

## 강릉지방의 오징어 식해 개발에 관한 연구

### 2. 숙성온도 및 기간에 따른 화학적 변화, 미생물 변화 및 단백질 분해 효소의 정제

김상무 · 조영제\* · 이근태\*

강릉대학교 수산자원개발학과 · \*부산수산대학교 식품공학과

## The Development of Squid(*Todarodes pacificus*) Sik-hae in Kang-Nung District

### 2. The Effects of Fermentation Temperatures and Periods on Chemical and Microbial Changes, and the Partial Purification of Protease

Sang-Moo KIM, Young-Je CHO\* and Keun-Tai LEE\*

Department of Fisheries Resources Development, Kangnung National University,  
Kangnung 210-702, Korea

\*Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan,  
Pusan 608-737, Korea

In order to develop the squid(*Todarodes pacificus*) sik-hae, the changes of TBA, fatty acids, free amino acids, and the number of microflora fermented at different fermentation temperatures and periods were determined. In addition, protease from squid sik-hae was partially purified.

The number of TBA was the highest after 5-day storage and decreased after that, and lipid oxidation was the highest at 10°C. The amounts of linoleic acid(18:2) and oleic acid(18:1) were about 60% of fatty acid composition of squid sik-hae, and linolenic acid(18:3) and EPA(20:5) significantly decomposed with increasing fermentation periods and temperatures. Pro, His, Arg, Leu, and Glu were composed mainly of amino acid and the composition ratios of Ser, His, and Arg decreased with increasing fermentation periods whereas, those of Glu, Ala, Val, and Tyr increased. The composition ratios of Glu, Val, and Met increased with increasing fermentation temperatures whereas, those of Ala, Cys, Thr, and Gly decreased. The number of microflora generally increased up to 15-days of storage and decreased after that. The rates of increase and decrease of the microbial number increased in proportion to fermentation temperatures. In addition, the bacteria producing proteases were identified as *Bacillus spp.* Proteases from 60~80% ammonium sulfate concentration showed the highest activity and had about 15 binds with molecular weights between 20,000 and 40,000 Dalton by the SDS-PAGE.

## 서 론

젓갈류는 어패류에 식염을 가하여 염장함으로써 부패균의 번식을 억제하고 자가소화효소 또는 미생물의 효소작용에 의해 육질을 분해시킨 우리나라 전통의 수산발효식품으로 제조공정이 단순하고 특별한 제조장치도 필요하지 않으며, 숙성 후의 제품은 독특한 감칠맛을 가지고 있어 옛부터 오늘에 이르기까지 밀반찬이나 김치의 조미 소재로 많이 이용되고 있다. 강릉지방을 중심으로 고래로부터 전해내려온 식혜는 우리나라 전통수산발효식품의 일종이지만 일반화 및 상품화 되어있지 못하고 이 지역의 향토 식품으로만 명맥을 유지하고 있는 실정이다. 최근에는 고식염이 성인병의 원인이 된다는 보고와 함께 저식염 젓갈류가 많이 보급되고 있으며 저식염을 사용하는 식혜는 전통문화의 보존 뿐 아니라 국민 건강적인 측면에서 볼때라도 그 중요성이 더 한층 요구되고 있다. 식혜에 대한 연구로는 이 등(1983)의 가자미 식혜에 관한 연구, 수안대 등(1987)의 가자미 식혜의 미생물에 관한 연구, 채(1990)의 강릉식혜의 상품화 증진을 위한 연구, 정 등(1992)의 함경도 가자미 식혜의 숙성중 맛성분의 변화에 관한 연구 등 일부밖에는 보고되고 있지 않으며 많은 연구가 필요한 분야이다. 본 연구에서는 전통적인 저염발효식품인 식혜에 대하여 오징어를 원료로 사용하여 숙성온도 및 기간의 변화에 따른 지방산, 유리아미노산 및 미생물의 변화를 연구하여 우리 전통식품에 대한 과학적 자료를 제공함과 동시에 오징어 식혜 생산과 보급에 대한 기초 자료를 얻고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

1) 시료의 처리: 동해안 특산 어종의 하나인 오징어를 원료로 사용하였다. 오징어(*Todarodes pacificus*)는 강릉시 수협에서 -25℃로 동결 저장된 것을 10℃에서 해동한 후, 폭 1cm 간격으로 썰어 식염을 7% 수준으로 하여 5℃에서 24시간 동안 물기를 제거한 후 사용하였다. 무우채는 2cm 정도 길이로 썰어 소금 7% 수준으로 하여 5℃에서 24시간 동안 물기를 제거한 후 사용하였다.

2) 식혜제조: 식혜제조는 전 공정은 전보(김 등, 1994)에서와 동일하게 조제하였다. 즉, 어육 중량당 곡류밥 50%(메조 및 멥쌀 각 25%), 고추가루

7%, 무우채 5%, 마늘 3%, 생강 1.5%로 혼합한 후, 용기에 넣어 밀봉하여 실험에 사용하였다.

