

정어리를 기질로 제조한 Koji의 Lipase활성과 지질성분

김 동 수

한국식품개발연구원

1. 서 론

액젓의 숙성발효를 위하여 상업적인 단백질분해 효소의 이용(金 등 1986), 간장용 코오지의 활용(李 등 1988) 및 가온에 의한 방법(具 등 1990) 등 다양한 응용 방법에 관한 연구가 기 수행된바 있고, 김 등(1990)은 *Aspergillus*속 곰팡이를 이용하여 어육을 기질로한 새로운 형태의 코오지 시험에서 제조과정중 "Koji"의 성장과 효소적 활성등을 조사하여 적정 제조조건을 확립한 바 있다. 그러나 "Koji"의 효소적 활성중 기질의 온도와 pH의 변화에 따른 lipase activity의 변화양상에 대한 검토가 진행되지 못했다. 본 연구에서는 정어리를 기질로한 "Koji"의 가공적성이 비교적 우수했던 *Aspergillus oryzae*를 이용하여 "Koji"를 제조하고 이것으로부터 추출한 조효소액중 lipase의 pH 및 온도의존성을 조사하고 지질의 성분 및 지방산 조성을 분석하여 향후 숙성발효 액젓의 제조시 "Koji"의 첨가가 지질성분에 미치는 영향을 조사하기 위한 기초자료를 확보하기 위하여 본시험을 수행하고 그 결과를 보고하는 바이다.

2. 재료 및 방법

2.1 재 료

본 시험에 사용한 정어리, (*Sardinops melanosticta*, 평균체중 : 52.4g, 평균체장 : 17.5cm)는 1993년 6월 노량진수산시장에서 구입하여 -45°C 동결고에 저장하여 두고 실험에 사용하였다.

2.2 균 주

前 보(김 등 1990), *Aspergillus*속을 이용하여 정어리를 기질로한 "Koji" 제조시험에서 비교적 우수한 것으로 나타난 *Aspergillus oryzae*(KFCC. 32343)는 한국중균협회에서 분양받아 정어리를 기질로한 Koji제조 시험용 균주로 사용하였다.

2.3 koji의 제조

前보(김 등 1990)와 동일한 방법으로 제조하였다. 즉 해동된 정어리를 통째로 chopper에 다 넣

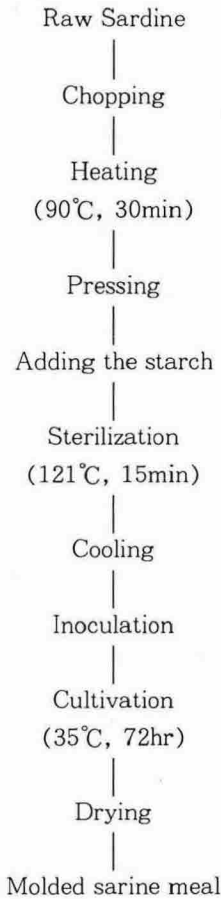


Fig. 1 Preparation procedure of molded sardine meal "koji"

고 마쇄한 후 90°C에서 30분간 가열한 다음 압착하여 수분과 지방을 분리제거 하였다.

냉각후 정어리육 50g과 옥수수전분 10g을 균일하게 혼합한 후 직경 15cm되는 petri-dish에 넣고 120°C에서 15분간 살균한 다음 냉각하여 여기에 *Asp.oryzae*균을 0.2g 접종하고 35°C에서 72시간 배양하여 Koji를 제조하였다. 제조공정은 Fig.1과 같다.

2.4 Lipase의 추출 및 활성의 측정

Yamada등(1962)과 Kunimoto등(1989)의 방

법에 따라 조사하였다. 즉 정어리 koji 5g을 증류수 15ml로서 1분간 균질화한 후 1분간 냉각하고 이 조작을 5회 반복한 후 5°C에서 6000×g, 15분간 원심분리하여 상등액을 조효소로 하였다.

기질로서는 올리브유 유화액 5ml(2%의 polyvinyl alcohol용액 75ml와 olive유 25ml를 혼합한 후 냉각상태에서 10분간 유화시킨것)와 pH별에 따른 완충액 4ml를 시험관에 넣고 37°C에서 5분간 예열한 후 조효소액 1ml를 가하고 신속히 혼합하여 반응시발점으로 하였다. 일정온도에서 60분간 반응시킨후 alcohol-acetone(1:1) 20ml를 가하여 반응을 중지시키고 1% phenolphthalein을 지시약으로 하여 0.01N NaOH로 적정하였다.

