KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.
Vol. 28, No. 2, pp. 292~297 (1996)

오징어 식해 숙성중 단백질 화학적 변화 -온도 및 수분함량의 영향-

이남혁 · 오세욱 · 김영명
한국식품개발연구원

Biochemical Changes in Muscle Protein of Squid *Sikhae* during Fermentation -Effects of Temperature and Moisture Content-

Nam-Hyouck Lee, Se-Wook Oh and Young-Myoung Kim
Korea Food Research Institute

Abstract

In this study, biochemical changes of muscle protein in squid *sikhae* prepared at various temperatures and moisture content were investigated. The pH values in squid *sikhae* decreased rapidly with increase in titratable acidity during fermentation at high temperature and moisture content. Growth rate of lactic acid bacteria increased rapidly during fermentation at high temperature and moisture content. Changes in muscle protein subunit were analyzed by SDS-PAGE; myosin heavy chain component disappeared completely during preparation of squid *sikhae* and actin component decreased slowly during fermentation. Therefore, it was suggested that myosin heavy chain component in squid muscle protein was autolyzed at the incipient fermentation time and actin component was degraded by acidic protease in muscle and protease produced from microorganisms during fermentation.

Key words: squid muscle, *sikhae*, myosin heavy chain, actin, fermentation

서 론

우리나라의 전통수산식품중의 하나인 식해류는 어패류에 식염과 곡류를 첨가하여 발효시킨 식품이다[1-3]. 첨가되는 곡류를 이용하여 젖산균이 성장하며 그 결과 생성되는 산에 의해 pH가 급격히 저하되어 부패균의 성장을 억제하며 근육조직은 근육내의 자가소화효소 및 미생물 유래의 단백질 분해효소에 의해 분해되어 식해의 독특한 풍미와 조직감을 가지게 된다고 알려져 왔다. 식해에 관한 연구는 이 등[4]의 가자미 식해에 관한 연구, 무사 등[5]의 가자미 식해의 미생물에 관한 연구, 정 등[6]의 함경도 지방 전통 가자미 식해의 맛성분에 관한 연구, 김 등[7,8]의 강릉지방의 오징어 식해 개발에 관한 연구 등이 있으나 대부분 숙성과정중 미생물적인 연구와 이화학적인 측면에 관한 연구가 수행되었으며 식해의 숙성발효중 단백질 화학적 측면에서는 거의 연구가 이루어지지 않고 있는 실정이다.

Corresponding author: Nam-Hyouck Lee, Korea Food Research Instute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-ku, Song-nam-si, Kyonggi-do 463-420, Korea

따라서 본 연구에서는 오징어를 주원료로한 식해의 숙성 과정중 수분함량 및 숙성온도에 따른 오징어 근육 단백질의 분해 양상을 검토하였다.

재료 및 방법

재료

시료의 처리 1993년 동해안에서 어획되어 3개월간 냉동(-25°C)보관된 신선한 오징어(*Todarodes pacificus*)를 원료로 사용하였다. 냉동 오징어를 해동시킨 후, 내장, 다리 및 귀 부분을 제거하고 몸통육만을 식해 제조에 사용하였다. 몸통으로 부터 상피를 제거한 후 10°C에서 냉풍건조하여 수분함량이 80, 70, 60%가 되도록 조정하였으며 폭 0.5 cm, 길이 3 cm의 크기로 세절하여 오징어 식해 제조에 사용하였다.

오징어 식해의 제조: 육중량에 대하여 식염을 5% 첨가한 후 약 12시간 동안 염지를 행하였다. 염지후 육중량당 고춧가루 5%, 생강 3%, 마늘 5%, 물엿 5%, 메조밥 20%를 첨가하여 혼합한 후 용기에 넣어 밀봉하여 10°C 및 20°C에서 숙성 시키면서 실험에 사용하였다.

