(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0057914
(43) 공개일자 2023년05월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 17/00 (2016.01) *A23L 17/50* (2016.01)
A23L 3/3571 (2017.01) *A23L 3/358* (2006.01)
A23L 33/135 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23L 17/65 (2016.08)
A23L 17/50 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2022-0009288
(22) 출원일자 2022년01월21일
심사청구일자 2022년01월21일
(30) 우선권주장
1020210142078 2021년10월22일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김진수
경상남도 통영시 광도면 죽림2로 31, 303동 604호(통영죽림3차 대우푸르지오)
허민수
경상남도 진주시 진주대로 1317, 104동 1704호(이현동, 이현하이클래스웰가아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

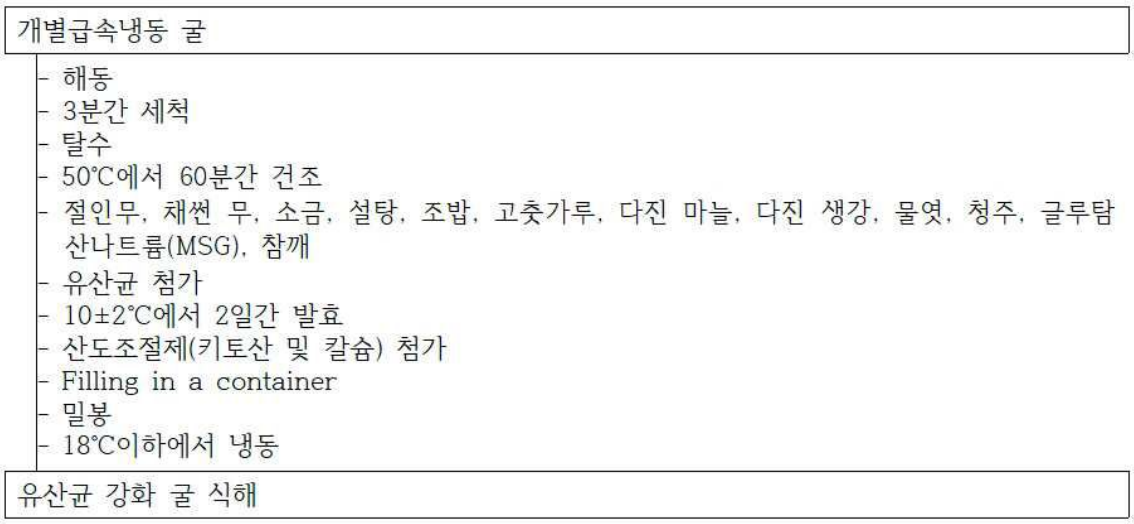
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **유산균 강화 굴 식해의 제조방법 및 소비기한 연장기술**

(57) 요 약

본 발명은 유통기한이 연장된 유산균 강화 굴 식해의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 제조방법은 pH, 총산도, 아미노산질소, 유산균수 변화 및 종합적 기호도를 고려하여 유산균 강화 굴 식해의 제조 시에 최적 발효 기간을 확립한 것으로, 최적화 공정에 의하여 제조된 유산균 강화 굴 식해는 소비자 기호도, 영양적 및 건강기능 특성이 우수하다. 또한, 본 발명은 유산균 발효 공정 이후 pH 완충능을 가진 산도조절제를 첨가하여 유산균의 과다 생육을 억제하여 소비기한을 연장하는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23L 3/3544 (2013.01)
A23L 3/3571 (2013.01)
A23L 3/358 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/06 (2013.01)
A23V 2200/10 (2013.01)
A23Y 2260/21 (2013.01)

(72) 발명자
이정석
경상남도 통영시 광도면 죽림3로 13, 107동 1002호(주영더팰리스)
최유리
경상남도 김해시 금관대로1325번길 17-7 (내동, 2층)
강상인
경상남도 함양군 병곡면 망월길 50-10
박선영
경상남도 통영시 한실1길 5 (인평동) 블루오션 301
윤인성
경상남도 통영시 국치2길 54, 201호(인평동)
손숙경
경상남도 통영시 한실1길 5, 203호(인평동)
이석민
경상남도 통영시 한실1길 5(인평동) 블루오션 201호
오선화
경상남도 사천시 갈대샘길 32-7(선구동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525010922
과제번호	201602752
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	수산식품산업기술개발사업
연구과제명	해역별 특성을 고려한 전통수산가공식품 개발 및 상품화
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경상국립대학교 산학협력단
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

굴을 건조하는 1단계;

상기 1단계의 굴에 절인 무, 채썬 무, 소금, 설탕, 조밥, 고춧가루, 마늘, 생강, 물엿, 청주, 글루탐산나트륨 및 참깨를 포함하는 식해 부원료를 첨가하여 믹스를 제조하는 2단계; 및

상기 2단계의 믹스에 유산균을 첨가하여 발효 시키는 3단계;

를 포함하는 유산균 강화 굴 식해 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 식해 부원료는 굴 100 중량부 기준, 절인 무 20 내지 26 중량부, 채썬 무 10 내지 16 중량부, 소금 1 내지 3 중량부, 설탕 2 내지 5 중량부, 조밥 5 내지 8중량부, 고춧가루 4 내지 7 중량부, 마늘 2 내지 5 중량부, 생강 0.5 내지 3 중량부, 물엿 0.5 내지 3 중량부, 청주 0.5 내지 3 중량부, 글루탐산나트륨 0.1 내지 1.5 중량부 및 참깨 0.1 내지 1.5 중량부 만큼 포함되는 것을 특징으로 하는, 유산균 강화 굴 식해 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 3단계의 유산균은 *Leuconostoc* 속 균주, Weissella 속 균주, *Pediococcus* 속 균주 및 *Lactobacillus* 속 균주로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 균주인 것을 특징으로 하는, 유산균 강화 굴 식해 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 *Leuconostoc* 속 균주는 *Leuconostoc citreum*인 것을 특징으로 하는, 유산균 강화 굴 식해 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 3단계의 발효는 5 내지 15℃에서 1 내지 3일 동안 수행되는 것을 특징으로 하는, 유산균 강화 굴 식해 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 방법은,

상기 3단계 발효 후 산도조절제를 첨가하는 4단계;를 더 포함하는 것인, 유산균 강화 굴 식해 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 산도조절제는 굴 100 중량부 기준, 3 내지 7 중량부 만큼 포함되는 것을 특징으로 하는, 유산균 강화 굴 식해 제조방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 산도조절제는 키토산 및 칼슘을 포함하는 것을 특징으로 하는, 유산균 강화 굴 식해 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 산도조절제는 0.5 내지 1%(w/w) 키토산 용액 및 1 내지 2%(w/w) 칼슘 용액을 혼합하여 제조되는 것을 특징으로 하는, 유산균 강화 굴 식해 제조방법.

청구항 10

제8항에 대하여,

상기 산도조절제는 키토산 및 칼슘이 1:2의 중량비로 포함되는 것을 특징으로 하는, 유산균 강화 굴 식해 제조방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 제조방법에 의해 제조된 유산균 강화 굴 식해.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 소비기한이 연장되고, 유산균이 강화된 굴 식해의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 굴은 유용한 다당류로 동물의 주요 에너지원인 글리코겐이 다량 함유되어 있고, 철, 구리, 아연 등과 같은 미네랄과 비타민 A, B1, B2, C, niacin 등이 풍부하며, EPA, DHA와 같은 오메가-3 지방산(omega-3 fatty acid)의 조성비가 높아 영양 및 건강 기능적으로 의미가 있는 수산물 중의 하나이다. 우리나라의 굴 생산량은 최근 10년간 306천 M/T에서 325천 M/T으로 점차 증가하여 2020년 기준 전체 패류 생산량의 65.1%를 차지하고 있고, 생산금액으로는 2,940억에 달하고 있어, 우리나라 주요 수산자원 중의 하나이다(Fishery Production Statistics, 2021). 그러나, 굴은 예로부터 산란기 이전인 11월부터 3월까지의 경우 맛이 있고, 조직감이 우수하여 상품성이 있어 대부분이 생굴과 같이 고가(高價)로 유통되고 있는데, 이들의 대부분이 탈각하여 알굴로 유통되고 있고, 이들의 아주 일부만이 개체냉동굴(individual quick frozen oyster, IQF oyster)로 이용되고 있다. 이로 인하여 굴의 생산이 주로 이 시기에 이루어지고 있고, 소비도 고가이면서 김장철이고, 맛이 우수한 산란기 이전에 주로 이루어졌다. 하지만, 최근 양식 기술의 발달로 생굴의 생산량은 많으나, 김장을 하는 가정의 감소 등으로 알굴의 소비가 감소하여 알굴을 활용한 소비자 니즈에 맞는 새로운 가공품의 개발이 절실하다. 한편, 발효식품은 맛과 조직감을 좋게 하며, 무엇보다도 프로바이오틱스 등을 통한 건강기능성을 증진시키는 효과를 갖는다. 발효의 주역할을 하는 발효 미생물은 주로 유산균, 고초균, 황국균 등이 있고, 이 중 유산균은 자연계에 널리 분포하며 여러 나라의 전통 발효식품 제조 및 가공품에 다양하게 사용되고 있으며, 항균물질을 형성하여 다른

균의 증식을 억제하는 기능이 있는 프로바이오틱스이다.

[0003] 우리나라에서 수산발효식품은 크게 젓갈, 액젓 및 식해로 분류할 수 있다. 이 중 식해(sik-hae)는 어패류의 근육이나 내장 또는 알에 소금과 다양한 곡류(쌀, 조, 고춧가루, 무, 마늘, 생강 등)를 넣고 발효시킨 제품으로, 발효 과정을 통하여 생성된 젖산균과 유기산에 의하여 부패를 억제하면서 유리아미노산 등에 의한 독특한 풍미를 가지게 한 우리 고유의 전통식품 이다. 이와 같은 식해는 우리나라에서 지방에 따라 제조방법에 있어 약간씩 차이가 있으나 일반적으로 세절 가자미, 도다리, 전어, 조기, 명태, 갈치, 쥐치, 도루묵, 멸치, 빨간 횟대, 우럭, 오징어, 고동, 백합, 멍게 등과 같은 수산물을 주로 사용하고 있고, 젖산균의 억제에 의한 최적 숙성기간 유지를 위하여 냉동 유통시키고 있다. 한편 식해에 관한 연구로는 명태, 오징어, 백합, 멸치 등과 같이 다양하게 시도된 바가 있으나, 굴을 활용한 연구는 찾아보기 어렵다.

[0004] 또한, 식해는 적정조건에서 발효되는 경우에 유기산 등의 영향으로 나는 상큼한 맛과 여러 가지 엑스성분 질소에 의한 감칠맛이 서로 어우러져 맛을 내는 것이 특징이지만, 적정 시기가 지나면 과도하게 생산된 젖산(lactic acid)을 주로 하는 산과 효모의 생육으로 인해 상품성이 저하되는 문제점이 있다. 따라서, 식해는 최적 발효 후 동결하여 두거나 모두 일시에 소비하여야 하는 불편함이 있다. 소비자가 식해의 구입 후 해동 및 섭취를 위한 소비기한 연장을 위한 시도는 키토산을 첨가하여 저장 기간을 연장하기 위한 연구들이 보고되고 있으나, 산도조절제 첨가에 의한 연구는 찾아보기 어렵다.

[0005] 이에 본 발명자들은 알굴을 이용하여 소비자 니즈에 맞는 고부가가치 제품을 개발하고자 소비기한이 연장되고, 유산균이 강화된 굴 식해 발효용 유산균의 분리, 동정하여 적절한 유산균을 선발하고자 하였으며, 선발한 유산균과 산도조절제를 활용한 유산균 강화 굴 식해의 발효 공정을 최적화함과 동시에 소비자가 개봉한 이후 소비기한 연장을 시도하고자 하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 소비기한이 연장되고, 유산균이 강화된 굴 식해의 제조방법을 제공하는 것으로, 구체적으로 유산균 강화 굴 식해 제조용 유산균을 발굴하고, 이를 활용한 유산균 강화 굴 식해의 제조 시에 최적 발효 기간을 확립하며, 최적화 공정에 의하여 제조된 유산균 강화 굴 식해의 구매 후 소비기한 연장을 위한 산도조절제를 선발하였으며, 이를 통해 소비자 기호도, 영양적 및 건강기능 특성이 우수하면서 소비기한이 연장 가능한 유산균 강화 굴 식해를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 굴을 건조하는 1단계; 상기 1단계의 굴에 절인 무, 채썬 무, 소금, 설탕, 조밥, 고춧가루, 마늘, 생강, 물엿, 청주, 글루탐산나트륨 및 참깨를 포함하는 식해 부원료를 첨가하여 믹스를 제조하는 2단계; 및 상기 2단계의 믹스에 유산균을 첨가하여 발효 시키는 3단계;를 포함하는 유산균 강화 굴 식해 제조방법을 제공한다.

[0008] 또한, 상기 방법은 상기 3단계 발효 후 산도조절제를 첨가하는 4단계;를 더 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에 따른 굴 식해용 유산균의 발굴은 발효식품 12종으로부터 유산균의 분리, 선별, 프로바이오틱스의 기능, 안전성 및 안정성을 고려하여 최적의 유산균을 선정하는 것으로, 유산균 강화 굴 식해에 의하여 발효 기간의 단축, 건강 기능성이 부여되고, 제조방법은 pH, 총산도, 아미노산질소, 유산균수 변화 및 종합적 기호도를 고려하여 유산균 강화 굴 식해의 제조 시에 최적 발효 기간을 확립한 것으로, 최적화 공정에 의하여 제조된 유산균 강화 굴 식해는 소비자 기호도, 영양적 및 건강기능 특성이 우수하다. 또한, 본 발명은 유산균 발효 공정 이후 pH 완충능을 가진 산도조절제를 첨가하여 유산균의 과다 생육을 억제하여 소비기한을 연장하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 유산균 강화 굴 식해의 제조공정도를 간단히 나타낸 도이다.

도 2는 Scanning electron microscopy (SEM)을 통한 유산균의 세포의 형태를 나타낸 도이다.

도 3은 *Leuconostoc citreum* SH-02의 내산성 및 내담즙성 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 *Leuconostoc citreum* SH-02의 아질산염 소거능 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 유산균 강화 굴 식해의 10℃에서 발효기간에 따른 pH 변화를 나타낸 도이다.

도 6은 유산균 강화 굴 식해의 10℃에서 발효기간에 따른 총 산도 변화를 나타낸 도이다.

