

## 코오지를 이용한 속성저식염 멸치젓의 미생물상과 효소활성

백승화\* · 임미선 · 김동한

\* 원광대학교 농화학과, 목포대학교 식품영양학과

### Studies on the Microflora and Enzyme Activity in Processing of Accelerated Low Salt-Fermented Anchovy by adding koji

Seung-Hwa Baek\* Mi-Sun Lim and Dong-Han Kim

\*Dept. of Agricultural Chemistry, College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University,

Ik-san, Cheonbuk, 570-749, Korea

Dept. of Food and Nutrition, College of Home Ecology, Mokpo National University, Mu-an, Cheonnam,

534-719, Korea

#### Abstract

To produce low salt fermented anchovy by an accelerated method with *Asp. oryzae* and *Bacillus sp. koji*, enzyme activity and variation of microflora during the 60 day fermentation were examined. Bacterial counts changed a little during the fermentation with the highest on day 40 for proteolytic and anaerobic bacteria and on day 20 for aerobic bacteria. Proteolytic, lipolytic, aerobic, and anaerobic bacteria counts were higher in the *Bacillus sp. koji* added anchovy paste than in others. The protease and lipase activities reached the highest point on day 20 and 30, respectively, and decreased gradually afterwards. The protease activity was higher in *Asp. oryzae* koji than in *Bacillus sp. koji*, but the lipase activity was to the contrary.

Key words : low salt fermented anchovy, protease, lipase, microflora

#### 서 론

젓갈은 어패류의 육질이나 내장 또는 전 어체를 염장한 것으로, 염장중에 자기소화 효소나 미생물 효소 작용에 의하여 구수한 풍미와 감칠맛을 내는 성분으로 분해된 전통 수산 가공 식품<sup>1)</sup>이다. 젓갈은 쌀을 주식으로 하는 한국, 일본, 중국, 태국, 필리핀 등 동남아시아 각국에서 여러 어패류로부터 다양한 것들을 만들어 식용하고 있다.

멸치(*Engraulis japonica*)는 지방 함량 9~16%의 고지방 어류로서 청어목(*Ordec clupeida*) 멸치과(*Family engraulidae*) 멸치속에 속한다. 멸치젓은 2개월 이상 숙성시키며 필수아미노산의 함량이 높고<sup>2)</sup> 밥 반찬으로 이용된다. 이와 유사한 식품으로는 동남아시아의 nuoc-mam과 스칸디나비아의 anchovy, tidbit 등이 있다. 또 생젓갈은 달여서 여과하여 김치조미용으로 사용된다. 6개월 이상 숙성시킨 것을 여과 청정화한 액체는 간장 대용의 조미료로도 사용한다<sup>3)</sup>.

멸치젓에 대해서는 지질의 산화 및 단백질분해<sup>4, 5)</sup>, 지방산의 산화억제<sup>6)</sup>, 질산염과 아질산염<sup>7)</sup>, 불휘발성아민 함량과 돌연변이원성<sup>8)</sup>, 정미 성분<sup>9)</sup> 등의 연구결과가 있다.

최근에는 식염이 고혈압이나 신장병 등 각종 성인병의 원인으로 과잉 섭취가 문제시됨에 따라 저장 식품의 식염 함량을 줄이려는 추세에 있다<sup>10)</sup>. 멸치젓은 20~26% 소금을 첨가하여 부패를 억제<sup>11)</sup>시키기 때문에 저식염화를 위해서는 부패미생물의 증식을 억제하기 위해 KCl, 젓산, 솔비톨, 에탄올을 첨가하는 연구가<sup>12~15)</sup> 보고되고 있다. 그외에 멸치젓의 속성에 관여하는 미생물상의 변화<sup>16, 17)</sup>, 저식염 멸치젓의 단백질 분해 세균과 단백질 분해 효소의 특성들의 연구도 있다. 젓갈에서 분리한 단백질 분해균 *Bacillus*속을 이용하여 저식염 멸치젓을 속성 발효시키려는<sup>18~21)</sup> 시도도 있다.

그러나 젓갈의 속성발효는 쓴맛이나 비린내등 풍미의 열화를 초래할 수 있기 때문에 이를 개선시키기 위하여 장류용 코오지균을 이용하는 연구<sup>22)</sup>가 진행되었다. 저

Corresponding author : Dong-Han Kim

식염멸치젓에도 코오지균을 이용한<sup>23)</sup> 보고가 있다.