방법

pH 측정: 시료 10 g에 10배량의 증류수를 넣고 저온에서 분쇄한 후 pH meter(Orion 100)로 측정하였다.

산도 측정: pH의 측정법과 같은 방법으로 시료를 분쇄한 후 여과하여 여과액 10 m*l*를 취하였다. 발효중 생성된 산은 0.1 N NaOH로 적정하여 lactic acid 함량%로 산출하였으며 lactic acid 함량%의 산출식은 다음과 같다.

$$\text{lactic acid}(\%)=\frac{\text{m}l \text{ of } 0.1\text{N NaOH}\times 0.009}{\text{weight of sample}}\times 100$$

젖산균수의 측정: 젖산균은 숙성기간별로 시료를 무균적으로 파쇄하여 멸균 1% pepton water로 10^4-10^9/m*l*범위가 되게 희석하고 0.01% bromocresol purple을 함유하는 MRS agar plate에 도말하여 37°C에서 48시간 배양한 후 나타나는 colony를 counter로 계측하였으며 3회 평균치를 나타내었다.

SDS-PAGE에 의한 숙성중 근육단백질의 subunit 조성의 분석[9]: 분쇄한 오징어 근육 0.4 g을 정확히 측량하여 7.5 m*l*의 8 M urea-2% mercaptoethanol-2% SDS-20 mM Tris-HCl (pH8.0)의 용액을 첨가하여 100°C에서 2분간 가열한 후 실온에서 20시간 교반시키면서 가용화시켰다. 가용화시킨 용액은 Biuret법[10]에 의하여 단백질을 정량하였으며 전기영동에 공시할 때에는 각각 일정양인 20 μ*l*를 취하여 행하였다. 전기영동은 Laemmli법[11]에 의한 10% polyacrylamide gel을 이용하여 행하고 Coomassie brilliant blue R로 염색하였으며 탈색은 50% methanol-7% acetic acid로 30분간 탈색후 7% acetic acid로 gel의 배경이 투명화될 때까지 탈색을 행하였다.

결과 및 고찰

수분함량 및 숙성온도에 따른 오징어 식해의 pH 변화

수분함량 및 숙성온도에 따른 오징어 식해의 pH 변화를 Fig. 1(a) 및 (b)에 제시하였다. Fig. 1(a)는 일정한 수분함량으로 조정된 오징어육을 사용하여 식해를 제조하여 10°C에서 숙성시켰을 때의 결과로서 숙성시간이 경과함에 따라 pH가 저하하는 경향을 나타내었으며 수분함량이 높을수록 pH의 저하가 급격히 이루어지는 경향을 나타내었다. 한편, Fig 1.(b)는 20°C에서 숙성시켰을 때의 결과로서 전체적으로 10°C에서 발효시켰을 때의 결과보다 빠른 pH 저하를 나타내었으며, 수분함량이 높을수록 pH의 저하가 빨리 이루어지는 경향은 Fig. 1(a)와 같은 결과였다.

수분함량 및 온도를 달리하여 오징어 식해를 숙성시키면 pH의 변화는 Fig. 1(a) 및 (b)에 결과를 제시한 것과 같이 수분함량 및 숙성온도에 따라 pH의 변화가 크게 영향을 받는 것으로 나타났다. 또한 이와같은 변화는 pH의 절대값으로 나타내었을 때 1차 반응식에 의해 초기에 빠르며 후기에 느린 2단계의 직선관계가 성립되었다. 따라서 초기의 1단계의 pH의 변화로부터 pH의 저하속도(KpH)를 산출할 수 있었으며 그 결과를 Fig. 2에 제시하였다. 이 결과에 의하면 수분함량 및 숙성온도에 따라 pH의 변화가 급격히 일어남을 알 수 있었다. 즉 10°C에서 숙성시켰을 때의 pH 저하속도를 살펴보면 수분함량이 80%일 때 저하속도가 수분함량 60%일 때보다 약 2배 정도로 pH 저하속도가