도 7은 유산균 강화 굴 식해의 10℃에서 발효기간에 따른 아미노산질소 변화를 나타낸 도이다.

도 8은 유산균 강화 굴 식해의 10℃에서 발효기간에 따른 유산균 농도 변화를 나타낸 도이다.

도 9는 유산균 강화 굴 식해의 발효기간에 따른 관능평가(종합적 기호도) 점수 변화를 나타낸 도이다.

도 10은 7종의 산도조절제의 pH 완충능을 나타낸 도이다.

도 11은 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해의 저장 기간 동안 pH 변화를 나타낸 도이다.

도 12는 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해의 저장 기간 동안 총 산도 변화를 나타낸 도이다.

도 13은 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해의 저장 기간 동안 유산균 수 변화를 나타낸 도이다.

도 14는 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해의 저장 기간에 따른 관능평가(종합적 기호도) 점수 변화를 나타낸 도이다.

도 15는 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해의 휘발성염기질소(VBN) 함량 및 냄새강도 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 16은 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해의 항산화, 항고혈압, 아질산염 소거능 분석 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0012] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology) 들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함”한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0014] 본 발명은 굴을 건조하는 1단계; 상기 1단계의 굴에 절인 무, 채썬 무, 소금, 설탕, 조밥, 고춧가루, 마늘, 생강, 물엿, 청주, 글루탐산나트륨 및 참깨를 포함하는 식해 부원료를 첨가하여 믹스를 제조하는 2단계; 및 상기 2단계의 믹스에 유산균을 첨가하여 발효 시키는 3단계;를 포함하는 유산균 강화 굴 식해 제조방법을 제공한다(도 1 참조).

[0015] 또한, 상기 식해 부원료는 굴 100 중량부 기준, 절인 무 20 내지 26 중량부, 채썬 무 10 내지 16 중량부, 소금 1 내지 3 중량부, 설탕 2 내지 5중량부, 조밥 5 내지 8중량부, 고춧가루 4 내지 7중량부, 마늘 2 내지 5중량부, 생강 0.5 내지 3중량부, 물엿 0.5 내지 3중량부, 청주 0.5 내지 3중량부, 글루탐산나트륨 0.1 내지 1.5 중량부 및 참깨 0.1 내지 1.5중량부 만큼 포함하는 것일 수 있다.

[0016] 바람직하게는 굴 100 중량부 기준, 절인 무 22.1 내지 24.1 중량부, 채썬 무 12.7 내지 14.7 중량부, 소금 1.1 내지 3.1 중량부, 설탕 2.8 내지 4.8 중량부, 조밥 5.8 내지 7.8 중량부, 고춧가루 4.5 내지 6.5 중량부, 마늘 2.9 내지 3.9 중량부, 생강 1 내지 2 중량부, 물엿 1 내지 2 중량부, 청주 1 내지 2 중량부, 글루탐산나트륨 0.3 내지 1.3 중량부 및 참깨 0.4 내지 1 중량부 만큼 포함하는 것일 수 있다.

[0017] 더욱 바람직하게는 굴 100 중량부 기준 절인 무 23.1 중량부, 채썬 무 13.7 중량부, 소금 2.1 중량부, 설탕 3.8 중량부, 조밥 6.8 중량부, 고춧가루 5.5 중량부, 마늘 3.4 중량부, 생강 1.4 중량부, 물엿 1.4 중량부, 청주 1.4 중량부, 글루탐산나트륨 0.8 중량부 및 참깨 0.7 중량부 만큼 포함되는 것일 수 있다.

[0018] 또한, 상기 유산균은 저온(5~17℃)에서 발효가 가능한 저온성 유산균일 수 있으며, 상기 저온성 유산균으로는 *Leuconostoc* 속 균주, *Weissella* 속 균주, *Pediococcus* 속 균주, *Lactobacillus* 속 균주 등이 있다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 *Leuconostoc* 속 균주는 *Leuconostoc citreum*일 수 있으며, 바람직하게는 *Leuconostoc citreum* SH-02(수탁번호 KCTC18974P)일 수 있다.

[0020] 또한, 상기 3단계의 발효는 5 내지 15℃에서 1 내지 3일 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021] 또한, 상기 방법은 상기 3단계 발효 후 산도조절제를 첨가하는 4단계;를 더 포함할 수 있다.

[0022] 본 발명에서 사용되는 용어, "산도조절제"는 식품의 산도를 적절한 범위로 조정하는 식품첨가물을 의미한다. 상기 산도조절제는 식품의 보존효과를 높이기 위해 사용되며, 본 발명에서는 최적 발효 후 유통 및 소비자가 저장 중 유산균의 생육을 억제하기 위한 목적으로 사용하였다.

[0023] 또한, 상기 산도조절제는 굴 100 중량부 기준, 3 내지 7 중량부 만큼, 바람직하게는 4 내지 6 중량부 만큼 포함되는 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 또한, 상기 산도조절제는 키토산 및 칼슘을 포함하는 것일 수 있고, 상기 산도조절제는 0.5 내지 1% (w/w) 키토산 용액 및 1 내지 2% (w/w) 칼슘 용액을 혼합하여 제조되는 것일 수 있으며, 상기 키토산 용액 및 칼슘 용액이 1:2의 중량비로 포함되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 이어서, 본 발명은 상기 유산균 강화 굴 식해 제조방법에 의해 제조된 유산균 강화 굴 식해를 제공한다.

[0027] 이하, 본 발명의 실시예를 첨부된 도면을 참고하여 보다 상세하게 설명하도록 한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐, 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아닐 것이다.

[0029] **<실시예 1> 재료의 준비**

[0030] **1-1. 주원료(굴)**

[0031] 굴 식해의 주원료 냉동 굴(*Crassostrea gigas*, oyster)은 2021년 3-4월 경상남도 통영시 소재의 (주)덕연씨푸드에서 양식(수하식)굴을 -44℃±0.2에서 급속 동결하고, 얼음막(glaze) 처리하여 제조한 IQF (Individual Quick Freezing) 굴을 제공받아 사용하였다.

[0033] **1-2. 유산균 분리용 발효식품**

[0034] 유산균 분리용 발효식품은 숙성도가 각기 다른 시판 젓갈류 9종, 시판 김치 1종 및 시제 굴 식해 2종으로 총 12종을 시료로 사용하였다. 발효식품 중 북새우젓[AR사], 굴젓, 물굴젓, 갈치속젓 2종, 멸치젓, 곤어리젓과 같은 시판 젓갈류 7종은 2021년 2월에 경상남도 통영시 소재 전통시장에서 구매하여 사용하였고, 참꼴기젓, 갈치속젓[GB사]과 같은 2종은 2021년 2월에 전라남도 보성군 별교읍 소재 전통시장에서 구매하여 사용하였으며, 맛김치[DS사]와 같은 1종은 2021년 2월에 경상남도 통영시에 소재한 대형마트(L사)에서 구입하여 사용하였다.

[0035] 시제 굴자숙수 무첨가 굴 식해 및 굴자숙수 첨가 굴 식해와 같은 2종은 Kim HJ at al. Development and characterization of sea squirt Halocynthia roretzi sikhae. Kor J Fish Aquat Sci 46(1) 27-36. (2013)에서 알려진 방법에 의해 직접 제조한 것을 사용하였다 (상기 논문은 멍게식해의 제조방법으로 상기존문에 재료에서 멍게를 굴로 변경하여 제조하였다. 또한, 굴자숙수 첨가 굴식해의 경우 물을 굴자숙수로 변경하여 제조된 것이다). 구체적으로, 식해의 제조에 사용할 냉동 굴을 유수해동하고, 원심분리(11,300g, 20분)한 후 이를 일정한 크기(폭 0.5 cm 간격)로 dice처리하여, 여기에 식염을 2% (w/w)가 되게 가한 다음 30분 동안 염지하여 제조하였다. 굴 식해의 제조를 위한 믹스(mix)는 염지 굴 무게에 대하여 메조 [쌀과 메조를 1:1 (w/w)로 혼합하여 제조한 된밥] 50% (w/w), 고춧가루 30% (w/w), 맥아가루 10% (w/w), 밀가루 3% (w/w), 다진 마늘 15% (w/w), 다진

생강 5% (w/w), 물 또는 굴자숙수 50% (v/w), 무채〔무채 무게의 5% (w/w)에 해당하는 소금에 30분 동안 절인 다음 손으로 짜서 물기를 제거한 것〕 40% (w/w), 설탕1% (w/w)가 되도록 각각 가한 다음 잘 혼합하여 굴 믹스를 제조하였다. 굴 식해는 상기 굴 믹스를 플라스틱 용기(직경×높이, 14×18 cm, 용량 2 L)에 넣어 밀봉한 후 15℃로 조정된 인큐베이터(EYELA LTI-400E, Rilalilai Co., Japan)에서 일정 시간동안 숙성시켜 제조하였다.

[0037] **1-3. 기타 부원료**

[0038] 정제염[㈜한주소금], 글루탐산나트륨[㈜이에스식품원료], 고춧가루[(주)영양명가식품], 물엿[오뚜기㈜], 설탕[씨제이제일제당㈜], 마늘[㈜황보마을], 참깨[오뚜기㈜], 메좁쌀[좋은곡식], 청주[롯데칠성음료㈜], 생강[글로벌냉동]은 2021년 1~6월에 온라인 쇼핑몰에서 구매하여 사용하였고, 무는 경상남도 통영시에 소재한 대형마트(L사)에서 구입하여 사용하였다. 산도조절제는 수용성 발효칼슘[KMF-1123, ㈜KMF] 및 수용성 키토산[MR-210818, ㈜ 미래바이오텍]을 구매하여 사용하였다.

[0040] **1-4. 대조구**

[0041] 굴 식해의 품질 특성 비교를 위한 대조구는 시판 어리굴젓[㈜해다은]으로 하였다.

[0043] **<실시예 2> 유산균의 분리**

[0044] **2-1. 유산균의 분리**

[0045] 유산균 분리를 위하여 시판 발효식품과 시제 굴 식해와 같은 발효식품 12종 각 25 g과 여기에 각 225 mL의 0.85% 생리식염수(w/v)를 혼합하여 stomacher (BagMixer 400, Interscience, France)로 3분간 균질화하였다. 이어서 균질화물은 십진희석법으로 단계별로 희석하여 Bromocresol Purple (BCP)을 함유한 MRS agar (MBcell, Korea)에 평판도말하여 배양(30℃, 24시간)하였다. 유산균의 분리는 배양된 single colony 주위에 노란색 환이 생긴 colony를 선별하여 백금이로 MRS agar 배지에 획선도말법으로 도말 후 배양(30℃에서 24시간)하여 2차 분리하였으며 총 10종을 분리하였다. 분리된 유산균은 15% glycerol (v/v) Stock으로 만들어 -85℃ deep freezer (CLN-40U, Nihon Freezer Co,. LTD, Japan)에서 보관하면서 사용하였다.

[0046] 그 결과, 시판 젓갈(JK)에서 11종, 시판 김치(KC)에서 3종, 시제 굴자숙수 무첨가 및 시제 굴자숙수 첨가 굴 식해(SH)에서 6종의 유산균이 분리되었다.

[0048] **2-2. 유산균 선별(온도별 특성)**

[0049] 온도별 특성은 굴 식해의 발효 온도(10℃)를 고려한 저온성 유산균을 선별한 목적으로 분리한 유산균 20종을 MRS broth 배지에서 평판도말한 후, 5-37℃에서 48시간 배양하였다. 그 결과는 양성(+)과 음성(-)을 육안으로 판단하였다.

[0050] 그 결과, 표 1에 나타낸 바와 같이 분리된 유산균은 5℃에서 배양한 경우 20종 모두가 생육 불가능하였고, 10℃에서 배양한 경우 SH-02가 우수하게 생육 가능하였지만, 4종(JK-04, JK-08, SH-01, SH-04)이 미미하게 생육하였으며, 15℃에서 배양한 경우 5종(JK-04, JK-08, SH-01, SH-02, SH-04)이 우수하게 생육하였지만, 12종(JK-03, JK-05, JK-06, JK-07, JK-09, JK-11, KC-01, KC-02, KC-03, SH-03, SH-05, SH-06)이 미미하게 생육하였다. 그리고, 분리한 유산균은 20-37℃ 범위에서 배양한 경우 20종 모두가 생육 활동이 우수했다.

[0051] 이러한 결과를 통해 굴 식해의 유산균 강화를 위하여 분리된 유산균 중 SH-02만이 10℃에서 우수하게 생육하여 본 연구에서는 굴 식해의 유산균 강화를 위한 적정 유산균의 경우 SH-02로 판단하였고, 이후 SH-02에 대하여 동정하고자 하였다.

표 1

[0053]

유산균주	온도 (℃)							유산균주	온도 (℃)						
	5	10	15	20	25	30	37		5	10	15	20	25	30	37

JK-01	-	-	+	+	+	+	+	JK-11	-	-	±	+	+	+	+
JK-02	-	-	-	+	+	+	+	KC-01	-	-	±	+	+	+	+
JK-03	-	-	±	+	+	+	+	KC-02	-	-	±	+	+	+	+
JK-04	-	±	+	+	+	+	+	KC-03	-	-	±	+	+	+	+
JK-05	-	-	±	+	+	+	+	SH-01	-	±	+	+	+	+	+
JK-06	-	-	±	+	+	+	+	SH-02	-	+	+	+	+	+	+
JK-07	-	-	±	+	+	+	+	SH-03	-	-	±	+	+	+	+
JK-08	-	±	+	+	+	+	+	SH-04	-	±	+	+	+	+	+
JK-09	-	-	±	+	+	+	+	SH-05	-	-	±	+	+	+	+
JK-10	-	-	-	+	+	+	+	SH-06	-	-	±	+	+	+	+

[0055] **2-3. 유산균의 형태 및 생화학적 특성**

[0056] 전계방사 주사전자현미경의 촬영을 위하여 24 well plate 위에 0.22 um PVDF membrane filter (GVWP04700, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 얹고 filter 위에 MRS broth에서 배양 (37℃, 24시간)한 SH-02 유산균을 접종 및 배양한 후 다음과 같은 방법으로 전처리를 하였다. 먼저 filter 위에 증식한 균주의 원활한 현미경 관찰을 목적으로 균체를 고정시키기 위해 배양 후 배지를 제거하여 2% (v/v) formaldehyde와 2.5% (v/v) glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 각각 1 mL씩 분주 후 4℃에서 24시간동안 유산균을 고정시켰다. 이어서 50%, 70%, 90% 및 95% ethanol 용액에서 농도별 순서로 15분씩 차례대로 탈수시킨 후 다시 100% ethanol 용액에서 10분 동안 2차례 탈수시켰다. 탈수한 균체를 동결 건조하였으며, 금(Au)으로 코팅하여 전계방사주사전자현미경(FE-SEM; JSM-7610F, JEOL Ltd., Japan)을 이용하여 관찰하였다.

