

저식염 오징어 식해의 생리활성 및 유통기한 설정

조원일 · 김상무*

강릉원주대학교 해양식품공학과

The Biofunctional Activities and Shelf-life of Low-salt Squid *Sikhae*

Won Il Cho and Sang Moo Kim*

Department of Marine Food Science and Technology, Gangneung-Wonju National University

Abstract *Sikhae* is a traditional Korean fermented seafood with a 7-10% salt concentration. Consumers have begun to look for low-salt food because excess salt is known to cause hypertension and gastric cancer. The quality characteristics of low-salt squid *sikhae* were investigated at different fermentation temperatures and periods, so as to determine its shelf-life. The shelf-life of the low-salt (5%) squid *sikhae* at -1°C based on pH was 142 days. The functional activities of the ethanol extract of squid *sikhae* such as its antioxidant activity and inhibitions on α -glucosidase, β -glucuronidase, and elastase were stronger than those of the water extract. Based on the results of sensory evaluation, the low-salted squid *sikhae* was very similar to fermented seafood. In conclusion, low-salt *sikhae* is commercially viable.

Keywords: fermented seafood, functional activity, shelf-life, *sikhae*, squid

서 론

오징어는 주로 동해안에서 생산되며 어민들의 주요 소득원 중 하나로서 타우린, DHA, EPA 등 각종 영양소가 풍부하여(1), 예로부터 회, 건조, 조미, 젓갈 및 식해 등 여러 가지 식품 소재로 이용되어 왔다. 그 중 식해는 어육 등의 주 원료에 7-10% 내외의 소금을 가하여 익힌 곡류와 고춧가루, 채소 등 각종 조미 부재료를 혼합하여 숙성시킴으로서 젓산균을 비롯한 미생물과 생성된 유기산에 의한 부패방지는 물론 식용에 적합한 풍미와 조직감이 생성되는 전통 수산발효식품이다(2). 하지만 식해는 일반화 및 상품화 되어있지 못하고 강원도 영동지역의 향토식품으로만 명맥을 유지하고 있으며, 수산발효식품의 품질개선을 위한 많은 기초연구가 있지만 대부분의 연구가 주로 단일 원료를 고농도의 소금으로 절여 발효시킨 젓갈류에 한정되어 있는 실정이다(3). 식해가 여타 다른 지역의 젓갈류와 특이하게 다른 점은 어육에 곡류(메주 또는 멥쌀), 무채, 엿기름 및 고춧가루 등의 부재료를 넣어 일정기간동안 숙성시켜 자체 발효에 의한 자가소화와 숙성 중 미생물의 발효작용에서 독특한 정미성분을 나타내는 것이 특징이다(4). 고식염 식품은 신장병, 고혈압 등 성인병의 원인이 되기 때문에 최근 소비자들은 고식염 식품을 기피하고 저식염 식품을 많이 선호하고 있다. 그러므로 고식염 식품의 기피현상에 부응하여 식해 또한 현대인의 식기호에 적합한 식품으로 발전할 필요가 있으며, 저식염 발효식품의 개발은 영양학적 측면이

나 시장성 측면에서도 많은 효과가 기대된다. 또한, 오징어 식해에 들어가는 부재료들은 강력한 항산화, 항당뇨 및 항대장암 등의 활성이 존재하며 이들의 생리활성을 측정하여 식해의 기능성이 확립되면 시장 점유율이 급격하게 향상될 것으로 기대된다.

이에 따라 명태식해 숙성 중 정미성분(2), 오징어 식해 숙성 중 단백질 화학적 변화(5), 소금 첨가수준에 따른 가자미 식해의 맛 성분의 변화(6), 가자미 식해에 관한 연구(7), 강릉지방 오징어 식해 개발(8-11) 등이 보고되어 있으나, 위의 연구들은 주로 고식염 식해에 관한 연구가 대부분이다.

따라서 본 연구는 전통발효식품인 식해를 염농도를 달리하여 제조하고, 발효 온도 및 기간에 따른 품질특성, 발효 최적조건 및 유통기한 설정, 최적발효조건에서 제조한 오징어 식해의 생리활성 등을 분석하여 우리 전통식품에 대한 과학적 자료를 제공함과 동시에 저식염 오징어 식해 생산과 보급에 대한 기초자료를 얻고자 수행하였다.

재료 및 방법

재료 및 식해제조

오징어(*Todarodes pacificus*, 수협, 강릉)는 -25°C로 저장된 것을 4°C에서 해동한 후, 귀, 내장, 다리를 제거하여 몸통만을 폭 0.5-1 cm 간격으로 썰고 어육 중량당 곡류밥 40% (메주 및 멥쌀 각 20%), 고춧가루 7%, 무채 5%, 마늘 3%, 생강 1% 및 올리브유 1%를 혼합한 후 염농도(3, 5 및 7%)를 달리하여 식해를 제조하였다. 제조한 식해는 저장온도(10, 20 및 30°C)에 따라 저장기간을 달리하여 발효하였으며 발효 기간 동안의 품질변화를 측정하였다(9).

일반성분 분석

일반성분은 AOAC의 방법(12)에 따라 분석하였다. 수분은 상압가열건조법, 조회분은 직접회화법, 조단백은 Micro-Kjeldahl법,

*Corresponding author: Sang Moo Kim, Department of Marine Food Science and Technology, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, Gangwon 210-702, Korea
Tel: 82-33-640-2343
Fax: 82-33-640-2882
E-mail: smkim@gwnu.ac.kr
Received September 16, 2011; revised November 30, 2011;
accepted December 14, 2011

조지방은 Soxhlet법, 탄수화물은 가감법으로 측정하였다. 즉, 수분은 시료를 물의 비점보다 약간 높은 온도 105°C에서 상압 건조시켜 그 감소되는 양을 수분량으로 하는 방법, 조지방은 시료를 회화용기에 넣고 직접 550-600°C의 온도에서 완전히 회화처리 하였을 때의 회분의 양을 측정하는 방법, 조단백은 kjeldahl 플라스크에 시료를 넣고 분해, 증류, 중화, 적정의 단계로 얻은 황산양을 질소-단백질 환산계수를 곱하여 조단백질의 양을 측정하는 방법, 조지방은 시료를 원통여지에 넣고 ether를 수기에 부어 원통여지를 수기에 침지시켜 가열한 후 추출물에서 ether를 휘발시킨 후 그 건조물의 중량을 달아 정량하는 방법, 탄수화물은 전체 100°C에서 나머지 일반성분의 함량을 합하여 빼는 방법으로 측정하였다.

pH

pH는 시료 10 g을 마쇄하고 증류수로 10배 희석한 후 원심분리(10,000×g, 15 min)하여 pH meter(Istek, Seoul, Korea)로 측정하였다(12).