본 연구는 현재까지 진척된 저식염화 조건에 것갈에서 분리한 단백질 분해 세균인 *Bacillus* sp. 과 *Aspergillus oryzae*로 제조된 코오지를 함께 처리하여 멸치젓의 속성 제조시 미생물상의 변화와 이들이 분비하는 효소 활성 변화를 분석한 결과이다.

## 재료 및 방법

### 1. 시 료

멸치 (*Engraulis japonica*)는 1996년 7월 13일에 전남 목포시 어관장에서 구입하였다. 소금은 NaCl 함량 98%인 정제염을 사용하였다.

### 2. 균 주

전보<sup>24)</sup>와 동일 방법으로 균주를 선별하였다.

### 3. 코오지제조

전보<sup>24)</sup>와 동일방법과 조건으로 제조하였다.

### 4. 것갈 제조

전보<sup>24)</sup>와 동일 방법인 Table 1과 같은 비율로 제조하였다.

### 5. 미생물

시료 1g을 취하여 멸균 생리식염수 9.0ml 로 균질화한 다음 10진법으로 희석했다. 이 희석액을 이용하여 각각 평판도말한 후 균수를 측정하였다.

1) 단백질분해균 : 단백질분해균은 차 등<sup>17)</sup>의 방법에 따라 단백질분해력 선별 배지에 평판도말하여 30±0.5℃, 2~3일간 배양한 후 배지 상의 콜로니주위에 투명환이 나타나는 것을 단백질 분해 양성 균으로 하여 계수하였다.

2) 지방분해균 : 희석액을 차 등<sup>23)</sup>의 방법에 따라 지

방분해력 선별 배지(bacto peptone 10g, calcium chloride 0.1g, sodium chloride 30g, polyoxyethylene sorbitan monooleate 10ml, bacto agar 16g, D.W. 1000ml)에 평판도말하여 30±0.5℃에서 3일간 배양한 후 콜로니 주위에 불투명한 환이 나타난 것을 지방 분해 양성 균으로 하여 계수하였다.

3) 호기성 및 혐기성균 : 호기성 균주의 경우는 tryptic soy agar를 이용 30±0.5℃, 1일간 배양하고, 혐기성 균주는 APT agar에 도말한 후 1.5% 한천으로 증충하여 30±0.5℃에서 1~3일 배양한 후 형성된 콜로니수를 계수하였다.

### 6. 효소 활성

효소액은 시료 6g을 100ml로 하여 1시간 교반 추출하고 여과지(Whatman No. 2)로 여과하여 여액을 조효소액으로 사용하였다.

단백질 분해 효소 활성은 Anson-萩原법<sup>25)</sup>에 따라 측정하였다. 0.6% 카제인(pH 7.2) 2ml를 기질로 하여 효소액 0.5ml를 가해 30℃에서 10분간 반응시키고 0.44M TCA 용액을 2.5ml 가하여 반응을 정지시킨 후 여과하였다. 여액 1ml에 0.4M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5ml와 folin시약 3배 희석액을 1ml 가하여 20분간 반응시킨 후 660nm에서 비색 정량하였다. 효소 활성은 멸치젓 1g중에 들어 있는 단백질 가수분해효소가 1분간에 1μM의 티로신을 생성하는 양을 1 unit로 하였다.

지방분해 효소 활성은 올리브유 유액(pH 7.0) 5ml에 0.1M 인산완충액(pH 7.0)을 4ml 가하여 37℃에서 10분간 예열시킨 다음 효소액 1ml를 가하여 20분간 반응시킨 후 아세톤, 에탄올(1 : 1) 혼합액 20ml를 넣어 반응을 정지시킨 후, 0.05N NaOH로 적정하였다. 효소 활성은 다음 식으로 계산하였다<sup>26)</sup>.

$$\text{Lipase 활성(단위/g)} = \frac{\text{시료액의 적정치-대조액의 적정치}}{\text{시료 용액 1ml중의 시료량(g)}} \times 2.5$$

Table 1. Formulas of ingredients for low salt fermented anchovy

(unit : %)<sup>a)</sup>

Code <sup>b)</sup>	Salt	Lactic acid	Ethyl Alcohol	Garlic pulp	Koji
C	15	0.5	5	1	10(Non-inoculum)
A <sub>1</sub>	15	0.5	5	1	10
A <sub>2</sub>	15	0.5	5	1	10
A <sub>3</sub>	15	0.5	5	1	5+5

a) Ratio to the raw anchovy b) Code C : Control A<sub>1</sub> : *Aspergillus oryzae* koji A<sub>2</sub> : *Bacillus* sp. koji A<sub>3</sub> : *Aspergillus oryzae* koji + *Bacillus* sp. koji

## 결과 및 고찰

### 1. 단백질 분해균

멸치젓 숙성중의 단백질분해균의 변화는 Fig. 1과 같다.