[0057] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이 SH-02는 단일 또는 쌍구균으로, 길이는 431.7±5.2 nm정도이며, 폭은 617.3±75.8 nm이었다.

[0059] 시제 굴자숙수 첨가 굴 식해에서 분리된 SH-02 유산균의 생화학적 특성은 API 50 CHL kit (BioMérieux, Lyon, France)를 사용하여 유산균의 당 이용성을 확인하였으며, 양성은 +, 음성은 -로 나타내었다. 선별된 유산균은 MRS broth에서 배양(30℃, 24 hr)하여 API 50 CHL medium (BioMerieux, Lyon, France)으로 탁도를 3-4 Mcfarland (BioMérieux, Lyon, France)로 현탁한 다음 strip에 접종 후 mineral oil을 첨가하였다. 이어서 이를 배양(35±2℃, 24 hr 및 48 hr)하여 색깔의 변화로 양성(+)과 음성(-)을 육안을 통하여 판단하여 API kit 동정 프로그램 (https://apiweb.biomerieux.com)을 이용하여 결과를 확인하였다.

[0060] 그 결과, SH-02는 L-arabinose, D-xylose, glucose, fructose, mannose, methyl-D-glucoside, N-acetyl-glucosamine, amygdalin, arbutin, esculin, salicin, cellobiose, maltose, sucrose, trehalose, β-gentiobiose, D-turanose, gluconate 등과 같이 18종의 당에 대하여 양성을 나타내었다(표 2 참조). API kit 동정 프로그램에 의하여 *Leuconostoc citreum*으로 동정되었으며, 96.2%가 일치하였다.

표 2

[0062]

시험 번호	균주 코드	SH-02	시험 번호	균주 코드	SH-02
0	Control	-	26	Salicin	+
1	Glycerol	-	27	Cellobiose	+
2	Erythritol	-	28	Maltose	+
3	D-Arabinose	-	29	Lactose	-
4	L-Arabinose	-	30	Melibiose	-
5	Ribose	-	31	Sucrose	+
6	D-Xylose	+	32	Trehalose	+
7	L-Xylose	-	33	Inulin	-
8	Adonitol	-	34	Melezitose	-
9	β-Methyl-D-xyloside	-	35	Raffinose	-
10	Galactose	-	36	Starch	-

11	Glucose	+	37	Glycogen	-
12	Fructose	+	38	Xylitol	-
13	Mannose	+	39	β-Gentiobiose	+
14	Sorbose	-	40	D-Turanose	+
15	Rhamnose	-	41	D-Lyxose	-
16	Dulcitol	-	42	D-Tagatose	-
17	Inositol	-	43	D-Fucose	-
18	Mannitol	-	44	L-Fucose	-
19	Sorbitol	-	45	D-Arabitol	-
20	Methyl-D-mannoside	-	46	L-Arabitol	-
21	Methyl-D-glucoside	+	47	Gluconate	+
22	N-Acetyl-glucosamine	+	48	2-keto-Gluconate	-
23	Amygdalin	+	49	5-keto-Gluconate	-
24	Arbutin	+	**Temporary identifed**		*Leuconostoc citreum* 96.2%
25	Esculin	+			

[0064] **2-4. 유산균의 분자생물학적 동정**

[0065] 분리된 SH-02 유산균의 분자생물학적 동정은 HiYieldTM Genomic DNA mini kit (YGC 100, RBC, Taiwan)로 genomic DNA를 추출하였다. 추출한 genomic DNA를 주형으로 16S rRNA 유전자 분석을 위해 polymerase chain reaction (PCR)로 증폭하였으며, 증폭한 DNA는 ㈜마크로젠에 의뢰하여 염기서열을 분석하였으며, National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 database 자료와 비교하여 분석하였다.

[0066] 그 결과, 표 3에 나타낸 바와 같이 SH-02는 NCBI에 등록된 *Leuconostoc citreum* KY435895.1과 16S rRNA 유전자 염기서열을 비교한 결과 99.93% 일치하여 *Leuconostoc citreum* SH-02로 명명하였다.

표 3

[0068]

분리된 유산균주	Closest relative	Length	Identity (%)	Reference strains NO.
SH-02	*Leuconostoc citreum*	1408	99.93	KY435895.1

[0070] **<실시예 3> 유산균의 프로바이오틱스 특성**

[0071] **3-1. 내산성 및 내담즙성**

[0072] 유산균의 내산성 실험은 Kobayashi et al. (1974)이 언급한 방법에 따라 다음과 같이 실시하였다. 분리 젖산균의 인공 위액에 대한 내성의 측정을 위하여 전처리한 분리 젖산균을 1 N HCl을 이용하여 pH 2.5로 조정하고, 1% pepsin이 함유된 MRS broth에 접종하였다. 이어서 인공 위액을 진탕배양 (37℃, 3 hr)한 후 1 mL 용액을 취한 후, PBS (0.1 M phosphate buffer saline, pH 7.2)로 단계별로 희석하여 MRS agar 배지에 평판 도말하여 배양(37℃에서 24-48 hr)하였다. 분리 젖산균의 인공 위액에 대한 내성 활성은 인공 위액에서 배양 전의 생균수에 대한 배양 후 생균수의 상대 비율(%)로 나타내었다.

[0073] 유산균의 내담즙성 실험은 Gilliland et al. (1984)의 방법을 일부 변형하여 실시하였다. MRS broth 배지에서 배양(30℃, 24 hr)된 유산균 배양액을 oxgall (B3883, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 0.3% 첨가한 MRS broth 배지와 첨가하지 않은 배지에 각각 1%가 되도록 접종하였다. 이어서 이를 배양(37℃, 7 hr)한 다음 PBS를 이용하여 단계별로 희석하고 MRS agar 배지에 평판도말하여 30℃에서 24-48시간 배양하였다. 분리 젖산균의 내담즙성은 oxgall에서 배양전의 생균수에 대한 배양 후 생균수의 상대 비율(%)로 나타내었다.

[0074] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이 *Leuconostoc citreum* SH-02의 내산성과 내담즙성은 각각 96.4±1.3% 및 84.9±1.3%이었다.

[0075] 내산성이 강한 균주들이 상대적으로 내담즙성이 우수하다고 보고된 바가 있다. 따라서 본 연구에서 선별된 유산균 *Leuconostoc citreum* SH-02은 전체적으로 내산성 및 내담즙성에 대한 안정성이 우수하여 섭취 시에 인체 내에서 산과 담즙에 의한 영향이 없을 것으로 판단되었고, 섭취 시 *Leuconostoc citreum* SH-02에 의한 건강기능성을 기대할 수 있을 것이다.

[0077] **3-2. 아질산염 소거능**

[0078] 아질산염은 Ito et al. (1979)와 Oh (1997)의 방법에 따라 다음과 같이 실시하였다. 아질산염의 최종농도를 100 ug/mL이 되도록 조정한 MRS broth 액체 배지에 선발 유산균을 접종한 후 12℃와 35℃에서 48시간 배양하여 일정 시간 간격으로 100 uL 시료를 채취하여 원심분리(4℃, 17000 x g, 10분)한 다음 상층액을 취하여 비색정량하였다. 이때 양성 대조구에는 배지의 최종농도가 100 ug/mL가 되도록 조정하여 흡광도를 측정하였으며, 음성 대조구에는 멸균 증류수만을 첨가하여 동일한 방법으로 흡광도를 측정하였다.

[0079] 정용 플라스크(25 mL)에 배양액 100 uL씩 넣고 발색지시약[0.2% sulfanylamind 용액(w/v), 0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride 용액(w/v), 5 N HCl (v/v)] 을 각각 1 mL씩 넣고 암실에서 5분간 발색시켰다. 이어서 증류수를 이용하여 25 mL로 정용한 다음, 분광광도계(UV/VIS Spectrophotometer, X-MA6100PC, Human Co. Ltd, China)를 이용하여 538 nm에서 흡광도를 측정한 후 미리 작성한 검량선으로부터 아질산염의 농도를 산출하였다.

[0080] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이 선별된 유산균(*Leuconostoc citreum* SH-02)의 아질산 소거활성은 배양 12시간째의 경우 42.2±0.8%, 배양 24시간째의 경우 79.6±1.4%, 배양 48시간째의 경우 96.2±0.1%으로, 배양시간이 경과할수록 급속히 증가하는 경향을 나타내었다.

[0081] 김치에서 분리한 유산균들의 아질산염 소거활성을 측정한 결과 모든 유산균들의 소거활성이 90% 이상이었다고 알려져 있다. 따라서, 선별된 유산균 *Leuconostoc citreum* SH-02는 아질산염 소거활성이 우수하여 섭취 시 건강기능성 기대 효과가 있다는 것을 의미한다.

[0083] **<실시예 4> 유산균의 안정성**

[0084] **4-1. 용혈성 분석**

[0085] 용혈작용은 적혈구가 파괴되는 정상적인 작용과 적혈구의 유전적인 결함이나 화학물질, 뱀 등의 독액, 미생물이 생성하는 독성물질에 의해서 형성되는 비정상적인 작용이다. 용혈성 실험은 Donohue et al. (1996)의 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 즉, 분리된 유산균을 MRS broth 배지에서 배양(37℃, 24 hr)한 다음 sheep blood (KisanBio, Seoul, Korea) 5%가 첨가된 tryptic soy agar (KisanBio, Seoul, Korea) 평판배지에 획선도말법(streasking)으로 도말 후 37℃에서 24-48시간 배양하였다. 이어서 육안을 통한 알파용혈(α-haemolysis, colony 주변 녹색 및 갈색환 생성), 베타용혈(β-haemolysis, colony 주변 투명환 생성) 또는 감마용혈(γ-haemolysis, colony 주변 환 생성 없음)으로 판단하였다.

[0086] 그 결과, 표 4에 나타낸 바와 같이 유산균 *Leuconostoc citreum* SH-02의 용혈성 분석은 α-haemolysis 또는 β-haemolysis 반응이 보이지 않았으며 투명환을 생성하지 않은 γ-haemolysis로 용혈반응이 일어나지 않는 것을 확인하였다.

표 4

[0088]

α (Incomplete hemolysis)	β (complete hemolysis)	γ (Non-hemolysis)
-	-	+

[0090] **4-2. 항생제 내성 분석**

[0091] 유산균의 항생제 내성 실험은 Klare et al. (2005) 및 Oh and Jung (2015)의 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 분리된 유산균은 MRS broth 배지에서 배양(37℃, 24 hr)한 다음 동일한 배지에 1×10^{6} CFU/mL 수준으로 현탁하였다. 각각의 유산균 배양액을 96 well plate에서 희석한 항생제(chloramphenicol, kanamycine, streptomycine, tetracycline, penicillin G, ampicillin 및 gentamicin, Sigma-Aldrich)와 혼합하여 최종 항생제 농도가 0.125-512 μg/mL이 되도록 하였다. 이어서 이를 배양(37℃, 24 hr)하고, 균이 증식하지 않은 배지 중 항생제의 농도가 가장 낮은 배지의 농도를 최소 생육 저해 농도(MIC, Minimum inhibitory concentration)로 표시하였다.

[0092] 그 결과, 표 5에 나타낸 바와 같이 *Leuconostoc citreum* SH-02의 항균제에 대한 내성은 ampicillin의 경우 0.5 μg/mL, gentamycin와 kanamycin의 경우 모두 8.0 μg/mL, streptomycin의 경우 16.0 μg/mL, tetracycline의 경우 0.5 μg/mL, chloramphenicol의 경우 1.0 μg/mL 및 penicillin G의 경우 0.125 μg/mL 이하로, EFSA에서 제시한 break point (ampicillin 2.0 μg/mL, gentamycin 16 μg/mL, kanamycin 16.0 μg/mL, streptomycin 64 μg/mL; tetracycline 8.0 μg/mL, chloramphenicol 4 μg/mL, penicillin G -) 보다 낮은 것으로 나타났으며, 이는 *Leuconostoc citreum* SH-02는 이들 항생제에 대하여 안전하다는 것을 의미한다. 따라서 *Leuconostoc citreum* SH-02는 항생제(ampicillin, gentamycin, kanamycin, streptomycin, tetracycline, chloramphenicol, penicillin G)에 대하여 저항성을 가지고 있으며 유럽식품안전청에서 제시한 break point보다 낮아 유산균 강화 굴 식해의 개발에 사용 가능하다는 것을 확인하였다.

표 5

[0094]

분리된 유산균	(MIC, μg/mL)						
	AMP	GEN	KAN	STR	TET	CHL	PEN
Break point for *Leuconostocs*	2	16	16	64	8	4	-
Leuconostoc citreum SH-02	0.5	8	8	16	0.5	1	≤0.125

[0096] Break point for *Leuconostocs*: 유럽식약처에 가이드라인에서 제시된 기준점, Strains with MICs lower than or equal to the break points are considered susceptible. AMP ampicillin/GEN: gentamycin/KAN: kanamycin/STR: streptomycin/TET: tetracycline/CHL: chloramphenicol/PEN: penicillin G

[0098] **<실시예 5> 유산균 강화 굴 식해의 제조**

[0099] **5-1. 유산균 강화 굴 식해의 제조**

[0100] 도 1을 참조하여 유산균 강화 굴 식해를 제조하였다. 구체적으로, 유산균 강화 굴 식해의 제조를 위하여 IQF 굴은 냉장고에서 해동(10℃이하, 12시간)하고, 흐르는 물에 세척 및 탈수한 다음 건조기(주문제작)에서 건조(50℃, 60분)처리하였다. 유산균 강화 굴 식해는 건조굴에 나머지 부원료 및 유산균 *Leuconostoc citreum* SH-02(수탁번호 KCTC18974P) 를 첨가하고, 10±2℃에서 0~12일간 발효한 다음 용기(PET, D 76 mm × H 45 mm)에 살쟁임한 후 밀봉하여 제조하였고, 더 이상의 발효를 억제할 목적으로 -18℃ 이하에서 저장 및 유통하였다. 이때 건조굴에 첨가한 부원료와 첨가량은 IQF 굴의 중량 기준으로 절인 무[무, 무 무게 기준으로 소금 2.0% (w/w), 설탕 1.0% (w/w)에 30분 동안 절인 다음 물기를 제거] 23.1% (w/w), 채썬 무 13.7% (w/w), 조밥 6.8% (w/w), 고춧가루 5.5% (w/w), 설탕 3.8% (w/w), 다진 마늘 3.4% (w/w), 소금 2.1% (w/w), 물엿 1.4% (w/w), 청주 1.4% (w/w), 다진 생강 1.4% (w/w), 글루탐산나트륨 0.8% (w/w), 참깨 0.7% (w/w), 유산균은 MRS 액체배지에 37℃에서 24시간 동안 배양하여 활성화시킨 후, 원심분리기(SUPRA 22K, Hanil, Korea)를 이용하여 원심분리(2520 x g에서 10분)하였다. 이후 배지를 제거하고 생성된 pellet은 멸균생리식염수로 2회 세척하여 굴 식해 제조 시 첨가하는데 하였다.

