

발간등록번호

11-1541000-000549-01

초고압 기술을 이용한 재래한식간장의 숙성 기간 단축
및 품질 향상에 관한 연구
(Studies on reduction of aging time and
quality improvement of Korean traditional soy sauce
using high pressure treatment)

고려대학교

농림수산식품자료실



0006058

농림수산식품부

20.7
5239天
2010-85

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “초고압 기술을 이용한 재래한식간장의 숙성 기간 단축 및 품질 향상에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010년 6월 24일

주관연구기관명 : 고려대학교

주관연구책임자 : 이철호

연 구 원 : 홍영식

연 구 원 : 고봉국

연 구 원 : 박병대

연 구 원 : 손홍석

연 구 원 : 안혁진

요 약 문

I. 제 목

초고압 기술을 이용한 재래한식간장의 숙성 기간 단축 및 품질 향상에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

재래한식간장의 건강기능성 특히 항암능력이나 면역증진 능력이 일본식간장보다 월등히 뛰어나다는 연구결과들이 보고되고 있으나 전통간장의 흑갈색은 음식에 검은색을 띠게 함으로 조미료로서의 사용을 제한하는 요소이다. 재래한식간장의 제조과정 중 초고압 처리에 의하여 색 품질 및 숙성을 촉진시켜 소금이나 일본식 간장에 대한 경쟁력을 높여 재래한식간장의 소비를 증대하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

장류 시장 중 가장 큰 비중을 차지하는 간장의 대부분은 우리나라 재래한식간장이 아닌 개량식 간장이 생산되고 있다. 이는 재래한식간장의 제조 과정이 까다롭고 공정화 되지 않았기 때문에 산업화에 어려움이 있고 현대 소비자의 맛이 개량식 간장에 길들여져 가고 있기 때문이다. 또한 재래한식간장의 달임공정에 의한 흑갈색화의 촉진은 소비자로부터 사용을 제한하는 요인이 된다. 따라서 재래한식간장의 품질을 향상 시켜 경쟁력을 높이기 위한 방안으로 간장의 숙성 과정 중 초고압 기술과 NMR 분석을 통해 최적 제조 공정을 확립하고, 이를 통해 간장 제품의 품질을 향상시켜 재래한식간장의 소비를 증진하고 나아가 훌륭한 우리의 전통식품을 보전, 발전시킬 수 있는 가능성을 조사하였다.

IV. 연구개발결과

재래한식간장의 제조과정 중 메주, 간장덧, 그리고 간장 제조 후 초고압 처리를 실시한 결과 액체상태 즉 간장에서 보다 고체상태인 메주에서 초고압 처리하는 것이 더 효과적이라는 결과를 얻었다. 간장 중 미생물은 염도에 따른 삼투압에 적응하면서 저항성이 높아져 초고압 처리에 대한 영향이 적었으며 또한 고체상태인 메주에서의 초고압 처리 효과가 더 뚜렷이 나타났다. 메주에 초고압을 처리함으로써 효소활성도가 증가하고 유리아미노산의 함량이 증가하였으며, 간장덧과 숙성과정을 거치면서 간장에서 유리아미노산의 함량이 증가하여 숙성을 촉진하는 것으로 나타났으며, 메주에 초고압을 처리함으로써 간장 덧과 간장 숙성 중 저장성을 부여함으로써 가열살균 공정을 대체하는 효과가 있어 가열살균공정에 의한 흑갈색화를 피할 수 있어 색 품질을 향상시켰다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

재래한식간장의 제조 과정 중 메주에 초고압을 실시함으로써 간장숙성기간 동안 숙성을 촉진하였고 가열 살균 공정을 초고압 처리로 대신함으로써 흑갈색을 저감화하여 색품질을 향상시킬 수 있다. 통상적인 가열살균공정으로 인해 흑갈색뿐 아니라 가열 동안 발생하는 증발에 의해 염도가 증가하게 된다. 그러나 초고압 처리를 함으로서 가열살균공정을 실시하지 않아도 저장성을 부여할 수 있고 재래한식간장을 저염화 할 수 있는 가능성을 제시하였다. 이 방법으로

재래한식간장의 색품질 및 숙성 촉진 그리고 저염화를 통해 소금, 개량식 간장 및 일본식 간장에 대한 경쟁력을 가질 수 있어 전통식품을 생산하는 기업에서 이 방법을 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

SUMMARY

I. Title

Studies on reduction of aging time and quality improvement of Korean traditional soy sauce using high pressure treatment

II. Purpose and Necessity of Research and Development

There have been reported that functionality of traditional Korean soy sauce was better than that of Japanese soy sauce, especially anti-cancer effect or immune enhancement. However, the dark brown color of traditional Korean soy sauce limited the use of it for seasoning because it made food dark. Therefore, We would like to use high pressure treatment in the period of a manufacturing process of Korean traditional soy sauce for improvement the color quality and aging and thus improve consumption of traditional Korean soy sauce

III. Contents and Ranges of Research and Development

The great part of the market of soy sauce was occupied by the modified soy sauce, not traditional one. It comes from the difficulty of industrialization because manufacturing process of traditional soy sauce is hard to make standardization and a modern consumers are familiar with modified soy sauce. Moreover, the promotion of dark brown color, which is due to boiling of soy sauce, was a factor for consumer limit to use. Therefore, we investigated use of high pressure treatment and NMR analysis during aging in soy sauce in order to establish the most suitable manufacturing process and for improve the quality of traditional soy sauce.

IV. Result of Research and Development

The high pressure (100 MPa ~ 400 MPa) was applied during manufacturing process of traditional *meju*, *ganjang dut* and soy sauce. A remarkable effect of high pressure treatment was observed in *meju* in solid status than soy sauce in liquid status. The microorganisms in soy sauce might be adapted to osmotic pressure and then improved the resistance. The high pressure treatment on *meju* caused increasing enzyme activity and free amino acids contents. Moreover, it improved storage capacity during aging period and could improve color quality because of substitution of heat-sterilization process.

V. Achievement of Research and Development and Design of Achievement Application

The high pressure treatment of *meju* of traditional Korean soy sauce could improve aging and color quality of the products, soy sauce with reducing dark brown color, as replacing heat-sterilization process. So, the high pressure technology could contribute development of traditional food manufacturing companies.

CONTENTS

Chapter 1. Summary of Research and Development Subject	11
Verses 1. Purpose, Necessity, and Range of Research and Development	11
1. Purpose of Research and Development	11
1. Necessity of Research and Development	11
A. Traditional Korean sauce market	11
B. Necessity for development of traditional Korean soy sauce	12
C. Using of high pressure treatment (HPT)	12
D. Use possibility of high pressure treatment for producing soy sauce	13
Chapter 2. Domestic and Foreign Technology Development	15
Verses 1. Application of High Pressure Technology	15
Chapter 3. Contents and Results of Research and Development	16
Verses 1. Components Changes of Soy sauce by High Pressure Treatment and Componential Analysis of Soy sauce according to Aging period <1 year>	16
1. Material and Methods	16
A. High pressure treatment of traditional Korean soy sauce	16
(1) Treatment at 100 MPa and room temperature (RT) for 24 hours and 48 hours ..	16
(2) Treatment at 200 MPa or 400MPa and RT for 20 min.	16
B. pH measurement	16
C. Titrable acidity measurement	16
D. Amino-type nitrogen measurement	17
E. Salinity measurement	17
F. Measurement degree of brown color	17
G. Total bacterial count measurement	17
H. Protease activities measurement	17
I. Free amino acid measurement	18
J. ¹ H-NMR spectroscopic analysis	18
2. Sterilization Effect of Microorganism on Soy sauce by High Pressure Treatment ..	18
A. Changes of total bacterial count after treatment at 100 MPa	18
B. Changes of total bacterial count after treatment at 200 MPa and 400 MPa	19
C. Conclusion	20
3. Study of Biochemical Changes of Soy sauce Components by High Pressure treatment	20
A. Effect of high pressure treatment (100 MPa) according to aging periods	20

(1) Changes in amino-type nitrogen	20
(2) Changes in free amino acids	21
B. Effect of high pressure treatment (200 MPa and 400 MPa) according to aging periods	21
(1) Changes in pH	21
(2) Changes in titratable acid	22
(3) Changes degree of brown color	22
(4) Changes in amino-type nitrogen	23
(5) Changes in neutral and alkaline protease activities	23
(6) Changes in free amino acids	23
C. Conclusion	24

4. Componential Analysis of Soy sauce according to Aging period through NMR analysis	24
A. Total microflora, pH and salt content in soy sauce	24
B. ¹ H NMR Spectroscopy of soy sauce	25
C. Variations in metabolites between unboiled and boiled soy sauces	27
D. Evolutions of metabolites during aging	29
E. Conclusion	29

Verses 2. Measurement of Quality Changes of Soy sauce during Manufacturing process by High Pressure Treatment <2 years>

1. Material and Methods	31
A. Experimental scheme of high pressure treatment after <i>ganjang-dut</i>	31
B. Experimental scheme of high pressure treatment on manufacturing process of traditional Korean <i>meju</i>	31
C. Experimental scheme of manufacturing process of traditional Korean soy sauce derived from HP-treated <i>meju</i>	32
D. High pressure treatment	33
E. pH measurement	33
F. Water contents measurement	33
G. Amino-type nitrogen measurement	34
H. Salinity measurement	34
I. Measurement degree of brown color	34
J. Total bacterial count measurement	34
K. Neutral and alkaline protease activities measurement	34
L. Reducing sugar measurement	35
M. Sensory evaluation	35
N. ¹ H-NMR spectroscopic analysis	35

2. Physicochemical Changes of Soy sauce during Aging by High Pressure Treatment after <i>Ganjang-dut</i>	35
A. Physicochemical changes of soy sauce during aging	36
B. Conclusion	37
3. Physicochemical Changes of <i>Meju</i> during Incubation by High Pressure Treatment ·	37
A. Changes in <i>mejues</i> during incubation	37
B. ¹ H NMR <i>mejues</i> spectra	39
C. Variation in metabolites in normal and HP-treated <i>meju</i>	40
D. Changes in metabolites of <i>mejues</i> during incubation by high pressure treatment	42
E. Conclusion	43
4. Physicochemical Changes of Soy sauce derived from HP-treated <i>Meju</i>	44
A. Changes in salinity, pH, amino-type nitrogen, and reducing sugar	44
B. Changes in chromaticity and degree of brown color	47
C. Changes in total bacterial counts	49
D. Variation in metabolites of soy sauce during <i>ganjang-dut</i> and aging period	51
(1) Changes in metabolites of soy sauce during <i>ganjang-dut</i>	51
(2) Changes in metabolites of soy sauce after <i>ganjang-dut</i> by heating process	53
(3) Changes in metabolites of soy sauce after aging period	53
(4) Sensory evaluation of soy sauce from normal <i>meju</i> and soy sauce from HP-treated <i>mejues</i>	55
E. Conclusion	56
Chapter 4. Accomplishment of objectives and contribution to correlated fields	57
Chapter 5. Achievement of Research and Development and Design of Achievement Application	58
Chapter 6. Foreign technology information collected on research and development process	59
Chapter 7. Reference	60

목 차

제 1 장. 연구개발과제의 개요	11
제 1절. 연구개발의 목적, 필요성 및 범위	11
1. 연구개발의 목적	11
2. 연구개발의 필요성	11
가. 우리나라 장류 시장 현황	11
나. 재래한식간장 발전의 필요성	12
다. 초고압기술의 이용현황	12
라. 초고압기술의 간장제조에의 이용 가능성	13
 제 2 장. 국내외 기술개발 현황	 15
제 1 절. 초고압 기술 응용 현황	15
 제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과	 16
제 1 절. 초고압처리에 의한 간장의 성분 변화 및 숙성 기간에 따른 성분 비교 분석 <1차년도>	 16
1. 연구 범위 및 연구수행 방법	16
가. 한식재래간장의 초고압 처리	16
(1) 100 MPa에서 24시간 및 48시간 상온에서 처리	16
(2) 200 MPa, 400MPa에서 20분간 상온에서 처리	16
나. pH 측정	16
다. 적정산도 측정	16
라. 아미노태질소 측정	17
마. 염도 측정	17
바. 갈색도 측정	17
사. 총균수 측정	17
아. 단백질분해효소 활성도 측정	17
자. 유리아미노산 농도 측정	18
차. NMR을 이용한 대사산물의 분석	18
2. 초고압처리에 의한 간장중의 미생물 살균 효과	18
가. 100 MPa 처리 후 총균수 변화	18
나. 200 MPa 및 400 MPa 처리 후 총균수 변화	19
다. 결론	20
3. 초고압처리에 의한 간장 성분의 생화학적 변화에 관한 연구	20
가. 숙성 기간에 따른 초고압 효과(100 MPa)	20

(1) 아미노태질소 변화	20
(2) 유리아미노산 변화	21
나. 숙성 기간에 따른 초고압 효과(200 MPa 및 400 MPa)	21
(1) pH 변화	21
(2) 적정산도 변화	22
(3) 갈색도 변화	22
(4) 아미노태질소 변화	23
(5) 중성 및 알칼리성 단백질분해효소 활성화도 변화	23
(6) 유리아미노산 변화	23
다. 결론	24
4. 숙성 기간에 따른 일반간장의 NMR 분석을 통한 성분비교 분석	24
가. 간장 중 총균수, pH 및 염도	24
나. 간장의 ¹ H NMR Spectroscopy	25
다. 비달임 간장과 달임 간장의 대사산물의 변화	27
라. 숙성 중 대사산물들의 변화	29
마. 결론	29
제 2 절. 간장 제조 과정 중 초고압 처리에 따른 품질 변화 측정 <2차년도>	31
1. 연구 범위 및 연구수행 방법	31
가. 간장덧 이후 초고압 처리 실험 모식도	31
나. 재래메주의 제조 및 초고압 처리 실험 모식도	31
다. 초고압 처리 메주를 이용한 간장 제조 실험 모식도	32
라. 초고압 처리	33
마. pH 측정	33
바. 수분함량 측정	33
사. 아미노태질소 측정	34
아. 염도 측정	34
자. 갈색도 측정	34
차. 총균수 측정	34
카. 중성 및 알칼리성 단백질분해효소 활성화도 측정	34
타. 환원당 측정	35
파. 관능평가	35
하. NMR을 통한 대사산물의 측정	35
2. 간장덧 이후 초고압 처리에 의한 숙성 중 이화학적 변화	35
가. 간장 숙성 중 이화학적 변화	36
나. 결론	37
3. 메주의 초고압 처리에 의한 저장 중 이화학적 변화	37

가. 메주의 저장 중 변화	37
나. 메주의 ¹ H NMR spectra	39
다. 초고압 처리 메주와 일반메주의 저장 중 대사산물의 변화	40
라. 초고압 처리에 의한 저장 기간 동안 메주의 대사산물의 변화	42
마. 결론	43
4. 초고압 처리한 메주로 제조한 간장의 이화학적 변화	44
가. 염도, pH, 아미노태질소 및 환원당의 변화	44
나. 갈색도 및 색도 변화	47
다. 총균수 변화	49
라. 간장 덧 및 간장 숙성 기간 동안 대사산물의 변화	51
(1) 간장덧 발효 기간 동안 대사산물의 변화	51
(2) 간장덧 이후 간장의 달임공정에 의한 대사산물의 변화	53
(3) 숙성 후 간장의 대사산물 변화	53
(4) 일반간장과 초고압 메주간장의 관능평가	55
마. 결론	56
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	57
제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획	58
제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	59
제 7 장. 참고문헌	60

제 1 장. 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 목적, 필요성 및 범위

1. 연구개발의 목적

재래한식간장의 건강기능성 특히 항암능력이나 면역증진 능력이 일본식간장보다 월등히 뛰어나다는 연구결과들이 보고되고 있으나 전통간장의 흑갈색은 음식에 검은색을 띠게 함으로 조미료로서의 사용을 제한하는 요소이다. 재래한식간장의 제조과정 중 초고압 처리에 의하여 색 품질 및 숙성을 촉진시켜 소금이나 일본식 간장에 대한 경쟁력을 높여 재래한식간장의 소비를 증대하고자 한다.

2. 연구개발의 필요성

가. 우리나라 장류 시장 현황

최근 5년 동안 우리나라의 장류 시장을 살펴보면(Table 1) 된장이나 고추장에 비해 간장의 생산량이 가장 크게 나타났다. 이는 간장이 된장이나 고추장에 비해 우리 식탁에서 더욱 많이 소비되는 것을 의미하며 중요한 위치를 차지하는 것을 나타낸다.

Table 1. 최근 5년간 장류 생산 실적 현황 (단위 : kl, ton)

년도 \ 품목	간장	된장	고추장
2005	201,942	162,694	151,882
2006	191,202	159,518	161,008
2007	217,817	163,871	168,705
2008	225,924	164,469	163,004
2009	227,241	154,711	164,347

자 료 : 대한장류공업협동조합¹⁾

장류 시장 중 가장 큰 비중을 차지하는 간장의 종류별 판매량(Table 2)을 살펴보면 2006년도에 대부분은 혼합간장이 약 58%로 시장의 대부분을 차지하고, 다음으로 양조간장 약 22%, 산분해간장이 약 18% 순으로 나타나고 있으며 한식간장은 약 1%정도로 판매량이 매우 적은 것을 알 수 있다.

Table 2. 간장 종류별 판매량 (단위 : ton)

년도	한식간장	양조간장	산분해간장	혼합간장	계
2004년	1,722 (0.8%)	54,868 (25.1%)	41,457 (19.0%)	120,407 (55.1%)	218,454
2005년	2,114 (0.9%)	51,710 (22.4%)	36,368 (15.8%)	140,187 (60.9%)	230,379
2006년	2,538 (1.0%)	57,760 (22.3%)	46,969 (18.1%)	151,822 (58.6%)	259,089

간장의 소비 실태를 조사한 결과 50세 이상의 주부들은 간을 맞추는데 재래한식간장의 사용비율이 35~42%였으나 50세 이하의 주부들은 재래한식간장의 사용비율이 8~14%로 급격히 감소하고, 반면 소금의 사용비율은 50세 이상에서 21~40%였고 50세 이하의 주부들은 71~72%로 나타났다(Table 3)³⁾.

Table 3. 음식의 간을 맞출 때 가장 많이 사용되는 조미식품에 대한 조사 (단 위 : %)

구 분	소 금	재래한식간장	시판간장	χ^2 -Test	
연 령	20~29세	71.1	7.9	21.1	***
	30~39세	72.3	8.0	19.6	***
	40~49세	62.7	13.6	23.7	***
	50~59세	40.0	35.0	25.0	***
	60세 이상	21.2	42.4	36.4	***
계	59.6	17.0	23.4		

*** : $\alpha=0.001$

나. 재래한식간장 발전의 필요성

간장 시장의 약 20%를 차지하는 양조간장 중에서도 산업체에서 생산되는 것은 대부분은 우리나라 재래한식간장이 아닌 개량식 간장이 생산되고 있으며, 현대인들의 기호도 개량식 간장에 길들여져 가고 있는 실정이다.

비교적 젊은 층에서 재래한식간장의 사용비율이 감소하고 소금의 사용비율이 증가하는 이유는 다음과 같다⁴⁾.

- 한식간장 특유의 흑색에 가까운 진한 흑갈색과 관련이 있다.
- 젊은 세대들이 재래한식간장 특유의 향취를 낯설어 하면서 이를 이취로 인식하는 경향이 있기 때문이다.
- 재래한식간장은 적게 사용하여도 음식에서 흑갈색의 짙은 색을 내게 되어 음식 고유의 색을 내지 못하므로 간장의 사용을 회피하게 된다.

이러한 이유로 인하여 전통적인 재래한식간장의 사용이 감소하는 것은 매우 안타까운 일이며 전통적인 방법을 고수하는 재래한식간장의 제조업체들에게도 큰 어려움이 되고 있다. 그러므로 재래한식간장의 진한 맛과 특유의 향미를 살리면서 흑색의 발현을 저감하는 기술을 개발하는 것이 매우 중요한 과제로 남고 있다.

다. 초고압기술의 이용현황

1899년 Hite⁵⁾에 의해 압력을 이용한 식품가공이 시도된 이래 1980년대까지 압력과 식품을 접목시키려는 시도는 많지 않았다. 그러나 1980년대 이후 식품가공에 이용할 수 있는 초고압기의 제조가 가능해지면서 압력을 식품에 이용하는 연구가 본격적으로 시작되었고⁶⁾ 일본에서는 시간당 6톤의 처리 능력을 가진 초고압 시스템이 개발되어 고압살균법에 의한 과즙 생산이 가

능해졌다. 잼이나 열대 과실가공에도 이용되어 가열처리를 대체한 비열처리 제품으로 판매가 시작되었고⁷⁾, 이러한 초고압기술에 의한 식품의 비가열 살균 및 품질개량은 지난 20년간 꾸준히 연구되어왔다. 소량의 시료를 회분식 방법에 의하여 처리하던 초기 단계에서 대용량 초고압 처리 시설이 제작되어 다양한 식품산업에서 이용되고 있으며 자동화 연속공정이 가능한 초고압처리 시설들이 고안되고 있으며, Kobe Steel Ltd.는 작은 테스트 압력용기와 내부 부피의 용적이 9400ℓ 그리고 200 MPa의 최고 작동 압력을 가지는 현재 이용 가능한 가장 큰 압력 용기 중 하나를 개발하였다⁸⁾.

초고압처리에 의한 살균효과 이외에도 화학반응 촉진작용, 특히 가수분해 속도 증진과 분해산물의 재합성 또는 에스테르화의 촉진 효과가 최근의 연구 결과에서 밝혀지고 있다. Cheddar cheese의 경우 50 MPa에서 3일간 처리하였을 때 전통적인 방법으로 6개월 동안 숙성시킨 효과가 있다는 보고가 있었고⁹⁾, 치즈를 제조 시 400 MPa에서 5분간 처리하였을 때 카세인의 가수분해를 촉진시키고 총유리아미노산의 양은 증가시켰으나 맛과 향에는 영향을 미치지 않았다고 보고하였다¹⁰⁾. 그리고 기존의 열처리에 비해 초고압 처리가 갖는 주요 장점으로서는 다음과 같은 것들이 제시되었다^{11~14)}.

- 열처리가공에 비해 현저히 적은 열에너지를 소비하며, 상온 또는 저온에서 실행 가능함
- 고압 살균처리 된 식품은 천연의 맛과 향미, 색, 신선도를 유지 할 수 있음
- 모든 방향에서 압력이 균일하게 작용하므로, 처리 정도의 차이가 존재하지 않음
- 미생물 사멸 외에도 단백질의 변성 또는 변형, 효소활성화 또는 불활성화, 기질특이성변화, 탄수화물과 지방의 특성 변화 등을 유도할 수 있음
- 공유결합이나 수소결합에 영향을 주지 않음
- 초고압 가동처리는 플라스틱필름과 같은 파우치형태의 bag을 이용할 수 있어 공정을 용이하게 할 수 있음

최초의 초고압가공식품은 1990년 일본에서 출시되었다. 그 후 미국, 프랑스, 스페인 등에서도 초고압기술에 관심을 갖고 신제품을 하나둘씩 내놓았다. 고압장치를 제조하는 기술적인 측면에 다소 어려움이 있어 초고압기술을 산업화하는데 제한을 받았으나 최근에는 여러 국가에서 초고압기술을 산업적으로 사용하고 있는 추세이다. 또한, 초고압기술은 비가열처리로 살균을 가능하게 하여 그 이용 분야를 넓혀 왔지만, 현재는 살균의 목적 외에도 앞서 언급한 다양한 효과를 얻기 위해 초고압가공기술을 이용하고 있다. 앞으로는 초고압기술과 다른 가공기술의 접목을 통해 우리가 원하는 효과를 극대화할 수 있을 것이다. 세계적으로 초고압에 대한 관심이 더욱 커져가고 있는 상황이므로 식품산업에 대한 초고압가공기술의 적용범위는 점차 넓어질 것으로 예상된다⁷⁾.

라. 초고압기술의 간장제조에의 이용 가능성

간장제조는 미생물 발효에 의하여 콩의 단백질, 탄수화물, 지방 등 주요성분들을 분해하고 재합성하여 흑갈색의 정미물질을 만드는 과정이다. 산업화된 일본식 간장은 찐 밀이나 쌀에 *Asp. oryzae*를 순수 접종하여 만든 코오지를 삶은콩과 혼합하여 통제발효(controlled fermentation)를 함으로 맛이 담백하고 색깔이 적갈색으로 음식에 사용하기에 적합하고 주로 테이블용(dipping) 소오스로 사용된다¹⁵⁾. 전통한식간장은 메주를 사용하는 자연발효(natural fermentation)임으로 여러 가지 발효균들이 관여하며 특히 *Bacillus subtilis*의 강력한 단백질 분

해력으로¹⁶⁾ 인해 암모니아를 포함하는 강한 자극취를 가지므로 주로 국간장으로 제한적으로 사용된다. 그러나 최근 재래한식간장의 건강기능성 특히 항암능력이나 면역증진 능력이 일본식간장보다 월등히 뛰어나다는 연구결과들이 보고되고 있다^{17, 18)}. 이것은 자연발효에 의한 다양한 미생물들의 작용에 기인한 것으로 보인다.

이와 같이 우수한 우리의 전통 장류의 소비를 촉진하기 위하여 무엇보다 먼저 해결해야 하는 문제는 재래한식간장의 흑갈색을 낮추어야 한다. 전통간장의 흑갈색은 음식에 검은색을 띠게 함으로 조미료로서의 사용을 제한하는 요소이다. 재래한식간장은 적게 사용하여도 음식에서 흑갈색의 짙은 색을 내게 되어 음식 고유의 색을 내지 못하므로 간장의 사용을 회피하게 된다⁴⁾.