Blank는 유화액과 완충용액에 alcohol-acetone 20ml를 먼저 기하여 유화를 파괴한 후 조효소액을 가하고 적정하였으며 양 측정치를 그대로 lipase 활성도로 표시하였다.

2.5 지질의 분획

정어리기질 코오지에서 Bligh and Dyer법(1959)으로 추출한 지질을 전보(김등, 1994)와 같이 Juaneda and Rocquelin의 방법(1985)에 따라 중성지질(NL)과 인지질(PL)을 분획하였다.

2.6 지질의 class별 조성

중성지질 및 인지질의 class조성의 분석은 Ohshima and Ackman의 방법(1991)에 따라 TLC/F.D analyzer(Iatron Laboratory Inc., Tokyo, Japan)을 이용하여 분석하였다.

空燒를 충분히 하여 활성화된 rod에서 Microcaps(Drummond scientific Co., USA)를 이용하여 NL은 농도 약 20mg/ml, PL은 100mg/ml로 조제한 시료의 클로로포름 용액 1μl를 spotting 하였다. NL분석은 전개용매 n-hexane, diethyl ether, formic acid(97:3:1, v/v/v)로 전개시간 35분, PL은 1차전개 용매는 acetone으로 20분,

2차전개용매는 chloroform, methanol, water(65 : 35 : 4 v/v/v)로 45분간 전개하였다.

전개 후 110°C에서 2분간 가열하여 용매를 제거하고 분석하였다.

표준물질은 20mg/ml의 농도로 모액으로 하고 16, 8, 4, 2mg/ml로 각각 희석하여 검량곡선을 작성하여 계산하였다.

2.7 지방산 조성

총지질, 중성지질 및 인지질의 지방산 조성은 전보(김 등, 1994)와 동일하게 A.O.C.S 방법(A.O.C.S official Method Ce lb-89, 1991)에 따라 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 Lipase의 pH 및 온도 의존성

Fig. 2는 정어리기질 코오지로 부터 추출한 조효

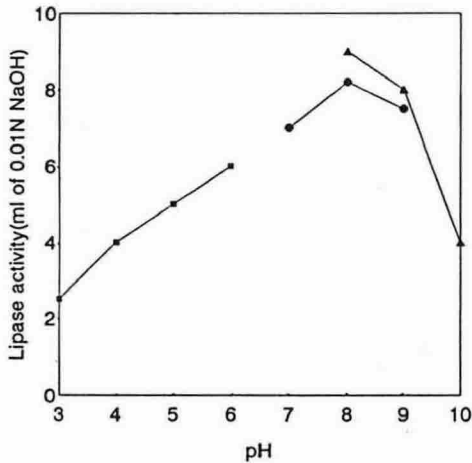


Fig. 2. Effect of pH on lipase activit of the molded sardine meal "koji" reacted in buffers for 60min at 37°C
 (■) 0.2M acetate buffer,
 (●) 0.1 M Tris-HCl buffer
 (▲) 0.1M NH₄ OH-NH₄ CL buffer

소액의 pH에 따른 lipase활성을 조사한 것으로 가장 높은 활성을 나타내는 범위는 pH 7-8의 범위였고 pH 5.0이하 또는 9.0이상이 되면 활력이 급격히 감소하는 경향을 보였다. 활력이 가장높은 pH 범위인 7-8은 이는 polyvinyl alcohol과 olive유화액을 기질로 했을 때의 경우이며 福本등(1972)은 lipase activity 측정법과 사용하는 buffer용액에 따라 다소 상이한 결과가 나올 수 있다고 보고한 바 있다. Fig. 3에 나타난 온도에 대한 영

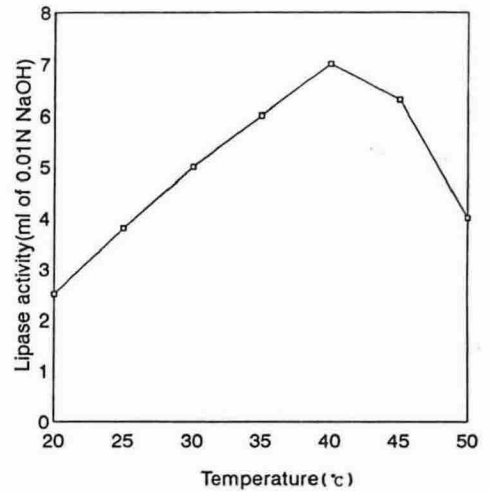


Fig. 3. Effect of tempreaure on lipase scitivity of the molded sardine meal "koji" reacted for 60min at pH 8.0

