

젓갈의 숙성 및 저온 저장이 미생물 균수 및 균총에 미치는 영향

홍 연 · 김정희 · 안병학 · 차성관*
한국식품개발연구원 생물공학연구본부

The effects of low temperature storage and aging of *Jeot-kal* on the microbial counts and microflora

Yeun Hong, Jeong-Hee Kim, Byung-Hak Ahn and Seong-Kwan Cha*
Food Chemistry and Biotechnology Division, Korea Food Research Institute

Abstract

The addition of 5% NaCl to standard plate count (SPC) and bromcresol purple (BCP) agar showed the highest viable cell counts for *Jeot-kal* samples. The use of 15% glycerol as cryoprotectant showed the highest microbial survival rate at both temperatures, -20°C and -170°C, and on both colony count media, SPC and BCP. During the aging, the pH of *Bajirak Jogae-Jeot* (fermented clam) decreased from 6.8 to 5.0. Crude protein content was 10% for *Bajirak Jogae-Jeot* and 6~7% for *Myeolchi-Jeot* (fermented anchovy). Microbial population of *Bajirak Jogae-Jeot* was 10^9 CFU/g after 4 weeks of aging, but was only 10^{3-5} CFU/g in the case of *Myeolchi-Jeot*. The proportion of Gram positive and catalase negative bacteria in *Bajirak Jogae-Jeot* increased drastically during the 4 weeks of aging, which showed typical lactic bacterial fermentation. After 2 years' storage of *Jeot-kal* in liquid nitrogen tank, the cell counts of total aerobic or lactic bacteria were decreased, resulting in about 10% survival rate. Microbial floral change of *Jeot-kal* was also investigated. In the case of *Bajirak Jogae-jeot*, the ratio of rod to cocci and that of Gram negative to positive increased after liquid nitrogen storage. But, rod to cocci ratio of *Myeolchi-jeot* decreased after liquid nitrogen storage. The ratio of yeasts decreased in both cases after storage.

Key words : microflora, liquid nitrogen storage, fermented fish, cell viability

서 론

젓갈은 어패류의 근육이나 내장 등에 다량의 소금을 가한 후 숙성 과정에서 자가소화효소나 미생물의 효소 작용에 의해 단백질이 분해되어 특유의 맛과 조식감을 갖게되는 전통발효식품이다^(1,2). 젓갈의 숙성과 발효에 관여하는 미생물은 높은 소금 농도에서 생육할 수 있는 내염성균으로 제품의 영양과 풍미에 영향을 미친다고 알려져 있다⁽³⁾. 젓갈의 미생물에 대한 연구는 많지 않으나 영양학적인 문제 및 기호의 변화 때문에 소금 농도를 줄이면서도 특유의 풍미를 지니는 젓갈 생산이 요구되고 있다. 현재 저식염 젓갈의 숙성 개발, 위생적 생산, 품질의 과학화 및 산업화를 위해

젓갈의 미생물분포를 밝히는 등 기초적인 연구와 함께 이들 미생물의 특성을 발효에 응용하는 시도들이 이루어지고 있다^(2,3,4,5). 젓갈 숙성에 관여하는 미생물에 대한 보고 중, 저염 정어리 절임의 숙성 단계별 미생물상의 변화는 숙성 초기에 *Brevibacterium*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus* 속 균이 분리되었으며, 숙성 후기에는 *Halobacterium*, *Micrococcus*, *Pediococcus* 속의 세균 및 *Torulopsis* 속의 효모가 분리되었다고 보고하고 있다⁽⁵⁾. 또, 저염 멸치젓에서 단백질 분해력이 강한 세균으로서 *Aeromonas anaerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus saprophyticus* 등이 분리되었다고 보고되었다⁽⁴⁾.

균주 및 미생물 source인 발효식품의 보존 방법으로 가장 대표적인 것이 저온저장과 동결건조법이다. 식품을 -10°C 이하에서 냉동하면 냉장 저장보다 식품의 저장기간을 5~50배 정도 연장시킬 수 있으며⁽⁶⁾, -198°C의 액체질소 보존법은 미생물을 보존했다가 추후 식품의 가공 저장에 재사용 하고자 할 때 널리 쓰이는

Corresponding author : Seong-Kwan Cha, Division of Chemistry and Biotechnology, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Songnam, Kyonggido 463-420, Korea
Tel : 82-342-780-9108
Fax : 82-342-780-9265
E-mail : skcha@kfri.re.kr