단백질 분해균수는 숙성 20~40일경에 증가하다 감소하였고 *Bacillus* sp. 코오지(A<sub>2</sub>) 첨가구에서 가장 많았다. 다음으로 혼합구(A<sub>3</sub>), *Asp. oryzae* 코오지(A<sub>1</sub>) 첨가구순이었다. 대조구는 숙성 전기간을 통하여 코오지 첨가구들에 비하여 단백질 분해균수가 현저하게 낮았다. 즉 멸치젓 숙성중 원료에 부착되어 자연적으로 생육하는 단백질 분해균수가 코오지 첨가구들보다 훨씬 낮고 코오지는 세균인 *Bacillus* sp.를 접종할 경우 숙성중에 균의 증식이 월등히 높았다. 이는 멸치젓의 식염 함량이 높아 *Asp. oryzae*는 증식이 활발하지 못한 반면 *Bacillus* sp.은 증식이 활발하였기 때문이다.

이러한 경향은 고추장 숙성중 호기성 세균이 숙성 30일경까지 급격히 증가하였다가 감소하나 곰팡이 수는 숙성 전기간 동안 뚜렷한 증가가 없었고 숙성 후기에 감소하였다는 보고<sup>27, 28)</sup>로 미루어 볼 때 멸치젓 중의 단백질 분해균도 곰팡이보다는 세균이 주가 되는 것으로 생각된다. *Asp. oryzae* 코오지(A<sub>1</sub>)를 이용한 저식염 멸치젓의 단백질 분해 균은, 코오지 첨가구는 20일경에  $3 \times 10^5$  cell/g로 가장 높고, 대조구는 30일경에 균수가 가장 높았던 차 등<sup>23)</sup>의 결과에 비해 경향은 유사하나 균수에서는 차이가 심하였다.

### 2. 지방질분해균

멸치젓 숙성중 지방질분해균의 변화는 Fig. 2와 같다.

지방질 분해균수는 단백질 분해균과는 달리 대조구를 제외하고는 멸치젓 숙성 후기인 숙성 60일경에 높았고, 시험구간의 차이도 심하지 않았으나 대체적으로 *Bacillus* sp. 코오지(A<sub>2</sub>) 첨가구가 숙성 중기 이후 약간 높았다. 김<sup>29)</sup>은 멸치젓의 지방질 분해균수는 숙성 하루에 담금 직후  $3 \times 10^6$  CFU/g이 감소하나 7주까지  $8.0 \times 10^5$  CFU/g수준으로 증가하였다는 보고와 유사하였다.

지방질 분해균수를 Fig. 2의 지방질 분해 활성이나 저자 등<sup>24)</sup>의 TBA가와 비교하여 볼 때 지방질분해균수가 높은 *Bacillus* sp. 코오지(A<sub>2</sub>) 첨가구가 지방질 분해 효소 활성과 TBA값이 높았다. 그러나 숙성후기에 TBA값이 현저하게 떨어진 경향과는 일치하지 않았다. 그원인은 본 실험에서 지방의 분해로 생성된 유리 지방산을 미생물들이 이용하거나 알코올 등과 에스테르화하

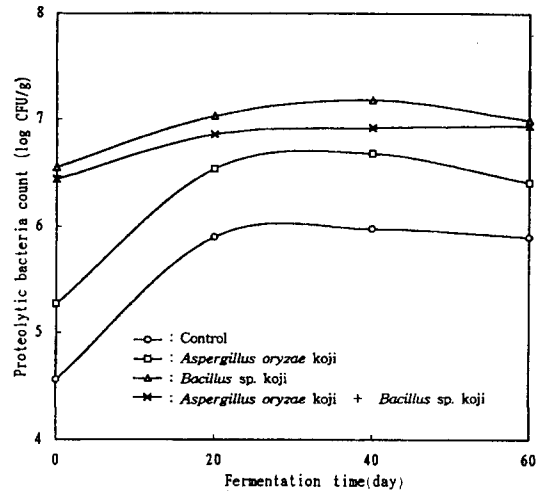


Fig. 1. Changes of proteolytic bacteria counts during the fermentation of low salted anchovy.