[0102] **5-2. 유산균 무강화 굴 식해의 제조**

[0103] 유산균 무강화 굴 식해는 상기와 동일한 방법으로 제조하되 유산균을 첨가하지 않고 제조하였다.

[0105] **5-3. 산도조절제를 포함하는 유산균 강화 굴 식해의 제조**

[0106] 산도조절제를 포함하는 유산균 강화 굴 식해는 상기와 동일한 방법으로 제조하되 유산균 발효 후 산도조절제를 굴 무게 기준 5% (w/w)만큼 첨가하여 제조하였다. 여기서 산도조절제는 소비자가 식용을 위하여 개봉 후 소비할 때까지의 소비기한 연장, 저장성 증대를 목적으로 최적의 산도조절제를 찾기 위해 키토산 및 칼슘이 혼합된 산도조절제를 사용하였다.

[0108] **<실시예 6> 유산균 강화 굴 식해의 발효 공정 최적화**

[0109] **6-1. pH 변화**

[0110] 발효 기간에 따른 유산균 강화 굴식해의 pH 변화를 측정하였다. 구체적으로, pH는 내용물을 검체로 하여 식품공전(MFDS, 2020)에서 언급한 방법(제8. 일반시험법 6. 식품별 규격 확인 시험법)에 따라 측정하였다.

[0111] 발효 중 유산균(*Leuconostoc citreum* SH-02) 강화 굴 식해의 pH 변화를 유산균 무강화 굴 식해(대조구)의 pH 변화와 비교한 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이 pH는 유산균 강화 유무와 관계없이 모두 감소하는 경향을 나타내었고, 그 정도는 대조구(상관식 y=-0.095x+6.1832)에 비하여 유산균 강화 굴 식해(상관식 y=-0.2082x+5.8749)가 확연히 신속하였다. 즉, 굴 식해의 발효 기간에 따른 pH는 대조구의 경우 담금 직후 6.02, 이후 발효 중 8일째 5.65, 10일째 4.88을 나타내어 완만히 감소하는 경향을 나타내었고, 유산균 강화 굴 식해의 경우 담금 직후 6.00, 발효 중 2일째 5.62, 8일째 4.47을 나타내어 가파르게 감소하는 경향을 나타내었다. 한편, 굴 식해의 pH는 유산균 강화 굴 식해의 발효 2일째(5.62)와 대조구 발효 8일째(5.65)가 유사하였다.

[0113] **6-2. 산도 변화**

[0114] 산도는 식품공전(MFDS, 2021, 제8. 일반시험법, 6. 식품별 규격 확인 시험법 식품성분시험법)에서 언급한 방법에 따라 실시하였다.

[0115] 유산균(*Leuconostoc citreum* SH-02) 강화 굴 식해의 총산도 변화를 유산균 무강화 굴 식해(대조구)의 총산도 변화를 비교한 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이 굴 식해의 발효 기간에 따른 총 산도는 유산균 강화 유무와 관계없이 모두 증가하는 경향을 나타내었고, 그 정도는 대조구(상관식 y=30.215x+408.49)에 비하여 유산균 강화 굴 식해(상관식 y=123.12x+424.85)가 확연히 신속하였다. 즉, 굴 식해 100 g 당 발효 기간에 따른 총 산도는 유산균 무강화 대조구의 경우 담금 직후 441.6 mg이었고, 이후 발효 중 8일째 662.4 mg, 10일째 766.8 mg으로 서서히 증가하는 경향을 나타내었으나, 유산균 강화 굴 식해의 경우 담금 직후 448.8 mg이었고, 이후 발효 중 2일째 657.6 mg, 8일째 1,413.6 mg으로 가파르게 증가하는 경향을 나타내었다. 또한, 굴 식해 100 g 당의 총 산도는 pH와 같이 유산균 강화 굴 식해의 발효 2일째(657.2 mg)와 대조구 발효 8일째(662.4 mg)가 유사하였다.

[0117] **6-3. 아미노산질소 변화**

[0118] 아미노산 질소의 검체는 굴 식해의 내용물로 하여, KFN (2000)에서 언급한 홀몰적정법(Formol법)으로 측정하였다. 즉, 전처리 검체는 마쇄한 내용물 5 g에 증류수 45 mL를 가하고, 교반하여 균질화시킨 다음 여과지 No. 2(Advantec, Toyo Roshi Kaisha Ltd, Japan)로 여과하여 여과된 용액 25 mL로 하였다. 이를 0.1 N NaOH 용액을 사용하여 pH 8.5로 조정하였고, 이어서 여기에 35% formaldehyde 용액(0.1 N NaOH 용액을 사용하여 pH 8.5로 조정된 용액) 20 mL를 가한 다음 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.5가 될 때까지 적정하여, 이를 토대로 아미노산 질소 함량을 산출하였다.

[0119] 유산균(*Leuconostoc citreum* SH-02) 강화 굴 식해의 아미노산질소 변화를 유산균 무강화 굴 식해(대조구)의 아미노산질소 변화를 비교한 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이 굴 식해의 발효 기간에 따른 아미노산질소 함량은 유산균 강화 유무와 관계없이 모두 증가하는 경향을 나타내었고, 그 정도는 대조구(상관식 y=9.8318x+198.3)에 비하여 유산균 강화 굴 식해(상관식 y=12.545x+235.82)가 확연히 신속하였다. 즉, 굴 식해 100 g 당의 아미노산질소 함량은 대조구의 경우 담금 직후 197.9 mg이었고, 발효 중 8일째 286.3 mg, 10일째 300.2 mg으로 서서히 증

가하는 나타내었으나, 유산균 강화 굴 식해의 경우 담금 직후 208.2 mg이었고, 발효 중 2일째 287.8 mg, 8일째 326.3 mg으로 신속히 증가하는 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과를 미루어 보아 굴 식해는 발효에 의하여 단백질이 분해되어 유리아미노산이 증가한다고 판단되었고, 그 속도는 유산균 강화에 의하여 증진된다고 판단되었다. 한편, 굴 식해 100 g 당의 아미노산질소 함량은 유산균 강화 굴 식해의 발효 2일째(287.8 mg)와 대조구 발효 8일째(281.5 mg)와 9일째(286.3 mg)가 유사하였다.

[0121] **6-4. 유산균 농도 변화**

[0122] 유산균 농도의 검체는 굴 식해의 내용물로 시료 약 15~20 g (mL)을 취하여 멸균팩에 넣고, 시료의 9배(v/w)가 되는 멸균생리식염수(0.85%)를 가하여 stomacher (BagMixer 400, Interscience, France)로 1분 30초간 균질화한 후 시료액을 단계적으로 희석하여 제조하였다.

[0123] 유산균 농도는 전처리한 시료를 d-Man rogosa and sharpe (MRS agar)에 접종하고, 배양(30±1℃, 24±2시간)한 후 집락수를 계측한 다음 Colony Forming Unit (CFU)/mL or g으로 나타내었다. 검액을 가하지 아니한 동일 희석액 1 mL를 대조시험액으로 하여 시험조작의 무균여부를 확인하였다.

[0124] 유산균(*Leuconostoc citreum* SH-02) 강화 굴 식해의 유산균수 변화를 유산균 무강화 굴 식해(대조구)의 유산균 농도 변화를 비교한 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이 굴 식해의 발효 기간에 따른 유산균 농도는 유산균 강화 유무와 관계없이 일정 기간 발효(유산균 강화 굴 식해의 경우 6일, 유산균 무강화 굴식해의 경우 9일) 후 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 즉, 굴 식해의 g당 유산균 농도는 대조구의 경우 담금 직후 4.38 Log CFU, 발효 중 8일째 7.98 Log CFU, 9일째 9.13 Log CFU로 최대치에 달하였고, 그 이후 약간 감소하는 경향을 나타내었으며, 유산균 강화 굴 식해의 경우 담금 직후 7.35 Log CFU, 발효 중 2일째 8.41 Log CFU, 6일째 9.18 Log CFU로 최대치를 나타낸 후 8일째 8.83 Log CFU로 감소하는 경향을 나타내었다. 이와 같이 굴 식해의 담금 직후 유산균 농도에서 큰 차이가 있는 것은 유산균 강화 유무 때문이다. 한편, 굴 식해 g 당의 유산균 농도는 유산균 강화 굴 식해의 발효 2일째(8.41 Log CFU)와 대조구 발효 8일째(7.98 Log CFU)가 유사하였다.

[0127] **6-5. 관능평가**

[0128] 관능평가는 굴 식해의 특성에 잘 훈련된 panel member 10인(20-30대, 남자 4인, 여자 6인)으로 구성하여 1) 유산균 강화 발효기간 최적화에 대한 연구의 경우 유산균 무첨가 대조구는 외관, 색, 맛, 조직감, 냄새 및 종합적 기호도를 기준점인 5점으로 하고, 이보다 우수한 것을 6-9점으로, 이보다 못한 것을 1-4점으로, 2) 산도조절제 첨가 후 소비기한 최적화에 대한 연구의 경우 산도조절제 무첨가 대조구는 외관, 색, 맛, 조직감, 냄새 및 종합적 기호도를 기준점인 5점으로 하고, 이보다 우수한 것을 6-9점으로, 이보다 못한 것을 1-4점으로, 3) 최적 조건 하에서 제조한 굴 식해의 품질 비교에 대한 연구의 경우 시판 대조구의 외관, 색, 맛, 조직감, 냄새 및 종합적 기호도를 기준점인 5점으로 하고, 이보다 우수한 것을 6-9점으로, 이보다 못한 것을 1-4점으로 하여 평가하였다.

[0129] 유산균(*Leuconostoc citreum* SH-02) 강화 굴 식해의 관능검사를 유산균 무강화 굴 식해(대조구)의 종합적 기호도를 비교한 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, 유산균 강화 굴 식해의 종합적 기호도는 담금 직후 5.1점이었고, 발효 기간이 경과할수록 유의적으로 개선되어 발효 2일째 7.1점으로 최고치를 나타내었고, 이후 8일째까지 유의적으로 계속 감소하는 경향을 나타내었다($P<0.05$). 이에 반하여 대조구의 종합적 기호도는 제조 직후 5.0점을 나타내었고, 이후 유의적으로 감소하였다($P<0.05$).

[0131] 상기와 같은 pH, 총산도, 아미노산질소, 유산균 수 및 관능평가 결과를 모두 고려하였을 때, 굴 식해의 최적 발효 기간은 대조구인 유산균 무첨가 발효 굴 식해의 경우 8일로 판단되었고, 유산균 강화 발효 굴 식해의 경우 2일로 판단되었다. 또한, 최적 발효기간에서 발효한 굴식해의 종합적 기호도는 유산균 강화 발효 굴 식해가 대조구에 비하여 우수하였다. 따라서, 이후의 실험에서는 유산균 무강화 굴 식해의 경우 8일간 발효시킨 것을, 유산균(*Leuconostoc citreum* SH-02) 강화 굴 식해의 경우 2일 동안 발효시킨 것을 검체로 사용하여, 진행하였다.

[0133] **<실시예 7> 산도조절제의 선발**

[0134] **7-1. 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해의 pH 변화-1**

[0135] 상기 실시예 6과 동일한 방법으로 산도조절제 7종의 pH 변화를 측정한 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이 유산균 강화 굴 식해용 산도조절제 7종 용액의 pH 완충능은 1% 피로인산염 용액의 경우 pH 6.43-10.38 범위, 1% 저분자 키토산 용액의 경우 pH 1.83-4.96 범위, 1% 칼슘 용액의 경우 4.65-7.65 범위이었다. 칼슘:저분자 키토산 혼합제의 농도별 pH는 0.5%:0.25% 혼합 용액의 경우 3.37-6.02 범위, 1.0%:0.5% 혼합 용액의 경우 4.65-6.02 범위, 2.0%:1.0% 혼합 용액의 경우 5.08-6.04 범위, 3.0%:1.5% 혼합 용액의 경우 5.30-6.10 범위이었다. 산도조절제 종류에 관계없이 0.1 N HCl 첨가량이 증가할수록 모두 감소하는 경향을 나타내었고, 그 정도는 1.0% 피로인산염 용액(y=-0.0704x+10.089)이 가장 신속하였고, 다음으로는 1.0% 칼슘 용액(y=-0.0424x+6.4136), 0.5% 칼슘과 0.25% 키토산의 혼합 용액(y=-0.0409x+5.7568), 1.0% 키토산 용액(y=-0.0405x+3.36), 1.0% 칼슘과 0.5% 키토산의 혼합 용액(y=-0.0259x+5.8291), 2.0% 칼슘과 1.0% 키토산의 혼합 용액(y=-0.0188x+5.9355), 3.0% 칼슘과 1.5% 키토산의 혼합 용액(y=-0.016x+6.0405) 순이었다. 한편, 유산균 강화 굴 식해의 소비기한 연장을 목적으로 과도한 키토산과 칼슘을 첨가하는 경우 떫은 맛과 가격 상승 등으로 소비자가 구매를 기피할 우려가 있고, 제조원가 또한 상승할 수 있다(표 6 참조). 이러한 문제점을 고려하여 산도조절제로 칼슘과 키토산의 혼합 용액으로 선발하였고, 이들의 최적 농도는 0.25%:0.50%, 0.50%:1.00% 및 1.00%:2.00%로 선정하여 항균 활성을 평가하였다.