방법이다. 온도를 낮추면 미생물의 대사활성이 낮아져 미생물의 생육을 정지시키는 효과가 있지만 장기간 냉동 보존시 세포가 손상을 입어 사멸하기도 하며^(6,7), 동결 보존 후 세포의 생육 정도는 냉동 속도, 배지의 조성, 저장 온도와 기간, 초기 균수에 영향을 받는다⁽⁸⁾. 일반적으로 저온에 저장할수록, 그리고 냉동 속도가 빠를수록 미생물의 높은 생존율과 세포의 활성이 유지되며 저장기간이 길수록 생존 세포의 수는 감소하는 것으로 알려져 있다⁽⁹⁻¹³⁾. 미생물의 냉동 보존과 관련된 연구들은 치즈와 요구르트, 주류 발효에 관여하는 젖산균과, 식품을 냉동한 후 해동하였을 때 식품에 존재했던 병원성 미생물의 잔존 정도 등을 중심으로 연구되었고, 냉동방법과 동결 보호제의 종류, 냉동 온도 및 속도를 변화시켰을 때 해동 후 생존율과 활성에 대한 결과들을 정리한 것들이다⁽¹⁴⁻¹⁸⁾. 그 외 동식물 세포와 양과 종자의 냉동 보존에 대한 연구도 찾아볼 수 있으나⁽¹⁹⁻²¹⁾ 한국의 전통발효식품인 젓갈의 동결보존 전후의 균수나 미생물 균총변화를 조사한 연구는 아직까지 없는 실정이다. 본 연구는 우리나라 전통발효식품 중 젓갈 발효 관련 미생물 자원을 확보하는 목적으로 수행하였으며, 이를 위해 젓갈 시료를 액체질소 중에 2년간 보존하였을 때 젓갈의 미생물 수 및 균총에 어느 정도 영향을 미치는지 조사 실험을 하였다.

재료 및 방법

젓갈시료

실험에 사용된 젓갈 시료는 전통적인 담금 방법으로 제조된 제품을 이용하였다. 바지락 조개젓은 서산 젓갈 생산 공장에서 조개껍질이 제거된 20 kg의 바지락에 천일염을 10, 15%씩 첨가한 후 항아리 (25 L)에 넣어 제조된 것으로 공장의 실온(약 20°C)에서 숙성된 제품을 시료로 채취하였다. 멸치액젓은 거제와 충무에서 포획된 멸치 원료를 마산의 젓갈업체에서 지하탱크(4×3×3 m)에 담근 것으로 시료의 채취는 특별 제조된 시료 채취관을 이용하여 지하탱크 하부로부터 액체시료를 채취하였으며, 채취된 액젓 시료는 멸균적으로 아이스박스에 담아 7시간 이내에 실험실로 운반하여 미생물 분석에 이용하였다. 미생물 계수배지 소금농도 결정을 위한 예비실험과 동결보호제 선발실험에 사용된 새우젓은 충남 대천과 강원도 강릉에 있는 전통식품업체로부터 제품을 구매하였고, 오징어젓은 강원도 강릉에 있는 전통식품업체로부터 그리고 까나리 액젓 및 조개젓은 충남 홍성 및 서산의 전통식품업체로부터 제품시료를 제공받아 아이스박스에 담아 실험

실에 운반하였으며, 시료는 homogenizer(cell master CM-100, Iuchi, Japan)로 마쇄하여 실험에 사용하였다.

젓갈미생물 및 저온저장 검토

시료의 미생물 분석은 식품공전⁽²²⁾의 방법에 따라 실시하였는데, 일반세균수는 standard plate count agar (PCA, Difco, USA)를, 젖산균수는 brom cresol purple agar(BCPA)를 실험실에서 제조하여 사용하였고, 일반세균수 측정시에는 미생물 동정을 위한 colony로부터의 미생물 순수분리를 위하여 pouring 방법 대신 spreading 방법을 사용하였다. 미생물 분석용 배지의 염첨가량을 결정하기 위하여 젓갈 미생물 분석용 배지에 NaCl(Junsei chemical, Japan)을 0, 5, 10, 15% 첨가하고 동일한 양의 젓갈시료 회석액을 접종하였을 때 생성되는 colony 수를 비교하였다. 저온저장시의 동결보호제 선택을 위하여 glycerol 15%와 skim milk 10%, skim milk 10%+adonitol 1%, skim milk 5%+sucrose 8%+gelatin 1.5%, skim milk 5%+lactose 8%+gelatin 1.5%와 같은 5가지의 동결보호제를 사용하여 1일과 30일간 저장한 후의 일반세균수와 젖산균수를 측정하였다. 젓갈의 저온저장이 미생물 균수 및 균총에 미치는 영향을 조사하기 위하여 동결보호제가 첨가된 젓갈을 2 mL cryogenic vial에 넣어 액체질소에서 2년간 보존한 후 시료를 해동하여 일반세균수와 젖산균수를 측정하였다.

미생물의 동정

미생물의 동정을 위한 균주의 분리는 일반세균수 측정배지에 형성된 집락으로부터 분리하였는데, 분리방법은 일반세균수 측정이 끝난 plate count agar plate 중 약 25~50개의 colony가 생성된 plate를 선택하여 배지에 생성된 집락들을 모두 취하여 각각의 균주들을 순수분리 하였다. 순수분리된 균주들의 간이 동정을 위하여 Collins 와 Lyne⁽²³⁾의 방법에 따라 집락 및 현미경을 이용한 세포의 형태학적인 성질의 조사와 그랜염색(Gram staining)을 하였고, 슬라이드 글래스 위에 집락으로부터 떼어낸 세포물질을 도말한 후 3% H₂O₂ 용액을 떨어뜨려 기포의 생성유무로 카탈라아제 실험을 하였다. 옥시데이즈 실험은 집락으로부터 떼어낸 균체덩어리를 여과지 위에 도말한 후 옥시데이즈 시약(0.1% EDTA, 0.05% Na-thiosulfate, 0.2% N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamin-dihydrochloride in cold water)을 한 방울 떨어뜨려 30초 후 푸른색의 형성여부를 판정하였다. 이러한 실험 후 Balows *et al.*⁽²⁴⁾을 참고하여 미생물 그룹의 구분 및 간이동정을 하였다.