### 2. 방 법

1) TBA 값: 마쇄한 식혜 10g에 9% percholic acid 15ml와 증류수 20ml를 가하여 10초동안 homogenize한 후, 10ml로 정용하여 Whatman No.2 여과지로 여과하였다. 여과액 5ml에 0.02M thiobarbituric acid(TBA) 5ml를 가한 후 혼합하여 15시간 암실에 방치한 후 529.5nm에서 흡광도를 측정하여 tetraethoxy propane(TEP)을 이용한 표준곡선에서 시료 g당에 malonaldehyde 량(μg/g)으로 환산하였으며 TBA 값은 시료 g당에 있는 malonaldehyde 상당량으로 표시하였다.

2) 지방산 분석: 지방산 분석은 Folch 등(1957)의 방법에 따라 시료 중량에 대한 4배량의 chloroform-methanol(2:1 v/v)를 가하여 blender로 마쇄하고 24시간 암실에서 방치 추출한 후 흡인 여과하였다. 위의 추출조작을 2회 반복한 추출액을 합쳐 적당량의 물을 가하여 methanol을 제거, rotary evaporator에서 농축하였다. 추출은 수분을 완전히 제거한 시료를 5% HCl-CH<sub>3</sub>OH으로 methyl화(Hammond, 1981)하였으며, 정제한 지방산 methyl ester를 40ml/min flow rate에서 gas-liquid chromatography(shimadzu GC-14B)로 분석하였다.

3) 유리아미노산 측정: 시료 10g에 70% ethanol 50ml를 넣고 24시간 방치한 후 6,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 잔사에 30ml ethanol을 가하여 2회 추출한 다음 원심분리하였다. 상등액에 sulfosalicylic acid 500mg을 첨가하여 3시간 방치한 다음 원심분리하여 상등액을 rotary evaporator에서 농축시켰다. 농축된 시료는 탈이온수로 25ml로 정용한 다음 Ultracac II(φ 0.6 cm) column을 부착한 아미노산 자동분석기(LKB 4150α)로서 분석하였다.

4) 미생물 균수 측정 및 동정: 식혜 숙성중의 미생물 변화는 다음과 같이 측정하였다. 즉, lactic acid는 MRS agar, fungi는 Malt extract agar, 총균수는 standard plate agar, proteolytic bacteria는 선택배지(Table 1), psychrotroph는 nutrient agar를 사용하였다. Psychrotroph은 7℃에서 15일, psychrotroph을 제외한 나머지는 32℃에서 48시간 배양한 다음 균수를 측정하였으며 균수측정은 dilution pour method를 이용하여 원시료 1g중의 균수로 산출하였다.

5) 단백질 분해효소 역가측정: 단백질 분해효소 역가는 azocasein method(Christen and Marshall,

2. 숙성온도 및 시간에 따른 화학적 변화, 미생물 변화 및 단백질 분해 효소의 정제

Table 1. Medium for the culture of proteolytic bacteria

A	Skim milk	20g
	Distilled water	500ml
pH 7.0		
B	Bacto peptone	5g
	Yeast extract	1g
	Sodium chloride	80g
	Bacto agar	15g
	Distilled water	500ml

\* A and B are mixed after autoclaved.

1984)로 측정하였다. 즉 1% (w/v) azocasein 용액 (in sterile 0.02 M phosphate buffer at pH 7.0) 2 ml를 screw-up tubes에 넣은 후 여기에 1ml 효소 용액을 가하여 32°C에서 1시간 반응을 시킨 다음 5% (w/v) TCA 용액 3ml를 가하여 반응을 중지시켰다. 상온에서 30분간 방치후 Whatman No. 40 여과지로 여과하여 345mm에서 흡광도를 측정하여 blank(azocasein 용액에 효소를 첨가하기 전에 TCA 용액을 첨가하여 사용) 수치를 뺀 값을 단백질 분해 효소 역가로 나타내었다.

6) 단백질 함량 측정: 효소 정제시의 단백질 함량분석은 Lowry method(1951)에 따라 측정하였다.

7) 단백질 분해효소 추출과 ion exchange chromatography: 식해 숙성중의 단백질 분해효소는 오징어육만 500g 취하여 여기에 0.1 M Tris buffer (pH 7.5) 800ml를 가하여 마쇄한 다음 5°C에서 24시간 방치하여 추출하였다. 이 추출액을 15,000rpm에서 15분간 2번 원심분리하여 pH를 7.5로 재조정 한 다음, ammonium sulfate 농도를 20%씩 높여가면서 분획 침전하여 투석하였다. Protease 정제는 DEAE-cellulose(sigma A-50-120) column(2.5×11 cm)을 사용하여 실시하였다. Column buffer는 0.02 M Tris(pH 8.0) buffer를 사용하였으며 linear salt gradient는 180ml의 column buffer와 1 N NaCl buffer(in column buffer) 180ml를 gradient-forming chamber에 각각 넣어 만들어 사용하였다. Column에 60~80% ammonium sulfate에서 추출한 조효소 15ml를 2일동안 2회 투석한 다음 충전하였으며 elution buffer로 0.25ml/min 속도로 5ml씩 분획하여 분별수집기(Gilson U.S.A)로 분획한 후 단백질 농도와 protease 활성을 측정하였다. 단백질 농도는 UV-monitor(Gilson, U.S.A.)를 이용하여 280nm에서 O.D.를 측정하였다.