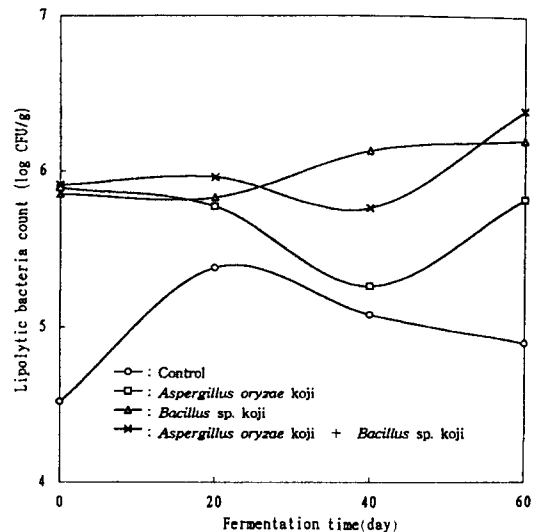


Fig. 2. Changes of lipolytic bacteria counts during the fermentation of low salted anchovy.

기 때문에 지방산의 산화 분해와 일치하지는 않기 때문으로 생각된다.

### 3. 호기성균

멸치젓 숙성중 호기성균 변화는 Fig. 3과 같다.

호기성균은 담금 20일경에 가장 높은 증가율을 보이다 감소하여 40일 이후에는 뚜렷한 변화가 없었다. 시험구간에는 *Bacillus* sp. 코오지(A<sub>2</sub>)첨가구에서 가장

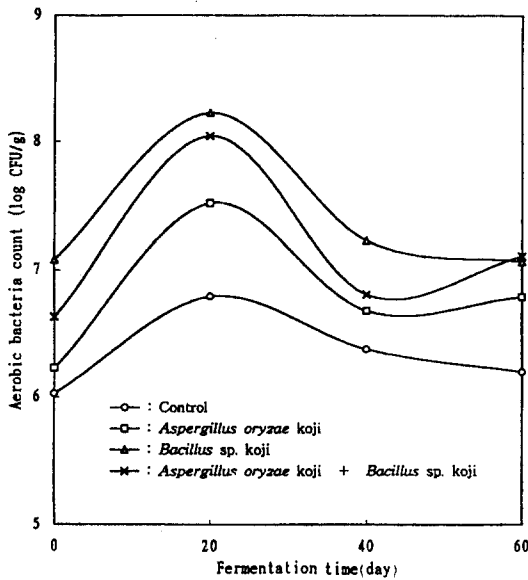


Fig. 3. Changes of aerobic bacteria counts during the fermentation of low salted anchovy.

높아 숙성 20일에  $1.7 \times 10^8$  CFU/g이었다. 전기간에 걸쳐  $10^7$  CFU/g 이상 유지하였으며 *Asp. oryzae* 코오지(A<sub>1</sub>) 첨가구는 대조구에 비하여 약간 높은 균수를 유지하였다.

*Bacillus* sp. 코오지(A<sub>2</sub>) 첨가구에 호기성균이 많은 것은 *Bacillus* sp.이 호기성이기 때문인 것으로 생각된다. 숙성 35일경의 총균수는  $5 \times 10^4$  CFU/g으로, 50일 이후부터 감소하기 시작하였다는 결과는 이 등<sup>16)</sup>의 결과와 차이가 심하였다. 차 등<sup>23)</sup>의 경우 *Asp. oryzae* 코오지를 첨가한 저식염 젓갈의 생균수는 숙성 20일 경에 최고치를 보이고 이후 감소하였다고 한다.

4. 혐기성균

멸치젓 숙성중 혐기성균의 변화는 Fig. 4과 같이 숙성 초기  $1.8 \times 10^5 \sim 3.21 \times 10^5$  CFU/g 였다가 이후 증가하여 40일경에 최고치를 보였다. 대조구에 비해 코오지 첨가구의 혐기성 균수는 약간 많았으며 *Bacillus* sp. 코오지(A<sub>2</sub>) 첨가구가 가장 높았다. 혐기성 균수는 Fig. 5의 호기성균보다는 대체로 적었다. 호기성균은 숙성 20일경에 많아졌고 혐기성 균은 숙성 중기 이후인 40일경에 많았다.

