 뚜껑을 덮고 냉장 온도 넣었다가 평가 10분 전 꺼내어 상온에서 보관 후 제공하였음. 시료는 포크(HY포크-중 155 mm Daesung industrial Co., Jeonju, Korea)를 사용하여 먹을 수 있도록 하였고, 이 때 각 시료 용기에는 난수표에서 무작위로 추출한 세 자리 숫자를 표기하였음.

Table 3-2-32. 숙주나물의 재료배합비

Ingredients (g)	Based mungbean sprouts				
Blanched Mungbean sprouts	930.00				
Shredded green onion	28.00				
crushed garlic	15.00				
Sesame seed powder	12.00				
sesame oil	15.00				
Total	1000.00				
Ingredients (g)	MC ¹⁾	M1 ²⁾	M2	M3	M4
Based mungbean sprouts	993.0	992.0	988.0	983.0	978.0
NaCl	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
eHISP ³⁾	-	1.00	5.00	10.00	15.00
Total	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00

¹⁾MC : Mungbean sprouts control with salt, NaCl solution 0.7%

²⁾M1~M4 : Mungbean sprouts Sample of eHISP peptide with various concentration (NaCl content of 0.7%)
M1 : eHISP peptide 0.1%, M2 : eHISP peptide 0.5%,
M3 : eHISP peptide 1.0%, M4 : eHISP peptide 1.5%

³⁾eHISP : Protein except for NaCl

④ 평가방법

- 조리적용 시료의 짠맛 강도 평가는 검사의 식별 능력이 다른 차이 검사보다 높다고 보고된 2-AFC (Two-alternative forced choice) 평가 방법을 사용하였으며(Kim, 2001), 15 cm 선척도(line scale)에 제시된 시료의 짠맛 강도를 표시하도록 하였음. 기호도 또한 15 cm 선척도 방법을 활용하여 좋아하는 정도(매우 좋음-매우 나쁨)를 평가하도록 하였음.
- 평가가 시 제시 순서에 의한 오차를 줄이기 위하여 시료는 무작위로 제공하였고, 시료와 시료 사이에는 식빵과, 오이, 생수 등을 사용하여 입안을 수시로 헹구도록 하였음. 또한 평가 도중 혀의 둔화현상을 줄이기 위하여 한 쌍의 시료 평가를 끝낸 후 1분 후에 다음 시료를 평가하도록 함.

(라) 시료의 이화학적 특성 분석

① 색도 측정

- 각 시료의 색도는 지름 3.5 cm 원형 평판 접시(Petri dish)에 시료를 5 mL씩 담아 색차계(CM-5, Minolta Co., Osaka, Japan)를 이용하여 L값(명도, Lightness), a값(적색도, Redness), b값(황색도, Yellowness)을 총 3회 반복 측정하였고, 이를 평균값으로 나타내었음. 이때, 표준 백판값은 L=96.50, a=-0.10, b=-0.33 이었음.

② pH 측정

- 각 시료의 pH 값은 시료 10 ml을 따서 15 ml Conical Tube (Centrifuge tubes FA2098, BD Falcon, USA)에 담아 pH meter (Docu-pH meter, sartorius, Germany)로 상온에서 3

회 반복 측정하였음.

③ 통계분석

- 조리적용 실험의 경우 NaCl 첨가구와 농도별 eHISP 첨가구 간에 짠맛의 차이가 있는지 알아보기 위하여 비모수적 대응2-표본 검정방법인 윌콕슨 부호 순위 검정(Wilcoxon signed rank test)을 수행하여 시료 간의 유의적인 차이를 검증하였음. 전반적인 기호도 및 시료의 이화학적 특성의 경우 시료 간 차이를 알아보기 위하여 분산분석(ANOVA) 및 Duncan 다중범위검정(Duncan's multiple range test)을 수행하였음.($p < 0.05$). 모든 통계 분석에는 SPSS Version 21.0 package program (SPSS INC., Chicago, IL, USA)를 사용함.

(4) 묘사분석을 통한 eHAP 짠맛증진물질의 관능적 특성 평가

(가) 묘사분석 패널의 선발

- eHISP의 묘사분석을 위한 관능검사 패널의 경우 기존에 짠맛 순위 검사 훈련을 받은 패널들 중 정답률이 높은 15명을 선정하였음. 이후 이들을 대상으로 짠맛, 단맛, 신맛, 쓴맛, 감칠맛에 대한 기본 맛 감도 검사를 실시하였고, 5가지 맛을 모두 느낌과 동시에 맛에 대한 구별력이 높은 학생 12명을 선발하였음. 선발된 패널을 대상으로 5가지 각각의 맛에 대하여 임의의 간격으로 설정한 12가지 농도의 시료를 제시하였으며, 최종적으로 이들 농도의 간격 차이에 대하여 인지가 가능한 패널 10명을 선발함.

(나) 정량적 묘사분석(QDA, Quantitative Descriptive Analysis)

- 정량적 묘사분석 중 언어개발을 위한 시료는 eHISP를 생수에 각각 1%, 2% (v/w)로 제조하여 70 mL 종이 소주컵에 15 mL씩 담아 제공하였으며, 1회용 멸균 스포이드를 사용해 1 mL씩 정량을 맛보도록 하였음. 패널들은 각 시료의 맛을 본 후 묘사용어를 도출하였고, 도출된 묘사용어에 대해서 패널 간 토의를 통하여 관능용어에 대한 합의과정을 진행함. 이후 선정된 용어에 대한 표준시료를 제공하여 묘사용어를 수정하는 절차를 통해 eHISP의 관능적 특성에 대한 묘사용어를 선정하였고, 이에 대한 강도평가를 진행하였음.
- 평가 항목 중 색의 경우 DIC COLOR GUIDE (3.2 Version, DIC Inc. Tokyo, Japan)를 사용하여 관련된 색을 기준으로 강도평가를 진행함. 묘사분석 전과 각각의 시료를 맛 본 후에는 입안을 헹구기 위하여 생수와 테두리를 제거한 식빵을 함께 제공하였으며, 혀의 둔화현상을 줄이기 위해 한 시료 평가 후 다음 시료를 평가하기까지 30초간 휴식을 취하도록 하였음. 평가는 일주일에 1시간 30분씩 2회로 진행되었으며, 10회 이상 반복 진행함.

(다) 향미프로필(Flavor Profile)

- 시료의 관능적 특성을 알아보는 방법 중 하나인 향미 프로필 방법을 사용하여 eHISP의 활성탄 처리, 전 후에 따른 색, 향, 맛에 대한 관능적 특성을 분석하였으며, 결과를 스펙트럼 묘사분석 방법으로 나타내었음.

- 평가의 이해를 돕기 위한 기준시료(R)는 eHISP와 비슷한 조성을 가진 model broth를 사용하였음. 이의 제조는 mono sodium L-glutamate monohydrate 1.9 g/L, maltoedextrin 6.38 g/L, yeast extract 2.1 g/L로 구성하였으며, NaCl 함량은 50 mmol/L 농도로 제조함. 시료는 생수에 eHISP를 1.0%, 2.0% (v/w) 농도로 제조하여 70 mL 종이 소주컵에 15 mL씩 제공하였고, 일회용 멸균 스포이드를 사용하여 1 mL씩 정량을 먹도록 하였음.

(라) 주성분분석(PCA, Principal Components Analysis)

- eHISP의 개발된 언어에 대한 활성탄 처리 전, 후에 따른 상관관계를 알아보기 위해 XLSTAT software version 2015 for Windows (Addinsoft INC., Paris, France)을 사용하여 주성분 분석을 실시하였음.

(마) 통계분석

- 묘사분석에서 개발된 용어에 대하여 시료 간에 차이가 있는지 알아보기 위해 분산분석(ANOVA)을 사용하여 평균 및 표준편차를 구하였으며, 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan의 다중범위검정(Duncan's multiple range test)법으로 검증하였음. 통계분석에는 SPSS Version 21.0 package program (SPSS INC., Chicago, IL, USA)을 사용하였음.

나. 실험결과

(1) Ion Chromatography를 이용한 짠맛증진물질의 Na 정량분석 결과

- eHISP 시료에 함유되어 있는 NaCl 함량은 Ion Chromatography (ICS-900, Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 나트륨 함량을 분석하였고, 측정된 값을 NaCl 분자량을 이용하여 계산하였음. 그 결과 69.5 g/L (NaCl)가 함유되어 있었으며, 이를 짠맛 강도평가 시료 제조 시 NaCl 농도를 맞추는데 사용함.

(2) eHAP의 짠맛 강도평가 결과

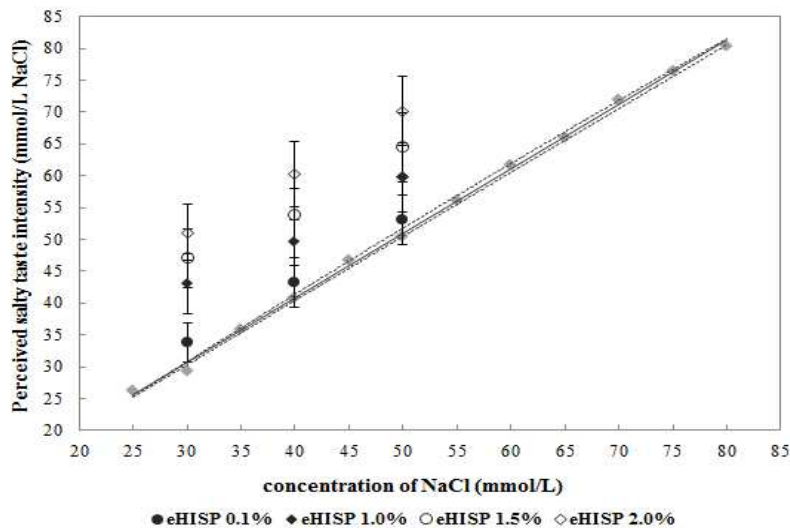


Fig. 3-2-33. 각기 다른 NaCl 농도에서 eHISP의 첨가량에 따른 짠맛증진효과.

- 강도평가 결과 30 mmol NaCl 용액에서 eHISP 첨가량에 따라 인지된 짠맛 정도는 각각 33.86 mmole, 43.00 mmole, 47.03 mmole, 41.11 mmole로 나타났으며, 결과적으로 약 15-22%의 짠맛증진효과가 나타남. 40 mmol NaCl에서 eHISP 함량에 따라 인지된 짠맛 정도는 각각 43.26 mmole, 49.49 mmole, 53.88 mmole, 60.25 mmole 로 약 2-19%의 증진효과를 나타내었고, 50 mmol NaCl 에서는 53.02 mmole, 59.74 mmole, 64.45 mmole, 70.13 mmole로 약 5-39%의 증진효과가 있는 것으로 나타남.

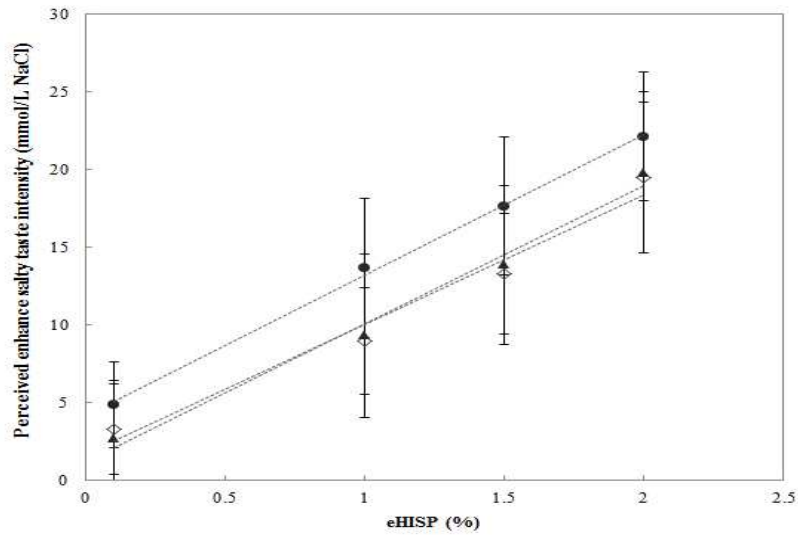


Fig. 3-2-34. 동일한 소금농도에서 eHISP 첨가량에 따른 짠맛증진효과.

- Fig. 3-2-34는 NaCl 기준 30 mmole, 40 mmole, 50 mmole의 평가 농도에서 eHISP의 첨가량에 따른 짠맛증진효과에 대한 결과로 농도에 따른 결정계수는 각각 0.9973, 0.9830, 0.9864로 비교적 높은 값을 나타내어 짠맛을 평가하는데 있어서 신뢰도가 높다고 할 수 있음. 평가 농도에 따른 eHISP의 전반적인 짠맛증진효과를 봤을 때, eHISP의 첨가량이 증가할수록 짠맛도 비례적으로 증가하는 것으로 나타났음.

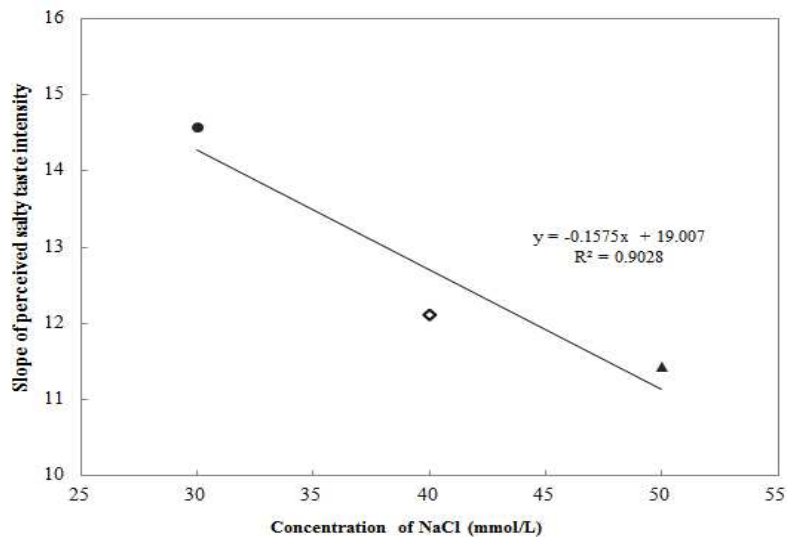


Fig. 3-2-35. 동일한 eHISP 첨가량에서 NaCl 농도에 따른 짠맛증진효과.

○ NaCl 농도에 따른 짠맛증진효과를 비교한 결과로 NaCl 농도가 진해질수록 짠맛증진효과가 낮아지는 경향을 보였음. 즉, eHISP는 낮은 NaCl 농도에서 짠맛증진효과가 더 높게 나타나는 결과를 나타냄. Fig. 3-2-34와 3-2-25를 종합적으로 봤을 때, 낮은 NaCl 농도에서 eHISP 첨가량이 증가할수록 시료의 짠맛증진 효과에 의해 Na 함량 감소효과가 커질 것으로 생각됨.

(3) eHAP 짠맛증진물질을 이용한 식품 내 소금사용량 감소효과

(가) 셀러드드레싱

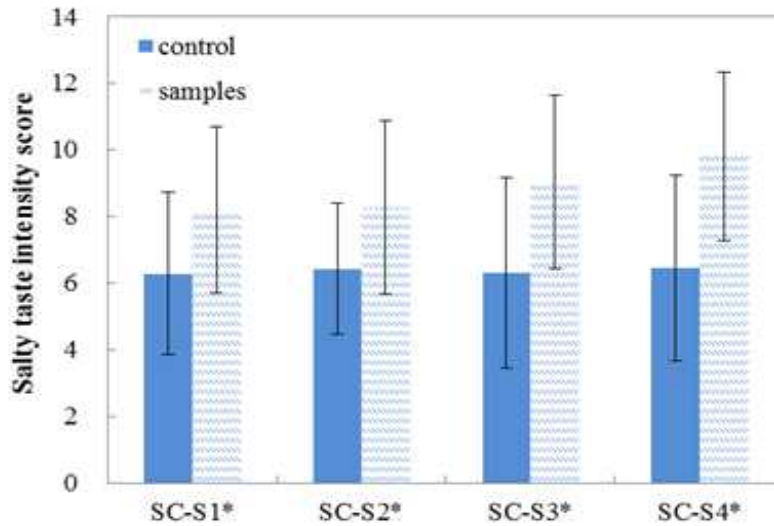


Fig. 3-2-36. 셀러드드레싱의 짠맛 강도평가.

SC : NaCl solution 2.0%

S1 : eHISP 0.1% in NaCl 2.0%

S2 : eHISP 0.5% in NaCl 2.0%

S3 : eHISP 1.0% in NaCl 2.0%

S4 : eHISP 1.5% in NaCl 2.0%

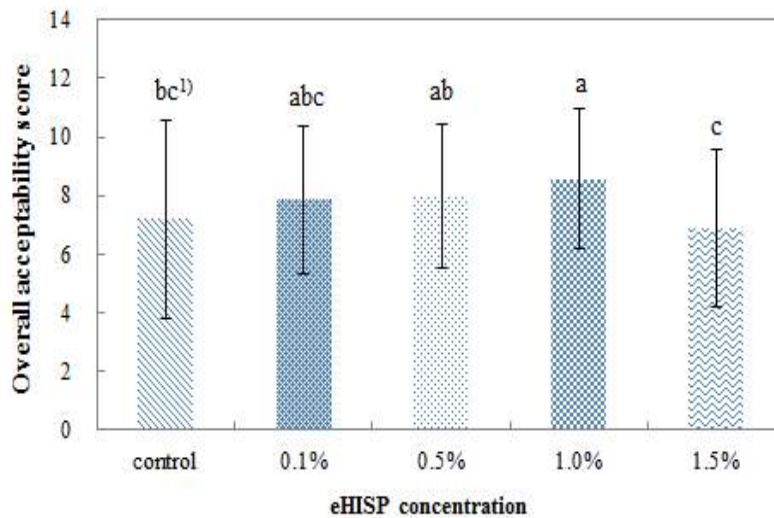


Fig. 3-2-37. 셀러드드레싱의 전반적인 맛 기호도.

- 실험 결과 대조구와 비교하였을 때, 0.1% 첨가구에서는 31%의 짠맛증진효과가 있었으며, 0.5% 첨가구에서는 29%, 1.0% 첨가구에서는 43%, 1.5% 첨가구에서는 52%의 증진효과가 나타났으며, 모든 eHISP 첨가구와 대조구 사이에 유의적인 차이가 나타났음($p < 0.05$). Russell et al. (2002)에 의하면 쓴맛은 신맛으로 감소시킴과 동시에 짠맛에 대한 증강 소재로 작용 할 수 있다고 하였으며, 이 결과로 미루어 봤을 때, 셀러드드레싱에 사용한 발사믹 식초의 신맛이 eHISP에 함유된 특유의 쓴맛을 감소시키면서 짠맛에 대한 증강소재로 작용하여 본 실험에서 높은 짠맛증진효과를 나타낸 것으로 생각됨.
- 전반적인 맛 기호도에 대한 결과에서는 eHISP 첨가량이 증가할수록 기호도가 높아지는 경향을 나타내었음. 이는 산도와 관련이 있는 것으로 생각되는데 일반적으로 신맛과 기호도는 양의 상관관계를 나타낸다고 알려져 있음. 뒤에 나타나는 셀러드드레싱의 pH 측정결과 eHISP 첨가량이 증가할수록 pH가 높아지는 결과를 나타내었으며, 이의 영향을 받아 본 실험에서 기호도가 높게 나타난 것으로 생각됨. 그러나 1.5% 첨가구에서는 기호도가 낮아지는 경향을 나타내었는데, 이는 eHISP 자체에 함유되어 있는 쓴맛으로 인하여 기호도가 낮아진 것으로 생각됨.

(나) 된장국

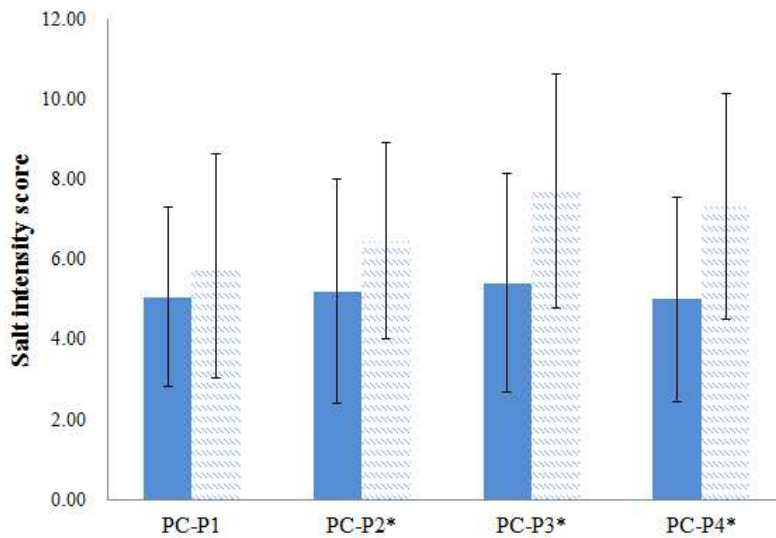


Fig. 3-2-38. 된장국의 짠맛 강도평가.

SC : NaCl solution 0.7%

S1 : eHISP 0.1% in NaCl 0.7%

S2 : eHISP 0.5% in NaCl 0.7%

S3 : eHISP 1.0% in NaCl 0.7%

S4 : eHISP 1.5% in NaCl 0.7%

- 된장국의 짠맛 강도 평가결과 된장국의 짠맛증진효과는 대조구와 비교하였을 때, 0.1% 첨

가구에서 21%의 증진효과가 있었으며, 0.5% 첨가구에서 49%, 1.0% 첨가구에서 61%, 1.5% 첨가구에서 70%의 증진효과를 나타내었고, 대조구와 모든 eHISP 첨가구 사이에 유의적인 차이가 나타났음($p < 0.05$). 이는 단맛과 감칠맛, 짠맛을 내는 다양한 맛 성분들의 상호작용에 의해 상승효과가 나타난 것으로 생각되는데, 일반적으로 된장에는 단맛을 내는 아미노산인 glycine, alanine, serine, threonine, tryptophan과 감칠맛을 내는 glutamic acid, glycine 등의 정미성분과 분리 대두단백질이 가수분해 되어 생성된 감칠맛, 쓴맛 정미성분이 짠맛에 상승작용을 하여 짠맛에 대한 증진효과가 나타난 것으로 생각됨(Pyun & Hwang, 1988; Kim & Kim, 1990).

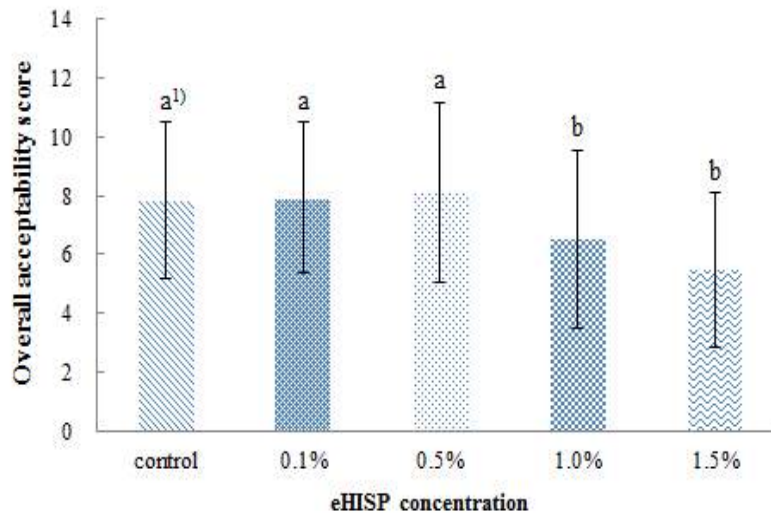


Fig. 3-2-39. 된장국의 전반적인 맛 기호도.

- 된장국의 전반적인 기호도에 대한 결과 0.5% 첨가구까지는 기호도가 증가하다가 1.0% 첨가구 부터는 기호도가 낮아지는 경향을 보였음. 이는 쓴맛의 영향을 받은 것으로 생각되는데, 된장의 경우 발효과정 중 쓴맛을 나타내는 valine, leucine, isoleucine, phenylalanine 등의 펩타이드가 생성되어 된장 자체에 쓴맛을 가지고 있으며(Hong & Lee, 1994), 이 쓴맛이 eHISP에서 쓴맛을 내는 leucine, valine phenylalanine, isoleucine 등의 펩타이드들과(Marshall, 1990) 섞이면서 강한 쓴맛이 느껴져 풍미 등을 저하시켜 기호도가 낮아지는 경향이 나타난 것으로 생각됨.

(다) 숙주나물

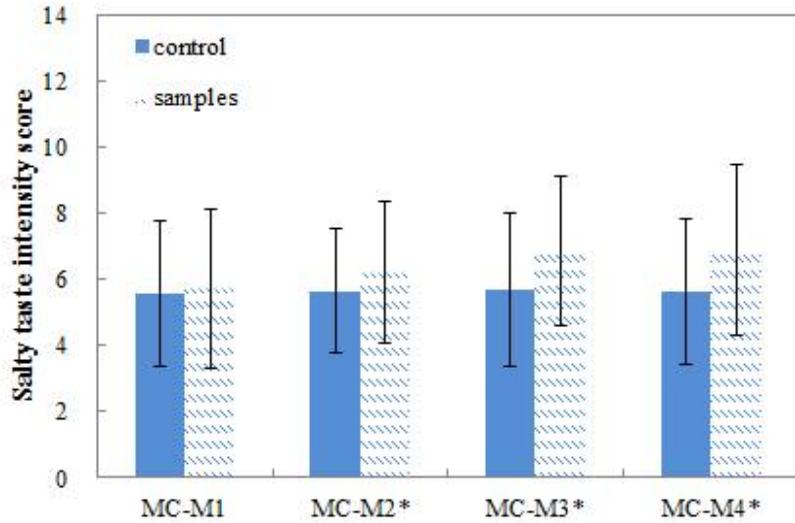


Fig. 3-2-40. 숙주나물의 짠맛 강도평가.

MC : NaCl solution 0.7%

M1 : eHISP 0.1% in NaCl 0.7%

M2 : eHISP 0.5% in NaCl 0.7%

M3 : eHISP 1.0% in NaCl 0.7%

M4 : eHISP 1.5% in NaCl 0.7%

- 실험결과 대조구와 비교하였을 때, 0.1% 첨가구 에서는 3%의 증진효과가 있었으며, 0.5% 첨가구 에서는 10%, 1.0% 첨가구 에서는 20%, 1.5% 첨가구 에서는 23%의 증진효과가 나타났고, 0.1%, 첨가구를 제외한 0.5-1.5%의 첨가구에서 대조구와 비교 시 유의적인 차이를 나타내었음 ($p < 0.05$). Choi & Roh (2013)에 따르면 마늘의 dimethyl sulfide라는 물질이 혀의 감칠맛 수용체를 자극하여 요리 중 MSG와 만나게 되면 감칠맛을 크게 상승시킨다고 하였으며, 이를 토대로 본 조리적용 실험에서 짠맛증진효과가 나타난 이유 중 하나가 마늘의 dimethyl sulfide와 eHISP가 함유하고 있는 glutamic acid 등의 감칠맛을 내는 정미성분이 서로 상호작용에 의해 감칠맛을 상승시켰고, 이 감칠맛이 짠맛에 대한 증강소재로 작용하여 본 실험과 같은 증진효과가 나타난 것으로 생각됨.

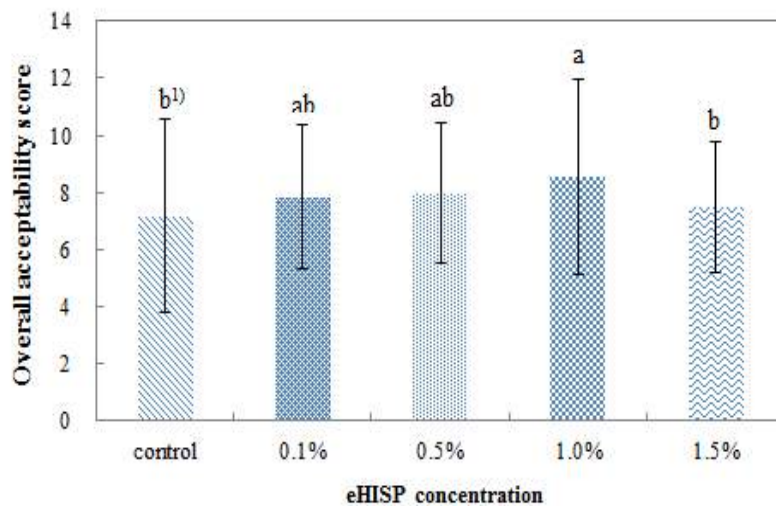


Fig. 3-2-41. 숙주나물의 전반적인 맛 기호도.

○ 전반적인 기호도는 1.0%가 가장 높게 나타났으며, 다른 조리적용 실험보다 높은 기호도를 나타내었는데, 이는 앞의 3차년도 eHAP 실험에서와 마찬가지로 숙주나물 제조 시 첨가한 파, 마늘 등의 향신채가 쓴맛과 eHISP 특유의 이취 등을 억제시켜 주어 이러한 높은 효과가 나타난 것으로 생각됨.

(라) 시료의 색도 및 pH

① 샐러드드레싱

○ 짠맛이나 전반적인 맛의 평가 시 시료의 색에 따른 영향을 알아보기 위하여 샐러드드레싱의 색도 및 pH를 측정하였으며, 그 결과를 Table 3-2-33과 Fig. 3-2-42에 나타내었음.

Table 3-2-33. 샐러드드레싱의 색도 및 pH

	Salad dressing				
	SC ¹⁾	S1 ²⁾	S2	S3	S4
pH	2.87±0.06 ^{3)e}	2.97±0.04 ^{bc}	3.03±0.07 ^a	3.17±0.09 ^a	3.20±0.07 ^d
Color					
L	7.52±0.24 ^c	11.62±0.73 ^c	13.55±0.10 ^a	12.49±0.29 ^b	10.92±0.17 ^d
a	12.41±0.12 ^b	13.26±0.26 ^a	13.50±0.32 ^a	11.85±0.18 ^c	10.35±0.10 ^d
b	7.83±0.21 ^e	9.65±0.14 ^d	10.96±0.08 ^c	11.94±0.65 ^b	13.25±0.30 ^a

¹⁾SC : Salad dressing control with salt, NaCl solution 2.0%

²⁾S1~S4 : Salad dressing sample of eHISP with various concentration (NaCl content of 2.0%)

S1 : eHISP 0.1%, S2 : eHISP 0.5%,

S3 : eHISP 1.0%, S4 : eHISP 1.5%

³⁾Mean±SD

^{a-e} Means are significantly different within the same row at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test

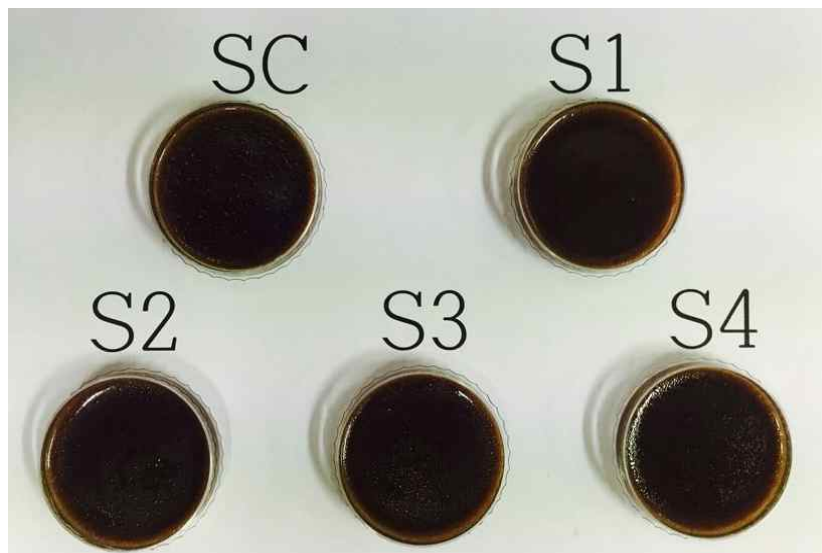


Fig. 3-2-42. eHISP 첨가량에 따른 샐러드드레싱.

- 쉐러드드레싱의 pH 측정결과 대조구가 2.87±0.06, eHISP 0.1 - 1.5% 첨가구는 2.97±0.02 - 3.27±0.02로 eHISP 첨가량이 증가할수록 pH값 또한 증가하였으며, 대조구와 모든 첨가구 간에 유의적인 차이를 나타내었음.
- 쉐러드드레싱의 색도에서 명도의 경우 대조구가 가장 낮은 값을 보였으며, eHISP 첨가량에 따라서는 첨가량이 증가할수록 값 또한 증가하다가 1.0%를 기점으로 다시 값이 감소하는 경향을 나타내었으며, 모든 시료 간에 유의적인 차이를 나타내었음($p<0.05$). 적색도의 경우에서도 eHISP 첨가량이 증가할수록 값이 증가하다가 명도와 마찬가지로 1.0% 첨가구를 기점으로 값이 낮아지는 경향을 나타내었고, 시료간의 유의적 차이는 0.1%와, 0.5% 첨가구 간을 제외한 모든 항목에서 유의적인 차이가 나타났음($p<0.05$). 황색도의 경우 대조구가 가장 낮은 값을 보였으며, eHISP의 첨가량이 증가할수록 값이 점점 증가하는 경향을 보였는데, 이는 eHISP가 가지고 있는 본래의 색의 영향으로 생각됨. 즉, eHISP 자체의 색이 황색계열의 색을 가지고 있기 때문에 첨가량이 증가할수록 황색도의 값이 증가하는 경향을 나타낸 것으로 생각되며, 시료들 간의 유의성은 모든 첨가구에서 유의적인 차이를 나타내었음($p<0.05$).

② 된장국

Table 3-2-34. 된장국의 색도 및 pH

Color value	Soybean paste soup				
	SC ¹⁾	S1 ²⁾	S2	S3	S4
pH	5.47±0.02 ^e	5.51±0.01 ^d	5.54±0.01 ^c	5.66±0.01 ^b	5.70±0.02 ^a
Color					
L	50.07±0.07 ^{a3)}	49.25±0.12 ^b	46.18±0.06 ^c	43.00±0.30 ^d	39.87±0.11 ^e
a	-0.24±0.06 ^e	-0.16±0.02 ^d	0.56±0.02 ^c	1.58±0.05 ^b	2.47±0.01 ^a
b	15.58±0.16 ^e	16.01±0.05 ^d	17.93±0.11 ^c	19.66±0.37 ^b	20.79±0.15 ^a

¹⁾ST : Soybean paste soup control with salt inside of doenjang, NaCl(inside of doenjang) solution 0.7%

²⁾S1~S4 : Soybean paste soup sample of eHISP peptide with various concentration (NaCl content of 0.7%)

S1 : eHISP peptide 0.1%, S2 : eHISP peptide 0.5%,
S3 : eHISP peptide 1.0%, S4 : eHISP peptide 1.5%

³⁾Mean±SD

^{a-e} Superscriptive letters in a row indicate significance at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

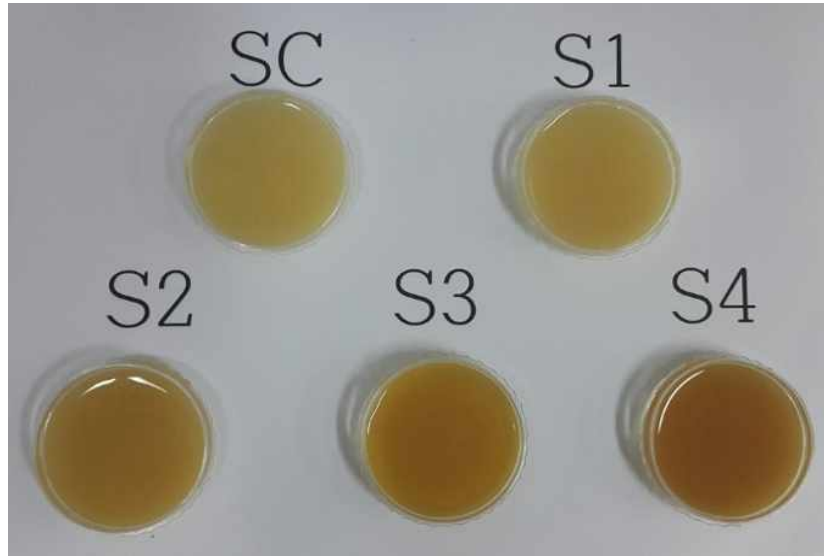


Fig. 3-2-43. eHISP 첨가량에 따른 된장국.

- 된장국의 pH 측정결과 대조구의 경우 5.47 ± 0.02 이었으며, 실험구는 $5.51 \pm 0.01 \sim 5.70 \pm 0.02$ 로 eHISP의 첨가량이 증가함에 따라 pH가 증가하는 경향을 보였음. 이는 eHISP의 pH 값이 5.83 ± 0.01 으로 eHISP의 첨가량이 증가할수록 pH가 증가한 것으로 판단됨.
- 명도(L-Lightness)의 경우 대조구가 50.07로 가장 높게 나타났고, eHISP 1.5% 첨가구가 38.87 ± 0.11 로 가장 낮게 나타남. 결과적으로 eHISP 첨가량이 늘어날수록 명도값은 감소하는 경향을 보였으며, 모든 시료 간에 유의적인 차이를 나타내었음($p < 0.05$). 적색도(a-Redness)와 황색도(b-Yellowness)의 경우 대조구와 모든 실험구 간에 유의적인 차이를 나타내었으며($p < 0.05$), 대조구와 비교하였을 때, eHISP 첨가량이 증가하면서 적색도와, 황색도도 증가하는 경향을 보였음.

③ 숙주나물 무침

Table 3-2-35. 숙주나물의 색도 및 pH

	Mungbean sprout				
	MC ¹⁾	M1 ²⁾	M2	M3	M4
pH	5.37 ± 0.02^e	5.43 ± 0.02^d	5.49 ± 0.02^c	5.67 ± 0.01^b	5.78 ± 0.02^a
Color					
L	$67.79 \pm 0.07^{a3)}$	67.15 ± 0.20^b	64.74 ± 0.31^c	63.90 ± 0.07^d	62.77 ± 0.18^e
a	2.37 ± 0.14^e	2.68 ± 0.13^d	2.98 ± 0.07^c	3.17 ± 0.07^b	3.43 ± 0.06^a
b	20.41 ± 0.38^e	21.26 ± 0.74^d	22.82 ± 0.35^c	23.91 ± 0.26^b	25.03 ± 0.03^a

¹⁾MC : Mungbean sprouts control with salt, NaCl solution 0.7%

²⁾M1~M4 : Mungbean sprouts sample of eHSP peptide with various concentration (NaCl content of 0.7%)
M1 : eHSP peptide 0.1%, M2 : eHSP peptide 0.5%,
M3 : eHSP peptide 1.0%, M4 : eHSP peptide 1.5%

³⁾Mean±SD

^{a-e} Superscriptive letters in a row indicate significance at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

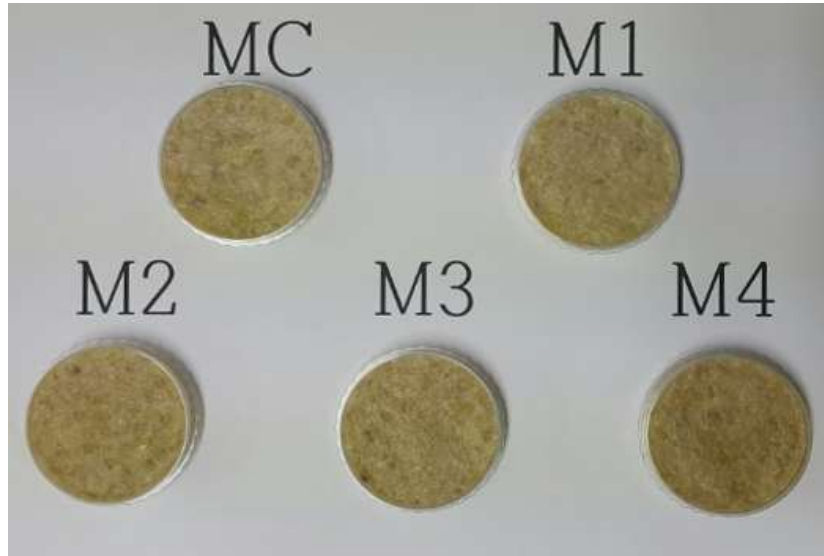


Fig. 3-2-44. eHISP 첨가량에 따른 숙주나물.

- 숙주나물의 pH 측정결과 된장국과 마찬가지로 대조구가 가장 낮은 값을 나타내었으며, 실험구는 $5.43 \pm 0.02 \sim 5.78 \pm 0.02$ 로 eHISP 함량이 증가할수록 pH 값도 증가하는 경향을 나타내었으며, 모든 첨가구간에 유의적인 차이를 나타내었음($p < 0.05$).
- 숙주나물의 색도 측정 결과 명도(L-Lightness)의 경우 대조구의 명도가 가장 높게 측정되었고, eHISP 첨가량이 증가할수록 명도는 감소하는 경향을 보였음. 적색도(a-Redness)의 경우, 첨가량이 증가할수록 적색도 또한 함께 증가하였으며, 대조구가 가장 낮은 적색도를 나타내었음. 황색도(b-Yellowness)의 경우도 적색도와 마찬가지로 대조구가 가장 낮은 값을 보였고, eHISP 첨가량이 증가할수록 황색도는 증가하는 경향을 보였으며, 명도, 적색도, 황색도 모두 시료 간에 유의적인 차이를 나타내었음($p < 0.05$).

(4) 묘사분석을 통한 eHAP 짠맛증진물질의 관능적 특성 평가

(가) 정량적 묘사분석(QDA, Quantitative Descriptive Analysis)

Table 3-2-36. eHAP의 묘사특성 정의

Sensory attributes	Definition	References	Intensity 0-11(12)
Appearance	yellow color	DIC COLOR GUIDE (3.2 Version DIC Co., Japan)	DIC-239 - DIC-306
Flavor/ Odor	traditional doenjang	flavor related with traditional doenjang	6
	korean soy sauce	flavor related with 10% korean soy sauce solution	7
	corn silks tea	flavor related with corn silks tea	4
	parched beans	flavor related with parched beans	5

	meju	flavor related with meju	8
Salty	korean soy sauce	salty taste related with 10% korean soy sauce solution	9
	traditional doenjang	salty taste related with traditional doenjang	6
	soybean paste soup	salty taste related with soybean paste soup	7
	stone plate cooked egg	salty taste related with stone plate cooked egg	6
	dried squid	salty taste related with dried squid	4
Sweet	stone plate cooked egg	sweet taste related with stone plate cooked egg	6
	water	sweet taste related with water	4
	soybean paste soup	sweet taste related with soybean paste soup	7
	miso	sweet taste related with miso ddoenjang	6
	seasoned squid	sweet taste related with seasoned squid	4
	dried bonito	sweet taste related with dried bonito	5
	jinmichae	sweet taste related with jinmichae	5
Sour	boiled bean	sour taste related boiled bean	5
	korean style soy sauce	sour taste related 10% korean style soy sauce 10% solution	7
	soybean paste soup	sour taste related soybean paste soup	8
	miso paste soup	sour taste related with miso paste soup	6
Bitter	parched beans	bitter taste related with parched beans	8
	burdock root tea	bitter taste related with root tea	9
	fry anchovy	bitter taste related with rry anchovy	10
	boiled bracken	bitter taste related with doiled bracken	8
	roasted pollack	bitter taste related with roasted pollack	6
Delicate taste	dried bonito	delicate taste related with dried bonito	6
	burned rice	delicate taste related with boiled burned rice	8
	parched beans	delicate taste related with boiled parched beans	8
Umami	miso	umami taste related with miso	7
	traditional doenjang	umami taste related with traditional doenjang	9
	soybean paste soup	umami taste related with soybean paste soup	10
	dried bonito	umami taste related with dried bonito	8

○ 개발된 언어 중 외관의 경우 진한 노란색 계열의 색으로 개발되었고, 기준은 DIC 239-306 까지 평가되었으며, 평가시료에 대하여 8점의 강도가 개발되었음. 향의 경우에는 재래식 된장의 향, 조선간장의 향, 옥수수 수염차 향, 구수한 향의 4가지 언어가 개발되었으며, 기준물질에 대하여 각각 6점, 7점, 4점, 5점의 강도가 개발됨. 짠맛에 대해서는 조선간장의 짠맛 9점, 재래식 된장의 짠맛 6점, 된장국의 짠맛 7점, 맥반석 달걀의 짠맛 6점, 마른오징어 짠맛 4점으로 총 5가지 언어와 이에 따른 강도가 개발되었음. 단맛의 경우 맥반석 달걀의 단맛 6점, 물의 단맛 4점, 된장국의 단맛 7점, 미소 단맛 6점, 조미오징어 단맛 4점, 가쓰오부시 단맛 5점, 진미채 단맛 5점으로 7개의 언어 및 강도가 개발됨. 신맛에서는 삶은 콩의 신맛 5점, 국간장의 신맛 7점, 된장국의 신맛 8점, 미소국의 신맛 6점으로 4가지의 언어와 강도가 개발되었으며, 쓴맛의 경우 볶은콩의 쓴맛 8점, 우엉차의 쓴맛 9점, 볶은 멸치의 쓴맛 10점, 삶은 고사리의 쓴맛 8점, 황태채의 쓴맛 6점으로 5가지 언어 및 강도가 개

발되었음. 구수한맛에 대해서는 가쓰오부시 구수한맛 6점, 누룽지 구수한맛 8점, 볶은 콩의 구수한맛 8점으로 3개의 언어와 강도가 개발되었고, 감칠맛의 경우는 미소 감칠맛 7점, 래식된장 감칠맛 9점, 된장국의 감칠맛 10점, 가쓰오부시의 감칠맛 8점으로 총 4가지의 언어 및 강도가 개발되었음.

(나) 향미프로필(Flavor Profile)

Table 3-2-37. eHAP의 관능적 특성강도 점수

Sensory attributes		B-ACT ²⁾ 2%	B-ACT 1%	A-ACT ³⁾ 2%	A-ACT 1%
Appearance	yellow color	8.50 ^a	6.30 ^b	3.10 ^c	1.30 ^d
	traditional doenjang	7.10 ^a	6.60 ^a	4.10 ^b	2.70 ^b
Flavor/	korean soy sauce	7.70 ^a	6.60 ^a	3.90 ^b	2.40 ^b
	corn silks tea	7.30 ^a	6.00 ^a	3.70 ^b	1.90 ^c
Odor	parched beans	5.20 ^a	4.90 ^a	4.00 ^a	2.00 ^b
	meju	9.60 ^a	6.70 ^b	2.80 ^c	1.50 ^d
Salty	korean soy sauce	5.70 ^a	4.60 ^{ab}	3.50 ^{bc}	2.60 ^c
	traditional doenjang	6.90 ^a	5.60 ^{ab}	4.10 ^{bc}	2.80 ^c
	soybean paste soup	6.20 ^a	5.10 ^a	4.80 ^a	2.70 ^b
	stone plate cooked	6.10 ^a	4.60 ^{ab}	3.70 ^b	2.70 ^b
	egg	5.90 ^a	4.50 ^b	2.90 ^c	1.80 ^c
Sweet	dried squid	5.10 ^a	4.20 ^{ab}	3.30 ^b	2.80 ^b
	stone plate cooked	5.10 ^a	4.20 ^{ab}	3.30 ^b	2.80 ^b
	egg	4.60 ^a	4.10 ^{ab}	3.40 ^{ab}	2.50 ^b
	water	5.40 ^a	4.70 ^{ab}	3.60 ^{bc}	2.50 ^c
	soybean paste soup	5.40 ^a	4.70 ^{ab}	3.60 ^{bc}	2.50 ^c
	miso	5.40 ^a	4.80 ^a	3.60 ^{ab}	2.50 ^c
	seasoned squid	4.80 ^a	4.50 ^a	3.80 ^{ab}	2.40 ^c
Sour	dried bonito	4.70 ^a	3.80 ^a	2.90 ^a	2.80 ^a
	jimmichae	4.90 ^a	4.20 ^{ab}	2.80 ^{bc}	2.10 ^c
	boiled bean	4.90 ^a	3.20 ^a	4.50 ^a	3.20 ^a
	korean style soy sauce	5.60 ^a	4.20 ^a	5.20 ^a	4.10 ^a
Bitter	soybean paste soup	5.40 ^a	3.40 ^b	4.30 ^{ab}	3.00 ^b
	miso paste soup	5.80 ^a	4.30 ^a	5.10 ^a	3.90 ^a
	parched beans	6.60 ^a	4.80 ^{ab}	3.70 ^{bc}	2.20 ^c
Delicate taste	burdock root tea	6.90 ^a	5.10 ^b	3.90 ^{bc}	2.70 ^c
	fry anchovy	6.10 ^a	4.50 ^b	3.10 ^{bc}	2.30 ^c
	boiled bracken	6.10 ^a	4.60 ^{ab}	3.80 ^{bc}	2.30 ^c
	roasted pollack	5.90 ^a	4.10 ^b	3.00 ^c	2.60 ^d
Umami	dried bonito	5.40 ^a	4.90 ^{ab}	4.60 ^{ab}	2.90 ^b
	burned rice	6.50 ^a	5.70 ^{ab}	4.80 ^{ab}	3.70 ^b
	parched beans	5.80 ^a	4.30 ^{ab}	4.00 ^{ab}	3.30 ^b
Umami	miso	6.60 ^a	5.10 ^{ab}	3.30 ^{bc}	2.80 ^c
	traditional doenjang	7.10 ^a	5.70 ^{ab}	3.80 ^{bc}	2.90 ^c
	soybean paste soup	6.60 ^a	5.40 ^a	4.60 ^{ab}	3.20 ^c
	dried bonito	5.50 ^a	4.60 ^{ab}	3.30 ^{bc}	2.50 ^c

¹⁾Subjects used 12-point category scale (0-11) for the evaluation.

²⁾B-ACT : before activated carbon treatment

³⁾A-ACT : after activated carbon treatment

⁴⁾There are no significant differences ($p < 0.05$) using Duncan's multiple comparison test between the samples having the same letter within an attribute.

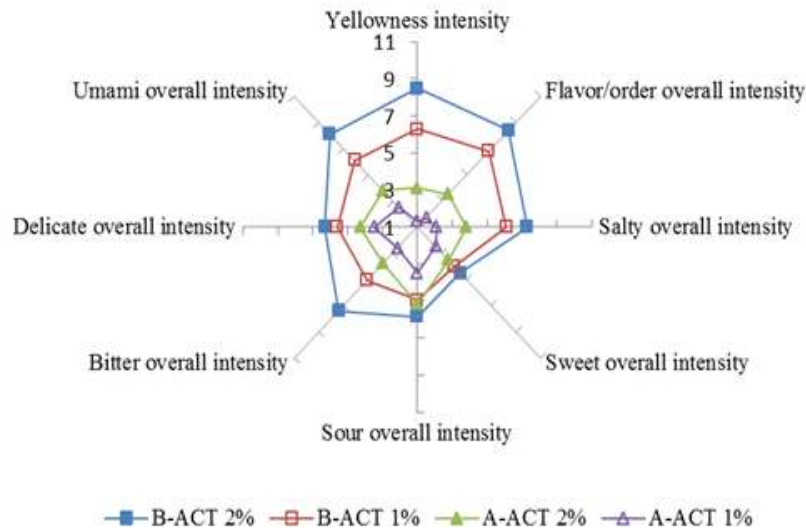


Fig. 3-2-45. eHAP의 종합적 차이강도(향미프로필).

- eHISP의 향미프로필 결과 신맛을 제외한 모든 항목에서 활성탄 처리구가 활성탄 미 처리구보다 관능적 특성이 낮게 나타났는데, 이러한 경향이 나타난 것 중 하나는 활성탄 처리로 냄새 등이 감소하면서 맛에 대한 감도가 낮아진 것이 어느 정도 영향을 미친 것으로 생각됨.
- 신맛의 경우 eHISP 첨가량이 증가할수록 관능적 특성이 높게 평가되었고, 활성탄 처리 유무에 따라서는 활성탄 미 처리구에서 더 높은 점수를 나타내었음. 이는 분리대두 단백질이 효소에 의해 가수분해 되어 생성된 펩타이드 중 하나인 aspartic acid의 영향일 것으로 생각됨. 일반적으로 aspartic acid는 감칠맛 외에 신맛을 내는 정미성분으로 대두단백질에는 글루탐산 다음으로 많은 양을 차지하고 있어 이의 영향을 받은 것으로 생각됨(Choi & Rho, 2013).
- 시료의 전반적인 기호도에는 Fig. 3-2-46과 같으며, 결과를 봤을 때 전반적으로 활성탄 처리구의 점수가 높게 나타났으며, 첨가량에 따라서는 eHISP 농도가 진해질수록 기호도가 낮아지는 경향을 나타내었음. 이는 eHISP 시료의 경우 제조 과정 중 분리 대두 단백질의 가수분해가 진행되면서 생성된 이취와 쓴맛을 내는 저분자 펩타이드가 증가함에 따라(Han & Hwang, 1992) eHISP 첨가량이 증가할수록 이들에 대한 이취나 쓴맛도 비례적으로 증가하여 기호도가 낮게 나타난 것으로 생각됨.

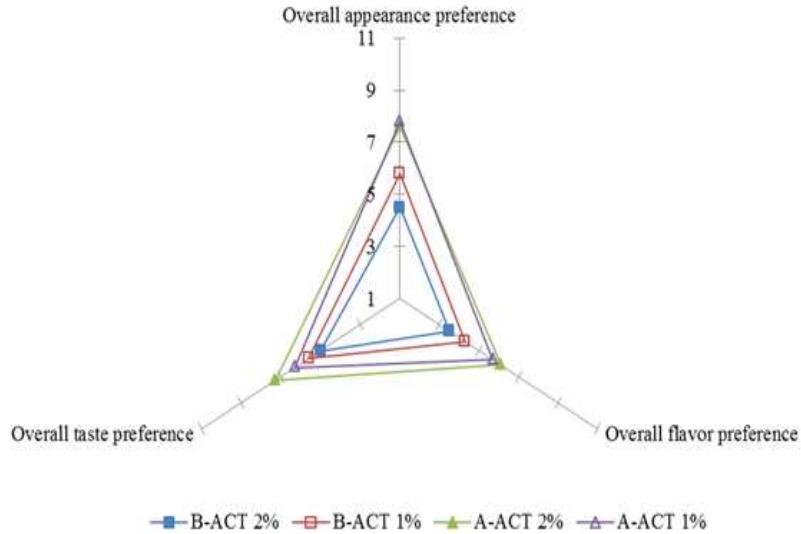


Fig. 3-2-46. eHAP의 전체적 기호도(향미프로필).

○ 시료의 전반적인 기호도에 대해서는 활성탄 처리구의 점수가 높게 나타났으며, 첨가량에 따라서는 eHISP 농도가 진해질수록 기호도가 낮아지는 경향을 나타내었음. 이는 eHISP 시료의 경우 제조 과정 중 분리 대두 단백질의 가수분해가 진행되면서 생성된 이취와 쓴맛을 내는 저분자 펩타이드가 증가함에 따라(Han & Hwang, 1992) eHISP 첨가량이 증가할수록 이들에 대한 이취나 쓴맛도 비례적으로 증가하여 기호도가 낮게 나타난 것으로 생각됨.

(다) 주성분분석(Principal Component Analysis, PCA)

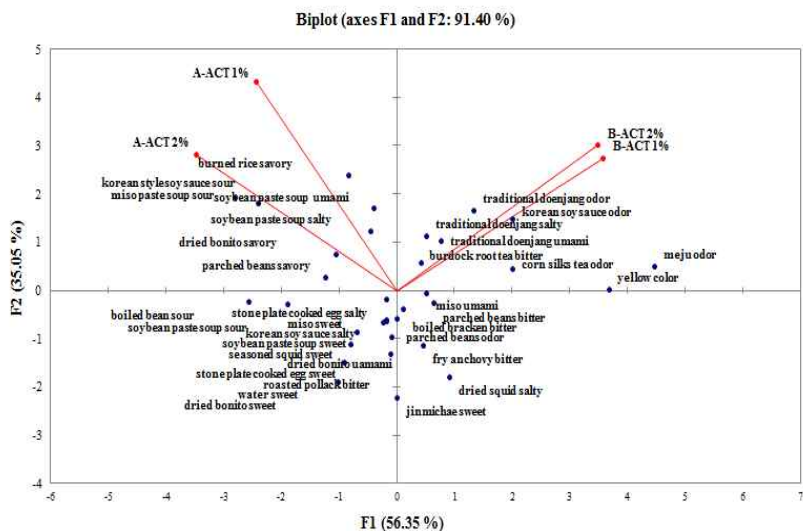


Fig. 3-2-47. eHISP 관능적 용어의 주성분분석.
(B-ACT : before activated carbon treatment,
A-ACT : after activated carbon treatment)

- 활성화탄 처리 전, 후의 시료와 34개의 관능적 특성 언어 간 상관관계 및 유사성을 분석한 결과 첫 번째 주성분인 F1은 56.35%, 두 번째 주성분인 F2는 35.05%의 설명력을 가지는 것으로 나타나 총 91.40%의 설명력을 보였음.
- F1에 대하여 색, 재래식 된장의 향·짠맛·감칠맛, 메주 향, 볶은콩의 향·쓴맛, 우영차의 쓴맛 등과 양의 상관관계를 나타내었는데, 특히 메주 향이 매우 높은 상관관계를 나타내었음. F1과 음의 상관관계를 나타낸 특성에는 국간장 및 삶은 콩·미소된장국의 신맛, 된장국의 짠맛·단맛·감칠맛, 조선간장의 짠맛, 맥반석 달걀의 짠맛 등이 있었음.
- F2에 대해서는 색, 볶은 콩을 제외한 향/이취 전체, 재래식된장·된장국의 짠맛, 구수한맛 전체, 우영차 쓴맛, 재래식된장의 감칠맛 등이 양의 방향으로 부하되었으며, 그 중 누룽지 구수한 맛과 매우 높은 상관관계를 나타내었음. 반면, 볶은콩의 향, 조선간장·맥반석달걀·마른오징어의 짠맛, 단맛 전체, 우영차를 제외한 쓴맛, 삶은 콩의 신맛, 미소의 감칠맛 등과 음의 상관관계를 나타내었음.
- 활성화탄 처리 전, 후에 대해서는 먼저 활성화탄 처리 전 시료의 경우 1사분면에 위치하여 색, 향, 일부의 짠맛·쓴맛과 상관관계를 가지고 있는 것으로 나타났으며, 이에 따른 관능적 특성 중 색, 조선간장의 향, 메주의 향, 옥수수 수염차 향, 재래식 된장의 향·짠맛·감칠맛, 우영차 쓴맛과 높은 상관관계를 가지는 것으로 나타남. 활성화탄 처리 후 시료의 경우 2사분면 위치하여 구수한맛, 일부의 짠맛·신맛·감칠맛과 함께 음의 값을 나타내고 있으며, 관능적 특성 중에는 된장국의 짠맛·감칠맛, 국간장의 신맛, 미소된장국 신맛, 구수한 맛 전체 항목에 대해 높은 상관관계를 가지는 것으로 나타남. 이 결과를 통하여 활성화탄 처리 전, 후에 따른 eHISP 시료의 관능적 특성에 대한 차이를 알 수 있었고, 그 중에서도 활성화탄 처리 후 시료의 경우 색·향과 음의 상관관계를 나타내어 이미와 이취 등이 줄어들었음을 알 수 있었음.

7. 신규 짠맛증진물질 소재의 강도평가

가. 실험방법

(1) Bio GABA

(가) Ion Chromatography를 이용한 Bio GABA의 Na 정량분석

- 제 3협동 연구기관에서 새로 개발한 Bio GABA 시료를 제공받았으며, 이에 대하여 Ion Chromatography를 이용하여 Na 정량분석을 실시함. 분석방법은 앞의 eHISP의 Na 정량분석 방법과 동일함.

(나) Bio GABA의 짠맛 강도평가

- ① 검사요원 선정 및 강도평가
- ② 검사요원 선정

- 강도평가 요원은 기존에 짠맛 차이 훈련을 받은 패널 35명을 대상으로 짠맛 순위검사에서 정답률이 80% 이상으로 짠맛에 대한 판별력이 일정수준 이상이 되는 패널 25명을 선발하여 이들을 대상으로 eHISP의 강도평가를 실시함.

② 짠맛 강도평가 방법

㉠ 평가 시료의 제조

- Bio GABA의 경우 시료 자체의 냄새를 맡았을 경우 시료 특유의 냄새나 맛이 강도평가에 크게 영향을 주지 않는 것으로 판단되었음. 따라서 NaCl 용액을 기준 용액으로 하여 짠맛 강도 평가 실험을 진행하였음.
- 평가시료의 eHISP 첨가량은 0.1, 1.0, 1.5, 2.0%로 eHISP 내 NaCl 농도를 계산한 후 최종 NaCl 농도는 50, 60 mmol/L가 되도록 평가시료를 제조하였으며, 그 방법은 Table 3-2-38, 3-2-39와 같음. 평가 시 짠맛 기준 농도로 제시된 시료는 NaCl 25 mmole에서 80 mmole 까지 5 mmole 간격으로 제조된 NaCl용액 12가지를 제공하여 비교평가 하도록 하였음.

Table 3-2-38. 강도평가를 위한 기준 시료 제조방법

Ingredients (g)	g/L											
	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80
NaCl	1.46	1.75	2.05	2.34	2.63	2.92	3.21	3.05	3.80	4.09	4.38	4.67
Water	998.54	998.25	997.95	997.66	997.37	997.08	996.79	986.57	985.82	985.53	985.24	984.95
Total	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00

Table 3-2-39. 강도평가를 위한 Bio GABA 시료 제조방법

Ingredients (g)	g/L							
	50				60			
	0.5	1.0	2.0	3.0	0.5	1.0	2.0	3.0
Water	996.08	987.08	977.08	967.08	995.95	986.95	976.95	966.95
NaCl	2.92	2.92	2.92	2.92	3.05	3.05	3.05	3.05
GABA	1.00	10.00	20.00	30.00	1.00	10.00	20.00	30.00
Total	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00

㉡ 평가 방법

- 제조된 시료의 평가는 15 cm 선척도(line scale) 방법을 활용하여 짠맛강도에 대해 평가

하도록 하였음. 시료는 70 mL 일회용 종이 소주컵에 15 mL씩 담아 제공하였으며, 검사원들은 1회용 멸균 스포이드(Sterile disposable transfer pipette 1.5 mL, Office Ahn, Gwangju, Korea)를 사용하여 1 mL씩 정량을 맛보도록 하였음. 각 시료에는 난수표에서 무작위로 추출한 세 자리 숫자를 표시하였으며, 시료의 제시 순서 또한 무작위로 제공하였고, 평가 전과 시료를 맛 본 후에는 입안에 남아있는 맛을 제거하기 위하여 테두리를 제거한 식빵과 생수 등을 제공하여 입 안을 헹구도록 하였음.

(다) Bio GABA를 이용한 식품 내 소금사용량 감소효과

① 관능검사 패널 선정

- 조리적용 실험의 경우 앞서 강도평가에서 선발된 패널 25명을 최종 패널로 선정하였으며, 기호도 평가의 경우는 한식조리학과 재학생 30명을 대상으로 선발하여 평가하도록 하였음.

② 시료의 제조 및 평가방법

㉠ 샐러드드레싱의 제조

- 샐러드드레싱의 재료 배합은 Table 3-2-40과 같으며, 제조방법의 경우 위의 eHISP 실험에서 샐러드드레싱 제조 과정과 동일함.
- 양상추는 하단부를 제거한 후 부드러운 잎 부분만을 사용하여 가로 4 cm, 세로 4 cm로 잘라 0°C 이하의 흐르는 물에서 2회 세척 후 야채탈수기(Meyer mini salad spinner, Motor Millions Electric Industries Co., Seoul, Korea)에 넣어 3분간 탈수 시킨 다음 냉장보관 하였음. 평가 5분 전 냉장보관한 양상추와 샐러드드레싱을 섞어서 제공하였으며, 포크(HY포크-중 155 mm, Daesung Industrial Co., Jeonju Korea)를 사용하여 시료를 먹을 수 있도록 하였음.
- 각 시료 용기에는 난수표에서 무작위로 추출한 세 자리 숫자를 부착하여 시료를 구분하도록 하였음. 평가 시 시료와 시료 사이에는 식빵과 오이, 생수 등을 사용하여 입안을 수시로 헹구도록 하였으며, 평가 도중 혀의 둔화현상을 줄이기 위해 한 쌍의 시료 평가를 끝낸 후 1분 후에 다음 시료를 평가하도록 하였음.

Table 3-2-40. 샐러드드레싱의 재료 배합비

Ingredients (g)	Based salad dressing				
Olive oil	570.00				
Balsamic vineger	420.00				
Ground black pepper	10.00				
Total	1000.00				
Ingredients (g)	SC ¹⁾	S1 ²⁾	S2	S3	S4
Based salad dressing	980.00	975.00	970.00	960.00	950.00
NaCl	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
GABA ³⁾	-	5.00	10.00	20.00	30.00
Total	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00

¹⁾SC : Salad derssing control with salt, NaCl solution 2.0%

²⁾S1~S4 : Salad derssing sample of GABA with various concentration (NaCl content of 2.0%)

S1 : GABA peptide 0.1%, S2 : GABA peptide 0.5%,

S3 : GABA peptide 1.0%, S4 : GABA peptide 1.5%

³⁾Bio GABA : Protein except for NaCl

㉔ 평가방법

- 조리적용 시료의 짠맛 강도 평가는 검사의 식별 능력이 다른 차이 검사보다 높다고 보고된 2-AFC (Two-alternative forced choice) 평가 방법을 사용하였으며(Kim, 2001), 15 cm 선척도(line scale)에 제시된 시료의 짠맛 강도를 표시하도록 하였음. 기호도 또한 15 cm 선척도 방법을 활용하여 좋아하는 정도(매우 좋음-매우 나쁨)를 평가하도록 하였음.
- 평가 시 제시 순서에 의한 오차를 줄이기 위하여 시료는 무작위로 제공하였고, 시료와 시료 사이에는 식빵과, 오이, 생수 등을 사용하여 입안을 수시로 헹구도록 하였음. 또한 평가 도중 혀의 둔화현상을 줄이기 위하여 한 쌍의 시료 평가를 끝낸 후 1분 후에 다음 시료를 평가하도록 함.

(라) 통계분석

- 조리적용 실험의 경우 NaCl 첨가구와 농도별 GABA 첨가구 간에 짠맛의 차이가 있는지 알아보기 위하여 비모수적 대응2-표본 검정방법인 윌콕슨 부호 순위 검정(Wilcoxon signed rank test)을 수행하여 시료 간의 유의적인 차이를 검증하음. 전반적인 기호도의 경우 시료 간 차이를 알아보기 위하여 분산분석(ANOVA) 및 Duncan 다중범위검정(Duncan's multiple range test)을 수행하였음.($p < 0.05$). 모든 통계 분석에는 SPSS Version 21.0 package program (SPSS INC., Chicago, IL, USA)를 사용함.

(2) 신 공정에 의해 개발된 식물성 단백질 효소 가수분해물(eHVP + Vit C)

- 경희대학교에서 제공한 신 공정에 의해 개발된 식물성 단백질 효소 가수분해물의 경우 콩(대두)과 Vit C 등의 재료를 사용하여 만든 것으로, 시료 제조 시 고압, 아임계 기술과 효소 가수분해 기술을 이용하였음.

(가) eHVP + Vit C 짠맛증진물질의 짠맛 강도평가

① 검사요원 선정 및 강도평가

㉠ 검사요원 선정

- 강도평가 요원은 기존에 짠맛 차이 훈련을 받은 패널 35명을 대상으로 짠맛 순위검사에서 정답률이 80% 이상으로 짠맛에 대한 판별력이 일정수준 이상이 되는 패널 10명을 선발하여 이들을 대상으로 eHVP + Vit C의 강도평가를 실시함.

② 짠맛 강도평가 방법

㉠ 평가 시료의 제조

- eHVP+Vit C 시료의 경우 시료 자체의 냄새를 맡았을 경우 시료 특유의 냄새나 맛이 강도평가에 크게 영향을 주지 않는 것으로 판단되었음. 따라서 NaCl 용액을 기준 용액으로 하여 짠맛 강도 평가 실험을 진행하였음.
- 평가시료 내 Na은 0.38%가 함유되어 있었음. 평가시료의 첨가량은 10, 20%로 eHVP+Vit C 내 NaCl 농도를 계산한 후 최종 NaCl 농도는 40, 50 mmol/L가 되도록 평가시료를 제조하였으며, 그 방법은 Table 3-2-41, 3-2-42과 같음. 평가 시 짠맛 기준 농도로 제시된 시료는 NaCl 25 mmole에서 80 mmole 까지 5 mmole 간격으로 제조된 NaCl용액 12가지를 제공하여 비교평가 하도록 하였음.

Table 3-2-41. 강도평가를 위한 기준 시료 제조방법

Ingredients (g)	g/L											
	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80
NaCl	1.46	1.75	2.05	2.34	2.63	2.92	3.21	3.05	3.80	4.09	4.38	4.67
Water	998.54	998.25	997.95	997.66	997.37	997.08	996.79	986.57	985.82	985.53	985.24	984.95
Total	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00

Table 3-2-42. 강도평가를 위한 eHVP+Vit C 시료 제조방법

Ingredients (g)	g/L			
	40		50	
	10.0	20.0	10.0	20.0
Water	897.66	797.66	897.08	797.08
NaCl	2.34	2.34	2.92	2.92
eHVP+VitC	100.00	200.00	100.00	200.00
Total	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00

㉠ 평가 방법

- 제조된 시료의 평가는 15 cm 선척도(line scale) 방법을 활용하여 짠맛강도에 대해 평가

하도록 하였음. 시료는 70 mL 일회용 종이 소주컵에 15 mL씩 담아 제공하였으며, 검사원 들은 1회용 멸균 스포이드(Sterile disposable transfer pipette 1.5 mL, Office Ahn, Gwangju, Korea)를 사용하여 1 mL씩 정량을 맛보도록 하였음. 각 시료에는 난수표에서 무작위로 추출한 세 자리 숫자를 표시하였으며, 시료의 제시 순서 또한 무작위로 제공하였고, 평가 전과 시료를 맛 본 후에는 입안에 남아있는 맛을 제거하기 위하여 테두리를 제거한 식빵과 생수 등을 제공하여 입 안을 헹구도록 하였음.

나. 실험결과

(1) Bio GABA

(가) Ion Chromatography를 이용한 Bio GABA의 Na 정량분석 결과

- Bio GABA 시료에 함유되어 있는 NaCl 함량은 Ion Chromatography (ICS-900, Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 나트륨 함량을 분석하였고, 측정된 값을 NaCl 분자량을 이용하여 계산하였음. 그 결과 86.3 g/L (NaCl)가 함유되어 있었으며, 이를 짠맛 강도평가 시료 제조 시 NaCl 농도를 맞추는데 사용함.

(나) Bio GABA의 짠맛 강도평가 결과

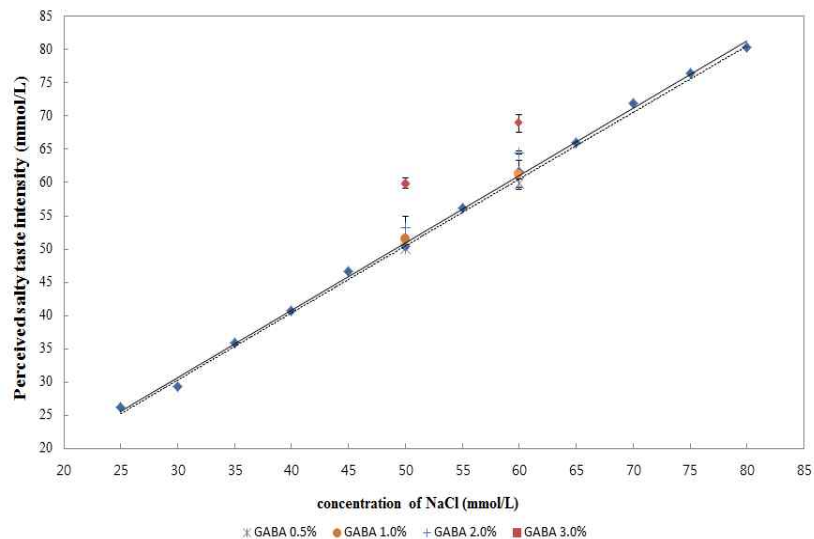


Fig. 3-2-48. 각기 다른 NaCl 농도에서 eHISP의 첨가량에 따른 짠맛증진효과.

- GABA의 짠맛 강도평가 실험결과 50 mmol/L NaCl에서 0.5% 첨가구의 경우는 증진효과가 나타나지 않았으며, 1.0% 첨가구는 2%, 2.0% 첨가구에서 약 6%, 3.0% 첨가구에서 약 19%의 증진효과가 있는 것으로 나타남. 60 mmol/L NaCl 에서는 0.5%, 1.0% 첨가구들에서는 증진효과가 나타나지 않았으며, 2.0% 첨가구에서 약 5%, 3.0%에서 약 12%의 증진효과를 나타냄. 평가 도중 Bio GABA의 신맛이 너무 강하여 짠맛을 평가하기 힘들다는

의견이 많았으며, 이의 영향으로 증진효과가 낮게 나타난 것으로 생각됨.

(다) Bio GABA를 이용한 식품 내 소금사용량 감소효과

① 셀러드드레싱

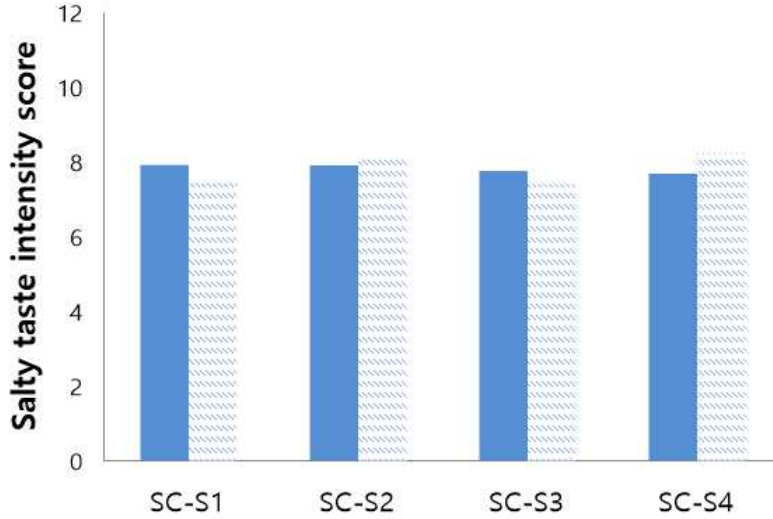


Fig. 3-2-49. 셀러드드레싱의 짠맛 강도평가.

SC : NaCl solution 2.0%

S1 : GABA 0.5% in NaCl 2.0%

S2 : GABA 1.0% in NaCl 2.0%

S3 : GABA 2.0% in NaCl 2.0%

S4 : GABA 3.0% in NaCl 2.0%

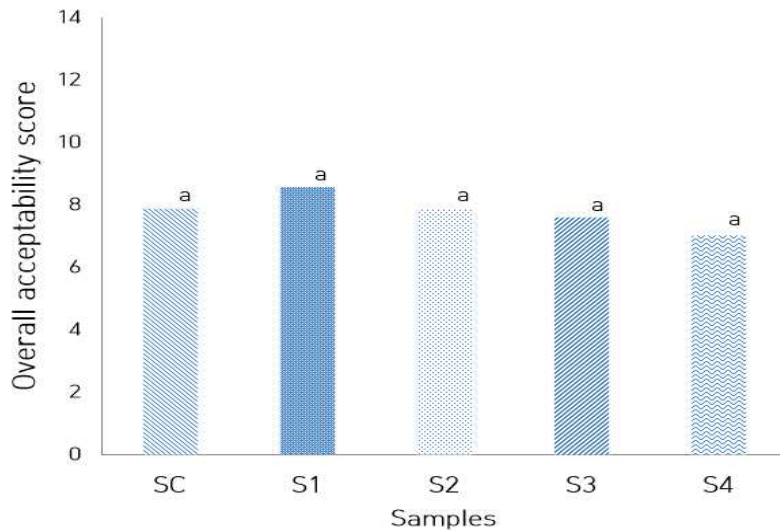


Fig. 3-2-50. 셀러드드레싱의 전반적인 기호도.

○ 실험 결과 대조구와 비교하였을 때, 1.0% 첨가구에서는 3%의 증진효과가 있었으며, 3.0% 첨가구에서는 7%의 증진효과가 나타남. 반면, 0.5% 및 2.0% 첨가구에서는 증진효과가 나타

나지 않았음. 실험결과 GABA 첨가량에 따른 증진효과에 대한 상관관계는 확인하기 어려웠으며, 이는 셀러드드레싱 및 GABA 자체가 함유하고 있는 신맛성분이 짠맛으로 오미 되어 평가된 것으로 생각됨.

- GABA 첨가량에 따른 기호도는 Fig. 3-2-50과 같으며, 가장 기호도가 높게 평가된 시료는 1.0% 첨가구였으며, 시료간의 유의적인 차이는 나타나지 않음. 대체적으로 GABA 첨가량이 증가할수록 기호도가 낮아지는 경향을 나타내었는데, 이는 GABA 자체가 함유하고 있는 신맛이 첨가량이 증가할수록 강해져 이의 영향으로 기호도가 낮아진 것으로 생각됨.

(2) 신 공정에 의해 개발된 식물성 단백질 효소 가수분해물(eHVP + Vit C)

(가) 짠맛 강도평가 결과

- eHVP + Vit C를 사용하여 제조한 식물성 단백질 효소가수분해물의 짠맛 강도평가 결과는 Fig. 3-2-51과 같음. 실험결과 40 mmol/L NaCl에서 10% 첨가구의 약 17%, 20% 첨가구에서는 26%의 증진효과가 있는 것으로 나타남. 그러나 50 mmol/L NaCl 에서는 증진효과가 나타나지 않았으며, 이는 시료 자체가 함유하고 있는 신맛으로 인한 것으로 생각됨. 실제로 평가 도중 시료 자체의 신맛이 너무 강하여 Bio GABA와 마찬가지로 짠맛을 평가하기 힘들다는 의견이 있었음. 따라서 이의 경우 시료의 신맛을 masking 하는 방안을 모색한다면 짠맛증진물질로써 이용가능성이 높아질 것으로 생각됨.

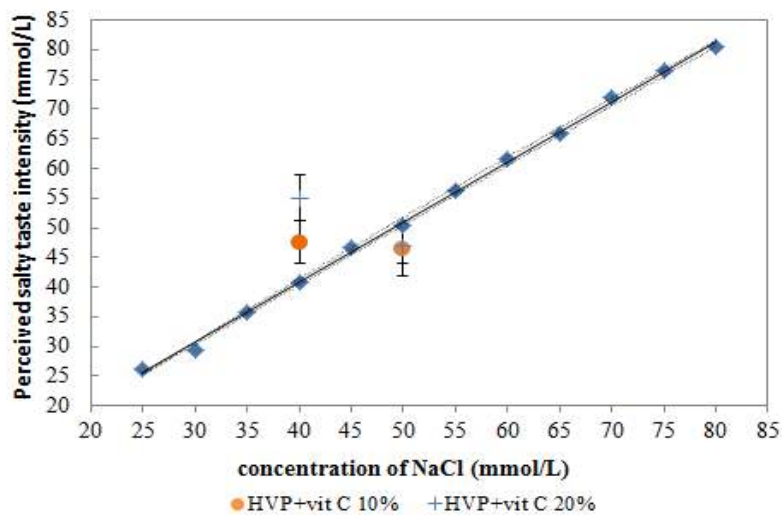


Fig. 3-2-51. 각기 다른 NaCl 농도에서 eHVP+Vit C 첨가량에 따른 짠맛증진효과.

8. LC -MS를 이용한 장류식품의 저분자량 펩타이드 분석법 개발(별첨 1 위탁연구개발보고서 참고)

9. 세포막전위 변화를 측정 할 수 있는 미세구조화된 랩온어칩 제작(별첨 2 위탁연구개발보고서 참고)

10. 완성된 짠맛센서 칩 기반 짠맛관련 이온채널 단백질이 존재하는 세포를 이용한 짠맛 증진후보물질의 성능 평가(별첨 2 위탁연구개발보고서 참고)

11. 연구개발성과

- 관능검사 패널을 통한 짠맛 증진 물질의 신속 선별 방법 확립
- 시중 판매하는 간장, 어간장, 양조간장 등의 짠맛 평가 결과 보고
- 짠맛 증진 물질의 펩타이드 분석 및 장류 내 저분자량 펩타이드 분석법 확립
- 양조간장을 사용한 식품 내 나트륨 사용량 감소 효과 연구 결과 발표 및 언론 홍보
- 멸치단백질 효소가수분해물의 짠맛 증진 효과 분석, 조리 적용 시 음식 내 짠맛 증진 효과 분석
- 콩단백질 효소가수분해물의 짠맛 증진 효과 분석, 조리 적용 시 음식 내 짠맛 증진 효과 분석
- HTS system을 활용한 신규 짠맛 증진 물질 탐색
- 세포막전위 변화를 측정 할 수 있는 미세구조화된 랩온어칩 제작
- 완성된 짠맛센서 칩 기반 짠맛관련 이온채널 단백질이 존재하는 세포를 이용한 짠맛 증진 후보물질의 성능 평가
- 이 이외에 다음과 같은 연구 개발 성과를 얻음

1. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2015	시판 액젓 및 간장으로부터 짠맛 증진 물질의 생산 가능성 연구	윤효선	조형용	박한설 이미연 신정규	산업식품 공학회지	19(2)	국내	비SCI
2015	양조간장을 이용한 샐러드 드레싱의 나트륨 감소 연구	박한설	신정규	조형용	산업식품 공학회지	19(2)	국내	비SCI
2015	양조간장을 이용한 식품 내 나트륨 감소 효과 연구	박한설	신정규	조형용	한국식품 과학회지	47(4)	국내	비SCI

2015	멸치 단백질 효소가수분해물의 강도평가를 통한 짠맛 증진효과	윤소정	신정규	차경희	한국식품 과학회지	47(6)	국내	비SC I
2015	아임계수를 이용한 분리대두단백질의 가수분해	황윤희	신정규	조형용 김고래 이석훈 최미정	한국식품 과학회지	47(6)	국내	비SC I
2016	멸치 가수분해물이 건면 짠맛에 미치는 영향	이지선	최미정	조형용 이미연 고은영 신정규	산업식품 공학회지	20(1)	국내	비SC I
2016	묘사분석을 통한 멸치 단백질 효소가수분해물의 관능적 특성	윤소정	신정규	김진선 조형용	산업식품 공학회지	20(2)	국내	비SC I
2016	멸치 단백질 효소가수분해물을 이용한 조리 적용 시 짠맛 증진 효과	김진선	신정규	윤소정 조형용	산업식품 공학회지	20(3)	국내	비SC I
2016	멸치 단백질 효소가수분해물을 이용한 샐러드 드레싱의 짠맛 증진 효과	윤소정	신정규	-	산업식품 공학회지	20(3)	국내	비SC I

2. 학술발표 성과

발표일자 (년.월.일)	발표논문명	행사명	행사 장소	구분	영문/ 국문
2013.08.30	Screening of saltiness fro, korean fermented sauces	제 80차 한국식품과학회 국제학술대회	천안	국내	영문
2013.11.21	Using naturally brewed soy sauce to reduce salt in selected foods	산업식품공학회 추계학술대회	강릉	국내	국문
2014.08.27	A study of salt reducing effect in foods by natural brewed so sauce	제 81차 한국식품과학회 국제학술대회	광주	국내	영문
2015.06.04	Salty taste enhancement effect of animal hydrolysate by intensity evaluation	제 82차 한국식품과학회 국제학술대회	부산	국내	영문
2015.05.08	멸치액젓을 이용한 eHAP의 짠맛증진효과와 묘사분석	산업식품공학회 2015 춘계 학술대회	서울	국내	국문
2015.11.12	멸치단백질 효소가수분해물의 짠맛증진효과 연구	산업식품공학회 2015 추계 학술대회	서울	국내	국문
2016.04.29	대두단백질 효소가수분해물의 짠맛증진효과 연구	산업식품공학회 2016 춘계 학술대회	수원	국내	국문
2016.07.18	Sensory characteristics of	83차 한국식품과학회	대구	국내	영문

	enzymatically hydrolyzed isolate soybean protein by descriptive analysis	국제학술대회			
2016.07.18	A study on the salty enhancing effect in korean foods using enzymatically hydrolyzed isolate soybean protein	83차 한국식품과학회 국제학술대회	대구	국내	영문
2016.07.23	A study of salty enhancing effect in korean foods using enzymatically hydrolyzed anchovy protein	18th IUFoST	아일랜드	해외	영문

3. 교육지도

교육명	교재명	주요내용	활용년도
관능검사 실무과정	관능검사 실무과정	관능검사 수행 및 방법	2013
관능검사 실무과정	관능검사 실무과정	패널 훈련 및 관능평가 방법	2013
관능검사 실무과정	관능검사 실무과정 (묘사분석의 이해)	관능검사 묘사분석의 이해 및 활용	2013

4. 인력활용/양성

기준년도	인력양성 현황										
	학위별				성별		지역별				
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
2014-2016		3				3				3	

5. 언론홍보

발표일자	주제	매체명
2015.09.21	“요리할 때 소금 대신 간장을!”. 나트륨 ‘최대 69%’감소	브레이크뉴스
2015.09.21	맛은 그대로 소금 대신 간장 넣으면 음식의 나트륨 최대 69%까지 감소	세계일보
2015.09.21	“소금 대신 간장 넣으면 나트륨 섭취 줄어”	뉴시스
2015.09.21	소금대신 간장 넣었더니... 나트륨 70%까지 줄어	중앙일보
2015.09.21	低나트륨 해법은 ‘소금 대신 간장’	매일경제
2015.09.21	소금 대신 간장, 나트륨 ‘20-70% 다운’	의학신문
2015.09.21	소금 대신 간장 넣으면 음식나트륨 최대 69%까지 줄인다	헤럴드경제
2015.09.21	소금 대신 간장을... 나트륨 함량 확 줄인다	코메디닷컴
2015.09.21	소금 대신 간장 넣으면 나트륨 최대 69%까지 줄여	하이닥뉴스
2015.09.21	소금 대신 간장, 나트륨 70% 줄일 수 있다	뉴스1
2015.09.22	소금 대신 간장 넣으면 음식의 나트륨 최대 69%까지 줄이기 가능	한국경제

2015.09.22	소금 대신 간장 넣으면 음식의 나트륨 최대 69% 줄여	헬스조선
2016.02.11	소금 대신 간장... 음식 나트륨 70% 줄여	KBS뉴스
2016.02.22	'소금중독'한국인... 우선 1주일만 싱겁게 먹어 보세요	한국일보
2016.04.26	육천휴게소, 나트륨 줄이기 실천음식점 선정 영예...모범음식점 6관왕	헤럴드경제

6. 수상실적

수상일	수상(포상)명	수여기관
2013.08.30	우수포스터상 'Screening of saltiness enhancer fro, various korean fermented sauces'	한국식품과학회
2014.08.30	우수포스터상 'A study of salt reduceing effect in foods by natural brewed soy sauce'	한국식품과학회
2015.05.13	교내 연구업적 우수상	전주대학교
2015.11.11	우수논문상 '양조간장을 이용한 샐러드 드레싱의 나트륨 감소 연구'	(사)한국산업식품공학회
2016.04.29	우수포스터상 '대두단백질 효소가수분해물의 짠맛증진효과 연구'	(사)한국산업식품공학회
2016.05.04	우수교육자상	전주대학교

12. 연구결과

가. 기술적 성과

- 관능 검사 방법을 통한 짠맛 증진 평가법의 체계적 확립을 통해 짠맛 증진 물질을 신속하게 선별할 수 있는 방법 제시
- GC-MS를 통한 장류 내 저분자량 펩타이드 분석법을 확립하여 짠맛 증진을 가진 펩타이드 규명
- 간장, 멸치단백질 효소가수분해물, 콩단백질 효소가수분해물의 짠맛 증진 효과와 식품 내 사용시 소금 사용량 감소효과를 밝혀 우리나라 장류 및 전통식품 내에 짠맛 증진 물질 존재 가능성을 제시하였음
- 바이오센서(Lap on a chip)를 통한 짠맛 증진 후보 물질 신속 평가법 제시

나. 경제적 성과

- 간장을 사용하여 조리시 식품 내 나트륨 사용량 감소 효과 연구 결과 발표와 KBS 뉴스 및 언론 매체 홍보를 통해 소금 사용량을 줄여 국민 건강에 이바지하여 건강 증진, 의료비 감소 등의 효과를 예상할 수 있음
- 간장, 액젓, 된장과 같은 우리나라 전통식품의 원료가 되는 물질의 짠맛 증진 효과와 전통식품 내 짠맛 증진 물질 존재 가능성을 제시함으로써 전통식품이 단순히 소금 과량 섭취의 원인 물질이라는 인식을 재고시켰으며, 이를 통해 전통식품산업의 새로운 방향을 제시하였음
- 바이오센서(Lap on a chip)를 활용한 짠맛 증진 물질의 신속 평가 가능성을 제시하여 저비용으로 짠맛 증진 물질을 탐색 비용을 절감할 수 있을 것으로 판단됨

제 3 절 물리적 변화를 통한 나트륨 사용 저감화

1. 나트륨 저감 건식 소금 제조법 개발

가. 소금 결정 미세화를 통한 나트륨 저감 건식 소금 개발

(1) 분무건조 공정 조건별 입자크기 조절 조건 확립

(가) Inlet 온도에 따른 입자크기

- 효율을 증진시키기 위해 EYELA 제조사의 분무건조기를 이용해 NaCl이 담긴 maltodextrin의 입자를 제조 하였다(Fig. 3-3-1.). Inlet/outlet temperature는 용액이 분사 되는 곳인 inlet과 용액이 증발되며 지나가는 곳인 outlet의 온도를 조절해 주어 입자의 크기 혹은 입자내 수부함량에 중요한 영향을 미친다. Outlet은 inlet의 온도와 흡기의 파워인 blow에 의해 조절되며 인위적인 조절은 불가능하다.
- 대신 inlet은 최대 200°C까지 조절이 가능하다. 본 실험에서는 130°C - 170°C 까지 조절하여 실험하였다. 이때 atomizing pressure는 6×10 kPa에서 blow는 $0.6 \text{ m}^3/\text{min}$, flow rate은 500 mL/h로 해주었다. 이 조건에서 제조된 소금은 주사전자현미경 및 광학현미경으로 표면을 관찰하였다. 분무건조 입자의 크기를 측정하기 위해 1000배의 사진을 중심으로 Image tool을 이용하여 입자의 크기를 측정하였다. 공정조건별 입자의 크기는 누적도수로 나타내었다.











	Inlet 온도 (°C)				
	130	140	150	160	170
시료					
시료 분말					

Fig. 3-3-1. Inlet 온도에 따른 NaCl/Maltodextrin 입자의 외관.

- 분무건조 후 나온 입자들을 image analysis tool을 사용하여 입자 면적을 누적도표 분포도를 나타내었다(Fig. 3-3-2). 전체적으로 60%를 차지하는 입자의 크기는 55 mm^2 미만으로 나타났다. 150°C의 inlet온도에서 입자의 크기가 다소 크게 나타났다. 온도가 증가함에 따라 입자의 크기는 증가하는 경향을 나타냈다(150°C 제외)(Fig. 3-3-3). 75 mm^2 미만의 크기가 전체적으로 80% 이상을 차지하고 있었고, inlet 온도가 높을수록 150 mm^2 이상의 면적을 차지하는 크기도 관찰되어졌다.

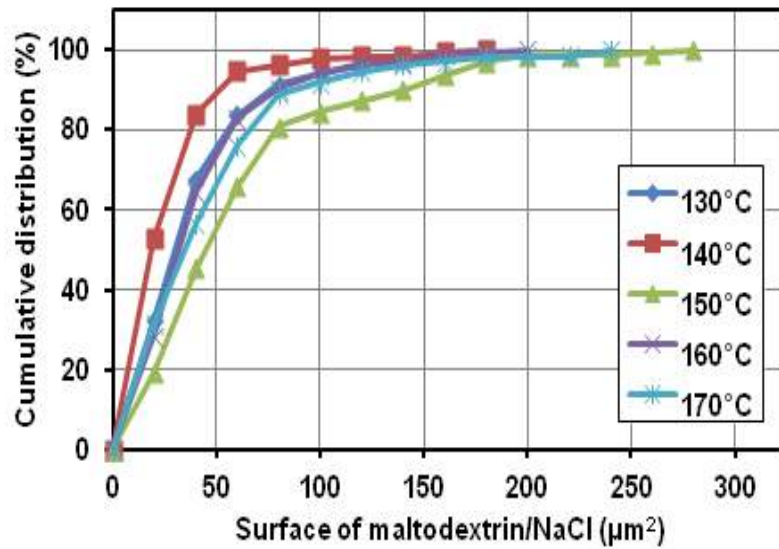


Fig.3-3-2. Inlet 온도에 따른 maltodextrin/NaCl 분말 입자 면적의 누적도표.

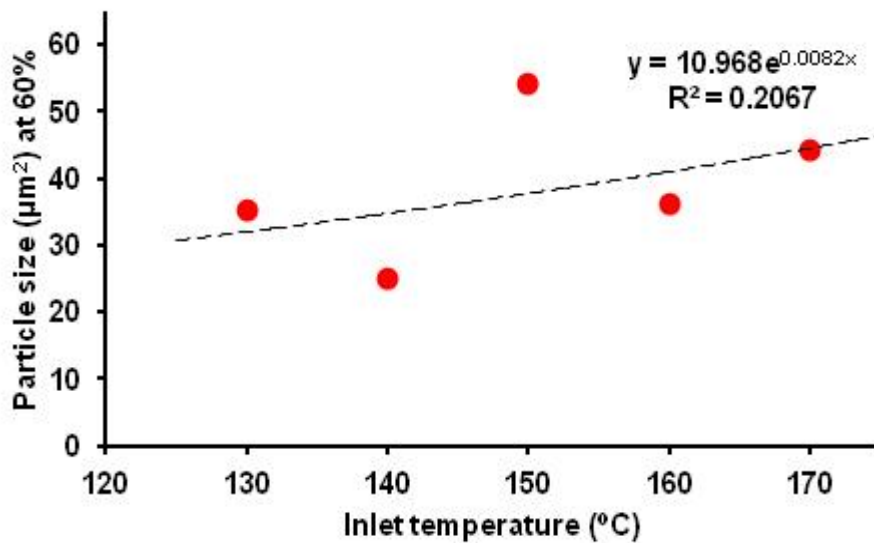
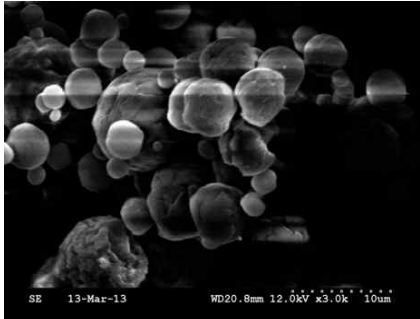
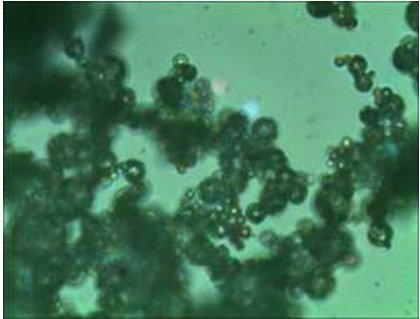
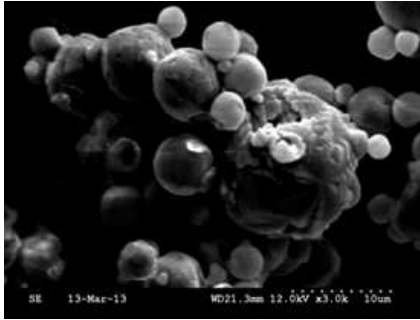
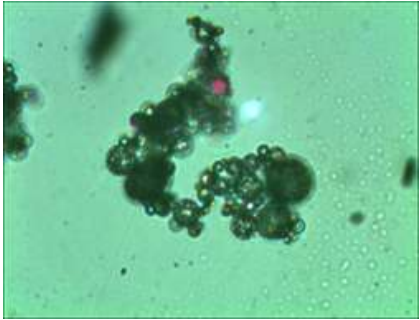
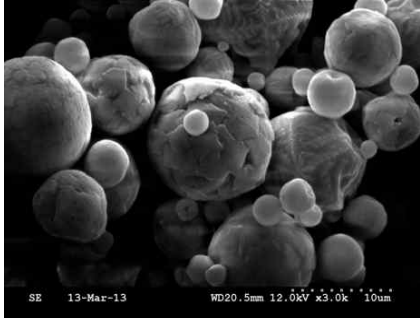
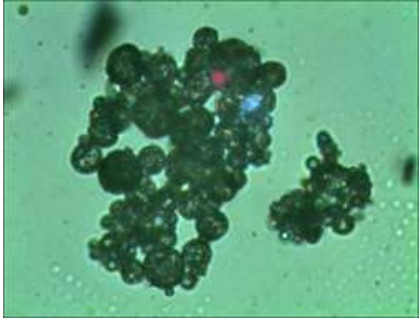
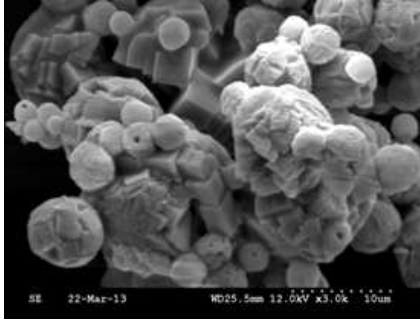
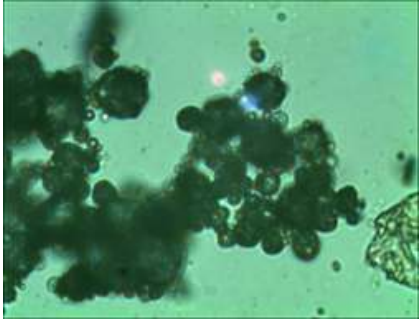
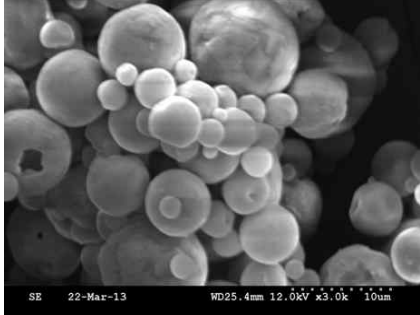
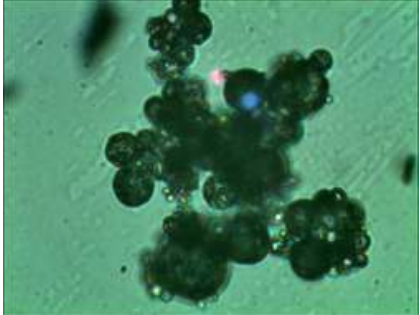


Fig. 3-3-3. 누적도수 60%에서의 평균입자크기와 inlet 온도와의 상관관계.

- 누적도수 결과 그래프를 통해서 inlet 온도와 입자 크기 변화에 영향을 미치지 않는 경향이 나타났으나 60% 이상을 차지하는 입자의 평균 크기로 상관관계를 살펴 본 결과 온도에 따라 입자 크기가 커지는 경향이 나타났다. 또한 흡착된 NaCl 결정체와 inlet temperature간의 유의적인 상관관계는 나타나지 않았다. 일반적으로 다른 논문 연구 결과 분석에 따르면 온도가 높을수록 결정체 정도는 높은 것으로 나타난다.
- 현미경 관찰의 결과에서 보면 가장 낮은 inlet 온도인 130°C와 가장 높은 온도인 170°C를 제외하고는 표면에 소금 결정체를 관찰할 수 있었다(Table 3-3-1). 가장 온도가 낮은 경우는 수분이 모두 건조되기는 충분하지 않은 조건이어서 소금이 말토덱스트린 표면에 석출되지 않은 것으로 사료되며, 온도가 높은 경우 내부 말토덱스트린 내부의 수분이 상대적으로 높은 온도에서 증발하여 crack을 형성하면서 구멍이 있는 입자를 관찰할 수 있었

다.

Table 3-3-1. Inlet 온도에 따른 결정체의 광학 및 전자 현미경 관찰

	SEM	광학현미경 (×1000)
130℃	 <p>SE 13-Mar-13 WD20.8mm 12.0kV x3.0k 10um</p>	
140℃	 <p>SE 13-Mar-13 WD21.3mm 12.0kV x3.0k 10um</p>	
150℃	 <p>SE 13-Mar-13 WD20.5mm 12.0kV x3.0k 10um</p>	
160℃	 <p>SE 22-Mar-13 WD25.5mm 12.0kV x3.0k 10um</p>	
170℃	 <p>SE 22-Mar-13 WD25.4mm 12.0kV x3.0k 10um</p>	

- SEM으로 관찰한 결과 표면의 차이가 거의 없었으며 말토덱스트린과 소금입자의 complex 평균 크기에는 큰 차이점을 발견하지 못하였다(Table3-3-1). 누적도수 60%에 해당하는 입자의 크기를 비교한 결과 150°C의 inlet 온도에서 평균 입자의 크기가 가장 큰 것으로 나타났다.
- 입자 표면의 모양을 관찰해 보면 특징적으로 160°C의 경우 매우 뚜렷한 소금 결정체로 보이는 정육면체의 모양을 관찰할 수 있었다. 이와는 상대적으로 140와 150°C에서는 소금 결정체의 정육면체는 관찰할 수 없었으나 소금 결정체가 형성되기 위한 dendrite이 뻗어가는 모양을 관찰 할 수 있었다. 하지만, 170°C에서는 소금결정체는 관찰할 수가 없었다.

(나) Atomizing pressure에 따른 입자크기

- Atomizing pressure는 용액이 노즐에서 분사되는 압력을 나타낸다. 단위는 $\times 10$ kPa으로 1-30 까지 조절이 가능하다. 본 실험에서는 6×10 kPa에서 22×10 kPa에서 수행하였다. 이때 inlet 온도는 150°C로 고정하였고, flow rate과 blow는 500 mL/h 와 $0.6 \text{ m}^3/\text{min}$ 으로 각각 일정하게 유지해 주었다. 마찬가지로 말토덱스트린/NaCl 입자의 면적을 누적도표로 나타내었다(Fig. 3-3-4).

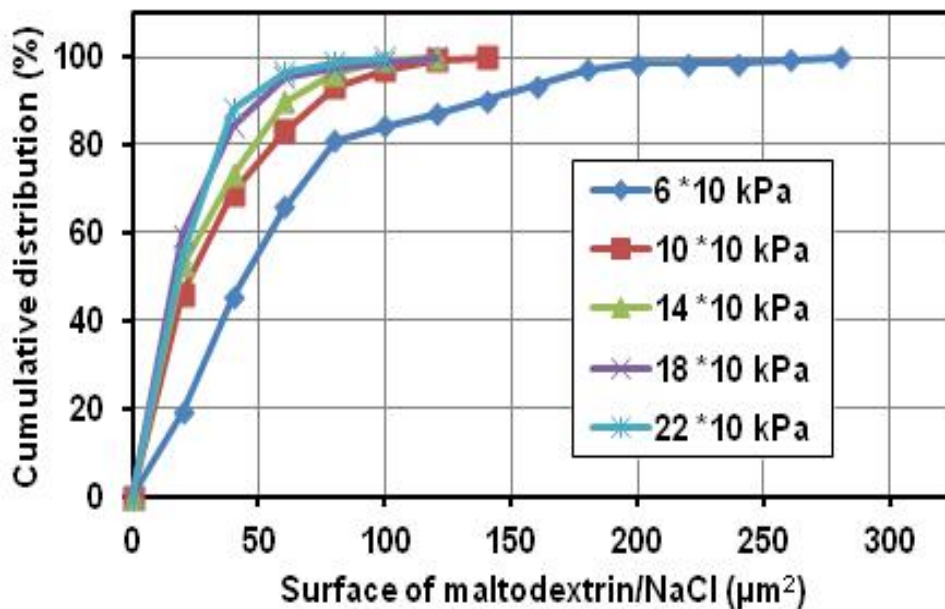


Fig. 3-3-4. Atomizing 압력에 따른 maltodextrin/NaCl 결정체 입자 면적의 누적도표.

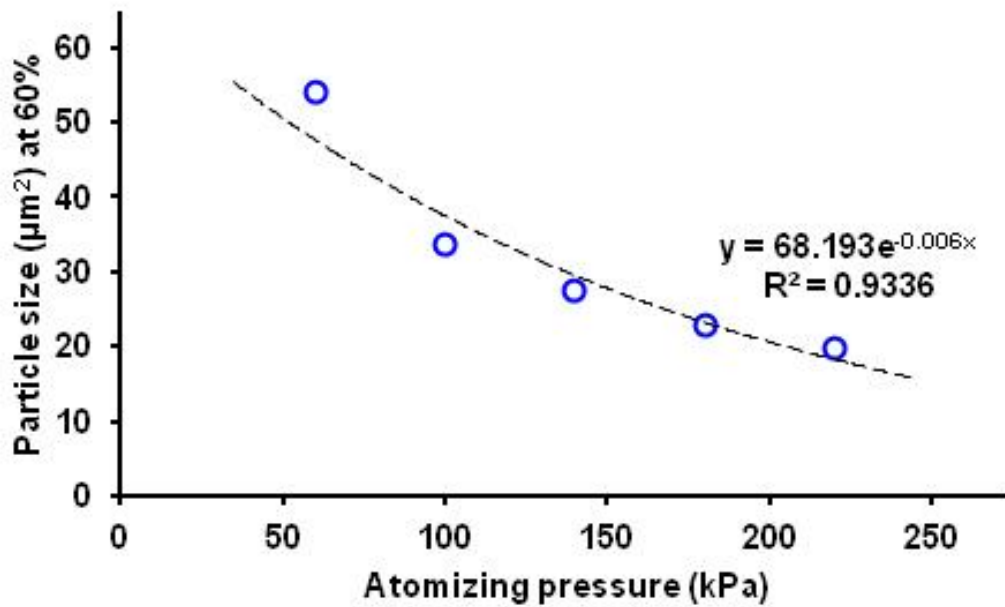
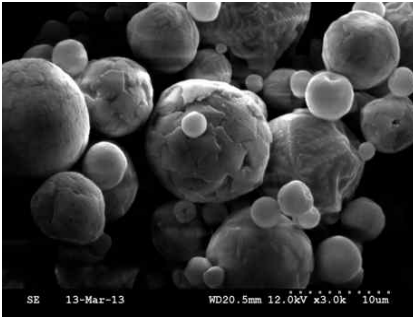
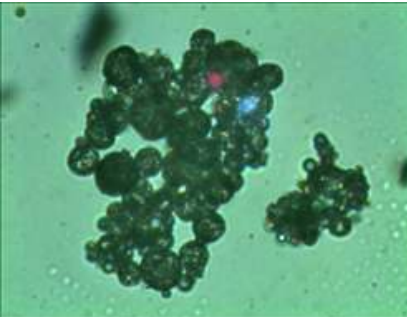
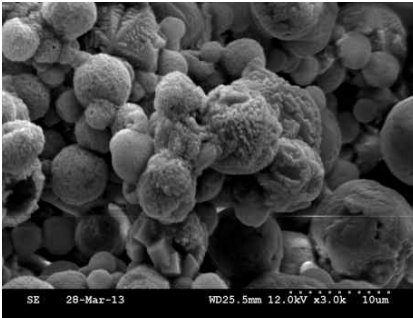
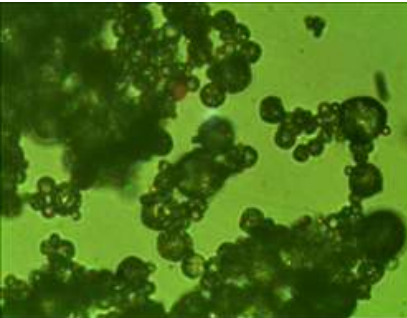

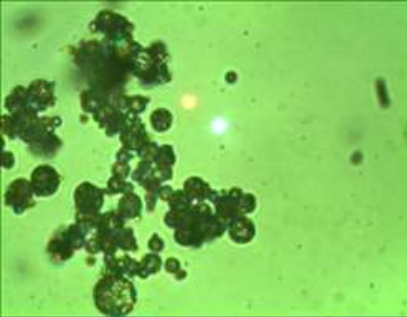
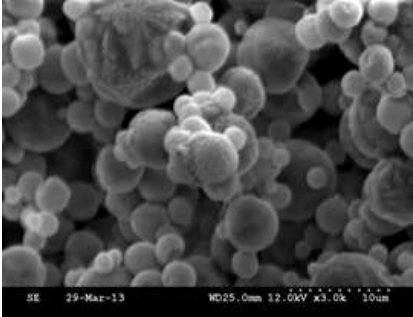
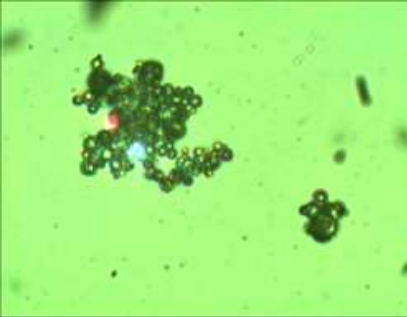
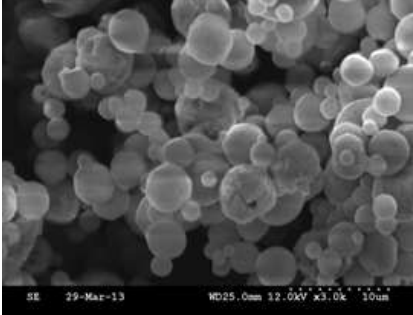
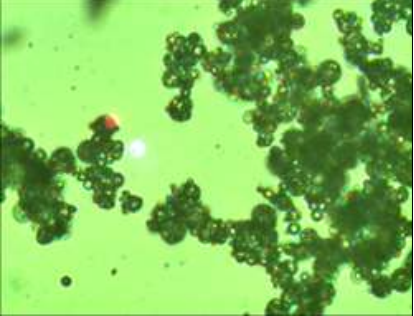


Fig. 3-3-5. 누적도수 60%에서의 평균입자크기와 atomizing pressure와의 상관관계.

- 누적도수 60%미만의 입자들은 6 ×10 kPa의 압력을 제외하고는 모드 40 mm²에 분포되었다. 전체적으로 압력이 높을수록 입자의 크기가 작아지는 경향이 나타났으며 이에 대한 상관관계를 나타내기 위해 누적도수 60%에 차지하는 입자면적을 대표로 하여 회귀곡선으로 나타내었다(Fig. 3-3-5). Atomizing 압력이 높을수록 입자의 크기는 감소하고 더 많은 수의 입자를 관찰할 수 있었다. 특히, 말토덱스트린 표면에 NaCl의 미세입자가 형성되는 것을 관찰할 수 있었다. Atomizing 압력이 커질수록 6 ×10 kPa에서는 관찰할 수 없었으나, 10 ×10 kPa에서부터 입자표면에 NaCl이 석출되었다. NaCl의 입자 크기에 따른 소금 짠맛 강도에 관한 관능평가를 실시하기 위해 대표 시료로 4 ×10 kPa, 10 ×10 kPa, 16 ×10 kPa을 선택하여 유의성을 관찰하였다.

Table 3-3-2. Atomizing pressure에 따른 결정체의 광학 및 전자 현미경 관찰

	SEM	광학현미경 (×1000)
6 ×10 kPa		
10 ×10 kPa		
14 ×10 kPa		
18 ×10 kPa		
22 ×10 kPa		

(다) Blow rate과 Flow rate에 따른 입자의 크기

- 실험에서 blow power는 $0.6 \text{ m}^3/\text{min}$ 으로 고정을 하였다. $0.6 \text{ m}^3/\text{min}$ 이상으로 강하게 하는 경우는 위의 우측 그림과 같이 미세소금의 소용돌이가 위쪽까지 크게 생기게 되어 배기구로 미세소금까지 빠져나가 수율이 많이 떨어졌다. 따라서 blow power는 $0.6 \text{ m}^3/\text{min}$ 이 가장 적당하다고 판단되어 고정해 실험하여 좌측의 그림처럼 적당한 위치에서 소용돌이가 형성될 수 있도록 설정해 실험하였다(Fig.3-3-6)
- 일반적으로 blow power는 입자크기나 다른 조건에 큰 영향을 미치지 않은 것으로 보고 되고 있어 본 실험에서도 일정한 값으로 유지시키면서 실험을 실시해 주었다.



Fig.3-3-6. Blow power에 따른 사이클론 내부 입자의 서로 다른 분포도:
왼쪽: $0.6 \text{ m}^3/\text{min}$, 오른쪽: $0.75 \text{ m}^3/\text{min}$.

- 주입속도의 경우 단위는 mL/h 이고 분당 노즐에서 뽑는 용액의 속도를 나타낸다. 이 조건의 경우는 약 2(약 500 mL/h)로 고정하였다(Fig.3-3-7). 그렇지 않은 경우 위와 같이 용액이 증발되지 못하고 증발관에 달라붙었다. 결과적으로 미세소금 product를 얻을 수 없었고, 따라서 나머지 실험에서는 속도를 2로 고정하고 실험에 임하였다. Injection 양은 일반적으로 시료의 표면 성분 흡착에 매우 중요한 인자로 작용한다. 하지만 본 실험에서는 최적 시료 효율과 소금입자를 말토텍스트린 표면에 흡착시키고자 하는 데 주목적을 두고자 하여, 하나의 인자 값으로 고정하여 실험을 실시하였다.
- 따라서 본 EYELA 분무건조기로 분말가루 제조 시 일정한 blow rate($6 \text{ m}^3/\text{min}$)과 시료 주입(500 mL/h) inlet 온도와 atomizing 압력 조절을 통해 저온과 고압의 조건에서 작은 입자가 형성되어 찐맛 인지 향상에 도움을 주는 것으로 사료된다.



Fig. 3-3-7. 시료주입 속도가 증가할 경우 증발관의 수증기 맺힘 현상.

(2) 관능검사 [경기대 위탁]

○ 소금의 농도가 모두 동일하고 complex 입자의 크기가 유의적으로 다르게 나타나는 atomizing 공정에 따라 관능검사를 실시해 주었다. 결과를 살펴보면, atomizing pressure가 클수록 입자의 크기는 작아진다는 결과는 앞에서 기술하였다. 짠맛과 짠맛이 느껴지는 순서는 유의적인 차이는 없으나 atomizing pressure가 상대적으로 높은 입자의 경우 입안에서 빨리 녹아 상대적으로 짠맛강도나 짠맛이 빨리 느껴지는 것으로 나타났다(Table 3-3-3).

Table 3-3-3. Atomizing pressure에 따라 제조된 건식 소금의 관능평가

짠맛강도	sample 3 > sample 2 > sample 1	유의적인 차이는 없음
짠맛이 빨리 느껴지는 순서	sample 3 > sample 2 > sample 1	유의적 차이는 없음
입안에서 빨리 녹는 순서	sample 3 > sample 2 > sample 1	sample 1과 3는 5% 수준의 유의차 있음

* sample 1: 4 ×10 kPa, sample 2: 6 ×10 kPa; sample 10 ×10 kPa

** 3가지 시료 중 sample 3이 sample 1에 비해 5% 수준에서 유의적으로 입안에서 녹는 정도가 가장 빠르다고 평가

*** 짠맛강도와 짠맛이 느껴지는 순서 간에는 유의적인 차이는 없으나 전체적으로 순서는 sample 3 > sample 2 > sample 1의 순으로 평가

○ 공정조건에 따라 건식 소금 시료 간 입안에서는 녹는 정도의 유의적인 차이를 통해서, atomizing pressure가 높게 하여 입자를 만들어 주었을 시 10 ×10 kPa에서는 전체 60%

를 차지하는 입자의 평균 면적은 약 25 mm²으로 입자의 크기가 가장 작은 것으로 나타났다. 상대적으로 작은 입자의 크기가 작아 입속에서 가장 빨리 녹아 들어가는 것으로 느껴지는 것을 알 수 있었고, 강도나 짠맛 인지 우선도간에 유의적인 차이는 없었어도 선택 순서에서는 상대적으로 높은 atomizing 압력에서 우의를 나타냈다.

- 따라서 같은 소금의 농도가 들어간 시료에서 입자의 크기가 작을수록 입속에서 빨리 녹아 들어가고, 그에 따라 짠맛을 빨리 느끼며 상대적으로 짠맛강도가 강하게 느껴지는 것으로 나타났다. 분무건조기를 이용하여 입자를 제조할 시 inlet 온도는 상대적으로 낮은 온도에서, atomizing pressure는 상대적으로 높은 압력에서 분무건조를 실시해 주면 작은 입자의 분말 가루를 얻어내어 상대적으로 짠맛이 강화된 저염 건식 소금을 제조할 수 있다.

나. 짠맛 증진 물질 첨가에 따른 건식 소금 결정 제조

(1) 염미증진제(GABA/MSG) 혹은 염미대체제(CaSO₄, MgSO₄, KCl) 첨가에 따른 건식 소금 제조

(가) GABA/MSG

- Enhancer의 기능으로 첨가된 MSG나 GABA의 경우에는 상대적으로 NaCl 표면흡착 현상을 많이 관찰 할 수 있었다. MSG 첨가에서는 2% 농도의 경우를 제외하고는 모두 표면이 울퉁불퉁하게 나타났다(Table 3-3-4). GABA의 경우에는 1.0%의 경우를 제외하고는 대체적으로 요철이 있는 형상으로 나타났다(Table 3-3-5).
- 건식소금에 대한 관능은 별도로 진행하지 않고 습식상태에서 관능평가만 진행하여 NaCl 입자의 크기는 측정하지 않았다. GABA의 경우는 농도에 따른 입자크기간의 변화는 나타나지 않았고, MSG의 경우에는 농도가 가장 낮은 경우 입자의 크기가 가장 크게 나타났다(Fig. 3-3-8,9).

Table 3-3-4. MSG에 첨가에 따른 결정체의 전자 현미경 관찰


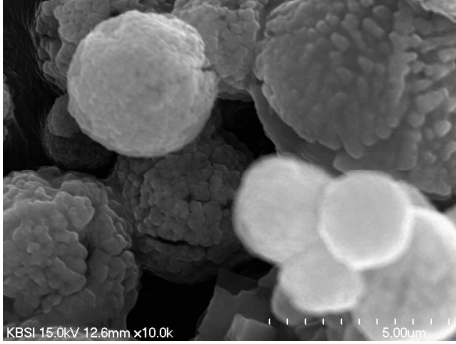
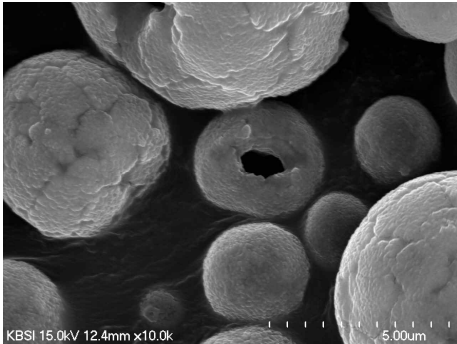
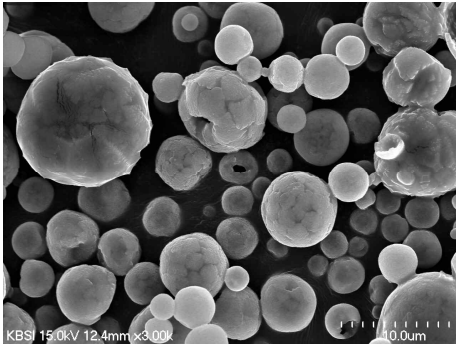
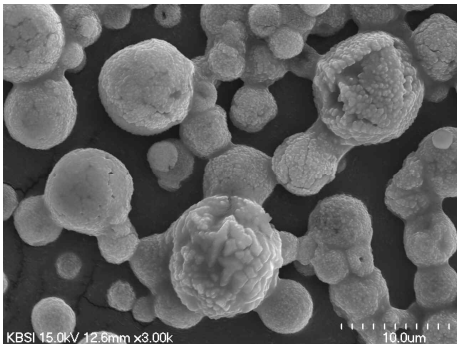
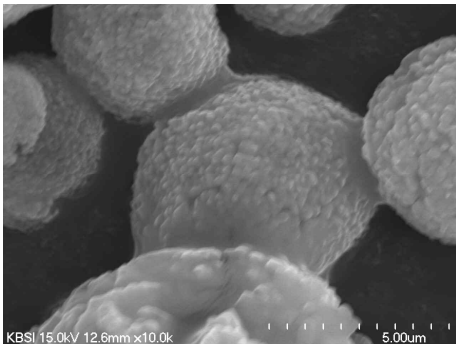
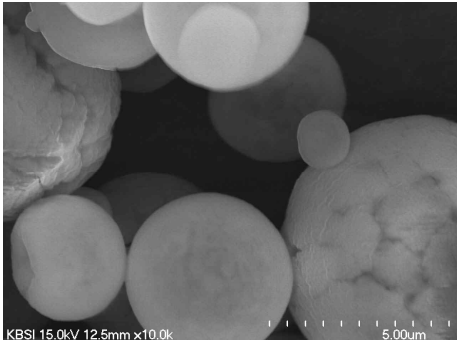
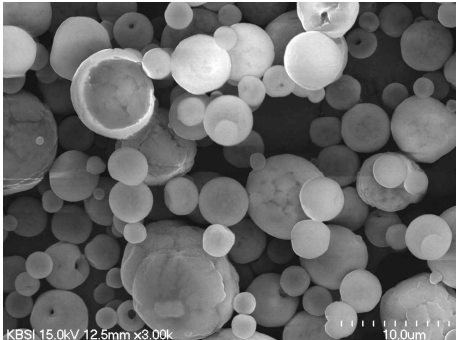
	확대율	
	×3,000	×10,000
0.5 wt%		
1.0 wt%		
1.5 wt%		
2.0 wt%		

Table 3-3-5. GABA에 첨가에 따른 결정체의 전자 현미경 관찰

	확대율	
	×3,000	×10,000
0.5 wt%		
1.0 wt%		
1.5 wt%		
2.0 wt%		

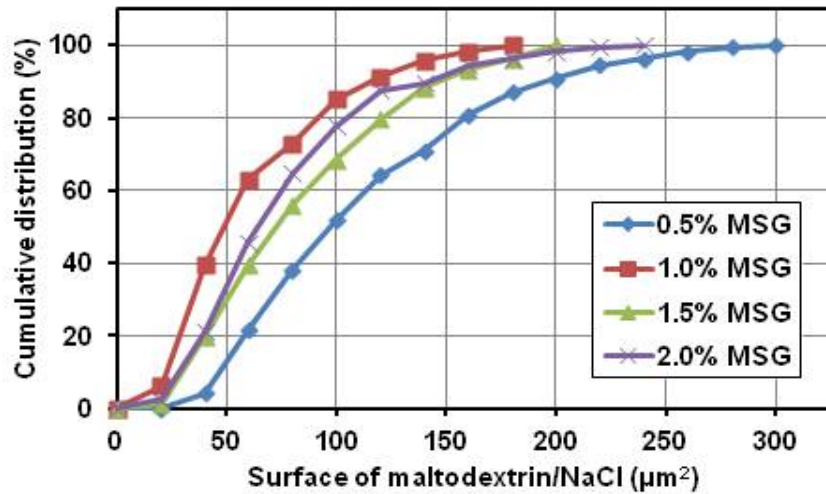


Fig. 3-3-8. MSG 첨가에 따른 maltodextrin/NaCl 결정체 입자 면적의 누적도표.

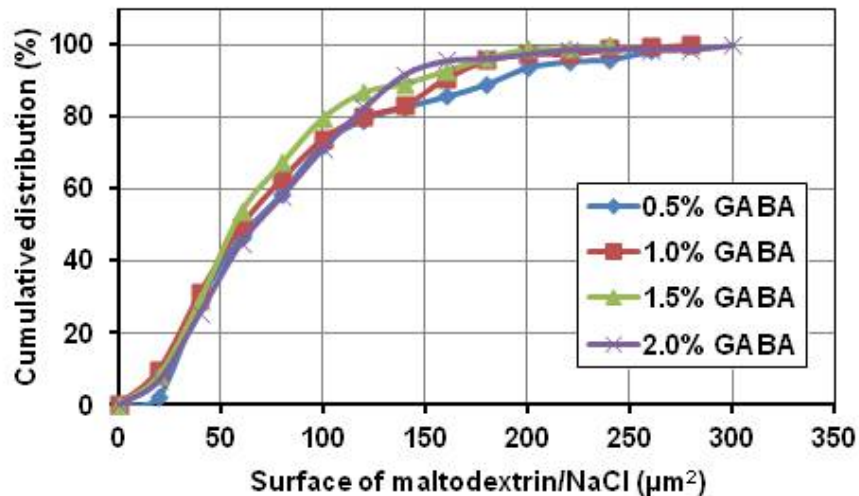


Fig. 3-3-9. GABA 첨가에 따른 maltodextrin/NaCl 결정체 입자 면적의 누적도표.

(나) CaSO₄, MgSO₄, KCl

○ 입자의 크기는 가장 작은 순서로 CaSO₄, MgSO₄, KCl로 나타났다. 누적도수 60% 이상을 차지하는 입자 사이즈를 비교해 보면, CaSO₄는 약 50 mm², MgSO₄는 80 mm², KCl은 110 mm²의 면적을 나타내었다(Fig. 3-3-10).

○ 입자 표면 형상은 CaSO₄, MgSO₄도 유사한 경향을 나타냈으나 보다 부드러운 모양을 나타냈다. 입자의 겉 표면에 염 결정체가 형성되는 것을 볼 수 있었으나, 그 경계가 뚜렷하지 않았다. 특히 입자 내부가 비어져 있어 crack이 형성되어 있는 입자가 관찰되어졌다. 따라서 건식소금에 대한 관능평가를 별도로 행해 주지 않았다. Table3-3-6에 따르면, KCl의 경우 입자 표면이 매끄럽지 않게 울퉁불퉁한 모양을 나타내고 있고, 속 내부는 비어 있는 입자들이 관찰되기도 하였다. 이는 상대적으로 높은 점도를 지니고 있는 물성적

인 특성으로 기인하여 수분이 건조되고 난 후 보다 매끄러운 표면을 지니고 있는 것이라 사료된다(Table 3-3-6).

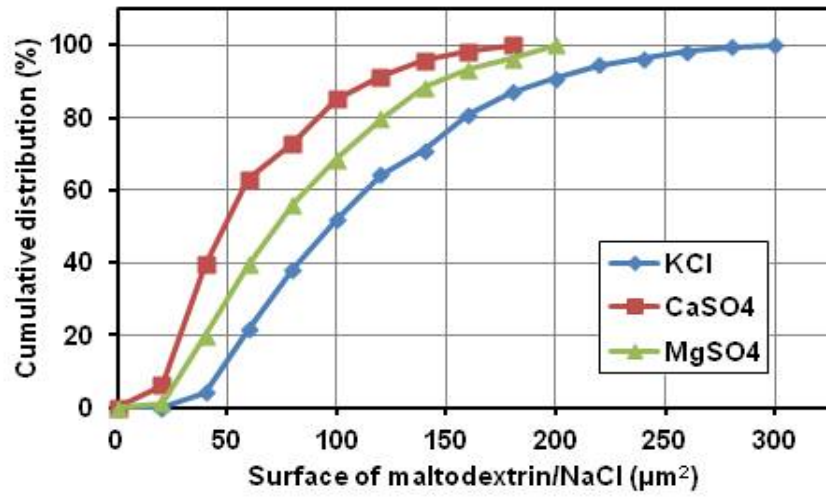
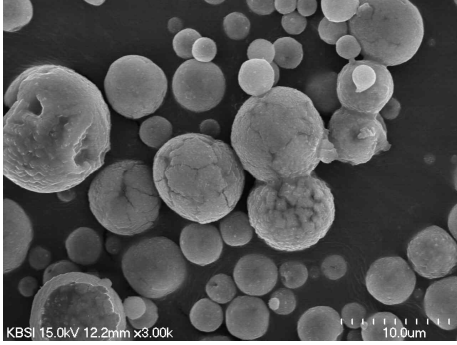
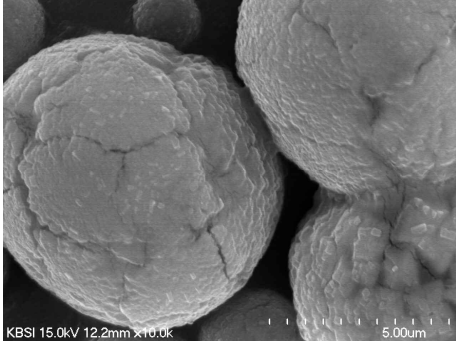
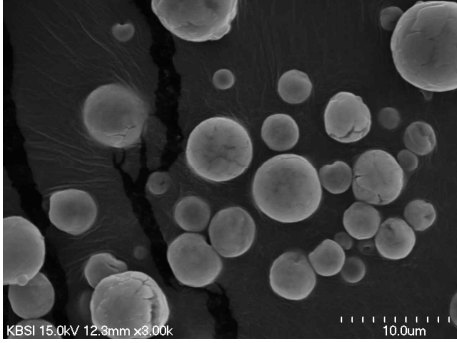
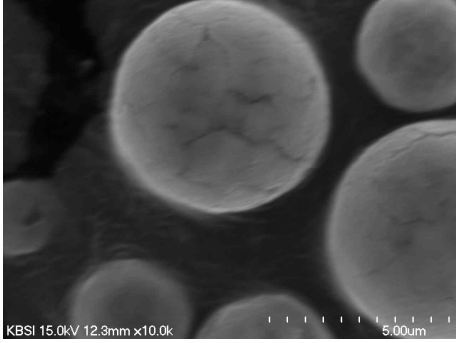
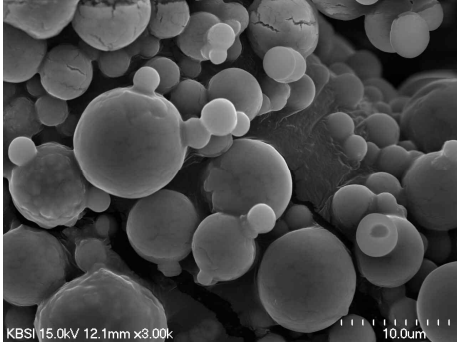
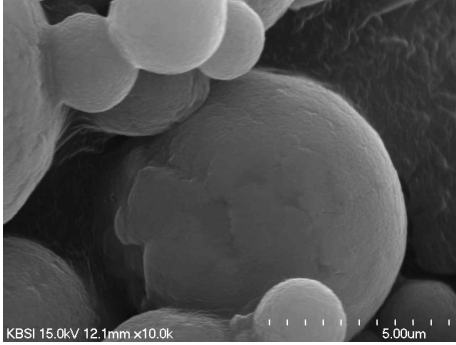


Fig. 3-3-10. 대체염 첨가에 따른 maltodextrin/NaCl 결정체 입자 면적의 누적도표.

Table 3-3-6. 대체염에 첨가에 따른 결정체의 전자 현미경 관찰

	확대율	
	×3,000	×10,000
KCl		
CaSO ₄		
MgSO ₄		

(2) 관능검사 [경기대 위탁]

- 대체염은 관능평가 결과 이미/이취가 심하여 짠맛에 대한 평가가 이루어질 수 없었으며 특히 독성 성분의 화학적인 전처리 과정이 필요한 이유로 본 과제에서는 관능평가를 실시해 주지 않았다.
- MSG는 대정이라는 회사에서 구입하여, GABA와 동일한 양으로 소금이 들어있는 대조구에 첨가, 전문 패널을 통해 관능평가를 실시해 주었는데 그 결과는 아래 Fig.3-3-11와 같다. 결과에 따르면 MSG의 첨가가 대조구와 비교 했을 때 소금 짠맛 강화에 유의적으로 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 하지만 대조구를 제외하고는 MSG 농도가 증가할수록 짠맛 강도는 다소 증가하는 경향을 나타냈다. 본 실험의 결과에 따르면 최소한 2% 이상의 MSG를 첨가해야 짠맛 강도가 강화되는 결과를 예상할 수 있다. 이는 내재된 MSG 함량이 함께 증가되는 결과를 초래할 수 있어 오히려 나트륨 함량을 과량으로 섭취할 수 있는 결과를 보인다. 기존 연구결과와 다르게 나타나는 내용으로 MSG 합성 조미료 사용이 비단 독성문제보다는 짠맛 증진 기여도에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

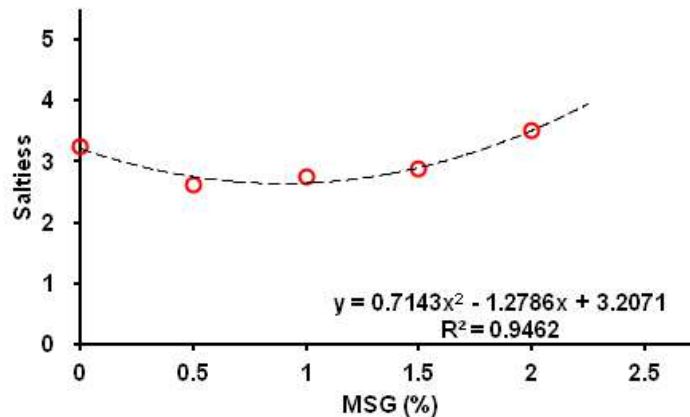


Fig. 3-3-11. MSG 첨가에 따른 관능평가(짠맛이 강한 배열순서 (5 > 4 > 3 > 2 > 1)).

- GABA(gamma-aminobutyric acid)는 세계적인 식품소재로 뇌혈류개선, 산소공급 증가, 뇌세포 대사기능 촉진, 신경안정작용, 스트레스 해소, 기억력 증진, 혈압강화작용, 우울증 완화, 중풍과 치매 예방, 불면, 비만, 갱년기 장애 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.
- 최근 뇌졸중 및 결장암 등에 효과가 있는 것으로 나타났다. 본 실험에서는 salt enhancer 역할을 할 수 있는지를 살펴보기 위해서 농도별로 대조구에 첨가해 관능평가를 실시해 보았다. GABA의 농도의 첨가량에 따라 1.5 wt% 이상에서는 유의적으로 짠맛이 증진되는 것으로 나타났고, 1.5 wt% 미만에서는 짠맛을 오히려 감소시키는 경향을 나타내기도 하였다. GABA 농도 2% 첨가에서는 동일한 소금 함량의 대조구와 비교했을 때 상대적으로 대조구의 짠맛 보다 매우 유의적으로 강하다고 느끼는 것으로 나타났다. 대조구를 제외한 결과 분석에서는 GABA 첨가량이 증가할수록 짠맛에 대한 강도를 증진시키는 것으로 나타났다(Fig.3-3-12).

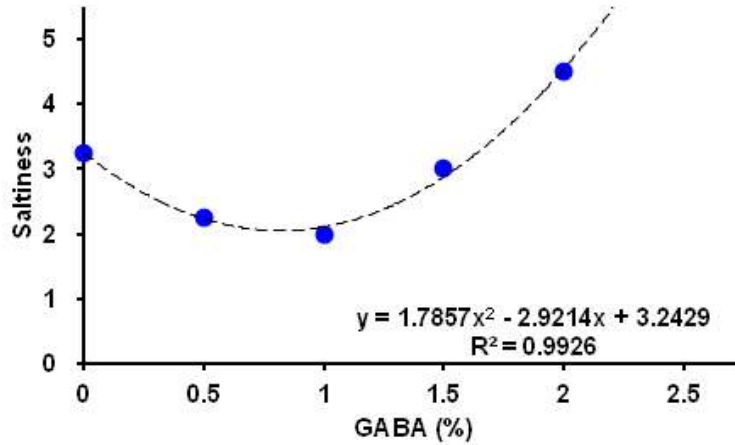


Fig. 3-3-12. GABA 첨가에 따른 관능평가(짠맛이 강한 배열순서 5 > 4 > 3 > 2 > 1).

- 따라서 GABA의 경우 MSG보다 enhancer 기능이 있는 것으로 판단되며, 임계 농도가 존재하여 적절 소금 농도에 따른 임계 GABA 농도를 찾아준다면 enhancer로써 활용 가능하다고 판단된다.

다. Carrier 입자 표면 흡착법을 이용한 소금의 초미세화 공정 최적화

(1) 분무건조 공정별 입자크기 조절 조건 확립

- Atomizing pressure가 입자크기에 직접적인 영향을 미치고, 그에 따라 NaCl cubic이 관찰된 앞선 결과에 따라 atomizing pressure에 따라 형성된 NaCl의 크기를 이미지 분석법을 통해 측정하여 누적도수로 나타내었다(Fig.3-3-13). Atomizing pressure가 클수록 표면에 흡착된 NaCl의 크기는 작게 나타났다. 70% 누적 구간에서 압력별 입자 크기를 살펴보면 0.030 mm² (22 kPa), 0.037 mm² (18 kPa), 0.045 mm² (14 kPa, 10 kPa), 0.060 mm² (7 kPa), 0.070 mm² (6 kPa)로 나타났다.
- Fig.3-3-14는 누적도수 60%에 해당하는 NaCl cubic 면적으로 atomizing pressure가 소금 결정 면적에 직접적인 영향을 미치는 것으로 나타났다. 본 연구결과를 통해 평균 직경의 크기를 계산할 수 있는데 22 kPa은 약 195 nm, 18 kPa에서는 217 nm, 14 혹은 10 kPa에서는 239 nm, 마지막으로 6 kPa에서는 298 nm의 직경이 계산되어진다. 이는 소금입자의 크기가 작을수록 혀에 닿았을 때 비표면적이 상대적으로 크고, 그에 따라 입속에 녹아 들어가는 속도나 짠맛을 빨리 느끼는데 기여하여 상대적으로 강한 짠맛을 인지할 수 있다고 판단된다.

Table 3-3-7. Atomizing pressure에 따른 NaCl 결정체의 전자 현미경 관찰

	확대율	
	×3,000	×10,000
6 ×10 kPa		
10 ×10 kPa		
18 ×10 kPa		

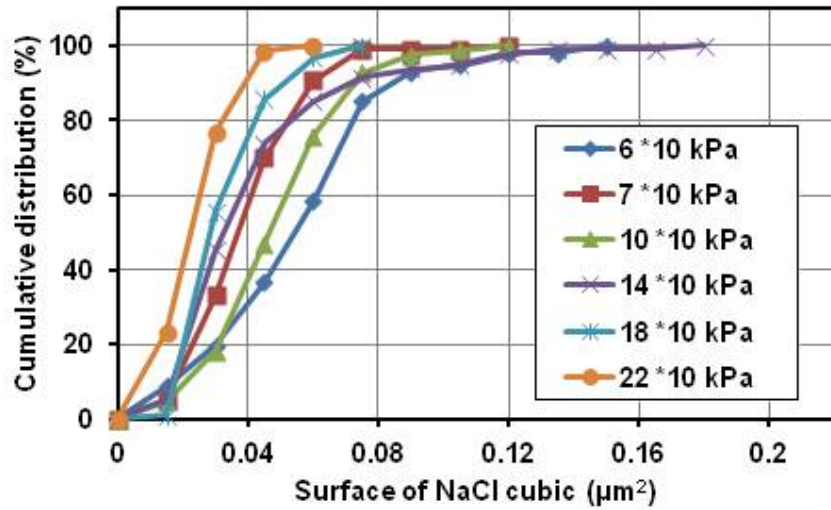


Fig. 3-3-13. Atomizing 압력에 따른 NaCl 미세 결정체 입자 면적의 누적도표.

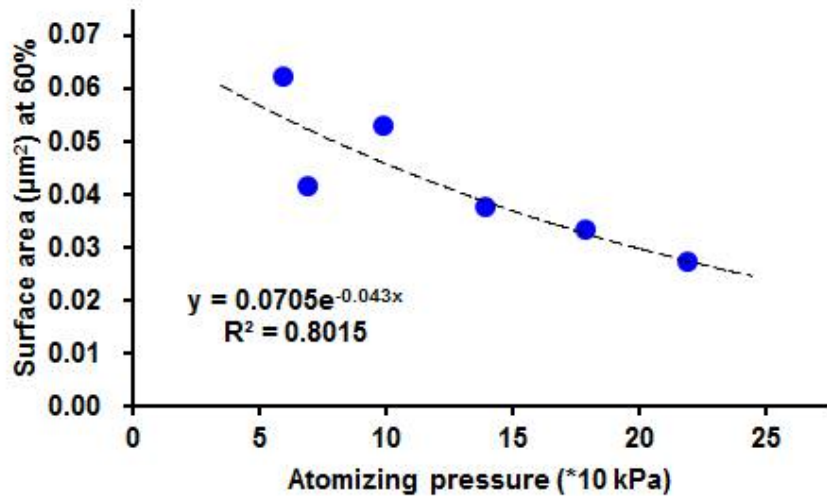


Fig. 3-3-14. 누적도수 60%에서의 평균 NaCl 미세입자크기와 atomizing pressure와의 상관관계.

(2) 관능검사 [경기대 위탁]

○ 소금의 농도가 모두 동일하고 complex 입자의 크기가 유의적으로 다르게 나타나는 atomizing 공정에 따라 관능검사를 실시해 주었다. 결과를 살펴보면, atomizing pressure가 클수록 입자의 크기는 작아진다는 결과는 앞에서 기술하였다. 짠맛과 짠맛이 느껴지는 순서는 유의적인 차이는 없으나 atomizing pressure가 상대적으로 높은 입자의 경우 입속에서 빨리 녹아 상대적으로 짠맛강도나 짠맛이 빨리 느껴지는 것으로 나타났다(Table3-3-8).

Table 3-3-8. Atomizing pressure에 따라 제조된 건식 소금의 관능평가

짠맛강도	sample 3 > sample 2 > sample 1	유의적인 차이는 없음
짠맛이 빨리 느껴지는 순서	sample 3 > sample 2 > sample 1	유의적 차이는 없음
입안에서 빨리 녹는 순서	sample 3 > sample 2 > sample 1	sample 1과 3는 5% 수준의 유의차 있음

* sample 1: 4 ×10 kPa, sample 2: 6 ×10 kPa; sample 10 ×10 kPa

** 3가지 시료 중 sample 3이 sample 1에 비해 5% 수준에서 유의적으로 입안에서 녹는 정도가 가장 빠르다고 평가

*** 짠맛강도와 짠맛이 느껴지는 순서 간에는 유의적인 차이는 없으나 전체적으로 순서는 sample 3 > sample 2 > sample 1의 순으로 평가

○ 공정조건에 따라 건식 소금 시료 간 입안에서는 녹는 정도의 유의적인 차이를 통해서, atomizing pressure가 높게 하여 입자를 만들어 주었을 시 100 kPa에서는 전체 60%를 차지하는 입자의 평균 면적은 약 25 mm²으로 입자의 크기가 가장 작은 것으로 나타났다. 상대적으로 작은 입자의 크기가 작아 입속에서 가장 빨리 녹아 들어가는 것으로 느껴지는 것을 알 수 있었고, 강도나 짠맛 인지 우선도간에 유의적인 차이는 없었어도 선택 순서에서는 상대적으로 높은 atomizing 압력에서 우의를 나타냈다.

라. 제조된 입자의 액상 상태에서 유체흐름에 따른 짠맛 감도 변화 관계 규명

○ 유체의 흐름에 따라 나트륨이 방출되는 속도는 달라지고, 그 속도는 입속에서 인지되는 속도에 중요한 역할을 한다. Fig.3-3-15에 따르면 대체염이 첨가된 경우 모두 shear rate 과 shear stress간의 관계가 원점을 지나는 정비례 관계를 나타내는 뉴턴성 유체를 모두 나타내었다. 따라서 이때의 기울기는 시료의 절대 점도로 표시할 수 있고 이는 다시 말해 대체염을 첨가하여도 식품의 물성에는 직접적으로 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있다. 대조구간 비교를 해보면 칼슘의 경우 점도가 다소 높게 나타났고, 나머지는 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

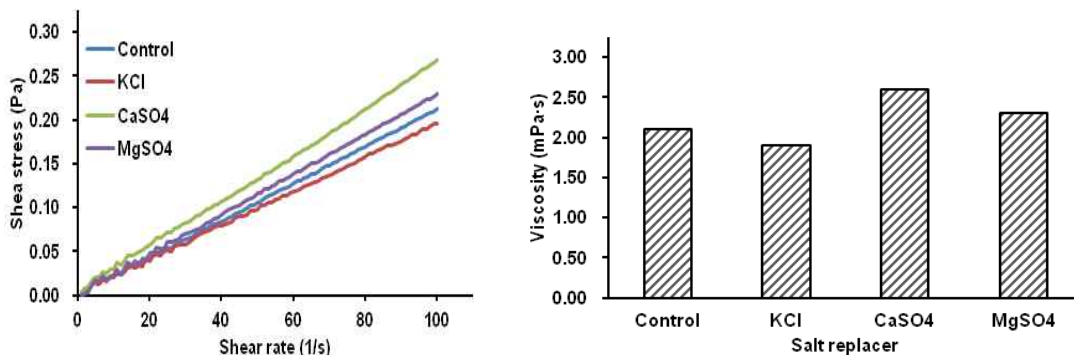


Fig. 3-3-15. 대체염이 첨가된 용액의 유체 물성측정 ; 왼쪽: shear rate에 따른 shear stress 변화, 오른쪽: 대체염의 종류에 따른 점도.

○ 염미증진제 첨가의 경우 MSG는 농도나 대조구간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 유동성은 뉴턴성 유체로 이때 기울기로 절대 점도로 표시할 수 있는데 대조구를 제외하고는 다소 점도가 증가된 것으로 나타났으나 처리구 간에는 차이점이 나타나지 않았다 (Fig.3-3-16). GABA 첨가의 경우에도 뉴턴성 유체로 나타났다. 농도가 증가할수록 절대 점도 값은 유의적으로 증가함을 알 수 있다.

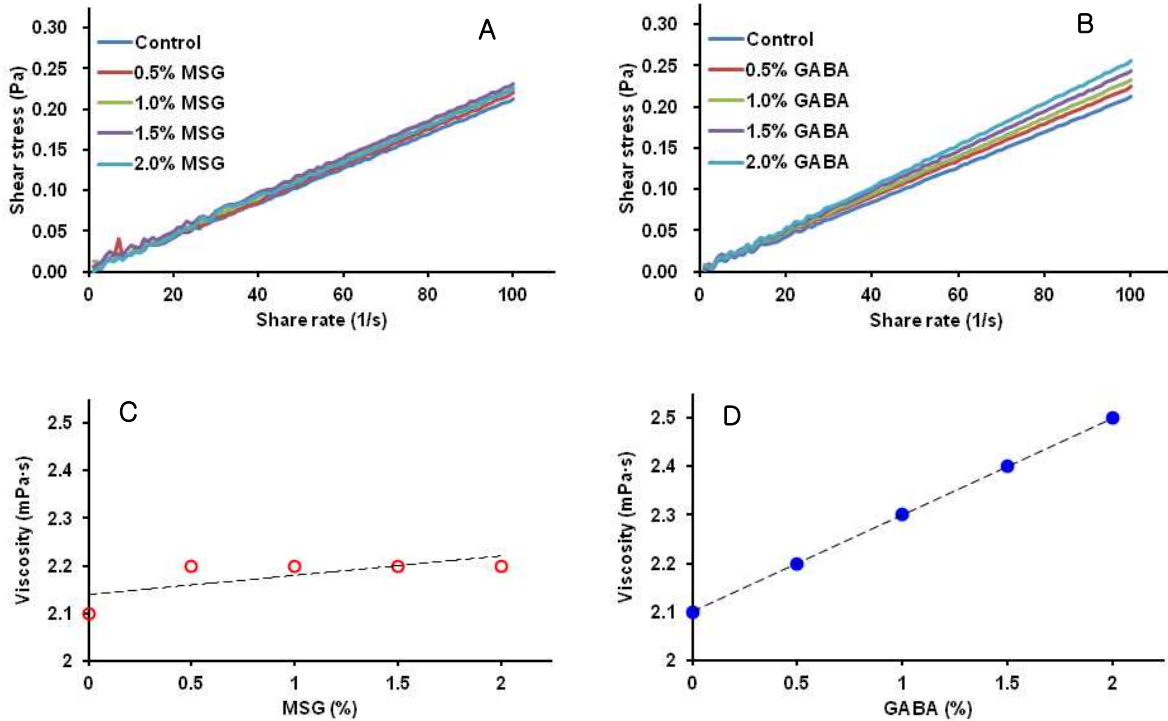


Fig. 3-3-16. MSG(A, C)와 GABA(B, D)가 첨가된 용액의 유체 물성측정 ;

A, B: shear rate에 따른 shear stress 변화, C, D: 염미 증진제 농도에 따른 점도.

- 모든 시료는 뉴턴성 유체로 나타났다. MSG나 대체 염의 경우에는 소금만 첨가한 시료 유사한 점도와 점도를 나타내었고, GABA의 경우 점도가 다소 농도에 따라 증가하는 것으로 나타났는데, 이는 추후 식품에 첨가 시 고려해야 할 것으로 사료된다.
- 관능검사 결과와 비교해 유추해 보면 증가된 점도가 짠맛 증진에 영향을 미쳤다고 설명할 수는 없으나 2차년도 과제에서 모델 식품을 제조하거나 실 제품을 만들어 제조할 경우 식품전체 미칠 관능적인 부분에 고려해야 할 부분이다.
- 저염햄이나, 저염빵을 제조할 경우 gel 제품이나 고형식품의 경우 저작과정이 직접적인 나트륨 유리 속도에 영향을 미칠 수 있다. 본 실험에서는 대부분 수분으로 구성되어 있어 유체의 유동성이 일반 물과 같이 뉴턴성 유체를 나타내었다.

2. 소금의 불균일 분포도를 이용한 저염 제빵 제조법 개발

가. 소금의 불균일 분포를 위한 제빵 제조 방법

(1) 제빵용 분무 건조 소금 제조 공중 조건

- 제빵 공정과정에서 효모가 만들어내는 이산화탄소 gas 공간에 첨가된 소금을 석출시켜 일종의 짠맛 농도 조절(saltiness taste contrast)을 통한 짠맛 증진 효과를 보고자 하였다. 제빵 공정에 들어가기 전에 소금과 효모가 혼합된 간수를 제조하여 분무건조를 실시해 주어 제빵용 소금입자를 제조한다.
- 분무 건조 과정에서 효모의 활성화가 떨어질 수 있기에 최적 분무 건조 조건을 찾아 주었고, 제빵의 최적 적성을 유지하기 위해 효모의 일부는 제빵 공정에서 별도로 첨가해 주어 최적 제빵 공정과 효모와 소금의 혼합비를 찾아 주었다.
- 소금과 효모를 20:6, 20:9, 20:12 (Table 3-3-9)로 혼합하여 분무 건조를 실시해 주었다. 제빵에 필요한 성분들은 Kim 등(2013)이 발표한 논문에 의거하여 제빵 재료들의 혼합비를 아래 Table 3-3-10에 따라 제조하였다.

Table 3-3-9. 분무 건조한 소금과 효모 혼합 비

소금 (g)	효모 (g)
2	0.6
2	0.9
2	1.2

Table 3-3-10. 제빵 재료의 종류와 중량

재료	무게 (g)
밀가루	100
물	64
설탕	6
탈지분유	7.11
효모	1.2*
소금	2

*: 효모 1.2 g의 무게는 전체 사용량의 무게로 분무건조로 제조된 효모의 무게. (Table3-1)를 제외한 나머지 무게는 제빵 제조 과정에서 별도로 첨가해 주어 제조하였다.

- 이에 따라 제조한 성분비로 각 재료들을 혼합한 뒤, 반죽분량을 만들어 준다. 반죽기를 이용하여 저속(반죽기 버튼 1-2단)에서 1분간, 중속(반죽기 버튼 4-6)에서 2분간 섞어준다. 후에, 쇼트닝 4 g을 첨가하고 저속(반죽기 버튼 2-4)에서 3분간, 중속(반죽기 버튼 4-6)에서 7분간 다시 한 번 반죽시킨다.
- 반죽 덩어리를 꺼내어 손으로 둥그랗게 모양을 만든 후 발효조 40°C에서 60분간 발효한다. 발효 후 밀대로 반죽을 밀어 주면서 탈기(degassing) 작업을 실시해 준다. 탈기 작업이 끝나면 다시 반죽을 둥그랗게 만든 후 실온에 15분간 두고 다시 반죽을 한다.
- 반죽을 빵틀에 맞게 성형한 후 50분간 발효조에서 2차 발효를 시킨다. 발효가 끝난 반죽으로 미리 예열된 오븐기에 넣고 180°C에서 20분간 굽는다.

(2) 효모 활성도를 최적화를 위한 분무건조 공정 조건

- 본 실험에서는 제조된 소금-효모 혼합액을 분무건조하기 위한 최적 조건을 찾기 위해 다양한 분무건조 조건을 실시한 뒤 효모 활성도를 비교하였다. 본 연구팀이 소유한 분무건조기에는 4가지 공정조건이 있는데 inlet/outlet 온도 (°C), blow power (m³/min), atomizing pressure (kPa), 주입속도 (mL/h) 등이 해당된다. 이 4가지 공정조건 중 inlet 온도를 제외한 3가지 조건은 1차 년도에서 나온 결과를 토대로 blow power는 0.5 m³/min, atomizing pressure 18x10 kPa, 주입속도는 400 mL/h로 고정하였다.

(3) 소금/효모 혼합물로 제조된 빵의 물리적 특성 검사

- 위의 조건별로 제조된 빵의 물리적 특성변화를 관찰하기 위해 반죽의 pH, 반죽의 발효율, 빵의 텍스처, 빵의 기공 현미경 관찰, 빵의 소금용출 속도 측정 등을 실시해 주었다.
- 반죽의 pH 측정: 식빵의 반죽은 효모의 지속적인 발효로 온도와 시간에 따라 변화가 심하기 때문에 증류수를 이용하는 회석방법으로는 정확한 측정이 어려우므로 반죽에 탐침봉을 직접 꽂아 pH를 측정하는 surface electrode method(Gelinas et al., 1995)를 사용하였다. 각각의 반죽마다 탐침봉을 반죽표면으로 5 cm 길이로 꼽고 정확히 5초 후에 상온에서 pH meter로 측정하였다.
- 식빵의 속질의 pH측정: AACC method 02-52 (AACC 1995) 인 slurry method로 측정하였다. 식빵 속질 15 g에 증류수 100 mL을 넣고 30분간 진탕한 후, 10분간 방치한 뒤 pH meter로 측정하였다.
- 반죽의 발효율: 실험에 사용되는 반죽은 700g씩 분할하여 둥글게 만든 후 3000 mL 비커의 바닥에 공기가 차지 않도록 넣고 발효율을 측정하였다. 각각 조건의 반죽은 10분마다 팽창된 반죽의 높이를 측정하여 발효율로 나타내었고 발효조건은 1차 발효와 같다.

- Loaf volume: 반죽의 무게를 측정한 후 제조된 식빵의 부피를 반죽의 무게로 나눈 값 (m^3/g)으로 계산하였다.
- 반죽의 텍스처: 반죽 시료를 지름*높이 15*15 mm cylinder shape으로 준비 한 후 TPA type으로 trigger load 50 g, test speed 2.5 mm/s 의 조건으로 CT39 Texture Analyzer (BROOKFIELD, USA) 이용하여 경도, 부착력, 탄력성, 검성, 씹힘성 및 응집성을 측정하였다.
- 식빵의 텍스처: 식빵 시료를 가로*세로*높이 10*10*65 mm로 준비 한 후 compression type으로 trigger load 70 g, test speed 2.5 mm/s 의 조건으로 CT3 Texture Analyzer (BROOKFIELD, USA) 이용하여 경도와 부착력을 측정하였다.
- 소금용출속도: 식빵 시료 2 g을 취하여 거즈로 감싼 후 물 100 mL 담긴 비커에 넣는다. 이 때 750 rpm으로 교반해 주면서 측정값이 일정해 질 때 까지 관찰하였다.
- 식빵의 기공관찰: 식빵 시료를 얇게 편으로 잘라서 광학현미경 40배(Olympus CX31, Japan) 배율로 관찰하였다.
- 식빵의 기공크기 측정: 1차 년도에서 실시한 방법으로 동일하게 측정하였다.

(4) 관능검사 방법 [경기대 위탁]

- 관능검사 항목과 검사지는 다음과 같다. 이 때 강도 및 선호도에 따라 순위를 선정하는 순위법으로 실시하였고 결과의 분석을 rank sum 방법으로 Kramer's 통계차트를 활용하였다(Table 3-3-11).

Table 3-3-11. 관능평가 평가지 예

식빵 시료의 소비자 검사를 위한 설문지

본 설문지는 다양한 식빵에 관한 귀하의 의견을 조사하기 위한 것입니다.
여하튼의 응답 내용은 연구의 귀중한 자료가 되오니 신중을
갖고 읽고서도 부담없이 답변해 주시기 바랍니다.
응답내용은 순수 연구 목적 이외의 다른 곳에는 사용되지 않을 것을
약속드립니다.

나이 (만) _____ 세 성 별 _____

※ 다음의 시트를 볼때부터 오른쪽까지 읽은 후, 해당문항에 맞는 순위를 순서대로 평가하십시오.
먼저 홀로 읽을 차례 주십시오.
한 시트를 읽은 후 다음 시트를 읽으기 전에 홀로 읽을 차례 주십시오.

1. 식빵 표면의 색상 (Crust color)

본인이 생각하는 식빵에 적합한 순으로 순위를 나타내십시오.

	333	512	658	728
순위	_____	_____	_____	_____

2. 식빵 속의 색상 (Crumb color)

본인이 생각하는 식빵에 적합한 순으로 순위를 나타내십시오.

	333	512	658	728
순위	_____	_____	_____	_____

3. 향 (선호하는 향)

	333	512	658	728
순위	_____	_____	_____	_____

4. 식빵 속 기공의 균일성 (Grain uniformity)

	333	512	658	728
순위	_____	_____	_____	_____

5. 촉촉함 (Moisture)

	333	512	658	728
순위	_____	_____	_____	_____

7. 맛 (Taste) 강도가 높은 시료에서 낮은 시료로 나타내시오

1) 짠맛

	333	512	658	728
순위	_____	_____	_____	_____

2) 단맛

	333	512	658	728
순위	_____	_____	_____	_____

3) 신맛

	333	512	658	728
순위	_____	_____	_____	_____

8. 짠맛에 대한 기호도 (본인 입맛에 맞는 순서)

	333	512	658	728
순위	_____	_____	_____	_____

9. 전체적 기호도 (Overall quality)

	333	512	658	728
순위	_____	_____	_____	_____

응답해주셔서 감사합니다.

나. 소금 불균일 방법에 따른 제빵 적성 분석

(1) 소금-효모 용액의 최적 분무건조 조건

(가) Inlet temperature에 따른 빵의 제빵 적성 비교

○ 예비실험에서 효모와 소금을 넣고 분무건조 시킨 후 빵을 만들 본 결과 제빵 적성이 나오지 않았다. 따라서 효모의 활성도를 최대화시키기 위해 분무 건조 시 최적 온도를 찾기 위해 효모만 물에 현탁시켜 inlet 온도에 따라 빵을 제조한 뒤 간단하게 loaf volume을 측정해 보았더니 아래 Fig. 3-3-17과 같은 결과가 나왔다.