아미노질소(NH₂-N)

아미노질소의 분석은 Adler-Nissen의 방법(13)으로 측정하였다. 즉, 마쇄한 후 증류수로 희석한 시료 0.25 mL와 2 mL의 0.2125 M sodium phosphate buffer(pH 8.2)와 0.01% trinitrobenzene sulfonic acid(TNBS) 1 mL를 넣고 50에서 60분간 반응 후 0.1 N HCl 용액 4 mL를 첨가하여 반응을 종결시키고 10초간 교반한 뒤에 340 nm에서 O.D. 값을 측정하여 L-leucine을 이용한 표준곡선에서 농도를 구하였다.

휘발성 염기질소(VBN)

휘발성 염기질소량은 Microdilution method(14)를 수정하여 측정하였다. 즉, 마쇄한 시료 10 g에 증류수 30 mL를 가하고 30분간 교반한 뒤 20% TCA(Trichloroacetic acid)용액 20 mL를 넣어 단백질을 침전시킨 후 100 mL로 정용하고 원심분리(4,800×g, 10 min)한 뒤 0.45 syringe filter(Advantec, Tokyo, Japan)로 여과한 여과액을 증류수로 10배 희석하였다. Conway unit 외실에 희석액 1 mL 및 포화 K₂CO₃ 1 mL, 내실에는 0.01 N H₂SO₄ 용액 1 mL를 각각 넣고 37°C에서 1시간 반응한 다음 내실에 Brumswick(0.07% methyl red, 0.03% methylen blue) 지시약을 1-2방울 첨가하고 0.01 N NaOH로 적정하여 휘발성 염기질소량을 구하였다. 공시험은 시료 대신 20% TCA 용액을 사용하였으며, 시료 중의 휘발성 염기질소량은 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{휘발성염기질소량} = 0.14 \times (V_1 - V_0) \times F \times D \times 100 / S$$

V₁: 시료의 0.01 N NaOH 용액의 적정소비량

V₀: 공시험의 0.01 N NaOH 용액의 적정소비량

F: 0.01 N NaOH의 역가

D: 희석배수

S: 시료의 채취량

0.14: 0.01 N H₂SO₄ 1 mL에 상당하는 휘발성 염기질소량

발효 최적조건 및 유통기한 설정

발효 최적조건 및 유통기한은 Arrhenius equation(15)을 이용하여 설정하였다. 즉, 10, 20 및 30°C에서 amino-N이 300 mg%가 되는 시점을 기준으로 발효 최적조건을 산출하였고, pH가 5.0이 되는 시점을 기준으로 유통기한을 산출하였다.

오징어 식해 추출물의 제조

최적 발효조건으로 제조한 염농도 3, 5 및 7%의 오징어 식해시료 300 g에 냉수 및 에탄올을 각각 1:10의 비율로 첨가하여 저온실에서 24시간 동안 추출하였다. 추출물을 원심분리(10,000×g, 15 min)하고 상층액을 농축한 것을 시료로 하여 생리활성을 측정하였다.

항산화활성

DPPH radical 소거능

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) radical 소거능은 Blois 등의 방법(16)을 수정하여 측정하였다. 즉, 농도별로 조정된 시료 0.05 mL와 0.15 mM DPPH 용액 0.2 mL를 혼합하여 실온에서 30분간 반응한 다음 microplate reader(Biotek, Winooski, VT, USA)로 515 nm에서 흡광도를 측정하였으며, DPPH radical 소거능은 다음식에 의하여 계산하였다.

$$\text{DPPH radical 소거능} = \{C - (S - SB)\} / C \times 100$$

C(Control): 시료 미첨가구

S(Sample): 시료 첨가구

SB(Sample blank): DPPH 용액과 같은 용량의 ethanol에 시료 첨가구

Hydrogen peroxide radical 소거능

Müller의 방법(17)에 따라 측정하였다. 즉 0.1 M phosphate buffer(pH 5.0)에 용해한 용액 0.1 mL와 hydrogen peroxide 0.02 mL를 96 microwall plate에 첨가한 후 37에서 5분간 반응하였다. 그 후 1.25 mM 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS) 0.03 mL와 peroxidase(1 unit/mL) 0.03 mL를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응한 다음 microplate reader(Biotek)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며, hydrogen peroxide radical 소거능은 다음식에 의하여 계산하였다.

$$\text{Hydrogen peroxide radical 소거능} = \{C - (S - SB)\} / C \times 100$$

C(Control): 시료 미첨가구

S(Sample): 시료 첨가구

SB(Sample blank): DPPH 용액과 같은 용량의 증류수에 시료 첨가구

Hydroxyl radical 소거능

Chung 등의 방법(18)에 따라 시험관(18×150 mm)에 1 mM FeSO₄/EDTA 용액, 10 mM 2-deoxyribose 용액, 시료를 각각 0.2 mL를 가하여 37°C에서 1시간 반응한 다음 2.8% TCA용액 1 mL를 가하고 반응을 정지하였다. 그런 다음 1% TBA 용액 1 mL를 가하여 다시 100°C로 10분동안 가열한 다음 급냉하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. Hydroxyl radical 소거능은 다음식에 의하여 계산하였다.

$$\text{Hydroxyl radical 소거능} = \{C - (S - SB)\} / C \times 100$$

C(Control): 시료 미첨가구

S(Sample): 시료 첨가구

SB(Sample blank): DPPH 용액과 같은 용량의 증류수에 시료 첨가구

α-Glucosidase 저해활성

α-Glucosidase의 저해활성은 Kim 등의 방법(19)을 수정하여 측

정하였다. 즉, 0.01 M phosphate buffer(pH 7.0) 2.2 mL에 농도별로 조정된 시료 0.1 mL와 0.01 M phosphate buffer에 녹인 0.25 U/mL α -glucosidase 0.1 mL를 첨가한 후 37°C에서 5분 동안 예비 반응하였다. 그 후 같은 buffer에 녹인 3 mM pNPG 0.1 mL를 넣고 교반 후 37°C에서 30분간 반응 한 다음 0.1 M Na_2CO_3 1.5 mL를 가하여 반응을 정지하고 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. α -Glucosidase 저해활성은 다음식에 의하여 계산하였다.

$$\alpha\text{-Glucosidase 저해활성} = \{C - (S - SB)\} / C \times 100$$

C(Control): 시료 미첨가구

S(Sample): 시료 첨가구

SB(Sample blank): 3.9 mL의 10 mM phosphate buffer에 시료 첨가구

β -Glucuronidase 저해활성

β -Glucuronidase 저해활성은 Kim 등의 방법(20)을 수정하여 사용하였다. 즉, 농도별로 조정된 시료 0.1 mL에 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0) 2.2 mL와 20 U/mL β -glucuronidase 0.1 mL를 가하여 37°C에서 5분간 예비 반응하였다. 그런 다음 10 mM p-nitrophenyl- β -D-glucuronide 0.1 mL를 가하여 37°C에서 30분간 반응하였으며, 1.0 M Na_2CO_3 1.5 mL를 가하여 반응을 종료한 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. β -Glucuronidase 저해능은 다음식에 의하여 계산하였다.