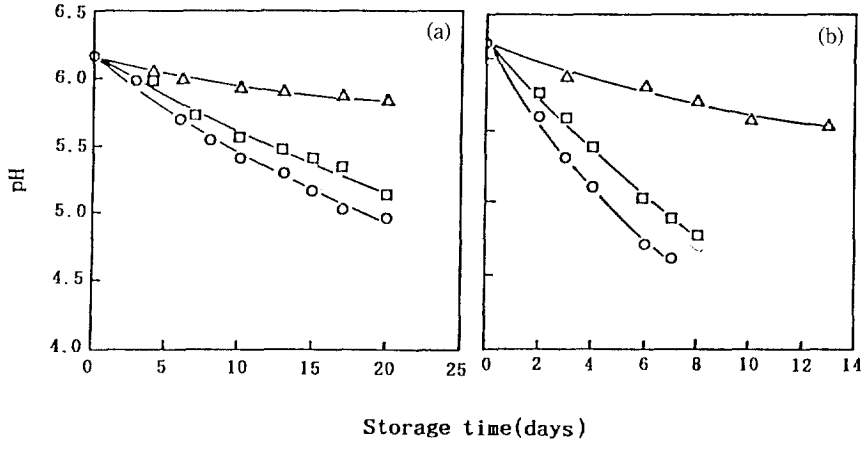

Fig. 1. Changes in pH of squid *sikhae* fermented at various moisture content (a) Squid *sikhae* fermented at 10°C; (b) Squid *sikhae* fermented at 20°C; The moisture content for the squid *sikhae* were 80 (○—○), 70 (□—□), and 60 (△—△)%

빠름을 나타내었으며 20°C에서 숙성시켰을 때의 경우는 그 속도가 약 4배 빠른 것으로 나타났다. 또한 같은 수분함량일 경우 숙성온도에 따라 수분함량 60%에서는 약 2배, 70%에서는 약 4배, 80%에서는 약 4.5배 정도로 온도가 높을수록 빠르게 pH가 저하됨을 알 수 있었다.

수분함량 및 숙성온도에 따른 산도의 변화

일반적으로 식해의 경우 젖산균이 성장함에 따라 산을 생성하여 식해의 pH를 저하시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 숙성 과정중 pH의 저하는 상대적으로 산도의 증가를 의미하게 된다. Fig. 3(a) 및 (b)는 수분함량 및 숙성온도에 따른 산도의 변화를 나타 내었다. (a)는 10°C에서 숙성시켰을 때의 산도의 변화로서 수분함량이 높을수록 산도가 급격히 증가함을 나타내었다. 한편 (b)는 20°C에서 숙성시켰을 때의 산도의 변화를 측정한 결과로서 (a)와 같은 경향을 나타내었다. 또한 10°C와 20°C에서 산도 변화를 비교하면 온도가 높을수록 산도가 빠르게 증가함을 알 수 있었으며 이와같은 경향은 앞서 제시한 pH 변화(Fig.1)와 상반되는 형태를 나타내었다.

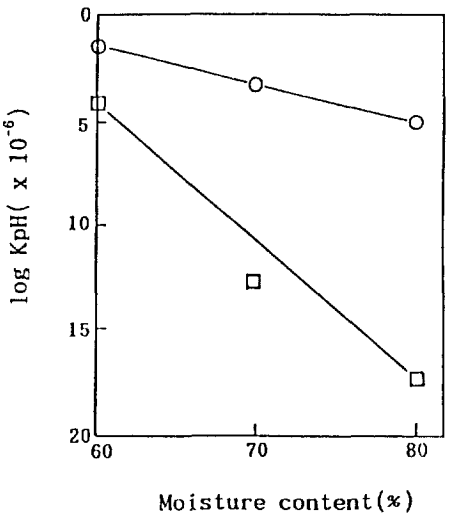

Fig. 2. Storage temperature and moisture content dependency of rate constant for decreasing of pH of squid *sikhae* during fermentation The first order rate constant (KpH) for decreasing of pH of fermented squid *sikhae* were estimated as described in Fig. 1; The storage temperatures for the squid *sikhae* were 10 (○—○) and 20 (□—□) °C

