

멸치 Vinegar 절임시의 산도와 효소 활성

河 奉 錫
(濟州大學)

ENZYME ACTIVITY AND ACIDITY IN VINEGAR PICKLING OF ANCHOVY

by

Bong-Suk HA
(Cheju College)

The following results are obtained by experiment on the variation of enzyme activity during pickling anchovy (*Engraulis japonicus*) in vinegar.

- 1) Protease activity increased during brine-salting. It decreased for a short time by the addition of acetic acid and gradually changed at an invariable ratio during pickling.
- 2) Lipase activity decreased during brine salting but increased temporarily by the addition of vinegar, after this no fixed tendency could be observed during pickling whereas acid value obviously increased.
- 3) VBN (Volatile basic nitrogen) and NaCl content quickly increased during brine salting. During pickling VBN increased slowly while NaCl content scarcely varied.
- 4) The bacterial plate count decreased suddenly when the anchovy were placed in brine but it increased during brine salting and decreased again when anchovy were pickled and the number of count remained the same thereafter.
- 5) To maintain preservation effects, the acidity of the vinegar must be maintained more than 2% in the muscle.
- 6) Based on this experimental condition, it transpires that 8 days of immersion in brine produces sufficient salt concentration in the muscles. From the results of VBN, acidity, amino nitrogen, lipase activity, and organoleptic tests, the quality of pickle was still preserved after 47 days and taste of the pickle seemed best on the thirty second day of the storage.

서 언

다획 어종인 멸치(*Anchovy, Engraulis japonicus*)를 건제품 것갈 이외의 제품으로 해외에 수출하여 보자는 의도로, 구미 각국에서 청어, 대구, 꽁치, 멸치 등을 대상으로 하여 성행되고 있는 식초 절임의 제품화 시험이 국립수산진흥원에서 시도되었었다. 그 제조 원리는 vinegar 중에 있는 활성 물질인 acetic acid가 방부성을 부여

하는 한편 혼유하고 있는 소량의 여러 가지 유기 화합물로 인한 맛, 색, 향기등을 달리 하게 되는 것이다. 그리고 15%의 식초를 가한 것은 세균의 발육을 정지시키고 저온 저장하면 1년 이상 저장할 수 있다(Tressler, 1951). 저자는 멸치 이용 확대 방안의 하나로, cider vinegar를 사용한 절임 제품의 제조 및 저장 중의 효소 화학적 변화에 대하여 실험하였다. 본 실험을 지도하여 주신 건 부산수산대학 신필현 교수, 정병선 박사에게 깊은 사의를 표하며 실험에 협조해 주신 국립수산진흥원 박동근 과장 그 밖에 여러 과원에 깊은 감사사를 드리는 바이다.

실험 방법 및 결과

1. 시 료

1964년 10월8일 동래군 기장면 죽성리 앞바다 600m해역(92/5해구)에서 자망으로 어획한 사후 17시간 지난 멸치중에서 머리, 내장의 파손이 없는 것을 골라 빙장하여 시료에 공하였다.

생시료의 일반 성분은 수분 67.24%, 지방 6.22%, 단백질 25.48% 였다.

2. 시료의 처리

전술한 신선한 멸치를 10ℓ의 수도수에 식염 9.7kg을 용해시킨 포화 식염수에 11일간 염장하였다가 내장, 머리, 비늘을 제거, 수세한 다음 물을 빼고 polyethylene 주머니에 넣고 작은 나무통에 담아서 따로 제조하였던 저온 예열한 cider vinegar를 채워서 5~25°C에서 저장하였다. cider vinegar의 제조(友田 et al., 1955)는 사과즙 15ℓ에 alcohol 200ml, acetic acid 90ml, K₂HPO₄ 3g, CaHPO₄ 3g, (NH₄)₃PO₄ 6g, 종초(발효초) 1500ml의 비율로 혼합한 것을 30°C에서 66일간 발효시킨 것 117ml에 생강 4.1g, 설탕 2700g, 丁香 30g, 肉豆蔻 29g, 桂皮 31g, 후추 15g, 小豆蔻 10g, 雀香 30g, 고추 2.2g을 각각 넣고 juice를 짜서 다시 위에서 발효 제조한 사과초로서 9ℓ로 정용하여 만들었다. 이것에 CH₃COOH를 첨가하여 산도(酸度) 약 6%가 되도록 하여 절임에 사용하였으며 이의 산도치는 Table 1과 같다.