○ D의 사진은 분무건조를 시키지 않고 바로 효모를 제빵 공정상에 첨가하여 구운 빵으로 100 g당 차지하는 부피가 약 212.9 cm³으로 나타났다. 처리구에서는 inlet 온도가 140, 160, 180°C으로 올라 갈수록 부피가 271.0 cm³, 162.6 cm³, 154.8 cm³으로 부피가 줄어들었다. 즉, inlet 온도가 올라갈수록 효소의 활성이 떨어져 제빵적성에 직간접적으로 영향을 미칠 것으로 사료되어 소금-효모액 분무 건조 시 최적 inlet 온도는 140°C으로 고정하여 효모 간수액을 만들어 제조하였다. 다른 분무건조 최적 조건은 앞에서 기술한 바와 같이 blow power는 0.5 m³/min, atomizing pressure 18x10 kPa, 주입속도는 400 mL/h로 고정하여 실시해 주었다.

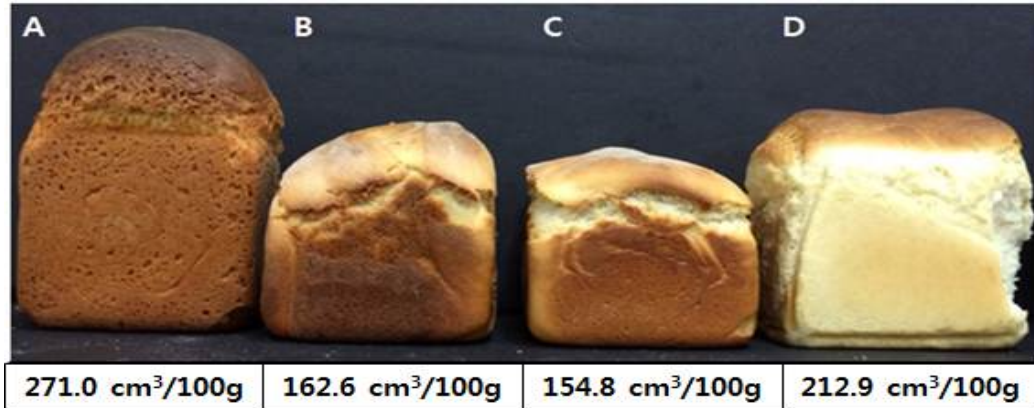


Fig. 3-3-17. Inlet 온도 (A: 140°C, B: 150°C, C: 160°C, D: 분무건조 하지 않은 생효모 처리)에 따른 빵의 부피 측정.

(2) 제조된 소금-효모 분말이 들어간 제빵의 물리적 특성 분석

(가) 반죽의 pH

○ 처리구 별로 반죽을 만든 뒤 pH를 측정한 결과 대조구의 경우 가장 높은 pH를 나타내었고, 분무 건조 한 시료 중 건조한 효모양이 증가할수록 pH는 증가하는 경향을 나타내었다. 특히 건조된 효모양만으로 첨가된 시료의 경우 처리구 가운데서 가장 높은 pH를 나타내었다(Table 3-3-12).

Table 3-3-12. 분무 건조된 소금-효모 가루가 첨가한 뒤 제조한 반죽의 pH 측정

	pH		
Control	6.32	±	0.02 ^a
20:6	6.03	±	0.01 ^d
20:9	6.13	±	0.01 ^c
20:12	6.26	±	0.02 ^b

(나) 반죽의 발효율

○ 대조구의 경우 시간이 지남에 따라 발효가 증진되어 반죽의 높이가 증가되는 것을 알 수 있었다. 소금-효모 분무 건조하여 제조된 소금을 혼합하여 반죽기에 넣고 발효 시킨 결과 발효율이 가장 좋은 것은 20:6과 20:9의 시료에서 발효율이 높게 나타났다. 그 중에서도 1시간 뒤에 20:6의 경우 가장 높은 값을 나타내었다. 20:12의 혼합물, 즉 별도의 생효모를 첨가하지 않은 처리구에서는 발효가 거의 진행되지 않아 매우 낮은 값을 나타내었다(Table 3-3-13). 이는 생효모가 소금과 함께 있어 효모의 활성이 떨어져 발효율이 낮게 나타난 것으로 사료된다.

Table 3-3-13. 분무 건조된 소금-효모 가루가 첨가한 뒤 제조한 반죽의 발효율(반죽높이) 측정

시료 분	Control	20:6	20:9	20:12 (높이 cm)
0	9.69	9.69	9.69	9.69
10	11.08	11.08	11.08	11.08
20	12.46	12.46	12.46	13.85
30	13.85	16.62	13.85	13.85
40	13.85	20.77	16.62	13.85
50	15.23	24.93	18.00	13.85
60	15.23	26.31	20.77	13.85

(다) 반죽의 texture 분석

○ 분무 건조 한 소금과 효모 분말 가루를 첨가한 반죽의 TPA를 측정한 결과 경도는 대조구의 경우 다소 높은 결과를 나타내었고, 20:9나 20:12의 비율로 혼합한 처리구를 제외한 분무 건조 첨가물이 다소 낮은 경도를 나타내었다. 부착성이나 응집성을 처리구나 대조구 간에 차이를 나타내지 않았다(Table 3-3-14).

Table 3-3-14. 분무 건조 한 효모와 소금 넣었을 때 반죽의 TPA

	Hardness (g)		Adhesiveness (mJ)		Cohesiveness	
control	559.0 ±	54.5 ^{ab}	0.3 ±	0.1 ^a	0.4 ±	0.1 ^a
20:6	463.3 ±	125.3 ^b	0.1 ±	0.2 ^a	0.4 ±	0.0 ^a
20:9	618.7 ±	98.0 ^{ab}	0.5 ±	0.6 ^a	0.4 ±	0.1 ^a
20:12	778.5 ±	252.4 ^a	0.2 ±	0.1 ^a	0.4 ±	0.1 ^a

(라) 빵의 loaf volume

○ 생효모(분무건조 처리하지 않은 효모)만으로 제조한 빵의 loaf volume은 100 g의 반죽 기준으로 111.3 cm³으로 나타났다. 소금-효모의 비율이 20:6, 20:9로 혼합하여 분무 건조하고, 여분의 효모양은 제조 시 첨가된 생효모를 첨가하여 제조한 빵의 loaf volume은 91.1 cm³과 115.3 cm³의 비율로 나타났다. 하지만 생효모를 첨가하지 않고 모두 소금과 혼합하여 분무건조 한 뒤 빵을 제조한 결과 loaf volume은 98.7 cm³으로 가장 낮게 나타났다(Fig. 3-3-18). 따라서, 제빵의 물리적인 특성을 변화하지 않는 범위 내에서 제빵 공정과정을 변화 시킨다면 생효모를 일부 따로 첨가해 주어 소금-효모의 분무 건조량을 조절해 주어 제조해 주는 것이 바람직하다고 사료된다.

○ 이는 효모가 소금과 직접적으로 맞닿으면 상대적으로 효모의 활성도가 떨어져 제빵 공정에서 발생할 수 있는 유기산, 알콜 및 이산화탄소 형성이 작아져 부푸는 정도가 낮게 나타났다 것으로 사료된다. 따라서 일부 효모는 소금과 함께 분무 건조하여 상대적으로 기

공에 맺힐 수 있는 소금의 위치를 잡아주는 역할을 하는데 사용해 주고 일부 효모는 별도로 제빵 공정상에 첨가해 주어 빵의 적성 공정이 나올 수 있도록 충분히 부풀 수 있는 빵을 형성해 주는데 활용해야 할 것으로 사료된다.

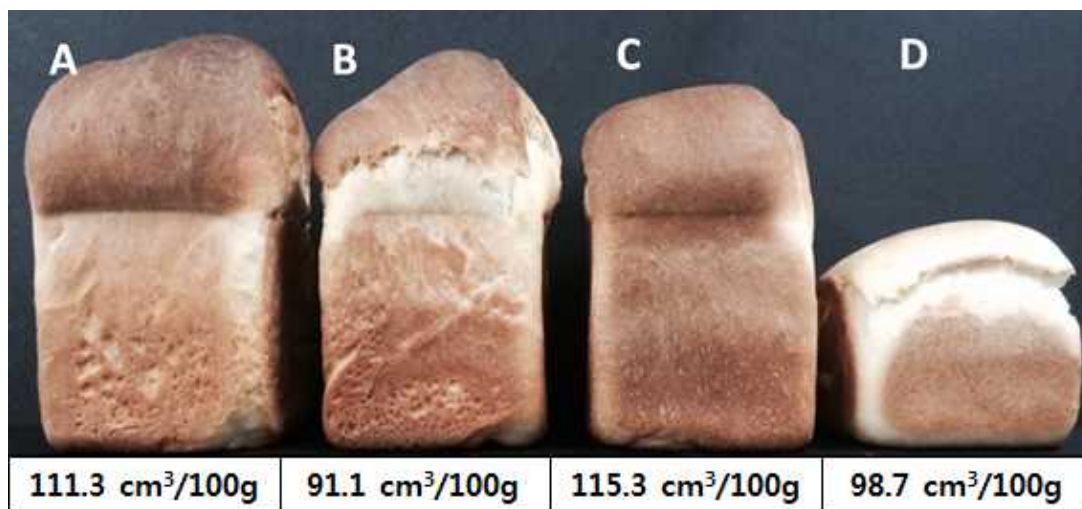


Fig. 3-3-18. 분무 건조된 소금-효모 가루가 첨가한 뒤 제조한 빵의 loaf volume 측정 값, A: control (분무건조 처리가 안 된 생효모 자체를 제빵에 모두 사용한 경우), 소금과 효모의 혼합비가 B: 20:6, 20:9, C: 20:12, D: 20:12인 것을 첨가한 뒤 남은 무게만큼 생효모(분무건조 처리 안한 효모)를 첨가하여 제조.

(마) 빵(속질)의 pH

- 소금은 빵의 품질 뿐만 아니라 맛에 중요한 영향을 미친다. 이론적으로는 본 실험에서 제조한 빵의 짠맛은 일정해야 하고, pH변화도 일정한 결과 값을 나와야 한다. 이를 살펴 보기 위해 소금을 효모와 서로 다른 비율로 분무 건조시킨 뒤 제조한 빵 속질의 pH를 측정하였다. 효모를 소금과 함께 모두 동결건조 한 뒤 빵을 제조한 pH의 경우 약 6에 가까운 값을 나타내어 pH가 증가 되는 것을 알 수 있었다. 반면, 일부 효모를 소금과 분무 건조하고 부족한 부분의 양은 생효모로 빵 제조 시 첨가해 준 제빵의 속질 pH는 상대적으로 낮은 값을 나타내었고, 대조구와 큰 차이를 나타내지 않았다(Fig. 3-3-19).
- 이는 앞에서 loaf volume이 상대적으로 높은 값을 나타내는 대조구나 생효모 혼합물에서 효모의 활성이 상대적으로 높아 유기산, 알콜 및 이산화탄소 작용이 활발해져 다소 낮은 pH를 나타낸 것으로 사료된다. 이와는 반대로, 소금과 함께 모두 첨가된 효모의 분무 건조시키고 별도의 생효모가 첨가 안 된 제빵의 경우는 소금에 의해 효모의 활성도가 다소 떨어져 상대적으로 부피가 작은 loaf volume과 함께 적은 양의 유기산, 이산화탄소 등이 생성된 것으로 사료된다.

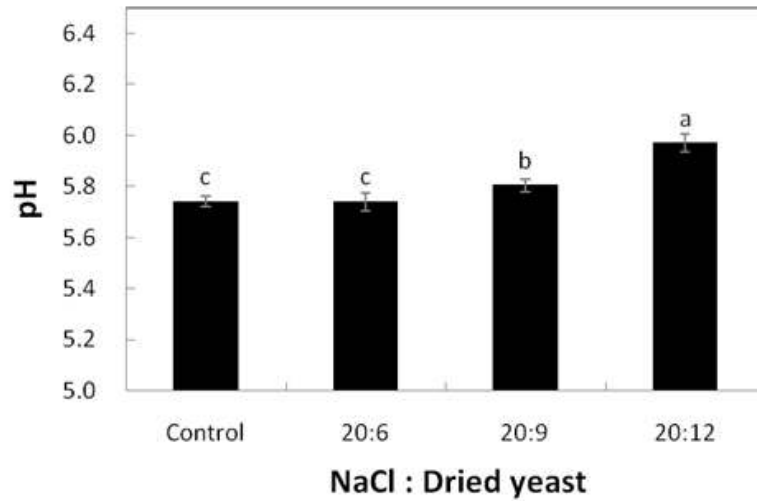
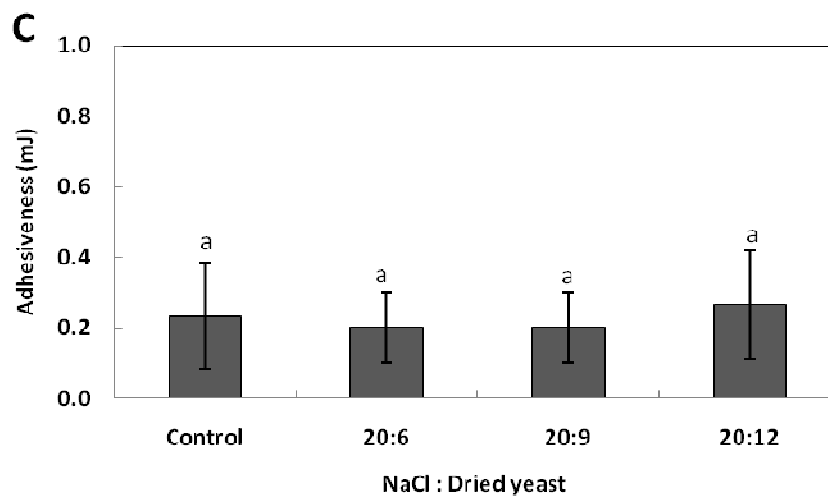
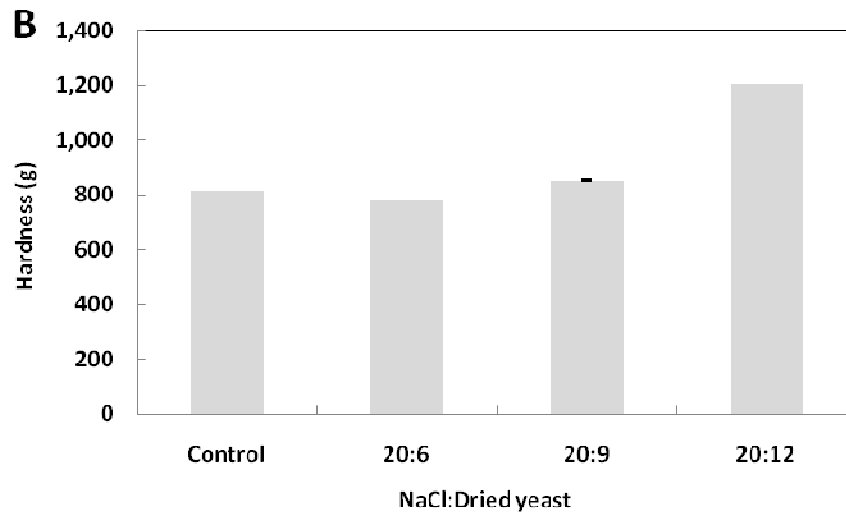
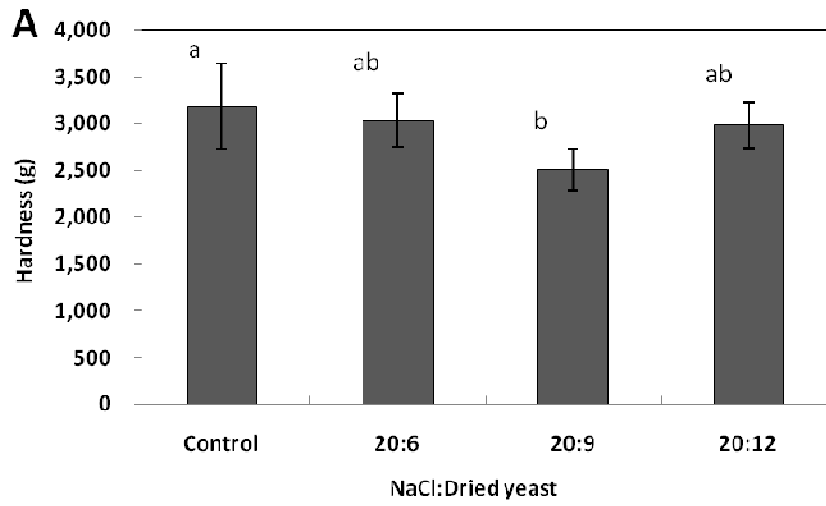


Fig. 3-3-19 건조효모 양에 따른 식빵의 pH 변화 ($p < 0.05$).

(바) 빵의 텍스처 (crumb과 crust의 hardness와 adhesiveness 측정)

- Crust (표면) 경도를 측정해 본 결과 분무건조 시 소금과 효모의 양이 20:9인 경우 조금 작은 값을 나타내었고, 나머지 처리구와 대조구의 경우 비슷한 결과를 나타내었다. Crumb (속질) 경도를 측정해 본 결과 생효모를 첨가하지 않고 효모 모두를 소금과 함께 분무 건조하여 제조한 소금을 이용해 빵을 만들어준 경우 다소 높은 경도를 나타내었다 (Fig. 3-3-20). 이는 상대적으로 잘 부풀지 않은 제빵의 경우 나타나는 결과로 소금과 함께 모두 분무 건조된 효모의 활성이 떨어져 그 결과 속질의 경도도 다소 높게 나타난 것으로 사료된다.
- 부착력을 측정한 결과 crust와 crumb 모두 유의적인 차이 값을 나타내지는 않았으나 그래프 경향은 crust의 경우 생효모를 별도 첨가하지 않은 경우 높아지는 경향을 crumb의 경우 낮아지는 경향을 나타냈다(Fig. 3-3-20).



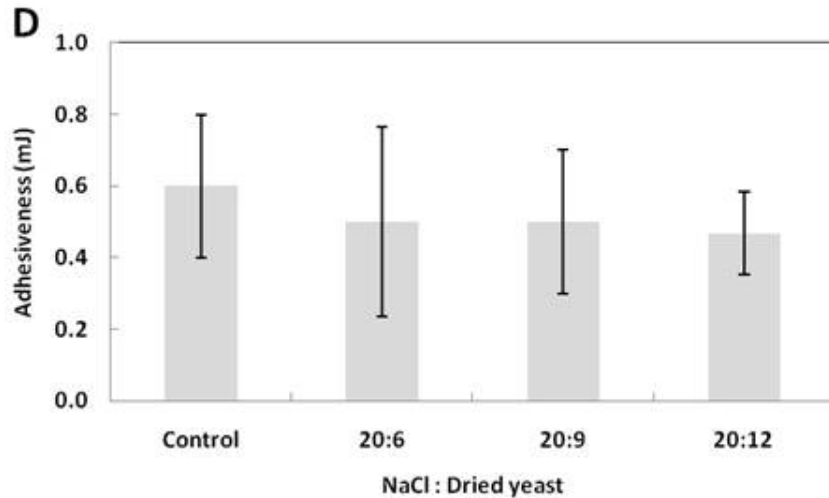


Fig. 3-3-20. 건조효모 양에 따른 식빵의 겉껍질 (A와 C) 및 속질 (B와 D)의 경도 (A와 B) 및 부착력 (C와 D) ($p < 0.05$).

(사) 기공의 현미경 관찰

○ 현미경으로 관찰한 기공의 모양은 크게 다르게 나타나지는 않았다. 기공은 둥근 모양의 것도 있지만 다소 찌그러져 타원형의 기공을 나타내는 시료도 있었다. 보다 정확한 기공 분포도를 나타내기 위해 입자를 image analysis 프로그램을 통해 입자의 크기를 측정하였다(Fig. 3-3-21).

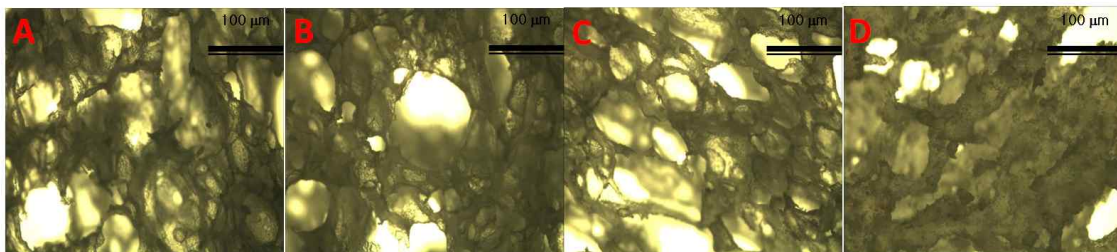


Fig. 3-3-21. 분무 건조된 소금-효모 가루가 첨가한 뒤 제조한 빵 기공 현미경 관찰, A: control (분무건조 처리가 안 된 생효모 자체를 제빵에 모두 사용한 경우), 소금과 효모의 혼합비가 B: 20:6, 20:9, C: 20:12, D: 20:12인 것을 첨가한 뒤 남은 무게만큼 생효모 (분무건조 처리 안한 효모)를 첨가하여 제조.

(아) 입자의 기공 크기 분포도

○ 아래 표에 따르면 기공의 평균 크기는 20:9의 처리구에서만 다소 크게 나타났고, 나머지 대조구와 다른 처리구간에는 차이가 나타나지 않는 것으로 나타났다. 기공의 크기를 누적 분포도로 나타낸 결과 전체적인 경향을 나타내지는 않았다(Fig. 3-3-22, Table 3-3-15).

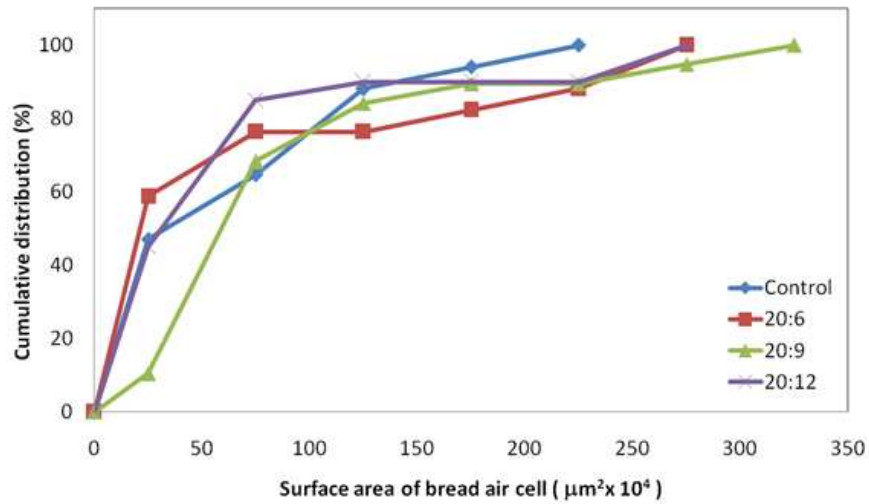


Fig. 3-3-22. 건조 효모량에 따른 식빵 속질의 기공크기 분포.

Table 3-3-15. 건조효모 첨가한 식빵의 기공면적

Unit : $10^4 \mu\text{m}^2$

Control	20:6	20:9	20:12
80.9±62.0	79.9±91.1	111.2±78.0	76.3±78.5

(자) 소금의 용출 속도

- 소금의 용출 속도가 가장 빨리 나온 시료는 소금과 효모를 20:6으로 혼합하여 분무건조한 뒤 여분의 생효모는 제빵 공정에서 첨가한 시료에서 나타났고, 다음으로는 20:9의 비율로 섞어준 시료에서 소금의 용출 속도가 빠르게 나타났다. 가장 늦게 소금이 용출되어 나온 시료는 효모 모두를 소금과 함께 분무 건조 시킨 시료로써 이는 대조구 보다도 늦은 속도를 나타냈다(Fig. 3-3-23).
- 이러한 결과는 제빵의 경도가 강하고 부풀기 정도가 다소 미약한 처리구, 즉 효모의 활성이 다소 떨어져 부풀기가 충분히 이루어지지 않은 제빵에서 상대적으로 늦은 소금의 용출 속도를 나타낸 것으로 사료된다.

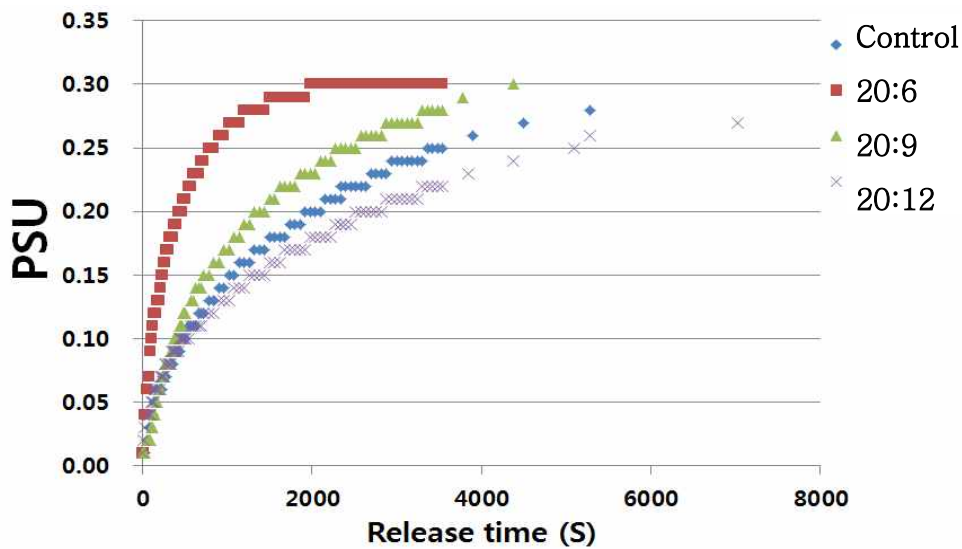


Fig. 3-3-23. 분무 건조된 소금-효모 가루가 첨가한 뒤 제조한 빵에서 소금 용출 속도, A: control (분무건조 처리가 안 된 생효모 자체를 제빵에 모두 사용한 경우), 소금과 효모의 혼합비가 B: 20:6, 20:9, C: 20:12, D: 20:12인 것을 첨가한 뒤 남은 무게만큼 생효모(분무건조 처리 안한 효모)를 첨가하여 제조.

(차) 관능검사 (경기대 위탁)

- 강도 및 선호도에 따라 순위를 선정하는 순위법으로 실시하였고 순위의 합이 낮을 때 강도 및 선호도가 높은 것을 의미한다. 결과의 분석은 순위법의 유의성 검정표(5%)에 의해 활용하였다 (김 등 2001; Kramer 등 1974). 최소 비유의적 순위합과 최대 비유의적 순위합에 포함되는 처리구는 서로 유의적 차이가 없는 것으로 판정한다.
- Table 3-3-16에 따르면 통계적 처리 결과에 유의적인 값을 나타내는 결과는 crust color 값의 결과로 값이 가장 낮은 값을 나타내는 20:9의 혼합비가 crust color 선호도가 높았고, 그 뒤로 20:6, 대조구, 20:12의 처리구로 나타났다. 다른 항목에 대한 경향을 분석해보면 crumb color 선호도도 crust 결과와 유사하게 나타났다.
- 짠맛에 대한 경향은 짠맛이 가장 짜게 나타나는 값은 20:12의 경우이고, 그 뒤로 대조구, 20:9, 20:6의 순서로 나타났으나 통계적인 유의차는 나타나지 않았다. 짠맛에 대한 기호도는 20:9의 경우 가장 선호도가 높았고, 20:12, 대조구, 20:6의 순서로 나타났는데, 이는 소금 용출 속도의 결과와 다소 다른 경향을 나타내었다.
- 이는 순위법의 결과를 통해서 짠맛의 강도를 비교해 보면, 효모와 소금을 모두 분무건조하여 제조한 뒤 제빵에 첨가했을 경우 제빵의 물성은 다소 떨어지기는 했으나 짠맛에 대한 강도는 강하게 느끼는 경향을 나타내었다.

○ 방사형으로 표현된 관능평가 분석표는 대조구, 즉 모든 생효모를 제빵에 제조시 첨가했을 경우의 빵을 Fig. 3-3-24로 비교하여 분석해 본 결과 crust color, crumb color, 수분, 향 등이 효모를 모두 건조하여 제조한 빵의 경우와 비슷한 결과를 나타내었다. 맛을 비교한 방사형 관능평가 분석 결과도 유사한 결과를 나타내었다. 하지만 20:9로 혼합한 경우도 유사한 결과를 나타내었다. 20:6으로 혼합한 처리구의 경우는 대조구와 다소 떨어진 짠맛, 짠맛 기호도를 나타내었다.

Table 3-3-16. 건조효모 양에 따른 식빵의 관능검사

측정항목	소금-효모의 분무건조 혼합비			
	대조구	20:6	20:9	20:12
crust color	70^B	52^B	45^A	73^C
crumb color	60	58	54	68
향	55	61	64	60
기공 균일성	61	58	53	68
Moisture	57	52	70	61
짠맛	57	69	64	50
단맛	62	66	56	56
신맛	58	70	62	50
짠맛 기호도	60	71	53	56
전체적 기호도	57	62	64	57

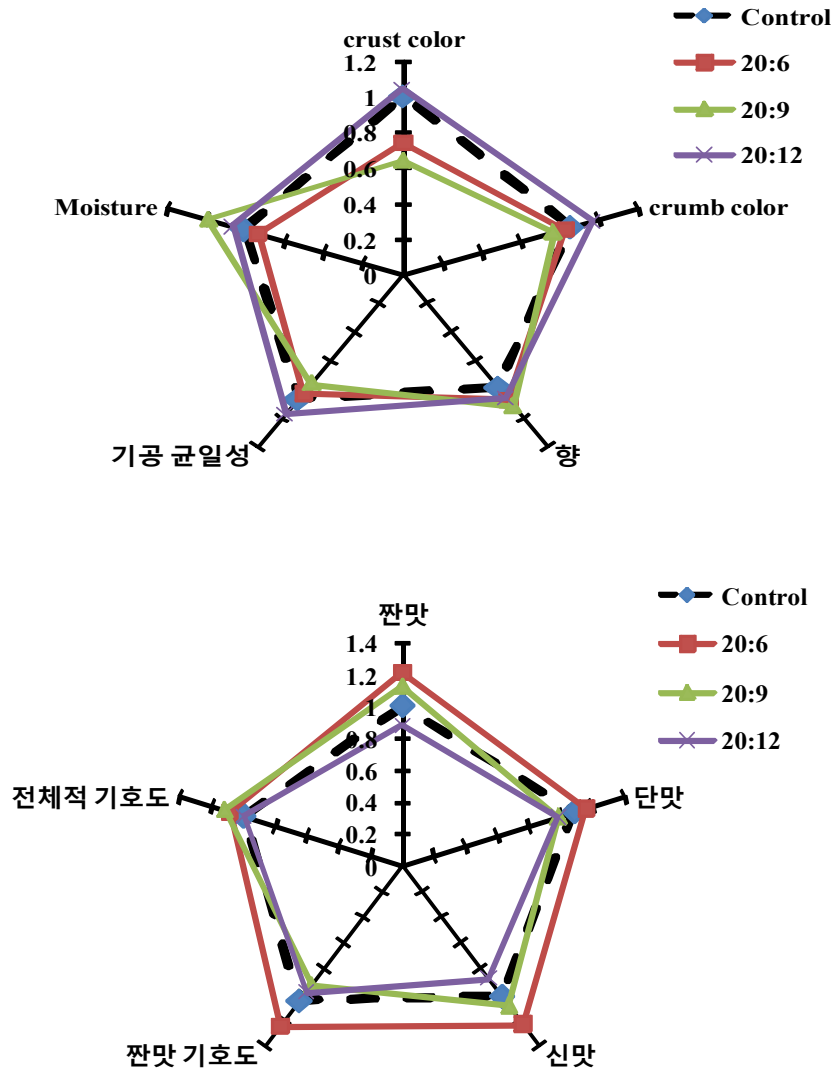


Fig. 3-3-24. 건조효모 양에 따른 관능검사 분석.

다. 짠맛 증진제가 첨가된 저염 제빵 제조

(1) 최적공정 조건 설정 후 enhancer 첨가에 따른 건식 소금제조 및 제빵 제조

○ 제1협동에서 가수분해하여 얻어진 단백질 가수분해물을 제공받아 분무건조를 이용한 건식 소금을 제조하여 제빵 공정에 첨가하여 같은 농도의 소금이 첨가된 제빵의 경우 단백질 가수분해물이 첨가된 제빵에서 짠맛을 더 느끼는지 살펴보는 실험이다.

○ 제빵의 필요한 소금의 농도 2%를 기준으로 소금과 단백질 가수분해물(1협동에서 제공)을 다양한 농도도 혼합 한 뒤 분무건조를 실시하였다. 단백질 가수 분해물에 14.6%의 NaCl

이 함유 되어있어 (1협동 분석결과), 가수분해물의 첨가농도가 증가(0g, 1.712g, 3.425g, 6.85g, 13.7g) 할수록 추가되는 소금의 양 (2g, 1.75g, 1.5g, 1g, 0g)을 미리 계산하여 2% 전체 소금 농도에 해당하는 나머지 양만 첨가해 주어 동일한 NaCl양으로 맞추어 주었다. 제조된 시료들은 앞서 선택된 최적 inlet 온도와 나머지 3가지 조건(atomizing pressure 18 ×10 kPa, flow rate 400 mL/h, blow power는 0.5 m³/min로)에서 분무 건조하여 동일하게 실시하였다.

- 위의 조건별로 제조된 빵의 물리적 특성변화를 관찰하기 위해 반죽의 pH, 반죽의 발효율, 빵의 텍스처, 빵의 기공 현미경 관찰, 빵의 소금용출 속도 측정 등을 실시해 주었다. 각 세부적인 실험방법은 앞에서 기술한 바와 동일하다.

(2) 짠맛 증진제가 첨가된 제빵의 물리적 특성 분석

(가) 반죽의 pH

- 가수 분해물을 첨가하지 않은 대조구의 경우 가장 높은 pH값을 나타내었고, 가수 분해물 첨가한 처리구 간 비교를 해보면 농도가 짙어 질수록 pH가 증가되는 경향을 나타내었다 (Table 3-3-17). 가수 분해물의 함량이 적은 시료에서 효모의 활성이 가장 높아 상대적으로 많은 유기산이 형성되어 낮은 pH를 나타내는 것으로 사료된다.

Table 3-3-17. 단백질 가수 분해물을 첨가하여 만든 반죽의 pH 측정

	pH
Control	6.32 ± 0.02 ^a
1.462	5.76 ± 0.01 ^e
2.925	5.91 ± 0.01 ^c
5.85	5.87 ± 0.01 ^d
11.7	6.02 ± 0.01 ^b

(나) 반죽의 발효율

- 대조구의 경우 시간이 증가함에 따라 반죽 높이가 증가하는 것을 알 수 있었다. 단백질 가수 분해물이 첨가된 시료의 경우 첨가한 시료에서 모두 발효율이 높게 나타났다. 고농도인 13.7 g 첨가의 경우를 제외하고는 1시간 뒤 모두 40 cm가 넘는 반죽높이를 나타내었다(Table 3-3-18).

Table 3-3-18. 단백질 가수분해물이 첨가된 반죽의 발효율(반죽높이) 측정

시료(분)	Control	1.462	2.925	5.85	11.7 (높이 cm)
0	14.92	12.79	12.79	12.79	12.79
10	17.05	17.05	14.92	17.05	14.92
20	19.18	27.71	21.31	23.44	17.05
30	21.31	31.97	23.44	25.58	21.31
40	21.31	38.36	29.84	29.84	21.31
50	23.44	40.49	38.36	40.49	25.58
60	23.44	42.63	40.49	42.63	29.84

(다) 반죽의 texture 분석

○ 단백질 가수 분해물이 첨가된 반죽의 TPA분석 결과 대조구에 비해서 다소 경도가 증가하는 경향을 나타내었다. 예외적으로 단백질 가수 분해물의 양이 13.7 g인 경우 다소 경도가 낮아지는 경향을 나타내었다. 부착성과 응집성은 대조구나 처리구간 차이가 나타나지 않았다(Table 3-3-19).

Table 3-3-19. 단백질 가수 분해물 넣은 반죽의 조직감 측정

	Hardness (g)	Adhesiveness (mJ)	Cohesiveness
Control	559.0 ± 54.5 ^a	0.3 ± 0.1 ^{ab}	0.4 ± 0.1 ^a
1.462	719.0 ± 195.7 ^a	0.2 ± 0.1 ^{ab}	0.4 ± 0.0 ^a
2.925	772.0 ± 225.6 ^a	0.4 ± 0.1 ^a	0.4 ± 0.0 ^a
5.85	663.7 ± 252.5 ^a	0.0 ± 0.1 ^b	0.3 ± 0.0 ^a
11.7	434.0 ± 47.4 ^a	0.2 ± 0.3 ^{ab}	0.4 ± 0.0 ^a

(라) 빵의 loaf volume

○ 전체적으로 유의적인 차이는 없었으나, 단백질 가수분해물이 첨가량이 증가함에 따라 loaf volume은 감소하는 경향을 나타내었다. 특히 6.85 g과 13.7 g의 가수분해물이 첨가된 시료의 경우 loaf volume이 크게 감소하였다. 색도 다소 짙어지는 외관을 나타내었다 (Fig. 3-3-25). 단백질 가수 분해물이 효소의 activity를 떨어뜨려 발효과정에서 생성되는 gas의 양이 작아 다소 작은 loaf volume을 나타낸 것으로 사료된다.

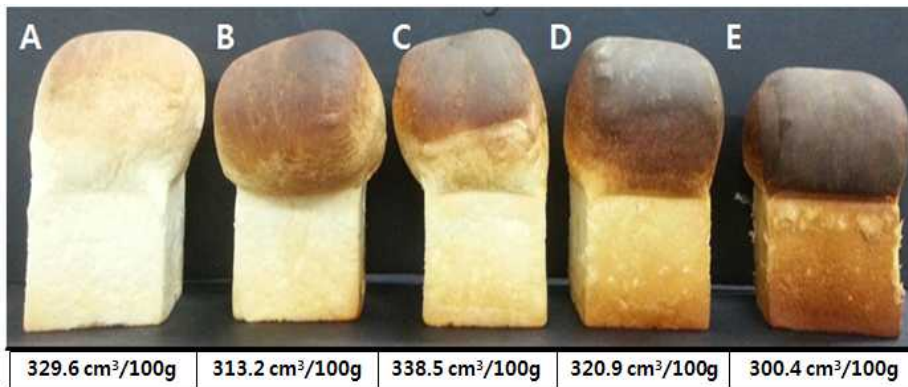


Fig. 3-3-25. 단백질 가수 분해물 농도에 따른 식빵의 부피에 미치는 정도, A: Control, B:1.73 g, C: 3.425 g, D: 6.85 g, E: 13.7 g.

(마) 빵(속질)의 pH

○ 단백질 분해물 첨가에 따른 빵의 pH 측정 결과를 비교해 본 결과를 아래 Fig. 3-3-26에

나타내었다. 가수분해물의 pH는 약 6으로 제빵 대조구의 pH인 5.64보다 다소 높은 값을 나타내었다. 가수분해물 첨가량이 증가함에 따라 pH는 점차적으로 증가하는 경향을 나타내었는데, 이는 가수분해물 자체의 상대적으로 높은 값으로 발효과정에서 발생한 유기산이 있을지라도 다소 간섭을 받아서 높은 값으로 증가하는 경향을 나타낸 것으로 사료된다.

- Loaf volume이 낮게 나타나는 경향과 비추어 유추해 보면 효모의 활성이 다소 떨어져 유기산 형성 양과 이산화탄소 형성 량이 적게 나타나 그에 따른 pH값이 높게 나타나는 것으로 사료된다.

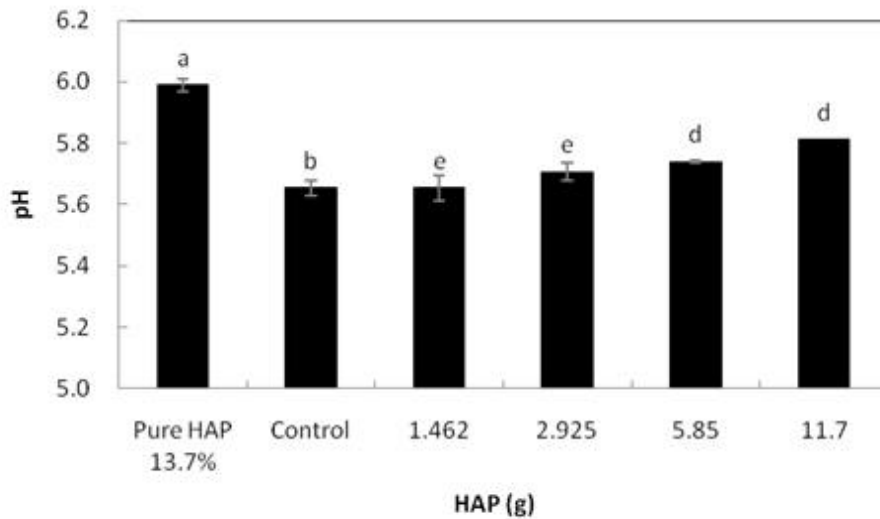
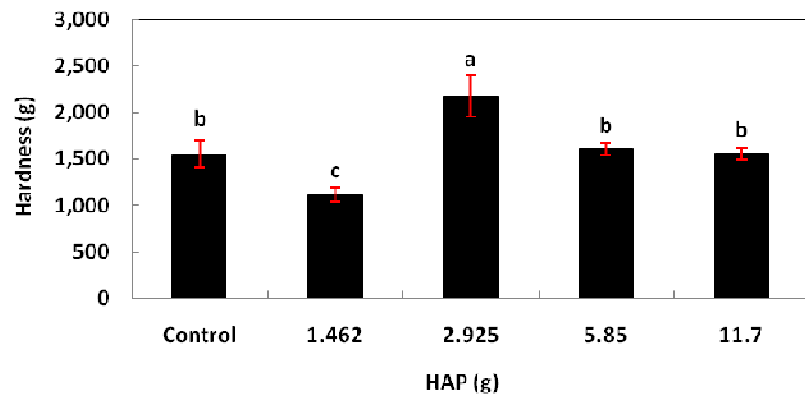


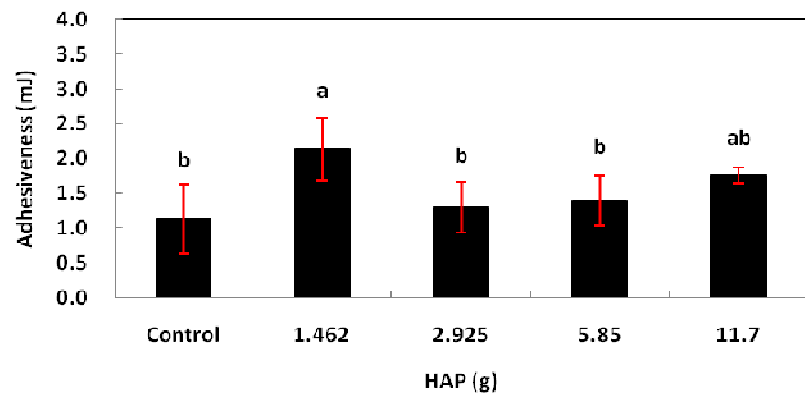
Fig. 3-3-26. 순수 가수분해물 (HAP)과 가수분해물 첨가량의 따른 식빵의 pH 변화량.
(6) 빵의 텍스처 (crumb과 crust의 hardness와 adhesiveness 측정)

- Crust (표면) 경도를 측정해 본 결과 가수분해물 2.925 g을 첨가해준 처리구의 경우에서 가장 높은 경도를 나타내었고, 1.462 g의 가수 분해물의 경우 가장 낮은 경도를 나타내었다. 부착성은 1.462 g이 첨가된 시료의 경우 가장 높은 값을 나타내고 다른 시료들은 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Fig. 3-3-27).
- Crumb (속질) 경도를 측정해 본 결과 시료간의 유의적인 차이는 나타나지 않았고, 부착성의 경우 분해물 첨가의 농도가 증가할수록 다소 증가하는 경향을 나타내었다. 단백질 분해물이 빵의 조직 감에 다소 영향을 미쳐 속질의 물성이 변화하는 것을 알 수 있었다.

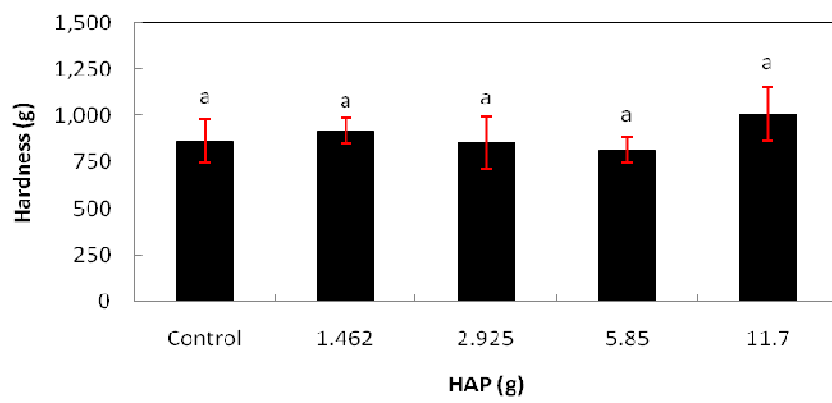
A



B



C



D

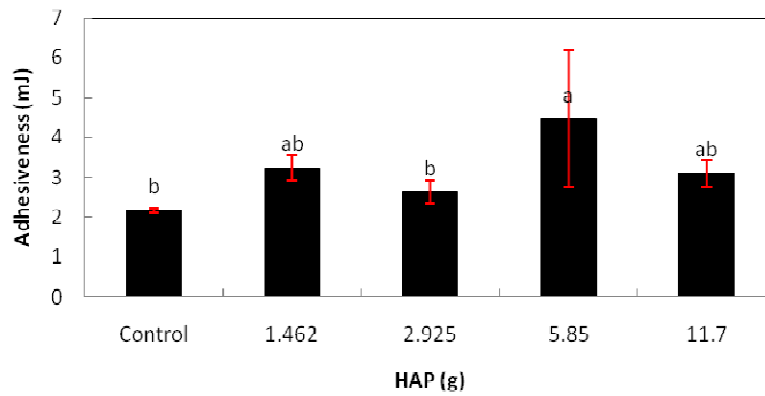


Fig. 3-3-27. 가수분해물 (HAP) 첨가량에 따른 식빵의 겉껍질 (A와 C) 및 속질 (B와 D)의 경도 (A와 B) 및 부착력 (C와 D) ($p < 0.05$).

(바) 입자의 기공 크기 분포도

- 단백질 가수 분해물이 다소 저농도로 첨가 되었을 때 기공의 평균 크기는 대조구에 비해 다소 적은 크기를 나타내었고, 고농도로 첨가 되었을 때 기공의 크기는 현저하게 증가 되는 것으로 나타났다(Table 3-3-28).
- 이러한 경향은 누적도수로 나타낸 그래프에서도 비슷한 양상을 나타냈다. 이는 후에 나오는 관능 평가 결과와도 연관되어 있는데 기공의 크기가 작게 형성되어도 짠맛에 대한 단백질 가수 분해물의 짠맛 강화역할에 따라 증진 효과는 기대할 수 있다(Fig. 3-3-20).

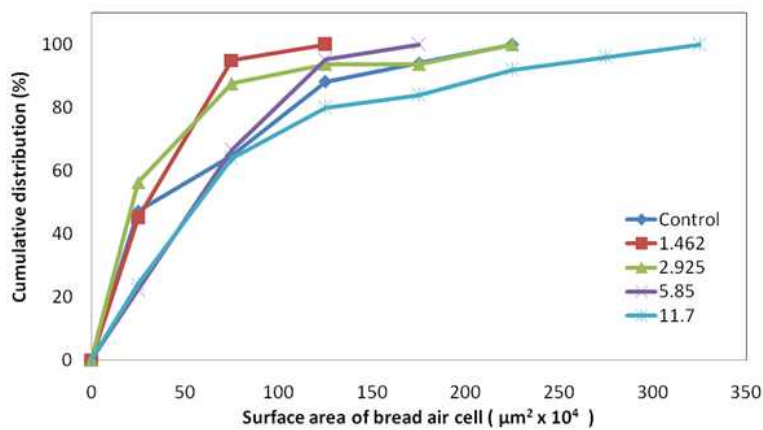


Fig. 3-3-28. 단백질 가수 분해물 첨가량에 따른 식빵의 기공 크기 분포도.

Table 3-3-20. 단백질 가수 분해물 첨가량에 따른 식품의 평균 크기 비교

Unit : $10^4 \mu\text{m}^2$

Con	1.462	2.925	5.85	11.7
80.9±61.9	61.0±25.8	58.4±52.8	80.8±32.2	110.5±90.2

(사) 기공의 현미경 관찰

○ 기공은 아래 Fig.과 같이 둥근 모양과 다소 타원형의 모양도 함께 관찰할 수 있었다. 앞에서 측정한 결과값과 유사하게 기공의 크기는 가수분해물의 농도가 짙어질수록 다소 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 3-3-29).

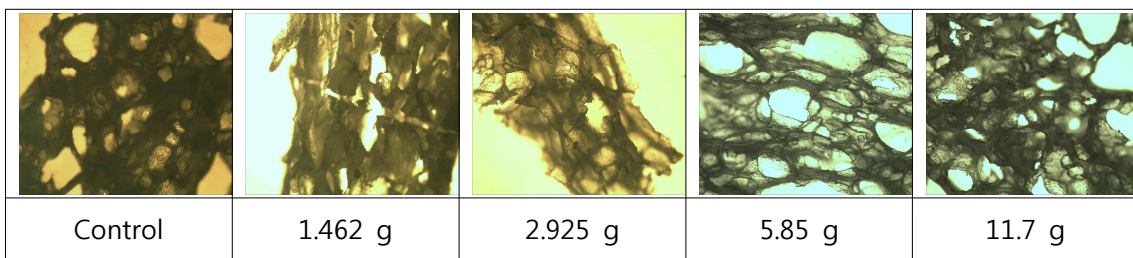


Fig. 3-3-29. 가수분해물 첨가량에 따른 식빵 속질의 기공 관찰.

(아) 소금의 용출 속도

○ 소금의 용출 속도는 대조구의 경우 가장 빠르게 유리되어 나왔고, 그 뒤로, 단백질 분해물 양이 증가할수록 NaCl이 유리되는 속도가 느려지는 것으로 나타났다(Fig. 3-3-30). 이는 단백질 분해물에 내재되어 있는 소금의 양을 배제한 뒤 부가적으로 소금을 첨가해 주어 전체적인 소금의 양을 2%로 고정시켜 주었는데, 첨가된 별도의 소금의 양이 많을수록 해리되어 물속에 녹아드는 소금의 양이 많아 빠른 속도로 검출되는 것으로 사료된다.

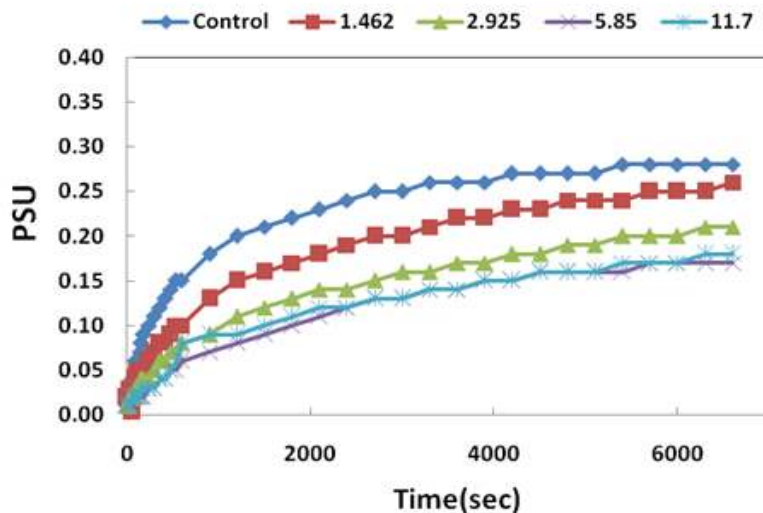


Fig. 3-3-30. 가수분해물 첨가량에 따른 식빵의 소금 용출 속도.

(자) 관능검사 (경기대 위탁)

- 본 관능검사 결과도 앞에서 기술한 바와 같이 순위 값이 합이 낮을 때 강도 값이 높은 것을 나타내거나 선호도가 높은 것을 의미한다. 즉 값이 작을수록 짠맛에 대한 강도를 높게 느끼는 것이다.
- 표에 따르면 짠맛의 경우 대조구와 비교했을 때 짠맛을 강하게 느끼는 경우 단백질 분해물을 1.712 g, 3.425 g 첨가했을 경우 상대적으로 높은 짠맛을 느끼는 것으로 나타났고, 첨가물의 농도가 6.85 g, 13.7 g으로 다소 배로 증가했을 경우 짠맛에 대해서 오히려 덜 느끼는 것으로 나타났다. 물론 통계적인 유의성을 나타내지는 않았으나 경향 분석은 이와 같았다. 신맛도 유사한 경향을 보였다(Table 3-3-21).
- 짠맛에 대한 기호도는 고농도의 단백질 첨가 처리구인 13.7 g 첨가 시 가장 높은 선호도를 나타내었고, 농도가 높을수록 선호도가 높게 나타났다. 처리구와 비교했을 시는 저농도 첨가 시료 1.712 g을 제외하고 선호도가 모두 높았다. 전체적인 기호도의 경우도 고농도의 단백질 첨가 군에서 높은 선호도를 나타내었고, 대조구와 비교했을 경우 저농도 첨가구에서 낮은 선호도를 나타냈다. 이는 향이나 기공 균일성, 수분함량, 혹은 crumb, curst 색 경향과도 유사하게 나타났다.
- 방사성 관능 평가 분포도 결과를 분석해본 결과 대조구에 유사한 결과 값을 나타내는 처리구는 3.425 g의 단백질 가수 분해물이 첨가된 처리구가 가장 대조구와 유사한 결과는 나타내었다. 대조구를 기준으로 미량 혹은 상대적 다량의 가수 분해물 첨가를 할 경우 여러 가지 이화학적 관능 평가 기준이 대조구와 다른 경향을 나타내는 것을 알 수 있었다. 이는 맛에 대한 평가에서도 유사하게 나타났다(Fig. 3-3-31).
- 결과적으로 단백질 가수 분해물은 동일한 소금이 함유되어 있는 제빵의 경우 특정 농도만큼 첨가 시켜주면 짠맛에 대해 증진 효과가 있는 것으로 나타났고, 약간의 신맛도 증진되는 것을 알 수 있었다. 그에 따른 적합한 농도는 1.712 g으로 매우 적은 양만의 첨가가 효과적인 것을 알 수 있었다. 이에 대한 심도 있는 고찰은 제3협동에서 분석한 결과와 비교분석할 수 있으리라 사료된다.
- 기존 실질적인 첨가량 대비 약 20% 소금 함량을 줄여도 동일한 짠맛의 식빵을 제조할 수 있고, 제빵 적성도 구현되었다.

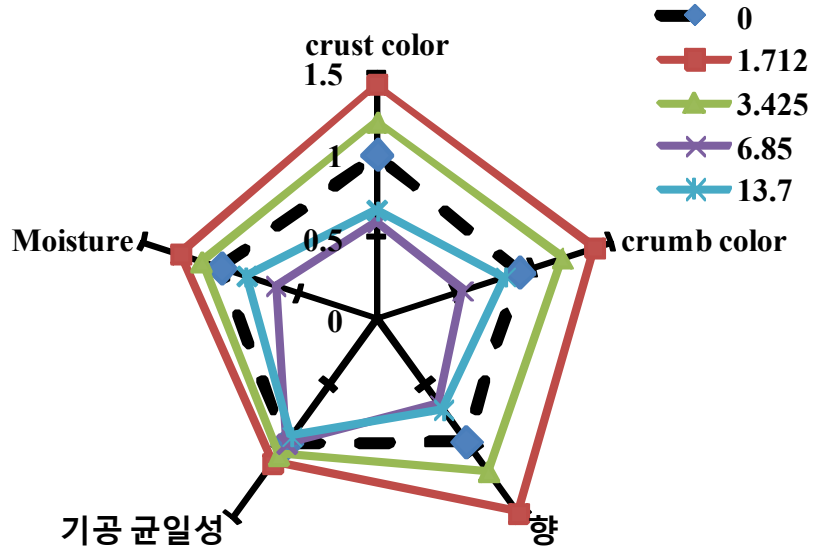


Table 3-3-21. 가수분해물량에 따른 식빵의 관능검사

측정 항목	단백질 가수분해물 (g)				
	0	1.712	3.425	6.85	13.7
crust color	80 ^B	114 ^C	96 ^C	47 ^A	53 ^A
crumb color	73 ^B	112 ^C	95 ^B	44 ^A	66 ^B
향	74 ^B	117 ^C	92 ^B	52 ^A	55 ^A
기공 균일성	75 ^A	87 ^A	82 ^A	75 ^A	71 ^A
Moisture	80 ^A	101 ^C	90 ^A	52 ^A	67 ^A
짠맛	77 ^A	61 ^A	70 ^A	97 ^B	85 ^A
단맛	76 ^B	104 ^C	94 ^C	55 ^A	61 ^B
신맛	85 ^B	46 ^A	63 ^B	97 ^C	99 ^C
짠맛 기호도	86 ^B	110 ^C	81 ^B	61 ^B	52 ^A
전체적 기호도	81 ^B	113 ^C	97 ^C	44 ^A	55 ^A

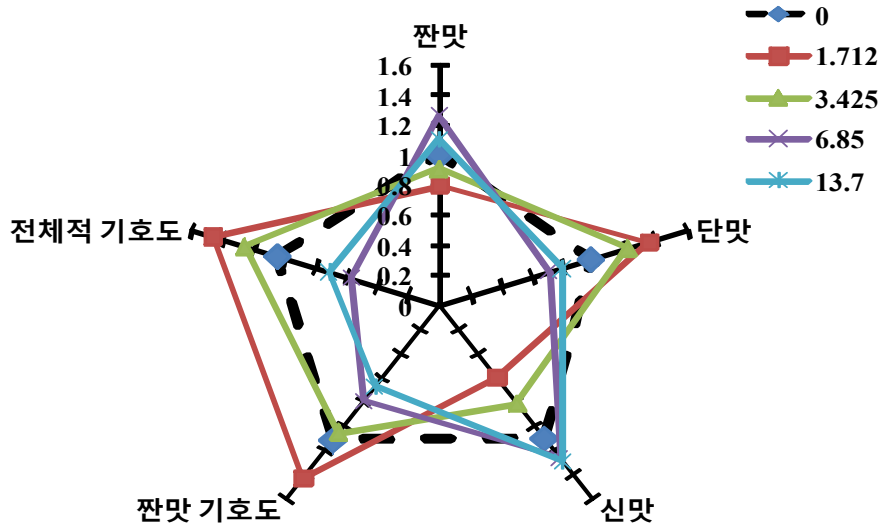


Fig. 3-3-31. 가수분해물량에 따른 식빵의 관능검사.

3. 염미강화제 혹은 대체염을 이용한 저염 육제품 개발

가. GABA 혹은 MSG가 첨가된 육제품 개발 방법

(1) 염미 강화제가 첨가된 돼지고기 패티 제조 방법

○ 돼지의 육 80%와 지방 20%에 1.5% 소금과 증진제 (GABA 혹은 MSG) 혼합물을 첨가하여 돼지고기 패티를 제조하였다. 아래 Table 3-3-22와 같이 소금과 첨가제의 농도를 다음과 같이 다양하게 조절해주었다. 모든 재료를 균질하고 95°C에서 패티의 중심온도가 75°C 될 때 까지 수조에 넣고 가열해 주었다.

Table 3-3-22. 돼지고기 패티 재료

재료 (%)		
돼지고기 육부위	80	
돼지고기 지방부위	20	
	NaCl	MSG or GABA
소금과 증진제 혼합물	1.5	0
	1	0.5
	0.5	1
	0	1.5

(2) 돼지고기 패티의 물리적 및 관능적 특성 관찰(경기대 위탁)

- 증진제가 함유된 돼지고기 패티의 다음과 같은 물리적 특성을 관찰하였다. 텍스처 (경도, 응집력), 소금용출 속도를 제조 후 실온으로 냉각한 후 실시 하였다.
- 각 시료는 2cm 큐브형으로 절단하고, 무작위로 선정된 번호를 부여하여 순위법을 이용하여 검사하였다. 측정항목은 짠맛, 다즙성, 부드러운 정도, 전체적인 기호도 였으며 이 때 강도 및 선호도에 따라 순위를 선정하는 순위법으로 실시하였고 결과의 분석을 rank sum 방법으로 Kramer's 통계차트를 활용하였다.
- 가열감량: 고기패티의 가열 종료 후 실온으로 냉각하였다. 가열 전 무게와 가열 후의 차를 가열전 무게 대비 100분율로 환산하여 계산하였다.
- 텍스처-경도 및 부착성 측정: 경도 및 부착성은 CT3 Texture Analyzer (BROOKFIFLD, USA) 이용하여 측정하였다. 이때 측정조건은 TA43 sphere 25.4 mm D (BROOKFIFLD, USA) 프로브를 사용하였으며, target value 10 mm, trigger load 20 g, test speed 0.50 mm/s, target type 10 mm distance, 2 cycles 이었다.

(3) GABA 혹은 MSG가 첨가된 육제품 적성 분석

(가) 가열감량

- 소금의 첨가수준을 1.0% 이하로 저하시켰을 때 MSG의 첨가량을 증가해 줌에 따라 가열 감량이 유의적으로 증가하였다. 이는 소금에 의한 염용성 단백질 추출이 감소한 데 기인한 것으로 판단된다. 반면 관능평가에서 다즙성은 소금을 0.5%까지 감소시키더라도 유의적인 차이를 보이지 않았다. MSG는 제품의 수분결합력(water binding)에는 효과가 없는 것으로 판단된다.
- 본 연구에서는 유화형 소시지가 아닌 햄버거 패티를 이용하였고, 햄버거 패티는 완전분쇄가 아닌 일부 분쇄만으로 제조되기 때문에 소금 첨가량의 저하에 따라 가열감량이 유의적으로 증가하였다. 하지만 이상의 문제는 세절형 소시지 제조에서는 일부 결착제의 활용을 통하여 보완할 수 있을 것으로 기대되며, 이를 통하여 가열감량을 낮추고 효과적으로 NaCl 사용량을 감소시킬 수 있을 것으로 보인다. 반면 동일하게 GABA 자체는 수분결합력에 영향을 미치지 않고 있으며, 따라서 소금을 GABA로 대체한 결과 높은 가열감량을 보인 것으로 보인다(Fig. 3-3-32).

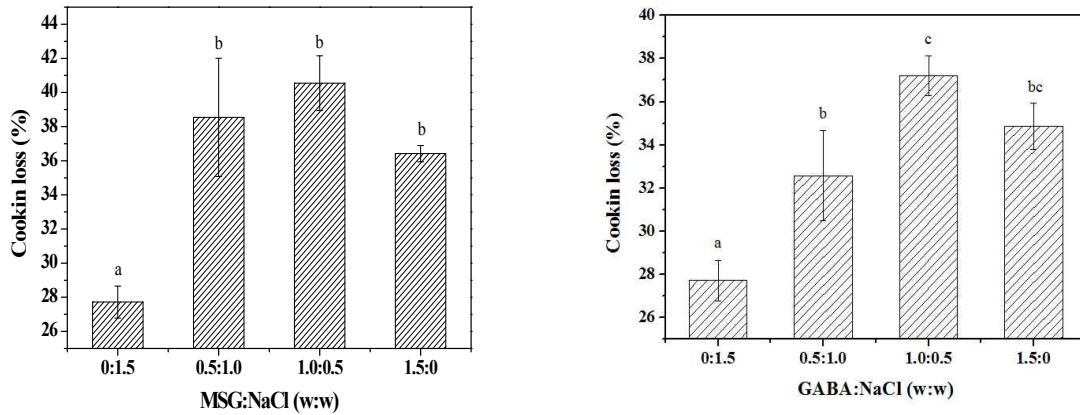


Fig. 3-3-32. MSG (왼쪽) 및 GABA (오른쪽) 첨가량에 따른 돼지고기 패티의 가열감량 변화

(나) 경도와 부착성

- 소금 첨가수준을 낮추더라도 제품 자체의 결합력에는 차이가 없어서 MSG를 사용하는데 문제가 없는 것으로 보인다. 유의차는 없었지만 경도 측면에서 1.5% MSG 처리구는 가장 높은 경도의 경향을 보였는데 이는 가열감량으로 인한 수분 손실에 기인한 것으로 보인다. 반면 응집력(Adhesiveness)에서는 0.5% MSG 처리구에서 높은 수치를 보였고, 따라서 일부 소금함량을 MSG로 대체하는 경우 효과적으로 소금 함량을 낮추면서 제품의 조직특성에는 영향을 미치지 않을 것으로 기대된다. 특히 부분 분쇄방식의 패티가 아닌 완전 세절형 소시지를 제조하는 경우 소금을 효과적으로 MSG로 대체할 수 있을 것으로 보인다.
- GABA의 경우마찬가지로 높은 가열감량에 기인하여 소금을 GABA로 대체할수록 경도가 증가하는 경향을 보이지만 패티 자체의 높은 편차수준으로 유의적 차이는 보이지 않았다 (Fig. 3-3-33).

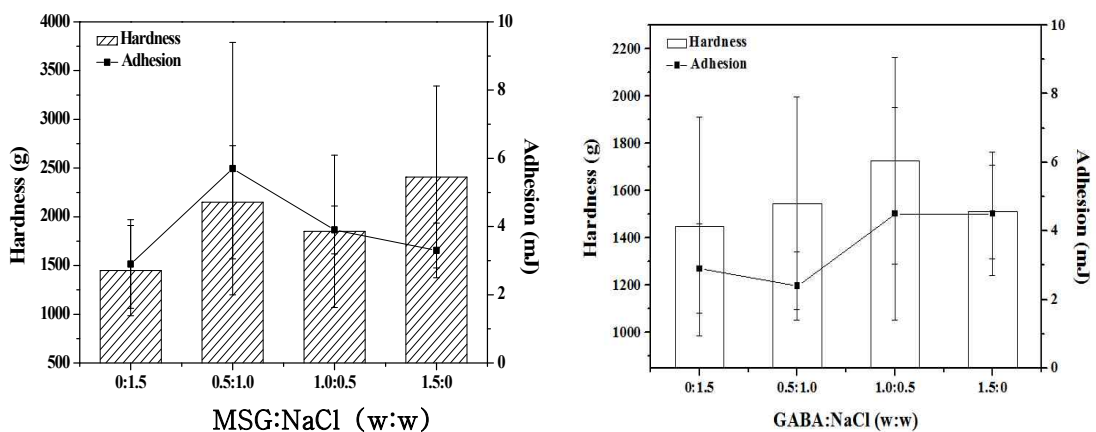


Fig. 3-3-33. MSG (왼쪽) 및 GABA (오른쪽) 첨가량에 따른 돼지고기 패티의 경도 및 부착성 변화.

(다) 소금 용출 속도

○ 소금의 용출 농도가 가장 높은 것은 대조구의 경우로 소금의 양이 가장 많은 시료에서 가장 먼저 용출되어 나왔다. MSG의 경우 enhancer의 농도가 짙어 질수록 소금의 용출되는 속도는 상대적으로 천천히 진행되었다. 이는 GABA의 경우도 동일하게 나타났다(Fig. 3-3-34).

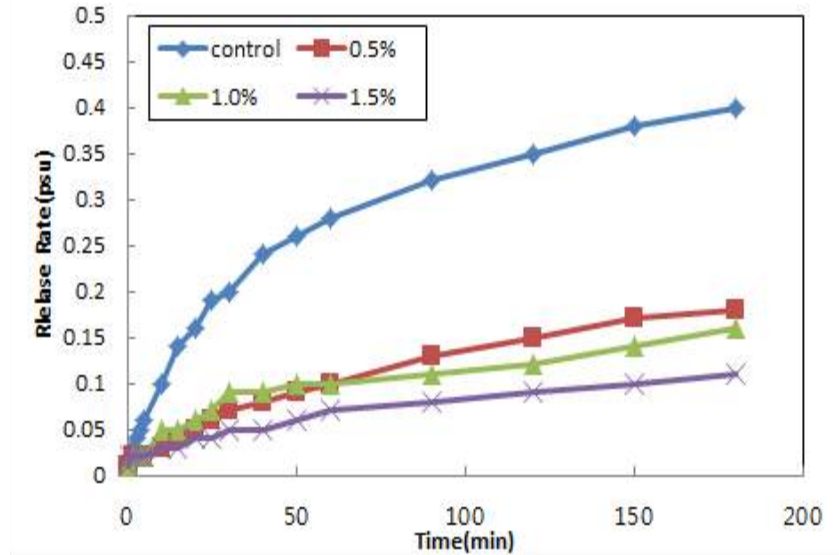


Fig. 3-3-34. MSG(위)와 GABA(아래)가 첨가된 돼지고기 패티의 소금 용출 속도.

(라) 관능검사 [경기대 위탁]

○ MSG의 경우 짠맛의 경우 대조군과 비교해 본 결과 소금의 양을 줄이고 MSG의 양을 증가해 줄수록 짠맛이 강화되는 경향을 알 수 있었다(Fig. 3-3-35). 이는 MSG내 포함된 나트륨 함량이 일정 부분 기여하여 짠맛을 보다 강하게 느낀 것으로 사료된다. 전체적인 기호도나 juiciness, tenderness 값도 유사한 경향을 나타내었다.

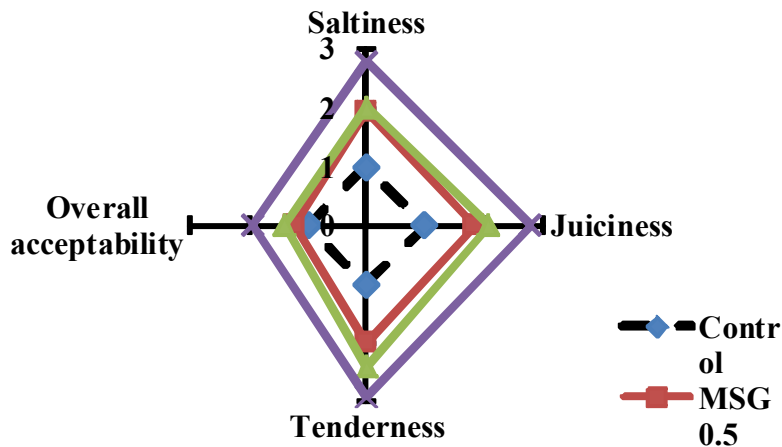


Fig. 3-3-35. MSG 함량에 따른 고기패티의 관능검사.

○ GABA의 경우는 오히려 첨가 농도가 증가할수록 짠맛에 대한 강도나 기호도가 떨어지고 전체적인 결과에 부정적인 영향을 미쳤다. 이는 GABA가 지니고 있는 특유의 향이 돼지고기 패티 관능에 영향을 다소 미친 것으로 생각이 들고, 상대적인 소금 함량의 감소로 짠맛에 대한 증진 효과 없이 전체적인 기호도는 떨어지는 경향만 야기 했다(Fig. 3-3-36).

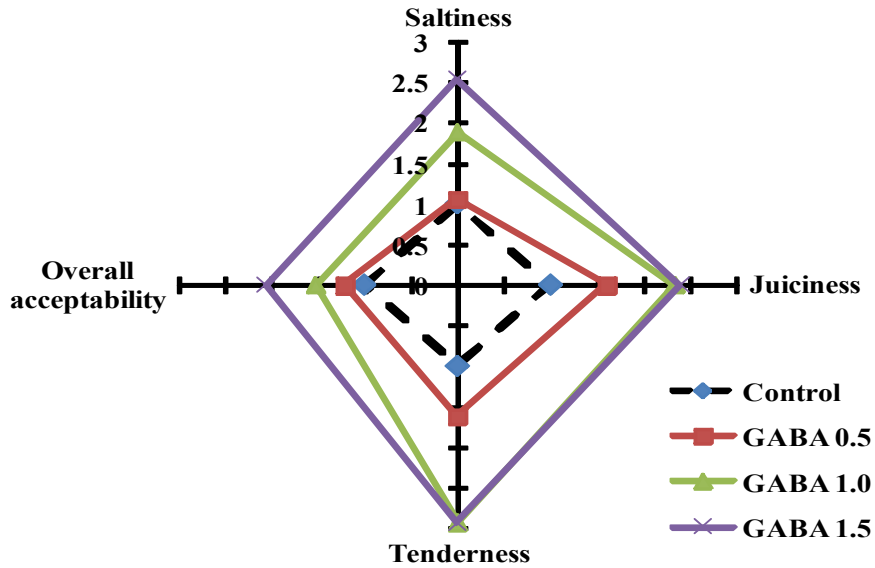


Fig. 3-3-36. GABA 함량에 따른 고기패티의 관능검사.

나. 대체염(KCl, CaSO₄, MgSO₄)이 첨가된 육가공 제품 개발

(1) 염미 대체제가 첨가된 돼지고기 패티 제조 방법

○ 돼지의 육 80%와 지방 20%에 1.5% 소금과 대체염 (KCl, CaSO₄, MgSO₄) 혼합물을 첨가하여 돼지고기 패티를 제조하였다. 아래 Table 3-3-23과 같이 소금과 첨가제의 농도를 다음과 같이 다양하게 조절해주었다. 모든 재료를 균질하고 95°C에서 패티의 중심온도가 75°C 될 때 까지 수조에 넣고 가열해 주었다.

Table 3-3-23. 돼지고기 패티 재료

재료 (%)		
돼지고기 육부위	80	
돼지고기 지방부위	20	
	NaCl	대체염
	1.5	0
소금과 대체염 혼합물	1	0.5
	0.5	1
	0	1.5

(2) 돼지고기 패티의 물리적 및 관능적 특성 관찰(경기대 위탁)

- 증진제가 함유된 돼지고기 패티의 다음과 같은 물리적 특성을 관찰하였다. 텍스처(경도, 응집력), 소금용출 속도를 제조 후 실온으로 냉각한 후 실시 하였다.
- 각 시료는 2cm 큐브형으로 절단하고, 무작위로 선정된 번호를 부여하여 순위법을 이용하여 검사하였다. 측정항목은 짠맛, 다즙성, 부드러운 정도, 전체적인 기호도 였으며 이 때 강도 및 선호도에 따라 순위를 선정하는 순위법으로 실시하였고 결과의 분석을 rank sum 방법으로 Kramer's 통계차트를 활용하였다.
- 가열감량: 고기패티의 가열 종료 후 실온으로 냉각하였다. 가열 전 무게와 가열 후의 차를 가열전 무게 대비 100분율(%)로 환산하여 계산하였다.
- 텍스처-경도 및 부착성 측정: 경도 및 부착성은 CT3 Texture Analyzer (BROOKFIFLD, USA) 이용하여 측정하였다. 이때 측정조건은 TA43 sphere 25.4 mm D (BROOKFIFLD, USA) 프로브를 사용하였으며, target value 10 mm, trigger load 20 g, test speed 0.50 mm/s, target type 10 mm distance, 2 cycles 이었다.

(3) 대체염(KCl, CaSO₄, MgSO₄)이 첨가된 육제품 적성 분석

(가) 가열감량

- 가열 감량의 결과를 살펴보면 KCl의 경우 농도에 상관없이 가열감량이 대조구보다 다소 높게 나타났다. CaSO₄의 경우도 마찬가지로 대조구에 비해 다소 높은 가열감량을 가져왔으나 농도에 따른 처리구 간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Table 3-3-24).
- MgSO₄의 경우도 다른 처리구와 마찬가지로 대조구에 비해 다소 높은 가열감량을 나타내었으나 농도에 따른 처리구간 차이는 나타나지 않았다.

Table 3-3-24. 대체염 종류 및 농도에 따른 가열감량

	control	KL	KM	KH
before cooking (g)	573±36.6	568.5±4.95	572.5±2.1	575.5±20.5
after cooking (g)	414±41.0	386.5±19.1	426.5±10.6	397.5±6.4
cooking loss (%)	159±1.4	182±14.1	146±12.7	178±14.1
cooking loss (%)	28%	32%	26%	31%

	CL	CM	CH
before cooking (g)	591.5±72.8	594.5±17.7	590±11.3
after cooking (g)	405±55.1	409±28.3	406.5±10.6
cooking loss (%)	186.5±17.7	185.5±10.6	183.5±0.7
cooking loss (%)	32%	31%	31%

	ML	MM	MH
before cooking (g)	545±39.6	564±31.1	542±4.2
after cooking (g)	473±41.0	454.5±27.6	396±1.4
cooking loss (%)	72±1.4	109.5±3.5	146±5.6
cooking loss (%)	13%	19%	27%

(나) 경도와 부착성

- KCl의 경우 농도가 증가할수록 경도는 유의적인 차이가 없었고, 부착성은 다소 감소하다가 증가하는 경향을 나타내었다. CaSO₄의 경우에는 농도가 증가할수록 경도는 증가 하였으나, 부착성은 전체적으로 감소하였고 농도간의 유의적인 차이는 없었다.
- MgSO₄의 경우는 경도의 경우 저농도를 제외하고 대조구와 차이가 없었고, 부착성의 경우 대조구보단 전체적으로 낮은 값을 나타내었으나 농도가 증가할수록 부착성은 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 3-3-37).

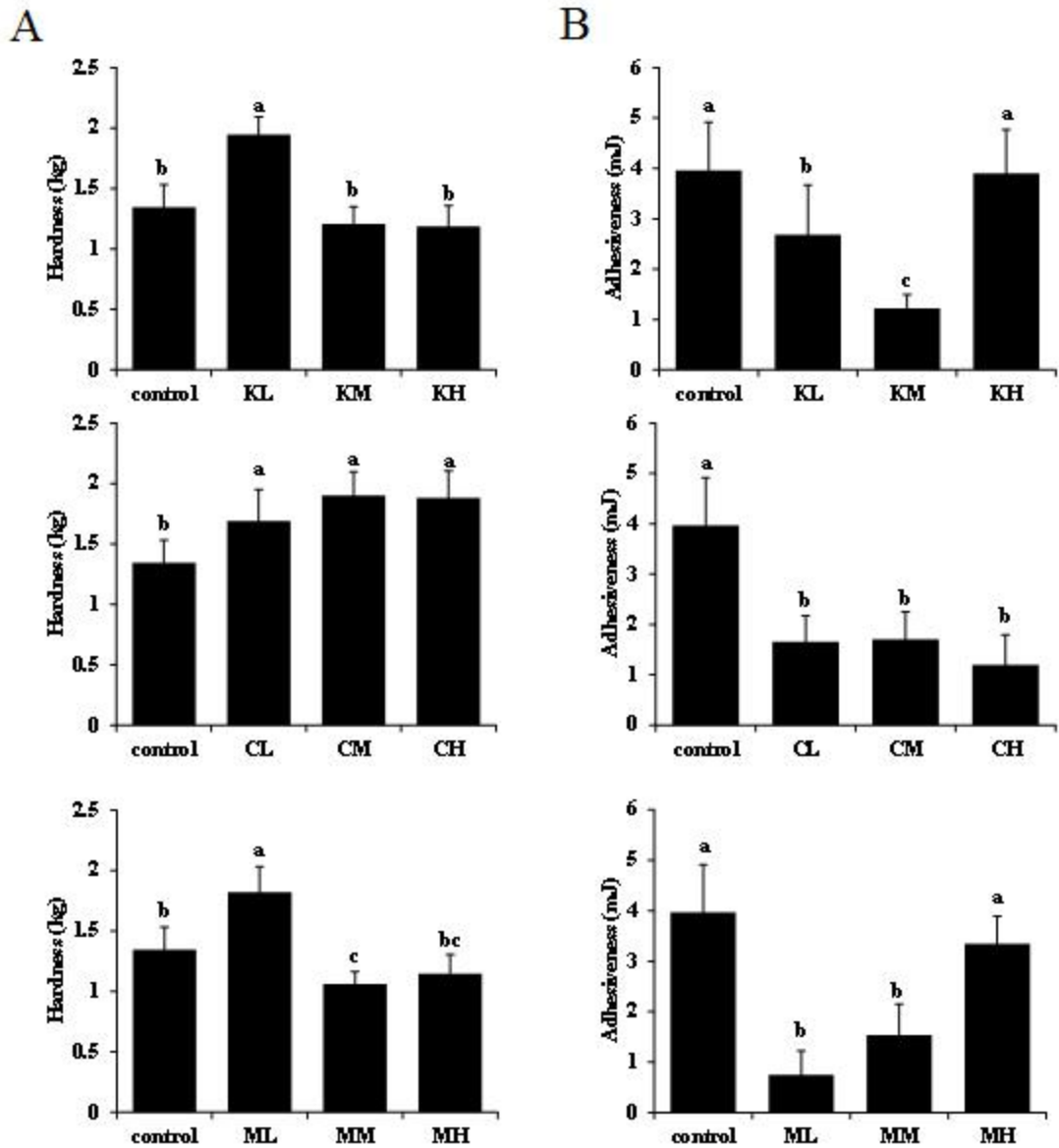


Fig. 3-3-37. 대체염 종류 및 첨가 농도에 따른 돼지고기 패티의 경도 및 부착성. L (저농도), M (중간농도), H (고농도).

(다) 소금 용출 속도

○ 전체적으로 소금의 용출 농도는 대조구에서 가장 빠르게 나타났다. 이는 소금의 농도가 가장 많은 시료에 해당되어 가장 빠르게 고농도로 방출 되는 것을 알 수 있다. 모든 대체염에서 대체염의 농도가 증가할수록 소금의 용출되는 속도는 늦어지는 것을 알 수 있었다(Fig. 3-3-38).

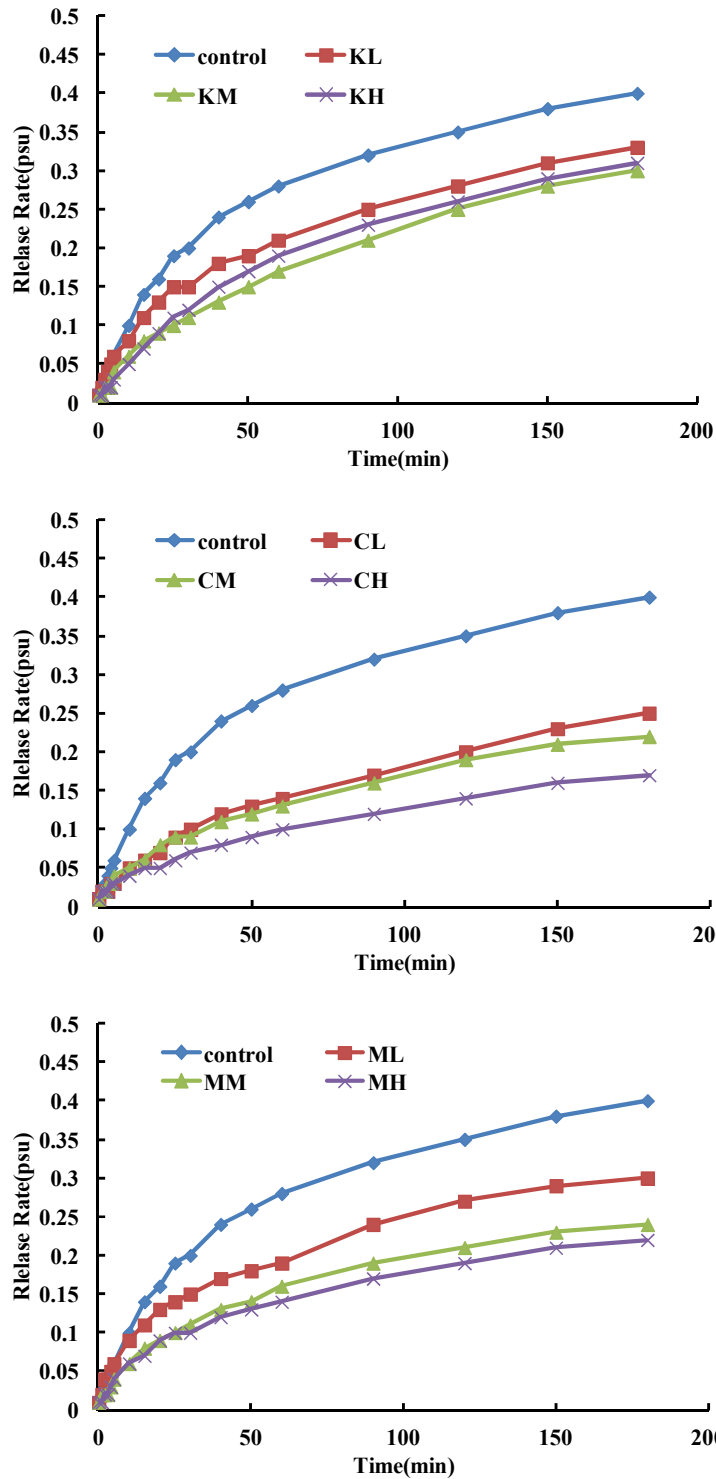
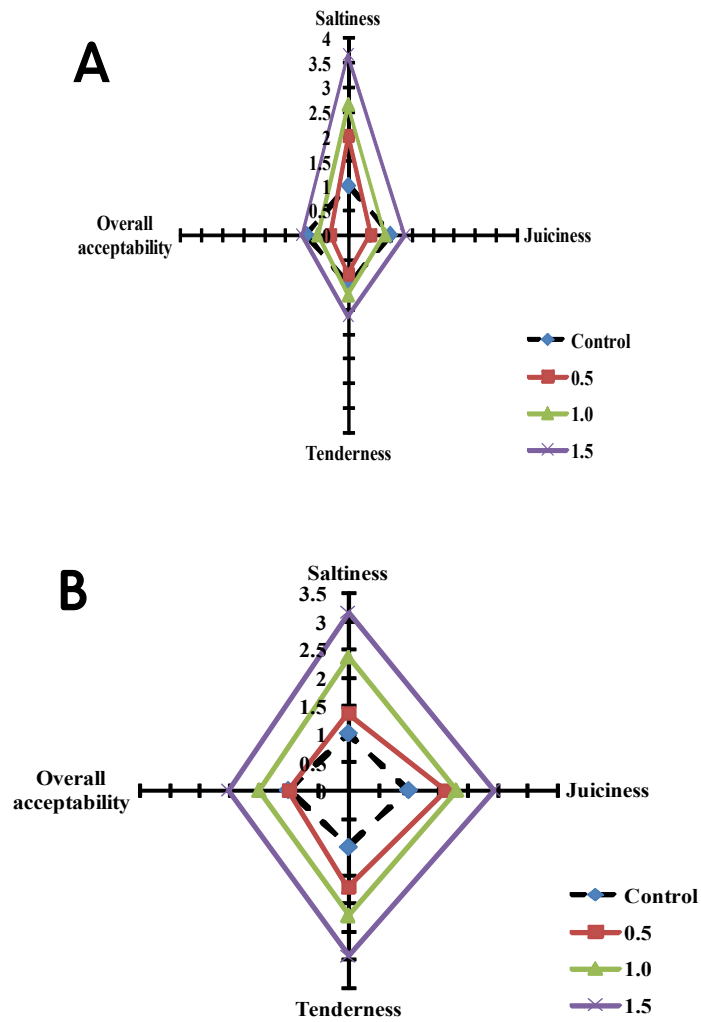


Fig. 3-3-38. 대체염 종류에 따른 고기 패티의 소금 용출 속도.

(라) 관능검사 [경기대 위탁]

○ $MgSO_4$ 의 경우 소금의 양이 대체염으로 대체될수록 짠맛에 대해 잘 느끼지 못하는 것으로 나타났다, 전체적인 기호도나 다즙성 등은 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다. $CaSO_4$ 의 경우는 대조구에서 짠맛이 가장 강하게 나타났으며, 농도가 짙어 질수록 짠맛에 대한

강도는 낮아졌다. 전체적인 기호도 다짐성, 부드러움에 대한 강도도 동일한 결과를 나타내었다. KCl도 동일한 결과를 나타내었다. 소금이 일부 첨가되고 대체염의 농도를 증가시킨 결과 enhancer의 역할과는 달리 염도 증가에 대한 효과는 나타나지 않았다(Fig. 3-3-39).



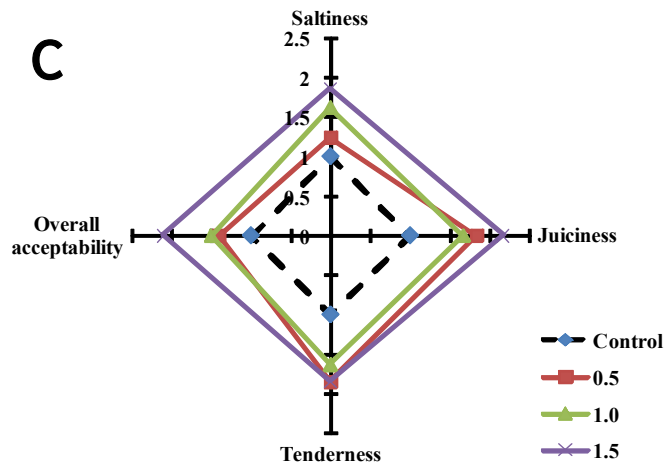


Fig. 3-3-39. 대체염 종류 및 첨가농도에 따른 관능검사 A: MgSO₄, B: CaSO₄, C: KCl.

4. 소금의 불균일 분포도를 이용한 저염 제면 제조법 개발

가. 소금의 불균일 분포를 위한 제면 제조 방법

(1) 제면용 리포솜 소금 제조 방법

- 리포솜 소금의 제조는 100 mL 증류수를 기준으로 2% w/v 레시틴과 5, 10, 15, 20% w/v NaCl을 30분간 교반시킨 후 High speed homogenizer(T25 digital ULTRA TURRAX, IKA, Germany)를 이용하여 11,000 rpm으로 5분간 균질하였다. 그 후, Ultrasonicator(HD-2200, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Germany)를 이용해 40% power로 3분간 2차 균질해준다.
- 최적화된 20% NaCl 농도를 가지고서 리포솜 소금 용액 제조 후, 6시간 동안 -80℃에서 deep freezing을 해주고, freezing dryer를 이용하여 1주일간 동결건조를 하여 건조된 제면용 리포솜 소금을 얻었다.
- 리포솜으로 코팅 후 입자의 크기를 측정(Zeta-Sizer[®] Particle Characterization System from Malvern)해 주었고, 동결건조 후 건물의 수분함량은 AOAC 법에 따라 105℃ 상압 건조 가열법으로 측정하여 나타내었다.

(2) 리포솜 코팅된 소금을 첨가한 국수의 제조 방법

- 소금과 리포솜으로 코팅된 소금은 아래의 표(Table 3-3-25)처럼 준비하고 밀가루 100 g 기준으로 물 45 ml을 반죽기(5K5SS, KitchenAid, Benton Harbor, Michigan, USA)를 이

용하여 반죽을 한다. 대조구의 경우 코팅하지 않은 소금을 밀가루 100 g 기준 2 g을 넣어 주었고, 처리구의 경우 아래 Table 3-2와 같이 여러 농도에서 실시해 주었다.

Table 3-3-25. Amount of salt and liposome encapsulated salt in noodle

	Non-coated salt (g)	Encapsulated salt within liposome (g)
Control	2.0	0
0.5% LE*	1.5	0.5
1.0% LE	1.0	1.0
1.5% LE	0.5	1.5
2.0% LE	0	2.0

*LE : Encapsulated salt within liposome

○ 반죽이 완료되면 제면기(noodles machine, BE-8000, Bethel, Korea)를 이용하여 반죽하였고, 완성된 반죽 100 g을 끓는 물 1000 mL에서 3분 조리하여주고, 면 표면의 전분을 없애 서로 엉키는 것을 방지하기 위하여 1분간 흐르는 물에 수세한다.

(3) 리포솜 코팅된 소금이 포함된 국수의 물리적 특성 검사

○ Moisture contents : 향량을 재어둔 칭량병을 이용하여 시료 2 g 씩 담아 105℃에서 상압 가열법에 의해 건조시켜서 소수점 셋째자리가 바뀌지 않을 때까지 측정하여주었다.

○ Cook properties : 국수의 조리특성은 반죽 100 g을 1000 mL의 끓는 물에 넣고 3분간 조리 후 체에 받쳐 1분 동안 찬물에 헹구고 10분간 자연건조 후 중량을 측정하였다. 조리면의 부피는 중량을 측정 후 바로 300 mL의 물을 채운 메스실린더에 국수를 넣은 후 증가하는 물의 부피로 측정하였다. 조리면의 수분 흡수율은 삶아서 측정한 국수의 중량에서 생면의 중량을 빼고 다시 생면의 중량으로 나눈 값에 100을 곱하여 구하였다. 조리국물의 탁도는 삶은 국수를 건져낸 물을 상온에서 냉각한 후 UV spectrophotometer를 사용하여 289 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Water absorption (\%)} = \frac{\text{조리 후의 생면의 중량 (W1)} - \text{조리 전의 생면의 중량 (W0)}}{\text{조리 전의 생면의 중량 (W0)}} \times 100$$

○ Texture analyze of flour : 반죽의 강도는 5 g의 반죽을 가지고 구 형태 (지름 2 cm)로 규격화 한 뒤 측정을 진행하였고 Texture analyzer(CT3-1000, Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, MA, USA)를 이용하였다. TPA type(Texture Profile Analysis)에서 50%의 변형률로 trigger load는 80 g, test speed는 2.5 mm/s의 속도로 측

정하였다. 변형률을 측정하는 TA25/1000 probe(Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, MA, USA)와 TA-BT-KI fixture(Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, MA, USA)를 사용하였다.

- Texture analyze of noodle : 조리한 면의 강도는 Fig. 3-3-40처럼 면을 15 cm로 자른 후 지름 2 cm의 짜리 형태로 말아 1 cm 높이로 맞춘 후 측정하였다. TPA type에서 20%의 변형률로 trigger load는 10 g, test speed는 1.0 mm/s의 속도로 측정하였다. 변형률을 측정하는 TA25/1000 probe와 TA-BT-KI fixture를 사용하였고 각 측정 시료는 3회 이상 반복 측정하여 평균값과 표준편차로 표시하였다.



Fig. 3-3-40. Method of texture analysis of noodle.

- Color measurement : 색도는 Chroma meter(CR-400, Konica Minolta, Inc., Tokyo, Japan)를 사용하여 명도(lightness)를 나타내는 CIE L* -값, 적색도(redness)를 나타내는 CIE a* -값 및 황색도(yellowness)를 나타내는 CIE b* -값을 3회 반복 측정하였다. 이때 표준색은 CIE L* -값이 47.05, CIE a* -값이 26.51, CIE b* -값이 15.44인 calibration plate를 표준으로 사용하였다.
- Salt release rate : Frasc-Melnik (2010)의 실험방법을 수정하여 소금의 용출 속도를 측정하였다. 본 실험에서는 식빵 시료 2 g을 거즈로 감싼 후에 증류수 100 mL에 넣고 750 rpm으로 섞어주며 염도계(Seven Compact™ S230 Conductivity meter, METTLER TOLEDO International Inc., Schwerzenbach, Switzerland)를 이용하여 측정하며 용출된 측정값이 변화가 없는 시점까지 관찰하였다.

(4) 관능검사 방법 [경기대 위탁]

- Sensory test : 패널은 1,2차년도에서 실시한 실험법으로 짠맛에 대해 훈련시킨 전문가

패널을 이용하였다. 짠맛이 가장 강한 것부터 낮은 숫자로 하여 가장 짠맛이 약한 것까지 순서를 선정하는 순위법(Rank method, Kramer 등 1974)을 사용하였고 Fig. 3-3-41의 평가표를 이용하여 관능검사를 실시하였다.

국수 시료의 소비자 검사를 위한 설문지

본 설문지는 다양한 국수에 관한 귀하의 의견을 조사하기 위한 것입니다. 여러분의 응답 내용은 연구의 귀중한 자료가 되오니 문항출력 없이 읽고 피곤함이 동반될 수 있으니 주의하십시오. 응답내용은 순수 연구 목적 이외의 다른 곳에는 사용되지 않을 것을 약속드립니다.

나이 (만) _____ 세 성 별 _____

※ 다음의 시료를 왼쪽부터 오른쪽까지 맛본 후, 해당문항에 맞는 순위를 순서대로 정하십시오. 먼저 풀포 입술 가져 주십시오. 한 시료를 맛본 후, 다음 시료를 맛보기 전에 풀포 입술 가져 주십시오.

1. **종합적인 외관**
본인이 생각하는 국수에 적합한 순으로 순위를 나타내십시오.

	196	311	495	792	967
순위	_____	_____	_____	_____	_____
2. **색 (color)**
본인이 생각하는 국수에 적합한 순으로 순위를 나타내십시오.

	196	311	495	792	967
순위	_____	_____	_____	_____	_____
3. **조직감 (texture) - 풀깃한 정도**
본인이 생각하는 국수에 적합한 순으로 순위를 나타내십시오.

	196	311	495	792	967
순위	_____	_____	_____	_____	_____
4. **향 (aroma) - 강도가 높은 시료에서 낮은 시료로 나타내십시오.**
본인이 생각하는 국수에 적합한 순으로 순위를 나타내십시오.

	196	311	495	792	967
순위	_____	_____	_____	_____	_____
5. **짠맛 (Taste) - 강도가 높은 시료에서 낮은 시료로 나타내십시오.**
본인이 생각하는 국수에 적합한 순으로 순위를 나타내십시오.

	196	311	495	792	967
순위	_____	_____	_____	_____	_____
6. **짠맛의 기호도 - 짠맛의 선호도가 높은 시료에서 낮은 시료로 나타내십시오.**
본인이 생각하는 국수에 적합한 순으로 순위를 나타내십시오.

	196	311	495	792	967
순위	_____	_____	_____	_____	_____
7. **종합적인 기호도 (overall acceptance)**
본인이 생각하는 국수에 적합한 순으로 순위를 나타내십시오.

	196	311	495	792	967
순위	_____	_____	_____	_____	_____

응답해주셔서 감사합니다.^^

Fig. 3-3-41. Sensory evaluation form.

나. 리포솜 소금의 최적 농도 조건 확립

(1) 소금 농도별 수율 및 수분함량

○ 5, 10, 15, 20%의 소금과 2%의 레시틴을 증류수에 섞어 균질한 결과 5% NaCl을 제외한 혼합물에서 3시간 저장보관을 한 뒤에 분리현상을 관찰할 수 있었다. 또한 동결건조 후의 수율은 42.67, 40.36, 39.24, 37.72%로 NaCl의 농도가 낮을수록 큰 수율을 나타내었다.

○ 외관상에서는 5, 10, 15, 20% NaCl에 따른 차이를 보이지 않았다(Fig. 3-3-42).

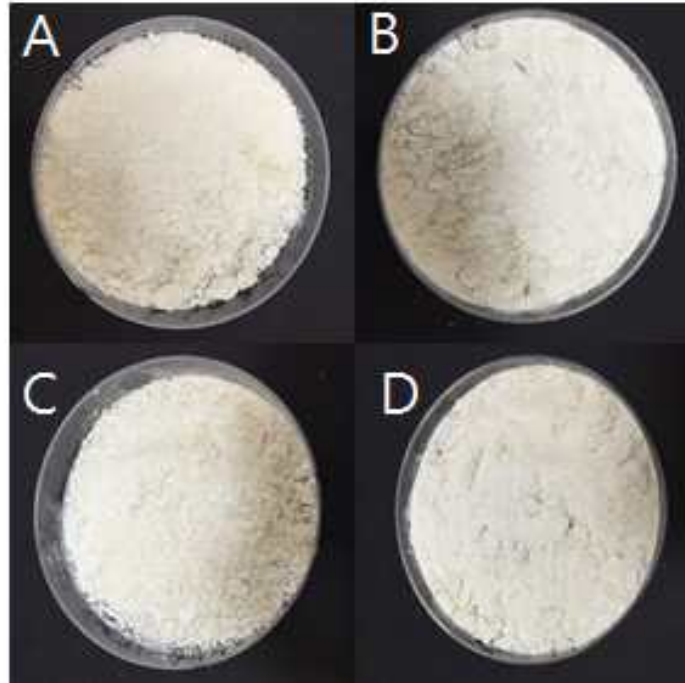


Fig. 3-3-42. Liposome encapsulated salt; A: 5% NaCl, B: 10% NaCl, C: 15%NaCl and D: 20% NaCl.

○ 수분함량은 대조구와 시료 간에 유의적인 차이를 나타내었으며($p < 0.05$), 리포솜 소금의 농도가 높아질수록 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 3-3-43).

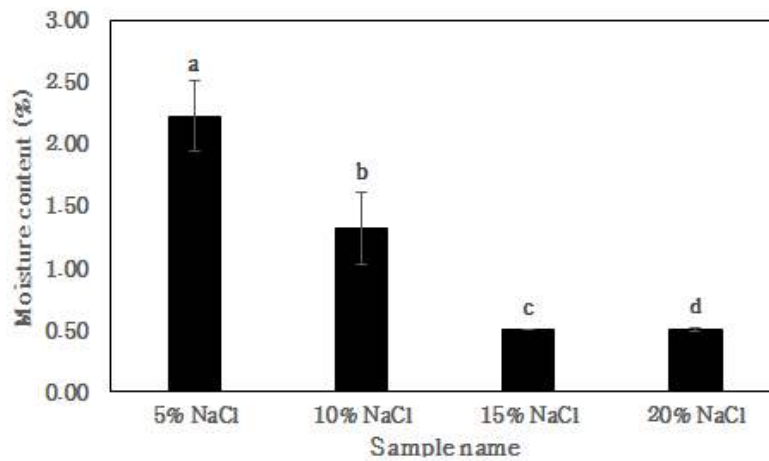


Fig. 3-3-43. Moisture contents of liposome encapsulated salt. ^{a-c} Means with same alphabet in a row are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test. LE means liposome encapsulated salt.

(2) 소금 농도별 입자 크기 결과

- 초기 입자크기의 경우 106.48, 144.47, 179.97, 202.03 nm으로 소금의 함량이 증가할수록 크기가 증가하는 것을 나타내었다. 또한 3시간 보관 후의 입자 크기의 결과는 272.53, 187.90, 174.30, 215.10 nm로 관찰되었다. 입자를 썰 때 적정 농도를 나타내는 수치로 mean count rate을 측정하는데 전체적으로 200-400 kcps 범위로 들어가 크기 및 제타 값이 유효함을 알 수 있었다(Table 3-3-26).
- 제타 값은 입자의 안정성을 예측할 수 있는 값으로 보통 전하량의 부호 값과 상관없이 절대 값이30이상일 때 안정성이 크고 분산이 오래 안정적일 것으로 예측한다. 따라서 본 실험에서 얻어진 리포솜 코팅 소금은 액상 상태에서 입자의 안정성이 떨어지는 것을 알 수 있었다.
- 또한 5%의 소금은 음의 전하를 띠고 있다가 10%부터 양의 부호로 전환 되는 것을 알 수 있었고 소금의 농도가 높을수록 그 값이 증가하는 것을 알 수 있었다. 이는 기본적으로 레시틴이 지니고 있는 음의 전하량에서 소금이 첨가됨으로써 해리되어 발생하는 Na⁺의 양이 증가되어 양의 분호로 증가되는 것으로 사료된다.
- 입자의 크기를 보면 입자는 전체적으로 200 nm 미만으로 나타났고, 소금의 농도가 증가할수록 입자의 크기는 증가하는 것으로 나타났다. 상대적으로 20% NaCl에서 처음의 크기와 저장후의 크기 차이가 가장 작은 것으로 관찰되었다. 또한 초기 20% NaCl 입자 크기 분포도와 저장 후의 분포도에서 다른 처리구의 농도에서 보다 가장 안전한 것을 관찰할 수 있으며, 이를 리포솜 소금의 최적농도로 정하여 다음 실험을 진행하였다.

Table 3-3-26. Zeta-potential and size of liposome encapsulated salt

	Z-Ave (d.nm)	Mean Count Rate (kcps)	PdI	ZP (mV)
5% NaCl	106.48±14.73	281.80±2.42	0.38±0.06	-0.73±0.44
10% NaCl	144.47±43.50	316.87±6.80	0.25±0.05	2.07±1.23
15% NaCl	179.97±26.60	323.07±3.46	0.17±0.13	3.50±2.38
20% NaCl	202.03±25.55	291.87±4.40	0.21±0.09	3.63±2.75

Table 3-3-27. Zeta potential and size of liposome encapsulated salt after 3 hours

	ζ-Ave (d.nm)	Mean Count Rate (kcps)	PdI	ZP (mV)
5% NaCl	272.53±14.60	245.67±1.83	0.25±0.02	7.53±1.87
10% NaCl	187.90±25.58	287.93±2.03	0.39±0.06	4.85±1.38
15% NaCl	174.30±15.23	302.53±0.74	0.29±0.05	8.26±0.57
20% NaCl	215.10±2.84	125.73±0.31	0.23±0.03	6.27±1.39

- 3시간이 지난 뒤 입자의 크기 및 제타 값을 측정해 본 결과 입자의 크기도 다소 증가 되어 있고 제타 전위 값도 전체적으로 상승하였다. 이는 입자가 다소 불안정하다는 것을 알

수 있다. 따라서 제조한 입자를 바로 동결건조하여 건물 상태의 분말 가루를 얻어 제면 제조를 실시해 주었다(Table 3-3-27).

○ 그 결과는 Fig. 3-3-44에서 입자 크기 분포도를 통해서도 알 수 있는데, 소금의 농도가 낮은 쪽에서 다소 단분상 분포도를 보이다가 농도가 높아질수록 다분산상으로 분포되는 것을 알 수 있다. 이러한 결과가 평균값이 영향을 미치고 제타 값에도 영향을 미치는 것으로 알 수 있다.

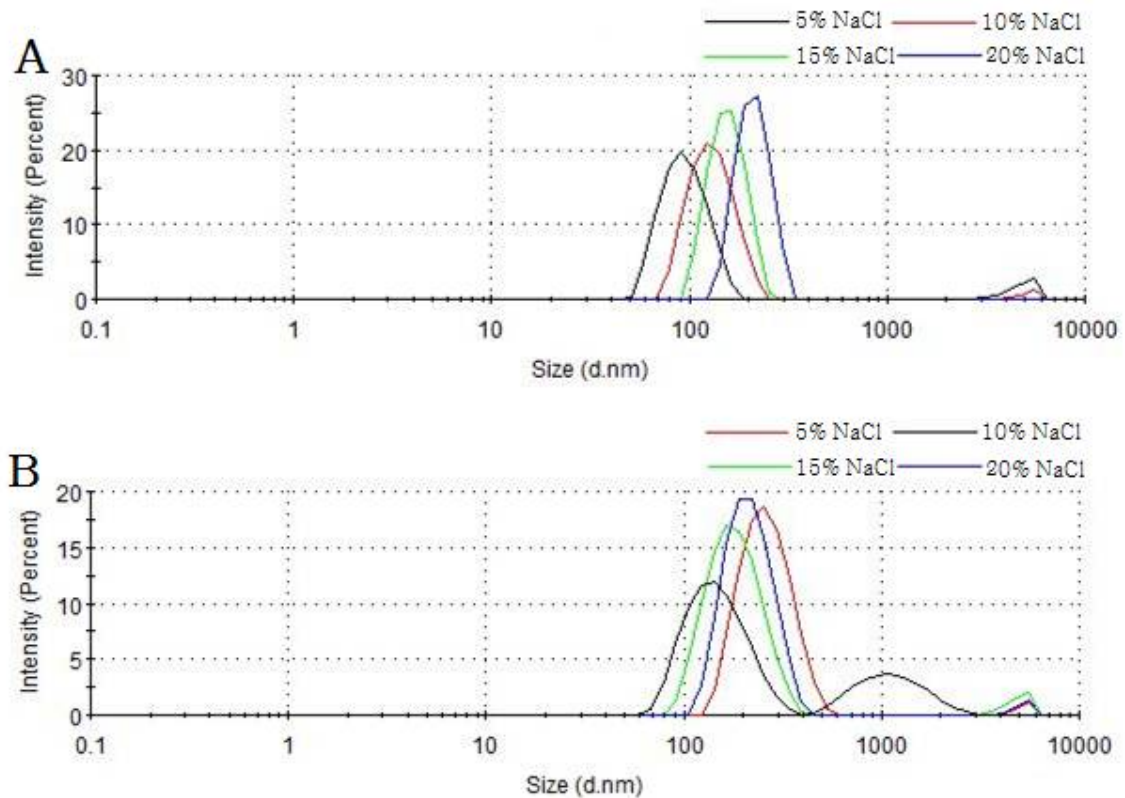


Fig. 3-3-44. Size distribution by intensity; A: measurement immediately, B: storage for 3 hours.

다. 리포좀 소금을 첨가한 제면의 물리적 특성 분석

(1) 조리 특성

○ 리포좀 소금이 첨가된 면의 조리 특성의 결과는 아래의 표(Table 3-3-28)에 나타내었다. 제조된 면을 상기한 바대로 조리한 뒤 국수의 부피 변화값, 국수의 함유량, 그리고 국물의 탁도를 나타내는 UV값으로 측정하였다. 부피변화는 대조구와 처리구간 차이는 없었고, 면의 함유량은 대조구와 2%의 경우 다소 적은 값을 나타내었고 1.0%의 경우 42%로 함유량이 높게 나타났다. 국물의 탁도를 관찰한 결과 대조구에서 가장 탁도가 낮은 것으로 나타났고 다른 시료들과 유의적인 차이를 나타내었고, 처리구 중에서는 1.5% LE에서

가장 큰 결과를 나타내었으며 처리구 간에서도 유의적이 차이를 나타내었다.

- 전체적으로 리포솜으로 코팅된 소금이 첨가되어 제조 되었다 하여도 제면 자체의 적성에 큰 차이를 나타내지 않았다.

Table 3-3-28. Cooking properties of noodle added liposome encapsulated salt

	Cook properties		
	Noodle volume (cm ³)	Noodle water absorption (%)	UV absorption of noodle soup (nm)
Control	28.20	35.21	0.51±0.07 ^d
0.5% LE*	29.60	38.09	0.91±0.08 ^b
1.0% LE	30.40	42.25	0.79±0.01 ^c
1.5% LE	29.40	38.53	1.18±0.10 ^a
2.0% LE	28.80	35.88	0.56±0.07 ^d

^{a-d} Means with same alphabet in a column are not significantly different at $p<0.05$ using Duncan's multiple range test.

*LE : liposome encapsulated salt.

(2) 색도 측정

- 반죽의 명도와 황색도의 경우 대조구와 시료들 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다 ($p<0.05$). 명도의 경우, 시료들 간에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 적색도의 경우 대조구와 2.0% LE은 유의적으로 차이를 보였지만 다른 처리구들과는 차이를 보이지 않았다. 또한 처리구 안에서도 2.0%를 제외한 나머지 처리구에서는 유의적 차이를 나타내지 않았고 리포솜 소금이 많이 들어갈수록 증가하는 경향을 나타내었다(Table 3-3-29).

- 고농도인 2.0%의 경우를 제외하고는 전체적으로 색에 대한 차이점은 나타나지 않아 색에 대한 반죽 적성에도 문제가 없는 것으로 나타났다.

Table 3-3-29. Color measurement of kneading

	L*	a*	b*
Control	83.61±0.83 ^a	-1.56±0.06 ^a	20.77±0.80 ^a
0.5% LE*	83.88±0.09 ^a	-1.51±0.04 ^{ab}	21.59±0.83 ^a
1.0% LE	83.27±0.34 ^a	-1.68±0.09 ^a	21.75±0.58 ^a
1.5% LE	83.29±0.35 ^a	-1.60±0.03 ^{abc}	20.89±0.66 ^a
2.0% LE	83.06±0.05 ^a	-1.66±0.03 ^{bc}	22.24±0.81 ^a

^{a-b} Means with same alphabet in a column are not significantly different at $p<0.05$ using Duncan's multiple range test.

*LE : liposome encapsulated salt

○ 조리면의 명도의 경우 모든 시료 간에 유의적 차이를 나타내지 않았으며 리포솜 소금의 농도가 증가할수록 명도 값이 증가하는 경향을 나타내었다. 적색도의 경우 대조구는 처리군보다 낮은 값을 나타내었으며, 1.0% LE를 제외한 나머지 시료들과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 처리군 안에서 1.0% LE 값이 가장 크게 관찰되었으며, 나머지 시료들과 유의적으로 차이가 관찰되었다. 황색도의 경우 대조구와 시료들 간의 유의적 차이를 나타내지 않았으며, 리포솜 소금의 농도가 증가할수록 값이 증가하는 경향을 나타내었다 (Table 3-3-30).

Table 3-3-30. Color measurement of noodle

	L*	a*	b*
Control	66.05±1.52 ^a	-2.97±0.13 ^b	11.26±0.16 ^a
0.5% LE*	65.44±3.27 ^a	-2.97±0.11 ^b	11.50±0.88 ^{ab}
1.0% LE	65.03±3.40 ^a	-2.63±0.03 ^a	11.69±0.21 ^{ab}
1.5% LE	67.05±1.15 ^a	-2.95±0.07 ^b	12.38±0.22 ^a
2.0% LE	68.82±1.03 ^a	-2.96±0.17 ^b	12.33±0.45 ^a

^{a-b} Means with same alphabet in a column are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test.

*LE : liposome encapsulated salt

(3) 조직감 측정

○ 반죽의 조직감 측정 결과는 Table 3-3-31과 같고, 모든 측정 항목에서 대조구와 시료간의 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p > 0.05$). 경도에서의 결과 값은 대조구에서 가장 높은 값을 나타내었으며 리포솜 소금만을 넣어준 처리구를 제외한 대조구와 나머지 처리구에서 리포솜 소금이 증가할수록 값이 감소하는 경향을 나타냈다.

Table 3-3-31 Texture analysis of kneading

	Hardness (g)	Adhesiveness (mJ)	Cohesiveness	Springiness (mm)	Gumminess (g)	Chewiness (mJ)
Control	520.0±53.4 ^a	0.1±0.1 ^a	0.3±0.0 ^a	2.2±0.1 ^a	163.3±41.4 ^a	3.6±1.2 ^a
0.5% LE*	513.0±2.6 ^a	0.2±0.2 ^a	0.4±0.0 ^a	2.2±0.1 ^a	180.0±9.5 ^a	3.9±0.4 ^a
1.0% LE	90.3±12.3 ^a	0.0±0.1 ^a	0.3±0.0 ^a	2.2±0.2 ^a	154.0±5.2 ^a	3.5±0.2 ^a
1.5% LE	468.3±23.5 ^a	0.0±0.1 ^a	0.4±0.0 ^a	2.4±0.1 ^a	183.3±28.3 ^a	4.9±1.0 ^a
2.0% LE	07.3±58.0 ^a	0.1±0.1 ^a	0.4±0.0 ^a	2.4±0.1 ^a	182.3±18.2 ^a	4.3±0.4 ^a

^a Means with same alphabet in a column are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test.

*LE : liposome encapsulated salt

○ 조리면의 경도 측정 결과 대조구에서 가장 높은 값을 나타내었으며, 처리군 안에서 유의적인 차이를 나타내지 않았으며($p > 0.05$), 처리군 안에서 결과 값은 리포솜 소금이 증가될

수록 값이 감소하는 경향을 나타냈다(Table 3-3-32).

- 조리면의 부착성, 응집성, 탄력성의 결과 모든 시료들 간의 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p>0.05$). 검성과 씹힘성의 결과에서 대조구의 값이 처리구 값보다 크며, 리포솜 소금이 증가할수록 결과 값이 감소하는 경향을 나타냈다.
- 조직감 측정값에서 차이를 보이는 것은 제면에서 반드시 필요한 최소의 소금의 양을 충족시키지 못하기 때문이라고 사료된다.

Table 3-3-32. Texture analysis of noodle

	Hardness (g)	Adhesiveness (mJ)	Cohesiveness	Springiness (mm)	Gumminess (g)	Chewiness (mJ)
Control	548.7±46.1 ^a	0.1±0.0 ^a	0.7±0.0 ^a	2.1±0.3 ^a	448.0±123.7 ^a	9.6±4.2 ^a
0.5% LE*	460.3±35.2 ^{ab}	0.2±0.0 ^a	0.8±0.0 ^a	2.2±0.2 ^a	428.0±105.7 ^a	8.2±1.4 ^{ab}
1.0% LE	346.7±131.5 ^b	0.1±0.1 ^a	0.8±0.1 ^a	2.0±0.2 ^a	279.7±120.3 ^{ab}	5.5±2.3 ^{ab}
1.5% LE	407.7±137.6 ^{ab}	0.1±0.0 ^a	0.7±0.0 ^a	2.3±0.4 ^a	300.7±95.7 ^{ab}	6.7±2.5 ^{ab}
2.0% LE	312.0±76.4 ^b	0.1±0.2 ^a	0.7±0.1 ^a	2.3±0.2 ^a	172.7±72.9 ^b	3.5±1.6 ^b

^{a-b} Means with same alphabet in a column are not significantly different at $p<0.05$ using Duncan's multiple range test.

*LE : liposome encapsulated salt

(4) 소금 용출 속도 측정

- 조리면 소금 용출 속도는 면을 입에 넣었을 때 입 속에서 짠맛을 어느 시료가 더 빨리 염을 용출 시킬 수 있는지 간접적으로 어느 시료가 더 짠맛을 빨리 느껴지게 하는지 관찰할 수 있는 실험이다.
- 조리면 소금 용출 속도의 경우 대조구와 0.5% LE, 2.0% LE에서 가장 빠른 소금의 용출을 보였고, 용출이 75초 정도 되었을 때에는 대조구와 2.0% LE에서 가장 높은 용출 속도를 보였다. 150초가 지났을 때에는 대조구에서 가장 많은 소금이 용출된 것을 확인할 수 있다(Fig. 3-3-45).

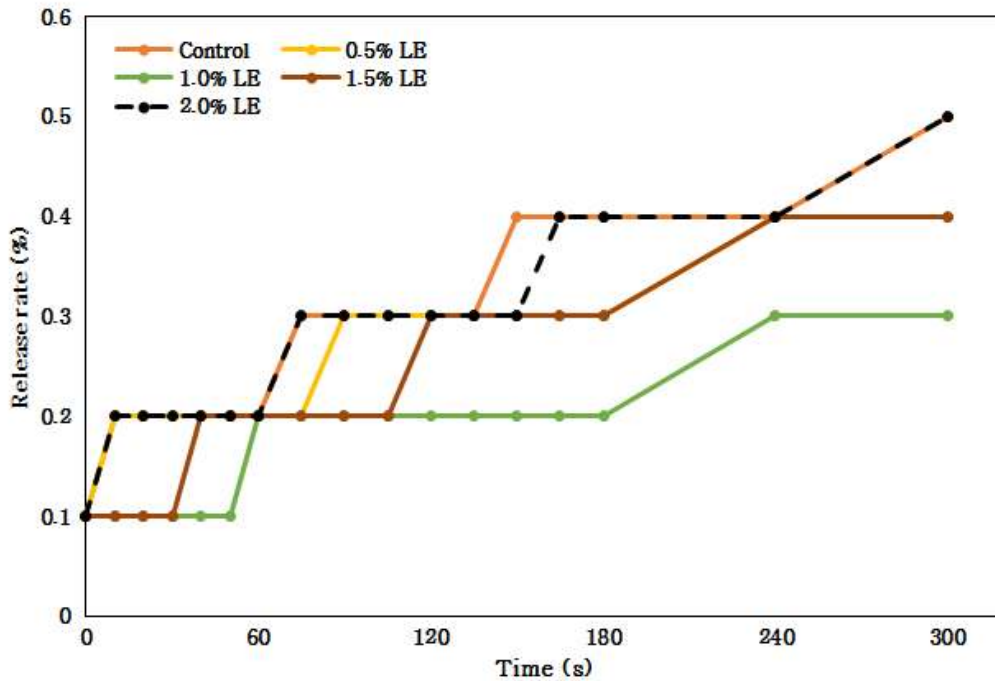


Fig. 3-3-45 Salt release rate of noodle added different amount of liposome encapsulated salt. LE means liposome encapsulated salt. LE means liposome encapsulated salt.

(5) 관능평가 - [경기대학교 위탁연구]

- 강도 및 선호도에 따라 순위를 선정하는 순위법으로 실시하였고 순위의 합이 높을 때 강도 및 선호도가 높은 것을 의미한다.
- 서로 다른 농도의 리포솜 코팅된 소금이 첨가된 면의 관능적 차이를 알아보고 리포솜 소금이 소금을 불균일하게 형성시켜 국수에서의 짠맛의 강도에 영향을 주는지 관찰하기 위해서 관능평가를 진행하였다.
- Table 3-3-33과 Fig. 3-3-46의 결과, 대조구의 짠맛과 짠맛선호도에서는 0.5% LE와 1.5% LE의 결과보다 높은 값을 나타내었으며, 1% LE와 2.0% LE의 결과보다는 낮은 값을 나타내었다. 짠맛의 경우 1.0% LE에서 가장 짜다고 느껴졌으나 짠맛의 선호도에서는 대조구와 비슷한 선호도를 나타내었으며, 2.0% LE의 경우, 짠맛은 대조구보다 더 짜다고 관찰되었고 짠맛의 선호도의 경우 가장 높은 선호도를 보였다. 그러나 전체적인 선호도의 경우 대조구와 1.0% LE에서 가장 큰 선호도를 나타내었다.
- 리포솜 소금을 제조한 뒤 제면에 첨가했을 경우 국수의 물성은 다소 떨어지기는 했으나 짠맛에 대한 강도는 강하게 느끼는 경향을 나타내었다.

Table 3-3-33. Sensory test of noodle added different amount of liposome encapsulated salt

	Control	0.5% LE*	1.0% LE	1.5% LE	2.0% LE
Appearance	60	45	58	68	69
Color	69	47	55	61	68
Texture	66	53	63	57	61
Flavor	68	45	61	66	60
Saltiness	61	50	68	57	64
Preference of saltiness	62	52	62	56	68
Overall preference	69	43	70	55	63

*LE means liposome encapsulated salt.

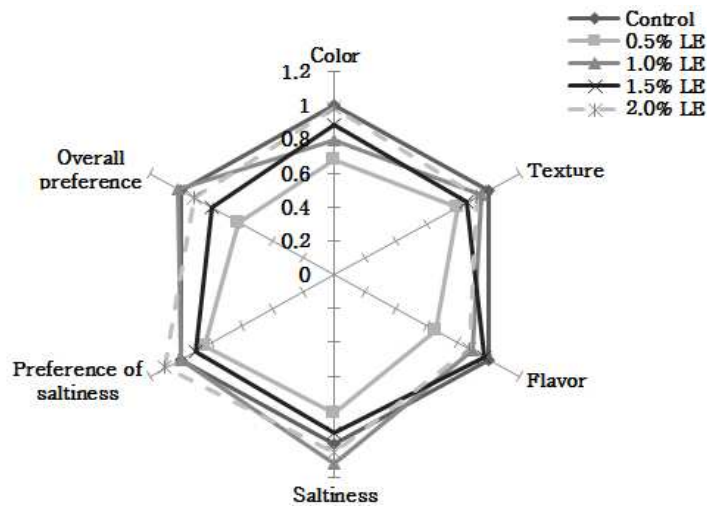


Fig. 3-3-46. Sensory test of noodle added different amount of liposome encapsulated salt. LE means liposome encapsulated salt.

라. 5 kDa 이하의 HAP가 첨가된 제면 제조 방법

(1) 분무건조 된 단백질 가수 분해물 제조 방법

- 제1세부에서 가수분해하여 얻어진 단백질 가수 분해물을 제공받아 분무건조 하여 제면에 첨가하여 국수를 제조한다.
- 총 소금의 농도는 동일하게 하되 단백질 가수 분해물을 첨가하였을 때 제면 적성을 관찰하고 관능검사에서 짠맛의 강도를 평가하여 첨가하는 단백질 가수분해물의 농도를 최적화한다.
- 액상의 HAP(hydrolysis animal protein)를 high speed homogenizer로 12,000 rpm으로 3분 균질후, 분무 건조기 SD-1000(EYELA, Tokyo, Japan)을 이용하여 건조물을 얻었다.

- 분무 건조기의 조절 인자로서 입구 온도는 증발 온도를 결정해 주는 것이고, 분사 압력은 용액을 분사할 때의 분사력이다. 또한 송풍기는 증발하는 수분을 외부로 배출해주는 송풍량을 조절해 준다(Fig. 3-3-47).
- 분무 건조 입자의 최적화를 위하여 본 실험에서는 160℃ 입구 온도(inlet temperature), 0.78 m³/min 송풍속도(blow rate), 100 kPa 분사압력(atomization pressure), 450 mL/h 용액주입속도(pump speed)로 고정하여 실험하였다.

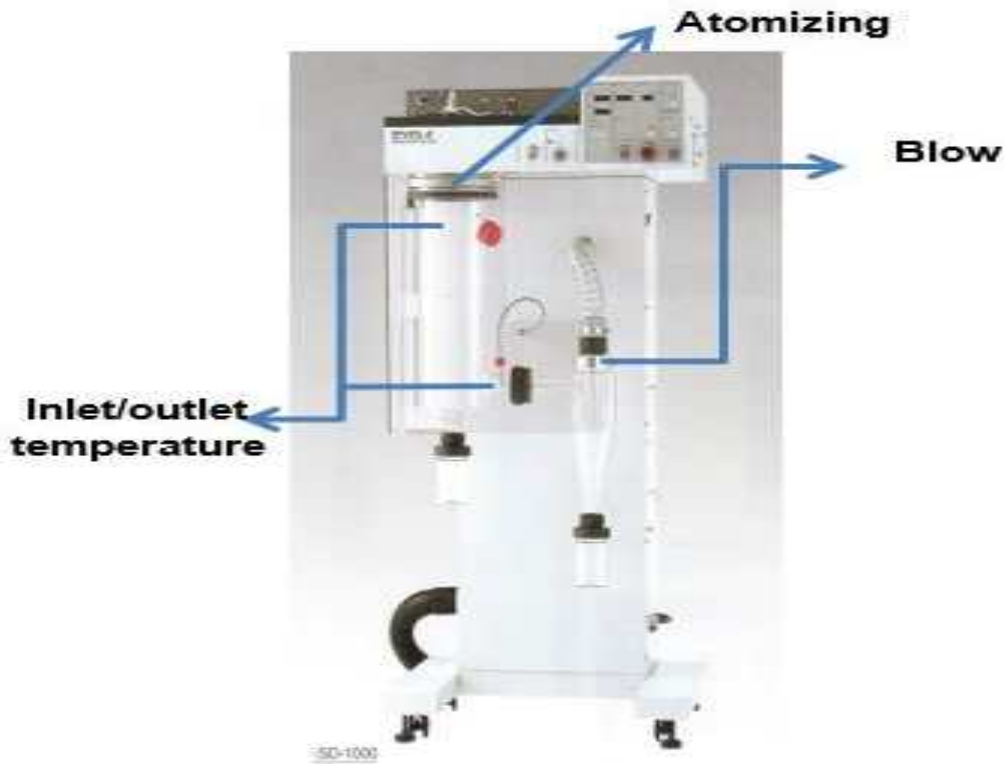


Fig. 3-3-47. Image of spray dryer and position of control factors.

(2) HAP가 첨가된 국수의 제조 방법

- 국수를 제면하는 법은 앞의 실험방법과 동일하나, 소금과 HAP의 농도는 아래의 표 (Table 3-3-34)와 같이 첨가하였다.
- NaCl 함량은 모든 시료에서 동일하게 밀가루 기준으로 2 %으로 고정하여주었다. HAP는 본래 6.7%의 Na를 함유하고 있으며, 이 때문에 HAP 안의 Na를 계산하여 그만큼 소금에서 양을 줄여 제면에 첨가하여주었다.

Table 3-3-34. Amount of salt and HAP in noodle

	Salt (%)		Liposome encapsulated salt (%)
	Formula	Actual*	
Control	2.0		
25% HAP	2.0	1.965	0.5
50% HAP	2.0	1.930	1.0
75% HAP	2.0	1.895	1.5
100% HAP	2.0	1.860	2.0
125% HAP	2.0	1.825	2.5

*Actual salt content.

(3) HAP가 첨가된 국수의 물리적 특성 분석

(가) 수율 및 수분함량

○ 분무건조된 건조물의 외관은 아래의 Fig. 3-3-48와 같다. 800 mL의 액상 HAP를 분무건조 하여 건조물을 41.53 g 얻었으며, 64.9%의 수율을 보였다. 이때 입자 크기의 분포가 다양해서 모두 수득할 수 없어 이러한 수율을 보인 것으로 사료된다. 또한 건조된 HAP는 $1.37 \pm 0.15\%$ 의 수분을 함유하고 있다.

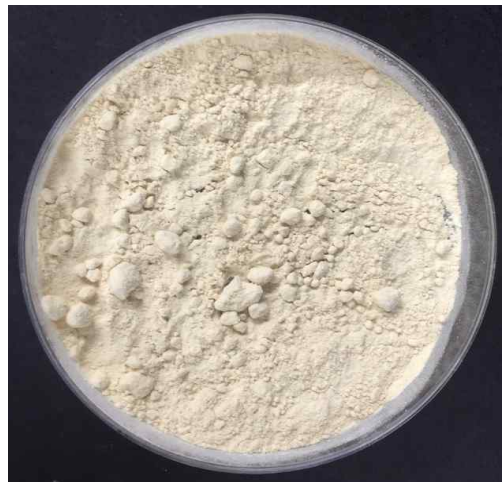


Fig. 3-3-48. HAP powder under 5 kDa manufactured by spray dryer.

(나) 조리 특성

○ 5 kDa 이하의 HAP를 첨가하여 제면한 국수의 조리 특성의 결과 아래의 표와 같다. 부피의 경우 대조구에서 가장 변화가 적었으며 75% HAP까지 가수 분해물을 첨가함에 따라 값이 증가하는 경향을 나타내었다. 부피의 변화는 수분 흡수율이 낮아 부피의 증가가 크게 변화하지 않은 것으로 사료되며 이는 수분 흡수율의 결과 값과 관련이 있는 것으로 판단된다. 또한 국물의 탁도에서 대조구의 결과 값은 25% HAP를 첨가한 처리구를 제외한 다른 처리구 보다 낮은 값을 나타내었고 유의적인 차이를 보였다(Table 3-3-35). 처리구에서 HAP의 함량이 증가할수록 탁도가 짙어지는 것을 확인할 수 있는데 이는 HAP의

고유색이 조리 시 빠져나와 국물의 탁도에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

Table 3-3-35. Cook properties of noodle added HAP powder under 5 kDa

	Cook properties		
	Noodle volume (cm ³)	Noodle water absorption (%)	UV absorption of noodle soup (nm)
Control	27.00	30.63	0.46±0.02 ^d
25% HAP	28.00	32.18	0.44±0.05 ^d
50% HAP	40.00	32.86	0.56±0.03 ^c
75% HAP	51.00	38.42	0.69±0.03 ^b
100% HAP	39.00	35.18	0.72±0.01 ^b
125% HAP	46.00	41.55	0.78±0.02 ^a

^{a-d} Means with same alphabet in a column are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test.

(다) 색도 측정

- 반죽 명도의 결과 대조구에서 가장 낮은 값을 나타내었으며, 처리구들과 유의적인 차이를 나타냈다($p < 0.05$). HAP 첨가하는 양이 증가할수록 명도의 값이 증가하는 것을 관찰 할 수 있고 처리구 내에서는 유의적인 차이를 나타내지는 않았다($p > 0.05$).
- 적색도의 경우 대조구에서 가장 낮은 값을 나타내었고, 25% HAP의 처리구를 제외한 다른 처리구와 유의적인 차이를 나타내었다($p < 0.05$). 또한 처리구에서 HAP의 함량이 높아질수록 값이 높아지는 경향을 나타내었다.
- 황색도의 결과에서는 대조구의 값이 가장 낮게 나타났으며, 대조구와 처리구 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았고 HAP의 함량이 많아질수록 값이 높아지는 경향을 나타내었다 (Table 3-3-36).

Table 3-3-36. Color measurement of kneading

	L*	a*	b*
Control	83.87±0.92 ^b	-1.43±0.15 ^b	20.19±0.14 ^a
25% HAP	85.00±1.03 ^{ab}	-1.34±0.04 ^b	20.46±0.70 ^a
50% HAP	85.18±0.43 ^{ab}	-1.11±0.04 ^a	20.36±0.60 ^a
75% HAP	85.63±0.39 ^a	-1.09±0.05 ^a	20.34±0.23 ^a
100% HAP	85.88±0.94 ^a	-1.12±0.07 ^a	20.97±0.85 ^a
125% HAP	85.75±0.78 ^a	-1.04±0.00 ^a	20.70±0.42 ^a

^{a-b} Means with same alphabet in a column are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test.

- 조리면의 대조구 명도 값은 75% HAP를 넣어주었을 때 보다 낮은 값을 나타내었지만 다른 처리구들 보다 더 높은 값을 나타내었으며, 100% HAP를 제외한 다른 처리구들과는

유의적인 차이를 나타내지 않았다.

- 대조구의 적색도는 가장 낮은 값을 나타내었고 처리구들과 유의적인 차이를 나타내었다. 처리구들 안에서는 HAP의 함량이 증가할수록 값이 높아지는 경향을 나타내었다.
- 대조구의 황색도의 경우 가장 낮은 값을 나타내었고 가장 높은 값을 나타낸 50% HAP를 제외하고 다른 처리구들과 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Table 3-3-37).

Table 3-3-37. Color measurement of noodle

	L*	a*	b*
Control	74.88±0.07 ^{ab}	-3.28±0.03 ^d	15.89±0.01 ^b
25% HAP	74.36±0.71 ^{ab}	-3.11±0.05 ^c	16.49±0.69 ^b
50% HAP	73.66±1.21 ^b	-2.86±0.01 ^b	17.31±0.18 ^a
75% HAP	75.36±0.15 ^a	-2.73±0.01 ^a	16.35±0.21 ^b
100% HAP	71.36±0.70 ^c	-2.90±0.00 ^b	16.51±0.07 ^b
125% HAP	74.28±0.31 ^{ab}	-2.69±0.01 ^a	16.39±0.36 ^b

^{a-c} Means with same alphabet in a column are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test.

(라) 조직감 측정

- 반죽의 경도는 대조구에서 가장 낮은 값을 나타내었고, 125% HAP의 처리구를 제외한 다른 처리구들과는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 처리구들 안에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, HAP의 함량이 높아질수록 경도의 값이 증가하는 경향을 나타내었다.
- 부착성, 응집성, 검성, 씹힘성에서 대조구와 다른 처리구들 사이에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 탄력성의 대조구는 처리구들과 유의적인 차이를 나타내었으며, 처리구에서 HAP의 함량이 높아질수록 결과 값이 증가하는 경향을 나타내었다(Table 3-3-38).

Table 3-3-38. Texture analysis of kneading

	Hardness (g)	Adhesiveness (mJ)	Cohesiveness	Springiness (mm)	Gumminess (g)	Chewiness (mJ)
Control	786.4±121.9 ^b	0.1±0.1 ^{ab}	0.4±0.0 ^a	2.2±0.2 ^{bc}	280.2±55.9 ^a	6.1±1.5 ^b
25% HAP	929.2±73.1 ^{ab}	0.1±0.1 ^b	0.3±0.0 ^a	2.1±0.1 ^c	313.5±30.0 ^a	6.4±0.9 ^b
50% HAP	935.5±153.3 ^{ab}	0.1±0.1 ^{ab}	0.3±0.0 ^a	2.2±0.1 ^{bc}	316.0±60.1 ^a	7.0±1.7 ^{ab}
75% HAP	937.8±72.3 ^{ab}	0.1±0.1 ^{ab}	0.4±0.0 ^a	2.4±0.1 ^{ab}	280.5±17.8 ^a	6.5±0.8 ^b
100% HAP	968.1±218.6 ^{ab}	0.2±0.1 ^a	0.4±0.0 ^a	2.4±0.2 ^{ab}	347.1±93.9 ^a	8.2±2.8 ^{ab}
125% HAP	1032.5±198.1 ^a	0.1±0.1 ^{ab}	0.4±0.0 ^a	2.5±0.3 ^a	373.8±94.1 ^a	9.4±3.1 ^{ab}

^{a-c} Means with same alphabet in a column are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test.

○ 조리면의 조직감을 측정된 결과 경도의 경우, 대조구에서 가장 낮은 값을 나타내었고, 25% HAP와 50% HAP와는 유의적으로 차이를 나타내지 않았지만 다른 처리구들과는 유의적으로 차이를 나타내었다. 또한 처리구들을 보면 HAP의 함량이 높아질수록 경도가 증가하는 경향을 나타내었다. 부착성의 결과에서는 대조구에서 가장 높은 값을 보였으며, 부착성, 응집성, 탄력성, 씹힘성에서의 대조구는 처리구의 결과와 유의적인 차이를 나타내었다. 검성의 결과에서는 대조구가 가장 낮은 값을 나타내었으며, HAP의 함량이 높아짐에 따라 값이 증가하는 경향을 나타내었다(Table 3-3-39).

Table 3-3-39. Texture analysis of noodle

	Hardness (g)	Adhesiveness (mJ)	Cohesiveness	Springiness (mm)	Gumminess (g)	Chewiness (mJ)
Control	101.2±25.2 ^b	0.2±0.0 ^a	0.8±0.1 ^{bc}	1.3±0.1 ^a	83.8±20.2 ^c	1.1±0.3 ^c
25% HAP	102.0±5.9 ^b	0.0±0.1 ^c	1.0±0.0 ^a	1.4±0.1 ^a	97.0±8.6 ^{bc}	1.3±0.1 ^{bc}
50% HAP	103.5±13.6 ^b	0.1±0.1 ^{ab}	0.9±0.1 ^{ab}	1.3±0.1 ^a	95.5±11.1 ^{bc}	1.3±0.2 ^{bc}
75% HAP	175.3±48.1 ^a	0.2±0.1 ^a	0.9±0.1 ^{ab}	1.3±0.1 ^a	159.8±46.1 ^a	2.1±0.5 ^a
100% HAP	192.0±60.1 ^a	0.1±0.1 ^{bc}	0.8±0.1 ^{bc}	1.1±0.1 ^b	157.0±47.3 ^a	1.8±0.6 ^{ab}
125% HAP	174.0±49.0 ^a	0.1±0.0 ^{abc}	0.8±0.0 ^c	1.0±0.1 ^b	137.0±44.3 ^{ab}	1.3±0.5 ^{bc}

^{a-c} Means with same alphabet in a column are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test.

(마) 소금 용출 속도 측정

○ 소금 용출 속도 측정 결과 아래의 Fig.(Fig. 3-3-49)과 같고, 20초가 지났을 때 50% HAP 처리구에서 가장 먼저 소금이 용출이 되었고, 105초가 지나고 75% HAP에서 가장 늦게 소금 용출이 시작되는 것을 관찰할 수 있다. 또한 165초가 지났을 때에는 100% HAP에서 가장 많은 소금 용출이 나타났다.

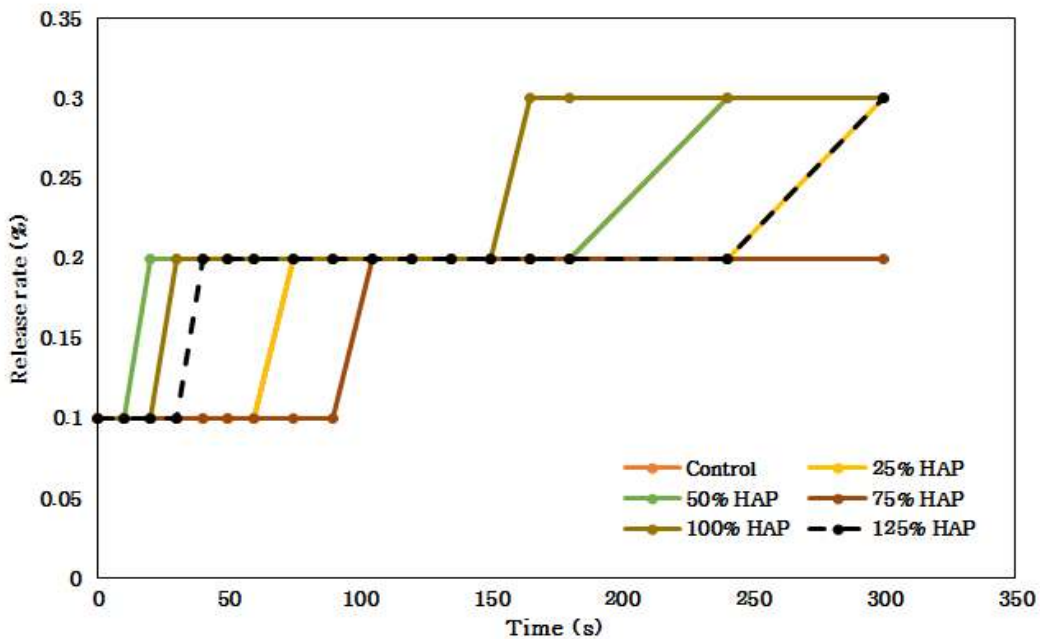


Fig. 3-3-49. Salt release rate of noodle added different amount of HAP.

(바) 관능검사 [경기대 위탁]

- HAP를 첨가한 제면에서 짠맛 증진효과를 나타내는지 확인하기 위해 진행한 관능평가의 결과에서 대조구의 짠맛의 강도는 25% HAP, 100% HAP, 125% HAP보다는 높았지만 50% HAP와 75% HAP를 첨가한 국수보다는 보다는 낮은 값을 나타내었다. 즉, 50% HAP와 75% HAP를 첨가하여주었을 경우 짠맛의 강도가 가장 높게 나타났다(Table 3-3-40과 Fig. 3-3-50).
- 짠맛의 선호도에서는 대조구는 25% HAP와 100% HAP 보다 높았으나, 다른 HAP 농도의 처리구 보다는 낮은 선호도를 나타내었다. 선호도 면에서는 75% HAP를 첨가하여준 국수에서 가장 높은 것으로 나타났고 그 다음으로는 125% HAP, 50% HAP 순으로 관찰되었다.
- 전체적인 선호도의 결과 대조구는 75% HAP를 제외한 다른 처리구들보다 높은 선호도를 나타내었으며, 짠맛과 짠맛의 선호도의 결과에서 가장 큰 값을 보여준 75% HAP가 전체적인 선호도에서도 가장 높은 값을 나타내었다.
- 50% HAP와 75% HAP를 첨가한 국수의 관능검사의 결과 물성에서 좋은 결과 값을 나타내었고 짠맛에 대한 강도는 강하게 느끼는 것을 관찰 할 수 있었으며, 적절한 농도의 가수분해물의 첨가가 짠맛 강도의 증가에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

Table 3-3-40. Sensory test of noodle added different amount of HAP

	Control	25% HAP	50% HAP	75% HAP	100% HAP	125% HAP
Appearance	63	67	88	79	62	61
Color	63	75	83	66	72	61
Texture	73	69	77	80	42	79
Flavor	70	55	93	71	66	65
Saltiness	74	57	83	80	56	70
Preference of saltiness	72	59	74	94	45	76
Overall preference	76	64	75	84	49	72

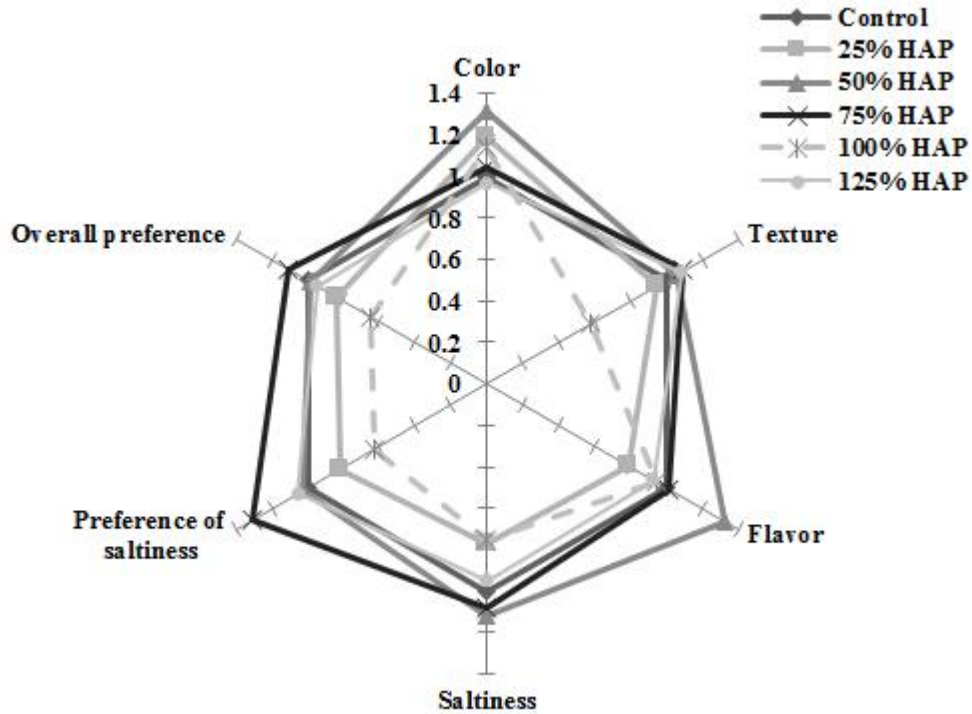


Fig. 3-3-50. Sensory test of noodle added different amount of HAP.

마. 5 kDa 이상의 HAP가 첨가된 제면 제조 방법

(1) 동결건조 된 단백질 가수 분해물의 제조

- 제1세부에서 가수분해하여 얻어진 단백질 가수 분해물을 제공받아 동결건조 하여 제면에 첨가하여 국수를 제조한다.
- 총 소금의 농도는 동일하게 하되 단백질 가수 분해물을 첨가하였을 때 제면 적성을 관찰하고 관능검사에서 짠맛의 강도를 평가하여 첨가하는 단백질 가수분해물의 농도를 최적화한다.
- HAP 용액을 -80°C 에서 deep freezing 해준 후 동결건조기에 넣어 1주일간 건조하여 건조물 HAP를 얻어 실험에 사용하였다.

(2) HAP가 첨가된 국수의 물리적 특성 분석

(가) 수율 및 수분함량

- 동결건조한 시료는 Fig. 3-3-51의 외관을 보였으며, HAP를 5,100 g을 동결건조 하여 건조물을 399.6 g 얻었고, 이 때 수율은 97.9%로 높은 값을 나타내었다. 또한 건조한 HAP의 수분함량 측정 결과 $8.44 \pm 0.48\%$ 의 수분을 함유하고 있다.



Fig. 3-3-51. HAP powder above 5 kDa manufactured by freeze dryer.

(나) 조리 특성

- 5 kDa이상의 HAP를 제면에 첨가하여 국수의 조리 특성을 나타낸 결과는 아래의 표와 같다. 대조구의 부피는 가장 낮은 값을 나타내었고 HAP의 첨가 양이 증가함에 따라 부피의 변화도 증가하는 경향을 나타내었다. 수분 흡수율에서 대조구는 상대적으로 HAP의 함량이 높은 100% HAP와 125% HAP를 제외한 처리구 보다 높은 값을 나타내었고, 처리구에서 125% HAP에서 가장 낮은 값을 나타내었고 75% HAP에서 가장 높은 수분 흡수율 값을 나타내었다.
- 국물의 탁도의 경우 대조구의 경우 75% HAP보다는 높은 값을 나타내었고 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 다른 처리구 보다는 낮은 값을 나타내었고 유의적인 차이를 나타내었다. 처리구 안에서는 서로 유의적인 차이를 나타내었으며 HAP의 함량이 증가함에 따라 탁도의 값은 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 HAP의 고유의 색이 조리 시 국물로 빠져나와 국물의 탁도에 영향을 미치는 것으로 사료된다(Table 3-3-41).

Table 3-3-41. Cooking properties of noodle added HAP powder above 5 kDa

	Cook properties		
	Noodle volume (cm ³)	Noodle water absorption (%)	UV absorption of noodle soup (nm)
Control	59.00	32.92	0.42±0.04 ^d
25% HAP	62.00	33.79	0.51±0.00 ^c
50% HAP	61.00	33.13	0.41±0.04 ^d
75% HAP	62.00	35.31	0.48±0.03 ^c
100% HAP	63.00	32.19	0.57±0.02 ^b
125% HAP	68.00	30.58	0.64±0.04 ^a

^{a-c} Means with same alphabet in a column are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test.

(다) 색도 측정

- 반죽의 색도 측정 결과 대조구의 명도는 25% HAP와 50% HAP보다 낮은 값을 나타내었고 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 다른 처리들과는 유의적으로 차이를 나타내었다.
- 적색도의 결과에서 대조구의 값은 가장 낮게 나타났고 처리구와 유의적으로 차이를 나타내었으며, 처리구에서 HAP의 함량이 증가할수록 값이 증가하는 경향을 나타내었다.
- 대조구의 황색도의 값은 가장 낮게 나타났고 상대적으로 적은 양인 25% HAP와 50% HAP와는 유의적인 차이를 나타냈다. 처리구에서 HAP함량이 증가할수록 값도 증가하는 경향을 나타내었다(Table 3-3-42).

Table 3-3-42. Color measurement of kneading

	L*	a*	b*
Control	85.48±0.70 ^a	-1.56±0.31 ^c	20.76±0.66 ^b
25% HAP	85.97±0.36 ^a	-1.42±0.10 ^{bc}	21.63±0.56 ^b
50% HAP	85.55±0.28 ^a	-1.39±0.05 ^{bc}	20.99±0.76 ^b
75% HAP	83.77±0.46 ^b	-1.11±0.13 ^{ab}	23.24±0.81 ^a
100% HAP	82.53±0.89 ^c	-0.93±0.27 ^a	23.29±1.00 ^a
125% HAP	83.01±0.09 ^{bc}	-0.79±0.17 ^a	23.86±0.60 ^a

^{a-c} Means with same alphabet in a column are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test.

- 조리면의 색도 측정 결과 대조구의 명도는 가장 높은 값을 나타내었고 HAP의 함량이 증가할수록 값은 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 HAP의 고유의 색이 조리면의 명도에 영향을 주는 것으로 사료된다.
- 대조구의 적색도는 가장 낮은 값을 나타내었으며, 처리구와 25% HAP, 50% HAP, 75% HAP의 처리구는 유의적인 차이를 나타내지 않았지만 다른 처리구와는 유의적인 차이를 나타내었다. 또한 처리구에서 HAP의 함량이 높아질수록 값이 증가하는 경향을 나타내었고 25% HAP를 제외하고 유의적인 차이를 나타내지 않았다.
- 대조구의 황색도는 100% HAP와 125% HAP보다는 값이 낮았지만 다른 처리구 보다는 높은 값을 나타내었고 75% HAP를 제외한 다른 처리구와 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 처리구에서는 HAP가 증가할수록 황색도 값이 증가하는 경향을 나타내었다(Table 3-3-43).

Table 3-3-43. Color measurement of noodle

	L*	a*	b*
Control	72.45±0.26 ^a	-3.24±0.13 ^{bc}	15.34±0.40 ^{ab}
25% HAP	67.28±2.81 ^{bc}	-3.28±0.04 ^c	13.75±0.35 ^{bc}
50% HAP	68.23±0.71 ^{bc}	-3.00±0.14 ^{ab}	12.18±2.40 ^{bc}
75% HAP	68.19±1.82 ^{bc}	-3.03±0.02 ^{ab}	14.19±0.59 ^c
100% HAP	69.90±1.20 ^{ab}	-2.92±0.04 ^a	17.27±1.01 ^a
125% HAP	66.27±1.26 ^c	-2.81±0.25 ^a	17.67±2.11 ^a

^{a-c} Means with same alphabet in a column are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test.

(라) 조직감 측정

○ 반죽 경도를 측정한 결과에서 대조구의 경우 가장 낮은 값을 나타내었고 HAP가 가장 많이 함유된 125% HAP의 처리구를 제외한 다른 시료들과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 처리구에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, HAP의 함량이 많아질수록 경도가 증가하는 경향을 나타내었다(Table 3-3-44).

Table 3-3-44. Texture analysis of kneading

	Hardness (g)	Adhesiveness (mJ)	Cohesiveness	Springiness (mm)	Gumminess (g)	Chewiness (mJ)
Control	2975.8±160.2 ^b	1.4±0.7 ^b	0.5±0.1 ^a	2.2±0.4 ^b	1432.3±250.1 ^a	31.5±10.2 ^b
25% HAP	3584.6±819.5 ^{ab}	3.0±1.3 ^{ab}	0.5±0.0 ^a	2.3±0.3 ^b	1774.7±494.6 ^a	40.2±11.7 ^b
50% HAP	4164.8±1143.7 ^{ab}	4.0±2.3 ^a	0.6±0.0 ^a	3.0±0.7 ^a	2336.0±1376.8 ^a	61.8±22.0 ^a
75% HAP	4368.5±1502.7 ^{ab}	1.7±0.5 ^b	0.5±0.0 ^a	2.0±0.1 ^b	1668.8±342.9 ^a	32.9±7.8 ^b
100% HAP	4437.0±915.2 ^{ab}	3.5±3.0 ^a	0.6±0.2 ^a	2.8±1.3 ^{ab}	2559.0±1600.9 ^a	30.5±5.4 ^b
125% HAP	4632.0±1133.5 ^a	1.8±0.9 ^b	0.5±0.0 ^a	2.0±0.2 ^b	2229.0±539.4 ^a	42.6±11.4 ^{ab}

^{a-b} Means with same alphabet in a column are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test.

○ 조리면의 경도 측정 결과 대조구와 처리구는 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 대조구는 25% HAP와 50% HAP 보다 낮은 경도 값을 나타내었고 다른 처리구 보다는 큰 결과 값을 나타내었다.

○ 부착성, 응집성, 탄력성, 검성, 씹힘성에서 대조구와 처리구는 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Table 3-3-45).

Table 3-3-45. Texture analysis of noodle

	Hardness (g)	Adhesiveness (mJ)	Cohesiveness	Springiness (mm)	Gumminess (g)	Chewiness (mJ)
Control	242.6±147.0 ^a	0.1±0.1 ^{ab}	0.8±0.1 ^a	2.4±0.3 ^a	189.8±101.5 ^a	4.5±2.5 ^a
25% HAP	264.0±89.1 ^a	0.1±0.1 ^{ab}	0.9±0.0 ^a	2.5±0.2 ^a	227.5±79.9 ^a	5.6±1.5 ^a
50% HAP	316.3±74.8 ^a	0.2±0.1 ^a	0.8±0.1 ^a	2.5±0.1 ^a	244.3±47.3 ^a	5.9±1.2 ^a
75% HAP	214.6±99.9 ^a	0.0±0.1 ^{ab}	0.9±0.1 ^a	2.5±0.2 ^a	182.4±74.2 ^a	4.4±1.6 ^a
100% HAP	143.0±19.7 ^a	0.1±0.1 ^{ab}	0.8±0.0 ^a	2.5±0.1 ^a	121.3±17.4 ^a	3.1±0.5 ^a
125% HAP	183.5±40.3 ^a	0.0±0.0 ^b	0.5±0.1 ^a	2.0±0.3 ^b	142.5±51.6 ^a	2.9±1.3 ^a

^{a-c} Means with same alphabet in a column are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test.

(마) 소금 용출 속도 측정

- 30초까지의 초기 소금 용출 속도는 대조구와 처리구의 차이가 크게 나타나지 않았지만 시간이 경과함에 따라 대조구는 25% HAP와 50% HAP를 첨가하여준 처리구를 제외하고 다른 처리구보다 소금 용출이 더딘 것을 관찰 할 수 있으며 300초까지 용출되는 소금의 양도 적은 것으로 나타났다.
- 처리구에서 소금의 용출은 HAP의 양이 증가할수록 소금이 용출되는 속도가 증가하는 경향을 나타냈다(Fig. 3-3-52).

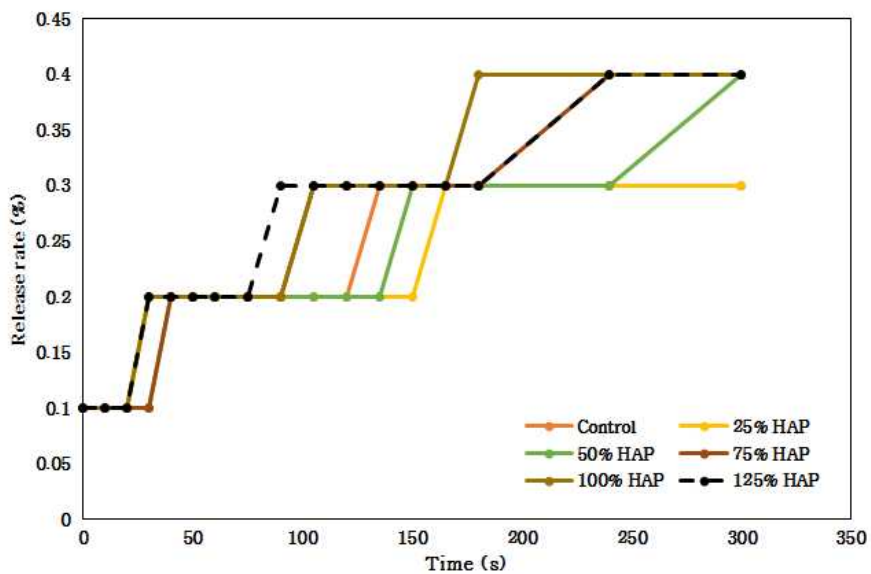


Fig. 3-3-52. Salt release rate of noodle added different amount of HAP.

(바) 관능검사 [경기대 위탁]

- 서로 다른 농도의 HAP를 첨가한 국수의 관능평가를 나타낸 결과이며, HAP가 짬맛 증진에 효과가 있는지 확인해본 실험이다.
- 대조구의 짬맛의 결과, 75% HAP를 제외한 다른 처리구에서 보다 값이 낮은 것을 나타내었다. HAP를 상대적으로 적게 넣어준 25% HAP와 50% HAP에서 다른 시료들보다 더 짜게 느끼는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 HAP가 짬맛 증진에 효과가 있다는 것으로 사료된다.
- 짬맛 선호도의 결과 대조구는 75% HAP와 100% HAP를 넣어준 국수를 제외한 다른 시료보다 낮은 값을 나타내었으며, 이 또한 상대적으로 낮은 농도의 HAP를 넣어주었을 때 짬맛의 선호도가 높은 것을 나타내었다.
- 전체적인 선호도의 결과 짬맛과 짬맛의 선호도와 유사한 경향을 나타내었는데 대조구보다 25% HAP와 50% HAP에서 더 높은 선호도를 보였다.
- 또한 다른 품질 평가 항목에서도 50% HAP를 첨가해준 국수에서 높은 결과 값을 나타내었다. HAP는 짬맛 증진에 효과가 있으나, 일정 농도 이상을 넣어주게 되면 선호도와 국수 품질에 좋지 않은 영향을 끼치는 것으로 사료되며, 50% HAP를 넣어주는 것이 최적 농도라고 사료된다(Table 3-3-46과 Fig. 3-3-53).

