

● 연구속보 ①

Aspergillus spp.를 이용한 Sardine meal koji의 제조 및 그 효소적 특성

김동수, 구재근, 김영명
(응용연구실)

I. 서 론

어패류 단백질의 효소가수분해물은 독특한 쓴맛의 생성으로 인하여 조미소재로서의 기능이 크게 떨어지며 그 분해조건도 효소의 종류에 따라 다를 뿐 아니라 값이 비싸기 때문에 사용상 많은 제한을 받고 있다.

최근에는 이러한 효소의 대체소재로 조효소(粗酵素)의 일종인 soy sauce용 koji를 이용하여 어장유나 액젓의 속성발효를 목적으로 한 연구가 진행된 바 있다. Lee 등(1984, 1988)은 속성정어리 어간장가공에 관한 연구와 가다랑어 잔사를 이용한 어간장제조에 관한 연구에서 *Aspergillus oryzae*로 제조한 soy sauce용 koji를 이용하여 어간장을 제조한 연구가 있고 堀江(1984)은 정어리통조림 제조시 발생하는 부산물인 자숙액을 이용하여 새로운 조미료소재로 활용코자 자숙액을 농축시켜 장유국균인 *Aspergillus sojae*와 酒造공정에서 부산물로 나오는 술찌꺼기를 같이 혼합하여 koji를 만들어 염수와 혼합, 발

효숙성시켜 어장유를 제조한 연구가 있다. 그러나 자숙액의 수분함량을 거의 50%까지 농축시켜야 하므로 에너지 비용이 많이 들고 가쓰오부시로 만든 조미료에 비해 감칠맛이 약하므로 glutamic acid의 보충이 필요하다고 문제점을 지적하였다.

본 연구에서는 어육을 기질로한 새로운 형태의 koji를 제조하고 효소나 soy sauce용 koji의 대체효과를 검토하기 위해 정어리를 원료로 하여 마쇄한 후 전분을 혼합하고 살균한 다음 *Aspergillus*속의 곰팡이 6종을 직접 어육에다 접종하여 정어리육을 기질로한 koji의 제조 가능성을 검토하고 이를 균주중 활성이 높은 균주를 선정하여 적정 koji의 제조 조건과 효소적 특성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

가. 원료

본 시험에 사용한 정어리 *Sardinops melanosticta*

Table 1. The list of mold strains used for sardine meal koji preparation

No. of strains	Strains
No. 1	<i>Aspergillus awamori</i> KFCC. 11439, YUFE. 1014
No. 2	<i>Asp. guercinus</i> KFCC. 11959, ATCC. 14307
No. 3	<i>Asp. niger</i> KFCC. 11239, ATCC. 2029
No. 4	<i>Asp. oryzae</i> KFCC. 32343, IFO. 30104
No. 5	<i>Asp. oryzae</i> KFCC. 32319, ATCC. 16513
No. 6	<i>Asp. sojae</i> KFCC. 11559, YUFE. 1078

는 선도가 양호한 것을 구입하여 사용하였으며 평균체장은 17.5cm, 평균체중은 63.8g였다.

나. 균주

Aspergillus awamori (KFCC. 11439, YUFE. 1014), *Asp. guercinus* (KFCC. 11959, ATCC. 14307), *Asp. niger* (KFCC. 11239, ATCC. 2029), *Asp. oryzae* 2종(KFCC. 32343, IFO 30104 및 KFCC. 32319, ATCC. 16513), *Asp. sojae*(KFCC. 11559, YUFE. 1078)를 한국종균협회에서 분양받아 본 실험의 균주(Tablel 1)로 사용하였다.

2. 실험방법

가. koji의 제조

정어리를 chopper에다 통채로 넣어 마쇄하여 90°C에서 30분간 가열한 후 압착하여 지방을 분리한 다음 열풍건조기로 수분함량이 60% 내외가 되도록 건조하였다.

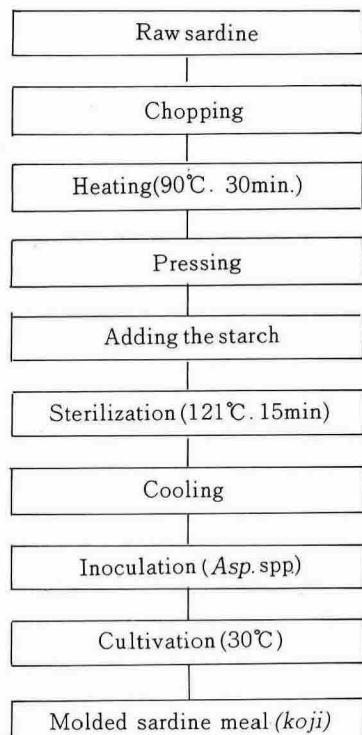


Fig 1. Flow diagram of molded sardine meal "koji" processing

건조한 정어리육(sardine meal) 50g과 옥수수전분 10g 씩을 혼합하여 샐레에 넣고 120°C에서 15분간 살균하고 품온이 30°C될 때까지 냉각한 후 A. SP. 균주를 각각 0.2g 씩을 접종하여 온도와 습도 및 배양시간등을 변화시켜 가며 koji를 제조하였다. 그 제조공정은 Fig. 1과 같다.

나. 아미노태질소(NH₂-N)

Spice등(1951)의 동염법에 따라 비색정량하였다. 시료 10g을 20분간 boiling한 다음 냉각하여 증류수로 50ml로 정용하여 2,540×g에서 10분간 원침한 후 상등액 10ml를 취하여 CuPO₄ 혼탁액 10ml와 혼합시켜 다시 2,540×g에서 10분간 원침한 후 상등액을 취해 620nm에서 O.D를 조사하여 측정하였다.