Table 1. Acidity of Vinegar Used

	pH	3.38
酸	度	6.60%
糖	度	12.40

3. 측정법

(1) Lipase activity

효소액: 내장, 육을 따로 수세 후 마쇄하고 ether 처리하여 상온에서 건조한 것 약 21mg을 10ml의 glycerine을 합해서 4시간 교반하고 원심 분리한 상등액을 효소액으로 하였다(小野, 1934. 島田, 1935).

기질: olive superior oil을 사용하였다(小野, 1934. 島田, 1935).

측정법: glycerine 침출 효소액 1ml에 물을 가해서 30ml로 하고, 이 회석액의 10ml를 活檢付 25ml용 삼각플라스크에 취해서 olive oil 2.5ml 완충액(NH₄OH:NH₄Cl=1:2→pH=9.2~8.9) 2ml, 2% CaCl₂ 용액 0.5ml, 3% albumin 용액(보호교질) 0.5ml 등을 가한 혼액을 3분간 강열히 진탕한 후 olive oil을 분주하고 난 후부터 시간을 측정하여 30분간 되도록 30°C의 항온조에 방치한 후 빙상에서 96% alcohol로 125ml로 회석 정용하고 즉시 20ml의 ether를 가해서 thymolphthalein을 지시약으로 하여 N/10 KOH alcohol 용액으로 심청색이 될 때까지 적정하였다. 대조 시험은 효소액 대신에 같은 양의 물을 넣었다(井上, 1952).

효소 활성 표시법: 맹현치를 맨 값을 침출 효소액 10ml로 환산해서 소요 N/10 KOH alcohol 용액의 ml수로 표시하였다.

(2) Protease activity의 측정

효소액: 위에서와 같이 건조한 시료를 약 210mg 평취하여 100ml용 beaker에 glycerine 10ml와 toluene 몇 방울을 가하여 냉장고에 1주야 방치했다가 100ml로 회석 정용한 것을 원심 분리하여 상등액을 10ml씩 분취해서 효소액으로 제공하였다(柏田, 1952).

기질 : Casein 5g 을 12ml 의 1N-NaOH 와 소량의 물에 용해한 후 1N-HCl 로 중화하여 전체를 500ml 로 한다
 음 toluene 을 가하여 빙장하여 두고 사용하였다. 즉 1% casein 을 사용하였다.

측정법 : Field gross method(赤掘, 1954. 柏田, 1952)를 채용하였다. 즉 1% casein 용액 10ml 에 효소액 10ml, Meilvaine buffer 용액(M/5 Na₂HPO₄: M/10 citric acid=3.53ml:16.47ml→pH=7.0) 10ml 를 가한 것을 40°C 항온조에서 2시간 방치했다가 빙상에서 초산산성 5% tannic acid 용액 10ml를 가해서 여과하고 여액 모두를 취해서 상법에 의해서 단백질을 분해시키고 Parnas 질소 미량 증류 장치로 증류하였다.

효소 활성 표시법 : 맹험치를 맨 가용성 질소를 효소액 100ml 중에 있는 것으로 환산 표시하였다.

산도 : 상법(東京大, 1961)에 의하였다.

VBN정량 : Conway method(石板, 1961)에 의하였다.

Plate count(A.P.H.A. 1958, Tanner, 1944) : 육은 7~8마리를 멸균한 관 위에서 fillet로 한 후(평균 약 52.3g) blender에서 buffered dilution water 로 희석, 90초동안 같은 것을 plate count 에 제공하였고 vinegar 는 멸균한 petri dish 에 취하고 충분히 혼합한 다음 사용하였다. 그리고 Standard plate count agar 와 A.P.T. agar 의 두 배지를 사용하여 각각 32°C에서 3일간 20°C에서 5일간 배양한 후 count 하였다.

Amino-N 정량 : Formol 적정법(Harwitz, 1960)을 택하였다.

식염 함유량 : 간편법(天野 et al., 1950)을 택하였다.

pH 측정 : Beckman model H pH-meter 를 사용하였다.

산가 측정 : 상법(日本藥學會, 1956) 을 택하였다.

4. 결 과

실험 결과는 Table 2,3과 같다.