8) SDS-polyacrylamide gel 전기영동: SDS-polyacrylamide gel 전기영동은 Weber and Osborn (1969)에 따라 12% gel을 사용하여 100 V에서 1시간 전기영동한 후 0.25% Coomassie brilliant R-250/10% acetic acid/5% methanol 용액으로 염색하였다.

## 결과 및 고찰

1. TBA 값 및 지방산 조성의 변화: 식해 숙성중의 숙성 온도에 따른 TBA 값의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. TBA 값은 지질산화정도를 나타내는데 각 온도에서 숙성 5일만에 최고치를 나타내었다가 감소하는 경향을 나타내었다. 그리고 숙성온도 10°C에서 지질산화가 제일 높았으며 15°C, 20°C, 5°C순이었다. 차(1985)는 멀치젯 실험에서 숙성 60일만에 TBA는 최고치를 나타내었다가 그후로는 감소하였다고 보고하였으며, Terrell(1983)은 식염함량이 많을수록 산패를 촉진시키며 KCl은 NaCl보다 억제효과가 있다고 하였다. 양 등(1974)은 고추가루 추출물에 유기산을 첨가할적에 항산화성의 상승효과가 있다는 것을 보고하였다. 일반적으로 지방산화는 온도가 상승하면 증가하지만 반대로 산소는 온도가 증가하면 할수록 덜 용해되어진다. 따라서 숙성 온도에 따른 식해숙성기구는 부재료(마늘, 고추가루 등) 등의 항산화효과와 함께 연구되어야할 것이다. 식해숙성 중의 주요 지방산 조성 변화를 Table 2에 나타내었다. Palmitic acid(16:0)을 기준으로 하여 식해의 지방산 조성을 살펴보면 linoleic

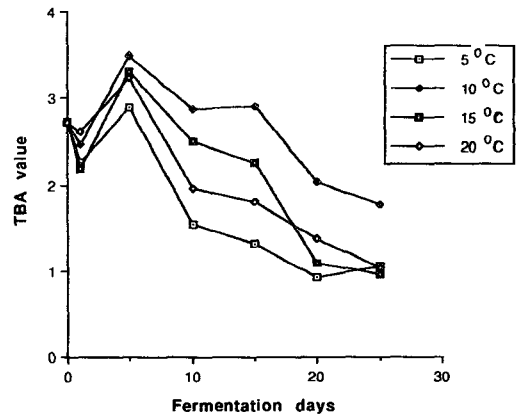


Fig. 1. Changes of TBA number during the fermentation of squid sik-hae.

Table 2. Changes of the major fatty acid content\* of squid sik-hae

Fatty acids	Periods(days)		0				5				12			
	Temperatures(°C)		5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20
16 : 0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
18 : 0	0.80	0.90	0.81	0.84	0.88	0.88	0.86	0.90	0.82					
18 : 1	5.89	5.50	4.96	4.65	4.75	4.72	4.47	4.87	4.31					
18 : 2	7.11	7.11	7.00	7.05	7.14	7.03	6.68	6.85	6.99					
18 : 3	1.38	0.83	0.65	0.67	0.62	tr	tr	tr	tr					
20 : 1	0.75	0.82	1.22	1.14	1.49	0.74	1.28	1.11	1.06					
20 : 5	1.38	1.27	1.33	1.14	1.08	0.92	0.90	0.86	0.86					
22 : 6	0.25	0.20	0.18	0.16	0.15	tr	tr	tr	tr					

\*Divided by the amount of 16 : 0 fatty acid.

acid(18 : 2) oleic acid(18 : 1)이 60% 이상을 차지했으며 EDA(20 : 5), linolenic acid(18 : 3) 등이 13% 정도 차지하였다. 김(1992)에 의하면 연안산 오징어에는 palmitic acid(16 : 0), DHA(22 : 6) 및 EPA(20 : 5)가 지방산 조성의 대부분을 차지하고 있으며 18 : 0, 18 : 1 및 20 : 1이 약 15% 정도를 차지하고 있다고 하였으며 계절에 따라 그 조성비는 현저하게 차이가 난다고 하였고, 또한 오징어 근육에는 linolenic acid(18 : 3)이 없다고 보고하였다. 한편 Kim 등(1991)은 고추가루씨의 지질함량은 약 26% 정도이며 주로 linolenic acid(18 : 2)가 주지방산이라고 보고하였다. 따라서 식해의 지방산 조성에서 18 : 3, 18 : 2, 18 : 1 등은 첨가되는 부재료(고추가루, 마늘 등)의 지방에서 대부분 유래되는 것으로 추정되며, DHA(22 : 6) 및 EPA(20 : 5)의 함량이 적은 것은 냉동 중 또는 식해제조시 분해가 촉진되었다는 것으로 생각된다. 숙성기간이 길어질수록 polyene은 현저하게 분해가 촉진되었으며 특히 DHA(22 : 6) 및 linolenic acid(18 : 3)은 숙성 15일째는 거의 분해가 다 되었다. 숙성온도 10°C에서 숙성 5일 및 15일에 18 : 2 및 18 : 3의 조성비가 타온도보다도 가장 낮았으며 숙성온도 15°C에서는 18 : 2의 조성비는 10°C 다음으로 낮은 수치를 나타내었다. 이러한 결과는 TBA 값의 변화(Fig. 1)와 유관해 보더라도 10°C 및 15°C에서 지방산화가 촉진되었다는 결론은 polyene중 22 : 6, 20 : 5 등이 현저하게 분해되어지는 것 외에 18 : 3 및 18 : 2가 분해가 촉진되었기 때문이라고 생각된다. 이 등(1986)은 새우젓의 지방산 조성 실험에서 숙성 중 polyene산의 조성비는 약간 감소한 반면 포화산은 증가하였