검량선은 CuPO₄ 혼탁액을 사용 L-alanine의 표준액을 증류수 100ml에 0.01g에서 0.1g 까지 0.01g 단위로 용해하여 10ml를 취한 후 상기와 같은 조건으로 원침하여 검량선을 구하였다.

다. Trimethylamine(TMA)

Conway unit를 이용한 미량화산법(齊藤 등 1974, micro diffusion method)으로 측정하였다.

TMA의 정량은 VBN의 측정방법과 동일하나 Conway unit외실에 HCHO용액 1ml를 더 첨가하여 37°C에서 90분간 방치한 후 N/70 Ba(OH)₂로 적정하여 조사하였다.

라. 조효소액의 제조 및 활성도

곰팡이가 활착된 koji 10g을 증류수 30ml와 같이 냉수에 2분간 균질화한 후 5%에서 6,000×g, 15분간 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소로 하였다.

1) Protease activity

Micheal 등(1988)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 Azocoll(Sigma사) 10mg을 25ml 삼각플라스크에 취하고 여기에 10ml의 1M glycine-NaOH buffer(pH 8.5)를 가하고 다시 증류수 3.9ml를 가하였다. 여기에 조효소액 1ml를 정확히 취하여 균일하게 혼화되게 하고 37°C에서 30분간 180rpm의 속도로 incubation하여 반응시켰다.

반응이 끝난 용액을 Whatman No. 2 여과지로 여과하여 여과액을 500nm에서 O.D를 조사하여 측정하였다.

one proteolytic unit를 520nm에서 O.D값 0.1을 나타낼 수 있는 효소량으로 표시하였다.

2) Lipase activity

Yamada 등(1962)의 방법을 약간 변형하여 조사하

였다. 즉 olive oil emulsion 5mℓ(2%의 polyvinyl alcohol 용액 75mℓ와 olive oil 25mℓ를 혼합 시킨후 냉각 상태에서 10분간 유화시킨 것) citrate-phosphate buffer 4mℓ를 test tube에 넣고 37°C의 water bath 중에서 5분간 예열한 후 조효소액 1mℓ를 가하고 신속히 혼합하여 반응 시발점으로 하였다. 60분간 반응시킨후 alcohol : aceton(1:1) 20mℓ를 가하여 반응을 중지시키고 test tube의 것은 50mℓ의 삼각 flask에 옮겨 1% phenolphthalein을 지시약으로 하여 0.05N NaOH로 적정하였다. Blank는 emulsion과 buffer용액을 혼합한 것에 alcohol : aceton 20mℓ를 먼저 가하여 emulsion을 파괴한 후 조효소액을 가하고 적정하였으며 측정차를 그대로 lipase activity로 표시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 곰팡이의 생육특성

마쇄후 가열처리한 정어리육 50g과 전분 10g을 혼합하여 살균한 다음 table 1에 나타난 No. 1, 2, 3, 4, 5, 6의 균주를 각각 접종하여 30°C에서 배양하면서 배양중 생육적성을 조사한 결과는 table 2와 같다. 배양 48시간 이후부터 곰팡이의 증식을 육안으로 확인할 수 있었고 No. 1, No. 4 및 No. 6을 접종한 것은 흑색의 포자를 형성하였고 나머지는 짙은 갈색의 포자를 형성하였다.

한편 어육에 활착된 곰팡이의 냄새를 조사한 결과 No. 1, No. 3을 접종한 것은 알코올취를 느낄 수 있었고 No. 2를 접종한 것은 산취와 흙냄새를 No. 4, No. 5 및 NO. 6의 경우는 약간의 약한 알코올취와 죽취를 동시에 느낄 수 있었으나 전처리구 모

두 생선 특유의 비린내는 느낄 수 없었다.

이러한 생육특성은 Shin 등(1990)이 연구한 명태고기풀에 여러종류의 곰팡이균을 접종하여 배양실험 결과와 거의 일치하는 현상을 보였다.

2. 균주의 선정

생육적성이 우수한 곰팡이 균주 선정을 위하여 살균된 정어리육에 곰팡이 균을 접종한 후 30°C에서 120시간 배양하면서 pH, NH₂N, TMA, protease activity 및 lipase activity를 조사하였다. Fig. 2는 배양 중의 pH변화를 나타낸 것으로 가열살균한 후 정어리육의 pH는 6.2였으나 배양시간이 경과함에 따라 No. 1를 접종한 것은 배양 72시간까지는 서서히 증가하다가 그 이후 감소하는 경향을 보였고 No. 2를 접종한 경우는 배양시간의 경과에 따라 계속 증가하여 120시간에는 pH 7.0을 나타냈으며 No. 3, No. 4 및 No. 6을 접종한 것은 배양 72시간까지 계속 감소하여 5.0, 5.4 및 5.5를 나타냈으나 96시간 이후에는 다시 pH가 증가하는 경향을 나타냈다.

Kumimoto 등(1989)의 연구결과에 의하면 정어리육에 Asp. oryzae(IF0. 4202)를 접종하여 28°C에서 24시간 배양했을 때 pH는 5.7이었고 36시간에는 5.8이었으나 60시간이후에는 pH 7.8로 급속히 증가했다고 보고한 바 있어 본 연구와는 다소 상이한 점이 있으나 이러한 pH차이는 곰팡이균주의 종류와 배양 중 생리적인 특성의 변화 및 균주가 분비하는 각종 효소의 활성등에 따른 차이로 생각되었다.