시료의 이화학적 성분 분석

시료의 pH값은 pH meter(SUNTEX, Model SP-7)를 이용하여 측정하였고, 아미노태 질소는 시료 5 g을 250 mL로 한 후 25 mL를 취하여 phenolphthalein을 가하고 미적색이 될 때까지 0.1 N NaOH용액을 가한 다음, formaldehyde 용액을 무색이 될 때까지 가하고, 다시 0.1 N NaOH로 미적색(pH 8.4)이 될 때까지 적정하여 소비 mL수를 Formol 법⁽²⁵⁾으로 환산하여 시료 1 g 당 g%로 표시하였다. 수분함량은 시료 5 g을 취하여 상압 건조법⁽²⁵⁾으로, 염도는 시료 5 g에 증류수를 넣어 250 mL로 하였고, 이 중 10 mL를 취해 2% K₂CrO₄ 1 mL를 가한 뒤 0.1 N AgNO₃로 적각색이 될 때까지 적정하여 소비 mL 수를 환산하여⁽²⁵⁾ %로 나타내었다. 조단백질 함량은 시료 5 g을 사용하여 semimicro kjeldahl 법(Kjeltec 1030 Auto Analyzer, Tecator, Sweden)으로 측정된 질소량에 질소계수 6.25를 곱하여 산출하였다.

결과 및 고찰

젓갈미생물 측정배지조건 조사

젓갈은 소금농도가 높아 배지에 NaCl을 첨가하지 않을 경우 내염성 미생물들의 생육이 활발하지 못할 것으로 생각되어 젓갈 미생물 분석용 배지의 NaCl 첨가 수준을 결정하기 위한 예비실험을 수행하였다. 젖산균 중 내삼투압성(내염성)이 높은 균주들이 있고 젓갈 숙성과정에 젖산 발효가 포함될 수 있다고 생각되어 일반세균수와 함께 젖산균수도 측정하여 NaCl 첨가수준을 비교하였다. NaCl을 각각 0, 5, 10, 15% 첨가한 standard plate count agar와 bromcresol purple agar 배지에 생성된 colony수를 비교하였을 때 Table 1에서 볼 수 있는 것과 같이 멸치젓과 조개젓은 NaCl을 첨가하지 않은 배지에서도 5% 첨가시 더 많은 수의 일반세균 및 젖산균이 생육하였으며, 15% NaCl 농도에서는 새우젓(shrimp-2)의 미생물수와 멸치젓의

일반세균수를 제외하고는 생육이 억제되었다. 따라서 젓갈의 미생물수를 측정하기 위한 본 실험의 모든 미생물 측정배지에는 5%의 NaCl을 첨가하여 사용하였다.

젓갈시료 보존을 위한 동결보호제의 선발

동결과 같은 젓갈의 저온저장에서 미생물의 생존율을 높이기 위해서는 동결보호제의 사용이 바람직하다. 따라서 동결보호제 선발을 위한 예비실험을 수행하였다. 동결보호제의 선발을 위하여 glycerol 15%, skim milk 10%, skim milk 10%+adonitol 1%, skim milk 5%+sucrose 8%+gelatin 1.5%, skim milk 5%+lactose 8%+gelatin 1.5%와 같은 동결보호제들을 젓갈에 첨가하여 2 mL cryogenic vial에 약 1 mL씩 넣어 -170°C 액체질소 탱크와 -20°C 저온 냉동고에서 동결시킨 후, 1일과 30일 경과 후의 일반세균수와 젖산균수를 측정하였다. 실험결과 Table 2에서 보는 것과 같이 일반세균수와 젖산균수 모두 동결보호제의 종류와 관계없이 -20°C의 저온 냉동고에 보존하는 경우보다 액체질소 탱크에 보존하였을 때 더 높은 생존율을 보여주었다. 이와 같은 결과는 균체의 생존율 유지에 보존 온도가 낮을수록 유리하다는 Foschino 등⁽¹⁵⁾의 연구와 치즈 제조용 스타터의 동결 보존시 -196°C의 액체질소에 보존했을 때 가장 높은 생존율을 보였다고 보고한 Coppola 등⁽²⁶⁾의 연구와 일치하는 결과이었다. 동결보호제들 중 skim milk만 첨가한 것보다 adonitol이나 sucrose, lactose를 첨가한 경우가 더 높은 생존율을 나타내었고, 그 중 sucrose의 첨가가 높은 보호 효과를 보여주었으며, glycerol 15%를 사용한 경우 모든 보존 조건에서 생존율이 가장 높게 유지되었고 특히 다른 동결보호제들에 비하여 30일 보존 후의 생존율이 잘 유지되었음을 볼 수 있었다(Table 2). 따라서 본 실험에 사용된 모든 젓갈시료는 glycerol 15%를 동결보호제로 첨가하여 -170°C의 액체질소 탱크에 보존하였다.