다고 하였으며, 차(1985)는 멸치젓 숙성 실험에서 숙성 120일만에 DHA 및 EPA는 절반이상이 분해되었으며 반면에 C<sub>16</sub> : 0 및 C<sub>18</sub> : 0이 상대적으로 증가하였다고 보고하였으며 이는 숙성기간 중 젓갈내의 미생물이 분비하는 지방분해효소에 의하여 지질이 가수분해되어 산화하기 때문인 것으로 생각된다고 하였다.

2. 유리 아미노산 조성: 식해 숙성온도에 따른 유리 아미노산 조성을 Table 3에 나타내었다. 식해의 유리 아미노산 조성은 Pro, His, Arg, Leu 및 Glu 등이 높은 점유율을 나타내고 있으며 Cys은 미량으로 존재하였다. 숙성기간이 길어질수록 Ser, His, Arg 등은 점유율이 떨어졌으며 특히 Arg은 숙성 5일 만에 극미량 검출되었으며 15일째는 15°C, 20°C에서 흔적만 남았다. 반면에 Thr, Glu, Ala, Val 및 Tyr 등은 숙성기간이 길어질수록 점유율이 증가하였다. 그리고 숙성온도가 증가할수록 Glu, Leu, Val 및 Met는 점유율이 증가하였던 반면에 Ala, Cys, Thr, Gly은 점유율이 감소하였다. 차(1985)는 조기젓 및 멸치젓 숙성실험에서 숙성 20일 경에 Arg, Glu, Cys량은 급격히 감소하였고 His 및 Ser은 숙성 중에 계속 감소하여 숙성 120일 경에는 탈아미노경로를 거쳐 거의 모두 분해되었다고 하였는데 이는 본 실험의 결과와 유사하다고 하겠다. 정 등(1992)은 가자미식해의 소금첨가에 따른 숙성의 유리아미노산 실험에서 Leu, Ala, Val, Glu 및 Ile이 소금 첨가량을 증가시켰을 때 급격히 증가하였고 보고하였으며, 정과 김(1980)은 원료에 많이 함유된 아미노산이 젓갈 중에서도 많이 생성되어진

2. 숙성온도 및 기간에 따른 화학적 변화, 미생물 변화 및 단백질 분해 효소의 정제

Table 3. Changes in the free amino acid content of squid sik-hae (mole %)

Amino acid	Periods(days)	Temperatures(°C)							
		0	5				15		
		5	10	15	20	5	10	15	20
Asp	5.8	6.8	6.7	6.2	6.2	6.5	6.4	6.0	5.5
Thr	3.5	4.9	4.8	3.5	3.9	4.0	3.6	3.4	3.3
Ser	4.5	4.1	4.0	1.9	tr	3.8	3.1	tr	tr
Glu	6.9	7.3	10.1	10.7	11.0	7.3	10.3	12.8	13.2
Pro	20.5	23.1	20.9	21.7	20.4	21.4	21.4	21.6	19.9
Gly	4.0	4.3	3.8	3.7	3.6	4.0	3.5	3.6	2.2
Ala	6.3	11.3	10.5	9.1	8.9	10.7	10.2	9.9	9.5
Cys	0.8	1.6	1.2	1.5	0.5	1.5	1.1	0.9	0.5
Val	4.1	3.5	4.6	5.3	5.6	3.7	4.9	5.7	5.8
Met	3.6	3.9	3.8	4.5	5.3	3.0	3.8	4.2	4.9
Ile	2.6	2.4	2.6	2.9	2.8	2.5	2.6	3.2	3.0
Leu	6.3	6.2	6.6	7.0	8.7	5.5	6.5	6.8	8.2
Tyr	2.5	2.9	3.4	3.6	3.3	2.9	4.0	3.8	3.9
Phe	4.6	3.5	3.9	4.3	4.8	3.4	3.7	4.1	5.4
His	10.1	9.7	8.4	8.4	9.0	7.1	8.5	8.4	8.2
Lys	5.6	4.1	4.1	5.0	6.1	3.6	4.6	5.8	6.7
Arg	8.5	0.7	0.7	0.8	tr	0.1	0.3	tr	tr

다고 하였다. 수산동물의 체단백질 구성 아미노산 조성은 어종에 따라 큰 차이가 없으나(Lee, 1968), 유리 아미노산 조성은 상당히 다르고 대부분의 어종은 몇몇 아미노산이 전 유리 아미노산의 대부분을 차지하는 경우가 많다(이·성, 1977). 그리고 몇종의 유리아미노산이 전체의 태반을 넘게 차지하는 것은 비록 다른 부재료가 혼합되었지만 어류의 이러한 특성 때문으로 생각된다(정 등, 1992). Pedraja(1970) 및 Fields 등(1968)은 식해 숙성 중 단백질의 분해로 얻어지는 유리아미노산은 젓갈 중에 존재하는 자가효소 또는 미생물이 분비하는 각종 효소의 작용에 의하여 각 아미노산이 휘발산이나 amine류 또는 지방산화 분해물과 상호작용하여 저급 carbonyl 화합물로 전환되어 휘발하기 때문이며, 이들 휘발성 성분들이 젓갈 특유의 풍미를 생성하는 것 같다고 하였다.