한식간장 특유의 흑갈색을 나타내는 물질로 마이알 반응의 산물인 melanoidin 물질에 의한 것으로 보고되고 있다. 메주 중에 형성된 색소가 침지기간 중 간장으로 용출되거나 간장 발효시 생성되는 carbonyl화합물과 amino acid, peptide, protein등의 amino화합물을 기질로 하는 마이알 반응을 통해 간장의 색이 형성된다¹⁹⁾. 이러한 갈변반응은 메주의 제조과정이나 간장 덧의 침지과정, 장을 달이는 가열과정 그리고 숙성과정을 통해서 진행되는데 이 중 간장의 장기 보존을 위해 가열 살균하는 공정에서 흑색이 심화된다. 적당한 갈변은 간장의 색과 향기를 좋게 하여 간장의 품질을 향상시키나 지나친 갈변은 영양성분을 감소시키고 맛이나 향기에 나쁜 영향을 끼쳐 간장의 품질을 저하시키는 요인이 된다²⁰⁾. 따라서 간장을 오래 끓여 달이는 공정을 초고압 처리공정으로 대체한다면 전통간장의 색도를 일식간장 수준으로 낮출 수 있을 것으로 판단된다,

조선간장은 10년, 20년 장기 저장된 간장일수록 그 맛이 뛰어나 고가로 팔리고 있다. 이것은 장기 저장 중에 일어나는 생화학적 분해, 합성, 전위 반응으로 다양한 화합물들이 만들어지기 때문이다. 초고압처리는 이러한 생분해, 합성, 전위반응을 가속화 할 수 있는 공정으로 간장의 장기저장 효과를 단시간에 이룰 수 있는 가능성도 있을 것으로 사료된다.

제 2 장. 국내·외 기술개발 현황

제 1 절. 초고압 기술 응용 현황

초고압 기술은 풍미와 조직감을 유지하고 천연물 추출공정에도 이용되며, 미생물과 효소를 불활성화 시켜 살균 효과를 낼 목적으로도 사용된다. Skimmed milk에서 *E. coli* K12를 불활성시키기 위해, cooked ham에서 *Salmonella* sp를 억제하기 위해서 사용되고 포도 껍질에서 anthocyanins을 추출하기 위해 이용되고 있다.

우리나라에서 초고압 기술에 대한 연구는 많이 이뤄지지 않고 있으며 와인, 좁쌀 탁주, 돈육, 미생물 살균 및 고추장 등에서 연구가 있었으나 그 편수가 많지 않고 우리나라에서 초고압 기술을 써서 상품화한 경우를 보면 D기업에서 초고압 기술을 이용하여 즉석밥을 제조하여 시판하고 있다. 최근 국내에서는 대나무에서 항산화활성물질을 추출하거나, 굴의 저장성을 증진하기 위해, 그리고 인삼을 가공하는 방법으로도 연구되고 있다(Table 4).

재래한식간장의 품질을 개선하고 제품의 균일화를 위한 연구노력은 있었지만 지역마다의 특색과 담그는 방법이 달라 적용이 어렵다. 그리고 초고압 등과 같은 최신기술을 간장에 도입하여 숙성 기간의 단축과 품질 향상에 대한 평가는 이뤄지지 않은 실정이다.

Table 4. 국내 초고압관련 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
한국식품연구원(한국)	초고압에 의한 신선육 및 가공육의 저장성 향상에 관한 연구 ²¹⁾	식육의 숙성 기간 단축 및 냉장육의 유통기한 연장, 대외 경쟁력 향상
(주)건국유업, 건국햄(한국)	High pressure Low temperature 기술을 이용한 새로운 축산식품 가공처리 기술개발 ²²⁾	
경원대학교, 제주대학교(한국)	초고압 처리한 좁쌀약주의 저장 중 미생물수, 효소활성 및 품질변화 ²³⁾	품질 변화를 줄이고 저장성 있는 전통주의 개발
이화여자대학교 (주)동원 F&D(한국)	초고압 처리 즉석밥의 생물학적 특성 ²⁴⁾	즉석밥의 생물학적 특성을 살표봄으로서 새로운 즉석밥 개발

제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 초고압처리에 의한 간장의 성분 변화 및 숙성 기간에 따른 성분 비교 분석 <1차년도>

1. 연구 범위 및 연구수행 방법

가. 한식재래간장의 초고압 처리

(1) 100 MPa에서 24시간 및 48시간 상온에서 처리

고려대학교 보건대학에 있는 초고압장치(TOYO KOATSU., LTD) (Figure 1A)를 이용하였으며, 이 기기는 처리용량은 2 ℓ, 압력은 0~100 MPa, 처리시간은 0~99시간, 온도는 0~75℃의 범위에서 처리할 수 있으며, 재래한식간장에 초고압 처리 시 조건은 100 MPa, 35℃에서 각각 24시간, 48시간을 처리하였다.

(2) 200 MPa, 400MPa에서 20분간 상온에서 처리

전라남도 나주에 소재한 생물산업지원센터에 있는 초고압장치(Avure Technologies AB, Sweden) (Figure 1B)를 이용하였으며, 이 기기의 처리용량은 35 ℓ, 압력은 0~600 MPa, 처리시간은 20분, 온도는 0~50℃의 범위에서 처리할 수 있으며, 재래한식간장에 초고압 처리 시 조건은 200 MPa과 400 MPa에서 20분간 상온에서 처리하였다.



A



B

Figure 1. 초고압 장치 (A: 고려대학교 보건대학 소재, B: 전남 나주 생물산업지원센터 소재)

나. pH 측정

pH meter (ORION 3 Star, Thermo Scientific.USA) 이용하여 재래한식간장의 초고압 처리 전·후 pH를 측정하였다.

다. 적정산도 측정

간장 10 ml를 증류수 10 ml와 혼합한 후 0.1 N NaOH로 pH8.3이 되도록 적정하여 소모된

ml수로 나타 내었다.

라. 아미노태질소 측정

아미노태질소는 Formol 적정법에 의해 측정하였다. 200~300 ml 삼각플라스크를 2개 준비하여 양쪽에 간장 5 ml를 취해 증류수로 희석하여 250 ml로 정용한 시료용액 25 ml를 홀피펫으로 취하였다. 한쪽에 중성 formalin 용액 20 ml와 물 20 ml를 메스실린더를 사용하여 가하고 다른 쪽은 공시험으로서 물 40 ml를 가하고 phenolphthalein 약 6방울을 가하여 0.05N NaOH 용액으로 적정하였다. 착색되어 있는 시료는 적정의 종말점을 찾기 어려우므로 공시험이 홍색을 나타낼 때까지 적정하여, 이것을 기준으로 하여 본 시험도 같은 색이 될 때까지 적정하여 아미노태질소는 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{아미노태 질소(\%)} = (V_1 - V_0) \times F \times 0.0007 \times D \times \frac{100}{S}$$

V1 : 본시험 적정소비량(ml),

V0 : 공시험 적정소비량(ml),

F : 0.05N NaOH 용액의 역가,

D : 희석배수, S : 시료의 채취량(g)

0.0007 : 0.05N NaOH 용액 1 ml에 상당하는 질소량(g)

마. 염도 측정

SALT. Meter TM-30D를 이용하여 재래한식간장의 초고압 처리 전 후의 염도를 측정하였다.

바. 갈색도 측정

재래한식간장 5 ml를 취하여 증류수로 50배 희석한 다음 이 액을 UV-visible spectrophotometer (SHIMADZU, JAPAN)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

사. 총균수 측정

간장을 0.1% peptone solution을 이용하여 희석하였고 Plate Count Agar (Difco)를 이용하여 30℃에서 48시간 배양 후 colony를 계수하였다.

아. 단백질분해효소 활성도의 변화 측정

간장의 중성 단백질 분해효소활성도는 간장 시료를 증류수로 10배 희석한 후 조효소액으로 사용하였다. 0.1M phosphate buffer pH 7.0 100 ml에 1 g Hammersten casein을 녹인 다음 이 용액 3 ml을 37℃ 항온수조에서 예열을 하고 10배 희석한 간장시료의 20mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)가 되도록 PMSF를 첨가한 후 10배 희석한 간장시료 0.1 ml을 첨가하여 20분간 반응시킨 다음 5 ml TCA (Trichloroacetic acid)를 첨가하여 효소반응을 정지시킨 후 Whatman No. 5로 여과한 여액을 275 nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard는 tyrosine을 사용하였다.

간장의 알칼리성 단백질 분해효소활성도 측정 역시 간장 시료를 10배 희석한 후 사용하였다. 20 mM이 되게 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)를 첨가한 0.2M borate buffer pH

10.0 100 ml에 1 g Hammersten casein을 녹인 다음 이 용액 3 ml을 37°C 항온수조에서 예열을 하고 10배 희석한 간장시료 0.1 ml을 첨가하여 20분간 반응시킨 다음 5 ml TCA를 첨가하여 효소반응을 정지시킨 후 Whatman No. 5로 여과한 여액을 275 nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard는 tyrosine을 사용하였으며, 효소활성도는 다음 식에 의해 계산하였다.

$$Activity(Unit/ml) = tyrosine(\mu g/ml) \times \frac{1}{reaction\ time(min)} \times \frac{1}{enzyme\ vol(ml)}$$

자. 유리아미노산 농도 측정

유리아미노산의 변화를 간장을 OPA (o-phthaldehyde) Amino acid analysis에 따라 HPLC를 이용하여 측정하였다. 간장시료를 1000배 희석하여 0.2 μ m membrane filter로 여과한 후 20 μ l를 HPLC로 측정하였다. Gilson HPLC를 사용하였고 column은 Nova-pak C₁₈ column 3.9×150 mm, 유속은 1.5 ml/min, detector는 fluorescence detector이고 Ex/Em = 338 nm/445 nm 이었다. Derivatization은 20 μ l 시료에 40 μ l Iodoacetic acid를 첨가한 후 40 μ l OPA를 첨가하여 2분간 정확히 반응시킨 후 injector로 주입하였다.

차. NMR을 이용한 대사산물의 분석

120 μ L의 간장, 420 μ L의 인산완충용액(0.2M sodium phosphate, pH 5.0), 그리고 60 μ L의 D₂O(99.9% deuterium oxide)를 혼합한 후 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액 550 μ L를 취하여 5-mm NMR tube로 옮긴 후 Varian Inova-600MHz NMR spectrometer(Varian Inc., Palo Alto, CA)를 이용하여 ¹H NMR spectra를 얻었다.

모든 NMR spectra는 VnmrJ software 2.1B(Varian Inc., Palo Alto, CA)를 이용하여 phase와 base line을 조정한 후 ASCII format으로 전환하였다. ASCII file은 MATLAB(R2006a, Mathworks Inc., 2006)에서 importing 하여 NMR spectra를 0.001-ppm의 spectra buckets으로 reducing 한 후 Correlation Optimized Warping(COW) 방법을 이용하여 모든 spectra를 정렬하였다. Water(4.6-4.8ppm) 지역은 spectra 정렬 전에 제거하였다. 정렬된 데이터는 total spectra area 혹은 median peak height로 normalization 시켰다. 결과 데이터는 SIMCA-P version 12.0(Umetrics, Umea, Sweden)을 이용하여 주성분분석(PCA)을 실행하였다.

2. 초고압처리에 의한 간장중의 미생물 살균 효과

가. 100 MPa 처리 후 총균수 변화

햇간장, 1년, 2년, 12년 숙성 재래한식간장에 100 MPa, 35°C에서 24시간과 48시간 처리 후 총균수의 변화를 Figure 2에 나타 내었다. 간장별로 총균수는 햇간장, 1년, 2년 그리고 12년 숙성간장의 순으로 각각 $5.0 \pm 0.6 \times 10^6$, $5.1 \pm 0.2 \times 10^4$, $3.0 \pm 0.9 \times 10^3$ 그리고 $1.6 \pm 0.3 \times 10^2$ cfu/ml으로 햇 간장에서 가장 많이 나타나 숙성이 진행됨에 따라 총균의 수가 감소하는 경향을 보였다. 100 MPa, 35°C에서 24시간처리 후 간장에서의 총균수의 변화는 각각의 간장에서 작은 폭으로 감소하는 경향을 보였으며 100 MPa, 35°C에서 48시간처리 후에는 각각 $4.0 \pm 0.1 \times 10^5$, $1.2 \pm 0.2 \times 10^3$, $3.7 \pm 0.5 \times 10^1$ 그리고 $3.7 \pm 1.5 \times 10^1$ cfu/ml으로 감소하였다. 처리 시간이 증가함에 따라 총균수는 감소하였고, 12년 숙성 간장의 경우 그 감소폭이 가장 적었으며,

다음으로 햇 간장, 1년 숙성 그리고 2년 숙성간장의 순으로 감소폭이 컸으나 그 감소폭에서는 큰 차이를 나타내지는 않았다. 본 실험에서 초고압처리에 의해 총균수가 어느 정도 감소하는 것으로 나타났고, 처리 시간이 증가함에 따라서도 더욱 감소하는 것으로 나타났다.

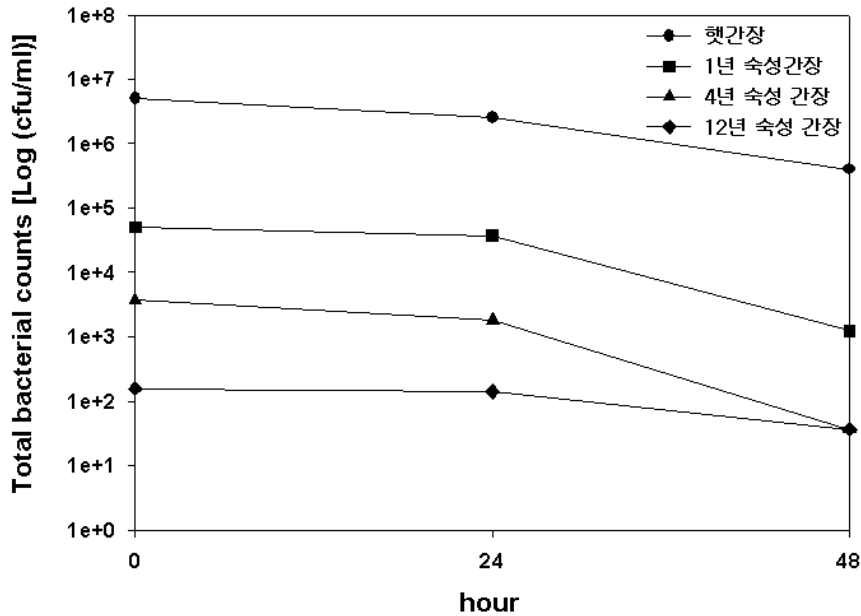


Figure 2. 재래한식 간장에서 초고압 처리(100 MPa, 35°C, 24시간 및 48시간)에 따른 총균수 변화

나. 200 MPa 및 400 MPa 처리 후 총균수 변화

햇간장과 1년 숙성 재래한식간장에 상온에서 20분간 200 MPa 및 400 MPa로 처리한 후 총균수의 변화를 Figure 3에 나타 내었다. 햇간장은 초기 $2.3 \pm 0.1 \times 10^7$ cfu/ml이었고 200 MPa와 400 MPa에서 초고압 처리 한 후 각각 $1.7 \pm 0.1 \times 10^7$ cfu/ml과 $1.4 \pm 0.2 \times 10^7$ cfu/ml로 나타났다. 1년 숙성 간장에서는 초기 $1.3 \pm 0.1 \times 10^4$ cfu/ml이었고 200 MPa와 400 MPa에서 초고압 처리 한 후 각각 $1.2 \pm 0.1 \times 10^4$ cfu/ml과 $8.8 \pm 0.6 \times 10^3$ cfu/ml으로 나타났다. 재래한식간장을 상온에서 200 MPa와 400 MPa에서 20분간 처리한 후 압력이 증가함에 따라서 총균수가 다소 감소하는 경향을 보였으나 감소폭이 크지는 않았다.

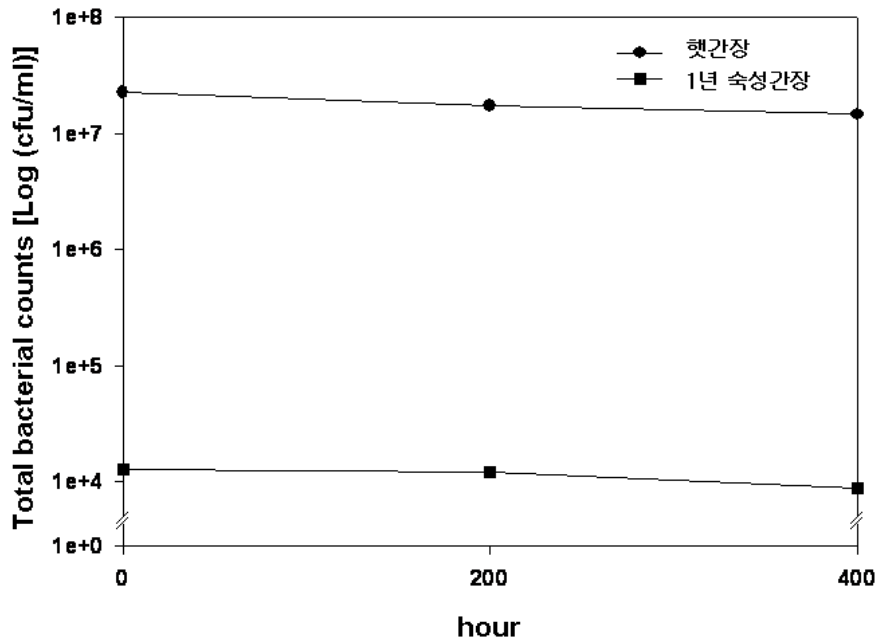


Figure 3. 재래한식간장에서 초고압 처리(200 MPa 및 400 MPa, 상온, 20분)에 따른 총균수 변화

다. 결론

재래한식간장에 초고압을 처리했을 때 총균수의 변화를 측정하였는데 상온에서 20분간 200 MPa와 400 MPa로 처리한 것보다 처리 시간이 상대적으로 길었던 100 MPa에서 48시간 처리했을 때 좀 더 총균수가 감소하는 것으로 나타났으나 그 감소폭 또한 크지 않았다. 따라서 본 실험에서 실시 한 초고압 처리의 조건은 간장의 총균수의 변화에 큰 영향을 미치지 않았으며 좀 더 높은 처리 조건 또는 간장 제조 중 초고압 처리를 실시 등 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 고려되어 진다.

3. 초고압처리에 의한 간장 성분의 생화학적 변화에 관한 연구

가. 숙성 기간에 따른 초고압 효과(100 MPa)

(1) 아미노태질소 변화

햇, 1년, 4년, 12년 숙성 재래한식간장에 100 MPa, 35°C에서 24시간과 48시간 처리 후 아미노태질소의 변화를 Table 4에 나타 내었다. 숙성기간이 증가함에 따라서 햇, 1년, 4년 그리고 12년 간장에서 각각 0.40, 0.51, 0.69 그리고 1.55% g/ml로 아미노태질소 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 그리고 재래한식간장에 100 MPa에서 24시간 및 48시간 초고압 처리 이후에 아미노태질소의 함량이 소량 증가하였지만 별다른 차이를 타나내진 않아서 100 MPa에서 초고압 처리 시간이 증가하여도 간장의 아미노태질소에 커다란 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

Table 4. 재래한식간장에 100 MPa, 35°C, 24시간과 48시간 처리 후 아미노테질소의 변화

(단위 : % g/ml)

	0 hr	24 hr	48 hr
햇 간장	0.40 ± 0.01	0.40 ± 0.01	0.41 ± 0.01
1년 간장	0.51 ± 0.01	0.52 ± 0.01	0.53 ± 0.01
4년 간장	0.69 ± 0.00	0.70 ± 0.01	0.71 ± 0.01
12년 간장	1.55 ± 0.01	1.55 ± 0.01	1.55 ± 0.01

(2) 유리아미노산 변화

햇, 1년, 4년, 12년 숙성 재래한식간장에 100 MPa, 35°C에서 24시간과 48시간 처리 후 유리아미노산의 변화를 Table 5에 나타 내었다. 유리아미노산 함량 역시 위에서 언급한 아미노테질소와 비슷하게 숙성 기간이 증가함에 따라서 햇, 1년, 4년 및 12년 간장에서 각각 1627.28, 2443.84, 2918.06, 5591.35 mg/100ml로 증가하는 것으로 나타났다. 그리고 재래한식간장에 100 MPa에서 24시간 및 48시간 초고압을 처리한 결과 각각의 간장에서 큰 차이는 아니지만 다소 증가하는 경향을 보여 초고압 처리가 재래한식간장의 유리아미노산 함량에 영향을 미치는 것으로 생각되었지만 100 MPa의 압력이 유리아미노산 함량을 변화시키는 데는 다소 낮은 것으로 고려되어진다.

Table 5. 재래한식간장에 100 MPa, 35°C, 24시간과 48시간 처리 후 유리아미노산 변화

(단위 : mg/100ml)

	햇 간장			1년 간장			4년 간장			12년 간장		
	0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr
Asp	76.75	78.48	79.50	46.61	47.22	48.28	112.74	114.71	116.71	235.97	239.00	242.06
Glu	364.93	373.16	381.39	588.93	601.92	615.50	639.73	650.89	662.24	1600.13	1638.69	1678.18
Cys	40.48	41.17	41.88	31.00	31.53	32.07	17.91	15.29	13.06	0.00	12.44	12.64
Ser	101.50	101.70	103.99	89.36	91.38	91.56	40.31	41.20	42.11	84.99	84.06	83.13
His	93.34	91.01	92.18	92.72	93.91	91.56	90.31	91.49	92.67	161.34	165.27	169.30
Gly	71.17	82.14	83.57	135.16	137.52	158.69	116.45	99.22	84.53	263.09	266.51	269.97
Thr	77.21	78.22	33.48	107.96	46.21	46.81	63.13	62.50	61.88	130.44	132.72	135.03
Arg	82.44	84.26	85.73	80.55	81.96	83.76	77.25	77.40	77.55	77.92	79.80	81.72
Ala	151.23	153.86	156.50	429.41	436.78	444.39	578.10	585.61	593.21	994.32	1012.81	1031.65
Tyr	71.11	72.67	72.81	146.72	147.00	150.24	251.05	255.36	259.74	419.44	420.25	421.05
Met	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Val	105.41	101.61	102.93	156.11	158.14	152.44	239.28	244.56	249.95	452.44	453.03	453.62
Phe	116.27	127.90	130.78	137.72	140.82	154.91	157.21	159.23	161.27	284.41	211.65	232.82
Ile	100.87	102.60	123.12	155.15	186.18	189.38	216.53	220.24	224.01	364.93	374.94	385.23
Leu	174.57	176.83	194.52	246.43	271.08	274.60	318.05	318.66	319.27	521.93	480.18	441.77
Lys	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Total	1627.28	1665.61	1682.38	2443.84	2471.63	2534.19	2918.06	2936.34	2958.21	5591.35	5571.34	5638.18

나. 숙성 기간에 따른 초고압 효과(200 MPa and 400 MPa)

(1) pH 변화

햇 간장과 1년 숙성 재래한식간장에 상온에서 20분간 200 MPa 및 400 MPa로 처리한 후

pH의 변화를 Table 6에 나타 내었다. 햇 간장과 1년 숙성 간장에서 200 MPa와 400 MPa로 처리한 결과 pH의 변화는 나타나지 않았다. 따라서 200 MPa와 400 MPa의 압력에서의 20분간 처리 시 재래한식간장에 영향을 주지는 못했다.

Table 6. 재래한식 간장에서 초고압 처리(200 MPa 및 400 MPa, 상온, 20분)에 따른 pH 변화

	무처리	200 Mpa	400 Mpa
햇 간장	4.96 ± 0.02	4.96 ± 0.01	4.96 ± 0.02
1년 간장	4.90 ± 0.03	4.89 ± 0.02	4.89 ± 0.03

(2) 적정산도 변화

햇 간장과 1년 숙성 재래한식간장에 상온에서 20분간 200 MPa 및 400 MPa로 처리한 후 적정산도의 변화를 Table. 7에 나타 내었다. 햇 간장의 경우 초기 22.95에서 200 MPa와 400 MPa에서 처리한 결과 23.50과 23.8로 다소 증가하는 것으로 나타났으나, 1년 숙성 간장에서는 초기 19.78에서 200 MPa와 400 MPa에서 처리한 결과 19.24와 20.14로 경향성을 보이지는 않았다.

Table 7. 재래한식 간장에서 초고압 처리(200 MPa 및 400 MPa, 상온, 20분)에 따른 적정산도 변화 (단위 : ml)

	무처리	200 Mpa	400 Mpa
햇 간장	22.95 ± 0.05	23.50 ± 0.07	23.80 ± 0.04
1년 간장	19.78 ± 0.03	19.24 ± 0.02	20.14 ± 0.07

(3) 갈색도 변화

햇 간장과 1년 숙성 재래한식간장에 상온에서 20분간 200 MPa 및 400 MPa로 처리한 후 갈색도의 변화를 Table 8에 나타 내었다. 갈색도는 햇 간장보다 숙성기간이 길었던 1년 간장에서 각각 0.318과 0.400으로 더 높게 나타났는데 이는 간장의 숙성 중 주로 maillard reaction에 의한 갈색화 반응이 일어나는데 그렇기 때문에 숙성 기간이 길었던 1년 간장이 좀 더 갈색도가 높게 나타나는 것으로 고려되어진다. 그리고 두 간장 모두다 초고압을 처리함에 따라 200 MPa에서는 큰 변화를 보이진 않았지만 400 MPa에서 처리 시에는 햇 간장과 1년 간장에서 각각 0.012와 0.019씩 감소하는 것으로 나타났다.

