

어육장 발효 시 생성되는 효소의 활성 변화

함수남 · 김상우 · 이재환 · 장판식*

서울산업대학교 식품공학과

Changes in Enzymatic Activities during *Eoyukjang* Fermentation

Soo-Nam Ham, Sang-Woo Kim, Jae Hwan Lee, and Pahn-Shick Chang*

Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology

Abstract *Eoyukjang* is a traditional sauce-type of Korean food that is similar to a soybean sauce made from fermented soybeans, and it is produced from a fermented mixture of sea foods, meats, and *meju* (soybean paste). This study examined periodical changes in the enzymatic activities of α -amylase, esterase, β -glucosidase, protease, lipase, and lipoxygenase within the culture broth and solids of *eoyukjang* during 1 year of fermentation. The *eoyukjang* solids had 234-532% higher protein content than the culture broth. The specific activities of α -amylase, esterase, β -glucosidase, and protease increased in both the culture broth and solids. Particularly, in the culture broth, α -amylase, esterase, β -glucosidase, and protease activities rapidly increased (3- to 8-fold) until 10 months of fermentation, and then drastically decreased. However, the activities of lipase and lipoxygenase in both the culture broth and solids were less than 0.05 unit/mg of protein, respectively, throughout fermentation; thus, their activity levels were low and changed little over the 12 months. Overall, while the solids had higher protein content than the culture broth, the broth had greater enzyme activity levels during *eoyukjang* preparation.

Keywords: *eoyukjang*, traditional Korean food, enzyme activities

서 론

우리 선조들은 간장, 된장, 고추장 이 세 가지의 대표적인 장류 외에도 여러 종류의 장을 담가 먹었다. 장을 담글 때 채소나 어육을 넣어서 만든 집장이나 무장은 별미의 반찬으로 삼았고 지방에 따라 검정콩이나 청태 또는 팥으로 장을 담그기도 했으며, 콩이 흔하지 않은 곳에서는 합자나 멸치 등의 해물 국물을 달여서 콩 간장을 대신하기도 하였다(1). 그 중 어육장(魚肉醬)은 별미장의 일종으로 육류와 어류를 독에 넣고 물을 끓여 식힌 후 소금을 풀어 장 담그는 법으로 메주를 넣어 봉하였다가 1년이 지나면 먹는 장으로서, 각종 요리의 간을 맞추고 맛을 내는 데는 육즙과 어탕을 농축한 것과 같은 효과를 내며, 동물성 단백질이 주성분인 육류와 생선에서 우려낸 성분 때문에 보통 장과는 달리 훨씬 진하고 구수하고 부드러운 맛을 낸다. 어육장은 현재 사용되는 장류의 기능과는 다른 맛장이라고 할 수 있으며(2,3), 발효기간이 1년 이상 되므로 발효기간 동안 메주에 있는 효소의 작용으로 각종 원료 성분이 발효·분해되어 있으므로 숙성 시 특유의 맛과 향을 지니게 된다(4).

어육장에 대한 정보는 옛 문헌상으로는나마 제조법, 형태 및 특

성을 찾아볼 수 있는 정도인데, 산림경제에 처음 기록되어있고, 그 외에 재료와 분량은 조금씩 다르긴 하지만 증보 산림경제, 규합총서, 부인필지, 간편조선요리제법, 조선요리제법, 우리나라 음식 만드는 법, 민속조사보고서 등에서 확인할 수 있다(5).

최근 전통 장류 복원에 대한 관심이 증가하고 있으며 Yoon 등(6)은 어육장 발효과정 중 휘발성 향기성분의 변화를 monitoring 하여 보고하였으며, Lim 등(7)은 어육장과 시판간장의 휘발성 향기성분을 전자코를 활용하여 비교하였다. 그러나 어육장 제조 중 생성되는 향기 혹은 맛 성분의 변화에 중요한 역할을 하는 효소 활성 변화에 대한 연구는 전무한 실정이다.

따라서, 본 논문에서는 우리의 식생활 문화 속에서 사라져가는 어육장을 전통적인 방법으로 제조하여 발효·숙성시켜, 발효기간에 따라 어육장 내에 생성되는 식품가공측면에서의 중요한 효소종류, 즉 전분, 단백질, 지방질, 향미성분 등과 관련 있는 여러 가지 효소들의 활성 변화를 추적함으로써 어육장의 기능성을 확인하고 어육장의 상품화를 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

재료, 기기 및 시약

어육장: 본 실험에 사용한 어육장은 산림경제, 증보 산림경제, 규합총서에 있는 제조법을 참고하여 메주, 쇠고기, 닭, 꿩, 송어, 도미, 홍합, 대하, 전복, 마늘, 파(흰 부분), 생강, 소금물을 넣어 제조하였으며(Table 1), 냉장고의 저장온도를 봄(4-5월, 13°C), 여름(6-9월, 23°C), 가을(10-11월, 7°C), 겨울(12-3월, 3°C)의 평균 땅속(0.5 m 깊이)의 지중온도 기준) 온도로 설정하여 숙성시켰다. 12개월 동안 발효·숙성하면서 어육장의 액체 및 고체시료를 채취