Table 3-3-46. Sensory test of noodle added different amount of HAP

	Control	25% HAP	50% HAP	75% HAP	100% HAP	125% HAP
Appearance	72	90	82	69	67	40
Color	80	84	81	56	73	46
Texture	72	68	91	70	52	67
Flavor	64	73	80	66	70	68
Saltiness	60	78	83	59	68	72
Preference of saltiness	66	86	76	61	60	71
Overall preference	75	81	86	57	65	56

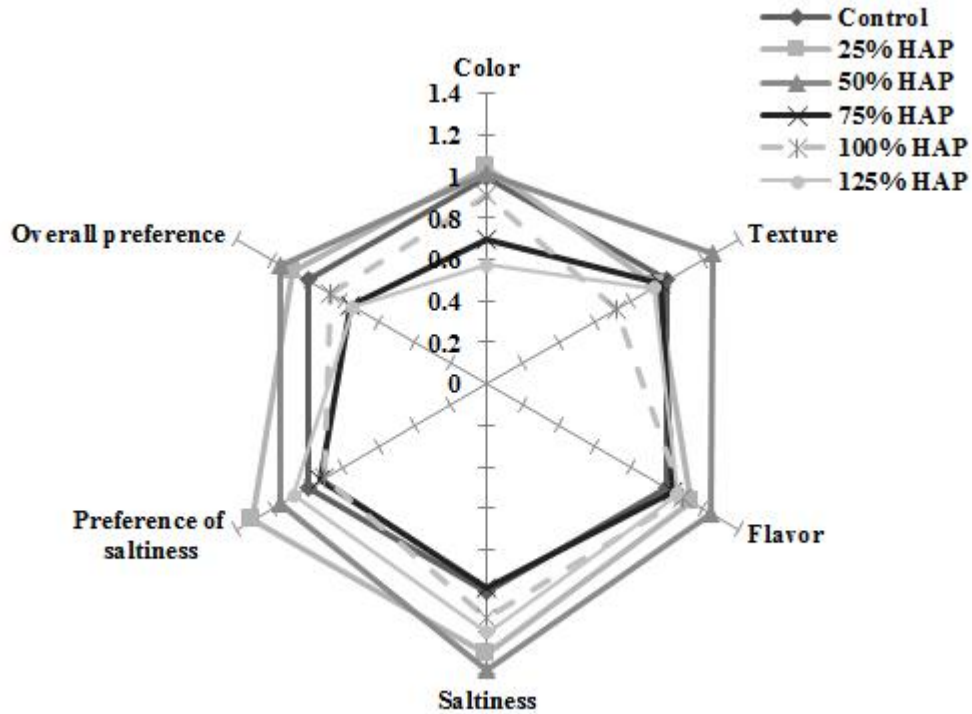


Fig. 3-3-53. Sensory test of noodle added different amount of HAP.

5. 저염스낵, 저염빵, 저염 제면 시제품 개발 (4차년도 연구내용)

가. 저염 떡튀기 대량 생산 및 시제품 제조

(1) 저염 떡튀기 대량 생산 및 시제품 제조 방법

(가) 미세분말 소금 입자의 제조 방법

- 20% NaCl-maltodextrin을 증류수에 녹여 준비하였으며, 이때의 NaCl과 maltodextrin의 비율은 2:1로 하였다. 그 후, spray dryer(SD-1000, EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 나노 입자의 NaCl-maltodextrin 복합체를 제조하였다.
- 이 때, Inlet temperature에 따른 소금의 제조는 inlet temperature는 150, 160, 170, 180°C으로 하였으며, 다른 조건인 atomizing pressure 180 kPa, 0.5 m³/min blower로 동일하게 하여 제조하였다.
- Atomizing pressure에 따른 소금의 제조는 atomizing pressure를 60, 100, 140, 180, 220 kPa로 하였으며, 다른 조건인 inlet temperature 160°C, 0.5 m³/min blow speed로 동일하게 하여 제조하였다.

(나) 미세분말 소금 입자 관찰

○ 제조된 미세분말 소금입자를 scanning electron microscope(SEM, S-4700, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰하였으며, 이를 image tool 프로그램(UTHSCSA, USA)을 이용하여 입자의 사이즈를 측정하였다.

(다) 관능검사 방법 (경기대 위탁)

○ 본 실험의 관능검사는 서로 다른 조건으로 제조된 소금입자가 짠맛에 어떠한 효과가 있는지 알아보기 위해 진행하였다. 건국대학교 대학원생 20명을 대상으로 본 실험에 맞는 관능검사에 대한 교육 후 실험을 진행하였다. 강도가 강한 것부터 높은 숫자로 하여 가장 강도가 약한 것까지 순서를 선정하는 순위법을 사용하였다. 소금의 경우, 동일한 양(0.03 g)을 제공하였으며, 떡튀기 시료는 떡튀기의 표면에 로터리쿠커(로터리쿠커-06, Taehwan Automation, Bucheon, Korea)를 이용하여 제조된 소금을 도포시켜 준비하여 제공하였다.

소금 시료의 소비자 검사를 위한 설문지

본 설문지는 다양한 소금에 관한 귀하의 의견을 조사하기 위한 것입니다.
 귀하의 응답 내용은 연구의 귀중한 자료가 되오니 문항을
 잘 읽고시고 해당항이 달변해 주시기 바랍니다.
 응답내용은 순수 연구 목적 이외의 다른 용에는 사용되지 않을 것을
 약속드립니다.

나 이 (단) _____ 세 성 별 _____

※ 다음의 시료를 왼쪽부터 오른쪽까지 맛본 후, 해당문항에 맞는 순위를 순서대로 경화하십시오.
 먼저 물로 입을 가셔 주십시오.
 한 시료를 맛본 후 다음 시료를 맛보기 전에 물로 입을 가셔 주십시오.
 ※ **순위법**의 경우 강도가 높은 순으로 나타내주십시오.
 ※ **점수법**의 경우 10점 최도형(높을수록, 좋거나, 낫음)으로 나타내주십시오.

1. 짠맛의 강도(saltiness)	198	245	473	792	919
순위	_____	_____	_____	_____	_____
점수	_____	_____	_____	_____	_____

2. 짠맛이 빨리 느껴지는 순서	198	245	473	792	919
순위	_____	_____	_____	_____	_____
점수	_____	_____	_____	_____	_____

3. 입안에서 빨리 녹는 순서	198	245	473	792	919
순위	_____	_____	_____	_____	_____
점수	_____	_____	_____	_____	_____

4. 부드러운 맛(smooth)	198	245	473	792	919
순위	_____	_____	_____	_____	_____
점수	_____	_____	_____	_____	_____

5. 쓴맛의 강도(bitterness)	198	245	473	792	919
순위	_____	_____	_____	_____	_____
점수	_____	_____	_____	_____	_____

6. 전체적인 기호도(Overall acceptance)	198	245	473	792	919
순위	_____	_____	_____	_____	_____
점수	_____	_____	_____	_____	_____

응답해주셔서 감사합니다 ☺

Fig. 3-3-54. Sensory evaluation form of NaCl-maltodextrin complex according to different spray dryer condition.

소금 시료의 소비자 검사를 위한 설문지

본 설문지는 다양한 소금에 관한 귀하의 의견을 조사하기 위한 것입니다.
 여러분의 응답 내용은 연구의 귀중한 자료가 되오니 문항을
 잘 읽고서도 최대한의 답변을 주시기 바랍니다.
 응답내용은 연구 용의 이외의 다른 용이는 사용되지 않을 것을
 약속드립니다.

나 이 (성) _____ 생 연 _____

※ 다음의 시료를 왼쪽부터 오른쪽까지 맛본 후, 해당문항에 맞는 순위를 순서대로 기재하십시오.
 맛의 불균형을 가하여 주십시오.
 맛 시료를 맛본 후 다음 시료를 맛보기 전에 불균형을 가하여 주십시오.
 ※ 순위별의 경우 강도가 높은 순으로 나타내주십시오.
 ※ 결구도의 경우 10점 척도일(호출10, 중립5, 불호출1)으로 나타내주십시오.

1. 외관(seasoning 된 정도)

	198	245	473	792	919
순위	_____	_____	_____	_____	_____
점수	_____	_____	_____	_____	_____

2. 쓴맛의 강도 (bitterness)

	198	245	473	792	919
순위	_____	_____	_____	_____	_____
점수	_____	_____	_____	_____	_____

3. 단맛의 강도 (sweetness)

	198	245	473	792	919
순위	_____	_____	_____	_____	_____
점수	_____	_____	_____	_____	_____

4. 짠맛 (saltiness)

4.1. 시즈닝된 파우더의 짠맛(겉부분만 맛보았을때)

	198	245	473	792	919
순위	_____	_____	_____	_____	_____
점수	_____	_____	_____	_____	_____

4.2. 짠맛이 느껴지는 순서(과자와 파우더 전체적인 짠맛)

	198	245	473	792	919
순위	_____	_____	_____	_____	_____
점수	_____	_____	_____	_____	_____

4.3. 짠맛의 강도(과자와 파우더 전체적인 짠맛)

	198	245	473	792	919
순위	_____	_____	_____	_____	_____
점수	_____	_____	_____	_____	_____

5. 전체적인 기호도(Overall acceptance)

	198	245	473	792	919
순위	_____	_____	_____	_____	_____
점수	_____	_____	_____	_____	_____

응답해주셔서 감사합니다😊

Fig. 3-3-55. Sensory evaluation form of puffed snack seasoning with NaCl-maltodextrin complex according to different spray dryer condition.

(2) 저염 떡볶이 대량 생산 및 시제품의 이화학적 특성 검사

(가) 미세분말의 관찰

○ 분무건조기 inlet temperature와 atomizing pressure의 조건에 따른 미세분말 소금 입자와 이를 적용한 스낵의 외관 관찰 결과는 Table 3-3-47,48,49,50에 나타내었다.

Table 3-3-47. Appearance of spray dried powder according to different condition of inlet temperature

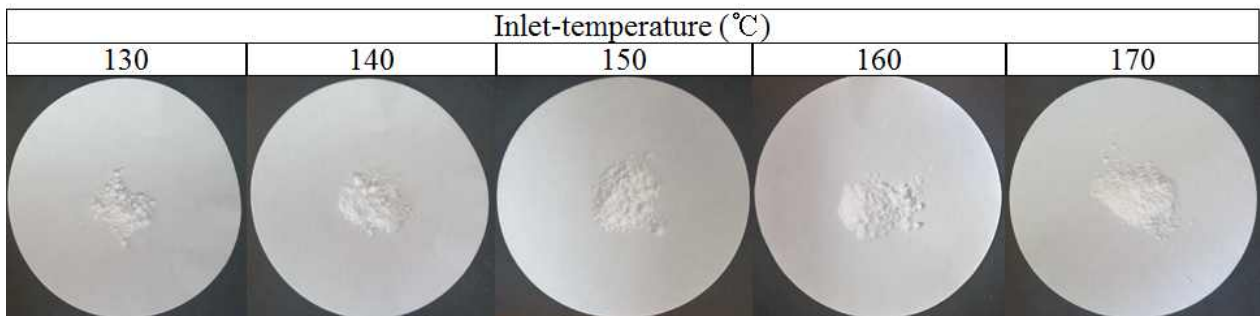


Table 3-3-48 Appearance of spray dried powder according to different condition of atomizing pressure

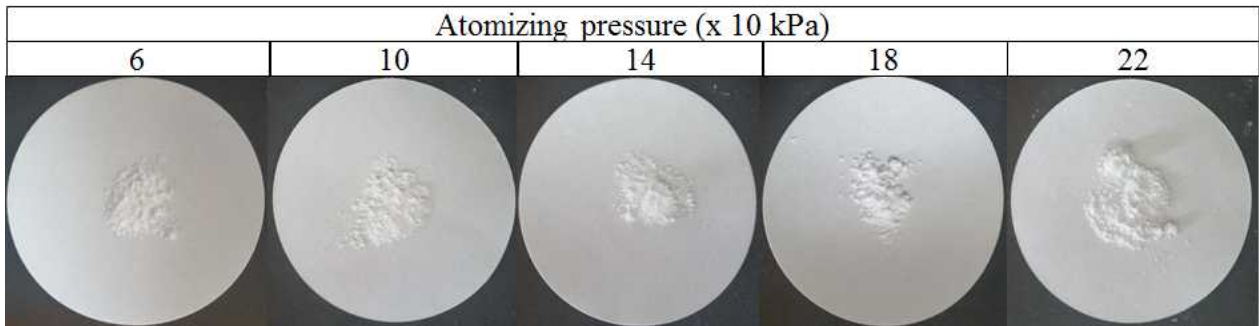


Table 3-3-49. Appearance of snack applied spray dried powder according to different condition of inlet temperature



Table 3-3-50. Appearance of snack applied spray dried powder according to different condition of atomizing pressure



(나) SEM 관찰

○ 서로 다른 조건의 분무건조를 시킨 NaCl-maltodextrin 복합체의 SEM 측정 결과를 Fig. 3-3-56,57에 나타내었다.

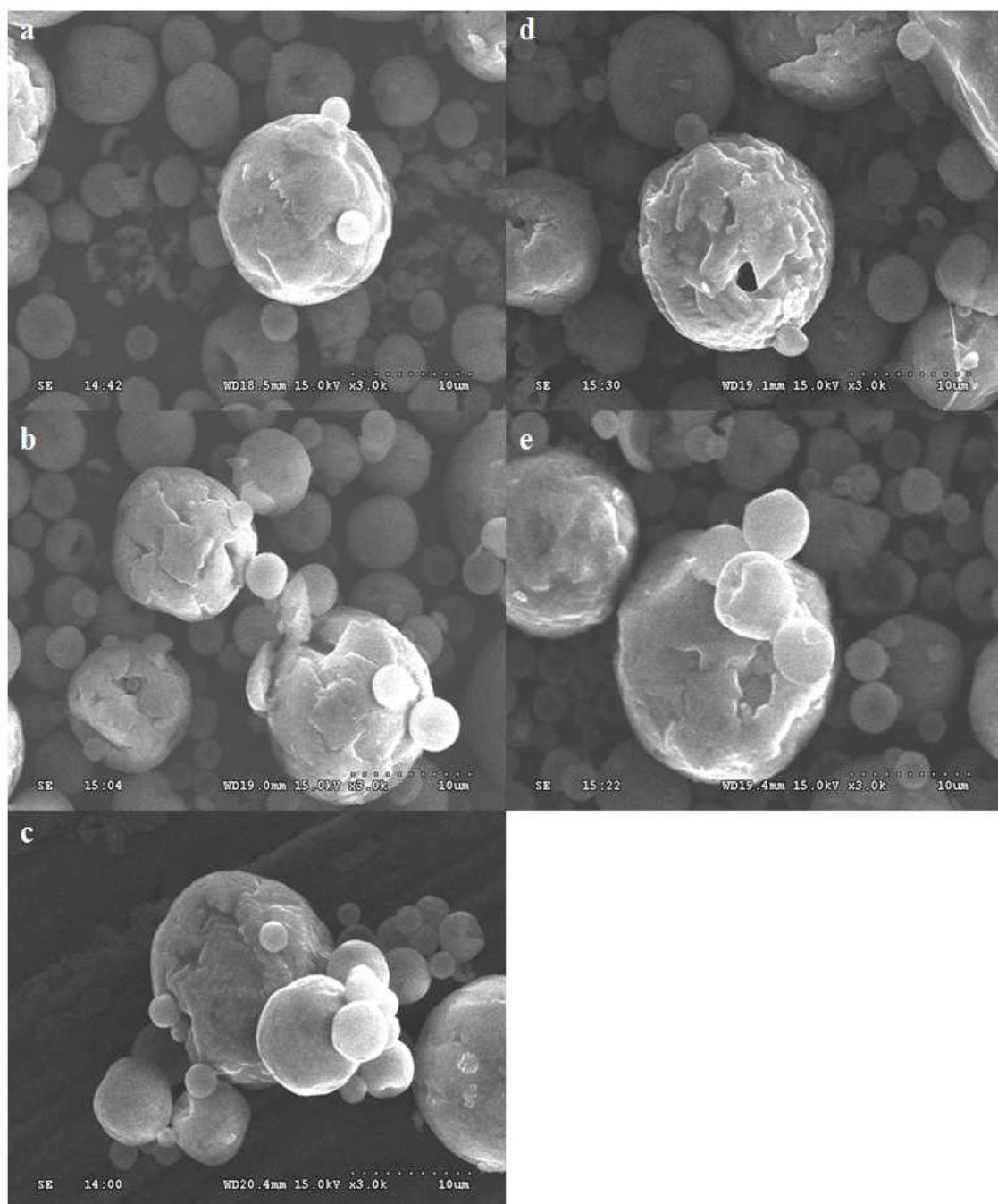


Fig. 3-3-56. SEM image of different inlet temperature condition of spray dryer; a)130, b)140, c)150, d)160, and e)170°C.

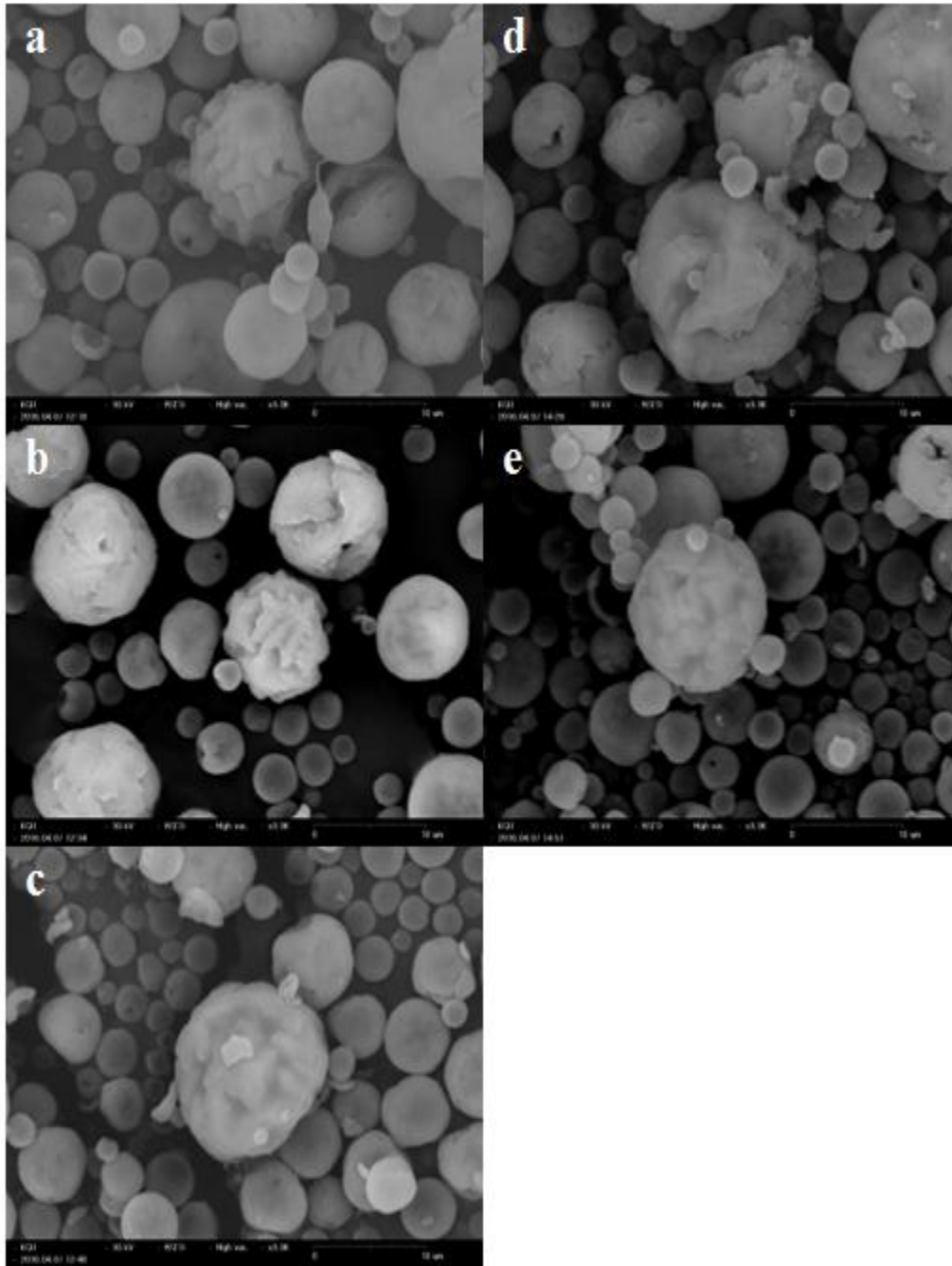


Fig. 3-3-57. SEM image of different atomizing pressure condition of spray dryer; a)60, b)100, c)140, d)180, and e)220 kPa.

(다) 관능평가 - [경기대학교 위탁연구]

○ 공정을 달리하여 제조한 소금의 관능평가의 결과는 Table 3-3-51에 나타내었다. Inlet temperature에 따라서는 짠맛의 강도 및 녹는 속도는 유사한 것으로 나타났다. 이와 달리, 분무공정과정의 atomizing pressure를 조절하였을 경우, 분무 압력이 높아질수록 녹는 속도가 증가하였으며, 짠맛 강도 또한 강해지는 경향을 관찰하였다.

○ 또한, inlet temperature와 atomizing pressure의 분무건조기 공정과정을 달리하여 제조한 소

금으로 시즈닝한 스낵의 관능평가의 결과는 Table 3-3-52,53과 같다. Inlet temperature를 조절하여 스낵에 적용하였을 때, 외관과 쓴맛, 단맛에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았으나($p>0.05$), 짠맛의 강도에서는 160℃ inlet temperature로 적용하였을 때 다른 처리구와 비교하여 유의적으로 높은 값을 나타내었다($p<0.05$).

- Atomizing pressure 처리를 달리한 소금을 스낵에 적용하였을 때, 외관, 쓴맛, 짠맛, 소금 자체의 짠맛, 전체적인 선호도에서 유의적으로 차이를 나타내지 않았다($p>0.05$). 그러나 짠맛이 느껴지는 순서와 짠맛의 강도에서 60, 180 및 220 kPa로 하였을 때 유의적으로 높은 값을 나타내는 것을 관찰하였다($p<0.05$).
- 따라서, 분무건조기의 적절한 조건의 공정과정을 통하여 소금의 짠맛 인지를 조절 할 수 있다는 것으로 사료된다.

Table 3-3-51. Sensory test of snack with different inlet temperature conditions of spray dryer

Sensory test					
Inlet temperature (°C)					
	130	140	150	160	170
Melting speed	3.6	3.5	3.7	3.7	3.6
Saltiness intensity	3.5	3.6	3.5	3.5	3.7
Atomizing pressure (kPa)					
	60	100	140	180	220
Melting speed	3.2	3.3	3.8	3.6	3.7
Saltiness intensity	3.3	3.3	3.8	3.8	3.8

Table 3-3-52. Sensory test of snack with different inlet temperature conditions of spray dryer

Inlet temperature (°C)					
	130	140	150	160	170
Appearance	3.45 ^a	2.55 ^a	2.45 ^a	3.55 ^a	3.00 ^a
Bitterness	3.18 ^a	1.82 ^b	3.73 ^a	3.00 ^a	3.27 ^a
Sweetness	3.09 ^a	2.82 ^a	3.45 ^a	2.45 ^a	3.18 ^a
Seasoning saltiness	3.36 ^a	3.09 ^a	2.36 ^a	3.45 ^a	2.73 ^a
Order of saltiness	3.09 ^a	2.64 ^a	3.00 ^a	3.45 ^a	2.82 ^a
Saltiness intensity	2.91 ^b	2.55 ^b	2.82 ^b	4.09 ^a	2.64 ^b
Overall preference	4.09 ^{ab}	3.00 ^{ab}	4.45 ^a	2.64 ^b	3.91 ^{ab}

^{a-b} Means with same alphabet in a row are not significantly different at $p<0.05$ using Duncan's multiple range test.

Table 3-3-53. Sensory test of snack with different atomizing pressure conditions of spray dryer

	Atomizing pressure (kPa)				
	60	100	140	180	220
Appearance	3.27 ^a	3.00 ^a	3.18 ^a	2.73 ^a	2.82 ^a
Bitterness	3.00 ^a	3.09 ^a	3.36 ^a	2.27 ^a	3.27 ^a
Sweetness	3.00 ^{ab}	2.27 ^b	3.73 ^a	3.73 ^a	2.27 ^{ab}
Seasoning saltiness	3.36 ^a	2.45 ^a	2.45 ^a	3.45 ^a	3.27 ^a
Order of saltiness	3.09 ^{ab}	2.64 ^b	2.27 ^b	3.09 ^{ab}	3.91 ^{ab}
Saltiness intensity	3.45 ^{ab}	2.36 ^b	2.27 ^b	3.27 ^{ab}	3.64 ^{ab}
Overall preference	3.64 ^a	3.64 ^a	3.73 ^a	3.64 ^a	3.09 ^a

^{a-b} Means with same alphabet in a row are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test.

(라) 나트륨 저감화된 빵과 시제품과의 소금의 용출속도 비교

○ 시판제품과 본 과제에서 진행한 빵의 소금 용출속도를 비교한 결과를 Fig. 3-3-58.에 나타내었다. 시판제품의 경우 0.22 psu의 결과 값을 나타내었으나, HAP를 첨가하여주었을 경우 그 보다 낮은 값인 0.17 psu 값이다. 또한 NaCl-yeast 복합체를 넣어준 시료에서는 최종 소금 용출된 양은 같으나, 용출 되는 속도는 시판제품에 비해 더 빠르게 관찰되었다.

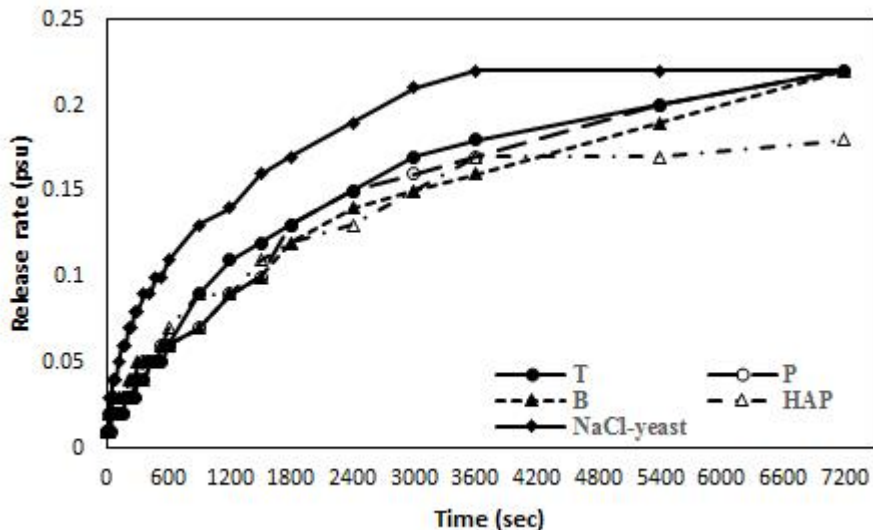


Fig. 3-3-58. Salt release rate of manufactured goods and salt reduction white pan bread. T, B, and P are manufactured in the T, B, and P company. NaCl-yeast and HAP are made including NaCl-yeast complex and hydrolyzed animal protein.

나. 저염 식빵 대량 생산 및 시제품 제조

(1) 저염 식빵 대량 생산 및 시제품 제조 방법

- 본 실험에서는 밀가루, 물, 천일염, 탈지분유, 설탕, 생효모를 대형마트에서 구매하였으며, 코팅제인 레시틴(LOPOID S 75, fat free soybean phospholipids with 70% phosphatidylcholine)은 Lipoids GmbH (Ludwigshafen, Switzerland)에서 구입하여 사용하였다.
- 리포솜으로 코팅된 소금은 20% NaCl과 2% lecithin을 증류수에 녹였으며, high speed homogenizer (Homogenizer Ultra-Turrax T18 basic, IKA, Germany)를 사용하여 11,000 rpm으로 5분간 균질화 후, ultrasonicator (HD-2200, BANDELIN electronic GmbH & Co. K.G, Berlin, Germany)을 이용하여 40% power (80 W)로 3분간 2차 균질하였다. -80℃의 deep freezer(NF-400SF, Nihon freezer Co. Ltd, Tokyo, Japan)를 이용하여 냉동시킨 후, 동결건조기(FD-8518, Iishinbiobase Co. Ltd., Dongducheon, Korea)를 이용하여 1주일간 건조하여 분말 형태의 리포솜 코팅된 소금을 제조하여 실험에 사용하였다.
- 식빵의 제조방법은 2차년도에서 사용한 방법(AACC 10-10b)과 동일하게 하여 실험해 주었으며, 아래의 표(Table 3-3-54)와 같이 배합하여 제조하였다.

Table 3-3-54. Ingredients of white pan bread

	Flour (g)	Yeast (g)	Water (ml)	Shortening (g)	Sugar (g)	Skim milk powder (g)	Salt (g)	Liposome coated salt (g)
LS 0 ¹⁾	100	1.2	64	4	6	7.1	2.0	-
LS 0.5	100	1.2	64	4	6	7.1	1.5	0.5
LS 1.0	100	1.2	64	4	6	7.1	1.0	1.0
LS 1.5	100	1.2	64	4	6	7.1	0.5	1.5
LS 2.0	100	1.2	64	4	6	7.1	-	2.0

¹⁾ The content of liposome coated salt.

(2) 저염 식빵의 대량 생산 및 시제품의 이화학적 특성 검사

(가) 수분함량 및 제빵특성

- 리포솜 코팅된 소금의 함량에 따라 제조된 식빵의 수분함량과 제빵특성의 결과는 Table 3-3-55와 같다. 수분함량의 결과 대조구(LS 0)와 리포솜 코팅된 소금만 첨가하였을 경우(LS 2.0)를 제외하고는 유의적으로 차이를 나타내지 않았다($p>0.05$). 부피 증가율은 LS 0.5에서 가장 높은 값을 나타내고 그 다음으로는 LS 1.5가 가장 높았으며, LS 0과 LS 1.0에서는 비교적 낮은 값을 나타내었다. 그러나 발효율에서는 LS 0에서 가장 높게 나타났으며, LS 1.0, LS 2.0 순으로 나타났으며, 비교적으로 LS 0.5와 1.5에서는 낮은 값을 나타내었다.

Table 3-3-55. The results of moisture content and loaf volume and fermentation of white pan bread added different concentration of encapsulated salt

	LS 0 ¹⁾	LS 0.5	LS 1.0	LS 1.5	LS 2.0
Moisture content (%)	67.31±0.43 ^{ab}	65.50±2.84 ^{ab}	69.03±1.19 ^a	65.67±1.02 ^{ab}	65.35±2.49 ^b
Loaf volume (cm ³ /g)	2.50	3.09	2.41	3.01	2.81
Fermentation rate (%)	25.00	22.92	28.13	23.40	26.09

¹⁾ The content of liposome coated salt.

(나) 외관

○ 리포솜 코팅된 소금의 함량이 다르게 첨가된 식빵의 외관 관찰 결과를 다음의 Fig. 3-3-59에 나타내었다. 외관으로 관찰한 결과 큰 차이는 나타내지 않았으며, 대조구와 처리구의 결과 비슷한 경향을 나타내었다.

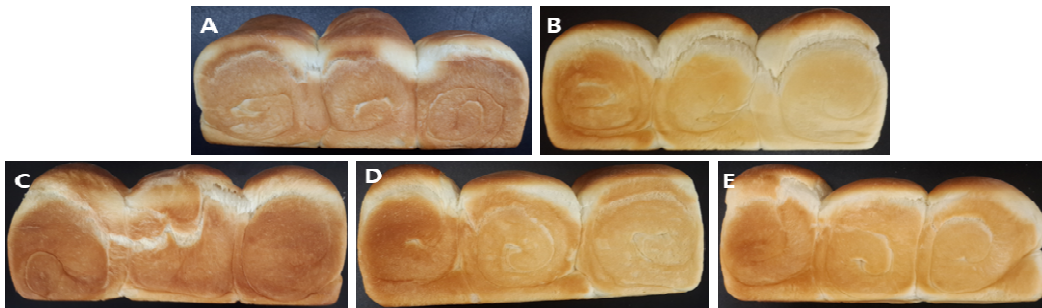


Fig. 3-3-59. The appearance of white pan bread added different concentration of liposome coated salt; A) 0, B) 0.5, C) 1.0, D) 1.5, and E) 2.0%.

(다) 색도

○ 리포솜으로 코팅된 소금의 첨가량에 따른 식빵의 색도 측정 결과 Table 3-3-56에 나타내었다. 식빵 겉표면의 명도에서 시료간 유의적인 차이를 나타내며, 리포솜으로 코팅된 소금이 첨가 될수록 낮아지는 경향을 나타내었다($p < 0.05$). 또한 적색도와 황색도에서도 시료간 유의적인 차이를 나타내었는데($p < 0.05$), 이는 식빵이 구어지는 동안 불에 직접 맞는 부분과 식빵 틀과 붙어 있는 부분이 있어 차이를 나타내는 것으로 사료된다. 식빵의 속질 부분에서 대조구의 경우, 명도와 황색도에서 가장 낮은 값을, 적색도에서는 가장 높은 값을 나타내었으며, 명도, 적색도, 황색도에서 리포솜 코팅된 소금을 넣은 처리구간에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p > 0.05$).

Table 3-3-56. Changes of white pan bread added different concentration of encapsulated salt

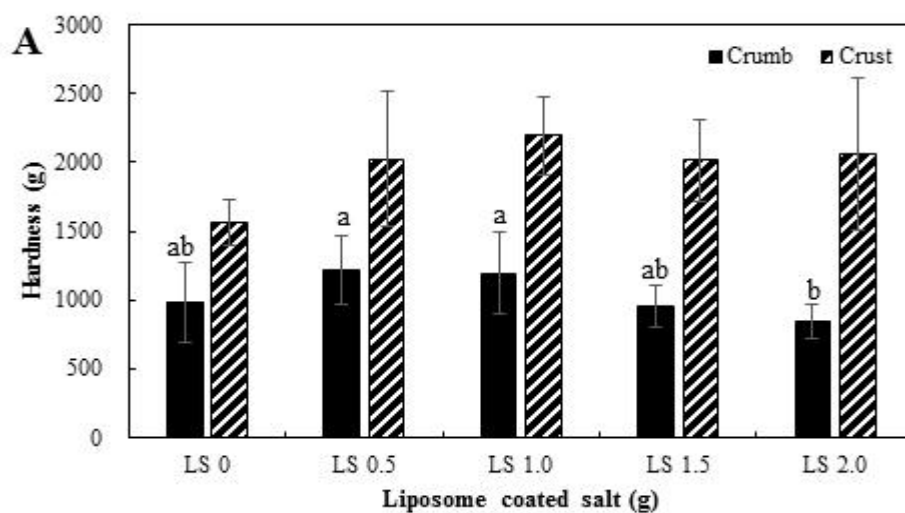
		L*	a*	b*
Crust	LS 0 ¹⁾	48.93±0.12 ^b	14.10±0.04 ^b	21.96±0.10 ^d
	LS 0.5	68.80±0.20 ^a	6.18±0.24 ^d	26.82±0.03 ^b
	LS 1.0	42.72±0.21 ^d	12.26±0.01 ^c	18.14±0.08 ^e
	LS 1.5	45.55±4.55 ^c	15.14±0.36 ^a	28.72±2.62 ^a
	LS 2.0	38.58±1.25 ^e	15.21±0.20 ^a	24.01±1.51 ^c
Crumb	LS 0	70.30±3.86 ^b	-1.73±0.08 ^a	13.29±0.60 ^b
	LS 0.5	73.92±2.13 ^{ab}	-1.94±0.16 ^{ab}	18.45±0.93 ^a
	LS 1.0	75.71±3.10 ^a	-1.93±0.20 ^{ab}	17.27±1.09 ^a
	LS 1.5	74.35±2.77 ^{ab}	-2.13±0.22 ^b	17.92±0.64 ^a
	LS 2.0	74.84±1.25 ^a	-1.90±0.12 ^{ab}	18.09±0.70 ^a

^{a-e} Means with same alphabet in a column are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test.

¹⁾ The content of liposome coated salt.

(라) 조직감

- 서로 다른 농도의 리포솜 코팅된 소금을 첨가한 식빵 겉표면과 속질의 경도와 점착성을 측정한 결과 Fig. 3-3-60에 나타내었다. 속질의 경도는 LS 2.0을 첨가하여주었을 때 다른 처리구들에 비하여 값이 유의적으로 감소하였음을 관찰하였고, 겉표면에서는 유의적으로 차이를 나타내지 않았다($p > 0.05$).
- 겉표면과 속질의 점착성에서 리포솜 코팅된 소금의 함량이 적은 대조구와 LS 0.5에서 유의적으로 높은 값을 나타내었으며, 리포솜 코팅된 소금의 첨가량이 많을수록 점착성이 감소하는 것을 관찰하였다.



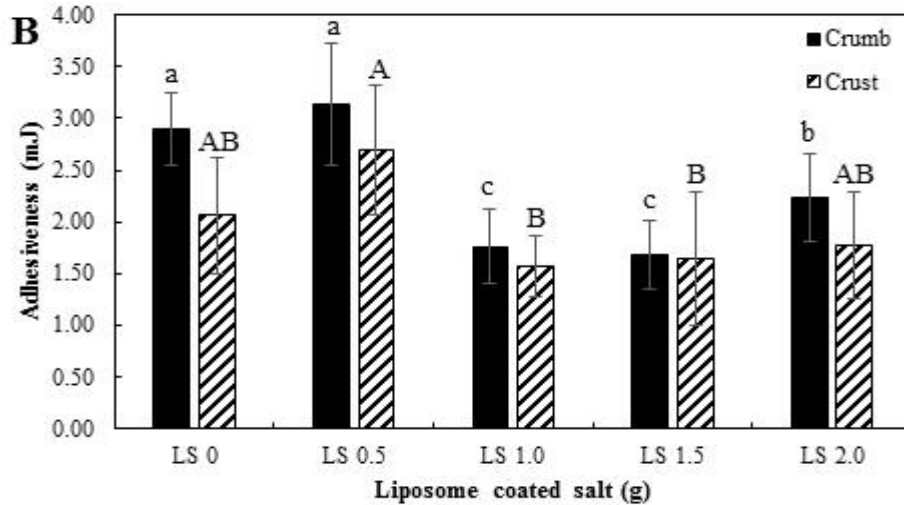


Fig. 3-3-60. Texture analysis of white pan bread added different concentration of encapsulated salt; A) hardness and B) adhesiveness. ^{a-c} Means with same alphabet are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test. ^{A-B} Means with same alphabet are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test. LS is the content of liposome coated salt.

(마) 관능평가 및 소금 용출 속도

- 리포솜 코팅된 소금 함량에 따른 식빵의 용출속도는 Fig. 3-3-61에 나타내었다. 초기 소금이 용출되는 속도에서 차이를 나타내지 않았으나, 600초가 경과하면서 차이가 관찰되었다. 결과적으로, LS 2.0에서 가장 많은 소금이 용출되는 것을 확인하였으며, LS 1.5에서 가장 낮은 값을 나타내는 것을 관찰하였다.
- 리포솜 코팅된 소금이 첨가되는 함량에 따른 관능평가의 결과는 Table 3-3-57과 같다. 겉표면과 속질의 색의 평가항목에서 LS 0은 가장 높은 선호도를 띄었으나, 이와 LS 1.5를 제외한 처리구간에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p > 0.05$). 향미와 기공의 균일성을 확인한 결과, 시료들간의 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p > 0.05$). 이와 같이 외관적인 항목에서 대조구와 리포솜 코팅한 소금을 넣은 식빵에서 유의적으로 차이를 나타내지 않고 비슷한 품질을 갖는 것을 관찰하였다.
- 리포솜 코팅된 소금의 농도를 다르게 첨가한 식빵에서 짠맛의 강도가 가장 높게 나타난 것은 LS 2.0으로, 리포솜 코팅된 소금으로만 제조된 식빵으로 관찰되었다. 그 다음으로는 LS 1.0, LS 0 순으로 강도가 높게 관찰되었으며, LS 0.5를 제외한 다른 처리구에서 유의적인 차이를 나타내지는 않았다($p > 0.05$). 이는 소금 용출 속도 측정의 결과 LS 2.0에서 용출되는 속도가 빠른 값을 나타내어 짠맛의 강도가 높은 것으로 관찰되었다고 사료된다.
- 또한 전체적인 선호도 평가 항목에서도 LS 2.0과 LS 1.0가 높은 값을 나타내었으며, 대조구와 유의적인 차이를 나타내지 않는 것을 관찰하였다($p > 0.05$).

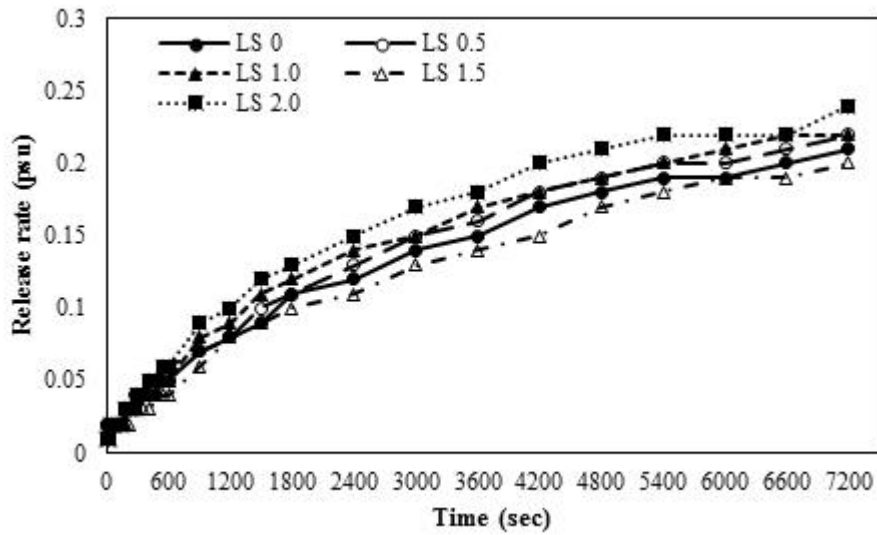


Fig. 3-3-61. Changes salt release rate of white pan bread added different concentration of encapsulated salt. LS is the content of liposome coated salt.

Table 3-3-57. Sensory test of white pan bread added different concentration of encapsulated salt

	Crust color	Crumb color	Flavor	Porosity	Saltiness	Overall acceptability
LS 0 ¹⁾	3.75±0.97 ^a	3.83±0.83 ^a	3.42±1.56 ^a	3.50±1.57 ^a	3.00±1.48 ^{ab}	3.42±1.31 ^a
LS 0.5	3.08±1.38 ^{ab}	2.83±1.40 ^{ab}	2.92±1.73 ^a	3.00±1.41 ^a	2.08±1.08 ^b	2.33±1.15 ^a
LS 1.0	2.67±1.23 ^{ab}	2.92±1.38 ^{ab}	3.33±1.56 ^a	2.50±1.09 ^a	3.42±1.31 ^a	3.25±1.42 ^a
LS 1.5	2.33±1.72 ^b	2.42±1.38 ^b	3.08±1.68 ^a	3.17±1.53 ^a	2.75±1.36 ^{ab}	2.58±1.56 ^a
LS 2.0	3.17±1.53 ^{ab}	3.00±1.41 ^{ab}	3.50±1.68 ^a	2.83±1.53 ^a	3.75±1.48 ^a	3.50±1.45 ^a

^{a-b} Means with same alphabet in a column are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test.

¹⁾ The content of liposome coated salt.

6. 전복 가수분해물이 포함된 저염 사골 육수 제조 (4차년도)

가. 전복 가수분해물의 이중에멀전 제조 및 사골육수 제조

(1) 전복 가수분해물의 이중 에멀전 제조 방법

○ 본 실험에서 대조구와 식염 대체제의 제조방법은 아래의 Table 3-3-58과 같다.

○ 1차 에멀전(W/O)의 제조에서 W과 oil의 비율은 1:4로 하였으며, 유화제는 oil과 같은 양으로 하여 넣어 주었다. 이를 초고속 균질기를 이용하여 8,000 rpm에서 3분 균질화 하여주었

다. 그 다음 초음파 균질기를 이용하여 40% power로 5분 동안 균질화하여 제조하였다.

- 다중 에멀전($W_1/O/W_2$)의 제조방법은 이미 제조된 W/O 와 W_2 의 비율을 1:4로 혼합하여, 초고속 균질기를 이용하여 8,000 rpm에서 3분간, 그 다음 초음파 균질기를 이용하여 40% power로 5분간 균질화하여 제조하였다.

(2) 사과 육수의 제조

- 사과 10 kg을 찬물에 2시간 담귀 핏물을 제거한 후, 사과 kg 당 5배의 증류수를 넣어 30분 동안 가열하여 혈액을 제거하였다. 그 후, 사과 kg 당 10배의 증류수를 넣어 센 불로 가열하여 끓인 후, 약한 불로 유지하여 12시간 동안 가열하여 사과 육수를 제조하였다. 상기 육수를 상온에서 냉각시킨 후, 면포를 이용하여 표면의 지방층을 제거하여 사용하였다.

(3) 관능평가 방법 (경기대 위탁과제)

- 염미 증진효과를 확인하기 위하여 상기 제조된 혼합물과 에멀전을 각각 10 ml씩 준비하였다. 준비된 시료는 실온으로 유지하였으며, 패널들은 시료를 맛본 후, 각 시료의 짠맛의 강도를 평가하였다. 관능평가는 5점 척도법으로 평가하였으며, 3번 반복한 결과를 통계 처리하였으며, t-test로 5% 수준에서 유의차를 검정하였다.
- 본 실험의 에멀전을 첨가한 사과 육수의 염미 증진 효과를 관찰하기 위하여, 5 ml의 사과 육수에 상기 제조된 혼합물과 에멀전을 0.6% 소금물과 염도가 동일하게 계산하여 첨가한 뒤 실험을 진행하여 주었다. 소금 용출 속도 측정: 제조된 5 ml의 혼합물과 에멀전이 포함된 사과 육수 100 ml을 150 rpm으로 교반하면서 시간에 따른 사과 육수의 염도를 측정하였다.

Table 3-3-58. The method of preparation of double-emulsion

Conventional		$W_1/O/W_2$ emulsion			
None	Salt enhancer	None	Salt enhancer		
Control	Mixture A	Emulsion B	Emulsion C	Emulsion D	
		Distilled water	Abalone extraction	Distilled water	W_1
0.6% NaCl solution	0.6% NaCl solution + 1% Abalone extraction	MCT oil	MCT oil	MCT oil	O
		0.6% NaCl solution	0.6% NaCl solution	0.6% NaCl solution + 1% Abalone extraction	W_2

나. 전복 가수분해물이 포함된 저염 사과 국물의 이화학적 특성

(1) Double-emulsion의 현미경 관찰

- 전복 가수분해물을 포함하는 double-emulsion의 현미경의 관찰결과를 Fig. 3-3-62에 나타내었다.

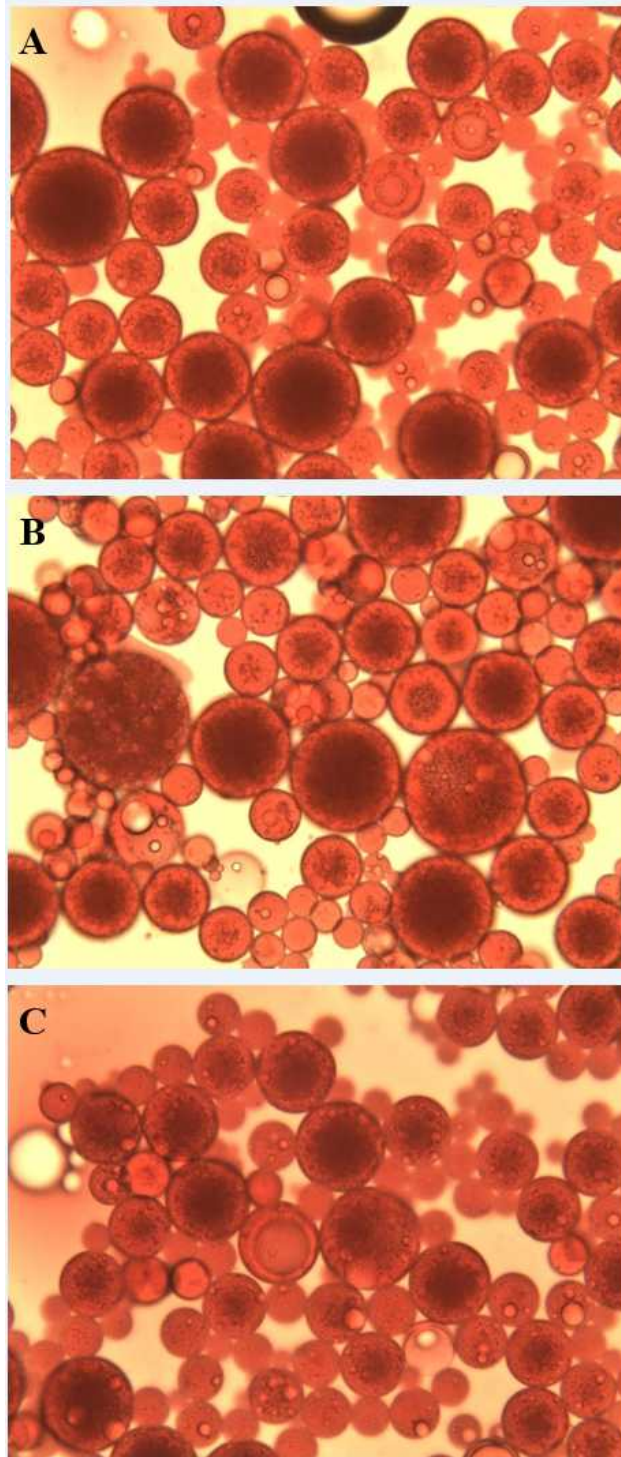


Fig. 3-3-62. Optical microscopy images of the water in oil in water ($W_1/O/W_2$) emulsions.

A, $W_1/O/W_2$ emulsion (W_1 , water; W_2 , 1% NaCl solution);

B, $W_1/O/W_2$ emulsion (W_1 , abalone extract solution; W_2 , 1% NaCl solution);

C, $W_1/O/W_2$ emulsion (W_1 , water; W_2 , 1% NaCl solution added abalone extract solution).

(2) 관능평가 (경기대 위탁)

- 염미 증강 효과가 있는지 확인하기 위해 관능평가를 실시한 결과를 Table 3-3-59와 60에 나타내었다. MCT oil을 포함한 W/O 에멀전으로부터 제조된 emulsion B와 D는 대조군과 A에 비해 관능평가에서 짠맛의 증진 효과는 낮은 것으로 관찰되었다. 반면, 전복 가수분해물을 포함하지 않는 대조군과 이를 포함한 A의 관능평가를 비교하였을 때, A에서 염미 증진 효과가 있음을 관찰하였다. 또한 emulsion B와 C 및 B와 D를 비교하였을 때, 전복 가수분해물을 포함하여 제조된 emulsion C와 D에서 염미 증진 효과가 나타나는 것을 관찰하였다. 또한 W₂에 전복 가수분해물을 포함하여 제조된 에멀전 D가 W₁에 전복 가수분해물을 포함하여 제조된 에멀전 C에 비해 염미 증진 효과가 더 크게 나타나는 것을 알 수 있었다.
- 본 실험 과정에 따라 제조된 전복 가수분해물을 포함하는 혼합물과 에멀전 C와 D를 사골 육수에 첨가하였을 때, 짠맛의 강도가 높아진 것을 관찰하였다. 특히, MCT oil을 사용한 W/O 에멀전을 포함하지 않는 A를 사골 육수에 넣었을 때, 가장 짠맛이 강한 것을 관찰하였다. 이러한 결과로부터, 전복 가수분해물을 포함하는 에멀전이 사골 육수의 짠맛을 증가시키는 것을 알 수 있었다. 따라서, 전복 가수분해물을 사용하여 음식의 짠 맛을 유지하면서 나트륨 함량은 낮출 수 있는 식염 대체제를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 3-3-59. Sensory test of mixture and emulsion

	Salty intensity
Control	3.4 ± 1.5 ^{ab}
Mixture A	3.8 ± 1.3 ^a
Emulsion B	2.3 ± 1.3 ^b
Emulsion C	2.5 ± 1.4 ^{ab}
Emulsion D	3.0 ± 1.3 ^{ab}

^{a-b} Means with same alphabet in a column are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test.

Table 3-3-60. Sensory test of beef bone broth added mixture and emulsion

	Salty intensity
Control	1.9 ± 1.2 ^b
Beef bone broth + Mixture A	3.7 ± 1.6 ^a
Beef bone broth + Emulsion B	2.5 ± 1.0 ^{ab}
Beef bone broth + Emulsion C	3.4 ± 0.8 ^a
Beef bone broth + Emulsion D	3.5 ± 1.6 ^a

^{a-b} Means with same alphabet in a column are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test.

(3) 소금 용출 속도

○ 사골 육수에서 $W_1/O/W_2$ 형 에멀전의 염 용출 속도를 측정한 결과를 Fig. 3-3-63에 나타내었다. 그 결과, emulsion C와 D에서는 10초 정도 지나서 염이 모두 용출 되었다. 따라서 전복 가수분해물을 포함하는 에멀전의 경우, 일반적으로 짠 맛을 내기 위해 사용하는 소금과 같은 속도로 용출되므로 조리용으로 쉽게 사용할 수 있음을 관찰하였다.

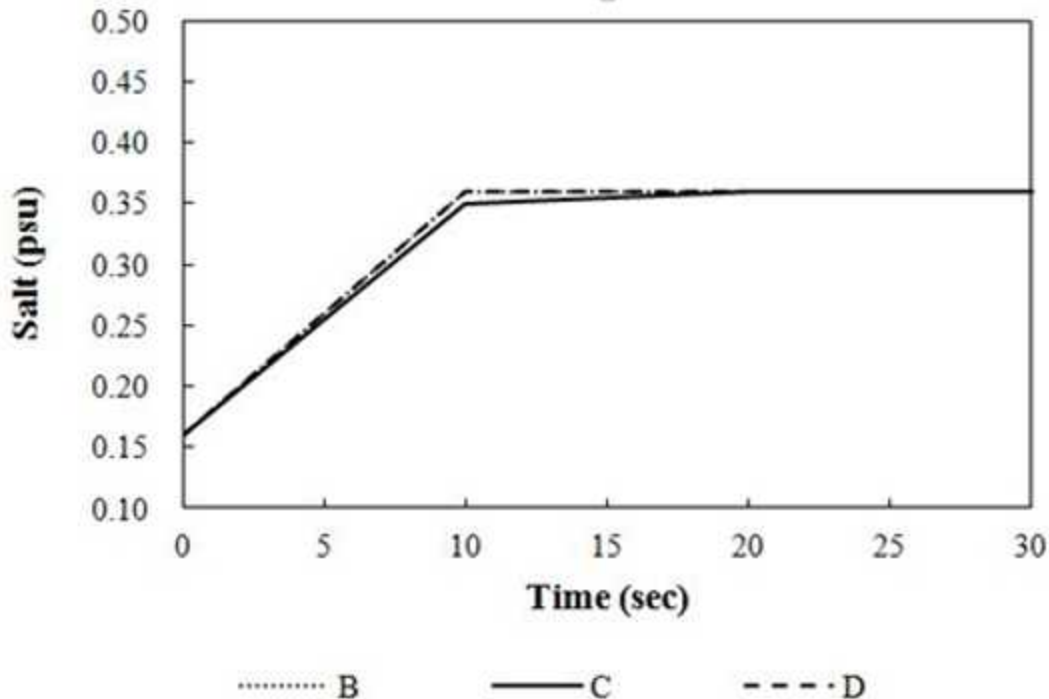


Fig. 3-3-63. Salt release rate of beef bone broth added double emulsion.

B, $W_1/O/W_2$ emulsion (W_1 , water; W_2 , 0.6% NaCl solution);

C, $W_1/O/W_2$ emulsion (W_1 , abalone extract solution; W_2 , 0.6% NaCl solution);

D, $W_1/O/W_2$ emulsion (W_1 , water; W_2 , 0.6% NaCl solution added 1% abalone extract).

7. 전복 가수분해물이 포함된 저염 치즈 제조 (4차년도)

가. 전복 가수분해물의 이중에멀전 제조 및 사골육수 제조

(1) 전복 가수분해물의 이중 에멀전 및 치즈 제조 방법

○ 본 실험에서 대조구와 식염 대체제의 제조방법은 위 실험인 사골에서의 double-emulsion과 동일하다.

○ 저염 살균된 시판 우유 500 mL을 water bath를 이용하여 37°C로 가열한 후, 2 g citric acid (우유 대비 0.4%)와 0.5 mL의 40% (w/v) calcium chloride 용액 (우유 대비 0.1%)과 0.5 mL rennet (우유 대비 0.1%)를 첨가하여 50°C로 50분간 응집시킨다. 그 후 5 g NaCl (대조구) 혹은 5 g double emulsion (처리구)를 첨가한다. 10분 뒤, 형성된 curd를 1 cm간격으로

커팅하고 면포와 체를 이용하여 유청을 제거하며, 25°C에서 2시간 동안 진행하여준다. 제조된 생치즈를 플라스틱 틀에 넣어 냉장 보관하였다.

- 수율 측정: 서로 다른 double emulsion이 첨가된 생치즈의 수율은 우유에서 생성된 커드의 양을 백분율로 나타낸 것으로 다음의 식과 같다.

$$Yield(\%) = \frac{Fresh\ curd(g)}{Milk(g)} \times 100$$

- pH 측정: 서로 다른 double emulsion이 첨가된 생치즈의 pH는 3 g 생치즈와 27 ml 증류수를 household blender (CNHR 26, Bosch, Slovenia)를 이용하여 1분간 균질화한 뒤, pH meter (Orion 3-STAR, Thermo scientific, USA)를 이용하여 측정하였다.
- 수분함량 측정 : Double emulsion이 첨가된 생치즈의 수분함량은 AOAC 법(AOAC, 1990)에 준하여 측정하였다.
- 색도 측정 : Double emulsion이 첨가된 생치즈의 색도는 chromameter (CR-200, KONICA MINOLTA, Osaka, Japan)를 이용하여 Huter의 색계인 밝기를 나타내는 명도(L*-value, lightness), 붉음의 정도를 나타내는 적색도(a*-value, redness), 노란색의 정도를 나타내는 황색도(b*-value, yellowness)를 측정하였다. 이 때, 기준인 백색판의 명도는 94.51, 적색도는 -0.66 그리고 황색도는 3.31을 나타내었다.
- 조직감 측정 : 생치즈의 조직감을 측정하기 위하여 texture analyzer (CT3-1000, Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, MA, USA)를 이용하였으며, TA39 probe와 TA-RT-KI fixture를 사용하였다. 치즈 20 g을 가로와 세로가 22 × 50 mm인 실린더에 채워 규격화 한 후 측정하였다, 50% 변형이 일어나도록 압착하였으며, trigger load는 50 g, test speed 2 mm/s로 설정하여 3번 이상 반복 측정하였다.
- 소금 용출 속도 측정 : 서로 다른 double emulsion이 첨가된 생치즈의 소금 용출 속도를 측정하기 위하여 2 g의 치즈와 100 ml의 증류수를 high speed homogenizer를 이용하여 300 rpm으로 160초간 혼합한 뒤 염도를 측정하여 나타내었다.
- 관능평가 (경기대 위탁) : 서로 다른 double emulsion이 첨가된 생치즈의 염미 증진효과를 확인하기 위하여 관능평가를 진행하였다. 준비된 시료는 1 g으로 준비하였으며, 패널들은 시료를 맛본 후, 각 시료를 평가하였다. 관능평가는 5점 척도법으로 평가하였으며, 선호도가 높을수록 1, 낮을수록 5의 점수로 하여 나타내었다. 시료의 결과는 3번 반복 실험하여 나타내었다.

나. 전복 가수분해물의 이중 에멀전 및 치즈의 이화학적 특성

(1) 수율, 수분함량 및 pH

○ 서로 다른 double emulsion을 첨가해준 생치즈의 수율, 수분함량 및 pH의 결과는 Table 3-3-61과 같다. 수율은 대조구에서 가장 높은 값을 나타냈으나, 처리구와 큰 차이를 나타내지 않았다. 수분함량과 pH의 결과 유의적인 차이를 나타내지 않았으며($p>0.05$), 이를 통해 double emulsion을 생치즈 제조에 첨가하였을 경우, 치즈의 물성에 큰 영향을 미치지 않는 것을 관찰하였다.

Table 3-3-61. Properties of fresh cheese added double emulsions

	Yield (%)	Moisture (%)	pH
Control	24.1	69.0 ± 1.04 ^a	5.04 ± 0.07 ^a
A	20.9	69.4 ± 0.55 ^a	5.16 ± 0.11 ^a
B	23.0	68.3 ± 5.31 ^a	5.02 ± 0.05 ^a
C	22.5	69.5 ± 0.28 ^a	5.02 ± 0.05 ^a

^a Means with same superscripts in each column are significantly not different ($p<0.05$).

Control, 1% NaCl solution;

A, W₁/O/W₂ emulsion (W₁, water; W₂, 1%NaCl solution);

B, W₁/O/W₂ emulsion (W₁, abalone extract solution; W₂, 1% NaCl solution);

C, W₁/O/W₂ emulsion (W₁, water; W₂, 1% NaCl solution added abalone extract solution).

(2) 색도

○ 서로 다른 double emulsion을 첨가해준 생치즈의 색도의 결과는 Table 3-3-62와 같다. 명도, 적색도 황색도의 결과 대조구와 처리구간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p>0.05$). 이와 같은 결과로 에멀전의 첨가는 생치즈의 색도에 영향을 미치지 않으며, 비슷한 특성을 나타내는 것을 확인하였다.

Table 3-3-62. Color of fresh cheese added double emulsions

	L*	a*	b*
Control	88.31 ± 0.24 ^a	-1.84 ± 0.03 ^a	6.71 ± 0.21 ^a
A	87.74 ± 1.03 ^a	-1.86 ± 0.09 ^a	7.07 ± 0.41 ^a
B	87.87 ± 0.12 ^a	-1.87 ± 0.02 ^a	6.64 ± 0.05 ^a
C	87.27 ± 0.22 ^a	-1.82 ± 0.04 ^a	6.72 ± 0.04 ^a

^a Means with same superscripts in each column are significantly not different ($p<0.05$).

Control, 1% NaCl solution;

A, W₁/O/W₂ emulsion (W₁, water; W₂, 1%NaCl solution);

B, W₁/O/W₂ emulsion (W₁, abalone extract solution; W₂, 1% NaCl solution);

C, W₁/O/W₂ emulsion (W₁, water; W₂, 1% NaCl solution added abalone extract solution).

(3) 조직감 측정

○ 서로 다른 double emulsion을 첨가해준 생치즈의 조직감 측정의 결과는 Table 3-3-63과 같다. 경도(hardness), 점착성(adhesiveness), 응집성(cohesiveness)의 경우 유의적인 차이를 나타내지 않았으나($p>0.05$), 복원성(springiness)와 씹힘성(chewiness)의 경우 전복 가수분해물이 W₂에 포함된 C의 시료에서 다른 시료들과 유의적으로 높은 값을 나타내었다($p<0.05$). 대조구와 A, B의 시료에서는 모든 측정 항목에서 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 이를 통해 A와 B의 경우, 생치즈 제조에 에멀전은 큰 영향을 미치지 않는 것을 관찰하였다.

Table 3-3-63. Texture of fresh cheese added double emulsions

	Hardness (g)	Adhesiveness (mJ)	Cohesiveness	Springiness (mm)	Chewiness (mJ)
Control	13.0 ± 2.2 ^a	0.6 ± 0.1 ^a	0.7 ± 0.1 ^b	11.1 ± 1.0 ^b	1.0 ± 0.2 ^b
A	15.0 ± 1.6 ^a	0.6 ± 0.1 ^a	0.6 ± 0.1 ^c	10.5 ± 1.0 ^b	1.1 ± 0.2 ^b
B	13.0 ± 2.0 ^a	0.7 ± 0.1 ^a	0.8 ± 0.1 ^a	11.1 ± 1.0 ^b	1.1 ± 0.3 ^b
C	14.6 ± 2.6 ^a	0.6 ± 0.1 ^a	0.7 ± 0.1 ^b	13.1 ± 2.3 ^a	1.3 ± 0.3 ^a

^{a-c} Means with different superscripts in each column are significantly different ($p<0.05$).

Control, 1% NaCl solution;

A, W₁/O/W₂ emulsion (W₁, water; W₂, 1%NaCl solution);

B, W₁/O/W₂ emulsion (W₁, abalone extract solution; W₂, 1% NaCl solution);

C, W₁/O/W₂ emulsion (W₁, water; W₂, 1% NaCl solution added abalone extract solution).

(4) 관능평가 및 소금 용출 속도

○ 서로 다른 double emulsion을 첨가해준 생치즈의 관능평가 및 소금 용출 속도의 결과는 Table 3-3-64와 Fig. 3-3-64에 나타내었다. 생치즈의 향미, 짠맛의 강도와 전체적인 선호도는 유의적인 차이를 나타내지 않았으나($p>0.05$), 짠맛 강도의 선호도는 C에서 가장 높은 것을 관찰할 수 있었다. 이는 소금 용출 속도의 결과에서, C가 가장 빠르게 소금이 용출된 것과 관련이 있으며, 이로 인해 짠맛을 빠르게 인지하는데 영향을 주었을 것으로 사료된다. 느끼함 정도는 에멀전을 첨가한 시료에서 다소 높은 값을 나타내었지만, A와 B는 대조구와 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p>0.05$).

Table 3-3-64. Sensory evaluation of fresh cheese added double emulsions

	Flavor	Salty intensity	Oiliness	Overall preference
Control	2.3 ± 1.0 ^a	2.6 ± 1.1 ^a	2.0 ± 1.2 ^b	2.5 ± 1.3 ^a
A	2.5 ± 1.2 ^a	3.0 ± 1.4 ^a	2.1 ± 0.4 ^b	2.2 ± 1.1 ^a
B	2.5 ± 1.2 ^a	2.4 ± 1.2 ^a	2.5 ± 1.3 ^b	2.7 ± 0.9 ^a
C	2.8 ± 1.3 ^a	2.0 ± 0.8 ^a	3.4 ± 0.8 ^a	2.6 ± 1.2 ^a

^{a-b} Means with different superscripts in each column are significantly different ($p < 0.05$).

Control, 1% NaCl solution;

A, W₁/O/W₂ emulsion (W₁, water; W₂, 1%NaCl solution);

B, W₁/O/W₂ emulsion (W₁, abalone extract solution; W₂, 1% NaCl solution);

C, W₁/O/W₂ emulsion (W₁, water; W₂, 1% NaCl solution added abalone extract solution).

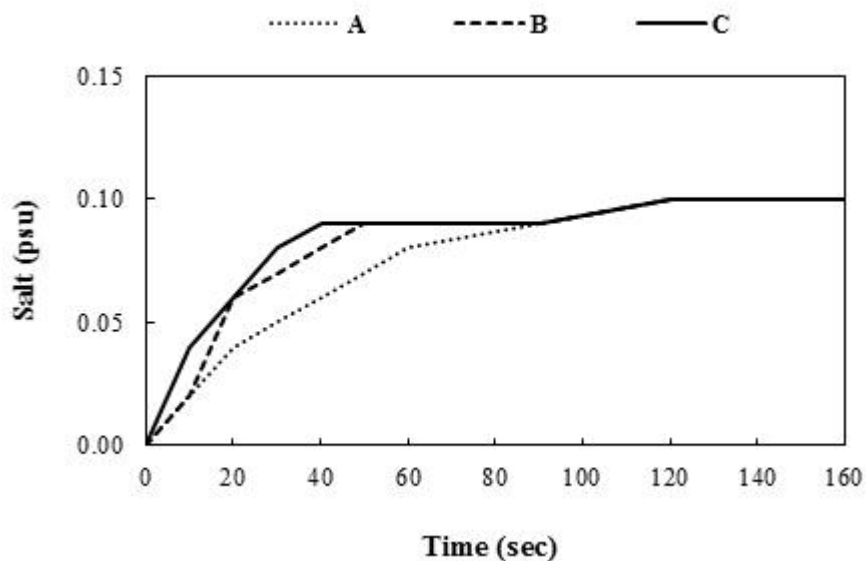


Fig. 3-3-64. Salt release rate of curd added double emulsions.

Control, 1% NaCl solution;

A, W₁/O/W₂ emulsion (W₁, water; W₂, 1%NaCl solution);

B, W₁/O/W₂ emulsion (W₁, abalone extract solution; W₂, 1% NaCl solution);

C, W₁/O/W₂ emulsion (W₁, water; W₂, 1% NaCl solution added abalone extract solution).

8. 연구개발성과

- 나노입자성 저염 소금 시제품 개발
- 저염화된 저염스낵, 저염제빵, 저염국수 시제품 개발
- 저염화된 저염치즈 및 저염사골국물 제조법 개발
- 이 이외에 다음과 같은 연구 개발 성과를 얻음

가. 논문게재 성과

연 번	게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol (No.)	국내외 구분	SCI 구분
			주저자	교신저자	공동저자				
1	2016	멸치 가수분해 물이 건면 짬맛에 미치는 영향	이지선	최미정	조형용 이미연 고은영 신정규	산업식품 공학회지	20(1)	국내	비SC I
2	2016	리포솜으로 코팅된 소금이 국수의 짬맛에 미치는 영향	이지선	최미정	이미연 조형용	산업식품 공학회지	20(2)	국내	비SC I
3	2016	5 kDa 미만의 oligopeptide가 건면의 짬맛에 미치는 영향 분석	이지선	최미정	조형용	산업식품 공학회지	20(3)	국내	비SC I
4	2016	리포솜으로 코팅된 소금이 제빵에 미치는 영향	이지선	최미정	고은영	산업식품 공학회지		국내	비SC I(심사중)
5	2014	Effect of partial substitutions of NaCl with KCl, CaSO ₄ on on the Quality Characteristics and Sensorial Properties of Pork Patties	Munkhtugs Davaats eren	최미정	천지연 조형용 민상기	Korean Society for Food Science of Animal Resource s	34(4)	국내	SCI
6	2014	Effects of NaCl Replacement	천지연	최미정	김병수 이중규	Korean Society for Food	34(4)	국내	SCI

		with Gamma-Amino butyric acid (GABA) on the Quality Characteristics and Sensorial Properties of Model Meat Products			조형용 민상기	Science of Animal Resource s			
7	2014	Effect of NaCl/Monosodi um Glutamate (MSG) Mixture on the Sensorial properties and Quality Characteristics of Model Meat Products	천지연	최미정	김병수 이중규 조형용 민상기	Korean Society for Food Science of Animal Resource s	34(5)	국내	SCI
8	2015	Effect of Spray-Drying Process on Physical Properties of Sodium Chloride/Maltod extrin Complexes	천지연	최미정	김병수 조형용	Powder technolo gy	277	국외	SCI
9	2016	Effect of W ₁ /O/W ₂ Double emulsion containing salty taste enhancer on beef bone broth	김수진	최미정	이지선	Korean Society for Food Science of Animal Resource s		국내	SCI (심사 중)

10	2016	Effect of W ₁ /O/W ₂ Double emulsion containing salty taste enhancer on cheese	최희정	최미정	이지선, 김수진, 고은영	Korean Society for Food Science of Animal Resources	국내	SCI (심사중)
----	------	--	-----	-----	---------------	---	----	-----------

나. 학술발표성과

연번	발표일자 (년.월.일)	발표논문명	행사명	행사장소	구분	영문/국문
1	13.05.16.	Effect of spray drying process on size of maltodextrin/NaCl complex	한국산업식품공학회	일산	국내	영문
2	13.08.28.	Operating condition of spray-drying process on particle size of microparticle and NaCl nanoparticles and salty taste	제 80차 한국식품과학회 (국제학술대회)	천안	국내	영문
3	13.08.28.	Effect of GABA and MSG on salty taste enhancement	제 80차 한국식품과학회	천안	국내	영문
4	14.05.16.	The effect of yeast and NaCl mixture method on bread quality	한국산업식품공학회	서울	국내	영문
5	14.08.25.	The effect of sodium substitutes on the saltiness of pork patty	제 81차 한국식품과학회 (국제학술대회)	광주	국내	영문
6	14.08.25.	The effect of hydrolyzed animal protein on saltiness of white pan bread	제 81차 한국식품과학회 (국제학술대회)	광주	국내	영문
7	14.10.27.	The effect of MSG or GABA on quality of pork patty as saltiness enhancers	한국식품영양과학회	대전	국내	영문
8	15.06.03.	Effect of liposome	한국식품과학회	부산	국내	영문

		encapsulated salt on noodle physicochemical properties	(국제 학술대회)			
9	15.11.11.	Effect of hydrolyzed animal protein on noodle properties as salty taste enhancer	한국산업식품공학회	서울	국내	영문
10	16.04.29.	Effect of sodium chloride/maltodextrin complex on puffed snack as salty taste enhancement	한국산업식품공학회	수원	국내	영문
11	16.04.29.	Effect of W ₁ /O/W ₂ multiple emulsion on fresh cheese as salty taste enhancer	한국산업식품공학회	수원	국내	영문

다. 특허성과

연번	계재연도	특허명	출원/등록번호	국내외 구분	구분
1	2013	나노입자성 저염 건식소금 및 그 제조방법	10-2013-0098379	대한민국	출원
2	2014	GABA를 이용하여 육류 가공식품을 저염화시키는 방법	10-2014-0195287	대한민국	출원
3	2014	저염화 빵의 제조방법	10-2014-0195281	대한민국	출원
4	2016	저염 건면의 제조방법 및 이에 따라 제조된 저염 건면	10-2016-0050275	대한민국	출원
5		전복 가수분해물을 포함하는 식염 대체제 및 그 제조방법		대한민국	출원
6	2015	나노입자성 저염 건식 소금 및 그 제조방법	10-1522774	대한민국	등록
7	2015	저염화 빵의 제조방법	10-1539901	대한민국	등록

라. 인력활용/양성

기준년도	인력양성 현황										
	학위별				성별		지역별				
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
2014-2016		1	1		1	1	2				

마. 기술이전

계약일	계약명	계약번호	금액 (천원)	회사명	구분
16.06.14	저염화 빵의 제조방법	2016-07-0002	10,000	제이피푸드	통상실시

바. 수상실적

연번	수상일	수상(포상)명	수여기관
1	2013.05.16	우수논문발표상 'Effect of spray drying drying process on size of maltodextrin/NaCl complex'	한국산업식품공학회
2	2016.04.29	우수논문발표상 '분무건조를 사용하여 제조한 NaCl-maltodextrin 복합체를 적용한 쌀튀기의 짠맛 증진 효과'	한국산업식품공학회

사. 홍보활동

연번	홍보일	내용	홍보기관
1	16.08.09	저염 건식 소금 제조 특허 (나노 입자성 저염 건식 소금 및 그 제조 방법) 소개	2016 농식품 유망기술 발표회 (농림축산식품부)
2	16.09.01. - 16.09.04.	식품 R&D관 저염화 빵 제조 방법 소개	2016 대한민국 식품대전

아. 성과예정

연번	성과예정	구분	제목
1	특허	등록	저염화 빵의 제조방법
2	논문	SCI	전복 가수분해물이 포함된 저염 치즈 제조
3	논문	SCI	Baking of saltiness enhanced white pan bread by inhomogeneous spatial distribution
4	논문	SCI	Baking of white pan bread added Hydrolyzed animal protein as enhancer for promoted saltiness
5	논문	비SCI	리포솜 코팅된 소금을 첨가한 식빵에서의 물성 및 짠맛 증진 효과 분석
6	인적자원	석사졸업	2017.02. 이지선 석사 졸업 예정
7	학술대회	2016 추계 산업식품공학회	Effect of liposome encapsulated salt on physicochemical and sensory evaluation of white pan bread

제 4 절 신제조공정을 이용한 단백가수분해물 제조와 이를 활용한 저염화방법 개발

1. 식물성 단백질 분해를 위한 효소제의 선정 및 고온/고압 효소분해조건 연구

가. 실험 방법

(1) 시료 전처리

- 가수분해물이 원심분리를 하여도 현탁물질이 분리되지 않으므로 12,000rpm에서 20분간 원심분리한 상등액을 다시 0.45 μ m syringe filter로 여과하여 분석시료를 제조하였다.

(2) 고형분 측정법

- 가수분해물의 고형분은 상압가열건조법을 사용하였다. 시료 적정량을 취하여 105 $^{\circ}$ C 오븐에서 완벽히 건조(약 24시간)시켜 수분을 제거 후 다시 칭량하여 건조 전과 후의 중량이 감소되는 양을 수분의 함량으로 구하여 고형분 함량을 계산하였다.

(3) 가수분해도 측정법(OPA법)

- 가수분해물의 가수분해도(Degree of Hydrolysis)는 OPA법을 이용하여 측정하였다.(Church and others,1983) di-sodium tetraborate 7.62g과 SDS(Na-dodecyl-sulfate) 0.2g을 증류수 150ml에 녹인후 OPA(o-phthaldialdehyde) 0.16g을 4ml의 에탄올에 용해시켰다. DTT(dithiolthreitol 99%) 0.176g을 넣고 총 volume이 200ml이 되도록 증류수로 맞춰 OPA reagent를 제조하였다.
- Standard는 serine 을 증류수에 녹여 총 volume이 500ml이 되도록 제조하였고, sample은 protein 농도가 8~80%가 되도록 희석하여 준비하였다.
- OPA reagent를 test tube에 3ml 씩 준비하고 blank(증류수), standard(serine), sample(희석된 가수분해물)을 400 μ l씩 투입하여 5초간 vortexing 후 정확히 2분간 반응시키며 흡광도 340nm에서 측정하여 다음과 같이 계산하였다.

$$DH = h / h_{tot} * 100(\%)$$

$$h = (\text{serine-NH}_2 - \beta) / \alpha \text{ (meqv/g protein)}$$

$$\text{Serine-NH}_2 = (\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank}} / \text{OD}_{\text{standard}} - \text{OD}_{\text{blank}}) * (0.9516 \text{ meqv/L} * 0.1 * 100) / (X * P)$$

* X = g sample, P = protein % in sample.

Table 3-4-1. Value of constants α , β , and h_{tot} for different protein raw materials

protein	α	β	h_{tot}
soy	0.970	0.342	7.8
gluten	1.00	0.40	8.3

(4) 분자량분포(GPC)측정

- 가수분해물의 분자량 분포는 Gel Permeation Chromatography(GPC)로 분석하였으며 분석조건은 아래의 표와 같으며, 표준물질로는 vitamin B12(Mw=1355.37), vitamin B1(Mw=337.27), L-glutamic acid(Mw 147.13)을 사용하였다.

Table 3-4-2. GPC 분석조건

Instrument	GE Healthcare AKTA prime plus
Column size	XK16/70
Column lesin	Sephadex G-10
Mobile phase	Formic acid 1%
Flow rate	0.5ml/min
Wavelength	214nm
Fraction size	5ml

Table 3-4-3. GPC standard 물질

	Standard 물질	Retention (min)	standard분자량
I	Vitamin B ₁₂	89.72	1355.37
II	Vitamin B ₁	101.95	337.27
III	L-Glutamic acid	129.2	147.13

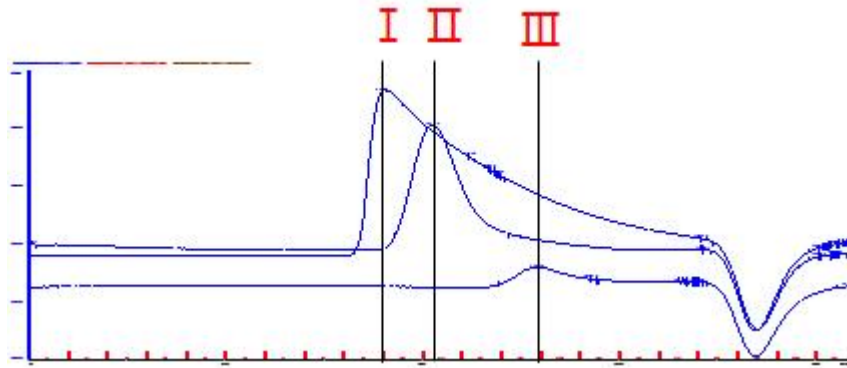


Fig. 3-4-1. GPC chromatogram for standard.

(5) Glutamate 측정(HPLC)

- Glutamate 정량 분석하기 위하여 RP-HPLC(Waters 2695)를 이용하였다. 가수분해물 20% TCA와 2ml:1ml(2:1)로 20min 반응시켜 단백질을 침전 시키고 상등액을 13000rpm으로 15min 원심분리 후 상등액을 0.2 μ m의 syringe filter(sartorius)를 이용하여 필터 과정을 거쳤다. 이렇게 얻어진 시료 10 μ l와 borate buffer(Agilent) 50 μ l, 3차 D·W 640 μ l를 혼합 후 o-phthaldialdehyde(OPA) 10 μ l를 이용하여 유도체화 과정 후 RP-HPLC에 적용되었다.
- HPLC column으로는 ZORBAX Eclipse AAA column(Agilent : 5 μ m, 4.6mm \times 150mm)을 사용하였으며 이동상으로는 40mM potassium phosphate(pH 7.8)를 Buffer A로, 그리고 acetonitrile(HPLC grade) : methanol(HPLC grade) : 3차 DW를 각각 45:45:10(v/v/v)의 비율로 혼합한 것을 Buffer B로 사용하였다. 그리고 각 시료 측정마다 세척을 위해 3차 D·W를 Buffer C로 사용하였다. 이동상의 유속은 2ml/min로 고정하여, 농도구배를 주어 분석하여, 340nm~450nm의 Scanning Fluorescence detector(Waters 474)로 glutamate를 검출하였다.

(6) 효소 활성(enzyme activity) 측정

- Casein (Sigma C-7078, USA) 분말을 0.03M phosphate buffer (pH7.5) 에 20mg/mL 의 농도로 기질을 제조하였다. 기질 5ml에 효소액을 각각 1ml씩 첨가하고 50 $^{\circ}$ C 에서 30분간 반응시킨 후 0.44M TCA용액을 5ml 첨가하여 vortexing 후 실온에 30분간 정치시켜 효소반응을 중단시켰다. 12,000 x g, 10분간 원심분리하여 상등액을 취하여 syringe filter에 통과시킨 여과액 1ml에 0.55M Na₂CO₃용액 2.5ml, 1N Folin & Ciocalteu(Sigma F-9252, USA) 0.5ml을 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 발색상온에 10분간 정치시킨 후 660nm에서 흡광도를 측정하였다.
- 표준곡선은 L-tyrosine(Sigma T-3754, USA)을 물에 녹여 2, 5, 10, 20, 33.3, 50 μ g/ml 농도가 되도록 제조하여 사용 하였다. 계산 시 효소 액 1ml 이 1분간 1 μ g 에 해당하는

tyrosine을 생산하는 것을 1unit 으로 하였다.

나. HVP(Hydrolyzed Vegetable Protein)제조를 위한 원물 선정

- HVP를 제조하기 위한 식물성 단백질원의 선정을 위하여 밀글루텐 (ROYAL INGREDIENTS GROUP B.V), 분리대두단백질(SUIHUA JINLONG VEGETABLE OIL CO.LTD)을 구입하여 사용하였고, 이들의 일반성분과 아미노산 조성은 다음과 같다.

Table 3-4-4. 밀글루텐과 분리대두단백의 일반성분조성

	조단백%	조회분%	조지방%
밀글루텐	73.66	0.89	4.66
SPI	82.74	5.19	2.27

<수원여대, 식품분석 연구센터>

Table 3-4-5. 밀글루텐과 SPI 아미노산조성

	aspartate	glutamate	asparagine	serine	glutamine	histidine	glycin	threonine	arginine	alanine	taurine	GABA
SPI	12.27	16.05	0.00	5.83	0.00	2.71	4.56	4.10	8.71	4.64	0.00	0.00
WG	3.70	30.68	0.00	5.52	0.00	2.27	3.82	2.92	4.20	3.04	0.00	0.00
	tyrosine	valine	methionine	norvaline	tryptophan	phenylalane	isoleucine	leucine	lysine	hydro proline	sarcosine	-
SPI	4.01	5.01	1.41	0.00	0.00	5.90	5.37	8.69	4.73	0.00	0.00	-
WG	3.69	4.32	1.64	0.00	0.00	5.91	4.38	7.84	1.32	0.00	0.00	-

<서울대학교, NICEM>

□ 밀단백질(wheat gluten)

- 밀단백질은 밀에 10~18 중량%, 밀가루에 8~16 중량% 함유되어 있으며 물에 불용성인 글리아딘과 글루테닌의 복합체인 글루텐이 전체 단백질의 85%정도를 차지하며 비글루텐 단백질로 알부민과 글로불린으로 이루어져 있다. 글루텐의 아미노산 조성은 글루타메이트의 함량이 약 30~40%정도로 다른 단백질에 비하여 매우 높은 특징을 가지고 있으므로, 증미 성분으로 알려진 글루타메이트를 고함유한 HVP의 제조에 유리할 것으로 판단된다. 본 실험에 사용한 밀글루텐은 단백질 함량 76%, 아미노산 조성은 glutamate가 30.1%인 것으로 확인되었다.
- 그러나 밀글루텐은 물에 불용성이며 점탄성이 있어 물과 함께 혼합하여 교반하게 되면 응집하게 되어 반응기 벽면이나 교반기에 눌러 붙게 되므로 원활한 효소가수분해를 하기 위해서는 분산(dispersion)과 액화(liquefaction)과정이 필요함. 밀글루텐을 분산시키는 방법으로는 산 또는 알카리 처리, 가열 처리, NaCl 첨가, 고온 분산 등의 방법이 고안되었으나(국제특허 PCT/JP1999/02171) 산 또는 알카리 처리방법은 산 또는 알카리에 의한 글

루텐의 가수분해가 일어나게 되고 중화시 생성되는 염의 탈염 공정 등이 문제가 되므로 제외하였고, NaCl 첨가 방법은 본 연구의 목적이 Na의 저감이므로 본 연구의 목적과 맞지 않아 사용하지 않았다.

□ 분리대두단백질

- 두류단백질은 콩에 40% 가량 함유되어 있는 대표적인 식물성 단백질로 80% 이상이 글라이시닌으로 이루어져 있으며 아미노산 조성은 글루타메이트가 15~20% 정도를 차지하며 메싸이오닌과 트립토판을 제외한 필수아미노산 함량이 높아 가공식품, 사료 등의 원료로 많이 사용되고 있으며 특히 우리나라에서는 전통적으로 간장, 된장 등의 조미료(항미증진제)의 원료로 사용되어 왔다. 본 실험에 사용한 분리대두 단백질은 단백질 함량이 82.7%, 아미노산 조성은 glutamate가 16%인 것으로 확인되었다.
- 실험에 사용하기 위한 단백질원인 밀글루텐과 분리대두단백질은 90°C의 물에 소량씩 첨가하며 교반하여 분산시키거나, 50~55°C의 Alcalase나 Protamex 등의 효소액에 소량씩 첨가하면서 pH를 7.0으로 보정하면서 액화시켰다.

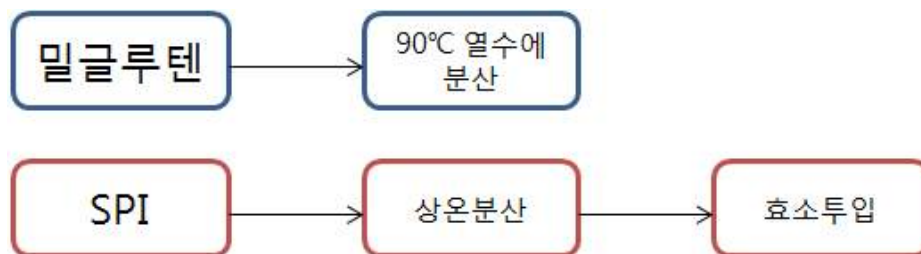


Fig. 3-4-2. 밀글루텐과 분리대두단백(SPI)의 전처리 방법

다. 상업용 단백질 가수분해 효소의 선정

- 상업용 단백질분해효소로는 endo-protease로 Protamex, Neutrase, Alcalase를 구입하여 사용하였고, exo-protease로는 Flavourzyme을 이용하여 각 효소의 가수분해 특성을 살펴 보았다.

Table 3-4-6. 시판효소의 특성

Enzyme	Class	Source	Activity	T _{opt} (°C)	t _{reaction} (hr)	pH _{opt}	Dosage (g/kg)	Manufacturer
Protamex	Protease (Subtilisin)	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1.5 AU-N/g 230,000 PC/g	50~55	1~4	6.0~7.5	1~2	Novozyme, (Bagsvaerd, Denmark)
Neutrase	Protease (neutral, metalloproteinase (Zn), β-glucanase)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0.8 AU-NH/g 160,000 PC/g	50~55	1~2	6.0~7.0	5~20	Novozyme, (Bagsvaerd, Denmark)
Alcalase	Protease (Subtilisin, endoprotease)	<i>Bacillus licheniformis</i>	2.4 AU-A/g 230,000 PC/g	50~60	1~4	6.5~8.5	1~2	Novozyme, (Bagsvaerd, Denmark)
Flavourzyme	Protease (exoprotease)	<i>Aspergillus oryzae</i>	500LAPU/g	50	1~48	5.0~7.0	-	Novozyme, (Bagsvaerd, Denmark)

- 밀글루텐을 90°C의 증류수에 10%(w/v) 농도로 첨가하여 분산시키고, 기질 기준으로 1%(w/w)의 Protamex, Neutrase, Alcalase 및 Flavourzyme을 첨가한 후, 50°C shaking water bath에서 가수분해시켰다. pH는 수시로 1N-NaOH를 이용하여 7.0으로 보정하며 반응시켰다.
- 가용화율은 반응초기 30분 이내에서 빠르게 증가하여 Alcalase의 경우 76%, Protamex는 69%, Neutrase는 57%였으나, Flavourzyme은 33%에 머물렀다. Endo protease인 Alcalase, Protamex, Neutrase는 30분 이후 400분까지 완만한 증가를 보여 Alcalase의 경우 300분에서 최대 97%의 가용화율을 보였다. 그러나 exo-protease인 Flavourzyme은 다른 효소에 비하여 30분 이후에도 가용화율이 꾸준히 증가하는 경향을 보여 360분에서 최대 68%의 가용화율을 보였다.

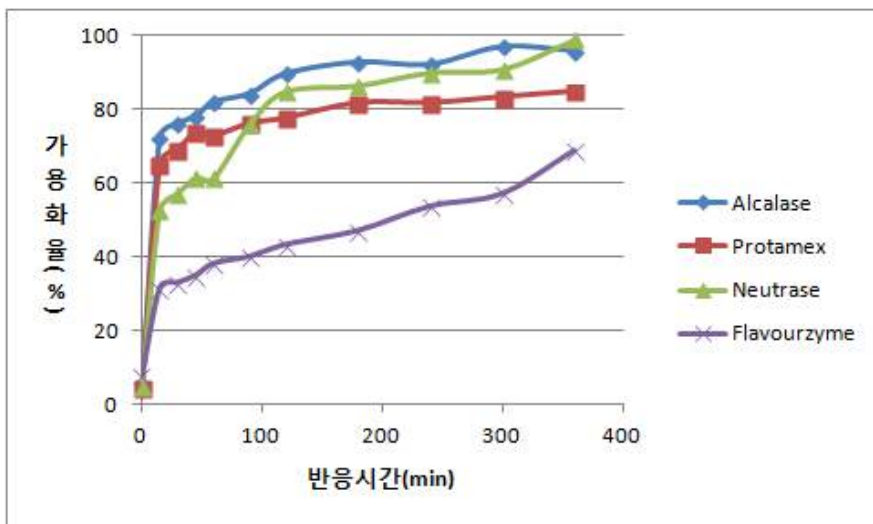


Fig. 3-4-3. 시판효소가수분해에 의한 밀글루텐의 가용화율

- 한편, 가수분해도는 가용화율과 유사하게 Alcalase, Protamex, Neutrase는 반응초기 30분 까지 빠르게 증가하다 이후 완만한 증가를 보여 Alcalase는 360분에서 최고 11.3%의 가수분해도를 보였다. Flavourzyme은 반응시간에 따라 초기부터 꾸준히 증가하여 360분에서는 최고 10.4%의 가수분해율을 나타내었다. 이는 exo-protease인 Flavourzyme의 가수분해 특징에서 기인한 것으로 보이며, 이에 따라 Flavourzyme을 이용한 가수분해는 다른 endo-protease에 비하여 장시간동안 가수분해하거나 endoprotease와의 혼합사용이 유용할 것으로 판단되었다.

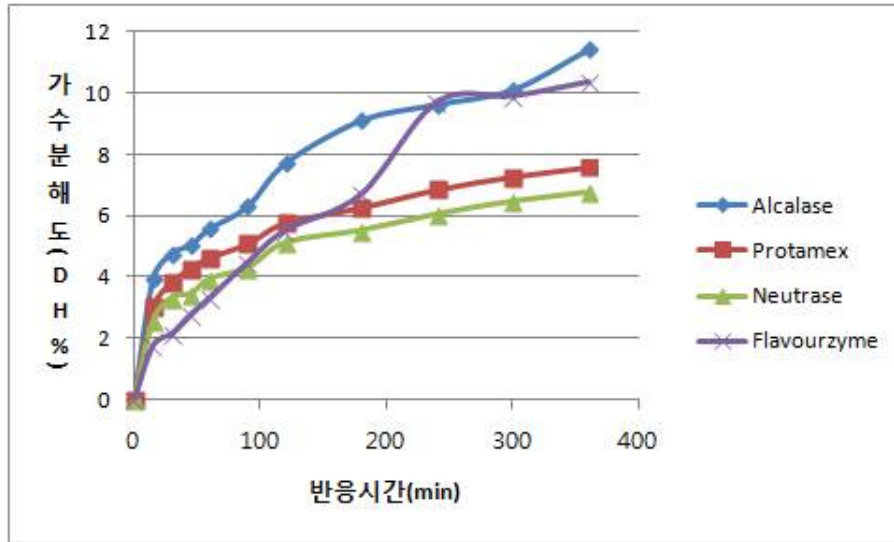


Fig. 3-4-4. 시판효소가수분해에 의한 밀글루텐의 가수분해도

- 이상의 결과를 종합하여 볼 때 상업용 효소 중에서는 Alcalase와 Flavourzyme이 짠맛 증진 물질 생산을 위한 가수분해에 적합한 것으로 판단되어 선택하였다.

라. 미생물 유래효소 선정

- Alcalase와 Flavourzyme을 이용하여 제조한 밀글루텐 가수분해물을 GPC와 HPLC 분석 (data not shown)한 결과, oligo peptide 이상의 거대 펩타이드가 주로 생성되고 저분자의 펩타이드의 생성율은 상대적으로 매우 낮음을 알 수 있었다.

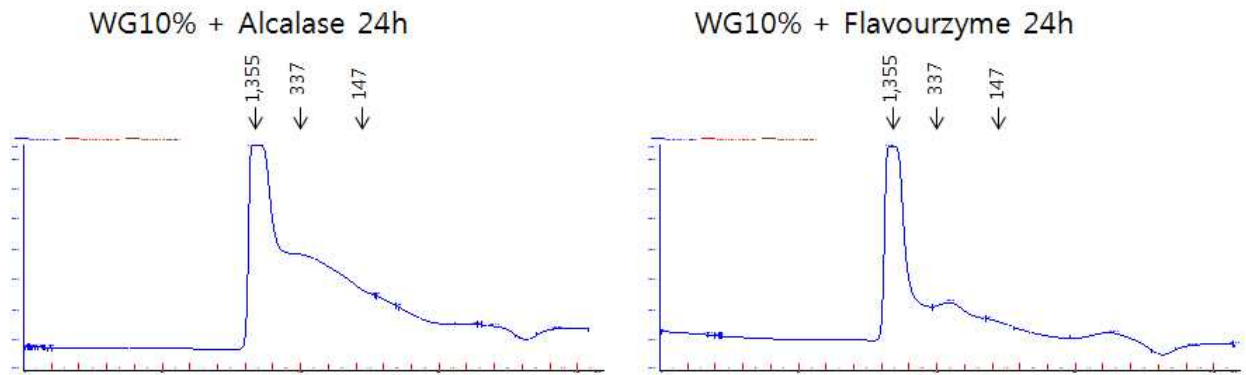


Fig. 3-4-5. 밀글루텐 기질의 Alcalase, Flavourzyme 가수분해물 GPC chromatogram.

- 이에 따라 전체 단백질의 가수분해율을 높이고 저분자 펩타이드의 생산에 적합한 미생물 유래 조효소가 필요하게 되어 본 연구진이 보유하고 있는 프로티아제 활성이 높은 된장 유래 *Aspergillus*속 미생물 및 청국장 유래 *Bacillus subtilis*속 미생물과 한국종균협회로부터 고 활성 프로티아제 후보 균주로 *Aspergillus*속 미생물 3종을 분양받아 밀 글루텐의 가수분해 특성을 살펴보았다.
- 10%의 밀글루텐 분산액에 총 5종의 균주를 직접 접종하거나 배양액을 분리하여 혼합한 후, 밀글루텐의 가수분해 형태를 살펴 본 결과, 된장유래 *Aspergillus*속과 청국장 유래 *Bacillus*속 균주가 글루텐의 액화 및 가수분해도, 아미노산 생성 능력이 우수한 것으로 판명되었고, 이 중에서 액화능력과 Glutamate 생성 능력이 특히 우수한 *Bacillus*속 미생물을 단백질 가수분해에 사용하기로 하였다.

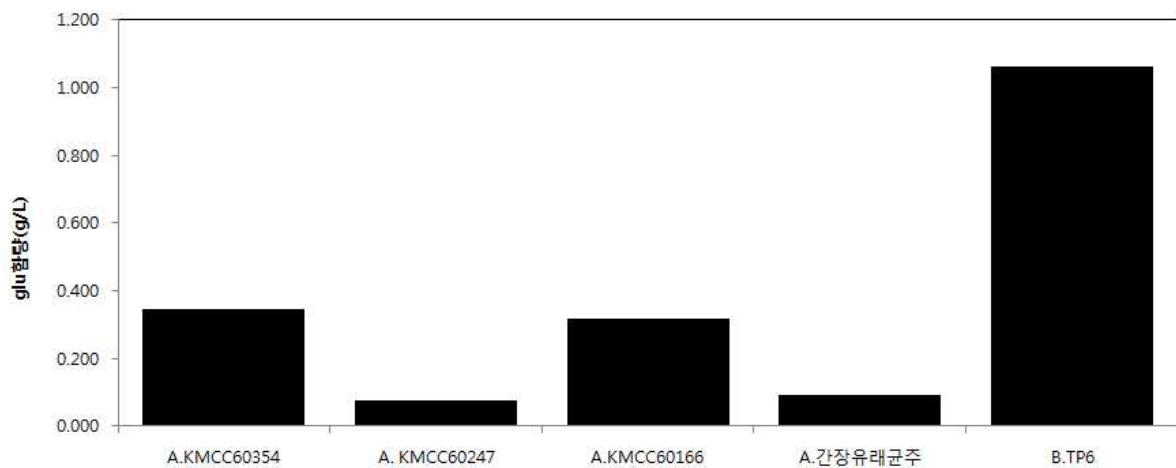


Fig. 3-4-6. 미생물조효소에 의한 가수분해물의 Glutamate 함량

Table 3-4-7. 미생물조효소에 의한 가수분해물의 가용화율

균 주	가용화율(%)
Aspergillus KMCC60354	55
Aspergillus KMCC60247	10
Aspergillus KMCC60166	54
Aspergillus 간장유래균주	13
Bacillus TP6	98

- Protease 생산 우수 균주로 선발한 *Bacillus*속 미생물은 본 연구팀((주)바이오벤)이 청국장으로부터 분리하여 보유하고 있는 serine protease 고활성 균주로 동정 결과 *Bacillus subtilis* TP6(이하 TP6)로 명명하고 있다.
- TP6를 밀글루텐과 분리대두단백질을 가수분해하기 위한 조효소액으로 사용하기 위하여 TP6의 단백질 가수분해 특성을 살펴보았다.

(1) TP6의 생육 단계에 따른 가수분해 특성

- 포자를 형성하는 *Bacillus*속 미생물은 생육단계에 따라 발현하는 효소의 종류 및 특성이 서로 상이하다는 것은 잘 알려진 사실로, 단백질 가수분해력이 우수한 조효소액을 얻기 위하여 생육상태에 따라 조효소액을 분리하여 protease 활성을 측정하고, 10%의 밀글루텐 분산액을 가수분해한 결과를 다음에 나타내었다.
- TP6의 배양 조건은 다음과 같으며 접종 후 일정시간 동안 배양한 배양액을 단백질 분산액과 혼합하여 가수분해를 위한 조효소액으로 사용하였다.

Table 3-4-8. TP6 균주의 배양조건

구분	배양조건
broth	NB 배지, glucose 1%
Temperature	37°C
pH	7.0

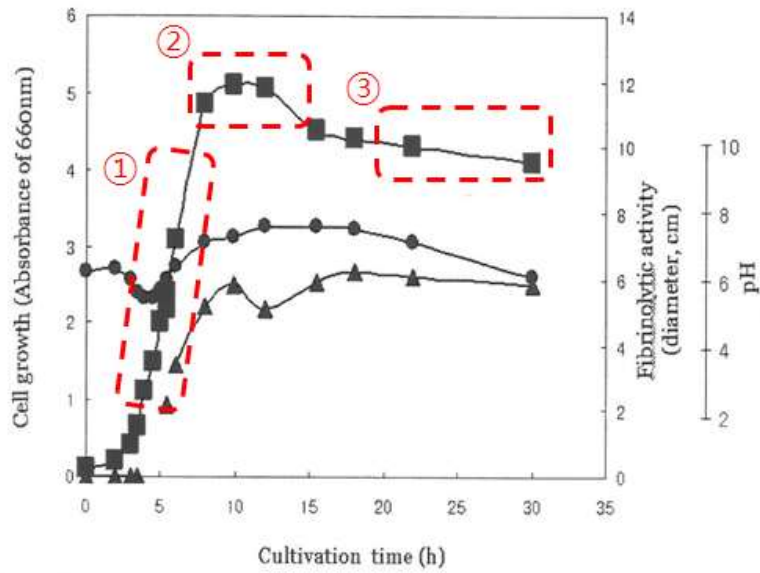


Fig. 3-4-7. TP6 생육상태에 따른 단백질 분해효소의 활성.

- : the cell density measured by the absorbance at 660 nm
- ▲: the fibrinolytic activity of the culture supernatants
- : the pH value of the culture broth

- 생육상태에 따른 조효소액의 protease 활성을 측정한 결과, 대수증식기의 1,078 ug/ml min에 비해 포자형성기의 조효소액의 활성은 1,310 ug/ml min으로 30% 정도 가수분해 활성이 높은 것으로 나타났다. 이는 포자형성기에 포자형성과 더불어 일어나는 autolysis를 위한 protease 생성이 된 것으로 보이며, 따라서 효율적인 가수분해를 위해서는 포자형성기의 TP6를 이용한 조효소액을 사용하는 것이 바람직한 것으로 나타났다.

Table 3-4-9. TP6 생육상태에 따른 protease 활성변화

	배양시간(h)	효소activity (ug/ml*min)
①증식기	6	1078.95
②정지기	12	1152.63
③포자형성기	24	1310.53

(2) TP6 조효소액을 이용한 분리대두단백질의 가수분해 특성

- 10% 대두분리단백질 분산액을 121℃에서 15분간 멸균한 후, 포자형성기의 TP6 조효소액과 1:1 비율로 혼합하고, 37℃, pH 7.0에서 반응시키면서 가수분해도를 측정한 결과를 아래에 나타내었다.

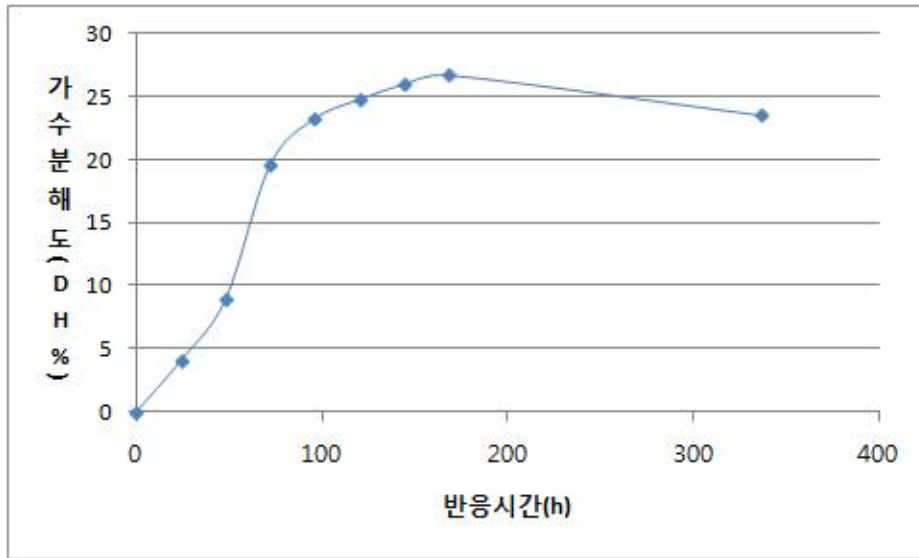


Fig. 3-4-8. TP6 조효소액에 의한 분리대두단백질의 가수분해도

- 분리대두단백질도 TP6 조효소액에 의하여 성공적으로 가수분해가 이루어짐을 확인하였다. 96시간까지 가수분해도가 빠르게 증가하다가 이후 완만한 증가를 보여 180시간에서 최대 27%의 가수분해도를 보였으나, 340시간에서는 23%로 감소하였다. 이는 장시간 반응에 따른 암모니아, 스카톨, 황화수소, 휘발성아민, 지방산 등의 이취 생성에 따른 아미노산 분해에 따른 것으로 보이므로, 이취 발생을 최소화하면서 높은 가수분해율을 얻을 수 있는 가수분해 조건 확립이 필요할 것으로 판단되었다.

(3) TP6 조효소액을 이용한 밀글루텐의 가수분해 특성

- 90℃ 열수에서 분산시킨 10% 밀글루텐 분산액을 생육상태에 따라 제조한 TP6 조효소액과 1:1 비율로 혼합하고, 37℃, pH 7.0에서 반응시킨 결과를 아래에 나타내었다.

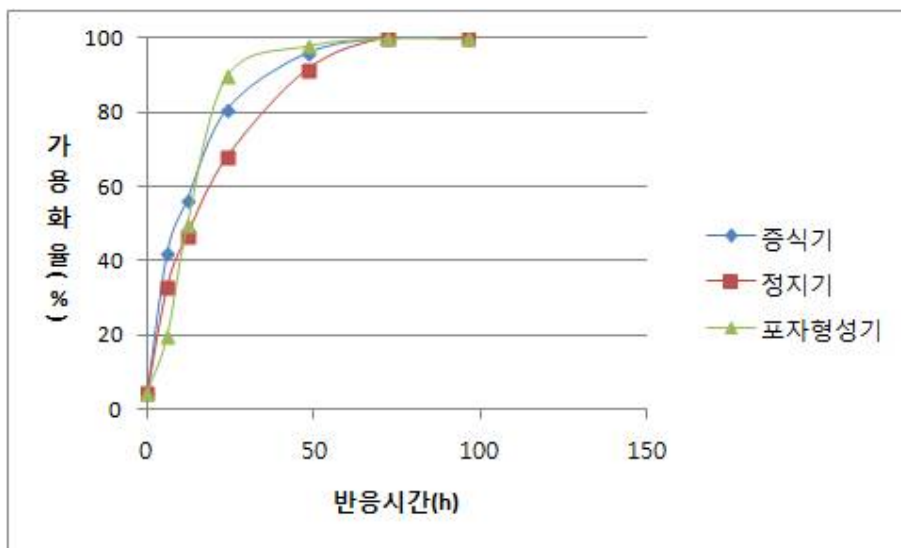


Fig. 3-4-9. 생육상태에 따른 TP6 조효소액에 의한 밀글루텐의 가용화율

- 반응시간에 따른 가용화율은 반응 24시간에서 포자형성기의 조효소는 90%의 가용화율을 나타낸 반면, 증식기와 정지기의 조효소는 각각 80%, 68%의 가용화율을 나타내어 포자형성기의 조효소의 가수분해능력이 우수한 것으로 나타났으나, 48시간 이후 부터는 모든 조효소가 90%이상의 가용화율을 나타내었고 72시간 이후에는 거의 100%의 가용화가 이루어졌다.
- 가수분해도도 가용화율과 비슷한 경향을 나타내어 포자형성기의 조효소가 72시간에서 최대 33%의 가수분해도를 나타내었고, 반응액 중의 glutamate 함량을 측정된 결과 대수증식기 조효소를 사용했을 경우 72시간에서 최대 0.45g/L의 glutamate 함량을 나타내어 생육기의 0.24g/L나 정지기의 0.29g/L에 비하여 상당히 높은 것으로 나타내었다. 또한 96시간에서는 0.41g/L로 약간 감소한 결과를 얻었다. 이는 조효소액에 포함된 기타 효소들에 의하여 생성된 glutamate가 다른 물질로 전환된 것으로 생각되며, 이에 따라 조효소액을 사용한 단백질 가수분해는 최적 반응시간이 존재할 것으로 생각되어 진다.

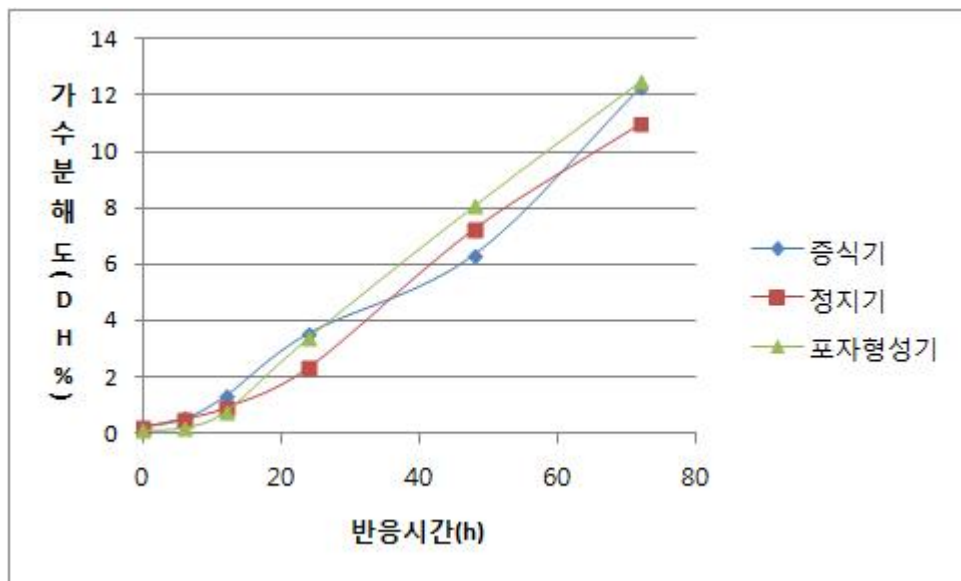


Fig. 3-4-10. 생육상태에 따른 TP6 조효소액에 의한 밀글루텐의 가수분해도

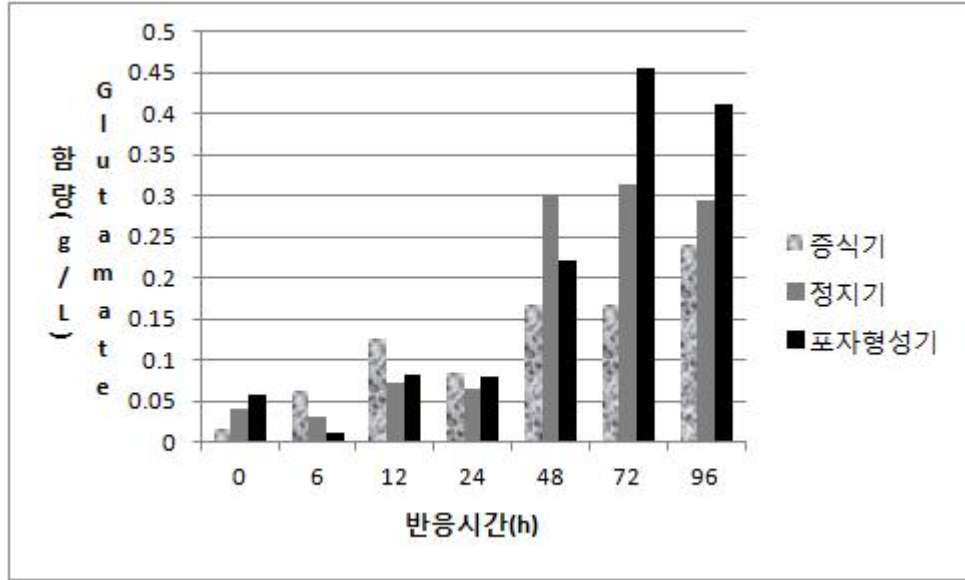


Fig. 3-4-11. 생육상태에 따른 TP6 조효소액에 의한 밀글루텐의 Glutamate 함량

마. 상압효소 가수분해

(1) 밀글루텐의 효소가수분해

- Alcalase, Flavourzyme 및 TP6조효소액에 대한 예비실험의 결과를 종합하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

Table 3-4-10. Alcalase, Flavourzyme, TP6 조효소액의 장단점

구분	장점	단점
Alcalase	초기 가용화 속도가 빠르다.	가수분해도가 낮다. 분해물의 분자량이 크다.
Flavourzyme	낮은 분자량의 펩타이드 생성 비율이 높다.	초기 가용화 속도가 느리다. 가수분해도가 낮다
TP6 조효소액	장시간 반응시 높은 가수분해도가 높다. 장시간 반응시 낮은 분자량의 펩타이드 생성 비율이 높다.	초기 가용화 속도가 느리다. Alcalase와 혼합하여 사용할 때, 활성이 급격히 저하된다.

- 이러한 결과로부터 밀글루텐을 가수분해하기 위한 공정을 다음과 같이 설계하였다.
- 밀글루텐을 가수분해하기 위하여 90°C에서 분산시키고, 초기 가용화 속도가 빠른

Alcalase를 이용하여 분산액을 3시간동안 가수분해하여 액화시키고, 이후 낮은 분자량의 펩타이드 생성율이 높은 Flavourzyme과 TP6 조효소액으로 2차 가수분해 시킴으로서 효율적인 가수분해가 이루어 질 수 있었다. 이때, Flavourzyme과 TP6 조효소액을 투입하기 전에 분해액 중에 잔존하는 Alcalase를 121℃에서 15분간 불활성화 시켰다. 이러한 가열에 의한 불활성화 과정은 잔존 Alcalase에 의하여 TP6조효소액의 활성이 소실되는 문제를 해결할 수 있었으며(data not shown), 가열처리에 의하여 장시간 가수분해 시에 발생하는 오염 문제도 감소시킬 수 있었다.

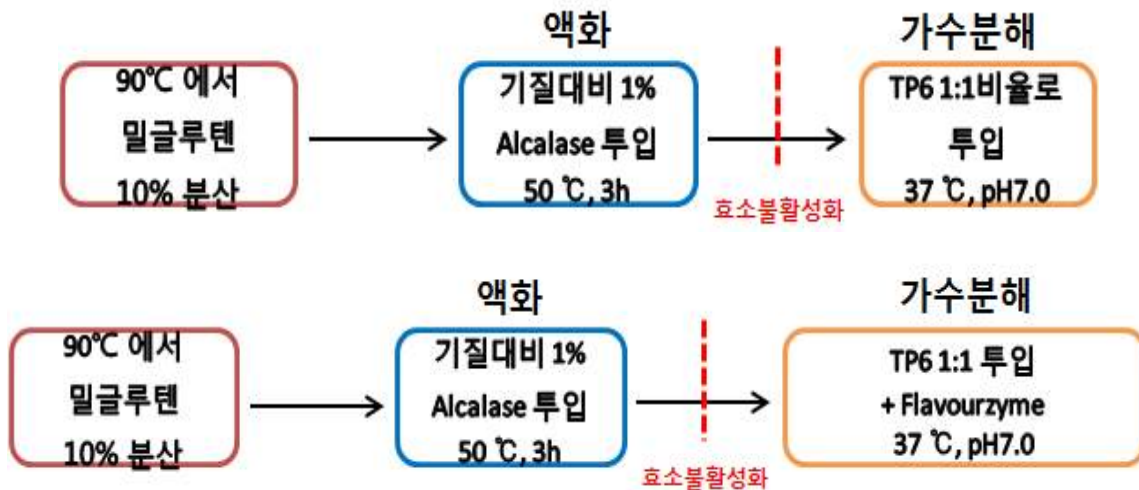


Fig. 3-4-12. 밀글루텐의 복합효소 가수분해과정.

- 기질농도에 따른 가수분해 특성을 살펴보기 위하여 밀글루텐 농도를 각각 10%, 30%로 조절하여 72시간동안 가수분해 한 결과를 아래 표에 나타내었다.

Table 3-4-11. 기질 농도에 따른 밀글루텐의 가수분해 경향

	가용화율(%)	가수분해도(%)	Glu 생성율(%)
10%	68.4	10.04	0.084
30%	58.3	1.73	0.031

- 기질의 농도가 30%로 높았을 경우에는 가용화율, 가수분해도, glutamate 생성율 등에서 모두 10%에 비하여 낮아 기질의 농도가 10% 이상일 경우에는 비효율적임을 알 수 있었다.
- 10%의 밀글루텐 분산액을 Alcalase에 의해 50℃에서 3시간동안 가수분해하여 얻은 밀글루텐 액화물을 TP6 조효소액과 Flavourzyme을 이용하여 가수분해한 결과를 아래 그림에 나타내었다.

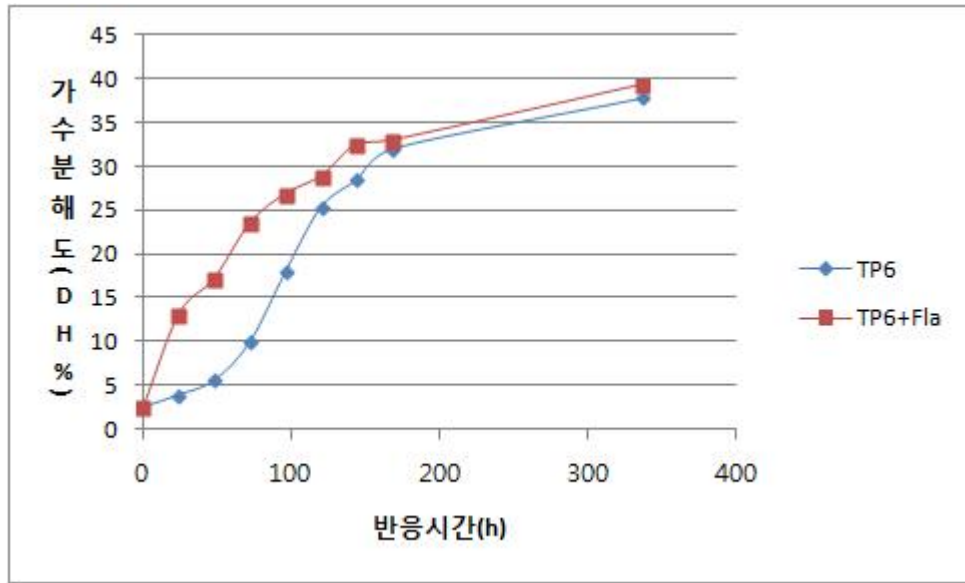


Fig. 3-4-13. TP6조효소액과 Flavourzyme에 의한 밀글루텐의 가수분해도.

- Flavourzyme의 없이 TP6 조효소액만으로 가수분해하였을 때, 96시간에서 18.1%로 Flavourzyme과 함께 사용했을 때의 26.9%에 비하여 현저하게 낮았으나 이후 168시간 이후에는 37.9%와 39.3%로 거의 비슷한 가수분해도를 보였다.
- 한편, Flavourzyme과 TP6조효소액을 모두 사용한 가수분해물의 glutamate 함량은 144시간까지 따라 꾸준히 증가하였으나 이후에는 거의 일정한 값을 보였고 반응시간 144시간에서 4.2g/L의 값을 나타내었고, TP6조효소액 만을 사용한 가수분해물은 336시간까지 꾸준히 증가하여 336시간에서 최대 4.0g/L의 glutamate 함량을 나타내었다.

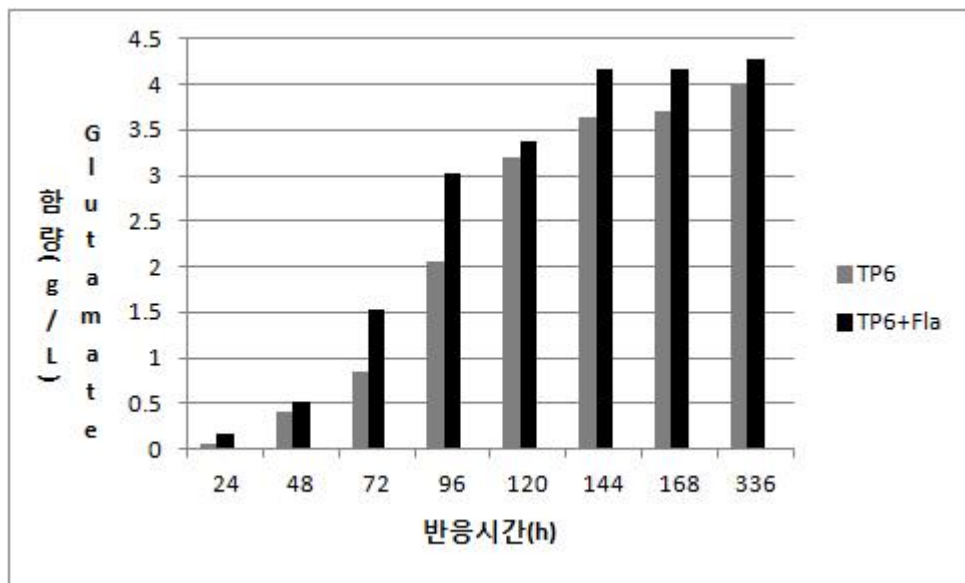


Fig. 3-4-14. TP6조효소액과 Flavourzyme에 의한 밀글루텐 가수분해물의 Glutamate 함량.

- 이러한 사실에서 TP6 조효소액에는 *Bacillus*속 미생물의 특징인 endo-protease외에도 exo-protease도 일부 포함되어 있음을 유추할 수 있으며, 산업화 측면에서 값이 비싼 Flavourzyme을 사용하지 않고 TP6 조효소액만을 사용하여도 반응조건을 조절함으로써 높은 가수분해율을 가진 단백질 가수분해물을 얻을 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.
- 생성된 가수분해물의 분자량 분포를 GPC를 이용하여 확인하였다. 표준물질로 vitamin B12(Mw=1355.37), vitamin B1(Mw=337.27), L-glutamic acid(Mw 147.13)을 사용하여 GPC 분석을 수행한 결과, 단백질 가수분해물의 GPC chromatogram을 아래 그림과 같이 세영역으로 나눌 수 있었다. 축합/중합된 아미노산의 평균분자량이 110 dalton/mol 임을 감안할 때, I 영역은 중합도 10이상(분자량 1100이상)의 고분자량의 단백질이고 II 영역은 중합도 2~10 사이의 oligo peptides 영역(분자량 220~1100), III 영역은 단일아미노산 영역(분자량 220이하)으로 판단하였다.

WG10%+Al 1% 3h + TP6(1:1) 24h(1day)

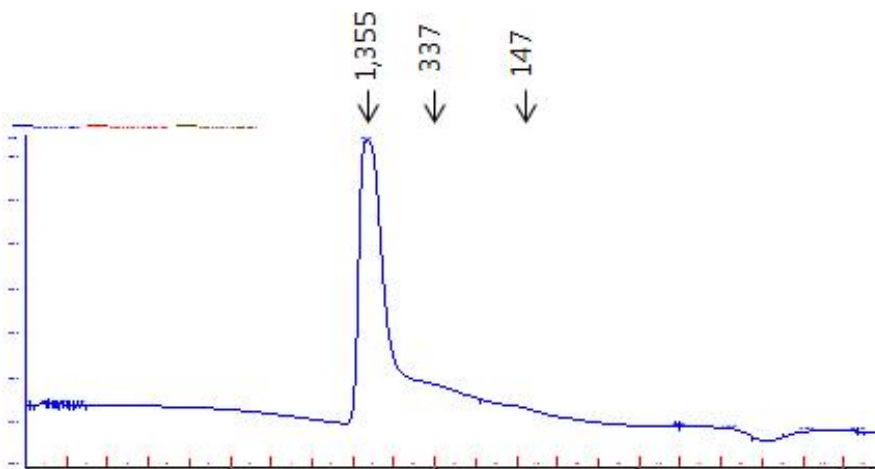
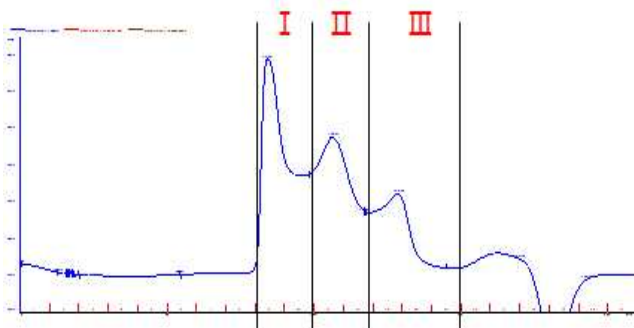


Fig. 3-4-15. 밀글루텐 복합가수분해물 1일차 시료의 GPC chromatogram.

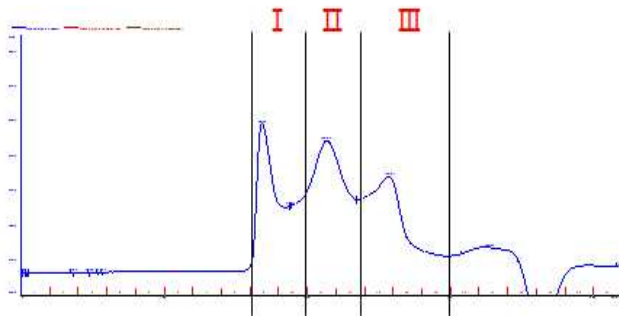
WG10%+Al 1% 3h + TP6(1:1) 144h(6day)



	Retention(min)	Peak area(%)
I	83.95	57.6
II	106.67	27.9
III	128.85	14.5

Fig. 3-4-16. 밀글루텐 복합가수분해물 6일차 시료의 GPC chromatogram I.

(WG10%+Al 1% 3h) + (TP6+Fl 1%) 144h(6day)



	Retention(min)	Peak area(%)
I	84.08	29.4
II	106.38	42.1
III	128.67	28.5

Fig. 3-4-17. 밀글루텐 복합가수분해물 6일차 시료의 GPC chromatogram II.

- 밀글루텐 가수분해물의 GPC 분석 결과, 반응 48시간까지는 I 영역의 peak만 나타나다가 반응시간 경과에 따라 가수분해가 진행됨에 따라 저분자 펩타이드가 생성되면서 II, III 영역의 peak가 나타나기 시작하는 것을 확인하였다.
- Flavourzyme 첨가에 따른 효과도 분명하게 나타났다. 반응 144시간의 가수분해물의 분자량 분포를 살펴본 결과 I 영역의 거대분자의 비율이 57%에서 29.4%로 거의 절반 수준으로 낮아졌고 II, III 영역의 비율이 Flavourzyme을 첨가하지 않았을 때와 비교해서 2배 수준으로 높아진 것으로 나타나 저분자 펩타이드의 생산을 위해서는 Flavourzyme의 사용이 매우 유리한 것으로 나타났다.
- Hofmann등(2011)에 따르면 fish sauce에 존재하는 di 형태의 arginyl dipeptide가 가장 높은 염미증진 효과를 나타내었다고 하였는데, 이러한 dipeptides가 II 영역에 포함되며, 우마미, 고쿠미 처럼 맛의 증진효과가 있다고 보고된 di, tri 형태의 peptides 역시 II 영역에 존재할 것이므로 짠맛 증진 물질의 가능성이 있는 II 영역의 극대화를 가수분해의 우선 목표로 잡아야 할 것이다.

(2) 분리대두단백질의 효소가수분해

- 10%(w/v)의 분리대두단백질 분산액을 기질대비 1%의 Alcalase를 첨가하여 50℃에서 3시간 가수분해하여 충분히 액화시킨 후, 121℃에서 15분간 가열하여 잔존하는 Alcalase를 불활성화시킴과 동시에 살균하고 TP6 조효소액 또는 TP6조효소액 + Flavourzyme(기질 대비 1%)과 1:1 비율로 혼합하여 37℃, pH 7.0에서 가수분해 하였다.

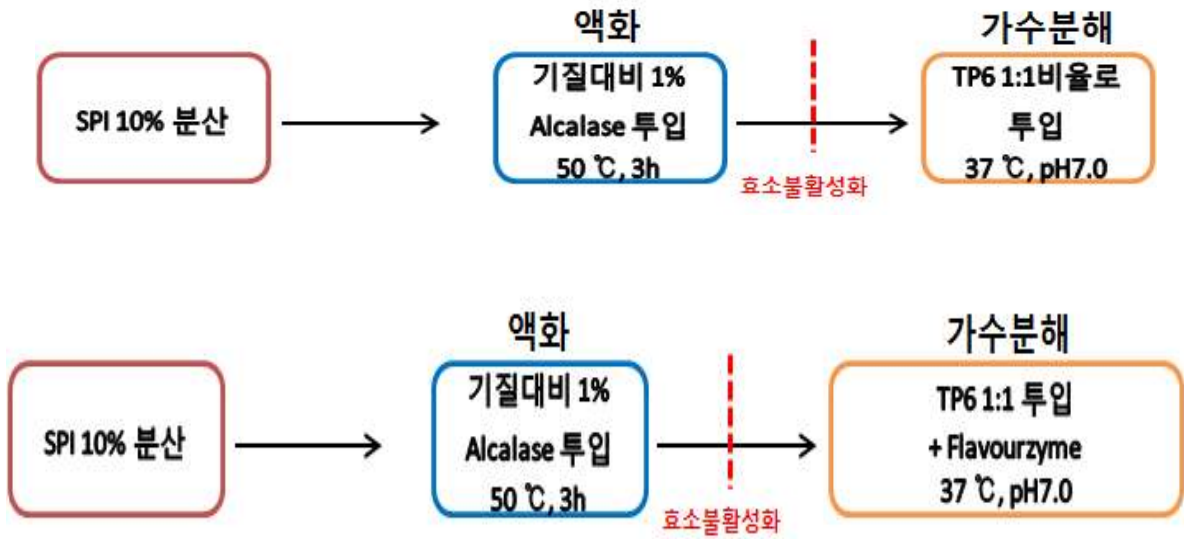


Fig. 3-4-18. 분리대두단백의 복합효소 가수분해 공정.

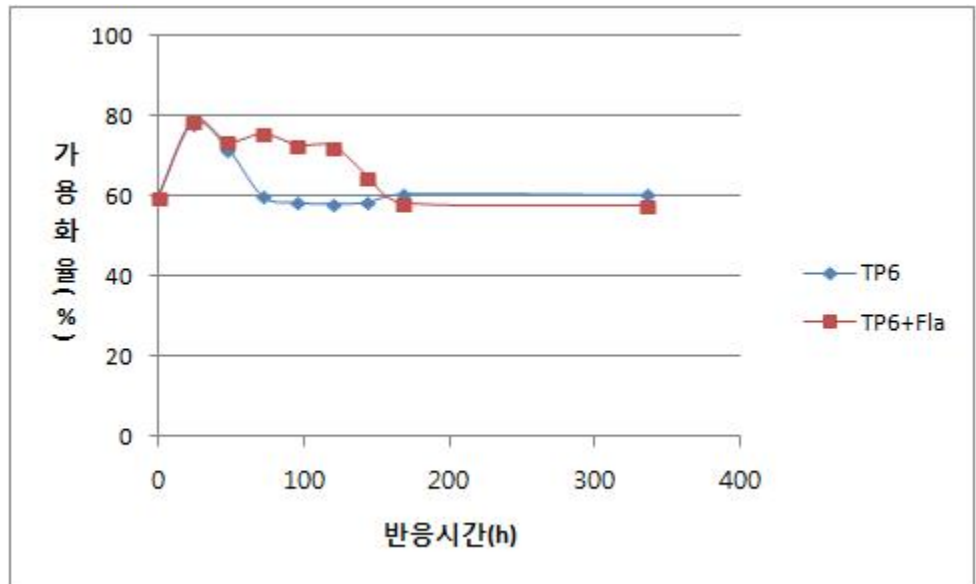


Fig. 3-4-19. TP6조효소액과 Flavourzyme에 의한 분리대두단백의 가용화율.

- 분리대두단백질의 가수분해 양상은 밀글루텐과는 다른 양상을 보여 가수분해 단백질원에 따라 최적조건이 서로 다를 수 있었다.
- 가용화율은 반응시작 후에 증가하여 24시간에서 최대 80%까지 증가하였으나 이후 감소하기 시작하여 168시간에 60%까지 감소한 후 336시간까지 거의 일정하게 유지되었다. 가수분해도는 Flavourzyme 첨가 여부에 따라 다른 양상을 보였는데 Flavourzyme을 첨가하지 않고 TP6조효소액으로만 가수분해한 경우에는 196시간까지도 서서히 증가하였고 이후 336시간에서 25%의 가수분해도를 나타내었으나, Flavourzyme을 첨가한 경우에는 96시간까지 빠른 속도로 가수분해도가 증가하여 최대 34%까지 증가하였다가 감소하기 시

작하여 336시간에서는 27%로 감소하였다. 한편 glutamate 함량은 96시간까지 증가하여 0.12g/L이였다가 이후 더 이상의 증가는 없었다.

- 한편, 가수분해물의 분자량 분포는 Flavourzyme과 TP6조효소액을 동시에 사용한 경우에 72시간까지는II, III 영역의 peak가 거의 나타나지 않다가 72시간부터 나타나기 시작하고 96시간 이후에는 거의 비슷한 형태의 peak가 생성되었는데, 이는 가수분해도와 glutamate 함량의 경향과 거의 일치하는 경향을 보였다.
- 가수분해가 진행되면서 72시간 이후 부터는 악취가 심하게 발생하는 현상이 관찰되었다. 아미노산이 탈아미노 반응이나 탈탄산반응이 일어나면 암모니아나 인돌, 스카톨, 황화수소, 휘발성 아민, 메르캅탄, 지방산 등이 생성되는데, 이러한 물질은 악취를 발생하는 물질이므로 반응 중에 발생하는 이취로 미루어 볼 때 이러한 현상은 TP6조효소액에 존재하는 다양한 효소의 작용에 의해 가수분해물 중에 존재하는 아미노산이 탈아미노반응(deamination)이나 탈탄산반응(decarboxylation)을 일으키게 되고 그에 따라 가수분해물 중의 아미노산이 암모니아나 지방산으로 전환되면서 일어난 것으로 보인다.

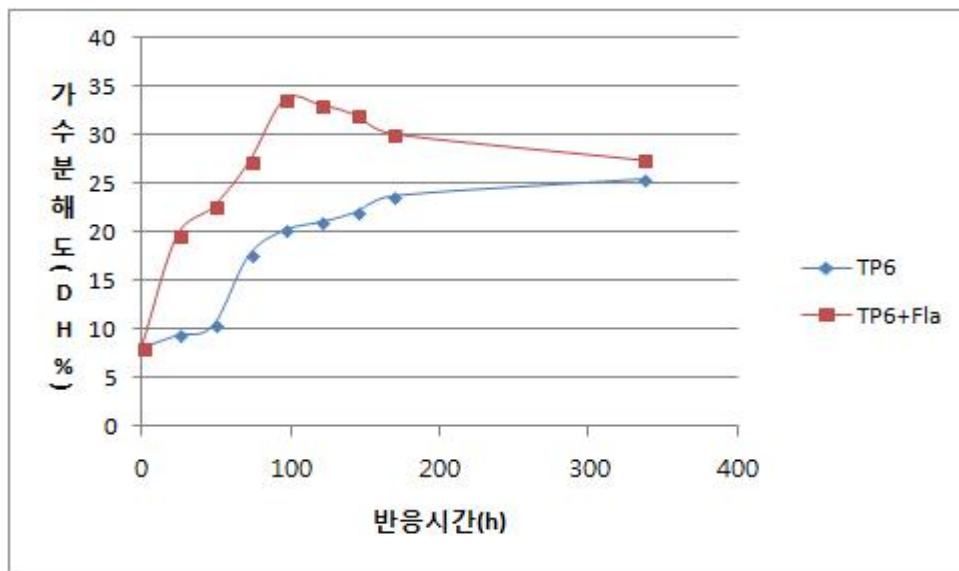


Fig. 3-4-20. TP6조효소액과 Flavourzyme에 의한 분리대두단백의 가수분해도.

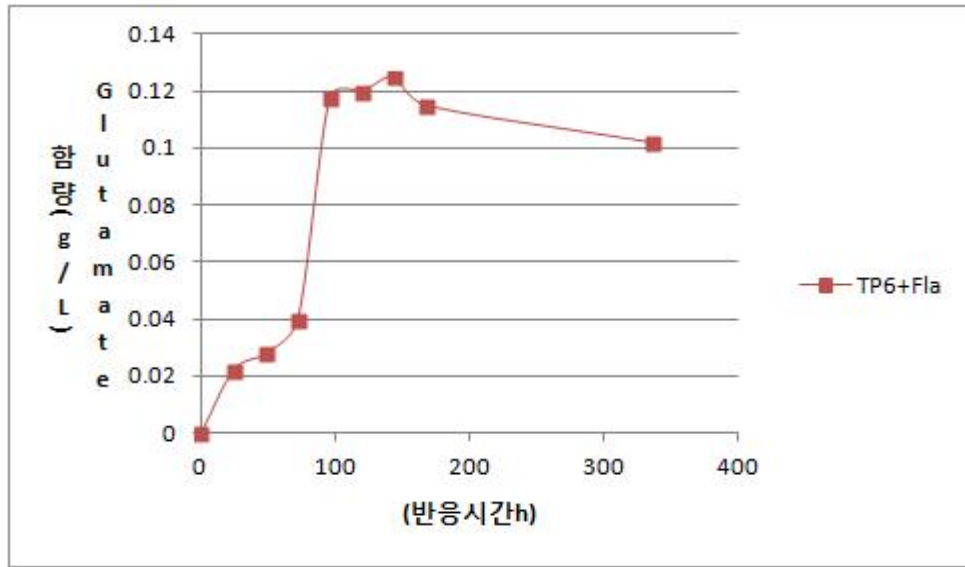


Fig. 3-4-21. TP6조효소액과 Flavourzyme에 의한 분리대두단백 분해물의 Glutamate 함량.

(SPI10%+Al 1% 3h) + (TP6+Fl 1%) 24h(1day)

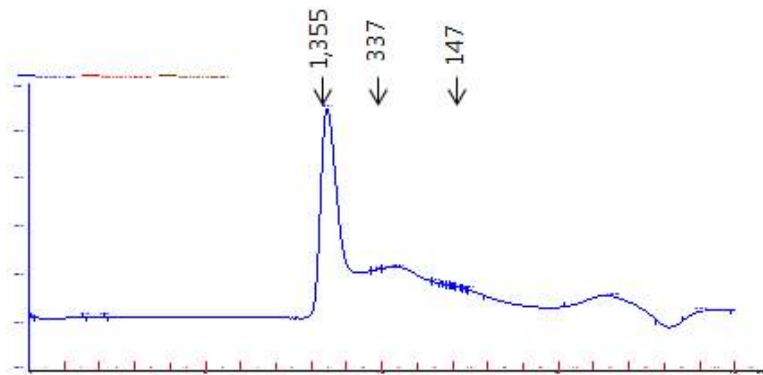
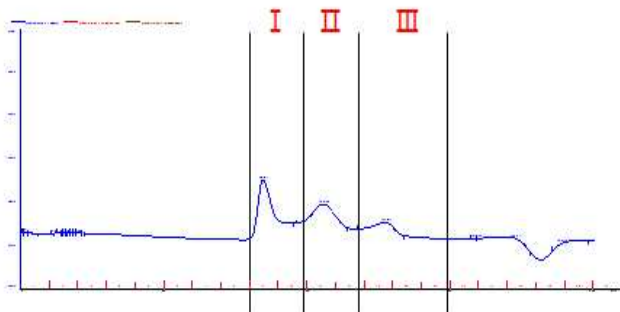


Fig. 3-4-22. 분리대두단백 복합가수분해물의 1일차 시료의 GPC chromatogram.

(SPI10%+Al 1% 3h) + (TP6+Fl 1%) 144h(6day)



	Retention(min)	Peak area(%)
I	84.87	47.9
II	105.95	34.1
III	127.67	18

Fig. 3-4-23. 분리대두단백 복합가수분해물의 6일차 시료의 GPC chromatogram.

바. 고압효소 가수분해

- 고압처리 기술은 주로 식품 중의 유해 미생물의 살균을 목적으로 개발되었으나, 최근에는 추출 및 효소분해 분야에 적용범위를 확대하고 있다. 고압처리에 의하여 식품 단백질의 구조변형을 일으키게 되고 이에 따라 효소활성도가 변할 수 있으므로 처리압력, 효소의 종류, pH, 온도, 시간 등이 효소활성도에 영향을 줄 수 있다.
- 효소 자체의 반응성을 향상시키는 압력은 효소가 가역적으로 변형되는 50-100MPa 정도이며, 반대로 내재 효소에 의한 품질열화를 억제하기 위하여 내재효소를 비가역적으로 변형시켜 불활성화 시키기 위한 압력은 400-800MPa 이상인 것으로 알려져 있다.
- 압력을 상압과 50MPa, 100MPa로 변화시키면서 상용효소에 의한 밀글루텐과 대두분리단백의 가수분해 특성을 살펴보았다.
- 밀글루텐은 10%(w/v)농도로 90℃의 열수에 분산시키고, 대두분리단백은 10%(w/v)농도로 상온에서 분산 시킨 후에 121℃에서 15분간 살균처리하여 가수분해 기질로 사용하였다. 상용효소는 Alcalase, Flvourzyme, Protamex, Neutrase를 기질 대비 1%(w/w) 농도로 첨가한 후, pH를 7.0으로 조절하고 50℃에서 가압가수분해 하였다.

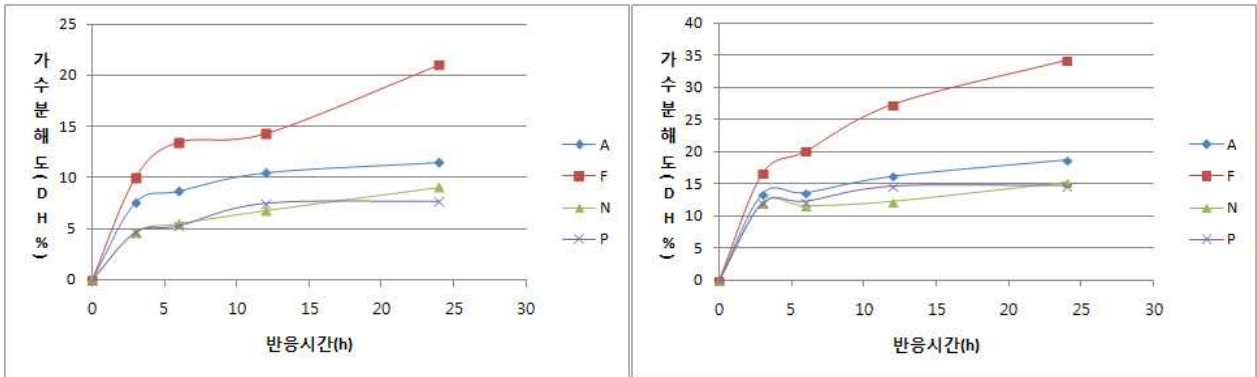


Fig. 3-4-24. 시판효소에 의한 밀글루텐(좌)과 분리대두단백(우)의 고압(50MPa)가수분해특성.

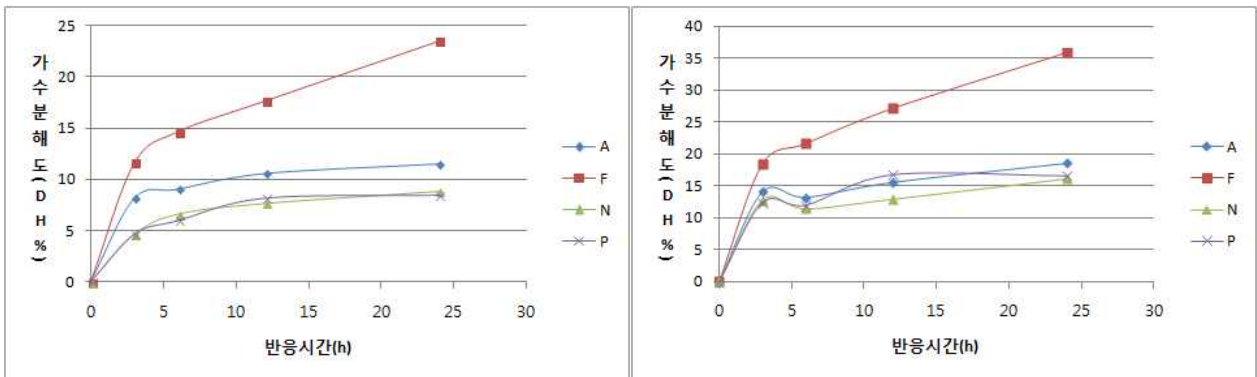


Fig. 3-4-25. 시판효소에 의한 밀글루텐(좌)과 분리대두단백(우)의 고압(100MPa)가수분해특성.

- Endo protease인 Alcalase, Protamex, Neutrase는 Alcalase가 다른 효소에 비하여 높은 가수분해도를 나타내었고 상압가수분해의 경우보다는 다소 높은 가수분해도를 나타내었다. 반면, exo protease인 Flavourzyme의 경우에는 상압가수분해에 비해 현저히 높은 가수분해도를 나타내었는데, 이는 Flavourzyme이 Alcalase에 비하여 압력에 의한 효소의 활성화도 증가가 우수한 것으로 판단된다.
- 처리압력과 기질에 따른 가수분해도를 살펴본 결과, 밀글루텐을 Alcalase로 가수분해 하였을 경우에 압력 증가에 따라 오히려 가수분해도가 감소하는 경향을 나타내었으나, 분리대두단백의 경우에는 압력 증가에 따라 증가하는 경향을 보이고 있다. 압력 변화에 따라 기질과 효소의 모두 3차 구조변화가 일어남에 따라 가수분해 활성이 증가되거나 감소하는 복합적인 현상으로 판단된다.

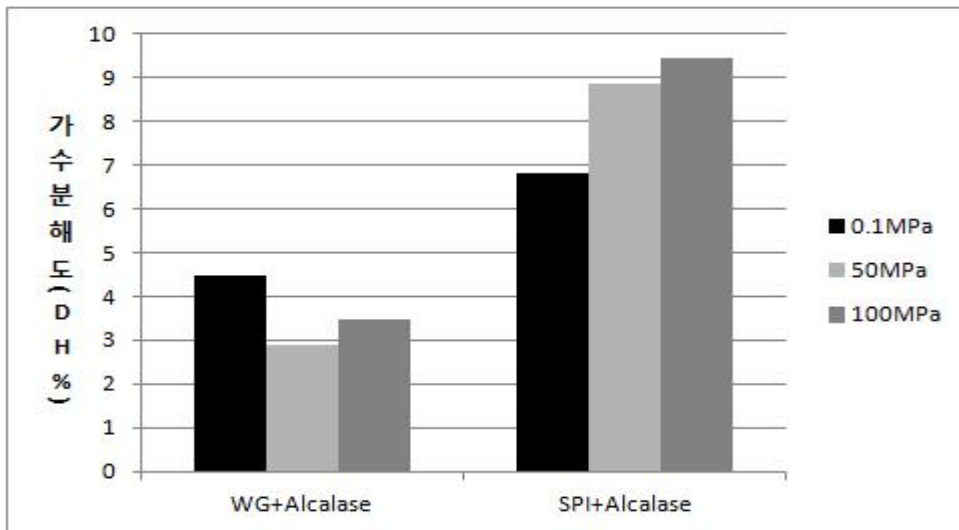


Fig. 3-4-26. Alcalase를 이용한 가수분해에 미치는 압력의 영향.

- 한편 Flavourzyme의 경우에는 기질에 관계없이 모두 압력증가에 따라 가수분해도가 증가하는 경향을 보여 분리대두단백질의 상압처리시 10%에서 100MPa 압력하에서는 18.2%로 80%의 가수분해율이 증가하였다. 이는 Flavourzyme이 압력에 따라 활성이 증가하는 것으로 볼 수 있으며, 이와 더불어 분리대두단백질 역시 압력에 따라 가수분해가 되기 쉽게 변성되는 것으로 추측할 수 있을 것이다.
- 밀글루텐의 경우에는 Flavourzyme은 활성화되나 밀글루텐의 활성이 낮아지거나 영향을 받지 않는 이유로 분리대두단백질에 비하여 낮은 증가를 나타낸 것으로 보여진다.

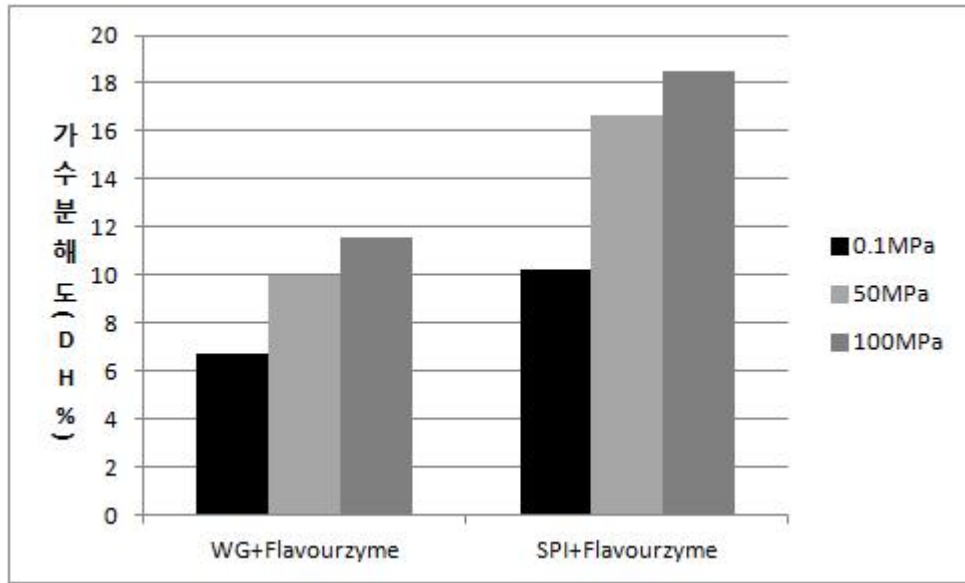


Fig. 3-4-27. Flavourzyme을 이용한 가수분해에 미치는 압력의 영향.

- 첨가한 효소의 양에 따른 가수분해도를 측정 한 결과를 다음 Fig. 3-4-26에 나타내었다. 10% 분리대두단백질에 Alcalase와 Flavorzyme을 각각 1% 첨가한 경우와 0.5%씩 첨가한 경우를 비교하였다. 각각 1%씩 첨가한 경우가 0.5%씩 첨가한 경우에 비하여 약 20%정도의 큰 가수분해도 증가효과를 얻었으나, 단백질 가수분해시에 첨가하는 상업용 효소의 양은 경제성을 고려하여 최적화시켜야 하므로 이에 대한 경제성 연구는 상업화에 있어 필히 추가로 연구되어야 할 것이다.

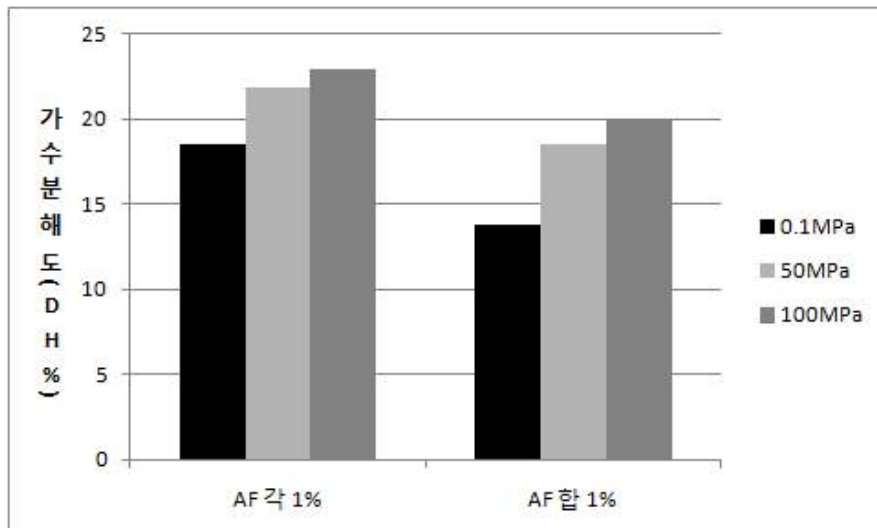
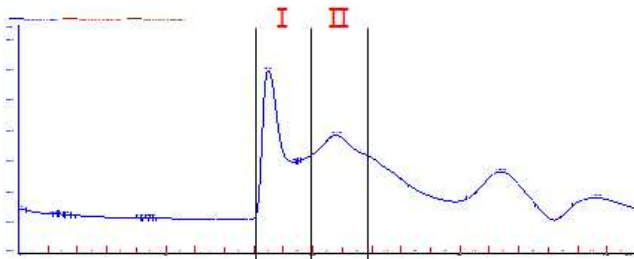


Fig. 3-4-28. 복합효소를 이용한 분리대두단백 가수분해에 미치는 압력의 영향.

- 한편, 고압가수분해에 의한 분리대두단백 가수분해물의 분자량 분포를 확인한 결과, 100MPa에서 24시간 반응으로 아미노산 영역인 III 영역은 나타나지 않았으나, 저분자 펩타이드 영역인 II 영역이 거의 50%에 달하는 것으로 나타나 본 연구의 목적에 부합하는

결과를 보였다.

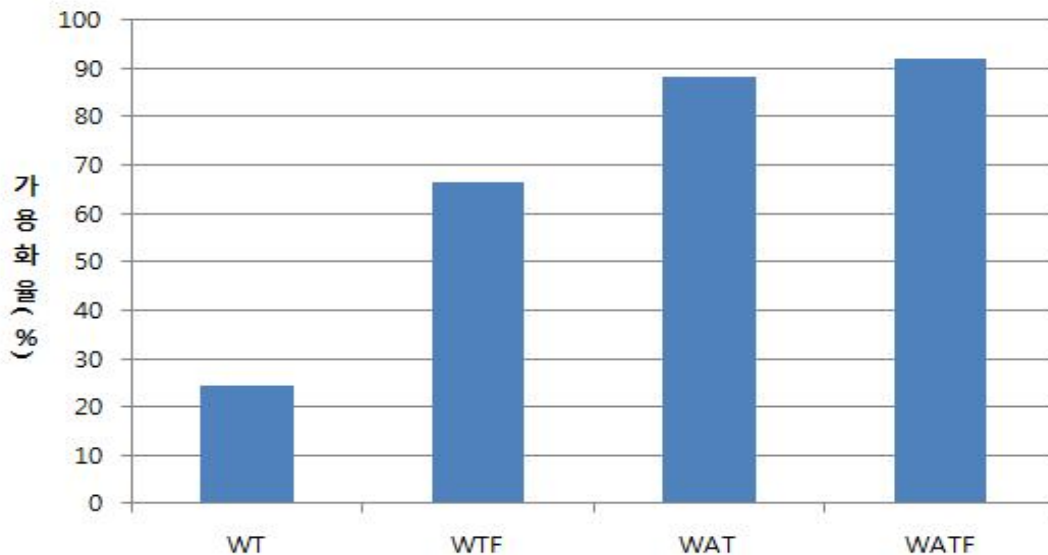
100MPa 24시간 SPI 10% + AF 각 1%



	Retention(min)	Peak area(%)
I	84.87	50.43
II	107.98	49.57

Fig. 3-4-29. 분리대두단백질의 고압복합가수분해물의 GPC chromatogram.

- TP6조효소액을 이용한 고압가수분해 결과는 예상과는 다르게 TP6조효소에 의한 가수분해가 거의 일어나지 않은 것으로 나타났다. 밀글루텐을 다양한 방법의 효소처리 방법을 이용하여 가수분해를 시도하였으나 Alcalase와 Flavourzyme에 의한 가수분해 정도 외에 TP6조효소의 효과가 거의 관찰되지 않았다. 이는 TP6조효소액이 압력에 매우 민감하게 반응하여 불활성화 되었거나, 또는 고압가수분해과정 중에는 pH조절을 할 수 없는 이유로 효소반응이 일어나지 않았을 것으로 판단된다.



- 시료조건

- ① WT : WG10% + TP6(1:1)
- ② WTF : WG10% + TP6(1:1) + FI 1%
- ③ WAT : WG10% → AI 1% 3hr + TP6(1:1)
- ④ WATF : WG10% → AI 1% 3hr + TP6(1:1) + FI 1%

Fig. 3-4-30. TP6조효소를 이용한 고압가수분해물의 가용화율

사. 가압열수 가수분해

- 가압열수에 의한 가수분해는 목재나 농산폐기물 등의 재활용을 위하여 개발되어 사용되고 있으며, 일부 난분해성 단백질의 가수분해에도 일부 적용되고 있다. 콜라겐을 160℃ 또는 180℃의 가압열수로 1시간 처리하여 펩타이드로 가수분해에 성공한 사례가 보고되고 있다.



Fig. 3-4-31. 아임계 추출 장치 (R-401 subcritical Extraction Pilot Plant System)
(① 예열조, ② 추출기, ③ 수거조).

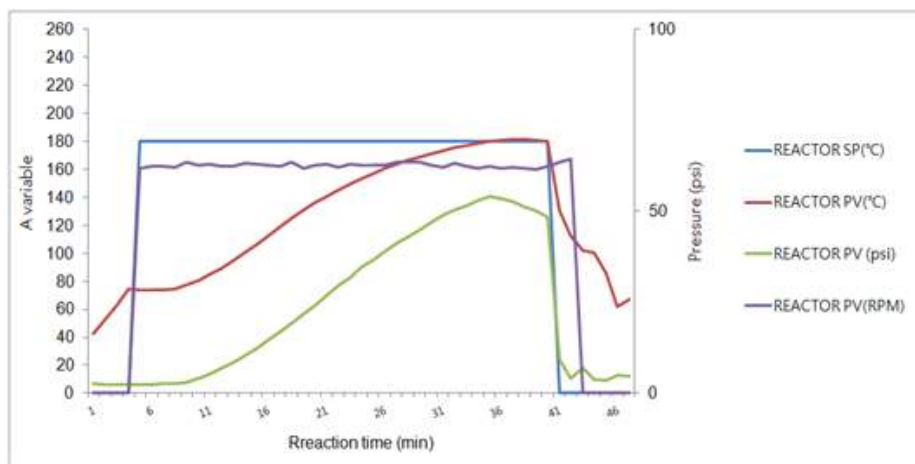


Fig. 3-4-32. 아임계수 장치의 압력 및 온도 프로파일(처리온도 180℃).

- 10%(w/v)농도로 90℃ 열수에 분산시킨 밀글루텐과 분리대두단백을 기질대비 1%(w/w)의 Alcalase를 첨가하여 3시간동안 액화시키고 1(액화물):3(증류수) 비율로 증류수와 혼합하여 온도별로 10분간 가열처리한 결과물을 그림에 나타내었다.