표 6

[0137]

산도조절제 (%)		100 g 제조시 단가(원)	관능적인 맛
칼슘	1.0	40	쓴 맛(Do, 2015)
키토산	1.0	93	떫은 맛(Jang, 2005)
키토산:칼슘	0.25 : 0.50	43.25	
	0.50 : 1.00	86.5	
	1.00 : 2.00	173	

[0139] 상기 선정된 3종의 산도조절제에 대하여 그람 음성균 2종(*Escherichia coli*와 비브리오 패혈증의 원인균인 *Vibrio parahaemolyticus*)과 그람 양성균 2종(황생포도상구균 식중독의 원인균인 *Staphylococcus aureus*와 패혈증에 원인균인 *Bacillus cereus*)에 대한 항균 활성을 디스크법으로 검토하여 clear zone으로 나타내었다. 이때 대조구는 1% 칼슘 용액과 1% 키토산 용액으로 하였다.

[0140] 그 결과, 표 7에 나타낸 바와 같이 대조구인 1.0% 칼슘 용액의 항균 활성은 *Vibrio parahaemolyticus* 6.35 mm로 미미한 정도에서 나타났으나, *Staphylococcus aureus, E. coli, Bacillus cereus* 나타나지 않았다. 또 다른 대조구인 1.0% 키토산 용액의 항균 활성은 *Vibrio parahaemolyticus* 6.45 mm, *E. coli* 6.70 mm, *Bacillus cereus* 6.60 mm로 미미한 정도에서 활성을 나타내었고, *Staphylococcus aureus* 검출되지 않았다. 시험구인 칼슘과 키토산 혼합 용액의 clear zone으로 살펴본 항균 활성은 검토한 농도 중 가장 낮은 농도인 0.50% 칼슘과 0.25% 키토산의 혼합 용액의 경우 *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 및 *Bacillus cereus*에서 모두 나타나지 않으나, 1.0% 칼슘과 0.5% 키토산 혼합 용액의 경우 *Vibrio parahaemolyticus* 8.20 mm, *Staphylococcus aureus* 8.25 mm, *E. coli* 8.90 mm, *Bacillus cereus* 7.70 mm로 나타났고, 2.0% 칼슘과 1.0% 키토산의 혼합 용액의 경우 *Vibrio parahaemolyticus* 9.20 mm, *Staphylococcus aureus* 9.30 mm, *E. coli* 10.80 mm, *Bacillus cereus* 8.05 mm로 나타나, 칼슘과 키토산의 농도가 높아질수록 항균 효과가 상승하는 것으로 나타났다.

표 7

[0142]

산도조절제 (%)	Clear zone (mm)			
	Vibrio parahaemolyticus	*Staphylococcus aureus*	*Escherichia coli*	*Bacillus cereus*

칼슘	1.0	6.35	ND	ND	ND
키토산	1.0	6.45	ND	6.70	6.60
키토산:칼슘	0.25 : 0.5	ND	ND	ND	ND
	0.5 : 1.0	8.20	8.25	8.90	7.70
	1.0 : 2.0	9.20	9.30	10.80	8.05

[0144] 산도조절제에 대한 pH 완충능 및 항균활성 등의 결과를 종합하였을 때, 키토산 및 칼슘의 적정 농도는 0.5%:1.0% 또는 1.0%:2.0% 범위 내에 있을 것으로 판단되어, 이후 실험에서는 이들 범위 내에서 검토하고자 이들 범위에 한정하여 실험을 진행하였다.

[0146] **7-2. 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해의 pH 변화-2**

[0147] 유산균 발효 후 키토산 및 칼슘이 0.5%:1.0% 또는 1.0%:2.0%의 농도로 혼합된 산도조절제를 첨가하여 유산균 강화 굴 식해를 제조하고, 실시예 6의 방법으로 동결 및 해동 후 냉장한 다음 냉장 일자별 pH 변화를 측정하였다.

[0148] 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이 굴 식해의 냉장 일자별에 따른 pH는 산도조절제 첨가와 관계없이 모두 감소하는 경향을 나타내었고, 그 정도는 대조구(산도조절제 무첨가)(y=-0.1644x+5.4592)가 산도조절제 첨가구에 비해 빠르게 감소하는 경향을 보이며, 산도조절제 간의 경우 칼슘 1.0%와 키토산 0.5% 첨가 굴 식해(y=-0.1234x+6.0959)가 칼슘 2.0%와 키토산 1.0% 첨가 굴 식해(y=-0.1123x+6.1259)보다 감소 폭이 컸으나 그 차이는 미미하였다. 즉, 굴 식해의 냉장 저장기간에 따른 pH는 대조구의 경우 해동 직후 5.65이었고, 저장 3일째까지 급격히 감소하여 4.76, 이후 완만히 감소하여 저장 7일째 4.49이었고, 칼슘 1.0%와 키토산 0.5% 첨가 굴 식해와 칼슘 2.0%와 키토산 1.0% 첨가 굴 식해의 경우 해동 직후 각각 5.87 및 5.90, 이후 저장 6일째까지 완만히 감소하여 각각 5.65 및 5.76, 저장 10일째까지 급속히 감소하여 각각 4.62 및 4.71을 나타내었다. 따라서, 산도조절제 처리에 의하여 냉장 저장 중 유산균 강화 식해의 과발효 억제 효과가 인지되었고, 농도를 달리한 산도조절제 간의 경우 농도가 높을수록 억제 효과가 있었으나, 유의한 차이를 나타내지는 않았다.

[0150] **7-3. 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해의 총산도 변화**

[0151] 유산균 발효 후 키토산 및 칼슘이 0.5%:1.0% 또는 1.0%:2.0%의 농도로 혼합된 산도조절제를 첨가하여 유산균 강화 굴 식해를 제조하고, 실시예 6의 방법으로 동결 및 해동 후 냉장한 다음 냉장 기간에 따른 총산도 변화를 측정하였다.

[0152] 그 결과, 도 12에 나타낸 바와 같이 냉장 저장 중 굴 식해의 소비기간에 따른 산도는 산도조절제 첨가 유무와 관계없이 모두 증가하는 경향을 나타내었으나, 그 정도는 대조구(상관식 y=79.771x+604.6)가 산도조절제 첨가구와 비교하여 빠르게 증가하였으며, 산도조절제 간의 경우 저농도(칼슘 1.0%와 키토산 0.5%) 첨가 굴 식해(y=46.527x+399.98)가 고농도(칼슘 2.0%와 키토산 1.0%) 첨가 굴 식해(y=45.076x+380.07)보다 신속하였으나 그 차이는 미미하였다. 즉, 냉장 저장 중 굴 식해 100 g 당의 저장기간에 따른 산도는 대조구의 경우, 해동 직후 650.4 mg이었고, 이후 직선적으로 증가하여 저장 10일째 1,168.8 mg이었으며, 칼슘과 키토산(1.0%와 0.5% 및 2.0%와 1.0%)첨가 굴 식해 간의 경우 해동 직후 각각 469.2 mg 및 451.2 mg, 이후 계속적으로 증가하여 저장 10일째 각각 955.2 mg 및 902.4 mg이었다. 이와 같은 결과로 미루어 보아 칼슘과 키토산의 첨가는 유산균 강화 굴 식해의 냉장 저장 중 유산균의 생육 억제에 기여하여 과발효를 억제 가능하다고 판단되었고, 그 정도는 산도조절제의 첨가 농도가 높을수록 컸으나, 첨가 농도에 따른 차이의 경우 미미하였다.

[0154] **7-4. 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해의 유산균 수 변화**

[0155] 유산균 발효 후 키토산 및 칼슘이 0.5%:1.0% 또는 1.0%:2.0%의 농도로 혼합된 산도조절제를 첨가하여 유산균 강화 굴 식해를 제조하고, 실시예 6의 방법으로 동결 및 해동 후 냉장한 다음 냉장 기간에 따른 유산균 수 변화를 측정하였다.

[0156] 그 결과, 도 13에 나타낸 바와 같이 냉장 저장 중 대조구의 유산균 수는 해동 직후 8.09 Log CFU/g이었고, 이후

계속적으로 증가하다가 저장 5일째 9.09 Log CFU/g로 최고치를 나타내었으며, 이후 감소하여 7일째 8.68 Log CFU/g을 나타내었다. 냉장 저장 중 저농도(칼슘 1.0%와 키토산 0.5%) 및 고농도(칼슘 1.0%와 키토산 0.5%) 산도조절제 첨가 유산균 강화 굴식해 간의 경우 해동 직후 각각 7.47 Log CFU/g 및 7.10 Log CFU/g이었고, 저장 1일째 다소 감소하여 각각 7.37 Log CFU/g 및 6.70 Log CFU/g이었으며, 이후 계속적으로 증가하여 저장 10일째 각각 9.08 Log CFU/g 및 8.56 Log CFU/g이었다. 칼슘과 키토산의 첨가는 유산균 강화 굴 식해의 냉장 저장 중 유산균의 생육 억제에 기여하였으며, 그 정도는 산도조절제의 첨가 농도가 높을수록 컸다.

[0158] **7-5. 관능평가**

[0159] 상기 실시예 6과 동일한 방법으로 관능평가를 실시하였다. 이때 산도조절제 무첨가 굴 식해(대조구)의 해동 직후(0일째)의 신선한 정도를 5점으로 하고, 이보다 신선도가 저하될수록 4-1점으로 평가하였다.

[0160] 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해의 관능 평가 결과, 도 14에 나타낸 바와 같이 산도조절제 무첨가 유산균 강화 굴 식해는 해동 직후 5.0점이었고, 냉장 저장 중 감소하여 저장 2일째 3.8점이었으며 이후 3.0점 이하로 급격히 감소하였다. 따라서, 산도조절제 무첨가 유산균 강화 굴 식해는 해동 후 냉장고에서 2일 이내에 모두 소비하여야 할 것으로 판단되었다. 이에 반하여 산도조절제 첨가(저농도의 경우 0.50%:1.00%, 고농도의 경우 1.00%:2.00%) 유산균 강화 굴 식해의 관능적 평가는 해동 직후 모두 신선한 것으로 나타나 평점이 해동 직후와 저장 1일째 모두 5.0점이었고, 저장 2일째 각각 4.9점 및 5.0점, 이후 감소하여 저장 7일째 각각 3.5점 및 3.8점, 저장 8일째 각각 2.9점 및 3.0점을 나타내었다. 따라서, 유산균 강화 굴 식해의 해동 후 냉장 저장 중 소비기한은 산도조절제 무첨가 굴 식해의 경우 2일로 판단되었고, 산도조절제 첨가 식해의 경우 첨가 농도에 관계없이 모두 7일로 판단되어, 안전계수를 0.9로 한 산도조절제 첨가에 의한 소비기한(7일 x 0.9 =6.3일)이 6일 연장되었다.

[0162] **<실시예 8> 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해의 식품 특성**

[0163] **8-1. 일반성분, pH, 염도 및 에너지**

[0164] 키토산 및 칼슘이 0.5%:1.0%로 포함된 산도조절제를 첨가한 유산균 강화 굴 식해와 시판 어리굴젓(대조구)의 일반성분, pH, 염도 및 에너지를 비교 분석하였다. 일반성분의 분석을 위한 검체는 굴 식해의 내용물로 하여 식품공전(MFDS, 2021)에서 제시한 방법(제8. 일반시험법 2. 식품성분시험법 2.1 일반성분시험법)에 따라 분석하였다. pH는 내용물을 검체로 하여 식품공전(MFDS, 2020)에서 언급한 방법(제8. 일반시험법 6. 식품별 규격 확인 시험법)에 따라 측정하였다. 염도의 검체는 굴 식해의 내용물로 하였다. 염도의 측정은 식품공전(MFDS, 2021, 제 8. 일반시험법 2. 식품성분시험법 2.2 미량일반성분시험법 2.2.1 무기질 2.2.1.5 식염)에서 언급한 회화법으로 실시하였다. 굴 식해의 에너지 환산은 일반성분의 분석 자료를 토대로 이들의 FAO/WHO 에너지 환산계수(RDA, 2016)를 적용하여 [(단백질 함량 × 4.27) + (지방 × 9.02) + (탄수화물 × 3.87)]로 계산하였다.

[0166] 그 결과, 표 8에 나타낸 바와 같이 굴 가공품 100 g 당의 일반성분 함량은 수분이 각각 74.3 g 및 68.2 g, 조단백질이 각각 8.1 g 및 9.4 g, 조지방이 각각 2.9 g 및 2.8 g, 회분이 3.1 g 및 3.3 g으로, 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해가 대조구인 어리굴젓에 비하여 유의적으로 조단백질의 경우 높았고, 수분의 경우 낮았으며($P<0.05$), 조지방과 회분의 경우 유의적 차이가 없었다($P>0.05$). 이와 같이 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해와 시판 어리굴젓 간의 일반성분 함량에서 차이가 있는 것은 주원료인 양식산 굴의 생산 장소, 시기 및 크기 차이 이외에도 제품의 제조를 위한 배합비의 차이 때문이라 판단되었다.

[0167] 또한, 굴 가공품의 pH는 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해가 5.87로, 시판 어리굴젓의 5.59에 비하여 높았는데, 이는 두 제품 간의 주원료 굴의 신선도뿐만이 아니라 원·부재료의 배합비 차이, 유산균의 농도 및 발효의 정도 차이 때문이라 판단되었다. 굴 가공품 100 g 당의 염도는 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해가 2.1 g으로, 시판 어리굴젓의 2.4 g에 비하여 낮았는데, 이는 두 제품의 제조를 위한 배합비 차이 때문이라 판단되었다.

[0168] 또한, 일반성분 함량을 토대로 산출한 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해의 100 g 당 에너지는 각각 128.5 kcal으로, 시판 어리굴젓의 105.6 kcal에 비하여 높았는데 이는 조단백질, 조지방 및 탄수화물과 같은 칼

로리 전환 가능한 유기성분의 함량 차이 때문이라 판단되었다.