*Corresponding author: Pahn-Shick Chang, Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology, Seoul 139-743, Korea
Tel: 82-2-970-6437
Fax: 82-2-976-6460
E-mail: pschang@snut.ac.kr
Received February 12, 2008; revised March 13, 2008; accepted March 14, 2008

Table 1. Recipe for the preparation of eoyukjang

Material	Component	Material	Component
Meju	320 g	Crayfish	45 g
Beef	110 g	Abalone	5 g
Chicken	125 g	Garlic	20 g
Pheasant	60 g	Green onion	20 g
Mullet	75 g	Ginger	20 g
Snapper	115 g	Brine ¹⁾	2.5 L
Mussel	35 g	Salt	875 g

Salt concentration was 35%.

하여 각종 효소들(α -amylase, esterase, β -glucosidase, protease, lipase, lipoxygenase)의 활성 변화를 분석하였다.

기 기: 효소 활성을 측정하기 위한 온도조절용 thermo-regulator는 Shin Kwang Scientific Co.(Seoul, Korea) 제품을, 효소반응계의 균일한 조성을 위한 magnetic multi stirrer는 VELP Scientific Co.(New York, NY, USA) 제품을, 시료내의 고체상 및 액체상 분리를 위해서는 micro high speed centrifuge(micro 17-R plus, Hanil Science Co., Seoul, Korea)를, 각 시료의 흡광도 측정을 위해서는 UV-visible spectrophotometer(UV-2101PC, Shimadzu, Tokyo, Japan)를 각각 사용하였다.

시 약: 유화제로 사용한 AOT(aerosol OT, dioctylsulfosuccinate)와 β -glucosidase의 기질인 *p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (pNPG) 및 lipoxygenase의 기질인 α -linoleic acid(cis-12-octadecadienoic acid) 등은 Sigma Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, cupric acetate-pyridine 용액은 Lowry와 Tinsley(8) 및 Shipe 등(9)의 방법을 이용하여 조제하였다. 그 외의 시약은 모두 EP등급 이상의 시약을 사용하였다.

어육장 시료의 준비 및 효소활성 측정

어육장의 액체시료는 발효 초기 및 발효 후 일정 기간이 경과하여 발효산물에 외부의 인위적인 힘을 전혀 가하지 않고 자연스럽게 생성된 액상의 시료를 채취·준비하였으며, 고체시료는 발효 초기 및 일정시간 경과 후 얻어진 발효산물 중 고체부분만을 10 g 채취하되, 100 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) 10 mL를 첨가하여 4°C에서 5분간 13,500 rpm의 속도로 시료를 균질화 시키는 초고속 균질기(Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, Staufen, Germany)에 적용함으로써 고체시료 조직내에 존재하는 효소를 균일하게 추출한 현탁액을 제조하였다. 이상에서 제조한 현탁액을 8,800×g로 30분간 원심분리하였으며, 상등액을 filter paper Whatman No. 2(Whatman International Ltd., Maidstone, UK)를 이용하여 4°C에서 여과한 후 그 여과액을 고체시료에서 추출한 조효소액으로 사용하였다.

전술한 방법에 의하여 준비한 어육장의 액체 및 고체 시료내에 존재하는 효소활성을 정량적으로 분석하되, 효소의 종류는 어육장의 원료 성분 및 풍미성분과 관련 있는 α -amylase, esterase, β -glucosidase, protease, lipase, lipoxygenase 등을 선정하였으며, 효소-기질반응을 위한 반응액 pH 및 온도는 각각 7.0과 35-40°C로 고정하였다(각 효소에 대한 최적 pH 및 온도는 예비실험을 실시하여 결정하였으며 중성 pH 및 중온을 선호하는 효소들임을 확인하였다).

α -Amylase 활성 측정: α -amylase 효소의 활성을 측정하기 위

하여 기질인 soluble starch 10 g을 Clark and Lubs buffer(pH 7.0) 100 mL에 분산시켰으며, 1 mL의 조효소액을 혼합하여 35°C에서 효소반응을 시작하였다. 효소-기질 반응액 1 mL를 취하여 3 mL의 3,5-dinitrosalicylic acid 용액(10)에 첨가하여 95°C에서 5분간 가열시켜 2-3분간 냉각시켰으며, 증류수로 전체 부피가 25 mL가 되도록 조정 후 vortex mixer로 5분간 교반시켜 550 nm에서 흡광도를 측정하여 효소 활성을 정량분석 하였다.

α -Amylase 1 unit는 효소 반응을 위한 최적 조건하(pH 7.0, 35°C)에서 기질인 soluble starch로부터 단위시간(min)당 1 μ mol의 glucose에 해당하는 환원당을 생산하는 효소량으로 정의하였다.