Table 1. Viable cell and lactic bacterial counts (log CFU/g sample) of Jeot-kal (fermented fish) according to variable salt concentration of media

Fermented fish	Viable cell counts (PCA ¹⁾)				Lactic bacteria counts (BCP ²⁾)			
	NaCl concentration (%)				NaCl concentration (%)			
	0	5	10	15	0	5	10	15
Anchovy	6.04	7.63	5.63	5.77	0.00	5.41	0.00	0.00
Clam	4.73	5.04	3.60	0.00	4.56	4.83	4.00	0.00
Shrimp-1	5.57	4.34	0.00	0.00	2.85	2.30	0.00	0.00
Shrimp-2	6.65	6.91	5.38	3.00	5.76	5.88	5.04	3.48
Squid	6.04	6.26	5.99	0.00	4.78	4.48	0.00	0.00

¹⁾Plate count agar for total aerobic bacteria

²⁾Lactic acid bacteria count medium containing brom cresol purple.

Table 2. Effects of five cryoprotectants and of two storage temperatures on the microbial survival rate (%)¹⁾

Cell counts ²⁾	Storage condition		Cryoprotectants (%)				
	Temperature ³⁾	Time (day)	Glycerol 15	Skim milk 10	Skim milk 10 adonitol 1	Skim milk 5 sucrose 8 gelatin 1.5	Skim milk 5 lactose 8 gelatin 1.5
Viable cell counts (PCA)	Liquid nitrogen	1	83.7	31.5	58.7	55.8	63.6
		30	75.7	24.1	41.3	51.2	44.2
	Deep freezer	1	23.4	11.2	6.4	25.6	6.7
		30	20.6	7.2	1.7	13.1	2.4
Lactic bacteria counts (BCP)	Liquid nitrogen	1	67.6	24.7	24.0	36.4	31.9
		30	61.3	17.3	13.8	27.9	20.3
	Deep freezer	1	5.7	0.0	0.7	6.9	0.0
		30	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0

¹⁾Survival rate (%) values were the mean value of two fermented shrimp products and of one fermented clam product.

²⁾Plate count agar containing 5% NaCl for total aerobic bacteria Lactic acid bacteria count medium containing brom cresol purple and 5% NaCl

³⁾-170°C in liquid nitrogen tank, -20°C in deep freezer.

Table 3. Chemical compositions of *Bajirak Jogae-jeot* (fermented clam) during the fermentation

NaCl concentration (%)	Fermentation period (week)	pH	Concentration (%)			
			Moisture	NaCl	Protein	Amino-nitrogen
10	Raw clam	7.3	81.8	2.6	0.4	0.2
	0	6.8	72.1	11.7	10.1	0.8
	2	5.8	73.1	16.7	10.0	0.3
	4	5.2	72.4	17.6	10.0	0.5
	Raw clam	7.3	81.8	2.6	0.4	0.2
15	0	6.6	75.0	12.0	8.9	0.4
	2	5.9	72.3	16.1	11.6	0.5
	4	5.3	67.9	26.8	11.2	0.4
	8	5.0	69.0	17.4	9.8	0.3
	12	4.9	74.8	13.3	10.9	0.7
	Raw clam	7.3	81.8	2.6	0.4	0.2

젓갈숙성과정 중의 성분변화 및 미생물 수의 변화

젓갈 숙성과정 중 이화학적 특성과 동결보존 후의 미생물수와 분포변화가 서로 관계 있는지 여부를 알아보기 위해 조개젓과 멸치젓의 숙성과정 중 미생물수와 이화학적분 변화를 조사한 결과는 Table 3, 4, 5, 6에서 보는 것과 같다. 조개젓은 숙성이 진행됨에 따라 pH 값이 6.8에서 약 5.0 정도로 감소하였고 단백질 함량은 변화없이 약 10% 정도였으나 아미노태 질소의 함량은 숙성이 진행되면서 약간 증가하는 경향을 보였다. 일반적인 젓갈의 pH 값은 약 5.5~6.5 이지 만⁽²⁷⁾ 조개젓의 경우 젓산균에 의한 젓산 발효가 유도 되어 pH 값이 낮게 유지된 것으로 생각할 수 있다 (Table 3). 멸치액젓의 성분 변화는 수분함량은 서서히 감소하였고 NaCl 함량은 조금씩 증가하였으며 원료 및 소금첨가 직후 약 11~13%였던 단백질 함량이 크게 감소하여 4주째에 2~4% 정도 되었다가 다시 서서히 증가하여 6~7% 정도가 되었다 (Table 4). 멸치와 소금을 혼합하여 지하탱크에 넣고 4주 정도 숙성시키면 수용성 단백질을 포함한 침출액이 탱크의 아래쪽에 고이

고 멸치 고형물은 위로 떠오르게 된다. 탱크의 아래쪽에서 시료를 채취하게 되므로 숙성 초기에는 고형물도 같이 채취하게 되어 단백질 함량이 높으나 4주 이후에는 침출액이 주로 채취되므로 4주째에 단백질 함량이 갑자기 감소한 것으로 생각된다. 아미노태 질소 역시 4주째에 감소한 후 조금씩 증가하는 경향을 보였다.