Table 3은 균주 종류별 배양시간에 따라 NH₂N의 변화를 나타낸 것이다. 전처리구 모두 배양시간의 경과에 따라 NH₂N의 양은 증가하고 있으며 배양

Table 2. Cultural characteristics of molded sardine meal inoculated with *Aspergillus* spp. cultured for 48hrs at 30 °C

<i>Aspergillus</i> spp.	Sporulation time(hrs)	Color of spores	Odor and flavor
No. 1	48	Black	Weak alcoholic
No. 2	48	Yellowish brown	Weak acidic and earthy
No. 3	48	"	Alcoholic
No. 4	48	Balck	Weak alcoholic and meaty
No. 5'	48	Yellowish brown	"
No. 6	48	Black	/

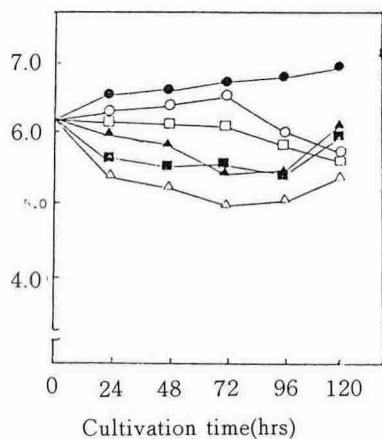


Fig. 2. Changes of $\text{NH}_2\text{-N}$ contents in the molded sardine meal "koji" prepared with *Aspergillus* spp. during cultivation at 30°C

No. 1 : *Asp. awamori*(○), No. 2 : *Asp. guercinus*(●),
No. 3 : *Asp. niger*(△), No. 4 : *Asp. oryzae*(▲)
No. 5 : *Asp. oryzae*(□), No. 6 : *Asp. sojae*(■).

24시간 이후부터 급속하게 증가하는 현상을 보이고 있고 그 이후에는 증가폭이 완만하였다.

생성량을 균주별로 비교해보면 No. 1을 접종한 것은 다른 균주에 비해 $\text{NH}_2\text{-N}$ 의 생성량이 극히 적어 배양 48시간에는 248mg%, 배양 96시간에는 380mg%로 나타나 나머지 균주들과는 큰차이를 보였다.

특히 No. 4와 No. 6의 균주는 다른 균주에 비해 $\text{NH}_2\text{-N}$ 의 생성량이 많아 배양 48시간에는 580mg%, 592mg%였고 96시간에는 각각 673mg%, 693mg%로 나타나 No. 1의 균주를 제외하고는 다른 균주에 비

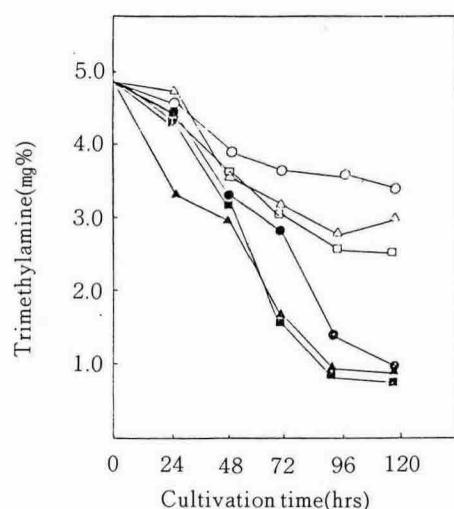


Fig. 3. Changes of trimethylamine in the molded sardine meal "koji" prepared with *Aspergillus* spp. during cultivation at 30°C

No. 1 : *Asp. awamori*(○), No. 2 : *Asp. guercinus*(●),
No. 3 : *Asp. niger*(△), No. 4 : *Asp. oryzae*(▲)
No. 5 : *Asp. oryzae*(□), No. 6 : *Asp. sojae*(■).

해 동일 배양시간에 있어서 27~116mg%정도의 높은 수준을 보였다.

이와같이 균주의 종류에 따라 어육속의 $\text{NH}_2\text{-N}$ 의 생성량이 다른 것은 어류단백질을 분해하는 능력이 균주의 종류에 따라 각기 다른 때문으로 사료되었다.

Fig. 3은 배양중 TMA의 변화를 나타낸 것이다. 곰팡이균을 접종하기 직전의 정어리육의 TMA양을 4.90mg%였으나, 곰팡이균을 접종한 후 96시간까지

Table 3. $\text{NH}_2\text{-N}$ contents of molded sardine meal "koji" prepared with *Asp. spp* during cultivation at 30°C

<i>Aspergillus</i> spp.	Cultivation time(hrs)					
	0	24	48	72	96	120
No. 1	48.5	124	248	350	380	392
No. 2	48.5	267	487	553	594	612
No. 3	48.5	150	316	550	604	625
No. 4	48.5	294	580	643	673	683
No. 5	48.5	243	476	574	613	625
No. 6	48.5	303	592	669	693	712

는 전처리구 모두 TMA양은 감소하는 경향을 보였다. 균주의 종류별 TMA양의 변화를 보면 No. 1를 접종한 경우 배양 48시간에는 3.8mg%로 배양초기에 비해 1.10mg%가 감소하였고 그 이후에는 서서히 감소하는 경향을 보였고 No. 2를 접종한 경우는 배양시간에 따라 급속히 감소하여 72시간에는 2.80mg%, 120시간에는 1.02mg%로 감소하였다.

한편 No. 3의 경우는 배양 72시간에는 3.20mg%로 접종직전의 양보다 1.70mg%가 감소하였으나 96시간 이후에는 오히려 증가하여 배양 120시간에는 3.00mg%로 나타났고 No. 4와 No. 6을 접종한 것은 96시간까지는 배양시간의 경과에 따라 계속 감소하는 경향을 보였으며 그 감소폭도 다른 균주보다 커졌다.