Esterase 활성 측정: *p*-Nitrophenyl butyrate(11)를 10 mL의 acetonitrile에 녹인 후 1 mL를 취하고, 4 mL ethanol과 95 mL의 Clark and Lubs buffer(pH 7.0)를 가하여 기질용액으로 사용하였다(12). 온도를 35°C로 유지하면서 이상의 방법으로 준비한 기질 용액 950 μ L와 조효소액 50 μ L를 혼합하여 반응시키면서 420 nm에서 흡광도를 측정함으로써 효소 활성을 정량분석하였다.

Esterase 1 unit는 효소 반응을 위한 최적 조건하(pH 7.0, 35°C)에서 기질인 *p*-nitrophenyl butyrate로부터 단위시간(min)당 1 μ mol의 *p*-nitrophenol을 생산하는 효소량으로 정의하였다.

β -Glucosidase 활성 측정: 온도를 35°C로 유지하면서 sodium phosphate buffer(100 mM, pH 7.0) 2.4 mL에 기질인 9 mM *p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside 용액 0.3 mL와 조효소액 0.3 mL를 혼합하여 반응시키면서 400 nm에서 흡광도를 측정함으로써 효소 활성을 정량분석하였다

β -Glucosidase 1 unit는 효소 반응을 위한 최적 조건하(pH 7.0, 37°C)에서 단위시간(min)당 1 μ mol의 *p*-nitrophenol을 생산하는 효소량으로 정의하여 효소활성도를 계산하였다(13).

Protease 활성 측정: 기질용액은 1.2 g의 casein과 5N NaOH 0.4 mL를 증류수로 100 mL에 혼합하여 90°C에서 15분간 가열하여 녹인 후 냉각시킨 다음 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 2배 희석하여 사용하였다.

Activator용액은 0.02 M EDTA를 함유하는 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 0.08 M NaCN을 첨가하여 사용직전에 만들어 사용하였다.

조효소액 1 mL에 activator용액 0.4 mL를 첨가하여 35°C로 유지된 water bath에서 10분간 예열처리한 후 기질용액 5 mL와 반응시켰다. 일정 시간이 경과한 후 10%(w/v) trichloroacetic acid (TCA) 용액 5 mL를 첨가하여 효소-기질반응을 중지시키고 8,800×g에서 5분간 원심 분리하여 상등액을 취하였으며, 상등액 내에 존재하는 기질(casein) 분해물을 정량·분석하여 효소활성 산출에 이용하였다.

Protease 1 unit는 효소 반응을 위한 최적 조건하에서 기질인 casein 단백질로부터 단위시간(min)당 1 μ mol의 tyrosine에 상응하는 유리 아미노산을 생성하는 효소의 능력으로 정의하였다(14).

Lipase 활성 측정: 기질인 olive oil은 10%(w/v)의 농도로, 유화제인 AOT의 농도는 50 mM이 되게 20 mL isoctane에 각각 용해시킨 후, 이 용액에 효소용액 0.18 mL를 넣고 vortex mixer로 50초간 격렬히 교반시켜 직경이 1-2 nm이면서 투명한 역미셀계(reversed micelles) 효소 반응액을 조제하여 35°C로 일정하게 유지하면서 효소-기질반응을 시작하였다. 효소반응 시작 후 일정 반응시간 간격으로 효소 반응액 0.4 mL를 취한 후, 5%(w/v) cupric acetate-pyridine 용액(pH 6.1) 1.0 mL 및 benzene 4.6 mL를 첨가하고 교반시킨 후, 8,800×g에서 3분간 원심 분리한 상등액을 취하여 715 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Lipase 1 unit는 효소 반응을 위한 최적 조건하에서 기질인 olive

oil로부터 단위시간(min)당 1 μmol의 유리 지방산(oleic acid)을 가수분해하는 능력으로 정의하여 효소활성도를 계산하였다(15).

Lipoxygenase 활성 측정: 효소반응의 기질인 α-linoleic acid (0.05% (w/v))와 유화제인 AOT(50 mM)를 isooctane에 용해시킨 후, 이 용액 39.91 mL에 조효소액 0.36 mL를 넣고 vortex mixer로 50초간 교반시켜 투명한 역미셀계 효소 반응액을 조제하여 온도를 35°C로 일정하게 유지하여 효소반응을 시작하였는데 일정 시간 간격으로 효소 반응액 5 mL를 취한 후, 5% (w/v) cupric acetate-pyridine 용액(pH 6.1) 및 ethanol을 각각 1 mL를 첨가하고 교반시켜, 8,800×g에서 5분간 원심 분리한 상등액을 취하여 715 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

Lipoxygenase 1 unit는 효소 반응을 위한 최적 조건하에서 단위시간(min)당 1 μmol의 α-linoleic acid를 산화·분해시켜 기질을 감소시키는 능력으로 정의하여 효소활성도를 계산하였다(16,17).

단백질 정량

Bradford(18) 방법에 따라 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 시료내의 단백질 함량을 정량·분석하였다.

통계처리

본 연구에서 제시한 자료들은 3반복 2회 실험한 결과들의 평균값과 표준편차로 환산하여 제시하였다.