향을 조사하기 위하여 온도의 범위를 20°C-50°C, pH 8.0에서 60분간 반응시킨 결과 최적 반응 온도는 40°C 부근이었으며 40-45°C의 범위가 20-30°C의 반응온도보다 활성이 높게 나타났다. 이는 Iwai등(1974), Nagaoka등(1973)이 보고한 *Rhizopus delamar*, *Mucor lipolyticus* 에서 추출한 lipase의 최적온도인 37°C 보다는 약간 높게 나타난 것으로 추정되고, 허(1988)는 Milk lipase의 최적 온도는 30°C라고 보고한 바 있으나 정어리기질 코오지의 lipase활성은 이보다 약간 높게나타났다.

Lipase의 활성온도는 lipase의 순도(불순물의 혼합정도)와 효소반응에 사용하는 기질에 따라서도 다소 차이가 있을 것을 사료된다.

Fig.4는 buffer 용액의 pH 별로 Yamade 등

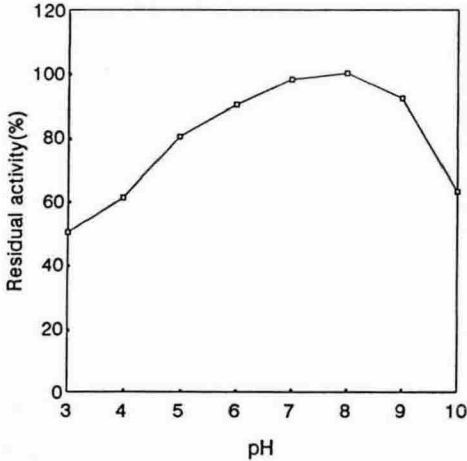


Fig. 4. Effect of pH on stability of lipase of the molded sardine meal "koji". Crude enzyme solutions in buffers shown below were incubated at 37°C for 1hr after incubation, pH of the enzyme solution was adjusted to pH 8.0.

Buffers : 0.025M acetate buffer(pH 3.0-6.0),
0.025M Tris-Hcl buffer(pH 7.0-9.0),
0.025M $\text{NH}_4\text{OH-NH}_4\text{Cl}$ (pH 7.0-9.0),

(1962)과 kunimoto등 (1989)의 방법에 따라 반응시킨 후 pH를 8.0으로 다시 조정하여 pH에 따른 lipase활성의 잔존율을 나타낸것이다. pH 6-9의 범위에는 90% 이상의 활성이 존재하였고 pH 5와 pH 10에서는 각각 80%와 63% 정도를 나타냈으며 pH 3에서는 50% 정도 밖에 잔존하지 않았다. 정어리기질 코오지의 lipase는 Nagaoka등 (1973)이 보고한 *Mucor lipolyticus* 곰팡이에서 추출한 lipase의 pH 3-10 사이의 안전성이 80% 이상이였다고 한 연구결과에 비해 다소 pH 안전성이

떨어진다고 생각된다.

Fig.5는 조효소액을 0-60°C의 범위로 pH 8.0에서 1시간 처리한 후의 lipase활성의 잔존율을 나타낸것이다. 가열온도가 높아짐에 따라 조효소액의 lipase잔존율은 서서히 감소하다가 40°C까지는 비교적 안정적인 경향을 보이다가 50°C 이상이 되면 활성이 거의 실활하였다. 이러한 경향은 Nagaoka 등(1973) 및 Kunimoto등(1989)의 연구결과와도 유사한 경향이였다.

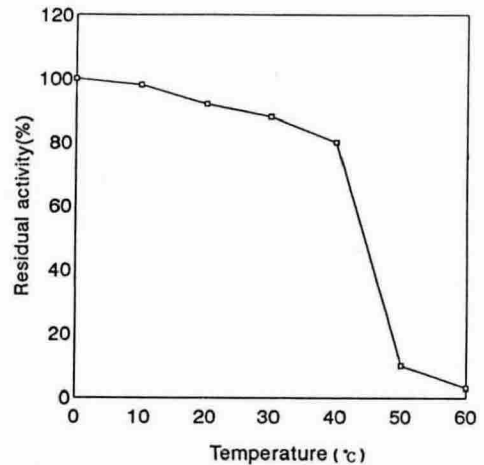


Fig. 5. Effect of temperature on stability of lipase of the molded sardine meal "koji". Crude enzyme solution in 0.1 M Na-phosphate buffer(pH 8.0) were incubated for 1hr at various temperature.