배양시간이 24시간, 48시간, 72시간 및 96시간으로 경과함에 따라 No. 4의 경우는 3.26mg%, 2.98mg%, 1.67mg% 및 0.98mg%로 감소하였고 No. 6의 경우는 4.35mg%, 3.19mg%, 1.53mg% 및 0.97mg%로 감소하였다. 堀江(1987)은 정어리통조림 제조시 부산물로 나오는 자숙액을 농축하여 *Asp. sojae*를 접종하고 25°C에서 96시간 배양시킨 후에는 TMA가 거의 소멸되었다고 보고 하였으나 본 실험에는 TMA가 완전히 소멸되지는 않았다. 그러나 어류의 선도가 저하하거나 부패될 때 발생하는 비린내의 주성분인 TMA는 분명히 억제되는 것은 틀림없는 듯 하였다. 이러한 원인은 TMA의 생성에 관여하는 효소들의 생성 또는 활동이 곰팡이가 분비하는 각종 미생물들에 의해 억제되는 것으로 생각되어지나 이러한 원인을 정확히 구명한 연구는 아직 찾아 보기 힘들다.

Fig. 4는 균주 종류 및 배양시간에 따른 protease activity를 조사한 것이다.

배양 72시간까지는 전처리구 모두 protease activity가 증가하는 현상을 보였고 96시간 이후에는 서서히 감소하는 경향을 보였다.

균주중 높은 activity를 보인 것은 No. 4와 No. 6으로서 24시간 배양시 1.3pu와 1.0pu였고 48시간에는 5.0pu, 5.2pu였으며 72시간은 8.8pu와 9.0pu로 다른 균주에 비해 비교적 높은 활성을 보였고 그 이후에는 점차 감소하는 경향을 보였다.

한편, No. 2와 No. 3은 배양24시간에는 각각 1.2IU와 0.8pu를 나타냈고 protease activity가 가장 높

은 72시간에는 각각 6.6pu와 6.7pu로 나타났다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 배양시간이 72시간이 경과하게 되면 No. 1을 제외하고는 protease activity는 서서히 감소하는 현상을 보였으며 No. 1은 배양 96시간에 4.0pu로 가장 높았으나 다른 균주에 비해 protease activity는 낮게 나타나 균주의 종류에 따라 정어리육에 활착된 곰팡이의 단백질분해능력이 크게 다르게 나타남을 알 수 있었다.

Lee 등(1980)의 보고에 따르면 wheat brane medium에서의 *Asp. oryzae* KC-15는 30°C에서 72시간 배양시 가장 높은 protease activity를 나타냈고 *Asp. sojae*는 50시간, *Asp. oryzae*, *Asp. niger*, 및 *Asp. awamori*는 30~40시간이었으며 *Asp. flavus*는 60시간으로 균주에 따라 약간의 차이를 보였다고 지적하였다.

Fig. 4에 나타난 결과로 살균된 정어리육을 기질로 했을 때 *Asp. awamori*를 제외하고는 배양 72시간에 가장 높은 protease activity를 보였다.

Fig. 5는 배양시간별 균주에 따른 lipase activity를 조사한 결과이다. No. 1을 접종한 경우는 배양 96시간에 3.7로 가장 높았고 No. 2의 경우도 No. 1과

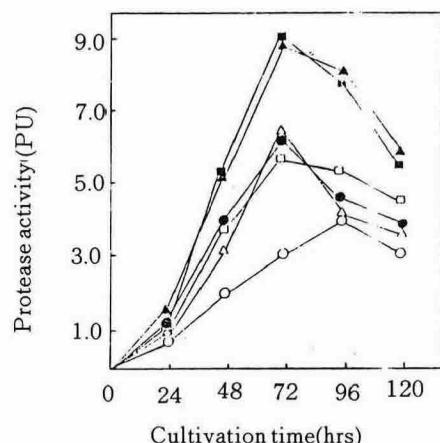


Fig. 4. Changes in protease activity of the molded sardine meal "koji" prepared with *Asp. spp.* during cultivation at 30°C

No. 1 : *Asp. awamori*(○), No. 2 : *Asp. guercinus*(●),
No. 3 : *Asp. niger*(△), No. 4 : *Asp. oryzae*(▲),
No. 5 : *Asp. oryzae*(□), No. 6 : *Asp. sojae*(■).

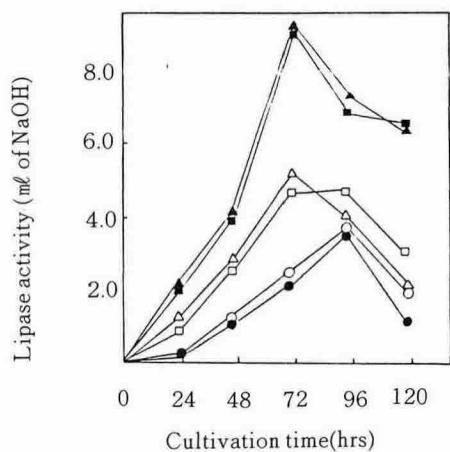


Fig. 5. Changes in lipase activity of the molded sardine meal "koji" prepared with *Asp. spp.* during cultivation at 30°C

No. 1 : *Asp. awamori*(○), No. 2 : *Asp. guercinus*(●),
No. 3 : *Asp. niger*(△), No. 4 : *Asp. oryzae*(▲)
No. 5 : *Asp. oryzae*(□), No. 6 : *Asp. sojae*(■).

비슷한 경향이었으나 약간 낮은 lipase activity를 보였으며 No. 3, No. 4 및 No. 6은 배양 72시간까지 계속 증가하여 5.2, 9.3, 9.0으로 다른 배양시간 보다 lipase activity가 높았고 그 이후 96시간에는 4.0, 7.2, 7.0 그리고 120시간에는 각각 2.2, 6.2, 6.3으로 점차 감소하는 경향을 보였다.