결과 및 고찰

어육장 발효 중 α-amylase 활성 변화

어육장 발효과정 중의 α-amylase 활성 변화를 발효기간(0, 2, 4, 6, 8, 10, 12개월)에 따라 채취한 액체 및 고체시료의 비활성도(specific activity)를 확인하였으며, 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. α-Amylase의 효소 활성은 발효 4개월에서 8개월까지 포화곡선 형태로 점점 증가하다가 발효 후 10개월째에 액체시료는 0.788 unit/mg protein, 고체시료는 0.147 unit/mg protein으로 최대값을 나타낸 후 감소하였다. 발효 후 4개월에서 8개월 사이에는 β-glucosidase의 경우와 유사하게 어육장의 액체시료가 고체시료보다 2-3배 이상의 효소 비활성도를 나타내었으며, 10개월째에는

액체시료가 고체시료 효소활성의 5배 이상 높은 수준을 나타내었다.

α-Amylase는 전분이나 글리코겐 등의 α-1,4-glucoside 결합을 무작위로 가수분해하며 호화전분에 작용하여 신속하게 점도를 감소시키므로 액화효소라고도 하는데, 발효 시 α-amylase에 의한 당화작용으로 인하여 전분질에서 저분자 당류로 가수분해하여 장의 단맛 형성에 기여한다. Mok 등(19)은 저염된장 숙성 기간 중 α-amylase 활성이 감소하였고 저염된장이 고염된장보다 효소의 활성이 더 높음을 보고하였으며, Lee 등(20)은 발효 된장에서 초기 30일간의 α-amylase 활성이 증가하다가 그 이후에는 감소한다고 보고하였다. 이와 동일하게, 본 연구에서도 어육장 발효 과정 중의 α-amylase의 활성이 발효 후 10개월까지는 증가하였으며 그 이후에는 감소하는 경향을 보였다.

어육장 발효 중 esterase 활성 변화

어육장 발효 중의 esterase 활성 변화, 즉 발효기간(0, 2, 4, 6, 8, 10, 12개월)에 따라 채취한 액체 및 고체시료의 esterase 효소 비활성을 측정하여 Fig. 2의 결과를 얻었다. 액체시료 esterase의 비활성은 발효 시작 후 8개월까지는 비례적으로 증가하다가 이후로 급격한 상승을 나타내면서 10개월에 2.432 unit/mg protein으로 최대값을 얻었으며 그 이후에는 급격히 감소하는 양상을 보였다. 고체시료의 경우에도 유사한 경향을 나타내었는데, 발효 10개월을 경과하면서 0.626 unit/mg protein으로 최대값을 나타낸 후 감소하였다.

발효 후 8개월까지는 어육장의 액체 및 고체시료 유래 esterase의 비활성이 서로 유사한 값을 나타내었지만 8개월이 경과한 후부터는 액체시료가 2-5배 수준으로 높은 값을 나타내었다. 즉, 어육장 esterase는 발효 8개월 이후부터 비활성이 높아지기 시작하여 10개월이 되어서는 발효 배양액상에 존재하는 esterase의 비활성이 최고조에 도달함을 확인할 수 있었는데, 이러한 결과는 첫째, 어육장 발효미생물이 배지의 고체성분을 활용하여 생산한 esterase에 의한 것이거나, 둘째로는 미생물이 발효액 중 액체상에 존재하는 성분을 흡수·이용하여 생산한 esterase 증가에 의한 경우에 기인하는 것으로 예측되며 향후 이에 관한 추가실험을 수행하여 그 원인을 규명할 필요가 있는 것으로 판단된다.

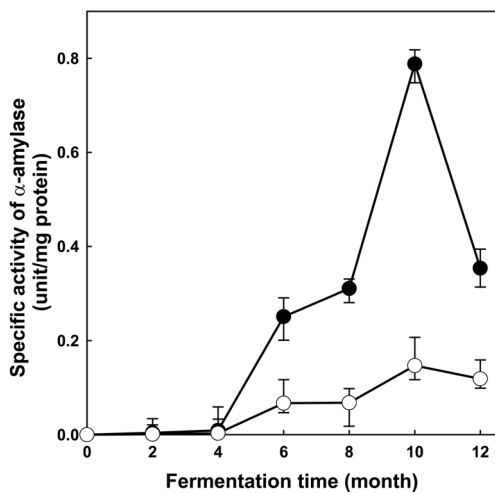


Fig. 1. Changes in the specific activity of α-amylase during eoyukjang fermentation. ●, from culture broth; ○, in crude enzyme from precipitate