Table 2. Analytical Data of Fresh, Salted & Vinegar Pickled Anchovy During Storage

Condition Storage period (days)	Fresh				Salted				Pickled					
	1	4	7	10	2	4	7	10	16	25	32	47	54	60
	1	5	8	11	13	15	18	21	27	36	43	58	65	71
Lipase activity (N/10 KOH ml)	5.02 (8.13)	5.00 (4.62)	2.15 (5.29)	3.89 (6.24)	3.54	4.50	2.21	1.85	0.06	1.00	0.56	2.04	2.22	
Acid value	4.78	5.07	6.99				22.25		47.04	48.38	58.74	39.09	57.67	72.51
		(38.42)	(42.65)	(42.70)	(55.74)									
Protease activity (Soluble-N)	0 (1.61)	0.26 (2.50)	0.45 (3.03)	0.504 (5.92)	0.14	0.21	0.26	0.31	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Amino-N (mg %)	64	118.45	132.39	159.1	155.08	136.75	160.28	184.40	254.28	312.68	365.49		204.92	305.55
pH	6.36	6.30	6.20	6.22	4.40	4.55	4.52	4.52	4.68	4.70	4.63	4.68	4.75	4.71
					(4.19)	(4.36)	(4.49)	(4.45)	(4.50)	(4.79)	(4.67)	(4.70)	(4.75)	(4.73)
NaCl content														
% , dry base	6.33	27.52	29.58	29.58	30.15	26.14		22.45	20.25	19.24	18.32	19.40		22.86
% , acidity					2.39	1.99	2.26	2.34	1.47	1.61	1.67	2.05	1.62	1.90
					(2.59)	(2.49)	(2.32)	(2.28)	(2.23)	(1.98)	(1.91)	(2.15)	(1.62)	(1.54)
VBN (mg %)	7.67	12.27	15.33	16.87	9.20	9.97	11.88	11.50	9.58	11.50	12.65	13.80	16.45	16.87

Remark: ().....Lipase activity, acid value, protease activity of entrails
 ().....pH, acidity of extrates (vinegar)

Table 3. Result of Plate Count

Media	Incubation		Vinegar (Extracts)				Fish			
			at 32°C		at 20°C		at 32°C		at 20°C	
	Sta	APT	Sta	APT	Sta	APT	Sta	APT		
Fresh fish							500,000	250,000	1,200,000	490,000
Salted for 3 days							200,000	12,000	24,000	16,000
Salted for 7 days							40,000	30,000	58,000	46,000
Salted for 10 days							45,000	29,000	5,600	42,000
Pickled in vinegar for 1 day	<30	<30	<30	<30			350	300	400	<300
Pickled in vinegar for 2 days	<30	<30	<30	<30			<300	<300	<300	<300
Pickled in vinegar for 58 days	<30	<30	<30	<30			<300	<300	<300	<300

Remark: Sta...Standard plate count; APT...APT agar

고 찰

Protease activity 와 amino-N 와의 관계를 나타낸 곡선은 Fig.1 과 같다. 선어에서의 세균수가 brine-salting 함으로써 줄어든 것은 식염의 영향으로 세균이 이상 대사를 이르켰음에 기인하고 세균수의 감소에도 불구하고 amino N 가 증가하는 것은 틀림없이 protease 의 작용에서 오는 것이다. 이 사실은 長崎, 山本(1954)의 연구와 일치하였다.

염장하는 동안 protease 활성의 부활(賦活)은 식염의 삼투에서 오는 것이고 절임후 활성이 감소하는 것은 vinegar 의 삼투로 육질의 [H⁺]가 커지는 데 기인하는 것으로 생각된다. 절임 후 세균수에 거의 변동이 없는 데도 불구하고 VBN가 증가한다는 것은 수산 동물육이 유문수 효소 또는 protease 의 작용을 받았을 때 환원해서 오염되었을 때에 근육 단백질로부터 다량으로 ammonia 가 발생한다는 柏田(1955)의 연구와 일치하였다.

절임후 lipase 활성이 점차적으로 증가했다가 감소하는 경향은 효소 시료 500mg 에 대해서 0.1 N-CH₃COOH 0.5ml 의 첨가비는 lipase 활력 부활(賦活)에 가장 적당하고 그 이상 또는 이하의 첨가비에서는 lipase 활력이 감소된다고 한 井上(1952), 井上等(1941)의 연구에 대략 일치한다. 그리고 lipase 활성이 대체적으로 절임함으로써 감소하는 데도 불구하고 관능검사에서 나타나는 어체의 황변은(절임하고 난 후 25일부터 미황녹색을 띠기 시작하여

47일부터 황변하였다) 다른 산화 효소가 존재하고 있음을 시사하여 준다. 효모는 열에 약하고 내열성의 것도 50~55°C 에서 사멸하며 80°C 이상에서는 산지물(酸漬物)의 악변을 가져온다는 小川(1964)의 보고에 비추어 polyethylene 에 포장한 것을 seal 부분의 손상없이 (80°C 에서 polyethylene 은 상한다) 또한 절임 내용물의 선택, 풍미가 상하지 않도록 60°C에서 10분 정도 저온 살균하면 좋으리라고 생각된다.