Table 8. 재래한식 간장에서 초고압 처리(200 MPa 및 400 MPa, 상온, 20분)에 따른 갈색도 변화

	무처리	200 Mpa	400 Mpa
햇간장	0.318 ± 0.002	0.317 ± 0.001	0.306 ± 0.001
1년 간장	0.400 ± 0.001	0.405 ± 0.002	0.381 ± 0.006

(4) 아미노태질소 변화

햇 간장과 1년 숙성 재래한식간장에 상온에서 20분간 200 MPa 및 400 MPa로 처리한 후 아미노태질소의 변화를 Table 9에 나타 내었다. 햇 간장에서 초기 함량이 0.86 % g/ml에서 200 MPa와 400 MPa에서 초고압 처리 후 각각 0.86% g/ml과 0.89% g/ml로 200 MPa에서는 변화가 없었으나 400 MPa에서 다소 증가하는 것으로 나타났다. 1년 간장에서는 초기 0.81% g/ml이었고 200 MPa와 400 MPa에서 초고압 처리한 후 각각 0.82% g/ml과 0.82% g/ml로 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 햇 간장에 400 MPa에서 20분간 초고압 처리하였을 때 아미노태질소 함량에 영향을 보이는 것으로 사료된다.

Table 9. 재래한식 간장에서 초고압 처리(200 MPa 및 400 MPa, 상온, 20분)에 따른 아미노태질소 변화 (단위 : % g/ml)

	무처리	200 Mpa	400 Mpa
햇간장	0.86 ± 0.01	0.86 ± 0.00	0.89 ± 0.01
1년간장	0.81 ± 0.01	0.82 ± 0.00	0.82 ± 0.01

(5) 중성 및 알칼리성 단백질분해효소 활성도 변화

햇 간장과 1년 숙성 재래한식간장에 상온에서 20분간 200 MPa 및 400 MPa로 처리한 후 효소활성도의 변화를 Table 10에 나타 내었다. 중성 단백질분해효소활성도의 경우 햇 간장에서 26.0 unit/ml이었으나 200 MPa에서 처리 시 28.5 unit/ml로 다소 증가하였고 400 MPa에서 처리 시 다시 감소하여 26.8 unit/ml이었다. 1년 간장에서는 다소 감소하는 경향을 보여 200 MPa와 400 MPa에서 27.3 unit/ml로 나타났으나 초기 27.9 unit/ml과 큰 차이를 나타내지는 않았다. 알칼리성 단백질분해효소활성도의 경우에는 햇 간장과 1년 간장 모두 200 MPa에서 다소 감소하다가 400 MPa에서는 반대로 증가하는 경향을 보였다.

Table 10. 재래한식 간장에서 초고압 처리(200 MPa 및 400 MPa, 상온, 20분)에 따른 중성 및 알칼리성 단백질 분해효소활성도 변화 (단위 : unit/ml)

중성 단백질분해효소활성도	무처리	200 Mpa	400 Mpa
햇간장	26.0	28.5	26.8
1년간장	27.9	27.3	27.3
알칼리성 단백질분해효소활성도	무처리	200 Mpa	400 Mpa
햇간장	19.4	18.7	20.2
1년간장	21.2	20.0	22.6

(6) 유리아미노산 변화

햇 간장과 1년 숙성 재래한식간장에 상온에서 20분간 200 MPa 및 400 MPa로 처리한 후 유리아미노산의 변화를 Table 11에 나타 내었다. 햇 간장에서 200 MPa와 400 MPa에서 초고압 처리를 실시 한 결과 유리아미노산의 함량이 2719.71 mg/100ml에서 2770.37 mg/100ml과

2846.55 mg/100ml로 초고압을 처리함에 따라 압력이 증가함에 따라 1.86%와 4.7%씩 증가하는 경향을 보였으나, 1년 간장에서 초고압 처리 후 유리아미노산 함량은 큰 변화를 나타내지 않았다.

Table 11. 재래한식 간장에서 초고압 처리(200 MPa 및 400 MPa, 상온, 20분)에 따른 유리아미노산 변화 (단위 : mg/100ml)

	햇 간장			1년 간장		
	무 처리	200 MPa	400 MPa	무 처리	200 MPa	400 MPa
Asp	21.01	22.76	19.70	18.49	17.58	18.88
Glu	565.44	572.83	589.04	570.74	567.12	562.48
Cys	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ser	164.01	175.09	172.32	176.40	170.44	174.39
His	78.22	81.28	83.18	181.37	183.31	166.24
Gly	117.33	130.55	126.74	135.93	125.23	134.39
Thr	128.63	128.33	133.56	114.65	123.49	99.99
Arg	888.16	901.42	933.46	662.40	640.01	658.79
Ala	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Tyr	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Met	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Val	121.55	124.11	127.67	101.95	99.13	107.37
Phe	150.77	147.52	153.41	154.97	179.34	156.58
Ile	190.36	194.05	205.02	155.19	148.21	164.46
Leu	294.22	292.42	302.45	273.03	267.94	273.14
Lys	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Total	2719.71	2770.37	2846.55	2545.11	2521.80	2516.71

다. 결론

재래한식간장에 100 MPa, 35°C, 24시간 및 48시간 처리했을 때 아미노태질소나 유리아미노산의 함량에 변화에 영향을 미치지 않았다. 그러나 200 MPa와 400 MPa에서 20분간 상온에서 처리한 후 1년 간장에서 큰 변화가 나타나지는 않았지만 햇 간장의 경우 아미노태질소나 유리아미노산 함량의 경우 다소 증가하는 것으로 나타났다. 이는 간장의 숙성시기의 차이에 따라 초고압처리의 효과가 차이가 나는 것으로 사료되어진다. 즉 간장 숙성 초기에 초고압처리를 실시하였을 때 숙성이 진행된 후 처리하는 것보다 효과가 좋은 것으로 나타났다.

4. 숙성 기간에 따른 일반간장의 NMR 분석을 통한 성분비교 분석

가. 간장 중 총균수, pH 및 염도

염도, pH 그리고 총균수는 Table 12에 나타 내었다. 간장을 30분간 달인 후 총균수는 유의적으로 감소하였고 숙성 12년 동안 일정하게 유지되었다. 그러나 달인 간장 중 4년 숙성 간장에서 2배정도 많은 총균수를 보였는데 이 간장에서 다른 달인 간장에서 나타난 pH와 염도 변화의 경향과 다르지 않게 나타났으며, 이렇게 4년 숙성 간장에서 다른 간장보다 2배정도 많은 총균수가 나타났는지는 본 연구에서는 확인되지 않았다.

Table 12. Salt Content (%), pH and the Total Number of Bacteria (log CFU/ml) in Soy Sauces.

간장	log CFU/ml	염도 (%)	pH
unboiled ¹⁾	6.43 ± 0.07 ^{a3)}	24.86 ± 0.16 ^b	5.00 ± 0.08 ^{bcd}
1 year ²⁾	2.79 ± 0.39 ^c	20.17 ± 1.14 ^c	4.87 ± 0.06 ^{cd}
2 years	2.30 ± 0.07 ^d	27.45 ± 0.54 ^a	4.89 ± 0.02 ^{cd}
4 years	4.35 ± 0.02 ^b	29.11 ± 0.15 ^a	5.15 ± 0.04 ^{bc}
12 years	2.84 ± 0.13 ^c	29.05 ± 0.23 ^a	5.37 ± 0.02 ^{ab}

1) represents soy sauce aged for 1 year without boiling process

2) represents soy sauces aged for 1, 2, 4 and 12 years, following boiling for 30 minutes

3) Different letters indicate significant differences between samples in Duncan's multiple-range test ($p < 0.05$).

나. 간장의 ¹H NMR Spectroscopy

전통 한국식 방법에 따라 메주로 제조된 비달임 1년 간장 (A), 1년 (B), 2년 (C), 4년 (D), 그리고 12년(E) 숙성 달인간장의 one-dimensional (1D) ¹H NMR spectra를 Fig. 5에 나타 내었다. 또한 일본 상업 간장 (Kikkoman) (F)과 한국 (CJ) 간장 (G)의 ¹H NMR spectra 역시 같이 나타 내었다. 2D NMR 분석과 spiking experiments를 통해서 37가지의 대사산물들을 동정하였다. Figure 4에서와 같이 간장의 spectra에 대사산물들 즉, leucine, isoleucine, valine, lactate, alanine, acetate, arginine, betaine, tyramine, phenylalanine, formate, α-glucose, β-glucose, lysine, γ-aminobutyrate (GABA), fucose, ethanol, succinate, tyrosine, proline, choline, uracil, hypoxanthine, aspartate, methionine, pyroglutamate, glutamate, glycine, trimethylamine, malonate, phosphocholine, oligosaccharides (O1, O2, and O3) and glycerol을 나타 내었다. Spectra를 보면 상업적인 간장제품에서 ethanol 함량이 많은 것을 알 수 있다. 게다가, butyrate와 propionate는 CJ 간장에서만 검출되었다.

간장 중의 대사산물의 변화를 설명하기 위해 PCA 방법을 전체 dataset에 적용하였다. PCA score plots (Figure 5A)에서는 재래한식간장(비달임, 1, 2, 4 그리고 12년 숙성)과 상업적인 간장제품(CJ, Sempio 그리고 Kikkoman)과의 차이를 분명하게 보여주고, 또한 염수 발효 또는 숙성 기간에 따른 재래한식간장의 차이를 Figure 5B에 나타 내었다. Figure 5B에서 나타난 왼쪽에서 오른쪽으로 plots의 이동은 재래한식간장이 12년 발효 또는 숙성 기간 동안에 연속적인 대사산물의 변화를 나타낸다.

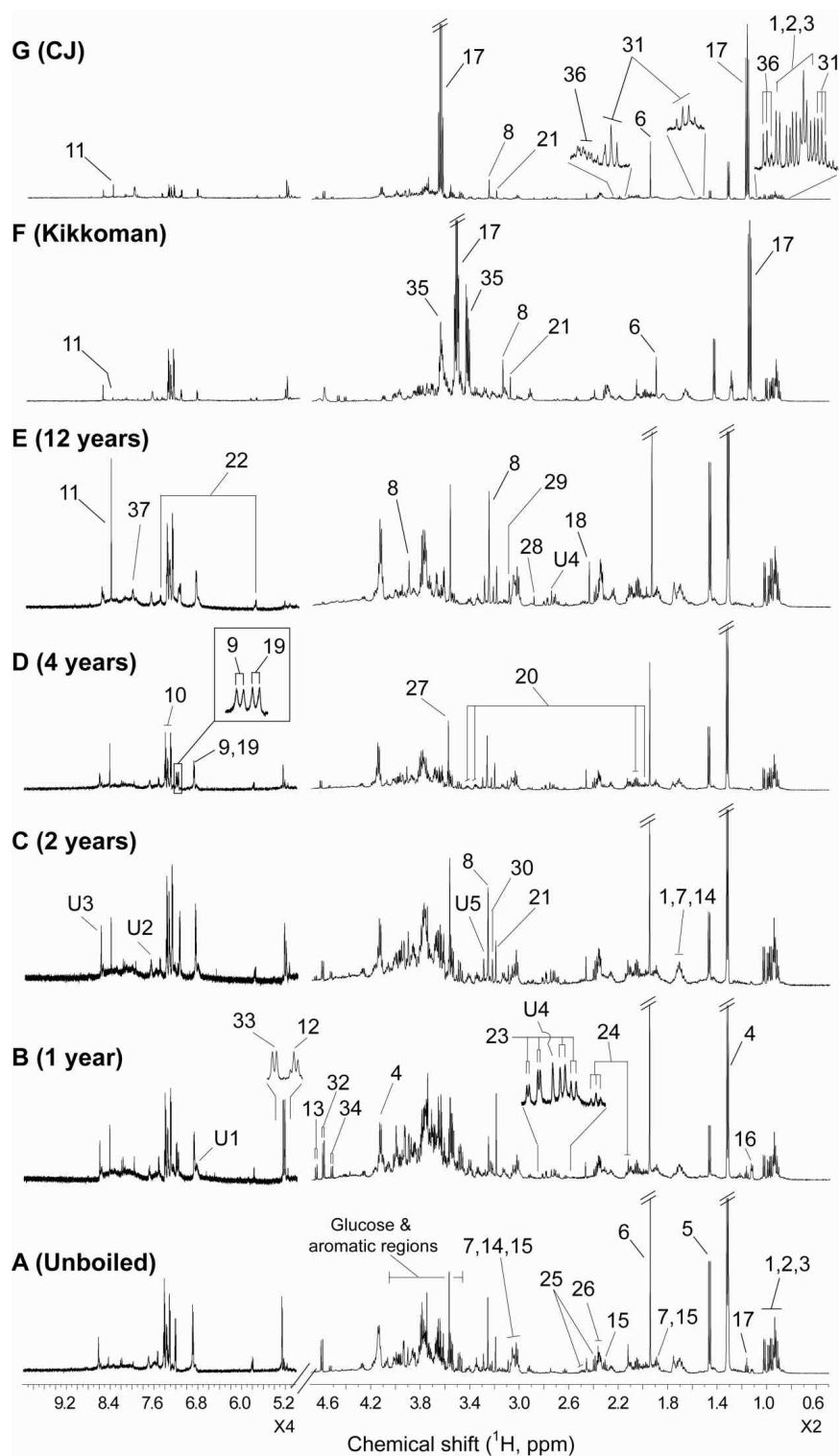


Figure 4. A typical 600MHz ^1H NMR spectra of soy sauces unboiled (A) and aged for 1 year (B), 2 years (C), 4 years (D) and 12 years (E) obtained from traditional Korean manufacturer. F and G represent commercially available soy sauces obtained from CJ and Kikkoman, respectively. Unpasteurized soy sauces were aged for 1 year. Key: 1, leucine; 2, isoleucine; 3, valine; 4, lactate; 5, alanine; 6, acetate; 7, arginine; 8, betaine; 9, tyramine; 10, phenylalanine; 11, formate; 12, α -glucose; 13, β -glucose; 14, lysine; 15, γ -aminobutyrate (GABA); 16, fucose; 17, ethanol; 18, succinate; 19, tyrosine; 20, proline; 21, choline; 22, uracil; 23, aspartate; 24, methionine; 25, pyroglutamate; 26, glutamate; 27, glycine; 28, trimethylamine; 29, malonate; 30, phosphocholine; 31, butyrate; 32, oligosaccharide (O1); 33, oligosaccharide (O2); 34, oligosaccharide (O3); 35, glycerol; 36, propionate; 37, hypoxanthine; U1, U2, U3, U4 and U5, unknown.

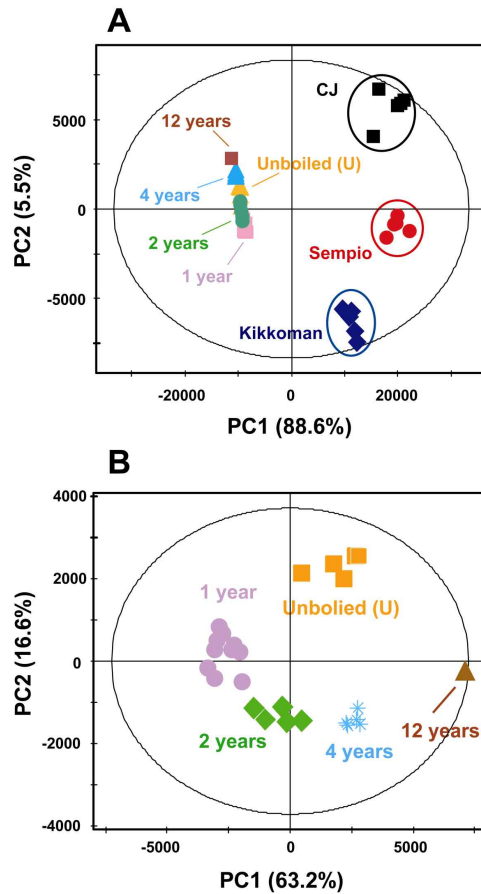


Figure 5. PCA scores plots derived from the 600 MHz ^1H NMR spectra of traditional Korean and commercial Korean and Japanese soy sauces (A). Unboiled (U), 1, 2, 4 and 12 years represent traditional Korean soy sauces; unboiled soy sauces (U) were aged for 1 year without boiling process whereas 1, 2, 4 and 12 years soy sauces were boiled for 30 minutes prior to aging. CJ, Sempio and Kikkoman represent commercially available soy sauces. PCA score plot in panel B was re-generated only with traditional Korean soy sauces from panel A.

다. 비달임 간장과 달임 간장의 대사산물의 변화

달이고 달이지 않은 1년 숙성 재래한식간장의 대사산물의 변화를 분석하기 위하여 같은 회사로부터 제조된 간장들의 ^1H NMR Spectra에서 관찰된 대사산물들에 대해 다변량 분석을 사용하여 관찰하였다. Figure 6A에 나타난 것처럼 달임 간장(B)과 비달임 간장(U)의 차이가 R^2 (0.85) and Q^2 (0.77)의 높은 통계적인 수치로 PCA (Principal component analysis) score plots에서와 같이 분명하게 나타났다. PCA loading plots은 상보적인 PCA score plot에서 차이를 나타내는데 기여하는 대사산물들을 나타낸다. PCA loading plot의 상단부분은 달임 간장(B)과 비교했을 때 비달임 간장(U)에 상대적으로 많이 함유되어있는 대사산물들을 나타낸 것이고, 반면 하단부분은 상대적으로 적은 대사산물들을 나타내고 있다. 달임 간장(B)과 비달임 간장(U)의 차이는 Figure 6B에 나타난 것처럼 비달임 간장(U)에 상대적으로 leucine, isoleucine, valine, lactate, alanine, lysine, g-aminobutyrate (GABA), acetate, methionine, pyroglutamate,

glutamate, tyramine, betaine, glycine, trimethylamine, oligosaccharides (O1 and O2), and phenylalanine의 함량이 많았고, fucose, aspartate, α - and β -glucoses, oligosaccharide (O3), tyrosine and formate의 함량이 적었기 때문이다.

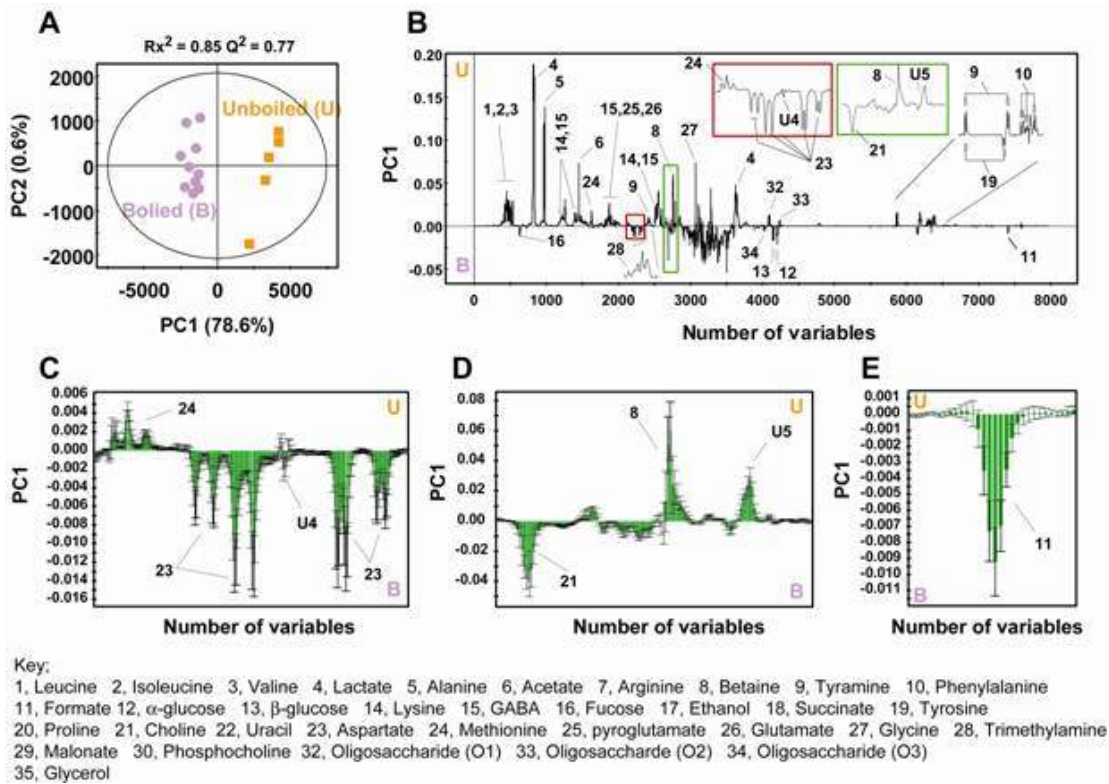


Figure 6. PCA score (A) and loading (B) plots derived from 600 MHz ^1H NMR spectra of traditional Korean soy sauces that were boiled (B) and unboiled (U), followed by aging for 1 year. Upper section of the loading plot represents relatively higher levels of metabolites in unpasteurized soy sauces, whereas the lower section represents lower levels. The Rx^2 (0.85) and Q^2 (0.77) values reveal high goodness of fit and predictability of the PCA model. The boxes inside panel B highlight the changes in methionine, aspartate, choline, betaine and formate levels. PCA column loading plots reveal significant differences in methionine, sarcosine and aspartate (C), choline and betaine (D), and formate (E). The smaller the bar, the higher the confidence limit in the PCA column loading plots. Other metabolites were also considered whether their levels were significant or not. U4 and U5 represent unknown compounds.

대사산물의 유의적인 차이를 보기 위해 Figure 6B에서 주어진 PCA line loading plot에서 대표적인 대사산물들을 선택한 후 PCA column loading plots를 만들었다. PCA column loading plots는 methionine, aspartate 그리고 U4 (Figure 6C), choline, betaine 그리고 U5 (Figure 6D), 그리고 formate (Figure 6E)에서 유의적인 변화를 나타내고, 여기서 좀 더 작은 bars는 좀 더 높은 신뢰성 한계를 나타낸다. 생 간장은 그 안에 존재하는 바람직스럽지 못한 미생물의 생육을 멈추거나 여과 또는 압착 후 남아있는 효소의 불활성을 위해, 그래서 저장 기

간 동안 향미나 색의 안정성을 부여하기 위해 전통적으로 30분 동안 달이는 과정을 거치게 된다. 최근에는 ceramic membrane이 일정한 품질을 상업적인 상품에 부여하기 위해 달임 과정 대신 미세여과를 위해 사용되어지고 있다. 대부분 영세 제조업체, 특히 세대에서 세대로 전해져오는 제조업체는 훌륭하고 높은 품질을 얻기 위해 옹기에서 적게는 1년에서 때론 10년 이상 숙성시킬 수 있게 생 간장을 달인다. 옹기는 세라믹 소재를 사용하여 제조하며, 발효 과정 중에 산소, 이산화탄소, 수분 그리고 염이 통과할 수 있는 다공성 성질을 가지고 있다. 이러한 다공성은 미생물들이 유용하게 성장할 수 있는 조건을 제공하며, 미생물들을 고정시켜준다. mesoporous molecular sieve의 pore 크기는 고정된 효소의 활성도에 또한 영향을 미친다. 세라믹 비드의 미세 구멍안의 고정된 세포는 간장에서 급속한 알코올 발효에 기여한다.

간장에서 고정된 세포의 사용에 대한 주된 이점은 잘 보고되어져있다. 최근 다른 유약이 처리된 옹기의 다공성은 미생물과 효소를 고정하는 중요한 역할을 하고 간장의 발효에 다시 사용되면 높은 품질과 재현성을 제공한다. 달임 과정은 주로 염수 중 발효 뿐 아니라 간장의 색에 관련된 미생물에 영향을 미친다. 이것은 Table 9에 나타난 것처럼 달임 간장(B)에서 보다 비달임 간장(U)에서 총균수가 많이 나타난 것에서 확신할 수 있다. 비달임 간장(U)에서 많은 미생물의 수는 많은 대사산물의 차이를 야기할 수 있고 좀 더 내부를 변화 초래할 수 있으며 이는 달임 과정이후 1, 2 그리고 4년 동안 숙성 시킨 간장에 비해 제어 되지 않은 품질을 간장에 부여하게 된다. 이러한 내부 변화는 PCA score plots에서 보인 것과 같이 비달임 간장의 상대적으로 산재되어 있는 plots의 무리에 의해 알 수 있다.

라. 숙성 중 대사산물들의 변화

숙성 1년 그리고 2년 간장의 차이를 first PCA component (PC1)에 의해 분명하게 차이가 있음이 Figure 7에 나타나 있다. 2년 숙성 간장에서 leucine, isoleucine, valine, lactate, alanine, glutamate, pyroglutamate, succinate, aspartate, lysine, GABA, glycine, malonate, betaine, tyrosine, phenylalanine and formate이 좀 더 높은 함량 나타났다(Figure 7C).

마. 결론

간장은 아시아와 전 세계를 통해 잘 알려진 간장은 발효 또는 숙성 기간 동안 생산되는 많은 대사산물로 구성되어 있고 다양한 건강에 유익한 성분을 가지고 있다. 그러나 표적되어지거나 기기적인 특정 분석 때문에 간장에 대한 포괄적인 평가가 제한되어져 왔다. 본 연구에서는 처음으로 ^1H NMR spectroscopy와 multivariate pattern recognition techniques을 통해 간장 특히 12년까지 숙성된 간장들의 대사산물의 변화에 대해 포괄적인 이해를 얻기 위해 간장의 대사산물 변화를 나타 내었다. 아미노산과 유기산의 증가와 탄수화물의 감소는 12년 동안 미생물에 의한 숙성과 관련되어 있다. 특히, 12년 숙성 기간 동안 betaine의 함량이 꾸준히 증가하는 것을 알 수 있었는데 이는 미생물 또는 효소와 관련된 대사산물로 숙성 중 내삼투압 또는 호염성 세균과 결부되어 설명되어질 수 있다. 이 논문은 간장의 품질을 평가하고 그 전체적인 대사산물에 대한 우리의 이해를 돕기 위해 ^1H NMR-based metabolomic 접근을 통해 간장에 대한 포괄적인 관찰을 제공하였다.