- 온도 증가에 따라 마이알반응 등에 의해 갈변화되어 짙은 색을 띠었다. 최근 조미료나 반응향료 생산에 열, 효소처리 기술뿐 아니라 Maillard 반응이 중요한 기술로 활용되고 있다. 국내에서 식물단백 가수분해물(HVP)은 고기 향 등을 내는 기본 전구물질로 향료산업에 이용되고 있으며 탈지대두 단백질 산분해액의 경우 유리아미노산과 염, 다양한 휘발성 화합물을 포함하고 있어 식품산업에서 조미액으로 많이 사용되고 있다. 탈지대두 단백질 산분해액의 유리아미노산 특유의 맛을 함유하려는데 특히 glutamic acid는 umami의 주요성분으로 알려져 있다. HVP는 자체적으로 고기 향을 내기도 하지만 황아미노산과 ribose, thiamine, 인지질 등의 전구체와 다양한 반응을 통해 풍부한 향미를 얻을 수 있어 meat flavour에 근접한 반응기질과 조건을 찾고자 하는 연구들이 많이 시도되었다.
- 밀글루텐과 분리대두단백 모두 가열처리에 따라 가수분해도와 가용화율이 감소하였는데, 이는 초기 액화과정에서 생성된 저분자 펩타이드와 아미노산이 분해되어 유기산 및 다른 화합물로 전환된다. 이들 화합물은 분해반응이 더 진행되어 최종생성물인 휘발성 탄소나물로 분해되는 것으로 판단된다. 이러한 연속반응에서 중간 생성물인 아미노산의 효과적인 회수를 위해서는 다른 생성물로 전환되기 이전에 반응의 종결을 필요로 한다. 따라서 반응 종료 후 이러한 부가 반응을 방지하기 위해 반응 온도의 제어가 필수적이라고 볼 수 있으며 아임계 수 가수분해 반응 시 아미노산의 최적 생성 회수율을 위하여 더욱 세부적인 반응 온도에 대한 검토가 필요하다고 판단된다.

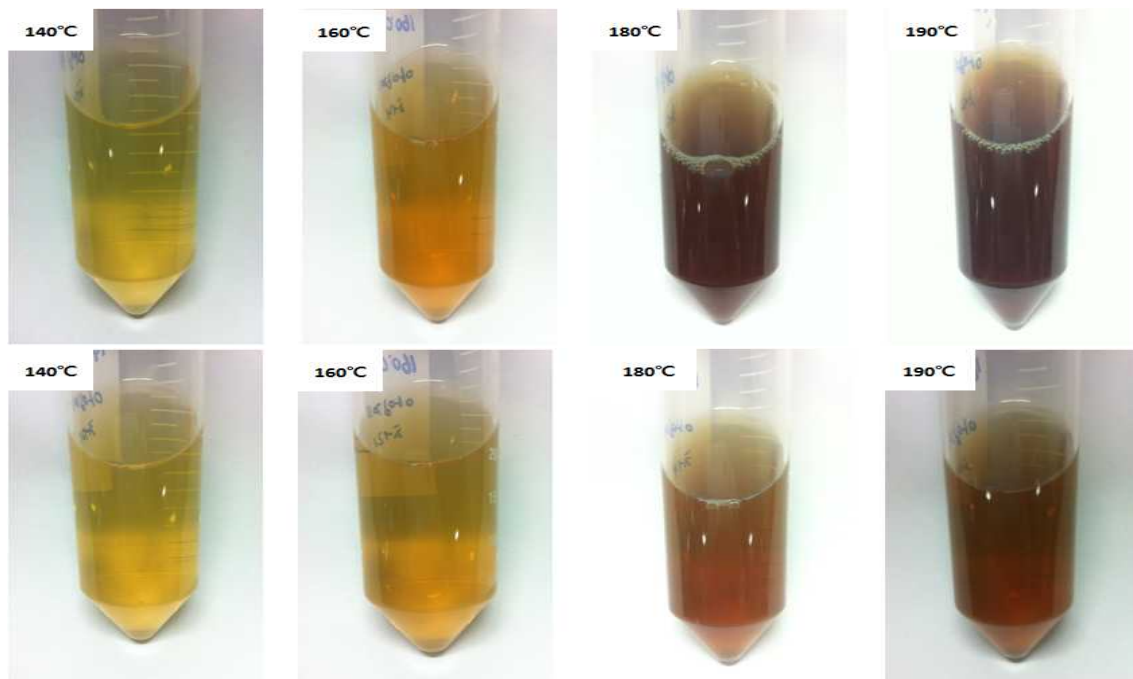


Fig. 3-4-33. 온도별 아임계수 처리한 시료(원심분리 후) / 밀글루텐(위) 분리대두단백(아래).

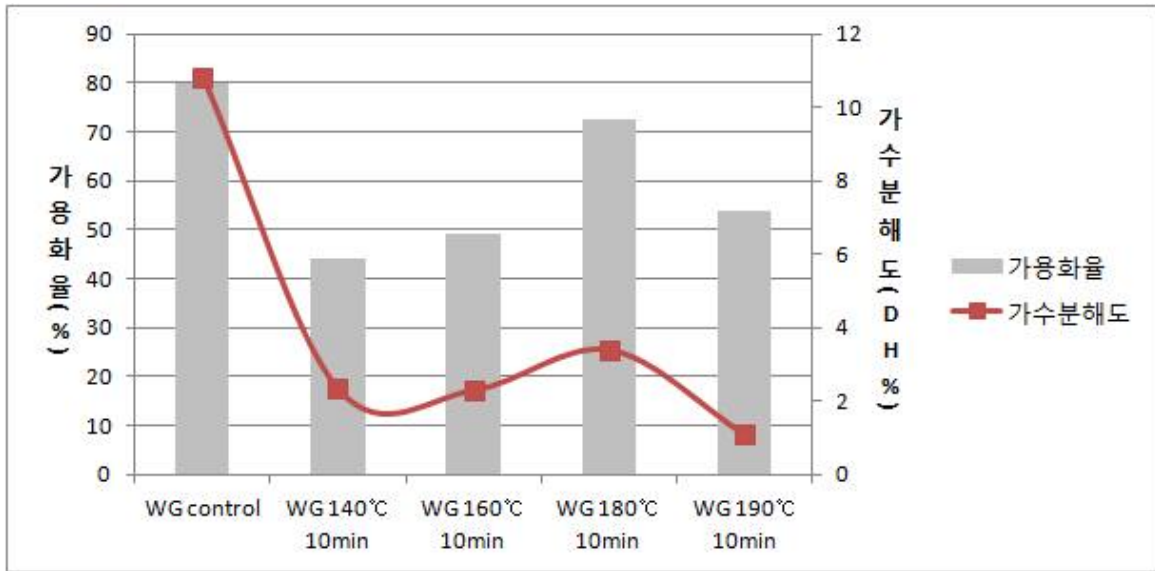


Fig. 3-4-34. 아임계수로 처리한 밀글루텐 액화물의 가용화율과 가수분해도에 미치는 처리온도의 영향.

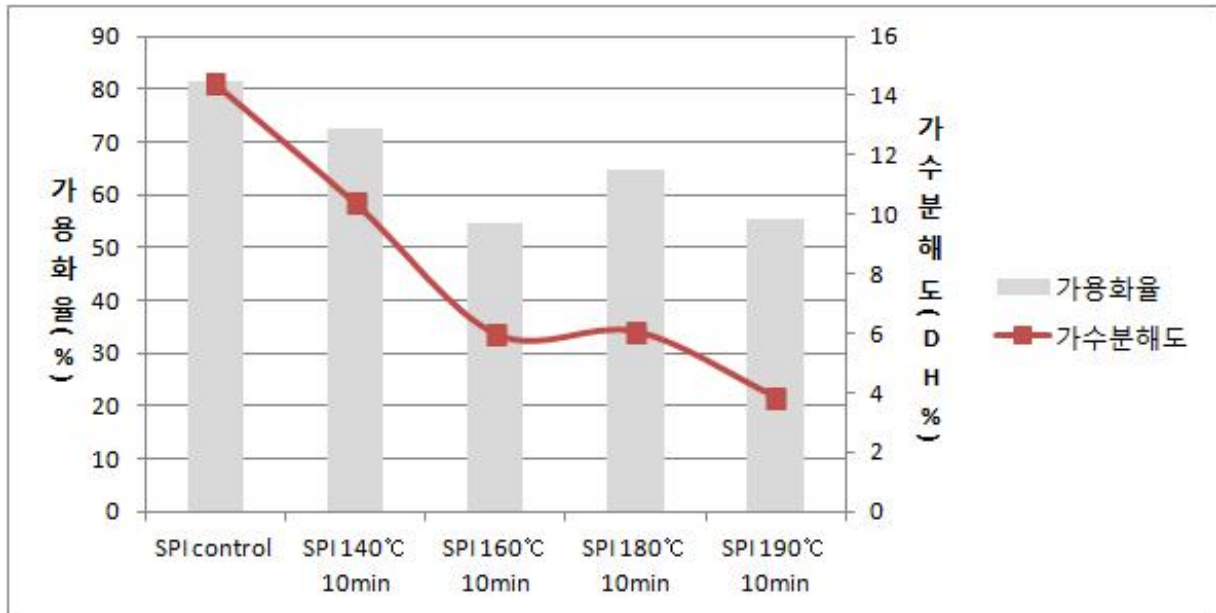


Fig. 3-4-35. 아임계수로 처리한 분리대두단백 액화물의 가용화율과 가수분해도에 미치는 처리온도의 영향.

아. 관능 평가

- 상압조건에서 가수분해한 밀글루텐과 대두분리단백 가수분해물의 짠맛 증진제로서의 효과를 확인하고자 다음과 같이 관능검사를 실시하였다.

(1) 차이 한계 설정

- 1협동(전주대학교)의 지원하에 차이 한계 설정 관능검사에 사용된 시료의 농도는 관능검사 요원 훈련 시 정답률이 높고, 짠맛의 인지(認知)를 손쉽게 할 수 있는 30 mmol에서 40 mmol 사이의 구간으로 정하였으며, 5 mmol 간격의 경우 훈련기간 동안에도 차이를 인지 할 수 있었으므로 2.5 mmol 간격으로 차이 한계 설정 관능검사를 실시하였다.

Table 3-4-12. 순위법 검사에 의한 소금물 농도의 관능검사

소금물 농도 (mmol)	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80
오답률 (%)	18.04	12.05	15.96	12.24	24.37	17.26	30.61	15.96	45.92	21.12	30.61	11.07
정답률 (%)	81.96	87.95	84.04	87.76	75.63	82.74	69.39	84.04	54.08	78.88	69.39	88.93

- 검사결과, 소금농도 30mmol 과 40mmol 사이에서 짠맛의 차이를 가장 잘 인식하는 것으로 나타났다.

(2) 짠맛 차이 지적 검사

- 차이한계설정 검사 결과를 바탕으로 30mmol의 NaCl을 대조군으로 하고, 30mmol NaCl 용액에 일정량의 가수분해물을 첨가한 시료를 피검자에게 제공하여 짠맛의 강도변화를 이점 대비법으로 차이 지적 검사하였다.
- 가수분해물의 색과 향으로 인한 오차를 최소화하기 위하여, 검사에 사용한 가수분해물은 활성탄을 이용하여 탈색 및 탈취하였고, 예비실험을 통하여 가수분해물의 적정 첨가량을 결정한 결과 2% 이상의 가수분해물을 30mmol의NaCl 용액에 첨가하였을 때부터 짠맛의 변화를 인식하기 시작하였으므로, 가수분해물의 첨가량을 소금물 대비 2%(v/v)로 하였다.
 - 목적 : 시료와 대조군과의 짠맛 강도 검사
 - 시료 A : 30mmol NaCl 용액 + 밀글루텐 가수분해물(2%)
 - 시료 B : 30mmol NaCl 용액 + 분리대두단백 가수분해물(2%)
 - 대조군 : 30mmol NaCl
 - 대상 인원 : 10명
- 밀글루텐 가수분해물을 첨가한 시료는 총 10명의 검사자 중 9명이 짠맛의 증가를 지적하여 95% 수준에서 가수분해물에 의한 짠맛의 증가가 유의성이 인정되었으나, 분리

대두가수분해물의 경우에는 3명만이 짠맛의 증가를 지적함에 따라 유의성이 인정되지 않았다.

2. 융합공정에 의한 식물성 단백질의 고도 가수분해와 정제 공정 개발

가. 실험 방법

(1) 시료 전처리

- 가수분해물이 원심분리를 하여도 현탁 물질이 분리되지 않으므로 12,000rpm에서 20분간 원심분리한 상등액을 다시 0.45 μ m syringe filter로 여과하여 분석시료를 제조하였다.

(2) 고형분 측정법

- 가수분해물의 고형분은 상압가열건조법을 사용하였다. 시료 적정량을 취하여 105 $^{\circ}$ C 오븐에서 완벽히 건조(약 24시간)시켜 수분을 제거 후 다시 칭량하여 건조 전과 후의 중량이 감소되는 양을 수분의 함량으로 구하여 고형분 함량을 계산하였고 초기의 투입량대비 가용화된 비율을 계산하였다.

(3) 가수분해도 측정법(OPA법)

- 가수분해물의 가수분해도(Degree of Hydrolysis)는 OPA법을 이용하여 측정하였다.(Church and others,1983) di-sodium tetraborate 7.62g과 SDS(Na-dodecyl-sulfate) 0.2g을 증류수 150ml에 녹인후 OPA(o-phthaldialdehyde) 0.16g을 4ml의 에탄올에 용해시켰다. DTT(dithiolthreitol 99%) 0.176g을 넣고 총 volume이 200ml이 되도록 증류수로 맞춰 OPA reagent를 제조하였다. 이때 모든 시약은 Sigma사(USA)의 시약을 사용하였다.
- Standard는 serine 을 증류수에 녹여 총 volume이 500ml이 되도록 제조하였고, sample은 proteine 농도가 8~80%가 되도록 희석하여 준비하였다.
- OPA reagent를 test tube에 3ml 씩 준비하고 blank(증류수), standard(serine), sample(희석된 가수분해물)을 400 μ l씩 투입하여 5초간 vortexing 후 정확히 2분간 반응시키며 흡광도 340nm에서 측정하여 다음과 같이 계산하였다.

$$DH(\%) = h / h_{\text{tot}} * 100$$

$$h = (\text{serine-NH}_2 - \beta) / \alpha \text{ (meqv/g protein)}$$

$$\text{Serine-NH}_2 = (\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank}} / \text{OD}_{\text{standard}} - \text{OD}_{\text{blank}}) * (0.9516 \text{ meqv/L} * 0.1 * 100) / (X * P)$$

* X = g sample, P = protein % in sample.

Table 3-4-13. Value of constants α , β , and h_{tot} for different protein raw materials

protein	α	β	h_{tot}
soy	0.970	0.342	7.8
gluten	1.00	0.40	8.3

(4) 분자량분포(GPC)측정

- 가수분해물의 분자량 분포는 Gel Permeation Chromatography(GPC)로 분석하였으며 GPC분석조건은 아래의 표와 같다.

Table 3-4-14. GPC 분석조건

Instrument	GE Healthcare AKTA prime plus
Column size	XK16/70
Column lesin	Sephadex G-10
Mobile phase	Formic acid 1%
Flow rate	0.5ml/min
Wavelength	214nm
Fraction size	5ml

Table 3-4-15. GPC standard 물질

	Standard 물질	Retention (min)	standard분자량
I	Vitamin B ₁₂	89.72	1355.37
II	Vitamin B ₁	101.95	337.27
III	L-Glutamic acid	129.2	147.13

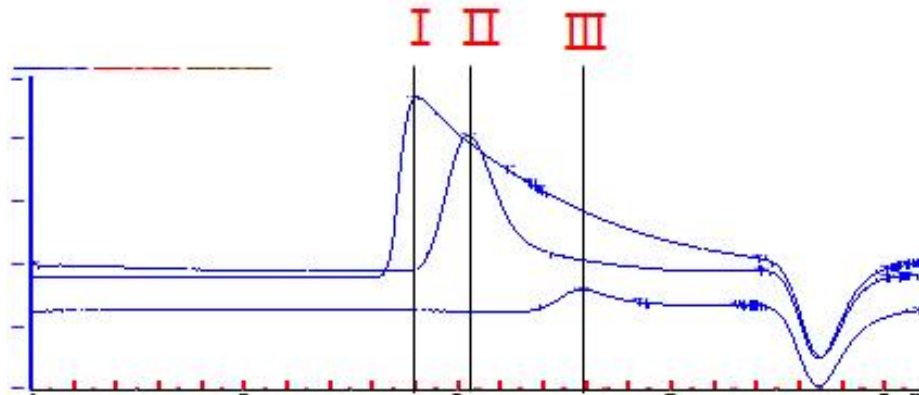


Fig. 3-4-36. GPC chromatogram for standard.

(5) 전기영동법(SDS-PAGE)

- 가열을 통한 1차가수분해물의 분해정도 확인은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 사용하여 분석하였다. 이때 사용된 gel은 BIO-RAD사의 Mini-Protean TGX Precast Gel을 사용하였다. 분석용 시약 중 버퍼용액으로는 Tris/Glycine/SDS Buffer(BIO-RAD, USA)를 standard는 Precision Plus Protein Standard All Blue(BIO-RAD, USA), marker는 Laemmli Sample Buffer(BIO-RAD, USA)를 사용하였다.
- 샘플과 marker를 함께 가열, 냉각 처리 한 후 20 μ l씩 gel에 loading한 후 100V로 30분간 전개하였다. 전개 후 Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution(BIO-RAD, USA)용액으로 염색 하여 관찰하였다.

(6) 식염정량(Mohr법)

- 가수분해물의 식염정량은 Mohr법(Cl정량)을 이용하여 분석하였다. 측정하려는 샘플을 적당량 증류수에 용해시켜 시료용액을 제조한 후 10ml 취한다. Potassium Chromate(대정화금, Korea) 10% 용액을 2~3방울 첨가한 뒤 0.1N silver nitrate solution(Yakuri pure chemical, Japan)을 이용하여 처음의 황색에서 붉은 빛이 돌때까지 적정하여 계산하였다.

$$\text{식염}(\%) = (0.00585 \times 0.1\text{N silver nitrate solution의 소비량}(\text{ml}) \times \text{희석배수/시료채취량}) \times 100$$

나. 가압열수를 이용한 1차 가수분해

- Alcalase에 의하여 가용화된 밀글루텐과 분리대두단백질 분산액을 140 $^{\circ}$ C~190 $^{\circ}$ C의 범위에

서 가압 열수 처리하였을 경우에 가용화율과 가수분해도가 오히려 감소되는 현상이 관찰되었다. 이는 alcalase에 의하여 수용화된 펩타이드와 단백질이 열처리에 의하여 침전을 형성하게 됨으로써 일어나는 현상으로 판단된다. 펩타이드 결합을 분해하여 가수분해 시키기 위해서는 200℃~250℃ 이상의 고온 열수 처리가 필요할 것으로 판단되나 보유 장비의 최고처리 온도가 190℃로 한정되어 있어 더 이상의 실험은 진행하지 못하였다.

- 기존의 연구에 의하면, 고압열수를 이용한 단백질의 가수분해는 처리 온도에 크게 영향을 받으며, 이에 따라 처리온도에 따라 다양한 분자량의 가수분해물을 얻을 수 있을 것으로 사료되어 차후 장비가 구비되면 이에 대한 보완 실험을 계속 진행할 것이다.

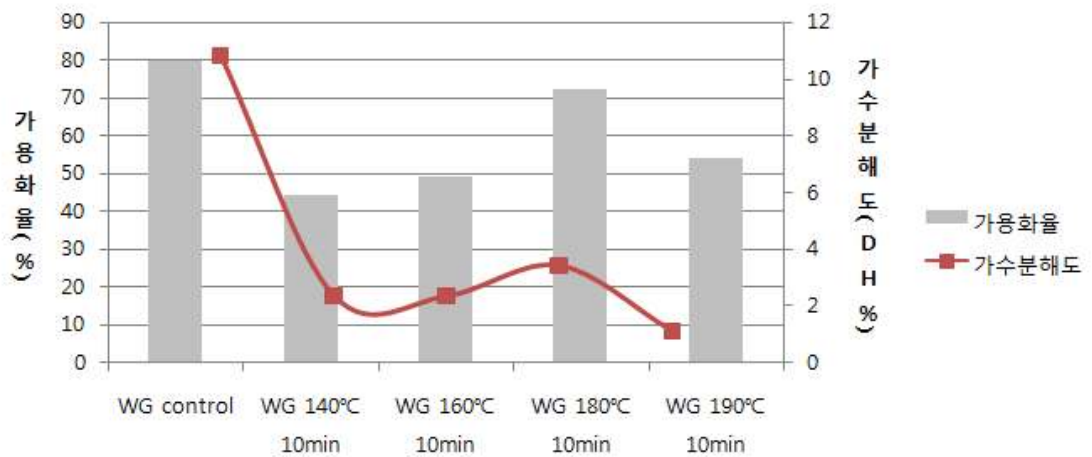


Fig. 3-4-37. 아임계수로 처리한 분리대두단백 액화물의 가용화율과 가수분해도에 미치는 처리온도의 영향.

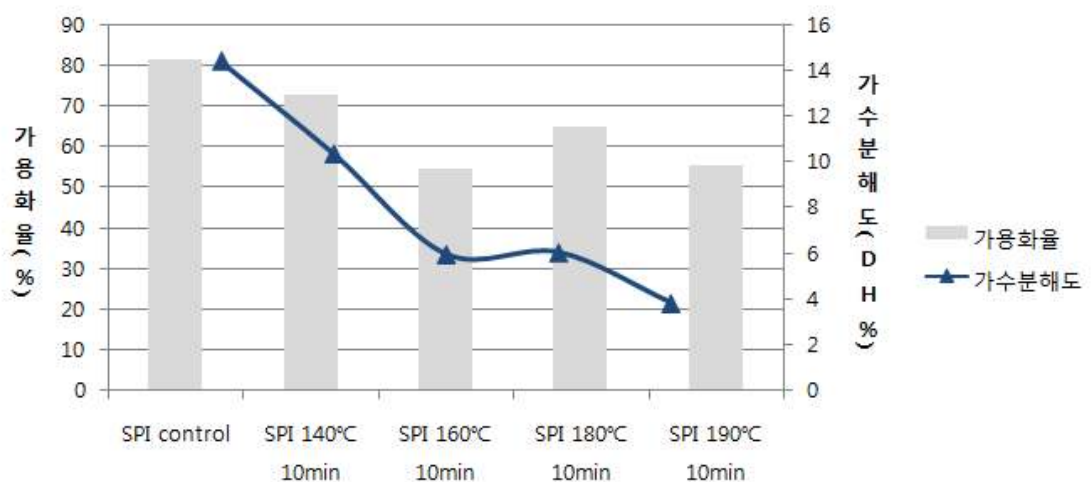


Fig. 3-4-38. 아임계수로 처리한 밀글루텐 액화물의 가용화율과 가수분해도에 미치는 처리온도의 영향.

- 산업적인 빠른 적용을 위하여 비교적 낮은 온도인 121℃에서 밀글루텐과 분리대두단백질의 가수분해 현상을 살펴보았다. 10%의 밀글루텐과 분리대두단백질 현탁액을 가열 시간을 달리하여 처리한 결과를 아래에 나타내었다.

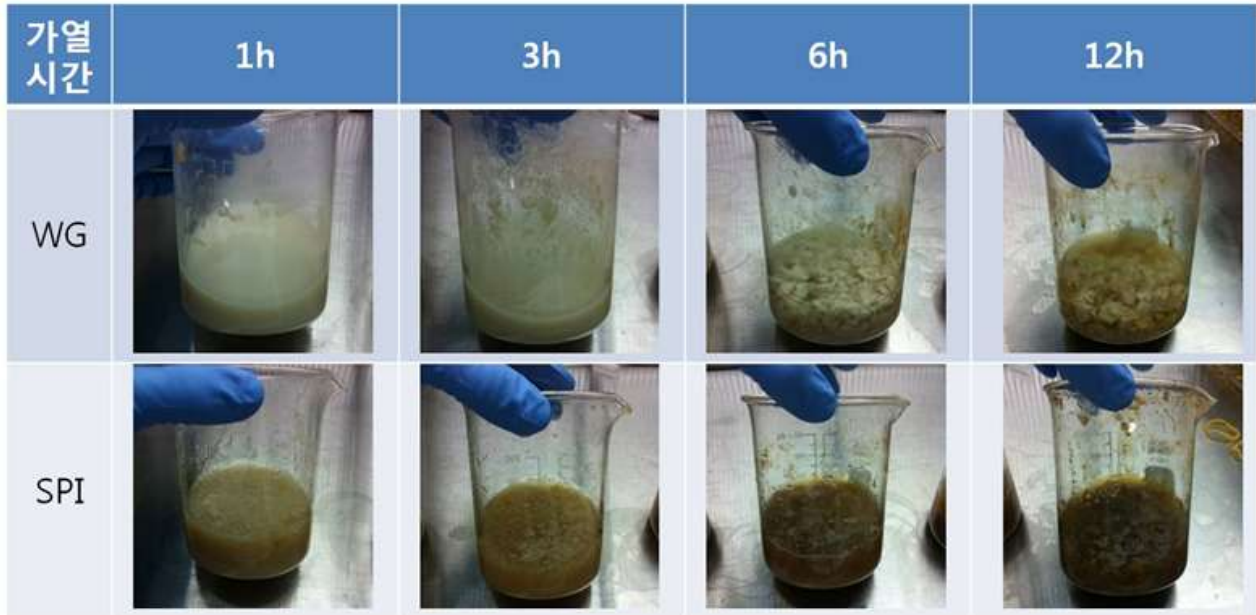


Fig. 3-4-39. 가열시간에 따른 밀글루텐과 분리대두단백질의 상태변화.

- 밀글루텐과 분리대두단백질 현탁액은 초기에 급격한 점도증가를 보이면서 겔을 형성하다가(data not shown) 가열시간 증가에 따라 점도가 감소하였으나, 가열시간 3시간 이후에는 응고되어 불용성의 침전을 형성하였다. 이는 alcalase 처리한 단백분산액의 가압열수 처리에서 발생한 현상과 유사하며, 수용성 단백질과 펩타이드가 과도한 열처리에 의하여 재응집하는 것으로 판단된다.
- 한편 단백질의 가수분해는 pH에 크게 영향을 받으므로 이에 대한 영향을 살펴 보기 위하여 pH 별로 10% 분리대두단백질 현탁액을 121℃에서 5분간 가열한 결과를 Fig. 3-4-38에 나타내었다.





pH	4	3	2	1.5
가열시간	5min	5min	5min	5min
가열온도	121°C	121°C	121°C	121°C
결과				

Fig. 3-4-40. pH 변화에 따른 분리대두단백 현탁액의 상태.

- 그림에서 알 수 있듯이 pH 4로 조절한 현탁액은 심하게 응고되어 침전을 형성하였고, pH 3 은 높은 점성을 보이면서 끓어 넘치는 현상이 발생하였다. 반면 pH 2와 pH 1.5 에서는 점도가 낮아지면서 묽어져 가수분해가 일어난 것으로 판단할 수 있었다. pH 2에 비하여 pH 1.5가 더 많은 가수분해가 일어난 것으로 보이나 pH 조절을 위해 과도한 산의 투입이 우려되므로 최적 조건은 pH 2로 결정하였다.

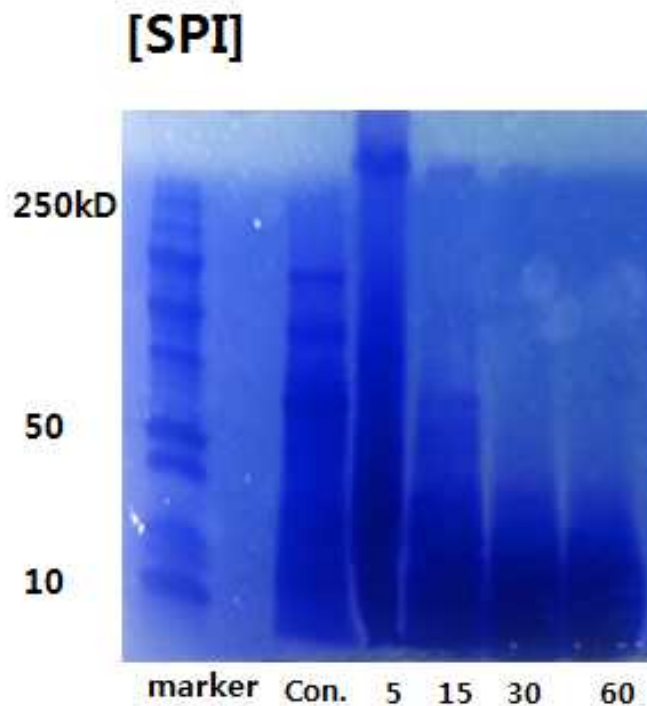


Fig. 3-4-41. 가열시간에 따른 분리대두단백질의 SDS-PAGE 결과.

- 가열시간에 따른 분리대두단백질의 가수분해 양상을 보기 위하여 pH로 조절한 분리대두단백 가수분해물을 SDS - PAGE를 사용하여 분석하였다. 121°C에서 5분간 가열로 100kD 이상의 단백질이 분해가 된 것을 확인할 수 있었으며, 시간의 경과에 따라 대부분

의 단백질이 저분자화되어 30분 가열로 30kD 이하로 변하였으나 이후 1시간 가열에서도 더 이상의 저분자화는 관찰되지 않았다. 따라서 분리대두단백질의 가압열수 처리 조건은 121°C에서 pH 2, 가열시간 30분으로 결정하였으며 생성된 10kD 부근의 펩타이드 및 단백질은 이후 2차 가수분해를 통하여 저분자화가 가능할 것으로 판단하였다.

- 한편 밀글루텐의 pH와 가열시간에 따른 결과를 아래 그림에 나타내었다.

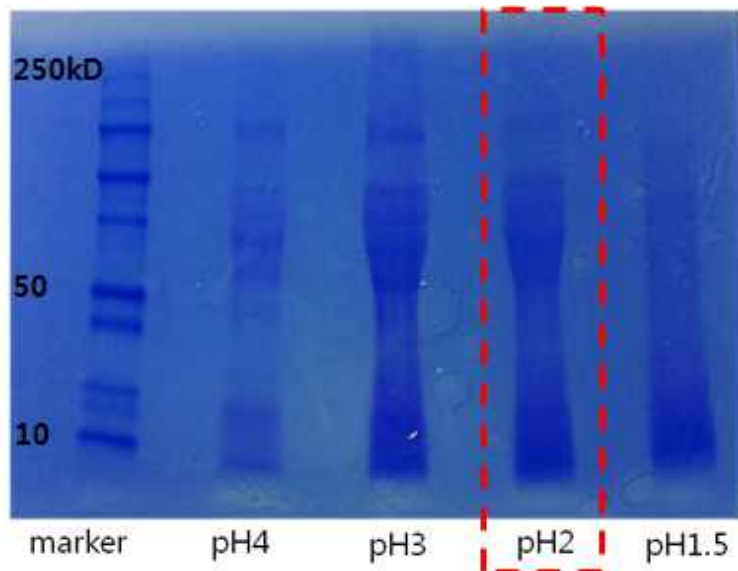


Fig. 3-4-42. pH변화에 따른 밀글루텐의 SDS-PAGE 결과.

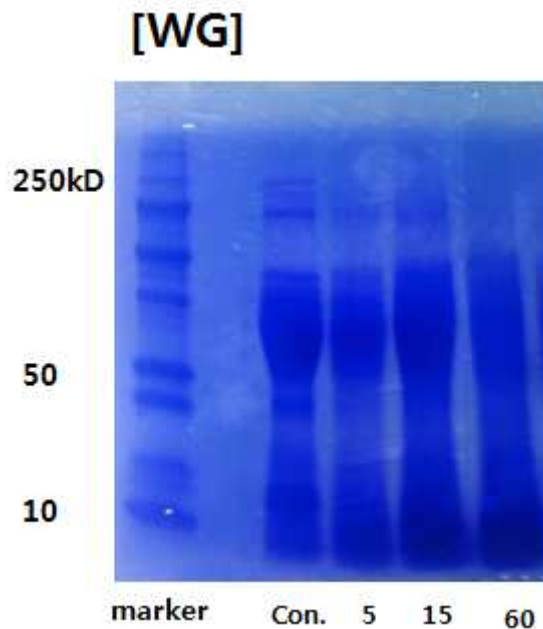


Fig. 3-4-43. 가열시간에 따른 밀글루텐의 SDS-PAGE 결과.

- 밀 글루텐의 경우에도 pH 1.5에서 보다 많은 가수분해가 일어나 저분자화가 진행된 것을

확인하였으나 과량의 산투입에 대한 부담이 있었으며, 가열시간에 따라 저분자화가 진행된 것을 확인할 수 있었으나 분리대두단백질에 비하여 저분자화가 현저히 낮은 현상을 보여 밀 글루텐은 가압열수에 의한 가수분해가 적합하지 않은 것으로 판단되어 이후의 실험에서는 분리대두단백질만을 원물로 사용하여 2차 가수분해를 진행하였다.

- 121°C에서 pH와 가열시간에 따른 분리대두단백질과 밀글루텐의 가압열수 최적화 조건을 아래 표에 나타내었다.

Table 3-4-16. 분리대두단백질과 밀글루텐의 가압열수 가수분해 최적화 조건

기질	SPI	WG
농도	10%	10%
촉매제(pH조절)	pH2	pH2
가열온도	121°C	121°C
가열시간	30min	60min

다. *Bacillus subtilis* TP6 균주를 이용한 2차 가수분해

- 가압열수를 이용하여 1차 가수분해한 가수분해물을 protease 고활성 미생물을 이용하여 2차 가수분해 하였다. Protease 고활성 균주로 선발하여 사용한 *Bacillus* 속 미생물은 본 연구팀((주)바이오벤)이 청국장으로 부터 분리하여 보유하고 있는 serine protease 고활성 균주로 동정 결과 *Bacillus subtilis* TP6(이하 TP6)로 명명된 균주이며 최적배양 조건은 아래와 같다.

Table 3-4-17. *Bacillus subtilis* TP6 균주의 배양 조건

구분	배양조건
Broth	NB 배지, glucose 1%
Temperature	37°C
pH	7.0



Fig. 3-4-44. *Bacillus subtilis* TP6 균주를 이용한 2차 가수분해 공정.

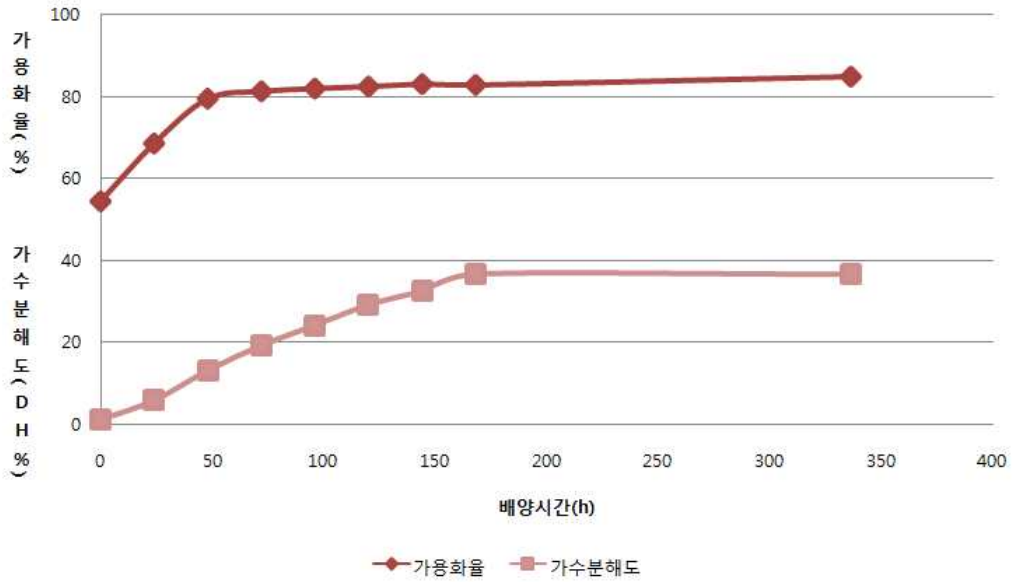


Fig. 3-4-45. *Bacillus subtilis* TP6 균주를 이용한 2차 가수분해 profile

- pH를 2로 조절한 10% 분리대두단백질을 121°C에서 30분간 가열하여 고온가수분해한 가수분해액과 24시간 배양한 TP6 배양액을 1:1 로 혼합하고 37°C에서 14일간(336시간) 배양하면서 가수분해도와 가용화율을 측정하였다.
- 초기 가용화율과 가수분해도는 각각 54%와 1.3%로 이는 고온처리에 의하여 일부 단백질이 가수분해 되었음을 의미한다. 가용화율은 48시간에 80%까지 도달한 후 더 이상의 가용화는 이루어지지 않았으나, 가수분해도는 꾸준히 증가하여 168시간에서 36.8%에 도달하였고 이후 일정한 값을 나타냈었다. 이는 TP6에 의한 가수분해에 의하여 48시간에서 거의 모든 단백질이 수용화 되었고 이후에도 가수분해는 계속 진행되어 배양 후 7일(168시간)까지도 진행되나 이후에는 더 이상의 가수분해는 일어나지 않음을 알 수 있었다.
- 배양시간에 따른 가수분해물의 분자량 분포를 GPC 분석을 이용하여 확인하였다. 표준물질로 vitamin B12(Mw=1355.37), vitamin B1(Mw=337.27), L-glutamic acid(Mw 147.13)을 사용하여 GPC 분석을 수행한 결과, 단백질 가수분해물의 GPC chromatogram을 아래 그림과 같이 세영역으로 나눌 수 있었다. 축합/중합된 아미노산의 평균분자량이 110 dalton/mol 임을 감안할 때, I 영역은 중합도 10이상(분자량 1100이상)의 고분자량의 단백질이고 II 영역은 중합도 2~10 사이의 oligo peptides 영역(분자량 220~1100), III 영역은 단일아미노산 영역(분자량 220이하)으로 판단하였다.

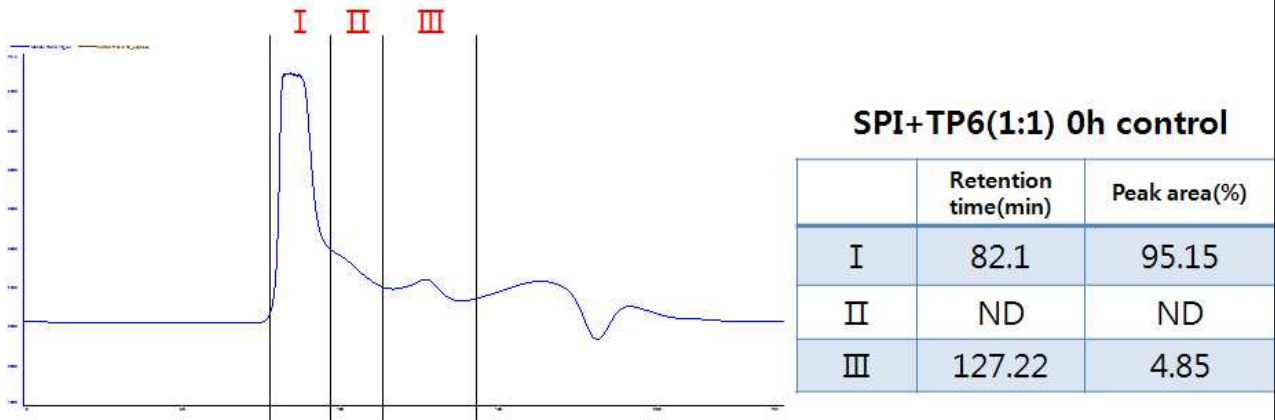


Fig. 3-4-46. TP6 균주를 이용한 가수분해물 0일차 시료의 GPC chromatogram

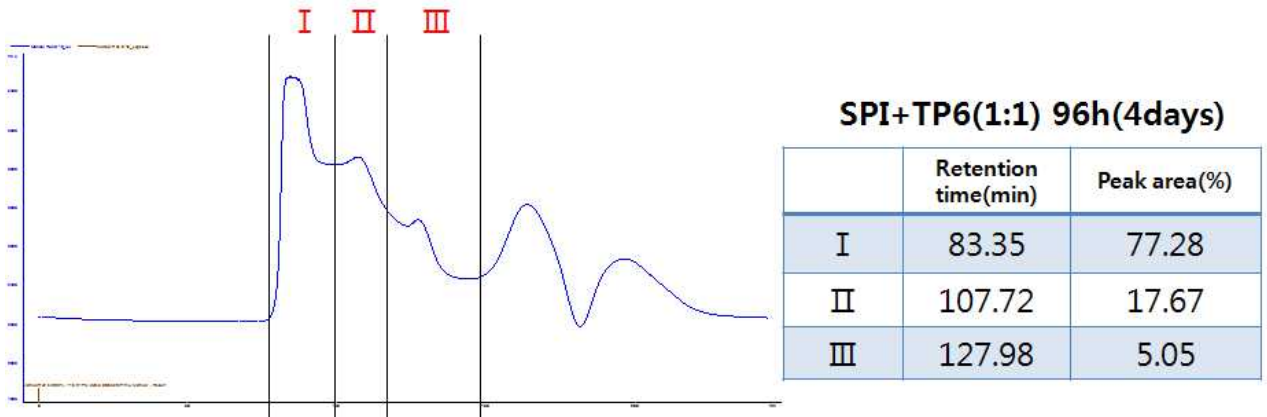


Fig. 3-4-47. TP6 균주를 이용한 가수분해물 4일차 시료의 GPC chromatogram

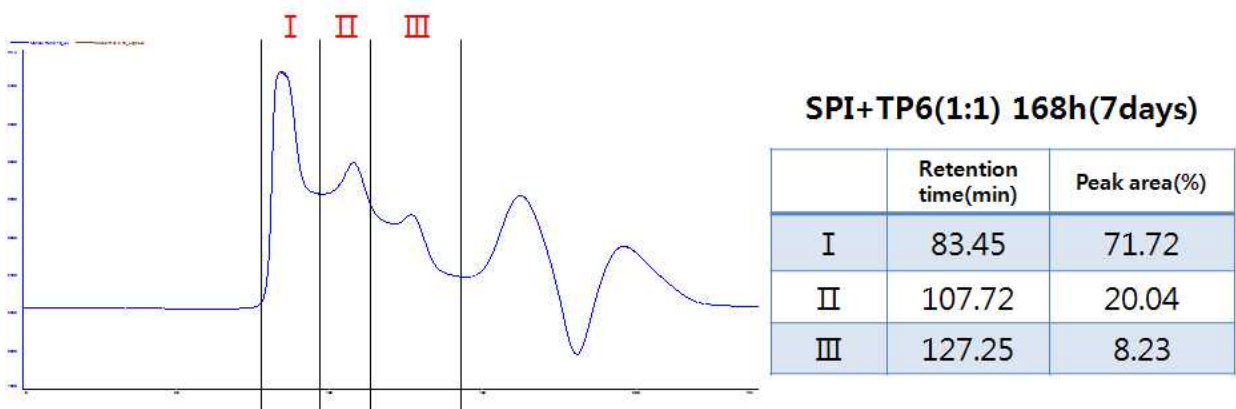


Fig. 3-4-48. TP6 균주를 이용한 가수분해물 7일차 시료의 GPC chromatogram

- 고온열수 처리한 분리대두단백가수분해물을 TP6 배양액과 1:1로 혼합한 후 배양한 결과, 배양시간 경과에 따라 분자량 1,100 이상의 고분자 영역은 점차로 감소하여 초기 95.15%에서 1주일(168시간) 배양 후에는 71.72%로 감소한 반면 초기엔 검출되지 않았던 올리고

펩타이드는 20%로 증가하였다. 한편 단일아미노산류는 초기 4.85%에서 8.23%로 약간 증가한 것으로 분석되었다. 이러한 결과로부터 TP6는 대두단백질을 아미노산 형태보다는 주로 올리고펩타이드 형태로 분해하는 것을 알 수 있으며, 본 연구의 목적인 염미증진제가 올리고 펩타이드 영역에 존재하는 것으로 보고되고 있으므로 TP6에 의한 가수분해는 본 연구목적에 적합한 선택으로 판단된다.

라. 고압을 이용한 3차 가수분해



Fig. 3-4-49. 고압을 이용한 3차 가수분해 공정



Fig. 3-4-50. 고압액화기(TFS-20, 이노웨이)

- 고압처리 기술은 주로 식품 중의 유해 미생물의 살균을 목적으로 개발되었으나, 최근에는 추출 및 효소분해 분야에 적용범위를 확대하고 있다. 고압처리에 의하여 식품 단백질의 구조변형을 일으키게 되고 이에 따라 효소활성도가 변할 수 있으므로 처리압력, 효소의 종류, pH, 온도, 시간 등이 효소활성도에 영향을 줄 수 있다.
- 효소 자체의 반응성을 향상시키는 압력은 효소가 가역적으로 변형되는 50-100MPa 정도이며, 반대로 내재 효소에 의한 품질열화를 억제하기 위하여 내재효소를 비가역적으로 변형시켜 불활성화 시키기 위한 압력은 400-800MPa 이상인 것으로 알려져 있다.

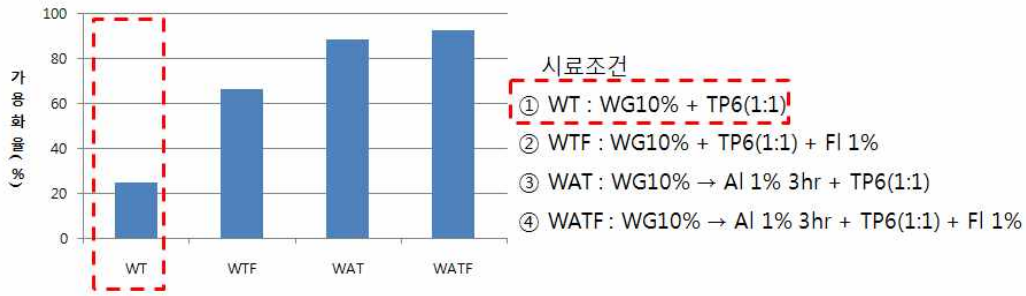


Fig. 3-4-51. TP6조효소를 이용한 고압가수분해물의 가용화율

- 1차년도 연구결과에 의하면 밀글루텐 분산액과 TP6 배양액을 혼합하여 50℃에서 24시간동안 100MPa의 고압처리하여도 가용화율과 가수분해율에 전혀 변화가 없었다. 이는 TP6 배양액에 포함되어 있는 단백가수분해효소가 활성이 없거나 매우 낮은 상태임을 의미하며, TP6 배양액에 의한 가수분해는 배양액 중에 포함된 protease에 의한 단순한 조효소(crude enzyme) 역할이 아닌 미생물의 생육과 연관되는(growth-association) 기작을 포함하고 있음을 의미한다. TP6는 호기성 균주이며 생육 최적 온도는 37℃이나 고압처리하는 50℃의 혐기적인 조건이므로 고압처리 과정에서 TP6의 생육활성은 억제되므로 단백질의 가수분해가 전혀 일어나지 않은 것으로 판단하였다. 24시간의 고압처리에 의하여 alcalase나 flavozyme에 의한 가수분해는 상당히 진행된 것과 비교하였을 때, 밀 글루텐과 혼합한 TP6 배양액 중에는 밀글루텐을 분해할 수 있는 protease가 거의 존재하지 않음을 의미하며, 이는 기질과 같이 배양을 하였을 때 비로소 기질을 분해할 수 있는 효소를 생산한다는 생육 연관 기작을 나타내고 있다.
- 따라서 10% 분리대두단백 현탁액을 고온가수분해한 후에 TP6 배양액과 혼합한 후 37℃에서 재배양을 실시하여 TP6가 단백질을 가수분해할 수 있는 효소를 생산한 후에 고압처리를 실시하는 것이 유리할 것으로 사료된다.
- 고온가수분해한 분리대두단백 가수분해물을 TP6 배양액과 1:1로 혼합한 후 다시 일정시간 동안 추가로 배양 한 후에 37℃, 100MPa의 압력하에서 24시간동안 고압처리한 결과를 Fig. 3-4-50에 나타내었다.

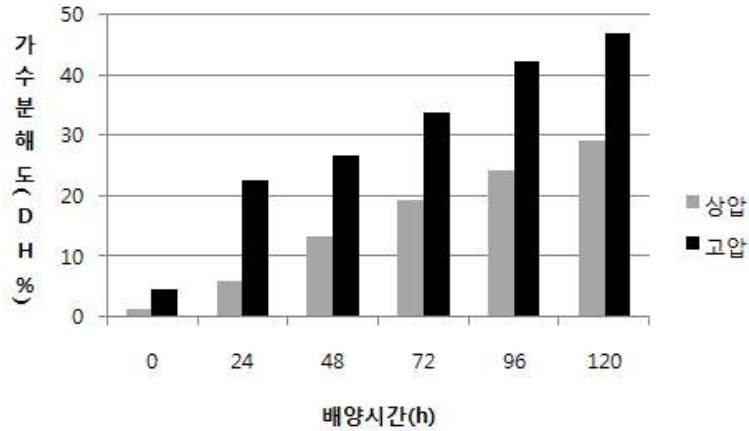


Fig. 3-4-52. 배양시간에 따른 상압 및 고압조건 가수분해도의 변화

- TP6 배양만으로 가수분해도는 배양초기 1.3%에서 점차로 증가하여 120시간에서 최대 29.3%를 나타내었다. 이 배양액을 추가로 24시간동안 고압처리 함으로써 가수분해도가 현저히 증가한 결과를 얻을 수 있었다. 120시간에서 최대 47.1%의 가수분해도를 나타내어 고압처리로 60%정도의 가수분해 증가 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 TP6 배양액은 분명한 생육연관 기질을 나타내며, 기질이 있을 때 비로소 기질을 분해하는 효소를 생산함을 증명하고 있다. 즉 분리대두단백질을 분해하기 위하여 TP6가 생산해 낸 protease가 고압처리에 의하여 활성이 증가하였음을 의미한다.
- 총반응시간(처리시간)을 기준으로 하였을 때 고압처리가 가수분해도에 미치는 영향을 아래 그림에 나타내었다. 즉 24시간 동안 고압처리하였을 때 대조군은 상압에서 24시간동안 계속해서 배양을 행하였다. 상압에서도 가수분해도가 계속 증가하였으나 고압처리에 의하여 가수분해도가 크게 증가하여 TP6에 의하여 생산된 protease는 고압처리에 의하여 활성이 크게 증가함을 알 수 있었다.

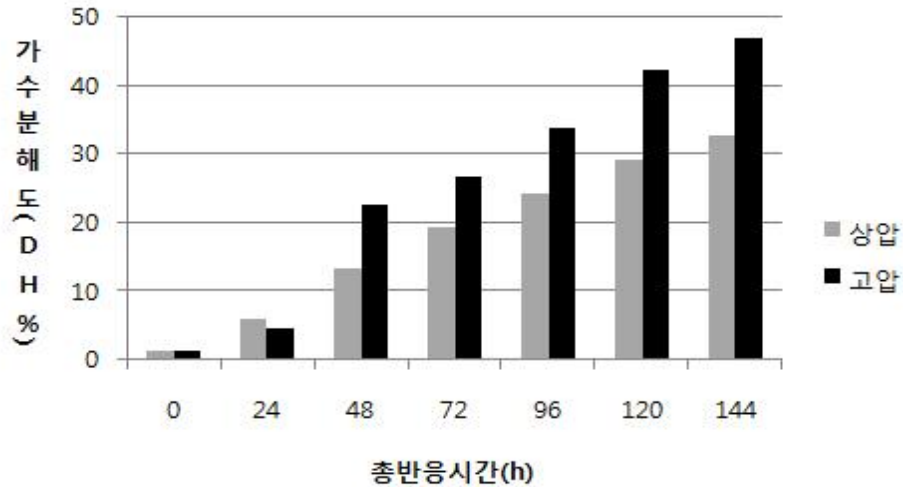


Fig. 3-4-53. 총 반응시간에 따른 상압 및 고압조건 가수분해도의 변화

- 고압처리가 가수분해물의 분자량 분포에 미치는 영향을 GPC 분석을 이용하여 확인하였다. 고온가수분해와 96시간의 TP6 배양을 거친 가수분해물의 경우 올리고 펩타이드와 단일 아미노산 비율이 각각 17.67%, 5.05%였으나 1시간의 고압처리를 거친 가수분해물은 28.44%와 7.93%로 증가하였다. 이러한 현상은 고압처리에 의하여 가수분해도가 크게 증가하는 현상과 일치하며 특히, 올리고 펩타이드의 양이 크게 증가한 것은 TP6에 의해 생산된 protease의 활성이 고압처리에 의하여 증가함에 따른 현상으로 보여 진다.

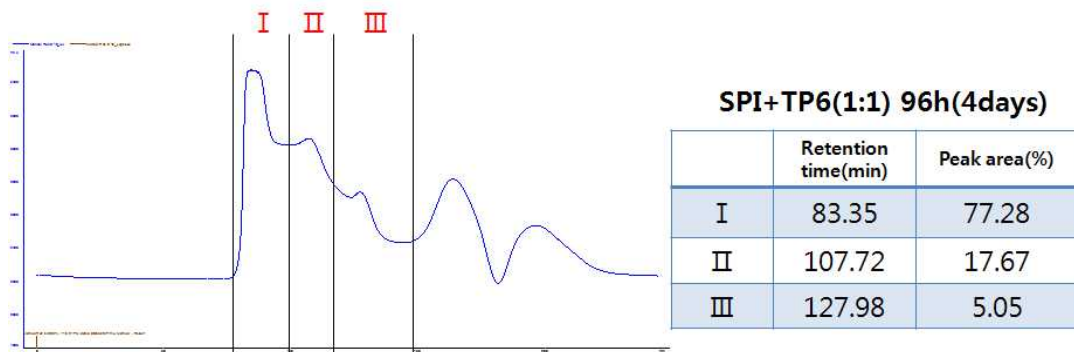


Fig. 3-4-54. TP6 균주를 이용한 가수분해물 4일차 시료의 GPC chromatogram

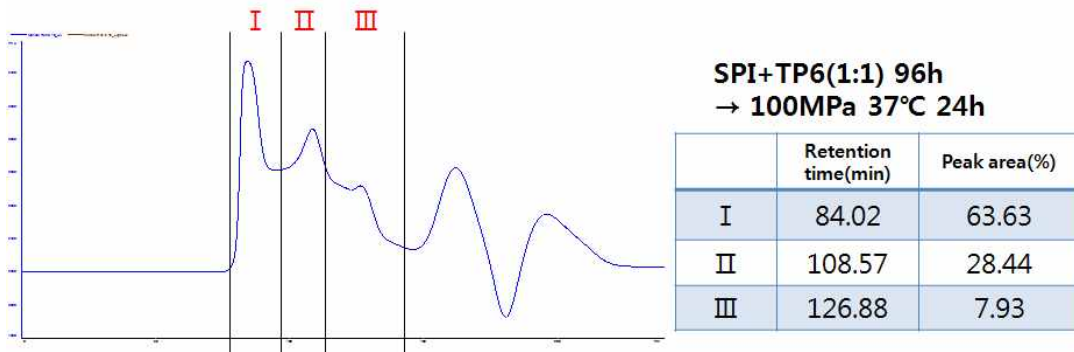


Fig. 3-4-55. TP6 균주와 고압처리 병행시료의 GPC chromatogram

다. 융합가수분해공정개발

- 전술한 바와 같이 상용효소 중에서 flavourzyme이 고압가수분해 시에 다른 효소에 비하여 높은 가수분해도를 나타내었고, exo type의 protease이므로 염미증진효과가 우수한 대두단백 가수분해물 생성에 유리할 것으로 판단되어 flavourzyme을 융합가수분해 공정에 사용하였다.
- 또한, Flavourzyme은 ext type의 protease로서 다른 상용 protease에 비하여 저분자 peptides를 많이 만드는 것으로 알려져 있다. 따라서 Flavourzyme의 활성을 극대화 시킬 수 있는 투입시기를 결정하여 사용한다면 연구의 목적인 올리고 펩타이드 생산에 크게 도움이 될 수 있을 것이다.

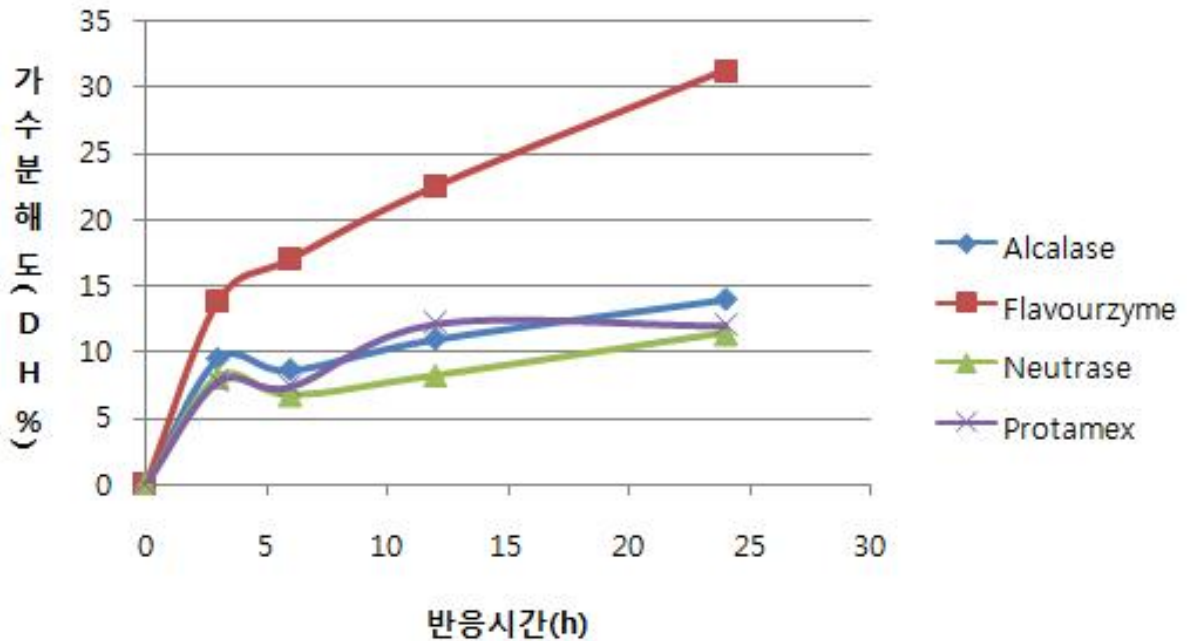


Fig. 3-4-56. 시판효소에 의한 분리대두단백의 고압(100MPa)가수분해특성

- Flavourzyme의 첨가 시기를 달리하여 Flavourzyme 첨가가 대두단백질의 가수분해에 미치는 영향을 살펴보았다.

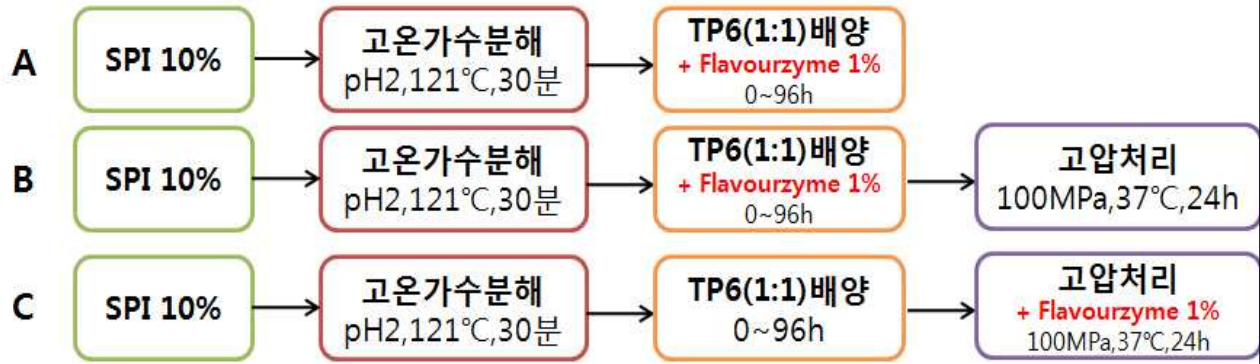


Fig. 3-4-57. Flavourzyme을 첨가한 융합가수분해 공정도

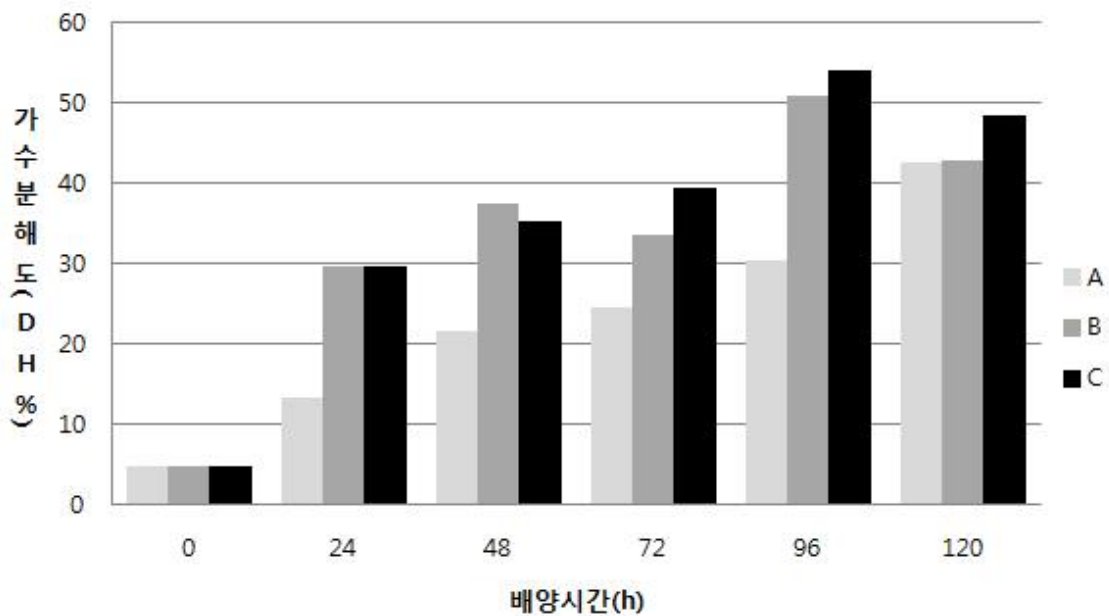


Fig. 3-4-58. 배양시간에 따른 Flavourzyme 첨가공정별 가수분해도의 변화

- Flavourzyme의 첨가는 전체적으로 약간의 가수분해도를 증가시켜 배양시간 기준으로 96시간에서 최대 53.9%의 가수분해도를 나타내었다. 그러나 120시간에서는 48.5%로 소폭 감소하는 경향을 보였는데 이는 가수분해된 아미노산이나 펩타이드가 TP6의 생육에 소비되면서 발생하는 것으로 판단되므로 수율적인 면에서 고려할 때 최적 배양시간은 96시간으로 판단된다. 또한 고압처리의 유무에 관계없이 120시간에서는 42.5%과 42.8%로 거의 같은 값을 나타내어 최대 가수분해도에 도달한 것으로 판단하였다. 이러한 결과를 토대로 대두분리단백질의 가수분해를 위해서는 상기 공정에서 2가지 선택을 할 수 있을 것이다. 즉, 고온가수분해와 TP6 배양 시에 Flavourzyme을 첨가하여 96시간을 배양한 후 고압처리하거나 또는 120시간 이상으로 배양시간을 늘리는 방법을 선택할 수 있다. 이러한 선택은 차후 산업화 단계에서 고압처리비용과 배양비용을 고려하여 결정하여야 할 사항으로 여겨진다.

- Flavourzyme의 첨가시기에 따른 가수분해물의 분자량 분포를 Fig.3-4-57,58,59에 나타내었다.

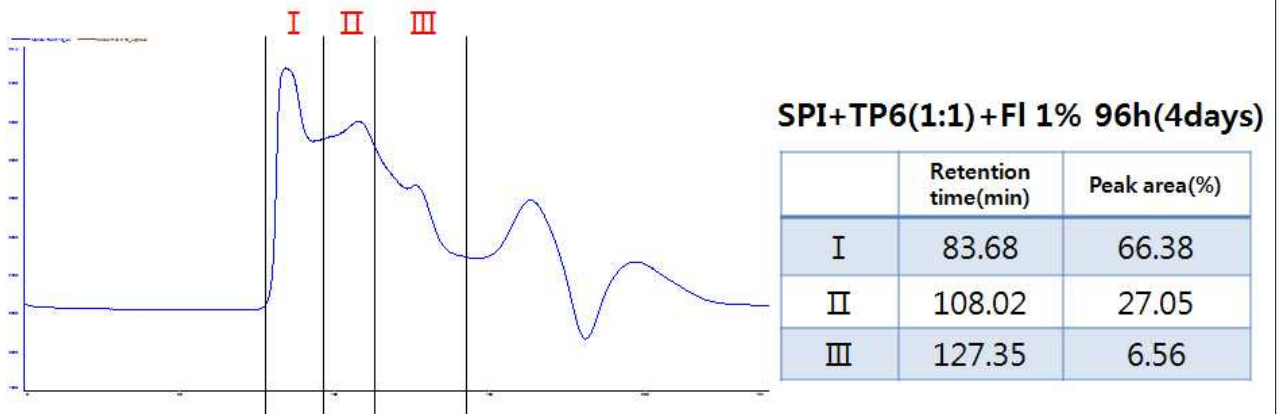


Fig. 3-4-59. 융합가수분해공정의 GPC chromatogram I

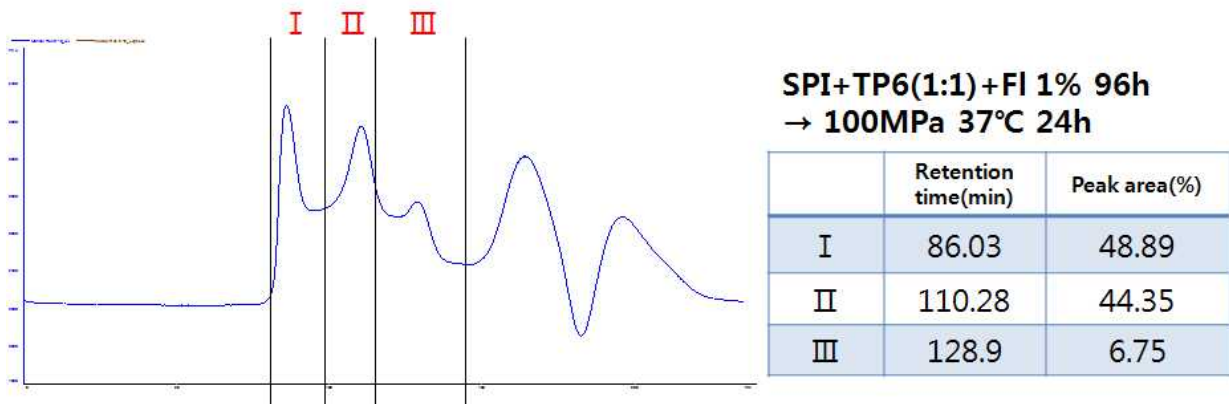


Fig. 3-4-60. 융합가수분해공정의 GPC chromatogram II

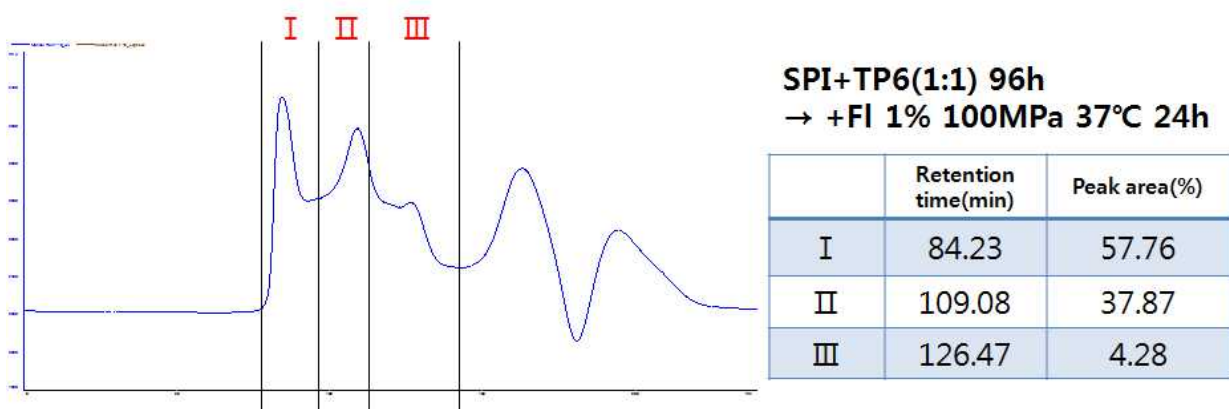


Fig. 3-4-61. 융합가수분해공정의 GPC chromatogram III

- Flavourzyme를 첨가하고 TP6를 96시간 배양한 경우 올리고 펩타이드는 27.06%였으며, 96시간 배양 이후에 24시간동안 고압처리한 경우에는 44.35%로 64%의 현저한 증가를 보였다. 그러나 Flavourzyme의 첨가 없이 TP6만의 배양 후 고압처리과정에서 Flavourzyme을 첨가한 경우에는 37.87%의 함량을 보여 Flavourzyme의 투입시기가 올리고 펩타이드 함량에 크게 영향을 주는 것을 알 수 있었다.
- TP6의 최적 생육온도는 37°C이고 Flavourzyme의 최적 온도는 50°C로 서로 다를 것을 감안하여 고압처리의 온도에 대한 효과를 살펴보았다.

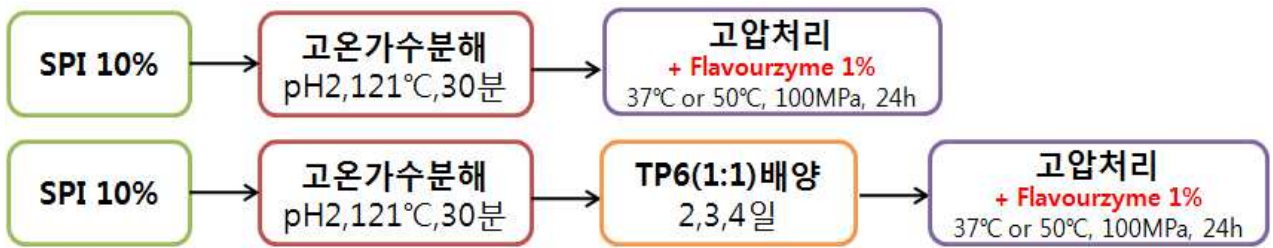


Fig. 3-4-62. 고압처리온도의 영향을 고려한 가수분해 공정도

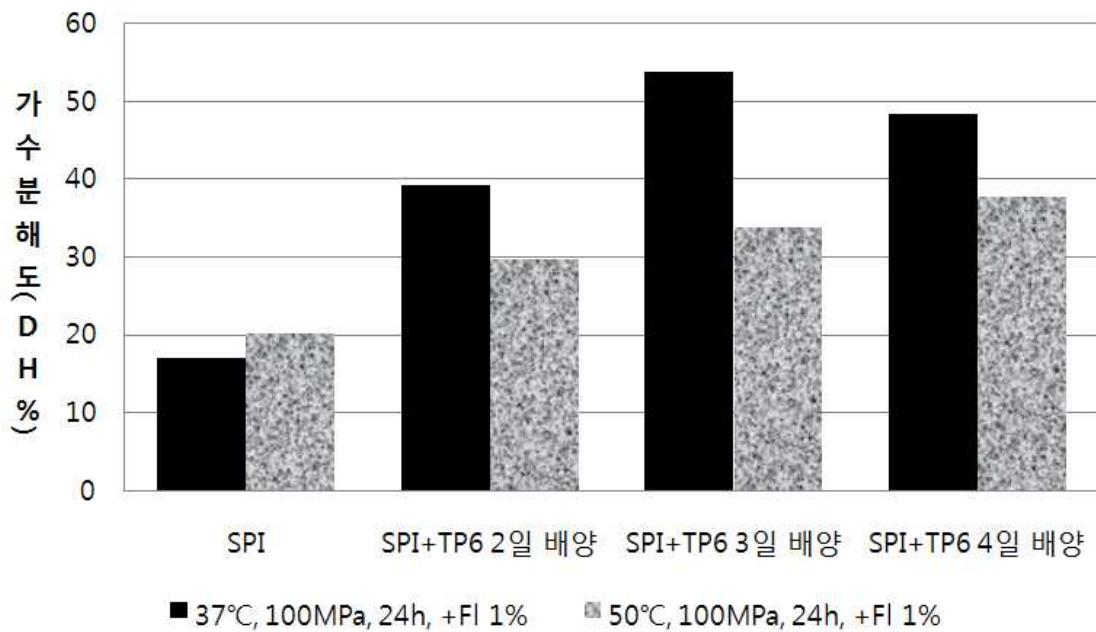


Fig. 3-4-63. 융합가수분해 시 고압처리 온도의 영향

- 그림 3-4-63에 나타난 바와 같이 고압처리시 온도는 TP6의 최적 생육온도인 37°C에서 처리한 경우가 Flavourzyme의 최적 활성온도인 50°C에서 처리한 경우 보다 배양시간에 관계없이 모두 우수한 가수분해도를 나타내었다.
- 이러한 결과에서 분리대두단백질의 가수분해에는 Flavourzyme 보다는 TP6가 크게 영향을 미치는 것을 알 수 있었으며, 일반적으로 protease의 최적 활성 온도가 50°C 부근임을 감안할 때 TP6에 의한 가수분해 역시 TP6가 배양 중에 이미 생산해 놓은 protease 뿐만

아니라 고압처리 시에도 생육활성을 유지하면서 지속적으로 protease를 생산하는 것으로 추측 할 수 있었다. 또한 상용효소의 이용한 실제 단백질 가수분해 공정에서 protease의 활성 지속시간을 감안하여 12~48시간의 간격으로 protease를 분할하여 투입하는 사실을 감안할 때 24시간의 고압처리 시간동안 TP6가 이미 생산한 protease는 활성을 잃어버리게 될 것이라는 사실을 예측할 수 있으며, 지속적인 가수분해를 위해서는 TP6가 고압처리 과정에서도 지속적으로 protease를 생산할 수 있는 조건인 37℃에서 고압처리 하는 것이 바람직함을 알 수 있었다.

바. 정제공정 개발

- 미생물을 이용한 단백질의 가수분해는 거의 필연적으로 이취의 발생을 수반하게 된다. 아미노산이 탈아미노 반응이나 탈탄산반응이 일어나면 암모니아나 인돌, 스카톨, 황화수소, 휘발성 아민, 메르캡탄, 지방산 등이 생성되는데 이러한 물질이 이취발생의 원인물질로 알려져 있다. 미생물은 단백질 분해효소 외에도 다양한 효소들을 생산할 것이며, 이러한 효소의 작용에 의해 가수분해물 중에 존재하는 아미노산이 탈아미노반응(deamination)이나 탈탄산반응(decarboxylation)을 일으키게 되고 그에 따라 가수분해물 중의 아미노산이 암모니아나 지방산으로 전환되면서 이취가 발생한다.
- 그러므로 미생물을 이용한 가수분해물은 이취제거 공정이 필수적으로 이루어져야 할 것이며, 본 연구에서도 상당한 이취가 발생하는 것을 확인하여 가수분해물의 관능평가와 상품화를 위하여 탈취공정을 수행하였다.

Table 3-4-18. 탈취기술의 분류

구분	세부기술			
물리적 방법	수세법(물, 활성탄현탁액)			
	냉각응축법(수냉, 공냉)			
	흡착법(활성탄, 제올라이트)			
	희석법(대기확산)			
화학적 방법	연소법	직접연소법	촉매연소법	
	약제처리법	산,알카리 세정법	약액세정법	
		산화법	은폐법	
		중화법	액상촉매법	
	생물화학적 방법	토양탈취법		
		활성오니법(스크라바, 포기조 방식)		
바이오필터				
부식질탈취법				

- 본 연구에서는 활성탄소를 이용한 흡착법과 진공 농축기를 이용한 증류법 및 막여과법을 이용하여 가수분해물의 이취제거 가능성을 시험하여 그 결과를 표 3-4-20에 나타내었다.

Table 3-4-19. 가수분해물의 전처리법 및 각 탈취방법

가수분해물의 전처리법

: 가수분해물 원심분리 → 0.2um filter로 filtering → 각 조건의 탈취실험 진행

사용한 탈취법	실험방법
Active carbon	가수분해물 + 탈취용 활성탄4% → 80°C 10min 가열처리 → 원심분리 후 0.2um filtering
Vacuum evaporator	농축비 0.3이 되도록 증류
Ultra filtration	가수분해물을 10배 희석하여 5KDa 이하로 Cut off

Table 3-4-20. 각 탈취방법에 따른 탈취공정 결과

탈취법	냄새	가용화율(%)
무처리 control	심한 악취	84.5%
Active carbon	심한 악취는 사라졌지만 냄새잔존	57.4%
Vacuum evaporator	악취는 사라지고 구수한 냄새 잔존	87.5%
UF	희석에 의해 악취가 희미하게 느껴짐	8%
AC+VE	잔존해있던 악취가 농축되어 진해짐	55.6%
VE+AC	악취일부제거	62.8%
UF+VE	희석에 의해 악취가 희미하게 느껴짐	7.6%

- 다양한 탈취방법의 조합에 의해 탈취공정을 수행한 결과, 진공농축기를 이용한 방법이 관능적으로 가장 우수한 것으로 평가되었다. 한편, 막분리기술(UF, cutoff 5kD)을 이용한 방법과 활성탄을 이용한 흡착법은 고형분함량이 84.5%에서 각각 8%, 57.4%로 감소하게 되어 전체 수율에 크게 영향을 주게 되므로 실제 산업화 공정에 적용하기 위해서는 보다 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.
- 각 탈취공정을 거친 시료는 제1협동 위탁기관(건국대)의 지원하에 GC-MS를 이용하여 성분분석을 수행하였다.
- GC-MS 분석 결과 분리대두단백 가수분해물 중의 주요 휘발성 성분은 표 3-4-21와 같았고, 탈취 전후의 휘발성 성분 패턴의 변화를 확인한 결과, 탈취 전후에 함량변화가 많았던 성분은 maltol, 3-Isobutylhexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione (Isomer 1), 3-Isobutylhexahydropyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4-dione (isomer 2), 3,6-Diisobutyl-2,5-piperazinedione, Peptide cyclic dimer 등 이었다. 따라서 이러한 성분들이 이취 성분의 주요 성분으로 추정할 수 있었다.

Table 3-4-21. 가수분해물의 주요 휘발성 성분

Rt (min)	화합물명	Rt (min)	화합물명
11.620	2-Methylbutanoic acid	23.180	Unknown 5
12.650	Pentanoic acid	23.320	Heptanoic acid
12.810	N,N-Diethylformamide	23.550	Unknown 6
14.320	Acetamides (unknown 1)	24.345	Dihydrobenzofuran
15.050	Alkylthiols (unknown 2)	25.251	Otanoic acid
15.820	Ethyl ethylbutanoate	29.800	Piperazine der.
17.750	Furan-2-yl-methanol	30.265	Cyclic dipeptide 1 (unknown 7)
17.935	N,N-Diethylacetamide	31.875	Pyrrolidinypropionic acid
18.840	N-2-Ethyl-butylamine	32.450	Pyrrolidino[1,2-a]piperazine-3,6-dione
19.475	Lactic acid	33.160	3-Isobutylhexahydropyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4-dione (Isomer 1)
20.765	Propanediol dibutyrate	34.480	3-Isobutylhexahydropyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4-dione (isomer 2)
20.910	Hexanoic acid	34.640	Proline cyclic anhydride
21.175	Tetramethylpyrazine	37.005	3,6-Diisobutyl-2,5-piperazinedione
21.805	Maltol	37.715	Peptide cyclic dimer
21.135	Alkylamine 1 (Pentyl, ?)	38.700	Tripeptide cyclic form 1
22.345	Alkylamine 2 (Hexyl, ?)	41.415	Tripeptide cyclic form 2

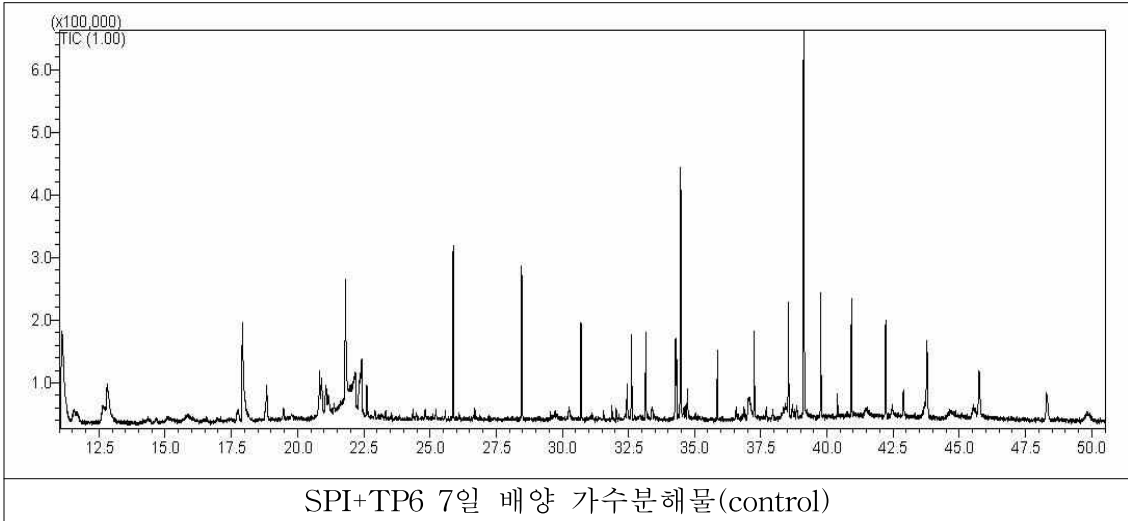


Fig. 3-4-64. 탈취 전 가수분해물의 Gas chromatography

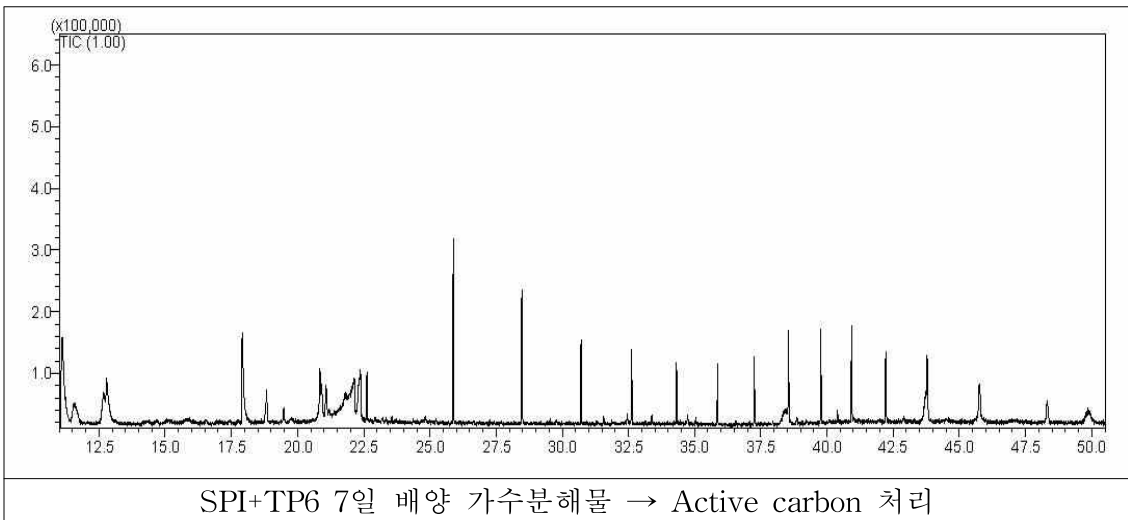


Fig. 3-4-65. 탈취 후 가수분해물의 Gas chromatography

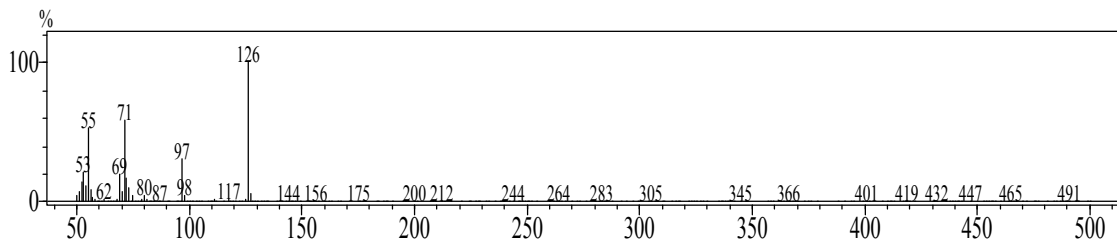


Fig. 3-4-66. 탈취과정 중 대량 제거 된 compound I (Maltol)

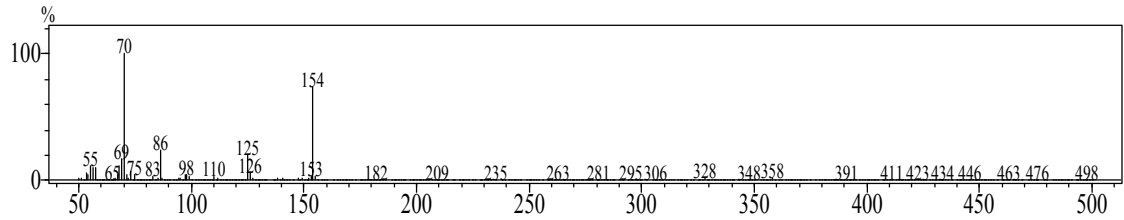


Fig. 3-4-67. 탈취공정 중 대량 제거 된 compound II
(3-Isobutylhexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione Isomer 2)

사. 융합가수분해물의 dipeptide 조성 분석

- 가열가수분해와 TP6 가수분해 및 Flavourzyme을 이용한 고압가수분해를 조합한 융합가수분해 공정을 통하여 가수분해도가 가장 우수한 것으로 판명된 시료를 제1협동(건국대)의 도움으로 성분 분석하여, 짠맛 증진 효과가 있는 것으로 추정되는 dipeptides의 조성 비율을 표 3-4-22에 나타내었다.
- 사전 문헌 조사를 통하여 짠맛 증진 효과가 있는 것으로 추정되는 9개의 표준품을 결정하였고 각 시료의 정량분석을 수행하였다.

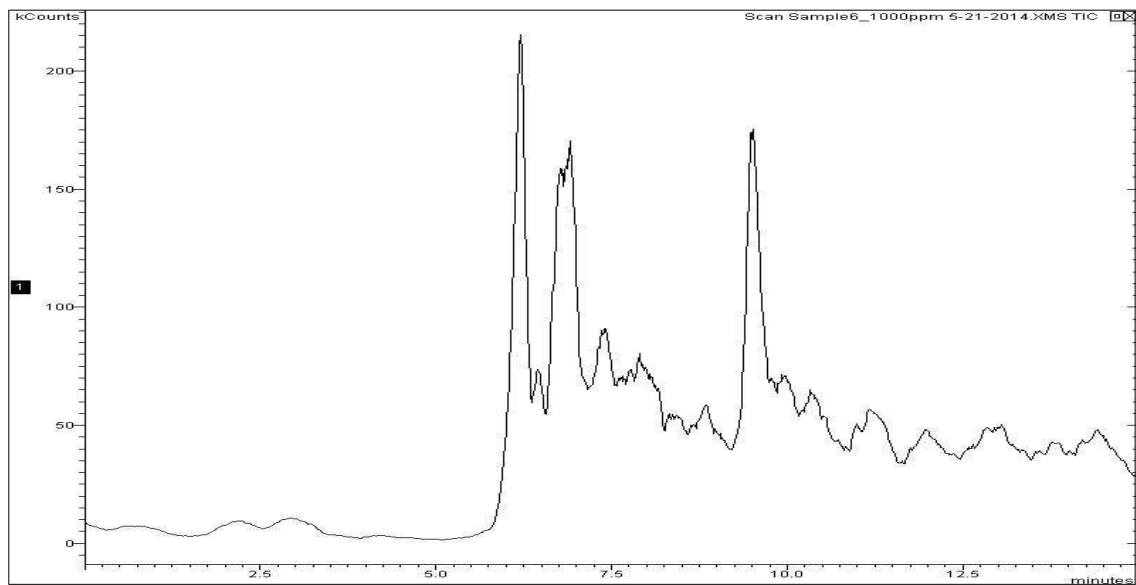


Fig. 3-4-68. 융합가수분해물의 LC-MS Chromatogram

Table 3-4-22. 융합가수분해물의 LC분석 결과

Standard peptide	분자량	umol/L
H-Arg-Try-OH acetate salt	337.38	0.14

H-Glu(His-OH)-OH	284.27	0
H-Arg-Glu-OH	303.32	1.13
H-Glu(Gln-OH)-OH	275.26	2.30
H-Glu(Gly-OH)-OH	204.18	0
H-Arg-Ala-OH acetate	245.28	1.71
H-Arg-Asp-OH	289.29	1.71
H-Arg-Gly-NH ₂ ·Sulfate	328.35	1.41
H-Glu(Glu-OH)-OH	276.25	0.17

- Hofmann 등의 보고에 따르면 fish source에 존재하는 arginine과 arginyl dipeptides가 짠맛 증진 효과가 큰 것으로 보고한 바 있으며, chedda cheese의 경우에는 glutamyl peptides가 주로 짠맛 증진에 영향을 주는 것으로 보고되고 있다.
- 본 연구의 원물로 사용된 분리대두단백질의 아미노산 조성은 glutamate가 16.05%, arginine이 8.71%로 전체 아미노산 조성의 약 24%를 차지하였고 glutamate가 arginine의 약 2배 가까운 조성비로 구성되어 있으나, 가수분해물의 dipeptide 조성비율에서는 오히려 arginyl dipeptide의 비율이 glutamyl peptides의 비율보다 높은 것으로 나타났다. 이러한 현상은 본 연구에 사용된 효소의 단백질 가수분해 특성에 기인한 것으로 보이며, 특히 TP6가 생산하는 다양한 protease에 의한 특성으로 보이며 Hofmann 등이 제시한 바와 같이 arginyl dipeptides가 짠맛 증진 효과가 크다는 사실에 근거하여 융합가수분해에 의한 분리대두단백 가수분해물의 짠맛 증진 효과를 기대하게 할 수 있었다.

Table 3-4-23. 밀글루텐과 SPI 아미노산조성

	aspartate	glutamate	asparagine	serine	glutamine	histidine	glycin	threonine	arginine	alanine	taurine	GABA
SPI	12.27	16.05	0.00	5.83	0.00	2.71	4.56	4.10	8.71	4.64	0.00	0.00
WG	3.70	30.68	0.00	5.52	0.00	2.27	3.82	2.92	4.20	3.04	0.00	0.00
	tyrosine	valine	methionine	norvaline	tryptophan	phenylalanine	isoleucine	leucine	lysine	hydro proline	sarcosine	-
SPI	4.01	5.01	1.41	0.00	0.00	5.90	5.37	8.69	4.73	0.00	0.00	-
WG	3.69	4.32	1.64	0.00	0.00	5.91	4.38	7.84	1.32	0.00	0.00	-

아. 용합가수분해물의 관능평가

- 용합가수분해한 분리대두단백 가수분해물의 짠맛 증진 효과를 관능평가를 통하여 확인하고자 제1협동기관(전주대)의 도움으로 강도평가 검사를 실시하였다.

(1) 평가 방법

- 관능 평가에 이용할 NaCl 표준 용액은 관능검사원들이 훈련한 25-80mmol(step 5mmol) 사이에서 짠맛에 대한 강도를 얼마나 느끼는 지, 15cm 선척도(Line scale)방법을 사용하여 평가하였고, 그 중 훈련시 정답률이 높은 NaCl 45mmol 강도에서 시료를 제조하였다. 평가는 2014년 05월 19일에 진행되었으며, 점심시간 이후 13:00부터 관능검사를 진행하였다. 관능검사원들의 나이는 20-25세 사이였고, 총 26명으로 관능검사원들은 관능검사 훈련을 6개월 이상 받은 상태였다. 시료의 제조는 NaCl 45mmol에 시료를 각각 0.1%, 0.5%, 1%로 제조하였으며, 25oz 소주컵에 15ml씩 정량 제공하였다.

(2) 평가 결과

Table 3-4-24. 짠맛증진물질 강도평가 결과

NaCl 45mmol+ 짠맛증진물질	순위	cm	검사원이 느낀 소금물의 농도 (mmol)
0.10%	2.58	5.46	45.02
0.50%	2.15	7.66	53.09
1%	1.27	10.32	62.85

- 본 실험에 사용된 분리대두단백 가수분해물은 가수분해 공정에서 pH 조절 목적으로 HCl 과 NaOH 가 사용되었고, 상용효소의 안정제로서 NaCl이 사용되고 있으므로 효소 첨가로 인하여 일부의 NaCl이 가수분해물에 유입된다. 그러므로 가수분해물에는 일부의 NaCl이 첨가된 상태이므로 이에 대한 정량이 필요하여 Mohr 법을 이용한 식염정량을 실시한 결과, 가수분해물에는 8.78%의 NaCl이 함유된 것으로 측정되었다.
- 이에 따라 45mmol의 기준 소금물에 가수분해물로부터 유입된 소금량을 계산하여 더해주어 전체 소금물 농도를 계산하였고 이렇게 계산된 소금물 농도를 기준으로 가수분해물 첨가에 따른 증진 효과를 계산하여 Fig. 3-4-67 에 나타내었다.

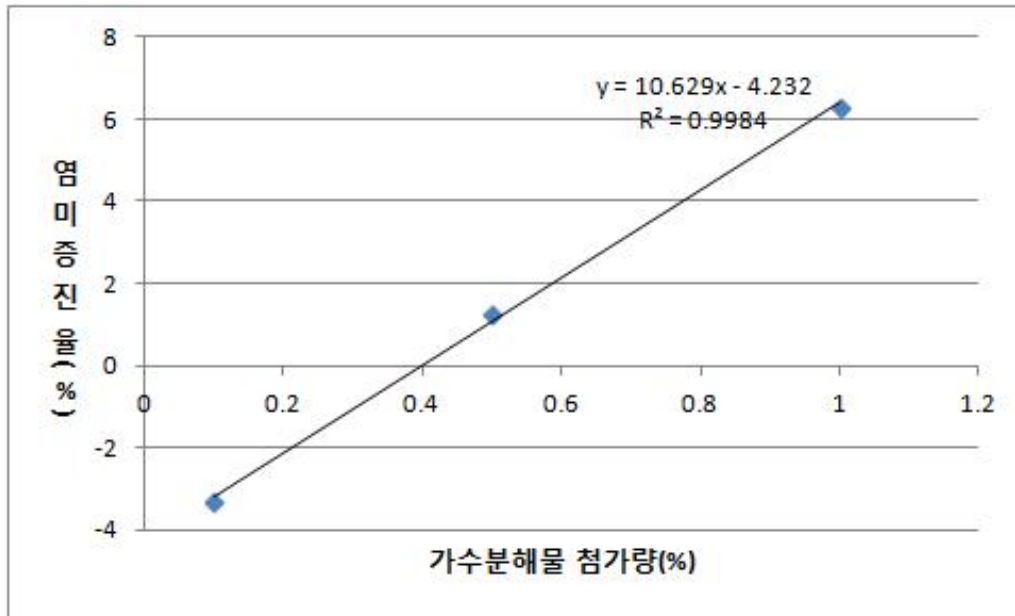


Fig. 3-4-69. 융합가수분해물의 염미증진효과

$$\text{염미증진율}(\%) = \frac{(\text{느낀 소금물의 농도} - \text{실제 소금물의 농도})}{\text{실제 소금물의 농도}} \times 100$$

- 가수분해물 첨가량에 따라 염미 증진율은 1차적으로 정확히 비례하였으며, 1.0% 첨가 시 6.2%의 염미 증진 효과를 나타내어 융합 가수분해에 의해 제조된 분리대두단백 가수분해물이 염미 증진제로서의 사용이 가능할 것으로 판단된다. 20% 이상으로 염미증진율을 높이기 위해서는 가수분해물 2.28% 첨가로 이루어 질 수 있을 것이며 추후 염미증진물질보다 명확히 규명하고, 염미증진물질만을 분획, 농축 등의 방법을 통하여 보다 소량의 첨가로도 높은 염미증진효과를 얻을 수 있을 것으로 기대한다.

3. 아임계수 처리를 이용한 천연조미료 소재 생산 공정 개발

가. 실험 방법

(1) 시료 전처리

- 가수분해물이 원심분리를 하여도 현탁 물질이 분리되지 않으므로 12,000rpm에서 20분간 원심분리한 상등액을 다시 0.45 μ m syringe filter로 여과하여 분석시료를 제조하였다.

(2) 고형분 측정법

- 가수분해물의 고형분은 상압가열건조법을 사용하였다. 시료 적정량을 취하여 105 $^{\circ}$ C 오븐에서 완벽히 건조(약 24시간)시켜 수분을 제거 후 다시 칭량하여 건조 전과 후의 중량이

감소되는 양을 수분의 함량으로 구하여 고형분 함량을 계산하였고 초기의 투입량대비 가용화된 비율을 계산하였다.

(3) 단백질 가수분해도(Degree of Hydrolysis, DH)

- 단백질 가수분해물의 가수분해도는 OPA(o-phthaldialdehyde) 용액으로 가수분해물을 유도체화 하여 340nm에서 흡광도를 측정하여 구하였다. Di-sodium tetraborate 7.62g과 SDS(Na-dodecyl-sulfate) 0.2g을 증류수 150ml에 완전히 녹인 후 여기에 4ml 에탄올에 OPA 0.16g을 용해시킨 액을 주입하였으며 이어서 DTT(dithiolthreitol 99%) 0.176g을 넣고 총 부피가 200ml이 되도록 증류수로 맞춰 OPA reagent를 제조하였다. 이때 모든 시약은 Sigma사(USA)의 시약을 사용하였다.
- Serine(100mg/L)을 standard로 하여 아래의 식으로부터 DH를 구하였으며, 시료는 단백질 농도가 8~80%가 되도록 희석하여 준비하였다.
- OPA reagent를 test tube에 3ml 씩 준비하고 blank(증류수), standard(serine), sample(희석된 가수분해물)을 400 μ l씩 투입하여 5초간 vortexing 후 정확히 2분간 반응시키며 흡광도 340nm에서 측정하여 다음과 같이 계산하였다.

$$DH(\%) = (h / h_{tot}) * 100$$

$$h = (\text{serine-NH}_2 - \beta) / \alpha \text{ (meqv/g protein)}$$

$$\text{Serine-NH}_2 = [(OD_{\text{sample}} - OD_{\text{blank}}) / (OD_{\text{standard}} - OD_{\text{blank}})] * (0.9516 \text{ meqv/L} * 0.1 * 100) / (X * P)$$

$$X = \text{g sample}, P = \text{protein \% in sample.}$$

Table 3-4-25. Value of constants α , β , and h_{tot} for different protein raw materials

protein	α	β	h_{tot}
soy	0.970	0.342	7.8
gluten	1.00	0.40	8.3

(4) 분자량분포(GPC)측정

- 가수분해물의 분자량 분포는 Gel Permeation Chromatography(GPC)로 분석하였으며 GPC분석조건은 아래의 표와 같다.

Table 3-4-26. GPC 분석조건

Instrument	GE Healthcare AKTA prime plus
Column size	XK16/70
Column lesin	G10
Mobile phase	Formic acid 1%
Flow rate	0.5ml/min
Wavelength	214nm
Fraction size	5ml

Table 3-4-27. GPC standard 물질

	Standard 물질	Retention (min)	standard분자량
I	Vitamin B ₁₂	89.72	1355.37
II	Vitamin B ₁	101.95	337.27
III	L-Glutamic acid	129.2	147.13

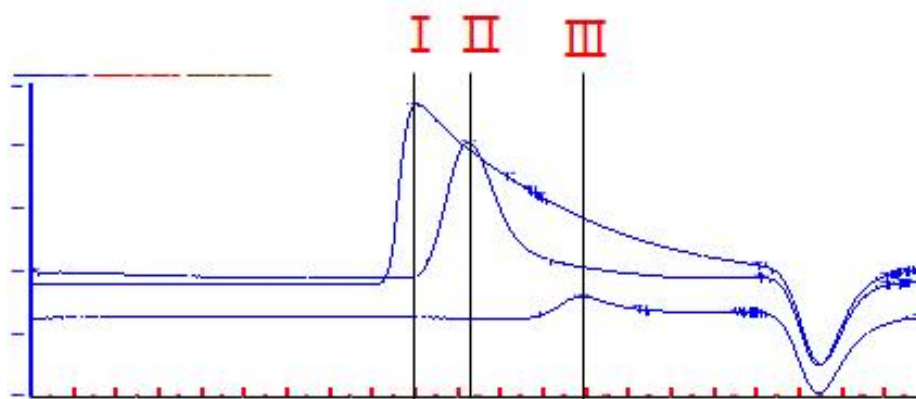


Fig. 3-4-70. GPC chromatogram for standard

(5) 아미노산함량

- 가수분해물의 아미노산함량은 ninhydrin법을 이용하여 측정하였다. 가수분해물 2ml에 ninhydrin reagent(Sigma, USA) 1ml을 투입하여 90℃에서 10분간 반응시킨 다음 95%

에탄올(대정화금, KOREA) 5ml를 투입하여 반응을 종료시키고 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

- Glacial acetic acid 0.05% 용액에 glutamate 50uM농도로 표준용액을 제조하여 standard curve를 작성하여 계산하였다.

(6) 염도측정

- 조미간장과 HVP formulation 시료의 염도는 굴절염도계(salinity refractometer, Atago, USA)를 이용하여 측정하였다.
- 염도계의 prism에 시료를 적당량 올려 eyepiece를 통해 값을 확인한다. 이때 측정할 수 있는 최대염도는 28%로 적정수준으로 희석하여 측정하였다.

나. 식물성 단백질 천연조미료 소재 생산공정 최적화

(1) 아임계수를 이용한 식물성 단백질의 수열분해

(가) 아임계수 장치의 제작 및 운전

- 단백질의 수열분해(hydrothermolysis)의 예비실험으로 이화여대에 설치되어 있는 pilot 규모(8L)의 아임계수 장치(120-190℃) 및 실험실 장비(100mL)를 이용하여 수행하였고, 이를 기반으로 하여 본 과제 내용에 적합하게 온도범위가 넓고 등온속도가 빠른 아임계수 처리장치를 Chem-I Engineering사에 의뢰하여 자체 제작하였으며 외형은 Fig. 3-4-69와 같다.



Fig. 3-4-71. 아임계수 처리 장치(R-401)

- 고압반응기는 스테인레스 스틸로 제작하였으며 용량은 2L이다. 반응기의 외벽에 히팅맨틀을 설치하여 전기적으로 가열하였으며, 내부에는 코일형 냉각기와 U자형 교반기를 설치하였다. 아임계수의 온도범위는 120-270℃이고, 허용 최고압력은 100MPa로 제작하였다.
- 단백질원은 고속 임펠러 호모게나이저를 사용하여 증류수에 5-15%농도로 분산시켰다. 단백질 현탁액 1-1.2L를 반응기에 넣고 밀폐한 다음 배기밸브를 열어놓은 상태에서 가열하여 현탁액의 온도가 80℃에 도달했을 때 2MPa의 질소가스로 약 1분간 퍼지 한 다음 모든 밸브를 닫고 설정온도로 가열하였다. 이때 반응기 내부 압력은 설정 온도에서 물의 포화증기압보다 약간 높은 압력을 유지하였고, 10-15분 이내에 설정온도(190-270℃)에 도달하게 가열하였다. 현탁액의 온도가 설정온도에 도달한 시점을 반응시간 0분으로 하여 온도를 ±2℃ 범위 내에서 일정하게 유지 하면서 일정시간(10-45분) 가열하였다. 대표적인 온도제어 프로파일은 그림 3-4-72에 나타내었다.
- 반응 종료 후 고압의 가수분해액은 자켓을 통하여 2℃의 냉매가 흐르고 있는 상압의 수액기(10L)로 배출시킴으로서 급속히 팽창하여 순간적으로 90℃ 이하로 냉각되게 하였다.

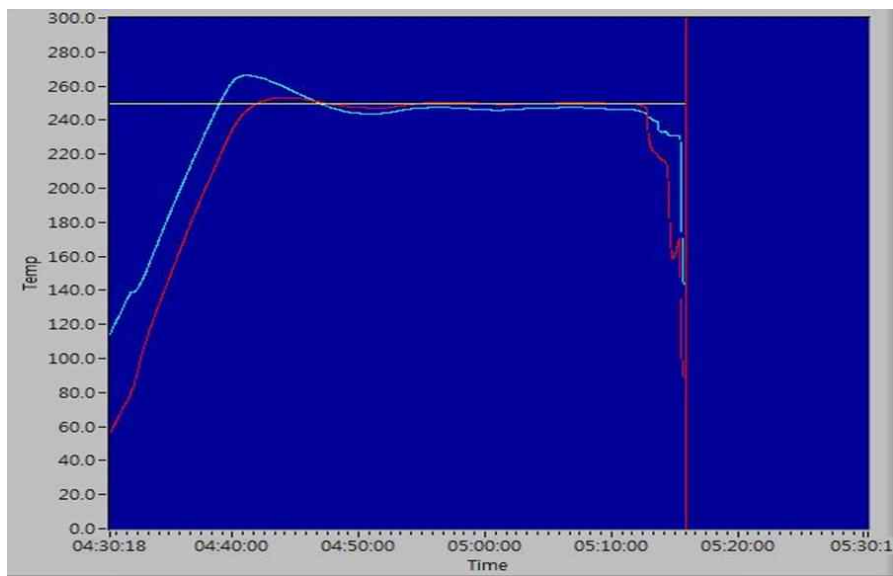


Fig. 3-4-72. 반응기의 온도제어 프로파일(250℃, 30min)

(나) 아임계수를 이용한 단백질의 수열분해

- 아임계수(subcritical water, SCW)란 100℃에서 임계점 T_c (374℃) 사이의 가압 상태의 액체 물을 말한다. 아임계수의 가장 큰 특징은 유전상수가 작고 이온곱이 크다는 점이다. 이온곱이 크다 것은 아임계수 중의 물은 해리도가 커서 수소이온(H^+) 및 수산화이온(OH^-)의 농도가 높다는 것을 의미하며, 물이 산 또는 염기촉매로서 작용할 가능성을 시

사 하는 것이다. 다시 말 하면 아임계 상태의 물은 반응성이 높기 때문에 단백질 가수분해 반응이 신속히 진행되는 반응장(反應場)이 된다는 것을 의미한다.

- **대두단백질 현탁액(5%)의 아임계수 수열분해** 반응기 내의 단백질 현탁액을 고온의 목표온도까지 가열하는데 걸리는 시간을 최소화하기 위하여 아임계수 처리장치의 반응기에 증류수 600mL를 넣고 목표온도보다 20-30℃ 고온으로 가열하였다. 한편, feeding tank에 동일 부피의 분리대두단백질 현탁액(10%)을 넣고 80℃로 예열한 다음 반응기보다 5-10bar 높은 압력을 걸어 주어 고압상태에서 현탁액을 반응기로 주입하였다.
- 반응기의 아임계수와 피딩탱크의 단백질 현탁액이 혼합되면서 순간적으로 목표온도에 근접하는 온도에 도달하고 5분 이내에 반응기의 단백질 현탁액이 목표온도에 도달하도록 조작하였다. 목표온도에 도달한 후 일정시간 가열한 후 순간적으로 상압의 수액기(receiver)로 방출하였으며, 수액기의 수열분해액은 8000xg에서 30분간 원심분리한 후 0.45µm membrane filter 여과하여 분석 시료로 사용하였다,
- 아임계수 온도는 230-270℃, 처리시간은 10-30분 범위에서 축점계획에 의하여 가수분해 조건을 설정하고 수열분해한 결과를 정리하면 표 3-4-28와 같다.

Table 3-4-28. 아임계수를 이용한 분리대두단백질 현탁액(5%)의 수열분해

표준 순서	런 순서	점 유형	블러	온도 (C)	시간 (분)	중고형 분 수율 (%)	DH (%)	AA Yield (%)
2	1	1	1	264.142	12.9289	64.0	18.2	23.4
3	2	1	1	235.853	27.0711	73.7	17.6	23.1
11	3	0	1	250.000	20.0000	65.3	18.5	23.5
4	4	1	1	264.142	27.0711	59.9	22.6	23.2
12	5	0	1	250.000	20.0000	65.3	18.5	23.5
8	6	-1	1	250.000	30.0000	69.4	17.3	21.2
6	7	-1	1	270.000	20.0000	59.0	21.4	23.0
13	8	0	1	250.000	20.0000	65.3	18.5	23.5
5	9	-1	1	230.000	20.0000	73.8	9.4	15.4
10	10	0	1	250.000	20.0000	65.3	18.5	23.5
7	11	-1	1	250.000	10.0000	77.3	13.1	16.6
9	12	0	1	250.000	20.0000	65.3	18.5	23.5
1	13	1	1	235.853	12.9289	77.5	14.2	20.0

- 그림 3-4-73과 3-4-74에 나타난 최적화 예측결과에 의하면 아임계수 온도 270℃, 처리시간 25분일 때 최대 가수분해도 23.26%를 얻을 수 있으며, 또한 아임계수 온도 270℃, 처리시간 20분일 때 최대 아미노산 수율은 24.4%였다.

- 수열분해액의 외관을 표 3-4-29에서 살펴보면 원액(왼쪽)은 처리조건에 관계없이 불투명한 진한 갈색을 나타내었다. 그러나 원액을 8000xg에서 30분간 원심분리한 후 0.45 μ m membrane filter 여과 정제한 청징액은(오른쪽) 투명하였으며 오히려 고온일수록 밝은 갈색 이었다.
- 수열분해액은 자극적인 탄 냄새가 났으며 고온일수록 약간의 타르상태의 물질이 형성되었다. 이와 같은 현상은 순간적으로 고온의 반응기 벽면과 접촉하면서 일부 단백질이 탄화되었기 때문인 것으로 추정되며, 실제 정제 과정에서 약간의 탄화된 입자가 관찰되었다.

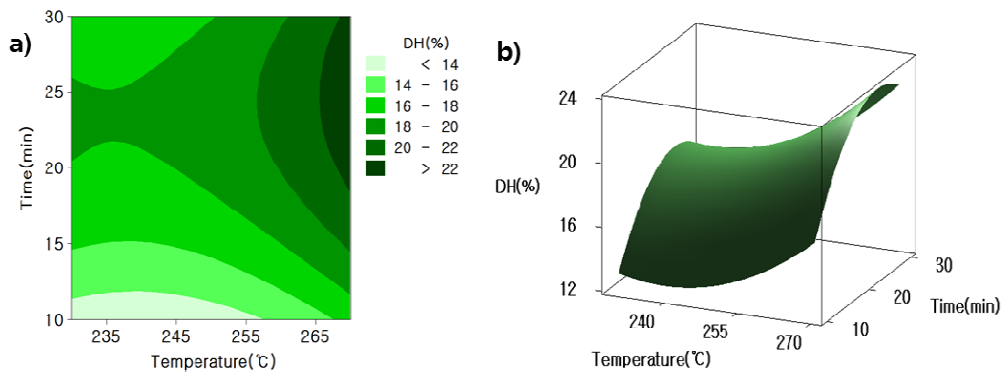


Fig. 3-4-73. 분리대두단백질 현탁액(5%)의 수열분해액의 가수분해도
수열분해 수용액 중의 단백질 가수분해도의 2차원(a) 및 3차원(b) 플롯

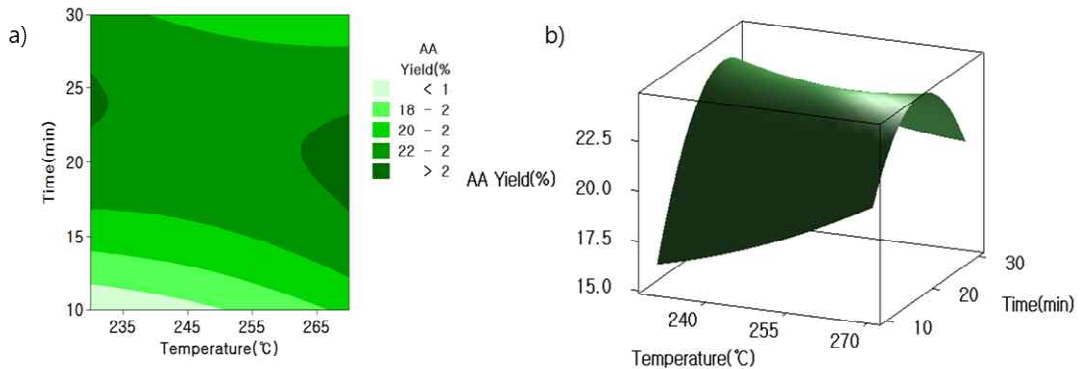











Fig. 3-4-74. 분리대두단백질 현탁액(5%)의 수열분해액의 아미노산 수율
수열분해 수용액 중의 아미노산 수율의 2차원(a) 및 3차원(b) 플롯

Table 3-4-29. 아임계수를 이용한 분리대두단백질 현탁액(5%) 수열분해액
(왼쪽: 원액, 오른쪽: 원심분리/막여과 정제액)

	10min	12.9289min	20min	27.0711min	30min
230°C					
235.858°C					
250°C					
264.142°C					
270°C					

- **가열방법이 수열분해에 미치는 영향** 전술한 내용을 확인하기 위하여 단백질 현탁액(10%)을 반응기의 동일 부피의 고온의 열수에 주입하여 순간가열하는 방법과 현탁액(5%) 모두 반응기에 넣고 가열하는 방법을 비교하였다. 가열시간은 두 경우 모두 현탁액의 온도가 250°C에 도달하는 시점부터 20분간 가열하였다.
- 현재까지 보고된 식물성 단백질의 가수분해 연구에서 사용된 아임계수 장치에서는 반응기에 단백질 현탁액을 넣고 가열하기 시작하여 목표온도까지 도달하는데 10-30분이 소요되는 것으로 보고되었으며, 본 연구에서 사용한 장치는 약 12분이 소요되었다.
- Table 3-4-29의 1행과 2행의 가열방법의 차이를 비교하여 보면 고압열수에 단백질 현탁액을 주입하여 순간가열 하는 방법이 반응기 내에서 서서히 승온 시킨 경우와 비교하여 가수분해도와 아미노산 수율은 약간 높았으나 고형분 수율이 낮았으며 자극성 냄새가 강하였다.
- **초기 단백질 농도가 수열분해에 미치는 영향** 한편 반응기에서 단백질 현탁액을 채우고 가열하였을 때 현탁액의 단백질 초기농도가 아임계수 가수분해에 미치는 영향을 살펴보았다. 고형분 수율은 농도에 거의 영향을 받지 않고 72-74% 였으며, 가수분해도 및 아미노산 수율은 단백질 농도 10%

일 때가 가장 우수한 22.3%였다.

Table 3-4-30. 가열방법 및 초기 농도가 단백질의 수열분해에 미치는 영향
(아임계수온도 250℃, 처리시간 20분)

농도 (%)	고형분 수율 (%)	가수분해도 (%)	아미노산 수율(%)	비고
5	66.3	18.5	23.5	반응기의 고온열수에 단백질 현탁액 주입
5	72.9	13.7	20.0	단백질 현탁액 반응기에서 가열
10	71.9	16.2	22.3	단백질 현탁액 반응기에서 가열
15	74.4	10.1	19.6	단백질 현탁액 반응기에서 가열

- **대두단백질 현탁액(10%)의 수열분해** 이상의 결과를 바탕으로 10% 대두현탁액을 반응기에 넣고 가열하였을 때 아임계수 온도가 수열분해에 미치는 영향을 연구하였다. Table 3-4-31 살펴보면 수열처리 온도가 높을수록 수열분해액의 pH는 서서히 상승하여 알카리성을 나타내었다.
- 수열분해액의 처리 직후와 12시간 정치 후의 상태를 비교하여 보면 처리온도 200-220℃의 분해액은 온도가 증가할 수록 탁도가 증가하였으며 정치 후에도 분산상태가 양호하여 가열에 의한 구조 변화로 단백질의 유효능이 향상된 것으로 추정되었다. 그러나 230℃ 이상에서는 유효상태가 파괴되고 불용성 층 분리되는 현상이 관찰되었으며, 침강된 층은 온도가 증가할수록 감소하고 투명해 졌다.
- 수열분해액의 냄새는 200-220℃에서는 약하지만 우리에게 익숙한 구수한 삶은 콩 냄새를 맡을 수 있었으나 230℃ 이상에서는 약한 자극성 이취가 생성되었고 온도가 높을수록 증가하였다. 한편 수열분해액의 쓴맛은 200-220℃에서는 약하였지만 230℃ 이상에서는 매우 강해 졌다. 단백질 가수분해액의 쓴맛은 가수분해도 5-10%부터 강해지는 것으로 보고되고 있다.
- 아임계수 처리온도에 따른 가수분해도(DH)와 아미노산 수율(YAA)의 영향을 Fig. 3-4-75에서 살펴보면 앞에서 기술한 관능적 관찰 결과에서와 같이 200-220℃에서는 가수분해도와 아미노산 수율은 서서히 증가하였으나 230℃ 이상에서는 급격히 증가하였고 250℃ 이상에서는 다시 완만히 증가하였다.
- 아임계수의 가수분해능력을 이용한 단백질 가수분해에 대한 지금까지의 연구에 의하면 아미노산 생성수율은 250-270℃에서 가장 높은 것으로 밝혀졌다. 이것은 이온도 부근에서 포화증기압의 아임계수의 오온공이 최대를 나타내므로 단백질 가수분해가 촉진되는 것으로 해석되고 있다. 한편

고온에서는 단백질 가수분해에 의한 아미노산 생성반응에 비하여 아미노산 자체의 분해반응이 차츰 우선적으로 진행되기 때문에 아미노산 수율증가가 둔화되는 것으로 보고되었다.

Table 3-4-31. 아임계수 온도가 대두단백질의 수열분해에 미치는 영향 (단백질 현탁액 농도: 10%; 처리시간 20분)

Temperature (°C)	pH	Turbidity (A ₆₀₀)	DH (%)	Y _{AA} (%)
200	7.31	2.47	2.5	6.9
210	7.73	2.80	3.5	8.7
220	8.11	3.58	4.5	9.1
230	8.41	2.89	7.8	11.4
240	9.36	2.81	11.7	18.2
250	9.99	1.80	18.6	27.6
260	10.24	1.55	20.6	29.2
270	10.25	1.28	22.2	31.3



처리 직 후의 분산상태

12시간 정치 후 상태

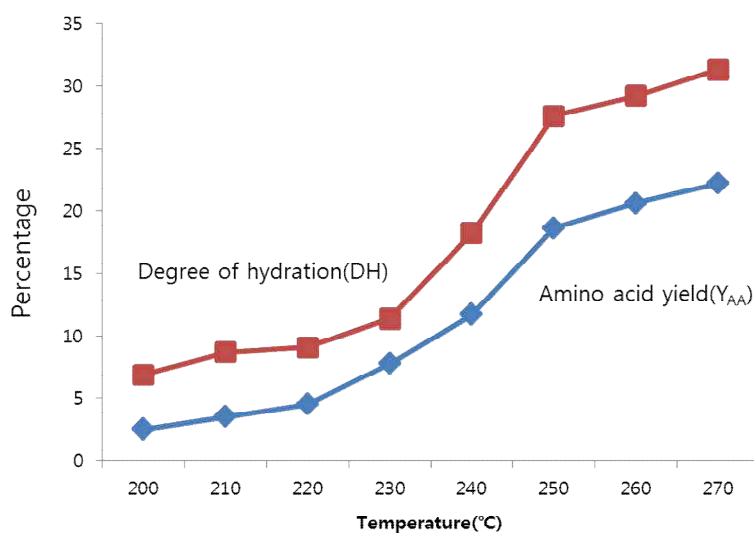


Fig. 3-4-75. 아임계수 처리온도가 대두단백질 수열분해액의 가수분해도 및 아미노산 수율에 미치는 영향. (단백질 현탁액 농도: 10%; 처리시간 20분)

- 이상의 연구결과를 바탕으로 아임계수 온도 250℃, 처리시간 30분을 중앙점으로 하여 축점계획에 의하여 처리온도와 시간이 대두단백질의 DH와 YAA에 미치는 영향을 살펴보았다(Table 3-4-32).
- Fig. 3-4-76와 3-4-77의 예측결과에 의하면 최대 가수분해도는 처리온도 270℃, 처리시간 42.1분일 때 24.8%, 최대 아미노산 수율은 처리온도 268.1℃, 처리시간 35.2분일 때 43.5%에 달하는 것으로 예측되었다.

Table 3-4-32. 축점계획에 의한 대두단백현탁액(10%)의 수열분해

표준 순서	런 순서	검 유형	블럭	온도 (C)	시간 (분)	DH (%)	AA Yield (%)
5	1	-1	1	230	30	14.2	31.8
7	2	-1	1	250	10	13.3	31.6
13	3	0	1	250	30	19.7	40
11	4	0	1	250	30	-	-
3	5	1	1	235.858	44.1421	19.8	37.8
4	6	1	1	264.142	44.1421	24.9	41.7
1	7	1	1	235.858	15.8579	11.8	30.3
12	8	0	1	250	30	20.6	42.7
2	9	1	1	264.142	15.8579	20.9	39.0
6	10	-1	1	270	30	21.1	41.2
8	11	-1	1	250	50	21.1	40.3
10	12	0	1	250	30	21.4	40.9
9	13	0	1	250	30	-	-

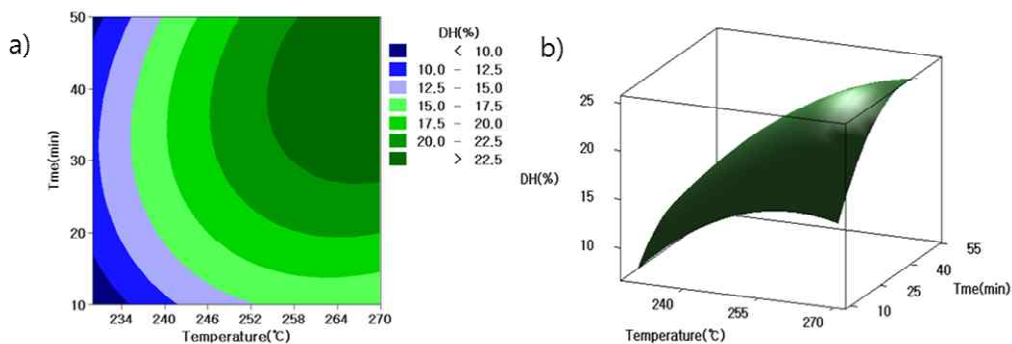


Fig. 3-4-76. 분리대두단백질 현탁액(10%)의 수열분해액의 가수분해도 수열분해 수용액 중의 단백질 가수분해도의 2차원(a) 및 3차원(b) 플롯

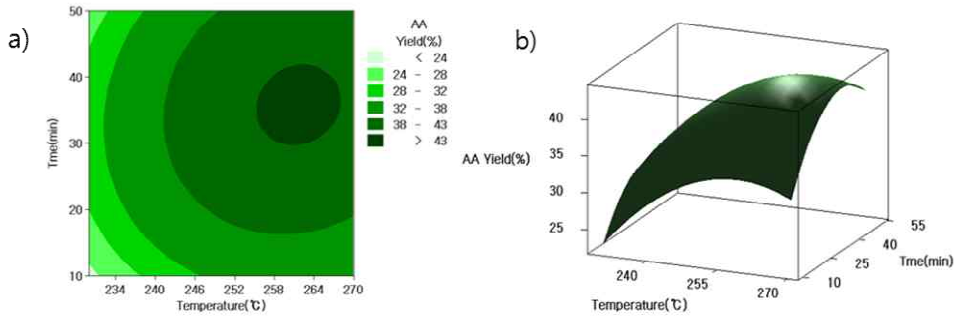


Fig. 3-4-77. 분리대두단백질 현탁액(10%)의 수열분해액의 아미노산 수율
수열분해 수용액 중의 아미노산 수율의 2차원(a) 및 3차원(b) 플롯

- 아임계수에 의한 단백질의 수열분해에 의하여 유리 아미노산 최대수율은 43.5%에 달하여 매우 고무적인 결과이다. 그러나 관능적인 측면에서 쓴맛이 강하며 효소처리, 발효 등으로도 쉽게 제거되지 않는 것이 문제이다.
- 일반적으로 단백질의 가수분해도가 5-10% 정도 일 때 쓴맛 생성이 적은 것으로 보고되고 있다. 따라서 가수분해가 급격히 진행되는 것으로 추정되는 230°C이하의 저온에서 밀글루텐의 수열분해를 실험을 수행하였다.
- Table 3-4-33에 의하면 가열분해가 거의 진행되지 않은 215°C에서 유리단백질 수율은 1.9%에 지나지 않음에도 쓴맛이 강해지기 시작하였으며 230°C에서는 매우 강하였다.

Table 3-4-33. 밀글루텐의 저온영역에서 수열분해
(농도 10%, 처리시간 20분)

처리 온도(°C)	가수분해도(%)	아미노산 수율(%)	비고
190	—	0.6	쓴맛 없음
205	—	0.9	약한 쓴맛
215	0.03	1.9	강한 쓴맛
230	2.9	3.3	내우 강한 쓴맛

(2) 아임계수를 이용한 수열분해(hydrothermolysis)와 효소 가수분해

(가) 아임계수 처리한 밀글루텐의 구조적 특성 변화

- 고온 조건에서 아임계수 처리에 의하여 효소가수의 특성을 명확히 밝히기 위하여 밀글루텐 10% 현탁액을 1.0 L를 반응기에 넣고 140-260°C의 아임계수(subcritical water, SCW)로 20분간 처리 하였다.

- 승온시간은 최종 목표온도에 따라 약간의 차이는 있으나 약 15분이 소요되었으며, 목표 온도에 도달한 시점부터 20분간 처리 한 후 receiver로 배출하였다. 140℃의 SCW처리한 시료는 receiver에서 냉각되면서 겔상태로 고형화 되어 제외하였다.
- 또한 일정한 온도 (200℃)에서 처리시간을 0-40min범위에서 변화시키면서 동일방법으로 아임계수 처리하였다.
- 각 온도의 아임계수로 처리 한 밀글루텐 시료(SCW-WG)를 4℃ 냉장고에서 24 h 정치했을 때 사진을 Fig. 3-4-76에 나타내었다. 온도 160℃의 아임계수로 처리한 밀글루텐 현탁액[SCW(160)-WG]은 응집된 단백질층이 전체 부피의 약 2/3 두께를 이루었으며, 처리 온도가 증가할수록 침강층은 점차 감소하여 220℃에서 처리한 시료 [SCW(220)-WG]에서는 소량 관찰되었다.
- 한편 SCW-WG의 상등액 색깔은 160℃에서 처리한 시료는 연한 갈색으로 원래의 색을 유지하였으나 200℃ 이상에서는 단백질 분해물과 미량 존재하는 탄수화물이 Maillard reaction, pyrolysis 및 caramelization 등의 반응에 의하여 온도 또는 처리시간이 증가할수록 흑갈색이 진하여졌다.

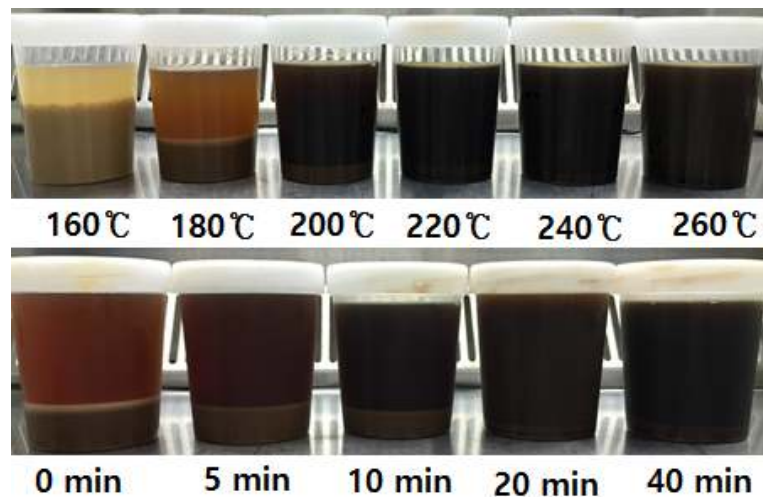


Fig. 3-4-78. 아임계수 처리한 밀글루텐 현탁액(10%)의 사진

(A) 각 아임계수 온도 (160-260℃)에서 20분간 처리

(B) 아임계수 온도 200℃에서 0~40 min 동안 처리

- 각 온도에서 처리한 직후 SCW-WG의 탁도를 600nm에서의 흡광도로 Fig. 3-4-78A)에 나타내었다. 160-200℃ 범위에서는 처리온도가 증가함에 따라 탁도는 거의 직선적으로 증가하였으며, 200℃ 이상의 온도에서는 완만히 감소하였다. 또한 처리시간의 영향을 살펴보면 turbidity는 처리시간 10분 후부터는 급격히 증가하여 20분 처리했을 때 최대에 도달하였고 그 이후에는 서서히 감소하였다[Fig. 3-4-78B)].

- WG 현탁액을 가열하면 단백질 구형입자 내부에 있던 소수성 및 -SH group이 표면으로 노출되어 -S-S-결합을 형성하여 응집, 응고되고 140℃ 이하에서는 겔을 형성하지만 160℃ 이상에서는 aggregation/disaggregation이 동시에 일어나며 온도가 증가할수록 disaggregation되는 비율이 증가되며 또한 unfolding과 deamidation에 의하여 전하를 띤 단백질이 증가함에 따라 단백질의 emulsifying activity index (EAI)가 현저히 증가하여 대부분의 단백질은 유화상태를 이루게 되어 200℃에서 탁도가 최대가 되는 것으로 추정된다. 한편 200℃ 이상에서는 단백질/polypeptide의 hydrothermolysis에 의하여 emulsion이 부분적으로 파괴되어 탁도가 감소되는 것으로 판단된다 (J. Cereal Sci. 52: 395-403 (2010)).
- 한편 상등액의 pH는 160-200℃ 온도영역에서는 5.60에서 5.06으로 약간 감소하였으나 200℃ 이상의 온도에서는 급격히 증가하여 260℃일 때 9.32까지 증가하였다. 이와 같이 처리온도가 증가할수록 pH가 급격히 증가하는 것은 deamidation 및 열에 비교적 불안정한 아미노산의 열분해에 기인하는 것으로 판단된다 (J. Agric. Food Chem. 43: 3001-3003 (1995), Biomass Bioenergy 64: 50-61 (2014)). 한편 처리 시간에 따른 pH 변화는 처리온도의 영향에서와는 달리 변하지 않고 일정한 5.2를 유지하였다[Fig. 3-4-79(B)].

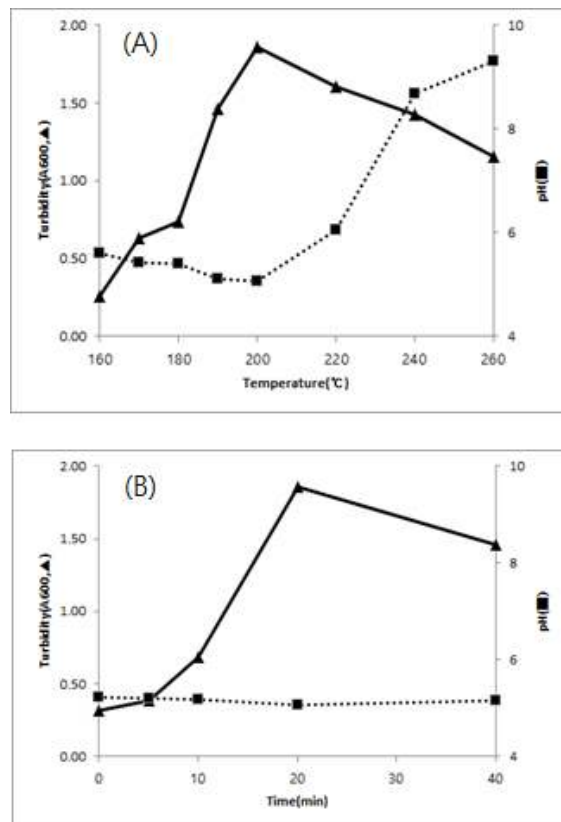


Fig.. 3-4-79. 아임계수 처리한 밀글루텐 현탁액의 탁도 (absorbance value at 600 nm) 및 pH.

- (A) 각 아임계수 온도 (160-260℃)에서 20분간 처리
- (B) 아임계수 온도 200℃에서 0~40 min 동안 처리

(나) 아임계수 처리가 밀글루텐의 효소가수분해 특성에 미치는 영향

- 전술한 각 온도에서 아임계수 처리한 밀글루텐을 4종류의 protease(Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, Protamex)로 가수분해한 결과를 Fig. 3-4-80에 나타내었다. 밀글루텐의 가수분해도 (degree of hydrolysis, DH)는 Sorensen법 (AOAC, 16th, 361-371 (1996))으로 측정하였다. 각 효소의 SCW-WG에 대한 가수분해 활성을 비교하면 Neutrase가 가장 낮았으며 Protamex, Alcalase 순으로 증가하여 Flavourzyme이 가장 우수하였다.
- 그러나 아임계수 처리한 밀글루텐의 각 protease에 의한 가수분해 프로파일은 총괄적으로는 모두 동일한 경향으로 처리온도가 증가함에 따라 DH가 서서히 증가하였다. 특히 처리온도 220℃ 일 때 4가지 효소에 의한 DH가 한 점에 모여 21.6%를 나타내는 특이한 현상을 나타내었으며, 220℃ 이상에서는 순전히 수열분해에 의하여 DH가 증가하여 260℃ 일 때 37.6%에 달하였다.

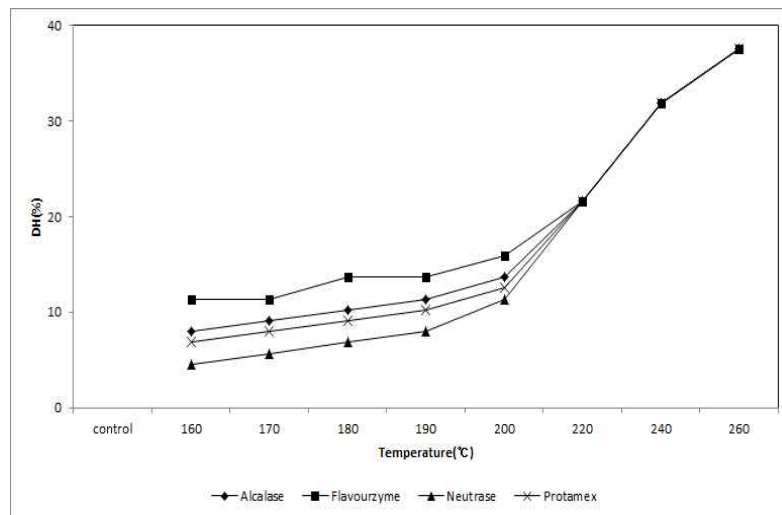


Fig. 3-4-80. 아임계수 처리 (160-260℃, 20 min) 한 밀글루텐의 enzyme susceptibility

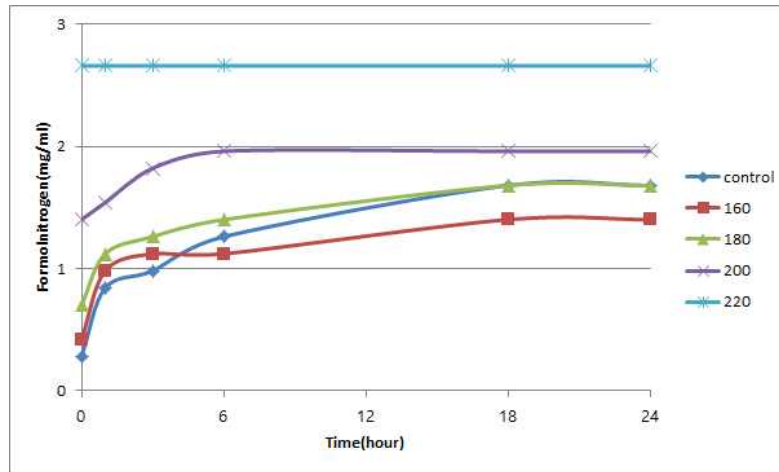


Fig. 3-4-81. 아임계수 처리 (160-260°C, 20 min) 한 밀글루텐의 효소 (Flavourzyme) 가수분해

- 상술한 것과 같이 protease의 종류에 따라 가수분해 활성에는 약간의 차이가 있으나 동일한 가수분해 경향을 나타내었다. 따라서 WG에 대한 가수분해 활성이 가장 높고 엑소 및 엔도형 protease가 복합적으로 존재하는 Flavourzyme를 대표적인 효소로 선정하였다. 또한 220°C 이상의 아임계수로 처리한 밀글루텐은 효소가분해반응을 받지 않고 hydrothermal hydrolysis에 의해서 분해되는 것으로 추정되므로 160-220°C 범위의 아임계수로 20분 처리한 밀글루텐 시료를 Flavourzyme(1%)으로 24시간 가수분해 하여 아임계수 처리가 글루텐의 protease susceptibility에 미치는 영향을 검토하였다.
- 160°C~180°C의 아임계수로 처리한 밀글루텐을 Flavourzyme으로 가수분해 했을 때 time profile은 무처리 글루텐을 가수분해한 control과 비슷한 경향을 보였다. 즉 초기 1시간 동안 효소가수분해가 급속히 진행된 다음 6시간까지는 비교적 서서히 진행되고 그 이후는 완만히 24시간까지 진행되었으며 최종 DH는 11.4-13.7%로 비슷한 값을 나타내었다.
- 특히 160°C 아임계수로 처리한 시료를 가수분해한 경우 [SCW(160)-WG-FH]에는 상당한 부분의 단백질이 응집되어 가수분해 속도는 control 보다 느렸으나 180°C 아임계수로 처리한 시료인 경우에는 control과 거의 동일한 profile을 보였다. 한편 200°C 아임계수로 처리한 경우에는 초기 6시간 동안에 효소 가수분해가 완료되고 반응시간이 경과하여도 더 이상 DH는 하지 않았으며, 220°C 아임계수로 처리한 시료는 Flavourzyme에 의하여 전혀 가수분반응을 받지 않음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과로 미루어 보아 아임계수 처리온도가 증가할수록 글루텐의 구조적 변화로 protease accessibility가 감소하며 200°C까지는 비교적 열에 안정한 효소가 접근할 수 있는 구조가 일부 남아 있으나 220°C에서는 완전히 소실되는 것으로 추측 된다

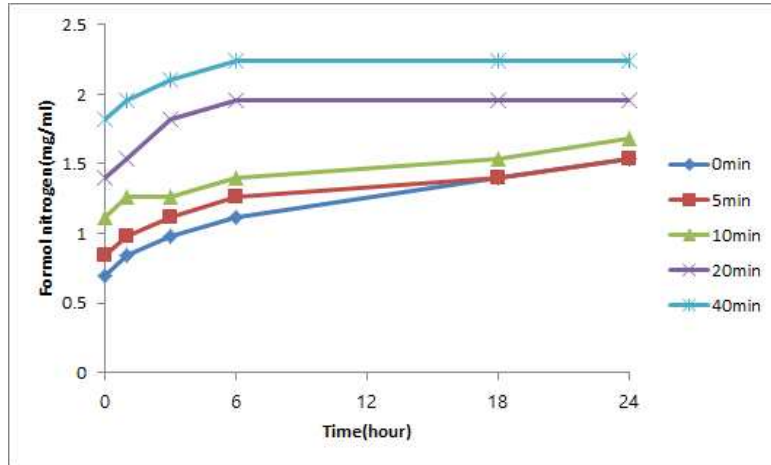


Fig. 3-4-82. 아임계수 온도 200℃에서 처리시간 (0-40 min)을 달리하여 처리한 밀글루텐의 enzyme susceptibility.

- 한편 200℃ 아임계수 환경조건에서 밀글루텐을 0, 10, 20 및 40분간 처리한 시료의 Flavourzyme에 의한 가수분해 profile을 Fig. 3-4-81에 나타내었다. 0-10분 아임계수 처리한 시료는 6시간 이후에도 효소가수분해가 서서히 지속되었으며, 24시간 후에도 더 계속될 것으로 예견되었다. 그러나 20분 아임계수 처리한 시료는 6시간 후에는 더 이상 가수분해가 진행되지 않았다. 한편 40분 아임계수 처리한 시료의 경우 20분 처리한 시료와 효소가수분해 패턴은 동일하였으며 단지 DH축을 따라 위로 shift한 패턴들 보였다. 이와 같은 양상은 200℃ 아임계수로 20분 처리한 경우 이 온도의 아임계수 용매 중에서 안정한 conformational change가 거의 완료되어 더 이상 처리시간이 경과하여도 enzyme susceptibility에는 변화가 없으며 단지 hydrothermolysis에 의하여 DH가 증가하기 때문에 위 방향으로 curve가 shift 되는 것으로 추정된다. 이와 같은 결과로 미루어보다 Matsudomi 등(Agric. Biol. Chem. 49: 1251-1256 (1985)이 보고한 것과 같이 gluten molecules에는 부분적으로 안정한 구조가 존재하는 것으로 추정된다. 그러나 아임계수 온도가 220℃로 상승하면 Flavourzyme이 access할 수 있는 비교적 열에 안정한 구조까지 변화되어 susceptibility가 완전히 소실되는 것으로 판단되며, 아임계수의 온도가 처리시간 보다는 enzyme susceptibility에 더 큰 영향을 미치는 것으로 판단된다.

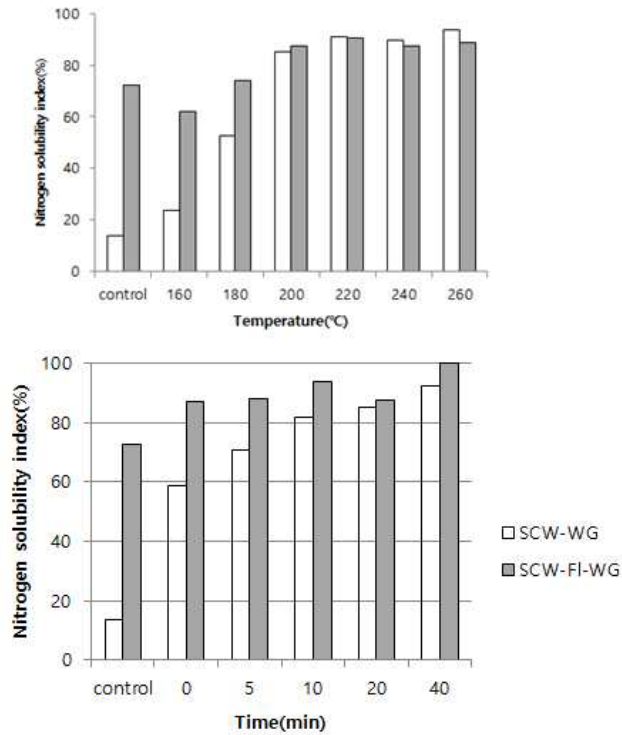


Fig. 3-4-83. 아임계수 처리 (200℃, 20 min) 및 아임계수 처리 후 효소가수분해 한 밀글루텐의 용해도.

SCW-WG: wheat gluten(WG) treated with subcritical water(SCW)

SCW-FL-WG: enzymatic hydrolysates of SCW-WG by flavourzyme(1%) for 24 h

- 단백질 용해도는 가장 중요한 데이터의 하나이다. 아임계수 처리한 밀글루텐과 아임계수 처리한 후 효소 가수분해한 시료의 단백질 용해도를 Fig. 3-4-83에 나타내었다. 먼저 아임계수 온도를 달리 하여 20분간 처리한 밀글루텐 시료의 단백질 용해도를 Fig. 3-4-83A에서 살펴보면 160℃ 아임계수로 처리한 경우 단백질용해도는 23.6%로 낮았으나 180℃의 경우 단백질 용해도는 52.4%로 현저히 증가되어 아임계수 처리로 응집되었던 단백질의 상당부분이 용해되었음을 알 수 있다. 단백질 용해도는 처리온도가 증가함에 따라 거의 직선적으로 증가하여 200℃ 처리 시료는 대부분 가용화되어 용해도는 85.3%에 달하였으며 220℃ 이상에서는 약 90%였다. 이와 같은 결과로 미루어 보아 200℃ 이하에서는 단백질의 disaggregation 또는 deamidation 등에 의하여 가용화가 주로 진행되는 것으로 판단되며 200℃ 이상의 아임계수는 밀글루텐의 가용화 수단으로 사용할 수 있음을 시사한다.
- 한편 아임계수 처리한 밀글루텐의 효소 가수분해액의 단백질 용해도를 살펴보면 무처리 밀글루텐의 효소가수분해 시료의 단백질 용해도는 72.5%로 가수분해에 의하여 밀글루텐은 대부분 가용화됨을 알 수 있다. 이에 비하여 160℃ 아임계수 처리한 밀글루텐의 효소가수분해 시료의 단백질 용해도는 62.1%로 무처리 효소 가수분해 시료보다 오히려 약 10% 낮은 용해도를 보였는데 이는 전술한 것과 같이 아임계수 처리에 의하여 단백질이

응집되어 효소와의 접촉이 충분하지 못하기 때문인 것으로 생각된다. 아임계수로 처리한 밀글루텐과 이를 효소가수분해한 시료의 용해도를 비교해 보면 200℃ 이하의 온도 영역에서는 아임계수 처리한 시료의 용해도는 현저히 낮으나 200℃ 이상에서는 모두 약 90%의 비슷한 수준의 용해도를 나타내었다.

- 또한 200℃ 아임계수 환경조건에서 밀글루텐을 0, 10, 20 및 40분간 처리한 시료의 단백질 용해도는 Fig. 3-4-83B 에 나타내었다. 처리시간 0분은 반응온도가 200℃에 도달한 시점의 시료이므로 승온시간(약 13분) 동안에 단백질이 열에 의한 가용화된 것을 나타내는 용해도로 58.6%의 비교적 높은 값을 나타내었다. 처리시간이 증가 할수록 단백질 용해도는 증가하여 10분 후에는 약 90%에 달하였다. 한편 효소가수분해 한 시료는 처리시간에 관계없이 약 90%의 용해도를 나타내었다.

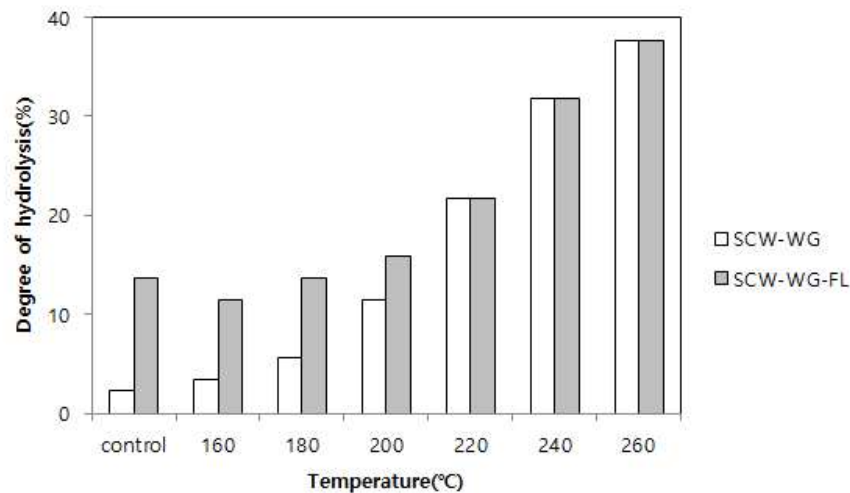


Fig. 3-4-84. 아임계수 처리 및 효소가수분해 밀글루텐의 가수분해도

SCW-WG: wheat gluten(WG) treated with subcritical water(SCW)

SCW-WG-FL: enzymatic hydrolysates of SCW-WG by flavourzyme(1%) for 24 h

- 각 온도의 아임계수로 20분간 처리한 밀글루텐과 이를 Flavourzyme (1%)으로 24시간 가수분해한 시료의 처리온도에 따른 가수분해도 (degree of hydrolysis, DH)의 변화를 비교하여 Fig. 3-4-84에 나타내었다. 무처리 글루텐 원물의 DH는 2.3%이었으며, 이를 Flavourzyme으로 24h 가수분해한 시료의 DH는 13.7%로 효소에 의한 DH 순증가는 약 11.5% 였다. 이에 비해 160℃ 아임계수로 처리한 밀글루텐의 DH는 3.4이며 이를 Flavourzyme으로 가수분해한 시료의 DH는 11.4%로 효소에 의한 DH 순증가분은 8%로 저하되었다. 이와 같은 결과는 Fig. 3-4-84의 사진에서 관찰할 수 있는 것과 같이 160℃ 아임계수 처리에 의하여 밀글루텐의 응집으로 효소의 accessibility가 감소하였기 때문인 것으로 생각된다.

- Fig. 3-4-84를 살펴보면 온도 160°C~180°C의 아임계수로 처리한 경우 열처리만으로는 가수분해가 거의 진행되지 않아 DH는 2.3-5.7% 낮았으나 180~200°C의 온도영역에서는 처리온도가 증가함에 따라 hydrothermolysis에 의하여 DH는 5.7에서 11.4%로 완만히 증가였고 200-260°C 온도영역에서는 DH는11.4%에서 최대 37.7%까지 급격히 증가하였다. 특히 260°C인 경우에는 생성된 아미노산의 일부가 열에 의하여 분해되기 때문에 DH 증가폭이 약간 감소하는 경향을 보였다.
- 아임계수 처리온도가 증가할수록 hydrothermolysis에 의한 DH가 증가하는 반면에 아임계수 처리 밀글루텐과 이들의 효소가수분해 시료의 DH 차 즉, 효소 가수분해에 의한 DH 순증가는 점점 감소하여 220°C에서는 한 점으로 일치하였다. 이와 같은 결과는 처리온도가 증가할수록 SCW-WG에 대한 enzyme accessibility가 감소하여 220°C 아임계수로 20 min 처리한 경우 완전히 소실되는 것으로 추정된다. 이와 같은 결과로 미루어 보아 220°C 아임계수로 처리한 WG은 효소의 active site가 완전히 소실되거나 구조적 변형으로 효소가 접근하지 못하는 것으로 추정된다.
- 한편 Fig. 3-4-83과 Fig. 3-4-84에서 아임계수 처리 밀글루텐의 DH와 용해도를 비교하면 160-200°C 온도영역에서 DH는 3.4%에서 11.4%로 서서히 증가한 반면에 단백질 가용화율은 23.6%에서 85%로 급격히 증가하는 것으로 미루어 보아 200°C 이하에서는 아임계수 처리에 의하여 단백질의 변성, deamidation 등이 주로 진행되는 반면에 200°C 이상에서는 가수분해가 급속히 진행되는 것으로 추측되었다.

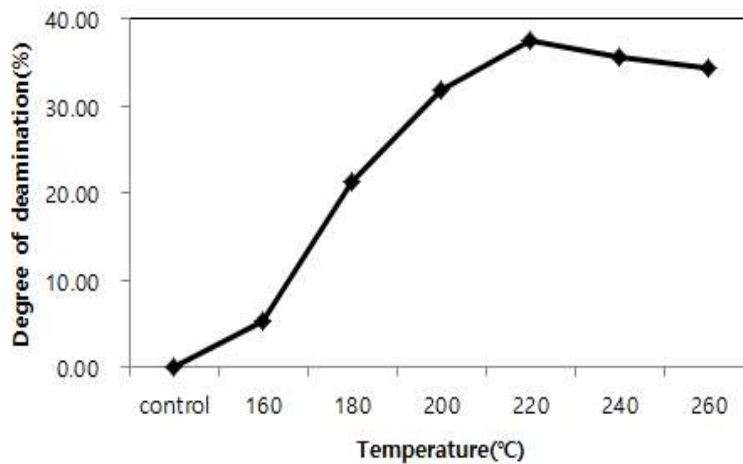


Fig. 3-4-85. 아임계수 처리 온도가 밀글루텐의 deamidation에 미치는 영향

- 밀글루텐의 아임계수 처리온도가 밀글루텐의 degree of deamidation(DD)에 미치는 영향을 Fig. 3-4-85에 나타내었다. 160-200°C의 온도영역에서 DD는 12.5%에서 42.8%로 거의 직선적으로 증가하였으며 220°C에서 최대값 47.4%를 나타내었다. 그러나 220-260°C 영역에서는 오히려 약간 감소하는 경향을 보였다.
- 이와 같은 경향은 Fig. 3-4-83A에 나타난 아임계수 처리한 밀글루텐의 protein solubility

와 거의 동일하다. 따라서 DD와 protein solubility 사이에 관계를 살펴본 결과 거의 linear relation을 가졌다. 그러나 전술한 것과 같이 160-220°C 온도영역에서 DH의 변화가 적은 것으로 미루어 보아 펩티드 결합의 가수분해 보다는 deamidation에 의한 가용화와 응집된 단백질과 폴리펩티드의 해리와 그에 따른 가용화가 주로 일어나는 것으로 판단된다.

- Matsudomi 등 (Agric. Biol. Chem. 46: 1583-1586 (1982)은 산가수분해한 글루텐의 경우 DD가 40% 이하이면 gluten molecules의 펩티드 결합이 변하지 않으면서 conformational change가 유도된다고 보고하였다. 또한 추가적으로 deamidated gluten의 helix content를 측정된 결과 native gluten의 30%~40%에서 deamidated gluten은 10%로 감소하였으며 탈아미이드가 40% 이상 증가하여도 거의 변화 없이 10%를 유지하였다. 이와 같은 결과는 gluten molecules에는 부분적으로 안정한 구조가 존재하는 것을 의미한다고 하였다

(다) 아임계수 처리 밀글루텐 및 그 효소가수분해물의 분자량 분포 및 아미노산 조성

- 밀글루텐은 단분자인 글리아딘 (gliadins)과 고분자인 글루테닌 (glutenin)으로 구성되어 있으며 그 구성비율은 65:45이다. 총괄적으로 글리아딘의 분자량은 28,000-55,000 Da 범위이며, 글리아딘은 아미노산 sequence에 따라 다시 ω 5-, ω 1,2-, α/β - 및 γ -gliadin으로 나누어진다. ω 5-gliadin의 분자량은 약 50,000, ω 1,2-gliadin 분자량은 약 40,000, α/β - 및 γ -gliadin 분자량은 약 28,000-35,000이다. 글루테닌은 여러 개의 subunit가 -S-S-결합으로 연결되어 있으며 분자량은 500,000 Da 에서 >10 million Da 범위이다. 글루테닌의 subunit는 분자량이 67,000-88,000 및 32,000-35,000 범위인 high-molecular-weight 및 low-molecular-weight subunit가 알려져 있다.
- 단백질의 SDS gel electrophoresis pattern은 아임계수 처리에 의한 밀글루텐의 구조변화에 대한 유용한 정보를 제공해 준다. Fig. 3-4-86의 SDS-PAGE에서 lane 1의 무처리 밀글루텐과 lane 2의 180°C 아임계수 처리 밀글루텐의 패턴을 비교하여 보면 75 kDa 이상의 고분자 밴드는 없어지고 10-20 kDa의 저분자 밴드가 현저히 증가되었음을 알 수 있다. 한편 200°C 아임계수로 처리한 밀글루텐의 경우 10 kDa이하의 밴드가 매우 진하였으며 220°C 아임계수로 처리했을 때 저분자 밴드가 다소 약해졌음을 알 수 있다.

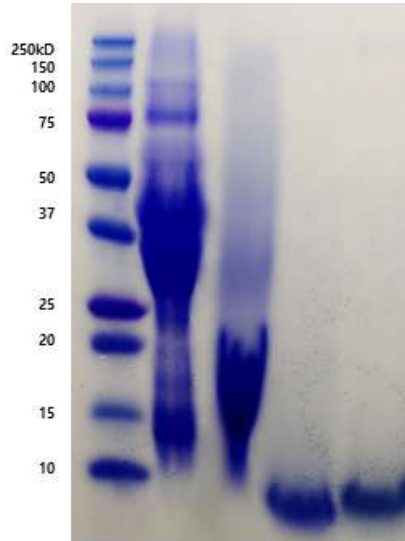


Fig. 3-4-86. 아임계수 처리한 밀글루텐의 SDS-PAGE 분석

Lane M: Standard molecule protein; lane 1: 무처리 밀글루텐;
lane 2: 180°C 아임계수 처리 밀글루텐; lane 3: 200°C 아임계수
처리 밀글루텐; lane 4: 220°C 아임계수 처리 밀글루텐.

- 분자량분포:** 밀글루텐의 Flavourzyme 가수분해물과 180-220°C 아임계수로 처리한 밀글루텐 수열분해물의 gel permeation chromatography를 Superdex Peptide HR 10/30 column을 장착한 AKTA purifier LC system (Amedrsham International plc, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 수행하였으며 그 분자량 분포 프로파일을 Fig. 3-4-87에 나타내었다. 180°C 아임계수 처리에 의하여 분자량 50 kDa 이상의 고분자 글루테닌 subunit 들은 거의 대부분 분해되고 주로 LMW glutenin과 gliadin monomer로 구성되어 있는 것으로 판단된다. 또한 200°C 아임계수로 처리한 밀글루텐은 분자량 10 kDa 내외의 펩티드의 비중이 가장 높았으며, 220°C 아임계수로 처리한 경우 대부분의 분자들은 6500 Da 이하로 감소되었으며 특히 189 Da 이하의 저분자 펩티드도 상당량 생성된 것으로 추측되었다.
- 특히 200°C 아임계수로 처리한 밀글루텐의 분자량분포는 대조구인 무처리 글루텐의 Flavourzyme 가수분해액과 유사한 패턴을 보였으며, 220°C 아임계수로 처리한 수열분해액은 Flavourzyme에 의하여 더 이상 가수분해 되지 않는 점으로 미루어 보아 6500 Da의 저분자 분포는 protease가 접근할 수 있는 한계인 것으로 추측된다.