$$\beta\text{-Glucuronidase 저해활성} = \{C - (S - SB)\} / C \times 100$$

C(Control): 시료 미첨가구

S(Sample): 시료 첨가구

SB(Sample blank): 3.9 mL의 10 mM phosphate buffer에 시료 첨가구

Elastase 저해활성

Elastase 저해활성은 Cannell 등의 방법(21)을 수정하여 사용하였다. 즉, 농도별로 조정된 시료 0.1 mL에 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.6)에 녹인 0.6 unit/mL의 elastase pancreatic solution (Source: porcine pancreas) 용액을 0.05 mL를 가한 후 기질로 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.6)에 녹인 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide 1 mg/mL을 0.1 mL 첨가하여 30분간 반응한 다음 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. Elastase 저해능은 다음식에 의하여 계산하였다.

$$\text{Elastase 저해활성 (\%)} = [1 - \{(S - C) / (A - D)\}] \times 100$$

A: 시료대신 증류수 넣고 효소를 첨가하여 반응한 후의 흡광도

S: 효소를 첨가하여 반응한 후의 시료의 흡광도

C: 효소 대신 증류수를 첨가하여 반응한 후의 시료의 흡광도

D: 시료와 효소대신 각각 증류수를 첨가하여 반응한 후의 흡광도

구성아미노산 및 유리아미노산

최적조건으로 제조한 식해의 구성아미노산 조성은 Shinha 등의 방법(22)으로 분석하였다. 시료 100 mg에 6 N HCl 20 mL를 가하여 105°C 정온건조기에서 24시간 분해하였다. 분해한 시료를 감압농축기(R-114, BÜCHI, Flawil, Switzerland)로 농축한 다음 25 mL로 정용하여 아미노산자동분석기(L-8800, Hitachi, Tokyo, Japan)로 분석하였다. 유리아미노산은 Kim 등의 방법(23)으로 시료 1 g에 75% ethanol 40 mL를 가하여 24시간 교반한 뒤 원심분리(10,000×g, 15 min)하여 상층액과 고형분을 분리하였고 이 실험을

3회 반복하였다. 3회째부터는 1시간 단위로 교반, 원심분리 과정을 상층액이 무색에 가까워질 때까지 반복하였다. 상층액을 감압농축기로 농축하여 증류수 25 mL로 정용한 후 아미노산자동분석기로 분석하였다.

관능검사

최적조건에서 발효한 오징어 식해를 관능검사 시료로 사용하였다. 식품학을 전공하는 대학원생 및 학부생 총 20명(20대 여자 8명, 20대 남자 12명)의 관능검사요원을 구성하여 맛, 냄새, 색 및 전체적 기호도의 4가지 항목에 한하여 5단계 평판법(5점: 매우 좋다, 4점: 좋다, 3점: 보통이다, 2점: 나쁘다, 1점: 매우나쁘다)으로 측정하였다(24). 관능검사 대조구로는 시판용 수산발효식품(강릉시)을 비교 평가 하였으며 모든 검사는 3회 반복하여 실시하였다.

통계분석

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

결과 및 고찰

일반성분분석

본 실험에 사용한 원료 오징어의 일반성분 분석 결과는 다음과 같다. 원료오징어의 수분함량은 79.2±1.3%이었으며, 조단백질, 조지방, 조회분 및 탄수화물의 함량은 각각 17.3±0.5, 1.0±0.0, 1.7±0.0 및 0.8±0.0%이었다. 식해 제조 시의 수분함량은 59.7%로 식염의 첨가와 곡류의 첨가로 인해서 약 20% 정도 감소하였으며, 조단백질은 9.8%로 약 8% 감소하였고 조지방 및 조회분의 함량은 각각 1.5, 5.8%로 2-4%정도 증가하였다. 탄수화물 함량은 23.3%로 크게 증가하였는데 이는 곡류의 첨가로 인한 증가로 보여진다. 숙성 6주 이후의 일반성분의 변화는 수분이 60.9%이었으며, 조단백질, 조지방, 조회분 및 탄수화물은 각각 11.3, 1.6, 5.5 및 20.8%로 식해 제조 시의 일반성분의 함량과 큰 차이는 없었다. Cha 등(2)과 Park 등(25)은 저식염 젓갈 및 식해의 숙성 중 일반성분 함량은 큰 변화가 없다고 보고 하였는데, 이는 본 연구와 유사하였다. Kim 등(8)은 오징어식해의 일반성분이 수분 70.3-72.2%, 조단백 9-10%, 조지방 1.3-2.1% 및 탄수화물 1.7-2.0%이라 보고하였는데, 본 연구 결과와 수분함량이 약 10%의 차이가 있었지만, 이는 원료의 상태(냉동오징어 시료) 및 식염 첨가에 의하여 탈수가 많아져 수분함량에 차이가 생기는 것이라 판단된다. 원료오징어와 오징어식해의 일반성분 함량은 식염과 곡류 등 부재료 첨가로 수분, 회분 및 탄수화물의 함량에 변화를 보였지만 그 이후 저장 하는 기간 동안에는 일정하게 유지되었다. 창란젓의 숙성 중 일반성분 변화에서도 부재료의 첨가로 회분은 7% 증가하였으며, 이 후 거의 변화 없이 유지되는 경향을 나타내었고(25), 이는 본 연구 결과와 유사하였다. 일반성분 결과를 종합하면 본 연구에서 제조한 오징어 식해는 부재료의 첨가에 의하여 원료오징어에 비해 일반성분의 변화가 있지만, 저장 기간 동안의 일반성분 함량의 변화는 큰 차이가 없었다.