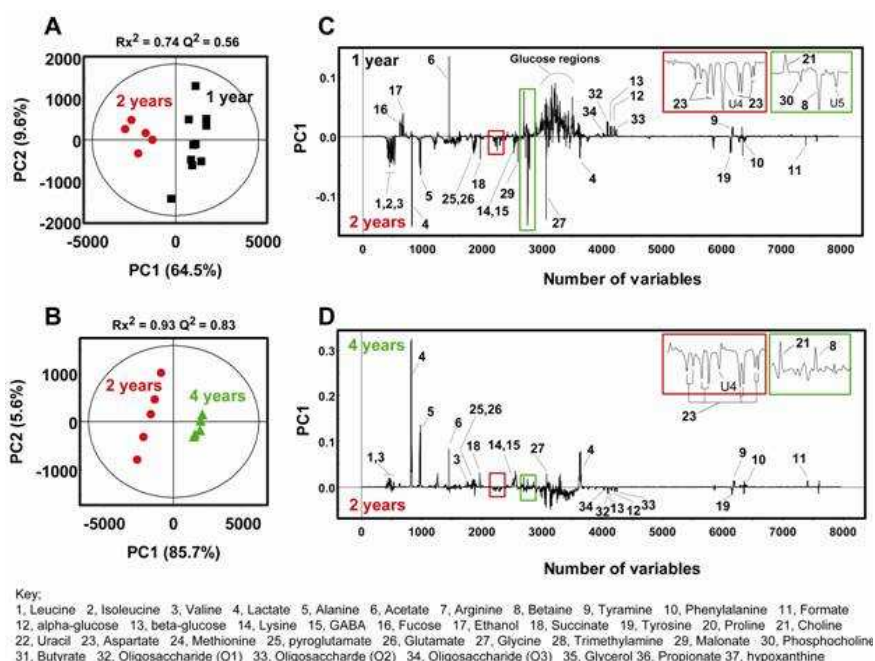


Figure 7. PCA scores (A and B) and loadings (C and D) plots derived from the ^1H NMR spectra of traditional Korean soy sauces aged for 1, 2 and 4 years, demonstrating significant metabolic evolutions as aging period increased. The fitness and predictability of the models are indicated by Rx^2 and Q^2 values of 0.74 and 0.93, and of 0.56 and 0.83, respectively. U4 represent unknown compounds.

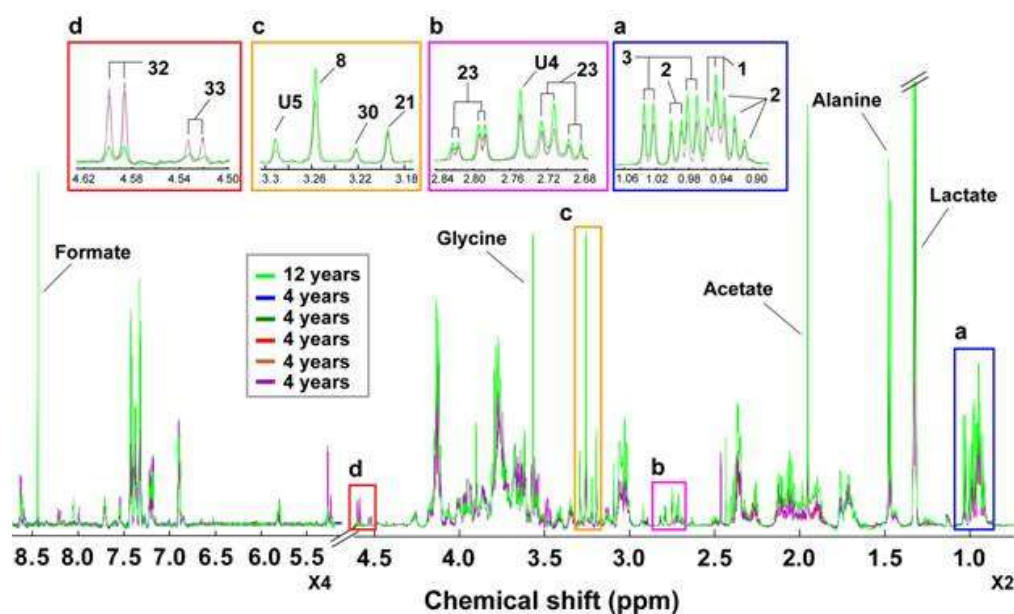


Figure 8. Normalized ^1H NMR spectra of 4 ($n=5$) and 12 ($n=1$) year-aged soy sauces. Expanded panels a, b, c and d highlight elevated levels of amino acids and betaine, and lowlevels of oligosaccharides, which were selected as typical metabolites, in 12-year-aged soy sauce compared to those in 4-year-aged soy sauces other metabolites showed constant changes as the aging period increased. Key: 1, leucine; 2, isoleucine; 3, valine; 8, betaine; 21, choline; 23, aspartate; 30, phosphocholine; 32, oligosaccharide (O1); 33, oligosaccharide (O2); U4 and U5, unknown.

제 2 절. 간장 제조 과정 중 초고압 처리에 따른 품질 변화 측정 <2차년도>

1. 연구 범위 및 연구수행 방법

가. 간장덧 이후 초고압 처리 실험 모식도

간장덧을 모식도(Figure 9)와 같이 제조한 이후 고품분인 된장과 액체부분인 간장을 분리한 이후 간장에 200 MPa와 400 MPa를 10분간 처리하여 간장 숙성 90일 동안에 10일 간격으로 샘플을 채취하여 그 변화를 살펴보았다.

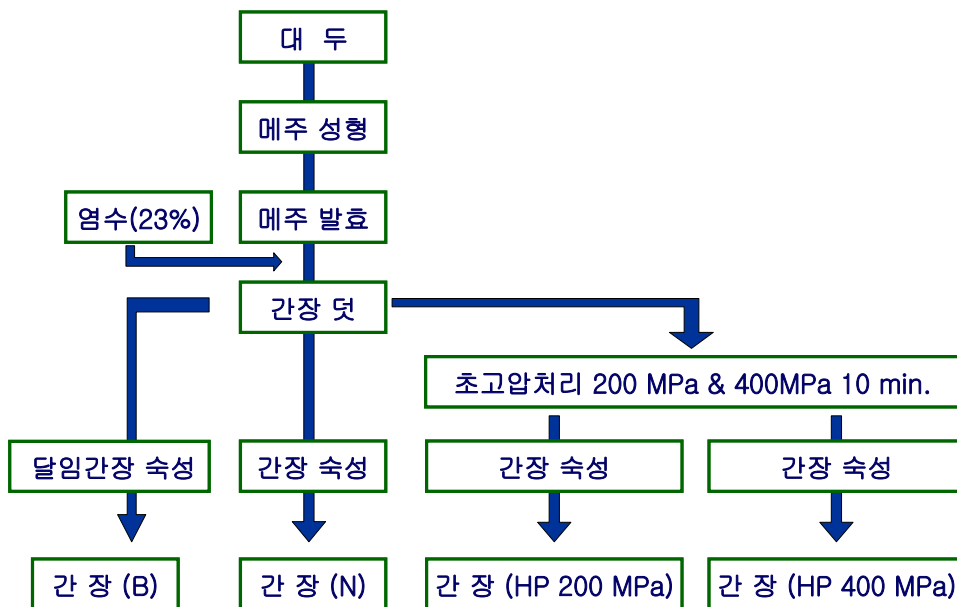


Figure 9. Manufacturing process of traditional Korean *ganjang* and experimental scheme.

나. 재래메주의 제조 및 초고압 처리 실험 모식도

재래메주를 제조하는 과정을 Figure 10에 나타 내었다. 대두를 세척한 후 10~12시간 침지한 후 4시간동안 삶은 다음 40℃까지 식힌 다음 분쇄하여 벽돌모양(18.0×14.2×7.4)으로 성형한 다음 2일 동안 건조한 후 벧짚으로 묶어서 50일 동안 발효를 시켰다. 이때 균은 따로 배양한 균을 접종하지 않고 벧짚으로부터 자연적으로 접종되는 전통적인 방법을 사용하였다. 전통 메주가 발효가 끝난 다음 500 MPa에서 10분간 초고압 처리를 하여 3주간 incubator에서 저장하면서 0, 1, 2, 그리고 3 주별로 성분의 변화를 측정하였다.

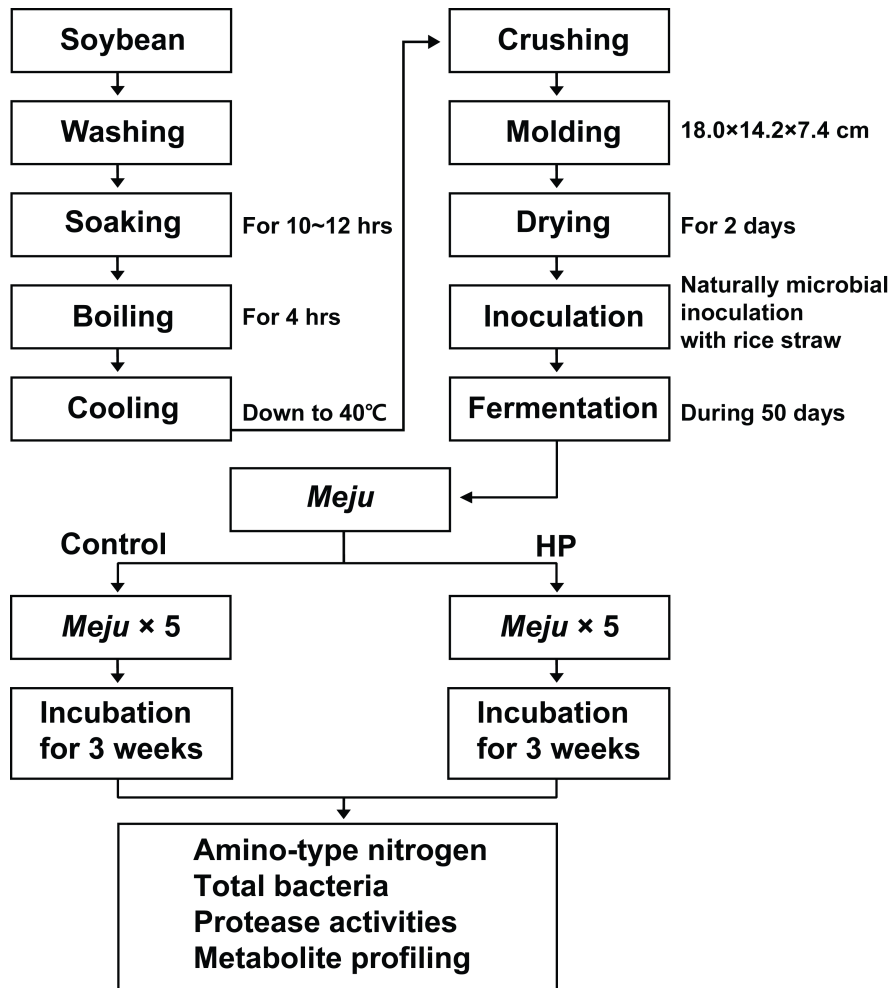


Figure 10. Manufacturing process of traditional Korean *meju* and experimental scheme.

다. 초고압 처리 메주를 이용한 간장 제조 실험 모식도

재래한식간장의 제조 과정을 Figure 11에 나타 내었다. 전통메주의 제조 과정은 앞선 Figure 10에 나타 내었고 이를 통해 제조된 메주를 500 MPa, 10분간 처리 한 후 이를 이용하여 간장을 제조하였다. 우선 초고압처리를 한 메주와 처리하지 않은 메주를 23% 염수와 1:2의 비율로 되게 염수를 붓고 8주 동안 간장덧 발효하였다. 간장덧 발효가 끝난 후 고형분인 메주와 액체부분인 간장을 분리 한 후 간장 숙성시켰다. 이때 초고압처리 하지 않은 간장덧으로 부터 나온 일반 간장, 일반 간장을 가열살균 처리하여 달임 간장, 그리고 초고압 메주로부터 나온 초고압메주 간장을 각 각 5 배치씩 90일간 숙성하였으며 숙성 중 10일별로 그 변화를 측정 하였다.

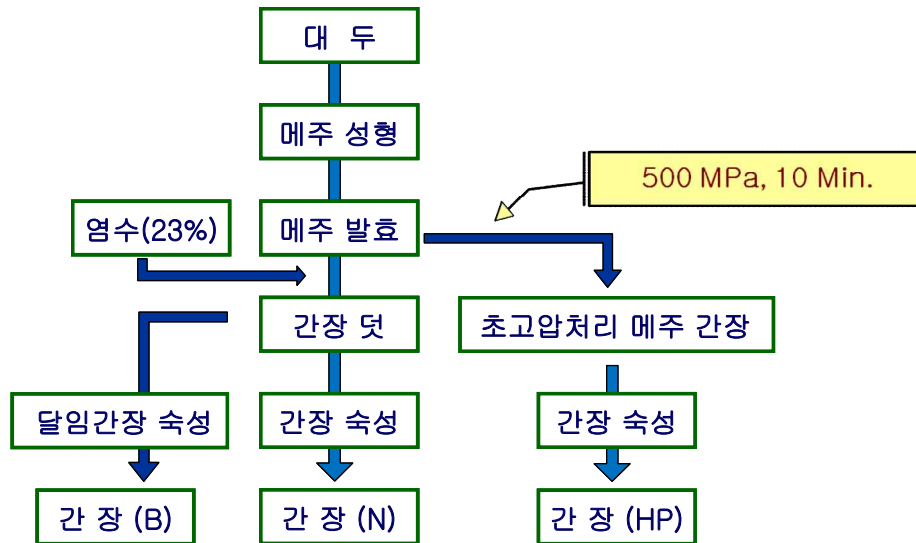


Figure 11. Manufacturing process of traditional Korean *ganjang* and experimental scheme.

라. 초고압 처리

전라남도 나주에 소재한 생물산업지원센터에 있는 초고압장치(Avure Technologies AB, Sweden) (Figure 12)를 이용하였으며, 이 기기의 처리용량은 35 ℓ, 압력은 0~600 MPa, 처리 시간은 20분, 온도는 0~50℃의 범위에서 처리할 수 있으며, 재래한식간장에 제조 과정 중 간장 덧 이후에 200과 400 MPa에서 10분간 처리하였고 재래메주에 초고압 처리 시 500 MPa에서 10분간 상온에서 처리하였다.



Figure 12. 초고압 장치 (전남 나주 생물산업지원센터 소재)

마. pH 측정

pH meter (ORION 3 Star, Thermo Scientific, USA) 이용하여 재래한식간장의 초고압 처리 전후 pH를 측정하였다.

바. 수분함량 측정

메주의 수분함량은 105℃ 건조기에서 상압가열건조법으로 측정하였다.

사. 아미노태질소 측정

Formal 적정법에 의해 아미노태 질소를 측정하였다. 200~300 ml 삼각플라스크를 2개 준비하여 양쪽에 간장 5 ml를 취해 증류수로 희석하여 250 ml로 정용한 시료용액 25 ml를 실포펫으로 취하였다. 한쪽에 중성 formalin 용액 20 ml와 물 20 ml를 메스실린더를 사용하여 가하고 다른 쪽은 공시험으로서 물 40 ml를 가하였다. phenolphthalein 약 6방울을 가하여 0.05N NaOH 용액으로 적정하였다. 착색되어 있는 시료는 적정의 종말점을 찾기 어려우므로 공시험이 홍색을 나타낼 때까지 적정하여 이것을 기준으로 하여 본시험도 같은 색이 될 때까지 적정하였다. 아미노태질소는 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{아미노산태 질소(\%)} = (V_1 - V_0) \times F \times 0.0007 \times D \times \frac{100}{S}$$

V1 : 본시험 적정소비량(ml),

V0 : 공시험 적정소비량(ml),

F : 0.05N NaOH 용액의 역가,

D : 희석배수, S : 시료의 채취량(g)

0.0007 : 0.05N NaOH 용액 1 ml에 상당하는 질소량(g)

아. 염도 측정

SALT. Meter TM-30D를 이용하여 재래한식간장의 초고압 처리 전 후의 염도를 측정하였다.

자. 갈색도 및 색도 측정

재래한식간장 5 ml를 취하여 증류수로 50배 희석한 다음 이 액을 UV-visible spectrophotometer (SHIMADZU, JAPAN)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 색도는 간장원액을 색차계(Spectrum Color Meter, JP7200F)를 사용하여 L, a, b, 그리고 ΔE 값으로 나타 내었다.

차. 총균수 측정

간장을 0.1% peptone solution을 이용하여 희석하였고 Plate Count Agar (Difco)를 이용하여 30℃에서 48시간 배양 후 colony를 계수하였다.

카. 중성 및 알칼리성 단백질분해효소 활성도 측정

간장의 중성 단백질 분해효소활성도는 간장 시료를 증류수로 10배 희석한 후 조효소액으로 사용하였다. 0.1M phosphate buffer pH 7.0 100 ml에 1 g Hammersten casein을 녹인 다음 이 용액 3 ml을 37℃ 항온수조에서 예열을 하고 10배 희석한 간장시료의 20mM PMSF 가 되도록 PMSF를 첨가한 후 10배 희석한 간장시료 0.1 ml을 첨가하여 20분간 반응시킨 다음 5 ml TCA를 첨가하여 효소반응을 정지시킨 후 Whatman No. 5로 여과한 여액을 275 nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard는 tyrosine을 사용하였다.

간장의 알칼리성 단백질 분해효소활성도 측정 역시 간장 시료를 10배 희석한 후 사용하였다. 20 mM이 되게 EDTA를 첨가한 0.2M borate buffer pH 10.0 100 ml에 1 g Hammersten casein을 녹인 다음 이 용액 3 ml을 37℃ 항온수조에서 예열을 하고 10배 희석한 간장시료 0.1

ml을 첨가하여 20분간 반응시킨 다음 5 ml TCA를 첨가하여 효소반응을 정지시킨 후 Whatman No. 5로 여과한 여액을 275 nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard는 tyrosine을 사용하였으며, 효소활성도는 다음 식에 의해 계산하였다.

$$Activity(Unit/ml) = tyrosine(\mu g/ml) \times \frac{1}{reaction\ time(min)} \times \frac{1}{enzyme\ vol(ml)}$$

타. 환원당 측정

DNS에 의한 비색법을 통하여 환원당을 측정하였다. 20배 희석한 간장 1 ml과 시약 3 ml를 가하고, 끓는 수욕 중에서 5분간 끓인 다음, 냉각한 후 물을 가하여 25 ml로 채운다. 시료 대신에 물 1 ml를 같은 방법으로 처리한 것을 공시험으로 하여 두께(내경) 2.5 cm 또는 1 cm 셀(cell)에 넣어 550 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 미리 구하여 둔 표준곡선에서 당의 양을 구하였다. 표준곡선은 특급 무수포도당을 사용하였다. 환원당양은 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{환원당}(\%) = A \times D \times \frac{1}{S} \times \frac{100}{1000}$$

A : 표준곡선으로부터 구한 시료용액 중의 환원당의 양(mg)

D : 희석배수

S : 시료채취량 (g)

파. 관능평가

간장의 색, 향, 구수한 맛, 쓴맛, 단맛, 짠맛 그리고 전체적인 기호도를 7점척도법을 사용하여 훈련된 10명의 패널이 참여하였고 QDA 도표를 통해 나타 내었다.

하. NMR을 통한 대사산물의 측정

간장 120 μL 또는 메주를 5배 희석한 후 1시간동안 추출한 용액 120 μL을 인산완충용액 (0.2M sodium phosphate, pH 5.0) 420 μL, 그리고 60μL의 D₂O(99.9% deuterium oxide)를 섞은 후 13,000rpm에서 10분간 원심분리를 하여 얻은 상등액 550μL를 취하여 5-mm NMR tube로 옮긴 후 Varian Inova-600MHz NMR spectrometer(Varian Inc., Palo Alto, CA)를 이용하여 ¹H NMR spectra를 얻었다.

모든 NMR spectra는 VnmrJ software 2.1B(Varian Inc., Palo Alto, CA)를 이용하여 phase와 base line을 조정한 후 ASCII format으로 전환하였다. ASCII file은 MATLAB(R2006a, Mathworks Inc., 2006)에서 importing 하여 NMR spectra를 0.001-ppm의 spectra buckets으로 reducing 한 후 Correlation Optimized Warping(COW) 방법을 이용하여 모든 spectra를 정렬하였다. Water(4.6-4.8ppm) 지역은 spectra 정렬 전에 제거하였다. 정렬된 데이터는 total spectra area 혹은 median peak height로 normalization 시켰다. 결과 데이터는 SIMCA-P version 12.0(Umetrics, Umea, Sweden)을 이용하여 주성분분석(PCA)을 실행하였다.

2. 간장덧 이후 초고압 처리에 의한 숙성 중 이화학적 변화

간장덧 이후 간장에 200 MPa 및 400 MPa를 10분간 처리 후 간장 숙성 기간 동안 변화를

살펴보았다. 그러나 간장덧 이후 초고압 처리에 대한 영향이 비 처리한 간장과 유의적인 차이를 보이지 않았는데 그 이유로는 간장이 액체라는 것과 간장에서 미생물이 외부 스트레스 즉 염도에 따른 삼투압에 어느 정도 내성을 가지고 적응을 하고 있어서 초고압 처리에 의한 스트레스에 좀 더 저항성을 가지고 있기 때문으로 사료된다. 그래서 이 연구에 대한 설명은 pH, 염도, 아미노태질소, 환원당 그리고 갈색도에 대해서만 언급하였다.

가. 간장 숙성 중 이화학적 변화

간장덧 이후 간장의 초고압 처리 후 pH와 염도의 변화를 Figure 13에 나타 내었다. 가열살균처리한 달임 간장의 경우 숙성 30일 이후 감소하는 경향을 보였고 초고압 처리 간장과 미처리 간장은 10일 이후에 감소하는 경향을 보였으며 200 MPa 처리 간장은 30일, 미처리 간장은 40일 그리고 400 MPa 처리 간장은 60일 이후에 pH가 증가하였고 간장에서 이취가 나기 시작하였다. 400 MPa 처리 간장의 이상 변화가 다른 군에 비해 좀 늦춰진 것을 보았을 때 초고압의 처리 효과가 나타난 것으로 보이나 저장성을 부여하기에는 부족하였다. 간장에 저장성을 부여하기 위해서는 400 MPa 이상의 조건이나 높은 온도 및 처리 시간이 필요할 것으로 생각된다. 염도의 경우에는 달임 간장이 24%이상으로 나타났고 다른 군에서는 차이가 나타나지 않았으면 전체적으로 숙성 기간 동안에 다소 증가하는 경향을 보였다.

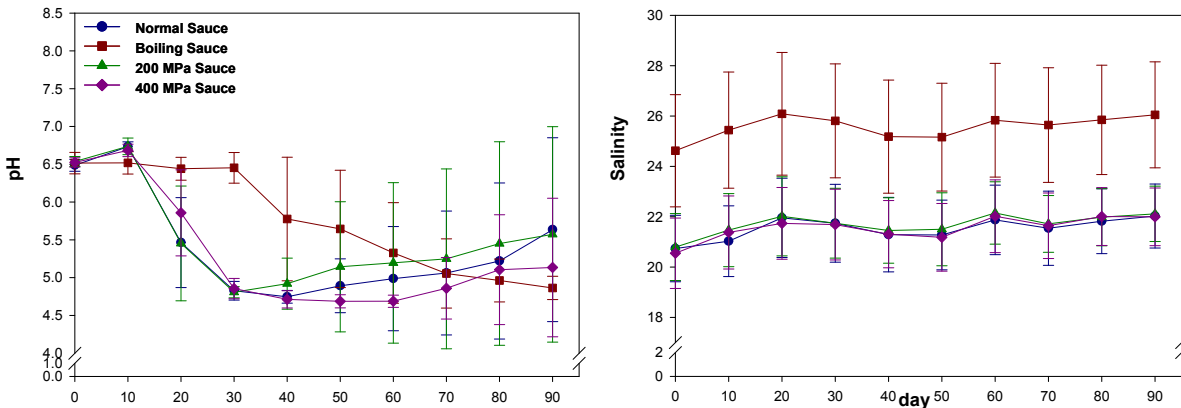


Figure 13. 간장 덧 이후 간장의 초고압 처리 후 숙성 중 pH 및 염도의 변화

아미노태질소의 간장 숙성 중 변화(Figure 14)는 40일 까지 증가하는 경향을 보이다가 60일 이후 다소 감소하는 경향을 보였는데 달임간장의 경우 수분의 증발에 의한 감소에도 불구하고 그 함량이 높지 않은 이유는 가열에 의한 단백질의 침전이 일어났기 때문으로 생각되어진다. 간장 숙성 기간 동안 모든 실험군에서 유의적인 차이가 나타나지는 않았다. 환원당의 경우에는 달임간장에서는 20일 이후 숙성이 끝날 때까지 감소하는 경향을 보였으며 미처리와 초고압 처리 간장의 경우에는 숙성 10일이 지난 이후 30일 까지 급격히 감소하였으며 이후 큰 변화 없이 유지되는 경향을 보였다. 이는 pH의 초반 경향과 유사하였으며 달임간장을 제외한 간장에서 유의적인 차이를 보이지 않았다.

갈색도의 간장 숙성 중 변화를 Figure 15에 나타 내었다. 달임간장의 경우에는 숙성 초반부터 꾸준히 증가하는 경향을 보였으며 다른 간장들에서는 숙성 30일째 다소 증가하는 경향을

보였으나 차이를 보이진 않았다.