가열하여 지방을 어느 정도 제거한 정어리육에도 상당량의 지방이 존재하기 때문에 곰팡이들이 분비하는 각종 효소중 지방을 분해하는 효소의 존재는 배양중 지질의 산화를 방지하는데 상당히 중요한 역할을 할 것으로 생각되며 Kunimoto 등(1989)은 정어리속에 함유되어 있는 지방의 양은 배양중 곰팡이가 번식함에 따라 점차 감소하여 배양 24시간 후에는 8.3%, 36시간에는 7.5% 그리고 60시간 배양후에는 2.1%까지 크게 감소하였고 lipase activity는 48시간 배양했을 때 9.3으로 가장 높았으나 60시간 이후에도 2.9으로 급속히 감소하였다고 보고한 바 있다.

본 연구에서는 No. 4, No. 6의 경우 배양 48시간과 72시간 사이에서 lipase activity가 급속히 증가하고 그 이후에는 크게 감소하는 경향을 보였는데 이러한 lipase activity는 배양온도, 균주의 첨가량과

첨가방법 그리고 측정방법의 차이에 따라 그 활력은 다소 다르게 나타날 수 있다고 한다.

이와같이 30°C에서 48시간 배양후의 생육적성과 균주의 종류별 배양시간에 따른 TMA의 생성억제 효과, protease 및 lipase activity 등을 종합해 보면 6종의 균주중 No. 4와 No. 6이 살균된 정어리육에 대한 생육적응능력이 다른 균주에 비해 우수한 것으로 나타났다.

3. koji제조 조건

정어리육을 기질로한 *koji*의 제조 조건을 검토하기 위하여 No. 4와 No. 6의 2균주를 이용하였고 기질의 수분량과 습도, pH의 변화와 전분의 첨가량 및 배양온도 조건에 따라 72시간 배양하여 *koji*를 제조하였다.

Fig. 6은 정어리육의 수분량을 20%에서 90%까지 각각 조정한 후 살균한 다음 항온 항습기에 두고 수분량에 따른 배양중 *koji*의 효소활성을 조사한 것으로 수분함량이 40%이하에서는 곰팡이의 활착이 어려워 균사가 형성되지 않았을 뿐아니라 효소의 활성도 매우 낮게 나타났으나 수분함량이 50%이상이 되면 서서히 증가하여 60%정도에서 가장 왕성하게 성장하였다.

한편 수분함량이 80%이상이 되면 오히려 곰팡이

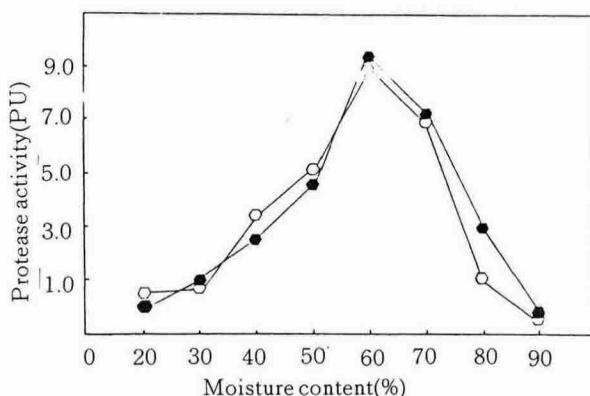


Fig. 6. Effects of moisture contents on the protease activity of the molded sardine meal "koji" cultivated for 72hrs at 30°C

No. 4 : *Asp. oryzae*(○), No. 6 : *Asp. sojae*(●)

생육은 크게 억제되어 효소의 활성을 극히 미약하였다.

井口 등(1981)에 의하면 일반장유의 *koji* 제조시 수분 함량이 지나치게 적으면 곰팡이균의 생육이 충분치 못하게 되고 반면 수분의 함량이 많으면 당의 소

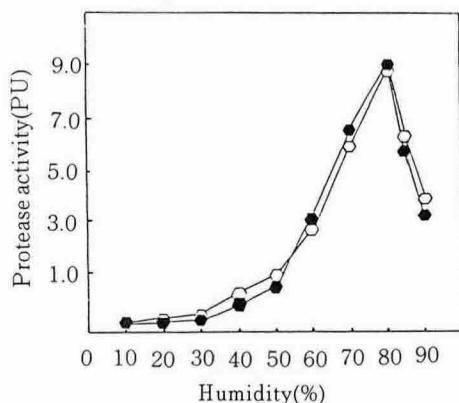


Fig. 7. Effects of humidity on the protease activity of the molded sardine meal "koji" cultivated for 72hrs at 30°C

No. 4 : *Asp. oryzae*(●), No. 6 : *Asp. sojae*(○)

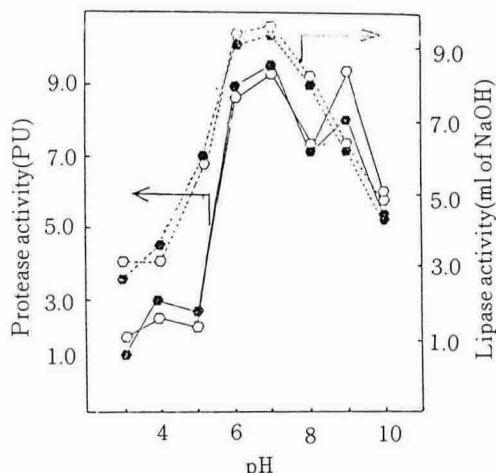


Fig. 8. Effects of pH on the protease and lipase activity of the molded sardine meal "koji" cultivated for 72hrs at 30°C

No. 4 : *Asp. oryzae*(●), No. 6 : *Asp. sojae*(○)

비가 많아지고 혼입된 세균의 번식이 왕성하게 되여 *koji*의 품질을 저하시킨다고 하며 통상 적정 수분 함량은 40~50%가 적당하다고 보고한 적이 있다.