수분함량 및 숙성온도에 따른 젖산균수의 변화

식해의 수분함량 및 숙성온도에 따른 젖산균수의 변화를 Fig. 4(a) 및 (b)에 나타내었다. 먼저 Fig. 4(a)는 10°C에서 숙성시켰을 때의 결과로서 수분함량이 80%의 경우 약 8일째에 최대치의 젖산균수에 달하였으며 수분함량 70%는 약 10일, 60%에서는 20일이 지나도록 계속 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 수분함량별로 젖산균수의 최대치를 살펴보면 각각 약 10^8/m*l*, 10^7/m*l*, 10^6/m*l*으로 수분함량이 높을수록 최대치가 높았으며 수분함량과 숙성과정과는 밀접한 관계가 있는 것으로 생각되었다. 한편, Fig. 4(b)에 제시한 20℃에서 숙성시켰을 때의 젖산균수의 변화를 살펴보면 Fig. 4(a)의 결과와 유사한 경향을 나타내었으나 젖산균의 성장속도에 있어서 상당히 빨리 진행되는 것으로 나타났다. 즉 80%의 수분함량에 있어서는 약 3일째, 70%에서는 4일째에 최대치의 젖산균수를 나타냈으며, 60%에서는 13일이 경과한 후에도 계속 증가하는

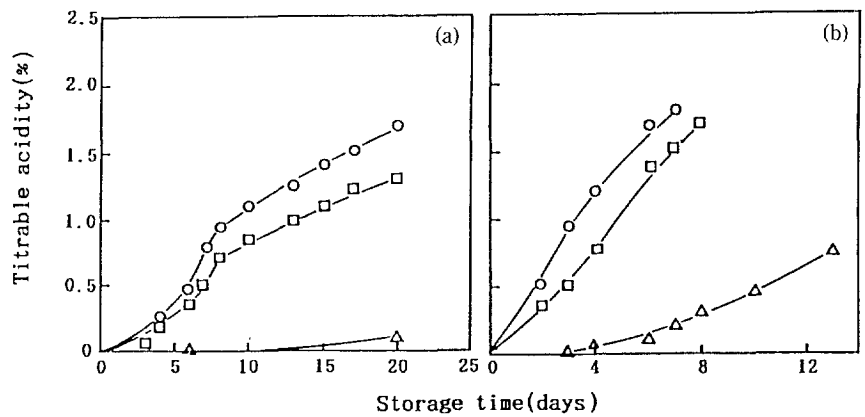

Fig. 3. Changes in titratable acidity of squid *sikhae* fermented at various moisture content Conditions and symbols are the same as in Fig. 1

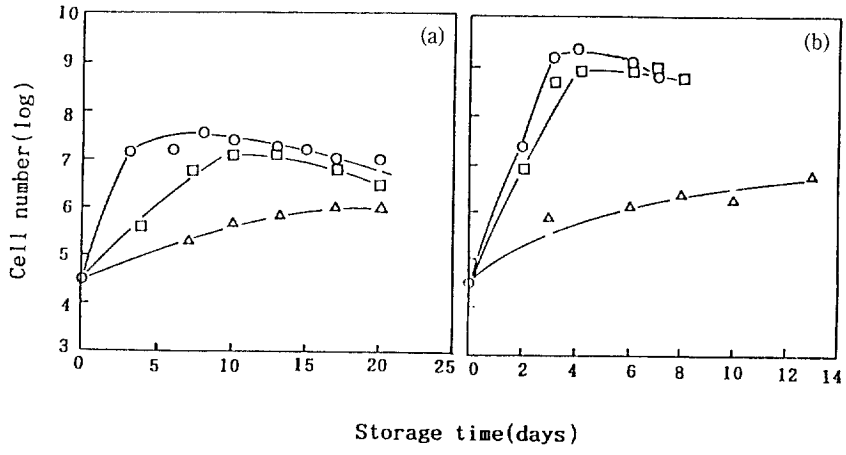

Fig. 4. Changes in viable cell count of squid *sikhae* fermented at various moisture content on MRS agar Conditions and symbols are the same as in Fig. 1