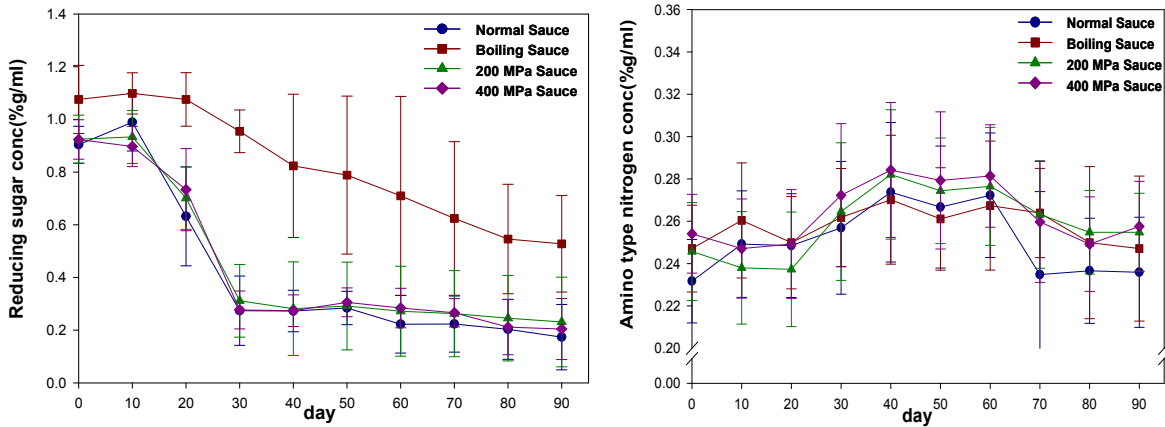


Figure 14. 간장 덧 이후 간장의 초고압 처리 후 숙성 중 아미노태질소 및 환원당의 변화

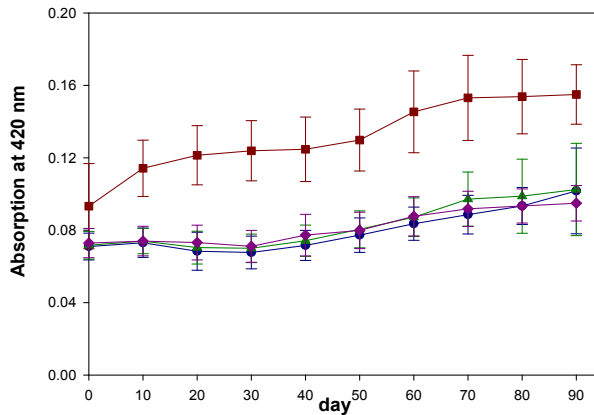


Figure 15. 간장 덧 이후 간장의 초고압 처리 후 숙성 중 갈색도의 변화

나. 결론

간장덧 이후 간장에 200 MPa 및 400 MPa를 10분간 처리 후 pH, 염도, 아미노태질소, 환원당 그리고 갈색도의 변화를 간장 숙성 기간 중 살펴본 결과 미처리 간장과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 앞서서 언급한 것처럼 간장의 성상이 액체라는 것과 간장 내 미생물의 외부 스트레스에 대한 저항성이 증가되었기 때문으로 사료된다. 초고압을 간장에 처리 시 400 MPa에서 10분의 조건은 간장에 영향을 미치기에 부족하였으며 더 높은 조건의 압력이나 시간 또는 온도가 필요한 것으로 생각된다.

3. 메주의 초고압 처리에 의한 저장 중 이화학적 변화

가. 메주의 저장 중 변화

전통메주에 초고압을 처리 한 후 3주 동안 저장 중 pH, 아미노태질소, 수분함량, 효소활성도 그리고 총균의 변화를 Table 13에 나타 내었다. 메주에 초고압을 처리 한 후 일반 메주에서 보다 초고압을 처리한 메주에서 총균의 수가 급격히 감소하는 것으로 나타났는데 이는 초고압에 의해 미생물의 불활성 되었기 때문으로 사료된다. 초고압의 주요한 효과 중 하나는 미생물

의 불활성시키는 것인데 이는 초고압에 의한 세포막의 불활성과 세포 형태, 유전적 기전, 리보솜의 파괴 또는 Key enzyme을 포함한 단백질의 변성에 의한 것으로 보고되고 있다.^{25, 26)} 이후 1주에 총균수는 증가한 후 다시 감소하는 경향을 보였는데 이는 수분함량의 급격한 감소에 기인하는 것으로 사료된다. 효소활성도는 초고압처리에 의해 증가한 후 이후 3주까지 초고압처리 매주에서 유의적으로 높게 나타났는데 중성 단백질 분해 효소가 일반매주에 비해 유의적으로 증가한 것으로 나타났는데 이는 초고압에 의한 효소의 활성도를 증가시키는데 비교적 분자량이 큰 효소의 경우에는 불활성되고 분자량이 작은 효소의 경우에는 활성도를 자극하는 것으로 보고되고 있다.²⁷⁾ 이러한 효소활성도의 증가는 초고압 처리 매주에서 아미노태질소의 함량이 증가하는 것과 일치하는 결과가 나타났다. pH는 1주까지 급격히 감소하다가 이후 조금씩 감소하는 경향을 보였으나 수분함량과 함께 초고압 처리에 의한 변화를 없는 것으로 나타났다.

Table 13. Changes in pH, Amino-Type Nitrogen (%), Water Content (%), Enzyme Activity (unit/ml) and Total Bacteria (cfu/ml × 10¹⁰) in Normal (N) and High Pressure (HP)-treated *Meju* during 3 weeks of Incubation.

Incubation periods	0 week	1 week	2 weeks	3 weeks
pH				
N	7.44 ± 0.06 ^{a,A}	6.83 ± 0.29 ^{b,A}	6.78 ± 0.14 ^{b,A}	6.75 ± 0.07 ^{b,A}
HP	7.50 ± 0.16 ^{a,A}	6.96 ± 0.12 ^{b,A}	6.65 ± 0.10 ^{c,A}	6.66 ± 0.07 ^{c,A}
Amino-type nitrogen				
N	0.92 ± 0.11 ^{a,A}	1.06 ± 0.16 ^{a,B}	1.00 ± 0.14 ^{a,B}	0.94 ± 0.10 ^{a,B}
HP	1.04 ± 0.04 ^{c,A}	1.32 ± 0.05 ^{a,A}	1.22 ^{ab,A} 0.06	1.15 ^{bc,A} 0.04
Water contents				
N	35.34 ± 2.43 ^{a,A}	11.38 ± 2.56 ^{b,A}	8.48 ± 0.35 ^{c,A}	8.25 ± 0.44 ^{c,A}
HP	36.42 ± 0.49 ^{a,A}	11.55 ± 1.84 ^{b,A}	8.73 ± 0.28 ^{c,A}	8.92 ± 0.52 ^{c,A}
Neutral protease				
N	44.53 ± 2.39 ^{ab,A}	47.80 ± 3.71 ^{a,B}	43.31 ± 2.31 ^{b,B}	42.87 ± 1.80 ^{b,B}
HP	46.83 ± 1.23 ^{b,A}	53.05 ± 2.67 ^{a,A}	47.25 ± 1.30 ^{b,A}	45.48 ± 0.98 ^{b,A}
Alkaline protease				
N	43.04 ± 2.89 ^{b,A}	51.40 ± 3.67 ^{a,A}	53.61 ± 2.62 ^{a,A}	53.19 ± 3.69 ^{a,A}
HP	44.92 ± 1.56 ^{b,A}	52.77 ± 2.48 ^{a,A}	55.97 ± 4.14 ^{a,A}	54.19 ± 1.50 ^{a,A}
Total bacteria				
N	0.46 ± 0.04 ^{d,A}	9.68 ± 1.31 ^{a,A}	3.30 ± 0.74 ^{c,A}	4.83 ± 0.92 ^{b,A}
HP	0.10 ± 0.01 ^{c,B}	5.38 ± 0.92 ^{a,B}	1.74 ± 0.41 ^{b,B}	1.81 ± 0.30 ^{b,B}

나. 메주의 ^1H NMR spectra

초고압을 처리한 메주와 일반메주의 0주와 3주의 1D ^1H NMR spectra를 Figure 16에 나타내었다. 2D와 spiking 실험을 통해서 40개의 대사산물들을 동정하였으며 다음과 같다. leucine, isoleucine, valine, lactate, alanine, acetate, arginine, betaine, tyramine, phenylalanine, formate, α -glucose, β -glucose, lysine, γ -aminobutyrate (GABA), fucose, ethanol, succinate, tyrosine, proline, choline, uracil, aspartate, methionine, pyroglutamate, glutamate, glycine, trimethylamine, malonate, phosphocholine, butyrate, oligosaccharide (O1), oligosaccharide (O2), oligosaccharide (O3), glycerol, hypoxanthine, histamine, histidine, tryptophan, 그리고 fumarate 이상 40개 대사산물이다. 이러한 spectra를 살펴보면 3주 동안 glucose와 oligosaccharides의 함량은 감소하고 betain은 증가하는 것을 알 수 있다. 이러한 저장 기간 동

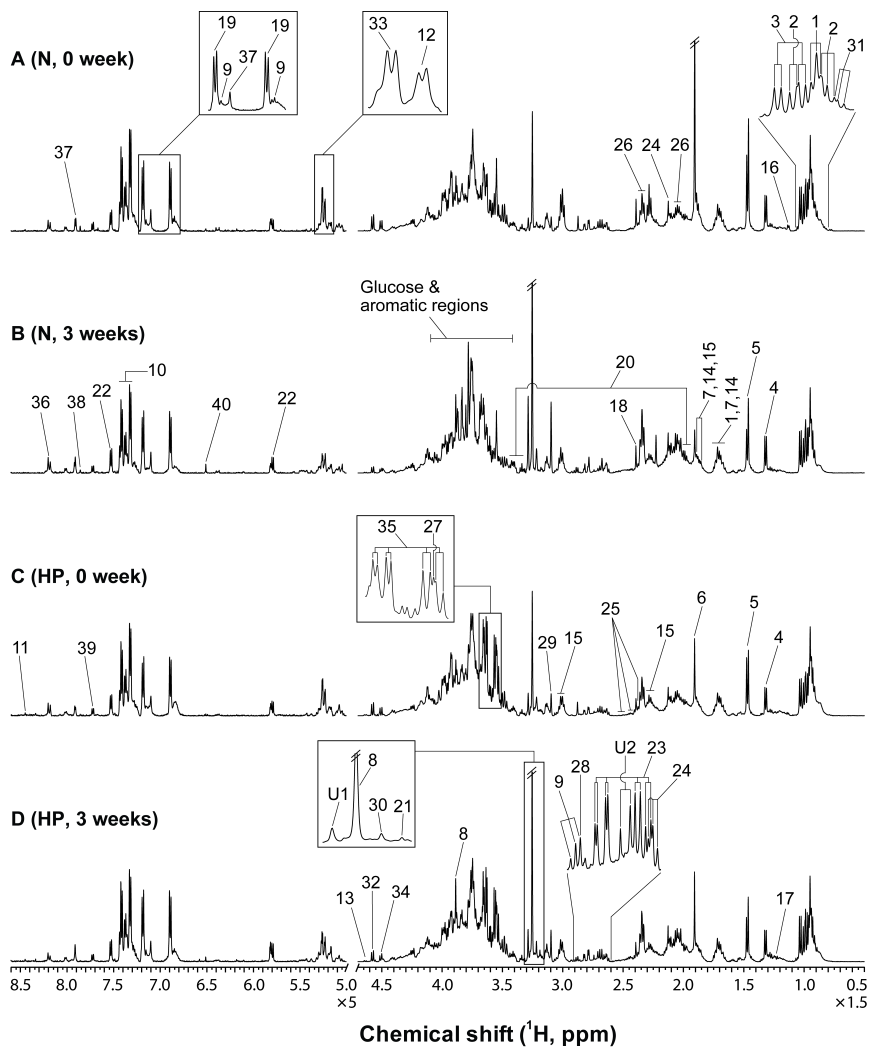


Figure 16. A typical 500MHz ^1H NMR spectra of normal *meju* incubated for 0 week (A) and 3 weeks (B) and of high pressure (HP) -treated *meju* incubated for 0 week (C) and 3 weeks (D). Key: 1, Leucine; 2, Isoleucine; 3, Valine; 4, Lactate; 5, Alanine; 6, Acetate; 7, Arginine; 8, Betaine; 9, Tyramine; 10, Phenylalanine; 11, Formate; 12, α -Glucose; 13, β -Glucose; 14, Lysine; 15, γ -Aminobutyrate (GABA); 16, Fucose; 17, Ethanol; 18, Succinate; 19, Tyrosine; 20, Proline; 21, Choline; 22, Uracil; 23, Aspartate; 24, Methionine; 25, Pyroglutamate; 26, Glutamate; 27, Glycine; 28, Trimethylamine; 29, Malonate; 30, Phosphocholine; 31, Butyrate; 32, Oligosaccharide (O1); 33, Oligosaccharide (O2); 34, Oligosaccharide (O3); 35, Glycerol; 36, Hypoxanthine; 37, Histamine; 38, Histidine; 39, Tryptophan; 40, Fumarate; U1 and U2, unknown compounds.

안 각각의 변화를 PCA와 OPLS-DA score plot에 나타 내었다(Figure 17). 저장 기간 동안에 score plot가 오른쪽에서 왼쪽으로 그룹을 이루면서 이동하는 것을 알 수 있으며 0주에서 1주 사이의 초고압 처리한 메주에서 그룹끼리 서로 겹치는 부분이 많은데 이는 미생물의 사멸에 의해 대사산물의 변화가 일반 메주에서의 변화보다 적었기 때문으로 사료된다.

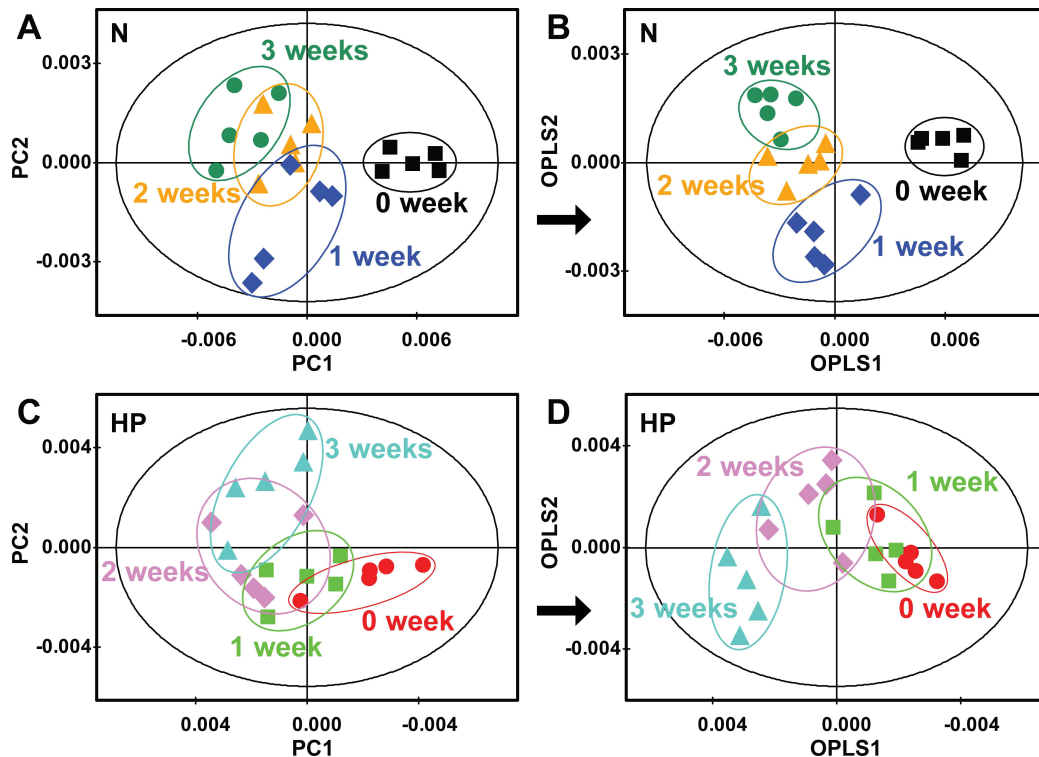


Figure 17. PCA (A and C) and OPLS-DA (B and D) score plots derived from the ^1H NMR spectra of normal (N) and high pressure (HP) -treated *meju*, indicating metabolic evolution during 3 week incubation.

다. 초고압 처리 메주와 일반메주의 저장 중 대사산물의 변화

일반메주의 0주와 3주의 차이가 유의적으로 차이가 있음을 Figure 18에서 보여 주고 있다. 이러한 차이를 보이는데 기인하는 대사산물을 OPLS-DA loading plot (Figure 18B)에 나타내었다. 이 loading plot의 윗부분은 3주에, 아랫부분은 0주에 많은 대사산물들의 peak를 나타내고 있으며, 3주에 betaine, proline, uracil, methionine, glutamate, malonate, phosphocholine, fumarate, and unknown compound (U1)이 함량이 높았으며, leucine, isoleucine, valine, alanine, acetate, arginine, tyramine, phenylalanine, α -glucose, lysine, γ -aminobutyrate (GABA), fucose, succinate, tyrosine, oligosaccharide (O1), oligosaccharide (O2), oligosaccharide (O3), and tryptophan의 함량은 낮은 것으로 나타났다.

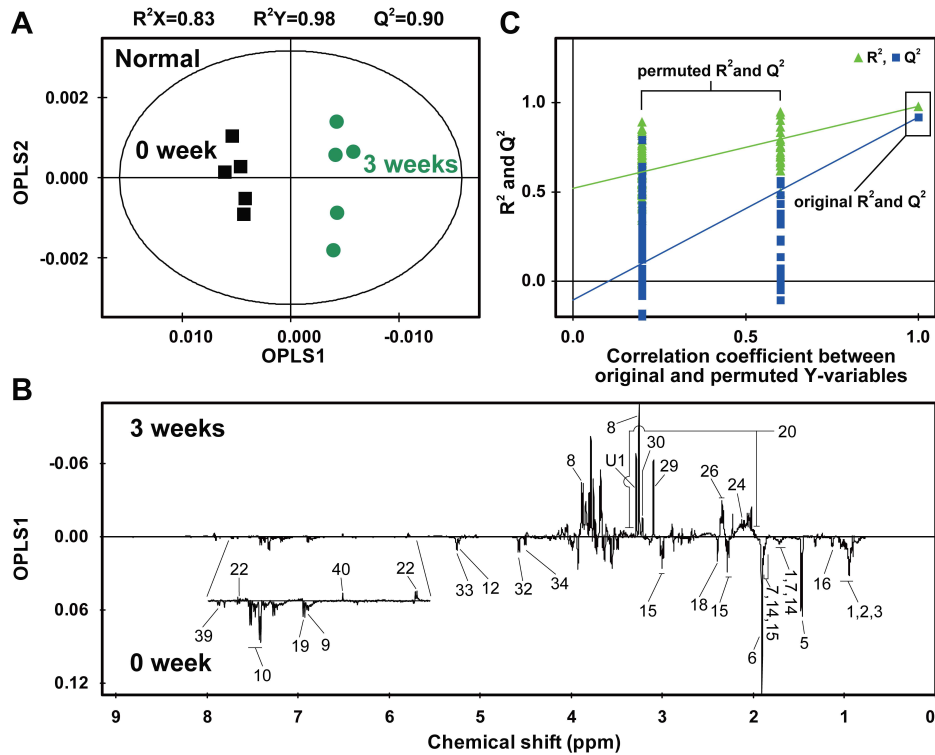


Figure 18. OPLS-DA score (A), loading (B) plots, and permutation test (C) derived from the ^1H NMR spectra of normal *meju* incubated for 0 week and 3 weeks. Key: 1, Leucine; 2, Isoleucine; 3, Valine; 5, Alanine; 6, Acetate; 7, Arginine; 8, Betaine; 9, Tyramine; 10, Phenylalanine; 12, α -Glucose; 14, Lysine; 15, γ -Aminobutyrate (GABA); 16, Fucose; 18, Succinate; 19, Tyrosine; 20, Proline; 22, Uracil; 24, Methionine; 26, Glutamate; 29, Malonate; 30, Phosphocholine; 32, Oligosaccharide (O1); 33, Oligosaccharide (O2); 34, Oligosaccharide (O3); 39, Tryptophan; 40, Fumarate; U1 unknown compound.

초고압 처리 메주에서도 0주와 3주에서 대사산물의 차이가 분명함을 Figure 19에서 보여주고 있다. 초고압 처리한 메주의 3주에 betaine, tyrosine, choline, methionine, glutamate, malonate, phosphocholine, fumarate, and U1의 함량이 높았으며, leucine, alanine, acetate, α -glucose, fucose, trimethylamine, oligosaccharide (O1), oligosaccharide (O2), oligosaccharide (O3), glycerol, and hypoxanthine의 함량은 낮은 것으로 나타났다(Figure 19B). α - and β -glucose 그리고 oligosaccharides (O1, O2, and O3)은 미생물의 소비에 의해 감소하는 것으로 여겨진다. 증발에 의한 수분의 감소는 미생물에 영향을 미치는데 즉, 미생물이 삼투압에 견디기 위해 osmoprotectants를 외부로부터 흡수하여 내부에 저장하거나 내부에서 합성을 하게 된다. 이러한 화합물로는 sugars (e.g. trehalose), polyols (e.g. glycerol and glucosylglycerol), free amino acids (e.g. proline and glutamate), quaternary amines과 their sulfonium analogues (betaine, carnitine 그리고 dimethylsulfoniopropionate 등), sulfate esters (choline-*O*-sulfate 등), 그리고 *N*-acetylateddiamino acids와 small peptides (*N*-acetylornithine and *N*-acetylglutaminylglutamine amide 등) 등이 있다. 3주에 betain, glutamate, choline, phosphocholine 그리고 proline의 함량이 일반 메주와 초고압처리 메주에서 높게 나타나는 원인이다.

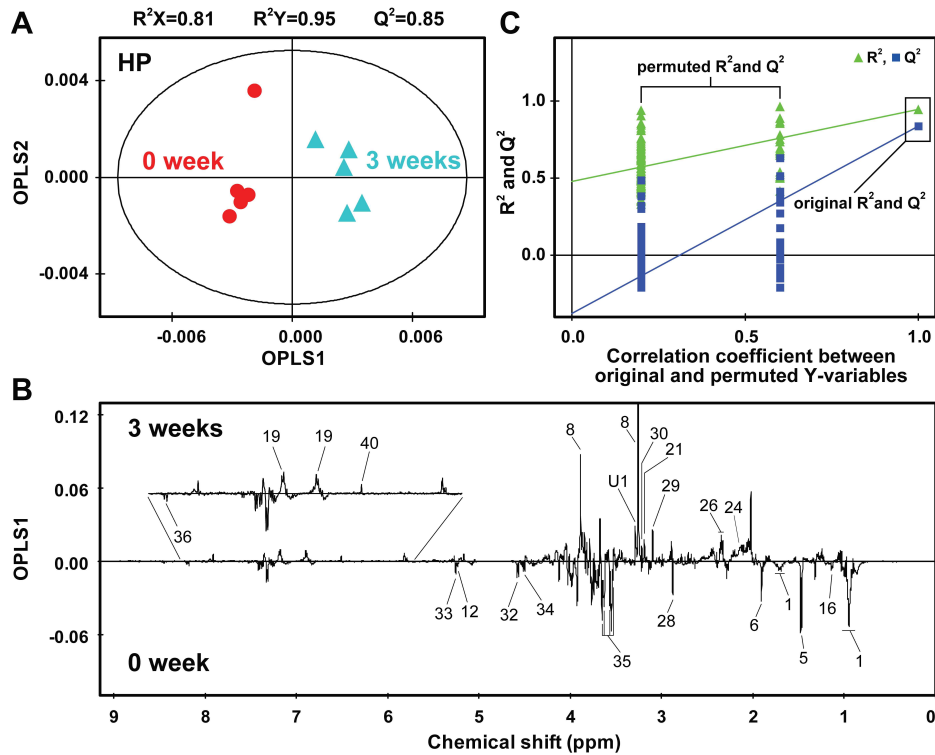


Figure 19. OPLS-DA score (A), loading (B) plots, and permutation test (C) derived from the ^1H NMR spectra of high pressure (HP) -treated *meju* incubated for 0 week and 3 weeks. Key: 1, Leucine; 5, Alanine; 6, Acetate; 8, Betaine; 12, α -Glucose; 16, Fucose; 19, Tyrosine; 21, Choline; 24, Methionine; 26, Glutamate; 28, Trimethylamine; 29, Malonate; 30, Phosphocholine; 32, Oligosaccharide (O1); 33, Oligosaccharide (O2); 34, Oligosaccharide (O3); 35, Glycerol; 36, Hypoxanthine; 40, Fumarate; U1 unknown compound.

라. 초고압 처리에 의한 저장 기간 동안 메주의 대사산물의 변화

저장 기간 동안 초고압 처리한 메주와 일반메주와의 차이를 각 주별로 OPLS-DA score plots (Figure 20)에 나타 내었고 그 차이가 분명하게 나타남을 알 수 있다. 초고압 처리한 메주에서 0주에는 choline, malonate, phosphocholine 그리고 glycerol의 함량이 높았고 lactate, alanine, arginine, phenylalanine, lysine, γ -aminobutyrate (GABA), succinate, tyrosine, oligosaccharide (O1), and oligosaccharide (O3)의 함량이 낮았으며(Figure 21A), 1주에는 acetate, tyrosine, uracil, histamine, and glycerol의 함량이 높았고, lactate, betain, succinate, proline, glutamate, malonate 그리고 U1의 함량이 낮았으며(Figure 21B), 2주에는 acetate, tyramine, formate, α -glucose, tyrosine, choline, oligosaccharide (O1), oligosaccharide (O2), glycerol 그리고 histamine의 함량이 높은 반면, lactate, betaine, aspartate, glutamate, glycine, malonate, oligosaccharide (O3), hypoxanthine 그리고 U1의 함량이 낮게 나타났고(Figure 21C), 마지막 3주째에는 acetate, tyramine, formate, tyrosine, choline, oligosaccharide(O2), and glycerol의 함량이 높았으며, alanine, betaine, aspartate, glutamate, malonate, hypoxanthine, histidine 그리고 U1 함량이 낮게 나타났다(Figure 21D).