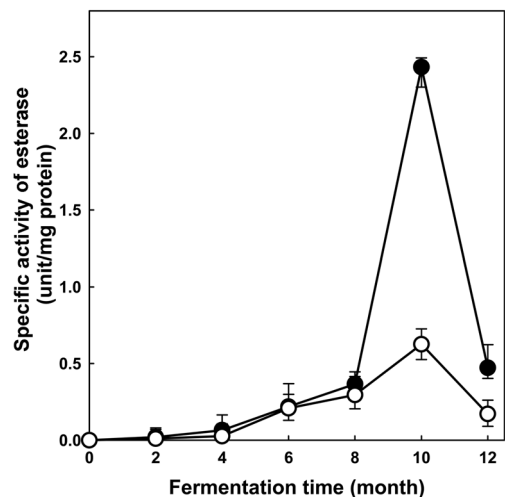


Fig. 2. Changes in the specific activity of esterase during eoyukjang fermentation. ●, from culture broth; ○, in crude enzyme from precipitate

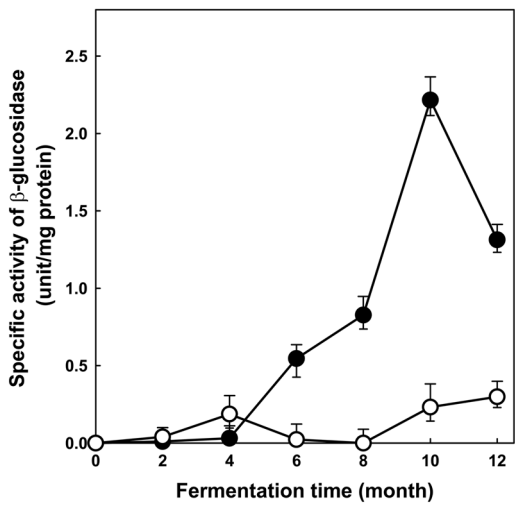


Fig. 3. Changes in the specific activity of β -glucosidase during *eoyukjang* fermentation. ●, from culture broth; ○, in crude enzyme from precipitate

어육장 발효 중 β -glucosidase의 활성 변화

어육장 발효액내의 β -glucosidase 활성 변화, 즉 어육장 발효 시작 후 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12개월이 경과하면서 채취한 액체 및 고체시료에서의 효소활성을 확인하되, β -glucosidase의 비활성도를 측정하여 Fig. 3의 결과를 얻을 수 있었다. β -Glucosidase 효소 활성이 sigmoid 형태의 곡선에 따라 증가하여 발효 후 10개월이 경과한 액체시료는 2.216 unit/mg protein, 고체시료는 0.312 unit/mg protein으로 최대의 값을 나타낸 후 급격히 감소하는 양상을 나타내었다.

대두 내 isoflavone은 estrogen 수용체 중, 뼈에 많이 분포되어 있는 수용체에 대한 친화력이 강한 여성 호르몬인 estrogen과 유사하여 폐경기 이후 여성의 골다공증을 예방할 수 있는 것으로 보고되었는데(21), 대두의 배축이나 배엽 부위에 isoflavone을 많이 함유하고 있으며 β -glucosidase는 이러한 isoflavone을 체내로 흡수하기 쉬운 형태인 비배당체(aglycone) 형태로 전환시키는 역할을 하는 효소이다. Yoon과 Kim(22)은 콩, 메주, 된장내의 β -glucosidase 효소 활성을 측정하였으며, Yang 등(23)은 청국장 발효 중의 β -glucosidase 활성 변화에 따른 장류 속의 isoflavone 형태 변화를 설명하였다. 이러한 결과들은 본 논문에서 얻어진 β -glucosidase의 비활성도에 비해 높은 수준(1.2-1.3배)이었는데, 이는 주원료 차이(어육과 대두의 차이) 때문에 유도된 생산효소의 함량과 활성 차이에서 기인한 것으로 예측된다.

어육장 발효 중 protease 활성 변화

발효 어육장 내의 protease 활성 변화를 분석하되, 발효기간(0, 2, 4, 6, 8, 10, 12개월)에 따라 채취한 액체 및 고체시료로부터의 비활성도를 측정하여 Fig. 4에 나타내었다. Protease 효소 비활성의 변화양상은 앞서 설명한 효소들의 경우와 동일하였는데, 어육장 발효 시작 후 8개월까지는 0.05-0.19 unit/mg protein 범위에서 미미하게 증가하다가 10개월에 액체시료는 0.741 unit/mg protein, 고체시료는 0.242 unit/mg protein으로 최대값을 나타내었으며 그 이후 급격히 감소함을 확인하였다.

장류의 구수한 맛은 주로 단백질이 분해되어 생성된 아미노산으로부터 유래하며, 아미노산 중에서도 특히 glutamate의 함량에 비례하여 구수한 맛이 증가하는 것으로 보고되어 있다. 즉, 장류