표 8

[0170]

제품	일반성분 (g/100 g)									pH	염도 (g/100 g)		에너지 (kcal/100 g)
	수분		조단백질		조지방		회분		탄수화물				
시판 어리굴젓	74.3	±0.3	8.1	±0.0	2.9	±0.2	3.1	±0.1	11.6	5.60	2.4	±0.1	105.6
산도조절제 첨가 유산균 강화 굴식해	68.2	±0.2	9.4	±0.0	2.8	±0.1	3.3	±0.1	16.3	5.87	2.1	±0.0	128.5

[0172] **8-2. 관능 특성(유리아미노산 및 맛값)**

[0173] 키토산 및 칼슘이 0.5%:1.0%로 포함된 산도조절제를 첨가한 유산균 강화 굴 식해 및 시판 어리굴젓의 유리아미노산은 식품공전(MFDS, 2021, 제8. 일반시험법, 2. 식품성분시험법, 2.1 일반성분시험법, 2.1.3 질소화합물, 2.1.3.3 아미노산)에 고시되어 있는 방법으로 실시하였다. 키토산 및 칼슘이 0.5%:1.0%로 포함된 산도조절제를 첨가한 유산균 강화 굴 식해 및 시판 어리굴젓 15 g에 20% trichloroacetic acid (TCA) (w/v) 20 mL를 가하고 10분간 교반 및 원심분리(9,400 × g, 20분)한 다음, 10% TCA (w/v)로 앞의 과정을 2회 반복 후 100 mL로 정용하여 제조하였다. 전처리액 100 mL 중 80 mL를 분액깔대기에 취하고, 동량의 에테르를 사용하여 TCA 제거 공정을 4회 반복한 후, 이를 농축 및 lithium citrate buffer (pH 2.2)로 25 mL로 정용하였다. 유리아미노산의 정량은 일정량의 분석용 시험용액을 13 mm syringe filter (PN6054567, Pall Co., Korea)로 필터링하여 아미노산 자동분석기(Pharmacia Biotech Biochrom 30, Biochrom Ltd., England)로 분석하였다.

[0174] 맛값(Taste value)는 유리아미노산 함량에 대하여 Kato et al. (1989)이 제시한 유리아미노산의 맛에 대한 역치(taste threshold)를 고려하여 나타낸 값으로, Kang et al. (2015)이 제시한 방법과 같이 계산하여 나타내었다.

[0175] 키토산 및 칼슘이 0.5%:1.0%로 포함된 산도조절제를 첨가한 유산균 강화 굴 식해와 시판 어리굴젓의 유리아미노산을 분석한 결과, 표 9에 나타낸 바와 같이 산도조절제가 첨가된 유산균 강화굴 식해가 33종이 동정되었고, 이는 시판 어리굴젓의 35종에 비하여 낮았다. 그러나, 굴 가공품 100 g 당의 유리아미노산 총 함량은 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해의 경우 3,458.7 mg으로, 시판 어리굴젓의 3,363.4 mg에 비하여 높았다.

표 9

[0177]

맛성분	시판 어리굴젓		산도조절제 첨가 유산균 강화 굴식해	
Phosphserine	7.6	(0.2)	9.7	(0.3)
Taurine	878.9	(26.1)	926.9	(26.8)
Phenylethylamine	15.9	(0.5)	28.6	(0.8)
Urea	478.9	(14.2)	517.7	(15.0)
Aspartic acid	54.0	(1.6)	49.4	(1.4)
Hyproxyproline	흔적량		흔적량	
Threonine	31.4	(0.9)	25.9	(0.8)
Serine	37.4	(1.1)	31.1	(0.9)
Asparagine	5.2	(0.2)	흔적량	
Glutamic acid	127.8	(3.8)	264.4	(7.6)
Sarcosine	9.7	(0.3)	4.3	(0.1)
α-Aminoadipic acid	2.5	(0.1)	1.5	(0.1)
Proline	71.1	(2.1)	61.6	(1.8)
Glycine	493.1	(14.7)	589.3	(17.0)
Alanine	652.6	(19.4)	668.0	(19.3)
Cituline	2.4	(0.1)	흔적량	

α-Aminobutyric acid	2.3	(0.1)	1.0	(흔적)
Valine	39.5	(1.2)	22.2	(0.7)
Cysteine	2.1	(0.1)	1.8	(0.1)
Methionine	24.3	(1.0)	11.6	(0.3)
Cystathionine-1	0.7	(흔적)	1.0	(흔적)
Isoleucine	29.2	(0.9)	14.1	(0.4)
Leucine	49.9	(1.5)	22.1	(0.6)
Tyrosine	28.3	(0.8)	15.7	(0.5)
β-Alanine	11.7	(0.3)	16.5	(0.5)
Phenylalanine	31.4	(0.9)	13.8	(0.4)
α-Aminoisobutyric acid	-		0.6	(흔적)
Homocystine	14.4	(0.4)	-	
γ-Aminobutyric acid	8.2	(0.2)	17.4	(0.5)
Ethanolamine	2.8	(0.1)	3.1	(0.1)
Hydroxylysine	3.7	(0.1)	0.4	(흔적)
Ornithine	5.3	(0.2)	3.6	(0.1)
Lysine	56.9	(1.7)	37.1	(1.1)
1-Methylhistidine	1.8	(0.1)	0.3	(흔적)
Histidine	14.0	(0.4)	11.3	(0.3)
Tryptophan	94.5	(2.8)	22.9	(0.7)
3-Methylhistidine	-		-	
Anserine	-		-	
Carnosine	-		-	
Arginine	73.9	(2.2)	63.8	(1.8)
합계	3,363.4	(100.0)	3,458.7	(100.0)

[0178] -: 검출안됨

[0179] 흔적량 or 흔적: detection of less than 1.0 mg/100 g.

[0181] 일반적으로 식품의 맛은 유리아미노산에 의하여 크게 영향을 받고, 그 강도는 함량도 고려되어야 하나, 이보다 맛의 역치(맛을 느낄 수 있는 최저 농도)를 우선적으로 고려하여야 한다. 이러한 일면에서 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해의 맛을 맛값(유리아미노산 함량/유리아미노산의 맛에 대한 역치)로 살펴보고, 이를 시판 어리굴젓과 비교하였다.

[0182] 그 결과, 표 10에 나타낸 바와 같이 총 맛값은 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해의 경우 77.84로, 대조구(시판 어리굴젓)의 64.15에 비하여 확연히 높았다. 이와 같이 굴 가공품의 총 맛값은 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해가 무발효 어리굴젓보다 높은 것은 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해의 경우 유산균 등에 의하여 발효로 인하여 단백질 등이 분해되어 저분자화되었기 때문이라 판단되었다.

표 10

[0184]

아미노산	맛 역치 (mg/100 g)	시판 어리굴젓	산도조절제 첨가 유산균 강화 굴식해
아스파르트산	3	18.00	16.47
트레오닌	260	0.12	0.10
세린	150	0.25	0.21
글루탐산	5	25.56	52.88
프로린	300	0.24	0.21
글리신	130	3.79	4.53
알라닌	60	10.88	0.11
발린	40	0.99	0.56
메티오닌	30	0.81	0.39
이소류신	90	0.32	0.16
류신	190	0.26	0.12

페닐알라닌	90	0.35	0.15
라이신	50	1.14	0.74
히스티딘	20	0.70	0.57
아르기닌	100	0.74	0.64
합계	-	64.15	77.84

[0186] **8-3. 관능특성(냄새)**

[0187] 키토산 및 칼슘이 1:2의 중량비로 포함된 산도조절제를 첨가한 유산균 강화 굴 식해의 냄새 특성을 휘발성염기질소와 냄새강도로 측정한 다음, 시판 어리굴젓과 비교하였다. 휘발성염기질소의 분석을 위한 검체는 굴 식해의 내용물로 하였다. 휘발성염기질소 함량의 측정은 식품공전(MFDS, 2021)에서 언급한 콘웨이유닛(Conway unit)을 사용하는 미량확산법(제8. 일반시험법 6. 식품별 규격 확인 시험법)으로 측정하였다. 냄새강도의 검체는 굴 식해의 내용물로 하였고, 측정을 위한 전처리는 코니칼 튜브(50 mL conical tube, 30×150 mm, SPL LIfe Science Co. Ltd., Gyeonggi, Korea)에 마쇄한 명란 향미유 담금 통조림 약 5 g을 넣은 것으로 하여 Kang et al. (2014)이 언급한 방법에 따라 실시하였다. 즉, 마쇄 내용물을 넣어둔 코니칼 튜브에 냄새강도기 측정기(Odor concentration meter, XP-329R, New Cosmos Electric Co. Ltd., Osaka, Japan)의 흡입구를 넣은 다음, 냄새가 휘발되어 나가지 않게 파라필름(parafilm)으로 밀봉하여 냄새강도기로 측정하였다. 이때, mode는 batch로 설정하였고, 단위는 냄새 강도(level)로 나타내었다.

[0188] 그 결과, 도 15에 나타낸 바와 같이 굴 가공품 100 g 당의 휘발성염기질소 함량과 냄새강도는 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해가 각각 13.8 mg 및 1,562.3 level으로, 시판 어리굴젓의 각각 11.4 mg 및 935.4 level에 비하여 유의적으로 높아($P<0.05$), 냄새가 강할 것으로 추정되었다. 이와 같은 결과는 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해의 경우 발효에 의하여 다양한 풍미를 나타내나, 시판 어리굴젓의 경우 양념으로 조미하여 제조함으로 인하여 양념에 의한 냄새가 주이었기 때문이라 판단되었다.

[0190] **8-4. 관능평가**

[0191] 시판 어리굴젓의 패널에 의한 관능적 특성(색, 맛, 향, 조직감 및 종합적 기호도)을 기준점인 5점으로 하고, 키토산 및 칼슘이 1:2의 중량비로 포함된 산도조절제를 첨가한 유산균 강화 굴 식해의 패널에 의한 관능적 특성이 이보다 우수한 경우 6-9점으로, 이보다 열악한 경우 1-4점으로 하여 관능평가를 실시하였다.

[0192] 그 결과, 산도조절제를 첨가한 유산균 강화 굴 식해의 관능평점은 색이 6.4점, 맛이 6.0점, 냄새가 7.1점, 조직감이 6.9점, 종합적 기호도가 7.6점으로 모든 항목에서 시판 어리굴젓에 비하여 유의적으로 우수하였다 ($P<0.05$).

표 11

[0194]

수산발효식품	관능적 특성(점)									
	색		맛		향		식감		종합적 기호도	
시판 어리굴젓	5.0	±0.0	5.0	±0.0	5.0	±0.0	5.0	±0.0	5.0	±0.0
산도조절제 첨가 굴 식해	6.4	±0.2	6.0	±0.4	7.1	±0.4	6.9	±0.2	6.8	±0.3

[0196] **<실시예 9> 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해의 기능 특성**

[0197] 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해의 기능 특성은 DPPH 라디칼 소거 활성, 안지오텐신 I 전환효소(Angiotensin-I converting enzyme, ACE) 저해 활성, 아질산염 소거활성 및 항균활성 등에 대하여 살펴보았다. ACE 저해활성은 Horiuchi (1982)의 방법에 따라, DPPH 라디칼 소거활성은 Blois와 Hatano(1989)의 방법에 따라, 아질산염 소거활성은 Kato (1987)의 방법에 따라 분석하였다. 항균활성은 Kim (1999)이 언급한 방법에 따라 페이퍼 디스크(paper disk) 법으로 실시하였다. 굴 식해의 항균활성을 살펴볼 목적으로 식중독에 크

게 문제가 되는 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* 및 *Vibrio parahaemolyticus*와 같은 4종의 균주를 각각 도말된 평판 배지 위에 6 ㎜ 직경의 페이퍼 디스크(paper disk) (Advantec, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)를 놓고 추출물을 40 μL 씩 일정하게 가한 후에 37℃에서 24시간 동안 배양하여 생육 저지환의 직경을 측정하였다. 이때, 항균 활성은 시료에 의하여 생성된 생육 저지환의 직경 크기(㎜)로 나타내었다.

[0198] 그 결과, 도 16에 나타낸 바와 같이 굴 가공품의 DPPH 라디칼 소거활성은 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해가 85.3%로 나타나, 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해의 경우 항산화 효과를 가지는 것을 확인하였다.

[0199] 굴 가공품의 안지오텐신 I 전환효소(Angiotensin-I converting enzyme, ACE) 저해 활성은 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해가 52.3%로 시판 어리굴젓의 51.3%로 나타났다. 따라서, 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해를 적정량 섭취하는 경우 항고혈압능을 기대할 수 있다.

[0200] 굴 가공품의 아질산염 소거 활성은 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해가 43.7%로, 시판 어리굴젓의 27.6%에 비하여 유의적으로 높았다($P<0.05$). 이상의 결과로 미루어 보아 산도조절제가 첨가된 유산균 강화 굴 식해는 아질산염에 의한 니트로사민(nitrosamine) 등의 생성에 의한 질병이 우려되는 햄, 소시지 및 베이컨 등과 같은 축육 가공품 등의 섭취 시 함께 식용하는 경우 니트로사민(nitrosamine)에 의한 질병을 다소 억제할 수 있을 것으로 판단되었다.