3. 미생물의 변화: 식해 숙성온도에 따른 미생물의 변화를 Table 4에 나타내었다. 총균수는 숙성 10일만에 각 숙성온도에서 최대로 나타났으며 그 후로는 감소하였다. 숙성 온도가 높을수록 총균수도

증가하였으며, 숙성 10일 후의 총균수는 10°C, 15°C 및 20°C에서는  $9.2 \times 10^9 \sim 9.3 \times 10^9$  범위에 있었으며 5°C 숙성에서는  $3.4 \times 10^9$ 로 나타났다. 이는 수안네 등(1987)의 숙성온도 5~10°C에서 5일만에  $1.02 \times 10^{10}$ 의 균수보다는 낮은 값을 나타내었다. 또한 이 등(1983)은 가자미 식해 연구에서 숙성기간이 16일째까지는 총균수가 급격히 증가하였다가 그 다음부터 감소하였다고 하였는데 본 실험에서는 숙성 15일째에 총균수는 감소하는 경향을 나타내었으며 숙성온도가 높을수록 많이 감소하였다. Lactic acid bacteria는 각 숙성온도에서 숙성 15일째에 최고치를 나타내었고 그후 최고값을 나타내었다가 그후로는 감소하였으며 균수는  $10^8 \sim 10^9$ 대였다. 이 등(1983)은 가자미 식해 실험에서 lactic acid bacteria는 숙성 온도 20°C에서 숙성 16일째에  $8.0 \times 10^6$  정도였으며 그 후로 감소하였다고 보고하였고, 수안네 등(1987)은 가자미 식해에서 20°C에서 숙성 4일째에  $2.6 \sim 10^8$ 에 도달하였다고 하였으며 lactic acid bacteria는 주로 *Lactobacillus spp.*와 *Streptococcaceae* 속이었다고 하였다. Proteolytic bacteria 수는 숙성온도 5°C에서는 숙성 15일째까지 증가하였으며

Table 4. Changes in the number of microflora during the fermentation of squid sik-hae

Microflora	Periods(days)		5				10				
	0		5	10	15	20	5	10	15	20	
Temperatures(°C)											
Total viable cell counts	2.1×10 <sup>5</sup>	2.1×10 <sup>7</sup>	3.3×10 <sup>9</sup>	4.4×10 <sup>9</sup>	8.1×10 <sup>9</sup>	3.4×10 <sup>9</sup>	9.2×10 <sup>9</sup>	9.3×10 <sup>9</sup>	9.5×10 <sup>9</sup>		
Lactic acid bacteria	9.1×10 <sup>2</sup>	2.3×10 <sup>4</sup>	1.6×10 <sup>6</sup>	8.2×10 <sup>6</sup>	2.8×10 <sup>7</sup>	1.2×10 <sup>6</sup>	1.7×10 <sup>7</sup>	3.2×10 <sup>7</sup>	2.0×10 <sup>8</sup>		
Proteolytic bacteria	1.4×10 <sup>4</sup>	7.2×10 <sup>4</sup>	5.3×10 <sup>5</sup>	1.7×10 <sup>6</sup>	1.6×10 <sup>6</sup>	9.3×10 <sup>4</sup>	2.1×10 <sup>6</sup>	2.0×10 <sup>6</sup>	2.1×10 <sup>6</sup>		
Psychrotrophs	5.3×10 <sup>4</sup>	2.3×10 <sup>5</sup>	9.2×10 <sup>7</sup>	8.3×10 <sup>7</sup>	3.6×10 <sup>7</sup>	1.2×10 <sup>6</sup>	1.0×10 <sup>8</sup>	8.4×10 <sup>7</sup>	5.6×10 <sup>7</sup>		
Fungi	1.4×10 <sup>3</sup>	8.6×10 <sup>4</sup>	3.4×10 <sup>5</sup>	8.2×10 <sup>5</sup>	9.6×10 <sup>5</sup>	1.5×10 <sup>6</sup>	1.4×10 <sup>6</sup>	1.6×10 <sup>6</sup>	3.2×10 <sup>6</sup>		