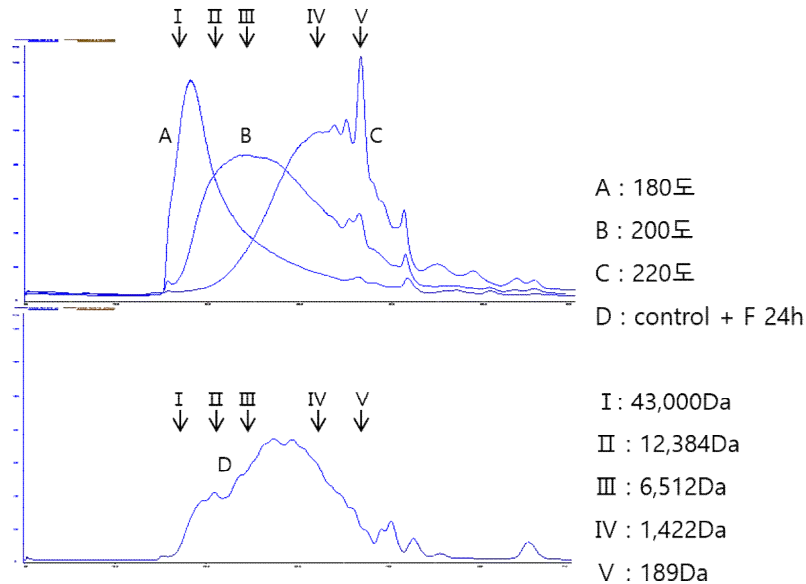


Fig. 3-4-87. 아임계수 처리 밀글루텐의 GPC 프로파일

- 앞서 기술한 것과 같이 220°C 이상의 아임계수로 처리한 경우 wheat gluten은 enzyme accessibility가 완전히 소실되는 경향을 보였다. 따라서 아임계수 처리온도가 밀글루텐의 enzyme accessibility에 미치는 영향을 더욱 면밀 검토하기 위하여 180, 200 및 220°C의 아임계수로 20분간 처리한 시료 및 이들을 Flavourzyme으로 가수분해한 시료의 total amino acid (Table 3-4-34) 및 free amino acid 함량 (Table 3-4-35)을 분석하였다.
- 밀글루텐 시료 원물은 glutamic acid (Glu) 및 proline (Pro)이 주성분을 이루어 각각 40.89% 및 13.17% 였으며, 이어서 leucine (Leu) 6.61%, phenylalanine (Phe) 5.07%, serine (Ser) 4.84%로 이들 5개의 아미노산이 총아미노산의 70.58%에 달하였다.
- 180°C 및 200°C 아임계수로 처리한 경우 총 아미노산 조성은 거의 변화가 없었다. 그러나 220°C 아임계수로 처리한 경우에는 총 아미노산의 약 10%가 감소되었으며, 특히 aspartic acid (Asp), serine (Se), threonine (Thr), arginine (Arg)이 현저히 감소하였으며, Ser 과 Thr 잔기는 다른 펩티드 잔기보다 빨리 절단되는 것으로 보고되었다 (Biochem. J. 49:463-481 (1951).
- 아임계수 처리한 밀글루텐 중에서 Asp가 가장 크게 변하므로 가장 중요한 아미노산인 것으로 추정된다. 밀글루텐 원물 현탁액 (10%) 중의 Asp 함량은 3.03% (2140 mg/kg) 이 였으나 220°C의 아임계수로 20분간 처리하면 0.4 % (240 mg/kg)까지 현저히 감소하였다. 묽은 산성조건(0.03 N HCl, pH 2.0, 105°C)에서 가열처리하면 단백질은주로 Gln 및 Asp 잔기가 deamidation되고 그 결과 펩티드 결합이 절단되는 것은 잘 알려져 있다 (Agric. Biol. Chem. 49: 1251-1256 (1985). 한 등 (Int. J. Biochem. 15: 875-884 (1983)은 묽은 산 성조건에서 처리하면 aspartyl 또는 Asp 잔기는 다른 아미노산 잔기에 비하여 약 100배 빠른 속도로 Asp로 deamidation된다고 보고하였다.

- 한편 아임계수 처리에 의하여 Glu의 함량은 아임계수 처리온도 160-220℃ 범위에서 거의 변화지 않고 29,000 mg/kg을 유지하였다. 이와 같은 결과로 미루어 보아 160-220℃의 아임계수 처리에 의한 밀글루텐의 가용화는 주로 Asparagin의 deamidation에 기인하는 것으로 추정된다.

Table 3-4-34. 아임계수 처리 밀글루텐 현탁액 (10%) 및 그 효소 가수분해물의 총 아미노산 조성

Amino acid (mg/L)	WG-SCW (T) Total AA of the solid fraction				H-WG-SCW(T) total AA Total AA of the solid fraction			
	control (WG)	180℃	200℃	220℃	Control (H-WG)	180℃	200℃	220℃
Aspartic acid	2140	1660	806	240	1313	1664	767	244
Glutamic acid	28802	29008	29758	29851	27019	29930	29054	29751
Serine	3408	3122	2659	1352	2150	3069	2554	1331
Histidine	1234	1128	1033	797	1055	1192	1016	817
Glycine	2195	2176	2291	2206	1862	2232	2230	2184
Threonine	1784	1559	1290	606	1431	1630	1225	618
Arginine	2487	1832	1365	968	1290	1572	1320	946
Alanine	1774	1676	1896	2171	1375	1734	1854	2191
GABA	5	11	15	30	7	11	17	35
Tyrosine	1947	1953	2109	2008	1714	2012	2049	1968
Valine	2670	2560	2599	2376	2134	2689	2631	2480
Methonine	1028	936	977	845	657	975	944	847
Phenylalanine	3569	3472	3537	3297	3124	3572	3447	3279
Isoleucine	2485	2404	2459	2098	2083	2585	2536	2405
Leucine	4653	4429	4584	4155	3727	4583	4449	4174
Lysine	981	638	604	488	666	732	552	464
Proline	9277	8739	9031	8182	8152	8921	8772	8034
Total	70441	67302	67017	61766	59760	69104	65446	61815

- 밀글루텐 현탁액 (10%)을 아임계수로 가수분해한 시료의 유리아미노산 함량 변화를 Table 3-4-35 및 Fig. 3-4-88에 나타내었다. 180-220℃ 아임계수 처리 시료의 유리 아미노산 수율은 0.12-2.70% 매우 낮아 이미 앞에서 지적한 것과 같이 이 온도조건에서는 아미노산까지 분해되지 않고 주로 deamidation되는 것을 알 수 있다. 그러나 비록 수율은 낮지만 처리 온도가 증가함에 따라 유리아미노산 함량은 427-1700mg/L로 현저히 증가하였다. 특히 Gly, Ala, Pro의 함량이 현저히 증가하였는데(Table 3-4-35) 이들 아미노산은 다른 아미노산의 thermal transformation 과정에서 중간산물로 형성되는 것으로 보고되었다 (Ind. Eng. Chem. Res. 46: 5286-5294 (2007)).
- Rogalinski 등 (J. Supercritical Fluids 46: 335-341 (2008))은 아임계수 조건에서 단백질의 가수분해에 대한 kinetic data로부터 각 온도에서 아미노산이 최대수율에 도달하는 시간을 추정하였다. 예를 들어 190℃에서는 350h, 210℃에서는 45h, 230℃에서는 6.5h 이므로 실질적으로 아미노산에 생성되는 온도는 230℃ 이상이라고 할 수 있으며 260℃에서는 아미노산 생성속도보다 분해속도가 크므로 기대한 것보다 아미노산수율이 낮아진다고 보고하였다.

- 한편 아임계수 처리액을 Flavourzyme로 가수분해한 경우는 180℃ 처리액의 경우 Gln농도가 현저히 증가하였으나 고온에서는 급격히 감소하였다. 이와 같은 결과는 Flavourzyme에는 glutaminase 활성이 거의 없다는 점을 고려한다면 아임계수 조건에서는 열에 의하여 Gln의 펩티드 결합이 파괴되기 때문이며, 아마이드 결합은 펩티드보다 안정한 것이 아닌 가 추정된다. 또한 200℃ 이상에서는 Glu와 Gln이 동시에 감소되는 것으로 보아 열에 의하여 파괴되는 것으로 추정된다.
- 한편 아임계수 처리한 밀글루텐을 효소 가수분해한 경우 유리 아미노산 함량은 역으로 처리온도가 증가할수록 6021 mg/L에서 2920 mg/L로 현저히 감소하였다(Fig. 3-4-88). 이와 같이 아임계수의 처리온도가 증가할수록 총 유리아미노산 함량은 감소하지만 DH는 오히려 증가한다는 점(Fig. 3-4-84) 을 고려하면 아임계수 처리에 의한 단백질의 구조적 변화는 Flavourzyme에 함유된 여러 가지 효소 중에서 endopeptidase보다 exopeptidase의 accessibility가 더욱 감소하는 것으로 추정된다.

Table 3-4-35. 아임계수 처리 밀글루텐 현탁액 (10%) 및 그 효소 가수분해물의 유리 아미노산 조성

Amino acid (mg/L)	WG-SCW (T)				H-WG-SCW(T)			
	Free AA of the water soluble fraction				Free AA of the water soluble fraction			
	control (WG)	180℃	200℃	220℃	Control (H-WG)	180℃	200℃	220℃
Aspartic acid	14	185	151	46	59	116	136	42
Glutamic acid	6	5	18	51	312	74	42	58
Asparagin	11	18	17	4	84	29	30	7
Serine	2	28	82	95	9	308	240	126
Glutamine		0	1	3	4380	1748	496	98
Histidine	1	7	24	59	434	192	95	73
Glycine	2	24	100	259	155	78	118	236
Threonine	1	8	19	19	366	261	207	99
Arginine	9	15	25	34	30	29	206	98
Alanine	8	40	138	406	412	245	235	424
GABA	6	4	2	3	3	4	2	3
Tyrosine	2	9	29	59	409	273	204	137
Valine	2	14	47	80	611	392	355	234
Methonine	1	6	13	18	181	134	48	8
Phenylalanine	3	7	21	58	563	466	382	205
Isoleucine	1	9	17	28	574	330	288	178
Leucine	4	14	40	94	1611	1265	1042	516
Lysine	1	4	6	10	111	41	23	17
Proline	4	31	93	375	ND	79	126	362
Total	78	427	842	1700	10304	6061	4274	2920

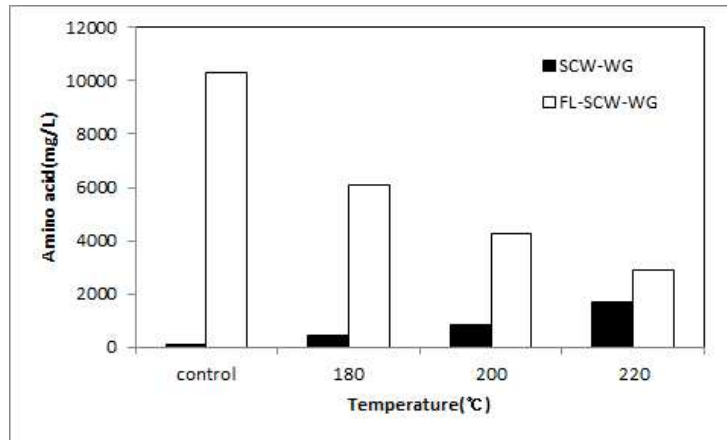


Fig. 3-4-88. 아임계수 처리 밀글루텐 현탁액 (SCW-WG) 및 그 효소 가부분해액 (FL-SCW-WG)의 유리 아미노산 함량

(3) 식물성단백 천연조미료 소재공정 최적화

(가) 전처리(deamidation)가 단백질의 가수분해에 미치는 영향

- 단백질의 deamidation은 단백질의 가수분해와 savory peptide의 생성을 위한 유용한 수단으로 보고되고 있다. 염산 사용에 대한 우려로 최근에는 염산 대신에 succinic acid 등의 유기산을 이용한 deamidation에 대한 다수의 연구가 보고되고 있다.
- 따라서 염산, succinic acid에 의한 deamidation과 아임계수 처리가 효소 susceptibility에 미치는 영향을 비교하였다. Fig. 3-4-89에 나타난 조건으로 처리한 단백질 용액을 Flavourzyme으로 가수분해했을 때 가수분해도와 아미노산 수율은 Table 3-4-36에 나타내었다.
- 잘 알려진 것과 같이 염산을 이용하여 deamidation한 대두단백과 밀글루텐의 가수분해도와 아미노산 수율이 가장 높았고, 그 다음이 succinic acid 및 아임계수 처리였다. 여기서 아임계수의 온도는 190°C로 비교적 저온이므로 반응성이 낮은 것으로 판단된다.

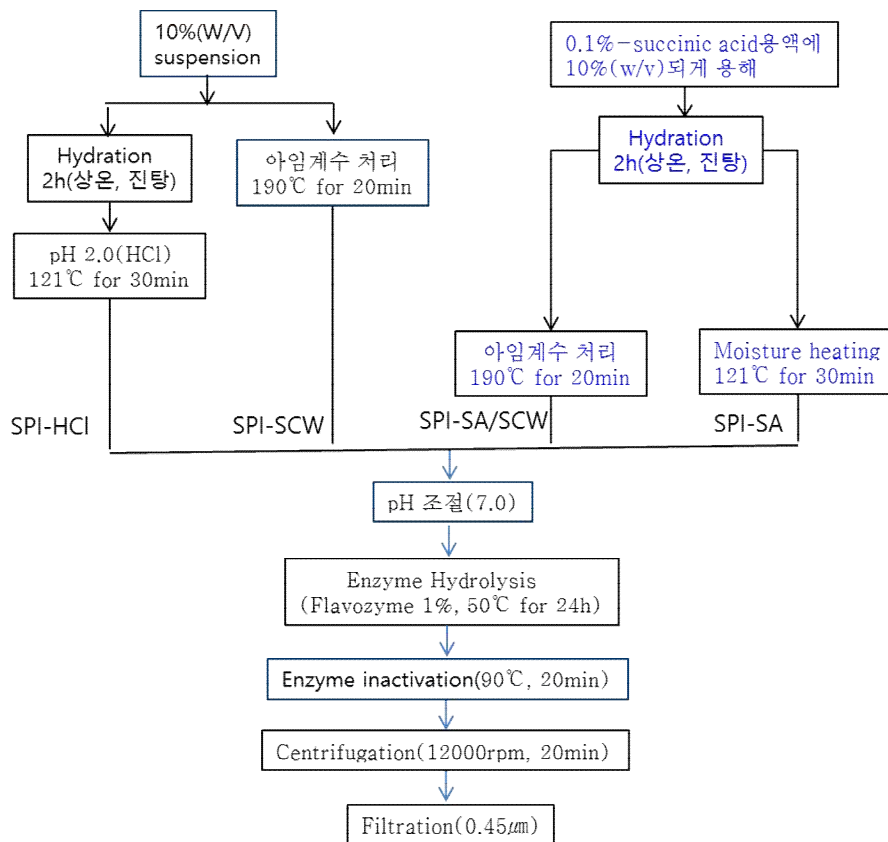


Fig. 3-4-89. 대두단백질의 전처리공정 비교

Table 3-4-36. 대두단백질의 전처리공정이 효소(Flavourzyme) 가수분해에 미치는 영향

시료	가수분해도(%)		아미노산 수율(%)	
	가수분해 전	가수분해 후	가수분해 전	가수분해 후
SPI-HCl	-	36.9	-	39.6
SPI-SA	-	29.7	-	32.1
SPI-SCW	1.8	20.8	6.9	27.0
SPI-SA/SCW	2.9	15.3	11.3	23.6
WG-HCl		26.3		50.1
WG-SA/SCW		21.5		28.5

(나) 수열분해액의 TP-6균주에 의한 발효

- 단백질 수열분해액을 단백질 가수분해액 제조에 가장 널리 사용되는 대표적인 endoprotease인 Alcalase와 exoprotease인 Flavourzym을 이용하여 가수분해 했을 때 가수분해도와 아미노산 수율

이 크게 향상되지 않았다. 따라서 고도 가수분해 천연조미료 소재 생산공정을 최적화하기 위하여 수열분해액의 *Bacillus subtilis* TP-6 균주에 의한 가수분해를 검토하였다. 분리대두단백질(HSPI)과 밀글루텐(HWG)을 240℃ 이하의 각 온도에서 수열분해하고 이를 다시 Alcalase로 가수분해한 다음 Flavourzyme과 *Bacillus subtilis* TP-6 균주로 4일간 배양했을 때 가수분해도와 아미노산 수율을 Table 3-4-37에 나타내었다.

- 대두단백의 경우 210℃ 수열분해분해액(HSPI-10)의 발효 후 가수분해도와 아미노산 수율은 각각 25.0%와 21.8%로 증가하였으며, 230℃ 수열분해액(HSPI-30)의 가수분해도는 증가하지 않았으나 아미노산 수율은 36%로 현저히 증가하였다.
- 한편 밀글루텐의 230℃ 수열분해분해액(HWG-30)의 발효 후 가수분해도는 15.9%로 낮았으나 아미노산 수율은 31.3%로 높았다.

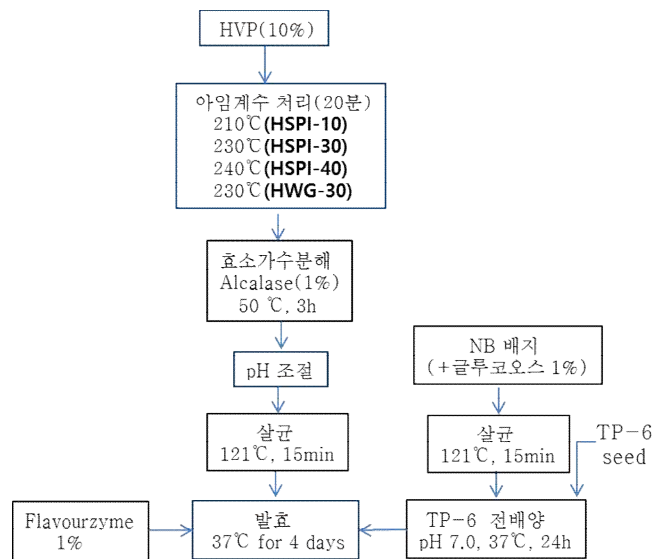


Fig. 3-4-90. 단백질 수열분해액의 발효

Table 3-4-37. 단백질 수열분해액의 효소가수분해 및 TP-6 발효

시료	가수분해도 (%)		아미노산수율 (%)	
	Alcalase 가수분해 후	발효 후	Alcalase 가수분해 후	발효 후
HSPI-10	7.5	25.0	15.4	21.8
HSPI-30	11.1	21.5	21.3	36.1
HSPI-40	13.9	22.3	27.2	36.7
HWG-30	3.3	13.6	15.9	31.3

(다) 효소원으로 TP-6 배양액

- 우리나라는 전통적으로 미생물 발효를 이용하여 다양한 식품을 제조하여 왔으며, 이 중에는 장류, 젓갈류처럼 천연물로부터 HVP와 HAP을 생산하여 조미효과를 내는 식품들이 다수 존재한다. 이러한 HVP나 HAP는 일반적으로 *Aspergillus*속의 균주를 고체발효 또는 액체발효 한 것을 효소원으로 하여 분해한다. 이때 여러 종류의 효소들에 의하여 다양한 형태의 아미노산 또는 펩타이드가 생산되므로 이들의 조합된 맛이 나타나게 된다.
- 식물성 단백질 천연조미 소재 생산공정을 개발하기 위해서는 대두단백 단독 가수분해물로서는 감칠맛이 부족하기 때문에 밀글루텐 가수분해물과 혼합하는 것이 일반적이다. 그러나 밀글루텐은 대두단백에 비하여 가용화와 가수분해가 어렵고 상업용 효소가수분해로서는 고아미노화율과 아미노산 유리율을 얻는데 한계가 있다.
- 따라서 염미증진제로 사용이 가능한 가수분해물을 생산하기 위해서는 상업용 protease 이외에 실제 산업화에 적용시킬 수 있는 우수한 발효균주의 확보가 중요하며, 특히 우마미 성분인 glutamic acid의 다량 생산을 위해서는 glutaminase 활성이 우수한 균주가 필수적이다. 상업용 glutaminase는 매우 고가로서 조미용 단백질 가수분해물 생산에는 사용할 수 없다.
- 1차년도 연구에서 장류제조에 사용되는 대표적인 여러 종류의 *Aspergillus*속 균주와 *Bacillus subtilis* TP-6의 밀글루텐에 대한 가수분해능과 glutamic acid 생산능을 비교하여 TP-6균주가 월등히 우수하다는 사실을 입증하였다. TP-6균주는 본 연구진이 청국장으로부터 분리한 특허균주이다.
- 따라서 우선적으로 TP-6균주를 밀글루텐 배지에 배양하여 이를 효소원으로 사용한 공정을 개발하기 위하여 10% 밀글루텐 현탁액에 최소한의 유기영양원 yeast extract과 탄소원으로 glucose 또는

xylose를 각각 1% 첨가하고 배양하여 24시간 후의 균수를 측정하였다.

- Table 3-4-38에 나타낸 것과 같이 영양원을 보충하지 않은 밀글루텐 현탁액 배지에서 생균수는 약 1×10^9 CFU/mL로 우수한 생육상태를 보였으며, yeast extract과 glucose를 첨가한 경우 생균수는 약 3배 증가한 2.8×10^9 CFU/mL였다.

Table 3-4-38. 밀글루텐 배지에서 TP-6균주의 생육

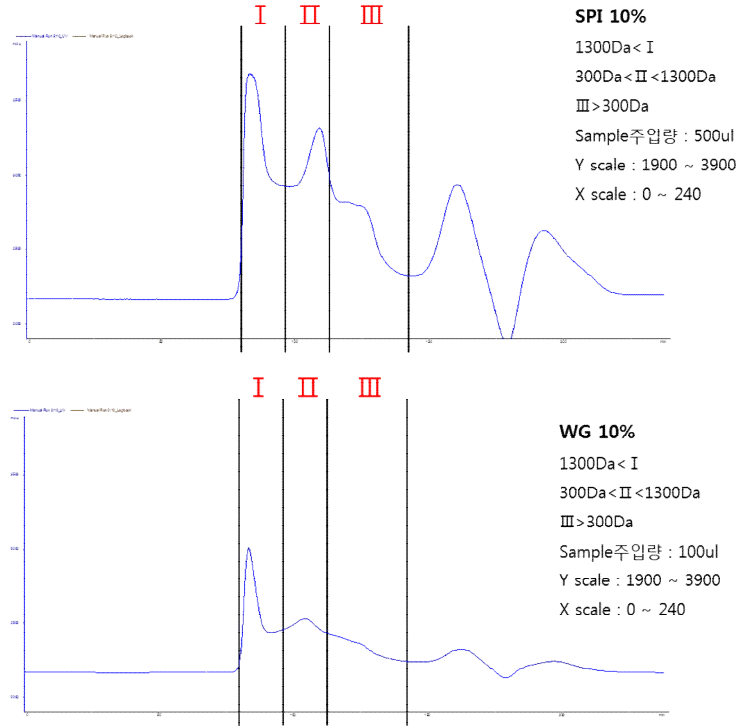
	밀글루텐(10%)	밀글루텐(10%) + YE(0.5%)	밀글루텐(10%) + YE(0.5%) + glucose(2%)	밀글루텐(10%) + YE(0.5%) + xylose(2%)
균수(CFU/mL)	9.4×10^8	9.7×10^8	2.8×10^9	2.5×10^9

(라) 밀글루텐 TP-6발효액의 고압가수분해

- 선행 연구를 통하여 대두단백 배지에 TP-6균주를 120시간 배양한 배양액을 100MPa에서 24시간 고압처리 했을 때 가수분해도가 약 30% 향상된다는 사실을 확인한 바 있다. 따라서 추가적으로 밀글루텐 배양액의 고압처리 효과를 확인하기 위하여 고압처리하였다(Table 3-4-39).
- 대두단백질 현탁액의 경우 4일 배양 후 가수분해도는 54.1%, 아미노산 수율은 61.8%로 매우 우수한 발효결과를 얻었으며, 이 배양액을 고압가수분해 한 결과 가수분해도와 아미노산 수율은 각각 66.3%와 62.9%로 증가하였다. 한편 밀글루텐의 경우 4일 배양 후 가수분해도는 32.9%, 가수분해도는 40.0%로 대두단백질보다 가수분해 효율이 약간 낮았다. 밀글루텐 발효액을 100MPa의 가압조건에서 24시간 고압가수분해한 경우 대두발효액의 경우와 비슷한 경향으로 가수분해도와 아미노산 수율은 각각 40.1%와 46.1% 증가하였다.

Table 3-4-39. 대두단백질 및 밀글루텐 현탁액의 TP-6 발효 및 고압가수분해

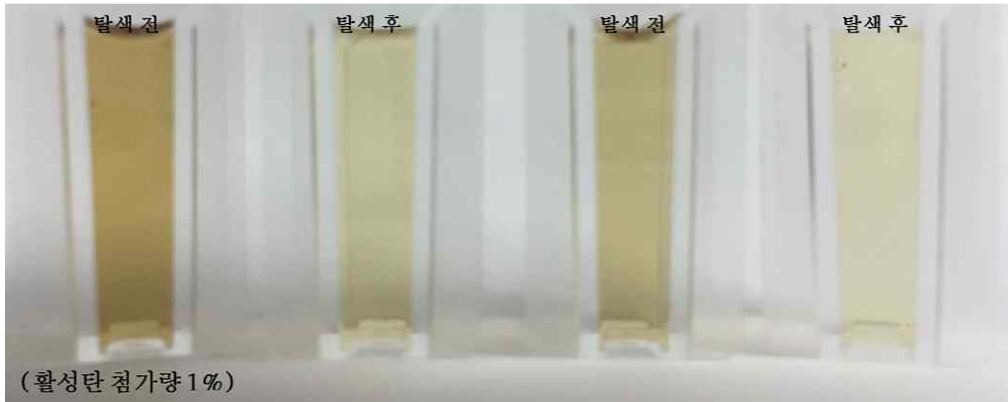
시료		가수분해도(%)	아미노산수율(%)
SPI(10%)	4일 배양	54.1	61.8
	4일배양 +100MPa(24h)	66.3	62.9
WG(10%)	4일 배양	32.9	40.0
	4일배양 +100MPa(24h)	40.1	46.1



- 단백질 가수분해물의 활성탄에 의한 탈색 선행연구를 통하여 선정된 신기화학 분말 활성탄(No. 3)을 가수분해물에 0.5-4.0% 범위에서 농도를 달리하여 첨가하고 80℃에서 40분간 가열한 후 여과하여 여액의 흡광도(340nm)를 측정하였다.
- Table 3-4-40에 나타낸 것과 같이 활성탄 첨가량이 증가할수록 흡광도는 감소하였으며 동시에 가수분해도 및 고형분도 약간 감소하였다. 따라서 가수분해도 및 고형분도 손실을 최소화하면서 탈색에 가장 적합한 활성탄 농도로 1%를 선정하였다.

Table 3-4-40. 단백질 가수분해액의 활성탄 탈색(80℃, 40분)

활성탄 첨가량 (%)	대두단백질 가수분해물			밀글루텐 가수분해물		
	DH(%)	A ₃₄₀	고형분함량 (%)	DH(%)	A ₃₄₀	고형분함량 (%)
0.0	26.2	4.051	4.84	19.5	4.237	4.49
0.5	25.0	3.910	4.61	17.8	3.933	4.31
1.0	23.9	3.821	4.38	18.6	3.826	3.97
2.0	22.0	3.669	4.00	15.7	3.622	3.49
4.0	19.7	2.711	3.21	15.0	2.497	2.81



대두단백질 수열분해액

밀글루텐 수열분해액

(마) 식물성단백 천연조미료 소재생산 공정 확립

- 이상의 식물성 단백질 고도가수분해를 위한 융합공정 개발연구를 종합하여 수립한 조미소재 최적 공정을 Fig. 3-4-91과 같이 확립하였다.
- 우선적으로 식물성 단백질원의 고도 가수분해를 위한 1단계 전처리공정으로는 신가공기술로 대두되고 있는 아임계수를 이용한 수열분해(hydrothermolysis)와 효소 가수분해를 선정하였다. 2단계는 전처리에 의하여 가용화된 1차 가수분해물을 *Bacillus subtilis* TP-6와 *Aspergillus oryzae* 유래 Flavourzyme에 의한 복합효소 작용으로 고도로 가수분해 시키며 제품에 따라 고압가수분해를 추가함으로써 염미증진 peptide의 생성을 최대화 하는 단계로 구성된다.
- 보다 구체적으로 본 공정의 핵심개념은 protease활성이 우수한 세균배양액을 효소원으로 이용하는 대량생산 공정을 개발하는 것이며, 이를 위해 단백질원의 가용화가 첫 단계이다. 산성조건에서 저온의 아임계수를 이용한 가용화 또는 세균 유래 protease를 이용한 가용화를 통하여 단백질원의 대량 살균시스템을 적용한다. 일반적으로 세균 유래 protease는 단백질을 크게 절단하는 특성을 이용하여 단백질의 가용화와 분산성을 향상시키는데 이용된다.
- 한편 곰팡이 유래 protease는 세균 유래 protease에 비하여 분해하는데 시간이 걸리나 복수의 protease와 peptidase를 생산하므로 보다 작게 절단한다. 따라서 정미성이 높은 조미료 제조를 위해서는 곰팡이 유래 protease와 세균 유래 protease와 같이 기원이 다른 protease를 조합함으로써 각각 특징적인 효소의 병용효과를 얻을 필요가 있다.
- 특히 밀글루텐을 단백질원으로 사용하는 경우 glutamine을 우마미 성분인 glutamic acid으로 변환시키기 위해서는 glutaminase 활성이 우수한 균주가 필수적이다. 상업용 glutaminase는 매우 고가로서 조미용 단백질 가수분해물 생산에는 사용할 수 없다.
- 따라서 다양한 protease 뿐만 아니라 특히 glutaminase 활성이 우수한 *Bacillus subtilis* TP-6의 배양액을 효소원으로 하는 발효시스템을 구축하였으며, 이 때 곰팡이 유래 protease와 병용효과를 얻

기 위하여 Flavourzyme을 동시에 첨가한다. 이와 같은 복합효소 시스템에 의하여 protease와 peptidase에 의하여 glutamine 유리와 동시 곧 바로 glutamic acid로 변환시킴으로서 맛이 없는 pyroglutamic acid로 전환되는 것을 최소화 한다.

- TP-6균주가 생산하는 다양한 protease에 의하여 밀글루텐 및 대두단백질이 충분히 가수분해 되기 위해서는 7일 이상의 장기간 발효, 숙성이 필요하다. 따라서 발효기간을 단축시키는 동시에 발효액 중의 효소에 의한 가수분해력을 증진시키기 위하여 발효액에 100 MPa(1000기압)의 고압을 걸어 주어 24시간의 단기간에 고도 가수분해 조미액을 생산한다.

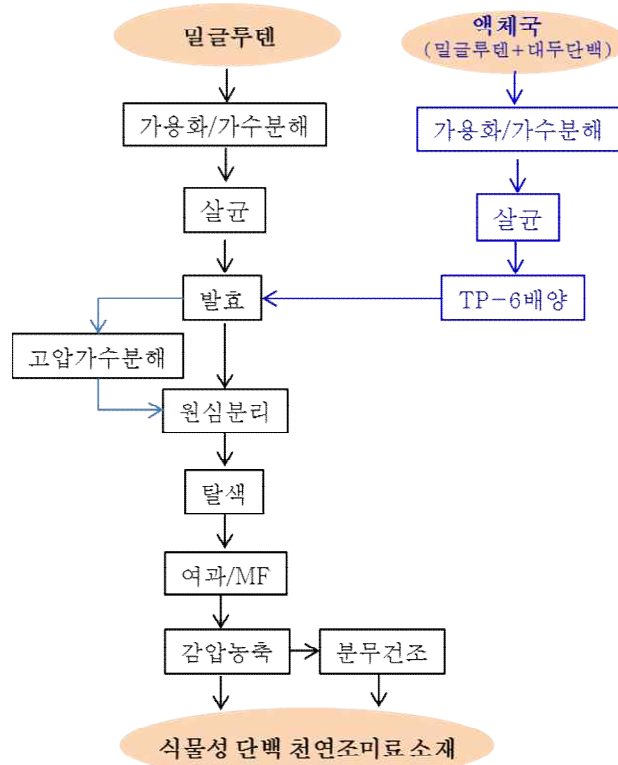


Fig. 3-4-91. 식물성단백 천연조미료 소재생산 최적공정

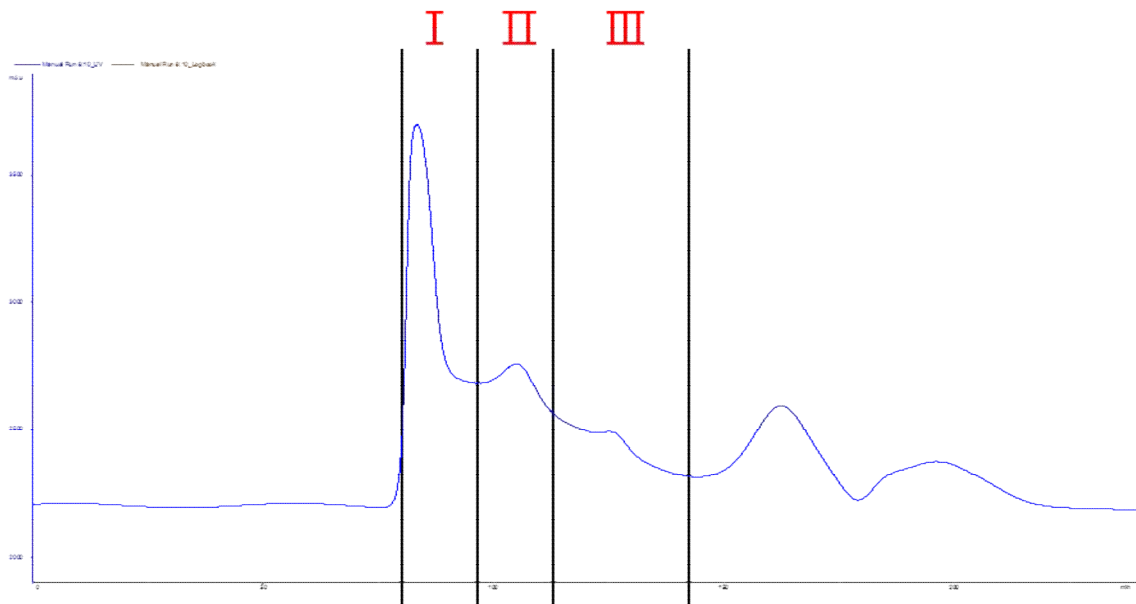
(4) 식물성 단백질 유래 천연조미료 기초소재 시제품 제조 및 품질평가

(가) 천연조미료 기초소재 시제품

- 전술한 조미소재 최적 생산공정에 의하여 분말 형태의 시제품 약 2 kg을 생산하여 GPC를 이용하여 분자량 분포를 확인하였고, 전주대학교(제1협동기관)의 지원하에 염미 증진 효과를 검증하기 위하여 관능평가를 실시하였다.



Fig. 3-4-92. 천연조미료 기초소재 시제품



1300Da < I, 300Da < II < 1300Da, III > 300Da

Sample주입량 : 100ul, Y scale : 1900 ~ 3900, X scale : 0 ~ 240

Fig. 3-4-93 천연조미료 기초소재 시제품의 분자량 분포도

- 천연조미료 기초소재 시제품의 분자량은 유리아미노산의 비율이 매우 적고, 1300 Da 이상의 거대 분자가 대부분을 차지하고 있으나 분자량 300~1300 사이의 올리고 펩타이드 크기의 펩타이드가 일부분을 차지하고 있는 것으로 나타나 많은 가수분해가 일어나지는 않았음을 의미하고 있다.

(나) 천연조미료 기초소재 시제품의 짠맛 증진 효과

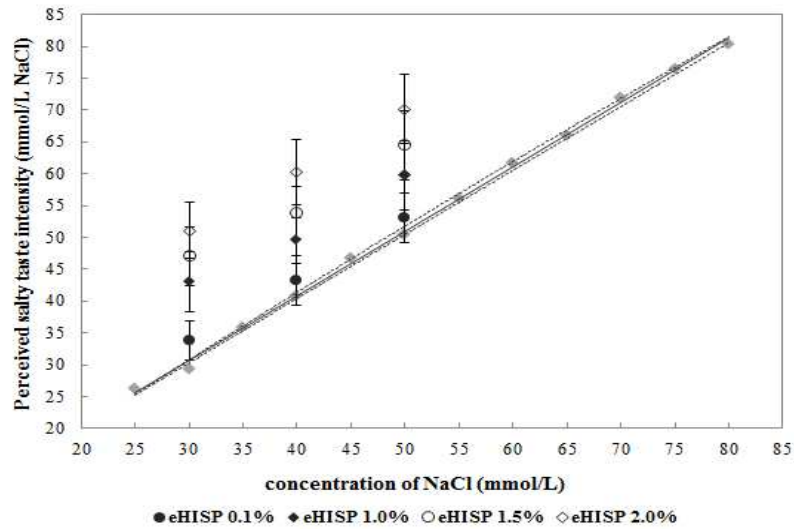


Fig. 3-4-94. 각기 다른 NaCl 농도에서 첨가량에 따른 짠맛증진효과

- 강도평가 결과 30 mmol NaCl 용액에서는 약 15-22%, 40 mmol에서는 약 2-19% 그리고 50 mmol에서는 약 5-39%의 염미 증진효과가 있는 것으로 나타났다.

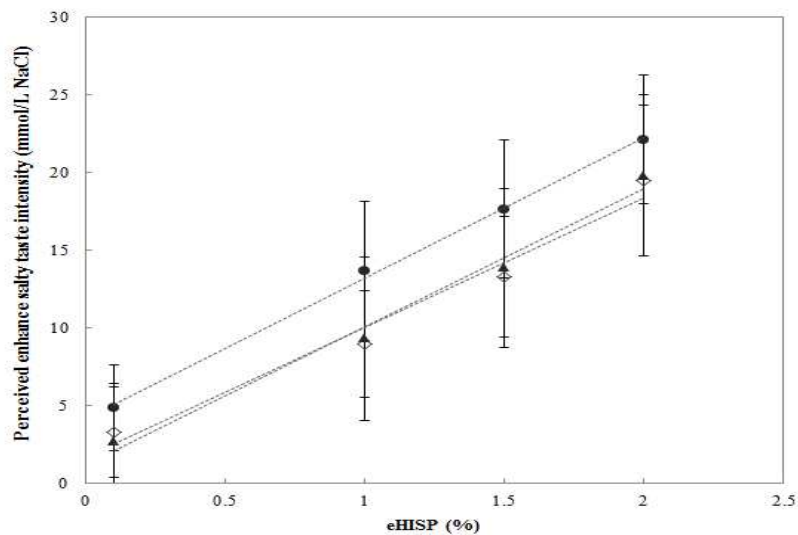


Fig. 3-4-96. 동일한 소금농도에서 첨가량에 따른 짠맛증진효과

- Fig. 3-4-94는 NaCl 기준 30 mmole, 40 mmole, 50 mmole의 평가 농도에서 첨가량에 따른 짠맛증진효과에 대한 결과로 농도에 따른 결정계수는 각각 0.9973, 0.9830, 0.9864로 비교적 높은 값을 나타내어 짠맛을 평가하는데 있어서 신뢰도가 높다고 할 수 있음. 평가 농도에 따른 전반적인 짠맛증진효과를 봤을 때, 첨가량이 증가할수록 짠맛도 비례적으로 증가하는 것으로 나타났다.

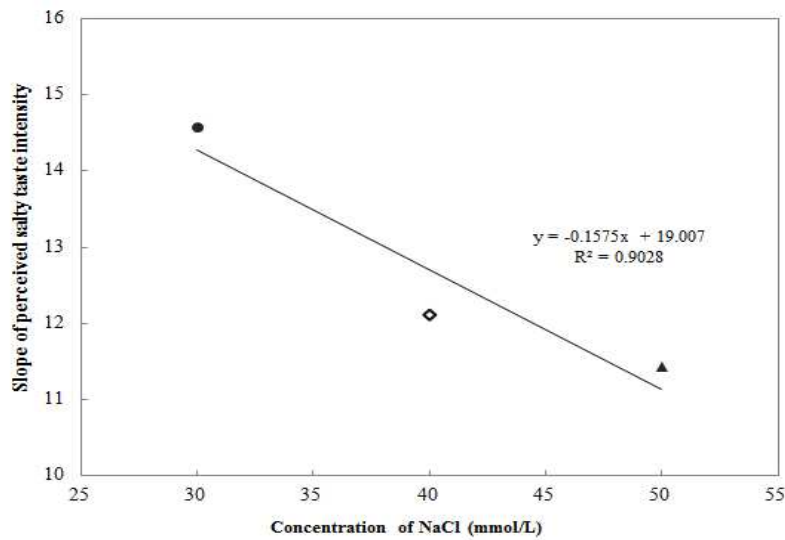


Fig. 3-4-97. 동일한 첨가량에서 NaCl 농도에 따른 짠맛증진효과

- NaCl 농도에 따른 짠맛증진효과를 비교한 결과로 NaCl 농도가 진해질수록 짠맛증진효과가 낮아지는 경향을 보였다. 즉, 낮은 NaCl 농도에서 짠맛증진효과가 더 높게 나타나는 결과를 나타내어 낮은 NaCl 농도에서 eHISP 첨가량이 증가할수록 시료의 짠맛증진 효과에 의해 Na 함량 감소효과가 커질 것으로 생각된다.

(5) 조미 저염간장 시제품의 레시피 개발

(가) 염미증강 소재로서 BioGABA

- GABA는 곡류, 과실류, 야채류 외에 사람의 내와 소화기관까지 널리 존재하는 유리 아미노산으로서 중추신경계에서 억제성 신경전달물질로 작용한다. GABA는 혈압강하 및 정신안정 작용 등 여러 가지 생리활성을 가지고 있어 현재 기능성 소재로서 널리 사용되고 있다.
- 최근 GABA는 혀에 존재하는 미뢰(taste bud) 내에서 GABA receptor와 결합하여 염미의 정보전달에 관여하는 것으로 알려졌다. GABA는 GABAA의 수용체의 ligand이므로 GABAA 수용체가 미뢰에 존재한다는 것을 시사하며 이에 의하여 미각 전달에 어떤 형태로 관여하는 것으로 추측된다.
- 최근의 미각연구에 의하면 염 용액(0.6% NaCl)과 MSG(0.06%) 용액에 각각 GABA(0.0025%)를 첨가한 경우 관능검사원의 50% 이상이 원래의 맛보다 강하게 느끼는 것으로 밝혀졌다. 특히 염미를 증강시키는 효과가 강하여 감염효과가 기대되는 것으로 보고되었다.
- (주)바이오벤은 유산균 발효에 의하여 「BioGABA」 (GABA 함량 15%)를 생산하는 기술을 보유하고 있다. 따라서 본 과제에서 개발한 단백질가수분해물 조미소재에 BioGABA를 배합하여 염미증진

효과를 더욱 증강시키고자 우선적으로 전주대학교(제1협동기관)의 지원하에 BioGABA의 염미 증진 효과를 검증하기 위하여 관능평가를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

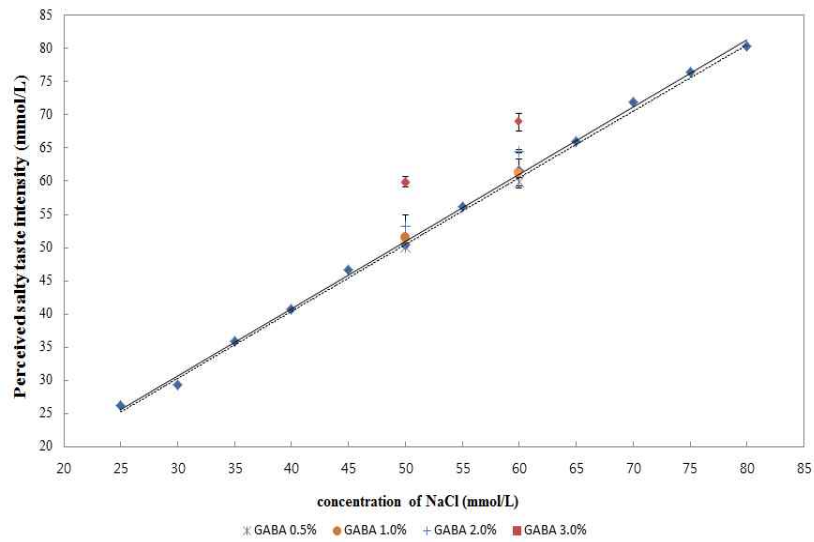


Fig. 3-4-98. 각기 다른 NaCl 농도에서 첨가량에 따른 짠맛증진효과

- GABA의 짠맛 강도평가 실험결과 50 mmol/L NaCl에서 0.5% 첨가구의 경우는 증진효과가 나타나지 않았으며, 1.0% 첨가구는 2%, 2.0% 첨가구에서 약 6%, 3.0% 첨가구에서 약 19%의 증진효과가 있는 것으로 나타났다. 60 mmol/L NaCl 에서는 0.5%, 1.0% 첨가구들에서는 증진효과가 나타나지 않았으며, 2.0% 첨가구에서 약 5%, 3.0%에서 약 12%의 증진효과를 나타내었다. 특이사항으로는 BioGABA가 유산균 발효물인 까닭으로 포함되어 있는 젖산에 의하여 신맛이 강하게 나타나 짠맛을 평가하기 힘들다는 의견이 많아 이의 영향으로 증진효과가 낮게 나타난 것으로 여겨지나, 기호도 평가(data not shown)에서는 이러한 신맛이 오히려 높은 기호도를 나타내었다.

(나) 대두단백 가수분해물과 BioGABA 첨가에 따른 조미간장의 나트륨 저감효과

- 시중에 판매되고 있는 저염간장(Y사)에 대두단백 가수분해물과 BioGABA를 0.1%~0.4% 각각 첨가하여 염미 증진 효과를 검증하였다. 시료로 사용한 저염간장의 나트륨 함량은 3.62%(w/v)로 식염으로 환산하면 9.2%(w/v) 이였고, 대두단백 가수분해물과 BioGABA에 함유된 나트륨 함량은 각각 4.92%와 4.09% 로 정량되었다(1협동 지원). 이를 기초로 하여 관능평가용 시료의 나트륨 함량을 계산하였다.
- 저염간장은 고농도의 식염이 포함되어 매우 짜기 때문에 관능평가에 어려움이 있기 때문에 10배로 희석하여 관능평가를 수행하였고, 비교 시료로는 10배 희석 저염간장에 일정량의 식염을 0.1% 단위로 추가로 첨가하여 제조하였다.
- 10배 희석 저염간장에 이미 염미증진 효과가 확인된 대두단백 가수분해물 1%가 첨가하고,

BioGABA를 0.1%에서 0.4%가 되게 추가로 첨가한 후 관능평가를 통하여 인지된 염미에 해당하는 소금물의 나트륨 함량을 계산하여 Fig. 3-4-99에 나타내었다.

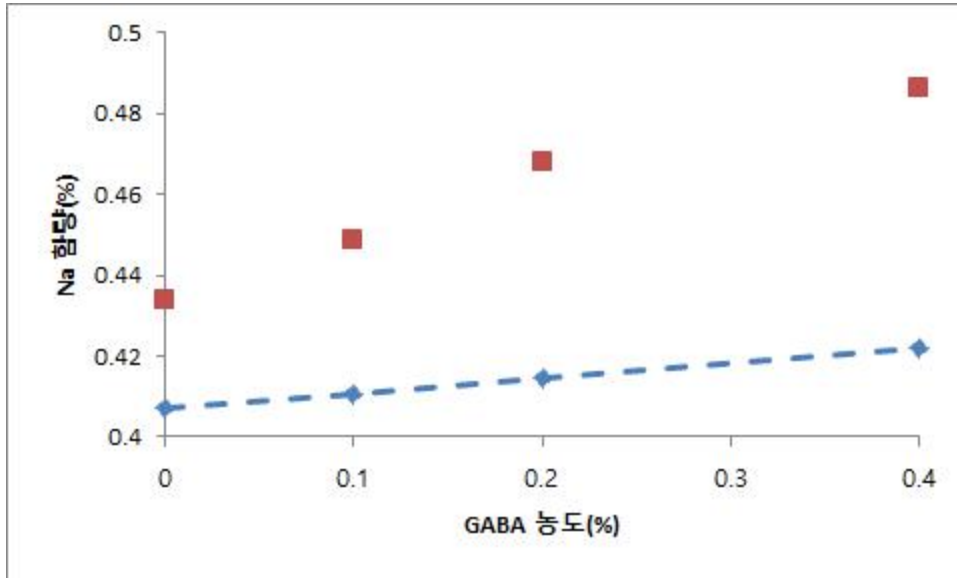


Fig. 3-4-99. 대두단백가수분해물(1%)과 BioGABA가 첨가된 저염간장에서 실제나트륨 농도와 인지된 나트륨 농도 차이(◆ : 실제 농도, ■ : 인지된 농도)

- 10배 희석 저염간장(나트륨 함량 0.362%, NaCl 0.92%)에 1 %의 대두단백가수분해물을 첨가함으로써 시료의 최종 나트륨함량은 0.41%가 된다. 이 시료의 관능평가 결과는 나트륨 함량 0.43%의 간장희석액(희석 저염간장 +식염)의 짠맛을 나타내었다.
- 추가로 첨가된 GABA의 함량이 많아 질수록 염미 증진율도 늘어나는 것을 확인하여 첨가된 GABA 농도에 따른 염미 증진율을 Fig. 3-4-100에 나타내었다.

$$\text{염미증진율}(\%) = \frac{(\text{느낀 소금물의 농도} - \text{실제 소금물의 농도})}{\text{실제 소금물의 농도}} \times 100$$

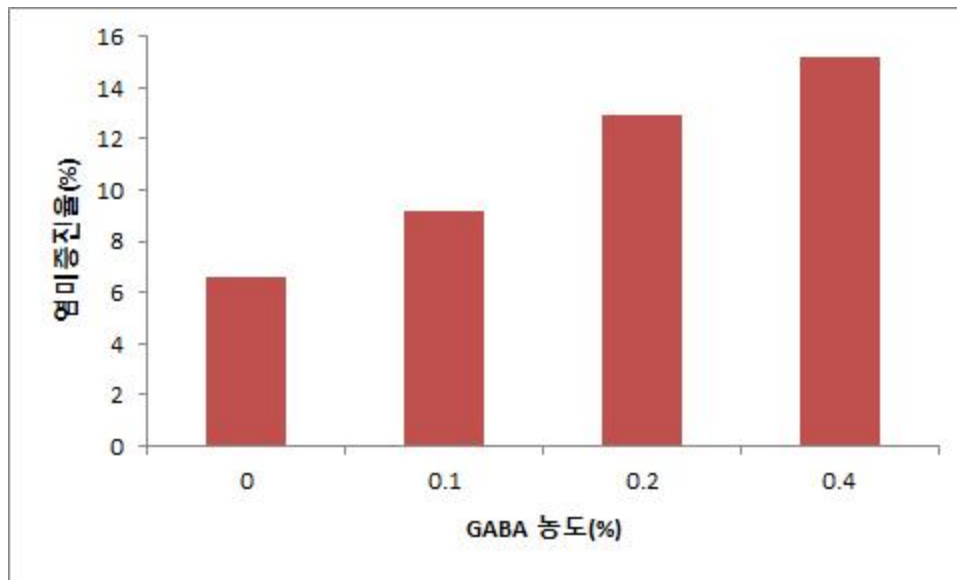


Fig. 3-4-100. 저염간장에서의 BioGABA 농도에 따른 염미증진율

- 1%의 대두단백 가수분해물의 첨가로 6.57%의 염미증진효과가 있었으며, 추가로 첨가된 BioGABA의 농도 증가에 따라 염미증진율이 증가하여 실험범위인 최대 0.4%의 BioGABA 첨가 시에 15.02%의 염미 증진 효과를 나타내어 저 나트륨 간장의 제조에 대두단백 가수분해물과 BioGABA의 혼합 사용이 유리할 것으로 사료된다.

4. 저염 라면스프 시험제품 개발 및 나트륨 저감화 실증시험

가. 저염 라면스프 시험제품 개발

(1) 시판 라면스프 현황

- 일반적으로 라면은 국수를 증기로 쪄 익히고 뜨거운 기름에 튀긴 후 건조시킨 유탕면에 분말스프를 합쳐서 만든 즉석식품을 말한다. 1958년 닛신식품이 최초로 출시한 “치킨라면”은 현재와 같이 스프가 따로 있지 않고 면 자체에 양념이 반죽되어 있는 형태였다.
- 오늘날 우리에게 익숙한 분말스프는 1961년 일본 명성식품이 양념을 건조, 분말화 하여 별도 포장한 분말스프 형태로 라면을 생산하기 시작한데서 비롯되었다. 1962년에는 건면의 등장으로 건면에 어울리는 액상스프가 개발되었다.
- 우리나라에서는 1963년 삼양식품이 일본 묘조식품으로부터 기술을 전수 받아 최초로 삼양라면을 생산하였으며 오늘날에는 농심, 롯데, 오뚜기, 팔도의 4개사가 시장을 점유하고 있다.

- 최근 시장환경의 변화로 기름에 튀긴 유탕면 중심의 라면 시장에 열풍으로 말린 건면, 냉면, 쌀국수 등 웰빙형 제품들이 출시되고 있으며, 넓은 의미에서 이들 제품도 라면이라 할 수 있다. 2014년 통계에 따르면 1인당 연간 라면소비는 우리나라가 73개로 세계에서 1위를 차지하고 있다.
- 스프에는 분말형과 액상형이 있으며 둘 다 사용하는 특수한 경우도 있다. 일반적으로 스프는 라면 맛의 약 60%를 차지하는 것으로 평가되고 있으며 스프의 형태에 따라 라면 맛의 형태도 다르다. 분말스프의 경우 오랫동안 끓여야 하는 국물라면에 어울리는 반면 액상스프는 별다른 제조과정 없이 면과 바로 비벼서 먹을 수 있는 비빔면이나 짜장라면 등에 적당하다. 최근에는 건조기술의 발전으로 파, 고추, 버섯 등의 다양한 건조야채류, 건조육, 절임야채 등을 포장한 별첨 건더기 스프를 동봉하여 국물의 맛을 보완하고 전체적인 영양밸런스를 고려한 것이 많다.



<http://www.nongshim.com>

Fig. 3-4-101. 분말스프 제조과정

Table 3-4-41. 건더기 스프 구성 예시

<진짬봉> <불짬봉> <맛짬봉> <갓짬봉>
(오뚜기) (팔도) (농심) (삼양)



건청경채 건파
건양배추
건목이버섯
건당근
게맛살후레이크



건양배추
청경채
건당근
건홍피망
목이버섯
조미비프후레이크
건오징어



건양배추
건청경채
조미건조홍고추링
건목이버섯
건미역
동결건조오징어



볶음참깨
건양배추
건파 청경채
목이버섯
건다시마 실당근
건미역
동결건조오징어

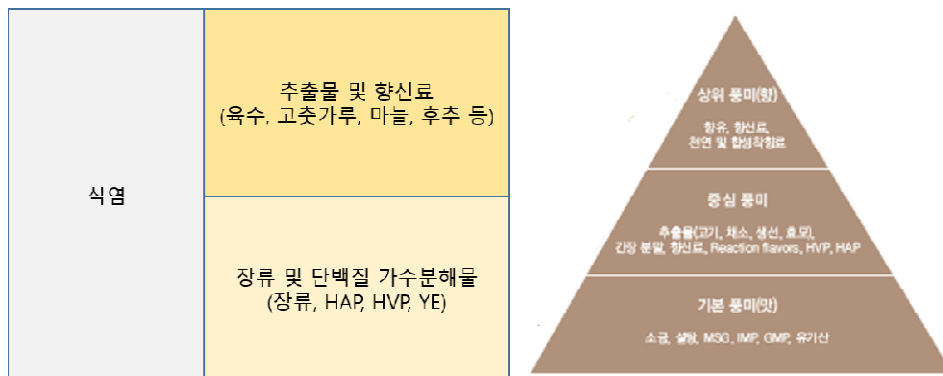


<http://www.nongshim.com>

Fig. 3-4-102. 건더기스프 제조과정

(2) 분말스프 현황

- 분말스프는 Table 3-4-42에 나타난 것과 같아 30여 가지 매우 다양한 성분으로 구성된 복합조미료이다. 그러나 이들은 편의상 소금, 장류와 단백질 가수분해물 및 고기맛을 내기 위한 육수와 향신료 등으로 구분할 수 있다.



(자료: 한국아지노모도 TECHO catalogue)

Fig. 3-4-103. 즉석 라면 분말 스프의 기본 구성

- 라면스프에 고기 맛을 내기 위하여 소 뼈, 돼지 뼈, 닭 뼈 등을 장시간 고아서 만든 추

출물을 농축하고 여기에 조미료 등을 첨가하여 건조분말로 만든 엑스분말을 첨가하며, 그 종류에 따라 쇠고기라면 등의 이름을 붙이기도 한다.

Table 3-4-42. 시판 라면 분말스프의 성분

제품명	회사명	스프 첨가물
신라면	농심	정제염, 소고기맛베이스, 정백당, 육수맛조미베이스, 볶음양념분, 조미소고기분말, 조미아미노산간장분말, 마늘발효조미분, 분말된장, 마늘베이스, 간장분말, 조미양념분, 조미홍고추분말, 후추가루, 리보뉴클레오티드이나트륨, 복합양념분말, 칠리맛풍미분, 돈골조미분말, 매운맛조미분, 호박산이나트륨, 후추풍미분말, 우골마늘조미분, 조미효모분말, 양파풍미분, 발효표고조미분, 분말카라멜, 생강추출물분말, 표고버섯분말, 이스트조미분, 건파, 건정경채, 건표고버섯, 건당근, 건고추
너구리	농심	정제염, 해물채소분말, 혼합지미베이스분말, 조미양념분, 혼합맛분말, 정백당, 볶음양념분, 포도당, 복합조미간장분말, 고춧가루, 조미아미노산간장분말, 멸치조미분, 간장분말, 칠리맛풍미분, 리보뉴클레오티드이나트륨, 마늘베이스, 후추가루, 양파풍미분, 오징어조미분말, 해물베이스2, 호박산이나트륨, 육산조미분, 분말카라멜, 호화옥수수분, 어육수분말, 효모추출물, 해물베이스, 진한맛조미분, 매운양념분말, 건미역, 오징어맛후레이크, 건당근, 건다시마
안성탕면	농심	정제염, 양념조미분말, 정백당, 볶음된장분말, 양념장베이스, 고소한양념분말, 구수한맛분말, 사골우거지베이스, 간장조미분말, 사골추출물분말, 조미된장분말, 전골스파이스분말, 리보뉴클레오티드이나트륨, 건미역, 매운맛분말, 비프본오일분말, 볶음양념분, 육수맛조미베이스, 계란스크램블, 후추가루, 호박산이나트륨, 염장고추분말, 칠리맛풍미분, 복합양념분말, 불고기맛분말, 이스트조미분, 마늘동결건조분말, 분말카라멜, 고추후레이크, 진한맛조미분
오징어짬뽕	농심	정제염, 정백당, 오징어풍미분말, 짬뽕분말, 칠리맛조미분, 볶음양념분, 육수맛조미베이스, 복합조미간장분말, 혼합해물베이스분말, 해물볶음조미분, 리보뉴클레오티드이나트륨, 조미양념분, 마늘베이스, 야채풍미유분말, 짬뽕베이스분말, 오징어조미분말, 육개장조미료, 호박산이나트륨, 후추가루, 매운맛조미분, 육수베이스분말, 생강추출물분말, 분말카라멜, 건양배추, 동결건조오징어, 건당근, 건미역, 건목이버섯
짜파게티	농심	분말짜장, 정백당, 분말카라멜2호, 짜장베이스, 짜장베이스분말, 볶음조미소맥분, 분말카라멜3호, 야채오일분말, 볶음조미옥수수분, 볶음조미감자분, 조미짜장분말, 물엿분말, 육수맛조미베이스, 리보뉴클레오티드이나트륨, 정제염, 대두단백, 건양배추, 튀김감자다이스, 조미건양파, 건당근, 양파풍미유, 짜장풍미유, 혼합올리브유, 양파조미유
생생우동	농심	정제수, 우동베이스, 양조간장, 미림, 가다랑어속성베이스, 아미노산간장, 가쓰오추출물, 포도당, 정제염, 멸치농축액, 다시마추출물, 정백당, 글리신, 표고농축액, 이스트조미분, 리보뉴클레오티드이나트륨, 호박산이나트륨, 별미튀김, 건조맛살, 건미역, 건파, 신미조정제, 구운김후레이크, 조미건조홍고추
진라면	오뚜기	정제염, 정백당, 포도당, 복합양념분말, 숙성마늘, 맛분, 간장분말, 볶음양념분말, 육수맛분말, 마늘농축조미분, 고추맛베이스, 로스팅맛분말, 쇠고기육수분말, 조미육수분말, 참맛양념분말, 발효복합분, 진한감칠맛분, 후추분말, 칠리맛분말, 고춧가루, 감칠맛분말, 참맛버섯양념분말, 버섯야채조미분말, 오뚜기참치간장분말, 감칠맛베이스, 로스팅조미분말, 맛베이스, 향미증진제, 볶음마늘분, 육수맛조미분, 육수추출농축분말, 참맛효모조미분말, 숙성양념분말, 칠리추출물, 구아검, 칠리혼합추출물 산도조정제, 고추농축소스, 조미쇠고기맛후레이크, 건당근, 건조정경채, 건파, 건표고버섯, 건고추잎자.
나가사끼	삼양	정제염, 청양고추시즈닝분말, 돈골농축액분말, 정백당, 짬뽕육수베이스, 쌀가루, 조미맛분, 간장조미분말, 향미증진제, 사골풍미부는 채소풍미유분말, 지미강화육수분말, 굴농축액분말, 볶음짬뽕베이스, 새우 액기스분말, 후추분, 채소풍미유, 짬뽕향미유, 허브내로맛시즈닝, 건양배추, 정경채, 실당근, 동결건조오징어, 건파, 목이버섯, 조미건조홍고추
진짬뽕	오뚜기	정제수, 짬뽕양념농축액, 해물양념소스, 혼합농축분말, 오징어액기스, 닭육수농축액, 혼합농축액, 사골액기스, 미더덕액기스, 짬뽕향미유, 오징어양념분말, 마늘, 양파, 감칠맛베이스, 진한감칠맛분, 고춧가루, 해물찌게브로스, 조미육수분말, 고추맛추출기름, 조미채증유, 백설탕, 향미증진제, 워풍미소스, 텍스트린, 칠리추출물, 영양강화제, 건정경채, 건양배추, 오징어조미후레이크, 건당근, 계맛살조미후레이크, 건파, 건미역, 건목이버섯

<시판라면 포장지 표기 내용 기준>

- 시중에 판매되고 있는 봉지라면 제품 중의 상위 12개 제품의 나트륨 함량은 Table 3-4-43에 나타내었다. 나트륨의 함량은 전체 평균 1,729 mg/봉지로 나타났다. 그러나 라면 제품의 특성상 국물의 섭취량에 영향을 많이 받기 때문에 나트륨의 실제 섭취량은 달라 질 수 있다.
- Kim 등(Korean J. Community Nutr. 18: 365-371. 2013)의 연구 결과, 라면의 나트륨이 조리 전에는 면에 20%, 스프에 80% 존재하는 것으로 추정하였으나, 조리 후 면에 51%, 국물에 49% 있는 것으로 조사되었다.
- 박유미(중앙대학교 의약식품대학원 석사논문, 2014)의 연구에 의하면 총 나트륨 함량의 20%인 345 mg 면과 국물 1/3을 함께 섭취 하였을 때는 총 나트륨 함량의 47%인 790 mg, 면과 국물 1/2을 함께 섭취하였을 때는 총 나트륨 함량의 60%인 1,012 mg, 면과 국물 2/3를 함께 섭취하였을 때는 총 나트륨함량의 74%인 1,235 mg, 면과 국물을 모두 섭취하였을 때는 총 나트륨함량 1,680 mg을 모두를 섭취하는 것으로 조사되었다.

- 또한 박(2014)은 식약처에서 정한 나트륨의 일일섭취권장량 2,000 mg/day를 사용하여 건강에 유해한 영향이 나타나지 않는 제품의 일일 섭취량을 산출한 결과 평균 141.5 g/day로 나타났다. 라면 1회 제공량 120g을 기준으로 한다면 라면을 하루에 1개 정도 섭취하면 일일섭취권장량의 기준치를 초과하지 않는 것으로 나타났다.

Table 3-4-43. 시판 라면의 나트륨 함량

순위	업체	브랜드명	나트륨 함량(mg)
1	삼양라면	삼양라면	1840
2	농심	신라면	1790
3	오뚜기	진라면	1860
4	팔도	꼬꼬면	1810
5	농심	안성탕면	1790
6	오뚜기	참깨라면	1790
7	팔도	뜸새라면	1780
8	농심	오징어 짬뽕	1780
9	오뚜기	스낵면	1730
10	농심	무파마	1720
11	농심	너구리	1700
12	삼양	나가사끼	1670

(한국소비자보호원, 세계인스턴트라면 협회)

- 최근 식품제조가공업체 등은 최근 라면 등 면류의 나트륨 함량을 자율적으로 저감화하기 위하여 지속적으로 노력하고 있다.
- 농심의 저감화 실적을 살펴보면 대표적인 라면 신라면의 나트륨 함량은 2007년까지 2,100 mg이었지만 현재 나트륨을 1790 mg까지 감소시켰으며, 최종적으로 1,650 mg 이하까지 감소시킬 계획을 가지고 있다.
- 또한 오뚜기도 나트륨 줄이기에 동참하여 진라면은 1,860 mg, 스낵면은 1,730 mg으로 감소시켰으며, 라면제품 뒷면에 면만 섭취할 경우, 절반 정도 섭취할 경우, 국물까지 모두 섭취할 경우 등으로 나눠 나트륨 섭취량을 표기하고 있다.

(3) 염미증진 식물성 단백질 가수해물 베이스 소재 개발

(가) 염미증진 단백질 가수분해물 베이스소재 개발

- 염미 증진 관능시험을 위한 베이스소재 시제품은 그림에 나타낸 process-2공정을 기준으

로 제조하였다. 가수분해액을 8,000xg에서 20분간 원심분리한 후 UF (Millipore, Pro Flux M60) 처리하여 5 kDa 이상의 peptide는 cut off하였다. UF한 여과액은 60°C에서 감압농축한 후 동결건조 (일신바이오베이스 PVTF 20R) 하였다.

- 밀글루텐 가수분해물은 FEN-G (fermentation and enzyme hydrolyzated wheat gluten) 및 분리대두단백질 가수분해물은 FEN-S(fermentation and enzyme hydrolyzated soybean protein isolate) 라 명명하였으며 일반분석값은 표 와 같다. Formol법으로 측정 한 가수분해도는 42.9-48.1%, 아미노산 유리율은 29.4-32.8%, NaCl 함량은 10.7-11.5%였다. FN/TN의 값은 단백질의 분해율의 지표로 사용하는 값으로 천연양조 장유에서는 50-55%이다.

Table 3-4-44 식물성 단백질 가수분해물 염미증진소재 표준분석값

시제품	수분함량 (%)	FN/TN (%)	전질소 (%)	아미노산 유리율 (%)	NaCl 함량 (%)
밀글루텐 가수분해물 (FEN-G)	4.68	42.9	15.6	29.4	10.7
분리대두단백질 가수분해물 (FEN-S)	5.61	48.1	12.0	32.8	11.5



- 각 가수분해물 시료의 분자량 분포를 Fig.3-4-104 에서 살펴보면 분자량 189-1,422 Da의 저분자 peptide가 주성분을 이루고 있음을 알 수 있으며, 1,422-6,512 Da 범위의 peptide는 FEN-G가 약간 많은 것으로 판단되었다.

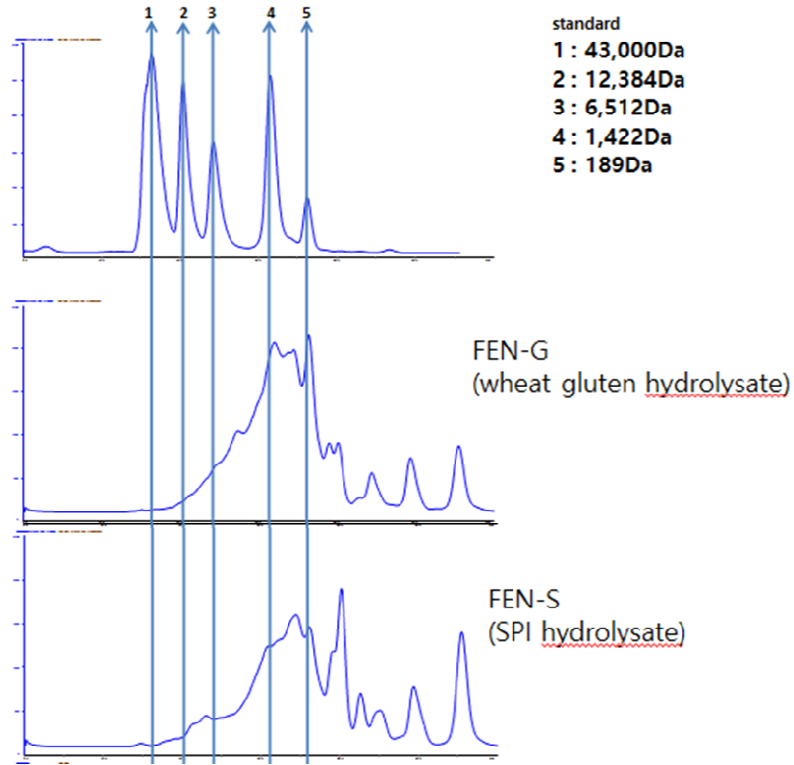


Fig. 3-4-104 식물성 단백질 가수분해물 염미증진소재 분자량 분포도

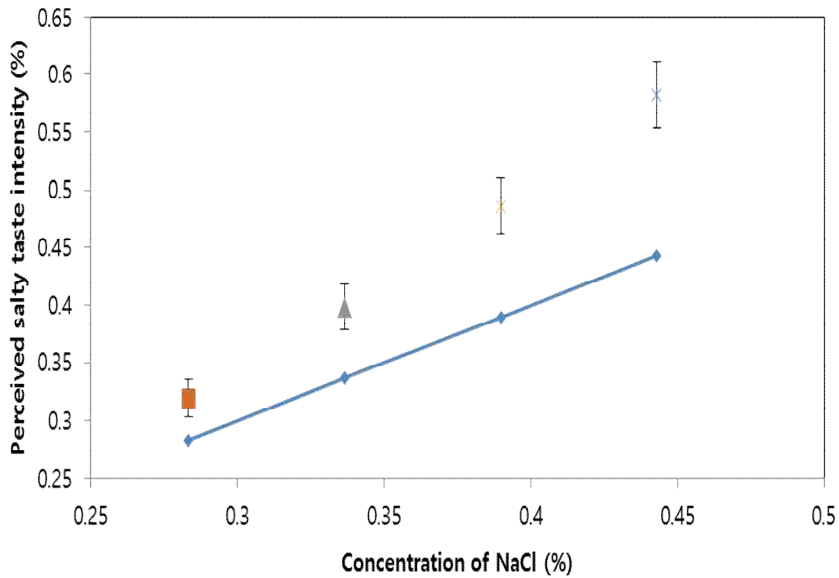
- 또한 각 가수분해물의 아미노산 조성은 Table 3-4-45에 나타내었다. 총 아미노산이 총 고형분의 75-89%를 차지하여 거의 대부분이 단백질 가수분해물로 구성되어 있음을 알 수 있다. 유리아미노산 함량은 29.5-32.8%였다.
- 아미노산은 천연으로 존재하는 것은 대부분 L-체이므로 그 수용액의 맛은 산성 아미노산 염류와 같은 맛을 나타내며, proline, glycine, alanine은 감미를 나타내나 다른 중성 아미노산, 염기성 아미노산의 대부분은 고미를 나타낸다. 한편 D-체는 일반적으로 감미를 나타낸다. 산성아미노산 자신은 H⁺이온의 영향으로 약한 산미를 나타낸다.

Table 3-4-45 식물성 단백질 가수분해물 염미증진소재 아미노산 조성

Amino acid (mg/L)	FEN-G (WG HVP)				FEN-S (SPI HVP)			
	Total (mg/L)	Free (mg/L)	Total (% w/w)	Free (% w/w)	Total (mg/L)	Free (mg/L)	Total (% w/w)	Free (% w/w)
Aspartic acid	2146.95	473.51	2.862603	0.631347	7386.07	874.29	8.206746	0.971437
Glutamic acid	28887.40	3670.84	38.51654	4.894458	16936.06	3068.49	18.81784	3.409433
Asparagine	n.a.	331.65	n.a.	0.442198	n.a.	849.71	n.a.	0.944121
Serine	1445.27	302.41	1.927024	0.403216	1785.98	372.01	1.984426	0.413346
Glutamine	n.a.	2685.68	n.a.	3.580909	n.a.	549.12	n.a.	0.610137
Histidine	1562.09	739.34	2.082782	0.985792	1765.34	1107.31	1.961491	1.23034
Glycine	2474.97	674.28	3.299955	0.899038	3119.25	936.06	3.465839	1.040069
Threonine	1624.91	1136.72	2.166551	1.51563	2563.53	1560.24	2.848364	1.733598
Arginine	932.97	131.48	1.243961	0.175302	2742.53	681.48	3.047254	0.757205
Alanine	1974.94	1323.65	2.633254	1.764862	3306.07	2194.10	3.673411	2.437892
Tyrosine	750.30	175.49	1.000401	0.233987	1270.58	938.20	1.411758	1.042447
Valine	2931.55	1870.91	3.908737	2.494547	3860.83	2607.71	4.289813	2.89746
Methionine	663.66	585.40	0.884881	0.780527	826.70	640.18	0.918554	0.711312
Phenylalanine	2810.29	878.91	3.747047	1.17188	3155.77	2314.06	3.506406	2.57118
Isoleucine	2691.3253	1737.1386	3.588434	2.316185	3810.6868	2639.939	4.234096	2.933266
Leucine	4539.685	3383.116	6.052913	4.510821	5318.7508	4302.857	5.909723	4.780952
Lysine	1254.6477	735.8603	1.672864	0.981147	5191.7604	3038.019	5.788623	3.375576
Proline	9710.8638	1177.9907	12.94782	1.570654	4278.3886	746.2638	4.753765	0.829182
Cystine	387.6671	101.8273	0.516889	0.13577	409.1247	103.1191	0.454583	0.114577
Total	66789.49	22116.2	89.05266	29.48827	67727.42	29523.16	75.25269	32.80353

(나) 식염에 대한 FEN-G의 염미 증진 효과

- 식염 농도와 미각과의 관계는 0.05% 식염수에 대해서는 순수한 물에 비하여 용질이 녹아 있는 것으로 감지는 되나 염미는 느끼지 못한다. 0.1~0.15%의 범위에서 비로소 식염의 맛이 판별되며 식염농도 0.6% 이상 6.6% 전후의 식염용액이 나타내는 맛이 가장 대표적인 염미이다. 일반적으로 식품 중 식염 함량은 0.5~1.2%가 적정량인 것으로 알려져 있다.
- 우선적으로 훈련된 12명의 관능평가원에 의하여 개발한 염미증진 베이스 소재인 FEN-G의 염미증진 효과를 평가하였다. 0.23%의 식염용액에 FEN-G를 각각 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0% 첨가하고 염미강도를 평가하게 하였다. FEN-G에는 10.7%의 식염이 함유되어 있으므로 FEN-G에서 유래되는 식염농도를 고려하여 그에 대응되는 관능적인 염미강도를 Fig. 3-4-105에 나타내었다.
- 실제 식염농도 0.28%일 때 관능적 식염농도는 0.32, 실제 염도 0.44% 일 때 관능염도는 0.58%로 평가되어 FEN-G의 첨가량이 0.5%에서 2.0%로 증가함에 따라 염미증진율은 12.8%에서 31.3%로 증가하였다. 이와 같이 FEN-G의 첨가량이 증가 할수록 염미증진율이 현저히 증가하는 것은 염미증진 기능을 가진 active ingredient 즉, 저분자 펩타이드 농도가 증가하기 때문인 것을 판단된다.



■ FEN-G 0.5%; ▲ FEN-G 1.0%; × FEN-G 1.5%; ⌘ FEN-G 2.0%

Fig. 3-4-105 식염농도에 따른 FEN-G의 염미증진 효과

(4) 저염 라면스프 시험제품 개발

- 상술한 것과 같이 라면 스프에는 대표적으로 액상과 분말상이 있으며 맛은 매우 다양하지만 우리나라 사람의 기호를 고려하여 약간 매운 맛의 분말 라면스프를 개발대상으로 선정하였다.
- 라면스프는 Table 3-4-42에 나타난 것과 같이 30여 가지 재료로 구성되어 있으므로 자체 개발하는 데는 한계가 있으므로 스프개발 전문기업인 「지보단 코리아」에 의뢰하여 저염 라면스프 시험제품을 개발하였다 「지보단 코리아」는 20여년의 역사 (1994년 설립)를 가진 향신료, 조미료 전문업체로서 국내 라면업계에 다양한 스프를 개발 보급하고 있다.
- 저염 라면스프 시험제품의 나트륨함량은 ion chromatography (ICS-900, Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 정량하였으며, 이를 NaCl로 환산한 결과 18.5% 였다 (동 라면스프 시험제품의 정상적인 식염농도는 약 50%).



Fig. 3-4-107. 지보단 코리아 개발 저염 라면스프 시험제품

(가) 라면스프에 대한 나트륨 저감화 실증시험

① 라면스프 시험제품에 대한 나트륨 저감화 실증시험

- 전술한 순수한 식염에 대한 FEN-G의 염미증진 효과 평가에서와 동일 방법으로 저염 라면스프 시험제품에 FEN-G를 0.25-2% 첨가하고 염미증진 효과를 평가하였다 (Fig. 3-4-108).
- 일반적으로 라면 1봉지에 동봉되는 라면스프는 평균 10g이며 끓일 때 물 550 mL을 붓는다. 즉, 라면스프의 농도는 약 2%이므로 저염 라면스프 시험제품 2% 용액을 조제하였다. 그리고 전체 식염농도가 적정범위 (0.5~1.2%)가 되도록 라면스프 시험제품 2%용액에 식염을 0.2% 추가로 첨가하고 여기에 FEN-G를 각각 0.25-2.0% 첨가하여 염미강도를 평가하였다.
- Fig. 3-4-108에서 실제 염농도 0.59% (FEN-G 0.25%)일 때 관능 염도는 0.67%, 실제 염농도 0.68% (FEN-G 1.0%)일 때 관능 염농도 0.90%, 실제 염농도 0.78 (FEN-G 2.0%)일 때 관능 염농도 1.13%으로 각각 평가되어 염미증진 효과가 매우 우수하였다. FEN-G의 첨가량이 0.25%에서 2.0%로 증가됨에 따라 염미 증진율은 13.0%에서 44.2%까지 증가하였다. 이를 나트륨 저감율로 나타내면 11.4%에서 30.7%로 증가하여 나트륨 농도를 11~30% 감소시킬 수 있음을 알 수 있다.
- 여기서,

$$\text{증진율 (\%)} = \frac{\text{관능 식염농도} - \text{실제 식염농도}}{\text{실제 식염농도}} \times 100$$

$$\text{저감율 (\%)} = \frac{\text{관능 식염농도} - \text{실제 식염농도}}{\text{관능 식염농도}} \times 100$$

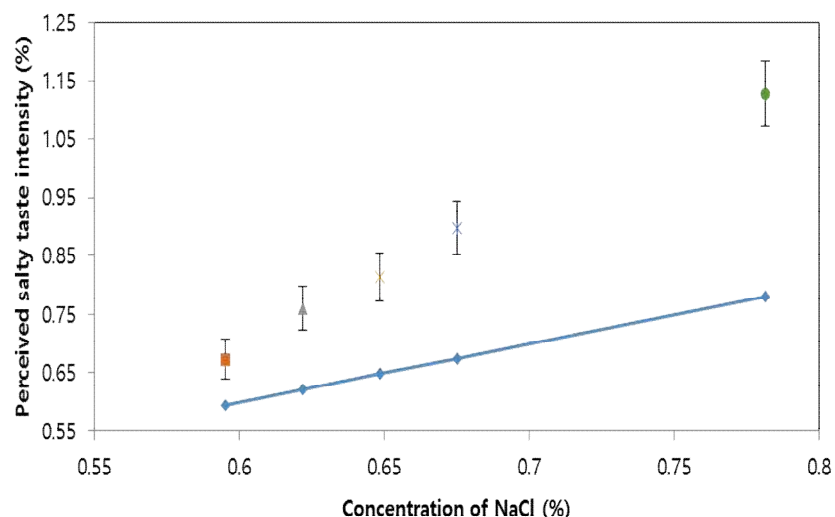


Fig. 3-4-108 저염 라면스프 시험제품에서 FEN-G의 염미증진 효과(■: FEN-G 0.25%, ▲: FEN-G 0.5%, ×: FEN-G 0.75%, ✖: FEN-G 1.0%, ○: FEN-G 2.0%)

② 시판 라면스프에 대한 나트륨 저감화 실증시험

- 저염 라면스프 시험제품은 메운 맛 스프이므로 시판 라면 중에서 순한 맛인 진라면을 대조군으로 선정하여 나트륨 저감화 실증시험을 동일 방법으로 수행하였다.
- 그림 에서 실제 염농도 1.35% (FEN-G 0.25%) 일 때 관능 염도는 1.82%, 실제 염농도 1.43% (FEN-G 1.0%)일 때 관능 염농도 2.05%, 실제 염농도 1.54 (FEN-G 2.0%)일 때 관능 염농도 2.48%로 각각 평가되어 염미증진 효과는 시험제품 보다 우수하였다. FEN-G의 첨가량이 0.25%에서 2.0%로 증가됨에 따라 염미 증진율은 34.8%에서 61.9% 까지 현저하게 증가하였다. 이를 나트륨 저감율로 나타내면 25.0%에서 38.3%까지 증가하여 FEN-G의 첨가로 나트륨 섭취량을 25~38% 정도 감소시킬 수 있음을 알 수 있다.
- 한편 진라면 스프 중의 식염농도를 분석한 결과 1.32%이므로 이를 전기투석장치로 0.38% 까지 탈염하고 여기에 다시 식염0.2% 및 FEN-G를 1.0% 첨가하여 염미증진율을 평가한 결과 실제 식염농도 0.34%, 관능 식염농도 0.42%로 평가되어 염미증진율은 22.3%였다. 탈염하지 않은 경우의 염미증진율 43.9%에 비하여 현저히 낮은데 이는 탈염하지 않은 진라면 스프의 실제 염농도가 1.42%로 탈염 스프의 3배인 점을 고려하면 식염농도의 차이 및 탈염과정에서 다른 성분의 일부 손실 등에 기인하는 것으로 판단된다. 그러나 FEN-G의 시판 라면스프에 대한 나트륨 저감효과는 스프 중의 식염함량에 따라 차이는

있으나 매우 우수하다는 것을 알 수 있다.

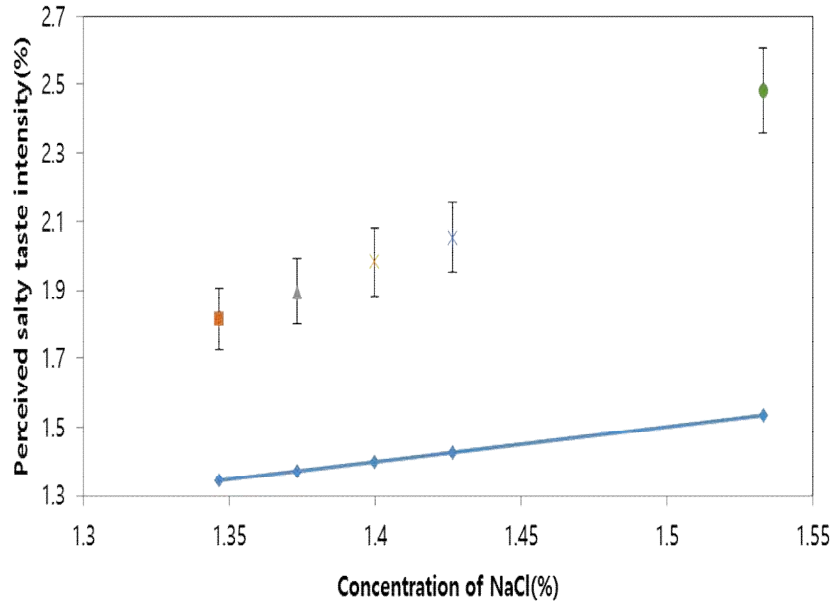


Fig. 3-4-109. 진라면 스프에서 FEN-G의 염미증진 효과(■: FEN-G 0.25%, ▲: FEN-G 0.5%, ×: FEN-G 0.75%, ✱: FEN-G 1.0%, ○: FEN-G 2.0%)

③ 라면스프에 대한 나트륨 저감 효과분석

- 이상의 결과를 종합하면 밀글루텐 가수분해물인 FEN-G를 각 시험시료에 첨가량을 0.25%에서 2.0%로 증가시켰을 때 순수한 식염용액(실제 염농도 0.27~0.45%)에서는 염미증진율이 12.8%에서 31.5%로 증가하였으며, 저염 라면스프 시험제품 (실제 염농도 0.59~1.13%)에서는 염미증진율이 13.0%에서 44.2% (나트륨 저감율 11.4~30.7%), 시판 진라면 스프(실제 염농도 1.35~1.54%)에 대해서는 염미증진율이 34.8%에서 61.9% (나트륨 저감율 25.0~38.5%)로 증가하여 FEN-G의 염미증강 효과가 매우 우수하다는 것이 입증되었다.
- FEN-G의 염미증진 효과는 순수한 식염에서 보다 실제 라면스프에서 그 효과가 뚜렷하였는데 이는 스프 중의 성분들이 시너지 효과를 나타내기 때문인 것으로 추정된다.

④ 저염 라면스프에 대한 소비자의 기호도 조사

- 저염소재 무첨가군(대조군)과 첨가군과의 기호도 평가에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p < 0.05$). 이는 라면스프는 포함된 다양한 조미 성분들에 의하여 강한 맛과 향을 가지고 있어 저염소재의 첨가로 맛과 향이 거의 변화하지 않았음을 의미하며, 일부 의견

으로 맛의 순화, 부드러움 등이 있었다.

나. 대량생산을 위한 pilot type scale-up 연구

(1) 발효-효소가수분해 융합공정 확립

- 종래 단백질 가수분해물 조미료 생산공정의 결점을 해결하기 위하여 glutaminase 활성이 우수한 균주(*B. subtilis* TP-6)의 전배양액을 효소원으로 밀글루텐 현탁액과 혼합하고 여기에 가수분해를 촉진하기 위하여 endo/exo 형 효소제를 첨가하여 발효초기에는 TP-6 유래의 전배양액 중의 효소와 외부에서 첨가한 효소에 의하여 가수분해가 진행되고 외부에서 첨가한 효소의 활성이 저하되는 발효 후기에는 TP-6균주가 증식하면서 생산하는 효소에 의하여 지속적으로 가수분해가 진행되게 하여 단시간에 저분자 펩타이드를 고농도로 생산할 수 있는 발효-효소가수분해 융합공정을 확립하고자 한다.
- 전술한 플라스크 배양에 의한 실험실적 연구결과를 종합하여 최종적으로 밀글루텐 가수분해 일괄공정을 확립하기 위하여 단백질 기질의 전처리, 발효 및 초고압 효소분해 등의 단위공정을 조합하여 6개의 복합공정을 구성하고 각 복합공정을 춘천 생물산업진흥원에서 pilot scale로 비교분석하였다.
- Process-1은 기본공정으로 산처리 대신 1차로 밀글루텐을 1% Alcalase로 가용화시킨 다음 살균하고 *Bacillus subtilis* TP-6로 96시간 발효시킨 발효액을 최종적으로 100MPa, 37°C에서 초고압 처리하는 공정으로 구성되어 있다.
- Process-2는 Process-1의 TP-6 발효를 촉진하고 가수분해도를 향상시키기 위하여 발효공정에 Flavourzyme를 첨가하여 *Bacillus*속 및 *Aspergillus*속 유래의 다양한 protease로 발효-효소 가수분해가 동시에 이루어지게 하였다.
- Process-3은 발효숙성 시간을 단축시키기 위한 초고압처리 대신에 Flavourzyme을 추가로 첨가하고 4일 발효한 공정이다. 다음 Process 4-6은 *Bacillus*속 및 *Aspergillus*속 유래의 다양한 protease의 특성을 보다 효과적으로 이용하기 위하여 특히 Flavourzyme의 첨가시기 및 첨가량을 달리하여 Process-2와 가수분해도를 비교분석 함으로서 최종적으로 공정을 확립하고자 하였다.

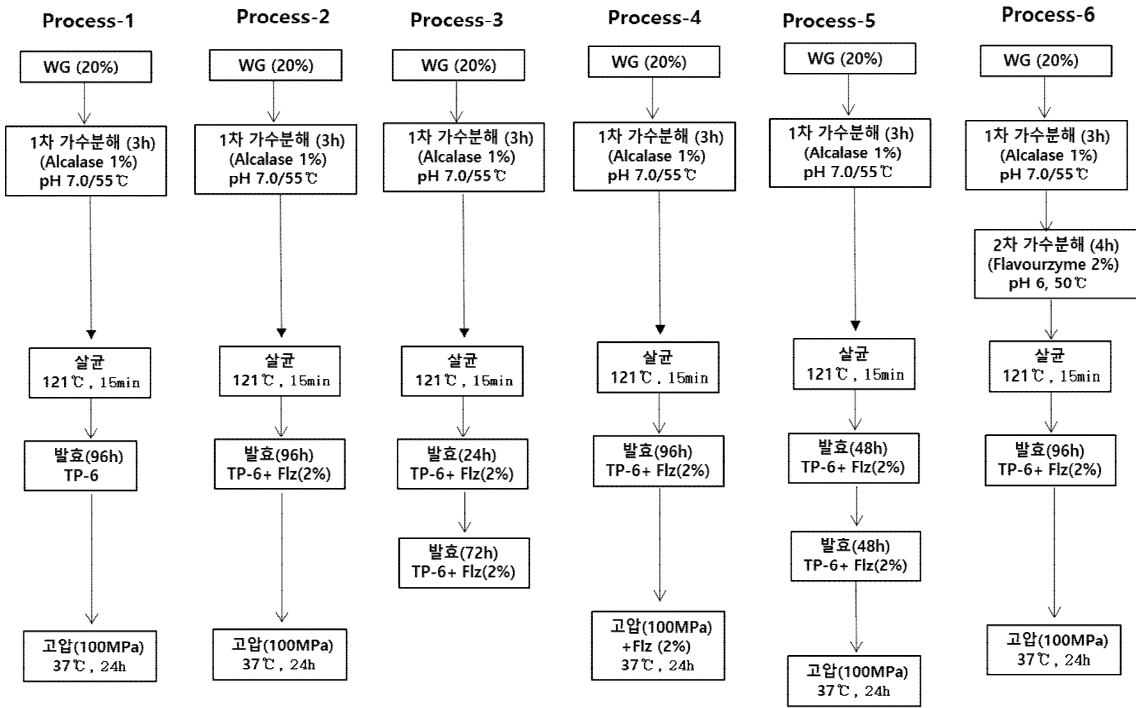


Fig. 3-4-110. 식물성 단백질 가수분해물 생산을 위한 복합공정의 조합

- 단백질원으로 밀글루텐 (WG)을 사용했을 때 각 공정별 가수분해도를 표에 나타내었다. TP-6를 단독배양한 Porcess-1의 경우 발효 후 가수분해도(DH)는 15.2%에 지나지 않으나 Flavourzyme을 첨가하여 발효와 효소가수분해가 동시에 일어나게 한 Porcess-2의 경우 DH는 38.5%로 현저히 증가하였다. 또한 이 발효액을 100 MPa의 초고압 조건에서 24시간 처리한 결과 DH는 42%로 증가하였다.
- 다른 공정에서도 고압처리 전후의 DH차를 살펴보면 고압처리에 의하여 DH를 4-6% 증가시킬 수 있음을 알 수 있다. 초고압 조건에서 효소반응이 촉진되는 이유는 기질과 효소의 회합도가 증가하고 압력에 의하여 효소의 입체구조가 변형되어 활성이 증가하기 때문인 것으로 추정되고 있다.
- 초고압 처리 대신에 Flavourzyme을 발효 24시간 후에 추가로 첨가한 Porcess-3의 경우 DH는 40.8%로 Porcess-2보다 DH가 낮았다. 또한 Porcess-4는 초고압 처리효율을 높이기 위하여 고압처리 단계에 추가로 Flavourzyme를 첨가한 공정으로 추가 첨가하지 않은 경우와 차이가 없었다.
- 한편 Porcess-3 동일하나 발효액을 고압처리 한 Porcess-5의 경우 DH는 46.7%로 가장 우수하였다. 그러나 전처리 단계에서 Alcalase처리 이후에 Flavourzyme 처리를 추가한 Porcess-6의 경우 DH는 Porcess-2와 동일하였다.
- 단백질원으로 분리대두단백질 (SPI)을 사용하여 동일 방법으로 각 공정에서 달성될 수 있는 DH를

측정하였다. 모든 공정에서 SPI는 WG 보다 DH가 3-8% 높았으나 전체적인 경향은 WG와 동일하였다.

- 이상의 결과를 종합할 때 최적공정은 Process-5임을 알 수 있다. 그러나 및 Process-5는 Precoss-2의 발효공정에서 추가로 Flavourzyme을 첨가하는 것이므로 Precoss-2 동일공정으로 볼 수 있다. 따라서 최종적으로 Process-2를 최적공정으로 선정하였다. 그러나 발효공정에서 Flavourzyme을 추가 첨가하지 않고 Process-5와 동일한 DH를 얻을 수 있도록 공정변수를 최적화할 필요가 있다.

Table 3-4-46. 그림 의 각 공정의 가수분해도

Process	Degree of hydrolysis (%)			
	Wheat gluten (20%)		Soy bean isolate (20%)	
	Before HPP	After HPP	Before HPP	After HPP
P-1	15.2	17.2	9.7	18.5
P-2	38.5	42.0	43.8	47.6
P-3	40.8		41.8	
P-4	36.2	40.8	44.7	46.7
P-5	40.8	46.7	45.7	49.6
P-6	39.7	42.0	47.6	48.6

(2) *B. subtilis* TP-6 전배양

(가) 전배양 배지

- TP-6 전배양을 효소원으로서 이용하기 위해서는 전배양 과정에서 균체생육도 중요하지만 protease 특히 glutaminase생산을 최대화 할 수 있는 배지 조성, 배양조건 등을 최적화 할 필요가 있다.
- 전술한 연구에서는 TP-6의 전배양 배지로 nutrient broth를 사용하였다. 그러나 대량생산을 위해서 선행연구를 통하여 선정한 탈지대두박 배지를 process-2의 산업용 생산배지로 활용하고자 nutrient broth와 비교하였다. 선행연구를 통하여 탈지대두박 농도를 1~10% 범위에서 검토한 결과 최적농도는 1%였으므로 탈지대두박 1% 현탁액에 탄소원으로 glucose 1%, 질소원으로 yeast extract 1%를 첨가하였다.
- 각 배지에 TP-6를 24시간 배양한 전배양한 배양액과 밀글루텐을 1:1로 혼합하고 발효하면서 발효 시간에 따른 DH를 분석한 결과 발효 후기로 갈수록 탈지대두박 배지의 가수분해도가 우수하였다 (Table 3-4-47).

Table 3-4-47. TP-6 전배양 배지조성이 가수분해도에 미치는 영향

공정	NB 배지 (glucose 1%)	탈지대두 배지 (glucose 1%, YE 1%)
밀글루텐 (20 g/L)		
Acalase (1%) → 효소 가용화 (pH 7.0, 55°C, 3h)	7.0	7.0
TP-6 culture broth → 발효효소가수분해 Flavourzyme (2%) → pH 7.0, 37°C, 24h	14.0	16.3
• 48 h	23.3	23.3
• 72h	28.0	30.3
• 96h	28.0	38.5
초고압가수분해 100MPa, 37°C, 24h	35.0	42.0

(나) *B. subtilis* TP-6 전배양 시간

- 다음 단계로 Process-2의 효율을 더욱 향상시키기 위하여 면밀히 검토하여야 할 또 하나의 공정변수는 전배양시간이다. 전배양액을 효소원으로 사용하기 위해서는 증식기, 정지기, 사멸기 등의 배양시기 중에서 protease활성이 가장 높은 시기에 전배양액으로 사용하는 것이 바람직하다. 특히 glutaminase 활성을 최대화하여 단백질 기질과 전배양액을 혼합함으로써 발효초기 단백질 가수분해는 전배양액 중의 TP-6가 분비한 효소와 외부에서 첨가한 Flavourzyme에 의하여 가수분해가 일어나고 발효 후기에는 증식된 TP-6가 생산하는 효소에 의하여 가수분해가 진행되게 함으로서 전발효기간 동안에 지속적으로 가수분해를 효과적으로 진행시킬 수 있다.
- 이와 같은 시나리오를 실증하기 위하여 TP-6 전배양액의 배양시간에 따른 효소활성을 예비 검토한 결과 균체 증식은 24시간, 효소활성은 96시간에 최대를 나타내었다. 따라서 TP-6의 24시간 및 96시간 배양액을 각각 밀글루텐 현탁액 (20%)과 1:1로 혼합하고 Flavourzyme 2%를 첨가하여 발효-효소가수분해를 동시에 진행하였다. 그 결과, Fig. 3-4-111을 살펴보면 TP-6를 96시간 전배양한 경우가 24시간 배양한 경우보다 가수분해도가 발효초기부터 약 5% 높았다.

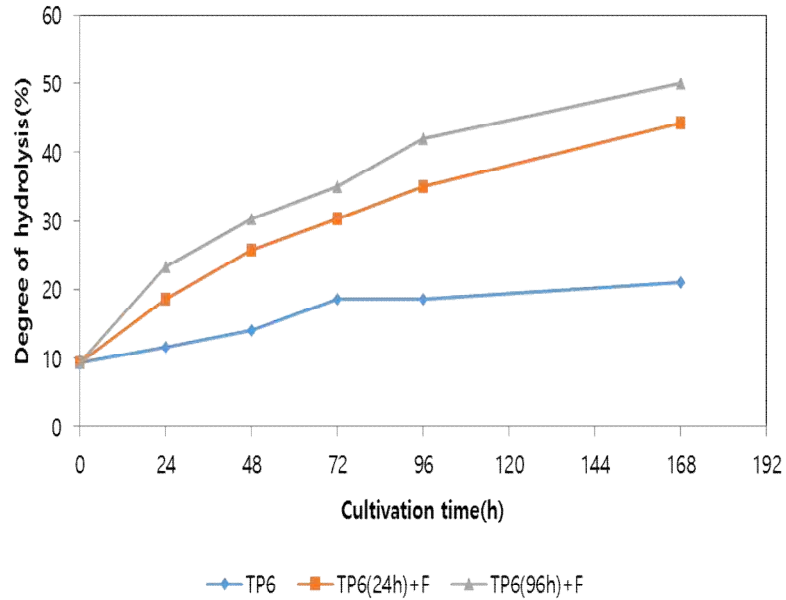


Fig. 3-4-111. TP-6 전배양 시간이 밀글루텐의 가수분해도에 미치는 영향

(다) 발효-효소 가수분해

① *B. subtilis* TP-6 전배양액과 혼합비

- 통상적인 발효에서는 5-10%의 seed를 접종한다. 본 공정에서는 TP-6 전배양액을 1차 효소원으로 이용하기 때문에 과량 접종하여야 한다. 따라서 전술한 실험실 연구에서 전배양액과 단백질 분산액과 1:1로 혼합하였다. 대량 생산공정을 확정하기 위해서 전배양액과 단백질 분산액의 혼합비가 단백질원의 가수분해에 미치는 영향을 분석하였다.
- TP-6 전배양액을 10% 접종하였을 때는 그림 에 나타난 것과 같이 발효 초기에는 증식기로서 이 때는 가수분해도가 낮았다. 그러나 TP-6 가 충분히 증식하여 효소 활성이 높아지는 발효 72시간 후부터는 단백질의 가수분해가 급속히 진행되었다.
- 한편 전배양액과 단백질 분산액과 1:1로 혼합했을 때는 아직 전배양액 중의 protease에 의하여 발효초기부터 거의 직선적으로 가수분해도가 증가하였으며 배양시간이 경과됨에 따라 가수분해도에 는 현격한 차이를 보여 혼합비의 중요성을 확인할 수 있었다.

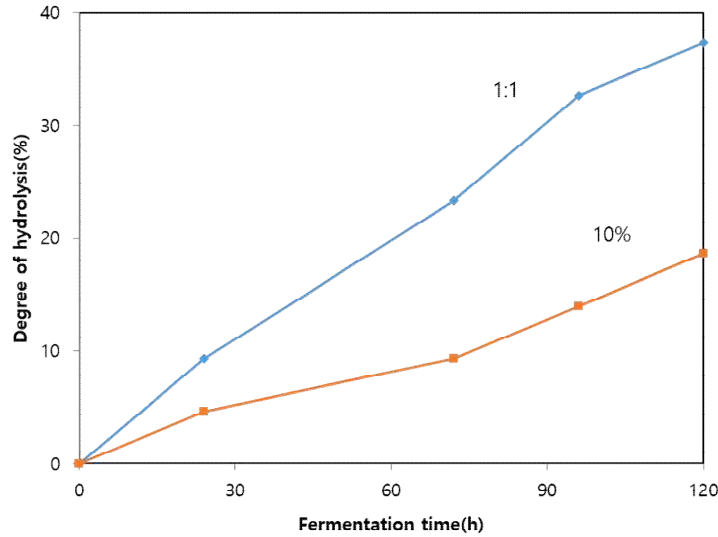


Fig. 3-4-112. 밀글루텐 용액과 TP-6 배양액 혼합비가 가수분해에 미치는 영향

② 식물성 단백질 농도

- 전술한 플라스크 배양에서는 기질 단백질 농도 5~10%인 경우 매우 우수한 가수분해 결과를 얻었다. 그러나 발효-효소가수분해 공정의 효율을 향상시키기 위해서는 가수분해도를 어느 정도 희생하더라도 가능한 한 고농도 배양이 바람직하다. 따라서 단백질원인 밀글루텐 분산액 농도의 영향을 살펴보았으며, 보다 정확한 비교분석을 위하여 Formol nitrogen 분석에 의한 DH보다는 HPLC에 의한 가수분해액의 total amino acid 및 free amino acid를 분석하였다.
- Table 3-4-48을 살펴보면 전술한 바와 같이 Process-1에 비하여 Process-2가 월등히 우수하다는 것을 아미노산 분석결과 확인 할 수 있다. Process-2의 발효-효소가수분해 직후 WG 10%일 때와 20%일 때 총 아미노산 수율은 8% 차이가 있으나 유리아미노산 수율은 2%에 지나지 않는다. 특히 WG 20%의 경우 고압처리에 의하여 유리아미노산 수율은 29.2%까지 증가하여 고농도 발효가 가능하였다.

Table 3-4-48. 밀글루텐 기질농도와 아미노산 생성율

Process	Wheat gluten (10%)		Wheat gluten (20%)	
	Total AA (%)	Free AA (%)	Total AA (%)	Free AA (%)
Process-1 (before HPP treatment)	78.7	8.8		
Process-2 (before HPP treatment)	81.5	26.2	73.5	24.3
Process-2 (after HPP treatment)			75.1	29.2

③ 숙성 발효기간

- 발효액의 초고압처리에 의하여 발효액 중의 효소의 가수분해 활성을 증가시킴으로서 DH를 4-8% 증가시킬 수 있다. 그러나 초고압처리는 장치 특성상 대용량으로 scale-up 하는데 한계가 있다.
- 따라서 숙성시킴으로서 발효액 중의 효소에 의하여 자연적으로 완만히 가수분해가 진행되도록 하는 것이다. Fig.3-4-113는 발효 4일에 종료하지 않고 7일간 발효기간을 연장 했을 때 생성되는 glutamic acid와 glutamine 농도를 비교하였다.
- 발효 4일에는 glutamine농도가 높으나 7일 후에는 glutamine농도는 약 50% 감소하고 glutamic acid 농도는 서서히 증가하였다. 또한 가수분해도는 40.8%에서 45.5%로 초고압처리 후의 가수분해도 수준으로 증가하였다. 즉, 숙성기간 동안 서서히 가수분해가 진행되면서 유리되는 glutamine은 TP-6 의 glutaminase에 의하여 glutamic acid로 전환된다는 것을 나타낸다.

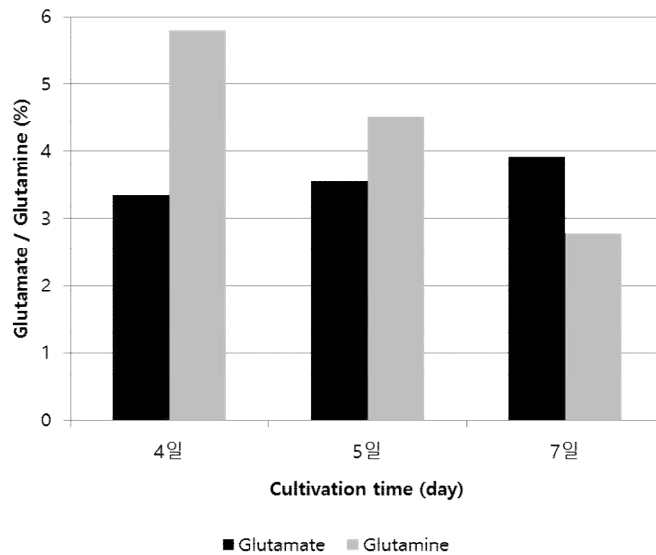


Fig. 3-4-113. 밀글루텐의 숙성 발효에 의한 글루탐산의 생성

(라) 가수분해액의 UF

- 최종적으로 단백질 가수분해액 중의 active ingredient인 저분자 peptide 를 농축하기 위하여 한외여과 (UF)를 하였다. UF 전후 peptide 의 분자량 분포를 GPC 로 분석한 결과, 패턴이 거의 동일하였다. Fig. 3-4-114에서 UF 전의 GPC 프로파일을 보면 가수분해액 중에는 6,512 Da 이상의 peptide 가 대부분이다.

- 단백질 수율은 막여과 전 78.3%에서 막여과 후 73.5%로 약 5%의 단백질 손실이 있었다.

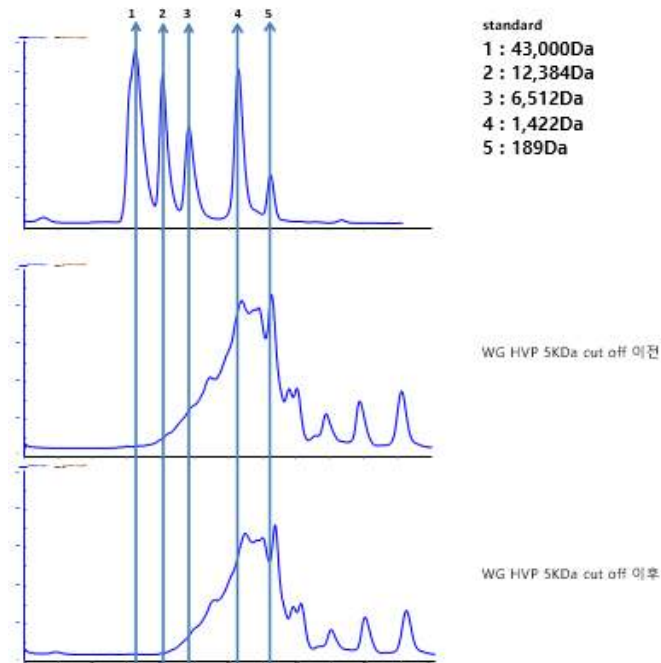


Fig. 3-4-114. 밀글루텐 가수분해액의 UF (5 kDa) 전후의 분자량 분포

(마) 총괄 생산공정

- 이상의 연구결과들을 종합하여 그림 과 같이 발효-효소가수분해 저염조미소재 생산 총괄공정 확립 하였다.
- 목표제품
 - 제품명: FEN-G, FEN-S
 - 원료: 밀글루텐, 분리대두단백질
 - 사용효소: Alcalase 2.4L (Novo)
Flavourzyme 1000 (Novo)
 - 사용균주: *B. subtilis* TP-6 (개발 균주, protease/glutaminase 고효율성)
 - 제조공정: 발효-효소 병용 가수분해
 - 제품특징: FN/TN : 45%
TN: 12-15%
아미노산 유리율: 30%
NaCl: 10%
성상: SD 분말 (무첨가 단백질 가수분해물 SD 건조분말), 농축액상
 - 사용처: 범용 염미증진 조미소재

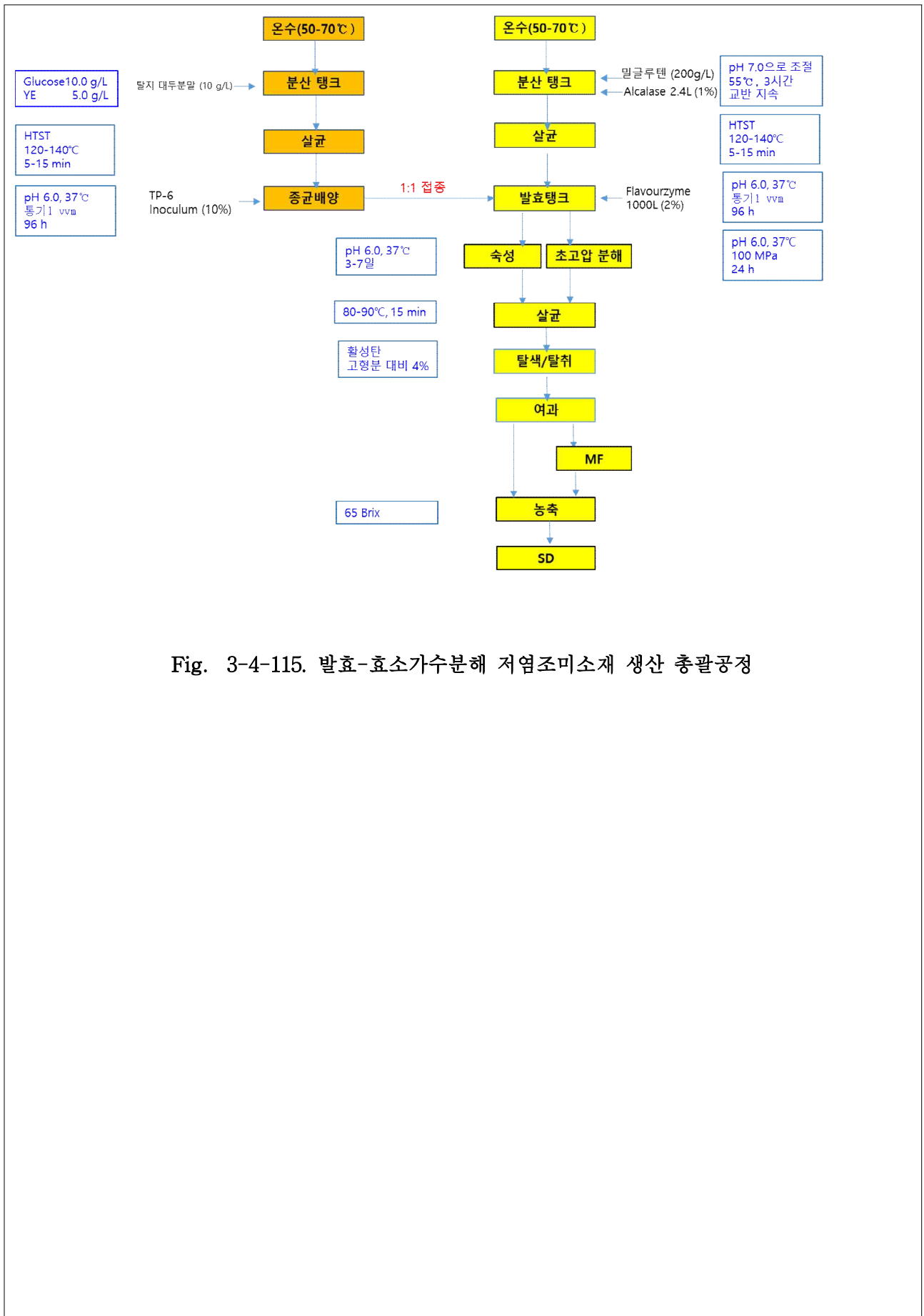


Fig. 3-4-115. 발효-효소가수분해 저염조미소재 생산 총괄공정

제4장 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호 D-06

제1절 목표달성도

1. 연구개발 최종 목표 대비 달성도

최종 목표	달성도
<ul style="list-style-type: none"> ○ 가공식품의 나트륨 사용 저감화를 위한 가공방법 및 가공적성 개선 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 나트륨 저감화 목표: 20% ▪ 물리적 처리에 의한 소금(제재 또는 가공소금), 짠맛 증진 물질(eHAP 및 eHVP), 천연조미료 개발 ▪ 가공방법 및 가공적성 개선을 통한 제품개발 5건(식빵, 우동면, 젓갈, 라면용 스프, 소스 또는 드레싱) ▪ 짠맛의 객관적 평가법 확립 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고압가수분해기술, 발효, 초고압 및 아임계 기술개발 및 이를 활용한 짠맛증진소재 개발 2건(APH, FEN) ○ 개발 소재/기술을 활용한 공정개선으로 나트륨 20%↑ 저감화 달성 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 저염 어간장(SR: 19~40%) ▪ 액상 소스 및 조미료 base 개발 ▪ 분무건조 조건에 따른 염미 강화가 다른 건식 소금 제조 ▪ 라면 수프 ○ 가공방법 및 가공적성 개선에 의한 나트륨 저감화 목표 달성(20%↑) <ul style="list-style-type: none"> ▪ 짠맛증진소재를 활용한 액상소스(SR: 90%) 및 복합조미식품개발(SR: 0.1%) ▪ 가압함침 기술에 의한 저염 오징어 젓갈 개발(SR: 29~50%) ▪ 소금의 불균일 짠맛 강화 제빵 기술 개발 ▪ 염미강화제(GABA, MSG), 혹은 대체염(KCl, CaSO₄, MgSO₄)이 첨가된 저염 육제품 개발 ▪ 리포솜 내 소금코팅 기술을 통한 소금 분포도 변화에 따른 짠맛 증진 체면 기술 개발 ▪ 이중에멀전을 이용한 저염 치즈, 저염 사골 국물 개발 ○ 짠맛의 객관적 평가 확립 및 짠맛 증진물질 신속평가를 위한 랩온어칩 개발
<ul style="list-style-type: none"> ○ 가공공정 개선 및 신가공기술을 활용하여 나트륨 저감화 목표 초과 달성 ○ 저염 가공 식품 시제품 및 시작품 초과 달성 (추가 연구 실시함) ○ 짠맛의 객관적 평가 확립 및 짠맛 증진물질 신속평가를 위한 랩온어칩 개발은 범용 기술개발로서 가공식품 나트륨 저감화 기술개발에 확대 적용 기대 ○ 고압효소가수분해 및 가압함침 기술은 선도적인 기술로서 지속적인 연구를 통하여 세계 일류 기술로 발전하여 상용화를 기대 ○ 아임계 기술은 상용화를 위한 지속적인 연구가 필요하다고 판단 	

2. 연차별 연구개발 목표 및 계획대비 달성도

가. 제1세부: 바이오선도가공기술을 활용한 HAP제조와 이를 활용한 나트륨 사용 저감화

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도	바이오선도가공기술을 활용한 HAP제조와 이를 활용한 나트륨 사용 저감화	HAP 제조 공정의 선별 및 단백질원 선정	100	<ul style="list-style-type: none"> - 단백질 급원에 따른 제조공정 분석 - 제조 공정별 시판 제품에 대한 짠맛 증진 효과 분석 - 단백질 급원(멸치) 및 개선시킬 제조 공정의 선별과 개선점 도출
		효소제의 선정	100	<ul style="list-style-type: none"> - 상업용 효소 선정을 위한 분석 - 쓴맛 제어를 위한 효소 선정
		고압효소분해조건의 최적화	100	<ul style="list-style-type: none"> - 중압 조건에서의 효소 stability - 공정 개선을 위한 최적화
2차 년도	eHAP 제조 기술 및 공정 개발	고압 처리시 효소 안전성과 개선공정의 최적화 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> - 대량 생산을 위한 1차년도 결과의 재현성 실험을 실시하여 효소 안정성과 처리 조건 검증 - 1차 pilot 규모 시험생산을 통하여 공정 개선 - 개선 공정에 의한 멸치 가수분해물의 2차 Pilot Scale Production
		eHAP 제조 기술 및 공정 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> - 정제 및 분획 공정: pilot scale에서 UF(10 kDa, 5 kDa) 및 NF(250 Da) - 탈염 처리 공정: 전기 투석 및 membrane separation → 통합공정에서 제외 - 탈색 및 탈취 공정: 필요시 활성탄 처리 - 제형화 공정(농축 및 건조): 액상 및 분말(Evaporation → Freezing Drying & Spray Drying) - 저장성 향상을 위한 공정: UHT & HTST - 전 공정의 통합화를 통한 제조 공정 개발: 진처리 → 고압효소가수분해 → 후처리 → 분리정제 → SD
		제조된 eHAP의 활용방안 검토와 염미 증진제 가능성 탐색 및 규명	100	<ul style="list-style-type: none"> - 염미 증진제로서의 가능성 탐색 및 규명: 1협동의 협조로 짠맛 증진 물질인 Arginine 및 Arginyl dipeptides의 다량 함유 및 관능검사를 통해 짠맛과 풍미 증진 효과를 확인, 경제성 분석 후 가능성 제시 - 액상천연조미료의 소재 개발(APH ; 짠맛증진 또는 풍미증진용 소재)
		유사제품에 대한 benchmark	100	<ul style="list-style-type: none"> - 시장조사 및 기존 제품 분석을 통하여 시제품 유형 선정 : 개발 소재를 이용하여

3차 년도	천연 저염 소스 또는 드레싱 제조기술 개발			기존 제품 개선 - 소금의 가공적성(functional role) 조사 및 파악 : 20% 나트륨 저감 목표치 설정
		Entire Supply Chain Approach를 통한 개선 및 개발 방안 도출과 해결책 탐색	100	- Sourcing of ingredients: 멸치 - Quality & safety of ingredients : 질소함량 or salt 함량 - Product design: 액상 및 분말(나트륨 20% 저감화) - Manufacturing product feasibility : 공정개선 - Quality assurance: 관능검사, 미생물 test & 질소함량 분석
		탐색된 해결방안을 중심으로 제품제조공정 및 시제품 및 시작품 개발	100	- APH 대량생산공정개발: 분말 시제품 1건 - 저염 어간장 대량생산공정개발 및 시제품 제조: 액상 및 분말 각 1건(참여 업체의 요구에 의한 추가 실험) - 품질평가 및 기호도 조사 : 차이식별조사를 통하여 기존의 제품과 관능적 특성 비교, 제품속성 도출 - 나트륨함량, 화학적 미생물학적 안전성 평가 완료 - General sauce base, powder base 배합비 2종 확립 - 시작품 2종 개발 (천연 저염 소스 및 복합조미식품)
		사업화 계획 수립	100	- 사업화 방안: 전략 도출
		3차 Pilot scale 시험생산	추가	- 사업화 전략에 의거 원료 및 고압장비 변경 - 공정 개선 - 시험생산
		유사제품에 대한 benchmark	100	- 시장조사 및 기존 제품 분석을 통하여 시제품 유형 선정 : 양념 젓갈 선정 - 소금의 가공적성(functional role) 조사 및 파악 : 20% 나트륨 저감 목표치 설정 (현재 저염 젓갈은 8%가 기준 규격임)
4차 년도	저염 젓갈 제조 기술 개발 및 염미증진제 개발 가능성 탐색	Entire Supply Chain Approach를 통한 개선 및 개발 방안 도출과 해결책 탐색	100	- Sourcing of ingredients: 오징어 - Quality & safety of ingredients : salt 함량 5% - Product design: 양념 젓갈(나트륨 20% 저감화 목표) - Manufacturing product feasibility : 가압함침기술 적용 - Quality assurance: 관능검사, 미생물 test & 염도 측정
		탐색된	100	- 가압함침기술을 적용한 염도 5% 이하의

	해결방안을 중심으로 제품제조공정 및 시작품개발		<ul style="list-style-type: none"> 시작품 제조: 1건 품질평가 및 기호도 조사 : 차이식별조사를 통하여 기존의 제품과 관능적 특성 비교, 제품속성 도출 나트륨함량, 화학적 미생물학적 안전성 평가 완료 (SR: 29~50%)
	Pilot scale에서 고압효소분해 조건의 최적화	추가	<ul style="list-style-type: none"> RSM 적용 DH, NR 및 분자량 1335 Da 이하 분율을 통합하는 최적 조건 확립
	염미증진제 개발 가능성 탐색	100	<ul style="list-style-type: none"> Lab on a chip으로 시험 test 새로운 eHAP 2건 확보

나. 제1협동: 관능검사를 활용한 짠맛 증진물질의 HTS 스크리닝 기법 개발 및 짠맛 평가 방법 확립

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도(%)	연구개발 수행내용
1차년도	[제 1협동]	관능검사 Salt Enhancer HTS system 확립을 위한 Panel 선발	100	<ul style="list-style-type: none"> Taste modulator, Taste Enhancer, Salt enhancer 등에 대한 전반적 review HTS system에 대한 자료정리 Salt Enhancer HTS system 확립을 위한 관능검사 요원의 선발 및 훈련
	관능검사를 활용한 짠맛 증진물질의 HTS 스크리닝 기법 개발 및 짠맛 평가 방법 확립	Panel을 활용한 짠맛 증진 물질 효과 Protocol 작성	100	<ul style="list-style-type: none"> 짠맛 강도를 평가하기 위한 관능검사 훈련 및 실험, 평가절차 확립 기각 한계 및 차이 한계 측정을 위한 관능검사 훈련 및 실험, 평가절차 확립
		짠맛 증진 물질의 분석을 위한 연계 network 구축 및 sensomic mapping 절차 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> 짠맛 증진 물질의 분석을 위한 sensomic mapping 절차를 확립 및 연계 network 구축 시중 판매 간장류에 대한 나트륨 분석 및 LC-Mass의 분석법 확립을 위한 기초 실험 진행
2차년도	[제 1협동]	관능검사를 활용한 짠맛 증진물질의 HTS 스크리닝 기법 개발 및 짠맛 평가 방법 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> 훈련된 관능검사 요원을 활용한 짠맛 증진 물질의 대량 탐색 시스템 구축을 위한 분획물 관능평가 농도설정 및 계산법과 실험계획 수립 구축된 시스템을 활용해 주관연구기관 및 제 3협동에서 제시되는 분획물로부터 짠맛 강도 평가 진행 향미프로필 및 묘사분석을 활용한 짠맛증진 물질의 관능적 특성 분석 시판 양조간장을 이용한 식품 내 소금 사용량 감소효과를 확인하기 위한 관능검사 진행

		분석지원시스템을 이용한 이화학적 성분조사 및 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> - 제 1세부와 제3협동에서 제공한 짠맛 증진 물질의 Na 정량분석 - 타 연구팀에서 개발하고자 하는 제품별 나트륨 정량법의 SOP 개발 - 타 연구팀에서 개발되는 제품에 대한 짠맛 및 기호도에 대한 관능검사
	[제 1위탁] LC-MS를 이용한 장류식품의 저분자량 펩타이드 분석법 개발	LC-MS를 이용한 장류식품의 저분자량 펩타이드 분석법 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> - 9가지 peptide 표준품의 분석조건 확립 - 표준품 농도별 검출량 차이로 검량성 작성 - LC-MS를 활용한 시료별 peptide 조성 확인 - LC-MS를 활용한 시료별 표준품 정량 확인 - 주요 제조 공정간 휘발성 성분 패턴의 변화 확인
3차 년도	[제 1협동] 관능검사를 활용한 짠맛 증진물질의 HTS 스크리닝 기법 개발 및 짠맛 평가 방법 확립	묘사분석을 활용한 salt enhancer 소재의 관능적 특성 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> - 이온크로마토그래피를 이용한 짠맛 증진물질의 Na 정량분석 - 동물성 단백질 가수분해물(eHAP)의 짠맛 강도평가 - eHAP를 이용한 식품 내 소금사용량 감소효과 - 묘사분석을 통한 eHAP 짠맛 증진물질의 관능적 특성 평가
	[제 1위탁] 짠맛 증진 물질 신속 평가를 위한 Lab in a chip 개발	세포막전위 변화를 측정 할 수 있는 미세구조화된 랩온어칩 제작	100	<ul style="list-style-type: none"> - 패치클램퍼(Patch clamp)에 의한 막전위 측정법과 관능 검사법 조사 - 랩온어칩 길이, 넓이, 높이 결정 - 골드전극 최적화를 위한 디자인 결정 - 민감도가 뛰어난 단일벽 탄소나노튜브를 이용한 랩온어칩 제작
4차 년도	[제 1협동] 관능검사를 활용한 짠맛 증진물질의 HTS 스크리닝 기법 개발 및 짠맛 평가 방법 확립	짠맛 증진 물질이 적용된 제품의 나트륨 저감화 평가 및 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> - 이온크로마토그래피를 이용한 짠맛증진물질의 Na정량분석 - 분리대두 단백질 효소가수분해물(eHVP)의 짠맛 강도평가 - eHVP를 활용한 식품 내 소금사용량 감소효과 - 묘사분석을 통한 eHVP 짠맛 증진물질의 관능적 특성평가
		신규 소재 탐색 적용	100	<ul style="list-style-type: none"> - Bio GABA의 짠맛 강도평가 및 식품 내 소금사용량 감소효과

				- 신규 eHVP 소재의 짠맛 강도평가
	제 [1위탁] 짠맛 증진 물질 신속 평가를 위한 Lab in a chip 개발	완성된 짠맛센서 칩 기반 짠맛관련 이온채널 단백질이 존재하는 세포를 이용한 짠맛 증진후보물질의 성능 평가	100	- 380℃의 고온에서 담금질 - 세밀한 자석 필터링 - 세포막전위의 변화 측정 - 상피세포 나트륨 채널단백질이 존재하는 세 포를 이용한 짠맛 증진후보물질의 성능 평가

다. 제2협동: 물리적 변화를 통한 나트륨 사용 저감화

구분 (연도)	세부과제 명	세부연구목표	달성 도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도	짠맛 증진을 위한 소금의 미세화 가공 공정 개발	소금의 입자 크기별 결정화 공정기술 개발	100	- 분무 건조 조건에 따른 소금입자 크기 조절 성공 - 분사압력이 높아질수록 입자 크기 미세화 되어 짠맛 강도 증진 효과를 봄 - GABA, MSG 첨가 시 건식 소금의 짠맛 증진 효과 가증
		나노소금입자화 기술 개발	100	- 분사 압력 조절에 따른 입자 크기의 200 nm 범주까지 미세화 성공 - 분말 입자 표면에 결정화된 소금의 입자 크기가 작을수록 짠맛 증진효과 증대
	[위탁] 관능평가	유동성에 따른 짠맛 감도 변화 관계 규명	100	- 뉴턴성 유체의 유동성을 나타냄. - 유동성에 대한 유기적인 관계는 유의적 차이가 나타나지 않음. - 2협동에서 개발된 제품에 대한 관능평가 결과로 입증

2차 년도	제빵 및 제면용 짠맛 증진 소금코팅 기술 개발	지질로 코팅된 소금입자 최적 공정 기술 개발	100	- 소금의 localization화를 위해 lipid를 활용한 코팅 기술 개발 - 제빵 공정과정에 적용하여 이화학적 분석 결과 빵의 적성에 영향을 미치지 않음. - 1협동에서 개발된 염지증진제 첨가시 짠맛 증진효과 증대
		나트륨 저감화된 제빵 가공 기술 개발	100	- 저염효과는 기존 첨가 양의 약 20%미만의 양을 첨가하여도 동일한 양의 짠맛을 부여할 수 있었음
		저염 육가공 제품 개발	추가 결과	- 염미 증진제 혹은 대체체가 포함된 육가공 제품 개발
	[위탁] 관능평가	개발된 저염 빵의 관능평가	100	- 2협동에서 개발된 제품에 대한 관능평가 결과로 입증
3차 년도	제면용 짠맛증진 소금코팅 기술 개발	단백질로 코팅된 간수입자 최적 공정 기술 개발	100	- 리포좀을 활용한 저염 제면용 코팅기술 성공 - 소금의 localization화를 위해 lipid를 활용한 제면용 최적화 된 코팅 기술 개발 - 1협동에서 개발된 염지증진제 첨가 시 짠맛 증진효과 증대
		나트륨 저감화 된 제면 가공 기술 개발		- 저염 효과는 기존 첨가 양의 약 10%미만의 양을 첨가하여도 동일한 양의 짠맛을 부여할 수 있었음
	[위탁] 관능평가	개발된 저염 제면의 관능평가	100	- 2협동에서 개발된 제품에 대한 관능평가 결과로 입증
4차 년도	저염 제빵, 제면, 스낵 제품 개발	저염화된 제빵, 제면, 스낵 시제품 개발	100	- 저염 소금이 도포된 스낵 시제품 개발 성공 - 시제품 저염 식빵, 제면 성공
		저염 사골 국물 및 치즈 개발	추가 결과	- 소스 등에 활용한 이중 에멀전 제조 - 실제 적용 제품 2종 성공
	[위탁] 관능평가	개발된 시제품의 관능평가	100	- 실제 대량생산에서의 제품에서도 저염 효과의 관능평가 입증

라. 제3협동: 신제조공정을 이용한 단백질가수분해물 제조와 이를 활용한 저염화방법 개발

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성 도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도	식물성 단백질 분해를 위한 효소제의	식물성 단백질을 분해 를 위한 효소제의 선정	100	상업용 단백질분해효소로 Protamex, Neutrase, Alcalase와 Flavourzyme의 가수분해 특성을 검증하여 Alcalase의 1차분해 후

	선정 및 고온/고온 효소분해조건 연구			Flavourzyme의 2차분해가 가장 우수한 가수분해율을 보여 선정하였고, 저분자 펩타이드의 생성율을 높이기 위하여 다양한 미생물 유래 조효소액을 검증하여 Bacillus subtilis 속 미생물 유래 조효소액을 최종 선발하였음
		고온/고압 효소분해 조건 연구	100	시판효소 및 미생물 조효소의 100MPa 고압하에서의 가수분해 특성을 연구한 결과, 3종의 효소의 복합 고압 가수분해로, 저분자 펩타이드의 함량이 높은 가수분해물 수득에 성공하였음
2차 년도	고온/고압 효소분해조건 확립 및 정제/분획 공정개발	융합공정에 의한 식물성 단백질의 고도 가수분해	100	고온가수분해, 미생물 가수분해, 상용효소 가수분해, 고압가수분해의 조합 특성 연구 융합가수분해공정을 이용한 분리대두단백질의 가수분해 특성 연구 최적 가수분해도와 분자량 분포를 가진 융합가수분해 공정 개발 열가수분해 → Flavourzyme과 미생물을 이용한 혼합가수분해 → 고압가수분해
		정제/분획 공정개발	100	가수분해물을 UF, active carbon, vacume evaporation 등의 방법을 단독 또는 조합하여 탈취공정을 수행한 결과 vacume evaporation 방법이 가장 우수한 것으로 확인되었으며, active carbon을 이용한 흡착 공정은 우수한 탈취효과를 보였으나 고품분 손실이 많아 낮은 수율로 바람직하지 못하였음
3차 년도	천연조미료소재 개발 및 '조미저염간장' 레시피 개발	식물성단백 천연조미료 소재 생산공정 최적화	100	아임계수를 이용한 식물성단백질의 수열분해 ①대두단백질 현탁액(5%)의 아임계수 수열분해 ②가열방법이 수열분해에 미치는 영향 ③초기 단백질농도가 수열분해에 미치는 영향 ④대두단백질 현탁액(10%)의 아임계수 수열분해 - 아임계수를 이용한 수열가수분해액 및 복합효소가수분해 - 식물성단백 천연조미료 소재공정 최적화 ①전처리가 단백질 가수분해에 미치는 영향 ②수열분해액의 TP-6균주에 의한 발효 ③TP-6 액체국 개발

				- 단백질가수분해액의 활성탄을 이용한 정제 공정
		식물성단백 유래 천연조미료 기초소재 시제품 제조	100	위에서 언급된 최적화된 공정으로 식물성단백유래 천연조미료 기초소재 시제품제조 (분말상) - 분자량분포 확인 및 성분분석 - 관능평가에 의한 저염풍미소재로서의 품질평가(제1협동 지원/분석)
		조미 저염간장 시제품의 레시피 개발		염미증강 소재로서 BioGABA와의 배합 시판 간장제품의 나트륨 함량, 단백질, 펩타이드, 아미노산 및 기타 증미성분을 분석 (제1협동지원/분석)
4차 년도	염미증진 물질의 응용시험과 소비자 기호도 검사	식물성 단백질 천연조미료 소재생산 융복합공정 개발	100	아임계수 처리가 밀글루텐의 효소가수분해 특성에 미치는 영향 연구 아임계수 처리 밀글루텐 및 그 효소가수분해물의 분자량 분포 및 아미노산 조성 분석
		저염 라면스프 레시피 개발 및 나트륨 저감화 실증시험	100	라면스프에 적용하여 소비자 관능검사를 통하여 20% 이상의 염미증진 효과를 확인함

제2절 관련분야 기여도

- 식품산업은 장치산업이라 하여고 과언이 아니다. 즉, 기술이 개발되어도 이를 산업적 생산을 하기위한 시스템이 없이는 산업화가 불가능하다. 예로서 주로 비가열살균기술로 활용되고 있는 HPP(high pressure processing)에 의한 pasteurization은 1980년에 연구가 시작되어 상용 고압처리 시스템이 개발된 1990년에 시제품이 나오고 2000년 이 후부터 급속 성장하고 있다. 국내도 2007년에 고가의 시스템을 도입하여 현재 10여개의 시스템이 도입되어 활성화 되고 있지만 아직도 장비 고가 문제로 많은 중소 규모의 기업이 기술도입에 애로를 겪고 있다.
- 그러나 본 연구팀이 개발한 고압효소가수분해기술이나 가압함침기술은 국내에서 보유하고 있는 중고압 영역의 처리 시스템을 기반으로 개발한 기술로서 바로 상용화가 가능하다. 더구나 장비제작 기술은 세계 최고 수준으로 알려져 있다. 따라서 개발기술 역시 세계 최고의 상용화 기술이라고 사료된다. 본 기술이 계속 연구 발전되어 관련 많은 산업에서 활용되면 세계를 선도하는 기술로 발전될 것으로 판단된다. 본 연구팀과 장비를 제작하는 (주)이노웨이는 전략적 제휴를 체결하고 toll processing plant를 구축하는 사업을 진행 중에 있다. 이는 관련 산업에서 기술을 활용하여 제품을 생산할 수 있는 기회를 제공할 있으리라 사료된다.
- 뿐만 아니라 나노기술을 적용한 나노입자 소금, 염미증진소재, 공정 개선에 의한 나트륨 저

감화 가공식품의 시제품 또는 시작품은 바로 현장에 적용 가능하므로 기술이전을 기대한다.

- 라면스프, 간장 등의 조미료 조제 시에 나트륨 저감화를 위하여 다양한 종류의 소재들이 개발되어 사용되고 있으며, 주로 단백질가수분해물(HVP/HAP)이 사용되고 있으며 염미증진효과는 10% 내외로 알려져 있음.
- 본 연구과제에서 개발된 HVP는 20%이상의 높은 염미증진 효과를 나타내고 있으며, 특히 본 연구팀이 보유하고 있는 미배아발효추출물과의 혼합 사용시에 매우 우수한 염미증진 효과를 나타내었음.
- 이는 본 과제 결과물은 염미증진제로서 산업화 가능성이 매우 높은 소재임을 기대하게 하며, 향후 다양한 식품에 부소재로서 사용가능하게 될 것임.
- 이와 같은 내용의 구체적인 근거 및 성과를 다음에 제시하였다.

1. 특허 출원 성과

번호	특허명	소속 기관명	특허등록국가	특허출원 및 등록일	특기사항
1	천연 염미 증진제 및 그 제조방법	차의과학대	대한민국	2014.10.13	출원
2	저염 어간장 및 그 제조방법	차의과학대	대한민국	2016.09.01	등록
3	짠맛이 증진된 저염소금 및 그 제조방법	건국대 (주)바이오벤	대한민국	2014.12.24	등록
4	나노입자성 저염 건식소금 및 그 제조방법	건국대 차의과학대	대한민국	2015.05.18	등록
5	저염화 빵의 제조방법	건국대	대한민국	2015.07.21	등록
6	단백질 가수분해 활성을 갖는 균주를 포함하는 조성물	(주)바이오벤	대한민국	2015.08.07.	출원
7	GABA를 이용하여 육류 가공식품을 저염화시키는 방법	건국대	대한민국	2015.12.23	출원
8	저염 건면의 제조방법 및 이에 따라 제조된 저염 건면	건국대 차의과학대	대한민국	2016.04.25	출원 (등록 우선심사 신청)
9	전복 가수분해물을 포함하는 식염 대체제 및 그 제조방법	건국대	대한민국	2016.	출원 (진행중)

2. SCI 논문게재 성과

연번	게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol (No.)	국내외 구분	SCI 구분
			주저자	교신저자	공동저자				
1	2014	Effect of partial substitutions of	Munkhtugs	최미정	천지연 조형용	Korean Society	34(4)	국내	SCI

		NaCl with KCl, CaSO ₄ on on the Quality Characteristics and Sensorial Properties of Pork Patties	Davaats eren		민상기	for Food Science of Animal Resources			
2	2014	Effects of NaCl Replacement with Gamma-Aminobutyric acid (GABA) on the Quality Characteristics and Sensorial Properties of Model Meat Products	천지연	최미정	김병수 이중규 조형용 민상기	Korean Society for Food Science of Animal Resources	34(4)	국내	SCI
3	2014	Effect of NaCl/Monosodium Glutamate (MSG) Mixture on the Sensorial properties and Quality Characteristics of Model Meat Products	천지연	최미정	김병수 이중규 조형용 민상기	Korean Society for Food Science of Animal Resources	34(5)	국내	SCI
4	2015	Effect of Spray-Drying Process on Physical Properties of Sodium Chloride/Maltodextrin Complexes	조형용	최미정	김병수 천지연	Powder technology	277	국외	SCI
5	2016	A highly sensitive electrochemical immunosensor by functional fusion	김아람	고성호	박태정 김민석 김인호 정광희	Sensors and Actuators B	(투고)	국외	SCI

		crosslinkers and prevention of electrode fouling							
6	2016	Effect of W1/O/W2 Double Emulsion Containing Salty Taste Enhancer on Beef Bone Broth	김수진	최미정	이지선	Korean Society for Food Science of Animal Resources	(투고)	국내	SCI
7	2016	Changes of Enzymatic Susceptibility of Wheat Gluten after Subcritical Water Treatment	황윤희	조형용	황윤희 김고래 신정규 이석훈 변유량	Food Science and Biotechnology	(투고)	국내	SCI
8	2016	Effect of W1/O/W2 Double Emulsion Containing Salty Taste Enhancer on Cheese	최희정	최미정	이지선 김수진 고은영	Korean Society for Food Science of Animal Resources	(투고)	국내	SCI

3. 비SCI 논문게재 성과

연 번	게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol (No.)	국내외 구분	SCI 구분
			주저자	교신저자	공동저자				
1	2015	시판 액젓 및 간장으로부터 짠맛 증진물질의 생산 가능성 연구	윤효선	조형용	박한설 이미연 신정규	산업식품 공학회지	19(2)	국내	비SCI
2	2015	아임계수를 이용한 분리대두단백질의 가수분해	황윤희	신정규	조형용 김고래 이석훈 최미정	한국식품 과학회지	47(6)	국내	비SCI
3	2015	양조간장을 이용한 샐러드 드레싱의 나트륨 감소 연구	박한설	신정규	조형용	산업식품 공학회지	19(2)	국내	비SCI
4	2015	멸치 단백질 효소가 가수분해물의 강도평가를 통한 짠	윤소정	신정규	차경희	한국식품 과학회지	47(6)	국내	비SCI

		맛증진효과								
5	2016	양조간장을 이용한 식품 내 나트륨 감소 효과 연구	박한설	신정규	조형용	한국식품과학회지	47(4)	국내	비SCI	
6	2016	고압 조건에서 멸치가수분해물 제조를 위한 산업용 단백질 분해효소의 선별	인예원	조형용	윤효선 방은 이화진 이미연	산업식품공학회지	20(2)	국내	비SCI	
7	2016	멸치 가수분해물이 건면 짬맛에 미치는 영향	이지선	최미정	조형용 이미연 고은영 신정규	산업식품공학회지	20(1)	국내	비SCI	
8	2016	묘사분석을 통한 멸치 단백질 효소가수분해물의 관능적 특성	윤소정	신정규	김진선 조형용	산업식품공학회지	20(2)	국내	비SCI	
9	2016	리포솜으로 코팅된 소금이 국수의 짬맛에 미치는 영향	이지선	최미정	이미연 조형용	산업식품공학회지	20(2)	국내	비SCI	
10	2016	5 kDa 미만의 oligopeptide가 건면의 짬맛에 미치는 영향 분석	이지선	최미정	조형용	산업식품공학회지	20(3)	국내	비SCI	
11	2016	멸치 단백질 효소가수분해물을 이용한 샐러드 드레싱의 짬맛 증진 효과	윤소정	신정규	-	산업식품공학회지	20(3)	국내	비SCI	
12	2016	멸치 단백질 효소가수분해물을 이용한 조리적용시 짬맛증진효과	김진선	신정규	윤소정 조형용	산업식품공학회지	20(3)	국내	비SCI	
13	2016	다구찌 기법을 이용한 멸치 고압효소가수분해 공정 최적화	인예원	조형용	윤효선 이유진 이미연	산업식품공학회지	(계제 확정)	국내	비SCI	
14	2016	Pilot plant scale 증고압장치를 이용한 멸치의 효소적 가수분해	이화진	조형용	방은 이선영 인예원	산업식품공학회지	(투고)	국내	비SCI	
15	2016	리포솜으로 코팅된 소금이 제빵에	이지선	최미정	나한솔	산업식품공학회지	(투고)	국내	비SCI	

4. 학술발표 성과

연 번	발표일자 (년.월.일)	발표논문명	행사명	행사 장소	구분	영문/ 국문
1	2013.08.30	Screening of saltiness fro, korean fermented sauces	제 80차 한국식품과학회 국제학술대회	천안	국내	영문
2	2013.08.30	Enzyme selection for producing fish protein hydrolysates with low bitterness under pressurization	제 80차 한국식품과학회 국제학술대회	천안	국내	영문
3	2013.08.30	Optimization of enzymatic hydrolysis of unsalted fish protein under pressurization by means of a taguchi robust design method	제 80차 한국식품과학회 국제학술대회	천안	국내	영문
4	2013.11.21	Using naturally brewed soy sauce to reduce salt in selected foods	산업식품공학회 추계학술대회	강릉	국내	국문
5	2014.08.27	A study of salt reducing effect in foods by natural brewed so sauce	제 81차 한국식품과학회 국제학술대회	광주	국내	국문
6	2014.08.27	Pressure-assisted Enzymatic Hydrolysis of Anchovy and Fractionating by Ultras/Nano-filtration using Pilot Plant Scale Systems	제 81차 한국식품과학회 국제학술대회	광주	국내	영문
7	2014.08.27	Feasibility Study for The Production of Salt Taste-active Compounds in Pressure-assisted Enzymatic Hydrolysates of Anchovy	제 81차 한국식품과학회	강릉	국내	영문
8	2015.06.04	Salty taste enhancement effect of animal hydrolysate by intensity evaluation	제 82차 한국식품과학회 국제학술대회	부산	국내	영문
9	2015.06.04	Development low salted fish sauce pressure assisted enzylic hydrolysate of anchovy	제 82차 한국식품과학회 국제학술대회	부산	국내	국문
10	2015.05.08	멸치액젓을 이용한 eHAP의 짠맛증진효과와 묘사분석	산업식품공학회 2015 춘계 학술대회	서울	국내	국문
11	2015.11.12	멸치단백질 효소가수분해물의 짠맛증진효과 연구	산업식품공학회 2015 추계 학술대회	서울	국내	국문
12	2016.04.29	대두단백질 효소가수분해물의 짠맛증진효과 연구	산업식품공학회 2016 춘계 학술대회	수원	국내	국문

13	2016.07.18	Sensory characteristics of enzymatically hydrolyzed isolate soybean protein by descriptive analysis	83차 한국식품과학회 국제학술대회	대구	국내	영문
14	2016.07.18	A study on the salty enhancing effect in korean foods using enzymatically hydrolyzed isolate soybean protein	83차 한국식품과학회 국제학술대회	대구	국내	영문
15	2016.07.18	Optimization of pressure assisted enzymatic hydrolysis of raw anchovy for producing salt enhancer	83차 한국식품과학회 국제학술대회	대구	국내	영문
16	2016.07.23	A study of salty enhancing effect in korean foods using enzymatically hydrolyzed anchovy protein	18th IUFOST	아일랜드	해외	영문

5. 인력활용/양성

기준년도	인력양성 현황										
	학위별				성별		지역별				
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
2014-2016		7	1		1	7	5			3	

6. 교육지도

교육명	교재명	주요내용	활용년도
관능검사 실무과정	관능검사 실무과정	관능검사 수행 및 방법	2013
관능검사 실무과정	관능검사 실무과정	패널 훈련 및 관능평가 방법	2013
관능검사 실무과정	관능검사 실무과정 (묘사분석의 이해)	관능검사 묘사분석의 이해 및 활용	2013

7. 홍보활동

번호	논문명/특허명/기타	소속 기관명	매체명	발표일자	특기사항
1	소금 대신 간장, 나트륨 '20-70% 다운'	전주대	의학신문	2015.09.21	언론홍보
2	소금 대신 간장 넣으면 음식나트륨 최대 69%까지 줄인다	전주대	(헤럴드 경제)REAL	2015.09.21	언론홍보

			FOOD])		
3	소금 대신 간장 넣으면 나트륨 최대 69%까지 줄여	전주대	(하이닥 뉴스)	2015.09.21	언론홍보
4	低나트륨 해법은 '소금 대신 간장'	전주대	(매일경제)	2015.09.21	언론홍보
5	소금대신 간장 넣었더니... 나트륨 70%까지 줄여	전주대	(중앙일보)	2015.09.21	언론홍보
6	"소금 대신 간장 넣으면 나트륨 섭취 줄어"	전주대	(뉴시스)	2015.09.21	언론홍보
7	소금 대신 간장, 나트륨 70% 줄일 수 있다	전주대	(뉴스 1)	2015.09.21	언론홍보
8	맛은 그대로 소금 대신 간장 넣으면 음식의 나트륨 최대 69%까지 감소	전주대	(세계일보)	2015.09.21	언론홍보
9	"요리할 때 소금 대신 간장을!". 나트륨 '최대 69%'감소	전주대	(브레이크뉴스)	2015.09.21	언론홍보
10	소금 대신 간장 넣으면 음식의 나트륨 최대 69% 줄여	전주대	(헬스조선)	2015.09.22	언론홍보
11	소금 대신 간장... 음식 나트륨 70% 줄여	전주대	(KBS 뉴스광장)	2016.02.11	언론홍보
12	'소금중독'한국인... 우선 1주일만 싱겁게 먹어 보세요	전주대	(한국일보)	2016.02.22	언론홍보
13	옥천휴게소, 나트륨 줄이기 실천음식점 선정 영예...모범음식점 6관왕	전주대	(헤럴드경제)	2016.04.26	언론홍보
14	소금 대신 간장을... 나트륨 함량 확 줄인다	전주대	(코메디닷컴)	2015.09.21	언론홍보
15	소금 대신 간장 넣으면 음식의 나트륨 최대 69%까지 줄이기 가능	전주대	(한국경제)	2015.09.22	언론홍보
16	저염 건식 소금 제조 특허 소개	차의과학대 건국대	(2016 농식품 유망기술발표회)	2016.08.09	농림축산식품부
17	식품 R&D관 저염화 빵 제조 방법 소개	건국대	(2016 대한민국 식품대전)	2016.09.01- 09.04	홍보전시

8. 타 연구개발사업에의 활용

번호	연구사업명	과제명	책임자	과제발주처 (부처)	활용년도
1	고부가가치식품기술개발사업	고령층 영양섭취 및 면역증진을 위한 시리얼 및 곡물 유동식 제품 개발 (제 1세부 위탁)	조형용	농림수산식품 기술기획평가원	2014-2016
2	고부가가치식품기술개발사업	유기가공식품용 첨가물 소재 및 수출 전략상품 개발 (제 1세부 위탁)	조형용	농림수산식품 기술기획평가원	2015-2017

9. 기술이전

계약일	계약명	계약번호	금액 (천원)	회사명	구분
16.06.14	저염화 빵의 제조방법	2016-07-0002	10,000	제이피푸드	통상실시

10. 수상실적

수상일	수상(포상)명	수여기관
2013.08.30	우수포스터상 'Screening of saltiness enhancer fro, various korean fermented sauces'	한국식품과학회
2013.05.16	우수논문발표상 'Effect of spray drying drying process on size of maltodextrin/NaCl complex'	한국산업식품공학회
2014.08.30	우수포스터상 'A study of salt reduceing effect in foods by natural brewed soy sauce'	한국식품과학회
2015.05.13	교내 연구업적 우수상	전주대학교
2015.11.11	우수논문상 '양조간장을 이용한 쉐리드 드레싱의 나트륨 감소 연구'	(사)한국산업식품공학회
2016.04.29	우수포스터상 '대두단백질 효소가수분해물의 짠맛증진효과 연구'	(사)한국산업식품공학회
2016.05.04	우수교육자상	전주대학교
2016.04.29.	우수논문발표상 '분무건조를 사용하여 제조한 NaCl-maltodextrin 복합체를 적용한 쌀튀기의 짠맛 증진 효과'	한국산업식품공학회

제5장 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

- 개발된 선도가공기술이 세계 최고의 상용화 기술로 발전할 수 있도록 toll processing plant에서 제품이 생산될 수 있도록 추진 중이므로 지속적인 연구지원이 있기를 바랍.
- 식품사업은 주로 영세하므로 기술이 개발되어도 상용화하기가 매우 요원하므로 이를 극복할 수 있는 방안의 하나로 toll processing plant 구축 사업을 진행하고자 함.
- 본 개발 기술의 기술이전을 위한 농림수산식품부의 적극적인 지원 혜택을 받을 수 있도록 노력함.
- 대체염, 염미증진제 혼합을 통해 저나트륨 함유, 짠맛 증진 식용소금의 개발이라는 것을 통해 기존의 염화나트륨 소금 첨가 의존도를 낮추어 식품전반에 저염 섭취화를 실현 시킬 수 있을 것으로 사료됨.
- 무엇보다 외식 및 가공 식품을 통한 1일 허용 나트륨 섭취량을 초가량을 자연스럽게 줄일 수 있어 국민건강 증진에 도움이 될 것으로 기대된다. 특히 제빵 및 제면용 가공식품 별 나트륨 저감화 가공 공정 기술을 통해 서구화된 현대인의 식생활 패턴에 저염화를 이룰 수 있을 것으로 사료됨.
- 소금입자의 입자크기별 제조공정과정 확립과 그에 따른 짠맛 감도 기준표를 제시해 줌으로써 건조식품 표면에 첨가 시 첨가되어지는 소금 양의 감소를 통해 나트륨 저감화에 정량적인 접근이 가능할 것으로 생각됨.
- 또한 다양한 나노크기의 소금 carrier 부분의 성분비 조합을 통해, 다양한 맛이 감미 된 소금을 개발할 수 있을 것으로 기대됨.
- 소금입자 코팅 및 식품 내 비균질화 분포도화 기술개발을 통해서 육가공 및 유가공 식품에도 다양하게 적용시킬 수 있어 광범위하게 응용할 수 있음.
- 본 과제에서 개발된 염미증진제는 라면스프에 적용하여 20% 이상의 성공적인 염미증진 효과를 확인하였으므로 라면스프와 유사한 다양한 분말상 또는 액상 조미료에도 바로 적용이 가능할 것으로 기대함.
- 그러나 산처리를 이용한 HVP에 비하여 장시간이 필요하고, 높은 생산 비용이 필요하므로 성공적인 사업화를 위해서는 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료됨.
- 범용 연구결과의 활용계획

- 훈련된 관능검사 요원의 양성 및 Screening 방법의 확립을 통한 향후 다른 맛(단맛, 쓴맛)의 대체물질 Screening 시 활용가능
- 기기분석을 통한 나트륨의 정량적 평가 방법 확립을 통한 현장에서의 분석법 활용
- 생물학적 방법을 통한 맛의 대체 물질 고속 Screening 방법 확립 및 적용
- 국내 식품의 염미 증진 물질 분석의 기반 제공 및 효과적 분석 자료 산출에 의한 유통 식품의 효용성 평가
- 식품 중 일반 저분자량 peptide 선발 효율성 증대 및 신규 peptide에 의한 식품 부가가치 증대
- 세포막 이온 채널의 막전위 변화를 측정할 수 있는 미세구조인 랩온어칩을 개발하여 짠맛 증진 후보 물질의 효능을 신속, 간단, 정확, 저렴하게 평가할 수 있는 시스템의 개발로 관련 식품 산업의 증대에 기여

○ 타 연구에의 응용

- 입자크기별 짠맛 표기 염 제품 개발: 건조식품 첨가 시 나트륨 저감을 10-20% 저감효과 기대
- 코팅소금: 2차적인 가공식품에 첨가염으로 활용(판매 예) 육제품
- 염미증진제(APH 또는 FEN) 및 천연액상 조미료: natural 이미지와 저염이라는 이슈를 활용한 니치마켓 공략
- 저염 제빵, 제면, chip 개발: 코팅소금의 비균질화 분포를 통한 저염 가공식품 판매를 통해 30% 나트륨 저감 효과 기대
- 제빵용 코팅소금: 조리목적에 따라, 팽윤제, 효모 등을 함께 첨가시켜 제빵용 소금 판매 가능
- 소스, 드레싱, 라면수프, 젓갈 등 우리가 많이 사용하고 있는 가공식품의 저염화를 통한 니치마켓 공략

○ 기업화 추진방안으로 참여기업을 위한 소재 구매처를 확보하는 노력으로 풀무원, 대상 등의 대기업과 소재를 적용한 제품 개발을 논의 중에 있음.

○ 다음과 같은 구체적인 성과 창출계획을 제시함

연번	성과예정	구분	제목	비고
1	특허	등록	저염화 빵의 제조방법	우선심사신청
2	논문	SCI	전복 가수분해물이 포함된 저염 치즈 제조	
3	논문	SCI	Baking of saltiness enhanced white pan bread by inhomogeneous spatial distribution	
4	논문	SCI	Baking of white pan bread added Hydrolyzed animal protein as enhancer for promoted saltiness	
5	논문	SCI	Optimization of pressure assisted enzymatic	(교정)

			hydrolysis of raw anchovy for producing salt enhancer	중)
6	논문	비SCI	리포솜 코팅된 소금을 첨가한 식빵에서의 물성 및 짠맛 증진 효과 분석	
7	학술대회	산업식품공학회	Effect of liposome encapsulated salt on physicochemical and sensory evaluation of white pan bread	
8	인적자원	석사졸업	2017.02. 이지선 석사 졸업 예정	

제6장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08
------	------

- 나트륨 대체제 및 저염 기술 연구 동향
 - 현재 소금 섭취를 줄이기 위한 방법으로는 점진적 소금 섭취의 저감(small step reduction), 대체 원료의 사용(replace salt by other ingredients), 맛 증진제의 사용(use of taste enhancers), 맛 감지 변조 첨가물 사용(add ingredients that modify taste perception), 염의 사용(use of salt-flavored ingredients), 보존제의 사용(use of preservative agents)등이 시도되고 있다.
 - 소금 사용량의 점진적 저감
 - 대체 원료의 사용
 - 맛증진제의 사용 (Glutamate, soy sauce, yeast product, high nucleotide ingredients, HVPs, HAPs)
 - 맛 감지 변조 물질 (Bitterness inhibitor, methanol, menthyl-lactate, peptide and amino acids)
 - Salt flavored ingredients (Minerals, Mycoscent, trehalose, lactates 등)
 - 작은 결정염의 사용

- 나트륨 저감 가공식품의 개발 동향
 - 저나트륨 제품에 사용되는 소재 현황

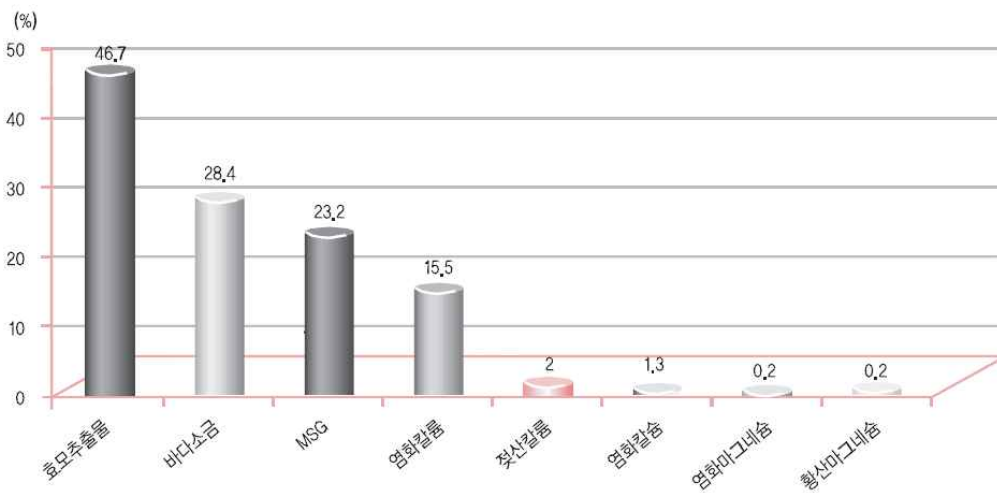


Fig 6-1-1. Salt substitute ingredients in EU (Innova database, 2008-2010).