경향이었다. 이와같은 결과는 10°C에서 숙성하였을 때보다 20°C에서의 숙성이 약 2.5배 빠르게 진행되는 경향을 나타내었으며 이는 앞서 제시한 산도의 변화와 같은 경향을 나타내었다. 또한 젖산균수의 최대치는 각각 10^9/m*l*, 10^8/m*l*, 10^6/m*l*으로 수분함량이 높을수록 최대치가 높았으며 이는 10°C에서 숙성시켰을 때보다 다소 높은 젖산균수를 나타내었다.

수분함량 및 숙성온도에 따른 근원섬유 단백질의 subunit 조성의 변화

식해류의 기호성에 있어서 중요한 것 중의 하나로 조직감을 들 수 있다. 식해류의 조직감은 숙성과정에 따라 변화하게 되는데 이것은 자체내 단백질 분해효소 또는 숙성과정중 관여하는 미생물로부터 기인하는 단백질 분해효소에 의한 근조직의 분해로 생각된다. 또한 숙성과정중 이와같이 단백질이 분해됨으로써 유리 아미노산의 함량이 높아지므로 고유의 풍미를 느낄 수 있는 것도 중요한 사실이다.

Fig. 5(a), (b) 및 (c)에는 수분함량을 각각 80, 70, 60%로 조정한 후 식해를 제조하여 10°C에서 숙성시킨 처리구의 SDS-PAGE에 의한 근원섬유 단백질 subunit 조성 변화를 나타내었다. 우선 수분함량 80% (a)에서 숙성시킨 결과를 살펴 보면 처리전 오징어 근육(SM)에서는 myosin heavy chain (MHC), actin (A), tropomyosin (TM) 및 myosin light chains (LCs)에 상당하는 분자량을 갖는 전형적인 근섬유 단백질의 pattern을 나타내고 있다. 그러나 숙성 0일에서 이미 근조직의 주요 단백질인 MHC는 완전히 소실된 것으로 나타났다. 그후 또 하나의 근조직의 주요 단백질인 A가 숙성과정을 통하여 감소하기 시작하였으며 숙성 10일경에는 완전히 소실되는 경향을 나타내었다. 또한 이외에도 tropomyosin을 비롯한 150 K, 100 K에 상당하는 성분들이 숙성기간의 경과와 함께 감소하는 경향을 나타내었으며 이에 따른 뚜렷한 새로운 band의 생성은 관찰되지 않았다.

한편 (b)에 제시한 수분함량을 70%로 조정하여 제조한 오징어 식해의 근단백질의 subunit 조성은 숙성전에 MHC가 완전히 소실되는 것은 (a)의 결과와 같았으며, A에 상당하는 성분이 숙성기간의 경과와 함께 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 (a)에서의 결과와 약간 다른점은 숙성일수가 20일이 지나도록 A에 상당하는 성분의 완전한 소실은 관찰되지 않았으며 수분함량이 단백질의 분해속도에 크게 영향을 미치는 것으로 생각되었다. 그외 다른성분의 변화에 있어서는 (a)의 결과와 매우 유사한 경향을 나타내었다.

(c)에 제시한 수분함량 60%로 조정하여 제조한 오징어 식해 근원섬유 단백질의 subunit 조성 변화를 살펴보면 전체적으로 (a) 및 (b)의 결과와 유사한 양상의 pattern을 보여 주었으나, 단지 A에 상당하는 성분에 있어서는 숙성 20일이 지나도록 거의 그 변화가 인정되지 않았다.