조개젓의 숙성단계별 미생물수는 Table 5의 액체질소에서의 보존 전 결과에서 보여주는 것과 같이 10% 소금첨가시는 숙성 2주째에 15% 소금첨가시는 4주째에 일반세균수와 젓산균수가 크게 증가하였다. 즉, 소금 첨가 15% 조개젓은 10% 첨가에 비해 미생물수의 증가속도가 지연되어 일반세균수는 숙성 2주부터 차츰 증가하여 숙성 4주째에 급격한 증가를 보이고 있고 숙성 8주에는 완만한 증가폭을 나타내다가 12주째 약간 감소하는 경향을 보였으며, 젓산균수도 숙성 4주까지는 일반세균수와 비슷한 경향을 나타냈지만 숙성 4주 이후에는 감소되었다. 멸치액젓의 숙성과정 중 미생물수의 변화는 Table 6의 액체질소에서의 보존 전 결과

Table 4. Chemical compositions of *Myeolchi-jeot* (fermented anchovy) during the fermentation

<i>Myeolchi-jeot</i>	Fermentation period (week)	Concentration (%)			
		Moisture	NaCl	Protein	Amino-nitrogen
Chungmu	Raw anchovy	85.15	3.08	12.52	0.55
	0	73.45	20.52	13.68	0.40
	4	70.58	20.66	4.65	0.15
	8	69.62	20.96	5.04	0.15
	19	69.32	20.66	5.37	0.16
	28	68.69	21.10	6.43	0.18
	38	68.15	21.54	7.22	0.18
	47	67.25	21.84	7.11	0.21
Keoje	Raw anchovy	84.49	2.64	12.39	0.52
	0	72.56	16.71	11.09	0.30
	4	70.72	20.52	2.86	0.20
	8	70.38	21.25	4.15	0.18
	19	69.85	22.57	5.38	0.20
	28	68.89	22.42	5.69	0.17
	38	68.64	23.59	6.12	0.19
	47	68.62	23.74	6.38	0.18

Table 5. Viable cell numbers of *Bajirak Jogae-jeot* (fermented clam) before and after liquid nitrogen storage during the fermentation

NaCl concentration (%)	Fermentation period (week)	Viable cell numbers (Log CFU/g sample)			
		PCA ¹⁾		BCPA ²⁾	
		Before ³⁾	After ⁴⁾	Before ³⁾	After ⁴⁾
10	Raw clam	5.4	3.8	3.5	3.9
	0	4.1	3.1	2.0	2.5
	2	9.5	9.0	8.6	6.5
	4	9.7	9.0	8.5	6.5
15	Raw clam	5.4	3.8	3.5	3.9
	0	3.6	3.5	3.0	2.5
	2	5.4	6.6	3.7	4.1
	4	9.8	6.1	9.7	6.4
	8	10.9	5.6	7.9	4.7
	12	9.9	6.3	8.2	5.9

¹⁾Plate count agar containing 5% NaCl for total aerobic bacteria

²⁾Lactic acid bacteria count medium containing brom cresol purple and 5% NaCl

³⁾Samples before liquid nitrogen storage (-170°C)

⁴⁾Samples were stored in liquid nitrogen tank (-170°C) for two years.

에서 보여주는 것과 같이 숙성기간이 경과함에 따라 전체적으로 감소하는 경향을 나타내어 숙성 28주째에는 일반세균수는 10^{3-5} CFU/g sample, 젓산균수는 10^2 CFU/g sample로 감소하였다. 총무 멸치액젓의 경우는 소금 첨가후 일반세균수와 젓산균수 모두 크게 감소한 반면 거제 멸치액젓의 경우는 원료 멸치에 소금을 첨가한 후 미생물 수의 감소가 나타나지 않았다. 조개젓에 비해 낮은 미생물수를 나타내었는데 이는 멸치액젓의 소금농도가 20% 이상으로 조개젓보다 높기 때문인 것으로 생각된다.

액체질소에서의 시료보존이 미생물 수에 미치는 영향 액체질소 탱크에 2년간 보존한 조개젓 시료의 미생

물 수를 조사하였을 때 Table 5에서 보여주는 것과 같이 총균수와 젓산균수 모두 보존 후 감소하였고, 15% NaCl을 첨가한 조개젓의 경우 10% 첨가한 조개젓보다 4주 이후 미생물의 생존율이 더 크게 떨어졌다(Table 5). 멸치액젓 시료의 경우는 Table 6에서 보여주는 것과 같이 미생물 수 중 총균수는 전체적으로 약 90% 이상 사멸하였으며, 거제 멸치액젓의 소금 침지한 0주째 시료의 경우에는 일반세균수와 젓산균수 모두 생존율이 크게 떨어졌다(Table 6). 소금이 첨가되지 않은 멸치 원료의 경우 소금을 첨가한 숙성과정 중의 시료보다 미생물 수의 감소정도가 더 컸다. 조개젓 시료와 멸치액젓 시료를 비교하면 액체질소 보존 후 미생물 수의 감소 정도는 멸치액젓의 경우가 조개젓보다 덜

Table 6. Viable cell numbers of *Myeolchi-jeot* (fermented anchovy) before and after liquid nitrogen storage