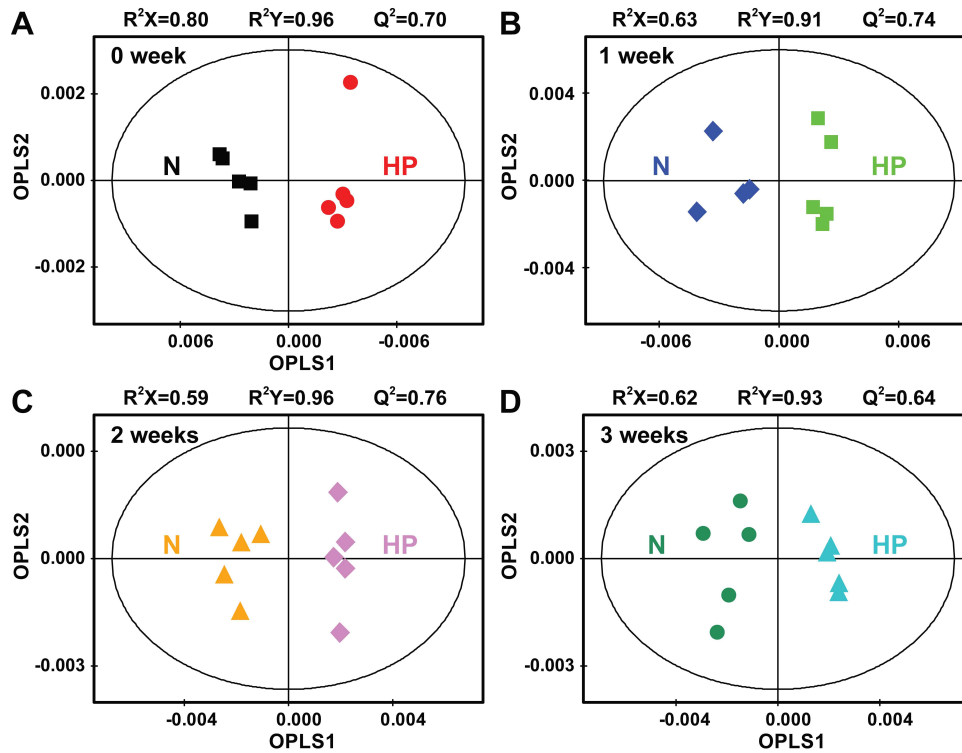


Figure 20. OPLS-DA score plots derived from the $^1\text{H-NMR}$ spectra of normal (N) and high pressure (HP) -treated *meju* at each incubation time of 0 (A), 1 (B), 2 (C), and 3 (D) weeks, showing the comparisons of metabolites between normal and HP-treated *meju* starters at each incubation time.

초고압처리에 의해 전통메주에서 아미노산은 큰 변화가 없는 것으로 나타났고 1주 이후에도 tyrosine을 제외하고 일반 메주에서 높게 나타났다. 이는 초고압에 의해 미생물의 감소로 인해 일반메주에서 초고압 처리한 메주보다 미생물의 수가 많아 대사산물의 분해 및 합성에 의한 유리아미노산 함량이 높은 것으로 사료된다. 반면, 초고압 처리한 메주에서 glycerol과 choline의 함량이 높게 나타났다. Glycerol은 내삼투압성 효모에서 생산되는 것으로 보고되어지나 glycerol이 초고압 처리 메주에서 저장 기간 동안 증가하지 않았지만 일반 메주에서의 함량보다는 높은 것을 보면 초기에 초고압에 의한 분해에 기인하는 것으로 생각된다.

마. 결론

전통 메주는 저장 기간 동안에 수분 함량의 감소로 인해 삼투압에 견디기 위해 glutamate, proline, betain 그리고 choline 등의 함량이 증가하였고 초고압 처리를 함으로써 단백질 분해효소 활성도가 증가하였고, 이로 인해 아미노태질소 및 tyrosine의 함량이 증가하였고 총균수는 감소하였다. 간장 숙성에서 미생물의 변화는 처음 고염에 의한 영향으로 조금씩 감소하는 경향을 보이며 큰 변화가 나타나지 않는다. 이는 처음 메주에서의 미생물의 수가 중요한 요인이 될 수 있다. 또한 간장 덧 이후 간장의 저장성을 위해 달임 공정을 실시하고 이는 maillard reaction을 촉진하여 흑갈색화를 촉진하게 된다. 이러한 측면에서 초고압에 의해 간장 덧 이전에 미생물을 불활성 시킴으로서 간장 덧 이후 가열 살균공정을 대신 하여 흑갈색화를 억제 하고 메주에서 효소활성도가 안정화 되어 간장 덧 이후 숙성 과정에서 숙성을 촉진하는데 기인

할 수 있을 것으로 사료된다.

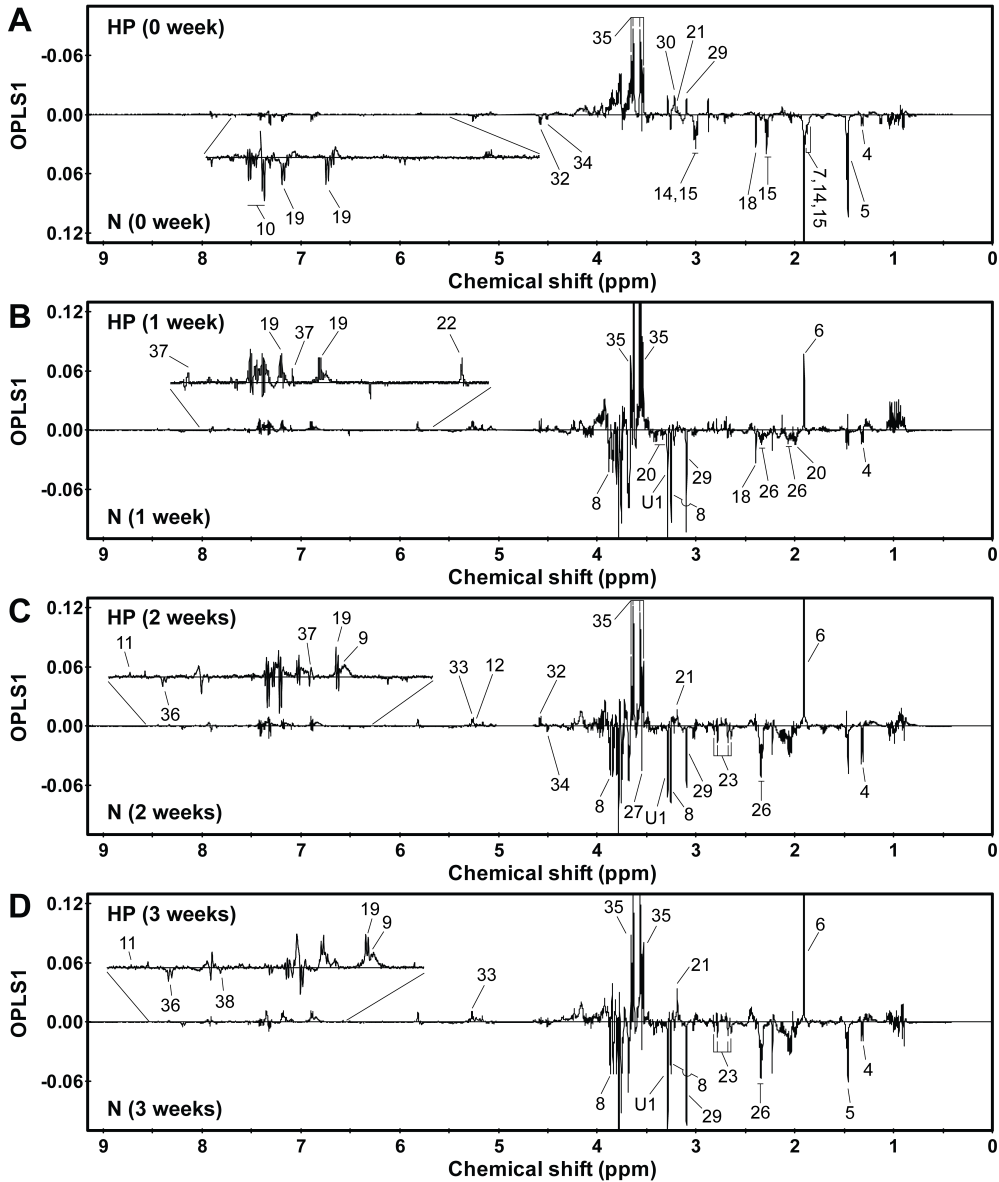


Figure 21. Identifications of metabolites responsible for the differentiations of normal (N) and high pressure (HP) -treated *meju* at incubation times of 0 (A), 1 (B), 2 (C) and 3 (D) weeks, through OPLS-DA loading plots, which correspond to OPLS-DA score plots in **Figure 8**. Key: 4, Lactate; 5, Alanine; 6, Acetate; 7, Arginine; 8, Betaine; 9, Tyramine; 10, Phenylalanine; 11, Formate; 12, α -Glucose; 14, Lysine; 15, γ -Aminobutyrate (GABA); 18, Succinate; 19, Tyrosine; 20, Proline; 21, Choline; 22, Uracil; 23, Aspartate; 26, Glutamate; 27, Glycine; 29, Malonate; 30, Phosphocholine; 32, Oligosaccharide (O1); 33, Oligosaccharide (O2); 34, Oligosaccharide (O3); 35, Glycerol; 36, Hypoxanthine; 37, Histamine; 38, Histidine; U1 unknown compound.

4. 초고압 처리한 메주로 제조한 간장의 이화학적 변화

가. 염도, pH, 아미노태질소 및 환원당의 변화

간장덧에서 염도의 변화를 Figure 22에 나타 내었다. 염도는 23%의 염수와 메주를 2:1의 비

율로 제조하여 간장덧 발효를 시작하였다. 일반 메주의 경우 염수를 부었을 때 염수에 뜨는데 비해 초고압 처리를 한 메주(초고압 메주)의 경우는 밀도가 높아지고 내부에 공간이 사라짐으로 인해 염수 중에 가라앉았으나 1~2주가 경과한 이후에는 염수 중에 뜨는 것을 관찰할 수 있었다. 간장 덧 1주차에 염도가 가장 급격하게 감소하였는데 이는 메주의 수분에 의해 희석효과로 생각된다. 초고압 메주로 제조한 간장덧(초고압 메주 간장덧)의 경우에는 약 3주까지 일반 간장덧에 비해 약간 높게 나타났는데 이는 초고압 메주의 표면적이 작아져서 메주 내부의 수분의 희석 속도가 낮았기 때문으로 생각되며 4주 이후에는 두 그룹간에 차이가 나타나지 않았다. 1주 이후 염도는 지속적으로 감소 추세를 보였으며 8주 후 염도는 일반 간장덧과 초고압 메주로 제조한 간장덧에서 각각 19.2%와 19.1%로 큰 차이를 나타내지는 않았다. 간장덧 이후 30분간 달임처리를 한 간장은 22.6%로 가열에 의한 수분 증발로 약 3%정도 증가하였다. 간장 숙성기간에 초고압 메주 간장과 일반 간장과 차이는 나타나지 않았으며 달임 간장과의 염도 차이도 유지 되었다. 그리고 간장숙성 기간 동안 항아리의 뚜껑이 밀폐되지 않기 때문에 수분 증발에 의해 염도가 상승하는 경향을 보였다.

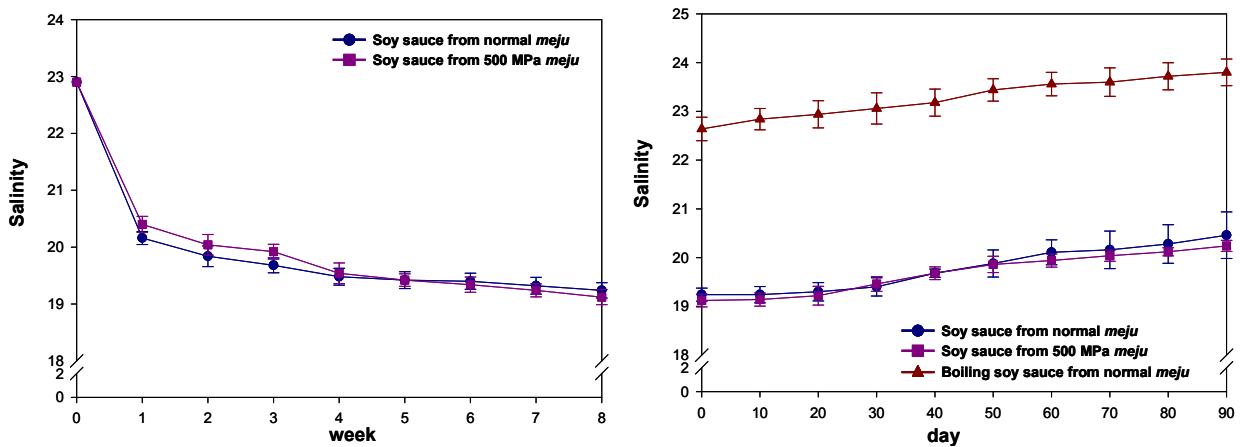


Figure 22. 초고압 처리 메주로 제조한 간장의 염도 변화(간장덧 : 좌, 간장숙성 : 우)

간장덧 기간 동안에 pH는 일반 간장덧에서는 1주까지 급격히 감소하다가 이후 다소 감소하였으나 큰 변화는 나타나지 않았으며 초고압 메주 간장덧에서는 2주까지 감소하는 경향을 보였으며 일반 간장덧보다 pH가 낮게 나타났고 8주까지 유지되었다(Figure 23좌). 간장 숙성에서도 10일째 일반 간장과 초고압 메주 간장의 pH는 약 5까지 낮아진 이후 초고압 메주 간장은 큰 변화 없이 유지되어 숙성 90일째 4.69로 나타났(Figure 23우). 일반간장의 경우에는 숙성 30일 이후에 pH가 급격히 증가하여 90일째에는 7.56까지 상승하였다. 이는 30일째부터 간장에서 암모니아 냄새가 나면서 숙성 중에 이상발효가 나타난 것으로 미생물의 제어가 되지 않았기 때문으로 사료된다. 달임간장의 경우에는 발효 30일째부터 pH가 감소하여 40일째 5.19였는데 앞에서 언급한 두 그룹에 비해 pH의 감소가 늦어진 이유는 가열살균에 의한 미생물 및 효소의 불활성에 의한 것으로 생각된다.

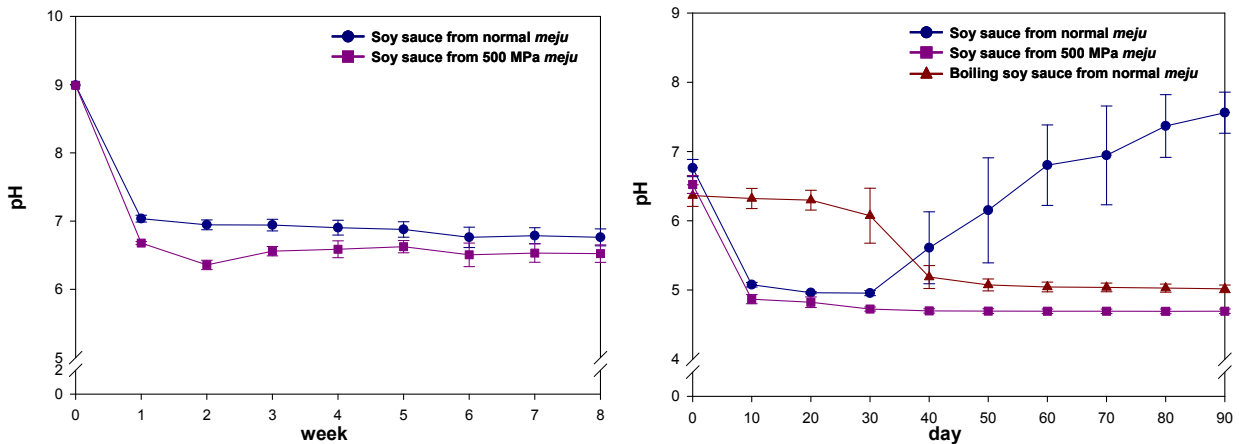


Figure 23. 초고압 처리 메주로 제조한 간장의 pH 변화(간장덧 : 좌, 간장숙성 : 우)

간장덧 및 숙성과정에서 아미노태질소의 변화를 Figure 24에 나타 내었다. 간장덧 기간에는 일반 간장덧에 비해 초고압 메주 간장덧에서의 아미노태질소 함량이 낮게 나타났으나 8주에는 다소 격차가 줄어들었다. 이는 초고압 메주의 표면적이 작았기 때문으로 초반에 아미노태질소의 함량이 낮은 것으로 생각된다. 간장 숙성 기간에는 달임간장과 초고압 메주 간장의 경우에는 그 변화가 크지 않았으나 일반 간장의 경우 숙성 초기부터 꾸준히 증가하였는데 초고압 메주와 달임간장의 경우에는 제조과정 중에 미생물의 불활성이 이뤄진 반면, 일반간장의 경우에는 미생물의 제어 공정이 없었기 때문에 아미노태질소가 꾸준히 증가하였고 이상발효가 일어난 것으로 보인다.

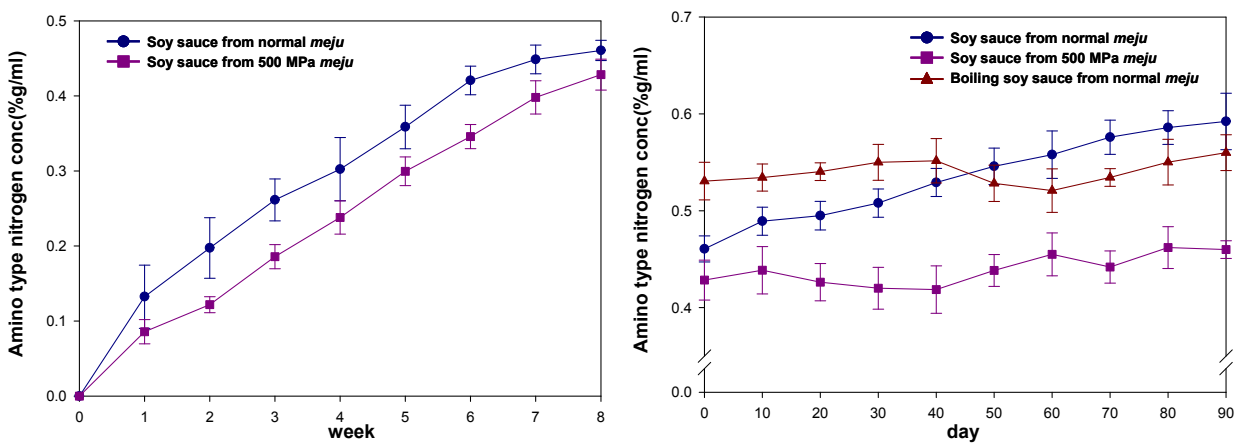


Figure 24. 초고압 처리 메주로 제조한 간장의 아미노태질소 변화(간장덧 : 좌, 간장숙성 : 우)

환원당의 경우도 간장덧에서 아미노태질소와 유사한 경향을 보였으며(Figure 25좌) 간장숙성 기간에는 초고압 메주 간장에서 10일째 급격히 감소한 이후 20일부터 큰 변화를 보이지 않았다. 반면 일반 간장의 경우에는 30일까지 초고압 메주 간장에 비해 환원당 함량이 높았으며 경향도 유사하였으나 이후 급격히 감소하여 40일째 초고압 메주 간장 보다 함량이 낮았으며

이후 계속 감소하는 것으로 나타났다. 달임 간장은 숙성기간동안 다른 간장들에 비해 환원당 함량이 높았으며 20일부터 다소 감소하다가 50일 이후 큰 변화를 보이지 않았다.

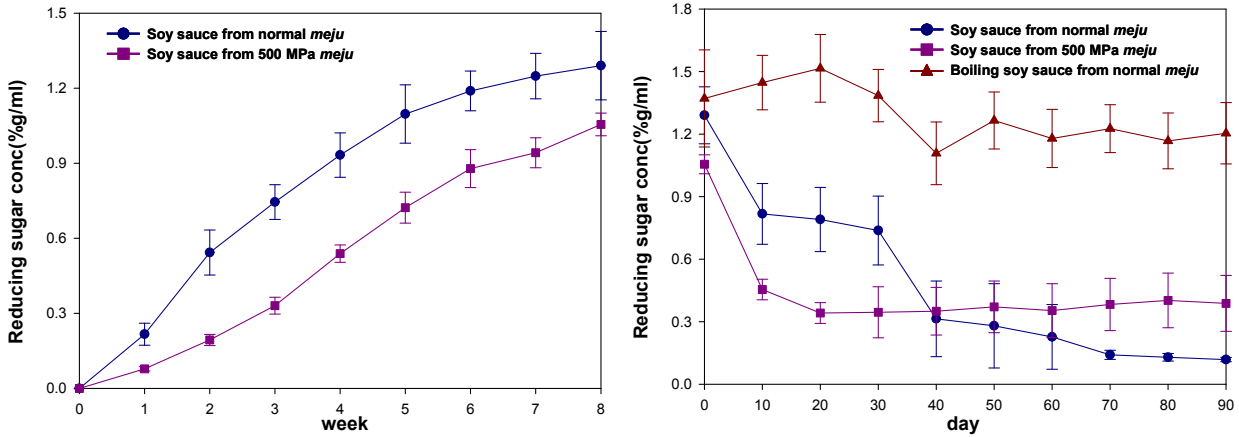


Figure 25. 초고압 처리 메주로 제조한 간장의 환원당 변화(간장덧 : 좌, 간장숙성 : 우)

나. 갈색도 및 색도 변화

간장덧과 숙성 기간동안에 갈색도의 변화를 Figure 26에 나타 내었다. 간장덧 기간에는 초고압 메주 간장덧에서 갈색도가 전반적으로 낮게 나타났으며 이후 간장 숙성 기간 동안에도 일반 간장덧에서의 갈색도가 높게 나타났다. 달임 간장의 경우에는 갈색도가 다른 두 그룹에 비해 월등히 높게 나타났는데 이는 가열에 의한 mailliard 반응이 촉진되었기 때문으로 사료된다. 숙성이 끝난 후 초고압 메주 간장에서 갈색도가 가장 낮게 나타나 흑갈색화가 가장 낮은 것으로 나타났다.

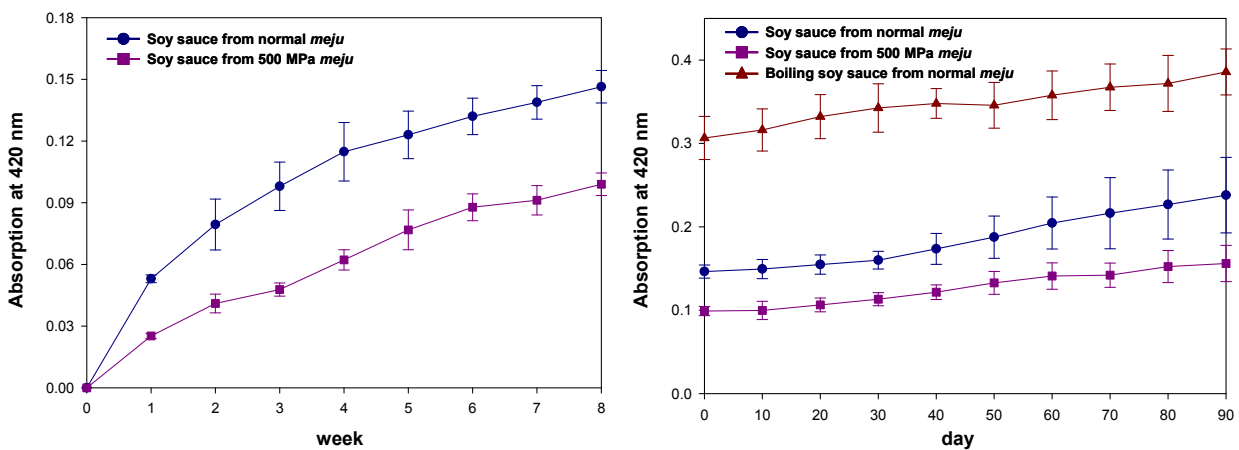


Figure 26. 초고압 처리 메주로 제조한 간장의 갈색도 변화(간장덧 : 좌, 간장숙성 : 우)

L (명도)값 역시 갈색도가 낮았던 초고압 메주 간장에서 일반 간장덧보다 높게 나타났으며 간장 숙성기간동안에 큰 변화 없이 유지하는 경향을 보였다. 달임간장은 가열에 의해 초기에 L값

이 가장 낮았으며 시간이 지나면서 감소하다가 50일 이후에 거의 변화가 없었다. 일반간장은 숙성기간동안 30일 때까지 별다른 변화가 없다가 이후 크게 감소하며 달임간장보다 값이 낮아졌고 이후로도 값이 떨어지는 경향을 보였다(Figure 27). a (적색도)값의 변화는 Figure 28에 나타난 것처럼 간장덧기 간에 일반 간장덧은 1주일 이후에 꾸준히 증가하였으나 초고압 메주 간장덧은 3주까지 다소 감소하는 경향을 보인 후 조금씩 증가하였다. 간장숙성 기간에는 달임간장의 경우 a값이 매우 높게 나타났으며 이후 큰 변화는 없었지만 가열이 간장의 색에 지대한 영향 미친다는 것을 알 수 있었다. 초고압 메주 간장의 경우에는 초기 10일 까지 급격히 증가하다가 이후 다소 증가하였는데 일반 간장은 30일 까지 초고압 메주 간장보다 높은 값으로 유사한 경향을 보였으나 이후 급격히 감소하여 L값에서와 유사한 경향을 보였다.