Funatsu 등[12]은 잉어 근원섬유 단백질의 산변성에 관한 연구에서 고염농도 및 산성조건하에서 α-chymotrypsin 처리를 하였을 때 A 성분이 불안정해지며, 산처리에 따라서 서서히 A가 소화되는 것을 보고하고 있다. 또한 김 등[8]은 오징어 식해의 숙성과정중 proteolytic bacteria에 관한 연구에서 숙성온도가 높을수

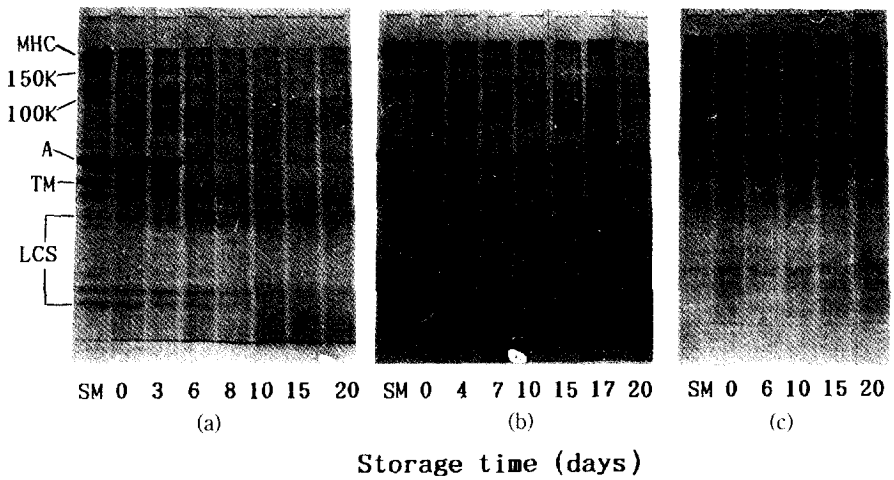

Fig. 5. SDS-PAGE patterns of solubilized protein from squid *sikhae* fermented at 10°C (a) Moisture content 80%, (b) Moisture content 70%, (c) Moisture content 60%, [SM]Squid mantle muscle; The muscle part (each 0.4 g) of squid *sikhae* **were solubilized with 2% SDS -8M urea-2% mercaptoethanol -20 mM Tris buffer (pH 8.0) by heating at 100°C for 2 min, followed by stirring at room tmperature for 24 hours; The identical aliquots (each 20 ug protein) of the solubilized protein were applied to SDS-PAGE using 10% polyacrylamide gel; The position of myosin heavy chain, 150 Kdalton, 100 Kdalton, actin, tropomysoin and myosin light chains are indicated as MHC, 150 K, 100 K, A, TM and**

록 그 수에 있어서 증가량 및 속도가 빠른 것을 보고한 바 있다.

따라서 이상과 같은 결과들을 토대로 고찰하면 오징어 식해의 숙성과정중 일어나는 오징어육 단백질의 분해는 자체내 단백질 분해효소 및 숙성과정중에 생성되는 미생물 유래의 단백질 분해효소에 기인한 것으로 생각되었다. 즉 숙성전에 이미 MHC의 완전한 소실은 제조공정중 자체내 단백질 분해효소에 의해 근섬유 단백질의 주요 성분인 MHC가 우선적으로 분해된 것으로 생각되었으며, 그 후의 단백질 분해는 숙성관여 미생물로부터의 단백질 분해효소와 오징어육 자체내의 산성 protease가 관여하여 분해가 일어났을 가능성이 시사되었다.