Microflora	Periods(days)		15				20			
	5	10	15	20	5	10	15	20		
Temperatures(°C)										
Total viable cell counts	3.2×10 <sup>9</sup>	8.3×10 <sup>8</sup>	7.5×10 <sup>8</sup>	7.3×10 <sup>8</sup>	1.0×10 <sup>8</sup>	9.1×10 <sup>7</sup>	3.3×10 <sup>7</sup>	2.4×10 <sup>7</sup>		
Lactic acid bacteria	2.3×10 <sup>8</sup>	4.3×10 <sup>8</sup>	3.6×10 <sup>8</sup>	2.1×10 <sup>8</sup>	1.2×10 <sup>7</sup>	3.4×10 <sup>7</sup>	2.0×10 <sup>7</sup>	1.8×10 <sup>7</sup>		
Proteolytic bacteria	7.5×10 <sup>6</sup>	1.2×10 <sup>6</sup>	1.6×10 <sup>6</sup>	1.3×10 <sup>6</sup>	1.1×10 <sup>6</sup>	2.5×10 <sup>5</sup>	1.0×10 <sup>5</sup>	9.5×10 <sup>4</sup>		
Psychrotrophs	8.5×10 <sup>6</sup>	2.0×10 <sup>8</sup>	1.3×10 <sup>8</sup>	2.3×10 <sup>8</sup>	9.0×10 <sup>6</sup>	5.1×10 <sup>7</sup>	1.2×10 <sup>7</sup>	1.0×10 <sup>7</sup>		
Fungi	1.2×10 <sup>5</sup>	1.4×10 <sup>5</sup>	2.0×10 <sup>5</sup>	3.3×10 <sup>5</sup>	7.2×10 <sup>4</sup>	7.3×10 <sup>4</sup>	8.3×10 <sup>4</sup>	8.4×10 <sup>4</sup>		

숙성온도 10°C, 15°C 및 20°C에서는 숙성 10일까지 증가하였다가 그 후로는 감소하였으며, 균수는 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> 범위가 최고값이었다. 10°C 이상에서는 숙성온도가 증가할수록 균의 증식은 감소하였으며, 숙성기간이 증가할 수록 균의 감소속도도 빨랐다. 이 등(1983)은 가자미 식해를 20°C에서 숙성시켰을 때 숙성 12일까지 proteolytic bacteria수는 증가하였다가 그 후로 감소하였다고 하였는데 이는 본 실험의 결과와 유사하였다. 수안네 등(1987)은 가자미 식해 숙성실험에서 proteolytic bacteria는 숙성온도에 따라 큰 변화가 없었다고 하였으며 5°C에서 숙성하였을 경우 20°C보다도 균수가 높았다고 하며 이는 식해의 젖산 생성에 따른 산성화로 균의 증식이 억제되었기 때문이라고 하였다. 본 실험의 경우도 5°C에서는 숙성 15일째까지 proteolytic bacteria 수가 증가하는 것은 10°C 이상온도에서 10일째까지 증가하였다가 감소하는 것에 비교해 볼 때 같은 설명으로 해석이 되어진다고 하겠다. 왜냐하면 식해의 pH 및 젖산의 변화 실험에서 5°C인 경우 pH 및 젖산의 변화는 거의 없으나 10°C 이상의 숙성온도에서는 급격한 변화를 나타내었기 때문이다. 내냉성 세균(Psychrotrophs)의 수는 각 숙성온도에서 숙성 15일째까지 증가하였으며 숙성 20일째에는 감소하였다. 그리고 숙성온도 10°C에서 내냉성

세균 수는 제일 많았으며 15°C, 20°C, 5°C 순이었다. 분류학적으로 내냉성 세균에 속하는 주된 gram 음성균으로는 *Pseudomonas sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Achromobacter sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Enterobacter sp.* 등이 있으며 대부분이 단백질 분해효소 및 지방분해효소를 분비하여 제품의 품질과 수율에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 특히 내냉성 세균은 어패류에 부착되어 있는 주 미생물이며 식해를 저온 숙성하여 숙성시킬 때 중요한 발효미생물로 알려져 있다. Fungi(균류) 수는 숙성온도가 높을 수록 숙성 10일까지 증가하였으며 그 후로는 감소하였으며 숙성온도가 높을 수록 증가량도 높았다. 이는 이 등(1983)의 가자미 식해 실험에서 yeast는 20°C에서 숙성 12일째까지 증가하였다가 그 후로 감소하였다는 보고와 비슷한 결과를 나타내었다.

4. 미생물 동정: 단백질 선택배지(Table 1)에서 배양한 단백질 분해능이 강한 균주를 동정하였을 때 모두 *Bacillus sp.*으로 동정되었다(Table 5).

5. 단백질 분해효소 추출과 ion exchange chromatography: 숙성 15일째의 식해의 오징어육에서 ammonium sulfate 농도를 단계적으로 20%씩 증가하였을 때 얻어지는 효소 및 단백질의 정제 결과를

2. 숙성온도 및 시간에 따른 화학적 변화, 미생물 변화 및 단백질 분해 효소의 정제

Table 5. Characteristics of the proteolytic strains isolated from squid sik-hae fermented at 20°C for 15 days

Test items	Strains								
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Cell morphology	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod
Gram strain	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility	+++	+++	+	++	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O-F Test	o/-	o/-	o/-	o/-	o/-	o/-	o/-	o/-	o/-

All belong to *Bacillus* species

Table 6. Protease purification from squid sik-hae fermented at 20°C for 15 days

Fractions	Volume (ml)	Enzyme activity	Protein (mg/ml)	Specific activity	Total I.U.	Yield (%)	Fold Purification
Original	600	0.124	3.89	0.031	74.40	100	1
40~60%	15	0.035	3.20	0.011	0.53	0.71	0.36
60~80%	15	0.141	6.76	0.021	2.16	2.84	0.68
Purified	30	0.253	0.30	0.843	7.59	10.20	27.19