- 나트륨 저감 관련 특허 사례

구분	특허내용	식품 예
미각 인식에 영향을 미치는 소금 대체제	<ul style="list-style-type: none"> ○ 나트륨을 줄이는 대신 짠맛을 더 잘 느끼도록 혼합물 사용 <ul style="list-style-type: none"> - 칼륨염을 용융소금(melten salt) 형태로 사용 - 칼슘과 비타민 D, 혹은 칼슘과 마그네슘 사용 	치즈 밀가루 소스

개발	- 전체 또는 일부를 칼륨염+aminobutyric acid로 대체 - 캡사이신 첨가	
	○ 대체제 사용 시 쓴맛 억제제를 함께 사용 taurine and 5'-adenosinic acid, 5'-inosinic acid, 5'-guanylic acid	모든 식품
	○ 향미증진제 효과 강화 또는 5가지 맛에 대한 인지정도 변화 N-substituted unsaturated alkyl amide	모든 식품
소금 저감에 의한 기능적 문제 보완 (보존기간, 식품의 질 등)	○ 질감 및 수분 보유력 관련 기술 - 육류의 질감 향상을 위해 tyrosinase 사용 - 소금 양을 낮추고 밀단백질 등의 단백질 부분 가수분해물과 transglutaminase 첨가	육류, 생선, 가공육 등
	○ 보존기간과 관련된 기술 - 저염 제품을 냉동 건조하여 수분함량 감소 - pH 감소, 유기산 첨가 - 염화나트륨 이외의 수분활성억제제 사용(예: 피클에 에틸알코올 사용 등)	모든 식품
	○ 기타 질감, 겔화능력, 색, 맛 변화와 관련된 특허기술 - 간장을 NF(nanofiltration) membrane 처리 - 채소를 소금과 아르기닌이 포함된 수용액에 담금 - thiamine dilaurylsulfate 첨가 등	피클, 소스
탈염, 필터링, 회석방법을 사용한 소금 저감화	○ 식품 가공의 마지막 단계에서 탈염 기술을 이용 - 생선 추출물로 생선 탈염 - 우롱차 또는 저삼투액을 사용하여 탈염	생선, 피클
	○ 전기투석방법을 이용한 필터링 기술	육류, 소스
	○ 심해층수, 사케, 간장 등을 이용한 회석 기술	소스
소금 흡착정도를 감소하는 기술	○ 소금 수송장벽(salt-transport barrier)을 사용 - 생선의 탈수/조미/훈제 시 반투막을 사용 - 살짝 소금 처리된 생선에 수분흡착 시트로 수분흡착	생선, 어패류, 육류
	○ 저 농도 염액을 사용하거나 소금의 첨가정도 조절 - 제빵 시 밀가루에 소금, 염화칼륨 및 아스코르빈산 첨가 - 피클 만들 때, 소금 농도가 낮은 피클 용액에 담금 등	빵, 생선, 피클, 소스

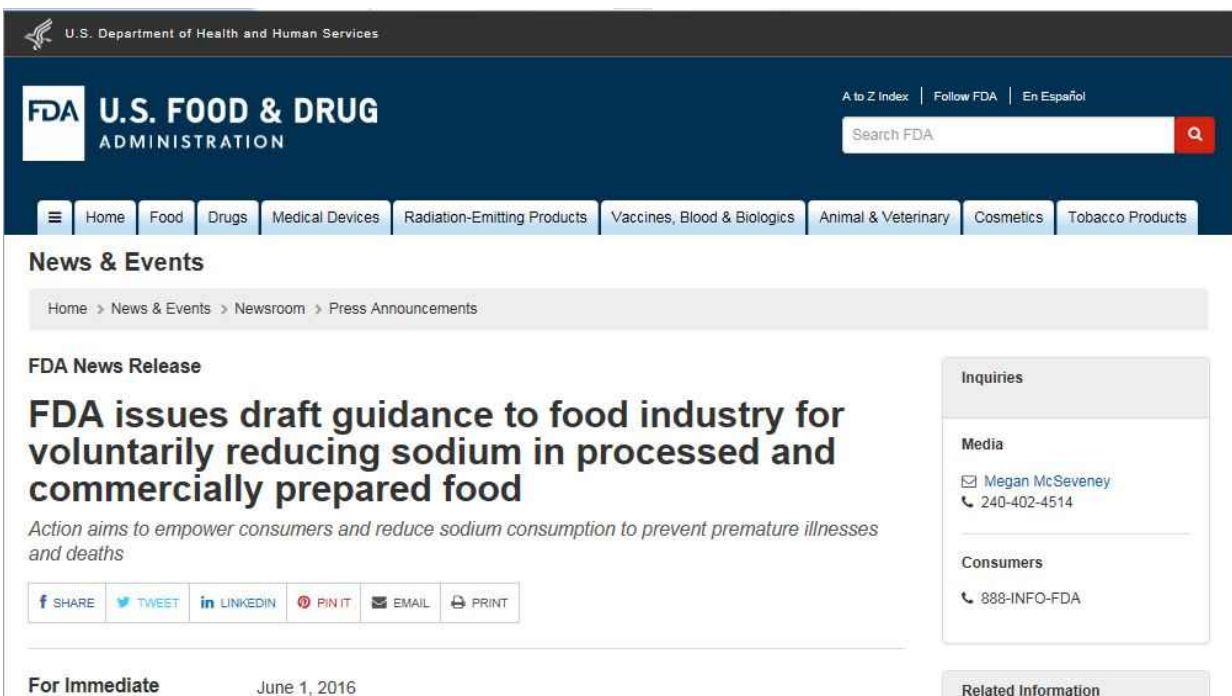
○ 짠맛 물질의 스크리닝 방법

▪ 현재 많은 과학자들이 짠맛 인지 기작을 좀 더 정확하게 밝히기 위하여 연구를 진행하고 있으며, 이러한 연구결과를 바탕으로 30% 이상의 나트륨 저감화를 달성하기 위한 천연의 salt booster 즉, 염미증진제를 개발하는데 집중하고 있음. 미생물학적(유전학적) 방법을 이용하는 방법으로는 상피(epithelial)의 나트륨 채널(sodium channel)을 modulating 하는 물질을 발현하는 유전자(vector)를 활용하여 modulating material을 만들어 이를 활용하는 방법(US patent 20090075320)이 보고되었으며, 또한 2012년에도 유전자를 활용하여 짠맛의 감지나 짠맛 대체물질을 enhancing하거나 inhibit하는 물질을 찾기 위해 salty taste receptor protein을 발현하는 DNA를 만들어 insertion하는 방법이 보고됨. 물리화학

적 방법은 짠맛을 낸다고 보고되어 있는 다양한 물질들을 선별한 후 이들 물질을 대조물질(소금)과 비교하거나 대조물질과의 적절한 combination을 통해 적절한 농도를 찾아 최적의 농도를 갖는 salty enhancer의 조합을 찾거나 짠맛을 갖는 물질의 화학적 구조를 바꾸어 짠맛을 강화시키는 방법 등이 보고되고 있음. 사람의 관능을 이용하는 경우에는 하루에 10~20개의 물질을 스크리닝 할 수 있지만, Senomyx나 Chromocell 등의 미국계 회사에서는 Fig 2-14.의 TRPV1t (VR1)과 같은 수용체를 이용한 cell-based high throughput screening 방법으로 하루에 10,000개 이상의 물질을 테스트할 수 있다고 함.

○ 미국 FDA에서 제공하는 가공식품에서의 나트륨 저감화 가이드라인

- <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm503874.htm>



○ Sodium Intake in Populations: Assessment of Evidence

- http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=18311

제7장 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
------	------

○ 해당사항 없음(일반과제)

제8장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

○ 해당사항 없음

제9장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
○ 차의과학대학교에서는 대학원생과 연구원들의 안전과 연구실 및 실험실 안전에 대해서 학기별로 안전 관리 교육을 다음과 같이 시행하고 있음.		
가. 연구실 안전조치 현황		
1) 본 연구소는 “연구실 안전환경조성에 관한 법률(제10874호, 2011.07.21, 일부개정)”과 시행규칙 및 시행령을 준수하여 교내에 연구실 안전관리규정을 시행하고 있음		
2) 연구실 안전환경 조성에 관한 법률에 의한 법정 의무교육을 시행, 연구실 안전환경 조성에 관한 법률 및 연구실 안전관련 전반의 교육		
3) 연구실 안전환경 조성에 관한 법률에 의거하여 2016년 연구실 정밀안전진단 실시(2016년 8월 17일) 미래연구실안전기술원(주)		
나. 연구실 안전조치 이행계획		
1) 본 연구소는 앞으로 각 실험실별 안전관리를 더 강화할 예정임		
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 소화기 추가 배치 ▪ 안전관리 교육강화 (연 2회 → 연 3회) ▪ 안전관리 미교육자는 실험 및 실습에 제한조치 취함 ▪ 실험실 안전관리규정 배포 및 비치강화 ▪ 퇴실 시 각 실험실별 안전점검 카드 작성 		
2) 실험실 정밀안전진단 시행		
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 점검기관 : 한국소방안전협회(기술자 1명, 특급기술자 1명, 고급기술자 1명, 초급기술자 2 		

명)

▪ 정기 점검 및 정밀안전진단 내용

- ① 시약 관리상태
- ② 기자재 관리상태
- ③ 전기 및 전력상태
- ④ 보호구 및 안전기기 등 비치상태
- ⑤ 의료폐기물 관리상태
- ⑥ 동물사육설비 설치 및 관리상태

■ 우리대학은 본교의 연구실 안전관리 규정을 준수할 것임.

- ▷ 본교는 “연구실 안전환경 조성에 관한 법률(제10874호, 2011.7.21, 일부개정)”과 시행규칙 및 시행령을 준수하여 교내에 연구실 안전관리규정에 따라 시행하고 있음.
 - ▷ 연구실 정기점검 및 정밀안전진단을 매년 정기적으로 수행하고 있음
 - ▷ 본교에서 시행하는 참여연구원의 교육훈련, 건강검진 실시, 보험가입 등에 적극 호응하여 안전관리에 만전을 기할 것임.
 - ▷ 본교의 규정을 준수하며 안전관리에 적극 협조하고 있음.
 - ▷ 연구실 책임자급의 참여연구원은 실험실의 안전을 책임지며 일상점검을 강화할 것임.
 - ▷ 우리대학은 안전교육을 추가적으로 별도로 시행하고 있으며 다음 단계에서는 안전 실무교육 즉 소화기 위치 숙지하기, 가상화재 시 대피 실습을 할 것임.
- 이 외 각 대학별로 대학원생과 연구원들의 안전과 연구실 및 실험실 안전에 대해서 학기별로 안전 관리 교육을 실시하고 있음.
- (주)바이오벤에서는
- **연구실협실 정기점검:** 해당과제 연구기관의 연구실험실은 안전확보를 위하여 매년 연구실험실 정기점검을 실시하고 있음. 주요 점검 사항으로는, 일상점검 및 안전교육 실시(이수), 약품 등 관련대장 작성 비치, 시설 및 장비 점검, 정리정돈 등이 있으며, 항상 연구실 안전관리 준수사항 이행 하고 있음.
 - **안전 교육 훈련:** 연구실 화재 안전을 위해 분기별 소방점검을 실시함.
 - **건강 검진:** 인체에 치명적인 위험물질 및 바이러스 등에 노출될 유해인자를 상시 취급하는 참여연구원에 대해 년 1회 건강검진 실시.

제10장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	짬맛이 증진된 저염 소금 및 그 제조방 법	건국대 (주)바이오벤처	-	대한민국	-	2014.12.24	-	등록
2	특허	나노입자성 저염 건 식소금 및 그 제조 방법	건국대 차의과학대	-	대한민국	-	2015.05.18	-	등록
3	특허	저염 어간장 및 그 제조방법	차의과학대	-	대한민국	-	2016.09.01	-	등록
4	논문	Effect of Spray-Drying Process on Physical Properties of Sodium Chloride/Maltodextr in Complexes	차의과학대 건국대	주저자 교신저자	P o w d e r technology	2.478	2015.02.25	단독사사	SCI
5	논문	멸치 단백질 효소가 수분해물을 이용한 샐러드 드레싱의 짬 맛 증진 효과	전주대	교신저자	산업식품공학	-	2016.08.31	단독사사	비SCI

제11장 기타사항

	코드번호	D-13
○ 해당사항 없음		

제 12 장 참고문헌

	코드번호	D-14		
<ul style="list-style-type: none"> ○ 1, 2, 3차년도 연차실적계획서 (가공공정 개선에 의한 나트륨 저감화 방법 개발) ○ A novel EP-involved pathway for iron release from soya bean seed ferritin. Xiaoping FU, Jianjun DENG, Haixia YANG, Taro MASUDA, Fumiyuki GOTO, Toshihiro YOSHIHARA and Guanghua ZHAO. Biochem. J. (2010) 427, 313-321. ○ A REVIEW OF APPROACHES TO SUPPLY CHAIN COMMUNICATIONS: FROM MANUFACTURING TO CONSTRUCTION. Anne-Francoise Cutting-Decelle, Bob. I. Young, Bishnu P. Das, Keith Case, Shahin Rahimifard, Chimay J. Anumba, Dino M. Bouchlaghem. ITcon Vol. 12 (2007) 73-102. ○ A. Schindler et al., Discovery of salt taste enhancing arginyl dipeptides in protein digests and fermented fish sauses by means of a sensomics approach, J. Agric. Food. Chem. 2011; 59, 12578-12588. ○ Abdelmoez W, Nakahasi T, Yoshida H. Amino acid transformation and decomposition in saturated subcritical water conditions. Ind. Eng. Chem. Res. 46: 5286-5294 (2007) ○ Adler-Nissen J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. J. Agric. Food Chem. 27: 1256-1262. ○ Adler-Nissen JA (ed) (1986) Enzymatic hydrolysis of food proteins. Elsevier, London ○ Aggarwal A, Singh H, Kumar P, Singh M. 2008. Optimizing power consumption for CNC turned parts using response surface methodology and Taguchi's technique--A comparative analysis. J. Mater. Process. Tech. 200: 373 - 384. ○ Akasaka K, Nagahata H, Maeno A, Sasaki K. 2008. Pressure acceleration of proteolysis: A general mechanism. Biophysics 4: 29-32. ○ American and Heart Association. 2006. http://www.americanheart.org ○ Amr AS, Jabay OA. 2004. Effect of salt iodization on the quality of pickled vegetables. Food Agri. Environ. 2:151-56. ○ An Integrated Approach to New Food Product Development. Howard R. Moskowitz, I. Sam Saguy, Tim Straus. CRC Press, Taylor & Francis Group.(2009) ○ AOAC Official method 983.23. ○ Aristotelis, T.H., Anthony, K.D.T., Anne, J.M. Enzymatic hydrolysis of fish frames using pilot plant scale systems. Food Nutr. science. 2011, 2, 568-593. ○ Armfield. 				

- <http://exploreamfield.com/en/products/view/ft94x/htst-uht-mini-pilot-system>
- Armor proteines. LactoSalt Optitaste. 35460 Saint-Brice-en-Coglè
 - Ashie INA, Simpson BK. 1996. Application of high hydrostatic pressure to control enzyme related fresh seafood texture deterioration. *Food Res. Int.* 29: 569-575.
 - Athes V, Degraeve P, Cavaill-Lefebvre D, Espeillac S, Lemay P and Combes D. 1997. Increased thermostability of three mesophilic β -galactosidases under high pressure. *Biotechnol. Lett.* 19: 273-276.
 - Atsushi S, Ken K, Hiroyuki T, Tadayuki N. (2006). Application of high hydrostatic pressure to meat and meat processing. In L. M. L. Nollet, & F. Toldr (Eds.), *Advanced technologies for meat processing* (pp. 193 - 217). Boca Raton: CRC/Taylor & Francis.
 - Balda FP, Aparicio BV, Samson CT. 2012. Industrial high pressure processing of foods: Review of evolution and emerging trends. *Food Eng.* 2: 543-549.
 - Balny C. 2006. What lies in the future of high-pressure bioscience? *Biochim. Biophys. Acta.* 1764: 632-639.
 - Bardocz S. 1993. The role of dietary polyamines. *European J. Clinic. Nutri.* 47: 683-690.
 - Benyounis, K.; Olabi, A. Optimization of different welding processes using statistical and numerical approaches-A reference guide. *Adv. Eng. Softw.* 2008, 39, 483-496.
 - Black, S. Mycoscent presentation - *Reducing salt without sacrificing taste.* [<http://www.fdin.org.uk/output/markmeedstalk.pdf>]
 - Bosnak C, Pruszkowski E, Neubauer K. 2008, Analysis of milk powder by ICP-MS, PerkinElmer Field Application Report 008279_03.
 - Bradstreet RB (1954) Kjeldahl method for organic nitrogen. *Anal Chem* 26:185 - 187.
 - Bravier ER. 1983. *Techniques for sodium reduction and salt substitution in commercial processing.* Research & Development Association. Norfolk VA.
 - Breslin PA, Beauchamp GK. 1995. Suppression of Bitterness by Sodium: Variation Among Bitter Taste Stimuli. *Chem Senses* 20: 609-23.
 - Breslin PAS, Beauchamp GK. 1997. Salt enhances flavor by suppressing bitterness. *Nature*, 387: 563.
 - Brink KM, Sebranek JG (1993) Combustion method for determination of crude protein in meat and meat products: collaborative study. *J AOAC Int* 76:787 - 793.
 - Bucci LR, Unlu L (2000) Protein and amino acid supplements in exercise and sport. In: Wolinsky I, Driskell JA (eds) *Energy-yielding macronutrients and energy metabolism in sports nutrition.* CRC Press, Boca Raton, FL, pp 191 - 212.
 - Byun BY, Mah JH. Occurrence of biogenic amines in miso, Japanese traditional fermented soybean paste. 2012. *J. Food Sci.* 77: T216-T223.
 - C. Marios et al., tmc-1 encodes a sodium-sensitive channel required for salt chemo-sensation in *C. elegans*, *Nature letter*, 2013
 - Cargill. Ascend™ application. Strategic alliance for the launch of Accelerate ready-to-drink sport drink. [http://www.cargillhealthandnutrition.com/industry_HFTnews_11-6-2002.html]

- Carter B E, Monsivais P, Drewnowski A. 2011. The sensory optimum of chicken broths supplemented with calcium di-glutamate: a possibility for reducing sodium while maintaining taste. *Food Quality and Preference*, 22: 699–703.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2006. <http://www.cdc.gov>
- Cheng H, Zhu X, Zhu C, Qian J, Zhu N, Zhao L, Chen J. Hydrolysis technology of biomass waste to produce amino acids in sub-critical water. *Bioresource Technol.* 99: 3337 - 41 (2008).
- Chae, S. K., Hiroshi, I., Sayuki, N. The color measurement and sensory evaluation for the accelerated fish sauce products. *Korean J Food Sci. Technol.* 21: 649–654(1989)
- Chalamaiah M, Dinesh kumar B, Hemalatha R, Jyothirmayi T. 2012. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chem.* 135: 3020–3038.
- Chegini, G.R., Ghobadian, B., 2005. Effect of spray-drying conditions on physical properties of orange juice powder. *Drying Technology* 23, 657–668.
- Chindapan, N, Devahastin, S, Chiewchan, N. 2010. Effect of electro dialysis pretreatment on physicochemical properties and morphology of spray-dried-fish sauce powder. *Food eng.* 99(1): 31–39.
- Chindapan, N., Devahastin, S., Chiewchan, N., 2009. Electro dialysis desalination of fish sauce. Electro dialysis performance and product quality. *Journal of Food Science* 74, E363–E371.
- Cho YJ, Im YS, Lee KW, Kim GB, Choi YJ. 1999. Quality Investigation of Commercial Northern Sand Lance, *Ammodutes Personatus* Sauces. *J. Korean Fish. Sic.* 32(5): 612–617.
- Cho, H.S. (1985) Studies on the rapid fermentation of the salted anchovy, *Eugraulis japonica*. Thesis for M. S. degree, Graduate School, Sungshin Women's University)
- Cho, S., Gu, Y., & Kim, S. (2005). Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 19(2), 221–229.
- Choi JM. A 2014, A study on quality characteristics of soy sauce by various manufacturing methods. MS thesis, Youngsan University. Busan, Korea.
- Choi NE, Roh JS. 2013. Nobody not told the story about umami and MSG. Reebok. Paju, Korea. pp 25–140
- Choi NU, Principle of Taste, Yemoondang, Seoul, Korea, pp 31–35
- Chou PY, Fasman GD. β -turn in proteins. *J. Mol. Biol.* 115:135–175 (1977)
- Conseil de la Transformation Agroalimentaire de des produits de Consommation. 2009. Reformulation of products to reduce sodium: Salt Reduction guide for the Food Industry.
- Cui C, Hu Q, Ren R, Zhao H, You L, Zhao M. Effect of the structural features of hydrochloric acid-deamidated wheat gluten on its susceptibility to enzymatic hydrolysis. *J. Agr. Food Chem.* 61: 5706–5714 (2013)
- Curme, A.G., Schimide, S.J., Steinberg, M.P., 1990. Mobility and activity of water in casein model systems as determined by ²H NMR and sorption isotherms. *Journal of Food Science* 55, 430–433.
- Desmond E, Pedro S, Nunes ML, Cauvain SP, Ainsworth P, Plunkett A, Guinee TP, O'Kennedy BT, Robinson T. 2007. Reducing salt in particular foods. In

Reducing Salt in Foods: Practical Strategies Kilcast, D., Angus, F., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, U.K.,; 233~368.

- Djordevic J, Zatorre RJ, Jones-Gotman M. 2004. Odour-induced changes in taste perception.. *EXP Brain Res.* 59. 405-408.
- Dohmoto N, Wang KC, Mori T, Kimura I, Koriyama T, Abe H. 2001. Development of a new type fish sauce using the soy sauce fermentation method. *Nippon Suisan Gakk.* 67: 1103-1109.
- Dzendolet E, Meiselman HL. 1967. Gustatory quality changes as a function of solution concentration. *Perception & Psychophysics*, 2: 29-33.
- Elamin WM, Endan JB, Yosuf YA, Shamsudin R, Ahmedov A. 2015. High pressure processing technology and equipment evolution: A Review. *J. Eng. Sci. Technol. Rev.* 8: 75-83.
- Espinoza AD, Morawicki RO, Hager T. Hydrolysis of whey protein isolate using subcritical water. *J. Food Sci.* 71: C20-C26 (2012)
- Fearon WA (1920) A modified kjeldahl method for the estimation of nitrogen. *Dublin J Med Sci* 1:28 - 32
- FitzGerald RJ, O'uinn G. 2006. Research review paper: Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. *Biotechnol. Advan.* 24: 234-237.
- Fres Z (1988) OPA method modified by use of N, N-dimethyl 2-mercaptoethyl ammonium chloride as thiol component. *Anal Chem* 330:631 - 633.
- FrymaKoruma InFocus by Romaco (2009). <http://www.frymakoruma.com>
- Fuji T, Sakai H. 1986. Effect of pH and temperature on spoilage of fish sauce. *Bull. Tokai Reg. Lab.* 119: 9-13
- Fujimaki M, Arai S, Yamashita M, Kato H, Noguchi M. 1973. Taste peptide fractionation from a fish protein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.* 37: 2891-2898.
- Functionality of Low Molecular Weight Peptides of Acceleratedly Manufactured Anchovy Sauce with *Bacillus subtilis* JM3 Protease. J.H Park, Y.M Kim, D.S Kim, and S.M Kim. *KOREAN J. FOOD. SCI. TECHNOL.* Vol. 37, No. 5, pp. 827~832 (2005)
- G. Wrobel, Transmission electron microscopy study of the cell-senser interface, *Journal of The Royal Society*, 2008; 5, 213-222
- Genichi T. 1986. Introduction to quality engineering : designing quality into products and processes. Kraus International Publications. Richmond, TX, USA, pp. 104 - 105.
- Gildberg A, Espejo-Hermes J, Magno-Orejana F. 1984. Acceleration of autolysis during fish sauce fermentation by adding acid and reducing the salt content. *J Sci Food Agric* 35:1363 - - 9
- Girgis S, Neal B, Prescott J, Prendergast J, Dumbells S, Turner C, Woodward M. 2003. A one quarter reduction in the salt content of bread can be made without detection. *European Journal of Clinical Nutrition.* 57: 616-20.
- Goh FXW, Itohiya Y, Shimojo R, Sato T, Hasegawa K, Leong LP. 2011. Using naturally brewed soy sauce to reduce salt in selected foods. *J. Sensory Stud.* 26: 429-435.
- Goula, A.M., Adamopoulos, K.G., 2004. Spray drying of tomato pulp: effect of feed concentration. *Drying Technology* 22, 2309-2330.
- Goula, A.M., Adamopoulos, K.G., 2008. Effect of maltodextrin addition during

spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. Powder properties. *Drying Technology* 26, 726–737.

- Guerrero A, Known SSY, Vadehra DV. 1998. Compositions to enhance taste of salts used in reduced amounts. U.S. Patent 5711985
- Gupta R, Beg QK, Lorenz P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microb. Biotechnol.* 59: 15–32.
- H. S. Song et al., Bioelectronic Tongue Using Heterodimeric Human Taste Receptor for the Discrimination of Sweeteners with Human-like Performance, *ACS Nano*, 2014; 8, 9781–9789
- Han DH, Park JM, Bai DH. 2014. Changes in Microflora and Flavor of Soy Sauce (Ganjang) According to the Salt Concentration. *Food Eng. Prog.* 18(3): 248–255
- Han JG, Oh SH, Choi WY, Kwon JW, Seo HB, Jeong KH, Kang DH, Lee HY. 2010. Enhancement of saccharification yield of *Ulva pertusa kjellman* for ethanol production through high temperature liquefaction process. *KSBB Journal* 25: 357–362.
- Han JS, Hwang IN. 1992. Effects of functional properties of soy protein isolate and Qualities of soybean curd upon proteolytic hydrolysis. *Korean J. Food Sci. Technol.* 24: 294–299
- Han KK, Richard C, Biserte G. Current developments in chemical cleavage of proetins. *Int. J. Biochem.* 15: 875–884 (1983)
- Hendrickx M, Ludikhuyze L. Van den Broeck I, Weemaes C. 1998. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends Food Sci. Tech.* 9: 197 - 203
- Hernandez-Andres A, Perez-Mateos M, Montero P, Gomez-Guillen MDC. 2008. A comparative study of the effects of high pressure on proteolytic degradation of sardine and blue whiting muscle. *Fish. Sci.* 74: 899–910.
- Hernedy PA and FitzGerald RJ. 2012. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *J. Funct. Foods* 4: 6–24.
- Hill RL (1965) Hydrolysis of proteins. *Adv Protein Chem* 20:37 - 107.
- Hong YS, Lee KY, Lee CH. Molecular weight distribution of protein hydrolysate by the enzymic hydrolysis of weakly acid-treated wheat gluten. *Food Science and Technology Research* 7: 126–130 (2001)
- Hou H, Li B, Zhao X, Zhang Z and Li P. 2011. Optimization of enzymatic hydrolysis of alaska pollock frame for preparing protein hydrolysates with low-bitterness. *Food Sci. Technol.* 44: 421–428.
- Howard R. Moskowitz, I. Sam Saguy, Tim Straus. 2009. *An Integrated Approach to New Food Product Development*. CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Hurtado JL, Montero P, Borderías *topus vulgaris*) and effects of high hydrostatic pressure. *J. Food Chem. Toxicol.* 67: 2555–2564.
- Hutton T. 2002. Sodium technological functions of salt in the manufacturing of food and drink products. *British Food Journal*, 104(2), 126–152.
- Im SB, Lee HG, Shim JY, Kim TR, Kim DO. 2015. Optimization of demucilage process of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* fruit using high hydrostatic pressure enzyme dissolution. *KSBB Journal* 30: 63–68.
- In YW, Yun HS, Bang E, Lee HJ, Lee MY, Cho HY. 2016. Selection of commercial proteolytic enzymes for the preparation of anchovy protein

- hydrolysates under pressurization. Food Eng. Prog. 20: 89-97.
- In YW, Yun HS, Lee YJ, Lee MY, Cho HY. 2016b. Optimization of a process for the pressure-assisted enzymatic hydrolysis of Anchovy using Taguchi method. Food Eng. Prog. (in press)
 - Israr T, Rakha A, Sohail M, Rashid S, Shehzad A. 2016. Salt reduction in baked products: strategies and constraints. Trends in Food Science & Technology. 51: 98-105.
 - J. S. Shim and C. H. Ahn, Optical immunosensor using carbon nanotubes coated with a photovoltaic polymer, Biosensors and Bioelectronics, 2012; 34, 208-214
 - J. S. Shim et al., The precise self-assembly of individual carbon nanotubes using magnetic capturing and fluidic alignment, Nanotechnology, 2009; 325607
 - Jandik P, Cheng J, Avalovic N (2003) Amino acid analysis in protein hydrolysates using anion exchange chromatography and IPAD. Method Mol Biol 211:155 - 167.
 - Jang MR, Kim IY, Hong MS, Shin JM, Han KY. 2004. Quality Evaluation of Commercial Salted and Fermented Fish Sauces. Korean J. Food Sci. Technol., 36(3): 423-431.
 - Jun LL, Chuhan-He Z, Zheng Z (2008) Analyzing molecular weight distribution of whey protein hydrolysates. Food Bioprod Process 86:1 - 6.
 - Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. 2005. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. Lancet 365: 217-223.
 - Keast RSJ, Canty TM, Breslin PA. 2004. The influence of sodium salts on binary mixtures of bitter-tasting compounds. Chem senses 29: 431-439.
 - KFDA. Food Code. Korean Food and Drug Administration. Seoul, Korea (2002)
 - KFIA. 2009. Food code, Korea Foods Industry Association, Moonyongsa Co., Seoul, Korea. pp 319-320.
 - KG Lee & SM Kim. 2012. Quality Changes in Low-Salted Squid Jeot-gal during Fermentation and Determination of Shelf-life. 한국식품영양과학회지(J Korean Soc Food Sci Nutr). 41(5):687-694.
 - Kim EHJ, Chen XD, Pearce D. Melting characteristics of fat present on the surface of industrial spray-dried dairy powder. Colloid Surface B 42: 1-8(2005)
 - Kim HK. 2009. Sensory characteristics and consumer acceptability of fermented soybean paste (*Doenjang*) products. MS Thesis, Ewha womans university, Seoul, Korea
 - Kim JH, Park HJ, Kim MJ, Ahn HJ, Byun MW. 2003. Survey of biogenic amine contents in commercial soy sauce. Korean J. Food Sci. Technol. 35:325-328.
 - Kim JH. 1996. Processing technique and quality control of fermented seafood. Bull. Food Technol. 9: 65-86
 - Kim JK. 2011. Cost-effectiveness of converting fish waste into liquid fertilizer. Fish Aquat Sci. 14: 230-233.
 - Kim MH, Kim DS. 2015. A quality analysis of low-salted red chilli seed powder added Gochugang. The Korean Journal of Culinary Research. 21(6): 195-205.
 - Kim MJ, Lee HS. 1988. The compents of free amino acids nucleotides and their related compounds in soypaste made from native and improved meju and soypaste product. J. Korean Soc. Food Nutr. 17: 69-
 - Kim MJ, Lee SJ, Kim CT. 2016. Process parameters on quality characteristics of

- Jacopever (*Sebastes schlegeli* Hilgendorf) under treatment of hydrostatic pressure. Korean J. Food Nutr. 29: 371-381.
- Kim MY, Lee SH, Jang GY, Park HJ, Li M, Kim SJ, Lee YR, Lee JS, Jeong HS. 2014. The enzyme inhibitory activity of ethanol extracts derived from germinated Rough Rice (*Oryza sativar* L.) treated by high pressure. Korean J. Food Sci. Technol. 46: 44-50.
 - Kim NS, Son SH, Maeng JS, Cho YJ, Kim CJ and Kim CT. 2013. Production of WGHs and AFPs using protease combinations at high and ambient pressure. World Academ. Sci. Eng. Technol. 76: 238-240.
 - Kim SH, Jeong YJ. 2016. Domestic and International Trends in Sodium Reduction and Practices. Food Science and Industry. 49(2): 25-33.
 - Kim SK & Mendis E. 2006. Bioactive compounds from marine processing byproducts-A review. Food Res. Int. 39: 383 - 393.
 - Kim SK, Jeon YJ, Byeun HG, Kim YT, Lee CK. 1997. Enzymatic recovery of cod frame proteins with crude proteinase from tuna pyloric caeca. Fish. Sci. 63: 421 - 427.
 - Kim YM. 2008. Present Status and Prospect of Fermented Seafood Industryin Korea. Korea Food Research Institute.
 - Kim, S. K., Byun, H. G., Jeon, Y. J. Desalting of tuna boiled extract by electro dialysis. J. Jorean Fish. Soc. 1999, 32, 68-74.
 - Kin HI, Jeong CH, Park SM. 2010. Morphological properties of poly(ϵ -caprolactone) Nano/Microcapsules prepared by emulsion-diffusion method. Textile Coloration and Finishing. 22(3): 229-238.
 - Knorr D, Heinz V, Buckow R. 2006. Review: High pressure application for food biopolymers. Biochimica et Biophysica Acta. 1764: 619 - 631
 - Koikuchi, tamari and shiro shoyu. Food Chem. 100: 1669 - 1677.
 - Kremer S, Mojet J, Shimojo R. 2009. Salt reduction in foods using naturally brewed soy sauce. J. Food Sci. 74:255-262
 - Kristinsson H.G. and Rasco B.A. (2010) Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Proterties, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40:1, 43-81
 - Krokida MK, Marinos-Kouris D. Rehydration of dehydrated products. J. Food Eng. 57: 1-7 (2003)
 - KSA. Korean Industrial Standards KSH 6022. Korean standards Association. Seoul, Korea (2002)
 - Kurppa, L. 1988. *Agent for reducing adverse effects of table salt*. European patent EU 377 119.
 - Kwon HM, Jang HA. 2013. Case studies on strengths and weaknesses of Taguchi method. J Food Eng. 39: 383 - 392.
 - L. Steller et al., Natural and artificial ion channels for biosensing platform, Anal Bioanal Chem, 2012; 402, 209-230
 - Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
 - Langrish, T., Wang, E., 2006. Crystallization of powders of spray-dried lactose, skim milk and lactose-salt mixture. International Journal of food Engineering 2(4)(Art 8).

- Langrish, T.A.G., 2007. New engineered particles from spray dryers: research needs in spray drying. *Drying Technology* 25, 971-983.
- Laurent, P., Rozenn, R., Martine, F.P., Laurent, V., Pascal, J., Maryse, C.D., Fabienne, G., Aurélie, C., Yves, L., Oscar, M.A., Jean-Pascal, B., Jean-Marie, P., Irineu, B., Carla, P., Gudjon, T., Charles, D., Greta, J., Inez, J., Patrick, B. Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties. *J. SCI. FOOD. AGR.* 2010, 90, 1819-1826.
- Lawless HT, Rapacki F, Horne J. Hayes A. 2003. *The taste of calcium and magnesium salts and anionic modifications*. *Food Quality and Preference*. 14: 319-325
- Lawrence G, Salles C, Septier C, Busch J, Thomas-Danguin T. 2009. Odour-taste interactions: a way to enhance saltiness in low-salt content solutions. *Food Qual Pref* 0. 241-248.
- Lee CL. 2014. The effects of KCl and soy sauce odor on salty taste and consumer' liking in NaCl reduced beef soup. The Graduate School Ewha Womans University, Seoul.
- Lee HJ, Bang E, Lee SY, In YW, Cho HY. 2016. Enzymatic hydrolysis of anchovy using medium-high pressure pilot plant scale systems. *Food Eng. Prog.* (in press)
- Lee MH. Official Methods of Analysis of AOAC International (16th edn), ed. by Cunniff PA. AOAC International, Elsevier, Kidlington, UK, pp. 361 - 371 (1996)
- Lee MY. 2015. Reduced sodium contents of processed food. *Food Industry and Nutrition*. 20(2): 1-5.
- Lee TD. 1992. Salt enhancer. U.S. Patent Appl. 005145707 A
- Lee W.D. Recent development of *Jeotagal* (traditional Korean fermented seafood) and its future. *Food Ind. Nutr.* 6(3): 23-27(2001)
- Lee YC, Song JH, Lee SY. 1994. Sensory Preference of Soy Sauces used for Seasoning Soups and Cooked Mungbean Sprouts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 26(5) : 507-511
- Lee YZ, Simpson BK, Haard NF. 1982. Supplementation of squid fermentation with proteolytic enzymes. *J. Food Biochem.* 6: 127-134.
- Lee, E.H., Cho, S.Y., Ha, J.H., Oh, K.S. and Kim, C.Y. Processing of sardine sauce from sardine scrap. *Bull. Korean Fish. Soc.* 17: 117-124 (1984)
- Lee, E.H., Lee, T.H., Kim, J.S., and Ahu, C.B. Processing and taste compounds of the fish sauce from skipjack scrap. *Bull. Korean Fish. Soc.* 22: 25-35 (1989)
- Lee, W., Yusof, S., Hamid, N. S. A., & Baharin, B. S. (2006). Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). *Journal of Food Engineering*, 73(1), 55-63.
- Liao L, Liu TX, Zhao MM, Zhao HF, Cui C. Aggregation behavior of wheat gluten during carboxylic acid deamidation upon hydrothermal treatment. *J. Cereal Sci.* 54: 129-136 (2011)
- Liao L, Qui CY, Liu TX, Zha MM, Ren JY, Zhao HF. Susceptibility of wheat gluten to enzymatic hydrolysis following deacidation with acetic acid and sensory characteristics of the resultant hydrolysates. *J. Cereal Sci.* 52: 395-403 (2010)
- Liao L, Zhao M, Ren J, Zhao H, Cui C, Hu X. Effect of acetic acid deamidation-induced modification on functional and nutritional properties and

- conformation of wheat gluten. *J. Sci. Food Agr.* 90: 409 - 417 (2010)
- Lindqvist, M. Flavour improvement of water solutions comprising bitter amino acids[dissertation]. Department of Food sciences, the Graduate School, Swedish University.
 - Lioe HN, Wada K, Aoki T, Yasuda M. 2007. Chemical and sensory characteristics of low molecular weight fractions obtained from three types of Japanese soy sauce (shoyu) -
 - Liu S, Zhang D, Liu L, Wang W, Du G, Chen J. Enhanced water absorption of wheat gluten by hydrothermal treatment followed by microbial transglutaminase reaction. *J. Sci. Food Agr.* 90: 658 - 663 (2010)
 - Lopetcharat K, Choi YJ, Park JW, Daeschel MA. 2001. Fish sauce products and manufacturing: A Review. *Food Rev. Int.* 17: 65-88.
 - Lopetcharat K, Park J. 2002. Characteristics of fish sauce made from Pacific whiting and surimi by-products during fermentation stage. *J Food Sci* 67:511 - 6
 - Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
 - Luft FC, Miller JZ, Grim CE, Fineberg NS, Christian JC, Daugherty SA, Weinberger MH. 1991. Salt sensitivity and resistance of blood pressure. Age and race as factors in physiological responses. *Hypertension* 17(1 Suppl): I102-108.
 - Mahadevan, S., Nitin, N., Salvi, D., Karwe, M. 2015. High Pressure Enhanced Infusion: Influence of Process Parameters. *J Food Process Eng.* 38(6):601-612.
 - Malin Lindqvist. 2010. Flavour improvement of water solutions comprising bitter amino acids. MS thesis. Swedish Univ. Agr. Sci., Uppsala, Sweden.
 - Mannar M, Dunn J. 1995. Salt iodization for the elimination of iodine deficiency. Ottawa, Canada. 13-19 p.
 - Matsudomi N, Kobayashi K. Conformation and surface Properties of deamidated gluten. *Agr. Biol. Chem. Tokyo* 46: 1583-1586 (1982)
 - Matsudomi N, Sasaki T, Kato A, Kobayashi K. Conformational changes and functional properties of acid-modified soy protein. *Agr. Biol. Chem. Tokyo* 49: 1251-1256 (1985)
 - Mattes RD, Donnelly D. 1991. Relative contributions of dietary sodium sources. *J Am Coll Nutr.* 10: 383-393.
 - Mekonnen T, Mussone PG, El-Thaaher N, Choi P, Bressler DC. Subcritical hydrolysis and characterization of waste proteinaceous biomass for value added applications. *J. Chem. Technol. Biot.* 90: 476 - 483 (2015)
 - Merz M, Eisele T, Berends P, Appel D, Rabe S, Blank I, Stressler T, Fische L. Flavourzyme, an Enzyme Preparation with Industrial Relevance: Automated Nine-Step Purification and Partial Characterization of Eight Enzymes. *J. Agr. Food Chem.* 2015, 63: 5682-5693 (2015)
 - Micronics. <http://www.micronicsinc.com/products/filter-presses/>
 - Ministry of Food and Drug Safety. 2013. 나트륨 줄이기 운동본부 활동보고서
 - Mishra, P., Mishra, S., & Mahanta, C. L. 2014. Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Emblica officinalis*) juice powder. *Food and Bioproducts Processing.* 92(3): 252-258.

- MMAF. Ministry of Maritime Affairs and Fisheries Notification No. 2002-97. Ministry of Maritime Affairs and Fisheries, Seoul, Korea (2002)
- Mohr, V., "Fish Protein Concentrate Production by En-zymic Hydrolysis," In: J. Adler-Nissen, B. O. Eggum, L. Munlic and H. S. Olsen, Eds., Biochemical Aspects of New Protein Food, Proceedings of the 11th FEBS meet-ing, Federation of European Biochemical Societies, Pergamon Press, Oxford, 1978.
- Moom, S. H., Lee, H. W., Ko, K. S. Concentration of functional mineral by NF/RO processes. Membrane journal. 2009, 19, 277-284.
- Morel MH, Redl A and Guilbert S. Mechanism of heat and shear mediated aggregation of wheat gluten upon mixing. Biomacromolecules 3:488 - 497 (2002)
- Morioka K, Fujii S, Itoh Y, Liu C, Obatake A. 1999. Recovery of amino acid from protein in the head and viscera of frigate mackerel by autolysis. Fish. Sci. 65: 588-591.
- Moyer B, Zlotnik A, Hevezi P, Soto H, Lu M, Gao N, Servant G, Brust P, Williams M, Kalabat D, White EC, Saganich M, Laita B, Dahan D. 2009. Identification of TRPML3 (MCOLN3) as a salty taste receptor and use in assays for identifying taste (salty) modulators and/or therapeutics that modulate sodium transport, absorption or excretion and/or aldosterone and/or vasopressin production or release. Pat. Appl. WO/2009/008950.
- Mukai J , Miyanaga Y, Ishizaka T, Asaka K, Nakai Y, Tsuji E, Uchida T. 2007. Quantitative taste evaluation of total enteral nutrients. Chem. Pharm. Bull. 52: 1416-1421.
- Mullally, M. M., O'Callaghan, D. M., FitzGerald, R. J., Donnelly, W. J., and Dalton, J. P., Proteolytic and peptidolytic activities in commercial pancreatin protease preparations and their relationship to some whey protein hydrolysate characteristics, *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2973, 1994.
- Mycoscent - S. *Black offers the sodium alternative*, Food Engineering & Ingredients. 01-JUN-03.
- Nagodawithana T (ed) (1995) Savory flavors. Esteekay, Milwaukee, WI
- Nagodawithana TW (1998) Production of flavors. In: Nagodawithana TW, Reed G (eds) Nutritional requirements of commercially important microorganisms. Esteekay Associates, Milwaukee, WI, pp 298 - 325.
- Nagodawithana TW, Nelles L, Trivedi NB (2010) Protein hydrolysates as hypoallergenic, flavors and palatants for companion animals. In: Pasupuleti VK, Demain A (eds) Protein hydrolysates in biotechnology. Springer, The Netherlands
- Nakamura H, Mohri Y, Muraoka I, Ito K. 1979. Production of soysauce with cryo-ground antarctic krill, *Euphausia superba*. Nippon Suisan Gakk. 45: 1389-1393.
- Nijdam, J.J., Langrish, T.A.G., 2005. An investigation of milk powders produced by a laboratory-scale spray dryer. Drying Technology 23, 1043-1056.
- Nilsang S, Lertsiri S, Suphantharika M, Assavanig A. 2005. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. J. Food Eng. 70: 571-578.
- Noda M, Van TV, Kusakabe I, Murakami K. 1982. Substrate specificity and salt inhibition of five proteinases isolated from the pyloric caeca and stomach of sardine. Agric. Biol. Chem. 46: 1565-1569.
- Ogawa T, Nakamura T, Tsuji E, Miyanaga Y, Nakagawa H, Hirabayashi H, Uchida T. 2004. The combination effect of L-arginine and NaCl on bitterness

- suppression of amino acid solutions. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 52: 172-177.
- Oh, S. W., Nam, E. J., Jo, J. H., Kim, E. M., Kim, Y. M. Chemical changes during desalting of fish sauces using electro dialyzer. *Korean J. Food. Sci. Technol.* 1997, 29, 992-998.
 - Ohmae E, Murakami C, Gekko K, Kato C. 2007. Review: pressure effects on enzyme functions. *J. Biol. Macromol.* 7: 23-29.
 - Okazaki T, Shigeta Y, Aoyama Y, Namba K. 2003. Autolysis of unsalted fish protein under pressurization. *Fish. Sci.* 69: 1257-1262.
 - Oliver JM, Duncan HG (2002) US Patent 6387241 Method of sterilization using ozone
 - Organisation mondiale de la propriete intellectuelle. Mycoscent. No brevet OMPI 12.02.2003 (803448). GB, 28.01.2003, 2321961. [<http://www.wipo.int/ipdl/en/madrid/key.jsp?KEY=803448>]
 - Ota M, Sawa A, Nio N, Ariyoshi Y (1999) Enzymatic ligation for synthesis of single-chain analogue of monellin by transglutaminase. *Biopolymers* 50:193 - 200.
 - Park C.K. Extractive nitrogenous constituents of anchovy sauce and their quality standardization. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27: 471-477 (1995)
 - Park HK, Sohn KH, Park OJ. 1997, Analysis of Significant factors in the Flavor of Traditional Korean Soy Sauce (I) - Analysis of General Characteristics, Sugars and Organic Acids Contents - . *Korean J. Dietary Culture* 12(1):53-61
 - Park HS. 2014. A study of salt reducing effect in foods by naturally brewed soy sauce. MS Thesis, Jeonju University, Jeonju, Korea
 - Park JN, Ishida K, Watanabe T, Endoh KI, Watanabe K, Murakami M, Abe H. 2002. Taste effects of oligopeptides in a vietnamese fish sauce. *Fish. Sci.* 68: 921-928.
 - Park OJ. 1999. Characteristics of flavor and aroma compounds of traditional Korean soy sauce sith various Meju types. The Graduate School of Yonsei University, Seoul.
 - Park, J. Y., Kim, W. J., Improvement of yields and organoleptic quality of anchovy extract by alkali-protease hydrolysis. *Korean J. Food Sci. Technol.* 20: 430-433(1988)
 - Park, P. J., Lee, S. H., Kim, S. K. Desalination of boiled oyster extract by electro dialysis. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 2000, 15, 167-173.
 - Pasupuleti V.K. and Braun S. (2010) State of the Art Manufacturing of Protein Hydrolysates. In: Pasupuleti VK, Demain A (eds) Protein hydrolysates in biotechnology. Springer, The Netherlands
 - Pasupuleti VK (2005) Manufacturing of protein hydrolysates and bioactive peptides. Presented at the annual meeting of Institute of Food Technologists, New Orleans, LA
 - Patton D. 2010. In Search of Balance. *Food Manufacture.* p.29-30.
 - Penas, E., Prestamo, G., Gomez, R. High pressure and the enzymatic hydrolysis of soybean whey proteins. *Food Chem* 2004;85:641-648.
 - Pinkowsak H, Wolak P, Oliveros E. Hydrothermolysis of rapeseed cake in subcritical water. Effect of reaction temperature and holding time on product composition. *Biomass Bioenerg* 64: 50-61 (2014)
 - Poirier D. 2009. Savoury capabilities. Sensient

- Preparation and physicochemical characteristics of anchovy hydrolysates produced by high hydrostatic pressure and enzymatic hydrolysis treatment. *Food Eng Prog* 2009;13(2):85-91.
- Pyun JW, Hwang IK. 1988. Study on free amino acids(glutamic acid) and nucleotide relating substances of various foods. *Korean J. Soc. Food Sci.* 4: 33-40
- Q. Liu et al., Bioelectronic tongue of taste buds on microelectrode array for salt sensing, *Biosensors and Bioelectronics*, 2013; 40, 115-120
- Raksakulthai R & Haard NF 2003. Exopeptidases and their application to reduce bitterness in food: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43: 401-445.
- Rao RS, Kumar CG, Prakasham S, Hobbs PJ. 2008. The Taguchi methodology as a statistical tool biotechnological applications: A critical appraisal. *Biotechnol. J.* 3: 510 - 523.
- Rastogi, N., Nirangan, K. 1998. Enhanced mass transfer during osmotic dehydration of high pressure treated pineapple. *J food sci.* 63(3):508-511.
- Riha WE, Izzo HV, Zhang J, Ho CT. Non enzymatic deamidation of food proteins. *Crit. Rev. Food Sci.* 6: 225-255 (1996)
- Rivalain N, Roquainc J, Demazeau G. 2010. Research review paper: Development of high hydrostatic pressure in biosciences: Pressure effect on biological structures and potential applications in Biotechnologies. *Biotechnology Adv.* 28: 659 - 672.
- Rogalinski T, Jerrmann S, Brunner G. Production of amino acids from bovine serum albumin by continuous subcritical water hydrolysis. *J. Supercrit. Fluid.* 36: 49-58 (2005)
- Rogalinski T, Liu K, Albrecht T, Brunner G. Hydrolysis kinetics of biopolymers in subcritical water. *J. of Supercrit. Fluid* 46: 335 - 341 (2008)
- Rood, R. P. 1984. *Salt substitute*. U.S. Patent 4473597 (WO850095).
- Rutherford SM. 2010. Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in Hydrolysates: a review. *J AOAC Int.* 93(5):1515-1522
- Saaïd M. Saad B, Hashim NH, Ali AS, M & Saleh MI. 2009. Determination of biogenic amines in selected Malaysian food. *Food Chem.* 113: 1356-1362.
- Salt Institute. 2006. <http://www.saltinstitute.org>
- Salt Reduction guide for the Food Industry. (2009)
- Sanger F, Tuppy H. The amino acid sequence in the phenyl-alanyl chain of insulin. *Biochem. J.* 49: 463-481 (1951)
- Santo MS. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microb.* 29: 213-231.
- Sauces: Flavour, 2007. Labels: Questions on cooking Posted by Yann_Chef. <http://www.seehint.com/hint.asp>
- Schlichtherle C H, Amado R. Analysis of taste-active compounds in an enzymatic hydrolysate of deamidated wheat gluten. *J. Agr. Food Chem.* 50: 1515 - 1522 (2002)
- Sereewatthanawut I, Prapintip S, Watchiraruji K, Goto M, Sasaki M, Shotipruk A. Extraction of protein and amino acids from deoiled rice bran by subcritical water hydrolysis. *Bioresource Technol.* 99: 555 - 561 (2008)

- Seyderhelm I, Boguslawski S, Michaelis G, Knorr D. 1996. Pressure induced inactivation of selected food enzymes. *J. Food Sci.* 61: 308-310.
- Shalab AR. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.* 29: 675-690.
- Shimono M, Sugiyama K. 2009. Salty taste enhancing agent and food or drink containing the same. *Jpn. Patent Appl.* 2008-074862.
- Shin HH, 2012. Development trend of salt reduction processed food products in oversea. *KHIDI brief report vol.* 45.
- Shin YJ, Lee CK, Kim HJ, Kim HS, Seo HG, Lee SC. 2014. Preparation and Characteristics of Low-salt Soy Sauce with Anti-hypertensive Activity by Addition of Miduduk Tunic, Mulberry, and Onion Extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 43(6): 854-858
- Shin, S.U., Kwon, M.A., Jang, M.S., and Kang, T.J. Rapid Processing of the Fish Sauce and Its Quality Evaluation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34(4): 666-672 (2002)
- Sikora, M., Badrie, N., Deisingh, A. K., & Kowalski, S. (2008). Sauces and dressings: a review of properties and applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(1), 50-77.
- Smyth M and FitzGerald RJ, 1998. Relationship between some characteristics of WPC hydrolysates and the enzyme complement in commercially available proteinase preparations. *Int. Dairy J.* 8: 819-827.
- Sohn M, Ho CT. Ammonia generation during thermal degradation of amino acids. *J. Agr. Food Chem.* 43: 3001-3003 (1995)
- Sorensen SPL (1908) Enzymestudien, Uber die quantitative Messung Proteolytischer Spaltungen. *Die Formol Titrierung. Biochem Z* 7:45 - 101.
- SR Kim, DW Han, MJ Im, SY Cho. 1993. Optimal processing Conditions and Concentrations for Red Pepper Powder and Crush Garlic in the manufacture of squid *Todarodes paxificus* Sikahe. *Korea Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* 45(6): 640-647.
- Staehler F, Behrens M, Bufe B, Meyerhof W. 2007. The molecular basis of peripheral taste transduction. *AgroFOOD Ind. Hi-tech.* 18: 61-63.
- Su G, Ren J, Zhao M, Sun DW. Comparison of Superdex Peptide HR 10/30 Column and TSK Gel G2000 SWXL Column for molecular weight distribution analysis of protein hydrolysates. *Food Bioprocess Technology* 6:3620 - 3626 (2013)
- Sullivan, D. M., Carpenter, D. E. 1993. *Methods of Analysis for Nutrition Labeling.* AOAC International. USA.
- Sunphorkaa S, Chavasirib W, Oshimac Y, Ngamprasertsitha S. Kinetic studies on rice bran protein hydrolysis in subcritical water. *J. of Supercrit. Fluid* 65 (2012) 54 - 60
- Sunwoo HH, Gujral N, Huebl AC, Kim CT. 2014. Application of high hydrostatic pressure and enzymatic hydrolysis for the extraction of Ginsenosides from fresh Ginseng Root (*Panax ginseng* C.A. Myer). *Food Bioprocess Tech.* 7: 1246-1254.
- TABOR H, Tabor CW. 1964. Spermidine, spermine, and related amines. *Pharmacol. Rev.* 16: 245-300.
- Tamm A, Bolumar T, Bajovic B, Toepfl S. 2016. Salt (NaCl) reduction in cooked

- ham by a combined approach of high pressure treatment and the salt replacer KCl. *Innovative Food and Emerging Technologies*. 36: 294-302.
- Tamura M, Seki T, Kawasaki Y, Tada M, Kikuchi E and Okai H. 1989. *An enhancing effect on the saltiness of sodium chloride of added amino acids and their esters*, *Agricultural and Biological Chemistry*, 53: 1625-1633
 - Tamura, M., Nakamura, K., Kinomura, K. and Okai, H. 1993. *Relationship between taste and structure of O-aminoacyl sugars containing basic amino acids*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 57: 20-23.
 - Ten Brink B, Damink C, Joosten HMLJ, In't Veld JH. 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microb.* 11: 73-84.
 - Thorkelsson G & Kristinsson HG. 2009. Bioactive Peptides from Marine Sources. State of Art. Report to the NORA fund, ISSN 1670-7192.
 - Thorkelsson G, Sigurgisladottir S, Geirsdottir M, Jóhannsson R, Guérard F, Chabeaud A, Bourseau P, Vandanon L, Jaouen P, Fouchereau-Peron M, Le Gal Y, Ravallec-Ple R, Picot L, Berge JP, Delannoy C, Jakobsen G, Johansson I, Batista I. 2008. Mild processing techniques and development of functional marine protein and peptide ingredients. In: Børresen T, editor. *Improving seafood products for the consumer*. Cambridge, U.K.: Woodhead Publishing Limited. pp. 363 - 98.
 - Tordoff MG. 1996. *Some basic psychophysics of calcium salt solution*. *Chemical Senses*. 21: 417-424
 - Triveni, R., Shamala, T., & Rastogi, N. (2001). Optimised production and utilisation of exopolysaccharide from *Agrobacterium radiobacter*. *Process Biochemistry*, 36(8), 787-795.
 - Tyler-Cross R and Schirch V. Effects of amino acid sequence, buffers, and ionic strength on the rate and mechanism of deamidation of asparagine residues in small peptides. *J. Biol. Chem.* 33: 22549 - 22556 (1991).
 - U.S. Food & DRUG. <http://www.fda.gov/>
 - Uchida S, Houjo M, Tochikubo M (2008) Efficient sterilization of bacteria by pulse electric field in micro-gap. *J Electrostat* 66:427 - 431.
 - UMicrobiology and Industrial Biotechnology of Food-grade Protease; A Perspective. *Food Technol. Biotechnol.* 44(2)211~220 (2006)
 - US EPA Method 200.7, 1994, Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry.
 - US EPA Method 200.8, 1994, Determination of Trace Elements in Waters and Wastes by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry.
 - Vila Real HJ, Alfaia AJ, Calado ART, Ribeiro MHL. 2006. High pressure-temperature effects on enzymatic activity: Naringin bioconversion. *Food Chem.* 102: 565-570.
 - Walton, D.E., Mumford, C.J., 1999. The morphology of spray-dried particles: the effect of process variables upon the morphology of spray-dried particles. *Chemical Engineering Research and Design* 77, 442-460.
 - Wang JS, Zhao MM, Yang XQ, Jiang YM, Chun C. Gelation behavior of wheat gluten by heat treatment followed by transglutaminase cross-linking reaction. *Food Hydrocolloid* 21:174 - 179 (2007).
 - Wasswa J, Tang J, Gu XH. 2007. Desalting Fish Skin Protein Hydrolysates Using Macroporous Adsorption Resin, *American J. of Food Technology*, 2(5); 406-413(2007)

- Watchararужи K, Goto M, Sasaki M, Shotipruk A. Value-added subcritical water hydrolysate from rice bran and soybean meal. *Bioresource Technol.* 99: 6207 - 13 (2008)
- Weon MK, Lee YJ. 2013. Consumer's perception, preference and intake frequency of Jangachi(Korean pickle) by age for developing low salt Jangachi. *The Korean Journal of Culinary Research.* 19(5): 249-263.
- Wilson, L. 2004. *Salt composition.* UK Patent Application GB 2 396 793.
- Wise PM, Hansen JL, Reed DR, Breslin PAS. 2007. Twin Study of the heritability of recognition thresholds for sour and salty taste. *Chemical Senses.* 32 June: 749-754.
- World Health Organization. 2007. Reducing Salt Intake in Populations Report of a WHO Forum and Technical Meeting, Oct 57, 2006, Paris, France; Geneva, Switzerland, 2007.
- Wright HT, Urry DW. Nonenzymatic deamidation of asparaginylyl and glutaminylyl residues in proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol.* 26:41 - 52 (1991).
- Wu, Y., Cui, S. W., Tang, J., & Gu, X. (2007). Optimization of extraction process of crude polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds by response surface methodology. *Food chemistry, 105*(4), 1599-1605.
- Xu, W., Yu, G, Xue, C., Xue, Y., and Ren, Y. Biochemical changes associated with fast fermentation of squid processing by-products for low salt fish sauce, *Food Chemistry 107*(2008): 1597-1604
- Yamaguchi S, Ninomiya K. 2000. Umami and food palatability. *J Nutr* 130, 921S-926S
- YM Kim, YM Jeong, JH Hong. 1993. Processing Conditions for Low-Salted Squid Jeotkal. *26*(4):312-320.
- Yongsawatdigul, J., Rodtong, S., and Raksakulthai, N. Acceleration of Thai Sauce Fermentation Using Proteinases and Bacterial Starter Cultures, *Journal of Food Science 72*(9): 382-390(2007)
- Yoon EK. 2015. Policy trends of sodium reduction. *Food Industry and Nutrition.* 20(2): 6-7.
- Yoshida H, Tavakoli O. Sub-critical water hydrolysis treatment for waste squid entrails and production of amino acids, organic acids, and fatty acids. *J. Chem. Eng. Jpn.* 37:253 - 60 (2004)
- Yoshinaka R, Sato M, Tsuchiya N, Ikeda S. 1983. Production of fish sauce from sardine by utilization of its visceral enzymes. *Nippon Suisan Gakk.* 49: 463-469.
- Youn SJ, Cha GH, Shin JK. 2015. Salty Taste Enhancing Effect of Enzymatically Hydrolyzed Anchovy Protein. *Korean J. Food Sci, Technol.* 47: 751-756.
- Youn SJ. 2015. A studies on the sensory characteristics and salty enhancing effect of enzymatically hydrolyzed anchovy protein. MS Thesis, Jeonju university. Jeonju, Korea
- Yun HS, Park HS, Lee MY, Shin JK, Cho HY. 2015. A feasibility study on producing salt taste enhancer in the Commercial Fermented Fish and Soy Sauces. *Food Eng. Prog.* 19: 139-147.
- ZaMaN MZ, Bakar FA, SelaMat J. Bakar JA. 2010. Occurrence of biogenic amines and amines degrading bacteria in fish sauce. *Czech J. Food Sci.* 28: 440-449.

- Zhang QT, Tu ZC, Wang H, Huang XQ, Fan LL, Bao ZY, Xiao H. Functional properties and structure changes of soybean protein. J. Food Sci. Tech. DOI 10.1007/s13197-014-1392-9 (2014)
- 강 등(1999) “멸치 발효 액화물 가공식품의 개발” 1999, 해양수산부 연구과제 보고서
- 건강기능식품공전(2013) 조단백질 실험법.
- 김동수, 김영명, 구재근, 이영철. 1990. *Aspergillus* spp.를 이용한 sardin meal koli제조에 관한 연구. 한국수산학회지: 23(2)
- 김동훈 .1989.
- 김영명 (2008) 젓갈류 산업의 현황과 전망. 식품과학과 산업, 12월호: 16~33
- 김영명, 구재근, 이영철, 김동수, 1988, 자가소화액 및 정어리 기질 코오지를 이용한 숙성정어리액젓 제조에 관한 연구. 한국수산학회지: 21
- 김영명, 허우덕, 강통삼: 위생적인 인스턴트 젓갈 제조시험, 1980. 1. 단백질분해효소 첨가에 의한 멸치젓 숙성시험, 농어촌개발공사 식품연구소 식품연구사업보고
- 小原哲二郎 外 2人. 1990. 식품분석핸드북.
- 식품공전(2013) 조단백질 실험법.
- 식품공전. <http://www.mfds.go.kr/식품공전>
- 신혜영. 외국의 나트륨 저감 가공식품개발동향. 보건산업 브리프, 45: 1-8.
- 조규옥, 저식염 숙성 멸치 발효액화물 가공 및 숙성 중합 질소 엑스성분에 관한 연구.
- 주현규, 조연, 박충균, 조규성, 채수규, 마상조. 1989. 식품분석법. 유림문화사.
- 축산물의 가공기준 및 성분규격, 2008, 국립수의과학검역원.
- 탈염된 참치 자숙액을 이용한 천연조미료 개발, 김세권 외 4명(1999). J. Korean Fish. Soc. 32(1), 75-82
- 황종현. 2010. 산학연 컨소시엄 연구개발 보고서(저염화 기능성 김치 개발). 충주대학교.
- 酵母を利用した低食塩魚醬油の開発

[별첨]

위탁연구개발보고서

[별첨 1] 제1협동 2년차 위탁연구개발보고서

[별첨 2] 제1협동 3,4년차 위탁연구개발보고서

[별첨 3] 제2협동 위탁연구개발보고서

[별첨 1]

제1협동 2년차 위탁연구개발보고서

보고서 요약서

과제고유번호	312010-4	해당 단계 연구 기간	2014.08.08. ~ 2015.08.07	단 계 구 분	3 단계/ 총 4 단 계
연구 사업 명	중 사업 명				
	세부 사업명				
연구 과제 명	대 과제 명	관능검사를 활용한 짠맛 증진물질의 HTS 스크리닝 기법 개발 및 짠맛 평가 방법 확립			
	위탁 과제명	LC-MS를 이용한 장류식품의 저분자량 펩타이드 분석법 개발			
연구 책임자	김영수	해당단계 참여 연구원 수	총: 3명 내부: 3명 외부: 명	해당단계 연구 개발비	정부: 25,000천원 민간: 천원 계: 천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 3명 내부: 3명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 25,000천원 민간: 천원 계: 천원
연구기관명 및 소속부서명	건국대학교			참여기업명	
위탁 연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약					보고서 면수
<p>○ 주요 저분자량 peptide 분석법 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - 기존연구로 밝혀진 주요 저분자량 peptide의 LC-MS를 이용한 분석법 검증/개선 및 확립 - Agilent LC-MS 등을 이용한 표준품의 일반적 MS 및 MS/MS 자료 확보 <p>○ 시료군별 peptide 성상 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - 여장류 시료의 주요 peptide 성상 파악 및 정량/정성 자료 산출 - 시료의 peptide 분자량 범위 확보 - 처리 공정에 따른 휘발성 성분 분석 및 변화 규명 					

4. 국문 요약문

		코드번호	D-01		
연구의 목적 및 내용	<p>연구목표</p> <ul style="list-style-type: none"> - 염미 증진 효능 저분자량 peptide 분석법 확립 및 장류 시료 분석 <p>연구내용</p> <ul style="list-style-type: none"> - 주요 저분자량 peptide 분석법 확립 <ul style="list-style-type: none"> • 기존연구로 밝혀진 주요 저분자량 peptide의 LC-MS를 이용한 분석법 검정/개선 및 확립 • Agilent LC-MS 등을 이용한 표준품의 일반적 MS 및 MS/MS 자료 확보 - 시료군별 peptide 성상 분석 <ul style="list-style-type: none"> • 어장류 시료의 주요 peptide 성상 파악 및 정량/정성 자료 산출 • 시료의 peptide 분자량 범위 확보 • 처리 공정에 따른 휘발성 성분 분석 및 변화 규명 				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> - 표준품 분석 조건 비교 연구 <ul style="list-style-type: none"> • 짠맛을 내는 것으로 알려진 Dipeptide 표준품 선정 • LC를 이용한 표준품 분석조건 연구 • LC-MS를 활용 표준품 검량선 작성 - 시료별 분석 및 peptide의 조성 및 정량분석 <ul style="list-style-type: none"> • LC-MS를 활용한 시료 분석으로 시료별 peptide의 조성 확인 • 표준품을 바탕으로 작성한 검량선을 활용하여 시료내 peptide의 정량 확인 - 농축 및 활성탄 활용 시료 추출간 향기 성분의 탈취여부 확인 <ul style="list-style-type: none"> • 농축 및 활성탄 활용 전/후 시료를 GC-MS 분석을 통해 Chromatogram상 변화 확인 • GC-MS Spectrum의 패턴을 분석하여 변화된 peak에 해당하는 물질 연구 - 주요 저분자량 peptide 분석법 확립 <ul style="list-style-type: none"> • 기존연구로 밝혀진 주요 저분자량 peptide의 LC-MS를 이용한 분석법 검정/개선 및 확립 • Agilent 기기 등을 이용하여 표준품의 일반적 MS 및 MS/MS 자료 확보 - 시료군별 peptide 성상 분석 <ul style="list-style-type: none"> • 어장류 시료의 주요 peptide 성상 파악 및 정량/정성 자료 산출 • 일부 시료의 peptide 분자량 범위 확보 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 식품의 염미 증진 물질 분석의 기반 제공 - 효과적인 분석 자료 산출에 의한 유통 식품의 효용성 평가 - 식품 중, 일반 저분자량 peptide 선별 효율성 증대 - 신규 peptide에 의한 식품 부가가치 증대 				
중심어 (5개 이내)	펩타이드	염미증진	젓갈	휘발성	

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

1. 연구개발 목적

본 연구는 장류식품 및 원료 제품의 가공 공정에 따른 염미 증진 peptide 및 휘발성 성분의 조성 및 정량분석법 확립을 목표로 하여 수행되었음.

2. 연구개발의 필요성

장류식품 및 원료 제품에 존재하는 염미 증진 peptide를 명확하게 규명하고, 이들 물질의 규명을 통해 염미 증진 peptide를 대량생산할 수 있는 기초자료를 확보하기위해 물질의 분석법을 확립할 필요가 있음

3. 연구개발 범위

- 표준품 분석 조건 비교 연구
 - 짠맛을 내는 것으로 알려진 Dipeptide 표준품 선정
 - LC를 이용한 표준품 분석조건 연구
 - LC-MS를 활용 표준품 검량선 작성
- 시료별 분석 및 peptide의 조성 및 정량분석
 - LC-MS를 활용한 시료 분석으로 시료별 peptide의 조성 확인
 - 표준품을 바탕으로 작성한 검량선을 활용하여 시료내 peptide의 정량 확인
- 농축 및 활성탄 활용 시료 추출간 향기 성분의 탈취여부 확인
 - 농축 및 활성탄 활용 전/후 시료를 GC-MS 분석을 통해 Chromatogram상 변화 확인
 - GC-MS Spectrum의 패턴을 분석하여 변화된 peak에 해당하는 물질 연구
- 주요 저분자량 peptide 분석법 확립
 - 기존연구로 밝혀진 주요 저분자량 peptide의 LC-MS를 이용한 분석법 검정/개선 및 확립
 - Agilent 기기 등을 이용하여 표준품의 일반적 MS 및 MS/MS 자료 확보
- 시료군별 peptide 성상 분석
 - 어장류 시료의 주요 peptide 성상 파악 및 정량/정성 자료 산출
 - 일부 시료의 peptide 분자량 범위 확보

2. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

1. 주요 저분자량 Dipeptide 분석법 확립 및 시료분석

1) 시약 및 재료

Liquid chromatograph-mass spectrometer(LC-MS)에 사용한 초순수는 Siemens Labostar 7 TWF-UV를 사용하였고, acetonitrile (ACN), ethyl acetate(EA)은 Fisher 사 (HPLC) 제품을 사용하였다. 연구에 사용된 주요 dipeptide 표준품 및 시료는 다음과 같다. 표준품 dipeptide는 Bachem (Korea)에서 합성화학적으로 제조된 것으로, 순도는 98%이상이었다. 장류 시료는 다양한 탈염 및 탈취 공정에 따라 제조된 것으로 차의과대학 및 바이오 벤(주)에서 공급받아 사용하였다.

가. Dipeptide Standard

구 분	이 름	분자량	제조사
STD-1	H-Arg-Tyr-OH acetate salt	337.38	BACHEM
STD-2	H-Glu(His-OH)-OH	284.27	
STD-3	H-Arg-Glu-OH	303.32	
STD-4	H-Glu(Gln-OH)-OH	275.26	
STD-5	H-Glu(Gly-OH)-OH	204.18	
STD-6	H-Arg-Ala-OH acetate	245.28	
STD-7	H-Arg-Asp-OH	289.29	
STD-8	H-Arg-Gly-NH ₂ ·Sulfate	328.35	
STD-9	H-Glu(Glu-OH)-OH	276.25	

나. Sample

시 료 군		처리방법	비고
멸 치	Sample-1	가수분해물	차의과대학
	Sample-2	10Kd <	
	Sample-3	5Kd < < 10Kd	
	Sample-4	250d < < 5Kd	
	Sample-5	< 250d	
분리대두단백	Sample-6	가수분해물	바이오 벤

2) 실험 방법

가. Standard Curve

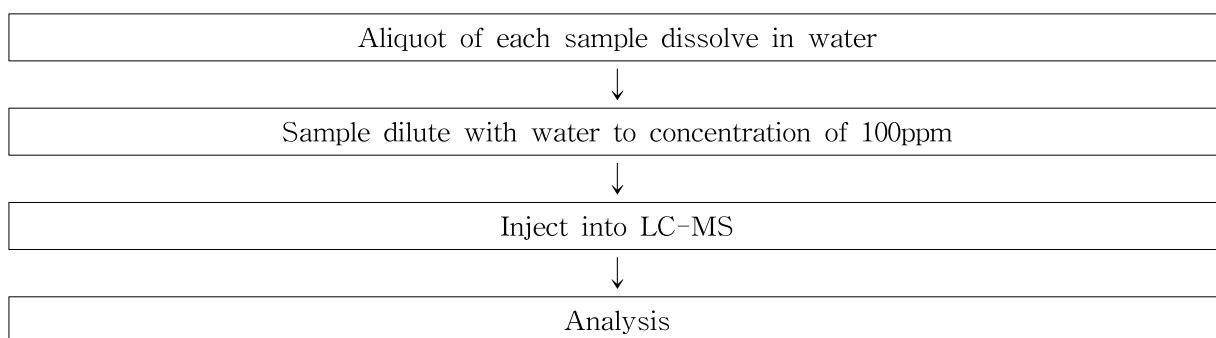
- (1) 각 dipeptide standard 5mg을 분취해 1000ppm의 표준용액을 조제하였다.
- (2) 상기 표준품 용액을 희석, 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10ppm의 농도의 분석 표준품 용액을 조제하였다
- (3) 상기 용액을 이하에 기재된 LC-MS로 분석하여 시료 중 dipeptide의 정량 및 정성 분석을 수행하였다.

나. LC-MS 분석조건

분석에 이용한 LC는 Agilent HEWLETT PACKARD SERIES 1100, peptide 정량 및 정성을 위한 MS로는 Varian 500-MS IT Mass spectrometer를 이용하였다. 분석에 사용된 용매는 상기한 바와 같이 HPLC급의 acetonitrile 및 초순수를 이용하였고, peptide 분리에 사용된 column은 Agilent Eclipse XDB-C8(5 μ m, 4.6 × 150mm)이었다. 이하 세부적 LC-MS 운용 조건을 기재하였다.

Column	Agilent Eclipse XDB-C8(5 μ m, 4.6 × 150mm)
Column temp.	25 $^{\circ}$ C
Mobile Phase	중류수(0.1% F.A) : ACN(0.1% F.A) (95 : 5) 15min Isocratic
Detector	UV/Visible(210nm)
Flow rate	0.2mL/min
Inj. vol.	5 μ L
Needle Voltage	3500volts
Capillary voltage	80volts
Drying gas temp.	350 $^{\circ}$ C
Drying gas pressure (nitrogen)	30psi
Nebulizer gas pressure (nitrogen)	40psi
Scan range	90~600

다. 모식도



3) 실험 결과

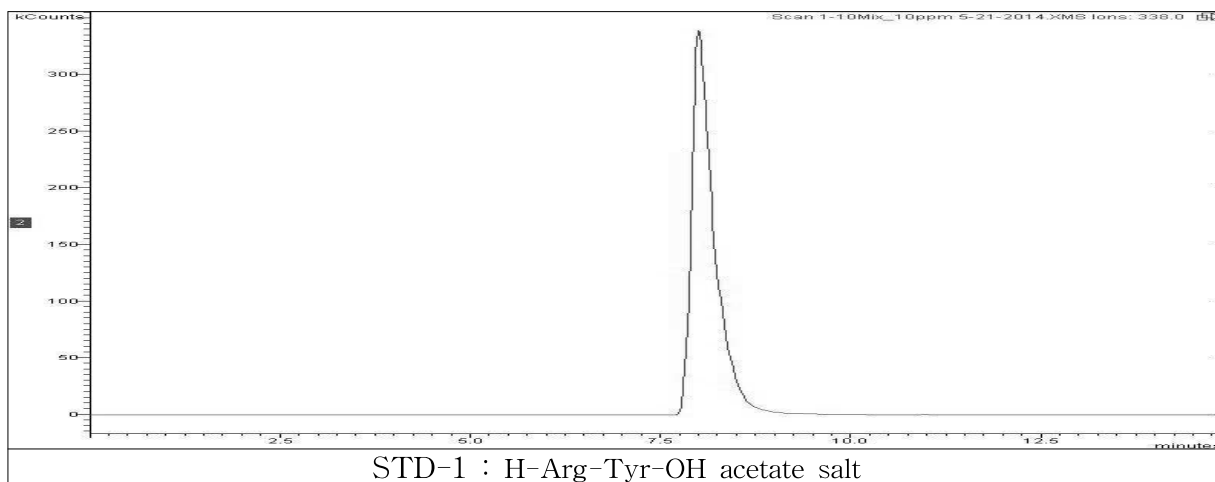
9종의 peptide를 이용, 표준분석 조건을 확립하였다. 본 연구에서는 3종의 Column 및 다양한 이동상 조건하에서 표준품의 분리능을 검증하여 최종적으로 분리능이 가장 우수하고, peak의 분리 및 감도가 가장 양호한 Agilent eclips XDB-C8 column으로 LC-MS로 분석하였다.

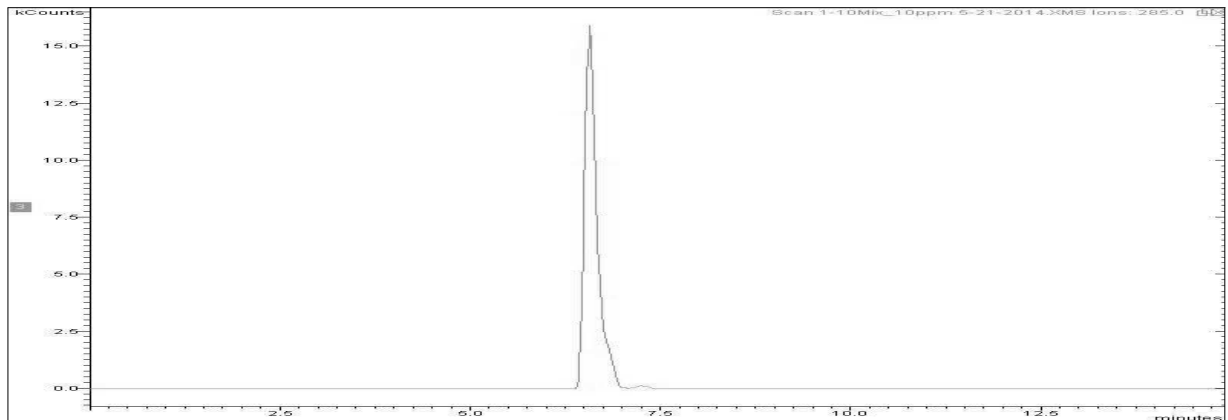
가. Standard LC-MS 분석 결과

표준품의 LC-MS 분석은 분석 표준품 용액을 사용하였으며, 각 표준품별로 6~8분 사이에 검출되었다. 각 표준품별 retention time과 Area값은 다음과 같다.

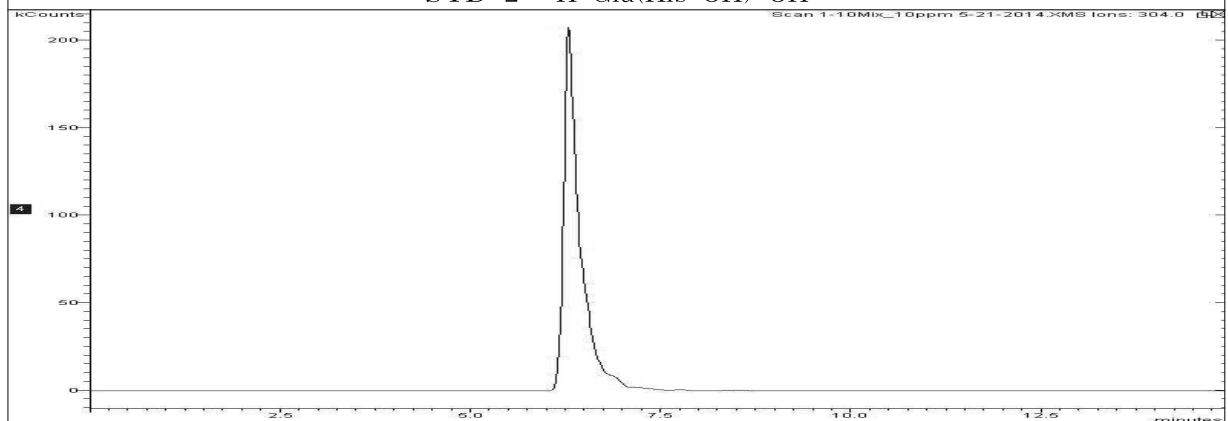
Peptide	Retention time	Area	비고
H-Arg-Tyr-OH acetate salt	8.631	7024000	
H-Glu(His-OH)-OH	6.605	185824	
H-Arg-Glu-OH	6.441	2987000	
H-Glu(Gln-OH)-OH	7.092	1257000	
H-Glu(Gly-OH)-OH	7.127	254204	
H-Arg-Ala-OH acetate	6.413	2645000	
H-Arg-Asp-OH	6.372	2483000	
H-Arg-Gly-NH ₂ ·Sulfate	6.140	1496000	
H-Glu(Glu-OH)-OH	7.817	1406000	

(별첨) 각 표준품별 LC-MS Chromatogram

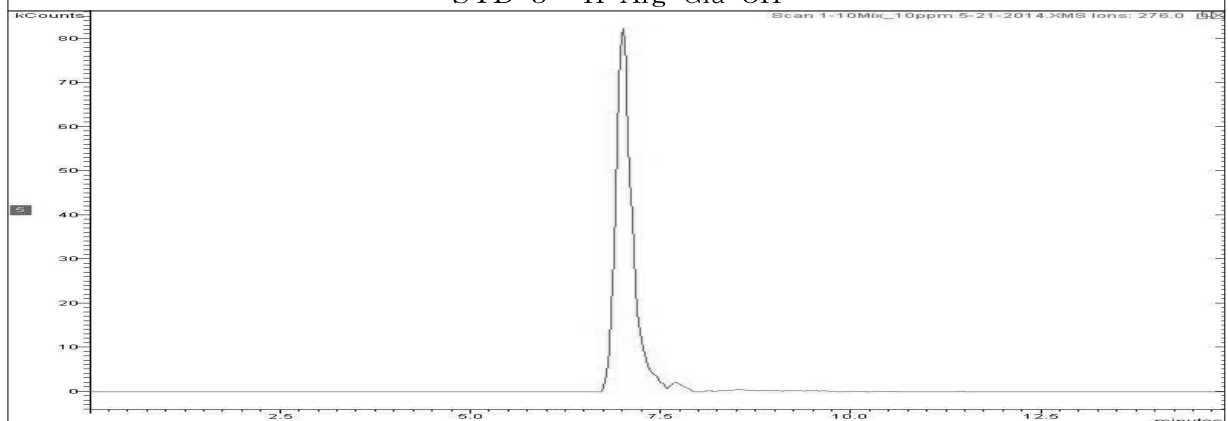




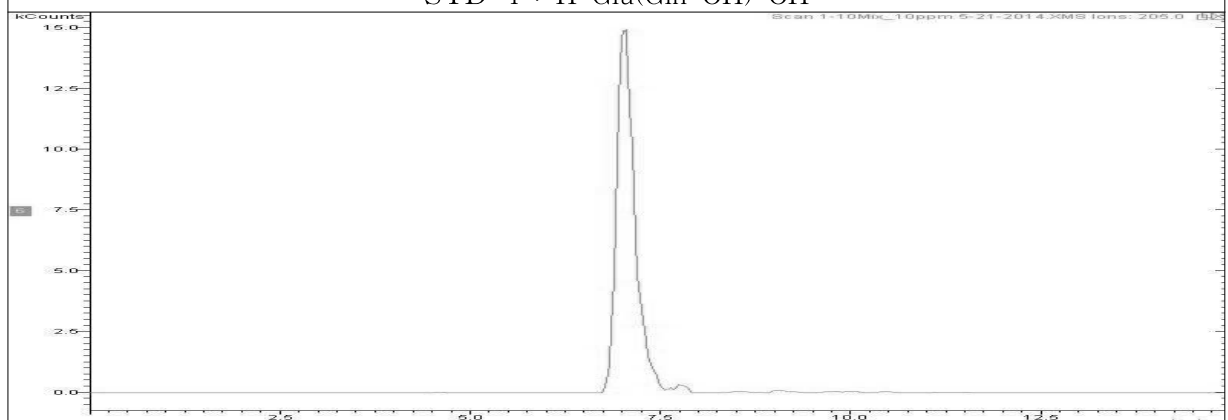
STD-2 : H-Glu(His-OH)-OH



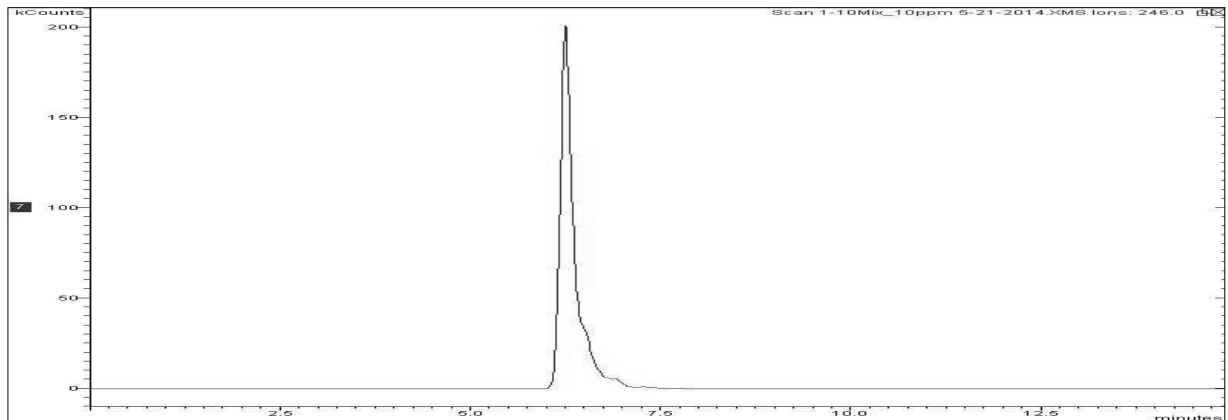
STD-3 : H-Arg-Glu-OH



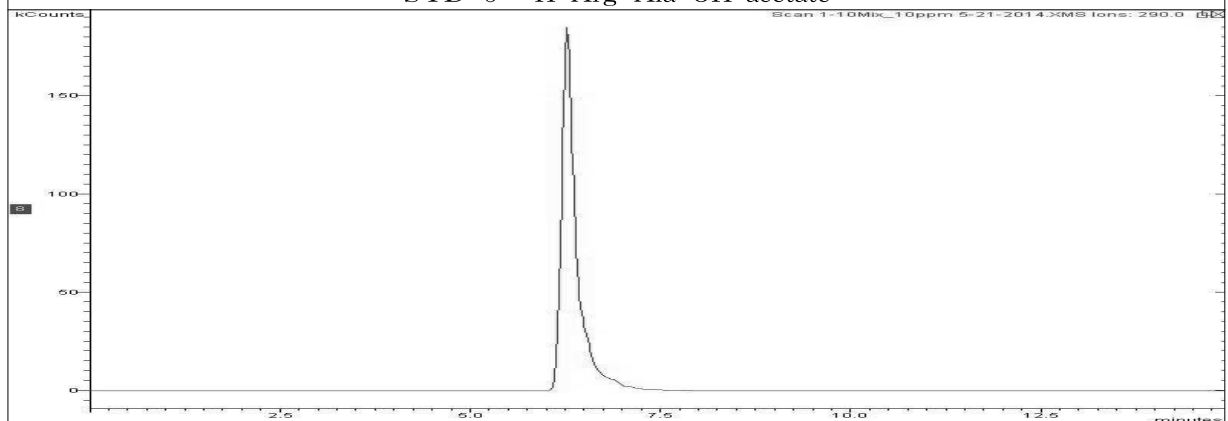
STD-4 : H-Glu(Gln-OH)-OH



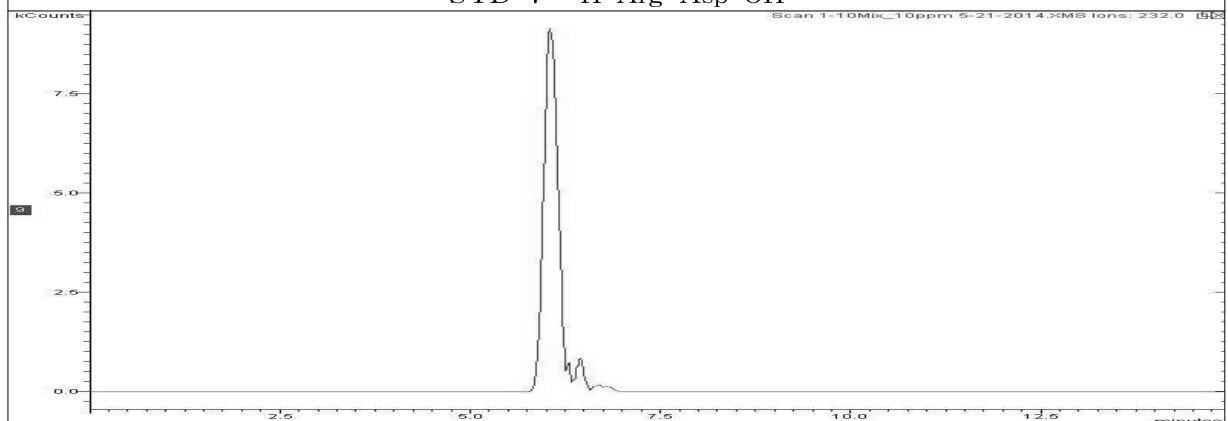
STD-5 : H-Glu(Gly-OH)-OH



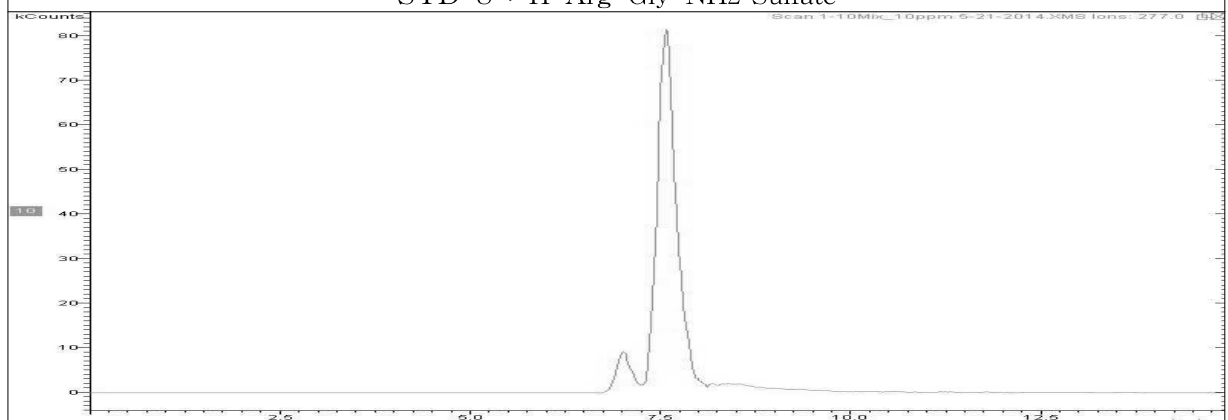
STD-6 : H-Arg-Ala-OH acetate



STD-7 : H-Arg-Asp-OH



STD-8 : H-Arg-Gly-NH2-Sulfate



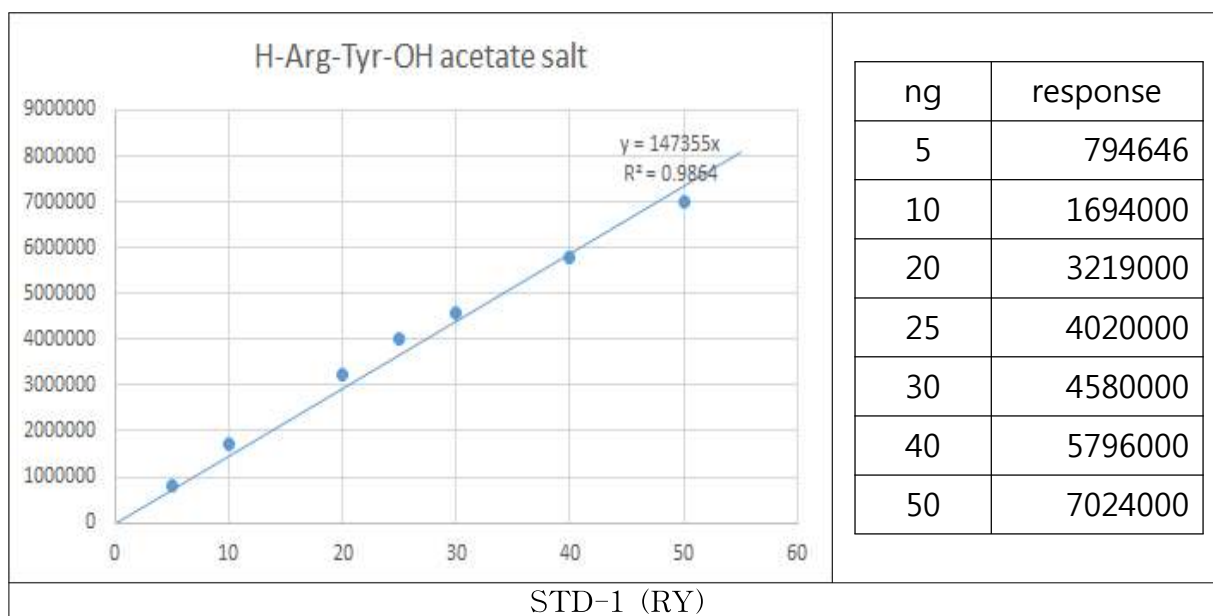
STD-9 : H-Glu(Glu-OH)-OH

나. 표준검량선 (Standard curve)

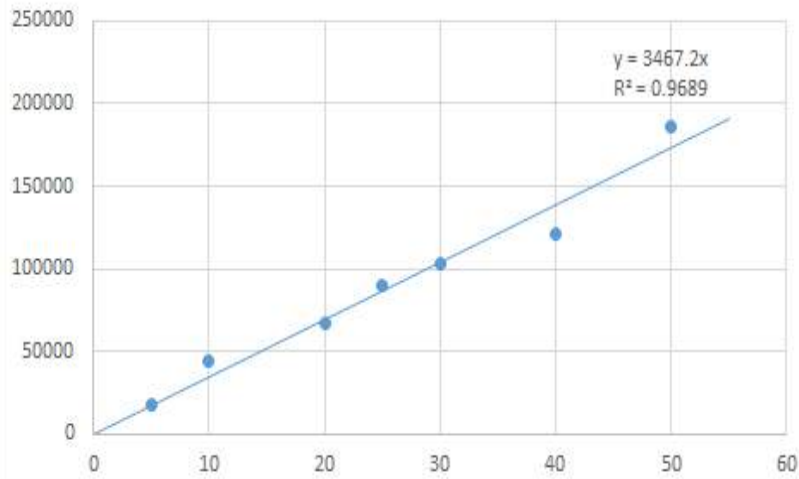
표준품의 LC-MS로 분석한 자료를 바탕으로 Standard curve table을 작성하였다. 각 표준검량선은 5~50ng (1~10ppm)의 표준품을 LC-MS에 주입하여 나타난 peak의 면적을 바탕으로 작성하였다. 이상의 결과를 하단 표에 기재하였다. 표준검량선 R² 값의 평균은 0.95이상으로 시료의 정량분석에 적합하였다.

한편 분석결과, peptide의 종류에 따라 매우 상이한 response factor를 나타내는 것을 알 수 있었다. 예를 들어 arginine을 포함한 dipeptide인 RY와 RE의 경우, 4배 이상의 분석 감도의 차이를 나타내었다.

Peptide	linear regression	R ²	비고
H-Arg-Tyr-OH acetate salt (RY)	y=14755x	0.9864	
H-Glu(His-OH)-OH (EH)	y=3467.2x	0.9689	
H-Arg-Glu-OH (RE)	y=60022x	0.9795	
H-Glu(Gln-OH)-OH (EQ)	y=26721x	0.9781	
H-Glu(Gly-OH)-OH (EG)	y=5609.8x	0.933	
H-Arg-Ala-OH acetate (RA)	y=53458x	0.9784	
H-Arg-Asp-OH (RD)	y=50766x	0.9837	
H-Arg-Gly-NH ₂ ·Sulfate (RG)	y=24432x	0.8255	
H-Glu(Glu-OH)-OH (EE)	y=29484x	0.9635	



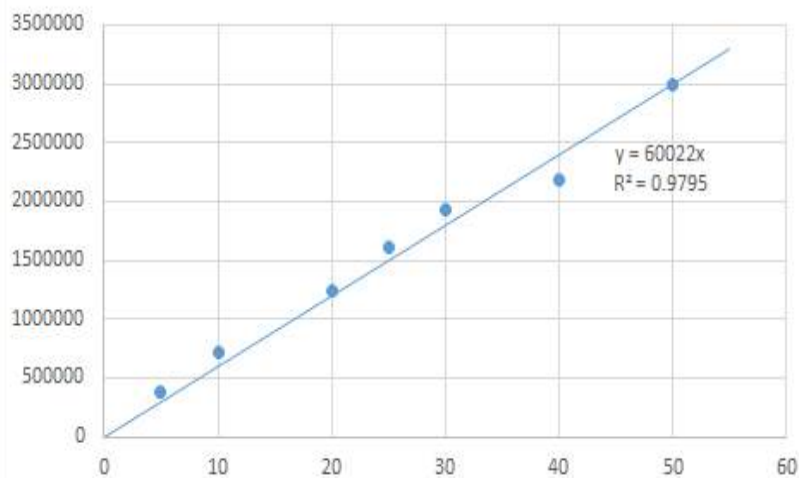
H-Glu(His-OH)-OH



ng	response
5	17934
10	43704
20	66617
25	89534
30	103135
40	121017
50	185824

STD-2 (EH)

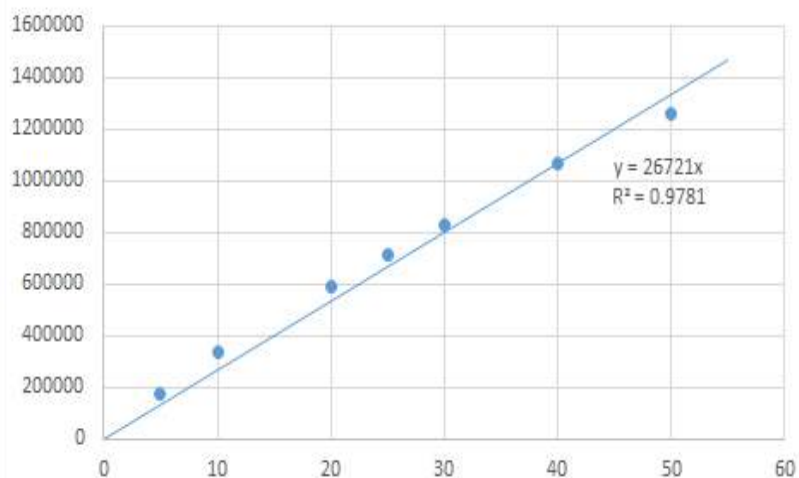
H-Arg-Glu-OH



ng	response
5	373431
10	715656
20	1245000
25	1610000
30	1939000
40	2186000
50	2987000

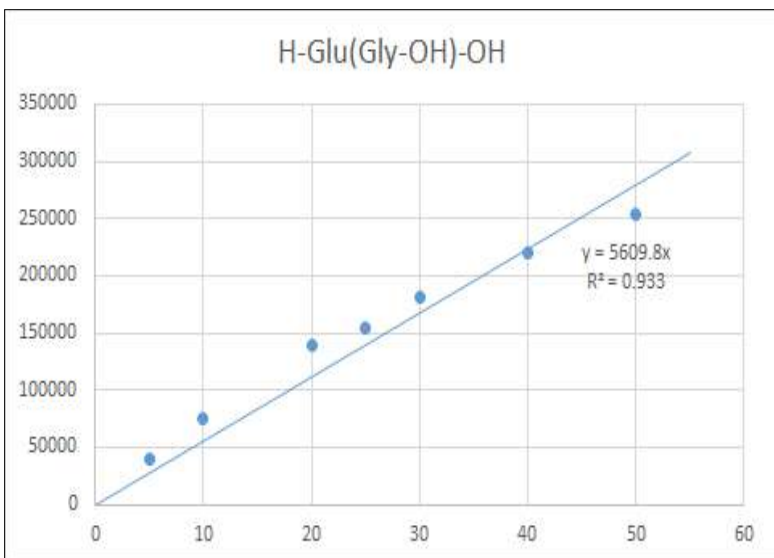
STD-3 (RE)

H-Glu(Gln-OH)-OH



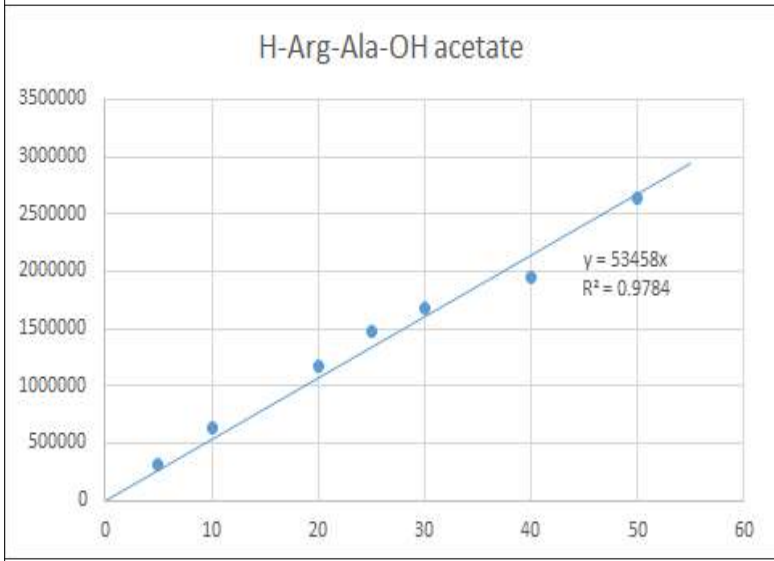
ng	response
5	172844
10	337973
20	593217
25	714779
30	830237
40	1065000
50	1257000

STD-4 (EQ)



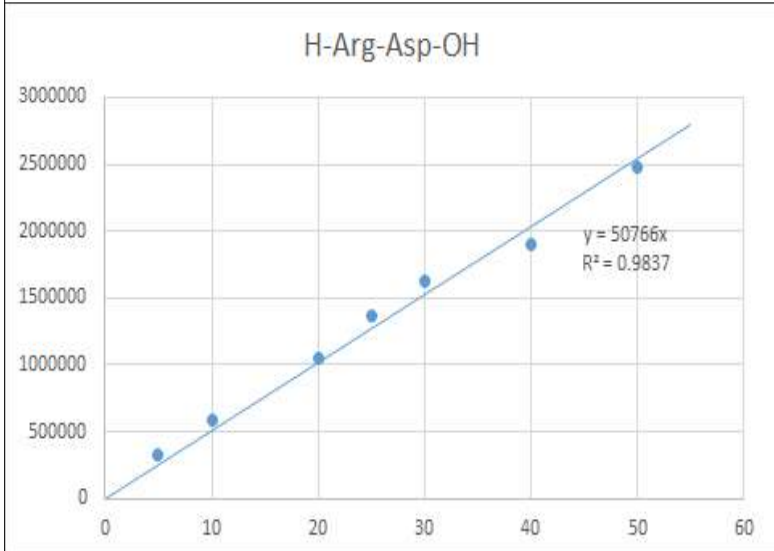
ng	response
5	40212
10	75913
20	138752
25	153820
30	180727
40	219689
50	254204

STD-5 (EG)



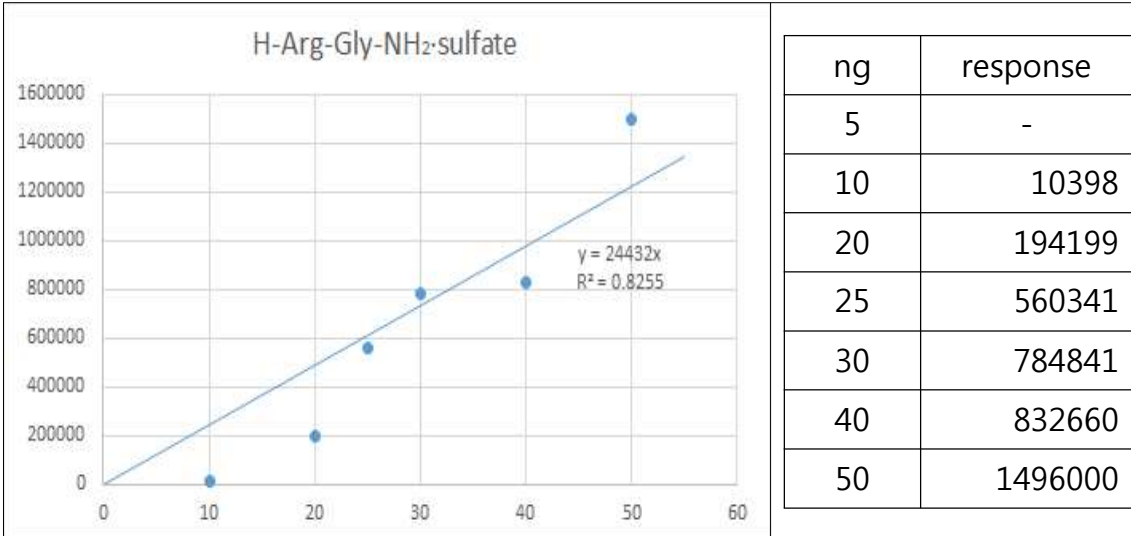
ng	response
5	306101
10	641317
20	1165000
25	1473000
30	1678000
40	1952639
50	2645000

STD-6 (RA)

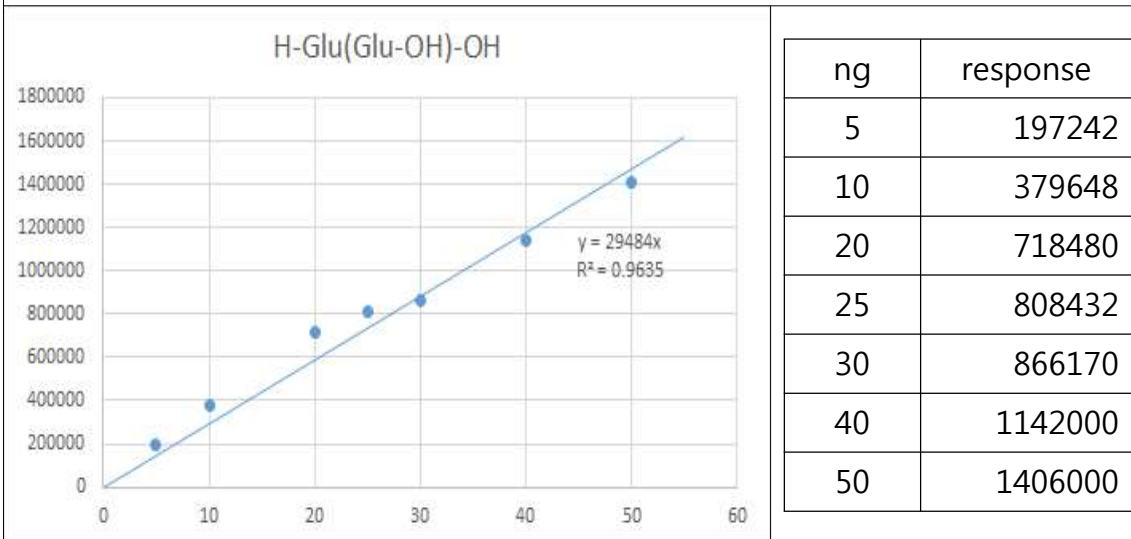


ng	response
5	327645
10	587019
20	1055000
25	1372000
30	1633000
40	1904000
50	2483000

STD-7 (RD)



STD-8 (RG)



STD-9 (EE)

다. 시료별 LC-MS 분석 결과

시료의 LC-MS분석은 표준품의 분석과 동일한 조건으로 진행하였다. 각 시료별 분석 대상 dipeptide의 LC-MS peak 면적을 아래의 표에 정리하였으며, 극미량 검출되어 LC-MS의 noise와 구분이 어려운 경우, Trace level(TR)로 표기하였다. 개별 시료 중의 분석 대상 peptide의 [M+H]⁺ ion의 m/z 값을 이용한 selected ion chromatogram을 별첨에 수록하였다.

TR : Trace level

구분	Sample-1	Sample-2	Sample-3	Sample-4	Sample-5	Sample-6
RY	TR	TR	TR	TR	TR	34896
EH	3963	5462	3875	48753	TR	TR
RE/ER	67758	63149	127370	364834	TR	103199
EQ	170487	168722	225641	456193	TR	81927
EG	1495	18544	13141	37446	TR	TR
RA/AR	3722	TR	39904	84065	TR	122001
RD	31824	16763	25699	111110	TR	103179
RG/GR	129260	65079	141654	256819	TR	56668
EE	69258	100218	84810	220450	TR	6364

(1) 멸치

멸치시료의 분석은 분말상태로 공급된 개별 시료를 증류수에 녹여 500ppm의 농도로 분석용액을 제조, 분석을 수행하였다.

멸치시료에서는 표준품 9가지 중 STD-1(RY, Arg-Tyr)을 제외한 8가지의 peptide가 검출되었으며, nano filtration 후 250d < <5Kd를 취한 Sample-4에서 가장 많은 peptide가 검출되었고, 분석 대상 peptide 중에서는 STD-4(EQ, Glu-Gln)가 가장 많은 양이 검출되었다.

시료별 peptide의 함량 및 median과 range는 아래 표에 정리하였다.

Compound	Concentration (µmol/L)				
	Sample-1	Sample-2	Sample-3	Sample-4	Sample-5
RY	0	0	0	0	0
EH	0.80	1.10	0.79	9.90	0
RE / ER	0.75	0.69	1.40	4.01	0
EQ	4.64	4.59	6.14	12.42	0
EG	0.26	3.24	2.30	6.54	0
RA / AR	0.06	0	0.61	1.28	0
RD	0.43	0.23	0.35	1.51	0
RG / GR	2.98	1.62	3.54	6.41	0
EE	1.70	2.46	2.08	5.42	0

Compound	Concentration (µmol/L)	
	median	range
RY	0	0
EH	0.80	0-9.90
RE / ER	0.69	0-4.01
EQ	4.64	0-12.42
EG	2.30	0-6.54
RA / AR	0.33	0-1.28
RD	0.35	0-1.51
RG / GR	2.98	0-6.41
EE	2.08	0-5.42

(2) 분리대두단백

분리대두단백시료의 분석은 시료를 1000ppm의 농도로 분석용액을 제조하여 분석하였다. 분리대두단백시료에서는 표준품 9가지 중 STD-2(EH, Glu-His), STD-5(EG, Glu-Gly)를 제외한 7가지의 peptide가 검출되었다.

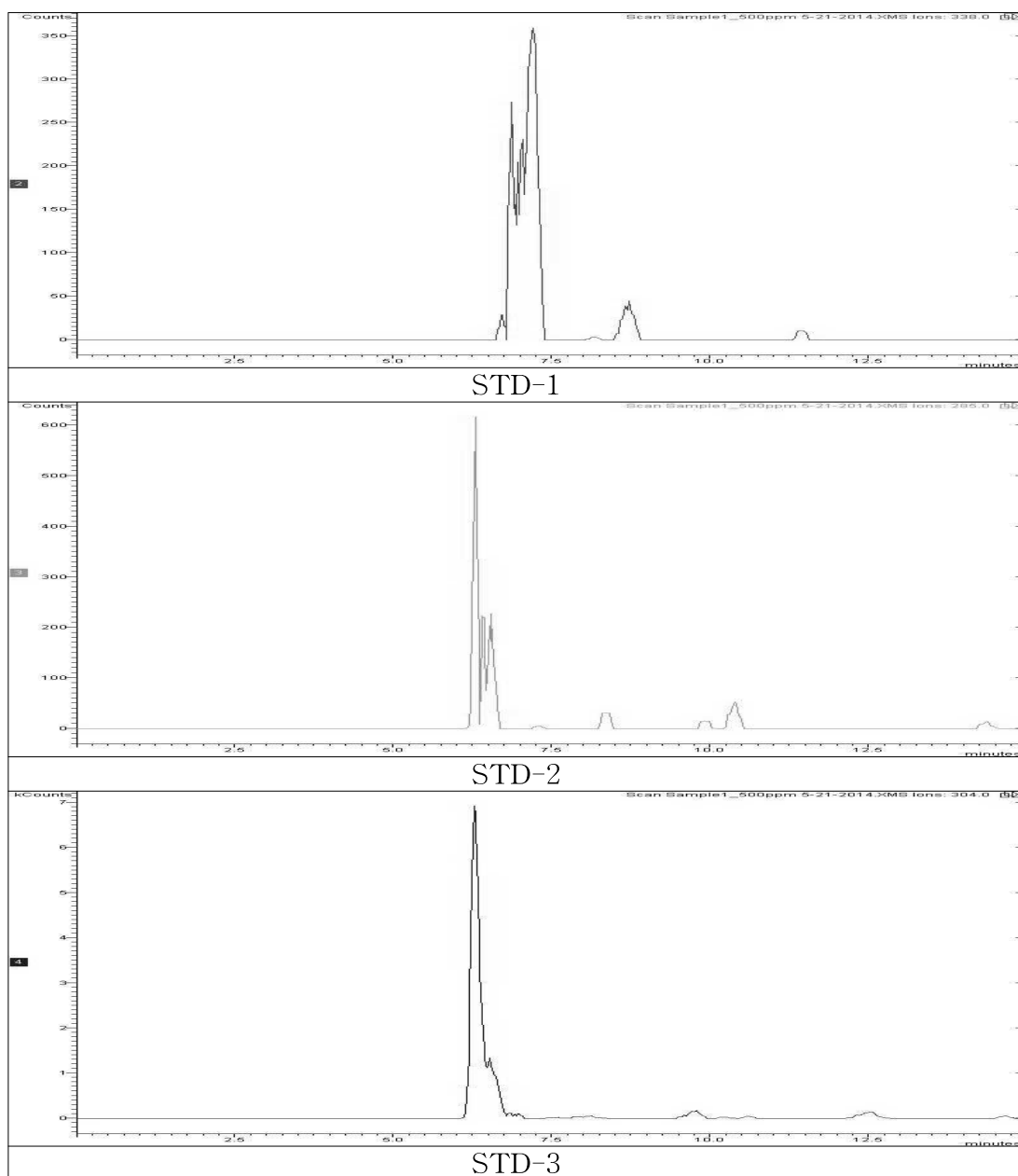
멸치시료와 동일하게 전체 peptide 중에서 STD-4 (EQ, Glu-Gln)가 가장 많은 양이 검출되었다. 한편 분석 대상 peptide의 총량 역시 멸치 시료의 경우와 비교, 낮은 것으로 나타났다.

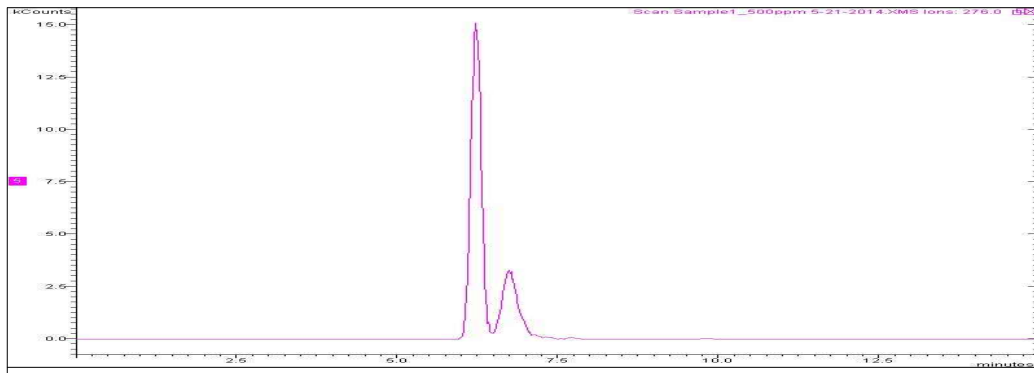
시료의 peptide함량은 아래 표에 정리하였다.

Compound	Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	
	median	range
RY	0.14	0.14
EH	0	0
RE / ER	1.13	1.13
EQ	2.30	2.30
EG	0	0
RA / AR	1.71	1.71
RD	1.41	1.41
RG / GR	1.41	1.41
EE	0.17	0.17

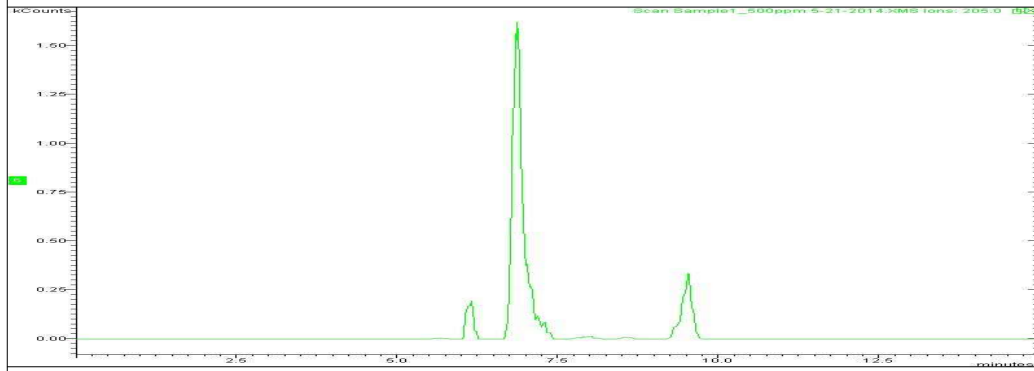
(별첨) 각 시료별 LC-MS Chromatogram

(1) Sample 1

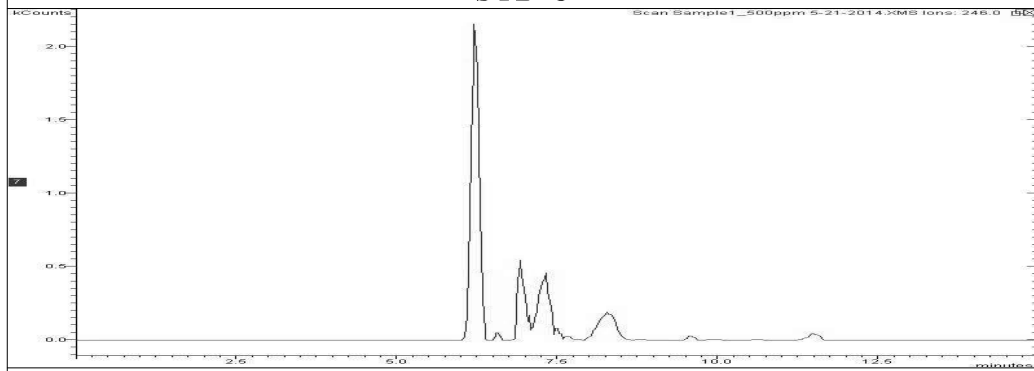




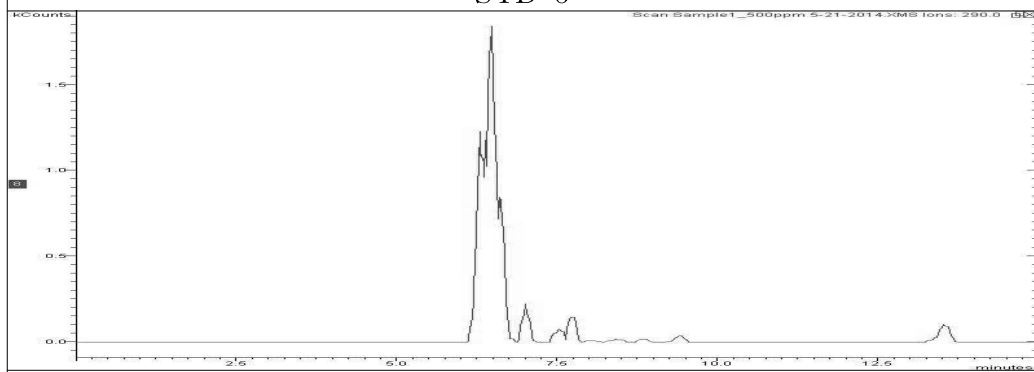
STD-4



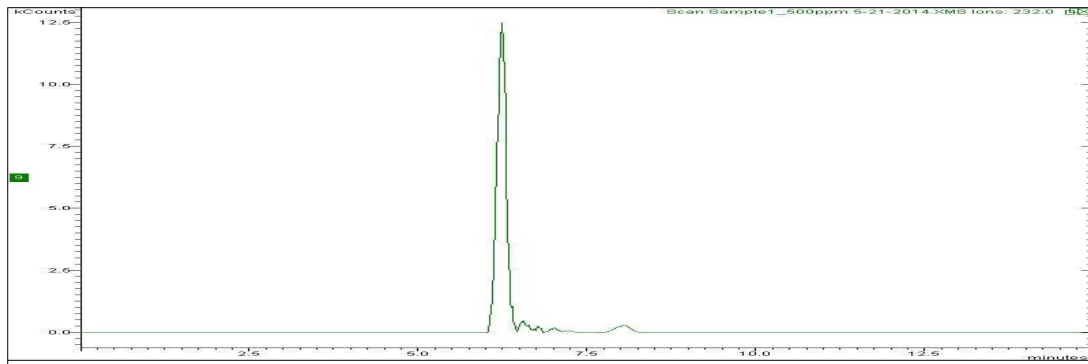
STD-5



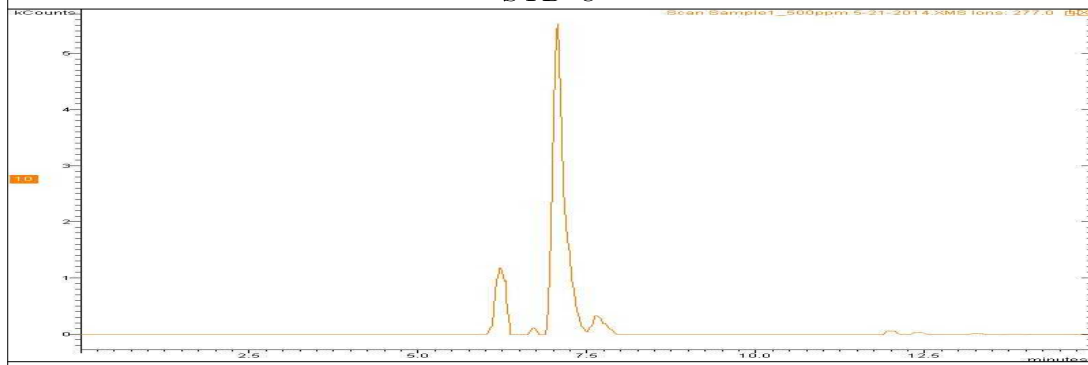
STD-6



STD-7

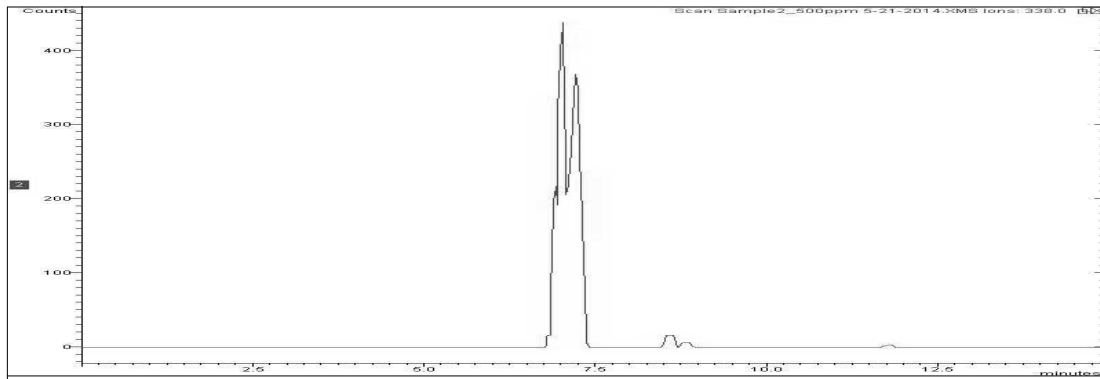


STD-8

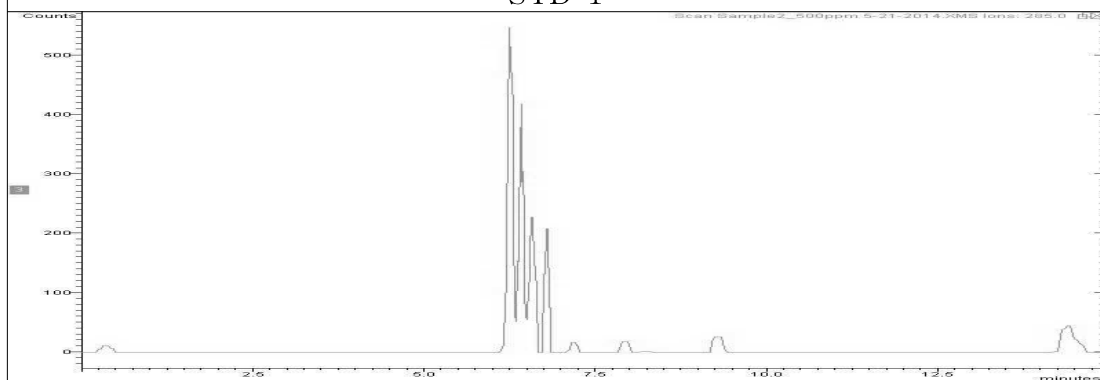


STD-9

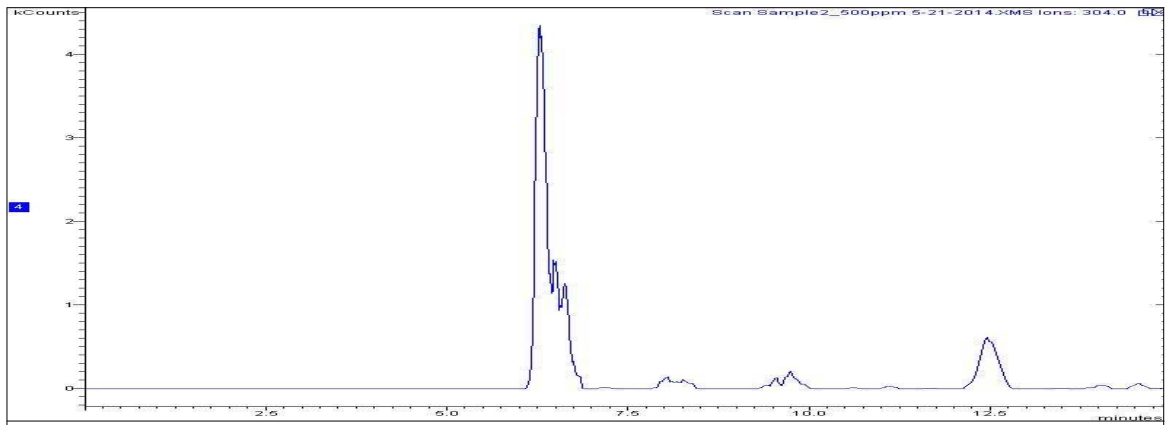
(2) Sample 2



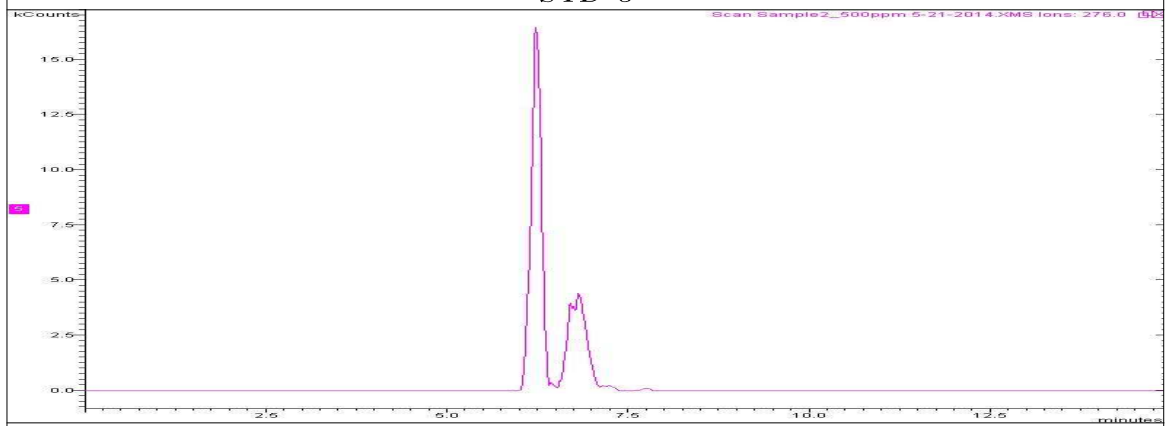
STD-1



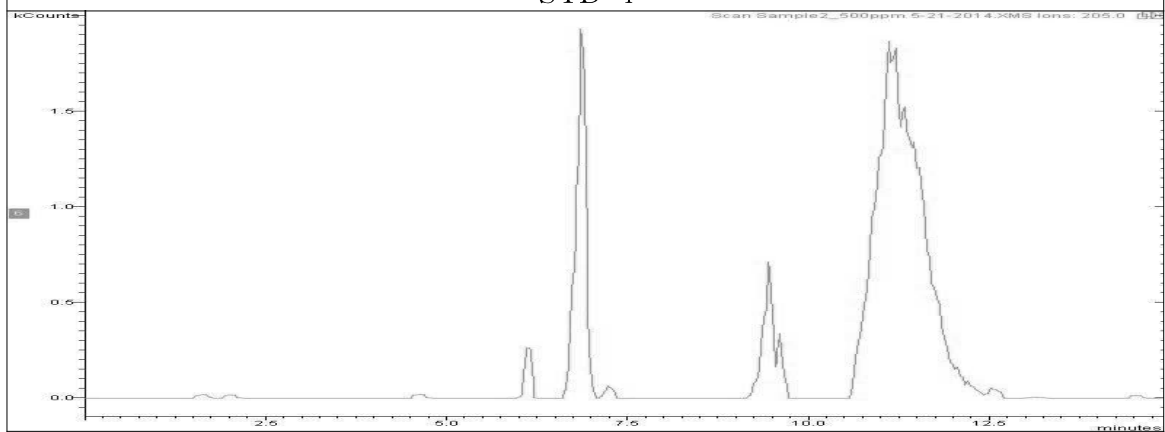
STD-2



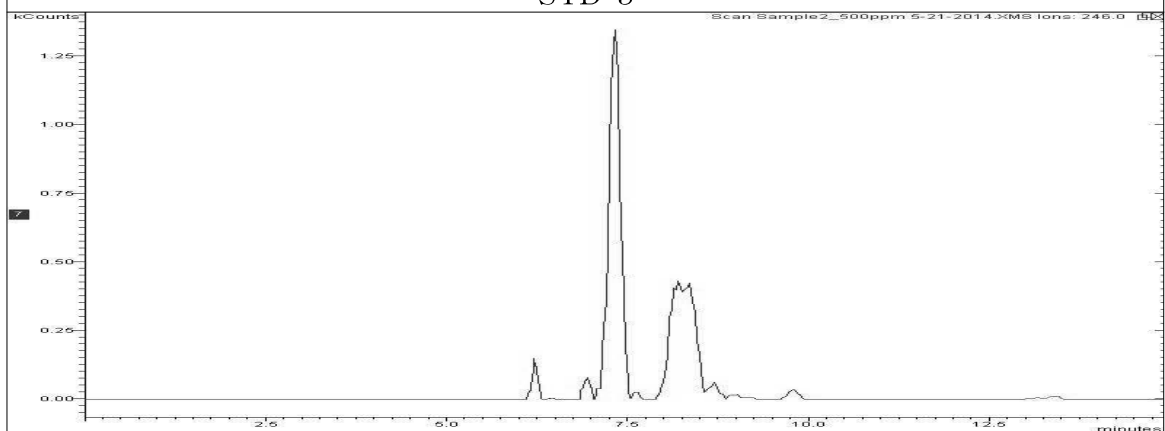
STD-3



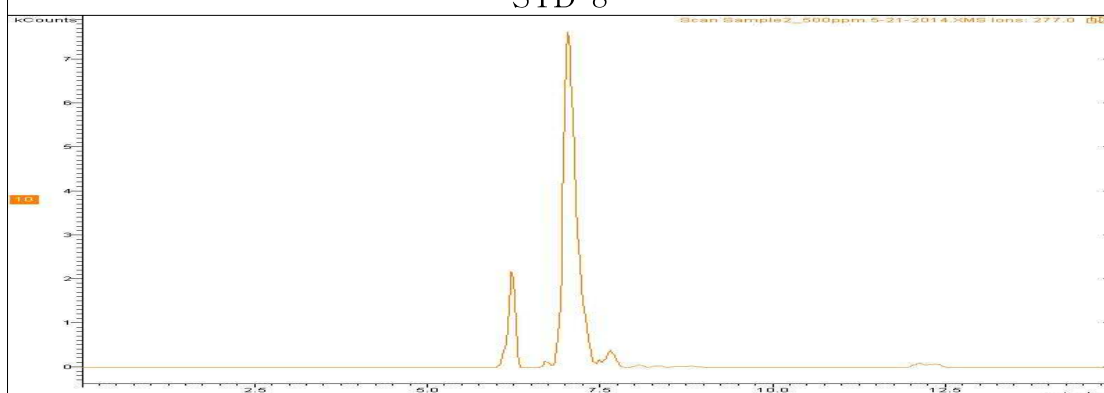
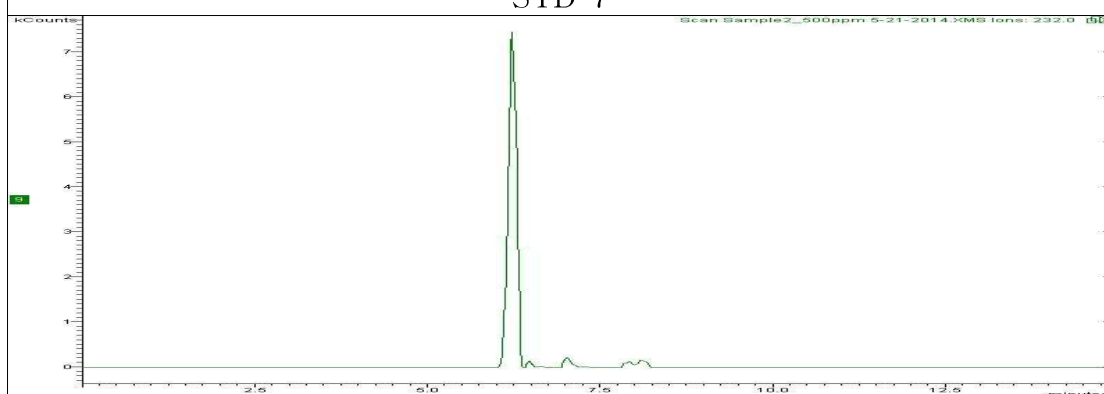
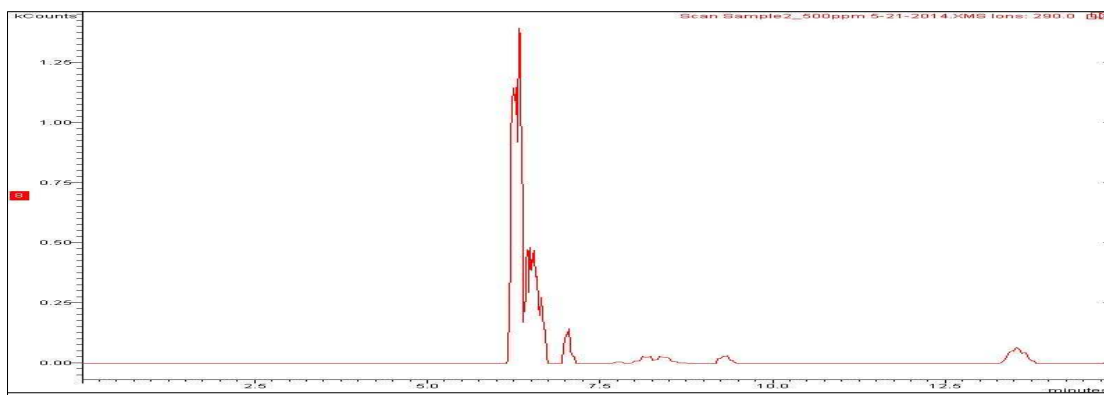
STD-4