한편 수분함량에 따른 오징어육 단백질의 분해정도는 수분함량이 높을수록 빨리 일어나는 것으로 나타났는데 이는 수분함량이 높을수록 산을 생성하는 미생물의 성장이 빨랐으며 이에 따른 오징어육 자체내의 산성 protease 및 미생물 유래의 protease가 관여했을 가능성이 시사되었다.

Fig. 6(a), (b) 및 (c)에는 Fig. 5와 같이 제조한 식해를 20°C에서 숙성시켰을 때의 오징어육의 근단백질 subunit 조성 변화를 SDS-PAGE로 분석한 결과이다. 제조 공정중에 MHC의 완전한 소실 및 그 후의 숙성과정중 A의 소실 등 전체적으로 Fig. 5와 같은 경향의 pattern을 나타내었으나 10°C에서의 분해과정보다 상당히 빠른 속도로 단백질의 분해가 일어났다. 즉, 같은 80%의 수분함량에서 비교해 보면 10°C에서 숙성시켰을 때는 약 8일째에 A에 상당하는 성분이 거의 소실되었으나 20°C에서는 약 4일째에 거의 소실되는 경향을 나타내었다. 또한 수분함량 70%에서는 10°C의 경우 약 20일째, 20°C에서는 약 8일째에 거의 같은 비율의 A에 상당하는 성분이 잔존하는 경향을 보여 주었으며 이와 같은 경향은 20°C에서 약 2배 정도 빠르게 단백질의 분해가 일어남을 알 수 있었다.

한편, 수분함량 60%에서의 근단백질의 subunit 조성 변화는 Fig.5(c) 및 Fig.6(c)에 제시한 것과 같이 A에 상당하는 성분의 변화가 거의 인정되지 않았는데, 이때의 젖산균의 총균수를 살펴보면 그 최대치가 10^6/ml 정도로 그 성장이 매우 느렸으며, 따라서 산을 생성하는 미생물의 성장 및 proteolytic bacteria의 성장속도가 매우 느렸기 때문일 것이라고 생각되었다.

이상의 결과를 종합해 보면 오징어 식해의 숙성은 온도 및 수분함량에 매우 민감한 반응을 나타내었다. 즉, 숙성온도와 수분함량이 높을수록 빠른 pH의 저하, 산도의 증가, 젖산균의 성장 등을 나타내었으며 단백질의 분해도 빨리 진행됨을 알 수 있었다. 단백질 분해 pattern의 결과로부터 제조공정중에 근원섬유 단백질의 주요 단백질인 MHC가 거의 소실되는 경향이었으며 이와같은 결과는 적어도 오징어 식해의 초기 숙성과정까지는 자가분해 효소의 관여가 매우 밀접한

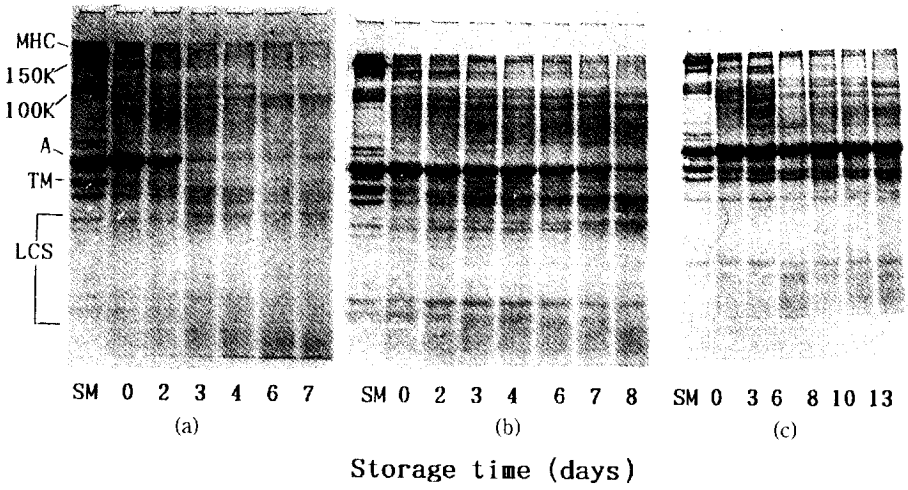

Fig. 6. SDS-PAGE patterns of solubilized protein from squid *sikhae* fermented at 20°C Conditions and marks are the same as in Fig. 5