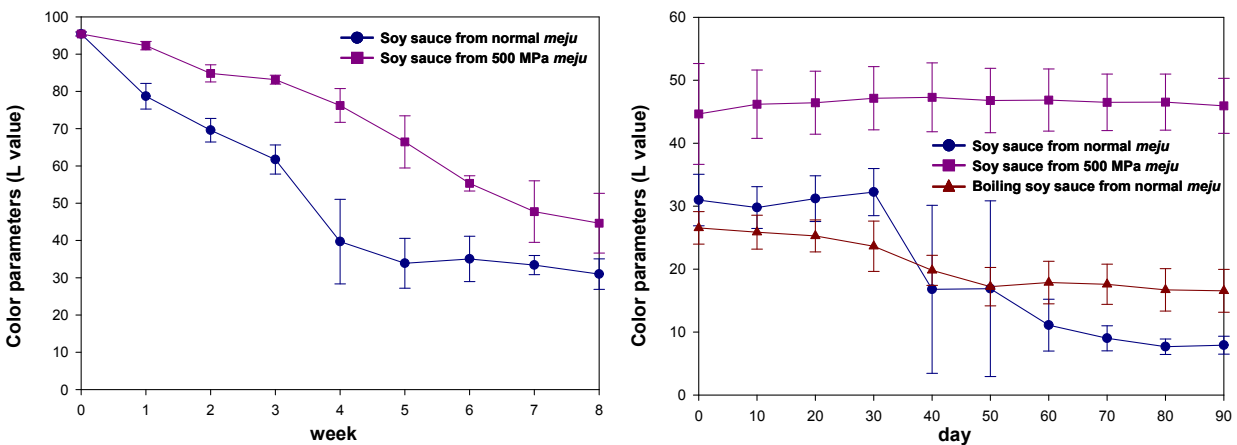


Figure 27. 초고압 처리 메주로 제조한 간장의 L값 변화(간장덧 : 좌, 간장숙성 : 우)

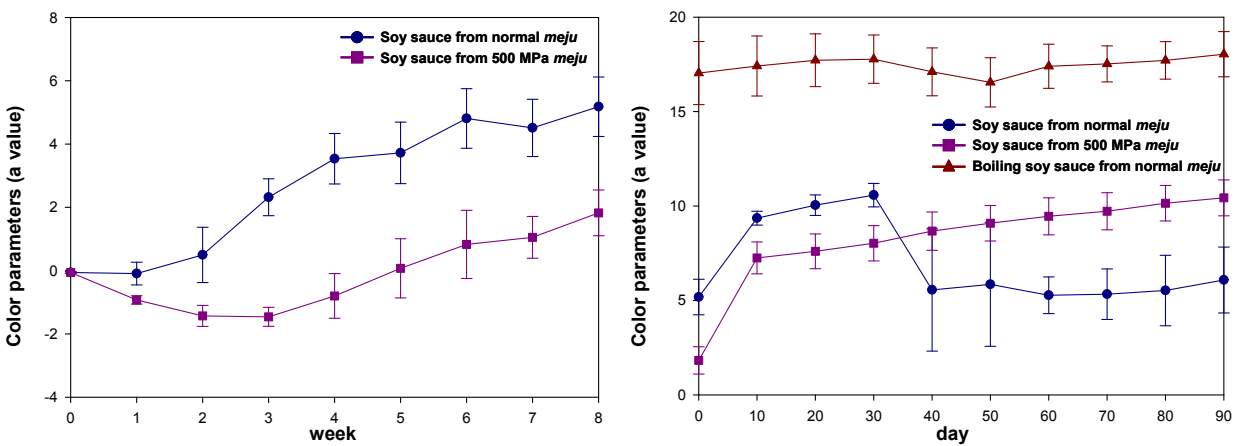


Figure 28. 초고압 처리 메주로 제조한 간장의 a값 변화(간장덧 : 좌, 간장숙성 : 우)

b (황색도)값 역시 간장덧에서 초고압 메주 간장이 일반 간장보다 낮은 값을 보였으며 두 그룹 다 6주 이후에 다소 감소하는 경향을 보였다. 달임간장은 가열살균처리에 의해 b값이 높

아졌으면 이 후 간장 숙성 기간에 40일 까지 유지되다가 이후 다소 증가하는 경향을 보였다. 초고압 메주 간장의 경우에는 숙성 초반부터 꾸준히 증가하는 경향을 보였으며 일반 간장의 경우는 앞선 L과 a값과 유사하게 숙성 30일 이 후 급격히 감소한 후 조금씩 낮아지는 경향을 보였다(Figure 29). ΔE 값의 변화는 Figure 30에 나타 내었는데 간장덧 기간에 초고압 메주 간장의 경우 그 변화가 일반 간장에 비해 적게 일어났으며 간장 숙성기간에는 초기 10일까지 변화가 크게 나타났으나 이후 꾸준히 조금씩 증가하는 경향을 보인 반면 달임간장은 30일까지 조금씩 증가하다가 이후 50일까지 크게 변화한 후 초고압 메주 간장과 유사한 변화를 보였다. 일반 간장은 앞에서 L, a, b값에서 나타난 것처럼 30일 이후에 크게 증가하였으며 그룹 내 편차도 크게 나타나 30일을 기점으로 색 품질의 변화가 크게 일어났다.

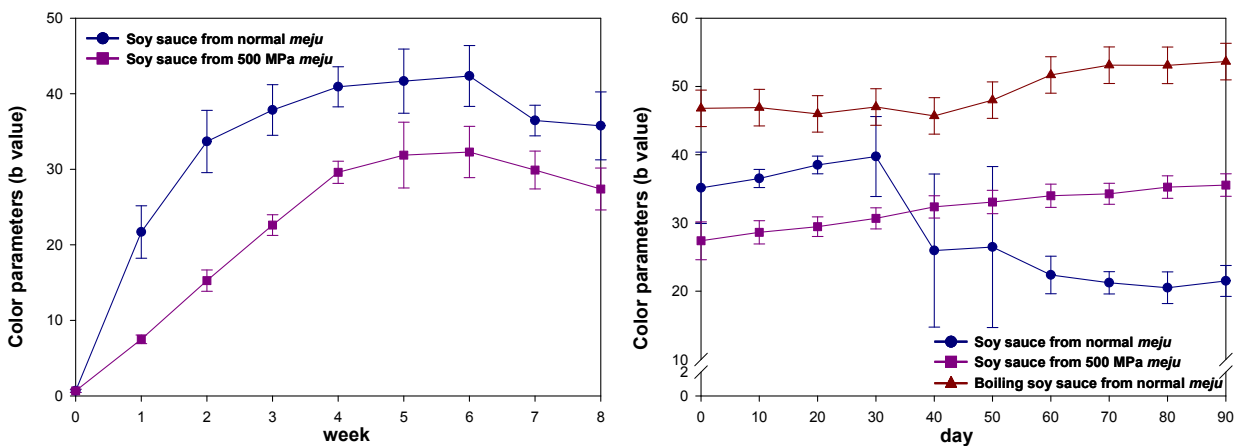


Figure 29. 초고압 처리 메주로 제조한 간장의 b값 변화(간장덧 : 좌, 간장숙성 : 우)

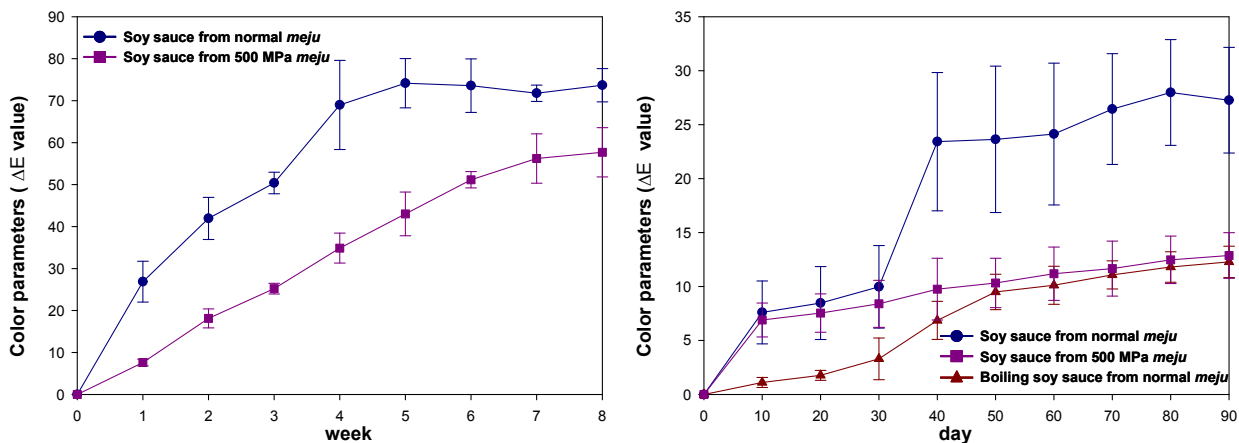


Figure 30. 초고압 처리 메주로 제조한 간장의 ΔE 값 변화(간장덧 : 좌, 간장숙성 : 우)

다. 총균수 변화

간장덧에서 초고압 메주 간장과 일반간장에서의 총균수의 변화를 Table 14에 나타 내었다. 1주차에 초고압 처리 메주 간장에서 $4.0 \pm 0.0 \times 10^6$ cfu/ml로 일반간장 $1.5 \pm 0.2 \times 10^7$ cfu/ml

으로 낮게 나타났으며 이는 초고압처리에 의한 미생물의 불활성에 기인한 것으로 사료된다. 이후 두 그룹에서 모두 간장덧 기간에 총균수가 증가하여 8주에는 초고압 메주 간장과 일반간장에서 $4.3 \pm 1.2 \times 10^7$ cfu/ml과 $2.3 \pm 0.5 \times 10^7$ cfu/ml 이는 간장덧 기간 동안 지속적으로 메주로부터 염수로 미생물이 이동하는 것을 의미한다.

Table 14. 초고압 처리 메주로 제조한 간장덧에서 총균수 변화 (Unit : cfu/ml $\times 10^7$)

간장덧 (N)	1주차	4주차	8주차
항아리-1	1.2	1.7	4.9
항아리-2	1.7	2.8	3.0
항아리-3	1.7	2.2	3.3
항아리-4	1.6	2.2	4.4
항아리-5	1.2	1.5	6.0
평균	1.5 ± 0.2	2.1 ± 0.5	4.3 ± 1.2
간장덧 (HP)	1주차	4주차	8주차
항아리-1	0.4	1.1	2.6
항아리-2	0.4	1.7	2.8
항아리-3	0.4	1.3	2.6
항아리-4	0.3	1.8	2.4
항아리-5	0.4	1.4	1.4
평균	0.4 ± 0.0	1.5 ± 0.3	2.3 ± 0.5

간장 숙성기간에 총균수의 변화는 Table 15에 나타 내었다. 달임간장의 경우 가열살균에 의해 $4.3 \pm 1.2 \times 10^7$ cfu/ml에서 $2.4 \pm 0.6 \times 10^4$ cfu/ml로 3 log으로 정도 감소하였고 숙성 90일에는 $1.3 \pm 0.4 \times 10^4$ cfu/ml로 감소하였다. 일반간장과 초고압 메주 간장의 경우에는 초기 $4.3 \pm 1.2 \times 10^7$ cfu/ml과 $2.3 \pm 0.5 \times 10^7$ cfu/ml로 약 2배정도의 차이를 보였고 90일 이후 $3.2 \pm 1.6 \times 10^7$ cfu/ml과 $8.0 \pm 1.0 \times 10^6$ cfu/ml로 일반간장에서 약 4배정도의 차이를 보였다. 이러한 간장덧과 간장 숙성 중 초고압 메주간장보다 일반간장에서 미생물이 많은 것은 일반간장의 품질에 이상과 연관되어진다.

Table 15. 초고압 처리 메주로 제조한 간장숙성에서 총균수의 변화

(Unit : cfu/ml)

N (cfu/ml × 10 ⁷)	0일째	90일째
항아리-1	4.9	2.3
항아리-2	3.0	5.4
항아리-3	3.3	2.0
항아리-4	4.4	2.0
항아리-5	6.0	4.3
평균	4.3 ± 1.2 cfu/ml × 10 ⁷	3.2 ± 1.6 cfu/ml × 10 ⁷
B (cfu/ml × 10 ⁴)	0일째	90일째
항아리-1	2.1	0.9
항아리-2	3.2	2.0
항아리-3	2.6	1.2
항아리-4	2.4	1.3
항아리-5	1.7	1.2
평균	2.4 ± 0.6 cfu/ml × 10 ⁴	1.3 ± 0.4 cfu/ml × 10 ⁴
HP (cfu/ml × 10 ⁷)	0일째	90일째
항아리-1	2.6	0.9
항아리-2	2.8	0.8
항아리-3	2.6	0.8
항아리-4	2.4	0.8
항아리-5	1.4	0.6
평균	2.3 ± 0.5 cfu/ml × 10 ⁷	8.0 ± 1.0 cfu/ml × 10 ⁶

라. 간장 덧 및 간장 숙성 기간 동안 대사산물의 변화

초고압을 처리한 메주와 일반메주를 사용하여 간장을 제조하였고 이들 간장으로부터 얻은 1D ¹H NMR spectra를 가지고 2D와 spiking 실험을 통해서 40개의 대사산물들을 동정하였으며 다음과 같다. leucine, isoleucine, valine, lactate, alanine, acetate, arginine, betaine, tyramine, phenylalanine, formate, α-glucose, β-glucose, lysine, γ-aminobutyrate (GABA), fucose, ethanol, succinate, tyrosine, proline, choline, uracil, aspartate, methionine, pyroglutamate, glutamate, glycine, trimethylamine, malonate, phosphocholine, butyrate, oligosaccharide (O1), oligosaccharide (O2), oligosaccharide (O3), glycerol, hypoxanthine, histamine, histidine, tryptophan, 그리고 fumarate 이상 40개 대사산물이다.

(1) 간장덧 발효 기간 동안 대사산물의 변화

간장덧 발효 기간 중에 초고압 메주 간장덧과 일반 간장덧의 변화를 Figure 31에 나타 내었다. 간장덧 1주가 지난 후 Figure 31A에서와 같이 초고압 메주 간장덧과 일반 간장덧은 분명하게 나타나는 것을 알 수 있었다. 이는 초고압 메주 간장덧에서 betaine 그리고 glycerol의 함량이 높았고 일반 간장덧에서는 leucine, isoleucine, valine, alanine, acetate, arginine, betaine, phenylalanine, α-glucose, lysine, γ-aminobutyrate (GABA), tyrosine, uracil, methionine,

glutamate, oligosaccharide (O1), oligosaccharide (O2) 그리고 oligosaccharide (O3)의 함량이 높게 나타났기 때문인데(Figure 31C) 이는 초고압 처리 메주가 일반 메주에 비해 밀도가 높고 표면적이 작았기 때문으로 사료된다. 그리고 초고압 메주 간장덧에서 glycerol 함량이 높았는데 이는 초고압 처리 이후 메주에서 glycerol의 함량이 증가했기 때문으로 여겨진다. 간장덧 발효 8주후에는 두 그룹이 1주에서보다는 낮은 통계적인 수치로 분리가 되었으며(Figure 31B) 초고압 메주 간장덧에서는 betaine, formate, tyrosine, choline, malonate, phosphocholine 그리고 glycerol이 함량이 높게 나타났고 일반 간장덧에 비해 leucine, lactate, acetate, arginine, α -glucose, lysine, uracil, aspartate, glutamate, oligosaccharide (O1), oligosaccharide (O2) 그리고 oligosaccharide (O3)의 함량이 낮았다(Figure 31D). 이는 초고압 처리 메주의 밀도가 높았고 표면적이 작아서 염수로의 대사산물들의 용출이 늦었음에도 불구하고 발효 8주후에 초기의 대사산물보다 많은 수의 대사산물들의 함량이 초고압 메주 간장덧에서 나타는데 이는 초고압 처리에 의해 일반 메주에서 보다 아미노태질소와 효소활성도가 증가했던 결과(Table 13)와 일맥상통한다고 볼 수 있다.

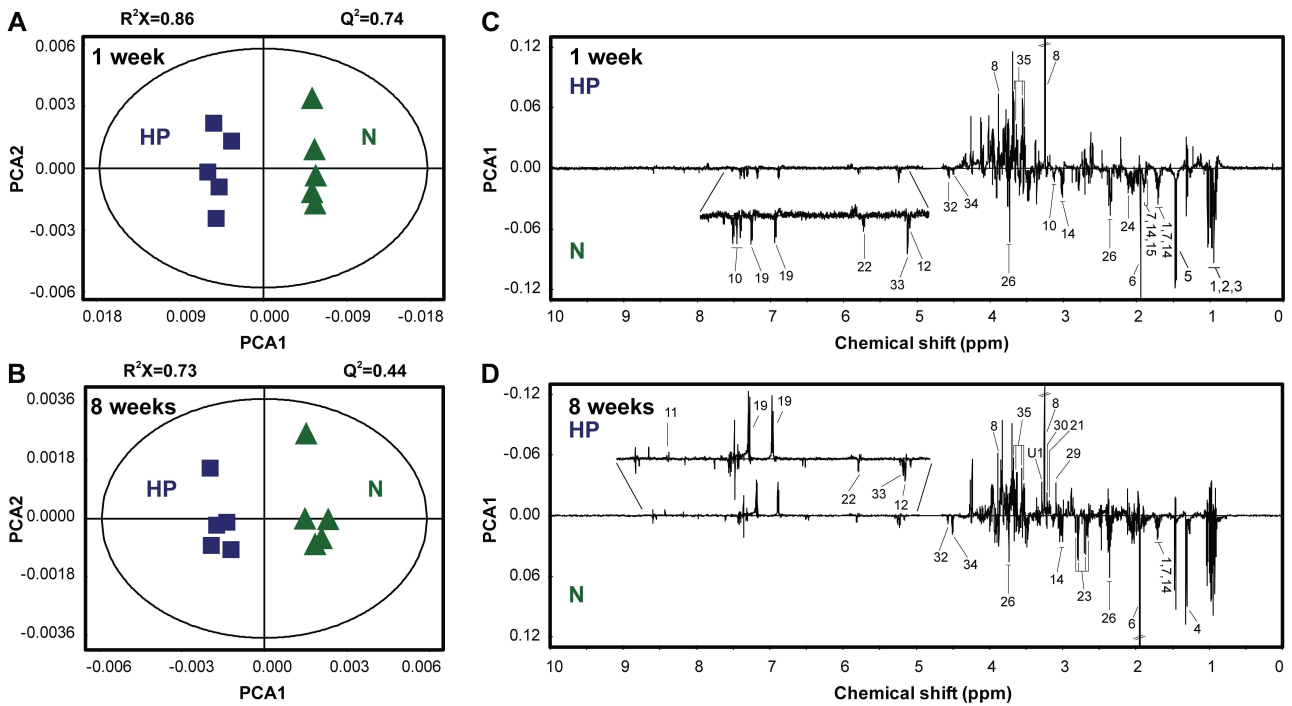


Figure 31. PCA score (A and B) and loading (C and D) plots derived from the ^1H NMR spectra of soy sauce (N) from normal *meju* and soy sauce (HP) from high pressure-treated *meju* fermented for 1 week and 8 weeks. Key: 1, Leucine; 2, Isoleucine; 3, Valine; 4, Lactate; 5, Alanine; 6, Acetate; 7, Arginine; 8, Betaine; 10, Phenylalanine; 11, Formate; 12, α -Glucose; 14, Lysine; 15, GABA (γ -aminobutyrate); 19, Tyrosine; 21, Choline; 22, Uracil; 23, Aspartate; 24, Methionine; 26, Glutamate; 29, Malonate; 30, Phosphocholine; 32, Oligosaccharide(O1); 33, Oligosaccharide(O2); 34, Oligosaccharide(O3); 35, Glycerol; and U1 unknown compound.

(2) 간장덧 이후 간장의 달임공정에 의한 대사산물의 변화

간장덧 이후 일반간장에 가열살균 처리를 하여 생성된 달임간장과 일반간장 그리고 초고압

메주 간장 사이에서 대사산물의 차이를 Figure 32에 나타 내었다. 우선 초고압 처리와 달임간장이 서로 구별됨을 알 수 있는데(Figure 32A) 이는 초고압 처리 간장에 acetate 그리고 glutamate의 함량이 높았으며 이에 반해 betaine, malonate, phosphocholine, oligosaccharide (O2) 그리고 glycerol의 함량이 높게 나타나기 때문이다(Figure 32C). 가열살균 후 달임간장에서 아미노태질소의 함량이 높게 나타났으나 유리아미노산 등의 함량에는 유의적인 차이가 나타나지는 않았다. 일반간장과 달임간장 역시 서로 다른 그룹을 형성함을 알 수 있는데(Figure 32B) 이는 일반 간장에 leucine, isoleucine, valine, lactate, alanine, acetate, arginine, α -glucose, lysine, γ -aminobutyrate (GABA), aspartate, glutamate, oligosaccharide (O1), oligosaccharide (O2) 그리고 oligosaccharide (O3)의 함량이 높았고 달임간장에서는 betaine, tyrosine, choline, malonate, phosphocholine 그리고 glycerol의 함량이 높았기 때문이다(Figure 32D).

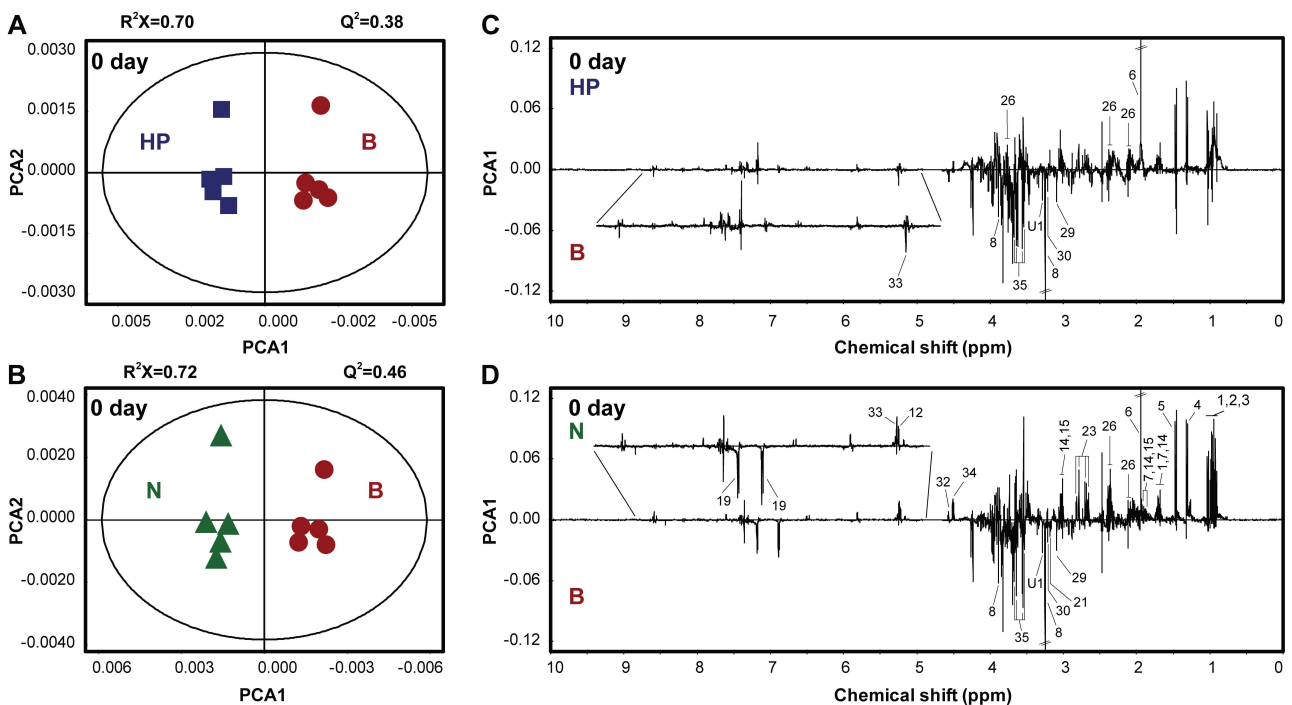


Figure 32. PCA score (A and B) and loading (C and D) plots derived from the ^1H NMR spectra of soy sauce (N) from normal *meju*, boiled soy sauce (B) from normal *meju*, and soy sauce (HP) from high pressure-treated *meju* aged for 0 day. Key: 1, Leucine; 2, Isoleucine; 3, Valine; 4, Lactate; 5, Alanine; 6, Acetate; 7, Arginine; 8, Betaine; 12, α -Glucose; 14, Lysine; 15, γ -Aminobutyrate (GABA); 19, Tyrosine; 21, Choline; 23, Aspartate; 26, Glutamate; 29, Malonate; 30, Phosphocholine; 32, Oligosaccharide (O1); 33, Oligosaccharide (O2); 34, Oligosaccharide (O3); 35, Glycerol; and U1 unknown compounds.