pH

숙성온도 및 저장기간에 따른 pH의 변화는 Fig. 1과 같다. 일

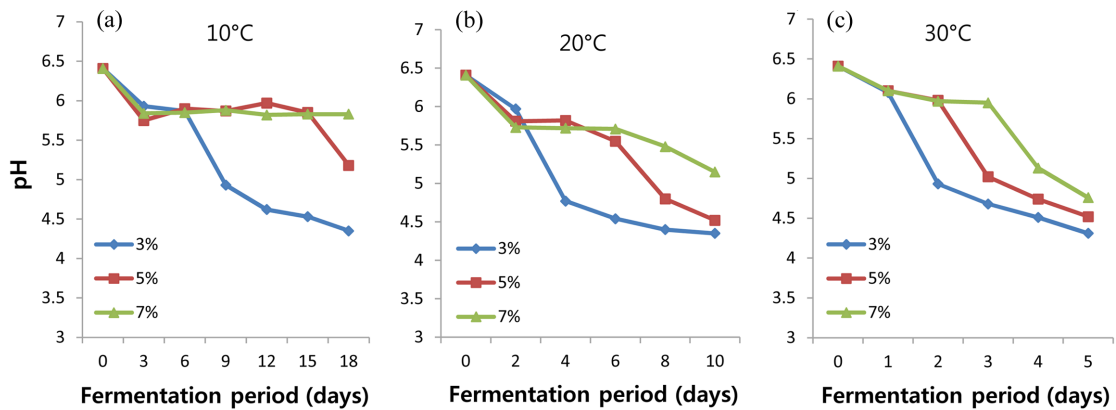


Fig. 1. Changes in pH of squid *sikkhae* at different fermentation temperatures and periods. (a), 10°C; (b), 20°C; (c), 30°C

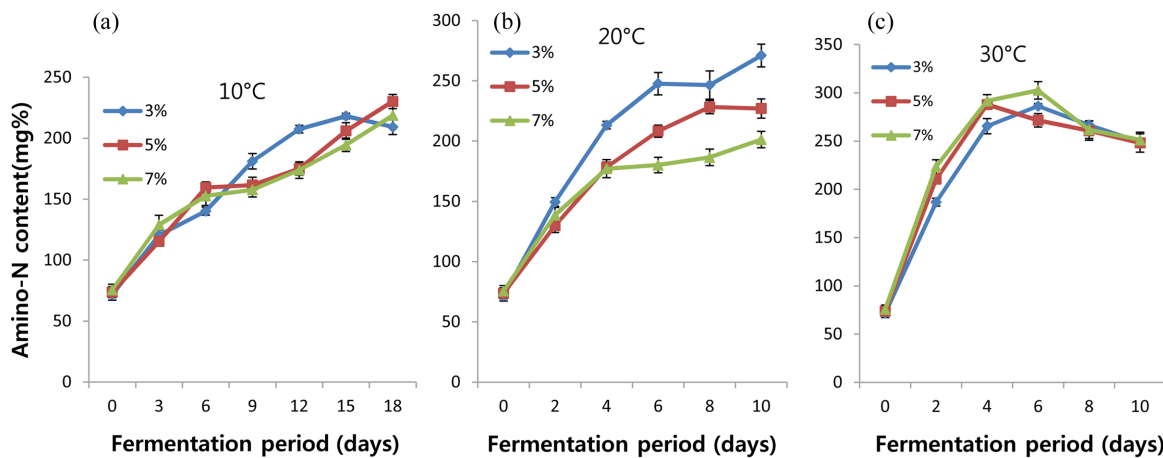


Fig. 2. Changes in Amino-N content of squid *sikkhae* at different fermentation temperatures and periods. (a), 10°C; (b), 20°C; (c), 30°C

반적인 수산발효식품은 pH 5 이하가 되면 악취와 더불어 풍미에 악영향을 미치며 유기산을 생성하여 상품성이 없다고 보고되어 있으며, pH는 수산발효식품의 품질특성에 중요한 영향을 치는 인자이다(26). 식해의 pH는 발효 기간에 따라 4.31-6.41의 범위로 변화하였으며, 식염의 농도가 낮고, 숙성온도가 높을수록 pH가 급격하게 감소하였다. Lee 등(5)은 온도변화 및 수분함량에 따른 오징어 식해의 성분변화에 대한 연구에서 20°C에서 발효숙성 시켰을 때, 10에서 발효숙성 한 것 보다 pH가 급격히 감소하였는데, 이는 본 연구와 유사하였다. 10 및 20°C의 발효숙성온도에서는 pH가 유의적인 차이가 없었으나, 3% 농도의 오징어 식해를 30°C에서 5일간 발효숙성 시켰을 때, pH가 5 이하로 떨어졌는데, 이러한 현상은 식해 제조 시 첨가되는 곡류에 따른 미생물의 활성 증가에 따라 유기산이 많이 생산되는 것이 원인이라고 보여진다(8). 이에 따라 고온에서의 발효 및 유통은 식해의 품질을 급속히 저하시키기 때문에 저식염 식해는 저온에서 발효 및 유통이 이루어져야 된다고 판단된다.

아미노질소

숙성온도 및 저장기간에 따른 아미노질소의 변화는 Fig. 2와 같다. 아미노질소량은 발효식품의 숙성도 지표로 이용될 뿐만 아니라 향미와 깊은 관련이 있기 때문에 중요한 품질 지표로 인식되고 있다(25). 본 연구에서 제조한 오징어 식해의 아미노질소량은 발효 기간에 따라 71-302 mg%의 범위로 변화하였으며, 식염의 농도가 낮고, 발효숙성온도가 높을수록 아미노질소량이 급격

하게 증가하였다. 또한, 10 및 20°C에서는 아미노질소량이 지속적으로 증가하였으나, 30°C에서는 4일 이후부터 오히려 아미노질소량이 감소하였는데, 이는 단백질에서 분해된 아미노산이 저급 질소화합물인 amine이나 NH_3 으로 저온에서 보다 빨리 분해되어 휘발되었기 때문인 것으로 판단된다(27). Kim 등(11)은 오징어 식해에 대한 연구에서 숙성기간이 증가할수록 급격한 증가경향을, 그 후로는 완만한 증가경향을 나타낸다고 하였으며, Park 등(25)은 창란젓의 숙성 중 아미노질소 변화는 꾸준히 증가하여 최고치에 달한 후 감소하는 경향을 나타낸다고 보고 하였는데, 이는 본 연구 결과와 유사하였다. 이에 따라 30°C에서 3일정도 발효시킨 오징어 식해의 아미노질소량이 가장 높아 이를 토대로 식해의 발효 최적조건을 산출하는 것이 적합하다고 판단된다.