이 등<sup>27)</sup>은 고추장 숙성중 혐기성균은 숙성 30~40일 경에 증가하였고 이때 젖산균의 생육이 왕성하여 pH를 저하시킨다고 보고하였다. 백 등<sup>24)</sup>의 경우 숙성 초기인

10일경에 산도가 많이 증가하였다. 이는 원료인 멸치가 고추장보다 단백질이 많아 가수분해물인 아미노산이 많이 생겨서 완충력이 강하기 때문으로 보인다.

5. 단백질 분해효소 활성

단백질 분해효소의 활성은 Fig. 5와 같다.

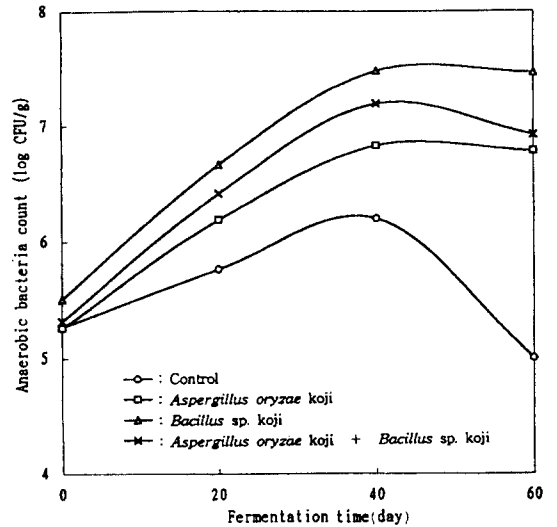


Fig. 4. Changes of anaerobic bacteria counts during the fermentation of low salted anchovy.

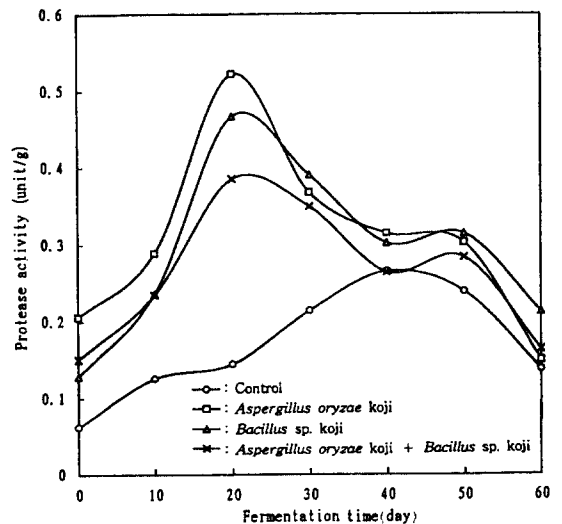


Fig. 5. Changes of protease activity during the fermentation of low salted anchovy.

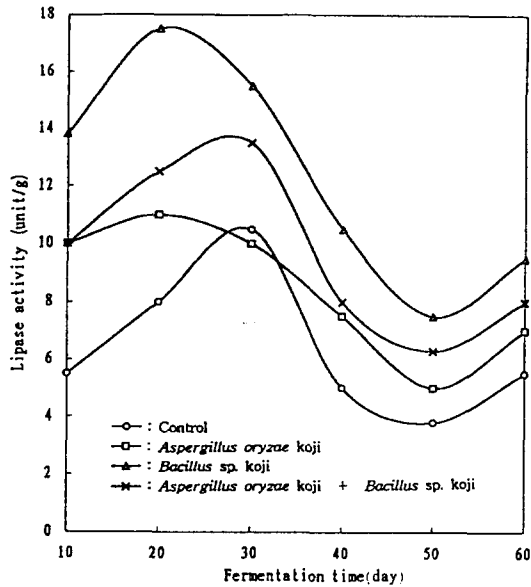


Fig. 6. Changes of protease activity during the fermentation of low salted anchovy.