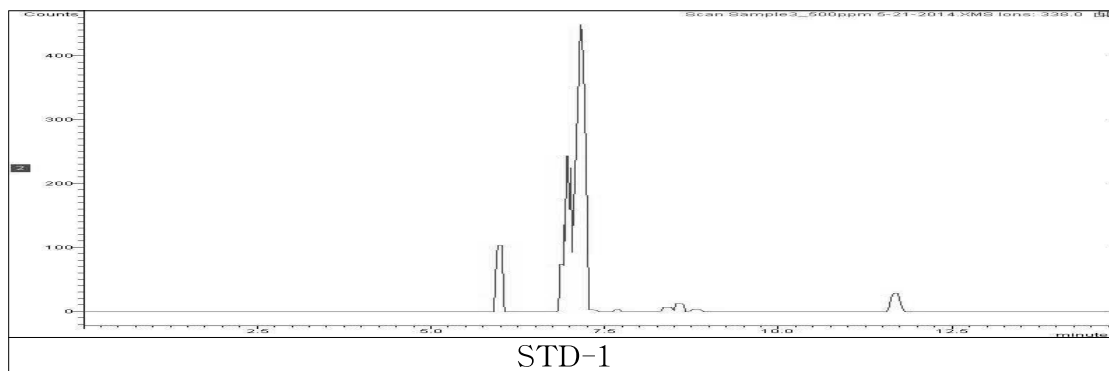
STD-5

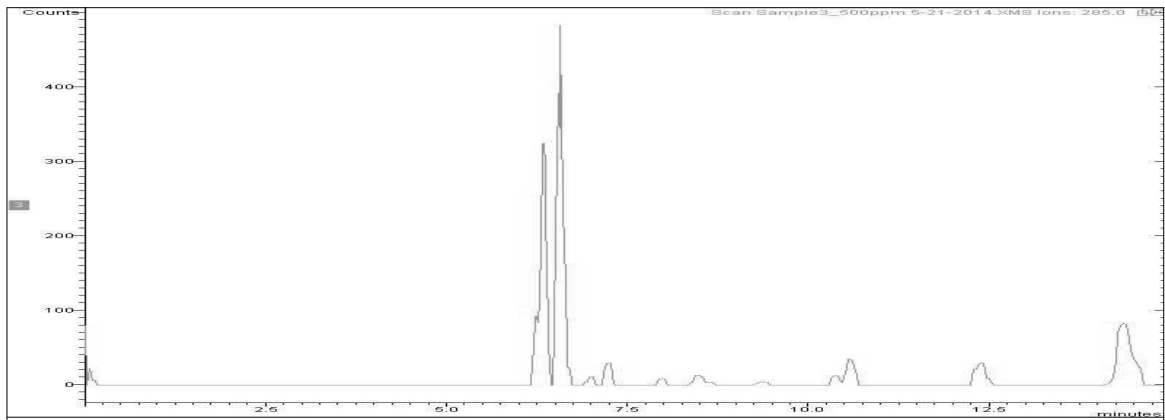


STD-6

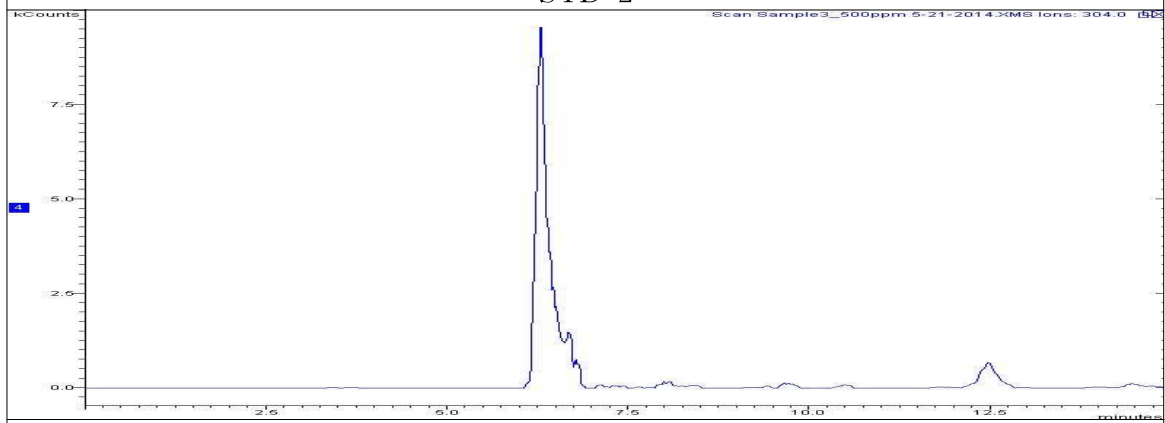


(3) Sample 3

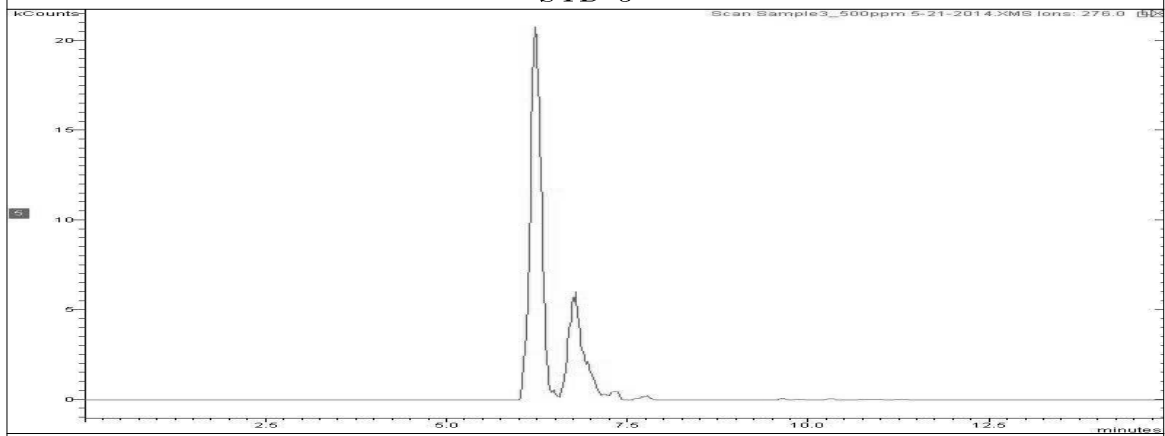




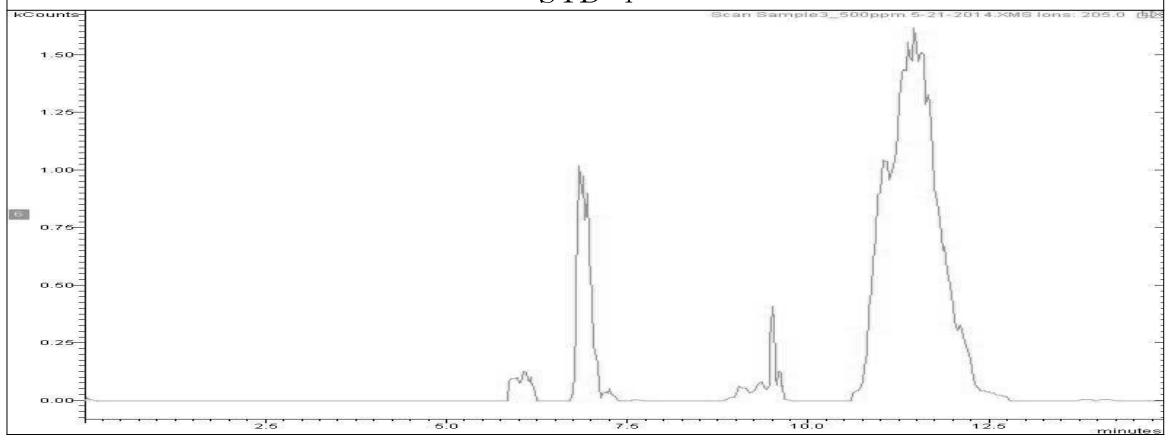
STD-2



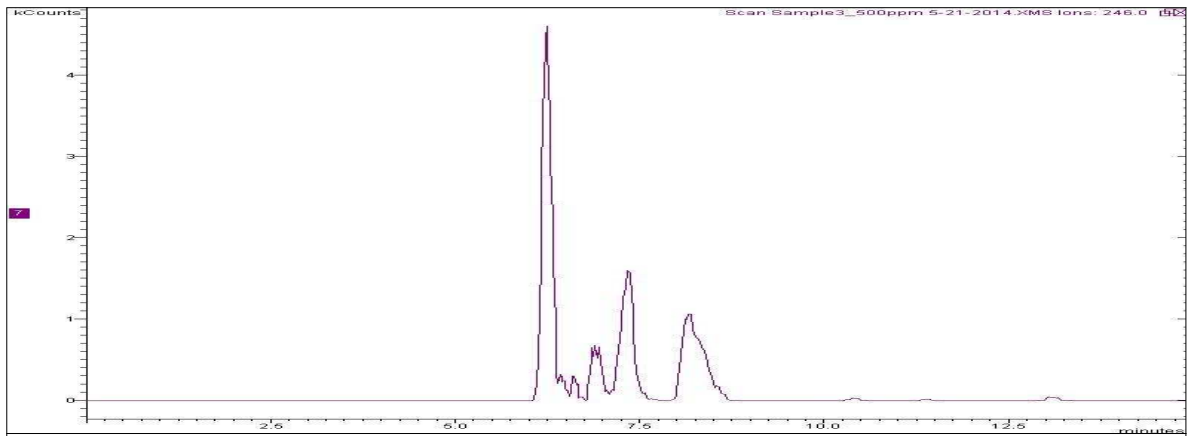
STD-3



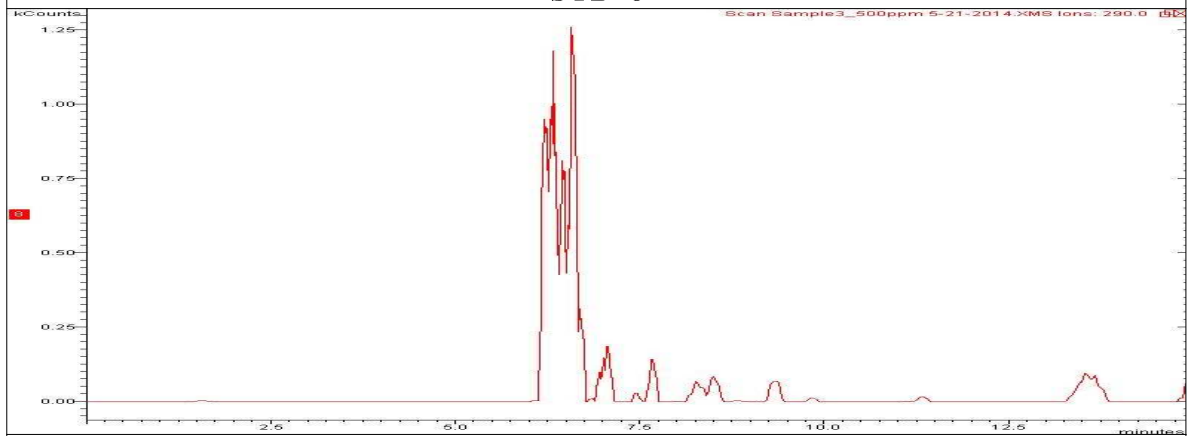
STD-4



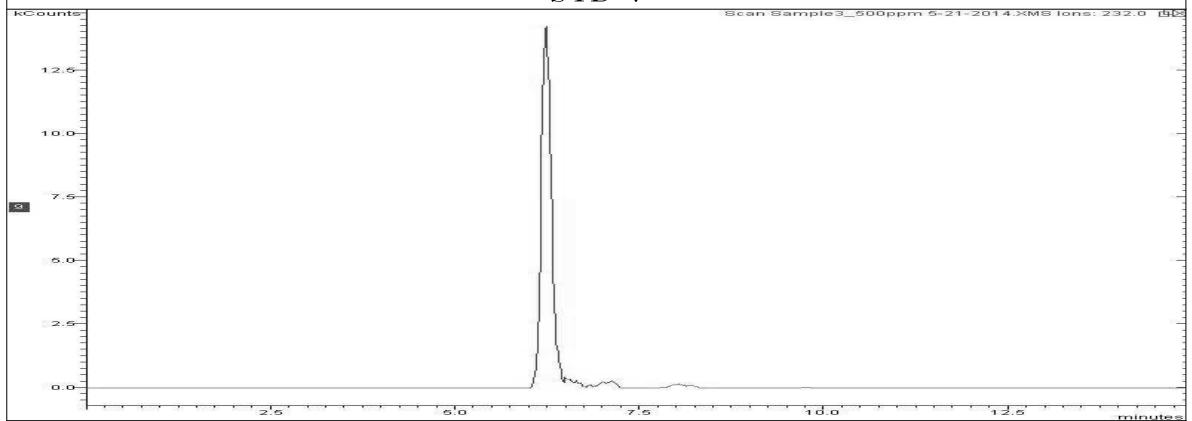
STD-5



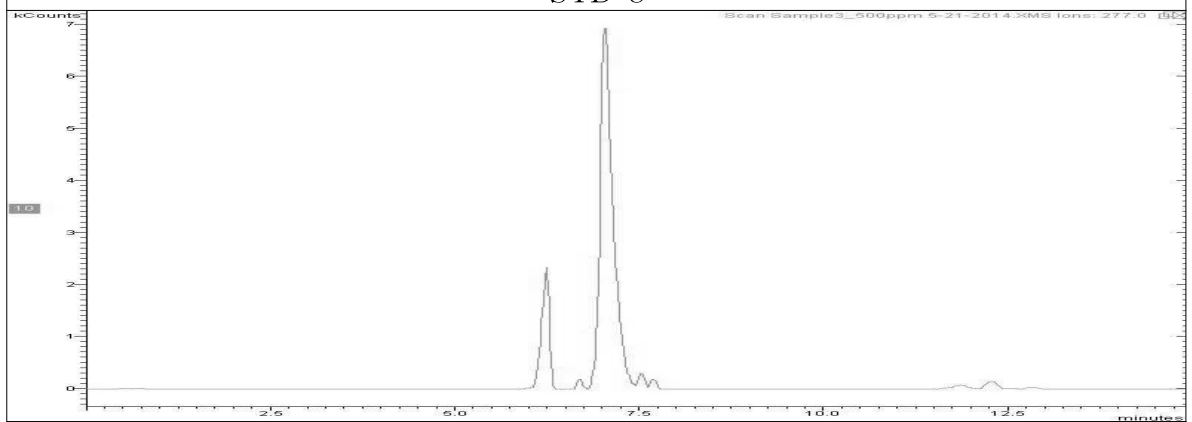
STD-6



STD-7

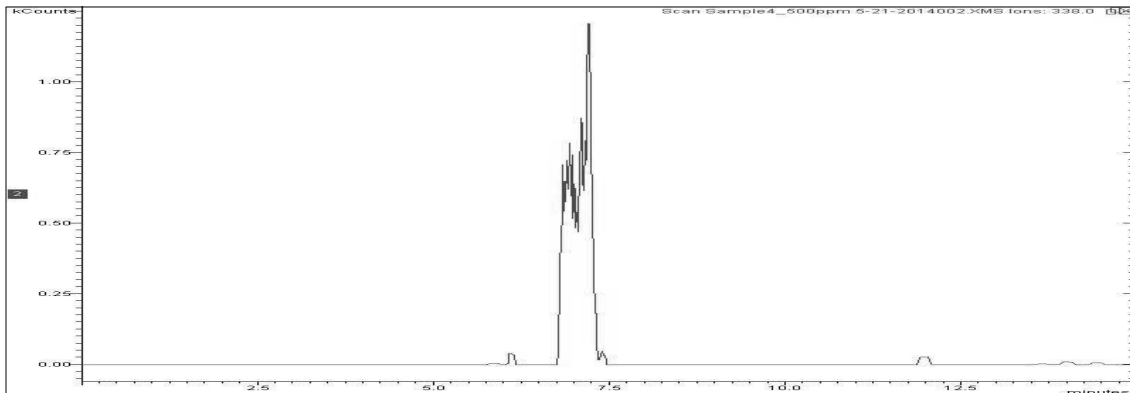


STD-8

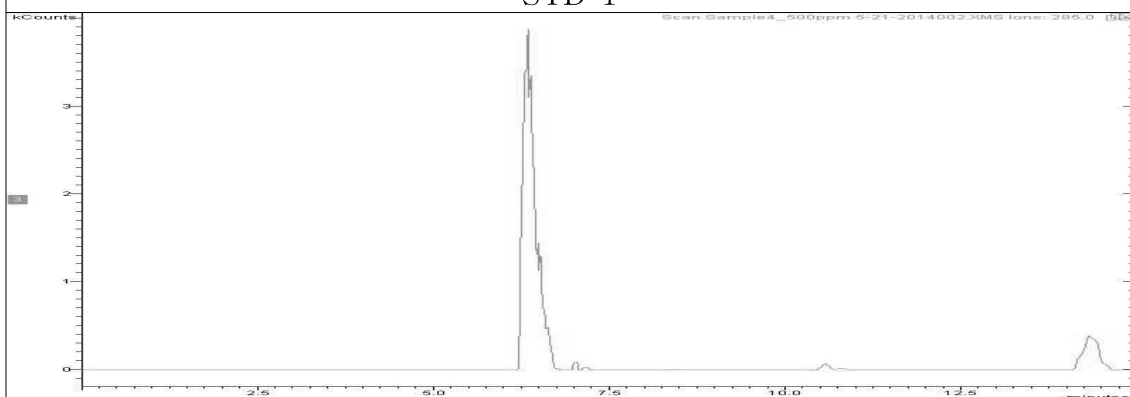


STD-9

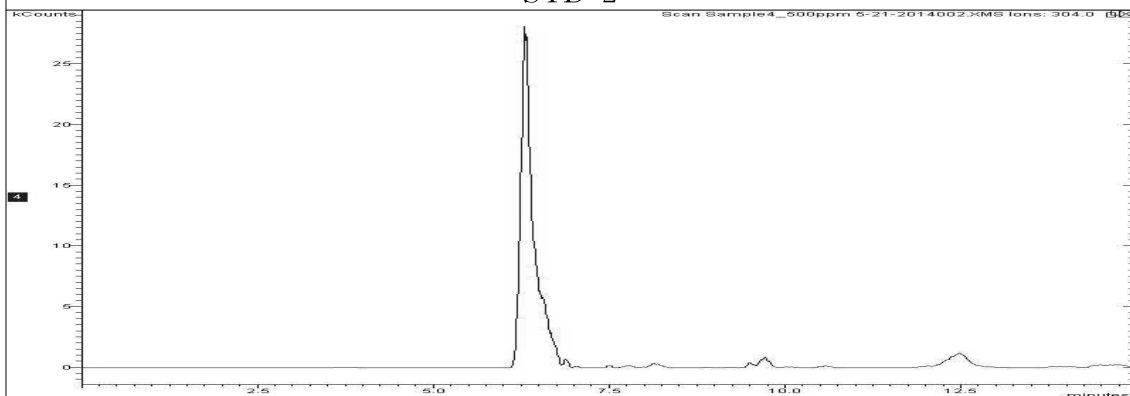
(4) Sample 4



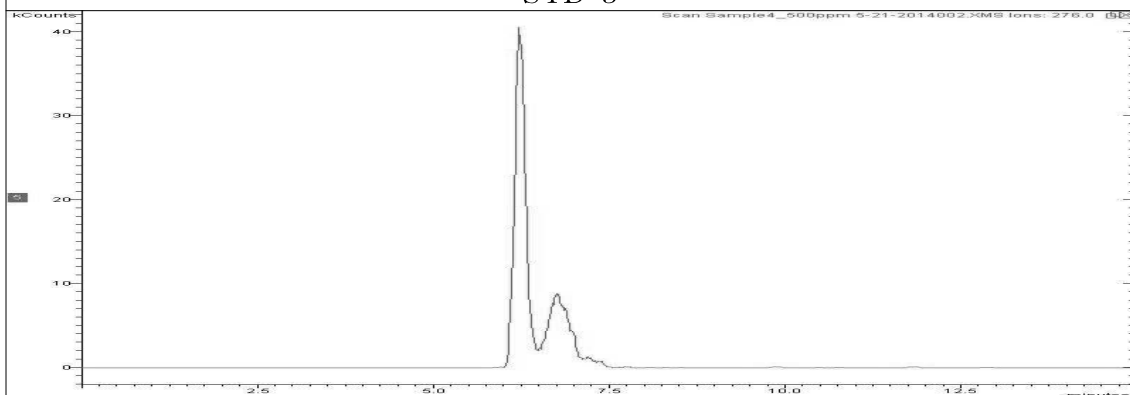
STD-1



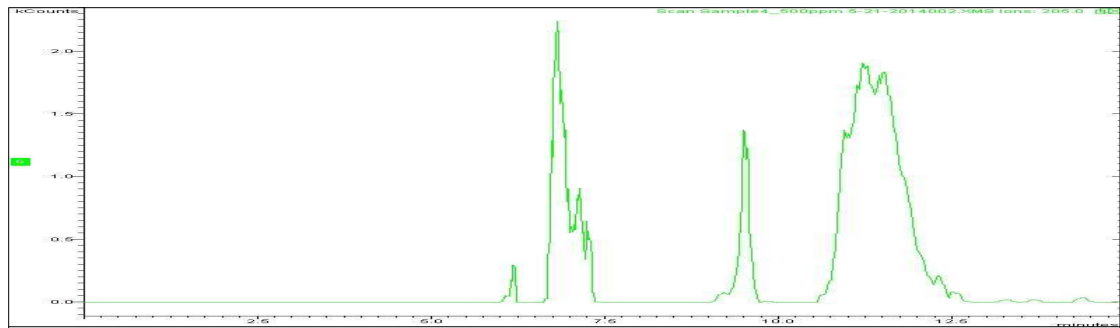
STD-2



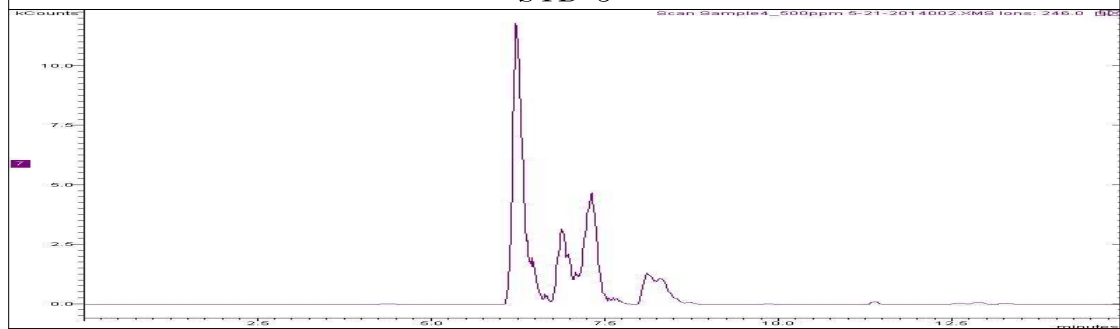
STD-3



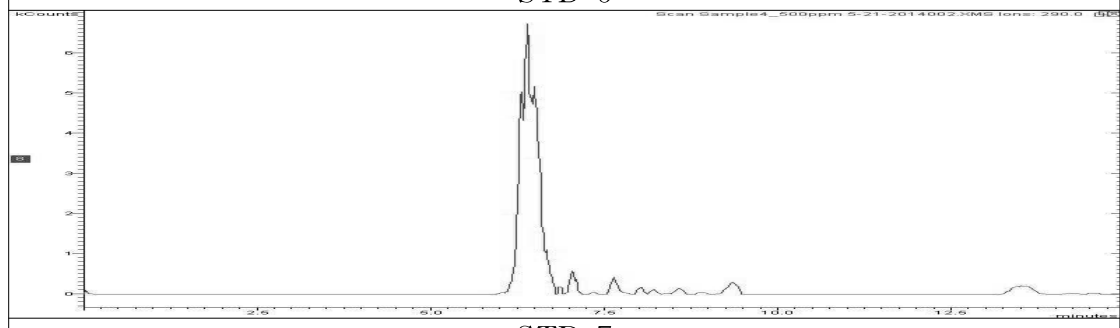
STD-4



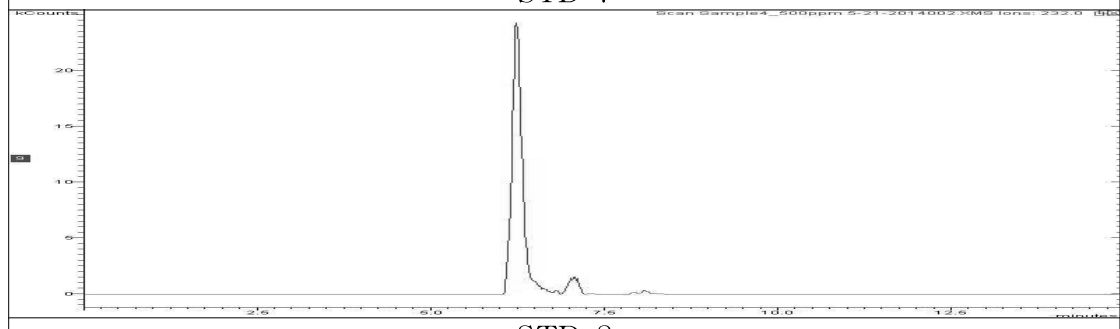
STD-5



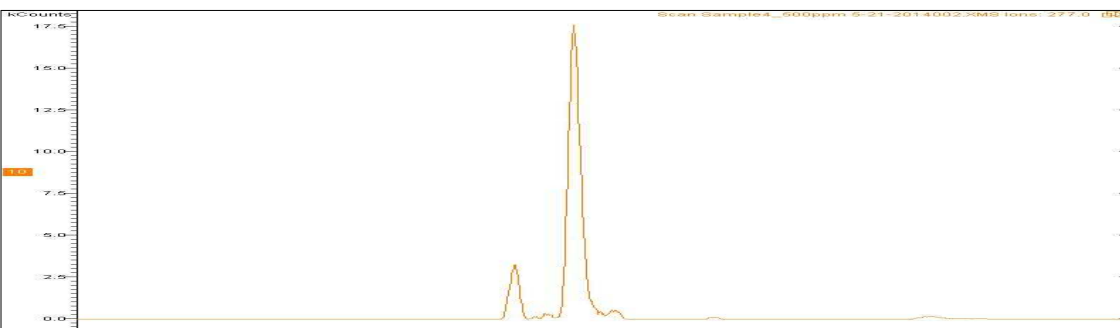
STD-6



STD-7

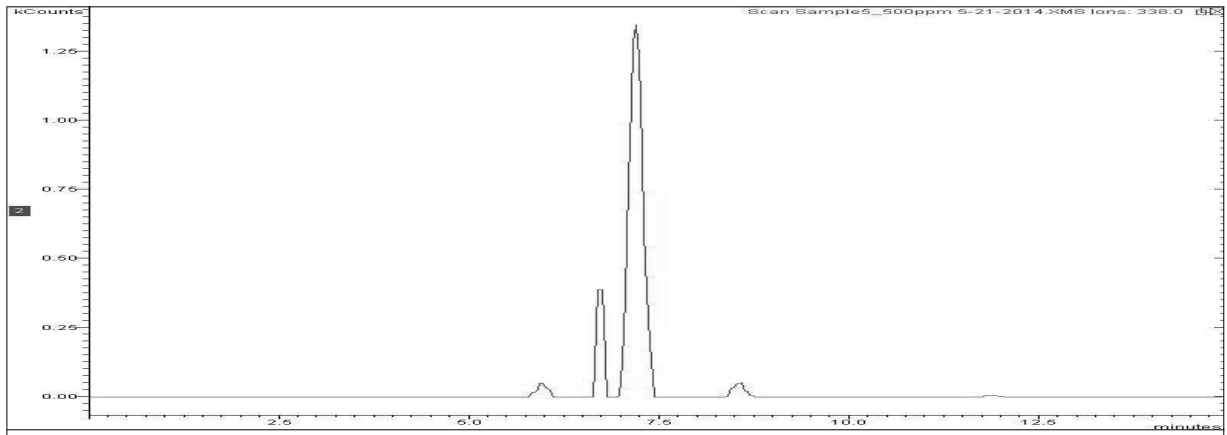


STD-8

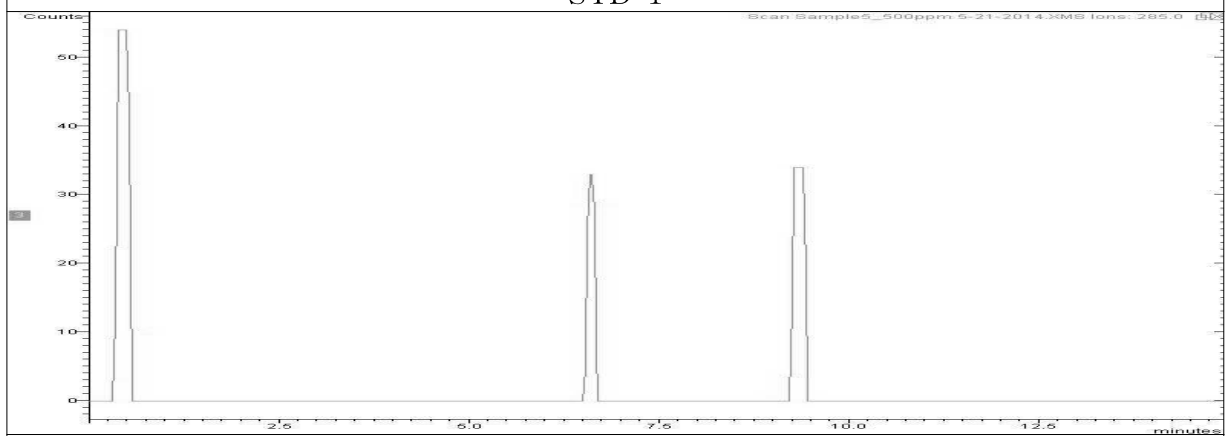


STD-9

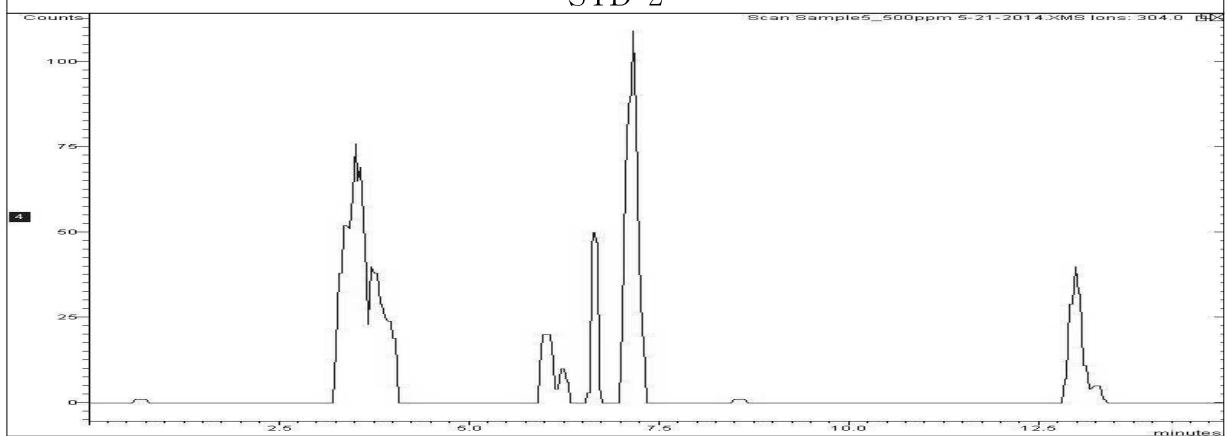
(5) Sample 5



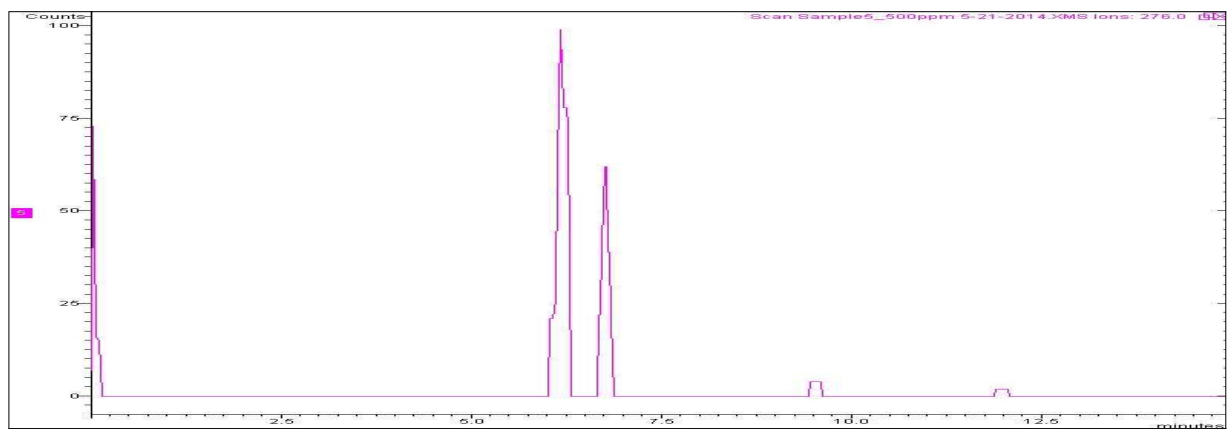
STD-1



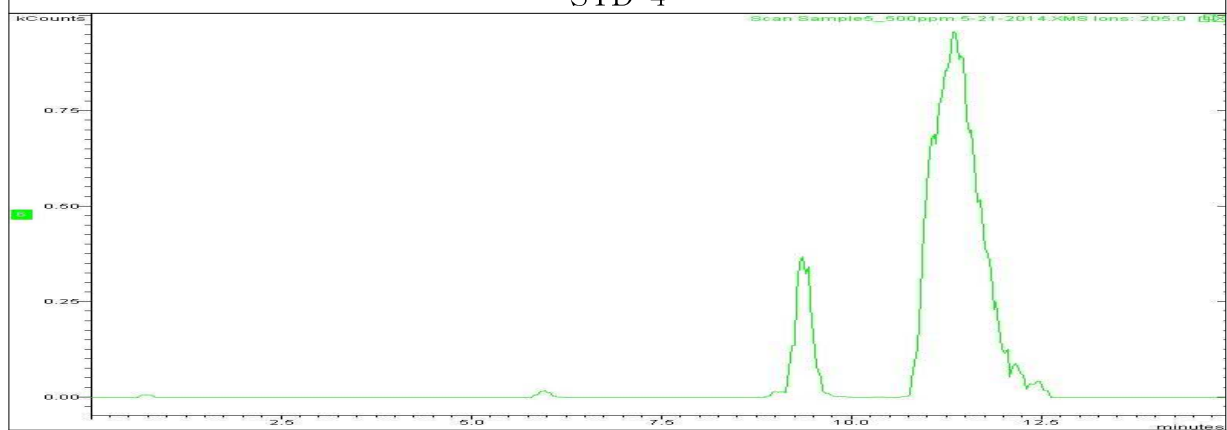
STD-2



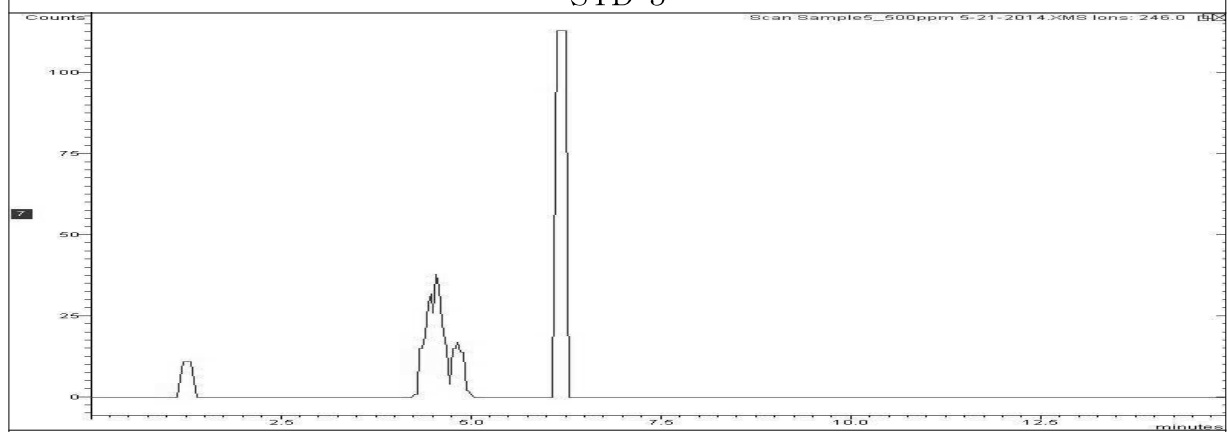
STD-3



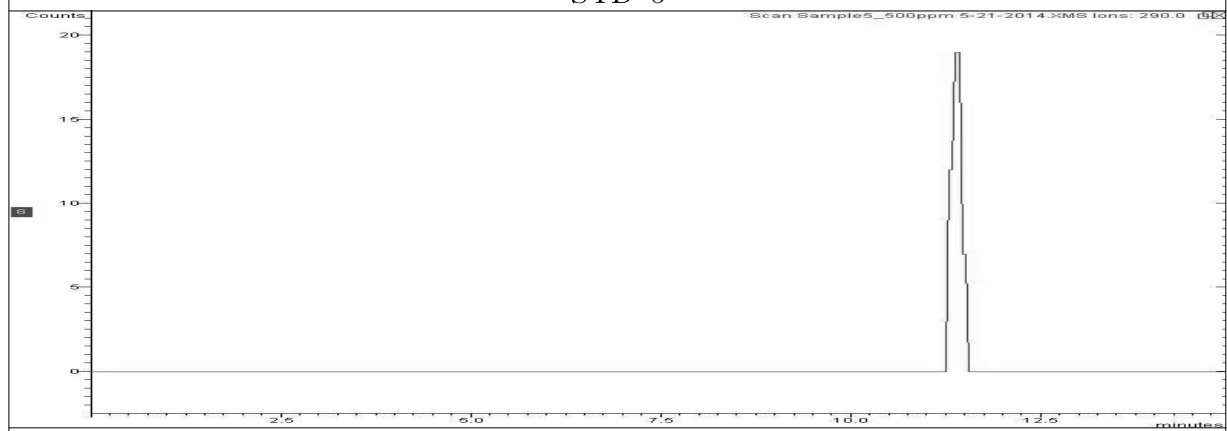
STD-4



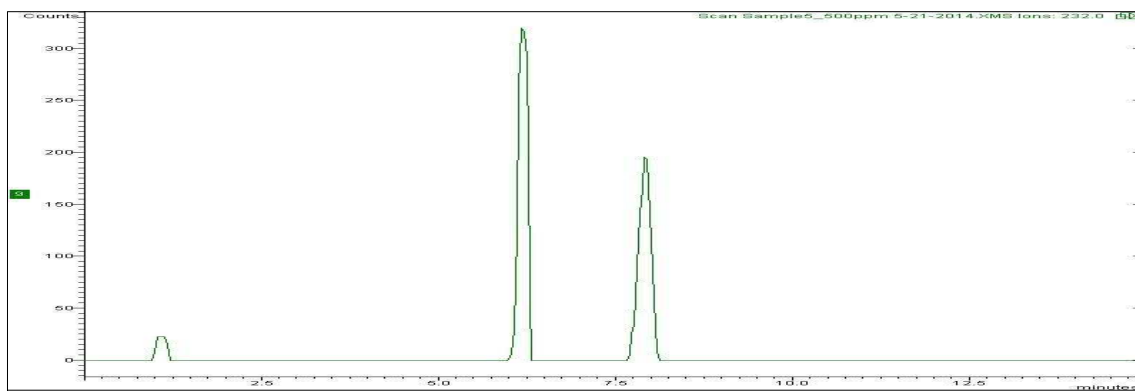
STD-5



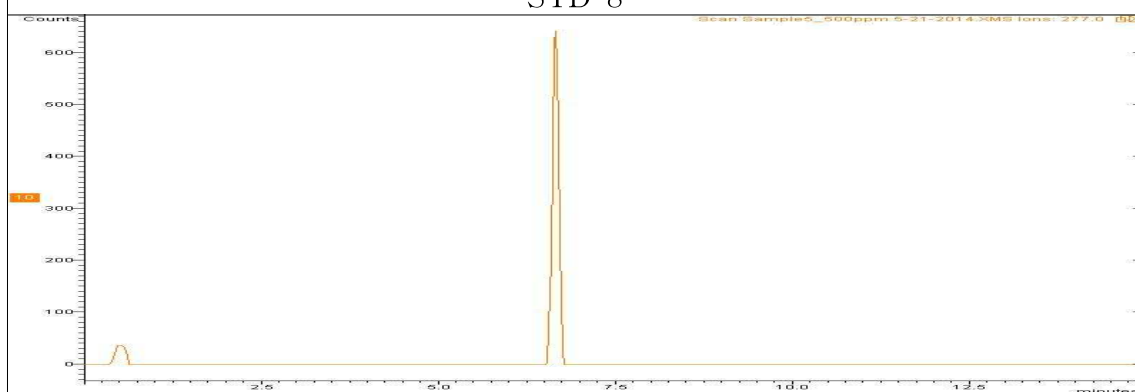
STD-6



STD-7

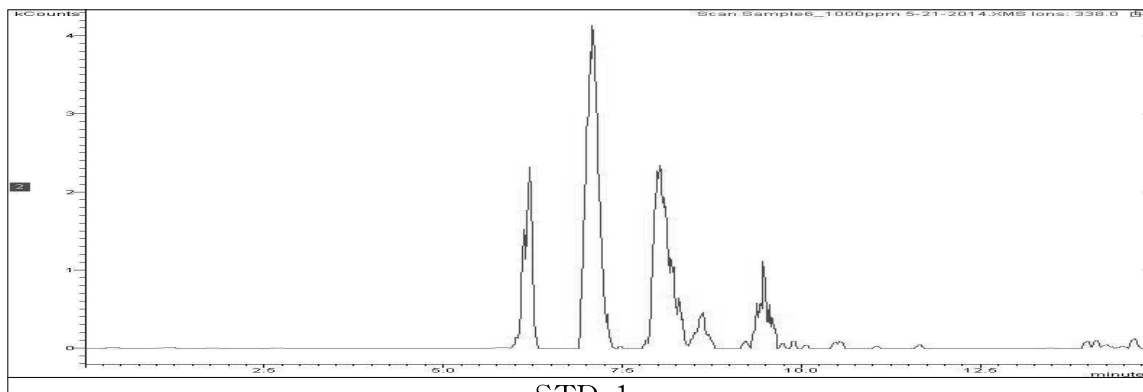


STD-8

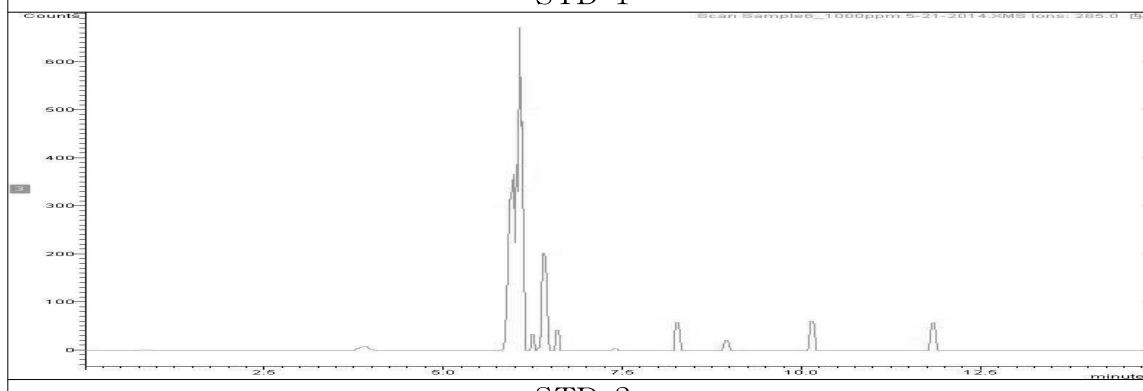


STD-9

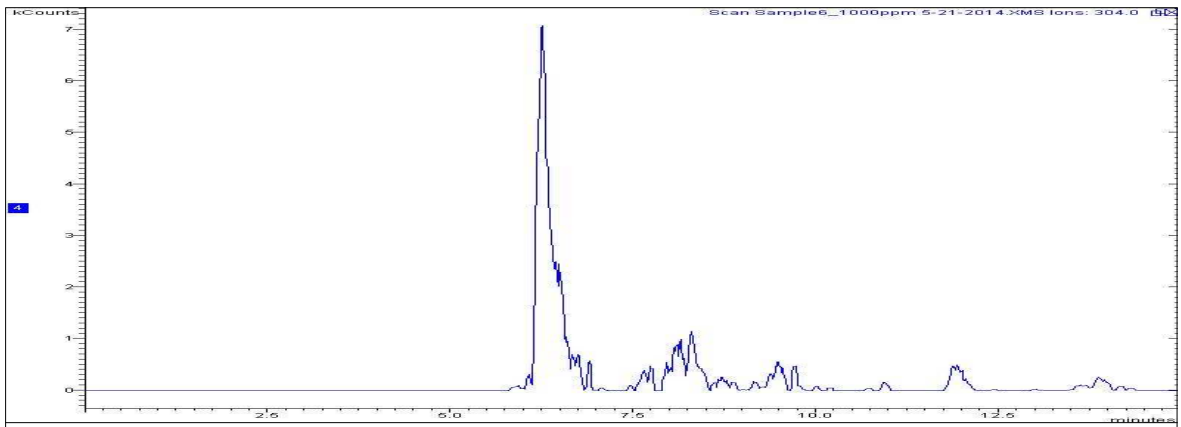
(6) Sample 6



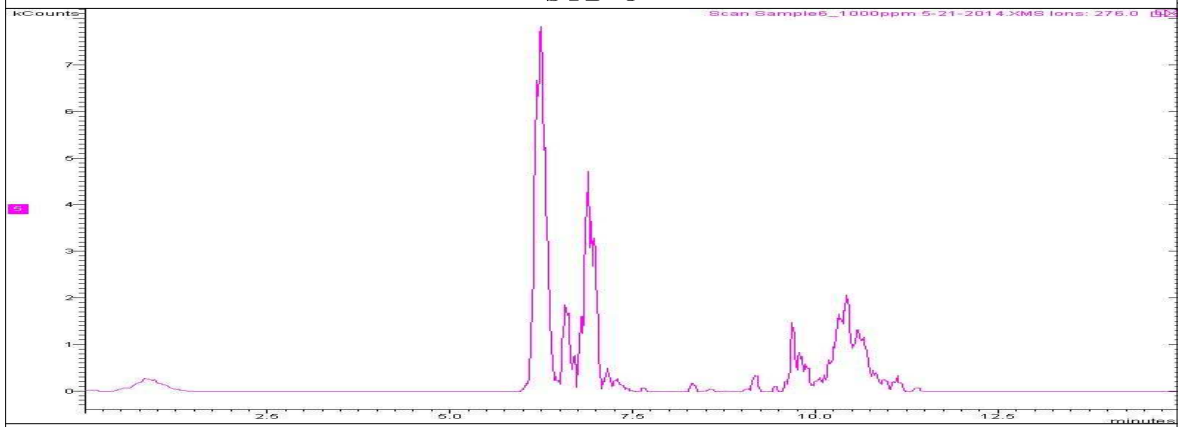
STD-1



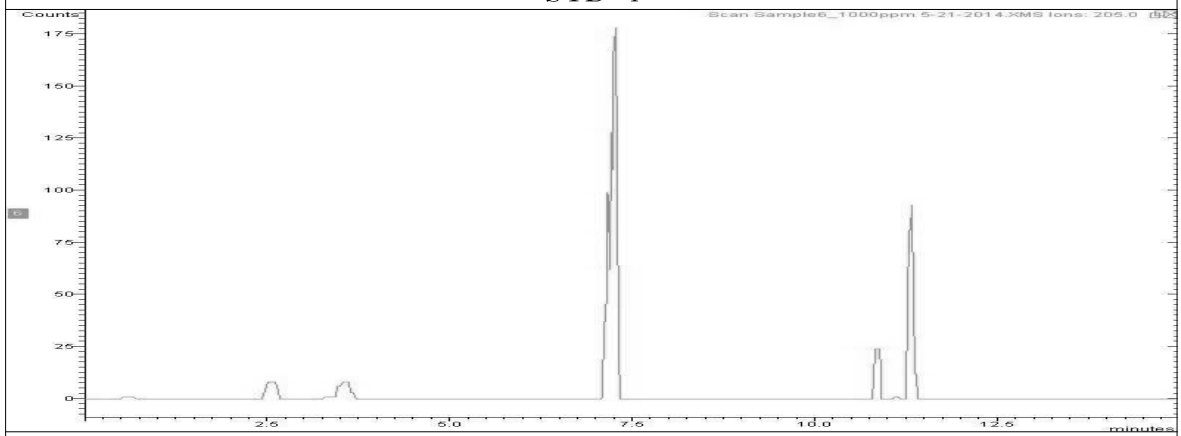
STD-2



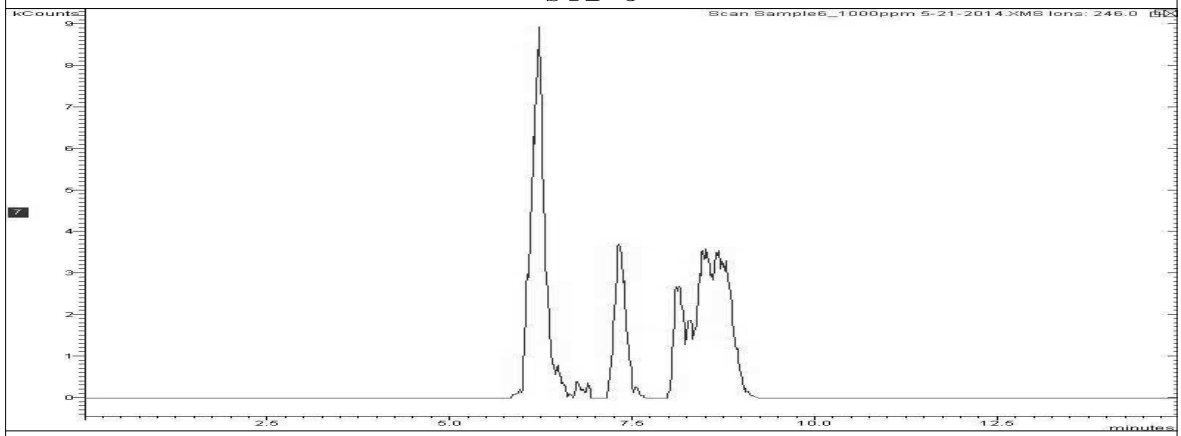
STD-3



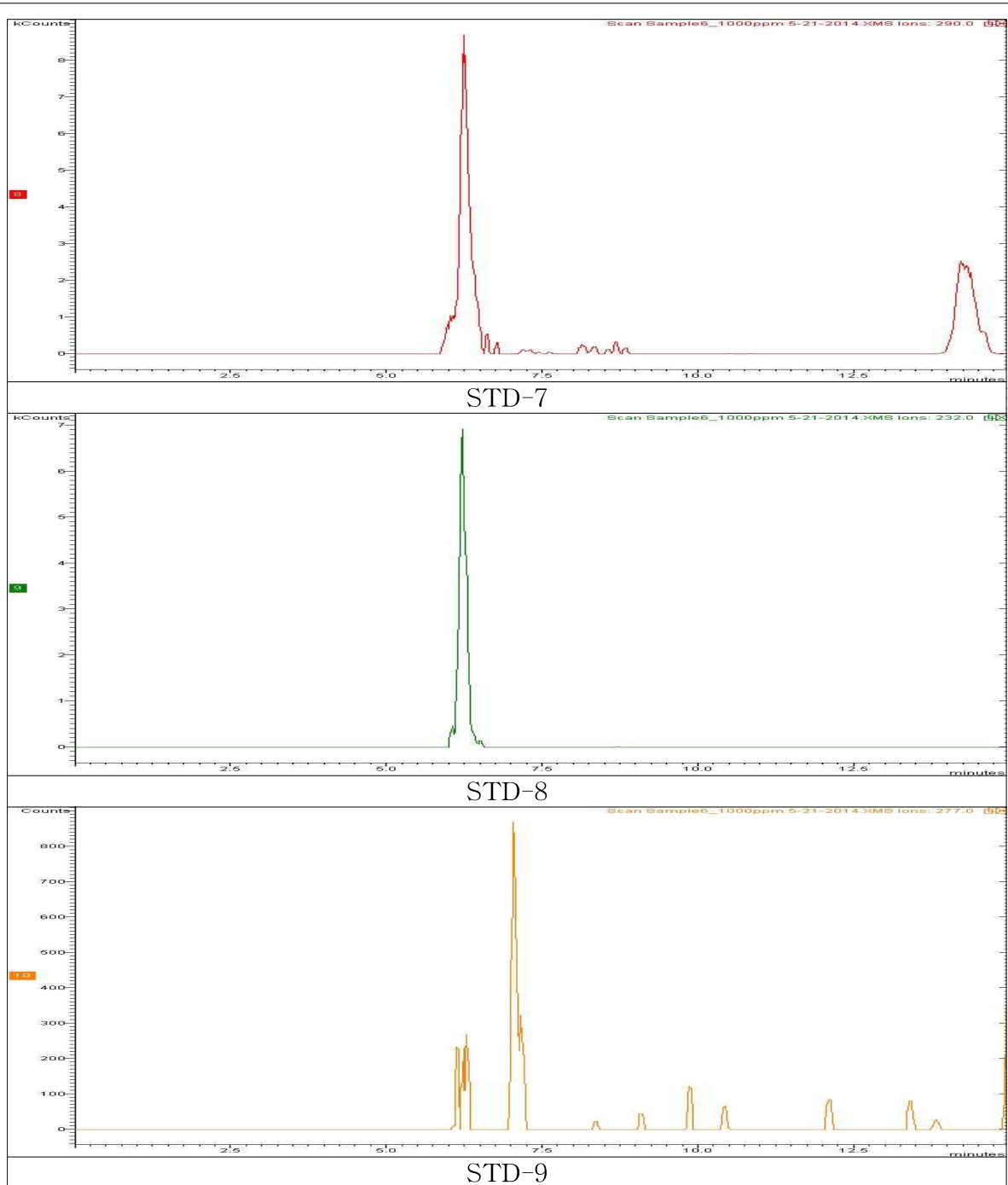
STD-4



STD-5



STD-6



4. 고찰

염미를 증진하는 것으로 알려진 dipeptide는 주로 Arg 또는 Glu로 이루어져 있는데, 본 연구에서는 Arg와 Glu로 이루어진 dipeptide 중 9종을 선정하여 분석을 진행하였다. Arg와 Glu로 이루어진 dipeptide는 이론적으로는 40여 종류가 가능하지만, 개별 dipeptide의 염미 증진효과에 대한 세부적인 연구는 부재하다. 따라서 본 연구에서는 기존 연구자들에 의하여 염미 증진효과가 보고된 일부 dipeptide (9종)를 주요 분석 대상으로 선정하여 분석하였다.

본 연구에 사용한 시료는 멸치젓갈, 대두 등, 2종의 식품원료를 바탕으로 발효/가수분해 및 탈염, 탈취 등의 공정을 통하여 생산된 것으로 다양한 단백질 및 분해 산물이 존재할 것으로 사료되었다.

멸치 시료의 경우, 가수분해를 통하여 제조된 조추출물을 GPC, nano-filtration 등의 과정을 통하여, 탈염 및 분자량에 따른 분획화 과정을 거친 것으로, 시료에 따라, 조추출물, 10 kd 이하, 5-10kd, 250d-5kd, 및 250d 미만 등의 분자량을 지닌 peptide를 선별하는 공정을 거친 것이다. 분석 결과, nano-filtration 공정을 거쳐 제조된 250d-5kd 분획중의 dipeptide의 함량이 가장 높은 것으로 나타났으며, nano-filtration 공정의 filtrate에 해당 하는 250d 이하 분획 (sample 6)에서는 분석 대상 peptide가 전혀 검출되지 않았다. 상기의 결과에 따르면, 분석 대상 시료의 생산 공정, 특히 nano-filtration 방법의 경우, 탈염 및 peptide의 분획화에 매우 효과적임을 확인할 수 있었다.

멸치 시료 중, 분석대상 dipeptide의 함량은 염미 증감효과가 보고되지 않은 EQ (12.4 umol/L)로 나타났으며, 다음으로 (EH, 9.9 umol/L) 등으로 나타났으며, 증진효과가 보고된 peptide로서 RG/GR (6.4 umol/L), RA/AR (1.28 umol/L), 및 RE/ER (4.01 umol/L)등이 함유된 것으로 나타났다. 한편 염미 증감효과가 검증되지 않은 peptide로 EG (6.54 umol/L), RD (1.51 umol/L), EE (5.42 umol/L) 등이 추가적으로 발견되었다. 이와 같은 peptide 중 일부는 기존 젓갈류 연구에서는 보고된 바 없는 것으로 향후 염미 증감 효과에 대한 추가 연구가 필요하다고 사료된다.

대두분리 단백질 시료의 경우, LC-MS 분석 결과, 분석 대상 dipeptide의 함량은 멸치시료와 비교, 낮은 것으로 사료된다. 특히 RG/GR 및 RE/ER의 경우, 멸치 시료와 비교, 20-30% 내외의 함량을 지닌 것으로 확인되었다. 그러나 기존 연구에 따라 염미증진 효과가 입증된 dipeptide의 일종인 RA/AR의 함량은 대두 시료 (1.71 umol/L)가 멸치 시료 (1.28 umol/L)보다 높은 것으로 나타났다.

2.. 농축 및 활성탄 활용 시료 처리간 휘발성 성분의 조성 변화

1) 실험 재료

시료 추출 및 gas chromatograph-mass spectrometer(GC-MS)에 사용한 ethyl acetate(EA) 및 증류수 등은 Burdick&Jackson(B&J HPLC)제품을 사용하였다. Pyridine은 Junsei, Bis-trifluormethylacetamide-trimethyl chlorosilane (BSTFA-TMCS)은 Sigma-Aldrich 제품을 사용하였다.

실험에 사용된 시료는 활성탄 처리 등 다양한 탈취 공정으로부터 산출된 대두단백질 및 멸치젓갈류를 이용하였으며, 차의과대학 및 바이오벤에서 제공 받아 사용하였다 (이하 표 참조).

가. 실험 시료

시 료 군		처리방법	비고
멸 치	Sample-1	가수분해물	차의과대학
	Sample-2	Sample-1 활성탄처리	
	Sample-3	감압농축한 가수분해물	
	Sample-4	Sample-3 활성탄처리	
	Sample-5	5Kd <	
	Sample-6	Sample-5 활성탄처리	
	Sample-7	250d < < 5Kd	
	Sample-8	Sample-7 활성탄처리	
분리대두단백	Sample-9	가수분해물(미생물배양3일) → 원심분리 → 0.2um filtering	바이오 벤
	Sample-10	가수분해물(미생물배양7일) → 원심분리 → 0.2um filtering	
	Sample-11	Sample-10 → Vacuum evaporator	
	Sample-12	Sample-11 → 활성탄 처리	
	Sample-13	Sample-10 → 활성탄 처리	
	Sample-14	Sample-13 → Vacuum evaporator	
	Sample-15	Sample-13 → 5kD이하의 permeate	
	Sample-16	Sample-10 → 5kD이하의 permeate	
	Sample-17	Sample-16 → Vacuum evaporator	

2) 실험 방법

가. 시료 추출

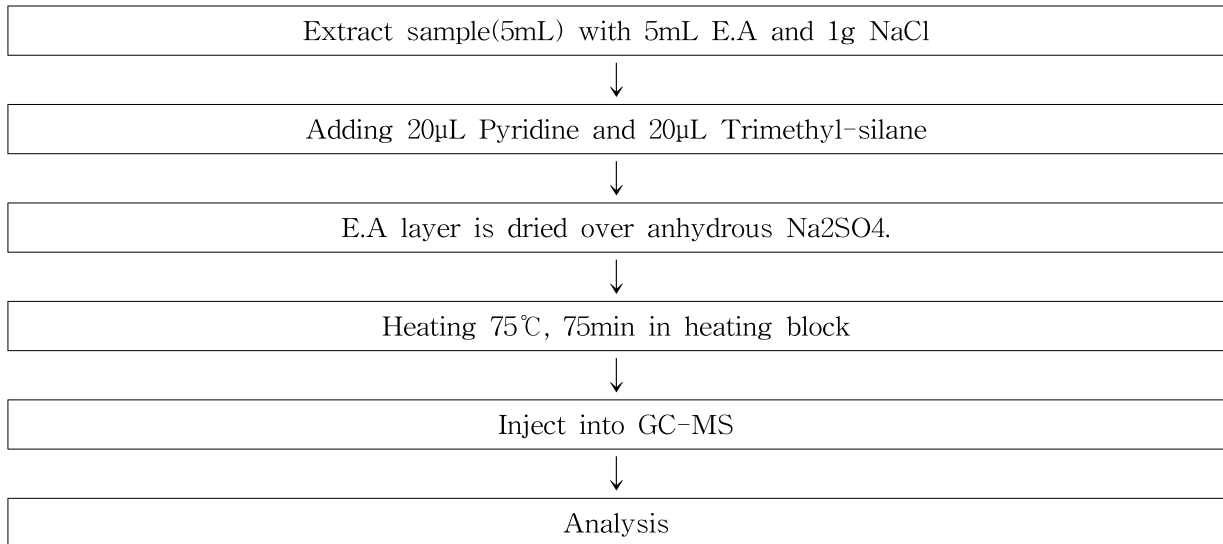
- (1) 시료 5mL에 E.A 5mL과 NaCl 1g을 가하고 5분간 진탕, 추출하였다.
- (2) EA 추출액을 무수 sodium sulfate를 통과, 수분을 제거한 다음, pyridine 50μL와 BSTFA-TMCS 용액 50μL을 넣고 Heating block에서 75°C로 75분간 가열반응을 진행하였다.
- (3) 상온으로 냉각 후, GC-MS를 이용하여 각 시료별 주요 성분의 조성을 분석하였다.

나. GC-MS

분석에 이용한 GC-MS는 Shimadzu GC-2010 Plus with GCMS-2010 SE이고, Column은 Rtx-5MS(30m, 0.25 μm film thickness, 0.25 mm i.d.; Restek, USA)이다. 이하 세부적 GC-MS 운용 조건을 기재하였다.

Carrier gas	Helium
Flow rate	1mL/min
Ion source temp.	250℃
Injection temp.	275℃
Column temp.	50℃에서 15분간 유지, 9℃/min의 속도로 280℃까지 승온 후 10분간 유지
Scan range	50~500

다. 모식도



3) 실험 결과

가. 휘발성분의 GC-MS 분석 결과

젓갈류 및 대두 단백질 추출물의 처리 공정에 따른 주요 휘발성 성분을 분석한 결과 대략 40 여종 내외의 물질이 검출되었다.

(가) 주요 휘발성 성분 및 기타 대사물 구성

실험시료 중 검출된 화합물로는 대략, 분자량이 비교적 작은 amide 또는 amine, alcohol류, carboxylic acid 및 기타 소량의 유기산과 함께, 젓갈 및 대두 단백질료 모두에서 cyclic peptide (2-3 아미노산 축합체) 검출되었다. 관련 chromatogram은 별첨자료로 수록하였다.

표 3.1. 멸치 시료의 휘발성 성분 목록

Rt (min)	화합물명	Rt (min)	화합물명
12.810	N,N-Diethylformamide	27.250	Mandelic acid
14.320	Dihydropyrazole	27.380	Phenylacetamide
14.650	Alkylthiols (unknown 1)	28.040	Acetophenone der.
16.520	Alkanone oxime (unknown 2)	29.005	Unknown 4
17.750	Furan-2-yl-methanol	30.250	Unknown 5
17.931	N,N-Diethylacetamide	33.145	Cyclic dipeptide 1
18.840	N-2-Ethyl-butylamine	34.255	3-Isobutylhexahydropyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4-dione (Isomer 1)
20.350	Alkanediol (unknown 3)	34.450	3-Isobutylhexahydropyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4-dione (Isomer 2)
20.900	Hexanoic acid	34.655	Proline cyclic anhydride
22.095	Alkylamine 1 (Pentyl, ?)	34.715	Hexadecanoic acid
22.295	Alkylamine 2 (Hexyl, ?)	36.385	Unknown 7
23.250	Sarcosine	37.950	Cyclic dipeptide 2
24.820	Phenylacetic acid	38.865	Cyclic dipeptide 3
25.251	Octanoic acid	39.110	Cyclic dipeptide 4
26.100	Indanedione		

표 3.2. 대두 분리 단백질 시료의 주요휘발성 성분 목록

Rt (min)	화합물명	Rt (min)	화합물명
11.620	2-Methylbutanoic acid	23.180	Unknown 5
12.650	Pentanoic acid	23.320	Heptanoic acid
12.810	N,N-Diethylformamide	23.550	Unknown 6
14.320	Acetamides (unknown 1)	24.345	Dihydrobenzofuran
15.050	Alkylthiols (unknown 2)	25.251	Otanoic acid
15.820	Ethyl ethylbutanoate	29.800	Piperazine der.
17.750	Furan-2-yl-methanol	30.265	Cyclic dipeptide 1 (unknown 7)
17.935	N,N-Diethylacetamide	31.875	Pyrrolidinylpropionic acid
18.840	N-2-Ethyl-butylamine	32.450	Pyrrolidino[1,2-a]piperazine-3,6-dione
19.475	Lactic acid	33.160	3-Isobutylhexahydropyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4-dione (Isomer 1)
20.765	Propanediol dibutyrate	34.480	3-Isobutylhexahydropyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4-dione (isomer 2)
20.910	Hexanoic acid	34.640	Proline cyclic anhydride
21.175	Tetramethylpyrazine	37.005	3,6-Diisobutyl-2,5-piperazinedione
21.805	Maltol	37.715	Peptide cyclic dimer
21.135	Alkylamine 1 (Pentyl, ?)	38.700	Tripeptide cyclic form 1
22.345	Alkylamine 2 (Hexyl, ?)	41.415	Tripeptide cyclic form 2

(나) 주요 시료별 휘발성 성분함량

본 연구에서는 주요 성분의 상대적 정량을 목적으로 수행된 바, 개별 시료간 해당 물질의 GC-MS chromatogram 중 peak 면적을 표로 기재, 제시하였다. 표 3.4와 표 3.5에 제시한 휘발성 성분은 표 3.3에 정리하였다.

표 3.3 주요 시료별 휘발성 성분 목록

구 분	명 칭
component-1	N-2-Ethyl-butylamine
component-2	Alkylamine 1 (Pentyl, ?)
component-3	Alkylamine 2 (Hexyl, ?)
component-4	Phenylacetic acid
component-5	Phenylacetamide
component-6	3-Isobutylhexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione (Isomer 1)
component-7	3-Isobutylhexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione (Isomer 2)
component-8	Proline cyclic anhydride
component-9	Cyclic dipeptide 2
component-10	Cyclic dipeptide 3
component-11	Cyclic dipeptide 4
구 분	분리대두단백
component-12	Furan-2-yl-methanol
component-13	N,N-Diethylacetamide
component-14	Maltol
component-15	Alkylamine 1 (Pentyl, ?)
component-16	Alkylamine 2 (Hexyl, ?)
component-17	Cyclic dipeptide 1 (unknown 7)
component-18	Pyrrolidino[1,2-a]piperazine-3,6-dione
component-19	3-Isobutylhexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione (Isomer 1)
component-20	3-Isobutylhexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione (isomer 2)
component-21	3,6-Diisobutyl-2,5-piperazinedione
component-22	Peptide cyclic dimer

표 3.4 멀치시료에서의 주요 휘발성 성분 함량

TR : Trace level

구 분	Sample-1		Sample-2		Sample-3		Sample-4	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
Component-1	18.815	185679	18.827	189027	18.832	183236	18.820	229186
Component-2	22.095	TR	22.091	TR	22.081	151840	22.109	TR
Component-3	22.295	TR	22.342	TR	22.332	489434	22.341	312120
Component-4	24.841	TR	24.820	TR	24.817	128696	24.817	TR
Component-5	27.380	88934	27.380	TR	27.382	182737	27.382	TR
Component-6	34.267	153530	34.267	TR	34.272	191029	34.272	TR
Component-7	34.459	304588	34.459	TR	34.461	495932	34.461	TR
Component-8	34.638	125034	34.638	TR	34.640	71671	34.640	TR
Component-9	37.949	45215	37.949	TR	37.950	74656	37.950	TR
Component-10	38.546	232975	38.546	TR	38.860	92981	38.860	TR
Component-11	39.111	141877	39.111	TR	39.108	188337	39.108	TR
구 분	Sample-5		Sample-6		Sample-7		Sample-8	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
Component-1	18.840	194309	18.832	193190	18.826	199260	18.767	176422
Component-2	22.051	250122	22.051	TR	22.143	456162	22.165	282625
Component-3	22.300	171609	22.300	TR	22.285	176540	22.285	TR
Component-4	24.817	69261	24.814	TR	24.820	TR	24.820	TR
Component-5	27.383	86305	27.383	TR	27.380	TR	27.380	TR
Component-6	34.269	137250	34.452	23166	34.264	47911	34.264	TR
Component-7	34.458	412044	34.641	26529	34.450	TR	34.450	TR
Component-8	34.636	96044	34.636	TR	34.638	33948	34.638	TR
Component-9	37.951	85574	37.951	TR	37.951	44122	37.951	TR
Component-10	38.856	114935	38.856	TR	38.865	TR	38.865	TR
Component-11	39.110	108039	39.110	TR	39.105	46561	39.105	TR

표 3.5 분리대두단백시료에서의 주요 휘발성 성분 함량

구 분	Sample-9		Sample-10		Sample-11	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
Component-12	17.749	108241	17.735	21054	17.740	66131
Component-13	17.917	779694	17.913	685975	17.911	716735
Component-14	21.806	808907	21.806	1021822	21.805	766551
Component-15	22.193	296203	22.100	85878	22.136	206217
Component-16	22.434	350190	22.423	727963	22.388	647898
Component-17	30.265	TR	30.265	46854	30.268	56647
Component-18	32.448	135053	32.447	164429	32.449	218624
Component-19	33.148	53956	33.157	275074	33.159	400514
Component-20	34.464	287885	34.472	867579	34.478	971491
Component-21	37.005	TR	37.033	123668	37.009	114958
Component-22	37.715	TR	37.711	44758	37.709	94401
구 분	Sample-12		Sample-13		Sample-14	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
Component-12	17.750	TR	17.750	TR	17.750	TR
Component-13	17.925	730589	17.907	650459	17.834	220422
Component-14	21.850	56668	21.805	TR	21.805	TR
Component-15	22.170	41266	22.147	20033	22.135	TR
Component-16	22.425	371017	22.372	56387	22.345	TR
Component-17	30.265	TR	30.265	9347	30.265	TR
Component-18	32.444	44420	32.442	55328	32.441	57825
Component-19	33.145	13063	33.145	TR	33.145	9144
Component-20	34.450	8585	34.480	TR	34.480	TR
Component-21	37.005	TR	37.005	TR	37.005	TR
Component-22	37.715	TR	37.715	TR	37.715	TR
구 분	Sample-15		Sample-16		Sample-17	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
Component-12	17.750	TR	17.750	TR	17.750	TR
Component-13	17.923	651772	17.913	581904	17.914	621329
Component-14	21.805	TR	21.805	TR	21.805	TR
Component-15	22.181	404239	22.077	238776	22.111	146244
Component-16	22.345	33905	22.296	541468	22.338	181157
Component-17	30.265	TR	30.265	TR	30.265	TR
Component-18	32.450	36868	32.450	TR	32.450	TR
Component-19	33.155	22142	33.154	18061	33.154	TR
Component-20	34.480	TR	34.468	39029	34.455	15801
Component-21	37.005	TR	37.005	TR	37.005	TR
Component-22	37.715	TR	37.715	TR	37.715	TR

4) 고 찰

감압농축 및 활성탄처리 간 향기성분의 탈취 관련 공정을 통하여 생산된 시료의 휘발성 성분 및 기타 유기 대사물의 이화학적 조성을 GC-MS로 분석하였다.

GC-MS를 이용한 분석 결과, 멸치 시료 및 대두 시료로부터 대략 30종 내외의 물질을 확인할 수 있었다. 상기 물질은 alkylamine, carboxylic acid, amide, alcohol, 및 cyclic peptide 등, 다양한 구조를 지니고 있는 것으로 밝혀졌다. 이와 같은 물질 중, amine류, carboxylic acid류 등은 pH에 따라 휘발성이 급격히 변화할 수 있는 것으로, 예를 들면 amine 류의 경우, 유기/무기산과 염을 형성할 경우, 휘발성은 매우 낮아지는 것이 알려져 있다. 본 연구에서는 이와 같은 점을 고려, 공급된 시료를 별도의 pH 조절 없이 추출/분석하였다. 또한 휘발성분

의 분리/분석 시, 가온, 농축 등의 과정에 의한 해당 성분의 유실이 예상되어, 비등점이 낮은 추출용매로 추출 후, 별도의 농축과정 없이 분석을 수행하였다.

GC-MS 분석 결과에 따르면, 다양한 공정에 따라 유기용매 추출 분획의 이화학적 조성이 급격히 변화하는 것을 알 수 있었다. 상기의 표 3-4 및 3-5에 해당 결과를 수록하였다. 일반적으로 단순 감압증류의 경우, 이화학적 조성상의 변화는 크지 않은 것으로 사료되었다. 그러나 활성탄처리 및 분자량에 따른 분획화 공정의 경우, 조성물의 함량 및 성상이 급격히 변화하는 것이 관찰되었다.

멸치 시료의 경우, 활성탄 처리에 따른 주요 성분의 변화 중, 휘발성이 예상되는 성분으로서 처리 후 제거된 물질은 phenylacetic acid 및 phenylacetamide 등이 있었으며, 기타 소량의 alkylamine 류의 농도 변화도 관찰되었다 (Figure 1).

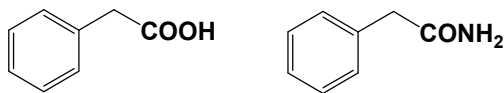


Figure 4.1. Phenylacetic acid 및 phenylacetamide의 구조

한편 휘발성 여부가 불명한 대사물 중, GC-MS retention time이 30-40 min에 해당되는 물질은 미처리 시료의 경우, 다량 존재하였으나, 활성탄 처리에 의하여 대부분 제거되었으며, 이들의 화학 구조를 아래의 figure 4.2.에 수록하였다.

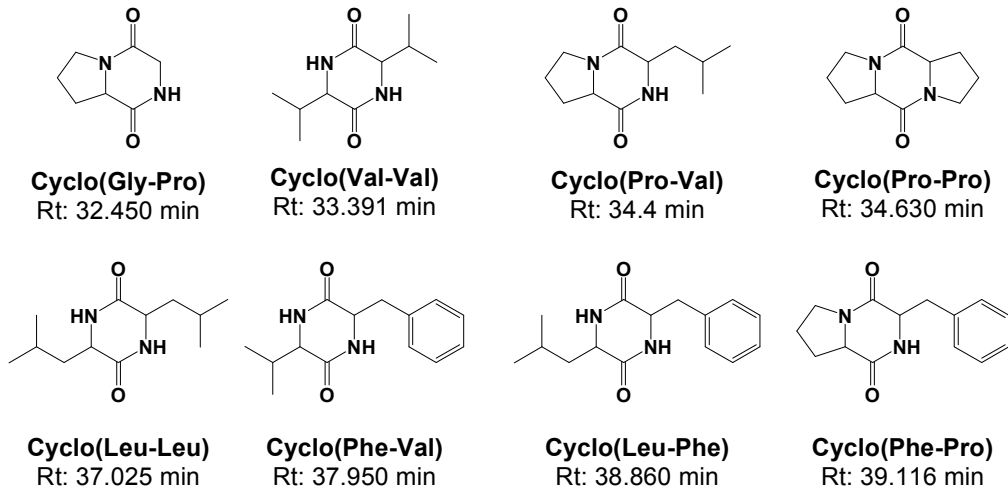


Figure 4.2. 활성탄 처리 공정에 따라 제거된 cyclic-dipeptide의 화학구조 및 GC-MS retention time

한편 대두 시료에서는 대략 30여종의 화합물이 검출되었으며, furan-2-yl-methanol, maltol 등, 멸치시료에서 검출되지 않았던 성분이 확인되었다.

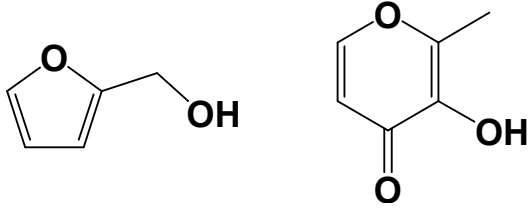


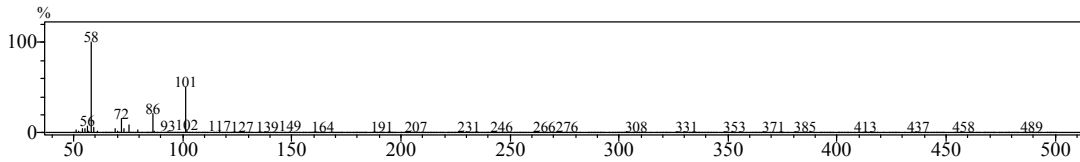
Figure 4.3. Furan-2-yl-methanol 및 maltol의 화학구조

상기 2종의 성분은 활성탄 처리 및 감압증류 등의 방법에 의하여 효과적으로 제거되는 것으로 보인다. Maltol 및 관련 유도체는 다양한 당류의 화학반응으로 산출되는 것으로 알려져 있으며, 식품의 맛에도 영향을 끼치는 것이 알려져 있다. 한편 상기한 물질과 함께 대두 단백질 시료의 경우에도 상기 figure 4.2.에 제시된 다양한 cyclic peptide가 검출되었으며, 활성탄처리 및 분자량에 따른 분획화 등의 방법에 의하여 대부분 제거되는 것으로 사료된다.

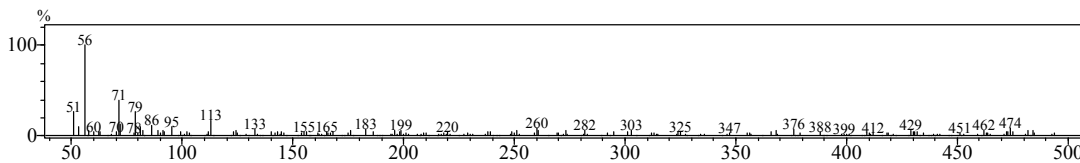
이상의 결과를 요약하면 다양한 탈취 공정에 따라 휘발성 성분의 일부 (amide, carboxylic acid, maltol, furan-2-yl-methanol) 등은 활성탄 처리에 의하여 효과적으로 제거되는 것을 확인할 수 있었으며, 한편 휘발성이 미확인된 cyclic dipeptide 역시 상기의 공정에 의하여 대부분 제거되는 것을 알 수 있었다. 또한 분자량에 의한 분획화 과정 역시 일부 물질군의 소거에 효과를 지니고 있는 것으로 사료되었다.

(별첨) 짓갈류 시료 중 휘발성 및 관련 성분 mass spectra

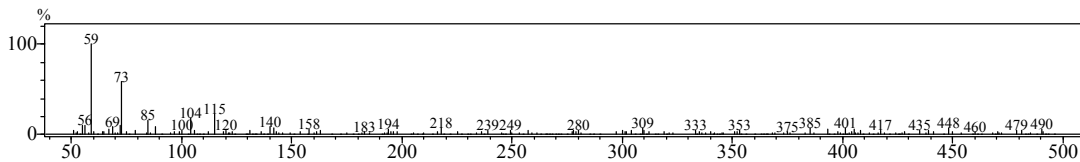
1. N,N-Diethylformamide



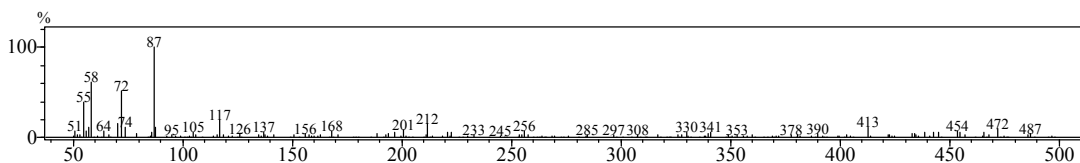
2. Dihydropyrazole



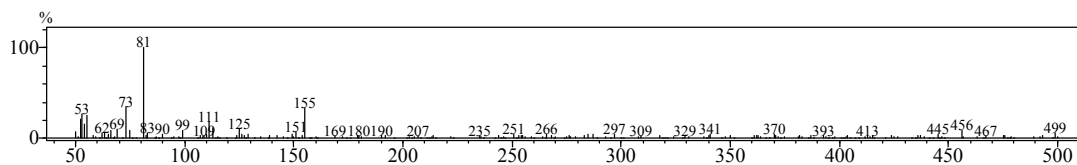
3. Alkylthiols



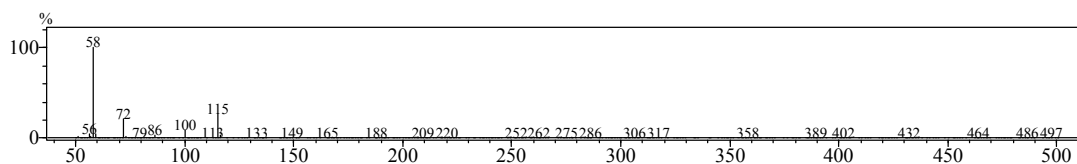
4. Alkanone oxime



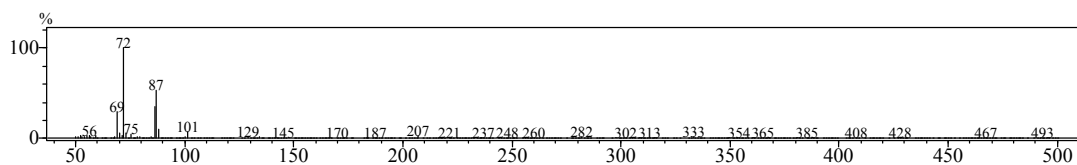
5. Furan-2-yl-methanol



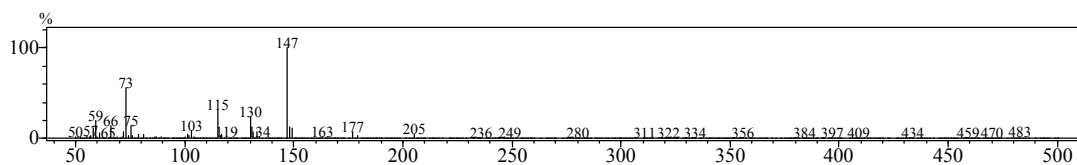
6. N,N-Diethylacetamide



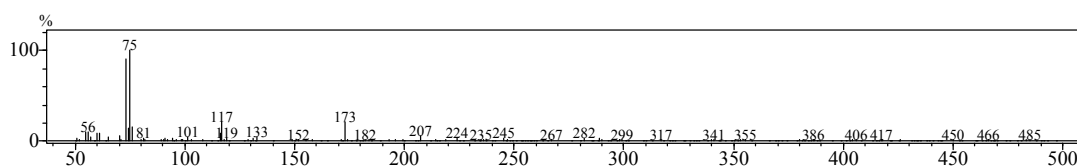
7. N-2-Ethylbutylamine



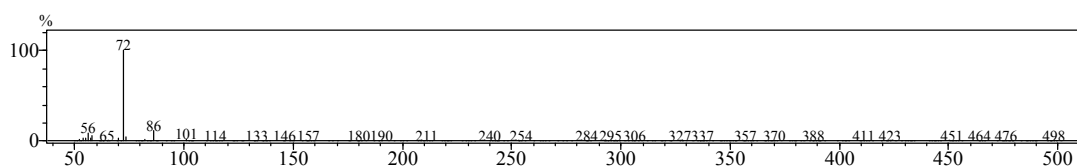
8. Alkanediol (unknown 3)



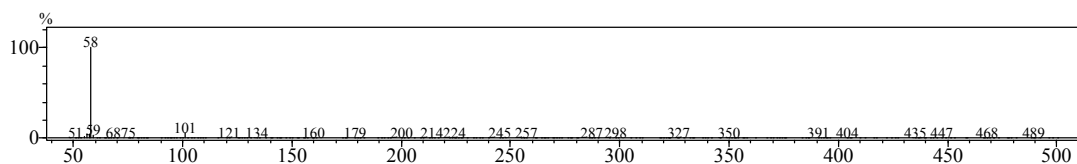
9. Hexanoic acid



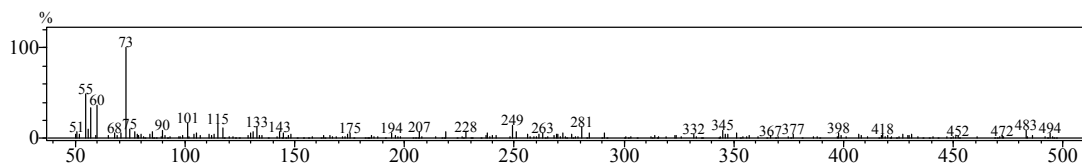
10. Alkylamine 1 (Pentylamine, ?)



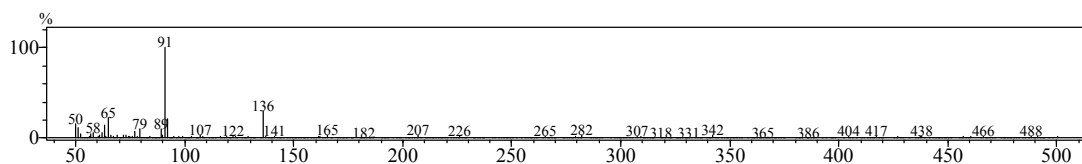
11. Alkylamine 2 (Hexylamine, ?)



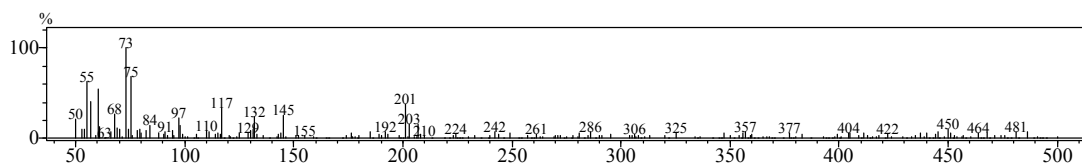
12. Sarcosine



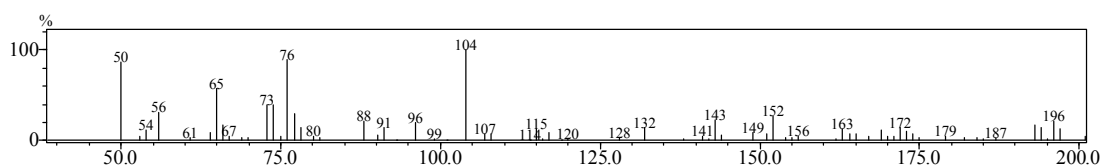
13. Phenylacetic acid



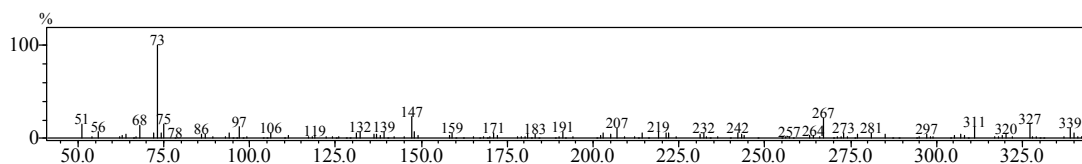
14. Octanoic acid



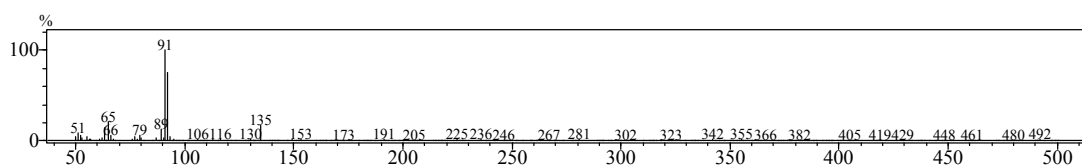
15. Indanedione



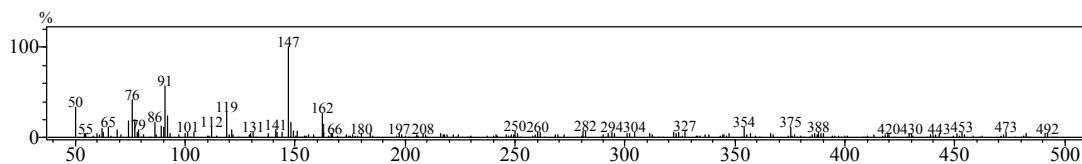
16. Mandelic acid



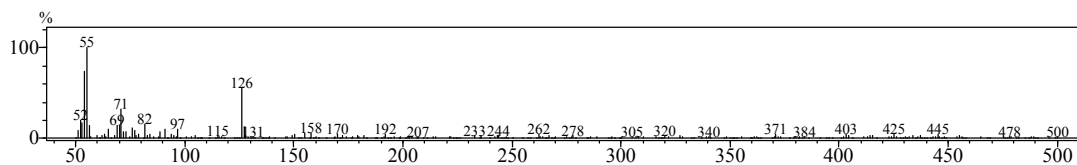
17. Phenylacetamide



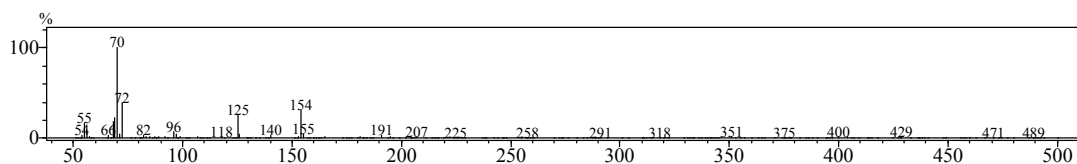
18. Acetophenone der.



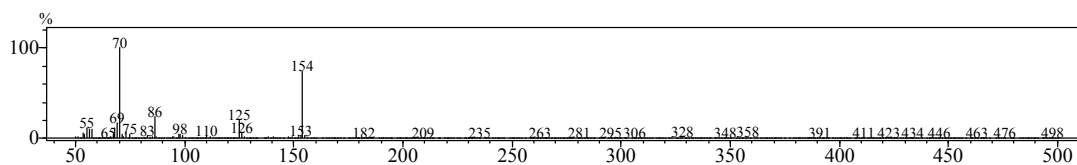
19. Cyclic dipeptide 1



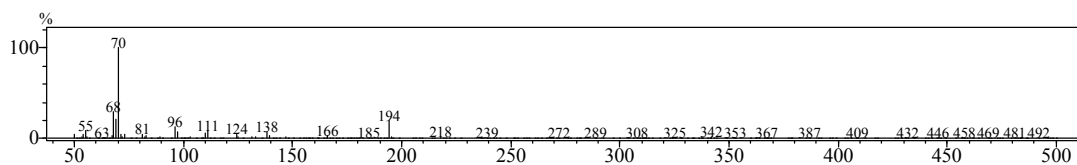
20. 3-Isobutylhexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione (Isomer 1)



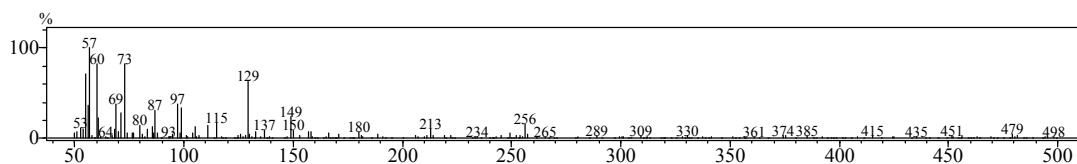
21. 3-Isobutylhexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione (Isomer 2)



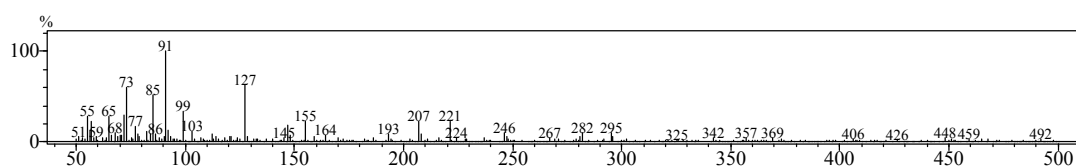
22. Proline cyclic anhydride



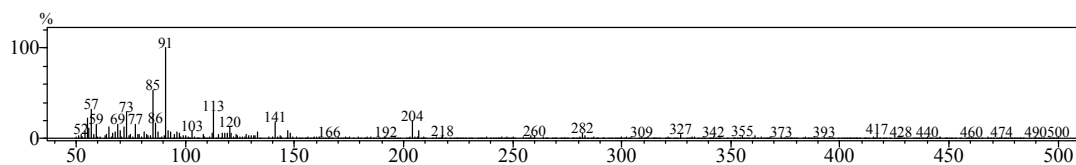
23. Hexadecanoic acid



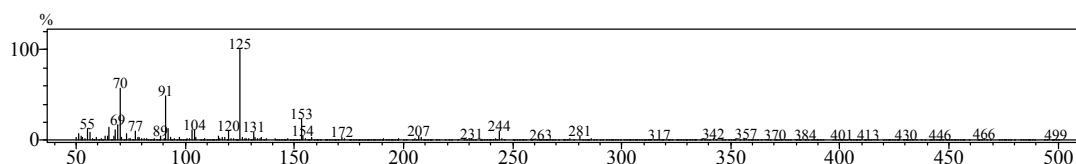
24. Cyclic dipeptide 2



25. Cyclic dipeptide 3

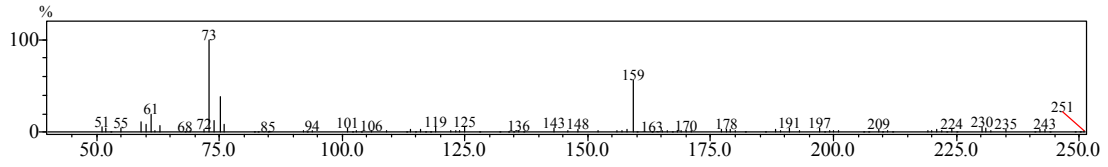


26. Cyclic dipeptide 4

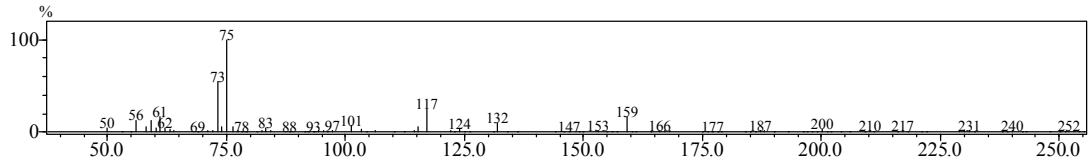


(별첨) 대두 단백질 추출물 중 휘발성분의 Mass Spectra

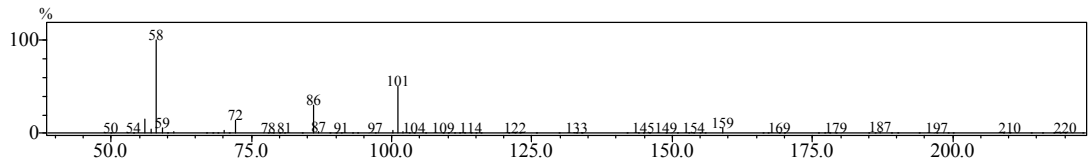
1. 3-Methylbutanoic acid (1TMS)



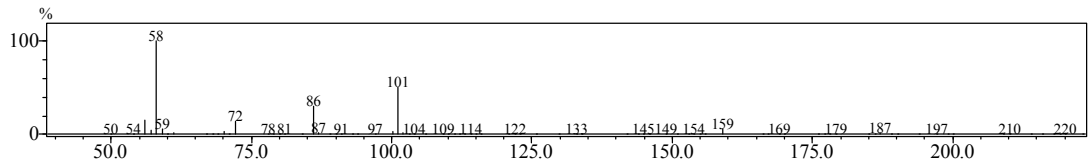
2. Pentanoic acid (1TMS)



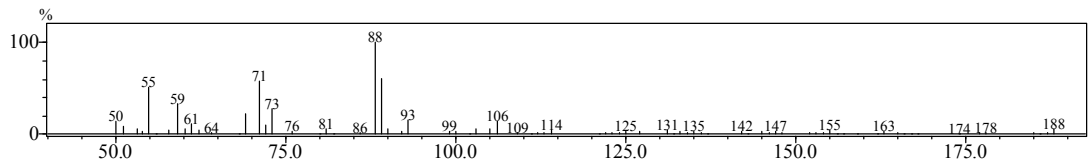
3. N,N-Diethylformamide



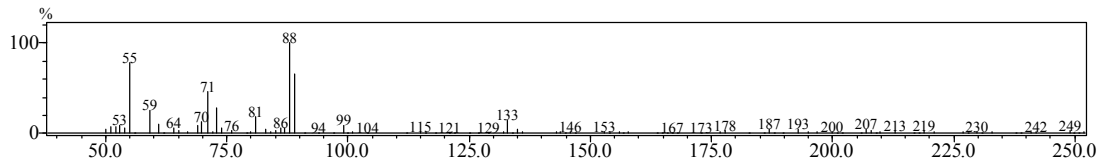
4. Acetamides (unknown 1)



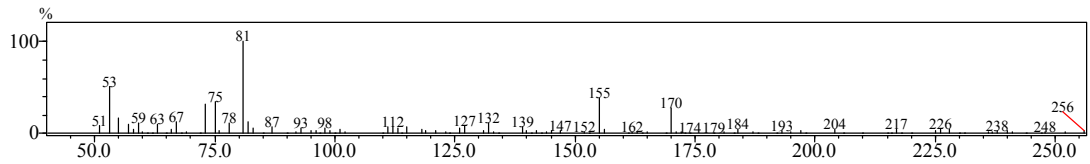
5. Alkylthiols (unknown 2)



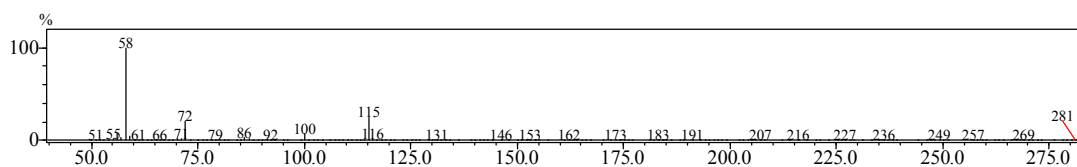
6. Ethyl 3-Ethylbutanoate



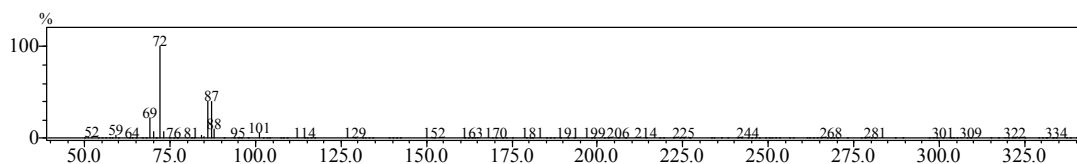
7. Furan-2-yl-methanol (1TMS)



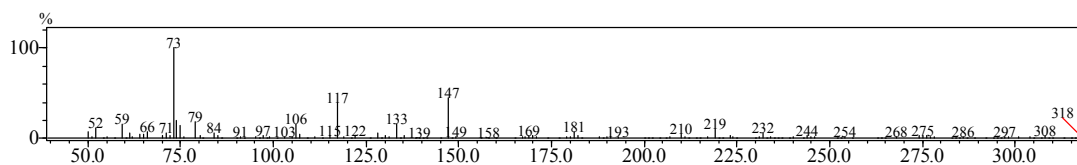
8. N,N-Diethylacetamide



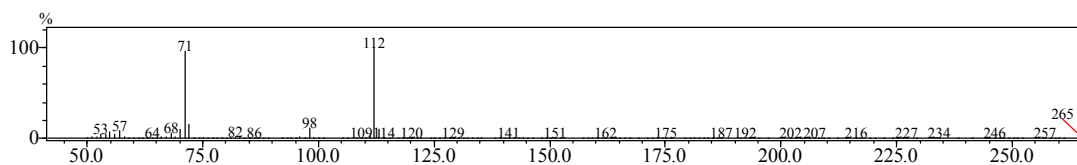
9. N-2-Ethyl-butylamine (1TMS)



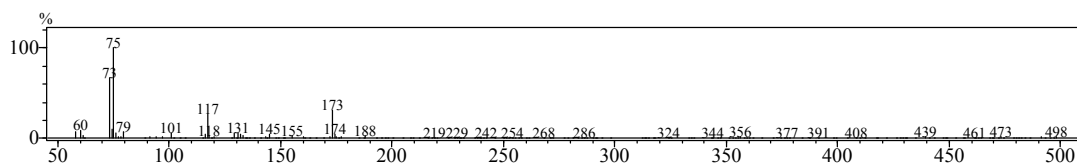
10. Lactic acid (2TMS)



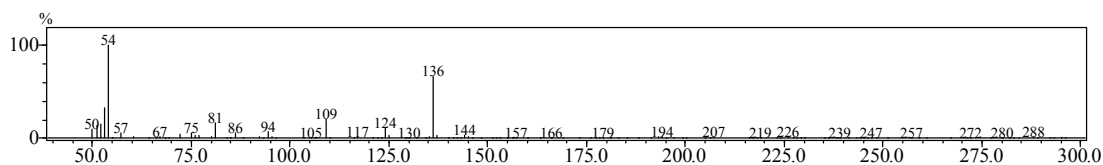
11. Propanediol dibutylate



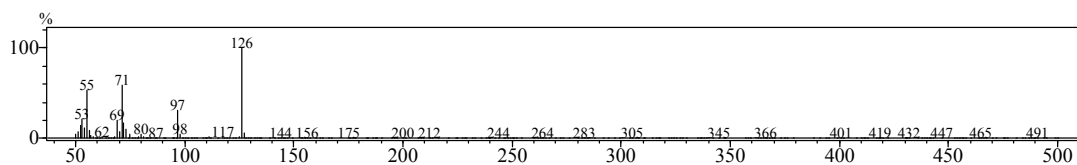
12. Hexanoic acid (1TMS)



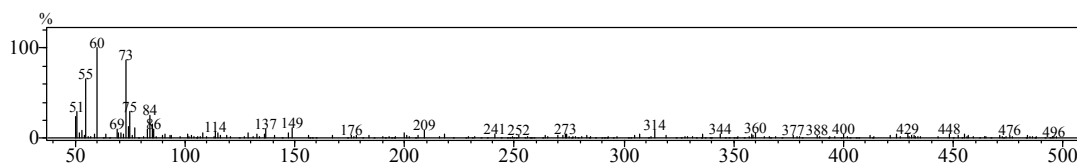
13. Tetramethylpyrazine



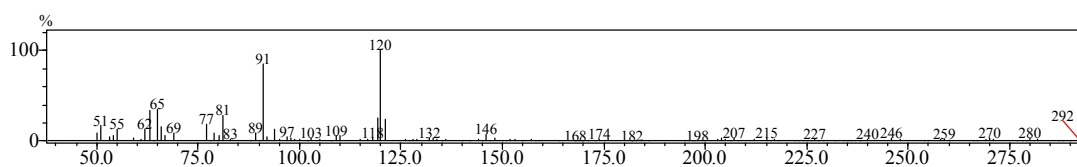
14. Maltol



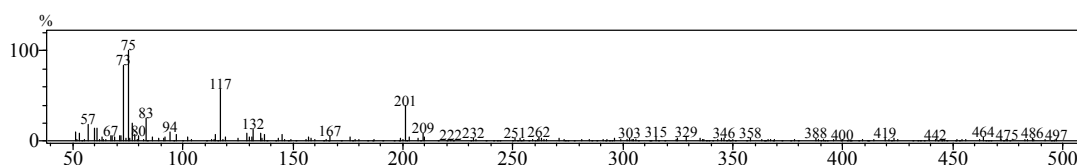
15. Octanoic acid



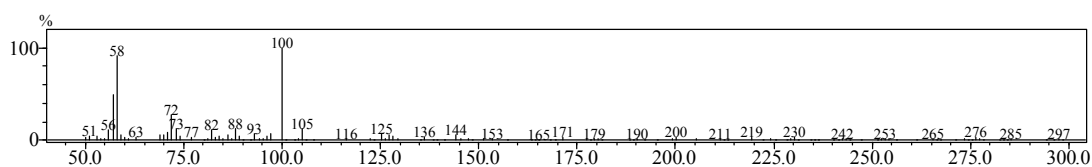
16. Dihydrobenzofuran



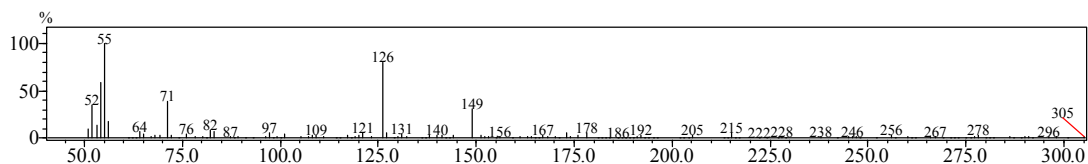
17. Octanoic acid



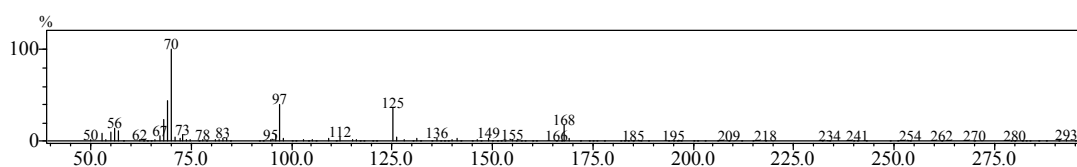
18. Piperazine derivative



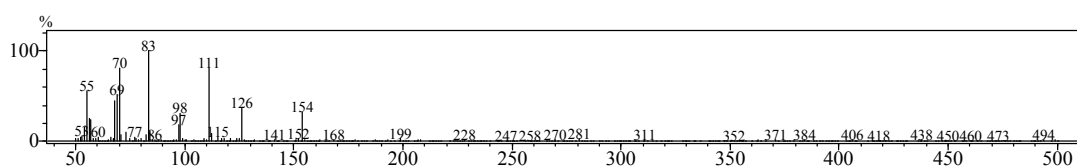
19. Cyclic dipeptide (unknown 7)



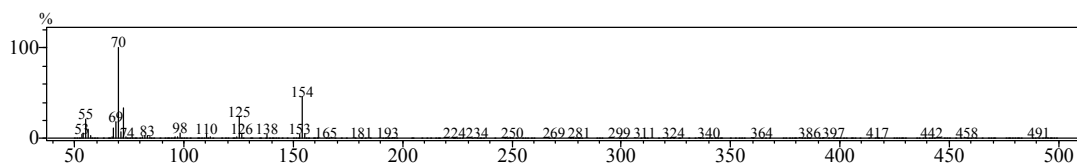
20. Pyrrolidinylpropionic acid



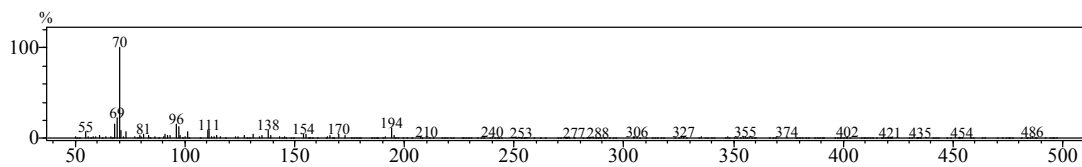
21. Pyrrolidino[1,2-a]piperazine-3,6-dione



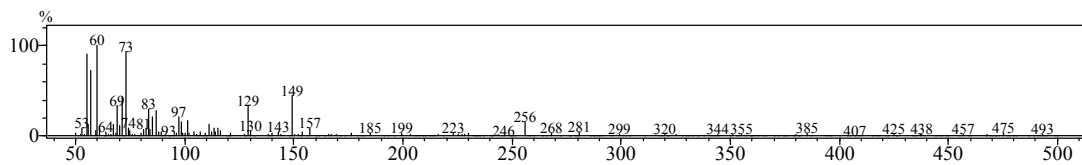
22. 3-Isobutylhexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione



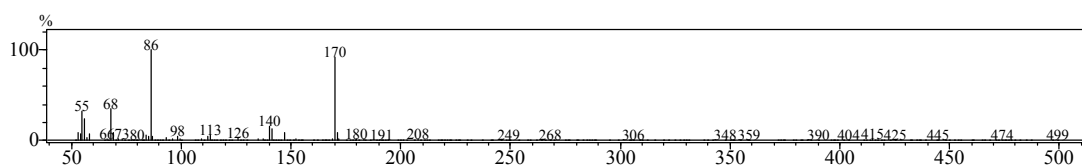
23. Proline cyclic anhydride



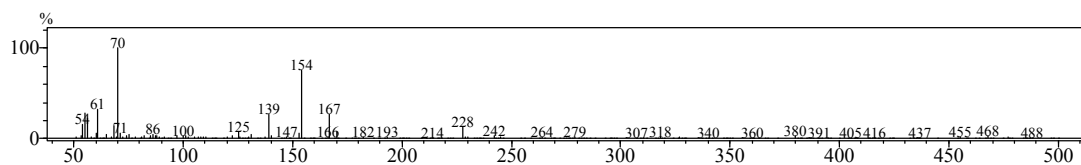
24. Hexadecanoic acid



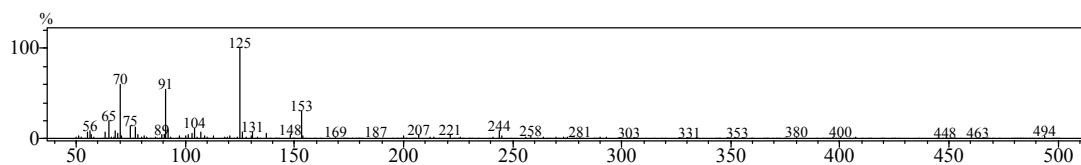
25. 3,6-Diisobutyl-2,5-piperazinedione



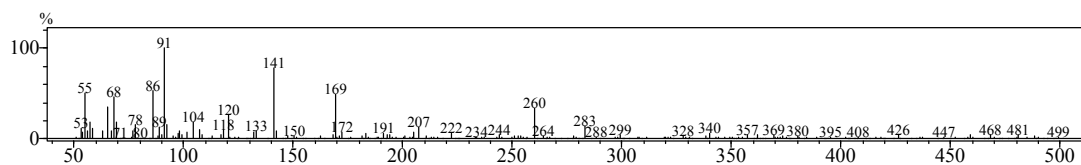
26. Peptide cyclic dimer



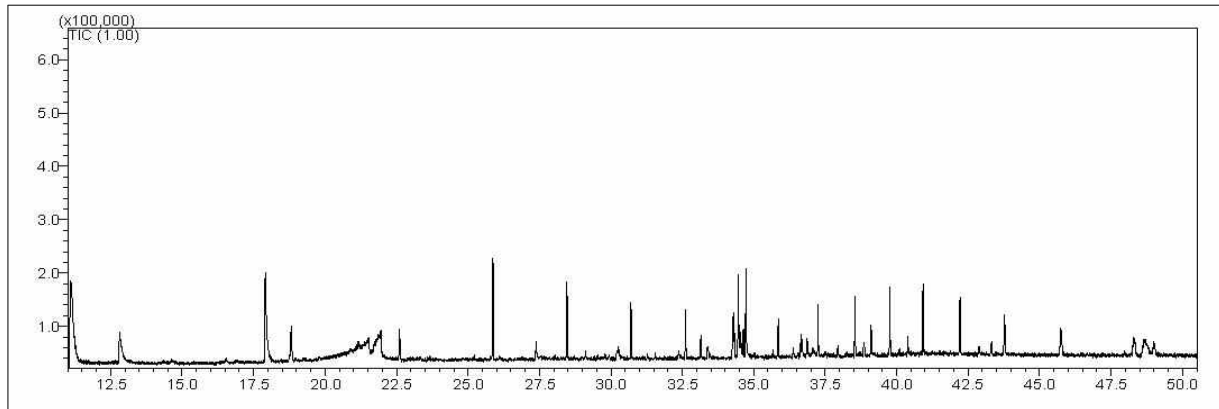
27. Tripeptide cyclic form 1



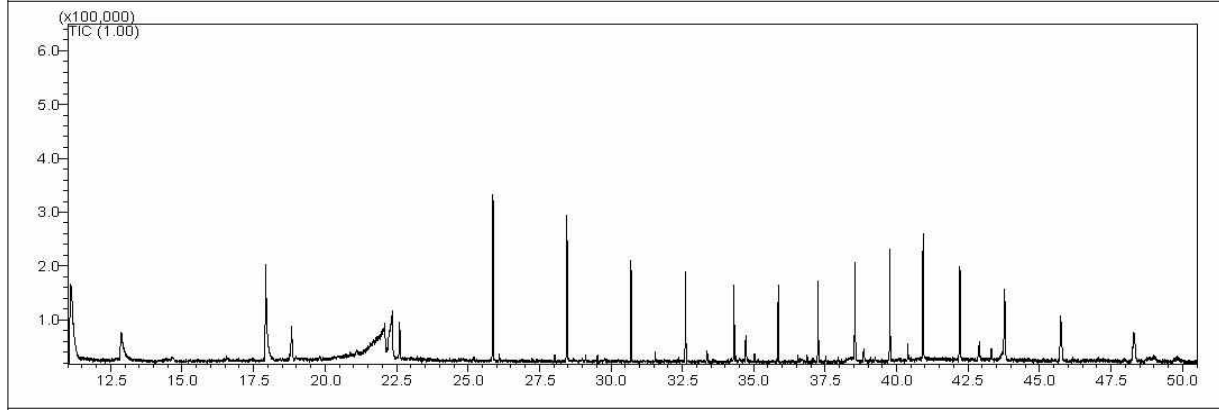
28. Tripeptide cyclic form 2



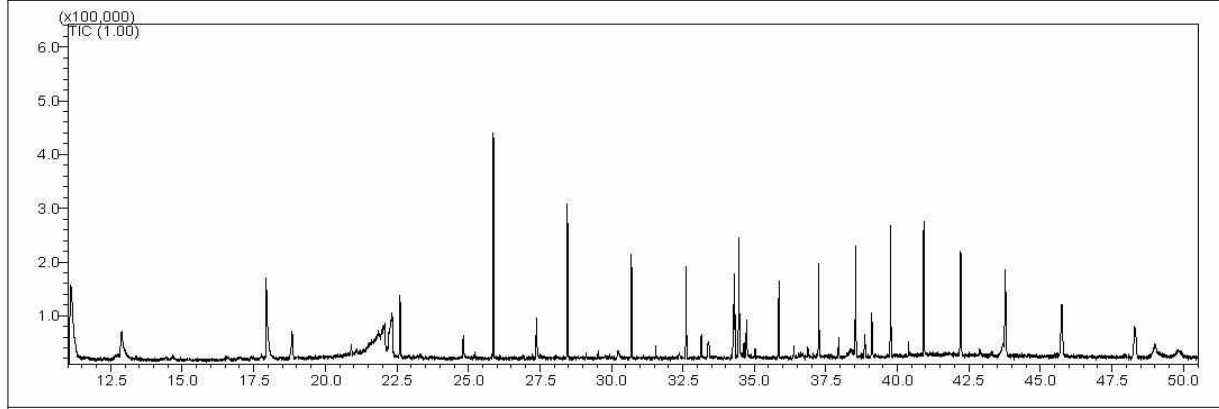
별첨: 첫갈 및 대두 단백질 시료 중, 휘발성 성분 분석 GC-MS chromatograms



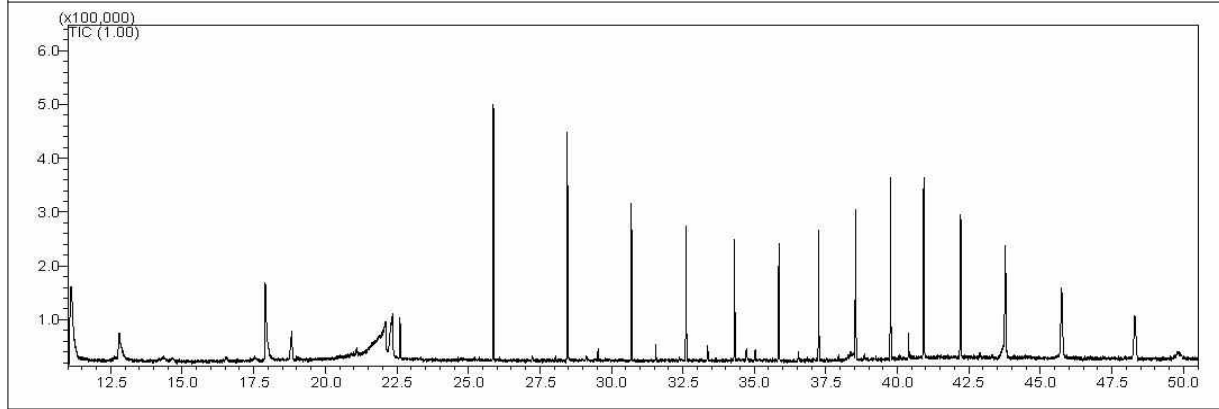
Sample-1



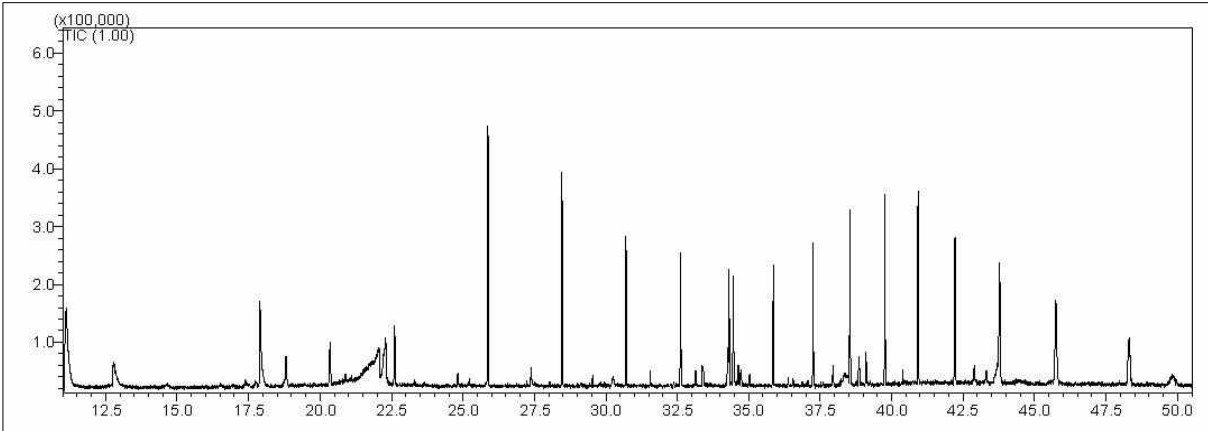
Sample-2



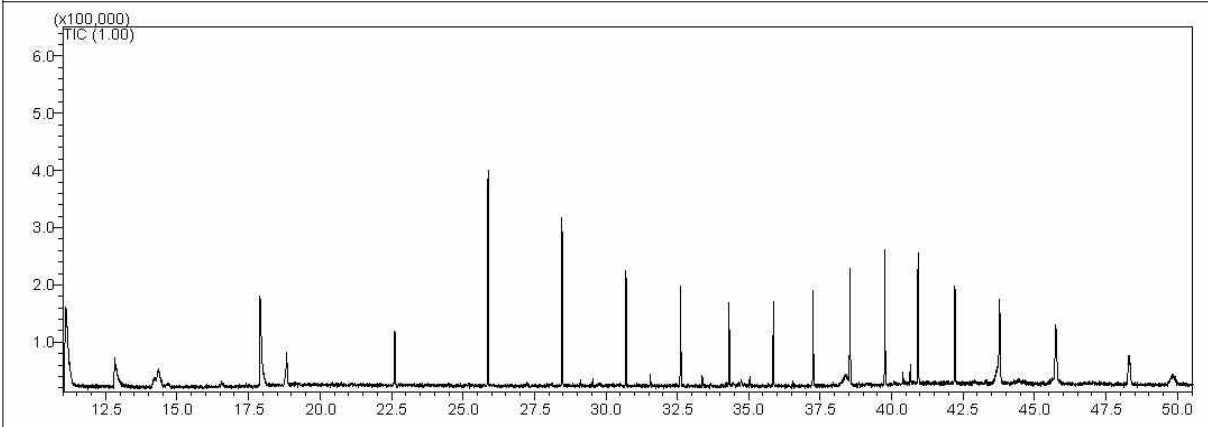
Sample-3



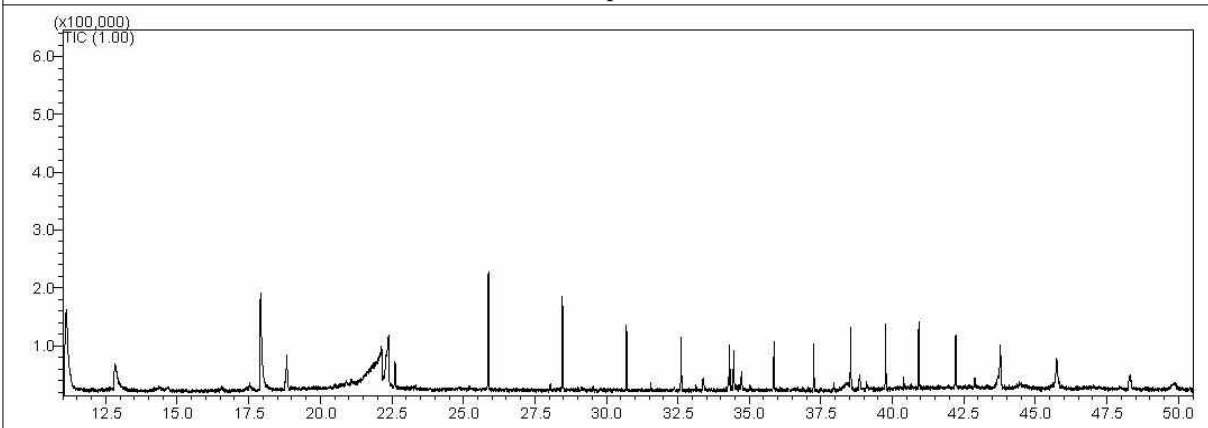
Sample-4



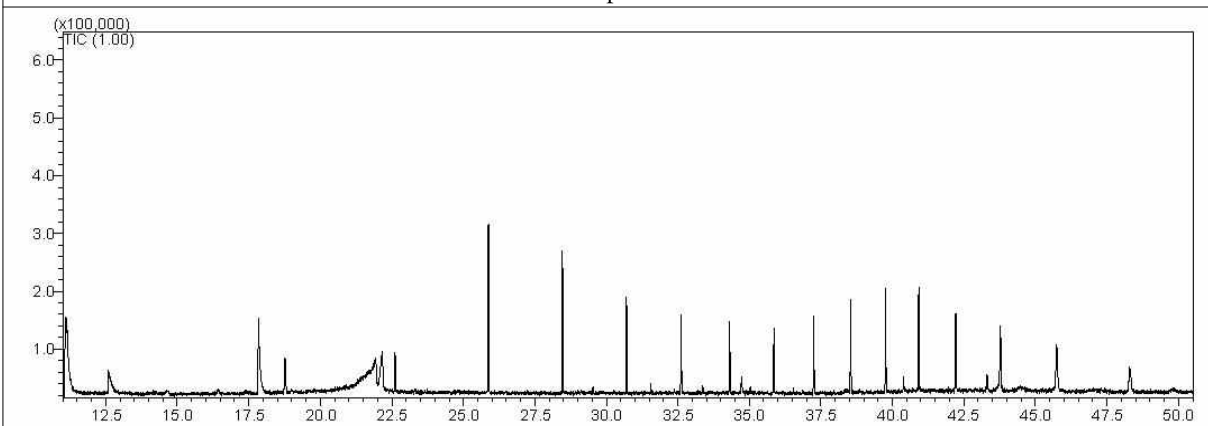
Sample-5



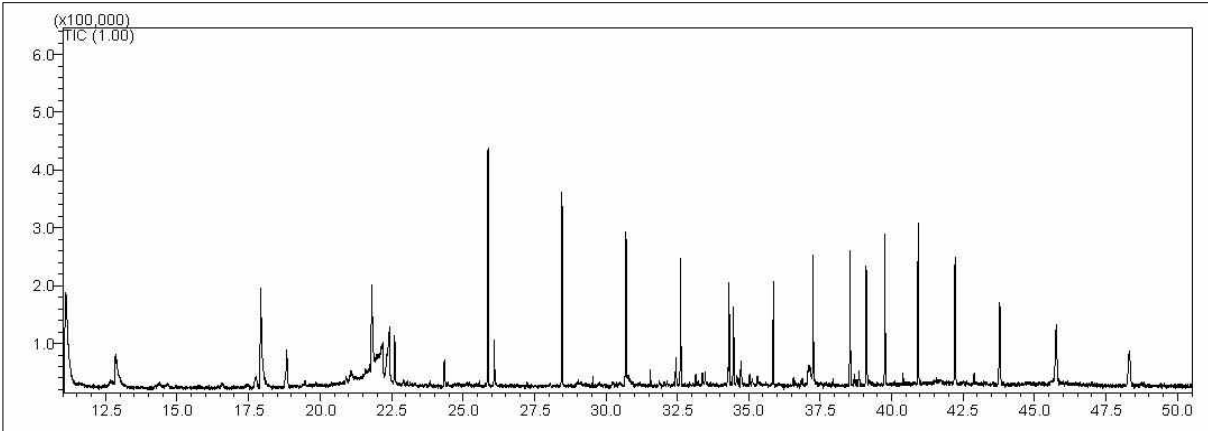
Sample-6



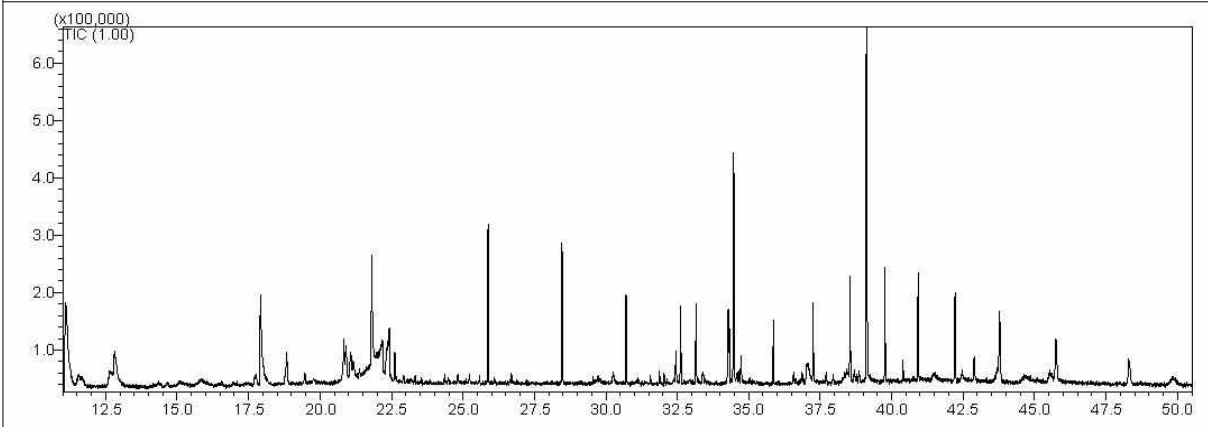
Sample-7



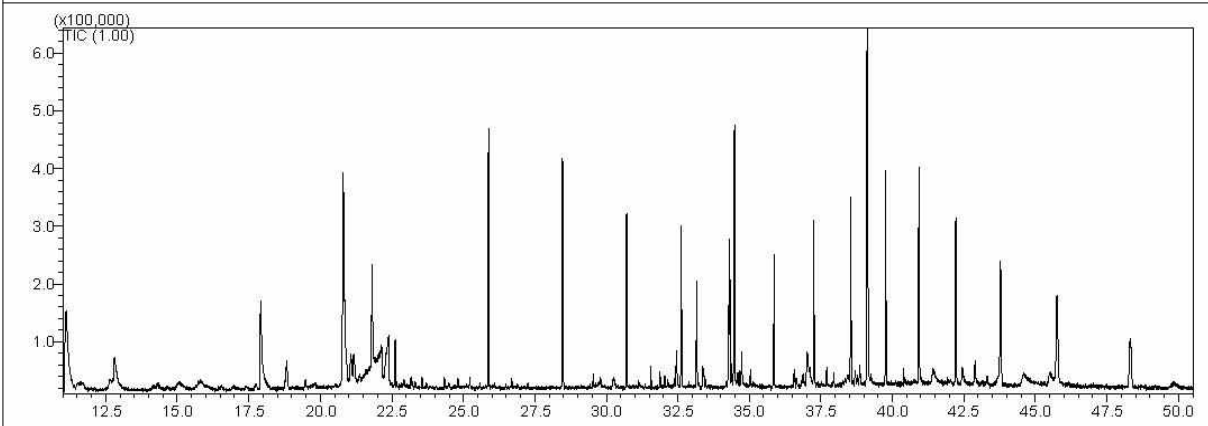
Sample-8



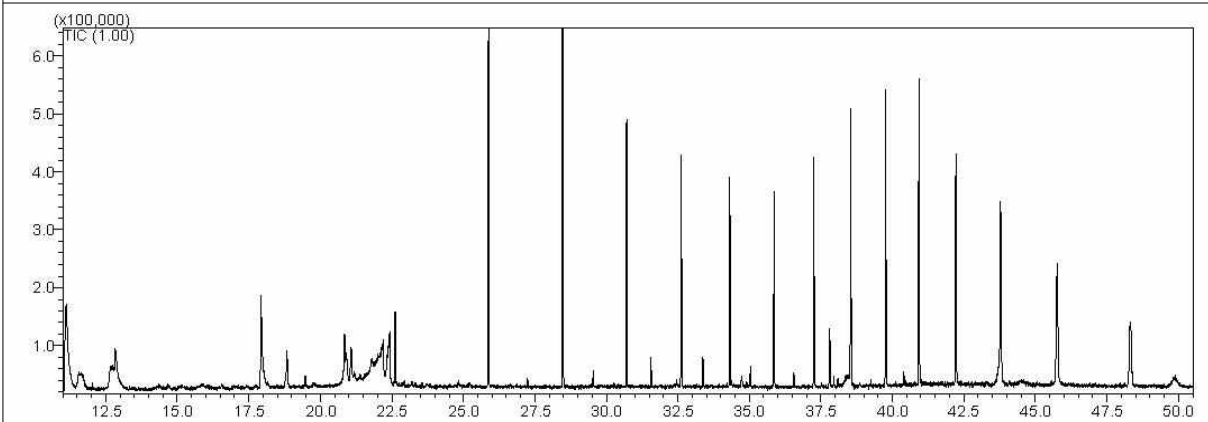
Sample-9



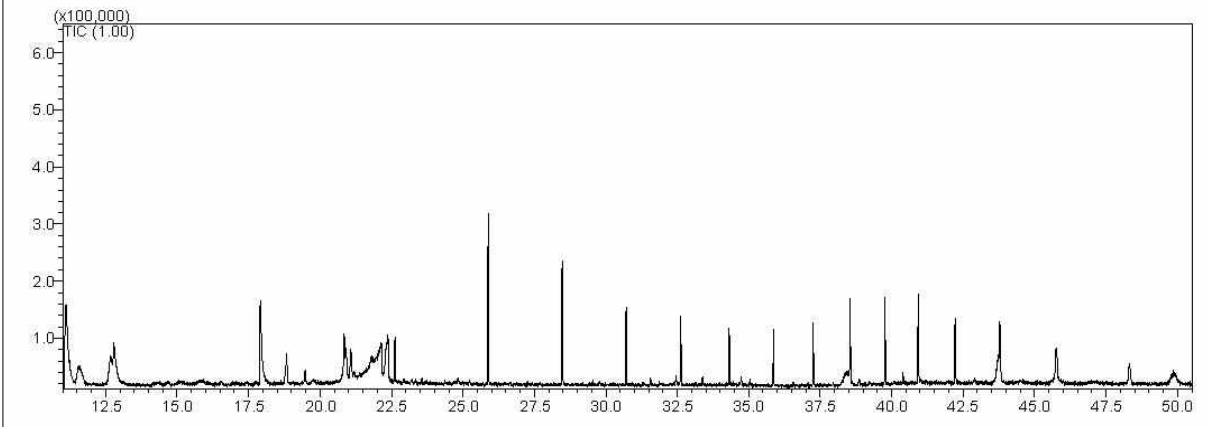
Sample-10



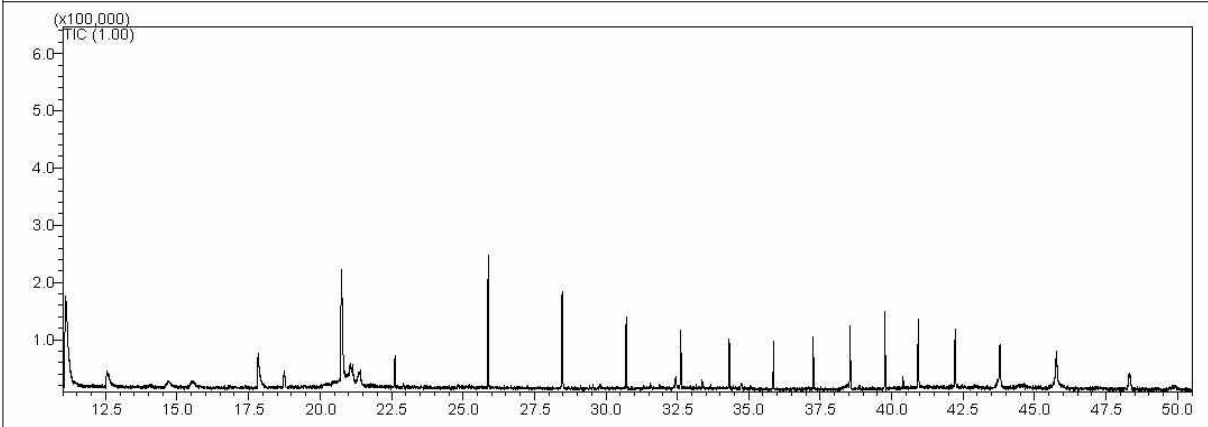
Sample-11



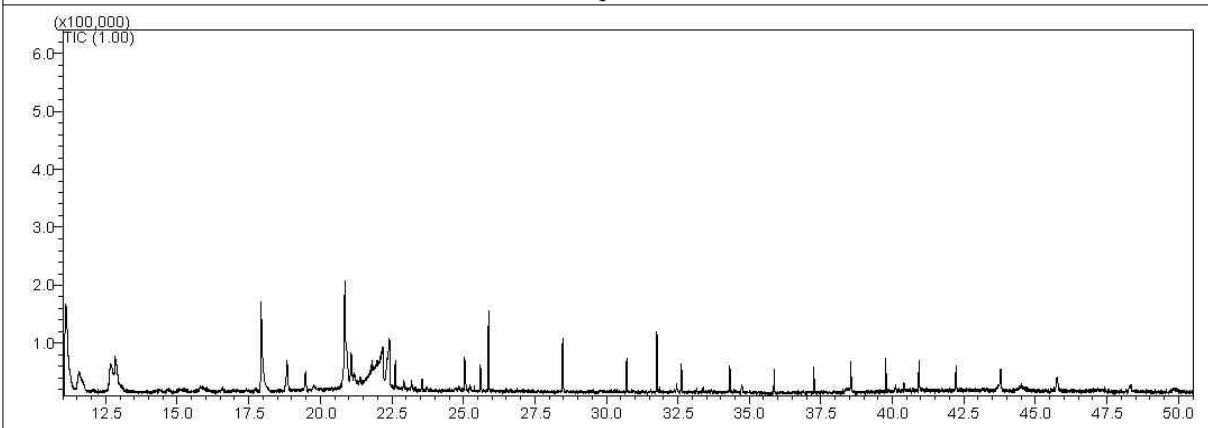
Sample-12



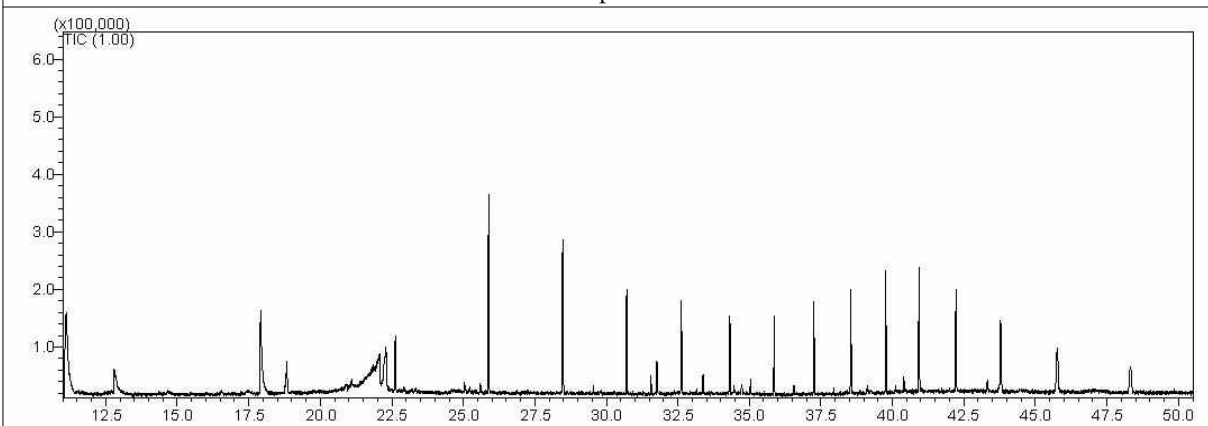
Sample-13



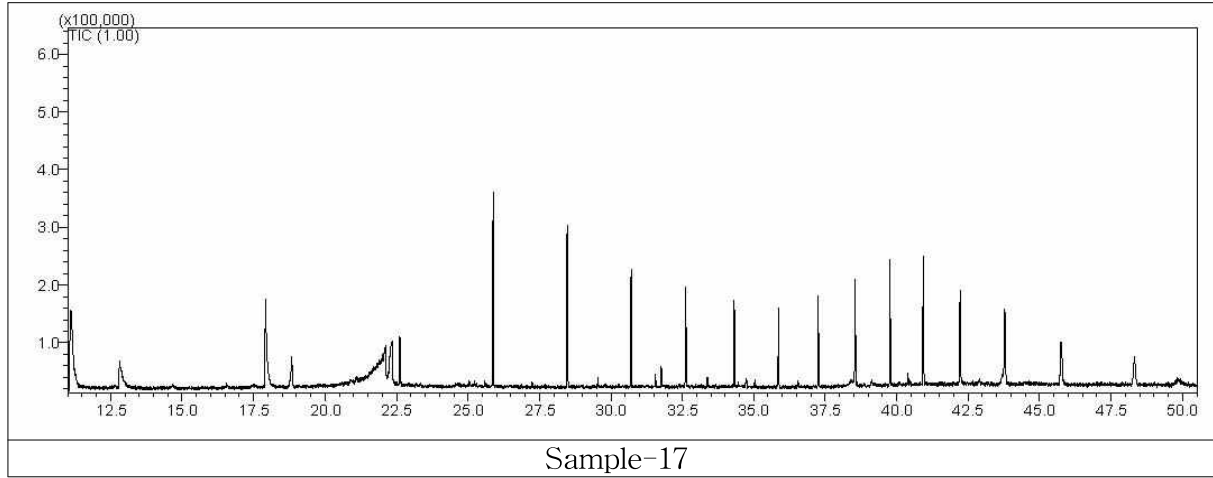
Sample-14



Sample-15



Sample-16



Sample-17

3. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
------	------

1. 목표달성도

가. 연구개발의 최종목표

본 연구는 장류식품 및 원료 제품의 가공 공정에 따른 염미 증진 peptide 및 휘발성 성분의 조성 및 정량 분석법 확립을 목표로 하여 수행되었다.

나. 연차별 연구개발 목표 및 계획대비 달성도

연도	세부과제명	세부연구목표	달성도	연구개발수행내용
1차년도 (2013)	LC-MS를 이용한 장류식품의 저분자량 펩타이드 분석법 개발	LC-MS를 이용한 장류식품의 저분자량 펩타이드 분석법 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> - 9가지 peptide 표준품의 분석조건 확립 - 표준품 농도별 검출량 차이로 검량성 작성 - LC-MS를 활용한 시료별 peptide 조성 확인 - LC-MS를 활용한 시료별 표준품 정량 확인 - 주요 제조 공정간 휘발성 성분 패턴의 변화 확인

2. 관련분야 기여도

- 국내 식품의 염미 증진 물질 분석의 기반 제공
- 효과적인 분석 자료 산출에 의한 유통 식품의 효용성 평가
- 식품 중, 일반 저분자량 peptide 선별 효율성 증대
- 신규 peptide에 의한 식품 부가가치 증대

4. 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07
------	------

- 염미증진물질의 탐색에 활용
- 염미증진물질의 대량생산에 대한 기초 자료 활용

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) LC-MS를 이용한 장류식품의 저분자량 펩타이드 분석법 개발				
	(영문) Development of Low molecular peptide analysis method of soy fermented foods by LC-MS				
주관연구기관	건국대학교		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 건국대학교	
참 여 기 업				(성명) 금 영 수	
총연구개발비 (25,000 천원)	계	25,000 천원	총 연 구 기 간	2013.08.08. ~ 2014.08.07. (1년)	
	정부출연 연구개발비	25,000 천원	총 참 연 구 원 수	총 인 원	3 명
	기업부담금			내부인원	3 명
	연구기관부담금			외부인원	

- 연구개발 목표 및 성과
- 염미 증진 효능 저분자량 peptide 분석법 확립 및 장류 시료 분석
- 연구내용 및 결과
- 주요 저분자량 peptide 분석법 확립
 - 기존연구로 밝혀진 주요 저분자량 peptide의 LC-MS를 이용한 분석법 검정/개선 및 확립
 - Agilent LC-MS 등을 이용한 표준품의 일반적 MS 및 MS/MS 자료 확보
 - 시료군별 peptide 정상 분석
 - 어장류 시료의 주요 peptide 정상 파악 및 정량/정성 자료 산출
 - 시료의 peptide 분자량 범위 확보
 - 처리 공정에 따른 휘발성 성분 분석 및 변화 규명
- 연구성과 활용실적 및 계획
- 국내 식품의 염미 증진 물질 분석의 기반 제공
 - 효과적 분석 자료 산출에 의한 유통 식품의 효용성 평가
 - 식품 중, 일반 저분자량 peptide 선별 효율성 증대
 - 신규 peptide에 의한 식품 부가가치 증대

[별첨 2]

제1협동 3,4 년차 위탁연구개발보고서

보고서 요약서

과제고유번호	312010-4	해당 단계 연구 기간	2015.08.08. ~ 2016.08.07	단 계 구 분	(4 단계)/ (총 4 단 계)
연구사업명	중사업명				
	세부사업명				
연구과제명	대과제명	가공공정 개선에 의한 나트륨 저감화 방법 개발			
	위탁 과제명	짠맛 증진물질 신속평가를 위한 랩온어칩 개발			
연구책임자	고성호	해당단계 참여 연구원 수	총: 3명 내부: 3명 외부: 명	해당단계 연구 개발비	정부: 17,500천원 민간: 천원 계: 천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 6명 내부: 6명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 35,000천원 민간: 천원 계: 천원
연구기관명 및 소속부서명	차의과학대학교 (바이오공학과)			참여기업명	
위탁 연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)				보고서 면수	
<p>○ 짠맛 증진물질 신속평가를 위한 랩온어칩 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 짠맛센서 칩의 실험 디자인 확립 및 제작 - ENaC 세포(HepG2)-NaCl 반응을 통한 짠맛센서 칩 기능성 평가 - ENaC 세포(HepG2)을 적용한 짠맛 증진후보물질 효능 평가 - TMC-1 세포(HEK293T)-NaCl 반응을 통한 짠맛센서 칩 기능성 평가 - TMC-1 세포(HEK293T)을 적용한 짠맛 증진후보물질 효능 평가 					

국문 요약문

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	본 연구의 목표는 나트륨 이온이 짠맛에 관여하는 것으로 여겨지는 세포막 이온 채널 단백질을 통해 세포 내로 유입됨으로써 변화하는 세포막전위를 측정할 수 있는 미세구조인 랩온어칩(Lap-on-a-chip)을 개발하여 짠맛 증진후보물질의 효능을 신속, 간단, 저렴하게 평가할 수 있는 새로운 시스템을 구축 하고자 함					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 짠맛센서 칩의 실험 디자인 확립 ○ 짠맛센서 칩의 제작 ○ 짠맛센서 칩을 이용한 ENaC 세포(HepG2)-NaCl 반응 확인 실험 <ul style="list-style-type: none"> - ENaC 세포(HepG2)의 전극 부착을 위한 짠맛센서 칩 위 배양 - NaCl 처리에 따른 세포막전위 변화 측정 가능성 평가 [짠맛센서 칩의 측정원리] - NaCl 농도별 차이에 따른 세포막전위 변화 측정 민감도 평가 - ENaC 세포(HepG2) 밀도별 차이에 따른 세포막전위 변화 측정 민감도 평가 ○ 짠맛센서 칩을 이용한 ENaC 세포(HepG2)-짠맛 증진후보물질 효능 확인 실험 <ul style="list-style-type: none"> - 짠맛 증진후보물질 농도별 차이에 따른 세포막전위 변화 측정 민감도 평가 ○ 짠맛센서 칩을 이용한 TMC-1 세포(HEK293T)-NaCl 반응 확인 실험 <ul style="list-style-type: none"> - TMC-1 유전자의 transfection가 완료된 세포(HEK293T) 준비 - TMC-1 세포(HEK293T)의 전극 부착을 위한 짠맛센서 칩 위 배양 - NaCl 처리에 따른 세포막전위 변화 측정 가능성 평가 [짠맛센서 칩의 측정원리] ○ 짠맛센서 칩을 이용한 TMC-1 세포(HEK293T)-짠맛 증진후보물질 효능 확인 실험 <ul style="list-style-type: none"> - 짠맛 증진후보물질 농도별 차이에 따른 세포막전위 변화 측정 민감도 평가 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 짠맛 증진후보물질의 효능평가를 신속, 간단, 정확, 저렴하게 평가 ○ 관능평가와는 별개로 짠맛 증진후보물질의 효능에 대한 객관적 지표로써 식품산업 발전에 기여 (짠맛 증진물질이 적용된 식품의 나트륨 저감화 평가 및 검증) ○ 새로운 짠맛 감지 이온채널 단백질 발견에 관련된 기초연구 ○ 새로운 짠맛 대체후보물질 발견에 관련된 기초연구 ○ 짠맛 이외의 미각 감지를 위한 이온채널이 적용된 바이오센서 연구 ○ 신경, 근육과 같은 세포막전위 변화를 측정이 필요한 연구에 응용 					
중심어 (5개 이내)	짠맛 증진물질	나트륨 이온채널	랩온어칩	막전위 변화	세포기반 분석	

< SUMMARY >

		코드번호	D-02			
Purpose& Contents	The purpose of our study is the establishment of the novel system for the rapid and simple evaluation of efficacy of diverse salt-enhancer candidates with low costs through the development of lap-on-a-chip which can measure the membrane potential changes caused by the influx of sodium ions by ionophoric protein					
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Experimental design of the salt taste sensor chip ○ Fabrication of the salt taste sensor chip ○ Confirmation of the reaction between HepG2(with ENaC) and NaCl via the salt taste sensor chip <ul style="list-style-type: none"> - Cultivation of HepG2 with ENaC on the chip for the electrode attachment - Possibility evaluation of measuring membrane potential changes by NaCl treatment [Measuring principle of salt taste sensor chip] - Sensitivity test of measuring membrane potential changes by concentration of NaCl - Sensitivity test of measuring membrane potential changes by cell density of HepG2 ○ Confirmation of the reaction between HepG2(with ENaC) and salt-enhancer candidates via the salt taste sensor chip <ul style="list-style-type: none"> - Sensitivity test of measuring membrane potential changes by concentration of salt enhancer candidates ○ Confirmation of the reaction between TMC-1 transfected HEK293T and NaCl via the salt taste sensor chip <ul style="list-style-type: none"> - Preparation of TMC-1 transfected HEK293T - Cultivation of TMC-1 transfected HEK293T on the chip for the electrode attachment - Possibility evaluation of measuring membrane potential changes by NaCl treatment [Measuring principle of salt taste sensor chip] ○ Confirmation of the reaction between TMC-1 transfected HEK293T and salt-enhancer candidates via the salt taste sensor chip <ul style="list-style-type: none"> - Sensitivity test of measuring membrane potential changes by concentration of salt enhancer candidates 					
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Rapid and simple evaluation of efficacy of salt-enhancer candidates ○ Aside from sensory evaluation, contribution to development of food industry as an objective index of efficacy of salt-enhancer candidates (evaluation and validation of sodium reduction of foods, including salt-enhancers) ○ Basic study for excavation of novel ion-channel proteins in salt sensing ○ Basic study for excavation of novel salt-alternative candidates ○ Study for biosensor using ion-channel to detect other tastes, regardless of a salty taste ○ Application to the study for membrane potential changes such as nerves and muscle 					
Keywords	Salt taste enhancer	Sodium ion channel	Lap-on-a-chip	Membrane potential change	Cell based assay	

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

1. 연구개발 목적

- 본 위탁기술 개발은 나트륨 이온이 짠맛에 관여하는 것으로 여겨지는 세포막 이온 채널 단백질을 통해 세포 내로 유입됨으로써 변화하는 세포막전위를 측정할 수 있는 미세구조인 랩온어칩(Lap-on-a-chip)을 개발하여 짠맛 증진후보물질의 효능을 신속, 간단, 저렴하게 평가할 수 있는 새로운 시스템을 구축 하고자 함

2. 연구개발의 필요성

- 2010년 보건복지부의 보고 자료에 따르면 우리나라 국민의 하루 나트륨 섭취량은 4878mg으로, 주요국과 비교하여 보았을 때 세계적으로 높은 편이며, 특히 세계보건기구(WHO)의 최대 섭취 권고량인 2000mg보다 2.4배 높은 심각한 수준임(그림 1). 이렇듯 우리나라의 상대적으로 높은 나트륨 소비량은 국민 건강을 크게 위협 하고 있음. 따라서 나트륨을 저감화할 수 있는 짠맛 증진물질의 개발이 절실함

주요국 1일 나트륨 섭취량(단위: mg)



자료: 보건복지부

그림 1. 주요국 국민 1인당 하루 나트륨 섭취량 비교 (2010년, 보건복지부)

- 기존의 짠맛 증진후보물질의 효능 평가는 관능적인 검사에 대부분 의존하고 있는데 이는 좀 더 정확한 결과를 도출해 내는데 다소 한계를 보이고 있음. 또한, 다양한 짠맛 증진후보물질 중 의미 있는 효능을 보이는 후보 물질을 탐색하는데 드는 비용 및 시간이 상당히 소요되는 문제점도 안고 있음
- 따라서, 짠맛 증진 물질 탐색 시, 이러한 한계점들을 극복하여 좀 더 신속하고 정확하며 저비용으로 우수한 짠맛 증진효능을 가진 후보 물질을 찾는데 적합한 새로운 평가 시스템 개발이 절실함. 이러한 새로운 시스템 개발에는 나노, 기계, 전기, 화학, 바이오 기술들이 융합된 미세구조 랩온어칩 혹은 바이오센서의 응용이 적합함

- 바이오센서(biosensor)란 분석대상 물질과 선택적으로 반응할 수 있는 생체감지물질(효소, 항체, 핵산, 세포 등)이 전기 또는 광학적 신호변환기 표면에 고정화되어 생물학적 인식 반응에서 나타나는 전기화학적 변화, 광학적인 변화, 열에너지의 변화, 형광 또는 색의 변화 등을 궁극적으로 전기적 신호로 변환시킴으로서 분석물질을 선택적으로 검출할 수 있는 측정기를 통틀어 지칭함. 이러한 바이오센서는 전통적인 기존 분석방법과는 달리 측정하고자 하는 시료를 신속히 고감도로 언제 어디서나 간편하게 분석할 수 있는 장점들이 있어 의료, 식품, 환경, 군사 분야 등에 응용 가능함(그림 2)



그림 2. 바이오센서(biosensor)의 종류

- 이러한 융합기술을 바탕으로 개발되는 랩온어칩은 바이오센서의 일종으로 ‘하나의 칩 위에 실험실을 올려놓았다’ 라는 뜻을 담고 있으며, 보통 ‘칩 속의 실험실’ 또는 ‘칩 위의 실험실’ 로 통함(그림 3) 플라스틱·유리·규소(실리콘) 등의 소재를 사용해 나노미터 이하의 미세 채널을 만들고, 이를 통해 극미량의 샘플이나 시료만으로 기존의 실험실에서 할 수 있는 질병 진단을 위한 시료 처리, 분석 등과 같은 실험과 연구과정을 신속하게 대체가능 하게 함. 이를 통하여, 생화학반응을 얻기 위한 시간과 비용을 획기적으로 감소시키며 고감도로 간편한 분석 절차를 통해 정확한 결과를 가져옴에 따라 이를 이용한 바이오센서의 연구가 많은 관심을 받고 있음

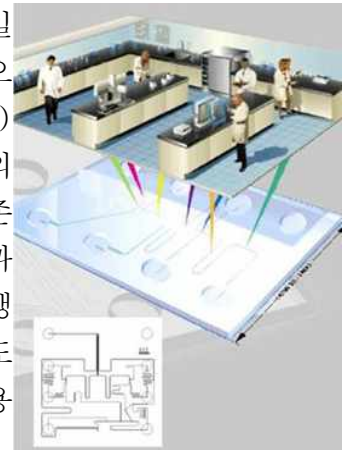


그림 3. 랩온어칩(Lap-on-a-chip)

- 전기화학적 원리를 도입한 랩온어칩의 경우 측정 시스템이 매우 단순하고 전극의 제작이 간단하다는 이점이 있음. 또한 바이오 신호를 디지털 전기신호로 전환하여 타 정보처리 디바이스와 연계성이 높아짐은 물론 민감도가 높고, 소형화에 용이하여 휴대성이 좋고 생산원가가 낮아지며 극소량의 분석물질을 정확하고 신속하게 실시간으로 모니터링 할 수 있는 등 많은 이점이 존재함으로, 쯤맛 증진후보물질의 신속 정확한 효능 평가 시스템을 구축하는데 적합할 것으로 사료됨

3. 연구개발 범위

가. 1차년도(총괄과제 3차년도)

- 기존의 짠맛 증진 물질 평가 방법 리뷰
 - 관능검사 방법
 - 패치클램프(Patch clamp)에 의한 막전위 측정방법
 - 트랜지스터(transistor) 기반 막전위 측정방법
 - 다채널기록법(MultiElectrode Array, MEA) 기반 막전위 측정방법
- 세포막전위 변화를 측정 할 수 있는 미세구조화된 랩온어칩 제작
 - 골드 전극의 최적화를 위한 디자인 결정(골드 패턴의 두께, 넓이, 간격 등 결정)
 - 전극 패터닝 수행

나. 2차년도(총괄과제 4차년도)

- 미세구조 랩온어칩과 골드 전극이 일체화된 시스템 제작
 - 일체화된 시스템 제작(그림 4)
 - 본 시스템의 전기적 신호 측정 및 세포 막전위 측정 유효성 평가

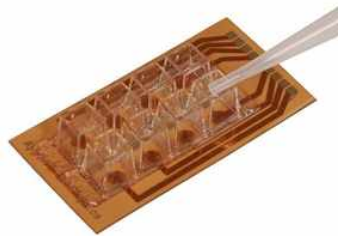


그림 4. 미세구조 랩온어칩과 골드 전극이 일체화된 시스템 예상도

- 일체화된 랩온어칩 기반 시스템의 짠맛 증진 물질 평가
 - 세포막 이온 채널이 과발현 세포 준비(그림 5)

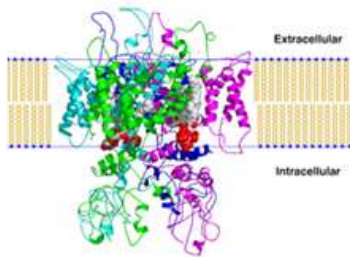


그림 5. 짠맛 관련 이온 채널이 과발현된 세포막 모식도

- 랩온어칩에 의한 세포막 이온 채널의 막전위 측정
- 랩온어칩과 짠맛 관련 이온채널이 과발현된 세포에 의한 짠맛 증진 물질 후보 평가

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04
------	------

- 원하는 세포막 이온 채널 단백질을 과발현시킨 HEK293 cell을 대상으로 한 cell sensor interface에 관한 연구 (G. Wrobel et al., Journal of The Royal Society Interface, 2008)
 - 세포막전위의 변화를 측정하기 위해서는 세포가 전극에 잘 부착되어 있어야 함. 보통 원하는 세포막 이온 채널 단백질을 과발현시키기 위해서는 transfection의 성공률이 높은 HEK293 세포를 기반으로 수행하게 되지만 이 세포는 substrate로부터 잘 떨어지는 특성을 가지고 있음. 따라서 이 연구에서는 PLL, PDL, ECM 등과 같이 여러 가지의 코팅물질을 이용하여 여러 조건하에서 HEK293를 cell sensor 표면에 잘 부착시키기 위한 조건을 최적화하고자 시도하였음(그림 6)

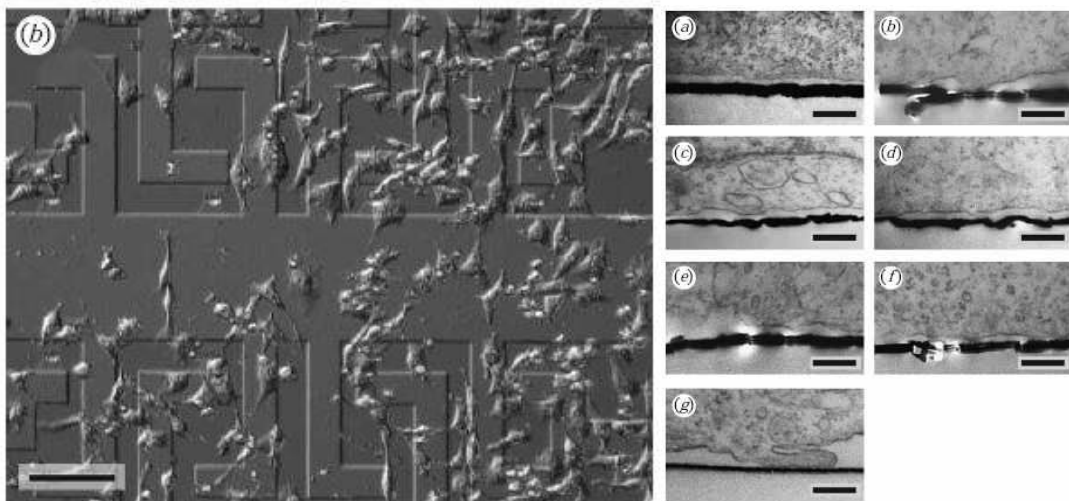
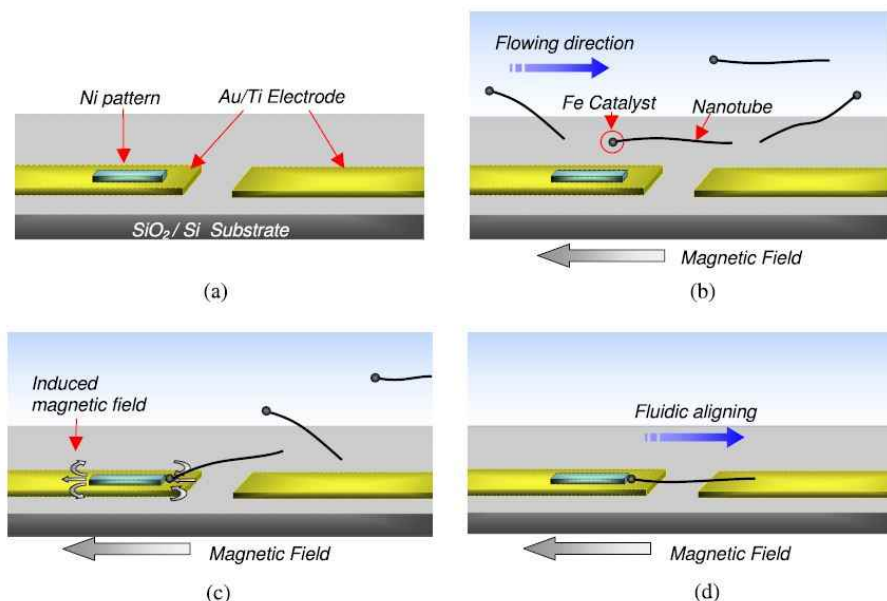


그림 6. HEK293 세포와 PET chip 사이의 최적화된 interface 관한 연구 (G. Wrobel et al. 2008)

- 자력 캡처링과 유체 배열을 통한 탄소나노튜브의 정밀한 자가조립 방법 개발 (J. S. Shim et al., Nanotechnology, 2009)



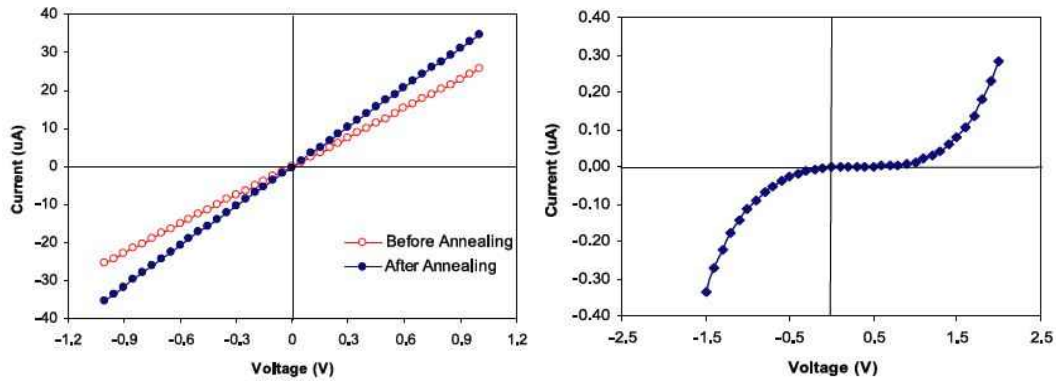
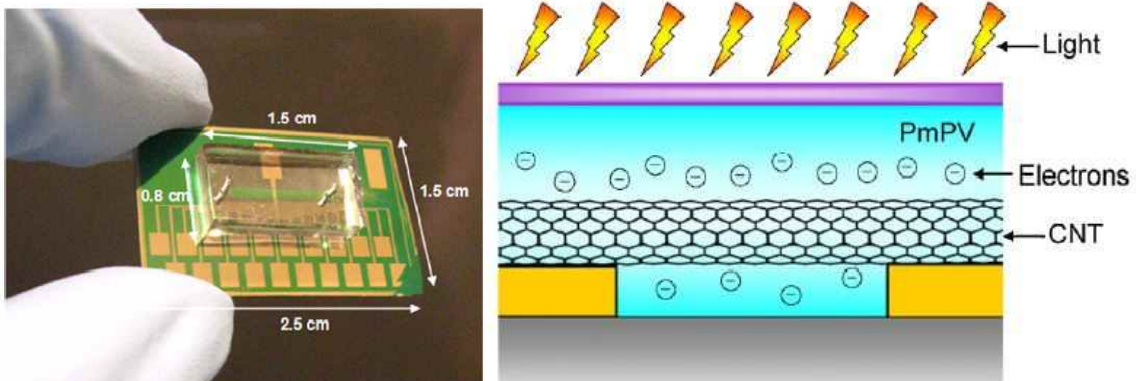


그림 7. 다중벽과 단일벽 탄소나노튜브를 이용한 정밀한 자가조립 방법에 대한 연구 (J. S. Shim et al. 2009)

- 탄소나노튜브 한 가닥만 붙을 수 있는 사이즈의 Ni 패턴을 e-beam lithography를 통하여 골드 전극 위에 증착시켜 자기장을 유도하고, 탄소나노튜브 합성 시 촉매로 쓰이는 철 부분을 전극 쪽으로 자력 캡처링시킨 후 유체를 흘려 붙지 않은 탄소나노튜브 가닥을 떨어져 있는 전극에 접촉시킨 후 어닐링을 시켜 완전히 전극과 접촉시킨 후 I-V curve를 측정함. 탄소나노튜브가 다중벽이나 단일벽이냐에 따라 다중벽 탄소나노튜브는 금속성질에서 보이는 stable ohmic contact 형태의 그래프를 나타나게 되며 단일벽 탄소나노튜브는 반도체성질에서 보이는 non-linear Schottky contact의 그래프를 나타냄을 확인하였음 (그림 7)

○ Photovoltaic polymer로 코팅된 탄소나노튜브를 적용한 광학 면역센서 개발에 관한 연구 (J. S. Shim and C. H. Ahn, Biosensors and Bioelectronics, 2012)

- 2009년 J. S. Shim 그룹의 후속연구이며 기존의 연구와 마찬가지로 탄소나노튜브 한 가닥만 붙을 수 있는 사이즈의 Ni 패턴을 e-beam lithography를 통하여 골드 전극 위에 증착시켜 자기장을 유도하고, 탄소나노튜브 합성 시 촉매로 쓰이는 철 부분을 전극 쪽으로 자력 캡처링시킨 후 유체를 흘려 붙지 않은 탄소나노튜브 가닥을 떨어져 있는 전극에 접촉시킨 후 어닐링을 시켜 완전히 전극과 접촉시킴. 그 후 photovoltaic polymer를 그 위에 코팅하여 빛을 쬐어 주었을 때 발생하는 전자로 인해 탄소나노튜브의 전도율(conductivity)을 변화시켜 더욱 민감하게 측정되는지 확인하였음. 응용을 위해 관련 항체를 이용하여 cardiac troponin T의 측정을 시도하였고 최소 측정 민감도는 12pg/ml이었음 (그림 8)



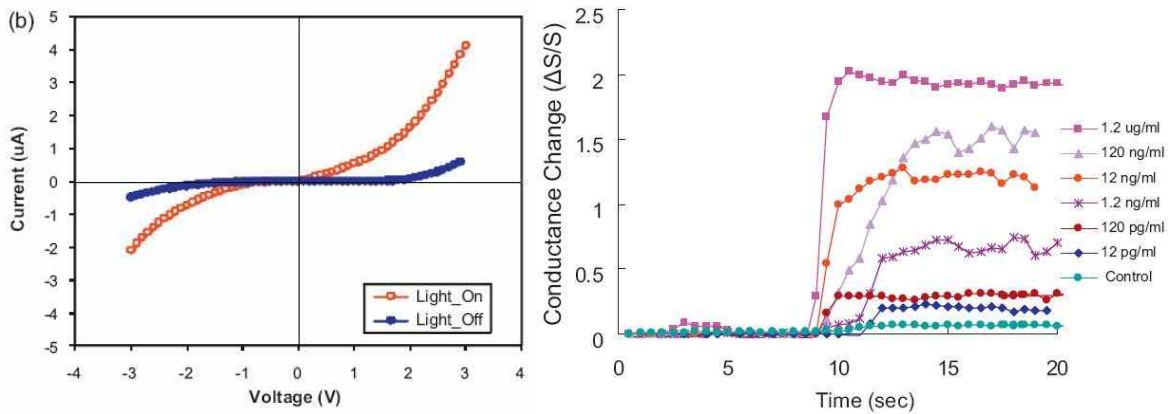


그림 8. Photovoltaic polymer로 코팅된 탄소나노튜브를 적용한 광학 면역센서 개발에 관한 연구 (J. S. Shim and C. H. Ahn 2012)

○ 꼬마애기선충(*C. elegans*)의 짠맛 감지능력에 필요한 나트륨 감지 채널을 코딩하고 있는 TMC-1에 관한 연구 (C. Marios et al., Nature letter, 2013)

- 인간의 Transmembrane channel-like(TMC) gene은 아직 그 분자생물학적 기능이 많이 밝혀지지 않았음. C. Marios 그룹에서는 꼬마애기선충이 높은 농도의 NaCl에서 행동학적 회피를 보이지만 다른 자극에 대해서는 반응을 보이는 것을 확인하였으며, 이러한 행동은 짠맛 감지능력에 필요한 나트륨 감지 채널인 TMC-1에 기인하는 것으로 판단하고 확인실험을 시도하였음. 꼬마애기선충의 TMC-1 유전자를 transfection하여 과발현시킨 Chinese Hamster Ovary (CHO) 세포를 대상으로 whole cell patch clamp를 통하여 NaCl의 자극에 의해서만 반응하는 것을 확인하였고 따라서 꼬마애기선충의 TMC-1은 나트륨 감지 이온채널임을 확인하였음 (그림 9)

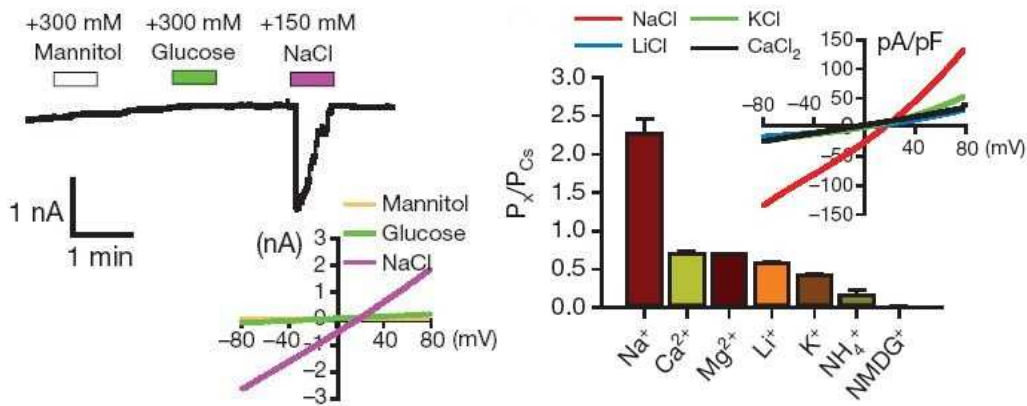


그림 9. 꼬마애기선충의 짠맛 감지능력에 필요한 나트륨 감지 채널을 코딩하고 있는 TMC-1에 관한 연구 (C. Marios et al., 2013)

○ 짠맛 감지를 위한 microelectrode array(MEA)가 적용된 미뢰 생체전자 혀 개발에 대한 연구 (Q. Liu et al., Biosensors and Bioelectronics, 2013)

- 36개의 채널로 이루어진 미세 전극(microelectrode)을 유리 위에 제작하고 쥐(rat)의 미각 상피조직(taste epithelium)을 MEA 칩 위에 고정 시켰음. 그 후 NaCl을 농도별로 처리하여 미각 상피조직 내 미뢰(taste buds)의 미각 수용기 세포들(taste receptor cells)을 자극시켜, 나트륨에 의해 유도된 전압(potentials)의 발생 정도와 같은 전기 생리학적인 활동을 측정할 수 있는 생체전자 혀를 개발하였음 (그림 10)

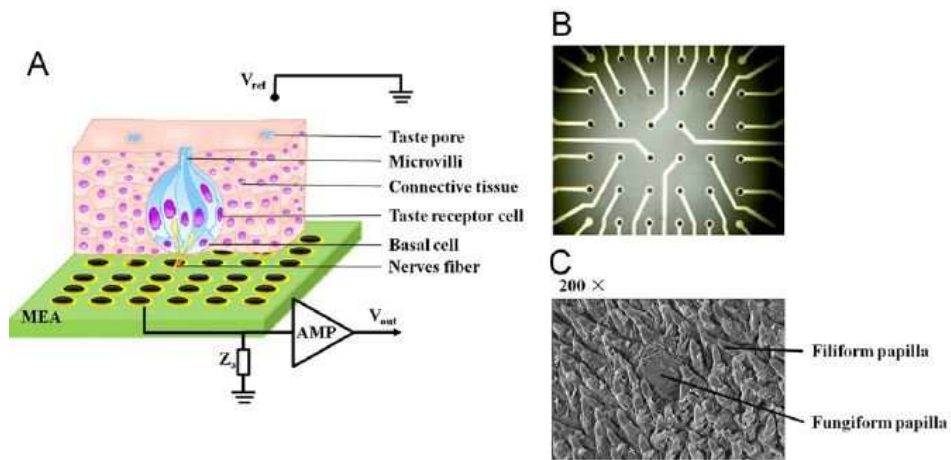


그림 10. 짠맛 감지를 위한 MEA가 적용된 미뢰 생체전자 허 개발에 대한 연구 (Q. Liu et al., 2013)

○ 단맛 구별을 위한 인간 미각 수용기가 적용된 생체전자 허 개발에 대한 연구

(H. S. Song et al., ACS Nano, 2014)

- 단일벽 탄소나노튜브를 이용한 field-effect transistor와 heterodimeric human sweet taste receptors (hTAS1R2와 hTAS1R3)와 칼슘이온 채널을 포함한 nanovesicle로 구성된 생체전자 허를 개발하여 sweetener가 taste receptors에 결합하는 것을 검출할 수 있게 하였음. 그 결과, 단맛물질의 농도에 따른 민감도가 높으며 여러종류의 단맛에 대한 선택도 넓은 것을 확인 할 수 있었음 (그림 11)

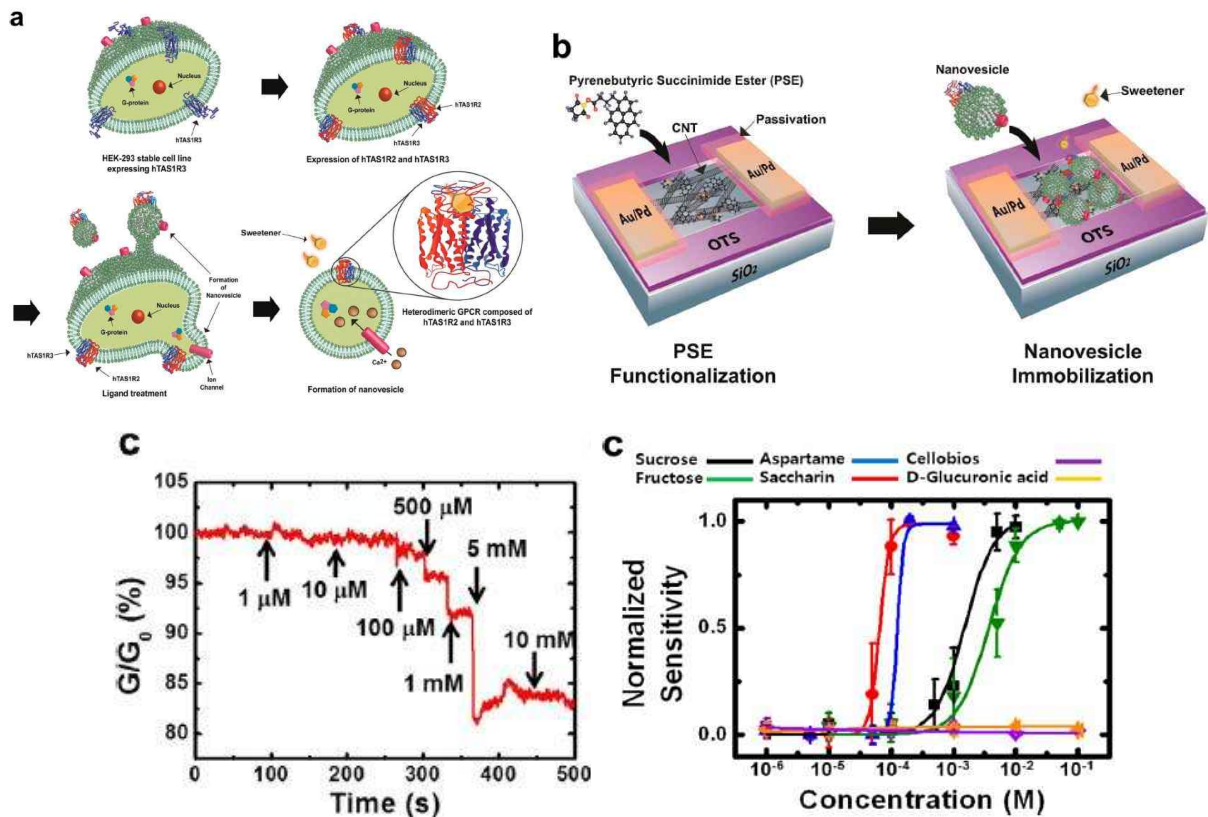


그림 11. 단맛 구별을 위한 인간 미각 수용기가 적용된 생체전자 허 개발에 대한 연구 (H. S. Song et al., 2014)

○ 위와 같은 미각 감지연구를 위해 이온채널에 대한 연구 및 이를 이용한 바이오센서 개발 연구는 본 위탁 연구를 포함하여 아직까지 초기화 단계임. 다만 이 외에도 여러 가지 목적을 위하여 생체 내 이온 채널을 이용하거나 인공적으로 만든 이온 채널이 포함된 막을 이용한 바이오센서 개발 연구가 많이 수행되어지고 있음 (표 1). 특히 많이 사용되는 기술은 patch clamp, SPR, fluorescence-based assays 등이 있지만 이러한 기술을 능숙하게 구사할 수 있는 전문가, 고가의 연구장비 등이 반드시 필요하다는 한계점이 있음

Table 1 Types of biosensors and techniques

	Type of biosensor	Type of matrix / bilayers	Type of technique / instrumentation
Safety screening	Bioterrorism agent ricin	Glass nanopore (solid state nanopore)	Aptamer-based nanopore
Drug screening	Detection of explosives using α -hemolysin	Black lipid membrane (BLM)	Patch clamp (conventional) / Port-a-Patch
	Safety pharmacology	Cell membrane	Automated patch clamp
Sensing narcotic drugs			Fluorescence-based assays (FluxOR)
	Based on receptor cell transistor	Droplet interface bilayer (DIB)	Two-droplet system
Detection of small organic molecules, ions, and enantiomers	Nanopore on a chip	Cell membrane on silicon chip	Receptor cell transistor (RCT)
	Based on engineered α -hemolysin pores	Free-standing membrane	Conventional bilayer technique / automated patch clamp (Port-a-Patch)
Detection of bacteria, viruses	Based on artificial pore	BLM / DIB / free-standing membrane	Conventional bilayer technique / automated patch clamp (Port-a-Patch) / DIB
	Based on natural and artificial ion channels	Tethered lipid bilayers	Conventional bilayer technique / automated patch clamp (Port-a-Patch)
Detection of antibodies			Electrochemical technique (impedance)
Detection of DNA, RNA		Black lipid membrane (BLM)	SPR technique, electrochemical technique (impedance)
			Conventional bilayer technique / Port-a-Patch / automated patch clamp / DIB

표 1. 생체 내 혹은 인공적인 이온채널을 이용한 바이오센싱 플랫폼 개발 사례 (L. Steller et al., 2012)

○ 미각 감지를 위한 이온채널을 이용한 바이오센서가 상품화된 사례는 현재까지 없으며 그에 대한 시장 또한 형성되어 있지 않은 상황임. 다만 이온채널 연구를 위한 바이오센싱 플랫폼 중에 상품화된 사례에는 patch clamp의 기술의 복잡성, 전문가의 필요성 등의 문제점이 개선된 port-a-patch system이 있지만 여전히 저렴하지는 않다고 판단되어 짐(그림 12)

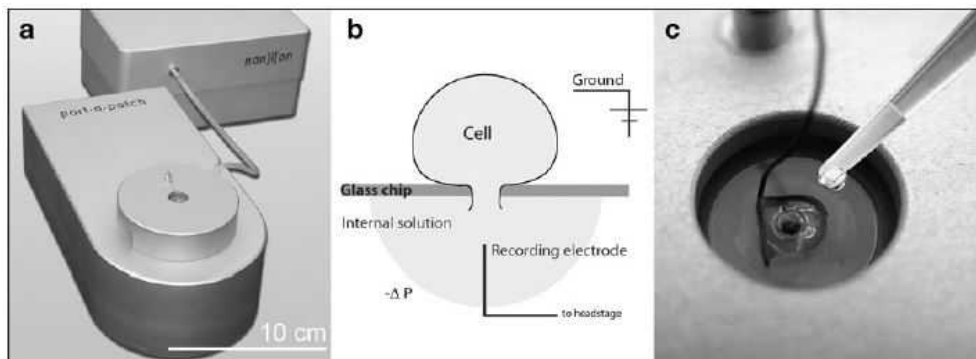


그림 12. The Port-a-Patch system (L. Steller et al., 2012)

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

1. 1차년도(총괄과제 3차년도) 연구수행 내용 및 결과

가. 짠맛센서 칩의 실험 디자인 설계

- 짠맛에 관여하는 세포막 채널 단백질에 대한 기본적인 연구 및 새로운 짠맛 증진물질의 효율적인 발굴을 목적으로, 패치 클램프(Patch clamp)와 같은 복잡하고 다루기 어려운 고가의 장비를 대체하여, 비교적 간단하고 다루기 쉬운 저렴한 랩온어칩(Lap-on-a-chip)을 고안하고자 하였음
- 본 위탁 연구는 나트륨 이온의 세포 내 유입에 따른 세포막전위의 변화를 전기화학적으로 측정할 수 있는 랩온어칩의 제작을 위하여 반도체 성질을 가지는 단일벽 탄소나노튜브(Single Walled Carbon NanoTubes; SWCNTs)를 적용하는 것이 효과적이라고 판단하였음. 탄소나노튜브(Carbon NanoTubes; CNTs)는 탄소 6개로 이루어진 육각형 구조의 그래핀(graphene)이 관 모양을 이루고 있는 튜브모양이며 직경이 수~수십 nm정도 되는 나노 신소재임. 전기 전도도는 구리와 비슷하며, 열전도율은 자연계에서 가장 우수한 다이아몬드와 같으며, 강도는 철강보다 100배 우수함. 종류로는 원통형 구조의 개수에 따라 단일벽(Single Walled; SW), 이중벽(Double Walled; DW), 다중벽(Multi Walled; MW)로 구분됨. 벽이 많은 다중벽(MW)일수록 금속성(Metallic)을 띄며, 단일벽(SW)은 반도체성(Semiconducting)을 띄게 됨 (그림 13)

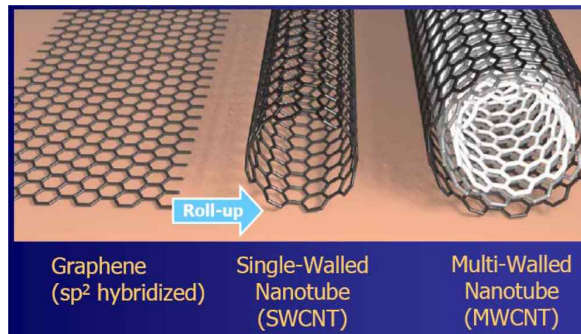


그림 13. 탄소나노튜브(Carbon NanoTubes; CNTs)의 구성 (Sensors journal, 2010)

- 아래 그림 14처럼 좌우로 평행하게 디자인된 5쌍의 전극들 사이에 반도체(semiconductor) 성질을 갖는 단일벽 탄소나노튜브(SWCNTs)를 부착시켜 양쪽 전극을 연결함. 나트륨 이온의 출입에 관여하는 몇 가지의 세포막 채널 단백질들 중, 인간이 느끼는 짠맛에 관여할 것으로 예상되는 가장 유력한 세포막 채널 단백질인 Epithelial Sodium Channel (ENaC) 혹은 Transmembrane channel-like protein 1(TMC-1)이 존재하는 세포를 단일벽 탄소나노튜브(SWCNTs)에 접촉하게 하여 나트륨이온의 세포 내 유입에 따른 세포막전위의 변화를 전기화학적 분석법 중 직류 전류 전압법(Direct-Current Current-Voltage method; DC-IV)을 이용하여 비표지 방식으로 실시간으로 정량할 수 있게 디자인하였음
- 이 때, 위와 같은 세포와 함께 단일벽 탄소나노튜브(SWCNTs) 위에 올린 완충용액(buffer)에 포함된 NaCl과 짠맛 증진후보물질의 비율조건을 다르게 하여, 완충용액으로부터 유래된 나트륨이온의 세포 내 유입정도를 측정된 전기화학적 신호를 확인한 후, 짠맛 증진후보물질의 효능을 신속, 간단, 저렴하게 확인하게 됨