Fig. 7은 습도 조건에 따른 영향을 조사하기 위하여 각종 염용액을 이용하여 일정한 습도로 각각 조정한 후 배양하면서 배양 중 *koji*의 protease activity를 조사한 것이다. Fig. 7에 나타난 바와 같이 습도 50% 이하에서는 곰팡이의 생육이 억제되어 protease activity가 낮게 나타났으나 60% 이상이 되면 서서히 증가하여 78%에서 가장 높은 protease activity를 보였고 80% 이상이 되면 서서히 protease activity가 감소하는 경향이었다.

이러한 습도 조건은 간장용 *koji*의 제조 조건과 거의 일치하였다.

Fig. 8은 pH의 변화에 따른 정어리 *koji*의 효소적 활성도를 조사하기 위하여 pH를 3.0에서 10으로 각각 조정한 후 30°C에서 72시간 배양시켜 곰팡이를 증식시킨 후 protease activity와 lipase activity를 조사한 결과이다.

pH에 따른 protease activity의 변화를 No. 4의 경우는 pH 3에서 1.9pu, pH 5에서는 2.3pu였고 pH 7에서는 9.2pu, pH 9는 9.4pu로 가장 높게 나타난 반면 No. 6은 pH 7에서 가장 높은 9.5pu, pH 9에서는 7.2pu로 나타나 No. 4의 경우는 alkaline protease activity가 매우 큰 것을 알 수 있었고 반면 No. 6은 pH 6~7 부근에서 가장 높게 나타나 neutral protease activity가 매우 높은 것을 알 수 있었다.

Lipase activity는 No. 4와 No. 6 모두 pH 6~7 부근에서 가장 높게 나타나 이는 Kunimoto 등(1989)의 연구 결과와 일치 하였으며 또한 福本(1975)은 미생물이 가지고 있는 lipase의 최적 pH는 측정법에 따라 다를 수 있고 사용하는 원충용액에 따라 다르게 나타난다고 보고한 것으로 보아 정어리육은 기질로 하여 제조한 *koji*의 경우도 측정조건에 따라 다소 다르게 나나날 가능성은 충분하다고 사료된다.

Fig. 9는 전분의 첨가량을 어육중량의 0%, 10%, 20%, 30% 및 40%(w/w)까지 첨가하여 살균한 후 30°C에서 72시간 배양하면서 protease 및 lipase activity를 조사한 결과이다. 전분의 첨가량이 20%일 때 No. 4와 No. 6의 protease 및 lipase activity가 가장 높고 전분을 첨가하지 않은 경우는 균주의 종류에 상관없이 protease activity가 2.5pu이하로 나타나 곰팡이의 생육을 육안으로 식별하기 어려웠으며

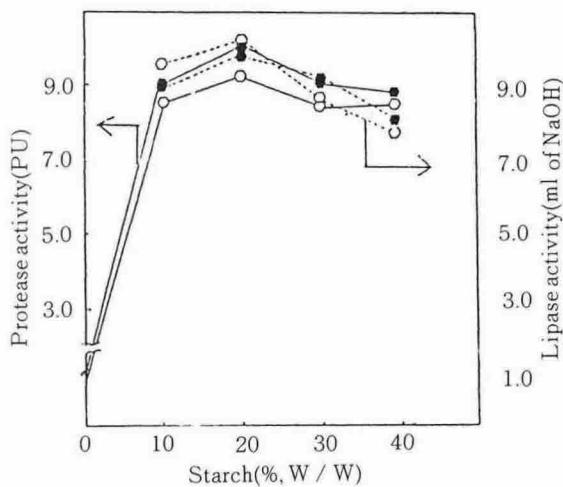


Fig. 9. Effects of starch on the protease and lipase activity of the molded sardine meal "koji" cultivated for 72hrs at 30°C

No. 4 : *Asp. oryzae*(○), No. 6 : *Asp. sojae*(●)

lipase activity도 거의 없었다.

한편, 전분의 첨가량이 40% 이상이 되면 protease 및 lipase activity가 10%나 30% 첨가수준 보다 다소 감소하는 경향을 보였는데 이는 곰팡이의 증식에 필요한 수분량의 감소로 인하여 배양중 습도가 생

육에 적합하지 못했기 때문으로 생각되었다.

Fig. 10은 배양온도 조건에 따른 효소적활성을 조사한 것으로 No. 4을 접종한 경우 protease 및 lipase activity는 35°C 부근에서 No. 6을 접종한 것은 35~40°C 부근에서 protease 및 lipase activity가 가장 높게 나타났다.

반면, 배양온도 30°C 이하와 50°C 이상에서는 72시간 배양의 경우 그 균주 모두 protease 및 lipase activity가 크게 감소하는 현상을 보였다.

Lee와 Chung 등(1980)의 보고에 따르면 wheat brane medium에서 *Asp. oryzae* KC-15의 최적배양온도는 40~45°C의 범위였다고 보고한 바 있고 Kunimoto 등(1989)은 살균된 정어리육에 *Asp. oryzae*를 접종했을 때 42°C에서 가장 높은 lipase activity를 나타냈다고 보고한 바 있어 본 연구의 결과보다 최적 배양온도가 다소 높게 나타났다.