멸치젓 숙성중 단백질 분해효소는 코오지 첨가구의 경우 담금 후 증가하여 숙성 20일경에 최고 치에 도달한 후 감소한 반면 대조구는 숙성 40일경까지 증가하다 감소하였다. 코오지를 첨가한 멸치젓은 숙성 전기간 동안 단백질 분해효소의 활성이 월등히 높았다. 이는 차 등<sup>21)</sup>의 결과와 비슷하였고 코오지 첨가구중에서 *Asp. oryzae* 코오지(A<sub>1</sub>) 첨가구는 숙성 초기에, *Bacillus sp.* 코오지(A<sub>2</sub>) 첨가구는 숙성 중기에 단백질 분해효소 활성이 높았다. 이를 Fig. 3의 단백질 분해균수와 비교하면 *Asp. oryzae* 코오지(A<sub>1</sub>) 첨가구는 *Bacillus sp.* 코오지(A<sub>2</sub>) 첨가구보다 숙성중 단백질분해균의 증식이 적어 단백질 분해효소 활성이 적었던 것으로 생각된다. 한편 조<sup>18)</sup>는 멸치젓 중에 존재하는 단백질분해균의 단백질 가수분해효소 생산은 소금 농도가 높을수록 저하하였다고 보고한 바 있기 때문에 본 실험에서 저식염과 코오지 첨가 병용이 단백질 분해 활성은 증가시킨 것으로 생각된다.

#### 6. 지방질 분해효소 활성

지방질 분해효소의 활성은 Fig. 6과 같다.

멸치젓 숙성중 지방 분해효소 활성은 코오지첨가구의 경우 숙성 초기인 10~20일 경에, 대조구는 숙성중기인 30일까지 증가하다 감소하였으며 60일경에 다시 증가하였다. 시험구간에는 코오지첨가구의 경우 지방질 분해

활성은 *Bacillus sp.* 코오지(A<sub>2</sub>) 첨가구가 높았고 다음으로 혼합구(A<sub>3</sub>), *Asp. oryzae* 코오지(A<sub>1</sub>) 첨가구 순이었다. 차 등<sup>23)</sup>은 *Asp. oryzae* 코오지(A<sub>1</sub>)를 이용한 경우 대조구와 비슷하게 숙성 20일경에 지방질 분해효소 활성이 가장 높았다가 감소하였다고 보고하였으나 본 결과에서는 숙성 20~30일경에 증가하다가 감소한 후 60일경에 다시 증가하여 이들 결과와 약간의 차이가 있었다.

#### 요 약

저식염 멸치젓을 숙성으로 제조하기 위하여 *Asp. oryzae*와 *Bacillus sp.*로 만든 코오지를 첨가하고 숙성중 미생물상 변화와 효소활성을 비교 검토하였다.

젓갈 숙성중 미생물상은 단백질분해균과 혐기성 균수는 숙성 40일경, 호기성 균수는 20일경에 많았다. 단백질분해균과 지방질분해균, 호기성균, 혐기성 균수는 *Bacillus sp.* 코오지 첨가구에서 높았다. 젓갈 숙성중 단백질 가수분해효소 활성은 숙성 20일 경에, 지방질 가수분해효소는 숙성 30일경에 높았다가 점진적으로 감소하였으며, 단백질 가수분해효소는 *Asp. oryzae* 코오지 첨가구가, 지방질 가수분해효소는 *Bacillus sp.* 코오지 첨가구에서 높았다.

#### 참고문헌

1. 이성우 : 고려 이전 한국 생활사 연구, 향문사, 181(1978).
2. 김영명, 김동수 : 한국의 젓갈-그 원료와 제품, 한국식품개발연구원, 102~120(1990).
3. 서혜경 : 우리 나라 젓갈의 지역성 연구, 중앙대학교 대학원 박사 학위논문 (1987).
4. 송영옥, 변대석, 변재형 : 멸치 젓갈 숙성중 지질의 산화와 단백질의 분해, *한국영양학 학회지*, 2(1), 1-6(1982).
5. 조영도 : 멸치젓 숙성중 지방질의 변화에 관한 연구, 고려대학교 대학원 석사학위 논문 (1986).
6. 장백경 : 멸치젓의 숙성과정중 지방질의 산화와 항산화력, 서울대학교 대학원 박사학위 논문(1986).
7. 이재성 : 멸치젓의 질산염, 아질산염 및 질산아민의 분석, *한국식품과학회지*, 14(2), 184~186(1982).
8. 정종순 : 멸치젓갈 숙성중 불휘발성 아민의 함량 변화 및 돌연변이원성, 경성대학교 대학원 석사학위논문(1989).
9. 이춘명, 이계호, 김영주, 한인자, 김상순 : 멸치젓의 정미성 5'-Mononucleotides에 관한 연구, *한국식품과학회지*, 1(1), 66~73(1969).
10. 박영란, 박봉옥 : 우리 나라 저장식품중의 NaCl함량, *한국영양학회지*, 7, 25~57(1968).
11. 이강호 : 젓갈숙성중의 어육단백질 분해에 관한 연구, *부산대연보*, 8(1), 51~57(1968).
12. 차용준, 박향숙, 최순영, 이용호 : 저염수산발효식품의 가공에 관한 연구(4. 저염 멸치젓 의 가공). *한국수산학회지*, 16(1), 363~367(1983).