휘발성 염기질소

숙성온도 및 저장기간에 따른 휘발성 염기질소의 변화는 Fig. 3과 같다. 휘발성 염기질소(volatil basic nitrogen, VBN)는 식품 단백질의 선도판정법으로 가장 일반적으로 사용되며 수산발효식품의 품질특성에 간접적으로 영향을 미치는 지표이다. 본 연구에서 제조한 오징어 식해는 발효 기간에 따라 3-58 mg%의 범위로 변화하였으며, 식염의 농도가 낮고, 발효 온도가 높을수록 휘발성 염기질소의 함량이 급격하게 증가하였는데, 이는 식염의 농도가 낮아지고 온도가 상승할수록 미생물에 의한 단백질 및 아미노산의 분해가 빨라져 휘발성 염기질소 생성량이 증가하기 때문이다. Park 등(25)은 창란젓의 숙성 중 휘발성 염기질소는 꾸준

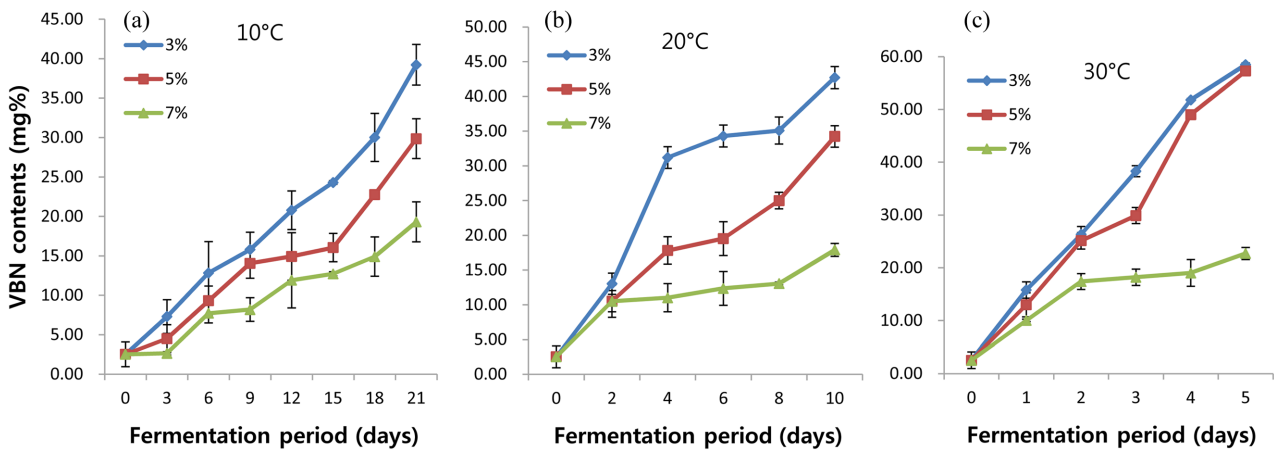


Fig. 3. Changes in VBN content of squid *sikhae* at different fermentation temperatures and periods. (a), 10°C; (b), 20°C; (c), 30°C

히 증가한다고 하였고, Oh 등(28)은 저식염 오징어 젓갈 숙성 연구에서 숙성 온도가 높을수록 휘발성 염기질소의 양이 증가하였는데, 이는 본 연구 결과와 유사하였다. 또한, 발효 중기에 부패 판정치인 40 mg%를 이미 초과하는 시료가 대부분인데, 발효식품에서는 휘발성 염기질소와 관련된 품질이나 저장성에 관하여는 아직 보고된 것이 없으며, 휘발성 염기질소와 발효식품의 품질 및 저장에 관한 연구는 관능검사 등을 통한 보충연구가 필요하다(26).

발효 최적조건의 설정

아미노질소량은 발효식품의 향미와 깊은 관련이 있기 때문에 중요한 품질 지표로 인식되고 있으며(25), 이에 따라 아미노질소량을 오징어 식해의 숙성도 지표로 활용하였다. 다양한 염농도 및 온도에 의한 오징어 식해의 발효기간 중 품질특성을 측정할 결과, 식염농도 3%에서는 염의 농도가 너무 낮아 부패가 빠르고, 7%는 염농도가 높기 때문에 5%의 식염농도를 선택하였고, 발효 온도가 상승할수록 부패가 빠르기 때문에 -1°C를 숙성온도를 선택하였다. 이에 따라 유통기한을 산출하는 공식인 Arrhenius식을 이용하여 amino-N을 기준으로 삼아 계산한 결과 5% 염농도의 식해를 -1°C에서 53일간 발효한 것을 최적조건으로 설정하였으며(Table 1), 이를 차후 연구에 활용하였다.

유통기한

다양한 염농도 및 온도에 의한 오징어 식해의 발효기간 중 pH의 변화량을 토대로 Arrhenius식에 대입하여 각각의 온도에 대한 유통기한을 산출한 결과는 Table 1과 같다. 일반적인 수산발효식품은 pH 5 이하가 되면 악취와 더불어 풍미에 악영향을 미치며 상품성이 없기 때문에(26), pH 5를 기준으로 유통기한을 산출한 결과 염농도 3%의 오징어 식해는 -1, 4, 10 및 20°C의 발효숙성 온도에서 각각 29, 19, 12 및 6일 이었고, 5% 식해는 각각 142, 71, 32 및 9일 이었으며, 7% 식해는 각각 475, 203, 76 및 12일 이었다. 이에 따라 본 연구결과를 바탕으로 최적조건으로 설정한 염농도 5%의 식해는 -1°C에서 142일간의 유통기한을 갖는 것으로 판단된다.

항산화활성

DPPH radical 소거능

식해 용매 추출물의 DPPH radical 소거능은 Table 2와 같다. DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 free radical이며 cystein,

glutathione과 같은 함 유황아미노산과 ascorbic acid, BHA 등에 의해 환원되어 탈색되므로 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다(29). 식해 용매 추출물의 50%를 저해하는 값인 IC₅₀ value는 에탄올 추출물이 1.66-2.68 mg/mL의 범위로 냉수 추출물의 DPPH 저해활성보다 높았다. 이는 대부분의 관련 연구에서 유기용매 추출물이 냉수추출물에 비하여 상대적으로 높은 DPPH 소거능을 보이는 것과 같은 결과이며, Choi 등(30)은 다양한 소재 추출물의 항산화성에 관한 연구에서 에탄올 추출물이 물 추출물보다 항산화효과가 우수하다고 보고하였고, 이는 본 연구와 일치하였다. 또한 Cheigh 등(31)의 연구에서 식해의 부재료로 사용된 마늘, 고춧가루, 생강 등은 항산화성 증진효과가 있다고 보고하였으며, 이는 본 연구에서 제조한 오징어 식해 추출물의 항산화성에 크게 기여하였을 것으로 추정된다. 이에 따라, 식해 용매 추출물은 항산화 소재로서 활용에 대한 가능성은 있으나 보충연구가 필요하다고 판단된다.