VBN 와 NaCl 농도 및 산도와의 관계를 나타낸 곡선은 Fig. 3과 같다. 그림에서 보는 것처럼 VBN 와 NaCl 농도간에는 하등의 직접적인 관계를 찾아볼 수 없다.

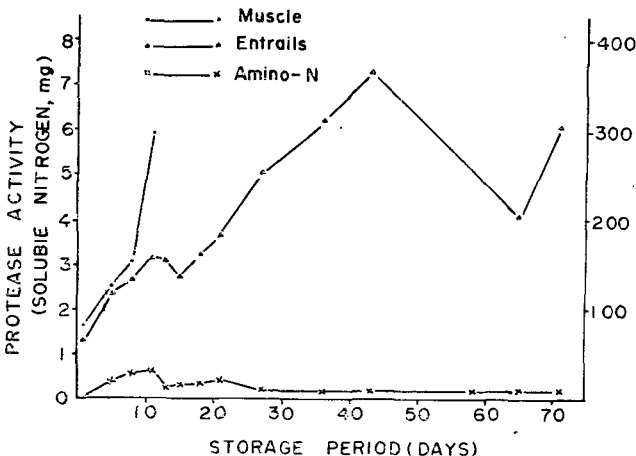


Fig.1. Protease activity and the change of amino-N.

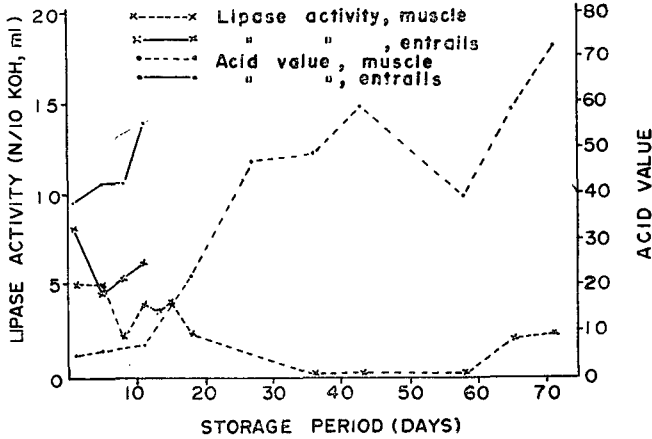


Fig. 2. Changes in lipase activity and acid value.

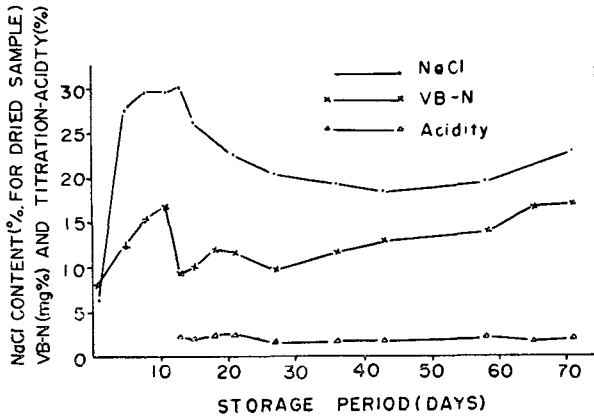


Fig. 3. Changes of VBN, and NaCl cont and activity during the storage period.

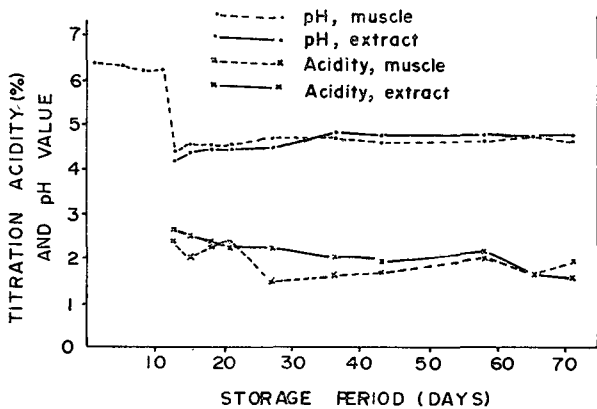


Fig. 4. Changes of pH, and acidity of muscle and its fluid during storage.

이것은 protease 와 NaCl 농도와의 관계에 대한 고찰을 일층 연관성있게 하여주는 인자가 된다. 그런데, VBN 와 산도와의 변화 곡선을 볼 것 같으면 산도가 2%이하일 때는 VBN가 증가하고 있다. 그래서 제품의 저장 중 산도가 2% 이상을 유지하여야 소위 내열성 효모등의 발육을 억제하여 VBN의 증가를 막을 수 있다고 생각된다.