[0202] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상술한 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0204]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18974P

수탁일자 : 20220106

도면

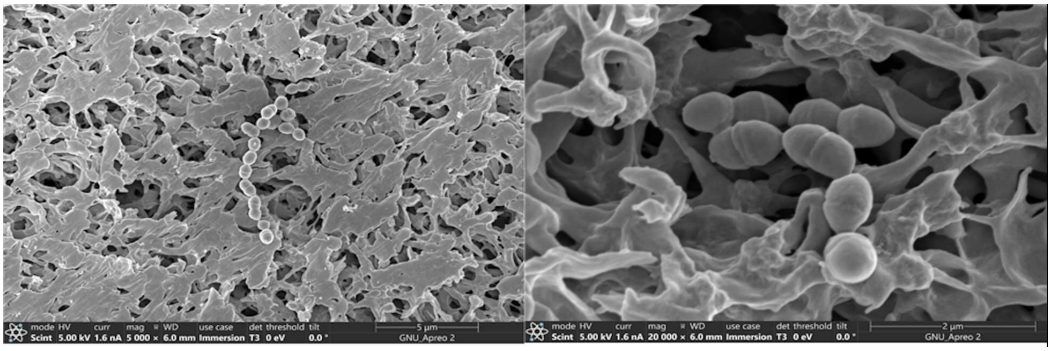
도면1

개별급속냉동 굴

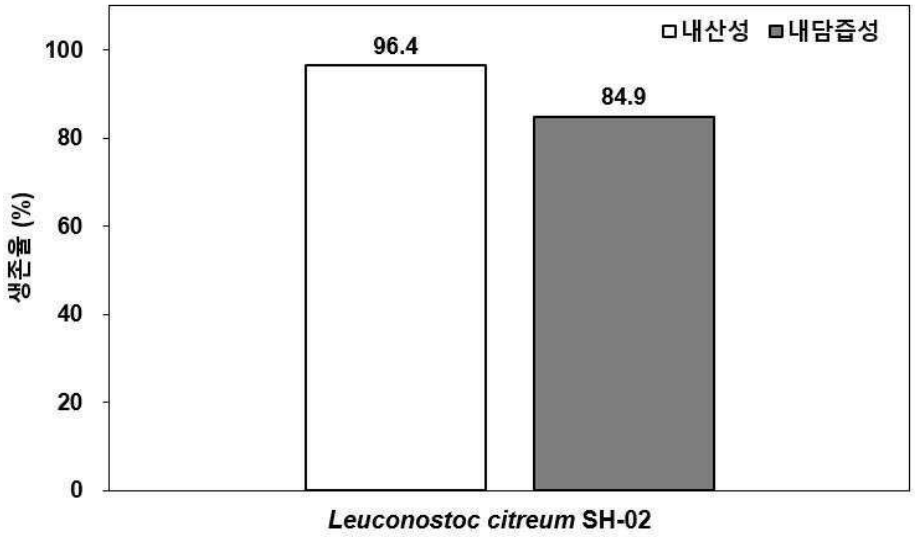
- 해동
- 3분간 세척
- 탈수
- 50℃에서 60분간 건조
- 절인무, 채썬 무, 소금, 설탕, 조밥, 고춧가루, 다진 마늘, 다진 생강, 물엿, 청주, 글루탐산나트륨(MSG), 참깨
- 유산균 첨가
- 10±2℃에서 2일간 발효
- 산도조절제(키토산 및 칼슘) 첨가
- Filling in a container
- 밀봉
- 18℃이하에서 냉동

유산균 강화 굴 식해

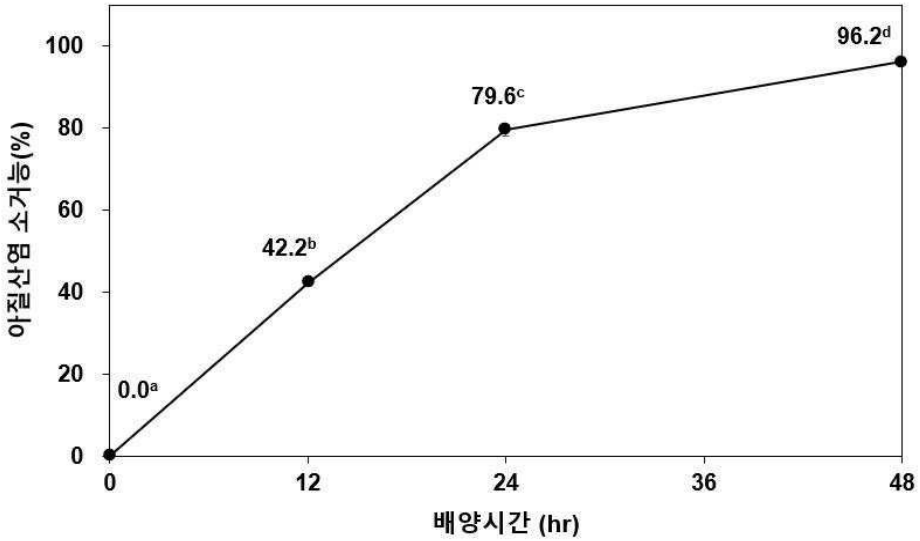
도면2



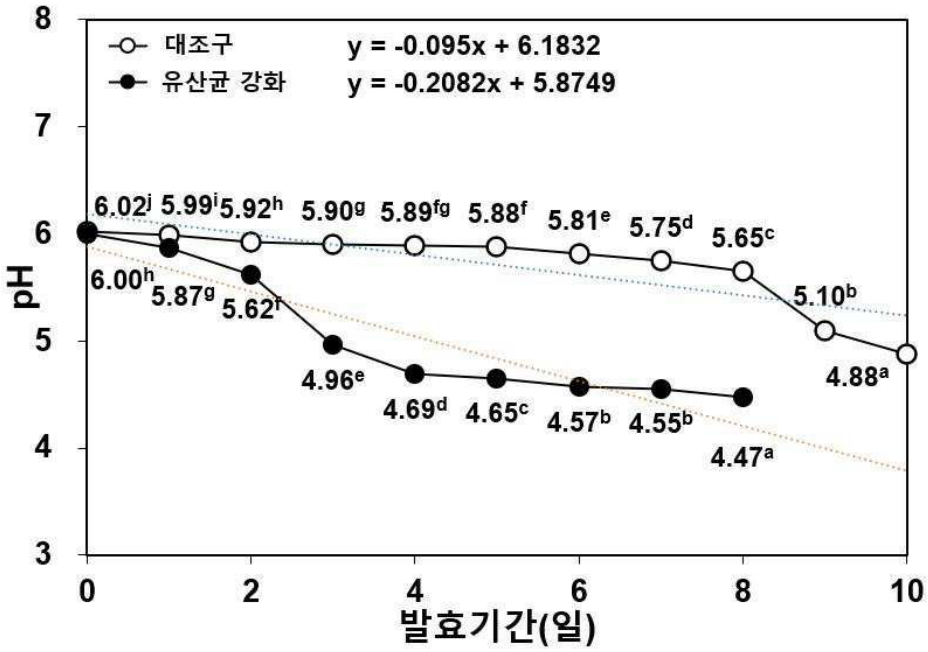
도면3



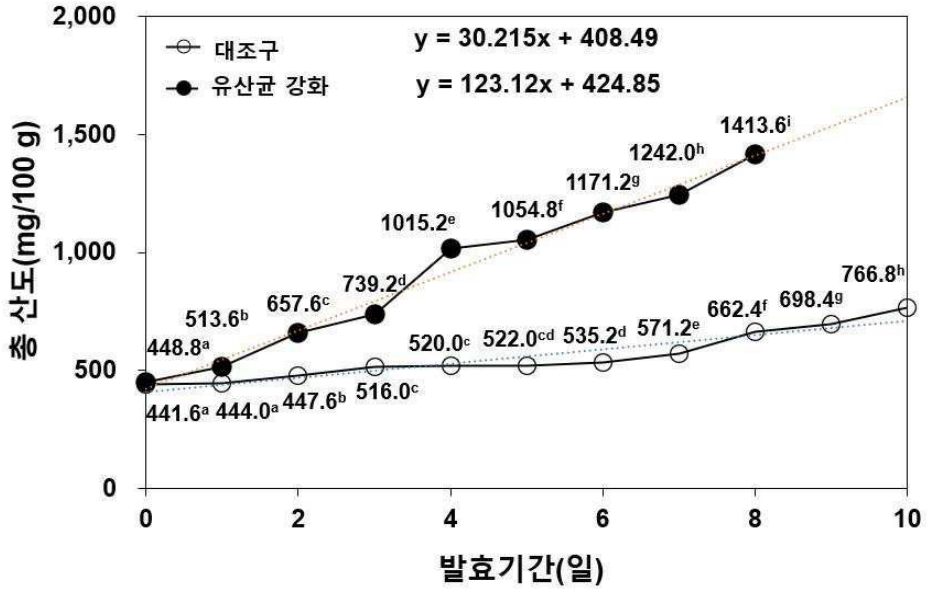
도면4


아질산염 소거능(%)
100
80
60
40
20
0
0.0a
42.2b
79.6c
96.2d
0
12
24
36
48
배양시간 (hr)

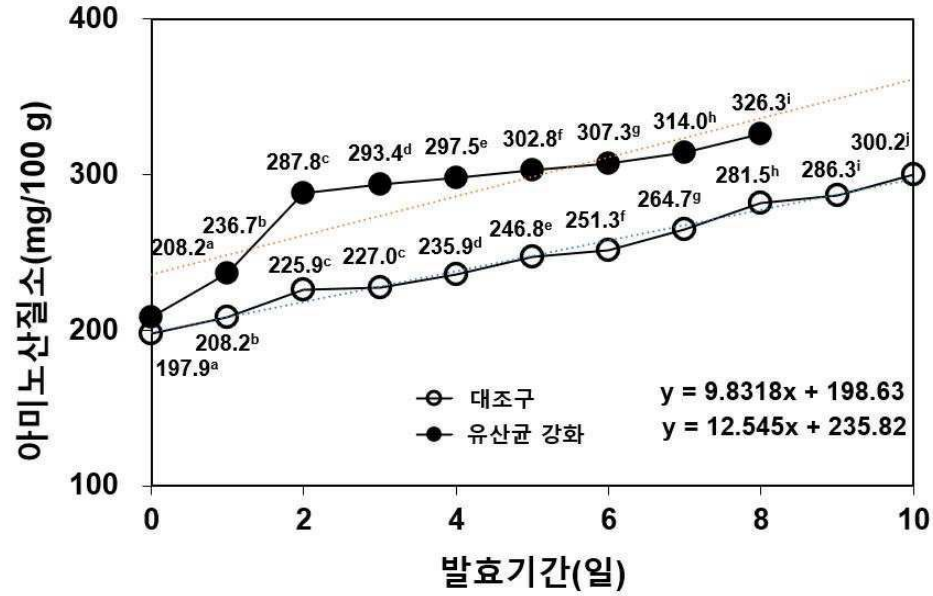
도면5


대조구
y = -0.095x + 6.1832
유산균 강화
y = -0.2082x + 5.8749
pH
8
7
6
5
4
3
6.02j 5.99i 5.92h 5.90g 5.89fg 5.88f 5.81e 5.75d 5.65c 5.10b 4.88a
6.00h 5.87g 5.62f 4.96e 4.69d 4.65c 4.57b 4.55b 4.47a
0
2
4
6
8
10
발효기간(일)

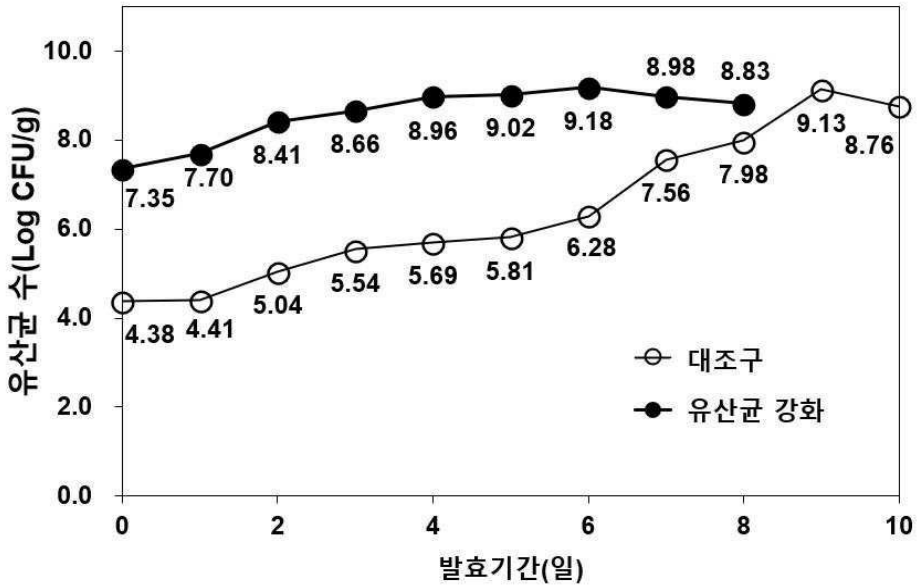
도면6


2,000
1,500
1,000
500
0
총 산도(mg/100 g)
대조구
유산균 강화
y = 30.215x + 408.49
y = 123.12x + 424.85
1413.6i
1242.0h
1171.2g
1054.8f
1015.2e
739.2d
657.6c
513.6b
448.8a
766.8h
698.4g
662.4f
571.2e
535.2d
522.0cd
520.0c
516.0c
447.6b
444.0a
441.6a
0
2
4
6
8
10
발효기간(일)

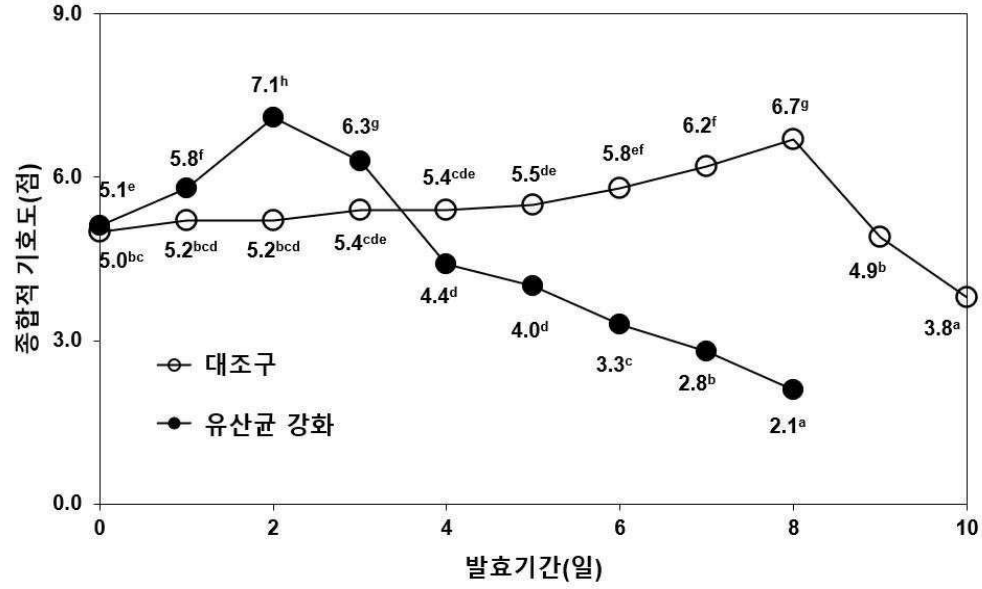
도면7


400
300
200
100
아미노산질소(mg/100 g)
326.3i
314.0h
307.3g
302.8f
297.5e
293.4d
287.8c
236.7b
208.2a
300.2j
286.3i
281.5h
264.7g
251.3f
246.8e
235.9d
227.0c
225.9c
208.2b
197.9a
대조구
유산균 강화
y = 9.8318x + 198.63
y = 12.545x + 235.82
0
2
4
6
8
10
발효기간(일)