Hydrogen peroxide 및 hydroxyl radical 소거능

식해 용매 추출물의 hydrogen peroxide 및 hydroxyl radical 소거능은 Table 2와 같다. Hydrogen peroxide 및 hydroxyl radical은 활성산소 중에서 반응성이 강하여 생체 내 각종 조직 및 세포막 등의 산화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(32). 20 mg/mL 농도에서 hydrogen peroxide 및 hydroxyl radical 소거능은 각각 47.94±0.76-78.56±3.42 및 29.64±1.31-44.61±1.92%의 범위로 에탄올 추출물이 냉수 추출물보다 활성이 높았고, positive control

Table 1. The shelf-life of squid *sikhae* at different fermentation temperatures calculated using Arrhenius equation

Salt concentration (%)	Shelf-life Index	Shelf-life (days)			
		-1°C	4°C	10°C	20°C
3	pH (5.0)	29	19	12	6
	Amino-N (300 mg%)	55	38	25	13
	VBN (40 mg%)	72	46	12	27
5	pH (5.0)	142	71	32	9
	Amino-N (300 mg%)	53	38	25	13
	VBN (40 mg%)	79	50	29	12
7	pH (5.0)	475	203	76	16
	Amino-N (300 mg%)	67	46	30	15
	VBN (40 mg%)	71	48	31	16

Table 2. Antioxidant activities of the water and ethanol extracts from the squid *sikhae*

Sample	Salt concentration (%)	IC ₅₀ (mg/mL)				Inhibitory activities (%) at 20 mg/mL			
		Water extract		Ethanol extract		Water extract		Ethanol extract	
		DPPH	Hydrogen peroxide	DPPH	Hydrogen peroxide	Hydrogen peroxide	Hydroxyl	Hydrogen peroxide	Hydroxyl
<i>Sikhae</i>	3	6.09	12.50	1.66	7.49	-	38.79±2.08	-	29.64±1.31
	5	7.34	-	2.31	12.55	68.74±2.83	37.46±1.75	-	33.37±0.58
	7	12.19	-	2.68	15.17	57.41±1.44	44.61±1.92	-	39.69±2.01
α -Tocopherol ^a (μ g/mL)		19.67	177.29	19.67	177.29	177.29	131.45	177.29	131.45

^apositive control**Table 3. α -Glucosidase, β -glucuronidase and elastase inhibitory activities of the water and ethanol extracts from the squid *sikhae***

Sample	Salt concentration (%)	Inhibitory activities (%) 20 mg/mL					
		Water extract			Ethanol extract		
		α -Glucosidase	β -Glucosidase	Elastase	α -Glucosidase	β -Glucosidase	Elastase
<i>Sikhae</i>	3	12.83±0.38	13.97±0.50	7.2±0.25	38.22±0.93	29.45±0.81	44.74±1.10
	5	14.11±0.68	10.76±0.12	12.69±1.42	33.85±0.38	48.47±1.70	31.76±1.13
	7	12.52±0.51	14.98±0.74	5.77±0.31	36.27±0.48	33.04±1.31	48.25±1.64
Acabose ^a (IC ₅₀)		3.09 mg/mL	-	-	3.09 mg/mL	-	-

^apositive control

인 α -tocopherol에 비하여는 활성이 낮았다. Yu 등(29)은 대추 추출물의 항산화성에 관한 연구에서 대추과육 추출물 및 대추씨 추출물의 hydrogen peroxide 소거능은 100°C/mL의 농도에서 각각 60 및 72%의 소거활성을 나타내었다고 보고하였는데, 이는 본 연구 결과보다 뛰어난 항산화성을 나타내었다. 본 결과로 미루어 볼 때 식해 용매 추출물의 hydrogen peroxide 및 hydroxyl radical 소거능의 활성이 낮아 기능성 소재로의 활용 가능성은 다소 미약하다고 판단된다.

α -Glucosidase 및 β -glucuronidase 저해활성

식해 용매 추출물의 α -glucosidase 및 β -glucuronidase 저해활성은 Table 3과 같다. α -Glucosidase는 소장 상피세포의 brush-border membrane에 존재하는 효소로서 이당류나 다당류를 탄수화물이 소화 흡수되기 위한 상태인 단당류로 가수분해하는 역할을 하며 이 효소의 저해는 탄수화물 식이 후 혈당상승을 억제할 수 있어 항당뇨 활성 측정법으로 이용된다(33). 또한, β -glucuronidase는 간에서 benzo(a)pyrene 등의 유독성 물질이 glucuronic acid conjugate로 무독화 되어 장으로 보내졌을 때 이 결합을 끊어 주어 발암원을 제공하며 이로 인하여 대장암을 일으킨다고 알려져 있다(34). 따라서 β -glucosidase 및 β -glucuronidase는 항당뇨 및 항대장암 활성의 지표로 사용된다. 식해 용매 추출물의 α -glucosidase 및 β -glucuronidase 저해활성은 20 mg/mL의 농도에서 각각 12.52±0.51-38.22±0.93 및 10.76±0.12-48.47±1.70의 범위로 50%를 저해하는 IC₅₀ value는 계산되지 않았다. Cho 등(35)은 오미자 물 추출물이 200°C/mL에서 97.4%, 에탄올 추출물이 200°C/mL에서 84.5%로 우수한 활성을 보인 반면 본 연구에서는 물 및 에탄올 추출물의 활성이 낮아 식해 용매 추출물은 항당뇨 및 항대장암 관련 기능성 소재로의 활용에 대한 보충연구가 필요하다고 판단된다.

Elastase 저해활성

식해 용매 추출물의 elastase 저해활성은 Table 3과 같다. Elastase는 피부주름생성으로 인한 내인성 피부 노화 발생의 원인

이고(36), elastase 저해제는 피부 주름을 개선하는 작용을 나타낸다. Ahn 등(37)은 소나무 껍질 추출물이 1 mg/mL에서 70%의 elastase 활성 억제 효과를 보인 바 있으며 이 수치는 소나무 껍질의 높은 피부 주름 개선능을 나타내고 있어 주름 예방 화장품 소재로서의 가치를 제시하고 있지만, 식해의 냉수 추출물의 elastase 저해활성은 20 mg/mL의 농도에서 5.77±0.31-12.69±1.42%의 범위이고, ethanol 추출물은 31.76±1.13-48.25±1.64%의 범위로 활성이 너무 낮아 기능성 화장품 관련 소재로의 활용은 미미하다고 판단된다.

구성 및 유리아미노산

오징어 식해의 구성아미노산 및 유리아미노산 조성은 Table 4와 같다. 5% 식해의 구성아미노산은 leucine(11.58%), arginine(9.52%), aspartic acid(9.36%), lysine(8.54%) 순으로 함량이 많았으며, 이들 아미노산 조성이 전체 아미노산 조성의 39.0%를 차지하였다. 유리 아미노산 조성은 proline(22.75%), arginine(15.04%), aspartic acid(12.63%), alanine(7.26%) 순으로 이들 아미노산이 전체 아미노산 조성의 57.68%를 구성하였으며, 이는 Kim 등(9)이 강릉지방의 오징어식해에 관한 연구에서 보고한 유리아미노산 함량과 유사하였다.