Table 6에 나타내었다. Ammonium sulfate 농도 40% 까지는 효소의 역가가 측정되지 않았으며, 0~20% 및 20~40%의 단백질 농도는 각각 2.18mg/ml 및 1.91mg/ml이었다. 효소는 40~80% ammonium sulfate 농도에서 추출되었으며 특히 60~80% 사이에서 집중적으로 추출되었으나, 이때의 specific activity는 0.021이며 수율이 2.84% 밖에 되지않아 수율상에 상당한 문제점이 있었다. 이온교환수지 (DEAE-cellulose)를 사용한 효소정제 pattern을 Fig. 2에 나타내었다. Ion exchange chromatography로 단백질 분해효소를 정제하였을 때 3개의 peak를 얻었으며 그 중 마지막 peak(elution volume 120~140ml)에서 효소의 활성이 측정되었다. 그 중 50% 이상 활성을 가진 fractions를 pooling하여 측정된 효소활성 및 단백질 농도를 Table 7에 나타내었다. 정제된 효소의 specific activity는 0.843이었으며 수율은 약 10.2% 그리고 약 27.19배 정도 정제되었다. 이(1969)는 것갈 실험에서 원료 중에 있는 단백질 분해 효소는 7% 소금농도에서 30~60% 실행되어진다고 하였는데 본 실험에서도 단지 미생물이 분비하는 효소량은 증가하였다고 보여지지만 식해숙성 중에 오징어육의 자가효소의 단백질 역가는 많이 떨어졌다고 생각된다. 또한 이(1969)는 *Bacillus* 단일 종에서 얻어지는 단백질 분

해효소도 7% 소금농도에서 10~30% 실행되어진다고 보고하였다.

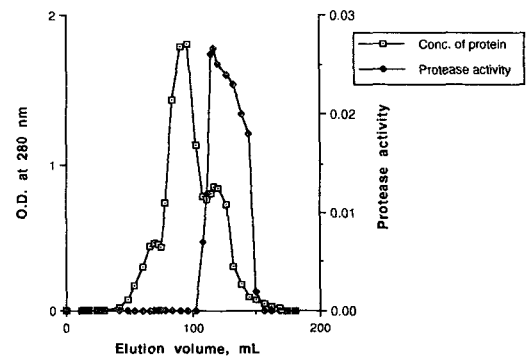


Fig. 2. Elution pattern of the protease preparation from squid sik-hae by ion exchange chromatography.

6. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: Ion exchange chromatography에 전기영동한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 전기영동한 결과 약 15개 정도의 bands가 나타났는데 한번의 Ion exchange chromatography로는 아주 순도가 높은 효소를 얻을

수 없었다고 보여지며 단지 이들 bands는 대략 분자량 20,000~40,000 사이에 위치해 있다는 것이 증명되었다. 차 및 이(1989)는 멸치젓에서 선별한 *Bacillus subtilis* 및 *Bacillus licheniformis*로 부터 gel permeation chromatography로 단백질 분해효소를 정제하였을 때 분자량이 각각 18,000 및 30,000인 효소를 정제하였다고 보고하였다. 이로 미루어 볼 때, 본 실험에서 얻어진 전기영동의 결과를 고려해볼때 이들 bands에는 오징어 자가효소 및 여러가지 미생물의 분비하는 효소들이 섞여져있다고 볼 수 있으며 이들 효소의 origin을 찾는 연구가 필요하다고 생각된다.

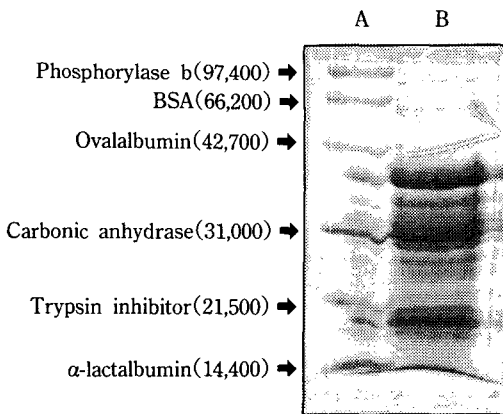


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of protease purified from squid sik-hae by ion exchange chromatography.  
A: MW marker B: Protease

### 요 약

오징어 식해 개발을 위하여 식해 숙성시 숙성 온도 및 기간에 따른 TBA, fatty acids, free amino acids 및 미생물의 변화와 단백질 분해효소의 정제 실험을 요약하면 다음과 같다.

TBA 값은 각 온도에서 숙성 5일만에 최고치를 나타내었다가 감소하였으며 숙성온도 10℃에서 지질의 산화가 가장 많았다. 오징어 식해의 지방산 조성은 linoleic acid(18:2), oleic acid(18:1)가 60% 이상 점유하였으며 EPA(20:5) 및 linolenic acid(18:3)은 약 13% 정도였다. 숙성기간이 길어질수록 linolenic acid 및 EPA는 현저하게 분해되었으며 10℃ 및 15℃에서 지방산화가 촉진되었다. 식해의 유리 아미노산 조성은 Pro, His, Arg, Leu, Glu 등이