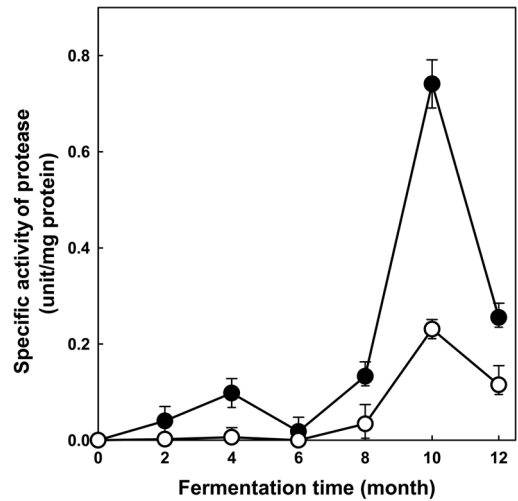


Fig. 4. Changes in the specific activity of protease during *eoyukjang* fermentation. ●, from culture broth; ○, in crude enzyme from precipitate

제조 주원료 중 하나인 단백질이 단백질을 분해하는 효소인 protease에 의해 가수분해되어 아미노산과 염류로 변화하면서 좋은 맛을 제공하며, 체내에서 흡수되기 좋은 형태로 바뀐다. 본 연구의 결과에서 얻어진 protease의 비활성이 0.8 unit/mg protein 수준으로 높은 것은 이러한 원인에 기인하는 것으로 예측된다.

장류 숙성 중 효소활성에 대한 연구는 주로 된장, 고추장 및 쌈장 등에 집중되어 있다. Mok 등(19)은 저염 된장 숙성 기간에 따른 protease, α - 및 β -amylase의 효소활성 변화를 분석·보고하였으며, Kim 등(24)은 된장 제조 공정 중 fibrinase의 활성 변화를 규명하였다. 또한 Oh 등(25)은 양고추냉이 분말을 첨가한 저염 고추장의 숙성 중에 amylase, protease 활성의 변화에 대하여 보고하였으며, Kim 등(26)은 감마선 조사된 쌈장의 보존 중 protease 활성의 변화를 규명하였다. 이상에서 이미 보고된 protease 들은 본 연구에서 정량·분석한 효소 비활성도의 수준과 유사함을 확인하였는데, 이들 보고 내용과 본 연구의 결과를 비교함으로써 어육장의 protease 활성이 높은 수준임을 확인할 수 있었

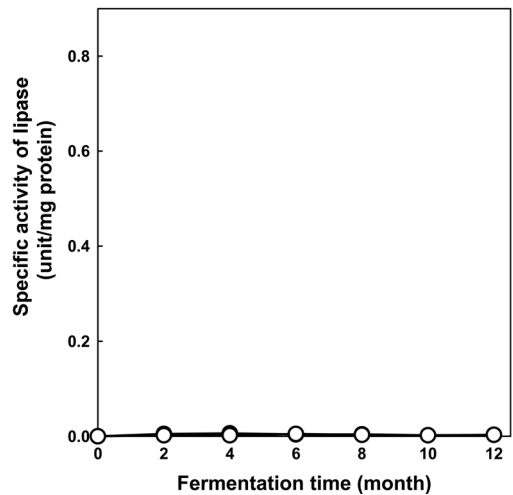


Fig. 5. Changes in the specific activity of lipase during *eoyukjang* fermentation. ●, from culture broth; ○, in crude enzyme from precipitate

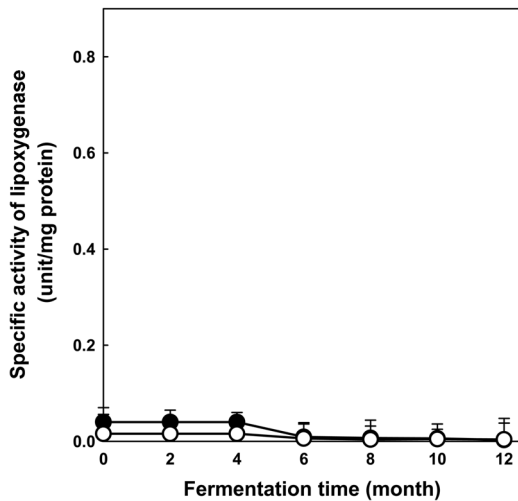


Fig. 6. Changes in the specific activity of lipoxigenase during *eo yukjang* fermentation. ●, from culture broth; ○, in crude enzyme from precipitate

며, 혈전을 용해할 수 있을 가능성이 높음을 시사하였다.

어육장 발효 중 lipase 활성 변화

Lipase(triacylglycerol acylhydrolase, EC 3.1.1.3) 비활성도는 모두 0.01 unit/mg protein 이하로서 효소의 활성도가 낮았으며, 1년의 발효·숙성기간 동안 증감변화가 미미하였다. 이러한 결과는 첫째, 발효 어육장 원재료 속에 함유된 지방질의 농도가 높지 않아 발효미생물이 lipase를 생산하기 위한 충분한 양의 유도기질(inducer) 함량 수준에 도달하지 못하였으며(각종 장류 발효에서 생산·제조되는 lipase는 유도효소(inducible enzyme 혹은 adaptable enzyme)인 것으로 보고되어 있음), 둘째로는 발효가 진행되면서 lipase 및 esterase의 작용에 의하여 원재료 속의 triacylglycerol이 diacylglycerol 또는 monoacylglycerol과 free fatty acid로 가수분해되기 때문에 lipase를 유도·생산할 수 있는 유도기질 형태의 농도가 급감하는데, 이상의 2가지 현상에 의하여 효소활성도가 전체적으로 낮으면서 동시에 발효기간이 경과함에 따라 감소한 것으로 생각된다. Joo 등(27)은 *Aspergillus* 속의 곰팡이를 이용한 된장 발효 시의 lipase 활성도가 발효시작 20일에 최대의 활성을 나타낸 후 즉시 감소한다는 보고가 있으며, 이러한 결과는 본 연구에서의 lipase 활성도 변화와 동일한 경향을 보임을 확인할 수 있었다.