3.2 지질의 class조성

정어리기질 코오지로 부터 추출한 NL 및 PL의 지질 조성은 Table 1과 같다. NL의 량은 총지질 20.78g/100g중 15.33g/100g(약 73.8%), 옹고 주요지질의 조성은 NL의 경우는 triglyceride (TG)가 53.4%, free fatty acid(FFA)가 28.1%

Table 1. Lipid class compositions of non-polar lipid and phospholipid of molded sardine meal "koji".
(g/100g)

Non polar lipid*	Phospholipid**	Total lipid
TG 8.19(53.4%)	PE 1.78(32.7%)	
FFA 4.30(28.1%)	PI 1.39(25.5%)	
ST 1.10(7.2%)	PC 1.37(25.1%)	
DG 1.03(6.7%)	LPC 0.40(7.3%)	
SE 0.71(4.6%)	PS 0.32(5.9%)	
	SPM 0.19(3.5%)	
Total 15.33(100.0%)	5.45(100.0%)	

*TG, triglyceride; FFA, free fatty acid; ST, sterol; DG, diglyceride SE, sterol ester

** PE, phosphatidylethanolamine; PI, phosphatidylinositol; PC, phosphatidylcholine; LPC, lysophosphatidylcholine; PS, phosphatidylserine; SPM, sphingomyeline

로 전체의 81.5%를 차지하였으며 sterol(ST), diglyceride(DG) 및 sterol-ester(SE)가 각각 7.2%, 6.7% 및 4.6% 정도 함유되어 있었다.

3.3 지방산 조성

Table 2는 정어리 코오지 총지질, 중성지질 및 인지질의 지방산 조성을 조사한 결과이다. 주요 지방산은 16:0, 22:6, 18:1n-9, 18:2n-6 및 20:5이었고 TL의 경우 saturated fatty acid가 32.39%, monoenoic acid는 29.86%, 그리고 polyenoic acid는 37.75%로 나타났고 NL의 경우 주요지방산인 16:0, 18:1n-9, 18:2n-6, 20:5 및 22:6이 전체 지방산의 62.62%였고 TL에 비해 saturated fatty acid는 약간 많이 함유되었고 monoenoic acid와 polyenoic acid는 약간 적게 함유되었다.

Table 2. Fatty acid content of molded sardine meal "koji"

(area %)

ECL* ²	Fatty acid	TL	NL	PL
14.00	14:0	3.23	4.54	2.86
14.51	15:0 iso	0.15	0.14	0.11
14.67	15:0 anteiso	0.09	0.07	0.01
15.00	15:0	0.57	0.51	0.45
15.50	16:0 iso	0.13	0.08	—
16.00	16:0	21.14	21.42	21.00
16.29	16:1n-7	7.52	—	—
16.41	16:1n-5	0.22	0.21	0.20
16.50	17:0 iso	0.42	0.42	0.38
16.68	17:0 anteiso	0.12	0.11	0.10
16.90	16:2n-4	0.66	0.67	0.37
17.00	17:0	0.9	0.96	1.09
17.19	16:3n-4	0.45	0.46	0.26
17.30	16:3n-3	0.47	0.47	0.40
17.49	17:2n-8	0.16	0.17	0.09
17.58	16:4n-3	0.28	0.27	0.19