유리 아미노산은 식해류의 향미에 가장 중요한 영향을 미치는 단백질의 분해산물로서 발효시에도 중요한 품질지표로 활용되고 있다(27). 식해 맛은 유리아미노산 및 핵산 관련물질이 주 역할을 하고 여기에 유기산, 유리당 및 향신료 성분 등이 보조적 맛의 역할을 한다. Glutamic acid와 aspartic acid는 신맛과 감칠맛의 주체라고 보고되고 있으며(2), alanine, proline, lysine은 단맛을 내고 histidine, methionine 및 valine은 쓴맛을 낸다고 알려져 있다(2). 본 연구에서 맛과 아미노산 조성의 연관성을 살펴보면 단맛을 내는 glycine, alanine, serine, proline의 함량은 35.7%, 감칠맛과 신맛, 짠맛을 내는 glutamic acid, aspartic acid, lysine의 함량은 20.6%로 전체 아미노산의 56.3%가 맛과 관련하여 양호하였으며, 쓴맛과 관련된 valine, methionine, leucine, phenylalanine,

Table 4. The compositional and free amino acids of the low-salted squid *sikhae*

Compositional amino acid	Content (%)	Free amino acid	Content (%)
Glycine	4.78	Glycine	2.81
Alanine	6.73	Alanine	7.26
Serine	6.53	Serine	2.85
Proline	4.66	Proline	22.75
Glutamic acid	1.29	Glutamic acid	4.85
Aspartic acid	9.36	Aspartic acid	12.63
Lysine	8.54	Lysine	3.10
Valine	6.64	Valine	5.58
Methionine	2.96	Methionine	2.50
Leucine	11.58	Leucine	4.77
Phenylalanine	4.79	Phenylalanine	2.74
Arginine	9.52	Arginine	15.04
Histidine	2.66	Histidine	2.92
Threonine	7.34	Threonine	2.53
Cystein	2.43	Cystein	3.63
Isoleucine	5.73	Isoleucine	2.41
Tyrosine	4.47	Tyrosine	1.63
Total	100.0	Total	100.00

arginine 및 histidine 등의 소수성 아미노산 함량은 약 33.6%였다. 일반적으로 단백질의 미생물 효소적 가수분해과정에서 발생되는 쓴맛은 소수성 아미노산의 함량과 관계가 있는데(27), 제조된 오징어 식해의 소수성 아미노산의 함량은 전체 아미노산의 33.6%로 쓴맛을 내는데 큰 영향을 미치지 않았다. 따라서 본 연구 결과에 따라 제조한 오징어 식해는 단맛과 감칠맛을 내는 아미노산이 쓴맛을 내는 아미노산보다 많아 맛에서 매우 우수하다고 판단된다.

관능검사

발효 최적 조건에서 제조한 식해의 관능검사를 실시한 결과는 Table 5와 같다. 염농도 5% 오징어 식해의 산업적 이용 가능성을 검토하기 위하여 시중에서 판매되는 식염 7-8% 오징어 식해, 7-8% 가자미식해 및 5% 오징어 젓갈을 대조군으로 하고 맛, 향, 색 및 전체적인 기호도를 비교하였다. 관능검사 결과 맛, 색 및 향이 전체적으로 식염 7-8% 가자미식해가 가장 우수하였고, 7-8% 오징어식해가 그 뒤를 이었으며, 본 연구에서 제조한 5% 오징어 식해는 이보다 조금 떨어졌지만 5% 오징어 젓갈보다는 우수하였다. 전체적인 평가 면에서 본 연구에서 제조한 오징어 식해는 시판중인 다른 수산발효식품과 큰 차이가 없어 저식염 수산발효식품의 보급 및 정착에 기여할 수 있을 것이라고 판단된다.

Table 5. Sensory evaluation of the fermented seafoods at different salt concentrations

Fermented seafoods (salt content, %)	Taste	Odor	Color	Overall
Squid <i>sikhae</i> (5)	3.48±0.08 ^b	3.50±0.05 ^a	3.37±0.03 ^b	3.58±0.03 ^b
Squid <i>sikhae</i> (7-8)	3.52±0.06 ^b	3.62±0.08 ^a	3.53±0.03 ^{ab}	3.77±0.06 ^a
Flatfish <i>sikhae</i> (7-8)	3.68±0.08 ^a	3.62±0.08 ^a	3.65±0.13 ^a	3.68±0.03 ^{ab}
Squid <i>jeotgal</i> (5)	3.37±0.08 ^a	3.45±0.05 ^a	3.47±0.15 ^{ab}	3.30±0.10 ^{ab}

^{ab}The mean with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

요 약

본 연구는 전통적인 발효식품인 식해에 대하여 염농도에 따른 발효기간별 품질특성, 발효 최적조건 및 유통기한 설정, 발효 최적조건에서의 생리활성을 측정하여 우리 전통식품인 식해를 저염화하고 생산 보급함과 동시에 이에 대한 과학적 자료를 제공하는 것을 목표로 하였으며 그 결과를 요약하면 다음과 같다. 본 연구에서 제조한 오징어 식해는 발효기간에 경과함에 따라 염농도가 낮고 온도가 높을수록 pH는 급격하게 감소하였으며, 아미노질소 및 휘발성 염기질소의 함량은 급격하게 증가하였다. 발효 최적조건은 5% 염농도의 식해를 -1°C에서 53일간 발효한 것이었고 유통기한은 염농도 5%의 식해를 -1°C에서 142일간 저장한 것이었다. 식해는 DPPH 저해활성이 확인되어 항산화 효과가 있으나, hydroxyl 및 hydrogen peroxide radical 소거능, 항당뇨, 항대장암 및 주름제거 활성은 낮아 기능성 소재로의 활용은 보충 연구가 필요하다고 판단된다. 유리아미노산의 조성은 정미 아미노산이 고미 아미노산보다 많아 맛에서 우수하였으며, 시판중인 다른 수산발효식품과 관능적으로 큰 차이가 없었다. 이상의 결과를 고려할 때 -1°C의 저온에서 식염 5%로 식해를 저염화시킨다면 현대인의 식기호에 적합한 식품으로 영양학적 측면이나 시장성 측면에서 큰 효과를 낼 수 있을 것이라 판단된다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지방기술혁신사업(RTI05-01-02)지원으로 수행되었음. 조원일은 교육과학기술부 2단계 BK21핵심사업의 수혜학생임을 밝히며 사의를 표합니다.