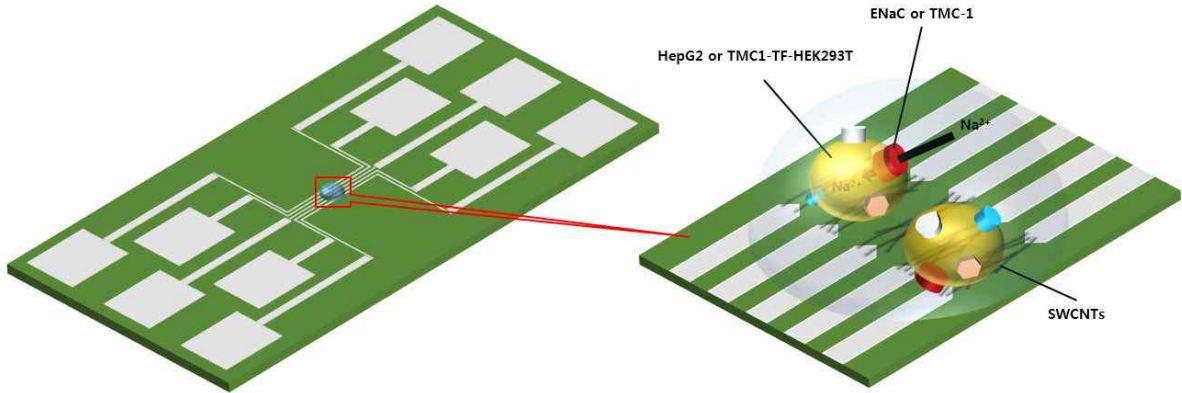


그림 14. 1차년도 짠맛센서 칩의 전체 모식도

나. 트랜지스터 기반 짠맛센서 칩의 제작

(1) 짠맛센서 칩의 정밀 디자인 도면 제작

- 짠맛센서 칩의 전체 사이즈는 W 8mm x L 17mm으로 설정하였으며, 칩 위에 전기회로(electric circuit)는 사이즈가 W 1.8mm x L 2.5mm인 총 10개의 전극 콘택 패드(contact pad)와 이 패드로부터 이어져 나오는 W 16 ~ 20 μ m인 총 10개의 전극(electrode)으로 구성하였음. 단일벽 탄소나노튜브(SWCNTs)를 부착하기 위한 공간으로, 좌우로 평행하게 놓인 5쌍의 전극사이의 간격은 마스크(mask) 제작공정상 전극간격을 2 μ m이하로 만들 수 없었으므로 약 3 μ m으로 설정하였음
- 전극 패터닝(Electrode patterning)용 마스크(mask) 제작을 위해 AutoCAD 360 프로그램을 사용하여 짠맛센서 칩의 정밀한 디자인 도면을 제작함. (그림 15) 이 디자인 도면을 바탕으로 외주 업체를 통해 전자빔 증착기(E-beam evaporator)를 이용하여 Chrome(Cr) patterned film을 증착시킨 마스크(mask)를 제작하였음

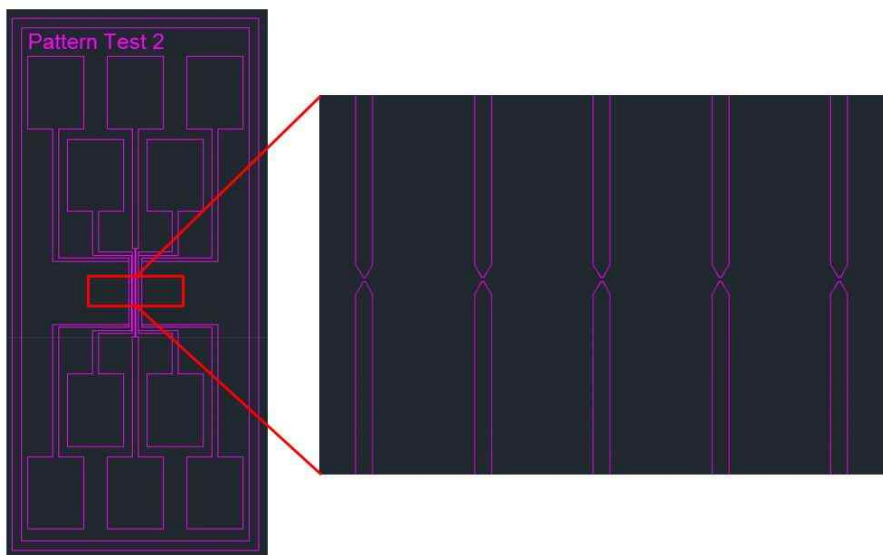


그림 15. Mask 제작을 위한 짠맛센서 칩 Design 도면

(2) 전극 패터닝(Electrode Patterning) 수행

- 그림 16의 포토리소그래피(photolithography) 과정을 통해 전극 패터닝(electrode patterning)을 수행함으로써, 백금(Platinum)으로 박막이 된 짠맛센서 칩의 전기회로(electric circuit)를 제작하였음
- 이전 공정에서 산화막(SiO₂)이 생성된 실리콘 웨이퍼(Si wafer)를 스핀 코터(Spin coater)의 척 위에 올려놓고 진공(vacuum)기능으로 고정시킨 후, 스핀 코터(Spin coater)의 작동과 동시에 아세톤(acetone)과 이소프로필 알코올(isopropyl alcohol; isopropanol) 처리를 하여 실리콘 웨이퍼(Si wafer)를 세척함

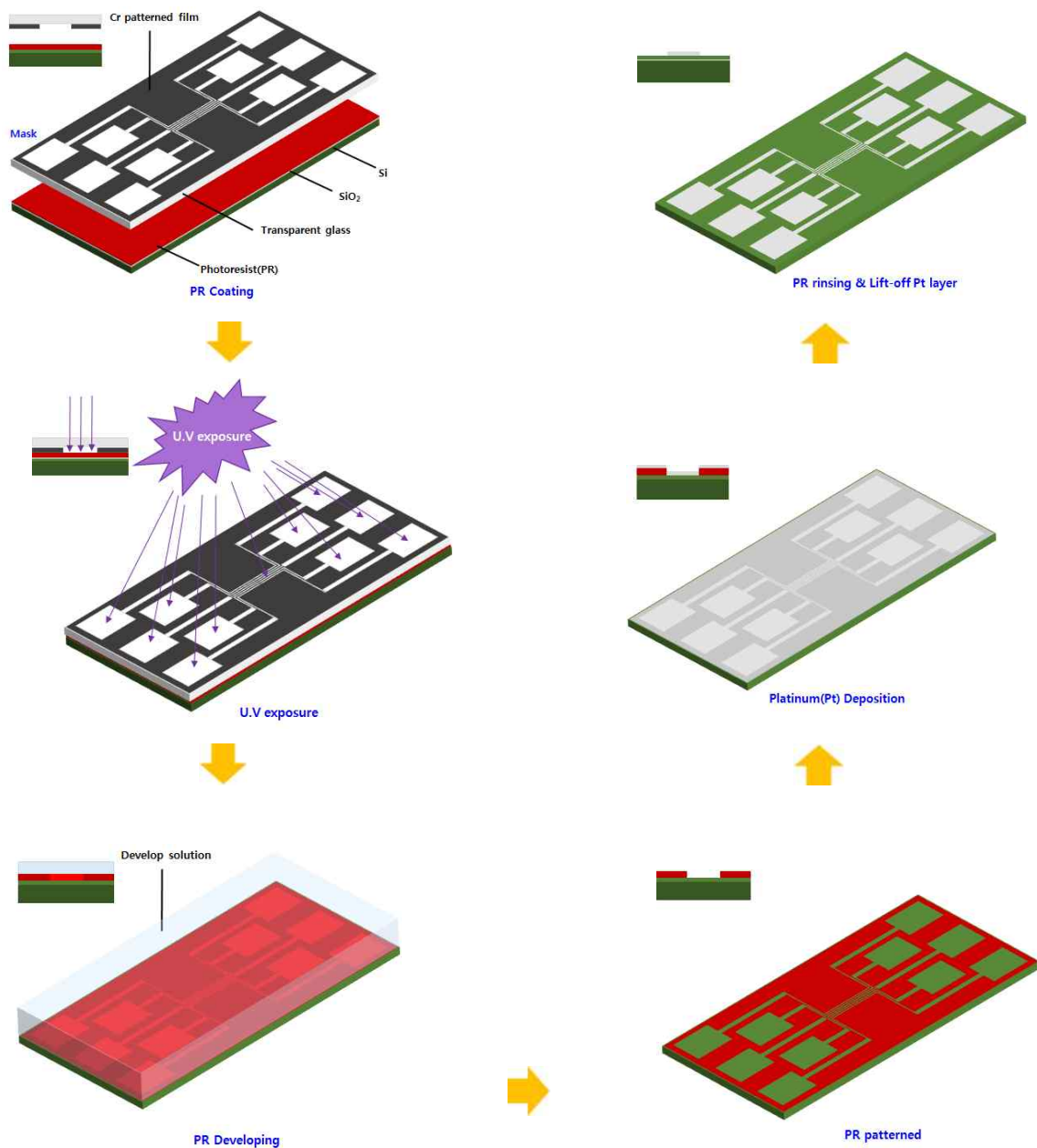


그림 16. 1차년도 짠맛센서 칩 Fabrication 절차 모식도 (Electrode Patterning)

- 세척 후, 감광액(photoresist; PR) [AZO GXR-601, AZ Electronic Materials] 약 1.5ml 정도를 1회용 스포이드를 사용하여 실리콘 웨이퍼(Si wafer) 표면 정중앙에 떨어뜨려, 약 2 μ m 두께로 고르게 감광액 도포(PR coating)처리를 하였음
- 감광액(PR)을 실리콘 웨이퍼(Si wafer) 표면에 좀 더 단단하게 부착하고 습기(용매)를 날려 보내서 감광액 현상(PR developing)시 자외선(Ultraviolet; UV)에 노출되지 않은 감광액(PR)이 떨어져 나가는 것을 방지하기 위해, 실리콘 웨이퍼(Si wafer)를 가열판(heat plate)위에 올려 약 95 $^{\circ}$ C에서 소프트 베이킹(soft baking)을 수행하였음
- 감광액 도포(PR coating)가 완료된 실리콘 웨이퍼(Si wafer) 위에 투명한 유리판(transparent glass)에 Chrome(Cr) patterned film을 증착시켜 제작한 마스크(mask)를 올린 후, 자외선 노광 얼라이너(UV exposable aligner)을 이용하여 자외선(UV)빛을 선택적으로 조사하여 노광과정(UV exposure)을 수행하였음. 감광액(PR)의 종류는 positive와 negative로 나뉘며, positive는 자외선(UV)에 노출된 부분이 흐물흐물해지며 negative는 자외선(UV)에 노출된 부분이 더욱 단단해짐. 본 위탁기술 개발에 사용된 감광액(PR)의 종류는 positive임
- 자외선 노광과정(UV exposure)을 마친 감광액(PR)이 도포된 실리콘 웨이퍼(Si wafer)를 현상액(Developing solution) [AZO DEV CD30, AZ Electronic Materials]에 약 1분 30초 동안 침강시켜 감광액 현상(PR developing) 처리를 하면 흐물흐물해진 감광액(PR)부분이 선택적으로 제거됨. 이 후, 탈이온수(deionized water; DI water)로 세척하고 질소로 건조시키면 감광액 패터닝(PR patterning)이 완료된 실리콘 웨이퍼(Si wafer)을 얻게 됨
- 감광액 패터닝(PR patterning)이 완료된 실리콘 웨이퍼(Si wafer) 위에 전자빔 증착기(E-beam evaporator)를 이용하여 비교적 공정이 잘 이루어지고 부식이 잘 되지 않는 백금(Platinum)을 선택하여 증착시켰음
- 백금(Platinum)을 증착시킨 실리콘 웨이퍼(Si wafer)에 감광액을 제거(PR rinsing)할 수 있는 아세톤(acetone)을 처리 하여 패터닝이 완료된 감광액(PR) 위에 증착된 백금층(Platinum layer)을 감광액(PR)과 함께 벗겨낸 후(lift off Platinum layer), 탈이온수(deionized water; DI water)로 세척하고 질소로 건조시켜 전극 패터닝(Electrode patterning) 이 완료되어 전기회로(electric circuit)가 형성된 실리콘 웨이퍼(Si wafer)을 얻게 됨
- 단일벽 탄소나노튜브(SWCNTs)를 직접적으로 부착하기 위한 전극간의 간격을 제외한 실리콘 웨이퍼(Si wafer) 표면에 미세구조로 제작된 전극(electrode)의 손상을 막기 위해 실리콘 질화물(Silicon nitride; SiN)을 코팅하여 피복(cladding)처리를 하였음
- 그림 17은 위와 같은 포토리소그래피(photolithography)과정을 완료한 후 실리콘 웨이퍼(Si wafer)를 칩 사이즈로 잘라내어 제작한 짠맛센서 칩의 실물 사진임

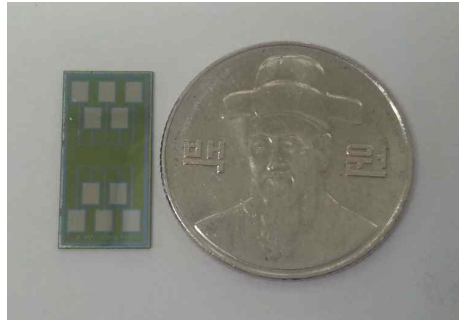
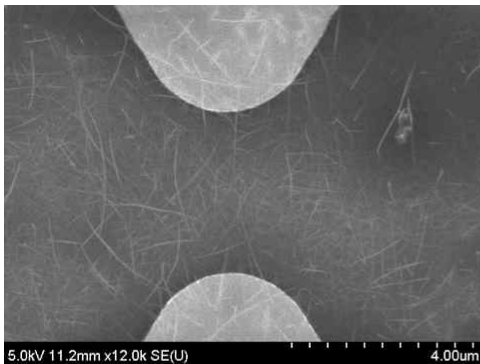


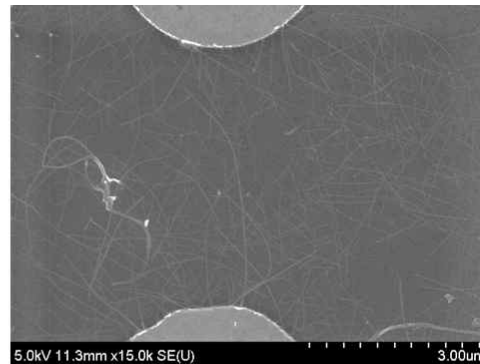
그림 17. 1차년도 짚맛센서 칩 실물 사진

(3) 단일벽 탄소나노튜브(SWCNTs) 코팅(coating) 및 주사형전자현미경(SEM) 확인

- 생산원가가 낮은 저렴한 짚맛센서 칩의 제작을 목적으로 단일벽 탄소나노튜브(SWCNTs)를 전문적으로 생산하고 유통하는 국내·외 업체의 제품들의 특성을 비교하여, 본 위탁기술 개발에 사용하기에 적합할 것으로 예상되는 단일벽 탄소나노튜브(SWCNTs) 제품들을 선별하였음
- 3회의 연속 희석(serial dilution)과 1회의 자석 필터링(magnetic dilution)과정을 거친 각 제품의 단일벽 탄소나노튜브 분산샘플(SWCNTs dispersed solution)을 전기회로(electric circuit)가 형성된 짚맛센서 칩의 전극 간격 사이에 떨어트렸음. 적절한 단일벽 탄소나노튜브(SWCNTs)의 밀도를 설정하기 위하여 KH Chemical사의 KH SWCNT HP제품을 2 μ l, OSiAl사의 TUBALL제품을 1 μ l씩 파이펫을 이용해 떨어트린 후, 짚맛센서 칩을 약 60 $^{\circ}$ C의 가열판(hot plate) 위에 올려 용매를 건조시켜 코팅(coating)을 완료하였음. 잘 부착되어있는지를 확인하기 위하여 고해상도 필드방사 주사형전자현미경(Field Emission Scanning Electron Microscope; FE-SEM) [S-4800, HITACHI]을 통해 검사하였음
- 고해상도 필드방사 주사형전자현미경(FE-SEM)으로 확인한 결과, 물리적 한계로 인한 정밀한 코팅(coating)작업이 불가능하여 몇 개의 전극은 연결이 잘 이루어지지 않았지만, 대부분의 전극 간격 사이에 단일벽 탄소나노튜브(SWCNTs)가 잘 연결되어져 있는 것으로 확인되며, 두 제품 모두 1 μ l씩을 코팅(coating)을 하여야 적절한 밀도를 유지하여 부착 할 수 있다는 것으로 확인하였음 (그림 18)



KH Chemical - KH SWCNT HP 2 μ l



OSiAl - TUBALL 1 μ l

그림 18. 선정된 국내 단일벽 탄소나노튜브(SWCNTs)과 전극 연결에 대한 필드방사 주사형전자현미경(FE-SEM) 사진

(4) 완성된 트랜지스터 기반 짚맛센서 칩의 전기적인 특성 측정

- 물질의 전기적인 특성을 측정할 때, 보통 전압(voltage; V)에 따른 전류(current; I)를 측정하는 방법을 사용함. 이를 I-V 특성(I-V characteristic)이라고 함. 이런 I-V 특성은 크게 비정류 접촉(ohmic contact)과 정류 접촉(Schottky contact)으로 나누어지게 됨. 비정류 접촉(ohmic contact)은 전류-전압 곡선(current-voltage curve; I-V curve)이 일반적인 옴의 법칙($V=IR$)을 따르는 경우로 금속성(Metallic) 물질에서 나타나며, 정류 접촉(Schottky contact)은 전류-전압 곡선(I-V curve)이 옴의 법칙($V=IR$)에서 벗어나, 특정한 방향으로만 전류가 잘 흐르는 경우로 반도체성(semiconducting) 물질에서 나타남
- 단일벽 탄소나노튜브(SWCNTs)로 전극 간격사이가 연결된 짚맛센서 칩이 반도체(semiconductor) 성질을 나타내는지 확인하기 위하여, 각 전극마다 직류 전류 전압법(Direct-Current Current-Voltage method; DC-IV)을 이용하여 해상도(resolution) $0.1 \mu A$ 단위로 전기적인 특성을 측정하였음
- 그 결과, KH Chemical사의 KH SWCNT HP제품은 측정이 안 되었고, OSiAI사의 TUBALL제품은 전류-전압 곡선(I-V curve)이 안정한 비정류 접촉(stable ohmic contact)을 보이는 것을 보아 금속성(metallic) 물질임을 나타내고 있음을 확인하였음 (그림 19)

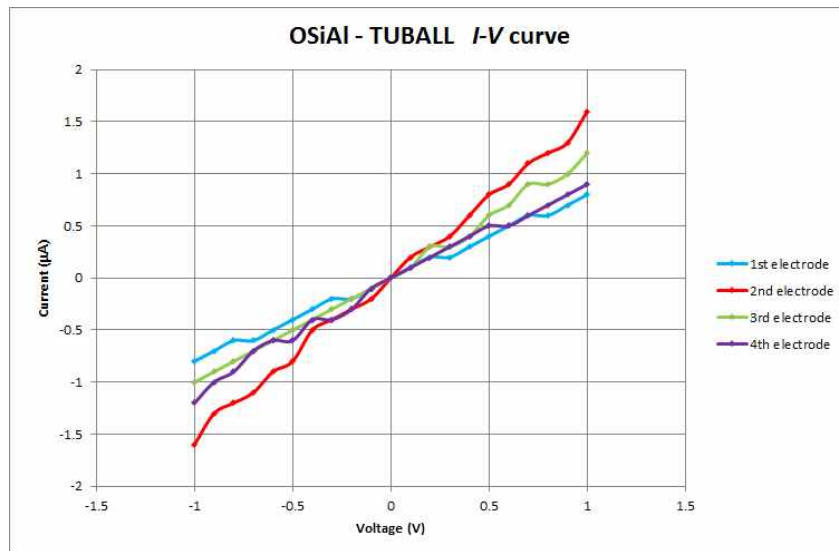


그림 19. OSiAI사의 TUBALL제품의 전도성 (conductivity) 성질을 측정한 I-V curve

2. 2차년도(총괄과제 4차년도) 연구수행 내용 및 결과

가. 트랜지스터 기반 짠맛센서 칩의 문제점 개선시도

(1) 단일벽 탄소나노튜브(SWCNTs)의 어닐링(annealing)

- 1차년도(총괄과제 3차년도) 연구에서 KH Chemical사의 KH SWCNT HP제품으로 전극 간격을 연결한 짠맛센서 칩의 전기적인 특성에 대한 측정이 실패하였던 이유를 추정하였을 때, 단일벽 탄소나노튜브(SWCNTs)가 전극 간격 사이에 연결은 되어있으나 엄밀히 말하면 전극 위에 얹혀 있는 상태이지 완벽하게 연결이 되어있는 상태라고 확신하기는 어려웠음. 또한 단일벽 탄소나노튜브(SWCNTs)를 전극 위에 코팅(coating)처리만 하여 직류 전류 전압법(Direct-Current Current-Voltage method; DC-IV)을 이용하여 전기적인 특성을 측정하였을 때, 불안정한 전기적인 반응을 확인한 사례가 있음(J. S. Shim, 2009). 따라서 급속열처리(rapid thermal annealing; RTA) 장비를 이용하여 약 380°C의 고온에서 전극을 급속도로 녹여 단일벽 탄소나노튜브(SWCNTs)가 완벽하게 전극에 연결되도록 시도하였으나 결과는 마찬가지로 전류-전압 곡선(I-V curve)이 안정한 비정류 접촉(stable ohmic contact)을 나타내었음

(2) 세밀한 자석 필터링(magnetic filtering)

- OSiAI사의 TUBALL제품으로 전극 간격을 연결한 짠맛센서 칩의 전기적인 특성이 금속성(metallic) 물질로 판단되어진 결과에 대해서는 전기적인 특성을 평가할 때 물질의 구성성분 중 99%가 반도체성질을 나타내더라도 1%의 금속성질을 갖는다면 금속성(metallic) 물질로 판단된다는 것을 기반으로 필드방사 주사형전자현미경(FE-SEM)으로 OSiAI사의 TUBALL제품으로 전극 간격을 연결한 짠맛센서 칩을 확인하였을 때 금속 촉매(metal catalyst)가 다수 존재하고 있다는 것을 확인 할 수 있음. 따라서 자석필터링(magnetic filtering)의 횟수를 늘리고, 바닥이 둥근 vial에서 바닥이 평평한 vial로 교체하여 자석과의 거리를 좁히고, 기존자석보다 강력한 자석으로 교체하여 좀 더 세밀한 자석필터링(magnetic filtering)을 수행하였으나 이 또한 전류-전압 곡선(I-V curve)이 안정한 비정류 접촉(stable ohmic contact)을 나타내었음

(3) 고순도 반도체성 단일벽 탄소나노튜브(Semiconducting SWCNTs) 적용

- 위의 2가지 개선된 방법으로도 원하는 결과를 얻기 못한 이유를 추정해보았을 때, 첫 번째로는 선정된 2개의 한국 업체의 반도체성 단일벽 탄소나노튜브(semiconducting SWCNTs)와 금속성 단일벽 탄소나노튜브(metallic SWCNTs)를 분리 정제할 수 있는 기술의 부재로 두 제품 모두 어느 정도 금속성 단일벽 탄소나노튜브(metallic SWCNTs) 함유하고 있는 경우이며, 두 번째로는 2업체에서 제공하는 데이터가 정확하지 않아 금속성(metallic)을 나타내는 다중벽 탄소나노튜브(MWCNTs)일 경우이라고 판단되었음.
- 어느 쪽이든 문제점을 해결하기 위해서 다소 고가이지만 세계적으로 반도체성 단일벽 탄소나노튜브(semiconducting SWCNTs)만을 정제 분리 할 수 있는 검증된 기술을 보유한 캐나다 회사인 NanoIntegris 사의 제품 IsoNanotubes-S을 적용해 보았으나 마찬가지로 전류-전압 곡선(I-V curve) 결과는 안정한 비정류 접촉(stable ohmic contact)을 나타내었음

- 검증된 기술을 보유한 NanoIntegris 사의 제품 IsoNanotubes-S을 적용하였는데도 불구하고 원하는 결과를 얻지 못한 이유를 추정하였을 때, 반도체성 단일벽 탄소나노튜브(semiconducting SWCNTs)의 순도보다는 이를 도포하여 전극을 이어주는 방법에서 문제가 있다고 생각하였음
- 구체적으로 말하자면, 2009년에 발표된 J. S. Shim et al. 그룹의 연구 결과를 살펴보면 단일벽 탄소나노튜브(SWCNTs)를 단일가닥만을 사용하여 양쪽 전극을 이어주었기 때문에 반도체(semiconductor) 성질을 나타내는 정류 접촉(Schottky contact)을 나타내었다고 여겨지며, 본 연구에서와 같이 간단한 제작을 위하여 고안했던 단일벽 탄소나노튜브 분산샘플(SWCNTs dispersed solution)을 짚맛 센서 칩의 전극 간격 사이에 떨어트린 후 약 60°C의 가열판(hot plate) 위에 올려 용매를 건조시켜 코팅하는 방식은 여러 개의 단일벽 탄소나노튜브가 서로 겹치게 되어 마치 다중벽 탄소나노튜브(MWCNTs)과 같이 금속성질(Metallic)을 띄고 있을 공산이 크다고 판단되어졌음
- 2009년에 발표된 J. S. Shim et al. 그룹의 연구 결과처럼 단일가닥으로 연결하기에는 많은 시간과 비용 소요 및 낮은 성공률 등과 같은 문제점이 발생하게 됨. 따라서 본 위탁연구의 목표인 신속, 간단, 저렴하게 짚맛 증진후보물질의 효능을 평가할 수 있는 새로운 시스템을 구축하는데 어려움이 있을 것으로 판단되었으므로 불가피하게 전년도에 고안한 방법과 다른 좀 더 효율적인 방법을 고안할 수밖에 없었음

나. 짚맛센서 칩의 실험 디자인 재설계

- 1차년도(총괄과제 3차년도)의 반도체성 단일벽 탄소나노튜브(semiconducting SWCNTs)를 적용한 트랜지스터 방식의 접근방법이 무산됨에 따라 다른 방식을 고안하여야 하였음. 따라서 2013년에 발표된 Q. Liu et al. 그룹의 연구와 같이 기존의 몇몇 연구들에서 언급되었던 세포막전위를 측정할 수 있는 다채널기록법(MultiElectrode Array, MEA)을 모티브로 하여 실험을 진행하고자 하였음
- 전기화학적 신호를 측정하기 위해 여러 개의 전극과 이를 연결하는 패드(pad)가 구성되어 다소 복잡성을 띄는 기존의 MEA 칩과는 다르게 아래 그림 20처럼 좀 더 간단하면서 전기화학적 신호를 측정하는데 전혀 무리가 없는 3종의 전극(counter, working, reference electrode)으로 구성된 짚맛센서 칩을 제작하였고 그 중에 가운데 working electrode를 Interdigitated array(IDA)로 설정하였음. MEA방식으로 수월하게 세포막전위의 변화를 측정하기 위해서는 전극에 세포를 부착시키는 것이 가장 중요한 요인이므로 전극 위에 링 구조물을 올린 후 세포를 일정시간 배지(media)와 함께 배양함으로써 세포가 전극표면에 충분히 부착할 시간을 부여하였음. 세포는 1차년도(총괄과제 3차년도)와 마찬가지로 나트륨 이온의 출입에 관여하는 몇 가지의 세포막 채널 단백질들 중, 인간이 느끼는 짚맛에 관여할 것으로 예상되는 가장 유력한 세포막 채널 단백질인 ENaC 혹은 TMC-1이 존재하는 세포를 사용하기로 하였으며 나트륨이온의 세포 내 유입에 따른 세포막전위의 변화를 전기화학적 분석법 중 순환 전압 전류법(cyclic voltammetry)을 이용하여 비표지 방식으로 실시간으로 정량할 수 있게 디자인하였음
- 세포 부착이 마무리 되면 링 구조물 내의 배지를 제거한 후 완충용액(buffer)에 포함된 NaCl과 짚맛 증진후보물질의 비율조건을 다르게 하여, 완충용액으로부터 유래된 나트륨이온의 세포 내 유입 정도를 측정된 전기화학적 신호를 확인하게 됨

- 구체적으로 측정원리를 설명하자면 낮은 전위값을 기준으로 ① 부착된 세포와 완충용액만 있을 경우 어떠한 자극이 없는 세포막전위는 양전하를 띄며 이는 전극의 자유전자를 끌어들이어 전류값이 낮게 측정됨. 이후 ② NaCl을 처리하게 되면 나트륨이온이 짠맛관련 이온 채널로 예상되는 ENaC 혹은 TMC-1을 통하여 세포 내로 유입됨에 따라 주변 전압 개폐 이온채널(voltage-gated ion channel) 등에 영향을 주고 이에 따라 세포막전위가 순간적으로 음전하를 띄게 되며 전극으로 다시 전자를 뺏기게 되어 전류값이 증가하게 됨. 추가적으로 ③ 짠맛 증진후보물질을 처리하게 되면 나트륨 이온의 추가유입이 야기되어 전류값이 더욱 증가하게 되는데 증가하는 정도에 따라 짠맛 증진후보물질의 효능을 신속, 간단, 저렴하게 확인하게 됨

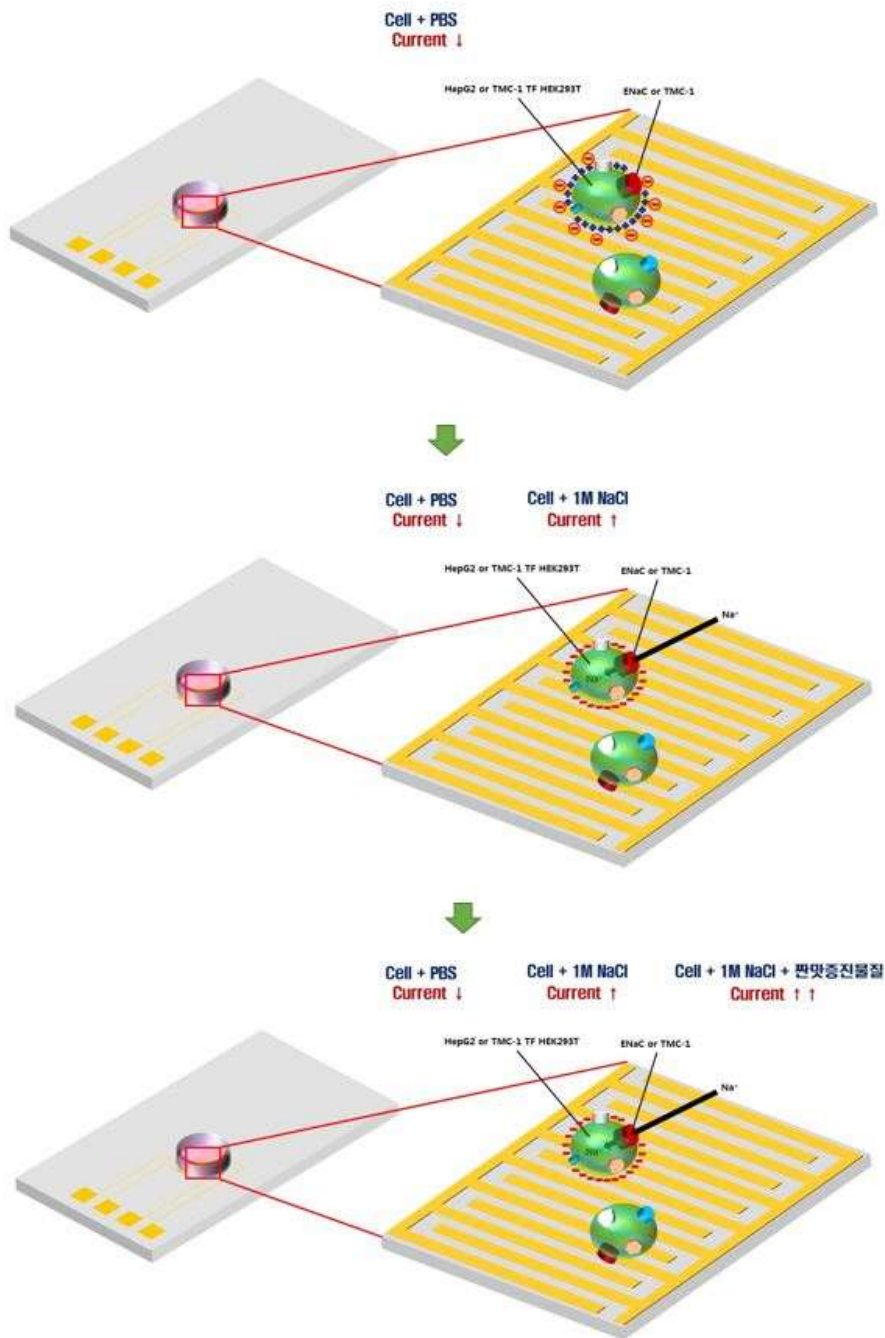


그림 20. 2차년도 짠맛센서 칩의 전체 모식도

다. MEA 기반 짚맛센서 칩의 제작

(1) 짚맛센서 칩의 정밀 디자인 도면 제작

- Cyclic Olefin Copolymer(COC) 재질의 짚맛센서 칩의 전체 사이즈는 가로 2.5cm x 세로 4.5cm 으로 설정하였으며, 전극은 마름모 형태로 가로 1mm x 세로 1mm의 counter, 가로 2mm x 세로 3mm의 working, 가로 1.5mm x 세로 1mm의 reference와 같이 총 3 종류의 전극으로 구성 하였음. working electrode는 넓이 $10\mu\text{m}$ 의 microfinger가 간격 $5\mu\text{m}$ 의 거리로 100개의 array 쌍으로 이루어진 Interdigitated array(IDA)로 디자인하였음. 각 전극은 가로 2mm x 세로 2mm 의 전극 콘택 패드(Contact pad)와 연결되며 working electrode는 2개의 패드와 연결되도록 하였음. 전극 패터닝(Electrode patterning)용 마스크(Mask) 제작을 위해 AutoCAD 360 프로그램을 사용하여 짚맛센서 칩에 대한 정밀한 디자인 도면을 제작함 (그림 21). 이 디자인 도면을 바탕으로 전자빔 증착기(E-beam evaporator)를 이용하여 Chrome(Cr) patterned film을 증착시킨 마스크를 제작하였음

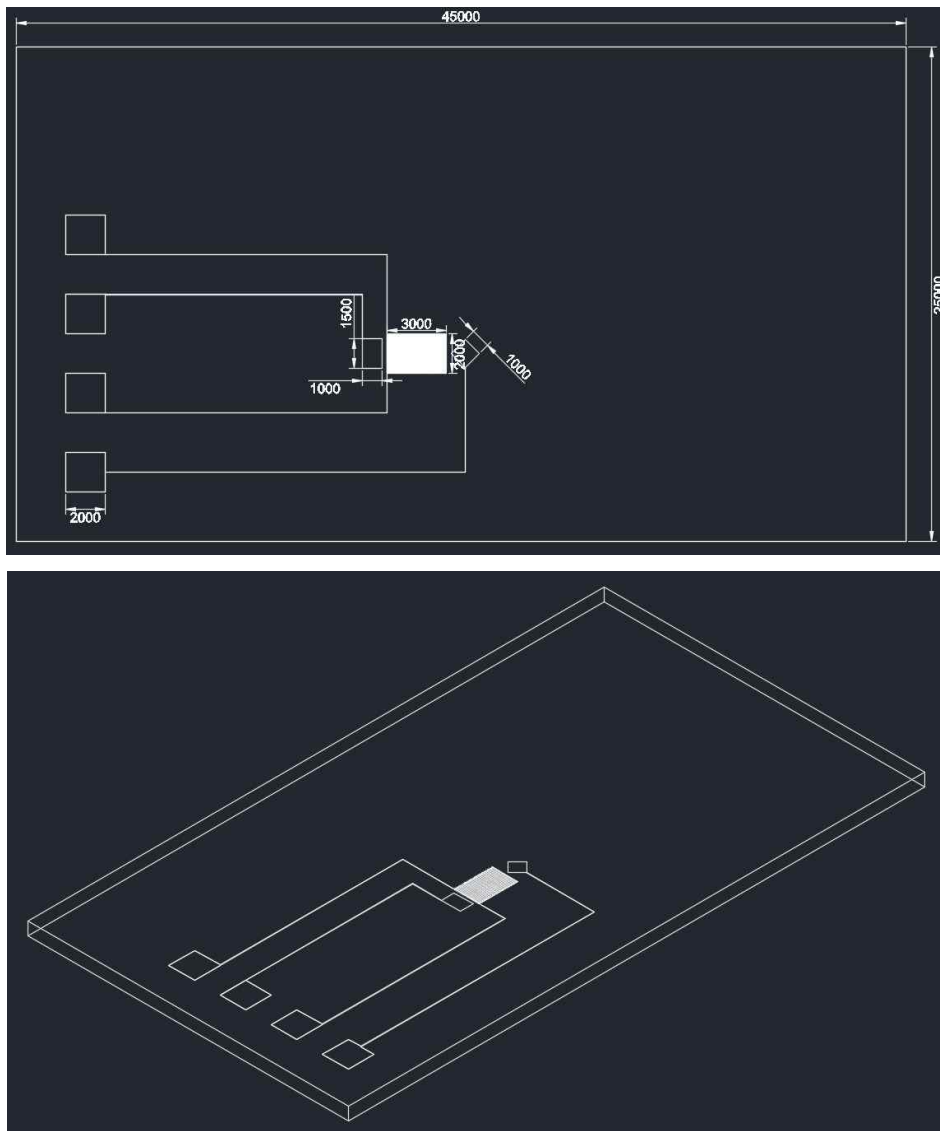


그림 21. 2차년도 짚맛센서 칩의 CAD 디자인 모식도 및 3D 모델링 (치수: Micron(μm))

(2) 전극 패터닝(Electrode Patterning) 수행

- 그림 22의 포토리소그래피(Photolithography) 과정을 통해 전극 패터닝(Electrode patterning)을 수행함으로써, 금(Gold)로 박막이 된 짠맛센서 칩의 전기회로(electric circuit)를 제작하였음

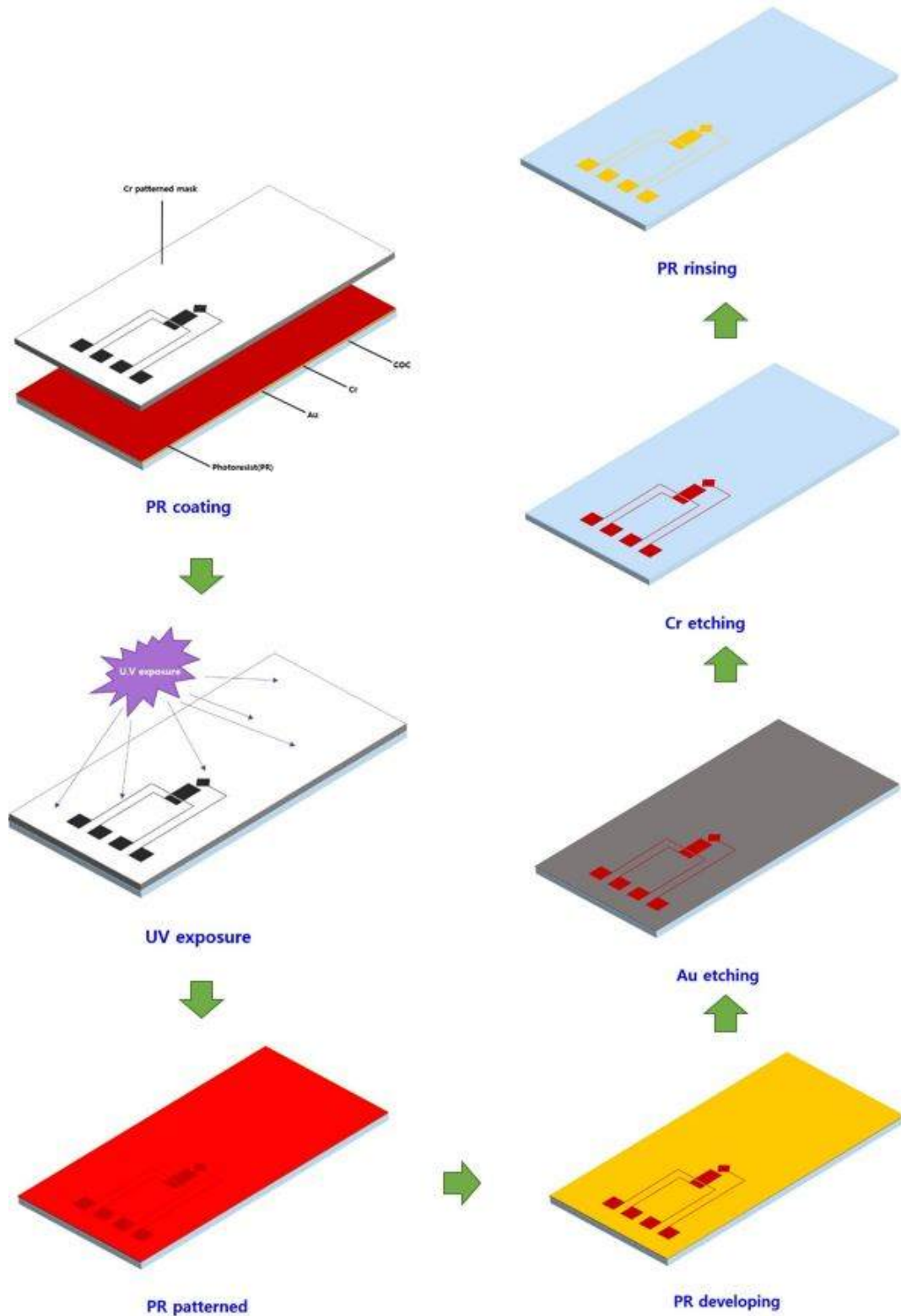


그림 22. 2차년도 짠맛센서 칩 Fabrication 절차 모식도 (Electrode Patterning)

- 세척 후, 감광액(Photoresist; PR) [AZ GXR-601, AZ Electronic Materials] 약 1.5ml 정도를 1회용 스포이드를 사용하여 COC 웨이퍼(COC wafer) 표면 정중앙에 떨어트리, 스피너코터(spin coater)를 이용하여 약 2 μ m 두께로 고르게 감광액 도포(PR coating)처리를 하였음
- 감광액(PR)을 COC 웨이퍼(COC wafer) 표면에 좀 더 단단하게 부착하고 습기(용매)를 날려 보내서 감광액 현상(PR developing)시 자외선(ultraviolet; UV)에 노출되지 않은 감광액(PR)이 떨어져 나가는 것을 방지하기 위해, COC 웨이퍼(COC wafer)를 가열판(heat plate)위에 올려 약 90 $^{\circ}$ C에서 소프트 베이킹(soft baking)을 1분 30초 동안 수행하였음
- 감광액 도포(PR coating)가 완료된 COC 웨이퍼(COC wafer) 위에 투명한 유리판(Transparent glass)에 Chrome(Cr) patterned film을 증착시켜 제작한 마스크(Mask)를 올린 후, 자외선 노광 얼라이너(UV exposable aligner)을 이용하여 자외선(UV)빛을 선택적으로 조사하여 노광과정(UV exposure)을 수행하였음. 감광액(PR)의 종류는 positive와 negative로 나뉘며, positive는 자외선(UV)에 노출된 부분이 흐물흐물해지며 negative는 자외선(UV)에 노출된 부분이 더욱 단단해짐. 본 위탁기술 개발에 사용된 감광액(PR)의 종류는 positive임
- 자외선 노광과정(UV exposure)를 수행한 COC 웨이퍼(COC wafer)를 드라이 오븐(dry oven) 안에 넣어 약 110 $^{\circ}$ C에서 포스트 베이킹(post exposure baking, PEB)을 1분 30초 동안 수행하였음
- 포스트 베이킹(post exposure baking, PEB)을 마친 감광액(PR)이 도포된 COC 웨이퍼(COC wafer)를 현상액(Developing solution) [AZ300 MIF Developer, AZ Electronic Materials]에 약 1분 동안 침강시켜 감광액 현상(PR developing) 처리를 하면 흐물흐물해진 감광액(PR)부분이 선택적으로 제거됨. 이 후, 탈이온수(Deionized water; DI water)로 세척하고 질소로 건조시키면 감광액 패터닝(PR patterning)이 완료된 COC 웨이퍼(COC wafer)를 얻게 됨
- 감광액 패터닝(PR patterning)이 완료된 COC 웨이퍼(COC wafer)를 금 부식액(Au etchant) [썬앤씨테크]에 침강시켜 크롬색이 나타나면서부터 약 3초가 지난 후 꺼내서 감광액 패터닝(PR patterning)에 의해 노출된 금부분을 선택적으로 제거함. 이 후, 탈이온수(Deionized water; DI water)로 세척하고 질소로 건조시킴
- 금 부식과정(Au etching)이 완료된 COC 웨이퍼(COC wafer)를 크롬 부식액(Cr etchant) [CR-7, OMRgroup]에 약 1분 30초 동안 침강시켜 금 부식과정(Au etching)에 의해 노출된 크롬부분을 선택적으로 제거함. 이 후, 탈이온수(Deionized water; DI water)로 세척하고 질소로 건조시킴
- 크롬 부식과정(Cr etching)까지 마친 COC 웨이퍼(COC wafer)에 감광액을 제거(PR rinsing)할 수 있는 아세톤(Acetone)을 처리 하여 감광액(PR)을 벗겨낸 후, 탈이온수(Deionized water; DI water)로 세척하고 질소로 건조시키면 전극 패터닝(Electrode patterning)이 완료된 COC 웨이퍼(COC wafer)를 얻게 됨

라. 짠맛센서 칩을 이용한 ENaC 세포(HepG2)-NaCl 반응 확인 실험

(1) ENaC 세포(HepG2)의 전극 부착을 위한 짠맛센서 칩 위 배양

- 아래 그림23과 같이 제작된 IDA 칩 위에 세포와 배지를 로딩할 수 있는 링 구조물(1000 μ l tip 사용, 따로 부착하지 않아도 배지의 표면장력으로 세는 현상은 없음)을 올려놓고 약 1~2일 동안 배양하였음. 이에 따라 초기에 수행했던 링 구조물 없이 세포를 전극 위에 로딩한 후 자연 건조시켜 세포를 부착시키는 방식과 비교하여 세포가 전극에 부착할 시간을 충분히 부여함으로써 부착 단백질에 의한 전극 부착정도가 개선되도록 하였음. 뿐만 아니라 배지와 함께 배양함으로써 세포 생존력을 최대한 유지하여 혹시 모를 세포의 상태에 따른 측정오류를 개선하고자 하였음

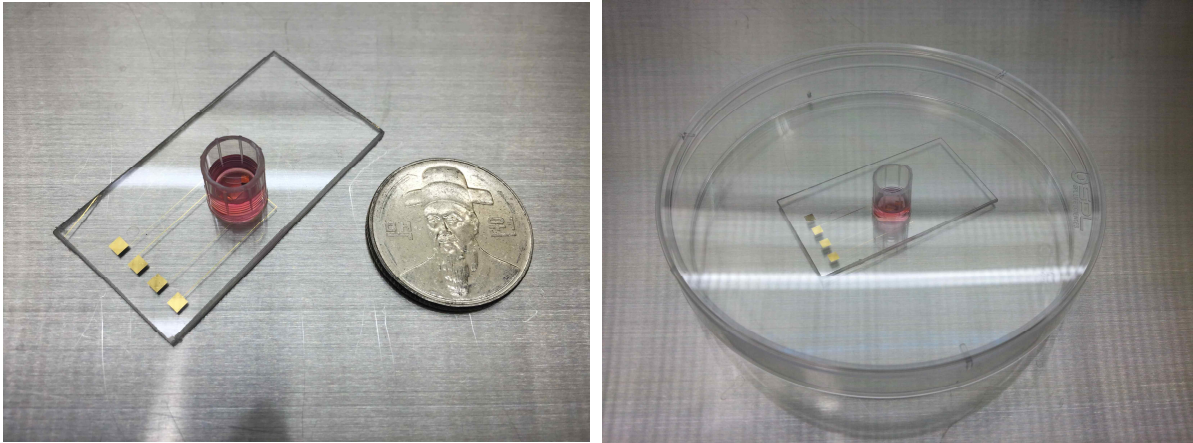
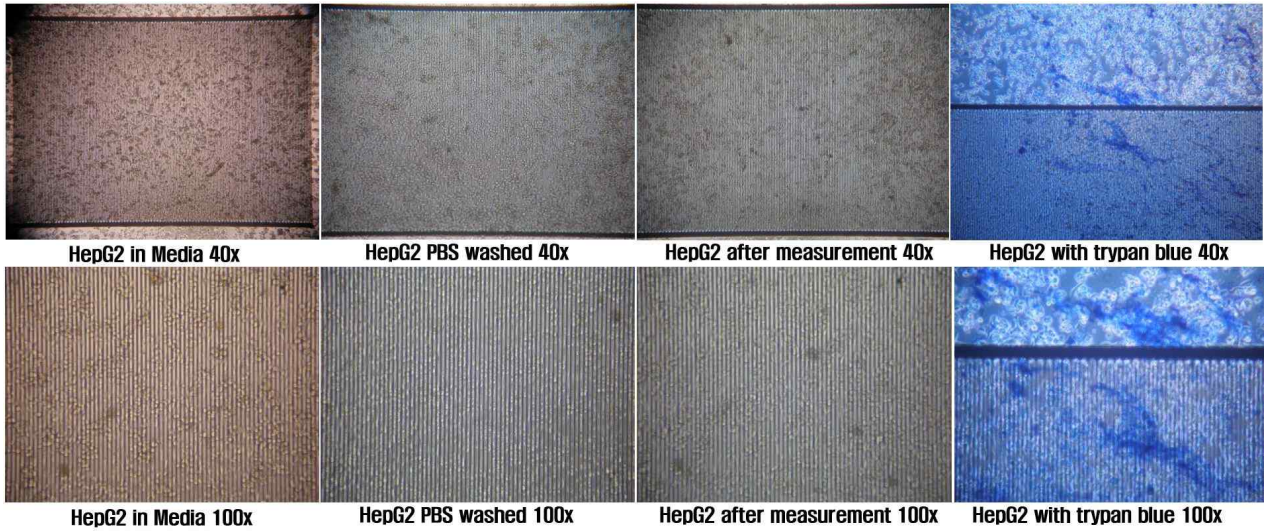


그림 23. ENaC 세포(HepG2)를 배양한 짠맛센서 실물사진

- 전극 위에 링 구조물을 올림으로써 적정 양의 배지와 함께 세포를 배양할 수 있는 well이 생성되고, 이 well에 ENaC 세포(HepG2)를 2×10^5 개/200 μ l (1×10^6 개/ml) 로딩한 후 약 1~2일을 배양한 후 현미경으로 세포의 confluence 정도와 cell distribution 정도 등을 확인하였음. 또한 측정 시 배지 성분에 의한 variation을 배제하기 위하여 배지를 suction을 통해 제거한 뒤, PBS 200 μ l로 washing과정을 거친 뒤 다시 suction으로 제거한 뒤 같은 양의 PBS 200 μ l를 로딩함으로써 PBS washing을 통해 세포의 전극이탈 정도를 확인해보았음
- 약 1일 동안 ENaC 세포(HepG2)를 칩 전극 위에 배양시키면 PBS washing하는 과정에서 다수의 세포가 전극에서 떨어지는 현상을 종종 확인할 수 있었음. 추가적으로 전기화학식 측정을 한 후에도 세포가 전극으로부터 유실되는 현상이 관찰됨에 따라 전극 위 세포부착정도가 약하다고 판단되어 약 2일 이상 배양한 후 측정하기로 결정하였음
- 위와 같은 이유로 ENaC 세포(HepG2)를 2×10^5 개/200 μ l (1×10^6 개/ml) 로딩한 후 약 2일 동안 배양한 후 현미경으로 세포의 confluence 정도와 cell distribution 정도 등을 확인한 결과, 약 1일을 배양한 것보다 전극 위 세포가 더 증식하여 전극과 세포가 접촉하는 면이 넓어졌으며 PBS washing시 전극 위 세포유실은 거의 발생하지 않았음

- 칩 위에 세포배양을 위한 링 구조물을 유지한 채 전극 위에 부착된 ENaC 세포(HepG2)가 마르지 않도록 PBS 200 μ l을 로딩한 상태와 PBS washing을 거친 후 1M NaCl 200 μ l을 로딩한 상태 각각에서 전기화학식 측정을 한 뒤, 이러한 측정에 의한 전극 상에 부착되어 있던 세포의 유실을 확인하였음. 추가적으로 실제로 모든 측정을 마친 뒤 전극에 부착되어있는 세포가 생존하고 있는지를 파악하기 위하여 0.4% trypan blue로 염색하여 세포의 생사여부를 확인하였음 (그림 24)



2 x 10⁵ cell / 48hr 배양 / 1M NaCl 반응시간 5min

그림 24. ENaC 세포(HepG2) 전극 위 배양사진

(PBS washing, 전기화학 검출 후 세포 부착정도 여부 및 trypan blue staining에 의한 세포 생사여부 확인)

- 위 사진에서도 알 수 있듯이 PBS washing 및 전기화학 측정 후에도 세포가 잘 부착되어 있는 것을 확인할 수 있었고, 이러한 세포들이 거의 대부분 그대로 살아있음을 확인할 수 있었기 때문에 초기 건조방식으로 세포를 부착하던 방법이 ENaC 세포(HepG2)의 생존에 있어서 매우 harsh한 조건이라고 한다면 칩 위에서 배양 시간을 약 2일 정도 주어줌으로써 전극과 세포간의 접촉력 증가 및 접촉면적 증가, 그리고 세포 생존력 증가의 결과를 유도하여 전극상의 세포이탈 및 세포의 사멸에 의한 측정값 variation이 야기되지 않았을 것이라는 것을 확인할 수 있었음

(2) NaCl 처리에 따른 세포막전위 변화 측정 가능성 평가 [짠맛센서 칩의 측정원리]

- 위에서 언급한 짠맛센서 칩의 측정원리를 다시 한 번 설명하자면 낮은 전위값을 기준으로 ① 부착된 세포와 완충용액만 있을 경우 어떠한 자극이 없는 세포막전위는 양전하를 띄며 이는 전극의 자유전자를 끌어들이어 전류값이 낮게 측정됨. 이후 ② NaCl을 처리하게 되면 나트륨이온이 짠맛관련 이온 채널로 예상되는 ENaC 혹은 TMC-1을 통하여 세포 내로 유입됨에 따라 주변 전압 개폐 이온채널(voltage-gated ion channel) 등에 영향을 주고 이에 따라 세포막전위가 순간적으로 음전하를 띄게 되며 전극으로 다시 전자를 뺏기게 되어 전류값이 증가하게 됨. 추가적으로 ③ 짠맛 증진 후보물질을 처리하게 되면 나트륨 이온의 추가유입이 야기되어 전류값이 더욱 증가하게 되는데 증가하는 정도에 따라 짠맛 증진후보물질의 효능을 신속, 간단, 저렴하게 확인할 수 있는 원리임

○ 아래 그림 25을 보면 낮은 전위값 $-0.868V$ 를 기준으로 control로서 완충용액인 PBS $200\mu l$ 를 로딩한 후 순환 전류-전압법(cyclic voltammery, CV)으로 전기화학식 측정을 하였을 때 $-3.27\mu A$ 의 전류값이 측정되었으며, ENaC 세포(HepG2)를 2×10^5 개/ $200\mu l$ (1×10^6 개/ml)의 밀도로 배지와 함께 로딩한 후 약 2일 동안 배양하고 PBS $200\mu l$ 로 washing과정을 1번 거친 뒤 마르지 않도록 PBS $200\mu l$ 를 로딩한 상태로 측정하였을 때 $-11.87\mu A$ 의 전류값이 측정되었음. ENaC 세포(HepG2)만을 전극에 부착한 상태인데 전류값 $-8.8\mu A$ 가 떨어지는 현상으로 미루어 볼 때 평상시 세포막전위는 양전하를 띄며 이에 따라 전극의 자유전자를 끌어들여 전류값이 크게 감소하는 것으로 해석할 수 있음. PBS를 다시 suction으로 제거하고 1M NaCl $200\mu l$ 을 5분간 처리한 후 다시 측정하였을 때 전류값이 $-9.42\mu A$ 로 NaCl 자극이 없을 때 보다 $2.45\mu A$ 가 증가하는 현상을 확인하였는데 이는 ENaC을 통해 나트륨 이온이 세포 내로 유입됨에 따라 세포막전위가 음전하를 띄게 되고 이 때 전자를 잃었던 전극이 세포로부터 다시 전자를 얻음으로써 전류값이 증가하는 것으로 생각되어 짐. 이 결과를 통해 본 연구팀에서 제작한 짠맛센서 칩이 세포막전위의 변화를 충분히 측정할 수 있음을 확인할 수 있었음

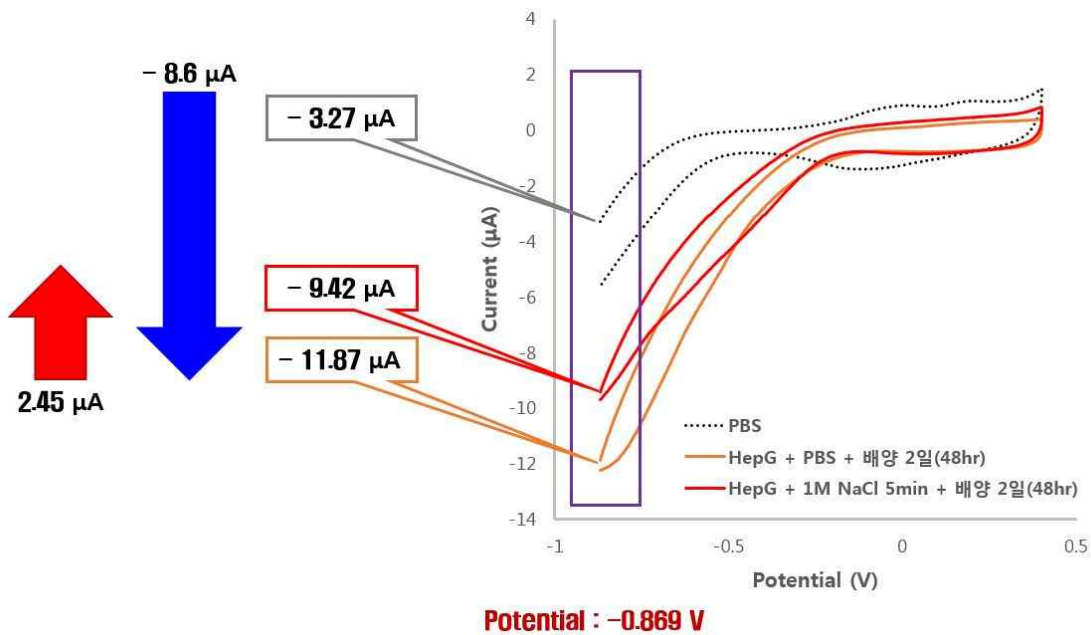


그림 25. ENaC 세포(HepG2)-1M NaCl 반응에 대한 cyclic voltammery(CV) 그래프

(3) NaCl 농도별 차이에 따른 세포막전위 변화 측정 민감도 평가

○ 세포 밖 NaCl의 농도의 차이에 따라 세포 내에 유입되는 NaCl의 양이 조절되고 이에 따른 세포막 전위의 변화를 확인하기 위하여 위와 동일한 방법으로 낮은 전위값 $-0.868V$ 를 기준으로 control, ENaC 세포(HepG2)과 PBS, ENaC 세포(HepG2)과 250mM, 500mM, 1M 농도의 NaCl를 5분간 처리한 3가지 조건에 대하여 순환 전류-전압법(cyclic voltammery, CV)을 이용하여 전기화학식 측정하였으며, 측정된 전류값은 ENaC 세포(HepG2)만 존재할 때 측정된 전류값 대비 각각의 농도별 NaCl를 처리하였을 때 증가한 전류값을 비교하였음

○ 그 결과, 250mM NaCl를 처리하였을 때는 $1.38 \mu\text{A}$ 가 증가하였으며, 500mM NaCl를 처리하였을 때는 $1.906 \mu\text{A}$, 마지막으로 1M NaCl을 처리하였을 때는 $2.097 \mu\text{A}$ 이 증가하였음. 이것으로 볼 때 NaCl의 농도가 높아질수록 세포 내 유입되는 나트륨이온이 증가하게 되고 그에 따라 세포막전위가 음전하를 띄는 정도가 높아져 측정되는 전류값이 증가하는 것으로 보임 (그림 26)

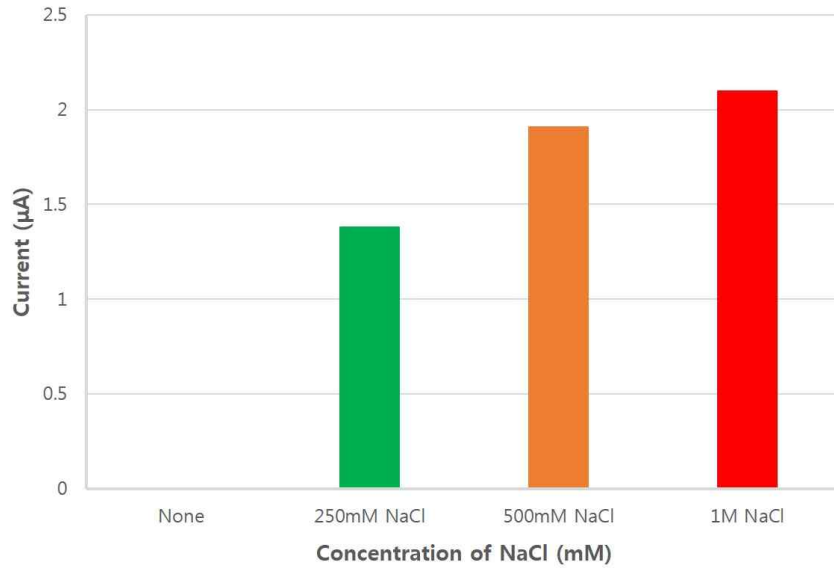
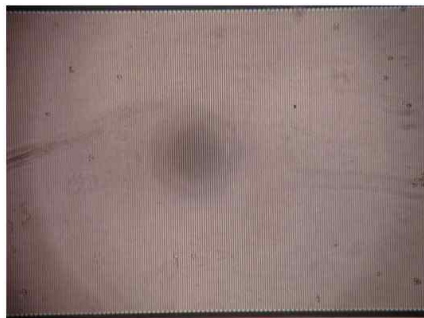
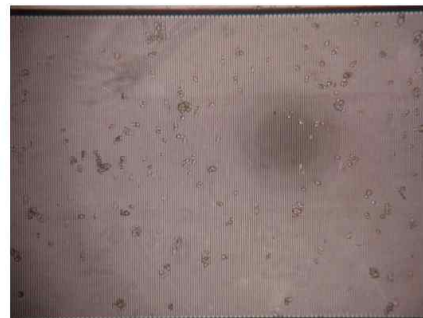


그림 26. ENaC 세포(HepG2)-NaCl 농도별 반응에 대한 막대그래프

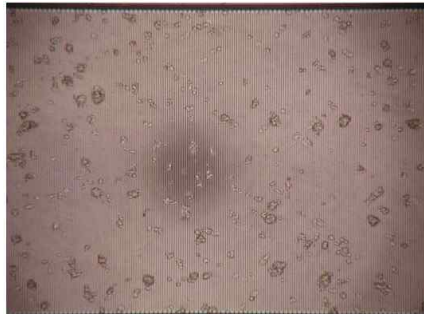
(4) ENaC 세포(HepG2) 밀도별 차이에 따른 세포막전위 변화 측정 민감도 평가



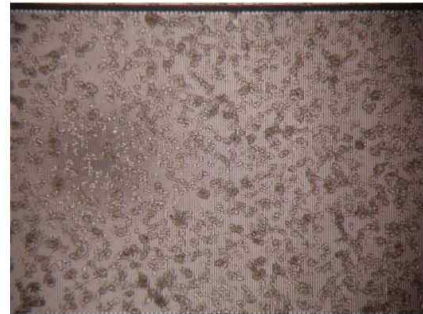
로딩한 세포 수 2×10^2 (48hr 배양)



로딩한 세포 수 2×10^3 (48hr 배양)



로딩한 세포 수 2×10^4 (48hr 배양)



로딩한 세포 수 2×10^5 (48hr 배양)

그림 27. ENaC 세포(HepG2) 밀도별 전극 위 배양사진

- 전극에 부착된 세포의 밀도 차이에 따라 전극에서 측정되는 세포막전위의 변화 정도를 측정할 수 있는지 확인하기 위하여 위의 그림 27과 같이 2×10^2 개/200 μ l(1×10^3 개/ml), 2×10^3 개/200 μ l(1×10^4 개/ml), 2×10^4 개/200 μ l(1×10^5 개/ml), 2×10^5 개/200 μ l(1×10^6 개/ml) 밀도의 ENaC 세포(HepG2)를 로딩한 후 약 2일 동안 배양하고 위와 동일한 방법으로 낮은 전위값 -0.868V를 기준으로 control, ENaC 세포(HepG2)과 PBS, ENaC 세포(HepG2)과 1M 농도의 NaCl를 5분간 처리한 3가지 조건에 대하여 순환 전류-전압법(cyclic voltammery, CV)을 이용하여 전기화학식 측정하였으며, 측정된 전류값은 ENaC 세포(HepG2)만 존재할 때 측정된 전류값 대비 각각의 농도별 NaCl를 처리하였을 때 증가한 전류값을 비교하였음
- 그 결과, 2×10^2 개/200 μ l(1×10^3 개/ml)를 로딩하였을 때 2.555 μ A가 증가하였으며, 2×10^3 개/200 μ l(1×10^4 개/ml)를 로딩하였을 때는 2.508 μ A, 2×10^4 개/200 μ l(1×10^5 개/ml)를 로딩하였을 때는 2.75 μ A, 마지막으로 2×10^5 개/200 μ l(1×10^6 개/ml)를 로딩하였을 때는 3.614 μ A이 증가하였음. 이것으로 볼 때 세포의 밀도가 높아질수록 나트륨이온을 유입하는 세포가 늘어나게 되고 그에 따라 세포막전위가 음전하를 띠는 세포들이 많아져 측정되는 전류값이 증가하는 것으로 보임 (그림 28)

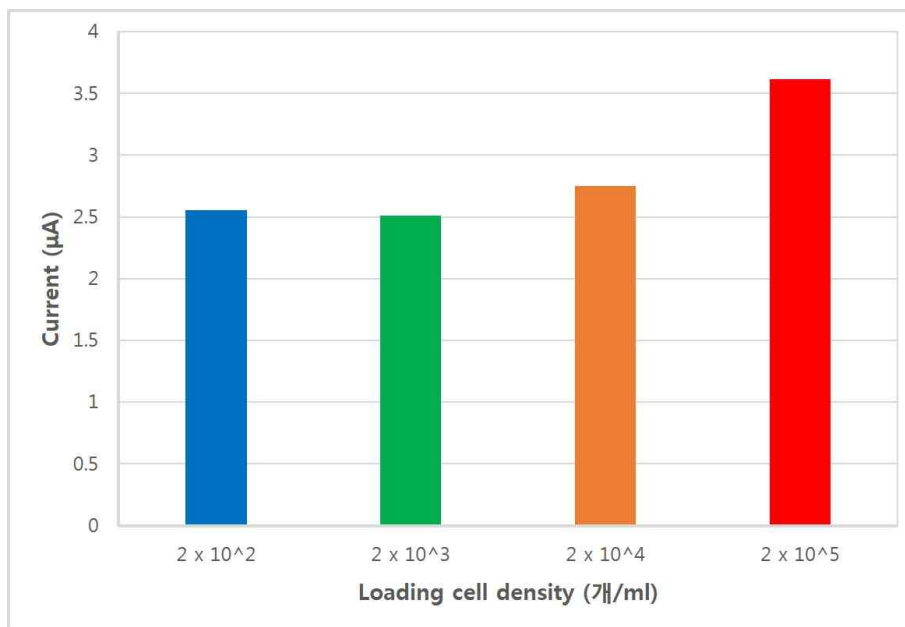


그림 28. 1M NaCl-ENaC 세포(HepG2) 밀도별 반응에 대한 막대그래프

마. 짠맛센서 칩을 이용한 ENaC 세포(HepG2)-짠맛 증진후보물질 효능 확인 실험

(1) 짠맛 증진후보물질 농도별 차이에 따른 세포막전위 변화 측정 민감도 평가

- 2011년 A. Schindler et al. 그룹에서 발표된 논문에 따르면 관능평가를 통해 arginyl dipeptides가 짠맛을 증진시키는 기능이 있다고 밝혀졌음. 따라서 같은 연구과제 그룹에 속해 있는 조형용 교수 연구팀으로부터 arginyl dipeptides 기반 짠맛 증진후보물질을 얻은 뒤 본 연구팀에서 개발한 짠맛센서 칩을 이용하여 그 효능을 평가해보고자 하였음

- 추가적으로 짠맛 증진후보물질이 처리된 농도에 따라 세포 내에 유입되는 NaCl의 양이 조절되고 이에 따른 세포막전위의 변화를 확인하기 위하여 짠맛 증진후보물질을 0mg/ml, 2mg/ml, 4mg/ml로 농도차이를 두고 위와 동일한 방법으로 낮은 전위값 -0.868V를 기준으로 control, ENaC 세포(HepG2)과 PBS, ENaC 세포(HepG2)과 1M 농도의 NaCl와 각각의 농도를 5분간 처리한 3가지 조건에 대하여 순환 전류-전압법(cyclic voltammery, CV)을 이용하여 전기화학식 측정하였으며, 측정된 전류값은 ENaC 세포(HepG2)만 존재할 때 측정된 전류값 대비 1M NaCl과 함께 각각의 농도별 짠맛 증진후보물질을 처리하였을 때 증가한 전류값을 비교하였음
- 그 결과, 0mg/ml의 짠맛 증진후보물질을 추가 처리하였을 때 2.447 μ A가 증가하였으며, 2mg/ml의 짠맛 증진후보물질을 추가 처리하였을 때는 3.538 μ A가 증가하였으며, 마지막으로 4mg/ml의 짠맛 증진후보물질을 추가 처리하였을 때는 5.669 μ A가 증가하였음. 이것으로 볼 때 짠맛 증진후보물질의 농도가 높아질수록 기존에 유입되던 나트륨이온의 양보다 증가하게 되고 그에 따라 세포막 전위가 음전하를 띠는 정도가 높아져 측정되는 전류값이 증가하는 것으로 생각됨 (그림 29). 따라서 짠맛 증진후보물질은 실제로 나트륨이온의 유입을 증가시켜 짠맛을 증진시키는 효능이 있는 것으로 판단됨

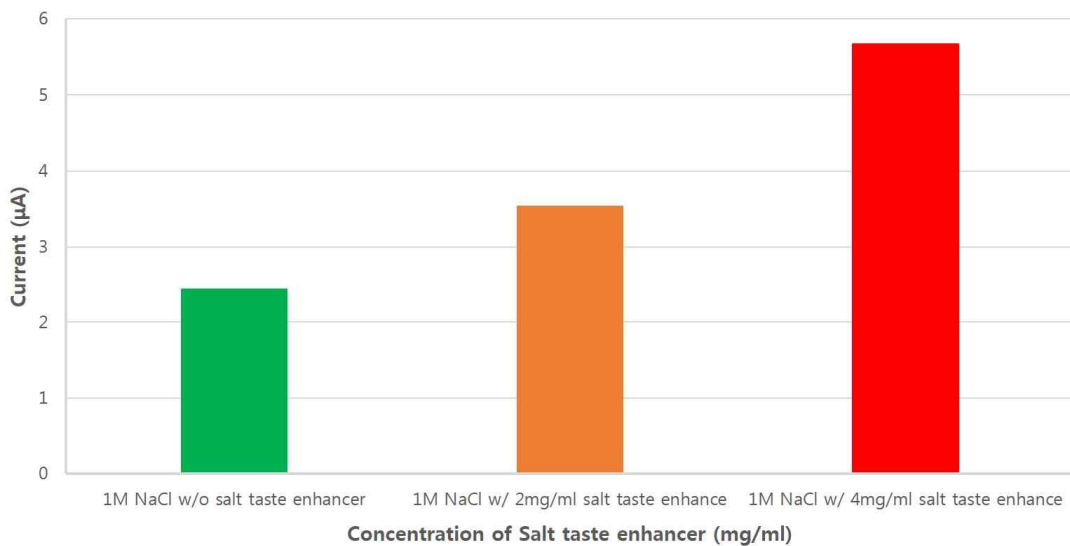


그림 29. ENaC 세포(HepG2)-1M NaCl-짠맛 증진후보물질 농도별 반응에 대한 막대그래프

바. 짠맛센서 칩을 이용한 TMC-1 세포(HEK293T)-NaCl 반응 확인 실험

(1) TMC-1 유전자의 transfection가 완료된 세포(HEK293T) 준비

- 앞서 실험을 진행한 ENaC이 존재하는 세포(HepG2) 이 외에 짠맛 감지에 관련 있다고 알려져 있는 TMC-1가 존재하는 세포를 준비하기 위하여 꼬마애기선충(*C. elegans*)의 TMC-1 유전자를 Human Embryonic Kidney 293(HEK293T) 세포에 lipofectamine 2000 [Thermo, 11668027]을 이용하여 transfection시켜 TMC-1 이온 채널이 발현된 세포를 준비하였음. 이 때 transfection이 제대로 되었는지 확인하기 위하여 Mock(lipofectamine만 처리한 상태), lipofectamine과 green fluorescence protein(GFP)이 들어있는 empty vector (pEGFP-N1), lipofectamine과 TMC-1을 삽입한 vector의 3가지 조건으로 transfection을 수행한 뒤, 형광현미경으로 TMC-1와 융합된 GFP의 발현 위치로 tranfection 성공 여부를 판단하였음

- 아래 그림 30을 보면 Mock 조건에서는 GFP가 포함된 vector가 없기 때문에 형광현미경 상에서 아무것도 확인할 수 없었으며, empty vector 조건에서는 비어있는 vector가 transfection된 세포에 한해서 세포 전체에 GFP가 발현된 것을 확인 할 수 있었음. 마지막으로 꼬마애기선충(*C. elegans*)의 TMC-1가 삽입된 vector 조건에서는 GFP와 융합된 TMC-1이 세포막에서만 발현되는 것을 확인할 수 있었음. 이 결과를 바탕으로 모든 HEK293T 세포에 TMC-1 유전자가 transfection 되었다고는 할 수 없지만, 전체 세포 중 일부에 transfection이 성공하였다는 것을 확인할 수 있었음

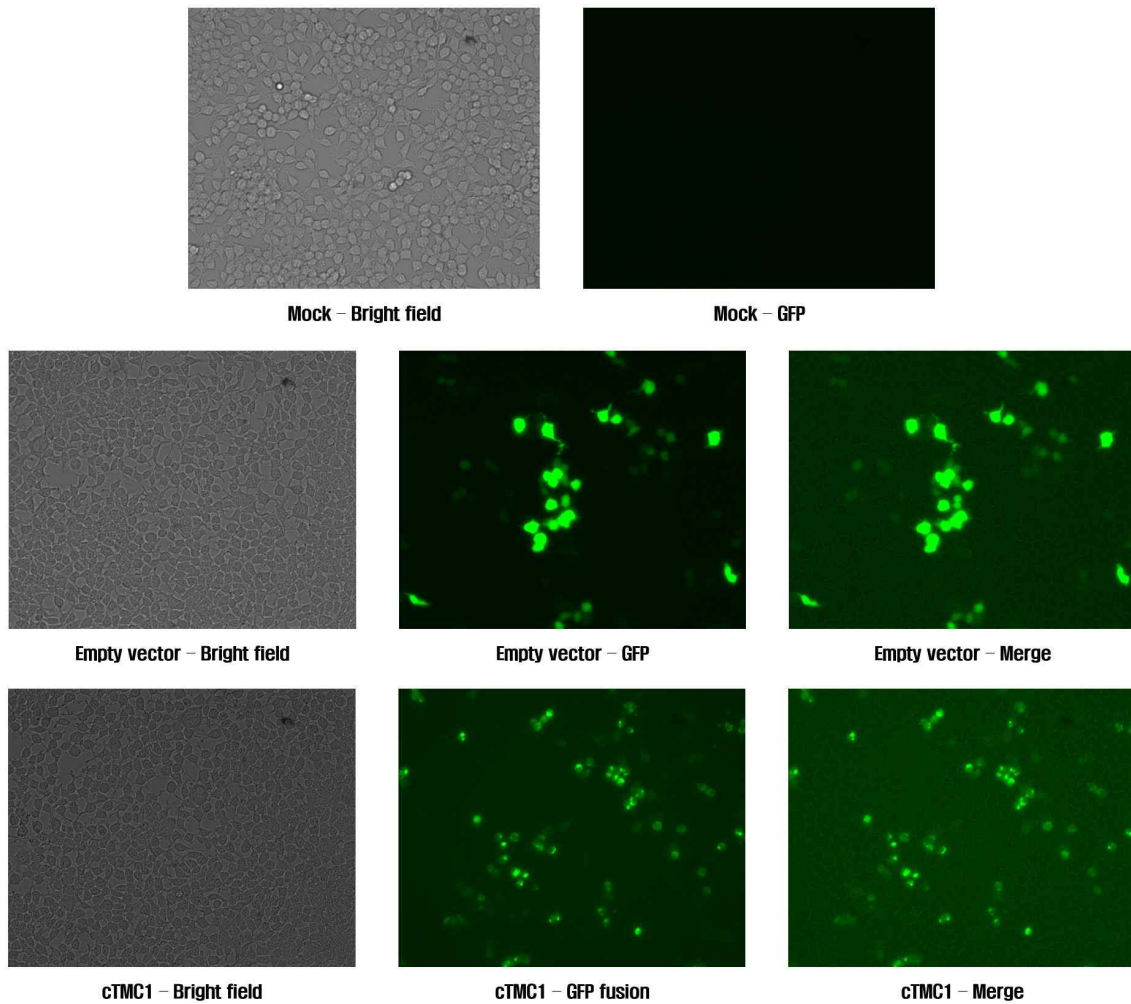


그림 30. TMC1-GFP 유전자의 transfection의 성공유무를 확인하기 위한 HEK293T 세포 형광현미경 사진

(2) TMC-1 세포(HEK293T)의 전극 부착을 위한 찐맛센서 칩 위 배양

- 앞 과정에서 준비된 TMC-1 세포(HEK293T)를 앞 서 실험한 ENaC 세포(HepG2)와 같이 전극에 부착시키기 위해 링 구조물에 2×10^5 개/ $200 \mu\text{l}$ (1×10^6 개/ml) 로딩한 후 약 1~2일을 배양한 후 현미경으로 세포의 confluence 정도와 cell distribution 정도 등을 확인하였음. 그 결과, HEK293T 세포 같은 경우 HepG2보다 더 빠르게 증식하므로 약 1일 동안만 배양을 수행하여도 well 안에 가득차기 때문에 약 1일 동안만 배양한 후 측정하기로 결정하였음

- 뭉치는 성질을 가지고 있는 ENaC 세포(HepG2)는 부착단백질을 이용해 배양 외의 별다른 과정 없이 손쉽게 전극에 부착시킬 수 있었던 반면 TMC-1 세포(HEK293T)는 배양 기간과 상관없이 조그마한 충격에도 쉽게 세포가 떨어지는 특성을 가지고 있음. 실제 실험을 했을 경우 suction을 통하여 배지를 제거 한다던가 PBS washing 등을 수행하게 되면 아래 그림 31과 같이 칩에 부착된 세포들이 떨어져 나옴으로 정확한 측정이 어려웠음

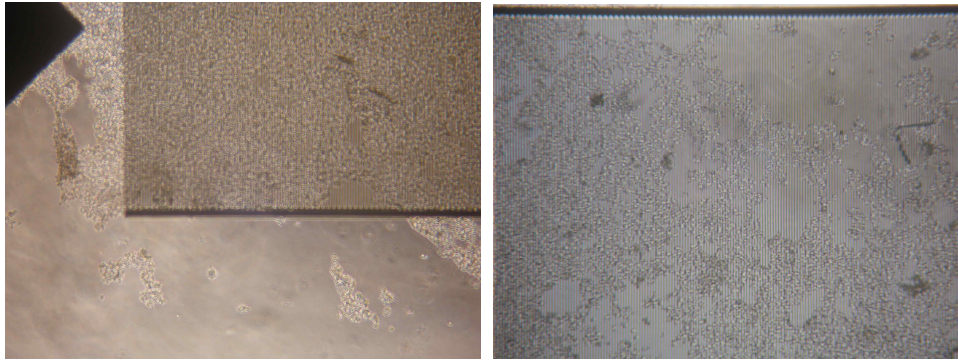


그림 31. 배지 suction 및 PBS washing에 따른 TMC1 세포(HEK293T)가 전극으로부터 이탈된 사진

- 위와 같은 문제점을 해결하기 위해서는 코팅물질을 이용하여 세포를 짚맛센서 칩 바닥에 부착시켜야 하는데 코팅물질을 사용하는데 있어서의 문제점은 부착은 수월할 수 있으나 세포막전위의 변화를 측정하기 위해서는 세포와 전극이 긴밀한 부착상태를 유지하여야 하는데 코팅물질이 그사이에 존재함으로써 민감도를 떨어트릴 수 있다는 점이 있음. 따라서 본 연구팀은 2008년 G. Wrobel et al. 그룹에서 발표한 논문을 참고하여 TMC-1 세포(HEK293T)를 로딩하기 전에 0.01% Poly-L-lysine (PLL) 100 μ l을 넣어 실온에서 30분 동안 코팅을 수행한 뒤 ENaC 세포(HepG2)을 대상으로 한 실험과 비교하여 배양기간만 제외하고 모든 조건을 동일하게 진행하였음
- PLL 코팅처리 후 아래 그림 32과 같이 suction을 통해 배지를 제거하고 PBS washing을 수행하여도 전극으로부터 세포가 이탈하는 현상은 발생하지 않음을 확인 할 수 있었으며, 세포막전위 변화를 측정함에 있어서 최적화된 조건의 확립으로 PLL 코팅처리가 측정 민감도를 크게 저하시키는 요인으로 작용하지는 않는다고 판단하였음



TMC1-TF-HEK293T in Media 40x

TMC1-TF-HEK293T in Media 100x

TMC1-TF-HEK293T PBS washed 100x

그림 32. 세포의 전극부착력 강화를 위한 PLL 코팅 후 TMC1 세포(HEK293T) 전극 위 배양사진

(3) NaCl 처리에 따른 세포막전위 변화 측정 가능성 평가 [짚맛센서 칩의 측정원리]

- 아래 그림 33을 보면 ENaC 세포(HepG2) 실험과 마찬가지로 낮은 전위값 $-0.868V$ 를 기준으로 control로서 완충용액인 PBS $200\mu l$ 를 로딩한 후 순환 전류-전압법(cyclic voltammery, CV)으로 전기화학식 측정을 하였을 때 $-3.27\mu A$ 의 전류값이 측정되었으며, TMC-1 세포(HEK293T)를 2×10^5 개/ $200\mu l$ (1×10^6 개/ml)의 밀도로 배지와 함께 로딩한 후 약 1일 동안 배양하고 PBS $200\mu l$ 로 washing과정을 1번 거친 뒤 마르지 않도록 PBS $200\mu l$ 를 로딩한 상태로 측정하였을 때 $-6.49\mu A$ 의 전류값이 측정되었음. ENaC 세포(HepG2) 실험과 비교하였을 때 상대적으로 적은 차이로 떨어진 이유를 고려해 보자면 TMC-1 세포(HEK293T)를 부착하기 위해 사용된 PLL 코팅이 어느 정도 측정 민감도를 감소시켰을 것으로 예상됨. 그럼에도 불구하고 TMC-1 세포(HEK293T)만을 전극에 부착한 상태인데 전류값 $-3.2\mu A$ 가 떨어지는 현상으로 미루어 볼 때 평상시 세포막전위는 양전하를 띄며 이에 따라 전극의 자유전자를 끌어들여 전류값이 감소하는 기본원리는 변함이 없다고 판단됨.
- PBS를 다시 suction으로 제거하고 1M NaCl $200\mu l$ 을 5분간 처리한 후 다시 측정하였을 때 전류값이 $-4.85\mu A$ 로 측정됨. 이는 ENaC 세포(HepG2) 실험과 마찬가지로 NaCl 자극이 없을 때 보다 $1.64\mu A$ 가 증가하는 현상을 확인하였는데 이것도 역시 TMC-1을 통해 나트륨 이온이 세포 내로 유입됨에 따라 세포막전위가 음전하를 띄게 되고 이 때 전자를 잃었던 전극이 세포로부터 다시 전자를 얻음으로써 전류값이 증가하는 것으로 생각되어 짐. 다만 증가하는 폭 역시 ENaC 세포(HepG2) 실험보다는 적은 현상을 보이는데 이는 TMC-1 세포(HEK293T) 준비과정의 형광현미경 결과에서도 알 수 있듯이 HEK293T 세포의 일부에만 TMC-1 유전자가 transfection이 되었으므로 나트륨이온 유입 정도가 낮아졌기 때문이라고 생각해 볼 수 있음. 어쨌든 이러한 결과를 통해 본 연구팀에서 제작한 짚맛센서 칩이 나트륨 이온 채널을 이용한 시스템에서 세포막전위의 변화를 충분히 측정할 수 있음을 확인할 수 있었음

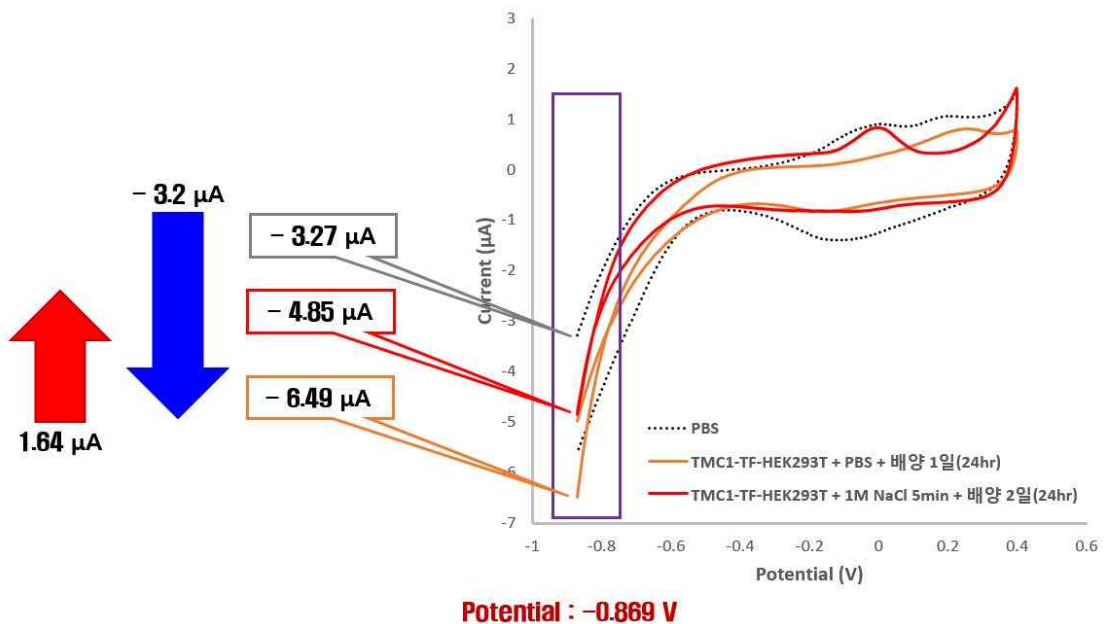


그림 33. TMC-1 세포(HEK293T)-1M NaCl 반응에 대한 cyclic voltammery (CV) 그래프

사. 짠맛센서 칩을 이용한 TMC-1 세포(HEK293T)-짠맛 증진후보물질 효능 확인 실험

(1) 짠맛 증진후보물질 농도별 차이에 따른 세포막전위 변화 측정 민감도 평가

- ENaC 세포(HepG2)를 대상으로 한 실험과 마찬가지로 추가적으로 짠맛 증진후보물질이 처리된 농도에 따라 세포 내에 유입되는 NaCl의 양이 조절되고 이에 따른 세포막전위의 변화를 확인하기 위하여 짠맛 증진후보물질을 0mg/ml, 2mg/ml, 4mg/ml로 농도차이를 두고 위와 동일한 방법으로 낮은 전위값 -0.868V를 기준으로 control, TMC-1 세포(HEK293T)과 PBS, TMC-1 세포(HEK293T)과 1M 농도의 NaCl와 각각의 농도를 5분간 처리한 3가지 조건에 대하여 순환 전류-전압법(cyclic voltammery, CV)을 이용하여 전기화학식 측정하였으며, 측정된 전류값은 TMC-1 세포(HEK293T)만 존재할 때 측정된 전류값 대비 1M NaCl과 함께 각각의 농도별 짠맛 증진후보물질을 처리하였을 때 증가한 전류값을 비교하였음
- 그 결과, 0mg/ml의 짠맛 증진후보물질을 추가 처리하였을 때 1.641 μ A가 증가하였으며, 2mg/ml의 짠맛 증진후보물질을 추가 처리하였을 때는 3.133 μ A가 증가하였으며, 마지막으로 4mg/ml의 짠맛 증진후보물질을 추가 처리하였을 때는 3.572 μ A가 증가하였음. 이것으로 볼 때 TMC-1 세포(HEK293T)를 대상으로도 짠맛 증진후보물질의 농도가 높아질수록 기존에 유입되던 나트륨이온의 양보다 증가하게 되고 그에 따라 세포막전위가 음전하를 띠는 정도가 높아져 측정되는 전류값이 증가하는 것으로 생각됨 (그림 34). 따라서 짠맛 증진후보물질은 실제로 나트륨이온의 유입을 증가시켜 짠맛을 증진시키는 효능이 있는 것으로 판단됨

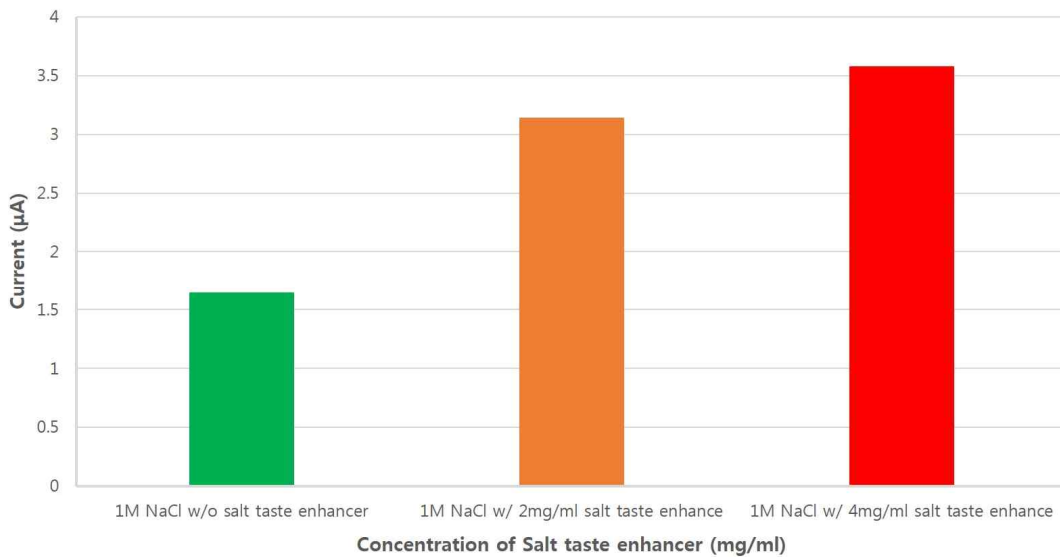


그림 34. TMC-1 세포(HEK293T)-1M NaCl-짠맛 증진후보물질 농도별 반응에 대한 막대그래프

3. 연구개발성과

- 최종년도까지 일부 연구내용들로 논문명(A highly sensitive electrochemical immunosensor by functional fusion crosslinkers and prevention of electrode fouling), 학술지명 (Sensors and Actuators B), 국외, SCI급 논문으로 준비 중에 있음

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호 D-06

1. 목표달성도

가. 연구개발의 최종목표

○ 본 위탁기술 개발은 나트륨 이온이 짠맛에 관여하는 것으로 여겨지는 세포막 이온 채널 단백질을 통해 세포 내로 유입됨으로써 변화하는 세포막전위를 측정할 수 있는 미세구조인 랩온어칩(Lap-on-a-chip)을 개발하여 짠맛 증진후보물질의 효능을 신속, 간단, 저렴하게 평가할 수 있는 새로운 시스템을 구축 하고자 함

나. 연차별 연구개발 목표 및 내용

연도	연구개발 목표	연구개발 내용	검증 방법
1차년도 [3차년도] (2014)	짠맛 증진물질 신속평가를 위한 랩온어칩 개발	세포막전위 변화를 측정 할 수 있는 미세구조화된 랩온어칩 제작	전극의 미세패턴 완성도를 광학현미경을 통해 확인
2차년도 [4차년도] (2015)		완성된 짠맛센서 칩 기반 짠맛관련 이온채널 단백질이 존재하는 세포를 이용한 짠맛 증진후보물질의 성능 평가	NaCl 자극 및 짠맛 증진후보물질 효능에 따른 세포막전위의 변화를 CV신호 증가를 통해 확인

다. 계획대비 달성도

번호	세부연구목표	달성내용	달성도(%)
1	짠맛센서 칩의 실험 디자인 확립	세포막전위 변화 측정방법 고안 및 전극의 길이와 넓이 등 결정완료	100
2	짠맛센서 칩의 제작	COC 기판의 사출성형 및 전극 패터닝을 통한 칩 제작완료	100
3	ENaC 세포(HepG2)의 전극 부착을 위한 짠맛센서 칩 위 배양	링 구조물 내 배지와 함께 ENaC 세포(HepG2)의 배양 성공 및 전극 부착 정도 확인완료	100
4	NaCl 처리에 따른 세포막전위 변화 측정 가능성 평가 (ENaC)	짠맛센서 칩을 이용한 세포막전위의 변화 측정원리를 CV 신호 변화 확인완료	100
5	NaCl 농도별 차이에 따른 세포막전위 변화 측정 민감도 평가 (ENaC)	NaCl의 농도별 차이에 의한 CV 신호 변화 확인완료	100
6	ENaC 세포(HepG2) 밀도별 차이에 따른 세포막전위 변화 측정 민감도 평가	ENaC 세포(HepG2)의 밀도별 차이에 의한 CV 신호 변화 확인완료	100
7	짠맛 증진후보물질 농도별 차이에 따른 세포막전위 변화 측정 민감도 평가 (ENaC)	짠맛 증진후보물질의 농도별 차이에 따른 CV 신호 증가 확인완료	100
8	TMC-1의 transfection이 완료된 HEK293T 세포 준비	융합된 TMC-1-GFP 유전자가 HEK293T 세포의 세포막에 발현되었는지 형광현미경을 통해 확인	100
9	TMC-1 세포(HEK293T)의 전극 부착을 위한 짠맛센서 칩 위 배양	링 구조물 내 배지와 함께 TMC-1 세포(HEK293T)의 배양 성공 및 PLL 코팅으로 전극 부착 정도 증진 확인	100
10	NaCl 처리에 따른 세포막전위 변화 측정 가능성 평가 (TMC-1)	짠맛센서 칩을 이용한 세포막전위의 변화 측정원리를 CV 신호 변화 확인완료	100
11	짠맛 증진후보물질 농도별 차이에 따른 세포막전위 변화 측정 민감도 평가 (TMC-1)	짠맛 증진후보물질의 농도별 차이에 따른 CV 신호 증가 확인완료	100

2. 관련분야 기여도

- 미각 감지를 위한 이온채널이 적용된 바이오센서에 대한 연구는 아직 초기화 단계이며, 사실상 인간의 짠맛 감지에 관련된 이온채널은 아직 명확하게 드러나지 않았기 때문에 쥐(rat)의 미각 상피조직(taste epithelium)을 통째로 적용시킨 사례를 제외하고는 짠맛 감지를 위한 이온채널이 적용된 바이오센서에 대한 연구는 전무하다고 볼 수 있음. 따라서 본 위탁연구에서 개발된 시스템은 관련분야에서 선구자와 같은 역할을 할 것이라고 기대됨
- 본 위탁연구에서 적용된 Epithelial Sodium Channel(ENaC)와 Transmembrane channel-like protein 1(TMC-1)은 현 시점에서 인간이 느끼는 짠맛에 관여할 것으로 추정되는 가장 근접한 세포막 이온채널 단백질이지만, ENaC은 거의 모든 세포의 나트륨 이동에 관여하는 이온채널로 나트륨을 이동시킨다고 짠맛을 감지하는 기능이 있다고 확신할 수 없으며, TMC-1은 꼬마애기선충(*C. elegans*) 생체 내에서 고농도의 NaCl을 감지하고 회피할 수 있게 해주는 나트륨 이온채널로써 인간 내에서 homology를 같은 유전자는 짠맛감지 기능이 없다고 알려져 있음
- 다만 ENaC와 TMC-1이 인간이 느끼는 짠맛에 관여하는 나트륨 이온채널이 아니더라도 본 위탁 연구를 통해 개발된 시스템을 통하여 새로운 짠맛 감지 이온채널 단백질 발견에 관련된 기초연구를 수행할 수 있으며, 발견이 된다면 개발된 시스템에 이온채널을 대체 적용하여 짠맛센서 칩의 본연의 기능을 구현할 수 있을 것으로 판단됨. 또한 관능평가에 의존했던 짠맛 증진후보물질의 효능평가를 좀 더 신속, 간단, 정확, 저렴하게 평가 할 수 있게 됨으로써 관련 식품 산업의 증대에 기여할 것으로 예상됨

5. 연구결과의 활용계획

	코드번호	D-07
<input type="radio"/> 짠맛 증진후보물질의 효능평가를 신속, 간단, 정확, 저렴하게 평가 <input type="radio"/> 관능평가와는 별개로 짠맛 증진후보물질의 효능에 대한 객관적 지표로써 식품산업 발전에 기여 (짠맛 증진물질이 적용된 식품의 나트륨 저감화 평가 및 검증) <input type="radio"/> 새로운 짠맛 감지 이온채널 단백질 발견에 관련된 기초연구 <input type="radio"/> 새로운 짠맛 대체후보물질 발견에 관련된 기초연구 <input type="radio"/> 짠맛 이외의 미각 감지를 위한 이온채널이 적용된 바이오센서 연구 <input type="radio"/> 신경, 근육과 같은 세포막전위 변화를 측정이 필요한 연구에 응용		

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
<input type="radio"/> 해당사항 없음		

7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
<input type="radio"/> 해당사항 없음		

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

					코드번호	D-10		
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
<input type="radio"/> 해당사항 없음		

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

						코드번호	D-12		
번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1							yyyy.mm.dd		

11. 기타사항

	코드번호	D-13
○ 해당사항 없음		

12. 참고문헌

	코드번호	D-14		
<ol style="list-style-type: none">1. G. Wrobel, Transmission electron microscopy study of the cell-senser interface, Journal of The Royal Society, 2008; 5, 213-2222. J. S. Shim et al., The precise self-assembly of individual carbon nanotubes using magnetic capturing and fluidic alignment, Nanotechnology, 2009; 3256073. J. S. Shim and C. H. Ahn, Optical immunosensor using carbon nanotubes coated with a photovoltaic polymer, Biosensors and Bioelectronics, 2012; 34, 208-2144. C. Marios et al., tmc-1 encodes a sodium-sensitive channel required for salt chemosensation in C. elegans, Nature letter, 20135. Q. Liu et al., Bioelectronic tongue of taste buds on microelectrode array for salt sensing, Biosensors and Bioelectronics, 2013; 40, 115-1206. H. S. Song et al., Bioelectronic Tongue Using Heterodimeric Human Taste Receptor for the Discrimination of Sweeteners with Human-like Performance, ACS Nano, 2014; 8, 9781-97897. L. Steller et al., Natural and artificial ion channels for biosensing platform, Anal Bioanal Chem, 2012; 402, 209-2308. A. Schindler et al., Discovery of salt taste enhancing arginyl dipeptides in protein digests and fermented fish sauses by means of a sensomics approach, J. Agric. Food. Chem. 2011; 59, 12578-12588				

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 짠맛 증진물질 신속평가를 위한 랩온어칩 개발				
	(영문) Development of lap-on-a-chip for rapid evaluation of salty enhancer				
주관연구기관	차의과학대학교		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 차의과학대학교 바이오공학과	
참 여 기 업				(성명) 고 성 호	
총연구개발비 (35,000 천원)	계	35,000 천원	총 연 구 기 간	2014.08.08. ~ 2016.08.07. (2년)	
	정부출연 연구개발비	35,000 천원	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	6 명
	기업부담금			내부인원	6 명
	연구기관부담금			외부인원	

○ 연구개발 목표 및 성과

본 위탁기술 개발은 나트륨 이온이 짠맛에 관여하는 것으로 여겨지는 세포막 이온 채널 단백질을 통해 세포 내로 유입됨으로써 변화하는 세포막전위를 측정할 수 있는 미세구조인 랩온어칩(Lap-on -a-chip)을 개발하여 짠맛 증진후보물질의 효능을 신속, 간단, 저렴하게 평가할 수 있는 새로운 시스템을 구축하였음

○ 연구내용 및 결과

- 짠맛센서 칩의 실험 디자인 확립
- 짠맛센서 칩의 제작
- 짠맛센서 칩을 이용한 ENaC 세포(HepG2)-NaCl 반응 확인 실험
- 짠맛센서 칩을 이용한 ENaC 세포(HepG2)-짠맛 증진후보물질 효능 확인 실험
- 짠맛센서 칩을 이용한 TMC-1 세포(HEK293T)-NaCl 반응 확인 실험
- 짠맛센서 칩을 이용한 TMC-1 세포(HEK293T)-짠맛 증진후보물질 효능 확인 실험

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 짠맛 증진후보물질의 효능평가를 신속, 간단, 정확, 저렴하게 평가
- 관능평가와는 별개로 짠맛 증진후보물질의 효능에 대한 객관적 지표로써 식품산업 발전에 기여
(짠맛 증진물질이 적용된 식품의 나트륨 저감화 평가 및 검증)
- 새로운 짠맛 감지 이온채널 단백질 발견에 관련된 기초연구
- 새로운 짠맛 대체후보물질 발견에 관련된 기초연구
- 짠맛 이외의 미각 감지를 위한 이온채널이 적용된 바이오센서 연구
- 신경, 근육과 같은 세포막전위 변화를 측정이 필요한 연구에 응용

자체평가의견서

1. 과제현황

				코드번호	D-15
		과제번호		312010-4	
사업구분	000000사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	고부가가치식품기술개발 사업				위탁
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	짬맛 증진물질 신속평가를 위한 랩온어칩 개발			과제유형	기초
연구기관	차의과학대학교			연구책임자	고성호
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2014.08.08. - 2015.08.07	17,500		17,500
	2차년도	2015.08.08. - 2016.08.07.	17,500		17,500
	3차년도				
	4차년도				
	5차년도				
	계	2014.08.08. - 2016.08.07	35,000		35,000
참여기업					
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2016.09.19

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
차의과학대학교	조교수	고성호

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	---

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

본 연구진은 나트륨이온이 짠맛에 관여하는 것으로 여겨지는 세포막 이온 채널 단백질을 통해 세포 내로 유입됨으로써 변화하는 세포막전위를 측정할 수 있는 미세구조인 랩온어칩을 개발하여 짠맛 증진후보물질의 효능을 신속, 간단, 저렴하게 평가할 수 있는 새로운 시스템을 구축하였음. 관련 분야의 연구는 아직 초기화 단계이며 사실상 짠맛 감지를 위한 이온 채널이 적용된 바이오센서에 관련된 연구는 전무하다고 할 수 있으므로 이 분야에서 만큼은 선구자와 같은 역할을 할 것으로 기대됨

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수)

본 연구에서 개발된 짠맛센서 칩은 기존의 관능평가에만 의존하였던 평가에서 정확하고 객관적인 지표를 제공할 수 있게끔 됨으로써 미각에 관련된 신소재의 발굴에 들어가는 비용 및 시간을 절감시킬 수 있을 것으로 기대됨. 뿐만 아니라 최근 웰빙, 웰니스, 나트륨 저감화과 같은 시대적 요구들과 맞물려 식품 나트륨 저감화 평가 및 검증과 같은 공인된 기준을 제시할 가능성이 있으며, 향후 식품산업 발전에 크게 기여 할 수 있을 것이라 여겨짐

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수)

본 연구에서 개발된 짠맛센서 칩은 짠맛 증진후보물질의 효능평가를 신속, 간단, 정확, 저렴하게 평가할 수 있을 뿐만 아니라, 새로운 짠맛 감지 이온채널 단백질을 발굴하는 기초연구에도 적용 가능함. 게다가 짠맛 증진물질은 물론 짠맛 대체물질의 발굴에도 적용 가능할 것으로 예상되며 짠맛 이외의 미각 감지를 위한 이온채널이 적용된 바이오센서 연구에도 사용될 수 있음. 보다 크게 보면 식품과학 이외에도 신경, 근육과 같은 세포막전위의 변화에 대한 측정이 필요한 연구에도 응용이 가능하다고 생각됨

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

본 연구진은 연구 계획서에 명시된 모든 연구를 100% 완료하였음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수)

최종년도까지 연구 결과물로 현재 SCI논문 1편 준비 중에 있음

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체 평가
짠맛센서 칩의 실험 디자인 확립	10	100	세포막적위 변화 측정방법 고안 및 전극의 길이와 넓이 등 결정완료
짠맛센서 칩의 제작	10	100	COC 기판의 사출성형 및 전극 패터닝을 통한 칩 제작완료
ENaC 세포(HepG2)의 전극 부착을 위한 짠맛센서 칩 위 배양	5	100	링 구조물 내 배지와 함께 ENaC 세포(HepG2)의 배양 성공 및 전극 부착 정도 확인완료
NaCl 처리에 따른 세포막전위 변화 측정 가능성 평가 (ENaC)	10	100	짠맛센서 칩을 이용한 세포막전위의 변화 측정원리를 CV 신호 변화 확인완료
NaCl 농도별 차이에 따른 세포막전위 변화 측정 민감도 평가 (ENaC)	10	100	NaCl의 농도별 차이에 의한 CV 신호 변화 확인완료
ENaC 세포(HepG2) 밀도별 차이에 따른 세포막전위 변화 측정 민감도 평가	10	100	ENaC 세포(HepG2)의 밀도별 차이에 의한 CV 신호 변화 확인완료
짠맛 증진후보물질 농도별 차이에 따른 세포막전위 변화 측정 민감도 평가 (ENaC)	10	100	짠맛 증진후보물질의 농도별 차이에 따른 CV 신호 증가 확인완료
TMC-1의 transfection이 완료된 HEK293T 세포 준비	10	100	융합된 TMC-1-GFP 유전자가 HEK293T 세포의 세포막에 발현되었는지 형광현미경을 통해 확인
TMC-1 세포(HEK293T)의 전극 부착을 위한 짠맛센서 칩 위 배양	5	100	링 구조물 내 배지와 함께 TMC-1 세포(HEK293T)의 배양 성공 및 PLL 코팅으로 전극 부착 정도 증진 확인
NaCl 처리에 따른 세포막전위 변화 측정 가능성 평가 (TMC-1)	10	100	짠맛센서 칩을 이용한 세포막전위의 변화 측정원리를 CV 신호 변화 확인완료
짠맛 증진후보물질 농도별 차이에 따른 세포막전위 변화 측정 민감도 평가 (TMC-1)	10	100	짠맛 증진후보물질의 농도별 차이에 따른 CV 신호 증가 확인완료
합계	100	100	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구에서 개발한 짠맛센서 칩은 짠맛 증진물질과 같은 새로운 미각관련 신소재를 발굴함에 있어서 수치적으로 분석할 수 있는 시스템을 제공함으로써 객관적이고 과학적인 지표라고 명확하게 말하기 어려운 관능평가의 부정확함을 보완할 수 있음. 또한 랩온어칩이라는 신속, 간단, 정확, 저렴한 방식을 적용함으로써 발굴 과정에 드는 비용 및 시간을 절감할 수 있음. 본 기술이 완전히 정확하다고 할 수 없으나 관련 분야의 연구는 아직 초기화 단계이며 사실상 짠맛 감지를 위한 이온 채널이 적용된 바이오센서에 관련된 연구는 전무하다고 할 수 있으므로 이 분야에서 만큼은 선구자와 같은 역할을 할 것으로 예상됨

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 짠맛센서 칩으로써 나트륨이온의 세포 내 유입에 따른 세포막전위의 변화 측정할 수 있는지의 유무
- NaCl 농도별 차이나 ENaC 세포(HepG2) 밀도별 차이에 따른 세포막전위 변화 측정 민감도 평가
- 짠맛센서 칩을 이용하여 ENaC 세포(HepG2)-짠맛 증진후보물질 효능 확인 가능 여부
- TMC-1 세포(HEK293T)을 대상으로 NaCl 자극에 따른 세포막전위 변화 측정 가능성 확인 여부
- 짠맛센서 칩을 이용하여 TMC-1 세포(HEK293T)-짠맛 증진후보물질 효능 확인 가능 여부

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

사실상 인간의 짠맛 감지에 관련된 이온채널은 아직 명확하게 드러나지 않았고 이에 대한 기초연구가 더 요구되어지는 상황임. 본 위탁연구를 통해 개발된 시스템을 통하여 새로운 짠맛 감지 이온채널 단백질 발견에 관련된 기초연구를 수행할 수 있으며, 발견이 된다면 개발된 시스템에 이온채널을 대체 적용하여 짠맛센서 칩의 본연의 기능을 구현할 수 있을 것으로 판단됨. 또한 관능평가에 의존했던 짠맛 증진후보물질의 효능평가를 좀 더 신속, 간단, 정확, 저렴하게 평가 할 수 있게 됨으로써 관련 미각관련 신소재의 발굴에 드는 비용 및 시간을 절감할 수 있을 것으로 생각됨

IV. 보안성 검토

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

해당사항 없음

2. 연구기관 자체의 검토결과

해당사항 없음

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	짠맛 증진물질 신속평가를 위한 랩온어칩 개발			
주관연구기관	차의과학대학교		주관연구책임자	고성호
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	35,000 천원			35,000 천원
연구개발기간	2014.08.08. ~2016.08.07			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 세포막전위 변화를 측정할 수 있는 미세구조화된 랩온어칩 제작	정밀한 미세구조 전극이 패터닝된 짠맛센서 칩 제작완료
② 구축된 랩온어칩 기반으로 짠맛 증진후보물질의 효능 평가	NaCl 자극 및 짠맛 증진후보물질 효능에 따른 세포막전위의 변화를 CV신호 증감을 통해 확인완료

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과		교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문				학술 발표	정책 활용		홍보 전시
												SCI	비 SCI						
최종목표																			
연간내 달성실적																			
달성율(%)																			

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	
②	
③	
⋮	

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화흡수	외국기술 개선개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술										
②의 기술										
③의 기술										
⋮										

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	
②의 기술	
③의 기술	
⋮	

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표							
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과		교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문				학술발표	정책 활용	
											SCI	비SCI						
최종목표												1						
연간내 달성실적																		
연구종료 후 성과창출 계획												1						

[별첨 3]

제2협동 위탁연구개발보고서

보고서 요약서

과제고유번호	312010-4	해당단계 연구기간	2015.08.08.- 2016.08.07	단계구분	4차년도/ 4년
연구사업명	중사업명	고부가가치기술개발사업			
	세부사업명	저탄소·신가공/공정			
연구과제명	대과제명	물리적 변화를 통한 나트륨 사용 저감화			
	세부과제명	다종 저염 식품군의 관능평가 분석			
연구책임자	최미정	해당단계 참여 연구원 수	총: 6 명 내부: 1 명 외부: 5 명	해당단계 연구개발비	정부: 10,000천원 민간: 천원 계: 10,000 천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 15 명 내부: 4 명 외부: 11 명	총 연구개발비	정부: 30,000천원 민간: 천원 계: 30,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	건국대학교			참여기업명 (주)삼양사	
위탁연구	연구기관명: 경기대학교			연구책임자: 이재권	
요약				보고서 면수	
○ 나노입자소금, 국수, 식빵의 관능검사 진행					

국문 요약문

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	상이한 공정으로 제조한 소금 및 개발된 저염 제품을 관능 평가하여 염미의 강도 및 특성을 규명하고 이에 따른 저염 효과를 확인					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ● 분말 표면에 결정화된 소금의 입자 크기가 작을수록 짠맛의 증진효과가 증대되는 것으로 확인 ● 분사압력이 높을수록 입자 크기가 미세화 되어 짠맛의 강도가 증진되는 효과 확인 ● GABA, MSG, 첨가 시 건식 소금의 짠맛 증진효과를 확인 ● 개발된 저염 빵의 염미는 기존 소금 첨가량의 20% 미만으로도 동일한 짠맛이 인지되는 것을 확인 ● 개발된 저염 면류의 염미는 기존 소금 첨가량의 10% 미만으로도 동일한 짠맛을 갖는 것을 확인 ● 개발된 저염 치즈 및 사골국수의 경우 기존 소금 첨가량의 10% 미만 사용으로도 동일한 짠맛 인지 확인 ● 개발된 시제품의 관능평가를 통하여 저염 효과를 검증하고 실제 제품의 대량 생산 과정에 적용가능성을 확인 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	소금입자의 크기를 조절하고 개발된 코팅기술을 활용함으로써 동일한 염미와 관능특성을 지닌 다양한 저염 제품의 개발에 적용할 수 있을 것으로 사료됨.					
중심어 (5개 이내)	나트륨	저염	나노	단백질 코팅	지질 코팅	

1. 연구개발과제의 개요

	코드번호	D-03
<p>제 1절. 연구개발 목적</p> <p>○ 소금의 관능평가로 공정과정 및 조건에 따른 상이한 짠맛 감별</p> <p>제 2절. 연구개발의 필요성</p> <p>○ 기존 소금함유 식품의 관능적 품질특성과 기호도를 갖는 저염 식품개발과 소금 함유량 저하를 위하여 다양한 공정과정으로 제조한 소금의 관능평가로서 공정과정이 소금의 짠맛에 미치는 영향을 규명하고 다양한 제품에서의 적용적합성을 확인</p>		

2. 연구수행 내용 및 결과

	코드번호	D-05
<p>1. 연구내용</p> <p>가. 1차 년도</p> <ul style="list-style-type: none"> - NaCl 미세입자 크기별 짠맛 관능검사 <p>나. 2차 년도</p> <ul style="list-style-type: none"> - 물리적 변화를 통한 나트륨 사용 제품의 관능검사 - 짠맛 증진제가 첨가된 저염 제빵의 관능검사 - 염미증진제 첨가군의 관능검사 - 대체염 첨가군의 관능검사 - 염미강화제 혹은 대체제가 첨가된 육제품 관능검사 <p>다. 3차 년도</p> <ul style="list-style-type: none"> - 리포솜 소금을 이용한 제면의 관능검사 - 5 kDa 이하의 HAP를 이용한 제면의 관능검사 - 5 kDa 이상의 HAP를 이용한 제면의 관능평가 <p>라. 4차 년도</p> <ul style="list-style-type: none"> - 상이한 공정과정으로 제조한 소금의 관능검사 - 리포솜으로 코팅된 소금을 첨가한 제빵의 관능검사 - 이중에멀전을 활용한 저염치즈 및 저염사골육수 관능검사 		

1. 연구결과

가. 1차 년도

(가) NaCl 미세입자 크기별 짠맛 관능검사

- Atomizing 압력을 달리하여 제조한 건식 소금의 짠맛 강도, 짠맛이 빨리 느껴지는 순서 및 입안에서 빨리 녹는 순서를 관능검사를 통하여 조사하였다.
- Atomizing 압력이 높을수록 소금입자의 크기는 감소하였으며, 시료 간 짠맛 강도와 짠맛이 빨리 느껴지는 순서는 유의적 차이가 없었다. 그러나 atomizing 압력이 높은 소금입자의 경우 입속에서 빨리 용해되어 상대적으로 짠맛의 강도와 짠맛이 빨리 느껴지는 정도에서 유의적 차이가 있는 것으로 확인되었다(표 1).

표 1. Atomizing pressure에 따라 제조된 건식 소금의 관능평가

짠맛 강도	sample 3 > sample 2 > sample 1	유의적 차이 없음
짠맛이 빨리 느껴지는 순서	sample 3 > sample 2 > sample 1	유의적 차이 없음
입안에서 빨리 녹는 순서	sample 3 > sample 2 > sample 1	sample 1과 3은 5% 유의수준에서 유의적 차이가 있음

* sample 1: 4 ×10 kPa, sample 2: 6 ×10 kPa; sample 10 ×10 kPa

** 3가지 시료 중 sample 3이 sample 1에 비해 5% 수준에서 유의적으로 입안에서 녹는 정도가 빠르다고 평가

*** 짠맛강도와 짠맛이 느껴지는 순서 간에는 유의적인 차이는 없으나 전체적으로 순서는 sample 3 > sample 2 > sample 1의 순으로 평가

(나) MSG와 GABA의 관능평가

- MSG는 대정이라는 회사에서 구입하여, GABA와 동일한 양으로 소금이 들어있는 대조구에 첨가, 전문 패널을 통해 관능평가를 실시해 주었는데 그 결과는 아래 그림 1과 같다. 결과에 따르면 MSG의 첨가가 대조구와 비교했을 때 소금 짠맛 강화에 유의적으로 영향을 미치지 않는 것이다. 하지만 대조구를 제외하고는 MSG 농도가 증가할수록 짠맛 강도는 다소 증가하는 경향을 나타냈다. 본 실험의 결과에 따르면 최소한 2% 이상의 MSG를 첨가해야 짠맛 강도가 강화되는 결과를 예상할 수 있다. 이는 내재된 MSG 함량이 함께 증가되는 결과를 초래할 수 있어 오히려 나트륨 함량을 과량으로 섭취할 수 있는 결과를 보인다. 기존 연구결과와 다르게 나타나는 내용으로 MSG 합성 조미료 사용이 비단 독성 문제보다는 짠맛 증진 기여도에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

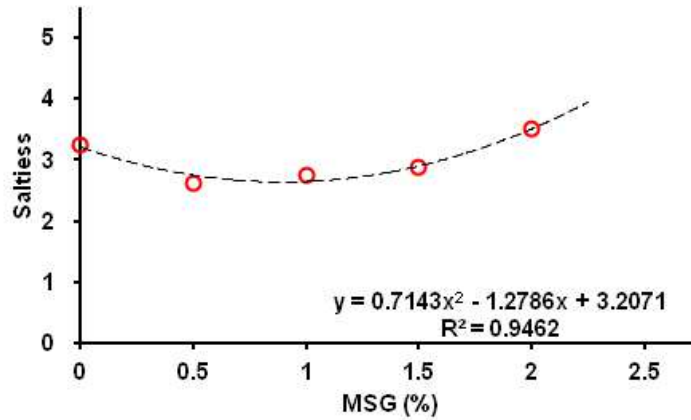


그림 1. MSG 첨가에 따른 관능평가(짠맛이 강한 배열순서 (5 > 4 > 3 > 2 > 1)).

- 최근 뇌졸중 및 결장암 등에 효과가 있는 것으로 나타났다. 본 실험에서는 salt enhancer 역할을 할 수 있는지를 살펴보기 위해서 농도별로 대조구에 첨가해 관능평가를 실시해 보았다. GABA의 농도의 첨가량에 따라 1.5 wt% 이상에서는 유의적으로 짠맛이 증진되는 것으로 나타났고, 1.5 wt% 미만에서는 짠맛을 오히려 감소시키는 경향을 나타내기도 하였다. GABA 농도 2% 첨가에서는 동일한 소금 함량의 대조구와 비교했을 시 상대적으로 대조구의 짠맛 보다 매우 유의적으로 강하다고 느끼는 것으로 나타났다. 대조구를 제외한 결과 분석에서는 GABA 첨가량이 증가할수록 짠맛에 대한 강도를 증진시키는 것으로 나타났다(그림 2).

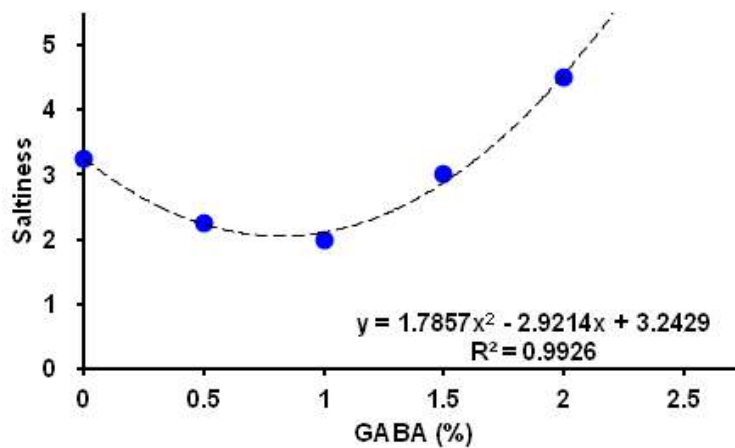


그림 2. GABA 첨가에 따른 관능평가(짠맛이 강한 배열순서 5 > 4 > 3 > 2 > 1).

나. 2차 년도

- (1) 물리적 변화를 통한 나트륨 사용 제품의 관능검사

- 강도 및 선택도에 따라 순위를 선정하는 순위법으로 관능검사를 실시하였다. 순위의 합이 낮을 때 강도 및 선택도가 높은 것을 의미하며 결과분석은 순위법의 유의성 검정표(5%) 활용하였다. 최소 비유의적 순위 합과 최대 비유의적 순위 합에 포함되는 처리구는 상호간 유의적 차이가 없는 것으로 판정하였다.
- 통계처리 결과(표 2), 유의적인 값을 나타내는 결과는 crust color 값으로 가장 낮은 값을 나타내는 20:9의 혼합비의 crust color에서 선택도가 가장 높았으며, 20:6, 대조구, 20:12의 처리구의 순으로 확인. 다른 항목에 대한 분석결과 crumb color 선택도도 또한 crust 결과와 유사한 경향을 나타내는 것으로 확인하였다.
- 짠맛에 대한 경향은 20:12 처리구에서 짠맛이 가장 강했으며, 그 뒤로 대조구, 20:9, 20:6의 순서로 확인되었으나 통계적으로 유의차는 없었다. 짠맛에 대한 기호도는 20:9의 경우 가장 선택도가 높았으며, 20:12, 대조구, 20:6의 순서로 조사되었는데, 이는 소금의 용출속도 측정 결과와 상이한 경향을 나타내었다. 이는 순위법의 분석결과를 통하여 짠맛의 강도를 비교하였을 때 효모와 소금을 모두 분무건조하여 제조 후 제빵에 첨가 시 제빵물성이 다소 떨어지거나 짠맛에 대한 강도는 강하게 느끼는 경향 때문으로 사료된다.
- 방사형으로 표현된 관능평가 분석표는 대조구, 즉 모든 생효모를 제빵제조 시 첨가한 경우의 빵을 그림 3으로 비교분석한 결과 crust color, crumb color, 수분, 향 등이 효모를 건조하여 제조한 빵의 경우와 유사한 결과를 나타내었다. 맛을 비교한 방사형 관능평가 분석결과 또한 유사한 결과를 나타내었다. 그러나 20:6으로 혼합한 처리구에서는 대조구와 다소 떨어진 짠맛, 짠맛 기호도를 나타내었다.

표 2. 건조 효모 양에 따른 식빵의 관능검사

측정 항목	소금-효모의 분무건조 혼합비			
	대조구	20:6	20:9	20:12
crust color	70 ^B	52 ^B	45 ^A	73 ^C
crumb color	60	58	54	68
향	55	61	64	60
기공 균일성	61	58	53	68
Moisture	57	52	70	61
짠맛	57	69	64	50
단맛	62	66	56	56
신맛	58	70	62	50
짠맛 기호도	60	71	53	56
전체적 기호도	57	62	64	57

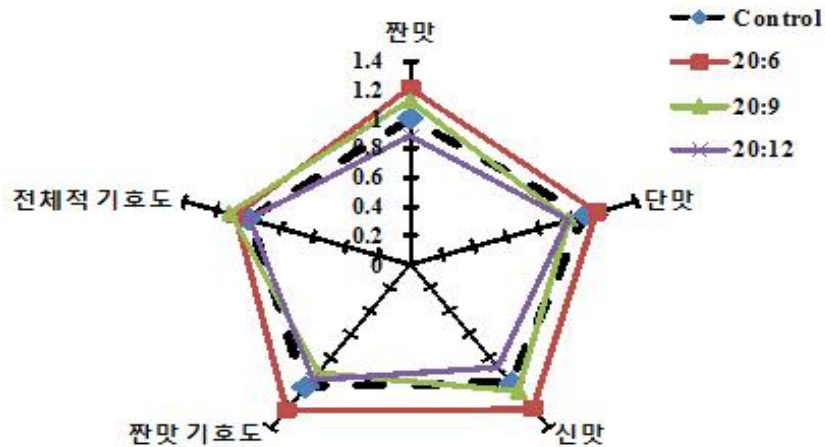
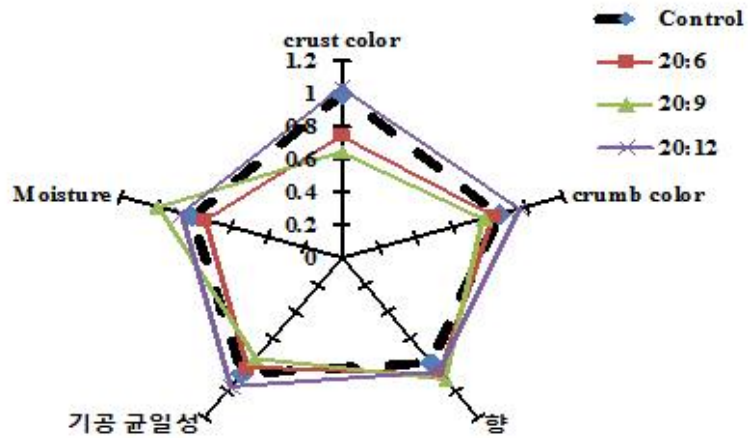


그림 3. 건조효모 양에 따른 관능검사 분석

(2) 짠맛 증진제가 첨가된 저염 제빵의 관능검사

- 본 관능검사 결과 또한 전술한 바와 같이 순위 값의 합이 낮을 때 강도 값이 높은 것을 나타내거나 선호도가 높은 것을 의미한다. 즉 낮은 값일수록 짠맛에 대한 강도가 높게 인지되는 것을 의미한다.
- 짠맛의 경우 대조구와 비교하여 단백질 분해물을 1.712 g, 3.425 g 첨가하였을 때 상대적으로 강한 짠맛을 느끼는 것으로 조사되었으며, 첨가물 농도를 6.85 g, 13.7 g으로 배로 증가 시 짠맛은 오히려 덜 느끼는 것으로 확인되었다. 그러나 이러한 짠맛의 인지 경향은

통계적 유의성을 보이지 않았으며, 신맛도 이와 같은 경향을 나타내었다(표 3).

- 짠맛에 대한 기호도는 고농도의 단백질 첨가 처리구(13.7 g 첨가)에서 가장 높은 선호도를 나타내었고, 농도가 높을수록 선호도가 높은 것으로 조사되었다. 처리구와 비교했을 시는 저농도 첨가 시료 (1.712 g 첨가)를 제외하고 모두 높은 선호도를 나타내었다. 전체적인 기호도의 경우에는 고농도의 단백질 첨가 군에서 높은 선호도를 나타내었고, 대조구와 비교 시 저농도 첨가구에서 낮은 선호도를 나타내었다. 이는 향, 기공 균일성, 수분함량, crumb 및 crust 색의 경향과도 유사하였다.
- 방사성 관능평가 분포도의 분석결과, 대조구와 유사한 결과 값을 갖는 처리구는 3.425 g의 단백질 가수분해물이 첨가된 처리구로서 대조구와 가장 유사한 결과를 나타내었다. 대조구를 기준으로 미량 혹은 상대적으로 다량의 가수분해물 첨가 시 다양한 이화학적 관능평가기준이 대조구와 다른 경향을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이는 맛에 대한 평가에서도 유사하게 조사되었다(그림 4).
- 결과적으로 단백질 가수분해물은 동일한 소금이 함유되어 있는 제빵의 경우 특정 농도만큼 첨가 하면 짠맛에 대해 증진 효과가 있는 것으로 확인되었으며, 약간의 신맛도 증진되는 것으로 조사되었다. 단백질 가수분해물의 적정 농도는 1.712 g으로 매우 적은 양의 첨가만으로도 효과적인 것을 확인하였다. 이에 대한 보다 심도 있는 고찰은 제3협동의 연구결과와 비교분석을 통하여 가능할 것으로 사료된다.

표 3 가수분해물량에 따른 식빵의 관능검사

측정항목	단백질 가수분해물 (g)				
	0	1.712	3.425	6.85	13.7
crust color	80 ^B	114 ^C	96 ^C	47 ^A	53 ^A
crumb color	73 ^B	112 ^C	95 ^B	44 ^A	66 ^B
향	74 ^B	117 ^C	92 ^B	52 ^A	55 ^A
기공 균일성	75 ^A	87 ^A	82 ^A	75 ^A	71 ^A
Moisture	80 ^A	101 ^C	90 ^A	52 ^A	67 ^A
짠맛	77 ^A	61 ^A	70 ^A	97 ^B	85 ^A
단맛	76 ^B	104 ^C	94 ^C	55 ^A	61 ^B
신맛	85 ^B	46 ^A	63 ^B	97 ^C	99 ^C
짠맛 기호도	86 ^B	110 ^C	81 ^B	61 ^B	52 ^A
전체적 기호도	81 ^B	113 ^C	97 ^C	44 ^A	55 ^A

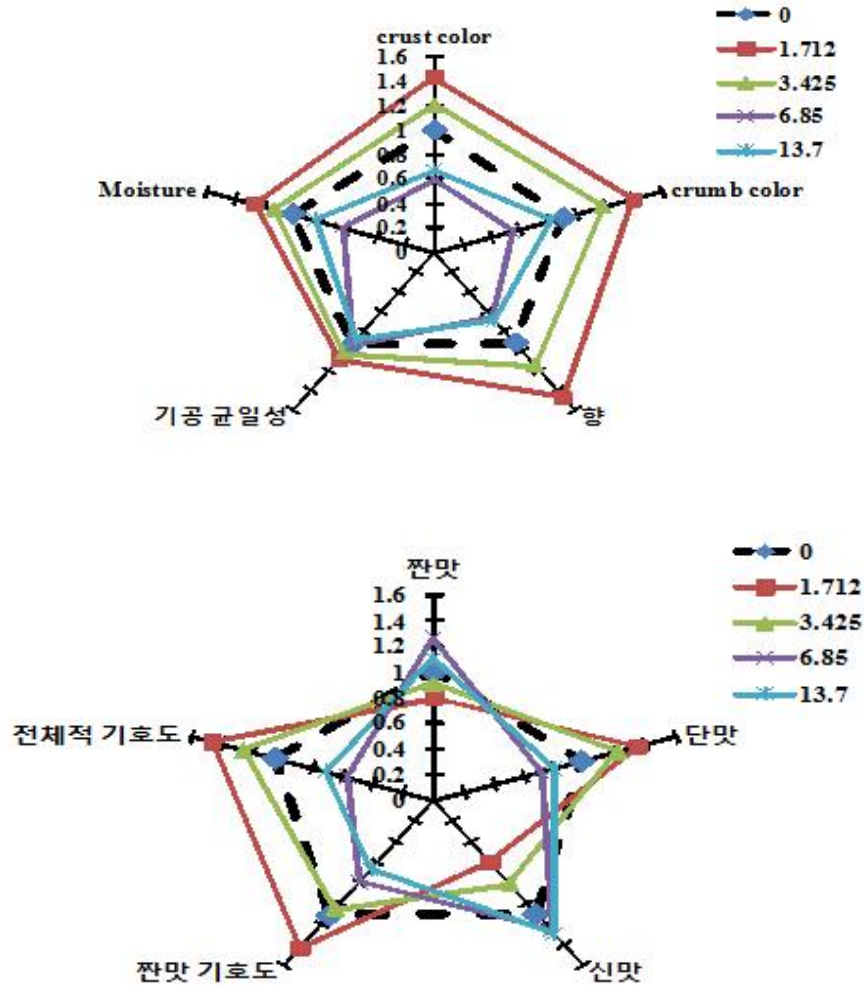


그림 4. 가수분해물량에 따른 식빵의 관능검사.

(3) 염미증진제 첨가군의 관능평가

○ MSG의 첨가에 따른 짠맛의 분석 결과, 소금의 양을 줄이고 MSG의 양을 증가할수록 짠맛이 강화되는 경향을 나타내었다(그림 5). 또한 이러한 결과는 MSG 내 포함된 나트륨 함량이 일정 부분 기여하여 짠맛을 보다 강하게 느끼게 하는 것으로 사료되며, 전체적인 기호도, juiciness, tenderness 값 또한 이와 유사한 경향을 나타내었다.

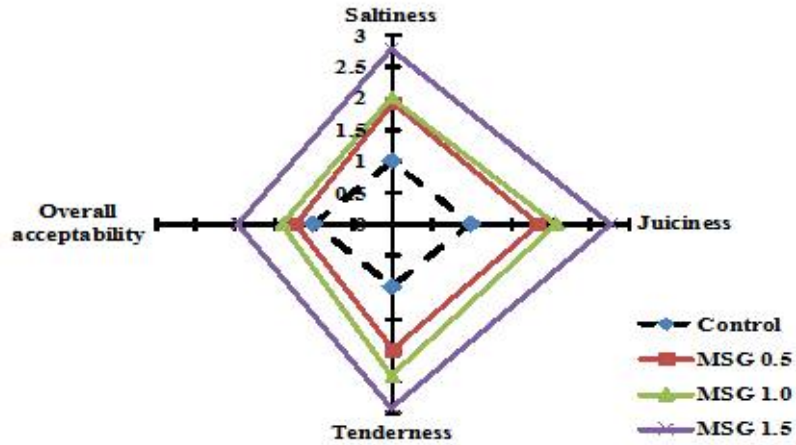


그림 5. MSG 함량에 따른 고기패티의 관능검사.

- GABA의 경우, 첨가농도가 증가할수록 짠맛에 대한 강도나 기호도가 낮아지고 전체적인 결과에 부정적인 영향을 미치는 것으로 조사되었다. 이는 GABA가 지니고 있는 특유의 향이 돼지고기 패티의 관능에 영향을 미치기 때문으로 사료되며, 상대적인 소금 함량의 감소로 짠맛에 대한 증진 효과 없이 전체적인 기호도가 떨어지는 경향이 야기되는 것으로 예상된다. 이와 같은 결과는 1차 년도에서 실시한 관능평가의 결과와는 다소 상이하였다(그림 6).

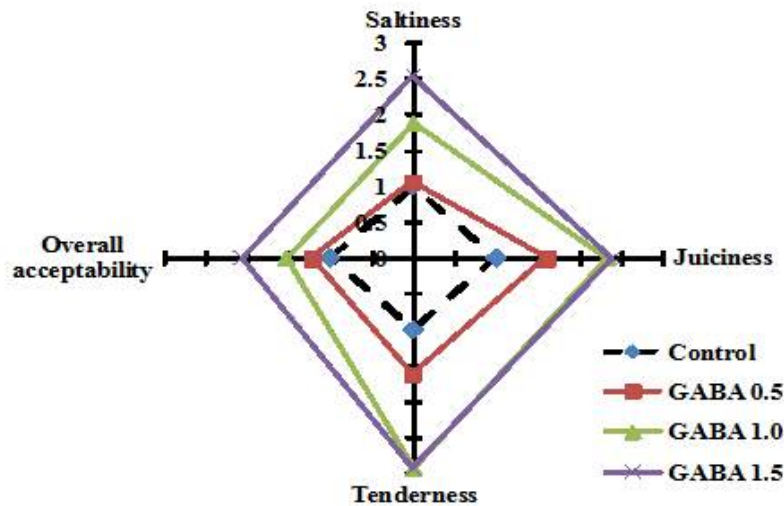


그림 6. GABA 함량에 따른 고기패티의 관능검사.

(4) 대체염 첨가군의 관능평가

- $MgSO_4$ 의 경우 소금 양을 대체염으로 대체할수록 짠맛에 대해 잘 인지하지 못하는 것으로 확인됨. 전체적인 기호도, 다즙성 등 또한 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다.

○ CaSO_4 의 경우는 대조구에서 짠맛이 가장 강하게 조사되었으며, 농도가 높아질수록 짠맛에 대한 강도는 감소하였다. 전체적인 기호도, 다즙성, 부드러움에 대한 강도 역시 동일한 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 KCl 에서도 동일하였다. 소금이 일부 첨가되고 대체염의 농도를 증가 시킨 결과 enhancer의 역할과는 달리 염도 증가에 대한 효과는 나타나지 않았다(그림 7).

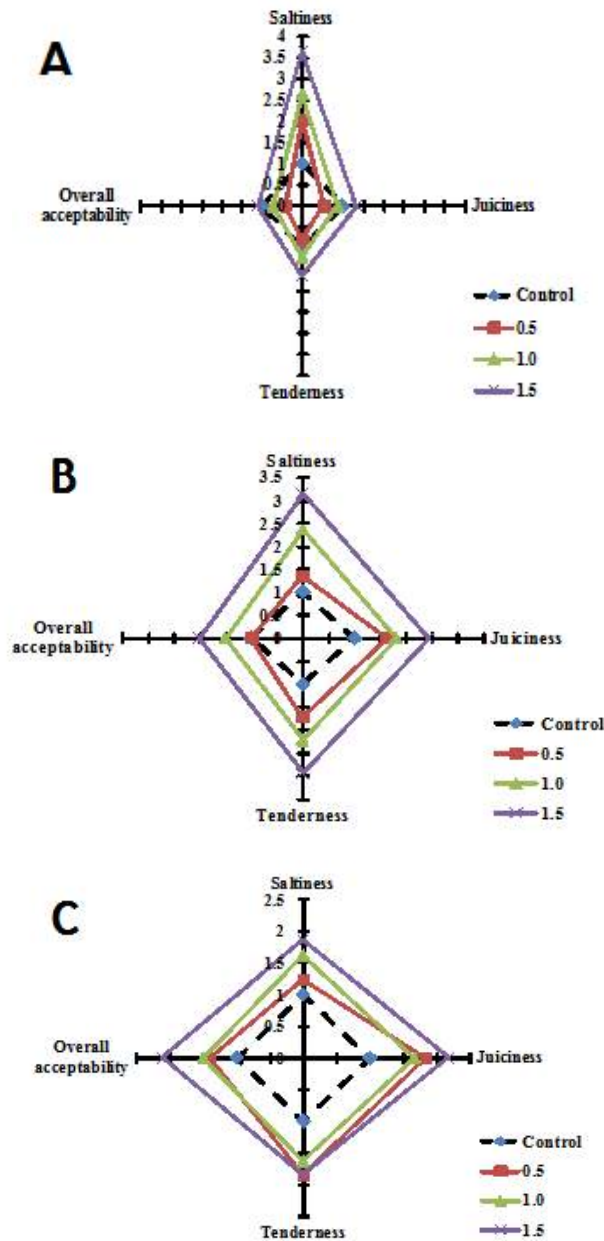


그림 7. 대체염 종류 및 첨가농도에 따른 관능검사 A: MgSO_4 , B: CaSO_4 , C: KCl .

다. 3차 년도

(1) 리포솜 소금을 이용한 제면의 관능평가

- 강도 및 선호도에 따라 순위를 선정하는 순위법으로 관능평가를 실시하였고 순위의 합이 높을수록 강도 및 선호도가 높은 것을 의미한다.
- 상이한 농도의 리포솜 코팅 소금을 첨가한 국수의 관능적 차이를 확인보고 리포솜 코팅 소금이 소금을 불균일하게 형성하여 국수의 짠맛 강도에 영향을 주는지 여부를 조사하였다.
- 대조구의 짠맛과 짠맛선호도는 0.5% LE와 1.5% LE의 시료보다 높은 값을 나타내었으며, 1% LE와 2.0% LE 시료보다는 낮은 값을 나타내는 것으로 확인되었다(Table 3-1과 Fig. 3-1). 짠맛의 경우 1.0% LE에서 가장 짜다고 느껴졌으나 짠맛의 선호도에서는 대조구와 유사한 선호도를 나타내었다. 2.0% LE 시료의 경우, 짠맛은 대조구보다 더 짜다고 조사되었고 짠맛의 선호도의 경우 가장 높은 선호도를 나타내었다. 그러나 전체적인 선호도의 경우, 대조구와 1.0% LE 시료에서 가장 큰 측정치를 나타내었다.
- 리포솜 소금을 제조한 뒤 제면 시 첨가한 경우 국수의 물성은 다소 떨어지나 짠맛에 대한 강도는 강하게 느끼는 경향을 나타내었다.

Table 4. Sensory test of noodle added different amount of liposome encapsulated salt

	Control	0.5% LE*	1.0% LE	1.5% LE	2.0% LE
Appearance	60	45	58	68	69
Color	69	47	55	61	68
Texture	66	53	63	57	61
Flavor	68	45	61	66	60
Saltiness	61	50	68	57	64
Preference of saltiness	62	52	62	56	68
Overall preference	69	43	70	55	63

*LE means liposome encapsulated salt.

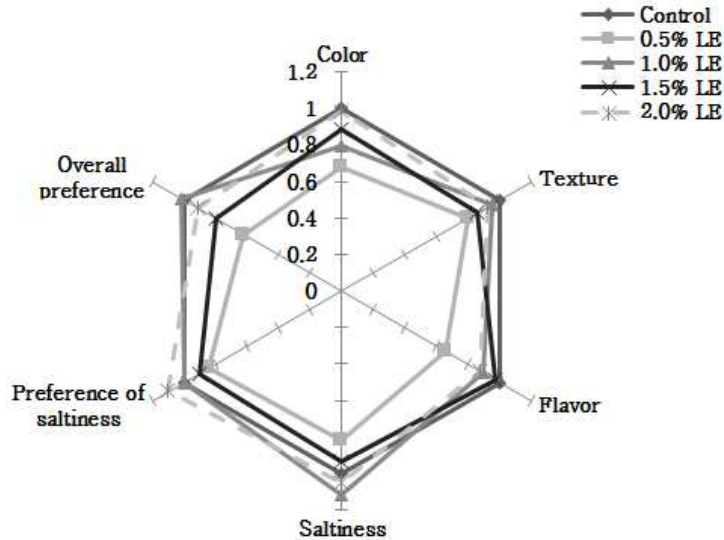


Fig. 8. Sensory test of noodle added different amount of liposome encapsulated salt. LE means liposome encapsulated salt.

(2) 5 kDa 이하의 HAP를 이용한 제면의 관능평가

- HAP를 첨가한 제면에서의 짠맛 증진효과 확인을 위한 관능평가 실시 결과, 대조구의 짠맛 강도는 25% HAP, 100% HAP 및 125% HAP보다는 높았으나 50% HAP와 75% HAP를 첨가한 국수보다는 보다는 낮은 것으로 확인되었으며, 즉, 50% HAP와 75% HAP를 첨가한 경우 짠맛의 강도가 가장 높은 것으로 조사되었다(Table 3-2과 Fig. 3-2).
- 짠맛의 선호도에서 대조구는 25% HAP와 100% HAP 보다는 높았으나, 다른 HAP 농도의 처리구 보다는 낮은 것으로 확인되었다. 선호도 측면에서는 75% HAP를 첨가한 국수에서 가장 높은 것으로 나타났고 그 다음으로는 125% HAP, 50% HAP 순으로 확인되었다.
- 전체적인 선호도 분석결과, 대조구는 75% HAP를 제외한 다른 처리구들보다 높은 선호도를 나타내었으며, 짠맛과 짠맛의 선호도의 결과에서 가장 큰 값을 보여준 75% HAP가 전체적인 선호도에서도 가장 높은 값을 나타내었다.
- 50% HAP와 75% HAP를 첨가한 국수의 관능검사 결과, 물성에서 높은 결과 값을 나타내었고 짠맛에 대한 강도는 강하게 느끼는 것으로 조사되었으며, 적정 농도의 가수분해물의 첨가가 짠맛 강도의 증가에 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

Table 5. Sensory test of noodle added different amount of HAP

	Control	25% HAP	50% HAP	75% HAP	100% HAP	125% HAP
Appearance	63	67	88	79	62	61
Color	63	75	83	66	72	61
Texture	73	69	77	80	42	79
Flavor	70	55	93	71	66	65
Saltiness	74	57	83	80	56	70
Preference of saltiness	72	59	74	94	45	76
Overall preference	76	64	75	84	49	72

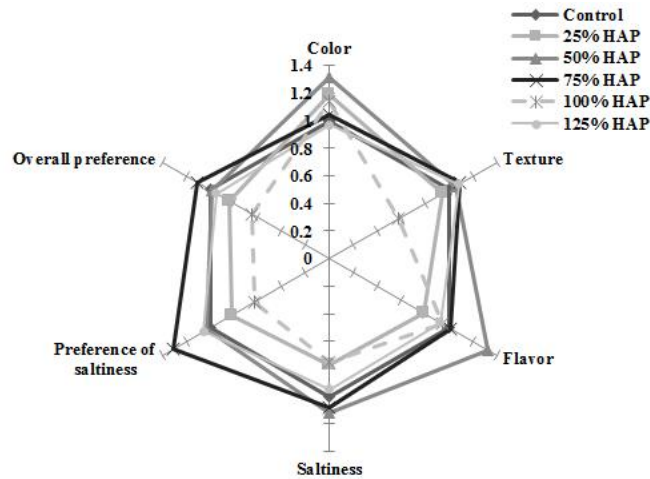


Fig. 9. Sensory test of noodle added different amount of HAP.

(3) 5 kDa 이상의 HAP를 이용한 제면의 관능평가

- 상이한 농도의 HAP를 첨가한 국수의 관능평가를 통하여 HAP의 짠맛 증진효과를 확인하였다.
- 대조구의 짠맛 측정결과, 75% HAP를 제외한 다른 처리구 보다 낮은 값을 나타내었다. HAP를 상대적으로 적게 넣어준 25% HAP와 50% HAP에서는 다른 시료들보다 더 짜게 느끼는 것으로 확인 되었으며, 이에 HAP의 짠맛 증진효과를 확인되었다.
- 짠맛 선호도 측정결과, 대조구는 75% HAP와 100% HAP를 첨가한 국수를 제외한 다른 시료보다 낮은 값을 나타내었으며, 이 또한 상대적으로 낮은 농도의 HAP를 넣어주었을 때 짠맛의 선호도가 높은 것으로 조사되었다.
- 전체적인 선호도의 측정결과, 짠맛과 짠맛의 선호도는 유사한 경향을 보였으며 대조구보다 25% HAP와 50% HAP에서 더 높은 선호도를 나타내었다.
- 또한 다른 품질 평가항목에서도 50% HAP를 첨가해준 국수에서 높은 측정치를 나타내었

다. HAP는 짠맛 증진에 효과가 있으나, 일정 농도 이상 첨가 시에는 선호도와 국수 품질에 좋지 않은 영향을 미치는 것으로 사료되며, 50%의 HAP 첨가가 최적농도로 사료된다 (Table 6 및 Fig. 10).

Table 6. Sensory test of noodle added different amount of HAP

	Control	25% HAP	50% HAP	75% HAP	100% HAP	125% HAP
Appearance	72	90	82	69	67	40
Color	80	84	81	56	73	46
Texture	72	68	91	70	52	67
Flavor	64	73	80	66	70	68
Saltiness	60	78	83	59	68	72
Preference of saltiness	66	86	76	61	60	71
Overall preference	75	81	86	57	65	56

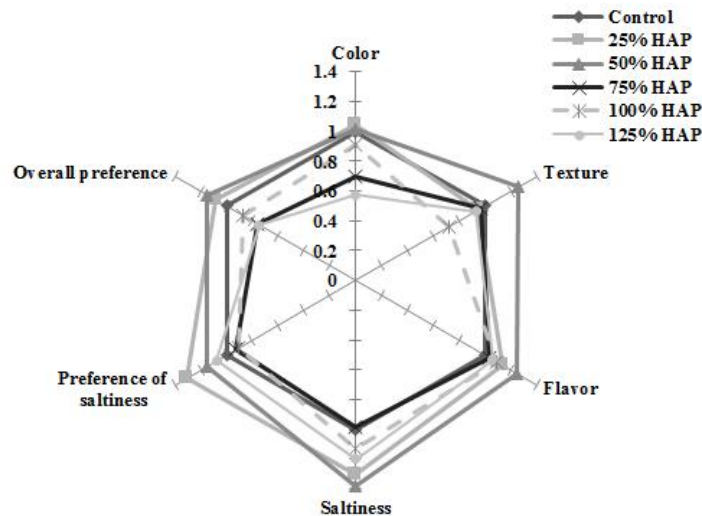


Fig. 10. Sensory test of noodle added different amount of HAP.

라. 4차 년도

(1) 상이한 공정과정으로 제조한 소금의 관능평가

- 공정을 달리하여 제조한 소금의 관능평가의 결과를 해주었다. Inlet temperature에 따라서는 짠맛의 강도 및 녹는 속도는 유사하였다. 반면 분무공정에서 atomizing 압력을 조절 시 분무압력이 높을수록 소금의 녹는 속도는 증가하였으며 짠맛의 강도 또한 강해지는 경향을 확인하였다.
- 분무건조공정에서 inlet temperature와 atomizing 압력을 달리하여 제조한 소금으로 시즈닝한 스낵의 관능검사 결과를 Table 9, 8 및 7에 표시. Inlet temperature를 달리하여 제조한 소금을 스낵에 적용 시 외관, 쓴맛, 단맛에서는 유의적 차이가 없는 것으로 확인되었다

($p>0.05$).

- 반면 짠맛의 강도에서는 160°C inlet temperature에서 제조한 소금을 사용한 경우 다른 처리구에 비해 유의적으로 높은 값을 나타내었다($p<0.05$).
- Atomizing pressure 처리를 달리하여 제조한 소금을 스낵에 적용한 경우 외관, 쓴맛, 짠맛, 소금 자체의 짠맛 및 전체적인 선호도에서 유의적 차이가 없는 것으로 확인되었다($p>0.05$). 그러나 짠맛이 느껴지는 순서와 짠맛의 강도에서는 atomizing pressure 60, 180 및 220 kPa에서 유의적으로 높은 값을 나타내는 것으로 확인되었다($p<0.05$).
- 상기 결과에 따라 분무건조 공정조건의 적절한 조절을 통하여 소금의 짠맛 인지도를 조절할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 7. Sensory test of snack with different inlet temperature conditions of spray dryer

	Sensory test				
	Inlet temperature (°C)				
	130	140	150	160	170
Melting speed	3.6	3.5	3.7	3.7	3.6
Saltiness intensity	3.5	3.6	3.5	3.5	3.7
	Atomizing pressure (kPa)				
	60	100	140	180	220
	Melting speed	3.2	3.3	3.8	3.6
Saltiness intensity	3.3	3.3	3.8	3.8	3.8

Table 8. Sensory test of snack with different inlet temperature conditions of spray dryer

	Inlet temperature (°C)				
	130	140	150	160	170
Appearance	3.45 ^a	2.55 ^a	2.45 ^a	3.55 ^a	3.00 ^a
Bitterness	3.18 ^a	1.82 ^b	3.73 ^a	3.00 ^a	3.27 ^a
Sweetness	3.09 ^a	2.82 ^a	3.45 ^a	2.45 ^a	3.18 ^a
Seasoning saltiness	3.36 ^a	3.09 ^a	2.36 ^a	3.45 ^a	2.73 ^a
Order of saltiness	3.09 ^a	2.64 ^a	3.00 ^a	3.45 ^a	2.82 ^a
Saltiness intensity	2.91 ^b	2.55 ^b	2.82 ^b	4.09 ^a	2.64 ^b
Overall preference	4.09 ^{ab}	3.00 ^{ab}	4.45 ^a	2.64 ^b	3.91 ^{ab}

^{a-b}Means with same alphabet in a row are not significantly different at $p<0.05$ using Duncan's multiple range test.

Table 9. Sensory test of snack with different atomizing pressure conditions of spray dryer

	Atomizing pressure (kPa)				
	60	100	140	180	220

Appearance	3.27 ^a	3.00 ^a	3.18 ^a	2.73 ^a	2.82 ^a
Bitterness	3.00 ^a	3.09 ^a	3.36 ^a	2.27 ^a	3.27 ^a
Sweetness	3.00 ^{ab}	2.27 ^b	3.73 ^a	3.73 ^a	2.27 ^{ab}
Seasoning saltiness	3.36 ^a	2.45 ^a	2.45 ^a	3.45 ^a	3.27 ^a
Order of saltiness	3.09 ^{ab}	2.64 ^b	2.27 ^b	3.09 ^{ab}	3.91 ^{ab}
Saltiness intensity	3.45 ^{ab}	2.36 ^b	2.27 ^b	3.27 ^{ab}	3.64 ^{ab}
Overall preference	3.64 ^a	3.64 ^a	3.73 ^a	3.64 ^a	3.09 ^a

^{a-b}Means with same alphabet in a row are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test.

(2) 리포솜으로 코팅된 소금을 첨가한 제빵의 관능평가

- 리포솜 코팅된 소금 첨가량을 달리하여 제조한 빵의 관능평가 결과를 Table 10에 표시하였다. 빵의 겉 표면과 속질의 색 평가항목에서 LS 0은 가장 높은 선호도를 나타냈으며, LS 0과 LS 1.5를 제외한 처리구간의 유의적 차이는 없는 것으로 확인되었다($p > 0.05$).
- 또한 향미와 기공의 균일성 확인결과, 시료 간 유의적 차이는 없었음($p > 0.05$). 이상과 같이 외관 평가항목에서 대조구와 리포솜 코팅한 소금함유 빵은 유의적으로 차이가 없는 유사한 품질을 나타내었다.
- 리포솜 코팅된 소금의 농도를 달리하여 제조한 식빵에서 짠맛의 강도가 가장 높게 나타난 것은 LS 2.0의 리포솜 코팅된 소금으로만 제조된 식빵으로 조사되었다. 그 다음의 짠맛 강도는 LS 1.0, LS 0 순으로 높게 조사되었으며, LS 0.5를 제외한 다른 처리구에서는 유의적 차이를 나타나지 않았다($p > 0.05$). 이러한 결과는 소금 용출속도 측정의 결과 LS 2.0에서 용출속도가 빠른 값을 나타내어 짠맛의 강도가 높은 것으로 사료된다.
- 또한 전체적인 선호도 평가항목에서도 LS 2.0과 LS 1.0가 높은 값을 나타내었으며, 대조구와 유의적인 차이를 나타내지 않는 것으로 확인된다($p > 0.05$).

Table 10. Sensory test of white pan bread added different concentration of encapsulated salt

	Crust color	Crumb color	Flavor	Porosity	Saltiness	Overall acceptability
LS 0 ¹⁾	3.75±0.97 ^a	3.83±0.83 ^a	3.42±1.56 ^a	3.50±1.57 ^a	3.00±1.48 ^{ab}	3.42±1.31 ^a
LS 0.5	3.08±1.38 ^{ab}	2.83±1.40 ^{ab}	2.92±1.73 ^a	3.00±1.41 ^a	2.08±1.08 ^b	2.33±1.15 ^a
LS 1.0	2.67±1.23 ^{ab}	2.92±1.38 ^{ab}	3.33±1.56 ^a	2.50±1.09 ^a	3.42±1.31 ^a	3.25±1.42 ^a
LS 1.5	2.33±1.72 ^b	2.42±1.38 ^b	3.08±1.68 ^a	3.17±1.53 ^a	2.75±1.36 ^{ab}	2.58±1.56 ^a
LS 2.0	3.17±1.53 ^{ab}	3.00±1.41 ^{ab}	3.50±1.68 ^a	2.83±1.53 ^a	3.75±1.48 ^a	3.50±1.45 ^a

^{a-b}Means with same alphabet in a column are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test.

¹⁾ The content of liposome coated salt.

(3) 전복 가수분해물이 포함된 저염 사골 육수의 관능평가

- 염미 증강 효과가 있는지 확인하기 위해 관능평가를 실시한 결과를 Table 3-3-59와 60에 나타내었다. MCT oil을 포함한 W/O 에멀전으로부터 제조된 emulsion B와 D는 대조군과 A에 비해 관능평가에서 짠맛의 증진 효과는 낮은 것으로 관찰되었다. 반면, 전복 가수분해물을 포함하지 않는 대조군과 이를 포함한 A의 관능평가를 비교하였을 때, A에서 염미 증진 효과가 있음을 관찰하였다. 또한 emulsion B와 C 및 B와 D를 비교하였을 때, 전복 가수분해물을 포함하여 제조된 emulsion C와 D에서 염미 증진 효과가 나타나는 것을 관찰하였다. 또한 W₂에 전복 가수분해물을 포함하여 제조된 에멀전 D가 W₁에 전복 가수분해물을 포함하여 제조된 에멀전 C에 비해 염미 증진 효과가 더 크게 나타나는 것을 알 수 있었다.
- 본 실험 과정에 따라 제조된 전복 가수분해물을 포함하는 혼합물과 에멀전 C와 D를 사골 육수에 첨가하였을 때, 짠맛의 강도가 높아진 것을 관찰하였다. 특히, MCT oil을 사용한 W/O 에멀전을 포함하지 않는 A를 사골 육수에 넣었을 때, 가장 짠맛이 강한 것을 관찰하였다. 이러한 결과로부터, 전복 가수분해물을 포함하는 에멀전이 사골 육수의 짠맛을 증가시키는 것을 알 수 있었다. 따라서, 전복 가수분해물을 사용하여 음식의 짠 맛을 유지하면서 나트륨 함량은 낮출 수 있는 식염 대체제를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 11. Sensory test of beef bone broth added mixture and emulsion

	Salty intensity
Control	1.9 ± 1.2 ^b
Beef bone broth + Mixture A	3.7 ± 1.6 ^a
Beef bone broth + Emulsion B	2.5 ± 1.0 ^{ab}
Beef bone broth + Emulsion C	3.4 ± 0.8 ^a
Beef bone broth + Emulsion D	3.5 ± 1.6 ^a

^{a-b} Means with same alphabet in a column are not significantly different at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test.

(4) 전복 가수분해물이 포함된 저염 치즈의 관능평가

- 생치즈의 향미, 짠맛의 강도와 전체적인 선호도는 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 ($p > 0.05$), 짠맛 강도의 선호도는 C에서 가장 높은 것을 관찰할 수 있었다. 느끼함 정도는 에멀전을 첨가한 시료에서 다소 높은 값을 나타내었지만, A와 B는 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p > 0.05$).

Table 12. Sensory evaluation of fresh cheese added double emulsions

	Flavor	Salty intensity	Oiliness	Overall preference
Control	2.3 ± 1.0 ^a	2.6 ± 1.1 ^a	2.0 ± 1.2 ^b	2.5 ± 1.3 ^a
A	2.5 ± 1.2 ^a	3.0 ± 1.4 ^a	2.1 ± 0.4 ^b	2.2 ± 1.1 ^a
B	2.5 ± 1.2 ^a	2.4 ± 1.2 ^a	2.5 ± 1.3 ^b	2.7 ± 0.9 ^a
C	2.8 ± 1.3 ^a	2.0 ± 0.8 ^a	3.4 ± 0.8 ^a	2.6 ± 1.2 ^a

^{a-b} Means with different superscripts in each column are significantly different ($p < 0.05$).

Control, 1% NaCl solution;
A, W₁/O/W₂ emulsion (W₁, water; W₂, 1%NaCl solution);
B, W₁/O/W₂ emulsion (W₁, abalone extract solution; W₂, 1% NaCl solution);
C, W₁/O/W₂ emulsion (W₁, water; W₂, 1% NaCl solution added abalone extract solution).

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
1. 목표달성도	○ 연구개발 최종 목표에 준하여 나노입자 소금 및 염미 증진제 혹은 공정 과정에 따른 염미 증진 물질을 식품에 첨가한 제품에 대한 관능검사가 수행되었다.

뒷면지에 필요한 내용입니다.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.