Myeolchi-jeot	Fermentation period (week)	Viable cell numbers (Log CFU/g sample)			
		PCA ¹⁾		BCPA ²⁾	
		Before ³⁾	After ⁴⁾	Before ³⁾	After ⁴⁾
Chungmu	Raw anchovy	10.2	7.5	7.7	6.5
	0	5.8	4.8	5.3	4.3
	4	4.7	3.8	4.0	2.9
	8	3.9	3.7	3.6	2.9
	19	5.9	-	5.5	-
	28	5.3	-	2.7	-
Keoje	Raw anchovy	9.0	6.9	7.4	5.5
	0	10.3	5.6	7.0	4.5
	4	3.0	-	2.0	-
	8	4.8	-	2.0	-
	19	4.3	5.0	3.7	2.0
	28	3.8	4.3	2.2	2.9

¹⁾Plate count agar containing 5% NaCl for total aerobic bacteria

²⁾Lactic acid bacteria count medium containing brom cresol purple and 5% NaCl

³⁾Samples before liquid nitrogen storage (-170°C)

⁴⁾Samples were stored in liquid nitrogen tank (-170°C) for two years.

Table 7. Distribution (%) of microbial flora in *Bajirak Jogae-jeot* (fermented clam) before and after liquid nitrogen storage during the fermentation

Liquid nitrogen storage	Fermentation period (week)	Gram positive bacteria				Gram negative bacteria	Yeast	Total aerobic bacteria		
		Catalase positive		Catalase negative						
		rod	cocci	rod	cocci					
10% NaCl	Before ¹⁾	Raw clam	40	24	4	8	22	2	100	
		0	47	13	4	15	19	2	100	
		2	0	26	44	0	14	16	100	
		4	0	10	44	40	6	0	100	
	After ²⁾	Raw clam	43	14	0	14	29	0	100	
		0	61	4	0	8	23	4	100	
		2	0	0	78	0	22	0	100	
		4	0	10	44	40	6	0	100	
	15% NaCl	Before ¹⁾	Raw clam	40	24	4	8	22	2	100
			0	16	52	6	12	14	0	100
2			0	28	30	30	10	2	100	
4			10	0	59	31	0	0	100	
8			10	0	33	40	10	6	100	
12			16	4	12	18	0	50	100	
After ²⁾		Raw clam	43	14	0	14	29	0	100	
		0	62	20	8	5	5	0	100	
		2	2	0	11	48	30	9	100	
		4	10	0	74	16	0	0	100	
		8	15	0	55	0	30	0	100	
		12	0	0	18	34	48	0	100	

¹⁾Samples before liquid nitrogen storage (-170°C)

²⁾Samples were stored in liquid nitrogen tank (-170°C) for two years.

감소하였다(Table 5, 6). 시료의 성분함량과 액체질소에 시료보존 후 미생물수의 감소정도 사이에는 뚜렷한 관계가 나타나지는 않았다.

젓갈 숙성과정 중의 미생물 균총의 변화

젓갈 숙성과정 중 및 액체 질소 탱크에서의 젓갈 시료 보존이 젓갈의 미생물 균총에 미치는 영향을 조사

Table 8. Distribution (%) of microbial flora of Chungmu and Keoje Myeolchi-jeot (fermented anchovy) before and after liquid nitrogen storage

Liquid nitrogen storage	Fermentation period (week)	Gram positive bacteria				Gram negative bacteria	Yeast	Total aerobic bacteria
		Catalase positive		Catalase negative				
		rod	cocci	rod	cocci			
<i>Chungmu</i>								
Before ¹⁾	Raw anchovy	2	0	0	30	68	0	100
	0	2	7	2	33	57	0	100
	4	0	44	0	0	56	0	100
	8	0	98	0	2	0	0	100
After ²⁾	Raw anchovy	0	7	7	64	18	4	100
	0	0	12	8	50	23	8	100
	4	0	19	0	33	48	0	100
	8	19	12	4	31	35	0	100
<i>Keoje</i>								
Before ¹⁾	Raw anchovy	3	0	0	56	41	0	100
	0	38	0	17	17	28	0	100
	19	12	0	0	0	27	61	100
	28	38	19	2	0	38	2	100
After ²⁾	Raw anchovy	0	0	0	80	20	0	100
	0	0	0	0	58	42	0	100
	19	10	43	0	0	38	10	100
	28	15	27	0	15	35	8	100

¹⁾Samples before liquid nitrogen storage (-170°C)

²⁾Samples were stored in liquid nitrogen tank (-170°C) for two years.

하기 위하여 젓갈 시료에서 분리된 미생물들을 1) 그램 음성균, 2) 젓산균으로 추정할 수 있는 그램 양성, 카탈라아제 음성 간균, 3) 젓산균으로 추정할 수 있는 그램 양성, 카탈라아제 음성 구균, 4) 바실루스균 (*Bacillus*) 계통으로 추정할 수 있는 그램 양성, 카탈라아제 양성 간균, 5) 포도상구균 계통의 균으로 추정할 수 있는 그램 양성, 카탈라아제 양성 구균 및 6) 효모와 같이 6개의 그룹으로 분류하여 미생물 균총 조사를 하였다. 조사결과 조개젓의 경우 Table 7의 액체질소 탱크 보존 전의 결과에서 볼 수 있는 것과 같이 4주까지의 숙성과정 중 젓산균으로 추정되는 그램 양성, 카탈라아제 음성 세균들의 비율의 증가를 보여 주어 우점종을 이루고 있음을 알 수 있고, 그램 양성, 카탈라아제 양성 세균과 그램 음성 세균의 경우 발효에 따른 감소 추세를 보여 주었다. 15% 소금첨가 조개젓의 경우는 4주 이후 그램 양성, 카탈라아제 음성 세균들이 감소하기 시작하였고, 12주째에는 효모가 우점종을 이루고 있었다(Table 7). 멸치 액젓의 숙성 단계별 미생물의 균총 변화를 조사한 결과는 Table 8의 액체질소 탱크 보존 전 결과에서 보여주는 것과 같다. 거제 멸치액젓의 경우 19주째에는 효모균들이 우점종을 이루고 있고, 충무와 거제 멸치액젓 모두 그램 음성 세균들의 비율이 비교적 일정하게 유지되었다. 충무 멸치젓은 8주째에는 그램 음성 세균이 존재하지 않고 그