것으로 나타났다. 또한 수분함량 및 숙성온도가 높을수록 숙성기간의 경과와 함께 단백질의 분해가 빠르게 진행되어 A에 상당하는 성분까지도 완전히 소실되는 경향이었으며, 이때는 젖산균의 성장과 함께 자체내 산성 protease 및 미생물 유래의 protease가 관여하는 복합적인 작용에 의한 것으로 생각되었다.

요 약

본 연구에서는 오징어를 주원료로 하여 제조한 식해의 숙성과정중 수분함량 및 숙성온도에 따른 단백질 화학적 변화를 검토하였다. 숙성과정중 pH의 변화는 수분함량 및 숙성온도가 높을수록 빠르게 저하되었으며 이에 따른 산도의 변화도 빠르게 증가되었다. 또한 젖산균의 생성속도에 있어서도 수분함량 및 숙성온도가 높을수록 빨랐다. 한편 숙성과정중의 오징어 근단백질의 subunit 조성의 변화는 식해의 제조과정중 MHC에 상당하는 성분은 완전히 소실되었으며, 그 후 숙성기간이 경과함에 따라 A에 상당하는 성분도 서서히 소실되었다. 이와같은 결과는 적어도 숙성초기까지는 오징어육의 자가분해효소에 의한 것으로 사료되며, 그후의 단백질의 분해과정은 숙성 진행과 함께 숙성 관여 미생물 성장에 의해 생성되는 protease 및 오징어육 자체내 산성 protease에 의한 것으로 생각되었다.

문 헌

1. 이미영, 이효지 : 문헌에 기록된 식해의 분석적 고찰. 한국식생활학회지, **4**, 39 (1989).
2. 이철호 : 수산발효기술. 한국산업미생물학회지, **17**, 645 (1989)
3. 김영명, 김동수 : 한국의 젓갈. 창조사, 서울, p.400 (1990)
4. 이철호, 조태숙, 임무현, 강주희, 양한철 : 가자미 식해에 관한 연구. 한국산업미생물학회지, **11**, 53 (1983)
5. 무사 수안네, 김영배, 이철호 : 가자미식해 발효에 관여하는 미생물에 관한 연구. 한국산업미생물학회지, **15**, 150 (1987)
6. 정해숙, 이수학, 우강윤 : 함경도 지방의 전통 가자미식해의 소금 첨가 수준에 따른 숙성중 맛성분의 변화에 관한 연구. 한국식품과학회지, **24**, 59 (1992)
7. 김상무, 정인학, 조영제 : 강릉지방의 오징어 식해 개발에 관한 연구. 1. 숙성온도 및 기간에 따른 성분변화. 한국수산학회지, **27**, 215 (1994)
8. 김상무, 조영제, 이근태 : 강릉지방의 오징어 식해 개발에 관한 연구. 2. 숙성온도 및 기간에 따른 화학적 변화, 미생물 변화 및 단백질 분해 효소의 정제. 한국수산학회지, **27**, 223 (1994)
9. Lee, N. H., Seki, N., Kato, N., Nakagawa, N., Terui, S. and Arai, K.: Gel forming ability and cross-linking ability of myosin heavy chain in salted meat paste from treadfin bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 329 (1990)
10. Gornall, A. G., Bradawill, C. J. and David, M. M.: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, **177**, 751 (1949)
11. Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 751 (1970)
12. Funatsu, Y. and Arai, K.: Acid-induced denaturation of carp myofibrillar protein. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 2061 (1990)

(1995년 11월 24일 접수)