이러한 현상은 어체처리조건, 원료어의 성상 그리고 균주의 종류 및 배양조건 등에 따라 다양하게 나타날 수 있으므로 어육을 기질로 한 koji의 적정 제조 조건을 확립하기 위해서는 이상과 같은 연구가 더욱 보강되어야 할 것으로 사료된다.

4. 조효소액의 안정성

이상의 연구결과는 토대로 하여 제조한 koji의 조효소액을 추출하여 소정의 pH완충액을 동량씩 가하여 5°C에서 24시간 방치한 후 조효소액의 잔존 prot-

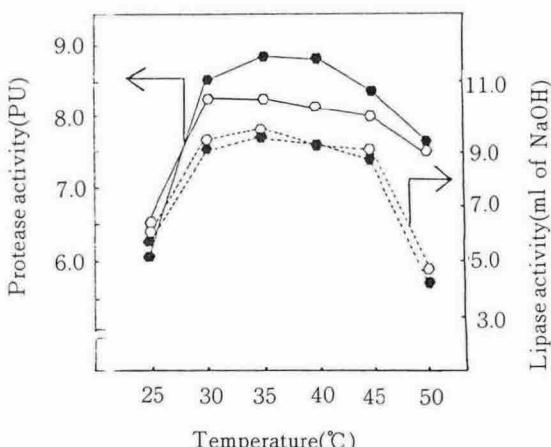


Fig. 10. Effects of temperature on the protease and lipase activity of the molded sardine meal "koji" cultivated for 72hrs at various temperature.

No. 4 : *Asp. oryzae*(○), No. 6 : *Asp. sojae*(●)

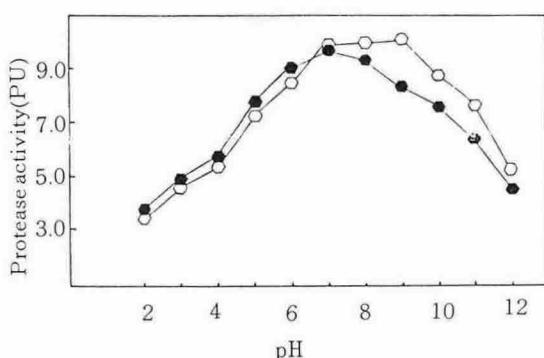


Fig. 11. Effects of pH stability on the protease activity of the molded sardine meal "koji" cultivated with *Asp. oryzae*, and *sojae* for 72hrs at 35°C

No. 4 : *Asp. oryzae*(○), No. 6 : *Asp. sojae*(●)

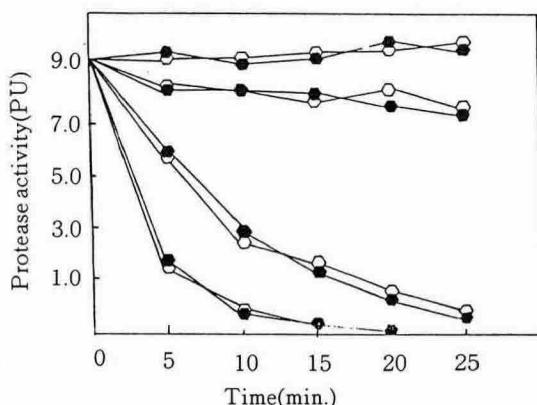


Fig. 12. Thermal stability of the protease activity of the molded sardine meal "koji" cultivated with *Asp. oryzae*, and *sojae* for 72hrs at 35°C

No. 4 : *Asp. oryzae*(○), No. 6 : *Asp. sojae*(◆)

ease activity를 조사한 결과는 Fig. 11과 같다. No. 4 및 No. 6 모두 pH 5.0~9.0까지는 비교적 안정한 것으로 나타났다.

吉田(1954, 1955)의 연구결과에 따르면 *Asp. saitoi*의 protease II는 pH 4.5~10.5, protease III은 pH 3.0~6.3사이에 모두 안정하였다고 보고한 바 있으며 본 실험의 결과는 이 보다 pH안정범위가 높게 나타났다.

Fig. 12는 조효소액을 40°C, 50°C, 60°C 및 70°C에서 각각 5분, 10분, 15분, 20분 및 25분간 유지한 후 잔존활성을 조사한 결과이다. No. 4 및 No. 6 모두 40°C에서는 잔존활성이 가열하기 전과 같이 그대로 유지하고 있었고 50°C의 경우는 가열시간이 경과함에 따라 서서히 감소하여 25분후에는 가열전에 비해 88~90%의 잔존활성을 보였다.

60°C의 경우는 실활속도가 비교적 빨라 5분후에는 약 60%정도의 잔존활성을 보였고, 15분후에는 80%정도 실활되었다. 70°C에서는 5분간 경과한 후 80%이상이 실활되었고 10분후에는 거의 실활되었다.

朴 등(1978)의 연구결과에 따르면 *Asp. awamori* U-3의 protease는 60°C에서 10분간 처리로 약 55%가 실활되었고 李 등(1980)의 *Asp. oryzae* KC-15의 경우는 60°C에서 5분간 처리했을 때 90%이상이 실활되었다고 보고한 바 있다.

IV. 요 약

액젓 또는 어간장제조시 발효기간의 단축과 향미를 개선할 목적으로 최근들어 간장(soy sauce)용 *koji*를 많이 이용하고 있으나 본 연구에서는 간장용 *koji*제조 가능성을 검토하였다.

마쇄한 정어리육과 전분을 혼합한 후 살균처리한 다음 *Aspergillus awamori* (KFCC. 11439) *Asp. guercinus*(KFCC. 11959), *Asp. niger* (KFCC. 11239), *Asp. oryzae* (KFCC. 32343, KFCC. 32319), 및 *Asp. sojae* (KFCC. 11559)의 곰팡이균을 각각 접종하여 배양시간에 따른 생육특성을 조사하고 우수한 균주를 선정하여 정어리육을 기질로한 *koji*의 효소적 특성을 조사하였다.