13. 차용준, 이용호 : 저식염수산발효식품의 가공에 관한 연구 (5. 저식염 멸치젓 및 조기젓의 가공조건). *한국수산학회지*, 18(3), 206~213(1985).
14. 차용준, 이용호 : 저식염 수산 발효 식품의 가공에 관한 연구 (6. 저 식염 멸치젓 및 조기젓의 향미성분). *한국수산학회지*, 18(1), 325~332(1985).
15. 차용준, 이용호, 김희운 : 저 식염 수산 발효 식품의 가공에 관한 연구 (7. 저 식염 멸치 젓 숙성중의 휘발성성분 및 지방산조성의 변화). *한국수산학회지*, 18(6), 511~518(1985).
16. 이종갑, 최위경 : 멸치 젓갈 숙성에 따른 미생물상의 변화에 대하여, *한국수산학회지*, 7(3), 105~114(1974).
17. 차용준, 이용호, 이강희, 장동식 : 저식염멸치젓에서 분리한 단백질분해력이 강한 세균 및 생산된 단백질분해효소의 특성, *한국수산학회지*, 21(2), 1~9 (1988).
18. 조희숙 : 멸치젓의 숙성 발효에 관한 연구, 성신여자대학교 대학원 석사학위논문 (1985).
19. 차용준, 이용호 : 미생물을 이용한 저 식염 멸치젓의 숙성 발효에 관한 연구 (1. 젓갈에 서 분리한 단백질분해균 및 단백질분해효소의 생화학적 특성), *한국수산학회지*, 22(5), 363~369(1989).
20. 차용준, 이용호 : 미생물을 이용한 저 식염 멸치젓의 숙성 발효에 관한 연구. (2. 젓갈에 서 분리한 단백질분해효소의 열역학적 특성), *한국농화학학회지*, 33(4), 325~329(1990).
21. 차용준, 이강희, 이용호, 김진수, 주동식 : 미생물을 이용한 저식염 멸치젓의 숙성 발효 에 관한 연구 (3. 단백질분해세균을 이용한 저 식염 멸치젓의 제조 및 저장 중의 품질 안정성), *한국농화학학회지*, 33(4), 33~336(1990).
22. 김영명, 구재근, 이영철, 김동수 : 자가 소화액 및 정어리 기질 코오지를 이용한 속성 정어리 액젓 제조에 관한 연구, *한국수산학회지*, 23(2), 167~177(1990).
23. 차용준, 김은정, 주동식 : 코오지를 이용한 저 식염 멸치젓의 숙성 제조에 관한 연구, *한국영양식량학회지*, 23(2), 348~352(1994).
24. 백승화, 임미선, 김동한 : 코오지를 이용한 저 식염 멸치젓의 숙성 제조시 성분변화에 관한 연구, *한국식품영양학회지*, 9(4), - (1996).
25. 萩原文二 : 酵素研究法, 第2卷, (赤堀四郎編) 7版, 朝倉書店, 東京, 日本, 237~259(1995).
26. 相泥孝亭, 小野正之, 手塚隆久, 柳田藤治 : 酵素利用 ハンドブック, 地人書館, 230~233(1955).
27. 이계호, 이묘숙, 박성오 : 재래식 고추장 숙성에 미치는 미생물 및 그 효소에 관한 연구, *한국농학학회지*, 19, 82~92(1976).
28. 이갑상, 김동한 : 청주 박을 이용한 저 식염 고추장의 양조, *한국식품과학회지*, 23, 109~115(1991).
29. 김영명 : 멸치어장유의 온도 및 발효조건이 품질 특성 및 단백질분해효소 활성에 미치는 영향, 고려대학교 대학원 박사 학위논문(1993).

---

(1996년 11월 11일 접수)