ECL* ²	Fatty acid	TL	NL	PL
17.67	16:4n-1	0.67	0.59	1.01
18.00	18:0	4.53	4.57	5.17
18.21	18:1n-9	11.65	11.95	9.14
18.28	18:1n-7	2.79	2.79	2.92
18.40	18:1n-5	1.56	0.20	0.11
18.68	18:2n-6	9.35	9.96	8.31
18.88	18:2n-4	0.22	0.23	0.16
18.97	18:3n-6	0.19	0.17	0.10
19.00	19:0	0.15	0.16	0.14
19.14	19:1 + 18:3n-4	0.04	0.16	0.12
19.30	18:3n-3	0.86	0.93	0.59
19.60	18:4n-3	1.27	1.19	0.71
19.67	18:4n-1	0.05	0.05	—
19.92	20:0	0.71	0.77	0.48
20.17	20:1n-9	1.81	2.01	1.06
20.23	20:1n-7	0.22	0.25	0.11
20.61	20:2n-6	0.17	0.18	0.14
20.89	20:3n-6	0.09	0.12	0.08
21.12	20:4n-6	1.08	1.15	1.12
21.27	20:3n-3	0.07	0.07	—
21.52	20:4n-3	0.32	0.34	0.27
21.77	20:5n-3	6.96	6.51	7.07
22.00	22:0	0.18	0.22	0.28
22.08	22:1n-11	2.75	3.25	1.20
22.17	22:1n-9	0.28	0.27	0.08
22.27	22:2(Δ 5,7NMID)	0.14	0.15	0.16
22.76	21:5n-3	0.80	0.33	0.23
23.10	22:3n-3	0.22	0.37	0.31
23.88	22:5n-3	0.04	0.05	0.10
24.10	22:6n-3	13.07	12.78	24.34
24.14	24:1n-9	0.89	0.15	1.67
24.20	24:1n-7	0.12	—	0.24
Saturated		32.39	33.97	32.07
Monoenoic		29.86	28.51	21.62
Polyenoic		37.75	37.52	46.31

한편 PL의 경우는 22:6이 24.34%로 가장 많이 함유되었고 그 다음이 16:0이 21.00%, 18:1n-9가 9.14%, 18:2n-6는 8.31%, 20:5이 7.07%였다.

Kunimoto등(1989)은 정어리 코오지의 TG와 FFA중 지방산 조성을 조사한 결과 60시간 배양 후에는 TG의 경우 주요 지방산이 18:1, 16:0, 16:1 및 18:2였고 FFA는 16:0, 18:1 및 16:1로 각각 30.9%, 20.6% 및 10.9%였고 이러한 주요 지방산의 변화는 배양시간의 경과에 따라서도 약간의 증감이 있었을 뿐 크게 변화하지는 않았다는 연구결과가 있어 코오지 배양중 지질의 산화와 가수분해는 계속 진행되지만 주요지방산은 크게 변화하지 않았을 것으로 사료된다.

4. 요 약

액젓 제조시 발효를 촉진하기 위하여 정어리를 기질로한 코오지를 제조하고 이것으로부터 추출한 조효소액인 lipase의 pH 및 온도의존성과 코오지의 구성지질 및 지방산 조성을 조사하였다. Lipase의 최적 활성을 나타내는 pH는 7-8이었으며 pH 5.0 이하와 9.0 이상이 되면 활성은 급격히 감소하였고, 최적온도는 40°C 부근이었다. pH 및 온도에 변화에 따른 활성잔존율을 조사한바 pH 6-9 범위에서 90-100%, 40°C에서 1시간 가열처리 했을때 약 80%의 잔존율을 보였고 50°C 이상이 되면 잔존율은 크게 감소하여 50°C는 10%, 60°C는 3%의 잔존율을 보였다. 코오지 지질 조성은 중성지질은 triglyceride가 53.4% 유리지방산은 28.1%로 전체 중성 지질의 81.5%를 차지하였고 인지질은 phosphatidylethanol이 32.7%로 가장 높았고 그 다음이 phosphatidylinositol이 25.5%, phosphatidyl choline이 25.1%였고 그 외 lysophosphatidyl-choline, sphingomyeline 등도 7.3%와 3.5% 정도 함유되어 있었다. 한편 총지질과 중성지질의 주요 지방산은 16:0, 22:6, 18:1n-9, 18:2n-6 및 20:5 이었고 인지질의 경우는

22:6이 중성지질에 비해 월등히 높게 나타났고 그 다음이 16:0, 18:2n-6 및 20:5로 나타났다.

총지질의 26.2% 정도 함유되어 있는 PL의 경우, 조성을 보면 phosphatidylethanol(PE), phosphatidylinositol(PI) 및 phosphatidylcholine(PC)가 각각 32.7%, 25.2% 및 25.1%로 전체 PL의 83.3%를 차지하였고 그외에도 lysophosphatidylcholine(LPC), phosphatidylserine(PS) 및 sphingomyeline(SPM)도 각각 7.3%, 5.9% 및 3.5%로 함유되어 있었다. 일반적으로 free fatty acid(FFA)는 신선어육에는 검출되지 않거나 거의 미량으로 존재하는 것으로 알려져 있으나 ko-izumi등(1988)은 저온저장중에 FFA의 생성은 점차 증가하는 것으로 보고한바 있고 본 연구에서도 정어리 기질 코오지속에는 상당량의 FFA가 검출된 반면 TG량이 크게 감소한 것으로 보아 일반 어육의 저온저장시 뿐만 아니라 어육을 가열 처리하여 제조한 코오지의 제조중에도 지질의 가수분해가 진행되고 있었음을 알 수 있었다.