대신 그램 양성, 카탈라아제 양성 구균이 거의 대부분을 차지하고 있었으며 그램 양성 카탈라아제 음성 구균은 숙성 초기에만 존재하고 4주째 이후는 거의 나타나지 않았다. 또 그램 양성 균주들 중에서는 간균보다는 구균의 비율이 더 높게 나타났다. 반면 거제 멸치액젓은 그램 양성, 카탈라아제 양성 구균이 28주째에 가서야 비율이 높아지고 충무 멸치액젓에서 나타나지 않았던 그램 양성, 카탈라아제 양성 간균이 많이 존재하였다.

액체질소에서의 시료보존이 미생물 균총에 미치는 영향
 젓갈을 액체질소에 2년 보존하였을 때 액체질소 보존 전 후의 미생물 균총 변화 조사 결과는 Table 7, 8에서 보는 것과 같다. 조개젓의 경우 전체 균주 중 그램 양성 균주의 비율은 액체질소 보관 후에 감소하였고, 그램 양성 균주들 중 간균과 구균의 비율은 보관 전에는 구균의 비율이 더 높았던 것에 비해 보관 후에는 간균의 비율이 약간 더 높아졌다. 그램 양성, 카탈라아제 음성 균주들 중 간균의 비율은 역시 액체질소 보존 후 증가하였다. 15% 소금첨가 조개젓의 숙성 12주째 전체 균총의 50%를 차지하던 효모는 액체질소 보존 후에는 검출되지 않았다. 멸치액젓의 경우에는 그램 양성, 카탈라아제 음성 균들의 전체 균총에 대한 비율이 액체질소 보존 후 증가하였으나 효모의 비율

은 크게 감소하였으며 거제 멸치액젓의 경우 그래프 양성 균주들 중 간균의 비율이 액체질소 보존 후 구균에 비해 많이 감소하였다(Table 8). 이러한 구균 및 간균에 대한 결과는 조개젓의 경우와 상반되는 결과이었으나, 효모균의 경우에는 조개젓 및 멸치액젓 모두 액체질소 보존 후 감소하는 경향을 보여주어 원핵생물에 비하여 진핵생물의 보존이 낮은 것을 추측할 수 있었다.

요 약

젓갈 미생물 계수용 배지의 소금농도를 결정하기 위한 실험에서는 NaCl을 5% 첨가한 배지에서 가장 많은 수의 미생물이 계수되었고, 시료를 보존하기 위한 동결보호제는 glycerol 15%를 사용하였을 때 -170°C에서 30일 보존 후 총균수는 75.5%, 젓산균수는 61.3%로 가장 높은 생존율을 나타내었다. 조개젓의 숙성과정 중 pH는 초기 6.8에서 5.0으로 낮아졌고, 숙성 후 단백질 함량은 조개젓은 10%, 멸치액젓은 6~7%이었다. 조개젓의 미생물수는 멸치액젓의 미생물수보다 많았고, 조개젓의 경우는 숙성기간에 따라 미생물수가 증가했다가 감소하는 경향을 보여주었으나 멸치액젓은 서서히 감소하는 경향을 보여주었다. 조개젓의 경우 숙성 4주까지 그래프 양성, 카탈라아제 음성 세균들의 비율이 크게 증가하는 전형적인 젓산 발효 형태를 보여주었다. 젓갈을 -170°C의 액체질소 탱크에서 2년간 보존 후 미생물수는 전체적으로 90% 이상 사멸하였고, 균총 변화를 보면 조개젓의 경우에는 그래프 양성 세균과 간균의 생존율이 더 높았으나 거제 멸치액젓의 경우는 간균의 비율이 구균에 비해 감소하였다. 두 가지 젓갈에서 모두 효모의 비율은 크게 떨어졌다.

감사의 글

본 연구는 1995년 농림부에서 시행한 '95' 첨단 농림수산물기술개발사업에 의하여 수행된 연구결과중의 일부이며 연구비 지원에 감사 드립니다.