문 헌

- Hwang SH, Youn KS. Stability and quality characteristics of squid liver oil during refining process. Food Eng. Prog. 12: 284-288 (2008)
- Cha YJ, Kim SJ, Jeong EJ, Kim H, Cho WJ, Yoo MY. Studies on taste compounds in alaska pollack *sikhae* during fermentation. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33: 1515-1521 (2004)
- Choi C, Lee HD, Choi HJ. A study on quality characteristics and establishment of fermentation process for traditional Kyungsando squid *sikhae*. Korean J. Dietary Culture 16: 118-127 (2001)
- Choi C, Lee HD, Choi HJ, Son JH, Kim S, Son GM, Cha WS. Functional and volatile flavor compounds in traditional Kyungsando squid *sikhae*. Korean J. Food Technol. 33: 345-352 (2001)
- Lee NH, Oh SW, Kim YM. Biochemical changes in muscle protein of squid *sikhae* during fermentation effects of temperature and moisture content. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 292-297 (1996)
- Jung HS, Lee SH, Woo KL. Effect of salting levels on the changes of taste constituents of domestic fermented flounder

- sikhae* of Hamgyeong-do. Korean J. Food Sci. Technol. 24: 59-64 (1992)
7. Lee CH, Cho TS, Lim MH, Kang JW, Yang HC. Studies on the *sikhae* fermentation made by flatfish. Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng. 11: 53-58 (1983)
 8. Kim SM, Jeong IH, Cho YJ. The development of squid *sikhae* in Kangnung district: 1. The effects of fermentation temperatures and periods on the properties of squid *sikhae*. Bull. Korean Fish. Soc. 27: 215-222 (1994)
 9. Kim SM, CHO YJ, Lee KT. The development of squid *sikhae* in Kangnung district: 2. The effects of fermentation temperatures and periods on chemical and microbial changes, and the partial purification of protease. Bull. Korean Fish. Soc. 27: 223-231 (1994)
 10. Kim SM, Back OD, Lee KT. The development of squid (*Todarodes pacificus*) *sikhae* in the Kangnung district: 3. The effects of garlic concentrations on the properties of *sikhae*. Bull. Korean Fish. Soc. 27: 357-365 (1994)
 11. Kim SM, Back OD, Lee KT. The development of squid (*Todarodes pacificus*) *sikhae* in the Kangnung district: 4. The effects of red pepper and grain contents on the properties of squid *sikhae*. Bull. Korean Fish. Soc. 27: 366-372 (1994)
 12. AOAC. Official Methods of Analysis 11th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA. p. 17 (2002)
 13. Nissen JA. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. J. Agr. Food Chem. 27: 1256-1262 (1979)
 14. Chae SK. Standard food analysis. Jiju Publishing Co., Seoul, Korea. pp. 637-640 (1998)
 15. Kim YS. Analysis of plastics pyrolysis in a thermogravimetric analyzer by an arrhenius-type rate equation including the effect of transfer lag. J. Korean Inst. Chem. Eng. 29: 503-511 (1991)
 16. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 181: 1199-1200 (1958)
 17. Jeon YJ, Byun HG, Kim SK. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. Process Biochem. 35: 471-478 (2000)
 18. Chung SK, Osawa T, Kawakishi S. Hydroxyl radical scavenging effect of spices and scavengers from brown mustard. Biosci. Biotech. Biochem. 61: 118-122 (1997)
 19. Kim KY, Nam KA, Kurihara H, Kim SM. Potent α -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*. Phytochemistry 69: 2820-2825 (2008)
 20. Kim KY, Choi KS, Kurihara H, Kim SM. β -Glucuronidase inhibitory activity of bromophenols purified from *Grateloupia elliptica*. Food Sci. Biotechnol. 17: 1110-1114 (2008)
 21. Hyun SH, Jung SK, Jwa MK, Song CK, Kim JH, Lim SB. Screening of antioxidants and cosmeceuticals from natural plant resources in Jeju Island. Korean J. Food Sci. Technol. 39: 200-208 (2007)
 22. Shinha R, Radha C, Prakash J, Kaul P. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional qualities, nutritional quality, and utilization in beverage formulation. Food Chem. 101: 1484-1491 (2007)
 23. Kim WJ, Kim SM. The chemical and microbial characteristics of northern sand lance, *ammodytes personatus*, sauce manufactured with fermentation acceleration agents. Korean J. Food Sci. Technol. 35: 447-454 (2003)
 24. Lee WJ, Jung JK. Quality characteristics and preparation of noodles from brown rice flour and colored rice flour. Korean J. Culinary Res. 8: 267-278 (2002)
 25. Park SM, Park CK, Lee KT, Kim SM. Changes in taste compound of low salt fermented pollack tripe during controlled freezing point aging. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 49-53 (1998)
 26. Park JH, Kim SM. Property changes of the salt-seasoned and fermented the broken roes of Alaska pollock stuffed into cellulose casing. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 220-224 (2002)
 27. Choi SH, Kim SM. Quality properties of fermented squid viscera product with *Aspergillus oryzae koji* and its seasoning. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 40: 94-101 (2011)
 28. Oh SC, Cho JS, Nam HY. Changes of the volatile basic nitrogen and free amino acids according to the fermentation of low salt fermented squid. Korean J. Soc. Food Sci. 16: 173-181 (2000)
 29. Yu MH, Im HG, Lee HJ, Ji YJ, Lee IS. Components and their antioxidative activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* rehder. Korean J. Food Sci. Technol. 38: 128-134 (2006)
 30. Choi U, Shin, DH, Chang YS, Shin JI. Screening of natural antioxidant from plant and their antioxidative effect. Korean J. Food Sci. Technol. 24: 142-148 (1992)
 31. Cheigh HS, Hwang JH. Antioxidative characteristics of kimchi. Food Indus. Nutr. 5: 52-56 (2000)
 32. Halliwell, B, Gutteridge, JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. Arch. Biophys. 246: 501-514 (1986)
 33. Park JH, Baek MR, Lee BH, Yon GH, Ryu SY, Kim YS, Park SU, Hong KS. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activity of compounds from roots extract of *Pueraria thunbergiana*. Korean J. Medicinal Crop. Sci. 17: 357-362 (2009)
 34. Kim YS, Yin Y, Shim TH, Sa JH, Wang MH. Studies for component analysis and biological evaluation in *Picrasma quassioides* (D. Don) Benn. extracts. Korean J. Pharmacogn. 37: 37-41 (2006)
 35. Cho YJ, Ju IS, Kim BC, Lee WS, Kim MJ, Lee BG, An BJ, Kim JH, Kwon OJ. Biological activity of *omija* (*schizandra chinensis* baillon) extracts. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 50: 198-203 (2007)
 36. Tsuji N, Moriwaki S, Suzuki Y, Takema Y, Imokawa G. The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: Implication through selective inhibition of elastase activity. Photochem. Photobiol. 74: 283-290 (2001)
 37. Ahn JY, Bae JH. Evaluation of biological activities on the extractives of pinaceae. J. Soc. Cosmet. 31: 121-125 (2005)