높은 점유율을 나타내고 있으며 숙성기간이 증가할수록 Ser, His, Arg 등은 점유율이 낮아지며, 반면에 Glu, Ala, Val, Tyr 등은 높아졌다. 그리고 숙성온도가 증가할 수록 Glu, Val 및 Met은 점유율이 증가하였으며 Ala, Cys, Thr 및 Gly은 감소하였다. 미생물의 변화는 총균수는 온도가 높을수록 증가하였으며 숙성 10일만에 최대가 되었다가 그 후 감소하였다. Lactic acid bacteria 수는 각 숙성온도에서 숙성 15일째에 최대였다가 그 후 감소하였으며 숙성온도가 높을 수록 증가속도 및 감소속도도 빨랐다. Proteolytic bacteria 수는 숙성온도가 높을 수록 증가량 및 속도가 빨랐으며 숙성기간이 증가함에 따라 감소량도 많았다. Psychrotrophs 수는 10℃ 숙성에서 제일 높았으며 숙성기간 15일째가 최대였다. 단백질분해능이 강한 균주들을 동정하였을 때 모두 *Bacillus* 속으로 밝혀졌다. 단백질 분해효소는 ammonium sulfate 60~80% 농도 사이에서 최대로 추출되었으며 이온교환수지로 정제하였을 때 3개의 peak중 마지막 peak에서 활성을 나타내었으며 전기영동 결과 분자량이 대략 20,000~40,000사이에 15개 정도의 bands가 나타났다.

### 감사의 글

이 연구는 학술진흥재단 1992년도 대학부설연구소 연구비 지원에 의한 결과의 일부이며, 이에 깊은 감사를 드립니다.

### 참 고 문 헌

김영명. 1992. 오징어자원의 식품학적 특성과 이용 기술. 한국식품개발연구원, 식품기술, 5(4), 19~28.  
무사 수안네 · 김영배 · 이철호. 1987. 가자미 식해 발효에 관여하는 미생물에 관한 연구. 한국산업미생물지, 15(3), 150~157.  
양기선 · 유주현 · 황적인 · 양용. 1974. 고추의 산화성에 대한 citric acid의 상승효과. 한식지, 6(4), 193~198.  
이계호. 1968. 첫갈등숙의 정미성분에 관한 미생물학적 및 효소학적 연구. 농화학회지, 11, 1~27  
이용호 · 성낙주. 1977. 팔두기젓의 향미성분. 한식지, 9(4), 255~263.



2. 숙성온도 및 기간에 따른 화학적 변화, 미생물 변화 및 단백질 분해 효소의 정제

- 이응호 · 안창범 · 오광수 · 이태현 · 차용준 · 이근우. 1986. 저식염 수산발효식품의 가공에 관한 연구. *한수지*, 19(5), 459~468.
- 이철호 · 조태숙 · 임무현 · 강주희 · 양한철. 1983. 가자미 식해에 관한 연구. *한국산업미생물지*, 11(1), 53~58.
- 정승용 · 김희숙. 1980. 전어 내장젓의 맛성분. *한국영양식량학회지*, 9, 23~32.
- 정해숙 · 이수학 · 우강용. 1992. 함경도지방의 전통 가자미식해의 소금 첨가수준에 따른 숙성중 맛성분의 변화에 관한 연구. *한식지*, 24(1), 59~64.
- 차용준. 1985. 저식염 멸치젓과 조기젓 제조조건 및 제품의 풍미에 관한 연구. 부산수산대학교 박사학위논문.
- 차용준 · 이응호. 1989. 미생물을 이용한 저식염 멸치젓의 숙성발효에 관한 연구. 1. 젓갈에서 분리한 단백질 분해균 및 단백질 분해효소의 생화학적 특성. *한수지*, 22(5), 363~369.
- 차용준 · 이응호 · 이강희 · 장동석. 1988. 저식염 멸치젓에서 분리한 단백질 분해력이 강한 세균 및 생산된 단백질분해효소의 특성. *한수지*, 21, 71~79.
- 채영석. 1990. 강릉식해의 상품화 증진을 위한 연구. 한국식품개발연구원.
- Christen, G.L. and Marshall, R.T. 1984. Selected properties of lypase and protease of *Pseudomonas fluorescens* 27 produced in four media. *J. Dairy Sci.*, 67, 1680~1687.
- Fields, M.L., B.S. Richmond, and R.E. Baldwin. 1968. *Advanced in food research*. Academic press, New York, 16, 184~188.
- Folch, J., M. Lee and G.H. Sloane Stanly. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.*, 226, 497~501.
- Hammond, E.W. 1981. The analysis of lipids, a personal approach to an analytical service. *Chemistry and Industry*, 17(10), 710~715.
- Kim, D. S., S. M. Jhun, S. G. Kang, D. Y. Jeong, H. D. Kim, and Y. H. Park. 1991. Comparison of tryglyceride composition between red pepper seed oils harvested from the Chungsong and Youngyang areas. *한국영양식량학회지*, 20(3), 225~232.
- Lee, E.A. 1968. A study on taste compounds in certain dehydrated sea foods. *Bull. Pusan Fish Coll.*, 8(1), 63~86.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, K.J. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265~275.
- Pedraja, R.R. 1970. Changes of composition of shrimp and other marine animals during processing. *Fd. Tech.*, 24(12), 37~42.
- Terrell, R.N. 1983. Reducing the sodium content of processed meat. *Fd. Tech.*, 37(7), 66~71.
- Weber, K. and Osborn, M. 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244, 4406~4412.

1994년 4월 9일 접수

1994년 5월 7일 수리