어육장 발효 중 lipoxigenase 활성 변화

발효 어육장 내 lipoxigenase의 비활성도는 발효 초기부터 4개월 동안에 액체시료 및 고체시료에서, 0.040 unit/mg protein 및 0.016 unit/mg protein으로 각각 나타났으며 그 이후로는 모두 0.05 unit/mg protein 이하로서 효소의 활성도가 매우 낮고, 1년의 발효·숙성기간 동안 미미하게 감소하는 경향을 나타내었다.

Lipoxigenase(linoleate: oxidoreductase, EC 1.13.11.12)는 non-heme iron을 가진 dioxygenase로서 *cis,cis*-1,4-pentadiene system을 가진 불포화지방산에 산소 분자를 반응시켜 지방산을 산화시키며, 이러한 system에 의해 생성된 산화물은 효소적 및 비효소적 반응에 의해 2차적으로 alcohol, aldehyde, ketone 등과 같은 물질로 전환되어 이취(off-flavor)를 생성하게 된다. 대두에 다량 함유된 lipoxigenase에 의해 대두식품의 이취가 발생하여 크게 문제시되어 왔다(28,29). 이러한 lipoxigenase의 활성은 콩이 발효되면

Table 2. Protein content changes in *eo yukjang* during fermentation

Fermentation time (month)	Protein content (mg/mL)	
	Culture broth	Precipitate
0	1.481±0.13	3.507±0.28
2	1.474±0.14	3.526±0.36
4	1.466±0.13	3.430±0.32
6	0.550±0.06	2.097±0.19
8	0.483±0.04	1.392±0.12
10	0.216±0.02	1.149±0.10
12	0.426±0.03	1.175±0.09

서 현저하게 감소하는 것으로 Lee 등이 이미 보고하였으며(30), 본 연구의 결과 동일한 양상을 보였다. 따라서, 본 실험에 의해 제조된 발효 어육장의 경우에도 lipoxigenase 반응에 의한 이취 발생 현상은 없는 것으로 확인하였다.

어육장 발효기간 중 단백질 함량 변화

발효기간에 따른 어육장내 단백질의 함량 변화를 Table 2에 나타내었는데, 어육장의 액체 및 고체시료 모두는 발효·숙성기간이 길어질수록 단백질 함량이 점점 감소하였으며, 고체시료내의 단백질 함량은 액체시료의 경우보다 높았다. 단백질 함량의 감소는 발효 기간 중에 생성되는 protease에 의해 polymer 형태의 단백질이 oligopeptide 이하의 크기로 가수분해되는 것에 기인한 것으로 예측된다.

요 약

한국의 전통 한국의 전통적인 식품 중, 대표적인 장류로서 반가 식품에 해당하는 수조육류와 어패류를 첨가하여 제조한 어육장(규합총서의 방법)을 발효시키되, 2달 간격으로 발효기간에 따라 α -amylase, esterase, β -glucosidase, lipase, lipoxigenase 및 protease의 활성을 각각 측정하여 경시적 변화를 관찰하였다. 어육장을 액체와 고체시료로 나누어 이상에서 열거한 효소들의 활성을 측정한 결과, lipase 및 lipoxigenase의 비활성도는 모두 0.05 unit/mg protein 이하로서 효소 활성도가 낮은 수준이었으며, 1년 동안의 발효·숙성기간 중 비활성 증감변화도 미미하였다. 반면, α -amylase, esterase, β -glucosidase 및 protease는 숙성기간에 따라 효소의 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 특히 10개월째에는 액체시료의 경우 4종류 효소의 비활성이 급격히 증가하였다가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 전반적으로 고체시료의 단백질 함량은 액체시료보다 높았지만, 액체시료의 비활성이 고체시료보다 2-5배 이상 높은 결과를 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 서울시 산학연 협력사업(과제번호: 10625)의 지원에 의해 수행한 연구결과와 일부로서 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Lee CH, Kwon TW. Introduction to Korean Foods. Korea University Press, Seoul, Korea. pp. 239-263 (2003)