육질의 산도가 증가하는 데도 불구하고 pH가 거의 직선적으로 변화할 이르키지 않는 것과 (Fig. 4) 세균수가 거의 일정하게 유지되는 것은 유기산의 항균력이 수소 이온 농도에 의한 뿐만 아니고, 다른 어떤 작용이 결합하고 있는 것으로 보인다. 이 점은 차후에 연구하여 볼만하다.

절임후 vinegar의 확산 침투 작용이 진행되어 액즙과 육질의 산도가 일치되는 시기가 절임하고 난 후 VBN치가 절임하기 직전 VBN 치와 같아지는 시기와 일치하였다. 이것으로 미루어 보아 이 기간에는 완전히 보장성이 있는 것으로 본다.

Fig. 3, Table 3에서와 같이 염의 농도와 VBN의 변화간에 아무런 관련성을 찾아 볼 수 없었다. 그리고 처음 염수 염장 했을 때를 제외하고 염장 4일째부터 균수가 증가하는 것은 식염에서 오는 2차적인 오염에 기인하는 것으로 생각된다. 더욱 절임 후에는 식염 함유량이 저하하므로 식염에 의한 방부보다는 식초산에 의한 방부가 주되는 것으로 생각된다.

요 약

멸치절임의 숙성 및 저장 중의 효소 활성 VBN, 세균수, 식염 함유량, 산도, amino-N, pH 그리고 지방의 산가에 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) Protease 활성은 염수 염장 중에는 증가하고 절임 중에는 식초산의 영향으로 감소하고 이후 차차 거의 일정하게 변화하며 이에 따라 amino-N는 대개 증가하여 숙성한다.

2) Lipase 활성은 염수 염장 중에는 감소하며 vinegar의 첨가로 일단 증가하였다가 절임중에는 증감의 일정한 경향을 볼 수 없다. 그리고 산도는 대개 증가하고 있다.

3) VBN와 NaCl 농도는 염수 염장 중에는 급

격히 증가하고 절입중에서는 VBN는 완만한 증가를 하며 NaCl 농도는 거의 변화가 없었다.

4) 세균수는 염수 염장함으로써 줄었다가 다시 증가하며 절입함으로써 급격한 감소를 보이고 그 이후에는 일정한 수를 유지하였다.

5) 절입 제품의 저장성을 유지하기 위해서는 육질의 산도가 2% 이상이 되도록 vinegar의 산도를 높혀 주어야 한다.

6) 염수 염장하는 기간은 8일이 적합하였으며 VBN, 산도, amino-N, lipase 활성 및 관능 검사 성적을 보아서 절입한 후 47일까지 보장할 수 있고 32일 때가 가장 맛이 좋았다.

문 헌

赤堀四郎, 水道三一郎(1954): 蛋白質化學 第3卷 共立出版 pp. 572.

American Public Health Association Inc. (1958): Recommended method for the microbiological examination of food. pp. 110~119.

天野慶之, 内野幸雄(1950): 直接滴定に依る鹽分簡易定量法に就いて. 水産研究誌 40, 1.

Harwitz, W. (1960): Official method of analysis of the A.O.A.C. pp. 301.

井上吉之, 眞俗五郎(1941): 蕒麻子lipaseに對する研究, 日本農藝學會誌 17(7), 559.

井上憲政(1952): 綜合酵素化學, 富山房 pp. 421.

石坂(1961): 微量互斯擴散分析提要.

柏田研一(1952): カツオ内臟酵素に關する研究. 日水會誌 18(4), 151.

柏田研一(1955): 水産動物組織の酵素分解に關する研究 — 筋肉よりの ammoniaの生成. 日水會誌 21(7), 494.

長崎龜, 山本龍男(1954): 微生物代謝に及ぼす食鹽の影響に關する研究 — イカ鹽辛熟成中における一知見. 日水會誌 21, 617.

東京大學(1961): 實驗農藝化學別卷 pp. 296.

日本藥學會(1956): 衛生試驗註解. pp. 41.

小川敏男(1964): 食品工業 7(12), 107.

小野豊樹(1934): 冷蔵中における魚體脂質の化學的變化. 日水會誌 3(5) 225.

島田 清(1935): 魷の消化酵素について. 日水會誌 4(1), 9.

Tenner(1944): Microbiology of food. pp. 723~743.

友田, 坂口, 山田, 朝井 (1955): 醱酵食品. 微生物工學講座 8, 283.

Tressler, D. K. (1951): Miscellaneous processes of preserving fish, marine products of commerce. pp. 459.