(3) 숙성 후 간장의 대사산물 변화

간장 숙성 90일 후 초고압 메주 간장과 일반 간장과의 대사산물들의 차이를 Figure 33에 나타 내었다. 높은 통계적인 수치로 두 그룹이 나뉘지는 것을 알 수 있었으며(Figure 33A) 일반 간장에서 leucine, isoleucine, valine, alanine, acetate, arginine, phenylalanine, formate, lysine, γ -aminobutyrate (GABA) 그리고 glutamate의 함량이 높았고 초고압 메주 간장에서는 betaine,

α -glucose, malonate, oligosaccharide (O2) 그리고 glycerol의 함량이 높게 나타났다(Figure 33C). 일반 간장은 숙성 기간 중에 이상발효가 일어나 이취가 났는데 이는 달임간장에 비해 염도가 낮았으며 초고압 메주 간장에 비해 총균수가 많았기 때문으로 생각되며 특이하게 formate의 함량이 초기에 비해 특이하게 매우 증가한 것을 알 수 있었다. 이는 formate가 초기 간장의 발효 이상을 알 수 있는 marker로 될 수도 있음을 보여준다. 초고압 메주 간장과 달임간장과의 차이는 앞선 일반간장과의 차이보다 더 높은 통계적인 수치로 차이가 나타났는데(Figure 33B) 이는 alanine, betaine, formate, lysine, γ -aminobutyrate (GABA), tyrosine and glycerol의 함량이 초고압 메주 간장에서 높게 나타났으며, lactate, acetate, α -glucose, choline, aspartate, oligosaccharide (O1), oligosaccharide (O2) 그리고 oligosaccharide (O3)의 함량이 달임간장에 높게 나타났다. alanine, betain, lysine, GABA, tyrosine 함량의 초고압 메주 간장에서 높게 나타났으며 aspartate의 함량만을 제외한 유리아미노산들이 함량의 차이가 유의적이 않았다. 이는 초고압 처리에 의한 효소활성도의 증가에 기인한 것으로 생각된다. 그리고 초고압 처리 간장에서 glycerol의 함량이 가열살균처리 이후 제외하고 간장덧과 간장 숙성기간동안 높게 나타났는데 메주의 초고압처리 이후 저장 중 glycerol의 함량이 증가한 것과 유사한 결과가 나타났다. 초고압 처리에 의한 glycerol 함량의 증가에 관한 논문은 아직 보고가 되진 않았지만 glycerol 분해 효소의 활성도를 증가 시키거나 물리적인 작용에 의한 것으로 보이며 앞으로 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

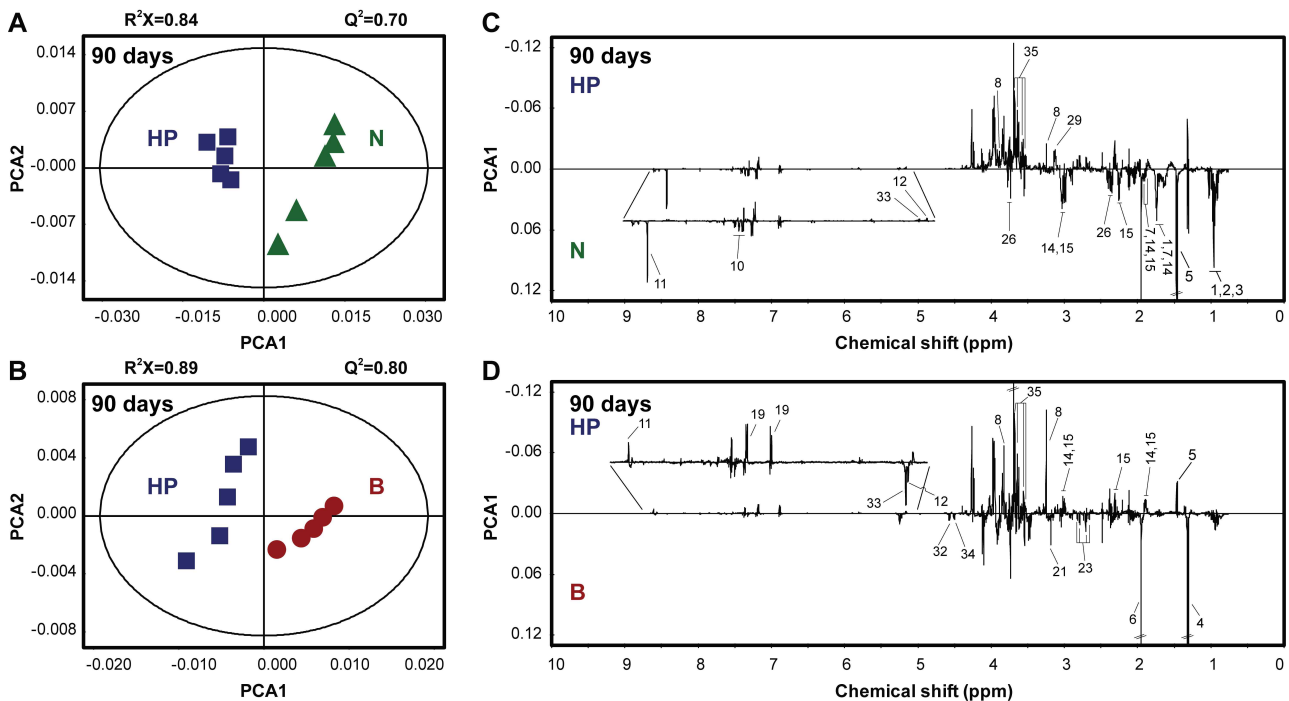


Figure 33. PCA score (A and B) and loading (C and D) plots derived from the ^1H NMR spectra of soy sauce (N) from normal *meju*, boiled soy sauce (B) from normal *meju*, and soy sauce (HP) from high pressure-treated *meju* aged for 90 days. Key: 1, Leucine; 2, Isoleucine; 3, Valine; 4, Lactate; 5, Alanine; 6, Acetate; 7, Arginine; 8, Betaine; 10, Phenylalanine; 11, Formate; 12, α -Glucose; 14, Lysine; 15, γ -Aminobutyrate (GABA); 19, Tyrosine; 21, Choline; 23, Aspartate; 26, Glutamate; 29, Malonate; 32, Oligosaccharide (O1); 33, Oligosaccharide (O2); 34, Oligosaccharide (O3); and 35, Glycerol.

(4) 일반간장과 초고압 메주간장의 관능평가

간장덧 기간 동안 1주, 4주 그리고 8주에 간장의 관능평가를 실시하여 Figure 34에 나타 내었다. 간장덧 1주에는(Figure 34A) 초고압 메주 간장의 색이 일반 간장에서보다 낮게 나타났고, 향은 일반간장에서 높게 나왔으나 이외의 항목에서는 큰 차이를 보이지 않았다. 간장덧 4주에는 전체적인 항목에서 초고압 메주 간장과 일반 간장간에 차이를 보이지 않았으며 간장덧 8주에는 색상과 기호도에서만 차이가 있었는데 일반간장이 초고압 메주 간장보다 진하게 나왔으며 다른 항목이 유사한 점을 고려하면 초고압 메주 간장이 기호도가 더 나왔던 것은 연한 색이 주요한 원인인 것으로 생각된다.

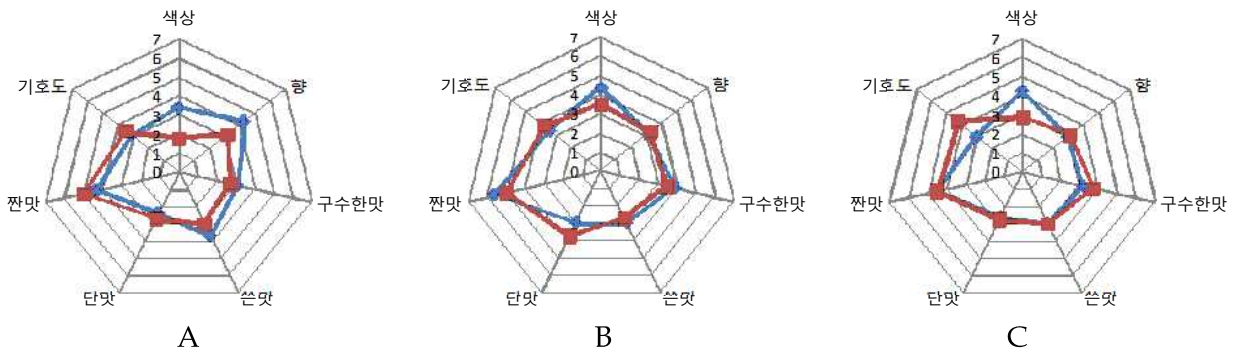


Figure 34. 간장 제조 중 초고압 메주 간장덧(■:적색)과 일반간장덧(◆:청색)의 1주(A), 4주(B) 그리고 8주(C)에서의 관능평가 QDA 도표

간장 숙성 기간 동안에 달임간장을 포함하여 초고압 메주 간장과 일반 간장의 관능평가의 결과를 Figure 35에 나타 내었다. 전반적으로 달임간장이 다른 간장에 비해 높은 점수를 받았으며 여기서 달임간장은 염도가 높음에도 불구하고 짠맛 항목에서 다른 간장과 별다른 차이를 나타내지 않았는데 이는 단맛과 향이 진하여 짠맛이 masking 되었기 때문으로 생각된다. 일반 간장의 경우에는 간장 숙성0일째는 초고압 메주 간장과 유사하였으나 숙성 40일째부터 낮은 점수를 받았는데 이는 이상발효가 시작되어 향에서 낮은 점수를 받았으며 이것이 기호도에도 직접적으로 영향을 미쳤기 때문으로 여겨진다. 초고압 메주 간장의 경우 색상은 다른 간장에 비해 가장 연하게 나타났고 향의 경우에는 달임간장에 비해 낮은 점수를 받았는데 다른 항목은 그리 큰 차이를 보이진 않았는데 기호도에서 역시 낮은 점수를 받은 것은 향에서 낮은 점수를 받은 것으로 생각 되었다.

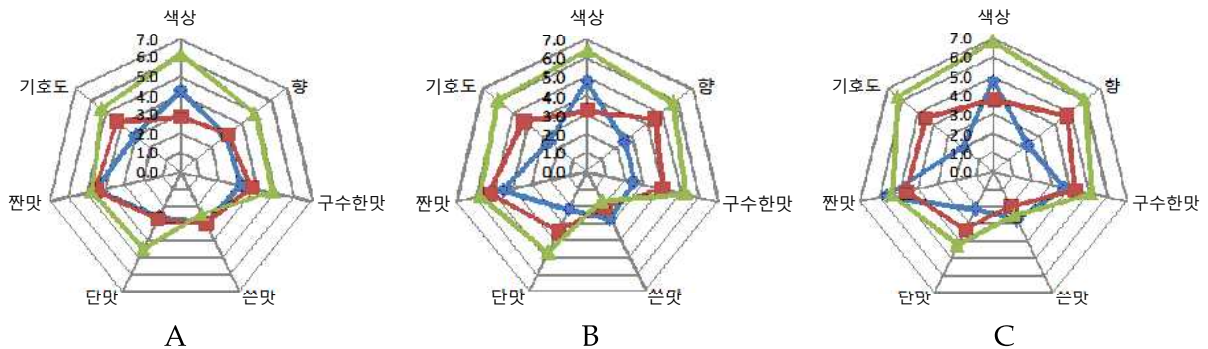


Figure 35. 간장 숙성 중 초고압 메주 간장(■: 적색), 일반간덧(◆: 청색) 그리고 달임간장(▲: 녹색)의 0일(A), 40일(B) 그리고 90일(C)에서의 관능평가 QDA 도표

마. 결론

한식메주에 500 MPa에서 10분간 초고압 처리한 후 간장덧과 간장 숙성기간 동안에 변화를 살펴보았다. 초고압 메주 간장은 간장덧에서 메주가 압력에 의해 밀도가 높아지고 표면적이 작았기 때문에 아미노태질소 및 환원당의 함량이 초반에는 낮게 나타났고 간장덧 기간 동안 전반적으로 낮게 측정되었지만 간장덧 발효가 진행되면서 그 격차가 조금씩 줄어들어 가는 것을 알 수 있었다. 간장 숙성 90일 이후에 달임간장에서 초고압 메주 간장에서 보다 수분 증발에 의해 아미노태질소는 높게 나타났지만 초고압 메주 간장에서 유리아미노산의 함량이 낮게 나타나는 것은 초고압에 의한 효소활성도가 증가했고 이로 인해 유리아미노산의 함량이 증가한 것으로 보인다. 또한 초고압 처리 간장의 간장 숙성 기간 동안에는 이취가 나면서 이상발효가 나타났던 일반간장에 비해 정상 발효가 나타났는데 초고압에 의한 미생물의 수가 감소했기 때문으로 생각되며 가열살균 처리 없이 저장성을 부여함으로써 maillard 반응에 의한 흑갈색의 발현이 현저히 낮게 나타났다.

간장의 제조 과정 중 초고압 처리를 실시 한 결과 간장 숙성 후와 간장덧 이후 초고압 처리는 그 효과가 별로 나타나지 않았으며 이는 간장의 성상이 액체이며 간장 중 미생물이 외부 스트레스에 대해 저항성을 갖고 있기 때문으로 생각된다. 그러나 간장덧이전인 메주에 초고압을 실시한 결과 메주에서 효소활성도가 증가하였고 아미노태질소의 함량 또한 증가하는 것을 알 수 있었다. 이러한 초고압 메주로 담은 간장에서는 초기 압력으로 인해 밀도가 높고 표면적이 작아 메주로부터 염수로 용출 속도가 늦었고 간장덧과 간장 숙성 기간 중 아미노태질소 및 환원당의 함량은 전반적으로 낮게 나타났으나 90일 숙성 이후 유리아미노산의 함량은 달임간장에서 보다 높게 나타났다. 그리고 초고압 메주 간장은 달임간장에 비해 맑은 색상을 보였다.

따라서 재래한식간장을 제조하는데 재래메주에 500 MPa에서 10분 처리하여 초고압을 처리하였을 때 효과가 가장 좋았으며 흑갈색을 저감화 하였고 숙성 촉진에도 기여하여 재래한식간장의 품질을 향상 시켜 그 경쟁력을 높이는데 기여할 것으로 생각된다.

제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	관련분야 기여도
1차 연도 (2008)	초고압처리에 의한 간장의 성분 변화와 처리 조건 확립	초고압처리에 의한 간장중의 미생물 사멸속도에 관한 연구	100%	간장중의 미생물에 대한 초고압 처리 효과가 크지 않았는데 미생물 이 외부스트레스에 저항성을 가지고 있었고 간장의 성상이 액체이기 때문인 것으로 생각된다. 즉, 초고압 처리에 의한 살균 효과는 미생물의 저항성과 처리 대상의 성상에 따라 달라짐을 알 수 있었다.
		초고압처리에 의한 간장 성분의 생화학적 변화에 관한 연구	100%	간장에 초고압을 직접 처리함에 따 라 성분에 큰 변화가 있지 않았다. 이는 간장이 액체였기 때문으로 생각된다. 이는 초고압의 대상이 액체일 경우 성분의 변화에 큰 영향 을 주지 못하는 것으로 생각된다.
		숙성 기간에 따른 일반간장의 NMR 분석을 통한 성분비교 분석	100%	숙성 기간별 재래한식간장과 상업적 간장에 대한 NMR 분석을 통해 간장의 대사산물에 대한 포괄적인 변화를 조사 후 품질을 평가하였고 다른 전통발효식품에 NMR 분석의 가능성을 제시함
구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	관련분야 기여도
2차 연도 (2009)	간장 제조 과정 중 초고압 처리에 따른 품질 변화	간장 제조 과정 중 초고압 처리에 따른 품질 변화 측정	100%	간장 제조 과정 중 액체 상태인 간장덧 이후와 고체 상태인 메주에 초고압처리를 실시한 결과 고체인 메주에서 미생물과 성분 및 효소활 성도에 영향을 미쳤다. 초고압은 대상이 액체보다는 고체일 때 효과 가 더 나타났으며, 효소 활성을 촉진하는 효과가 있었다.
		초고압 처리 간장과 일반간장의 풍미 및 관능적 품질 비교분석	100%	초고압 처리 메주로 제조한 간장과 일반간장의 관능평가에서 초고압 처리에 의해 관능적으로 변화를 가져오지는 않았다. 즉, 초고압 처리 는 관능적인 측면에서 큰 영향을 미 치지 않는다.
		초고압 처리 기술을 도입한 재래한식간장의 제조 기술 확립	100%	재래한식간장의 제조 과정 중 메주 에 초고압 처리 하였을 때 그 효과 가 가장 잘 나타났으며, 전통발효식 품인 된장이나 고추장에도 이용 가능성을 제시하였다.

제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획

■ 실용화 · 산업화 계획(기술실시 등)

재래한식간장의 제조과정 중 초고압 처리를 하기 위해서는 우선시 되는 조건은 초고압 처리 설비나 초고압 장비 사용의 용이성이 해결되어야 한다. 그러나 현재 이러한 조건이 충족되지 않아 실용화 및 산업화에는 어려움이 있을 것으로 생각된다. 그러나 최근 초고압에 관한 연구가 계속 진행되고 있어 그 효과가 지속적으로 보고되고 있으므로 향후 초고압 장치의 설비가 증가되고 좀 더 용이하게 사용이 가능해 질 것이라고 생각되며 본 연구의 실용화 또는 산업화가 이뤄질 것으로 여겨진다.

■ 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

전통발효식품인 간장의 제조 과정 중 메주에 초고압을 처리하여 간장을 제조한 실험은 본 실험을 제외하고 아직 이뤄지지 않았다. 앞으로 이 연구를 통해 초고압 처리한 메주를 이용한 재래한식간장의 제조에 따른 색 품질 향상, 숙성 촉진 그리고 저염화 관한 특허 출현도 가능하며 이에 관련된 논문 또한 투고할 예정이다.

■ 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

한식간장의 제조 과정 중 초고압을 메주에 처리 시 가장 효과적인 것으로 나타났다. 그러나 더 높은 압력과 온도 조건으로 간장덧 이후 또는 간장 제조 후 처리하였을 때 숙성의 촉진이나 관능적인 측면에서 다른 효과를 얻을 수 있을 것으로 생각되며 앞으로 연구가 좀 더 필요하다.

초고압 처리가 메주에서 미생물 사멸과 효소활성도를 촉진한 효과가 나타난 것을 알 수 있다. 이는 전통발효식품인 된장에도 응용 가능성을 제시한 것이다. 고추장의 경우에는 초고압처리에 의한 연구가 보고되었는데 이는 된장이나 간장에 비해 고추장은 당이 많기 때문에 유통 또는 저장 기간 동안에 저온상태를 유지 하지 않을 경우 미생물 발효에 의해 생기는 gas로 인해 부풀기 때문에 용기가 파괴되거나 품질이 떨어지게 된다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 고추장에 열과 함께 초고압 처리를 실시 한 결과 미생물의 살균효과를 나타냈다고 보고하였다. 된장의 경우에도 초고압 처리에 의해서 저장성을 부여함으로써 저염화와 같은 효과를 기대할 수 있으며 숙성을 촉진하여 품질 향상에 도움이 될 것으로 생각된다.

전통발효식품은 미생물을 제어하기 위해 염농도를 조절하여 저장성을 유지하게 된다. 그러나 최근 고염도 식품이 건강에 위해하다는 소비자들의 인식으로 인해 전통발효식품이 외면당하고 있다. 그러므로 초고압 처리를 통해 저장성을 전통발효식품에 부여하여 저염화 한다면 그 소비를 촉진할 수 있을 것으로 생각된다.

제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. Nuray Erkan and Gonca Üretener: The effect of high hydrostatic pressure on the microbiological, chemical and sensory quality of fresh gilthead sea bream. *European Food Research and Technology*. Vol. 230(4) pp. 533-542 (2010)

▶ 어류인 돔에 3°C 그리고 15°C/5분/250 MPa에서 초고압을 처리하여 4°C에서 저장한 후 미생물학적, 화학적 그리고 관능적 평가를 실시한 결과 shelf life가 처리하지 않은 돔은 15일이었으나 초고압 처리한 돔은 18일 까지 연장되었다.

2. Michael J. Eisenmenger and José I. Reyes-De-Corcuera: High pressure enhancement of enzymes: A review. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 45(5), pp.331-347 (2009)

▶ 초고압 처리는 유해한 효소를 불활성하는데 사용되어지기도 하는 반면, 다른 효소는 안정화 또는 활성도를 유도한다는 결과도 있다. 초고압 처리의 효과는 처리압력, 온도, 용매, 원료 등에 따라 달라지나 효소의 촉매작용에 큰 도움을 주어 효과적인 반응을 촉진하는 효과가 있다.

3. Bettina Kepf, Erhard Bremer: Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol*. Vol 170, pp. 319-330 (1998)

▶ 미생물이 삼투압 스트레스를 받았을 때 이를 극복하기 위해 compatible solutes를 내부에서 합성하거나 외부로부터 가지고와 내부에 축적을 한다. 이렇게 미생물내 축적된 compatible solutes은 다른 외부의 스트레스에 좀 더 저항성을 갖게 된다. 그래서 염수 중에서 적응을 하고 있는 미생물은 초고압 처리와 같은 스트레스에 좀 더 저항성을 갖는 것으로 생각된다.

4. Xiang Dong Sun and Richard A. Holley: High Hydrostatic Pressure Effects on the Texture of Meat and Meat Products. *J. Food Sci*. Vol. 75(1) pp. R17-R23 (2009)

▶ Meat와 meat products에 초고압과 온도 처리한 후 조직감을 보았는데 초고압처리에 의해 Juiciness, springiness과 chewiness가 증가한 것으로 나타났다. 초고압 처리는 관능적인 측면에 큰 영향을 미치지 않는다고 보고되고 있으나, 처리 대상이 texture에 따라서 관능적인 변화에도 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

제 7 장. 참고문헌

- (1) 대한장류공업협동조합 (<http://www.jangryu.or.kr>)
- (2) 식품의약품안전청 (<http://www.kfda.go.kr>)
- (3) 김영아, 김현숙: 재래식 조선간장과 시판양조간장의 소비실태조사 및 관능적 특성 연구, *KOREAN J. SOC. FOOD SCI.* Vol. 12, NO. 3, pp. 280~290 (1996)
- (4) 한복려: 각종 잘류음식과 활용. 장류 산업의 현재와 미래, 2004 지역혁신특성화 포럼활동지원사업, 전남대학교 경영연구소.
- (5) Hoover, D.G: Pressure effects on biological systems. *Food Technol.*, 47, 150 (1993) [Hite, B.H.: The effect of pressure in the preservation of milk. West Va. Univ. Agr. Expt. Sta. Bull. (1988)]
- (6) 이동언, 박지용, 이윤범, 여익현: 초고압을 이용한 신선초 녹즙의 살균 및 갈색화 효소의 불활성, *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.* Val. 27. NO. 6. pp 991~996 (1995)
- (7) 구송이, 차광현, 이동언: 식품·생물 산업에서의 초고압기술 응용, *Food Science and Industry*, Vol. 40 No. 3 pp. 23~30 (2007)
- (8) M.Shafiur Rahman: Handbook of Food Preservation, High-Pressure Treatment. MARCEL DEKKER, INC. p537 (1999)
- (9) Yokohama, H., Sawamura, N., & Motobayashi, N. (1992). Method for accelerating cheese ripening. *European Patent application EP*, 469, 857(0) A1.
- (10) Avila, M., Garde, S., Gaya, P., Medina, M., & Nunez, M. (2006). Effect of high-pressure treatment and a bacteriocin-producing lactic culture on the proteolysis, textura, and taste of Hispanico cheese. *Journal of Dairy Science*, 89, 2882 - 2893.
- (11) Yayanos, A. A., 1975, *Biochimica et Biophysica Acta* 392, 271.
- (12) Askar, A., 1998, Minimally processed tropical fruits. *Fruit Processing*, 8, 339.
- (13) Mertens, B., 1993, Development in high pressure food processing. 2. *Lebensm Technol.*, 44, 100.
- (14) Ponce, E., Pla, R. Mur-Mur, M., Gervilla, R. and Guamis, B., 1998, Inactivation of *Listeria innocua* inoculated in liquid whole egg by high hydrostatic pressure., *J. Food Prot.*, 61, 119.
- (15) 고영란, 권선화, 최재훈, 손미예, 박석규: 원료콩의 증자조건을 달리한 검정콩 간장의 질소 화합물 및 유리아미노산, *Korean Journal of Food Preservation*, Vol 10, No. 75~79 (2003)
- (16) 유승구, 조원희, 강수민, 이선희: 전통 된장 및 간장의 숙성기간별 생육 미생물의 분리 및 동정, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 27, No. 2, 113~117 (1999)
- (17) 건국대 식품개발연구소, 1996. 전통 콩 발효식품의 기능 및 생리적 활성, 건국대 개교 50주년 기념 국제심포지움 논문집, 건국대학교 식품개발연구소: 1~58
- (18) 신현경: 기능성 식품의 개발 및 연구동향, *식품과학과산업*, Vol. 30, No. 1, pp 2~13 (1997)
- (19) 김동훈: 식품화학: 마이알 반응. 탐구당, 서울, p.403~416 (1995)
- (20) 전민선, 손경희, 채선희, 박현경, 전형주: 제조조건에 따른 한국전통간장의 색 특성에 관한 연구. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 31(1), 32~38 (2002)

- (21) 이남혁, 홍석인, 김윤숙, 장종근, 홍상필, 왕순남, 순서연, 김윤지: 초고압에 의한 신선육 및 가공육의 저장성 연장 연구. 한국식품개발연구원. 2001
- (22) 고세희, 홍근표, 박성희, 최미정, 민상기: 초고압 동결 처리 방법에 따른 돈육의 물리적 특성에 관한 연구. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* Vol. 26(4) pp. 464~470 (2006)
- (23) 임상빈, 좌미경, 목철균, 박영서: 초고압 처리한 좁쌀약주의 저장 중 미생물수, 효소활성 및 품질변화. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 33(3), 576~581 (2002)
- (24) 권수미, 김창민, 김양하: 초고압 처리 즉석밥의 생물학적 특성. *Food Science and Industry*, Vol. 40 No. 3 pp. 31~35 (2007)
- (25) McClements, J. M. J.; Patterson, M. F.; Linton, M. The effect of growth stage and growth temperature on high hydrostatic pressure inactivation of some psychrotrophic bacteria in milk. *J.FoodProtect.*2001,64,514-522.
- (26) Linton, M.; Patterson, M. F. High pressure processing of foods for microbiological safety and quality: (A short review). *ActaMicrobiol.Immunol.Hung.*2000,47,175-182.
- (27) Morild, E. The theory of pressure effects on enzymes. *Adv.ProteinChem*1981,34,93-166.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.