한편 어육에 존재하는 주요한 인지질인(鴻巢章 二 등 1992)PC 및 PE의 함량도 *Asp.oryzae*에 의해 일부 가수분해를 받은 것으로 생각된다. 豊水(1985)는 어류에는 LPC가 존재하지 않는다고 하였으나 Oshisma등(1985, 1991)은 수중의 어류 근육에서 LPC가 검출되었다고 보고한바 있으며 본 연구에서도 LPC가 검출되었다.

참 고 문 헌

1. A.O.C.S. 1991. Official Method of sampling and Analysis of Commercial Fat and oil. Fatty acid composition by GLC(marine oil) Sci. A.O.C.S. official Method ce 1b-89.
2. Bligh,E.G. and W.H.Dyer. 1959. A rapid method of lipid Extraction and Purification. Can.J.Biochem. Physiol. 37, 911-917
3. IAwai, M and Y. Tsujisaka. 1974. The

- Purification and the Properties of Three Kinds of Lipase from *Rizopus delamar*. Arg. Biol. Chem., 38(6), 1241-1247
4. Juaneda, P and G. Roquelin. 1985. Rapid and Convenient Separation of Phospholipid and Nonphosphorus Lipids from Rat Heat Using Silica Cartridges. Lipids, 20, 40-41
 5. Koizumi, C., C.C. Chang, and T. Ohshima. 1988. Influence of Freeze-Thawing Processing on the Quality of Sardine and Horse Mackerel during Refrigerated Storage. Bull. Japan Soc., Sci. Fish. 54(12), 2203-2210
 6. Kunimoto M., T. Hoshino and M. Nakano. 1989. Decomposition of Lipid and Occurrence of Lipase of Molded Sardine Meal "koji". Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 55(6), 1097-1102
 7. Nagaoka, K. and Y. Yamada. 1973. Purification of Mucor Lipase and Their Properties. Arg. Biol. Chem., 37(2), 2791-2796
 8. Ohshima, T. and R. G. Ackman. 1991. New developments in Chromarod/Introsan TLC/FID; Analysis of Lipid Class Composition. J. Planar Chromatogr. 4, 27-34.
 9. Ohshima, T., S. Wada and C. Koizumi. 1985. Accumulation of lyso-form Phospholipids in Several Species of Fish Flesh during Storage at -5°C. Bull. Japan Soc., Sci. Fish. 51(6), 965-971
 10. Yamada, K., Y. Ota, and H. Machida. 1962. Studies on the Lipase Production by Microorganism. J. Arg. Chem. Soc. Japan. 36, 858.
 11. 福本壽一郎. 1975. 生化学実験講座. 脂質の代謝, 東京化学同人, 東京. p211-222
 12. 豊水正道. 1974. 魚類の脂質加水分解酸化油焼け, 漁の品質(日本水産學會編)恒星社 厚生閣, 東京. 123-127
 13. 鴻巣章二·橋本周久. 1992. 水産物利用化学, 恒星社厚生閣, 東京. 80-81
 - 구재근·김영명·이영철·김동수. 1990. 속성 정어리 액젓의 정미성분. 한국수산학회지. 23(2), 87-92
 14. 김동수·김영명·구재근·이영철·우상규. 1990. *Aspergillus spp.* 를 이용한 Sardine Meal koji 제조에 관한 연구. 한국수산학회지. 23(2), 69-76
 15. 김동수·小泉千秋. 1994. 가온숙성 멸치액젓의 지질함량 및 지방산 조성의 변화. 한국수산학회지, 투고중
 16. 김병삼·박상민·최수일·김장량·한봉호. 1986. 어장류의 속성발효와 동역학적 고찰. 한국수산학회지. 19(1), 10-19
 17. 이용호·지승길·안창범·김진수. 1988. 속성 정어리 간장 엑스분의 가공조건 및 정미성분에 관한 연구. 한국수산학회지. 21(1), 51-66
 18. 허태련. 1988. Affinity Chromatography에 의한 Milk Lipase의 분리정제 특성. 한국식품과학회지. 20(6), 762-768