2. Cho HJ, Kim SC. A study on the contents of fatty acid and amino acid of *Öyukjang*. J. Natural Sci. 12: 119-120 (1995)
3. Kim JS. A comparative study of physicochemical characteristics of soy sauce and *Öyukjang* during storage at different ripening temperatures. MS thesis, Kyung Hee University, Seoul, Korea (2005)
4. Yoon SS. A Research on the History of Korean Food Culture. Shinkwang Publishing Co., Seoul, Korea. p.247 (1993)
5. Oh HS. A bibliographical study on meat food in Korea. MS thesis, Hanyang University, Seoul, Korea (2002)
6. Yoon MK, Choi AR, Cho IH, You MJ, Kim JW, Cho MS, Lee JM, Kim YS. Characterization of volatile components in *Öyukjang*. Korean J. Food Sci. Technol. 39: 366-371 (2007)
7. Lim CL, Lee JM, Kim JW, You MJ, Kim YS, Noh BS. Comparison of volatile components in *Öyukjang* and commercial soy sauce. Korean J. Food Culture 22: 383-387 (2007)
8. Lowry RR, Tinsley IJ. Colorimetric analysis of fatty acids by cupric sulfate. J. Am. Oil Chem. Soc. 53: 470-478 (1976)
9. Shipe WF, Senyk GF, Fountain KB. Modification of cupric sulfate method for the analysis of free fatty acids. J. Dairy Sci. 63: 193-201 (1980)
10. Bandani AR, Balvasi A. Comparison of α -amylase activity in larval stages of flour beetles, *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. 71: 537-541 (2006)
11. Kwon OT. Production of functional monoglyceride by esterase-catalyzed esterification in AOT-isooctane reversed micelles. MS thesis, Seoul National University of Technology, Seoul, Korea (2004)
12. Gacesa P, Hubble J. Enzyme Technology. Taylor and Francis Press, London, UK. pp. 45-64 (1987)
13. Son YJ, Sul OJ, Chung DK, Han IS, Choi YJ, Jeong CS. Isolation and characterization of *Trichoderma sp.* C-4 producing cellulase. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 4: 346-353 (1997)
14. Lee EJ. Characterization of protease from *Calotropis procera* R. Br.. MS thesis, Seoul National University of Technology, Seoul, Korea (2000)
15. Han DS. Characteristics of lipase from *Candida rugosa* and hydrolysis of triglycerides by the enzyme in AOT-isooctane reversed micellar system. PhD thesis, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Seoul, Korea (1986)
16. Luisi PL, Straub BE. Acidities and Basicities in Reversed Micellar Systems. Plenum Press, New York, NY, USA. p. 81 (1984)
17. Boyes S, Perera C, Young H. Kiwifruit lipoxygenase: Preparation and characteristics. J. Food Sci. Technol. 57: 1390-1398 (1995)
18. Bradford M. A rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254 (1976)
19. Mok CK, Song KT, Lee JY, Park YS, Lim SB. Changes in microorganisms and enzyme activity of low salt soybean paste (*Doenjang*) during fermentation. Food Eng. Prog. 9: 112-117 (2005)
20. Rhee CH, Lee JB, Jang SM. Changes of microorganisms, enzyme activity and physiological functionality in the traditional *Doenjang* with various concentrations of *Lentinus edodes* during fermentation. J. Korean. Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 43: 277-284 (2000)
21. Oh JH. The effects of β -glucosidase addition on genistein contents and physicochemical characteristics in *Doenjang*. MS thesis, Kookmin University, Seoul, Korea (2003)
22. Yoon S, Kim JS. Isoflavone contents and β -glucosidase activities of soybeans, *Meju*, and *Doenjang*. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 1405-1409 (1999)
23. Yang SO, Chang PS, Lee JH. Isoflavone distribution and β -glucosidase activity in *Cheonggukjang*, a traditional Korean whole soybean-fermented food. Food Sci. Biotechnol. 15: 96-101 (2006)
24. Kim DH, Song HP, Kim KY, Kim JO, Byun MW. A correlation between fibrinolytic activity and microflora in Korean fermented soybean products. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33: 41-46 (2004)
25. Oh JY, Kim YS, Shin DH. Changes in microorganisms and enzyme activities of low-salted *Kochujang* added with horseradish powder during fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 37: 463-467 (2005)
26. Kim DH, Ahn HJ, Yook HS, Kim MJ, Sohn CB, Byun MW. Quality properties of gamma irradiated *Samjang*, seasoned soybean paste during storage. Korean J. Food Sci. Technol. 32: 396-401 (2000)
27. Joo HK, Kim ND, Yoon KS. Changes of enzymatic activities during the fermentation of soybean-soypaste by *Aspergillus sp.* J. Korean Agric. Chem. Soc. 32: 295-302 (1989)
28. Song YS, Kim JW, Jeon US, Sim YM, Jo HR. The study on lipoxygenase characteristics of common legumes. Injechongron 14: 917-926 (1998)
29. Christopher JP, Pistoius EK, Axelrod B. Isolation of a third enzyme of soybean lipoxygenase. Biochim. Biophys. Acta 284: 54-62 (1972)
30. Lee SY, Min YK, Park KH. Nutritional evaluation of naturally fermented soybean and the enzymatic activity changes during the preparation. Korean J. Food Sci. Technol. 15: 101-107 (1983)