생육특성을 조사한 바 30°C에서 48시간 배양한 후 곰팡이의 포자가 형성되었으며 protease 및 lipase activity는 배양 72시간까지 계속 증가하는 현상을 보였고 TMA의 생성은 배양 96시간까지 *Asp. awamori*와 *Asp. niger*를 접종한 처리구를 제외하고는 모두 감소되었으며 6종의 *Asp. spp*중 *Asp. oryzae*와 *sojae*가 비교적 우수한 균주로 선발되었고 적정 배양시간은 72시간이었다.

이 균주를 대상으로 적정 *koji*제조 조건을 검토하기 위하여 pH의 변화, 전분의 첨가량 및 배양온도 등에 따른 protease와 lipase activity를 조사한 바 protease activity는 *Asp. oryzae*를 접종한 경우 pH9 부근에서 가장 높은 활성을 나타냈고 *Asp. sojae*의 경우는 pH 6~7에서 가장 높은 활성을 보였고 lipase activity는 두균주 모두 pH 6~7범위에서 가장 높았다. 전분의 첨가량은 어육중량의 20%(w/w), 배양온도는 *Asp. oryzae*는 30~35°C 범위에서 *Asp. sojae*는 35°C 부근에 거 이들의 활성도가 가장 높게 나타나 어육을 기질로한 *koji*의 제조 가능성을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

- Lee, E. H., S. Y. Cho, Y. J. Cha, H. S. Park, and C. H. Kwon.: 1984. Studies on the Processing of Krill Sauce. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **13**(1) 97.
- Lee, E. H., S. Y. Cho, J. H. Ha, and K. S. Oh.: 1984. Processing of Sardine Sauce from Sardine Scrap. *Bull. Korean Fish. Soc.*, **17**(2) 117.
- Lee, E. H., S. K. Lee, C. B. Ahn, and J.S. Kim.: 1988. Studies on the Processing Condition and the Taste Components of the Sardine Sauce Extract. *Bull. Korean Fish. Soc.*, **21**(1) 57.
- 堀江修二, 岩本正俊, 山崎辛一, 林中克昭. :1984. :水溶性魚卵質原料とする新規調味素材の開発(第一報). 島根県立工業技術Center研究報告第21号, 1.
- 堀江修二, 岩本正俊, 山崎辛一, 林中克昭. :1984. 水溶性魚卵質原料とする新規調味素材の開発(第二報). 島根県立工業技術Center研究報告第21号, 18.
- Spice, T. R. and D. C. Chamber. 1951.: Spectrophotometric analysis of Amino Acid and Peptides with Their Copper Salt. *J. Biol. Chem.*, **9**, 1387.
- 河瑞俊治, 梅山滋, 濱藤恒行. 1974. 水產生物化學, 食品學實驗書, 恒星社厚生閣, 東京, 125.
- Michael, J. B. and G. G. Khachatourians.: 1987. Purification and Properties of an Extracellular Protease Produced by the Entomopathogenic Fungus. *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, **7**, 1679
- Yamada, K., Y. Ota, and H. Machida. 1962 :*J. Agr. Chem. Soc. Japan.* **36**, 858.
- Shin, D. H., Y. M. Kim, D. S. Kim, and B. W. Lee. 1990. :Screening of Suitable Mold Strains for Production of Taste Materials from Alaska-pollack Flesh. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **22**(2) 221.
- Kunimoto, M., T. Hoshino, and M. Nakano. :1989. Decomposition of Lipid and Occurrence of Lipase in Mold Sardine Meal "Koji", *Nippon Shokuhin Kogyo Fakkaishi*, **55**(6) 1097.
- Lee, M. J., and M. J. Chung. 1980. Studies on the Productio of Protease by *Aspergillus Oryzae* LC-15 and Characteristics of the Enzyme, *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **8**(2) 77.
- Stansby, M. E. 1962. Speculation of Fishery Odours and Flavor, *Food Technol.*, **16**, 28.
- Davies, W. L., and E. Gill. 1939. Investigation on Fishery Flavor, *J. Soc. Chem. Ind.*, **55**, 141.
- Reineccius, G. A. 1979. Off Flavor in Meat and Fish-A Review, *J. Food Sci.*, **44**(1) 12.
- Yang, H. C. 1966. Studies on the Proteolytic Enzyme Pr oduced by Aspergilli. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, **6**, 67.
- Shimada, K. and K. Matsushima. 1968. Studies on the Pr oduction of Protease Inhibitor by Mold- Examination of the Ability of Molds to Produce Protease Inhibitor, *Agric. Biol. Chem.*, **42**(6) 325.
- Nagaoka, K. and Y. Yamada. 1973. Purification of Mucor Lipases and Their Properties, *Agric. Biol. Chem.*, **37**(12) 2791.
- 井口信義, 水沼, 大稼謙 1981. 釀造學, 養賢堂, 日本東京, 210.
- 朽倉辰六郎編著 1988. 醬油の科學と技術, 財團法人日本釀造協會, 87.
- 福本壽一郎, 1975. 生化學實驗講座 9, 脂質の代謝よ 東京化學同人, 東京, 211.
- 吉田文彦 : 1954. 麴菌蛋白質分解酵素に関する研究(第一報), 日農誌, **28**, 66.
- 吉田文彦 : Crystallization of New Proteolytic Enzyme from, 1955. *Aspergillus saito*. 日農誌, **29**, 175.
- 朴南圭 : 全北大學校 碩士學立論文, 1978. **4**, 101.