문 헌

- Lee, C.H. Importance of Lactic acid bacteria in non-dairy food fermentation, p. 17. In: Lactic Acid Fermentation of Non-Dairy Food and Beverages. Lee, C.H., Nisse, J.A., and Barwald, G. (ed.). Harnrimwon Publishing Co., Seoul, Korea (1994)
- Cha, Y.J. and Lee, E.H. Studies on the processing of low salt fermented sea foods. Bull. Korean Fish Soc. 18: 206-213 (1985)
- Cha, Y.J., Cho, S.Y., Oh, K.S., and Lee, E.H. Studies on the processing of low salt fermented sea foods. 2. The taste compounds of low salt fermented sardine. Bull. Korean Fish Soc. 16: 140-146 (1983)
- Cha, Y.J., Lee, E.H., Lee, K.H., and Chang, D.S. Characterization of the strong proteolytic bacteria isolated from low salt fermented anchovy and the protease produced by that strain. Bull. Korean Fish Soc. 21: 71-79 (1988)
- Cha, Y.J., Chung, S.Y., Ha, J.H., Jeong, I.C., and Lee, E.H. Studies on the processing of low salt fermented sea foods. 3. Changes of microflora during fermentation of low salted sardine. Bull. Korean Fish Soc. 16: 211-215 (1983)
- Ciobanu, A. Freezing, p. 140. In: Cooling Technology in the Food Industry. Ciobanu, A. et al. (ed.). Abacus Press, Tunbridge Wells, Kent (1976)
- Marth, E.H. Behavior of food microorganisms during freeze-preservation, p. 388. In: Low-Temperature Preservation of Foods and Living Matter. Fennema, O.R., Owrie, W.D., and Marth, E.H. (ed.). Marcel Dekker, Inc., New York, USA (1973)
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Factors affecting life and death of microorganisms, Vol. 1, pp. 1-37. In: Microbial Ecology of Foods. Silliker, J.H., Elliott, R.P., Baird-Parker, A.C., Bryan, F.L., Christian, J.H.B., Clark, D.S., Olson, J.C., and Roberts, T.A. (ed.). Academic Press, London, UK (1980)
- Wright, C.T. and Klaenhammer, T.R. Calcium-induced alteration of cellular morphology affecting the resistance of *Lactobacillus acidophilus* to freezing. Appl. and Environ. Microbiol. 41: 807-815 (1981)
- Gilliland, S.E. and Lara, R.C. Influence of storage at freezing and subsequent refrigeration temperatures on β -galactosidase activity of *Lactobacillus acidophilus*. Appl. and Environ. Microbiol. 54: 898-902 (1988)
- Foschino, R., Beretta, C., and Ottogalli, G. A study of the best conditions for freezing and thawing lactic cultures. Industria del Latte 28: 49-67 (1992)
- Tsvetkov, T. and Shishkova, I. Studies on the effects of low temperatures on lactic acid bacteria. Cryobiology 19: 211-214 (1982)
- Davis, R. and Obafemi, A. Response of micro-organisms to freeze-thaw stress, pp. 83-107. In: Microbiology of Frozen Foods. Robinson, R.K. (ed.). Elsevier Applied Science Publishers, London, UK (1985)
- Suihko, M.L. and Haikara, A. Maintenance of the anaerobic beer spoilage bacteria *Pectinatus* and *Megasphaera*. Food Microbiology 7: 33-41 (1990)
- Foschino, R., Fiori, E., and Galli, A. Survival and residual activity of *Lactobacillus acidophilus* frozen cultures under different conditions. J. Dairy Research 63: 295-303 (1996)
- El-Kest, S.E., Yosef, A.E., and Marth, E.H. Fate of *Listeria monocytogenes* during freezing and frozen storage. J. Food Sci. 56: 1068-1071 (1991)

17. Uboldi-Eiroa, M.N., Porto, E. Influence of the freezing with liquid nitrogen on the survival of *Vibrio cholerae* in lobster tails. *Coletanea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, 26: 181-187 (1996)
18. Ryhanen, E.L. The effect of freezing rate on survival and metabolic activity of frozen and freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* cultures. *Finnish J. Dairy Sci.* 49: 14-36 (1991)
19. Penfold, L.J., Garner, D.L., Donoghue, A.M., and Johnson, L.A. Comparative viability of bovine sperm frozen on a cryomicroscope or in straws. *Theriogenology* 47: 521-530 (1997)
20. Luo, X. and Widholm, J.M. Cryopreservation of photosynthetic plant cell suspension cultures. *Plant cell, tissue organ cult.* 47:183-187 (1996)
21. Stanwood, P.C. and Sowa, S. Evaluation of onion (*Allium cepa* L.) seed after 10 years of storage at 5, -18, and -196 degrees C. *Crop Sci.* 35: 852-856 (1995)
22. Korea Food Industry Association. Food Code. p. 714, 726, 717, 735 Seoul, Korea (1995)
23. Collins, C.H. and Lyne, P.M. *Microbiological methods*. 5th ed. Butterworths Co., London (1987)
24. Balows, A., Tenover, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H. (eds.). *The prokaryotes*. 2nd ed. Vol. 1, 2, 3, 4. Springer-Verlag, New York (1992)
25. AOAC. *Official Methods of Analysis*. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA (1985)
26. Coppola, R. and Coppola, S. Low-temperature storage of starters for buffalo milk Mozzarella cheesemaking (In Italian). *Latte* 18: 666-673 (1993)
27. Lee, S.R. and Jun, H.S. Studies on traditional fermentation foods of Korea-Consumption realities and presupposition of fermentation foods. *The Research Institute for Food Culture of Korea*. Vol. 1, pp. 137-156 (1998)

(2000년 5월 10일 접수)