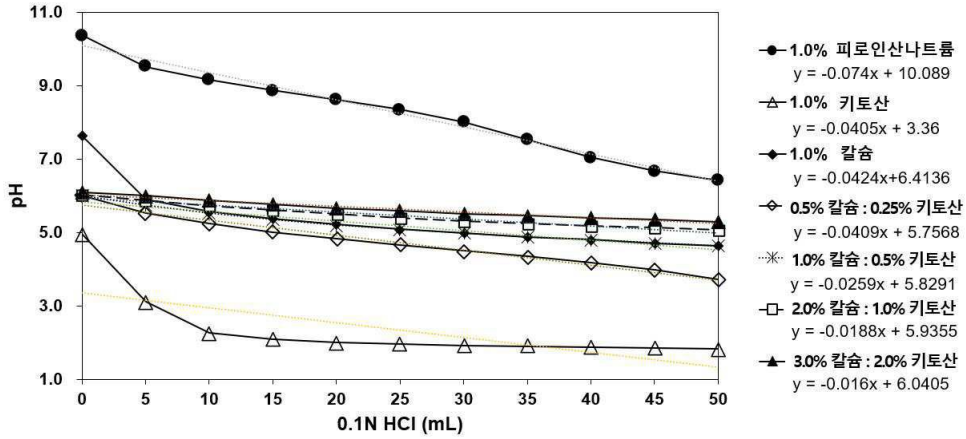
도면8


유산균 수(Log CFU/g)
발효기간(일)
대조구
유산균 강화
7.35
7.70
8.41
8.66
8.96
9.02
9.18
8.98
8.83
4.38
4.41
5.04
5.54
5.69
5.81
6.28
7.56
7.98
9.13
8.76

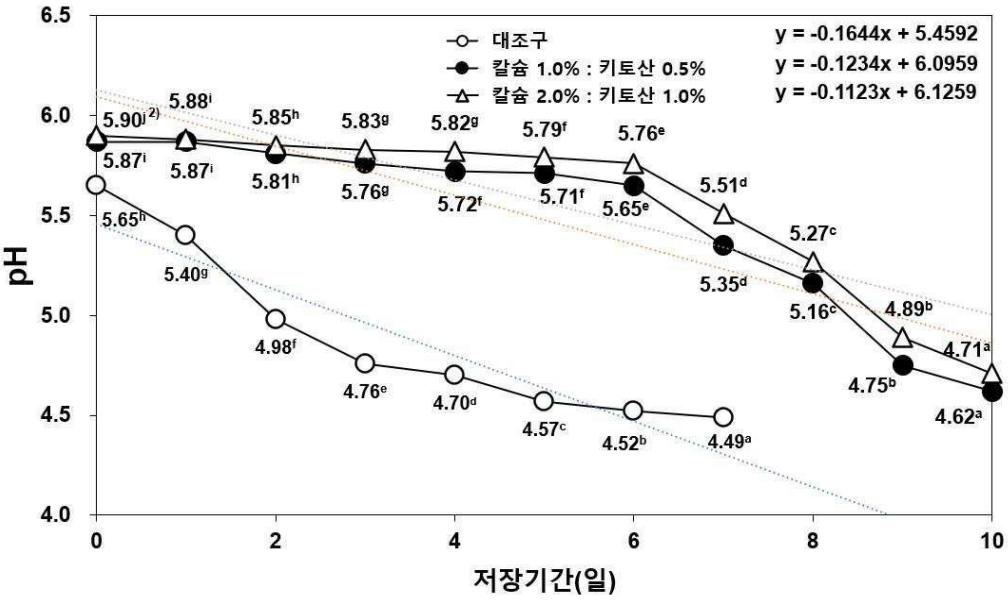
도면9


종합적 기호도(점)
발효기간(일)
대조구
유산균 강화
5.1e
5.8f
7.1h
6.3g
5.4cde
5.5de
5.8ef
6.2f
6.7g
5.0bc
5.2bcd
5.2bcd
5.4cde
4.4d
4.0d
3.3c
2.8b
2.1a
4.9b
3.8a

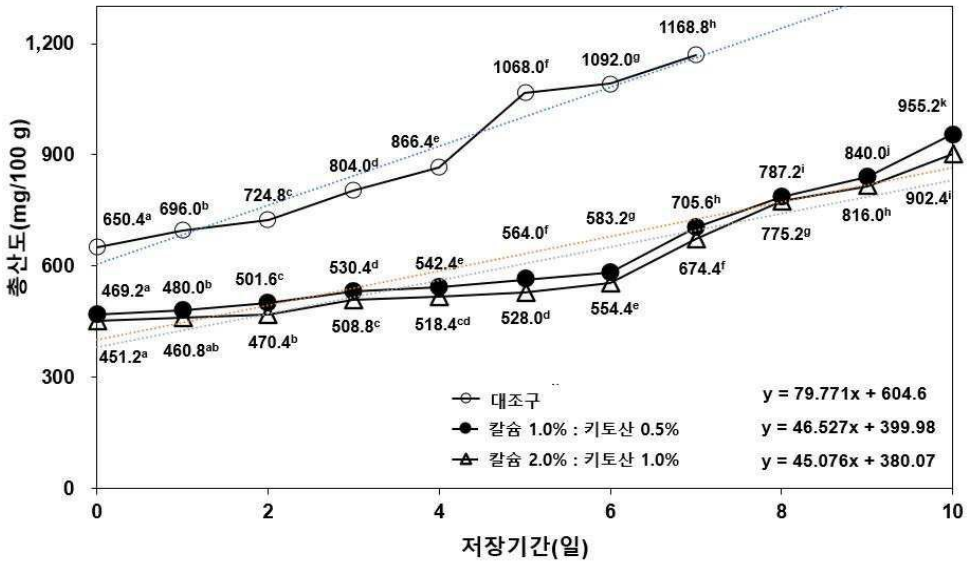
도면10


11.0
9.0
7.0
5.0
3.0
1.0
pH
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
0.1N HCl (mL)
1.0% 피로인산나트륨
y = -0.074x + 10.089
1.0% 키토산
y = -0.0405x + 3.36
1.0% 칼슘
y = -0.0424x+6.4136
0.5% 칼슘 : 0.25% 키토산
y = -0.0409x + 5.7568
1.0% 칼슘 : 0.5% 키토산
y = -0.0259x + 5.8291
2.0% 칼슘 : 1.0% 키토산
y = -0.0188x + 5.9355
3.0% 칼슘 : 2.0% 키토산
y = -0.016x + 6.0405

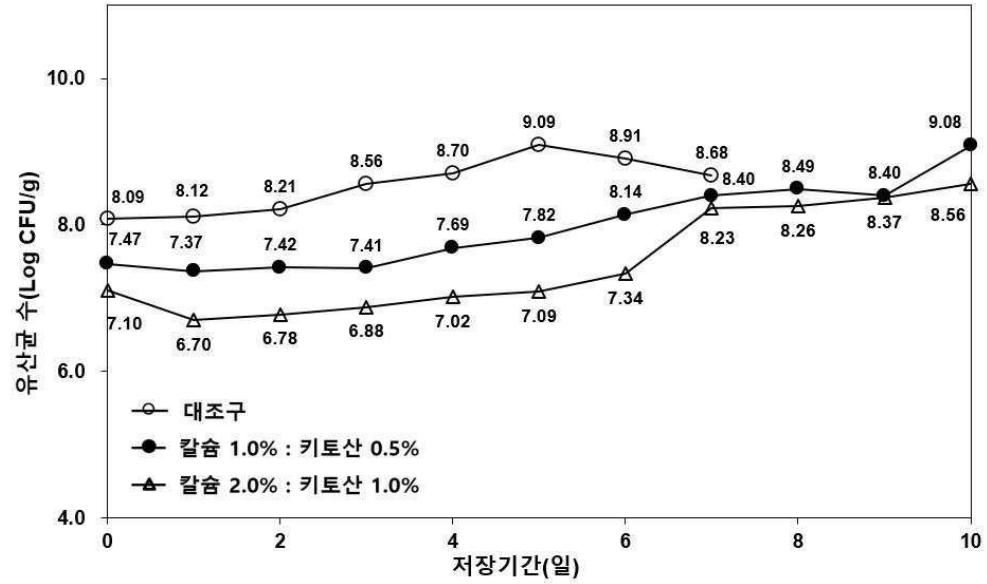
도면11


6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
pH
0
2
4
6
8
10
저장기간(일)
대조구
칼슘 1.0% : 키토산 0.5%
칼슘 2.0% : 키토산 1.0%
y = -0.1644x + 5.4592
y = -0.1234x + 6.0959
y = -0.1123x + 6.1259
5.90j 2)
5.88i
5.85h
5.83g
5.82g
5.79f
5.76e
5.87i
5.87i
5.81h
5.76g
5.72f
5.71f
5.65e
5.51d
5.27c
5.65h
5.40g
4.98f
4.76e
4.70d
4.57c
4.52b
4.49a
5.35d
5.16c
4.89b
4.71a
4.75b
4.62a

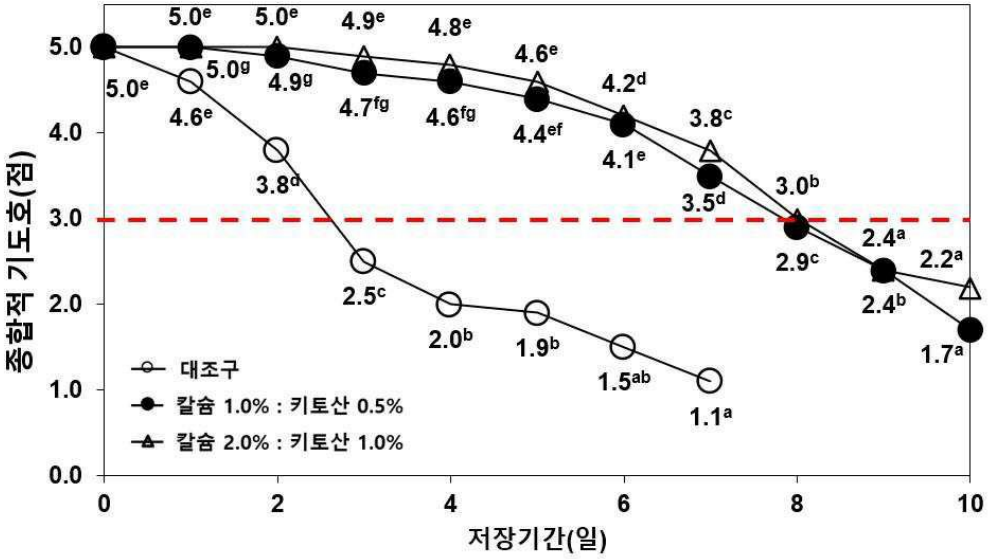
도면12


총산도(mg/100 g)
저장기간(일)
대조구
칼슘 1.0% : 키토산 0.5%
칼슘 2.0% : 키토산 1.0%
y = 79.771x + 604.6
y = 46.527x + 399.98
y = 45.076x + 380.07

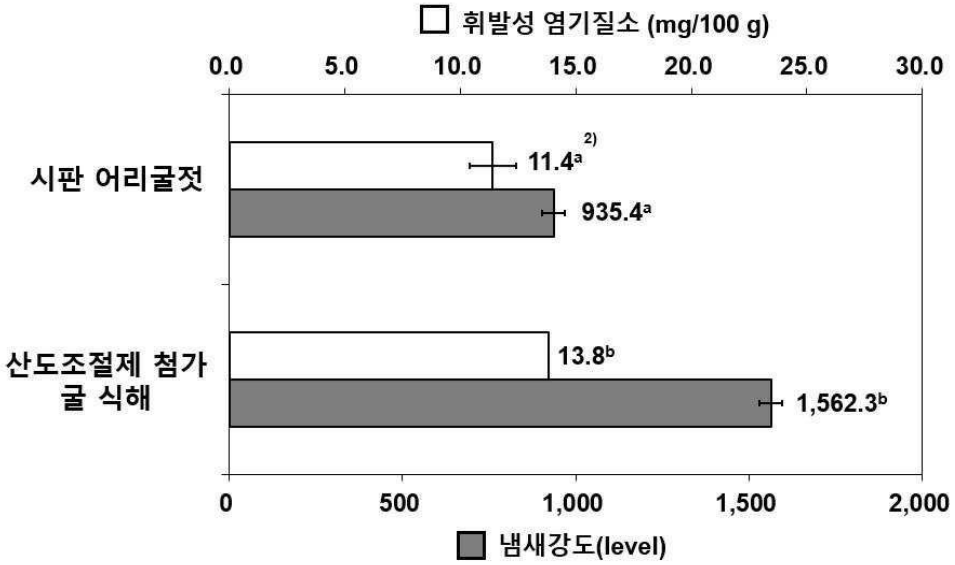
도면13


유산균 수(Log CFU/g)
저장기간(일)
대조구
칼슘 1.0% : 키토산 0.5%
칼슘 2.0% : 키토산 1.0%

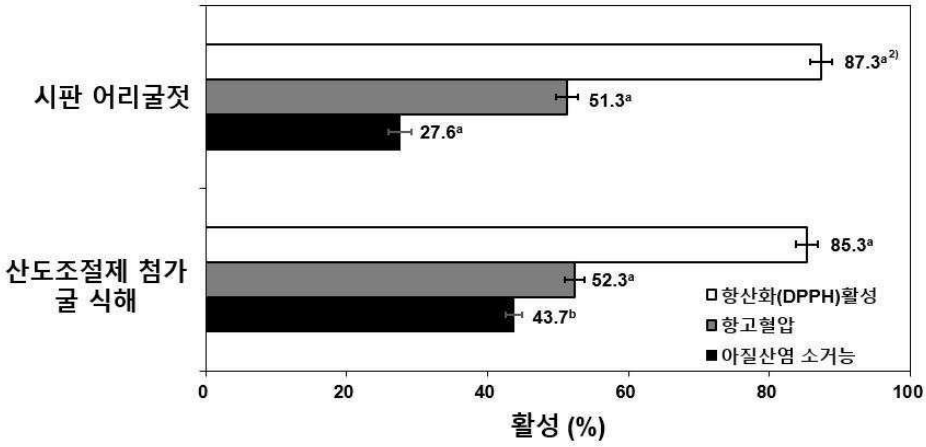
도면14


종합적 기도호(점)
저장기간(일)
대조구
칼슘 1.0% : 키토산 0.5%
칼슘 2.0% : 키토산 1.0%

도면15


휘발성 염기질소 (mg/100 g)
시판 어리굴젓
산도조절제 첨가 굴 식해
냄새강도(level)

도면16


시판 어리굴젓
산도조절제 첨가 굴 식해
87.3a2)
51.3a
27.6a
85.3a
52.3a
43.7b
항산화(DPPH)활성
항고혈압
아질산염 소거능
0
20
40
60
80
100
활성 (%)